

・考察

実験室スケールでの廃グリセロール処理PHA生産条件の確立

研究課題として

1. 好塩、好アルカリ細菌のスクリーニングおよび突然変異株の作製
 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
- を設定して研究を行った。

課題 1 について

好塩、好アルカリ細菌 *Halomonas* sp. KM-1 株が得られ、高塩、高アルカリ環境において極めて旺盛に生育し、変異株も含めこれを上回る生育特性を持った菌株は得られていない。

当初懸念された BDF 副製夾雑物については、メタノールは有効に回収する手段が確立されており、その他の夾雑物についても、廃グリセロールを培地の 20%まで混合しても生育可能であり、脂肪酸メチルエステル等の夾雑物も 1%以上混入しても、目立った生育の抑制は認められないなど、本菌の潜在的な適応能力の高さが示された。

また、廃グリセロールを処理する培養条件において、菌相変化を 16SrRNA を用いてモニタリングし、*Halomonas* sp. KM-1 株のみが生育していることを確認した。

また、ゲノム情報も明らかになったことから、将来は PHA 産生に不要な遺伝子群の変異、不活化した株などを用い、より高効率な PHA 産生に向け検討を進展させることが可能と判断する。

課題 2 について

グリセロールを与えた場合、初年度には 10 g/L、最終年度には 40 g/L の PHB を生産することができた。廃グリセロールの場合、初年度は 4.5 g/L、最終年度は 14.9 g/L の生産を行うことができた。研究当初の目標である、2 g/L をはるかに超える成果を得たが、最終年度に目指した 100 g/L には届かなかった。

一方、グリセロールと廃グリセロールで、PHB の生産量、乾燥菌体に占める割合が異なることから、菌体内外の代謝物についてメタボローム解析を行った結果、グリセロールは 8 g/L、廃グリセロールは最大 30 g/L の α -ケトグルタル酸を培地に分泌発現していることを発見した。

暫定的な分析結果ながら、グリセロールと廃グリセロールで蓄積される代謝物が異なっており、グリセロールの場合は PHB がその多くを占め、一方で廃グリセロールの場合は α -ケトグルタル酸がその多くを占めること、これらの間には相補的な関連があり、炭素源のほとんどがこれら 2 種の化合物に転換されることがわかってきた。

実際の処理現場を考えると、単一の産物を得ることに利点がある一方で、菌体内にバイオプラスチック PHA、培地に α -ケトグルタル酸、それぞれ培地に対しパーセントオ

ーダーで蓄積できるとことは、今まで報告されたことがない新しい事例である。

実際の培養で問題となる雑菌の混入については、意図的に土壌や活性汚泥を混入する試験においても、PCR-DGGE 法、リアルタイム PCR 法を用いた分析で、*Halomonas* sp.KM-1 株に由来するバンドのみが増幅され、また、同培養液を画線培養しても、*Halomonas* sp.KM-1 株のみの培養が認められたため、雑菌の混入に対して極めて強いことが明らかとなった。