

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580452

研究課題名(和文)非可食性バイオマス糖化物に適応するバイオプラスチック製造微生物工場の開発

研究課題名(英文)Development of microbial factory for bioplastic production adapting inedible biomass hydrolysates

研究代表者

大井 俊彦(Ooi, Toshihiko)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40223713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：セルロースの触媒加水分解では、糖の過分解で生じる5HMFが副生され宿主の生育を阻害することから、5HMF耐性を持った大腸菌を検索し、使用する糖濃度の範囲でポリマー生産性に障害とならない宿主大腸菌LS5218株を選抜した。また、改良した微生物工場がキシロースとグルコースの単独使用だけでなく、混合糖液においてもポリマー生産に十分適応可能であることを示した。実際に非可食バイオマスから調製した各種不純物を含む混合糖液においても十分なポリマー生産能力を示した。

以上の研究結果から、本研究目的である非可食バイオマス糖化物を炭素源としたバイオポリエステルを生産するまでの一貫プロセスの開発することができた

研究成果の概要(英文)：Lignocellulosic biomass is mainly composed of glucose and xylose as the major sugars. The use of glucose for the biopolymer production has been demonstrated to be efficient whereas, the use of xylose is inefficient. However efficient utilization of both sugars is essential. In this study, methods for the efficient utilization of xylose were developed and enhanced to obtain high productivities of biopolymers. For P(LA-co-3HB) production lactic acid supplementation into the cell contributed to the improvement of polymer yield from xylose. In addition xylose was found to be superior to glucose in giving higher LA fraction in the copolymer. The uptake of xylose by GatC which is galactitol transporter also effective to produce the copolymer. The approach for high yield production of biopolymers in combination with the lignocellulosic-derived mix sugars have a potential for the establishment of biorifinary for the production of variety of biopolymers.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：環境農学

キーワード：バイオプラスチック バイオポリエステル 非可食バイオマス 微生物工場 糖化 乳酸ポリマー

1. 研究開始当初の背景

(1) バイオマスのリファイナリー技術の確立には、バイオマスの主成分であるセルロースやヘミセルロースの糖化プロセスと、生じた糖化液からのバイオプロセスから構成されるが、これら両コア技術が有機的に連動することで初めて達成できる複合技術である。糖化プロセスで副生される阻害物質や未利用糖質が、続くバイオプロセスでの生産性に大きく左右することから、両コア技術を融合するための「インターフェース」に存在する問題点の解決が重要な課題となる。特に非可食バイオマスである草本系植物から得られる単糖はグルコースとキシロースを主成分とするために、両単糖を効率よく資化してポリマーを生産するためのバイオプロセスの開発が必要である。

(2) セルロースなどの糖化プロセスには化学的、物理的、生物学的方法など多くの方法があるが、ルテニウム担持触媒によるセルロースの効率的糖化法が研究協力者らにより開発され、新たな糖化技術として注目されている。

(3) 我々の研究グループでは、大腸菌をプラットフォームとして、バイオポリエステルの集約型製造プロセスに適応した「微生物工場」を新規に創製した。この微生物工場は使用宿主、代謝経路、関連酵素、培養条件等を人為的に改変・育種・制御することで、多様なモノマー組成によって発現する硬軟多様な優れた物性を示すバイオポリエステル (PHB, PHA, 乳酸ポリマー等) を生産することが可能である。

2. 研究の目的

(1) 糖化プロセスにより生成する生育阻害物質への影響を回避あるいは抑制するため、阻害物質に対する耐性の付与、あるいは毒性回避策について検討し、有効糖濃度が高い糖化液でも生育阻害を受けない微生物宿主を選択する。

(2) バイオマスに含まれるヘミセルロース由来のキシロース資化能を付与した微生物工場を開発する。そのためにキシロースの菌体内への取込み系を強化し、糖化物からのバイオプラスチック生産性の向上を目指す。

(3) 植物バイオマスから得られるグルコースとキシロースを主成分とする混合糖質を炭素源として、効率よく各種バイオポリマーを生産可能な大腸菌を宿主としたプラットフォームを開発する。

3. 研究の方法

(1) ルテニウム担持触媒によりセルロースを加水分解することで得られる加水分解物の組成を検討したところ、グルコースを主成分とする糖質以外に、等の過分解に由来するフルフラール化合物を検出した。その化合物は5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-HMF) とフルフラールであり、濃度は 1.6% 程度であった。この糖化液を炭素源として、グルコース濃度が最適となるように LB 培地に添加して培養をすると、従来からポリマー生産に

使用してきた *Escherichia coli* JM109 株では生育できないことが判明した。そのため高濃度の 5-HMF でも生育が可能な各種大腸菌株を検討するとともに、ポリマー生産性を検討した。

(2) 非可食バイオマスに含まれるセルロース及びヘミセルロースから得られる混合単糖は、グルコースと比較してキシロース資化の効率が悪いことが予想されたため、各種代謝遮断株およびキシロースの資化能を強化するために、キシローストランスポーター高発現株を利用することで、キシロースを効率よく代謝してポリマーに変換できる大腸菌宿主について検討することに加え、両単糖の混合物からのポリマー生産が適応可能かどうか検討した。

(3) 実際に草本系植物バイオマスであるスキおよび稲ワラから調製した単糖混合物を炭素源として、開発した微生物工場が期待通りに駆動するかどうか検証した。

4. 研究成果

(1) セルロースをルテニウム担持触媒により加水分解した糖化液にはグルコース、オリゴ糖以外にフルフラール化合物 (5-HMF およびフルフラール) が副生されており、この化合物が大腸菌 JM109 株の生育を阻害することが分かった。そこで遺伝子操作実験に使われる B 株由来および K 株由来以外に、脂肪酸を炭素源とした場合のポリマー生産に良く使用される LS5218 株、5-HMF 耐性があると報告されている NADPH-dependent aldehyde reductase 欠損株の 5 種類を選択し、それらを宿主として、5-HMF を様々な濃度で添加した培地での生育を検討したところ、5-HMF 濃度が 3g/L では DH5 株、JM109 株、BL21 株の 3 菌株がほとんど生育できなかったが、LS5218 株および JW2978 株はわずかに生育が阻害されただけで、十分ポリマー生産に使用可能であると判断された。

これらの中から LS5218 株を用いて、P(3HB-co-3HV) の生産を検討した。培養にはセルロース加水分解物をグルコース換算で 10g/L、各種濃度のプロピオン酸を添加して 37 で組換え大腸菌を培養した。その結果、生産されたコポリマーは、添加したプロピオン酸濃度に応じた 3HV 分率 (7-42%) を持つコポリマーが生産された。加えて菌体内のポリマー含量はプロピオン酸濃度が高くなるに従って減少する傾向であった。

以上の結果から、セルロース加水分解物中に含まれる 5-HMF は大腸菌の生育を阻害するがポリマー生産には大きく影響しないことが分かった。

(2) 菌体内に取り込まれた キシロースは、ペントースリン酸経路により代謝され、基幹経路である解糖系に合流する。キシロースを炭

素源としてポリマーを生産させた場合、P(3HB)の場合はグルコースを炭素源とした場合と比較して同様または若干低いポリマー蓄積率を示した。一方、P(LA-co-3HB)を生産した場合でも、グルコースを炭素源とした場合と比較して同様のポリマー蓄積率を示すが、キシロースを炭素源とした場合には生産されたポリマー中の LA 分率が上昇した。これらの事実から考察すると、グルコースを炭素源とした場合では、代謝過程で生じつ補酵素である NADPH の供給量が、キシロースを炭素源とした場合より多くなるために、大腸菌宿主に導入した P(3HB)合成酵素遺伝子群の中でアセトアセチル-CoA の水和反応を触媒する PhaB の補酵素として NADPH がグルコースの方が多く供給されるために P(3HB)の生産性が高くなると考えられた。

P(LA-co-3HB)を生産した場合には両モノマー成分は解答系のピルビン酸から分岐して供給されるが、キシロースの場合では NADPH の供給量が制限されるために、3HB モノマーへの流れが少なくなり、代わりに乳酸への代謝系に傾くことで乳酸モノマーが相対的に多くなったため乳酸重合酵素の両基質の存在量の違いによってコポリマー中の乳酸分率が高くなると考えられた。

さらに高乳酸分率のコポリマーを生産させるためにピルビン酸から乳酸以外の代謝経路に流れると考えられる酵素遺伝子のノックアウト株を用いてコポリマー中の乳酸分率への影響を調べたところ、アセチル-CoA から酢酸への代謝経路 ある PTA および ACK のノックアウト株ではコポリマー生産性が約 17% 向上した。またピルビン酸から Acetyl-CoA を生じる酵素 PFL を欠損した株でも同様にコポリマーの生産性は向上した。以上のことから、糖の代謝経路を乳酸の生成に傾けることで細胞内の乳酸濃度が上昇することでコポリマー中の乳酸分率を上昇させることが可能であることが分かった。

次に、培地中のキシロース添加濃度を通常の 2%以上に増加させることでもコポリマーの生産性が向上した。4%とした場合に最大となり、生産性は約 2 倍に増加した。

さらにキシロースを細胞内に取込むためのトランスポーターは 2 種類が知られている。XylFGH は取込みの駆動力として ATP を消費するが、GatC は駆動力として ATP を消費しないことが知られていることから、これに注目し GatC 高発現株を宿主としてコポリマーの生産性を検討した結果、さらに 15% の生産性が向上できた。

これまでの実験で得られたポリマーの分子量を分析したところ、コントロールであるグルコースや親株と比較しても同程度であった。

以上の結果から、キシロースの取り込みを強化し、代謝経路を最適化して乳酸生成に傾けることで高乳酸分率の P(LA-co-3HB)を生産できることが示された。

(3) 非可食の植物バイオマスから得られるバイオポリマーの生産に利用可能な単糖はセルロースからグルコース、ヘミセルロースからはキシロースを主成分として得ることができる。しかし実際に植物バイオマスから脱リグニンして得られる多糖はセルロースとヘミセルロースであるホロセルロースであり、これを糖化した場合主成分の単糖はグルコースが 70%、キシロースが 25%程度含む単糖の混合物として得ることになる。そこで、非可食植物バイオマスとして草本系植物であるススキと稲ワラを選択し、脱リグニン処理の後に市販セルラーゼ剤で酵素糖化して得られた単糖混合物を炭素源としてポリマー生産性を検討した。はじめに乾燥させて微粉碎した両バイオマスと垂塩素酸処理および NaOH 処理によって脱リグニンしてホロセルロースを調製した。ホロセルロースの収率は稲ワラでは 58%、ススキからは 67%であった。得られたホロセルロースを乾燥重量として 10%とし、50 で 4 日間酵素糖化した。酵素濃度をタンパク質として 1%とした場合、ホロセルロース中の多糖は定量的に単糖へと加水分解できた。

糖組成を分析したところ、両バイオマス由来の糖化物には単糖としてグルコースが 70%、キシロースが 20%程度含むことが分かった。この単糖混合物を炭素源として P(3HB)を生産した場合、純粋なグルコースとキシロースを道組成で混合させたコントロールと比べてほぼ同様のポリマー生産性を示した。

これら糖化物にプロピオン酸を同時に添加して P(3HB-co-3HV)を生産させた場合でも同様に純粋糖混合液と遜色のない生産性を示した。

同様に P(LA-co-3HB)を生産させた結果、稲ワラ由来の単糖混合物では純粋糖混合物と同程度の生産性であったが、ススキ由来の単糖混合物ではわずかに生産性が低下した。

以上の全ての結果をまとめると以下のようになる。非可食バイオマスから調製される糖化物中の生育阻害物質など問題点を明らかにし解決することができた。さらにグルコースに比べると資化がし難いキシロースを効率よく資化可能な微生物工場を開発することができた。最後にバイオマス由来の単糖混合物からでも効率よく各種バイオポリマーを生産する微生物工場を開発することができた。

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 3 件)

JM. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi, Enhanced production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) from xylose in engineered

Escherichia coli overexpressing a galactitol transporter., Appl. Microbiol. Biotechnol., 査読有, Vol. 98, No. 6, 2014, pp. 2453-2460.
DOI: 10.1007/s00253-013-5401-0

JM. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi, Effectiveness of xylose utilization for high yield production of lactate-enriched P(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using a lactate-overproducing strain of *Escherichia coli* and an evolved lactate-polymerizing enzyme., Metab. Eng., 査読有, Vol. 15, 2013, pp. 159-166.
DOI: 10.1016/j.ymben.2012.11.007

JM. Nduko, W. Suzuki, K. Matsumoto, H. Kobayashi, T. Ooi, A. Fukuoka, S. Taguchi, Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance against 5-hydroxymethylfulfural, J. Biosci. Bioeng., 査読有, Vol. 113, No. 1, 2012, pp. 70-72.
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.08.021

〔学会発表〕(計 7件)

大井俊彦、佐々木勝平、松本謙一郎、田口精一、植物バイオマス由来の酵素糖化物を炭素源としたバイオポリエステル生産、日本農芸化学会大会 2014.03.27-30, 明治大学(川崎)

JM. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi, Efficient production of poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) using hemicellulose-derived sugar, xylose, in engineered *Escherichia coli* overexpressing a galactitol transporter., Frontier Chemistry Center International Symposium 2013, 2013.12.09-10, Hokkaido University (Sapporo).

佐々木勝平、大井俊彦、ンドウコジョン、松本謙一郎、田口精一、植物バイオマスを用いた共重合ポリエステル生産、日本生物工学会大会、2013.09.18-20、広島国際会議場(広島)。

大井俊彦、佐々木勝平、ンドウコジョン、松本謙一郎、田口精一：非可食性植物バイオマスからのP(3HB)の微生物生産、日本生物工学会大会、2013.09.18-20、広島国際会議場(広島)。

JM. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi, Efficient bioconversion of lignocellulosic biomass-derived sugars into poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate) by metabolically engineered *Escherichia coli*., 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2102.09.16-21, EXICO, Daegu (Korea).

JM. Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi, Lactate-based polyester production by recombinant bacteria using lignocellulosic biomass sugars as carbon sources., Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012.5.28-31, Kanazawa Excel Hotel (Kanazawa).

JM Nduko, K. Matsumoto, H. Kobayashi, T.

Ooi, A. Fukuoka, S. Taguchi, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* strain with superior tolerance to 5-hydroxymethylfurfural, The 5th GCOE International Symposium, 2012.02.22, Hokkaido University (Sapporo).

JM Nduko, K. Matsumoto, T. Ooi, S. Taguchi, Production of lactate-based polyesters from xylose in *Escherichia coli*., 日本生物工学会大会, 2011.9.26-28, 東京農工大学(東京)。

JM Nduko, W. Suzuki, K. Matsumoto, H. Kobayashi, T. Ooi, A. Fukuoka, S. Taguchi, Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance against 5-hydroxymethylfulfural, 2011 Taiwan-Japan Bilateral Polymer Symposium, 2011.09.15, National China University (Taiwan).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
[http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/](http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/seika/TOP.html)
TOP.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大井 俊彦 (001, Toshihiko)
北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：4 0 2 2 3 7 1 3

(2) 研究分担者

田口精一 (TAGUCHI, Seiichi)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：7 0 2 1 6 8 2 8

松本 謙一郎 (KEN' ICHRO, Matsumoto)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80360642

(3)連携研究者

()

研究者番号：