

〔醸酵工学 第60巻 第5号 359-362, 1982〕

ノ ー ト

硫黄化合物制限条件下で土壌より分離された糸状菌 によるリグニンスルホン酸の除去

藤井 貴明・片野 正明・本田 洋
安藤 昭一・矢吹 稔

千葉大学園芸学部農芸化学科

Removal of lignosulfonate by a mold isolated from soil under sulfurous compound-limited conditions. TAKAAKI FUJII, MASAOKI KATANO, YOH HONDA, AKIKAZU ANDO, and MINORU YABUKI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo-shi, Chiba 271, Japan) *Hakkokogaku* 60: 359-362. 1982.

Enrichment cultures of various soil samples were carried out in a medium containing lignosulfonate (LS) and glucose and a limited concentration of sulfurous compounds other than LS. A isolated mold, 0-7W, could not utilize LS as a sole source of carbon but grew well on a salt medium containing 4 g/l of LS (A_{280} , 47.2) and 10 g/l of glucose. After 4 days of cultivation, glucose was almost completely consumed and the absorbance at 280 nm of the culture filtrate decreased by about 60%. Cells turned black during the cultivation. The removal of LS was greatly reduced by the addition of about 10 mg per liter of sodium sulfate to the medium. The mold was identified as the genus *Penicillium*.

リグニンは再生可能でかつ豊富に存在する資源の一つであるが、その大部分は未利用の状態に置かれている。現在のところパルプ工業の廃棄物として大量に排出されるリグニンのうち、クラフトパルプ廃液中のチオリグニンは大部分が薬品回収のさい燃料として利用されており、一方、サルファイトパルプ廃液中のリグニンスルホン酸 (LS) の一部は回収され、各種の物理化学的性質に関する改良剤やバニリン等の原料として利用されている。^{1,2)} しかしながら、サルファイトパルプ廃液の大部分は LS の濃度が非常に低く、また親水性が強いため効果的濃縮方法がなく、廃水処理の上で古くから重要な研究課題ともなっている。^{3,4)} これまでに LS を利用できる微生物についてはいくつか知られているが、^{1,2)} LS は特に分解し難い物質といわれ、これの直接発酵原料としての利用を試みた研究は少ない。^{5,6)} また、廃液中からのリグニンの除去、回収に関しても、チオリグニンについては菌体表面への吸着等によってこれを著量に除去できる微生物の存在が報

告されているが、^{7,8)} LS については同程度の除去能を持っている微生物は知られていない。

以上の点より、著者らは自然界から LS を利用する微生物の分離を試み、その過程で LS とグルコースを含む培地において、硫黄を制限した場合に、培養液中から著量の LS を除去する糸状菌を分離したので報告する。

LS は市販のコパルチン〔株興人〕をそのまま、あるいは蒸留水に対して十分に透析したものをを用いた。なお、透析した LS 標品についてはフェノール硫酸法⁹⁾で定量できる糖類は検出されなかった。各種の土壌試料から LS 利用性の微生物を分離するにあたっては、LS 培地 [LS (コパルチン PNA-11) 10 g, (NH₄)₂HPO₄ 2 g, K₂HPO₄ 1.2 g, KH₂PO₄ 0.8 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, FeSO₄·7H₂O 20 mg, CaCl₂·2H₂O 5 mg, Mn SO₄·4H₂O 2 mg, ZnSO₄·7H₂O 2 mg, CoCl₂ 0.2 mg 酵母エキス 100 mg, 水 1 l, pH 7.0] と硫黄化合物を制限した [-S]-LS 培地 [LS (透析コパルチン) 4 g,

グルコース 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2 g, K_2HPO_4 1.2 g, KH_2PO_4 0.8 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g, $\text{FeCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2 mg, ZnCl_2 2 mg, 酵母エキス 50 mg, 水 1 l, pH 7.0] を高圧蒸気滅菌 (121°C 15 min) をしたのち, $\phi 1.8 \times 16.5$ cm の試験管にそれぞれ 5 ml ずつ分注して用いた. この試験管に分離源の土壌の少量を加えて振とう集積培養した. 分離菌株の各種培養試験は, 培地 80 ml を含む 500 ml 坂口フラスコを用いて 30°C にて往復振とう培養して行った. 培養液中の LS の量は, 280 nm における吸光度を測定して求めた. 測定時における pH は 3~10 の範囲でほとんど 280 nm における吸光度に影響がなかったため, 培養ろ液の吸光度を測定する際には, pH の調整は行わなかった. なお, 透析したのち凍結乾燥して調製した LS の 1 g を 1 l の水に溶解した溶液の 280 nm における吸光度は 11.8 を与えた. 乾燥菌体重量はろ別した菌体を十分水洗し, これを 105°C にて 20 時間乾燥したのち秤量して求めた. グルコースは 3,6-ジニトロフタル酸法にて定量した.¹⁰⁾

千葉県内の各地の 120 種の土壌について微生物の分離を試みた. LS 培地を用いた場合には, ほとんどすべての土壌の集積培地において細菌等のわずかな生育が観察されたが, これらはいずれも透析した LS を用いて調製した培地において生育することができなかった. ところで, 一般に高分子のリグニンを分解することができる白色腐朽菌は, その生育やエネルギー源として適当な炭素源, セルロース, ヘミセルロースなどを必要とするといわれている.^{11,12)} 従って, LS に作用できる微生物の分離にあたっては, LS 以外に利用しやすい炭素源を添加した培地を用いることも一考を要するところと思われる. しかしながら, もしこのような培地を用いて土壌等の集積培養を行えば, LS 以外の添加した炭素源を利用する微生物が優先的に集積されてしまうことが予想される. そこで LS 分子中には硫黄が存在することに注目して前述の硫黄を制限した培地を用い, LS と無関係に生育する微生物が集積されることを防いだ. この培地を用いてさきの土壌試料より 50 種について集積培養を行ったところ, 数回の新鮮培地への植えつぎの後にも良好な生育を示した 3 種の培養を得た. その中の培養 0-7 については, 増殖に伴って黒褐色を呈した培養液をすみやかに脱色する能力を持つことがわかった. これに対して, 他の 2 種については脱色能は認められなかった. 天然のリグニンは淡クリーム色であるが, LS やチオリグニンは黒褐

色を呈し, この色は主としてキノイド構造, カテコールやフェノール性水酸基と金属〔主として Fe(III)〕とのキレート形成, カルコン構造などのカルボニル基と二重結合を含む共役系の存在によるものといわれている.¹¹⁾ 実際に 3 種の培養について LS 量の変化を 280 nm の吸光度を測定して追跡してみると脱色能と LS の除去能は一致していた. 培養 0-7 は 2 種の糸状菌の混合したものであったから, これよりそれぞれを単離した (0-7W, 0-7G). 糸状菌 0-7W についてはもとの培養と同程度の脱色 (LS 除去) 能を有していたが, 0-7G は培地を脱色しなかった. なお, 糸状菌 0-7W の培養液からろ別した菌体は黒褐色を呈することから, 除去された LS は菌体表面に何らかの形で吸着していることが予想された.

糸状菌 0-7W の生育は [-S]-LS 培地で作った平板上に 25°C において良好で, 2 週間で直径 7-8 cm に達するが, しばしばセクターが出現した. また, 37°C においては生育しなかった. 分生胞子は灰緑色で, 古くなると灰褐色となった. 分生胞子柄はほふくした菌糸より直生 ($2.5 \sim 3 \times 10 \sim 50 \mu\text{m}$) し, ペニシリは非対称体, 数本のフィアライド ($2.5 \sim 3 \times 6 \sim 7 \mu\text{m}$) から形成された. 分生胞子 ($3 \mu\text{m}$) は球~亜球であった. 以上の点より, 糸状菌 0-7W は *Penicillium* に属すると推定されたが,^{12,13)} 本菌の菌学的性質についてはさらに検討を加えている.

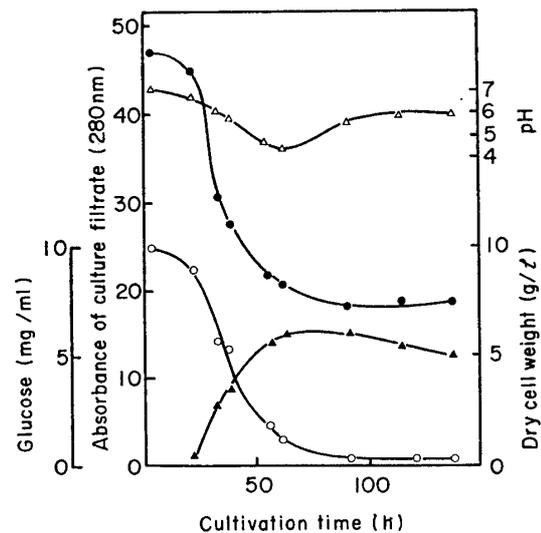


Fig. 1. Time course of growth of strain 0-7W in sulfurous compound-limited medium containing lignosulfonate and glucose.

●, absorbance of culture filtrate; ○, glucose; ▲, dry cell weight; Δ, pH.

糸状菌 0-7W は市販の LS あるいはこれを透析した LS 標品を唯一の炭素源として生育することができないため、生育には何らかの炭素源を必要としたが、グルコースの他に、フルクトース、マンノース、リボース、キシロース、マンニトール、デンプン、エタノール、グリセリン等を利用した。本菌株はこれらの炭素源の存在下にグルコースの場合と同様に培地中より LS をよく除去した。

分生胞子の懸濁液 ($10^4 \sim 10^5/\text{ml}$) の 1ml をグルコース 10 g, LS 4.1 g ($A_{280}, 48.4$) を含む [-S]-LS 培地に接種して、 30°C にて培養経過を測定した (Fig. 1)。胞子懸濁液は10日間斜面培養したものに殺菌水 10ml を加えて調製した。本菌はおおよそ90時間でグルコースを消費し、菌体量が最大に達した。LS は生育に伴って培養液中より減少し、それは生育の停止とともに終了した。グルコース 10 g の存在下で除去された LS は 280 nm における吸光度の減少量にして 28.2 に達した。この量は添加した LS の約 2.4 g に相当した。このような培養期間を通じて培養ろ液の吸光度は 280 nm 以外の各波長においても全体に著しい減少が認められたが、吸収スペクトルの形はほとんど変化がみられなかった。また、培養後、ろ別した菌体を 100mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.6) に懸濁したのちスターラーを用いて 4°C にて12時間ゆるやかにかくはんしてから、そのろ液について吸光スペクトルを測定したところ、それは、培養前の培養液の示したものとほぼ等しい結果で、また、培養中に減少した 280 nm に

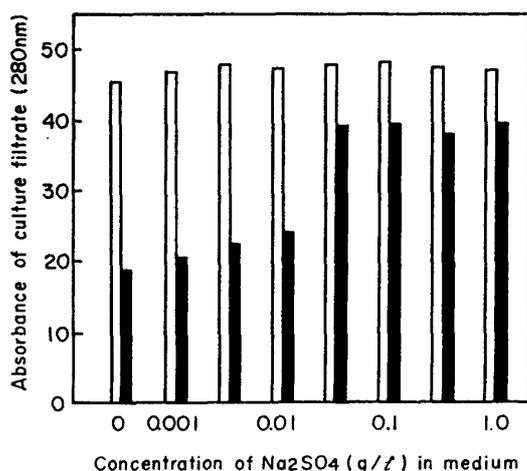


Fig. 2. Effect of sodium sulfate on removal of lignosulfonate by strain 0-7W. Cells were cultured at 30°C for 96 h in Sakaguchi flasks with reciprocal shaking. □, initial absorbance; ■, absorbance after 96 h.

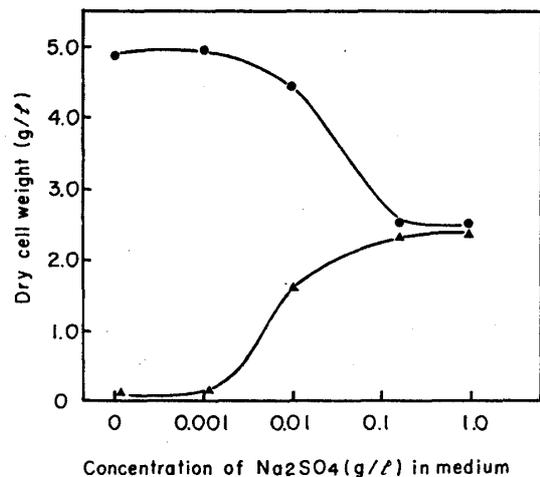


Fig. 3. Effect of lignosulfonate and sodium sulfate on growth of strain 0-7W. Cultural conditions were the same as in Fig. 2.

●, with lignosulfonate; ▲, without lignosulfonate.

における吸光度の約90%以上の値を示した。硫黄化合物の制限下における LS の除去は上述のような経過をたどるが、糸状菌 0-7W を硫酸根を含む培地で培養した場合には、除去される LS の量は著しく減少することが見出された。そこで LS の除去に及ぼす硫黄化合物の影響を硫酸ナトリウムを用いて検討した。その結果を Fig. 2 に示す。培養液中から除かれる LS の量は添加された硫酸ナトリウムの量が 5 mg/l 以下では 280 nm における吸光度の減少量にして 28~30 に達したが、添加量が約 10 mg/l を境に著しく影響され減少した。

しかしながら、十分な硫酸ナトリウムが添加された場合にも少量の LS は培養液から除去され、その量は吸光度の変化にして 5.9 であった。次に生育に及ぼす LS と硫酸ナトリウムの影響をみると、Fig. 3 に示すように培地に LS を含んでいない場合にはほとんど生育が認められず、これに硫酸ナトリウムが添加されると増殖がはじまった。また、その量が 10 mg/l 以上になると良好となり、最終的にはろ別した菌体の乾燥重量は 2.5 g/l に達した。一方、LS を含んだ培地においては、すでに述べたように硫酸ナトリウムを添加することなく生育が認められ、ろ別した黒色の菌体乾燥重量は約 5 g/l であった。しかしながら、硫酸ナトリウムの添加とともに乾燥重量は減少し、おおよそ 2.5 g/l 付近に落ちつくことがわかった。この場合、菌体の着色の程度はかなり薄くなっていた。ところで、さきの Fig. 2 の実験において、280 nm における吸光度の減少量を LS の重量に換算すると $2.5\text{--}0.5 \text{ g/l}$ に相当した。

これらの値をそれぞれの硫酸ナトリウムの濃度において得られた乾燥菌体重量より差し引くと、それらの値は測定したすべての濃度においてほぼ 2.5 g となることがわかった。以上の結果より、糸状菌 0-7W は培養液中の LS を適当な糖類の存在下に菌体に吸着あるいは取り込み、その量は菌体重量にほぼ匹敵すると考えられる量に達する能力を持つことが示された。

最近, Steinitz¹⁴⁾ は LS を唯一の硫黄源として数種の微生物を分離し、これらの菌株の細胞抽出液中に arylsulfatase の活性が存在することを報告している。本研究で示した糸状菌 0-7W による LS の除去現象の詳細については今後の検討を待たねばならないが、本菌株においても類似の酵素の作用によって LS 分子中の硫黄が利用されているのかどうかは興味の持たれるところである。

要 約

硫黄化合物を制限した培地を用いて、リグニンスルホン酸に作用する微生物の分離を試みた。

分離菌株、糸状菌 0-7W は *Penicillium* 属に属すると推定された。本菌株はリグニンスルホン酸を唯一の炭素源として生育することはできなかったが、グルコース 10 g を含む培地において初発濃度 4 g/l (A_{280} , 47.2) のリグニンスルホン酸に作用して、約 96 時間で 280 nm における吸光度の減少量にして 28~30 に相当する量を液中より除去した。この過程で菌体は黒褐色に着色した。除去作用は培地中の硫黄化合物の存在によって著しく影響を受け、硫酸ナトリウムが 10 mg/l 以上の濃度で添加されると除去量は急激に低下し、

0.5 g/l 以上の添加では、無添加の場合に除去される量の 20% 以下となった。

終わりに、本糸状菌の同定に関してご指導いただきました国立衛生試験所真菌室長宇田川俊一博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 原口：化学と生物, **14**, 626 (1976).
- 2) 福住：発酵と工業, **37**, 1041 (1979).
- 3) 廃棄物の処理・再利用編集委員会編：廃棄物の処理・再利用, 350, 技術資料センター, 東京 (1977).
- 4) 猪狩：化学と工業, **31**, 282 (1978).
- 5) Kleinert, T. N., Joyce, C. S.: *Svensk Pappersidn.*, **62**, 37 (1959).
- 6) Ferm, R., Nilsson, A. C.: *Svensk Pappersidn.*, **72**, 531 (1969).
- 7) 東野, 谷, 大野：醸工, **46**, 569 (1968).
- 8) Fukuzumi, T., Nishida, A., Aoshima, K., Minami K.: *Mokuzai Gakkaishi*, **23**, 290 (1977).
- 9) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 10) 百瀬, 向井, 河辺, 鈴木, 山本：分析化学, **11**, 956 (1962).
- 11) 飯塚, 中野, 右田：紙の技術誌 **22**, 455 (1968).
- 12) 宇田川, 椿, 堀, 三浦, 箕浦, 山崎, 横山, 渡辺：菌類図鑑 講談社 東京 (1978).
- 13) Pitt, J. I.: *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*, 235 Academic Press Inc., New York (1979).
- 14) Steinitz, Y. L.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 216 (1981).

(昭57. 5. 7受付)