

平成 26 年度  
環境研究総合推進費補助金 研究事業  
総合研究報告書

微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからの  
燃料生産  
(3K123007)

平成 27 年 3 月

筑波大学 中島 敏明

補助事業名	環境研究総合推進費補助金研究事業（平成 24 年度～平成 26 年度）
所管	環境省
国庫補助金	75,625,000 円（複数年度の総計）
研究課題名	微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからの燃料生産
研究期間	平成 24 年 6 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日
研究代表者名	中島敏明（筑波大学）
研究分担者	なし

## 目 次

総合研究報告書概要 .....	1
本文	
1 研究背景と目的 .....	10
1.1 研究背景 .....	10
1.2 研究目的 .....	11
1.3 参考文献 .....	11
2 培養方法の検討 .....	14
2.1 休止菌体法による生産の検討 .....	14
2.2 固定化菌体法による生産の検討 .....	16
2.3 浮遊菌体による連続培養法の検討 .....	16
3 培地成分の検討 .....	
3.1 各種栄養源の検討 .....	21
3.2 グリセロールの逐次添加濃度及び酵母エキス(YE)添加量の検討 .....	22
3.3 安価な栄養源の探索 .....	26
3.4 参考文献 .....	31
4 変異処理による菌株の機能向上 .....	33
4.1 UV による変異株の取得 .....	33
4.2 プロトン自殺法による変異株の取得 .....	35
4.3 参考文献 .....	39
5 エタノール生産に向けたグリセロール代謝プロファイルと代謝フラックス解析 .....	40
5.1 純グリセロールを用いた場合の代謝フラックス解析 .....	41
5.2 BDF 廃液を用いた場合の代謝フラックス解析 .....	46
5.3 純グリセロールと BDF を用いた場合でのフラックス分布の比較 .....	48
5.4 参考文献 .....	50
6 遺伝子組み換え手法による高生産変異株の創出 .....	51
6.1 代謝フラックス解析に基づく代謝キープポイントの策定 .....	52
6.2 遺伝子増強による生産性の向上 .....	56
6.3 遺伝子破壊技術の構築 .....	66
6.4 遺伝子破壊による生産性の向上 .....	71
6.5 参考文献 .....	73
7 フィージビリティースタディー .....	76
7.1 調査方法と前提条件 .....	76
7.2 試算方法 .....	80
7.3 ヒアリング調査結果 .....	80
7.4 各種条件の経済性に与える影響 .....	85
7.5 基本となる運転条件での試算と目標値 .....	92
8 パイロットスケール試作発酵槽による実証試験 .....	93
8.1 発酵槽の設計と試作 .....	93
8.2 回分培養による生産試験 .....	97
8.3 逐次添加培養による生産試験 .....	100

9	結論	104
10	研究発表	106
11	知的財産権の取得状況	108
12	研究概要図	109
13	英文概要	110

## 環境研究総合推進費補助金 研究事業 総合研究報告書概要

研究課題名：微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからの燃料生産

研究番号：3K123007

国庫補助金清算所要額：75,625,000 円（複数年度の総計）

研究期間：平成 24 年 6 月 1 日～平成 27 年 3 月 31 日

研究代表者名：中島敏明（筑波大学）

研究分担者：なし

### 研究目的

バイオディーゼル燃料(BDF)は、軽油の代替燃料として用いられるバイオマス液体燃料であり、動植物油脂を原料に作られ、カーボンニュートラルな特性をもつ。また、硫黄成分を含まないため、排気ガス中の硫黄酸化物(Sox)を低減し、大気汚染防止、地球温暖化抑制に効果的である。油脂を原料とした BDF の生産過程では、副生成物としてグリセロールが必ず生じる。このグリセロールは市場で供給過剰状態であるため用途がない。加えて現在 BDF のほとんどがアルカリ触媒法によって製造されるため、その廃液も高アルカリ性で、廃棄や再利用の妨げとなっている。

本研究ではバイオディーゼル燃料(BDF)廃液のエネルギーとしての再生技術の確立を最終目標として、研究代表者によって自然界から新たに分離された微生物、*Klebsiella variicola* TB-83D 株による BDF 廃液からのバイオエタノール生産を試みる。このための最適生産条件と微生物の育種を行うことを目的とする。

### 研究方法・結果

（培養方法の検討）

微生物による発酵生産プロセスは発酵法と休止菌体法に大別される。前者は微生物が増殖する過程の機能を利用するため、菌体増殖を伴うのが特徴であり、複雑な代謝経路を利用できる代わりに増殖するための炭素原・エネルギー源を必要とする。一方、休止菌体法では増殖の停止した、いわゆる休止状態にある微生物内部の酵素活性を利用するため、増殖のための原料は不要であるが、複雑な反応は困難である。本研究課題であるグリセロールからのエタノール生産では、その代謝ステップは単純であるとはいえないが、アミノ酸発酵などの発酵生産ほど複雑ではない。そこで、本プロセスに休止菌体法が適用できるか検証を行った。

検討の結果、休止菌体反応においてもグリセロール資化およびエタノール生産が確認された。しかし、エタノールの生産は最初の 1 日で急激に上昇し、その後はあまり増えなかった。このことから、休止菌体法によるエタノール生産性の増大は困難であると考えられた。本菌株によるグリセロールからのエタノール生産はエネルギー生成系であるため、休止菌体ではエネルギーバランスに偏りが生じ、生産が低下したと考えられる。以上の結果より、本プロセスにおいては休止菌体法ではなく、菌体増殖を伴う発酵法が適していると考えられた。

発酵法による物質生産において微生物を何らかの担体に付着（固定化）させて培養することは、菌体密度の上昇や、発酵終了後の菌体と生産物の分離、連続発酵時における wash out 防止等、多くのメリットがある。そこで、本プロセスに、固定化菌体法が適用可能か検証した。かご状に成形した金網に固定化担体として不織布をロール状に詰め、その金網を培養器の中に入れた。その後、TB-83D 株を植菌し、培養を行った。

不織布を用いない分散系と比べると、不織布系ではエタノール生産量は培養 7 日で 370mM(1.48%)までしか上昇せず、生産性の向上は認められなかった。培養液を観察すると、分散系では大きな菌体の塊はなく菌体は分散していたが、不織布系では不織布全面にべったりと菌の集団が形成されていた。おそらく菌体増殖に伴って不織布が目詰まりしたことによって、基質と菌体との接触が妨げられたため、生産が低下したと考えられる。このことから、生産を連続的、効率的に行うためには、基質との接触が効率よく行われるように、増殖した菌体密度を一定に保つことが必要であり、菌体濃度を上げることが必ずしも生産向上には結びつかないと考えられた。また、実際の BDF 廃液は不純物を多く含むため粘度が高く、不織布の目詰まりをさらに助長すると考えられる。そのようなリスクも考慮した結果、最終的に菌体の固定化は本プロセスには適さないと結論づけ、以降の検討には浮遊菌体を用いることとした。

#### （培地成分の検討）

これまでの検討結果より、本菌株は植菌量を増大させても生産は増大しないことが明らかになっている。これは培地成分等の他の要素が菌体増殖の律速となっている可能性が考えられたため、培地成分について各々検討を行い、生育の律速となっている成分について検討した。検討は、基本培地組成のうちの  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、カザミノ酸、酵母エキス（YE）について行った。培養にはミニジャーファーマンターを用い、培地中の pH を 8、グリセロール濃度を 2%におおよそ維持した。YE 添加量を増加させるか否かでエタノール生産性が大きく 2 つのグループに分かれ、YE を添加することで生産性が大きく向上することが示された。また、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  に関しては添加量を増加させても生産性の向上は見られず、場合によっては阻害効果が見られた。続いて YE 添加量の検討を行った。YE 15 g/L までは添加量依存的にエタノール生産量が増加し、最大で YE 15 g/L の時にエタノール生産量 697 mM(32g/L)に達した。しかし、さらに YE 添加量を増やしてもそれ以上のエタノール生産は見られなかった。この時点での生産物を見ると、エタノールの他にギ酸が 3%程度生産されており、ギ酸によるエタノール生産阻害の可能性が考えられた。また、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加しなくても問題ないことが示された。

これまでの結果より YE がエタノール生産に特に有効であることが示された。しかし、YE は高価であるために工業生産の現場で使用することは困難である。そこで次に、YE に代わる安価な栄養源の探索を試みた。コーンステープリカー(以下 CSL)とは、トウモロコシ粒から溶出した可溶性成分を含む浸漬液

を濃縮したもので、アミノ酸、糖類、ビタミン類などの多様な成分を含む。また、YE と比べて安価であるため、高価な栄養源の代替剤としての利用価値がある。CSL のエタノール生産量への影響を下表に示す。CSL の添加量によるエタノール生産への影響は YE と比べると低いものとなったが、YE に CSL を添加することで YE 単体よりはエタノール生産量が向上した。YE と CSL を 15g/L の濃度で添加した場合、エタノール生産量は 732.1mM (34g/L)に達した。

YE (g/L)	CSL (g/L)	Product concentrations (mM)					Consumed glycerol (mM)	Ethanol productivities (ethanol-mol/glycerol- mol)	Final OD <sub>580</sub>
		Ethanol	1,3-P D	Lactate	Formate	Acetate			
30	-	700.4	99.6	107.8	639.9	38.1	901.0	0.79	10.1
15	15	732.1	91.4	148.1	482.8	64.8	998.1	0.74	18.4
5	5	427.8	117.5	97.9	215.6	63.9	704.4	0.61	8.9
5	10	459.8	108.8	80.7	239.3	73.2	726.1	0.63	12.3
5	15	455.4	113.9	127.4	183.5	59.2	744.2	0.61	12.7
-	30	321.5	71.0	75.4	167.8	40.4	434.2	0.77	13.0

これまでのグリセロールからのエタノール生産に関する報告におけるエタノール生産量としては、組換え菌を使用しない場合においては、細菌では *Kluyvera cyocrescens* S26 によるエタノール生産量 27.0 g/L 、酵母では *Pachysolen tannophilus* CBS4044 によるエタノール生産量 28.1 g/L がそれぞれ最高値となっている。本研究においてにおいてエタノール生産量 34g/L と、これまでの世界最高値を超えることができた。

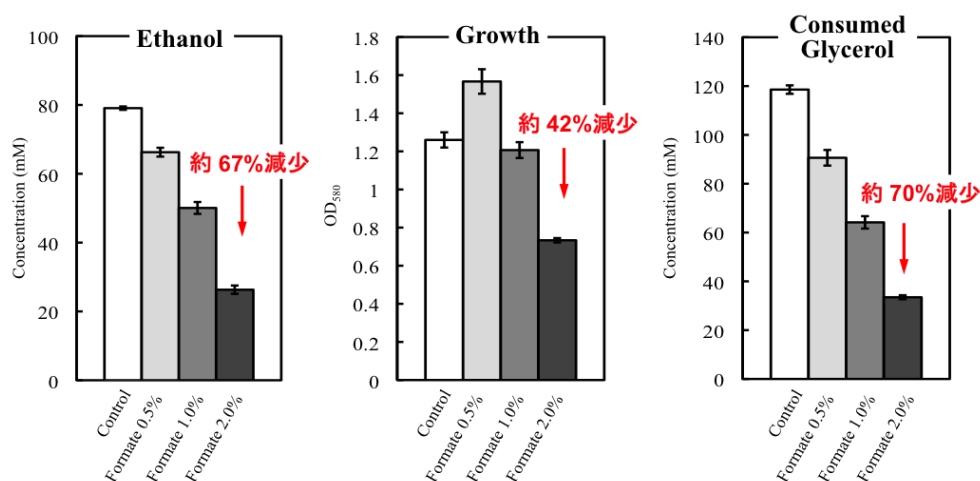
さらに、別の安価な栄養源としてメタン消化液の使用を検討した。メタン消化液とは、メタン発酵において生じる液状の残渣のことを指す。窒素やリン、カリウムといった肥料成分を多量に含んでいるため液肥としての有用性が知られている。また、有機物の分解産物及びメタン発酵に関わる細菌・メタン生成菌由来のアミノ酸やビタミンなどを多量に含んでいると考えられる。メタン消化液は基本的には廃棄物であるため安価であることから、YE に代わる安価な栄養源としての有用性が考えられた。そこで次に、メタン消化液のエタノール生産への影響を調べることにした。

その結果、メタン消化液を使用することで、YE には及ばないものの、グリセロールとメタン消化液のみから 2%以上の比較的高いエタノール生産量を達成できた。また、非滅菌のメタン消化液においても滅菌したものと同程度のエタノール生産量を示した。以上のことより、栄養源として YE の代わりにメタン消化液を使用することは、原料コスト及び滅菌コストの削減という観点から、本技術の実用化において非常に大きなメリットであることが示唆された。

#### (変異処理による菌株の機能向上)

栄養成分の検討の結果から、確かにエタノール生産の増加が確認された。しかし、栄養源の初期添加量を増加させた場合、急激に生育が起きることによって培地中の阻害物質 (エタノールもしくはギ酸) 濃

度が急上昇し、その後の生産を阻害している可能性が考えられた。本菌株(TB-83D株)は、親株であるTB-83株のストレプトマイシン耐性変異株であり、高いエタノール耐性(約7%)を持つ。現時点でのエタノール生産量は4%を下回っているため、エタノールが原因であるとは考えにくい。そのため、この原因物質はエタノール生産に同調して生産される「ギ酸」であることが強く示唆された。そこで、各濃度のギ酸を含むグリセロール基本培地を用いてTB-83D株の生育、消費グリセロールおよびエタノール生産性を調べたところ、2%のギ酸存在下でそれらは著しく減少した。これらの結果から、培養中に蓄積するギ酸が生育と生産における律速因子であることが分かった。



そこで、ギ酸による生育・生産阻害を軽減するために、TB-83D株に変異処理を施すことで「ギ酸耐性変異株」および「ギ酸生産能低下変異株」の取得を試みた。UV照射による変異導入を繰り返し行った結果、ギ酸濃度5%下で比較的生育の良い27株を選抜し、その中から3B12, 3F12, 4A6, 4A9, 5C11の5菌株をギ酸耐性候補株とした。継代培養における復帰細胞の検討を含め、これら5株を各ギ酸濃度の寒天培地上で生育を調べたところ、5%ギ酸含有寒天培地上でも良好な生育を示した。また、親株は同培地上では生育しなかった。5%純グリセロールを用いたグリセロール基本液体培地で培養を行ったところ、4A6株において親株と比べて生育およびエタノール生産性の増加が確認された。今後本菌株を使用することにより、さらなる生産性の増大が期待できる。

UV処理によるギ酸耐性変異株のエタノール生産試験の結果、親株よりも生産性が向上することが明らかとなった。しかしながら、ギ酸の生産そのものを抑制したギ酸生産能欠損株の構築も目指す必要がある。そこで、酸生産能欠損株取得法であるプロトン自殺法を適応することにより、ギ酸生産能欠損株の取得を試みた。プロトン自殺法は、発酵に伴い生成される酸による致死効果に基づく手法である。より具体的には、臭素酸( $\text{NaBrO}_3$ )と臭化物( $\text{NaBr}$ )の混合物を培地に添加して培養を行うと、発酵に伴い培地が酸性に傾く。この酸性条件下(プロトン存在下)では、培地に添加した臭素酸と臭化物の混合物は細胞致死に作用する臭素を生成するので、適切な細胞致死条件下で出現するコロニーは酸を生成しない。このことから、出現するコロニーは酸生成能に何らかの欠損を生じていることになる。故にこの方法を用いれば、ギ酸生産能が欠損した変異株を取得できると考えられた。

TB-83D株 0.1 mlを、pHを変化させかつ $\text{NaBr} : \text{NaBrO}_3 = 4 : 1$ となるように様々な濃度で添加した同培地に塗布し、30℃で48~72時間静置培養を行った。EMSで変異処理を行い選択培地にて変異株を選別した

ところ、最終的に30個の候補株を得ることができた。しかしながら、ほぼすべての株においてエタノール生産性はTB-83D株より向上せず、むしろ低下していた。

(エタノール生産に向けたグリセロール代謝プロファイルと代謝フラックス解析)

代謝フラックス解析 (Metabolic Flux Analysis: MFA) とは、ゲノムスケールでの細胞代謝ネットワークをシミュレーションした手法であり、代謝中の個々の反応ではなく代謝全体の物質循環に焦点を当てた近年脚光を浴びている解析手法である。フラックス (Flux) は「流れ」であり、まさに細胞内物質代謝における物質循環の流れを表す。代謝フラックス解析は、細胞による物質変換 (発酵や代謝) における細胞物質変換経路のボトルネックの検出や、細胞における物質循環を視覚的に理解することを可能にしている。この解析は、培養条件や培地組成の検討、代謝に関与する遺伝子の改変、すなわち効率の良い分子育種にも発展できる可能性を秘めている。また、培養のスケールアップや自動化の際に、従来よりも精密な培養制御を行うことが可能となる。

このような代謝フラックス解析を本研究に適用し、実際グリセロールがエタノールに微生物変換される際の物質の流れの追跡、各培養条件・経時時間におけるフラックスの分布を調べることで、エタノール変換主要経路を特定し、効率的な分子育種へ発展させることとした。本実験では、代謝マップの各経路に対応する代謝反応を書き下ろし、その化学量論係数と HPLC などによる測定実測値を組み合わせた「Flux balance analysis: FBA」法を用いて、フラックス分布解析のためのプラットフォームを構築した。FBA は基質の消費・生産物の生成速度を基に細胞内に流入および細胞から流出する代謝産物の流れを表現しており、代謝反応と物質収支に基づく化学量論モデルである。これを用いて、本菌株のグリセロール代謝プロファイルを純グリセロールと BDF 廃液を用いることで調べた。解析の結果、BDF 廃液を用いた場合、乳酸生産がエタノール生産に最も関与している可能性を示唆したため、ピルビン酸における乳酸フラックス比を調べたところ、pH 制御・非制御条件下ともに、純グリセロールの場合と比較して、乳酸生成フラックス比は約3倍高かった。(非制御下: 10.6% (純グリセロール) → 31.3% (BDF 廃液) 制御下: 6.5% (純グリセロール) → 22.9% (BDF 廃液)。このことから、pH 制御下で BDF 廃液からエタノール生産を行う場合、乳酸生産の抑制が必要であることがわかった。

(遺伝子組み換え手法による高生産変異株の創出)

代謝フラックス解析により、TB-83D 株のグリセロールからエタノール生産についての鍵となる物質は「ギ酸」と「乳酸」であることが強く示唆された。そこで、まず遺伝子発現による特定酵素機能の増強として、ギ酸デヒドロゲナーゼの発現によるエタノール生産中でのギ酸分解を試みた。TB-83D のギ酸代謝遺伝子は、ギ酸・水素リアーゼとして染色体上に存在しており、制御遺伝子も遺伝子の発現に関与している。その中でも特に、転写活性化因子 FhlA は、ギ酸分解に重要である Hydrogenase 3 オペロンおよびギ酸デヒドロゲナーゼ FdhF の転写を活性化する。このことから、これらの発現強化はギ酸の分解に効果的であると期待できる。

まず TB-83D 株のドラフトゲノムシーケンスから、ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の存在数を調べたところ、ゲノム上にギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のホモログが4コピー存在していた (*fdhF1*, *fdhF2*, *fdhF3*, *fdhF4*)。発現プラスミドを構築するにあたり、まずどのギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が発現しているのか

を調べる必要があった。その結果、実際に発現させる遺伝子は、ギ酸濃度が最も高く、pH 減少の log phase に相当する 24 時間で最も転写量の高かった「*fdhF3*」を用いればよいということがわかった。しかし、*FdhF3* 発現株においては、コントロールと比較してほとんど変化がなく、TB-83D 株内で活性を持たないことが示唆された。*FhlA* 発現株については、一見ギ酸濃度が減少したように見えるが、それに伴いエタノール濃度も減少しており、それらの濃度はエタノール濃度と同調していた。すなわち、実際は *fhlA* の導入はギ酸分解に影響していない。以上の結果から、グリセロール代謝中におけるギ酸分解には、異なるアプローチが必要となることが考えられた。

そこで、他菌株由来のギ酸分解酵素遺伝子のクローニングと発現を試みた。*S. cerevisiae* 由来のギ酸脱水素酵素遺伝子を TB-83D 株に導入したところ、発現は確認できたものの、ギ酸の分解に変化は見られなかった。しかし、最終的なエタノール生産量は増加した。続いて、乳酸生成に関与する L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhA*) をターゲットとして、遺伝子破壊株の構築を目指した。しかし、*Klebsiella* 属細菌は遺伝子導入効率と遺伝子破壊の為の組換え効率が著しく低く、遺伝子改変が非常に困難であることが知られていたため、まずは高効率な遺伝子破壊法の構築を行った。構築した手法を元に乳酸脱水素酵素遺伝子破壊株を作成した結果、破壊株はグリセロール消費率が増加し、エタノール生産性が向上するということが明らかとなった。

(フィージビリティスタディー)

これまでの各種検討結果より、*Klebsiella variicola* TB-83D 株による BDF 廃液からのグリセロール生産性の向上に関しては、一定の成果が得られた。今後実用化を視野に入れた検討を行うには、実際にビジネスとして立ち上げた場合のプロジェクトの実現可能性を事前に調査・検討する必要がある。さらに、一定のモデルを設定し、プロジェクトの妥当性を評価することによって、研究目標を具体的数値（生産量等）として設定することが望ましい。

BDF は、一般的に国内では廃油等から廃棄物処理業者等が生産しているケースが多い。一方、海外においては主に発展途上国等によって油糧植物から大規模に生産されている。これらの業種では前者では生ゴミからのエタノール生産やメタン発酵、後者では植物残渣からのエタノール生産が並行して稼働している場合が多い。パイロットスケールの実証試験を行った（有）鳥栖環境開発総合センターは、廃棄物処理業を主体とし、廃油からの BDF 生産及びメタン発酵による廃棄物処理を既に行っている。そこで、まずはここに BDF 廃液からのエタノール生産を組み込むことを想定してフィージビリティスタディーを行い、その結果を基に当研究の目標について明確にしておくこととした。

本事業の経済性を、製造コスト（設備建設費、運転人件費、転換コスト）、エタノール販売売上および廃グリセロール受け入れ費用から試算した。黒字化するための条件を検討した結果、設備建設費を抑えたままで収益を上げるには、①エタノール生産速度の向上、②廃グリセロールの希釈率の低下、が効果的と考えられた。試算結果では、エタノール生産速度は 2 倍程度、廃グリセロールの希釈率は約 1/2（グリセロール濃度で約 2 倍）にすることができれば、収益性への影響が大きいと推定された。

本研究の現在までの実績と、フィージビリティスタディーの初期設定条件を比較すると、設定条件である BDF 廃グリセロール 20 倍希釈（初期グリセロール濃度 2%）、4 日間の滞留時間に対して、ラボスケールにおいて初期グリセロール 5%を約 2 日間でほとんどエタノール(約 2.5%)に変換できる。さらに逐

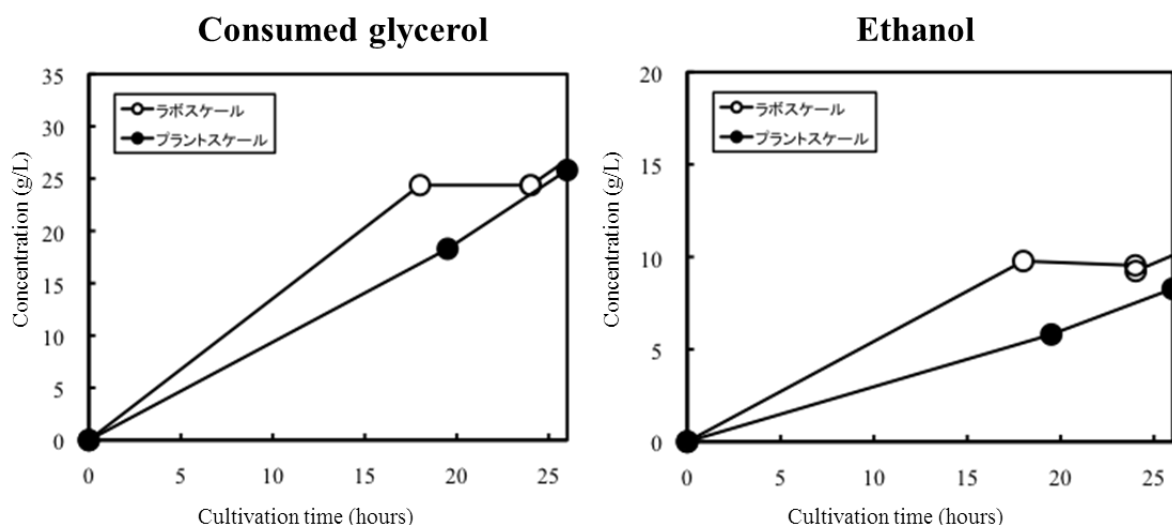
次添加においては4日程度まで維持可能であり、その場合の最終エタノール濃度（3.4%）から逆算すると、原料グリセロール約7%を4日間でエタノールに変換したことになる。蒸留段階を考慮するとぎりぎりの濃度であるが、少なくともラボスケールでは上記の試算をほぼクリアすることができた。設備投資においては、既存遊休設備の有効利用等を考慮すれば、さらに公的資金に頼らずとも収益をあげることが可能であると思われた。

#### （パイロットスケール試作発酵槽による実証試験）

最後に、これまでの研究成果を元に実証試験用のプラントを制作し、パイロットスケールでの実証試験を行った。エタノール生産用試作発酵槽は、有限会社 鳥栖環境開発総合センター（佐賀県鳥栖市轟町）敷地内に設置した（幅 4 m × 奥行き 1.5 m）。この試作発酵槽と同敷地内に BDF 製造装置およびメタン発酵槽が設置してあることから、培養に用いる BDF 廃液およびメタン消化液をすぐ供給することができる。



フィージビリティスタディーにおける初期設定値を念頭に、ラボスケールで検討した酵母エキス (YE) 培地を用いて回分培養によるエタノール生産を行った。その結果、消費グリセロール、エタノール生産ともに、ラボスケールと比較すると若干低下したものの、ほぼ同様の生産性を有していたことから、ラボスケールの検討結果がプラントスケールにおいても応用可能であることが示唆された。しかし、培養基材として非滅菌のメタン消化液を用いる場合、使用する消化液のロットによっては深刻な雑菌汚染を引き起こすことも明らかになり、この点については今後十分に検討する必要があると結論づけた。



## 環境政策への貢献

バイオディーゼル燃料(BDF)は、軽油の代替燃料として用いられるバイオマス液体燃料であり、動植物油脂を原料に作られ、カーボンニュートラルな特性をもつ。しかし、油脂を原料とした BDF の生産では、副生成物としてグリセロールが生じる。この反応は通常、アルカリ触媒法によるため、その廃液も高アルカリ性であり、有害かつ危険な廃棄物となる。

一般的にバイオマスエネルギーは再生可能であるだけでなく、環境に優しいというイメージで認知されており、その生産、利用においては危険な廃棄物を生じることが好ましくない。このため、その中間生産物、廃棄物の安全な有効利用法（ゼロエミッション化）が求められる。本研究では代表者が新たに自然界から取得した *Klebsiella variicola* TB-83D 株による BDF 廃液からのバイオエタノール生産を試みた。本研究の成果より、その生産性は最高で研究開始時の約 2 倍（34 g/L）と、同様の研究では世界最高の生産量を持つに至った。また、生産性は劣るものの、培地を廃棄物であるメタン消化液のみで作成することにも成功した。これは、BDF 生産のゼロエミッション化に大きく貢献すると考えられる。

## 研究成果の実現可能性

フィージビリティスタディーを行った結果では、本研究の現在までの実績と、フィージビリティスタディーの初期設定条件を比較すると、蒸留段階を考慮するとぎりぎりの濃度であるが、少なくともラボスケールでは上記の試算をクリアすることができた。設備投資においては、既存遊休設備の有効利用等を考慮すれば、さらに公的資金に頼らずとも収益をあげることが可能であると思われる。今回は親株を用いて検討したが、現在 UV 変異によりギ酸耐性を持ち、エタノール生産性の向上した株の取得に成功している。さらに本研究にて構築した高効率な遺伝子破壊法を元に乳酸脱水素酵素遺伝子破壊株を作成した結果、グリセロール消費率が増加し、エタノール生産性が向上した破壊株を得ている。この成果は遺伝子組換え技術によるものであるもので、直ちに実用化できるものではないが、変異株等の取得等、今後の育種のターゲット設定において重要な意味を持っている。なお、*Klebsiella* 属細菌はエタノール生産だけではなく、種々の嫌気代謝産物の発酵生産に広く用いられており、その効率的な遺伝子破壊法の確

立は、*Klebsiella* 属細菌を扱う研究者にとって極めて有用な手法であると考えられる。最後に、本研究において、パイロットスケールとラボスケールの結果はほぼ一致したことから、今後はラボスケールの検討のみでも、ある程度大規模培養のシミュレーションが可能であると考えられる。

## 結論

本研究ではバイオディーゼル燃料(BDF)廃液のエネルギーとしての再生技術の確立を最終目標として、研究代表者によって自然界から新たに分離された微生物、*Klebsiella variicola* TB-83D 株による BDF 廃液からのバイオエタノール生産を試みた。本菌株の培養方法について検討した結果、酵母エキス(YE)とコーンステープリカーの添加によりエタノール生産量は 34g/L に達し、研究開始時の 2 倍の生産量を達成した。この生産量は非組換え菌によるグリセロールからのエタノール生産では現時点での世界最高値であり、同分野では最も実用化に近いものであった。また、さらに安価な栄養源としてメタン消化液を用いたところ、ある程度の生産が認められ、その一部は YE と代替可能であることが示された。さらに、UV 変異により、ギ酸耐性を持ちエタノール生産性の向上した株を得ることができた。今後はこれらの変異株による生産性の向上が期待される。

続いて、代謝フラックス解析を行い、本菌株におけるグリセロール代謝とエタノール生産に関する代謝フローを明らかにした。これはグリセロールを出発物質とした代謝フラックス解析における世界初の実施例であり、これに用いた技法は今後様々な物質（廃棄物等、一般的ではない原料）を出発点とした発酵生産における代謝フラックス解析に応用可能な手法としての利用が期待される。なお、*Klebsiella* 属細菌はエタノール生産だけではなく、種々の嫌気代謝産物の発酵生産に広く用いられており、その効率的な遺伝子破壊法の確立は、*Klebsiella* 属細菌を扱う研究者にとって極めて有用な知見であると考えられる。

これまでに BDF 廃グリセロールからのエタノール生産において、数 100L 規模のスケールでの検討は報告されておらず、今回のデータは今後の同分野の研究において貴重なものである。本研究において、パイロットスケールとラボスケールの結果はほぼ一致したことから、今後はラボスケールの検討のみでもある程度大規模培養のシミュレーションが可能であると考えられる。本研究では培養条件の検討のみで初期の 2 倍の生産量を達成している。今後の育種方針についても代謝フラックス解析からそのターゲットが絞られているので、効率の良い改良が可能であると思われ、更なる生産性の向上も期待できる。

# 1 研究背景と目的

## 1.1 研究背景

バイオディーゼル燃料(BDF)は、軽油の代替燃料として用いられるバイオマス液体燃料であり、動植物油脂を原料に作られる。また、含酸素燃料であることから燃焼効率がよく、一酸化炭素や黒煙粒子の低減にも効果的であるうえ、硫黄成分を含まないため、排気ガス中の硫黄酸化物(Sox)を低減し、大気汚染防止、地球温暖化抑制に効果的である。我が国においては、廃食用油を原料とした BDF 生産が自治体や NPO が中心となって実施されている。製造された BDF を市営バスなどの燃料に使用することで、地域内での循環型社会形成を目指した取り組みが行われている(1)。日本国内の廃食用油発生量は年間 45 万トンであるが、このうち 18 万トンについては未利用である。この未利用分を BDF 生産に用いることが可能であれば、日本における BDF 生産普及の潜在的可能性はあると考えられる。現在、BDF をディーゼルエンジンに供給するため法整備等が進められているとともに、東南アジアで生産されているパームオイルからの BDF 生産・輸入も検討されている(2)。

BDF の中で現在最も一般的なものは動植物油脂を原料に作られる脂肪酸メチルエステル(FAME)であり、油脂の主成分であるトリグリセライドをアルカリなどの触媒存在下でメタノールとエステル交換反応させる方法が用いられている(3, 4)。製造における反応過程を図 1-1 に示す。この反応において、副生成物としてグリセロールが生じる(5, 6)。グリセロールは精製して医薬品の原料として売却することもできるが、精製にかかるコストは莫大であるうえに、グリセロール市場は供給過剰状態であるため、非常に安価でしか取り引きされない。また、国内の BDF 製造は主に廃油を使用しているため、その用途はほとんどない。さらに、アルカリ触媒法による BDF の製造は高温高压条件が不要で簡便なため多用されているが、その廃液は高アルカリ性であるため、廃棄や再利用の妨げとなっている。これらのことから、廃グリセロールは再利用されることなく、コストをかけて焼却処分されているのが現状である。

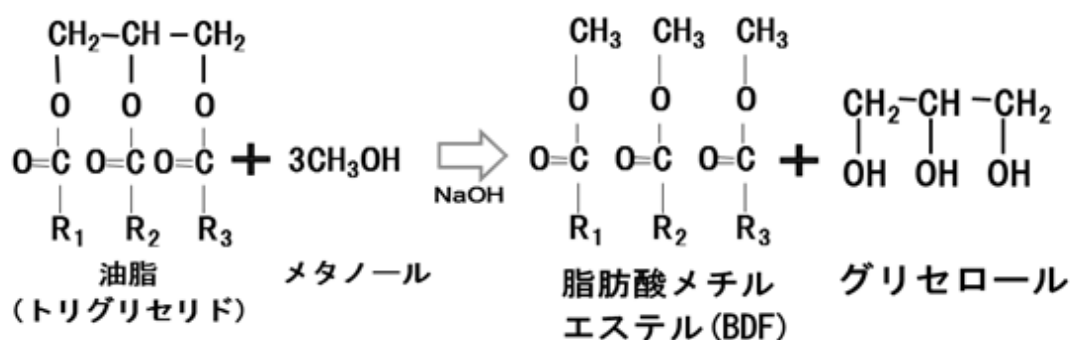


図 1-1 バイオディーゼル燃料の製造過程

BDF の製造において副生される廃グリセロールは、原料油脂に対し約 10%生産される。全世界の BDF 生産量は、2004 年の 20 億 L から 2012 年には 225 億 L と 10 倍以上も増加しており(7)、この BDF 製造増加に伴い廃グリセロールの世界生産量は年間 200 万トンを超えた。このように国内及び世界各国での BDF 生産は今後さらに拡大すると見込まれているため、廃グリセロールの有効利用は重要な課題である。

## 1.2 研究目的

廃グリセロールの利用方法として、微生物を活用した廃グリセロールからの有用物質生産に関する研究が進められている。現在までに、微生物によるグリセロールからの物質生産として、1,3-プロパンジオール、1,2-プロパンジオール、ブタノール、エタノール、コハク酸、プロピオン酸、クエン酸、乳酸、ポリヒドロキシアルカン酸など、様々な物質に関する報告がある(8, 9)。なかでも、1,3-プロパンジオール(1,3-PD)に関しては、主に高機能性ポリマーの原料として古くから研究が行われており、BDF 廃液を用いたバイオプロセスによる 1,3-PD の大量生産が検討されている(8)。しかし、上記に挙げた 1,3-PD などの生産物質の多くはプラスチックなどのポリマー原料としては有用であるが、燃料である BDF とは流通経路が異なり、BDF 生産プラントとの併設は現実的ではない。このため、施設外への危険な高アルカリ性廃液の移動が必要で、安全管理の点から問題が多い。そこで本研究では、BDF 廃液からのバイオエタノール生産を試みる。エタノールは BDF と同様、次世代環境調和型燃料として高い需要があり、両者共に自動車の燃料として流通経路も共通している。また、メタノールの代替として BDF 生産にも使用可能である(10)。BDF 生産に関して一般的には、国内では廃油等から廃棄物処理業者等が生産しているケースが多い。一方、海外においては主に発展途上国等によって油糧植物から大規模に生産されている。これらの業種では、前者では生ゴミからのエタノール生産やメタン発酵、後者では植物残渣からのエタノール生産が並行して稼働している場合が多い。ここに BDF 廃液からのエタノール生産を組込むことは、他の物質を生産させる場合と比較して初期投資や販路の開拓に関わるコスト低減に繋がり、導入の促進が行いやすいことが考えられる。特に、前者の廃棄物処理施設においては地域規模でのゼロエミッション化につながり、廃棄物をほとんど出さない生産現場でのバイオマスエネルギーの低負荷・高効率生産が可能となると考えられる。

本研究では BDF 廃液のエネルギーとしての再生技術の確立を最終目標として、BDF 廃液からのバイオエタノール生産を試みる。研究代表者はこれまでにグリセロール資化性のエタノール生産菌である *Klebsiella variicola* TB-83D 株を取得しており、本研究ではこの菌株を使用することとした。TB-83D 株は、グリセロールから主生産物としてエタノールを、副生産物として 1,3-PD や乳酸、酢酸、ギ酸などを生産することが分かっている。次に、この菌株の大きな特徴として、弱アルカリ条件下及び実際の BDF 廃グリセロールを用いた場合に高いエタノール生産を示すことが挙げられる。これまでのグリセロールからのエタノール生産の報告を見ると、その多くにおいて培地 pH は中性で行われている(11, 12)。BDF 廃液は高アルカリ性であるため、そのまま使用しては培地がアルカリ性になってしまい、中和に大量のコストが必要となる。それに対して、本菌株はアルカリ条件で高い生産性をもつため、BDF 廃液の中和コストの削減ができるというメリットを持つ。また、基質として純グリセロールと BDF 廃グリセロールを比較すると、一般的に BDF 廃液では生育や物質生産量阻害が見られることが知られている (13, 14)。対して本菌株は、実際の BDF 廃液を用いた場合に高いエタノール生産を示す。これらの理由から TB-83D 株は廃グリセロールからのエタノール生産の実用化に当たり、大きなメリットを持っている。

## 1.3 参考文献

1. 環境省 「一般廃棄物に係る新基準策定調査報告書」

<http://www.env.go.jp/recycle/report/h19-01/>

2. 環境省 「平成 21 年度中国における都市交通環境汚染対策コベネフィット CDM 事業化調査業務報告書」  
<http://www.env.go.jp/air/report/h22-01/index.html>
3. Eggersdorfer M, Meyer J, Eckes P. 1992. Use of renewable resources for non-food materials. FEMS Microbiol. Rev. 103, 355-364.
4. Chowdury J, Fouky K. 1993. Vegetable oils: from table to gas tank. Chem. Eng. 100, 35-39.
5. Vicente G, Martinez M, Aracil J. 2004. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. Bioresour. Technol. 92, 297-305.
6. Du W, Xu Y, Liu D. 2004. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation. Biotechnol. Appl. Biochem. 38, 103-106.
7. REN21 Renewables Global Status Report 2013(自然エネルギー世界白書) <http://www.ren21.net/>
8. Clomburg JM, Gonzalez R. 2013. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. Trends Biotechnol. 31, 20-28.
9. Dobson R, Gray V, Rumbold K. 2012. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. J. ind. Microbiol Biotechnol. 39, 217-226
10. Zanin FG, Macedo A, Archilha MV, Wendler EP, Dos Santos AA. 2013. A one-pot glycerol-based additive-blended ethyl biodiesel production: a green process. Bioresour. Technol. 143, 126-130.
11. Choi WJ, Hartono MR, Chan WH, Yeo SS. 2011. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1255-1264.
12. Durnin G, Clomburg J, Yeates Z, Alvarez PJ, Zygorakis K, Campbell P, Gonzalez R. 2009. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. Biotechnol. Bioeng. 103, 148-161
13. Sarma SJ, Brar SK, Bihan YL, Buelna G, Soccol CR. 2014. Mitigation of the inhibitory effect of soap by magnesium salt treatment of crude glycerol – A novel approach for enhanced biohydrogen production from the biodiesel industry waste. Bioresour. Technol. 151, 49-53.
14. Nguyen ADQ, Kim YG, Kim SB, Kim CJ. 2013. Improved tolerance of recombinant *Escherichia coli* to the toxicity of crude glycerol by overexpressing trehalose biosynthetic genes (*otsBSA*) for the production of  $\beta$ -carotene. Bioresour. Technol. 143, 531-537.

15. Liu X, Jensen PR, Workman M. 2012. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresour. Technol.* 104, 579-586.
16. Oh BR, Seo JW, Heo SY, Hong WK, Luo LH, Joe MH, Park DH, Kim CH. 2011. Efficient production of ethanol from crude glycerol by a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain. *Bioresour. Technol.* 102, 3918-3922.
17. Oh BR, Seo JW, Heo SY, Hong WK, Luo LH, Kim S, Kwon O, Sohn JH, Joe MH, Park DH, Kim CH. 2012. Enhancement of ethanol production from glycerol in a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain by the inactivation of lactate dehydrogenase. *Process Biochem.* 47, 156-159.

## 2 培養方法の検討

### 2.1 休止菌体法による生産の検討

微生物による発酵生産プロセスは発酵法と休止菌体法に大別される。前者は微生物が増殖する過程の機能を利用するため、菌体増殖を伴うのが特徴であり、複雑な代謝経路を利用できる代わりに増殖するための炭素原・エネルギー源を必要とする。一方、休止菌体法では増殖の停止した、いわゆる休止状態にある微生物内部の酵素活性を利用するため、増殖のための原料は不要であるが、複雑な反応は困難である。本研究課題であるグリセロールからのエタノール生産では、その代謝ステップは単純であるとはいえないが、アミノ酸発酵などの発酵生産ほど複雑ではない。そこで、本プロセスに休止菌体法が適用できるか検証を行った。

なお、本研究では当初 *Klebsiella variicola* TB-83 株、84 株を用いることとしたが、検討の結果、TB-83 株の方が TB-84 株と比較して高い生産速度を示し、かつ乳酸や 1,3-プロパンジオール等の副産物をほとんど生じないため、エタノール生産には最適であると判断した。さらに、本菌株のストレプトマイシン耐性変異株である TB-83D 株が、高いエタノール耐性（7%程度）と、親株に対して若干高いエタノール生産性を持つことが明らかにされている。そこで、今後の検討には特に必要のない限り TB-83D 株を用いることとした。

#### 【材料と方法】

##### 供試菌株

供試菌株としては *Klebsiella variicola* TB-83 株のストレプトマイシン耐性株である TB-83D 株を用いた。本菌株は親株（5%）と比較して高いエタノール耐性（7%）を有している。Nutrient Broth (NB) 寒天培地で前培養した TB-83D 株 1 白金耳を、生理食塩水 1mL に入れよく攪拌した。この菌液 500  $\mu$ L を 1%グリセロール基本培地（表 2-1）200mL の入った三角フラスコに 2 つにそれぞれ移し、25℃で静置培養した。2 日間培養後、50mL 容ファルコンチューブを用いて遠心して上清を除き、菌体を回収した。その後、各種緩衝液で 1 回洗浄し、同緩衝液に懸濁して休止菌体を作成、4℃で保存した。

表 2-1 グリセロール基本培地

	(g/L)
Glycerol	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10.0
NH <sub>4</sub> Cl	1.0
Casamino acid	1.0
Yeast extract	0.5

次に、2%のグリセロールを含む 100mM の各種緩衝液 30ml に上記菌体を OD<sub>580</sub> で 4.0 となるように加え、25℃で静置培養した。なお、初期 pH はすべて 9.0 とした。その後、経時的に培養液を 1mL 採取し、生育量(OD<sub>580</sub>)、pH の測定および上清を HPLC 分析に供した。実験は 3 連で行った。

### 【結果と考察】

緩衝液としてリン酸カリウム、リン酸カリウムーリン酸ナトリウム、MOPS、炭酸緩衝液を用い、休止菌体によるエタノール生産について検討した。また、緩衝液の代わりにグリセロール濃度を 2%とした基本培地を用いたものについても同様に検討を行った。

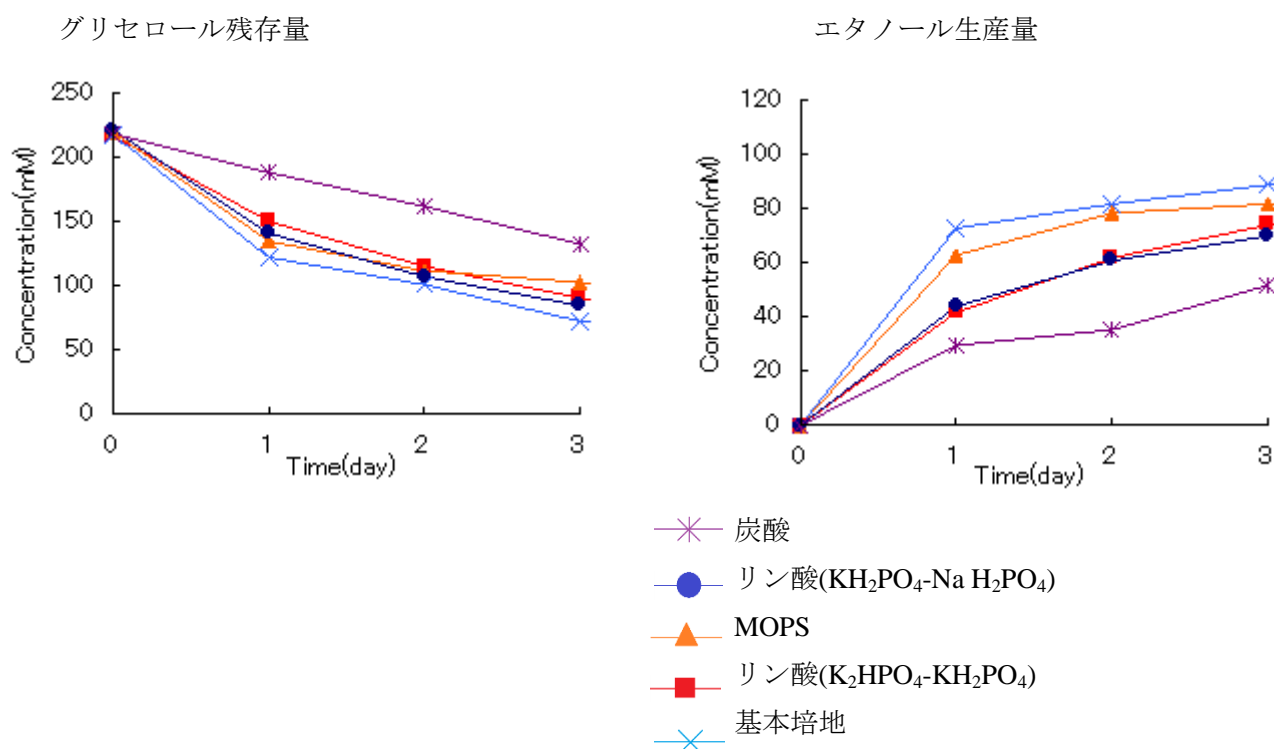


図 2-1 各培養液における生育量、pH、グリセロール残存量、エタノール生産量の経時変化

図 2-1 に示したように、休止菌体反応によるグリセロール資化およびエタノール生産が確認された。しかし、エタノールの生産は最初の 1 日で急激に上昇し、その後はあまり増えなかった。なお、これまで行ってきた通常の培養法による生産(グリセロール濃度を 2%とした基本培地を用い、植菌量を OD<sub>580</sub>=0.01 に調整)では 3 日目までグリセロール消費量約 120mM、エタノール生産量は約 90mM となることが確認されている。このことから、休止菌体法によるエタノール生産性の増大は困難であると考えられた。本菌株によるグリセロールからのエタノール生産はエネルギー生成系であるため、休止菌体ではエネルギーバランスに偏りが生じ、生産が低下したと考えられる。反応初期において生産が認められたのは、おそらく菌体調製時の培地成分の持ち込み、または菌体内の貯蔵物質による増殖が起こったものと思われる。以上の結果より、本プロセスにおいては休止菌体法ではなく、菌体増殖を伴う発酵法が適していると考えられた。

さらに、今回基本培地を用いた系に着目すると、初期 OD<sub>580</sub> を 4.0 と、植菌量をこれまでの 400 倍に増大させたにも関わらず、グリセロール消費量・エタノール生産量はむしろ低下した。このことから初期植菌量を増やしても生産は増大しないことが明らかになった。本菌株の増殖には培地成分等の他の要素が律速となっている可能性が考えられる。

## 2.2 固定化菌体法による生産の検討

発酵法による物質生産において微生物を何らかの担体に付着（固定化）させて培養することは、菌体密度の上昇や、発酵終了後の菌体と生産物の分離、連続発酵時における wash out 防止等、多くのメリットがある。そこで、本プロセスに、固定化菌体法が適用可能か検証した。

### 【材料と方法】

供試菌株としては *Klebsiella variicola* TB-83D 株を用いた。かご状に成形した金網に固定化担体として不織布をロール状に詰め、その金網を培養器の中に入れた。培養器をオートクレーブ滅菌後、滅菌した 5% グリセロール基本培地 900mL を培養器に入れた。その後、NB 寒天培地で生育させた TB-83D 株 1 白金耳を生理食塩水 1mL に懸濁し、菌液全量を培養液に植菌した。次に、pH コントローラーとペリスタポンプを用いて 1N NaOH を培養液に滴下し、培地 pH を 8 付近に保った。そして、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しつつ、25℃で培養した。経時的にシリンジを用いて培養液約 1mL 採取し、生育量の測定と上清の HPLC 分析を行った。

### 【結果と考察】

結果を図 2-2 に示す。不織布を用いない分散系と比べると、不織布を用いた場合に最終的なエタノール生産量が 1.17 倍向上した。不織布には菌体が高密度に付着しており、担体上で菌体が増殖していることが確認された。しかし、それ以上の生産性の向上は認められなかった。

## 2.3 浮遊菌体による連続培養法の検討

これまでの結果より、本菌株を用いた BDF 廃液からのエタノール生産には浮遊菌体による発酵法が適すると考えられた。この場合菌体濃度を一定に保つためには、菌体を連続的に除去する必要がある。また、生産を効率的に行うためにも、基質の添加と生産物の回収を連続的に行うことが望ましい。そこで、連続培養法による生産プロセスの適用を検討した。さらに、これまでの検討結果より、本菌株は植菌量を増大させても生産は増大しないことが明らかになっている。これは培地成分等の他の要素が菌体増殖の律速となっている可能性が考えられたため、培地成分の添加についても検討を行った。

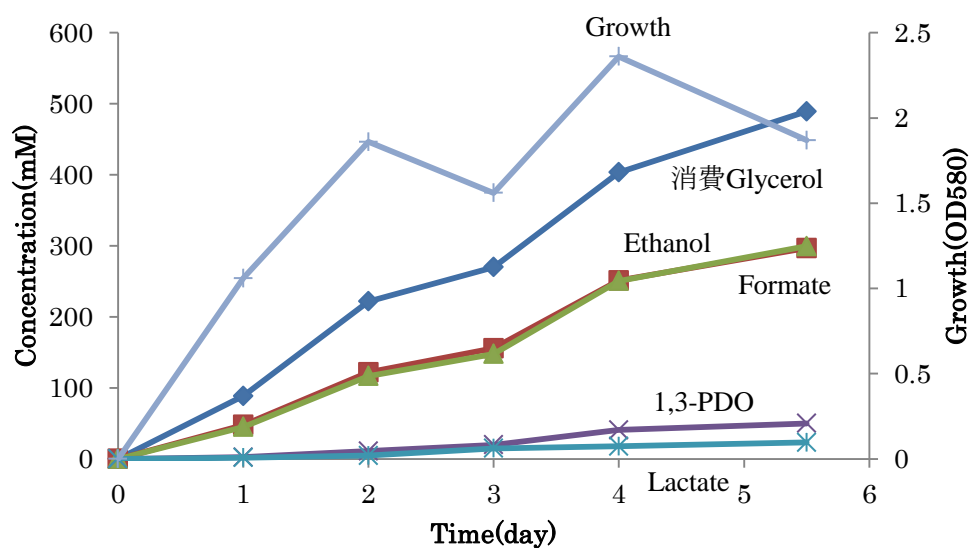


図 2-2 不織布を用いた培養法によるエタノール生産の経時変化

#### 【材料と方法】

供試菌株としては *Klebsiella variicola* TB-83D 株を用いた。NB 寒天培地で生育させた TB-83D 株 1 白金耳を 1% グリセロール基本培地 50mL に植菌し、25℃で静置培養することで 3 日間前培養を行った。滅菌した培養器に、滅菌済み 2% グリセロール基本培地 850mL と前培養液全量を加えた。pH コントローラーとペリスタポンプを用いて 1N NaOH-12% グリセロール溶液を培養液に滴下し、培地 pH を 7.5, 8.0, または 8.5 に、グリセロール濃度を約 2% に保った。そして、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しつつ、25℃で培養した (図 2-3)。継時的に培養液量が約 900mL になるように培養液を除き、生育量の測定と上清の HPLC 分析を行った。消費グリセロール量の測定は、培養液量を常に 900mL であったと仮定し、除いた培養液量と残存グリセロール量から計算でおおよその値を求めた。

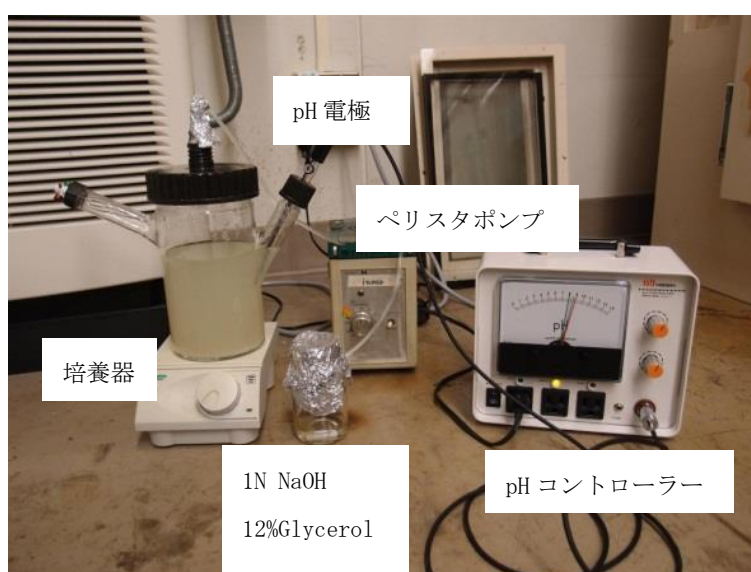


図 2-3 ミニジャーを用いた連続培養装置

## 【結果と考察】

### 運転pHの影響

図 2-4 に示したように、pH8 において、初期の生育量、グリセロール消費量およびエタノール生産量が最も高く、また、1,3-プロパンジオールと乳酸生産量が低かった。このことより、pH8 がエタノール生産に最適であると考え、今後の実験でも pH8 で行うことにした。

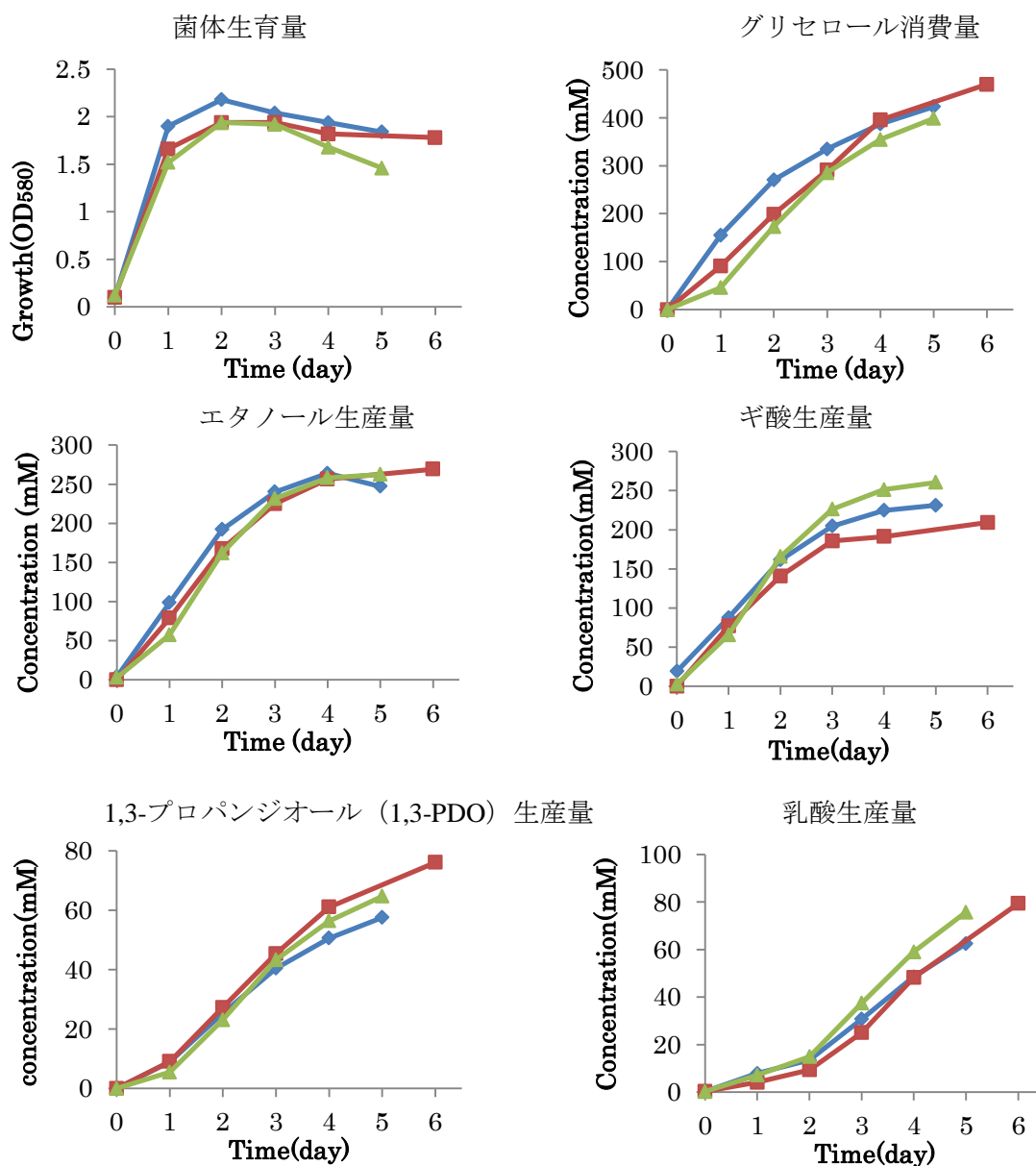
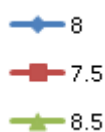


図 2-4 エタノール生産における pH の影響



## 栄養成分の逐次添加の影響

これまでの検討結果より、本菌株は植菌量を増大させても生産は増大しないことが明らかになっている。これは培地成分等の他の要素が菌体増殖の律速となっている可能性が考えられたため、培地成分の添加についても検討を行った。培養1日目以降のサンプリング時に培養液を900mLまで除いた後、グリセロールを除いた基本培地( $\text{NH}_4\text{Cl}$  50g/L, Casamino acid 50g/L, yeast extract 25g/L)を10mL添加した。

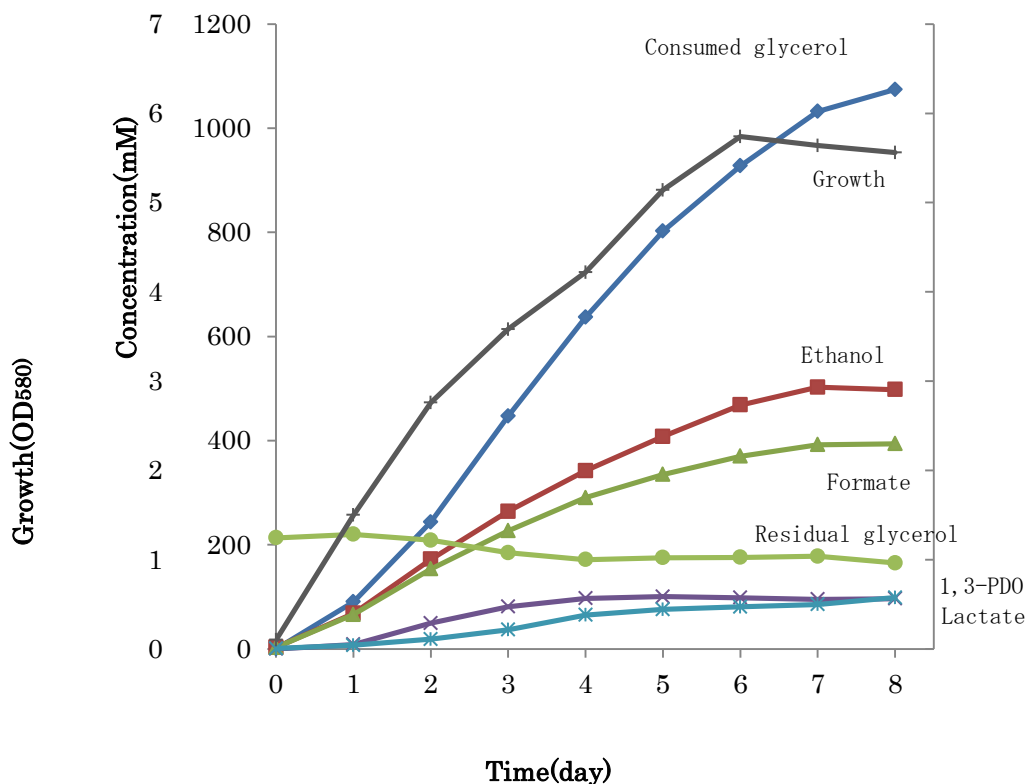


図 2-5 栄養成分の逐次添加の影響

その結果、培養7日目でエタノール生産量 502mM (23g/L)に達した (図 2-5)。また、生育量がこれまでの3倍程度上昇し、グリセロール消費量も上昇した。このことから、何らかの培地成分が菌体生育の律速となっている可能性が強く示唆された。

## 不織布を用いた培養の再検討

培地成分を追加することによって、菌体量の大幅な上昇とエタノール生産量の増大が認められたため、この条件を用いて、再度不織布による培養を試みた。かご状に成形した金網に固定化担体として不織布をロール状に詰め、その金網を培養器の中に入れ、同条件で培養した。

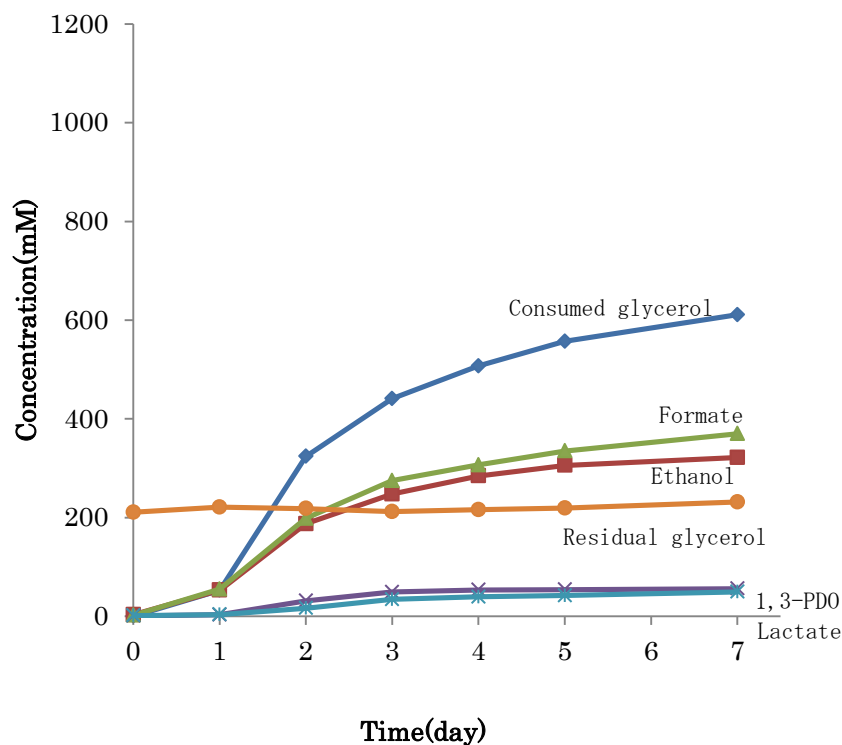


図 2-6 栄養成分の逐次添加の影響（不織布を用いて培養）

その結果、図 2-6 に示したように、不織布系ではエタノール生産量は培養 7 日で 370mM(1.48%)までしか上昇せず、生産性の向上は認められなかった。培養液を観察すると、分散系では大きな菌体の塊はなく菌体は分散していたが、不織布系では不織布全面にべったりと菌の集団が形成されていた。おそらく菌体増殖に伴って不織布が目詰まりしたことによって、基質と菌体との接触が妨げられたため、生産が低下したと考えられる。このことから、生産を連続的、効率的に行うためには、基質との接触が効率よく行われるように、増殖した菌体密度を一定に保つことが必要であり、菌体濃度を上げることが必ずしも生産向上には結びつかないと考えられた。また、実際の BDF 廃液は不純物を多く含むため粘度が高く、不織布の目詰まりをさらに助長すると考えられる。そのようなリスクも考慮した結果、最終的に菌体の固定化は本プロセスには適さないと結論づけ、以降の検討には浮遊菌体を用いることとした。

### 3 培地成分の検討

#### 3.1 各種栄養源の検討

前章において培地成分の追加が生育、及びエタノール生産量を増大させたことから、培地成分について各々検討を行い、生育の律速となっている成分について検討した。検討に当たっては、操作性の簡便化を考慮に入れて、逐次添加ではなく培養開始時の培地成分濃度を上昇させることによって実施した。

##### 【材料と方法】

TB-83D 株 1 白金耳を 2 章に示した 1%グリセロール基本培地(pH 9) 25 mL に植菌し、25℃で 3 日間前培養を行った。その後、ミニジャーファーメンターにオートクレーブ滅菌した 2%グリセロール生産培地(pH 8) 500 mL 及び前培養液全量を植菌し、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しつつ 25℃で培養した。生産培地組成は基本培地組成のうち  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、カザミノ酸、酵母エキス (YE) を 5 倍量添加したものを用いた。なお、コントロールとして基本培地を用いて試験を行った。オートクレーブ滅菌した 1N NaOH 及び 12.5%グリセロール溶液の添加により培地中の pH を 8、グリセロール濃度を 2%におおよそ維持した。経時的に培養液量が 500 mL になるまで除き、生育量と基質及び生産物量の測定を行った。

##### 【結果と考察】

$\text{NH}_4\text{Cl}$ 、カザミノ酸及び YE のエタノール生産への影響を図 3-1 に示した。注目すべき点として、YE 添加量を増加させるか否かでエタノール生産性が大きく 2 つのグループに分かれ、YE を添加することで生産性が大きく向上することが示された。また、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  に関しては添加量を増加させても生産性の向上は見られず、むしろ場合によっては阻害効果が見られた。さらに、YE のみを増加させた場合よりも YE とカザミノ酸の両方を増加させた場合に高いエタノール生産が見られた。一方、前章の栄養源の逐次添加培養の結果と比較すると、YE 添加量を増加させた場合に初期のエタノール生産性は向上したが、最終的なエタノール生産量は減少した。

以上の結果より、エタノール生産の律速となっている栄養源は主に YE であることが明らかとなり、エタノール生産量は YE とカザミノ酸添加量を同時に増加させた場合に最も高かった。他の YE 添加量を増加させた場合(YE のみ 5 倍量もしくは  $\text{NH}_4\text{Cl}$  と同時に 5 倍量添加)と比べて培養 48 時間くらいまではエタノール生産量に大きな違いはなかったため、TB-83D 株の栄養源の資化性の違いではないかと予想される。おそらく先に YE を資化し、その後カザミノ酸を資化することで 2 段階のエタノール生産様式になったと思われる。このことはカザミノ酸が有効であること、もしくは単に YE 添加量が基本培地の 5 倍量では不十分であったことが考えられた。栄養源としての YE やカザミノ酸は、アミノ酸などの窒素源やビタミン源として有効であるため、TB-83D 株によるエタノール生産にはビタミンやアミノ酸が有効であることが考えられた。

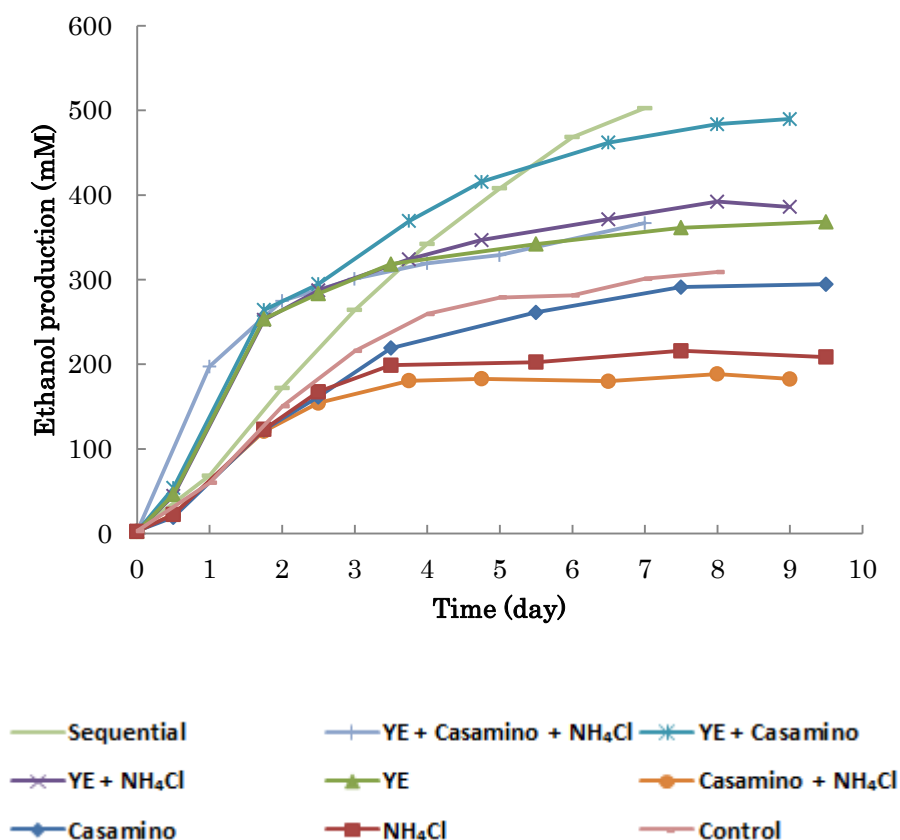


図 3-1 各種栄養源のエタノール生産への影響

栄養源の逐次添加培養(sequential)は前章の結果を載せた

本実験結果より YE が栄養源として特に有効であることが示されたが、YE は高価であるため工業生産においてその使用は困難である。しかし、今後 YE の代わりに栄養に富む安価な栄養源の検討を行い、廃グリセロールと安価な栄養源だけでエタノール生産を行うことができれば、培地コストを著しく低下させることができる。このことから、培地成分を簡略化することは、今後の安価な培地成分の検討を考慮すれば実用化において大きなメリットであるといえる。

### 3.2 グリセロールの逐次添加濃度及び酵母エキス (YE) 添加量の検討

エタノール生産の栄養源として YE が最も適することが示されたため、次に最適な YE 添加量の検討を行うことにした。合わせて、基質であるグリセロールの添加方法の検討を行った。

## 【材料と方法】

### グリセロールの逐次添加濃度の検討

TB-83D 株 1 白金耳をオートクレーブ滅菌した 1%グリセロール基本培地(pH 9) 25 mL に植菌し、25℃で 3 日間前培養を行った。その後、ミニジャーファーマンターにオートクレーブ滅菌した生産培地(pH 8) 500 mL 及び前培養液全量を植菌し、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しつつ 25℃で培養した。生産培地組成は基本培地の内カザミノ酸と YE を 5 倍量添加したものをを用い、初期グリセロール量をそれぞれ 2, 3, 4, 5, 15%とした。経時的に培養液を採取し、生育量と基質及び生産物量の測定を行った。培地中のグリセロールがなくなりそうになったら 50%グリセロール溶液を 50 mL 添加することで基質の補充を行った。6N NaOH により培地中の pH を 8 に維持した。

### YE 添加量の検討

(ミニジャーファーマンターにおける YE 添加量の検討)

TB-83D 株 1 白金耳をオートクレーブ滅菌した 1%グリセロール基本培地(pH 9) 25 mL に植菌し、25℃で 3 日間前培養を行った。その後、ミニジャーファーマンターに YE 添加量を変えたオートクレーブ滅菌した 5%グリセロール生産培地(pH 8) 500 mL 及び前培養液全量を植菌し、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しつつ 25℃で培養した。6N NaOH により培地中の pH を 8 に維持した。経時的に培養液を採取し、生育量と基質及び生産物量の測定を行った。培地中のグリセロール濃度が約 1%以下になったら 50%グリセロール溶液を 50 mL 添加することで基質の補充を行った

(YE 資化性の確認)

TB-83D 株をオートクレーブ滅菌した基本培地(グリセロール非添加、YE 濃度 0 から 15 g/L、pH 9) 30 mL に終濃度が OD<sub>580</sub> で約 0.01 になるように植菌し、25℃で静置培養を行った。経時的に培養液 1 mL 採取し、生育量、培地 pH、基質及び生産物量の測定を行った。実験は 3 連で行った。

## 【結果と考察】

### グリセロールの逐次添加濃度の検討

他の研究におけるグリセロールからの物質生産の報告を見ると、基質の添加方法としては一般的に回分または逐次添加方法が採用されている(1-3)。特に高濃度の生産物を得る場合にはその分多くの基質が必要となり、運転コストを考えると初めに必要な全ての基質を反応槽に添加することが望ましい。しかし、高濃度グリセロール下では菌の生育阻害が生じ、また、pH 電極のような低コストで容易に使用できるグリセロールバイオセンサーが無いことから培養中のグリセロール濃度の制御が難しいため、逐次添加法を行うこととした。そこで、基質の最適な逐次添加濃度の検討を行った。

グリセロールの逐次添加濃度によるエタノール生産への影響について図 3-2 に示した。グリセロール濃度 2 から 4%まではエタノール生産量に大きな違いは無く、5%で若干の低下が見られた。また、グリセロール濃度 5%以上では濃度依存的なエタノール生産阻害が見られた。今後、TB-83D 株の基質耐性を向上させ高濃度グリセロール存在下で高エタノール生産を行うことができれば、さらに実用性が増すと考えられる。以上の結果から、以降の実験ではグリセロール濃度を 5%とした。

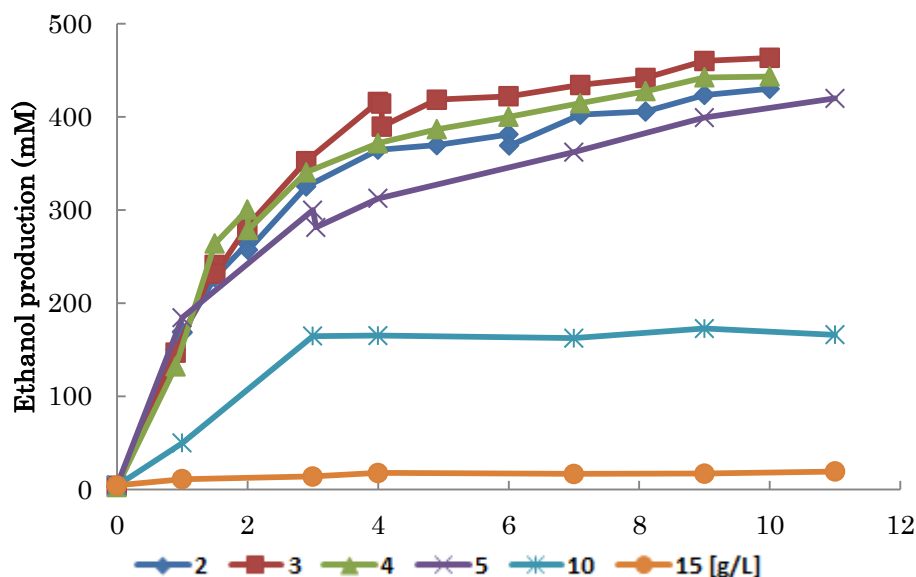


図 3-2 グリセロール逐次添加濃度によるエタノール生産への影響

#### YE 添加量の検討

これまでの実験では窒素源として  $\text{NH}_4\text{Cl}$  やカザミノ酸を添加していたが、その後の検討の結果 (data not shown)、これらを YE で代用できることが予想されたため、基質としてのグリセロール、リン源としての  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、そして栄養源としての YE に絞った培地において、YE 添加量の検討を行った。

YE 添加量によるエタノール生産性への影響を図 3-3 に示した。YE 15 g/L までは添加量依存的にエタノール生産量が増加し、最大で YE 15 g/L の時にエタノール生産量 697 mM (32g/L) に達した。しかし、さらに YE 添加量を増やしてもそれ以上のエタノール生産は見られなかった。また、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を除いた場合においても同程度の生産量が確認された。以上のことより YE の最適添加量は 15 g/L であり、エタノール生産の栄養源として YE のみで十分であることが示された。この時点での生産物を見ると、エタノールの他にギ酸が 3% 程度生産されており、ギ酸によるエタノール生産阻害の可能性が考えられた。また、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を添加しなくても問題ないことが示され、リン源としては YE に含まれる量で十分であることが考えられる。

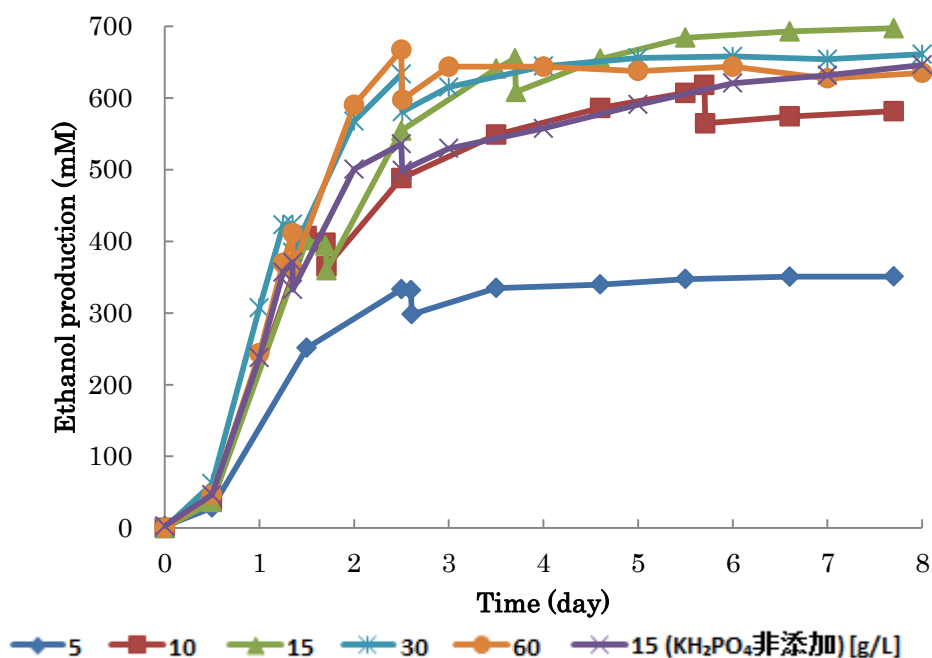


図 3-3 YE 添加量によるエタノール生産への影響

一般的なグリセロールからの物質生産には、一般的に栄養源として YE が使用されるが、その添加量は 1 から 2 g/L 程度であり(1, 4)、多い場合でも 5 g/L 程度である(7)。本菌株においても YE の添加量の増加によりエタノール生産量の向上が見られたが、最適 YE 添加量は 15 g/L と非常に大量の栄養源を必要とすることが示された。栄養源の使用量の増加は原料コストの増加を招くため実用生産では好ましくない。さらに、YE は栄養源としては高価であるため、今後 YE に代わる安価な栄養源の探索は必須とされる。また、エタノール生産の律速となる栄養成分について詳細な検討を行い、YE に含まれる有効な成分を特定することで栄養源使用量を低減できると考えられる。YE 使用量が大量であることに関してさらに、YE は炭素源も含まれており、その使用量が増加することは YE を基質とした物質生産が考慮される(4)。そこで、YE を唯一炭素源とした培地において TB-83D 株の培養を行ったところ、生育は見られたがエタノールを含めた物質生産はほとんど確認されなかった(data not shown)。

以上の結果より、YE は TB-83D 株に対して生育促進効果が高く、それ自体からのエタノール生産は見られないため、グリセロールからのエタノール生産に対して非常に有効であることが示された。エタノール生産の律速としてギ酸などの生産物阻害が考えられ、今後更なるエタノール生産量の向上には、使用菌株の生産物耐性の向上が必要であると考えられる。

### 3.3 安価な栄養源の探索

これまでの結果より YE がエタノール生産に特に有効であることが示された。しかし、YE は高価であるために工業生産の現場で使用することは困難である。そこで次に、YE に代わる安価な栄養源の探索を試みた。

#### コーンステープリカーの検討

コーンステープリカー(以下 CSL)とは、トウモロコシ粒から溶出した可溶性成分を含む浸漬液を濃縮したもので、アミノ酸、糖類、ビタミン類などの多様な成分を含む。また、YE と比べて安価であるため、高価な栄養源の代替剤としての利用価値がある(8, 9)。

#### 【材料と方法】

TB-83D 株 1 白金耳をオートクレーブ滅菌した 1%グリセロール基本培地(pH 9) 25 mL に植菌し、25℃ で 3 日間前培養を行った。その後、ミニジャーファーメンターにオートクレーブ滅菌した 5%グリセロール生産培地(pH 8、各濃度の CLS 含有) 500 mL 及び前培養液全量を植菌し、マグネチックスターラーで緩やかに攪拌しつつ 25℃ で培養した。CSL は ROQUETTE(株)製の SOLULYS® AST を用いた。6N NaOH に より培地中の pH を 8 に維持した。経時的に培養液を採取し、生育量と基質及び生産物量の測定を行った。培地中のグリセロール濃度が約 1%以下になったらオートクレーブ滅菌した 50%グリセロール溶液を 50 mL 添加することで基質の補充を行った。

#### 【結果と考察】

CSL のエタノール生産量への影響を表 3-1 に示す。CSL の添加量によるエタノール生産への影響は YE と比べると低いものとなったが、YE に CSL を添加することで YE 単体よりはエタノール生産量が向上した。YE と CSL を 15g/L の濃度で添加した場合、エタノール生産量は 732.1mM (34g/L)に達し、これまでの最高値である 32g/L を上回った。

表 3-1 YE と CSL の添加効果

YE (g/L)	CSL (g/L)	Product concentrations (mM)					Consumed glycerol (mM)	Ethanol productivities (ethanol-mol/glycerol- mol)	Final OD <sub>580</sub>
		Ethan ol	1,3-P D	Lactat e	Format e	Acetate			
30	-	700.4	99.6	107.8	639.9	38.1	901.0	0.79	10.1
15	15	732.1	91.4	148.1	482.8	64.8	998.1	0.74	18.4
5	5	427.8	117.5	97.9	215.6	63.9	704.4	0.61	8.9
5	10	459.8	108.8	80.7	239.3	73.2	726.1	0.63	12.3
5	15	455.4	113.9	127.4	183.5	59.2	744.2	0.61	12.7
-	30	321.5	71.0	75.4	167.8	40.4	434.2	0.77	13.0

これまでのグリセロールからのエタノール生産に関する報告におけるエタノール生産量としては、野生株を用いた場合においては、細菌では *Kluyvera cyocrescens* S26 によるエタノール生産量 27.0 g/L (4)、酵母では *Pachysolen tannophilus* CBS4044 によるエタノール生産量 28.1 g/L (5) がそれぞれ最高値となっている。また、組換え菌を用いた場合では、*Klebsiella* 属において *K. pneumoniae* の組換え体を用いた場合にエタノール生産量 31.0 g/L を達成しており、さらに組換え大腸菌においてエタノール生産量 46.5 g/L が報告されている (6)。この値はこれまでの報告の中では最高値となっている。しかし、これら遺伝子組換え体の使用は、環境への安全性の観点から生産プロセス全体を厳密に管理しなければならず、生産コストの増大につながる。特にエタノールのような原価が低い生産物の場合は、実用化に際して生産コストの影響は大きく、組換え菌の使用はエタノールの工業生産には不向きであると考えられる。これに対して、本研究において組換え菌を使用しない場合においてエタノール生産量 34g/L と、これまでの世界最高値を超えることができ、本技術の実用化に当たり大きな進展と言える。

### メタン消化液の検討

アミノ酸やビタミンを含む別の安価な栄養源としてメタン消化液の使用を検討した。メタン消化液とは、メタン発酵において生じる液状の残渣のことを指す。窒素やリン、カリウムといった肥料成分を多量に含んでいるため液肥としての有用性が知られている(10, 11)。また、有機物の分解産物及びメタン発酵に関わる細菌・メタン生成菌由来のアミノ酸やビタミンなどを多量に含んでいると考えられる。メタン消化液は基本的には廃棄物であるため、日本においては二次処理後に公共用水域に排水することが多いが、欧州では液状肥料として農地還元することが一般的である(11)。これらのことから、メタン消化液は栄養に富み、基本的に廃棄物であるため安価であることから、YE に代わる安価な栄養源としての有用性が考えられた。そこで次に、メタン消化液のエタノール生産への影響を調べることにした。

### (試験管培養)

メタン消化液は有限会社鳥栖環境総合開発センターより頂いたものを用い、実験にはオートクレーブ滅菌した後のそのままの原液、もしくは 13,000 rpm、10 分遠心分離した後の上清を使用した。また、使用したメタン消化液は水分を多量に含んでいるため、添加量の検討に当たり総窒素量(TN)で評価することにした。TN の測定には島津製作所(株)製の TOC-V CSH 及び TNM-1 を用いた。培養試験は基本培地または表 3-2 に示した栄養培地を用いて行い、それぞれについて YE を TN 等量のメタン消化液(原液または上清)に置き換えたものについても試験した。TB-83D 株をオートクレーブ滅菌した各培地 (pH 9) 30 mL に菌体終濃度が OD<sub>580</sub> 約 0.01 になるように植菌後、25℃で静置培養を行った。経時的に培養液 1 mL 採取し、生育量、培地 pH、基質及び生産物量の測定を行った。実験は 3 連で行った。

表 3-2 栄養培地組成

成分	g/L
Glycerol	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10
NH <sub>4</sub> Cl	1
YE	2

### 小型ジャーファーマンターによる培養

メタン消化液は試験管培養と同じものを用い、今回はオートクレーブ滅菌したものに加えて、滅菌していない原液も用いた。また、培養装置として1.5 L容のジャーファーマンターを用いた(M-1000A、EYELA 東京理化学器械(株)製)。TB-83D 株 1 白金耳をオートクレーブ滅菌した 1 % 基本培地(pH 9) 50 mL に植菌し、25℃で 3 日間静置による前培養を行った。その後、前培養液全量をオートクレーブ滅菌した生産培地 950 mL (Glycerol : 50 g/L、メタン消化液 : TN で YE 15 g/L 相当)に植菌した。pH コントローラーとペリスタポンプを用いて 6N NaOH を滴下することで培地 pH を 8 に維持した。経時的に培養液約 1 mL をサンプリングし、上清を HPLC 分析に供した。培地中のグリセロールがなくなりそうになったら培地を 100 mL または 60 mL 抜いて同量のオートクレーブ滅菌した 50%グリセロール溶液を添加することでグリセロールを補充した。実験には TB-83D 株を植菌しない系も作成し、その場合は前培養液 50 mL 分の滅菌蒸留水を加えた。

### 【結果と考察】

#### 試験管培養

まず、メタン消化液の TN の測定結果を表 3-3 に示す。これを見ると YE と比べて著しく小さい値となり、水で薄まっていることが原因であると考えられる。次に、試験管培養におけるメタン消化液のエタノール生産性への影響を図 3-4 に示す。メタン消化液原液、上清共に YE と同等もしくはそれ以上のエタノール生産量を示し、メタン消化液のエタノール生産への有用性が示唆された。栄養培地と基本培地を比べると、基本培地において YE と比較してメタン消化液のエタノール生産性が大きく向上した。

表 3-3 メタン消化液と YE の全窒素量(TN)

	TN (mg/g)
YE	95.9
メタン消化液原液	2.25
メタン消化液上清	1.67

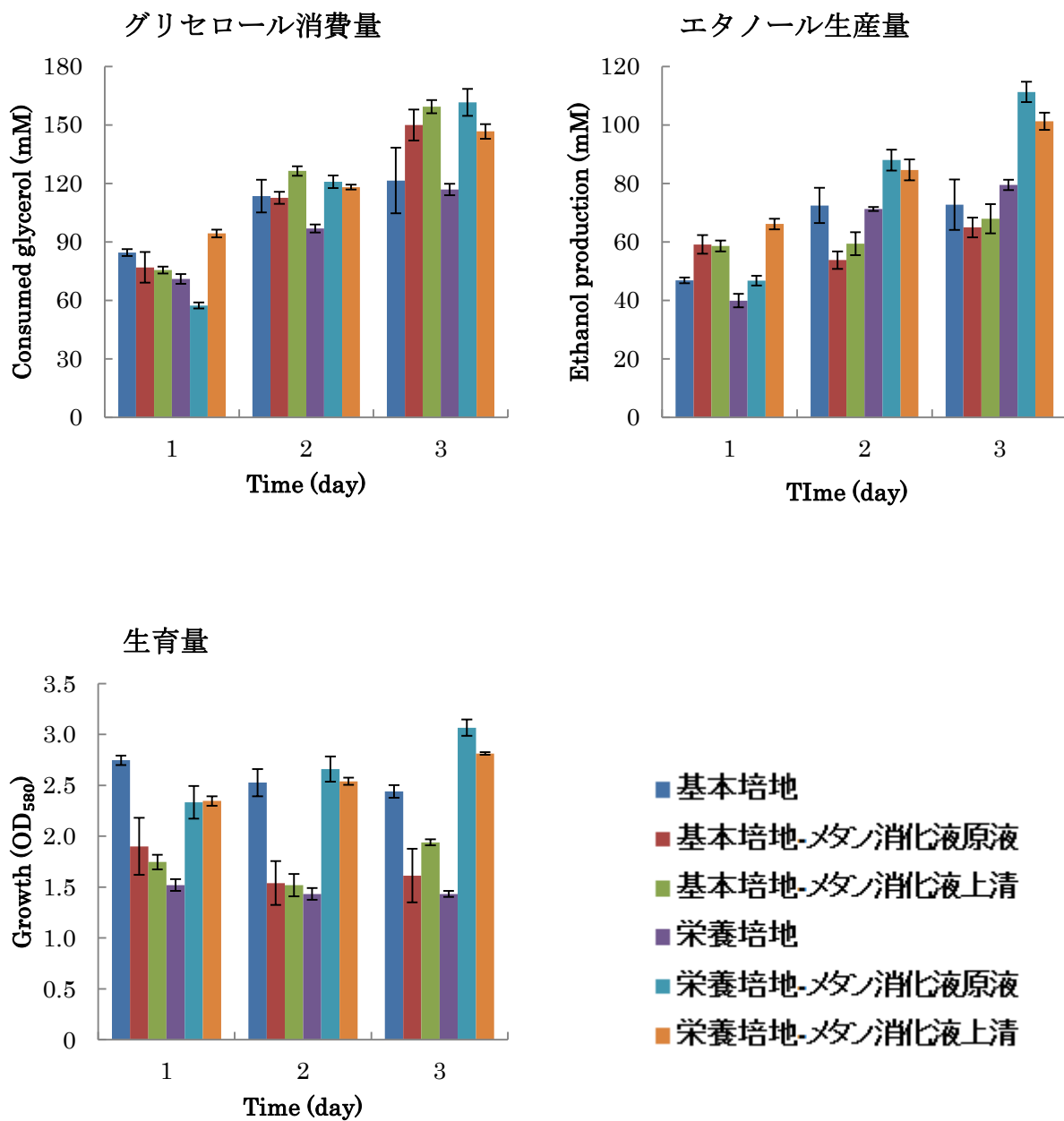


図 3-4 試験管培養におけるメタン消化液のエタノール生産性への影響

エラーバーは3連の結果における標準偏差を示す

## ジャーファーマンターによる培養

試験管培養において、メタン消化液のエタノール生産への有用性が示されたため、次にジャーファーマンターを用いたスケールアップを試みた。その結果を図 3-5 に示す。まず、滅菌しないメタン消化液を用い、TB-83D 株を植菌しなかった系において、グリセロールの消費が確認された。生産物を見ると 1,3-PD や酢酸の生産量が高く、これらの生産菌がメタン消化液中に存在することが示唆された。一方、エタノール生産はほとんど見られなかった。次に、TB-83D 株植菌系において、メタン消化液を滅菌した場合と滅菌しない場合を比べると、エタノール生産は非滅菌系において初期の生産量が低下したが、最終的な生産量は両系とも約 500mM (2.2%)程度となった。前節の YE 単独の結果と比べると、生産量は低下したが、比較的高い値が確認された。

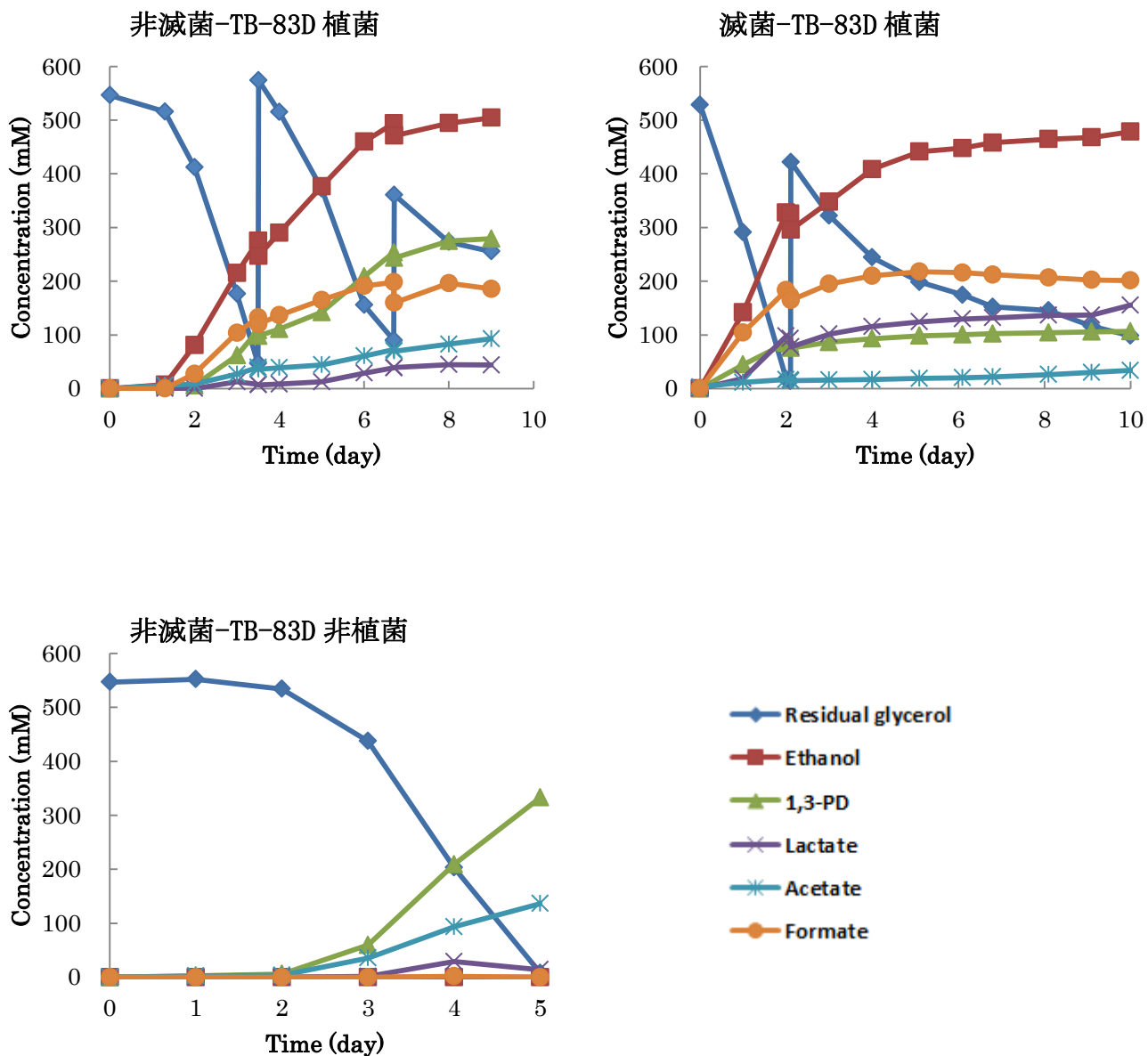


図 3-5 小型ジャーファーマンター培養におけるメタン消化液のエタノール生産への影響

本技術の実用化のためには、生産量を上げることはもちろん、それと同時に生産コストを下げることも重要である。一般的にバイオプロセスにおける主要な生産コストとしては、材料コストや運転コスト、回収コストが挙げられる(12)。グリセロールからの物質生産においては、廃グリセロールを用いることが原料コストの削減となっている。その他にも、多くの報告において生産量の向上と共に原料コストや滅菌コストなどの生産コストの低減が試みられている(4, 13- 15)。

本研究においては、今回の結果より、YE の代わりにメタン消化液を使用することで比較的高いエタノール生産量を達成したこと、及び、滅菌・非滅菌共に最終的なエタノール生産量は同程度であることが確認された。まず前者に関して、メタン消化液の使用により、YE には及ばないものの、グリセロールとメタン消化液のみから 2%以上の比較的高いエタノール生産量を達成でき、原料コストを著しく削減できることを示した。先に述べたように、特に日本においてはメタン発酵を行っている廃棄物処理業者が BDF の製造も同時に行っている場合が多い。このことから、将来的にこれらの施設で BDF 廃液とメタン消化液という廃棄物のみから高エタノール生産を行うことで、原料コストをほぼ無くすることができる。今後、詳細な栄養成分の検討を行い、メタン消化液においても YE と同等以上のエタノール生産を達成することで、本技術の実用化に向けて大きな進歩となると考えられる。次に後者に関して、非滅菌のメタン消化液においても滅菌のものと同程度のエタノール生産量を示したことから、メタン消化液の滅菌コストを削減できることが示された。滅菌が不要であることは、特に工業スケールにおいては、高価な滅菌装置の設置や大規模な滅菌操作に係るコストを削減できる。しかし、非滅菌のメタン消化液においては、在来菌による初期のエタノール生産性の低下が見られたため、今後 TB-83D 株が優先化する条件を検討することで、滅菌コストを削減しつつ生産性の向上が見込まれる。以上のことより、栄養源として YE の代わりにメタン消化液を使用することは、原料コスト及び滅菌コストの削減という観点から、本技術の実用化において非常に大きなメリットであることが示唆された。

### 3.4 参考文献

1. Oh BR, Seo JW, Heo SY, Hong WK, Luo LH, Kim S, Kwon O, Sohn JH, Joe MH, Park DH, Kim CH. 2012. Enhancement of ethanol production from glycerol in a *Klebsiella pneumoniae* mutant strain by the inactivation of lactate dehydrogenase. *Process Biochem.* 47, 156-159.
2. Mu Y, Teng Hu, Zhang DJ, Wang W, Xiu ZL. 2006. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnol. Lett.* 28, 1755-1759.
3. Yen HW, Li FT, Chang JS. 2014. The effects of dissolved oxygen level on the distribution of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol produced from glycerol by an isolated indigenous *Klebsiella* sp. Ana-WS5. *Bioresour. Technol.* 153, 374-389.
4. Choi WJ, Hartono MR, Chan WH, Yeo SS. 2011. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1255-1264.
5. Liu X, Jensen PR, Workman M. 2012. Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen*

*tannophilus*. Bioresour. Technol. 104, 579-586.

6. Wong MS, Li M, Black RW, Le TQ, Puthli S, Campbell P, Monticello DJ, 2014. Microaerobic conversion of glycerol to ethanol in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 80, 3276-3282.
7. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. 2005. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. J. Biosci. Bioeng. 100, 260-265.
8. Maddipati P, Atiyeh HK, Bellmer DD, Huhnke RL. 2011. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. Bioresour. Technol. 102, 6494-6501.
9. Xi YL, Chen KQ, Dai WY, Ma JF, Zhang M, Jiang M, Wei P, Ouyang PK. 2013. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 using corn steep liquor powder as nitrogen source. Bioresour. Technol. 136, 775-779.
10. 中村 真人、2011、メタン発酵消化液の液肥利用とその環境影響に関する研究、農村工学研究所報告、第 50 号、1-57
11. 遠藤 はる奈、中村 修、力武 真理子、2008、行政主導によるメタン発酵施設の事例調査、長崎大学総合環境研究、第 10 巻、第 2 号、25-35
12. Pauline MD. 2012. Bioprocess Engineering Principles, Second Edition. Academic Press. 762-764.
13. Tarek D, Ake S, Stefan L, Rajni HK. 2013. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. Bioresour. Technol. 135, 504-512.
14. Dan DV, Francisc VD, Oana LP, Carmen S. 2013. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol. Microb. Cell Fact. 12, 92.
15. Afroditi C, Seraphim P, David D, Agapi ID, George-John EN, An-Ping Z. 2011. Production of 1,3-propandiol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through an non-sterilized fermentation process. Appl. Microbol. Biotechnol. 91, 101-112.

## 4 変異処理による菌株の機能向上

栄養成分の検討の結果から、確かにエタノール生産の増加が確認された。しかし、栄養源の初期添加量を増加させた場合、急激に生育が起こることによって培地中の阻害物質（エタノールもしくはギ酸）濃度が急上昇し、その後の生産を阻害している可能性が考えられた。本菌株(TB-83D株)は、親株であるTB-83株のストレプトマイシン耐性変異株であり、高いエタノール耐性(約7%)を持つ(1)。現時点でのエタノール生産量は4%を下回っているため、エタノールが原因であるとは考えにくい。そのため、この原因物質はエタノール生産に同調して生産される「ギ酸」であることが強く示唆された。そこで、ギ酸による生育・生産阻害を軽減するために、TB-83D株に変異処理を施すことで「ギ酸耐性変異株」および「ギ酸生産能低下変異株」の取得を試みた。

### 4.1 UVによる変異株の取得

#### 【材料と方法】

#### ギ酸による生育阻害試験

TB-83D株の培養は、2% グリセロール基本寒天培地上で生育したTB-83Dのコロニーを、各濃度のギ酸を含む20 mlの2% グリセロール基本培地で前培養し、同培地に最終OD<sub>580</sub>=0.01となるように接種し、25℃で培養を行った。

#### UVによる変異

TB-83D 株を 25 µg/ml ストレプトマイシン含有 LB 液体培地 (5 ml) で 30℃、16 時間培養し、定常期に達するまで培養を行った。集菌後、0.1 M MgSO<sub>4</sub> 溶液で菌体を洗浄し、5 ml の同溶液に再懸濁した。この原液および希釈系列に従い、10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> 倍に希釈した溶液 50µL をストレプトマイシン含有 LB 寒天培地に塗布した。クリーンベンチ内の殺菌ランプ（東芝製 GL-15）の光源から 25 cm の距離で、シャーレの蓋を開けて 30 秒間 UV を照射した。Photolyase による光回復を遮るために、直ちに UV 照射したシャーレをアルミ箔で包み、さらにキムタオルで包み遮光して 30℃で 24 時間培養を行った。

#### 変異株の選択

死滅率 98%で生育の認められたコロニーを、96 穴マルチプレートに分注した 50 µg/ml Streptomycin 含有 LB 液体培地に接種し、30℃遮光状態で 16 時間培養を行った (First screening)。

First screening で生育の認められた菌株を、各濃度でギ酸を添加した 2% グリセロール基本培地 (pH 7.0) にレプリカした (Second screening)。

#### エタノールの簡易定量

得られたギ酸耐性株のエタノール生産性を、4-アミノアンチピリンを用いたGoncharらの方法(2)を参考に行った（図4-1）。A solutionとB solution溶液を等量混合し、そこに遠心後の上清を加え 30℃で15分反応を行った。反応後のサンプルを吸光度515 nmで測定した。

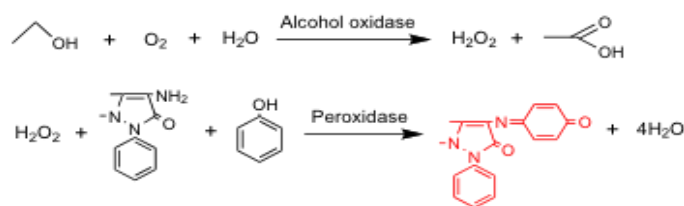


図4-1 比色法によるエタノール簡易定量の原理

## 【結果と考察】

### 生育・生産阻害物質の特定

まず、各濃度のギ酸を含むグリセロール基本培地を用いてTB-83D 株の生育、消費グリセロールおよびエタノール生産性を調べたところ、2%のギ酸存在下でそれらは著しく減少した。これらの結果から、培養中に蓄積するギ酸が生育と生産における律速因子であることが分かった。

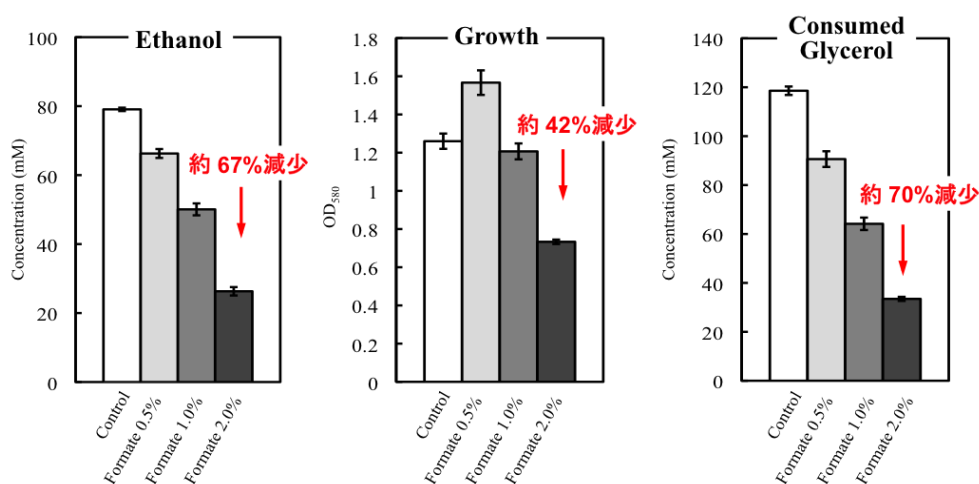


図4-2 TB-84D株のギ酸耐性

### UV処理によるギ酸耐性変異株の取得

UV 照射による変異導入を繰り返し行った結果、First screening で 768 株の変異株が得られた。次に、野生株のギ酸耐性試験と同様に、各ギ酸濃度 (3%, 4%, 5%) の寒天培地上に First screening で得られた 768 株をレプリカしてその生育を調べたところ、ギ酸濃度 5%で生育した菌株を 152 株獲得し、その中でも比較的生育の良い 27 株を選抜し以降の実験に用いた。

これら 27 株を、1ml の 2% glycerol basal medium を分注した 24 穴マルチプレートを用いて 25℃で 4 日間静置培養を行った。培養液を遠心し、その上清を 4-アミノアンチピリンを用いたエタノール簡易測定を行ったところ、3B12, 3F12, 4A6, 4A9, 5C11 の 5 菌株が TB-83D 株よりも高い吸光度値を示した (data not shown)。

以上の結果から、3B12, 3F12, 4A6, 4A9, 5C11 の 5 株をギ酸耐性候補株とした。継代培養における復帰細胞の検討を含め、これら 5 株を各ギ酸濃度の寒天培地上で生育を調べたところ、5%ギ酸含有寒天培地上でも良好な生育を示した (図 4-3)。また、親株は同培地上では生育しなかった。取得した変異株が、親株に比べ約 1.3 倍のギ酸耐性を有するという知見は、ギ酸デヒドロゲナーゼもしくはピルビン酸ギ酸リアーゼの酵素活性が増加している可能性、もしくは膜の透過性が変化していることも考えられる。

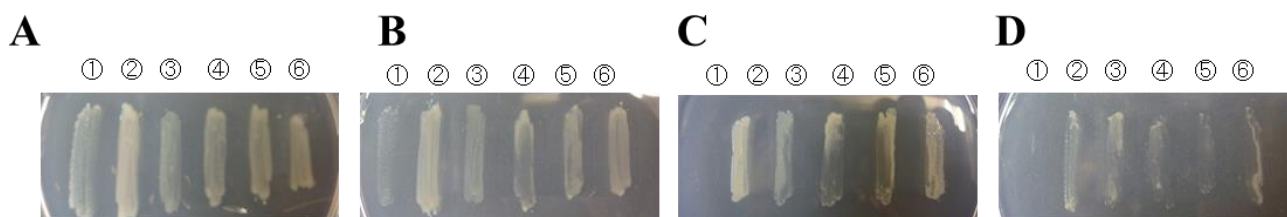


図4-3 ギ酸耐性株の寒天培地上での生育

(A) ギ酸濃度 3%, (B) ギ酸濃度 4%, (C) ギ酸濃度 5%, (D) ギ酸濃度 5.5%. ①: TB-83D, ②: 3B12, ③: 3F12, ④: 4A6, ⑤: 4A9, ⑥: 5C11

ギ酸耐性を示した5菌株について、5% 純グリセロールを用いたグリセロール基本液体培地で12日間培養を行ったところ、4A6株において親株と比べて生育およびエタノール生産性の増加が確認された（図4-4）。培養終了時の最終的な菌体生育量とエタノール生産量は、4A6株で親株の約1.4倍増加し、それに伴いギ酸の量も増加した。また、両菌株とも培養3日目に5%のグリセロールをほぼ消費したが、その後添加した5%グリセロールの消費率は4A6株の方が早かった。以上のことから、ギ酸耐性の付与はグリセロール消費量、エタノール生産性および生育量を増加させることが分かった。

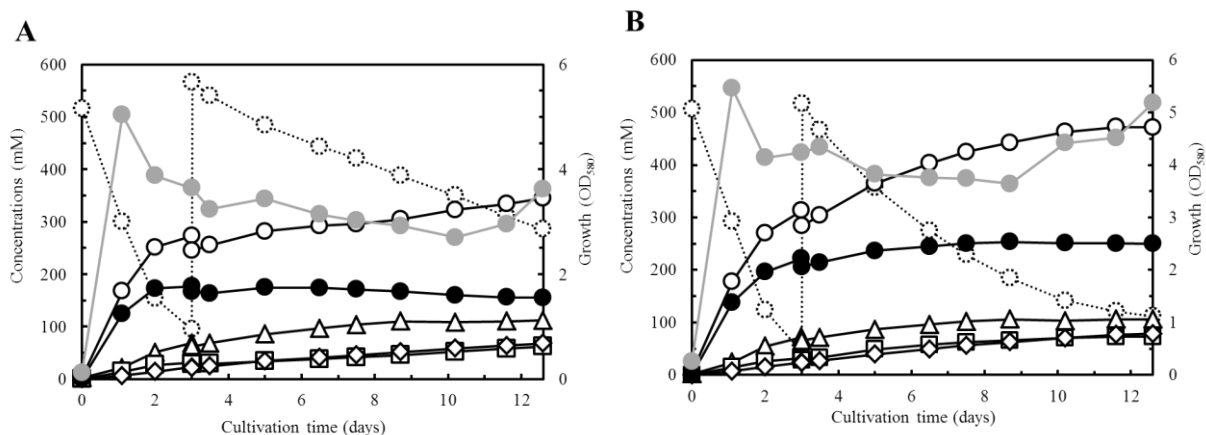


図4-4 ギ酸耐性株と親株の生育およびエタノール生産性 (A) TB-83D. (B) 4A6株.

## 4.2 プロトン自殺法による変異株の取得

UV処理によるギ酸耐性変異株のエタノール生産試験の結果、親株よりも生産性が向上することが明らかとなった。しかしながら、連続培養におけるエタノール生産を試みた場合、更なるギ酸の蓄積が予想されることから、ギ酸の生産そのものを抑制したギ酸生産能欠損株の構築も目指す必要がある。そこで、酸生産能欠損株取得法であるプロトン自殺法 (3)を適応することにより、ギ酸生産能欠損株の取得を試みた。

プロトン自殺法は、発酵に伴い生成される酸による致死効果に基づく手法である。より具体的には、臭素酸( $\text{NaBrO}_3$ )と臭化物( $\text{NaBr}$ )の混合物を培地に添加して培養を行うと、発酵に伴い培地が酸性に傾く。

この酸性条件下(プロトン存在下)では、培地に添加した臭素酸と臭化物の混合物は細胞致死に作用する臭素酸を生成するので、適切な細胞致死条件下で出現するコロニーは自身を致死から守るため酸を生成しない。このことから、出現するコロニーは酸生成能に何らかの欠損を生じていることになる。故にこの方法を用いれば、ギ酸生産能が欠損した変異株を取得できると考えられた。

## 【材料と方法】

### プロトン自殺法を用いた変異

50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン含有 2%グリセロール基本液体培地 (pH 8.0) で生育したTB-83D株 0.1 mlを、pHを変化させ且つNaBr : NaBrO<sub>3</sub> = 4 : 1となるように様々な濃度で添加した同培地に塗布し、30℃で48～72時間静置培養を行った。また、変異処理を行った場合には、前培養液をEMSにより処理 (最終濃度 4%、40分) した後、上記の培地に塗布した。

### 酸生産能欠損株の検出・培養・代謝産物解析

酸生産能欠損株の検出は、得られたコロニーを 0.06% BTB 含有 2%グリセロール基本液体培地 (pH 8.0) にレプリカし、BTB の色の変化を見る、もしくは酸化還元指示薬 (2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド) を含む培地に塗布することで簡易的に酸生産能欠損株の選別を行った。BTB 含有培地上でTB-83D 株と比較して色の変化が明白であった株については、試験管スケールで培養を行い、代謝産物をHPLCにより調べた。

## 【結果と考察】

### プロトン自殺法によるギ酸生成能欠損株の取得

まず、プロトン自殺法による変異株の取得に先立ち、培地 pH と NaBr および NaBrO<sub>3</sub> 濃度の選定を行った。pH を 6.0, 5.5, 5.0, 4.8 に調製し、NaBr : NaBrO<sub>3</sub> 濃度を 30 mM ずつ増加させて実験を行ったところ、pH 5.5, NaBr : NaBrO<sub>3</sub> = 160 – 190 mM : 40 – 47.5 mM で生育抑制が見られた (図 4-5)。このことから、pH 5.5, NaBr : NaBrO<sub>3</sub> = 190 mM : 47.5 mM の培地を選択培地とした。EMS で変異処理を行い選択培地にて変異株を選別したところ、46 株のコロニーを取得することができた。それらについて更に選択を行ったところ、最終的に 30 個の候補株を得ることができた (図 4-5, 表 4-1)。

NaBr	NaBrO <sub>3</sub>	pH 6.0	pH 5.5	pH 5.0	pH 4.8
50 mM	12.5 mM	++	++	±	-
80 mM	20 mM	++	+	+	-
100 mM	25 mM	++	±	-	-
130 mM	32.5 mM	++	±	-	-
160 mM	40 mM	+	-	-	-
190 mM	47.5 mM	+	-	-	-
220 mM	55 mM	+	-	-	-
250 mM	62.5 mM	±	-	-	-
250 mM	250 mM	-	-	-	-
0 mM	0 mM	+++	+++	+++	+++

+++ , confluent growth; ++, +, ±, intermediate levels of growth; -, No growth

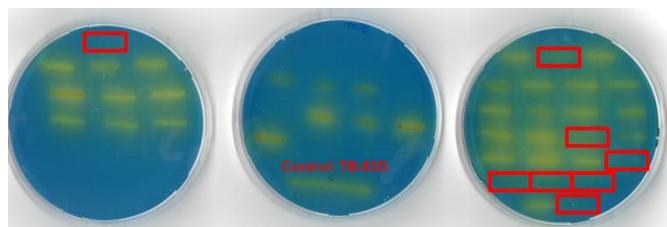


図4-5 変異株取得条件とBTB含有培地上で生育した変異株の選択

表4-1 得られた変異株の代謝産物解析結果

Strain numbers	Products (mM)								Final pH
	Consumed glycerol	Ethanol	1,3-PD	Lactate	Formate	2,3-BD	Succinate	Acetate	
TB-83D	184.3	126.9	18.7	12.0	29.9	14.4	0.8	1.7	6.40
T1	109.3	89.0	0	7.9	51.2	4.5	0.7	1.1	6.4
T2	102.3	50.6	16.4	10.2	58.8	14.7	0.5	0.7	5.9
T3	90.9	46.4	13.7	7.7	53.3	12.7	0.6	1.0	6.0
T4	101.1	45.5	18.3	9.4	50.8	15.6	0.4	0.6	6.2
T5	176.1	114.7	19.0	16.3	40.2	11.0	0.7	0.5	6.4
T6	125.2	88.1	7.4	10.6	47.0	10.4	0.7	0.5	6.2
T7	89.5	47.3	12.1	14.8	61.9	10.5	0.4	0	5.75
T8	150.8	87.2	13.6	10.3	44.7	21.9	1.1	2.1	6.18
T9	86.3	47.8	14.0	15.8	49.3	11.0	0.4	0	5.74
T10	83.7	53.7	12.6	13.1	63.0	8.1	0.7	0	5.26
T11	88.5	54.0	11.4	4.8	57.3	13.4	0.7	0	5.64
L1	132.4	110.0	44.5	32.9	21.7	14.2	0.8	2.8	6.2
L2	126.0	120.5	22.8	12.2	33.4	23.8	1.6	4.0	6.4
L3	116.5	124.1	36.6	13.1	43.7	26.0	1.1	0.6	6.4
L4	103.3	115.0	21.0	15.0	36.8	13.8	0.9	1.2	6.4
L5	127.9	106.1	23.0	13.8	40.9	25.4	1.2	4.4	6.5
L6	83.1	52.1	17.6	10.4	61.7	12.3	0.6	1.1	6.0
L7	83.2	51.7	17.6	9.2	63.1	11.9	0.6	1.1	5.9
L8	83.8	54.5	9.9	17.3	64.1	12.0	0.7	1.0	5.3
A1	147.2	105.7	12.7	15.2	53.2	7.4	0.7	0.5	6.4
A2	144.0	109.8	9.5	11.4	55.0	8.1	0.6	0	6.5
A3	158.8	83.6	35.3	18.2	28.9	16.3	0.9	3.0	6.28
A4	60.1	40.1	7.1	2.3	28.4	0	0.4	1.6	6.54
A5	160.1	130.0	11.4	11.8	34.9	10.5	0.7	0	6.30
A6	124.2	58.1	33.9	23.4	28.4	0	0.9	5.6	6.34
A7	96.2	55.6	15.9	6.0	50.3	15.5	0.6	0.6	5.93
A8	87.7	58.6	9.7	7.9	66.5	8.7	0.5	0.9	5.60
A9	142.0	97.1	17.8	11.8	45.8	13.5	0.7	1.0	6.28
A10	147.7	102.5	18.1	11.7	42.8	13.0	0.8	1.1	6.28
A11	156.7	122.8	8.4	12.6	43.5	8.5	0.8	0	6.31
A12	163.9	125.4	8.4	11.1	72.5	9.2	1.2	0.8	6.26
A13	153.5	100.9	18.7	14.3	45.3	8.1	0.7	2.8	6.35

TB-83D 株と比較して有機酸生産性が低いものは少なかったが、その中でも、約半数は酢酸生産能が低下している株であった。T3 株は乳酸生産能が低下し T6 株は 1,3-PD 生産能が低下していた。しかしながら、ほぼすべての株においてエタノール生産性は TB-83D 株より向上せずむしろ低下していた。A4, A6 株は 2,3-BD 生産能を欠損しており、A4 については乳酸生成能も同時に欠損していた。特筆すべき株としては、T1 株が 1,3-PD が非生産、2,3-BD の生産性が低下し、L1 株は 1,3-PD と乳酸の生産性が増加したにもかかわらず、ギ酸生産性が低下したことが挙げられる。

ギ酸生産量については、T1 株と L1 株が親株よりもギ酸生産量が低かった。これら 2 株のエタノール生産性を詳細に解析したところ、T1 株でエタノール生産性 0.81 mol-ethanol/mol-glycerol、L1 株で 0.83 mol-ethanol/mol-glycerol であり、それぞれ親株比で 1.17 倍、1.2 倍増加していることが分かった (図 4-6)。さらに、経時的にエタノール生産を含む各種生産物の生産性を調べたところ、T1 株は、親株と比較してエタノール生産性が低下しギ酸濃度が増加した。一方、L1 株はギ酸濃度にあまり変化はみられなかったが、エタノール生産性が増加した。

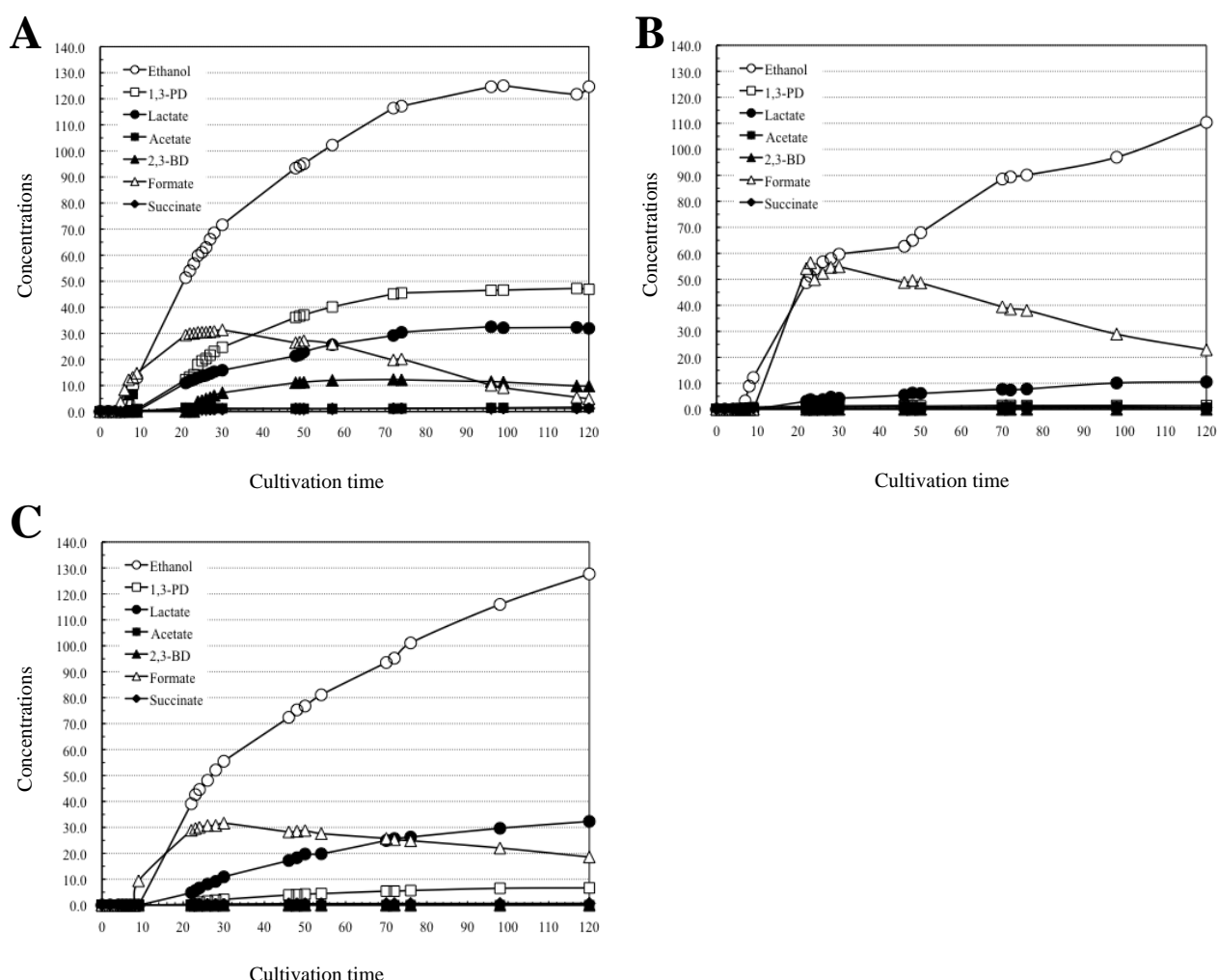


図4-6 T1株、L1株およびTB-83D株の代謝産物解析 (A) TB-83D (B)T1株 (C) L1株

プロトン自殺法により有機酸生産能欠損株 (願わくばギ酸生産能欠損) の獲得を試みた。確かに有機酸生産能が欠損 (もしくは低下) している株を取得することはできたが、結果的にエタノール生産が向上する株の取得には至らなかった。これらは、菌体内酸化還元バランスによる NADH の隔たりによるものであろう。しかし、これら変異株の代謝産物解析から、エタノール生産に及ぼす酸化還元バランスについての知見を得ることができた。

NADH を要求する反応は、1,3-PD、乳酸、2,3-BD、エタノール生成 (2 分子)、4 反応である。例えば、T1 株は 1,3-PD 非生産、NADH が 1 つ余剰することになるが、NADH を要求する反応において生産性の増加が見られない。また、T3 株は乳酸生成能が TB-83D 株の 1/2 になっているにもかかわらず、ギ酸生成以外全て減少した。

逆に、NADH 生成系に着目すると、NADH を生産する系 (すなわち NAD 要求) はピルビン酸からアセチル CoA を生成する系の 1 反応である (ギ酸から二酸化炭素を生成する系も含めれば 2 反応)。L1 株は TB-83D 株よりギ酸生産能が低下した。すなわち、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによる経路 (ギ酸を経由しない反応) にフラックスが流れていることが考えられる。これにより NADH は TB-83D 株より多く生産されていると仮定しても、エタノール生産よりもむしろ 1,3-PD、2,3-BD 生産が増加した。

これらのことから、NADH を余剰させてもエタノール生産性は増加しないということがわかった。

#### 4.3 参考文献

1. Suzuki T, Seta K, Nishikawa C, Hara E, Shigeno T, Nalajima-Kambe T. 2015. Improved ethanol tolerance and ethanol production from glycerol in a streptomycin-resistant *Klebsiella variicola* mutant obtained by ribosome engineering. *Bioresour Tech.* 176,156-162.
2. Gonchar MV, Maidan MM, Pavlishko HM, Sibirny AA. 2001. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food Technol Biotechnol.* 39(1), 37-42.
3. Winkelman JW, Clark DP. 1984. Proton suicide: general method for direct selection of sugar transport- and fermentation-defective mutants. *J Bacteriol.* 160(2), 687-90.

## 5 エタノール生産に向けたグリセロール代謝プロファイルと代謝フラックス解析

微生物による発酵生産を考えた場合、その物質生産の生産性の向上に向けて代謝レベルでの解析が必要不可欠であるが、一概に代謝といえども細胞の代謝は多くの代謝制御による複雑なネットワークで構成されており、それを包括的に解析することは難しい。また、代謝産物は1つではなく複数の副生産物が生産されるため、酸化還元バランスなどの物質のエネルギー収支を考慮しなければならない。さらに、ある特定の物質生産に着目すると、その物質の高生産に向けての分子育種や遺伝子工学的改変株の構築を行う場合、その解析に向けての足がかりを掴むことは、まずその為の指標を探索する必要があり、非常に多くの労力と時間を要する。そのために、代謝の流れを定量的に、視覚的に理解することでより効率よく分子育種を行うアプローチが重要となってくる。

代謝フラックス解析 (Metabolic Flux Analysis: MFA) とは、ゲノムスケールでの細胞代謝ネットワークをシミュレーションした手法であり、代謝中の個々の反応ではなく代謝全体の物質循環に焦点を当てた近年脚光を浴びている解析手法である(1, 2)。フラックス (Flux) は「流れ」であり、まさに細胞内物質代謝における物質循環の流れを表す。代謝フラックス解析は、細胞による物質変換 (発酵や代謝) における細胞物質変換経路のボトルネックの検出や、細胞における物質循環を視覚的に理解することを可能にしている(3)。この解析は、培養条件や培地組成の検討、代謝に関与する遺伝子の改変、すなわち効率の良い分子育種にも発展できる可能性を秘めている。また、培養のスケールアップや自動化の際に、従来よりも精密な培養制御を行うことが可能となる。

代謝フラックス解析は、代謝マップの各経路に対応する代謝反応を書き下ろし、その化学量論係数と HPLC などによる測定実測値を組み合わせた「Flux balance analysis: FBA」(4, 5)と安定同位体基質を用いた「 $^{13}\text{C}$ -assisted metabolic flux analysis」(6, 7)が挙げられる。前者は、基質の消費・生産物の生成速度を基に細胞内に流入および細胞から流出する代謝産物の流れを表現しており、代謝反応と物質収支に基づく化学量論モデルである。一方後者は、安定同位体基質を細胞に取り込ませ、その培養細胞の菌体 (タンパク質) 構成アミノ酸の同位体分布を測定する。同位体でラベルされた基質は代謝経路を通じ、最終的に菌体 (タンパク質) 構成アミノ酸となる。そのアミノ酸は、代謝経路における中間代謝産物の同位体分布を引き継いでいるので、前者の解析に加え、代謝ネットワーク制御機構やバイパス経路を考慮した場合の代謝フラックスも求める事ができる。さらに代謝フラックス解析は、補充経路やバイパス経路による代謝経路の主要な分岐点でのフラックス比を算出する「代謝フラックス比解析」と、代謝全体において物質変換がある経路においてどのくらいの割合で行われているのかを算出する「代謝フラックス分布解析」に分別され、それぞれにおいて実験データと化学量論係数を用いた行列表現で求められる。

このような代謝フラックス解析を本研究に適用し、実際グリセロールがエタノールに微生物変換される際の物質の流れの追跡、各培養条件・経時時間におけるフラックスの分布を調べることで、エタノール変換主要経路を特定し、効率的な分子育種へ発展させる。本実験では、グリセロールからのエタノール生産に向けたエタノール変換プロセスの最適化として、*Klebsiella variicola* TB-83D 株を供試菌体として、上記に示した FBA を用いてグリセロール代謝フラックス分布解析のためのプラットフォームを構築し、代謝フラックスと本菌株のグリセロール代謝プロファイルを純グリセロールとバイオディーゼル廃液を用いることで調べた。

## 5.1 純グリセロールを用いた場合の代謝フラックス解析

### 【材料と方法】

#### 培養および代謝産物の分析

TB-83D株の培養は、これまで行われていた従来の方法に従い、2% グリセロール基本寒天培地上で生育したTB-83Dのコロニーを、20 mlの2% グリセロール基本培地 (pH 8.0) で前培養し、同培地に最終OD<sub>580</sub>=0.01となるように接種した。100mlの5% グリセロール基本培地(各pH)を添加した100ml容ガラスバイアルを用い、ラバーセプタムおよびアルミシールキャップで密栓後、ガスパージのために滅菌した19 Gのシリンジをセプタム中央に突き刺し、25℃で静置本培養(微好気培養)を行った。培養は回分培養もしくはpHコントロール下で行い、培養容器はサンプリングの数を用意し各二連で行った。

#### サンプリングと乾燥重量およびの代謝産物測定

あらかじめ作製した生育曲線から、サンプリングポイントを設定した。各サンプリングポイントでの100mlの培養液を遠心分離した後、上清をHPLC分析、菌体を乾燥重量測定に用いた。乾燥重量の測定は、遠心分離により得られた菌体を85℃で一晩乾燥させた後に重量を測定した。代謝産物の解析は、Aminex HPX-87H Column (Bio-Rad) を連結したWaters alliance 2695 高速液体クロマトグラフィー (Waters) を用い、移動相に0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて流速 0.7 ml/minで行った。

#### ゲノムDNAの調製・シーケンス解析および代謝マップ作成

ゲノムDNAの調製は、Marmur法(8)の改良法を用いて行った。Nutrient Broth (NB) 液体培地 100 mlで一晩生育させたTB-83株を集菌し、10.3% Sucrose溶液で二回洗浄した。洗浄後の菌体にTSE-Sucrose溶液 (25mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 0.3M Sucrose, pH8.0)、40 mg Lysozyme 溶液 (in TSE-Sucrose)と0.5M EDTAを加え、37℃で1 時間保温した。そこに、あらかじめ37℃で2 時間自己消化させたActinase E溶液 (in TSE溶液; 25mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 75mM NaCl) を加え、37℃で1時間保温した。さらに、10% SDS溶液を加え37℃で30分、5M NaCl溶液を加え37℃で30分保温し、4℃で一晩タンパク質を塩析させた。遠心後の上清に、等量のIsopropanolを添加し穏やかに攪拌した。析出したDNAを、滅菌ガラス棒にて巻き取り、70% エタノール溶液でDNAを洗浄した。遠心後に得られたDNAペレットを、TE-Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) に懸濁後、Phenol:Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1) 抽出、再度エタノール沈殿を行い、RNase処理後ゲノムDNAを得た。得られたゲノムDNAを、1×TAE Bufferを用いたアガロースゲル電気泳動に供し、同時に泳動した各濃度のλ-DNAから、およそそのゲノムDNA濃度を算出した。ドラフトゲノムシーケンスは、Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc, San Diego, CA) を用いて解析し、54のコンティグで総塩基数約5 Mbのシーケンスデータを得た。得られたドラフトゲノムシーケンス結果とすでに全ゲノム配列が明らかとなっている*Klebsiella variicola* At-22株のシーケンスデータをふまえ、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)(<http://www.genome.jp/kegg/>) の代謝マップを参考に、代謝フラックス解析に用いる代謝マップを作成した。

## 【結果と考察】

### pHの影響

まず、代謝フラックス解析を行うに際し使用菌株 TB-83D株の生育曲線を作製した。その結果、菌体は24時間まではほぼ指数関数的に増殖し、24時間以降で増殖はほぼ一定になるというデータを得た。これらのことから、生育曲線を3つのPhase (0-12 hour, 12-24 hour, 24-72 hour) に分けた。Phase Iは誘導期および対数増殖期の前半をカバーしており、培養における培地中の溶存酸素の消費を考慮した (すなわち好気培養と同様と仮定) 条件とした (レサズリン添加による試験確認済み 図5-1)。Phase IIは対数増殖期をカバーしており、Phase Iで培地中の溶存酸素が菌体により消費された後の嫌気条件とした。

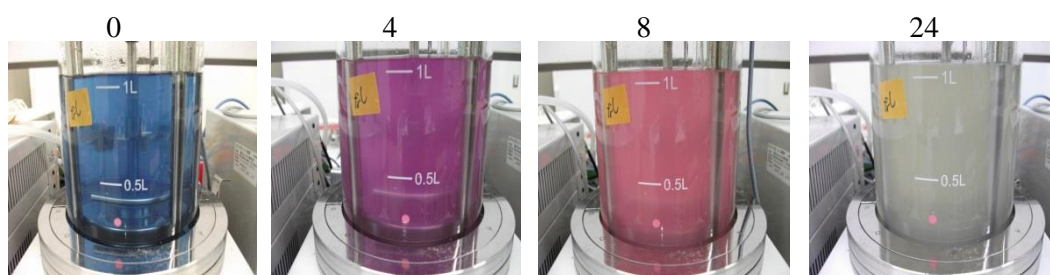


図5-1 レサズリン添加による培地中の嫌気度

代謝マップの作成は、KEGG databaseを基に、本菌株のドラフトゲノムシーケンスと *Klebsiella variicola* At-22株のシーケンスデータをふまえて、グリセロール代謝経路のモデル化を行った。嫌気呼吸での反応を考慮し、6個の代謝産物 (1,3-propanediol, Lactate, 2,3-butanediol, Formate, Ethanol, Acetate) と PhosphoenolpyruvateとPyruvateからOxaloacetateに至る補充経路 (アナブレロティック反応) における1個の代謝産物 (Succinate) の計7個をモデル中の代謝産物とした。また、代謝経路のモデル化に際し、グリセロール代謝の主要経路の骨格を残し、11の代謝経路と流入基質を含む11の代謝物質を考慮してモデル化した (図5-2)。

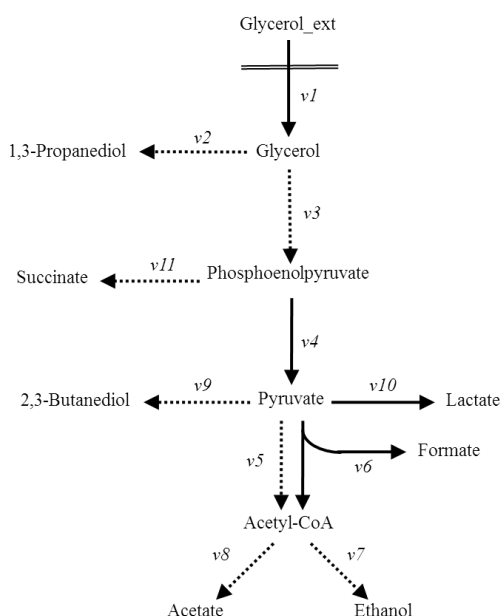


図 5-2 グリセロール代謝経路

代謝フラックス分布解析は、作製した化学量論式からの量論係数を行列表現化し、HPLCで得られた代謝産物の実測値からの物質収支を用いて求めた。行列計算はMATLAB 7.0 (Mathworks, Inc) を用いて行った。

計算式は  $r^T = A v^T$  で表される。

ここで、 $r^T$ は各代謝産物の比生成速度 (mmol/g-CDW/h) ( $m \times 1$ )、 $v^T$ は各反応のフラックスの要素 ( $n \times 1$ ) を表し、 $A$ は化学量論係数を含む代謝反応行列を表す ( $m \times n$ )。

$$r^T = [r_1, r_2, r_3 \cdots v_7, 0, 0, 0, 0]$$

$$v^T = [v_1, v_2, v_3 \cdots v_8, v_9, v_{10}, v_{11}]$$

下に示した式は、11の代謝経路と11の代謝物質から成るため、**A**は正方行列となり逆行列が存在する。

$$r^T = A v^T \text{ を置き換えると } v^T = A^{-1} r^T \text{ となる。}$$

また、図5-2に示した11の代謝経路のうち中間代謝産物は3個であるため、自由度は8となる。故に8個の反応速度を測定すれば、他の反応速度は決定できる。測定した代謝産物は、グリセロール比消費速度 ( $r_1$ )、1,3-propanediol生産速度 ( $r_2$ )、ギ酸生産速度 ( $r_6$ )、エタノール生産速度 ( $r_7$ )、酢酸生産速度 ( $r_8$ )、2,3-butanediol生産速度 ( $r_9$ )、乳酸生産速度 ( $r_{10}$ )、およびコハク酸生産速度 ( $r_{11}$ ) である。

これらの測定値を  $v^T = A^{-1} r^T$  の式を用いて計算することで、他の代謝産物の反応速度を求めた。

結果として、pH制御なしの条件下では、Phase IIで1,3-プロパンジオール、2,3-ブタンジオールおよび乳酸の生成フラックスの増加し、それに伴いギ酸およびエタノールの生成フラックスが減少した。一方、一定pH条件下では、phase IIでpH制御なしと比較すると、エタノールの生成フラックスはほぼ変化がなかったが、乳酸およびギ酸の生成フラックスが、それぞれ約2.5倍、約3倍に増加した。一方、1,3-プロパンジオール、2,3-ブタンジオールの生成フラックスの著しい減少が見られた。

以上のことから、一定 pH 条件下で エタノール生産を行う場合、乳酸の生成を抑えるもしくはギ酸耐性を付与させることが最も効果的であると示唆された。

表5-1 代謝フラックス解析結果

Metabolic flux distribution of Phase I (0 – 24 hour)							Metabolic flux distribution of Phase II (24 – 72 hour)						
反応	代謝フラックス						反応	代謝フラックス					
	pH 7.0		pH 8.0		pH 9.0			pH 7.0		pH 8.0		pH 9.0	
	制御なし	制御あり	制御なし	制御あり	制御なし	制御あり		制御なし	制御あり	制御なし	制御あり	制御なし	制御あり
v1	100 (4.53)	100 (4.88)	100 (4.47)	100 (5.96)	100 (4.55)	100 (5.91)	v1	100 (2.43)	100 (6.42)	100 (2.23)	100 (9.35)	100 (2.86)	100 (15.7)
v2	7.8	9.4	8.1	10.2	7.8	8.7	v2	24.9	18.8	26.0	15.4	18.1	15.6
v3	92.1	90.6	91.9	89.8	92.2	91.3	v3	75.1	81.1	73.9	84.6	81.9	84.4
v4	89.3	89.6	89.6	88.5	89.3	89.9	v4	74.2	80.6	73.0	83.9	81.2	83.3
v5	48.3	-27.0	48.4	3.79	48.6	-50.2	v5	49.8	53.0	37.7	17.5	51.9	15.2
v6	36.6	103.3	38.4	69.7	41.4	125.4	v6	4.3	6.7	17.1	51.9	16.0	48.9
v7	84.5	62.6	87.4	72.1	89.8	64.8	v7	55.7	61.9	69.5	64.5	71.5	61.2
v8	0	4.1	0.2	3.3	0.2	4.2	v8	0	0.5	0	4.6	0	3.0
v9	0	0	0	0	0	0	v9	15.2	11.0	14.3	0.32	7.8	0
v10	4.3	9.3	2.5	11.6	3.1	10.5	v10	4.8	9.4	4.0	9.5	4.8	16.2
v11	2.9	1.0	2.4	1.4	1.0	1.4	v11	0.9	0.5	0.9	0.6	0.7	0.1

各代謝産物の前駆体 (エタノールならアセトアルデヒド) やグリセロールからホスホエノールピルビン酸に至る中間体は、(擬)定常状態と仮定される。フラックス算出の際に、要素「0」として扱われるため、省略して記載した。フラックス値は、グリセロールの比消費速度を「100」とした時の相対値で表記してある。また、表記した値は、実験は2連もしくは3連で行ったものの平均値で示してある。

## バイオマス生成を考慮した場合の影響

これまでに求めてきた代謝フラックス分布解析に、バイオマス生成量も考慮してフラックスの再算出を行うために、従来の化学量論行列の見直しと、実測値を用いての代謝フラックス分布解析を行った。

前項で算出した代謝フラックス分布解析は、代謝量論行列が正方行列となるようにマトリックスを構築して算出しているのですが、その逆行列と実測値から計算できたが、バイオマス生成量を加えての算出となると、代謝量論行列が正方行列とならず、逆行列がとれないという問題に行き当たった。そこで、化学量論行列を再構築するために、再度化学量論式を書き下ろした。(図5-3)

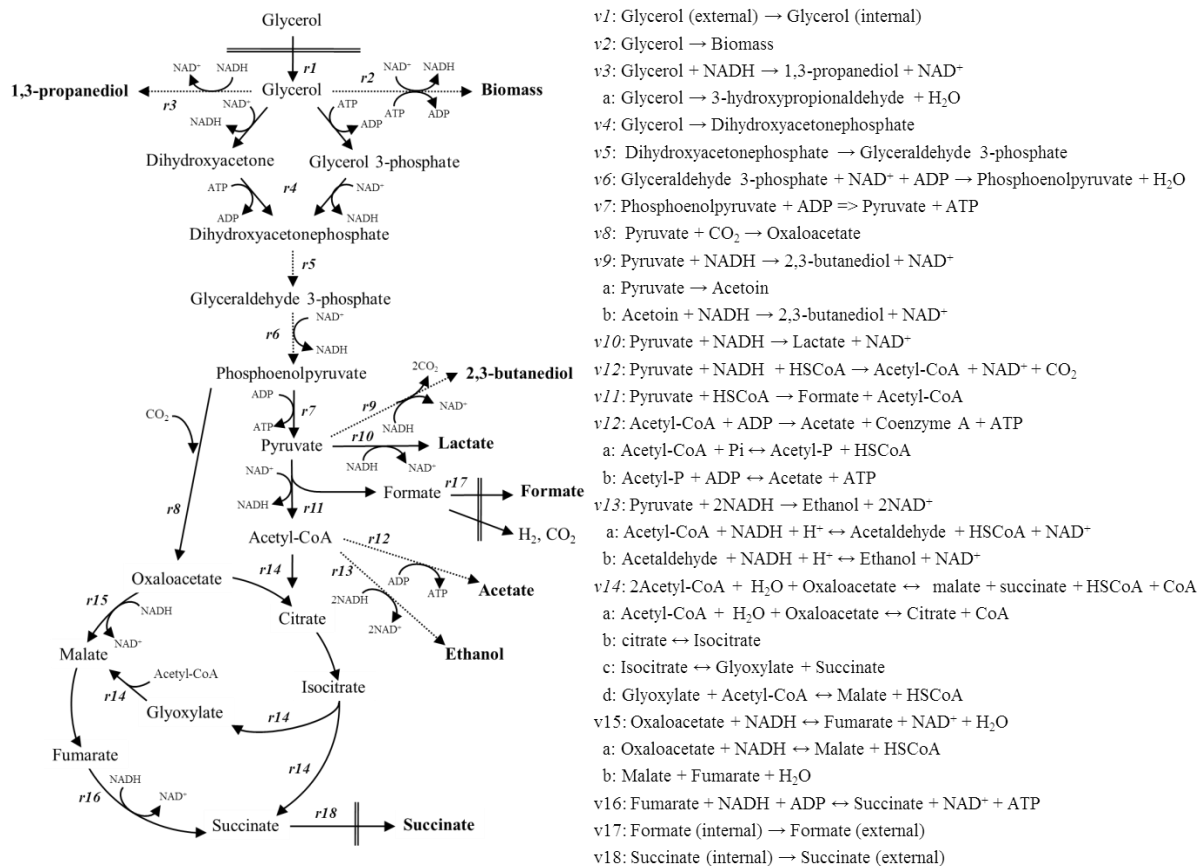


図 5-3 新たに構築したバイオマス生成を考慮した場合のグリセロール代謝経路

グリセロール代謝における化学量論式は多数報告されているが、その殆どが簡略化モデルであり、詳細なモデルは少なかった。そこで、同位体を用いず詳細な化学量論式および化学量論行列を報告しているSanchezらの方法を参考にした。なお、Sanchezらの報告(9)は、基質がグルコースであるため、基質をグリセロールとしてモディファイした。書き下ろした化学量論式は、20の代謝物質と18の代謝経路を考慮し、NADHの収支を制約条件として加えて作製した。故に20×38の化学量論行列となり、物質収支式はAr=0の式となった。

変数の数=38 であり、式=20 であるので、自由度は 18 になり、モデル中に含まれる 11 の中間代謝産物の比速度は、擬似定常状態であると仮定すると、比速度は 0 になるので、最終的に自由度は 7 となった。しかし、測定可能な代謝産物は 8 個であり、このシステムは冗長な状態 (Over-determined) になった。これは、従来行っていた方法のように、逆行列がとれないので、 $v(t) = (A^T A)^{-1} A^T r(t)$  の Moore-Penrose 型の擬似逆行列を用いて算出した。

表 5-2 バイオマス生成を考慮したフラックス解析結果

Metabolic flux distribution of Phase I (0 – 24 hour)							Metabolic flux distribution of Phase II (24 – 72 hour)						
反応	代謝フラックス						反応	代謝フラックス					
	pH 7.0		pH 8.0		pH 9.0			pH 7.0		pH 8.0		pH 9.0	
	制御なし	制御あり	制御なし	制御あり	制御なし	制御あり		制御なし	制御あり	制御なし	制御あり	制御なし	制御あり
v1	100 (4.53)	100 (4.88)	100 (4.47)	100 (5.96)	100 (4.55)	100 (5.90)	v1	100 (2.44)	100 (6.42)	100 (2.28)	100 (9.35)	100 (2.86)	100 (15.73)
v2	2.8	6.9	3.4	3.3	2.8	3.7	v2	2.4	1.0	2.3	1.4	2.2	0.5
v3	3.5	13.5	3.4	9.9	2.9	14.6	v3	20.0	14.1	17.7	14.6	12.7	15.0
v4	94.3	78.5	94.0	87.0	95.4	80.5	v4	78.5	85.5	81.7	83.8	86.2	84.3
v5	95.0	77.4	94.8	87.1	96.5	79.2	v5	79.4	86.2	83.5	83.5	87.3	84.1
v6	95.7	76.4	95.7	87.3	97.6	78.0	v6	80.2	86.9	85.3	83.3	88.3	83.9
v7	69.9	90.7	70.6	83.6	72.9	101.9	v7	55.5	59.4	65.0	72.1	62.4	73.5
v8	19.4	-9.3	18.5	3.5	18.5	-16.1	v8	17.9	20.4	13.9	8.9	18.6	8.6
v9	2.9	-2.0	2.9	1.4	2.6	-3.3	v9	18.1	14.2	16.4	1.6	10.8	1.0
v10	7.2	7.4	5.3	11.6	5.6	7.3	v10	7.8	12.5	6.4	10.8	8.7	17.3
v11	53.4	90.3	55.9	70.4	58.4	105.6	v11	22.7	25.6	35.6	57.5	35.6	53.4
v12	-2.1	6.2	-2.1	3.2	-2.2	7.1	v12	-2.4	-1.8	-3.0	4.2	-2.6	2.7
v13	74.8	71.4	77.0	71.6	79.0	77.6	v13	45.2	51.4	57.0	62.2	59.9	59.4
v14	-8.6	5.4	-8.4	-2.1	-8.0	9.0	v14	-8.9	-10.9	-7.7	-4.3	-9.5	-4.2
v15	21.5	-9.6	20.3	5.4	20.2	-17.3	v15	20.0	24.1	15.1	10.9	20.8	10.9
v16	10.1	-2.3	9.1	3.2	9.6	-5.1	v16	8.1	10.0	5.0	5.4	8.1	5.7
v17	44.9	97.3	47.0	70.1	49.7	116.3	v17	13.5	16.1	26.2	54.8	25.7	51.2
v18	2.2	2.0	1.5	1.2	2.7	2.7	v18	0.1	0.0	-0.9	0.9	-0.3	1.3

表 5-2 に示した通り、バイオマス生成量を加えて化学量論行列を細分化した場合も同様に、バイオマスを加味しないフラックスの算出（前出）とほぼ同様な結果を得ることが出来た。Phase II において v14 の値がほぼ負となっており、v15 の値が正になっていることが分かる。これは、コハク酸生産はアセチル CoA からではなく、補充経路からであると考えられる。また、これに伴い v8 のフラックス (すなわち補充経路) が負になっている場合は、v14 の値が正になっているので、コハク酸生産はアセチル CoA 経由で生産されているということがわかる。さらに、補充経路を経てコハク酸生成に至る場合とアセチル CoA を経てコハク酸生成に至る場合を見ると、アセチル CoA 経由でコハク酸生成に至る場合は、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸に至るフラックス (v7) が増大していた (Phase I の pH 7.0 および 9.0 の pH 制御条件下)。

また、酢酸生成フラックス (一部コハク酸も) の値が負になっているのは、生産量が 0 (もしくはほぼ 0) であるために計算上みかけのフラックスは負となっていると思われる。

pH 制御条件下の全ての場合において、エタノール生産に重要であると思われるピルビン酸からアセチル CoA へのフラックス (v11) が増加していることもわかった。

- pH 制御におけるエタノール生産の場合 -

- ・ ギ酸生成フラックス ( $v_{17}$ )、乳酸生成フラックス ( $v_{10}$ ) の増加
- ・ ピルビン酸からアセチル CoA へのフラックス ( $v_{11}$ ) の増加
- ・ エタノール生成フラックス ( $v_{13}$ ) はほぼ変化なし

→ エタノール生産最適 pH 8.0 の場合は pH 7.0 もしくは pH 9.0 と比べてその増加率は顕著。

(1,3-PD 生成フラックス ( $v_3$ ) および 2,3-BD 生成フラックス ( $v_9$ ) は培養進行と共に減少)

以上の結果から、やはり乳酸生成を抑えることが効果的であるとわかった。

## 5.2 BDF廃液を用いた場合の代謝フラックス解析

### 【材料と方法】

前項に準じた

### 【結果と考察】

基質をグリセロールに代えて、鳥栖環境開発総合センターの BDF 廃液を用いた。この場合、初期 pH 8.0 では、培養経過に伴い phase II (24 hr – 72 hr) でバイオマス生成量が phase I (0 hr – 24 hr) より減少していた。これは、再度実験を行ったが (バイオマス生成のみの検証)、同様に phase II ではバイオマス生成量が減少するという結果が得られた。一方、pH 9.0 ではこのような現象はみられず、phase I でのバイオマス生成量は pH 8.0 の phase I と比べて 2.3 倍に増加していた (表 5-3)。このことから、バイオマス生成量のみに関しては、pH 8.0 よりも pH 9.0 の方が高いということがわかった。

表 5-3 各初期 pH における微分菌体収量

	Differential cell yield ( $Y_{X/S}$ ) [-]		Biomass (g/L)	
	pH 8.0	pH 9.0	pH 8.0	pH 9.0
Phase I (0 – 24 hour)	0.038	0.084	0.290	0.175
Phase II (24 – 72 hour)	ND	0.030	0.263	0.428

ND., Not determined

基質消費速度に関しては、phase I で pH 8.0 は pH 9.0 よりも 1.7 倍増加したが、phase II では逆に pH 9.0 が 4 倍増加するという現象が見られた (表 5-4)。今回の BDF を用いた培養により得られた代謝プロファイルのまとめを図 5-4 に示す。

表 5-4 各初期 pH におけるグリセロール消費速度

	Substrate consumption rate ( $r_s$ ) [g-substrate/L/h]	
	pH 8.0	pH 9.0
Phase I (0 – 24 hour)	0.314	0.194
Phase II (24 – 72 hour)	0.077	0.291

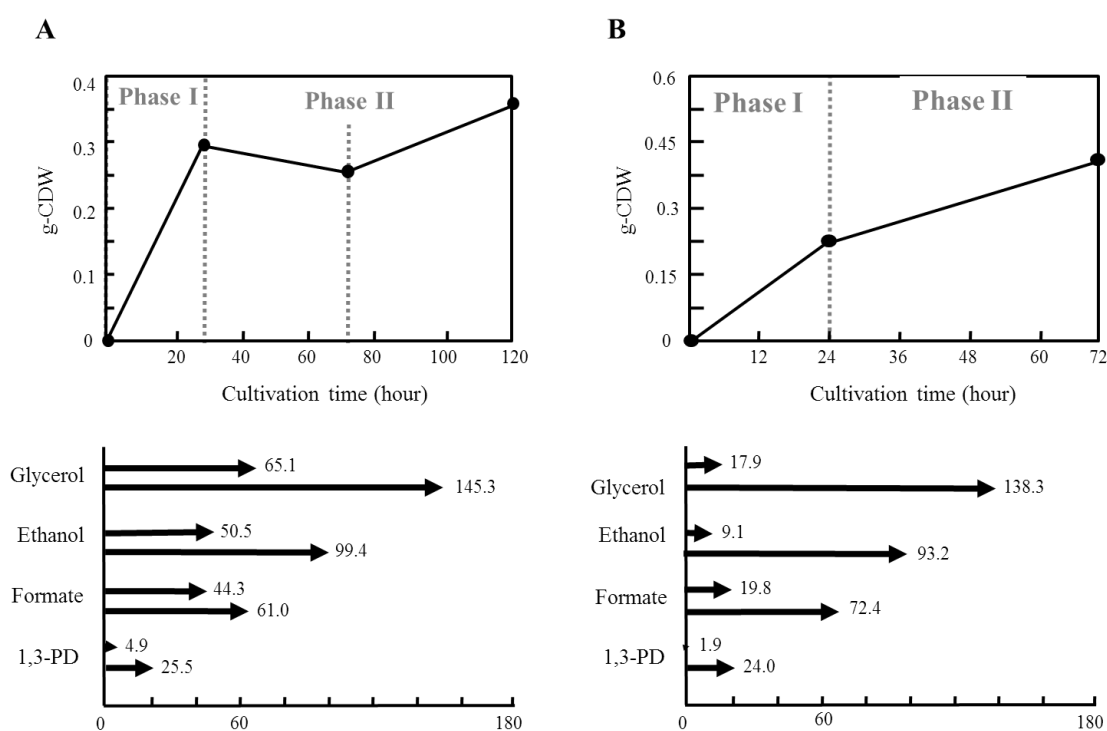


図 5-4 BDF 廃液を用いたバイオマス生成量と、各 phase における主要生成物の生産量

(A) 初期 pH 8.0 (B) 初期 pH 9.0. 生成量のグラフは、上段が phase I、下段が phase II を示し、矢印横の値は実際の生産量 (mmol/L) を表す。

最終的な消費グリセロール量、エタノール生成量、1,3-PD 生成量 (72 時間後) は pH 8.0 が最も高かったが、ギ酸生成量は pH 9.0 の方が高かった。

### 5.3 純グリセロールと BDF を用いた場合でのフラックス分布の比較

#### 【材料と方法】

前項に準じた

#### 【結果と考察】

前項で構築した TB-83D 株のグリセロール代謝マップは、ピルビン酸からアセチル CoA に至る経路で  
 ギ酸を生成する経路のみで作製していたので、今回はギ酸を生成しない経路も新たに付け足したものを  
 再構築した (図 5-5)。これにより、化学量論式および化学量論行列も変化するため、これに対応するよう  
 に再度書き直した。

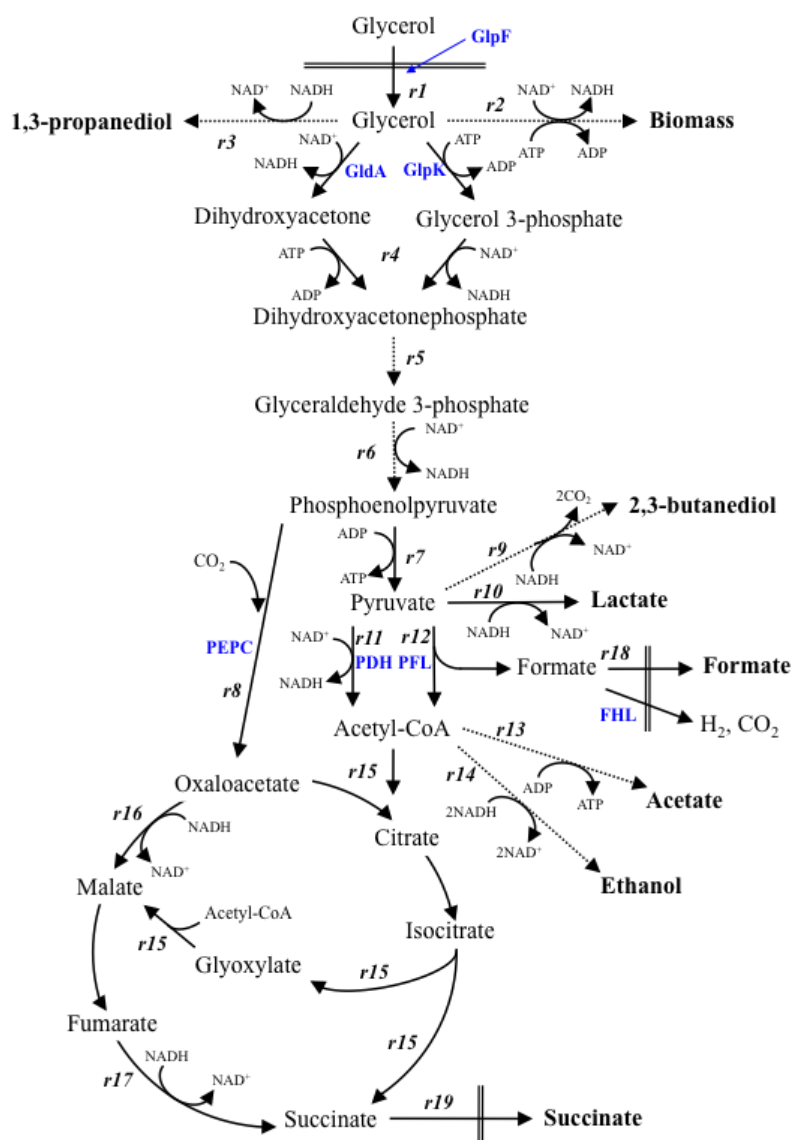


図 5-5 *K. variicola* TB-83D 株の再構築したゲノムスケールレベルでのグリセロール代謝マップ

また、従来の計算方法では発酵の各種副生産物が生成されない場合、その比生成速度 (mmol/g-CDW/h) は 0 (ゼロ) として計算を行っていた。今回、各種副生産物が生成されない場合についてはその生産経路を化学量論式から省き (例えば、酢酸を生成しない場合は、酢酸の生成経路を省いて、化学量論行列も酢酸の生成を省いたものを作製) 計算を行った。純グリセロールを用いた場合と BDF を用いた場合では、それぞれの基質の各 Phase で、ある副生産物が生成されないといういくつかのパターンがあり、それらも上記に示した通り生成しないものについては、その生産経路を化学量論式から省いて計算を行った。

純グリセロールを用いた場合、pH 非制御条件下で 1,3-PD および 2,3-BD のフラックスの増加が見られ、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸へのフラックスが減少した (表 5-5)。一方、pH 制御下では非制御下とは逆の現象が見られ、ピルビン酸生成フラックスが著しく増加した。

表 5-5 純グリセロールと BDF を用いた場合でのフラックス分布の比較

Reaction	Flux							
	without pH control				pH control			
	Pure-glycerol		BDF-waste		Pure-glycerol		BDF-waste	
	Phase I	Phase II	Phase I	Phase II	Phase I	Phase II	Phase I	Phase II
<i>r1</i>	100 (4.47)	100 (2.28)	100 (9.49)	100 (6.36)	100 (5.96)	100 (12.22)	100 (5.39)	100 (15.21)
<i>r2</i>	4.3	4.2	1.3	0.8	3.4	0.9	5.0	0.4
<i>r3</i>	8.1	24.1	7.5	23.2	10.2	11.8	9.5	12.1
<i>r4</i>	87.6	71.8	91.2	76.0	86.5	87.4	85.5	87.5
<i>r5</i>	87.6	71.8	91.2	76.0	86.5	87.4	85.5	87.5
<i>r6</i>	87.6	71.8	91.2	76.0	86.5	87.4	85.5	87.5
<i>r7</i>	80.4	53.8	90.5	63.8	78.6	113.3	84.2	84.3
<i>r8</i>	7.2	17.9	0.7	12.1	7.8	-	1.4	3.1
<i>r9</i>	0.0	14.3	0.0	9.0	0.0	0.2	0.0	0.0
<i>r10</i>	2.5	4.2	9.9	17.1	11.6	7.3	10.5	19.3
<i>r11</i>	39.4	18.3	12.5	16.8	-	66.0	-	22.2
<i>r12</i>	38.5	17.1	68.1	20.8	69.8	39.8	77.9	42.8
<i>r13</i>	0.2	0.0	1.9	0.0	3.3	3.5	2.0	0.8
<i>r14</i>	87.5	69.5	77.7	60.8	76.7	49.3	72.0	68.9
<i>r15</i>	-	-	0.5	-	-	26.5	-	-
<i>r16</i>	12.1	35.0	0.2	23.7	14.3	-	1.5	5.4
<i>r17</i>	7.2	17.9	0.7	12.1	7.8	-	1.4	3.1
<i>r18</i>	38.5	17.1	68.1	20.8	69.8	39.8	77.9	42.8
<i>r19</i>	2.3	0.9	1.2	0.5	1.4	0.5	1.2	0.8

Values indicate the average from three independent experiments.  
Values given in parentheses indicate specific consumption rate (mmol/g-CDW/h).

BDF 廃液を用いた場合、純グリセロールと比較してフラックス分布は明らかに変化していた。純グリセロールの場合と同様に、pH 非制御下では 1,3-PD および 2,3-BD の生成フラックスの増加に加え、乳酸およびアセチル CoA の生成フラックスの増加が見られた。pH 制御下では、測定した条件のうち培養期間中でのエタノール生成フラックスの減少率は最も低かったが、培養後期には乳酸およびギ酸生成フラックスが、非制御下と比較して約 2.5 倍と約 3.0 倍に増加した。

以上の結果は、BDF 廃液を用いた場合、乳酸生産がエタノール生産に最も関与している可能性を示唆しているため、ピルビン酸における乳酸フラックス比を調べたところ、pH 制御・非制御条件下ともに、純グリセロールの場合と比較して、乳酸生成フラックス比は約 3 倍高かった。(非制御下: 10.6% (純グリセロール) → 31.3% (BDF) 制御下: 6.5% (純グリセロール) → 22.9% (BDF)。このことから、pH 制御下で BDF からエタノール生産を行う場合、乳酸生産の抑制が必要であることがわかった。

## 5.4 参考文献

1. Shimizu H. 2002. Metabolic engineering--integrating methodologies of molecular breeding and bioprocess systems engineering. *J Biosci Bioeng.* 94(6), 563-73.
2. Stephanopoulos G, Vallino JJ. 1991. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction. *Science.* 252, 1675–1681.
3. Feng X, Page L, Rubens J, Chircus L, Pakrasi HB, Tang YJ. 2010. Bridging the Gap between Fluxomics and Industrial Biotechnology. *J Biomed Biotechnol.* 460717.
4. Orth JD, Thiele I, Palsson BØ. 2010. What is flux balance analysis? *Nature Biotech.* 28, 245-248.
5. Blank LM, Kuepfer L. 2010. Metabolic flux distributions: genetic information, computational predictions, and experimental validation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86(5), 1243-55.
6. Nanchen A, Fuhrer T, Sauer U. 2007. Determination of metabolic flux ratios from  $^{13}\text{C}$ -experiments and gas chromatography-mass spectrometry data: protocol and principles. *Methods Mol Biol.* 358, 177-97.
7. Fischer E, Zamboni N, Sauer U. 2004. High-throughput metabolic flux analysis based on gas chromatography–mass spectrometry derived  $^{13}\text{C}$  constraints. *Anal Biochem.* 325(2), 308–16.
8. Marmur J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J Mol Biol.* 3, 208-218.
9. Sanchez AM, Bennett GN, San KY. 2006. Batch culture characterization and metabolic flux analysis of succinate-producing *Escherichia coli* strains. *Metab Eng.* 8, 209–226

## 6 遺伝子組換え手法による高生産変異株の創出

物質生産において、ある特定の代謝産物の生産量を特異的に増加させたい場合、「開始物質(基質)がどのような代謝経路を経るか?」「それらの物質が最終的にどれくらいの割合で目的産物に変換されるか?」という点を調べ(代謝フラックス解析)、様々な培養条件を調べることにより生産性の増加を目指す。これらは、使用菌株の最適条件(pH・培地成分・酸素の有無)に依存し、菌の増殖と生産を包括的に制御することによる。物質生産性を増加させるにあたり、「副生産物生産性の増加」や「副生産物による生産阻害」といった問題が浮上し(本菌株の場合ギ酸)、それらをピンポイントで抑制させることには限界がある。代謝といえども、実際は酸化還元バランスや遺伝子制御など複雑な要因が関わっており、それらを制御するには遺伝子操作による代謝改変が必要になってくる。

代謝改変 (前述のギ酸分解も含めて) を行うにあたり、2つのアプローチがある。1つ目は遺伝子発現による特定酵素機能の増強 (遺伝子の足し算)。もう一つは、遺伝子破壊による特定酵素機能の欠失 (遺伝子の引き算) がある。前章の代謝フラックス解析により、TB-83D のグリセロールからエタノール生産についての鍵となる物質は「ギ酸」と「乳酸」であることが強く示唆された。そこで、まず遺伝子発現による特定酵素機能の増強として、ギ酸デヒドロゲナーゼの発現によるエタノール生産中でのギ酸分解を試みた。

ギ酸はグリセロール以外にも、グルコースなどの糖類を発酵原料にした時にも必ず生産される(図 6-1)。基本的に発酵は嫌気条件で行われるため、ピルビン酸から生産される代謝産物はほとんどの場合がピルビン酸・ギ酸リアーゼ (PFL) によりギ酸生産を伴って生産されるためである(1, 2)。これまでギ酸分解に関しては、ギ酸脱水素酵素もしくはギ酸・水素リアーゼ (FHL) の発現によるギ酸の分解がよく研究されている(3-5)。しかし、これらは菌体 (もしくは酵素) を触媒として水素を生産させる研究がほとんどであり(6-8)、阻害効果の抑制といった、培養過程に目的生産物を生産させながらギ酸を分解させるという試みはなされていない。TB-83D のギ酸代謝遺伝子は、ギ酸・水素リアーゼとして染色体上に存在しており、制御遺伝子も遺伝子の発現に関与している(9, 10)。その中でも特に、転写活性化因子 FhlA は、ギ酸分解に重要である Hydrogenase 3 オペロンおよびギ酸デヒドロゲナーゼ FdhF の転写を活性化する(10)。このことから、これらの発現強化はギ酸の分解に効果的であると期待できる。

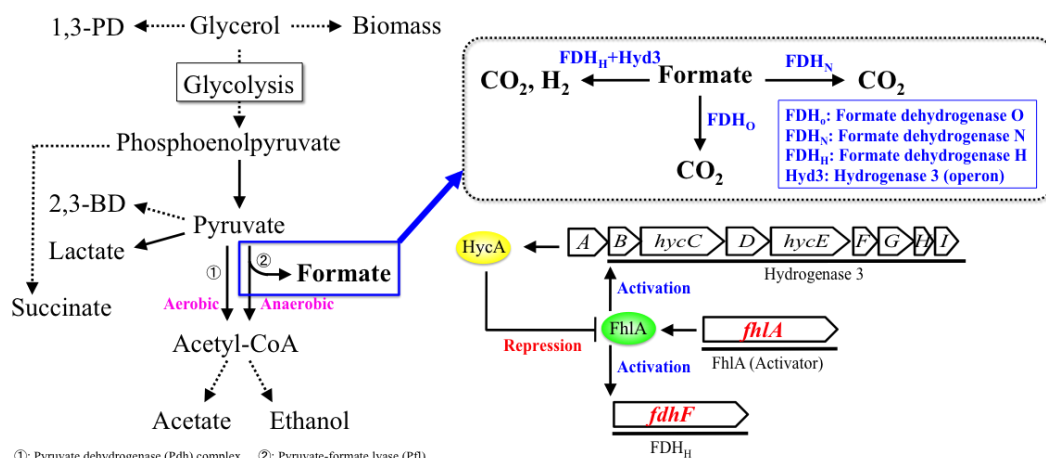


図 6-1 ギ酸分解関与遺伝子群

2つ目のアプローチである遺伝子破壊に関しては、乳酸脱水素酵素遺伝子をターゲットとすることで、その遺伝子破壊を試み、エタノール生産性を評価する。しかしながら、現段階において TB-83D 株における効率的な遺伝子破壊方法は見いだされていない。遺伝子破壊技術の構築は、代謝改変による目的物質生産性の向上における重要なファクターである。このことから、TB-83D 株の遺伝子破壊法を構築し、その技術を適応することで乳酸脱水素酵素遺伝子破壊を試み、得られた遺伝子破壊株のエタノール生産性について評価した。

## 6.1 代謝フラックス解析に基づく代謝キーポイントの策定

本菌株のエタノール生産条件 (pH 8.0 一定条件) でエタノール生産を行うと、エタノールとほぼ等量のギ酸が蓄積することが明らかとなっている。この理由は、ピルビン酸からギ酸を経由してアセチル CoA に変換するピルビン酸-ギ酸リアーゼ活性はアルカリ条件で高く、ギ酸を二酸化炭素と水素に変換するギ酸デヒドロゲナーゼ (ギ酸-水素リアーゼ) 活性は酸性条件で高いことに由来する(11, 12)。すなわち、pH 8.0 の一定条件での培養でギ酸の影響を回避するには、アルカリ条件下でギ酸を分解させることが最も効率がよいと思われる。そこで、ギ酸デヒドロゲナーゼを発現させる、すなわち遺伝子増強によるアプローチとして、経時的代謝産物解析によるギ酸濃度の変化挙動を調べ、各培養 Phase でのギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現を調べることで、代謝キーポイントの策定を行った。また、遺伝子破壊のアプローチとして乳酸脱水素酵素遺伝子破壊について遺伝子の策定も行った。また、本菌株におけるグリセロール代謝とエタノール生産に関する代謝フローを明らかにした結果から、エタノール生産を最大にするには、乳酸の生成を抑えることが最も有効であるということが分かった。このため、乳酸生成系に関与する遺伝子の破壊を試みることにした。

### 【実験材料と方法】

#### *TB-83D 株の培養*

本培養は 1.5 L 用ジャーファーメンターを用いた。20 ml の 50 µg/ml ストレプトマイシン含有 2% グリセロール基本培地 (pH 8.0) で前培養を行った菌体を、初期 OD<sub>580</sub>=0.01 になるように、同培地 1 L に接種し、pH コントロール有と無しの場合で培養を行い、経時的に培養温度、pH、代謝産物解析を行った。

#### *Total RNA の単離*

あらかじめ測定したギ酸濃度のグラフからサンプリング時間を設定し、培養液をサンプリングした。サンプリングした培養液をすぐさま RNeasy Protect Bacteria Reagent で処理し、RNA の安定化を行った。得られたサンプルを RNeasy mini kit を用いて Total RNA の単離を行い、DNase I で on column digestion を行うことで残存 DNA を分解させた。

## RT (Reverse transcription) -PCR

各 RNA 溶液 1 µg を Random hexamer を用いて Random priming を行い、更に PrimeScript RTase を用いて逆転写を行うことで cDNA を合成した。得られた cDNA をテンプレートに Ex Taq HS DNA polymerase を用いて PCR を行った。また、ゲノム DNA のコンタミネーションのチェックとして、逆転写を行わない RNA サンプルを用いた。

## 乳酸の定量

2% グリセロール基本培地で培養した培養液を、遠心 (13,000 rpm, 10 min) 後、その遠心上清を基質として、F-kit D-lactate/L-lactate により乳酸定量を行った。

## 【結果と考察】

ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子発現プラスミドの構築として、まず TB-83D 株のドラフトゲノムシーケンスからギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の存在数を調べた所、ゲノム上にギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のホモログが 4 コピー存在していた (*fdhF1*, *fdhF2*, *fdhF3*, *fdhF4*)。発現プラスミドを構築するにあたり、まずどのギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子が発現しているのかを調べる必要があった。そこで、最初に TB-83D 株を pH コントロールなしと有りの条件で培養し、細かく経時的にサンプリングすることでギ酸濃度の挙動を調べた。まず、pH と DCW の挙動を調べたところ (図 6-2)、pH コントロール無し (A) では pH は培養 72 時間まで減少し、DCW は培養 24 時間でほぼプラトーに達した。一方、pH コントロール下では、DCW は培養約 72 時間以降減少する傾向が見られた (B)。さらに、ギ酸濃度は pH コントロール非条件下では培養 5 時間後から生産し始め、その後約 21 時間～30 時間後 (pH 6.5～6.2) で最大となった (31 mM)。その後減少した。一方、pH コントロール制御下では、培養 7 時間後から生産され始め、48 時間前後で最大となったが (100 mM) その後の減少率は非制御下と比較して著しく低かった。

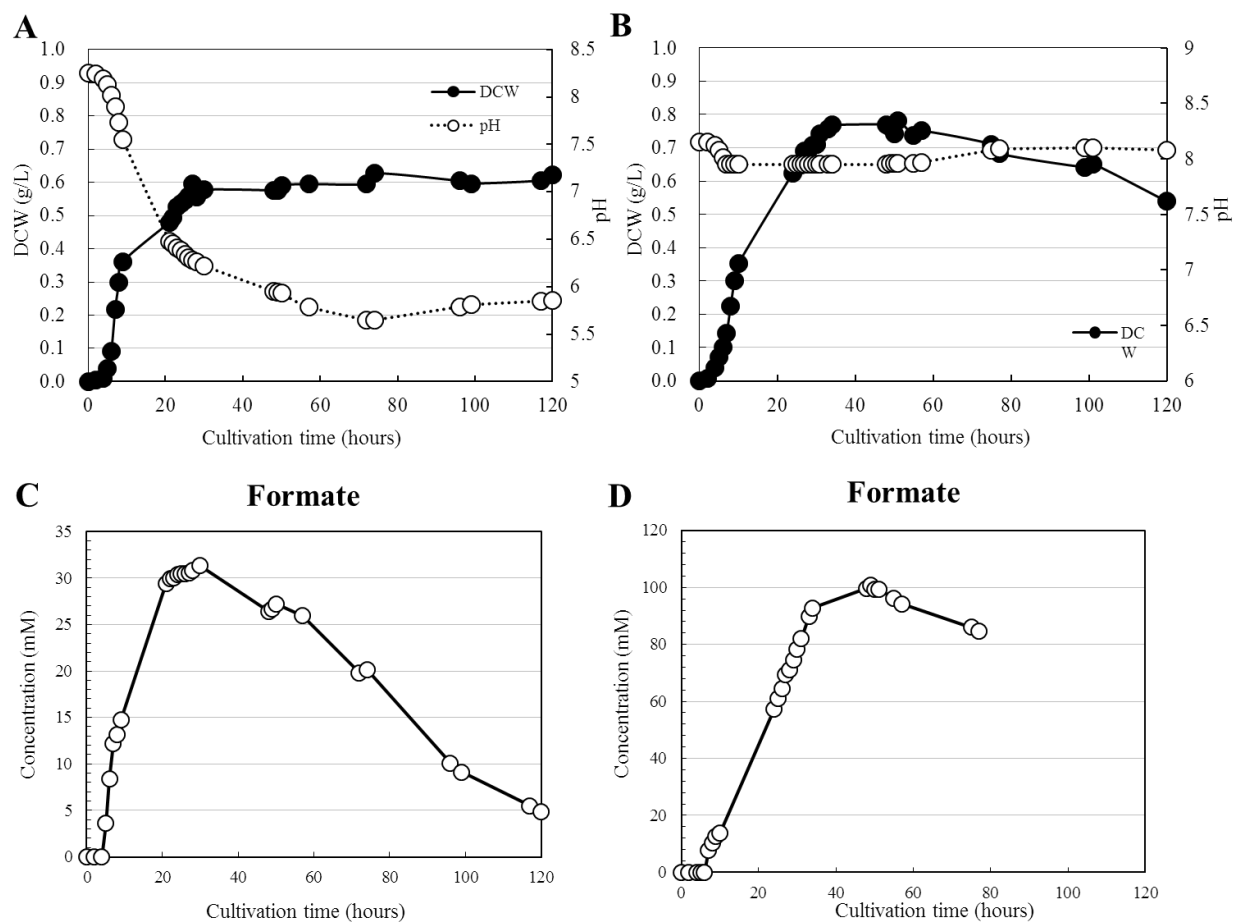


図 6-2 pH コントロール有と無の場合の、DCW および pH の挙動  
 A) pH コントロール無 B)有 C) pH コントロール非制御下でのギ酸濃度  
 D) pH コントロール条件下でのギ酸濃度

### ギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子発現

ギ酸濃度の挙動変化から、確かに pH コントロール非制御下では pH 低下と共にギ酸濃度の減少がみられ、制御下ではギ酸濃度は高く減少率も非常に低いことが分かった。前述のとおり、本菌株のゲノム上にはギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のホモログが *fdhF1*, *fdhF2*, *fdhF3*, *fdhF4* の 4 コピー存在していた。実際にギ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の発現に際し、これら 4 個のホモログの内どの遺伝子を発現させるのか？という問題に行き当たった。このような場合、各培養 phase で遺伝子の発現みて、どの段階でどの遺伝子が最も発現しているのかどうかを調べる事が常套手段である。そこで、ギ酸濃度の挙動変化 (pH コントロール無) から、5 時間 (ギ酸生成開始)、9 時間 (ギ酸生成における log phase)、24 時間 (ギ酸濃度最大)、48 時間 (ギ酸濃度減少段階) の 4 ポイントをサンプリングポイントとして設定した。

設定した各サンプリングポイントで回収した培養菌体から RNA を抽出し、*fdhF1*, *fdhF2*, *fdhF3*, *fdhF4* の mRNA の発現を調べた (図 6-3)。ギ酸濃度上昇段階 (5 時間, 9 時間) では *fdhF1* が転写されており、培養が進行し pH が低下し始めると *fdhF3* の転写が開始され、ギ酸濃度が最大となる 24 時間で転写量は最大となった。*fdhF4* は転写量は低いものの、培養初期から常に発現しており、*fdhF2* に関しては全くのサイレント遺伝子であることが明らかとなった。これらの結果から、実際に発現させる遺伝子は、ギ酸濃度が最も高く、pH 減少の log phase に相当する 24 時間で最も転写量の高かった「*fdhF3*」を用いればよいということがわかった。

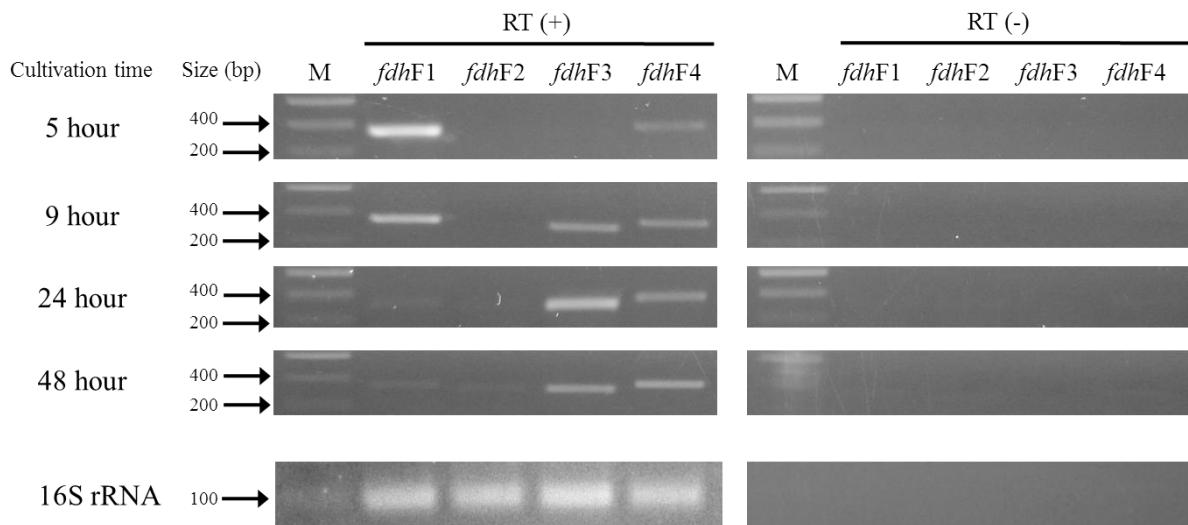


図 6-3 各培養 phase から抽出した RNA を用いた時の RT-PCR

### ギ酸脱水素酵素遺伝子アクチベーターの遺伝子発現

ギ酸脱水素酵素遺伝子のアクチベーター (*FhlA*) は、ギ酸脱水素酵素遺伝子を構成する遺伝子を活性化。上記で解析した *FdhF* もそのターゲットの 1 つである。ギ酸から水素生産における論文を調べると、数報ではあるが、*fhlA* の過剰発現により水素生成能が増加したという報告があった。故に、上記の *fdhF* の発現に次いで、このアクチベーター遺伝子の発現も試みる必要がある。

まず、*fhlA* の発現 plasmid 構築に当たり、TB-83D 株のドラフトゲノムシーケンスから *fhlA* の存在数を調べた所、ゲノム上に 1 コピー存在していた。この遺伝子配列から、RT-PCR 用のプライマーを作製した。次に、2% グリセロール基本培地を用いた pH コントロール無しのバッチ培養で TB-83D 株を培養し、逐次 pH をモニタリングしながら、培地中の pH が、pH 8.0, pH 7.5, pH 6.5, pH 6.0 になった時に培養液をサンプリングし、すぐに Total RNA を単離した。得られた Total RNA を用いて mRNA の発現を調べた所、どの pH 段階でも *fhlA* は発現していた (図 6-4)。このことから、FhlA はアクチベータータンパク質として TB-83D 株内で発現していることが明らかとなった。

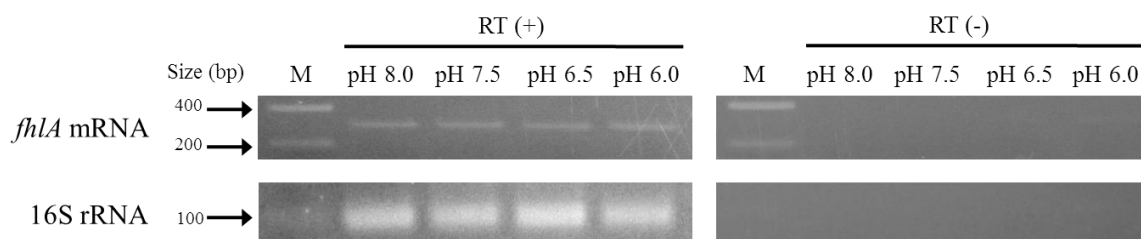


図 6-4 各培養 pH における *fhlA* mRNA 遺伝子の発現

## 乳酸定量

TB-83D 株は嫌氣的(微好氣的)グリセロール代謝において、副生産物として乳酸を生産する(13)。グリセロールやグルコース代謝において生産される乳酸は、D-型と L-型がある。例えば、*Enterococcus* などの乳酸菌は L-乳酸を主として生産する(14)。今後の解析 (FBA、転写解析や酵素活性) のため、TB-83D は D-型もしくは L-型のどちらの乳酸を生産するのか? また、その生成比はいくつなのかを調べる必要がある。そこで、得られた遺伝子破壊株の生産する乳酸について調べた。2%グリセロール基本培地で培養を行った各菌株の 4 日目の培養液を基質に(Filter 濾過済み)、D-乳酸および L-乳酸特異的脱水素酵素を用いて解析を行ったところ、TB-83D 株は生成した乳酸の約 95%は D-乳酸であり約 5%が L-乳酸であった。このことから、遺伝子破壊を行う際は、D-乳酸脱水素酵素遺伝子をターゲットとすればよいことが分かった。

## 6.2 遺伝子増強による生産性の向上

目的遺伝子を持つベクターをプラスミドとして宿主株に導入して発現させる場合、そのプラスミドにコードされた遺伝子が発現しているかどうかの確認は必須であるので、数種類のベクターを構築し FdhF の発現を試みた。それに加え、ギ酸脱水素酵素遺伝子のアクチベーター (*fhlA*) 導入による、ギ酸脱水素酵素遺伝子を構成する遺伝子の活性化も行った。

## 【実験材料と方法】

### ベクターの構築

プロモーターとして pBAD promoter, レポーター遺伝子として GFPuv を保持する発現ベクター pBAD-GFPuv がコードしている Ampicillin 耐性遺伝子の *ScaI* サイトに、PCR により増幅した pIJ8600 由来の *aac(3)IV* 遺伝子(15)を挿入することで、pBAD-GFPuv-*aac(3)IV* を構築した。以降に構築したプラスミドはこのベクターを基にして作製した。

### *fdhF* および *fhlA* 発現プラスミドの構築 (GFPuv-fusion)

TB-83D のゲノム DNA を鋳型にして KOD plus DNA polymerase を用いて、*fdhF* および *fhlA* を PCR により増幅した。得られた PCR fragment を *SacI*-*XbaI* で制限酵素消化し、同制限酵素で消化した pBAD-GFPuv-*aac(3)IV* に連結することにより、pBAD-GFPuv-*fhlA-aac(3)IV*, pBAD-GFPuv-*fdhF-aac(3)IV* を構築した。これらのプラスミドは、GFPuv 融合タンパクとして発現する。

### *fdhF* および *fhlA* 発現プラスミドの構築 (GFPuv-mon-fusion)

TB-83D のゲノム DNA を鋳型にして KOD plus DNA polymerase を用いて、*fhlF* および *fhlA* を PCR により増幅した。得られた PCR fragment を *NheI*-*XbaI* で制限酵素消化し、同制限酵素で消化した pBAD-GFPuv-*aac(3)IV* に連結することにより、pBAD-*fhlA-aac(3)IV*, pBAD-*fdhF-aac(3)IV* を構築した。これらプラスミドは、GFPuv を欠失しているため、GFP 融合タンパク質としては発現しない。

### pACYC 系ベクターによるクローニング

#### (*fhlA* のクローニング)

pBAD-GFPuv-*fhlA-aac(3)IV* を鋳型にして KOD plus DNA polymerase を用いて、pBAD-GFPuv-*fhlA-aac(3)IV* 上の GFPuv-*fhlA* 部分を増幅した。得られた PCR fragment を *BglII*-*NotI* で制限酵素消化し、*Bam*HI-*NotI* で消化した pACACDuet-1 の MCS1 部分に convertible で挿入することで、pACYCDuet-*fhlA*-MCS1 を構築した。

#### (*fdhF* のクローニング)

TB-83D のゲノム DNA を鋳型にして KOD plus DNA polymerase を用いて、*fdhF* およびその上流・下流を含む領域を PCR により増幅した。得られた PCR fragment を *Bam*HI-*PacI* で制限酵素消化し、*BglII*-*PvuI* で消化した pACACDuet-1 の MCS2 部分に convertible で挿入することで、pACYCDuet-*fhlF*-MCS2 を構築した。

#### (*fhlA*-*fdhF* のクローニング)

pBAD-GFPuv-fhlA-aac(3)IV を鋳型にして KOD plus DNA polymerase を用いて、pBAD-GFPuv-fhlA-aac(3)IV 上の GFPuv-fhlA 部分を増幅した。得られた PCR fragment を *BglII-NotI* で制限酵素消化し、*BamHI-NotI* で制限酵素消化した pACYCDuet-fhlF-MCS2 に convertible で挿入することで、pACYCDuet-fhlAF を構築した。上記に示した plasmid は、各種制限酵素で消化し、fragment の数とサイズでチェックした。また、pBAD-GFPuv-aac(3)IV 由来の plasmid は、*E. coli* JM109 に、pACYCDuet-1 由来の plasmid は、発現確認のためエレクトロポレーション法により *E. coli* BL21(DE3)および TB-83D に導入した。

#### 大腸菌およびTB-83D 内での発現解析

pBAD-GFPuv-aac(3)IV 由来の plasmid を保持する大腸菌は、Apramycin、pACYCDuet-1 由来の plasmid を保持する大腸菌は、Chloramphenicol 含有 LB 液体培地で 16 時間培養した。培養後の菌体を、各抗生物質を含む LB 液体培地 100ml に接種し、30℃, 200rpm で 9 時間培養を行った。なお、誘導剤として pBAD-GFPuv-aac(3)IV 由来の plasmid を保持する大腸菌には、0.2% Arabinose、pACYCDuet-1 由来の plasmid を保持する大腸菌には 1 mM IPTG を添加した。TB-83D 内での発現は 2% グリセロール基本培地を用いて大腸菌の場合と同様に行った。各培地で生育させた培養後の菌体を、9,000rpm で 10min 遠心することにより回収した。発現チェックは、365nm の UV を照射することで、GFPuv の発色により判別した。

#### ギ酸脱水素酵素遺伝子(FDH)のクローニング

使用ベクターについては、プロモーターとして pBAD promoter, レポーター遺伝子として GFPuv を保持する発現ベクター pBAD-GFPuv がコードしている Ampicillin 耐性遺伝子の *ScaI* サイトに、PCR により増幅した pIJ8600 由来の aac(3)IV 遺伝子を挿入することで構築した、pBAD-GFPuv-aac(3)IV ベクターを用いた。*S. cerevisiae* のゲノム DNA を鋳型にして KOD plus DNA polymerase を用いて、FDH を PCR により増幅した。得られた PCR fragment を *NheI-EcoRI* で制限酵素消化し、同制限酵素で消化した pBAD-GFPuv-aac(3)IV に連結することにより、pBAD-Sc-FDH を構築した。この場合、挿入した FDH の発現はベクター側の SD 配列を使用することになる。一方、Native の SD 配列を用いた場合の発現用プラスミドも同様に操作を行い、pBAD-Sc-SD-FDH を構築した。これらプラスミドは、ベクターに含まれる GFPuv 遺伝子を欠失させているので GFP 融合タンパクとしては発現しない。上記に示した plasmid は、各種制限酵素で消化後 fragment の数とサイズでチェックし、さらにシークエンス解析により配列を確認した。また、plasmid は、*E. coli* DH5α もしくは TB-83D 株に導入した。

#### 大腸菌での発現・SDS-PAGE

pBAD-Sc-FDH もしくは pBAD-Sc-SD-FDH を保持する大腸菌は、Apramycin 含有 LB 液体培地で 16 時間培養した。培養後の菌体を、50 µg/ml Apramycin 含有 LB 液体培地 100ml に接種し、30℃, OD<sub>600</sub>=0.3 程度になるまで培養を行った。その後、誘導剤として最終濃度 0.2% となるように Arabinose を添加し更に約 5 時間培養を行った。培養後の菌体を、6,000rpm で 10min 遠心することにより回収し、10 mM Sodium

phosphate Buffer (pH 7.5)で菌体を洗浄した。SDS-PAGE は、Laemmli らの方法(16)に従い、Stacking gel 4.5%、Resolving Gel 12.5%のアクリルアミド濃度で泳動を行った。

## 代謝産物解析

前培養として、Apramycin 含有 2%GB 液体培地に、各種 plasmid を保持する TB-83D 株を接種し 30℃で 48 時間培養を行った。この前培養液を、同培地 100 ml に OD<sub>600</sub>=0.01 になるように接種してブチルゴム栓とアルミシールキャップでフタをし、ガスパージ用に 9G のシリンジを突き刺し、25℃でマグネチックスターラーを用いて穏やかに攪拌しながら本培養を行った。1 日ごとにサンプリングを行い、HPLC にて代謝産物の解析を行った。なお、誘導剤および抗生物質は培養開始時から添加した。

## 【結果と考察】

### 発現確認

各種ベクターを用いて作製した plasmid の詳細と遺伝子マップを図 6-5 に示す。

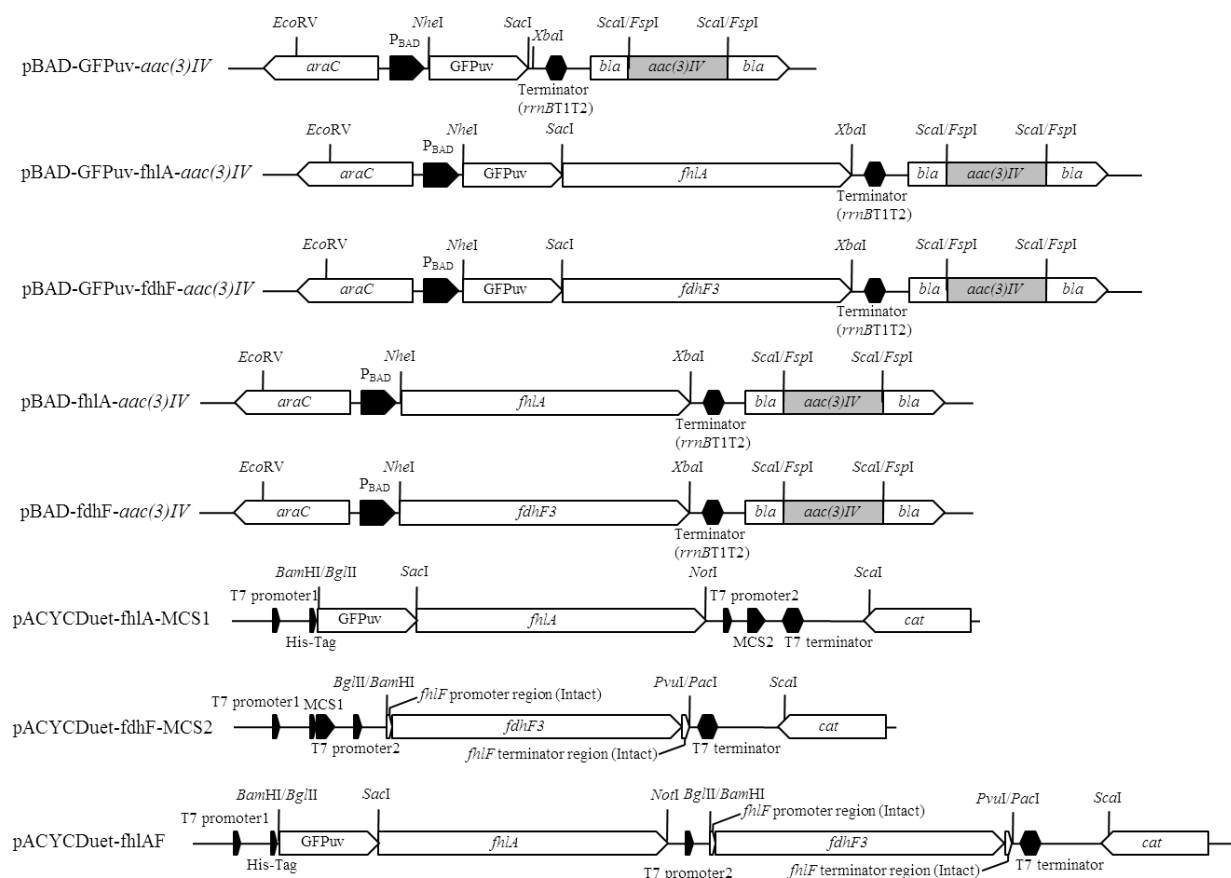


図 6-5 各種ベクターを用いて作製した plasmid の遺伝子マップ

上記の plasmid を保持する大腸菌を用いて、*in vivo* での発現を調べたところ、GFPuv 融合のものは発光が確認できた (図 6-6)。

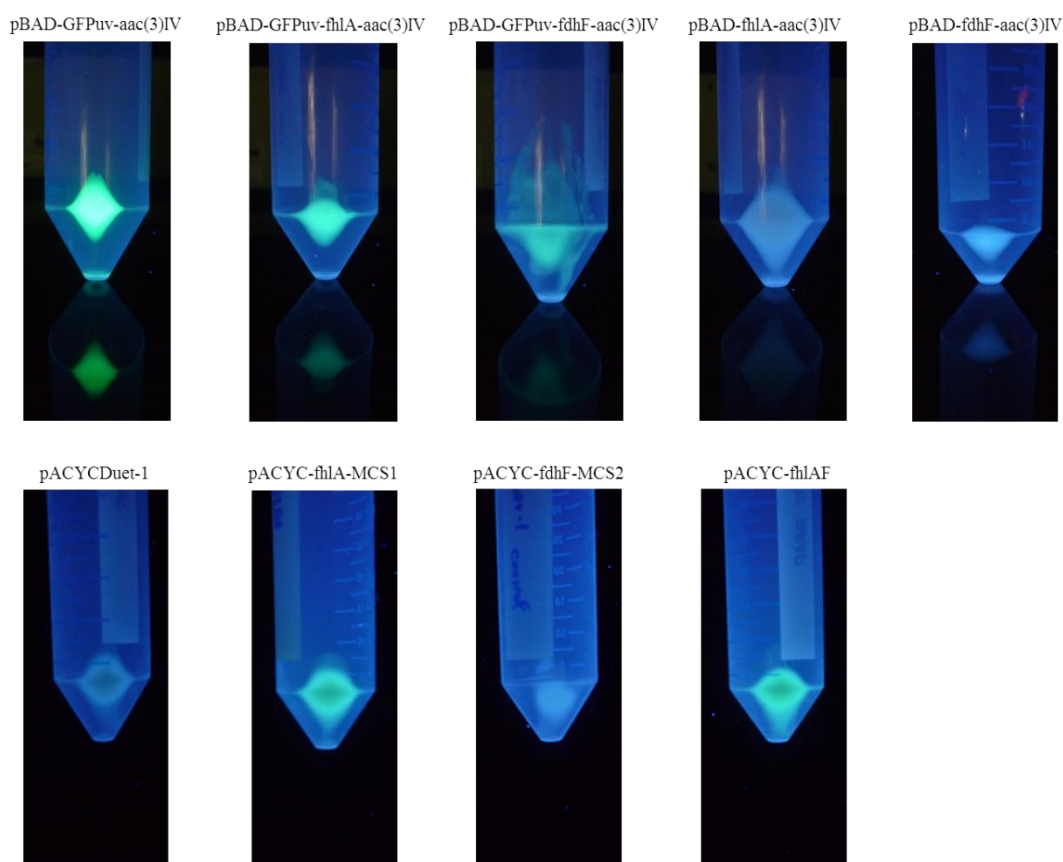


図 6-6 各 plasmid を保持する大腸菌での *in vivo* 発現解析

次に、各 plasmid を TB-83D にエレクトロポレーションにより導入し、2%グリセロール基本液体培地で培養することにより発現を調べた。その結果、pBAD-GFPuv 由来のものは GFPuv の発光が検出されたが、pACYCDuet-1 由来のものは検出されなかった。この結果に関して、pACYCDuet-1 由来の plasmid を保持する TB-83D 株は、IPTG で誘導がかかっていない事が示唆されたが、寒天培地で発現を調べてみると、発色は弱いものの発現が見られた (図 6-7)。

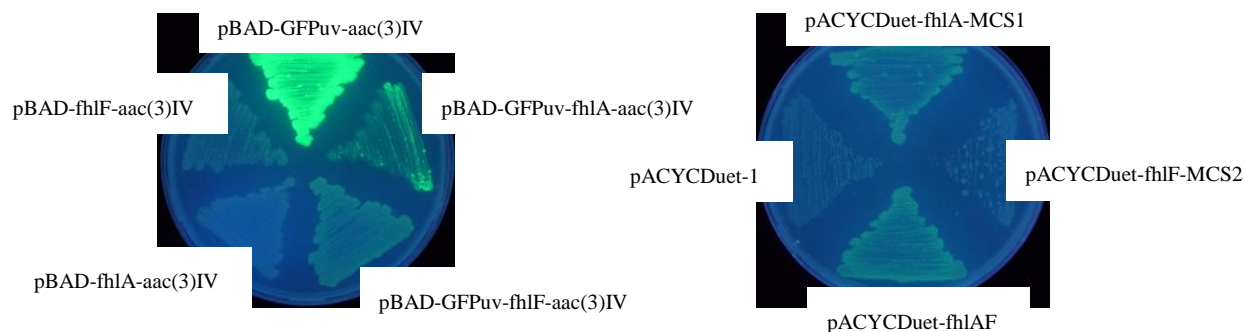


図 6-7 2%グリセロール基本寒天培地上での *in vivo* 発現解析

## 外来遺伝子導入によるグリセロール発酵中に蓄積するギ酸の分解

結果として、pACYC 由来のプラスミド導入に関しては、寒天・液体の両培地における GFP の発現確認からも、発現量は非常に低かったため、発現の効果はほとんど見る事ができなかった。しかし、pBAD-GFPuv 由来の発現プラスミドを有する TB-83D 株については顕著な変化が見られた。

GFP を融合した FdhF 発現株については消費グリセロール、1,3-PD、エタノール生産量が減少し、乳酸、ギ酸生産量が増加した。一方 GFP 非融合の FdhF 発現株については全てのプロファイルにおいてコントロールと変化がなかった (図 6-8)。

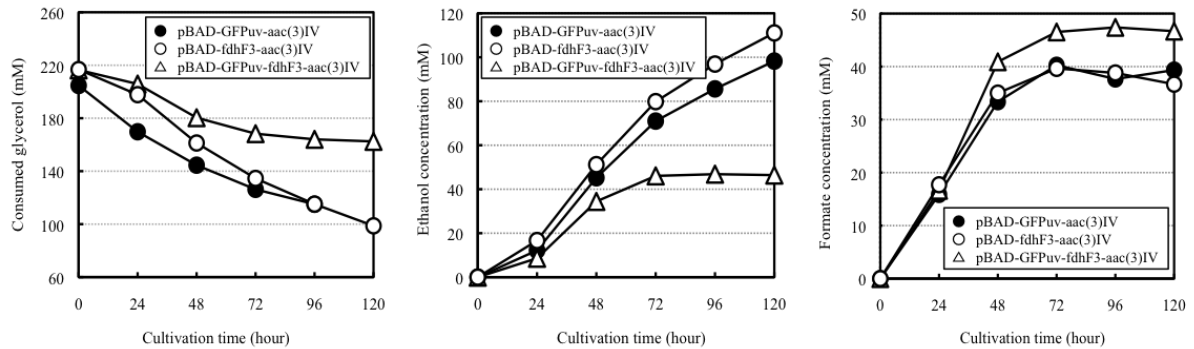


図 6-8 pBAD プロモーターを用いた FdhF 発現株の代謝産物解析

以上の結果をまとめると、まず GFP 非融合の FdhF 発現株においては、コントロールと比較してほとんど変化がなかったため、これは TB-83D 株内で作用していないことを示している。

これらのことより、FdhF は TB-83D 株内で (ギ酸分解に) 機能しているとは言い難い。今回導入した遺伝子は、ギ酸-水素リアーゼ (FHL) 複合体を構成する酵素遺伝子の 1 つであるため、これだけを発現させてもギ酸の減少効果は得られないということが分かった。また、TB-83D (*Klebsiella* 属や *Escherichia* 属全般) は、染色体上にヒドロゲナーゼ (オペロン) を有しており、今回導入した FdhF と複合体を形成することで FHL 複合体として機能する。従って、これらを総括的に制御 (機能) させることは困難であるため、他菌株の NAD 依存性ギ酸脱水素酵素を導入する系も行っていく必要がある。

FhlA 発現株については、GFP 融合・非融合共に 1,3-PD、乳酸、酢酸生産量が増加し、ギ酸生成量が大きく減少し親株(TB-83D)と比較してギ酸濃度を約 60%減少させた (図 6-9)。しかしながら、一見ギ酸濃度が減少したように見えるが、それに伴いエタノール濃度も減少しており、それらの濃度はエタノール濃度と同調しているのが分かる(本菌株のグリセロール代謝はピルビン酸ギ酸リアーゼによる経路が主経路であるためエタノールとギ酸濃度はほぼ同じになる)。すなわち、実際は *fhlA* の導入はギ酸分解に影響していない。以上の結果から、グリセロール代謝中におけるギ酸分解には、異なるアプローチが必要となることが考えられた。

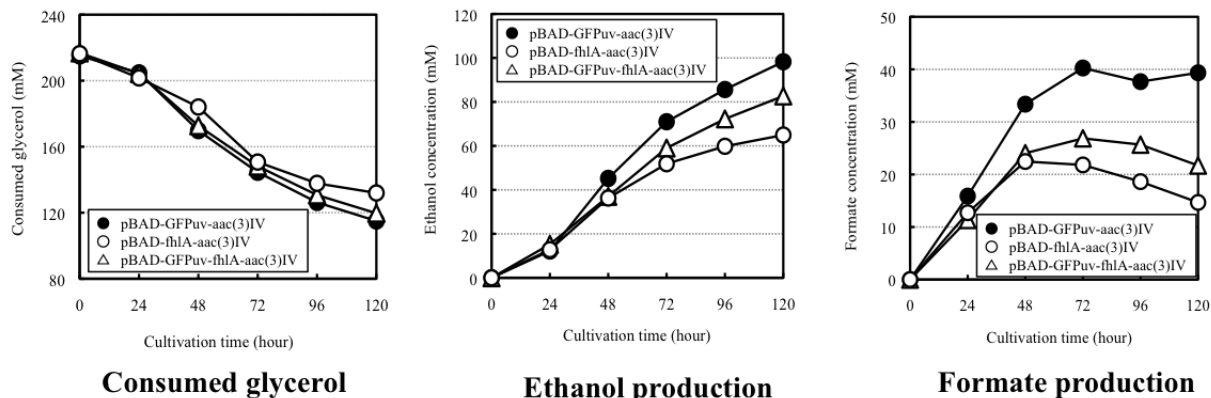


図 6-9 pBAD プロモーターを用いた FhlA 発現株の代謝産物解析

### 他菌株由来のギ酸脱水素酵素遺伝子のクローニングと発現

ギ酸分解アプローチの 1 つとして、他菌株由来のギ酸脱水素酵素遺伝子(FDH)の発現によるグリセロール代謝中のギ酸分解を試みた。遺伝子供与体として FDH を保持する *S. cerevisiae* を用いた。まず始めに、PCR にて FDH (1.1 kb) を増幅し、BAD promoter を有しアンピシリン耐性遺伝子を *aac(3)IV* に置き換えた pBAD-GFPuv-aac(3)IV にクローニングし、「pBAD-Sc-FDH」を構築した。この際 GFPuv 遺伝子を欠失させ、SD 配列は Vector 側のものを用いるように作製した (図 6-10)。

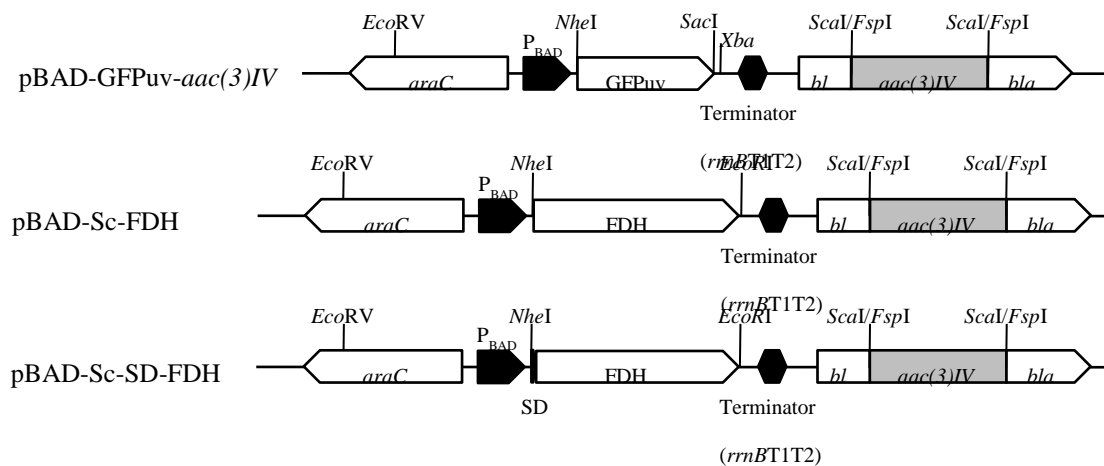


図 6-10 FDH 発現用プラスミド

得られた、pBAD-Sc-FDH を *E. coli* DH5α に導入し、Arabinose 誘導により *E. coli* 中での発現を SDS-PAGE により調べた。その結果、FDH に由来する 41 kDa を示すバンドは Total cell, 上清, 沈殿の全てにおいて検出されなかった (図 6-11)。これは恐らく Vector 側の SD 配列を用いたことが原因であると考えられた

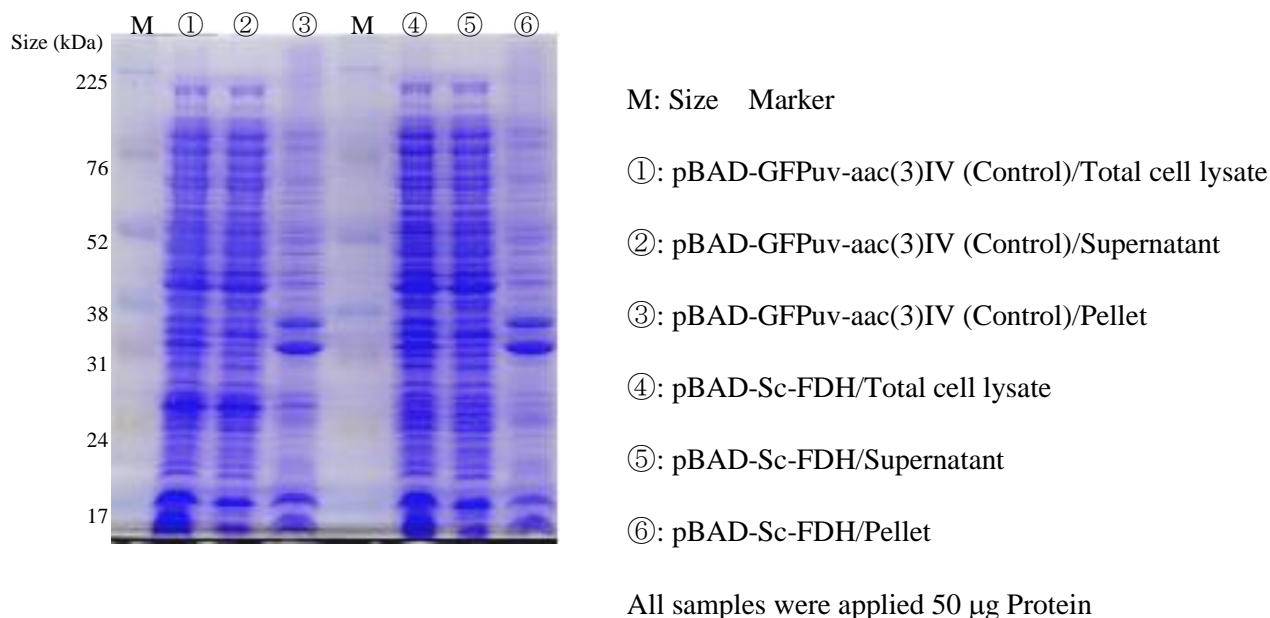


図 6-11 SDS-PAGE による FDH の発現確認

pBAD-Sc-FDH を用いたところ発現が確認されなかったため、次に新たに SD 配列を付与したプラスミド pBAD-SC-SD-FDH を構築した。また、シーケンスで配列を確認したところ問題なく FDH が組み込まれていることを確認した (図 6-12)。

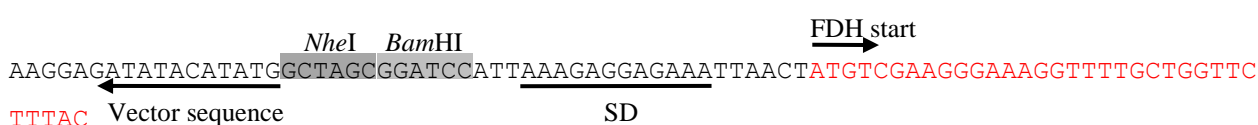
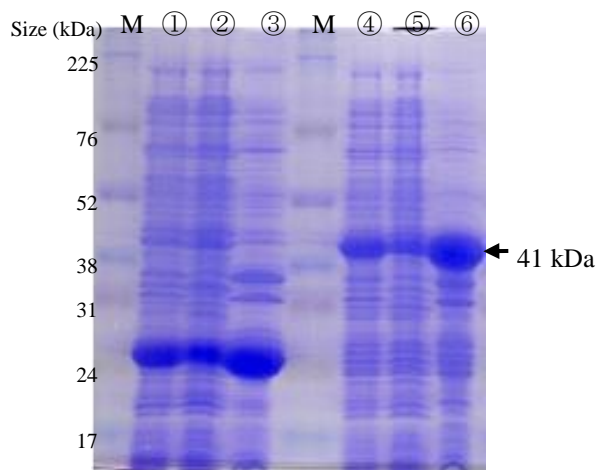


図 6-12 新たに SD 配列を付加したプラスミド pBAD-Sc-SD-FDH

このプラスミドも同様に *E. coli* DH5α に導入し、Arabinose 誘導により *E. coli* 中での発現を SDS-PAGE により調べたところ、Total cell, 上清, 沈殿に FDH 由来の 41 kDa のバンドを検出することができた (図 6-13)。しかし、発現タンパク質の大部分は不溶性画分(沈殿)に存在していた (恐らくインクルージョンボディ)。酵素活性による FDH の活性は上清画分で見られた (data not shown) ことから (活性は低い)、この pBAD-Sc-SD-FDH を *S. cerevisiae* 由来 FDH 発現プラスミドとして以降の実験に用いた。



M: Size Marker

①: pBAD-GFPuv-aac(3)IV (Control)/Total cell lysate

②: pBAD-GFPuv-aac(3)IV (Control)/Supernatant

③: pBAD-GFPuv-aac(3)IV (Control)/Pellet

④: pBAD-Sc-SD-FDH/Total cell lysate

⑤: pBAD-Sc-SD-FDH/Supernatant

⑥: pBAD-Sc-SD-FDH/Pellet

All samples were applied 50 µg Protein

図 6-13 SDS-PAGE による FDH の発現確認 (新たに SD 配列を付加した場合)

#### *pBAD-Sc-SD-FDH* 導入 TB-83D でのグリセロール代謝中のギ酸分解

上記で作製した *pBAD-Sc-SD-FDH* を、エレクトロポレーションにより TB-83D 株に導入した。導入菌株を 2% GB 培地にて培養を行い、経時的にサンプリングして代謝産物を解析した (100 ml スケール; バッチ) (図 6-14)。結果として、プラスミドを導入した場合でも Control と比較して最終的な(培養 5 日後)ギ酸の分解に変化は見られなかった。また、乳酸、コハク酸の生産速度が減少したが、これらについても最終的な生産量に変化はなかった。一方興味深いことにプラスミドを導入した場合、最終的なエタノール生産量は増加した。消費グリセロールに関しても、親株と FDH 発現株で変化は見られなかった。これに関しては、通常 TB-83D 株を用いた 100 ml スケール pH 8.0 でのバッチで培養を行うと、培養 72 時間でほぼ半分のグリセロールを消費するが、今回の実験では、通常のグリセロール消費に比べて著しく少なかった。これは、発現誘導剤として添加した Arabinose が原因であると思われる。

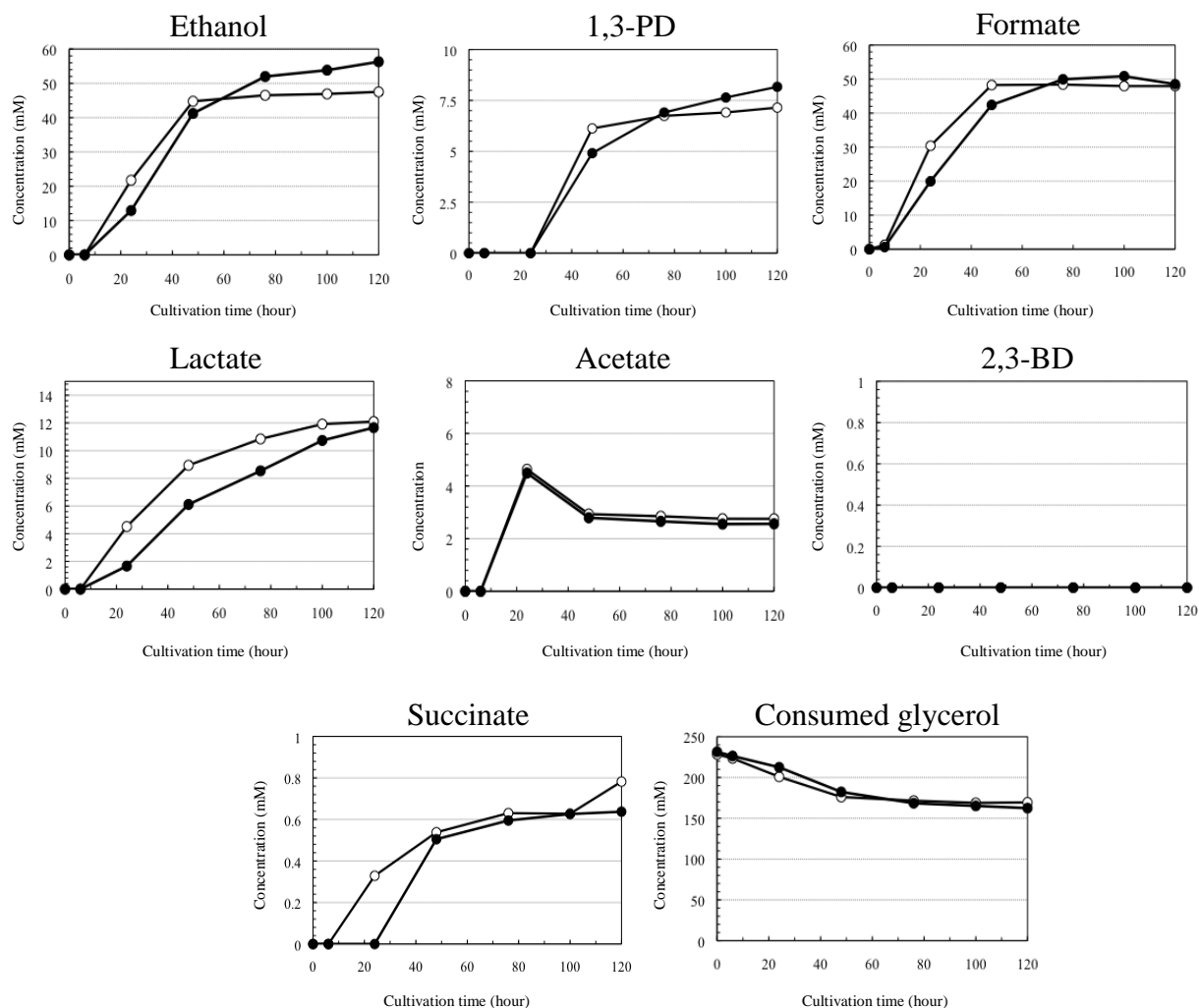


図 6-14 Control と FDH 発現株の代謝産物解析

○は TB-83D/pBAD-GFPuv-aac(3)IV、●は TB-83D/pBAD-Sc-SD-FDH を示す

新たに他菌株由来のギ酸脱水素酵素遺伝子を発現させることでギ酸の分解を試みた。グルコースやグリセロールを基質としてギ酸から水素および二酸化炭素を生産させる場合（すなわちギ酸分解）、一般的によく利用されるのが「Formate-hydrogene lyase (FHL)」もしくは「Formate dehydrogenase (FDH)」の2種類が挙げられる(5)。前者は、*E. coli* や *Klebsiella* 属細菌をはじめとするグラム陰性細菌が保持しており、酵素は Formate dehydrogenase H(FdhF) および Hydrogenase3 operon と複合体を形成している(5)。酵素反応に関しては、酸性・嫌気条件下で反応が進行する。一方後者は、酵母(*Saccharomyces*, *Candida*)などが保持しており1個の FDH 単独で作用する。酵素反応に関しては、中性条件下で反応が進行し、含酸素条件下でも反応する(17)。

Formate dehydrogenase H(FdhF) もしくはその活性化因子 FhlA の発現を試みたが、ギ酸の減少は確認されなかった。またこれらの発現は上記に示した通り、酸性条件下で反応が進行するため、実際の pH 制御

下での適応は難しいと思われる (pH 制御はアルカリ条件下)。TB-83D を宿主として発現を試みる際の注意点がいくつかあるが、その中でも本菌株は IPTG による誘導が効かない点が挙げられる。そのため、必然的に T7 や Lac といった IPTG 誘導型のプロモーターが利用できない。本実験で使用した pBAD プロモーターは Arabinose 存在下で働くプロモーターであるが、このプロモーターを用いた場合、TB-83D でも問題なく発現する。故に TB-83D での発現は、pBAD プロモーターが最適であるということがわかった。

### 6.3 遺伝子破壊技術の構築

遺伝子組換えの主たる手法である遺伝子破壊は、代謝改変や物質生産においての強力なツールであるが、適応する微生物によりその手法は異なる。ほとんどの遺伝子組換え技術が確立されている大腸菌の場合、多くの手法が適応可能であり、高い効率で遺伝子破壊が可能である(18)。本菌株を含む一部の *Klebsiella* 属細菌は、遺伝子導入効率と遺伝子破壊の為の組換え効率が著しく低く、遺伝子改変が非常に困難であることが知られている(19)。また、一部の *Klebsiella* 属細菌は、培養過程において多量の LPS を菌体外に生産することが知られている(20)。この LPS は菌体自身をカプセルのように包み込むことで、抗生物質など様々な外部因子に抵抗性を示す(20)。この特徴が、*Klebsiella* 属細菌の遺伝子導入や遺伝子破壊を困難にしていた。*K. variicola* に関しても同様に LPS を生産し、遺伝子操作方法が確立されていないことから遺伝子操作は非常に困難であった。このことから、遺伝子破壊によるエタノール生産性の向上に際し、まずこの遺伝子破壊方法を構築する必要がある。そこで、代謝フラックス解析により導き出された乳酸生成に関与する L-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhA*) をターゲットとして、遺伝子破壊法の構築を目指した。

#### 【実験材料と方法】

##### 遺伝子破壊用線状 DNA 断片の構築

TB-83D のゲノムシーケンスから、破壊したい遺伝子配列を調べ、破壊したい遺伝子を含む領域を制限酵素サイトを導入したプライマーを用いて PCR により増幅し、反応溶液の一部をアガロースゲル電気泳動により増幅をチェックした。次に、制限酵素消化後 pUC18 に組込み、遺伝子破壊用テンプレートを構築した。構築したプラスミドを鋳型に PCR を行った。その後、反応溶液の一部をアガロースゲル電気泳動により増幅をチェックした。増幅を確認した後、残りの反応溶液に *DpnI* を加えてテンプレートのプラスミドを除去した後、アガロースゲル電気泳動により再度増幅をチェックした。その後、目的 DNA をゲルから抽出し遺伝子破壊用 PCR 断片とした。全ての PCR は、KOD-plus- DNA polymerase を用いて行った。

##### Recombinase 発現プラスミド (*pRedET-Tet*) の導入

Recombinase 発現プラスミド, *pRedET* (*Tet<sup>r</sup>*) をあらかじめ作製した TB-83D 株のエレクトロコンピテントセルに加え、0.1 cm ギャップのキューベットを用いて、2.0 kV, 5 ms の条件でエレクトロポレーションを行った。パルスをかけた後、直ちに氷冷した LB を加え、30℃ で 3 時間回復培養を行った。その後、20

μg/ml Tetracycline 含有 LB 寒天培地に塗布し、直ちにアルミホイルでシャーレを包み、遮光状態にて 30℃で一晩培養を行うことにより、TB-83D/pRedET を得た (Tetracycline は光分解を受けるので遮光)。

#### 遺伝子破壊用 PCR 断片の導入

あらかじめ 10 μg/ml Tetracycline 含有 LB 液体培地で生育させた TB-83D/pRedET を、同培地 1.4 ml に 30 μl 植菌し、OD580 が 0.2~0.3 程度になるまで 30℃で培養した (本菌株の場合は 2 時間)。そして、10% L(+)-Arabinose 50 μl を添加し、37℃で 2 時間 培養を行った。

培養液を、氷上にて 5 分冷却し、1 ml の冷却滅菌水で 3 回洗浄後、10% glycerol 50 μl に再懸濁しコンピテントセルを調製した。作製したコンピテントセル 50 μl に遺伝子破壊用 PCR 産物を加え、0.1 cm ギャップのキュベットを用いて、2.0 kV, 5 ms の条件でエレクトロポレーションを行った。パルスをかけた後、直ちに氷冷した LB 液体培地を 1 ml 加え、37℃で激しく攪拌しながら 2 時間培養し、発現させた Recombinase による相同組換えを促した。その後培養液を、任意の濃度で添加した抗生物質を含む LB 寒天培地に塗布し、37℃で培養を行い、pRedET を欠落させた。

#### 遺伝子破壊の確認

培養後のコロニーを 50 μl の LB 培地に懸濁後、その上清を用いて PCR を行うことにより変異のチェックを行った。またそれと同時に、コロニー懸濁液を任意の濃度で添加した抗生物質を含む LB 液体培地に接種して 37℃で一晩培養を行い、ゲノム DNA の単離を行った。ゲノムシーケンセスから任意の制限酵素サイトを選別し、制限酵素処理を行い、DIG-ELISA 法に基づいたサザンハイブリダイゼーションにより変異部分を解析した。

### 【結果と考察】

#### ホモロジーアームの影響

組換えに必要なホモロジーアーム (相同領域) の長さは、組換え効率に関係する重要なファクターである(18, 19)。大腸菌の組換えの場合、そのホモロジーアームの長さは 10 bp~50 bp 程度で効率よく組換えが可能である(21)。しかし、*Klebsiella* 属細菌の場合、ホモロジーアームを 100 bp にしても組換えがほぼ起こらない(19)。

遺伝子破壊に際し、ホモロジーアーム長の影響をより詳細に調べるために、*ldhA* の左断片 (*Bam*HI-*Pst*I)、*aac(3)IV* (*Pst*I-*Hind*III)、*ldhA* の右断片 (*Hind*III-*Eco*RI)を PCR によって獲得した後、Multi fragment ligation により pUC18 に連結し、「pUC-*ldhAaac(3)*-BE」を得た。このプラスミドを鋳型に *ldhA* の両側のホモロジーアームを 50 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp となるように DNA 断片を調製した (図 6-15)。それら得られた断片を電気泳動して増幅を確認した後 (図 6-16)、*Dpn*I 消化を行うことで残存するプラスミド DNA を完全に除去した。

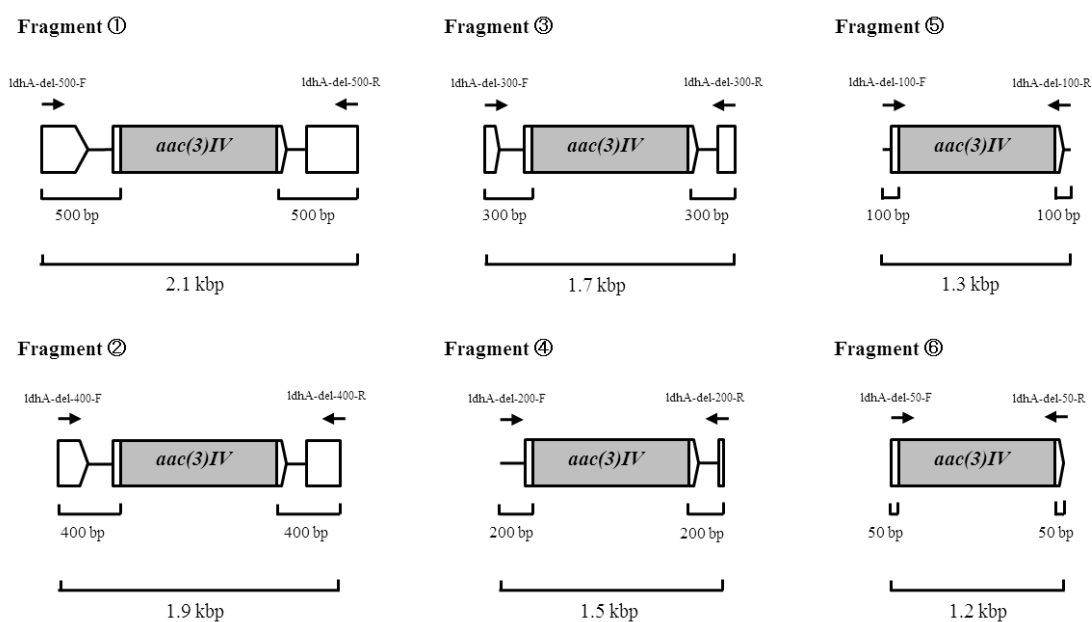


図 6-15 ホモロジーアーム長の検討のための増幅した PCR 断片の模式図

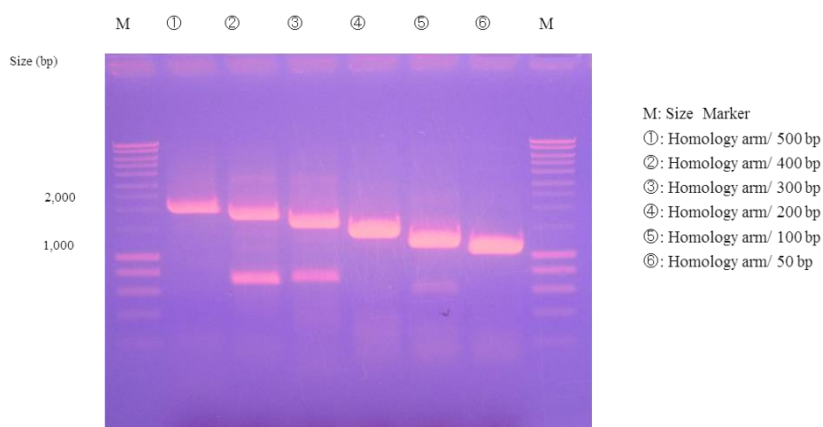


図 6-16 遺伝子破壊に用いた各 Homology arm を含む PCR 断片と増幅確認

各 PCR 断片はゲルから精製し、*DpnI* 処理したものを使用した。

得られた各 DNA 断片をコンピテントセルに各 100 ng となるように加え、Red/ET 法による遺伝子破壊を行った。それに加え、培地成分の検討も同時に行った。*ldhA* はグリセロール代謝に関連している酵素遺伝子であるので、培地中にグリセロールを添加することで、組換え効率の向上を狙った。結果的に、ホモロジーアームの長さを変えた全ての場合において組換えが正確になされていることを PCR およびサザン解析により確認した (図 6-17)。得られた株を「TB-83D  $\Delta$ *ldhA*Apr」とした。

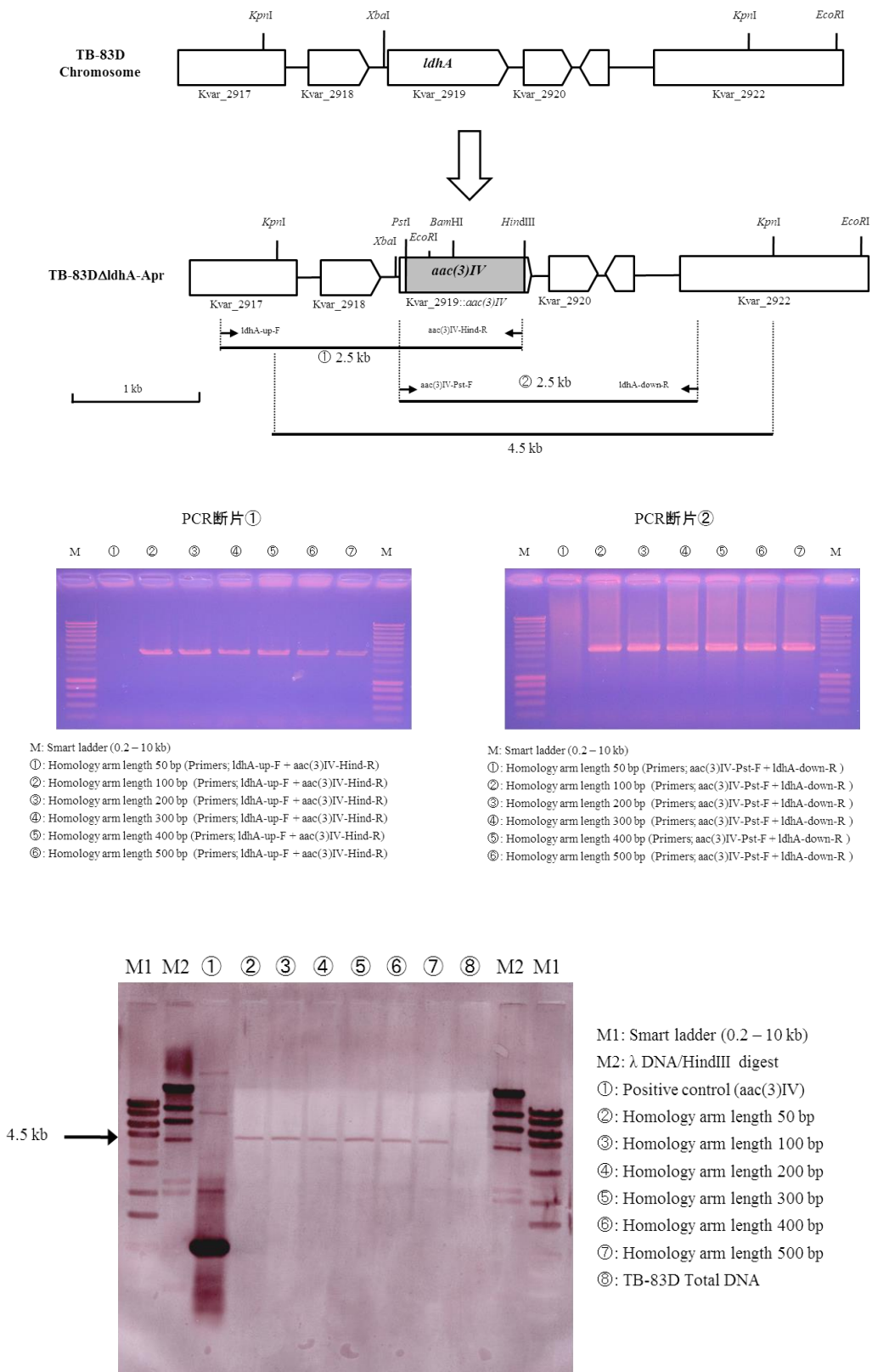


図 6-17 サゼン解析による変異の確認

このことから TB-83D 株の遺伝子破壊は 50 bp のホモロジーアームで可能であることがわかった。これまでに *Klebsiella* 属細菌の遺伝子破壊において、約 100 bp のホモロジーアームでの組換え率はゼロ (すなわち組換えは起こらない) であると報告されている (19)。それと比較しても、本菌株は 50 bp のホモロジーアームで十分な組換えを生じさせることを立証することができた。また、培地中へのグリセロールの添加については、いずれの場合も添加に影響はなかった (表 6-1)。

表 6-1 各ホモロジーアーム・グリセロール添加におけるコロニー数 (培地 1 枚あたり)

	Homology arm length (bp)					
	50	100	200	300	400	500
LB・Apr(10)	364	1212	>1,500	>1,500	>1,500	>1,500
LB・Apr(20)	352	1296	>1,500	>1,500	>1,500	>1,500
LB・Gly・Apr(10)	492	960	>1,500	>1,500	>1,500	>1,500
LB・Gly・Apr(20)	295	748	>1,500	>1,500	>1,500	>1,500

コンピテントセルに各 DNA 断片 100 ng を加えて TB-83D 株に導入後、1 ml の LB 培地で回復培養を行い、寒天培地 1 枚あたりその内の 100  $\mu$ l を塗布して検出できたコロニー数を示している。

本研究で確立した遺伝子組換え法のポイントを以下に列記する。

- ・ 本菌株は多量のリポ多糖(LPS)様物質を細胞外に生産するため、コンピテントセル作製は非常に難しい。これまでに、本菌株のコンピテントセル調製は *E. coli* の場合と同様に 100 ml スケールの培養液から低速回転で集菌操作を行っていたが、菌体が沈殿せず、洗浄の段階で LPS 様物質除去と共に菌体も一緒に無くなってしまう。そこで、数々の条件を試したところ、13,000 rpm の高速回転で遠心時間 8 min とすることが最適である (すなわち、若い細胞をなるべく集めることが良い)。

- ・ 本菌株は、*E. coli* と比較して細胞倍加時間が長いため、ある程度の培養時間が必要である。これは、上記に示したように遠心・洗浄操作中に菌体が消失してしまうために、ある程度菌体を増やして行っていたためである。何とかコンピテントセルを調製し、エレクトロポレーションにより DNA を導入してみたが、得られるコロニーはごく僅かであった (形質転換効率が非常に低い)。そこで、若い細胞を効率よく集めるという方法に発想を転換させた。様々な培養条件により実験を試みたところ、Arabinose 誘導時間も含めて約 3 時間が効率よく形質転換体を得られた(初期培養 2 時間+誘導剤添加後 1 時間)。

- ・ ホモロジーアームの長さ と Arabinose 誘導後の培養時間についても実験を行った結果、ホモロジーアームの長さ 50 bp～100 bp の時は、Arabinose 添加後の培養を 2 時間にしないと組換えは全く起こらない

(コロニーが1つも出現しない)。200 bp 以上のホモロジーアームの長さならば、Arabinose 添加後の培養は1時間で充分であった。

- ・ DNA 断片挿入後の選択培地に関して、プラスミド挿入による相同組換え(Homologous recombination)の場合、添加する抗生物質濃度は非常に弱いレベルで選択する。本菌株の場合、抗生物質濃度は通常使用するレベルの濃度で問題ない。また、培地は常に要時調製するべきで、古い培地を使用するべきではない。

以上の結果から、本菌株の遺伝子破壊が可能となり、代謝改変を的確に迅速に行えるようになった。今後、代謝改変によるエタノール以外の有用物質生産も可能となったことは大きな意味を持つ。

## 6.4 遺伝子破壊による生産性の向上

得られた L-乳酸脱水素酵素遺伝子破壊株 (TB-83D*AldhA*Apr) を用いてエタノール生産性と代謝変化を TB-83D 株と比較することで評価した。

### 【材料と方法】

#### 菌株・培地・培養条件

使用菌株は、*K. variicola* TB-83D を親株として用いた。培地は、グリセロール(BDF)基本培地を用い、必要に応じて Apramycin もしくは Kanamycin を最終濃度 50 mg/L となるように添加した。

代謝産物解析は 100 mM グリセロール(BDF)基本培地 20ml であらかじめ 48 時間 前培養を行った菌体を遠心により回収後、0.85% NaCl で洗浄したものを、100 ml の同培地に最終 OD<sub>600</sub>=0.05 になるように接種した。微好気(嫌気)培養の場合は、125 ml 容バイアル瓶を用いてテフロンコートラバーセプタムおよびアルミキャップで密栓し、25℃で穏やかに攪拌しながら培養した。好気培養は、500 ml 容バッフル付き三角フラスコを用いてシリコンキャップで蓋をし、30℃, 200 rpm で激しく攪拌しながら培養を行った。

#### 代謝産物解析

TB-83D および乳酸脱水素酵素遺伝子破壊株の代謝産物解析は、HPLC により行った。また、生成された D-乳酸および L-乳酸量は F-kit を用いた。

### 【結果と考察】

これら乳酸を生成しない破壊株がグリセロール代謝およびエタノール生産にどのような影響を及ぼすか調べるため、微好気もしくは好気条件で代謝産物を調べた。TB-83D 株の生育・pH 変化・代謝産物について、生育は培養 24 時間で急激に増加しそれ以降はプラトーになり(培養が進むにつれて減少していっ

た)、それに伴い pH も同様に生育と共に減少し、培養 24 時間で 6.1 まで減少した後にプラトーになった。これは、微好気(嫌気)および好気条件でも差はなかったが、BDF を用いた方が純グリセロールを用いた場合より *ldhA* 破壊株で最も生育が良かった (図 6-18)。

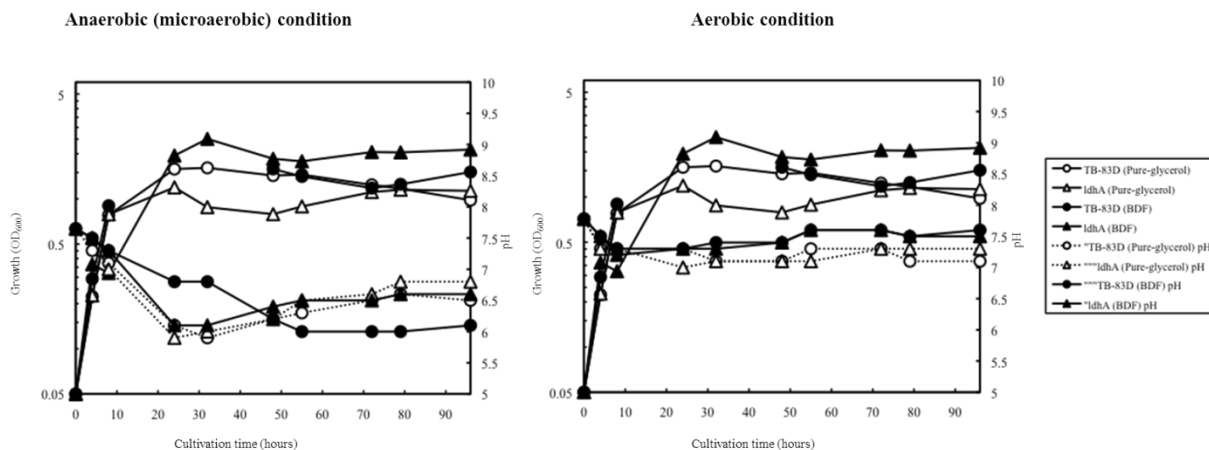


図 6-18 純グリセロールと BDF で培養した TB-83D と *ldhA* 破壊株の微好気・好気条件下での生育と pH

上記のように *ldhA* 破壊株に関しては、生育・pH については TB-83D 株と同様の挙動を示したが、最終代謝産物に違いが見られた (図 6-19)。まず、純グリセロールを用いた場合、*ldhA* 破壊株では、乳酸生産量が TB-83D と比較して著しく低く、最終代謝産物は 1,3-PD であった。特にエタノール生産量については、TB-83D よりも増加した。グリセロール消費については、TB-83D 株は培養 48 時間までに全グリセロールを消費できなかったのに対し、*ldhA* を破壊株は培養 32 時間で全てのグリセロールを消費した。このことから、乳酸脱水素酵素遺伝子の破壊は、グリセロール消費には影響を与えずむしろ消費量が促進していることが分かった。

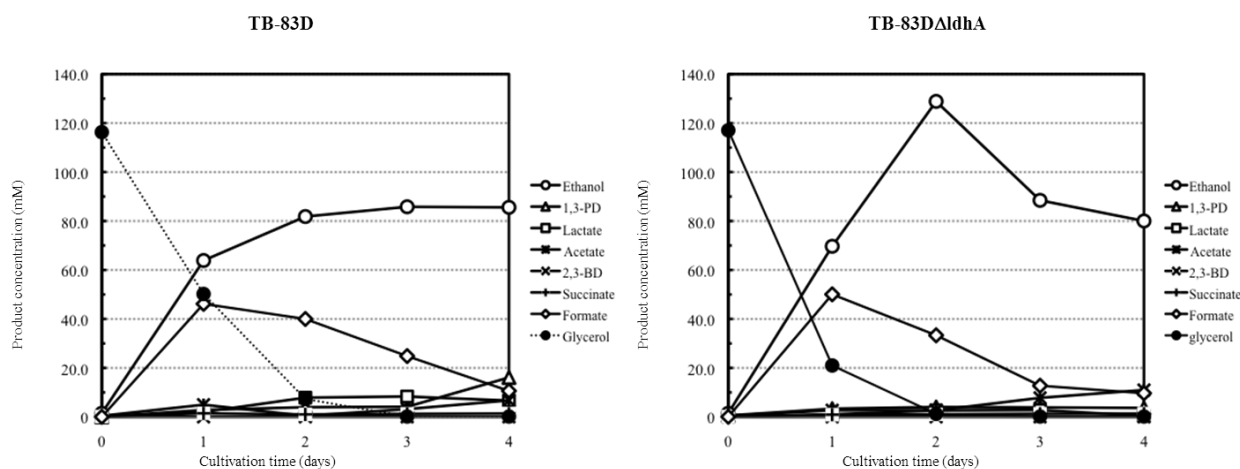


図 6-19 純グリセロールで培養した TB-83D と *ldhA* 破壊株の代謝産物解析

一方、BDF を用いた場合も純グリセロールと同様な変化が見られた (図 6-20)。グリセロール消費量に関して TB-83D 株は培養 48 時間までにグリセロールを完全消費できなかったが、*ldhA* を破壊は 48 時間で完全消費した。エタノール生産性も純グリセロールの場合と同様に増加した。

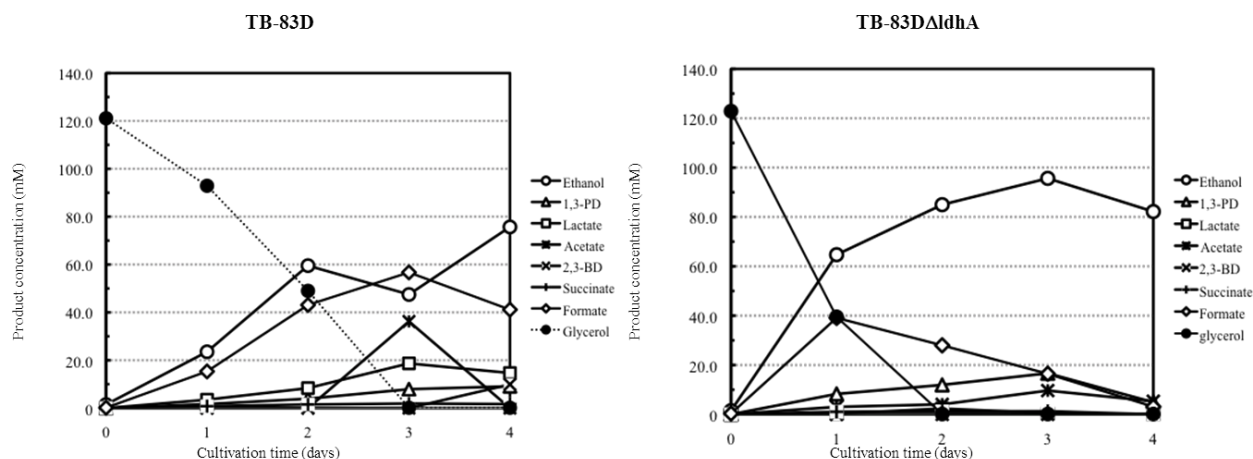


図 6-20 BDF で培養した TB-83D と *ldhA* 破壊株の代謝産物解析

以上の結果から、乳酸脱水素酵素遺伝子を破壊することで、グリセロール消費率が増加した結果エタノール生産性が向上するということが明らかとなった。

## 6.5 参考文献

1. Murarka A, Dharmadi Y, Yazdani SS, Gonzalez R. 2008. Fermentative utilization of glycerol by *Escherichia coli* and its implications for the production of fuels and chemicals. *Appl Environ Microbiol.* 74:1124-1135.
2. Jarvis GN, Moore ER, Thiele JH. 1997. Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a *Klebsiella planticola* strain isolated from red deer. *J Appl Microbiol* 83, 166–74.
3. McDowall JS, Murphy BJ, Haumann M, Palmer T, Armstrong FA, Sargent F. 2010. The bacterial formate hydrogenlyase complex. *Proc Natl Acad Sci.* 111, 3948-3956.
4. Maeda T, Sanchez-Torres V, Wood TK. 2007. *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities, *Appl Microbiol Biotech.* 76, 1035-1042.

5. Lu Y, Zhao H, Zhang C, Lai Q, Wu X, Xing XH. 2009. Expression of NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase in *Enterobacter aerogenes* and its involvement in anaerobic metabolism and H<sub>2</sub> production. *Biotechnol Lett.* 31(10), 1525-1530.
6. Kivistö A, Santala V, Karp M. 2010. Hydrogen production from glycerol using halophilic fermentative bacteria. *Bioresour. Technol.* 101, 8671–8677.
7. Ito T, Nakashimada Y, Kakizono T, Nishio N. 2004. High-yield production of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* mutants with decreased alpha-acetolactate synthase activity. *J Biosci Bioeng.* 97, 27-232.
8. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng.* 100, 260-5.
9. Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. 2005. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 71, 6762-6768.
10. 前田憲成、尾川博昭、2009、大腸菌の代謝改変およびタンパク質改変による水素ガスの高度生産化、環境バイオテクノロジー学会誌、第9巻、第2号、69-74
11. da Silva GP, Mack M, Contiero J. 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol Adv.* 27, 30–39.
12. Dharmadi Y, Murarka A, Gonzalez R. 2006. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 94, 821–829.
13. Suzuki T, Seta K, Nishikawa C, Hara E, Shigeno T, Nalajima-Kambe T. 2015. Improved ethanol tolerance and ethanol production from glycerol in a streptomycin-resistant *Klebsiella variicola* mutant obtained by ribosome engineering. *Bioresour Tech.* 176,156-162.
14. Doi Y. 2015. l-Lactate Production from Biodiesel-Derived Crude Glycerol by Metabolically Engineered *Enterococcus faecalis*: Cytotoxic Evaluation of Biodiesel Waste and Development of a Glycerol-Inducible Gene Expression System. *Appl Environ Microbiol.* 81(6), 2082-2089.
15. Sun J, Kelemen GH, Fernández-Abalos JM, Bibb MJ. 1999. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 45, 2221-2227.
16. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259), 680-685.

17. Berríos-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. 2002. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: increase of NADH availability by overexpressing an NAD<sup>+</sup>-dependent formate dehydrogenase. *Metab Eng.* 4, 217–229.
18. Yamamoto S, Izumiya H, Morita M, Arakawa E, Watanabe H. 2009. Application of lambda Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene.* 438. 57- 64.
19. Wei D, Sun J, Shi J, Liu P, Hao J. 2013. New strategy to improve efficiency for gene replacement in *Klebsiella pneumoniae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 40(5), 523-7.
20. Ho JY, Lin TL, Li CY, Lee A, Cheng AN, Chen MC, Wu SH, Wang JT, Li TL, Tsai MD. 2011. Functions of some capsular polysaccharide biosynthetic genes in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K-2044. *PLoS ONE.* 6(7), e21664.
21. Fujimoto R, Osakabe T, Saito M, Kurosawa N, Isobe M. 2009. Minimum length of homology arms required for effective Red/ET recombination. *Biosci Biotechnol Biochem.* 73(12), 2783-6.

## 7 フィージビリティスタディー

これまでの各種検討結果より、*Klebsiella variicola* TB-83D 株による BDF 廃液からのグリセロール生産性の向上に関しては、一定の成果が得られた。今後実用化を視野に入れた検討を行うには、実際にビジネスとして立ち上げた場合のプロジェクトの実現可能性を事前に調査・検討する必要がある。さらに、一定のモデルを設定し、プロジェクトの妥当性を評価することによって、研究目標を具体的数値（生産量等）として設定することが望ましい。

BDF は、一般的に国内では廃油等から廃棄物処理業者等が生産しているケースが多い。一方、海外においては主に発展途上国等によって油糧植物から大規模に生産されている。これらの業種では前者では生ゴミからのエタノール生産やメタン発酵、後者では植物残渣からのエタノール生産が並行して稼働している場合が多い。パイロットスケールの実証試験を行った（有）鳥栖環境開発総合センターは廃棄物処理業を主体とし、廃油からの BDF 生産、及びメタン発酵による廃棄物処理を既に行っている。そこで、まずはここに BDF 廃液からのエタノール生産を組み込むことを想定してフィージビリティスタディーを行い、その結果を基に当研究の目標について明確にしておくこととした。

### 7.1 調査方法と前提条件

#### 調査方法

実際の調査は（有）エル・シー・エーに依頼した。文献およびインターネット上の各種情報を調査して、基本的な各種の値を求めた。またこれらの数値をもとに本事業の収益を試算した。廃食用油と廃グリセロールの回収範囲の拡大の拡大については、有限会社 鳥栖環境開発総合センターへのヒアリング調査を行った。さらに関東近辺の廃棄物処理業者へのヒアリング調査も行って、廃食用油と廃グリセロールの委託処理費の実態も把握した。

#### 前提条件

本事業の経済性評価にあたって、いくつかの前提条件を定めた。本事業を行う主体は、実証試験での協力者である有限会社 鳥栖環境開発総合センター（佐賀県鳥栖市）とした。有限会社 鳥栖環境開発総合センターは廃食用油の回収と BDF 製造を行っている。またメタン発酵装置、活性汚泥処理槽も有しており、原料である廃グリセロールと培地となるメタン発酵の消化液の調達が容易である。

BDF 製造およびメタン発酵を含めた本事業のプロセス概要は図 7-1 に示すものと仮定した。現在、有限会社 鳥栖環境開発総合センターでの廃グリセロール処理量は年間 12kL であり（年間廃食用油処理量 80kL、この 15%が廃グリセロール）、グリセロール濃度を 40%として、年間 4,800kg のグリセロールを処理するものとした。エタノールへのモル変換効率は 100%として、エタノール 2,400kg(=3,038L、比重 0.79)生産される計算となる。グリセロールからはエタノールの他にギ酸が副成する。ギ酸はメタン発酵の良い基質となるので、エタノールを蒸留した後の残渣はメタン発酵槽に添加する。

## 基本的な数値

前提条件の処理量をもとに、装置の概略を図 7-2 のように仮定した。年間廃グリセロール処理量 12kL を 20 倍希釈して処理を行う。年間稼働日数を 200 日、発酵槽の滞留時間を 4 日とした。また 1 日の稼働時間は 6 時間とした。製品であるエタノールの販売価格は、化学工業統計月報（経済産業省、添付資料参照）の 2008-2012 年の平均値では、130 円/L 程度である。ただし生産されたエタノールをガソリンへ混合することを前提とした場合には、ガソリンの税抜き価格である 96-106 円/L（2013 当時）を参考にする必要がある。これらを踏まえて、本報告書では 100 円/L を基本とした。

なお、資源エネルギー庁の資料によるとでは、バイオエタノールの価格は現状（2012 年）で 100-150 円/L であり、将来的（2015 年）な目標値を 40 円/L としている。この資料ではセルロースを原料とするエタノール生産が検討されており、内訳は原料コスト 14-40 円/L、酵素（セルラーゼ）の製造コスト 44-60 円/L、転換コスト（プラント運転費、設備投資は含まれていないと考えられる）40-50 円/L となっている。本事業では原料である廃食用油は無償回収、廃グリセロールは処理委託費を受け取っての回収を前提としている。また培地成分は、メタン発酵の消化液をそのまま用いるので、コストにならない。当然のことながら酵素（セルラーゼ）の製造コストも不要である。従って本事業においては、転換コストも 0 円/L となる可能性が高いが、試算においては資源エネルギー庁資料と同等の 40 円/L を用いた。

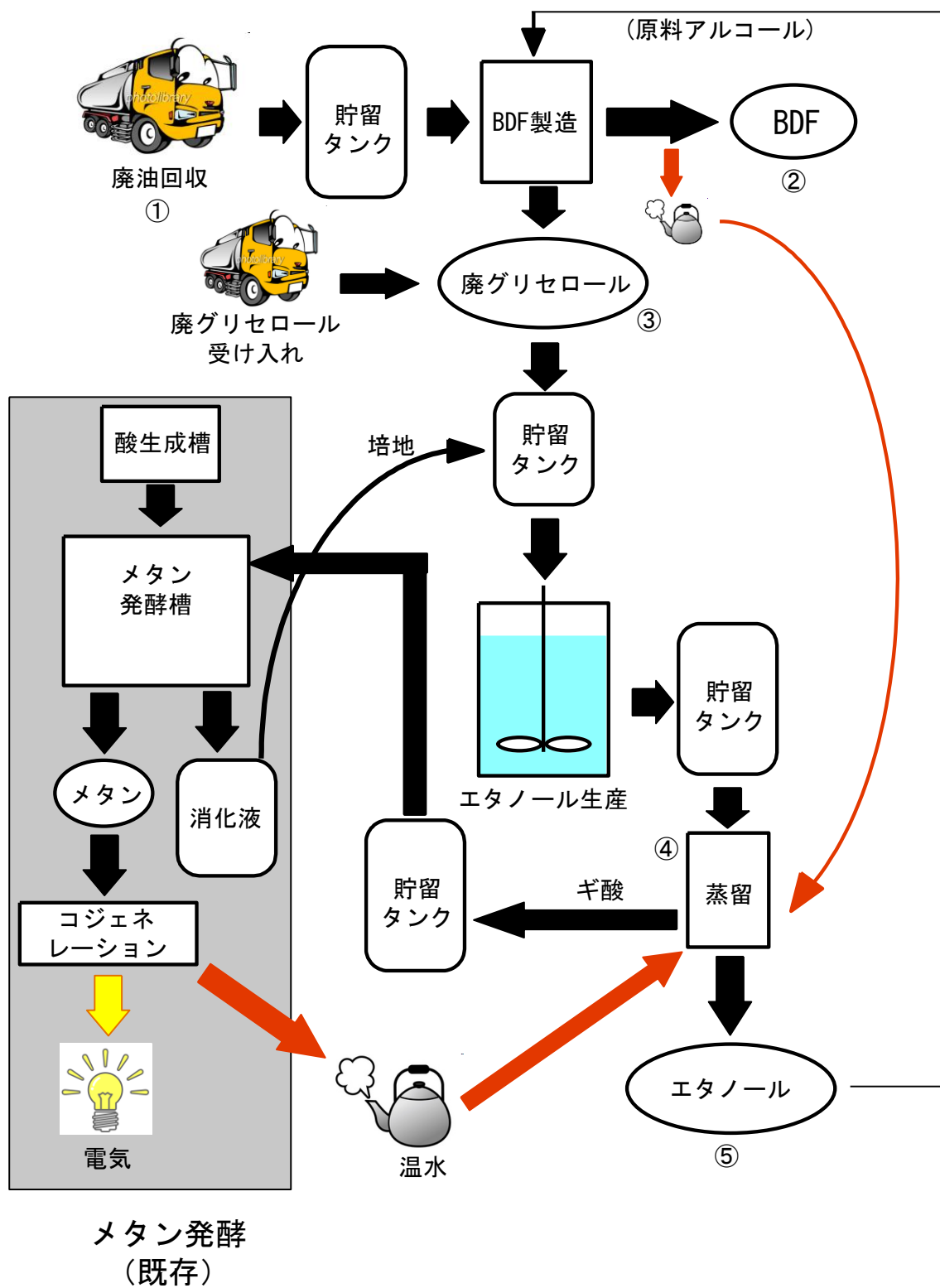
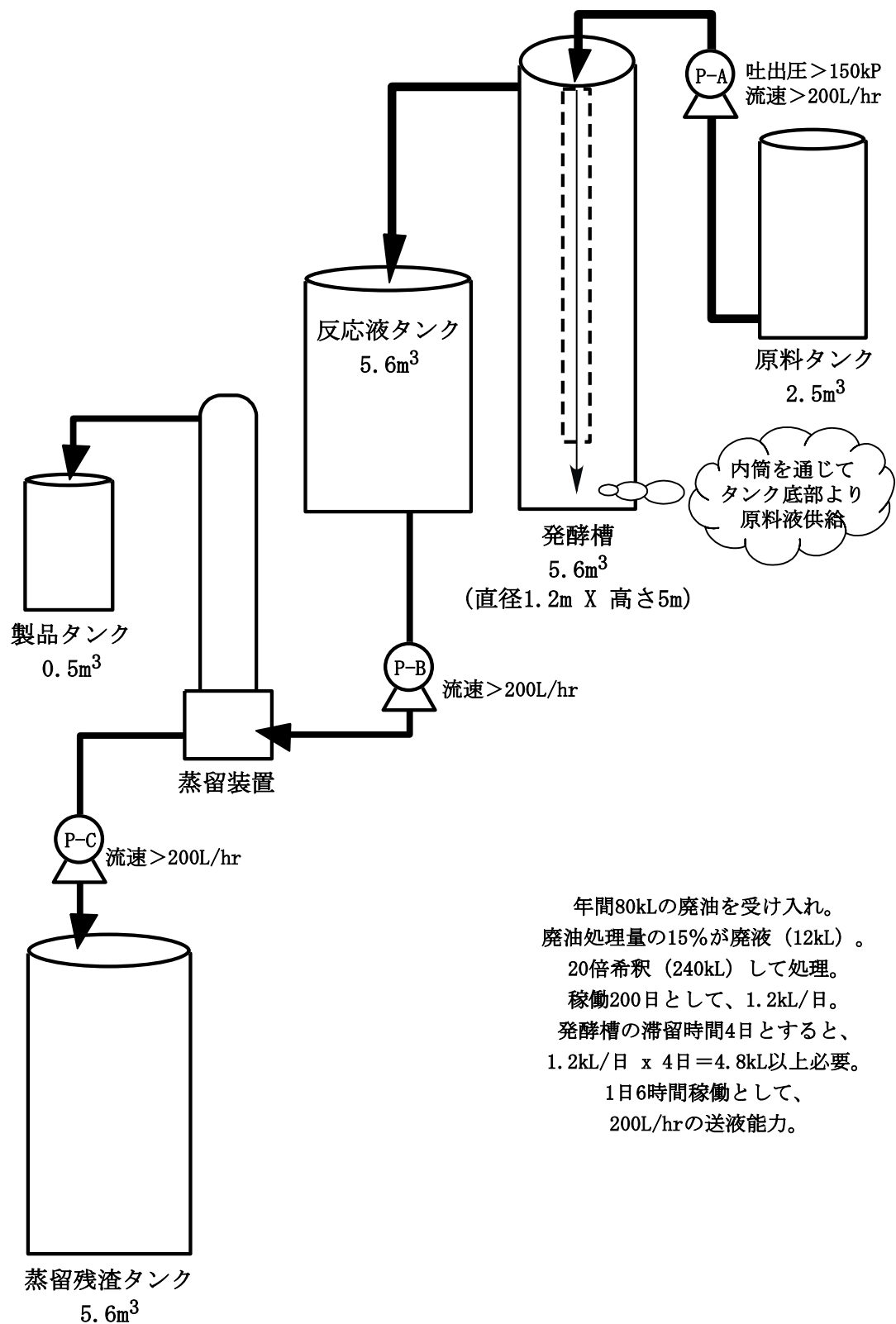


図 7-1 本事業のプロセス概要



年間80kLの廃油を受け入れ。  
 廃油処理量の15%が廃液（12kL）。  
 20倍希釈（240kL）して処理。  
 稼働200日として、1.2kL/日。  
 発酵槽の滞留時間4日とすると、  
 1.2kL/日 x 4日=4.8kL以上必要。  
 1日6時間稼働として、  
 200L/hrの送液能力。

図 7-2 基本的な装置概要

### 各廃棄物の委託処理費用の調査

廃食用油および廃グリセロールについて、関東近郊の廃棄物処理業者を対象にヒアリング調査を行った。廃棄物の委託処理費は処理量や回収地域などの諸条件によって大きく異なる。全体的な傾向を把握するため、大手の処理業者のみを対象として調査した。

有限会社 鳥栖環境開発総合センターに対してもヒアリングを行い、①鳥栖市近郊での廃食用油および廃グリセロールの委託処理費用、②同社で回収可能と考えられる地域、について調査を行った。また廃油回収業者の団体として、全国油脂事業協同組合連合会の情報も紹介された。

## 7.2 試算方法

製造にかかるコストとしては、設備建設費、運転人件費、転換コスト（運転にかかる電気、水道等）を想定した。

設備建設費は培養槽メーカーである株式会社プリスに初期的な見積もり作成を依頼した。設備規模に対応した設備建設費は 0.7 乗則を適応した。また設備建設費については、一定割合の公的な資金援助があるものとした。

運転人件費は年収 4,000 千円（保険等の会社負担を考慮して年間 8,000 千円）の運転員 1 名分とし、寄与率は 10%とした。

転換コストは資源エネルギー庁資料（2012 年）の 40 円/L とした。ただし本事業では原料である廃食用油は無償回収、廃グリセロールは処理委託費を受け取っての回収を前提としているので、原料費は考慮する必要がない。また培地に掛かる費用についても、廃グリセロールをメタン発酵消化液で希釈したものをそのまま培地として用いるので、これも考慮しない。従って転換コストはほとんど 0 になる可能性もある。

収入は、廃グリセロールの委託処理費、生産物であるエタノールの販売売上とした。

## 7.3 ヒアリング調査結果

### 全国的な廃食用油の回収状況

国内の食用油の消費や廃油回収について調査した。

国内では年間約 241 万 t の植物油が消費されている。これは国民 1 人当たり 19.1kg となる。全国油脂事業協同組合連合会の調査によると使用後の食用油は年間約 37-41 万 t 排出されており、内訳は事業系が約 27-29 万 t、一般家庭からの排出量は約 10-12 万 t である。国内での年間の植物油消費量約 241 万 t に対

して、排出量はその 15-17%と低い。一般家庭からの排出される廃食用油は、年間で国民 1 人当たり約 0.78-0.94kg と算出される。

回収された廃油は、①ゴミとして廃棄、②飼料への再生、③工業原料としての利用、④燃料としての再利用、の主に 4 つの方法で処理されている。事業系の廃油は回収率が高いが、一般家庭からの回収率は低く、10-30%程度を想定している。

有限会社 鳥栖環境開発総合センターへのヒアリング調査では、一般家庭からの回収率は、鳥栖市で約 30%と高く、久留米市では約 3%と低かった。同社が鳥栖市にあることなどの立地条件も関連すると考えられるが、鳥栖市が廃油回収に積極的であることが伺える。

## 廃食用油の処理費用

関東近郊の廃棄物処理業者へのヒアリングの結果を表 7-1 に示した。多くの場合、廃棄物処理業者が排出者から買い取っており、単価は 10 円/L 以下であった。現状で既に回収ネットワークが充実しており、地域間での引取価格にはあまり差がないものと考えられる。

大量排出者は限られており、小さな店舗から発生する廃食用油を細かく回収しているのが現状である。このため回収には労力を要し、多くの場合で無償引取（0 円/L）となっている。廃棄物扱いしないようにするためにも、回収業者による買い取りが行われているが、この場合でも価格は下落傾向にある。また廃油の状態（水や固形物等の不純物の混入状況）によっては、産業廃棄物として処理され、この場合には委託処理費を排出者が負担している。

有限会社 鳥栖環境開発総合センターへのヒアリング調査でも、九州北部地域では多くの場合、無償引取（0 円/L）となっている。

表 7-1 関東近郊の廃食用油買取価格

社名	所在地	URL	管轄エリア	一般単価(植物性油)	備考
株式会社 日の丸商事	茨城県つくば市田中	<a href="http://hinomaru-ibaraki.seesaa.net/">http://hinomaru-ibaraki.seesaa.net/</a>	茨城県	5円/L(引取込み)	植物性のみ
株式会社 吉川油脂	栃木県佐野市飛駒町	<a href="http://www.y-yushi.com/outline/">http://www.y-yushi.com/outline/</a>	東日本全域	0円/L(引取、持込とも)	植物性のみ
有限会社 半藤油脂	群馬県太田市石原町	<a href="http://www.hando-yushi.co.jp/index">http://www.hando-yushi.co.jp/index</a>	関東圏	0円/L(小ロット引取の場合) [他は個別見積り]	植物性のみ
ウム・ヴェルト株式会社	埼玉県加須市栄	<a href="http://www.umwelt.co.jp/service/kaitori.htm">http://www.umwelt.co.jp/service/kaitori.htm</a>	茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都	5円/L(200L以上の場合、引取のみ)	植物性のみ
有限会社 丸新	埼玉県吉川市大字三輪野江	<a href="http://www.marushin-web.jp/company/company.html">http://www.marushin-web.jp/company/company.html</a>	茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、山梨県、静岡県、新潟県	0円/L(小ロット引取の場合) [他は個別見積り]	油種問わず (価格は別途)
吉岡製油有限会社	埼玉県入間市二本木	<a href="http://www.y-seiyu.co.jp/facility/first.html">http://www.y-seiyu.co.jp/facility/first.html</a>	茨城県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、山梨県	0円/L(3缶以上で引取、持込とも)	油種問わず (価格は別途)
株式会社アドバン	埼玉県熊谷市妻沼西	<a href="http://www.kk-advan.co.jp/bdf/02.html">http://www.kk-advan.co.jp/bdf/02.html</a>	東京・神奈川・千葉・埼玉・群馬・茨城・栃木	0円/L(引取、持込とも)	植物性のみ
千葉オイレッシュ株式会社	千葉県君津市笹	<a href="http://www.oilshu.co.jp/company.html">http://www.oilshu.co.jp/company.html</a>	千葉県	10円/L(持込み) 5円/L(引取り)	油種問わず (価格は別途)
株式会社アクアエアー	東京都調布市菊野台	<a href="http://www.aquair.co.jp/index.html">http://www.aquair.co.jp/index.html</a>	東京都、神奈川県、千葉県	5円/1斗缶(引取、持込とも)	植物性のみ
株式会社 リンクス (湘南オイルサービス)	神奈川県茅ヶ崎市下寺尾	<a href="http://www.shonan-oil.jp/">http://www.shonan-oil.jp/</a>	茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県、山梨県、静岡県、愛知県	2.5円/L(個人商店) [他は個別見積り]	植物性のみ
株式会社エコライフアシスト	静岡県藤枝市前島	<a href="http://www.ecolifeassist.co.jp/index.html">http://www.ecolifeassist.co.jp/index.html</a>	静岡県	0円/L(持込みのみ)	一般廃棄物処理業者

## 廃グリセロールの処理費用

関東近郊の廃棄物処理業者へのヒアリングの結果を表 7-2 に示した。廃食用油とは異なり、排出物の性状（水分量、pH、固形物の有無、粘性等）や排出量によって委託処理費が異なるため、参考程度の価格しか回答が得られなかった（いくつかの業者は「実サンプルに基づき見積もり」との回答）。さらに荷姿や回収方法（ドラム缶、バキューム車での回収等）によっても価格は異なり、三友プラントサービス株式会社の場合は 30-500 円/L と価格差が大きい。ある程度の量を取り扱うとした場合、30-40 円/L 程度になるものと推定される。尚、処理方法は焼却処理が一般的と推定される。

表 7-2 関東近郊の廃グリセロール委託処理費用

社名	所在地	URL	一般単価	備考
三友プラントサービス株式会社	神奈川県相模原市緑区橋本台	<a href="https://www.g-sanvu.co.jp/index.html">https://www.g-sanvu.co.jp/index.html</a>	500円/kg(ガロン瓶程度までの量)	容器重量含む
			150円/L(18Lポリ容器程度の量)	
			60円/L(ドラム缶程度の量)	
			30円/L(バキューム車程度の量)	運搬費含む(県内)
千葉オイレッシュ株式会社	千葉県君津市笹	<a href="http://www.oilshu.co.jp/company.html">http://www.oilshu.co.jp/company.html</a>	25円/kg(ドラム缶程度の量)	
エコシステム千葉株式会社	千葉県袖ヶ浦市長浦拓	<a href="http://www.dowa-eco.co.jp/busine">http://www.dowa-eco.co.jp/busine</a>	30～35円/kg (実サンプルに基づき見積りが基本)	
有限会社 丸新	埼玉県吉川市大字三輪野江	<a href="http://www.marushin-web.jp/company">http://www.marushin-web.jp/company</a>	案件毎に実サンプルに基づき見積り	
JFE環境株式会社	神奈川県横浜市鶴見区弁天町	<a href="http://www.ife-kankyo.co.jp/index.html">http://www.ife-kankyo.co.jp/index.html</a>	30～35円/kg (実サンプルに基づき見積りが基本)	
相模原市 調査結果資料より	—	<a href="http://www.iora.jp/biodz/pdf/sagami.pdf">http://www.iora.jp/biodz/pdf/sagami.pdf</a>	12～40円/kg	参考資料

有限会社 鳥栖環境開発総合センターへのヒアリング調査の結果は表 7-3 に示した。焼却処分する場合、委託処理費は 15-20 円/kg 程度が相場と推定される。同社では現状で廃グリセロールを有償で受け入れており、委託処理費は 13 円/kg である。佐賀市の様に廃グリセロールを堆肥化プラントの pH 中和剤として利用（処理）する方法は安価である。しかし大量に添加することができないのが課題となっている。

また一部では廃グリセロールを燃料として 10 円/kg で買い取っている業者（自然と未来 株式会社）がある。ただし、燃料となる廃グリセロールは BDF 製造時のアルカリ触媒にカルシウム塩を用いたものに限られる。これはナトリウムやカリウムが燃料に混入すると燃烧炉やバーナーを腐食・閉塞するためである。一部では BDF 製造時のアルカリ触媒にカルシウム塩を用いているケースもあるようだが、広く普及した技術ではない。

表 7-3 鳥栖市近郊の廃グリセロール委託処理費用

廃グリセロールの処理について				
団体名	所在地	廃グリセロール発生量	処分方法	処分費
佐賀市	佐賀市	10,000 L/年	堆肥化	0円
(株)フチガミ	久留米市	48,000 L/年	売却	+10円/kg
クリーン筑紫野(有)	筑紫野市	3,600 L/年	産廃・焼却	-15円/kg
鳥栖環境開発総合センター 廃グリセロール処分受託費				
こがね園	鳥栖市	(持込み処分) 12,500 kg/年	堆肥化	-13円/kg

#### 有限会社 鳥栖環境開発総合センターの潜在的許容量

(廃食用油の回収量)

現在のところ、有限会社 鳥栖環境開発総合センターの回収廃食用油量は、鳥栖市で約 18.5kL/年、久留米市で約 7.4 kL/年、これに事業系の約 29 kL/年を加えて約 54.9 kL/年である。一般家庭からの回収率は、鳥栖市で約 30%、久留米市では約 3%と推定される。

事業系廃食用油の定期回収箇所を図 7-3 に示した。定期回収箇所は同社の所在地からおよそ 20km 圏内である。この範囲内であれば、条件が整えば一般家庭からの廃食用油の回収も可能と考えられる。この範囲内には、鳥栖市、大野城市、春日市、太宰府市、筑紫野市、小郡市、神埼市、久留米市、大川市、八女市、筑後市が含まれる。各市の人口は表 7-4 に示す通りであり、合計で約 100 万人となる。一般家庭からの排出される廃食用油は、年間で国民 1 人当たり約 0.78-0.94kg であるので、約 100 万人で約 780-940t (=約 867-1044kL) と算出される。さらに鳥栖市並の回収率(約 30%) が実現できれば年間で約 260-313 kL の回収が期待される。尚、事業系の廃食用油も潜在的には増加するものと思われるが、現時点では推定するための情報が得られなかった。



図 7-3 有限会社 鳥栖環境開発総合センターの事業系廃食用油定期回収箇所

表 7-4 有限会社 鳥栖環境開発総合センターから 20km 圏内にある市の人口

市	人口
鳥栖市	71,681
大野城市	98,051
春日市	105,219
太宰府市	71,209
筑紫野市	102,275
小郡市	59,536
神埼市	33,009
久留米市	305,933
大川市	39,213
八女市	69,057
筑後市	49,229
合計	1,004,412

(廃グリセロールの回収量)

現在、有限会社 鳥栖環境開発総合センターでは年間 12,500kg (比重 1 として 12.5kL) の廃グリセロールを受け入れて堆肥化处理をしている。委託処理費は 13 円/kg である (表 7-4)。加えて筑紫野市の排出者は年間 3.6kL (15 円/L)、佐賀市は年間 10kL (無償) で処分している。委託処理費の問題があるが、これらの廃グリセロールを全て受け入れるとして、合計で 26.1kL となる。

## 7.4 各種条件の経済性に与える影響

### 基本となる条件等

図 7-2 に示した設備制作費の試算 (見積もり) を (株) プリスに依頼した。タンクと発酵槽はステンレス製とし、値段交渉のない状態での価格とした。タンクと発酵槽および主要ポンプが約 8,000 千円、蒸留装置が約 16,000 千円、総合計で約 24,000 千円であった。これには建設にかかる費用と配管工事などは含まれていない。本調査を実施した時点では、製造装置の建設予定地の状況など不明な点が多いので、正確な数値は算出できなかった。制作費の交渉による減額と付帯工事費用を含めて、総額で 30,000 千円程度と仮定した。製造装置の建設費用のうち 50% の公的補助が受けられるとし、15 年で投資を回収するとした。

廃グリセロールの委託処理費は中間報告では 50 円/L としたが、その後の調査で鳥栖市近郊では 15-20 円/L、関東圏では 30-40 円/L が相場と推定されたので、20 円/L とした。廃食用油は無償回収とした。

運転人件費は年収 4,000 千円 (保険等の会社負担を考慮して年間 8,000 千円) の運転員 1 名分とし、寄与率は 10% とした。

エタノールの販売価格は、ガソリンの税抜き価格である 96-106 円/L および資源エネルギー庁資料 (2012 年) を参考に 100 円/L を基本とした。

### 基本的な試算結果

(有限会社 鳥栖環境開発総合センターの現状での試算)

現在の廃グリセロール処理量は年間 12kL であり (年間廃食用油処理量 80kL、この 15% が廃グリセロール)、グリセロール濃度を 40% として、年間 4,800kg のグリセロールを処理するものとした。エタノール生産量は 2,400kg (=3,038L)、エタノール販売益は 304 千円となる。

この条件で計算すると、年間 1,618 千円の赤字となる。コストの内訳を見ると図 7-5 のようになり、設備投資の負担 (1,000 千円) と人件費 (800 千円) がそのほとんどを占めている。

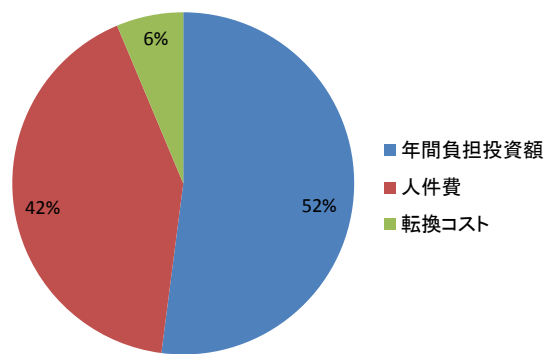


図 7-5 鳥栖環境開発総合センターの現状でのコスト内訳

現在、有限会社 鳥栖環境開発総合センターでは年間 12,500kg の廃グリセロールを受け入れて堆肥化処理をしている。委託処理費は 13 円/kg である。この廃グリセロールをエタノール生産に用いると、年間 1,265 千円の赤字と計算され、僅かに赤字が減少する。

(基本となる運転条件での試算)

損益分岐点に近い（赤字にならない）条件を試算した。廃グリセロールの委託処理費は中間報告では 50 円/L としたが、その後の調査で鳥栖市近郊では 15-20 円/L、関東圏では 30-40 円/L が相場と推定されたので、20 円/L とした。廃食用油の処理量は現状と同じ（80kL）とし、廃グリセロールの受け入れ量を 110kL とした。これにより装置規模は約 5 倍となり、装置の建設費用には 0.7 乗則を適応、公的な資金援助率は 50% とした。試算結果は 132 千円の黒字となった。以下、各種条件検討においては、本条件を基本とする。

基本条件での収入の内訳はエタノールの販売で 3,089 千円（廃グリセロール由来 2,785 千円、廃食用油由来 304 千円）、廃グリセロールの処理で 2,200 千円となる。廃グリセロールを受け入れることで委託処理費とエタノール販売益の双方が得られ、収益への貢献度が高くなっている。

またこの時のコスト内訳は、図 7-6 のようになる。装置建設の投資額と人件費がコストの約 80% を占めている。同条件で公的な資金援助率を 2/3 とすると、総経費は約 100 万円減じ、黒字は 1,168 千円となる。この際のコスト内訳は、図 7-7 のようになり、装置建設の投資額と人件費がコストの約 70% に抑えられている。

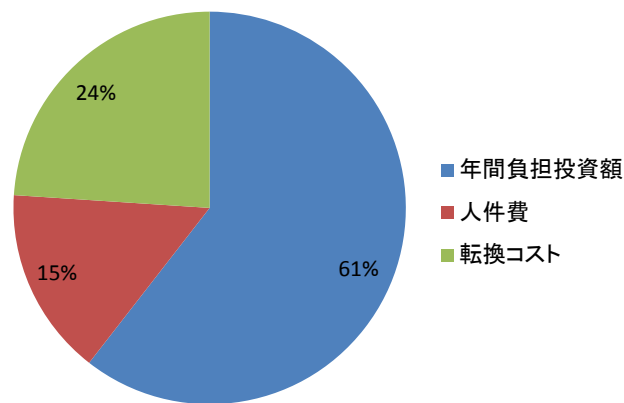


図 7-6 基本となる運転条件でのコスト内訳

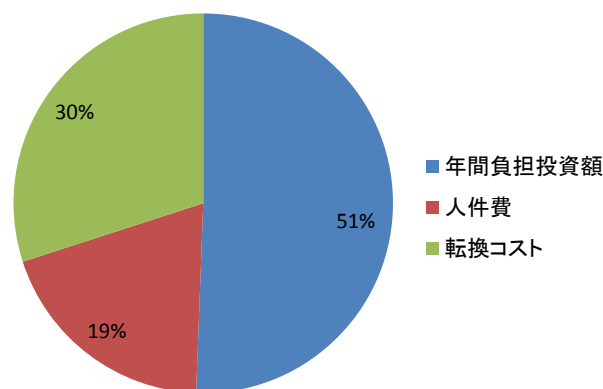


図 7-7 基本となる運転条件でのコスト内訳（ケース 2）

#### 廃食用油処理量の影響

年間に処理する廃食用油の処理量の影響を検討した。ヒアリング調査の結果、廃食料油は排出者から低価格（10 円/L 以下）で買い取るか、無償回収が一般的であった。このため試算では無償回収とした。また廃グリセロールの処理量は年間 110kL で一定とした。

結果を図 7-8 に示した。廃食用油の処理量が増加すると装置規模も大きくなり、設備投資も増大する。設備投資額と装置規模に 0.7 乗則を適応して試算すると、廃食用油の処理量約 700 kL で総利益は最小となり、これ以上の処理量で総利益は増加した。廃食用油は委託処理費が得られないこと、総量の 15% のみがグリセロールであることから利益への貢献度が廃グリセロールと比較して小さいことが原因と考えられる。廃グリセロールは 1kL 処理すると 45.3 千円の売上となるが、廃食用油は 1kL で 3.8 千円に留まる。

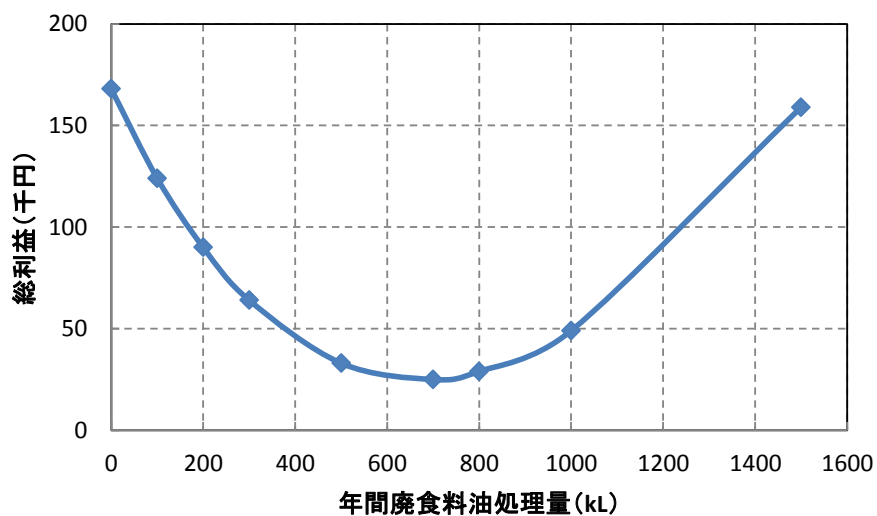


図 7-8 廃食用油処理量の影響

#### 廃グリセロール処理量の影響

年間に処理する廃グリセロールの処理量の影響を検討した。廃グリセロールの委託処理費は鳥栖市近郊では 15-20 円/L、関東圏では 30-40 円/L が相場と推定されたので、20 円/L とした。また廃食用油の処理量は年間 80kL で一定とした。結果を図 7-9 に示した。委託処理費が得られるため、処理量を増加するほど総利益が増大する結果となった。

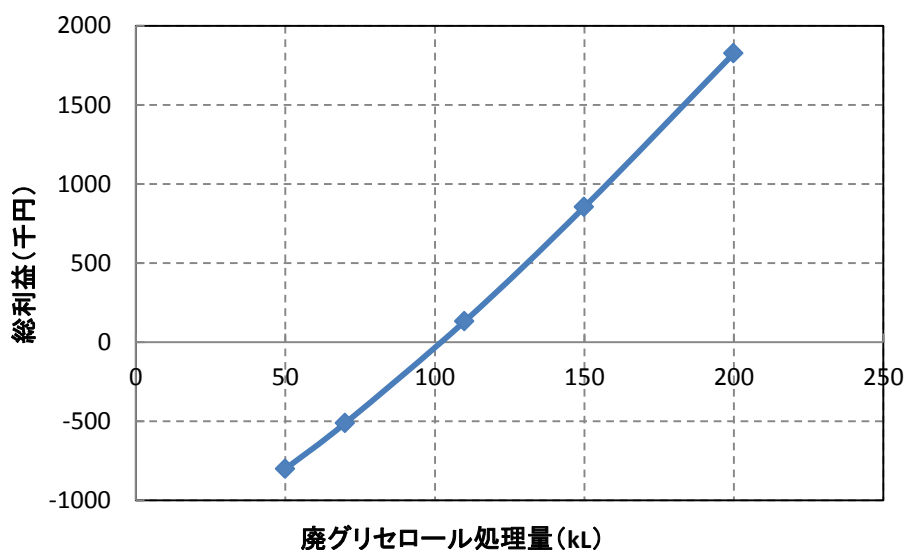


図 7-9 廃グリセロール処理量の影響

## エタノール価格の影響

試算の基本となる運転条件では、エタノール価格を 100 円/L としている。これは燃料として価格を設定した為である。経済産業省発表の化学工業統計月報のデータをもとに、工業用エタノール価格の年次推移を図 7-10 に示した。過去 5 年間は、およそ 130 円/L を前後しており、100 円/L よりも高い価格を維持している。生産物であるエタノールを燃料用ではなく、工業用とすることも本事業の利益を確保するための重要な選択肢である。ただし、用途によっては求められる純度などの性状がことなるので、この点はコスト面からも留意すべきである。

図 7-11 にはエタノール価格の総利益に対する影響を示した。エタノール価格が約 90 円/L を下回ると利益は確保できない。工業用アルコール並の 130 円/L であれば 1,000 千円程度の黒字となる。

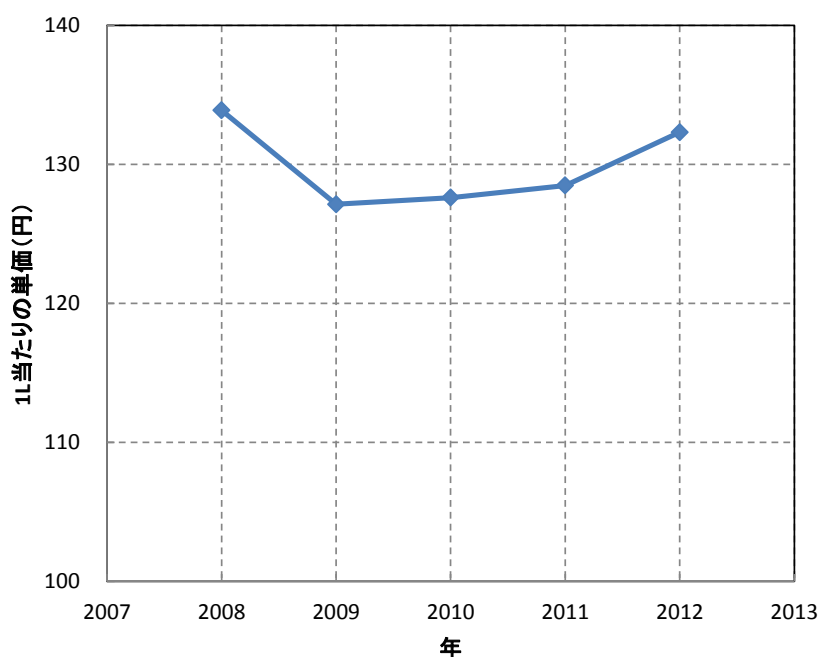


図 7-10 工業用エタノール価格の年次推移

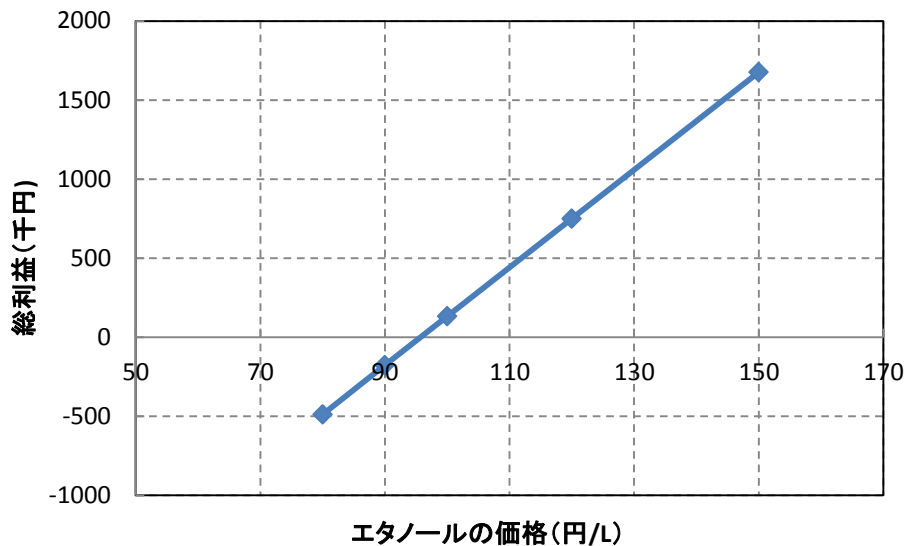


図 7-11 エタノール価格の総利益への影響

#### 設備建設費に対する公的援助の影響

図 7-6 に示したように、本事業のコストにおける設備建設の費用の割合は大きい。基本条件では公的な補助が 50%得られるとしたが、補助率の影響を試算した。結果は図 7-12 に示す通りで、補助率が 48%以下で利益は消失する。

図 3 のような装置構成と規模での初期的見積もりから、設備費用を 30,000 千円としたが、事業化にあたってはさらなる精査と圧縮が必要である。

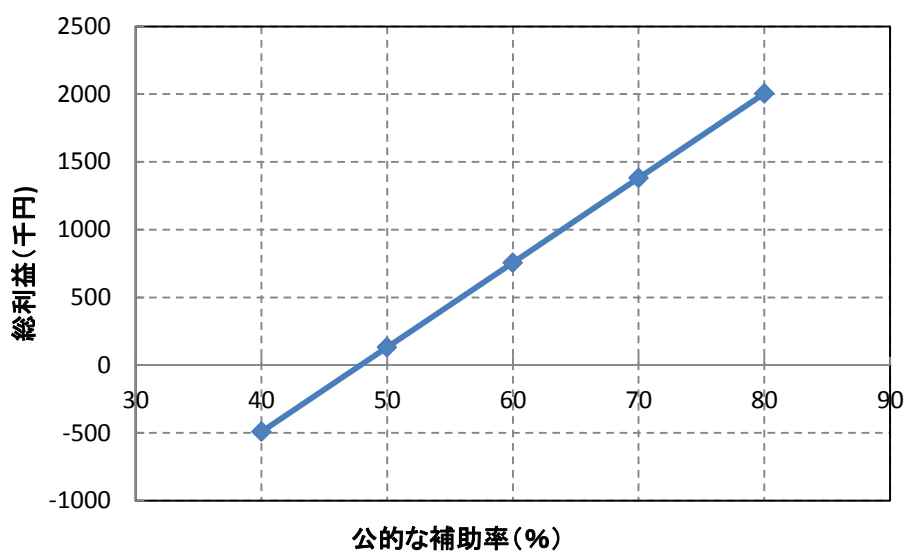


図 7-12 設備建設に対する公的援助の影響

### エタノール生産速度の影響

エタノールの生産速度が向上すると、同じ規模の発酵槽で処理できる廃グリセロール量が増加する。基本条件のまま、エタノール生産速度が向上した場合を試算した。正確にはポンプの送液や配管直径および貯留タンク容量なども考慮する必要があるが、ここでは単純にエタノール生産速度が2倍になれば、同容積の反応槽で処理量が2倍になるとして試算した。

結果は図 7-13 に示した通りで、エタノール生産速度の向上は利益の増大をもたらすことが期待できる。特に2倍程度の生産速度の向上は影響が大きい。これは設備建設費を増やさずに廃グリセロールの処理量とエタノール生産量を増加することができるためである。

廃グリセロールの希釈率も同様な効果を示すと考えられる。基本条件では廃グリセロールは20倍希釈してグリセロール濃度が約2%となるようにしている。培地の仕込みグリセロール濃度を高くする（＝希釈率を下げる）ことができれば、総培地量が減るため同容量の装置でより大量の廃グリセロールを処理することが可能となる。仕込みグリセロール濃度が2倍になれば、同容積の反応槽で処理量は2倍になり、利益は増大する。

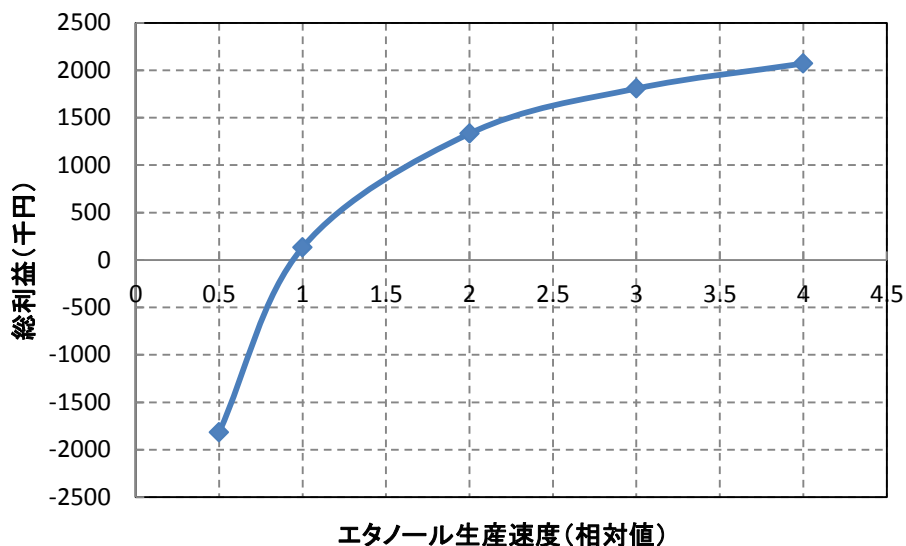


図 7-13 エタノール生産速度の影響

## 7.5 基本となる運転条件での試算と目標値

本事業の経済性を、製造コスト（設備建設費、運転人件費、転換コスト）、エタノール販売売上および廃グリセロール受け入れ費用から試算した。セルロース系バイオマスからのエタノール生産と異なり、原料費は無料であり、廃グリセロールを受け入れる場合には委託処理費が収入となる。またセルラーゼ等による原料の前処理も不要である。さらに、培地としてメタン発酵の消化液がそのまま利用可能であれば、培地作成に掛かる原料代も不要となる。製造コストの各項目も適当と考えられる数値を使ったが、実際のデータに即したものではない。設備建設費の試算は設置場所を決めて、精度を向上させる必要がある。運転人件費は実際にどの程度の労力が必要なのかを実証試験等で検証する必要がある。転換コストのうち、特に蒸留にかかるコストは大きいと考えられるが、これは蒸留装置の規模や他の装置との熱エネルギーバランスなどを考慮して算出する必要がある。

有限会社 鳥栖環境開発総合センターの現状データをもとに試算すると赤字であった。黒字化するための条件を検討した結果、廃食用油の処理量は現状と同じ（80kL）、廃グリセロールの受け入れ量 110kL が求められた。装置規模は基本条件の約 5 倍となり、設備建設費の算出には 0.7 乗則を適応、公的な資金援助率を 50% とし、年間 132 千円の黒字となった。廃食用油の処理量の影響を検討した結果、処理量約 700 kL 以下では、処理量を増やすと利益は減少した。処理量約 700 kL で利益は最小となるが、これ以上に処理量を増加すると利益は増加した。これは廃食用油では委託処理費が得られないこと、総量の 15% のみがグリセロールであることから利益への貢献度が廃グリセロールと比較して小さいことが原因と考えられた。これに対して、廃グリセロールの処理量は増加するほど、利益も増大した。

エタノールはガソリンへの混合を前提として 100 円/L を基本としたが、工業原料としての利用も考慮すると利益は大きくなることが期待できる。ただし、用途によって要求性状は異なり、それに応じた設備が必要となる。設備建設費はコストに重大な影響を与えるので、慎重な検討を要する。設備建設費は、本事業のコストの大部分を占める。投資を 15 年で回収するとしても、少なくとも 50% 程度の公的な資金援助がないと黒字化は望めない。設備建設費を抑えたままで収益を上げるには、①エタノール生産速度の向上、②廃グリセロールの希釈率の低下、が効果的と考えられた。試算結果では、エタノール生産速度は 2 倍程度、廃グリセロールの希釈率は約 1/2（グリセロール濃度で約 2 倍）にすることができれば、収益性への影響が大きいと推定された。

本研究の現在までの実績と、フィージビリティスタディーの初期設定条件を比較すると、設定条件である BDF 廃グリセロール 20 倍希釈（初期グリセロール濃度 2%）、4 日間の滞留時間に対して、ラボスケールにおいて初期グリセロール 5% を約 2 日間でほとんどエタノール（約 2.5%）に変換できる。さらに逐次添加においては 4 日程度まで維持可能であり、その場合の最終エタノール濃度（3.4%）から逆算すると、原料グリセロール約 7% を 4 日間でエタノールに変換したことになる。蒸留段階を考慮するとぎりぎりの濃度であるが、少なくともラボスケールでは上記の試算をほぼクリアすることができた。設備投資においては、既存遊休設備の有効利用等を考慮すれば、さらに公的資金に頼らずとも収益をあげることが可能であると思われる。

## 8 パイロットスケール試作発酵槽による実証試験

実証試験用のプラント制作に当たり、各種条件をリストアップした。まず、実際に使用する菌株に関して、まず研究期間内に数種の TB-83D 変異株を取得したが、遺伝子改変を施した株 (6 章参照) に関しては、遺伝子組換え微生物に該当するため、開放系である実証プラントでは使用できない。また、ギ酸耐性・ギ酸生産能低下変異株については、TB-83D 株と比較してエタノール生産量に大きな違いはなかったことから、パイロットプラントスケールでの運転には当初の予定通り TB-83D 株を供試菌体とした。

エタノール生産培地については、3 章に記載したとおり、酵母エキスをを用いることでエタノール生産性が飛躍的に増加したこと、それに加え、メタン消化液でもエタノールを生産し、培養コストをほぼゼロにすることが可能であったことから、酵母エキス培地およびメタン消化液培地を生産培地とした。培地滅菌については、滅菌コストを考慮し、原則として滅菌操作は行わない。また、これら培地を逐次的もしくは連続的に添加させることでエタノール生産を行うこととした。

具体的な培養条件に関しては、実験室レベルで実証したエタノール生産最適温度である 25℃、pH8.0 の一定条件下で穏やかに攪拌しながら培養を行う微好気条件を用いた。試験用プラントについては、設置場所である (有) 鳥栖環境開発総合センター内のスペースと、同センターにおける BDF 廃液の供給能力、発酵槽の制作と運転に関わるコスト等を考慮して、実証データが充分得られる規模として主発酵槽の容量を 300L (運転時 200L) として製作した。発酵終了後の培地処理に関しては、発酵副生産物でメタン発酵の良い基質となるギ酸や有機物を含むことから、発酵終了後にセンター敷地内に設置してあるメタン発酵槽に戻すことにより、処理費用を削減し環境低負荷な処理を行うと共に、BDF 廃液のゼロエミッション化を目指した。

### 8.1 発酵槽の設計と試作

エタノール生産用試作発酵槽は、有限会社 鳥栖環境開発総合センター (佐賀県鳥栖市轟町) 敷地内に設置した (幅 4 m × 奥行き 1.5 m)。この試作発酵槽 (図 8-1) と同敷地内に BDF 製造装置およびメタン発酵槽が設置してあることから、培養に用いる BDF 廃液およびメタン消化液をすぐ供給することができる。



図 8-1 製作した試作発酵槽の外観

設計・作製した試作発酵プラントは、原料タンク・主発酵槽・貯留タンクの3個のタンクから構成されており、それらタンクはゴムチューブにより連結されている。また、pH制御のためのpHメーター、攪拌速度の調節器、温度センサーの各種センサー類を搭載した制御基盤、アルカリおよび原料流加のためのポンプを設置した。さらに、温度調整用にボイラーの配管をタンクに接続することにより一定温度の保持を可能にした。以下にそれらの詳細を示す。

#### 主発酵槽（発酵タンク：図8-2）

- ・ 容量 400 L (SUS304 製) (直径  $\Phi 770$  × 縦  $\Phi 900$ )
- ・ pH センサー (メトラートレド製 Inpro4260) をタンク下部に装備し、pH7-9 での制御が可能である
- ・ 攪拌機 (阪和化工機製 KP-4002B-29AV) を装備し、タンク内の培養液が十分に混合可能である
- ・ タンク上部に培養液吐出口を有し、オーバーフローさせることでタンク内の培養液が一定量に保つことが可能である
- ・ ベント (SUS304 製) を装備
- ・ タンク最下部に培養液吐出口及び開閉弁及び送液ポンプを有する
- ・ 温度センサーと温度制御装置を装備し、20-35℃での温度制御が可能である

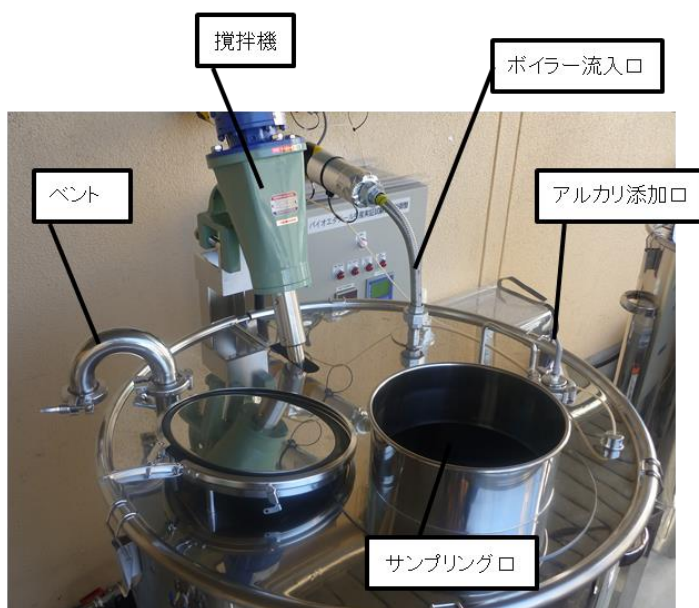


図 8-2 主発酵槽の外観 (左図) と 設置配管・機器類 (右図)

原料タンク: 図 8-3

- ・ pH センサーをタンク下部に装備
- ・ 攪拌機を装備し、タンク内の培養液が十分に混合可能である
- ・ タンク最下部に培養液吐出口及び開閉弁及び送液ポンプを有する

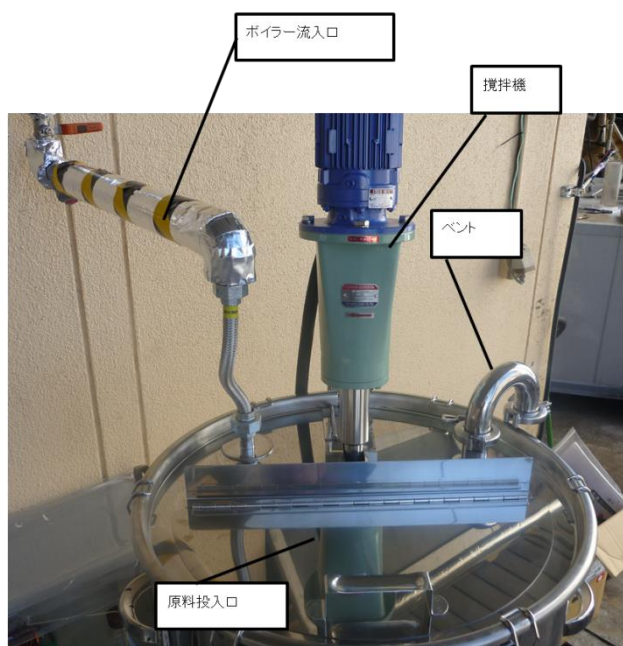


図 8-3 原料タンクの外観 (左図) と 設置配管・機器類 (右図)

#### 貯留タンク: 図8-4

- ・ 容量 600 L (SUS304 製) (直径  $\Phi 1000$  × 縦  $\Phi 850$ )
- ・ 培養タンクからオーバーフローにて排出される培養液が滞留及び逆流しない
- ・ タンク最下部に培養液吐出口及び開閉弁を有する

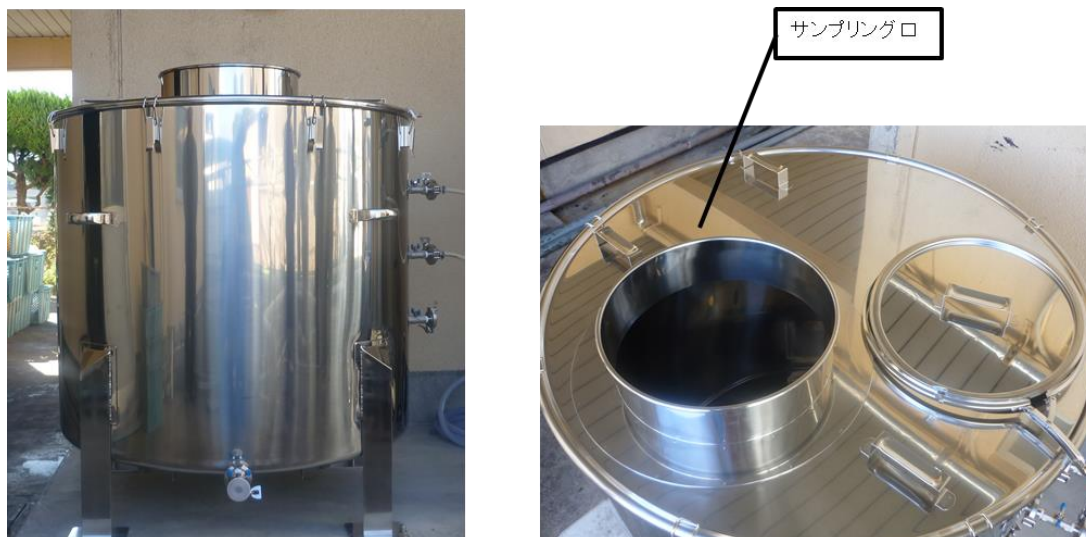


図 8-4 貯留タンクの外観 (左図) と 設置配管・機器類 (右図)

#### その他機器類: 図8-5

- ・ 制御板には攪拌機の手速度調整器および ON/OFF スイッチ、pH 計、送液・アルカリ添加ポンプ ON/OFF スイッチを備え、万が一の誤作動に備えて緊急停止スイッチを装備する
- ・ 原料タンクと主発酵槽を連結するホースには、ローラーポンプを備え、5~20 L/h の送液が可能である
- ・ 主発酵槽上部のチューブにはペリスタポンプを装着し、アルカリタンクからアルカリ添加を可能とする

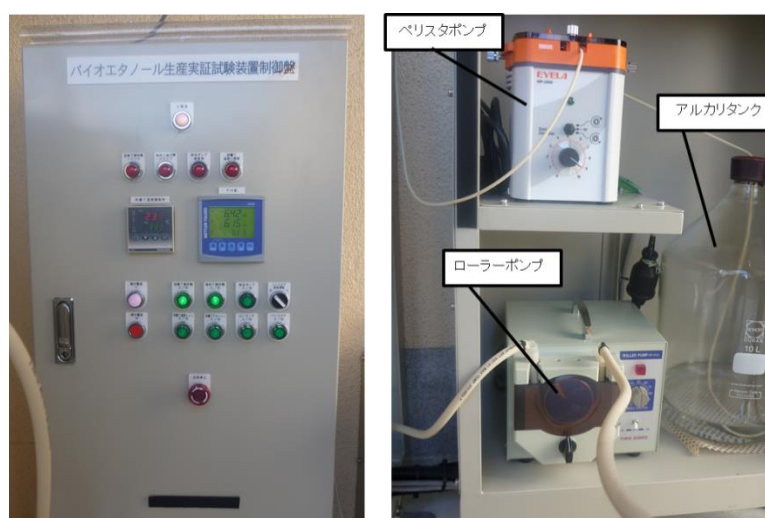


図 8-5 装置制御板 (左図) と その他機器類 (右図)

## 8.2 回分培養における生産試験

まず、前章のフィージビリティースタディーにおける初期設定値（初期グリセロール 2%、4 日間滞留）を念頭に、ラボスケールで検討した酵母エキス(YE)培地を用いて回分培養によるエタノール生産を行った。最高の生産性を出すためには、本来はコーンステープリカー (CSL) を同時添加する必要があるが、効果がそれほど高くないことを考慮して、添加は見送った。

### 【材料と方法】

#### 使用培地

主発酵槽に4倍希釈BDF廃液 25 L(初期グリセロール濃度 約 2.5%) と酵母エキス 3.0 kg (YE 培地) を投入し、そこに水 (水道水) を加え全量 200L にし、25℃, pH 8.0 に調整した後、筑波大学から郵送した菌懸濁液 (6 L 培養分) を投入した。培養中に原料の流加は行わない回分培養にて培養を行い、pH コントロール、25℃条件下で培養を行った。培養期間中に主発酵槽の上部からサンプリングを行った。メタン消化液を用いた場合は、4 倍希釈 BDF 廃液の代わりにメタン消化液 130 kg を投入した (メタン消化液培地)。

#### 代謝産物解析

サンプリング後の培養液を、発酵が進行しないようにクール便にて筑波大学に郵送した後、HPLC により解析を行った。

### 【結果と考察】

#### 酵母エキス培地での生産

酵母エキス培地を用いて培養を行った結果（図 8-6）、グリセロールは培養 24 時間後に完全消費され、それと共にエタノールが生産された。また、エタノール生産と同時に副生産物であるギ酸も同程度生産された。このことから、実験室スケールと同様にパイロットプラントスケールでもエタノール生産が可能であることを実証できた。

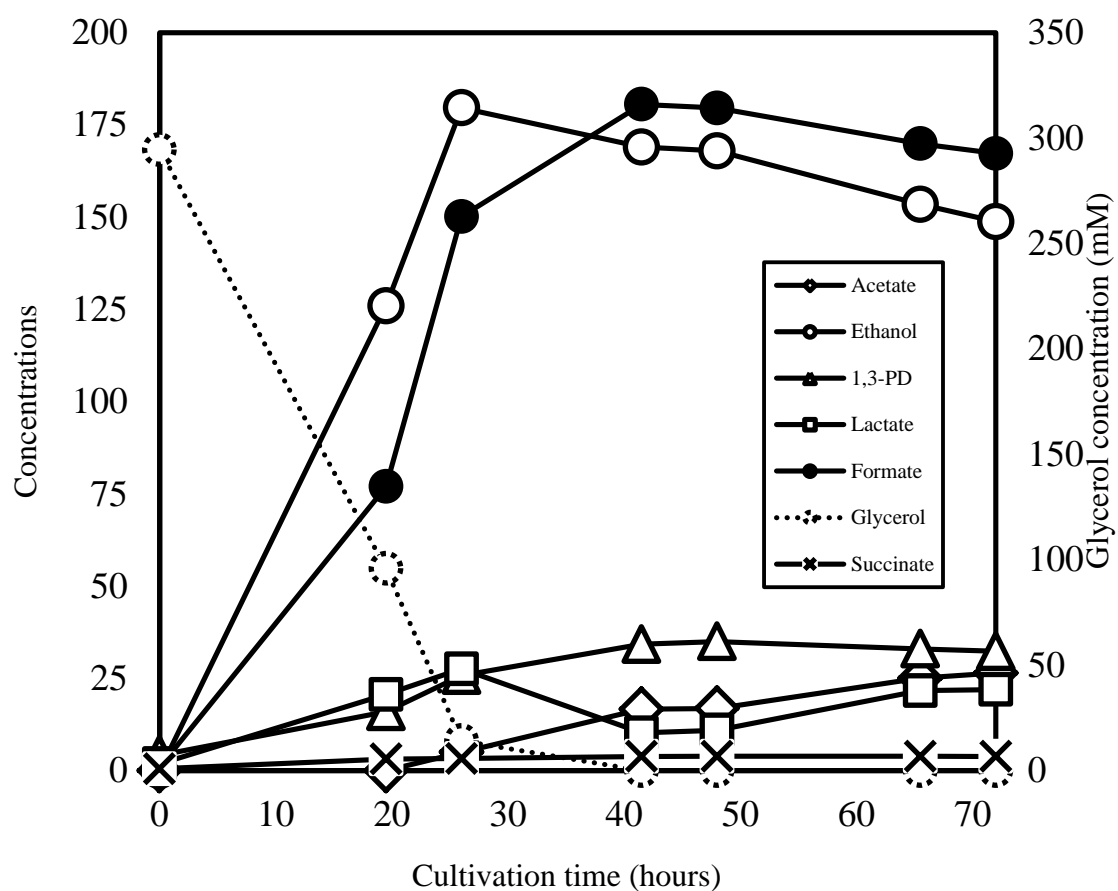


図 8-6 回分培養による BDF 廃液からのエタノール生産 (酵母エキスを培地)

また、回分培養で得られたデータについて、実験室レベルでのデータと消費グリセロールおよびエタノール生産性の比較を行った（図 8-7）。消費グリセロール、エタノール生産ともに、実験室レベルと比較すると若干低下したが、ほぼ同様の生産性を有していたことから、ラボスケールの検討結果がプラントスケールにおいても応用可能であることが示唆された。

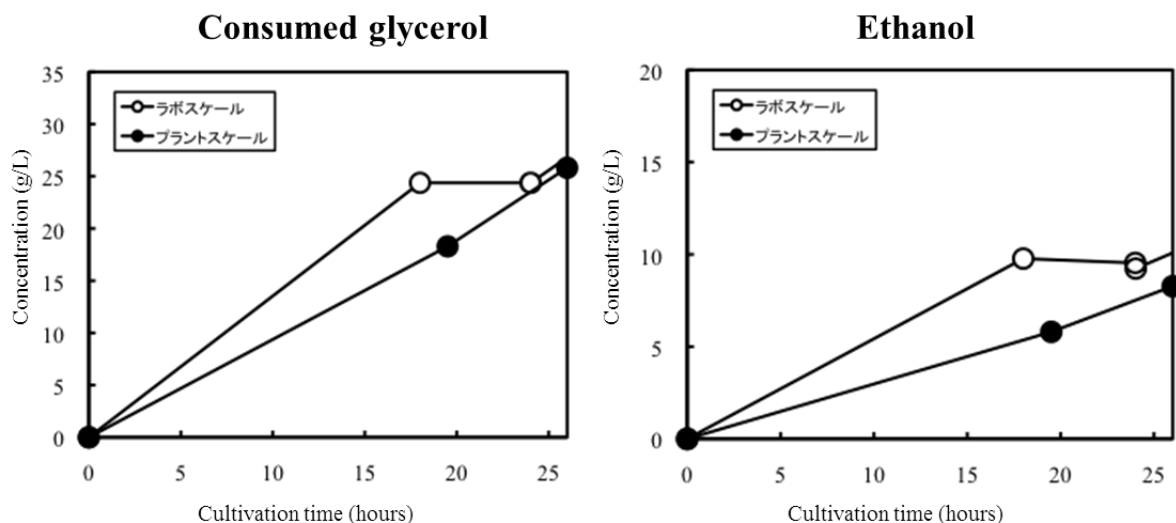


図 8-7 実験室レベルとプラントレベルでの生産性比較

#### メタン消化液培地での生産

次に、メタン消化液を用いた場合についても同様に、回分培養によりエタノール生産性を調べた（図 8-8）。メタン消化液を用いた場合、グリセロール消費率は酵母エキス培地の場合と比較して減少し、培養 48 時間で完全消費され、エタノールとギ酸もそれと同時に生産された。酵母エキス培地よりもエタノール生産量は低いものの、メタン消化液を用いた場合でもパイロットスケールでエタノール生産が可能であることを実証できた。

一方、副生産物として 1,3-プロパンジオール（1,3-PD）の生産量が、酵母エキス培地の場合と比較して約 3 倍程度増加した。培地滅菌コスト等を加味して、パイロットプラントスケールでの運転は滅菌操作を行っていないため、この 1,3-PD 量の増加は、メタン消化液中に存在する他のグリセロール資化性菌による可能性が疑われた。

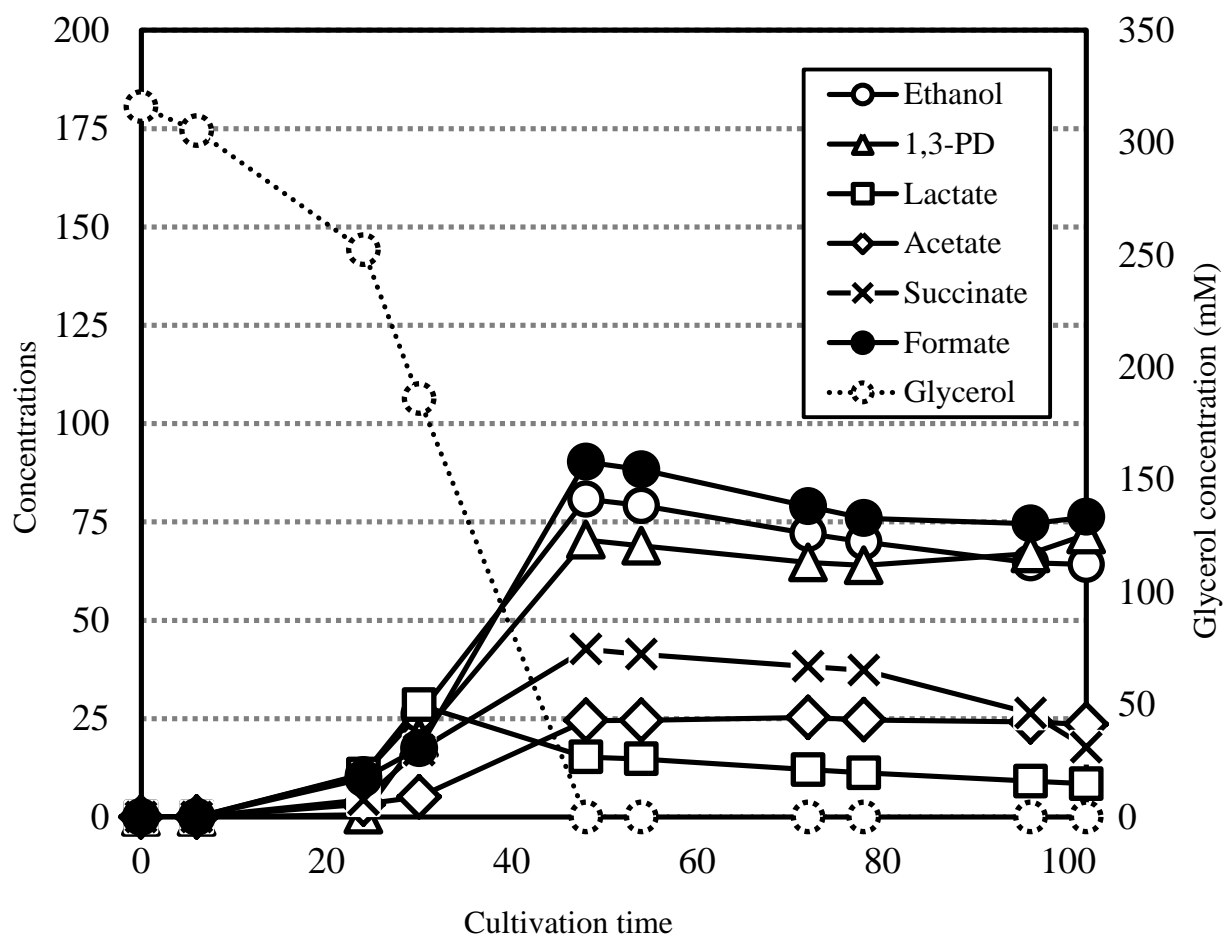


図 8-8 回分培養による BDF 廃液からのエタノール生産 (メタン消化液培地)

### 8.3 逐次添加培養による生産試験

次に、BDF 廃液の逐次添加培養を行うことによるエタノール生産を行った。培養に当たってはラボスケールの最適条件を反映し、初期グリセロール濃度を 5% として、逐次添加培養を行うことで、エタノール生産性の向上を図った。

#### 【材料と方法】

##### 使用培地

主発酵槽に BDF 廃液の 2 倍希釈液 25 kg (グリセロール濃度 終濃度で約 5%) と酵母エキス 3.0 kg (酵母エキス培地) を投入し、そこに水 (水道水) を加え全量 200L にし、25℃, pH 8.0 に調整した後、筑波大学から郵送した菌懸濁液 (6 L 培養分) を投入した。培養 24 時間までは BDF 廃液の添加を行わない回分培養を行い、24 時間後から BDF 廃液の 2 倍希釈液 25 kg を 3 日間連続で添加した。培養期間中は pH コントロール (pH 8.0) を行い、25℃の一定温度で行った。

純グリセロール用いる場合は、培地中の BDF と純グリセロール(Wako) 10 kg(グリセロール濃度 終濃度で約 5%)を置き換えることで培地を作製した。その後の逐次添加には BDF 廃液の 2 倍希釈液 25 kg (グリセロール濃度 終濃度で約 5%)を添加した。

## 【結果と考察】

前項の実験において、1,3-PD の蓄積が認められ、雑菌の混入が疑われたため、各培養槽を 1 日おきに 3 回蒸気で簡易滅菌し、洗浄・乾燥した後実験を開始した。まず、BDF 廃液を用いた逐次添加培養について検討したところ、培養 48 時間まではグリセロールは良好に消費された。しかしながら、エタノールは前項の場合と同様にほとんど生産せず、1,3-PD が生産された (図 8-9)。

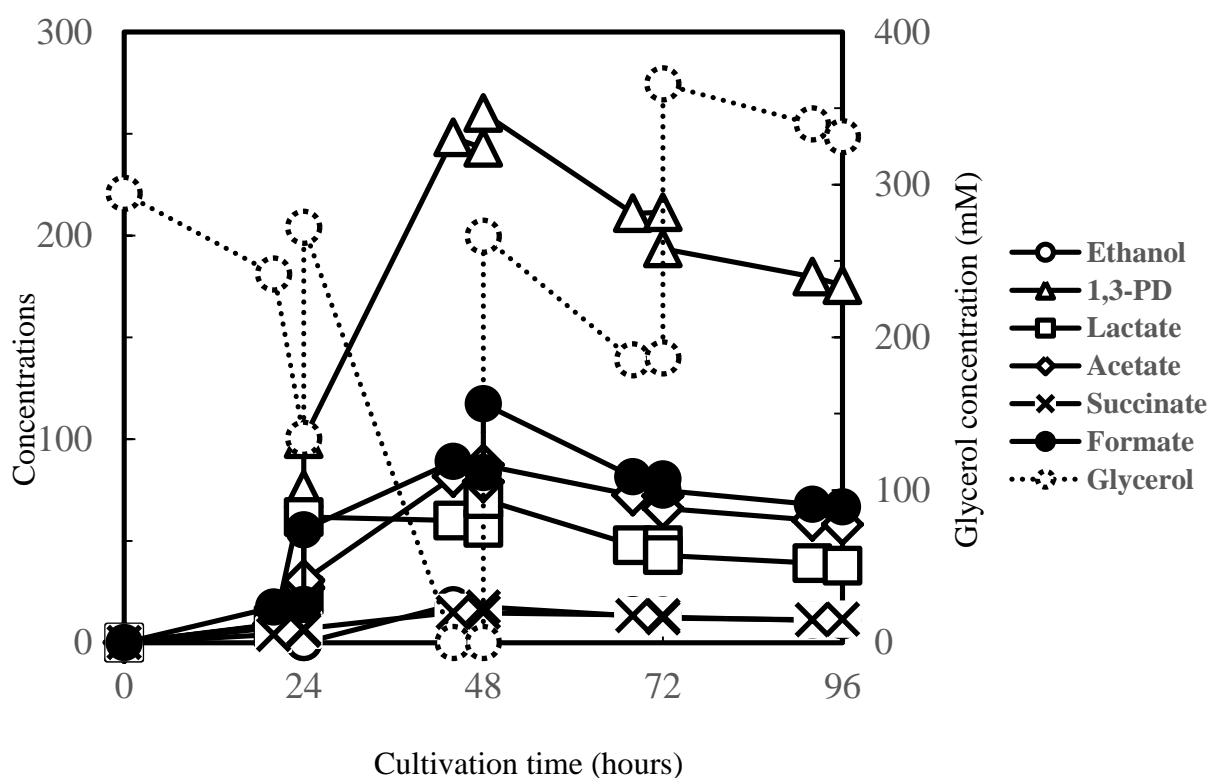


図 8-9 逐次添加培養によるエタノール生産性 (BDF 廃液)

培養中、培養終了後に培養液を引き抜き、これを希釈して Nutrient Broth 寒天平板に塗布したところ TB-83D とは明らかに異なるコロニーが優占していた。この優占コロニーを単離し、生産培地で培養したところ、著量の 1,3-PD を生産することが明らかになった、また、本菌と TB-83D 株を共存させて培養すると TB-83D 株の生育が抑制され、最終的に本菌が優占化することが確認された。なお、本菌はストレプトマイシンに耐性を有していた。

そこで、再度槽内の滅菌を慎重に行った。そのうえで、植菌した TB-83D 株の初期生育を早めることで、汚染の回避を試みた。培養初期の炭素源を BDF 廃液に代えて、純グリセロールを用いて培養を行ったが、エタノールはほとんど生産されず、むしろ 1,3-PD が生産された。(図 8-12)。

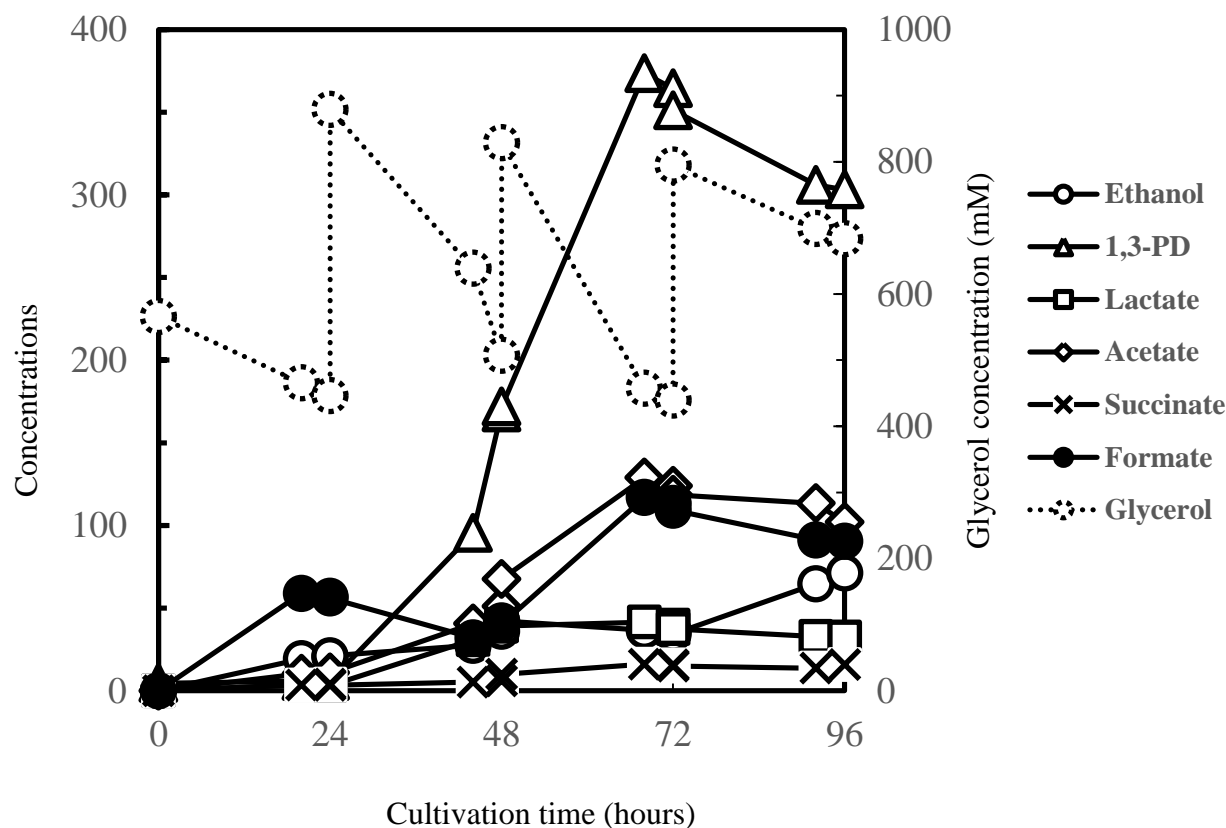


図 8-12 逐次添加培養によるエタノール生産性 (純グリセロール)

培養中、および培養終了後のサンプルの微生物叢を解析した結果、今回も前回と全く同じコロニーが、培養 12-24 時間から急速に優占化していることが明らかになった。その後、滅菌方法や培養条件、植菌量や種菌の送付方法（温度変更や、郵送にせず持参するなど）等を変えて数回検討したが、汚染を回避することは出来なかった。最終的に塩酸による滅菌と次亜塩素酸を用いることで汚染菌の排除には成功したが、TB-83D 自体の生育も阻害され、データの取得はできなかった。

なお、前項で行った回分培養に用いたメタン消化液の微生物叢を調べたところ、本汚染菌はメタン消化液に由来している可能性が強く示唆された。第 3 章において、今回と同じ有限会社 鳥栖環境開発総合センターからいただいたメタン消化液を用いた場合には、非滅菌で用いても TB-83D の生育阻害や、他菌の優占化は見られなかった。今回も同じ発酵槽のメタン消化液を使用したのであるが、この間に発酵槽の洗浄と再構築作業が入っていたため、内部の微生物叢に変化があったと考えられる。メタン消化液のような発酵残渣を栄養源として用いるには、雑菌汚染の可能性も充分考慮し、TB-83D 株を確実に優占化させるための条件検討も必要であると考えられる。

しかし、当初の実験において、雑菌汚染が無い場合においてはパイロットスケールとラボスケールの結果はほぼ一致したことから、今後はラボスケールの検討のみでも、ある程度大規模培養のシミュレー

ションが可能であると考えられる。これまでに **BDF** 廃グリセロールからのエタノール生産において、数 100L 規模のスケールでの検討は報告されておらず、今回のデータは今後の同分野の研究検において貴重なものである。なお今回分離した汚染菌については、何の条件検討も行っていない現時点でも極めて高い生育速度と 1,3-PD 生産性を有しており（非組み換え菌の中では世界最高レベル）今後、同定してその生産性を検討したい。

## 9 結論

本研究ではバイオディーゼル燃料(BDF)廃液のエネルギーとしての再生技術の確立を最終目標として、研究代表者によって自然界から新たに分離された微生物、*Klebsiella variicola* TB-83D 株による BDF 廃液からのバイオエタノール生産を試みた。

まず本菌株の培養方法について検討した結果、本プロセスにおいて休止菌体法や菌体の固定化は適さないことが明らかになったため、以降の検討には浮遊菌体による培養法を用いることとした。また、培地成分について各々検討を行なったところ、エタノール生産量は酵母エキス (YE) を添加した場合に最も高かった。その最適濃度を検討するとともに、他の基質の添加を試みたところ、YE とコーンステープリカー (CSL) を 1.5% の濃度で添加した場合において、初期グリセロール濃度を 5% とした逐次添加を行うことで、エタノール生産量は 34g/L に達し、研究開始時の 2 倍の生産量を達成した。この生産量は非組換え菌によるグリセロールからのエタノール生産では現時点での世界最高値であり、同分野では最も実用化に近いものであった。また、さらに安価な栄養源としてメタン消化液を用いたところ、ある程度の生産が認められ、その一部は YE と代替可能であることが示された。今後はこれらの変異株による生産性の向上が期待される。

また、培養条件の検討結果より、本菌株のエタノール生産は副生するギ酸に強く阻害されることが明らかになったため、新たにギ酸耐性を有した変異株の取得を行った。紫外線照射およびプロトン自殺法による変異処理を行い、ギ酸に耐性な変異株を取得した。その一部には親株より高いエタノール生産性を見いだした。また、プロトン自殺法による有機酸非生産菌の取得過程において、NADH を余剰させてもエタノール生産性は増加しないということが明らかになり、次の代謝フラックス解析の参考とした。

続いて、代謝フラックス解析を行い、本菌株におけるグリセロール代謝とエタノール生産に関する代謝フローを明らかにした。まずTB-83D株の全ゲノムのドラフト解析をおこない、その結果より本菌株の持つグリセロール代謝経路を確定した上で、代謝フラックス解析を行った。その結果、エタノール生産を最大にするには、乳酸の生成を抑えることが最も有効であるということがわかった。このことは、特に基質としてBDF廃液を用いた場合に顕著であった。本研究結果はグリセロールを出発物質とした代謝フラックス解析における世界初の実施例であり、これに用いた技法は今後様々な物質（廃棄物等、一般的ではない原料）を出発点とした発酵生産における代謝フラックス解析に応用可能な手法としての利用が期待される。

これまでの培養条件の検討と代謝フラックス解析の結果をもとに、1)ギ酸生成の抑制と 2)乳酸生成系の抑制にターゲットを絞り、TB-83D株の遺伝子改変を試みた。まずTB-83D株の全ゲノムのドラフト解析から明らかになった関連遺伝子群のうち、ギ酸分解酵素とそのアクチベーター遺伝子の増強を試みたが、十分な発現量を得ることが出来なかった。そこで、他菌株由来のギ酸分解酵素遺伝子のクローニングと発現を試みた。*S. cerevisiae*由来のギ酸脱水素酵素遺伝子をTB-83D株に導入したところ、発現は確認できたものの、ギ酸の分解に変化は見られなかった。しかし、最終的なエタノール生産量は増加した。続いて、乳酸生成に関与するL-乳酸脱水素酵素遺伝子 (*ldhA*) をターゲットとして、遺伝子破壊株の構築を目指した。しかし、*Klebsiella*属細菌は遺伝子導入効率と遺伝子破壊の為の組換え効率が著しく低く、遺伝子改変が非常に困難であることが知られていたため、まずは高効率な遺伝子破壊法の構築を行った。構築した手法を元に乳酸脱水素酵素遺伝子破壊株を作成した結果、破壊株はグリセロール消費率が増加し、エタノール生産性が向上するということが明らかとなった。これらの成果は遺伝子組み換え技術による

ものである、直ちに実用化できるものではないが、変異株等の取得等、今後の育種のターゲット設定において重要な意味を持っている。なお、*Klebsiella*属細菌はエタノール生産だけではなく、種々の嫌気代謝産物の発酵生産に広く用いられており、その効率的な遺伝子破壊法の確立は、*Klebsiella*属細菌を扱う研究者にとって極めて有用な手法であると考えられる。

さらに、今後の実用化を視野に入れたフィージビリティスタディーを行った。パイロットスケールの実証試験を行った（有）鳥栖環境開発総合センターの事例をモデルとして、ここに BDF 廃液からのエタノール生産を組み込むことを想定したフィージビリティスタディーを行い、その結果を基に当研究の目標について明確にしておくこととした。本研究の現在までの実績と、フィージビリティスタディーの初期設定条件を比較すると、蒸留段階を考慮するとぎりぎりの濃度であるが、少なくともラボスケールでは上記の試算をほぼクリアすることができた。設備投資においては、既存遊休設備の有効利用等を考慮すれば、さらに公的資金に頼らずとも収益をあげることが可能であると思われる。

最後に、これまでの研究成果を元に実証試験用のプラントを制作し、パイロットスケールでの実証試験を行った。有限会社 鳥栖環境開発総合センター（佐賀県鳥栖市轟町）の敷地内に 300L クラスの実証試験装置を設置し、フィージビリティスタディーにおける初期設定値を念頭に、ラボスケールで検討した酵母エキス(YE)培地を用いて回分培養によるエタノール生産を行った。その結果、消費グリセロール、エタノール生産ともに、ラボスケールと比較すると若干低下したものの、ほぼ同様の生産性を有していたことから、ラボスケールの検討結果がプラントスケールにおいても応用可能であることが示唆された。しかし、培養基材として非滅菌のメタン消化液を用いる場合、使用する消化液のロットによっては深刻な雑菌汚染を引き起こすことも明らかになり、この点については今後十分に検討する必要があると結論づけた。

これまでに BDF 廃グリセロールからのエタノール生産において、数 100L 規模のスケールでの検討は報告されておらず、今回のデータは今後の同分野の研究検において貴重なものである。本研究において、パイロットスケールとラボスケールの結果はほぼ一致したことから、今後はラボスケールの検討のみでも、ある程度大規模培養のシミュレーションが可能であると考えられる。本研究では培養条件の検討のみで初期の 2 倍の生産量を達成している。今後の育種方針についても代謝フラックス解析からそのターゲットが絞られているので、効率の良い改良が可能であると思われ、更なる生産性の向上も期待できる。また、代謝フラックスとドラフトゲノムの情報を元に、本菌株を用いた他の原料からの物質生産も比較的容易であり、今後はエタノールに限らず本菌株を用いた廃棄物系バイオマスからの有用物質生産への応用についても検討していきたいと考えている。

## 10 研究発表

### 1) 論文発表

- Suzuki T, Seta K, Nishikawa C, Hara E, Shigeno T, Nakajima-Kambe T (2015) Improved ethanol tolerance and ethanol production from glycerol in a streptomycin-resistant *Klebsiella variicola* mutant obtained by ribosome engineering. *Bioresource Technology* 176: 156-162.
- Suzuki T, Nishikawa C, Seta K, Shigeno T, Nakajima-Kambe T (2014) Ethanol production from glycerol-containing biodiesel waste by *Klebsiella variicola* shows maximum productivity under alkaline conditions. *New Biotechnology* 31: 246-253.

### 2) 学会発表

- Kohei Seta, Toshihiro Suzuki, Toshiya Shigeno and Toshiaki Nakajima-Kambe (2015) The effect of methane digested slurry for ethanol production from glycerol by *Klebsiella variicola* TB-83D, The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015) Maastricht, the Netherlands (2015. 6月)
- Toshihiro Suzuki, Kohei Seta, and Toshiaki Nakajima-Kambe (2015) Gene disruption analysis for ethanol production in glycerol fermentation in glycerol-assimilating *Klebsiella variicola* and its metabolic changes, The 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015) Maastricht, the Netherlands (2015. 6月)
- 鈴木敏弘, 瀬田幸平, 茂野俊也, 中島敏明 (2014) ギ酸分解関連遺伝子の発現によるグリセロールからのエタノール生産過程におけるギ酸分解, 日本生物工学会66回大会 (北海道札幌市)
- 鈴木敏弘, 瀬田幸平, 茂野俊也, 中島敏明 (2014) グリセロール含有バイオディーゼル廃液からのエタノール生産において副生するギ酸が生産性に及ぼす影響, 第48回日本水環境学会年会 (宮城県仙台市)
- 瀬田幸平, 鈴木敏弘, 茂野俊也, 野村暢彦, 中島敏明 (2014) 微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからのエタノール生産, 日本農芸化学会2014年度大会 (神奈川県川崎市)
- 瀬田幸平, 鈴木敏弘, 茂野俊也, 中島敏明 (2014) *Klebsiella variicola* 変異株によるグリセロールからのエタノール生産性の向上, 日本生物工学会66回大会 (北海道札幌市)
- 鈴木敏弘, 瀬田幸平, 茂野俊也, 野村暢彦, 中島敏明 (2013) *Klebsiella variicola*によるグリセロールからのエタノール生産に向けた分子育種, 日本生物工学会65回大会 (広島県広島市)
- 鈴木敏弘, 瀬田幸平, 中島敏明 (2013) 微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからのエタノール生産, 第47回日本水環境学会年会 (大阪府大阪市)
- 瀬田幸平, 鈴木敏弘, 茂野俊也, 野村暢彦, 中島敏明 (2013) ギ酸耐性向上株によるバイオディーゼ

ル廃グリセロールからのエタノール生産, 日本生物工学会65回大会 (広島県広島市)

瀬田幸平, 鈴木敏弘, 中島敏明 (2012) 微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールの有効利用,  
日本農芸化学会関東支部2012年度大会 (新潟県新潟市)

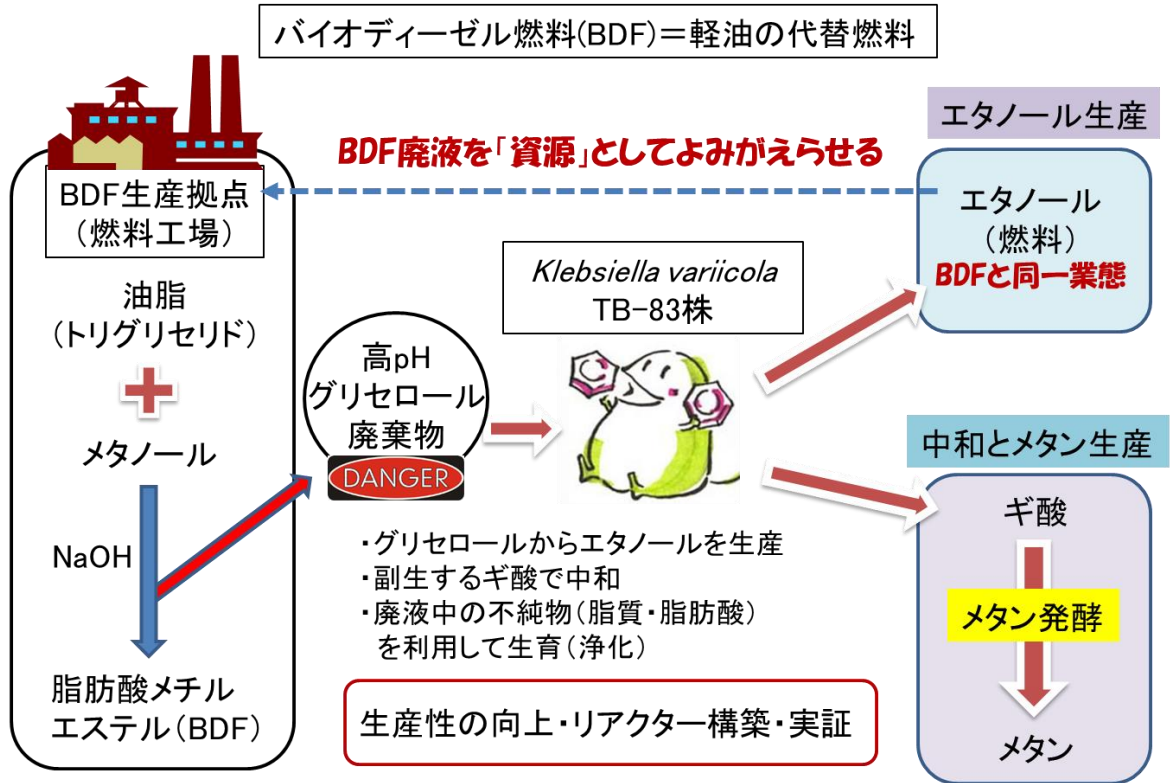
## 11 知的財産権の取得状況

本研究は過去に出願された下記特許をもとに研究を行ったものである。

- 1) 特願 2010-226959：新規微生物、当該微生物を用いた廃水処理方法及び廃水処理装置
- 2) 特願 2010-278150：新規微生物、当該微生物を用いた廃水処理補方法及び廃水処理装置

## 12 研究概要図

K-123007 微生物によるバイオディーゼル廃グリセロールからの燃料生産



## 13 英文概要

Project Code : 3K123007

Research Title : Biofuel Production from Glycerol Discharged after Bio-Diesel Manufacturing Process

Research Institution : University of Tsukuba

Principal Investigator : Toshiaki Nakajima-Kambe

Biodiesel fuel (BDF) is a biomass fuel that is used as an alternative fuel of diesel oil. BDF, a carbon neutral fuel, is also made from vegetable oils and animal fats. Almost all BDF production is carried out by transesterification with methanol in the presence of an alkaline catalyst. However, BDF waste has a high alkaline pH, and contains a large amount of crude glycerol as a by-product. Since almost all BDF-derived glycerol is waste oil-derived, it has no applied use, and is almost always incinerated. Therefore, the treatment of BDF-derived crude glycerol is an environmental problem. Bacteria that can utilize glycerol as a sole carbon source are known to produce some valuable metabolites. Among them, ethanol is particularly valuable as its biomass energy is similar to that of BDF. The production of bio-ethanol is an efficient use of waste and decreases burdens on the environment.

We isolated a glycerol-assimilating bacterium, *Klebsiella variicola* strain TB-83D. Strain TB-83D was able to grow in the presence of 7% (v/v) ethanol and it showed higher ethanol production. Examination of various culture conditions revealed that yeast extract was essential for ethanol production and bacterial growth. In addition, ethanol production was elevated by the addition of yeast extract and corn steep liquor (CSL), with a production of 34 g/L.

We also tried to acquire some formic acid tolerant mutants because it was proven that the ethanol production of strain TB-83D was strongly inhibited by formic acid which is a major by-product. UV and proton suicide methods were used to get mutants that are resistant to formic acid. Some of the mutants showed higher ethanol productivity than their wild type (TB-83D). Then, a metabolic flux analysis was performed and its metabolic flow from glycerol to ethanol was clarified. As a result, it was revealed that the suppression of the lactic acid production pathway is most effective to maximize ethanol production.

Based on the results of the metabolic flux analysis and the culture condition experiments, it was shown that suppression of formic acid and lactic acid are necessary to increase the ethanol production by strain TB-83D. At first, a formic acid degrading enzyme (formate dehydrogenase: FDH) and its activator gene were reinforced by gene manipulation, but, in both cases, the mutants were not able to get enough expression. Then, the FDH gene derived from *S. cerevisiae* was introduced into strain TB-83D. As a result, the ethanol production of the mutant was increased.

Furthermore, a feasibility study of this project was performed. Comparison of the initial parameter settings of the feasibility study with current achievement of our study revealed that it was able to clear a break-even point at least on the laboratory scale.

Finally a pilot-scale fermentation was performed. A 300-L class anaerobic fermentor was built and ethanol production by strain TB-83D was performed using batch culture method. As a result, approximately similar productivity (glycerol consumption and ethanol production) with the laboratory scale experiment was shown in the pilot-scale fermentation.