

Clostridium cellulovorans および *Clostridium beijerinckii* の共培養系によるシュガービートパルプからの有用物質生産

川出雄二郎¹, 田丸 浩^{1,2,3*}, LÓPEZ-CONTRERAS, Ana M.⁴

1 三重大学 大学院 生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻

2 三重大学 生命科学研究支援センター バイオインフォマティクス部門

3 三重大学 新産業創生研究拠点 バイオテクノロジー部門

4 Wageningen UR, Food and Biobased Research

Production of useful materials from sugar beet pulp by co-cultivation of *Clostridium cellulovorans* and *Clostridium beijerinckii*

Yujiro KAWADE¹, Yutaka TAMARU^{1,2,3*}, Ana M. LÓPEZ-CONTRERAS⁴

1 Department of Life Sciences, Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

2 Department of Bioinformatics, Mie University Life Science Research Center, 1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

3 Laboratory of Applied Biotechnology, Mie University Industrial Technology Innovation Institute,
1577 Kurimamachiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan

4 Food and Biobased Research, Wageningen UR, Bornse Weilanden 9, 6708 WG Wageningen, The Netherlands

Abstract

Sugar beet pulp (SBP) is the residue of beet sugar processing and is a promising feedstock for bio-fuels and chemicals production. The aim of this study was to develop the co-culture system of two mesophilic *Clostridia*, *Clostridium cellulovorans* and *Clostridium beijerinckii*, which allows simultaneous saccharification and fermentation of SBP to useful chemicals. *Clostridium cellulovorans* degraded SBP without pre-treatment and addition of exogenous enzymes, but could not utilize the arabinose produced by the arabinan degradation and *Clostridium beijerinckii* fermented this arabinose to produce organic acids and alcohols. Approximately 4.270 g/L of butyric acid and 0.276 g/L of 1-butanol from 20 g/L of SBP were obtained. These results indicated that co-culture of these two clostridia strains provides a technically feasible and more simplified way for producing useful chemicals directly from SBP.

Keywords: Sugar beet pulp, *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium beijerinckii*, co-cultivation, useful chemicals

2015 年 12 月 25 日受理

^{1,2,3} 〒 514-8507 津市栗真町屋町 1577

⁴ Bornse Weilanden 9, 6708 WG Wageningen, The Netherlands

* For correspondence (e-mail: ytamaru@bio.mie-u.ac.jp)

緒 言

近年, 化石資源の枯渇や地球温暖化とそれに伴う地球規模の気候変動が問題となっている。その解決策として, 再生可能かつカーボンニュートラルな資源である植物バイオマス为原料としたエネルギーや化学品原料などの有用物質生産技術であるバイオリファイナリーが注目されている。しかしながら, トウモロコシやサトウキビなどの可食資源の利用は食糧と競合する。そのため, 非可食資源であるセルロース系バイオマスの利活用が求められている。そこで, 本研究では, セルロース系バイオマスとして温帯地域での砂糖の生産における副生物であるシュガービートパルプ (Sugar beet pulp : SBP) に着目した。

シュガービート 1t あたり湿重量で 500 kg の SBP が副生される¹⁾。シュガービートの生産量から試算すると, 世界で約 1 億 2,400 万トン, オランダで 284 万トン, 日本で 194 万トンの SBP が毎年生産されていると考えられる (国際連合食糧農業機関 (FAO) の統計情報 <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E> より推計)。また, 表 1 に示したように, SBP はセルロースおよ

びアラビナンを主成分とするヘミセルロース, ペクチン, 少量のリグニンから構成されている²⁻⁴⁾。リグニン含有量が少ないことから, 高コスト化の要因の一つである前処理工程の簡略化が可能と考えられ, また, 生産量が多く, 安定的に生産されていることから, バイオリファイナリーに適した原料と考えられる。

これまでに, 酵素製剤および組換え細菌を用い, 糖化・発酵工程を同時に行う SSF (simultaneous saccharification and fermentation) プロセスによる SBP からのエタノールの生産は報告されているが^{4,5)}, 酵素生産・糖化・発酵工程を一貫して行う Consolidated bio-processing (CBP) が, 最も低コストな手法とされている⁶⁾。そこで, 本研究では, 2 種の *Clostridium* 属中温菌を用いて, 酵素製剤を添加せずに未処理 SBP を原料とした CBP による有用物質生産を目的とした。すなわち, 糖化細菌として, セルロースだけでなくキシランおよびペクチンも利用でき, 多くの糖質加水分解酵素群およびセルロソームと呼ばれる酵素複合体を生産することが知られている *Clostridium cellulovorans* 743B 株⁷⁻¹²⁾, 発酵細菌として, 種々の糖類から酢酸および乳酸, 酪酸といった有機酸, アセトンおよび

表 1 シュガービートパルプ (SBP) の成分組成

成 分	Graham H. <i>et al.</i> , 1986	Zheng Y. <i>et al.</i> , 2013
	Percentage of dry matter	
灰分	3.42	2.51
タンパク質	11.42	11.42
脂質	1.63	-
糖類 ^{*1}	5.20	-
デンプン	0.99	-
リグニン	2.38	1.16
グルカン	17.34 ^{*2}	22.70
キシラン	1.36 ^{*2}	5.14
ガラクトン	4.88 ^{*2}	5.92
アラビナン	16.83 ^{*2}	23.73
マンナン	1.58 ^{*2}	1.85
ペクチン	21.15 ^{*2}	22.84
その他	11.82	2.73

*1 残りのフルクトース, グルコース, スクロースおよびフルクタン¹⁾の合算値。

*2 文献値を多糖に換算。

数字は乾燥重量に対するパーセント値。

Graham H. *et al.* 1986²⁾ および Zheng Y. *et al.* 2013⁴⁾ から抜粋。

ブタノール, エタノールといったアルコール類を発酵生産することが知られている *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 株¹³⁾ を用い, これら 2 種の共培養系による未処理 SBP からの有用物質生産に関する基盤技術確立を試みた。

材料および方法

シュガービートパルプ

2013 年夏季にオランダで収穫し, 1 年間, 地中に保存したシュガービートパルプ (SBP) を用いた。保存中の乳酸発酵によりスクロース含有量が低下し, 乳酸含有量が増加していた。凍結保存した後, 使用前に乾燥 (105℃, 24 時間) し, 重量を測定した後に実験に供した。

菌株

Clostridium cellulovorans 743B 株 (ATCC 35296) および *Clostridium beijerinckii* NCIMB8052 株 (ATCC 51743) は, American Type Culture Collection (ATCC) より分譲を受けた。*C. cellulovorans* 743B 株は, 20% (v/v) のグリセロール存在下, -80℃ で凍結保存した。*C. beijerinckii* NCIMB8052 株 (ATCC 51743) は, 孢子懸濁液を -20℃ で凍結保存した。

培地

Sleat らの *Clostridium cellulovorans* 培地¹¹⁾ を一部改変した培地を用いた。(培地 1 L あたり: Yeast extract 4 g, Resazurin salt 1 mg, L-Cysteine.HCl 1 g, NaHCO₃ 5 g, K₂HPO₄ 0.45 g, KH₂PO₄ 0.45 g, NH₄Cl 0.3675 g, NaCl 0.9 g, MgCl₂·6H₂O 0.1575 g, CaCl₂·2H₂O 0.12 g, MnCl₂·4H₂O 0.85 mg, CoCl₂·6H₂O 0.942 mg, Na₂EDTA 5.2 mg, FeCl₂·4H₂O 1.5 mg, ZnCl₂ 0.07 mg, H₃BO₃ 0.1 mg, CuCl₂·2H₂O 0.017 mg, NiCl₂·6H₂O 0.024 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.036 mg, FeSO₄·7H₂O 6.6 mg, p-aminobenzoic acid 0.1 g)

Clostridium cellulovorans の単一培養

0.3% (w/v) のセロビオースを含む液体培地で前培養 (37℃, 72 時間, 静置) した。乾燥したシュガービートパルプを最終濃度で 1 および 2, 5% (w/v) 含む 45 mL の液体培地に前培養液 5 mL を接種し, 37℃ で静置培養を行った。

Clostridium cellulovorans および *Clostridium beijerinckii* の共培養

0.3% (w/v) のセロビオースを含む液体培地で前培養 (37℃, 72 時間, 静置) した *C. cellulovorans* 前培養液 5 mL を, 乾燥したシュガービートパルプを最終濃度で 2% (w/v) 含む培地 45 mL に植菌した直後 (同時共培養) あるいは 48 時間後 (逐次共培養) に, 60 g/L グルコースを含む液体培地で 37℃ で 24 時間前培養した *C. beijerinckii* 前培養液 5 mL を植菌した。培養容器には, 生成ガスの排出のために 0.2 μm のフィルター付きの一方弁を付けた容量 500 mL の三角フラスコを用いた。サンプリング前後の重量差から, 生成ガス重量を見積もった。

糖類および有機酸, アルコール類の分析

培養液より継時的に 2 mL ずつサンプリングし, 波長 600 nm の吸光度 (OD_{600nm}) および pH を測定した。その後, 遠心分離 (20,000 x g, 4℃, 5 分間) し, 上清を分取した。上清 400 μl と内部標準溶液 (プロピオン酸溶液) 400 μl を混合した後に, 遠心分離 (20,000 x g, 4℃, 1 分間) し, 口径 0.2 μm のフィルターで濾過した後に, HPLC 分析に供した。Waters 社製 HPLC システム model e2695 および昭和電工社製カラム (Shodex KC-811, 8.0 × 300 mm, 粒径 6 mm) を用いた。カラム温度 65℃, 移動相 3 mM H₂SO₄, 流速 1 mL/min の条件で分離し, 示差屈折検出器 (Waters model 2414) および紫外線吸収検出器 (Waters model 2487) を用いてセロビオース, グルコース, フルクトース, アラビノース, 乳酸, 酢酸, 酪酸, エタノールおよび 1-ブタノールを検出した。

結果

Clostridium cellulovorans の単一培養

乾燥したシュガービートパルプ (SBP) を 1 および 2, 5% (w/v) 含む培地で培養した結果, 1 および 2% (w/v) の条件で分解が観察された (図 1)。一方, 5% (w/v) の条件では, 多くの残渣が観察された。

SBP 濃度 2% (w/v) の条件における糖濃度の継時的変化 (図 2) を分析した結果, 培養開始直後にグルコースおよびフルクトース濃度が減少し,

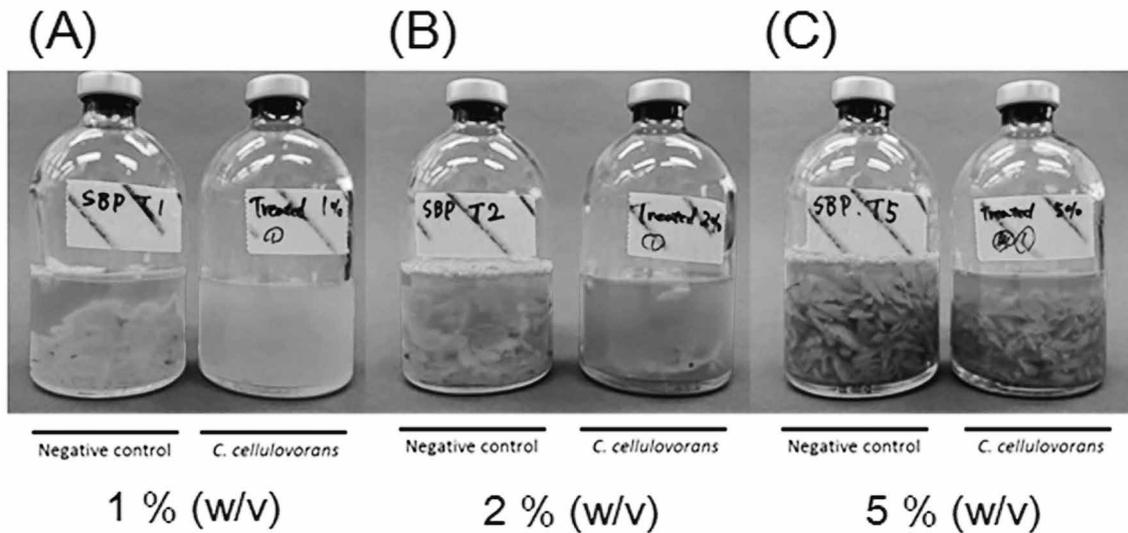


図1 *C. cellulovorans* によるシュガービートパルプ (SBP) の分解

(A) SBP 1 % (w/v), (B) SBP 2 % (w/v), (C) SBP 5 % (w/v)。Negative control : 未植菌区。 *C. cellulovorans* : 植菌区。37 °C, 静置, 144 時間培養後。

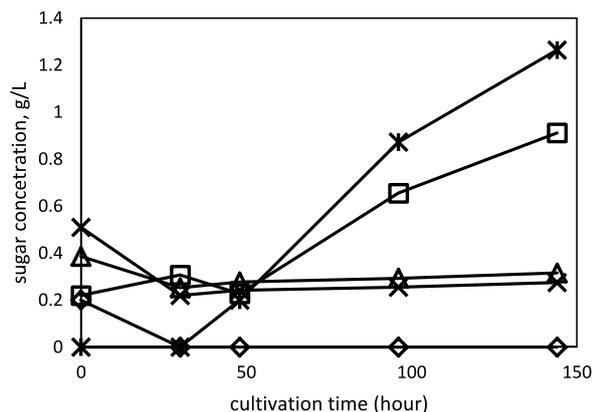


図2 *C. cellulovorans* 単一培養における糖類の経時的変化

□: セロビオース, ◇: グルコース, △: フルクトース, ×: スクロース, *: アラビノース。スクロース濃度はグルコース濃度とフルクトース濃度の合算値から算出。

培養 48 時間以降, セロビオースおよびアラビノース濃度の上昇が見られた。

また, 有機酸およびエタノール濃度の経時的変化 (図3) を分析した結果, 培養 30 時間から 48 時間まで酢酸および酪酸の濃度が上昇し, 50 時間以降からエタノール濃度の上昇が見られた。

Clostridium cellulovorans および *Clostridium beijerinckii* の共培養

C. cellulovorans を接種し 48 時間培養後に *C. beijerinckii* を接種する逐次共培養, *C. cellulovorans* および *C. beijerinckii* の 2 種を同時に接種する同時

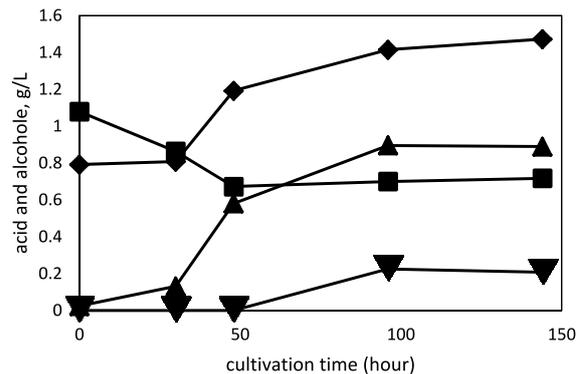


図3 *C. cellulovorans* 単一培養における有機酸およびエタノールの経時的変化

■: 乳酸, ◆: 酢酸, ▲: 酪酸, ▼: エタノール。

共培養を行った。

逐次共培養 (図4) において, *C. cellulovorans* 植菌後の 48 時間まで, セロビオースおよびアラビノース濃度が増加した。次いで, *C. beijerinckii* を植菌した 48 時間目以降に, これら糖濃度が減少し, 酪酸および 1-ブタノール濃度の増加が見られた。また, 菌体増殖の指標である 600 nm の吸光度 (OD_{600nm}) およびガス生産量が増加した。これらのことから, *C. cellulovorans* による SBP の分解に伴い遊離したセロビオースおよびアラビノースを, *C. beijerinckii* が資化, 増殖し, 酪酸および 1-ブタノールを生産したことが示唆された。

一方, 同時共培養 (図5) においては, 逐次共

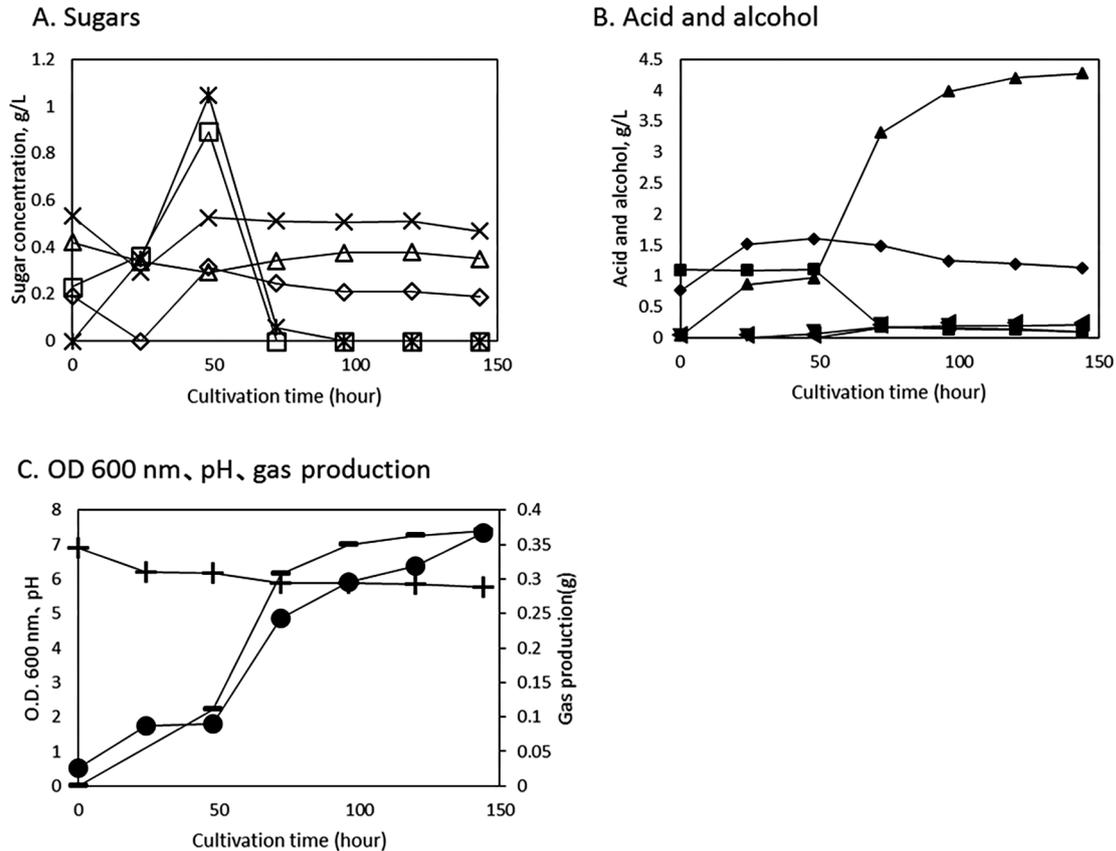


図4 逐次共培養における継時的変化

(A) 糖類, (B) 有機酸およびアルコール, (C) OD_{600nm} および pH, ガス生産量。□: セロビオース, ◇: グルコース, △: フルクトース, ×: スクロース, *: アラビノース, ■: 乳酸, ◆: 酢酸, ▲: 酪酸, ▼: エタノール, ◄: 1-ブタノール, ●: OD 600 nm, +: pH, —: ガス生産量。スクロース濃度はグルコース濃度とフルクトース濃度の合算値から算出。48 時間後に *C. beijerinckii* を植菌。

培養と異なりセルビオースおよびアラビノースは系内に蓄積しなかった。しかしながら、逐次共培養と同様に、酪酸およびブタノールの生産が見られた。これらのことから、同時共培養では *C. cellulovorans* が SBP を分解し、遊離されたセルビオースおよびアラビノースは、速やかに *C. beijerinckii* によって資化されたことが考えられた。

逐次共培養および同時共培養における *C. beijerinckii* 接種後 96 時間時点での酪酸濃度は、4.273 および 4.265 g/L であり、1-ブタノール生産量は 0.205 および 0.276 g/L であった。*C. cellulovorans* の単一培養における酪酸生産量は 0.890 g/L であったことから (図 3)、共培養によって生産された酪酸の約 70% は *C. beijerinckii* による生産と考えられた。また、上記の結果より、培地中の SBP の約 21% が酪酸に、約 37~39% がガスに変換されたことが見積もられた。

考 察

C. cellulovorans は単独でシュガービートパルプ (SBP) を分解し (図 1)、セルビオースおよびアラビノースを培養液中に蓄積した (図 2)。これは、培養初期には培地中の可溶性糖を資化して増殖し、次いで増殖と共に産生する糖質加水分解酵素群により SBP 分解速度が次第に上昇し、SBP より遊離する可溶性糖の増加速度が菌体による資化速度を上回るため、培養液中にセルビオースが蓄積したと考えられた。また、アラビノースの蓄積が見られたことから、アラビナンが分解されたことが示された。Sleat ら (1984) の既往の研究¹¹⁾ より *C. cellulovorans* はアラビノースを資化しないことが推定され、結果としてアラビノースが系内に蓄積したことが考えられた。一方、ペクチンの主成分であるガラクトuron酸は検出されなかったことから、これは速やかに *C. cellulovorans* に資化

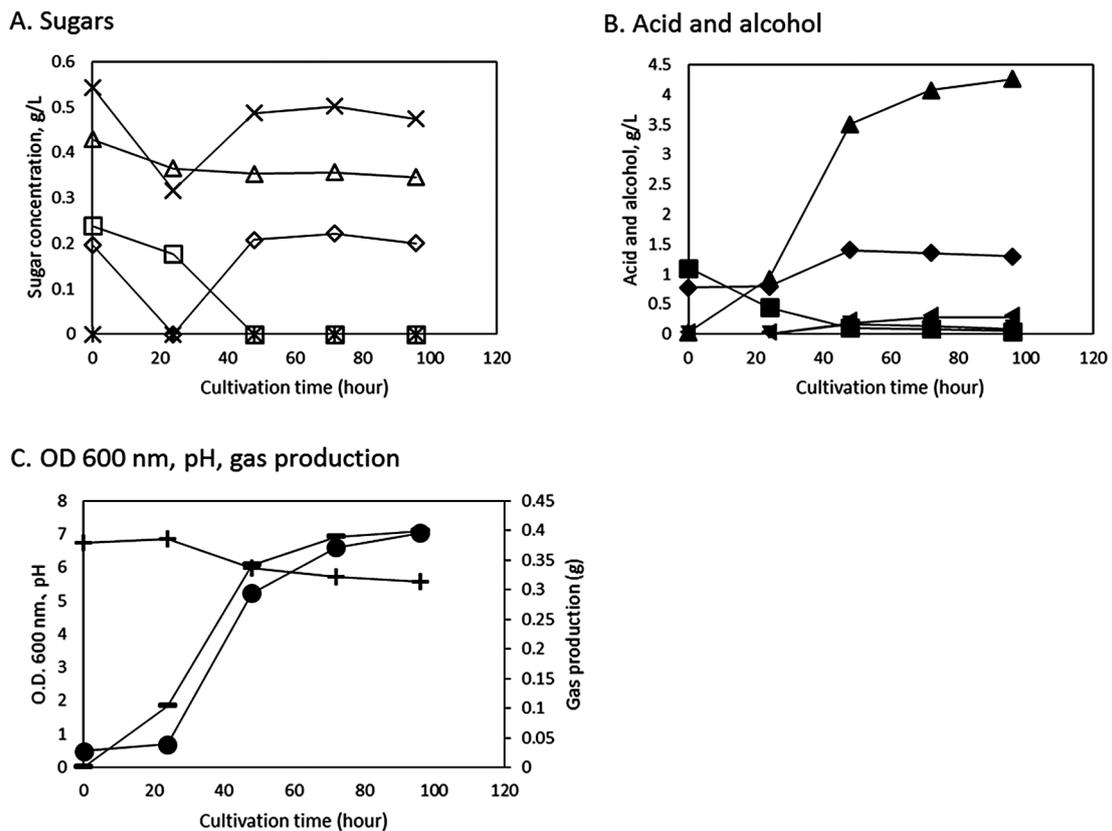


図5 同時共培養における継時的変化

(A) 糖類, (B) 有機酸およびアルコール, (C) OD_{600nm} および pH, ガス生産量。□: セロビオース, ◇: グルコース, △: フルクトース, ×: スクロース, *: アラビノース, ■: 乳酸, ◆: 酢酸, ▲: 酪酸, ▼: エタノール, ◄: 1-ブタノール, ●: OD 600 nm, +: pH, —: ガス生産量。スクロース濃度はグルコース濃度とフルクトース濃度の合算値から算出した。

されたものと考えられた。

C. cellulovorans および *C. beijerinckii* の共培養においては, *C. cellulovorans* が SBP を分解し, 培地中に遊離したセロビオースおよびアラビノースを, *C. beijerinckii* が資化, 増殖し, 酪酸および 1-ブタノールを生産したことが示唆された。共培養によって培地中に約 4 g/L の酪酸が蓄積した一方, 1-ブタノール濃度は約 0.2 g/L と低い値を示した。*C. beijerinckii* は, 他の *Clostridium* 属発酵細菌と同様に, 対数増殖期は酢酸や酪酸を生産する酸生成期であり, 定常期に至ると代謝転換により, 1-ブタノールやエタノール等を生産する溶剤生成期になる。酸生成期から溶剤生成期への移行は有機酸の蓄積による pH の低下によって引き起こされることから¹⁴⁾, 今後, 培養条件の検討により, 酪酸生産から 1-ブタノール生産に移行させることが可能であると考えられた。

以上, 本研究結果は, *C. cellulovorans* および *C.*

beijerinckii の共培養系によるバイオマス資源からの有用物質生産の可能性を示すものである。

謝 辞

本研究は, 独立行政法人 日本学術振興会「頭脳循環を加速する若手研究者戦略的海外派遣プログラム」の一環として実施した。

要 約

本研究では, 砂糖の製造工程における副生物であるシュガービートパルプ (SBP) からの有用物質生産を目指し, 2 種の *Clostridium* 属中温細菌, すなわちセルロースおよびアラビナン, ペクチン等に対する優れた分解能を有する *C. cellulovorans*, およびアセトン, ブタノール, エタノール発酵細菌である *C. beijerinckii* の共培養により SBP の直接

的発酵を行った。その結果、*C. cellulovorans* は、SBPのアラビナンを分解し、自らは資化できないアラビノースを生成し、これを*C. beijerinckii*が資化、増殖し、有機酸やアルコールを生産することが明らかになった。このことから、*C. cellulovorans*と*C. beijerinckii*は異なる特性、すなわち、バイオマス分解能力および発酵特性、糖利用性を持ち、互いに補完し合えることが示された。これらのことから、*C. cellulovorans* および*C. beijerinckii*の共培養系が、SBPからの有用物質生産に有用であることが示された。

引用文献

- 1) FAO: Sugar beet white sugar, Agribusiness handbook (2009)
- 2) Graham, H., K. Hesselman, P. Aman: The influence of wheat bran and sugar-beet pulp on the digestibility of dietary components in a cereal-based pig diet, *J. Nutr.*, **116**, 242–251 (1986)
- 3) Spagnuolo, M., C. Crecchio, M. D. R. Pizzigallo, P. Ruggiero: Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp, *Biores. Technol.*, **60**, 215–222 (1997)
- 4) Zheng, Y., C. Lee, C. W. Yu, Y. S. Cheng, R. H. Zhang, B. M. Jenkins, J. S. VanderGheynst: Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol, *Appl. Ener.*, **105**, 1–7 (2013)
- 5) Doran, J. B., J. Cripe, M. Sutton, B. Foster: Fermentations of pectin-rich biomass with recombinant bacteria to produce fuel ethanol, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84-6**, 141–152 (2000)
- 6) Lynd, L. R., W. H. van Zyl, J. E. McBride, M. Laser: Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update, *Curr. Opin. in Biotechnol.*, **16**, 577–583 (2005)
- 7) Beukes, N., H. Chan, R. H. Doi, B. I. Pletschke: Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse, *Enzyme Microb. Technol.*, **42**, 492–498 (2008)
- 8) Dredge, R., S. E. Radloff, J. S. van Dyk, B. I. Pletschke: Lime pretreatment of sugar beet pulp and evaluation of synergy between ArfA, ManA and XynA from *Clostridium cellulovorans* on the pretreated substrate, *3 Biotech*, **1**, 151–159 (2011)
- 9) Koukiekolo, R., H. Y. Cho, A. Kosugi, M. Inui, H. Yukawa, R. H. Doi: Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 3504–3511 (2005)
- 10) Liu, C. C., R. H. Doi: Properties of exgS, a gene for a major subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome, *Gene*, **211**, 39–47 (1998)
- 11) Sleat, R., R. A. Mah, R. Robinson: Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov., *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 88–93 (1984)
- 12) Tamaru, Y., R. H. Doi: Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 4125–4129 (2001)
- 13) Lee, S. M., Cho, M. O., Park, C. H., Chung, Y. C., Kim, J. H., Sang, B. I., Y. Um: Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate, *Ener. Fuels*, **22**, 3459–3464 (2008)
- 14) Shi, Z., H. P. Blaschek: Transcriptional Analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the Hyper-Butanol-Producing Mutant BA101 during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 7709–7714 (2008)