

## 藻類の粗繊維分画の利用について

田邊幾之助・浜田史郎・大垣昌弘\*・辰巳忠次\*\*

(応用微生物学研究室)

昭和58年8月10日 受理

### Utilization of Algal Crude-Fiber-Fraction

Ikunosuke TANABE, Shiro HAMADA, Masahiro OGAKI\*

and Chuji TATSUMI\*\*

(Laboratory of Applied Microbiology)

#### 緒 言

昭和42年来、微細藻類の応用微生物学的取扱いを目的として微細藻類でん粉の生成<sup>1,7,8)</sup>、藻体蛋白、CGF (Cnlorella Growth Factor) 製造などについて研究を行ってきた。また、アオミドロ (*Spirogyra*) およびアミミドロ (*Hydrodictyon*) などの藻類を利用して、水系から窒素・リンを回収する廃水の三次処理法を検討しているが、増殖した藻体の利用方法の検討も、活性汚泥法での余剰汚泥の問題と同じように急を要する。今回は、これら藻類の藻体を藻パルプとして利用できるかどうかを、また、最近、各地の湖沼で大繁殖し、公害問題にまでなっている沈水植物のオオカナダモ (*Egeria densa*) の藻体利用もあわせ検討したので報告する。

#### 実験と結果

藻類の粗繊維分画の利用を検討するため藻体の増殖は、*Spirogyra setiformis* および *Hydrodictyon reticulatum* を鹿児島大学農学部3号館の屋上で、有効容16lの発泡スチロール製の魚箱を使って半連続的に行った。廃水の二次処理水のかわりに Czurda 培地および側溝の泥抽出液の、いずれも水道水で希釈した1~2%液を使用して好結果であった。また、旧式焼酎蒸溜廃液を活性汚泥処理した水道水活性汚泥上澄<sup>6)</sup>の1/2~1/4の水道水による希釈液でも良好であった。ただ、どの場合も、*Spirogyra setiformis* は生育に必要な未知の因子があって、種培養として、時々、自生のものを使用しなければならなかった。種培養は

*Spirogyra setiformis* の場合、本学獣医学科前、同教養部文系研究棟前などの側溝で、また、*Hydrodictyon reticulatum* は鹿児島市和田町の和田川の浅瀬で採集した。なお、*Egeria densa* は本学指宿植物試験場の池に繁殖しているものを採集し、実験に供した。

まず、アオミドロ *Spirogyra setiformis* は藻体が繊維状なので、粗繊維分画をそのまま藻パルプとして利用することを検討した (Photos 1, 2, 3, および 8)。また、淡水産緑藻で、培養も容易なアミミドロ *Hydrodictyon reticulatum* と南米原産で琵琶湖のほか西日本各地の湖沼で大繁殖し、公害問題をひきおこしているオオカナダモ *Egeria densa* の粗繊維分画の藻パルプとしての利用法をあわせ検討した。*H. reticulatum* はクロロコックス目 *Chlorococcales* に属し、細胞は円筒状で、一目6個の細胞からなる網目状の群体をつくる。さらに、その増殖は一個の細胞の中に網目状の娘群体を形成して行われ、田や水深の浅い池で大繁殖する (Photos 4, 5, 6, 7 および 9)。一方、*E. densa* はトチカガミ科 *Hydrocharitaceae* の沈水植物で、わが国で大繁殖しているのは雄株のみである。

粗繊維分画の調製は食品および飼料の一般分析で用いられる公定法<sup>9)</sup>に準じて行ったが、実用的な調製法として次の二方法でも検討した：①藻体を湿物重量で500gとり、次亜塩素酸ソーダ溶液を有効塩素5~6%となるように加えたのち、70~80℃に加温してから、ろ過し乾燥した。収量は *Sp. setiformis* で乾物重量の約20%であった。これをK-藻パルプとする。一方、②藻体を2~3センチの長さにはさみで切り、2% NaOH 溶液中、室温で24時間放置、次に、水洗したあと、99% ethanol で40~60℃で12時間の脱色を数回行った。これをS-藻パルプとする。なお、こ

\* 大阪府立大学総合科学部

\*\* 摂南大学経営工学科

Table 1. Analyses of the crude fiber fraction of *Spirogyra setiformis*

Fractions	Weight, g	Percentage to dry weight, %	Percentage to the preceding fraction, %
Algal sample	275.43	3,050	
Dry weight	9.0300	100	3.3
Crude fiber fraction	1.5910	17.6	17.6
Hypochlorite-treated fraction	1.2877	14.3	80.9
Insoluble fraction in 17.5% NaOH solution	1.1506	12.7	89.4

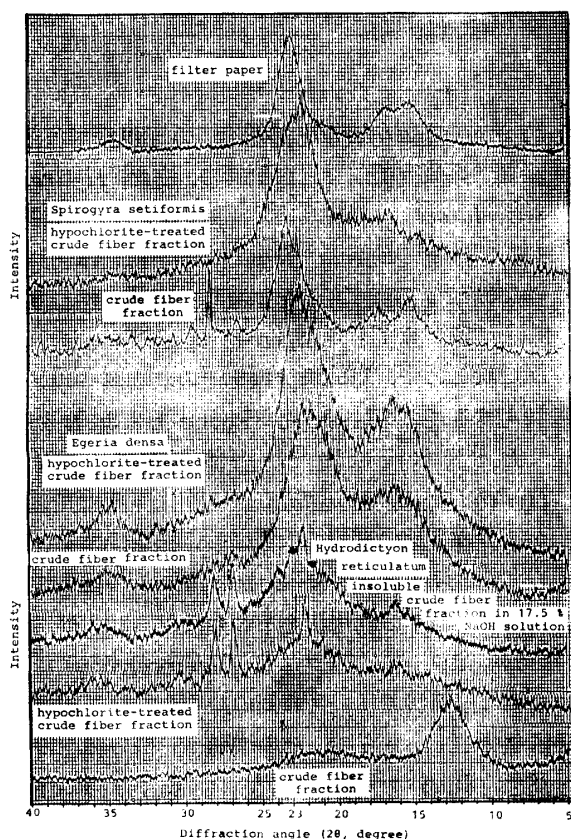


Fig. 1. X-ray diffractograms of algal crude fiber fractions.\*1,2

\*1 X-ray diffractography was carried out under the following conditions: Rate meter, 8; multiplier, 1; time constant, 4; 12.5 mA, 30 kV, target-Cu. Another condition was applied only to "filter paper": Rate meter, 32; multiplier, 1; time constant, 2.

\*2 "Filter paper" was prepared by the same way as the one by which crude fiber fraction of algal sample was prepared. "Hypochlorite-treated crude fiber fraction" was prepared by the treatment of "Crude fiber fraction" with hypochlorite. "Insoluble crude fiber fraction in 17.5 % NaOH solution" was a fraction of "Hypochlorite-treated crude fiber fraction" insoluble in 17.5 % NaOH solution. "Hypochlorite-treated crude fiber fraction" and "Insoluble crude fiber fraction in 17.5 % NaOH solution" are equivalent to cellulose and  $\alpha$ -cellulose fractions, respectively.

ここでは、公定法による粗繊維分画のパルプ漂白法<sup>3)</sup>によって次亜塩素酸処理を行ったものを便宜的にセルロース分画とみなし、これをさらに 17.5% NaOH 溶液に対する溶解度から、 $\alpha$ -セルロース分画と  $\beta$ ,  $\gamma$ -セルロース分画として定量した<sup>5)</sup>。ここで、実用的調製法の①による K-藻パルプは澱粉、蛋白質が両者をあわせて 5~20% 含まれている。しかし、抄紙実験ではこれらが繊維間の結合を助ける働きをするので、表面強度は極めて強く、紙質は非常に良好であった。

*Sp. setiformis* の粗繊維分画の分析は Table 1 に示した。セルロース分画は乾物重の約 14% で、いずれの試料についても再現性があった。また、粗繊維分

画とセルロース分画の X 線回折と赤外線分光分析を行ったが、結果は Fig. 1 および 2 のとおりであった。図中、同様の処理を行った東洋ろ紙 No. 2 の粗繊維分画のそれと比較したが、非常によく似た類型を示した。ろ紙の粗繊維分画はほぼ純粋のセルロースとみなし得るので、*Sp. setiformis* の粗繊維分画がこれとよく似るといえることは、とりもなおさず、ろ紙と *Sp. setiformis* の粗繊維分画が同じ組成と結晶構造をもつと判断できよう。このことは *Spirogyra* の細胞壁はセルロース I が含まれるという Kreger<sup>2)</sup> の報告を裏づけることにもなる。また、赤外分光分析でみると S-藻パルプは K-藻パルプよりはろ紙の粗繊維分画に近

Table 2. Analyses of the crude fiber fraction of *Hydrodictyon reticulatum*

Fractions	Weight, g	Percentage to dry weight, %	Percentage to the preceding fraction, %
Algal wet sample, dried at reduced pressure in a desiccator, equivalent to drying in the shade	79.63	138	
Dry weight	57.8114	100	72.6
Crude fiber fraction	8.1529	14.1	14.1
Hypochlorite-treated fraction	5.2545	9.1	64.5
Insoluble fraction in 17.5% NaOH solution	3.9524	6.8	75.2

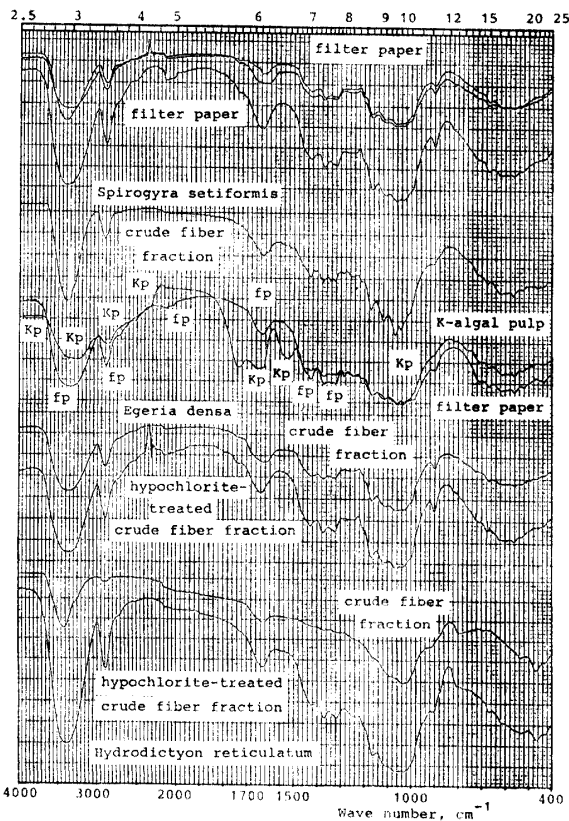


Fig. 2. Infrared spectra of algal crude fiber fractions.\*1,2

\*1 Preparation of algal pulps from *Spirogyra setiformis*:

	Crude fiber fraction g	S-algal pulp g	K-algal pulp g
Wet weight	53.00	54.35	77.68
Dry weight	2.3161	2.3750	3.3946
Algal pulp	0.1293	0.2871	0.7745
Yield, %	5.6	12.1	22.8

Yield: percentage to the dry weight of the sample.

\*2 "Filter paper" is a crude fiber fraction of filter paper prepared by the same way as the one by which the crude fiber fraction of algal sample was prepared. fp: Spectrum of the crude fiber fraction of filter paper. Kp: Spectrum of K-algal pulp.

いが、実用的には K-藻 パルプの方が優れているとのことであった。粗繊維分画はその 72.3% が  $\alpha$ -セルロースで、分画中、17.5% NaOH 溶液に溶解しない成分で、ほぼセルロースに相当する。これを確かめるため粗繊維分画の濃硫酸加水分解物のペーパークロマトグラフィーを行った<sup>5)</sup>。溶媒は n-ブタノール、ベンゼン、ピリジン、水=10:2:5:5(v/v) で、東洋ろ紙 No. 50 にスポットし、二重に展開し、アニリン・フタル酸試薬で発色させた。結果は Fig. 3 に示したが、少量のキシロース、ガラクトースなどを含むものの主成

分はグルコースであり、上述の *Sp. setiformis* の細胞壁の主成分がセルロース I であることを側面的に証明している。

つぎに、*H. reticulatum* の粗繊維分画の分析を行い、Table 2 に示した。粗繊維分画、セルロース分画および  $\alpha$ -セルロース分画の X 線回折と赤外線分光分析を行った。結果は Fig. 1 と Fig. 2 に示したが、結晶構造を証明できなかった。*Sp. setiformis* の場合と同じように、粗繊維分画を加水分解して、ペーパークロマトグラフィーで検討したところ、Fig. 3 で示した

Table 3. Analyses of the crude fiber fraction of *Egeria densa*

Fractions	Weight, g	Percentage to dry weight, %	Percentage to the preceding fraction, %
Wet weight: plant cut by 2 cm, chopped by a mixer, squeezed dry	96.27	1,592	
Dry weight	6.0470	100	6.3
Crude fiber fraction	1.6681	27.6	27.6
Hypochlorite-treated fraction	1.3925	23.0	83.5
Insoluble fraction in 17.5% NaOH solution	1.2701	21.0	91.21

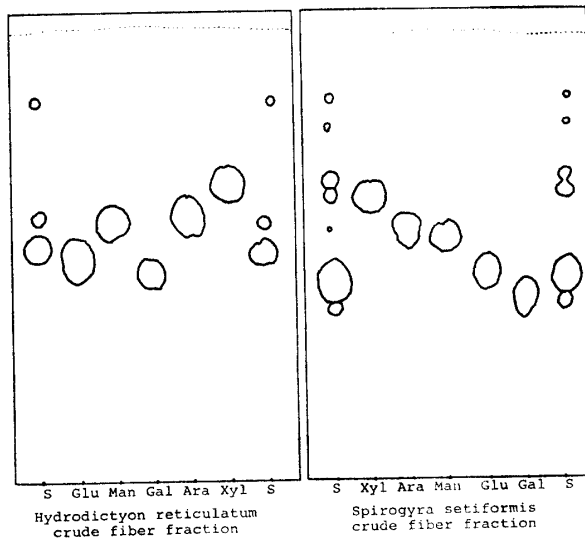


Fig. 3. Paper chromatograms of the hydrolyzates of the crude fiber fractions of *Spirogyra setiformis* and *Hydrodictyon reticulatum*.<sup>\*1,2</sup>

\*1 Solvent system: n-butanol/benzene/pyridine/water = 10:2:5:5(v/v), double ascending development.

\*2 S: sample. Glu: glucose. Man: mannose. Gal: galactose. Ara: arabinose. Xyl: xylose.

ように、成分はグルコースを主とするものの副次的にマンノースが検出されており、*H. reticulatum* の細胞壁はセルロースとポリマンノースを等量含むという報告<sup>4)</sup>と符号している。また、赤外線分光分析の結果では、ろ紙の粗繊維分画と類似したパターンであったが、抄紙実験では紙原料としては不向きであるとの結論であった。

*E. densa* は茎をはさみで2センチの長さに切り、水を加えてミキサーで2分間粉碎したものを試料とした。これまでと同じような処理をして *E. densa* の粗

繊維分画を調製した。分析値は Table 3 に示したが、これによると  $\alpha$ -セルロース分画が乾物重量の約 22% と高く、X線回折と赤外線分光分析の結果も多少の期待をいだかせたが、粗繊維分画での抄紙実験では、原料として、このままでは不適であるということであった。

#### 要 約

アオミドロ *Spirogyra setiformis*, アミミドロ *Hydrodictyon reticulatum* およびオオカナダモ *Egeria densa* を活性汚泥法処理水の三次処理と藻体生産を目的に研究を行っている。

今回は、*Spirogyra setiformis*, *Hydrodictyon reticulatum*, および *Egeria densa* の藻体の粗繊維分画を藻パルプとして利用することの可能性を検討した。X線回折、赤外線分光分析、加水分解物のペーパークロマトグラフィー、および抄紙実験によって検討したが、*Spirogyra setiformis* の粗繊維分画のみがパルプ原料として適していることが明らかとなった。

謝辞 本研究の化学分析にあたり、懇切な御助言をいただいた本学農学部林学科の北川謙治助教授に、またX線回折の操作上、親切な御教示をいただいた本学農学部農芸化学科の宮内信文助教授に、それぞれ深く感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Kobayashi, T., Tanabe, I. and Obayashi, A.: On the Properties of the Starch Granules from Unicellular Green Algae. *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 941-946 (1974)
- 2) Kreger, D.R.: New Crystallite Orientations of Cellulose I in *Spirogyra* Cell-walls. *Nature*, **180**, 914-915 (1957)

- 3) 京都大学農学部農芸化学教室：新改版農芸化学実験書，第二卷，p. 522-523；第三卷，p. 1217-1243，産業図書，東京（1967，1963）
- 4) Lewin, R.A.: Physiology and Biochemistry of Algae, 19 Cell Walls (Kreger, D.R.), p. 315-335, Academic Press, Inc., New York (1972)
- 5) 右田伸彦・米沢保正・近藤民雄：木材化学，下巻，10 木材分析，p. 1-31，共立出版，東京（1968）
- 6) Tanabe, I., Fujii, M., Kamimura, Y., Yoshii, S., Kuboyama, H., Nagata-Maehara, T., Kawaji, H. and Sonoda, T.: Studies on the Biological Treatment of the Shôchû-Distiller's Slops by the Sea-Water Activated Sludge. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **15**, 131-143 (1979)
- 7) Tanabe, I., Kobayashi, T., Dent, D.F., Meiki, S. and Obayashi, A.: Isolation of Heterotrophic Microalgae. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **8**, 9-25 (1972)
- 8) 田邊幾之助・滑川修吾・佐藤(二階堂)和代・小林武一・大垣昌弘・辰巳忠次・渡邊 篤：微細藻類からの澱粉粒の回収について。鹿大農学術報告，No. **32**, 79-86 (1982)

### Summary

For the realization of the tertiary treatment of effluents from the activated sludge plant and the possible production of algal biomass, some investigations are under way on *Spirogyra setiformis*, *Hydrodictyon reticulatum*, and *Egeria densa*.

Of the crude fiber fractions of the algae, the possible availability for algal pulp was investigated. The investigation was carried out, making use of the X-ray diffractography, infrared spectra, paper chromatography of the hydrolyzates of the algal crude fiber fractions, and the paper-making test. Suitability for pulp material was ascertained only concerning the crude fiber fraction of *Spirogyra setiformis*.

**Photos**

- Photo 1. Trichomes of *Spirogyra setiformis*, cultivated stationarily.
- Photo 2. Rod-shaped cells of *Spirogyra setiformis*, cultivated under aeration.
- Photo 3. Zygotes of *Spirogyra setiformis*, formed in continuous cultivation at the beginning of October.
- Photo 4. Net of *Hydrodictyon reticulatum*, consisting of innumerable hexangles, each of which includes six rod-shaped cells.
- Photo 5. Fresh net of *Hydrodictyon reticulatum*.
- Photo 6. Adult-cells in net, and a fragment of small net.
- Photo 7. A mother cell, which is going to produce a daughter net.
- Photo 8. Continuous outdoor cultivation of *Spirogyra setiformis*.
- Photo 9. Continuous cultivation of *Hydrodictyon reticulatum* at the window.

