

沖縄で分離した好アルカリ性・好塩性細菌による PHB 生産

世嘉良宏斗、花城隆二、楽隆生*¹、常盤豊*²

好アルカリ性・好塩性細菌は高 pH や高塩濃度条件下で生育可能なことから、培養時の雑菌汚染を抑制した効率的な発酵生産が期待できる。沖縄県内で分離した 66 菌株について、pH10 に調整した培地を用いてポリ(3-ヒドロキシ酪酸) (PHB) の生産性を調べた。このうち生産性の高かった 4 菌株について、異なる pH 条件で発酵試験を行ったところ、いずれの菌株も pH8~9 のとき生育が良好で PHB を多く生産した。また、これらの菌株は塩濃度が高いほど良好に生育し、このうち 1 菌株は高塩濃度 (NaCl 濃度 10%) のとき最も PHB 量が多かった。さらに、2 種類の無機窒素源を培地に用いたときの生産量の変化を比較した結果、窒素源の種類が生産性に影響することが分かった。

1 はじめに

ポリ(3-ヒドロキシ酪酸) (PHB) は代表的な生分解性プラスチックのひとつで、微生物による発酵生産が可能なことから、未利用バイオマスを原料とする生産が期待されている。PHB の発酵生産に関する研究は多数報告されており、これらを応用した樹脂について商業生産が行われた例もある¹⁾。一方、微生物の細胞内に蓄積される PHB は分離・精製することが容易ではないため、近年では、PHB の構成単位である (R)-3-ヒドロキシ酪酸 (R3HB) を効率的に生産するための方法も検討されている²⁾。光学活性体である R3HB はプラスチックや医薬品の原料となるキラルビルディングブロックとして期待されている。また、R3HB は人間の体内における生理活性物質としても重要な役割を担っており、いくつかの疾病に対する予防や治療の効果も期待されている^{3,4)}。

沖縄県内においても小規模ながら PHB の発酵生産が行われているが、県内で用いられている PHB 生産菌株は生育が不安定で発酵管理が容易ではないことが課題となっており、低コスト生産や生産規模の拡大ができない要因のひとつとなっている。一方、PHB 生産菌のなかでも *Halomonas* 属細菌は、好アルカリ性・好塩性の微生物で、pH10 の強アルカリ条件や 30% 塩化ナトリウム含有培地での生育が可能な菌株も報告されている^{5,6)}。好アルカリ性・好塩性菌の培養では、培地の pH や塩濃度を高めることによって雑菌汚染を抑制することが可能なため、培地や培養装置の高圧高温滅菌を省略できる可能性がある。好アルカリ性・好塩性菌を用いることで pH や塩濃度条件によって発酵管理を容易に行うことができれば、生産規模拡大のための設備やエネルギーのコスト低減が期待できる。

そこで本研究では、発酵管理が容易な PHB 生産菌を得るため、沖縄県内で採取した試料から好アルカリ性・

好塩性細菌を分離・収集し、その PHB 生産性を調べた。さらに生産性の高い菌株について、培養条件の最適化を検討した。

2 実験方法

2-1 微生物の分離

沖縄県内で採取した海洋由来の試料や天然藍染料を分離源として用いた。海洋由来の試料は pH10 に調整した液体培地に接種し、1~5 日間好氣的に集積培養した。これらを生理食塩水で適宜希釈して、pH10 に調整した寒天培地に塗布し、30℃で数日間培養した。寒天培地上に出現したコロニーを、見た目の違いにより釣菌して新たな寒天培地で培養し、純化するまでこれを繰り返した。分離菌株は一部を凍結保存するとともに寒天培地で継代・保存した。

2-2 分離菌株の PHB 発酵試験

分離菌株の PHB 生産性を比較するための発酵試験では 3 種類の培地 (無機窒素培地、糖蜜培地、酵母エキス培地) を用いた。培地は水酸化ナトリウム溶液で pH10 に調製後、ろ過滅菌して使用した。1L あたりの培地組成は以下のとおり。

無機窒素培地：スクロース 15g、グルコース 15g、炭酸ナトリウム 34g、炭酸水素ナトリウム 13g、塩化ナトリウム 15g、硝酸ナトリウム 2g、リン酸水素二カリウム 1g、硫酸マグネシウム七水和物 10mg、硫酸鉄七水和物 8mg

糖蜜培地：糖蜜 50g

酵母エキス培地：スクロース 20g、酵母エキス 2g、塩化ナトリウム 10g、硫酸マグネシウム七水和物 10mg、硫酸鉄七水和物 8mg

これらの培地を試験管へ 4mL ずつ分注した後、分離

*1 甲南化工 (株)、*2 元任期付研究員

菌株の種培養液（液体培地で数日間好気培養したもの）を接種して3日間好気培養（30℃、振とう 200rpm）した。培養液のうち 3mL を遠心分離して菌体を回収し、加熱乾燥（120℃、3時間）した後で重量を測定した。乾燥菌体はさらに硫酸で加水分解し、生成したクロトン酸量から PHB 量を換算した。

2-3 pH 及び塩濃度の違いによる生産性比較

pH の影響を比較した発酵試験では、水酸化ナトリウム溶液で pH8、9、10 に調整した液体培地（1L あたりの組成：スクロース 50g、酵母エキス 4g、塩化ナトリウム 10g、硫酸マグネシウム七水和物 10mg）をろ過滅菌後、試験管に各 4mL ずつ分注し、上述と同様に分離菌株を接種・培養して PHB 量や菌体量を調べた。

塩濃度の影響を比較した発酵試験では、塩化ナトリウムを 0、1、5、10% となるよう添加した液体培地（1L あたりの組成：スクロース 50g、酵母エキス 4g、硫酸マグネシウム七水和物 10mg）を水酸化ナトリウム溶液で pH10 に調製してからろ過滅菌し、上述と同様に試験した。

2-4 窒素源の違いによる生産性比較

窒素源の違いを比較するための発酵試験は、尿素あるいは硝酸ナトリウムを加えて窒素濃度が同じになるよう調整した培地 2L を用いて、卓上型培養装置で培養条件を一定に保つよう制御して行った（pH9、30℃、攪拌速度：700rpm、通気量：5L/分）。培養の途中で培養液の一部を分取して、PHB 量や菌体量、糖の消費量を調べた。1L あたりの培地組成：グルコース 100g、炭酸ナトリウム 5g、炭酸水素ナトリウム 13g、塩化ナトリウム 10g、硝酸ナトリウム 10g（又は尿素 5g）、リン酸水素二カリウム 2g、硫酸カリウム 1g、硫酸マグネシウム七水和物 200mg、エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム 90mg、塩化カルシウム 40mg、硫酸鉄七水和物 10mg

2-5 HPLC 分析及び 16S rRNA 遺伝子解析

グルコース及びクロトン酸（上述した PHB の加水分解物）は HPLC を用いて定量した。また、分離菌株の分類は 16S rRNA 遺伝子領域の解析情報を用いて行った。HPLC の分析条件や 16S rRNA 遺伝子解析等の方法については既報^{7,8)}に示した。

3 実験結果と考察

3-1 好アルカリ性菌の分離と PHB 生産性

沖縄県内 42 カ所で採取した海水等の海洋由来の試料

表 1 分離菌株の PHB 生産量比較

菌株 ID	分離源	PHB (g/L)		
		無機窒素培地	糖蜜培地	酵母エキス培地
1011	海水	(N.G.)	—	—
1211	海岸堆積物	(N.G.)	1.9	0.5
1212	海岸堆積物	(N.G.)	2.5	0.5
1213	海岸堆積物	(N.G.)	1.9	1.3
1235	海岸堆積物	(N.G.)	—	(N.G.)
1251	海水	2.5	1.0	0.6
1252	海水	1.7	1.1	0.5
1261	海岸堆積物	4.8	4.5	2.2
1262	海岸堆積物	2.5	1.5	0.7
1271	海水	2.3	2.4	1.3
1281	海水	4.9	3.3	3.4
1291	海水	0.9	2.0	1.0
1301	海水	1.5	1.8	0.7
1302	海水	0.2	0.7	0.5
1313	海水	4.2	3.3	3.4
1320	海水	—	—	—
1330	海水	2.4	0.9	0.9
1340	海水	2.2	3.0	3.0
1341	海水	0.4	—	—
1342	海水	2.0	3.3	3.3
1350	海水	1.1	1.9	1.9
1380	海岸堆積物	(N.G.)	—	—
1381	海岸堆積物	(N.G.)	—	—
1390	海岸堆積物	(N.G.)	—	—
1391	海岸堆積物	(N.G.)	—	—
1400	海水	1.8	2.4	1.1
1410	海水	0.9	0.8	0.5
1420	海藻	0.4	1.2	0.6
1430	海藻	1.7	2.2	1.0
1440	海岸堆積物	0.9	2.5	1.5
1450	海岸堆積物	0.3	0.3	2.0
1451	海岸堆積物	—	—	—
1460	海水	1.3	0.6	0.8
1461	海水	0.3	2.5	0.7
1462	海水	0.3	2.5	1.4
1470	海岸堆積物	—	0.1	—
1471	海岸堆積物	0.1	3.1	—
1480	海水	(N.G.)	—	—
1481	海水	—	—	—
1490	海岸堆積物	0.7	0.1	1.3
1500	海水	0.2	—	0.3
1501	海水	2.3	0.2	0.5
1502	海水	1.5	0.4	0.6
1510	海岸堆積物	1.2	0.3	2.5
1511	海岸堆積物	0.2	1.4	1.5
1520	海岸堆積物	3.1	0.1	2.3
1530	海水	(N.G.)	0.1	—
1531	海水	(N.G.)	—	0.1
1532	海水	(N.G.)	—	—
1540	海岸堆積物	—	3.4	(N.G.)
1550	海岸堆積物	(N.G.)	—	(N.G.)
1560	海岸堆積物	—	2.7	0.8
1570	海水	0.1	1.3	0.7
1571	海水	0.2	(N.G.)	0.8
1572	海水	0.2	(N.G.)	2.2
1580	海岸堆積物	—	(N.G.)	(N.G.)
1590	海水	(N.G.)	—	(N.G.)
1591	海水	(N.G.)	1.5	0.5
1600	海岸堆積物	—	0.7	1.0
5093	藍染料	—	1.2	0.6
5105	藍染料	—	0.6	0.5
5108	藍染料	(N.G.)	2.2	0.7
5110	藍染料	—	0.1	0.6
5113	藍染料	5.2	1.9	2.2
5139	藍染料	3.2	1.0	0.3
5151	藍染料	—	1.8	2.3

—: 検出限界以下 N.G.: 生育不良

と県内5カ所の工房で採取した天然藍染料を分離源として、pH10の強アルカリ条件で生育する微生物を分離した結果、海由来の分離源から84菌株、天然藍染料から7菌株（計91菌株）を単離した。

分離菌株のうち液体培地での生育が良好だった66菌株について、3種類の培地（無機窒素培地、糖蜜培地、酵母エキス培地）で培養したときのPHB生産性を比較した（表1）。その結果、52菌株がPHBを生産することが分かった。これらのPHB生産量は培地の種類によって異なり、無機窒素培地ではID5113、糖蜜培地ではID1261、酵母エキス培地ではID1281とID1313がそれぞれ最も生産量が多かった。

分離した91菌株について、16S rRNA遺伝子領域の解析を行ったところ、*Halomonas*属や*Bacillus*属等に分類されることが分かった（図1）。このうち生育良好で生産試験に供した66菌株は、未同定の3菌株以外、ほぼ全て*Halomonas*属に分類された。上述のとおり*Halomonas*属細菌のような好アルカリ性・好塩性細菌は、その特異な性質を利用した効率的な発酵生産が期待されており、PHB生産性の高い菌株も報告されている⁹⁾。好塩性である*Halomonas*属細菌は塩分濃度の高い環境から分離が報告されており、県内の海洋由来の試料からも多数分離できることが分かった。また、強アルカリ条件で使用される天然藍染料も有価物生産菌の分離源となることが確認された。

今回分離した*Halomonas*属細菌は培地条件や菌株によって様々な生産性を示しており、強アルカリや高塩濃度の環境から好気条件で分離を行うことで多様な性質のPHB生産菌株を分離・収集できる可能性が示唆された。

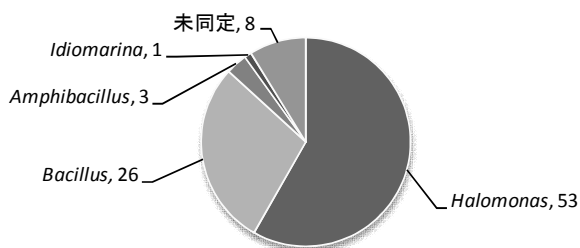


図1 分離菌株の分類と分離数

3-2 塩濃度及びpHの影響

*Halomonas*属細菌は好塩性・好アルカリ性のPHB生産菌として知られていることから、培地の塩濃度とpHが生産性にどのような影響を与えるか調べた。表1の各培地条件で生産性の高かった4菌株（ID5113、1261、1281、1313）を用いて、NaCl濃度あるいはpHが異なる培地で培養した時のPHB生産量と菌体重量を比較した。

塩濃度の影響については、4菌株ともNaCl濃度が高いほど菌体重量が増加して生育が良好であることが示唆された（図2B）。しかし、PHB生産に最適なNaCl濃度は菌株によって異なっており、ID1261、1313、5113はNaCl濃度1%、ID1281はNaCl濃度10%のとき高い生

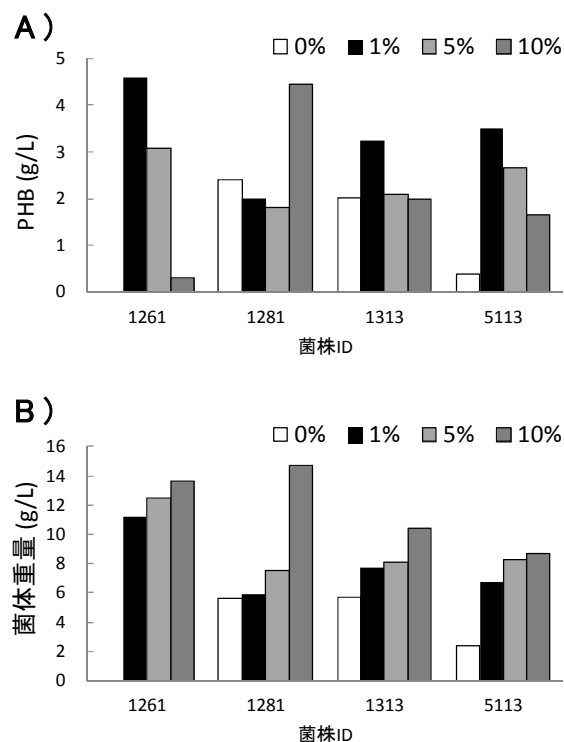


図2 NaCl濃度の影響

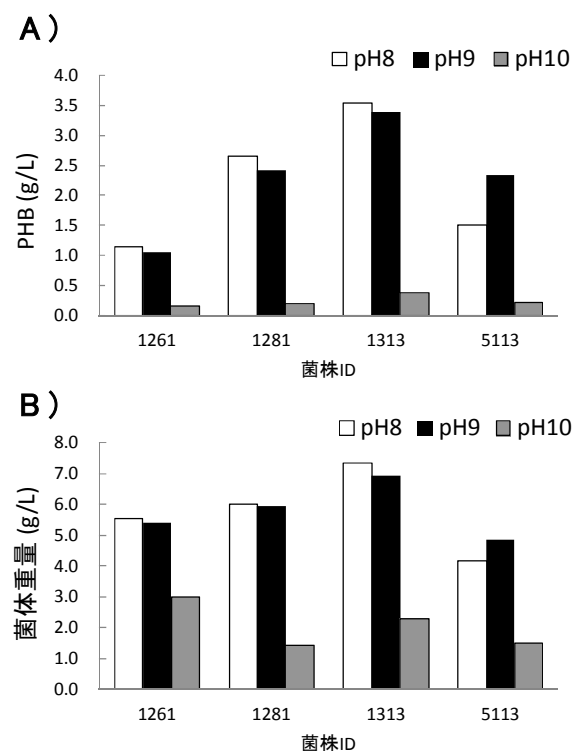


図3 pHの影響

産性を示した(図2A)。

pHの影響については、4菌株ともpH9の強アルカリ条件下でも良好に生育してPHBを生産することができた(図3A、3B)。しかし、pH10では生育が悪くなりPHBの生産量も低下した。

以上のとおり、分離菌株のうち生産性の高かった菌株についてさらにその特性を調べたところ、ID5113及び1261、1281、1313はpH9のアルカリ条件でPHB生産が可能で、特にID1281は高塩濃度でのPHB生産に適していることが確認された。

3-3 無機窒素源を用いた発酵試験

無機窒素等の安価な窒素源で構成される培地でPHB生産が可能な菌株を用いれば、比較的高価な培地成分である酵母エキス等が不要となるため、発酵生産における培地費用の低減が期待できる。そこで表1の無機窒素培

地で最も生産性の高かったID5113について、2種類の窒素源を用いたときのPHBの生産性を調べた。

窒素源として用いた硝酸ナトリウムあるいは尿素は、培地中の窒素濃度が等しくなるようにそれぞれ1%及び0.5%を加えた。NaCl濃度及びpHは前項の試験でPHB生産量の高かった条件とし、pHや温度、攪拌速度、通気量は卓上型培養装置で一定に制御するよう設定した。

培養期間中のPHB(図4A)及び菌体重量(図4B)、グルコース(図4C)の時間変化を比較すると、ID5113は窒素源として尿素を用いたときに速く生育することが分かった。PHB生産量についても培養開始後24時間で7g/Lとなり、硝酸ナトリウム含有培地の約3倍多く生産していた。また、基質となるグルコースの消費速度も尿素含有培地の方が速かった。以上のことからID5113は、硝酸ナトリウムよりも尿素を窒素源として利用しやすく、PHB生産速度も向上することが確認された。

尿素や硝酸ナトリウムを用いることで培地費用を低減できるだけでなく、これらを窒素源として利用できない他の微生物の増殖を抑制することとなり、発酵管理が容易になることが期待できる。PHB生産を確認できた分離菌株52菌株のうち37菌株は硝酸ナトリウムを窒素源とする培地でもPHBを生産し、さらにこのうちID5113を含む20菌株は酵母エキスを窒素源とした場合より生産性が高かった(表1)。これらのPHB生産菌は、安価な培地による効率的な発酵生産に適しており、窒素源を最適化することで生産性の向上が期待できる。

4 まとめ

沖縄県内で採取した試料から、強アルカリ条件下で生育する微生物91菌株を分離した。これらのうち52菌株はPHBを生産し、高pHや高塩濃度条件下でも発酵生産が可能な菌株が含まれていた。また、45菌株は安価な窒素源を用いた培地でもPHB生産が可能であり、窒素源の種類によって生産性の向上が期待できることが分かった。

今回分離したPHB生産菌株を用いれば、高pHや高塩濃度で培養が可能となり、雑菌汚染を抑制して発酵管理が容易になることが期待できる。さらに、安価で雑菌が資化しにくい窒素源を用いることも可能なことから、コストを低減した効率的な発酵生産が期待できる。

本研究は「海洋微生物を利用したR-3-ヒドロキシ酪酸の効率的生産(2013技015/工業研究費(受託)/平成25~26年度)」として行ったものである。

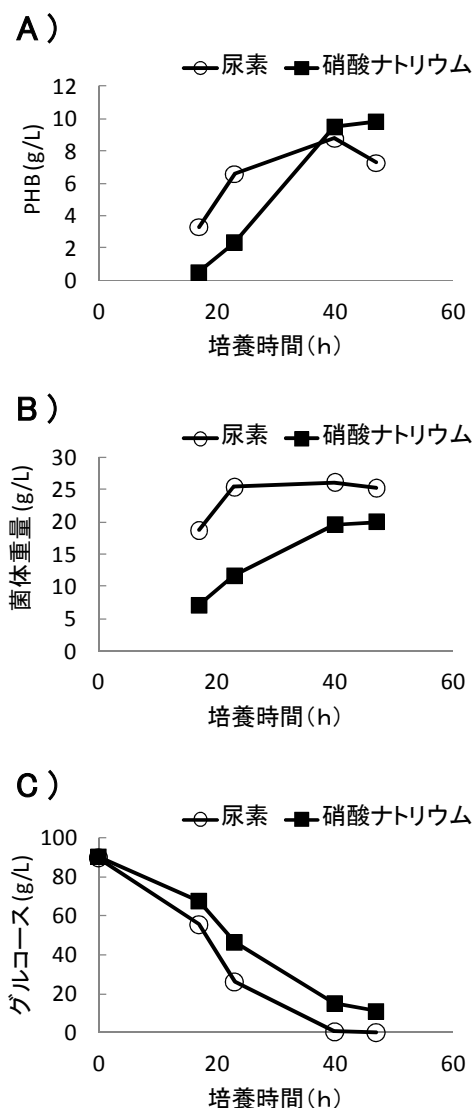


図4 窒素源の影響(菌株ID5113)

参考文献

- 1) 大矢裕一, 相羽誠一 監修, 進化する医療用バイオベースマテリアル, 13-20, (2015)
- 2) Y. Kawata, H. Ando, I. Matsushita, J. Tsubota, Efficient secretion of (*R*)-3-hydroxybutyric acid from *Halomonas* sp. KM-1 by nitrate fed-batch cultivation with glucose under microaerobic conditions, *Bioresour. Technol.*, 156, 400-403, (2014)
- 3) R. Krikorian, M.D. Shidler, K. Dangelo, S.C. Couch, S.C. Benoit, D.J. Clegg, Dietary ketosis enhances memory in mild cognitive impairment, *Neurobiol Aging.*, 33, 425.e19-425.e27, (2012)
- 4) Y.H. Youm, K.Y. Nguyen, R.W. Grant, E.L. Goldberg, M. Bodogai, D. Kim, D. D'Agostino, N. Planavsky, C. Lupfer, T.D. Kanneganti, S. Kang, T.L. Horvath, T.M. Fahmy, P.A. Crawford, A. Biragyn, E. Alnemri, V.D. Dixit, The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease, *Nature Medicine*, 21, 263-269, (2015)
- 5) J.A. Mata, J. Martinez-Canovas, E. Quesada, V. Bejar, A detailed phenotypic characterization of the type strains of *Halomonas* species, *System. Appl. Microbiol.*, 25, 360-375, (2002)
- 6) R.H. Vreeland, C.D. Litchfield, E.L. Martin, E. Elliot, *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30(2), 485-495, (1980)
- 7) 世嘉良宏斗, 常盤豊, 照屋全才, 市場俊雄, 沖縄県工業技術センター研究報告, 第 12 号, 1-4, (2009)
- 8) H. Yokaryo, Y. Tokiwa, Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 60, 270-275, (2014)
- 9) Y. Kawata, S. Aiba, Poly(3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(1), 175-7, (2010)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。