

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550179

研究課題名(和文) 植物油中のグリセリンを炭素源としたバイオプラスチックの高収率生合成と高機能化

研究課題名(英文) Biosynthesis of Biopolyester from the mixed substrates of glycerin and fatty acid/amino acids

研究代表者

中沖 隆彦 (NAKAOKI, Takahiko)

龍谷大学・理工学部・教授

研究者番号：90257824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：食物油に含まれるトリグリセリドを加水分解して得られるグリセリンを炭素源として、微生物を用いたバイオプラスチックであるポリ(3-ヒドロキシアルカノエート)(P3HA)を高収量で生合成することを目的としたプロジェクト研究を行った。グリセリンだけを炭素源とすると3つのヒドロキシ基の存在のためP3HAの収量があまり高くないが、脂肪酸を添加した混合基質では微生物*Eutropha*および*Putida*によるP3HAの収量は30～50%の増大が見られた。またグリセリンとアミノ酸であるロイシンの混合基質をリンフリーの条件下で*Eutropha*により培養すると、収量は約3倍に増加することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Plant oils are composed of triglycerides. Glycerin is derived from plant oil, however glycerin is not widely used in industrial applications. As for poly(3-hydroxyalkanoate) (P3HA) biosynthesis from glycerin, there have been only a small number of studies reported because glycerin is not a good carbon source for PHA biosynthesis. When the mixed substrate of glycerin and fatty acid is used as carbon sources for biosynthesizing P3HA by *Ralstonia eutropha*, we found that the addition of small amount of fatty acid to glycerin makes the polymer yield enhance. The polymer yield is about 1.3 times larger than the use of original carbon sources. Amino acids are another good carbon source to accumulate P3HA. In this case, phosphate-free medium was used because amino acid itself contains nitrogen. The cultivation of leucine and glycerin as carbon sources successfully improved the polymer yield with 3 times larger polymer yield than the original ones.

研究分野：高分子化学

キーワード：ポリ(3-ヒドロキシアルカノエート) 生合成 グリセリン 脂肪酸 アミノ酸 収量

1. 研究開始当初の背景

廃油から製造されるバイオディーゼル燃料 (BDF) の副生成物で応用範囲が限定的なグリセリンを炭素源として利用し、微生物を用いたバイオプラスチックの生合成を行う。グリセリンは単体では炭素源としてバイオプラスチックの生合成には適さないが、微生物 *Eutropha* を用いて少量の脂肪酸を加えることで劇的にバイオプラスチック生合成の収率を向上させることに成功した。この成果を用いて、その他の炭素源との混合基質からバイオプラスチックの効率的な製造過程について検討を行う。

2. 研究の目的

グリセリンの有効利用を目指して、脂肪酸やアミノ酸などの炭素源との混合基質により微生物を用いたポリエステル生合成を行い、収率の向上を目指す。

3. 研究の方法

微生物としては炭素数が 5 以下の繰り返しユニットを生合成する *Eutropha* および炭素数が 5 以上のユニットを生合成する *Putida* を用いた。窒素あるいはリンを含まない培養液で、グリセリンに少量の脂肪酸およびアミノ酸を混合した基質を炭素源として、菌体内にバイオポリエステルであるポリ(3-ヒドロキシアルカノエート) (P3HA) を蓄積させる。蓄積した P3HA はクロロホルムで抽出して取り出す。

4. 研究成果

(1) *Putida* によるグリセリン/ノナン酸から P3HA の生合成

これまでの研究で、*Eutropha* の培養においてグリセリンに少量の脂肪酸を添加した混合基質を炭素源に用いたところ収率の増加が確認された。しかし *Eutropha* では結晶化度の高い炭素数 4 のブチレートと炭素数 5 のバリレートの共重合しかできない。そこで、炭素数が 5 以上の繰り返しユニットを生合成する *Putida* の培養でもグリセリンにノナン酸を添加した時の収量の増大について検討した。図 1 は炭素源としてグリセリンと脂肪酸であるステアリン酸の混合基質を用いたときの代謝への影響を調べるため、グリセリンの濃度を 20 m モルで一定とし、異なる濃度

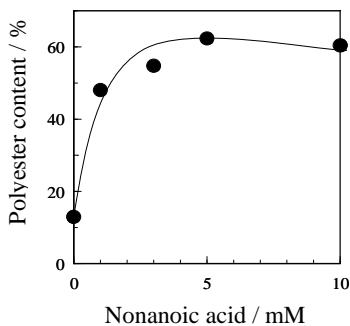


図 1. グリセリン 20m モルに対して所定の量のノナン酸を加えて培養した時の P3HA の収率

のノナン酸を添加して培養したときの収率をプロットした図である。グリセリンだけのときの収率は 12.9 % であるがノナン酸を加えると、大体 50 % 以上となり、特にノナン酸 5 mM を添加した場合に最も高い収率の、62.4 % に達した。¹⁾ このことから、グリセリンに脂肪酸を添加することで、*Putida* による PHA 生合成にグリセリンを有効利用できると思われる。

(2) *Eutropha* によるグリセリン/イソロイシンから P3HA の生合成

天然のアミノ酸は 20 種類あり、P3HA の生合成の炭素源として使用することができるが、従来から広く行われている窒素フリーの条件下では、アミノ酸自体に窒素原子を含むため収率が上がらなかった。²⁾ そこで我々はリンフリーの条件下で *Eutropha* を用いて P3HA の蓄積を行ったところ、ロイシン、イ

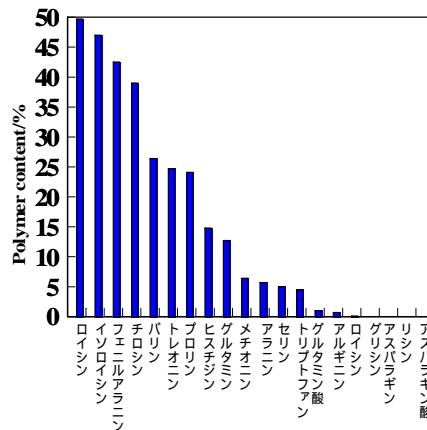


図 2. リンフリーの条件下で *Eutropha* により 20 種類のアミノ酸を炭素源として培養し、得られた P3HA の収率。

ソロイシン、フェニルアラニン、チロシンの 4 つが 40% を超える高収率で P3HA が得られた。(図 2) ³⁾ そこでグリセリンに添加する炭素源としてロイシンとイソロイシンを用いて検討した。

図 3 はグリセリン 30mM に対してイソロイシンの添加量を変えた混合基質で培養して、得られた P3HA の収量(棒線青)である。比較のために、グリセリンとイソロイシンの単体を培養した時の収量の足し合わせを示した。いずれの場合も混合基質とした方が収量が高くなり、混合基質とすることの有効性が確認された。特にイソロイシンを 15mmol 添加した時に、最も収量が大きくなり、単体の時よりも約 2.2 倍多くなった。

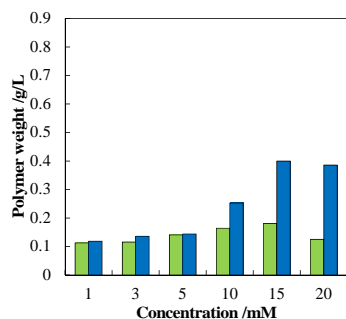


図3 .グリセリン 30m モルに対して所定の量のイソロイシンを加えて培養した時の P3HA の収量 (青：混合基質、緑：単体で培養した時の収量の足し合わせ)

(3) *Eutropha* によるグリセリン/ロイシンから P3HA の合成

アミノ酸としてロイシンを用いて、グリセリンに添加した混合基質により *Eutropha* で培養を行った。図4はグリセリン 30mM に対してロイシンの添加量を変えた混合基質で培養して、得られた P3HA の収量 (棒線青) である。比較のために、グリセリンとロイシンの単体を培養した時の収量の足し合わせを緑で示した。イソロイシンの時と同様、P3HA の収量は混合基質とした方が単体で得られた P3HA の収量より大きくなった。特にロイシンを 30mモル加えたときは、収量が単体の時よりも約 3.3 倍になった。このことからグリセリンの混合する炭素源としてはイソロイシンよりもロイシンを用いた方が、効果が高いことが明らかになった。

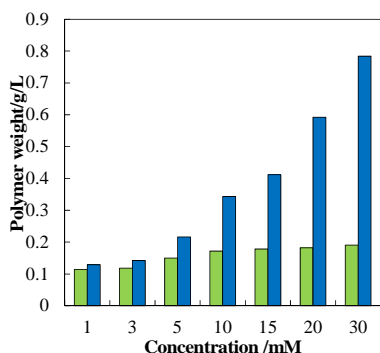


図4 .グリセリン 30m モルに対して所定の量のロイシンを加えて培養した時の P3HA の収量 (青：混合基質、緑：単体で培養した時の収量の足し合わせ)

(4) グリセリンと他の炭素源の混合効果

以上のことから、当初グリセリンに対してリノール酸メチルの添加効果が P3HA の収量増加に寄与することが研究の動機であった。本プロジェクトでは、ノナン酸、イソロイシン、ロイシンの添加効果について検討を行った。P3HA 収量は図5にまとめた。グリセリンに対して脂肪酸およびその誘導体では

P3HA の収量増加が見られたが、収量の増大は2倍以下で、あまり大きくなかった。一方アミノ酸であるイソロイシンやロイシンを用いると劇的な収量増加が見られ、図4で示すようにロイシンではリノール酸メチルを用いる時と比較して約8倍の収量の P3HA を得ることに成功した。

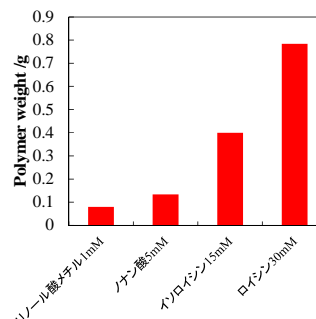


図5 .グリセリンにそれぞれの炭素源を加えた混合基質で培養して得られた P3HA の収量。

<引用文献>

- T. Miura, D. Ishii, and T. Nakaoki, Production of Poly(3-hydroxyalkanoate)s by *Pseudomonas putida* Cultivated in a Glycerol/Nonanoic Acid-Containing Medium, *J. Polym. Environ.*, **21**, 2013, 760-765
- H. Kimura, K. Mouri, M. Takeishi, and T. Endo, Production and Characterization of Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) from L-Valine by *Ralstonia eutropha* Bull. Chem. Soc. Jpn. 76, (2003) 1775-1781.
- T. Miura, D. Ishii, and T. Nakaoki, Production of Poly(3-hydroxyalkanoate)s by *Pseudomonas putida* Cultivated in a Glycerol/Nonanoic Acid-Containing Medium, *J. Polym. Environ.*, **21**, 2013, 760-765

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- M. Sakamoto, Y. Kimura, D. Ishii, and T. Nakaoki, Biosynthesis of Poly(3-hydroxyalkanoate) from Amino Acids in Medium with Nitrogen, Phosphate, and Magnesium, or some Combination of these Nutrients, *J. Polym Environ.* (査読有) **22**, 2014, 488-493. DOI: 10.1007/s10924-014-0656-9
- T. Miura, D. Ishii, and T. Nakaoki, Production of Poly(3-hydroxyalkanoate)s by *Pseudomonas putida* Cultivated in a Glycerol/Nonanoic Acid-Containing Medium, *J. Polym. Environ.*, (査読有) **21**, 2013, 760-765. DOI: 10.1007/s10924-013-0588-9

〔学会発表〕(計 6 件)

J. Yasui, R. Yamagishi and T. Nakaoki,
Relationship between Mechanical
Properties and Molecular Structures of
P(3HBV-block-3HB) Copolymer
Biosynthesized by *Wautersia eutropha*,
The 10th SPSJ International Polymer
Conference (IPC 2014), 2014 年 12 月 2
日 ~ 5 日, つくば国際会議場 (茨城県)

安居 潤哉・山岸 理沙・中沖 隆彦、*W.*
eutropha を用いて生合成した
P(3HBV-block-3HB)ブロック共重合体
の引張特性、第 63 回高分子討論会 2014
年 9 月 24 日 ~ 26 日、長崎大学 (長崎県)

安居 潤哉・山岸 理沙・中沖 隆彦、*W.*
eutropha を用いたポリ(ヒドロキシブチ
レート-*b*-ヒドロキシバリレート)ブロッ
ク共重合体における力学物性の検討、織
維学会年次大会、2014 年 6 月 11 日 ~ 13
日、タワーホール船堀 (東京)

安居 潤哉・山岸 理沙・中沖 隆彦、*W.*
eutropha を用いたポリ(ヒドロキシブチ
レート-*b*-ヒドロキシバリレート)ブロッ
ク共重合体の生合成と力学物性、高分子
学会年次大会、2014 年 5 月 28 日 ~ 30
日、名古屋国際会議場 (愛知県)

中沖 隆彦・高橋 輝行・安居 潤哉、*P.*
putida によるバイオディーゼル燃料の副
生グリセリンを炭素源としたポリ(3-ヒ
ドロキシアлкаノエート)の生合成、高
分子討論会、2013 年 9 月 11 日 ~ 13 日、
金沢大学 (石川県)

佐篠慶・野出明奈・石井大輔・中沖隆彦、
バイオディーゼル燃料合成時に副生する
グリセリンからのポリヒドロキシアлка
ノエートの生合成、高分子討論会、2012
年 9 月 19 日、名古屋工業大学 (愛知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沖 隆彦 (NAKAOKI, Takahiko)
龍谷大学・理工学部・教授
研究者番号: 90257824

(2) 研究分担者

石井 大輔 (ISHII, Daisuke)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
特任助教
研究者番号: 70415074