

Rhodobacter sphaeroides RV 株による廃液からの 生分解性 Polymer PHB (poly- β -hydroxybutyrate) 生産に関する研究

PHB (poly- β -hydroxybutyrate) production from organic waste water
by *Rhodobacter sphaeroides* RV

大 竹 優・今 村 健 亮・斎 藤 みづほ
高 橋 大 輔・小 森 谷 友 絵・神 野 英 毅

Yu OTAKE · Kensuke IMAMURA · Mizuho SAITO
Daisuke TAKAHASHI · Tomoe KOMORIYA · Hideki KOHNO

¹ 日本大学生産工学部応用分子化学科(〒275-8575 千葉県習志野市泉町 1-2-1
e-mail : h5kohno@cit.nihon-u.ac.jp)

Rhodobacter sphaeroides RV 株は嫌気条件における高い PHB 蓄積能力とアンモニアへの耐性を有している。われわれはこの紅色非硫黄光合成細菌を用いた廃液からの PHB 生産実験を行っている。しかし、産業や生活環境より排出される廃液にはさまざまな成分が含まれており、低い PHB 生産量、長い生産時間が問題となっている。この報告でわれわれは PHB 生産に利用されにくい炭水化物を利用可能な成分へ変換するために新たに *Lactobacillus plantarum* を乳酸発酵菌体として加えた混合培養系を用いた PHB の生産を行った。この画期的な培養系によって廃液は効率的に PHB 生産に利用された。結果として、PHB 生産時間は短縮化され、より高収率な PHB の生産ができた。

Keywords ; *Rhodobacter sphaeroides* RV, PHB, organic waste, *Lactobacillus plantarum*,
co-culturing system

2005 年 12 月 20 日受理

1. はじめに

現代社会においてプラスチックは多く利用されている。しかし石油資源の枯渇¹⁾、焼却時に発生する有害物質、廃棄されたプラスチックによる地球環境の破壊などの問題が深刻化している²⁾。それらの問題を解決するものとして生分解性プラスチックが挙げられる³⁾。生分解性プラスチックは、使用時には普通のプラスチックと同様に使用でき、廃棄されたときには、最終的に水と二酸化炭素にまで分解されて環境のサイクルに組み込まれることが可能なものである²⁾。生分解性プラスチックは大きく分類して、化学合成されたもの、生物を利用して生産されるもの、天然物を利用したものとある。その中でも多くの微生物が産生する微生物産生系のプラスチックの一つである PHB (poly- β -hydroxybutyrate) は特に分解性に優れている

といわれており、早期の分解を目的とした場面での利用が期待されている。しかし微生物による生産は効率が悪く、高収率化が工業的生産への大きな課題となっている^{3, 4)}。また、微生物による生産の研究の多くは基質に試薬を用いたときのものであり、工業化の際に同様に試薬を用いるとなると原材料コストがかさむことはいうまでも無い^{5, 6)}。

一方、人間は一人当たり一日に 1 kg のゴミを排出して生活をしているといわれているが、その中の約 30% は生ゴミである^{7, 8)}。生ゴミは水分を多く含み、燃焼温度を低下させて焼却を困難にするばかりでなく、ダイオキシン類などの有害物質の発生の原因ともされており、生ゴミの処理問題は深刻であるといえる。家庭用、産業用を問わず生ゴミ処理や廃液処理には多く微生物が用いられているが、生ゴミ中に残存する有機酸や糖類など、

さまざまな栄養素は未利用のままである。実質的に原材料費のかからない食品工業の廃液や生ゴミなどを基質成分とした PHB の生産を微生物によって行うことは、生ゴミなどの処理問題の解決の足がかりになるばかりではなく、従来のプラスチック生産が抱える問題を解決する手段の一つとして期待されている。

われわれは有機酸からの PHB 菌体内蓄積能力に優れ、生ゴミの資化中に生じるアンモニアへの耐性を有している光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株を用いた廃液からの PHB 生産の工業化に向けた実験と、生ゴミ中に存在する糖を迅速に PHB 生産基質として利用可能な乳酸に変換するために *Lactobacillus plantarum* を乳酸発酵菌体として加えた co-culture を使用した生産時間の短縮化と高収率化を検討し、生産収率向上の結果を得たのでここに報告する。

2. 実験方法

2.1 使用菌体

2.1.1 *Rhodobacter sphaeroides* RV 株

三宅らが茨城県つくば地域より単離した紅色非硫黄光合成細菌 *Rh. sphaeroides* RV 株⁹⁾を PHB 生産菌体として用いた。*Rh. sphaeroides* RV 株は PHB 蓄積能力に優れており、窒素飢餓条件下での菌体内への PHB 蓄積量は 60~80%となる。また、廃液に含まれるアンモニアへの耐性を持っており、有機酸資化能力に優れていることから、食品工業廃液や生ゴミからの PHB 生産に適していると考えられる。

2.1.2 *Lactobacillus plantarum*

Japan Collection of Microorganisms より供与された乳酸菌 *Lb. plantarum* を生ゴミ処理能力を向上させるために乳酸発酵菌体として用いた。

2.2 菌株の保存

2.2.1 *Rh. sphaeroides* RV 株

菌体の植継ぎには全量 20ml の捻子蓋付き試験管に aSy 培地を 19ml 加えたものに植菌率 5% で植菌して、嫌気-明条件(10klux, 30℃)で 48 時間の培養を行った。

2.2.2 *Lb. plantarum*

菌体の植継ぎには全量 20ml の蓋付き試験管に

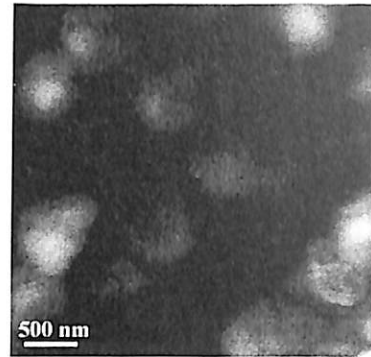


Fig. 1 a AFM image of *Rh. sphaeroides* RV

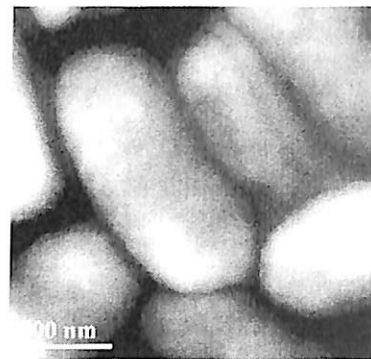


Fig. 1 b AFM image of *Lb. plantarum*

Table 1-1 aSy medium

| Components | Amount |
|--------------------------------|---------|
| Ammonium Sulfate | 1.25 g |
| Disodium Succinate·hexahydrate | 9.8 g |
| Yeast Extract | 1.0 g |
| Dipotassium Hydrogenphosphate | 0.75 g |
| Potassium Dihydrogenphosphate | 0.85 g |
| Magnesium Sulfate | 0.2 g |
| Vitamin solution | 10 ml |
| Inorganic solution | 5 ml |
| Filled up with distilled water | 1000 ml |

pH is adjusted at 8.5

Table 1-2 GYP medium

| Components | Amount |
|--|---------|
| D(+)-Glucose | 10 g |
| Yeast extract | 5 g |
| Peptone | 5 g |
| Magnesium sulfate | 0.4 g |
| Manganese (II) sulfate·5H ₂ O | 0.01 g |
| Iron (II) sulfate·7H ₂ O | 0.01 g |
| Sodium chloride | 0.01 g |
| Filled up with distilled water | 1000 ml |

pH is adjusted at 7.0

GYP培地を19ml加えたものに植菌率5%で植菌して、嫌気条件30℃で48時間の培養を行った。

2. 3 前培養

2. 3. 1 *Rh. sphaeroides* RV株

植え継ぎ後48時間培養した菌体を全量1,200mlのメディウム瓶に試験管全量加え、aSy培地を加え蓋をして嫌気・明条件(10klux, 30℃)で48時間の培養を行った。

2. 3. 2 *Lb. plantarum*

植え継ぎ後48時間培養した菌体を全量1,200mlのメディウム瓶に試験管全量加え、GYP培地を加え蓋をして嫌気・明条件30℃で48時間の培養を行った。

2. 4 PHB生産

2. 4. 1 PHB生産培地

食品廃液や生ゴミはさまざまな種類があり、培地組成の影響でPHB蓄積量は大きく変化するため実験の再現性をとることは困難である。そこで本研究ではモデル廃液として40%の水分を含ませたドッグフード(株)ビッグ・エー社製)をPHB生産培地とした。

2. 4. 2 PHB生産実験

100g/lのPHB生産培地を加えた溶液1,000mlと、集菌・洗浄後に実験時の2倍濃度に調製を行った混合菌体を培養瓶中で混合して全量を2,000mlとしたものを嫌気・明条件(10klux, 30℃, pH 8.5⁹⁾)で培養した。また、0時間目から24時間毎にサンプリングを行い、菌体増殖量、基質有機酸量、PHB蓄積量の測定を行った。

2. 5 サンプルの測定

2. 5. 1 菌体濃度の測定

PHB生産実験の培養液を石英ガラスセルに分取し、紫外可視分光光度計(SHIMADZU UV-160A)を使用してO.D₆₆₀での測定を行い菌体濃度の指標とした。

菌体の計算値としてO.D=1.5は0.4mg dry cell/mlに相当する。

2. 5. 2 基質中有機酸量の測定

菌体濃度測定後のサンプルを15,000rpm, 4℃, 15minの条件の遠心分離器で分離し、上澄み液

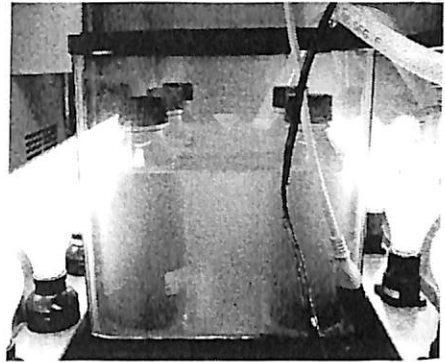


Fig. 2 Pilot model of PHB production system

を0.45μmのフィルターに通したものをHPLC(ディテクター: SHIMADZU SPD-10Avp UV-210nm, カラム: ULTRON PS-80H 8φ×300mm, キャリア: HClO₄: H₂O=1.5: 1000)で測定して、基質中の有機酸量の測定とした。

2. 5. 3 PHB生産量の測定

基質中有機酸量の測定時に遠心分離した沈殿に2mlの次亜塩素酸を加え、菌体膜を破壊してPHBを取り出したものから遠心分離器で次亜塩素酸を取り除き、洗浄したものに硫酸を加えてクロトン酸に分解したものを50倍希釈したものをHPLCで測定し、クロトン酸濃度をPHB量に換算してそれをPHB生産量とした。

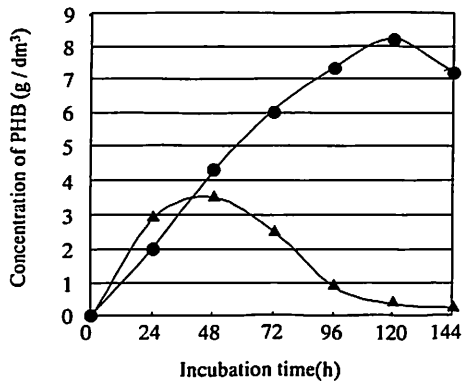
3. 結 果

3. 1 単一菌体でのPHB生産

Rh. sphaeroides RV株のみを使用したモデル廃液からのPHB生産実験での蓄積量は8.2g/lであった。標準的にPHB生産に適している培地組成、酢酸50mM, 硫酸アンモニウム10mMの培地での生産量が3.5g/l付近であるのに対して、2倍以上の高い生産量が確認された。しかしPHB生産にかかる時間は、酢酸-硫酸を用いたときが48時間であるのに対し120時間となり、生産効率は下がった。Fig. 3においてはPHBの産生性において調製培地よりの産生と有機廃物を培地としたものの比較を説明する。

3. 2 混合菌体系でのPHB生産

混合菌体を用いたPHBの生産は、*Rh. sphaeroides* RV株と*Lb. plantarum*の混合比



●: PHB production from modified waste.
▲: PHB production from organic acid (50 mM of sodium acetate and 10mM of ammonium sulfate).
We expected that organic waste was more efficient substrate than the experimental culture media.

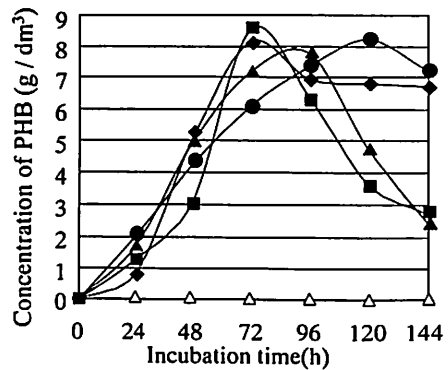
Fig. 3 PHB production in *Rh. sphaeroides* RV

をこれまでの計算値より O.D 値が① 2 : 1, ② 1 : 1, ③ 1 : 2, ④ 0 : 1 に調製した 4 系での実験を行った。結果, サンプル①のときには, PHB の最高蓄積量までに有する時間が 96 時間で, 蓄積量は 7.8g であった。②および③のときには 72 時間で蓄積され, 生産時間は *Rh. sphaeroides* RV 株のみでの培養から 48 時間の短縮がなされた。また, そのときの蓄積量は②, ③それぞれ 8.6g, 8.1g であった。④の *Lb. plantarum* のみの培養では PHB の蓄積は確認されなかった (Fig. 4)。この理由として *Lb. plantarum* はギ酸の代謝能が高く PHB 産生回路をほぼ完全に阻害していると考えられる。

3. 3 PHB 生産時の基質有機酸量変化

Rh. sphaeroides RV 株を使用した各種有機酸からの PHB 生産では, ピルビン酸, 酢酸, 乳酸を炭素源として使用したときに PHB 生産量が多く, 逆に, ギ酸, プロピオン酸, リンゴ酸を使用したときに菌体の増殖が抑制され, PHB 生産量も少ないことが確認されている³⁾。

本研究ではモデル廃液からの PHB 生産を行ったときの基質中有機酸量の変化を測定して, そのときに特徴的な変化を示した乳酸とギ酸の変化に注目した。乳酸量の変化では, *Rh. sphaeroides* RV 株のみの系では乳酸はすぐに消費されて, 培養開始から 48 時間目には確認できなくなっていた。



Ratio of *Rh. sphaeroides* RV:*Lb. plantarum*;
● 1:0, ▲ 2:1, ■ 1:1, ◆ 1:2, △ 0:1.

In co-culturing system, the accumulation time of PHB moved 48 hour earlier than culturing single strain of *Rh. sphaeroides* RV.

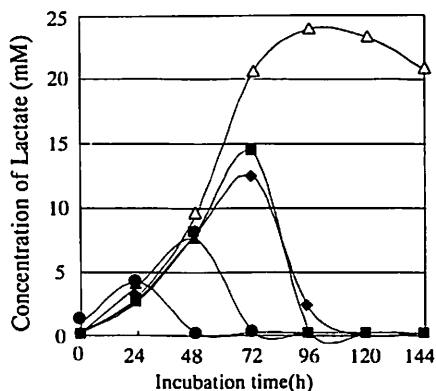
Fig. 4 PHB production in co-culture

しかし *Lb. plantarum* を混合した系では, 乳酸菌の混合比が高いほど乳酸量の増大がみられた。乳酸量が最大になった時間は, *Rh. sphaeroides* RV 株と *Lb. plantarum* の混合比が 2 : 1 のものでは培養開始から 48 時間目, 1 : 1 と 1 : 2 のものでは 72 時間目であった。また, 乳酸菌のみの系でも 96 時間目以降は乳酸量の減少が確認された (Fig. 5)。

PHB の生産量を落とすばかりでなく¹²⁾菌体の増殖を抑制する働きをするギ酸の蓄積量の測定結果では, *Rh. sphaeroides* RV 株のみの系ではギ酸量が培養開始から増加して, 72 時間目には濃度が 50mM で最大となり, その後もギ酸は消費されずに蓄積していた。しかし *Lb. plantarum* を混合した系では, 乳酸菌の割合が多いほどギ酸の蓄積量は下がり, *Rh. sphaeroides* RV 株と *Lb. plantarum* の混合比が 2 : 1 のものでは 40 mM の蓄積, 1 : 1 のものでは 32mM, 1 : 2 のものでは 31mM であった (Fig. 6)。

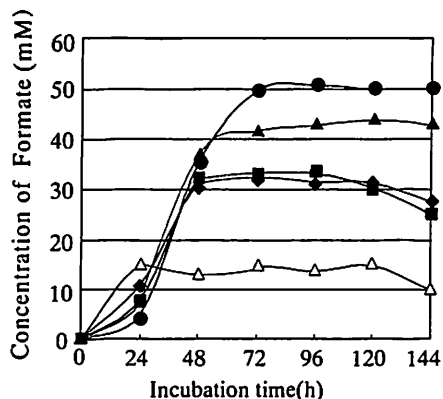
4. 考 察

Rh. sphaeroides RV 株はアンモニアへの耐性と, 有機酸から PHB 生産をする能力を有している。しかし実廃液からの PHB 生産には, *Rh. sphaeroides* RV 株が基質として利用しにくい物質が多く含まれており, 廃液中の未利用成分を効率よく変換することが困難である。それらは廃液



Ratio of *Rh. sphaeroides* RV:*Lb. plantarum*;
 ● 1:0, ▲ 2:1, ■ 1:1, ◆ 1:2, △ 0:1.
 In proportion to the ratio of more *Lb. plantarum* to less *Rh. sphaeroides* RV, the lactate concentration was increased.

Fig. 5 Lactate production in co-culture



● 1:0, ▲ 2:1, ■ 1:1, ◆ 1:2, △ 0:1.
 The concentration of formate becomes low in proportion to the ratio of more *Lb. plantarum* to less *Rh. sphaeroides* RV.

Fig. 6 Formate production in co-culture

の前処理をすることで基質として利用可能な有機酸に変換可能なことが知られている。しかし前処理をすることでPHB生産にかかる時間は延長され、生産効率は下がってしまう。そこでそれら物質をPHB生産と同時に効率的に基質として利用できるならば、生産時間は延長されずに、利用可能な成分が増加することによって生産性は向上すると考えられた。本実験では *Rh. sphaeroides* RV株を使用した廃液からのPHB生産に利用されていない成分を効率よく有機酸に変換し、PHBの基質として利用可能な状態にして、生産性の向上と生産時間の短縮を図るために *Lb.*

plantarum を乳酸発酵菌体として加えた混合培養系を用いてのPHBの高濃度生産を行った。

Rh. sphaeroides RV株のみを使用したモデル廃液からのPHB生産では、酢酸を炭素源とした標準的な培地での生産よりも2倍以上高い生産量を示したが、生産時間が長くなったことから、*Rh. sphaeroides* RV株が基質として利用しにくい成分が含まれていることが原因であると考えられた。そこで、*Rh. sphaeroides* RV株が未利用の成分を利用可能なかたちに変換するために糖を有機酸化する能力に優れた菌体として *Lb. plantarum* を混合した。

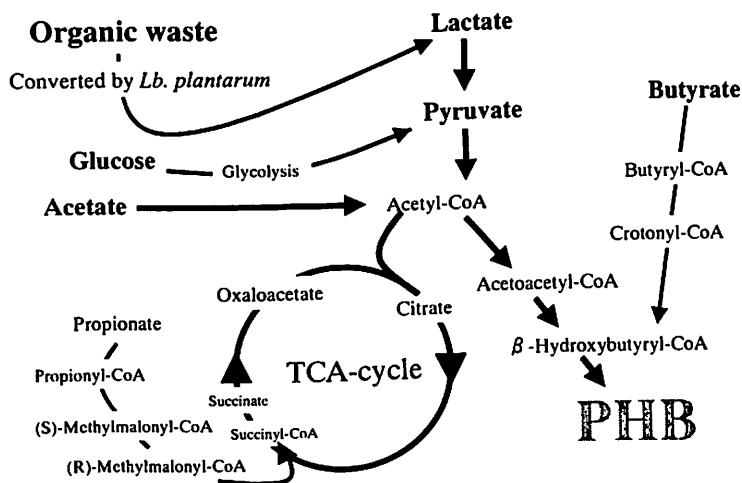


Fig. 7 Metabolic map of glycolysis and TCA cycle on the basis of PHB biosynthesis

Lb. plantarum を混合した系では、乳酸菌の混合割合が高いほど基質中に分泌される乳酸量が増大した。このことは、乳酸菌により未利用の糖類からの乳酸の生産されたためであると考えられた。また、蓄積するギ酸量が減少したことから、*Rh. sphaeroides* RV 株のみでの培養よりも PHB 生産に適していることが確認された。

Rh. sphaeroides RV 株は有機酸資化能力に優れているが、生ゴミ中に含まれる糖類を基質として用いることが難しい菌体である。そのため、糖類を有機酸に変換して利用する必要がある。乳酸菌 *Lb. plantarum* は糖を乳酸に変換する能力に優れており、実廃液中に含まれる糖類を速やかに有機酸化することが可能な菌体である。しかし有機酸からの PHB を生産する能力には優れていないことから、他の PHB 生産能力に優れた菌体との混合培養が必要となる。しかし混合したときに互いの菌体活性を落とすような関係の菌体であってはいけないことが最も重要なことであるが、*Rh. sphaeroides* RV 株と *Lb. plantarum* を混合したときに、混合培養での菌体増殖が有利であったことからみても、この混合培養での PHB 生産は高効率であったといえる¹⁰⁾。

また、乳酸菌が糖を、*Rh. sphaeroides* RV 株が有機酸を基質として用いて効率よく PHB に変換することにより混合菌体系での生産実験では、生産量を落とさずに生産時間を早めることが可能になったと考えられた。

5. 今後の展望

Rh. sphaeroides RV 株を用いた廃液からの PHB 生産は、廃液中に残存する未利用な有機酸からの有用物質生産であり、現代社会が抱えるゴミ問題や化石資源の枯渇問題といった大きな問題を解決しうる手段の一つとして使用可能であり、もし化石資源が枯渇したときには絶対に必要な技術である。しかし *Rh. sphaeroides* RV 株は廃液中の有機酸を PHB 生産に利用する能力には優

れているが、生ゴミ中に含まれる糖類を基質として用いることが難しい菌体であるため、他の菌体を用いて糖類を有機酸に変換する必要がある。そして実際に、*Rh. sphaeroides* RV 株と *Lb. plantarum* との混合系では未利用の糖を乳酸化したことによる PHB 生産時間の短縮が見られた。

微生物を利用した PHB 生産は、生産効率では他のプラスチックの生産よりも時間がかかり、生産量も少ないことからコスト高になってしまう。しかしプラスチックの原料として、生ゴミや食品工業の廃液を利用可能な *Rh. sphaeroides* RV 株による PHB 生産は、原料費がかからないため、安価な生産を実現することが可能である。そして酢酸菌や酪酸菌を利用した多数種混合系や活性汚泥での PHB 生産や、コンポスト等に利用されている好気性微生物へ PHB 生産遺伝子を組み込んだ組換え菌体をも用いた PHB の更なる高蓄積化など、今後の発展への期待も大きい。

参考文献

- 1) Y. Deniz., Ufuk, G., Lemi, T., Y. Meral and E. Inci., : *J. Biotechnol.*, **70**, 125-131 (1999)
- 2) 伊勢直人：生ゴミ・有機性廃棄物のリサイクルと市場動向、付録-171、共立出版 (1995)
- 3) 吉川浩司：日本大学生産工学部 平成 13 年度修士論文 (2002)
- 4) Rehm, B. H.A., Antonio, R. V., Spiekermann, P., Amara, A.A. and Steinbuchel, A., : *Biochemica et Biophysica Acta.*, 36522, 1-13 (2001)
- 5) Tohyama, M., Patarinska, T., Ziwen, Q and Shimizu, K., : *Biochem. Eng. J.*, 3571, 1-17 (2002)
- 6) Tohyama, M., Shimizu, K., : *Biochem. Eng. J.*, **4**, 45-53 (1999)
- 7) 伊勢直人：生ゴミ・有機性廃棄物のリサイクルと市場動向、付録-202、共立出版 (1995)
- 8) 森 忠洋：やってみませんか家庭でできる生ゴミの処理、4-6、パワー社 (1997)
- 9) Suzuki, T., Tsygankov, A.A., Miyake, J., Tokiwa, Y and Asada, Y., : *Biotechnol. Lett.*, **17**, 395-400 (1995)
- 10) 徳本 大, 粟飯原康行, 奥 業紗代, 小森谷友絵, 浅田泰男, 神野英毅：分離技術, **36**, 59-65 (2005)

Yu OTAKE · Kensuke IMAMURA · Mizuho SAITO
Daisuke TAKAHASHI · Tomoe KOMORIYA · Hideki KOHNO

Department of Applied Molecular Chemistry, College of Industrial Technology,
Nihon University.
Izumi-cho, Narashino-shi, Chiba, JAPAN. 275-8575

Abstract

Rhodobacter sphaeroides RV is a type of purple non-sulfur bacteria and it produces a biodegradable polymer PHB(poly- β -hydroxybutyrate) by irradiating under anaerobic condition. The difficulty is that *Rh. sphaeroides* RV accumulated PHB even in a small amount for long cultivation time. In order to obtain PHB both in higher yield and shorter cultivation time in addition to the use of carbon source from organic waste, we developed unique co-culturing system using *Lactobacillus* and *Rhodobacter*. In this paper, we report our successful co-culturing system in combination of *Rh. sphaeroides* RV and *Lactobacillus plantarum* to produce PHB from organic waste as carbon source to achieve higher productivity of PHB in together with efficient decomposition of organic waste.