

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658090

研究課題名（和文）

発酵熱の生化学的制御と低温廃熱発電への応用

研究課題名（英文）Biochemical regulation of fermentation heat and its application to waste heat recovery power generation

研究代表者

吉村 徹 (YOSHIMURA TOHRU)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70182821

研究成果の概要（和文）：

発酵熱生成の機構を明らかにするため、天然インジゴ生産の工程である藍葉の発酵について研究を行った。乾燥させた藍葉に適量の水を加えることによって発酵が開始し、30℃の外気温に対して最高42℃までの温度上昇が起った。発酵物メタゲノムの変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE）法による解析や藍葉の洗浄液の培養等によって、*Pantoea calida*、*Pantoea dispersa*、*Pantoea agglomerans*、*Pseudomonas alcaligenes*、*Sanguibacter marinus*、*Bacillus amyloliquefaciense*、*Bacillus circilans*、*Bacillus subtilis*などの細菌と、*Aspergillus oryzae*、*Mucor circinnelloides*、*Cryptococcus vishniacii*、*Lichitheimia lamosa* など3種の真菌の存在を見出すとともに、そのいくつかを単離した。単離した菌を滅菌した藍葉に植菌したところ、*A. oryzae*を植菌した場合のみ、藍葉の発酵時とほぼ同程度までの温度上昇が見られた。一方、他の真菌および細菌を植菌しても温度上昇は得られなかった。藍葉の発酵時にPenicillinとStreptomycinを添加しても温度上昇が得られたのに対して、抗真菌剤であるNystatinを加えた場合には温度上昇は起らなかった。以上の結果、この系における発酵熱生成には*A. oryzae*の寄与が大きいものと推測された。

研究成果の概要（英文）：

We studied the fermentation process of indigo leaves to understand the mechanism of the production of fermentation heat. The indigo leaf fermentation can proceed by mixing the dry indigo leaves and water. With the laboratory scale, the temperature of the fermented leaves increased up to 42℃ under the external temperature of 30℃. Through the analyses of the metagenome of the fermented leaves and the cultivation of the wash fluid of the indigo leaves, we found several species of bacteria and fungus such as *Pantoea calida*、*Pantoea dispersa*、*Pantoea agglomerans*、*Pseudomonas alcaligenes*、*Sanguibacter marinus*、*Bacillus amyloliquefaciense*、*Bacillus circilans*、*Bacillus subtilis*、*Aspergillus oryzae*、*Mucor circinnelloides*、*Cryptococcus vishniacii*、and *Lichitheimia lamosa*、and isolated some of them. When the autoclaved indigo leaves were inoculated with these microorganisms, the temperature of the leaves inoculated with *Aspergillus oryzae* reached to that comparable to the fermented indigo leaves. Any other microorganisms gave no such a thermal elevation. Fermentation heat production could be obtained when the indigo leaves were fermented in the presence of penicillin and streptomycin. In contrast addition of Nystatin, an antifungal compound, inhibited the heat production. These results suggest that *A. oryzae* contributes to the fermentation heat production in the indigo leaf fermentation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野： 生物化学

科研費の分科・細目： 農芸化学・応用微生物学

キーワード： 藍、発酵熱、*Aspergillus oryzae*

1. 研究開始当初の背景

堆肥の生成などに発酵熱が伴うことは古くから知られている現象であるが、あまりに自明のことと考えられているためか、発熱の機構そのものが議論されることは少ない。文献上でも発酵熱は「微生物による酸化分解に伴って生成する」として記載されるに止まっており、発酵熱を取り上げた研究では、その測定や物質生産や生ゴミ処理への影響といったテーマが多く、微生物による発熱機構自体が解析された例は我々が知る限り見る事が無い。

一方、冬眠を行う哺乳動物等では発熱の機構が研究されている。これらの動物では、uncoupler protein (UCP) と呼ばれるタンパク質が存在し、これがミトコンドリア内膜のプロトン濃度勾配によるポテンシャルエネルギーを ATP 生成から脱共役させることにより発熱を起こす。またザゼンソウ等発熱性の植物の呼吸鎖には、シアン耐性経路として知られる Alternative Oxidase (AOX) が存在する。AOX は電子伝達の際、内膜を介した水素イオンの能動移動がなく ATP 合成とは共役せず、エネルギーフラックスを発熱へ導く可能性があること等が報告されていた。

2. 研究の目的

本研究は、これまで不分明の状態にある発酵熱生成の機構を明らかにするとともに、得られた知見に基づき、積極的な発酵熱生産を試みるものである。将来的にはゼーベック効果等を利用して、発生した熱を電力に転換する低温廃熱発電を目指す。本研究を遂行するため、哺乳動物や植物等における研究から、微生物の発酵熱の生成に作業仮説として次のような機構を想定した。(a) 第一は、発酵熱が菌体外で進行する有機物の分解に附随する自由エネルギーの放出による場合である。この際、微生物は例えば菌体外酵素を供給することで反応の触媒となる。発酵熱の大きさは培地成分の含有エネルギーと進行する化学反応によって決定されると推測される。第二は、菌体内での代謝によって熱が発生する場合であり、これにはさらに二つの可能性が想定される。(b)一つ目は、菌

の呼吸に際して、本来であれば ATP 生成へ向かうべきエネルギーが脱共役して熱として放出される場合である。(c)二つ目は、微生物が ATP の分解などによって積極的に熱を生産する場合である。この場合には、発酵熱によって微生物が温度環境を生育に適するものに変えている可能性がある。(b)(c)のように菌体内のエネルギー代謝によって発酵熱が放出される場合には、代謝経路が同じであっても菌の種類によって生成する発酵熱の大きさは異なるケースが想定される。本研究はこれらの作業仮説の妥当性を検証することを目的に進めた。

3. 研究の方法

再現可能な発酵熱産生のモデル系として藍葉の発酵過程(すくも作り)を選定した。この系を用いて、発酵熱産生の経時変化と微生物の菌叢の解析を行い、熱産生に関する微生物の同定を目指した。また、熱産生に必要な因子を検討するために、栄養源の検討や、藍葉から単離した微生物を用いて、種々栄養源の熱産生への寄与を検討した。

(1) 実験室での藍葉の発酵

乾燥藍葉 120 g と水道水 200 ml を混合し、発砲スチロール中、保温環境下で発酵を開始させた。内部に温度センサー(おんどとり®TR-71Ui, TAND D 社)を差し込み、外気温、庫内(藍葉中心部)の温度変化を 10 分間隔で記録した。

(2) 培地成分が熱産生に与える影響

乾燥藍葉 100 g と水 200 g を用いて発酵を開始、その後、数度のかき混ぜ操作を行い、発酵が終了したと思われる残渣(湿重量 約 50 g)を Ziploc®容器に移し(i)10%グルコース + 10% カザミノ酸 + 1% 酵母エキス水溶液、(ii) 10% グルコース + 10% カザミノ酸水溶液、(iii) 10% グルコース水溶液 をそれぞれ 10 ml ずつ追加して 30°C でインキュベートし、経時的な庫内の温度を記録した。

(3) PCR-DGGE 法を用いた藍葉発酵過程の菌叢解析

乾燥藍葉(120 g)と水道水(200 ml)を混合して前項と同様に発酵を開始、経時的に温度測定とサンプルの採取を行った。サンプルからのメタゲノムの抽出には NucleoSpin®

Soil (TaKaRa 社) を用いた。PCR 反応には以下の配列をもつ真正細菌特異的プライマーを用いて行い、16S rDNA をコードする領域の配列の増幅を行った。

<プライマー>下線部は GC クランブ

Fw(GC-984Fw) :

5' -cgc ccg ggg cgc gcc ccg ggc ggg gcg ggg
gca cgg ggg gaa cgc gaa gaa cct tac - 3'

Rv(1378Rv) :

5' - cgg tgt gta caa ggc ccg gga acg - 3'

PCR 試薬は BIOTAQ™ PCR Kit (BIOLINE 社) を用いた。PCR 反応液 2 μl をアガロースゲル電気泳動に供し目的配列の増幅を確認した後、エタノール沈殿により精製し、TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 15 μl に再溶解した。続いてこれを変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) : (PCR-DGGE 法) を用いて分離し、ゲルから DNA を抽出した。DGGE バンドから抽出した DNA は PCR で再増幅させ、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer にてシーケンスを行った。

(4) 藍葉からの微生物の単離と熱産生能の検証

乾燥藍葉 100 g と水 200 g を混合して発酵を開始した。その後、数度のかき混ぜ操作を行い、温度が 30°C まで低下し発酵が終了したと考えられる残渣をコニカルチューブに適量サンプリングした (これを低温時サンプルとした)。その後、残渣に新しい藍葉 (乾燥藍葉 (50 g) と水道水 (50 ml) を混合したもの) を追加し、再度発酵を開始した。温度が 40°C を超えた時点で、同様にサンプリングした (これを高温時サンプルとした)。これら 2 種のサンプルに液体 GC 培地 1.2 ml を加え、懸濁した後に、45°C × 1 時間の熱処理を行った。その後、段階的に希釈したサンプル 100 μl を GC プレートへプレーティングし、37°C で一晚培養して得られたシングルコロニーを単離した。単離したコロニー (計 11 個) を GC 液体培地で 37°C にて一晚培養し、その 1.5 ml を用い、ゲノム DNA を抽出した。これには ISOPLANT II (ニッポンジーン) を用い、キットの手順に従って行った。エタノール沈殿により DNA を精製し、TE 溶液 50 μl に再溶解し、そのうち 5 μl を用いて、16SrDNA 領域を PCR により増幅、増幅した DNA のシーケンスを行う事。菌を同定した。なお同様の細菌の分離は、発酵以前の乾燥藍葉についても行った。この場合は藍葉を滅菌水に懸濁し、その上清を数種の培地に植菌した。真菌の単離についてはこの方法で行った。

単離した菌をそれぞれ GC 培地 16 ml に植菌し、37°C で 16 時間培養して増殖させた。その後、その 16ml 全量を 10×GC 培地 8 ml と混合し、ミキサーで細かく破碎した濾紙 (25 g) に均等にしみ込ませた。植菌後の濾紙は

Ziploc® 容器中で、発砲スチロールで覆い保温し、室温 30°C でインキュベートした。温度センサーを差し込み、庫内 (濾紙中心部) の温度変化を記録した。

4. 研究成果

(1) 実験室での藍葉の発酵

乾燥藍葉を水と混合し、室温にてインキュベートした。発酵開始から 30 時間程度までは、庫内温度と室温がほぼ同一であったが、その後庫内温度は急激に上昇し、約 42°C に達した。その後、庫内温度は徐々に低下した。そこで、開始後 72 時間に、藍葉をかき混ぜたところ温度の再上昇が観察された。測定開始後 100 時間後に再度藍葉をかき混ぜたが、この際の温度上昇はほとんど観察されなかった。

72 時間後に藍葉をかき混ぜたことによって温度の再上昇が見られたことは、発酵熱産生のために酸素が必要であることを示唆している。一方、測定開始後 100 時間後に藍葉をかき混ぜた場合には、その効果は小さく、温度上昇はほとんど観察されなかった。この理由として、藍葉に残存する栄養源が枯渇した可能性や蒸発等によって水分が不足した可能性が示唆された。

なお実際の藍染め工程では、70°C を超すような発酵熱の産生が 100 日間も持続する。しかしながら、今回の実験で得られた最高温度は 45°C であり、また、持続日数も数日にとどまった。この理由としては第一に、規模の大きさが考えられる。実際の工程では何十トンという規模で発酵を行っているのに対し、本実験は 100 g 程度の系であり、栄養源の枯渇がより早いと予想される。また、今回の実験系では、十分な保温効果が得られていない可能性がある。放熱量が微生物からの発熱量を上回っていた場合、実際に発酵熱が産生されていたとしても、測定できない可能性も考えられる。

(2) 培地成分が熱産生に与える影響

藍葉発酵過程でみられる発酵熱産生に関わる微生物の増殖は、藍に特異的ではなく、桑葉によっても代替可能であった。そこでこの栄養源を明らかにするため、グルコース、カザミノ酸、酵母エキスによっても発酵熱生成が可能かどうかを検証した。まず藍葉を発酵させ、熱産生が見られなくなった残渣を調製した。この残渣に (i) 10% グルコース + 10% カザミノ酸 + 1% 酵母エキス水溶液、(ii) 10% グルコース + 10% カザミノ酸水溶液、(iii) 10% グルコース水溶液 を添加し、その温度変化を観察した。いずれの場合にもコントロールとして水を添加した場合と比べて明確な温度上昇が観測された。最も効果的であったのはグルコース、カザミノ酸、酵母エキス

スを加えた場合で、測定開始後3時間で最高温度は42℃に達した。この結果より、藍葉発酵過程における熱産生には、藍葉を含めた植物の葉に特有な成分は要求されないこと、グルコースやカザミノ酸などの一般的な培地成分が存在することで、発酵熱が産生される事が明らかとなった。なおデータには示していないが、トリプトン、デンプンを加えた場合でも温度上昇が確認される一方、硫酸水溶液(pH 8.0)を加えた場合はコントロールと同様の温度変化を示し、熱産生は見られなかった。また、得られた温度上昇は [グルコース+カザミノ酸+酵母エキスを加えた場合>グルコース+カザミノ酸 > グルコースのみ]の順で大きかった

(3)PCR-DGGE法を用いた藍葉発酵過程の菌叢解析

乾燥藍葉を水と混合し、室温にてインキュベートした。温度変化を記録しながら経時的にサンプリングを行った。ただしこの時は庫外の温度が17℃前後と低く、発酵開始後45時間を過ぎても培地温度の上昇が見られなかったため、発酵開始後48~60時間にかけて外気温を30℃に調整して熱産生を誘導した。この結果、温度上昇が起これ発酵熱の産生が観察された。熱産生が見られた後に(発酵開始後60時間)、外気温を室温に戻した。その結果、発酵開始後65時間で最高温度42℃に達した。経時的に採取した9つのサンプルからメタゲノムを抽出し、これをテンプレートとしたPCRによりrDNAの配列を増幅させた。

このようにして得られた、PCR産物は、アガロース電気泳動法により約400bpの単一バンドとして確認された。エタノール沈殿法によって濃縮しDGGEに供した。

シーケンス解析の結果、各バンドに含まれるrDNA増幅配列が明らかとなった。発酵初期段階の30℃~35℃の段階で得られた真正細菌としては *Pantoea agglomerans*、*Pseudomonas alcaligenes* などが挙げられる。ここで検出された *Pantoea* 属は土壌や植物、動物体内など自然界に広く存在する細菌である。菌叢の遷移については、温度が上昇するまで、あまり大きな変化は認められなかった。38℃~42℃の高温域においては *Pantoea* 属細菌が優占的に得られた他、*Micrococcus* sp. の存在が確認された。

一方、真菌検出用のプライマーを用いた結果では、発酵開始時には、*Penicillium* sp.、*Blakeslea trispora* 近縁種等が見られたが、発酵開始後30℃~35℃の低温時には、*Aspergillus* sp.、*Lichtheimia lamosa* などが認められた。温度がもっとも高かった42℃の培養物においては *Aspergillus* sp.、*Cryptococcus vishniacii* が優先種であった。

なお、今解析では、同属の微生物にも関わらず、DGGE解析で異なる泳動位置にバンドが確認された。DGGEは元来DNAの点変異検出に用いられた手法で分離能が非常に高く、塩基配列のわずかな変異でさえも移動距離に影響を与える。このことが、同じ菌種にもかかわらず複数の位置にバンドが現れた原因として推測される。

(4) 藍葉からの微生物の単離と熱産生能の検証

藍葉発酵終了後の残渣を低温時サンプル、発酵終了後に藍葉を追加投入し約40℃にまで温度が上昇した時点のサンプルを高温時サンプルとして、両サンプルからGC培地に生育してくる細菌11種類(低温時サンプルから5種、高温時サンプルから6種)を単離同定した。低温時サンプルから単離された細菌はシーケンス解析の結果、*Klebsiella* 属、*Arthrobacter* 属、*Bacillus* 属、*Sphingobacterium* 属、*Alcaligenes* 属の近縁種であると同定された。一方、高温時サンプルから単離された菌6種は、その4種が *Klebsiella* 属の近縁種に帰属され、他の2種は *Pantoea* 属、*Enterococcus* 属の近縁種であると同定された。すなわち、高温時の藍葉には *Klebsiella* 属の近縁種の優位性が示唆された。この結果は、先のDGGE分析の結果では、藍葉の熱産生時には *Pantoea* 属細菌が優位となることが示されている。*Pantoea* 属細菌は *Klebsiella* 属と同じ腸内細菌科であり、両者の16S rDNAの相同性が非常に高い。DGGE法によって解析された配列は、約400bpと短く、この配列から *Klebsiella* 属と *Pantoea* 属細菌を区別することは困難である。従って、先のDGGE解析で同定された *Pantoea* 属は *Klebsiella* 属細菌に帰属される可能性も十分に考えられた。一方、未発酵の乾燥藍葉からは、*Bacillus amyloliquefaciense*、*Bacillus circulans*、*Bacillus subtilis*、*Pantoea calida*、*Pantoea dispersa* 等が単離された。

真菌については未発酵の乾燥藍葉から、*Rhizopus oryzae*、*Aspergillus oryzae*、*Lichtheimia ramosa* の3種を分離した。

上記の単離された菌の発熱への寄与を明らかにするため、オートクレーブによって滅菌した藍葉(50g)に滅菌水(100ml)を加えた培地に、単離した菌体を植菌し、温度の上昇を検討した。未滅菌の藍葉では24時間後に最高温度の40℃(外気温は30℃)に達した。これに対して、滅菌した藍葉に *Aspergillus oryzae* を加えた場合には、30時間後にほぼ同程度まで温度上昇を見た。*Rhizopus oryzae* を植菌した藍葉では37時間後に33℃程度までの温度上昇を、*Lichtheimia ramosa* を植菌した場合には29

時間後に 32°C程度までの温度上昇が確認された。リアルタイム PCR によってこれらカビの生育を検討したところ、3 種ともほぼ同程度の生育であることが確認された。細菌については上記の *Bacillus* 属および *Pantoea* 属細菌を混合して植菌したが、40 時間経過しても温度の上昇は認められなかった。これらの結果は温度上昇が、真菌（カビ）、特に *Aspergillus oryzae* の生育によって起こる可能性を示唆している。

この知見を裏付けるため、藍葉（滅菌せず）に抗真菌剤である Nystatin(250 µg/mL)、または Penicillin(500 units/mL)と Streptomycin (150 µg/mL)の混合物を加えて発酵させた。この結果、Penicillin と Streptomycin の存在下では、48 時間後に 39°Cまで温度上昇が見られたのに対して、Nystatin 存在下では、温度上昇が得られなかった。すなわちこの系においては、温度上昇には真菌、特に *Aspergillus oryzae* の寄与が大きいと推測された。

ただし温度上昇にかかる時間、あるいは到達した最高温度は単独の菌種を用いた場合と未滅菌の藍葉を用いた場合で異なる。このことは、温度上昇が単一の菌ではなく、真正細菌も含めた複数の菌の共同のよって行われる可能性を示唆するものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

西村圭祐、伊藤智和、羽田亜紀、高橋克忠、吉村 徹、藍葉発酵の非破壊計測：ナトリウム塩による活性化と抑制、平成 24 年度第 39 回日本防菌防黴学会年次大会、2012 年 9 月 11 日 (東京)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 徹 (Yoshimura Tohru)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号：70182821

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし