

# バイオポリマー（微生物産生凝集剤）の生産および利用に関する研究

鈴木 令  
(技術研究所)  
田澤 龍三  
(技術研究所)

## § 1. はじめに

微量有害物質による汚染、各種排水・廃棄物の処理・処分、および限りある資源の有効利用等、地球レベルの環境問題への対応の一環として、水・廃棄物分野における技術の革新が叫ばれて久しい。

凝集分離法は、各種排水・汚泥の処理、水質浄化分野の基盤技術の一つとして多用されている。凝集剤には現在主に用いられている高分子系凝集剤（合成高分子が主成分）と無機系凝集剤（金属塩が主成分）の他に、生物由来の物質を主成分とした凝集剤がある。生物由来の凝集剤は一般に毒性が無く、生分解性が高いために環境に優しい凝集剤として利用拡大が期待されているが、現在ではキトサンが水処理分野で利用されている程度である。

土壌微生物の1種 *Rhodococcus erythropolis* (旧分類では、*Nocardia erythropolis*) S-1 株は菌体外に凝集性を示す高分子成分（バイオポリマー）を分泌する。この凝集成分（発見当時の生産菌名にちなんで NOC-1 と命名された。以下、NOC-1 と称する）は、フタル酸エステル（プラスチックの可塑剤の一種）分解実験中に、この微生物を含んだ活性汚泥の沈降性が著しく向上する

微生物	・大腸菌 ・アオコ（植物プランクトンの一種） ・ビール酵母 ・活性汚泥
各種懸濁物	・カオリン（粘土の一種） ・土壌濁水 ・火力発電所廃石炭灰 ・活性炭微細粉末 ・河川浚渫濁水 ・ヘドロ
各種排水	・タイル工場排水（軸葉排水、素地排水） ・豚糞尿汚水 ・顔料排水 ・パルプ廃液（黒液、晒アルカリ排水） ・セリサイト（上質紙コーティング材）生産排水 ・蔗糖蜜排水（パン酵母製造工場）

表-1 NOC-1 が凝集力を示す物質例

ことから発見された<sup>1)</sup>。

NOC-1 は、(1)無害・生分解性が高い、(2)凝集作用が強い、(3)凝集スペクトルが広い等の優れた特徴があることが明らかにされた<sup>2)</sup>。NOC-1 が凝集力を示す物質例を表-1 に、従来の凝集剤と NOC-1 の特徴を表-2 に示した。

NOC-1 はこの優れた性質から、水質の浄化だけでなく沈澱回収物の再利用・資源化への展開が期待される。排水処理の凝集処理における沈澱回収物の再利用・資源化は、産業廃棄物として処理・処分すべき汚泥量を軽減し、資源の有効利用、さらには経済性、地球環境保全への視点から今後ますます重要となる。

NOC-1 を排水処理や水質浄化に用いるためには、表-2 の利点を活かすとともに、欠点を解決する必要がある。NOC-1 の実用化モデルとして図-1 のようなモデルを考えた。このモデルのポイントを以下に示す。

(1)NOC-1 生産用の培養液の栄養源として、排水・廃棄物または安価な有機物を用いる。

		利 点	欠 点
既存の凝集剤	高分子系	・やや安価 ・供給が安定 ・多くの製品がある <sup>*1)</sup>	・生分解性が悪い ・自然界での分解過程で有害な中間物を生成する可能性がある ・有害な原料を使うものがある <sup>*2)</sup>
	無機系	・安価 ・供給が安定	・金属塩（鉄やアルミニウムの塩化物や酸化物）が主成分 <sup>*3)</sup> ・機器の錆の原因になる ・使用量が多い
NOC-1		・生分解性が良い ・鉄やアルミニウムを含まない ・毒性がない	・高価（従来の生産方法） ・培養液から凝集成分の分離に手間がかかる

\*1): 懸濁物質に応じて使い分ける

\*2): 広く使われるポリ・アクリルアミドの原料は発癌性がある

\*3): 凝集剤中の合成高分子や金属塩はその多くが沈澱回収物に移行するので、再利用・資源化が難しい

表-2 既存の凝集剤と NOC-1 の比較

(2)NOC-1 を実際に使用するオンサイトで培養生産する。

(3) NOC-1 を凝集剤として使用する際、培養液から分離せずに培養液のまま使用する。

(4)NOC-1 を凝集剤として凝集・分離処理を行なった際に発生する沈殿回収物を資源化、有効利用を図る(例えば、飼料、肥料等)。

以上の実用化モデルの実現性を検証するために、次の検討を行なった。

(1)NOC-1 生産のための培養液および培養方法

- ・炭素、窒素源および微量栄養源
- ・滅菌の要否
- ・連続培養生産

(2)NOC-1 の凝集沈殿能とその評価

- ・金属イオンや pH の影響
- ・既存の凝集剤との比較

(3)凝集沈殿物の再利用・資源化

本報では、これらの検討結果について報告する。

## § 2. NOC-1 の成分と凝集機構

### 2.1 NOC-1 の成分

NOC-1 生産菌 (*Rhodococcus erythropolis* S-1 株) の電子顕微鏡写真を写真-1 に示した。細長い細菌表面に見られる綿状の物質が NOC-1 である。

凝集成分 NOC-1 はアセトン90%、水10%の混合溶媒により抽出される脂質性成分と、これにより抽出されない蛋白性成分より成ることが明らかにされた。そして、この両成分がそれぞれ凝集活性を有する。脂質性の成分は多糖で構成されている<sup>9)</sup>。蛋白性成分は、ゲルクロマトグラフより分子量100万以上と推定されている<sup>9)</sup>。

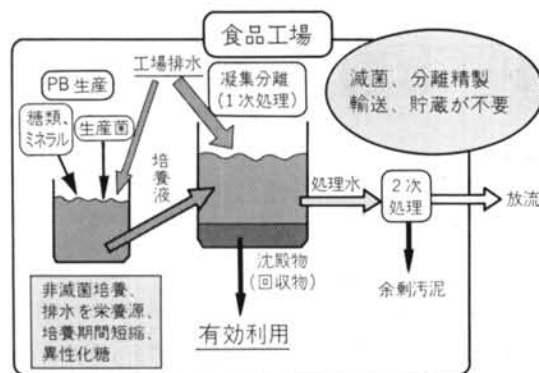


図-1 NOC-1 のオンサイト生産による実用化モデル

### 2.2 微生物由来の凝集成分と凝集機構

微生物が産生する高分子凝集成分や、凝集機構に関する国内の代表的な研究を表-3 に示す。これら凝集活性成分はいずれも多糖類、あるいは蛋白質である。

これら各種の微生物由来凝集成分は、多胡義孝博士の *Pseudomonas* No12 菌を除き、凝集力が金属イオンに依存する。本バイオポリマー NOC-1 の凝集力も、同様に金属イオンの存在に依存する。これら金属イオンに依存する微生物由来凝集成分の凝集力は、1 価の金属イオンより、2 価あるいは3 価のイオンでより増強される(表-4)。例えば、NOC-1 凝集力に対する金属イオン添加効果は、次の順序で効果がある<sup>11)</sup>。

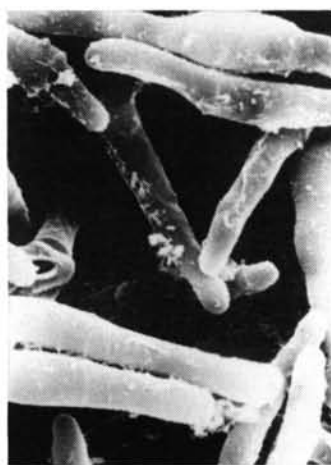


写真-1 *R. erythropolis* S-1 株の電子顕微鏡写真

研究者	所属	対象	文献
多胡義孝	東京大学 (応微研)	<i>Pseudomonas</i> sp. No12菌のフロック形成	5)
佐藤俊一	醸造試験所	凝集性酵母	6)
柿井一男	宇都宮大学 (工)	下水活性汚泥中の凝集性細菌	7)
小泉淳一	島根大学 (農)	バイオフィキュラント	8)
藤井 昇	宮崎大学 (農)	黒酵母 ( <i>Aureobasidium</i> 属菌) の生産する多糖	9)
宮 晶子	韓任原総研	汚泥の自己造粒に及ぼす菌体外高分子	10)

表-3 微生物が産生する凝集成分の国内の研究

2 価の金属イオン	$\text{Ca}^{2+}$ $\text{Mn}^{2+}$ $\text{Co}^{2+}$ $\text{Fe}^{2+}$ $\text{Mg}^{2+}$ $\text{Ba}^{2+}$ $\text{Sr}^{2+}$
3 価の金属イオン	$\text{Fe}^{3+}$ $\text{Al}^{3+}$ $\text{La}^{3+}$

表-4 バイポリマーの凝集力を促進する金属イオン

このように、微生物由来の凝集成分の凝集力が金属イオン濃度に依存することは、凝集作用が次の2つの作用によることを示唆している。

(1)懸濁物質表面の電荷の中和

(2)金属イオンの架橋効果による粒子サイズの増大

蛋白質や多糖類は、正あるいは負に荷電する様々な極性基を数多くもつ両性の多価分子であり、凝集スペクトルの広さはこの性質によると考えられる。さらに、架橋効果により巨大な網目構造を作り、微細な懸濁粒子を捕捉すると推定される。

また、酵母エキスを栄養源として培養したNOC-1を含む培養液は、カオリン（白陶土）懸濁液に対して、中性（pH 7.0）条件下より弱アルカリ性（pH 8.5）条件下において凝集活性が強くなる。一方、後で述べる水産排水培養液を用いて培養した場合は、中性（pH 7.0）条件下の凝集活性の方が弱アルカリ性（pH 8.5）下におけるそれより強い。このことは、凝集活性を発現する成分が2種類以上存在することを示唆し、先に述べたNOC-1が脂質性成分と蛋白性成分より成るといふ報告を支持している。

### § 3. 排水・廃棄物を栄養源とした生産

#### 3.1 従来の生産用培養液

排水処理の用途でNOC-1を生産するには、培養コスト

成分の分類	添加化合物	培地A <sup>2)12)</sup>	培地B <sup>13)</sup>
炭素源	・グルコース ・果糖	1% <sup>*1)</sup>	0.5% 0.5%
有機窒素源	・酵母エキス ・カザミノ酸 ・ペプトン	0.05% <sup>*2)*3)</sup>	0.05% — —
無機窒素源	・尿素 ・硫酸	0.05% <sup>*4)</sup>	0.05% —
ミネラル類	・KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ・K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・MgSO <sub>4</sub> ・NaCl	0.2% 0.5% 0.02% 0.01%	0.2% 0.5% 0.02% 0.01%

\*1): グルコース、果糖の両方とも培養に適しており、いずれを添加しても良い

\*2): 3成分のうち、少なくとも1成分を添加することを特徴としている

\*3): 酵母エキスの添加効果が一番高かった

\*4): 尿素、硫酸の両方ともに培養に適しており、いずれを添加しても良い

表—5 従来のNOC-1生産用培養液の組成

トの低減が大きな課題である。具体的には、従来のNOC-1生産培養液(表—5)で有機窒素・微量栄養源として添加されていた酵母エキスやカザミノ酸、牛肉エキスに代わる栄養源の発見が鍵である。

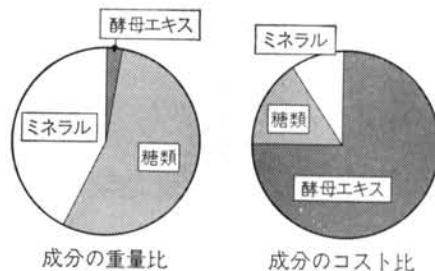
これら成分は他の成分と比べて高価で、全培養液コストの80%以上を占める(図—2)。

*Rhodococcus erythropolis*の基質代謝特性<sup>2)</sup>の考察に基づき、従来の有機窒素・微量栄養源の代替物質として排水・廃棄物の利用に注目した。すなわち、有機窒素、脂質、微量栄養源を多く含み、かつ排水中に生産菌の成育やバイオポリマー生産を阻害する成分が含まれない排水・廃棄物の利用である。以上の視点から食品加工系の排水に注目し、その中で水産加工排水と牛血液(屠畜場排水を想定)を選択して検討を行なった。

#### 3.2 水産加工排水を栄養源としたNOC-1生産

##### 3.2.1 水産加工排水と水産排水培養液

実験に用いた排水は、静岡県下のマグロ加工を主とするA工場から入手した。排水は魚の血液や脂質、体液、微小な肉片等を含んでいる。排水の水質分析結果を表—6に示した。



図—2 従来の培養液の成分の重量、コスト比

項目	分析値	項目	分析値
BOD	2,400~3,000	SS	700~1,500
COD	900~2,000	NH <sub>4</sub> -N	40~70
n-Hexane抽出物	60~90	Org-N	250~650
		T-N	300~800

(単位: mg/l)

表—6 水産加工排水の水質

成分の分類	成分(濃度組成)
有機窒素・微量栄養源	・水産加工排水 (80.0% (V/V))
炭素源	・グルコース (0.5%) ・果糖 (0.5%)
無機窒素源	・尿素 (0.05%)
ミネラル類	・KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.2%) ・K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.5%) ・MgSO <sub>4</sub> (0.02%) ・NaCl (0.01%)

表—7 水産加工排水を栄養源とした水産排水培養液

培養液には、従来の培養液で有機窒素・微量栄養源として添加していた酵母エキス等の代わりに、水産加工排水を培養液の80% (V/V) 加えた (表-7)。他の組成は従来の培養液と共通とした (表-5)。

### 3.2.2 実験方法および装置

#### 1) 装置および培養条件

培養実験は、三角フラスコによる回分および半連続培養、小型ジャー培養装置 (写真-2) による回分および連続培養の実験を行なった。

- (1) 回分 (バッチ) 培養: 培養毎に培養液を全量入れ換える。
- (2) 半連続培養: 培養液の一部を定期的に入れ替えて培養する。
- (3) 連続培養: 培養液を連続的に供給/引き抜きを行ないながら培養する。

小型ジャーの連続培養において培養日数の経過により凝集活性が低下してきた場合は、生産菌を接種して凝集

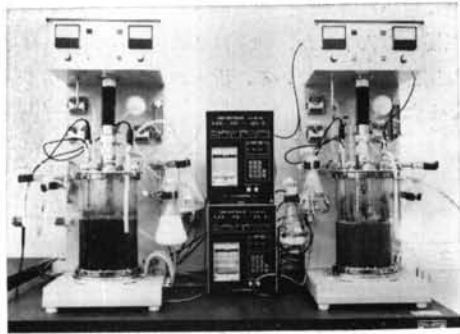


写真-2 小型ジャー培養装置

		三角フラスコ培養 (回分/半連続)	ジャー培養 (回分/連続)
容器容量 培養液量		500ml 100ml	5 l 2~3 l
振盪培養装置/ ジャー培養装置		小型培養装置 TB シ リーズ (高崎科学器 機械)	小型培養装置 MD- N型 (株式会社バイオ エンジニア)
条 件	・温度 ・攪拌 ・回転数	30℃ 回転振盪 180 rpm (振幅 70mm)	30℃ 攪拌羽根 200 rpm (または DO 調節に連動)
接種菌培養液量		2 ml	100ml (開始時) (培養中に生産菌を 接種する場合は 200 ml)
培養液の添加量 (半連続、連続 のみ)		(半連続培養) 2日毎に培養液を 1/3 ずつ新しい水産 排水培養液と入れ換 えた	(連続培養) 滞留時間が3~6日 になるように水産排 水培養液を連続的に 供給/引き抜きを行 なった

表-8 培養装置の仕様と培養条件

能力の回復を図った。三角フラスコの半連続培養では、途中で生産菌の接種は行なわなかった。

培養に用いた装置仕様の概要と主な培養条件を表-8に示した。

NOC-1 の凝集能力評価は、カオリン標準液 (4,000 mg/l) の凝集沈澱能力で評価した「凝集活性」(Flocculation Activity, 以下 FA)<sup>12)</sup>で行なった。FA は、カオリン懸濁液の上澄水の吸光度の逆数から計算する。このために、FA 値が大きいくほど上澄水の透明度が高いことを示し、培養液の凝集力も強いことを意味する。今回の一連の研究では、凝集分離・濃縮性の視点より FA 値 1.5 以上を必要凝集力の目安とした。

$$FA = (1/A_{カオリン}) - (1/A_{CaCl_2})$$

$A_{カオリン}$ : カオリン懸濁液に NOC-1 を含む培養液 0.5% と  $CaCl_2$  を加えて攪拌し、5 分間放置後の上澄水の吸光度

$A_{CaCl_2}$ :  $CaCl_2$  を加えたカオリン懸濁液を攪拌し 5 分間放置した後の上澄水の吸光度

#### 2) 非滅菌培養の検討

通常の微生物の培養および微生物による物質生産では他の微生物の影響を除き、生産物の品質を保つために培養液を滅菌してから使用する。NOC-1 生産培養でも、従来法は培養前にオートクレーブ滅菌処理 (120℃, 15 分間の加圧滅菌) を行なっていた。排水処理用途に NOC-1 を生産する場合、NOC-1 の凝集力が第一の要求条件であり、培養液中の他の微生物の増殖は NOC-1 の凝集力が維持されるならばそれほど重要ではない。滅菌を行なわない (以下、非滅菌) 培養液で生産が可能であれば、実用上において次のような利点が生じる。

	測定 pH	実験①	実験②	実験③	実験④
従来の培養液 (滅菌)	7.0	3.3 (188)	3.4 (192)	3.9 (96)	6.3 (192)
	8.0	3.6 (188)	3.6 (192)	4.8 (384)	6.5 (288)
水産排水培養液 (滅菌)	7.0	1.1 (137)	0.7 (192)	3.2 (288)	2.7 (384)
	8.0	5.7 (137)	1.8 (192)	3.7 (384)	4.1 (288)
水産排水培養液 (非滅菌)	7.0	5.8 (20)	7.8 (48)	4.6 (48)	5.4 (24)
	8.0	3.5 (20)	4.3 (48)	6.4 (72)	8.9 (72)

(単位: 時間)

(注) 括弧の中は最大 FA 値を記録した培養時間

表-9 滅菌/非滅菌培養液の比較実験結果

- (1)培養装置に滅菌関連機器を付加しなくて良い
- (2)滅菌に必要な蒸気を発生するエネルギーが不要
- (3)生産に高度に清浄な環境を必要としなくなる

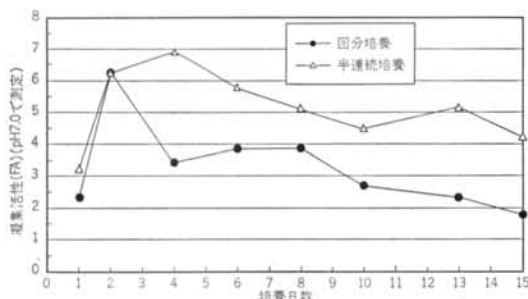
非滅菌培養液による NOC-1 生産の可能性を検討するために、滅菌系と並行して三角フラスコ培養を行なった。

### 3.2.3 実験結果

#### 1)培養液の滅菌の要否

水産排水培養液は、オートクレーブ処理により沈澱を生じた。これは、排水中の蛋白質が変性して不溶化したためである。しかしながら、オートクレーブ処理で pH は殆ど変化しなかった。

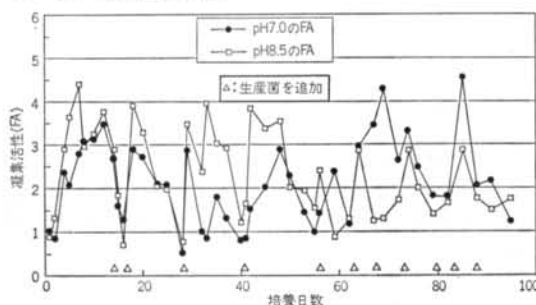
三角フラスコ培養により繰り返し行なった NOC-1 生産実験の最大凝集活性(最大 FA) 値と、そのときの培養時間を表一9に示す。なお、従来の培養液を非滅菌で用いた場合の結果を表に示していないが、これはいずれの実験においても最大 FA は0.5以下だったためである。



図一3 回分/半回分培養の比較実験結果

培養液量/容量	2.5 l / 5 l
培養液の添加	滞留時間 3 日間: 35 ml/hr 6 日間: 17 ml/hr
通気量	0.5 l / 分
攪拌速度	200 rpm
温度	30℃(ヒーターと冷水ジャケットで自動調節)
pH	実験開始時 8.0 (以降無調整)
消泡剤	信越化学 KM-73 シリコン

表一10 連続培養の条件



図一4 連続培養における FA の変化

水産排水培養液では非滅菌培養液を用いた方が、滅菌培養液を用いた場合より、

- (1)凝集活性の発現が早い
- (2)凝集活性の最大値が高い

という結果になった。滅菌培養液の結果が悪かった理由として、次のことが考えられる。

(1)ビタミン等の微量栄養成分がオートクレーブ処理で分解した。

(2)蛋白質の変性・沈澱により栄養源が不溶化した。

#### 2)三角フラスコによる回分/半連続培養

三角フラスコ培養で、水産排水培養液(非滅菌)を用いた回分/半連続培養の比較実験の結果を図一3に示した。半連続培養では、培養2, 4, 6, 8, 10, 13日目に培養液を1/3量(35ml)ずつ入れ換えた。

#### 3)小型ジャー培養装置による連続培養実験

培養条件を表一10に示した。水産排水培養液(表一7)は、培養液の滞留時間が3日と6日となるように連続的に供給し、これと等量の培養液を同時に引き抜いた。FAが低下した場合は、培養液中の微生物個体数における生産菌の割合が減少したと考え、適宜生産菌を接種した。接種する生産菌は、菌体量の増大を目的とした前培養用の GFYN 培養液<sup>15)</sup>で培養したものを、GFYN 培養液とともに添加した。

pH は実験開始2時間後から低下し始め、9時間後に pH 5.8 まで下がった。その後、約24時間は pH が7.5 から5.9の間で安定していた。その後徐々に上昇し、さらに24時間後に pH 7.5 に上昇した後は、おおむね7.0 から8.0の間で推移した。

培養液の滞留時間を3日間に設定した実験の凝集活性の経日変化を図一4に示した。FAが低下したときに生産菌を接種することにより、FAを1.5~2.0程度以上に保って90日程度維持することができた。このことは、非滅菌の連続培養の可能性と同時に、非滅菌培養においても生産菌を補充することにより、NOC-1 生産菌が優占種の一つとして維持できることを示唆している。

### 3.3 牛血液を栄養源とした NOC-1 生産

#### 3.3.1 牛血液

屠畜場や畜肉加工工場等では、屠殺した動物の血液、胃腸内容物等が大量に発生する。大きな施設では血液の一部が回収され、肥料・飼料あるいは薬品原料として活用される。しかし、中小の施設においては殆どが排水の汚濁源や廃棄物となる。

血液の BOD は非常に高く、排水中への血液の流入量が増えると BOD 値は高くなるとともに、排水が着色し

て景観上も問題となる。このように、血液は屠畜場等の排水の主な汚濁源となっている。

血液は、窒素分を始め各種栄養成分を含んでいることから、NOC-1 生産培養液の栄養源としての利用を検討した。

### 3.3.2 実験方法

実験で使用した牛血液は、東京都内のB食肉市場より入手した。血液の採取および運搬にはポリエチレン製容器を使用した。ポリエチレン容器にはヘパリン・ナトリウム（和光純薬㈱，和光特級）を、血液投入後に20,000ユニット/lの濃度になるように少量の水で溶解して事前

項目	分析値	項目	分析値
BOD	235,000	T-P	192
COD	82,800	PO <sub>4</sub> -P	19.6
NH <sub>4</sub> -N	295	n-Hexane抽出物	62
Org-N	33,200		
T-N	33,600		

(単位: mg/l)

表一11 牛血液(全血)の水質分析値

No	①	牛血液使用培養液			
		②	③	④	⑤
	生産培養液(YE)	牛血液添加培養液		牛血液希釈培養液	
グルコース	0.5%	←	←	—	—
果糖	0.5%	←	←	—	—
牛血液	—	10%	2%	10%	2%
酵母エキス	0.05%	—	—	—	—
尿素	0.05%	←	←	—	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2%	←	←	—	—
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5%	←	←	—	—
MgSO <sub>4</sub>	0.02%	←	←	—	—
NaCl	0.01%	←	←	—	—
pHの調整	塩酸または NaOH 溶液により培地の初期 pHは 8.0 に設定した				

表一12 従来の培養液と牛血液培養液の組成

培地種類	培地①	培地②	培地③	培地④	培地⑤
	従来の酵母エキス培地	牛血液添加(10%)	牛血液添加(2%)	牛の希釈血液(10%)	牛の希釈血液(2%)
滅菌の有無	有/無	有/無	有/無	有/無	有/無
最大 FA	5.3/ 1.4	3.4/ 1.7	2.1/ 7.1	10.0/ 0.01	0.8/ 2.9
最大 FA の培養日数	10日/ 6日	6日/ 9日	6日/ 6日	3日/ 7日	6日/ 6日

(上段は滅菌培養液, 下段は滅菌しない培養液)

表一13 牛血液培養液と従来の培養液の比較

に入れることにより、血液の凝固を予防した。屠殺直後に採取した牛の鮮血を直ちに実験に用いた。牛血液の水質分析結果を表一11に示した。

実験は、表一12に示したように牛の血液を利用した4種の培地(②~⑤)と、比較対照として従来法の培養液(酵母エキス添加, ①)で行なった。また、それぞれについて滅菌(120℃, 15分間)の有・無の2条件を設定した。牛血液濃度が20%以上では滅菌時に血液がゲル化し、培養液として使用できなかった。

牛血液添加培養液は、従来の培養液の酵母エキスの代替栄養源として牛血液を用いた培養液である。牛血液希釈培養液は、牛血液を所定の濃度に希釈して pH を調整しただけの培養液である。

### 3.3.3 実験結果

実験結果を表一13に示す。この実験より、次の結果が得られた。

(1)牛血液を10%の濃度で添加、あるいは10%に希釈使用した場合は、滅菌を行なった方が FA 値が高い。

(2)また、最大凝集活性発現の培養日数が短い。

(3)一方、2%で使用した場合は、滅菌を行なわない方が FA が高い。

特に、10%牛血液希釈血液培養液は調整が容易で安価にもかかわらず、滅菌して用いることで非常に高い FA 値が短い培養日数で得られたことは、実用化に向けて興味深い。

ここに示さないが、牛血液濃度20%および50%の滅菌無しでは FA は発現しなかった。このように10%以上の牛血液濃度、滅菌無しの培養で FA が低いあるいは発現しない理由は、血液中に微生物の活性を抑制する成分や機構(酵素、免疫系の諸細胞や抗体等)が活性状態で存在するためと考えられる。滅菌することによりこれら細胞、機構、酵素が失活し、生産菌の増殖が可能になる。

血液濃度が2%と薄い場合は、滅菌しなくてもこれら成分・機構の影響が薄らぎ、生産菌の増殖が可能になると考えられる。

## § 4. 農・水産物を栄養源とした生産

### 4.1 農・水産物利用の意義

NOC-1 の利用用途を排水処理に限らず、食品加工工程やバイオ医薬品生産工程等における有用物回収に拡大する場合、安価かつ衛生的な生産方法が必要になる。このため、培養に用いる栄養源は次の条件を満たす必要がある。



- (1)窒素分や微量栄養源を含む
- (2)安価である
- (3)保存性が良い,あるいは容易に入手できる

農・水産物からこれら条件を満たすものとして,農産物からは米ヌカとヒマワリ種子粉末,水産物からはフィッシュミールについて検討した。

同様の研究として,大豆カス(Soybean Meal)の利用の研究<sup>14)</sup>があるが,より入手しやすく,また扱い易い栄養源の探索を目的とした。

有機窒素源	米ヌカ		ヒマワリ 粉末	フィッシュ ミール
	5g	5g	5g	0.5g
処理方法	水抽出 <sup>*1)</sup>	お湯抽出 <sup>*2)</sup>	懸濁液 <sup>*3)</sup>	懸濁液 <sup>*4)</sup>

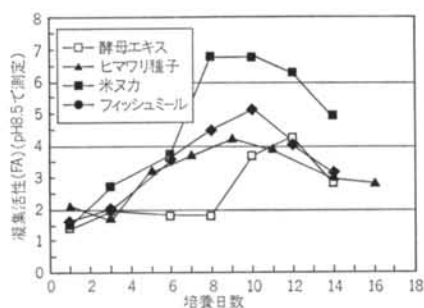
\*1): 米ヌカ懸濁液を室温(約20℃)で10分間攪拌後に濾紙で濾過し,その濾液を用いた。滅菌(121℃,20分間)は全成分を混合後に行なった

\*2): 米ヌカのお湯懸濁液(約80℃)で5分間攪拌後に濾紙で濾過した。この濾液をメンブレンフィルターで濾過滅菌した後に滅菌済みの他の混合液に加えた

\*3): ヒマワリ種子粉末の固形物を含んだままでオートクレーブ滅菌した

\*4): フィッシュミールの不溶成分を含んだままでオートクレーブ滅菌(121℃,20分間)した

表—14 各栄養源の使用量と処理方法(1l中)



図—5 代替栄養源による NOC-1 の生産

培養液	従来の 培養液	米ヌカ		ヒマワリ 種子粉末	フィッシュ ミール
		水抽出	お湯抽出		
最大 FA <sup>*1)</sup>	4.1	4.2	6.7	4.1	4.2
FA が最初に3 を越えた培養日 数 <sup>*2)</sup>	10日目	8日目	8日目	8日目	6日目
最大 FA の日 数 <sup>*3)</sup>	12日目	10日目	8日目	8日目	10日目

- \*1): pH8.5 で測定した最大凝集活性
- \*2): 培養開始後 FA が3以上になった培養日数
- \*3): 最大凝集活性を示した培養日数

表—15 農・水産物を利用培養実験の凝集活性

#### 4.2 方法および実験条件

米ヌカは糠漬け用,ヒマワリ種子粉末はペットの餌用,フィッシュミールは養魚や家畜飼料用のものをそれぞれ用いた。

米ヌカとヒマワリ種子粉末は固形物の殆どが水に不溶のために,次の3通りについて効果を調べた。

- (1)固形物を含んだままの懸濁液
- (2)水で抽出した後,濾紙で濾過した濾液
- (3)お湯(50℃以上)で抽出した後,濾紙で濾過した濾液

フィッシュミールは骨片等大きな不溶性の固形物だけを除去し,微細な不溶性固形物を含んだままで使用した。

培養液の調製の際の使用量と処理方法を表—14に示した。糖類,ミネラル類はすべて従来の培養液と共通とした。

培養は,500ml三角フラスコを用いた回分培養で行なった。実験条件は,培養液量は100ml,温度30℃,攪拌は回転振盪(180rpm)で行なった。

#### 4.3 実験結果

以下の条件の凝集活性の経日変化を図—5に,全体のまとめを表—15に示した。

- (1)従来の酵母エキス培養液
- (2)ヒマワリ種子粉末 0.5%懸濁液
- (3)米ヌカ 0.5%お湯抽出・濾液
- (4)フィッシュミール 0.1%懸濁液

米ヌカ,ヒマワリ種子粉末,フィッシュミールのいずれを用いた場合も,凝集活性は酵母エキスを使用したときと同等あるいはそれ以上の値を示した。そして,凝集活性が3を越えた培養日数,凝集活性が最大値を示した培養日数ともに,酵母エキスを使用した従来の培養液に比べて短縮できた。

これら農・水産物は,従来の培養液で栄養源に用いて

添加濃度	放置	CaCl <sub>2</sub> 処理	NOC-1 処理(3%)	pH4 処理
CaCl <sub>2</sub>	—	500ml/l		—
処理 pH	—	—	7.0 8.0	6.0
COD <sup>*1)</sup> (mg/l)	1,903 (4.9%)	1,695 (17.1%)	1,566 (21.7%) 1,286 (35.6%)	1,705 (14.8%)

- \*1): 原排水の COD は 2,080mg/l
- \*2): 括弧内は原水に対する除去率

表—16 水産加工排水の処理実験(1)

いた酵母エキスよりはるかに安価であり、同時に入手が容易で保存性が良い。これらを用いることにより、全国どこでも比較的安価に NOC-1 を生産できる。また、衛生的でもあり、種々の用途に向けた NOC-1 生産が可能である。

添加濃度	NOC-1 処理			PAC 処理
	3% (培養液 % (V/V))	4%	5%	PAC 2,400mg/l
CaCl <sub>2</sub>	500mg/l			—
処理pH	8.4	8.4	8.4	6.0
COD <sup>*1)*2)</sup> (mg/l)	2,174 (46.7%)	2,019 (50.5%)	2,450 (40.0%)	2,068 (49.3%)
SS <sup>*1)*2)</sup> (mg/l)	92 (95.0%)	270 (85.1%)	246 (86.4%)	41 (97.7%)

\*1): 原排水の COD は 4,080mg/l, SS は 1,800mg/l

\*2): 括弧内は原水に対する除去率

表-17 水産加工排水の処理実験(2)



写真-3 NOC-1 による水産加工排水の処理

項目	NOC-1 処理	PAC 処理
処理条件	添加濃度 培養液 5% (V/V)	PAC 3,000mg/l
	CaCl <sub>2</sub>	500mg/l
	処理 pH	8.5
凝集沈殿物	SS	6,270mg/l
	粗蛋白質 2,780mg/l (SS中の44.3%)	2,600mg/l (SS中の72.0%)
	アルミニウム	—

(原排水は BOD=2,780mg/l, COD=930mg/l, SS=397mg/l)

\*1): 添加した PAC 中のアルミニウムの 98.1% に相当する量が沈殿物中に存在

表-18 水産加工排水からの有用物回収実験

## § 5. 水産加工排水の処理と資源回収

NOC-1 を用いた排水処理および沈殿回収物の資源化・有効利用のモデルとして、水産加工排水を取り上げて検討を行なった。

### 5.1 水質浄化

NOC-1 による水産加工排水の凝集沈殿処理実験を行なった。NOC-1 は水産排水培養液で培養し、NOC-1 を分離精製せずに培養液をそのまま凝集剤として使用した。水質の指標として化学的酸素消費量 (COD) と懸濁物質 (SS) を用いた。対照として放置、塩化カルシウムのみ添加、pH 4 による蛋白質の等電点沈殿処理、代表的な無機系凝集剤である PAC (ポリ塩化アルミニウム) 処理を行なった。実験の処理条件と結果をそれぞれ表-16、表-17に示す。

NOC-1 を含む水産排水培養液を 3~5% 添加処理することにより、PAC 処理とほぼ同程度の処理結果が得られた。

本水産加工排水は、塩化カルシウム 500mg/l 濃度の添加のみでは十分な凝集分離効果を得ることができないこと、また蛋白質の等電点沈殿処理 (pH 4 処理) でも同様に十分な効果が得られないことが明らかになった。

NOC-1 による水産加工排水の処理実験の様子を写真-3に示した (ただし、写真-3は表-16、表-17とは異なる実験のもの)。

### 5.2 有用物の回収

水産加工排水は、魚の解体を行なう生切り工程で発生する魚の肉片や血液、溶液性の蛋白質等を含んでいる。NOC-1 による凝集沈殿処理により、これらの回収を試みた。比較として、代表的な無機系凝集剤である PAC (ポリ塩化アルミニウム) の処理を並行して行なった。回収実験の条件と回収物の分析結果の一例を表-18に示した。

NOC-1 の添加により SS (懸濁物質) 量は 3~4 倍に増加した。これは、溶解していた成分が NOC-1 の添加により凝集したためである。回収物の粗蛋白質含有率は 40~70% であり、飼・肥料の原料として市販されているフィッシュミール (蛋白質含有率 60~65%)、フィッシュソルブル (同 45~50%) と同等である。

一方、PAC の 3,000mg/l 濃度の添加処理でもほぼ同様の実験結果が得られた。この沈殿回収物中には、PAC に含まれていたアルミニウムの約 98% が含まれていた。このことから、PAC による沈殿回収物の処理や資源化



の際にはアルミニウムに留意する必要がある。

また、NOC-1により凝集分離された沈澱物は、MLSSで7,500~11,500 mg/lまで濃縮され、VSS/SSが98%と高いにもかかわらず十分に濃縮できた。

## § 6. 結 論

三角フラスコ、小型ジャー培養装置規模の基礎的な研究結果をまとめると、次のようになる。

(1) NOC-1生産の主栄養源の一つとして、水産加工排水、牛血液を用いることにより、酵母エキスを用いていた従来の培養液より、滅菌あるいは非滅菌にて短時間でより強い凝集活性が得られた<sup>15)16)</sup>。

(2) 水産加工排水を主要な栄養源とした培養液を用いた非滅菌培養で、生産菌を追加接種することにより、3カ月にわたる NOC-1連続生産ができた。

(3) 培養液から凝集成分 NOC-1を精製分離しないで、そのまま排水処理に適用することが可能である。そして、PACと同等あるいはそれ以上の処理性能を得るこ

とができた。

(4) NOC-1を凝集処理に用いる場合、Ca<sup>2+</sup>等の金属イオン濃度とpHが重要な設定因子である。

(5) NOC-1を従来の凝集剤の代わりに用いることにより、従来は産業廃棄物として処理処分していた沈澱回収物を、アルミニウムや鉄等の金属塩、合成高分子凝集剤等の有害物質を含まない資源として活用できることが示唆された。

(6) 特に、水産加工排水を対象とするときは可溶性の蛋白質が回収でき、栄養価の高い飼・肥料源として有用である<sup>17)</sup>。

(7) 米ヌカ、ヒマワリ種子粉末、フィッシュミール等の農・水産物がNOC-1生産に利用できる。また、その培養条件を明らかにした<sup>18)</sup>。

謝辞 本研究は、微生物工業技術研究所と共同研究で進めているものである。本研究の遂行に当たり、日頃から御指導、御助言くださり、また電子顕微鏡写真を提供してくださった微生物工業技術研究所物質変換研究室倉根隆一郎室長に感謝いたします。

## <参考文献>

- 1) R. Kurane, T. Suzuki & Y. Takahara: "Removal of Phthalate Esters by Activated Sludge Inoculated with a Strain of *Nocardia erythropolis*" Agricultural & Biological Chemistry, Vol. 43 (1979) pp. 421~427
- 2) R. Kurane, K. Takeda & T. Suzuki: Agricultural & Biological Chemistry, Vol. 50 (1986) pp. 2301~2307
- 3) 倉根隆一郎, 富塚登, 吉津洋一, 角野匡, 清原正高, 谷口佳隆, 川口謙, 平野昌彦: "微生物が産生する脂質性凝集剤の精製と特性 (微生物産生凝集剤第23報)" 日本農芸化学会誌 Vol. 66, No. 3 (1992年) p. 385
- 4) 武田穰, 倉根隆一郎, 中村以正: "*Rhodococcus erythropolis* S-1の産生する蛋白性凝集剤の精製と凝集機構の解明 (微生物産生凝集剤第18報)" 日本醸酵学会大会講演要旨集 (1990年) p. 69
- 5) 多胡義孝: "細菌の凝集現象" 微生物 Vol. 1 (1985年) pp. 51~57
- 6) 佐藤俊一: "排水処理用凝集性酵母の凝集メカニズム" 水質汚濁研究 Vol. 13 (1990年) pp. 283~287
- 7) 柿井一男: "活性汚泥および汚泥構成細菌の凝集における金属イオンの役割" 水質汚濁研究 Vol. 13 (1990年) pp. 273~277
- 8) 小泉淳一: "細胞外バイオポリマーの機能と利用—バイオフィロキュラントとバイオサーファクタント—" 微生物 Vol. 5 (1989年) pp. 545~551
- 9) 藤井昇, 篠原智, 今田清久: "Aurebasidium pullulans FERM-P4275の産生する多糖について—第3報 物理的並びに化学的諸性質—" 宮大農報 Vol. 33 (1986年) pp. 249~254
- 10) 宮晶子, 安井智子, 川島浩二, 棚久保英二: "好気性上向流式沈泥床法 (AUSB法)における菌体外高分子の挙動—菌体外高分子の機能を活用した排水処理—" 水質汚濁研究 Vol. 14 (1991年) pp. 665~673
- 11) 戸枝一喜, 倉根隆一郎: "Rhodococcus erythropolis 産生凝集剤の生産条件と凝集現象" 製糖技術研究会誌 Vol. 36 (1988年) pp. 77~86
- 12) 発明者・倉根隆一郎, 鈴木智雄, 出願人・工業技術院長: "微生物による可溶性色素の脱色方法" (特許出願番号 昭61—272583)
- 13) R. Kurane, K. Toeda, K. Takeda & T. Suzuki: "Culture Conditions for Production of Microbial Flocculant by *Rhodococcus erythropolis*" Agricultural & Biological Chemistry, Vol. 50 (1986) pp. 2309~2313

- 14) 倉根隆一郎, 花岡平, 近藤作司, 三上栄一, 鈴木智雄: “微生物産生凝集剤低コスト生産培地の検討(微生物産生凝集剤第6報)” 日本醸酵工学会大会講演要旨集(1988年) p. 151
- 15) 倉根隆一郎, 鈴木令, 田澤龍三, 三上栄一, 鈴木智雄: “微生物産生凝集剤低コスト化培養方法の検討(微生物産生凝集剤第5報)” 日本醸酵工学会大会講演要旨集(1988年) p. 152
- 16) 倉根隆一郎, 鈴木令, 田澤龍三, 三上栄一, 鈴木智雄: “微生物産生凝集剤低コスト化培養方法の検討(Ⅱ)(微生物産生凝集剤第9報)” 日本農芸化学会誌 Vol. 63, No. 3 (1989年) p. 442
- 17) R. Tazawa, R. Kurane & S. Suzuki: “Low-cost Production Medium and Application to Recovery of Resources by Microbial Flocculant” Reprint of Poster Papers, Water Pollution Research and Control (1990) pp. 633~636
- 18) 倉根隆一郎, 鈴木令, 田澤龍三: “微生物産生凝集剤低コスト化培養方法の検討(Ⅲ)(微生物産生凝集剤第19報)” 日本醸酵工学会大会講演要旨集(1990年) p. 69