

戦略的創造研究推進事業(ALCA)  
「微生物によるバイオ燃料廃棄物系バイオマスから  
ポリマー原料への転換」

終了報告書

研究開発期間 平成27年10月～令和 2年 3月

研究開発代表者:中島 敏明  
((大)筑波大学 生命環境系 教授)

## ○報告書要約（和文）

研究開発代表研究者：(大)筑波大学 教授 中島 敏明

研究開発課題名：微生物によるバイオ燃料廃棄物系バイオマスからポリマー原料への転換

### 1.研究開発の目的

本研究は、バイオディーゼル燃料(BDF)の生産において副生する廃棄物系バイオマスであるグリセロールから、微生物を用いてポリマー原料である 1,3-プロパンジオールを生産する上での技術的基盤の構築を目的とする。廃グリセロールを資源として用いることで、焼却処理による CO<sub>2</sub> の直接的な増加だけでなく、ポリマー原料である原油の使用削減にもつながり、2 倍の温室効果ガス削減効果が期待できる。本提案では、申請者が新たに自然界から取得した *Citrobacter braakii* TB-96 株による廃グリセロールからの 1,3-PD の高効率生産を試みる。検討にあたってはオミクス解析を元に代謝のボトルネックを明らかにしたうえで、変異株の取得や関連遺伝子を強化し、実用化を目指す。同時に本プロセスの経済的・社会的インパクトを加味したコスト試算を行い、社会実装にむけた目標を見定めつつ研究を進める。

### 2.研究開発の概要

#### (1)内容:

*Citrobacter braakii* TB-96 株を用いて培地組成・培養条件等の外的要因の最適化(中島 G)、代謝経路、遺伝子発現状況のオミクス解析と遺伝子改変による菌体自身の機能強化(中島・清 G)を行った。実施に当たっては各条件での生産コスト試算と、最終的なコストに与える各種条件の寄与度を算出(水野谷 G)し、これらの情報を生産条件の最適化にフィードバックし、効率的な条件検討を行った。

#### (2)成果:

前培養条件の検討と生産培地への鉄、コバラミンの添加、原料グリセロールの逐次添加等の工夫を行い、1,3-PD 生産性の増大を行った。並行して、TB-96 株の全ゲノム情報を元に代謝経路を明らかにし、D-乳酸生産系およびギ酸生産系の一部を破壊した二重変異株を作成することで、バッチ培養で約 70g/L の 1,3-PD の生産に成功した。さらに、不織布を用いた固定化菌体による繰り返しバッチ培養、連増培養を検討した結果、最高到達濃度は 40g/L に低下したが、期間を通して生産性の低下は見られず、生産速度は高くなる傾向を示した。また、二重変異株に対してさらに 1,3-PD 生産系の強化、TCA 回路の強化による還元量の増強についても検討した。コスト試算の結果からは、本プロセスには生産時の最高濃度と、培地コストが大きく寄与することが示され、このうち培地コストについて最も高価な酵母エキスの 80%を安価なコーンステープリカーに置き換えることに成功した。その結果、現在の生産コストは既存プロセスに充分対抗可能であることが示唆された。

#### (3)今後の展開:

今後は連続培養の最高到達濃度の改善と、1,3-PD からの 3-ヒドロキシプロピオン酸等の各種誘導体の生産を目指す。また、廃棄グリセロールの前処理による生産性向上と、BDF 廃液以外のグリ

セロール資源からの生産を検討する。また、副産物として生じるピルビン酸や L-乳酸の生成抑制等についても検討したい。

## ○Report summary (English)

Principal investigator: University of Tsukuba professor NAKAJIMA-KAMBE Toshiaki

R & D title: Microbial conversion into polymer ingredient from biofuel waste based biomass.

### 1. Purpose of R & D

The aim of this study is to establish a technical foundation to produce 1,3-propanediol, a polymer raw material, from microorganism's fermentation of glycerol which is a biomass-waste produced as a by-product in the production of biodiesel fuel (BDF). By converting waste glycerol into a resource, we do not only expect the decrease of CO<sub>2</sub> generated from incineration but also the reduction of the use of crude oil, doubling the reduction of greenhouse gases effect. In this proposal, the applicant attempts for high-efficiency production of 1,3-PD from waste glycerol using *Citrobacter braakii* TB-96 strain, newly obtained from nature. After clarifying the bottleneck of metabolism based on omics analysis, acquisition of mutant strains and enhancement of related genes will be carried, aiming at practical implementation. At the same time, we will conduct cost estimations considering the economic and social impacts of the process and proceed with research while setting goals for social implementation.

### 2. Outline of R & D

#### (1) Contents:

Using *Citrobacter braakii* strain TB-96, optimization of external factors such as medium composition and culture conditions (Nakajima G), omics analysis of metabolic pathways and gene expression levels, and enhancement of cellular functions through genetic modification (Nakajima and Kiyoshi G) were performed. For implementation, the production cost under each condition was calculated as well as its contribution to the final cost (Mizunoya G). Collected information was then used to efficiently study and optimize the production conditions.

#### (2) Achievements:

We examined the pre-culture conditions, addition of iron and cobalamin to the production medium, and sequential addition of raw glycerol effect to increase the 1,3-PD productivity. In parallel, we clarified the metabolic pathway based on whole genome information of TB-96, and its double mutant strain in which part of the D-lactic acid production system and formic acid production system were destroyed was constructed. We succeeded in producing 70g / L of 1,3-PD. Furthermore, as a result of examining repeated batch culture and continuous-culture with immobilized cells using nonwoven fabric, the maximum concentration decreased to 40 g / L, but no decrease in productivity was observed throughout the period, but rather we found an increasing tendency of productivity rate. Using our double mutant strain, we further investigated the enhancement of 1,3-PD production system and the reduction amount by strengthening the TCA cycle. Estimation results showed that the high concentration during production and medium costs contribute significantly to the production cost. We could successfully replace 80% of the most expensive medium component (yeast extract) with inexpensive corn steep liquor. As a result, we assume that the current production cost can sufficiently compete with the existing process.

#### (3) Future developments:

In the future, we aim to increase the maximum concentration of continuous culture and to produce

various useful derivatives (such as 3-hydroxypropionic acid) from 1,3-PD. In addition, we will study productivity effect of pretreatment of waste glycerol and production from glycerol resources other than liquid waste BDF. In addition, we would like to investigate effect of suppressing the production of pyruvic acid and L-lactic acid produced as by-products.