

# アルコールの高効率生産微生物の育種に関する研究

－高温・エタノール耐性変異株による高濃度エタノールの製造－

食品工業部

江口良寿

バイオエタノールの高効率生産技術の開発を目的として、これまでに流加培養システムの構築及び発酵原料の高発酵性糖液の製造技術を開発し、短時間で高エタノール濃度の発酵もろみが製造可能となった。しかしながら、これまでの研究では従来の清酒酵母を用いていたために、高濃度アルコールの発酵もろみを得るためには発酵温度を低下させる必要があったことから、より高温でも高濃度アルコールの発酵もろみが製造可能となる高温耐性を有する酵母の取得を昨年度に行い、高温耐性となった変異株を取得することができた。この得られた高温耐性変異株を用い流加培養システムによる発酵試験を行ったところ、高発酵性糖液を用いなくとも 84 時間で約 19%濃度のエタノールを有する発酵もろみが製造できたことから、高温耐性の付与により発酵温度を低下させることなく、さらに高いエタノール濃度の発酵もろみの製造が可能となったことがわかった。

## 1. はじめに

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。その中でも、農産物や農産廃棄物、廃木材などを原料としたバイオエタノールは世界的に研究開発や実証試験が行われている。現在行われている研究としては、木質系バイオマスの高効率な糖化、C5糖（キシロースなどの炭素数5の糖）発酵性微生物の育種、遺伝子組み換え細菌による高効率アルコール発酵などの技術開発やエネルギー作物としての農産物の開発などが挙げられる。

このような動きは全国的に広がっており、（独）産業技術総合研究所や大手プラントメーカーを中心とした木質系バイオマスからのバイオエタノール製造をはじめとして、コメ、小麦、こうりゃんなどの農作物や糖蜜からのエタノール製造・実証試験が進められている<sup>1)~3)</sup>。

現在実施されているアルコール発酵では、酵母を用いて10%程度のアルコールを製造し、これを蒸留して90%以上のバイオエタノールを製造している。しかしながら、この製造方法では発酵によって得られるアルコール濃度が低いため、発酵装置や蒸留装置、廃水処理施設が巨大化するため、発酵・蒸留・廃水処理に関する投与エネルギー量が膨大になる問題がある。この問題を解決するには、発酵により得られる発酵もろみのアルコール濃度を高くする必要があり、その原料である発酵原液の糖濃度も高める

必要がある。しかしながら、糖濃度を高くすると高糖圧迫により酵母が発酵阻害を受け、単発酵で14%以上のアルコールを得ることは一般的に困難となっている。

一方、清酒醸造では低温での発酵という制限はあるものの、清酒醪（もろみ）では18~20%のアルコールが製造されている。これは清酒醸造が並行複発酵と呼ばれるデンブンの液化・糖化とアルコール発酵が醪中で同時に進行する発酵形態であることによる。そのため、醪中の糖濃度は発酵期間中1~2%程度に抑えられ、酵母が高糖圧迫を受けずにアルコール発酵できる。このような並行複発酵のメカニズムが知られているにもかかわらず、現在でも一般的なアルコール発酵によってバイオエタノールが製造されているのは、並行複発酵による高濃度アルコール発酵には低温が必要であり、そのため発酵期間が長くなり、発酵システム全体としては発酵効率が悪くなるためである。また、現在の並行複発酵はデンブン質でのみ実施可能であり、糖蜜や廃木材等を原料として糖化した原料については実施できないことも一要因であった。

昨年度までの研究において、並行複発酵を擬似的に再現可能な流加培養システムの構築と米由来高発酵性糖液の製造技術を開発し、エタノール濃度が48時間で18%、66時間で20%の発酵もろみを製造可能とした。しかしながら、本システムでは使用している酵母が従来の清酒酵母であるために、高濃度アル

コールの発酵もろみを製造するには発酵温度を低下させる必要があった。発酵温度の低下は初期の発酵速度の低下を招き発酵時間の延長を引き起こすばかりか、発酵熱の除去のための冷却を必要とすることから冷却コストが増大する。従って、エタノール発酵を高効率に行わせるには高温耐性に優れた酵母の育種が必要になると考えられる。しかしながら、これまで研究されてきた酵母の高温耐性菌及びアルコール耐性菌の取得は酒類製造を目的<sup>4)~7)</sup>とするものが多く、バイオエタノール製造を目的<sup>8)~9)</sup>としたものは少ない。そのため、昨年度に高温耐性及びアルコール耐性の双方の性質を同時に有する変異株の取得を行った。

本研究では、昨年度取得した高温及びエタノール耐性酵母を用いて流加培養システムによる発酵試験を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌株及び培地

酵母菌株は昨年度取得した高温・エタノール耐性変異株の H2023-4 (協会 9 号酵母由来; 変異株 No. 4) とその親株の協会 9 号酵母を用いた。これらの菌株は MY 培地 (酵母エキス 0.3%, 麦芽エキス 0.3%, ペプトン 0.5%, グルコース 1.0%) でそれぞれ培養して実験に用いた。また、酵母エキス, 麦芽エキス, ペプトンをそれぞれ 2 倍とした 2MY 培地 (酵母エキス 0.6%, 麦芽エキス 0.6%, ペプトン 1.0%) のグルコース濃度をそれぞれ 20% (2MY20), 15% (2MY15) とした培地を前培養, 開始培地とし, MY 培地のグルコース濃度を 55% (MY55) とした流加培地を用いた。

### 2.2 流加培養システム

流加培養システムは平成 19 年度に開発したシステムを用いた。すなわち, 東京理化学器械株式会社製

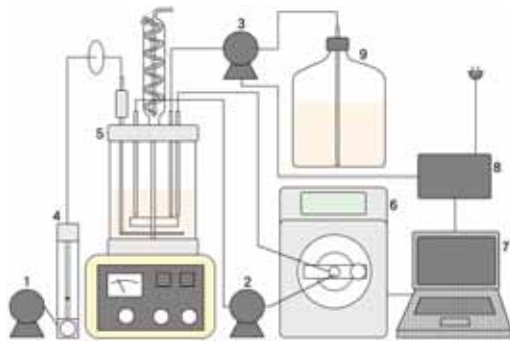


図 1 流加培養システムの概略図

1 : 送気ポンプ, 2, 3 : 送液ポンプ (P-1), 4 : 流量計, 5 : ジャーファーマンタ (M-100), 6 : Brix測定装置, 7 : 制御コンピュータ, 8 : リレーユニット, 9 : リザーバタンク

MINI JARFERMENTOR M-100 にアタゴ社製 RX-5000 をフローセルに改造した Brix 測定装置 (RX-5000FA) 及び GE Healthcare Bio-Sciences AB 社 Peristaltic Pump P-1, 株式会社システムサコム販売の USB-TMI-AC10Aa, 制御用コンピュータ (OS:Windows 2000 Professional) を用いて構築した (図 1)。また, 制御プログラムは Microsoft 社製 Visual Basic 6.0 で作成して用いた。

### 2.3 流加培養システムによる発酵試験

グルコース濃度を 15% とした開始培地 900ml をジャーファーマンタに入れ, これに 2MY20 培地で 12 時間振とう培養した酵母培養液 15ml を添加した後, 30°C で培養を開始した。10 秒毎に培養液の Brix 糖度を測定し, 設定した Brix 濃度以下になった時点で流加培地を添加して培養液の Brix 濃度を一定に保ちながら培養を行った。規定量の流加培地を添加後さらに培養を行い, Brix 濃度の低下が認められなくなってから 6 時間後, または発酵もろみのグルコース濃度が 0.1% 以下となったときを発酵終了とした。

### 2.4 発酵もろみの分析

発酵もろみのアルコール濃度は株式会社島津製作所製ガスクロマトグラフィー GC-A9 によるアセトン内標とした 1 点検量線法で, グルコース濃度は株式会社アークレイ ファクトリー社製グルテストエース R により測定し, 菌体量は培養液 1.0ml 中の菌体の湿重量とした。

### 2.5 流加プログラム

開始培地への流加培地 (高濃度糖液) の流加は開始培地の糖濃度が低いことから Brix が 1.1 低下後に開始し, 流加培地量を 600 ml とした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 親株 (協会 9 号酵母) による発酵経過

図 2 に親株の協会 9 号酵母での 30°C における発酵経過を示す。親株では高温・エタノール耐性がない (弱い) ために, 発酵後期にエタノール生産性が低下し, 途中で発酵が停止した。そのため, 約 1% (848 mg/dL) の残糖があるにもかかわらず, 到達エタノール濃度は 17.2% であった。また, 菌体密度は 42 時間の最高値 38.8 mg/ml から 21.0 mg/ml と 54% 程度に低下しており, 16 から 17% 程度のエタノール濃度でも菌体の死滅が起きていることが示唆された。そのため, 72 時間以降は Brix の低下が認められず, また, エタノール濃度の上昇も認められていない。

### 3.2 高温耐性酵母による発酵経過

図 3 に H2023-4 での 30°C における発酵経過を示す。

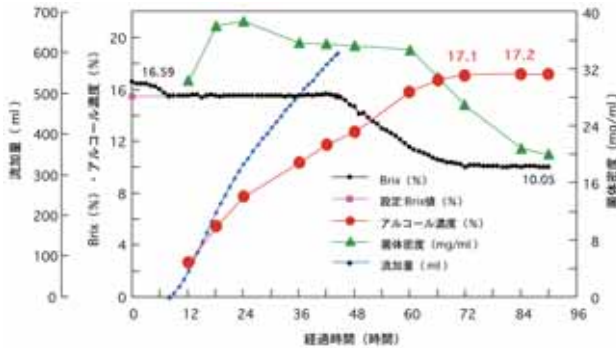


図2 親株（協会9号酵母）による発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：55%グルコースMY培地600ml，酵母菌株：協会9号，発酵温度：30.0℃，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

耐性株では親株と比較して発酵初期及び中期に発酵速度の向上は認められなかったが，発酵後期では発酵速度の低下がなく，最終的にはエタノール濃度が18.8%に到達した．このときの残糖は52 mg/dL (0.052%) であり，原料糖が不足したために発酵が停止したものと考えられた．そのため，糖濃度が十分であったならさらにエタノール濃度が向上していたと推測される．また，菌体密度は最高でも24時間の35.5 mg/mlと親株に比較し低い値であったが，親株では60時間以降に菌体密度の急激な低下が認められたものの，耐性株では菌体密度の低下が72時間以降と遅く，発酵終了時のエタノール濃度18.8%においても最高値の60%以上を保っていた．従って，この耐性菌によるエタノール濃度の上昇は，アルコール発酵に伴う生成エタノールによるフィードバック阻害を受けにくくなったことによるものではなく，エタノール濃度に対してより高い抵抗性を持つことで，死滅する菌体の減少によってエタノール発酵が継続されることによると推察される．

#### 4. おわりに

高温とエタノールに対して抵抗性を有する耐性変異株を用いることで30℃での発酵でもアルコール濃度約19%の発酵もろみを得ることが可能となった．本耐性変異株は38℃での試験管発酵試験において30℃における親株の発酵速度に匹敵する発酵速度を有していたこと<sup>10)</sup>から，至適発酵（生育）温度が上昇していることが示唆されたが，実際には高温・エタノール耐性が向上したことによって死滅するエタノール濃度がより上昇したことによるものと推測された．実際，本耐性変異株の発酵経過は平成19年度に実施した28.5℃の経過（図4：再掲）と非常に似ており，

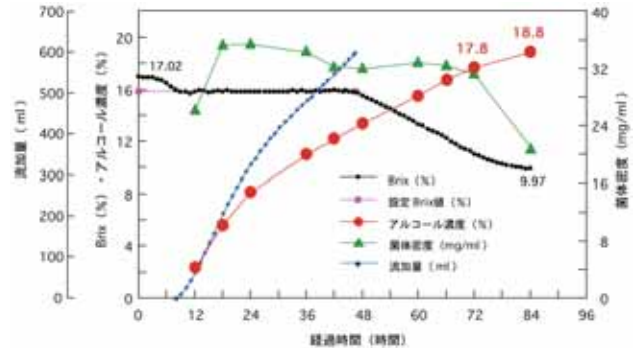


図3 耐性変異株による発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：55%グルコースMY培地600ml，酵母菌株：H2023-4，発酵温度：30.0℃，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

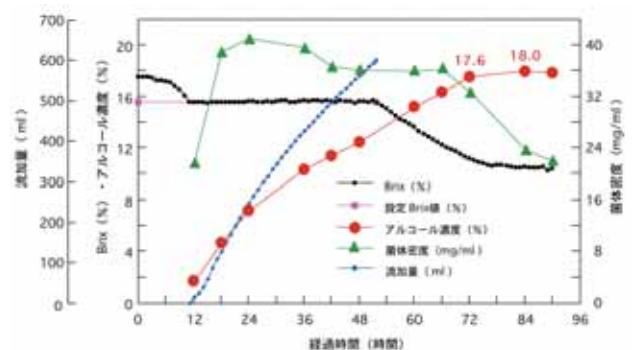


図4 親株による発酵経過（28.5℃：再掲）

開始培地：16%グルコース2MY培地900ml，流加培地：55%グルコースMY培地600ml，酵母菌株：協会9号，発酵温度：28.5℃，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

このことからエタノール濃度の上昇が死滅する菌体の減少に基づくものと考えられる．より高濃度アルコールの発酵もろみを製造するためには発酵期間を延長する必要があり，発酵期間をより短縮するためには本耐性変異株とは異なるタイプの耐性変異株の取得が必要となる．しかしながら，本耐性変異株は発酵温度を低下させなくても親株より高濃度エタノールの発酵もろみを製造できることから，親株より高温耐性の向上した変異株の取得といった目的を達成できたといえる．今後は育種した耐性変異株を用いて高温条件下でのエタノール生成についてさらに検討を行っていく予定である．

#### 参考文献

1) Francisco B. Pereira・Pedro M. R. Guimaraes・Jose A. Teixeira・Lucilia Domingues: Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strain for efficient very

high gravity bio-ethanol fermentation processes, *Biotechnol Lett*, 32, 1655-1661 (2010)

2) 木本浩介: 木質原料からのバイオエタノール製造プロセス, 三井造船技報 No. 201 (2010-10)

3) Francisco B. Pereira, Pedro M.R. Guimaraes, Jose A. Teixeira, and Lucilia Domingues: Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 130-136 (2011)

4) 高アルコール生産酵母の育種, 国税庁長官, 特開平10-215860 (1998)

5) アルコール、糖および高温に耐性な新規酵母株およびそれを使用する酒類の製造方法, 大関株式会社, 特開平10-262652 (1998)

6) 果糖資化性酵母, 鹿児島県, 特開2003-169667 (2003)

7) 新規な醸造用酵母, 七尾淳也, 特開2006-67812 (2006)

8) 耐熱性エタノール生産細菌及び耐熱性エタノール生産最近を用いたエタノール生産方法, 国立大学法人山口大学, 特開2009-60836

9) 耐熱性エタノール生産酵母及びこれを用いたエタノール生産方法, 国立大学法人山口大学, W02008/062558

10) 江口良寿, 平成21年度研究報告書 (2010)

※本研究は平成22年度に実施しましたが, 知的所有権取得のため掲載を遅らせて平成23年度の報告書に掲載しました。