

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22928

研究課題名（和文）「大気窒素」活用型次世代発酵技術の基盤開発と循環型社会の構築

研究課題名（英文）Development of bases on next-generation fermentation technology using atmospheric nitrogen and construction of sustainable society

研究代表者

橋本 渉（Hashimoto, Wataru）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：30273519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* が、窒素源として「大気窒素」を活用し、バイオディーゼル生産時に副生する「廃グリセロール」を前処理（脱脂や中和）なく資化することにより、有用なバイオポリマー（アルギン酸とポリヒドロキシ酪酸（PHB））を合成した。アルギン酸とPHBの合成は拮抗するため、アルギン酸合成欠損株のPHB生産を調べた結果、欠損株では野生株と比較して顕著にPHBの生産レベルが向上した。「廃グリセロール」からのPHB高生産にもアルギン酸合成の遮断が有効であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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」から生体適合医療素材と生分解性プラスチック素材を生産する新たな「大気窒素」活用型発酵技術の基盤を開発することができた。「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、循環型社会や脱炭素社会の形成〔持続可能な開発目標（SDGs）の達成〕に貢献し、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に展開できる。

研究成果の概要（英文）：Biodiesel is an important eco-friendly fuel, although crude glycerol, a byproduct of the fuel production process, is expected to be more and more utilized. This study aimed to develop a next-generation fermentation technology using an atmospheric nitrogen-fixing bacterium to utilize crude glycerol. *Azotobacter vinelandii* exhibited a significant growth on tap water-diluted crude glycerol without any pretreatment, and produced useful polymers such as polyhydroxybutyrate and alginate in crude glycerol minimal medium supplemented with some faint minerals. This study indicates that it is possible to develop a technology to produce industrially useful polymers from crude glycerol by energy-saving and -efficient microbial fermentation using atmospheric nitrogen.

研究分野：応用微生物学

キーワード：アルギン酸 大気窒素 窒素固定細菌 バイオディーゼル 廃グリセロール ポリヒドロキシ酪酸

1. 研究開始当初の背景

世界人口は増加の一途を辿り、それに見合う食糧生産が喫緊の課題となっている。その解決策として、農作物の単位当たりの増収または砂漠や塩害地域での生育を可能とする研究が進められている。植物は「大気窒素 (N₂)」を直接利用することができないため、窒素、リン、カリウムが植物肥料の三大必須元素として重要である。そのため、ハーバー・ボッシュ法¹⁾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、農作物の増収に繋がっている。その半面、本反応は高温・高圧の条件下で行われ、莫大なエネルギーを必要とし、二酸化炭素の排出も伴う。また、余剰の窒素化合物が硝酸態窒素として土壤汚染を引き起こしている。一方、「生物学的窒素固定」は、一部の微生物により「大気窒素」を酵素ニトロゲナーゼによりアンモニアに変換し、生態系における窒素循環と植物（農作物）の生育に重要な役割を果たしている。したがって、循環型社会の構築と省エネルギーの観点から、「生物学的窒素固定」の割合を高めることが極めて肝要である²⁾。

脱炭素社会の実現に向けて、欧州を中心に植物油からバイオディーゼル (BDF) が製造されている³⁾。日本においても、廃食用油からメタノール存在下でアルカリ触媒を用いたエステル交換反応により BDF が生産されている。バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議では、BDF 生産量は今後も顕著に増大すると見積もられている。一方、BDF 製造時に、グリセロールが副生する。このグリセロールには、アルカリ触媒と未反応の物質（油脂とメタノール）が混入するため、高 pH で且つ不純物を多く含む「廃グリセロール」として、その利活用が緊要な課題となっている⁴⁾。近年、「廃グリセロール」の堆肥発酵促進剤やボイラー燃料としての利用も検討されつつあるが、抜本的な解決には至っていない。

2. 研究の目的

分子状窒素 (N₂) は、大気中の約 78% を占める最多の分子であり、分子内の三重結合により極めて安定である。一方、核酸やタンパク質をはじめとして、生物体内に存在する化合物の多くは窒素分子の三重結合の切断と掛け替えによって生じた窒素原子を含んでいる。安定な「大気窒素」を利用するため、化学的窒素固定（ハーバー・ボッシュ法）によるアンモニア合成が行われているが、環境への配慮からエネルギー消費や二酸化炭素排出に対する削減が求められている。一方、「大気窒素」をアンモニアに変換する窒素固定微生物が窒素の循環に重要な役割を果たしており、窒素固定微生物の例として、植物の生長に寄与する植物共生根粒菌などがよく知られている⁵⁾。脱炭素社会や循環型社会を構築するに当たり、生物学的窒素固定を推進することは、化学的窒素固定の低減化に繋がり、炭素のみならず窒素の循環にも大きく貢献する。本研究では、窒素源（含窒素化合物）を必要とする従来の発酵法とは異なり、窒素固定細菌 (*Azotobacter vinelandii*⁶⁾) による「大気窒素」を積極的に利活用する次世代の発酵技術を開発し、廃棄物や難利用資源から有用物質（アンモニア、アミノ酸、バイオプラスチックなど）を生産することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 材料と微生物

BDF 製造時に副生する「廃グリセロール」は京都市廃食用油燃料化施設より提供された。窒素固定細菌として、*A. vinelandii* ATCC 12837 を用いた。本菌のアルギン酸合成欠損株は AlgD (GDP-マンノース 6-デヒドロゲナーゼ) 遺伝子が破壊された変異株⁷⁾を用いた。窒素固定細菌の培養には、窒素源を新たに添加することなく、炭素源を添加した modified Burk's (MB) 培地を用いた。「廃グリセロール」液体培地での生菌数は、寒天培地を用いたコロニー形成単位 (CFU) を測定することにより算出した。

(2) ポリヒドロキシ酪酸 (PHB) 合成欠損株の育種

PHB 合成に関わる PHB ポリメラーゼ (PhbC) 遺伝子を破壊することにより、PHB 合成欠損株を育種した⁸⁾。具体的には、*A. vinelandii* 野生株より当該遺伝子をクローニングし、本遺伝子の中央にテトラサイクリン耐性遺伝子を挿入した遺伝子断片を調製した後、自然形質転換法により、PHB 合成欠損株を育種した。

(3) グリセロールの定量

「廃グリセロール」培地中のグリセロール濃度は、F-kit グリセロール (J.K. インターナショナル) を用いた酵素法により測定した。

(4) バイオポリマーの定量

窒素固定細菌が産生する二種類のバイオポリマー (PHB とアルギン酸) の定量は、以下の通り行った^{7,8)}。PHB については、培養菌体を凍結乾燥し、有機溶媒による抽出物を加熱処理後、ガスクロマトグラフィー (GC) (島津 GC-2014) に供した。3-ヒドロキシ酪酸を標準物質として GC チャートより、PHB の濃度を算出した。菌体外に分泌されたアルギン酸は、培養濾液を回収し、硫酸-カルバゾール法により定量した。

(5) 電子顕微鏡解析

株式会社東海電子顕微鏡解析にて、*A. vinelandii* の細胞の超薄切片を調製し、透過型電子顕微鏡(JEOL JEM-1200EX)により PHB 生産を解析した。アルギン酸分泌を解析するため、*A. vinelandii* の細胞を走査型電子顕微鏡(日立 SU8230)を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 窒素固定細菌 *A. vinelandii* は「廃グリセロール」を資化する

一般に、BDF 製造時に副生する「廃グリセロール」は、高い pH を示し、未反応の油脂やメタノールを含む。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する。実際に、「廃グリセロール」から有用物質(有機酸、モノオール、ジオール、及び油脂)の微生物生産が報告されているが、「廃グリセロール」による微生物の生育阻害を認められている⁹⁾。本研究で用いた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」についても、その組成は 45%グリセロール、13%メタノール、25%油脂、及びその他の微量な不純物であり、アルカリ性(pH 9.3)を示す。そこで、本研究では、「廃グリセロール」を脱脂や中和などの前処理を必要とせず、「廃グリセロール」を炭素源とする極めて単純な培地での有用物質生産を試みた。

本研究者は、窒素固定細菌 *A. vinelandii* が精製された「純グリセロール」を良好に資化し、その際に有用なバイオポリマー(アルギン酸と PHB)を生産することを見いだしている⁷⁾。アルギン酸は生体適合医療素材(例:手術糸)として、PHB は生分解性プラスチック素材として利用されている。他の殆ど全ての微生物が生育に必要とする窒素源を新たに添加することなく、窒素固定細菌は「大気窒素」を窒素源として利用できる。*A. vinelandii* による「廃グリセロール」資化性を評価するため、本菌の生育 pH を調べた結果、pH 9 以上でも本菌は良好に生育することがわかった。そこで、「廃グリセロール」を炭素源として水道水のみで段階希釈した寒天培地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」寒天培地で本菌の生育が確認できた(図 1 上)。したがって、脱脂や中和などの前処理することなく「廃グリセロール」を水道水で希釈するだけで、*A. vinelandii* が生育することが判明した。

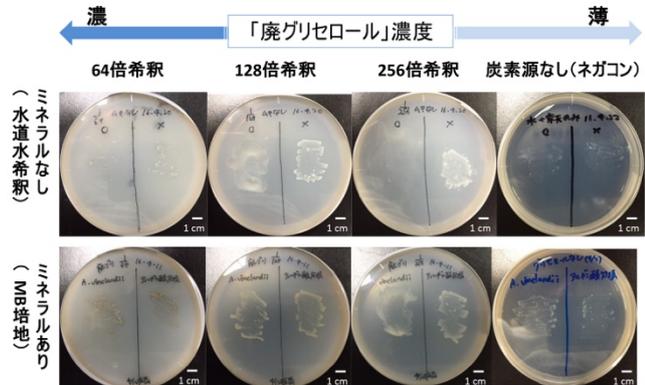


図 1. 「廃グリセロール」寒天培地での *A. vinelandii* の生育

微量のミネラルを添加した「廃グリセロール」MB 培地で培養すると、本菌の生育が促進された(図 1 下)。一方、炭素源を添加していない寒天培地でも生育が若干認められたことから(図 1 右)、寒天に含まれる成分の一部が本菌の栄養素となることが考えられた。そのため、「廃グリセロール」液体培地での生育とグリセロール資化性を調べた。その結果、水道水で 256 倍希釈しただけの「廃グリセロール」液体培地でも生育が認められたが、培地中のグリセロールは完全には消費されなかった(図 2 左)。そこで、256 倍希釈「廃グリセロール」MB 液体培地を用いたところ、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た(図 2 右)。

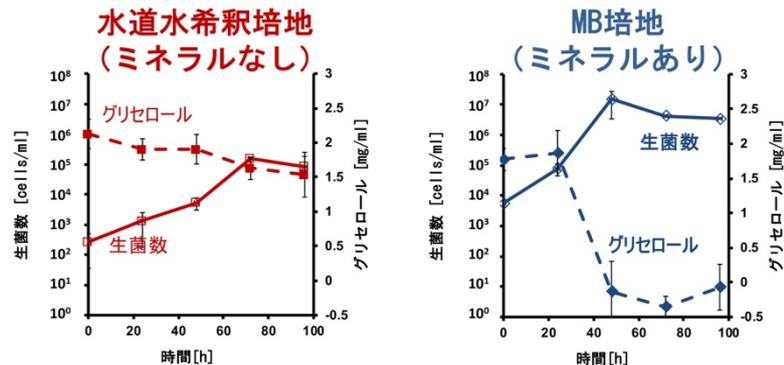


図 2. 「廃グリセロール」培地での *A. vinelandii* の生育とグリセロール資化

「廃グリセロール」の濃度(希釈倍率)、温度、及び通気量(震盪速度)の観点から、最適な生育条件を調べた(図 3)。その結果、「廃グリセロール」濃度については、128 倍希釈では殆ど生育が認められなかった。256 倍希釈では培地中のグリセロールが途中で枯渇するため(図 2 右)、グリセロール含量及び不純物による生育阻

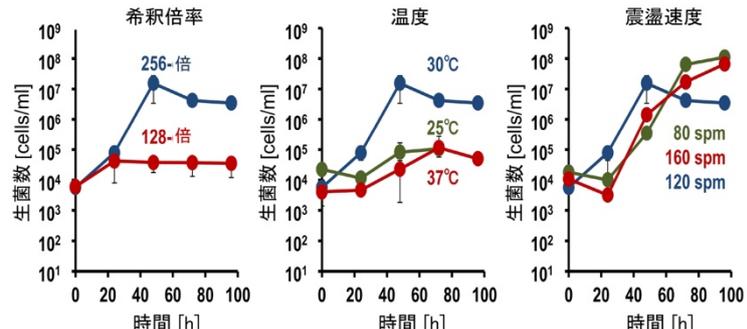


図 3. 「廃グリセロール」培地での *A. vinelandii* の最適生育条件

害の二つの要素の影響から、128~256 倍希釈に最も生育に適した濃度があることが示唆された。培養温度については、今回試した 3 つの温度では、30°C での培養で最も良好に生育した。振盪速度については、80 strokes/min (spm)、120 spm、及び 160 spm では生育挙動に顕著な相違が認められず、一定の振盪速度以上では、即ち培養液中の窒素・酸素濃度が一定値以上であれば、良好に生育できることがわかった。以上の結果から、最終的には、MB 培地を用いて、「廃グリセロール」希釈率：256 倍、温度：30°C、震盪速度：120 spm の生育条件で以降の実験を行った。

(2) 「廃グリセロール」からのアルギン酸生産

A. vinelandii が「廃グリセロール」を資化したため、その際のアルギン酸合成を評価した。野生株は、対数増殖期後期あたりから定常期にかけてアルギン酸を分泌生産した (図 4 左)。*A. vinelandii* は、生育環境が悪化すると、シストという芽胞様の生存形態を示し、アルギン酸を外皮としてシストを覆うことが知られている⁶⁾。高濃度の「廃グリセロール」では、本菌の生育が抑制されることから、本菌にとって「廃グリセロール」は環境ストレスの一要因であると示唆される。そのため、「廃グリセロール」培地でアルギン酸を生産することは、栄養細胞からシストへの変換プロセスが促進されている可能性がある。

A. vinelandii はアルギン酸と PHB の二つのバイオポリマーを生産するため、両者の合成は競合する。これまでに、単一のポリマー生産菌に改変することにより、その生産量が增大することが報告されている¹⁰⁾。そこで、PHB ポリメラーゼ (PhbC) 遺伝子破壊株 ($\Delta phbC$) を育種し、アルギン酸生産の増大を試みた。その結果、遺伝子破壊株は、「廃グリセロール」MB 培地で良好な生育を示さず、アルギン酸の生産量も低レベルのまま推移した (図 4 右)。PHB 合成欠損株は増殖不良を示すため¹⁰⁾、アルギン酸の合成量が增大しなかった要因の一つとして、栄養細胞が増殖せずに少ない細胞数で速やかにシストに移行したことが考えられた。

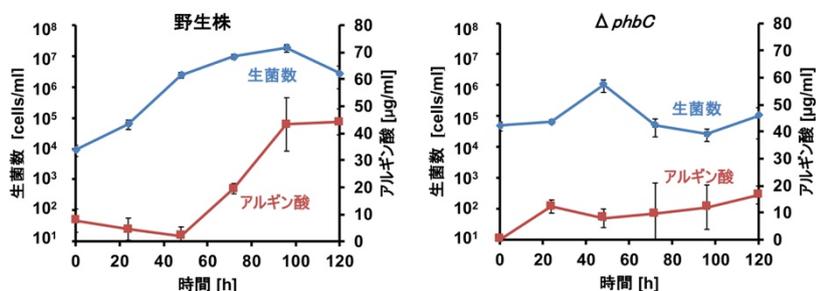


図 4. 「廃グリセロール」からのアルギン酸生産

(3) アルギン酸合成欠損株は「廃グリセロール」から著量の PHB を生産する

A. vinelandii は、アルギン酸に加えて、PHB を細胞内に生産する。そこで、「廃グリセロール」からの PHB 生産を電子顕微鏡により定性的に評価した。その結果、「廃グリセロール」MB 培地で定常期まで培養した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、細胞内に油滴状の PHB 顆粒を生産することが判明した (図 5 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た (図 5 右)。一方、対数増殖期の細胞では繊維状物質が産生されていなかった。この知見は、図 4 左の結果とよく一致した。以上のことから、*A. vinelandii* は、「廃グリセロール」から細胞内に PHB を蓄積し、細胞外にアルギン酸を分泌することが明らかになった。

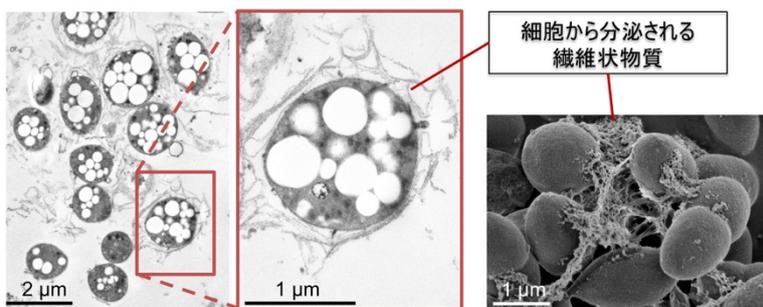


図 5. 「廃グリセロール」資化における *A. vinelandii* の細胞構造

「廃グリセロール」MB 培地での PHB 合成欠損株によるアルギン酸の増産は達成されなかったが、アルギン酸合成欠損株 ($\Delta algD$) を用いて PHB の大量生産を図った。その結果、対数増殖期後期または定常期から野生株 (図 6 左) と欠損株 (図 6 中) とともに PHB の生産が認められた。

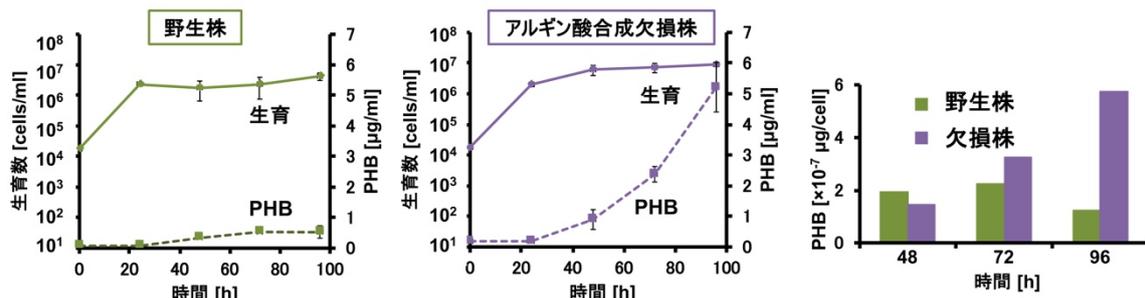


図 6. 「廃グリセロール」からの PHB 生産

野生株と比較して、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 倍に増大した (図 6 右)。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は、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わかった。

【本研究成果のインパクトと今後の展望】

窒素固定細菌 *A. vinelandii* が、新たに窒素源を添加することなく、BDF 生産時に副生する「廃グリセロール」から有用なバイオポリマー (アルギン酸と PHB) を合成した。「廃グリセロール」は油分を含み高 pH を示すが、本菌は、脱脂や中和などの前処理をせずに、単に微量ミネラルを含む水溶液で希釈するだけで「廃グリセロール」を資化した。アルギン酸合成欠損株では野生株と比較して顕著に PHB の生産レベルが向上したことから、「廃グリセロール」からの PHB 高生産にアルギン酸合成経路の遮断が有効であることを明らかにした。

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」から生体適合性材料や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る。

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や、海洋資源としての「ブルーカーボン」からの有用物質生産も期待される。既に、土壌より窒素固定細菌を新たにスクリーニングし、「大気窒素」を窒素源とする条件下で良好に生育する細菌を分離した。16S rRNA 解析により本細菌を *Azotobacter tropicalis* と同定した。本菌はブルーカーボンとして高度利用が求められているマンニトールを良好に資化することがわかり、*A. vinelandii* と同様、アルギン酸と PHB を生産することが示唆された。以上のことから、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や脱炭素社会の形成に貢献し、各種発酵産業 (アミノ酸、有機酸など) と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に展開できる。次世代のエネルギーとして、窒素固定により生じるアンモニアも注目されている。以上のことから、本研究成果は、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る。

引用文献

- 1) Huo, Y.X., Wernick, D.G., and Liao, J.C. (2012) Toward nitrogen neutral biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 406-413.
- 2) Hirsch, P.R. and Mauchline, T.H. (2015) The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. *Adv. Appl. Microbiol.*, **93**, 45-71.
- 3) Mathew, G.M., Raina, D., Narisetty, V., Kumar, V., Saran, S., Pugazhendi, A., Sindhu, R., Pandey, A., and Binod, P. (2021) Recent advances in biodiesel production: Challenges and solutions. *Sci. Total Environ.*, **794**, 148751.
- 4) Vivek, N., Sindhu, R., Madhavan, A., Anju, A.J., Castro, E., Faraco, V., Pandey, A., and Binod, P. (2017) Recent advances in the production of value added chemicals and lipids utilizing biodiesel industry generated crude glycerol as a substrate - Metabolic aspects, challenges and possibilities: An overview. *Bioresour. Technol.*, **239**, 507-517.
- 5) Chen, W.F., Wang, E.T., Ji, Z.J., and Zhang, J.J. (2021) Recent development and new insight of diversification and symbiosis specificity of legume rhizobia: Mechanism and application. *J. Appl. Microbiol.*, **131**, 553-563.
- 6) Noar, J.D. and Bruno-Bárcena, J.M. (2018) *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, **164**, 421-436.
- 7) Yoneyama, F., Yamamoto, M., Hashimoto, W., and Murata, K. (2015) Production of polyhydroxybutyrate and alginate from glycerol by *Azotobacter vinelandii* under nitrogen-free conditions. *Bioengineered*, **6**, 209-217.
- 8) Yoshida, N., Takase, R., Sugahara, Y., Nambu, Y., and Hashimoto, W. (2022) Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by *Azotobacter vinelandii* using atmospheric nitrogen. *Sci. Rep.*, **12**, 8032.
- 9) Chatzifragkou, A. and Papanikolaou, S. (2012) Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **95**, 13-27.
- 10) Segura, D., Guzmán, J., and Espín, G. (2003) *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 159-163.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nobuhiro Yoshida, Ryuichi Takase, Yoshimi Sugahara, Yuko Nambu, Wataru Hashimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by <i>Azotobacter vinelandii</i> using atmospheric nitrogen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-11728-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡 智志、高瀬 隆一、渡辺 大輔、橋本 渉
2. 発表標題 大気窒素活用型発酵生産によるSDGs達成への挑戦
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第518回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸田 有希渚、高瀬 隆一、渡辺 大輔、野村 暢彦、橋本 渉
2. 発表標題 動物宿主由来多糖を資化する腸内優占菌の膜小胞形成
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長瀬 鮎美、杉浦 春香、南部 優子、高瀬 隆一、橋本 渉
2. 発表標題 大豆上で納豆菌の細胞極に生じる巨大な洞穴の発見とその形成に関わる遺伝子の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第509回講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------