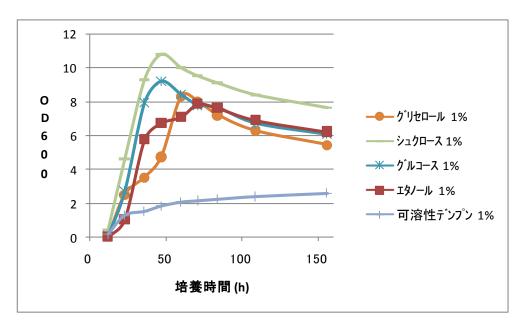
- 2. 生育状況によるグリセロール処理、PHA 生産状態の変化の分析
- 2-1. Halomonas sp. KM-1 株の培養条件の検討

Halomonas sp. KM-1 株は、以下の手法に従い、培養及び PHA の分析をおこなった。 Halomonas sp. KM-1 株のプレ培養は、プレート培養より、試験管に 5 ml SOT 改培地(それぞれの炭素源を 1 w/v%を含む)を加え、37°C で 1 晩振盪培養した。

プレ培養した菌体 0.2 ml を、200 ml 容の振とう三角フラスコに入れた液体培地 20 ml に混合して植菌し、シリコ栓をした。これを  $30\sim37$  で振盪培養し、12 時間後より経時的に培養液を回収して、吸光度 $(OD_{600})$ 、乾燥菌体重量、および PHA 含有量を測定した。培養液は、再度シリコ栓をし、 $30\sim37$  で振盪培養を継続して培養した。

菌体内に蓄積された PHA の含有率は、以下の手法で測定した。上記培養した培養液を遠心分離して菌体のみ採取し、蒸留水で数回洗浄したのちコンセントレーターで 1 時間乾燥させた。この乾燥菌体 3~10 mg に、3 vol%  $H_2SO_4$  を含むメタノール 0.50 mlを加え 105 °Cで 2 時間加熱した。その後、室温まで冷却した後、クロロホルム 0.50 ml、蒸留水 0.25 ml を加え、激しく攪拌した。 1 分間遠心分離したのち、クロロホルム層を 1  $\mu$ 1分取し、ガスクロマトグラフ装置を用いて、PHA を分析した。ヒドロキシブチレート、ヒドロキシバレレートを含む標品を乾燥菌体と同様に処理、分析し、これを基準として乾燥菌体あたりの PHA 含有率(PHA (g)/乾燥菌体重量(g)) を求めた。

はじめに、Halomonas sp. KM-1株の各種炭素源の資化性を調べた。いずれも1%(重量)の濃度で、グリセロール、シュクロース、グルコース、エタノール、可溶性デンプンを添加し、その成長を吸光度( $OD_{600}$ )で、また、菌体中のPHA蓄積量をGCで調べた。いずれの炭素源も資化可能で、最大50%までのPHA蓄積を認めた(図4)。



a)

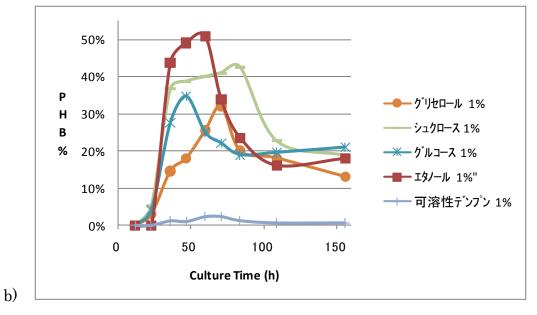


図4. 各種炭素源による Halomonas sp. KM-1 株の成長曲線、PHB 蓄積量

- a) Halomonas sp. KM-1 株の成長曲線
- b) Halomonas sp. KM-1 株の PHB 蓄積量

# 2-2. 雑菌の混入の有無の確認

廃グリセロールを炭素源に滅菌せずに培養した培養液への雑菌の混入を、PCR-DGGE 法、リアルタイム PCR 法等を用いて遺伝子レベルで調べた。手法は以下の通りあるが、いずれも *Halomonas* sp. KM-1 株のみの成育を確認した。

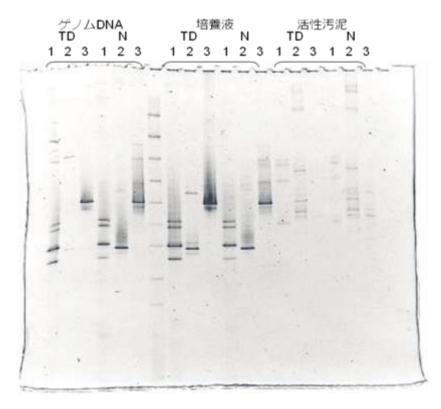
#### 2-2-1. PCR-DGGE 法条件検討

ゲノム DNA(コントロール用)、廃グリセロール培養液(滅菌操作無し)、活性汚泥(コントロール用)を用い、PrepMan マニュアルに従ってテンプレートを調製した。 プライマーには、既報の以下の3種のプライマーセットを用いた。

- 1. GC341f-534r
- 2. GC518f-907r
- 3. GC984f-1378r

タッチダウン法(TD)、ノーマル法(N)の PCR 増幅をおこない、PCR-DGGE 分析を行

った(図 5)。プライマーセット 2 において、ゲノム DNA と同じく廃グリセロール培養 液から増幅バンドが検出され、他のバンドの増幅が見られないことから、廃グリセロール培養液においては、Halomonas sp. KM-1 株のみが増殖していることが判明した。



#### 図 5. PCR-DGGE 法の分析パターン

ゲノム DNA、廃グリセロール培養液抽出 DNA、活性汚泥抽出 DNA をそれぞれテンプレートに、上記 3 種のプライマーペア、2 種の PCR 手法にて増幅分析した。

## 2-2-2. リアルタイム PCR 法

培養液からゲノム DNA を抽出し、これをテンプレートとしてリアルタイム PCR 法を実施した。プライマーは、DDBJ(DNA Data Bank of Japan)に報告されているハロモナス種の 16S rRNA の配列 102 種を選び、これらと他のバクテリアの配列とを比較し、ハロモナス種においてのみ高度に保存されている領域から以下のプライマーペアを作成した。

ペア 1 168-F 5'-GGGGCTCTTCGGACCTTGCGC-3'

486-R 5'-GTGATGTCCTTCCTGACGGG-3' 318 bp

ペア 2 832-F 5'-TGGGTCCTTCGCGGACTTT-3'

1016-R 5'-CGTCTCCGAAGGGTTCGCAGG-3' 184 bp

これらの、プライマーペアを用い、*Halomonas* sp. KM-1 株とこの環境で生育可能な *Spirulina platensis、Novosphingobium* sp.のゲノム DNA をテンプレートに SYBR Green を用いたインターカレーション法でリアルタイム PCR を試みたところ、

Halomonas sp. KM-1 株のみにペア 1、2 ともに増幅が見られた。

そこで、廃グリセロールを用い滅菌操作せずに培養した *Halomonas* sp. KM-1 株の培地よりゲノム DNA を抽出し、同様にリアルタイム PCR を試みたが、コントロールの *Spirulina platensis、Novosphingobium* sp.のゲノム DNA では増幅は見られず、廃グリセロールから抽出したゲノムのみが増幅を見た。また、増幅産物の融解曲線は一種類であったため増幅した DNA のテンプレートは *Halomonas* sp. KM-1 株であると判断した。

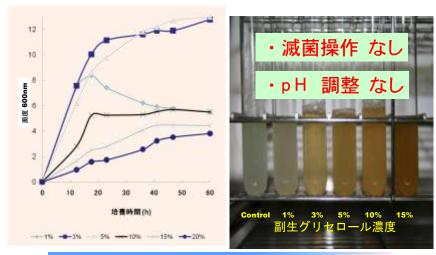
#### 2-2-3. 活性汚泥、土壌の投入試験

連続して廃グリセロールを処理する環境において混入する微生物源となる可能性のある活性汚泥、土壌を恣意的に混入し、菌相の変化を調べた。 $5\,\mathrm{ml}$  液体培地に対し、 $1\,\mu 1\,\mathrm{o}$  *Halomonas* sp. KM-1 株培養液、土壌または活性汚泥 5%相当を混入し、30%にて2日間振盪培養をおこなった。液体培地の様子は、*Halomonas* sp. KM-1 株のみを植菌したものも、活性汚泥、土壌を混合したものも変わらなかった。この培地からゲノムDNA を抽出し、PCR 産物より直接  $16\mathrm{S}$  rRNA の配列を調べ、*Halomonas* sp. KM-1 株の配列であることを認めた。また、培地を  $\mathrm{SOT}$  改培地のプレートに画線培養したが、これらから生じたコロニーは、その特徴から *Halomonas* sp. KM-1 株のみと認められた。それゆえ、現在は、滅菌操作をせず培養操作を行っている。

# 2-3. 廃グリセリンの利用について

実験に使用している廃グリセロールは、京都市廃食油燃料化施設より譲与されたものである。当施設においては、メチルエステルを作成するために用いたメタノールはほとんど回収されているため、結果的にメタノールによる生育阻害は認められなかった。また、グリセロール含有率は、 $60\sim65$  重量%、脂肪酸のメチルエステルは総量として 2 重量%であり、10%水溶液にした場合 pH10.4 であった。

廃グリセロールの実際の処理を想定した場合、できるだけ安価な培地組成が望まれる。そこではじめに、SOT改培地から、緩衝液成分 $NaHCO_3$ を除き、生育の状況を濁度 $OD_{600}$ で測定した。以下の図3ように廃グリセロールを20重量%まで混合しても生育が認められた。



Halomonas sp. KM-1は 栄養塩と廃グリセリンで培養できる.

図 6. 廃グリセリンによる Halomonas sp.KM-1の生育状況

しかしながら、pH変化が著しく、後期の生育が遅くなる傾向が見られたので、SOT 改培地のうち、 $NaHCO_3$ 、 $Na_2CO_3$ からなる緩衝液の成分を変化させ、初期のpH8.90、9.40、9.85、10.28、3%の精製グリセロールを炭素源に生育を検討した。(表 2 、図 7)

表 2 SOT 改培地の pH 調整組成

培地 pH	pH8.90(SOT改 と同じ)	SOT 改 2 pH9.40	pH9.85	pH10.28
NaHCO <sub>3</sub>	16.8 g/l	12.6 g/l	8.4 g/l	4.2 g/l
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0 g/l	5.3 g/l	10.6 g/l	15.9  g/l

培地組成として、緩衝成分である  $NaHCO_3$  と  $Na_2CO_3$  は終濃度 0.2M として以下の配合で調製し、他の成分は SOT 改と同じとした培地を作成し、3 重量%のグリセロールを加え生育を見た。培養方法等は上記「2. 生育状況によるグリセロール処理、PHA 生産状態の変化の分析」と同じである。

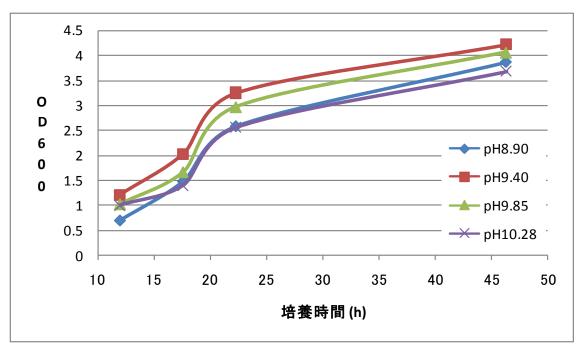


図 7. 異なる pH 条件における Halomonas sp. KM-1 株の生育状況

図 7 のように、いずれも、生育するが、pH9.40 が一番生育がよかった。また、生育後の pH はほぼ初発の pH と同等であった。

初期 pH9.40 の場合が、もっとも生育が早かったので、初期の pH9.40 のものを中心に検討した結果、培養温度 33℃において廃グリセロール 10%まで、生育阻害なくで生育可能であることが判明した。

#### 2-4. キャピラリー電気泳動による培養液中成分の分析

キャピラリー電気泳動(Capillary Electrophoresis, CE)のうち、最もシンプルな分離モードであるキャピラリーゾーン電気泳動は、主として水溶液中の低分子量イオン成分を簡便・迅速に分析できる手法である。本課題においては、グリセロール培養液中成分の経時変化を調べて培地組成の最適化に反映させるため、以下に示す3種類の対象成分について分析条件の最適化を検討し、うち2種類については培養過程での培養液中成分の分析に適用した。

#### 2-4-1. 培養液中有機酸の分析

グリセロール培養液においては培養時間の経過に伴い pH が低下する傾向が見られ、

簡易キットにより成分を調べたところ培養過程で乳酸が生じていることが確認された。そこで、乳酸を対象としてこれまでに報告されている3種類の泳動溶液が、今回用いたようなアルカリ性(pH9程度)で高塩濃度(0.2~0.5 M)の培養液に適用可能かどうかを検証した。なお多くの有機酸は紫外吸光度があまり大きくないため、いずれの泳動溶液にも吸収のある間接吸光試薬(ピリジン-2,6-ジカルボン酸)を加え、試料により生じる負ピークで定性・定量を行う間接吸光光度法が用いられる。

うち 2 種類は主に有機酸のみを対象とするもので、pH は 5.6 および 5.7 である。これらについて培養前の培養液に乳酸を 1000~mg/l になるよう添加して測定した結果、図 8 a) および b) に示すように、乳酸イオンのピーク形状が悪かったり、他のイオン性成分のピークと重なったりして定量が困難であった。もう 1 種類は無機陰イオンから有機酸、アミノ酸、糖までを対象とし一斉分析するためのもので、糖を陰イオン化させることから泳動溶液の pH は 12.1 とかなり高くなっている。この泳動溶液を用いた結果、c) に示すように、乳酸イオンについてベースライン分離を達成することができた。この理由については、泳動溶液の pH が培養液よりも高いことや、電気伝導度が大きいため培養液の拡散が抑えられるこ

とによると考えられる。

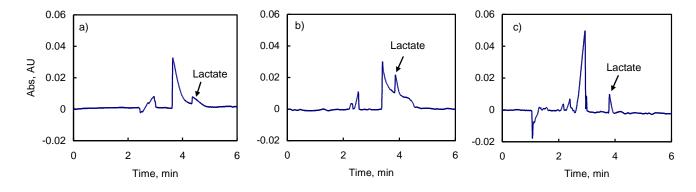


図8. 泳動溶液を変えたときの培養液中乳酸イオンの検出結果

次いで c) の泳動溶液を用い、測定の再現性・定量性について検討した。4回の繰り返し測定を行った結果、相対標準偏差はピーク面積で3.5%、ピーク高さで2.2%であった。また、100~2500 mg/l の範囲で検量線を作成した結果、相関係数はピーク面積で0.999、ピーク高さで0.996であった。再現性はピーク高さの方が良いといえるが、ピーク面積の方が検量線の直線性が良かったため、定量はピーク面積により行うこととした(以下同様)。

以上の検討をもとに、実際の培養液を分析した結果を図9に示す。培養が進むと乳酸が生成することが確認できた。また、さらに時間が経過すると有機酸と思われる別のピークが検出され、同定の結果酢酸と判明した。一方、それらよりかなり遅い泳動時間にもピークが検出され、これについては培養前が最も大きく、培養時間とともに減少する

傾向がみられた。培養液を前処理したのちガスクロマトグラフィーで測定したグリセロールの定量値と CE でのこの遅いピークの面積値の間には相関がみられ、このピークはグリセロール由来であると推測された。

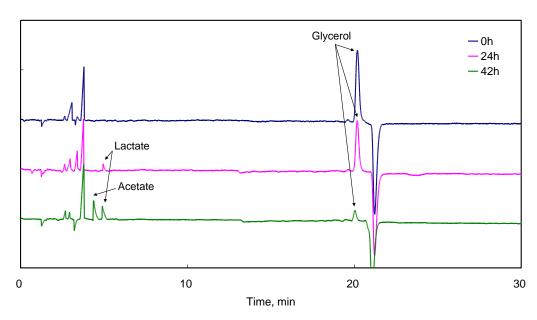


図9. グリセロールを添加した培養液中成分の培養に伴う経時変化

#### 2-4-2. 培養液中硝酸イオンの分析

培養液には菌体生育のための窒素源として硝酸ナトリウムを添加しており、添加量によって生育状態やPHB生産量が変化する。硝酸イオンは有機酸等の測定に用いた陰イオン一斉泳動溶液でも対象になってはいるが、無機陰イオン同士のピークがかなり近接することと、他の無機陰イオンと異なり 200~220 nm 辺りでの紫外吸光度が大きく選択的検出が可能であることから、直接吸光光度法による測定を検討した。

まず泳動溶液として、海水中の硝酸分析に用いられている人工海水(5 倍希釈)のほか、培養液のpH が高いことから、炭酸pH 標準緩衝液(pH 10)およびトリスー塩酸緩衝液(pH 8)を加えた 3 種類を用いた。培養前の培養液を測定した結果を図 3 に示す。いずれの泳動溶液でも測定時間が  $2\sim3$  分程度で硝酸イオンのピークを検出することができた。ピークが最も大きかったのは図 1 0 a)の人工海水(5 倍希釈)を用いた場合であり、次いで c)のトリスー塩酸緩衝液、最も小さかったのは b)の炭酸 pH 標準緩衝液であった。しかし、a)についてはピークのテーリングが c)よりも大きく、ベースラインも c)に比べて不安定であることから、泳動溶液にはトリスー塩酸緩衝液を用いることとした。

次いで c) の泳動溶液を用い、CE でのピーク面積による定量値を硝酸イオンメーターの値と比較した。添加した硝酸ナトリウム、すなわち窒素の量が培養液の基準値 (0.421 g/l) に対して 1 から 10 の範囲で作成した検量線における相関係数は CE が

0.975、イオンメーターが 0.998 であった。

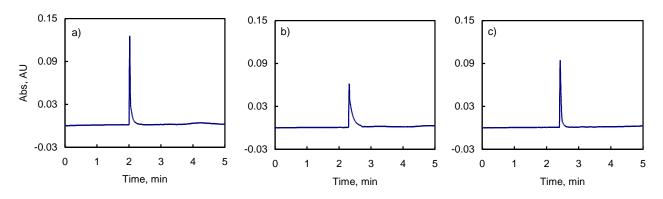


図10. 泳動溶液を変えたときの培養液中硝酸イオンの検出結果

一方、0.01 から 0.2 の範囲で作成した場合の相関係数は CE が 1.000、イオンメーターが 0.983 であった。従って、CE はイオンメーターに比べてより低濃度の硝酸イオンの測定に適していることが明らかとなった。

そこで実際の培養液を測定した結果、硝酸イオンは培養時間が長くなるにつれて減少し、早いものでは36時間後には検出されなくなった。但し、時間の経過と共に硝酸イオンのピークより遅い時間にいくつかのごく小さなピークが検出されることがあった。これらについてはまだ同定を行っていないが、紫外吸光光度が比較的高い有機酸の可能性がある。

### 2-4-3. 培養液中マグネシウムイオンの分析

硝酸と同様、培養に必要な微量成分として硫酸マグネシウムを培養液に添加しており、こちらも添加量によって生育状態や PHB 生産量が変化する。但し、マグネシウム量に換算すると培養液の基準値は 0.020 g/l とかなり微量である。CE においてはアルカリおよびアルカリ土類金属イオンの一斉分析も行われているが、培養液中には基準値でナトリウムイオンが 6.816 g/l、カリウムイオンが 0.714 g/l 含まれておりマグネシウムイオンとの濃度差が非常に大きいことから、通常の一斉分析条件ではマグネシウムイオンのピークはそれらの巨大なピークに埋もれてしまい検出が困難である。

濃度差が大きい場合のアルカリおよびアルカリ土類金属イオンの一斉分析に関しては、ナトリウムイオンが他のイオンに比べて大量に存在する場合に 15-クラウン-5-エーテル (15-cw-5) の添加を検討した結果が報告されている。無添加の場合には電気泳動移動度に基づいてマグネシウムイオンよりもナトリウムイオンやカリウムイオンが先に検出されるが、15-cw-5 の包接作用によりそれらがマグネシウムイオンの後に検出されるようにしてピークが重なる問題を解決している。そこでこの手法が培養液に適用できるか検討を行った。

まず、泳動溶液に添加する 15-cw-5 の量を 40 mM から 500 mM まで変化させ分離状況を調べた。

その結果を図11に示す。a) は160 mM、b) は300 mM、c) は500 mM を添加したものである。添加量が多くなるにつれてナトリウムイオンやカリウムイオンの検出時間が遅くなり、500 mM で添加されているマグネシウムイオンを単独のピークとして検出することができた。但し、300 mM では調製した泳動溶液に濁りが生じ、500 mM ではさらに顕著になったためそれ以上の添加については検討を行わなかった。

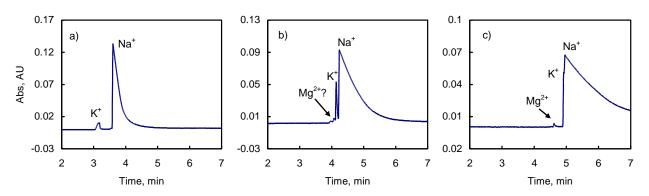


図11. 泳動溶液中の15-cw-5添加濃度を変えたときの培養液中陽イオンの検出結果

次に培養前培養液にマグネシウムイオンを異なる濃度で添加し、定量性の確認を行った。 $0.001\sim0.010~g/l$  を添加した結果、検量線の相関係数は0.987 であった。有機酸や硝酸のデータよりも小さい値であり、これはマグネシウムイオンの濃度が低くピークが小さいことによるためと考えられる。また、培養液に添加されているマグネシウム濃度の基準値は0.020~g/l であるが、検量線のy 切片から求めた値は約0.010~g/l と約半分の値になった。以上のことから、培養液中のマグネシウムイオンの経時変化を調べるためにはさらに分析条件を検討し、感度および定量性を向上させる必要がある。

#### 2-5. 初期の生産効率の向上に向けて

培地組成の栄養塩の構成、培養中の給気条件の改善をおこない、バッチ培養における 廃グリセロールを用いた培養の結果を図12に示す。

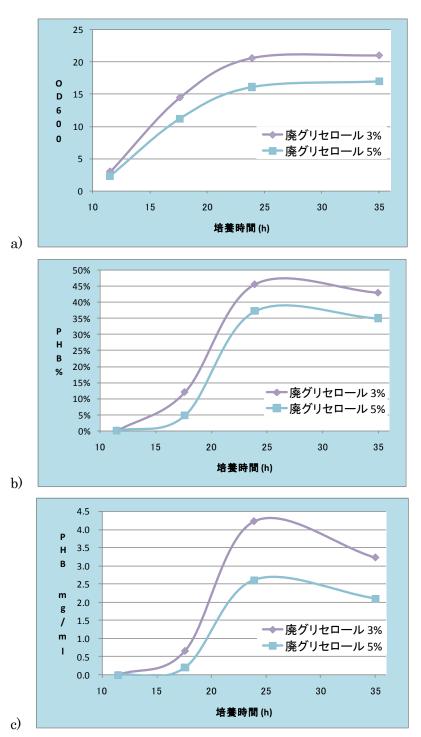


図12. 廃グリセロールを用いた *Halomonas* sp. KM-1 株の培養解析 a)成長曲線、b)PHA のうち Poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)の乾燥菌体あたりの含有率、c)PHB の培養液あたりの蓄積量

同様にグリセロールのみを炭素源として培養した場合のバッチ培養における廃グリセロールを用いた培養の結果を図13に示す。

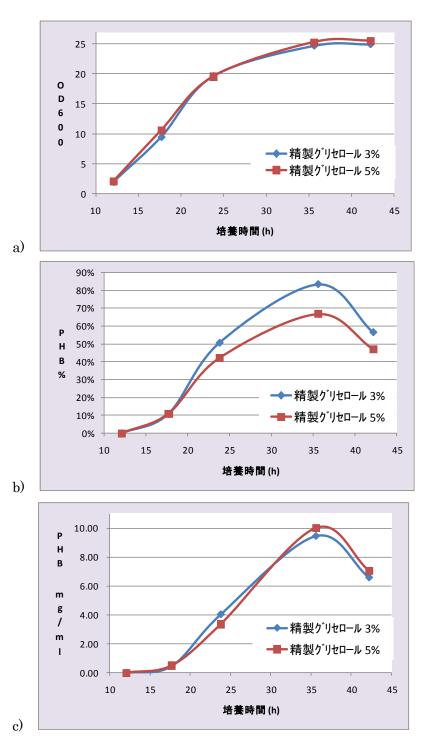


図13. グリセロールを用いた *Halomonas* sp. KM-1 株の培養解析 a)成長曲線、b)PHA のうち Poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)の乾燥菌体あたりの含有率、c)PHB の培養液あたりの蓄積量

# 2-6. 生産効率の向上に向けて

培地組成の栄養塩の構成、培養中の給気条件の改善を行った。バッチ培養における精

製グリセロール、廃グリセロールを用いた培養の結果例を以下に示す(図14)。

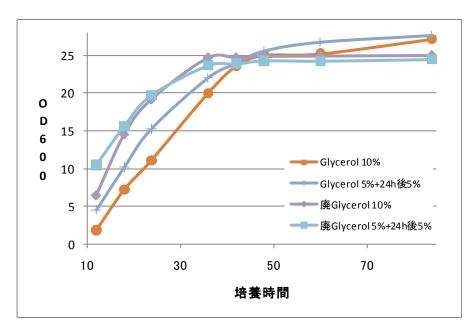
(培地名) SOT改2 (Spirulina platensis Medium改) pH9.4±0.1

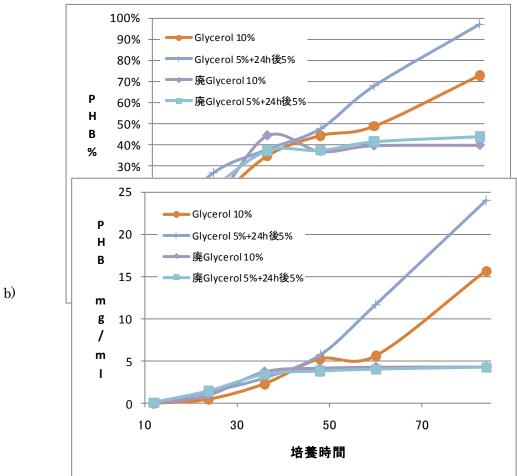
(培地組成) NaHCO<sub>3</sub> 1.26 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5.30 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mg, NaNO<sub>3</sub> 500 mg,

 $\mathrm{K_2SO_4\ 100\ mg,\ NaCl\ 100\ mg,\ MgSO_4 \cdot 7H_2O\ 20\ mg,\ CaCl_2 \cdot 2H_2O\ 4\ mg,}$ 

 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1 mg,  $Na_2$  EDTA 8 mg, A5+Co 溶液 0.1 ml

培地中の、窒素を 2 倍、リンを 4 倍に増量した。通気条件は、100ml 容三角フラスコを、200ml 容振とう三角フラスコに変更することで、酸素の取り込み条件を改善した。





a)

c)

図14. グリセロール、廃グリセロールを用いた *Halomonas* sp. KM-1 株の培養解析 a)成長曲線、b)PHA のうち Poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)の乾燥菌体あたりの含有率、c)PHB の培養液あたりの蓄積量

# 培養条件改善によるPHA高収率化

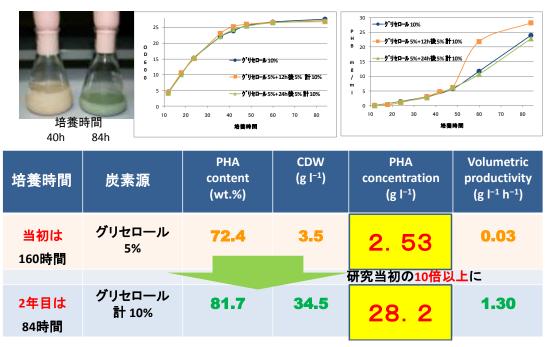


図15. グリセロールによる PHA 生産量の増加

この結果、現在では、廃グリセロールを利用してバイオプラスチックを生産する効率は、初期の目標である「バッチ培養で2g/L(乾燥重量)以上のPHA

生産菌の増殖、PHA 含量 70%以上を目指した、パイロットスケール処理に反映できる培養条件を確立する。」に対し、2 年目の時点で「PHA 生産 4.6 g/L (乾燥重量、菌体重量 13.5g/L)、含有量 34.0%」を達成し、精製グリセロールを用いた培養では、「PHA 生産 28.2 g/L (乾燥重量) 菌体重量 34.5 g/L、含量量 81.7%」を達成した(図 1 5)。

#### 2-7. 生産効率の更なる向上に向けて

培地組成の栄養塩の構成、培養中の給気条件の改善を行った。バッチ培養における精製グリセロール、廃グリセロールを用いた培養の結果例を以下に示す。

(培地名) SOT改5 (Spirulina platensis Medium改) pH9.4±0.1

(培地組成) NaHCO<sub>3</sub> 1.26 g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5.30 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mg, NaNO<sub>3</sub> 1250 mg,

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mg, NaCl 100 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 4 mg,

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg, Na<sub>2</sub> EDTA 8 mg, A5+Co 溶液 0.1 ml

培地中の、窒素を 5 倍、リンを 4 倍に当初の濃度より増量すること等により、最終的には「PHA 生産 14.9 g/L(乾燥重量、菌体重量 24.8 g/L)、含有量 60.0%」を達成し、精製グリセロールを用いた培養では、「PHA 生産 40.5 g/L(乾燥重量)菌体重量 50.5 g/L、含量量 80.2%」を達成した(表 3)。

表3. バッチ培養による PHA 生産の比較

# バッチ培養によるPHA 生産の比較

(shake flasks and fermentors)

Organism	Carbon source	PHA content (wt.%)	CDW (g l <sup>-1</sup> )	PHA concentration (g l <sup>-1</sup> )	Volumetric productivity (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Reference
Halomonas sp. KM-1	廃グリセロール	60.0	24.8	14.9	0.58	本成果
Halomonas sp. KM-1	グリセロール	80.2	50.5	40.5	1.04	<b>本</b> 从 未
Halomonas boliviensis	ショ糖	54.0	14.0	7.7	0.40	Quillaguamán et al. 2007
Alcaligenes latus	ショ糖	83.0	14.0	11.5	0.39	Wang and Lee 1997
Azotobacter vinelandii a	グルコース	74.0	10.0	7.5	0.30	Page <u>1992</u>
Escherichia coli ª	グルコース	80.8	8.9	7.2	0.15	Lee et al. <u>1994</u>
Wautersia eutropha	H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	76.0	17.0	13.0	0.18	Heinzle and Lafferty 1980
Wautersia eutropha ª	グルコース	54.0	9.4	5.1	0.11	Doi et al. <u>1988</u>
Pseudomonas oleovorans	Octane	25.0	2.0	0.5	0.02	Lageveen et al. <u>1988</u>
Haloferax mediterranei	デンプン	67.0	9.7	6.5	-	Lillo and Rodriguez- Valera <u>1990;</u> Rodriguez-Valera ar Lillo <u>1992</u>

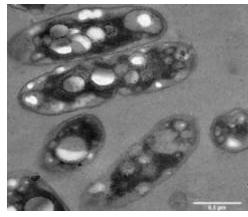
 $^{\rm a}$  Cultivation of the microorganism was performed in shake flasks

2-8.

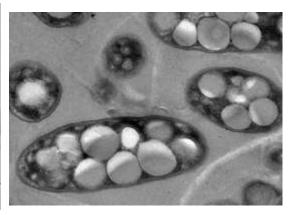
電子顕微鏡による PHB 蓄積状況の観察

10%グリセロールを炭素源にも用い、対数増殖期と定常期ににおいてサンプリングし、それぞれの PHB 蓄積の状況を電子顕微鏡により観察した(図16)。以下のように対数増殖期から PHB の蓄積は行われており、栄養制限を行わなくても PHB がいつも蓄積されていることが観察された。さらに、廃グリセロールにおいても、滅菌せず、培地に直接添加した培養で、PHB の蓄積が見られることが判明した(図17)。

# Halomonas sp.KM-1によるPHA生産状況



OD<sub>600</sub> = 8.66 PHA content 18.5%

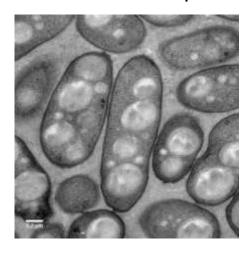


OD<sub>600</sub> = 20.0 PHA content 45.7%

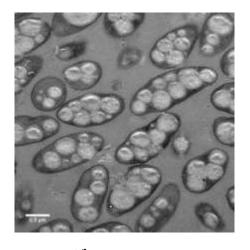
# 培養初期から、PHAが蓄積する.

図16. Halomonas sp.KM-1の電子顕微鏡観察

# Halomonas sp.KM-1によるPHA生産状況



<u>廃グリセロール 10%</u> 乾燥菌体重量 23.4 g/L PHA の割合 52.8%



グリセロール 10% 乾燥菌体重量 34.8 g/L PHA の割合 63.6%

# 滅菌なし、直接添加して48 h培養

図17. ハロモナス菌による PHA 生産状況

2-9. 代謝物解析 1 (メタボローム解析)

試験目的

培養条件の異なる *Halomonas* sp. KM-1 株について、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行い、イオン性代謝物質の変動を測定解析する。分析及び解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社研究所(HMT)に依頼して行った。

# 材料及び方法

試料

産総研にて、*Halomonas* sp. KM-1 株を採取した。採取した*Halomonas* sp. KM-1 株 以下を4 検体を分析した。

試料

菌体・グリセリン10%培養分

菌体・廃グリセリン10%培養分

菌体・アラビノース5%培養分

培養液上清・ (アラビノース5%培養)

#### • 前処理

 $\it Halomonas \, sp. \, KM-1 \,$ 株の培養を行った。 $\it 20\, 0D_{600}/mL \,$ をサンプリングし、これをフィルトレーションにより速やかに吸引ろ過した。次にMilli-Q 水 $\it 10\, mL \, \times \, 2$  回を吸引ろ過し、洗浄した。フィルター上に集菌された $\it Halomonas \, sp. \, KM-1 \,$ 株は内部標準物質 $\it 5\, \mu \, M$  を含んだメタノール $\it 2\, mL \,$ に浸し超音波処理した後に、 $\it 1.6\, mL \,$ を遠沈管に移し、凍結条件下で $\it HMT$ に送付した。

HMT にて、 $1.6\,\text{ mL}$  のクロロホルム及び $640\,\mu\text{ L}$  のMilli-Q 水を加え撹拌し、遠心分離( $2,300\,\times\,g$ ,  $4^\circ$  C,  $5\,$  分)を行った。遠心分離後、水相を限外ろ過チューブ(MILLIPORE, ウルトラフリーMC UFC3 LCC 遠心式フィルターユニット  $5\,$  KDa)に $250\,\mu\text{ L}\,\times\,6\,$  本移し取った。これを遠心( $9,100\,\times\,g$ ,  $4^\circ$  C,  $120\,$  分)し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び $50\,\mu\text{ L}\,$  のMilli-Q 水に溶解して測定に供した。

培養液上清については、試料を希釈して測定に供した。カチオンモードでの測定では試料 $40~\mu$ L に対し、内部標準物質の濃度が1~mM のMilli-Q 水 $10~\mu$ L を加え、撹拌し、測定に用いた(4/5~倍希釈)。アニオンモードでの測定では、試料 $10~\mu$ L に対し、内部標準物質の濃度が1~mMのMilli-Q~水 $10~\mu$ L を加え、さらに $30~\mu$ L のMilli-Q~水を加え、撹拌したものを用いた(1/5~倍希釈)。

# 測定

本試験ではカチオンモード、アニオンモードの測定を以下に示す条件で行った。

#### 陽イオン性代謝物質(カチオンモード)

装置 Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) 6 号機

Capillary : Fused silica capillary i.d. 50  $\mu\,\mathrm{m}$  imes 80 cm

測定条件

Run buffer : Cation Buffer Solution ( p/n : H3301-1001) Rinse buffer : Cation Buffer Solution ( p/n : H3301-1001)

Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 10 sec

CE voltage: Positive, 27 kV MS ionization: ESI Positive MS capillary voltage: 4,000 V

MS scan range : m/z 50-1,000

Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n: H3301-1020)

### 陰イオン性代謝物質(アニオンモード)

装置 Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies 社) 5 号機

Capillary: Fused silica capillary i.d. 50  $\mu$ m imes 80 cm

測定条件

Run buffer: Anion Buffer Solution (p/n: H3302-1021)
Rinse buffer: Anion Buffer Solution (p/n: H3302-1022)

Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 25 sec

CE voltage: Positive, 30 kV MS ionization: ESI Negative MS capillary voltage: 3,500 V MS scan range: m/z 50-1,000

Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n: H3301-1020)

#### 分析結果

# • データ処理

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver. 1.0.6.12 (慶應義塾大学開発)を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。得られたピーク面積値は下記の式(相対面積値 =目的ピークの面積値/内部標準物質の面積値)を用いて相対面積値に変換した。次に、m/z とMT の値をもとに、各試料間のピークの照合・整列化を行った。このとき、ピーク以外のノイズは削除した。また、これらのデータにはNa+やK+などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。

#### • 候補代謝物質検索

検出されたピークに対して m/z とMTの値をもとにHMT代謝物質データベースと の照合、検索を行った。検索のための許容誤差はMT で  $\pm 0.5 \, \text{min}$ 、m/z では  $\pm 10 \, \text{ppm}$ (質量誤差(ppm)=(実測値-理論値)/実測値 $\times 10^6$ )とした。

#### 代謝経路の描画

代謝物質定量データの代謝経路マップへの描画を実施した。代謝経路の描画には、VANTED (Visualization and Analysis of Networks containing Experimental Data) を用いた。描画に用いた代謝物質の名称には、一部HMT 化合物データベースとは異なる略称を用いている。尚、代謝経路はヒトで確認された酵素を基に作成している。

#### • 候補代謝物質検索

Halomonas sp. KM-1 株 4 検体をCE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。この結果、HMT 代謝物質データベースに登録された物質のm/z 及びMT の値から163(カチオン60,アニオン103)ピークに候補物質が付与され、候補物質が絞り込まれた163 ピークについて、各群間の相対面積値比を算出した。

これらの候補物質を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、 尿素回路、Purine代謝経路、Pyrimidine 代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に 描画した。

#### 要約

Halomonas sp. KM-1 株 4 検体について、キャピラリー電気泳動 -飛行時間型質量分析計 (CE-TOFMS) のカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。本試験では、HMT 代謝物質データベースに登録された物質を対象として解析を行った。この結果、163 (カチオン60, アニオン103) のピークが検出された。これらの物質を解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、Purine 代謝経路、Pyrimidine 代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路に示した(図 18)。

## 参考文献、資料

- 1) T. Soga, D. N. Heiger: Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass
- spectrometry. Anal. Chem. 72: 1236-1241, 2000.
- 2) T. Soga, Y. Ueno, H. Naraoka, Y. Ohashi, M. Tomita et al.: Simultaneous determination of anionic
- intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray
- ionization mass spectrometry. Anal. Chem. 74: 2233-2239, 2002.
- 3) T. Soga, Y. Ohashi, Y. Ueno, H. Naraoka, M. Tomita et al.: Quantitative metabolome analysis using
- capillary electrophoresis mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **2**: 488-494, 2003.
- 4) http://vanted.ipk-gatersleben.de/\_\_

今後、これらのデータを基に、代謝を改変し、より多くのPHBを生産できるよう培養条件等の改変を行う。

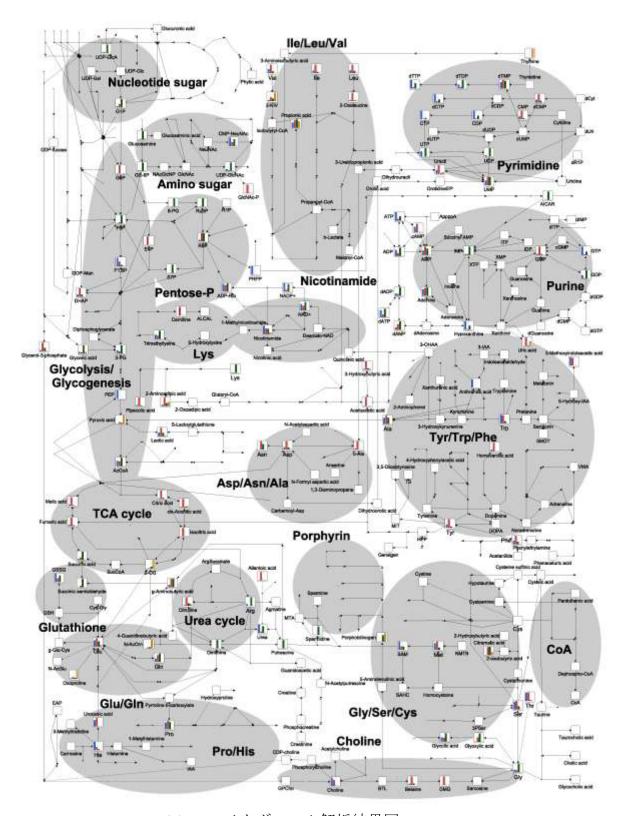


図18. メタボローム解析結果図

# 2-10. 代謝物解析 2 (メタボローム解析)

#### 試験目的

炭素源(グリセロール、廃グリセロール)、培養時間(24時間、48時間)の条件の 異なる Halomonas sp. KM-1 株について、CE-TOFMS によるメタボローム解析 を行い、イオン性代謝物質の変動を測定解析した。分析及び解析は、ヒューマ ン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社研究所(HMT)に依頼して行った。

#### 材料及び方法

・ Halomonas sp. KM-1 株 を、10%グリセロール、10%廃グリセロールでそれ ぞれ培養し、菌体サンプルは24時間と48時間、上清サンプルは48時間、計6サン プルについて分析を行った。48時間サンプルについては、同時に電子顕微鏡で の観察を行った。

### 各分析值

10% グリセロール調製分

	Time	菌体重量	PHB%	PHB重量	吸光度0D600
	24h	6. 78g/1	9.0%	0.61 g/L	11. 827
	48h	34. 80	63.6%	22.12 g/L	68.305
10%	廃グリ	セロール調製分			
	Time	菌体重量	PHB%	PHB重量	吸光度0D600
	24h	17. 68	40.8%	7.22 g/L	23.890
	48h	23.40	52.8%	12.35 g/L	45. 223

分析手法は前回と同じ。

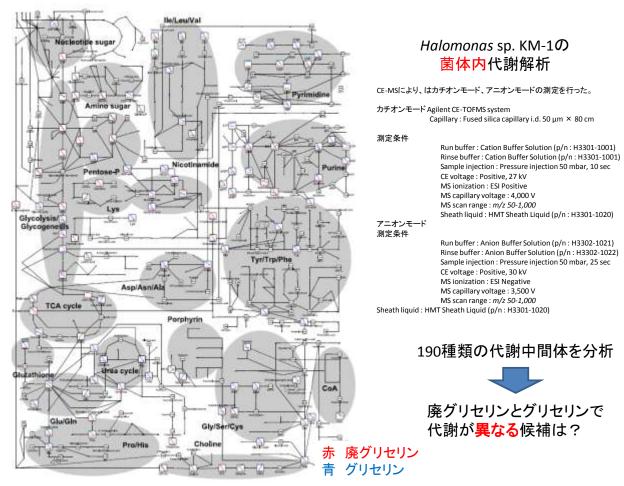


図19. メタボローム解析結果図

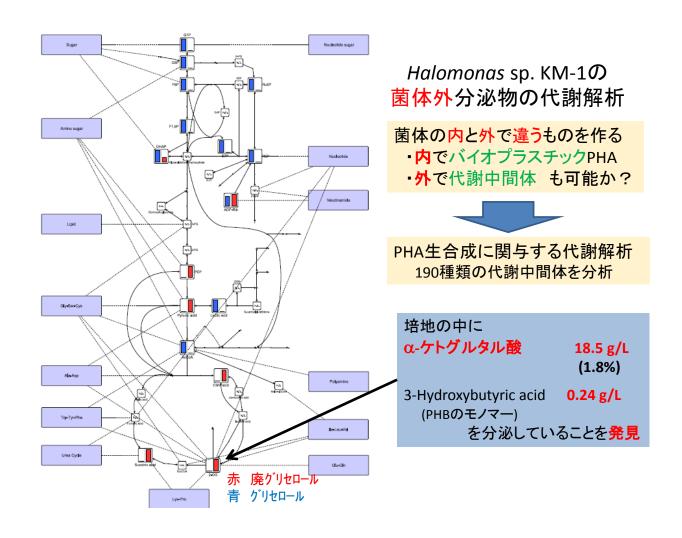


図20. 培養液のメタボローム解析結果図(部分拡大)

菌体内外ともに、グリセロール、廃グリセロールで代謝物が異なることが見受けられた。特に、菌体外の代謝物について注目して分析すると、廃グリセロールの培地上清に $\alpha$ -ケトグルタル酸が 18.5 g/L、3-Hydroxybutyric acid(PHB のモノマー)が 0.24 g/L、それぞれ分泌発現していることが判明した。これらの差異は、PHB 生産において、グリセロールと廃グリセロールの PHB 蓄積効率の違いが、PHB とは異なる $\alpha$ -ケトグルタル酸等へ変換されていることを示す発見であった(図19,20)。そこで、 $\alpha$ -ケトグルタル酸の産生について、分析した。

#### **2-11**. α-ケトグルタル酸の分析

培地中に分泌された $\alpha$ -ケトグルタル酸は以下の手法で測定した。上記培養した培養液を遠心分離して菌体上清のみを回収し、 $50\mu$ 1をコンセントレーターで1時間乾燥さ

せた。これに、3 vol% H2SO4 を含むメタノール 0.50 ml を加え 105  $^{\circ}$   $^{\circ}$   $^{\circ}$  で 2 時間加熱 した。その後、室温まで冷却した後、クロロホルム 0.50 ml、蒸留水 0.25 ml を加え、激しく攪拌した。1 分間遠心分離したのち、クロロホルム層を 1  $^{\circ}$   $^{\circ}$ 

# グリセリンからのα-ケトグルタル酸の産生の状況

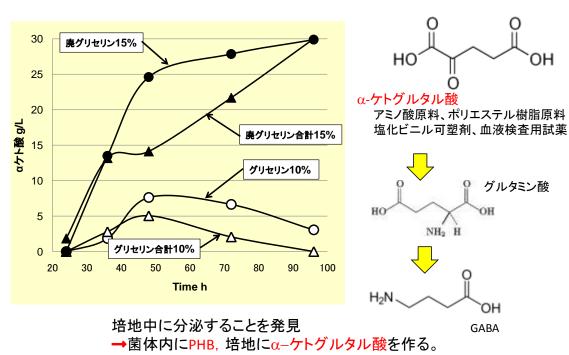
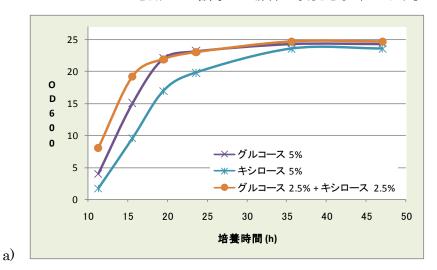
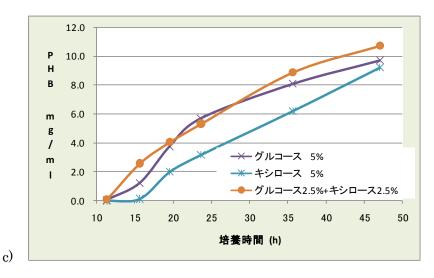


図 21.  $\alpha$ -ケトグルタル酸の産生量

2-12. グリセロール以外の炭素源の利用の可能性について さらに、グリセロール以外の炭素源の利用の可能性も検討した。その過程の中でグル コースとキシロースを用いて培養した場合の状況を以下に示す。



90% 80% 70% 60% 50% 40% 30% <del>──</del> グルコース 5% 20% <del>\*\*\*</del> キシロース 5% 10% ◆ グルコース2.5%+キシロース2.5% 0% 10 15 20 25 30 35 40 45 50 培養時間 (h) b)



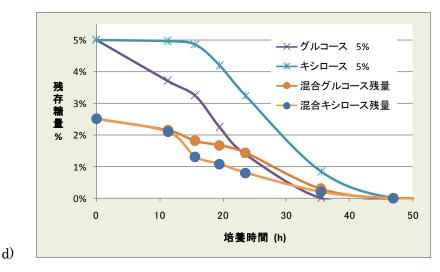


図22. グルコース、キシロースを用いた *Halomonas* sp. KM-1 株の培養解析 a)成長曲線、b)PHA のうち Poly(3-hydroxybutyrate)(PHB)の乾燥菌体あたりの含有率、c)PHB の培養液あたりの蓄積量、d)培養液あたりのグルコース、キシロースの残存量

グルコース、キシロースともに、ほぼグリセロール相当の培養速度、PHB 蓄積効率を示した。バクテリアを培養する場合、グルコースが存在すると、グルコースが優先して代謝されるカタボライトレプレッション(代謝制御)があることが知られている。しかしながら、本菌株においては、2.5%ずつグルコースとキシロースを混合して培養した場合も、グルコース 5%と比べ、成長速度は早く、また、それぞれの培地中での残存量もほぼ同じスピードで代謝されていることが図 2 2 で示されている。

現在、バイオエタノール生産においては、グルコース(C6)が、キシロース、アラビノース(C5)に比べ優先して代謝されることが問題となっている。本菌株は、図8d)より C5 糖の代謝が C6 糖に比べて遜色ないことが示されているため、今後何らかの理由で C5 糖の過剰が社会問題となった場合には、廃グリセロールとともに C5 糖も効率よく利用し、PHB 生産が可能なことが示された。