

補助事業名 循環型社会形成推進科学研究費補助金研究事業  
(平成20年度～平成22年度)

所 管 環境省

国庫補助金 80,684,000 円(複数年度の総計)

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

研究期間 平成20年4月1日～平成23年3月31日

代表研究者名 河田 悦和 (産業技術総合研究所)

共同研究者名 竹田 さほり (産業技術総合研究所)

川崎 典起 (産業技術総合研究所)

中山 敦好 (産業技術総合研究所)

山野 尚子 (産業技術総合研究所)

## ・研究目的

持続可能型社会の構築を目指す上で、エネルギー、マテリアルの再生可能化が求められており、バイオエタノールやバイオディーゼルBDFが検討されている。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、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。バイオベースプラスチックとしては、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などにより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。

そこで、我々は廃グリセロールの処理、活用を目指し、高塩濃度、高pHの環境で生育する菌体をスクリーニングしたところ、乾燥菌体あたり80%以上のバイオプラスチック・PHAを蓄積し、45°C程度までの環境で増殖する菌体 *Halomonas* sp. KM-1 株を見いだした。この菌株は、高価な酵母エキスなどを培養に要せず、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。

将来は、本菌株を用い、廃グリセロールを処理し、持続可能型社会に資することを目的に研究を実施する。

## ・研究方法及び結果

バイオディーゼルの原料油脂や製造プロセスにより BDF 廃グリセロールの性状は異なり、高塩濃度、高 pH 環境だけではなく、メタノールや脂肪酸メチルエステル (FAME) が混入し、微生物の炭素源としての利用の阻害となることが懸念される。そこで BDF の京都市暫定規格を示し、BDF 製造の先駆的存在の京都市廃食油燃料化施設の廃グリセロールを標準的な品質と想定し、これを有効に利用できることを目指し、以下の研究課題の検討をおこなった。

### 1. 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

バイオディーゼルの原料や製造プロセスにより BDF 廃グリセロールの性状は異なり、メタノールや脂肪酸メチルエステル (FAME) が混入するおそれがある。実際に廃グリセロールを微生物により処理、資源化するプロセスでは、より雑菌の混入が起こりにくい高塩濃度、高 pH 環境の条件や、混在する有機物への耐性が要求される。そのため、これらの条件に適応した菌体のスクリーニングや、突然変異体の作出、評価を行った。

これらの菌体のスクリーニング、突然変異体の作出、並びにゲノム解析等により、実プロセスに合わせた微生物のデザイン化を行うため、以下の項目について検討した。

- ・ 廃グリセロール利用可能な微生物のスクリーニング
- ・ *Halomonas* sp. KM-1 株の高度利用に向けた基礎検討
- ・ *Halomonas* sp. KM-1 株の更なる有効活用に向けた基礎検討

### 2. 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

好塩、好アルカリ細菌を用いた実験室レベルでのグリセロール処理過程において、*Halomonas* sp. KM-1 株等の廃グリセロール処理菌の生育状況を 16S rRNA 等を用い遺伝子レベルでモニタリングした。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した。各種廃グリセロール利用細菌について、処理液のリアルタイム PCR 法による菌相のモニタリング、キャピラリー電気泳動分析 (CE) 等を用いた処理液組成の分析を行い、その結果を培養条件に反映させることにより、廃グリセロールの処理条件を検討した。

本菌株を用いた廃グリセロールの処理系は、一般の微生物の生育は難しい高塩濃度、高 pH 環境である。この特長を生かし、簡易な準開放系のプラントで、長期間にわたり廃グリセロールを連続処理することが予想される。準開放系のプラントでの本菌株の生育だけでなく、他の微生物の生育の有無もモニタリングする必要があるため、以下の項目を検討した。

- ・ *Halomonas* sp. KM-1 株の培養条件の検討
- ・ 廃グリセリンの利用について
- ・ その他 PHA 以外のリファイナリー産生について など