

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月27日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560806

研究課題名（和文） バイオフィルムリアクターを用いたC5糖の有効利用

研究課題名（英文） Effective utilization of C5 sugars through the use of biofilm reactor

研究代表者

阿野 貴司（ANO TAKASHI）

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：80202654

研究成果の概要（和文）： バイオマスの糖化後に得られる、グルコースを主とする6炭糖（C6糖）とキシロースを主とする5炭糖（C5糖）の内、一般的に微生物は、C6糖を資化することはできるが、C5糖を資化することができないものが多い。そこでC5糖を有効利用することができる枯草菌を用い、C5糖の有効利用という観点からC5糖による有用抗菌物質をモデル物質として生産を試みた結果生産性が高まることが示され、C5糖の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： The main components of plant biomass are carbohydrates, a mixture of cellulose, and hemicellulose. When cellulose and hemi-cellulose are hydrolyzed, their constituent sugars, glucose (a six carbon sugar, hence "C6") and xylose (a five carbon sugar, hence, "C5"), are produced respectively. As a method of metabolizing the C5 sugars is required to utilize the biomass effectively, *Bacillus subtilis* was used to metabolize the C5 sugar. Production of a useful antibiotic as a model compound was employed, and the higher productivity was observed, and the usefulness of C5 sugars were shown.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオリアクター

1. 研究開始当初の背景

(1) 石油資源の枯渇に備え、枯渇しない持続可能な資源として、太陽光線をエネルギー源とする光合成によるバイオマスの有効利用が重要視され始めている。植物バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース及びリグニンの3つの主要な化合物から成り立っている。現在までの技術開発により、リグニンの取出しや燃料としての利用が進んでいる他、セルロースの分解と分解産物であるグルコ

ースを主成分とする6炭糖（C6糖）の有効利用は進んでいる。これに比べて、ヘミセルロースに由来するキシロースなどの5炭糖（C5糖）に関する研究は少なく、このためヘミセルロースの有効利用が重要であると考えられる。このような背景からバイオマスの有効利用にあたっては、ヘミセルロースの有効利用が重要であると考えられる。また、微生物学的には、グルコースのアルコール変換において多用される酵母はC5糖であるキ

シロースを利用することができない。このため、本研究では、C5糖の利用が可能である枯草菌を用い有効利用を図ることを考えた。

(2) 次に重要な研究の学術的背景として、バイオフィルムを上げることができる。微生物が、膜状に集合して増殖するバイオフィルムという概念が注目を集めている。このバイオフィルムの研究は、医学における感染症の分野や歯学におけるプラークや虫歯などの領域において主に進められているため、病気との関連性やバイオフィルムの形成メカニズムの解析が中心である。従って、国内・国外ともにバイオフィルムを用いた有用物質生産への応用、およびそのためのリアクターの開発に関する研究は、ほとんど行われていない。バイオフィルムの有効利用として、物質生産のためにリアクターへの応用を考える点が新しい点である。

バイオフィルムリアクターには、以下のようなメリットが考えられる。

(1) 液体培養に比べて、細胞が集積して培養されるため、菌数密度が10倍以上高くなる。

(2) 細胞が固い膜状になるため、遠心操作のような固液分離が不要となる。

(3) 静置培養が基本となるため、通気や攪拌に要する動力がほとんど不要となる。

(4) 培地中に蓄積する代謝産物への耐性が高いため、生産物阻害の回避ができる。

(5) 発泡が生じないため、ジャー培養などで問題となる発泡の抑制が不要となる。

(6) 細胞の移動が非常に小さいため、コンタミネーションが生じても被害が局所的である。

我々は、バイオフィルム形成能を持たない菌株に、抗生物質生産能を付与した。すると、抗生物質生産能力が付与されたばかりでなく、バイオフィルム形成能も出現したことに気付いた。そこで、この発見により、バイオフィルム状態を用いた抗生物質生産という新しい試みと、高密度に微生物細胞が集積しているというバイオフィルムの特性を活かした新しいリアクターを開発するという研究背景が出現した。

2. 研究の目的

持続可能な社会に向けて化石燃料への依存を減らすことは重要課題のひとつであり、この観点からもバイオマス（木材、稲ワラ、草など）の有効利用が望まれている。バイオマスに含まれるセルロース、ヘミセルロースの糖化により、グルコースを主とする6炭糖（C6糖）とキシロースを主とする5炭糖（C5糖）が得られるが、エタノール発酵等に用いられる有用微生物には、C6糖を資化することはできるが、C5糖を資化すること

ができないものが多く、本研究では、C6糖に加えて、C5糖も資化できる枯草菌を用いることにより、バイオマスの高度な有効利用を目的とした。また、枯草菌を用いた発酵には、新しい培養概念であるバイオフィルムリアクターという細胞が高度に集積した状態を培養に用いるという発想を用い、バイオマスの有効利用に応用することを目的とする。また、通気や攪拌という通常のリアクターに必須のステップを必要としないため、このバイオフィルムリアクターを用いることにより、通気・攪拌動力に要するエネルギーを省力化することが可能となることも考えられた。

また、浸透圧に対する耐性も高まることが予想されるため、液体培養では増殖が難しいような、高濃度の培養基質を用いても、培養が可能となることが示唆され、液体培養では困難な濃度における培養も目的とした。以上の理由から、最終産物の濃度が上昇する培養、物質の精製等が容易になり、廃溶媒等の減少など、培養後のプロセスにおいても環境負荷が少なく、かつ省エネルギーとなるような、高密度培養、高濃度物質生産、省エネルギー、省廃溶媒、等の新しい特性が期待される、C5糖の利用というバイオマスの高度有効利用の試みを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料及び方法

使用菌株は、*B. subtilis* RB14-CS で、10%(w/w)グリセリン溶液にて-80℃で保存した。*B. subtilis* RB14 は、in vitro で各種の植物病原菌の増殖を抑制することがわかっており、RB14株の streptomycin 耐性変異株が RB14-C 株である。本研究で使用した RB14-CS 株は、RB14-C 株の自然突然変異株であり、streptomycin 耐性、iturin A 生産能を有する。また streptomycin 耐性により、土壌中における菌数を計測する際に他の土壌微生物の存在下でも RB14-CS 株を検出することができる。

(2) 使用培地は、L培地、mSM培地であり、培地は120℃、20 min、オートクレーブ滅菌を行った。mSM培地に使用した Polypepton S は脱脂大豆由来である。L培地は、1 Lあたり、Polypepton 10、Yeast extract 5、NaCl 5、を含み pH 7.0 である。また、mSM培地は、Polypepton S を 8%、carbon source として、glucose あるいは、xylose を 6.70%、K₂HPO₄ を 0.50%、MgSO₄ · 7H₂O を 0.05%、FeSO₄ · 7H₂O 25mg/L、MnSO₄ · 7H₂O を 22mg/L、CaCl₂ を 184mg/L それぞれ含み、各成分を別滅菌して調整した。

(3) 培養および菌数測定

5 mL の L 培地で 37°C、120 spm の条件で 16 時間前培養した後、200 mL 三角フラスコ中の mSM 培地 40 mL に 400 μ L を植菌し、30°C、120 spm の条件で本培養を行った。

菌数は平板希釈法により測定した。培養液 100 μ L を 0.85% NaCl 水溶液で適当に希釈し、希釈液 100 μ L を L プレートに塗布し、37°C で 1 晩静置培養後、コロニーを計測した。また、希釈前に培養液を 80°C、10 min 熱処理を行うことによって、孢子数の測定も行った。また、pH メーター(Φ300 pH Meter)により、培養液の pH も測定した。

(4) HPLC による培養液中の iturin A 濃度の分析は、RB14-CS 株の培養液 100 μ L を 10 mM $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 65 : 35(\text{v/v})$ で 10 倍希釈し、ボルテックスした。micro tube mixer で 15 min 攪拌後、15,000 $\times g$ 、4°C、10 min 遠心分離し、得られた上清を pore size 0.20 μ m の PTFE フィルター (アドバンテック東洋 (株)) で濾過することで不純物を除去した。得られた抽出サンプルを HPLC (カラム: Chromolith Performance RP-18eb (MERCK) 4.6 mm ϕ \times 100 mm) に 20 μ L インジェクションした。展開溶媒は 10 mM $\text{NH}_4\text{OCOCH}_3 : \text{CH}_3\text{CN} = 65 : 35(\text{v/v})$ で、流速は 2 mL/min、カラム温度は 30°C とした。流出パターンを UV 検出器 (880-UV, Interigent UV/VIS Detector、日本分光工業 (株)) を使い、205 nm で検出した。iturin A 標品を使用し、iturin A 量とピークの高さとの相関性から iturin A の定量を行った。

(5) HPLC による培養液中の残糖濃度(グルコース、キシロース、アラビノース)の分析 RB14-CS 株の培養液 100 μ L を $\text{CH}_3\text{CN} : 3.8$ mM トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液 = 4 : 1 (v/v) の溶離液 900 μ L に入れ、4°C、15,000 rpm、10 min 遠心分離を行った。得られた上清を孔径 0.20 μ m の PTFE メンブレンフィルターでろ過した。このサンプルから HPLC 分析によりグルコース、キシロース、アラビノースの残糖濃度を測定した。使用した装置は、ポンプ; PU-980、カラムオープン; CO-965、示差屈折計; RID-300、インテグレーター; 807-IT、条件 Column; 順相アミノカラム、Shodex $\text{NH}_2\text{P-50 4E}$ 4.6 mm ϕ \times 250 mmL、Guard column; Shodex $\text{NH}_2\text{P-50G}$ 、Column 温度; 40°C、溶媒; $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} = 3 : 1$ (v/v)、 H_2O はイオン交換水を孔径 0.20 μ m の Cellulose Nitrate メンブレンフィルターでろ過し、 CH_3CN と混合してから脱気して使用した。尚、 CH_3CN は和光純薬株式会社製の高速液体クロマトグラフィー用を用いた。尚、流速; 1.0 mL/min、サンプルのインジェクション量; 20 μ L とした。各糖の標品を使

用し、各糖の量とピークの高さとの相関性から残糖濃度の定量を行った。

4. 研究成果

(1) 各培養液の pH の経時変化の結果を Fig. 1 に示す。glucose 含有培地(Glc)では培養 1 日目に pH が減少したが、2 日目以降は増加し続け、培養 4 日目には約 8 まで上昇した。xylose 含有培地(Xyl)では pH は約 7 でありあまり変化しなかった。炭素源に糖を加えていない培地(Non)では培養 2 日目には pH が約 9 まで上昇し、その後はあまり変化しなかった。pH は各培地において、異なる挙動を示した。これは RB14-CS 株による、glucose と xylose の代謝経路における生産物質の違いによるものではないかと考えられる。

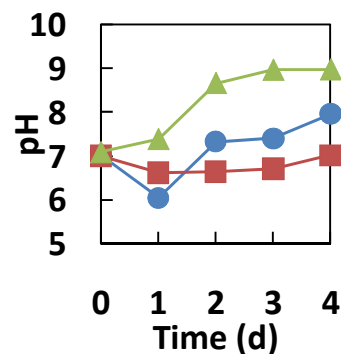


Fig. 1 pH の経時変化(丸 Glc、四角 Xyl、三角 Non)

(2) 生菌数の経時変化、iturin A 生産の結果

各培養液の生菌数の経時変化の結果を Fig. 2 に示す。全ての培養液が、培養開始から 1 日目にかけて 10^6 から 10^8 オーダーに上昇し、さらに 2 日目に 10^9 オーダーまで上昇して、その後は定常期に入る、といった傾向にあった。各培養液の孢子数の経時変化の結果は、Glc では、孢子数は培養 2 日目から 3 日目にかけて急激に増大し、培養 4 日目には、生菌数とほぼ同程度の値になることが示された。Xyl では、孢子数は培養 1 日目から増加傾向にあり、培養 4 日目には生菌数の 1/10 程度となった。Non では培養 2 日目には生菌数と孢子数がほぼ同じ値になった。

各培養液の培養 4 日後の iturin A 濃度の結果を Fig. 3 に示す。培養 4 日後の iturin A 濃度において、Glc は Non の 1.3 倍程度、Xyl は Non の 2 倍程度となった。Xyl において、生菌数が培養初日から 4 日目までに約 1000 倍となったこと、さらに残糖濃度が培養 3 日目に 0 となっていることから、RB14-CS 株が xylose 資化能を有することが示された。また、xylose を添加することによって、有用物質 iturin A の生産性が向上することも確認で

きた。さらに微生物の栄養源として一般的に用いられている glucose よりも約 1.5 倍もの iturin A を生産した。

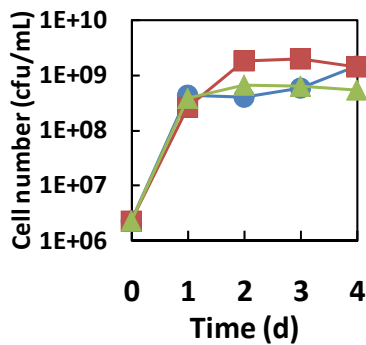


Fig. 2 生菌数の経時変化 (丸 Glc、四角 Xyl、三角 Non)

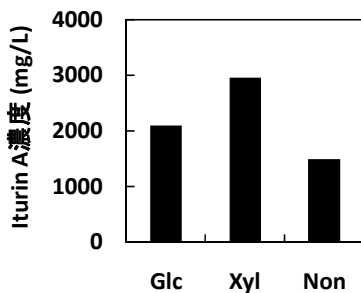


Fig. 3 各糖源を含む培地における iturin A 生産

(3) 残糖濃度の経時変化 各培養液の残糖濃度の経時変化の結果を Fig. 4 に示す。glucose は培養 2 日目に全て消費され、xylose は培養 3 日目に全て消費された。糖の消費速度、胞子形成速度においては、Glc よりも Xyl の方が遅いという結果となった。

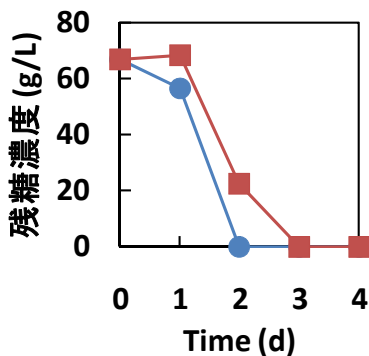


Fig. 4 残糖濃度の経時変化 (丸 Glc、四角 Xyl)

これは C5 糖である xylose の方が微生物にとって資化しにくいために、培地中の栄養源である xylose が長く培地中に残存するからであると考えられる。さらにこのことから、Xyl では iturin A の二次代謝が持続すると考えられるので、Xyl の方が Glc よりも iturin A を多く生産すると考えられる。

(4) 本研究において本培養培地として用いた mSM 培地は、窒素源として大豆脱脂粉末を由来とする soy bean powder を用いるため、大豆廃棄物の再利用としても価値のあるものである。この大豆脱脂粉末は、溶解性が低いいため、ポリペプトンを用いることで、高濃度培地での iturin A 生産を試みたところ、バイオフィーム状態では、通常の液体培養では困難な 25% というような高濃度培地濃度においても増殖および生産が認められ、バイオフィームリアクターの有用性が示された。

また、天然物に由来するヘミセルロースを用いた場合も有用物質の生産が可能であるか否かを調べるために、バイオ燃料作物として注目を浴びている *Jatropha curcas* の種子採油残渣を用い iturin A 生産を試みたところ効率よく生産されることが示され、ヘミセルロースを分解しながら増殖、物質生産が可能なのも示された。

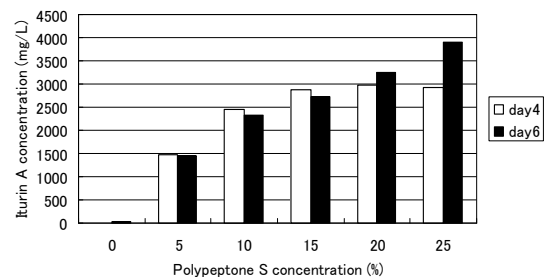


Fig. 5 高濃度ペプトン培地における iturin A 濃生産

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① A.W. Khan, M.S. Rahman, U.S. Zohora, M. Okanami, T. Ano. Production of surfactin using pentose carbohydrate by *Bacillus subtilis*. Journal of Environmental Sciences vol23, S63-S65 (2011). (査読有)

② A.W. Khan, M.S. Rahaman, U.S. Zohora, M. Okanami, T. Ano, Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using

pentose carbohydrate. *Extende Abstracts of The 4th international Symposium on Environmental Economy and Technology*, pp.61-63, 2010. (査読無)

- ③ A.W. Khan, M.S. Rahaman, U.S. Zohora, M. Okanami, T. Anō, Utilization of pentose carbohydrate and production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *Extende Abstracts of The 4th international Symposium on Environmental Economy and Technology*, pp.58-60, 2010. (査読無)

[学会発表] (計 3件)

- ① 吉川諒、大池 達矢、松川 哲也、岡南 政宏、梶山 慎一郎、阿野 貴司、*Jatropha curcas* の種子採油残渣を用いた微生物農薬の開発、日本農芸化学会、2012年3月24日、京都女子大学、京都府
- ② A.W. Khan, M.S. Rahaman, U.S. Zohora, M. Okanami, T. Anō, Utilization of pentose carbohydrate and production of iturin A by *Bacillus subtilis*. June 24, 2010, Dalian Jiatong University, China.
- ③ A.W. Khan, M.S. Rahaman, U.S. Zohora, M. Okanami, T. Anō, Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using pentose carbohydrate. June 23, 2010, Dalian Jiatong University, China.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿野 貴司 (ANO THAKASHI)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：80202654

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

