

循環型社会形成推進科学研究費補助金 総合研究報告書概要版

- ・研究課題名=ハロモナス菌を用いた BDF 廃グリセロール利活用によるバイオプラスチック PHA 生産に関する研究
- ・研究番号 = K 2 0 1 7, K 2 1 6 1, K 2 2 0 4 0
- ・国庫補助金精算所要額 (円) =80,684,000(複数年度の総計)
- ・研究期間 (西暦) = 2008~2010
- ・代表研究者名=河田悦和 (独立行政法人産業技術総合研究所)
- ・共同研究者名=竹田さほり、川崎典起、中山 敦好、山野尚子 (独立行政法人産業技術総合研究所)
- ・研究目的 =再生可能エネルギーとして油脂を原料に製造されるバイオディーゼルBDFは、水素による直接還元も検討されているものの、現在はアルカリ触媒とメタノールを用いる手法で主に生産され、製造に伴って生じる廃グリセロールの利用拡大が望まれている。一方、持続可能社会の構築を目指す上で、化成品のバイオベース化も必須であり、なかでもプラスチック原料の再生可能資源への転換は喫緊の課題である。現在、バイオプラスチックとしてポリ乳酸の利用が進んでいるが、これとは異なる物性、生分解特性を持つプラスチック材料として微生物で生産されるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)が注目されている。

我々は、酵母エキスなどを要せず培養できる *Halomonas* sp. KM-1株を用いて、高効率、低コストに、余剰の廃グリセロールを処理し、PHA等を生産することにより、持続可能型社会に資することを目的に研究を実施した。
- ・研究方法 =京都市廃食用油燃料化施設由来の廃グリセロールを用い、以下の課題を実施した。
 - ・好塩、好アルカリ細菌のスクリーニングおよび突然変異株の作製
実プロセスでは、よりコンタミが起こりにくい高アルカリ、高塩濃度の条件や、混在する有機物への耐性が要求される。そのために、実プロセスに適応した菌体を選抜する。
 - ・生育状況によるグリセロール処理、PHA 生産状態の変化の分析

Halomonas sp. KM-1 株等の生育状況を 16S rRNA 等を用いてモニタリングする。同時に残存グリセロール量、PHA 生産量および副生成物を測定する。処理液のリアルタイム PCR 法による菌相等のモニタリング、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)等を用いた分析を行い、その結果を培養条件に反映させる。微生物の生育が難しい高塩、高アルカリ環境であるが、準開放系で長期間、廃グリセロールの連続処理が期待されるため、処理菌の生育が良好で、混入菌の生育が阻害され、かつ廃グリセロール処理能力の高い条件を見いだす。

・結果と考察 =実験室スケールでの廃グリセロール処理PHA生産条件の確立

Halomonas sp. KM-1株を含め、スクリーニングした好塩、好アルカリ細菌、これらの変異処理株から廃グリセロール処理能力がより高い菌株を実験室にて選抜検討した。

その結果、KM-1株は、廃グリセロール15~20%直接培地に加えても生育可能であり、脂肪酸メチルエステル等の夾雑物も1%以上混入しても、目立った生育の抑制は認められなかった。

また、廃グリセロールを処理する培養条件において、菌相変化を16SrRNAを用いモニタリングし、*Halomonas sp.* KM-1株のみが生育していることを確認した。

グリセロールを与えた場合、初年度には10 g/L、最終年度には40 g/LのPHBを生産することができた。廃グリセロールの場合、初年度は4.5 g/L、最終年度は14.9 g/Lの生産を行うことができた。研究当初の目標である、2 g/Lをはるかに超える成果を得たが、最終年度当初に目指した100 g/Lには届かなかった。

一方、グリセロールと廃グリセロールで、PHBの生産量、乾燥菌体に占める割合が異なることから、菌体内外の代謝物についてメタボローム解析を行った結果、グリセロールは8 g/L、廃グリセロールは最大30 g/Lの α -ケトグルタル酸を培地に分泌発現していることを発見した。

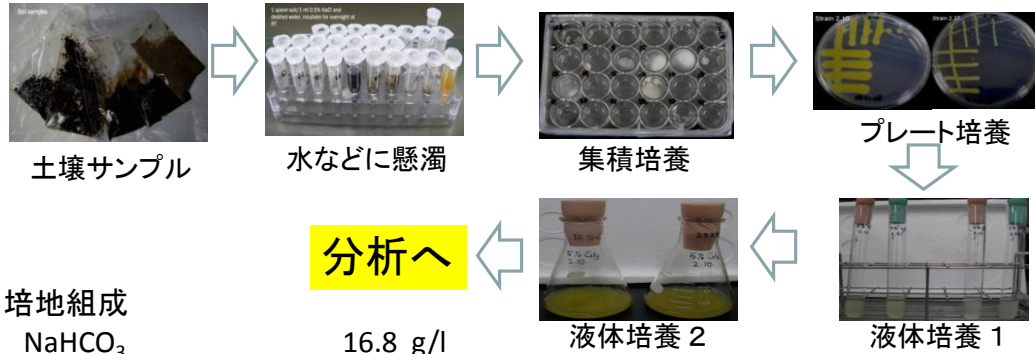
暫定的な分析結果ながら、グリセロールと廃グリセロールで蓄積される代謝物が異なっており、グリセロールの場合はPHBがその多くを占め、一方で廃グリセロールの場合は α -ケトグルタル酸がその多くを占めること、これらの間には相補的な関連があり、炭素源のほとんどがこれら2種の化合物に転換されることがわかってきた。

実際の処理現場を考えると、単一の産物を得ることに利点がある一方で、菌体内にバイオプラスチックPHA、培地に α -ケトグルタル酸、それぞれ培地に対しパーセントオーダーで蓄積できるとことは、今まで報告されたことがない新しい事例である。

・結論 = *Halomonas* sp. KM-1 による廃グリセロール処理は、高塩、高アルカリの極限環境に適した本菌の特長を生かした手法である。酵母エキスなどを含まない栄養塩と炭素源からなる培地で生育する経済性、高塩高アルカリ環境ゆえ他の菌の混入がないゆえ滅菌に伴うエネルギー使用が不用な省エネルギー性、炭素源をグリセロールのみならず C5 糖(キシロース、アラビノース)、さらには木材糖化液も利用できる汎用性、生産物が菌体内にバイオプラスチック PHA、菌体外に α -ケトグルタル酸をそれぞれ培地の数%生産できる生産性など日本発のホワイトバイオテクノロジーインフラとして利用できる潜在的な能力を秘めたシステムとなったことが明らかになった。

今後は、これらの可能性を生かしつつ、パイロットスケールなどの検討により、実際の生産に向けたコスト試算など、まずは廃グリセロール利活用を当面のターゲットとした検討が必要であり、将来は海洋バイオマスを含む様々な炭素源を利用し、バイオマスベースの社会形成の礎となるべく検討を進める。

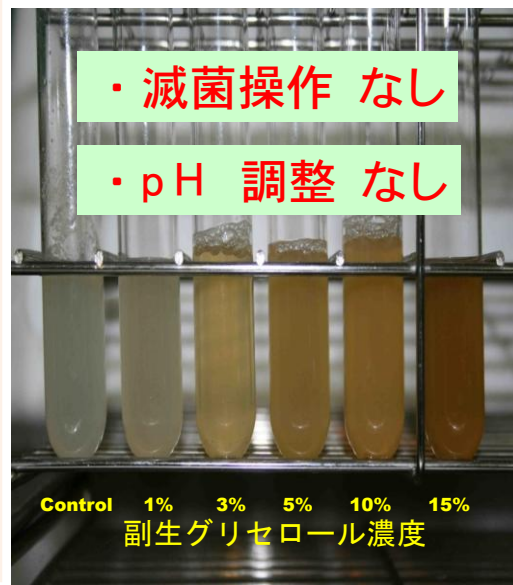
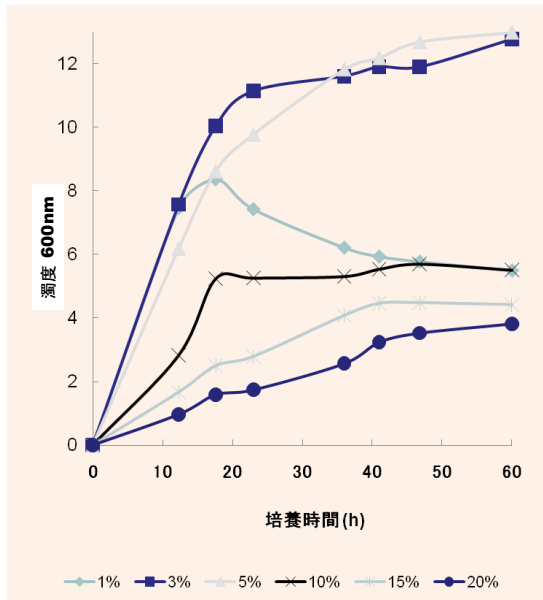
廃グリセロール利用菌のスクリーニング



培地組成

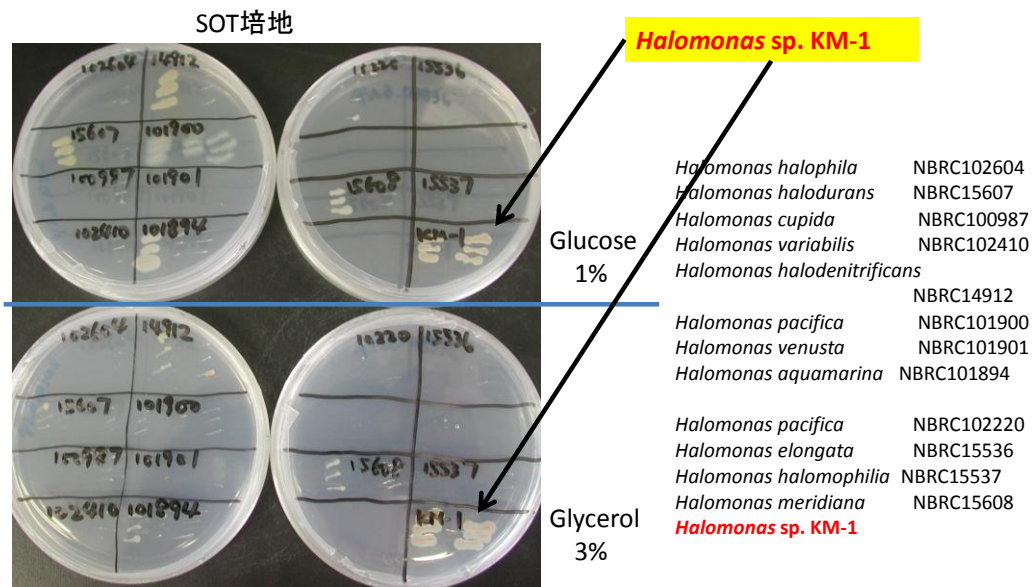
NaHCO ₃	16.8 g/l
K ₂ HPO ₄	0.5
NaNO ₃	2.5
K ₂ SO ₄	1.0
NaCl	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
EDTA·2Na	0.32 他トレース金属
Glycerol	pH 9.0

→ *Halomonas* sp. KM-1など取得
トリプトン、酵母エキスを含まない
安価な培地で培養



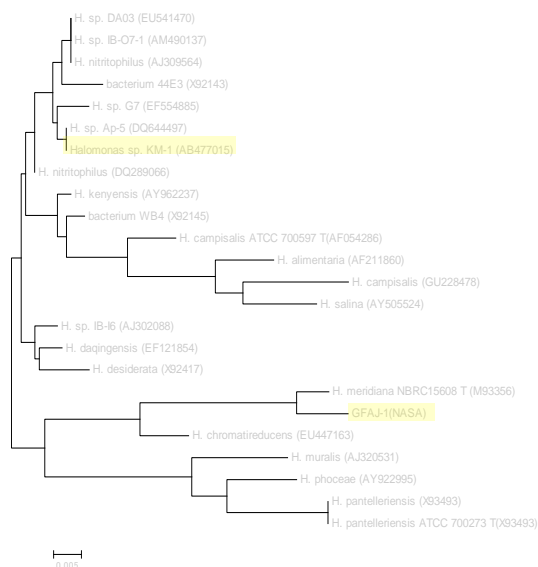
Halomonas sp. KM-1は
栄養塩と廃グリセロールで培養できる。

炭素源＋栄養塩でのハロモナス菌の生育



Halomonas sp. KM-1は、グリセロールを利用するのに適する

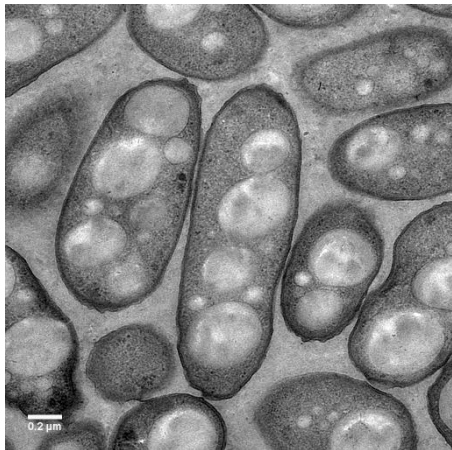
Halomonas sp. KM-1の遺伝子解析



リード数	1,120,000 リード
全リード長 (リンカーを除く)	205 Mb
Contigs N50 (kb)	60.6 kb
Assembly size (Mb)	5.0 Mb
Genome Coverage	41
Large Contigsの数	208個
Scaffoldの数	6個
Scaffold N50	2.89 Mb
Largest Scaffold	2.89 Mb

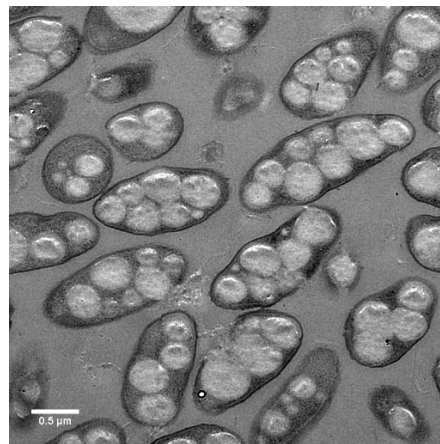
Roche社454 GS FLXシーケンサー
Pyrosequencing法により実施

Halomonas sp.KM-1によるPHA生産状況



廃グリセロール 10%

乾燥菌体重量 23.4 g/L
PHAの割合 52.8%



グリセロール 10%

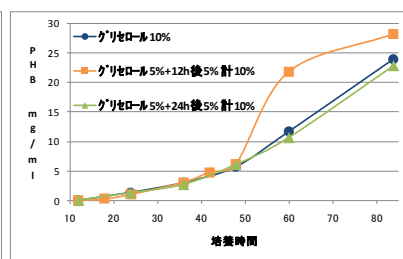
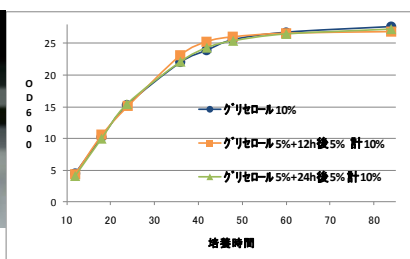
乾燥菌体重量 34.8 g/L
PHAの割合 63.6%

滅菌なし、直接添加して48 h培養

培養条件改善によるPHA高収率化



培養時間
40h 84h



培養時間	炭素源	PHA content (wt.%)	CDW (g l ⁻¹)	PHA concentration (g l ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)
当初は 160時間	グリセロール 5%	72.4	3.5	2.53	0.03
2年目は 84時間	グリセロール 計 10%	81.7	34.5	28.2	1.30

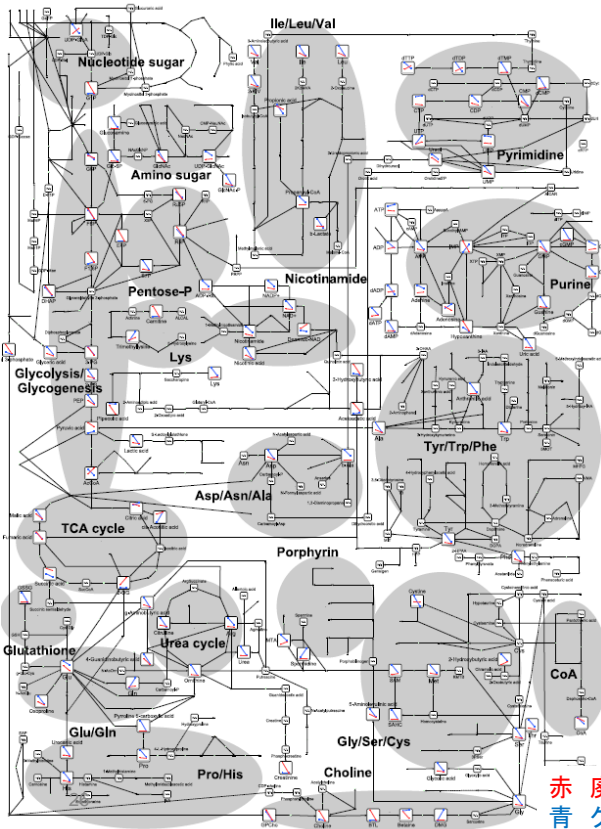
研究当初の10倍以上に

生産効率が異なる？

バッチ培養によるPHA 生産の比較 (shake flasks and fermentors)

Organism	Carbon source	PHA content (wt.%)	CDW (g l ⁻¹)	PHA concentration (g l ⁻¹)	Volumetric productivity (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Reference
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	廃グリセロール	60.0	24.8	14.9	0.58	本成果
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	グリセロール	80.2	50.5	40.5	1.04	
<i>Halomonas boliviensis</i>	シヨ糖	54.0	14.0	7.7	0.40	Quillaguamán et al. 2007
<i>Alcaligenes latus</i>	シヨ糖	83.0	14.0	11.5	0.39	Wang and Lee 1997
<i>Azotobacter vinelandii</i> ^a	グルコース	74.0	10.0	7.5	0.30	Page 1992
<i>Escherichia coli</i> ^a	グルコース	80.8	8.9	7.2	0.15	Lee et al. 1994
<i>Wautersia eutropha</i>	H ₂ /CO ₂	76.0	17.0	13.0	0.18	Heinze and Lafferty 1980
<i>Wautersia eutropha</i> ^a	グルコース	54.0	9.4	5.1	0.11	Doi et al. 1988
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Octane	25.0	2.0	0.5	0.02	Lageveen et al. 1988
<i>Haloferax mediterranei</i>	デンプン	67.0	9.7	6.5	-	Lillo and Rodriguez-Valera 1990 ; Rodriguez-Valera and Lillo 1992

^a Cultivation of the microorganism was performed in shake flasks



Halomonas sp. KM-1の 菌体内代謝解析

CE-MSIにより、はカチオンモード、アニオンモードの測定を行った。

カチオンモード Agilent CE-TOFMS system
Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μm × 80 cm

測定条件

Run buffer: Cation Buffer Solution (p/n: H3301-1001)
Rinse buffer: Cation Buffer Solution (p/n: H3301-1001)
Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 10 sec
CE voltage: Positive, 27 kV
MS ionization: ESI Positive
MS capillary voltage: 4,000 V
MS scan range: m/z 50-1,000
Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n: H3301-1020)

アニオンモード
測定条件

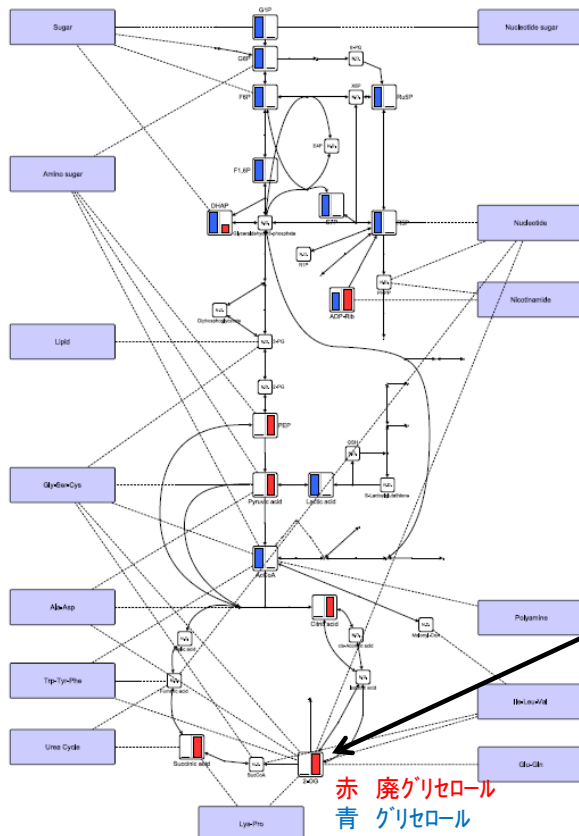
Run buffer: Anion Buffer Solution (p/n: H3302-1021)
Rinse buffer: Anion Buffer Solution (p/n: H3302-1022)
Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 25 sec
CE voltage: Positive, 30 kV
MS ionization: ESI Negative
MS capillary voltage: 3,500 V
MS scan range: m/z 50-1,000
Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n: H3301-1020)

190種類の代謝中間体を分析



廃グリセリンとグリセリンで
代謝が異なる候補は？

赤 廃グリセリン
青 グリセリン



Halomonas sp. KM-1の 菌体外分泌物の代謝解析

菌体の内と外で違うものを作る
 ・内**で**バイオプラスチックPHA
 ・外**で**代謝中間体も可能か？

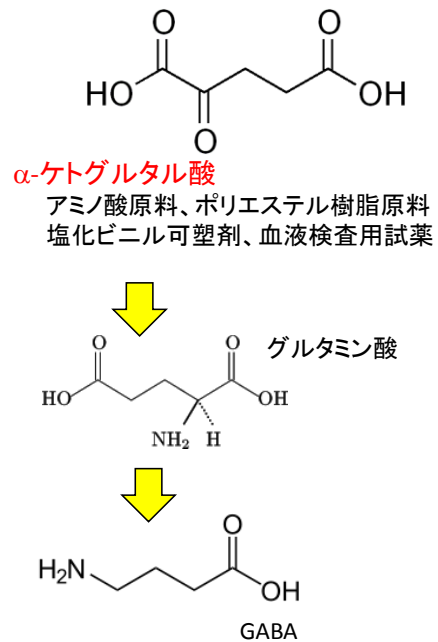
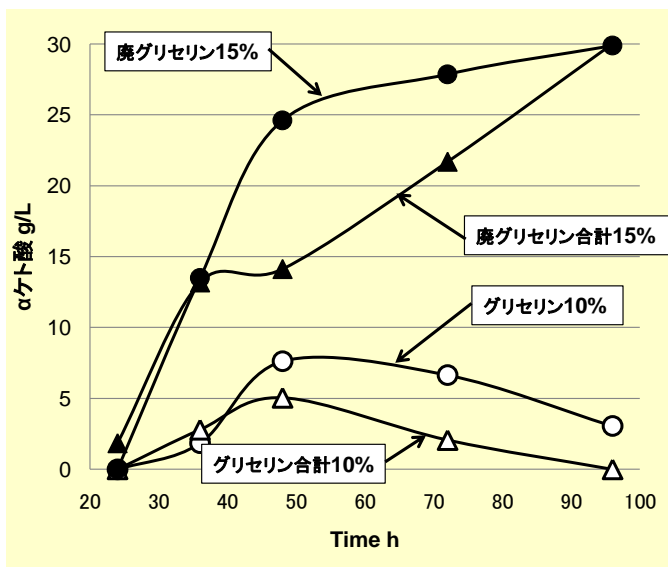


PHA生合成に関する代謝解析
 190種類の代謝中間体を分析

培地の中に
α-ケトグルタル酸 18.5 g/L (1.8%)
 3-Hydroxybutyric acid 0.24 g/L
 (PHBのモノマー)
 を分泌していることを**発見**

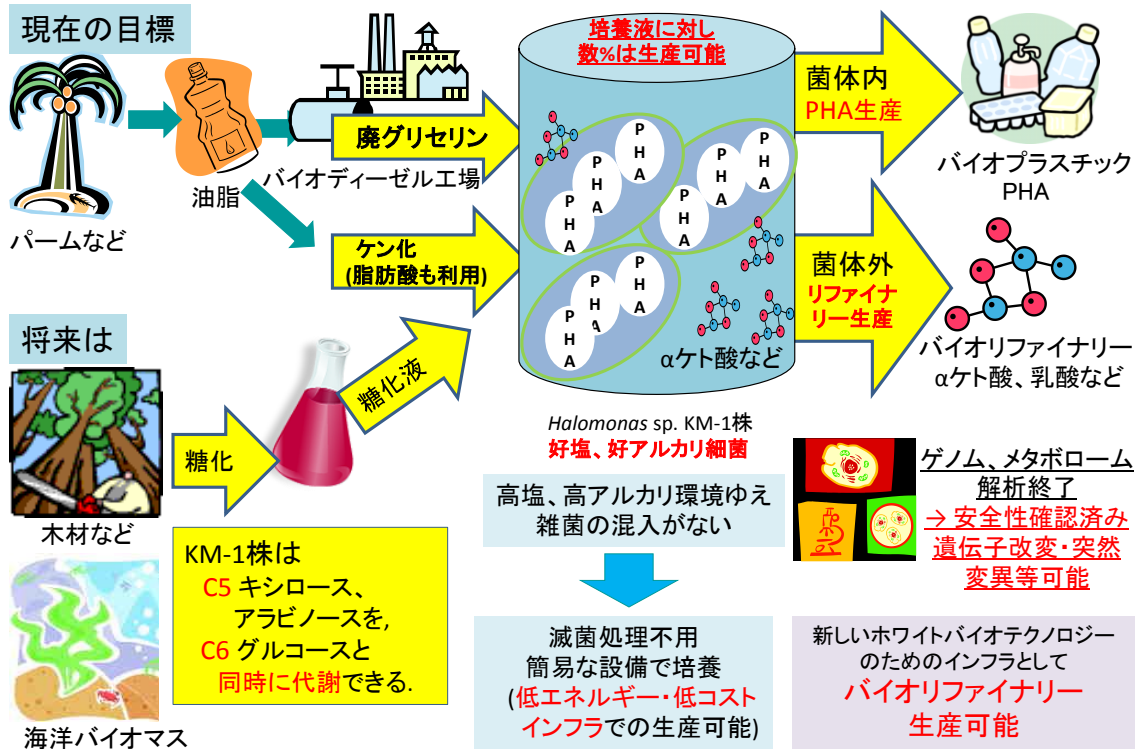
赤 廃グリセロール
 青 グリセロール

グリセリンからのα-ケトグルタル酸の産生の状況



培地中に分泌することを発見
 →菌体内に**PHB**, 培地に**α-ケトグルタル酸**を作る。

バイオマス資源からのリファイナリー生産



英語概要

・研究課題名

「Study on producing Bioplastic PHA utilizing BDF waste glycerol by *Halomonas* sp. KM-1」

・研究代表者名及び所属

Yoshikazu KAWATA, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Sahori TAKEDA, AIST

Norioki KAWASAKI, AIST

Atsuyoshi NAKAYAMA, AIST

Naoko YAMANO, AIST

・要旨

Biodiesel fuel (BDF) is becoming popular as a carbon-neutral fuel that can protect the environment from global warming. BDF is produced from oil and fat using mainly a methyl esterification process that employs methanol and alkali catalysis. This process generates a by-product, waste glycerol, produced at about 10 wt% from raw materials. This glycerol contains a high salt concentration and has a high pH. The problem of waste glycerol utilization must be addressed if BDF usage is to be enhanced. Some chemical treatments are available for the utilization of waste glycerol, but a purification process is required before glycerol can be used as a source for chemical refineries. Furthermore, if glycerol is to be used as a carbon source, biological trials using screening bacteria are required.

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by bacteria was first reported in 1926, and its product, poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA), has been commercially available since the 1990s. However, due to high production cost, mainly carbon source, PHA is not a popular plastic material. We isolated the alkalo- and halophile bacteria *Halomonas* sp. KM-1. This strain produced 14.9 g/L PHB and 30 g/L α -ketoglutarate in a simple medium and diluted waste glycerol.

・キーワード

日本語 廃棄物再資源化、グリセロール、バイオディーゼル(BDF)、バイオプラスチック (PHA, PHB)

英語 waste material recycling, glycerol, biodiesel (BDF), bioplastic (PHA, PHB)