

プロジェクト2

Rhodobacter sphaeroides による生分解性ポリマー (poly- β -hydroxybutyrate) の菌体内蓄積に関する研究

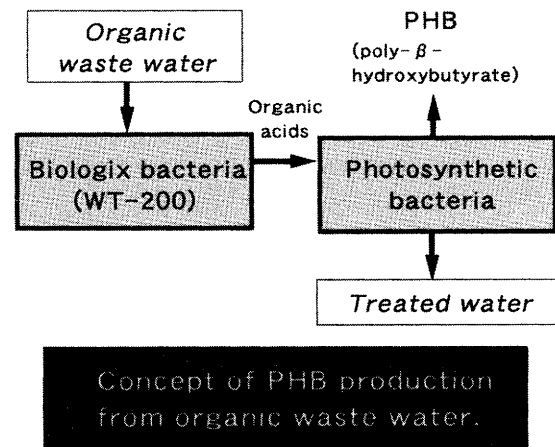
神野 英毅 (応用分子化学科)

1. 緒言

光合成細菌を用いた廃液浄化は自然の力を活用した環境調和技術として期待されている¹⁾。また、光合成細菌は菌体内に高分子エステルである poly- β -hydroxybutyrate (PHB) を蓄積する能力がある²⁾。PHB は生分解性ポリマーの中で最も分解性が高く、嫌気条件での分解も良好であることが知られている³⁾。生分解プラスチックは地球にやさしい素材であるが、微生物由来のものは高価であり、新しい生産技術が望まれている^{4, 5)}。

炭素源として有機廃液中の炭素化合物成分が利用可能となれば、廃液を浄化するとともに生分解性ポリマーを獲得することができる。光合成細菌による PHB 蓄積に関する基礎研究は難分解性化学合成プラスチックの代替品として期待されている。また、有機廃液の有効資源化を考える上においても大変、興味深い課題である。現在、光合成細菌による廃液由来の有機酸成分の混合基質または、廃液による PHB 生産の研究は極めて少ない。

そこで、本研究を有機実廃液からの PHB 生産を行うための工学的知見を得るための基礎研究と位置付けた。廃糖蜜などの糖成分を多く含む有機廃液を第一次プロセスで微生物製剤により低級有機酸化し、それを第二次プロセスで光合成細菌により資化させ、PHB 生産を行うというシステムを構築することができれば、環境調和型のモデルとなることが可能となる (Fig.1)。糖を効率的に有機酸化することが可能とな



れば、糖を含む有機廃液を光合成細菌の基質へと大量にバイオコンバージョンすることができる。

微生物製剤を用いて人工廃水としてのグルコースを嫌氣的に処理することにより生成される有機酸の種類、濃度の制御を目的に培養条件の変化による影響について検討した。

さらに、有機廃液を微生物製剤での処理により得られる低級有機酸（酢酸、酪酸、プロピオン酸）に注目し、それらを混合して使用し、混合有機酸系が光合成細菌に与える影響について検討した。

2. 方法

2-1 前処理工程での微生物製剤適用への検討

微生物製剤は米国 Biologix 社製の WATER TREAT 200 (WT-200) を使用した。人工廃水として 30mM のグルコースを含む培地を

用いて 30°Cで培養した。NaOH または HCl で pH をそれぞれ 6.0、7.0、8.0、9.0 に調整した。微生物製剤の初期添加量は 5.6g/L とした。培養は遮光 Roux 型培養瓶中、嫌気暗条件下で行った。基質であるグルコースおよび生成された有機酸の濃度は HPLC を用いて測定した。バイオガス発生量は水上置換によりガスホルダーに誘導し、定量した。

2-2 光合成細菌による混合基質からの PHB 生産の検討

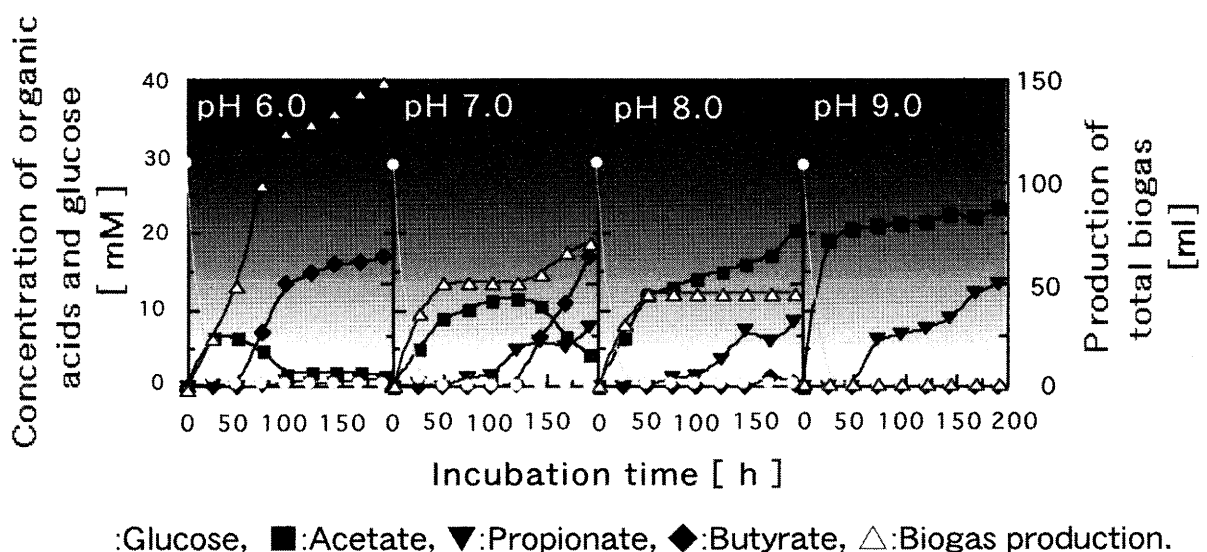
供試菌体には、産業技術総合研究所 特許生物委託センターに保存してある PHB 高蓄積能を有する紅色非硫黄性光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株を用いた。硫酸アンモニウム、コハク酸ナトリウム、イーストエキストラクトを含む aSy 培地中で光合成細菌を嫌気明条件 (5 klux、30°C、pH 6.8) で培養し、対数期後期における接種菌を PHB 生産実験に用いた。PHB 産生実験では、炭素源として酢酸、酪酸およびプロピオン酸のナトリウム塩の混合比率を変化させ、全濃度が 40mM になるように調整した培地を用いた。窒素源として 10mM 硫酸アンモニウムを用いてアルゴン雰囲気下で培

養 (10 klux、30°C、pH 8.5) を行った。初期菌体濃度は 0.48 dry cell g/L となるように調整した。全量 600ml の Roux 型培養増殖量は 660nm における光学濁度を指標とし、乾燥菌体重量に換算した。炭素源消費量である有機酸濃度は HPLC を用いて測定した。菌体中の PHB を抽出して、モノマー単位であるクロトン酸に分解して HPLC により測定した。

3. 結果・考察

3-1 前処理工程での微生物製剤への検討

生成有機酸は主に酢酸、酪酸、プロピオン酸であった。pH を塩基性側にすることによりバイオガス発生量の減少は見られ、pH9.0 では全く発生しなかった (Fig.2)。基質がバイオガス化しなかった分、生成された有機酸の全量が多くなり、最大で 37mM となった (Table 1)。酢酸が最も多く生産されたのは pH 9.0 のときであった。酢酸は光合成細菌による PHB 生産における優良な炭素源である。酢酸を主要な有機酸とするためには微生物製剤による嫌気発酵の条件を塩基性側にした方が有効であると考えられる。



また、pH 9.0 の培地でも後期培養段階においてはプロピオン酸が生成されるため、酢酸のみを回収するのであれば、培養開始 48 時間前後が適していると考えられる。以上の結果より、生成した有機酸が培地の pH により種類、濃度を制御可能であることがしめされた。光合成細菌による PHB 生産のための前処理工程として微生物製剤が適していると考えられる。

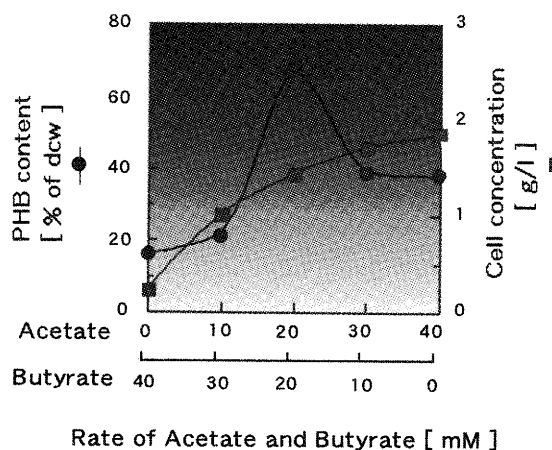
3-2 光合成細菌による混合基質からの PHB 生産

3-2-1 酢酸-酪酸混合基質による影響

酢酸-酪酸の混合系では、単一基質を餅田ときよりも PHB を多く蓄積する傾向があった (Fig. 3)。酢酸と酪酸が 20:20 の系の PHB 蓄積量が最も高い値であり、酢酸単一系の 1.8 倍あった。酢酸からの PHB 代謝経路は還元的過程であり、酪酸からの経路は酸化経路である。これらの経路間でのプロトンの授受等が起こり PHB 生合成経路が活性化したと考えられる。酢酸の単一系と比べ、混合基質では経路から PHB 代謝経路の途中でアセトアセチル-CoA レダクターゼの触媒作用により β -ヒドロキシブチリル CoA に合成されるときに NADPH が使用される。この NADPH は TCA サイクルのイソクエン酸による反応で合成される。PHB 代謝経路だけが活性が高くて NADPH は欠乏を起し、PHB 代謝経路は停止してしまう。このため、代謝のバランスが重要であると考えられる。NADPH が複数の代謝のバランス重要であると考えられる。NADPH が複数の代謝経路および TCA 回路においてバランス良く生成したためアセチル-CoA が効率的に PHB に変化したと考えられる。

Organic acids production from glucose at various pHs

pH	Acetate [mM]	Butyrate [mM]	Propionate [mM]	Total [mM]
uncontrolled	13.78	23.80	0.0	37.58
6.0	1.37	16.93	0.93	19.23
7.0	4.22	17.08	7.77	29.07
8.0	20.29	0.0	7.64	27.93
9.0	23.42	0.0	13.33	36.75



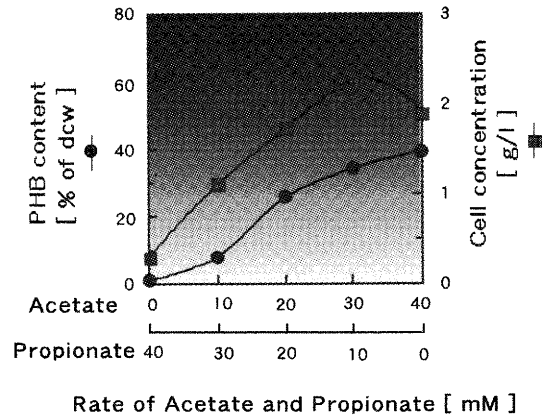
PHB production in various ratio of mixed Acetate with Butyrate

3-2-2 酢酸-プロピオン酸混合基質による影響

酢酸とプロピオン酸の混合系では、30:10の系のとき菌体増殖が酢酸単一の系の 1.3 倍になった (Fig.4)。このため、培地当たりの PHB 蓄積量が最大値を示した。実廃液利用の PHB 生産においても、少量のプロピオン酸は存在する方が都合が良いと考えられる。しかしながら、プロピオン酸はそのまま単一基質として使用すると、菌体の増殖が悪く、PHB 生合成も起こさない。そのため、微生物製剤を用いて廃液から有機酸を得る場合、プロピオン酸濃度が上昇する前に光合成細菌による処理に移す必要があると考えられる。

3-2-3 3種（酢酸-酪酸-プロピオン酸）混合基質による影響

炭素源としての酢酸、酪酸、プロピオン酸のモル比を任意に変化させたとき PHB の菌体蓄積量は酢酸と酪酸が 20mM ずつ混合した系を頂点として、酢酸単一系に向けて穏やかに、酪酸単一系に向けて劇的に減少した (Fig.5)。酢酸、酪酸、プロピオン酸を単独で使用するよりも、2種、3種と混合した方が PHB 生産力が増加することが確認された。

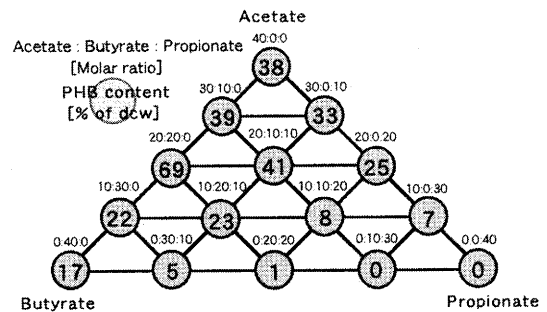


PHB production in various ratio of mixed Acetate with Propionate.

4. 結論

今後、ポリマー産業また我々人類が持続可能な展開を遂げるためには、循環型社会の確立とともに、生産可能な資源から生分解性プラスチックを生産するシステムを確立する必要があると思われる。

本研究により、太陽光エネルギーを利用できる光合成細菌による地球環境調和型の PHB 生産システムの構築が可能であることが示唆された。廃液の有効資源化のための有力な情報となるであろう。得られた知見を踏まえた基礎的、応用的な研究により PHB のような微生物生産ポリエステルは価格面でも石油由来のプラスチックに対応できるようになると考えられる。今後は更なる研究の進展が期待される。



Effect of compound substrate on PHB production.

参考文献

- 1) Hassan, M.A., et al., J.Fement. Bioeng., 82, 151-156 (1996).
- 2) Fuller, R. C., In "Anoxygenic bacteria", eds. Blankenship, R. E., et al., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp.1245-1256 (1995).
- 3) Brandl, H., et al., Arch. Microbiol., 155, 337-340 (1991).
- 4) Khatipov, E., et al., FEMS Microbiol. Lett., 162, 39-46 (1998).

5) Liebergesell, M., et al., Arch. Microbiol., 155, 415-421 (1991).

6) 神野英毅, 日本大学生産工学部ハイテクリサーチセンター 平成 13 年度研究報告書, 2-25, (2002)

7) 神野英毅, 日本大学生産工学部ハイテクリサーチセンター 平成 14 年度研究報告書, 2-21, (2003)