

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850064

研究課題名(和文) 副生グリセリン利用を指向したキラル酸化バイオプロセスの高度化と応用

研究課題名(英文) Development of enantioselective oxidation of glycerol by microbial fermentation for efficient utilization of raw glycerol and its application to functional chemicals

研究代表者

佐藤 俊 (Sato, Shun)

独立行政法人産業技術総合研究所・環境化学技術研究部門・主任研究員

研究者番号：10586605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオディーゼル燃料製造過程で排出される副生グリセリンの有効利用のため、メタノール等の不純物を含む副生グリセリンを直接原料とするD-グリセリン酸生産のための技術開発、および得られたグリセリン酸の誘導体化による機能性材料の創出を目的とした。グリセリン酸の生産菌である酢酸菌の中でも、メタノール資化性菌を利用することで、メタノール存在下でグリセリン酸生産能が向上する現象を見出した。また、グリセリン酸の誘導体化により、新しい構造および性質を有する両親媒性化合物を合成し、新たな機能性材料と成り得ることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Glycerol becomes alternative and attractive feedstock for chemical production due to rapid increase of biodiesel fuel utilization. Some acetic acid bacteria are known to produce large amount of D-glyceric acid from glycerol. However, raw glycerol derived from biodiesel fuel production contains impurities like methanol, which would cause a severe decrease in yield of glyceric acid. In this study, enantioselective oxidation of glycerol derived from biodiesel fuel production was investigated by using a methanol-assimilating acetic acid bacterium. Application of glyceric acid to functional chemicals was also investigated. The methylotrophic acetic acid bacterium used in this study could produce larger amount of glyceric acid from glycerol in the presence of methanol than that in the absence of methanol. Also, glyceric acid was successfully converted to amphiphilic compounds, and these compounds showed superior amphiphilic properties compared with those of commercial detergents.

研究分野：応用微生物、生体高分子、分子生物学

キーワード：グリセリン酸 グリセリン メタノール 酢酸菌

1. 研究開始当初の背景

再生可能資源を利用したエネルギー・物質生産プロセスの開発は、持続発展可能な社会構築のために重要である。中でも、植物油や動物油脂を原料に生産可能なバイオディーゼル燃料は、バイオマスエネルギーとしてヨーロッパやアジア、南アメリカ諸国で生産量が急増している。バイオディーゼル燃料の多くは、油脂とメタノールを反応させて製造されており、このプロセスにおいて、原料に対して10%程度のグリセリンが副生する。そのため、この副生グリセリンを化学品原料として利用することが期待されているものの、グリセリンの純度が低いことから、不純物除去などの分離精製が必要とされてきた。しかし、既存のグリセリン生産プロセスに比べて経済性に劣ることから、副生グリセリンは、精製されず燃焼処分されるものも存在している。そのため、資源有効利用の観点から、分離精製などの前処理を必要とせず、副生グリセリンを直接原料として利用できる化学品生産技術の開発が期待されていた。

この課題に対し、近年、酢酸菌によるグリセリン酸(2,3-ジヒドロキシプロパン酸)の生産プロセスが開発された(図1)。これは、グリセリンを原料とし、量産可能かつ光学純度99%以上のD体を生産できる優れた技術である(引用文献①)。D-グリセリン酸は、植物に含まれる微量有機酸の一種として見出された化合物で、細胞内での糖代謝中間体の一部でもあることが知られている。そのため、グリセリン酸およびその誘導体は、生理活性物質としての高いポテンシャルが期待されており、これまでも、エタノール代謝促進作用や細胞賦活効果が明らかとなっている(引用文献②)。加えて、バイオベースポリマーの原料としても有用であることが見出されるなど(引用文献③)、グリセリン酸は幅広い応用が見込まれる化学品である。

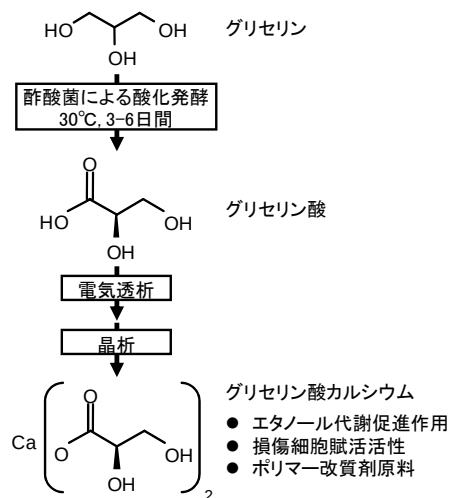


図1 酢酸菌によるグリセリン酸生産プロセス

酢酸菌によるD-グリセリン酸生産プロセスは、キラル化合物をバイオマス資源から1段階で合成できる優れた手法である。しかし、バイオディーゼル燃料製造プロセスで排出される副生グリセリンに含まれる不純物により、グリセリン酸の生産性が大きく低下することが明らかになりつつある。特に、不純物として含量の多いメタノールは、酢酸菌の生育や酸化触媒反応に対する影響が大きいと推測される。ところで、酢酸菌の中には、メタノールを唯一の炭素源として生育可能なメタノール資化菌が存在する。中でも、アシドモナス菌は、グリセリンでも生育可能であることが知られており(引用文献④)、副生グリセリンのようなメタノール含有グリセリンを原料とする場合、他の酢酸菌では悪影響となるメタノールを生育に利用できるなど、非常に有利となる可能性が考えられる。しかし、これまでにアシドモナス菌等の酢酸菌に属するメタノール資化菌を利用したグリセリン酸生産に関する報告は知られていなかった。

キラル化合物は、医薬品や生理活性物質の合成における基幹物質として広く利用されており、その重要性はますます増加している。キラル化合物の合成では、有機金属触媒の開発が精力的に進められており、高いエナンチオ選択性を示す触媒が開発されている。しかし、有害な重金属や有機溶媒の利用、高温高压といった高エネルギーを必要とする反応条件等の問題がある。これに対し、微生物や酵素等のバイオ触媒を利用するキラル化合物の合成技術は、重金属のような有害物質を必要としない、水を溶媒として利用できる、常温常圧下で反応が進行するなど、有機金属触媒の問題点を解決できる優れた触媒技術である。そのため、キラル化合物の重要性の増加とともに、バイオ触媒はキラル化合物合成における有力な技術として期待されている。

2. 研究の目的

バイオディーゼル燃料製造過程で排出される副生グリセリンの有効利用のため、グリセリンを原料とする酢酸菌によるD-グリセリン酸生産技術が開発されてきた。しかし、副生グリセリンに含まれる不純物存在下ではグリセリン酸の生産性低下が課題であった。そこで本研究では、副生グリセリンを精製せず直接利用可能なD-グリセリン酸の生産技術開発を目的とした。さらに、グリセリン酸生産プロセスの応用展開として、得られたD-グリセリン酸の誘導体化により両親媒性化合物へと変換し、D-グリセリン酸をベースとする新たな機能性化合物の創出を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、従来のグリセリン酸生産菌と同じ酢酸菌に分類される、メタノール資化能を有するアシドモナス菌 (*Acidomonas methanolica* NBRC104435^T) を用いて、不純物の中でも含量の多いメタノール存在下でのグリセリン酸生産を検討した。

A. methanolica のグリセリン酸生産能およびメタノール資化能を調べるため、ポリペプトン (5 g/L)、酵母エキス (5 g/L)、および硫酸マグネシウム7水和物 (1 g/L) を含む培地に炭素源 (グリセリン、メタノール) を 0-10% 加えて 30℃ で 4 日間振とう培養した。培養液中に蓄積されたグリセリン酸、および残存しているメタノールは、高速液体クロマトグラフィーで定量的に評価した。また、菌の増殖は分光光度計を用いて培養液の濁度 (OD600) で評価した。

D-グリセリン酸の変換では、ヒドロキシ基およびカルボキシル基を、アシル化、アミド化、およびグルコシル化の手法を用いて修飾した。得られた化合物は、核磁気共鳴スペクトルおよび液体クロマトグラフィー/質量分析で構造を確認した。また、物性評価として、水の表面張力低下能を測定し、界面活性物質としての評価を行った。

4. 研究成果

まず、*A. methanolica* のグリセリン酸生産能を調べるため、グリセリンのみを炭素源に培養し、菌の増殖および生産物の評価を行った。その結果、*A. methanolica* はグリセリンからグリセリン酸を生産していることが確認された。また、メタノールを炭素源に培養した場合にも良好な生育を示した。そこで、メタノール存在下でのグリセリン酸生産能を調べるため、グリセリンとメタノールの両方を添加した条件でグリセリン酸の生産能を調べると、メタノールが存在する条件下において、優れたグリセリン酸生産能を示すことを見出した (図 2)。

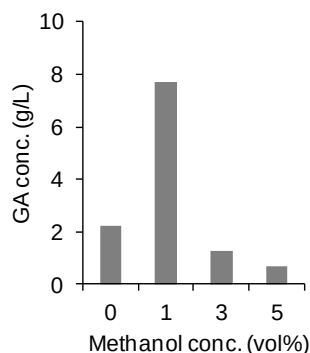


図 2 *A. methanolica* によるメタノール存在下での 5 wt%グリセリンからのグリセリン酸生産

そこで、メタノール存在下でのグリセリン酸生産条件の最適化を検討した。その結果、グリセリン 3%、および、メタノール 1%の条件下で、培養液中に 10 g/L 以上のグリセリン酸を生産可能であることを明らかにした。

これらの結果は、本菌の有するグリセリン酸生産酵素およびメタノール代謝酵素が、メタノール存在下でのグリセリン酸生産において有用であることを示唆していると考えられた。そこで、さらなる生産性向上のためには、*A. methanolica* のメタノール代謝関連酵素およびグリセリン酸生産酵素遺伝子を、グリセリン酸高生産株であるグルコノバクター菌に組換えるための技術開発も必要であると考えられる。今後、培養プロセスの改良を合わせて展開させることで、副生グリセリンからのグリセリン酸高生産プロセス開発が期待される。

一方で、D-グリセリン酸をベースとする新たな機能性化合物の創出では、グリセリン酸の 2 つのヒドロキシ基をアシル化することで両親媒性の化合物を合成し、その物性評価を行った。その結果、アシル鎖長の選択により水溶性を変化させることが可能であることが分かった。また、中鎖ジアシル誘導体のナトリウム塩は、良好な水の表面張力低下能を示し、ドデシル硫酸ナトリウムやドデカン酸ナトリウム等の市販の界面活性剤よりも優れていることを明らかにした。

また、グリセリン酸に親水部と疎水部の両方を導入した両親媒性化合物の合成を試みた。親水部として糖構造を酵素反応で導入し、疎水部としてアルキル鎖をグリセリン酸のカルボキシル基を利用して導入した。得られた化合物は、良好な水溶性を示す両親媒性の化合物であり、新しい構造の糖型界面活性剤となり得ることが分かった。今後、これら化合物の詳細な物性および集合体構造の評価を進めることで、グリセリン酸をベースとする新しい機能性素材としての展開が期待される。

<引用文献>

- ① H. Habe, Y. Shimada, T. Yakushi, H. Hattori, Y. Ano, T. Fukuoka, D. Kitamoto, M. Itagaki, K. Watanabe, H. Yanagishita, K. Matsushita, K. Sakaki. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, 75, 7760-7766.
- ② H. Habe, S. Sato, T. Fukuoka, D. Kitamoto, K. Sakaki. *J. Oleo Sci.*, **2011**, 60, 585-590.
- ③ T. Fukuoka, S. Ikeda, H. Habe, S. Sato, H. Sakai, M. Abe, D. Kitamoto, K. Sakaki. *J. Oleo Sci.*, **2012**, 61, 343-348.
- ④ J. Frebortova, K. Matsushita, O. Adachi. *J. Ferment. Bioeng.*, **1997**, 83, 21-25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 佐藤 俊、羽部 浩、グリセロールを原料とする *Acidomonas methanolica* によるグリセリン酸生産、平成 26 年度油化学関連シンポジウム、2014 年 10 月 31 日～11 月 1 日、琉球大学千原キャンパス（沖縄県・中頭郡石原町）
- ② 佐藤 俊、羽部 浩、メタノール資化性酢酸菌によるメタノール含有グリセリンからのグリセリン酸生産、第 3 回 JACI/GSC シンポジウム、2014 年 5 月 22 日～23 日、東京国際フォーラム（東京都・千代田区）
- ③ 佐藤 俊、北本 大、羽部 浩、メチロトロフ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* のメタノール含有グリセリンからのグリセリン酸生産能、日本油化学会第 52 回年会、2013 年 9 月 3 日～5 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県・仙台市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 俊（SATO, Shun）

独立行政法人産業技術総合研究所・環境

化学技術研究部門・主任研究員

研究者番号：10586605

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし