

## 第 69 回高分子学会年次大会 に参加して

横江 洋人

Hiroto YOKOE

物質化学専攻修士課程 2020 年度修了

### 1. はじめに

私は今回、2020 年 9 月 16 日から 18 日にかけてオンライン上で開催された高分子学会の「第 69 回高分子学会年次大会」に参加した。今回は「*R. eutropha* による炭素源にグリセリンを用いた新規くり返し培養法による P3HB 収率の向上」と題して、ポスター発表を行った。

### 2. 研究概要

微生物 *Ralstonia eutropha* (*R. eutropha*) は細胞内にエネルギー貯蔵物質として poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) を効率よく蓄積できる代表的な微生物である。*R. eutropha* による P3HB 生合成で炭素源としてグルコースなどの炭素源を用いた時の 50-60% と高い P3HB 含有率を示すが、炭素源としてグリセリンを用いると P3HB 含有率が 30-40% と低くなる。また、本研究室では異なる炭素源を含む培養液を交換することでブロック共重合体の生合成について報告している。そこで、本研究では同じ炭素源であるグリセリンを含む培養液を交換（“くり返し培養法”とする）することでグリセリンを炭素源とした P3HB の高収率化、それに伴うグリセリン炭素源の消費量の関係について検討した。

### 3. 実験操作

*R. eutropha* (NCIMB 11599) を有機培地中で 32 °C, 120 rpm, 24 h で振とう培養し、炭素源にグリセリンを用いて窒素、リン制限の条件下で 72 h 振とう培養した。72 h の培養が終わると炭素源培地を入れ替えてさらに 72 h 培養を行った。さらにもう一度行い合計で 72 h×3 回のくり返し培養を行っ

た。クロロホルムを用いて菌体内に蓄積した P3HB を抽出した。P3HB の収率は乾燥菌体中に含まれている P3HB の重量分率とした。培地中のグリセリン濃度は <sup>1</sup>H NMR 測定により標準試料としてアセトアニリドを用いてグリセリンのピーク強度から求めた。<sup>1</sup>H NMR 測定は JEOL-ECA 400 を用いた。

### 4. 結果と考察

炭素源であるグリセリン濃度を 10 mmol/100 mL として 72 時間培養を 3 回くり返した時と、グリセリン濃度を 30 mmol/100 mL として 72 時間培養した時の P3HB 収率を Fig. 1 に示した。30 mmol/100 mL で 72 h 培養した時の P3HB 収率は、従来報告されている値に近く 30.8% と低くなった。しかしグリセリン濃度が 10 mmol/100 mL で 3 回くり返し培養を行うと P3HB 収率が 53.6% となり、炭素源にグルコースを利用した時と同等の 50% を超える値となった。この結果は、我々のブロック共重合体の生合成の結果と併せて考えると、1 回目の培養で P3HB が蓄積され、2 回目の培養でさらに生合成が進んで P3HB の分子量が大きくなったため P3HB 収率が高くなったと考えられる。

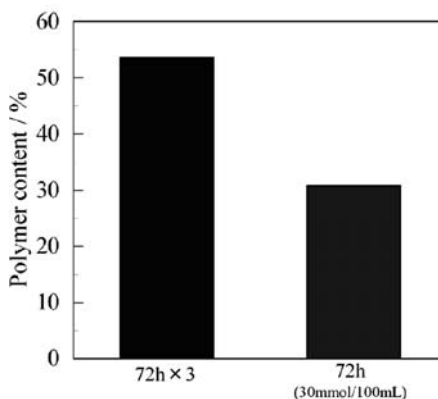
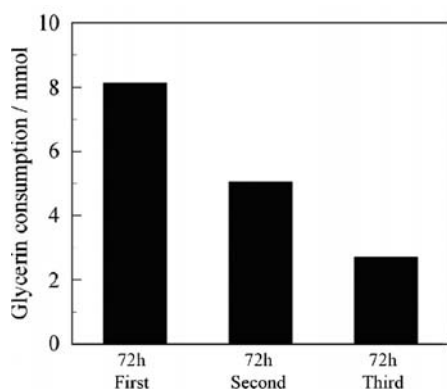


Fig. 1 Polymer content during culturing for 72 h×3 times with glycerol 10 mmol/100 mL

次に、この時の培養液中の残留グリセリン量を <sup>1</sup>H NMR 測定により求めた。菌体に代謝されたグリセリンの量は加えたグリセリンの量から、培養液中に

残留しているグリセリンの量との差から求めた。Fig. 2には *R. eutropha* による 10 mmol/100 mL グリセリン濃度を用いた P3HB 生合成時の第一段階での 72 h 培養を終えた後の培地中のグリセリン消費量、培地を入れ替えてさらに 72 h 培養を行った第二段階目でのグリセリン炭素源の消費量、最後にもう一度培地を入れ替え 72 h 培養を行った第三段階目のグリセリン炭素源の消費量を示す。第一段階ではグリセリンを約 80% 消費していたことが確認できたが第二段階、第三段階と培地を入れ替え培養時間が長くなるごとに徐々にグリセリン炭素源の消費量は減少した。この結果は、すでに P3HB 含有率が高くなっていて、菌体がさらに炭素源を代謝して蓄積する必要がなくなってきたためと考えられる。

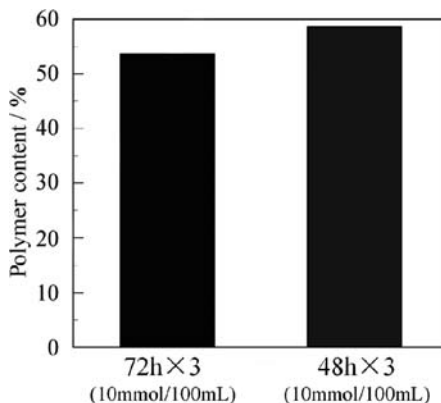


**Fig. 2 Glycerin consumption during culturing for 72 h×3 times with glycerol 10 mmol/100 mL**

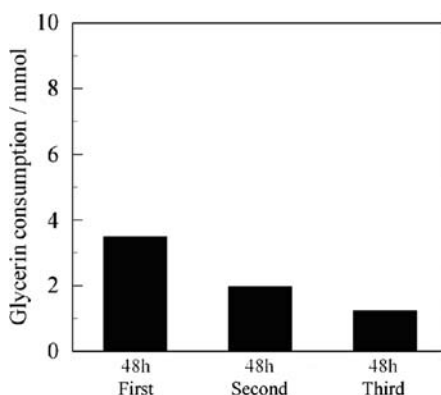
また、くり返し培養法の培養時間を変えて得られる P3HB 収率の変化について検討を行った。Fig. 3・Fig. 4には 48 h×3回でのくり返し培養の結果を示す。

Fig. 3・Fig. 4より 48 h×3回でのくり返し培養では 72 h×3回のくり返し培養に比べ、グリセリン炭素源の消費量は少なかった。それにも関わらず得られたポリマー収率は 50% を超えることが確認できた。

グリセリン炭素源の消費量が少なかったのにも関わらず、ポリマー収率が向上した原因として、ポリマー蓄積に利用されるグリセリン炭素源には限界が



**Fig. 3 Polymer content during culturing for 72 h×3 times with glycerol 10 mmol/100 mL**



**Fig. 4 Glycerin consumption during culturing for 48 h×3 times with glycerol 10 mmol/100 mL**

あるためだと考えられるが、これからの検討の余地がある。炭素源にグリセリンを用いるとポリマー収率が 30-40% 程度であり高いという報告がされているが培地を入れ替えるくり返し培養を行うことで炭素源にグルコースを用いる生合成と同等のポリマー収率が得られた。

## 5. おわりに

コロナウイルスの影響で学会が中止となっていく中、オンラインでの開催という初めての貴重な経験をさせて頂いた。大学院最後の年に発表することができ大変嬉しく思っている。今まで学んできた資料作成やプレゼンの知識をこれからの活動に活かしていきたいと考えている。