バイオリファイナリーによる未利用資源や産業廃棄物からの有用脂質生産

Production of Valuable Lipids from Underutilized Resources and Industrial Wastes by Biorefinery System

渡邊 研志

広島大学 大学院統合生命科学研究科
〒739-8530
東広島市鏡山 1-3-1

Kenshi WATANABE
Graduate School of Integrated
Sciences for Life, Hiroshima University
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima
739-8530, Japan

秋 庸裕

広島大学 大学院統合生命科学研究科
〒739-8530
東広島市鏡山 1-3-1

Tsunehiro AKI
Graduate School of Integrated
Sciences for Life, Hiroshima University
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima
739-8530, Japan

論文要旨：地球環境の保全と資源・エネルギーの再生利用を両立する持続的技術として、海洋大型藻類や火力発電排出ガスを原料としたバイオリファイナリーにより、高度不飽和脂肪酸やカロテノイド、炭化水素などの有用脂質を生産する新規システムの構築を進めている。油糧微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属の有機酸資化性を活用した二段階発酵系とゲノム育種による高機能化を統合して生産性の最大化をめざしているため、その進捗を紹介する。

Abstract: For conservation of the global environment with the recycling of resources and energy, a novel sustainable biorefinery system has been developed to produce useful lipids such as polyunsaturated fatty acids, carotenoids, and hydrocarbons from marine macroalgae and thermal power generation exhaust gas. To maximize the productivity, a two-stage fermentation system was constructed using oleagenous Labyrinthulean protist, genus *Aurantiochytrium*, assimilating organic acids, which was tried to further functionalize by genome breeding technologies.

Key words: biorefinery, macroalgae, greenhouse gas, carotenoids, polyunsaturated fatty acids

1 はじめに

近年、世界的な人口やエネルギー消費量の増加に伴い、地球環境の保全と天然資源の有効利用に資する新技術の確立が喫緊の課題となっている。特に、石油や石炭などの化石資源に代わる再生可能エネルギーに期待がかけられており、我が国でも、太陽光発電の高効率化や設備の普及が進められるとともに、風力や地熱、バイオマスなどを利用した発電技術も鋭意検討されている。しかし、現時点での国内エネルギー需要に対する供給比率は合計10数%程度に過ぎず、その伸び率を考慮しても当面は化石資源に頼らざるを得ないのが実状である¹⁾。そのような中、火力発電の高効率化システムとして石炭ガス化

燃料電池複合発電技術(Integrated coal gasification fuel cell combined cycle; IGFC)が実証段階に入っており、CO₂の分離・回収を組み合わせた革新的低炭素火力発電の実現を射程範囲に捉えている。したがって、再生可能エネルギーの改良や開発を継続するとともに、火力発電で排出されるCO₂の有効利用・貯留技術(Carbon dioxide capture, utilization and storage)を確立することが、「持続可能な開発目標(Sustainable development goals; SDGs)」の達成にも寄与する重要な課題と考えられる。

これらの課題に対して筆者らは、微生物を触媒としたバイオリファイナリー技術の適用による解決をめざしている。バイオリファイナリーは、農作物の非可食部分や間伐材などの未利用バイオマスあるいは食品製造残渣や下水汚泥などの廃棄物系バイオマスを原料に、主に微生物の物質変換能力を活用してバイオ燃料や化学品を生産

連絡者：秋 庸裕
E-mail : aki@hiroshima-u.ac.jp

する技術である。廃棄物の処理にかかるコストや環境負荷を低減しながら、有用物質へと再生する一挙両得の技術であり、廃棄物を原料としたメタンやエタノールの発酵システムがすでに実用化されている。バイオリファイナリーではまた、原料も生産物も拡張可能である。本稿でも後述の通り、原料としては大型藻類や火力発電排出ガスも有効であり、生産物としては健康食品や水畜産飼料、コスメ製品、医薬品などの素材となる高付加価値物質も当然、視野に入る。こうした多様性は、基本的には触媒となる微生物の代謝性能に依存する。薬剤処理や遺伝子組換え技術による変異導入によって理想の代謝経路に改変できれば良いが、大幅な改変は微生物細胞内での物質・エネルギーバランスを乱すため、変換効率を下げる原因にもなり得る。したがって、原料に対する資化性や目的物質の生産性が高い野生株の獲得が開発研究の初期段階での成否の鍵を握っている。

筆者らは以前から、海洋性の油糧微生物ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム (*Aurantiochytrium*) 属に着目して、その利用技術の開発を試みてきた。ラビリンチュラはクロミスタ界の不等毛藻に属するが、光合成能を持たず、一般的な藻類とは異なる従属栄養型の真核単細胞微生物である。高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) の顕著な生産性から産業界で注目を集めるとともに、海洋における高い賦存量から海洋生態系における重要な役割が想起され、環境生物学的にも興味深い。筆者らは、DHA の新規供給源を探索する過程で、アスタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイドやスクアレレンなどのイソプレノイド炭化水素を共生産する新種株を見出した^{2,3)}。さらなる新規株の収集と系統分類に続き、組成脂質の酵素化学的改変、食品廃棄物を基質原料とする利用法や分子育種に有用な形質転換法の開発を通じて、ラビリンチュラの脂質合成・代謝系の理解と生産効率化を進めてきた⁴⁻⁸⁾。その高密度培養による各種機能性脂質の生産効率は、それらを各々生産する光合成藻類や細菌類と比肩するレベルにある。DHA 生産系はすでに商用化されており、サプリメントや水産飼料への応用では一定の成果が認められるが、さらなる市場及び用途の拡大に向けては一層の低コスト化が要望される。このような背景から、大型藻類を新たな原料としたバイオリファイナリーによる有用脂質生産系の開発に着手した。

2 海藻糖質からのカロテノイド生産

近年、持続的低炭素社会の実現に向けて、エネルギーや有用物質の生産原料となる生物資源、すなわちバイオマスの利用法の開発が世界的に益々活発になってきた。当初は、とうもろこしなどの可食バイオマスが利用され

たが、食糧との競合による価格高騰が問題となった。次に草本類がターゲットとなったが、セルロースやリグニンなど不溶性繊維の分解と可溶化のプロセスが未だ課題として残されている。これらの陸上植物と比べて水産バイオマスは利用形態の自由度が高く、生産性、賦存量、炭素貯蔵量も比較的高いことから注目され始めた。なかでも、大型藻類は海洋国家である我が国にとって潤沢な再生可能資源であり、有効活用が望まれる。

筆者らを含む広島大学研究グループは、2012年から科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」において、CREST事業「海洋微生物発酵制御を基盤とした大型藻類の完全資源化基盤技術の開発」を推進してきた。本事業では、大型藻類を完全資源化するために適した海洋微生物の取得と発酵生産システムの構築をめざし、高塩濃度条件に馴化した海洋汚泥菌叢によるメタン発酵技術を中心に、大型藻類原料の水熱処理による可溶化技術や発酵残渣からの希少元素の回収技術など、各種要素技術の確立を進めてきた (Fig. 1)。筆者らの研究チームが担当したラビリンチュラ類による高付加価値脂質生産は、これらのエネルギー生産プロセスを経済収支において支援するとともに、当微生物の新たな活用法を開発する目的で実施した。

2・1 褐藻マンニトールの原料化

海洋大型藻類は褐藻、紅藻、緑藻の三種類に大別され、賦存量は褐藻が圧倒的に多い。褐藻はラビリンチュラと同じくクロミスタに属する不等毛藻だが多細胞体であり、コンブやワカメ、ホンダワラがその代表例である。光合成色素と受光波長の関係で海面から深い位置に生育するため、栽培や収穫には工夫が必要となるが、生産速度の高さから経済性の担保が期待できる有望なバイオマスである。大型藻類に含まれる主な糖質成分としては、アルギン酸、マンニトール、フコイダン、ラミナランなど、淡水藻類や陸上植物には見られないものが多い。そこで、ラビリンチュラ類オーランチオキトリウム属株の資化性を調べたところ、それらの糖質を直接利用できないことが分かった。一方、グルコースやガラクトース、フルクトース、マンノース、グリセロールなどの単糖であれば、顕著に増殖した。したがって、海藻糖質をこれらの単糖に変換する前処理技術が必要となる。水熱処理による多糖の低分子化は別途試行中であり、酵素製剤などのコスト的に不利な選択肢を避けて、微生物変換の可否を検討することにした。

近海から単離した微生物や海藻糖質に対する資化性が報告あるいは予想された系統保存株の培養上清を炭素源として、オーランチオキトリウム属株の増殖性を調べ

Fig. 1 海洋微生物発酵制御を基盤とした大型藻類の完全資源化基盤技術の開発

Fig. 2 二段階培養による海藻糖質からのカロテノイド生産

グルコノバクター属 NBRC14819 株を 10 g/L ポリペプトン、5 g/L 酵母エキス、pH6.0 を含むコンブ抽出液 3 L (100 g/L 乾燥昆布からの水抽出、遠心上清) で 28℃、12 時間培養した後、2% 人工海水 3 L を加え、オーランチオキトリウム属 KH105 株を接種して培養を継続した。

た。その結果、褐藻などの主要糖質であるマンニトール（固形分の 10～30 wt%）を、オーランチオキトリウム属株が資化できるフルクトースに変換して細胞外に遊離する好気性酢酸菌グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属が有望株として得られた⁹⁾。グルコノバクター属菌のペリプラズム画分に存在するソルビトール脱水素酵素による変換反応で、細胞への取り込み量を超えて生成したフルクトースが培地中に遊離したと考えられた。グルコノバクター属菌は、オーランチオキトリウム属株の至適濃度である 2% 以上の海水塩存在下でほとんど生育しなかった。したがって、褐藻（コンブ）から水抽出したマンニトールを主たる炭素源として、グルコノバクター属菌によるフルクトースへの糖質変換反応の後、海水塩の

添加による制菌とオーランチオキトリウム属株の接種により、フルクトースを基質として有用脂質を生産する二段階培養システムが成立した (Fig. 2)。海藻バイオマスとオーランチオキトリウム属をつなぐ発酵生産系はこれが最初の例である。食品や化粧品素材として需要が高まっているアスタキサンチンについて、海藻原料の単位重量あたりの生産性と市場価格を参照し、メタン発酵系の物質収支と合算したところ、エネルギー収支と経済収支を両方同時にプラスに示る原料分配比が明らかとなり、その実用性を示すことができた。

2・2 アルギン酸の利用とその展開

アルギン酸も褐藻の主要糖質であり、マンニトールと同等かそれ以上の組成率を示すことから発酵基質として

無視できない。そこで、アルギン酸資化性の海藻付着微生物や系統保存株とオーランチオキトリウム属を組み合わせた共培養の系を検討したが、得られた候補微生物では増殖及び脂質生産性が不十分であった。一方、上記事業の共同研究者らによって、アルギン酸原料でのメタン発酵でその分解に関与するジスゴノモナス (*Dysgonomonas*) 属株が海洋沿岸汚泥から単離された¹⁰⁾。その培養上清を含む培地でオーランチオキトリウム属株の顕著な増殖が見られ、アルギン酸を基質原料とした油脂生産が可能であることが実証された。ジスゴノモナス属は海洋における一次分解者として知られており、この組み合わせで生態系の一部が再現できている可能性もある。しかし、両微生物間に介在する物質は当初不明であった。そこで、ジスゴノモナス属株の主要生成物である各種有機酸に対するオーランチオキトリウム属株の資化性を調べたところ、特定の株においては酢酸やクエン酸などが一定の濃度及び pH の範囲内で有効な炭素源となりうるということが分かった (Fig. 3)。

褐藻の属種によっては、マンニトールとアルギン酸で固形分の 60% 以上を占めるため、海洋での賦存量としては最も高い糖質の新規利用法を開発したとも言える。ただし、生産効率や対糖収率などの発酵指標は未だ改善の余地がある。現在、糖質代謝や脂質生成の各経路を

至適化する個別戦略とオミクス技術の適用による俯瞰的攻略の両面から解決を図っているところである。また、実用化に際して必要となる連続あるいは反復培養の実現に向けた検討も続けている。

3 火力発電排出ガスからの油脂生産

火力発電の高効率化に向けては IGFC を始め、実証レベルの新技术が検討されているところだが、分離・回収された排出 CO₂ の再利用、すなわちカーボンリサイクルは各種技術が提案、比較される段階にある。微細藻類による炭素固定及び有用物質生産はその有力候補の一つであり、その炭素固定に要するエネルギー源として太陽光が十分に利用できる環境では有望な技術となる。現状では、エネルギー変換効率を格段に向上させて増殖速度を上げる必要があるが、その結果、細胞密度と光照射効率の両立がさらなる問題となって立ちはだかる。

一方、筆者らは、非光合型従属栄養微生物であるオーランチオキトリウム属の有機酸に対する高い資化性をこの目的に適用する方法として、CO₂ を還元固定化して酢酸を遊離生成するホモ酢酸菌と組み合わせた二段階培養システムを提案している^{11, 12)}。ホモ酢酸菌は、メタン発酵系において基質生体高分子の代謝分解で生成する CO₂ から酢酸を合成してメタン菌に供給する役割を果

Fig. 3 酢酸を炭素源としたオーランチオキトリウム属による油脂生産

オーランチオキトリウム属 SR21 株を 30 g/L 酢酸 (A) またはグルコース (B)、6 g/L ポリペプトン、2 g/L 酵母エキス、20 g/L 人工海水塩 (pH6.5) を含む培地で 28℃、150 rpm にて培養した。

Fig. 4 二段階培養による CO₂ からの脂肪酸生産

ホモ酢酸菌 *Acetobacterium woodii* DSM1030 の培養用培地 (-), 同培地に 30 g/L 酢酸を添加した培地 (Ace) 及び、同培地での CO₂ 存在下での培養後の回収液 (Bro, 29.3 g/L 酢酸を含む) にそれぞれ *Aurantiochytrium limacinum* SR21 株を接種して、28℃, 250 rpm にて 48 時間培養した。

たす。ホモ酢酸菌において、CO₂ から Wood-Ljungdahl 経路を通じて生成するアセチル CoA は細胞構築素材として利用されるとともに、一部が分解されて ATP として生体エネルギーを得る。このとき、酢酸だけを最終生成物として排出することからアセトゲンとも呼ばれており、アセトバクテリウム (*Acetobacterium*) 属、モレラ (*Moorella*) 属やクロストリジウム (*Clostridium*) 属などが分類される嫌気性微生物の一群である。

実際に、CO₂ を主たる炭素源とする嫌気条件下でアセトバクテリウム属株を培養し、得られた酢酸含有培養液をほぼそのまま第二段階の培地としてオーランチオキトリウム属株を接種したところ、顕著な細胞増殖と脂肪酸生産が認められた (Fig. 4)。培養前のアセトバクテリウム用培地に同等濃度の酢酸標品を添加した合成培地でオーランチオキトリウム属株を培養した場合と比較すると、窒素源濃度が1段目で消費された分だけ増殖量は20%程度低かったが、細胞あたりの脂肪酸含有率は約2倍であった。この結果は、オーランチオキトリウム属株の増殖や脂質生産を阻害する物質がアセトバクテリウム属株によって生産されておらず、今後の条件至適化による生産性の向上が期待できることを示している。現在、各ステップの培養特性を詳細に解析して、連続あるいは半連続培養系を連結した高効率 Gas-to-Lipids バイオプロセスを構築しているところである (Fig. 5)。

4 オーランチオキトリウム属のゲノム育種による生産脂質の改質

発酵原料の多様化とともに、生産物の多量化及び多様化も進めている。オーランチオキトリウム属は高度不飽和脂肪酸やカロテノイドなどの高付加価値脂質を野生株

Fig. 5 カーボンリサイクルを実現する Gas-to-Lipids バイオプロセス

でも顕著に生産するが、さらなる生産性改善のために遺伝子への変異導入や人為的改変による特定成分の増産や組成改質が行われている。

筆者らは、食品用途に利用可能な突然変異誘発法により、アスタキサンチンやカンタキサンチンなどの抗酸化性カロテノイドの高生産株を取得した¹³⁾。すなわち、オーランチオキトリウム属の遊走子に対して遺伝子変異誘発剤としてニトロソグアニジン暴露し、固体培地上でカロテノイドに由来する赤橙色をより強く呈するコロニーを単離した。一例としては、0.3 mg/L 程度のβ-カロテンを生産する野生株への複数回の変異誘発処理により、総カロテノイド生産量としてそれぞれ 22 mg/L 及び 43 mg/L を示す変異株 RH-7A と RH-7A-7 が順次得られた。いずれもβ-カロテンからアスタキサンチンに至る生合成経路上の5種類のカロテノイドが生産されていたことから、遺伝子変異はその上流で働くβ-カロテン合成酵素 CrtIBY の発現に関わる部位やその基質生成に関わる遺伝子に導入されたことが推察された。さらに、これら変異株のメタボローム解析で、酸化ストレス応答に関わる因子の変動が見られたため、酸化ストレスを誘導する鉄イオンを添加して培養したところ、抗酸化活性が特に高いアスタキサンチンの含有率が顕著に増加した。

近年、多くの生物種の育種においてゲノム編集技術が適用されるようになった。部位特異的に作用する人工ヌクレアーゼを利用して標的遺伝子のノックアウトあるいは外因性遺伝子のノックインを行う技術である。なかでも CRISPR-Cas9 システムが簡便であり、Cas9 スクレアーゼとそれを標的部位に誘導する guide RNA との複合体をあらかじめ形成して細胞に導入すれば、外因性遺伝子の残存がない限り、薬剤変異導入と同様に食品用途にも利用可能とされている。筆者らは、ゲノムワイドなスクリーニングを目的として、オーランチオキトリウム属への CRISPR-Cas9 システムの適用を試みた。その際、β-カロテン合成酵素 CrtIBY を標的として、その失活によ

りカロテノイドに由来するコロニーの赤橙色が白色になることを指標とした¹⁴⁾。単離株のDNA塩基配列を解析したところ、CRISPR-Cas9による改変の形跡が認められた。さらに、マーカー遺伝子のノックインにも成功し、任意の遺伝子を標的とした機能解析を迅速に行う技術が確立できたので、順次解析を進めており、ゲノム育種による実用株の樹立に向けて研究推進中である。

5 おわりに

異なる代謝特性を示す複数の微生物を組み合わせた物質変換システムにより、未利用資源として海洋大型藻類を、また、産業廃棄物として火力発電排出CO₂をそれぞれカロテノイドや脂肪酸に作り変える技術について概略を述べた。二段階発酵は清酒醸造を始めとする古典的な技術であるが、利用する微生物の組み合わせによって原料と生産物の選択肢を増やせる柔軟性が強みである。グルコノバクター属菌には多様な酸化還元酵素が細胞膜に局在しているため、マンニトールの他にも多彩な原料に対応できる。また、ホモ酢酸菌は草本類リグノセルロースが資化可能であるなど、極めて多様なバイオマスを原料化できることから、酢酸を介したオーランチオキトリウム属との複合発酵系でバイオ燃料や化学品を生産するバイオリファインリー技術がさらに多角的に展開していくことが期待される。

本研究を行うにあたり、広島大学大学院統合生命科学研究所・中島田豊教授、岡村好子准教授、田島誉久助教、山本卓教授、同工学研究科・松村幸彦教授、長瀬産業株式会社・松山恵介氏、出光興産株式会社・黛新造氏、福永哲也氏、伊藤真治氏、中国電力株式会社・沢田健氏、角田祐介氏ならびに各研究グループ諸氏の多大な支援を得ており、ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) 経済産業省資源エネルギー庁. 平成30年度エネルギーに関する年次報告(2019).
(Agency for Natural Resources and Energy, Ministry of Economy, Trade and Industry. The Cabinet Approves the FY 2018 Annual Report on Energy (Japan's Energy White Paper 2019))
- 2) Aki, T.; Hachida, K.; Yoshinaga, M.; Katai, Y.; Yamasaki, T.; Kawamoto, S.; Kakizono, T.; Maoka, T.; Shigeta, S.; Suzuki, O.; Ono, K. Thraustochytrid as a potential source of carotenoids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 789-794 (2003).
- 3) Li, Q.; Chen, G. Q.; Fan, K. W.; Aki, T.; Jiang, Y. Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrids from Hong Kong mangroves. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4267-4272 (2009).
- 4) Huang, J.; Aki, T.; Yokochi, T.; Nakahara, T.; Honda, D.; Kawamoto, S.; Shigeta, S.; Ono, K.; Suzuki, O. Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes. *Mar. Biotechnol.*, **5**, 450-457 (2003).
- 5) Huang, J.; Aki, T.; Kawamoto, S.; Shigeta, S.; Ono, K.; Suzuki, O. Enzymatic preparation of glycerides rich in docosahexaenoic acid from thraustochytrid single cell oils by *Candida rugosa* lipase. *J. Oleo Sci.*, **51**, 447-455 (2002).
- 6) Iwasaka, H.; Aki, T.; Adachi, H.; Watanabe, K.; Kawamoto, S.; Ono, K. Utilization of waste syrup for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls by *Aurantiochytrium*. *J. Oleo Sci.*, **62**, 729-736 (2013).
- 7) Yamasaki, T.; Aki, T.; Mori, Y.; Yamamoto, T.; Shinozaki, M.; Kawamoto, S.; Ono, K. Nutritional enrichment in larval fish feed with thraustochytrid producing polyunsaturated fatty acids and xanthophylls. *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 200-206 (2007).
- 8) 小埜和久, 秋庸裕, 河本正次. 特許第4796787号(2006). (Ono, K. *et al.* *Jpn. Pat.* 4796787 (2006).)
- 9) Arafles, K. H. V.; Iwasaka, H.; Eramoto, Y.; Okamura, Y.; Tajima, T.; Matsumura, Y.; Nakashimada, Y.; Aki, T. Value-added lipid production from brown seaweed biomass by two-stage fermentation using acetic acid bacterium and thraustochytrid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 9207-9216 (2014).
- 10) Kita, A.; Miura, T.; Kawata, S.; Yamaguchi, K.; Okamura, Y.; Aki, T.; Matsumura, Y.; Tajima, T.; Kato, J.; Nakashimada, Y. *Dysgonomonas alginatilytica* sp. nov., a novel alginate-degrading bacterium isolated from microbial consortium. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.*, **65**, 3570-3575 (2015).
- 11) 秋庸裕, 渡邊研志, 中島田豊, 松村幸彦, 岡村好子, 田島誉久, 廣谷蘭, 石垣元務, 黛新造, 吉田和広, 沢田健, 角田祐介. 特願2017-250129 (2017). (Aki, T. *et al.* *Jpn. Pat. Appl.* 2017-250129 (2017).)
- 12) Perez, C. M. T.; Watanabe, K.; Okamura, Y.; Nakashimada, Y.; Aki, T. Metabolite profile analysis of *Aurantiochytrium limacinum* SR21 grown on acetate-based medium for lipid fermentation. *J. Oleo Sci.*, **68**, 541-549 (2019).
- 13) Watanabe, K.; Arafles, K. H. V.; Higashi, R.; Okamura, Y.; Tajima, T.; Matsumura, Y.; Nakashimada, Y.; Matsuyama, K.; Aki, T. Isolation of high carotenoid-producing *Aurantiochytrium* sp. mutants and improvement of astaxanthin productivity using metabolic information. *J. Oleo Sci.*, **67**, 571-578 (2018).
- 14) 北堀智希, 渡邊研志, 青井真人, 畑浩介, 高橋宏和, 岡村好子, 松山恵介, 黛新造, 秋庸裕. 第71回日本生物工学会大会トピックス集, pp. 2-3 (2019). (Kitahori, T. *et al.* The 71st Annual Meeting of the Society of Biotechnology of Japan, Abstracts. pp. 2-3 (2019).)