

リグニンスルホン酸からの菌体生産

I. 酢酸資化性菌の分離と培養

桑原 正章, 鍵村 達夫, 村木 周作

PRODUCTION OF MICROBIAL CELLS FROM
LIGNOSULFONATEI. Isolation and cultivation of acetate-assimilating
microorganisms

Masaaki KUWAHARA, Tatsuo KAGIMURA and Shusaku MURAKI

Acetate-assimilating organisms were isolated from soil samples by an enrichment culture technique. Each organism was cultured in a medium supplemented with Na-acetate as a carbon source in concentrations of 0.25–8.0%. μ_{max} of yeast strains A 601, A 1603 and A 4404 were calculated to be 0.25, 0.39 and 0.23 hr⁻¹, respectively. A Gram-positive rod, A 2904 assimilated 8.0% acetate and the maximal growth was obtained in 4.0% acetate; growth of cell was 8.9 based on absorbance at 600 nm. μ_{max} of this bacterium was 0.22 hr⁻¹. Continuous cultures of A 4404 and A 2904 were examined using a chemostat.

酢酸資化性酵母および細菌を土壤中より分離した。無孢子酵母と考えられる菌株 A 601, A 1603, および A 4404 の最大増殖速度係数 μ_{max} はフラスコ培養において、それぞれ 0.25, 0.39, および 0.23 hr⁻¹ となった。グラム陽性桿菌 A 2904 は酢酸ナトリウム 8% まで生育を示し、 μ_{max} は 0.22 hr⁻¹ であり、2 日間培養で生育度 8.9 (吸光度) に達した。連続培養条件においては A 4404 では μ_{max} は 0.14 hr⁻¹, 収量係数は 0.078 (平均) となり、A 2904 では μ_{max} は 0.36 hr⁻¹, 収量係数は 0.325 (平均) となった。

結 言

リグニンは光合成産物のうちセルロースに次いで大量に生産される植物体構成成分である。Kirk の試算によれば、リグニンの年間生産量は 200 億トンに達し、⁽¹⁾ 資源的な重要性が指摘される。De novo に合成されるリグニンとともに、産業廃棄物として未利用のままのリグニンの有効利用を計ることは重要と考えられる。本研究はリグニンを微生物的な手段により有用な物質に変換することを目的とする研究の一環として行なっている。

リグニンはフェニルプロパノールの重合体で、一般に生物的作用を受け難く、これが微生物的利用を防げる一因となっている。このためまず化学的処理によりリグニンを微生物作用を受けやすい構造に変えた後、微生物による利用を行なう方式が考えられる。酸化剤としてオゾンはリグニンの芳香環を攻撃してリグニンを低分子化し、種々の分子量の分解中間体のほか、酢酸、マレイン酸、シュウ酸、ムコン酸などの低分子脂肪酸の混合物を生成する。^(2,3) 本研究はオゾン処理したリグニンスルホン酸を培養原料とし、微生物菌体をはじめ種々の物質を生産することを最終目的とする。本報はまずオゾン分解物中に存在する酢酸に注目し、酢酸資化性菌の生育と培養工学的な性質について予備的に検討した結果について述べる。

実 験 方 法

培養 酢酸資化性菌の分離と培養には、1.0% 酢酸ナトリウム (3 水塩) (酢酸として 0.44%), 0.3% (NH₄)₂SO₄,

0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% 酵母エキスからなる pH 6.2 (酵母用) および 7.5 (細菌用) の培地を用いた。また、これに 2% 寒天を加えたものを固体培地に用いた。回分培養は培地 6 ml を含む 18 mm 試験管中および 100 ml を含む 500 ml 三角フラスコ中で、28°C, 振とう培養条件下で行なった。連続培養には New Brunswick Scientific 社製ケモスタット連続培養装置 C-30型を用いた。

培養液の菌体生育度は 600 nm における吸光度により測定し、別に作成した菌体重量と吸光度との関係を示す検量線から乾燥菌体重量を算出した。

定量 培養液中の酢酸はガスクロマトグラフィーにより定量した。まず培養液の遠心分離上澄液に約 1/4 量の Dowex 50×4 [H⁺] を加えて酢酸を遊離型とし、FID を付置した日立ガスクロマトグラフ 163 型により次の条件で分析した。カラム, Tenax GC (ガラスカラム, 3 mm×1 m); カラム温度, 110°C; インジェクションポートおよび検出器温度, 170°C; キャリアガス, N₂ (40 ml/min)。

実験結果

1. 酢酸資化性酵母および細菌の分離

土壌試料より集積培養により酢酸資化性菌を多数分離したが、このうち良好な生育が認められた酵母 A 601, A 1603, A 4404 および細菌 A 2904 の 4 菌株を主として実験に用いた。

酵母 A 601, A 1603 はスライド培養において菌糸および擬菌糸を形成した (Fig. 1-A, 1-B)。また、振とう培養では卵形、円筒形、棍棒形等、種々の形態を示した (Fig. 2-A, 2-B)。これらの形態的特徴は両株が *Trichosporon*, *Can-*

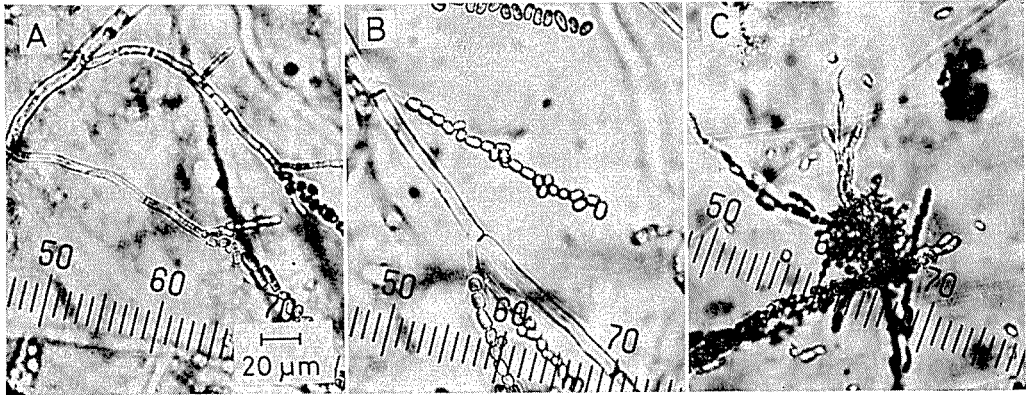


Fig. 1. Photomicrographs of slide cultures of acetate-assimilating yeasts, A 601 (A), A 1603 (B) and A 4404 (C).

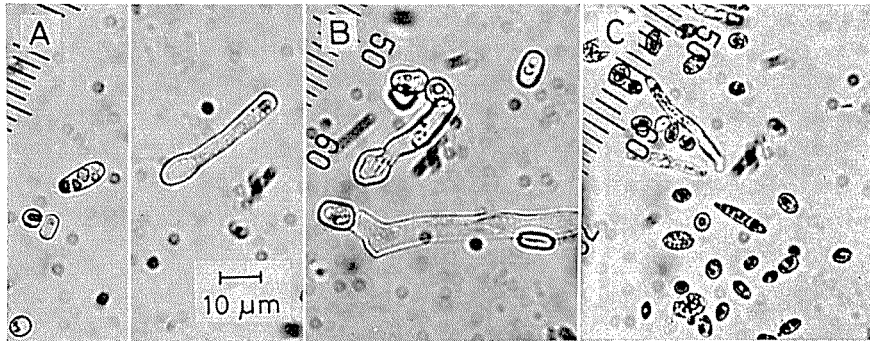


Fig. 2. Photomicrographs of acetate-assimilating yeasts, A 601 (A), A 1603 (B) and A 4404 (C) grown in liquid medium under shaking condition.

dida, *Torulopsis* など無孢子酵母に属することを示している。また, A 4404 では明確な菌糸あるいは擬菌糸の形成は認められず (Fig. 1-C), 振とう培養においては前2株と比べ小型の卵形あるいは紡垂形の細胞を形成した (Fig. 2-C)。この菌については形態からの分類上の位置は推測できなかったが, 非発酵性酵母に属すると考えられる。

一方, 細菌 A 2904 はグラム染色陽性, 非運動性であり, Fig. 3 に示すように $0.5\sim 0.7\ \mu\text{m}\times 1.0\sim 1.3\ \mu\text{m}$ の大きさを持つ桿菌であったが, 同定には至っていない。

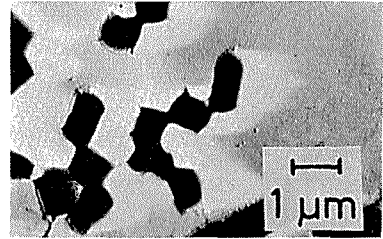


Fig. 3. Electron micrograph of acetate-assimilating bacterium A 2904.

2. 酢酸培地における酵母の生育

酵母 A 601, A 1603, A 4404 は窒素源として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ や NH_4NO_3 などの無機態窒素を利用し, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ の場合 0.25~0.5% 添加で生育は最も良好であった。また, 初発培養液 pH 5~7, リン酸カリウム ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) 0.1~0.2% で最もよく生育した。次いで酢酸ナトリウム濃度を 0.25~8.0% と変化させ, 増殖速度への影響を検討した。試験管振とう培養においては Fig. 4 に示すように, A 601 は 4.0% まで生育し, グラフから算出した最大生育速度係数 μ_{max} は $0.22\ \text{hr}^{-1}$ であった。A 1603 は他の菌株と異り高濃度の酢酸ナトリウムに耐性で, 8.0% まで生育でき, μ_{max} は $0.18\ \text{hr}^{-1}$ であった。A 4404 は 2.0% で最もよく生育し, μ_{max} は $0.22\ \text{hr}^{-1}$ であった。3日間培養後の吸光度で測定した生育度は, A 601 では 4.0% において 1.9, A 1603 では 8.0% で 1.3, A 4404 では 4.0% において 2.5 であった。

フラスコ培養においては Fig. 5 に示すように, μ_{max} は試験管培養に比べて大となり, A 601, A 1603, A 4404 についてそれぞれ $0.25, 0.39, 0.23\ \text{hr}^{-1}$ となった。また, この培養においては, 基質消費量に対する菌体増加量の関係を示す $\Delta X/\Delta S$ 直線は Fig. 6 に示すようになり, この直線の傾斜から算出された収量係数 $Y (= \Delta X/\Delta S)$ は A 601, A

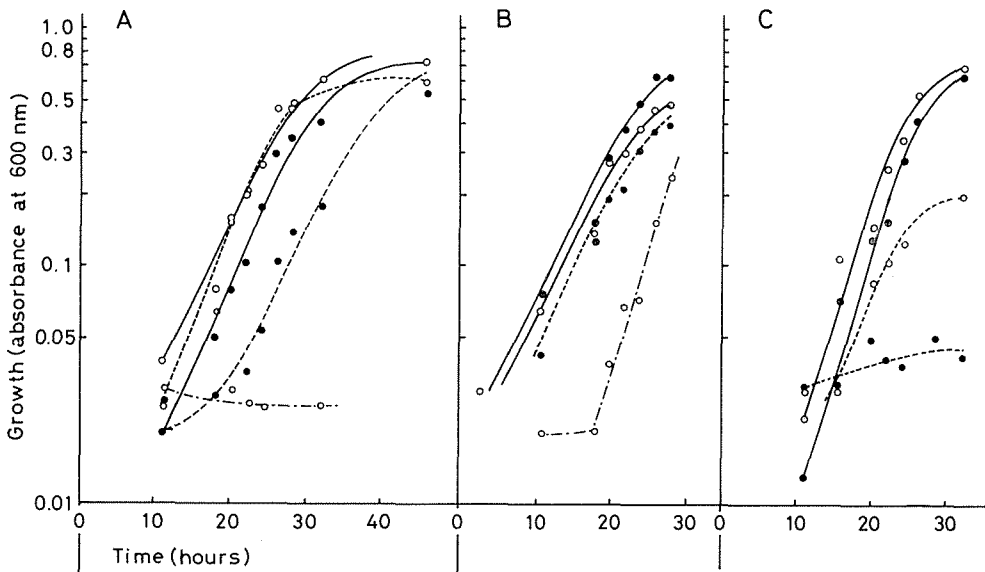


Fig. 4. Effect of acetate concentration on growth of A 601 (A), A 1603 (B) and A 4404 (C).

Medium contained indicated amount of Na-acetate, 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% yeast extract (pH 6.2). An aliquot of the cell suspension was inoculated into 6 ml of medium in a 16.5-mm test tube. Culture was at 28°C with reciprocal shaking.

Symbols: ---○---, 0.25%; —○—, 1.0%; —●—, 2.0%; ---●---, 4.0%; ---○---, 8.0%.

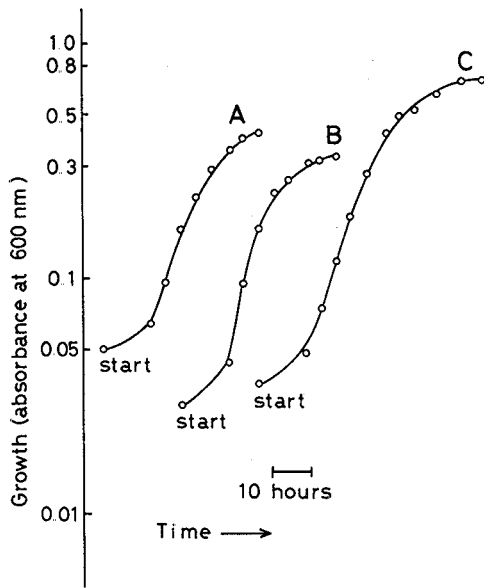


Fig. 5. Growth of A 601 (A), A 1603 (B) and A 4404 (C).

Each strain was cultured in 100 ml of medium in a 500-ml flask with rotary shaking. μ_{max} were calculated to be 0.25, 0.39 and 0.23 hr⁻¹ for A 601, A 1603 and A 4404, respectively.

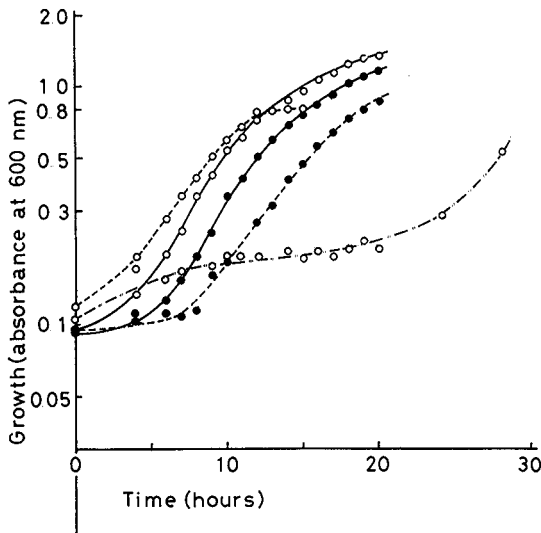


Fig. 7. Effect of acetate concentration on growth of A 2904.

Composition of medium was the same as that for yeast except that pH was adjusted to 7.5. Symbols are the same as in Fig. 4. μ_{max} was calculated to be 0.22 hr⁻¹.

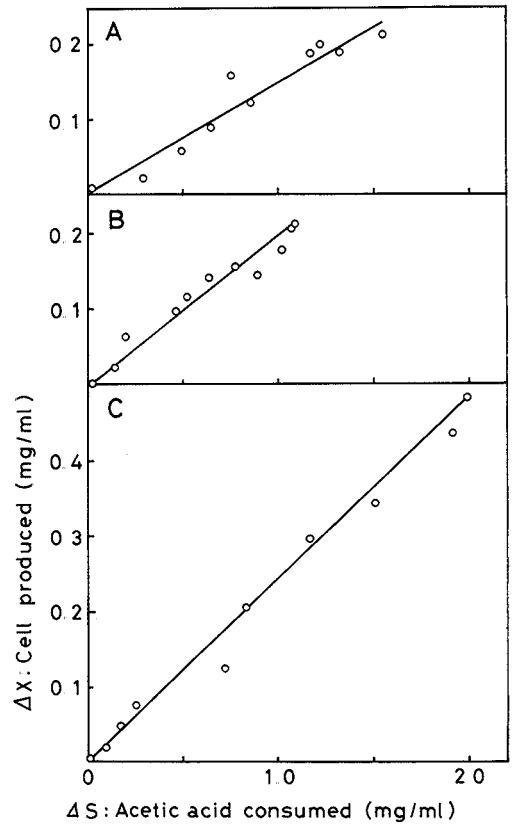


Fig. 6. ΔX - ΔS curves of A 601 (A), A 1603 (B) and A 4404 (C).

Yield coefficients (Y) were calculated to be 0.15, 0.20 and 0.25 for A 601, A 1603 and A 4404, respectively.

1603, A 4404 に対し、それぞれ 0.15, 0.20, 0.25 となった。

3. 酢酸培地における細菌の生育

細菌 A 2904 を酵母の場合と同様、種々の濃度の酢酸ナトリウムを含む培地で振とう培養した (Fig. 7)。この菌株は 0.25~8.0% に生育し、 μ_{max} は 0.22 hr⁻¹ であった。また、4.0% 2 日間の培養で生育は吸光度 8.9 に達した。これは、5 mg/ml の菌体収量に相当する。この菌株は 8.0% でも約 24 時間の log の生育を開始した。

4. 連続培養

ケモスタット型連続培養装置を用いて酢酸からの酵母 A 4404 および細菌 A 2904 の菌体生産を試みた。また、定常状態における各菌株の生育のパラメーターを算出し、生育のそれぞれの特性について考察した。なお、培養液

Table 1. Growth parameters of strains A 4404 and A 2904 in continuous culture

Strain	D (hr ⁻¹)	X_{∞} (mg/ml)	S_{∞} (mg/ml)	Y	μ_{\max} (hr ⁻¹)	K_s (mg/ml)
A 4404	0.05	0.32	0.48	0.079	0.14	0.84
	0.10	0.19	2.10	0.077		
	0.20		wash-out			
A 2904	0.05	1.52	0.13	0.349	0.36	0.58
	0.10	1.28	0.22	0.300		
	0.21	1.06	0.79	0.326		
	0.25		wash-out			

Abbreviations: D , dilution rate; X_{∞} , cell concentration at steady state; S_{∞} , acetic acid concentration at steady state; Y , cell-yield coefficient; μ_{\max} , maximal growth rate constant; K_s , acetic acid concentration which gives $\mu_{\max}/2$.

Culture condition: fermentor volume, 350 ml; aeration, 1.5 l/min; agitation, 500 rpm. Medium: 1.0% Na-acetate (0.44% as acetic acid), 0.3% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.0005% FeSO₄·7H₂O, 0.001% yeast extract. The pH of the culture was controlled automatically at 6.2 for A 4404 or 7.5 for A 2904 with 1.0 N HCl or 1.0 N NaOH, respectively.

中の菌体濃度および残存基質濃度が一定値を保った時、定常状態に達したものと判定した。さらに溶存酸素量 (DO) が一定値を示すことも定常状態の目安とした。実験より得られた各パラメーターは Table 1 にまとめた。

まず酵母 A 4404 について、希釈率 (D) を 0.05 hr⁻¹ として培地を連続的にフィードし、菌体濃度 0.06 mg/ml の条件で培養を開始し、160時間後に定常状態を得た。ついで、希釈率 0.10 hr⁻¹、菌体濃度 0.10 mg/ml の条件で培養を行ない、12時間後に定常状態を得た。この2つの培養で得た定常状態での菌体濃度 (X_{∞}) と残存濃度 (S_{∞}) の値を Monod の経験式から誘導された定常解を与える式

$$\begin{cases} x_{\infty} = Y(S_r - S_{\infty}) & (1) \quad (S_r: \text{制限基質濃度, } 0.44 \text{ mg/ml}) \\ S_{\infty} = \frac{K_s}{(\mu_{\max}/D) - 1} & (2) \quad (K_s: \mu_{\max}/2 \text{ を与える基質濃度}) \end{cases}$$

に代入した。まず、(1) 式より、 $D=0.05$ (hr⁻¹) の時 $Y=0.079$ 、 $D=0.1$ (hr⁻¹) の時 $Y=0.077$ が得られた。次いで (2) に各希釈率での S_{∞} を代入し、連立方程式を解き、 $\mu_{\max}=0.14$ (hr⁻¹) および $K_s=0.84$ (mg/ml) を得た。

一方、A 2904 も同様に連続培養を行なった。希釈率 0.05 hr⁻¹、初期菌体濃度 0.50 mg/ml で培養を開始し、25時間後に定常状態が得られた。希釈率 0.1 hr⁻¹、菌体濃度 1.52 mg/ml では29時間後に、また、希釈率 0.21 hr⁻¹、菌体濃度 1.04 mg/ml では16時間後に定常状態が得られた。なお、0.25 hr⁻¹ 以上の希釈率では洗い出しの状態となった。これらの値をそれぞれ (1) に代入し、 Y を算出し、平均値 0.325 を得た。また、(2) に各値を代入し、 $\mu_{\max}=0.3$ (hr⁻¹) および $K_s=0.58$ (mg/ml) の値が得られた。これらの数値は、生育速度、最大生育量および菌体収率のいずれにおいても、A 2904 は A 4404 などの酵母よりも優れていることを示している。

考 察

酢酸を発酵原料とする物質生産は、非糖質原料の利用の点から重要であり、生産物としては、微生物菌体やアミノ酸その他の通常の糖からの発酵生産物が想定されている。緒方ら⁽⁴⁾ は *Candida*, *Pichia*, *Hansenula* などの各属に酢酸資化性の菌株を報告した。また、パン酵母のある株にも酢酸資化能が示されている。⁽⁵⁾ Edwards ら⁽⁶⁾ は *Candida utilis* を用い、酢酸に対する菌体増殖について検討し、 $\mu_{\max}:0.54$ hr⁻¹ の値を得ている。われわれの得た値はこれよりも低い。一方、細菌については *Brevibacterium* や *Corynebacterium* 属の菌株に酢酸資化能が認められ、グルタミン酸の生産が試みられている。⁽⁷⁾ 本実験で得られた A 2904 は *Brevibacterium* や *Corynebacterium* の 610 nm で測定した生育度が 0.8 以下であるのに対し、より高い生育度を示した。分離した酵母、細菌いずれの菌株も、培養条件特に良好な窒素源と栄養要素の選定により、増殖速度、菌体収量ともに増加するものと考えられる。

樋口らによれば、リグニンスルホン酸をオゾン分解すると酢酸 5mM に相当する揮発酸が生成する。⁽⁸⁾ リグニンからの有機酸の生成蓄積量は有機酸の生成反応と分解反応の平衡状態に左右されると考えられ、蓄積量の増加のための条件が現在検討されている。本報では特に酢酸資化性菌について取り上げたが、マレイン酸標品自体に生育する菌株も分離しているので、これらの菌株を併用して、リグニンスルホン酸あるいはそのオゾン分解物から菌体を生産する方法を検討中である。

謝 辞

酢酸資化性菌の連続培養については金沢大学工学部化学工学教室沢田達郎教授にご助言をいただいた。また、電子顕微鏡観察には本学徳田孝技官にご助力いただいた。併せて謝意を表したい。本研究の一部には文部省科学研究助成金（環境特別研究「植物廃棄物の有効利用に関する研究」）を用いた。

文 献

- | | |
|---|--|
| <p>(1) KIRK, T. K.: <i>Biological Delignification</i>, Weyerhaeuser, p 31 (1976).</p> <p>(2) 畠山兵衛, 外岡豊穂, 中野準三, 右田伸彦: 工化, 71, 96 (1968).</p> <p>(3) HIGUCHI, T.: <i>Microbiology for Environment Cleaning</i>, ed. K. ARIMA, p. 550 (1978).</p> <p>(4) 緒方浩一, 西川英郎, 大杉匡弘: 醗工, 48, 478 (1970).</p> <p>(5) 松浦慎治, 高橋治男, 真鍋 勝: 醗工, 53, 258</p> | <p>(1975).</p> <p>(6) EDWARDS, V. H., GOTTSCHALK, M. J., NOOJIN, A. Y., III, TUTHILL, L. B. and TANNAHILL, A. L.: <i>Biotechnol. Bioeng.</i>, 12, 975 (1970).</p> <p>(7) TSUNODA, T., SHIO, I. and MITSUGI, K.: <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i>, 7, 18 (1961).</p> |
|---|--|

(1980年10月31日 受理)