

称号及び氏名 博士（工学） 吉原 章仙

学位授与の日付 2015年9月25日

論文名 「微生物の付着現象の解明とその応用に関する研究」

論文審査委員 主査 小西 康裕

副査 綿野 哲

副査 荻野 博康

副査 野村 俊之

## 論文要旨

微生物機能を活用したバイオプロセスが鉱工業分野で研究開発されている状況のなか、高効率なプロセスを構築するためには、反応装置内の微生物濃度を高い状態で保持する必要がある。そのため、微生物が高密度化した集合体であるバイオフィルムの利用価値は高く、その形成における微生物の付着現象を理解し、その制御因子を把握することは意義深いことである。本論文は、微生物細胞を細胞コア表層に高分子鎖が生えたコロイド粒子と捉えて、「微生物-微生物」や「微生物-固体」の表面間に働く相互作用を、静電気力と **van der Waals** 力の和からコロイド分散系の安定性を評価する **DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek)** 理論および付着による **Gibbs** 自由エネルギー変化  $\Delta G$  に基づいて定量的に把握するとともに、平行平板流れ場を用いた微生物の付着力分布の新しい解析法を提案し、微生物の付着現象の解明をすることを研究目的として行ったものである。さらに、微生物細胞の表層特性評価手法を応用して、メタン発酵プロセスにおけるメタン生成古細菌の担体粒子への付着現象（固定化）や凝集塊（グラニュール）形成現象、また微生物と同様に表層が高分子物質で被覆された複合粒子の製造プロセスにおける粒子付着現象の解明を試みた。

本論文の各章の概要は次のとおりである。

第1章では、本論文の研究背景をまとめるとともに、研究目的と本論文の構成について述べた。

第2章では、二種類のメタン生成古細菌 (*Methanosarcina barkeri* と *Methanosaeta concilii*) をモデル微生物として、コロイド科学の観点から細胞表層特性を評価した。その結果、*M. barkeri* は **pH 2** 付近に等電点を持つ負帯電の微生物、*M. concilii* は **pH 4.5** 付近に等電点を持つほぼ無帯電の微生物であり、両者ともに疎水性表面をもつ微生物であることがわかった。また、両者の帯電性の違いは、微生物表層におけるカルボキシル基やリン酸基の存在量が異なることに起因することを明らかにした。以上の研究結果を踏まえて、メタン生成古細菌の自己凝集実験を行った。その結果、溶液のイオン強度が増加すると微生物の凝集が進行し、この現象は柔らかい粒子モデルで推算した微生物の表面電位と、微生物層に対する極性の異なる種々の溶媒の接触角から得られる表面エネルギーを用いて推算した微生物間の  $\Delta G_{\text{Total}}$  で説明できることがわかった。

第3章では、鞭毛を持たない非運動性の乳酸菌 *Lactococcus lactis* と鞭毛を持つ運動性の大腸菌 *Escherichia coli* をモデル微生物に用いて、細胞外高分子物質 (Extra polymeric substance, EPS) や線状構造物 (鞭毛や線毛) が微生物の付着挙動に及ぼす影響について検討した。その結果、微生物の付着による  $\Delta G^{\text{Total}}$  が正、かつ DLVO 理論から微生物-固体間に高いポテンシャル障壁が存在して付着が困難と評価できる場合でも、微生物細胞と比較して曲率が小さい細胞外構造物が存在すると、微生物は固体表面に付着できることが明らかになった。また、非運動性微生物 *L. lactis* では EPS の存在によって微生物の固体表面への付着は促進されたが、運動性微生物 *E. coli* では線状構造物の存在により EPS による付着促進効果は減少することがわかった。

第4章では、鞭毛が欠損した親水性の *E. coli* と疎水性の *M. barkeri* を非運動性モデル微生物に用いて、平行平板流れ場の固体表面における微生物の付着・脱離挙動を直接観察した。その結果、微生物の付着速度は、負帯電ガラスではイオン強度の増加とともに増加し、正帯電ガラスではイオン強度とは無関係に一定となり、DLVO 理論によって合理的に説明できることがわかった。また、固体表面に付着した微生物に作用する流体抗力から、微生物の脱離に必要な抗力を定量的に評価した結果、脱離抗力は Weibull 分布関数で相関できることがわかった。得られた抗力の中央値は、イオン強度の増加に伴い減少したが、高イオン強度ではほぼ一定値を示した。これは、高イオン強度の領域では、静電相互作用が弱まり、van der Waals 相互作用が支配的になったためと考えられる。

第5章では、前章で提案した平行平板流れ場における微生物の付着力分布評価法に基づいて、細胞外構造物が固体表面への微生物の付着・脱離現象に及ぼす影響について解析した。運動性微生物 *E. coli* KP7600 株とその鞭毛に関わる変異株 (運動性欠損株と鞭毛欠損株) を用いて、負帯電ガラスへの微生物の付着・脱離現象を直接観察した。その結果、鞭毛の有無によって付着速度に有意差はなく、鞭毛や運動性は必ずしも微生物の付着を促進する因子ではないことが判明した。一方、微生物の脱離に必要な抗力の中央値は、運動性微生物 KP7600 株、運動性欠損株、鞭毛欠損株の順に増加したことから、鞭毛と運動性は微生物の脱離を抑制する要因になることがわかった。また、ガラスに付着した微生物の 99.9% を除去するために必要な抗力は、いずれの菌株でも抗力の中央値に対して約 30 倍も大きく、またその分布幅は微生物の粒子径分布よりも広いことから、バイオフィームは微生物の付着界面で強固な相互作用が働くことにより形成されることが示唆された。さらに、非運動性微生物 *L. lactis* の洗浄細胞 (EPS 除去) と未洗浄細胞を用いて、負帯電ガラスへの微生物の付着・脱離現象を観察した。未洗浄細胞は、洗浄細胞よりも付着速度が増加したことから、EPS が微生物の付着を促進することがわかった。さらに、両微生物細胞を 24 時間静置した場合には、その前後で微生物脱離に必要な抗力の中央値は 2 倍に増加したことから、静置期間内に産出された EPS が微生物付着に大きく寄与することが明らかになった。

第6章では、前章で得られた基礎的知見を基に、メタン発酵プロセスの高効率化を図るためのコンセプトを確立した。まず、発酵槽内におけるメタン生成古細菌を高密度に保持する方法として、固定化担体を用いる方法を検証した。*Methanosaeta* 属のメタン生成古細菌は疎水性・無帯電という特異的な微生物であるのに対し、消化発酵液に含まれる他の嫌気性微生物は疎水性・負帯電であることが判明したことから、メタン生成古細菌だけを選択的に付着できる固定化担体としては負帯電・疎水性表面を持つ竹炭が適していると判断した。この検証実験を行った結果、*Methanosaeta* 様の微生物はアルミナ担体 (正帯電・親水性表面) には付着せずに竹炭担体に数多く付着し、メタンガスも産出されることが明らかになった。次に、メタン生成古細菌と酸生成菌のヘテロ凝集実験を行い、メタン生成古細菌の固定化方法となるマイクログラニュールの形成を試みた。その結果、未洗浄のタンパク質分解菌とメタン生成古細菌 *M. barkeri* は、急速凝集してマイクログラニュールを形成することがわかった。タンパク質分解菌が産出する水素ガスがメタン生成古細菌の基質となることから、両微生物細胞の凝集には種間水素伝達を効率的に行うための生物学的因子が寄与している可能性が示唆された。

第7章では、前章で得られた基礎的知見を拡張して、高分子をコア粒子に被覆する粒子複合化プロセスにおける付着現象を解明し、複合化粒子の生産効率を向上させるための方策を提案した。

具体的には、複合化装置内では粒子混合による局所的な高温場が生じることから、装置内壁素材と複合化処理材料の表面自由エネルギーを高温下で実測した接触角から推算し、複合化処理による材料間の  $\Delta G_{\text{Total}}$  に基づいて、複合化材料の付着量を大きく削減できる装置内壁素材を探索した。その結果、耐付着性の高い壁面素材としてポリテトラフルオロエチレンが有力であることを示した。また、高分子の被覆順序を変更することで、複合化粒子の収率が向上することを明らかにした。

第 8 章では、本論文における各章の研究成果を総括したうえで、今後の研究展望を示した。

## 審査結果の要旨

本論文は、微生物細胞を細胞コア表層に高分子鎖が存在するコロイド粒子と捉え、微生物の付着現象の解明とその応用について研究したものであり、以下の成果を得ている。

1) 「微生物-微生物」や「微生物-固体」の表面間に働く相互作用は、静電気力と **van der Waals** 力の和からコロイド粒子の分散凝集を論じる **DLVO** 理論および微生物付着に伴う **Gibbs** 自由エネルギー変化に基づいて定量的に把握できることを示した。この理論的アプローチによって、メタン生成古細菌の自己凝集現象、また微生物（乳酸菌、大腸菌）の付着挙動に及ぼす細胞外高分子物質（**EPS**）や線状構造物（鞭毛、線毛）の影響が合理的に説明できることを明らかにした。

2) 平行平板流れ場における微生物の付着力分布の新しい解析法を提案し、固体表面から微生物を脱離させるために必要な抗力を定量的に評価するとともに、脱離抗力が **Weibull** 分布関数で相関できることを明らかにした。また、脱離抗力の中央値は、溶液イオン強度の増加に伴い減少するが、高イオン強度の領域では静電相互作用に比べて **van der Waals** 相互作用が支配的になるために一定値を示すことを明らかにした。さらに、微生物の運動性や鞭毛は、微生物の付着を促進する因子ではないが、微生物の脱離を抑制する要因になることを見出した。

3) 上記の微生物表層の特性評価手法を応用し、各種微生物の共存下においてメタン生成古細菌だけを選択的に付着できる固定化担体の表面性状を解明することにより、メタン発酵プロセスの効率向上を図るコンセプトを確立した。さらに、微生物付着に関する基礎的知見を合成高分子粒子の製造プロセスに応用し、複合化装置の内壁素材ならびに被覆順序の最適化を図ることにより、複合化粒子（コア粒子が高分子物質で被覆）の生産効率を向上させるための方策を提案した。

以上の成果は、固液界面における微生物の付着・脱離現象に関する重要な基礎的知見を与えるとともに、バイオリクターなど実用化装置の開発においても貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。