C3チーム：バイオマス変換要素技術の高度化(3)
エタノール変換工程に適した発酵微生物及びその利用利術の開発

矢部希見子*[1)]、中村敏英[1)]、安藤　聡[1)]、島　純[2)]、鈴木秀之[3)]

[1)]独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所（＊Ｃチームリーダー）
[2)]独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター
[2)]京都大学　微生物科学寄附研究部門
[3)]京都工芸繊維大学大学院　工芸科学研究科微生物工学研究室

１．はじめに

食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマス原料を用いた効率的エタノール変換技術の構築が求められている。エタノール発酵工程はバイオマスエタノール変換の重要な工程であり、その工程の効率化は、実用的エタノール変換技術の構築達成に極めて重要な課題である。エタノール変換においては、セルロースの糖化で生じるグルコースが主要な発酵原料となるが、バイオマス原料にはセルロース以外にキシラン等ヘミセルロースをかなりの割合で含まれており、ヘミセルロースの糖化によって生じるキシロースなどの５炭糖の発酵も重要である。しかし、一般的に利用されている *Saccharomyces cerevisiae* はキシロース発酵能を有していないことから､バイオマスの効率的利用の点で問題を有している。また、バイオエタノール生産のコストを下げるためには、糖化と発酵をワンポットで一度に進行する併行複発酵（ＳＳＦ）が望ましいが、50℃付近での糖化処理が望ましいのに対して、*Saccharomyces cerevisiae* の生育温度は30℃近傍が適当である。したがって、40℃で生育できる酵母の開発はＳＳＦの達成に極めて重要な課題である。さらに、発酵工程は、バイオマス原料が有する成分や、前処理工程及び糖化工程により新たに生じる各種成分・条件を通じた系に酵母を接種して実施することから、雑菌汚染の可能性や、酵母の生育・代謝を抑制する物質の蓄積が発酵活性に大きく影響する可能性が高い。したがって、以上のような様々な過酷ともいえる条件で高い発酵活性を有する酵母の開発及び発酵条件の適切な制御技術の開発が求められている。

２．有用酵母の分離・育成及び作出と、発酵工程の制御技術の開発

Saccharomyces cerevisiae にキシロース代謝にかかわる遺伝子を導入し、キシロース発酵能を有する株を作出する。また、培地中にグルコースとキシロースが共存する際には、グルコースの取り込みが優先されキシロースが使われるまで発酵時間が長くなりコスト高になるという問題があったため、異なる酵母のキシローストランスポーター遺伝子の導入により、同時発行を可能にして発酵時間の短縮を図る。

糖化工程より以前の段階で持ち込まれた種々の発酵阻害因子に対して耐性を示す酵母の分離や育種を行う。また糖化は50℃程度で行うのに対し、発酵工程は30℃程度であり、発酵工程における雑菌汚染の防御が重要である。そこで、雑菌の増殖を抑制する技術を開発する。さらにコスト削減のため酵母のリサイクル利用を可能にする固定化酵母の開発を行う。

３．有用酵母の分離・育成及び作出と、発酵工程の制御技術の開発

バイオマス糖化液の発酵に乳酸を添加することで、雑菌の増殖を抑制できることが明らかとなった。また、酵母を固定化し、部分糖化した20％稲わらを用いてＳＳＦを行った結果、少なくとも５回の連続的ＳＳＦが可能であることが確認された。

また、土壌や不朽木等から集積培養により、発酵阻害物質耐性や高温発酵性などすぐれた特性を有する酵母株のスクリーニングを行い、高温耐性及びキシロース資化性を有する株を短離し、*Candida shehatae* であると同定した。各種前処理稲わらを用いて同酵母によるＳＳＦを行ったところ、35℃で高効率の発酵が観察され実用化の可能性が示唆された。

Saccharomyces cerevisiae に *Pichia stipites* キシロースリダクターゼ遺伝子、*Pichia stipites* キシリトールデヒドロゲナーゼ遺伝子、*S. cerevisiae* キシルロキナーゼ遺伝子を導入した KOM818A 株を作成した結果、キシロースからのエタノール生産が可能となった。杉糖化液を用いて KOM818A 株の発酵能を調べたところ、グルコースとキシロースを糖源として加えた場合と同様な発酵活性が確認された。さらに、*Candida guilliermondii* の *CGUG_05859* がグルコース耐性キシロースストランスポーター遺伝子であることを明らかにし、その遺伝子をプラスミド上にクローニングし、KOM818A 株に導入したところ、導入株のキシロース取り込み活性がグルコースで阻害されないことが確認された。今後、稲わら糖化液を用いて、グルコースによる影響を確認する予定である。

効率的バイオエタノール生産に向けた発酵阻害因子耐性酵母の分離・育種と固定化酵母利用技術の開発

稲わら等未利用バイオマスからのエタノール生産はエネルギー不足解消の大きなポイントになります。バイオエタノールの効率的な生産を目標に研究を進め、新たな発酵阻害因子耐性酵母の分離・育種や、固定化酵母の利用技術を開発することによって、目標を達成しました。

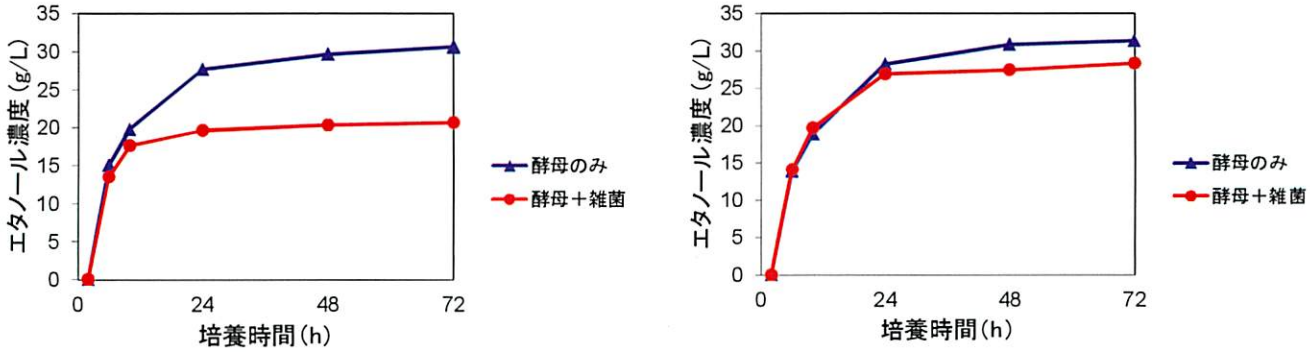
発酵阻害因子耐性酵母は光硬化性樹脂を用いて包括（固定化）した後、前処理した稲わら及び分解酵素とあわせて同時糖化発酵を行います。発酵終了後、固定化担体は回収して再利用します。

1. 発酵阻害因子耐性酵母

発酵工程で発酵阻害因子（ストレス）耐性酵母を利用することにより、生育や発酵の遅延がなくなり、エタノール生産性の向上が望めます。

2. 乳酸を利用した雑菌汚染低減化技術

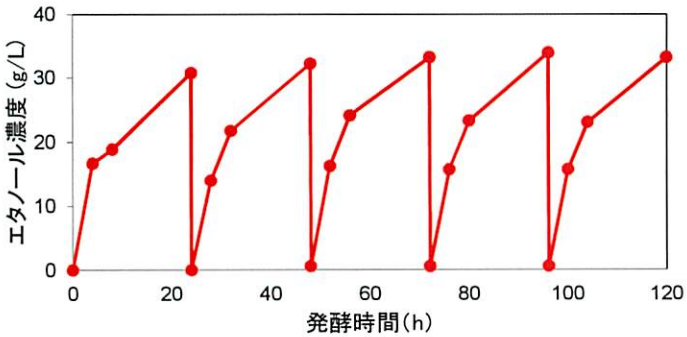
バイオマス糖化液の発酵においては雑菌汚染が課題となっています。糖化液に乳酸を添加することで、雑菌の増殖を抑制し、乳酸耐性酵母や固定化酵母を利用することでエタノールを生産することができます。



乳酸を添加しなかった場合（左）および乳酸を添加した場合（右）

20% 稲わらの同時糖化発酵では、0.8% 程度の乳酸を添加し、固定化酵母で発酵します。

3. 固定化酵母を利用した稲わらの連続同時糖化発酵技術



稲わらの連続同時糖化発酵試験

20% 稲わらを 2 時間部分酵素糖化した後に固定化酵母で発酵した。
24 時間発酵した後、固定化酵母を回収し、次の発酵に使用した。

部分糖化した稲わらと固定化酵母を使用して、安定的な連続同時糖化発酵を行うことができます。固定化酵母の使用により、理論収量の 95% 以上のエタノールを生産することができました。

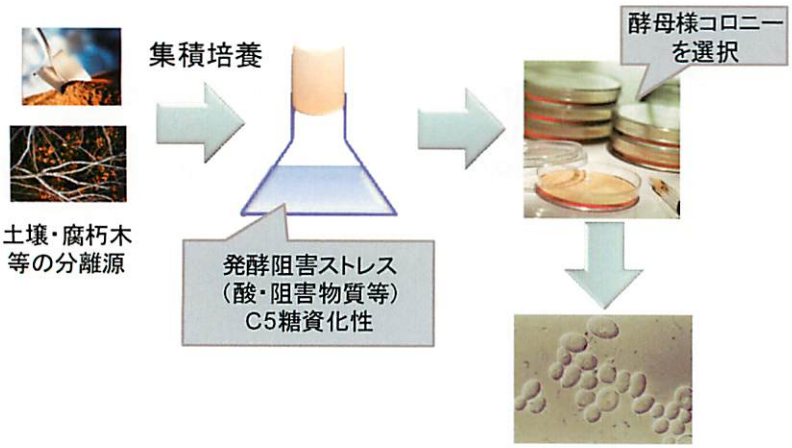
中村敏英、他　アルコール発酵に適した新規酵母及びそれを用いたアルコール製造方法
特許公開番号：2009-142219
Watanabe et al. (2008) J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 35:1117–1122
Watanabe et al. (2009) J. Biosci. Bioeng., 107:379–382

■農研機構 食品総合研究所
中村敏英、安藤　聡（応用微生物研究領域）
■ C050、阻害物質耐性の向上及び発酵阻害物質の制御によるバイオエタノール発酵過程の効率化及び低コスト化に関する研究
中村敏英、安藤　聡
■ TEL：029-838-8066　■ E-mail：nakamrto@affrc.go.jp

稲わら由来糖化液等の発酵の効率化に向けた高機能酵母の開発

稲わら等の未利用バイオマス資源からの国産バイオエタノール生産のコスト削減にとって、糖化プロセスに応じた発酵プロセスの最適化は大きなポイントになります。新規に開発されたCaCCO法やリン酸水熱処理法等の前処理方法に最適な酵母株の開発を目標に研究を進め、腐朽木から、既存の株と比較して優れた特性を有する酵母株を取得することができました。

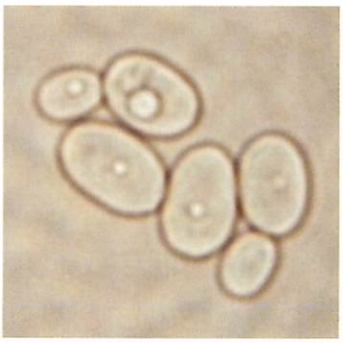
1. 酵母株の検索ソースの整備



優れた特性を有する酵母株の検索には、バラエティーに富んだ特性を有する検索ソースを整備する必要があります。

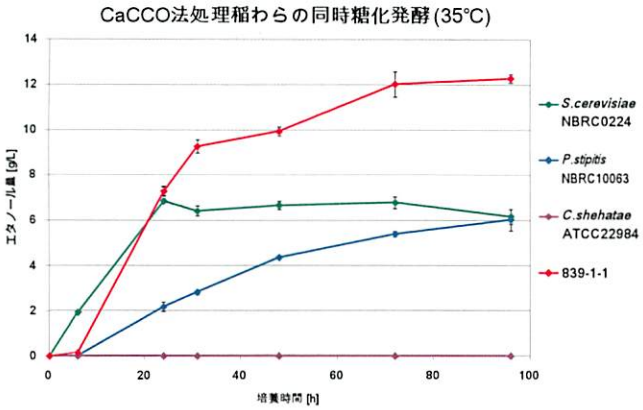
2. *C. shehatae* 839-1-1 株の検索

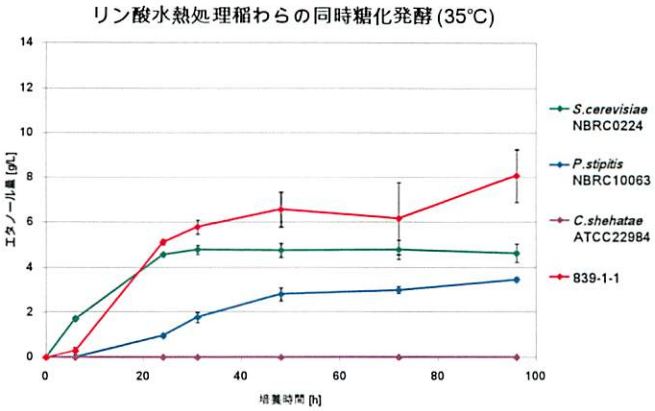
検索ソースから糖化液を発酵する場合に有利な特性である高温耐性及びキシロース資化性を有する839-1-1株を単離しました。839-1-1株を同定したところ、*Candida shehatae* に属する酵母株であるとわかりました。前処理した稲わらの効率的な発酵に役立てることができます。



Candida shehatae 839-1 株の生育形態及び光学顕微鏡写真

3. *C. shehatae* 839-1-1 株の CaCCO 法処理稲わら及びリン酸水熱処理稲わらの発酵適性を実証





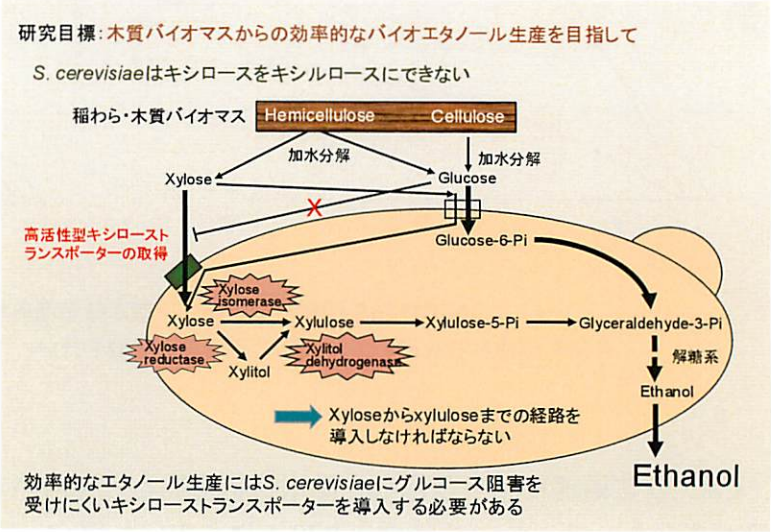
CaCCO 法処理稲わら及びリン酸水熱処理稲わらを用いた同時糖化発酵
各前処理稲わらを用いて、35℃で同時糖化発酵を行い、エタノール生産量を経時的に測定した。

CaCCO 法処理稲わら及びリン酸水熱処理稲わらを用いて同時糖化発酵を行った場合の発酵特性を調べました。*Candida shehatae* 839-1 株を用いた場合、既存の酵母株と比較して、35℃において最も効率よくエタノールを生産することがわかりました。また、発酵の速度も *S. cerevisiae* を用いた場合とほぼ同等でした。

■京都大学 微生物科学寄附研究部門
島　純
■ C051、新規高機能型発酵阻害因子耐性酵母の分離・育種と様々な糖化液発酵への適用
島　純（京都大学　微生物科学寄附研究部門）
■ TEL：075-753-9545
■ E-mail：shimaj@kais.kyoto-u.ac.jp

キシロースを糖源として エタノール発酵する微生物の育種

食糧と競合しない再生可能なバイオマスからのエタノールの生産が期待されています。木質バイオマスや稲わらを糖化した液にはグルコースのほかにキシロースが含まれており、効率的なエタノール生産のためにはキシロースを効率的にエタノールに変換することが重要です。*Saccharomyces cerevisiae* という酵母は、エタノールの生産性、エタノールに対する耐性、安全性という点で極めて優れた微生物です。唯一の欠点は、キシロースを代謝できないということです。キシロースリダクターゼ→キシリトールデヒドロゲナーゼ、あるいはキシロースイソメラーゼを導入し、キシロースを代謝できるように改変した *S. cerevisiae* は数多く報告されています。しかし、キシロースの取り込みはヘキソーストランスポーターによっているため、バイオマスの加水分解物のように多くのグルコースを含む糖液の場合、まずグルコースが取り込まれてからキシロースが取り込まれるため、発酵時間が長くなるという問題がありました。グルコースによって阻害されないキシロストランスポーターを他の酵母で見つけ出し、その遺伝子を *S. cerevisiae* で発現することにより、この問題を解決することを目指しました。

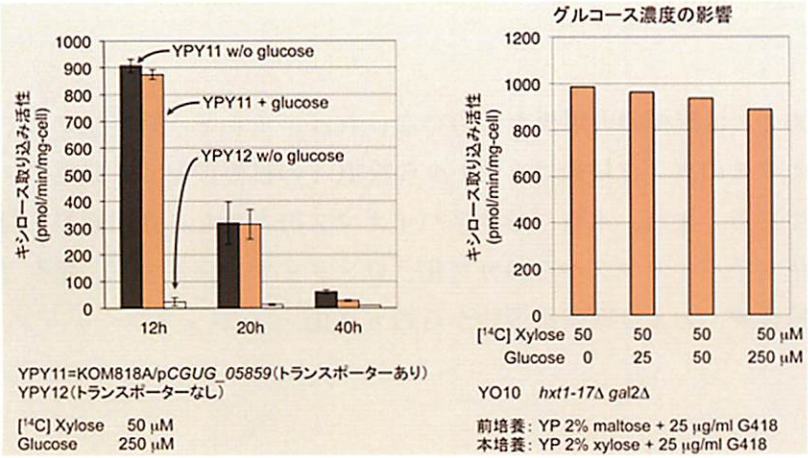


1. グルコース耐性のキシロストランスポーターのスクリーニングとその遺伝子のクローニング

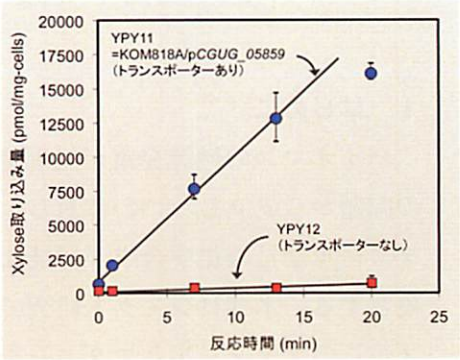
キシロースを代謝することが知られている酵母について、[^{14}C] キシロースの取り込み活性を測定すると *Candida guilliermondii* が高い取り込み能を示し、グルコース存在下でもあまり阻害されてないことが分かりました。*CGUG_05859* 遺伝子を発現させた株はキシロース取り込み能を示しました。

2. *CGUG_05859* 遺伝子がコードするキシロートランスポーターがグルコース耐性である

トランスポーターを導入したYO11株のキシロース取り込みはグルコースでほとんど阻害されないことが明らかとなりました。

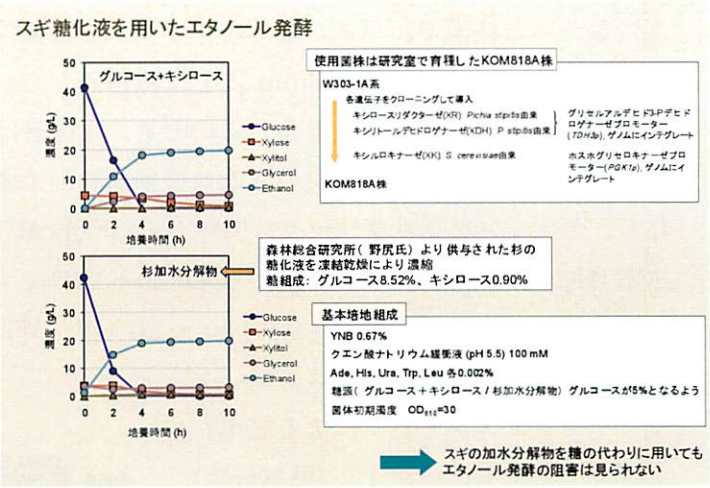


CGUG_05859 遺伝子がコードするタンパク質はキシロートランスポーターである



3. ホストであるKOM818A株はスギの糖化液を糖の代わりに用いてもエタノール発酵の阻害は見られない

木質バイオマスの加水分解液に含まれる夾雑物によって、酵母のアルコール発酵が阻害されることが報告されていますが、ホストとして作成したKOM818A株は純粋なグルコースとキシロースを糖源とした場合と同様の発酵を示しました。



特許出願：特願 2011-37519 キシロートランスポーター活性を有する新規タンパク質および当該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、並びにそれらの利用

■京都工芸繊維大学大学院　工芸科学研究科微生物工学研究室
鈴木秀之

■C091、キシロースを糖源としてエタノール発酵する微生物の育種
鈴木秀之

■TEL：075-724-7763　■hideyuki@kit.ac.jp