

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



岩手大学大学院総合科学研究科

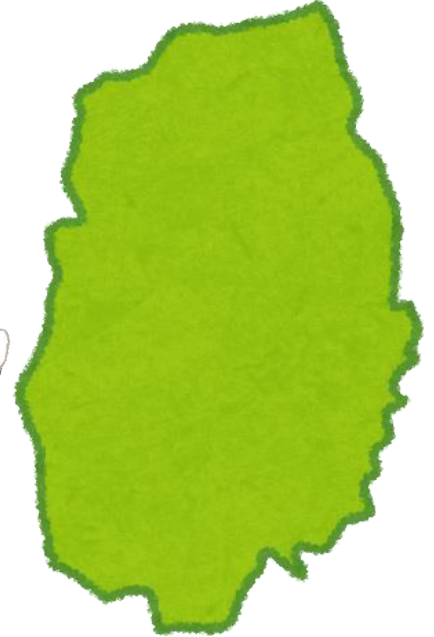
根本 真夕

岩手県における貝類の生産

岩手県では、ホタテガイや牡蠣といった水産物の生産が盛んである

岩手県における牡蠣生産量（令和2年度）は約6千トン

全国では広島県が生産量第1位だが、
岩手県は**第5位**となっている



岩手県におけるホタテガイ生産量（令和2年度）は約1千トン

ホタテガイは北海道が生産量第1位、岩手県は**第4位**



海面漁業生産統計調査 確報 令和2年漁業・養殖業生産統計

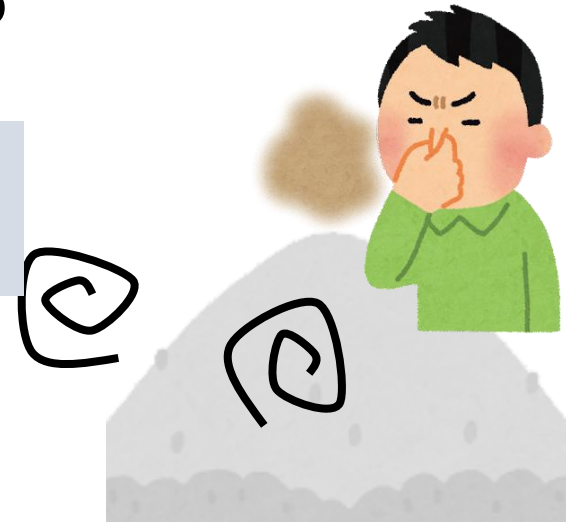
廃棄貝殻が引き起こす問題

貝類の生産に伴い大量の貝殻が発生、一部は再利用されるが、大部分は野積みまたは埋め立て処分される



埋め立て地の限界や野積みによる悪臭の発生、それに伴う景観悪化といった問題がある

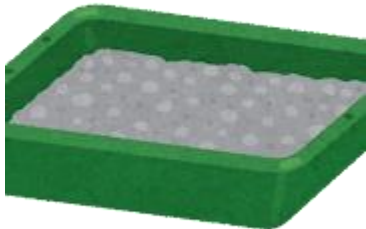
また、貝殻廃棄にかかる費用は
漁業関係者にとって負担となる



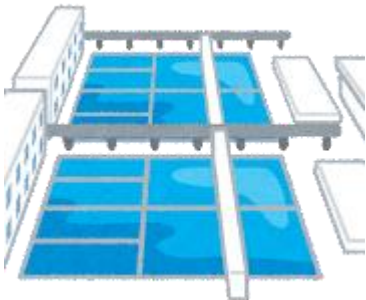
廃棄貝殻の利用例



畑で使用する土壌改良剤



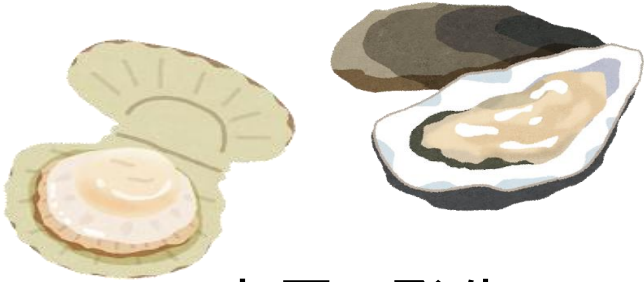
建築資材
セメントの構成成分



廃水中のリン酸の除去

Junxiong e al. (2021) Review in Aquaculture, Millero et al. (2001) Aquatic Geochemistry, Ruslan et al. (2022) Materials Today: Proceedings

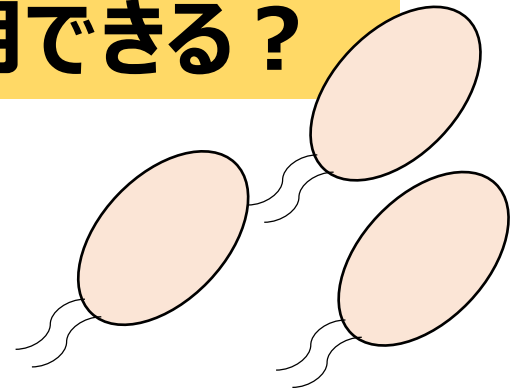
廃棄貝殻の新たな有効活用



大量に発生している貝殻の一部は再利用されているが、未だ廃棄されている部分も多く存在している



**廃棄貝殻を微生物による物質生産
に利用することで有効活用できる？**



化学合成法

- ・高温、高圧条件が必要
 - ・石油由来原料を用いる
- 環境負荷が大きい

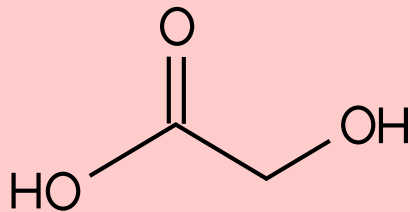


微生物合成法

- ・常温、常圧条件で合成可能
 - ・廃棄物原料、バイオマスを利用できる
- 環境負荷が少ない

本研究では、**大腸菌**を用いてグリコール酸を合成する

【本研究における微生物による物質生産のターゲット】



グリコール酸

化粧品



ピーリング剤

医療用材料



手術用縫合糸

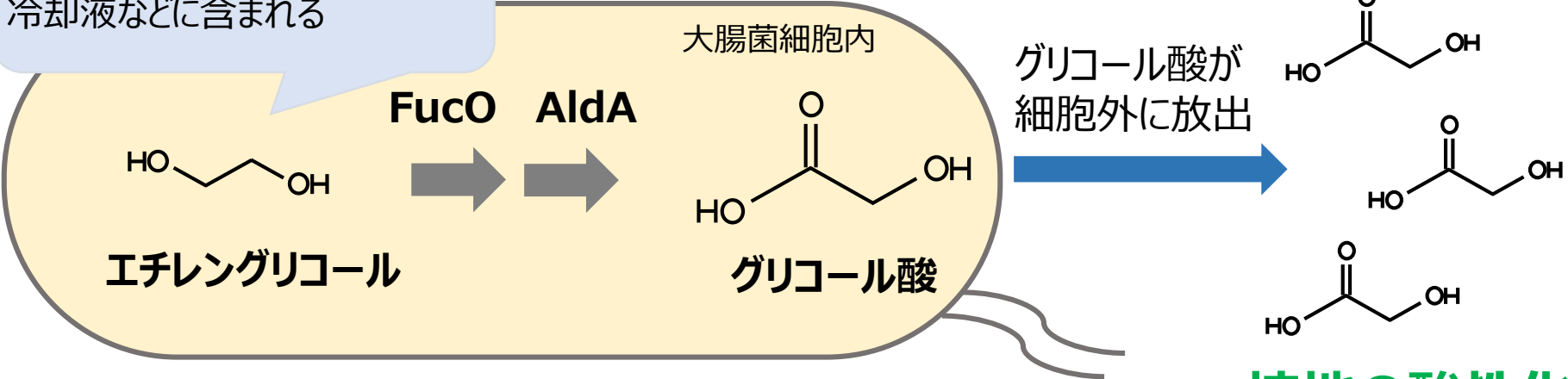
環境用材料



バイオプラスチック

組換え大腸菌によるグリコール酸合成

産業廃棄物
プラスチックや自動車のエンジンの冷却液などに含まれる

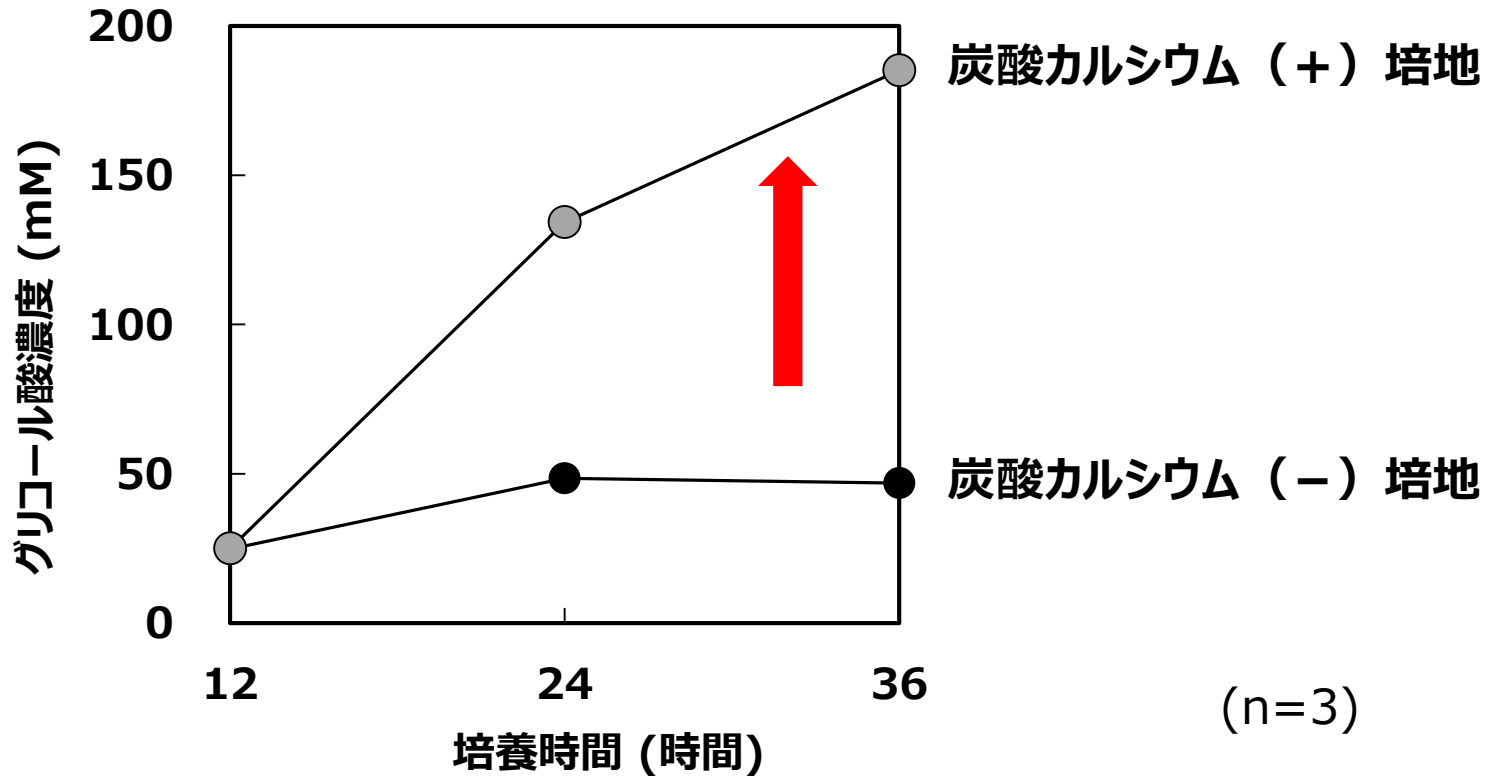


FucO: 大腸菌由来ラクトアルデヒドレダクターゼ
AldA: 大腸菌由来ラクトアルデヒドデヒドロゲナーゼ

大腸菌はpH 7.0付近の中性環境でのみ生育可能
培地の酸性化は大腸菌の生育を阻害

【問題】

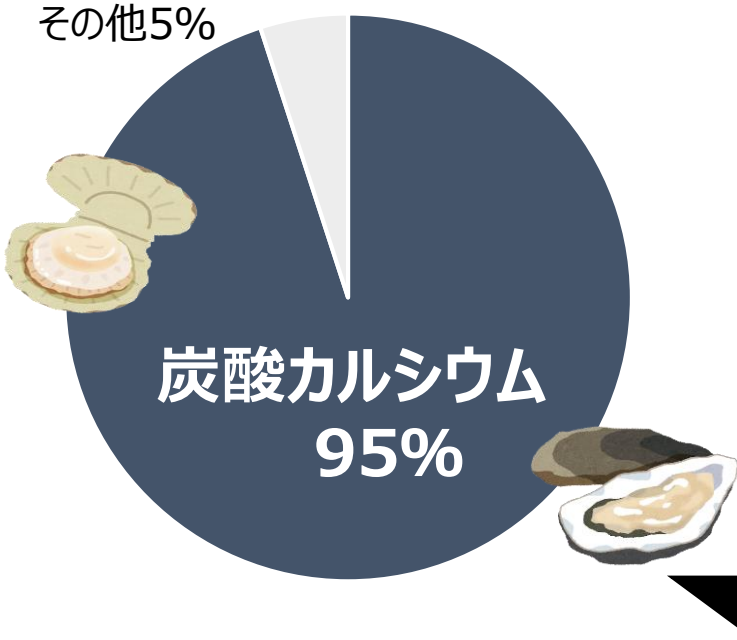
グリコール酸の生産量が停止し、一定の生産量で頭打ちになってしまう



炭酸カルシウムを培地へ添加して培養すると、グリコール酸生産量が最大**4倍**に増加した

しかし、この方法では炭酸カルシウムの使用がコストを増やす...

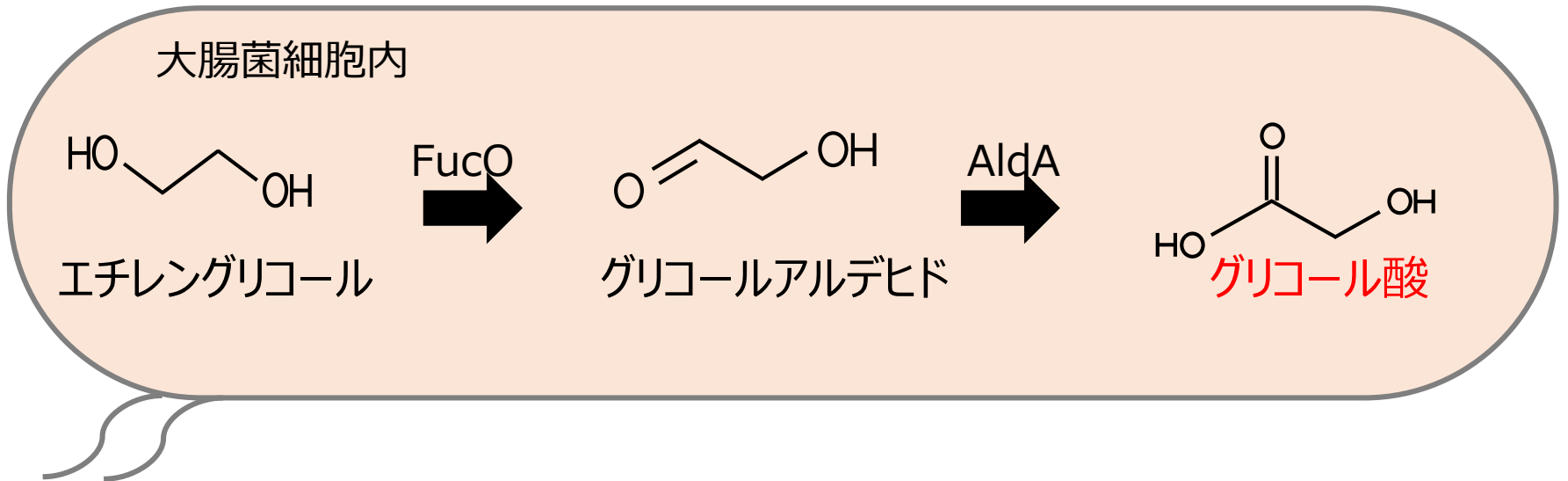
本研究の目的



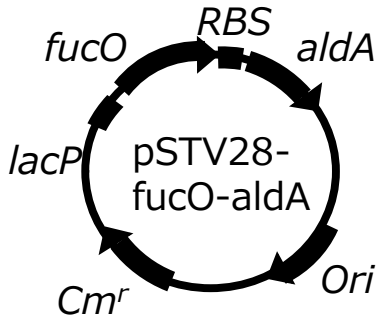
貝殻 (牡蠣、ホタテガイ) は炭酸カルシウムを豊富に含む

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

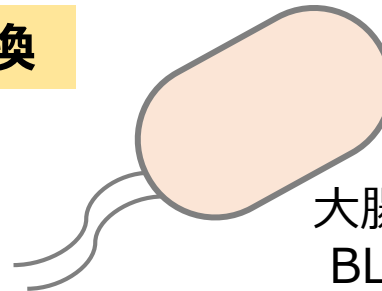
グリコール酸の組換え大腸菌における合成経路



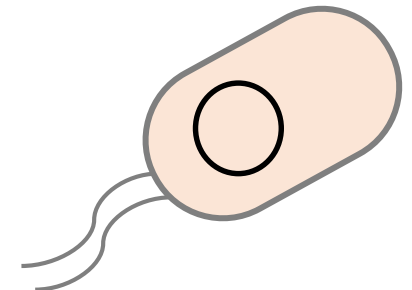
グリコール酸合成に必要な遺伝子を含むプラスミド



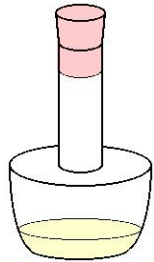
形質転換



形質転換体
(組換え大腸菌)
の取得



培地の作成



- 50 mL LB/Cm/EG培地
- ・粉末貝殻 (牡蠣殻、ホタテ貝殻)
または CaCO_3 (1、2、5 %w/v)
 - ・ 800 mM エチレングリコール
pH 8.0 (初期pH)

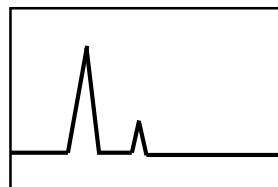


粉碎した牡蠣殻、ホタテ貝殻
(岩手県下閉伊郡山田町産)

▼ 30°C、24時間

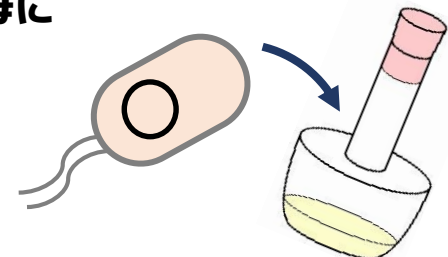
分析

- ・ HPLCによる
グリコール酸濃度の測定
- ・ 培養上清のpH測定



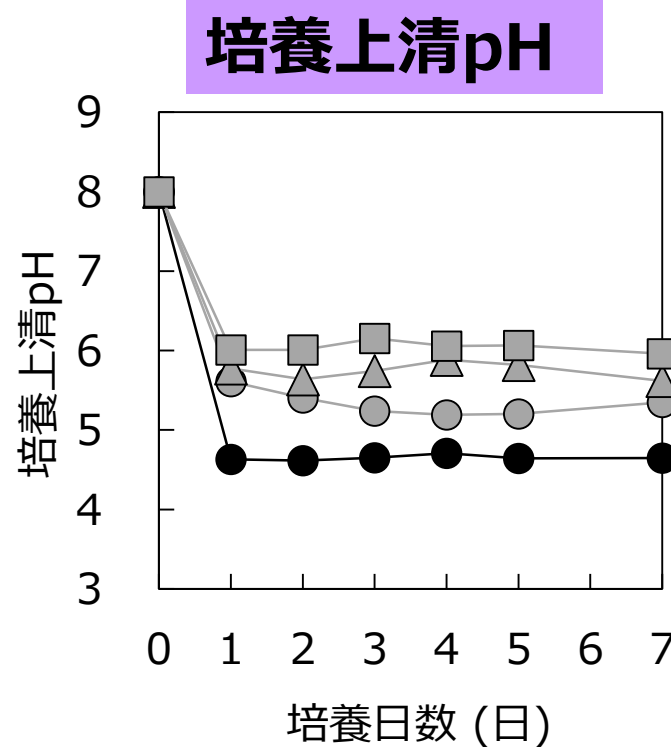
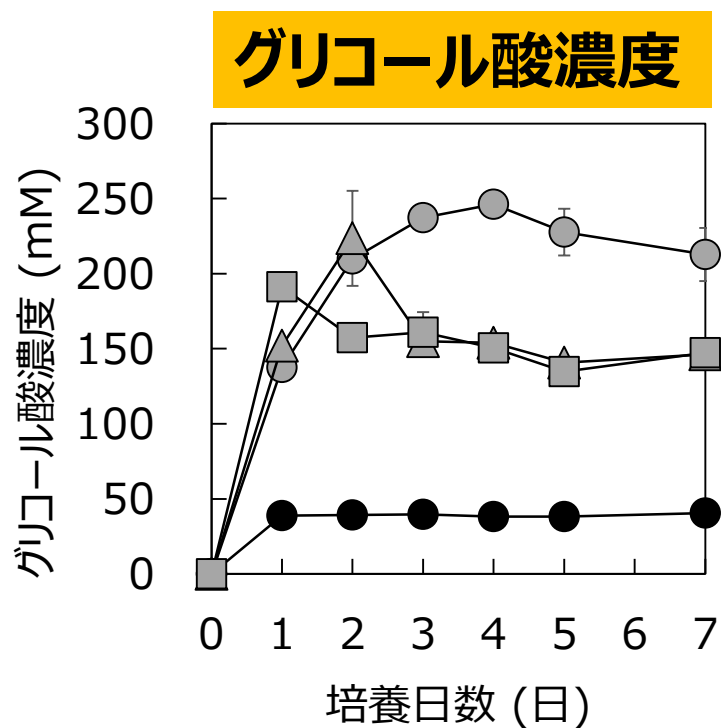
振盪培養

7日間、1日毎に
サンプリング



炭酸カルシウム添加時のグリコール酸生産

12/19



●炭酸カルシウム (-) 炭酸カルシウム添加量: ○1% ▲2% ■5%

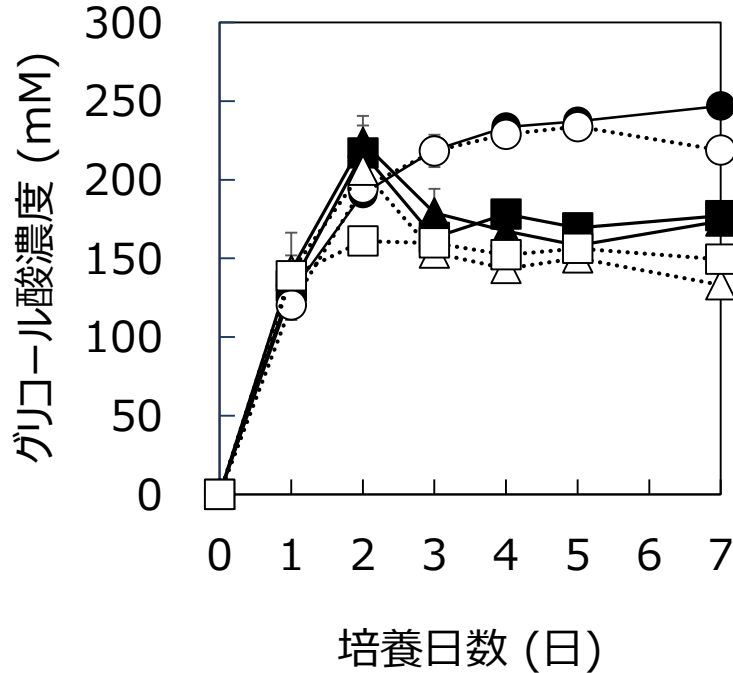
(n=3)

炭酸カルシウムを培地に添加した場合、グリコール酸濃度は大幅に向上し、培地のpHは中性付近で維持された
炭酸カルシウムの添加量が多いほど、培地pHはより中性に維持された

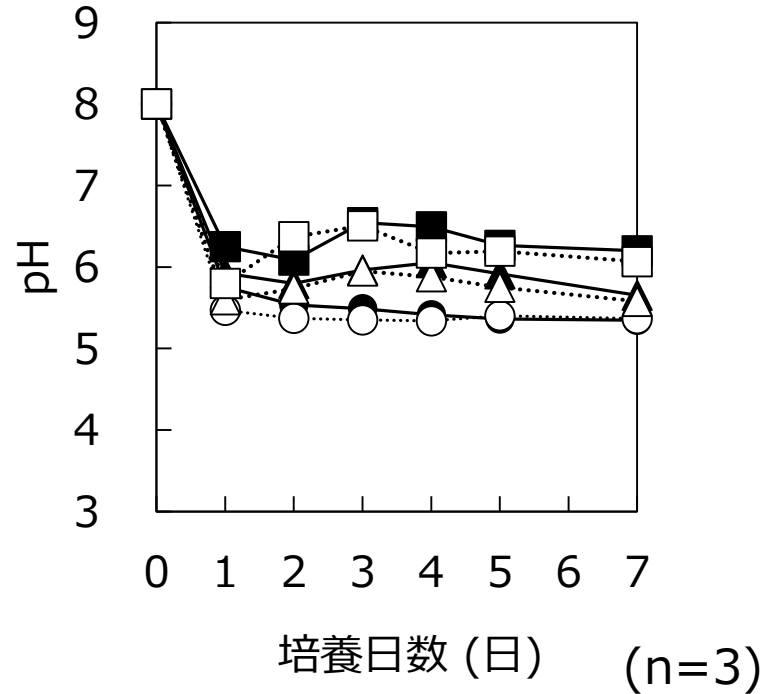


貝殻添加時のグリコール酸生産

グリコール酸濃度



培養上清pH



牡蠣殻添加量: ● 1%、▲ 2%、■ 5%
ホタテ貝殻添加量: ○ 1%、△ 2%、□ 5%



牡蠣殻とホタテ貝殻の添加は同様にグリコール酸濃度を向上させ、培地のpHを中性付近で維持した

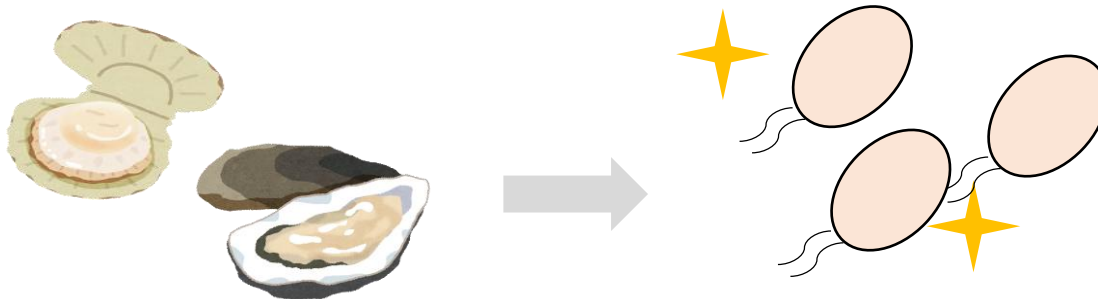


貝殻添加培地において、グリコール酸濃度が向上した



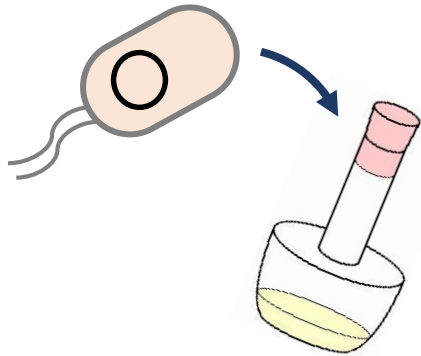
【仮説】

貝殻によって培地の酸性化が抑制され、
大腸菌が生存しやすくなったことでグリコール酸濃度が向上した？



したがって、次に大腸菌の生菌数の測定を行った

振盪培養



- 50 mL LB/Cm/EG培地
- ・粉末貝殻 (牡蠣殻、ホタテ貝殻)
またはCaCO₃ (2 %w/v)
 - ・ 800 mM エチレングリコール
pH 8.0 (初期pH)

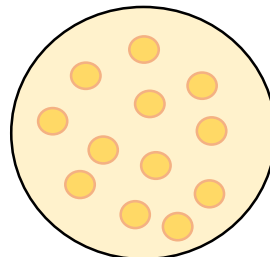
30°C、24時間

▶ 7日間、1日毎に
サンプリング

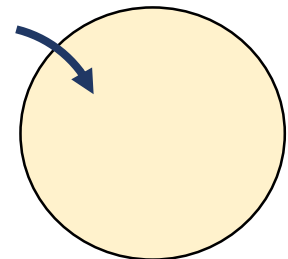
生菌数の測定

培養液1 mL当たりの
コロニー数で生菌数を
算出

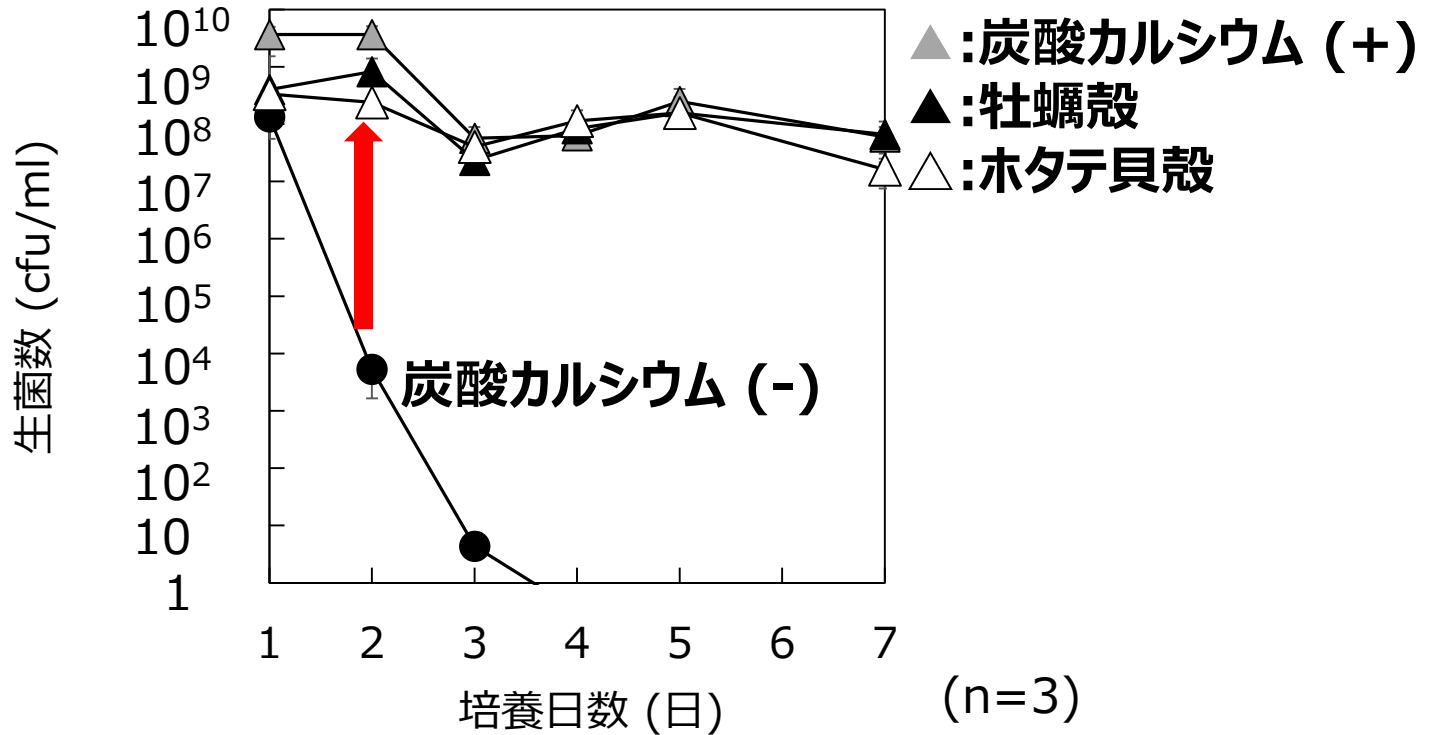
コロニー数を計測



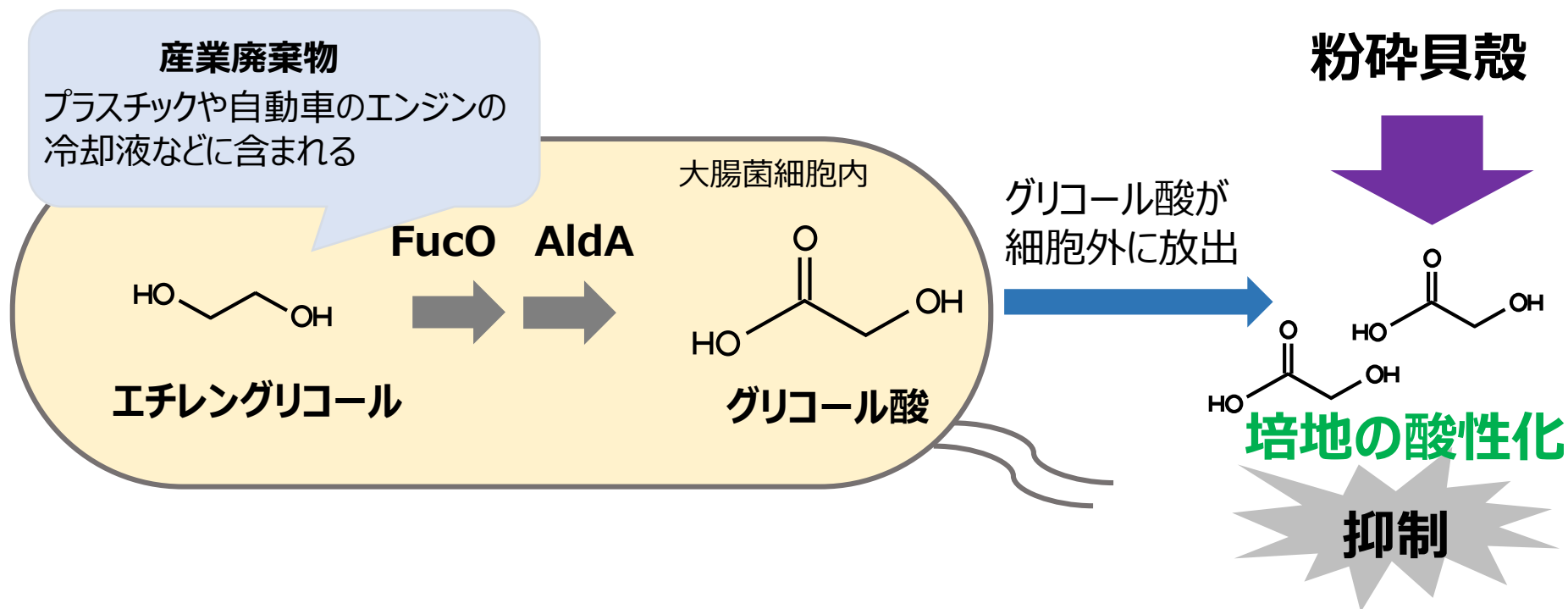
培養液を寒天培地
に植菌



グリコール酸合成時の生菌数



貝殻添加培地では、炭酸カルシウム添加培地と同様に、培養2日目以降も高い生菌数が維持された



大腸菌の生育阻害が緩和され、グリコール酸生産量が向上

【結論】

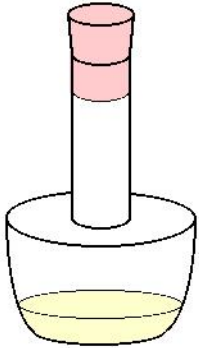
廃棄貝殻は大腸菌によるグリコール酸合成における培地のpH調整剤として利用可能であることが示唆された

最終目標

100 L~

本結果

50 mL



フラスコスケールの培養

1 L~



実験室スケールの大量培養



工業スケールの大規模培養

培養方法の検討などにより

- ・グリコール酸合成量のさらなる向上
- ・廃棄貝殻を大量に活用できる培養方法の確立

を目指す

**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
佐々木 浩徳 様
昆 隆広 様
に御礼申し上げます**