

# 廃棄物から生分解性プラスチック素材へ

## —大気窒素活用型発酵生産への展開—

### 概要

京都大学大学院農学研究科 吉田 暢広 修士課程学生（研究当時）、橋本 渉 同教授らの研究グループは、とても安定で反応性に乏しい「大気窒素」を利用する微生物を用いて、バイオディーゼル<sup>※1</sup>生産時に副生する「廃グリセロール」<sup>※2</sup>から生分解性プラスチック素材を生産しました。

脱炭素社会に実現に向けて、欧州を中心に世界各地で植物油などからバイオディーゼルが製造されています。日本国内においても、京都市などでは廃食用油を回収し、バイオディーゼルの生産をしています。一方、生産時に副生する「廃グリセロール」は高 pH で不純物を含むため、その利活用が遅れています。本研究では、水で希釈した「廃グリセロール」と「大気窒素」を栄養源とする窒素固定細菌<sup>※3</sup>を用いて、有用なバイオポリマー<sup>※4</sup> [アルギン酸<sup>※5</sup>とポリヒドロキシ酪酸 (PHB) <sup>※6</sup>] を生産しました。さらに、生分解性プラスチック素材となる PHB の生産について、生育条件と改変株の育種を検討した結果、本窒素固定細菌が大量の PHB を蓄積することが明らかとなりました。

本研究は、化学的窒素固定による環境負荷を低減するとともに、廃棄物を有用素材に変換できる点で、持続可能な開発目標 (SDGs) の「目標 7：エネルギーをみんなに そしてクリーンに」の達成の一助にも繋がること期待されます。

本成果は、2022 年 6 月 7 日に英国の国際学術誌「Scientific Reports」にオンライン掲載されました。

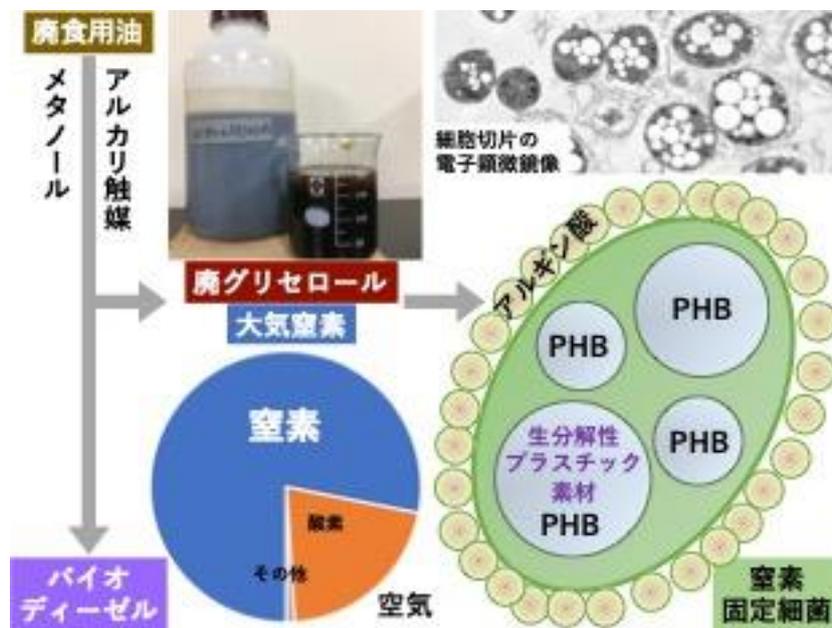


図. 「大気窒素」を活用した「廃グリセロール」からの有用ポリマー生産

# 1. 背景

温室効果ガスの排出量を実質ゼロにする脱炭素社会の実現に向けて、化石燃料（石油・石炭）の代替燃料として、欧州を中心に世界各地で、生物起源の油からバイオディーゼル（BDF）が製造されています。日本においても、廃食用油からアルカリ触媒法<sup>\*7</sup>より BDF が生産されています。具体的には、廃食用油とメタノールを、アルカリ触媒によるエステル交換反応<sup>\*8</sup>により脂肪酸メチルエステル<sup>\*9</sup>とグリセロールに変換します（図1）。京都市は全国の自治体に先駆けて廃食用油の回収と BDF 製造を実施し、市バスやゴミ収集車の燃料に用いており、二酸化炭素排出量の削減に貢献しています。一方、BDF 製造時に、高 pH で、かつ、不純物を多く含む「廃グリセロール」が副生するため、「廃グリセロール」の利活用が緊要な課題となっています。



図 1. バイオディーゼル生産プロセスと「廃グリセロール」

現在広く適用されているハーバー・ボッシュ法による「化学的窒素固定」は、飛躍的に「大気窒素」の利用を推進し、固定された窒素で化学肥料を生産できるようになったことから、顕著な食糧増産を可能にしました。その反面、ハーバー・ボッシュ法は高温（500℃）・高圧（300気圧）の条件下で行われるため、莫大なエネルギーを必要とし、余剰の窒素化合物が環境汚染を引き起こすという問題がありました。したがって、循環型社会の構築と、省エネルギーおよび環境保全の観点から、環境負荷の低い「生物学的窒素固定」の割合を増やすことが極めて重要です。「生物学的窒素固定」の一例として、窒素固定細菌（*Azotobacter vinelandii*）は「大気窒素」を固定し、有用なバイオポリマーであるアルギン酸とポリヒドロキシ酪酸（PHB）を生産することが知られています（図2）。

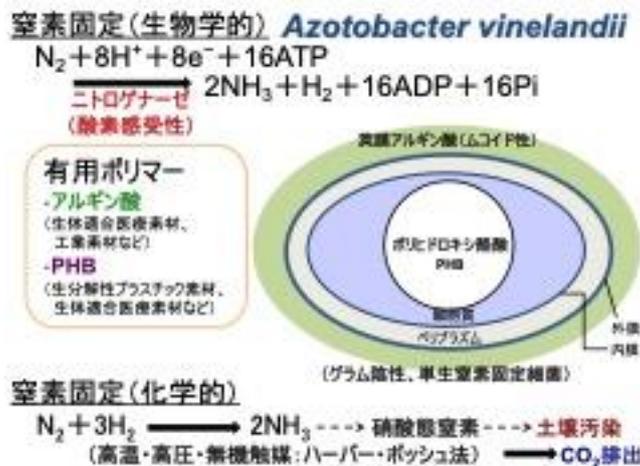


図 2. 窒素固定と窒素固定細菌による有用なバイオポリマー生産

## 2. 研究手法・成果

京都市廃食用油燃料化施設で BDF 製造時に副生する「廃グリセロール」は、45%グリセロール、13%メタノール、25%油分とその他の不純物を含み、アルカリ性 (pH 9.3) を示します。そのため、「廃グリセロール」を利活用するためには脱脂や中和などの前処理を必要とします。本研究では、窒素固定細菌 *A. vinelandii* による「廃グリセロール」の利活用を図るため、先ず始めに本菌の生育 pH を調べました。リン酸緩衝液<sup>※10</sup>を用いて、「純グリセロール」と窒素源を含まない無機塩からなる最少培地で生育させたところ、pH 9 以上でも本菌は良好に生育することがわかりました。そこで、「廃グリセロール」を水道水のみで段階希釈した溶液で生育させたところ、128 または 256 倍希釈した「廃グリセロール」で本菌の生育が確認できました。したがって、脱脂や中和することなく「廃グリセロール」を水道水で希釈するだけで、*A. vinelandii* が生育することが明らかになりました。さらに、微量のミネラルを添加することにより、その生育が促進されることもわかりました。生育条件を検討した結果、最終的には、希釈率：256 培、温度：30°C、震盪（しんとう）速度：120 strokes/min の生育条件で、本菌は 1,000 倍以上に生育し、「廃グリセロール」中のグリセロールを完全に消費しました（図 3 左）。また、生育 3 日目より、バイオポリマーの一つであるアルギン酸を細胞外に分泌生産しました（図 3 右）。

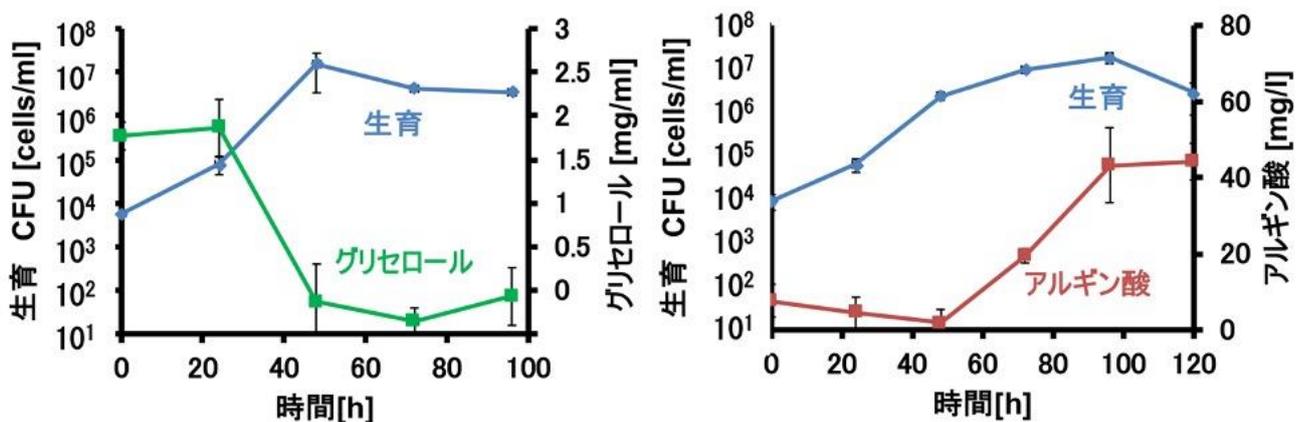


図 3. (左)「廃グリセロール」培地での生育とグリセロール消費 (右)「廃グリセロール」からのアルギン酸分泌生産

*A. vinelandii* は、アルギン酸に加えて、生分解性プラスチック素材となる PHB を細胞内に生産します。そこで、「廃グリセロール」からの PHB 生産性を電子顕微鏡により定性的に評価しました。その結果、本菌の細胞切片を透過型電子顕微鏡で観察したところ、本菌は、「廃グリセロール」培地で、細胞内に油滴状の PHB 顆粒を生産することがわかりました（図 4 左）。また、走査型電子顕微鏡解析により、細胞外にはアルギン酸に相当する繊維状物質が認められました（図 4 右）。

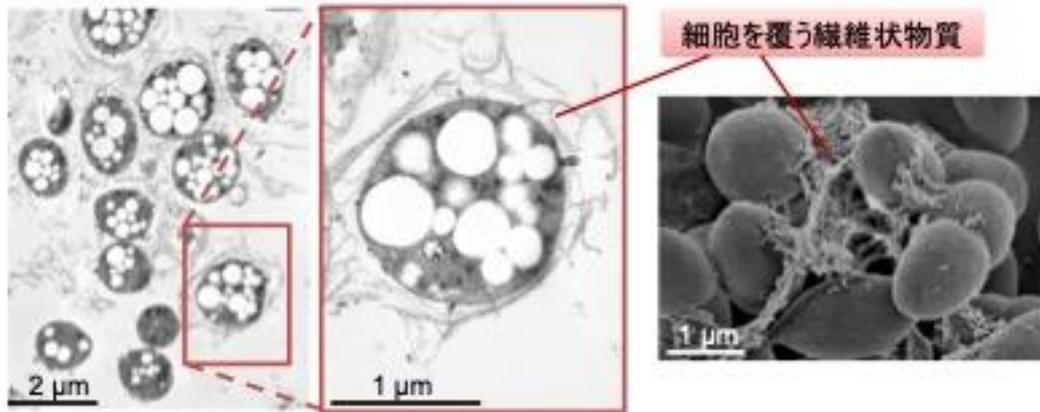


図4. (左)「廃グリセロール」培地での細胞内 PHB 生産と (右) 細胞外アルギン酸分泌生産

アルギン酸と PHB 生産は競合するため、アルギン酸合成を遮断することにより、PHB 生産が向上することが知られています。そこで、アルギン酸合成欠損株を用いて PHB の大量生産を試みました。PHB 生産性は、ガスクロマトグラフィーにより評価しました。野生株とアルギン酸合成欠損株 ( $\Delta algD$ ) の乾燥菌体を酸性条件下で熱処理し、PHB 分解物を定量しました。その結果、培養開始 48 時間以降から両株とも PHB の生産が認められ、野生株と比較して、アルギン酸合成欠損株では PHB 生産量が培養液あたりで約 10 倍、細胞あたりで約 4.6 倍に増大しました (図5)。このことから、「廃グリセロール」から PHB を生産する場合においても、アルギン酸合成経路を遮断することが有効であることが明らかになりました。

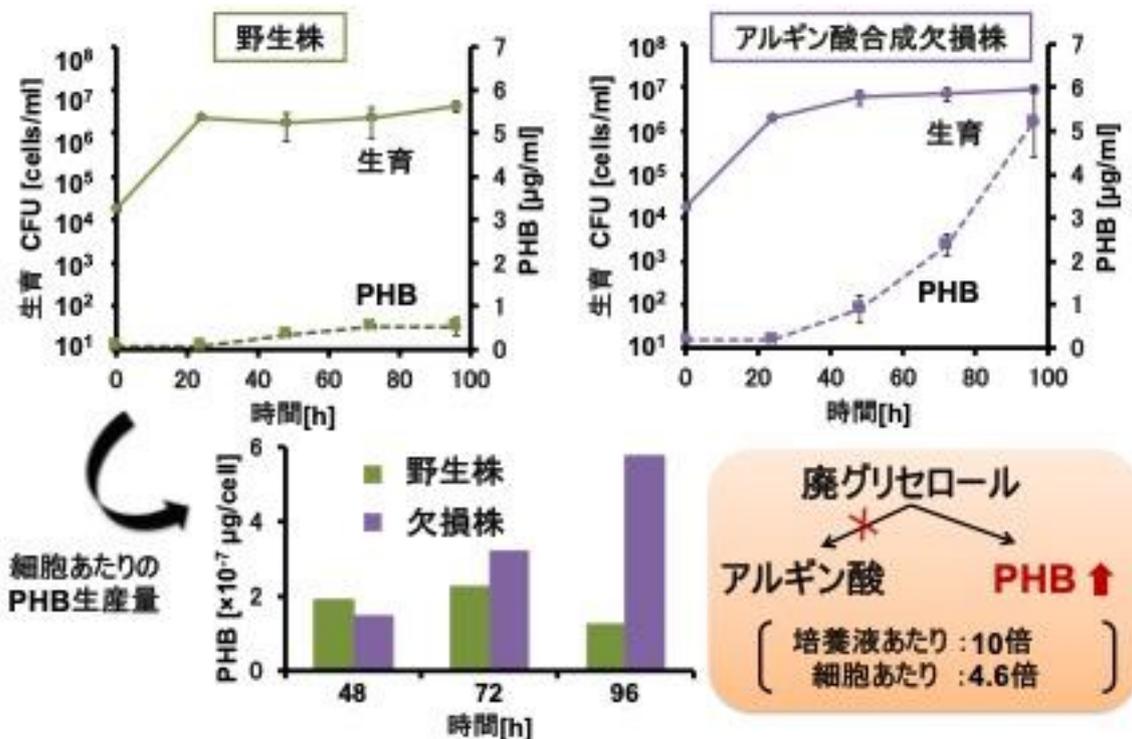


図5. 「廃グリセロール」からの PHB 大量生産

本研究により、窒素固定細菌を用いて、「大気窒素」を窒素源として、「廃グリセロール」から生分解性プラスチック合成を可能にする有用素材生産のための、新たな発酵技術の基盤を開発することができました。これ

により、生育に窒素源を要しない環境調和型・低コスト型の新たな発酵生産システムを開発し、BDF 製造から生じる廃棄物のリデュース、「廃グリセロール」のリユース、廃食用油のリサイクルの 3R を強力に推進することができます。したがって、本研究成果は、循環型社会の構築や、持続可能な開発目標（SDGs）の達成などに資することが期待されます。

### 3. 波及効果、今後の予定

今後は、「大気窒素」と「廃グリセロール」から、アルギン酸や PHB だけではなく、アミノ酸や有機酸の生産も目指します。本研究による「大気窒素」活用型微生物発酵モデルの確立は、「化学的窒素固定」から「生物学的窒素固定」へシフトする端緒に繋がり、持続可能な循環型社会の形成に貢献します。この次世代型微生物発酵技術が確立されれば、日本の各種発酵産業（アミノ酸、有機酸など）とも連携することにより、窒素循環型社会を構築する新たな産業分野の開拓も期待されます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（挑戦的研究（萌芽）, 19K22928）の支援を受けて実施されました。

#### <研究者のコメント>

生物界の中には、動物や植物が果たすことができない役割を示す微生物もいます。窒素固定など、微生物の巧みな生存戦略を紐解いて、学術的成果を積み重ねることは勿論のこと、その成果をわたしたちの暮らしを豊かにすることに繋げる所存です。（橋本 渉）

#### <用語解説>

※1 **バイオディーゼル（BDF）**：植物油などの油とメタノールから、エステル交換反応により生じた脂肪酸メチルエステルはディーゼルエンジンの燃料として利用されます。

※2 **廃グリセロール**：BDF 製造時に副生するグリセロールを主成分としますが、未反応の油脂やアルカリ触媒などが混入しています。

※3 **窒素固定細菌**：窒素  $N_2$  をアンモニアに変換できる微生物の一種です。

※4 **バイオポリマー**：生物により合成される高分子化合物です。

※5 **アルギン酸**：バイオポリマーの一種で、マンヌロン酸とグルロン酸からなる酸性多糖です。*A. vinelandii* の他、褐藻類（コンブやワカメ）も粘性物質として生産し、手術糸などにも利用されています。

※6 **ポリヒドロキシ酪酸（PHB）**：3-ヒドロキシ酪酸が重合したポリマーであり、生分解性プラスチック素材として期待されています。

※7 **アルカリ触媒法**：水酸化カリウムや水酸化ナトリウムなどのアルカリ触媒の存在下で反応させる方法です。

※8 **エステル交換反応**：エステルとアルコールとを反応させて、置換基を交換する反応です。

※9 **脂肪酸メチルエステル**：脂肪酸エステルの一類で、バイオディーゼルとして利用されます。

※10 **リン酸緩衝液**：各 pH に合わせて、リン酸一カリウムとリン酸二カリウムで作製される緩衝液です。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by *Azotobacter vinelandii* using atmospheric nitrogen (大気窒素を用いて窒素固定細菌による廃グリセロールからのポリヒドロキシ酪酸とアルギン酸の直接生産)

著者：Nobuhiro Yoshida, Ryuichi Takase, Yoshimi Sugahara, Yuko Nambu, & Wataru Hashimoto

掲載誌：Scientific Reports DOI：10.1038/s41598-022-11728-1