

II-478

高温嫌気性セルロース分解菌のセルロース分解特性

北海道大学工学部 ○学生員 田中 秀昌 正員 清水 達雄
工藤 憲三 正員 那須 義和

1. はじめに セルロース性廃棄物は嫌気性微生物を用いると分解処理できると同時にアルコール、有機酸、メタンガス等の有用物質への変換も可能である。そこで本研究では、嫌気性微生物を用いて、セルロース性物質を処理するとともに有用物質を生産するための基礎的知見を得ることを目的として、高温嫌気性セルロース分解菌（増殖に対する最適温度73℃）の連続培養を行い、増殖速度、セルラーゼ生産性、セルロース分解および生産物生成特性などについて検討した結果を報告する。

2. 実験装置および方法 図-1に示すケモスタット型培養槽を用いて、セルロース分解菌（名古屋大・工学部・化学工学科・小林研究室より分譲）を嫌気条件下で連続培養した。培養槽、培地供給槽、pH調整液槽は絶対嫌気状態を維持するために、還元カラムを通過した二酸化炭素あるいは窒素ガスで槽内を置換し、

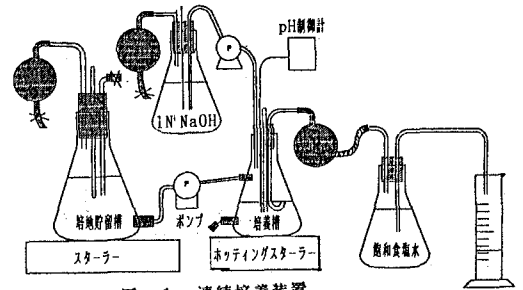


図-1 連続培養装置

表-1 培地組成 (per liter)

さらに微量残存する酸素を還元剤（ $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ および $\text{L-cysteine}\cdot \text{HCl}\cdot \text{H}_2\text{O}$ ）を用いて完全に除去し。また培養系にブチルゴム風船を接続し、加圧状態で培養を行い、外部からの酸素の混入を完全に防止した。培地はマイクロチューブポンプを用いて間欠的に供給し、培養液はガスとともに連続的に排出させた。pHはpHコントローラによって6.5～7.0に制御し、培養温度を73℃に保持した。連続培養に用いた基本培地の組成を表-1に示す。

$\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4.2g
KH_2PO_4	1.5g
Na_2CO_3	4.0g
NH_4Cl	0.6g
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4g
Yeast extract (Difco)	1.0g
Bacto tryptone (Difco)	1.0g
$\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2mg/100ml solu.)	20ml
Wolfe's modified mineral elixer	50ml
Vitamin solution	10ml
glucose or cellulose	10gl
Resazurin·Na (0.1% solu.)	1ml
L-cysteine·HCl·H ₂ O (5% solu.)	4ml
$\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (5% solu.)	4ml

3. 実験結果 嫌気性セルロース分解菌を絶対嫌気性条件下で、グルコースおよびセルロースを炭素源（流入濃度約10,000mg/ℓ）として供給し、約2ヶ月間連続培養を行い、定常状態の値を用いて、増殖および分解特性に関して検討を行った。セルロースおよびグルコースを制限基質としたいずれの培養系についても、滞留時間10時間以上では残存セルロースおよびグルコース濃度は600～700mg/ℓで、その分解率は90%以上であった。しかし平均滞留時間を10時間以下に短縮すると急激に残存濃度が増加した（図-2）。以上の結果から本菌の最大比増殖速度はおおよそ0.1hr⁻¹であり、セルラーゼの生産は増殖連動型であると考えられた。また本菌によって生産されるセルラーゼはその大部分が菌体あるいはセルロースに付着されていることが明らかになった（図-3）。培養系におけるセルラーゼ濃度およびセルラーゼ生産性はWash out pointまで平均滞留時間が短縮さ

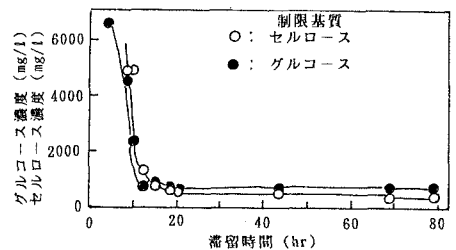


図-2 滞留時間と残存セルロース濃度あるいは残存グルコース濃度との関係

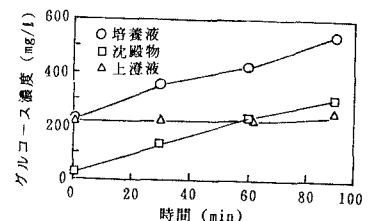


図-3 セルラーゼ活性

れるに伴って増加した。次に本菌のセルロース分解能に関して検討を行った結果（図-4）、最大総括セルロース分解速度は $17,000 \text{ mg} / \ell \cdot \text{day}$ （最大比セルロース分解速度； $1.72 \text{ mg cellulose} / \text{mg} \cdot \text{cell} \cdot \text{hr}$ ）であり、極めて高いセルロース分解能を有することが明らかになった。次に菌体増殖に関して実験的検討を行った結果について述べる。連続培養系における菌体濃度は流入セルロース（濃度 $9,000 \sim 10,000 \text{ mg} / \ell$ ）がほとんど分解されたにもかかわらず高々 $500 \sim 600 \text{ mg} / \ell$ であり（図-5）、見かけの増殖収率は小さい値であった。またその増殖収率は比増殖速度に依存し、比増殖速度が小さくなるに従って減少した（図-6）。この結果は本菌の維持代謝係数が非常に大きく（表-2）、高温細菌の特徴を示している。表-2に連続培養実験から求められた本菌のセルロース分解に対する動力学定数を示しておく。以上の結果から高温嫌気性セルロース分解菌を用いて、セルロース性物質を処理する場合、菌体およびセルラーゼをリアクター内に高濃度に保持できる膜型バイオリアクターを採用すると高速処理が可能であることが明らかになった。セルロースおよびグルコースの分解に伴う生産物は主として酢酸であり（図-7）、エタノールもごく少量生産された。酢酸の収率は約30%であった。

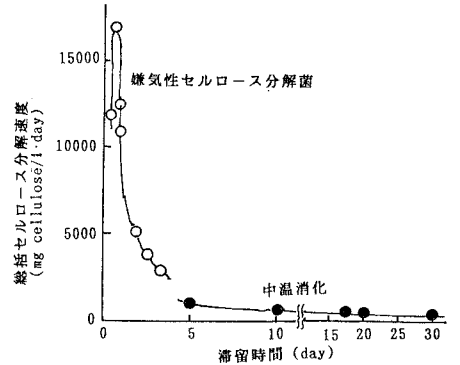


図-4 滞留時間と総括セルロース分解速度との関係

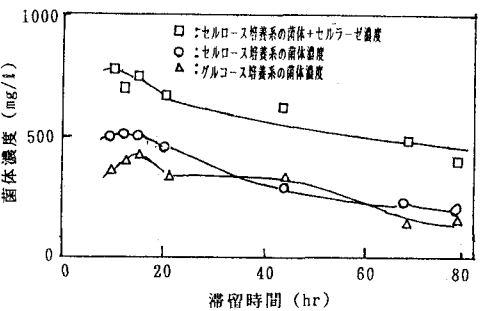


図-5 滞留時間と菌体濃度との関係

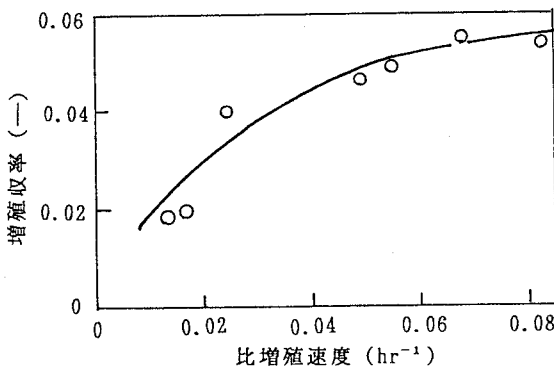


図-6 比増殖速度と増殖収率との関係

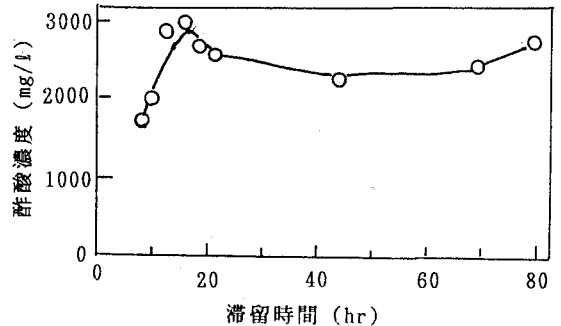


図-7 滞留時間と酢酸濃度との関係

4. まとめ 高温嫌気性セルロース分解菌を絶対嫌気性条件で連続培養を行った結果、①本菌が生産するセルラーゼは菌体およびセルロースに付着するものであった。②本菌のセルロース分解活性は極めて高いが、菌体の増殖収率が小さいので、高濃度に菌体を維持できるバイオリアクターを用いることによって、セルロース性物質の高速処理が可能であることが示唆された。

表-2 セルロース分解菌の動力学定数

最大比増殖速度 (hr^{-1})	0.10
真の増殖収率 (-)	0.085
維持代謝係数 (hr^{-1})	0.46
最大比セルロース分解速度 ($\text{mg-cellulose} / \text{mg-cell} \cdot \text{hr}$)	1.72