

再生可能バイオマス資源のバイオリファイナリー

築瀬 英司

鳥取大学大学院工学研究科生物応用工学講座

Microbial cell factory design for renewable resource biorefineries

Hideshi Yanase

Biotechnology Course, Department of Chemistry and Biotechnology,
Graduate School of Engineering
Tottori University, 680-8552 Japan
E-mail: yanase@bio.tottori-u.ac.jp

Abstract: Biorefineries, which are based on renewable biomass, can contribute to establish our future sustainable society. To establish sustainable society, we should replace the present manufacturing process based on fossil non-renewable resources with the biorefinery process. From such a viewpoint, we focused on the development of microbial cell factories capable of producing biofuels, chemical building blocks, and pharmaceuticals.

Key Words: Biomass, Biofuel, Biorefinery, Cell factory, Chemical building block, Metabolic engineering, Pharmaceuticals

1. はじめに

2100年の地球は、気温が6℃上昇することにより海面も6m上昇し、重篤な異常気象に加え、世界の主要都市は水没する危機に瀕すると予想されている。その原因の一つには、産業革命後の石炭から石油・天然ガスの大量消費に伴う温暖化ガス(Green House Gas: 二酸化炭素やメタンなど)の発生にあるとされている。2015年11月30日から12月11日まで、フランス・パリで気候変動枠組条約第21回締約国会議(COP21)、京都議定書第11回締約国会議(CMP11)が開催され、日本の2020年以降の新たな温室効果ガス排出削減目標は、2030年度に2013年度比▲26.0%(2005年度比▲25.4%)の水準(約10億4,200万t-CO₂)と設定されている。このような切迫した地球温暖化を回避し、持続性社会を構築するためには、これまでの石油などの化石資源を大量に消費してエネルギーや化学製品を生み出す生産プロセス(オイルリファイナリー)から、太陽光と二酸化炭素と水から生み出されるバイオマス原料として環境調和型プロセスにより輸送用燃料、様々な化成品基材、そして先端材料を生産可能なシステム(バイオリファイナリー)への転換がEUや米国の国家戦略として位置づけられている。本稿では、原料とするバイオマス資源が食糧

と競合しないように、非可食部バイオマスである草や木などのリグノセルロース系バイオマス資源を原料とし、生物反応を利用することで輸送用燃料、化成品基材、および医薬品基材へと高効率で変換できるバイオリファイナリープロセスの開発について、特に、プロセスの触媒素子として最も重要なMicrobial cell factory(微生物細胞工場)の開発研究を紹介する(図1)。



図1. オイル・リファイナリーからバイオ・リファイナリーへの転換

2. 輸送用代替燃料・第二世代バイオエタノール

地球規模でのバイオマス生産量は年間 2,000 億トンに達しており、これは年間エネルギー総消費量の 10 倍以上に相当する。バイオマス資源のエネルギー変換技術は熱化学的な変換と生物化学的な変換技術に大別されるが、現在の燃料流通と内燃機関を考慮すると、ガスよりも液体が石油に代替可能な燃料として実用に近いとされ、バイオテクノロジー、すなわち発酵性の微生物を利用したバイオマス資源からの燃料用エタノール生産技術が開発されている。エタノールは 5.8×10^8 kcal/kl、つまり石油の約 2/3 の燃焼熱を有し、燃焼効率もよく、燃焼の際には窒素酸化物や一酸化炭素の生成量も少ないことから、内燃機関の燃料としてガソリンに代替可能である。また、エタノールは酢酸、アセトアルデヒド、ブタノール、エチレンなどの化成品製造の出発物質としても有用である。そのため、長期的な展望に立つと、食糧とは競合しない未利用リグノセルロース系バイオマス資源からエタノール（第二世代バイオエタノール）を生産することは地球環境保全の観点からも重要な意義をもっている。

2.1 未利用セルロース系バイオマスの原料化

我が国における潜在的な発酵原料としては、森林間伐材、稲藁、籾殻、バガス、茅等の未利用農林産廃棄物に加え、建築廃材、古紙・廃紙、都市ゴミ等のリグノセルロース系産業廃棄物が想定され、これら廃棄物の総廃棄量は年間約 4,000 万トンに達している。すなわち、これら未利用リグノセルロース系バイオマスをエタノールに変換すると、理論的には 1,000 万トンのエタノールの製造が可能となり、我が国のガソリン需要の約 1/4 をまかなうことになり、温室効果ガスの 25% 削減を達成できる。一方、リグセルロース系バイオエタノールのグローバルな商業展開を前提とした場合には、既にプランテーションに実績のある油ヤシ、ユーカリ、農産廃棄物としてのコーンストーバ、サトウキビ・バガスの原料化も対象となる。

これらリグノセルロース系バイオマスを原料とした第二世代バイオエタノール製造プロセスでは、リグニンにより被覆された植物細胞壁多糖を露出させる前処理原料化工程と、前処理物の高効率な糖化・発酵工程の開発が必要である(図2)。木質系バイオマスは稲藁、コーンストーバやサトウキビバガスなどの草本系バイオマスに比較して前処理原料化が難しいとされ、その前処理技術に関しては、蒸煮、水蒸気爆砕、加圧熱水、アンモニア爆砕、粉碎、ソルボリシス、オゾン酸化、酸処理、アルカリ処理、マイクロ波処理、など様々な方法

が検討されてきた。一般的に、爆砕、蒸煮などの水熱反応が広葉樹材に利用されているが、杉などの針葉樹材である難分解性バイオマスにも適用できる前処理法としてマイクロ波ソルボリシス法を選択し、3次元電磁界シミュレーションを用いてマイクロ波照射装置の電磁界分布やマイクロ波増感作を最適化した新方式の連続式マイクロ波照射装置が開発されている。マイクロ波照射前処理杉材に市販のセルロース分解酵素カクテルを添加して 50℃ にて保持することで、15% 前処理物から 90% 以上の収率で酵素糖化されることが報告されている。開発したマイクロ波照射前処理と糸状菌由来のセルラーゼ酵素カクテルを用いる糖化法の組み合わせは、針葉樹と同様に建築廃材、ユーカリ材、コーンストーバなどの原料化に有効である。

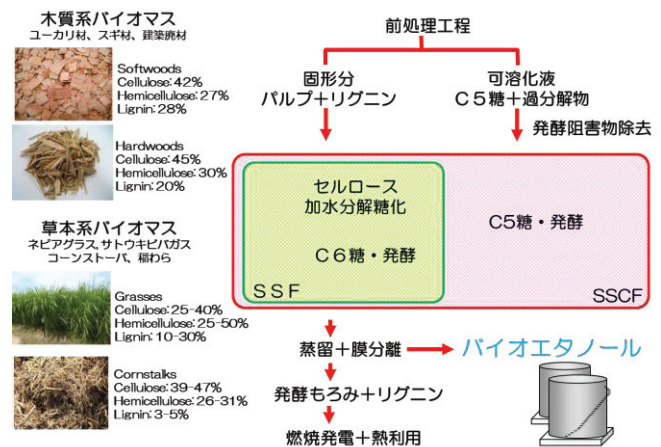


図2. リグノセルロース系バイオエタノール転換バイオプロセス

2.2 高速発酵細菌の発酵特性

現状の第2世代バイオエタノール製造プロセスでは、リグノセルロース系バイオマスを物理的あるいは熱化学的前処理により原料化した後、その前処理物に対して糸状菌由来のセルラーゼ酵素カクテルと発酵菌を加えてワンポッドで糖化と発酵を行う同時糖化並行発酵 (SSCF: Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation) が商用プロセスとして想定されている。嫌気的な生育条件下で糖質からエネルギーを獲得することによりエタノールを代謝産物として生成する細菌は数多く報告されているが、糖質から理論収率に近い量のエタノールを効率よく生産する細菌は、*Zymomonas mobilis* と我が国で単離された新種の *Zymobacter palmae* に限定される(表1)。多様なリグノセルロース系バイオマスに最適な発酵菌の育種を目標とし、*Zm. mobilis* と *Zb. palmae* の代謝工学的な育種を並行して実施したが、本稿では木質系バイオマス

原料に最適な *Zm. mobilis* に焦点を絞り紹介する [1,2]。

表1. エタノール発酵細菌の発酵特性

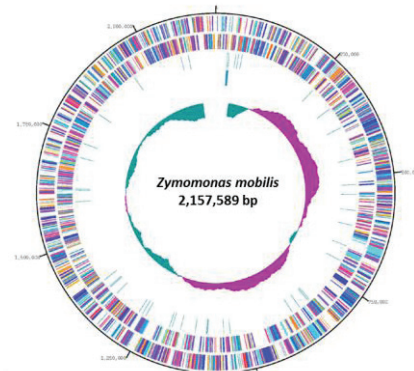
***Zm. mobilis*および*Zb. palmarum*のエタノール発酵特性**

発酵特性	<i>Zymomonas mobilis</i> (グラム陰性細菌)	<i>Zymobacter palmarum</i> (グラム陰性細菌)	Saccharomyces (酵母)
分離源	ブルケ酒 (メキシコ)	椰子発酵液 (沖縄)	醸造菌
エタノール生成速度 g/l・hr	120~200	20~30	15~30
	(菌体再循環 連続発酵)	(固定化菌体 連続発酵)	(固定化菌体 連続発酵)
エタノール濃度	12%	7-8%	12%
エタノール回収率	95~97%	95-97%	93~95%
糖代謝経路	ED経路	ED経路	EMP経路
ATP生成量 (/molGlc)	1 mol	1 mol	2 mol
発酵性糖 (リグノセルロース系)			
グルコース	++	++	++
キシロース	-	-	-
マンノース	-	+	+
セロオリゴ糖	-	-	-
非晶性セルロース	-	-	-
結晶性セルロース	-	-	-

グラム陰性の通性嫌気性細菌である *Zm. mobilis* は、省エネルギー的な解糖系である Entner-Doudoroff (ED) 経路を利用するために、エタノール生産性は酵母よりも5倍程度優れており、菌体リサイクル連続発酵によるエタノール生産速度は 120 ~ 200 g/l・hr に達する。筆者らは、*Zm. mobilis* のゲノムDNAの完全解読に成功し、*Zm. mobilis* のゲノムサイズは2,157,589塩基で2000の遺伝子がコードされている (図3)。解読したゲノム情報に基づき、*Zm. mobilis* の解糖経路やその糖代謝周辺の代謝経路の特徴を明らかにしている (図4)。商用化プロセスとして、SSCFプロセスに求められる発酵菌の能力は、セルラーゼによるセルロース糖化反応と発酵が同時に進行することが前提であり、発酵菌には①酸性側 (pH4.5-5.0) での発酵能力、②高温での発酵能力 (35℃以上) に加えて、③高濃度原料仕込みを可能にするための高濃度グルコース耐性、④高濃度エタノール耐性、⑤前処理工程で副生して発酵菌の成育や発酵能を阻害するとされるヘミセルロースおよびリグニン由来過分解物に対する耐性、がある。自然界から新たに分離した *Zm. mobilis* 株に対して①~⑤の発酵特性を検討した。その結果、分離株は、初発 pH を 4.0 とした酸性条件下においても速やかに発酵して理論収率でエタノールを生産するとともに、37℃までは生育と発酵速度に遅延は認められず、40℃においても発酵能は観察された。さらに、SSCFプロセスでの原料高濃度仕込みを想定し、高濃度のグルコースとエタノールに対する耐性を検討した結果、180 g/l のグルコースは48時間以内に完全に消費して理論収率でエタ

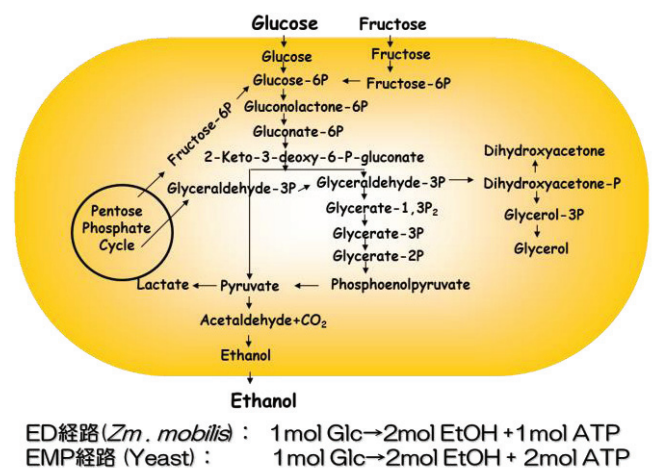
ノールを生産した。また、初発エタノール濃度が 7.5% まではエタノールに耐性をもつことが明らかになった。さらに、セルロース系バイオマスの前処理工程で副生する発酵阻害物 (酢酸、フルフラール類、およびリグニン由来芳香族アルデヒド類) に対する耐性を検討した結果、酢酸濃度は 1% 以上、ベンズアルデヒドは 10 mM、ヒドロキシベンズアルデヒドは 5 mM、シリンガスデヒドは 20 mM、バニリンは 10 mM、フルフラールは 20 mM、HMF は 20 mM の濃度で耐性を示し、分離菌が酢酸とともにフルフラールやリグニン過分解物に耐性を有することが明らかになった。

***Zymomonas mobilis* の全ゲノム地図**



最も外側の円：プラスストランドORFs, 2番目の円：マイナスストランドORFs, 3番目の円：tRNA, 4番目の円：rRNA, 内側の円：GC含量

図3. *Zymomonas mobilis* の全ゲノム解読



ED経路 (*Zm. mobilis*) : 1 mol Glc → 2 mol EtOH + 1 mol ATP
 EMP経路 (Yeast) : 1 mol Glc → 2 mol EtOH + 2 mol ATP

図4. 発酵細菌のエタノール生合成経路

2.3 リグノセルロース由来難発酵性糖のC5・C6糖同時並行発酵細菌のメタボリックエンジニアリング

リグノセルロース系バイオマス前処理物の糖化液中には、グルコースに加えヘミセルロース由来の難発酵性糖質であるキシロースやマンノースが混在し、エタノール収率の低下の原因となる。高効率なエタノール回収を可能にするためには、混在する糖質の発酵能、すなわち C5・C6 同時並行発酵菌の開発が不可欠である(図5)。

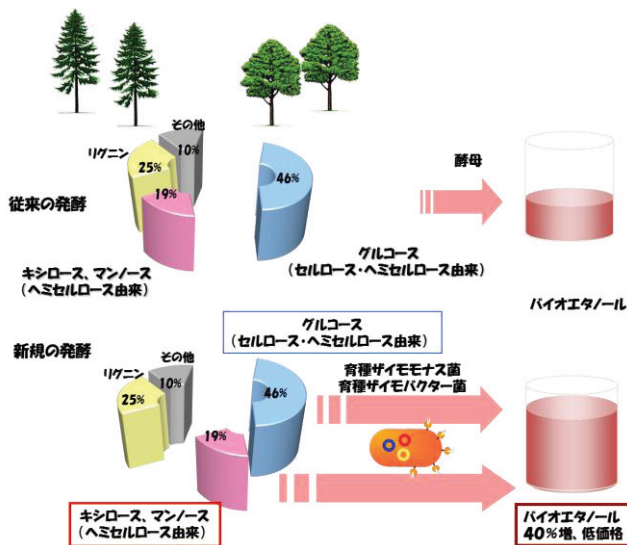


図5. C5・C6 糖同時並行発酵性の賦与

① キシロース並行発酵性の賦与

一般的に細菌におけるキシロース代謝は酵母とは異なり、細胞内に取り込まれたキシロースはキシロースイソメラーゼ(XI)により異性化されてキシロースへと変換された後、キシロキナーゼ(XK)によりキシロースリン酸へとリン酸化を受けてペントースリン酸(PP)経路により代謝される。*Zm. mobilis*はキシロースをPP経路に導入するためのXIとXKの両遺伝子(*xylA*, *xylB*)を欠損している。一方、*Zm. mobilis*での細胞内へのキシロース取り込みにはグルコース輸送タンパク質として働くグルコースファシリテーター(Glf)が関与する。そこで、キシロースをPP経路に導入するための大腸菌由来の*xylA*と*xylB*、およびPP経路flux向上のためのトランスアルドラーゼ遺伝子(*tal*)とトランスケトララーゼ遺伝子(*tkt*)を導入した(図6)。導入したキシロース異化代謝酵素遺伝子は*Zm. mobilis*株内で高発現し、40 g/lのキシロースを唯一の炭素源として生育し、48時間で完全に消費して理論収率のエタノールを生産した。キシロースからのキシリトール等の副産物の蓄積は認められなかった[1]。

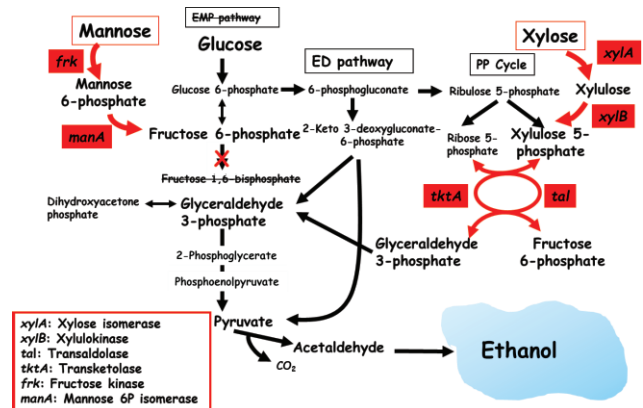


図6. C5・C6糖異化代謝経路の導入

② マンノース並行発酵性の賦与

*Zm. mobilis*はグルコース輸送促進タンパク質を介してマンノースを細胞内に取り込むが、エタノールに変換できない。一方、*Zm. mobilis*のフルクトース発酵の初発酵素であるフルクトキナーゼ(FRK)はマンノースのリン酸化反応も触媒することから、マンノース発酵性の賦与は細胞内でリン酸化されたマンノースをフルクトース6リン酸へと異性化するホスホマンノースイソメラーゼ遺伝子(*manA*)の導入により可能になる。そこで、大腸菌由来の*manA*を*Zm. mobilis*に導入することで、40 g/L マンノースを唯一の炭素源として生育し、理論収率のエタノール生産株を育種した[1]

2.4 実用的 C5・C6 同時並行発酵細菌のメタボリックエンジニアリング

リグノセルロース系バイオマス前処理糖化液の完全発酵に最適な発酵菌を育種するために、マンノースとキシロース異化代謝遺伝子群の共発現株を育種した。*manA*を*Zm. mobilis*の染色体DNA上に組み込み、さらにキシロース異化代謝酵素遺伝子群をプラスミドとして導入することで、グルコース混在下でのキシロースとマンノースからの理論収率での速やかなエタノール生産を確認した[1]。すなわち、1つの菌株によりリグノセルロース系バイオマス前処理糖化液に含まれる主要な糖成分から理論収率でのバイオエタノールを生産するC5・C6糖並行発酵性*Zm. mobilis*を育種することができた。そこで、C5・C6糖並行発酵性*Zm. mobilis*のパフォーマンスを確かめるために、実際の稲わら前処理液と廃木材前処理液を原料とした並行発酵性試験を実施した(図7)。実液に含まれるグルコース、キシロース、およびマンノースを完全に並行発酵して、

理論収率に近いエタノールを生産した。

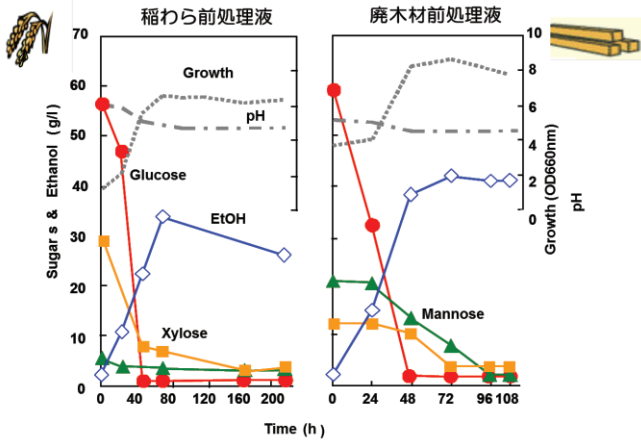


図7. 組換え *Zm. mobilis* による稲わらと廃木材の前処理液の発酵

2.5 セルロース直接発酵発酵細菌のメタボリックエンジニアリング

先に述べたように、前処理した廃木材や稲わらの糖化工程は糸状菌由来のセルラーゼを利用する酵素糖化が主流となっているが、十分量の酵素を使用した糖化処理においてもセルロース部分分解物であるセロオリゴ糖が残存する(図8)。また、バイオエタノール製造プロセスにおいて、酵素糖化工程は前処理工程とともにコスト削減が必須とされている。筆者らは、酵素糖化液に含まれるセロオリゴ糖からのエタノール回収と酵素糖化工程のコスト削減を目標に、発酵細菌へのセルロース糖化発酵性の賦与を検討した。*Zm. mobilis* に草食動物である牛の胃袋に生息するルーメン細菌由来の β -グルコシダーゼ遺伝子 (*bgl*) を導入した。まず、*bgl* を *Ruminococcus albus* の染色体 DNA よりクローン化して *Zm. mobilis* に導入した。発現させた Bgl の大部分は細胞質内に局在したことから、*bgl* の分泌シグナル領域を *Z. mobilis* 由来のペリプラズム局在性酵素の分泌シグナル領域と交換して導入した。その結果、発現した Bgl がペリプラズムに局在することにより、22 g/L セロビオースから理論収率に近い 10.7 g/L エタノールを生産した[3,4]。

さらに、クローン化したセルラーゼ遺伝子を *Zm. mobilis* の細胞表面に高密度で発現提示させることにより効率よくセルロースを糖化させるために、発酵細菌に独自の細胞表面提示システムを開発した(図9)。

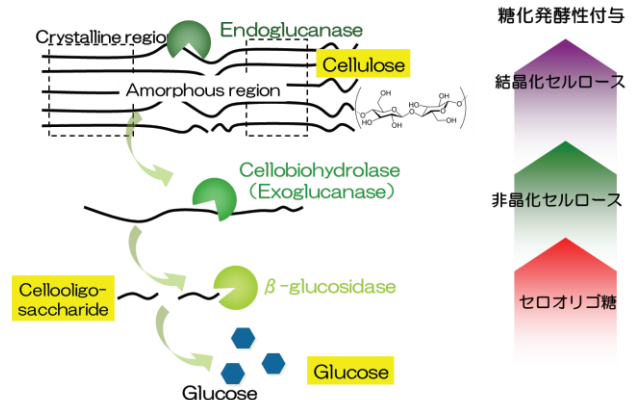


図8. セルロース糖化発酵菌の育種

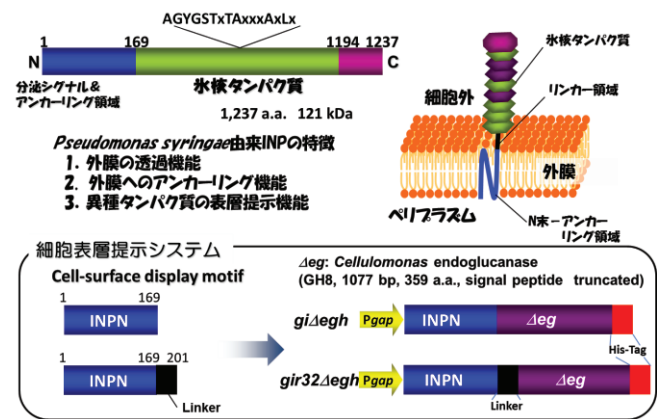


図9. 新規氷核タンパク質遺伝子を利用したセルラーゼの細胞表面提示システム

植物病原性グラム陰性細菌である *Pseudomonas syringae* は細胞表面に氷核蛋白質を表面提示する。そこで、*P. syringae* 由来ゲノム DNA から新規な氷核蛋白質遺伝子をクローン化し、詳細に遺伝子構造を解析した結果、N末領域に細胞外膜へのアンカーリング領域を見いだした[5,6]。そこで、氷核蛋白質遺伝子の N末アンカーリング領域 (INPN) をセルラーゼの細胞表面提示に利用するシステム開発を行った。*Zm. mobilis* 由来高発現プロモーター制御下に INPN を挿入し、INPN に分泌シグナル領域を欠損させたエンドグルカナーゼ遺伝子を連結した細胞表面提示セルラーゼ遺伝子を構築して導入した。導入エンドグルカナーゼに対する蛍光標識抗体を用いて、発酵細菌におけるエンドグルカナーゼの細胞表面提示を観察したと

ころ、融合遺伝子を導入した発酵細菌は蛍光顕微鏡下で細菌細胞に蛍光が認められ、エンドグルカナーゼが細胞表面に提示して発現されていることが明らかになった。さらに、エンドグルカナーゼとセロビオハイドロラーゼの細胞表面提示を可能にして、セルロースから直接エタノールを生産できる発酵菌を育種している。

以上のように、木質系バイオマス为原料とした SSCF に最適な高速発酵菌の育種に成功した。

2.6 NEDOプロジェクト「木質バイオマスからの高効率バイオエタノール生産システムの研究開発と実証試験

商用レベルでのセルロース系バイオエタノール製造の実証は、平成 13～17 年度 NEDO「バイオマスエネルギー高効率転換技術開発」、平成 17～20 年度 NEDO「バイオマスエネルギー先導技術研究開発」、平成 20～24 年度 NEDO「バイオマスエネルギー加速的先導技術研究開発」、平成 26 年度 NEDO「新エネルギーベンチャー技術革新事業」において実施した。平成 20～24 年度は木質系バイオマスからの第二世代バイオエタノールを高効率で生産する目的で、鳥取大学大学院工学研究科、京大生存圏研究所、日本化学機械製造株式会社、トヨタ自動車株式会社の 4 法人から構成するプロジェクトを立ち上げ、マイクロ波照射による新規な前処理法・前処理装置の開発、前処理バイオマスの高効率酵素糖化条件の確立、低コスト基材を用いた発酵阻害物除去法の開発、発酵細菌の SSCF 最適化を実施し、これら要素技術を統合して木質バイオマスからのバイオエタノールを生産するベンチスケールでの新規な一貫プロセスを開発した(図10, 11)。

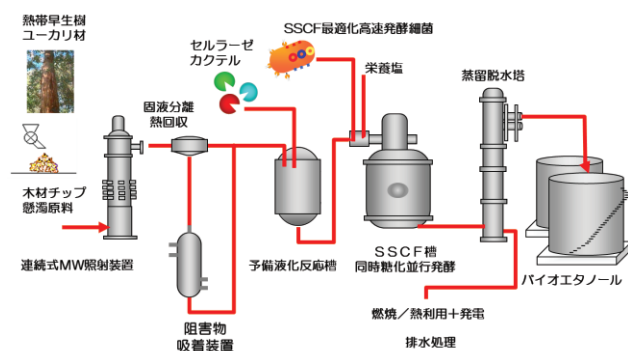


図10. 木質バイオマスからのバイオエタノール一貫製造プロセス

原料：ユーカリ材全木チップ（15%乾重量仕込み）
最終エタノール濃度：5%以上、エタノール生産速度：1g/l.hr以上、
エタノール回収率：90%以上



図11. 木質系バイオエタノール製造ベンチプラント

① マイクロ波照射前処理工程

木質系バイオエタノール生産の低減には、転換効率の高さと設備費・運転費の低減を両立させることが重要である。そこで、はじめに3次元電磁界シミュレータによる計算機実験と実測実験により、民生用 1.5kw のマグネトロンを8ポートもつ新規な超低コストマイクロ波照射前処理装置を開発した[7-10]。この装置は、アイソレータやEHチューナーなどのマイクロ波を制御する高価な付帯装置を用いることなく、マグネトロンをガラスの遮蔽板を介してステンレスパイプに直結させたシンプルな構造をもつ。本前処理装置を用い、ユーカリ・グロビュラスを固形分 15%以上で前処理を実施し、従来の添加触媒量比の 1/50 に低減した処理条件を設定し、触媒回収を不要とする高効率かつ低コストプロセスを開発した。この前処理条件では、ベンチプラントで反応温度 190℃が最適温度となり、触媒量の多い条件と比較すると発酵阻害物質の生成量が増加した。これに対応するため、発酵菌の阻害耐性強化を行うとともに、残滓リグニンからの発酵阻害物質吸着剤を開発した。糖化残滓および SSCF の残滓リグニンを熱処理することにより、発酵阻害物質を強力に吸着する担体の製造に成功した。このリグニン由来吸着体は、発酵阻害物質を吸着した後は熱処理によりリサイクルでき、最終的には燃焼によりエネルギー回収される。リグニン由来吸着体を組み込んだプロセスでは、吸着体の購入や廃棄の必要がなく、可溶部の発酵阻害物質を吸着除去により廃水処理の負荷を軽減するメリットをもつ。NEDO プロジェクトでは、開発した吸着体を用いて処理したマイクロ波前処理可溶化液の *Zm. mobilis* による C5・C6 糖並行発酵

(CF:Co-Fermentation)に成功した。吸着体は、SSCF反応槽に添加するオール・イン・ワンプロセスにおいても強力な阻害低減効果を発揮し、理論収率に近いエタノールの生産が可能になった。

② SSCF(同時糖化並行発酵)工程

マイクロ波照射前処理ユーカリ材スラリーを直接の原料として、セルラーゼ酵素カクテルとSSCFに最適な育種 *Zm. mobilis* を加え、ワンポットでセルロース糖化とC5・C6糖の並行発酵が同時に進行するSSCFプロセスを開発した。ユーカリ材を原料としてマイクロ波照射誘電加熱処理して得られるパルプ固形物(セルロース)および黒液(ヘミセルロース可溶化液)の糖化・並行発酵条件を設定した。SSCFプロセスの開発にあたって、第1段階として黒液を含まないMW前処理パルプ固形物の同時糖化発酵(SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation)プロセス条件について、添加セルラーゼ酵素カクテル量、糖化・発酵のpHと温度条件を最適して、ベンチプラントにて実証試験に成功した。次に、黒液とパルプ固形物をワンポットで糖化と発酵を行うSSCFプロセスの最適化を検討した。SSF条件下にて、先に開発した残渣リグニンを活用した新規低コスト阻害物吸着基材により発酵阻害物を吸着除去したMW処理可溶化液とパルプ固形物を原料として、セルラーゼ酵素カクテルとC5・C6糖並行発酵性 *Zm. mobilis* を加えて糖化並行発酵が進行するSSCFプロセスを開発した。最終的に、ベンチプラントでのSSCF条件を最適化するために、セルラーゼ酵素カクテル添加量と酵素糖化効率、および予備液化と育種 *Zm. mobilis* 発酵速度との相関を詳細に検討して、ユーカリ材前処理固形パルプ + 発酵阻害物吸着処理可溶化液にセルラーゼ酵素カクテルを添加して予備液化した後に、育種 *Zm. mobilis* を植菌してSSCFを継続するL+SSCF(Liquefaction followed by SSCF)プロセスを開発した。

③ ベンチプラント実証試験

L+SSCFのベンチプラント実証試験では、ユーカリ材チップを150 g dry weight%でマイクロ波照射前処理をおこなった固形物(パルプ)と発酵阻害物吸着処理可溶化液を原料として、30 L発酵槽からなるベンチプラントにてSSCFを実施した。その結果、最終エタノール濃度64 g/L、エタノール生産速度1 g/L・h、エタノール回収率90%以上を達成し、商用レベルでのセルロース系バイオエタノール製造プロセスであることを実証することができた(図12)。なお、製造したバイオエタノールは、輸送用燃料やプロピレン生産原料として使用できる高い品質をもつことも示され、代替燃料用途に加え化成品原料としての利用も期待されている。

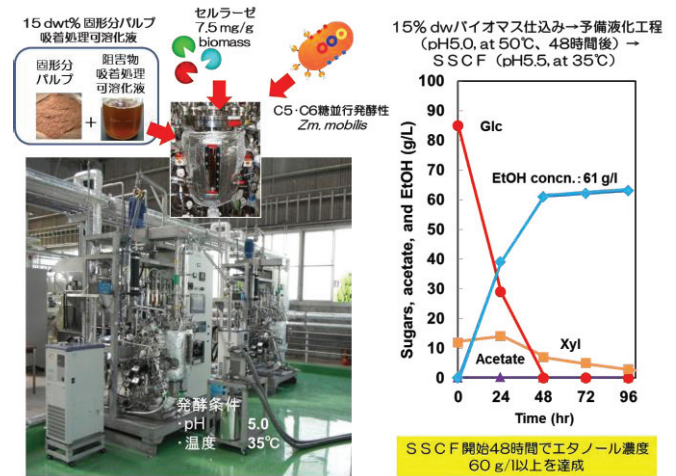


図12. ベンチプラントによるユーカリ材MW前処理 MashのL+SSCF

2.7 第二世代バイオエタノールの展望

セルロース系バイオエタノールの商業製造を加速するためには、低コストでシンプルなプロセスを開発することで安価で安定したバイオエタノールを供給することが可能になる。過去20年の間で、バイオエタノール製造プロセスはSHF (Separated Hydrolysis and Fermentation) からSSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation)、そしてSSCF (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation)へと改良されている。これらのプロセス改良はセルロース系バイオエタノールを穀物由来セルロース価格に引けをとらない価格に近づけている。ブラジルのサトウキビからのバイオエタノール価格は0.23-0.29 \$/L、EUの砂糖大根と米国のトウモロコシからのバイオエタノール価格は0.29 \$/Lと0.53 \$/Lと報告されている[11]。これら第一世代バイオエタノール価格に比較して、2011年に発表されたNREL報告書では、コーンストーバを原料としたエタノール販売価格(MESP)を0.57 \$/Lと設定しており、今後のセルロース製造価格の基準になるとされている[12]。このエタノール価格を達成するためには、さらなる発酵菌の強靱(Robust)化とともに、バイオマス前処理物の酵素糖化に使用するセルラーゼ酵素カクテルの高活性化と低コスト製造、発酵阻害物質の生成を抑えながら高い糖化効率を与える前処理反応の開発が重要な鍵と考えている。

3. 化成品合成基材・バイオジオール

米国のエネルギー省 (DOE) が策定したバイオマスを原料とする重要な化成品基材 Top 30 にジアルコールである 2,3-ブタンジオールがリストアップされている。2, 3-ブタンジオールはブタジエンを経て合成ゴム(タイヤ)の原料であるばかりでなく、化成品基材としてインク、香水、殺虫剤、軟化試薬、爆薬、可塑剤の原料として有用である。さらに、光学純度の高い 2, 3-ブタンジオールは医薬品や液晶などの付加価値の高い化合物の合成素材として利用される可能性を有している。工業的には 2, 3-ブタンジオール合成は、ナフサを原料とし 2-ブテンオキシドを過塩素酸水溶液中で加水分解する方法で製造されている。2, 3-ブタンジオールは化学変換により汎用な溶剤であるメチルエチルケトンに変換されることや、アセチル化した後に酢酸を脱離する方法により1, 3-ブタジエンへと変換されることが報告されている。中でも、1, 3-ブタジエンはヘキサメチレンジアミンやアジピン酸、1, 4-ブタンジオール等といった多種類の化合物を合成可能な出発物質であり、これら技術の確立は石油由来の既存合成樹脂をバイオマス由来に置き換えられる可能性があるため、その製造技術は非常に重要であり、セルロース系バイオマスを原料とした微生物発酵法が注目されている。

3.1 ブタンジオール発酵生産菌の検索

筆者らは、第二世代バイオエタノール生産菌として、先の *Zymomonas mobilis* に加え、新種の発酵菌として分離された *Zymobacter palmae* にも注目した。本菌は酵母や *Zm. mobilis* と同様にグルコースから理論収率でのエタノールを発酵生産する(表1)。そのため、第二世代バイオエタノール製造に最適な発酵菌として位置づけ、NEDO 事業においても育種研究を実施してきた。その育種研究の過程で *Zb. palmae* のゲノム DNA の完全解読に成功し、糖代謝とその周辺代謝経路を予測したところ、*Zb. palmae* に 2,3-ブタンジオール生合成経路の存在を世界で初めて発見し、2,3-ブタンジオール発酵生産の検討を開始した。なお、本研究は、平成23~26年度 JST「先端的低炭素化技術開発:セルロースからのポリマー原料の革新的製造プロセス研究開発」の一部として実施した。

① *Zymobacter palmae* の発酵特性

新規エタノール発酵細菌である *Zb. palmae* は沖縄の椰子樹液の発酵液から分離されたグラム陰性の通性嫌気性細菌であり、酵母と同程度のエタノール発酵性を示す。エタノール生成速度は 30 g/L.h、エタノール収率は 95-97%、エタノール耐性は 7%程度、グルコ

ース耐性は 20%、発酵温度は 37°C が最適であり、バイオエタノール生産菌として有用である。一方、発酵性糖種はグルコース、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトースなど酵母と同様な発酵特性を示す[13]。

② 全ゲノム DNA 完全解読

Zb. palmae の育種研究を加速させるために、世界に先駆けて *Zb. palmae* のゲノム DNA の完全解読を開始した。解析法としては、ショットガンシーケンス解析と GAP クローズ解析を組み合わせて実施した。*Zb. palmae* のゲノム DNA ライブラリーから約 44,500 クローンの塩基配列を決定した。解析情報量としては冗長度 7.7 で、全ゲノム DNA を網羅する完全解読を終了した。これら塩基配列情報に基づき、遺伝子機能予測解析(アノテーション)を行った。すなわち、RNA 領域の予測、遺伝子領域の予測を行い、解析領域を決定した後、相同性検索やドメイン検索により遺伝子機能解析を行い、*Zb. palmae* のゲノム DNA は 3,023,645 bp で、2,247 の遺伝子がコードされていると結論した(図 13)。

Zymobacter palmae の全ゲノム地図

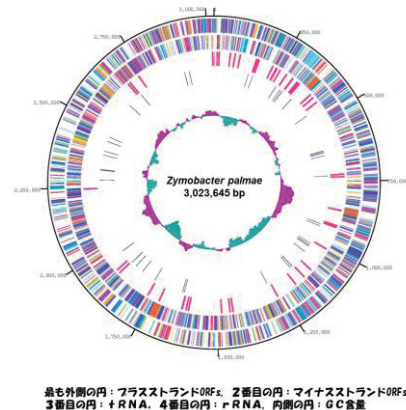


図13. *Zymobacter palmae* の全ゲノム DNA 解読

ゲノム情報に基づく *in silico* スクリーニングにより、糖輸送、糖代謝、エネルギー代謝、を構成する酵素遺伝子の構成を検討した。エネルギー代謝の核となる解糖系は、一般的な EMP 経路とは異なり、省エネルギー的な代謝経路である ED 経路が稼働していることが明らかになった(図 14)。ED経路により生成されるピルビン酸は、大腸菌などの一般的な細菌とは異なり、アセチル CoA を経ることはなく、直接、アセトアルデヒドへと脱炭酸された後、エタノールへ変換される。これまでにエタノール発酵菌として伝統的に利用されている酵母や *Zm. mobilis* と同様な代謝を経ることが明らかになった。さらに興味深いことに、酵母や *Zm. mobilis*

には報告されていない 2,3-ブタンジオール合成経路を見出した。解糖系で生成されるピルビン酸がアセト乳酸合成酵素によりアセト乳酸へと変換された後、アセト乳酸脱炭酸酵素によりアセトインへ、最終的にアセトインはアセトイン脱水素酵素により 2,3-ブタンジオールへと変換される経路である。しかし、リグノセルロース由来の難発酵性糖質であるキシロース、マンノース、アラビノースの異化代謝に関連する酵素遺伝子群は欠損していることも明らかになった。

2,3-BDO合成の代謝経路

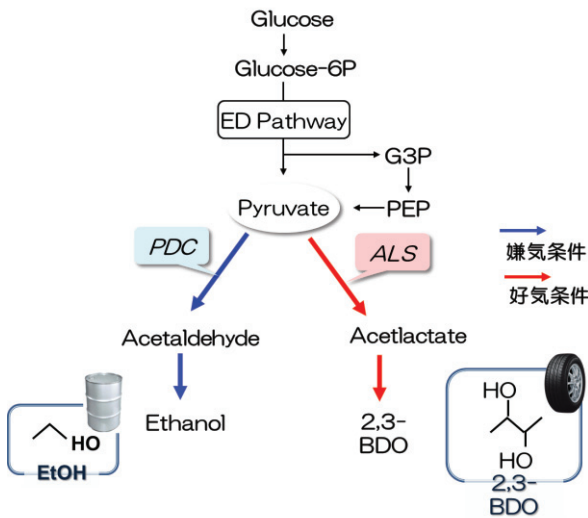


図14. *Zymobacter palmae* のアルコール生合成経路

3.2 *Zymobacter palmae* による 2,3-ブタンジオール生産

Zb. palmae はエタノール発酵菌として分離されたことから、酸素を供給しない嫌気的な培養条件では、グルコースから理論収率でのエタノールを生産する(図15)。そこで、嫌気的な培養条件下と酸素を供給する好気的な培養条件下での発酵代謝物を詳細に分析した。その結果、*Zb. palmae* は嫌気的な条件下では主要な発酵産物としてはエタノールを生産・蓄積するに対し、好気的に条件下では有機酸とともに 2,3-ブタンジオールを蓄積することが明らかになった。そこで、培養時の通気量、培地 pH と 2,3-ブタンジオール生産との相関を詳細に検討し、2,3-ブタンジオール生産の最適条件を設定した。さらに、大量培養を想定し、ジャーフェーマンターを用いた 2,3-ブタンジオール生産を検討し、50 g/L のグルコースを炭素源として、18 時間という短時間で、理論収率の 85% での 2,3-ブタンジオール生産に成功した(図16)。得られた収率と生産速度は、既報の他のバクテリアを利用した発酵結果よりも優れていた。その結果、*Zb. palmae* は既報の

2,3-ブタンジオール発酵生産微生物である *Klebsiella* sp.、*Bacillus* sp.、*Panibacillus* sp. に比べて高い生産速度(2.3 g/L・h⁻¹)であった。

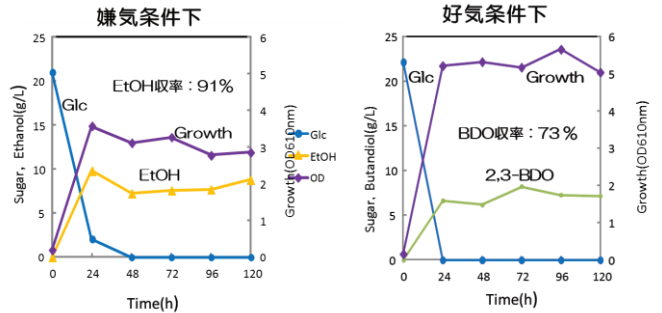


図15. 培養条件による発酵産物の生産制御

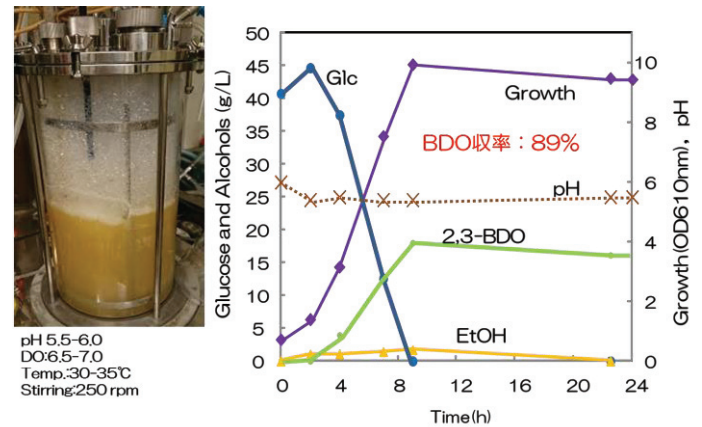


図16. 通気・攪拌培養での *Zb. palmae* による 2,3-BDO の発酵生産

以上の結果から、*Zb. palmae* は酵母や *Zm. mobilis* とは異なり、培養時の通気量によりエタノールから 2,3-ブタンジオールへと発酵転換することが可能であった。そこで、ピルビン酸からのエタノール代謝と 2,3-ブタンジオール代謝の分岐酵であるピルビン酸脱炭酸酵素とアセト乳酸合成酵素の発現を嫌気条件下と好気条件下で比較した。その結果、嫌気条件下で高い活性を示したピルビン酸脱炭酸酵素活性は好気条件下では著しく低下するのに対し、アセト乳酸合成酵素は好気条件下で誘導発現することが明らかになった。環境中の酸素濃度により発現制御される転写機構は大変興味深い。

3.3 リグノセルロース系バイオマス由来難発酵性糖質からの 2,3-ブタンジオール生産性の賦与

Zb. palmae の発酵性糖種の拡大を検討した。

① 遺伝子操作技術の開発

Zb. palmae への糖発酵性遺伝子の導入と発現には、独自の宿主-ベクター系の開発が必須となる。そこで、遺伝子導入に利用するベクタープラスミドとして、広宿主域性多剤薬剤耐性プラスミドの *ori* とマーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を連結したプラスミドを選択し、遺伝子導入法として電圧ポレーション法を組み合わせたシステムを開発し、初めて *Zb. palmae* の遺伝子操作が可能になった[4]。

② キシロース並行発酵性の賦与

ゲノム情報に基づき、*Zb. palmae* に導入すべきキシロース異化代謝経路上の酵素遺伝子を選択した。大腸菌由来のキシロースイソメラーゼ(XI)、キシロキナーゼ(XK)、ペントースリン酸回路を活性化するためのトランスアルドラーゼ遺伝子(*tal*)とトランスケトラーゼ遺伝子(*tkt*)を広宿主域性プラスミドに挿入して導入した。大腸菌由来の4種のキシロース代謝酵素遺伝子群を導入したザイモバクターによるキシロース発酵性を検討した(図17)。40g/Lのキシロースを唯一の炭素源として生育し、24時間で消費して、理論収率での2,3-ブタンジオール合成が可能になった(図18)。一方、酵母によるキシロース発酵で収率低下の原因となるキシリトールなどの副産物の蓄積は認められなかった。

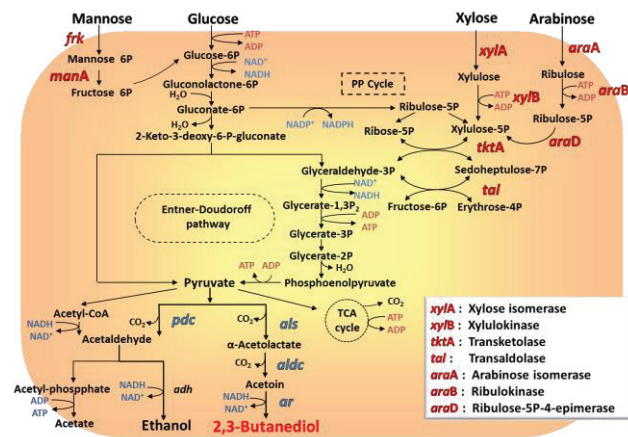


図17. *Zb. palmae* への C5・C6糖並行発酵性の賦与

セルロース系バイオマスの前処理糖化液中には、グルコースとキシロースが混在しており、従来の育種発酵菌ではグルコース消費後にキシロース発酵が開始し、発酵速度とエタノール収率を低下させる。しかし、*Zb. palmae* 育種株は40g/Lグルコースと40g/Lキシロースを同時に消費し、理論収率に近い2,3-ブタンジオールを生産する同時並行発酵が可能であった。C5

糖とC6糖を同時に並行発酵できる微生物は *Zb. palmae* が最初の報告である。その後、 C^{14} ラベルしたキシロースをもちいたトレーサー実験により、*Zb. palmae* はグルコースとキシロースの取り込み機構を異にするトランスポーターを明らかにした[2]。

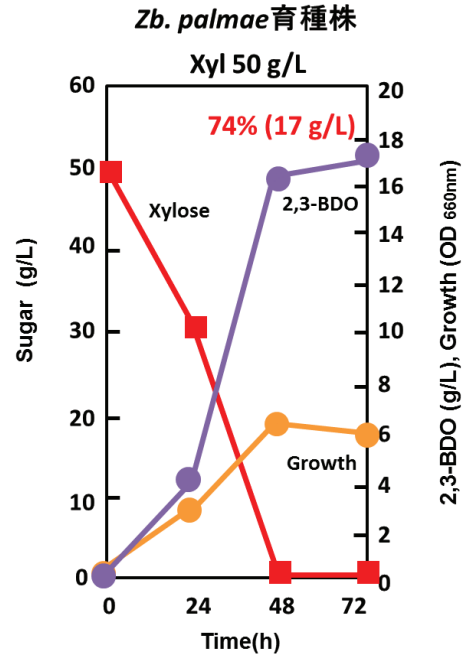


図18. キシロースからの2,3-BDO発酵生産

③ マンノース並行発酵性の賦与

マンノース発酵性賦与には、細胞内に取り込んだマンノースを解糖系に導入するためにマンノースリン酸化酵素とリン酸化したマンノースをグルコース6リン酸へと異性化するホスホマンノースイソメラーゼが必要とされている。そこで、*Zm. mobilis* 由来の広い基質特異性を特徴とするフルクトキナーゼ(*frk*)と大腸菌由来のホスホマンノースイソメラーゼ(*manA*)を *Zb. palmae* に導入して発現させた。*frk*と*manA*を導入により、ホスホマンノースイソメラーゼとフルクトキナーゼの高い酵素活性が認められ、マンノースを唯一の炭素源として生育して、2,3-ブタンジオールを生産した。

④ 実用的なC5・C6糖同時並行発酵菌の育種

キシロース発酵性酵素遺伝子群とマンノース発酵性酵素遺伝子群の安定した発現を可能にするために、構築した人工キシロースオペロン(Xt)と人工マンノースオペロン(opm)のザイモバクター染色体DNAへの組み込みを行った。組み込み標的遺伝子としては、レバンスクララーゼ遺伝子とエンドグルカナーゼ遺伝子を用いた。キシロース発酵性遺伝子をレバンスクロース遺伝子に挿入した染色体組み込みベクターを作製した

後、*Zb. palmae* に形質転換して相同組換えによる組み込みを行った。次に、マンノース発酵性遺伝子をエンドグルカナーゼ遺伝子に挿入した染色体組み込みベクターを作製した後、相同組換えによる染色体DNA組み込みを行った。Xtとopmを染色体DNAに組み込んだ育種 *Zb. palmae* は、一つの株で、グルコース、キシロース、およびマンノースを唯一の炭素源として利用して理論収率でエタノールを生産した。また、育種株はキシロースとマンノースの並行発酵も可能であった。

3.4 草本系バイオマスおよび大型藻類由来アラビノース発酵性賦与

バイオマス原料として草本系および非可食性の大型藻類に多く含まれるアラビノースからの2,3-ブタンジオール生産を検討した。アラビノース発酵性を賦与するためには、細胞内に取り込んだアラビノースをリブローースに異性化後、リン酸化してリブローース5リン酸へとリン酸化し、次にキシロース5リン酸に変換することでペントースリン酸化経路に導入することが出来る。そこで、大腸菌由来のアラビノースイソメラーゼ(*araA*)、リブロキナーゼ(*araB*)、リブロー-5リン酸-4-エピメラーゼ(*araD*)、トランスケトラーゼ(*tkt*)、トランスアルドラーゼ(*talA*)の遺伝子群を導入した(図16)。これら6種の酵素遺伝子を導入した *Zb. palmae* 株はアラビノースを炭素源として生育し、2,3-ブタンジオールを生産した(図19)。

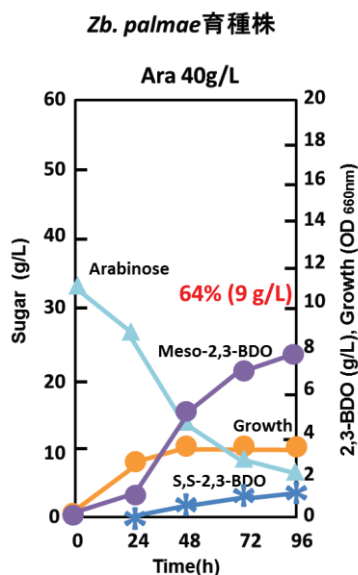


図19. アラビノースからの2,3-BDO発酵生産

3.5 バイオジオールの展望

微生物が生産するバイオジオール類には、本稿で紹介した2,3-ブタンジオールとともに、1,3-プロパンジオール、1,2-プロパンジオール、1,4-ブタンジオールが化成品基材としてリグノセルロース系バイオマス資源を原料として発酵による生産が期待されている。発酵法が石油化学産業における大量製造に近づき、追いつくためには、発酵液からのバイオジオール回収工程の高効率化も重要となる。回収法としては、蒸留回収、有機溶媒回収、イオン交換樹脂への吸着回収、などが確立されているが、新しい技術としてナノ濾過膜とイオン交換処理と組み合わせた回収法も実用化に近いとされている(図20)。バイオジオールは、バイオエタノールに比較して市場価格も1000-5000\$/tonと高く設定されており、未利用セルロース系バイオマスからの一貫製造プロセスが構築されれば、発酵法でのバイオジオール製造は商業レベルで稼働が可能になると期待している。

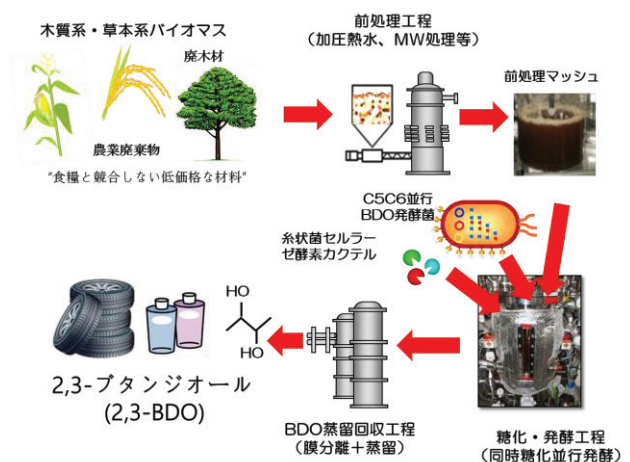


図20. 木質系・草本系バイオマスからの2,3-BDO製造プロセス

4. 化粧品/医薬品基材・超高分子ブランチ多糖

リグノセルロース系バイオマスを原料として発酵生産する第二世代バイオエタノールは輸送用代替燃料として、また、酢酸、アセトアルデヒド、ブタノール、エチレンなどの化成品製造の出発物質としても有用であるが、発酵原料としても注目されている。すなわち、エタノールは蒸留により高い純度での回収が容易なクリーンな液体であり、かつ水に混ざりやすいという優れた特性から、バイオプロセスを利用したコモディティーケミカルズやファインケミカルズの合成のための発酵原料としても期待されている(図21)。そこで、先に紹介した第二世

代バイオエタノールを原料として、より付加価値の高い、ファインケミカルズの製造ができないか、その利用の検討を開始した。微生物に報告されているファインケミカルズとしては、糖脂質、有機酸、バイオサーファクタント、ポルフィリン、イソプレノイド等がターゲット化合物となるが、筆者らは微生物が細胞外に生産する多糖体であるEPS (Exopolysaccharide)に着目した。EPSには抗癌作用、炎症作用、免疫賦活化作用、抗糖尿病作用、抗肥満作用、抗酸化作用等の多様な生理活性が知られている(表2)。また、EPSにはユニークなレオロジー特性が報告され、食品テクスチャーの改質とともに化粧品基材としての利用も報告されている。

以下に、バイオエタノールからの生理活性 EPS 生産について紹介する。なお、本研究は、平成7~12年度 METI 事業「アルコールを原料としたバイオケミカルズに関する研究開発」で実施した。



図21. バイオエタノールの工業的用途

表2. 多糖の生理活性機能と用途

生理活性機能： 抗癌作用、抗炎症作用、免疫賦活化作用、抗糖尿病作用、抗肥満作用、抗酸化作用、 抗酸化作用 等
ゲル化・レオロジーコントロール特性の利用用途： 液体の流動性改変、サスペンションの安定化、粒子の塊状化、物質の被覆、乳化物の 作製、イオン交換担体、分子ふるい担体、油の回収、船底摩擦抵抗軽減剤
微生物発酵性多糖体の用途
キサントガム (<i>Xanthomonas campestris</i> : マンノース、グルコース、グルクロン酸) 食品工業 (漬物、マヨネーズ、ドレッシング、ソース、缶詰、レトルト 食品、 冷凍即席麺、塩辛) 芳香剤
ジュランガム (<i>Pseudomonas elodea</i> : グルコース、グルクロン酸、ラムノース) 食品工業 (ゼリー、ジャム、水羊羹)、芳香剤
ウェランガム (<i>Alcaligenes sp.</i> : グルコース、グルクロン酸、ラムノース、マンノース) 農薬、ボールペン、高流動コンクリート
フルラン (<i>Aureobasidium pullulans</i> : 分岐マルトトリオース) 食品工業 (豆腐、スープの素)、医薬 (カプセル)

4.1 EPS生産微生物の検索

微生物は植物感染時のシグナル伝達やストレス環境下での耐性獲得のために細胞外に多糖を分泌して身にまとうことが報告されている。新規なEPSを生産する微生物を取得するために、ストレスを与えた環境下で生育する微生物のスクリーニングを行った。通常、微生物は中性付近で旺盛に生育するとされていることから、酸性条件下やアルカリ条件下で生育する微生物をスクリーニングした。次に、酸性やアルカリ性条件下で生育してきた微生物に対して、一般的な微生物が生育できない高濃度エタノールを単一の炭素源として生育する微生物を選択した。その結果、鳥取市内の土壌から純粋分離した *Pseudomonas stutzeri* BL58株がアルカリ条件下、エタノールを炭素源とし、高粘性の多糖体を生産することを見出しました(図22)。

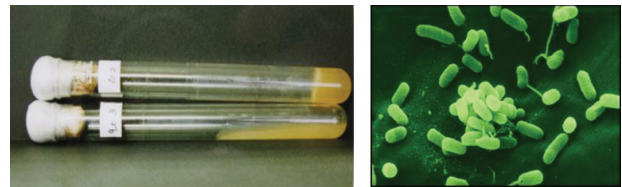


図22. EPS生産細菌の検索

4.2 EPS発酵生産の最適化

P. stutzeri BL58は高粘性の多糖を生産したが、生育速度と多糖生産性は低いものであった。そこで、多糖生産性の向上を目指し、培養条件の最適化を検討した。培地の初発 pH、培養温度、炭素源、窒素源を対象に菌の生育と多糖生産量の相関をとり、最終的に最適な培地と培養条件を設定した。その結果、培地の初発 pH は 10 付近という強アルカリ条件で、30℃、通気攪拌培養することで、5%エタノールから 12 g/L の多糖を細胞外に分泌生産することができた。さらに、商用化を目指して、培養のスケールアップを検討した。30-L 容全自動バイオリアクターを用いた多糖生産実験では、炭素源とするバイオエタノールを逐次添加することにより、短時間の培養で高収率の多糖を生産することに成功した(図23)。

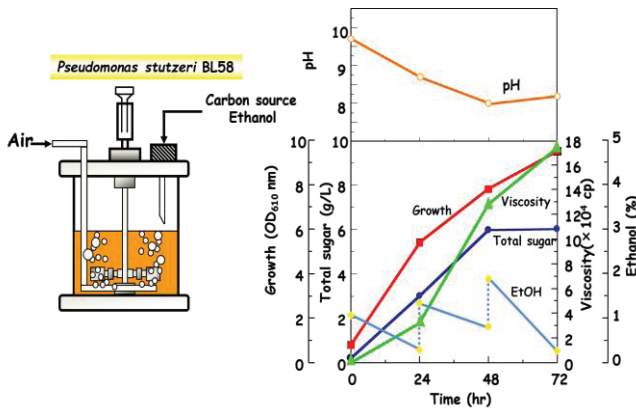


図23. バイオエタノール逐次添加による BL58 ポリマー発酵生産

さらに、*P. stutzeri* BL58 株の多糖生産に利用可能な炭素源の種類を検討した結果、リグノセルロース系バイオマス由来の難発酵性糖質であるキシロース、ガラクトース、マンノースに加え、バイオディーゼル油製造時に副産物として問題となっているグリセリンからもエタノールと同様に高収率での多糖生産が明らかになった。

4.3 EPS の精製回収

培養終了後の培養液は、非常に粘度が高く、スライムの様相を示す。一般的に、培養液中に蓄積された多糖体はアセトンやエタノールなどの有機溶媒の添加により、溶解度が変化して沈殿として回収できるが、BL58 株が生産する多糖は有機溶媒を分子内マトリックスに包括して、膨潤するために有機溶媒沈殿法が利用できない。そこで、多糖回収条件を詳細に検討し、培養液を希釈後、遠心分離により菌体を除き、その上澄みを活性炭処理、珪藻土処理後、UF膜による透析後、スプレッドライあるいは凍結乾燥法により粉末とする調製法を確立した。なお、有機溶媒を分子内マトリックスに包括する多糖の特性は、石油産業でのオイル回収添加剤として有望とされている。

4.4 EPSの物性

P. stutzeri BL58が生産する多糖精製標品 (BL58 ポリマーと称する) の暫定規格をまとめた。食品や化粧品の規格を満たす結果となった。そこで、食品物性改質のための増粘剤や化粧品基剤としての利用を想定し、レオロジー特性を評価した。BL58 バイオポリマーは水溶液ではユニークな物性を示し、0.5%溶液までは高粘調なゾルを形成し、1%以上ではエラスティック

なゲルを形成した。水溶液のゲル特性の温度による影響として、40℃以下で高粘調なゲルを形成し、40℃以上では粘性は低下した。一方、pH 変化ではむしろアルカリ側で高い粘性を示し、ボレート緩衝液中では完全なゲルを形成することが明らかになった。ユニークな BL58 ポリマーの物性は、レオロジーコントロール剤として化粧品の基剤としての開発が期待されている。

4.5 EPS の糖鎖構造解析

BL58 ポリマーユニークなレオロジー特性は、その糖鎖構造に起因する。そこで、糖鎖構造解析を行った。まず、得られた培養液から BL58 ポリマーを精製し、HPLC 分析に供した結果、その溶出パターンから分子量がおおよそ 1,800kDa の多糖体であることを確認した。次に、構成糖を、精製ポリマーの TFA による酸加水分解と加水分解物のアルジトールアセテート誘導体の GC-MS および NMR 分析により同定を検討した。糖鎖の結合様式は、精製ポリマーのメチル化誘導体を加水分解後、アルジトールアセテート化した誘導体の GC-MS 分析により決定した (図24)。また、解析中に、構成糖として未知の糖質の存在が認められたことから、精製ポリマーの部分加水分解物から未知糖質を分取後、NMR、CI-MS 等により構造を決定した。以上の解析結果から、BL58ポリマーの構成糖とその糖鎖結合を決定した。すなわち、構成糖は、4-グルコース-1 にエステル結合を、4-マンノース-1 にエステル結合を、さらに3位にエステル結合をもつグルコース、そして、未知糖質は 3-O-カルボキシエチルラムノース

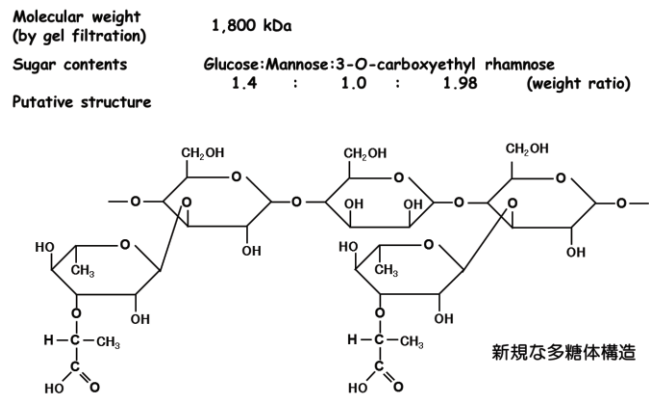


図24. BL58 ポリマーの糖鎖構造

であると結論した。構成糖比は、グルコース:マンノース:3-O-カルボキシエチルラムノースが重量比、1.4:1.0:1.98で、グルコースとマンノースが 1,4 結合したものを主鎖とし、枝分かれ構造としてグルコースの

3位の位置に3-O-カルボキシエチルラムノースがエステル結合した構造を推定した。

糖鎖構造決定から、BL58 ポリマーが新規の超高分子ブランチ多糖であることが明らかになった。

4.6 EPSの安全性試験

本多糖体の糖鎖構造として特徴的なことはグルコース、マンノースなどの中性糖に枝分かれ構造として3-O-カルボキシエチルラムノースが結合していることであり、この高分子ブランチ多糖の構造がユニークな物性とともに、新たな生理活性の発現が期待できる。そこで、化粧品基剤としての用途を目指し、基準とされる安全性試験を実施した。

① 急性毒性試験(マウス単回投与毒性試験)

BL58 ポリマーの急性蓄性値 LD50 は 1000mg/kg 以上であり、急性毒性は認められなかった

② ウサギ眼刺激性試験

10週令の日本白色種、雄ウサギ3羽を使用し、右目の結膜嚢内に検体0.1mlを点眼した。観察期間を通じて全例に炎症など変化は認められず Draize の基準による点数は0、Draize Kayand Calanda の眼粘膜刺激性の分類では Non-irritating と判定された。

③ ウサギ皮膚1次刺激性試験

10週令の日本白色種、雄ウサギ3羽を使用し、背部皮膚に検体を閉塞貼付し観察した。全観察期間を通じて全例に変化は認められなかった。全例の皮膚1次刺激性評点は0であり刺激性無しと判定された。

④ ヒト皮膚刺激性試験

パネル健常成人45名について上腕内側部にフィンチャンバーを貼付、皮膚刺激の程度を観察した。皮膚1次刺激性に関する安全性に問題はないと判定された。

⑤ 小核試験(染色体異常誘発作用試験)

ICR 雄性マウス(6週令、SPF)を1群5匹として、強制経口投与で行った。BL58 投与区は小核保有の多染性赤血球の有意な増加を示さなかった。従って BL58 は染色体異常誘発を起こさないと判定された。

⑥ Rec アッセイ(DNA修復試験)

Bacillus subtilis H17Rec⁺ 及び M45Rec⁻ を用いた。*Bacillus subtilis* H17Rec 及び M45Rec⁻ とも生育阻止帯は認められなかったことから DNA 損傷作用はないと判定された。

⑦ 環境汚染度試験(ヒメダカによる急性奉性試験)

JIS K O102:「工場排水試験方法」の魚類による急性奉性試験の項に準拠し、ヒメダカによる48hr急性奉性試験を実施した。検体の48hrLC50 (Median lethal concentration) は 100mg/L 以上であり死亡率0で毒性は見られなかった。

4.7 EPSの生理学的評価試験

医薬等への利用を想定して、BL58 ポリマーの基本的な生理活性試験を検討した。

① 抗菌性、抗ウイルス性試験

大腸菌 K12 株の増殖をバイオポリマー500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で顕著に低下した。ヒトインフルエンザウイルス (H1N1 型、H3N2 型) を MDCK 培養細胞に感染後、感染阻害を評価した結果、バイオポリマー (15.6~2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) での感染阻害活性を示した。

② 皮膚感作性抑制試験

モルモット(雌、5匹/群)の皮膚に2% DNCB と BL58 (0.1%または0.5%)のエマルジョンを塗布して皮膚感作反応を惹起させた。BL-58は皮膚感作性に顕著な抑制を示さないことが示唆された。

③ 抗原性試験

モルモットを使用した能動的全身性アナフィラキシー (ASA) 反応により検討した。陽性対照の EA (卵白アルブミン) に比べて症状発現時間の遅延と少数の症状発現を示したことにより、BL58 は弱い抗原性を持つと考えられた。

④ ヒト癌細胞増殖抑制試験

バイオポリマーの生理活性について調査するために、各種腫瘍細胞をに対する細胞増殖抑制作用について検討を行った。白血病細胞並びに肝臓系細胞を利用してバイオポリマーの細胞増殖作用をMTT試験により観察した。HL60 (急性前骨髄性白血病細胞)、U-937 (単球性白血病細胞)、HepG2 (肝癌細胞)、MRC5 (正常肺細胞) の四種類を使用した。HL60 (急性前骨髄性白血病細胞) に対しては、バイオポリマー50mg%添加72時間培養のHL60細胞はほとんどが生存し、増殖性を保持していた。一方、U937 (単球性白血病細胞) に対しては、HL60とは全く様相が異なり、50mg%ポリマーの添加で細胞の増殖は止まり、逆に初発細胞数より生存細胞数が減少した。バイオポリマー添加前後での細胞の様子は顕著で、添加後では細胞が破壊され、生存している細胞が減少しているのが明確に見られた。HL60とU937は共に白血病細胞であるが、バイオポリマーに対する感受性が明らかに異なっており、分化の方向あるいは増殖に対する情報伝達への作用機序については今後に残された課題である。HepG2 (肝ガン細胞) に対しては、50mg%のポリマー添加では、無添加に比べて65%の細胞数となり、初発細胞数に近い数に相当した。また、ポリマー添加培養後の細胞はシャーレにしっかりと接着し、細胞死は認められず、HepG2細胞の成長抑制活性が示された。

⑤ 抗炎症試験

興味深い抗炎症活性が観察された。マウスに、肺炎を誘発させる薬剤を投与して、肺炎を誘発させる系に、バイオポリマーを同時に投与して、肺の炎症を抑えるかを、解剖して観察した。その結果、薬剤を投与したマウスの肺は重篤な炎症を起こし呼吸困難となり死亡するのに対し、バイオポリマー投与では、0.4mg/kgの投与で完全に炎症を抑える事が明らかになった(図25)。抗炎症効果のメカニズム解明が課題である。

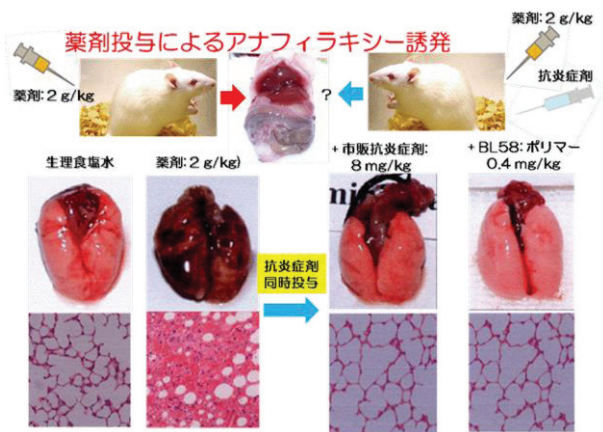


図25. BL58 ポリマーの抗炎症作用試験

4.8 超高分子ブランチ多糖の展望

鳥取市内の土壌から分離された微生物、*P. stutzeri* BL58 株が、第二世代バイオエタノールやバイオディーゼル油廃棄物であるグリセリンを原料として細胞外に著量のバイオポリマー、BL58 バイオポリマーを生産することを見出し、そのユニークな物性を利用した用途開発を検討した。用途開発のためには、BL58 ポリマーを安価に、且つ安定して供給することが重要であり、そのための最適な培養条件と調製法を検討し、大量調製のための調製法を確立するに至った。一方、BL58 バイオポリマーの用途先を食品、化粧品、あるいは医薬に求める場合には、BL58 バイオポリマーの安全性評価は大変重要な課題となる。そのためには、精製標品を対象とした安全性試験とともに、物質としての構成成分とその構造を知り、得られる知見から BL58 ポリマーの安全性を評価することも不可欠である。この様な観点から、BL58 ポリマーの未知の構成糖質を様々な機器分析により分析して、3-O-carboxyethyl rhamnose と推定して、基本糖鎖構造を明らかにすることができた。また、化粧品や食品を対象とした基本的な安全性試験では、十分な安全性を示すことができた。BL58 ポリマーの生物活性効果の

試験研究を行うい、多様な生理活性発現を明らかにすることができた。特に、炎症性細胞との関わりを検討し、BL58 バイオポリマーが血液中の好中球を活性化しないが、マクロファージを誘引することが観察されている。これらの生物活性試験結果は、BL58 ポリマーが消炎剤や抗ショック剤として大変有望であることを示唆しており、医療分野においてもその用途が期待されている。

5. おわりに

産業革命以降の化石資源の大量消費は、今日の経済基盤を構築したが、反面、地球規模での温暖化を加速させるに至った。このような社会基盤の変革を可能にする一つのテクノロジーが再生可能なバイオマス資源を原料として生物反応を活用することで従来の石油由来の製品を製造する技術、すなわちバイオリファイナリープロセスである。しかし、従来のオイルリファイナリーからバイオリファイナリーへの技術転換の実現には課題も多く、その普及を妨げているのが製造コスト問題である。原油価格が高く設定されていた数年前までは、バイオマスを原料としたバイオアルコール類の製造コストはその技術革新により石油と競争できるまでにコスト削減されていた。しかし、シェールガスやシェールオイルの増産に加え、OPEC の原油増産が引き金となり、現在の原油価格は低迷しており、バイオマス由来燃料の製造コストは大変厳しい状況にある。この様な状況を打破するために、製造対象を燃料などのコモディティーケミカルから、より高付加価値の香料、化粧品基材、医薬品原料などへと製造転換するための技術開発が国内外で盛んになっている。筆者らも、輸送用代替燃料である第二世代バイオエタノールから始まり、香料・化成品基材としてのバイオジオール、さらには医薬品への利用が期待できる超高分子ブランチ多糖など、コモディティーケミカルからファインケミカルへとターゲットを拡大し、これら化合物を未利用リグノセルロース系バイオマスから製造できる微生物細胞工場(セルファクトリー)を開発してきた。今後は、世界中のバイオテクノロジー研究者がさらなる技術革新を達成して製造コスト削減を可能にすることでバイオリファイナリー産業が成長・拡大するとともに、製品製造工程で排出される GHG が大幅に削減されることで地球温暖化防止と持続的社会的構築を実現できるものと確信している。

参考文献

- [1] Yanase, H. *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 94, 1667 (2012)
- [2] Yanase, H. *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, 73, 2592 (2007)
- [3] Yanase, H. *et al.*, *Biotechnol Lett.*, 27, 259 (2005).
- [4] Yanase, H. *et al.*, *J Biotechnol.*, 118, 35 (2005).
- [5] Kojima, M. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96, 1093 (2012)
- [6] Kojima, M. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 5137 (2013)
- [7] Hasegawa, N. *et al.*, *IEICE Transactions on Electronics E97.C*, 986 (2014)
- [8] 三谷友彦、渡辺隆司、マイクロ波プロセス技術Ⅱ、シーエムシー出版、262-272 (2013).
- [9] Watanabe, T. and T. Mitani, *The Role of Green Chemistry in Biomass Processing and Conversion*, John Wiley & Sons, 281-291 (2012).
- [10] 渡辺隆司、最新マイクロ波エネルギーと応用技術、産業技術サービスセンター、701-710 (2014).
- [11] Balat, M., *Energy Conversion and Management*, 52, 858 (2011)
- [12] Humbird, D. *et al.*, *Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover*, Technical Report, NREL/TP-5100-47764 (<http://www.osti.gov/bridge>) (2011)
- [13] Bisaria, V.S. (ed): *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, pp.169-200, WILEY, (2015)

(受理 平成 28 年 10 月 27 日)