

並行複発酵によるバイオエタノール生産を目指した 高温耐性酵母 TJ14 の発酵性能評価

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
原島研究室

長谷川 大 介

【背景・目的】

近年、世界的な環境問題の顕著化により、環境負荷の少ない再生可能なエネルギーの研究開発が活発化している。中でも、農産物や農産廃棄物、廃棄剤などのバイオマスを原料としたバイオエタノールは、世界的なレベルで研究開発や実証試験が行われている。現在使用されている石油・石炭などの化石燃料に代わり、バイオマス由来のバイオエタノールが普及すれば、二酸化炭素の排出削減に多大な効果があると期待できる。これまで、バイオマスの原料として、トウモロコシ、サトウキビなどに代表される食糧穀物を用いたエタノール生産が行われてきたが、食糧との競合や、原料生産拠点の新規開拓による環境破壊が問題となっている。そのため、現在は食糧と競合しない稲わらや建築廃材などの木質・草本系バイオマスを原料としたエタノール生産の研究開発が進められている。しかし、トウモロコシなどから得られるデンプンとは異なり、木質・草本系バイオマスに含まれるセルロース、ヘミセルロースを糖化するには、これらを覆っているリグニンを除去する必要がある。これには多大なエネルギーとコストを要する。また、ヘミセルロースはキシロース、アラビノースなどの五単糖を含むが、エタノール発酵において最もよく用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*（以下酵母）は、この五単糖を資化することができない事も大きな問題である。

これらのバイオマスに対し、本研究で我々が着目したのが、中古の衣服や紡績工場で排出される布くず・糸くずといった繊維系原料である。これらは食糧との競合を回避できるだけでなく、綿繊維はほとんど純粋なセルロースからできているため、脱リグニンも不要である。また分解産物はほぼ全てグルコースであるため、五単糖の問題も避けることができる。こうした理由から、廃棄布類はバイオエタノールの原料として有

望なバイオマスであるといえる。セルロース系バイオマスを発酵原料として用いる場合、並行複発酵を採用することが望ましい。並行複発酵は一つのタンクで糖化と発酵を同時に進行させるため、プラントの設備投資費、維持・操業コストを低く抑えることができるからである。また並行複発酵では、糖化で生じたグルコースを酵母がすぐに消費するため、酵素に対する生産物阻害が回避できる。並行複発酵を用いると、糖化と発酵を異なるタンクで行う単行複発酵よりも高いエタノール収率が得られることが報告されている。一方、並行複発酵の主な問題点として、エタノール生産菌にとって発酵に最適な温度と、糖化に利用される酵素セルラーゼの至適温度との間に大きな隔りがあることが挙げられる。一般的な酵母の発酵最適温度は 30℃ 前後であり、生育可能上限温度は 40℃ 未満である。これに対し、現在使用されている酵素セルラーゼの至適温度は 50℃ 前後であり、酵母が発酵を行える温度域においては活性が大きく低下する。そのため、高温耐性酵母を用いることにより、高温での並行複発酵が実現すれば、エタノール生産効率を飛躍的に向上させることに繋がると期待できる。

これまでに当研究室において、高温耐性を持つホモタリック二倍体株である C3723 から作製されたヘテロタリック一倍体株 HB8-3A と、高温では生育できないが高いエタノール生産性を持つ二倍体株 TISTR5606 の胞子との接合によって、高温耐性をもつ雑種株及びその減数分裂分離株が計 44 株得られている。本研究ではこれらの株を対象に、高温耐性をはじめとした複数の要素を総合的に評価することで、これらのストレス耐性を併せ持つ酵母の育種と、廃棄繊維製品からのエタノール生産の実用化に向けた基盤的な知見を得ることを目的とした。

【実験結果】

1) 雑種株と胞子クローンのエタノール生産性評価

10%グルコース培地において、通常の酵母では生育できない41℃で24時間培養した際のエタノール生産量および培地中の残存グルコース濃度を測定した。41℃の培養では、高温耐性を持たないTISTR5606はほとんどエタノールを生産せず、グルコースも大部分が残存していた(図1-a,b)。また、C3723および胞子クローンは41℃において24時間後にもグルコースの残存がみられ、エタノール生産量もやや少なかった。これに対し、雑種株は完全にグルコースを消費して比較的高いエタノール生産量を示し、なかでもTJ14株は最も高いエタノール生産量を示した(理論値の90%以上)。これらの結果から、最も優れたエタノール生産性を持つ株としてTJ14を選抜した。

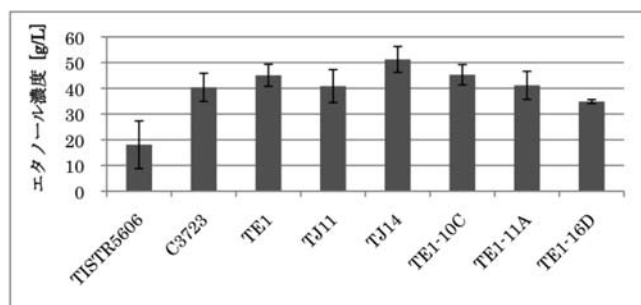


図1-a. 41℃で24時間培養後のエタノール生産量

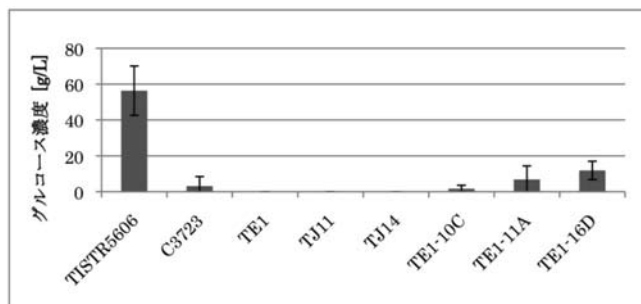


図1-b. 41℃で24時間培養後のグルコース残存量

2) 雑種株TJ14と親株の耐熱性評価

【長時間培養における高温耐性評価】

実際のエタノール生産では長期間の培養が想定される。そこで、高温での長時間培養への適性を、高温下での生存率を測定することで評価した。十分に生育させた菌体を41℃に曝し、その後の菌体の生存率を比較した。

図2に示したように、高温耐性を持たない親株のTISTR5606株は時間を経る毎に生存率が徐々に低下した。また、高温耐性を持つ親株のC3723株は、

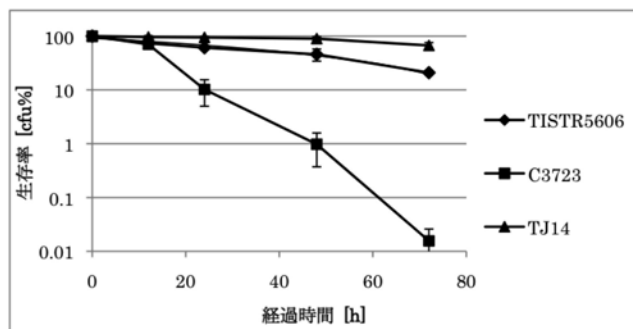


図2. 41℃における生存率の推移

TISTR5606株以上の速度で菌体が死滅していき、41℃で旺盛に増殖するものの、長時間高温にさらすと生存率がTISTR5606以上に低下することがわかった。これに対し雑種TJ14株は60時間以上培養しても100%近い生存率を示した。これらの結果より、雑種TJ14株は41℃において親株C3723よりも安定した高温耐性を持つことがわかった。なお、この時使用した培地に含まれるグルコース濃度は20g/lであるため、培地中に存在するエタノール濃度は10.2g/l未満である。

【耐熱ショック性】

間欠的な熱ショックへの耐性を評価するため、十分に生育させた菌体を45℃、50℃、55℃の各温度に30分間放置した後の生存率を両親株と比較した結果を図3に示した。TISTR5606が、45℃において60%程度の生存率しか示さなかったのに対し、C3723およびTJ14は100%近い生存率を示した。また50℃において、TISTR5606は1%未満の生存率となったが、C3723は20%以上、TJ14は40%近い生存率を示した。さらに、55℃ではいずれの株も著しく低い生存率となったが、TJ14株は最も高い生存率を示した。TJ14株は、高温耐性である親株C3723よりもさらに強化された耐熱性を持つと考えられた。

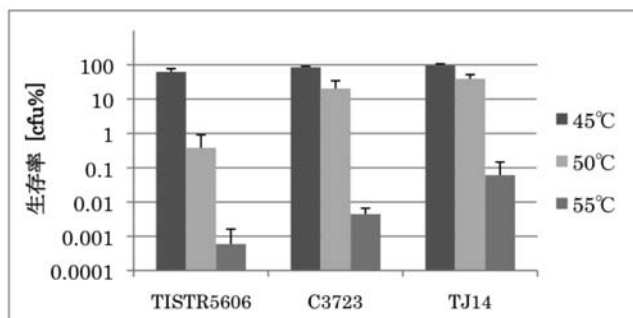


図3. 45、50、55℃での熱ショック後の生存率

3) 雑種株 TJ14 による並行複発酵

綿繊維を原料としたエタノール生産に向けたモデル実験として、TJ14 株を用いたセルロースを基質とした並行複発酵を行った。10%セルロースを基質とした並行複発酵培地を用い、41℃で24時間振とうしながら糖化のみを行った後、30℃で一晩前培養した TJ14 株を植菌した。

発酵開始後、糖化で蓄積されたグルコースが消費されて、エタノールが2.5%まで蓄積した(図4)。その後およそ24時間は培地中のグルコース濃度が増加しなかったことから、セルラーゼの糖化によるグルコース生産速度よりも、酵母によるグルコース消費速度の方が早いことがわかる。また、発酵開始から約50時間経過すると、エタノールの蓄積が停止した。その後、糖化によってグルコースが再度蓄積しても発酵は再開しなかった。この時の培地中の生菌数を見ると、植菌後24時間までは増殖が続くが、40時間を超えると、酵母が急激に死滅を始めていることがわかった。TJ14は72時間の41℃への暴露には耐性を示す(図2)ことがわかっているため、培養液中にエタノールが蓄積したことと、41℃に長時間暴露したことによる相乗効果であると考えられた。そこで、培養温度を2℃落とし、39℃で同様の試験を行った(図5)。また、培地中に蓄積するエタノールの影響を避けることで菌体の死滅を回避できるかどうかを調べるため、24時間ごとに新しい培地に菌体を植え替える、連続継代回分培養(後述)を行った。

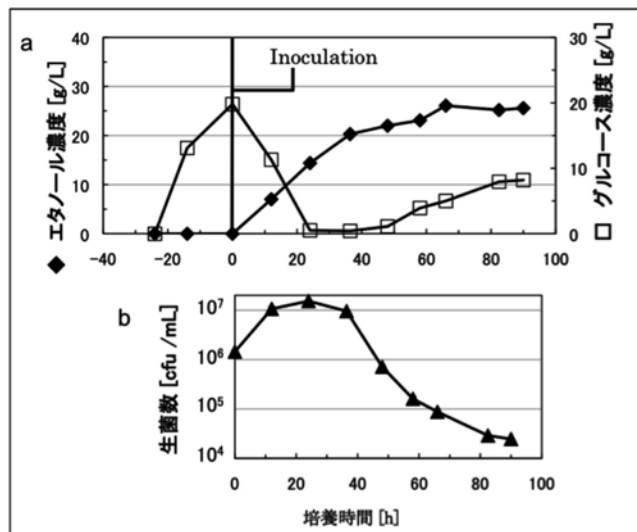


図4. TJ14を用いた41℃での並行複発酵における培養液中のエタノールおよびグルコースの蓄積量(a)と、生菌数の推移(b)

39℃での並行複発酵を行った結果、培養を100時間継続しても生菌数は減少せず、4.5%のエタノールを得ることができた(図5)。これは、基質として加えたセルロースの79%をエタノールに転換できたことになる。

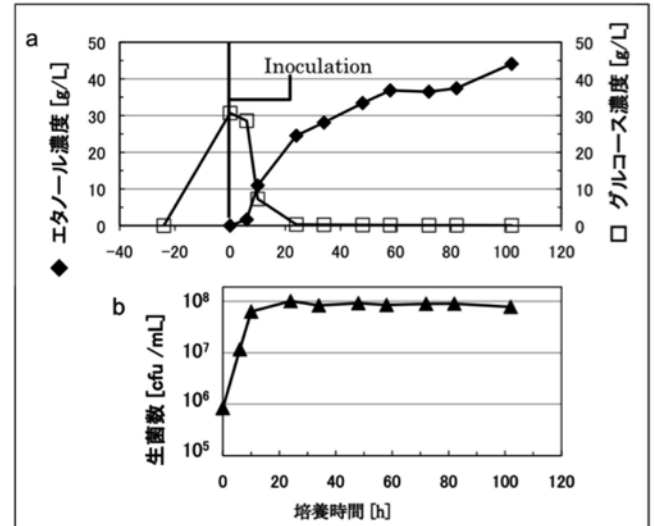


図5. TJ14を用いた39℃での並行複発酵における培養液中のエタノールおよびグルコースの蓄積量(a)と、生菌数の推移(b)

4) 雑種株 TJ14 による連続継代回分培養

培地中に蓄積するエタノールの影響を避けることで、41℃での長期間の培養が可能になるかを検証するため、24時間ごとに菌体を新しい培地に植え継ぎ、回分培養を繰り返した。10%グルコースを基質とするYPD液体完全培地で、植え継ぎを10回繰り返した。

図6に示した通り、連続継代回分培養の結果、エタノールを含まない新しい培地に植え継ぐことで、41℃でも長期間の発酵が可能であった。しかし、10回の植え継ぎを繰り返した240時間後には、得られるエタノール濃度が20%減少した。3回目の植え継ぎ後

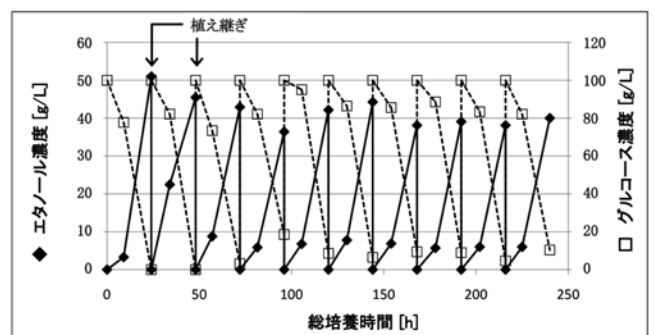


図6. TJ14を用いた41℃での連続継代回分培養

以降では、グルコースも消費されず残存していた。この結果より、TJ14 は、限界生育温度である 41℃ に長期間曝されると発酵能が低下することがわかった。対照として、並行複発酵を成功裏に行うことができた 39℃ で、同様の実験を実施した結果（図 7）、植え継ぎを 10 回繰り返し、240 時間に渡って発酵を続けても TJ14 の発酵能は低下しなかった。

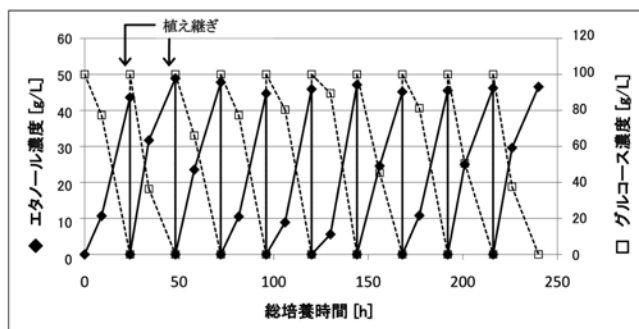


図 7. TJ14 を用いた 39℃での連続継代回分培養

【考察】

本研究では、当研究室で育種された高温耐性を持つ 7 株の雑種株と 44 株の高温耐性を持つ減数分裂分離株を対象に、エタノール生産性を比較することで雑種二倍体株 TJ14 を選出した。

TJ14 によるセルロースを基質とした並行複発酵により、10%のセルロースから、41℃ではおよそ 70 時間で 2.5%、39℃では 100 時間で 4.5%のエタノールを生産することができた（図 4、5）。これまでに、*Scerevisiae* によるセルロース系バイオマス为原料とした並行複発酵によるエタノール生産はいくつかの報告がある。Hari Krishna (2000) らの報告によると、10%セルロースに相当する木質バイオマスから、40℃において 48 時間で 2.1%、72 時間までに 2.2%のエタノールを生産した *Scerevisiae* の NRRL-Y-132 株があるが、TJ14 はこの報告を上回る 2.5%のエタノールを 41℃で生産できた。また、*Scerevisiae* よりも強力な高温耐性を持つとして近年その存在感を増している *Kluyveromyces* 属の酵母 NCIM3358 株による並行複発酵では、43℃での並行複発酵が試みられているが、10%のセルロースから生産できたエタノールは 3.5%（理論収率の 61%）に留まっている。Hui Li (2009) らの研究で、同様に 10%セルロースを基質とした並

行複発酵により、38℃で 5%程度のエタノールが生産されているが、この報告の中では、糖化で生じたグルコースを消費し切れていない。これらに対し TJ14 は、39℃による並行複発酵で 4.5%のエタノールを生産し、しかも糖化で生じたグルコースをすべて消費しており、糖化速度の改善により、さらなる収率向上を見込むことができる。本研究では、*Scerevisiae* によるセルロース系原料を基質とした並行複発酵によるエタノール生産としては、これまで報告されている中では最も高い温度で、最大濃度のエタノールが得られており、TJ14 は、現存するエタノール生産菌としては極めてポテンシャルの高い株であると推察される。

また、41℃での並行複発酵の結果、TJ14 は 2%あまりのエタノールが蓄積した時点で生菌数が大きく落ち込み、発酵能が失われた（図 4）。また、TJ14 の発酵能は、新しい培地に植え継ぎ蓄積するエタノールの影響を避けることで維持されたが、時間とともに低下した（図 6）。バイオエタノール生産において、株の発酵能が維持されない場合、それぞれの培養ごとに菌体を供給する必要があるため、接種菌体の準備にコストとエネルギーがかさむことになる。TJ14 は、39℃で培養を行うと、100 時間後まで並行複発酵を継続できた（図 5）。エタノールを連続的に取り出し、培養液中のエタノール濃度を 5%以下に保てば、TJ14 は新しく接種することなく 39℃で連続利用可能である。他方、これまでに、培養液中のエタノール濃度を制御しつつ並行複発酵を行うことのできるシステムが開発されている（Moukamnerd et al., 2010）。このシステムでは、気相を循環させ、連続的にエタノールを回収し、バイオマスを逐次的に投入することで、菌体と酵素を実質的に再利用することができる（図 8）。このようなシステムを応用し、TJ14 を生産菌として用いることで、セルロース为原料としたエタノール生産プラントの実現が期待できる。

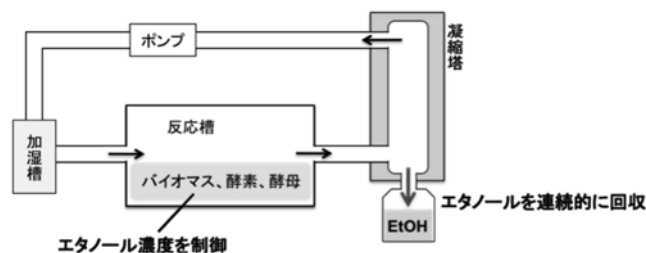


図 8. 固体連続併行複発酵 (Moukamnerd et al., 2010)

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会（JSPS）、タイ国家学術調査委員会（NRCT）、タイ国科学技術省（NSTDA）による共同プログラム「亜熱帯微生物資源を活用する次世代物造りバイオ技術の構築」の一部支援を受けて実施された。

【引用文献】

- Hari Krishna S., Janardhan Reddy T., Chowdary G.V., Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology* 77 (2003) : 193-196
- Hui Li, Nag-Jong Kim, Min Jiang, Jong Won Kang, Ho Nam Chang, Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology* 100 (2009) : 3245-3251

Moukamnerd C, Kino-oka M, Sugiyama M, Kaneko Y, Boonchird C, Harashima S, Noda H, Ninomiya K, Shioya S, Katakura Y., Ethanol production from biomass by repetitive solid-state fed-batch fermentation with continuous recovery of ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (2010) : 87-94



(株) NEC 情報システムズ勤務
先端技術ソリューション事業部
アプリケーション構築基盤グループ

(応用生物 平成 21 年卒 23 年前期)