

(R)-3-ヒドロキシ酪酸のベンチスケール生産

－沖縄産海洋細菌ハロモナスによる工業原料の発酵生産－

世嘉良宏斗、照屋盛実、花城隆二、合田雅浩

機能的食品や生分解性プラスチック等の原料として注目されている(R)-3-ヒドロキシ酪酸 (R3HB) の大量生産技術を開発した。沖縄で分離した海洋細菌*Halomonas* sp. OITC1261株は、これまでの方法とは異なり、培地中へ直接R3HBを生産できるため生産性が高い。卓上型培養槽を用いた2 Lスケールの培養試験では、PHBを細胞内に維持すると同時に、111 g/LのR3HBを培地中へ生産した。中型培養槽による40 Lスケールの培養試験では、R3HBの生産速度は最大1.60 g/L/h (41時間後) に達し、最終的には100 g/LのR3HBを生産した。大型培養槽による300 Lスケールの培養試験においても、培養条件を最適化することによって、生産速度1.48 g/L/h (41時間後) を達成した。発酵液中のR3HBは高純度結晶として精製し、用途開発研究のために活用することができた。

1 はじめに

(R)-3-ヒドロキシ酪酸 (β-ヒドロキシ酪酸、以下R3HB) はヒトを含む生体内で生産・利用されている物質でケトン体とも呼ばれている。糖質制限食等を行うことで血中のR3HB濃度を上昇させることが可能で、糖(グルコース)の代替として脳のエネルギー源となるほか、認知機能改善、抗ガン作用等の様々な機能が報告されている^{1, 2)}。R3HBは光学活性体であり、分子の立体構造が鏡写しの関係にある(S)-3-ヒドロキシ酪酸(以下S3HB)が存在する(図1)。R3HBと比べてS3HBの生体内機能に関する知見は少ないが、S3HBはR3HBとは異なりATP産生に関与しないこと等が報告されている³⁾。R3HB及びS3HBの混合物は比較的安価に生産できるため、健康効果を目的とした食品への利用が想定される。実際に独自で行った調査では、市販されているケトン体サプリメントにR3HBとS3HBがほぼ等量含まれている製品が確認されている。しかし、代謝経路が異なるS3HBの摂取は慎重になるべきであり、S3HBの生体内機能の解明を待つ必要がある。一方、様々な治療効果が報告されているR3HBについては、高い光学純度で生産する技術や酸度を軽減した摂取方法等の開発が求められている。

また、R3HBは生分解性プラスチックとして知られるポリヒドロキシ酪酸 (PHB、図2) の構成単位でもあり、そのエステル結合部位は優れた生分解性を示すことから、機能的樹脂原料としても注目されている⁴⁾。現在、日

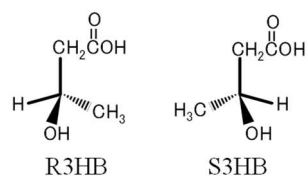


図1 R3HBとS3HBの構造

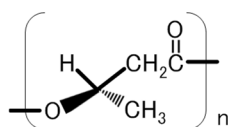


図2 PHBの構造

常に幅広く利用されているプラスチックは自然環境中では分解しない石油由来のものが主流であることから、環境汚染等の様々な問題が指摘されている。その対策として一部で利用されている生分解性プラスチックについても土壌やコンポストでは分解するものの海洋中で分解する種類は限られている。特に使い捨てプラスチックの多くは海洋へ流出するため、R3HBを部分構造に取り入れた生分解性の高いプラスチックの開発が求められている。しかしこの分野においても、R3HBが高価なために、R3HB含有樹脂の開発は進展していなかった。

R3HBは、食品や医療、化学工業等の幅広い分野で機能的原料として期待されているが、これまで大量生産技術が確立されておらず、用途開発が進展していなかった。化学合成法が適用できれば安価に大量生産できる可能性もあるが、上述のとおり鏡像異性体が存在するため、R3HBと等量のS3HBが同時に化学合成されることとなり、これらの分離のために生産性が著しく低下する。

一方、微生物を用いる発酵法では、R3HBを選択的に生産するため化学合成法よりも優位性が高いと考えられており、PHB生産菌を用いた方法が多く検討されてきた^{5, 6)}。この方法では、まず好気培養によって微生物の細胞内へPHBを蓄積させた後、これを加水分解してR3HBを生成する。しかし、細胞内へ蓄積するPHBは、細胞外(培地中)へ生産・放出される他の代謝物と比べて、生産・蓄積できる量に限界があるため、これを変換して得られるR3HBの生成量も制限されることや、PHBの生合成と分解の2段階以上の工程が必要になるため、より生産性の高い方法が求められていた。

そこで我々は、効率的にR3HBを生産する微生物を探索し、これまでとは異なる方法でR3HBの生産が可能な*Halomonas* sp. OITC1261株を見出した。OITC1261株は

沖縄の海由来の試料から分離された好アルカリ性・好塩性の細菌である。*Halomonas*属細菌はPHB生産菌としても知られており、OITC1261株もPHBを生産するが、他のPHB生産菌とは異なり、細胞内でPHBとR3HBを同時に生産し、PHBを細胞内へ維持したままR3HBを細胞外へ放出するという特異な性質を有している。そのため、従来法のようにR3HBを得るためのPHB生成工程や分解工程が不要であるとともに、PHB量に限定されることなくR3HBを生産できることから、従来法よりも生産速度が速くかつ容易に増産が可能な生産方法である(図3)。

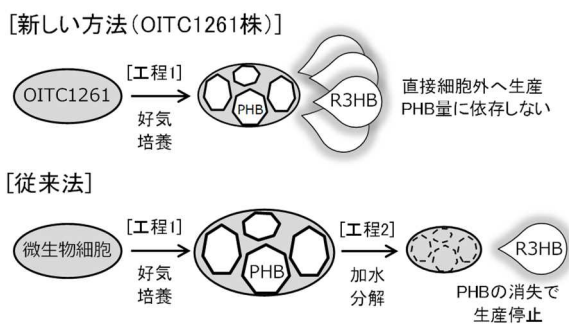


図3 OITC1261株による新しい生産方法

さらに、OITC1261株は様々な炭素源からR3HBを生産することも特徴のひとつで、スクロースやグルコース等の糖類だけでなく、有機酸や多価アルコール等からもR3HBを生産することができるため、食品系事業所等から排出される副産物等の安価なバイオマスを利用することが可能である⁷⁾。また、OITC1261株の代謝物からS3HBは検出されず、高い光学純度(>99.0% ee)のR3HBが得られることも確認されている⁸⁾。これまでに遺伝子組み換え技術等を用いた微生物によるR3HBの直接生産についても検討されてきたが実用的な生産性の菌株は得られておらず⁹⁻¹¹⁾、野生型のOITC1261株による効率的な生産方法は、R3HB生産技術の実用化と用途開発に貢献できると考えている。

本報告は、OITC1261株を用いたR3HB生産技術の実用化に向けて行ったスケールアップ生産試験の結果の一部をまとめたもので、培養条件を最適化することによってラボスケール時と同等の生産性でR3HBが得られることを示した。

2 実験方法

2-1 微生物材料

R3HB生産に用いたOITC1261株は、沖縄の海洋由来試料から分離されたもので、16S rRNA遺伝子領域の解析から*Halomonas*属に分類されている(accession number LC195268)。*Halomonas* sp. OITC1261株は、NITE特許

微生物寄託センターへNITE P-02027として寄託されている^{7, 8)}。

2-2 培養装置と培養条件

卓上型培養槽、中型培養槽、大型培養槽は、それぞれBioneer-C500 5L、MSJ-U2W 90L、MPF-N 1000L(いずれも丸菱バイオエンジニアリング社製)を用いた。

種培養液は、卓上型培養槽及び中型培養槽ではそれぞれ2L及び40Lの本培養液に対して5%、大型培養槽では200L又は300Lの本培養液に対して10~20%の量を加えた。攪拌速度と通気量は培養期間中一定になるよう設定した。pHは10N水酸化ナトリウム溶液(大型培養槽では5N)を自動添加して一定になるよう設定した。培養温度はOITC1261株によるR3HB生産に最適温度(35°C)を保つよう設定した。

2-3 成分分析

発酵液中の成分(R3HB、PHB、スクロース)は既報の方法により定量分析した⁸⁾。

3 実験結果および考察

3-1 OITC1261株のR3HB生産能力

前述したとおり、OITC1261株は好気培養によってPHBとR3HBを同時に生産する。R3HBはPHB量に依存せず、細胞外へ生産されるため、連続的に生産量を増やすことができる。卓上型培養槽を使った試験では、原料となるスクロースを適宜追加しながら好気培養を続けた結果、R3HB濃度は最終的に111 g/Lに達した(図4)。この濃度は、培地中に直接R3HBを生産する野生株を用いる方法としては、これまで報告されているなかで最も高い値である。また、100 g/Lを超える生産濃度は、既に生分解性樹脂原料として市場展開されているL-乳酸の発

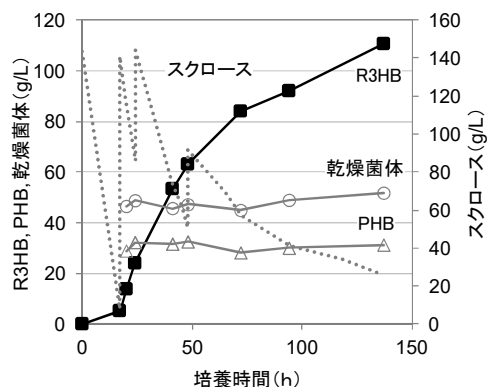


図4 R3HBの高濃度生産(卓上型培養槽)

培養液量 2 L (組成:2.0%硝酸ナトリウム、スクロース/17、24、48時間後に追加、その他無機塩類等)、培養温度 35°C、攪拌速度 700 rpm、通気量 5 L/min、pH 8.5

酵生産濃度の水準と同等のものである。

R3HBと同時に生産されるPHBは蓄積場所が細胞内に限定されるため、培養初期（20時間後）に29 g/Lとなった後、培養終了時（137時間後）の31 g/Lまでほぼ同程度の量を維持していた。PHBがほぼ一定量に維持されたままR3HBの生産が継続されていることから、OITC1261株の好気条件下におけるR3HB生産はPHB生合成経路を経由せずに行われている可能性が示唆されている⁸⁾。

3-2 好気条件による生産量への影響

PHB生産菌は、通常、好気条件下ではPHBを細胞内へ蓄積するだけで、R3HBを細胞外へ生産することはないが、好気培養後に嫌気条件へ変えるとPHBを分解してR3HBを生産する。OITC1261株もPHBを蓄積した後に嫌気条件にするとPHBを分解してR3HBを細胞外へ排出するが⁸⁾、PHB分解なくとも好気条件を継続するだけで効率よくR3HBを生産する。

好気条件下におけるR3HB生産が酸素供給量にどのよ

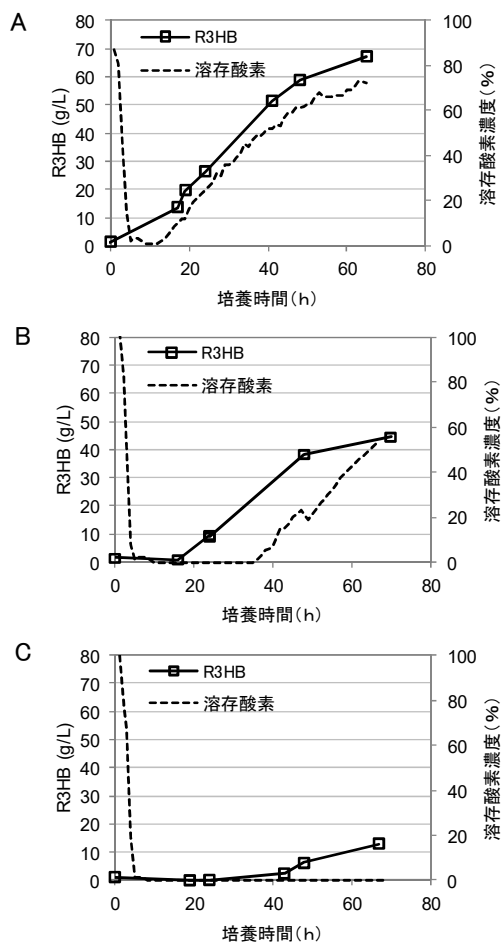


図5 酸素供給量と生産量（中型培養槽）

- A : 通気量 80 L/min、攪拌速度 500 rpm
- B : 通気量 40 L/min、攪拌速度 500 rpm
- C : 通気量 80 L/min、攪拌速度 300 rpm

うな影響を受けるのかを調べた。図5には40 L仕込みで通気量や攪拌速度を変えた時の溶存酸素濃度と生産量の変化を示した。図5Aでは培養初期の増殖期に酸素が急激に消費されるが、その後は酸素供給が十分となりR3HBの生産量が増加している。図5BではAよりも通気量を制限したため、酸素不足（溶存酸素濃度がほぼゼロ）の期間が長くなり、R3HBの生産が始まるのも遅れたため生産量は低下している。さらに、攪拌速度を制限した場合（図5C）は、終始酸素不足の状態となり、R3HBの生産量は極端に低下した。

このことから、OITC1261株は酸素供給が十分な条件下で、より多くのR3HBを生産することが分かった。この結果は蓄積したPHBを嫌氣的に分解してR3HBを得る方法とは、生合成経路が異なる可能性を支持している。

中型培養槽を用いた試験では、窒素源として培地に加えている硝酸ナトリウム濃度を最適化することにより、さらに生産性を高めることができた（図6）。R3HBの生産速度は41時間後に最大の1.60 g/L/hとなった後、培養後期には若干低下したが、92時間後の濃度は100 g/Lに達した（1.09 g/L/h）。同時に生産したPHBは45-53 g/Lを維持していた。R3HB生産速度やPHB生産量は、卓上型培養槽の結果（図4）よりも良好な値を示しており、培地組成等を最適化することでスケールアップ後も効率的に生産が可能であることが分かった。

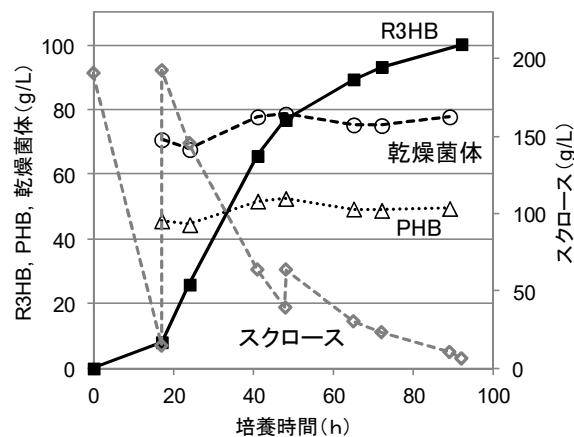


図6 中型培養槽によるR3HB生産

培養液量 40 L（組成：2.5%硝酸ナトリウム、スクロース／17時間後に追加、その他無機塩類等）、培養温度 35°C、攪拌速度 500 rpm、通気量 80 L/min、pH 8.5

3-3 ベンチスケールによる生産試験

微生物による工業的な発酵生産では数トン～数百トン規模で培養が行われている。R3HBについては大規模な発酵生産はこれまで行われていないため、スケールアップ生産のための基礎的なデータを蓄積する必要がある。

そこで大規模生産にむけた模擬装置として、1kL容量の大型培養槽(図7)を用いて数百リットル規模の培養試験を行った。

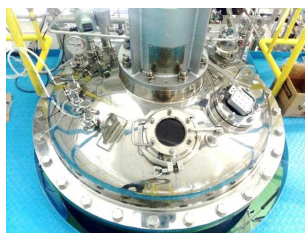


図7 実証試験用培養槽の外観(1kL培養槽)

培地量を増やして実施した培養試験の結果、中型培養槽を用いた数十リットルの試験では問題とならなかった発酵熱が生産性に大きな影響を与えることが明らかとなった。OITC1261株の培養では、培養初期の増殖期に酸素を多く消費しながら発酵熱を生じる。本実験で使用した大型培養槽では、周囲に冷却水を循環させることで発酵熱による温度上昇を抑制し、培養温度が一定となるよう制御している。しかし、培養液400 Lで培地組成等を小スケール時と同じ条件で培養したところ、装置の仕様を上回る発酵熱が発生し、設定温度に制御できなくなった(図8①)。そこで、培地中の窒素源濃度を30%低減して細胞増殖を抑制したところ、温度制御は比較的改善して生産量も向上した(図8②)。また、培養液量を200 Lに減らすとともに、初期の設定温度を低く(30°C)することで生産量はさらに改善した(図8④)。これらの培養条件を最適化したところ、小スケール時よりも窒素源を10%減らすとともに、初期温度設定を33°C(〜20時間後。以降35°C)、培養液量300 Lとすることで最も生産性が高くなった(図8③)。

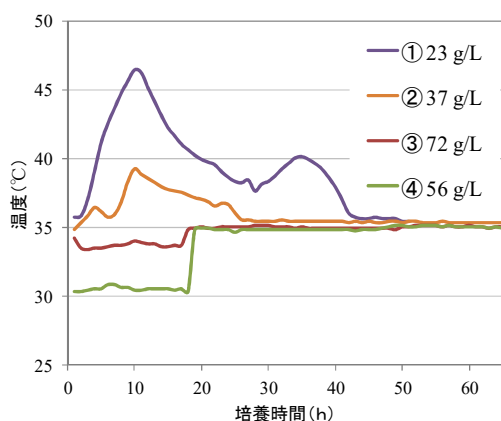


図8 発酵熱による生産量への影響
グラフ凡例の数値は48時間後のR3HB生産量

培養条件を最適化して実施した大型培養槽での試験結果を図9に示した。原料となるスクロースを消費しながら生産したR3HBの生産速度は、41時間後で1.48 g/L/hに達し、良好な値を示した。64時間後には85 g/LのR3HBを生産することができた。このことから大型培養槽による生産では、2Lの種菌培養から300 Lの本培養終了まで

5日間で完結することができ、1バッチ(5日間)で26 kg分のR3HB生産能力であることが示された。

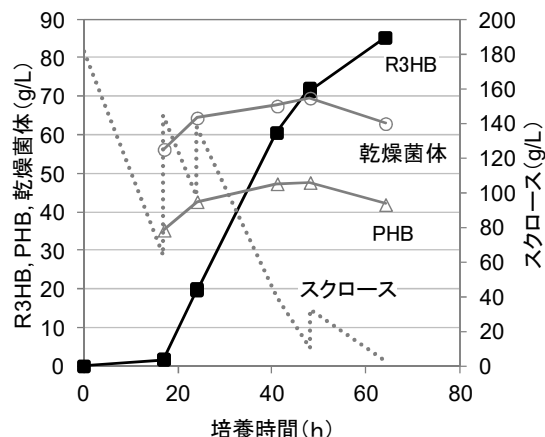


図9 大型培養槽による生産結果
培養液量 300 L、培養温度 35°C、攪拌速度 200 rpm、通気量: 750 L/min、pH 8.5

発酵液中に含まれる菌体等の不純物を除去することで得られたR3HBの高純度結晶(図10)は、HPLCによる分析で標品(Sigma-Aldrich社製、純度 $\geq 98.0\%$)以上の純度であることを確認した。



図10 R3HBの高純度結晶

R3HBは様々な分野で機能性原料として期待されていたが、これまでは大量生産が困難だったため用途開発が進展していなかった。

一方、OITC1261株を用いる方法では、効率的にR3HBを生産して高純度な結晶を得ることもできる。本法によって発酵生産した高純度R3HBは用途開発のために必要な量を供給することが可能で、実際に生分解性樹脂の開発等に活用されている¹¹⁻¹⁵⁾。

4 まとめ

沖縄の海洋細菌*Halomonas* sp. OITC1261株は、特異な性質のR3HB生産菌で、実用的な水準でR3HBの発酵生産が可能であることを示した。大型培養槽(1 kL容量)を用いた培養試験では、小スケール試験と同程度の生産速度でR3HB生産が可能であることを示すことができた。さらに、得られた高純度R3HBを活用して用途開発研究を推進し、生分解性樹脂の合成技術等、基礎的な知見を蓄積することができた。

本研究は、「おきなわ型グリーマテリアル製品開発事業(平成27~30年度、2015技003)」として実施した。

謝辞

本研究の実施に関してご指導を頂いた常盤豊氏（おきなわ型グリーンマテリアル生産技術共同体プロジェクトリーダー、現：株式会社グリーンテクノプラス）に感謝いたします。また、常盤氏ならびに同共同体構成員の皆様には、共同研究として実施したR3HBの用途開発に関して多大なるご尽力を賜りましたことに厚く御礼を申し上げ、感謝の意を表します。

参考文献

- 1 M.T. Newport et al., A new way to produce hyperketonemia: use of ketone ester in a case of Alzheimer's, *Alzheimers Dement.* 2015, 11, 99-103.
- 2 A.M. Poff et al., Ketone supplementation decreases tumor cell viability and prolongs survival of mice with metastatic cancer, *Int. J. Cancer*, 2014, 135, 1711-1720.
- 3 A. Julio-Amilpas et al., Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by β -hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2015, 851-860.
- 4 Y. Tokiwa, C.U. Ugwu, Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer, *J. Biotechnol.* 2007, 132, 264-272.
- 5 Y. Kawata et al., Efficient secreted production of (R)-3-hydroxybutyric acid from living *Halomonas* sp. KM-1 under successive aerobic and microaerobic conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 96, 913-920.
- 6 S. Y. Lee et al., Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals, *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 65, 363-368.
- 7 特許第6521243号, 3-ヒドロキシ酪酸又はその塩の好氣的生産方法
- 8 H. Yokaryo et al., Direct production of (R)-3-hydroxybutyric acid of high optical purity by *Halomonas* sp. OITC1261 under aerobic conditions, *Biotechnol. J.*, 2017, DOI: 10.1002/biot.201700343
- 9 S. Y. Lee, Y. Lee, Metabolic engineering of *escherichia coli* for production of enantiomerically pure (R)-(-)-hydroxycarboxylic acids, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2003, 3421-3426.
- 10 Q. Liu et al., Microbial production of R-3-hydroxybutyric acid by recombinant *E. coli* harboring genes of *phbA*, *phbB*, and *tesB*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007, 76, 811-818.
- 11 M. Perez-Zabaleta et al., Increasing the production of (R)-3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli* by improved cofactor supply, *Microb. Cell Fact.*, 2016, 15:91, DOI 10.1186/s12934-016-0490-y
- 12 常盤豊ら, 発酵(R)-3-ヒドロキシ酪酸を用いて化学合成した芳香環を含む共重合体とその生分解性, 第67回高分子討論会予稿集, 2018, 第67巻2号, 1Y07
- 13 常盤豊ら, 発酵(R)-3-ヒドロキシ酪酸と α -ヒドロキシ酸の共重合体の化学合成と生分解, 第70回日本生物工学会大会トピックス集, 2018, 3Ga02.
- 14 常盤豊ら, 発酵(R)-3-ヒドロキシ酪酸を用いた芳香環を含むポリエステルの化学合成と生分解, 日本農芸化学会2018年度大会講演要旨集, 2018, 3A11a01.
- 15 川崎典起ら, (R)-3-ヒドロキシ酪酸の縮合重合における金属粉の影響, 第68回高分子学会年次大会予稿集, 2019, 2Pb102.