

II-601

菌体内生産PHBの増殖条件下における挙動

大成建設（株）技術研究所 正会員○柴山雅子
 大成建設（株）技術研究所 正会員 吉田泰子
 大成建設（株）技術研究所 正会員 友沢 孝

1.はじめに

嫌気好気活性汚泥では、嫌気槽で原水中の有機酸が汚泥に摂取され、その一部はPHB等の形で蓄積される^{1),2)}。著者らは昨年、酪酸基質を用いて嫌気好気汚泥にPHBを高蓄積させ、排水処理施設におけるPHB生産の可能性を報告した³⁾。嫌気槽でPHBを生成した汚泥は好気槽に移り、増殖条件になるがこの時の菌体内に生成したPHBの挙動については不明な点が多い。活性汚泥中のPHBの生成や分解といった挙動を解析するには、汚泥中のPHB生産菌を単離培養することが望ましいが現状では活性汚泥中のPHB生産菌の研究事例はほとんどない。また分解挙動を把握するには分析上PHB蓄積がなるべく高い状態での実験が望ましいが、通常培養の活性汚泥では高蓄積状態を保つのは困難である。そこで、本報ではPHBの高生産菌である*Alcaligenes eutrophus*を用いて、増殖条件培養→PHB蓄積培養→増殖条件培養という行程の実験を行い、それに伴う菌体内PHBの挙動を把握することを試みた。

2.方法

容器は1000mlバツフル付き三角フラスコを用いた。設定温度30℃、回転速度120r.p.mの振とう培養で下記の順序で行った。

増殖培養1→PHB蓄積（制限）培養→増殖培養2
 各培地の培養時間による影響も考え、増殖1の培養時間を48時間、72時間としたもの、PHB蓄積培養時間を24時間、48時間としたもの計4つを設定した。

（表-1）4つの増殖培地（表-2）には、1晩アレインキューベーションした*A. eutrophus*を10ccずつ接種した。培養経過後、遠心分離により集菌し、再び酢酸を炭素源としたPHB蓄積培地（表-3）に移植、培養を続けた。各培養時間によりその割合は異なるが、この培養により*A. eutrophus*は窒素制限され、PHBが蓄積した状態となる。この状態で再び増殖培地（増殖2）へ移植し、その後の菌の増殖と菌体PHBの生成率、培養液中の炭素源の消費を分析した。

3.分析項目

PHB量は採取した菌体を凍結乾燥しメチルエステル化（安息香酸を内部標準物質とする）したものをガスクロマトグラフィーにより測定した。従って、本報に記載したPHB蓄積率とは乾燥菌体重量中のPHB量である。その他、培養液中の炭素量を全有機炭素計（TOC-500）、OD660（濁度）を分光光度計により測定した。

表-1 培養条件

	増殖48時間	増殖72時間
制限24時間	A	B
制限48時間	A'	B'

表-2 増殖培地組成

酵母エキス	10(ml)
グルコース	10
ポリペプトン	10
肉エキス	5
NaCl	5
Mineral	5
0.5M KH ₂ PO ₄	1(ml)
0.25M Na ₂ HPO ₄	39
20%MgSO ₄	107
	1

表-3 制限培地組成

CH ₃ COONa	20.0(g/l)
K ₂ HPO ₄	2.65
KH ₂ PO ₄	4.67
100mMMgSO ₄	16.6(ml)
Mineral	1

4. 結果

通常の増殖培養後、PHBを蓄積させた

*A. eutrophus*を再び増殖(増殖2)培養させたときのTOC、ODの分析結果を図-1、図-2に示す。TOCはほぼ順調に消費され、ODは増加している。これらのことから*A. eutrophus*は基質のTOCを消化し、かつ増殖をしていることが判る。一方、PHBの蓄積変化を図-3に示す。4ケースともに全体の傾向としてはPHBの蓄積率の変化はなく、いったん蓄積されたPHBは増殖環境下におかれても少なくとも34時間程度は減少しないことが判る。ただし、A'(増殖培養48時間、制限培養48時間)については初期5時間までに急激に減少し、8時間で再び増加、その後若干減少していくという傾向がみられた。

5. 考察

*A. eutrophus*の通常の増殖は、過去の実験結果から図-4のような増殖曲線を描く。このような増殖特性を考慮した場合、増殖のまだ盛んな対数増殖期のもの、ある程度増殖がMaxに達した定常期のもの、またPHBを蓄積させるための窒素制限培養時間の長さなども、その後の増殖培養2での増殖、PHB蓄積率に影響を与えるのではないかと考え、本実験では、表-1に示したような4つのケースを設定した。結果からもわかるように、A'(増殖培養48時間、制限(蓄積)培養48時間)の培養条件が最適で高蓄積率となったが、ODやTOCの消費は他の3ケースとほぼ同じであり、PHBの蓄積率は*A. eutrophus*の増殖にはほとんど影響を与えていないと考えられる。また、乾燥菌体重量あたりの重量パーセントで算出しているPHB蓄積量が、菌体量の増加に拘らず、ほとんど変化していないということは、少なくとも増殖条件に変換してただちに増殖のためにPHBを消費することなく、PHBは維持され、代謝に必要な炭素源は培養液中から取り込まれる方が優先されると考えられる。その一方で、増殖した*A. eutrophus*が新たにPHBを蓄積しているものと推察される。ただし、こうしたPHBの挙動を把握するにはPHBを蓄積した個々の菌体についての解析を行う必要もあり、今後はより詳細な検討が必要である。

《参考文献》

- 1) 松尾吉高・宮晶子：嫌気好気活性汚泥の嫌氣的有機物摂取, 衛生工学研究論文集, 第23巻, pp.287~298, 1987
- 2) 味埜俊：嫌気好気活性汚泥の嫌氣的有機物摂取, 衛生工学研究論文集, 第23巻, pp.299, 1987
- 3) 副島敬道・友沢孝・金子誠二：嫌気好気汚泥を用いた炭素/窒素比とポリエステル生成の関係, 土木学会第47回年次学術講演会(平成4年9月)

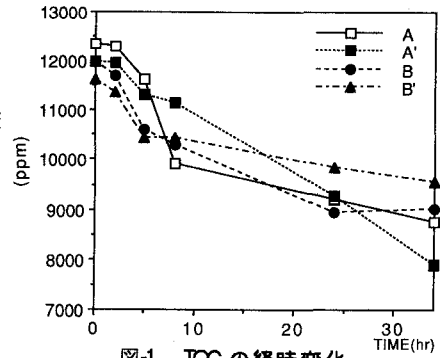


図-1 TOCの経時変化

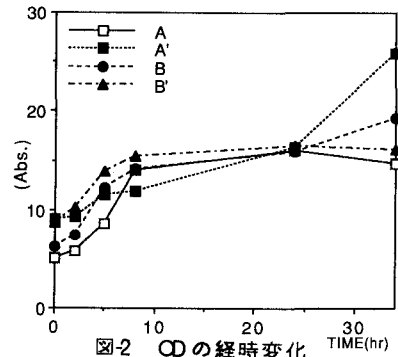


図-2 ODの経時変化

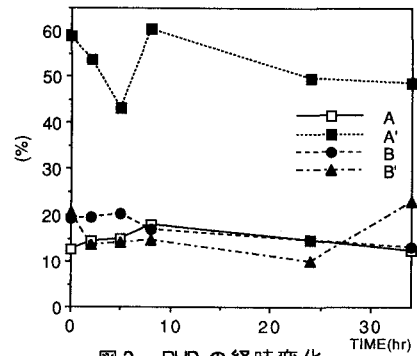


図-3 PHBの経時変化

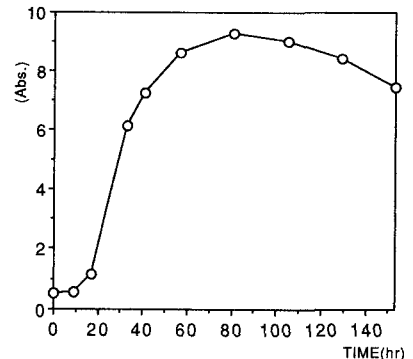


図-4 *Alcaligenes eutrophus* の増殖曲線