

## 有機系廃液の資源化技術

\*新井 孝昭, 平田 光男 (応用分子化学科)

## 1. 緒論

光合成細菌はし尿や豆腐工場廃水などの処理施設に利用され、その有効性が明らかにされている。特に、酢酸などの低級脂肪酸を有効な炭素基質として生育するため、その機能を利用した BOD 低減効果は価値が高い。しかし光合成細菌の利用価値は廃水処理だけではない。光合成細菌は、その育成のために行う代謝過程において、人類にとって有用な様々な物質を生合成している。その中でも、現在化学合成によって生産され、市場に供給されている物質のコストダウンが期待できるものも少なくない。その代表としては、生分解性プラスチック材料となるポリ-β-ヒドロキシブチレート (以下 PHB)、濃度によって除草剤と植物成長促進物質の使い分けが可能な 5-アミノレブリン酸 (以下 ALA)、抗癌剤としての利用が期待されるポルフィリンなどがあげられる。これらの物質は、その有効性は認められているものの、コスト高の問題から市場への定着度は薄い。その問題点であるコストダウンの手段の一つとして、光合成細菌は利用価値があると考えられる。このような物質の生産と廃水処理を同時に行うことのできるシステムが構築されれば、環境汚染問題やエネルギー問題などの解決策の一つとなり得る。前述のように、廃水処理設備への利用は実績を残しているため、処理と生産の融合システムの構築を目指す上で、物質生産に関する基礎知見の獲得が必要不可欠となる。光合成細菌の生育や代謝産物生産に影響を与える環境因子は、培地成分、光照射条件、温度、pH など様々である。

そこで本研究では、まず光合成細菌の有効な炭素源である有機酸に着目し、有機酸を単独で与えたときの有機酸種およびその濃度による影響について検討を行った。廃水処理との融合を視野に入れると、様々な物質が存在する複雑系への拡張が望まれるため、次いで有機酸 2 種混合系についても検討した。

## 2. 実験

供試菌体として、紅色非硫黄性光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* NR3 株を用いた。培養条件は、嫌気-明条件 (アルゴン雰囲気下、光強度 10 klux)、303K、pH 7.5 とした。培地には、炭素源基質として酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸を単独ないし 2 種混合したものを、また窒素源基質としてグリシンを添加した。炭素源基質は添加濃度や混合比率を変化させて添加し、窒素源基質であるグリシンは全実験系に対して  $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  とした。このような条件で培養を行い、その培養液を経時的にサンプリングし、分析に供した。このサンプルから、菌体量の指標として波長 660 nm における光学濁度 (Optical Density at 660 nm = O.D.<sub>660</sub>) の測定、培地中の有機酸および PHB 菌体内蓄積量 (クロトン酸換算) の高速液体クロマトグラフィによる定量、ALA およびポルフィリン菌体外分泌量の比色法による定量を行った。

## 3. 結果および考察

## 3-1 有機酸単独系

低級有機酸である酢酸、プロピオン酸、酪酸、乳酸の 4 種を任意の濃度で培地中に添加し、培養を行った。

酢酸添加系は、培養開始時から 48 時間後程度までに酢酸の取り込みが停止した。最終的な酢酸消費量は、 $80 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  添加系で最大かつ極大をとった。菌体量に関しても同様な傾向が見られたため、酢酸濃度  $80 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  付近が至適濃度であると思われる。菌体への物質の取り込みには、菌体内外の濃度勾配が影響する。しかし濃度が高すぎると生育などに阻害作用がおこるとも報告されている。酢酸添加系において、そのバランスが最もとれていたのが  $80 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  添加系であったと推測される。PHB 生成量は、菌体量に大

大きく依存する傾向が見られた。そこで、単位菌体量 (O.D.<sub>660</sub>=1.0) あたりの PHB 生成量を算出したところ、ほぼ同様の値を示した (図 1)。よって酢酸添加濃度は PHB 生合成経路に大きな影響を与えないと考えられる。酢酸から PHB への変換効率は、60%前後と高効率を示した。これは、酢酸が PHB 合成の先駆体となるアセチル CoA へ容易に代謝されるためであると推察される。

酢酸は、菌体内への消費も速やかで生育や PHB 合成に大きく関与していたものに対して、プロピオン酸と酪酸は、消費量も少なく、菌体増殖や代謝産物量もあまり多くなかった。この両者が菌体内へ積極的に取り込まれなかったのは、メチレン鎖の増加による疎水性の上昇に伴っていると考えられる。そこで、物質の菌体内への取り込みに対する分子構造の影響について検討を行った。炭素源基質として、モノカルボン酸であるプロピオン酸 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ) と酪酸 ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ )、そしてジカルボン酸であるコハク酸 ( $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) を各  $20\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ずつ添加したときの菌体内への消費挙動を図 2 に示す。分子の大きさは、プロピオン酸<酪酸<コハク酸の順であるため、菌体内への取り込みが大きさだけに支配されているならば、プロピオン酸>酪酸>コハク酸の順に消費されやすくなる。しかし実際は、コハク酸>プロピオン酸>酪酸の順であった。コハク酸はジカルボン酸であるため、親水性のカルボキシル基の効果によって、モノカルボン酸である他の 2 種よりも消費に優位であったと考えられる。細胞膜は脂質 2 重層で形成されていて、極性部分を外側に向けているため、細胞膜表面での物質の近づきやすさがこのような挙動をとる要因になったと推察される。菌体内への消費に問題があったプロピオン酸、酪酸は代謝産物生産において興味深い結果が得られた。プロピオン酸は炭素源基質としてではなく、ポルフィリン代謝における ALA 脱水酵素の阻害剤としての役割に注目した。通常ポルフィリン代謝は、最終生成物によるフィードバック阻害で厳密の制御されている。しかし ALA 脱水酵素を阻害し、フィードバック阻害を解除することで、ALA 生成の割合が高くなることが報告されている<sup>2)</sup>、<sup>3)</sup>。ALA 脱水酵素の阻害剤としては、レブリン酸を用いているものが多く報告されているが、プロピオン酸にもこの効果が期待できる。プロピオン酸添加系において、ALA およびポルフィリン (ALA8 分子と換算) の菌体外分泌量の総量 ( $\text{ALA}_{\text{TOTAL}}$ ) における ALA の割合を算出すると、最大で約 90% になった (図 3)。酢酸添加系の 10% 前後と比較すると、かなり高いといえる。光合成細菌の中には、プロピオン酸に生育阻害作用を受けるものも存在することが示唆されているので、炭素源基質としてではなく、このような添加剤としての利用が期待される。酪酸は PHB 変換効率が高く、 $5\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  添加系

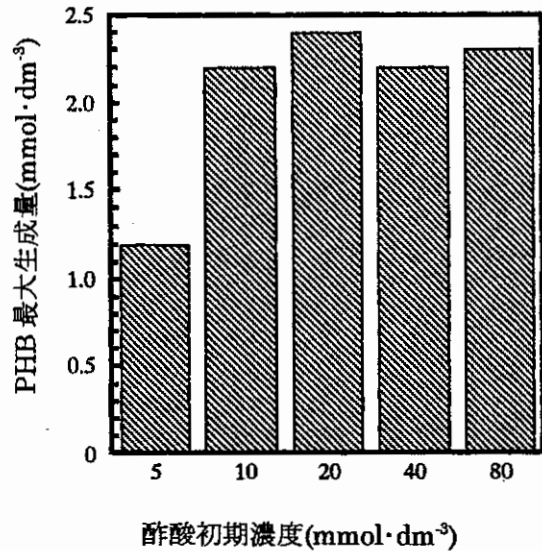


図 1 単位菌体量当たりの PHB 生成量

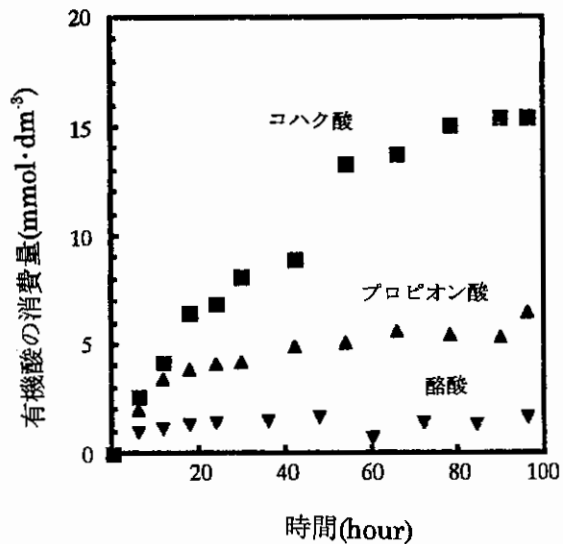


図 2 有機酸消費量の比較

では酢酸と同様の 60% 近い変換効率を示した。菌体への消費を促進することができれば、PHB の生産の有効な原料となり得る。

乳酸の菌体内への消費は、酢酸に次ぐ良好なものであった。これは、親水基であるヒドロキシル基の存在に起因すると思われる。PHB の合成では酢酸に次ぐ生産性を示し、ポルフィリンの菌体外分泌量は今回用いた有機酸の中で最も優れていた。このことから、PHB とポルフィリン代謝生産物の同時生産を試みるには最適であると思われる。

### 3-2 有機酸 2 種混合系

前節で用いた有機酸 4 種から 2 種を選択し、両有機酸の合計が  $20\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  となるように添加し、培養を行った。

酢酸-プロピオン酸系では、酢酸  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  : プロピオン酸  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  添加系で、有機酸から PHB への変換効率が最大値 (83.3%) を示した (図 4)。他の実験系では、酢酸添加量の増加にともなって PHB 変換効率が上昇する傾向が見られた。微生物における代謝は複雑に絡み合っているため、与える基質の添加量と代謝産物生成量の間には単純な量論的關係が成立するとことは考えにくい。酢酸とプロピオン酸は代謝経路が異なるため、両者の代謝バランスが酢酸  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  : プロピオン酸  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  添加系で PHB 生合成に対して最適であったと推測される。酢酸-酪酸系における PHB 変換効率も、前後の傾向に反して酢酸  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  : 酪酸  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  添加系が高効率を見せたため、有機酸混合系における代謝バランスは、添加濃度あるいは添加比率によって制御可能であることが示唆され、代謝産物生産の大幅な向上に寄与することが期待される。

酢酸-乳酸系では、酢酸添加濃度増加にともなった乳酸消費速度の減少が見られた。培養初期における酢酸消費速度は全実験系で同様であったのに対して、乳酸消費速度にはこのような酢酸濃度に依存した減少傾向が見られたことから、酢酸と乳酸の間に菌体への取り込みに対する競争関係があると推察される。また両基質の消費量は、他の存在によって減少する傾向が見られた。酢酸と乳酸は代謝経路上で近接しているため、代謝への量的関与が類似する可能性がある。そこで、酢酸および乳酸消費量の合計を算出した (図 5)。その結果、全実験系の値が類似したため、酢酸と乳酸は光合成細菌の代謝において同様の役割を持つことが示唆される。PHB 生産量は、酢酸  $20\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  : 乳酸  $0\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  添加系、15 : 5 添加系、10 : 10 添加系の三者の最大値が同様な値を示した。しかし最大となる時間は、それぞれ 18 時間後、24 時間後、96 時間後と異なっていた。最も PHB 生成に関与しやすいと思われる酢酸が 1 : 1 以上の割合を占めることが前提であるが、乳酸添加率の増加にともなう PHB 生産量の減少は見

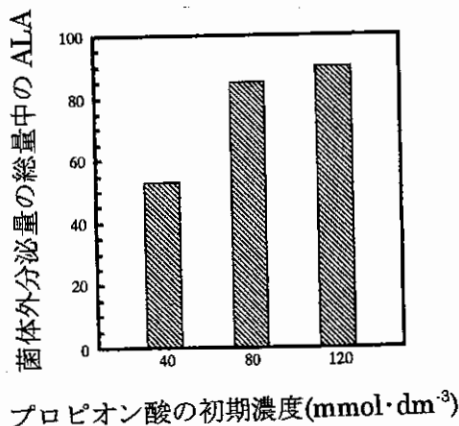


図 3 プロピオン酸添加における菌体外分泌量の総量中の ALA

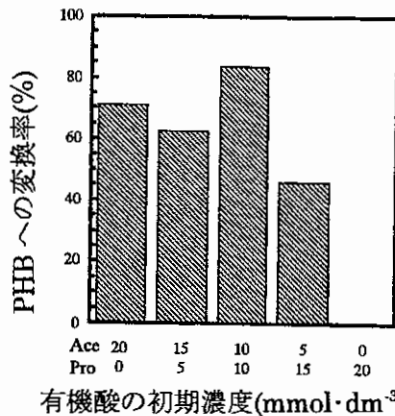


図 4 酢酸(Ace)/プロピオン酸(Pro)比と PHB への変換

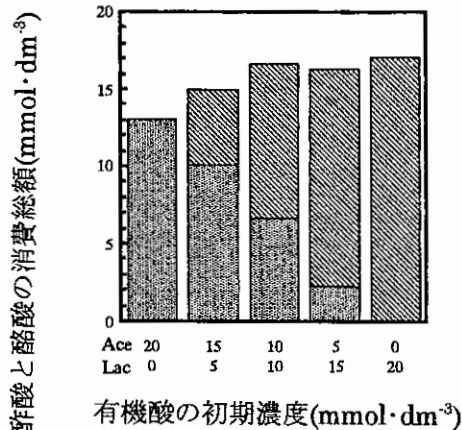


図 5 酢酸(Ace)/酪酸(Lac)比と消費総額の比較

られなかった。酢酸主導でなければならない原因として、乳酸から PHB 生合成の前駆体となる CoA への代謝過程に律速段階となる反応が存在することが考えられる。その律速段階によって、PHB 生合成の条件であるアセチル CoA 過剰状態になりにくくなるため、速やかにアセチル CoA に代謝される酢酸が多く含まれていないと PHB 生合成への関与が小さくなると推察される。酢酸-乳酸混合系では、両炭素源基質の組成を操作することによって、PHB 生成量および PHB 変換効率ともに減少させることなく PHB 生成速度を制御できることが示唆された。

#### 4. 結論

4 種の炭素源基質の単独系および 2 種混合系における代謝産物生産について検討した結果、各炭素源基質の代謝への関わり方が明かとなった。特に、2 種混合系の挙動は興味深く、今後 3 種混合系、多種混合系への拡張が望まれる。本研究より、光合成細菌を培養する際に用いる培地中の炭素源基質を操作することによって、代謝産物、特に PHB 生合成への制御が可能であることが示唆された。

#### 5. 参考文献

- 1) 北村博ら, *光合成細菌*, 学会出版センター, p. 112(1984)
- 2) Beal, S. I. et.al., *Plant physiol.*, 53, 291(1974)
- 3) Jaenchen, R., et. al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 12, 167(1981)