

アプリケーションデータシート #009

恒温振とう培養機 バイオシェーカー **BR** シリーズ No. 01
好熱菌および低温菌の培養事例のご紹介



※本文中に紹介しているBR-11FHはBR-21FHに、BR-33FLはBR-43FLに、それぞれモデルチェンジしました。

恒温振とう培養機“BR”シリーズによる好熱菌および低温菌の培養事例

[好熱菌] 好熱性メタン資化性菌の培養

ここでは、大阪ガス株式会社 エネルギー技術研究所 環境技術TBU 坪田様のご協力による、好熱性メタン資化性菌の培養についてご紹介します。同社は「微生物による新メタノール変換技術」の研究を行っており、平成12~14年度には新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)委託の「環境適合型石油代替燃料製造技術先導研究」にも参画していました。本先導研究の平成12、13年度の成果報告書はNEDOのホームページにて閲覧が可能となっており(2003年7月現在)、以下の記述は公表された研究成果を踏まえて大阪ガス(株)坪田様のご好意により、好熱性メタン資化性菌の研究についてその概要をご紹介するものです。なお、好熱性メタン資化性菌の培養では、大腸菌等のいわゆる中温菌よりも高い温度が必要なため、そのような高温での培養に対応したBR-11FH等の機種を使用していただいている。

●メタン資化性菌と石油代替燃料の研究

メタン資化性菌は、メタンを唯一の炭素源およびエネルギー源として生育する微生物で、メタンをメタノールに変換しホルムアルデヒドへと代謝してエネルギーを得ています。メタンは天然ガスの主成分として豊富に存在し、またメタノールは石油代替燃料として期待されるジメチルエーテル(DME)の原料となります。DMEはメタノールから化学的に合成することが容易である一方、メタンからメタノールの化学合成は大規模なプラントが必要になるという背景から、メタン資化性菌のメタン-メタノール変換能力を工業利用するための研究が行われています。

●好熱性のメタン資化性菌の探索

メタン資化性菌は、好熱性のものは稀であり、常温で生育するものがほとんどです。しかし工業的に利用する場合、雑菌の繁殖防止やメタノールの回収のしやすさという理由から50~65°C程度の高温で生育できる好熱性メタン資化性菌が有用と考えられ、温泉などの高温環境からのメタン資化性菌の分離が試みられています。常温では、液体であるメタノールは速やかにホルムアルデヒドへと代謝されてしまうため回収が困難ですが、メタノールの沸点(65°C)付近では菌体外に気体として拡散する量が多くなり、回収が容易になるというメリットがあります。

■BR-11FHおよびBR-3000LFによる好熱性メタン資化性菌のスクリーニングおよび培養

50~65°Cで生育できる好熱性メタン資化性菌のスクリーニングは、各地の源泉から採取した温泉水を特定の培養条件のもとで50°Cで培養し、増殖が見られたものについてはより高温での耐性を試験する、という手法で行われました。

[スクリーニングおよび培養の方法]

- ・70mL血清瓶に20mLの硝酸無機培地^{※1}を入れ、10mLの温泉水サンプルを添加
- ・ブチルゴム栓^{※2}でしっかりと密栓し、気相に20%メタンを含む空気を封入
- ・二段振とう式BR-3000LFで50°C、140r/minで往復振とう^{※3}(図1)
→まだ雑多なサンプルなので、培養液が濁ってくるまでに2週間程度かかりました(図2)。増殖の確認はO.D.₆₀₀の測定によります。
- ・増殖が確認できたサンプルは、安定して増殖するまで継代
→安定したサンプルは、1~7日程度で一定の増殖を確認できるようになりました(図3)。
- ・安定した増殖が確認できたサンプルは、BR-11FH(+100°Cまで温度調節が可能)を使用してより高い温度にて200r/min^{※4}で培養試験(図4)
- ・それほど高温が必要ないサンプルを大量に培養する際は、三角フラスコにガスパックをつないで二段振とう式BR-3000LFなどで培養(図5)

※1. メタン資化性菌*Methylosinus trichosporium* OB3bの培地として一般的に使用されているNMS (Nitrogen Mineral Salt) 培地です。

※2. 小さい穴を開けても弾力で塞がるので、細い径の注射針ならば栓を開けることなくサンプリングができます。

※3. 最初の培養温度が50°Cであること、サンプル数が多く血清瓶を200本近く振とうする必要があることから、大型タイプを使用しました。

※4. 温度が高くなるほど気体の溶解度は低下します。メタンが培地中によく溶け込むように、より効率的なエアレーションが必要となります。

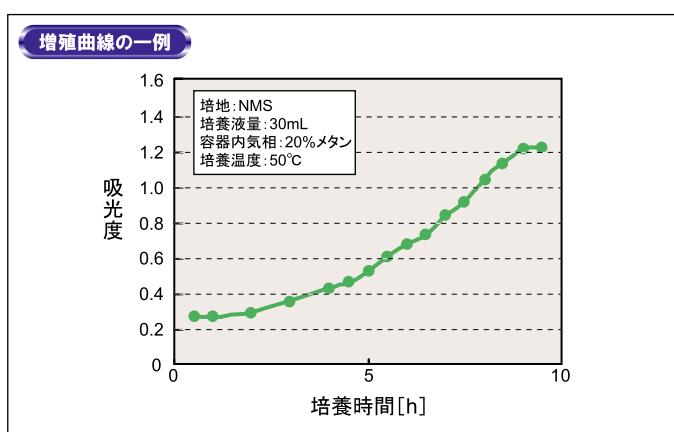
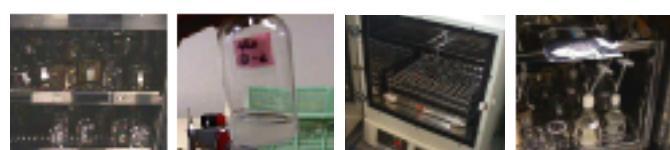


図3. スクリーニングにより得られた、50°C付近で生育するメタン資化性菌の増殖曲線



■参考文献

- ・月刊バイオインダストリー(シーエムシー出版) 2002年8月号 51-56
- ・新エネルギー・産業技術総合開発機構委託 環境適合型石油代替燃料製造技術先導研究 平成13年度成果報告書
- ・微生物利用の大展開(エヌ・ティー・エス)

【低温菌】 シュワネラ属細菌の培養

Shewanella(シュワネラ)属細菌は、4°Cなどの低温で生育することができる細菌、いわゆる低温菌の一種です。低温菌はその特性から産業への利用価値が高く、好熱菌と同様に研究されている微生物です。ここでは低温菌についての概要を交えつつ、京都大学化学研究所の江崎教授・栗原博士のご協力により、教授らが現在研究中の*Shewanella* sp. Ac10の培養について、その概要をご紹介します。なお、教授らの研究では、低温での培養のため低温域の温度調節が可能なBR-33FL等の機種を使用していただいている。

●低温菌とは

ある定義によれば、0~5°Cで生育可能な微生物の内、最適生育温度が15°C以下・生育限界温度が20°C以下のものは好冷菌、生育限界温度が20°Cより高いものは低温菌、とされています。しかし境界線を20°Cとする根拠に乏しいことから、低温に適応した微生物をひとまとめにして低温菌と呼んだり、cold-adapted microorganismsと呼ぶことが多いようです。

●低温菌の特性と利用価値

低温菌はその名が示す通り低温に適した性質および機能をもつていて、それは酵素であったり細胞の構造であったりします。低温菌がもつ酵素の多くは低温環境下で高い活性を示します。そのような酵素としては、おもにプロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、カタラーゼなどが研究されています。

低温菌の酵素はそれほど高温でなくても速やかに失活させることができるため、洗濯洗剤用酵素(冷たい水でも使用可能)、食肉の酵素処理(低温で処理できるので風味が損なわれない)、低温向けバイオセンサーなどに利用することができます。また低温菌自体の利用法としては、低温地域でのバイオレメディエーションや組換えタンパク質発現用の宿主などがあります。

■BR-33FLおよびBR-3000LFによる*Shewanella* sp. Ac10の培養

Shewanella sp. Ac10は南極の海水から分離され、江崎教授・栗原博士により16S rRNA遺伝子の情報などから*Shewanella*属の細菌であることが同定されました(種名は未同定)。生育温度は、4~25°Cであることが確認できているとのことです(最適生育温度は15~18°C)。ここでは、おまかに培養条件と4°Cで培養した際の増殖曲線を記載しました。

[増殖曲線作成時の培養条件]

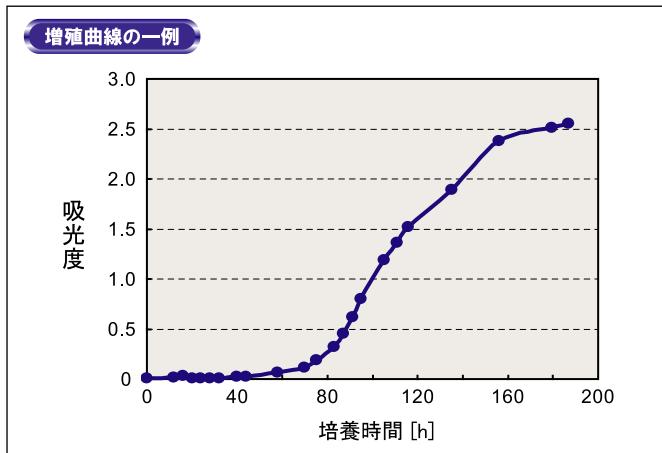
容器 500mL三角フラスコに下記の培地を300mL
 培地(Ac medium, pH7.0) — 1.5%バクトリブト、0.1%イーストエキストラクト、
 0.1%グルコース、0.2% K₂HPO₄、0.1% KH₂PO₄、
 0.01% MgSO₄·7H₂O、3% NaCl
 振とう速度 130r/min(旋回振とう)
 増殖の確認 O.D.₆₀₀の測定による
 培養機 BR-3000FL



図1. BR-3000LF。図3の増殖曲線はこちらを用いて上記の条件で培養したときのものです。



図2. BR-33FLによる*Shewanella* sp. Ac10の振とう培養の様子。容器は試験管、設定温度は4°C、振とう速度は往復で170r/minでした。



■参考文献

• *Applied and Environmental Microbiology*, Feb. 1999, p. 611-617

恒温振とう培養機 バイオシェーカー **BR** シリーズ

低温から高温、少量から大量まで豊富な
 ラインアップで培養をサポートします！



タイトック株式会社

商品企画部 宣伝企画グループ

〒343-0822 埼玉県越谷市西方2693-1

TEL:048-988-8359 FAX:048-988-8362 E-mail:miyatani@taitec.org

ホームページ:<http://taitec.net/>

著者・編集

宮谷宣秀・福井竜宏・廣田晶宏

2003年10月発行(2004年1月改訂)

本紙についてのお問い合わせは、左記までお願ひいたします。