

消化工程より分離した菌体の代謝活性による有機酸生成能力の検討

日大生産工 ○大木 宜章 小森谷 友絵 神野 英毅
日大生産工（院） 木科 大介

1. はじめに

地球温暖化対策として資源循環型社会の一方策としてバイオエネルギーへの変換技術の開発が高まっている。我が国では資源エネルギー庁を中心として、2005 年 2 月発効された京都議定書の世界的な CO₂ 削減による対策としての取り組みがされている。

このような流れの中で 2007 年、時の首相の指示により国産バイオエネルギーの生産拡大に向けた工程表が作成されている。この目標値として 2010 年までに原油換算 50 万 kl(エタノール換算 76 万 kl)を挙げているが、生産量はせいぜい 40 万 kl 程度と見込まれている。さらに 2030 年までに 360 万 kl(エタノール換算 600 万 kl)としている。この目標が困難であることはバイオエネルギー変換技術などの技術的な面も含め商業化には 10 年程度の年数が必要とされるといわれる。

本研究は第 1 プロジェクトの協力により国家的プロジェクト開発の促進を計るべく、エネルギー変換技術での有機・無機的要因の現象解明を行うものである。

本報告では消化工程より生物化学的に分離同定した菌体を純培養し、各菌体の増殖能力および代謝生成物について比較検討を行った。

2. 実験概要

Fig. 1 に実験概要図を示す。本実験は大きく 2 段階に分けられる。Step1 では菌体の分離・同定の結果を、Step2 では分離した菌体の純培養による代謝活性能力の比較検討を行った。

2. 1 消化工程における菌体の分離・同定(Step1)

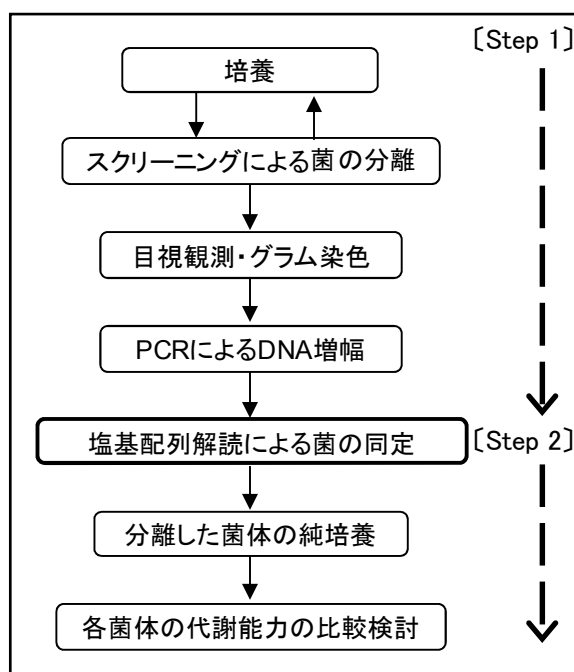


Fig. 1 実験概略図

Step1 での菌体は消化工程における槽内の種汚泥をサンプルとした。培地には非選択性の LB、GAM、BHI、GYP を用いた。まず、寒天により減菌シャーレに固定した培地表面にサンプルを塗布し、35℃の恒温槽で 3、4 日嫌気培養した。その後、増殖した菌体ごとに新たな培地に塗布(スクリーニング)し嫌気培養した。これを 3~4 回繰り返し、菌体の分離を行った。分離した菌体は菌体集合群(以後、コロニーと称す)およびグラム染色後の菌形状を顕鏡観察で行った。

次に、塩基配列解読のための DNA の増幅を目的に PCR を行った。PCR 法の手順として、まず ISOIL(ニッポンジーン)により分離した菌体から DNA の抽出を行ない、これをサンプルとして、

サーマルサイクラーにより DNA 増幅を行った。
 なお、増幅でのプライマーは全細菌に特異的な
 16SrRNA ユニバーサルプライマー 27f および
 800r を用いた。PCR 条件は 94℃5min+(94℃
 30sec-50℃30sec-72℃60sec)×35 サイクル+
 72℃6min である。PCR 産物は DNA 精製キット
 (QUIAGEN)を用いて精製した後、1.5%アガロ
 スゲル電気泳動により DNA バンドの確認および
 分光光度計を用いて DNA 濃度の測定を行った。
 この PCR 精製産物にシーケンス反応用の PCR を
 行った後、遺伝子解析システム(BECKMAN 社
 製:CEQ8800)により塩基配列の解読を行った。解
 読した塩基配列は相同性検索プログラム
 [DDBJ : BLAST]を用いて、相同性の高い既知種
 を検索し菌の同定を行った。なお分離した菌体は
 2 倍に希釈した GAM 高層軟寒天培地に菌体を穿
 刺接種し、35℃で嫌気培養の後、4℃まで落とし
 菌体の代謝活性を低下させた状態で保存した。

2. 2 純培養による比較検討(Step2)

[分離した菌体の純培養]

消化工程より分離した菌体は代謝能力の比較を
 すべく、菌の純培養を行った。まず、冷蔵保存し
 た培地より菌体を活性化し、その後寒天培地にて
 平板培養を行った。なお、培地には嫌気性菌の培
 養に有効であり本実験においても各菌に培養実績
 があることから GAM 培地を用いた。培地成分を
 Table1 に示す。3 日後、増殖したコロニーから釣
 り菌を行い、この菌をねじ口試験管(15ml)で液体
 培養をした。ここで、分光光度計により培養液の
 吸光度を測定し、各菌の増殖曲線の確認を行った。
 この増殖曲線から、各菌の植菌最適期間で拡大培
 養を行った。培養は遮光状態の嫌気条件下 35℃で
 行った。次に実験に用いるための菌量の確保のため、
 15ml の液体培地にて増殖した菌体全量を
 250ml の GAM 液体培地に植え継ぎ、培養した。
 培養した菌体懸濁液体培地を 9000×g、30min の
 条件で遠心分離し沈殿した菌体を集菌しこれを用
 いた。

[各菌体の代謝能力の比較検討]

Fig.2 に実験装置図を示す。GAM 液体培地 250ml

Table 1 培地成分

GAM培地 (g/ℓ)	
Pepton	10
Soybean Peptone	3
Proteose Pepton	10
Digestive Serum powder	13
Yeast extract	5
Meat extract	2.2
Liver extract powder	1.2
Glucose	3
NaH ₂ PO ₄	2.5
NaCl	3
Soluble Starch	5
pH	7.2

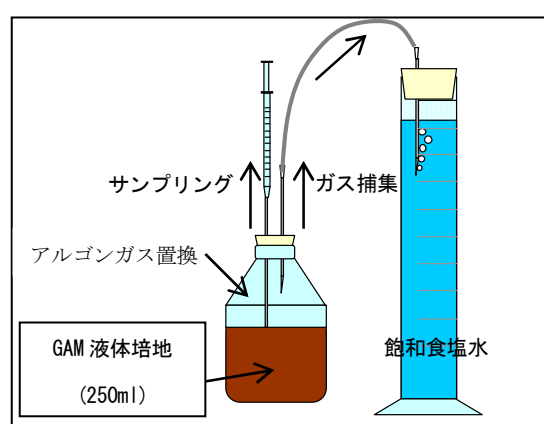


Fig. 2 実験装置図

のいったねじ口びんに植菌した。菌量は 250ml 液
 体培地によって増殖した量とした。これを 2 本の
 注射針を突き刺したシリコン栓で密閉した。注射
 針の先端は 1 本が液相部に、片方が気相部に到達
 しておりサンプリングとガス回収のためである。
 なお気相部アルゴンガス置換により内部を嫌気状
 態に保持した。サンプリングは 12 時間おきに行い
 発生するガスの分析および培地の有機酸生成割合
 を GC および HPLC により測定した。

3. 結果および検討

3. 1 消化工程における菌体の分離・同定(Step1)

消化工程における菌体の分離・同定結果および
 サンプル中で最も相同性の高かった塩基数を
 Table2 に示す。現段階で 16 のサンプルにおいて
 塩基配列の解読を行った。その結果各サンプル
 600bp(98%)以上と高い精度で 5 種類の菌体の分

離・同定が行えた。また本実験により分離された菌は *Clostridium* 属が多く、酸生成菌として考えられる *Bactericides* 属や *Lactobacillus* 属などの菌は得られなかった。

3. 2 純培養による比較検討(Step2)

Fig.3 に吸光度の経時変化を示す。菌が増殖すると培養液は懸濁する。つまり吸光度の値は菌の増殖を示していることになる。結果より、各菌体の増殖速度には差異がみられた。Cbi は最も増殖が早く植菌直後から増殖し、6 時間目には定常期になった。Cbu および Cca は 15 時間目をピークに定常期となった。Stp は増殖期の時間が最も長く、27 時間後に定常状態となった。また、誘導期が長かった菌は Csa で 15 時間費やしたが、増殖期は 6 時間で、他の菌に比し最も短かった。この結果から、各菌とも 24 時間後には増殖を終え定常期に入ったといえる。したがって、効率的な拡大培養のための植え継ぎ期間は余裕をみて 2~3 日必要とする。

Fig.4 に消化工程における装置内での有機酸濃度の経時変化を、Table3 に消化工程から分離・同定した [1] ~ [5] までの菌体を用いた培養 48 時間後における培養液内の有機酸濃度を示す。Fig.4 より、消化工程において最も生成されている有機酸は乳酸であるが、乳酸を主生成物とする菌はみられなかった。Table3 の結果から、今回分離した菌体の中に消化工程の優占菌はなかったといえる。

Fig.5 に各菌体の有機酸濃度経時変化を示す。グラフより、Cca、Cbi および Stp は初期段階より有機酸濃度の増加が見られたが、Cbu は 12 時間後に、Csa は 24 時間後から生成が行われた。また、生成される有機酸の割合は各菌体によって異なり、Cbu はギ酸、酢酸、酪酸、Cca は酢酸、酪酸の他、酪酸、乳酸、クエン酸など 7 種類の有機酸であった。また、Csa はプロピオン酸、Cbi および Stp は酢酸、プロピオン酸の生成がみられた。なお、有機酸の総生成量は Cbi が 0.039mol/l と最も多く、最も少なかったのは Stp の 0.015mol/l であった。

Table 2 消化工程における菌体の分離・同定

No. 略号	最近縁種	相同性の高かったサンプルの相同塩基数
[1]Cbu	<i>Clostridium butyricum</i>	709/712(99%)
[2]Cca	<i>Clostridium cadaveris</i>	712/723(98%)
[3]Csa	<i>Clostridium sartagoformum</i>	626/631(99%)
[4]Cbi	<i>Clostridium bifermentans</i>	709/718(99%)
[5]Stp	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	712/723(98%)

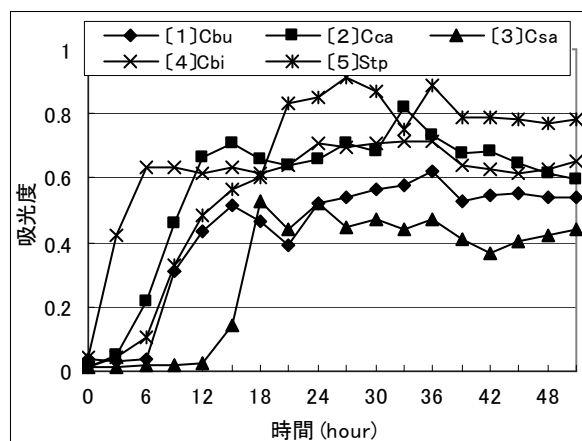


Fig. 3 吸光度の経時変化

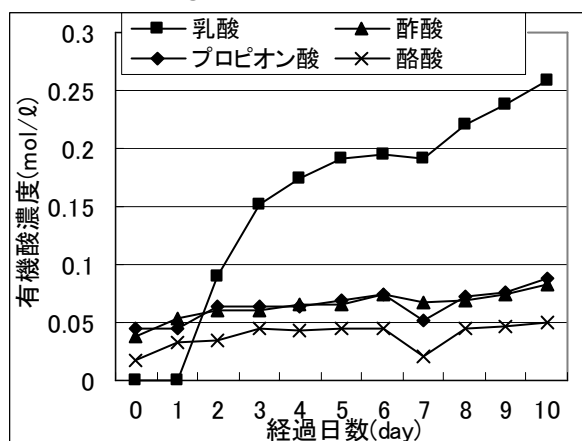
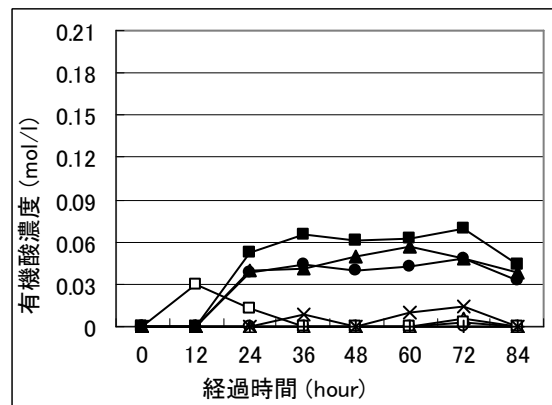
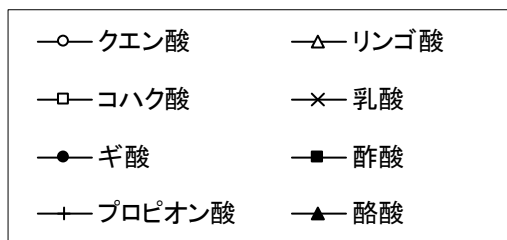


Fig. 4 消化工程における装置内の有機酸濃

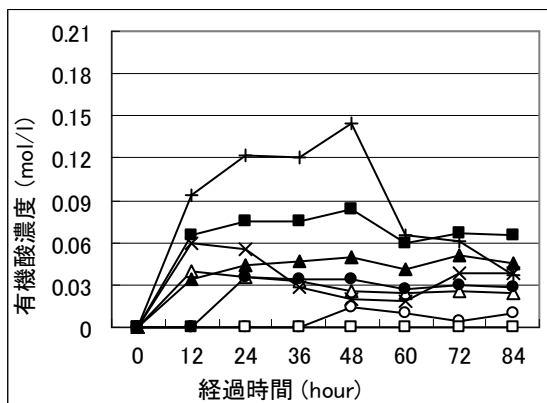
Table 3 分離・同定した菌培養 48 時間後の有機

	[1]Cbu	[2]Cca	[3]Csa	[4]Cbi	[5]Stp
クエン酸	-	0.015	-	-	-
リンゴ酸	-	0.026	0.004	-	0.025
コハク酸	-	-	0.045	-	-
乳酸	-	0.020	-	-	-
ギ酸	0.040	0.035	0.330	0.043	0.030
酢酸	0.061	0.083	-	0.139	0.067
プロピオン酸	-	0.145	0.153	0.159	0.015
酪酸	0.050	0.050	-	0.044	-

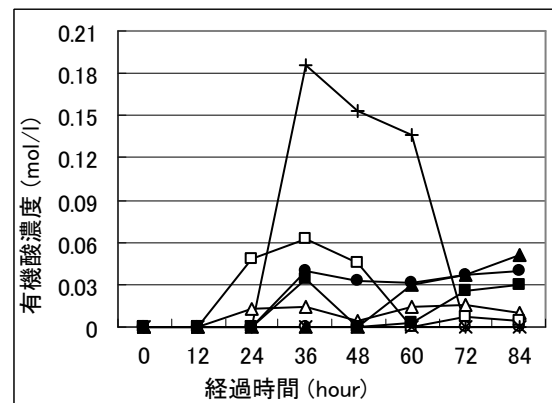
(mol/l)



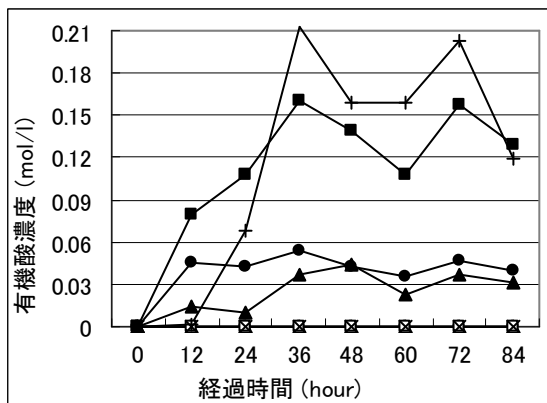
[1] Cbu *Clostridium butyricum*



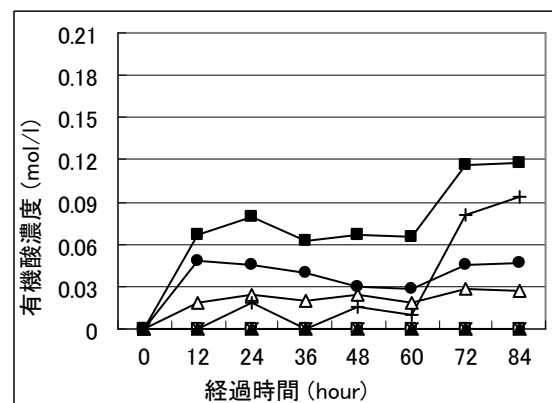
[2] Cca *Clostridium cadaveris*



[3] Csa *Clostridium sartagoformum*



[4] Cbi *Clostridium bifermentans*



[5] Stp *Staphylococcus epidermidis*

Fig. 5 有機酸濃度の経時経過

発酵工程の槽内における HPLC の結果では、各有機酸の分解速度は差異がみられ、酢酸が最も早く、次いで乳酸、プロピオン酸となっており、逆に酪酸は最も遅い分解速度となっている。このことから、現段階において分離した菌体のなかでは酢酸、プロピオン酸を多く生成している [4] *Clostridium bifermentans* が優先菌であるといえる。

4. まとめ

- 1) Step1 での菌体の分離同定の結果、現段階までで 5 種類の分離が行えた。また分離した菌体は、*Clostridium* 属が多いものであった。
- 2) 純培養による実験から、各菌体の増殖能力および有機酸生成には差異がみられた。また、発酵工程における有機酸分解速度から、現段階において消化工程における優先菌を *Clostridium bifermentans* とした。