

廃棄された貝殻を pH 調整剤として利用したグリコール酸の微生物合成

所属 岩手大学大学院総合科学研究科農学専攻 氏名 根本真夕

ショートアブストラクト【要旨】

大腸菌を用いた高生産なグリコール酸 (GA) 合成に向けた課題のひとつとして、培養時に培地中に蓄積された GA による培地の酸性化がある。培地中に GA が放出されると、培地が酸性化し、GA 合成大腸菌の生育が抑制されることで GA の生産が頭打ちになる。この問題に対し、本研究では現在大量に廃棄され、有効活用法が求められている廃棄貝殻が GA 生産時における培地の pH 調整剤として使用可能であるかどうかを検討した。

アブストラクト【本文】

[緒言]

グリコール酸 (GA) は、スキンケア用品や生分解性プラスチックの原料、香料などに使用されている有用な有機酸である。しかし、現在はほとんどが化学合成法によって合成されている。化学合成法では、一酸化炭素やホルムアルデヒドといった石油由来原料を使用し、200℃、900 気圧の高温・高圧な条件下で反応を行う必要がある。したがって、化学合成法による GA の生産は環境負荷の大きい合成法であるといえる。このような課題がある GA 合成の代替方法として、近年微生物による合成方法が研究されている。微生物による GA の合成は、常温、常圧といった温和な条件下で行うことが可能であり、さらに、酵素を反応に用いるため副反応生成物が少ないという利点がある。

また、GA の合成に用いられる微生物には様々なものがあるが、当研究室では遺伝子操作法や培養方法が確立されており、実用化への可能性が高い大腸菌を宿主とした GA 合成を試みてきた。しかし、大腸菌を用いた GA の高生産には課題がある。大腸菌は GA を合成すると、GA を菌体外へ放出し、培地中に GA が蓄積する。この GA は、培地の酸性化を引き起こし菌の生育を抑制するため、GA の合成量は培養時間を延長しても一定の値で頭打ちになる。これまで我々は、pH 調整剤として炭酸カルシウム (CaCO₃) や水酸化ナトリウム (NaOH) などの pH 調整剤を培地に添加することで培養中の培地の pH をコントロールし、GA を高生産できることを確認してきた。実際、過去の我々の実験では、pH 調整剤を添加した培地を使用すると、添加前と比較して GA 合成量が最大で約 4 倍となっている(未発表)。

また、岩手県では、カキの生産量が令和 2 年度で約 6 千トン、ホタテガイの生産量が約 1 千トンと、貝類が養殖業における重要な生産物となっている。しかし、これらの貝類の生産時には、貝殻が産業廃棄物として発生する。ホタテの貝殻の一部はカキの養殖に用いられ、カキの貝殻の一部は石灰肥料などに再利用されているが、未だに産業廃棄物として

処分されている部分も存在し、処分方法が問題となっている。つまり、廃棄貝殻の有効活用方法が求められている。このような課題に対し、本研究では貝殻の主成分が CaCO_3 であるということに着目し、前述した GA 生産時の培地の pH 調整剤としてカキやホタテの貝殻を利用できるのではないかと考え、検討を行った。

[実験方法]

培地調製

50 ml の LB/クロラムフェニコール(Cm) /エチレングリコール (EG) 培地 (NaCl 1%、トリプトン 1%、酵母エキス 0.5%、Cm 0.05mg/ml、EG 5%、pH8.0) に粉碎した廃棄貝殻 [岩手県下閉伊郡山田町由来カキ貝殻とホタテ貝殻 (図 1)、それぞれ 1、2、5%] を添加し、121°C で 15 分間オートクレーブ処理を行って滅菌した。

大腸菌の形質転換と組換え大腸菌の培養による GA 合成

大腸菌における GA 合成に過剰発現が必要な遺伝子である大腸菌由来ラクトアルデヒドレダクターゼ遺伝子 (*fucO*) とラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*aldA*) を含むプラスミド (pSTV-*fucO*-*aldA*) を用いて *Escherichia coli* BL21 (DE3) 株を形質転換した。形質転換体は LB/Cm 培地において 30°C で 16 時間、前培養した後に貝殻含有 LB/Cm/EG 培地に植菌した。培養開始から 4 時間でイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) による酵素発現を誘導し、培養開始から 24 時間おきに 7 日間、培養液 1 ml をサンプリングした。続いて、サンプリングした培養液を 4°C、6,000 rpm で 10 分間遠心分離し、培養上清を回収した。培養上清は pH メーターを用いて pH を測定し、HPLC 分析に供することで培地中の GA 濃度を決定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による培養液中の GA 濃度の分析

培養上清を過塩素酸 (pH 2.1) によって 100 倍に希釈した。この希釈液をフィルターを通した後に 20 μL ずつ HPLC にインジェクションした。カラムは ULTRON PS-80H を使用し、移動相は過塩素酸 (pH 2.1) を用いて 20 分間分析を行い、UV-210 nm で検出した。また、移動相の流速は 1.0 ml/min とした。同様に、GA 標準液を HPLC で分析し、クロマトグラムにおける保持時間 9.7 付近のピークが GA を示すことを確認した。GA を示すピークを、データ処理ソフトを用いてピーク面積を算出した。標準液の GA 濃度と対応するピーク面積から検量線を作成し、各サンプルの GA 濃度を定量した。

培養した菌体量の測定

サンプリングによって得られた培養液を RO 水で $10^4 \sim 10^8$ 倍希釈し、LB/Cm プレート培地に植菌し、30°C で 24 時間静置培養した。24 時間後にコロニー数を計測し、コロニー形成単位 (cfu/ml) によって各培養液中の菌体量を算出した。

[結果と考察]

pH 調整剤を添加していない培地にて組換え GA 合成大腸菌を培養した結果、培養液中の GA 濃度は培養 1 日目において 40 mM 程度となり、それ以上培養を継続しても GA 濃度は上昇しなかった (図 2A)。この際の培地中の pH は 1 日目に pH 4.5 まで低下し、それ以降



図 1 粉碎貝殻
(左がホタテ貝殻、
右がカキ貝殻)

は変化しなかった (図 2B)。それに対して、1%の CaCO_3 を添加した培地では培地中の GA 濃度が 4 日目まで増加し、最大で 246 mM となり、2%の CaCO_3 を添加した培地では GA 濃度が 2 日目まで増加し、最大で 224 mM となった (図 2A)。この際の pH は培養 7 日間の間 pH 5~6 付近で保たれていた (図 2B)。また、5% CaCO_3 を添加した培地では、GA 濃度は、培養 1 日後に最大の 191 mM となり、それ以上は増加しなかった。

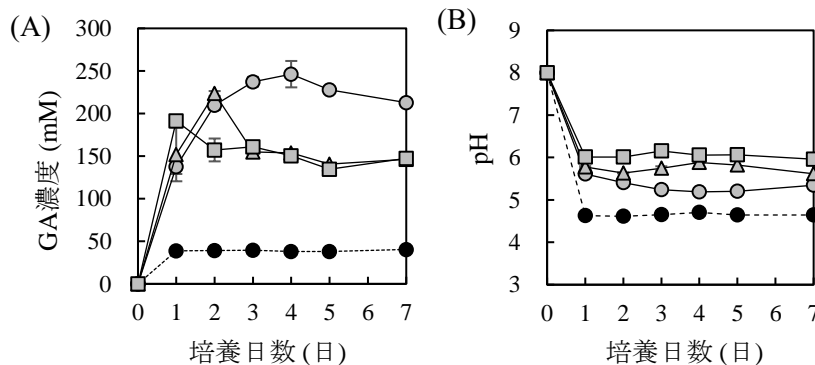


図 2 (A) 炭酸カルシウム (CaCO_3) を培地へ添加した際の培地中の GA 濃度、(B) 培地の pH (●: pH 調整剤なし、○: 1% CaCO_3 、△: 2% CaCO_3 、□: 5% CaCO_3)

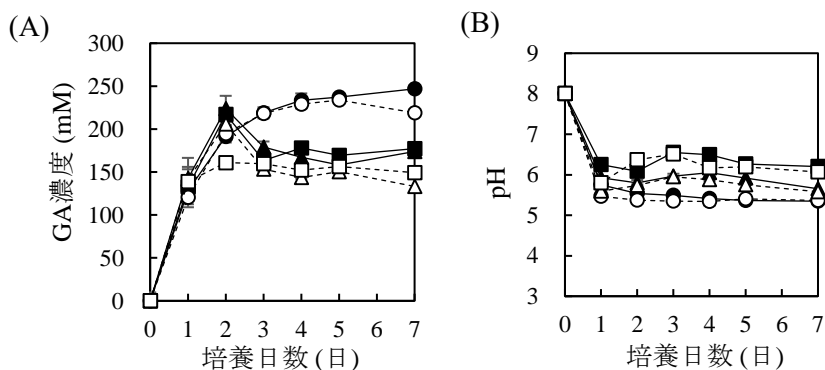


図 3 (A) 貝殻を培地へ添加した際の培地中の GA 濃度、(B) 培地の pH (●: 1% カキ貝殻、▲: 2% カキ貝殻、■: 5% カキ貝殻、○: 1% ホタテ貝殻、△: 2% ホタテ貝殻、□: 5% ホタテ貝殻)

続いて、1%のカキとホタテの貝殻それぞれを添加した培地を用いて培養を行ったところ、培地中の GA 濃度は培養 7 日目までに 247 mM、219 mM となり (図 3A)、2%のカキとホタテ貝殻を添加した培地ではどちらも培養 2 日目まで GA 濃度が上昇し、最大で 224 mM、206 mM となった。この際の培養上清の pH は pH 5.6~pH 6.0 付近で維持されていた (図 3B)。したがって、貝殻の添加量が 1%または 2%では、 CaCO_3 を添加した際の培養時と同様の GA 濃度や pH の挙動を示すことが明らかになった。さらに、5%のカキ貝殻またはホタテ貝殻を添加した培地では、培養 2 日目で GA 濃度が最大の 217 mM と 161 mM となり、それ以降は GA 濃度が向上しなかった (図 3A)。また、この時の培養上清の pH は 6.0~6.5 付近で維持されていた (図 3B)。5%の CaCO_3 を添加した培地では、培養 1 日目において GA 濃度が最大となっていたが (図 2A)、貝殻の培地への添加量が 5%の際には、5%の CaCO_3 を添加した際とは異なる挙動を示していた。培地 pH が中性付近に維持されているにもかかわらず、このように異なる挙動を示す原因のひとつとして、貝殻が菌を吸着し、培地の粘性が増加したことによる酸素供給量の低下と、それに伴う菌の生育の抑制が引き起こされ

た可能性が考えられる。今後はホタテ貝殻とカキ貝殻における菌の吸着の程度の違いを調査するとともに、培養中の攪拌が可能な発酵槽を用いることで菌の生育が改善される可能性があると考えられる。

続いて、カキ貝殻とホタテ貝殻の両方において培養 1 日目の GA 濃度が最も高くなった 2% 添加時の菌体量を測定した (図 4)。その結果、pH 調整剤を添加していない場合と比較すると、貝殻添加培地を用いて培養した際には、CaCO₃ 添加時と同様に、培養液における菌体量が多い状態が維持されていることが示唆された。特に、GA 濃度の高い培養 2 日目まで菌体量の低下はほとんど見られなかった。したがって、貝殻添加培地において貝殻が培地の酸性化を抑制し、大腸菌の生育が維持されたため、GA 濃度が CaCO₃ 添加時と同様に pH 調整剤を添加しない場合と比較して向上したことが示唆された。

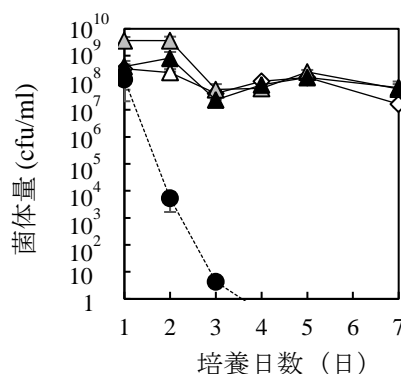


図 4 貝殻添加培地における GA 生産時の菌体量 (●: pH 調整剤なし、△: CaCO₃、▲: カキ貝殻、△: ホタテ貝殻、pH 調整剤なしの時、4 日目から菌体量は 0 cfu/ml)

[結論]

廃棄貝殻の処分方法は焼却や埋立であるが、カキやホタテガイなどの水産物の加工に伴い大量に発生するため、焼却による環境負荷や埋立地の不足といった問題が生じている。これに対し、本研究では貝殻の新たな有効活用方法を見出すことで課題解決策のひとつの選択肢を提案することができた。また、本研究で提案した廃棄貝殻の利活用法は、廃棄貝殻を粉砕して培地に添加するだけで GA 合成時の pH 調整剤として利用可能であるため、他の貝殻の再利用方法で必要とされる高温加熱などの処理を必要としない。したがって、従来よりも環境負荷や加工の手間の少ない廃棄貝殻の有効活用方法となることが期待できる。

[参考文献]

- 1) 岩手県水産技術センター (2022) 岩手の沿岸漁業 令和 4 年度版 (2023 年 8 月 1 日閲覧、<https://www2.suigi.pref.iwate.jp/others/fisheryiwate>)
- 2) Hanis Nadiah Ruslan et al. (2022) Materials Today: Proceedings, 48, 713-719

[謝辞]

本実験で使用したカキとホタテをご分与くださいました三陸やまだ漁業協同組合の佐々木浩徳様と昆隆広様に御礼申し上げます。