

環境負荷物質の高度有効利用と生物的原位置処理技術に関する研究

機能材料工学専攻 吉川博道

本課題においては、二つの研究テーマを設定している。一つは焼酎蒸留廃液の有効利用法の開発であり、今一つは非イオン系界面活性剤であるアルキルフェノールポリエトキシレートの原位置分解コンソーシアの構築である。以下にテーマごとに記載する。

《1. 焼酎蒸留廃液の有効利用》

近年の焼酎ブームで急激に生産を拡大した焼酎産業において、アルコール分を留去した残渣の処理が問題となっている。焼酎蒸留廃液は、pH が 3.5~4 と酸性が強く、BOD が 6~10 万 ppm で、SS も約 10 万の比較的粘性の高い廃液である。現在のところ、この残渣は焼却、海洋投棄、あるいは堆肥材料としてのリサイクルが行われているが、廃棄に伴うコストがメーカーを苦しめてきた。ロンドン条約批准により 2007 年から海洋投棄が禁止されることもあり、より効率的な処理方法の開発が望まれている。

蒸留残渣の固液分離を行い、各画分を独立して利用しようとする試みが行われてきたが、効率的固液分離に成功したグループは存在しない。我々は蒸留残渣液体部分が各種アミノ酸を始めとして、クエン酸や植物繊維などを含むことから高付加価値の飲料原料として使用できる可能性を考え、清澄な液体部分を分取する方法の確立を試みた。

1. 遠心分離

福岡市の焼酎メーカーである光酒造より麦焼酎蒸留残渣を入手し、遠心分離による固液分離を試みた。2000 g で大きな残渣を落とした後、この懸濁液をスプレードライして得られる粒子と、さらに 5,200 g で遠心分離をした後、蒸留水で洗浄して得られた微粒子成分を SEM と EPMA で観察した。下図のように微粒子成分は飼化されない多糖であると思われ

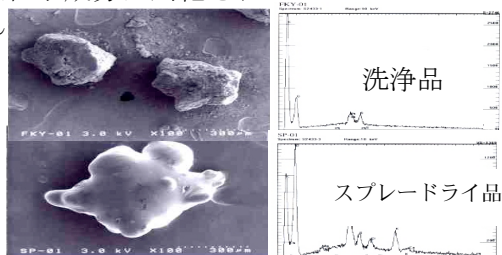


図1 微粒子成分のSEMとEPMAの結果

2. 遠心分離液の口過助剤処理

遠心分離のみでは清澄な分離液を得るのは困難であったので、300 g~2,000 g で分離した液層部分に口過助剤として、A(#80)、B(XR)、D(M-B419)、E(M-479)を 1%となるように添加し、150 rpm 15 分間攪拌した後、300 g~2,000 g で遠心分離した。この結果、前処理としての遠心分離の回転数が大きく後処理に影響すること、口過助剤としては A(#80)がもっとも微粒子を捕捉する能力が高いことを確認した。

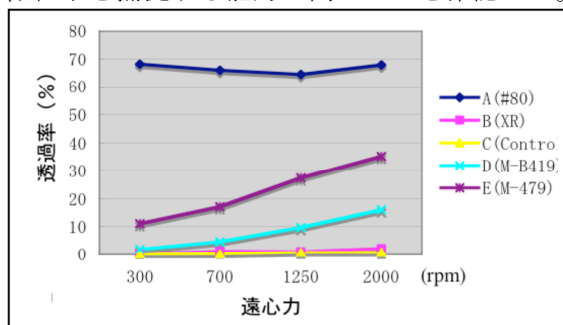


図2 1250g で分離した液体部分の濾過助剤による処理結果



廃液中の微粒子 ろ過助剤 A 微粒子を捕集した A
図3 濾過助剤による微粒子捕捉

《2. Alkylphenol polyethoxylate (APEO)の環境動態と原位置処理》

Alkylphenol polyethoxylate (APEO)は工業用洗剤、農薬の展着剤として大量に使用されてきた。環境中に放出された APEO は非生物的・生物的分解を受け Estrogen 活性をもつアルキルフェノールオリゴエトキシレート (APmEO) や対応するカルボン酸(APmEC)を通して、アルキルフェノール (AP) まで分解することが知られており、河川水や底泥から、これら分解中間体が広く検出されている。APmEO と AP はエストロゲンのアゴニストとして働くのみではなく、アンドロゲンのアンタゴニストとして作用するいわゆる環境ホルモンであり、水生生物に対する悪影響が心配されている化合物群である。我々は APEO の環境における動態を明らかにすると同時にこれら有害な分解中間体の原位置分解を可能とする微生物コンソーシアの構築を目的とし、Triton X をモデル化合物として以下の実験を行った。

1. 分解菌の探索・単離・同定

・ 集積培養と土壌の分解能検定

西日本各地 (140 カ所) から採集した土壌(各 5 g)と 0.2 % Triton X を含む無機塩培地(20 ml)を加え 30 °C, 150 rpm で 10 日間振とう培養を行った。培養液 50 ml を採取し MeOH で 20 倍希釈した後、攪拌・遠心し、上清を HPLC で分析した。分解の見られた培養液を 5 分間静置した後、上清 1 ml を新たな無機塩培地(19 ml)に加え、30°C 150 rpm で 5 日間集積培養を継続した。同時に高圧滅菌した土を集積培養と同様の条件で 2 日間振とう後、上清中の Triton X の量を HPLC で分析し、139 カ所の土壌の中で 43 カ所の土壌に分解活性を見出した。

・ 菌の単離・分解能検定・同定

0.2 % Triton X、0.05 % Yeast Extract を含む無機塩培地(1.5 % Agar)に、集積培養液を画線し、出現したシングルコロニーから巨大コロニーを作らせ、コロニーの形、色、透明度等を指標として、異なると思われる菌を斜面培地へと移植した。

フェノール抽出法により単離菌のゲノム DNA を得た。この DNA に対して RAPD-PCR を行い単離菌の相違を明確にした。この結果 ○コロニーの単離菌を得た。単離菌の DNA に対して、大腸菌の 16S rDNA から作成した 41-f, 1066-r primer を用いて PCR を行った。増幅されたフラグメントを PAGE で精製し、シーケンシング反応を行った。得たサンプルはエタノール沈殿で精製し、CEQ8800 で解析した。単離菌の多くは *Pseudomonas* 属であろうと推定した。

LB 培地で前培養した単離菌を、無機塩培地で OD600 = 1 に希釈し、その 1 ml を無機塩培地 14 ml に添加し、30°C、150 rpm で振とう培養を行い経時的にサンプリングした。サンプル溶液は適量のメタノールで希釈後、OD600 により菌の増殖を判断した。また得られた溶液を HPLC で分析を行った結果、ほとんどの菌が AP2EO までの分解を行うことを確認した。

・ 新規分解産物の検出

埼玉農業研究センターから供与された土壌 No.4 の集積培養液から新規な代謝中間体を見出した。この化合物はモノカルボキシレートと同じ分子量を持つ化合物であった。末端が脱炭酸して生成したメチルエステル体ではないかと考え、これを合成してコクロマトグラフィーを行ったが、GC 上で異なるリテンシ

ョンタイムを示した。

2. 分解中間体、サロゲートの合成

・ 標品として使用する分解中間体 APmEO, APmEC (m = 1-3) は AP を原料として用い、図 3 に示す化合物を合成した。

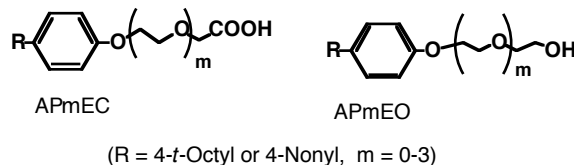


図 4 APmEO, APmEC 構造

- ・ 混合物を用いての分解試験では、メカニズムの詳細な検討はできないため、単一の鎖長を持つ APEO ホモログの合成法を検討した結果、AP と 8-chloro-3, 6-dioxa-1-octanol を相間移動触媒存在下に反応させることにより、オープンカラムで分離可能な一連のホモログを一括合成することに成功した。

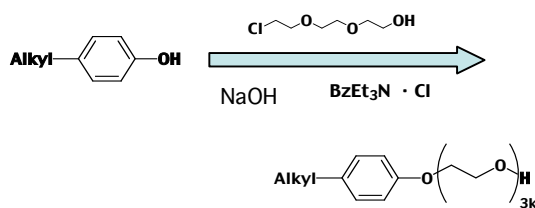


図 5 長鎖ホモログの合成

3. 重水素でラベルしたサロゲートの合成

APEO は長期間使用されてきたために、広範囲の農耕地、河川が汚染されている。従って、こうした場所から採取した土壌を用いて動態解析を行う場合、実験土壌からの持ち込みによる影響を排除できない。正確な実験を行うために、以下のスキームに従って重水素ラベルしたサロゲートの合成を行った。

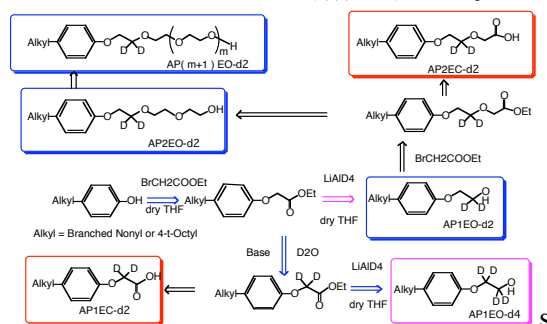


図 6 重水素ラベルサロゲート合成経路

謝辞： 本研究遂行にあたり協力して頂いた、市来弥生、谷昭幸、安部大輔、石本淑恵、能塚 史、福田 昌平の各位に感謝します。