

# 増殖非依存型バイオプロセスによる バイオ燃料・化学品生産技術の開発

乾 将行・湯川 英明\*

近年のバイオ燃料の生産急増は、食料・飼料作物の価格高騰を永続させる要因との指摘や栽培地拡大による環境破壊など、現状バイオ燃料の負の側面として強く認識されている。このような状況に対し、非可食資源である農産廃棄物やエネルギー作物（スイッチグラスなど）由来のセルロース類を原料とするバイオ燃料製造は、食料との競合を回避・軽減し、さらに、LCA（Life Cycle Assessment）評価からも二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）排出削減に高い効果が示されるなど、クリーンな燃料として期待されている。

一方、グリーン化学品分野は、さらに今後の急展開が見込まれている。すなわち、石油価格は今後も高値圏を維持すると予測されることから、化学品のグリーン化は経済的にも優位性を有するとされていること、ユーザーとなる自動車・家電・電子業界などの環境対応材料への要望はますます強まる状況にあることから、グリーン化学品製造に関する研究開発への積極姿勢が目立っている。この傾向は先行してきた米国系企業のみならず、EU系企業も同様であり、一斉に本格的R&Dへの取り組みを表明している。バイオ燃料と比較し遥かに付加価値の高いグリーン化学品は、今後急速に工業化が実現していくものと考えられる。本稿では、このような状況の下、RITEが取り組む非可食バイオマスからのバイオ燃料・化学品生産技術の開発について紹介する。

## 増殖非依存型バイオプロセス

従来の発酵法では主に糖類を原料とし、生産菌を培養しながら目的物質の生産を行う様式であった。したがって、発酵法は原料糖類を微生物バイオマスと目的物質に変換させるプロセスと考えることができるが、“微生物の増殖”は、原料原単位の低下のみならず、生産速度の低下や副生物の生成、それに伴う目的物質の精製コストの上昇など、経済性を圧迫する主要因となっている。

仮に、微生物を高密度に反応槽に充填して、原料糖類を供給し、連続的に物質生成を行うことができれば、まさに理想的なバイオプロセスと考えられる。このバイオプロセスでは、微生物細胞はあたかも化学プロセスにおける触媒のように機能し、しかも、化学反応では困難な多段階反応でありながら選択的な物質生産が可能となる。ところがこのようなプロセスはこれまでまったくの

夢物語とされてきた。

これに対し筆者らは、アミノ酸の工業生産に用いられてきたコリネ型細菌 (*Corynebacterium glutamicum*) が、還元条件下におくと増殖は停止するものの、主要な代謝系は機能する性質を見いだした<sup>1)</sup>。この性質を利用した新規バイオプロセスが「増殖非依存型バイオプロセス」であり、前記発酵法の課題を根本的に解決できる突破口を見いだしたのである(図1)。増殖非依存型バイオプロセスでは、まず微生物細胞を大量に培養し、続いて得られた細胞を反応槽に高密度に充填し、原料糖類を投入して物質を生産する。このように、あたかも「化学触媒」の如く微生物細胞を利用することによって、従来の発酵法を大幅に上回る高STY (space time yield) を実現した<sup>1-3)</sup>。

増殖非依存型バイオプロセス（還元条件下）における細胞内代謝プロファイル解析の一つとして、DNAマイクロアレイを用い、好気（増殖）条件下と還元（非増殖）条件下における代謝遺伝子の転写レベルでの網羅的発現解析を行った<sup>4)</sup>。その結果、還元条件下では、複数の解糖系酵素遺伝子 (*gapA*, *tpi*, *pgk*)、および糖代謝関連遺伝子 (*ldhA*, *ppc*, *mdh*, *malE*) の転写量が好気条件と比較して増大し、これらの酵素活性も上昇していた。逆にTCAサイクルの複数の遺伝子発現は抑制されていた(図2)。この結果は、還元条件下では増殖は停止しているが、細胞当りの糖消費速度は好気増殖条件と比較して

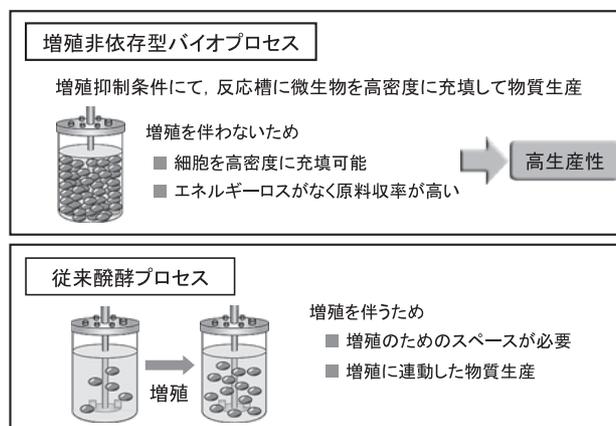


図1. 増殖非依存型バイオプロセスと従来発酵法との比較

\*著者紹介 (公財)地球環境産業技術研究機構 バイオ研究グループ (理事, グループリーダー) E-mail: mmg-lab@rite.or.jp

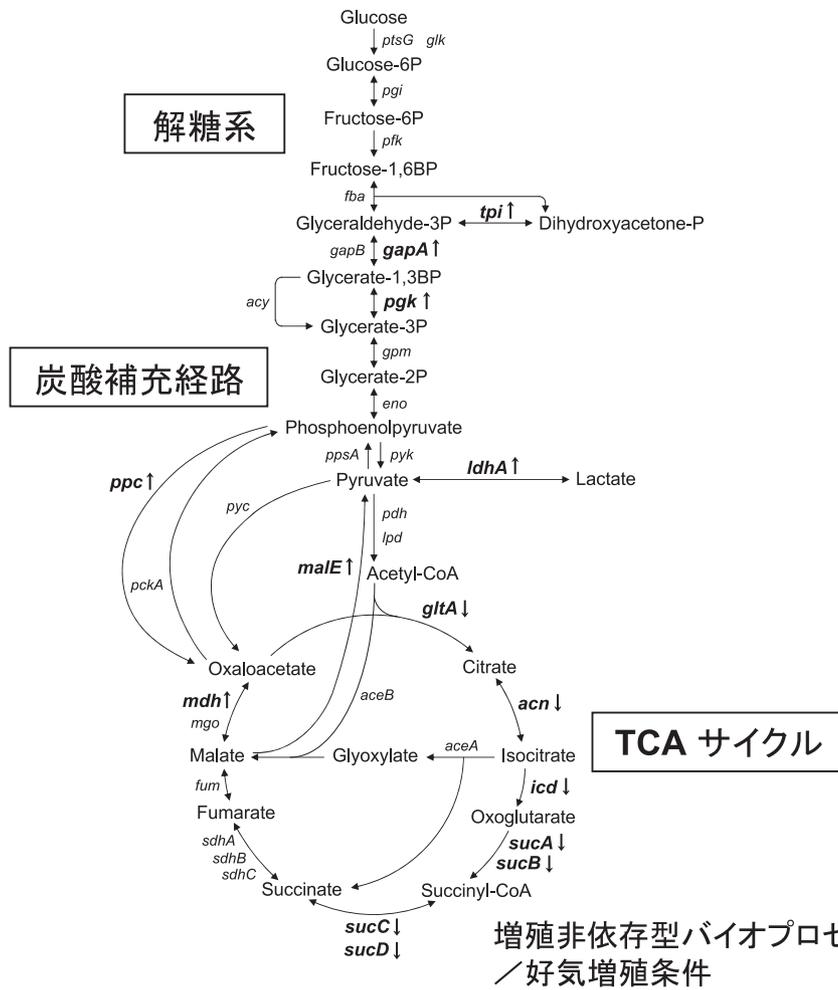


図2. コリネ型細菌の好気条件下と還元条件下における遺伝子発現変化. 図中の矢印は、還元条件（増殖非依存型バイオプロセス条件）において発現誘導（↑）および発現抑制（↓）される遺伝子を示す.

増加する現象をうまく説明することができる. このように、コリネ型細菌は周りの酸化還元状態に应答して代謝シフトが生じ、還元条件では糖代謝活性が向上するメカニズムを初めて明らかにした<sup>4)</sup>.

### 非可食バイオマス利用技術の開発

バイオ燃料や化学品の原料として、非可食バイオマスである稲わら、麦わら、コーンストーバーなどの農産廃棄物に加え、エネルギー作物として、ミスカンサス、スイッチグラス、エネルギーケーンなどの多収量作物の検討も行われている. エネルギー作物を原料として利用した場合、原料作物の土地面積当りの収穫量が格段に高く、現行のトウモロコシ原料法と比べて1桁高いバイオエタノール生産量となり得る. またエネルギー作物は、商品作物に比べて気候や栽培地の土質などによるハードルが低く、栽培可能地域が遥かに広い. その結果、食糧生産との“栽培地の競合”も回避可能である. そのためエネルギー

作物の利用は、貧困地域（国）の農業振興、新規雇用の発生といった地政学上のプラスの効果も期待される.

非可食バイオマスからのバイオ燃料・化学品生産は、2つの要素技術から構成される（図3）. すなわち、非可食バイオマスからの糖類生成工程、および生成糖類からバイオ燃料・化学品へのバイオ変換工程である. 前者は使用する酵素（セルラーゼ）のコストが鍵であり、酵素メーカーによる技術改良、大規模生産による大幅なコストダウンが必要となる. 一方、後者のバイオ変換工程では、後述の3つの技術確立が不可欠である.

**バイオ変換工程に必要な技術特性** 非可食バイオマスからのバイオ燃料・化学品生産におけるバイオ変換工程には、3つの技術特性が要求される. すなわち、C6, C5糖類の同時利用、リグノセルロース由来「発酵阻害物質」に対する耐性、高生産性である<sup>5)</sup>. デンプン系バイオマスの構成糖は、グルコース（C6糖類（炭素数6））であるが、非可食バイオマスにはグルコースに加えて、

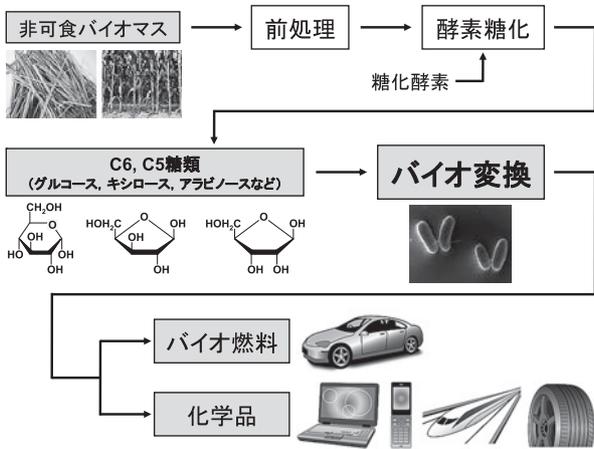


図3. 非可食バイオマスからのバイオ燃料・化学品生産の概念図

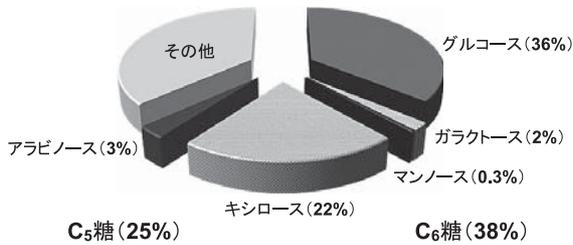


図4. 非可食バイオマス（コーンストローバー）の組成

キシロースやアラビノースなどのC5糖類（炭素数5）も著量存在する（図4）。そのため、バイオ変換工程に用いる微生物は、C6、C5糖類を同時利用できることが必要となる。さらに、非可食バイオマスからの糖類生成工程では、酵素糖化を容易にするために、水熱などによる前処理を必要とするが、バイオマスの過分解によって芳香族化合物、フラン類、有機酸類などが副生する。これらの副生物は、“発酵阻害物質”と呼ばれ、エタノール生産性を低下させる原因物質として大きな問題となっている。物理的・化学的除去方法の開発も進められているが、新たな工程の追加はコスト高になるため、発酵阻害物質に影響を受けないプロセスが求められる。

**C6、C5糖類の同時利用** 図4に示したように非可食バイオマスは、グルコースに加えて著量のC5糖類（キシロース、アラビノースなど）を含有している。米国エネルギー省の試算によれば<sup>6)</sup>、原料コストは、エタノール製造価格の約35%を占めており、原料バイオマスに含まれる糖類を効率的に利用することは、経済性の観点から非常に重要となる。

もっとも研究が進展しているバイオエタノールを例にとり説明する。従来、バイオエタノール製造に用いられ

てきた酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）や *Zymomonas mobilis* は、C5糖類を発酵炭素源として利用できない。遺伝子工学的手法により、キシロース資化性を付与した組換え酵母や *Z. mobilis* が多数開発されているが、現在のところグルコースと比較してC5糖類の消費速度が非常に遅く、さらなる研究開発が進められている。

野生型のコリネ型細菌（*C. glutamicum*）も酵母と同様に、C5糖類を利用できないため、大腸菌由来のキシロース代謝遺伝子（*xylA*, *xylB*）を導入した組換え株を構築した<sup>7)</sup>。該組換え株は、キシロースを単一炭素源として生育可能であった。次にグルコース、キシロースを炭素源とし、該組換え株を好氣的に培養したところ、生育において diauxic 効果は観察されなかったが、糖の消費ではグルコースを優先的に消費し、その後キシロースを消費した。これに対し増殖非依存型バイオプロセスでは、非常に興味深いことにグルコース存在下においてもキシロースを消費した。グルコースとキシロースが同時に利用されたことは、微生物変換反応に要する時間が短縮され、工業利用の観点から好ましい。筆者らはすでに、キシロースに加えてアラビノースおよびセルロースの部分分解物であるセロビオースを利用できるコリネ型細菌を開発している<sup>8-10)</sup>。さらにコリネ型細菌の近縁種より、新規ペントーストランスポーターを見だし<sup>11)</sup>、該トランスポーターを上述の混合糖利用コリネ型細菌に導入することで、グルコース、キシロース、アラビノースおよびセロビオースをより効率的に同時に利用する菌株の構築に成功している<sup>12)</sup>（図5）。当該混合糖利用株は、グルコース、キシロース、アラビノースをほぼ同じ速度で利用するという特徴をもち、これにより混合糖原料による連続生産の扉が開かれ、混合糖利用における技術課題は、増殖非依存型バイオプロセスにおいては概ね解決されたと考えている。

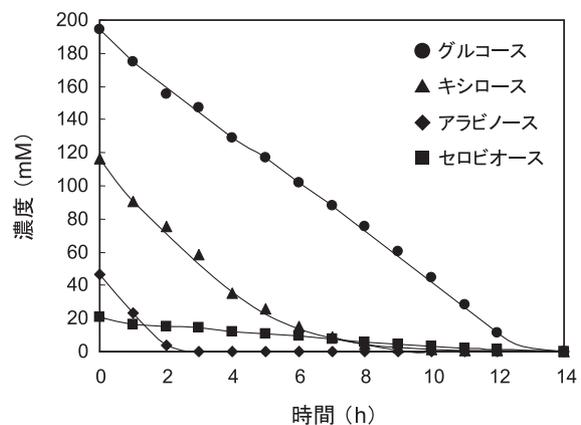


図5. 混合糖同時利用遺伝子組換えコリネ型細菌によるグルコース、キシロース、アラビノースおよびセロビオースの利用

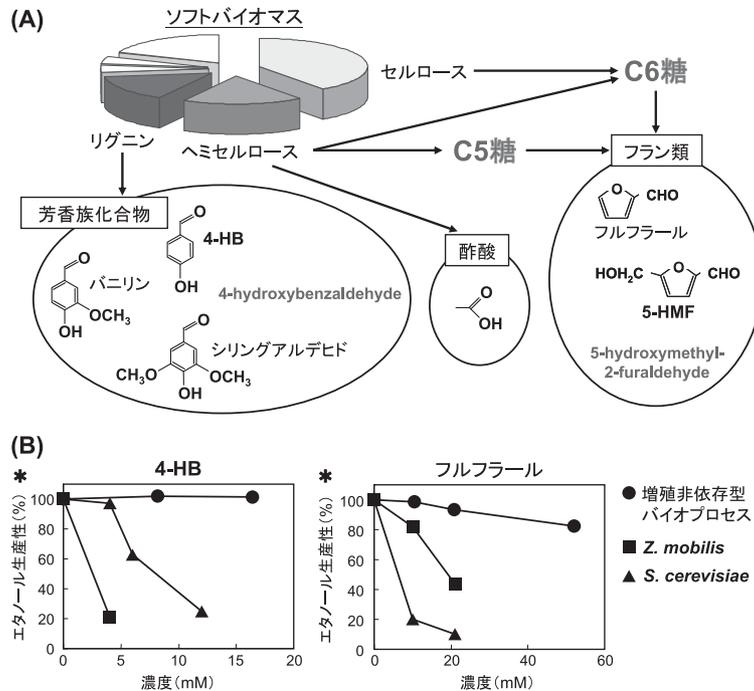


図6. 非可食バイオマス由来の主要発酵阻害物質 (A) とエタノール生産性に対する発酵阻害物質の影響比較 (B). \* 発酵阻害物質を添加していないときのエタノール生産性を100%とした相対生産性.

**発酵阻害物質耐性** 非可食バイオマスから糖類への糖化工程の効率化を目的とし、水熱処理や酸・アルカリ処理がバイオマスに施される。この前処理工程において、微生物の発酵を阻害する種々の物質が生成する (図6)。こうした物質がバイオマス糖化液に存在すると、エタノール生産性および収率の低下を招くことが知られている。そのため、発酵阻害物質を取り除く手法や、発酵阻害物質に耐性を有するエタノール生産菌が開発されている。現状では、糖化酵素コストが非常に高いことがセルロースエタノール工業化の大きな障害の一つとなっているが、糖化工程において厳しい前処理を行うと必要酵素量は少なくなるが発酵阻害物質生成量が多くなり、逆に穏やかな前処理を行うと発酵阻害物質生成量は少なくなるが必要酵素量が多くなるという trade off の関係となっている。こうした背景の下、筆者らは増殖非依存型バイオプロセスによるエタノール生産へ与える発酵阻害物質の影響について検討した<sup>13)</sup>。その結果、増殖非依存型バイオプロセスにおいては、芳香族化合物、フラン類、有機酸類などの発酵阻害物質により、エタノール生産性が低下しないことを確認した (図6)。また、実糖化液に含まれる複数の発酵阻害物質を混合しても生産性の低下は観察されなかった。これは、発酵阻害物質の作用機構が増殖阻害であり、本プロセスにおいて微生物細胞は非分裂増殖状態にあることから、エタノール生産が低下しないのである。

**高生産株の創製** 増殖非依存型バイオプロセスは、上述のように、コリネ型細菌の還元状態では細胞増殖は抑制されるが、糖類代謝活性は維持される性質を利用し、目的物質を生産するバイオプロセスである。当該条件における糖類からの主要な代謝産物は、乳酸、コハク酸、および微量の酢酸である<sup>1)</sup>。乳酸とコハク酸の生成量比は、添加した炭酸の量により変化させることができ、添加量に比例してコハク酸の生成量が増加する<sup>3)</sup>。これは、コリネ型細菌が、増殖非依存型バイオプロセスにおいて炭酸固定反応を介した還元的TCA経路によりコハク酸を生成しているためである。当該性質を利用することにより、バイオプロセスにおいてCO<sub>2</sub>を副原料とし得ることを初めて示した<sup>1)</sup>。こうしたコリネ型細菌の代謝特性を基盤とし、解読したコリネ型細菌のゲノム情報に基づいた代謝設計、ゲノム工学技術とトランスクリプトーム解析、メタボローム解析などのシステムバイオロジーを駆使した代謝改変により、各種有用物質のきわめて高い生産性を達成している。エタノール生産コリネ型細菌は、乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の破壊株を宿主とし、これに*Z. mobilis*由来のピルビン酸脱炭酸酵素、およびアルコールデヒドロゲナーゼを高発現することにより構築した<sup>2)</sup>。当該遺伝子組換え菌株のエタノール生産性は、充填した細胞濃度に依存して上昇し、従来法と比較して高い生産性 (STY) を示した<sup>2)</sup>。この他、従来のバイオプロセスの生産性を上回るきわめて効率的なD-乳酸<sup>14)</sup>、

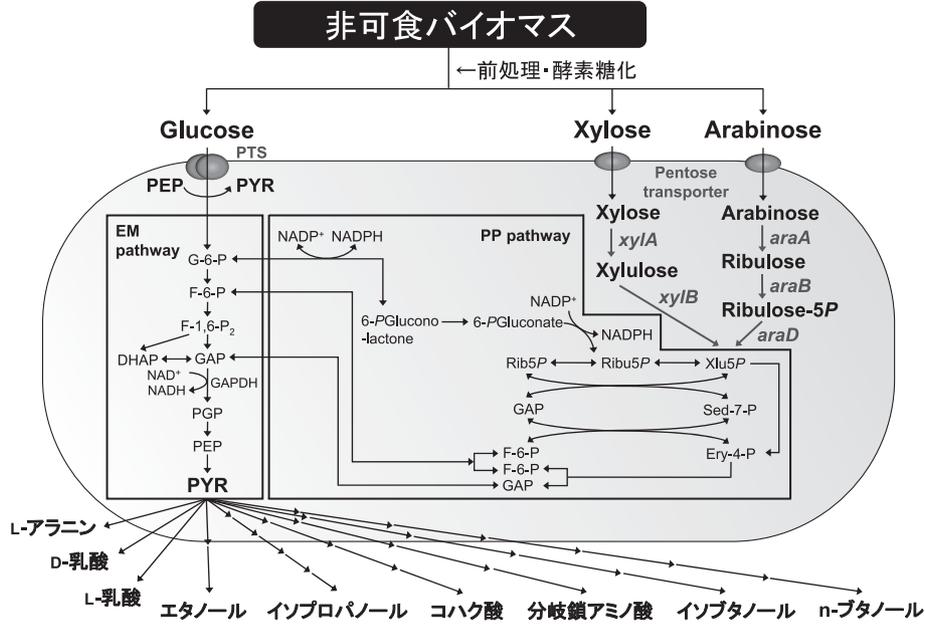


図7. コリネ型細菌の代謝設計による化学品・バイオ燃料の生産

コハク酸<sup>15)</sup>, アラニン<sup>16)</sup>, バリン<sup>17)</sup>などの生産プロセスを構築している(図7)。

### おわりに

米国におけるセルロースエタノールの工業生産が滞っている。RFS2(再生可能燃料基準)で義務付けられた2011年のセルロースバイオ燃料の使用量は600万ガロン(2.3万kl)/年であるのに対して、米国環境保護庁(EPA)の発表によると、昨年(2010年7月~2011年10月)の米国におけるセルロースバイオ燃料の製造量は「ゼロ」と報告された。これは、糖化酵素コストが非常に高いこと、バイオ変換工程におけるC6、C5糖類の同時利用や発酵阻害物質の課題解決が遅れていることなどが工業化の障害になっていると考えられる。一刻も早い課題のブレークスルーが望まれる。一方、次世代バイオ燃料としてバイオブタノールや脂肪酸などの生産研究が盛んに行われている。これらは航空燃料への使用も可能であり、実用化への期待も大きい。

グリーン化学品製造は、我が国の重要産業である電子機器類、自動車などの先端産業の基礎材料であり、これらのグリーン化による競争力の強化は必須の課題である。

地球環境対策に関する技術開発競争は、今後も世界レベルで激化・拡大し続けると予想される。RITEは独自技術である「増殖非依存型バイオプロセス」を基盤とし、内外企業との共同研究開発により、バイオリファインリー産業を早期に実現すべく努力していきたい。

### 文 献

- 1) Inui, M. et al.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 182 (2004).
- 2) Inui, M. et al.: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 243 (2004).
- 3) Okino, S. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 475 (2005).
- 4) Inui, M. et al.: *Microbiology*, **153**, 2491 (2007).
- 5) Dien, B. S. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 258 (2003).
- 6) [http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/mypp\\_nov\\_2011\\_appendix\\_c.pdf](http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/mypp_nov_2011_appendix_c.pdf)
- 7) Kawaguchi, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3418 (2006).
- 8) Kawaguchi, H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 1053 (2008).
- 9) Kotrba, P. et al.: *Microbiology*, **149**, 1569 (2003).
- 10) Sasaki, M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 691 (2008).
- 11) Kawaguchi, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3419 (2009).
- 12) Sasaki, M. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**, 105 (2009).
- 13) Sakai, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2349 (2007).
- 14) Okino, S. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 449 (2008).
- 15) Okino, S. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 459 (2008).
- 16) Jojima, T. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 159 (2010).
- 17) Hasegawa, S. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 865 (2012).