

平成21年 5月21日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19380052
 研究課題名（和文） システム発酵学的手法に基づくアセトン・ブタノール発酵の高速高効率化と最適制御化
 研究課題名（英文） Kinetic study and optimization of acetone-butanol-ethanol fermentation by systematic fermentomics
 研究代表者
 園元 謙二（SONOMOTO KENJI）
 九州大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：10154717

研究成果の概要：アセトン・ブタノール（ABE）発酵について、システム発酵学的アプローチを行った。すなわち、(1) 非増殖系菌体を用いた酪酸からの Whole cell catalyst プロセスによるブタノール生産システムを開発し、高速高効率ブタノール生産システムの構築を行った。(2) 構築した動的モデルによる様々な代謝解析を行い、ブタノール高生産に関与する代謝経路を特定し、最適な培養システムの構築を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

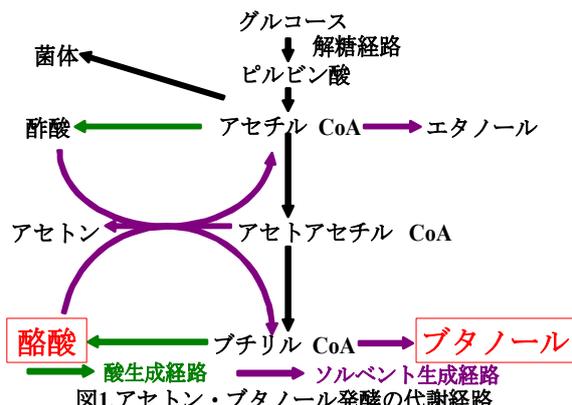
科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：アセトン・ブタノール発酵、*Clostridium*、Whole Cell Catalyst、ブタノール生産、高密度静止菌体、酪酸添加、pH-stat 流加培養、人工電子供与体

1. 研究開始当初の背景

嫌気発酵の理論的な構築は好気発酵と比較して非常に遅れている一方で、プロセスのCO₂発生量が低い、菌体あたりの物質転換率が高いなど、環境調和型のプロセスとしての特徴を備えている。アセトン・ブタノール（ABE）発酵は、未利用バイオマスを原料とした化学物質の供給方法や燃料の製造方法として注目されている。しかし、ABE発酵も他の嫌気発酵と同様に幾つかの問題点を有している。

- ・強い**ブタノール生産物阻害**によりブタノール生産量が低い(10 g/l程度)。
- ・ヘテロ発酵であり、エタノールなどの副産物の生産により**ブタノールの収率が低い**(0.30以下)。
- ・菌体濃度が低く**生産性が低い**(0.5 g/l/h以下)。
- ・酸生成期からソルベント生成期へとシフトする代謝転換が起こり**発酵の制御が難しい**(図1)。



これらの問題点を解決するために様々な研究が行われている。実際に、遺伝子改変によるブタノール耐性菌の育種 (Appl. Env. Microbiol., **69**, 4951-4965, 2004) や代謝酵素遺伝子の破壊によるアセトン・ブタノール生産のホモ発酵化 (J. Bacteriol., **185**, 3644-3653, 2003) が試みられたが未だ成果は得られていない。また、高密度菌体を用いた連続発酵が行われたが、時間の経過とともにブタノール生産が停止する退化が問題となっている (Bioprocess Eng., **4**, 27-34, 1989)。一方、代謝のモデル化では経時的情報を与えない静的モデルが構築されているが (Biotechnol. Bioeng., **67**, 813-826, 2000)、動的モデル化は行われておらず、発酵を最適制御したという報告はない。そのため、ABE発酵の高速高効率ブタノール生産システムは未だ開発されず、実用化に至っていない。そこで申請者は問題点を克服するべく従来の発酵生産/培養工学や近年進歩の著しいシステム情報工学に基づいて研究を行ってきた。

2. 研究の目的

以上のように、申請者らは高効率ブタノール生産システムおよび高速ブタノール生産システムの二つの独立したシステムを構築した。しかし、それらの両方の長を併せもつ高速高効率ブタノール生産システムの構築例はない。申請者らが構築した動的モデルを用いて、最適な培養条件の検討および様々な代謝解析を行うことにより、ABE発酵への応用が期待される。そこで、以下の研究目標を提案した。

(1) 非増殖系菌体を用いた酪酸からの Whole cell catalyst プロセスによるブタノール生産システムを開発し、高速高効率ブタノール生産システムの構築を行う。

(2) 構築した動的モデルによる様々な代謝解析を行い、ブタノール高生産に関与する代謝経路を特定し、最適な培養システムの構築を行う。

3. 研究の方法

ABE発酵生産菌として、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) を用いた。ここでは Whole Cell Catalyst を「目的物質すなわちブタノールを効率よく作り出す複合共役型の代謝触媒」と定義し、これは以下のように発酵プロセスと異なる特徴を有している。

発酵プロセス

- 増殖のため収率が低い。
- 増殖にスペースが必要である。

Whole Cell Catalyst システム

- 増殖と連動せず収率が高い。
- スペースを縮小できる。
- 生産物阻害を解除できる。
- 雑菌汚染の危険性が小さい。

Whole Cell Catalyst は、ソルベント生成期に入った培養した N1-4 菌体を窒素源の無添加のリン酸培地で懸濁して調製した (静止菌体)。

代謝制御経路の解析用シミュレータは、関口・岡本が開発した WinBEST-KIT を用いた (Sekiguchi and M. Okamoto: *J. Bioinfo. Comput. Biol.*, **4**, 621, 2006)。

その他についての詳細な研究方法は該当する研究成果の項で述べる。

4. 研究成果

(1) Whole Cell Catalyst システムによるブタノール生産システムの開発

① Whole Cell Catalyst システムにおける諸特性の解明、ブタノール生産

ABE発酵における中間代謝物である酪酸を基質とした場合、推定される2つの経路 (図2) のいずれも炭素原子のロスがなく酪酸はブタノールへ変換される (Shinto *et al.*: *J. Biotechnol.*, **131**, 45, 2007)。また、ABE発酵プロセス (増殖菌体) では、定常期にブタノールが増殖非連動的に生産されることから、静止菌体による生産転換プロセスが考えられる。静止菌体のメリットとして、菌体を再利用できる、操作安定性のすぐれた生産システムが構築できる、菌体増殖に伴う副産物の生産量が小さいなどが挙げられる。すでに、著者らは増殖菌体による酪酸を基質とした pH-stat 流加培養によるブタノール生産システムの構築に成功しているが (Tashiro *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 263, 2004)、静止菌体を用いた酪酸からのブタノール生産に関する報告はない。そこで、N1-4 株の静止菌体 (Whole Cell Catalyst) によるブタノール生産の高効率化を検討した。

N1-4 株の静止菌体を用いて増殖非連動的な酪酸からのブタノール生産を検討した。酪酸のみからブタノールは生産されなかったが、酪酸にグルコースを添加したリン酸培地を用いた結果、酪酸消費濃度が増加し、ブタノール生産濃度が増大した。よって、グルコースは還元力 NADH などの補酵素の再生系に利用されることが示唆された (図 2)。pH を 5.5 に制御し、非解離型酪酸濃度を上げた結果、酪酸消費濃度、グルコース消費濃度が増加し、ブタノール生産濃度が増大した。また、増殖菌体と比較して、副産物 (アセトン、エタノール) の生成が抑制された。よって、酪酸消費とグルコース代謝による還元力の再生のバランスによりブタノール生産が効率的に行われることが示唆された。また、酪酸からのブタノール生産に関与する酵素活性が増大した結果、ブタノール生産速度が大きくなった。グルコース代謝阻害剤 (フッ化ナトリウム、ヨード酢酸) を用いて、ブタノール対酪酸収率を検討した。その結果、ブタノール対酪酸収率はほぼ 1 mol/mol で、酪酸からブタノールに変換されることが明らかとなった。さらに、粗酵素液を用いた *in vitro* での酪酸からのブタノール変換を可能であったことから、N1-4 株の酪酸消費は CoAT 経路および酪酸生成の逆経路を介して行われることが示唆された。さらに、4 種類の電子供与体の選択および濃度の最適化を行ったところ、0.1 mM メチルピオローゲンの添加により、最大理論ブタノール対炭素源収率 (0.667 mol/mol) を超える 0.671 mol/mol を世界で初めて達成した (Tashiro *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 238, 2007)。

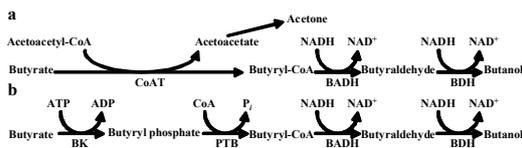


図 2. 酪酸からブタノール変換への経路 (Shinto *et al.*: *J. Biotechnol.*, **131**, 45, 2007) CoAT 経路 (a) および酪酸生成逆経路 (b); CoAT, CoA transferase; BADH, butyraldehyde dehydrogenase; BDH, butanol dehydrogenase; BK, butyrate kinase; PTB, phosphotransbutyrylase

② Whole Cell Catalyst システムによるブタノールの連続生産

ABE 発酵の効率化を目指し、ABE 生産菌の高密度静止菌体を用いた酪酸からのブタノール生産を検討した。TYA 培地において本培養 15 時間後、中空糸膜により培養液を 10 倍に濃縮し高密度菌体を得た。濃縮後、菌の増殖を抑えるため TYA 培地から窒素源を除去し、

酪酸を 10 g/l となるように添加した TYA-N 溶液を用いて、希釈率 0.85 h⁻¹ で連続ブタノール生産を行った。コントロールとして、高密度増殖菌体による連続ブタノール生産を行った。その結果、消費基質 (グルコースと酪酸) に対するブタノール収率および ABE 収率は、増殖菌体でそれぞれ 0.334 mol/mol、0.488 mol/mol であったが、静止菌体ではそれぞれ 0.530 mol/mol、0.676 mol/mol と大きく増加した。また ABE に対するブタノールの比率は、増殖菌体では 0.681 であったが、静止菌体では 0.828 と高くなった。これらの結果から、酪酸を基質に静止菌体を用いることでブタノール生産が促進されることが示唆された。

次に、人工電子供与体としてのメチルピオローゲンの影響を検討した。ABE 発酵では、ブタノール生産に還元力 (NADH) が必須である。この還元力を外部から人工的に補うことでさらに効率的なブタノール生産システムの構築を目指した。実験条件は上記と同様で、メチルピオローゲンを終濃度 0、0.01 および 0.1 mM となるように TYA-N 溶液に添加し、希釈率 0.85 h⁻¹ で連続ブタノール生産を行った。その結果、ブタノール生産濃度、生産性および収率は、0.01 mM メチルピオローゲン添加により無添加と比較していずれも増大した (10.1→11.5 g/l、8.61→9.78 g/l/h、0.530→0.584 mol/mol)。一方、ブタノール生産性とその最大生産性の半分となる半減期は約 20 h となり、操作安定性の低さが問題となった。

そこで、連続ブタノール生産の途中で TYA 培地を添加する活性再生システムを考案した。すなわち、TYA-N 溶液 (4 時間) と TYA 培地 (15 時間) を交互に添加したところ、半減期は 100 h 以上維持され、さらに本システムのブタノール生産濃度、生産性および収率はそれぞれ 11.5 g/l、9.81 g/l/h、0.670 mol/mol と非常に高くなった。以上の結果、高速高効率化と安定性を同時に実現し得る新規なブタノール生産システムの構築に成功した。

(2) 構築した動的モデルによる様々な代謝解析、およびブタノール高生産に関与する代謝経路の特定

① 高効率のアセトン・ブタノール発酵法における酪酸再同化に関与するブタノール生成酵素群の解析

これまでに申請者らは酪酸を基質とした pH-stat 流加培養法により回分培養法よりも高いブタノール収率を可能とした (Tashiro *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 263, 2004)。本培養法では、酪酸再同化からブタノール生成に関与する酵素群 (CoA transferase (CoA-T)、Butyraldehyde dehydrogenase

(BADH)、Butanol dehydrogenase (BDH)の活性が変化したと考え、更に酪酸生成に関与する酵素群 (Butyrate kinase (BK)、Phosphotransbutyrylase (PTB))の酪酸再同化への関与も考慮し、これらの酵素活性について検討を行った。酪酸を基質とした pH-stat 流加培養法、回分培養法、塩酸を用いて pH 制御した回分培養法でそれぞれの酵素活性の経時変化を測定し最大比活性を比較した。その結果 BADH は、pH-stat 流加培養法において回分培養法よりも 3.70 倍増加し、塩酸を用いて pH 制御した回分培養法よりも 3.09 倍増加した。また、BDH は回分培養法よりも 1.40 倍増加したが、塩酸を用いて pH 制御した回分培養法とは差異がなかった。その一方で、酪酸消費速度は pH-stat 流加培養法において大きく増加したにも関わらず、CoA-T は pH-stat 流加培養法と回分培養法でほとんど変化がなかったことから、酪酸再同化には CoA-T を介した経路だけでなく酪酸生成経路の逆経路も関与することが示唆された。そこで、酪酸生成酵素群 PTB、BK も同様に測定し最大比活性を比較したところ、PTB は pH-stat 流加培養法において回分培養法よりも 1.42 倍増加し、塩酸を用いて pH 制御した回分培養法よりも 1.80 倍増加した。BK は逆に回分培養法よりも 0.605 倍低下し、塩酸を用いて pH 制御した回分培養法よりも 0.554 倍低下した。以上の結果より、pH-stat 流加培養法において活性が増加した BADH、BDH、PTB が本培養法での酪酸からのブタノール生産の促進に関与することを明らかにした。また、酪酸再同化には CoA-T を介した経路が一般的であるとされているが、PTB 活性の増加より pH-stat 流加培養法における酪酸再同化には CoA-T を介した経路だけでなく酪酸生成経路の逆経路も働くことが示唆された。

② 感度解析を用いたアセトン・ブタノール発酵の代謝解析

近年、メタボロームなどの膨大なデータの解析手法としてバイオインフォマティクスが積極的に利用されている。生物化学工学の分野では、代謝解析による遺伝子改変のターゲット決定や最適制御法の確立による目的生産物の生産向上への応用が期待されている。ABE 発酵においても、代謝流束解析を用いた種々の代謝解析や制御法の確立がなされている。

回分培養など細胞内外の条件が連続的に変化する場合、それに応じて遺伝子発現量も連続的に変化する。よって、明らかにした遺伝子発現制御機構を組み込んだ代謝のモデル化のためには、従来の代謝流束解析のような静的モデルではなく、連続的な変化に対応する動的なモデルが必要である。すでに申請者らは、ABE 生産菌の既知の代謝経路に基づ

き、関口・岡本が開発した代謝制御経路の解析用シミュレータ WinBEST-KIT (Sekiguchi and M. Okamoto: *J. Bioinfo. Comput. Biol.*, **4**, 621, 2006) を用いてグルコースを基質とした ABE 発酵の動的モデル化に成功した (Shinto *et al.*: *J. Biotechnol.*, **131**, 45, 2007)。その結果、実験データの各物質濃度の時間的挙動がモデルのシミュレーション結果と定性的に一致し、本モデルの有用性が検証できた。また、キシロースを基質とした ABE 発酵の動的モデル化にも成功した (Shinto *et al.*: *Process Biochem.*, **43**, 1452, 2008)

次に、どの代謝経路がブタノール生産に大きな影響を与えているかを調べるために、構築したモデルのそれぞれの代謝反応の V_{max} 、 K_m などのパラメータを 5%ずつ増加させる感度解析を行い、最終ブタノール濃度の変化を検討した。その結果、グルコース消費経路の V_{max} を 5%増加させた場合に最終ブタノール濃度の変化が最大となり、1.52%減少した。2 番目に影響を与えた代謝経路はブタノール生産経路であり、 V_{max} を 5%増加させた結果、最終ブタノール濃度は 1.06%増加した。また、CoA transferase を介した酪酸再同化経路および酪酸生産逆経路も最終ブタノール濃度に大きな影響を与え、 V_{max} をそれぞれ 5%増加させた結果、最終ブタノール濃度はそれぞれ 0.87%減少、0.98%増加した。以上の結果、酪酸の再同化は、CoA transferase を介するよりも酪酸生産逆経路を介した方がブタノール生産を促進することが示唆された。以上の結果、ブタノール高生産のためには酪酸逆経路関連遺伝子 (butyrate kinase、phosphotransbutyrylase) の大量発現および CoA transferase の抑制の組み合わせが有効であることが示唆された。今後は構築したモデルを用いて培養条件の最適化の検討を行う予定である。

(3) 総括と展望

このように、ABE 発酵についてシステム発酵学的アプローチを行った結果、生物化学工学的手法を駆使して、Whole cell catalyst プロセスによるブタノール生産の高効率化に成功した。また、構築した動的モデルによる様々な代謝解析を行い、ブタノール高生産に関与する代謝経路を特定し、最適な培養システムの構築を行った。今後、構築したモデルにより、実験で得られない ABE 発酵の動的挙動や代謝を迅速に網羅的に予測・解析することが可能である。また動的な解析手法を用いることで従来の静的な解析手法では得られなかった新たな知見を得ることができ、より詳細な代謝解析が可能となる。本研究は関連研究分野が相互に融合するという極めて広い分野から成り立ち、さらに、他の発酵分

野でも、理論的かつ実用性に優れた**高速高効率培養(変換)システムの構築**を行うことが可能である。

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5件)

① Hideaki Shinto, Yukihiro Tashiro, Genta Kobayashi, Tatsuya Sekiguchi, Taizo Hanai, Yuki Kuriya, Masahiro Okamoto & Kenji Sonomoto, Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation, *Process Biochem.*, **43**, 1452-1461 (2008) 査読有り

② 大城麦人、田代幸寛、園元謙二、アセトン・ブタノール発酵における新バイオディーゼル燃料の生産、*廃棄物学会誌*, **19**, 271-277 (2008) 査読有り

③ 田代幸寛、大城麦人、園元謙二、廃棄物からのバイオブタノールの製造と高効率生産システムの開発、*分離技術*, **38**, 241-245 (2008) 査読有り

④ Yukihiro Tashiro, Hideaki Shinto, Miki Hayashi, Shun-ichi Baba, Genta Kobayashi & Kenji Sonomoto, Novel high-efficient butanol production from butyrate by non-growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) with methyl viologen, *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 238-240 (2007) 査読有り

⑤ Hideaki Shinto, Yukihiro Tashiro, Mayu Yamashita, Genta Kobayashi, Tatsuya Sekiguchi, Taizo Hanai, Yuki Kuriya, Masahiro Okamoto & Kenji Sonomoto, Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone-butanol-ethanol production, *J. Biotechnol.*, **131**, 45-56 (2007) 査読有り

[学会発表] (計3件)

① 園元謙二、バイオブタノール生産システムの開発、日本生物工学会西日本支部シンポジウム、2009年3月7日、ホテルチューリッヒ東方2001(広島)

② 園元謙二、ブタノール発酵の今昔ー新たなバイオ燃料への挑戦ー、平成20年度廃棄物学会研究討論会、2008年6月11日、学士会館(東京)

③ 園元謙二、アセトン・ブタノール発酵による新バイオディーゼル燃料の生産、日本化学会第88春季例会、2008年3月29日、立教大学(東京)

[図書] (計1件)

① 進藤秀彰、園元謙二、エヌ・ティー・エス、*バイオ液体燃料*、2007, p. 411-422.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園元 謙二 (SONOMOTO KENJI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：10154717

(2) 研究分担者 (2007年度)

岡本 正宏 (OKAMOTO MASAHIRO)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：40211122

(3) 連携研究者 (2008年度)

岡本 正宏 (OKAMOTO MASAHIRO)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：40211122