

好熱性細菌による有機物からのアンモニア生成

大成建設 (株)	正会員	○天石 文
大成建設 (株)	正会員	帆秋 利洋
大成建設 (株)	正会員	藤原 靖

1. 目的

現在、家畜糞尿や食品加工残渣、一般家庭からの生ゴミなど様々な有機性廃棄物を対象に、微生物を用いた様々なエネルギー等の資源回収システムが開発されているが、高い有機物負荷条件下で微生物を培養した際、分解によって生じたアンモニアや有機酸の高濃度の蓄積によって微生物分解が阻害されてしまう場合がある。この問題を解決するための手段として、主には加熱や pH 調整、希釈などの手法が用いられている。

微生物による有機物分解過程においてアンモニアは、アミノ酸が分解される過程の副産物として発生すると考えられている。このアミノ酸の多くはタンパク質に由来するが、このアンモニア蓄積に対する生物学的な解決法として、プロテアーゼを有しアミノ酸分解能を保有する微生物を利用することによって有機性廃棄物からのアンモニア生成・除去が可能となると考えられる。そこで、我々はプロテアーゼを有し、アミノ酸を選択的に資化する微生物を探索すると共にそのタンパク質分解能について検討した。

2. 実験方法

2.1 適用微生物の選抜

タンパク質分解能を有し、かつその分解産物であるペプチド、アミノ酸を選択的に炭素源、エネルギー源として利用可能な微生物を調べた結果、好熱性細菌が該当することがわかった。耐熱性プロテアーゼを有する好熱性細菌としては *Pyrococcus* 属、*Staphythermus* 属、*Thermococcus* 属などが知られている¹⁾²⁾。これらの微生物は炭素源としてタンパク質を分解し、更にアミノ酸を利用して有機酸を生成する際に副産物としてアンモニアを発生させる。我々は以前に海底の熱水鉱床や石油地下備蓄基地などから多数の好熱性細菌を分離しており、その中には耐熱性プロテアーゼを有するものも見出している。そこで、我々が保有する 78 株の分離した好熱性細菌と菌株保存機関 (DSM) より入手した 11 菌株について、それぞれのタンパク質分解能 (プロテアーゼ保持の有無) について調査を行った。

培地は N, P, Ca などの栄養塩にビタミン類、微量金属類を添加した基本培地に、唯一の炭素源としてタンパク質であるカゼインを 0.2% 添加したものを使用した。使用する好熱性細菌は全て嫌気性細菌であるため、培養器内を窒素ガスで気相交換し、還元剤を加えて嫌気状態にした。70℃または 80℃で静置培養を行い、培養前後の $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度を測定し、アンモニア生成量及び $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率を算出した。プロテアーゼ活性については、カゼインの分解によって生じたアンモニア発生量より推定した。

2.2 温度による影響

プロテアーゼ生産菌株の指標として最もアンモニアを生成した菌株を選抜し、そのタンパク質分解における至適温度を調査した。0.2%カゼインを唯一の炭素源として添加した培地を用いて培養温度を 80℃, 85℃, 90℃の 3 条件として 6 日間培養を行い、菌無接種のコントロール (加温影響のみ) を差し引いた値についてアンモニア生成量と $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率を求めた。

2.3 pH による影響

至適温度を調査した菌株について、タンパク質分解における至適 pH を調査した。培地 pH は 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 の 4 条件とした。pH 維持のため pH6.5, 7.0 では Bis Tris propane を、pH7.5, 8.0 では HEPES を添加して用いた。85℃で培養を行い、前述の実験と同様にしてアンモニア生成量と $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率を求めた。

キーワード 好熱性細菌, アンモニア生成, タンパク質分解

連絡先 〒245-0051 神奈川県横浜市戸塚区名瀬町 344-1 大成建設 (株) 技術センター TEL 045-814-7226

2.4 基質濃度の違いによるアンモニア生成量の変化

添加するタンパク質基質濃度の違いによるアンモニア生成量の変化について調査した。有機物はカゼイン濃度を 0.2%, 0.4%, 0.8%, 1%, 4% の 5 条件になるように添加した。80℃で培養を行い、アンモニア生成量から、カゼイン中窒素含有量と $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率との関係について調査した。

3. 結果

3.1 耐熱性プロテアーゼ保有好熱性細菌株

89 菌株のうちタンパク質基質培養において明確なアンモニア生成が見られたのは CMI, Ku-9, MI-2, MI-3, MI-4, MI-6, TW-1 tc-2 の 7 菌株であり、添加したカゼイン由来の総窒素量に対して、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率はおよそ 20~40% であった。最もアンモニア生成量が多かった菌株は CMI で $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率 38% であった。顕微鏡による細胞観察によって 7 つの培養全てにおいて微生物の増殖が確認された。これら 7 菌株がタンパク質を唯一の炭素源とする培地で増殖しアンモニアを生成したことから、耐熱性プロテアーゼを有すると考えられた。なお、選抜された 7 菌株は全て油田産出物や原油タンク中のスラッジより分離した好熱性細菌である³⁾。

3.2 タンパク質分解時の至適培養条件

タンパク質分解能試験において最も多くアンモニアを生成した CMI 株を選抜し、その培養温度及び pH の至適条件を検討した。

80, 85, 90℃の温度条件でタンパク質を唯一の炭素源として培養を行ったところ、85℃で培養した時のアンモニア生成、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率が最も高く、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率が約 40% に達したことから CMI 株のタンパク質基質培養における至適温度が 85℃であることが明らかとなった。また至適 pH 調査では、pH6.5 及び 7.0 ではほぼ同程度の $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率であり約 45% であった。pH7.5, 8.0 では、アルカリ側に移行するにつれ $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率も減少することが明らかとなり、CMI 株のタンパク質基質培養における至適 pH が pH6.5~7.0 であることが示唆された。

3.3 基質タンパク質中窒素含有量とアンモニア生成量の関係

初期タンパク質基質添加量を変化させた場合、約 6 日間の培養ではタンパク質添加量が多い培養ほどアンモニア生成量は増加する傾向を示した。この時培養に用いた初期菌体密度は全て 10^6cells/ml のオーダーであり、初期投入菌体密度が等量の場合は、窒素含有量が高くなるにつれて $\text{NH}_4\text{-N}$ 転換率が低下するという相関関係が認められた。

4. まとめ

今回、複数の好熱性細菌の中から最も高いアンモニア生成能を有する菌株を選抜し、そのタンパク質分解とアンモニア生成能について検討した。その結果、添加したカゼイン（タンパク質）由来窒素分を最大約 40% アンモニアへ転換することが明らかとなった。しかしながら実際の有機性廃棄物を対象として耐熱性プロテアーゼを有する好熱性細菌を用いてアンモニアを生成させようとする際には、好熱性細菌が利用可能な栄養源や分解対象となるタンパク質の種類、形態などが多岐にわたり、培養条件が複雑になることが考えられる。このため実際の有機性廃棄物を用いた好熱性細菌によるアンモニア生成や高い有機物負荷環境下での安定したアンモニア転換のための条件などについて今後検討予定である。

参考文献

- 1) 上木勝司, 永井史郎: 嫌気微生物学, 養賢堂, 1993.
- 2) 古賀洋介, 亀倉正博: 古細菌の生物学, 東京大学出版会, 1998.
- 3) Y. Takahata, T. Hoaki and T. Maruyama: Starvation survivability of *Thermococcus* strain isolated from Japanese oil reservoirs. Arch. Microbiol. 176: 264-270, 2001.