

総 合 論 文

炭酸ガスから化学合成独立栄養的に PHB を生産する 安全な培養プロセスの開発

(平成8年度 日本生物工学会照井賞受賞)

田中 賢二

九州大学農学部食糧化学工学科
〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

Development of Fermentation Processes for Autotrophic Production of P(3HB) from CO₂ under Safe Culture Conditions —Monograph—

KENJI TANAKA (*Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812*) *Seibutsu-kogaku* 75: 185-195, 1997.

Fermentative production of a biodegradable plastic material, poly-D-3-hydroxybutyrate, P(3HB) from CO₂ is expected to contribute to the solution of global environmental pollution problems caused by the increased CO₂ concentration in the atmosphere and the disposal of non-degradable plastic materials. Practical culture method for autotrophic production of P(3HB) from CO₂, H₂ and O₂ by the hydrogen-oxidizing bacterium *Alcaligenes eutrophus* were investigated. A recycled-gas closed-circuit culture system enabled high-cell-density cultivation with high utilization efficiency of substrate gasses. The fermentation conditions for cell growth and P(3HB) accumulation and the stoichiometry for biomass production were thus investigated. The P(3HB) concentration could be increased to 91.3 g/l after 40 h cultivation using an explosion-proof type of fermentation system without the danger of substrate-gas explosion by maintaining the O₂ concentration in the gas phase below the lower limit for explosion (6.9%) and by using a high-performance agitation system ($KLa=2,970\text{ h}^{-1}$). In order to produce P(3HB) under a non-explosive gas composition without using a high-performance agitation system, a two-stage culture method was developed. This method consisted of a heterotrophic cell-growth stage using an organic carbon source and an autotrophic P(3HB) accumulation stage. The P(3HB) concentration could be increased to 21 g/l in the autotrophic culture stage using this method in a normal type of jar fermentor ($KLa=340\text{ h}^{-1}$) under a safe gas composition.

[Key words: PHB, *Alcaligenes eutrophus*, hydrogen-oxidizing bacterium, chemolithoautotroph, carbon dioxide fixation, biodegradable plastics]

はじめに

プラスチック製品は全世界で年間1億トン以上も生産されており、そのうちの12%はわが国でつくられている。しかしながら、その廃棄物による環境汚染問題は年々深刻化している。その解決策として、自然界において微生物の作用によって分解される生物分解性高

分子素材の使用が検討されている。なかでも微生物がつくるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)は熱可塑性のある生分解性高分子として古くから知られており、“地球にやさしい”環境調和型のプラスチック素材として期待されている。PHAはヒドロキシアルカン酸をモノマー単位とするポリエステルであり、多くの細菌がエネルギー貯蔵物質として細胞内にPHAを

Table 1. Polyhydroxyalkanoates and the carbon sources.

Carbon sources	Polyesters
Glucose	Poly-3HB
Propionic acid, pentanoic acid	Poly(3HB-co-3HV)
4HB, 4-hydroxybutyrate	Poly(3HB-co-4HB)
1,4-butanediol, g-butyrolaktone	
4-chlorobutyrate	
4-HB + pentanoic acid	Poly(3HB-3HV-4HB)
5-chloropentanoate + pentanoate	Poly(3HB-3HV-5HV)
Fatty acid (C ₆ -C ₁₂)	Poly(3HA)

HB, hydroxybutyrate; HV, hydroxyvalerate; HA, hydroxyalkanoate (C₄-C₁₂).

蓄積する。Table 1に細菌が合成する代表的なPHAと合成に使用される炭素源を示す。PHAを構成するモノマーの種類と含有率は使用する炭素源や生産菌の種類によって異なり、プラスチック素材としての物性を大きく左右する。PHAを商業レベルで実用化するには多くの課題が残されているが、最大の問題はその価格の高さにある。現在、英国のZeneca社によってD-3-ヒドロキシ酪酸とD-3-ヒドロキシ吉草酸の共重合ポリエステル（商品名；Biopol）が年数百トン規模で生産・販売されているが、その価格は1kgあたり2,000～3,000円で、¹⁾従来使われてきたプラスチックに較べると価格に圧倒的な差がある。PHAの価格を安くするには生産コストの低減が必須であるが、具体的には以下の検討項目が考えられる。

- (1) 生産速度の向上
 - (2) PHA生産濃度および菌体あたりのPHA含有率の向上
 - (3) より安価な炭素源の探索と利用法の開発
 - (4) PHA含有菌体を培養プロセスから回収する操作の効率化
 - (5) 菌体からPHAを回収・精製する操作の効率化
- PHAの高濃度生産や生産の高速化については山根らのグループがメタノール資化細菌などを使って早くから行っており、^{2,3)}現在も多くの研究者がこれに精力的に取り組んでいる。⁴⁻⁸⁾PHAは自然界では最終的に水や炭酸ガスに分解されるため、プロピオン酸のような化石燃料由来の化合物を炭素源として生産していたのでは、温室効果ガスである炭酸ガスを大気中へ大量に放出することになる。したがって、PHAの実用化に当たっては生産原料の由来についても慎重に考慮する

必要があり、光合成の産物である農産廃棄物やバイオマスを原料として利用することが望まれる。さらに、炭酸ガスそのものを炭素源として利用できれば、これは地球温暖化現象の抑止に貢献するものと期待される。このような観点から、光合成細菌やラン藻などの独立栄養微生物あるいは遺伝子組換え植物^{9,10)}を用いた炭酸ガスからのPHA生産が最近よく研究されている。しかし、発酵工業に用いられている微生物に較べると植物や光合成微生物は増殖がたいへん遅く、また、採光のため施設面積が過大になる欠点を抱えている。したがって、炭酸ガスからPHAを生産するには増殖が速く、基質の供給が比較的簡単な化学独立栄養細菌を使用する必要がある。

1. 水素酸化細菌の独立栄養培養における問題点

分子状の水素を酸化し、その際に生ずるエネルギーで炭酸ガスを還元・固定して生育する水素酸化細菌は化学合成独立栄養生物としては増殖速度が非常に速く、なかでも*Alcaligenes eutrophus*は特に増殖が速く、有機化合物を基質に用いる従属栄養条件下でも生育可能であるうえ、すぐれたPHA蓄積能を持っている。本菌の独立栄養条件下での生理・生態についてはSchlegelらが多数の研究報告を残しており、¹¹⁻¹⁵⁾*A. eutrophus*以外の水素酸化細菌についても児玉らのグループが精力的に研究を行っている。¹⁶⁻²⁵⁾しかしながら、*A. eutrophus*を用いたPHA生産については従属栄養条件下での研究がほとんどで、独立栄養条件下での研究は少なく、特に大量生産のための培養技術に関する研究は皆無ともいべき状況にあった。これは基質である水素ガスを菌体に効率よく消費させることの難しさと、水素と酸素の混合ガスを使うため培養に爆発の危険が付きまとうことが大きな原因となっている。

独立栄養細菌の高菌体密度培養技術は発酵工学では未開発の領域であり、もちろん、炭酸ガスや水素ガスを基質とする有用物質の発酵生産はほとんどない。また、水素という無機質ガスを基質として利用することや、培養プロセスが常に爆発の危険に曝されることは発酵工業がこれまで経験することのなかった問題であり、このため新しい発酵技術の創製が必要とされる。以上の背景から、本研究では炭酸ガスからPHAを生産するための水素酸化細菌の実用的な培養プロセスの開発を目的として、PHA生産の効率化とプロセスにおける安全性を確保するための培養制御法について一連の検討を行った。

2. 独立栄養条件下における水素酸化細菌の培養特性と閉鎖基質ガス利用率の改善

水素酸化細菌を用いて炭酸ガスから PHA を生産するには、次の2つの問題の解決が不可欠であった。一つは基質である水素、酸素および炭酸ガスの利用率の改善であり、もう一つはこれら混合ガスの爆発を回避することである。水素酸化細菌を独立栄養条件下で培養するには、硫酸アンモニウムやリン酸カリウムなどからなる無機塩合成培地に水素、酸素および炭酸ガスを適当な比率で調製した混合ガスを供給しなければならないが、これらの無機質ガスは培地への溶解度が非常に小さいため、基質不足による増殖制限が起こりやすい。特に高菌体密度培養では、他の好気発酵と同じ方法で通気・かくはん操作を行っても菌体は供給された基質ガスの一部しか吸収・利用できず、残りのガスはすべて発酵槽外へ排気されることになり、その結果、基質の利用率が大幅に低下する。また、水素と酸素の混合ガスは静電気スパークなどでも容易に爆発するため、これを培養系外に放出することはプロセスの安全性を著しく低下させる。

このため、排出されたガスを再び発酵槽に戻し循環させることによって基質ガスの完全利用を図る閉鎖式のガス循環発酵システムを作製し、これをもとに水素酸化細菌の培養プロセスを開発することにした。閉鎖循環式のガス培養システムの概念はすでに Schlegel らによって発表されており、¹⁴⁾ 新種の水素酸化細菌の分離に使用されたこともあったが、¹⁵⁾ 基質ガス貯槽の容量を大きくする必要があることなどから高菌体密度培養や培養工学的な研究には不向きであった。そこで、まず実験室規模で簡単に取り扱いができる培養システムの作製を行った。²⁶⁾

2.1 閉鎖循環ガス発酵システムの作製と培養方法

閉鎖循環式ガス発酵システムの概要を Fig. 1 に示す。²⁶⁾ 発酵槽として全容積が 220 ml のマイクロジャーフェメンターを、基質ガス貯槽として耐圧性のガラス容器（全容積 20 l）を用いた。ガス貯槽内の空気を真空ポンプとデジタルマノメータを使って基質混合ガスと置換した。ダイヤフラム式の循環ポンプを使って、ガス貯槽内の混合ガスを滅菌フィルターに通した後、発酵槽に供給した。発酵槽内でガスの一部は菌体に消費されるが、残ったガスは圧差によってガス貯槽へと戻され、以後、システム内を循環する。基質ガスが消費されるとシステムの内圧が低下するので、基質ガス

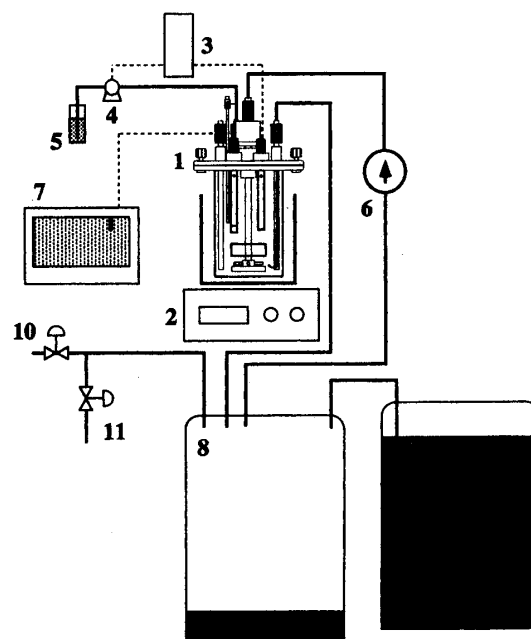


Fig. 1. Schematic diagram of recycled-gas closed-circuit culture system. 1, Fermentor; 2, agitation and temperature controller; 3, pH controller; 4, alkali-tubing pump; 5, NH_3 solution reservoir; 6, gas-recycling pump; 7, DO recorder; 8, gas reservoir; 9, saline water; 10, gas inlet; 11, gas-sampling port.

の培地への溶解速度は減少する。これを防ぐため、ガス貯槽と飽和食塩水を満たしたガラス容器をチューブを介して連結し、飽和食塩水をガス貯槽内に自動的に滴下させることによって内圧を一定に保った。また、これにより菌体の基質ガス消費量を正確に測定することが可能となった。

2.2 回分培養における *A. eutrophus* の増殖特性

本システムを用いて *A. eutrophus* ATCC17697^T を培養し、その増殖特性や基質ガス消費を調べた。²⁶⁾ $\text{H}_2:\text{O}_2:\text{CO}_2=75.0:4.8:11.6$ の組成の混合ガスを供給した培養の結果を Fig. 2 に示す。接種後、本菌は $0.2\sim0.4\text{ h}^{-1}$ の比増殖速度で増殖し、菌体濃度が増加するに従って培養液の溶存酸素分圧は減少した。やがて、培養系は酸素制限状態に陥り、菌体増殖は対数増殖から比例増殖へと移行した。培養系が酸素制限状態に移行する溶存酸素分圧、すなわち臨界溶存酸素分圧は 3.17 kPa 近傍にあった。²⁷⁾ 培養15時間以降に菌体濃度が増加しなくなったのは、気相の酸素濃度が著しく減少して菌体が酸素を利用できなくなったためと考えられる。基質ガスを適宜に補充すると、菌体濃度は順調に増加を続けた。

同様に、基質ガス組成を変化させて回分培養を繰り返す。

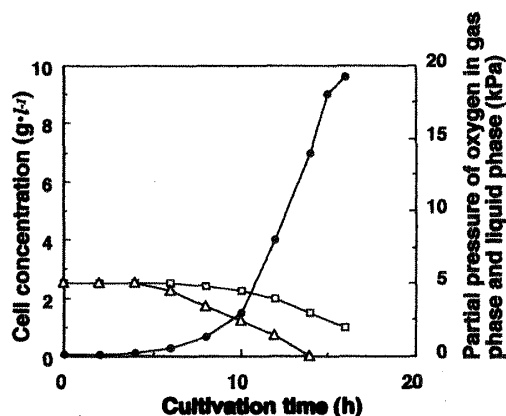


Fig. 2. Autotrophic cell growth of *A. eutrophus* under the gas composition of $H_2:O_2:CO_2=75.0:4.8:11.6$ in recycled-gas closed-circuit culture system. Symbols: ●, cell concentration; □, partial pressure of oxygen in gas phase; △, partial pressure of dissolved oxygen.

返し行ったところ、本菌の増殖は溶存酸素分圧に著しく影響されることが分かった (Fig. 3).²⁶⁾ 培養液の溶存酸素分圧が低下するに従って比増殖速度は増加し、大気圧条件下での溶存酸素分圧 (20 kPa) よりもかなり低い 4.8 kPa 付近の溶存酸素分圧において比増殖速度は最大となった。逆に、溶存酸素分圧が上昇すると比増殖速度は減少し、溶存酸素分圧が 30 kPa 以上になると本菌はほとんど増殖できないことが分かった。溶存酸素濃度の上昇によって菌体増殖が阻害される現象は、他の種類の水素酸化細菌でも報告されている。¹⁹⁾ *A. eutrophus* の増殖が溶存酸素分圧の上昇によって阻害されるのは、ヒドロゲナーゼの酸素に対する感受性が高いことが原因と考えられる。^{12,15)} したがって、*A. eutrophus* の独立栄養条件下での培養では、溶存酸素分圧を 4.8 kPa 付近に制御するのが望ましいと考えられた。

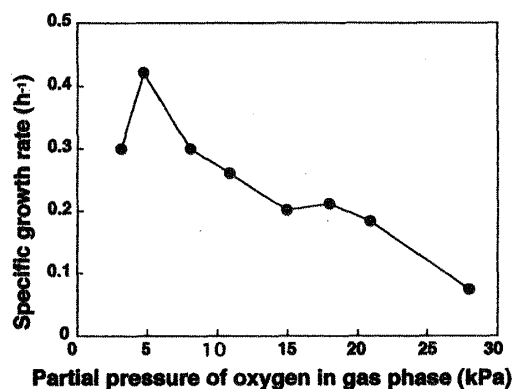


Fig. 3 Effect of partial pressure of dissolved oxygen on specific growth rate.

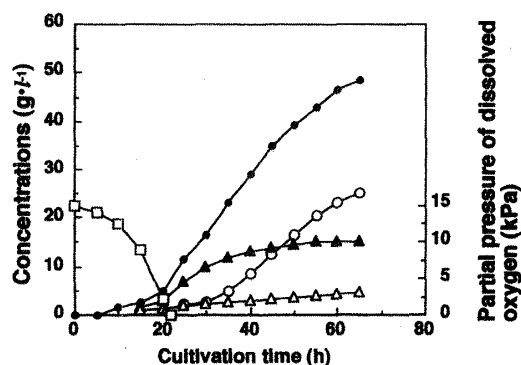


Fig. 4. Time course of oxygen-limited culture of *A. eutrophus* without supplementation of mineral nutrients under the initial gas composition of $H_2:O_2:CO_2=75:15:10$. Symbols: ●, concentrations of cell; ○, P(3HB); △, protein; △, nucleic acid; □, partial pressure of dissolved oxygen.

2.3 溶存酸素制限条件下におけるポリエステルの蓄積 酸素制限条件下では本菌は菌体内に D-3-ヒドロキシン酪酸のポリマー (以下、P(3HB) と称する) を蓄積し、基質ガスを繰り返し補充して培養を続けると、ほぼ一定の速度で P(3HB) を生産した。Fig. 4 に、 $H_2:O_2:CO_2=75:15:10$ の組成の混合ガスを補充しながら行った回分培養の結果を示す。²⁶⁾ 培養20時間で乾燥菌体重量濃度は約 6 g/l に達し、培養系は酸素制限状態に移行した。以後、菌体内には P(3HB) が蓄積した。培養65時間後には乾燥菌体重量濃度は 50 g/l に、P(3HB) 濃度は 26.5 g/l 達した。培養中の無機イオン濃度の変化を調べると、培養20時間目以降はリン酸イオンが枯渇していることが分かった。そこで培養中期において KH_2PO_4 を 0.5 g/l 添加すると P(3HB) の生産はいくぶん速くなり、培養60時間で乾燥菌体重量は

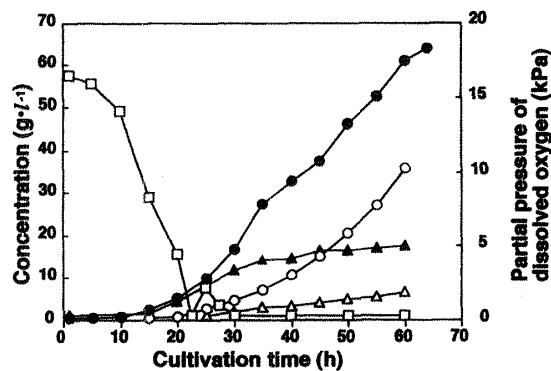


Fig. 5. Time course of oxygen-limited culture of *A. eutrophus* with supplementation of KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ and $CaSO_4$. Symbols are the same as in Fig. 4.

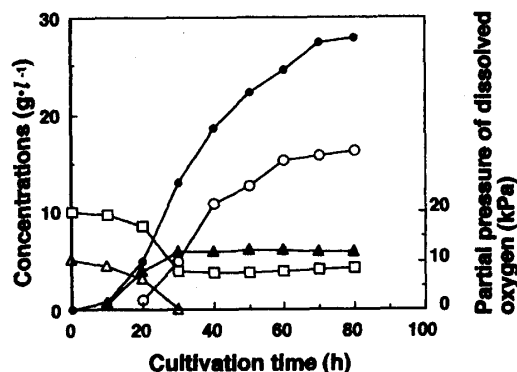


Fig. 6. Time course of ammonium-limited culture of *A. eutrophus*. Symbols: ●, concentrations of cell; ○, P(3HB); ▲, protein; △, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; □, partial pressure of dissolved oxygen.

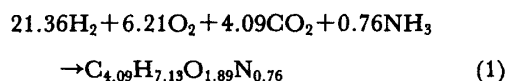
60 g/l に, P(3HB) 濃度は 36 g/l に増加した (Fig. 5).²⁸⁾

2.4 窒素源制限状態でのポリエステルの蓄積 *A. eutrophus* は酸素制限条件だけでなく培地中の窒素源や無機イオンなどの濃度を制限した条件下でも P(3HB) を菌体内に蓄積し, むしろ本菌を始め多くの PHA 生産菌は窒素源濃度を制限した条件下でもっともよく PHA を蓄積することが知られている. しかし, どの条件下でもっとも効率よく PHA を蓄積するかは, 使用する菌株の種類と炭素源の種類によって大きく異なる. 独立栄養条件下では, *A. eutrophus* は溶存酸素濃度を制限した場合にもっともよく P(3HB) を蓄積した. Fig. 6 は窒素源制限培養, すなわち pH 制御のための中和剤としてアンモニア水のかわりに 1N-NaOH を添加した回分培養の結果を示しているが, 酸素制限条件下での培養に較べて P(3HB) の蓄積が悪く, 最終的な P(3HB) 濃度は 16 g/l に過ぎなかった.²⁸⁾ 同様に, リン酸やマグネシウムなどの無機質栄養成分の濃度を制限した場合も, P(3HB) の生成速度と菌体内含有率が酸素制限培養での値に較べて低くなった. また, 気相の水素ガス濃度を低くして水素制限状態で培養を行うと P(3HB) はほとんど蓄積しない.²⁸⁾ 後に述べるが,

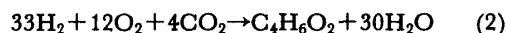
高菌体密度培養では混合ガスの爆発を防止するためにシステム内の気相酸素濃度を非常に低くしなければならず, 培養系が酸素制限状態に陥るのは避けられない. したがって, 炭酸ガスから P(3HB) を生産するには酸素制限条件下で培養するのが望ましいと判断した.

2.5 独立栄養条件下における菌体生成の化学量論式とエネルギー利用効率 本研究に用いた培養システムは完全な密閉系なので, 培養前後における気相容積と組成の変化から基質ガス消費量を測定することが可能である. そこで, 菌体生成量, 生成菌体の元素組成および各基質ガス消費量から本菌の増殖と P(3HB) 蓄積に関する物質収支を明らかにした. これを Table 2 に示す. また, これらのデータをもとに, 菌体生成の化学量論式を次のように決定した.^{26,28)}

Exponential cell growth;



P(3HB) formation;



式 (1) は対数増殖期における菌体生成に関する化学量論式, 式 (2) は酸素制限条件下における P(3HB) 生成に関する化学量論式を示している. 式 (1) に示されるように, 対数増殖期では 1 モルの菌体 (元素組成; $\text{C}_{4.09}\text{H}_{7.13}\text{O}_{1.89}\text{N}_{0.76}$, P などの無機元素も含めて約 100 g) が生成するために約 21 モルの水素と 6 モルの酸素が消費され, それに伴い 4 モルの炭酸ガスが固定されることがわかった. 式 (1) は, Bongers らが dead-end culture system によって決定した *A. eutrophus* の化学量論式とよく一致した.²⁹⁾ しかし, *Pseudomonas* 属の水素酸化細菌¹⁷⁾ や *Alcaligenes hydrogenophilus*³⁰⁾ とはかなり異なっていた. また, 式 (2) が示すように本菌の P(3HB) 蓄積期ではほぼ同じモル数の炭酸ガスを固定するために水素の消費量が対数増殖期に較べて約 1.5

Table 2. Material balance for production of biomass, P(3HB) and residual biomass* in the oxygen-limited culture.

Product	Amount of product (g)	Gas consumption (mol)			Elementary composition of product
		H ₂	O ₂	CO ₂	
Biomass including P(3HB)	3.05	0.833	0.247	0.132	$\text{C}_{4.38}\text{H}_{7.07}\text{O}_{2.17}\text{N}_{0.38}$
Residual biomass	2.01	0.376	0.114	0.045	$\text{C}_{4.09}\text{H}_{7.13}\text{O}_{1.89}\text{N}_{0.76}$
P(3HB)	1.04	0.456	0.133	0.087	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$

*Residual biomass is the cell components except P(3HB).

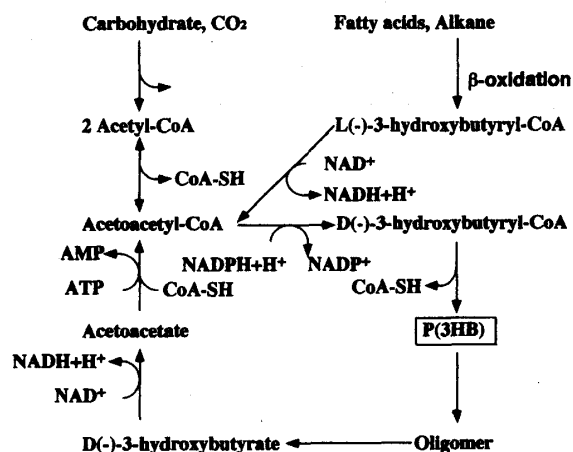


Fig. 7. Biosynthesis pathway of P(3HB).

倍に増加することが明らかになった。P(3HB)蓄積期において菌体の水素要求量が対数増殖期よりも大きくなった理由を、以下のように考察した。培養系が酸素制限状態に移行すると電子伝達系におけるNADHのNADへの酸化・再生が滞り、NADHの菌体内濃度が上昇する。菌体内NADH濃度の上昇はTCAサイクルの関与酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼやクエン酸シンターゼの活性を阻害し、その結果、菌体内にはアセチル CoA が蓄積する。アセチル CoA は、P(3HB)合成酵素の作用によってアセトアセチル CoA、ヒドロキシブチリル CoA を経て、P(3HB)の合成に利用される (Fig. 7)。対数増殖期ではエネルギー生成反応と菌体合成のためのエネルギー消費反応はうまく共役しており、水素酸化によって生じたエネルギーはすみやかに菌体合成に利用されると考えられる。しかし、培養系の溶存酸素や窒素源が制限された状態では菌体合成反応が抑制され、菌体内にはエネルギーが過剰に蓄積することになる。過剰なエネルギーの一部はポリエステルの合成などに利用されて菌体内に蓄えられ、残りは発酵熱などとして菌体外に放出される。このため、P(3HB)蓄積期においてはエネルギー源である水素と酸素の要求量が増加するのではないかと考えられた。実際、P(3HB)蓄積期では対数増殖期に較べて菌体内の ATP レベルが約1.5倍に増加し、さらに培地にリン酸が過剰に存在するとポリリン酸が菌体内に蓄積した。³¹⁾ P(3HB)もポリリン酸も細菌にとっては、エネルギー高貯蔵物質である。また、P(3HB)蓄積期では対数増殖期に較べて発酵熱による温度上昇が激しくなった。

3. 酸素供給の制御による爆発の回避

3.1 三成分系ガスの爆発範囲とガス組成の制御

閉鎖循環式ガス発酵システムを用いることにより、基質ガスをほぼ完全に利用しながら P(3HB)を生産できた。しかし、水素酸化細菌による有用物質生産を実用化するには、混合基質ガスが爆発する問題も完全に解決しなくてはならない。一般に、水素、酸素および炭酸ガスからなる混合ガスが爆発を起こす下限界濃度は、酸素に関して6%(v/v)、水素に関して4%(v/v)とされている。³²⁾しかし、閉鎖循環式発酵システムのように水蒸気を多く含むガスが系内を循環する場合には、爆発範囲はこれと異なることが考えられた。そこで、ヘンベル式の高圧ガス定量装置 (JIS K2301-1980) を改良した装置を用いて、酸素および水素ガスの爆発下限界濃度を測定した。その結果、炭酸ガスを数%~10%(v/v)含む混合ガスは、酸素濃度が6.9%(v/v)以下になるか、水素濃度が4.0%(v/v)以下になると、静電気スパークなどが生じて爆発しないことがわかった。^{33,34)}したがって、水素酸化細菌の独立栄養的な培養プロセスにおいて基質ガスの爆発を回避するには、気相組成が爆発範囲に入らないようにガスの供給を制御するのがもっとも確実である。しかし、菌体生成の化学量論式が示すように *A. eutrophus* の水素要求量は非常に大きいので、気相の水素濃度をあまりに低くすると培養系は容易に水素制限状態に移行し、その結果として P(3HB)が蓄積しなくなる。したがって、本研究では気相の酸素濃度を爆発下限界以下に保つようにガス供給を制御することによって培養プロセスの安全性を確保することにした。

3.2 防爆型培養ベンチプラントの開発

非爆鳴気組成下での培養試験を行うため、先の閉鎖循環ガス発酵システムをベースとして防爆型の培養ベンチプラントを西部ガス株式会社総合研究所と共同で作製した (Fig. 8)。³⁵⁾発酵槽には全容積2lのジャーファーメンタを用い、ガス循環ライン上には可燃性ガス検出装置やガス供給遮断装置などの安全装置を導入した。また、循環ポンプや電気系統は全て防爆型のものを使用し、ガス循環ラインとして用いたステンレス製のパイプにはすべて禁油処理を施して静電気スパークの発生を防止した。

ところで、6.9%(v/v)という気相酸素濃度は空気のものに較べると3分の1しかなく、このように低い気相酸素濃度では酸素移動速度が激減する。酸素移動速

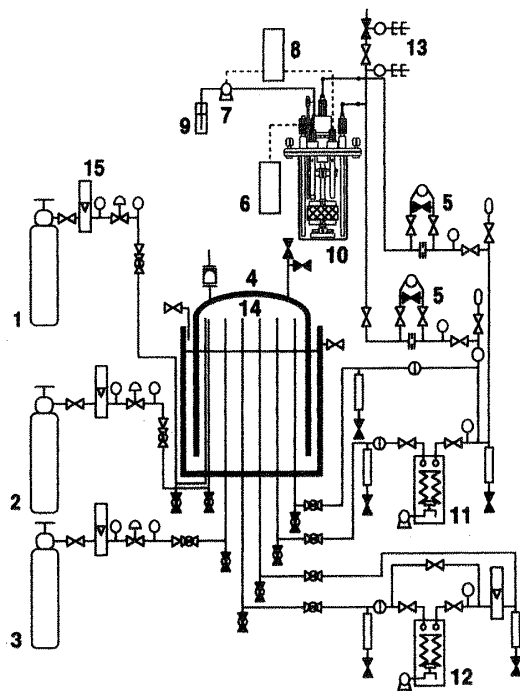


Fig. 8. Schematic flow diagram of the bench-plant scale recycled-gas closed circuit culture system. 1, O₂ cylinder; 2, H₂ cylinder; 3, CO₂ cylinder; 4, gas reservoir; 5, differential-pressure type flowmeter; 6, DO controller; 7, alkali feeding pump; 8, pH controller; 9, NH₃ solution; 10, fermentor; 11, circulating pump; 12, mixing pump; 13, internal pressure sensor; 14, saline replacement; 15, flowmeter.

度 (OTR) は式 (3) が示すように、気相と液相間の酸素分圧の差 ($p_g - p_L$)、ヘンリー定数 H および酸素移動速度容量係数である KL_a の積として表わされる。

$$OTR = KL_a \cdot H \cdot (p_g - p_L) \quad (3)$$

そして、式 (3) と P(3HB) 生成の化学量論式から、ある通気条件下における P(3HB) 生産速度 γ_{cell} を式 (4) によって推定することが可能である。

$$\gamma_{\text{cell}} = 0.26 \cdot KL_a \cdot H \cdot (p_g - p_L) \quad (4)$$

ラボスケールの閉鎖循環ガス発酵システムで使用した発酵槽の KL_a は、かくはん速度 1,400 rpm、通気量 1.5 vvm、温度 30°C の条件では 760 h^{-1} であり、好気培養用の発酵槽の性能としては決して低くはなかったが、気相の酸素濃度を 6.9%(v/v) まで下げると式 (4) から推定される P(3HB) 生産速度は $0.4 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ しかない。³⁵⁾

そこで、防爆型培養ベンチプラントではパイオット (株) 製の EG-star という特殊なかくはん装置を使用す

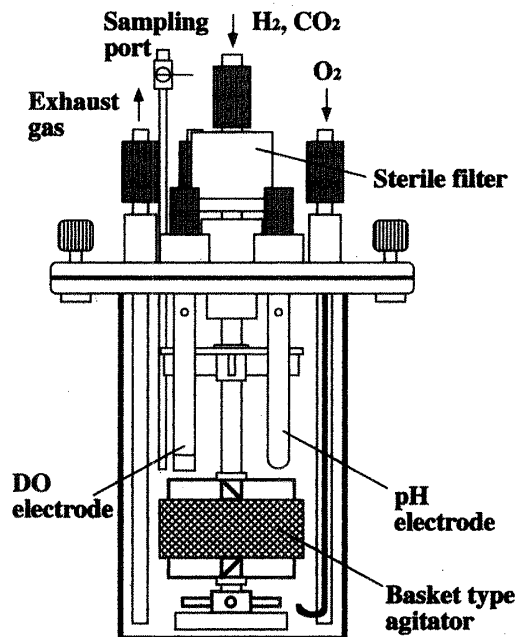


Fig. 9. Diagram of a basket-type agitation system.

ることにより発酵槽の KL_a を高めた。Fig. 9 に示すように、このかくはん装置は、ドーナツ形状をしたステンレス製の籠型かくはん翼と、その上下に取り付けられたタービン翼によって構成されており、700 rpm、1.5 vvm の通気条件下で発酵槽の $2,970 \text{ h}^{-1}$ の KL_a を得ることができた。³⁵⁾ また、水素と炭酸ガスを 9:1 の割合で調製した混合ガスを発酵槽中央部のスパージャーから供給し、酸素ガスは別のスパージャーから供給した。防爆型電磁弁と接続した溶存酸素濃度コント

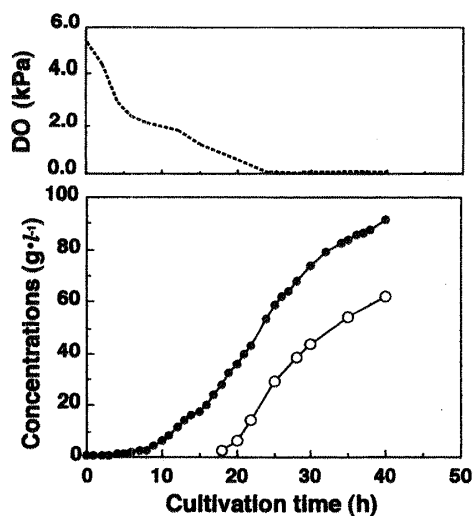


Fig. 10. Time course for autotrophic batch culture of *A. eutrophus* using the explosion-proof type bench plant with separate feeding of oxygen gas. Symbols: ●, concentrations of cell; ○, P(3HB).

ローラによって、ガス循環ライン中における気相酸素濃度が爆発下限界を超えないように酸素ガスの供給を制御した。

3.3 防爆型培養ベンチプラントによる P(3HB) の生産 防爆型ベンチプラントでの回分培養の結果を Fig. 10 に示す。気相の酸素濃度は培養全期間を通じて 6.0%(v/v) 付近に維持した。培養40時間で菌体濃度は約 91.3 g/l に、P(3HB) 濃度は 62 g/l に増加した。P(3HB) の生産速度は培養25時間目で 5.0 g/l·h⁻¹ に達し、以後は時間が経つにつれて減少した。25時間目以降、P(3HB) の生産速度が減少したのは、基質ガス消費速度の増大により気相の酸素濃度を爆発下限界付近に維持できなくなり、そのため酸素ガスの供給を停止したことが原因と思われる。培養全期間を通じての P(3HB) の生産性は 1.55 g/l·h⁻¹ であった。³⁵⁾

閉鎖循環型システムおよび防爆型培養システムでの培養成績を、水素酸化細菌の高菌体密度培養および PHA の発酵生産に関する過去の報告と比較した (Table 3)。なお、PHA 生産に関しては、有機化合物を炭素源に用いて *A. eutrophus* のグルコース資化性変異株や他の種類の菌株を従属栄養条件下で培養した結果も含んでいる。本研究で得られた *A. eutrophus* の菌体濃度と菌体生産性は、水素酸化細菌の独立栄養条件下での培養成績としてはもっとも高く、化学合成独立栄養微生物のなかでも飛び抜けて高い。また、グルコースなどの有機化合物を用いた培養と較べても遜色のない生産速度と収量で P(3HB) を得られることが示された。

このように防爆型培養ベンチプラントを用いて気相の酸素濃度を低くすることによって、爆発の危険のない安全な条件下で高い P(3HB) 収量を得ることに成功

Table 3. List of autotrophic cultivations of hydrogen-oxidizing bacteria and fermentative production of P(3HB) using various microorganisms and substrates.

Strains	Substrate	Culture method	Cultivation time (h)	Cell concentration (g/l)	Cell productivity (g/l·h)	P(3HB) concentration (g/l)	P(3HB) productivity (g/l·h)	Ref.
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Batch	25	25.0	1.00	—	—	41
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Batch	40	91.3	2.28	61.9	1.55	35
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Batch	48	24.0	0.50	—	—	29
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Continuous			0.40	—	—	46
<i>Alcaligenes eutrophus</i> H16	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Batch	70	18.0	0.26	16.0	0.23	42
<i>Alcaligenes hydrogenophilus</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Continuous			0.33	—	—	43
<i>Pseudomonas hydrogenothermophila</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Continuous			3.00	—	—	44
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	H ₂ /O ₂ /CO ₂	Batch	60	60.0	1.00	36.0	0.60	28
Recombinant <i>E. coli</i>	Glucose	Fed-batch	42	117.0	2.79	89.0	2.11	4
<i>Protomonas extroquens</i>	Methanol	Fed-batch	121	223.0	1.84	136.0	1.12	3
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Glucose	Fed-batch	50	164.0	3.28	121.0	2.42	5
<i>Alcaligenes latus</i>	Sucrose	Fed-batch ^a	18	142.0	7.89	68.4	4.0	6
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Methanol	Fed-batch	70	250.0	5.57	130	1.85	7
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Glucose + valerate	Fed-batch	50	—	—	90.4 ^b	1.80	8

^a The inoculum cell size was 13.7 g/l.

^b The product was poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate).

した。しかし、ベンチプラントで使用した発酵槽の KLa は非常に高く、このように特殊な発酵槽をそのまま工業レベルでの発酵に使用することは実用的ではない。かといって酸素供給能が低い発酵槽を使うと P(3HB) の生産性は低下する。

4. 2段階培養法による安全な条件下での P(3HB) 生産

4.1 2段階培養法による P(3HB) の生産 そこで、 KLa のあまり高くない通常タイプの発酵槽を使って、気相酸素濃度を低くした条件でも高い P(3HB) 収量を得られる培養方法について検討した。そのため、培養の全期間を独立栄養的に行うのではなく、まず糖などの有機炭素源を用いて空気を通気することによって菌体を従属栄養的に増殖させ、次に酸素濃度を 6.9%(v/v) 以下に調製した混合基質ガスを供給することによって独立栄養的に P(3HB) を蓄積させる培養方法を新たに考案した。³⁶⁾ 我々は、これを従属・独立栄養段階からなる 2 段階培養法と呼んでいる。もちろん、この方法では菌体増殖段階における有機炭素源の異化により炭酸ガスが発生するが、後の P(3HB) 蓄積段階で菌体によって固定・還元される炭酸ガス量のほうが増殖段階において発生する炭酸ガス量よりもずっと多いため、培養プロセス全体は炭酸ガス吸収系として機能する。

従属栄養段階での炭素源として 10 g/l のフルクトースを用いた 2 段階法による回分培養の結果を Fig. 11 に示す。使用した発酵槽（全容積；220 ml）の KLa は 1,400 rpm, 1.5 vvm の通気条件下では 340 h^{-1} であった。菌体濃度を 4.3 g/l まで従属栄養的に増殖させた後に、混合ガスを供給して独立栄養条件下で菌体内に P(3HB) を蓄積させたところ、P(3HB) 濃度は 21 g/l まで増加した。³⁶⁾ このように 2 段階培養法により P(3HB) の高濃度生産が可能であることを確認したが、ただし従属栄養段階で使用したフルクトースは価格が非常に高いので、現在これに代わる炭素源として乳酸発酵によって農産廃棄物、特にリグノセルロースから生産した乳酸や酢酸などの有機酸を原料とする生産法を検討している。^{37,38)}

4.2 気泡塔によるパイロットプラント運転 つづいて、地球環境産業技術研究機構 (RITE) の研究プロジェクトとして、パイロットプラントを西部ガス株式会社管内に設置したが、ガス爆発を避ける安全上の配慮からパイロットプラントには気泡塔型バイオリア

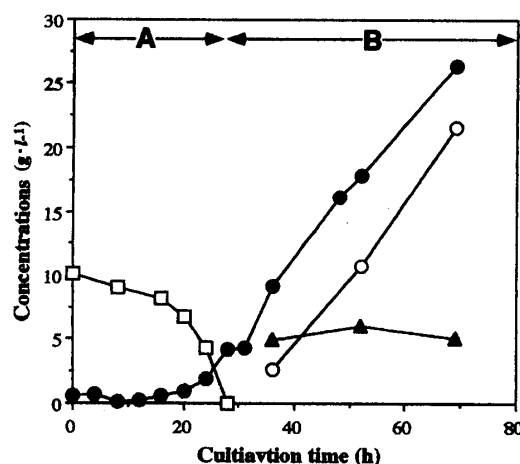


Fig. 11. Time course of a two-stage culture of *A. eutrophus* using 10 g/l fructose medium in the heterotrophic stage (indicated by "A") and a substrate gas mixture composed of $\text{H}_2 : \text{O}_2 : \text{CO}_2 = 86.5 : 4.9 : 9.8$ in the autotrophic stage (indicated by "B"). Symbols: ●, concentrations of cell; ○, P(3HB); ▲, protein; □, fructose.

クター（容量；400 l）を採用した。³⁹⁾ しかし、ここで使用した気泡塔型発酵槽の KLa は 100 h^{-1} 程度しかなく、P(3HB) 生産性は非常に低くなった。一方、菌体内に蓄積可能な P(3HB) 量にも当然限界があり、最大でも菌体あたり 90%(w/w) の含有率までしか P(3HB) は蓄積できないので、低い菌体濃度で培養系が酸素制限状態に移行して P(3HB) が蓄積し始めると、P(3HB) の最終的な収量も当然低くなってしまふ。この問題を解決する方法として、培養系に CMC などの増粘剤を若干量添加して培養液のレオロジーを制御することにより酸素移動速度を高める方法を検討している。⁴⁰⁾

おわりに

本研究では、資源のリサイクルを前提とした環境調和型の発酵工業技術の開発を目的として、炭酸ガスから生分解性プラスチック素材を生産するための水素酸化細菌の発酵プロセスと生産の効率化、プロセスにおける安全性の確保について検討した。このため、まず閉鎖循環ガス発酵システムを使って *A. eutrophus* の独立栄養条件下での増殖および P(3HB) の生産特性を調べた。本システムをベースにして防爆型の培養ベンチプラントを製作し、気相の酸素濃度を 6.9% 以下に抑え、かつ KLa の高い特殊な発酵槽を用いることにより、爆発の危険性のない安全な条件下で高い P(3HB) 生産速度を得ることができた。さらに KLa のあまり

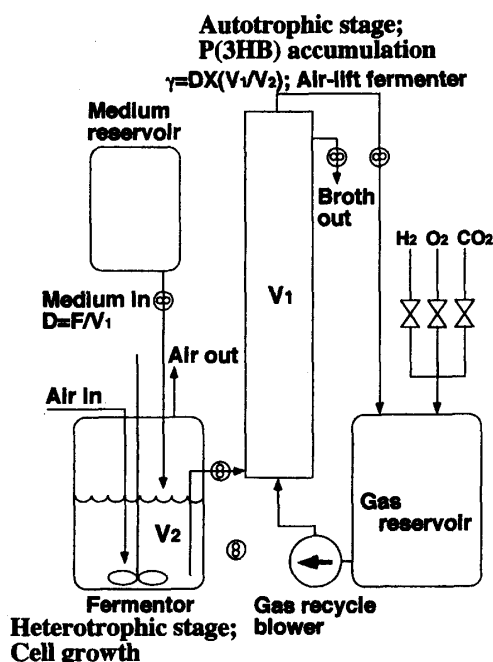


Fig. 12. Schematic diagram of the two-stage bioreactor for continuous production of P(3HB) from CO₂.

高くない通常タイプの発酵槽を用いても高いP(3HB)収量が得られる培養法として、従属栄養培養と独立栄養培養からなる2段階培養法を開発した。菌体濃度を4.3 g/lまで従属栄養的に増殖させた後に、混合ガスを供給して独立栄養条件下で菌体内にP(3HB)を蓄積させたところ、P(3HB)濃度は21 g/lまで増加した。2段階培養法は、特にP(3HB)生産の連続化に有効と考えられる。*Alcaligenes latus*⁶⁾などの一部の菌株を除けば、PHA生産菌の多くはPHA蓄積期では新しい細胞をほとんど生成せず、PHAはすでに生成した細胞の中に蓄積する。したがって、連続培養法でPHAを生産するには希釈率を非常に低く設定しなければならない。有機化合物の基質を0.1~0.2 h⁻¹程度の希釈率で供給して従属栄養的に菌体を増殖させ、その培養プロセスを従属栄養段階での10倍容積の発酵槽に供給して、0.01~0.02 h⁻¹の希釈率で独立栄養的に連続培養を行えば、気泡塔発酵槽を用いて効率よくPHAを生産できるのではないと思われる (Fig. 12)。

*A. eutrophus*が炭酸ガスから生産するPHAはP(3HB)であり、D-3-ヒドロキシ酪酸などを構成モノマーとして含むプラスチック素材としての物性にすぐれる共重合タイプのPHAではなかった。しかし、遺伝子工学などの手法を用いることによって物性のすぐれたポリエステルを炭酸ガスから合成することは充分可能と思われる。八木らは炭酸ガスから共重合タイプの

PHAを生産する *Pseudomonas acidophila* の組換え体株の作製に成功している。⁴⁵⁾ 一方、水素ガスについてはその供給源をどこに求めるかという根源的な問題が残されているが、現在のところ、天然ガス精製工程において副産物として生成するガスなどに依存するしかないように思われる。しかし、水素エネルギーは次世代の2次エネルギーとしても利用が期待されており、将来、大量生産される可能性も残されている。

生分解性プラスチック素材の商業的な実用化にはまだまだ多くの課題が残されているが、本研究を通じて得られた知見が生分解性プラスチック素材の実用化のみならず、独立栄養細菌の産業面での応用に役立つことを期待している。

本研究テーマをお与え下さり、終始御指導頂いた九州大学農学部教授石崎 文彬先生に深謝申し上げます。また、さらに、本研究は九州大学農学部食糧化学工学科微生物工学講座の卒業生と西部ガス株式会社バイオグループの皆様のご協力とご努力によって成し得た成果であるので、ここに心より感謝申し上げます。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金(試験研究(B)(1)、研究課題番号04556011)によって行われました。

文 献

- 1) 生分解性プラスチック研究会編著：生分解性プラスチックハンドブック、エヌ・ティー・エス、東京(1995)。
- 2) Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322-329 (1986)。
- 3) Suzuki, T., Yamane, T., and Shimizu, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 370-374 (1986)。
- 4) Kim, B. S., Lee, S. Y., and Chang, H. N.: *Biotechnol. Letters*, **14**, 811-816 (1992)。
- 5) Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., and Woo, S. I.: *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892-898 (1993)。
- 6) Yamane, T., Fukunaga, M., and Lee, Y. W.: *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 197-202 (1996)。
- 7) Kim, S. W., Kim, P., Lee, H. S., and Kim, J. H.: *Biotechnol. Lett.*, **18**, 25-30 (1996)。
- 8) Lee, I. Y., Kim, M. K., Kim, G. J., Chang, H. N., and Park, Y. H.: *Biotechnol. Lett.*, **17**, 571-574 (1995)。
- 9) Poirier, Y., Dennis, D. E., Klomparens, K., and Somerville, C.: *Science*, **256**, 520-523 (1992)。
- 10) Nawrath, C., Poirier, Y., and Somerville, C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12760-12764 (1994)。
- 11) Schlegel, H. G., Gottschalk, G., and von Barthán, R.: *Nature*, **191**, 463-465 (1961)。
- 12) Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., and Gottschalk, G.: *Arch. Microbiol.*, **38**, 209-222 (1967)。
- 13) Schlegel, H. G. and Schuster, E.: *Arch. Microbiol.*, **58**, 380-409 (1967)。
- 14) Schlegel, H. G. and Lafferty, R. M.: *Advan. Bio-*

- chem. Eng.*, **1**, 143-168 (1971).
- 15) Oeding, V. and Schlegel, H. G.: *Biochem. J.*, **134**, 239-248 (1973).
 - 16) Kodama, T., Igarashi, Y., and Minoda, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 77-82 (1975).
 - 17) Kodama, T., Igarashi, Y., and Minoda, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **39**, 83-87 (1975).
 - 18) Kodama, T., Igarashi, Y., and Minoda, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **40**, 2373-2377 (1976).
 - 19) Goto, E., Suzuki, K., Kodama, T., and Minoda, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 521-525 (1977).
 - 20) Goto, E., Suzuki, K., Kodama, T., and Minoda, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 685-690 (1977).
 - 21) Goto, E., Kodama, T., and Minoda, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1305-1308 (1978).
 - 22) Kawasumi, T., Igarashi, Y., Kodama, T. and Minoda, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1985-1986 (1980).
 - 23) Nishihara, H., Igarashi, Y., and Kodama, T.: *Arch. Microbiol.*, **153**, 294-298 (1990).
 - 24) Nishihara, H., Igarashi, Y., and Kodama, T.: *Int. J. Synt. Bacteriol.*, **41**, 130-133 (1991).
 - 25) Yaguchi, T., Chung, S.-Y., Igarashi, Y., and Kodama, T.: *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 1-8 (1993).
 - 26) Ishizaki, A. and Tanaka, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **69**, 170-174 (1990).
 - 27) Takeshita, T., Tanaka, K., Ishizaki, A., and Stanbury, P. F.: *J. Ferment. Bioeng.*, **76**, 148-150 (1993).
 - 28) Ishizaki, A. and Tanaka, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 254-257 (1991).
 - 29) Bongers, L.: *J. Bacteriol.*, **104**, 145-151 (1970).
 - 30) Ohi, K., Nishimura, T., and Okazaki, M.: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 203-209 (1979).
 - 31) Ishizaki, A. and Tanaka, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 288-291 (1992).
 - 32) Yagyu, S.: *Anzenkougaku*, **1**, 100-104 (1962).
 - 33) Ishizaki, A. and Tanaka, K.: *The Proceeding for Global Environment and Energy Issues, Fukuoka International Symposium*, p. 137-143 (1990).
 - 34) Ishizaki, A., Tanaka, K., Takeshita, T., Kanemaru, T., Shimoji, T., and Kawano, T.: *J. Chem. Eng. Japan*, **26**, 225-227 (1993).
 - 35) Tanaka, K., Ishizaki, A., Kanemaru, T., and Kawano, T.: *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 268-275 (1995).
 - 36) Tanaka, K. and Ishizaki, A.: *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 425-427 (1994).
 - 37) Ishizaki, A., Ueda, T., Tanaka, K., and Stanbury, P. F.: *Biotechnol. Lett.*, **14**, 599-604 (1992).
 - 38) Ishizaki, A., Ueda, T., Tanaka, K., and Stanbury, P. F.: *Biotechnol. Lett.*, **15**, 489-494 (1993).
 - 39) 石崎文彬, 田中賢二, 金丸利壽: 学術月報, **48**, 1235 (1995).
 - 40) Taga, N., Tanaka, K., and Ishizaki, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 529-533 (1997).
 - 41) Repask, R. and Mayer, R.: *Appl. Environ. Biotechnol.*, **32**, 592-597 (1976).
 - 42) Sonnleitner, B., Heinzle, E., Braunegg, G., and Lafferty, R. M.: *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 1-10 (1976).
 - 43) Miura, Y., Okazaki, M., Ohi, K., Nishimura, T., and Komemushi, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1173-1182 (1982).
 - 44) 五十嵐泰夫: 農化, **60**, 935-941 (1986).
 - 45) Yagi, K., Mikami, I., Kayashita, A., Kondou, M., Kitano, Y., Murakami, Y., Maeda, I., Umeda, F., Miura, Y., Kawase, M., and Mizoguchi, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1004-1007 (1996).
 - 46) Morinaga, Y., Yamanaka, S., Ishizaki, A., and Hirose, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 439-444 (1978).