デザインドバイオマスによるバイオプロセスの開発：乳酸からのブタノール生産

○ 田代幸寛[1]・大城麦人[2]・花田克浩[2]・園元謙二[2,3,*]

[1]西南女学院大学短期大学部　生活創造学科、[2]九州大学大学院　農学研究院、
[3]九州大学　バイオアーキテクチャーセンター
[*]〒812-8581　福岡市東区箱崎 6-10-1　電話: 092-642-3019
Fax: 092-642-3019　E-mail: sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

植物バイオマスを原料としたバイオブタノール、バイオエタノール、乳酸などの有用物質生産は、エネルギー・環境の観点よりますます脚光を集めている。我々は既存の優秀な微生物・発酵プロセスに適するように発酵原料である植物バイオマスを改質・デザイン化したデザインドバイオマスによるバイオプロセスの開発に取り組んでいる。すでに、*Enterococcus* 属による直接乳酸発酵プロセスにおける最適なデンプンを確認しており、このような研究手法は今後様々なバイオプロセスに展開されることが予想される。我々はさらに、デザインドバイオマスから生産された乳酸発酵産物をフィードストックとしてバイオブタノールに変換する技術・バイオプロセスの開発を進めている。

1. はじめに

種々のバイオマスを発酵原料として *Clostridium* 属細菌により嫌気発酵（アセトン・ブタノール・エタノール（ABE）発酵）生産される「バイオブタノール」は、現在注目されている。エタノールと比べてブタノールには優れた特質が多々あり、バイオ燃料のみならず、バイオマテリアルとしての利用も期待されている[1]。エタノール発酵同様に、ABE 発酵でも安価かつ安定に供給可能な発酵原料、特に非食糧性の植物バイオマスの探索・利用に関する研究は重要である。

図 1 に示すように、近年、我々は乳酸発酵による植物バイオマスのカスケード利用を提言している[2]。すなわち、高分子多糖を資化できる乳酸菌を活用して、農産廃棄物、規格外農産物、余剰農産物などの植物バイオマスを一次発酵原料として乳酸（L-、D-、DL-体）や酢酸などの有機酸に変換させる。それらは安定性に優れるため、フィードストックとしての利用が可能であり、光学活性乳酸はそのままポリ乳酸の素材として活用できる。また、その発酵生産物を二次発酵原料として次の発酵プロセスに用いることもできる。すでに、乳酸と酢酸から生分解性プラスチックの一種であるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）の高生産に成功している[3]。

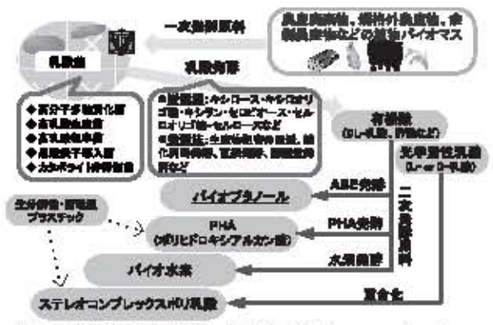

図 1. 乳酸発酵を活用した植物バイオマスのカスケード利用

一方、ABE 生産 *Clostridium* 属細菌は乳酸、酢酸、酪酸などの有機酸消費経路を有することが明らかとなっている（図 2）[4]。そこで、ABE 発酵を二次発酵プロセスとし、これらの代謝経路を利用することにより、様々な有機酸からブタノールへ変換することが可能である。これまでに、酪酸発酵や水素発酵で生産される酪酸からのブタノール生産を検討し、高効率ブタノール生産システムの構築に成功している[5, 6]。我々はさらに、乳酸からのブタノール生産法の開発を検討した。

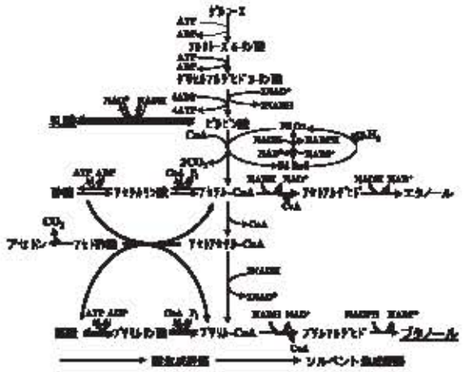

図 2. ABE 発酵の代謝経路図

2. 実験方法

(1) 乳酸を発酵原料とした高ブタノール生産法の開発

菌株には、高ブタノール生産性 *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 株(N1-4 株)を使用し、基質には DL-乳酸（0–20 g/l）とグルコース（0, 20 g/l）を使用した。約 10 g/l の N1-4 株の高密度菌体を用いて、pH 非制御回分培養および基質を逐次添加する pH 非制御流加培養と pH 制御流加培養（pH 5.5）を行った。さらに、pH 5.5 を指標に基質を連続的に添加する pH-stat 流加培養を行った。

(2) 炭素の安定同位体 ^{13}C を用いた乳酸からのブタノール変換の証明

[1,2,3-^{13}C$_3$]-乳酸と ^{13}C-グルコースを基質とした pH 非制御回分培養を行った。48 時間培養後の発酵液を回収し、ガスクロマトグラフ質量分析計に供した。

3. 結果と考察

(1) 高ブタノール生産システムの開発

N1-4 株は D-乳酸と L-乳酸を同時に消費できた。基質濃度の影響を pH 非制御回分培養で検討した結果、消費した乳酸からのブタノール生産にはグルコースが必要であり、高濃度の乳酸(>10 g/l)により発酵阻害が生じた。そこで、乳酸による発酵阻害を回避するために流加培養を行った結果、ブタノール生産濃度は pH 非制御回分培養 (6.62 g/l) と比較して、pH 非制御流加培養では 54%（10.2 g/l）、pH 制御流加培養では 90%（12.6 g/l）増加した。さらに、乳酸を基質とした pH-stat 流加培養を検討した結果、乳酸濃度を約 5 g/l に維持したまま、ブタノール生産濃度が 134%増加（15.5 g/l）し、ブタノール生産速度、乳酸消費速度ともに増加した。よって、pH-stat 流加培養による高ブタノール生産システムを構築できた[7]。

(2) 乳酸からのブタノール変換の証明

ブタノールの 4 つの炭素原子のうち、4 つすべてまたは 2 つが ^{13}C に置換されたブタノールをそれぞれ検出できた。また、消費された乳酸の約 54%および約 12%がそれぞれブタノールおよびアセトン＋エタノールに変換されることが示唆された。これまでに、他の研究者により酢酸と酪酸のブタノール変換は報告されていたが[8]、我々は初めて乳酸のブタノール変換を確認した[7]。

4. 今後の展望

本研究では、「乳酸発酵を活用した植物バイオマスのカスケード利用」における二次発酵プロセスの一つとして、ABE 発酵によるバイオブタノール生産の有用性・実現性を示すことができた。

詳細は不明だが、乳酸からのブタノール生産には、グルコースの共添加が必須である。デンプンの加水分解などで得られるグルコースは食糧資源でもあるため、発酵原料として好ましくない糖源である。今後、実用性を高めるために、セルロース、ヘミセルロース、リグノセルロースなどを構成する糖源を検討し、完全なる非食糧性の植物バイオマスによるブタノール生産に取り組む。

参考文献

[1] Tashiro Y, Sonomoto K.: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Microbiology Book Series, number #2), Accepted
[2] 柴田　圭右, *et al.*:生物工学, 86, 222-225 (2008)
[3] Tsuge T, *et al.* : J. Biosci. Bioeng., 91, 545-550 (2001)
[4] Jones DT, Woods DR. : Microbiol. Rev., 50, 484-524 (1986)
[5] Tashiro Y, *et al.*: J. Biosci. Bioeng., 98, 263-268 (2004)
[6] Tashiro Y, *et al.*: J. Biosci. Bioeng., 104, 238-240 (2007)
[7] Oshiro M, *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 1177-1185 (2010)
[8] Hartmanis MGN, *et al.*: Appl. Microbiol. Biotechnol., 20, 66-71 (1984)