

機関番号：10106

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20560724

研究課題名（和文） エネルギー代謝改変による中枢代謝活性化に基づくキシリトール発酵の効率化

研究課題名（英文） Enhanced xylitol fermentation based on the activation of central metabolism caused by metabolic modification

研究代表者

堀内 淳一 (Jun-ichi Horiuchi)

北見工業大学・工学部・教授

研究者番号：30301980

研究成果の概要（和文）：

本研究では、バイオマスなどの再生可能資源を原料として、高付加価値生産物であるキシリトールを微生物により生産するプロセスを対象に、キシリトール生産菌 *Candida magnoliae* のエネルギー代謝系に着目しキシリトール生産の効率化を目指した。

代謝反応モデルを構築し検討した結果、菌体あたりの酸素供給条件が  $0.7 \text{ (mmol-O}_2\text{/g-cell}\cdot\text{h)}$  において、キシリトール収率70%、生産性  $1.7 \text{ (g-キシリトール/L}\cdot\text{h)}$  の最も高い結果が得られ、キシリトール生産が大幅に向上した。

研究成果の概要（英文）：

Microbial xylitol production from renewable resources is expected to have potentials to realize a cheaper production of xylitol with low environmental impact. In this study, in order to realize enhanced production of xylitol using *Candida magnoliae* from corn cobs, we developed a simplified metabolic reaction model concerning xylose metabolism. The metabolic flux analysis was successfully applied for effective production of xylitol and it can be a useful tool to obtain reliable information not only for genetic modification but also for operational improvements in microbial processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物化学工学、バイオプロセス工学、生物情報工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：キシリトール、バイオマス、代謝反応モデル、最適化

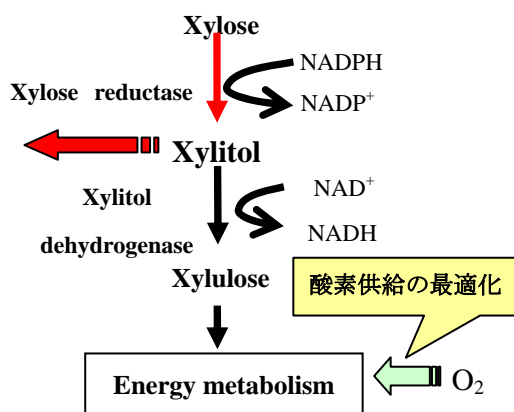
## 1. 研究開始当初の背景

微生物反応を利用するバイオプロセス

は、生物反応の特異性や穏やかな反応条件を生かした次世代の環境調和型ものづくり

技術として大きな期待が寄せられている。申請者らは、バイオマス等の再生可能資源を原料としたバイオプロセスによる有用物質生産に着目し様々な研究を進めているが、その一環として、従来化学プロセスにより生産されてきたキシリトールを農産廃棄物であるコーンコブ（トウモロコシの芯）を原料とし、キシロース資化性酵母 *Candida magnoliae* を用いて生産するバイオプロセス開発を進めてきた。

*Candida magnoliae* におけるキシロース代謝では、下図に示すごとく細胞内に取り込まれたキシロースがキシロース還元酵素によりキシリトールに変換される。通常生成したキシリトールはエネルギー代謝に利用されるが、酸素供給が制限されるとエネルギー代謝が抑制され、キシリトールのキシルロースへの酸化が進まず、その結果キシリトールは赤い矢印に従い菌体外に分泌される。キシリトールの微生物生産ではこの代謝経路を利用する。



### *Candida magnoliae* のキシリトール代謝

この菌を利用した更なるキシリトール生産の効率化を図るためにはキシリトール生産菌の遺伝的育種が不可欠と考えられる。

この点に関し最近、エネルギー代謝の改変による中枢代謝の活性化が有用物質発酵生産菌育種に有効であるとの研究が現れてきている（例えば、横田篤、バイオサイエンスとインダストリー, Vo165, 276-281(2007)）。すなわち、発酵生産の

効率化を解糖系やTCAサイクルなどの中枢代謝の活性化と捉え、細胞のエネルギー充足率下げのためATP合成酵素、FoF<sub>1</sub>-ATPアーゼを変異導入により不活性化させることにより、中枢代謝が逆に活性化し発酵生産の効率化につながるものとするものである。この考え方を本申請の *C. magnoliae* によるキシリトール生産に当てはめると、次ページの図において、従来はキシリトール生産を向上させるため酸素供給を制御し呼吸を抑制していたのに対し、FoF<sub>1</sub>-ATPアーゼ（複合体V）の変異導入によりATP合成活性を阻害することによりエネルギー合成系を抑制することに相当する。

### 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本申請ではキシリトール生産菌 *Candida magnoliae* のエネルギー代謝系を対象に、中枢代謝の活性化・制御によるキシリトール生産の効率化を目指す。すなわちキシリトール生産菌 *C. magnoliae* に、FoF<sub>1</sub>-ATPアーゼ変異を導入することによりエネルギー代謝を改変し、キシリトールからキシルロースへのフラックスを酸素供給に依存せずに削減することを目指す。その上で、中枢代謝を律速する酸素供給を代謝工学的手法に基づき中枢代謝を活性化し、キシロースのキシリトールへのフラックスの向上を実現する。これらの相乗的効果により、キシリトール生産性の大幅な向上を目指す。更にこれらのエネルギー代謝改変の影響をプロテオーム解析および代謝反応モデルにより評価する。これらのアプローチにより従来型化学プロセスに代替しうるキシリトール発酵プロセスの大幅な効率化を実現することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) キシリトール生産菌 *C. magnoliae* に、FoF<sub>1</sub>-ATPアーゼ変異を導入することによりエネルギー代謝を改変し、キシリトールからキシルロースへのフラックスを酸素供給に依存せずに削減することを試みた。

(2) 次に中枢代謝を律速する酸素供給速度を制御することによりキシリトール生産を向上させることを試みた。すなわち、キシリトール生合成系と解糖系、TCAサイクル、ペントース・リン酸系、呼吸鎖からなる代謝反応モデルを構築し、酸素供給速度を変化させることによりキシリトール収率がどのように変化するか検討した。

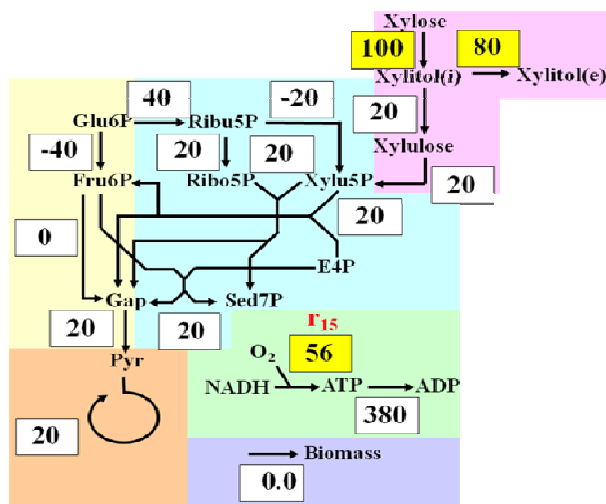
(3) さらに5Lジャーフェーマンターを用いて、酸素供給速度を変化させ、コーンコブ加水分解液を原料としたキシリトール発酵に及ぼす酸素供給速度の影響を実験的に検討した。

#### 4. 研究成果

(1) キシリトール生産菌 *C. magnoliae* に、FoF<sub>1</sub>-ATPアーゼ変異を導入することによりエネルギー代謝を改変し、キシリトールからキシロースへのフラックスを酸素供給に依存せずに削減することを試みたが、呼吸代謝系を阻害することにより、菌の生育が大きく阻害されることが明らかとなった。

(2) キシリトール生合成系と解糖系、TCAサイクル、ペントース・リン酸系、呼吸鎖からなる代謝反応モデルを構築し、酸素供給速度を変化させることによりキシリトール収率がどのように変化するか検討した結果、キシリトール収率は酸素供給速度の影響を大きく受け、酸素供給速度が過剰となると収率が大幅に低下することが明らかとなった。最適な酸素供給条件は、ペントース・リン酸系から生成するNADPHが全量、キシロースのキシリトールへの還元に用いられる条件であった。

(3) 5L ジャーフェーマンターを用いて、酸素供給速度を変化させ、コーンコブ加水分解液を原料としたキシリトール発酵に及ぼす酸素供給速度の影響を実験的に検討した。すなわち、菌体あたりの酸素供給速度を 0.5、0.7、0.8、1.0 (mmol-O<sub>2</sub>/g-cell·h) の条件となるように、菌体の増殖に対応して通気速度を変化させる回分培養を行った。その結果、菌体あたりの酸素供給条件が 0.7 (mmol-O<sub>2</sub>/g-cell·h) において、キシリトール収率 70%、生産性 1.7 (g-キシリトール/L·h) の最も良い結果が得られた。この結果は、従来の OTR 制御による培養に比べ、収率は若干減少するものの生産性は 1.7 倍に向上した。



**Optimal metabolic flux distribution for maximizing xylitol production**

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) J. Horiuchi, and K. Tada: Bioprocess Development for Microbial Xylitol Production from Agricultural Wastes, *J. Biotechnol.* 136, Supplement 1, 2008, Page S463,

(2) J. Horiuchi and K. Tada: Biorefinery for Effective Utilization of Agricultural Wastes, *J. Biosci. Bioeng.*, 108, Supplement 1, 2009, Pages S43-S44

(3) M. Miura, K. Yokono, H. Miyamoto, M. Aoyama, K. Tada, J. Horiuchi, Y. Kojima, C. Sakai, M. Nakahara: Prehydrolysis of xylan in culm of *Sasa kurilensis* with dilute sulfuric acid, *European Journal of Wood and Wood Products*, Published online; 17 December 2009 (2009)

(4) J. Horiuchi, K. Tada and T. Kanno ; Biorefinery for bioethanol, lactic acid, xylitol and astaxanthin production from corn cobs *J. Biotechnol.*, 150, Suppl. 1, 171 (2010)

(5) M. Miura, A. Shimahata, T. Nishikawa, M. Aoyama, K. Tada, J. Horiuchi, M. Nakahara, C. Sakai: Hydrolysis of *Sasa senanensis* culm with dilute sulfuric acid for production of a fermentable substrate. *J. Mater. Cycles Waste Manag.*, 13, 80-83 (2011)

[学会発表] (計 12 件)

(1) J. Horiuchi and K. Tada: Biorefinery Based on Cascade Utilization of Agricultural Wastes (Proc. of YABEC2009, 2009, Xiamen, China)

(2) J. Horiuchi and K. Tada : Application of metabolic flux analysis for optimization and control of microbial xylitol production from biomass, Proceeding of Metabolic Engineering Conference IIIV (Ceju, Korea 2010)

(3) 堀内淳一; バイオリファイナリー: 北海道産トウキビの芯からエタノール、乳酸、キシリトール、アスタキサンチンを作る, 平成 22 年度日本生物工学会シンポジウム 2010.7.23, 北見工業大学

(4) 多田清志, 高村裕哉, 水尻直樹, 菅野 亨, 堀内淳一, コーンコブを原料としたキシリトール発酵の酸素供給制御, 平成 22 年度日本生物工学会シンポジウム 2010.7.23, 北見工業大学

(5) 多田清志, 原田 陽, 鈴木由麻, 菅野 亨, 堀内淳一, エノキタケ廃培地を原料とした *Candida magnoliae* によるキシリトール生産, 化学工学会第 42 回秋季大会, 2010.9.7, 同志社大学

(6) 鈴木由麻, 多田清志, 山内 太, 菅野 亨, 堀内淳一, バイオマスを原料とした *Xanthophyllomyces dendrorhous* によるキシリトール・アスタキサンチンの同時発酵生産, 第 62 回日本生物工学会大会, 2010.10.29, 宮崎

(7) 堀内淳一, 多田清志他, 寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリー(第 2 報キシリトール生産), 化学工学会第 41 回秋季大会, 2009 年 9 月, 広島大学

(8) 堀内淳一, 多田清志他, 寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリーの構築, 日本生物工学会大会, 2009 年 9 月, 名古屋大学

(9) 堀内淳一, 多田清志他, コーンコブを原料したバイオリファイナリーの構築, 化学工学会年会, 2010 年 3 月, 鹿児島大学

(10) 堀内淳一, 寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリー, 北見市汚泥利用協議会, 2010 年 2 月, 北見市

(11) 堀内淳一, 寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリー, 東農大オホーツク実学センタ

ー公開シンポジウム, 2009 年 11 月, 東京農業大学

(12) 堀内淳一, 寒冷地バイオ資源を活用したバイオリファイナリー, CREST 公開シンポジウム, 2010 年 3 月, 北見工業大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀内 淳一 (HORIUCHI JUN-ICHI)  
研究者番号: 30301980

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

多田 清志 (TADA KIYOSHI)  
研究者番号: 90333666