

第 66 回高分子討論会に参加して

山 内 一 平

Ippei YAMAUCHI

物質化学専攻修士課程 2 年

1. はじめに

私は今回、2017 年 9 月 20 日から 22 日にかけて松山市の愛媛大学城北キャンパスにて開催された高分子学会の「第 66 回高分子討論会」に参加した。今回は「*R. eutropha* によるバイオプラスチック生合成時に培地中に残留する炭素源の定量解析」と題して、ポスター発表を行った。

2. 緒言

微生物による Poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA) の生合成では、微生物の種類や炭素源の種類を変えることで得られる PHA の組成や収量が増加することが知られている。炭素源としてグルコースを用いて生合成を行うことが多く、比較的安価な炭素源としてグリセリンを用いた研究も行われているが、炭素源としてグリセリンを用いると PHA の収率があまり高くないと報告されている。しかし、我々はグリセリンにアミノ酸を混合することで、得られるポリマー収量が増大すると報告した。そこで、本研究ではグリセリンとアミノ酸の混合基質を用いて生合成を行ったときの培養液中に残留する炭素源から収量の増大について検討した。

3. 実験操作

微生物 *R. eutropha* (NCIMB 11599) を有機培地中で 32℃, 120 rpm, 24 h で振とう培養して増殖させたのち、炭素源にグリセリンおよびアミノ酸であるロイシン、イソロイシン、トレオニン、プロリンを用いてリン制限の条件下で 72 h 振とう培養した。微生物内に蓄積した PHA はクロロホルムを用いて抽出した。また、培地中のグリセリンとアミノ酸の残留量は液体¹H NMR 測定から求めた。内部標準試

料としてアセトアニリド、マレイン酸を用いた。

4. 結果と考察

アミノ酸であるトレオニンを 20 mmol と一定にして、加えるグリセリンの量を変えた混合基質を用いて生合成を行ったときの PHA 収量を Fig. 1 に赤で示した。PHA の収量は、グリセリンとトレオニンをそれぞれ単一の炭素源として用いた場合に得られた PHA 収量の合計よりも、混合基質から得られた PHA 収量の方が多くなった。また、イソロイシン、プロリンを用いた場合の収量を Fig. 2 と Fig. 3 に示した。先ほどのトレオニンの場合と同様に、イソロイシン、プロリンともに混合炭素源を用いた場合に収量が増大した。これらの収量の増加の原因には、グリセリン及びアミノ酸の菌体への取り込み量が増加した可能性が考えられる。

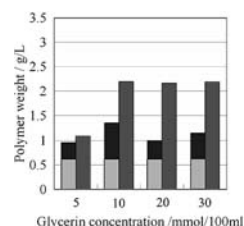


Fig. 1 Polymer weight of PHA biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin and threonine 20 mmol.

■ : glycerin
■ : threonine
■ : the mixed substrate of glycerin and threonine

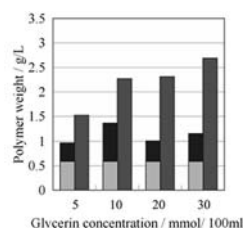


Fig. 2 Polymer weight of PHA biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin and isoleucine 20 mmol.

■ : glycerin
■ : isoleucine
■ : the mixed substrate of glycerin and isoleucine

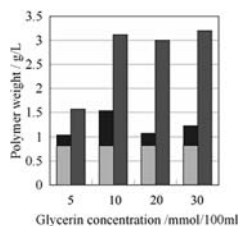


Fig. 3 Polymer weight of PHA biosynthesized from the mixed carbon source of glycerin and proline 20 mmol.

■ : glycerin
 ■ : proline
 ■ : the mixed substrate of glycerin and proline

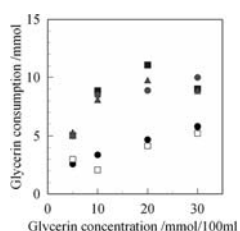


Fig. 4 Consumption of glycerin in the mixed carbon source.

■ : without amino acids,
 ● : mixed with leucine,
 ▲ : mixed with threonine,
 □ : mixed with proline, and
 ● : mixed with isoleucine.

グリセリンとアミノ酸の培地中の残留量は液体¹H NMR 測定より求めた。培養後のグリセリンの消費量を Fig. 4 に示した。■はアミノ酸を加えずにグリセリンのみで培養した場合の消費量を示しており、グリセリンが5 mmol の時、グリセリンは100%消費されていることを示した。また、グリセリンの消費量はロイシン、トレオニンと混合した場合は、グリセリン単一の場合の消費量と同等の値となり、混合による影響はみられなかった。しかし、イソロイシン、プロリンを混合した場合にはグリセリンの消費量が減少した。これは、混合することでグリセリンの消費を抑制したと考えられる。

続いて培養後のアミノ酸の消費量を Fig. 5 に示した。グリセリンの濃度が0 mmol の時はアミノ酸のみで生合成した場合の消費量を示している。全てのアミノ酸はグリセリンと混合しても消費量に差がみ

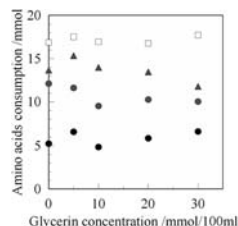
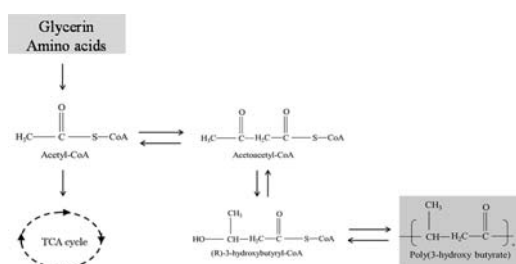


Fig. 5 Consumption of amino acids in the mixed carbon source.

● : leucine,
 ▲ : threonine,
 □ : proline, and
 ● : mixed with isoleucine.



Scheme 1 Metabolic pathway using glycerin and amino acids.

られなかった。したがってグリセリンとの混合はアミノ酸の取り込みに影響しないと考えられる。

炭素源であるグリセリンとアミノ酸が菌体内に取り込まれてから Poly (3-hydroxy butyrate) (PHB) に変換されるまでの大まかな代謝経路を Scheme 1 に示した。グリセリン及びアミノ酸の消費量は混合と単一とで差が見られなかったことから、収量の増大の原因は菌体内に取り込まれてからの代謝経路内における Acetyl-CoA から PHB への変換効率が向上したからであると考えられる。

5. 評価

学会でのポスター発表はこれまでに何度か経験しているため、緊張することもなくいつも通り発表することができた。また、今回は多くの人に来ていただくことができ、特に専門の方が多く来てくださり多くのアドバイスをいただくことができたため、今後の研究活動に活かしていきたいと思う。