

第4章 メタン菌の菌体活性とビタミンB₁₂含有濃度の相関関係

4-1 序

前述したようにビタミンB₁₂は悪性貧血を防ぐ、神経の働きを正常に保つ、または、動物の成長因子として重要な有用物質である。ところが、今までのビタミンB₁₂生産方法としてはプロピオン酸菌を用い、ビタミンB₁₂の含有濃度の低いことと生産物である有機酸の阻害などの欠点を問題として残されている。メタン菌を利用して、従来の廃水処理とメタンの生産の同時にビタミンB₁₂のような有用物質生産が可能である。この場合、コストは低く、ビタミンB₁₂濃度は高く、生成物としてメタンガスであるなどの利点がある。これによって、高生産性、低コストのビタミンB₁₂生産システムの構築も可能と考えられる。しかし、H₂ / CO₂ 資化性メタン菌を利用し、ビタミンB₁₂の生産に関する研究は非常に少ないのは現状である。特に、メタン菌の菌体活性とビタミンB₁₂含有濃度の相関関係についての研究はまだなされていない。

Mazumder, T. K. ら(1987)の報告により、コリノイドは菌体外へ分泌される。この点については ① 菌体外タンパク量が極めて低いこと、② 栄養十分な対数増殖期においても菌体外コリノイド生成が見られることから主として分泌されるものと考えている。その一因は、L-システイン添加によるメタン生成

菌の細胞膜透過能の変動があり、また、植物においてシステインによる青色色素の分泌の向上も報告されている（大島ら 1991）。メタン菌の対数増殖期と定常期について、ビタミンB₁₂の生産はどんな変化がある、H₂ / CO₂ 資化性メタン菌に含まれたコリノイドは菌体外へ分泌される可能性についても調べるべきである。

この章は加圧真空試験装置を用いて、H₂ / CO₂ 資化性メタン菌を高密度培養法で培養し、メタン菌の活性とビタミンB₁₂含有量との相関関係を調べ、高効率のメタン発酵からビタミンB₁₂の生産技術の開発を目的とする。

4-2 実験材料及び方法

4-2-1 実験装置

試験管培養は全て加圧培養試験管（16 by 160 mm, 30mL）を用い、振とう培養を行った。試験管内の酸素の除去、基質ガスの注入及び加圧は図 3-1 に示す加圧真空培養装置（三紳工業）を利用し、実験を行った。

4-2-2 菌種

菌種は嫌気状態で筑波大学構内の池の底泥体積物から採集し、CO₂ と H₂ (20/80、v/v) を基質とし、微量金属塩など含む標準濃度の無機混合培地によ

り、温度 37℃、2.8L のジャーファーマンタで 6 ヶ月の半連続馴養を行った。

また、馴養されたメタン菌群は CO₂ と H₂ (20/80、v/v) を基質とする菌種が優先菌となり、位相差顕微鏡(オリンパス、BX50) の観察でほとんど長かん菌であることを判った。

4-2-3 培地

試験管培養用培地 (tube 培地)の組成は下記の通りである：KH₂PO₄ , 3.4 g ; K₂HPO₄ , 3.4 g ; NH₄Cl , 2.13 g , Na₂CO₃ , 2.54 g , 10 ml 及び微量金属塩液 10 ml に蒸留水を加えて 1 L とした。

微量金属液の組成：MgCl₂ · 6 H₂O , 4.1 g ; MnCl₂ · 4H₂O , 0.5 g ; FeCl₂ · 4H₂O , 0.5 g ; NiCl₂ · 6H₂O , 0.12 g ; ZnSO₄ · 7H₂O , 0.1 g ; CoCl₂ · 2H₂O , 0.1 g ; CaCl₂ · 6H₂O , 0.1 g ; Na₂SeO₃ , 0.08 g ; Na₂MoO₄ · 2H₂O , 0.024 g ; CuSO₄ · 5 H₂O , 0.01 g ; Al K(SO₄)₂ , 0.01 g ; H₃BO₃ , 0.01 g ; NaWO₄ · 2H₂O , 0.01 g に蒸留水を加えて 1L とした。培地を嫌気状態にさせる前に、システイン等は液体で培地を入れた加圧試験管に注入(添加)してから、加圧真空装置で 2atm の基質ガスを用い、加圧及び減圧を数回繰り返し、試験管内を嫌気状態にした。嫌気状態の加圧試験管に嫌氣的に接種した後、試験管内を 2atm まで加圧した。

4-2-4 実験方法

メタン菌は CO_2/H_2 資化性馴養メタン菌を用いた。接種サイズは 20%、加圧培養試験管を用いて 37°C の振蕩培養槽 (130 回往復/min) より行った。試験管内の酸素の置換除去および基質ガスの充填、加圧は加圧真空置換装置を用いて行った。

一定の時間間隔でサンプルを採集し、メタン生成量、メタン菌体密度及びビタミン B_{12} の含有量をガスクロマトグラフ (島津 GC-8A)、分光光度計、液クロマトグラフ (日本分光 CULLIVER 1500 シリーズ) を用いて測定を行った。

4-2-5 分析方法

1) ガス組成の分析

ガスクロマトグラフ (島津製作所 GC-8A) でガスの成分の分析を行った。カラム充填剤に Porapak-Q (P-Q)、キャリアガスを N_2 とし、カラム温度 60°C、検出器温度を 80°C に設定した。 CH_4 、 CO_2 、 H_2 の濃度を三回測定し、その平均値を求めた。

2) B_{12} 含量の分析

液クロマトグラフ (日本分光 CULLIVER 1500 シリーズ) を用いて、3 章と同じ方法で測定する。

3) メタン菌体密度の測定

① 乾燥重量法

A. 機器：濾過機、吸引瓶、0.2 μm のメンブレンフィルターを用いる。

B. 測定手順：

I. 20mL の検体と培地を一本ずつ瓶に取る。

II. 濾過機を使って20mL の培地を0.2 μm のフィルタで濾過する。

III. このフィルタを105℃で2時間乾燥した後、デジケータの中に移し、十分放冷後 a を測る。

IV. 上記の重量を測ったフィルタを再び使い20ml の菌の検体を濾過する。

V. 上記のIII、IVを経て、十分放冷後重量 b を測る。

VI. 菌体の乾燥重量 = $(a - b)1000 / 20$ (mg / L)

② 濁度法

A. 機器：高感度分光光度計（東京光電 ANA-72）。

B. 測定手順：

I. PH 7.0 の磷酸緩衝液で希釈された(4 倍または 8 倍)培地を対比液として試料セルに注入し、セルホルダーにセットする。

II. I と同様に検体を希釈して試料セルに注入し、セルホルダーにセットする。

Ⅲ. セルホルダーを試料室に入れ、560nm にあわせ、吸光度を読み取る。

4-3 結果及び考察

実験の結果は図 4-1 に示した。培養開始後 17 時間までのメタン生成速度を見た場合に、対数増殖期を呈し、それと対応してビタミン B₁₂ の含有濃度も同じ傾向で増大した。メタン生成速度は最も高い時、すなわち、メタン菌の活性は高い時のビタミン B₁₂ 濃度は最大であり、その濃度は 2.03mg/L に達成した。メタン生成速度は安定期に入ると、ビタミン B₁₂ 生成速度は急に減少し、その後、徐々に減少する傾向が見られた。このことから、メタン菌の活性は一番活発した対数増殖期間で、ビタミン B₁₂ 含有濃度が最も高いことが確認できた。これによって、高効率ビタミン B₁₂ を生成するため、メタン発酵の操作条件の一つ重要な知見を得た。Sakurai, Y.ら(1977)の研究より、対数増殖期では一般に細胞の大きさ、形状などがほとんど一定などで、その時期の細胞構成成分もほぼ一定の比例に維持されている。したがって対数増殖期において、ビタミン B₁₂ は細胞外大量分泌可能性が高い。しかし、微生物細胞の特性から見ると、対数増殖期から定常期に入ると細胞の構成成分はかなり変動し、その時期反応に必要な酵素の構成成分である Co, Ni などの摂取も十分ではない、ビタミン B₁₂ の菌体外への分泌量も減少していく可能性が考えられる。これについ

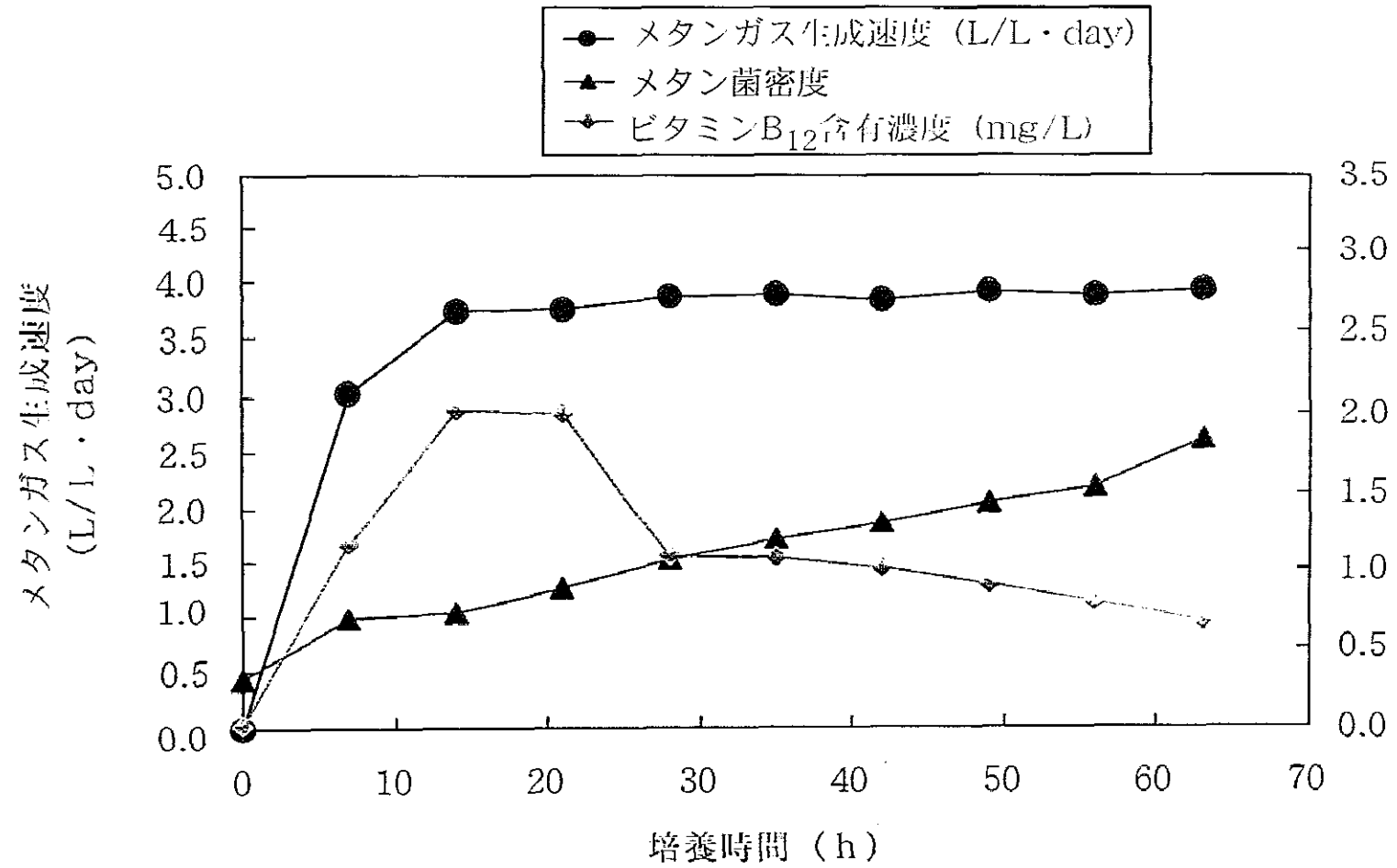


図 4-1. メタン菌菌体活性と培養液から抽出した
ビタミンB₁₂含量との関係図

て、さらに研究する必要がある。

4-4 まとめ

メタン菌の活性は一番活発した対数増殖期間で、ビタミンB₁₂含有濃度が最も高いことが確認できた。これによって、高効率ビタミンB₁₂を生成するため、メタン発酵の操作条件の一つ重要な知見を得た。

それは加圧試験管培養の結果である、実際連続発酵リアクターを用いて培養を行う場合、どんな結果になるについて、さらに検討する必要がある。