

Bacillus coagulans の増殖至適条件の探索

環境計画研究室 砂川裕二

1. はじめに

トウモロコシの非食用部や稲わらなどの多糖(セルロース)含量の高い農業廃棄物を原料に発酵を行い、L-乳酸などの生成が検討されている。中でも高温 L-乳酸発酵は、培養温度を 55 °C、pH 5.5 に整えることで高温耐性を有する *Bacillus coagulans* の自然な優先化が起きることが示されており、比較的容易な培養方法として提案されている。しかし、この条件は意図しない微生物を寄せ付けないためのものであり、L-乳酸生成菌である *B. coagulans* 本来の増殖至適条件ではない。

ところで、トウモロコシの非可食部や稲わらを糖化、L-発酵させる際、必ず糖化時に滅菌を必要とする。この滅菌状態を次工程でも引き続いて保つことができれば、その後の発酵は滅菌下で行える。その場合、必ずしも意図しない微生物を寄せ付けないためのという条件にこだわる必要はない。*B. coagulans* 本来の増殖至適条件を用いることで、効率的な発酵が行えると期待される。そこで、本研究では *B. coagulans* の増殖至適条件を探索することとした。

2. 研究方法

温度 45 °C、50 °C、55 °C、pH 5.5、6.5、7.5 の 9 通りの条件で最大比増殖速度 μ をもって評価を行った。また、中心条件は繰り返し数 3 回とした。

培養方法は連続培養法に属するケモスタットを用いた。容器内の培養液の一部を絶えず新しいものに交換しながら培養を続ける方法である。物理的、化学的な培養条件を長時間一定に保持することができる。実験装置の概要を図 1 に示す。

一般的に微生物の増殖過程を表す Monod 式では比増殖速度は $\mu = \mu_{\max} S / (K_s + S)$ (K_s : 半飽和定数, S : 基質濃度) と表わされる。温度、pH 条件は一定とし、リアクター内のグルコース濃度を高く設定する ($S \gg K_s$) ことで $\mu \approx \mu_{\max}$ となる (ただし、設定した温度と pH 条件による最大値となる)。

本研究では、グルコース濃度を高く設定(30g/L)し、菌体濃度を極力 0 に近づける操作を行った。菌体濃度が 0 になる現象は“wash out”と呼ばれている。これは、菌体の増殖速度が流失速度に追いつけず、菌体が全部流しだされてしまうことを意味している。この“wash out”近傍の比増殖速度 μ をもって μ_{\max} とし、増殖至適条件の評価を行った。また、応答曲面法により増殖至適条件の探索を行った。

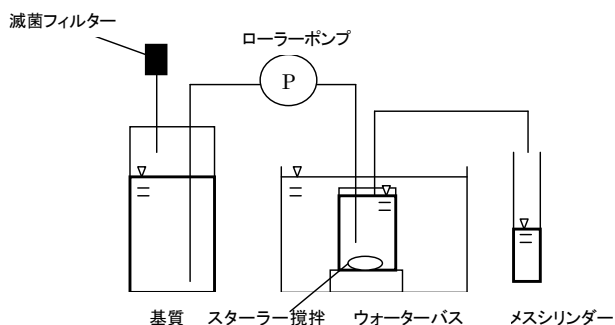


図 1 実験装置の概略図

3. 結果および考察

本実験の目的はケモスタット系における“wash out”近傍の $\mu = D(D$: 希釈率, Q (流量)/ V (反応器体積))の値を求めることである。“wash out”近傍の $\mu = D$ の値を図 2 に示す。なお、50 °C、pH 6.5 の D の値は平均値 (1.13) で表わしている。本実験の設定範囲では 50 °C、pH 6.5 で高い最大比増殖速度の値となった。次いで、45 °C、pH 7.5 が高い D の値が得られた。

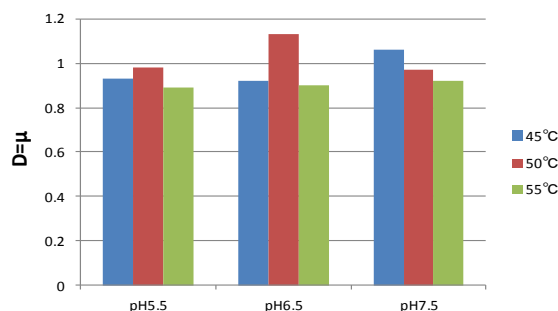


図 2 実験条件別の最大比増殖速度の値

実験で得た結果を用いて 2 次の応答曲面法を行うと、式 1 を得た。

$$Y = 1.0916 - 0.0333X_1 + 0.025X_2 - 0.1189X_1^2 - 0.0539X_2^2 - 0.025X_1X_2 \quad (1)$$

$X_1 = \text{温度} \quad X_2 = \text{pH}$

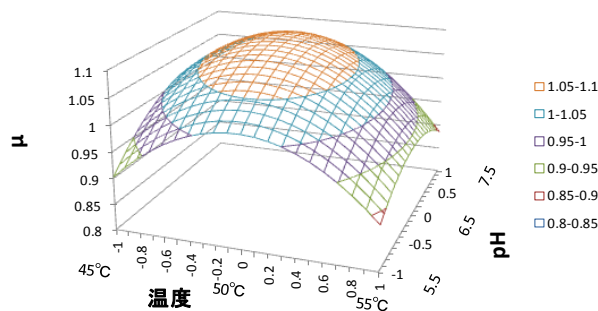


図 3 応答曲面図

表 1 分散分析表

要因	偏差平方和	自由度	平均平方	F 値	P 値
回帰変動	0.069	5	0.014	2.201	0.2034
誤差変動	0.031	5	0.006		
全体変動	0.100	10			

重回帰式の検定を行った結果、p 値は 0.2034 となった。この得られた式(1)から傾向が見られるとすれば、温度 49 °C、pH 6.8 付近に高い比増殖速度が期待される。

また最大比増殖速度を求めるのに必要な滞留時間(D の逆数)は累積滞留時間では平均で 43 滞留時間の培養が必要であった(最低値 32.1 滞留時間, 最大値 61.7 滞留時間)。