

木質系バイオマスを原料に利用するバイオ燃料の 発酵生産プロセスの開発

日大生産工 ○秋田 紘長

1. 緒言

木質系バイオマスは、使用により大気中の温室効果ガスを増大させないだけでなく、近年では「持続可能な社会の構築」の観点からも利用が進んでいる。これまでに、トウモロコシやサトウキビ等の可食バイオマスから調製した糖化液を培地に利用して、アルコールや有機酸の発酵生産プロセスが確立されている。特に、米国や南米を中心に、発酵生産されたバイオエタノールがバイオ燃料として産業利用されており、その需要は年々増大している¹⁾。但し、可食バイオマスの利用促進に伴って食糧不足を招くため、現在では食糧と競合しない木質系バイオマスの有効利用が鋭意研究されている。本講演では、大腸菌を利用したイソブタノール生産株の作製、木質系バイオマスからの糖化液の調製、糖化液を培地に利用したイソブタノールの発酵生産について報告する。

2. 実験方法

2.1 イソブタノール生産株の作製

大腸菌 *Escherichia coli* MG1655株に保存されている *mlc* (レギュレーター遺伝子) に変異導入して、炭素カタボライト抑制を解除した。次に、炭素カタボライト抑制を解除した株のゲノムDNAに遺伝子カセット (キシロース依存性プロモーター + T7RNAポリメラーゼ遺伝子) を導入して、キシロース誘導型外来遺伝子発現システムを構築した。さらに、4種の遺伝子カセット (T7プロモーター + イソブタノール生産酵素遺伝子) を導入してイソブタノール生産株を作製した (図1)。

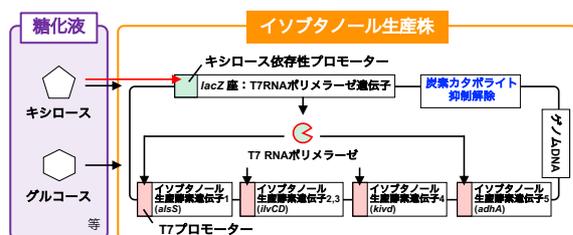


図1 イソブタノール生産株の概要

イソブタノール生産株内では、糖化液中に含まれるキシロースにより発現された T7RNA ポリメラーゼが、T7 プロモーターに作用することでイソブタノール生産遺伝子が逐次的に発現する。

2.2 イソブタノール生産条件の最適化

M9Y 合成培地 (40 g/L グルコース, 8 g/L キシロース, 5 g/L 酵母エキス, 17 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L NaCl, 1.0 g/L K_2CO_3 , 0.3 g/L KH_2PO_4 , 0.1 g/L NH_4Cl , 0.024 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0011 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を用いて、培養温度 (28–37°C) と初期培地 pH (pH6.0–8.0), 振盪培養速度 (100–300 rpm) をそれぞれ検討し、イソブタノール生産の最適条件を決定した。

2.3 糖化液の調製と利用

高圧蒸気滅菌器を用いてスギ木粉を水熱処理後、既報に従って水熱処理物から糖化液を調製した²⁾。得られた糖化液を培地に利用して、最適条件下でイソブタノール生産株を培養してイソブタノールを発酵生産した。

3. 結果および考察

3.1 炭素カタボライト抑制の解除

大腸菌には炭素カタボライト抑制と呼ばれる遺伝子発現調節機構が存在し、混合糖の代謝が制御されている。グルコースやキシロース等の混合糖を含む糖化液中で *E. coli* MG1655株を培養した場合、グルコース以外の糖の代謝に関わる遺伝子群の発現が抑制され、グルコースのみが選択的に代謝される。そこで、木質系バイオマスから調製した糖化液に含まれる混合糖を効率良く利用してイソブタノールを発酵生産するため、炭素カタボライト抑制の解除を試みた。

野生株 (*E. coli* MG1655株) と比較して、*mlc* への変異導入により作製された炭素カタボライト抑制解除株は、グルコース共存下で約2倍高いキシロース消費量を示した (図2)。

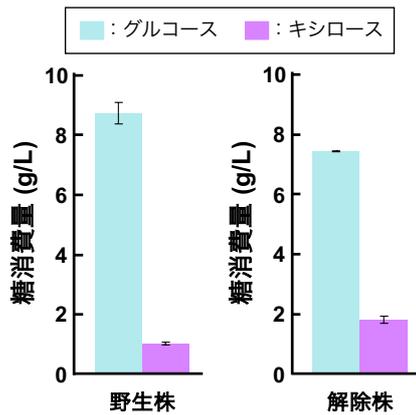


図2 糖消費量の比較

3.2. 合成培地を用いたイソブタノールの発酵生産

pETシステムに代表されるように、既存の外來遺伝子発現法では高価なプラスミドと遺伝子発現誘導剤が必要なため、生産コストの増大を招く³⁾。そこで本研究では、キシロース誘導型外來遺伝子発現システムを開発した^{4, 5)}。

本システムでは、糖化液の主成分であるキシロースを利用した外來遺伝子の発現を可能にした。またエタノールと比較して、エネルギー密度が高く、腐食性が低いため、バイオ燃料としての利用はイソブタノールの方が好ましい。そこで本システムを応用して、イソブタノール生産株を作製した。野生株はイソブタノールを生産しないのに対し、イソブタノール生産株をM9Y合成培地中で培養した場合、グルコースとキシロースを共代謝して、6.8 g/L イソブタノールを発酵生産した (図2)。さらに、最適生産条件下 (培養温度:32°C, 初期培地pH:6.5, 振盪培養速度:150 rpm)でイソブタノール生産株を培養した場合、イソブタノールの生産濃度 (8.4 g/L)を約1.2倍まで向上できた。

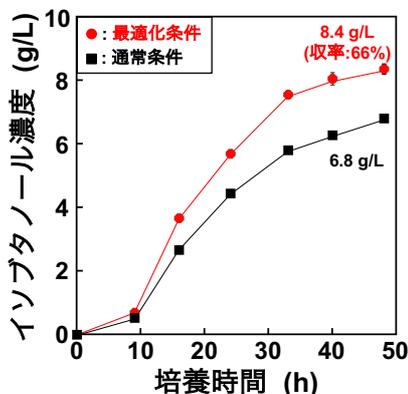


図2 M9Y合成培地を用いたイソブタノールの発酵生産

3.3. 糖化液を用いたイソブタノールの発酵生産

スギ木粉から調製した水熱処理物を原料として、86.4 g/L グルコースと15.5 g/L キシロースを含む糖化液を調製した。次に、最適生産条件下でイソブタノール生産株を糖化液中で培養し、3.7 g/L イソブタノールを発酵生産した (図3)。

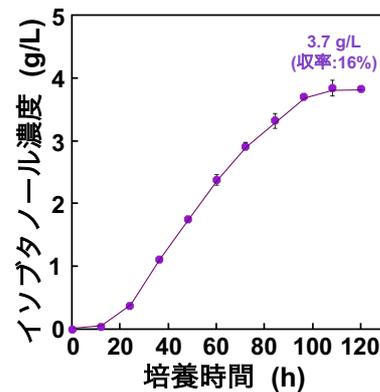


図3 糖化液を用いたイソブタノールの発酵生産

M9Y合成培地を用いた場合と比較して、糖化液を用いた場合、イソブタノール生産濃度は4割程度まで減少した。これは、糖化液中に含まれるフルフラール等のアルデヒドによりイソブタノール生産株の増殖が阻害されたことに起因したと考えられた。

4. 結言

E. coli MG1655株を利用してキシロース誘導型外來遺伝子発現システムを開発した。本システムでは、従来必要とされていた高価な遺伝子発現誘導剤とプラスミドを必要としないため、より経済的な遺伝子発現が可能となった。また、本システムを応用してイソブタノール生産株を作製した。作製した株を糖化液中で培養し、イソブタノールを発酵生産した。

参考文献

- 1) H. Yamamoto. J Jpn Inst Energy, 2017, 96:239-249.
- 2) H. Akita, M.Z.M. Yusoff, S. Fujimoto. Fermentation, 2021, 7:1-14.
- 3) 秋田紘長, 中島信孝. 科学と工業, 2023, 97:17-24.
- 4) H. Akita, N. Nakashima, T. Hoshino. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 99:991-999.
- 5) N. Nakashima, H. Akita, T. Hoshino. Metab Eng, 2014, 25:204-214.