

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：13904

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21360252

研究課題名（和文） ハイパフォーマンスキノンプロファイル法の開発と環境技術への応用

研究課題名（英文） Development of high performance quinone profiling method and application to environmental engineering.

研究代表者

大門 裕之（DAIMON HIROYUKI）

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60335106

研究成果の概要（和文）：これまでに構築してきたハイパフォーマンスキノンプロファイル法のさらなる簡便化，高速化，高精度化のため，抽出および定量における最適条件を検討し，環境技術や農業分野に対して微生物群集構造の解析手法として適用できることを示した．さらに，開発した分析手法を用いて，メタン発酵，家畜排泄物および堆肥を対象とした微生物群集構造の解析を行い，実際の環境サンプルに適用可能であることを示した．

研究成果の概要（英文）：The optimum conditions of extraction and determination in high performance quinone profiling method were investigated to improve the simplicity, speed and reliability on the procedure. This study showed the potential application of supercritical fluid extraction as a routine method for the analysis of microbial community structures in environmental assessment using the lipid biomarker profiles. Furthermore, application of the developed method was demonstrated to various environmental samples (anaerobic digestion, livestock excreta and composting process).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：キノンプロファイル，微生物群集構造，超臨界流体抽出，バイオマーカー，メタン発酵，土壌分析，液体肥料，リン脂質脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

ある環境や現象に関わる微生物群は相互的に活動しているため，モニタリングを行う際には，特定の微生物群のみに着目するだけでなく，微生物群集構造全体の変化を把握する必要がある．しかし，微生物群を主に株レ

ベルで解析する分子生物学的手法は，有用微生物種の特特定などにおいては効果的であるが，多種多様な微生物群集構造の包括的かつ定量的な把握は困難である．そのため，環境技術における微生物群集構造のモニタリング手法として適しているとはいえない．一方，分子生物学的手法に比べ，定量性，汎用性，

簡便性の面で優れた点が多い微生物群集構造の解析手法の一つとして、菌体細胞に含まれる電子伝達物質であるキノンをバイオマーカーとして利用するキノンプロファイル法が注目されている。しかし、その有効性が認められながらも、有機溶媒による抽出等、操作が煩雑で解析結果を得るのに約 10 時間を要していたため、微生物群集のモニタリングにはほとんど利用されてこなかった。

そこで、これまでに研究代表者らは、微生物群集構造解析手法の簡便化、高速化、高精度化のため、超臨界流体抽出 (SFE, 図 1) 法と超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) を用いる、ハイパフォーマンスキノンプロファイル (HPQP) 法 (図 2) を開発してきた。これにより、従来分析時間の 2 分の 1 以下である 4 時間程度での分析が可能となった。さらに分析手法の最適化および自動化の検討を進めることで、将来的に 1~2 時間程度での解析が可能であることが示されていた。

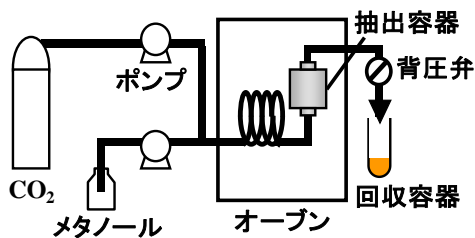


図 1 超臨界流体抽出装置

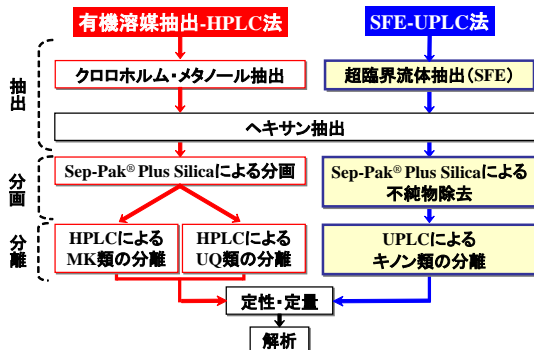


図 2 有機溶媒を用いた従来法とハイパフォーマンスキノンプロファイル法の手順

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下のとおりである。

- (1) 微生物群集構造解析手法の開発
 - ・ ハイパフォーマンスキノンプロファイル (HPQP) 法の確立
 - ・ リン脂質脂肪酸 (PLFA) の抽出と分析
- (2) 微生物群集構造解析手法の応用
 - ・ メタン発酵槽の菌相モニタリングおよび診断手法の検討
 - ・ 動物排泄物の微生物群集構造解析による

- 消化器官内の状態モニタリング法の検討
 - ・ 実規模の堆肥製造過程における微生物群集構造変化の評価
- (3) 微生物群集構造のデータベース構築とキノン分析に関するホームページの作成

3. 研究の方法

(1) 微生物群集構造解析手法の開発

① HPQP 法の確立

本研究では環境技術として、活性汚泥、土壌、堆肥および家畜排泄物を対象として、HPQP 法を適用する際の抽出および分析の最適条件の決定を試みた。

さらに、キノンプロファイル法のさらなる汎用性向上および自動化を目的とし、SFE 法と LC とをオンライン結合したシステム (オンライン SFE-LC) を設計した。

② リン脂質脂肪酸 (PLFA) の抽出と分析

バイオマーカーである菌体キノンおよびリン脂質脂肪酸 (PLFA) の同時抽出、分析の基礎的知見を得るため、PLFA の最適な SFE 条件について検討した。すなわち、統計的な方法により、異なる SFE 条件が脂質バイオマーカーの抽出量に与える影響を検討した。

さらに、環境試料からの PLFA 抽出における SFE 法の有効性を評価するため、従来法である有機溶媒抽出法と SFE 法の抽出効率を比較した。

(2) 微生物群集構造解析手法の応用

① メタン発酵槽内の菌相モニタリングおよび診断手法の検討

メタン発酵槽内 (図 3) の菌相モニタリングおよび診断手法への応用のため、乳牛糞と模擬食品残渣を投入試料とした連続的メタン発酵を対象に、HPQP 法を適用した。

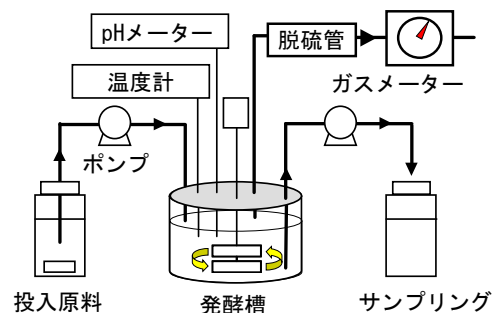


図 3 メタン発酵装置

② 動物排泄物の微生物群集構造解析による消化器官内の状態モニタリング法の検討

HPQP 法を用いて、表 1 に示す豚の糞便の微生物群集構造を解析した。試料は、凍結乾燥した糞便 0.3g-dry とした。

表 1 糞便を採取した豚の育成条件

農場	飼料	豚の育成条件
A農場	乾燥飼料	肥育豚：日齢26日, 170日 母豚：母豚①, 母豚②
B農場	液状飼料	肥育豚：日齢100日

③ 実規模堆肥製造過程における微生物群集構造変化

堆肥工場で食品廃棄物と木質チップを原料とした堆肥試料に対して、HPQP 法を適用し、最適な SFE 条件（温度，時間）を検討した。実規模の堆肥製造過程より、異なる堆積期間の堆肥試料を採取した。異なる抽出温度および時間において SFE 法を適用し、最適な SFE 条件を検討した。さらに、SFE 法の有効性を評価するため、キノン抽出量を従来法である有機溶媒抽出法と比較した。

(3) 微生物群集構造データベースの構築および本研究の取りまとめ

化学的な微生物群集構造の分析手法についての原理，手法，応用事例などを調査した。さらに，それらをデータベース化し，ホームページへ公開した。

4. 研究成果

(1) 微生物群集構造解析手法の開発

① HPQP 法の確立

キノン抽出時に SFE 装置流路口に水を送液し，抽出溶媒の極性を調節することで，トラッピングカラムによるキノンの選択的な回収が可能となることを明らかにした。

SFE と LC とをオンライン結合したシステム（オンライン SFE-LC）を設計するための基礎的知見を得ることができた（図 4）。

土壌，堆肥および家畜排泄物などの環境試料を対象とし，HPQP 法を適用する際の抽出および分析の最適条件を検討した結果，有機溶媒抽出法と同等の抽出率が得られる条件を確認した。

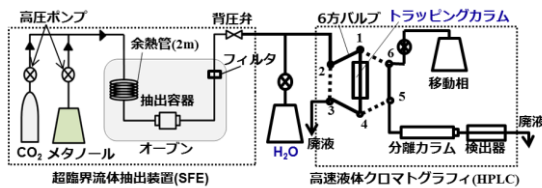


図 4 自動オンライン SFE-LC 法のイメージ

② PLFA の抽出および分析

消化汚泥試料を対象にした PLFA の至適 SFE 条件は，抽出温度 80°C，その他の条件はキノン抽出と同条件であった。

さらに，SFE 法は有機溶媒抽出法と同程度の PLFA を抽出することが可能であることが明らかになり，SFE 法の有効性が確認された（図 5）。

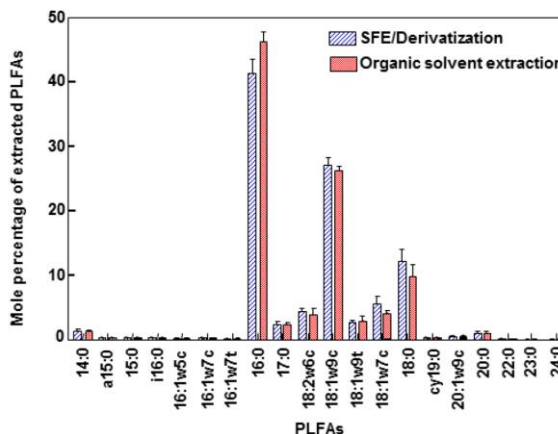


図 5 SFE 法および有機溶媒抽出法による消化汚泥の PLFA 抽出量

(2) 微生物群集構造解析手法の応用

① メタン発酵槽内の菌相モニタリングおよび診断手法の検討

メタン発酵プロセスの安定性とキノンプロファイルの変化に相関性が見られ，キノン種の多様性が高いメタン発酵槽は生育環境の変化に対応しやすいことを明らかにした。さらに，中温発酵におけるメタン発酵槽内のキノンプロファイルは水理学的滞留時間（HRT）により異なった（図 6）。このことから，メタン発酵槽内の微生物量は槽内への負荷と関連していることが示された。キノンプロファイル法を用いることにより，微生物相の動的変化を評価することが可能であることが明らかになり，メタン発酵槽の安定性指標になりうる可能性を示した。

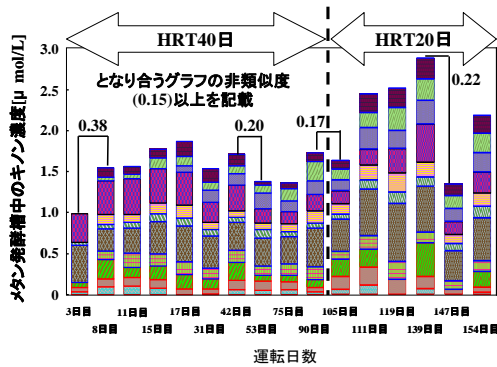


図 6 異なる水理的滞留時間におけるメタン発酵槽内のキノンプロファイル

② 動物排泄物のキノンプロファイル解析による消化器官内の状態モニタリング法の検討

豚排泄物の微生物群集構造の解析結果を図 7 に示す。豚糞中ではユビキノン種、特に UQ-9 や UQ-10 が優占していた。A 農家の肥育豚および母豚の結果より、日齢が大きくなると UQ-9 の量が増加し、UQ-10 の量が減少すること、並びに成育条件が同一の豚においては排泄物中のキノン組成の個体差は小さいことが明らかとなった。また、B 農家の肥育豚の排泄物から多くのメナキノン種が検出された。B 農家は発酵液状飼料を主飼料として給餌していることから、これは発酵液状飼料が様々な原料からなる混合物であることや、発酵によって多くの微生物を含有していることなどが理由であると考えられる。すなわち、排泄物中のキノン種評価によって、給餌する飼料の違いがもたらす腸内細菌叢の差が検出可能であることが示された。

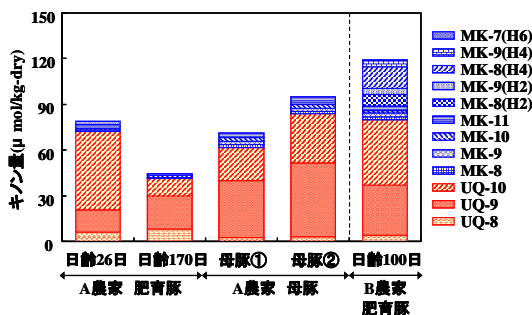


図 7 肥育法の異なる豚糞のキノンプロファイル

③ 実規模の堆肥製造過程における微生物群集構造変化の評価

堆肥を試料とした、HPQP 法における至適

SFE 条件 (温度, 時間) を検討した結果, 抽出温度 45°C, 抽出時間 25 分が最適であることを明らかにした. さらに, SFE 法は有機溶媒抽出法と同程度のキノンを抽出することが可能であることが明らかになり, SFE 法の有効性が確認された.

最適化された SFE 条件で HPQP 法による堆肥製造段階のキノン抽出を行った結果, 堆肥製造過程の C/N 比の変化が安定しているにもかかわらず微生物相は変動し続けていることが明らかになり (図 8), 堆肥製造過程のキノンプロファイルの変化を評価できることが示唆された. 以上のことから, 堆肥化における微生物相変化の定量的モニタリングに HPQP 法を用いることが可能であることが示された.

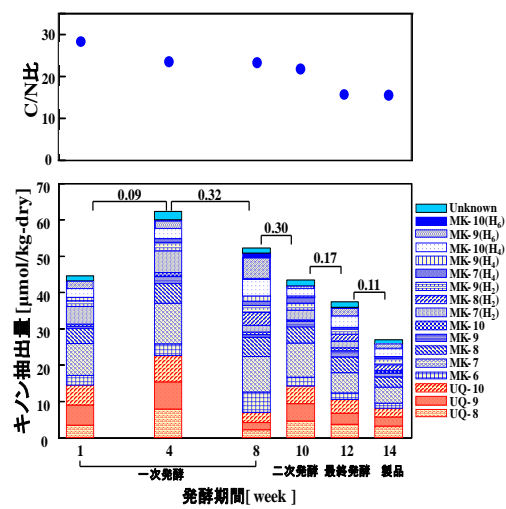


図 8 堆肥製造過程における C/N 比とキノンプロファイルの変化

(3) 微生物群集構造データベースの構築および本研究の取りまとめ

微生物群集構造の化学的分析手法についての原理, 手法, 応用事例などを調査した結果をデータベースにまとめ, ホームページへ公開した.

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 3 件)

1. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta, Koichi Fujie and Hiroyuki Daimon, Supercritical Fluid Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography of Respiratory Quinones for Microbial Community Analysis in Environmental and Biological Samples, *Molecules*, 査読有, 17, 2012, 2628-2642.

2. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta, Koichi Fujie and Hiroyuki Daimon, Supercritical Fluid Extraction of Bacterial and Archaeal Lipid Biomarkers from Anaerobically Digested Sludge, International Journal of Molecular Science, 査読有, 13, 2012, 3022-3037.
3. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta, Koichi Fujie and Hiroyuki Daimon, Supercritical Fluid Extraction of Microbial Phospholipid Fatty Acids from Activated Sludge Journal of Chromatography A, 査読有, 1217(43), 2010, 6704-6708.

[学会発表] (計 16 件)

1. Sidik Marsudi, Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Monitoring of Microbial Community in Methane Fermentation Process of Palm Oil Mill Effluent using Lipid Biomarkers, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, March 11-15, 2012, Orange County Convention Center, Florida, USA.
2. Muhammad Hanif, Takeshi Yamada, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Supercritical Fluid Extraction of Lipid Biomarkers for Monitoring Microbial Community Structure in an Anaerobic Digestion, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, March 11-15, 2012, Orange County Convention Center, Florida, USA.
3. Muhammad Hanif, Jin Yoshino, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Simultaneous Supercritical Fluid Extraction and Chemical Derivatization of Microbial Phospholipid Fatty Acids from Anaerobically Digested Sludge, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, March 11-15, 2012, Orange County Convention Center, Florida, USA.
4. Muhammad Hanif, Keita Ito, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, An Innovative Strategy for the Characterization of Microbial Lipid Biomarkers in the Environment using Supercritical Fluid Extraction, Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, March 11-15, 2012, Orange County Convention Center, Florida, USA.
5. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Rapid Analysis of Bacterial and Archaeal Lipid Biomarkers during Methane Fermentation Process by Supercritical Fluid Extraction, International Symposium on EcoTopia Science(ISETS), December 9-11, 2011, Nagoya University, Aichi.
6. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Application of Supercritical Fluid Technology for a Rapid Analysis of Microbial Lipid Biomarkers in Methane Fermentation Process, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011, November 17-18, 2011, Toyohashi University of Technology, Aichi.
7. 大野祥平, Muhammad Hanif, Asri Gani, 熱田洋一, 大門裕之, 化学分析に基づいた微生物群集構造解析手法による嫌気性消化槽のモニタリング, 日本水環境学会第 45 回年会, 2011 年 3 月 18-20 日, 北海道大学 (北海道).
8. 内田あゆ美, 武田圭, 鈴木邦彦, 熱田洋一, 大門裕之, 人工ゼオライトによるメタン発酵消化液の脱窒および窒素含有人工ゼオライトを用いた幼植物試験, 第 41 回中化連秋季大会, 2010 年 11 月 6-7 日, 豊橋技術科学大学 (愛知県).
9. 大野祥平, Muhammad Hanif, Ahamd Fall, 熱田洋一, 大門裕之, 超臨界二酸化炭素抽出法を用いたキノンプロファイル法によるメタン発酵槽中の微生物群集構造解析, 第 41 回中化連秋季大会, 2010 年 11 月 6-7 日, 豊橋技術科学大学 (愛知県).
10. 大野祥平, Muhammad Hanif, Ahamd Fall, 熱田洋一, 大門裕之, 超臨界流体技術を用いたキノンプロファイル法による嫌気性消化処理の安定性解析, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010 年 9 月 6-8 日, 同志社大学 (京都府).
11. Muhammad Hanif, Syouhei Ohno, Ahamd Fall, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Application of Supercritical Fluid Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography to Microbial Quinone Analysis in Anaerobic Digestion, 34th International Symposium on Capillary Chromatography and 7th GCxGC Symposium, May 30-June 4, 2010, Congress Centre, Riva del Garda, Italy.
12. 阪本崇, 小野孝之, 熱田洋一, 大門裕之, 超臨界二酸化炭素抽出法を用いたキノンプロファイル法の迅速・高精度化, 日本水環境学会第 44 回年会, 2010 年 3 月 15-17 日, 福岡大学 (福岡県).
13. 大野祥平, 熱田洋一, 富内芳昌, 大門裕之, パーム油製油工場排水の嫌気性消化処理における有機物分解率の向上, 日本水環境学会第 44 回年会, 2010 年 3 月 15-17 日, 福岡大学 (福岡県).
14. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta, Takashi Sakamoto, Syouhei Ohno and Hiroyuki

Daimon, Rapid Identification of Microbial Quinones and Phospholipid Fatty Acids with Supercritical Fluid Extraction for Environmental Assessment, International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP), January 26-27, 2010, Bruges, Belgium.

15. Muhammad Hanif, Yoichi Atsuta and Hiroyuki Daimon, Characterization of Microbial Communities in Anaerobic Digestion Process using Quinone Profiles, 1st International Conference on Engineering, Environment, Economics, Safety & Health, October 26-27, 2009, Manado, Indonesia.
16. 大野祥平, 熱田洋一, 大門裕之, SFE-UPLC によるキノンプロファイルの迅速化, 化学工学会第41回秋季大会, 2009年9月16-18日, 広島大学(広島県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大門 裕之 (HIROYUKI DAIMON)

豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・
准教授

研究者番号 : 60335106

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :