

218

石油醗酵について

2. 細菌菌体の分離

(九大, 食糧化学工学科) ○熊傑田, 上田誠之助

1. 目的: 菌体の回収について普通の手段として高速回転遠心分離や濾過等があります。演者らは炭化水素培養からの菌体回収に際して上述の手段を取らずに機械的・化学的方法で菌体凝固^{*}を起させ, その最適粒径を自由に制御して回収困難な対数増殖期の細菌菌体も回収できる方法について検討する。

2. 方法: (1) 25l 容量の jar fermenter を用いて炭化水素を基質として培養を行ない, 対数増殖期の終了直前に適当な pH に調整して化学的 (魚油を基質とした場合, span 20 を使用する) や機械的 (n-paraffin を使用する場合, 攪拌速度を上げる) に菌体凝固を行なわせ, 粒径, 凝固率と RNA 含量を観察した。

(2) 炭化水素や非炭化水素 (酢酸や糖質) の培養菌体を Folch 法に従って脂質を抽出分画する。一方, 種種の炭化水素資化性菌, 非資化性菌, 酵母とカビの培養液 (炭化水素資化性菌は n-paraffin や魚油含有の無キ塩溶液培地, 非資化性菌は合成培地, 酵母とカビは糖度 10, pH 5.1 のコウジ汁で攪拌培養した) 50 ml を振とう用フラスコに入れて至適 pH に調整した後, 前記の分画脂質を様様な濃度に添加して 120 rpm ロータリーシェーカーで振とう, 菌体凝固を行なわせる。振とう 10 分～1 時間後, 粒径と凝固率を観察した。

(3) 其他の定量法: (a) 菌体量は 105°C で乾燥した菌体を乾燥重量とした。ただし菌体内の脂質量の時間経過を見る場合は真空凍結乾燥で定量した。(b) RNA の定量は S T S 法に従った。(c) 分画脂質の定量は脂質分画終了後, 有キ溶媒を 40°C 真空エバポレーターで完全に蒸発させた後重量を計った。(d) 脂質分散液は脂質 2 gm を 100 ml 蒸留水に入れて超音波 200 W, 10 分間で分散させた。

3. 結果: (1) Detergent と菌体凝固: 炭化水素培養液に陽イオンと陰イオン界面活性剤を添加すると油滴が互に寄り集まり, 液表面に浮遊してガラス壁に粘着したが, ノニオン界面活性剤 span 20 を入れると油滴が寄り集まるが, 液面に浮遊するだけである。この現象を利用して攪拌されている状態で span 20 を添加すると 0.5 mm の極めてそろった粒径の凝固菌塊が観察された。数種類の魚油資化性菌について検討して凝固菌塊の粒径は 0.5～2.0 mm, 凝固率は濾布で濾過すると 90% 前後にある事を観察した。他の基質 (酢酸, 葡萄糖, エタノール) を用いた場合には凝固現象が認められないが, 粒径不明の凝集が見られ, 0.25% (9lc 培地, 菌体濃度は 0.8 mg/ml) を添加すると 50～60% の凝集率が観察された。凝固への pH の影響について検討したが, 酸性側では凝固は認められなく, pH 5.5～12 の範囲で 93～97% であった。培養過程における凝固最適時期は対数増殖期の終了直前から定常期で菌体の凝固率は 94% であった。(2) n-paraffin を使用する場合, span 20 を使わずに対数増殖期の後半にはいると図 1 に示されたように攪拌や振とう速度を早くすると凝固できる。凝固した菌体の RNA 含量を調べると RNA 含量は 12% であり, 対数増殖期の RNA 含量と一致した。pH の影響について凝固菌塊の径はアルカリ性側では大きい, 凝固率と RNA の収量について pH 6～8 の範囲で最適である。2価カチオンの凝固に対する明白な効果は認

シンポジウム(非炭水化物資源)

められない。尿素を添加すると凝固菌塊の径は小さくなる。攪拌速度200 rpmの時粒径は0.04 mm, 凝固率87.5%, 500 rpmの時, 粒径は0.25 mm, 凝固率97.5%であった。酸素通気すると粒径は0.07 mm, 窒素通気すると粒径は0.25 mm (400 rpm), 凝固率はそれぞれ97~98%であった。(3) 培養の対数増殖期にはいゝらなゝと凝固できない事と第(2)項に述べた塩類と酸素の影響の事より n-paraffin 培養菌体の凝固は菌体からまたはその自己消化菌体から排出された凝固促進成分が関与してゐると考えた。これは培養液の上澄液縮液(PO_4^{3-} , SO_4^{2-} を $Ba(OH)_2$ で沈澱させた)の凝固効果から認められた事と菌体より抽出した水可溶性成分と ether, Acetone 可溶成分。それぞれの添加によつて凝固できる(添加しないとは凝固できない)事から証明された。Folch 法によつて抽出された脂質を種種の炭水素素質化性菌の非炭水素基質(酢酸, 葡萄糖)培養液に0.06% (基質濃度1%) を添加して凝固率86~97%をあげる事ができたが, *Aerobacteraerogenes*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranaefaciens* には無効であった。一々種種の細菌, 酵母, カビより抽出した脂質の凝固効果が認められた。この事から凝固有効成分は広範囲に微生物界に存在してゐる事が分つた。抽出脂質の中, 水可溶性成分と ether acetone 可溶成分がそれぞれ有効である事を認めた(図2)。

* 凝固: Coagulation
凝集: Flocculation

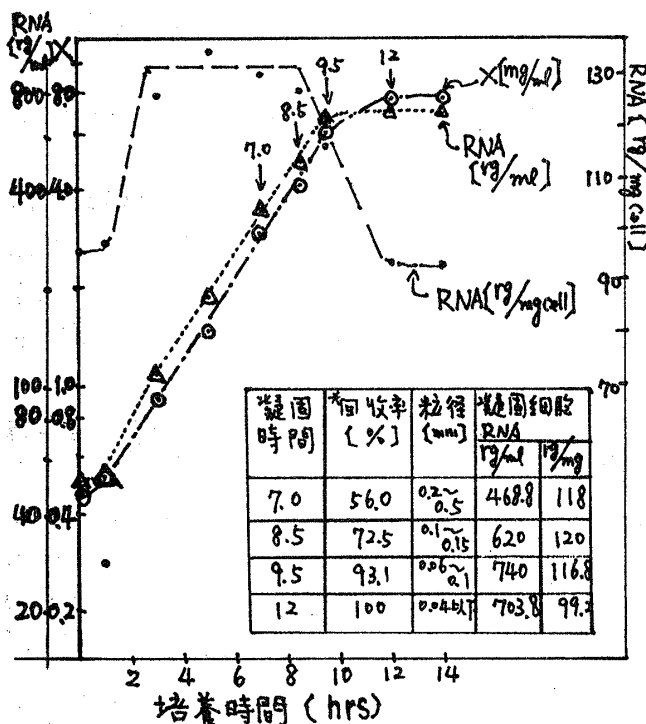


図1: 凝固させる時間と回収率, RNA含量の変化。

Sample	添加量 (%)	線菌体 (mg/ml)	凝固菌体 (mg/ml)	粒径 (mm)	凝固率 (%)
水溶性区分	0.04	2.45	2.29	0.7	93.5
	0.12	2.40	2.21	1.0	92.0
	0.28	2.42	2.18	1~2.8mm	90.2
ether, acetone可溶分	0.04	2.41	2.10	0.5	87.1
	0.12	2.56	2.31	0.7	90.1
	0.28	2.63	2.39	1.0	91.0
リ>脂質区分	0.12	2.86	2.28	0.4~1.1	80.0
	0.28	3.12	2.44	0.12	78.3
	0.56	3.76	2.97	0.15	79.0
糖脂質区分	0.12	2.56	2.09	0.4	89.5
	0.28	2.86	2.29	0.3~1.1	80.4
	0.56	2.56	2.04	0.01	80
Blank	0	2.35	1.88	0.45	80

図2 *Brevibacterium A25R* 菌の Chloroform methanol 抽出液各区分の凝固への影響