

プロジェクト 2

有機系廃液の資源化技術

－ *Rhodobacter sphaeroides* による生分解性 polymer PHB の生産工学的研究 －

神野英毅（応用分子化学科）

1. 目的

現代社会が抱える地球環境問題のひとつとして、生ゴミや廃プラスチック等の廃棄物処理が挙げられる。全世界で年間約一億 t 生産され日本での生産量は 12% を占める。しかし自然界に分解機構がなく不可逆的な物質を環境に持ち込むこととなる¹⁾。一方、日本では年間五千 t のゴミが家庭から排出され、一人当たり一日 1.1kg、年間 407kg となっている²⁾。そこでこれらの廃液物やその資源利用化を実現するため生ゴミの資源化技術が必要とされている³⁾。Fig.1 に生分解性プラスチックである PHB(poly- β -hydroxybutyrate) (Fig.2,3)を軸とした循環型社会システムを示す。これは光合成細菌が菌体内に PHB を蓄積する能力を利用する⁴⁾。有機廃棄物を微生物分解し有機酸とし光合成細菌によって PHB 生合成、または分解菌と光合成細菌の混合培養によって PHB を生産し製品として使用後、有機廃棄物とともに処理し再び PHB 生産を行うリサイクルシステムである。微生物産生型の生分解性プラスチックは微生物が飢餓状態に備え蓄える高分子で、従来のプラスチックと同様に使用できる環境対応型プラスチックである。環境中に廃棄されると微生物によって最終的に水と二酸化炭素に分解され、自然界の物質循環に組み込むことができる。また、原料に有機廃棄物を用いることで生産コストを抑えることができ、生ゴミを有効資

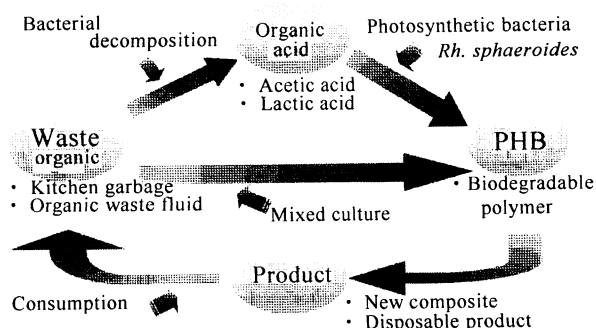


Fig.1 PHB circulating system



Fig.2 PHB in powder



Fig.3 PHB in film formation

源化することも可能である。しかしながら微生物による生分解性プラスチックの生産は収率が悪く、長時間を要するため高価であり新しい生産技術の開発が望まれている⁵⁾。そこで有機廃棄物からの生分解性プラスチックの生合成を高効率、高収率化し、工業化を目的として実験を行った。

2. 実験方法と実験材料

1) 供試菌体

産業技術総合研究所特許生物寄託センターに保管されている、Miyake らにより茨城県つくば地域から単離された紅色非硫黄性光合成

細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株を使用した (Fig.4)。Fig.5 に PHB 産生経路を示す。*Rh. sphaeroides* RV 株は有機物を Acetyl-CoA へと変換し Acetyl-CoA は富栄養条件では TCA 回路へと流れ菌体の増殖や生育に用いられる。栄養的負荷などから Acetyl-CoA の濃度上昇と遊離 CoA の濃度低下により β -Acetyl-CoA acetyltransferase 活性が高まり Acetyl-CoA は Acetoacetyl-CoA に二量化し、さらに β -Hydroxybutyryl-CoA に転換され PHB synthetase の作用を受け PHB が生合成される⁶⁾。

2) 実験操作

活性を維持するため aSy 培地を用いて 20ml 試験管で 30℃、嫌気明条件下 (5klux) で 72h 毎に継代した。対数期後期まで培養した菌体懸濁液を生産培地と混合し pH8.5、30℃、嫌気明条件下 (10 klux) で PHB 生産実験を行った。24 h 毎に pH 調整とサンプリングを行った。サンプルは光学濁度 (O.D. 660nm) を用いて菌体濃度を測定し、遠心分離 (温度 2℃にて 16000rpm, 5 分間) を行い、培地と菌体とに分離した。菌体は次亜塩素酸ナトリウムで PHB を抽出し、熱濃硫酸でクロトン酸に分解した。これを定量し PHB 産生量へと換算した。培地中の有機酸濃度の測定とクロトン酸の定量には HPLC を用いた。

3. 結果と考察

1) 生産工程の高効率化

菌体懸濁液を集菌、再懸濁を行わず前培養から直接、PHB 生産を行うことで活性低下やコンタミネーションを防ぎ、生産時間を短縮し低コスト化する。(Fig. 8) PHB の生合成には菌体に栄養的負荷を与えるため生産培地中では菌体の増殖は抑制される。このため初期菌体濃度を調整する必要がある。また増殖培地の成分を除くため、従来法では遠心分離し緩



Fig.4 SEM image of *Rhodobacter sphaeroides* RV containing PBH

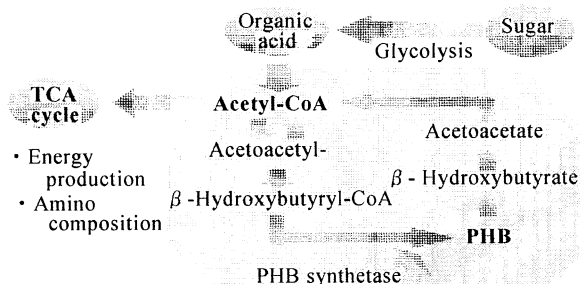


Fig.5 Biosynthesis of PHB in *Rh. Sphaeroides*

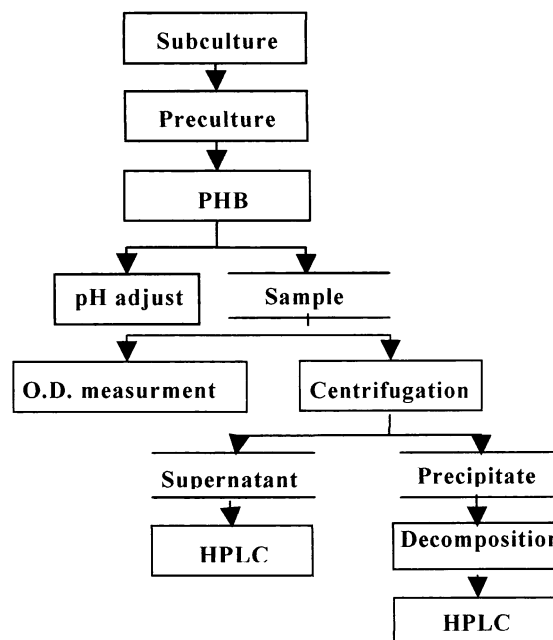


Fig.6 Procedure of PHB production in experiment



Fig.7 Experimental production model of PHB using *Rhodobacter sphaeroides*

衝液で洗浄した後、再懸濁し初期菌体濃度の調整を行う。集菌、再懸濁を行わない PHB 生産のために増殖を阻害せず合成の可能な至適条件を検討した。

菌体懸濁液と生産培地との混合比率が菌体の生育に与える影響を菌体数から検討し PHB 産生に適した菌体混合比を決定した。Fig. 9 より菌体懸濁液 : 生産培地 = 1 : 2 及び 2 : 1 では菌体数は低く *Rh. sphaeroides* RV 株が順調に生育していない。1 : 2 では初期菌体濃度が低いため菌体の増殖に長時間を要し、また菌体の増殖に基質が消費されてしまったことが、2 : 1 では初期菌体濃度が高いため徐々に死菌も増えていき菌体の活性が早く低下してしまったことが原因と考えられる。そこで最も菌体濃度の高い 1 : 1 を至適混合比とした。

増殖培地には菌体の増殖を促すため Yeast Extract が添加されている。この中に含まれる菌体懸濁液を生産培地と直接混合するため Yeast Extract が残留し合成を阻害する恐れがある。増殖培地中の Yeast extract 添加量の合成への影響から至適添加量を検討した。Fig. 10 に PHB 生産量の経時変化を示す。Yeast extract の添加量が 0.5、1.0g/ℓ と増大するのに伴い PHB 産生が阻害され、蓄積に長時間を要している。0.1g/ℓ では従来法と同じ 48h であり、これを至適添加量とした。以上の条件での培養時間および PHB 生産量は従来法と同程度であった。よって集菌、再懸濁を行わないことにより生産時間の短縮を達成することが出来た (Fig. 11)。

2) ポリエチレングリコールの影響評価

Rh. sphaeroides RV 株は PHB を菌体内に蓄える。このため菌体を肥大化することで高収率化が可能であると考えた。そこで生産培地に PEG (Polyethylene Glycol) を添加し PHB

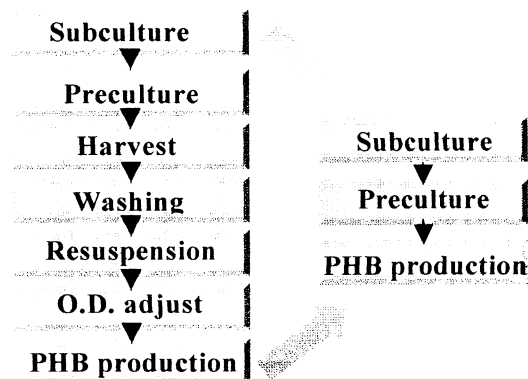


Fig.8 Efficient production scheme

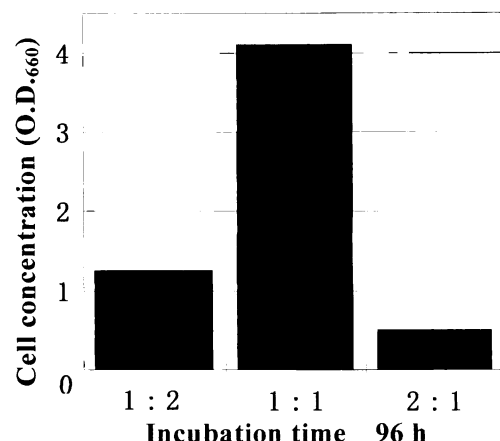


Fig.9 Effect of the ratio of suspension to medium

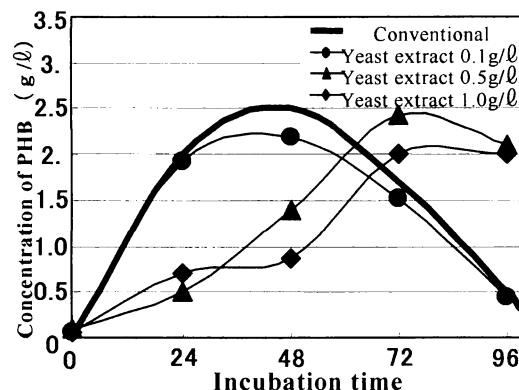


Fig.10 Effect of yeast extract addition

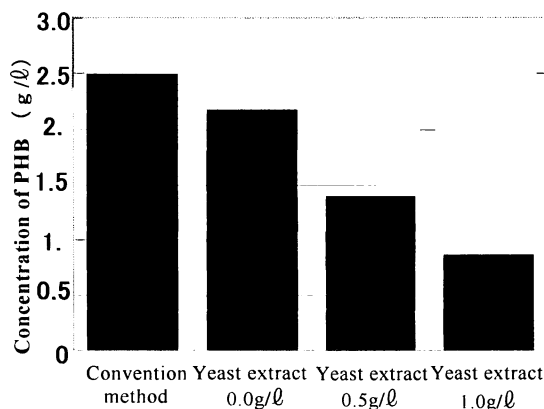


Fig.11 PHB amount of incubation time 96h

生産に与える影響を評価した。PEG は細胞融合剤として働き、細胞表面のリン脂質二重膜の流動性を高め、密着した細胞膜が互いに融合する⁷⁾。このためハイブリドーマ細胞の作成などに広く用いられている。

細胞膜を柔軟にする性質を利用して菌体の肥大化が可能と考え使用した。今回の実験には、細胞融合に用いられる平均分子量 3000 の PEG 4000 を用いた。

Fig.11 に PEG を 0~25% 添加し生産実験を行った際の O.D. 及び PHB 生産量を示す。PEG 5% 未満では菌体の生育が悪く低収率であった。また 12.5% 以上の PEG を添加すると菌体は死滅してしまった。どちらも PEG の細胞毒性が原因と考えられる。しかしながら、PEG 濃度 5~10% の範囲では高い O.D. を示し、それに伴い PHB 生産量の増大も見られた。O.D. は乾燥菌体重量法により菌体数の指標として用いる。だが、この実験での O.D. の上昇は PEG の細胞毒性による生育不良や死滅が起きていることから、菌体数の増加とは考えにくい。菌体がそれぞれ肥大化し吸光度が上昇したためと考えられる。この結果から PEG を添加することで細胞の肥大化による PHB 生産量の増大が確認できた。しかし、PEG を添加したことで遠心分離による菌体の回収が困難となり PHB 精製が難しくなるという欠点があった。また、PEG が有毒物質であることから細胞の肥大化を促す代替物質を検討する必要がある。

4. 結論

Rh. sphaeroides RV 株による PHB 生産は、微生物を用いた技術であるため、高いエネルギー効率を持ち、人類が持続可能な発展を遂げていくうえで不可欠な技術である。本研究では至適混合比を菌体懸濁液：培地 = 1：1、Yeast extract の至適添加量を 0.1g/ℓ として集

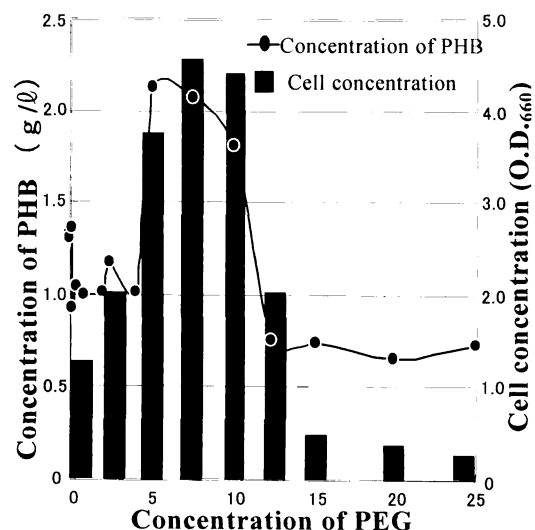


Fig.12 Effect of polyethylene glycol 4000

菌、再懸濁を行わないことにより生産時間の短縮を達成した。また、PEG 5~10%を培地に添加し、細胞の肥大化によって PHB 生産量を増大させた。有機廃棄物から PHB 生産に適した前処理や諸条件を決定し、高効率、高収率な生合成を行うことで工業化を実現することが可能である。

参考文献

- 1) 市川定夫：環境学, 藤原書店, (1999) 480
- 2) 矢田美恵子ら：廃棄物のバイオコンバージョン, 地人書館(1996)
- 3) 白井義人：化学装置, (2000) 8-9
- 4) E.Khatipov, et.al. : FEMS Microbiol.Lett., 162 (1998) 39-45
- 5) T.Suzuki, et.al. : Biotechnol.Lett., 17 (1995) 395-400
- 6) 北村博ら：光合成細菌, 学会出版センター, (1984) 58
- 7) 黒木登志男ら：培養細胞実験ハンドブック, 羊土社, (2004) 155
- 8) 徳本大, 神野英毅:通性嫌気性菌と光合成細菌の混合培養による水素生産, 分離技術, in press
- 9) 大竹優, 神野英毅:微生物利用による廃液からのプラスチック生産, 分離技術, in press