

蟻酸からのコポリエステルの微生物生産

福留伸浩* 生沼紀明* 長島秀行** 飯田貢*

Microbial Production of Copolyester from Formic Acid

Nobuhiro FUKUTOME*, Noriaki OINUMA*, Hideyuki NAGASHIMA**, Mitsugi IIDA*

Formate-assimilating *Paracoccus* sp. strain 12A accumulated polyester by using formic acid as a sole carbon source without the intentional nitrogen-source limitation and restriction of air supply. The polyester produced was identified as a copolyester of P (3HB-co-5mol% 3HV) by ^1H and ^{13}C NMR analysis. The molecular weight of copolyester was determined to be 6.4×10^5 by GPC and its maximum content was 60% of dry cell weight. The strain could not assimilate 2-hydroxyoctanoic acid (2HO). By the incubation of formic acid-grown cells in the presence of 2HO for 24hr and 48hr at 30°C, however, 3HV content in P (3HB-co-3HV) increased to 20% and 41%, respectively, under nitrogen-deficient conditions. The molecular weight of these copolyester were 3.7×10^5 and 7.4×10^5 , respectively. The copolyester contents of respective cells were 18.4% and 21.3% of dry cell weight. Further, the presence of many copolyester granules was observed in formic acid-grown cells by transmission electron microscopy.

Keywords : Formate-assimilating bacteria, *Paracoccus* sp. 12A, Copolyester, 3-Hydroxybutyrate (3HB), 3-Hydroxyvalerate (3HV), P (3HB-co-5 mole% 3HV), Formic acid

蟻酸資化性細菌、*Paracoccus* sp. 12A株は菌体内にポリエステルを蓄積する。また、窒素源や通気量の制限なしで唯一の炭素源として蟻酸を用いて本菌株を培養した時、そのポリエステルは菌体内に最大60%を含有し、その分子量は 6.4×10^5 、融点は168°Cであった。このポリエステルは5モル%の3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)を含む3-ヒドロキシ酪酸(3HV)とのコポリエステルP(3HB-co-5mol% 3HV)と同定された。本菌株は2-ヒドロキシオクタン酸(2HO)を資化できない。そのため、窒素源を欠乏させた条件において、蟻酸生育菌体を2HOで24時間と48時間反応させると、コポリエステル中の3HVの組成比がそれぞれ20モル%と41モル%に高められ、分子量はそれぞれ 3.7×10^5 と 7.4×10^5 であった。また、コポリエステル含量はそれぞれ18.4%と21.3%であった。さらに、電子顕微鏡の観察によっても、多数のコポリエステル顆粒の存在が蟻酸生育菌体内に確認された。

キーワード : 蟻酸資化性細菌、*Paracoccus* sp. 12A株、コポリエステル、3-ヒドロキシ酪酸(3HB)、3-ヒドロキシ吉草酸(3HV)、P(3HB-co-5mol% 3HV)、蟻酸

* 東京理科大学理工学部応用生物科学科 (〒278 千葉県野田市山崎2641) : Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641, Yamazaki, Noda, Chiba, 278

** 東京理科大学理学部 (〒278 千葉県野田市山崎2641) : Faculty of Science, Science University of Tokyo, 2641, Yamazaki, Noda, Chiba, 278

1. 緒言

近年、増加の一途をたどる廃棄物問題と環境保護の立場から汎用高分子素材の生分解性および光分解性高分子への転換に強い関心が集まってきている。現在、使用されている包装素材の多くのものは、石油を原料としての合成高分子である。これら高分子の殆どのが、非生分解性である。これらの使用増加は自然環境の全てに悪い影響を与えている。この問題を解決する一つの手段として、微生物の生産する生分解性プラスチックに対する要求が増加している。

ポリ-β-ヒドロキシ酪酸 (PHB) は、微生物が菌体内に蓄積するエネルギー貯蔵物質で、一種の脂肪族ポリエステル¹⁾ である。PHBはその構成単位が3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) からなるホモポリマーで、融点が180℃前後で硬くもろいという欠点をもっている。この欠点はPHBが3-ヒドロキシ吉草酸 (3HV) などの脂肪酸との共重合体を形成させることによって解消される²⁾。

3HBと3HVを構成単位とするコポリマーは、*Paracoccus denitrificans*³⁾、*Rhodospirillum rubrum*⁴⁾、*Methylobacterium extroguenens*^{3), 4)}、*Alcaligenes eutrophus*⁵⁾ のような微生物によってメタン、メタノール、メチルアミンなどのC₁化合物や二酸化炭素から合成されると言われるいるが、蟻酸からのコポリマーを合成する微生物に関しての報告は見当たらない。

最近、我々は唯一の炭素源およびエネルギー源として蟻酸を資化する新しい細菌、*Paracoccus* sp. 12A株をスラッジから分離した⁶⁾。本菌株はメタンやメタノールを資化

できないが、蟻酸を唯一の炭素源として供給した際、その菌体内に60% (重量) のコポリマーP (3HB-co-5mol% 3HV) を生産蓄積することを発見した。更に、蟻酸生育菌体が窒素源欠乏の条件下で、2-ヒドロキシオクタン酸と反応させることにより3HVの組成比が41モル%に高められたコポリマーP (3HB-co-41% 3HV) の合成にも成功したので報告する。

2. 実験方法

2.1 薬品 (標準ポリエステルと蟻酸)

標準ポリエステルとして、PHB (分子量=640K) とP (3HB-co-30mol% 3HV) (分子量=800K) はAldrich Chemical Co Inc. (Milwaukee, USA) から、蟻酸 (GR) は和光純薬工業 (大阪) からそれぞれ購入し、実験に使用した。

2.2 培養法

蟻酸資化性細菌は、1986年茨城県守谷工業排水処理場から採取したスラッジ2gを蟻酸培地600mlに添加し1L容ジャーファメンター (通気量0.6L/min) を用いて、30℃、7-10日間の集積培養により分離した。蟻酸資化性菌の生育によりpHが上昇するのでpH自動調節機で50%蟻酸を添加しpH7.4を維持した。その培養液を適当に希釈し蟻酸寒天平板培地および普通寒天平板培地を用いて常法により純粋分離を行い、11分離菌株を得た。その内優良な蟻酸資化菌12Aを*Paracoccus* sp.と同定した⁷⁾。なお、12Aは蟻酸の高濃度培養ができないため逐次蟻酸を供給しながら培養を行うこととした。本菌株は3Lの蟻酸

培地を含有する7L容ジャーファメンターに接種して、温度30℃、通気量3L/minで培養し、生育に伴いpHが上昇するため、50%硫酸を添加しpHを約7.4に維持しながら90時間培養を継続した。蟻酸培地の組成⁷⁾は、0.7% KH_2PO_4 、0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.004% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% HCOONa 、0.03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% NaCl と0.1%微量元素溶液、pH7.4である。微量元素溶液は、0.03% H_3BO_3 、0.02% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.075% ZnCl_2 、0.02% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.25% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.01% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ および0.015% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ から構成されている。

2.3 ポリエステルの抽出および精製

菌体内のポリエステルを分離・精製するため、本菌株は2.2の培養法により73時間の通気培養を行った。その培養液を4℃、2700xgで30分間冷却遠心し、集菌後、一昼夜凍結乾燥した。その菌体をソックスレー連続抽出器を用いて熱クロロホルムで2日間抽出した。これを減圧濃縮し、*n*-ヘキサンを添加してポリエステルを沈殿させた。次に、ポリエステルはクロロホルムに再溶解し、濾過した後*n*-ヘキサンにて再沈殿させ、アセトンで洗浄した後、白色のポリエステル結晶を得た。

2.4 メタノリス

各試料6.0mgは2.0mlのクロロホルムに溶解し、それに3%メタノール性硫酸を加えた。この混合液はキャップ付き試験管で100℃、3.5時間加熱し、室温で冷却した。この反応液に1.0mlの蒸留水を加え激しく振盪した。この下層は無水硫酸ナトリウムで乾燥し、GC

とGC-MS分析用試料とした⁸⁾。

2.5 ポリエステルの分析

2.5.1 融点測定

融点は島津製MM-2型融点測定装置を使用し、2℃/minで昇温しながら測定した。

2.5.2 分子量測定

分子量は東ソHLC-8020型高速GPC装置、SC-8020型スーパーシステムコントローラーおよびTSKgelGMH_{HR}-Hカラム付きRI8012型屈折率検出器を接続したゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)を用いて測定した。クロロホルムを溶出溶媒として、4℃、流速1.0ml/minで使用した。試料濃度は0.5mg/ml、注入量は200μlであった。検量線は13種の標準ポリスチレンを用いて作製した。

2.5.3 GC分析

ガスクロマトグラフィー(GC)は日立製163型ガスクロマトグラフシステムを使用し、カラムとして15%DEGS Chromorb GAW DMCS(80/100mesh)(ガスクロ工業)を充填したガラスカラム(3.0mmI.D.×1.5m)を用いてカラム温度、130℃~150℃(2℃/min)、キャリアーガスN₂(40ml/min)、検出器FIDの条件で行った。保持時間(Rt)から定性を、安息香酸を内部標準としてその面積比から定量を行った。

2.5.4 GC-MS分析

GC-MSは、Hewlett Packard製5792A型ガスクロマトグラフ装置に接続した日立製M-80Bダブルフォーカス質量分析機を用いて測定した。ガスクロマトグラムはキャピラリーカラム(DB-wax 0.25mmI.D.×60m);液層、HP-1;カラム温度、100℃~240℃

(2℃/min)；キャリアーガス、He (1ml/min) の条件で行った。

2.5.5 NMR 分析

水素核磁気共鳴スペクトラム ($^1\text{H-NMR}$) は JNM FX100 を用い、100MHz にて、重クロロホルム中でテトラメチルシラン (TMS) を内部標準として測定した。

炭素核磁気共鳴スペクトラム ($^{13}\text{C-NMR}$) は JNM FX100 を用い、25MHz にて、重クロロホルム中で TMS を内部標準として測定した。

2.6 休止菌体によるポリエステルの生成試験

2.2 の培養法によって蟻酸生育菌体 (73 時間培養) を調製した。その菌体 (乾燥重量 400mg 相当) を蟻酸培地から $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を除き、 K_2HPO_4 と KH_2PO_4 の濃度をそれぞれ 0.43 % と 0.27 % にして、蟻酸の替りに 2-ヒドロキシオクタン酸 (2HO) を 320.4mg を加えた 100ml 無機培地に添加した。その菌体懸濁液は 30℃ で、24 時間、48 時間それぞれ回転振盪 (160rpm) しながら反応させた。反応終了後、各菌体を集菌して蒸留水で洗浄し、凍結乾燥した。ポリエステルの抽出は 2.3 の方法で行った。反応混液中に残存する 2HO はエチルエーテルで抽出した。その抽出物はジアゾメタンでメチルエステル化した後、クロロホルムに溶解し GC で定量分析を行った。

2.7 顕微鏡用試料の調製

光学顕微鏡については、蟻酸生育菌体懸濁液 (73 時間培養) をマイクロピペットで採取した 5 μl をスライドガラス上にのせ、5 μl の 2 % グルタルアルデヒドを加えて固定後、オリンパス BH-2 位相差顕微鏡により観察した。

電子顕微鏡では、菌体 0.5ml に 9.75 % グルタルアルデヒドと 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.0) をそれぞれ 0.5ml 加え、室温で 1 時間固定した。次に 0.01M カコジル酸緩衝液 (pH 7.0) で遠心洗浄後、沈澱と同量の 4 % 四酸化オスミウム-0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて最終濃度が 2 % になるようにした。更に、室温で 1 時間固定後、遠心洗浄した試料を寒天で固め、エタノールで段階的に脱水し QY-1 に置換後、Spurr 樹脂⁹⁾ で包埋した。超薄切片はウルトラミクロトーム (Porter-Brum MT-1) を用いて作製し、酢酸鉛、酢酸ウラニルによって二重染色後、電子顕微鏡 (JEM-1200EX) を用いて観察した。

3. 実験結果および考察

3.1 ポリエステルの生産

7L 容ジャーファメンターを用いて、蟻酸培養における本菌株の生育とポリエステル生産との関係を Fig. 1 に示す。本菌株は指数関数的に増殖し、ポリエステル生産もこれに伴って増加し、対数増殖期 (36 時間) で 9 $\mu\text{g/ml}$ 、対数増殖期の終りで、ほぼ定常期 (73 時間) にいたる試料では最大生産量 246.5 $\mu\text{g/ml}$ を得た。その際のポリエステルは凍結乾燥菌体 3.5g から 0.85g が得られ、その含有率は 23 % であった。

次に、菌体内のポリエステルの含量を高めるため、本菌株を蟻酸培地 600ml を含有する 1L 容ジャーファメンターに接種し、通気量を増加 (2.4L/min) させて 30℃、73 時間の通気培養を試みると、最大生育度は前者の培養系の約 1.5 倍となり、ポリエステルは乾燥菌体 0.35g から 0.21g が得られ、その含有率は約

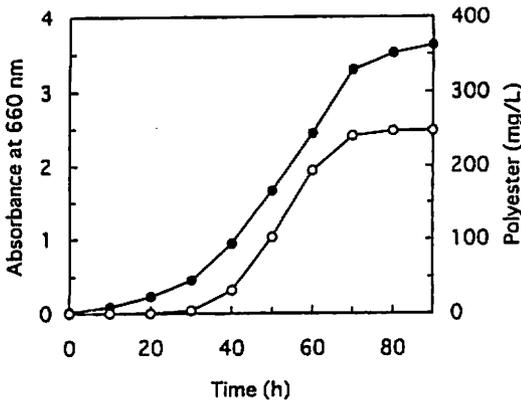


Fig. 1 Time course of growth and polymer production in *Paracoccus* sp. 12A under a sole carbon and energy source of formic acid. The growth was evaluated by measuring the absorbance at 660nm and polymer production was determined by the method of Brauuegg *et al.* (references 8). ●, growth ; ○, polyester production.

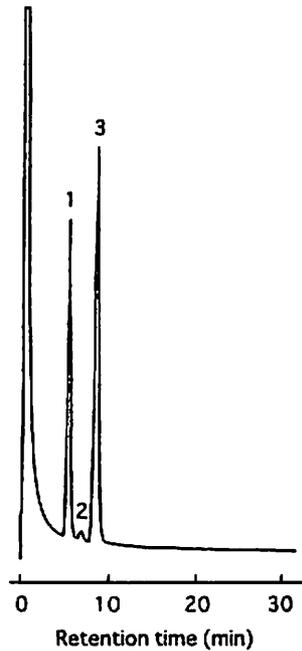


Fig. 2 Gas chromatographic profile of the methanolysated polyester (POL) produced from formic acid-grown cells of *Paracoccus* sp. 12A. Peak 1, 3HB methyl ester ; Peak 2, 3HV methyl ester ; Peak 3, benzoic acid methyl ester, as internal standard.

60%まで高められた。今後、高生産のための詳細な培養条件を検討する。

3.2 ポリエステルの同定

純粋ポリエステル (POL) の融点は168℃で、PHBのもの (180℃) よりも低かった。一般に微生物由来のポリエステルは共重合体になると融点が低下する傾向¹⁰⁾を示すので、POLはコポリマーの可能性が考えられる。

POLの平均分子量は、GPCにより 6.4×10^5 と決定された。POLのメチル化体のGCスペクトラム (Fig. 2) は2つのピーク、ピーク1 (Rt: 5.7min) とピーク2 (Rt: 7.0min) が認められた。これらの値はそれぞれ標準3HBと3HVものと一致した。

次にPOLのGC-MS分析では、3-ヒドロキシル基の特徴的ピーク (m/z 103 [$C_4H_7O_3^+$], m/z 74 [$C_3H_6O_2^+$], m/z 71 [$C_3H_5O_2^+$], m/z 43 [C_2H_3O]) が得られた。また、ピーク1とピーク2の [M-1] はそれぞれ m

/z117, m/z131となり、従って分子量はそれぞれ118, 132と決定され、それらのフラグメントパターンは標準の3HBと3HVの値と完全に一致した。更に、 1H -NMRの δ (ppm) は、0.89 (CH_3 -, t), 1.27 (CH_3 -, d), 1.62 (CH_2 -, m), 2.53 (CH_2 -, m) と5.24 (CH -, m)であった。 ^{13}C -NMRの δ (ppm) は、9.4 (C_5), 19.9 (C_9), 27.0 (C_4), 38.9 (C_2), 40.9 (C_7), 67.7 (C_8), 72.0 (C_3) と169.2 (C_1, C_6)であった。これらの化学シフトとスピンスピンカップリングは、標準化合物P (3HB-co-30mol%3HV)の値^{11), 12)}と完全に一致した。POLの構成脂肪酸、3HBと3HVの組成比は、1.27ppmの二重線 CH_3 -プロトン共鳴 (C_9) に対する0.89ppmの三重線 CH_3

—プロトン共鳴 (C_3) の強度比から 95 : 5 (モル%) と決定された。

以上の諸結果から、POL の構造は P (3HB-co-5mol% 3HV) (Fig. 3) と決定された。微生物による蟻酸からのこのようなコポリエステルの生産は新しい知見であると思われる。

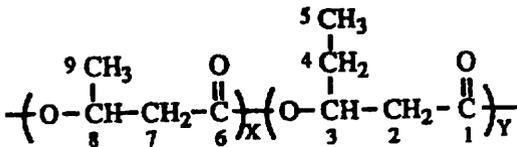


Fig. 3 The structure of P (3HB-co-3HV) copolyester synthesized from formic acid by *Paracoccus* sp.12A grown on formic acid medium.

Number in figure indicates the carbon number in the copolyester.

3.3 ポリエステルの脂肪酸組成に及ぼすヒドロキシ酸の影響

Alcaligenes sp. AK201 株は 2HO や 12-ヒドロキシステアリン酸のような脂肪酸の生育基質からコポリマー、P (3HB-co-47mol% 3HV) を生産する報告⁵⁾ がある。しかし、本菌株はこのようなヒドロキシ脂肪酸を資化しないため、蟻酸生育菌体と 2HO の共存下での休止菌体実験を試み、その結果を Fig. 4 に示す。

24 時間反応させた菌体内のポリエステル (POL-1) は乾燥菌体 437.0mg から 80.2mg が得られ、その含有率は 18.4% であった。48 時間反応の菌体 (POL-2) では乾燥菌体 416.0mg から 88.6mg が得られ、その含有率は 21.3% に高められた。

一方、2HO の無添加系では、24 時間と 48 時間反応させて得られた菌体内のポリエステルをそれぞれ POL-1C、POL-2C とし、ポリ

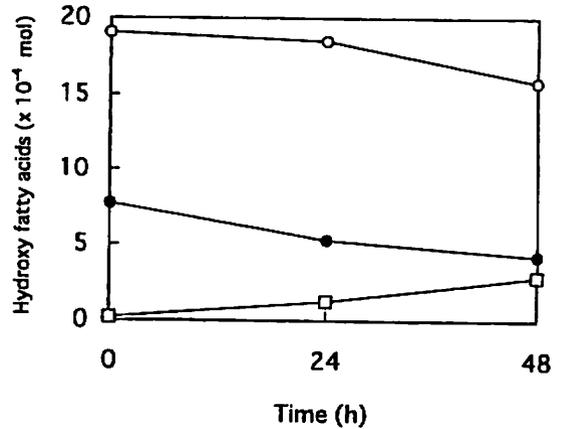


Fig. 4 Effect of 2-hydroxyoctanoic acid (2HO) on the 3HV content in the copolyester synthesized by *Paracoccus* sp.12A. Formic acid-grown cells were incubated at 30°C on a rotary shaker under the nitrogen deficient medium containing 2HO. After methanolysis of the copolyester, each 3-hydroxylated fatty acid methyl ester was analyzed by GC. ○, 2HO; ●, 3HB; □, 3HV.

エステルの含有率は POL-1C で 14.8% (菌体量: 60.4mg)、POL-2C では 8.8% (36.0mg) と大幅に減少した。融点は共に 168°C と変動がなかった。

POL-1 と POL-2 の融点はそれぞれ 146°C、76°C で、POL-1 と POL-2 の分子量はそれぞれ 3.7×10^5 、 7.4×10^5 であった。¹H-NMR および ¹³C-NMR 分析から、POL-1 と POL-2 のシグナルは POL のものと完全に一致した。¹H-NMR の δ (ppm) 値から、POL-1 と POL-2 内の構成脂肪酸、3HB と 3HV の組成比はそれぞれ 80 : 20 (モル%)、59 : 41 (モル%) に高められた。従って、POL-1 と POL-2 の構造は、それぞれ P (3HB-co-20% 3HV)、P (3HB-co-41mol% 3HV) と決定された。

以上の諸結果は、本菌株により 2HO が α -酸化を受けて、生成した *n*-ヘプタン酸 (C_7 ユ

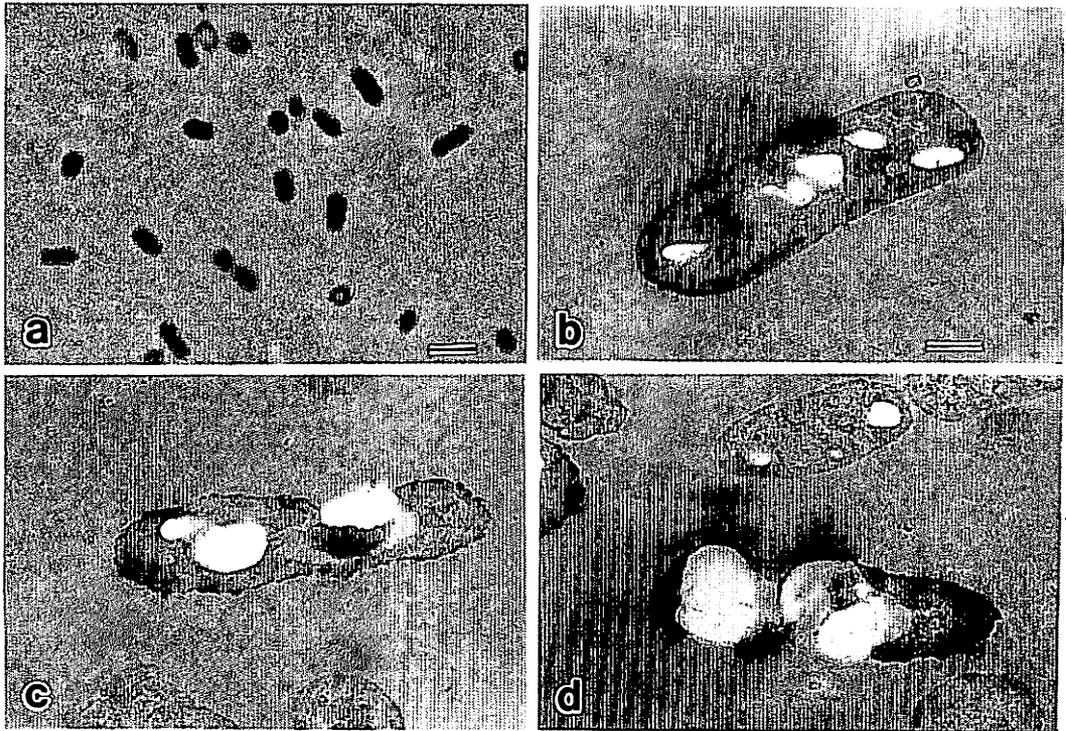


Fig. 5 Micrographs of formic acid-grown cells of *Paracoccus* sp.12A. a, phase contrast micrograph of cells containing polyester granules; b~d, transmission electron micrographs of cells containing polyester electron opaque granules; b, small granules; c, middle size granules; d, large size granules. Bars in a and b (common with c and d) are $2 \mu\text{m}$ and $0.2 \mu\text{m}$, respectively.

ニット)からの C_5 ユニット¹³⁾が、主としてPOLの構成脂肪酸、3HVにほぼ等モル取り込まれた可能性を示唆している。

我々は、新たに土壌から分離したPHB資化性菌、*Agrobacterium* sp. K-03株の生産する2種類の菌体外PHB分解酵素が、22時間の酵素反応でPHBを100%、POL-2を94%まで分解したことを既に報告している¹⁴⁾。従って、本菌株によって生産されるコポリマーは生分解性高分子素材として期待される。

3.4 蟻酸資化性細菌の細胞構造

光学顕微鏡で観察すると、*Paracoccus* sp. 12A株は短桿菌で、大きさは $1.4 \sim 2.0 \mu\text{m}$ mx

$0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$ であった (Fig. 5a)。菌体を固定しないでスライド上で加熱すると、細胞が収縮すると同時に、透明で屈折率の高い、ポリエステル粒子が菌体外に多数見られる。この事実はポリエステル粒子が、加熱などの物理的処理により、容易に菌体外に排出しやすいことを意味する。この性質は本菌株の細胞構造の特徴とも考えられる。

更に、菌体を電子顕微鏡で観察すると、細胞内に電子密度の低い顆粒 (大きき約 $0.2 \mu\text{m}$) がかなり認められた (Fig. 5b)。これらの顆粒の大きさや数は細胞によって異なり、大きい場合は $0.38 \mu\text{m}$ もあり、細胞が破壊されている菌体もあった (Fig. 5c~d)。これら

の顆粒は、上記のコポリエステルが細胞内に蓄積されたものと考えられる。従って顕微鏡的観察からもコポリエステルの存在が立証されたことになる。

4. 結 語

Paracoccus sp. 12A株は、意図的に全ての栄養成分や通気量を制限することなく、唯一の炭素源およびエネルギー源として蟻酸を資化することで、指数関数的に増殖し、ポリエステル生産量もこれに伴って増加し、定常期において菌体内に最大約60% (乾燥重量)のコポリマー、P (3HB-co-5mol%3HV)を生産蓄積した。

更に、蟻酸生育菌体と2HOの共存下での休止菌体実験において、48時間の反応系でポリエステル中の3HVの組成比が41モル%まで高めた。

謝 辞

GPCの測定にご協力を頂いた東ソ株式会社科学計測事業部 宮沢 洋氏、雪印乳業株式会社技術研究所 須栗俊明氏、ならびにテルモ株式会社研究開発センター 数野公正氏に深謝します。

また、NMRを測定して下さいました東京理科大学薬学部 澤辺紀子氏に感謝します。

<引用文献>

- 1) 岡村圭造 化学と生物、32, 609 (1994)
- 2) Doi, Y., Microbial Polyester, VCH, NEW

York (1990)

- 3) Ueda, S., Matsumoto, S., Takagi, A., Yamane, T., Appl. Environ. Microbiol., 58, 3574 (1992)
- 4) Yamane, T., Biotechnol. Bioeng., 41, 165 (1993)
- 5) Akiyama, M., Doi, Y., Biotechnol. Lett., 15, 163 (1993)
- 6) 飯田貢、化学と生物、30, 628 (1992)
- 7) Iida, M., Kitamura-Kimura, K., Maeda, H., Mineki, S., Biosci. Biotechnol. Biochem., 56, 1966 (1992)
- 8) Braunegg, G., Sonnleitner, B., Lafferty, R. M., Eur. J. Appl. Microbiol., 6, 29 (1978)
- 9) Spurr, A. R., J. Ultrastructure Res., 26, 31 (1969)
- 10) Marchessault, R. H., Bluhm, T. L., Deslandes, Y., Hamer, G. K., Orts, W. J., Sundarajan, P. R., Taylar, M. G., Bloembergen, S., Holden, D. A., Makromol. Chem., Macromol. Symp., 19, 235 (1988)
- 11) Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., Macromolecules, 19, 2860 (1986)
- 12) Bloembergen, S., Holden, D. A., Hamer, G. K., Bluhm, T. L., Marchessault, R. H., Macromolecules, 19, 2865 (1986)
- 13) Pawar, S., Schulz, H., J. Biol. Chem., 256, 3894 (1981)
- 14) Nojima, S., Mineki, S., Iida, M., J. Ferment. Bioeng., 81, 72 (1996)

(原稿受付1997年2月26日)

(審査受理1997年5月12日)