

微生物による廃グリセロールの有効活用に関する研究

早瀬 伸樹* 井手 翔太** 三村 精男***

Fermentative Utilization of Glycerol by Microorganisms

Nobuki HAYASE* Shouta IDE** Akio MIMURA***

Glycerol is expected to be abundant carbon source due to its generation as the by-product of bio-diesel fuel production. The microorganisms utilizing glycerol were isolated on the inorganic medium containing glycerol as a sole source of carbon. Among isolated 38 bacteria, 4 strains produced ethanol from glycerol in the culture broth. In all these strains, the rate of growth and ethanol production decreased with a decrease in the culture pH value. Newly isolated *Enterobacter ludwigii* Aq-2B produced 76.6 mmol/L ethanol and 83.9 mmol/L formic acid from 133.7 mmol/L glycerol by controlling the culture pH value at 7.5.

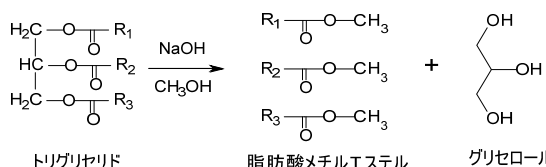
1. 緒言

現代の社会では膨大なエネルギーが消費されている。そのエネルギー源として化石燃料が主に使用されているが、地球温暖化などの環境の悪化を背景に、近年では化石燃料の膨大な使用が問題になっている。また、限りある資源である化石燃料を用いた社会活動は持続不可能であり、循環型社会への転換に向けて動き出す必要性が出てきた。その結果、微生物の力を活用したバイオエタノールや自然エネルギーに注目が集まっている。中でもバイオエタノールは石油代替燃料として使用可能であるため、米国などでは国を挙げて行っている一大プロジェクトである。しかし、バイオエタノールには、解決すべき幾つかの問題が残っている。最も早急な対策を必要としているのがバイオエタノールを生産する原料の問題である。現在はトウモロコシや小麦など、人・家畜の食料となる農作物が主原料であるために経済及び世界の食糧問題に少なからず影響を与えている^[1]。この問題を解決すべく、廃棄物からのエタノールの生産が検討され、活発な研究がなされている。一例として、農作物の茎の部分や稲藁を使つてのエタ

ノール生産がある^[2]。しかし、これらは現在のところ生産技術が確立されておらず、コストも高く実用化には至っていない。

バイオエタノールの他にもバイオマスを利用した燃料には様々な種類が存在し、近年にはそれらに注目が集まっている。その中の一つであるバイオディーゼル燃料は植物由来であるためカーボンニュートラルの考え方に沿ったものであり、化石燃料の代替物として使用されている。バイオディーゼル燃料はパームヤシなどの植物由来のトリグリセリドをメチルエステル化し、脂肪酸メチルエステルへ変換したディーゼル燃料である^[3]。その生産過程(Scheme 1)において、トリグリセリドのメチルエステル化とともにグリセロールが副生する^[4]。ここで副生するグリセロールは、製品グリセロールとしてマテリアルリサイクルを行なうことが好ましいが、触媒や未変換の脂肪酸などが混入しているため、そのまま再利用することは容易ではない^[5]。

そこで、本研究ではバイオディーゼル燃料生産にともない副生するグリセロールを、酵母や細菌の代謝能力を利用し、エタノールをはじめとする有用な有機化合物への変換を目的とした。



Scheme 1 バイオディーゼル燃料 (脂肪酸メチルエステル) の生成反応

令和5年8月10日受付 (Received Aug. 10, 2023)

*新居浜工業高等専門学校生物応用化学科 (Department of Applied Chemistry and Biotechnology, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Niihama, 792-8580 Japan)

**新居浜工業高等専門学校専攻科生物応用化学専攻 (Applied Chemistry and Biotechnology Program, Advanced Engineering Course, National Institute of Technology (KOSEN), Niihama College, Niihama, 792-8580, Japan)

***前山梨大学大学院医学工学総合研究部 (Integrated Graduated School of Medicine, Engineering, and Agricultural Science, University of Yamanashi)

2. 実験

2-1 グリセロール資化細菌の分離

グリセロール資化細菌を分離するために、Table 1 に示したグリセロールを単一炭素源として含むグリセロール無機塩培地 (MDG 培地) を使用した。土壤などの微生物分離源を滅菌水に懸濁し、寒天 2% で固化させた MDG 寒天培地上に植菌し、30 °C で培養した。

Table 1 グリセロール無機塩培地組成 (MDG 培地)

Glycerol	10 g/L
K ₂ HPO ₄	2.34 g/L
KH ₂ PO ₄	1.33 g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.20 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
微量元素溶液	1ml/L

2-2 グリセロール資化試験

グリセロール資化細菌によって、好氣的条件下でグリセロールから生産される生成物の解析を行った。グリセロールを単一炭素源とした MDG 培地にグリセロール資化細菌を植菌した。これを 30 °C、130 rpm の条件で振とう培養し、定期的に培養液を採取した。採取した培養液は、15000 rpm、10 min の条件で遠心分離後、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いてグリセロール消費量と生成物の解析を行った。また、同様に嫌氣的条件下でグリセロールから生産される生成物の解析を行うために、グリセロール資化細菌を MDG 培地に植菌後、30 °C の条件下で静置培養し、定期的に培養液を採取した。採取した培養液は 15000 rpm、10 min の条件で遠心分離後、HPLC を用いてグリセロール消費量と生成物の解析を行った。

2-3 グリセロール資化細菌の同定試験

同定試験は L 培地 (Trypton 10g/L, Yeast extract 5g/L, NaCl 5g/L) を寒天 2% で固化させたものを用いて培養した菌体より、InstaGene Matrix (Bio Rad 社) を用いて DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型として PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio 社) により 16s rDNA のうち、5'末端側約 500bp の領域を増幅した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) によって解析し、国際塩基配列データベース (GenBank) を用いて検索した。

2-4 pH コントロール条件下でのグリセロール資化試験

グリセロール資化の阻害原因と想定される pH の低下を防ぐために、pH 自動調節装置 (東京理化工機株式会社:FC-2000) を備えた装置を用いて培養を行った。枝付き三角フラスコに酵母エキスを 2 g/L 添加した MDG 培地を入れて滅菌し、グリセロール資化細菌を植菌した。これを、本培養装置を用いて pH 7.5、培養温度 30 °C の条件で、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しながら培養を行い、定期的に培養液を採取した。採取した培養液は 15000 rpm、10 min の条件で遠心

分離後、HPLC 分析を用いてグリセロール濃度と生成物の解析を行った。

3. 結果及び考察

3-1 グリセロール資化細菌の分離

グリセロールを単一炭素源とした MDG 寒天培地を用いて、グリセロール資化細菌の分離を行ったところ、38 株のグリセロール資化細菌が分離できた。また、分離に使用したすべての試料から複数のグリセロール資化細菌が得られたため、多種多様なグリセロール資化細菌が自然界に存在していると考えられた。なお、MDG 寒天培地はグリセロールを単一炭素源とした寒天培地であるので、この培地上で増殖した細菌はグリセロール資化細菌であると考えられる。

3-2 分離したグリセロール資化細菌のグリセロール資化試験

分離したグリセロール資化細菌を用いて好氣 (振とう) 条件下でグリセロールの資化試験を行った。その結果、38 種のグリセロール資化細菌の中で、Aq-2B 株でグリセロールのエタノールへの変換が確認できた。Fig. 1 には、Aq-2B 株のグリセロール消費量及びエタノール生成量の経時変化を示した。Aq-2B 株は培養 5 日後のグリセロール消費量が 26.8 mmol/l と少なかったが、HPLC 分析によって少量 (0.92 mmol/l) ではあるがエタノールの生成が観察された。理論的には、グリセロール 1 mol からエタノール 1 mol が生成することより、Aq-2B 株のグリセロール資化によるエタノールへの変換率は約 3.4% である。

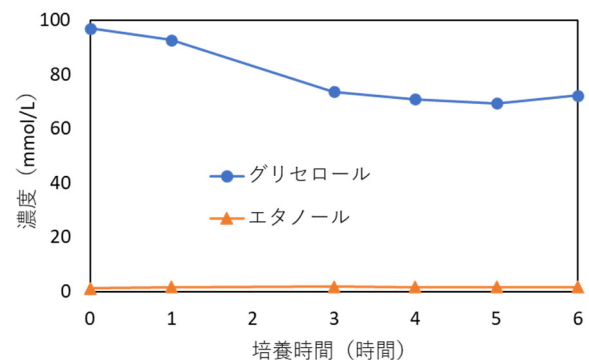


Fig. 1 好氣的条件下における Aq-2B 株のグリセロール消費量及びエタノール生成量の経時変化

Fig. 2 には、嫌氣 (静置) 条件下における Aq-2B 株のグリセロール消費量、エタノール生成量の経時変化を示した。培養 6 日後の嫌氣的条件下における Aq-2B 株によるグリセロール消費量は 29.3% であり、好氣的条件下におけるグリセロール消費量 (24.7%) と同程度であった。また、好氣的条件下と同様に培養液中からエタノールの生産が観察され、その濃度は 7.47 mmol/L であり、Aq-2B 株によるグリセロールか

らエタノールへの変換率は21.8%であった。この変換率は好氣的条件下におけるグリセロールからエタノールへの変換率(3.4%)と比較して高く、嫌気条件下ではエタノールへの変換が進みやすいことが示唆された。

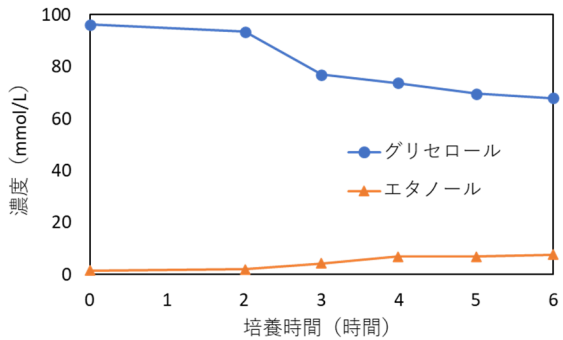


Fig. 2 嫌氣的条件下における Aq-2B 株のグリセロール消費量及びエタノール生成量の経時変化

Aq-2B 株では嫌気条件下においてエタノールへの変換が進むことより、嫌氣的条件下では、好氣的条件下で行われるグリセロールからピルビン酸を経由し TCA 回路において二酸化炭素及び水へ変換する代謝が抑制され、グリセロールをエタノールへ変換する代謝が選択されているのではないかと考えられた。また、Aq-2B 株培養後の培養液について pH の測定を行ったところ、培養開始前は pH 7.5 であったのに対して培養後は pH 5.5 まで低下していることが観察された。

3-3 pH 制御条件下におけるグリセロールの資化試験

細菌によるグリセロールからエタノールを生成する代謝過程において、蟻酸もしくは二酸化炭素を副生することが報告されている¹⁰⁾。従って、培養液の pH 低下は蟻酸の生成によるものであると想定され、これら副生物による pH の低下がグリセロールの資化を阻害しているのではないかと考えられた。そこで、培養液の pH を 7.5 に制御しながら Aq-2B 株の培養を行った。

Fig. 3 には、pH7.5 に制御した条件下における Aq-2B 株のグリセロール消費量、エタノール生成量及び蟻酸生成量の経時変化を示した。Fig. 4 には、同じ装置を用いて pH を制御せずに培養を行った時の Aq-2B 株のグリセロール消費量、エタノール生成量及び蟻酸生成量の経時変化を示した。Aq-2B 株を pH 7.5 に制御しながらグリセロールを資化させることで、Aq-2B 株は、培養 47 時間後にグリセロール 133.7 mmol/l からエタノール 76.6 mmol/l を生成した。この時、グリセロールからエタノールへの変換率は 57.3%であった。グリセロール消費量及びエタノール生成量について、pH を制御せずに培養を行なった場合と比較すると、それぞれ 2 倍以上の増加が観察された。従って、Aq-2B 株培養時の pH の低下がグリセロール消費及びエタノール生成を阻害していることが強く示唆された。また、Fig. 3 に示したように、Aq-2B 株はエタノールだけでなく、エタノール濃度を超える蟻酸が生成してい

ることが確認できた。更に、Aq-2B 株を pH7.5 に制御しながら培養した時に、pH 制御のために添加された NaOH 量と生成した蟻酸濃度の経時変化が高い相関性を示すことが明らかになり、pH の低下は蟻酸の生成が原因であると考えられた。

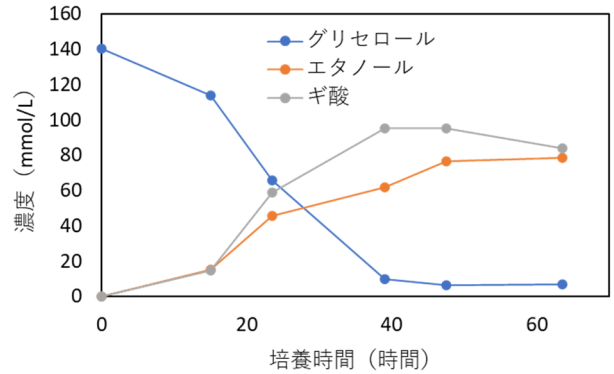


Fig. 3 pH7.5 制御条件下における Aq-2B 株のグリセロール消費量、エタノール生成量及びギ酸生成量の経時変化

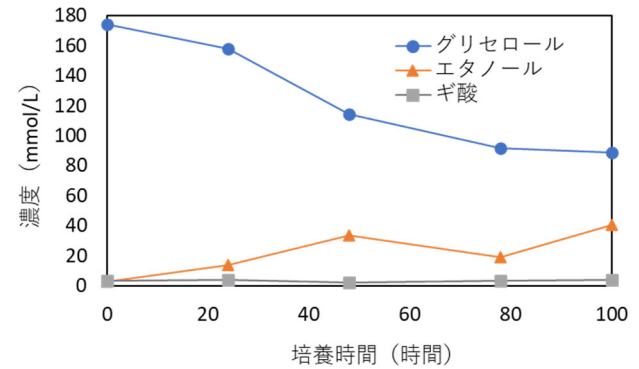


Fig. 4 pH 無制御条件下における Aq-2B 株のグリセロール消費量、エタノール生成量及びギ酸生成量の経時変化

3-4 グリセロール資化細菌の同定

Aq-2B 株について 16s rDNA の塩基配列を解析したところ、*Enterobacter ludwigii* と 100 % の相同性を示し、本菌株は *Enterobacter ludwigii* に属する細菌であると考えられた。

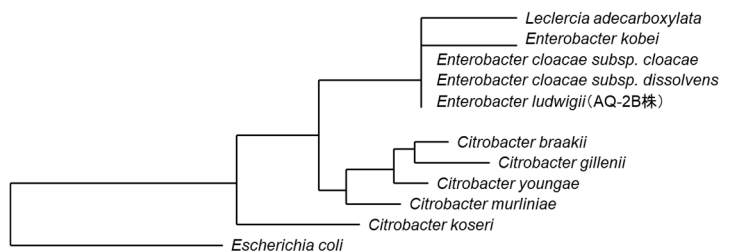


Fig. 5 16S rDNA を用いた分子系統樹

4. 結 言

グリセロール資化細菌 38 株を分離し、グリセロールを炭素源として振とう培養を行ったところ、グリセロール資化細菌 Aq-2B 株においてエタノールの生成が観察された。Aq-2B 株について 16Sr DNA の塩基配列を解析したところ、*Enterobacter ludwigii* と 100 % の相同性を示した。

Aq-2B 株を用いた嫌気条件でのエタノール生成実験では、培養 40 時間後に 1 % グリセロールを 29.3 % 消費したが、培養 40 時間後からのグリセロールの資化及びエタノールの生成が停止した。この培養液の pH を測定したところ、pH7.5 に調整していた培養液の pH が 5.5 に低下していることが明らかになった。そこで pH を制御しながら培養を行い、さらに補助成分として酵母エキスを培養液に添加して培養を実施した。その結果、グリセロールの資化及びエタノール生成が大幅に向上し、培養 47 時間後にグリセロール 133.7 mmol/l (消費率 95 %) からエタノール 76.6 mmol/l (変換率 57.3 %) 及び蟻酸 83.9 mmol/l (変換率 62.8 %) への変換が確認できた。また、Aq-2B 株のグリセロール資化によって変換された蟻酸の生成量は、pH 調整のために添加していた NaOH の添加量と高い相関性を示した。従って、培養液の pH 低下は蟻酸の生成が原因であると推察された。

以上の結果より、エタノールの変換率を高めるために補助成分の添加量や種類、pH などの最適な条件を模索すると共に、蟻酸の生成を抑制もしくは除去、分解する方法を検討することで、さらなる変換率の上昇が望めると考えられる。また、バイオディーゼル生成に伴う廃液のグリセロール濃度は 41 %⁷⁾と高濃度であることより、高濃度グリセロールでも生育可能な微生物の取得が必要であると考えられる。

参考文献

- [1] 竹田みぎわ, 柴田大輔, “植物バイオ燃料をめぐる視点”, *バイオサイエンススコープ*, Vol. **46**, 286-290 (2008).
- [2] 柳田高志, 藤本真司, ベスビョトコリュミラ, 井上誠一, 塚原建一郎, 澤山茂樹, 美濃輪智明, “稲わらからのエタノール生産における非硫酸前処理法のプロセスエネルギーおよび経済性評価”, *エネルギー・資源*, Vol. **30**, No.5, 8-14 (2009).
- [3] Subramaniam, D., Murugesan A., Avinash, A., and Kumaravel, A., Bio-diesel production and its engine characteristics—An expatiate view, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, Vol. **26**, 361-370 (2013).
- [4] Kaur, J., Sarma, A. K., Jha, M. K., and Gera, P., Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnol. Rep.*, Vol. **27**, e00487 (2020).
- [5] Asopa, R. P., Bhoi, R., and Saharan, V. K., Valorization of glycerol into value-added products: A comprehensive review

- on biochemical route, *Bioresour. Technol. Rep.*, Vol. **20**, 101290 (2022).
- [6] 中島田豊, “嫌気生菌のエネルギー代謝制御による有用物質の効率的生産”, *生物工学会誌*, Vol. **85**, 120-125 (2007).
- [7] Ito, T., Nakashimada, Y., Senda, K., Matsui, T., and Nishio, N., Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. **100**, 260-265 (2005).