

木材資源廃棄物からエコマテリアルを生産する微生物プロセスに関する研究

Study for microbial process to produce ecomaterial from wood industry residue

代表研究者 九州大学農学部助手 田中賢二
Assistant Prof., Faculty of Agriculture, Kyushu Univ.,

A two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus* was developed for the production of poly(D-3-hydroxybutyrate), P(3HB) from xylose via L-lactate. In this method, xylose was converted into L-lactic acid and acetic by a *L.lactis* and the organic acids were then converted into P(3HB) by *A.eutrophus*. The microorganism grew at a specific growth rate of 0.5h⁻¹ during initial phase of cultivation, however the growth rate decreased as lactate concentration in the medium increased. When the supernatant of the IO-1 culture broth was used as a medium for *A.eutrophus*, cell concentration increased to 8.5 g/l in 24 h and 55(w/w) % of the cells found to be P(3HB). Furthermore, fed-batch culture of *A.eutrophus* was carried out with feeding of L-lactic acid to maintain L-lactate concentration around 3.0 g/l. As a result, 41.0 g/l of cells and 28.7 g/l of P(3HB) were produced after 17 h of cultivation.

研究目的

近年、地球の温暖化や産業廃棄物による生態系の破壊、天然資源の減少・枯渇が深刻化しつつある。化石燃料から合成されるプラスチックは現代生活に欠かせない工業製品であり、毎年莫大な量が生産されているがその廃棄物はほとんどが埋め立てによって処分されている。しかし、近年では用地不足などの問題によりこの処理法にも限界が見え始めており、さらにプラスチックは極めて分解しにくい素材であるため自然界に流出すると野性生物に甚大な被害を及ぼす。このため、自然界において速やかに分解される生分解性プラスチック素材への関心が高まっている。なかでも微生物が生産するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) はプラスチックとしての物性や分解性が優れているため有望視されている。しかし、PHAの実用化には大量生産法の確立やコストの低減化など多くの技術的な課題が残されている。一方、木材をはじめとする植物性のバイオマス資源が多量に消費されているが、その廃棄物は燃料として使用されるか、埋め立て・投棄によって処理されている。森林破壊や天然資源の枯渇が懸念される現在、植物バイオマス廃棄物の有効利用法の確立が急務であるが、これには主要構成単糖の一つであるキシロースを効率よく有用物質へ変換する技術の開発が必須である。微生物が持つ高度な機能を利用してキシロースから生分解性プラスチック素材を効率よく生産できれば、これはプラスチックによる環境汚染や資源のリサイクル・有効利用という地球環境問題の解決に大きく貢献しうる。本研究は、バイオテクノロジーの利用による地球環境問題の解決を目的としてキシロースから生分解性プラスチック素材を生産する微生物プロセスの開発を試みるものである。

研究経過

キシロースから生分解性プラスチック素材を生産するには、PHA合成能を持ち、かつキシロース資化性に優れた微生物菌株が必要であるが、このような能力を持つ微生物はこれまでに報告されていない。キシロース資化性を持つ微生物は多いが、増殖が速く、有用物質を生産する微生物は少ない。また、従来報告されている生産物の種類もエタノールや酢酸がほとんどである。一方、PHAを生産する微生物は現在100種類以上が知られているが、やはりキシロースを直接資化できる微生物は非常に少ない。市場で試験市販されているPHAは、代表的なPHA生産菌である *Alcaligenes eutrophus* をショ糖とプロピオン酸を基質として培養することにより生産されているが、この菌はキシロース資化能を持たない。*Pseudomonas* 属に比較的強いキシロース資化能を持った細菌がいく種類か存在するがキシロースを基質とした増殖やPHAの蓄積が悪く、これらの菌を使って直接キシロースからPHAを生産するのは実用性に欠ける。そこで、ある種のキシロース資化性菌を用いて、キシロースをPHA生産菌に利用されやすい物質に変換し、次にこの物資を含む培養液

を培地に用いて培養を行い、PHAを生産する方法を考えた。この方法を2段階培養法と名付けた。この培養法では2種類の微生物菌株が使用するが、そのような微生物として我々は*Lactococcus lactis* IO-1と*Alcaligenes eutrophus*を選択した。*Lactococcus lactis* IO-1は、我々が分離・同定した乳酸球菌であり、グルコースおよびキシロースから非常に高い速度でL-乳酸を生産する。L-乳酸は様々な工業分野で使用されており、特に最近ではPHAと並んで生分解性プラスチック素材の一つとして期待されているポリL-乳酸の原料として利用価値が高まっている。もちろん、我々は本菌のキシロース培地でのL-乳酸発酵特性について多くの研究蓄積を有している。一方、*Alcaligenes eutrophus*はよく知られたPHA生産菌であり、この菌はL-乳酸基質能を有している。我々は、*A. eutrophus*を用いた二酸化炭素を炭素源とするPHA生産の量産化・実用化に関する研究を行っており、このため本菌の培養とその制御について優れた技術蓄積を有している。以上の経緯から、我々は*L. lactis* IO-1と*A. eutrophus*を用いた2段階培養法によるキシロースからのPHA生産について検討を行った。

2段階法では、まずCMX培地（酵母エキス5g/l、ポリペプトン5g/l、NaCl5g/lおよびキシロースからなる）を用いて*L. lactis* IO-1を回分培養した。培養は、全容積1lのガラスジャーフェーマンタを用いて3N NaOHを自動添加することによりpHを6.0に維持しながら行った。培地張り込み量は500ml、かくはん速度は400rpm、培養温度は37℃に調整した。キシロースが完全に消費された後に遠心分離により菌体を除去し、L-乳酸を含む培養液上清を培地として*A. eutrophus*を培養し、PHAの蓄積について調べた。*A. eutrophus*の培養は、試験管、フラスコもしくは1Lサイズのガラスジャーフェーマンターを用いて行った。ジャー培養では、かくはん速度を1,000rpm、通気速度を0.5vvm、温度を30℃とし、3H₂SO₄を自動添加することによりpHを7.0に制御した。また、L-乳酸培地でのPHAの蓄積特性を調べるためL-乳酸Naを添加した無機塩培地（(NH₄)₂SO₄ 5g/l、KH₂PO₄ 0.5g/l、MgSO₄·7H₂O 0.2g/lおよび微量元素）を用いた培養も行った。分析は、菌体増殖を培養液の562nmにおける吸光度、または培養液1l当たりの乾燥菌体重量を測定することによって求めた。PHA濃度は、菌体を加水分解してHPLCで生成したモノマー量を測定することにより求めた。L-乳酸濃度はラクテートアナライザーにより、その他の有機酸濃度はHPLCにより測定した。キシロース濃度はSomogyi-Nelson法により比色定量した。

研究成果

はじめに*A. eutrophus*の増殖に対する乳酸濃度の影響を試験管培養により調べた。培地のL-乳酸濃度を10、20、30および50g/lに調製して培養を行った結果、10g/lでの増殖が最も良好で、乳酸濃度が高くなるにつれて増殖は悪くなり、30g/l以上の乳酸濃度では増殖できなかった。さらに、L-乳酸Naを種々の濃度で添加した無機塩培地を用いてpHをコントロールしながらジャーによる回分培養を行い、L-乳酸基質での増殖速度を調べた。TABLE.1は、種々のL-乳酸濃度、フルクトースおよび二酸化炭素を基質とした場合の*A. eutrophus*の比増殖速度を示している。本菌は従来、独立栄養細菌として分離された菌であり、二酸化炭素を基質とした場合が最も増殖がよく、次に単

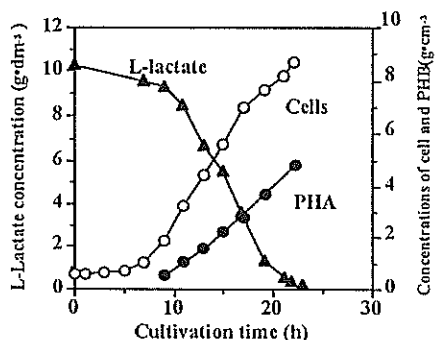


Fig.1 Fermentation time course of *A. eutrophus* in the supernatant of *L. lactis* IO-1 broth

Specific growth rate of *A. eutrophus* on various carbon sources

| Carbon source | Specific growth rate (μ^2) |
|---|----------------------------------|
| 5 g/l of L-Lactate | 0.61 |
| 10 g/l of L-Lactate | 0.42 |
| 20 g/l of L-Lactate | 0.30 |
| 20 g/l of fructose ¹⁾ | 0.18 |
| Carbon dioxide ²⁾ (H ₂ :O ₂ :CO ₂ =85: 5:10) | 0.42 |

1) The used medium was composed of fructose and minerals.

2) The microorganism was autotrophically cultivated using hydrogen and oxygen as energy source and carbon dioxide as carbon source.

糖であるフルクトースを基質とした場合に高い増殖速度が得られるとされていた。しかし、我々の実験では5g/l程度の濃度のL-乳酸を与えたときに最も増殖速度が最も高く、その値はフルクトース基質での2倍以上になった。一般に有機酸、特に乳酸はほとんど全ての細菌に対して増殖抑制作用を示す。しかし、濃度を高くしない限り*A. eutrophus*はL-乳酸を基質として他の種類の炭素化合物よりも高い比速度で増殖することが明らかになった。このことは、L-乳酸を中間基質として2段階培養法によりPHAを生産する上で都合がよい。また、これら一連の培養において菌体内含有率にして30~55(w/w)%に相当するPHAの蓄積が確認された。*A. eutrophus*を始めとしてほとんどのPHA生産菌はアンモニウム等の窒素源や溶存酸素濃度が制限され細胞の分裂が抑制されたときにPHAを蓄積するが、L-乳酸を基質とした場合にはこれらの栄養素を制限しなくても細胞内にPHAが蓄積した。次に、*L. lactis* IO-1をキシロース(約30g/l)を炭素源として培養し、L-乳酸を含む培養液を培地として*A. eutrophus*を培養し、菌体の増殖とPHAの蓄積について調べた。*A. eutrophus*の培養開始時におけるL-乳酸濃度は約10g/lに調製した。培養の結果、*A. eutrophus*は比増殖速度 0.30h^{-1} で増殖し、培養24時間で菌体濃度は8.5g/lに、PHAは生成菌体の55%の含有率になるまで蓄積した(Fig.1)。先のL-乳酸濃度10g/lの無機塩培地を用いた回分培養の結果と比較すると、2段階培養での増殖速度は幾分低くなったが、これはIO-1を培養した際に生じた酢酸の影響によるものと思われる。逆に菌体収率が0.85(g-cells/g-substrate)と、非常に高くなったがこれはIO-1の培地に含まれていた酵母エキスやポリペプトンが残存して*A. eutrophus*の炭素源として利用されたためと思われる。*A. eutrophus*が2段階培養法で蓄積したPHAをクロロホルムで抽出後、エタノールで沈殿させることにより精製し ^{13}C と ^1H のNMR解析にかけ、その化学構造を調べたところ、D-3-ヒドロキシ酪酸を唯一の構成ユニットとするポリエステル(P(3HB))であることが分かった。

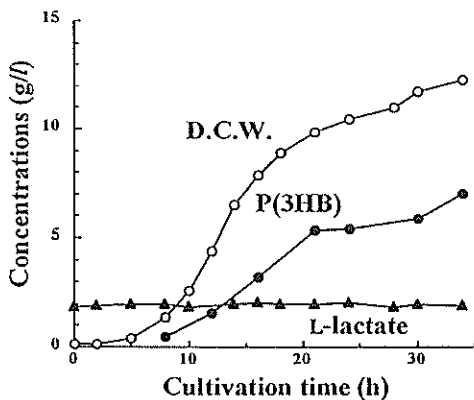


Fig.2 Fed batch culture of *A. eutrophus* using on-line L-lactate analyzer.

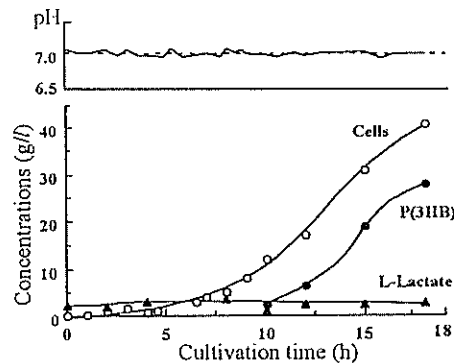


Fig.3 P(3HB) accumulation and cell growth of *A. eutrophus* in fed-batch culture feeding L-lactic acid with maintenance of L-lactate concentration at $3.0\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$

TABLE.2 The inhibitory effect of lactide on growth of *A. eutrophus* in batch culture using L-lactate as carbon source.

| Initial L-lactate concentration ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$) | Cultivation time (h) | D.C.W ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$) | Yp/s (g/g) |
|---|----------------------|---|------------|
| 10.3 | 18 | 7.23 | 0.19 |
| 4.6 | 6.5 | 4.33 | 0.24 |
| 6.1* | 24 | 3.74 | 0.17 |

*:contained $2\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of lactide

このように、*Alcaligenes*は乳酸を炭素源とした場合に最も速く増殖できるが、乳酸の濃度が高くなると逆に増殖は阻害され、結果としてP(3HB)の生産速度は低くなる。このため培養系の乳酸濃度を低く保ちながら乳酸を供給する流加培養法による高菌体密度培養について適用した。まず、旭化成社製のオンライン乳酸アナライザーBiotechnalyzer PM-1000を用いて培地のL-乳酸濃度を3g/lに保ちながら40%のL-乳酸Na液をフィードした。その結果、培養初期においては、0.5/h程度の比増殖速度で安定に増殖を示したが、pHの維持に硫酸を添加しているため培養の進行に伴い培養系には硫酸ナトリウムが蓄積し、これにより菌の増殖は阻害され10g/lの菌濃度で増殖は停止した (Fig.2)。そこで、フィード培地をL-乳酸Naから40%のL-乳酸溶液に変えて流加培養試験を行った。しかし、この場合も菌体増殖は10g/lで停止し、P(3HB)の収量や生産速度を向上させることはできなかった。高濃度の乳酸溶液中では乳酸は自然に環状縮合してラクチドを形成する。このため、フィード液に含まれていたラクチドが蓄積して菌体増殖を阻害したのではないかと思われる。実際、流加培養の培養液からは2~5g/lのラクチドが検出された。ラクチドは2g/l程度の濃度でも*A.eutrophus*の増殖を著しく阻害することを確認した (TABLE.2)。また、培養系のリン酸濃度の変化を測定したところ、菌体当たりのリン酸消費量が他の種類の炭素化合物を基質とした場合の2倍以上にもなったので、L-乳酸基質では無機塩要求性が增大しているのではないかと考えられた。そこで、L-乳酸溶液と共に、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および微量元素の溶液を培養系に供給しながら流加培養を行ったところ、約17時間で菌体濃度は40g/lに、(3HB)濃度は28g/lに達した (Fig.3)。培養系における各無機塩の濃度を至適レベルに保つように基質の供給をコントロールすることにより、菌体およびP(3HB)の収量をさらに高くすることができるのではないかとと思われる。

今後の課題と発展

L.lactis IO-1と*A.eutrophus*を用いた2段階培養法により、L-乳酸を経由してキシロースから生分解性プラスチック素材であるP(3HB)を生産できることを実証した。*A.eutrophus*はL-乳酸を基質とした場合に非常に良好に増殖し、P(3HB)をよく蓄積したが、L-乳酸の濃度が高くなると阻害作用により増殖が阻害されるため高菌体密度生産は流加培養法で行わなければならないが、またこのときL-乳酸濃度だけではなく無機塩濃度も一定に保たなければならないことが分かった。今後は、この無機塩の至適濃度を決定して、これを保つように培地のフィード法の改良を行って生産のより効率化を図る。さらに、木材廃棄物を加水分解して得たキシロース液を用いてL-乳酸発酵を行い、その発酵液を培地に用いたPHA生産を検討したい。使用する木材廃棄物としては、パーム油を製造する際に多量に生じるパームヤシ廃繊維を予定している。特に、流加培養法で検討した培地フィード法を利用して連続培養を行い、パーム廃繊維からPHAを生産する連続プロセスを完成させたい。

発表論文リスト

1. K. Tanaka, K. Katamune and A. Ishizaki: 1993. Fermentative production of poly- β -hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Letters*. 15, 12(1217-1222).

2. K. Tanaka and A. Ishizaki: 1995. Fermentative production of poly- β -hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. *Biotechnol. Letters. Can. J. Microbiol.*, 41, 257-261.