報文

光硬化性樹脂を用いた固定化微生物によるバイオエタノール連続発酵技術の研究

Study on Continuous Bio-ethanol Fermentation Process Utilizing Recombinant Microorganism Immobilized in/on Supporting Media Composed of Photo-curing Materials

AT 研究所
第 2 研究部
高寺貴秀
Takahide
Takadera

AT 研究所
米原洋一
Yoichi
Yonehara

Summary

Bio-gasoline can be produced by introducing so-called bio-ethanol, fermented from plant derived materials, into ordinary gasoline. This bio-ethanol production in Japan, however, is still within an experimental phase. This study aims to promote such bio-ethanol production by providing innovative techniques for highly efficient fermentation process for cellulose taken from waste wooden materials. *Zymomonas mobilis* has been famous with its high fermentation speed. A couple of species of recombinant *Zymomonas mobilis* proved that they could ferment not only glucose but mannose and xylose and showed high speed fermentation by being immobilized in/on supporting media composed of photo-curing materials.

要　旨

バイオガソリンは植物由来原料から発酵させたエタノール（バイオエタノール）を混合して作られるが、国内におけるバイオエタノールの生産は未だ実験段階に留まっている。本報は、こうしたバイオエタノールの発酵プロセスに関するものであり、廃木材などを対象としてセルロースを糖に分解し、より高効率で発酵することを意図したものである。*Zymomonas*は酵母に比べて発酵速度が速いことが知られていたが、本研究においては、遺伝子組み換えにより発酵対象糖の範囲が拡大され、それらをさらに光硬化樹脂担体に包括することで高速度でのアルコール生産を可能にすることが示された。

1. 緒　言

バイオガソリンをはじめとして最近注目を集めているのが生物の作り出す有機物を利用するバイオマスエネルギーである。バイオマスエネルギーは、動植物の廃棄物や栽培作物を原料とし、産業廃棄物や生活廃棄物などを有効活用できるといった利点がある。さらに、カーボンニュートラルであり、有効な地球温暖化防止策、持続的な再生可能資源、循環型社会の形成等、多様な側面を持っており重要な役割を担っている。

我が国では廃棄物系バイオマス資源の賦存量は、原油換算で2,600万klと推定されている（平成12年度 資源エネルギー庁「バイオマスエネルギーの実態等基礎調査」）。このうち、エネルギー資源として利用されているのは、バガス、パルプ黒液等ごく僅かに過ぎず、バイオマスエネルギー転換技術の開発・実用化は喫緊の大きな課題となっている。総合資源エネルギー調査会新エネルギー部会においても、バイオマスエネルギーを2010年度までに発電・熱利用を含め原油換算で101万kl（1999年実績5.4万kl（石油換算））導入する目標を報告している。

こうした状況下、弊社は平成13年度から5年間に亘りNEDO（独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構）の委託研究に参加した。本研究は、糖・でんぷん系のエタノール発酵技術をセルロース系バイオマスに適用するための技術を開発し、実用化に目途をつけることを目的としたものである。従来の酵母を用いた単純なエタノール発酵では、単糖またはデンプンなどから分解した単糖を酵母で発酵するが、発酵可能な糖は通常グルコースのみである。本研究では、より広範なソースを有するセルロースを対象とし、その分解・発酵・精製工程の高効率化が研究され、ガソリン添加用エタノール発酵の実用化に必要な技術の提供を目指したものである。弊社の担当は、テキーラの発酵に使用される

*Zymomonas*という発酵微生物を用いた発酵プロセスを確立することである[1)~3)]。*Zymomonas*の特徴[4)~7)]は酵母に比べ数倍速いとされている発酵速度にある。発酵においては遺伝子組換え技術を用いて多種類の糖からの発酵を可能とした上で、弊社の光硬化樹脂担体を用いた発酵プロセスの検討を行った。本報ではその研究内容の一部を紹介する。

2. 研究プロジェクトの概要

セルロースソースとして木質系バイオマス（廃木材、間伐材、木工端材、農作物収穫残渣など）を対象とし、**図1**のようなスキームで研究が実施された。酵母をはじめとした微生物を用いて穀物を原料としたアルコール発酵は古来より行われているが、本プロジェクトでは、廃木材を硫酸で処理しセルロースを分解して得られる糖類を、できる限り高効率でエタノールに発酵させることを目的としている。木材中のセルロース、ヘミセルロースを分解してできる糖は、グルコース（Glc）、マンノース（Man）、キシロース（Xyl）などであるが、このうち通常の発酵微生物はグルコースしか発酵できず、分解して生成するこれらの糖類を高効率で発酵するにはマンノースやキシロースも発酵できるよう遺伝子組み替えを行う必要があった。高効率発酵達成のためには連続発酵プロセスが前提となるが、連続発酵を行うためには、微生物自身に凝集性がない場合には担体に包括または付着させる必要がある。遺伝子を組み替え、マンノースおよびキシロース発酵能を付与した*Zymomonas*には凝集性がなく、発酵を阻害しない担体として弊社の光硬化樹脂担体が選定された。なお本研究において供試された*Zymomonas*については鳥取大学より提供をうけた。

3.実　験

検討初期～中期の段階では、グルコース存在下ではキシロース（五員環糖）発酵はほとんど進行しなかった。これはグルコースを選択的に発酵するため、比較的短期間にキシロース発酵遺伝子が脱落することによると考察した。この結果をもとに、2段発酵システムを構築し、1槽目でグルコースおよびマンノースを発酵させ、2槽目でキシロース発酵させることでキシロース発酵遺伝子の脱落を防止できると判断した。

この2段発酵システムを前提とし、このシステムに適する菌株の選定を行った。鳥取大学より譲渡された各種組み換え菌体を用い，バッチ試験により各糖発酵能を評価した。この結果より1槽目、2槽目に最適な菌株を選定した。

さらに選定した菌株を用いて連続発酵試験を行い、連続発酵における発酵速度を確認した。

研究開発テーマと主担当

(1) 総合調査研究	アルコール協会
(2) 連続濃硫酸法による前処理技術の開発	日揮
(3) エタノール発酵微生物の育種研究	熊大・神大・京大・鳥大等
細胞表層提示または遺伝子組み替えによる育種	
(4) 高効率発酵技術研究	関西ペイント／熊本大学
(5) 膜濃縮プロセス研究	BNRI

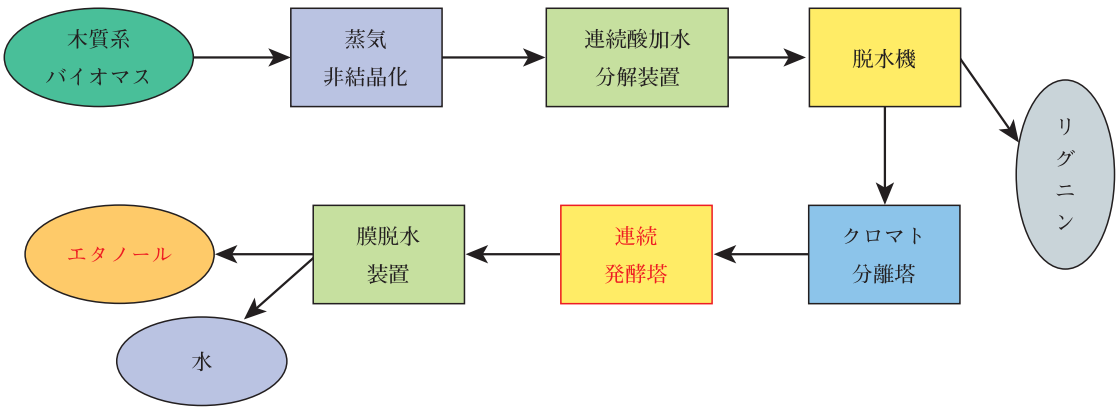

図1　研究プロジェクトの概要

3.1 菌株の選定

3.1.1 供試菌体

No.	菌株名	導入遺伝子	発酵性能＊
#1	*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx42	(*sucZE::manA,pZA22-Xyl*)	Glc＞Xyl＞Man
#3	*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx41	(*sucZE::manA,pZA22-Xyl*)	Glc＞Man＞Xyl
#4	*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx21	(*pZA22-Xyl*)	Glc＞Xyl

（＊鳥取大学データより）

3.1.2 培地

保存菌株再生培地：3wt%グルコース、1wt%キシロース、1wt%酵母エキス(Difco)、0.2wt%KH_2PO_4

生育培地 ：2wt%キシロース、0.5wt%酵母エキス、0.2wt%KH_2PO_4

RM培地 ：各種、各濃度糖、0.5wt%酵母エキス、0.2wt%KH_2PO_4

連続発酵用培地 ：8wt%グルコース、2wt%キシロース、0.5wt%酵母エキス、0.2wt%pH7.0KH_2PO_4-Na_2HPO_4

（1/15Mリン酸緩衝液）

3.1.3 光硬化樹脂包括担体の作製

光硬化樹脂/3wt%アルギン酸ナトリウム/菌体培養液 /光重合開始剤＝4/3/3/0.02（重量部）の割合で混合し、凝固液（2wt%塩化カルシウム）に滴下した後、高圧水銀灯下（紫外線ランプ）で15秒照射し担体を作製した。作製した担体はイオン交換水中で2時間撹拌洗浄した。

3.1.4 連続発酵試験

無菌状態を維持しながら培地をポンプでリアクター下部から送液する上向流嫌気性リアクター（容積60ml）を用いた。担体充填率：見かけ容積75%、培養温度26～30℃の条件下で連続試験を行い、評価を行った。連続発酵試験は2段で行った。**図2**に2段発酵の装置図を示す。

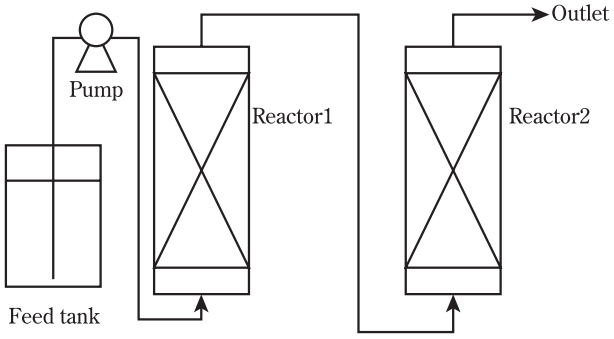

図2　2段発酵装置

3.1.5 糖濃度分析

糖濃度分析は高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）（東ソー　8020シリーズ）により定量を行った。

3.1.6 エタノール分析

エタノールの定量はガスクロマトグラフィー（ＧＣ）（島津製作所　GC-2014）により行った。

4. 結果および考察

4.1 1槽目用菌株の選定

1槽目用菌株の選定を行った。候補株としてグルコース、マンノース発酵能を 有している#1株（*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx42, *sucZE::manA, pZA22-Xyl*）　及び、#3株（*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx41, *sucZE::manA, pZA22-Xyl*）について発酵評価を行い、比較した。

培養は 保存菌株再生用培地を 調整後、フィルター 滅菌（0.2μm セルロース アセテートフィルター）を行い、培地5ml に対し 1白金耳植菌し、30 ℃ で 3～4日間静置培養を行った。生育培地をオートクレーブ滅菌（120℃、20分）後、培地50mlに対し保存菌再生液を5ml 植菌し（10％植菌）、30℃で3～4日間静置培養を行った（前培養）。オートクレーブ処理後の 各種糖、各濃度に調整したRM培地50ml に前培養液を植菌（10％植菌）し、30℃で静置培養した（本培養）。糖の減少をHPLC、エタノール生産量をGCで測定し発酵能評価を行った。#1株の結果を**図3**に、#3株の結果を**図4** に示した。

これらの結果から、#1株では、グルコース又はグルコース、マンノースを発酵後、キシロースを発酵したのに対し、#3株ではグルコース、マンノースを発酵した後にキシロースの発酵は確認されなかった。これは#3株においてキシロース発酵遺伝子が不安定であり脱落したものと推定された。グルコース･キシロース･マンノース混合糖連続発酵においてはキシロース発酵速度が律速であり、全体の発酵速度はキシロース発酵速度に依存する。また、2段発酵では1槽目発酵液が2槽目に流入するため、キシロース発酵能の脱落した菌株が流入することは2槽目のキシロース発酵において不利に作用するものと推定された。

これらのことより、1槽目の発酵槽には#1株を用いることとした。

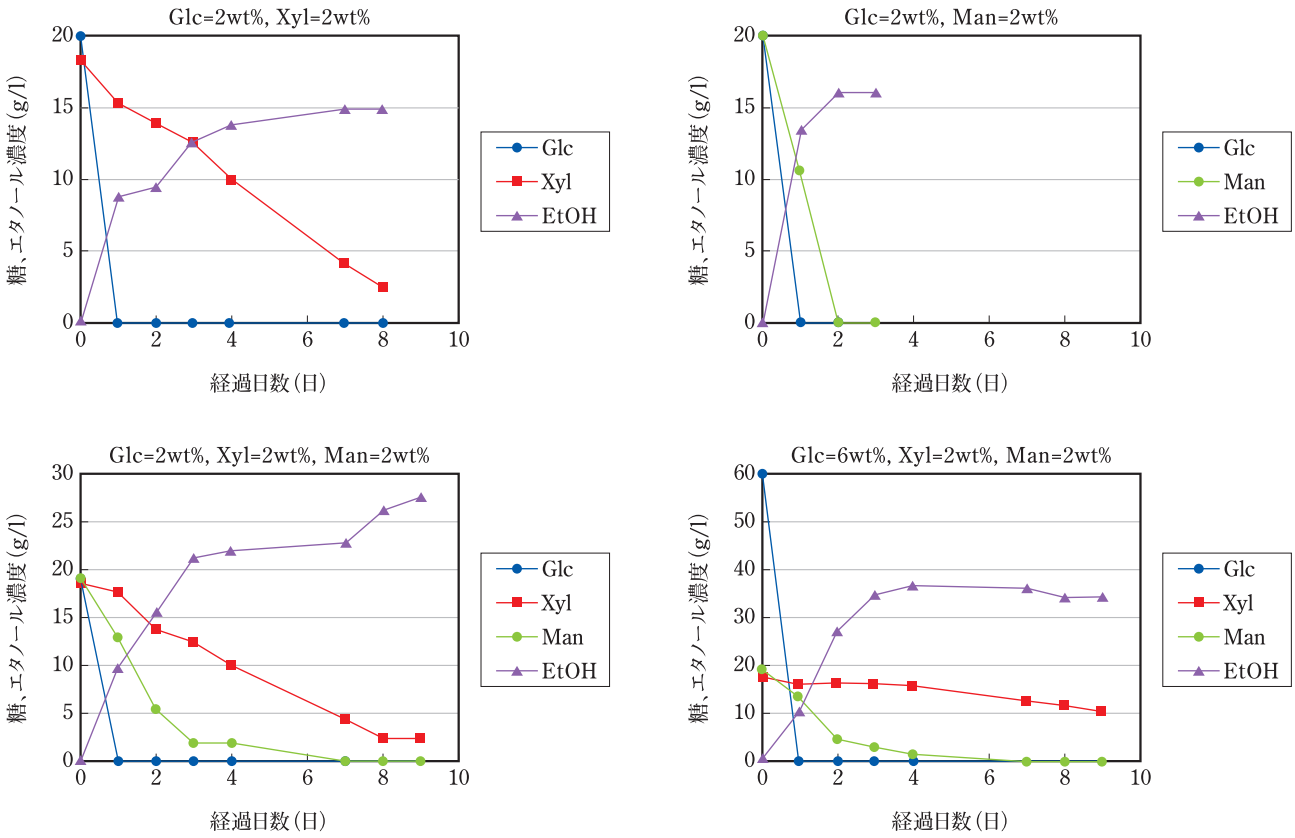

図3　＃1株（*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx42）の混合糖に対する発酵性評価

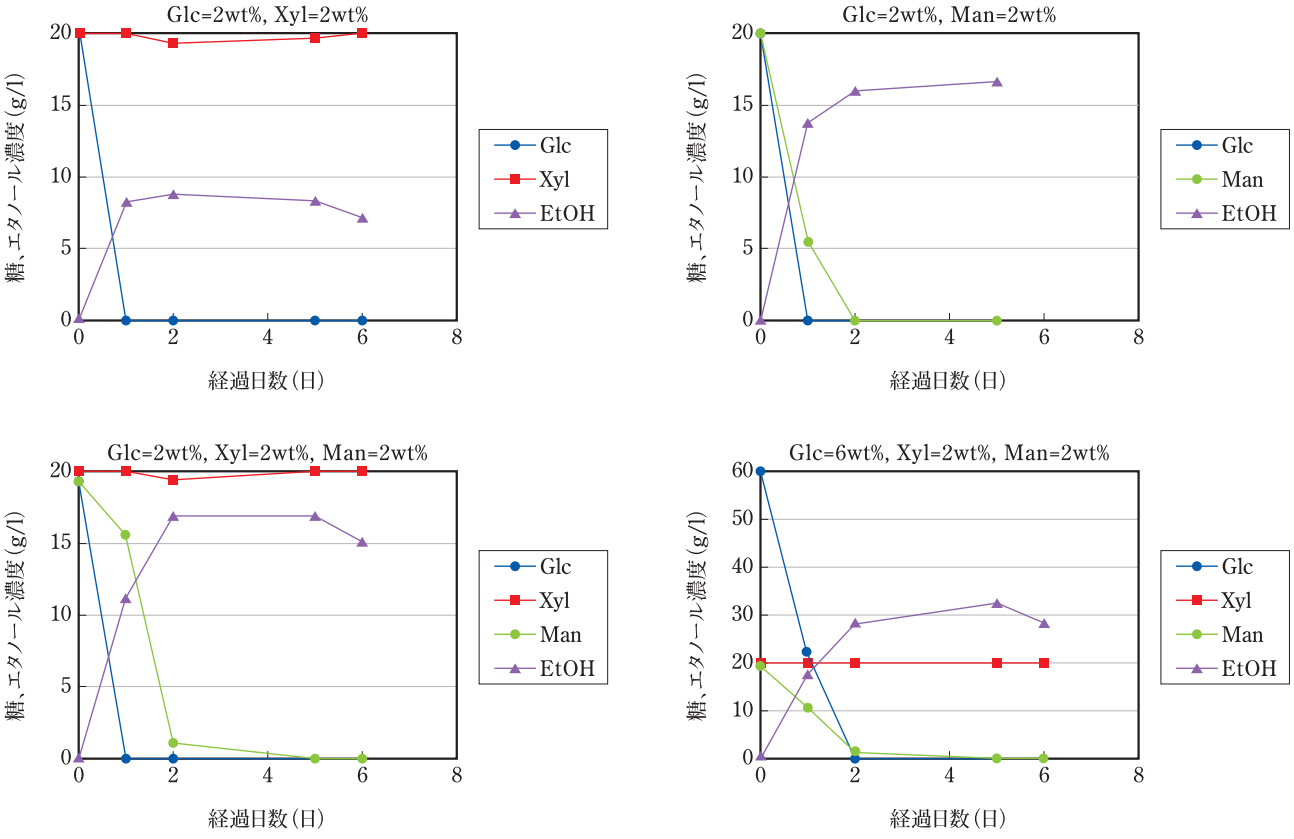

図4　＃3株（*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx41）の混合糖に対する発酵性評価

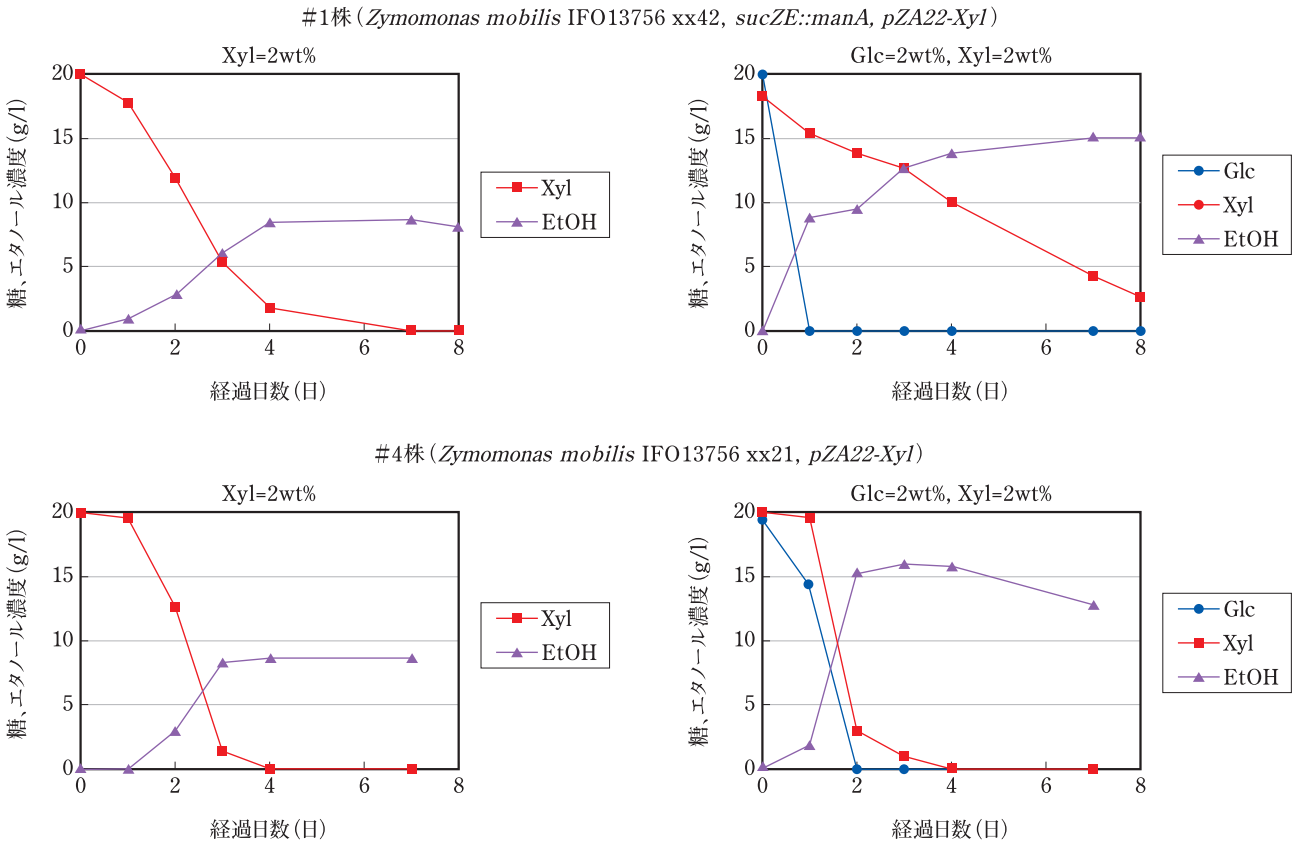

図5　＃1株および＃4株の混合糖に対する発酵性評価

4.2 2槽目用菌株の選定

2槽目用菌株の選定を行った。候補株として、キシロース発酵能を有している#1株（*Zymomonas mobilis* IFO13756 xx42, *sucZE::manA, pZA22-Xyl*）及び、#4株（*Zymomonas mobilis* IFO13756xx21, *pZA22-Xyl*）について発酵評価を行い、比較した。発酵評価は、**4.1**と同様な手順で実施した。結果を**図5**に示した。

これらの結果から、#1株及び、#4株のキシロース発酵の比較では、#4株が優れており、キシロース発酵速度が速いことが確認された。これは、#1株ではマンノース発酵遺伝子の導入が、生育及びキシロース発酵に不利に作用したと考えられる。また、グルコース･キシロース混合糖発酵において#1株では#4株に比べ、グルコースを発酵した後、キシロースを発酵するまでにより長時間を要している。これは、グルコースを選択的に発酵した結果、キシロース発酵遺伝子を部分的に脱落したものと考えられた。これに対し#4株ではキシロース発酵遺伝子がより安定に存在していると推定された。

これらのことより、2槽目のキシロース発酵では、#4株を用いることとした。

4.3 2段連続発酵プロセスの検証

4.1および**4.2**の結果を受け、1槽目に#1株、2槽目に#4株をそれぞれ包括固定化した菌体を用い、最適化した連続発酵システムの検証を行った。発酵評価は**4.1**と同様な手順で試料を調整し連続試験に供した。連続発酵試験の結果を**図6**および**図7**に示した。

図6より、1層目ではグルコースおよびマンノースが、2層目ではキシロースがそれぞれ期待通り消費されエタノールが生成していることが確認できた。また、**図7**においてエタノール生産速度をみると、運転開始から生産速度は徐々に上昇を続け、試験開始後43日でプロジェクトの目標値であるエタノール生産速度＝15g/l/hrを達成することができ、その後も安定して目標の生産速度以上で連続発酵を維持することができた。

5. 結　論

遺伝子組換え*Zymomonas*について、発酵プロセスに適合する菌株を選定し連続二段発酵での有効性を確認できた。遺伝子組換え*Zymomonas*による連続発酵は、これまで報告例が少なく、その高発酵速度の利点から実用化が期待されているところであり、貴重な研究例となるものと思われる。しかしながら、一方ではより実用に近い廃木材からの酸糖化液を用いた発酵では安定した連続発酵に課題を残しており、実用化に向けてはまだ解決すべき課題が残っていると言わざるを得ない状況である。本研究の成果を元に、バイ

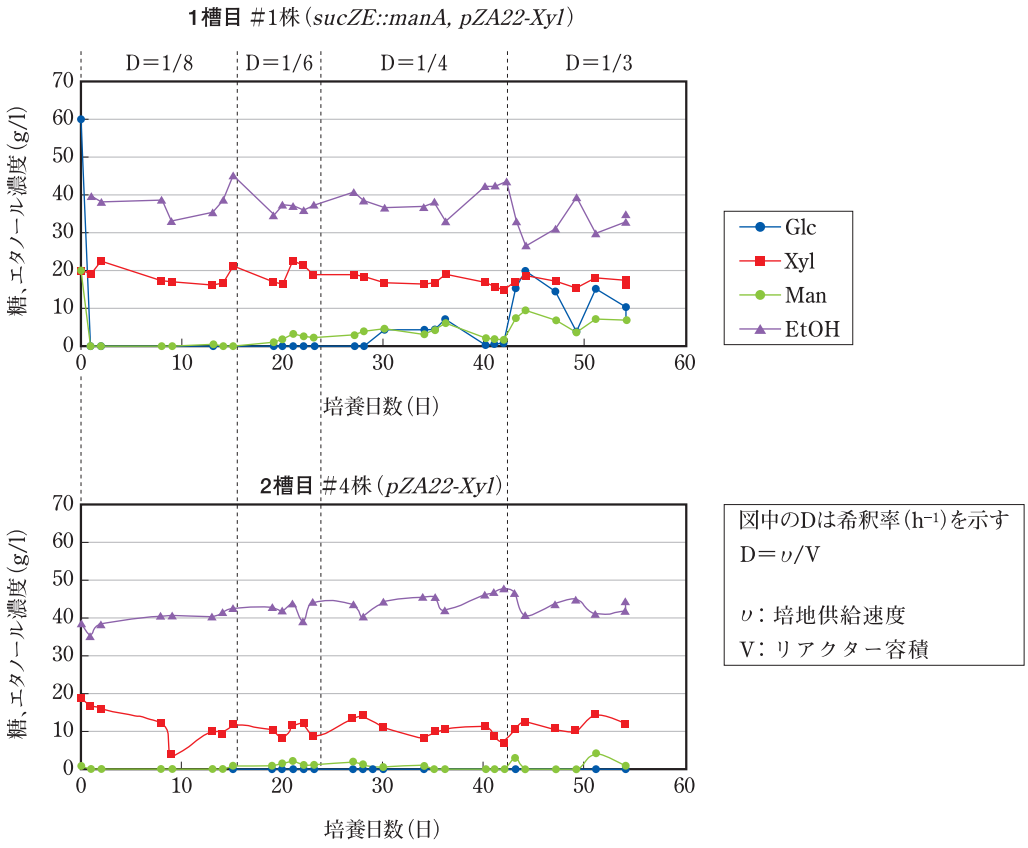

図6　連続2段発酵による糖の消費とエタノールの生成

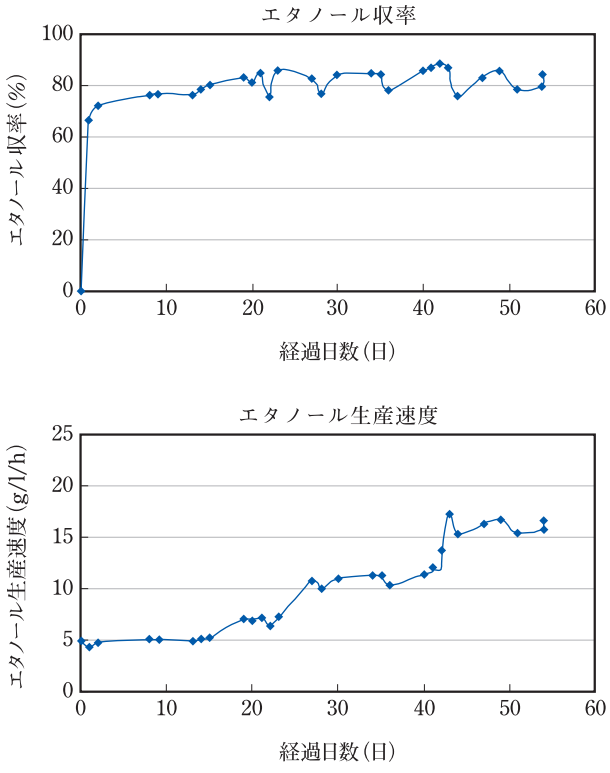

図7　連続2段発酵によるエタノール収率と生産速度

オマスエネルギー関連事業で社会に貢献していきたいと考えている。

冒頭にも記したように、本研究はNEDO（独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構）の先端的委託研究事業「バイオマスエネルギー高効率転換技術の開発」「セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール発酵技術等により燃料用アルコールを製造する技術の開発」　ーザイモモナス等による連続発酵技術に関する研究ー　として実施された。本報はその研究成果の一部を紹介したものである。菌株を提供していただいた鳥取大学簗瀬教授およびNEDOの関係者の皆様にこの場を借りて深い感謝の念を表したい。

参考文献

1）バイオマスエネルギー 高効率転換技術開発　セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール醗酵技術等により燃料用エタノールを製造する技術の開発　凝集性ザイモモナスによる連続醗酵技術に関する研究　成果報告書（2002年度）　独立行政法人　新エネルギー・産業技術総合開発機構

2）平成16年度成果報告書　バイオマスエネルギー 高効率転換技術開発　セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール醗酵技術等により燃料用エタノールを製造する技術の開発　凝集性ザイモモナスによる連続醗酵技術に関する研究　独立行政法人　新エネルギー･産業技術総合開発機構

3）平成17年度成果報告書　バイオマスエネルギー 高効率転換技術開発　セルロース系バイオマスを原料とする新規なエタノール醗酵技術等により燃料用エタノールを製造する技術の開発　凝集性ザイモモナスによる連続醗酵技術に関する研究　独立行政法人　新エネルギー･産業技術総合開発機構

4）M Reddy Kunduru and AL Pometto III. Continuous ethanol production by Zymomonas mobilis and Saccharomyces cerevisiae in biofilm reactors. J. Industrial Microbiology 16:249-256 1996

5）C. Abate, D. Callieri, E. Rodrigues and O Garro. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of Zymomonas mobilis and Saccharomyces sp. Appl Microbiol Biotechnol 45:580-583 1996

6）Flava P. Puget, Marcos R.T.Halasz, Giulio Massarani and Tito L.M.Alves. Influence of the flocculating agent in sedimentation and performance of a non flocculent strain of Zymomonas mobilis in the ethanol production process. Bioseparation 9:119-124 2000

7）T. Yamada, M.A. Fatigati and M. Zhang. Performance of immobilized Zymomonas mobilis 31821(pZB5) on actual hydrolysates produced by Arkenol technology. Appl Biochem Biotechnol 98-100:899-907 2002