Nocardia amarae の産生する複数の凝集関与物質と それらの協同作業によるフロック形成*

小 泉 淳 一 武 田 穰

1. はじめに

凝集剤、フロキュラントは、現代工業の様々な分野、例えば造水、醗酵、食品工業の各種工程で直接使用される他に、種々の産業から排出される排水の処理に広く使用されることで、現代の生産活動の一部を支えている。今後その使用は、増えこそすれ減ずることはないであろう。こうして使用されている主に合成高分子系の凝集剤についての、それ自身の難分解性または未反応モノマーの毒性に対する疑惑から、糖、アミノ酸、脂肪酸等から構成される生物由来の凝集剤、バイオフィロキュラントが開発され得るならば、それは積極的に使用されるべきものであると考える。またさらに、排水処理の多くが生物処理に委ねられている現状で、その生物処理プロセスでも当然、自然に機能しているはずのバイオフィロキュラントについて、その生成および作用の機構が判明すれば、生物処理における固液分離性能の確保、向上を生物生理の側面から制御できる技術が確立することとなる。そしてこの両者が達成されるならば、食品、医薬生産を含む醗酵工業でのダウン

ストリームプロセスは、大きく変容するであろう。

2. *Nocardia amarae*のバイオフィロキュラント FIX

バイオフィロキュラント生産微生物として、*Rhodococcus erythropolis*^{1)~4)}が知られているが、ここではそれと細胞表層がよく似ていると言われている、種名に下水管渠という名を持つ *N. amarae* のバイオフィロキュラントについて述べる。*N. amarae* YK 1は、静置培養すると気液界面にマット状に増殖するグラム陽性のバクテリア(放線菌)で、例えば14%のグルコースという高い浸透圧を持つ培地でも増殖できる。また、活性汚泥における汚泥浮上の原因微生物ともされている⁵⁾。この *N. amarae* を7%グルコースを含む培地で培養し、培養細胞を蒸留水で洗浄し、その2回目以降の洗液を濃縮し、大腸菌の培地に加え、そこでの大腸菌の増殖の様子を観察したところ、大腸菌のフロック形成が見られた⁶⁾。写真1の上段は *N. amarae* の細胞洗液を加えていない対照であり、下段は添加した培地での大腸菌集団の様相を示している。写真から、*N. amarae* の細胞洗液を添加した系での増殖では、大腸菌が徐々にフロックを形成している様子が見えるであろう。

このバクテリア細胞の凝集を引き起こす機能物質にFIXという名称を与え、それを精製、回収し、物質構造についての知見を求めようとしたところ、興味深い新たな現象に遭遇した。その説明の前に、他の微生物由来のバイオフィロキュラントについて概括したい。

3. 他の微生物が生産するバイオフィロキュラント

自律的な凝集を積極的に活用している生物プロセスは、排水処理で用いられる活性汚泥であろう。そこでは、多量の夾膜物質とスライム様物質とを分泌する *Zoogloea ramigera* が活性汚泥の凝集能に関わる重要な微生物であると見做されたこともあった⁷⁾が、活性汚泥に生息するそれ以外の微生物に注目した研究の中から、多くの他懸濁粒子の凝集をもたらす物質、バイオフィロキュラントが報告されている。ここではそれらを表1のようにまとめた^{1)~4), 6), 8)~22)}。

興味深いことに、バイオフィロキュラント生産微生物

Jun-ichi Koizumi

昭和56年 東京大学大学院工学系研究
科博士課程修了

同年 大阪大学工学部助手

60年 島根大学農学部助教授
工学博士

〔趣 味〕 猫

Minoru Takeda

平成元年 島根大学大学院農学系研究
科修士課程修了

同年 筑波大学大学院農学系研究
科博士課程

〔趣 味〕 テレビ

* Synergetic Flocculation of FIXs Produced by *Nocardia amarae*, 1990年2月13日受理

写真1 FIXによる大腸菌のフロック形成⁶⁾。数字は培養時間。上段はFIX無添加対照。

表1 バイオフィロキュラント生産微生物

微生物名	溶脱/精製	凝集pH	文献
<i>Anabaenopsis</i> sp.	有	不明	8
<i>Aspergillus ochraceus</i>	無	酸性	9
<i>Aspergillus perasiticus</i>	無	酸性	9
<i>Aspergillus sojae</i>	無	中性	9
<i>Brevibacterium insectiphilum</i>	無	酸性	9
<i>Corynebacterium brevicale</i>	無	酸性	9
<i>Corynebacterium</i> sp.	無	中性	2
<i>Nocardia amarae</i>	有	酸性/アルカリ性	6
<i>Nocardia calcarea</i>	無	中性	2
<i>Nocardia restricta</i>	無	中性	2
<i>Nocardia rhodnii</i>	無	中性	2
<i>Paecilomyces</i> sp.	無	中性	10, 11
<i>Phormidium</i> sp.	有	酸性/アルカリ性*	8, 12, 13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	無	酸性	9
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	無	酸性	9
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	無	中性	1, 2, 3, 4
<i>Staphylococcus aureus</i>	無	酸性	9
<i>Streptomyces griseus</i>	無	酸性	9
<i>Streptomyces vinaceus</i>	無	酸性	9
未同定放線菌	有	酸性	14
未同定バクテリア	有	酸性	15, 16, 17
活性汚泥	有	酸性	18, 19, 20
	有	アルカリ性	21, 22

* 即時的凝集について

の培養液そのもので被験粒子の凝集を生起できる例を別として、フロック形成に与る成分を、バイオフィロキュラント生産微生物細胞から溶脱させた場合、得られた溶脱成分はもはや中性 pH での凝集活性を保持しておらず、生物の生存には一般には適しない酸性またはアルカリ性の極端な pH においてしか作用しないことがほとんどであったことである。このことは、後でも述べるが *N. amarae* の FIX についても同様であった。

こうした事実から大胆に推量すれば、表1に示した微生物の作るバイオフィロキュラントにはそれぞれ、カウンターファクターが存在し、実際の生物環境におい

図1 FIXの分画手続き

NaOH 溶脱液：静置培養した *N. amarae* YK1 10g (乾重) を濾紙 (アドバンテック, 5A) 上に集菌し、蒸留水で洗浄。洗浄細胞を 0.1N NaOH 600ml に懸濁し、5～6時間おだやかに攪拌。細胞分散後、遠心分離 (10,000×g, 15min) によって *N. amarae* 細胞を取り除いた上澄液を NaOH 溶脱液とした。

HCl 溶脱液：洗浄細胞 10g (乾重) を 0.1N HCl 600ml に懸濁し、5～6時間攪拌。遠心分離の上澄液をメンブレンフィルター (ニトロセルロース, 0.45μm) で濾過し、濾液を HCl 溶脱液とした。

FIX-フラクション1：NaOH 溶脱液 (600ml) に HCl を添加し、pH を低下させ、pH 4 前後で出現する不溶物を遠心分離により回収し、FIX-フラクション1とした。

FIX-フラクション11：0.05N NaOH 100ml に上記 FIX-フラクション1を溶解し、ジエチルエーテル 100ml と 1N HCl 4ml とを加え、よく混合した。数分間振盪し、全体を均一なエマルジョン状態にした。これを遠心すると、3層に分かれた。下層の水層は捨て、上層のジエチルエーテル層を回収した。水層とジエチルエーテル層の間にクリーム化層が形成されるが、これを再び 0.05N NaOH 100ml に溶解し、酸性ジエチルエーテル抽出をさらに2度繰り返した。以上3回の抽出で得られた 300ml の抽出液を風乾し、FIX-フラクション11を得た。

FIX-フラクション12：FIX-フラクション11で残ったクリーム化層を 0.05N NaOH 100ml に溶解し、これに水飽和 n-ブタノール 100ml と 1N HCl 4ml を加え、安定なエマルジョンとなるまでよく混和した。遠心分離により、上層のブタノール層を回収した。この酸性ブタノール抽出3回から得られた 300ml の抽出液を減圧で乾固し、FIX-フラクション12を得た。

FIX-フラクション13：上記 FIX-フラクション11, FIX-フラクション12を得た抽出残物を FIX-フラクション13とした。

FIX-フラクション2：HCl 溶脱液に NaOH を加え、pH を 8 以上に調整すると生ずる沈殿物を遠心分離により回収し、0.02N NaOH で洗浄し、FIX-フラクション2とした。

ては、それらが相協力してフロック形成に作用しているのではないだろうか考えることができる。そして、バイオフィロキュラントの溶脱と精製過程が、一種のフィルターとして働き、カウンターファクターを視野から排除していたのではないだろうか。そう考えると、その性状は決して同一ではないであろうが、活性汚泥という源から、作用 pH の相反するバイオフィロキュラントが、それぞれ異なる研究グループで見出された^{18)~22)}という背景が理解できるように思われる。

4. FIX の分画

ここで、カウンターファクター検証のための FIX 分画手続きについて説明するが、分画の途中で捨てられる水層については、凝集に関わる成分が存在すると考えられる証拠は得られなかったことから、図 1 および説明からはあらかじめ除外されていることを初めに述べておく。

N. amarae YK 1 は静置培養すると、濾紙で回収可能な程度の大きさの集合体を形成しながら増殖する。この集合体は 0.05N 以上の濃度の NaOH を用いた細胞表層物質の溶脱操作によって分散させることができたが、0.1% SDS あるいは Triton X-100 のような界面活性剤、10mM EDTA 溶液そしてアセトン、ジエチルエーテルといった有機溶媒では分散させることはできない。またリゾチームおよびプロテアーゼによる分解処理を施しても分散させることはできなかった。0.1N NaOH で表層物質を溶脱させた細胞は、分散するものの、走査型電子顕微鏡による観察では、細胞のリシスは見られず、表層物質の溶脱のみができていと判断できる。

この NaOH 溶脱液に HCl を加え pH を下げていくと、pH が 4 近くになったところでフロック状の不溶物が発生した。これを FIX-フラクション 1 として回収した(図 1)。種々の有機溶媒に対する FIX-フラクション 1 の挙動をそれぞれ調べた上で、FIX-フラクション 1 をさらに、酸性条件でのジエチルエーテルと

n-ブタノールに対する溶解性の違いにより 3 画分に分けた。

最も疎水的と思われる画分は、酸性条件でジエチルエーテルに抽出される画分であり、これを FIX-フラクション 11 とした。ジエチルエーテルには抽出されなかったが、酸性状態で n-ブタノールには抽出される画分を FIX-フラクション 12 とし、両溶媒に不溶な画分を FIX-フラクション 13 とした(図 1)。

HCl 溶脱では NaOH を用いた場合のような、細胞の完全な分散は起こらない。しかし、この HCl 溶脱液に NaOH を加えてゆくと pH 8 で、やはりフロック状の不溶物が生じた。これには FIX-フラクション 2 と名づけた。FIX-フラクション 2 はジエチルエーテル、n-ブタノールに不溶な成分のみで、FIX-フラクション 1 のように幾つかの画分に分画することはできなかった(図 1)。

5. 各画分特性

5.1 FIX-フラクション 11

FIX-フラクション 11 の収率は $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ で、他の画分に比べ最も微量であった。またこれは一旦乾固すると水には決して溶解せず、NaOH 溶脱液および FIX-フラクション 1 の段階では、他の水溶性成分の介在で可溶化されていたものと考えられる。

5.2 FIX-フラクション 12

FIX-フラクション 12 の収率は $10 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ で、こ

写真 2 FIX-フラクション 12 によるカオリン粒子の凝集。数字は pH。

写真 3 FIX-フラクション 13 によるカオリン粒子凝集の pH 依存性(A)、SDS による作用 pH のシフト(B)およびフロックの消失(C)。

写真4 FIX-フラクション1(左)と2(右)の協同による凝集(中央)。

の画分は、乾固の後でも中性またはアルカリ性の溶液に可溶であった。FIX-フラクション12の水溶液にHClを加えてゆくと、pH4.0以下でFIX-フラクション12は不溶物となり沈殿する。この不溶化は、pHの変化に対応して可逆的であった。この中性水溶液は121°Cで20minオートクレーブした後でも、pH変化に依る可逆的な不溶化を起こし、現象は熱には安定であった。しかしプロテアーゼ処理後には、この現象は見られなくなり、現象生起の主体はペプチドであろうと推定でき、不溶物の出現はペプチドの分子または会合コロイドの凝析に依るものと判断できる。

カオリン粒子(1,000ppm)を用い、FIX-フラクション12の他懸濁粒子に対する凝集活性を調べた。カオリン懸濁後30minの状態を写真2に示す。pH4.0以下でカオリンはフロックを形成し、沈殿した。フロックの体積はpHが低下するにつれて減少している。1,000ppmカオリンのフロック形成に、10ppmオーダーのFIX-フラクション12で十分であった。この形成されたフロックも熱には安定であった。しかし、界面活性剤に対しては非常に不安定で、試験したFIX-フラクション12の1/10量のSDSないしはTriton X-100を加えると、凝集体は即座に分散した。

5.3 FIX-フラクション13

FIX-フラクション13の収率は50~60mg・g⁻¹で、この画分の乾固後は、0.05N以上のNaOHでなければ溶解させることはできなかった。この画分の凝集活性は、FIX-フラクション12のそれがpH4.0以下で見られるのとは異なり、pH4.0でのみ観察された(写真3A)。また、形成されたフロックは、Triton X-100に対しては安定であった。ところが、FIX-フラクション13の1/20量のSDSを添加すると、フロックを形成できるpH領域は酸性側にシフトし(写真3B)、1/5量のSDSを加えるとフロックは消失した(写真3C)。この画分もタンパク分解処理により、凝集活性を失ったところから、FIX-フラクション12と同様、その構成成分はペプチドであろうと考えられる。

5.4 FIX-フラクション2

FIX-フラクション2の収率は10mg・g⁻¹であった。この画分は、FIX-フラクション12やFIX-フラクション13が酸性側pHで可逆的凝析を示したのとは逆に、pH8以上のアルカリ側で可逆的不溶物形成を示した。タンパク分解処理により、不溶物形成は消失したので、これもやはりペプチドコロイドの凝析によるものであると考えられる。この画分は、上に述べたようにpHに依存したそれ自身の凝析を示すものの、FIX-フラクション12やFIX-フラクション13とは異なり、カオリン等の他懸濁粒子のフロック形成は起こさなかった。

6. 協同作業による凝集

これまで述べた各画分は単独で、ある特定のpH領域において凝析あるいは他懸濁粒子を含んだフロックを形成することができるものがある。しかしながら、そのpHは前にも述べたように、一般に生物が生息する中性pHからは大きくはずれたところにある。そこで、こうして得た画分を用いて、協同作業による中性pHでの凝集を検証する。

6.1 HClで溶脱する表層物質の役割

微生物のフロック形成に対してカチオンが重要な影響を与えることは、柿井²³⁾の報告にもある通りである。各画分に対してのカチオンの効果を調べたところ、FIX-フラクション11, 12, 13の母体であるNaOH溶脱液由来のFIX-フラクション1のみが、中性pHでカチオンと共存することでフロックを形成することができた。そこで、pHを7に調整したFIX-フラクション1溶液に、HCl溶脱液に由来するやはりpHを7に調整したFIX-フラクション2溶液を加えると直ちにフロックが生じた(写真4)。即ち、FIX-フラクション2は上で述べたカチオンが示したのと同じ機能を示した。FIX-フラクション2を、塩基性タンパクであるリゾチームやヒストンタンパクまたは塩基性抗生物質であるストレプトマイシンやカナマイシンに置き換え、同様の実験を試みたところ、やはり同様の結果を得た。従って、FIX-フラクション2は自然に存在するFIX-フラクション1の電気的なカウンターファクターであり、タンパク分解処理の結果から考えると、塩基性タンパクが主成分であると考えられる。

6.2 FIX-フラクション11は中性pHでの凝集に不可欠

上で述べたFIX-フラクション2の示した協同作業によるフロック生成で、3.で強調した、中性pHでは凝集活性を示さないバイオフィロキュラントにはカウンターファクターが存在し、それは溶脱過程で除かれて

いたのであろうという仮説は証明されたと考えるが、さらに興味深い現象が、各画分を用いた再構成実験から浮き彫りとなった。

ジェチルエーテル層に移動し、再び水に溶解させることができないため、凝集活性を検討できなかった FIX-フラクション11を別として、FIX-フラクション1に由来する FIX-フラクション12, 13またはその混合物に FIX-フラクション2を加えても、また調べた限りのいかなるカチオンが共存しても、中性 pH ではフロック形成はなかったのである。即ち、最も疎水的で FIX-フラクション12および13と共存してはじめて水相に保ちうる FIX-フラクション11が存在しないと、FIX-フラクション2との相互作用が生じ得ず、FIX-フラクション11, 12, 13そして2の4画分が全て同一系内に存在してはじめて、中性 pH で安定なフロックが形成できたのである。

7. おわりに

本報告では、微生物由来の凝集剤、バイオフィロキュラントでは、複数画分の協同作業があり、それらが正の制御要素として微生物集団の凝集に関わっていることについて述べた。生物制御が秘めている興しろさは、こうした点にあるのであろう。

本報告に示した研究の一部は、平成元年度文部省科学研究費補助金一般研究(C)の補助を受け、実施されたものである。

文 献

- 1) 高原義昌, 倉根隆一郎, 鈴木智雄 (1984) 微生物凝集剤, 造水技術, 10(4), 49-51.
- 2) Kurane R., Toeda K., Takeda K., and Suzuki T. (1986) Screening for and characteristics of microbial flocculants, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2301-2307.
- 3) Kurane R., Takeda K., and Suzuki T. (1986) Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2309-2317.
- 4) 倉根隆一郎 (1988) バイオポリマーによる排水の高度処理, 用水と排水, 30, 960-966.
- 5) 本多和彦, 森忠洋, 矢野郁也, 堺好雄, 松本利通 (1984) 放線菌細胞壁中の強疎水性物質 (ミコール酸) の同定と汚泥浮上の関係について, 下水道協会誌, 21(2), 1-8.
- 6) Koizumi J.-i., Takeda M., and Mori T. (1989) Extracel-lular product from *Nocardia amarae* induces bacterial cell flocculation, *FEMS Microbiol. Lett.*, 57, 61-64.
- 7) Butterfield C.T. (1935) Studies of sewage purification—II. A Zoogloea-forming bacterium isolated from activated sludge, *Public Hlth. Rep.*, 50, 671-684.
- 8) Bar-Or Y., and Shilo M. (1987) Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phormidium* sp. strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC6720, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2226-2230.
- 9) Nakamura J., Miyashiro S., and Hirose Y. (1976) Screening, isolation, and some properties of microbial cell flocculants, *Agric. Biol. Chem.*, 40, 377-383.
- 10) Takagi H., and Kadowaki K. (1985) Flocculant production by *Paecilomyces* sp.: Taxonomic studies and culture conditions for production, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3151-3157.
- 11) Takagi H., and Kadowaki K. (1985) Purification and chemical properties of a flocculant by *Paecilomyces*, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3159-3164.
- 12) Fattom A., and Shilo M. (1984) *Phormidium* J-1 bioflocculant: Production and activity, *Arch. Microbiol.*, 139, 421-426.
- 13) Bar-Or Y., and Shilo M. (1988) The role of cell-bound flocculants in coflocculation of benthic cyanobacteria with clay particles, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53, 169-174.
- 14) 芳賀実, 沢井えり子, 増沢竹子, 青柳茂雄 (1978) 微生物の生産する凝集活性物質に関する研究, 玉川大学農学部研究報告, 18, 93-100.
- 15) 小田宗宏, 神辺道雄, 土屋文安, 藤尾雄策 (1981) 活性汚泥優占細菌の分離とその性状, 醗酵工学, 59, 119-124.
- 16) 小田宗宏, 神辺道雄, 土屋文安, 藤尾雄策 (1981) 活性汚泥細菌が産生する凝集物質の特性, *ibid.*, 59, 431-436.
- 17) 小田宗宏, 神辺道雄, 土屋文安, 藤尾雄策 (1981) カオリンの凝集機構, *ibid.*, 59, 443-447.
- 18) Sato T., and Ose Y. (1980) Floc-forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution, *Water Res.*, 14, 333-338.
- 19) 小田宗宏, 神辺道雄, 土屋文安, 藤尾雄策 (1981) 活性汚泥容量の変化とその原因物質, 醗酵工学, 59, 125-130.
- 20) 小田宗宏, 日比野光一, 神辺道雄, 土屋文安, 藤尾雄策 (1981) 活性汚泥から抽出した汚泥凝集物質, *ibid.*, 59, 131-136.
- 21) Pavoni J.L., Tenny M.W., and Echelberger Jr W.F. (1972) Bacterial exocellular polymers and biological flocculation, *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 44, 414-431.
- 22) Tenny M.W., and Verhoff F.H. (1973) Chemical and auto-flocculation of microorganisms in biological waste water treatment, *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 1045-1073.
- 23) 柿井一男 (1990) 活性汚泥および汚泥構成細菌の凝集における金属イオンの役割, 水質汚濁研究, 13, 273-277.