

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780299

研究課題名（和文） セルロースを基質とした選択的アセトン・ブタノール生産システムの構築

研究課題名（英文） The development of selective butanol and/or acetone production system from cellulose

研究代表者

中山 俊一（NAKAYAMA SHUNICHI）

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：90508243

研究成果の概要（和文）：

高温性セルロース分解菌 *Clostridium thermocellum* と中温性ブタノール生産菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* を混合培養することで、非食料資源であるセルロースを基質としてブタノール生産可能であることを見出した。本培養系では副産物であるアセトン生産が低減し、選択的なブタノール生産も達成した。

研究成果の概要（英文）：

The butanol production system from cellulose by the co-culture of cellulose degrading *Clostridium thermocellum* and butanol producing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* was developed. This co-culture system selectively produced butanol and the acetone as a by-product were extremely decreased.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：バイオマス・セルロース・セルロース分解菌・バイオブタノール・*Clostridium* 属細菌・発酵

1. 研究開始当初の背景

循環型社会の形成や CO₂ 排出削減の観点から、非食料資源からの有用物質生産システムの開発が求められている。*Clostridium* 属細菌によって生産されるバイオブタノールは、石油代替燃料や化学原料として注目されており、循環型社会の形成に貢献することが期待される。一方、ブタノール生産性 *Clostridium* 属細菌は非食料資源であるセルロース系基質から直接ブタノールを生産することができない。また、ブタノール生産とともにアセトンを同時に副産物として生産する。以上のことからセルロースを基質とし

た選択的なブタノール生産系の構築が求められる。

2. 研究の目的

バイオブタノールを生産する *Clostridium* 属細菌は、非食料資源であるセルロースを基質として利用することができない。また、副産物としてブタノールと化学的性質が類似したアセトンを生成することから、分離コストがかかるためアセトン生成を低減する必要がある。本研究では、ブタノール生産菌へのセルロース分解能の付与、セルロース分解性 *Clostridium* 属細菌とブタノール生産性

Clostridium 属細菌の混合培養、セルロース分解性 *Clostridium* 属細菌へのブタノール合成遺伝子の導入により、セルロースを基質とした選択的ブタノール生産システムの構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではセルロース分解菌として *Clostridium thermocellum*、*Clostridium cellulovorans* を、ブタノール生産菌として *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* を使用した。それぞれの菌株は推奨される培地・温度にて培養した。

発酵産物は Aminex HPX-87H カラムを用い液体クロマトグラフィーにて、水素生成量は培養液から生成されるガスをガスバックに回収し Molecular Sieve 13 カラム、TCD 検出器を用いガスクロマトグラフィーにて定量した。

4. 研究成果

(1) セルラーゼ添加によるブタノール生産菌の単独でのセルロースからのブタノール生産

ブタノール生産菌は高分子であるセルロースの分解能を有さない。そのため、セルロース系基質からのブタノール生産にはセルラーゼによるセルロースの糖化工程を必要とする。まず初めにセルロース系基質からのブタノール生産において、セルラーゼの添加によりブタノール生産が可能であるかどうかを確かめた(図1)。基質として結晶性セルロースである Avicel セルロース、ろ紙を用いた。Avicel セルロースとろ紙を用いた場合でも *Aspergillus* 由来、*Trichoderma* 由来のセルラーゼを添加した場合、ブタノール生産が可能であることが明らかになった。これらのことから、ブタノール生産菌でのセルラーゼ発現によってブタノール生産菌単独でもセルロースからの生産が可能であることが示唆された。また、ブタノール生産菌でのセルラーゼ発現を試みたものの、活性を有する形質転換体の取得には至らなかった。

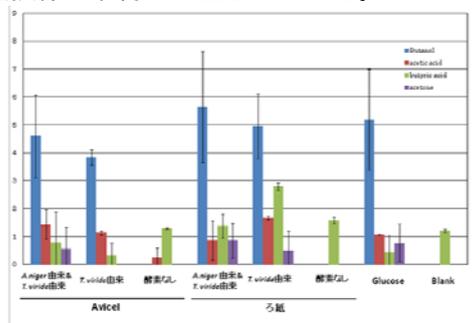


図1 セルラーゼ添加によるブタノール生産菌単独培養でのブタノール生産

(2) 高温性セルロース分解菌 *Clostridium*

thermocellum NBRC103400 とブタノール生産菌の混合培養によるセルロースからのブタノール生産

セルラーゼを培養液中に添加することで、セルロースを基質としたブタノール生産が可能であることを見出した。しかしながら、酵素剤を添加する方法は低コストでの生産には適さない。一方、*Clostridium* 属細菌の中にはセルロースを高効率に分解する高温性 *C. thermocellum* が知られている。酵素剤に依存しないブタノール生産系を確立するために、*C. thermocellum* とブタノール生産菌の混合培養によるセルロースからのブタノール生産系の構築を試みた。

セルロースからのブタノール生産には糖化工程を必要とする。そこで、本培養系ではセルロース分解菌を 60°C で培養しセルラーゼを発現した後、ブタノール生産菌の至適生育温度である 30 °C でブタノール生産を行った。まず、*C. thermocellum* の 60 °C 培養時間について検討した(図2)。60 °C での培養を行わず *C. thermocellum* とブタノール生産菌を同時に植菌し 30 °C で培養したところ、ブタノールはほとんど生産されなかった。一方、60 °C で *C. thermocellum* を 24 時間以上培養した後、ブタノール生産菌を植菌した場合、いずれも 20 g/L の Avicel セルロースから 4.0 g/L 以上のブタノールを生産した。このことから、セルロース分解菌 *C. thermocellum* を少なくとも 24 時間培養しセルラーゼを十分に培養液中で発現させることが、本混合培養系において重要であることが明らかとなった。

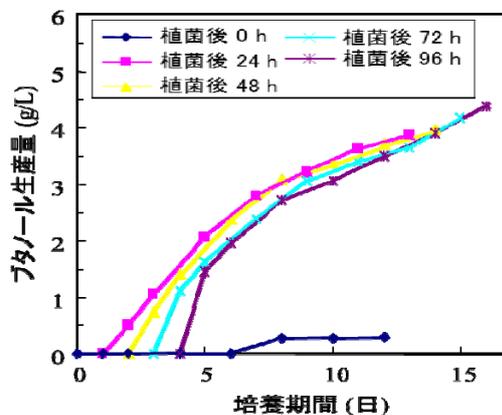


図2 混合培養における *C. thermocellum* 培養時間の効果

高温性の *C. thermocellum* 由来のセルラーゼの至適温度は 60 °C 以上である。このことから、セルラーゼ活性を増強しより高効率にブタノール生産を行うには、ブタノール生産時の培養温度も増加させることが望ましい。そこで、ブタノール生産菌添加後の培養温度を 42°C まで段階的に増加させ、ブタノール生産量を比較した(図3)。その結果、ブタ

ノール生産量は 30 °C で培養した場合が最も高く、培養温度の増加に伴いブタノール生産量は減少し、酪酸生成量が増加した。グルコースを炭素源としブタノール生産菌を 42 °C で培養した場合でもブタノール生産量は低いことから、高温での培養によりブタノール生産菌の生育が阻害され、その結果ブタノール生産量が減少すると考えられた。

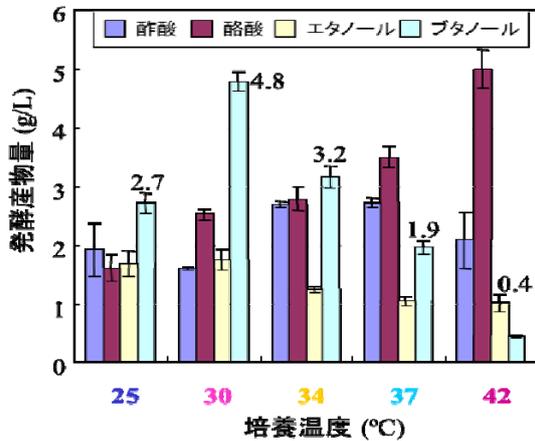


図3 ブタノール生産菌添加後の培養温度がブタノール生産に及ぼす影響

さらに、本混合培養系の他の実用セルロース基質への有効性を確かめるため、様々なセルロース基質を用いてブタノール生産を試みた(図4)。その結果、ろ紙、新聞紙、生産量は低いものの稲わらからもブタノール生産が可能であることが明らかになった。以上の様に、セルロース分解菌 *C. thermocellum* とブタノール生産菌の混合培養により、セルロースからのブタノール生産が可能であることが示された。

通常、ブタノール生産菌はブタノール以外にアセトンを生産する。興味深いことに、上記混合培養系ではアセトン生産量が低く抑えられ選択的にブタノールのみが生産された(図2~4)。

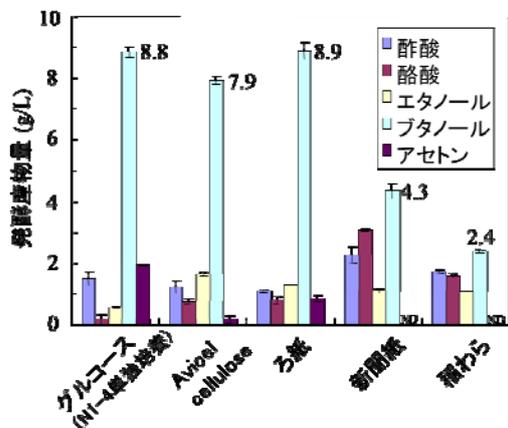


図4 混合培養による実用セルロース系基質からのブタノール生産

(3) 選択的ブタノール生産機構の解明

ブタノール生産には還元力として NADH を必要とするが、アセトン生成には必要としない。アセトンが副産物として生成される原因としてこの還元力である NADH が不足していることが考えられている。このように細胞の還元状態は高ブタノール生産のための一つの因子である。

本混合培養系においては、セルロース分解菌の生産する水素によって培養系がより還元状態になるために、還元力を利用しないアセトン生成が減少し、還元力を利用するブタノール生産系が増強されるためであると推測した。これと一致するように、混合培養系では単独培養より酸化還元電位がより-30mV程度低下していた。また混合培養系では単独培養系に比べて水素生成量は 28.5%まで低下した(図5)。

以上のことより、エレクトロンフローが水素生成ではなく還元力生成へと向かうため選択的にブタノールが生産されることを明らかにした。

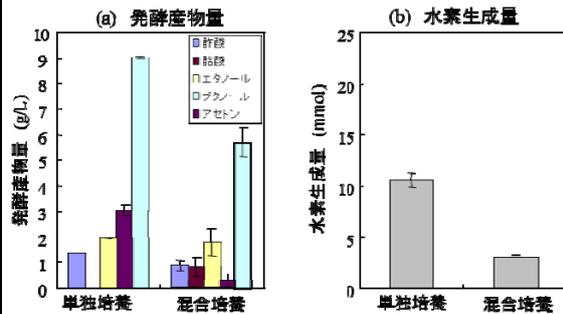


図5 単独培養と混合培養における発酵産物および水素生成量の比較

(4) 中温性セルラーゼ分解菌のスクリーニング

これまでに、高温性セルロース分解菌 *C. thermocellum* によるセルロース基質からの選択的ブタノール生産系を構築した。高温性セルロース分解菌は 60 °C で培養することが望ましいため、熱量をかけない低コストでのブタノール生産には中温性のセルロース分解菌を用いることが期待される。既知の中温性セルロース分解性 *Clostridium* 属細菌とブタノール生産菌を混合培養したが、*C. thermocellum* の場合と同等のブタノール生産には及ばなかった。そこで、各種土壌サンプルを、単一炭素源として 10 g/L セルロースを用いた液体培地に植菌し、中温域で高いセルロース分解能を有する嫌気性 *Clostridium* 属細菌のスクリーニングを試みた。その結果、セルロースを分解し酢酸や酪酸を主発酵産物として生成する細菌群を取得した(図6)。

今後、セルロース分解に関与する嫌気性 *Clostridium* 属細菌を単離・同定が求められる。

中温域でも高いセルロース分解能を有する菌を取得し、ブタノール生産菌と混合培養することで中温域での安価なセルロースからのブタノール生産系の開発が期待できる。

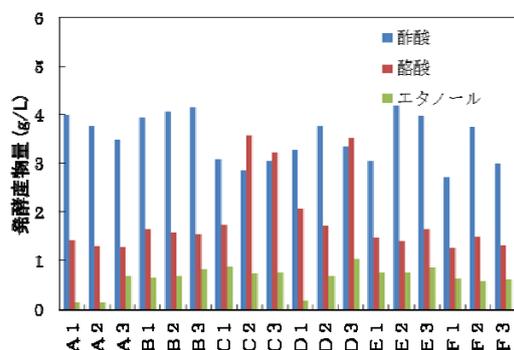


図6 各種土壌サンプルのセルロースを炭素源とした場合の発酵産物量比較

(5) セルロース分解性酪酸菌 *C. cellulovorans* におけるブタノール生合成遺伝子発現。

中温域においてセルロースからブタノールを生産するもう一つの方法は、セルロース資化性酪酸菌においてブタノール生合成遺伝子を発現させることである。酪酸生成経路の中間代謝物であるブチリル-CoA から2つの脱水素酵素によってブタノール生産可能である。現在までに、*C. cellulovorans* がセルロースから酪酸生成が可能であることが報告されている。そこで、ATCC (American type culture collection) より *C. cellulovorans* ATCC35296 を購入したが、酪酸生成を示さなかった。そのため、ATCC 由来の *C. cellulovorans* は遺伝子改変の宿主として不適切であることが示唆された。

スクリーニングによりセルロースから酪酸を生成する細菌群を取得していることから、新規に単離したセルロース分解性酪酸菌の改変により、中温域でのセルロースからのブタノール生産が期待される。

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1件)

Nakayama S., Kiyoshi K., Kadokura T., Nakazato A. I. Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. Appl Environ Microbiol. 査読あり. Vol:77 p:6470-6475 (2011). DOI: 10.1128/AEM.00706-11

[学会発表](計3件)

依田杏子, 中山俊一, 吉野貞蔵, 古川謙介,

門倉利守, 中里厚実 非ブタノール生産性退化株における *spo0A* 遺伝子の解析 第63回日本生物工学会大会 2011年9月26日 東京農工大

清啓自, 横原武, 中山俊一, 門倉利守, 中里厚実 *Clostridium* 属細菌の混合培養による稲わらからのブタノール生産 第62回日本生物工学会大会 2010年10月28日 宮崎シーガイア

中山俊一, 清啓自, 依田杏子, 門倉利守, 中里厚実 *Clostridium* 属細菌の混合培養によるセルロースを基質としたブタノール生産 日本農芸化学会 2010年度大会 2010年3月28日 東京大学

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: クロストリジウム属細菌を用いた水素およびブタノールの生産方法

発明者: 中山俊一

権利者: 東京農業大学

種類: 特許権

番号: 特願 2011-246971

出願年月日: 2011年11月10日

国内外の別: 国内

名称: クロストリジウム属細菌を用いたブタノールの生産方法

発明者: 中山俊一

権利者: 東京農業大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-113603

出願年月日: 2010年5月17日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 俊一 (NAKAYAMA SHUNICHI)

東京農業大学・応用生物学部・助教

研究者番号: 90508243

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: