



木質バイオマスを利用した バイオリファイナリー技術によるバイオ燃料・アミノ酸の開発

Green Earth Institute株式会社

当該事業の理念と目的

当該事業の理念(実現しようとしているビジョン)

植物と微生物と技術で地球を救う！！

植物

(木質バイオマス)



微生物

Corynebacterium glutamicum



技術



地球の課題の解決に貢献

エネルギー
問題



食糧問題



生存可能な
地球環境



当該事業の目的

上記の理念を実現するため、増殖非依存型バイオプロセス(RITEバイオプロセス)*という革新的バイオリファイナリー技術を使い、木質系バイオマスを原料として、次世代航空機燃料などのバイオ燃料やメチオニンというアミノ酸を生産する技術開発を行う

* RITEバイオプロセスは、公益財団法人地球環境産業技術研究機構(RITE)において開発されたバイオリファイナリー技術であり、GEIはその事業化を進める公益財団発ベンチャー企業

実施概要

コア技術の説明

増殖非依存型バイオプロセスとは

非可食バイオマス



木質バイオマス
コーンの茎や葉
さとうきびのバガス

6

C6 sugar

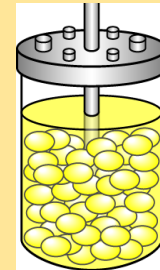
C5 sugar

5



RITEバイオプロセス

Corynebacterium glutamicum



増殖非依存型バイオプロセス

JP3869788	JP4927297	DK1647594
JP4451393	US7598063	FR1647594
US7368268	EP1291428	GB1647594
EP1647594	JP4294373	DE602004026192
CH1647594		



■ バイオ燃料

■ 化学品



特徴

- ① 木質バイオマスを含む非可食バイオマスを原料として有効活用できる
- ② バイオ燃料からグリーン化学品まで幅広い製品を製造することができる
- ③ 圧倒的なコスト競争力を持つ可能性がある

実施概要

① イソブタノール (JET燃料)



実施項目

1. 木質バイオマス由来の混合糖からイソブタノールを高効率に変換する菌株の開発
2. 木質バイオマスからのバイオジェット燃料サンプル生産

実施場所

千葉県木更津市かずさ Green Earth 研究所 (一部は外部に委託)

実施概要

②メチオニン(飼料添加物)

メチオニンの化学合成は

- ①工程が長い
- ②危険な物質を多数取り扱う
- ③腐食性物質の発生
- ④有害な排水が発生
- ⑤悪臭の発生 など、様々な問題がある

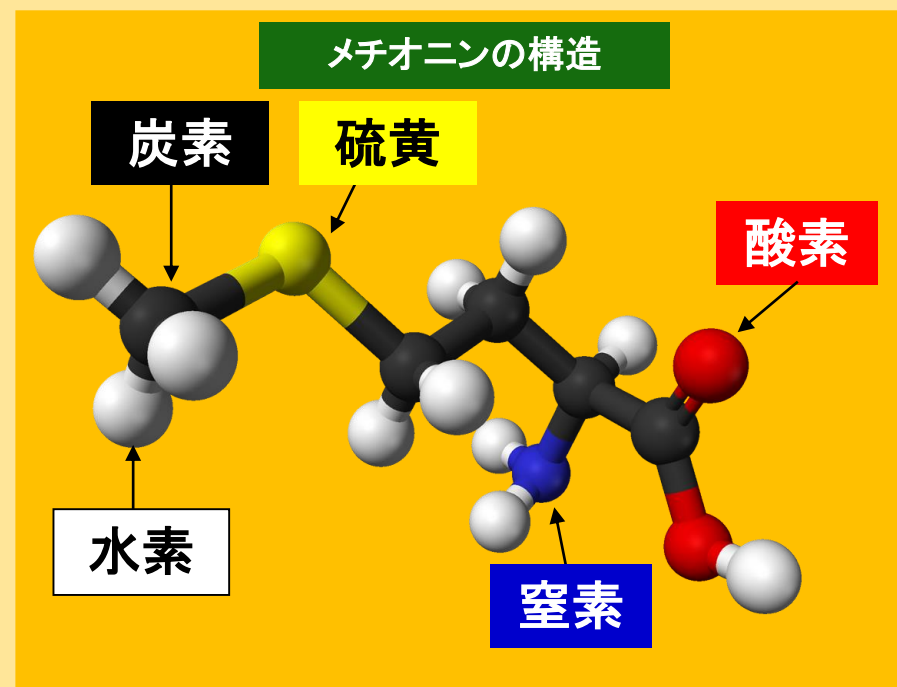
プロピレン+アンモニア ⇒ アクリロニトリル or シアン化水素

プロピレン+酸素 ⇒ アクロレイン

メタノール+硫化水素 ⇒ メチルメルカプタン

メチルメルカプタン + アクロレイン ⇒ 3-メチルチオプロパナール

3-メチルチオプロパナール + シアン化水素 ⇒ メチオニン



実施項目

3.木質バイオマス由来の混合糖からメチオニンを生産する菌株の開発

実施場所

千葉県木更津市かずさ Green Earth 研究所 (一部は外部に委託)



今年度の事業実績・成果

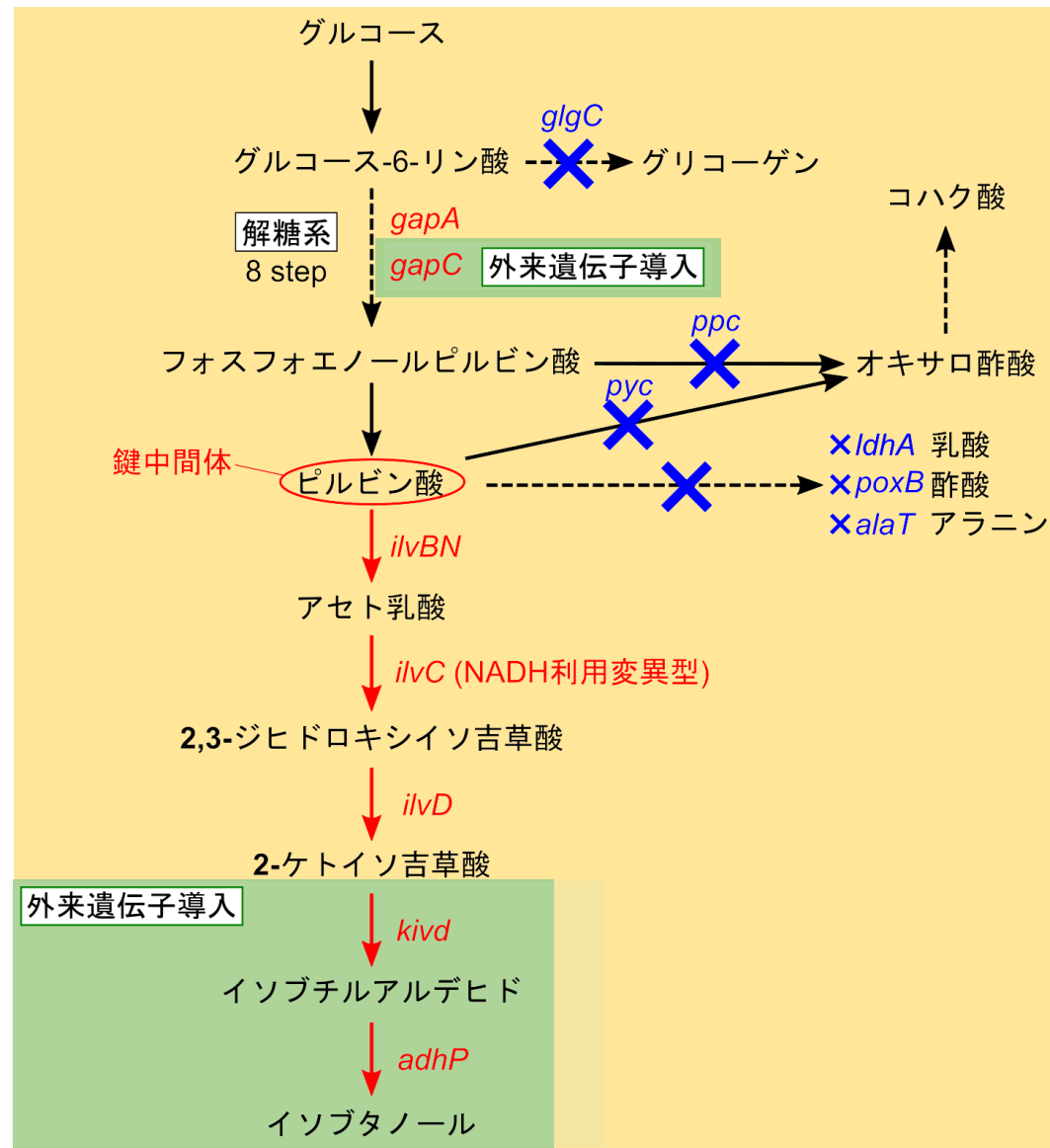
①-1 イソブタノール (JET燃料)

【実施項目1】

▶ 木質バイオマス由来の混合糖から イソブタノールを高効率に変換する 菌株の開発

本事業において、増殖非依存型バイオプロセスで用いるコリネ菌の遺伝子を組み換えたイソブタノール生産菌について、従来のものよりも高い生産性を実現すべく、遺伝子組み換えなどを実施。

具体的には、RITEの協力を得て、糖から鍵となる中間体(ピルビン酸)までの生産能力を向上させるための遺伝子組み換えの検討と当該中間体からイソブタノールまでの生産能力向上のための遺伝子組み換えを実施。



* 青は欠失を試みた遺伝子、赤は過剰発現を試みた遺伝子、点線は複数ステップを示す



今年度の事業実績・成果

イソブタノール改良のために試みた具体的な遺伝子操作

代謝プロセス (大区分)	個別の代謝プロセス	遺伝子	触媒酵素	加えた遺伝子操作
解糖系	グリコーゲンの生産	<i>glgC</i>	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	遺伝子欠失
	1,3-bisphospho-D-glycerateの 生産	<i>gapA</i> (NAD型)	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	遺伝子導入(ゲノム)
		<i>gapC</i> (異種生物種由来)	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	遺伝子導入(ゲノム)
	解糖系遺伝子の遺伝子発現	<i>fruR</i>	sugar metabolism transcriptional regulator	遺伝子欠失
<i>sugR</i>		sugar metabolism transcriptional regulator	遺伝子欠失	
ピルビン酸から イソブタノール	酢酸の生産	<i>poxB</i>	pyruvate dehydrogenase	遺伝子欠失
	コハク酸の生産	<i>pyc</i>	pyruvate carboxylase	遺伝子欠失
		<i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvate carboxylase	
	アラニンの生産	<i>alaT</i>	glutamate-pyruvate aminotransferase	遺伝子欠失
	乳酸の生産	<i>ldhA</i>	Lactate dehydrogenase	遺伝子欠失
	アセト乳酸の生産	<i>ilvBN</i>	acetohydroxy acid synthase	遺伝子導入
	2,3-ジヒドロキシイソ吉草酸の 生産	<i>ilvC</i> (NADH依存変異型)	acetohydroxy acid isomeroeductase	遺伝子導入
	2-ケトイソ吉草酸の生産	<i>ilvD</i>	dihydroxyacid dehydratase	遺伝子導入
	イソブチルアルデヒドの生産	<i>kivD</i> (異種生物種由来)	alpha-ketisovalerate decarboxylase	遺伝子導入
	イソブタノールの生産	<i>adhP</i> (異種生物種由来)	alcohol dehydrogenase	遺伝子導入

今年度の事業実績・成果

①-2イソブタノール(JET燃料)

【実施項目2-1】

➤ 木質バイオマス由来の混合糖からのイソブタノール生産

木質バイオマス由来の混合糖から、RITEバイオプロセスにより、イソブタノールが生産可能であることを確認するために、米国企業から入手したポプラ由来の糖液(C6糖が多く含まれているものとC5糖が多く含まれているものの2種類)を使った反応テストを行った。

Time (h)		0	2	4	6	19	
Glucose	g/L	21.7	18.8	18.3	16.1	0.0	
Xylose	g/L	16.7	7.7	3.6	1.6	0.0	
iBuOH	g/L	0.4	2.8	4.4	5.8	11.6	
EtOH	g/L	3.0	3.1	3.1	3.2	3.3	
基質量g	sugar	2.303					Yield (%)
生成量g	iBuOH					0.727	77.0

イソブタノール反応液



C6rich糖液
(主にセルロース由来の
グルコース)



C5rich糖液
(主にヘミセルロース
由来のグルコース)

今年度の事業実績・成果

①-2イソブタノール(JET燃料)

【実施項目2-2】

➤ バイオJET燃料のサンプル生産

本事業において、増殖非依存型バイオプロセスというユニークで革新的なバイオ法により製造したイソブタノールをもとにしたJET燃料基材が製造可能なものであることを示すために、サンプルを得るべく以下を実施。

- ① 増殖非依存型バイオプロセスによって、バイオマスから濃度1%程度のイソブタノールの溶液を200L程度製造。
- ② 当該イソブタノール溶液を90%超まで濃縮
- ③ 濃縮されたイソブタノール溶液を、脱水、オリゴマー化、水素添加というプロセスによりジェット燃料基材のサンプル(1L程度)を製造

* ③については、外部委託先である米国エネルギー省の国立研究所(Pacific North National Laboratory(PNNL))のリソースの問題で、3月中の実施が困難となり、自己資金で6月中に終了する予定

イソブタノール反応液



反応液上清



菌体を含んだ反応液

イソブタノール濃縮液



JET燃料サンプル



今年度の事業実績・成果

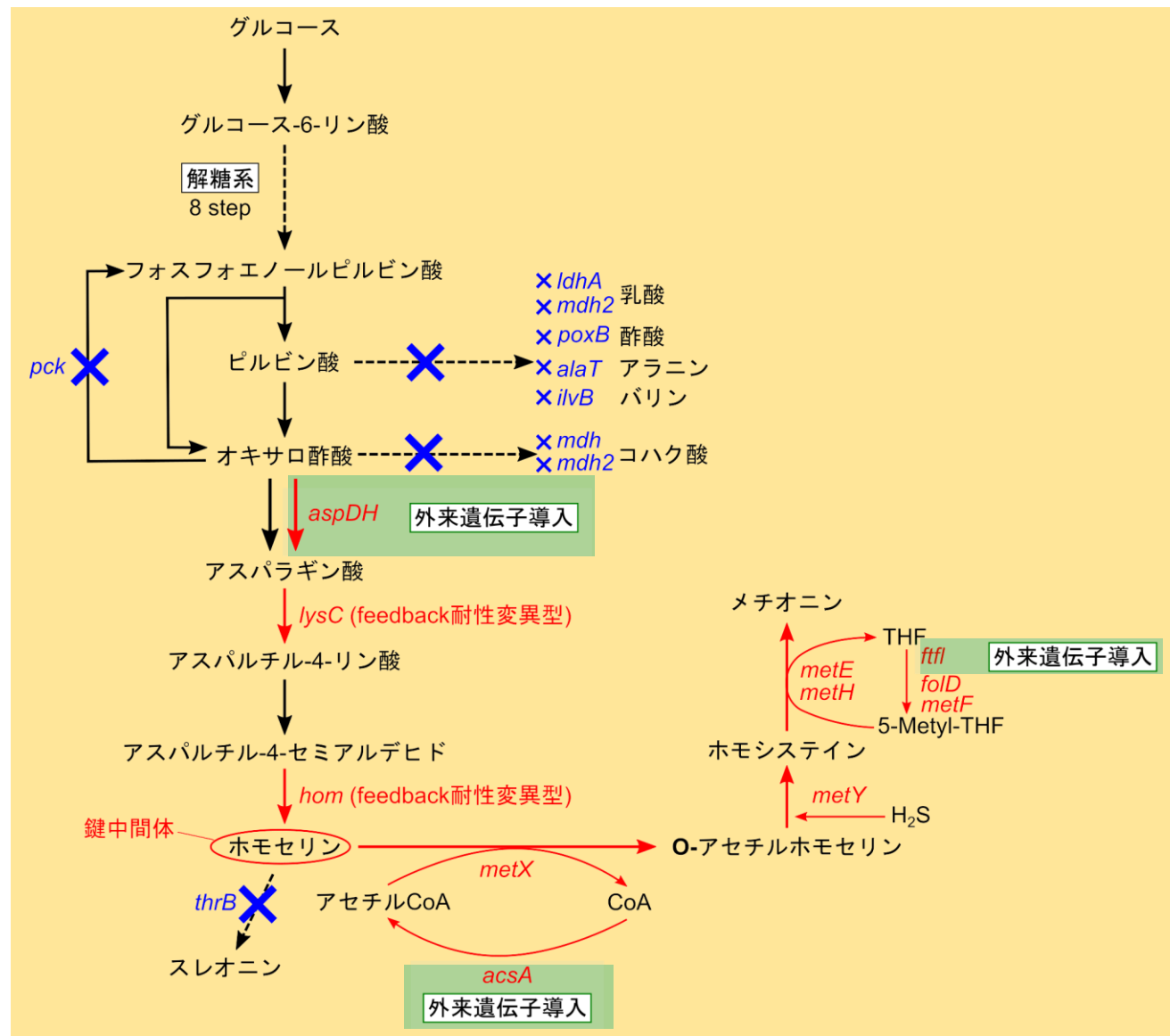
②メチオニン(飼料添加物)

【実施項目】

本事業において、増殖非依存型バイオプロセスによって、バイオマスから得られる糖をメチオニンに変換できる菌株を開発。

具体的な開発手法としては、イソブタノール生産菌の開発と同様に、鍵となる中間体を決め、当該中間体までの代謝系を強化し、その上で、当該中間体からメチオニンまでの代謝系を強化するための遺伝子組み換えを行うというものである。

メチオニンの場合は、当該中間体としては、ホモセリンをターゲットとした。



* 青は欠失を試みた遺伝子、赤は過剰発現を試みた遺伝子、点線は複数ステップを示す



今年度の事業実績・成果

メチオニン生産菌開発のために試みた具体的な遺伝子操作

代謝プロセス (大区分)	個別の代謝プロセス	遺伝子	触媒酵素	加えた 遺伝子操作
フォスフォエノールピルビン酸 ーアスパラギン酸	乳酸の生産	<i>ldhA</i>	L-lactate dehydrogenase	遺伝子欠失
		<i>mdh2</i>	malate/L-lactate dehydrogenase	
	コハク酸の生産	<i>mdh</i>	malate dehydrogenase	遺伝子欠失
		<i>mdh2</i>	malate/L-lactate dehydrogenase	
	酢酸の生産	<i>poxB</i>	pyruvate dehydrogenase	遺伝子欠失
	糖新生	<i>pck</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	遺伝子欠失
	アラニンの生産	<i>alaT</i>	alanine aminotransferase	遺伝子欠失
バリンの生産	<i>ilvB</i>	acetolactate synthase	遺伝子欠失	
アスパラギン酸の生産		<i>aspDH</i> (異種生物種由来)	aspartate dehydrogenase	遺伝子導入
アスパラギン酸 ーホモセリン	アスパラギン酸からL-4-アスパルチルリン酸	<i>lysC</i> (feedback 耐性変異型)	aspartate kinase	遺伝子導入
	L-アスパラギン酸-4-セミアルデヒドからホモセリン	<i>hom</i> (feedback 耐性変異型)	homoserine dehydrogenase	遺伝子導入
ホモセリン ーホモシステイン	スレオニンの生産	<i>thrB</i>	homoserine kinase	遺伝子欠失
	ホモセリンのアセチル化	<i>metX</i>	homoserine O-acetyltransferase	遺伝子導入
	硫黄の導入	<i>metY</i>	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	遺伝子導入
	アセチルCoAの再生	<i>acsA</i> (異種生物種由来)	acetyl-CoA synthetase	遺伝子導入
ホモシステイン ーメチオニン	ホモシステインのメチル化	<i>metE</i>	homocysteine methyltransferase	遺伝子導入
		<i>metH</i>		遺伝子導入
		<i>metF</i>		5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
	5-Me-THFの再生	<i>folD</i>	bifunctional 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase/ 5,10-methylene-tetrahydrofolate cyclohydrolase	遺伝子導入
		<i>ftfI</i> (異種生物種由来)	10-Formyltetrahydrofolate synthetase	遺伝子導入
メチオニン生産	メチオニン生産遺伝子発現制御	<i>mcbR</i>	transcriptional regulator of sulfur metabolism	遺伝子欠失

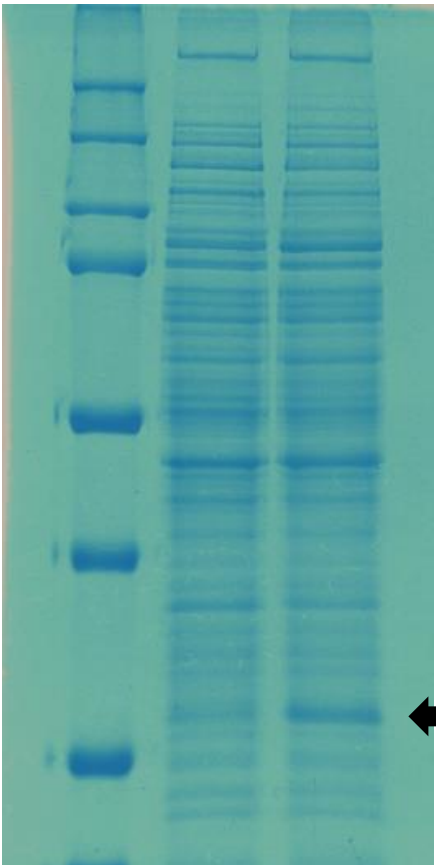

成果:これらの遺伝子操作により、乳酸、コハク酸、酢酸、アラニン、バリン等の副生産物の生産を抑え、一部の代謝プロセスにおいては、目的物の生産が野生株の20倍になっている。

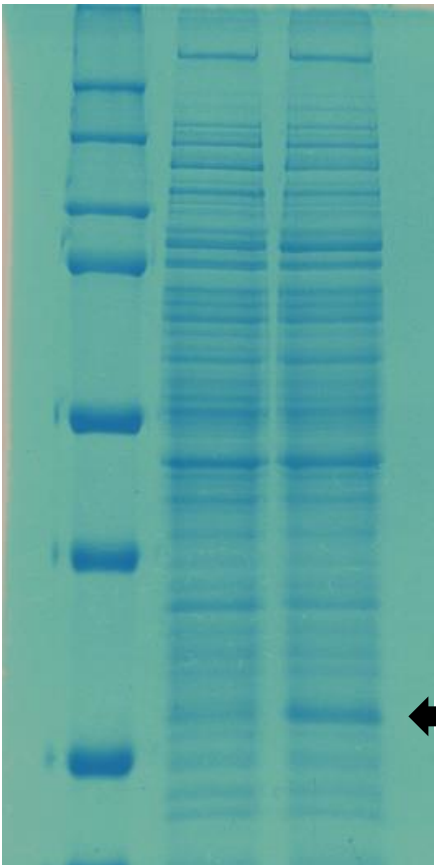
今年度の事業実績・成果

メチオニン関係の遺伝子操作の成果の例1

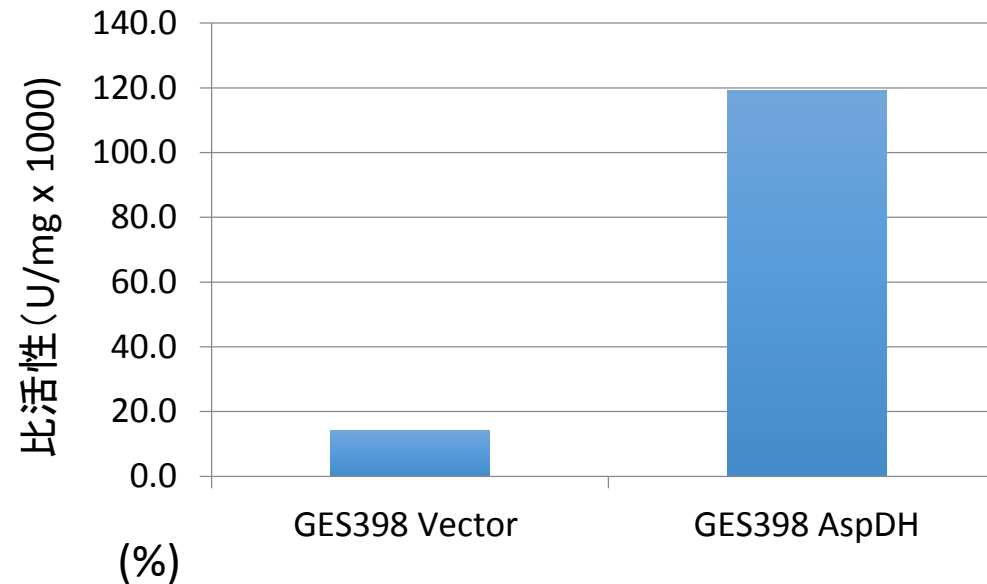
$\Delta IdhA \Delta poxB \Delta mdh$

GES398

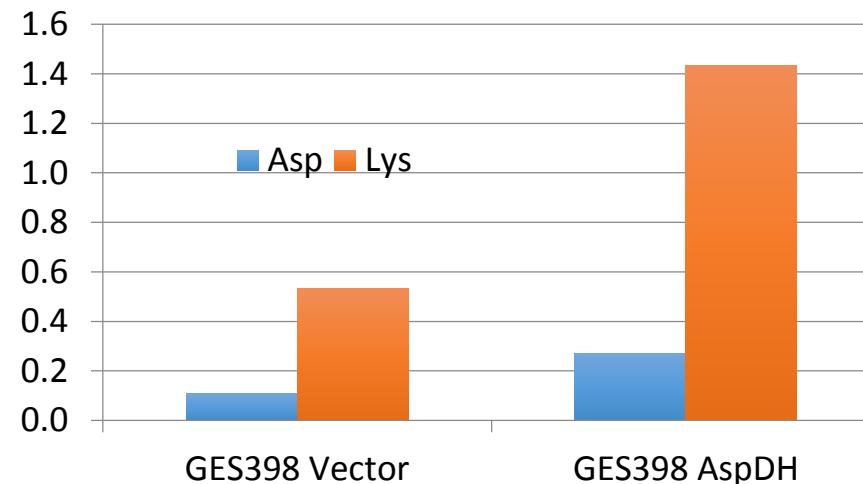
Vector alone	AspDH plasmid
	



← AspDH



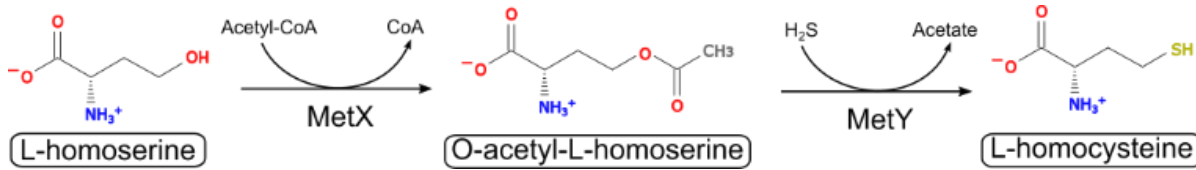
アスパラギン酸脱水素
酵素の活性



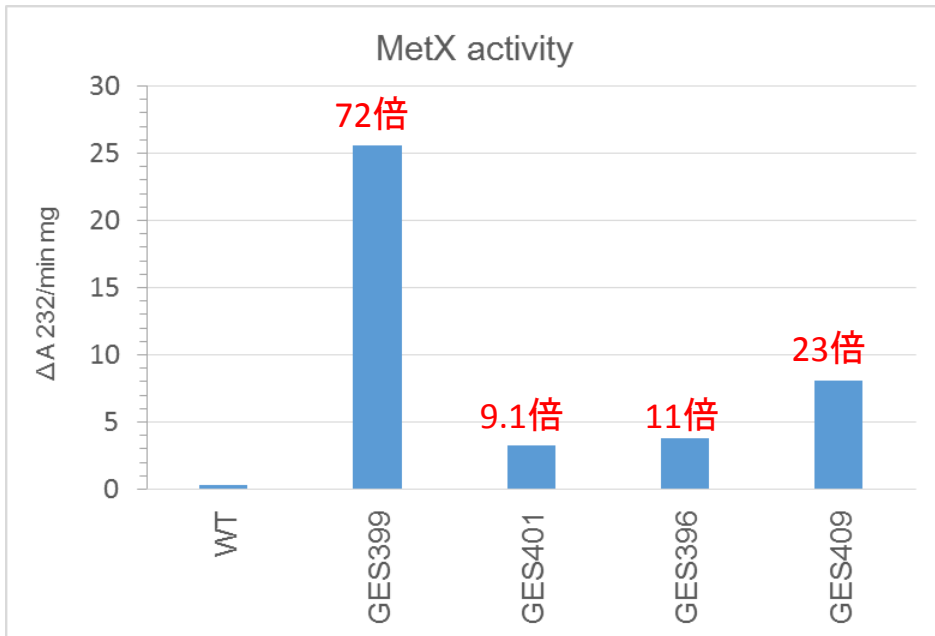
アスパラギン酸由来のアミノ酸の生成

今年度の事業実績・成果

メチオニン関係の遺伝子操作の成果の例2

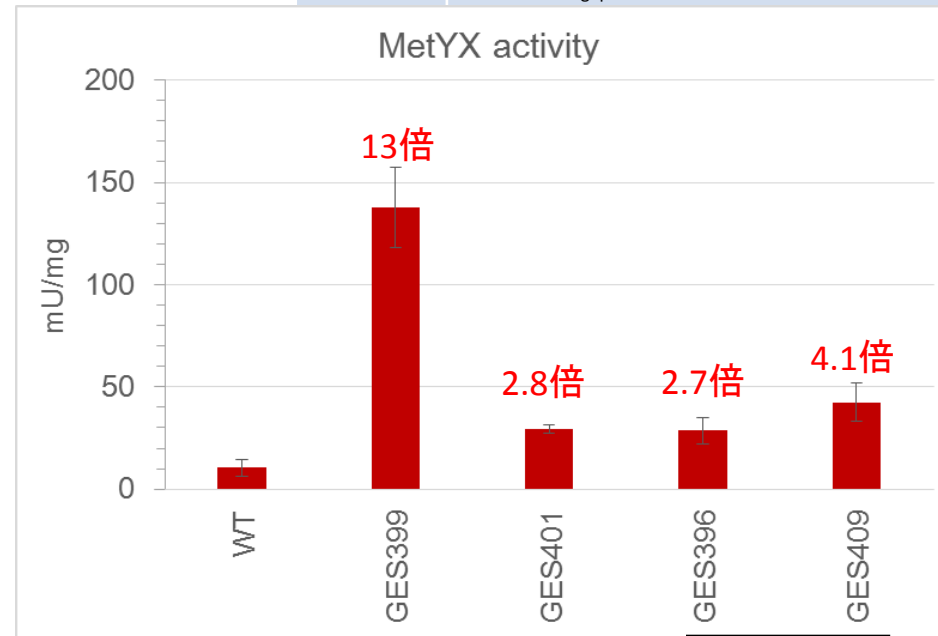


菌株ID	遺伝子型
WT	ATCC13032
GES399	$P_{\text{idhA}}\text{-metYX-pCASE1ori}$ (plasmid)
GES401	$P_{\text{gapA}}\text{-metYX-pCG1ori}$ (plasmid)
GES396	ΔmcbR
GES409	$\Delta\text{mcbR}::P_{\text{gapA}}\text{-metYX}$



プラスミド導入

ゲノム改変



プラスミド導入

ゲノム改変

error = SD from 2-3 results

*mcbR*の欠失、*metYX*のゲノム挿入により、ホモセリンからホモシステインまでの酵素活性が約4倍上昇



Green Earth
Institute

<http://www.gei.co.jp>