Short Paper

Special articles: Biomass

特集：バイオマス

Production of Bio-ethylene Using Dead Grape Leaf

Saori OCHIAI, and Takaaki ISHII

(Received January 11, 2008)

ブドウ枯葉を用いたバイオエチレンの生産

落合彩織, 石井孝昭

Ethylene is one of the most important intermediates in the industry, being expected to increase in the future despite a predicted shortage of petroleum. In previous papers, we showed that lipids in dead grape leaf (DGL) were attractive substances for biological ethylene production. Furthermore, we reported that 22 kinds of microorganisms including *Bacillus mycoides* KIOSB43 or the compounds containing ferrous ion such as FeSO_4 , FeCl_2 and $\text{Fe}(\text{OOCCH}_3)_2$ related to ethylene production from DGL lipids. In order to establish a new technique for sustainable ethylene production independent on petroleum, we investigated the efficient procedure for producing ethylene from DGL. When mono- and di-saccharides were added to DGL, it was decomposed. Then, the treatments of *B. mycoides* after FeSO_4 treatment produced large amounts of ethylene from the decomposed DGL as compared with those of *B. mycoides* before FeSO_4 treatment. This procedure seems to be useful for producing bio-ethylene. Further experiments are needed to establish more efficient methods for the bio-ethylene production by improving the treatment of ferrous ion and by strengthening the activity of ethylene-producing microorganisms.

Key Words

Bio-ethylene, Dead grape leaf, Ferrous ion, Microorganisms

1. 緒言

エチレンは植物ホルモンの一つとして生体機能を制御する重要な物質であると同時に、プラスチックなどのさまざまな工業用化学製品を製造するための基本物質として極めて重要である。現在、エチレンは石油から大量に生産されているが、石油の大量消費の結果、我々は石油資源の枯渇、環境汚染などの深刻な問題を抱えている。このような問題を解決し、新たな展望を開くために、環境負荷の少ない持続可能な新しいエチレン生産技術の開発が望まれている。現在、この観点から、バイオエタノールからバイオエチレンを生産する技術の開発が進められているが、本研究では有機物からエチレンを直接生産する方法を確立することを目的として実験を行った。

これまでの研究において、土壌と有機物を混合し、湛水状態にしたとき、ブドウ枯葉は他の数百種類の有機物に比べて、約20～1000倍以上のエチレンを多量に生成するとともに、他の低級炭化水素の発生量が極めて少ないという特徴も有していた¹⁾。それゆえ、ブドウ枯葉はバイオエチレンの生産には非

常に有望な素材であると着目した。このエチレン生成は、ブドウ枯葉に乾燥重あたり約15%含まれている脂質が基質となって、微生物あるいは非微生物作用によって引き起こされる²⁾。そこで、微生物作用によるエチレン生成機構を解明するため、ブドウ枯葉脂質から多量のエチレンを生成する微生物を、様々な土壌を用いて調査したところ、糸状菌16種、および細菌6種を分離・同定した^{3) 4)}。これらの微生物をブドウ枯葉脂質に処理した場合、他の低級炭化水素の生成は少なく、エチレンが特異的に生成された。そこで、200 Lの培養槽をもつプラントを用いて、同定した微生物の中でも特に多量にエチレンを生成する非病原性細菌 *Bacillus mycoides* KIOSB43 によるブドウ枯葉からのエチレン生産も試みたところ、約1ヶ月の培養で1 kgの粉末ブドウ枯葉から13.8 mgのエチレンを得た。しかしながら、in vitroでの実験やブドウ枯葉に含まれる脂質含量を考えると、その生成量は十分とは言えないことから、より効率的な手法を開発する必要があった。

一方、最近の研究の結果、非微生物作用によるブドウ枯葉

Graduate School of Life and Environmental Sciences,
Kyoto Prefectural University
1-5, Nakaragi-cho, Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan

京都府立大学大学院生命環境科学研究科
〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

脂質からのエチレン生成では FeSO_4 、 FeCl_2 ならびに $\text{Fe}(\text{OOCCH}_3)_2$ などの2価鉄イオンを含むすべての化合物が非常に有用であり、脂質からの2価鉄イオンによるエチレン生成は、有機物から抽出した数十種類の脂質のいずれからもみられたが、中でもブドウ枯葉脂質から大量のエチレンが生成し、他の低級炭化水素はほとんど生成しないことが明らかになってきた⁵⁾⁶⁾。従って、微生物作用と同様に非微生物作用においても、ブドウ枯葉脂質は特異的にエチレンのみを多量に生成することができる基質であることが明らかになった⁵⁾⁶⁾。一方、脂質の抽出には多量の有機溶媒が、またブドウ枯葉の粉碎には手間が必要となるため、ブドウ枯葉を直接使用したバイオエチレンの生産技術の開発も生産コスト削減のためには重要である。ブドウ枯葉は落葉後1年も経たないうちに容易に分解される。これはブドウ枯葉表面にブドウ枯葉を分解する微生物が存在するためであると考えられる。また、このような微生物による糖質の分解は、バイオエチレンの生産効率を高めるだけでなく、バイオエチレン生産後のバイオエタノールの生産にも役立つと思われる。

そこで本研究では、有機物からのエチレン生産の工業化を目指して、より簡便かつ多量にブドウ枯葉から直接エチレンを生成することを目的として、*B. mycoides*および FeSO_4 を用いた微生物と非微生物作用との併用効果について調査し、効率的な施与手順を検証した。また、バイオエチレン生産のための前処理として、糖の添加が、ブドウ枯葉表面に付着している菌を活性化させて、枯葉を効率的に分解させる方法についても検討した。

2. 実験材料および方法

2.1 ブドウ枯葉およびその脂質の抽出

ブドウ枯葉は京都府立大学下鴨農場温室で無農薬栽培された‘藤稔’から得た。冬に落葉した枯葉を集め、温室で約1ヶ月間風乾させたものを供試した。ブドウ枯葉からFolch⁷⁾らの方法を用いて脂質を抽出した。得られた抽出液をろ過し、40℃で減圧濃縮した後、以下の実験に用いた。

2.2 エチレン分析

30 mlのバイアル瓶に、ブドウ枯葉もしくはブドウ枯葉脂質を添加し、2価鉄イオンもしくは微生物処理を行った。3時間もしくは3日後に気相のガスを採取し、生成したエチレンを分析した。*B. mycoides* KIOSB43は0.5% (w/v) ポリペプトンおよび0.1% (w/v) 酵母エキスを含む滅菌した液体培地で、28℃の暗黒条件下において振盪培養し、実験に用いた。エチレンの分析には水素炎イオン化検出器 (FID) 付きガスクロマトグラフを使用した。分析条件は以下に示す通りである。

充填剤：活性アルミナ 60-80 mesh,
 ガラスカラム：3 mm × 2 m,
 キャリヤー（窒素）ガス流量：15 ml/min,
 カラム温度：130℃,
 注入温度：150℃, 検出温度：150℃

2.3 ブドウ枯葉からのエチレン生産の最適条件の検討

効率的なエチレン生産のための2価鉄イオンの最適濃度を決定するため、10 mgのブドウ枯葉脂質を10 mlの2価鉄イオン溶液（0.1, 1, 10, 100 mM FeSO_4 ）に添加した。処理の3時間後、生成したエチレンを分析した。

2価鉄イオンによるブドウ枯葉からのエチレン生成を調査するため、10 mgブドウ枯葉脂質、その相当量のブドウ枯葉（66.7 mg）粉末もしくは未粉末を10 mlの2価鉄イオン溶液（1 mM）に添加し、培養3日後にエチレン生成量を分析した。

次に、2価鉄イオンおよび*B. mycoides*の効果的な施与方法を検証した。2価鉄イオンを処理した3日後に生成したエチレンを分析し、その後、クリーンベンチ内でバイアル瓶のガスを、エアフィルターに通した室外の新鮮な空気に置換し、*B. mycoides*を添加して3日後、再びエチレン生成量を測定した。一方、*B. mycoides*添加後に2価鉄イオンを加えた場合における、同様のエチレン生成量も測定した。

さらに、ブドウ枯葉からエチレンをより効率的に生産するためには、ブドウ枯葉をより分解する必要があると考え、糖がブドウ枯葉の分解およびエチレン生成に及ぼす影響についても調査した。糖アルコールとしてエリトリトール、キシリトール、グルシトールおよびマンニトールを、単糖類および二糖類としてキシロース、グルコース、スクロース、フルクトースおよびマンノースを実験に用いた。実験の手順は以下の通りである。まずはブドウ枯葉を分解するために、66.7 mgのブドウ枯葉を3日間2% (w/v) 糖溶液中で培養した。生成したエチレンを分析した後、バイアル瓶内のガスを完全に置換し、終濃度が1 mMになるように2価鉄イオンを加え、さらに3日間培養した。エチレン分析後、再びガスを置換した後、*B. mycoides*を植菌して3日間培養し、生成したエチレンを測定した。

最後に、Fig. 1に示す200 Lのプラントを用いて、上記の条件の中で最もエチレン生成の多かった条件で、ブドウ枯葉が

Fig. 1 A plant for bio-ethylene production
 A: a container (200 L) for culture with dead grape leaf,
 B: a water circulator to regulate the temperature in the container, C: a hydronic drive to stir medium, D: an air pump, E: an air bag for a store of the produced gas including ethylene

らのエチレン生成を試みた。すなわち、未粉末のブドウ枯葉 1 kg および各糖 500 g (キシロース, グルコース, フルクトース, およびマンニトール) を水 100 L の入ったプラントに入れ、枯葉の分解を試みた。その後、 FeSO_4 (終濃度 1 mM) および脂質からの 2 価鉄イオンによるエチレン生成を促進するアスコルビン酸 (終濃度 10 mM) を加え、さらに *B. mycoides* を植菌することによって、得られたエチレンを分析した。また比較のため、同様の条件でブドウ枯葉投入量 5 kg の場合についても実験を行った。

3. 実験結果および考察

2 価鉄イオン処理によるブドウ枯葉脂質からの、エチレン生成量の変化を Fig. 2 に示す。わずか 0.1 mM の 2 価鉄イオン存在下でさえもブドウ枯葉脂質からエチレンは生成し、その量は 2 価鉄イオン濃度が高まるほどに増加し、10 mM 濃度以上においては、その生成量の増加は緩やかになった。エチレン生成量は 2 価鉄イオン濃度を高めるほど増加することが予想されたが、過剰の 2 価鉄イオンによる水質汚濁、ならびに *B. mycoides* の生存可能な 2 価鉄イオン濃度を考慮し、以下の実験では 1 mM 濃度の 2 価鉄イオンを用いてブドウ枯葉からのエチレン生成を検討した。

Fig. 2 Ethylene production from dead grape leaf (DGL) lipids by ferrous ion treatment
Three h after the addition of 10 ml of FeSO_4 solution (0.1, 1, 10 and 100 mM) to 10 mg of DGL lipids, ethylene evolved was analyzed.

2 価鉄イオン処理によるブドウ枯葉もしくはブドウ枯葉脂質からのガス状低級炭化水素の生成量を Table 1 に示す。ブドウ枯葉の状態が 2 価鉄イオンによるエチレン生成量に及ぼす影響について調査したところ、ブドウ枯葉脂質から最も多くのエチレンが生成し、ブドウ枯葉未粉末からのエチレン生成量は粉末からの約 1/2 程度であった。なお、ブドウ枯葉はいずれの状態においても、エチレンを特異的に生成し、他の低級炭化水素はほとんど生成しなかった。従って、効率的なエチレン生成のためには、ブドウ枯葉をより分解する必要があると考えられた。

Fig. 3 に 2 価鉄イオンおよび *B. mycoides* KIOSB43 の処理方法がブドウ枯葉からのエチレン生成に及ぼす影響を示す。すなわち、ブドウ枯葉に *B. mycoides* を加えた後に 2 価鉄イオンを加えたときよりも、2 価鉄イオンを加えた後に *B. mycoides* を加えた場合が多量のエチレンを生成した。なお、2 価鉄イオン処理後の *B. mycoides* の接種によるエチレン生成量は、それぞれ単独の時の約 6 倍であった。これは、ブドウ枯葉分解微生物によって放出された脂質が 2 価鉄イオンによって還元

Fig. 3 Effect of procedure for ferrous ion (Fe^{2+}) and *Bacillus mycoides* KIOSB43 (KIOSB43) treatment on ethylene production from dead grape leaf (DGL)
Three days after the addition of 1 mM FeSO_4 or *B. mycoides* KIOSB43 to 66.7 mg of DGL, we added the other to the mixture.
Three days after each treatment, ethylene evolved was analyzed.
Vertical bars show standard error of the mean (n=3).

Table 1 Evolution of gaseous hydrocarbons from dead grape leaf (DGL) and extracted lipids by ferrous ion treatment*

Gaseous hydrocarbons	DGL (μg / equivalent to 10 mg DGL lipids · 3 days)		
	Non-powder	Powder	Lipids
Methane	0.105 ± 0.019^z	0.165 ± 0.007	0.141 ± 0.003
Ethane	0.008 ± 0.001	0.020 ± 0.000	0.022 ± 0.008
Ethylene	1.007 ± 0.213	1.771 ± 0.033	2.947 ± 0.188
Propane	trace	0.008 ± 0.001	trace
Propylene	trace	trace	trace
iso-Butane	trace	trace	trace
n-Butane	trace	trace	trace
iso-Butene	trace	trace	trace
n-Butene	trace	trace	trace

* Three days after the addition of 10 ml of FeSO_4 solution (1 mM) to DGL equivalent to 10 mg lipids, gaseous hydrocarbons were analyzed.

^zMean $\pm$ SE (n=3).

されて、*B. mycoides*がエチレンを生成しやすい状態になったものと推察される。ちなみに、ブドウ枯葉を施用した土壌を嫌気条件下にした場合、エチレン生成量は好気条件下の数倍も増加することが明らかとなっている¹⁾。

さらに、枯葉を分解するために糖を処理した後、2価鉄イオンおよび*B. mycoides* KIOSB43を処理することによってブドウ枯葉から生成されるエチレン量をFig. 4に示す。すなわち、マンニトールを除く糖アルコールは、2価鉄イオンおよび*B. mycoides*によるブドウ枯葉からのエチレン生成を抑制したが、単糖類および二糖類はブドウ枯葉からのエチレン生成を増加させた。糖を添加することによって、ブドウ枯葉に存在していた微生物が活発に繁殖し、ブドウ枯葉の分解がより進んだため、その後の2価鉄イオンおよび*B. mycoides*処理によって、ブドウ枯葉からより多くのエチレンが生成したと考えられる。一方、糖アルコールは金属封鎖作用を引き起こす⁸⁾ことから、ブドウ枯葉脂質の酸化還元反応が抑制されたため、エチレン生成が阻害されたと考えられる。しかしながら、マンニトールはエチレン生成を阻害しなかった。その原因は明らかでないが、ブドウ枯葉脂質である糖脂質を構成する糖として、マンニトールが含まれる（データ未発表）ことと関係があるのかもしれない。糖の添加だけではエチレンは生成しなかったことから、ブドウ枯葉の表面に存在している微生物はエチレンを生成せず、ブドウ枯葉中の糖質の分解のみに関わると考えられた。さらに、エチレン生成後の溶液中に含まれる微生物相を調べたところ、*B. mycoides*が優占種であることを確認した。したがって、糖の利用はブドウ枯葉を分解する微生物の増殖に役立ち、2価鉄イオンや*B. mycoides*によるエチレン生成を効率化するのに非常に有効であると考えられた。

本実験の結果、プラントを用いたエチレン生成では、糖、2価鉄イオン、そして*B. mycoides*の処理により、未粉末のブドウ枯葉1 kgから約1ヶ月の培養で28.75 mgのエチレンを回収した。同条件下でのブドウ枯葉投入量5 kgからのエチレン生成量145.68 mgは、1 kg投入時の約5倍であった。本実験

の範囲内では、投入量とエチレン生成量は比例していた。また、この量は*B. mycoides*のみによる粉末のブドウ枯葉からのエチレン生成量の約2倍であった。本実験での生産技術を用いることによって、バナナなどの果実の成熟促進などの園芸分野への利用には十分な量のバイオエチレンを採取することができた。現在、わが国においては石油から生産された物質を有機農産物に使用することは原則として認められておらず、エチレンの使用許可も限定的である。それゆえ、本研究で得られたエチレンは有機物から生成させたものであるもので、これらの問題解決にも大いに役立つと考えられる。In vitroの実験では、今回得られた量の数十倍のエチレンが生成されることが明らかにされている⁹⁾。したがって、ブドウ枯葉の潜在的なエチレン生成能を発揮できれば、さらにその生産量を増加させることができると考えられる。2価鉄イオンの定期的添加や、生成されたエチレンによる*B. mycoides*の増殖阻害などを改善することにより、今後さらに効率的な生産方式を確立する必要がある。

2006年のブドウの世界の栽培面積は7,399,546 ha¹⁰⁾であるので、全てのブドウ枯葉を回収できれば11,839,274 tonの枯葉が得られると予想される。このブドウ枯葉に含まれる脂質は1,775,891 tonと試算できるため、これらの脂質を全てエチレンに変換できると仮定すれば、理論的には世界のエチレン生産量(74,773,000 ton, 2003年)¹¹⁾の約2.4%を占めることが可能であると考えられる。さらにブドウ枯葉の有効利用法に関しては、ブドウ枯葉に約15%含まれる脂質はエチレン生成に消費されるが、残りの85%には糖質、つまりセルロースなどの糖質が多量に含まれているので、これらを今回用いた微生物などによって分解することで、スクロース、アラビノース、ガラクトース、キシロース、グルコース、フルクトース、あるいはラムノースなどの二糖類あるいは単糖類を多量に得て、それを酵母によってエタノールにすることができる。ブドウ枯葉の利用効率を上げるためには、これらの微生物を分離・同定し、その菌の利用を検討する必要がある。今後、2価鉄および微生物(エチレン生成菌、ブドウ枯葉分解菌など)

Fig. 4 Effect of sugars, ferrous ion (Fe^{2+}) and *Bacillus mycoides* KIOSB43 (KIOSB43) on ethylene production from dead grape leaf (DGL)

After incubating 66.7 mg of DGL and sugar for 3 days, we added 1 mM FeSO_4 .

Three days after addition of 1 mM FeSO_4 , *B. mycoides* KIOSB43 was inoculated.

Three days after each treatment, ethylene evolved was analyzed.

Vertical bars show standard error of the mean ($n=3$).

の施与方法, ならびにプラント内の通気および温度を改善することによって, ブドウ枯葉からのエチレン生成量の増大を図っていくと同時に, ブドウ枯葉残渣を利用したエタノール生産も試みることによって, エネルギー資源としてのブドウ枯葉の利用効率をあげていきたい。

現在の果樹栽培は多くの場合, 果実生産という1次産業的な食料生産の場としての役割しか果たしていない。農業生産の過程から排出される有機物であるブドウ枯葉を用いてエチレンを生産することは, 果樹の多面的利用の面からも重要である。また, 工業面においても, ブドウ枯葉は食糧生産と競合せずに採取できる農業廃棄物であるため, 持続的なエネルギー資源として確保できることが見込まれる。ブドウ枯葉の採取作業は, 園内のネット被覆や採葉のための機具の導入で容易に省力化できるだろう。また, 本実験の結果から判断されるエチレン生産に必要な2価鉄は, ブドウ枯葉1 kgあたり1 g程度とわずかである。さらに, エチレン生産後の培養液をそのままエタノール生産に用いれば, エチレン生産後の鉄は, 酵母のような微生物による還元作用^{12) 13)}で, 2価鉄に変えることができ, 再びエチレン生産に利用することができる。従って, ブドウ枯葉からのエチレン生成のための費用は, 初期費用のみであることから, 投資対効果は長期継続使用によって上がるだろう。このバイオエチレン生産方式は大規模な施設を必要としないので, ブドウ生産地周辺にブドウ枯葉からエチレンや, その後にエタノールを生産できるような施設を設けることができると思われる。このような環境にやさしいエネルギー生産システムの開発は, バイオエチレンやバイオエタノール生産に大いに役立つと考えられる。特に, バイオエチレンの販売はブドウ農家の収入増につながるるとともに, バイオエタノールは農機具などの石油代替エネルギーとして利用することもできるので, 本開発の地域社会への貢献は極めて大きいと考えられる。

4. 結 論

環境負荷が少なく持続可能な新しいエチレン生産システムの構築に向かって, 他の有機物に比べて, 特異的に多量のエチレンを生成するブドウ枯葉の利用方法について検討した。その結果, ブドウ枯葉に単糖類あるいは二糖類を処理し, 微生物を活性化させ, 糖質を分解させた後, 2価鉄イオンで反応させ, その後エチレン生成菌を用いる方法が有効であることが明らかになった。

文 献 : References

- 1) Ishii, T., Kadoya, K., *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **53**, 157 (1984)
- 2) Ishii, T., Kadoya, K., *Acta Hort.*, **201**, 69 (1987)
- 3) Ochiai, S., Ishii, T., *Acta Hort.*, **768**, 293 (2008)
- 4) 石井孝昭, 落合彩織, 公開特許公報 特開2006-87331
- 5) 落合彩織, 川下智美, 土橋由起子, 石井孝昭, 園芸学研究, **6**(別1), 273 (2007): Ochiai, S., Kawashita, T., Tsuchihashi, Y., Ishii, T., *Hort. Res. (Japan)*, **6**(Suppl 1), 273 (2007)
- 6) 落合彩織, 土橋由起子, 前原祥夏, 石井孝昭, 園芸学研究, **6**(別2), 647 (2007): Ochiai, S., Tsuchihashi, Y., Maehara, S., Ishii, T., *Hort. Res. (Japan)*, **6**(Suppl 2), 647 (2007)
- 7) Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S., *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)
- 8) 山口直彦, 大島克己, 村瀬誠, 日本食品工業学会誌, **21**(4), 131 (1974): Yamaguchi, N., Ohshima, K., Murase, M., *J. Food Sci. Technol.*, **21**(4), 131 (1974)
- 9) 石井孝昭, 愛媛大学教育学部紀要 第3部 自然科学, **14**, 101 (1994): Ishii, T., *Mem. Fac. Educ. Ehime Univ. Nat. Sci.*, **14**, 101 (1994)
- 10) <http://faostat.fao.org/>
- 11) UN, Industrial Commodity Statistics Yearbook (2003)
- 12) Lesuisse, E., Crichton, R. R., and Labbe, P., *BBA.*, **1038**, 253 (1990)
- 13) Anderson, G. J., Lesuisse, E., Dancis, A., Roman, D. G., Labbe, P., Klausner, R. D., *J. Inorg. Biochem.*, **47**, 249 (1992)