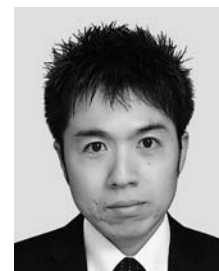


2014年度 生物工学奨励賞（照井賞） 受賞



バイオ燃料生産における デザインドバイオマスの創生と 高速高効率化に関する 新生物化学工学研究



田代 幸寛

Study on application of designed biomass and establishment of highly efficient process for biofuel production in the field of new biochemical engineering

Yukihiko Tashiro^{1,2} (¹*Institute of Advanced Study, Kyushu University*, ²*Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581*) *Seibutsu-kogaku* **93**: 130–138, 2015.

はじめに

バイオマスを原料として生産されるバイオ燃料の中でもブタノールは次世代バイオ燃料として着目されている。世界で幅広く生産・普及されているエタノールと比較すると、①高いエネルギー含量、②直接燃料として利用可能、または任意の濃度でガソリンおよびディーゼルに混合可能、③疎水性が高いため、湿気の多い場所にも保存可能、④蒸気圧が低いため、取扱いが安全、⑤腐食性が低いため、既存のインフラが利用可能、⑥燃料以外にも種々の化学物質への変換が可能、などの優れた特性を有する¹⁻³⁾。

ブタノールを生産する微生物として、一部の *Clostridium* 属細菌が古くからもっともよく知られており、副産物としてアセトンやエタノールを生産することから、生産プロセスは acetone-butanol-ethanol (ABE) 発酵と呼ばれている⁴⁾。グルコースなどの糖を炭素源とした *Clostridium* 属細菌による通常の ABE 回分発酵の問題点には、①低ブタノール生産濃度 (< ca. 20 g/L)、②低ブタノール生産性 (< ca. 0.5 g/(L·h))、③低ブタノール収率 (ca. 0.35 g/g) などがあげられる⁴⁾。さらに、食料と拮抗しない非食料由来の発酵原料の探索やブタ

ノールの分離・精製プロセスの改良も課題である。このような背景から、筆者らは、新たな概念である「デザインドバイオマス」を提唱するとともに、発酵工学を基盤とする複合多領域（メタボローム、代謝工学、酵素工学）アプローチにより、本課題に取り組んでいる。本稿では、これまでに筆者らが ABE 生産 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 株 (N1-4 株) を用いて実施してきた研究成果の一部を紹介する。

1. デザインドバイオマス

化石資源の大量消費による化石資源の枯渇や環境・生態破壊などの諸問題が喚起されているが、本会所属の多数の会員がバイオマス資源を原料とした微生物による有価物発酵生産プロセスを精力的に研究しているのは周知の通りである。それらのバイオプロセスでは、発酵原料であるバイオマス資源を微生物が消費・利用できることが必要条件である。従来研究では、発酵原料に用いるバイオマスをあらかじめ決定したのち、優れた微生物の分離や分離微生物による効率的発酵プロセスの構築、あるいは遺伝子改変や自然突然変異による育種微生物の獲得が行われる (図1)。一方、筆者らは従来とは異なる『デザインドバイオマス』研究を提唱しており、デザインド

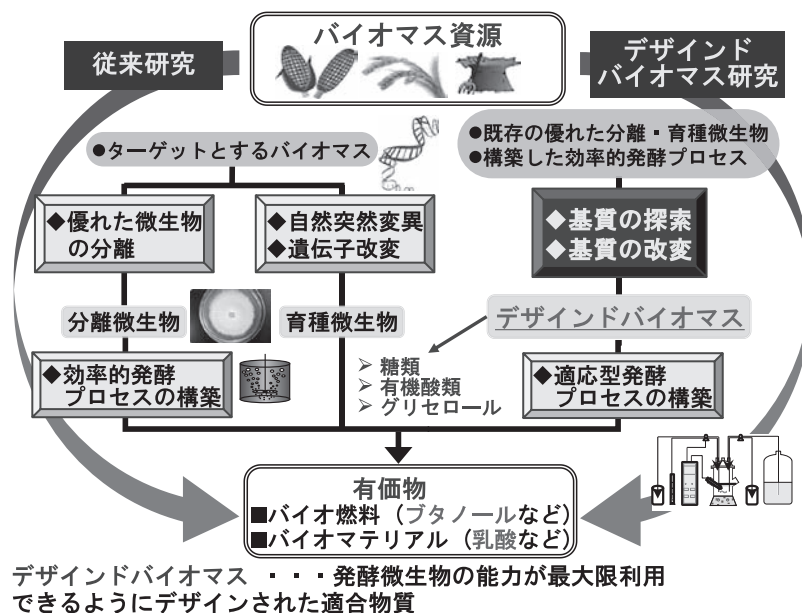


図1. デザインドバイオマス研究概念図

バイオマスとは、「発酵微生物の能力が最大限利用できるようにデザインされた適合物質」と定義している⁵⁻⁷⁾。本アプローチでは、既存の優れた分離・育種微生物や構築した効率的発酵プロセスに適するように基質の探索や改変を行い、得られたデザインドバイオマスによる適応型発酵プロセスの構築を目指すものである。また、デザインドバイオマスには、糖類に加えて、水素生産やバイオディーゼル生産などのバイオプロセスから排出される有機酸類やグリセロールなどの非糖類も含む。さらに、筆者らは、デザインドバイオマス研究を積極的に推進し、かつ諸問題を有機的に解決できるために、発酵工学、分子微生物学、および植物育種学の研究者らによる学際的連携からなるスマート発酵工学の創生も目指している⁸⁾。

2. ABE発酵の特性

本論に入る前にABE発酵の特性を簡略に概説する。前述のように、ABE生産微生物として、絶対嫌気性である*Clostridium*属細菌4種(*Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharobutylicum*, *C. saccharoperbutylacetonicum*)が特に有名である³⁾。近年では、ブタノール非生産微生物[大腸菌(*Escherichia coli*)⁹⁻¹⁰⁾、乳酸菌(*Lactobacillus brevis*)¹¹⁾、*Bacillus subtilis*¹²⁾、*Pseudomonas putida*¹²⁾、および酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)¹³⁾]を宿主として、遺伝子改変によるブタノール生産を目指す代謝工学の研究も盛んであるが、多くの育種微生物におけるブタノール生産濃度がABE生産*Clostridium*属細菌よりも低く、改良の余地がある。

ABE生産*Clostridium*属細菌は図2の代謝経路^{4,14)}により、ペントースまたはヘキソースをブタノールへと変換する。紙面の都合上、詳細は割愛するが、ABE発酵の代謝は非常に特異的であり、複雑である。すなわち、乳酸、酢酸、酪酸を生産する酸生成期(対数増殖期)から代謝転換が生じて、生産した有機酸を再利用しながらエタノール、アセトン、ブタノールを生産するソルベント生成期(定常期)へと移行する。上記の有機酸およびソルベントに加えて、ピルビン酸からアセチルCoAへの脱炭酸化反応により、二酸化炭素が放出される。したがって、ABE発酵は副産物生成を伴うヘテロ発酵である。仮に、1 molのグルコースから1 molのブタノールを生産するホモ発酵が実現しても、2 molの炭素原子が二酸化炭素として損失する。また、ブタノールは非常に強い最終生産物阻害を起こすために、高濃度(> ca. 10 g/L)では、増殖およびブタノール生産が停止する。

3. サルベージ合成能力を活用した デザインドバイオマスの創生

ABE生産*Clostridium*属細菌は酸生成期で生成した有機酸類(乳酸、酢酸、酪酸)を、ソルベント生成期で再利用、すなわちサルベージ合成する。そこで筆者らは、今まで発酵原料として着目されなかった非食糧資源である有機酸類をターゲットとして、代謝転換を伴うブタノール生産の促進発酵能力を高めるために有機酸利用経路によるサルベージ合成能の活用を検討し、酪酸、乳酸、アラビノースがN1-4株のデザインドバイオマスであることを見いだした。

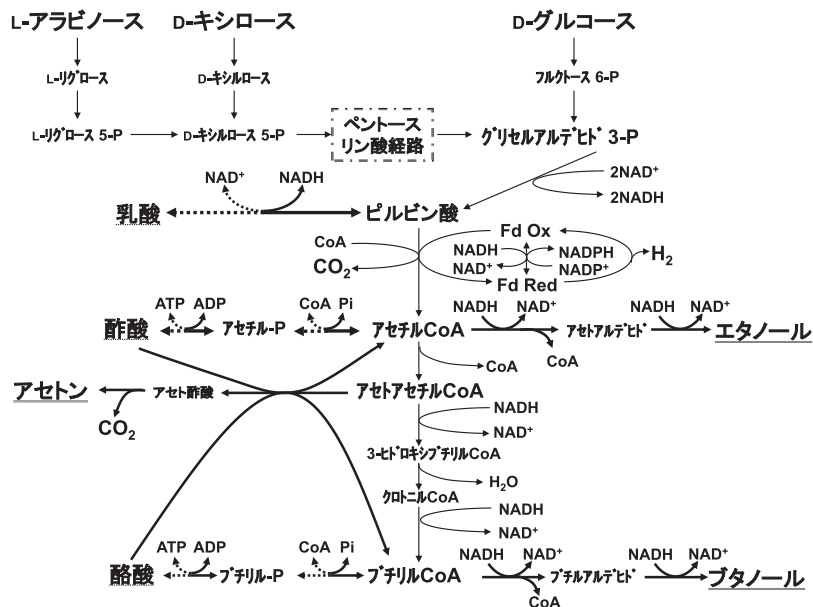


図2. *Clostridium* 属細菌による ABE 発酵の代謝経路. 破線は酸生成期, 太字実線は溶剤生成期の代謝流束を示す.

3-1. 酪酸からのブタノール生産 酪酸は, CoA transferase 経路または酪酸生成逆経路 (butyrate kinase および phosphotransbutyrylase) によりブチリル CoA へ変換され, さらに butyraldehyde dehydrogenase および butanol dehydrogenase により, それぞれブチルアルデヒド, ブタノールへ還元される. すなわち, グルコース (16 反応) と比べて, 炭素を損失することなくきわめて少ない代謝反応 (3 反応または 4 反応) により, 酪酸をブタノールへと変換することが可能である.

最初に, 異なる濃度 (0–5 g/L) の酪酸を添加したグルコース含有培地にて N1-4 株を培養したところ, 酪酸濃度増加に伴い比増殖速度が低下し, 若干の増殖阻害が確認された. ところが, 5 g/L 酪酸添加時には, 酸生成期でも, 比ブタノール生産速度は, 無添加の 0.10 g/(g·h) から 4 倍の 0.42 g/(g·h) へ増加し, 酪酸による代謝転換の迅速化とブタノール生産促進が確認された. また, 酪酸からのブタノール生産には, グルコースが共役基質として必須であることから, 糖代謝で得られる NADH, ATP および アセトアセチル CoA などの補因子の必要性が示唆された. さらに, 酪酸濃度を一定に制御できれば, 効率的に酪酸からブタノールを生産できるのではないかと考え, 酪酸消費とともに上昇する pH に着目した. 当時学生だったが, 後輩が pH-stat 流加発酵法¹⁵⁾により基質となる有機酸を一定値に制御しながら poly-D-3-hydroxybutyric acid (PHB, 生分解性プラスチック) を生産していたことからヒントを得て, ABE 発酵への適用を検討した. すなわち, 酪酸消費により上昇した pH を酪酸供給により元の設定値に下げれば, pH のモニタ

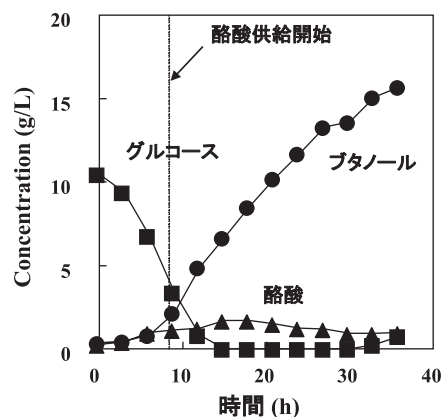


図3. 酪酸とグルコースを基質とした pH-stat 流加発酵の経時変化 (B/G 比 : 1.4)

リングのみにより, 理論上酪酸濃度を一定に制御できる. 予想通り, ブタノール生産に適した pH (5.5 付近) を指標に酪酸とグルコースを供給基質とした pH-stat 流加発酵法により, ブタノール生産が停止するまで酪酸が供給されて, 酪酸濃度をほぼ一定に制御できた. さらに, 供給液の酪酸とグルコース比 (g/g) (B/G 比) を検討したところ, B/G 比 1.4 では, 酪酸濃度に加えてグルコース濃度もほぼ 0 に制御できることが分かった (図3). 最終的に, グルコースを用いた回分発酵よりも高いブタノール生産濃度 (16 g/L), ブタノール対菌体収率 (3.7 g/g) およびブタノール対グルコース収率 (0.55 g/g) を得て, 効率的ブタノール生産プロセスの開発に成功した¹⁶⁾.

3-2. 乳酸からのブタノール生産 乳酸菌や *Bacillus* 属細菌などにより種々のバイオマスから高濃度

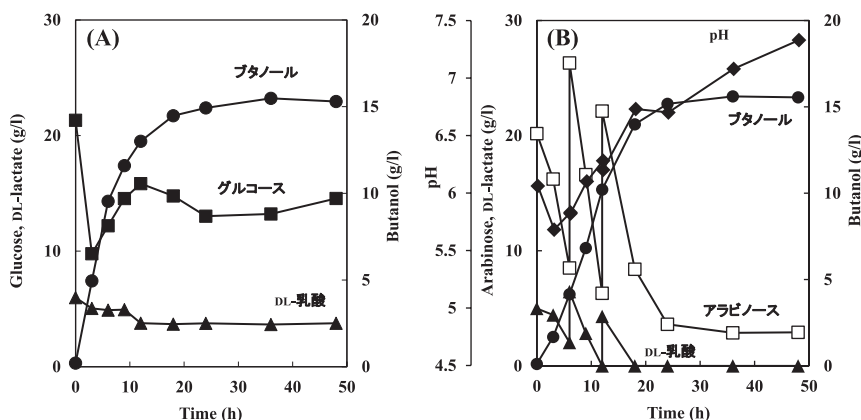


図4. DL-乳酸と糖の混合基質からのブタノール生産. (A)；DL-乳酸とグルコースを供給する pH-stat 流加発酵, (B)；DL-乳酸とアラビノースを二回添加する逐次流加発酵.

(> 100 g/L) の乳酸を発酵生産し¹⁷⁾, その優れた安定性によりフィードストックとしての利用が可能である⁵⁾. 近年需要が急増しているポリ乳酸(バイオプラスチック)製造には, 光学活性乳酸 (L-乳酸またはD-乳酸) の使用が不可欠である. ところが, 一部の乳酸発酵では, ラセミ体のDL-乳酸が生産され, それらはポリ乳酸製造に用いることはできない. これまでにDL-乳酸からのブタノール生産に関する報告はなく, 筆者らは, メタボローム・酵素工学技術を駆使した発酵工学研究を展開した.

DL-乳酸のみを炭素源としてABE発酵を行ったが, DL-乳酸消費とブタノール生産を確認できず, グルコースを共役基質として添加すると確認できたことから, 酪酸同様, 糖代謝により得られる補因子の必要性が明らかとなった. さらに, DL-乳酸濃度10 g/L以上で阻害が生じ, また, 培養液のpHを5.5に制御すると, 乳酸消費が促進することが明らかとなった. そこで, pH (5.5) を指標にDL-乳酸とグルコースを供給基質としたpH-stat流加発酵法により, DL-乳酸からの効率的なブタノール生産 (濃度: 15.5 g/L, 最大生産速度: 1.76 g/(L·h)) に成功した (図4A). さらに, 安定同位体[1,2,3-¹³C]乳酸と¹²C6-グルコースを用いて培養した上清をGC-MSに供したところ, 分子量の異なるブタノール (¹²C4-ブタノール, ¹³C4-ブタノール, ¹³C2¹²C2-ブタノール [4個の炭素のうち2個ずつ¹³Cと¹²C原子]) に該当する3つのピークが得られた. よって, 筆者らは世界で初めて乳酸からのブタノール変換を証明し, DL-乳酸からのブタノール変換効率が52.6%であることを明らかにした¹⁸⁾.

次に, DL-乳酸およびペントース (キシロース, L-アラビノース) を用いて, 完全非食料資源からのブタノール生産の実現および高ブタノール生産システムの構築を目指した. 驚いたことに, 特に, アラビノースを共役基質として用いた場合, pH非制御の回分発酵でも糖の消

費と同時に乳酸の消費が始まり, 糖消費と同等の速度で, 乳酸は完全に消費され, グルコース利用時よりも高いブタノール生産濃度を得た. 乳酸からピルビン酸への反応には, NAD⁺ 依存的乳酸脱水素酵素 (nLDH) に加えて NAD⁺ 非依存的乳酸脱水素酵素 (iLDH) の関与が考えられる. グルコースによるiLDH活性の低下が明らかとなっているが¹⁹⁾, アラビノース利用時におけるiLDHによる乳酸消費の促進が示唆された. また, 乳酸阻害を回避するために流加発酵が有効だが, pHを制御しなくても, DL-乳酸とアラビノースの2回の逐次添加による流加発酵で最大ブタノール生産濃度が15.6 g/Lとなった (図4B). さらに, [1,2,3-¹³C]乳酸と¹²C5-アラビノースを用いた培養液上清から, GC-MS解析により乳酸からのブタノール変換効率は51.9%と高い値を示した²⁰⁾.

4. 動的代謝モデル化と律速代謝経路の理論的推定

代謝モデルは代謝解析や発酵プロセスの最適化などに有効なツールである. もっとも代表的なものとして, 化学量論式より構成される静的代謝モデルがあり, ある条件における定常状態の代謝フラックスを算出できるため, 代謝フラックス解析に広く用いられているが, 異なる条件における経時的な情報 (代謝ダイナミクス) を予測することはできない. 一方, 反応速度式より構成される動的代謝モデルは, 代謝ダイナミクスを予測することができるため, 異なる条件における発酵プロセスの最適化や律速代謝経路の特定に強力なツールとなる. ところが, 各反応速度式における速度パラメータを決定することが非常に難しい. 前述のように, 特異的かつ複雑な代謝を伴うABE発酵では, 静的代謝モデルは構築されていたが²¹⁾, 動的代謝モデルは報告されていなかった. そこで, 筆者らは, 異なる炭素源 (ヘキソース: グルコース, ペントース: キシロース) におけるABE発酵の動

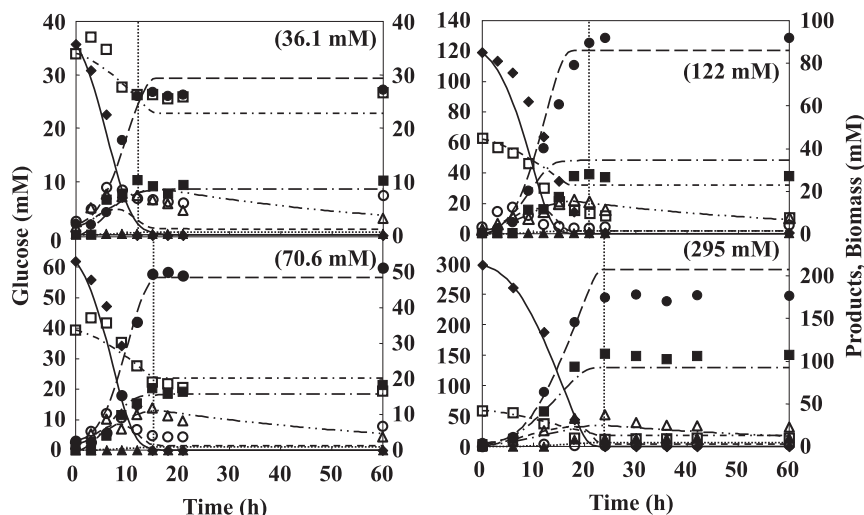


図5. 実験値とModel_{GLC} IIIによるシミュレーション結果. シンボルは実験値, 実線と破線はシミュレーションによる計算値. ()内の数字は初発グルコース濃度. ◆; グルコース, ■; アセトン, ●; ブタノール, □; 酢酸, ○; 酪酸, △; バイオマス.

的代謝モデル化および感度解析による律速代謝経路の特定を行った. 筆者が所属していた研究室はバイオインフォマティクスに精通していなかったが, Okamotoらが開発したユーザー (未経験者) フレンドリーなソフトウェア, WinBEST-KIT (Biochemical Engineering System analyzing Tool-KIT (Windows version))²²⁾を用いて動的代謝モデル化を行った.

4-1. グルコース代謝におけるABE発酵の動的代謝モデル化 まず, 図2で示すABE発酵の代謝経路にアセチルCoAからの菌体増殖反応と死滅反応を加えた19反応を主にミカエリス-メンテン型反応速度式 (菌体増殖反応のみブタノール阻害式を導入) で表した(Model_{GLC} I). 初発グルコース濃度70.6 mMにおける回分発酵の基質, 生産物および菌体のタイムコースデータに一致するように各パラメータの決定を行い, タイムコースデータと動的モデルによるシミュレーションデータとの相関係数(r^2)により評価した. 上記のModel_{GLC} Iでは, r^2 は0.867と低かった. さらに, グルコース消費にブタノール阻害式とグルコース阻害式を導入するとともに, 3-1.項で明らかにしたブタノール生産と酪酸消費に酪酸活性式を導入したModel_{GLC} IIでは, r^2 は0.941に上昇した. ところが, シミュレーションでは, グルコースが枯渇した後も有機酸消費や溶剤生産が続いた. そこで, ATPまたはNADHを補因子とする13反応について, グルコースが枯渇した後に反応速度が0となるon-off機構を導入したModel_{GLC} IIIでは, r^2 が0.970に増加し, タイムコースデータとシミュレーションデータが定性的に一致した. さらに, 他のグルコース濃度 (36.1 mM, 122 mM, 295 mM) におけるタイムコースデータとModel_{GLC} III

によるシミュレーションデータを比較してModel_{GLC} IIIの有効性を調べると, いずれの濃度でも定性的に一致し (図5), 平均 r^2 は0.901と高い値を示した. すなわち, 非常に広範な初発グルコース濃度によるABE発酵の動的代謝モデルの構築に初めて成功した²³⁾.

4-2. キシロース代謝におけるABE発酵の動的代謝モデル化 Model_{GLC} IIIのグルコース代謝の上流部分 (EMP経路) の2反応速度式をキシロースのペントースリン酸経路の6反応速度式に置換し, 動的代謝モデル (Model_{XYL}) を作成した. Model_{GLC} III同様, Model_{XYL}では, ATPを補因子とするキシロース消費反応にブタノール阻害式とon-off機構を導入した. 初発キシロース濃度65.7 mMにおける回分発酵の基質, 生産物および菌体のタイムコースデータに一致するように置換した6反応速度式の各パラメータの決定を行ったところ, r^2 は0.909と高い値を示した. さらに, 他のキシロース濃度 (40.7 mM, 116 mM, 292 mM) におけるタイムコースデータとModel_{XYL}によるシミュレーションデータを比較して有効性を調べると, 平均 r^2 は0.901となった. よってグルコース同様キシロースにおけるABE発酵の動的代謝モデルを構築できた²⁴⁾.

4-3. 動的代謝モデルを用いた感度解析による律速代謝経路の推定 どの代謝経路がブタノール生産に大きな影響を与えているかを調べるために, 構築した動的代謝モデルのそれぞれの反応速度式の V_{\max} , K_m , K_{ii} などのパラメータを5%ずつ増加させる感度解析を行い, シミュレーションにおける最終ブタノール濃度変化 (Δ_{Butanol}) を検討した.

Model_{GLC}ではグルコース消費の V_{\max} を5%増加させ

た場合に、Model_{XYL}ではキシロース消費のV_{max}を5%増加させた場合にΔ_{Butanol}が最大の1.52%減少となった。次に影響の大きかった経路では、Model_{GLC}、Model_{XYL}におけるブタノール生産のV_{max}を5%増加させた場合に1.06%増加した。また、CoA transferaseを介した酪酸消費と酪酸生産逆経路による酪酸消費もΔ_{Butanol}にそれぞれ負と正に影響を与えた。以上の結果、酪酸の再利用は、CoA transferaseを介するよりも酪酸生産逆経路を介した方がブタノール生産を促進することが示唆された。よって、グルコースとキシロースのどちらを発酵原料とする場合もブタノール高生産のためには酪酸生成逆経路関連酵素（butyrate kinaseおよびphosphotransbutyrylase）遺伝子の大量発現およびCoA transferase 遺伝子の抑制の組合せが有効であることが示唆された^{23,24)}。このように、動的代謝モデルを用いた感度解析によりブタノール発酵の律速代謝経路の理論的推定が可能となった。本知見は、分子育種研究にフィードバックされるとともに、代謝工学領域においては、経験則に頼らないターゲット遺伝子の決定法となり得る。

5. 新規ブタノール生産プロセスの開発と
新規パラメータの提唱

筆者らは、冒頭で述べたABE回分発酵の問題点を解決すべく、種々の糖質（グルコース、キシロース、セロビオース）やデザインドバイオマス（酪酸、乳酸、アラビノース）を原料とする新規なブタノール生産プロセスを開発し、各パラメータ（生産濃度、生産性、収率など）の向上に成功した（表1）。酪酸・グルコースを供給基質としたpH-stat流加発酵法¹⁶⁾、DL-乳酸・グルコースを供給基質としたpH-stat流加発酵法¹⁸⁾、DL-乳酸・アラビノースを供給する逐次添加流加発酵法²⁰⁾はすでに述べたが、本項ではそれ以外の生産プロセスの概要を簡単に述べる。

5-1. ブタノール生産プロセス評価のための新規パラメータの提唱 開発した生産プロセスを評価するパラメータとして、特に、生産濃度、生産性、収率が重要である。ABE発酵では、ブタノール収率は質量濃度（g/Lなど）や物質濃度（mMなど）から計算されてそれぞれ、『g/g』や『mol/mol』と表記されることが多い。ところが、それらには、①基質が異なると最大理論収率が変わる、②炭素損失が収率に反映されない、などの問題点がある。そこで筆者らは、ABE発酵では初めてブタノール対炭素源収率（C-mol/C-mol）（1 molから何molの炭素原子がブタノールに変換されるか表す指標）を提唱した（式1）²⁵⁾。

$$(\text{生産濃度 [mM]} \times \text{生産物 1 分子中の炭素数}) \div (\text{基質消費濃度 [mM]} \times \text{基質 1 分子中の炭素数}) \quad (\text{式 1})$$

対炭素源収率で計算すると、基質をグルコースおよび酪酸における最大理論ブタノール収率は、それぞれ0.667 C-mol/C-mol（4÷6）および1.00 C-mol/C-mol（4÷4）となり、グルコース代謝における2分子の炭素損失が反映される。したがって、炭酸固定と炭素損失がなければ、最大対炭素源収率は1 C-mol/C-molとなるため、有用性（混合糖や有機酸と糖類との混合基質にも応用可能）と広い汎用性（異なる基質・プロセスの結果とも比較可能、他の有価物生産プロセスにも応用可能）を有している。

5-2. 1-Dodecanolとpolytetrafluoroethyleneを用いた膜型抽出回分発酵 冒頭で述べたように、最終生産物阻害によりブタノール生産は抑制される。これまでに、ブタノールの抽出剤に菌体増殖阻害のないオレイルアルコール（分配係数：3.3）を用いた抽出発酵が報告されている²⁶⁾。筆者らは、さらなる高分配係数（5.14）を示す1-dodecanolに着目した。ところが、1-dodecanolを直接培養液と接触させると、N1-4株への菌体増殖阻害が観察された。そこで、1-dodecanolと培養液の接触面に疎水性であるpolytetrafluoroethylene膜を設置することにより、菌体増殖阻害を回避しながら、ブタノールを抽出することができた。最終的には、通常回分発酵と比較して、総ブタノール生産濃度は16.0 g/Lから20.1 g/Lに向上し、報告されている膜型抽出発酵の中でも最大のブタノール生産性対膜面積（78.6 g/(L・h・m²))を得た²⁷⁾。

表1. 新規ブタノール生産プロセスの開発

発酵原料	生産プロセス	文献
グルコース	膜型ブタノール抽出回分発酵	27
グルコース	Cell-recycling 高密度連続発酵	28
キシロース	Cell-recycling 高密度連続発酵	29
キシロース、セロビオース	pH制御回分発酵	31
酪酸、グルコース	pH-stat 流加発酵	16
酪酸、グルコース	Living cellによる回分プロセス	25
酪酸、グルコース	Living cellによる連続プロセス	32
DL-乳酸、グルコース	pH-stat 流加発酵	18
DL-乳酸、アラビノース	逐次添加流加発酵	20

5-3. Cell recycling法による高密度連続発酵

ABE発酵における連続発酵の報告例はあるが、低菌体濃度による低ブタノール生産性や長時間運転による退化現象（ブタノール生産が停止する）などが報告されている。そこで我々は、高活性でフレッシュなN1-4株の回分発酵液を10倍に濃縮して高密度菌体を得た後に、フローファイバー精密ろ過膜を用いたCell recycling法による高密度連続発酵を検討した。

グルコースを炭素源とした場合、菌体濃度（DCW：乾燥菌体重量）は100 g/L以上となり、希釈率 0.85 h^{-1} で高ABE生産性（ $11.0\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ ）を示したが、発泡や発酵液のオーバーフローにより、わずか48時間で運転不能となった。そこで、発酵液を直接一定速度で引き抜くCell bleedingを導入した結果、総希釈率 0.85 h^{-1} （Cell bleeding; 0.09 h^{-1} ）で200時間以上安定して運転が可能となり、平均ABE生産性 $9.77\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ となった。Cell recycling法による連続発酵の中では、最長の操作安定性と最高のABE生産性であった²⁸⁾。

さらに、キシロースを炭素源とした連続発酵を検討した。発酵液のpHが4.6の場合と比較して、pHを5.7に制御した通常の連続発酵では、希釈率 0.20 h^{-1} におけるブタノール生産性が $0.272\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ から $0.526\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ に増加し、pHが重要な因子であることが明らかとなった。さらに、Cell recycling法による高密度連続発酵では、いずれの希釈率（ $0.26\text{--}0.85\text{ h}^{-1}$ ）でもDCWは約20 g/Lにほぼ一定となり、希釈率 0.78 h^{-1} で平均ブタノール生産性 $3.32\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ を得た²⁹⁾。本研究はキシロースを発酵原料としたABE連続発酵の初めての報告である。

5-4. カーボンカタボライト抑制（CCR）を回避した混合糖からの回分発酵

リグノセルロース糖化液を発酵原料のターゲットとした場合、セルロース由来のグルコースとヘミセルロース由来のキシロースの混合糖を効率よく消費する必要がある。ところが、一般に、グルコース存在下では、他の糖消費が抑制されるカーボンカタボライト抑制（CCR）が生じる。これまでに、分子育種による育種微生物を用いてCCRを回避した報告はあったが³⁰⁾、野生株で回避した報告はない。筆者らは、セルロース加水分解物として、グルコースではなく、セロビオースを用いることを想定して、セロビオース/キシロース混合糖を発酵原料に用いて炭酸カルシウムによるpH制御回分発酵を行った。その結果、キシロース消費が抑制されることなく両糖が消費され、 16 g/L ブタノールが生産された。また、セロビオース/キシロース比を検討したところ、1:1が最適であった³¹⁾。本結果は、野生株を用いたABE発酵におけるCCRを回避した初めての報告だけではなく、リグノセルロースをターゲットとす

る新規糖化プロセスや植物育種、すなわちデザインドバイオマスの創生に有用な知見となり得る。

5-5. Living cellによる酪酸からの回分・連続プロセス

Growing cellに比べて、Living cell（休止菌体、非増殖菌体）には、高収率や低副産物生成などが期待できるが、これまでにLiving cellによる酪酸からのブタノール生産は皆無であった。まず、窒素フリー培地を用いて回分プロセスで検討したところ、Growing cellと同様に、酪酸とともに補因子の供給源としてグルコースを共添加した結果、酪酸からブタノールが生産された。さらに、電子供与体であるmethyl viologen（MV）を異なる濃度（ $0.01\text{ mM--}1\text{ mM}$ ）で添加したところ、 0.1 mM MV添加時にブタノール対炭素源収率はMV無添加の 0.577 C-mol/C-mol から 0.671 C-mol/C-mol に大きく増加した。筆者らは世界で初めて糖類からの最大理論ブタノール対炭素源収率 0.667 C-mol/C-mol を上回る収率を達成し、高効率ブタノール生産システムの構築に成功した²⁵⁾。

次に、Cell recycling法による高密度Living cellを用いた酪酸からの連続プロセス生産を検討した。回分プロセス同様に、 0.01 mM MV添加によりブタノール対炭素源収率は無添加の 0.528 C-mol/C-mol から 0.591 C-mol/C-mol に増加した。ところが、時間の経過とともにブタノール生産能が著しく低下したことから、Living cellで機能している関連酵素群の低下が示唆された。そこで、4時間ごとに15分間のみ窒素フリー培地から窒素含有培地へ切り替えて酵素活性再生を行った。その結果、希釈率 0.85 h^{-1} で 0.01 mM MVを添加時にブタノール生産能の低下は100時間以上たっても見られず、平均ブタノール生産性 $7.99\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ 、ブタノール対炭素源収率

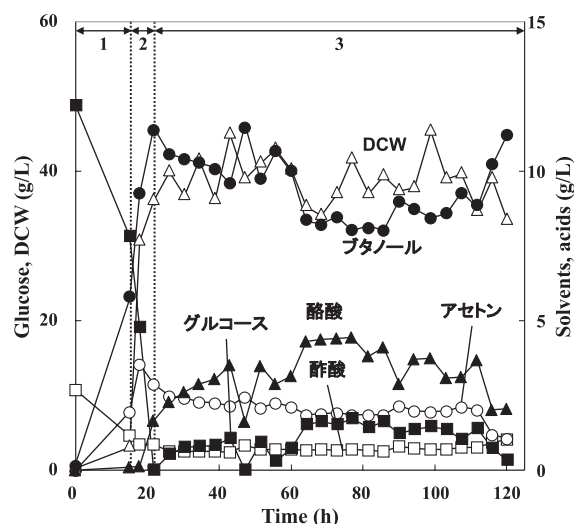


図6. 活性再生による高密度Living cellを用いた酪酸からの連続ブタノール生産。希釈率： 0.85 h^{-1} 、 0.01 mM MV添加。1：回分発酵期，2：菌体濃縮期，3：連続生産期。

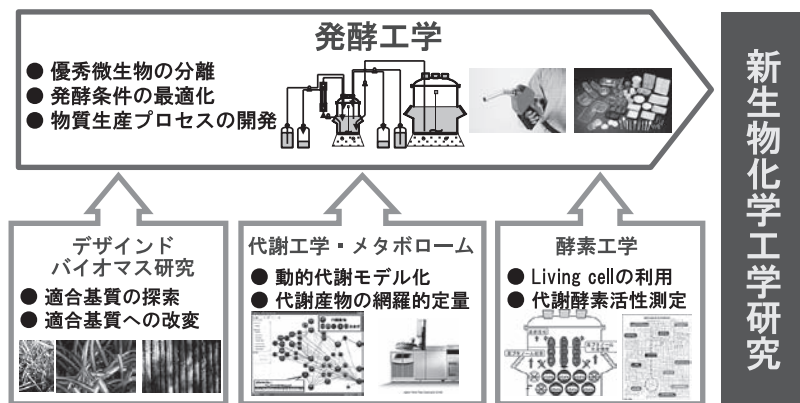


図7. これまでに実施してきた複合多領域アプローチ

0.686 C-mol/C-molとなり(図6), 世界最高水準の高速高効率ブタノール生産プロセスの構築に成功した³²⁾.

おわりに

筆者は, 新たな概念『デザインドバイオマス』を提唱するとともに, 発酵工学を基盤とする複合多領域(メタボローム, 代謝工学および酵素工学)的観点から研究を遂行し, 本会が世界を牽引してきた生物化学工学を進展させたいわば『新生物化学工学』領域を切り拓いている(図7). 残念ながら, 発酵工学を専門とする本会会員は年々減少しているように感じる. 筆者は, 学生時代から指導教員に「発酵工学研究者は常に新しい切り口を探さなければいけない」ということを教育されてきた. 換言すれば, 新しい切り口がなければ, 論文発表できないということである. 口で言うのは簡単だが, 新しい切り口を発見できるのは現在でも非常に難しく, 産みの苦しみを味わっている. このことが, 発酵工学研究者が減少している一因であるかもしれない. 一方, 近年では, 日進月歩でさまざまな解析方法が開発されており, 特に, 開発技術を用いた『オーム研究』が著しく発展している. 種々のオーム研究はもちろん発酵生産でも実施されているが, 多くが通常の回分発酵を対象としており, 発酵工学アプローチにより構築された発酵プロセスを対象としている例は少ない. 極論だが, 発酵工学とオーム研究の融合により, 無尽蔵かつ無限に新たな切り口と知見を発見できる可能性を感じている.

さらに, 現所属研究室(九州大学大学院農学研究院土壌微生物学)では, 酒井謙二教授とともに, “メタ発酵”(複合微生物による有価物生産のための発酵)による有価物生産プロセスの開発を目指している. すなわち, 純粹微生物系から複合微生物系へのシフトである. 複合微生物系を自由自在に制御するのは不可能のように感じられたが, 筆者らは温度を最適化することにより, 光学純度

100%であるメタ発酵によるL-乳酸生産に初めて成功した³³⁾. 究極的には, デザインドバイオマスからターゲットとするさまざまな有価物生産にそれぞれ適したメタ発酵プロセスを構築したい.

最後に, 本研究は九州大学大学院農学研究院および佐賀大学農学部にて遂行されたものです. 恩師であり, 公私ともに大変お世話になっていました園元謙二先生(九州大学大学院農学研究院教授), 小林元太先生(佐賀大学農学部教授)に心から御礼申し上げます. また, 本研究を行うにあたり, 多大な御指導, 御鞭撻を賜りました酒井謙二先生(九州大学大学院農学研究院教授)に深謝申し上げます. さらに, 絶えず有益な御助言, 御協力を頂きました石崎文彬先生(同名誉教授), 岡本正宏先生(同教授), 中山二郎先生(同准教授), 花井泰三先生(同准教授), 善藤威史先生(同助教)に深く感謝いたします. また, 一緒に研究を行いました小宮山晶子博士, 江藤晃嗣氏, 進藤秀彰博士, 田中重光博士, Mohamed Ali Abdel-Rahman博士, 吉田剛士博士をはじめとする多くの共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) 大城麦人, 田代幸寛, 園元謙二: 廃棄物学会誌, **19**, 271–277 (2008).
- 2) 田代幸寛, 園元謙二: 生物工学, **87**, 484–486 (2009).
- 3) Tashiro, Y. and Sonomoto, K.: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Microbiology Book Series, Volume 2), 1383–1394 (2010).
- 4) Tashiro, Y., Yoshida, T., Noguchi, T., and Sonomoto, K.: *Eng. Life Sci.*, **13**, 432–445 (2013).
- 5) 田代幸寛, 吉田剛士, 園元謙二: 化学と工業, **63**, 894–896 (2010).
- 6) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **156**, 286–301 (2011).
- 7) Wang, Y., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 10–18 (2015).
- 8) 野口拓也, 田代幸寛, 園元謙二: バイオサイエンスとインダストリー, **71**, 530–532 (2013).
- 9) Shen, C. R., Lan, E. I., Dekishima, Y., Baez, A., Cho, K.

- M., and Liao, J. C.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2905–2915 (2011).
- 10) Shen, C. R. and Liao, J. C.: *Metab. Eng.*, **10**, 312–320 (2008).
 - 11) Berezina, O. V., Zakharova, N. V., Brandt, A., Yarotsky, S. V., Schwarz, W. H., and Zverlov, V. V.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 635–646 (2010).
 - 12) Nielsen, D. R., Leonard, E., Yoon, S. H., Tseng, H. C., Yuan, C., and Prather, K. L. J.: *Metab. Eng.*, **11**, 262–273 (2009).
 - 13) Steen, E. J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C. J., Redding, A., Ouellet, M., and Keasling, J. D.: *Microb. Cell Fact.*, **7**, 36 (2008).
 - 14) Zheng, J., Tashiro, Y., Wang, Q., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 1–9 (2015).
 - 15) Tsuge, T., Tanaka, K., Shimoda, M., and Ishizaki, A.: *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 404–409 (1999).
 - 16) Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., and Yoshino, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 263–268 (2004).
 - 17) Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *Biotechnol. Adv.*, **31**, 877–902 (2013).
 - 18) Oshiro, M., Hanada, K., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 1177–1185 (2010).
 - 19) Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B., and Hunter, J. B.: *Arch. Microbiol.*, **164**, 36–42 (1995).
 - 20) Yoshida, T., Tashiro, Y., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 526–530 (2012).
 - 21) Desai, R. P., Harris, L. M., Welker, N. E., and Papoutsakis, E. T.: *Metab. Eng.*, **1**, 206–213 (1999).
 - 22) Yoshimura, J., Shimonobou, T., Sekiguchi, T., and Okamoto, M.: *Chem-Bio. Inform. J.*, **3**, 114–129 (2003).
 - 23) Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **131**, 45–56 (2007).
 - 24) Shinto, H., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., Okamoto, M., and Sonomoto, K.: *Process Biochem.*, **43**, 1452–1461 (2008).
 - 25) Tashiro, Y., Shinto, H., Hayashi, M., Baba, S., Kobayashi, G., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 238–240 (2007).
 - 26) Ishizaki, A., Michiwaki, S., Crabbe, E., Kobayashi, G., Sonomoto, K., and Yoshino, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 352–356 (1999).
 - 27) Tanaka, S., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Ikegami, T., Negishi, H., and Sakaki, K.: *Bioresour. Technol.*, **116**, 448–452 (2012).
 - 28) Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **120**, 197–206 (2005).
 - 29) Zheng, J., Tashiro, Y., Yoshida, T., Gao, M., Wang, Q., and Sonomoto, K.: *Bioresour. Technol.*, **129**, 360–365 (2013).
 - 30) Ren, C., Gu, Y., Hu, S., Wu, Y., Wang, P., Yang, Y., Yang, C., Yang, S., and Jiang, W.: *Metab. Eng.*, **12**, 446–454 (2010).
 - 31) Noguchi, T., Tashiro, Y., Yoshida, T., Zheng, J., Sakai, K., and Sonomoto, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 716–721, (2013).
 - 32) Baba, S., Tashiro, Y., Shinto, H., and Sonomoto, K.: *J. Biotechnol.*, **157**, 605–612 (2012).
 - 33) Tashiro, Y., Matsumoto, H., Miyamoto, H., Okugawa, Y., Poudel, P., Miyamoto, H., and Sakai, K.: *Bioresour. Technol.*, **146**, 672–681 (2013).