

古くて新しいアセトン・ブタノール発酵

小林 元太

アセトン・ブタノール発酵の歴史

アセトン・ブタノール（ABE）発酵の歴史は古く、微生物によるブタノール生産に関する研究は19世紀後半にまで遡り、近代微生物学の先駆者として有名なPasteurによりブタノール生産菌は初めて発見されたり、日本においても1930年代前半から廃糖蜜を発酵原料としたABE発酵の工業化が開始され、第二次世界大戦開戦後は航空燃料としてのブタノールを生産するために世界の広い地域でABE発酵が行われた。しかし、第二次世界大戦終戦後の1940年代後半から1950年代にかけて、石油化学工業の発達・拡大により、合成法によるブタノール生産が普及し、ABE発酵によるアセトン・ブタノール生産量が急激に減少し、1960年代頃には南アフリカなどの一部の地域を除き、ABE発酵による工業生産は完全に衰退した。しかし、1970年代半ばに起きた石油ショックにより、石油の枯渇性が危惧され、石油化学工業の依存からの脱却が重要視されるようになった。一方、石油の大量消費による大気中炭酸ガスの増大と地球温暖化の因果関係が問題とされるようになった。このような状況から、枯渇性の石油に代わる資源として、炭酸ガスの固定化能力に優れ、世界中に豊富に存在するバイオマスが着目され、発酵法による未利用バイオマスからの化学原材料生産が広く模索されるようになった。このような状況の下、1980年初頭よりABE発酵研究の機運が増大し、世界各国で基礎および応用研究が再開され、バイオマスの有効利用法の一つとして現在に至っている²⁾。

アセトン・ブタノール菌の種類とその代謝

工業的アセトン・ブタノール菌は偏性嫌気性、芽胞形成能を有するグラム陽性桿菌 *Clostridium* 属細菌に属し、*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutyl-aceticum*, *C. saccharobutylicum* の4種が知られている^{3,4)}。アセトン・ブタノール菌の有用性は、エタノール生産に用いられる酵母とは異なり、デンプンやグルコースなどの食糧として利用可能な糖類以外にも広範な糖類を利用できることにある。アセトン・ブタノール菌の代謝は非常に複雑であり、ABE発酵においては、菌体増殖期によってその代謝産物が大きく変化する。対数増殖期は、酢酸・酪酸を生産する酸生成期であるが、定常期に至ると代謝転換が生じ、アセトン・ブタノール・エタ

ノールを生産する溶剤生成期となるのである。図1にアセトン・ブタノール菌の代謝経路および代謝酵素を示す。菌体内に取り込まれたグルコースなどのヘキソースは、解糖経路を経てピルビン酸へと変換される。また、ペントースに関しては、解糖経路中のフルクトース-6-リン酸あるいはグリセルアルデヒド-3-リン酸として代謝される。ピルビン酸はピルビン酸-フェレドキシンオキシドレダクターゼにより酸化的脱炭酸され、アセチルCoAへと変換される。アセチルCoAは、さらに二量化されアセトアセチルCoA、続いて脱水・還元によりブチリルCoAへと変換される。酸生成期においては、これらアセチルCoAおよびブチリルCoAから、それぞれ酢酸・酪酸が生成され、菌体増殖と代謝に重要なATPを2分子獲得する。一方、増殖が定常期にいたると溶剤生成へと代謝がシフトする。ひとたび代謝転換が起こると、それまでに生成した酢酸および酪酸を、それぞれアセチルCoA、ブチリルCoAへと再同化する。こ

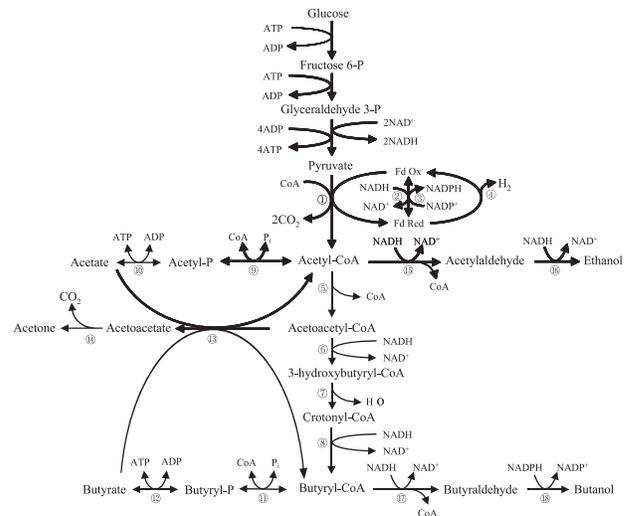


図1. アセトン・ブタノール菌の代謝経路図。①ピルビン酸-フェレドキシンオキシドレダクターゼ、②NADH-フェレドキシンレダクターゼ、③フェレドキシン-NADレダクターゼ、④ヒドロゲナーゼ、⑤チオラーゼ、⑥3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ、⑦クロトニルCoAヒドラターゼ、⑧ブチリルCoAデヒドロゲナーゼ、⑨ホスホトランスアセチラーゼ、⑩酢酸キナーゼ、⑪ホスホトランスブチリラーゼ、⑫酪酸キナーゼ、⑬CoAトランスフェラーゼ、⑭アセト酢酸デカルボキシラーゼ、⑮アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ、⑯エタノールデヒドロゲナーゼ、⑰ブチルアルデヒドデヒドロゲナーゼ、⑱ブタノールデヒドロゲナーゼ。

の反応は、CoAトランスフェラーゼの働きにより、アセトアセチルCoAからアセト酢酸に変換する反応と共役して起こる。さらに、アセチルCoAとブチリルCoAは、それぞれエタノールとブタノールに還元され、最終生産物として菌体外へと排出される。また、アセチルCoAとブチリルCoAの再同化の際に生じたアセト酢酸は、アセト酢酸デカルボキシラーゼにより脱炭酸され、アセトンへと変換される。

ABE発酵における各種最終代謝産物は、菌体にとって、代謝の過程で生じる余剰電子を廃棄する手段としての役割も担っている。解糖経路およびピルビン酸の酸化的脱炭酸反応においてNADHが余剰電子として生じる。このNADHはアセトアセチルCoAからブチリルCoAへの還元反応に用いられるほか、酸生成期ではヒドロゲナーゼの働きにより水素として放出される。一方、ソルベント生成期では水素の生成量は減少し、NADHはアセチルCoAとブチリルCoAからエタノール、ブタノール生成への還元力として用いられる。つまり、発酵のフェーズによって電子の受け渡し先を変更しつつ、そのバランスを保つことにより代謝を制御しているのである。アセトン・ブタノール菌のソルベントの生成比は、酢酸や酪酸および人工電子供与体を添加することで大きく異なることが知られている⁵⁻⁹⁾。つまり、アセトン・ブタノール菌の代謝は、炭素および電子の流れのバランスにより厳密に制御されているのである。

バイオリファイナリーとしてのABE発酵

バイオマスをABE発酵の原料として利用する場合、まず、現在の世界情勢を考慮する必要がある。国連食糧農業機関 (FAO) によると、2050年には世界人口は現在の約1.5倍の90億人に増加する一方で、主要穀物の生産量は年に数パーセントの増加しか見込めないのである。すなわち、有限性資源の枯渇という環境・エネルギー問題に加え、食糧不足という食糧問題も現実には解決しなければならない。つまり、発酵原料にはわれわれの食糧になりえないものを用いることが望ましい。これまで世界中でさまざまな種類のABE発酵原料の探索が行われてきたが、バイオマスの中でも特に生物系廃棄物からのアセトン・ブタノール生産について述べる。

サゴおよびサゴデンプン廃液の利用¹⁰⁾ サゴは東南アジアに広く分布する熱帯植物で、光合成能力が高く、大気中の二酸化炭素の吸収量に優れたカーボンニュートラルなバイオマスである。また、抽出して得られるサゴデンプンの生産性は25 t/ha/yearと他の植物資源と比較して非常に高いことから小麦、米、トウモロコシ、ポテト以外のデンプン源としてその利用価値は高い。しかし同時に、サゴからデンプンを抽出した後のサゴデンプン廃液は利用されることなく廃棄されており、新たに河川

や土壌の環境汚染の原因となっている。石崎らは*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (N1-4株) をアセトン・ブタノール菌として用いてサゴデンプン廃液のABE発酵への利用を検討した。サゴデンプン廃液のみではN1-4株の増殖を促進することができず、ブタノール生産量も低いものだった。しかし、サゴデンプン廃液にトウモロコシ工場より産業廃棄物として排出されるコーン・スティープ・リカー (CSL) および1%程度のサゴデンプンを添加すると増殖が促進され、ブタノール生産量も3.5 g/lに達することができた。よって、サゴデンプン廃液は炭素源、CSLは窒素源としてABE発酵に応用可能なバイオマスであることが明らかとなっている。

オイルパーム廃液の利用¹¹⁾ オイルパームもサゴと同様に東南アジアに広く生息する熱帯植物の一つであり、果実から抽出されるパームオイルは食用油、マーガリン、石鹼工業の原料などに利用されている。しかし、パームオイルの製造工程で排出されるパームオイル廃液も環境汚染の原因となっている。LeeらはN1-4株を用いてパームオイル廃液のABE発酵への利用を検討した。パームオイル廃液のみでもN1-4株の増殖は可能であり、ブタノール生産量も2.5 g/lに達した。さらに、パームオイル廃液には高分子多糖が多く含まれているため、加水分解処理を行い、ブタノール生産量を4.4 g/lへと増加させた。また、ABE発酵後ではパームオイル廃液のBODを64%も削減し、ABE発酵はバイオエネルギー生産方法のみならず、パームオイル廃水処理技術としても可能である。

焼酎粕および生ごみの利用¹²⁾ 焼酎粕と生ごみは大量に排出される生物系廃棄物である。著者らはABE発酵を行うことにより、焼酎カス・生ごみのBOD、COD、全窒素量、全リン量、全炭素量、懸濁物質量をそれぞれ30、45、29、29、26、40%に削減することに成功している。

余剰汚泥の利用¹³⁾ 活性汚泥法は廃水処理に現在最も広く普及している技術であり、その処理能力も高い。しかし、日本の活性汚泥プロセスでは年に4000万m³以上の余剰汚泥が発生し、一部を除いて有効利用されずに焼却や埋め立てにより廃棄されているのが現状である。著者らはN1-4株を用いて余剰汚泥のABE発酵への利用を試みた。余剰汚泥のみでは加水分解処理の如何に関わらず、N1-4株の増殖を促進することができず、ブタノールはほとんど生産されなかった。しかし、余剰汚泥にグルコースや生ごみを添加すると増殖が促進され、ブタノール生産量もそれぞれ9.3 g/lおよび5.8 g/lに増大した。さらに、ABE発酵後では、余剰汚泥の懸濁物質量を最大で53%に削減することに成功している。よって、ABE発酵は活性汚泥プロセス後の新たな処理プロセスとして有効であると考えられる。

その他のバイオマス利用 上記で述べた4種類以外のバイオマスを利用した例を挙げてみる。オランダ国内

表1. バイオマスを発酵原料としたABE発酵

アセトン・ブタノール菌	発酵原料
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	サゴデンブ サゴデンブ廃液
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	オイルバーム廃液
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	焼酎蒸留廃液, 生ごみ
<i>C. saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	余剰汚泥
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 ^T	有機性廃棄物
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824 ^T	廃木材
<i>C. acetobutylicum</i> IFP913	農産廃棄物
<i>C. beijerinckii</i> BA101	大豆モラセス
<i>C. beijerinckii</i> BA101	コーン廃液
<i>C. saccharobutylicum</i> NCP262 ^T	乳清

の有機性廃棄物¹⁴⁾, アメリカの大豆工場で廃棄される大豆モラセス¹⁵⁾, フランスの農産廃棄物¹⁶⁾などを原料としたABE発酵に成功している。

ABE発酵は環境低付加型であり省エネルギー型であるという優れた特徴を備えている。表1に示すように、アセトン・ブタノール菌には菌種に関わらず、多種類のバイオマスを発酵原料として利用できる能力がある。

高ブタノール生産システムの開発

ABE発酵は嫌気発酵のご多分に漏れず、好気発酵と比較して増殖速度が小さく、最大菌体濃度も高くないために、その生産性が低い。また1.0-1.5%程度のブタノールの蓄積により、発酵が停止するために、その生産量も高くは望めない。そこで、これらの問題を解決するためにさまざまな高ブタノール生産システムの開発が検討されてきている。著者らによるその例をいくつか紹介する。

田代ら⁸⁾はブタノールの前駆体である酪酸に着目し、pHを指標に酪酸をフィードするpH-stat流加培養法を考案した。酪酸のみをフィードした場合、ブタノールは生産されなかったが還元力としてグルコースを供給すると生産された。また酪酸とグルコースのフィード比1.4で残グルコース濃度をほぼ0に維持して、ブタノール収率は約1.5倍に増加し、高い収率を示す新寄なブタノール生産法を構築した。次に、田代ら¹⁷⁾は中空糸膜を用いた高密度連続培養法を考案しアセトン・ブタノール・エタノール生産性を検討した。高密度ではない連続培養では生産性は1.85 g/l/hであったが、高密度連続培養では11.0 g/l/hに増加した。しかし、液量の制御が48時間で不可能となり、培養液を引き抜くbleedingを行った。その結果、世界最高水準の生産性7.55 g/l/hと207時間の操作安定性を示すシステムを構築した。さらに、田代ら⁹⁾は非増殖菌体を用いた酪酸からの新規ブタノール生産方法を考案し、ブタノール対炭素源収率を検討した。酪酸のみからは生産できなかったが、グルコースの添加によるブタ

ノール生産は促進された。また、還元力の供給に電子供与体の添加を試みた結果、メチルビオローゲンにより収率は0.671 mol/molにまで増加し、理論収率0.667 mol/molに匹敵するブタノール生産法の構築に初めて成功した。

進藤ら¹⁸⁾は、複雑な代謝経路を有するアセトン・ブタノール発酵の動的モデル化および感度解析によるキー代謝経路の決定を行った。ABE発酵菌の既知の代謝経路に基づき、生体反応系解析シミュレータWinBEST-KIT¹⁹⁾を用いてABE発酵の動的モデル化を行った。モデル内のパラメータは、N1-4株を初発グルコース濃度62.0 mMで回分培養した際の実験値を再現するように決定した。初発グルコース濃度を種々に変えた回分培養の実験データは、既知の代謝経路のみで構築した本モデルでは再現が困難であったため、酪酸の再同化がCoAトランスフェラーゼ経路および酪酸生産経路の逆経路で行われることを考慮してモデルを再構築した。その結果、実験データの各物質濃度の時間的挙動が定性的に一致し、本モデルの有用性が検証できた。この動的モデルは、刻一刻と変化する代謝物の動的変化を常に把握できるので、今後は発酵生産過程全体のボトルネックの同定、ブタノール生産の最適培養条件の設定などへの応用が期待される。

ABE発酵菌株の分子育種

高ブタノール生産を目的として、高ブタノール生産プロセスのみならず、菌株の分子育種も積極的に行われている。特に、ゲノム情報が明らかとなっている*C. acetobutylicum* ATCC824^Tについては、アンチセンスRNA法による酪酸キナーゼ抑制によってブタノール生産量が増加し²⁰⁾、CoAトランスフェラーゼ抑制株ではブタノール生産量が減少した²¹⁾と報告されている。一方で、高ブタノール生産株である*C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4株についてもアンチセンスRNA法を応用したヒドロゲナーゼ遺伝子群を抑制することによるソルベント生産制御の報告がなされている。ヒドロゲナーゼはABE発酵のエレクトロフローを制御しているキー酵素であるので、その活性制御はソルベント生成に大きな影響を及ぼすと考えられている。中山ら²²⁾の報告によれば、ヒドロゲナーゼ遺伝子群*hupCBA*をアンチセンスRNA法により活性抑制を行ったところ、水素生産量は3.1倍、アセトン生産量は1.6倍に増加したが、ブタノール生産量は76%に減少した。このことよりHupCBAは水素取り込み型ヒドロゲナーゼと推定された。このことから水素放出型ヒドロゲナーゼの抑制により、ブタノール生産量増加が期待される。また、ABE発酵菌の遺伝子群を利用したイソプロパノール生産を目的とした分子育種に関する研究も報告されており^{23,24)}、ABE発酵菌株の遺伝子群はバイオマスコンビナート構想における重要なプラットフォームであることが示唆されている。

我が国のABE発酵に対する動向

農林水産省と経済産業省は2007年11月21日に「バイオ燃料技術革新協議会」を立ち上げ、セルロース系バイオマスからバイオ燃料などを効率的に生産するため「バイオ燃料技術革新計画」の策定を進めることを提言した。それに先立つ同年5月に地球環境、エネルギー多様化の観点から、経済産業省と自動車業界、石油業界が協力し「次世代自動車・燃料イニシアティブ」とりまとめを公表し、その中で、バイオマス・ニッポン総合戦略推進会議の「国産バイオ燃料の生産拡大工程表」との整合を図りつつ、セルロース系バイオマスからバイオ燃料などを効率的に生産するため「バイオ燃料技術革新計画」の策定の必要性について提言を行った。その後、産学官からなる「バイオ燃料技術革新協議会」を農林水産省と連携して開催し、本協議会において、セルロース系バイオ燃料の生産についての具体的な目標、技術開発、ロードマップなどを内容とする「バイオ燃料技術革新計画」の策定を進めると公表した。この「バイオ燃料技術革新計画」は主にセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産が主眼とされているが、バイオ燃料技術革新協議会第一回委員会においては、バイオリファイナリー連携WGの論点中にブタノールに関する記載があり、バイオ燃料技術革新協議会第二回委員会における「バイオ燃料技術革新計画（案）2008年3月」においては「バイオリファイナリー連携分野」のロードマップ上に「バイオマスからの有効化学品の直接生産（発酵法）」としてブタノールの発酵生産技術は緊急性が高い課題として挙げられている。バイオマス中間体からのプロピレンへの化学転換法においては、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類を出発原料とすることが明確に示されている。

一方、(財)科学技術戦略推進機構では、汎用ポリオレフィン樹脂の原料であるナフサの需給がタイトになると予測し、「バイオマス由来原料からのオレフィン製造の可能性」について検討を行って「バイオマスコンビナート（BMC）構想」を提言している²⁵⁾。このBMC構想では、バイオマスから得られる粗留エタノールを原料として触媒を用いた化学反応によりエチレン/プロピレンを生産する化学変換技術と、糖を原料とした発酵法すなわちバイオ変換技術による2つのオレフィン原料製造技術の確立を提唱している。バイオ変換技術においては、アセトン・ブタノール発酵によって生産されるブタノールをエタノールと共存させることによってプロピレン製造原料として利用すること、およびアセトンを還元することによってイソプロパノールを製造することの2つが期待されている。そのためにはABE発酵の高効率化と代謝制御が不可欠な要素技術開発として挙げられている。

筆者らは、上記のようなバイオマスを原料としたエネルギーや化学物質生産技術としてのABE発酵を検証するべく、(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)「新エネルギー技術研究開発/バイオマスエネルギー等高効率転換技術開発(先導技術開発)」受託研究において(独)産業技術総合研究所および九州大学・東京農業大学と共同研究を開始し、バイオブタノールの効率的な発酵生産法の開発を実施してきた。この研究開発項目には、高効率ABE発酵生産プロセスの開発、高性能ABE発酵菌株の分子育種およびバイオインフォマティクス技術を応用したABE発酵の代謝制御解析が挙げられており、我が国で唯一のABE発酵に関するナショナルプロジェクトとして期待されている。

文 献

- 1) Jones, D. T. *et al.*: *Micriobiol. Rev.*, **50**, 484 (1986).
- 2) 吉野貞蔵: 発酵ハンドブック, p.19, 共立出版 (2001).
- 3) Jones, D. T. *et al.*: *FEMS Microbiol. Rev.*, **17**, 223 (1995).
- 4) Keis, S. *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 2095 (2001).
- 5) Hartmanis, M. G. N. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 66 (1984).
- 6) Chauvatcharin, S. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **58**, 561 (1998).
- 7) Chen, C. K. and Blaschek, H. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 499 (1999).
- 8) Tashiro, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 263 (2004).
- 9) Tashiro, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 238 (2007).
- 10) Ishizaki, A. *et al.*: *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics*, **12**, 1 (1998).
- 11) Lee, T. M. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **17**, 649 (1995).
- 12) 田代幸寛ら: バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 544 (2003).
- 13) Kobayashi, G. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 517 (2005).
- 14) Lopez-Contreras, A. M. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 162 (2000).
- 15) Ropars, M. R. *et al.*: *Bioresour. Technol.*, **42**, 197 (1992).
- 16) Qureshi, N. *et al.*: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 290 (2001).
- 17) Tashiro, Y. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **120**, 197 (2005).
- 18) Shinto, Y. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **131**, 45 (2007).
- 19) Sekiguchi, T. *et al.*: *J. Bioinfo. Comput. Biol.*, **4**, 621 (2006).
- 20) Desai, R. P. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 936 (1999).
- 21) Tummala, S. B. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **185**, 1923 (2003).
- 22) Nakayama, S. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 483 (2008).
- 23) Hanai, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 7814 (2007).
- 24) Jojima, T. *et al.*: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 1219 (2008).
- 25) 中川 隆: バイオプラスチックの高機能化・再資源化技術, p.311, NTS (2008).