

# 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2－

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。また、高温耐性を有する酵母変異株を取得することで、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。しかしながら、エタノール生成速度には変化が認められず、より高濃度エタノールの発酵もろみを製造するためには発酵時間の延長が必要であった。また、得られた高温耐性変異株は発酵温度を 39℃、40℃とした高温条件下での発酵試験において、それぞれ 47 時間で 12.0%、45 時間で 10.7%のエタノールを含有する発酵もろみの製造が可能であった。

### 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については、研究開発や実証試験が活発に行われている。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>。

しかしながら、これらの研究開発では、原料からの糖化効率や高糖圧迫による発酵阻害の問題もあり、発酵もろみのアルコール濃度は10%程度にとどまっている。そのため、発酵槽や蒸留装置、排水処理施設等が巨大になり、投与エネルギー量や低コスト化に多くの課題を残している。

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プンの液化・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

ることで、酵母細胞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、そのために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プ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。

以上のような背景から我々は、これまで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、このシステムで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り、このことが大きな課題であった。すなわち、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というものである。

エタノール発酵を高効率に行わせるため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が、これまで研究されている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。そこで本研究では、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を育種し、育

種した耐性変異株および流加培養システムを用いた高温発酵試験を行い、高温条件下での高効率エタノール製造について検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試菌株及び培地

酵母菌株は平成 21 年度に取得した高温・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 2MY20 培地（酵母エキス 0.6%，麦芽エキス 0.6%，ペプトン 1.0%，グルコース 20%）でそれぞれ培養して、実験に用いた。また、流加培養システムを用いた発酵試験には、2MY15 培地（酵母エキス 0.6%，麦芽エキス 0.6%，ペプトン 1.0%，グルコース 15%）を開始培地として、1/2MY50 培地（酵母エキス 0.15%，麦芽エキス 0.15%，ペプトン 0.25%，グルコース 50%）を流加培地としてそれぞれ用いた。

### 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 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 社製 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）を用いて構築したものである（図 1）。また、制御プログラムは Microsoft 社製 Visual Basic 6.0 で自作した。

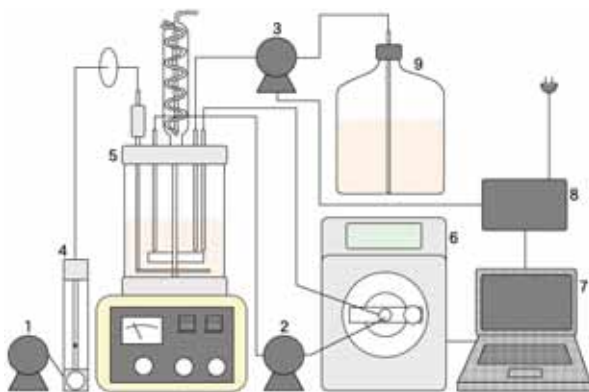


図 1 流加培養システムの概略図

1：送気ポンプ，2，3：送液ポンプ（P-1），4：流量計，5：ジャーフェルメンタ（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

### 2.3 流加培養システムによる発酵試験

開始培地 900ml をジャーフェルメンタに入れ、これに 2 MY20 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、39℃又は 40℃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（150ml）の流加培地の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 時間後または発酵開始後 48 時間経過し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、流加を開始し、流加培地量を 150 ml とした。

### 2.6 前培養

前培養は、2 MY20培地に協会 9 号酵母及びH2023-4をスラントから 1 白金耳接種し、36から48時間30℃で振とう培養し、この培養液0.1mlを新しい 2 MY20培地 7.5mlに接種して、以下の（1）～（12）の条件で培養した。（1）30℃で72時間静置培養，（2）30℃で60時間静置培養した培養液0.1mlを7.5mlに接種し、30℃で12時間振とう培養，（3）30℃で60時間静置培養後，4℃で12時間静置，（4）30℃で24時間振とう培養，4℃で72時間静置した培養液0.1mlを7.5mlに接種し，30℃で12時間振とう培養，（5）30℃で24時間振とう培養後，4℃で72時間静置，（6）30℃で14時間振とう培養後，4℃で82時間静置した培養液0.1mlを7.5mlに接種し，30℃で12時間振とう培養，（7）30℃で14時間振とう培養後，4℃で82時間静置，（8）15℃で96時間静置培養した培養液0.1mlを7.5mlに接種し，30℃で12時間振とう培養，（9）15℃で60時間静置培養後，30℃で12時間振とう培養，（10）15℃で108時間静置培養，（11）15℃で60時間静置培養後，30℃で12時間振とう培養し，その後4℃で45日間静置，（12）15℃で60時間静置培養後，30℃で12時間振とう培養後，4℃で45日間静置。

### 2.7 試験管培養試験

調製したそれぞれの培養液 0.1ml を新しい 2MY20 培地 7.5ml に接種し、40℃で振とう培養して経時的にその全重量を測定することで炭酸ガスの発生量を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 39°Cにおける発酵経過

図 2 に 39°Cにおける発酵経過を示す。39°Cでは 30°Cに比較して菌体密度が全体的に低下するものの、到達エタノール濃度は 12.0%となった。また、菌体密度は 36 時間以降低下しており、11%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、発酵温度の上昇は酵母菌株に大きなストレスとなっていることが示唆された。

#### 3.2 高温発酵における前培養条件の影響

流加培養試験を行っているとき、時として到達エタノール濃度が向上しないことがたまに発生し、この現象の原因を明らかにするために、高温発酵における前培養条件の影響について検討した。

前培養条件を変更したH2023-4の40°Cにおける発酵経過を図 3 に示す。前培養条件を変更することで、発酵経過に大きな差が生じている。48時間における炭酸ガス発生量が多かった前培養条件は、30°Cで24時間振とう培養後、4°Cで72時間静置した場合、30°Cで14時間振とう培養後、4°Cで82時間静置した場合、15°Cで60時間静置培養後、30°Cで12時間振とう培養した場合の3条件であった。また、最も炭酸ガス発生量の少なかったものと比較して約0.1g（エタノール濃度約1.3%）の差が生じていた。これが育種した耐性株に特有の現象なのかどうかを確認するため、親株及び耐性株の前培養条件を30°Cで48時間振とう培養、15°Cで60時間静置培養後に30°Cで12時間振とう培養した培養液0.1mlを新しい2MY20培地7.5mlに接種して、40°Cにおける発酵経過について検討を行

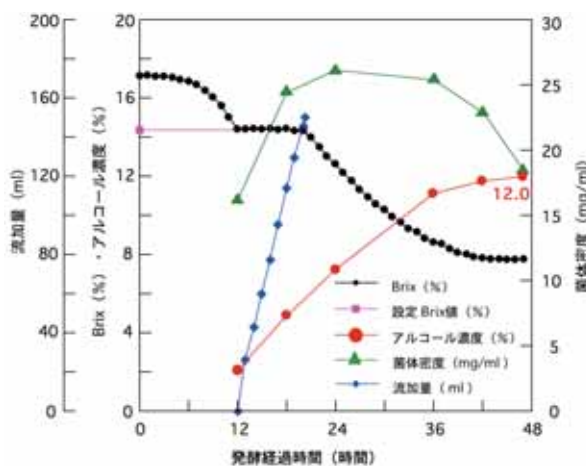


図 2 39°Cにおける発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：50%グルコースMY培地150ml，酵母菌株：H2023-4，発酵温度：40.0°C，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

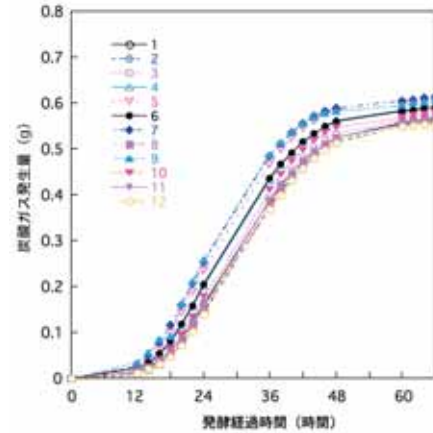


図 3 40°C発酵における前培養条件の影響

培地：2MY20培地7.5ml，培養液添加量：0.1ml，酵母菌株：H2023-4，発酵温度：40.0°C，攪拌速度：150rpm，グラフ中の番号は2.6 前培養に記載

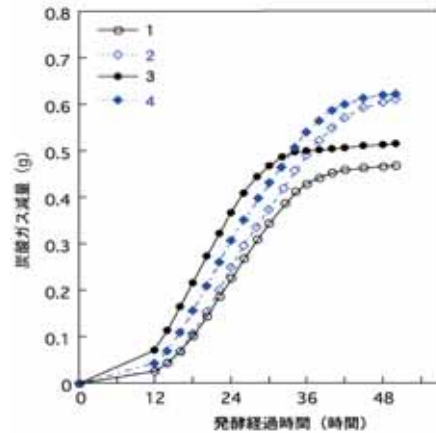


図 4 菌株の違いにおける前培養条件の影響

培地：2MY20培地7.5ml，培養液添加量：0.1ml，酵母菌株：協会901号酵母，H2023-4，発酵温度：40.0°C，攪拌速度：150rpm，1：協会901号酵母を30°Cで24時間振とう培養，2：H2023-4を30°Cで24時間振とう培養，3：協会901号酵母を15°Cで60時間静置培養後，30°Cで12時間振とう培養，4：H2023-4を15°Cで60時間静置培養後，30°Cで12時間振とう培養

った。図 4 に示すように、親株自体にも同様の効果があることがわかる。しかもその効果は親株の方が高く、また、初期の発酵速度は耐性株と同等であることから前培養条件を適正に管理することで、変異株を育種することなく酵母菌株にある程度の高温耐性を付与できることが可能となる。

#### 3.2 40°Cにおける発酵経過

前培養条件が酵母菌株の高温耐性に影響していることがわかったことから、前培養を30°Cで24時間振とう培養したH2023-4株と15°Cで60時間静置培養後、



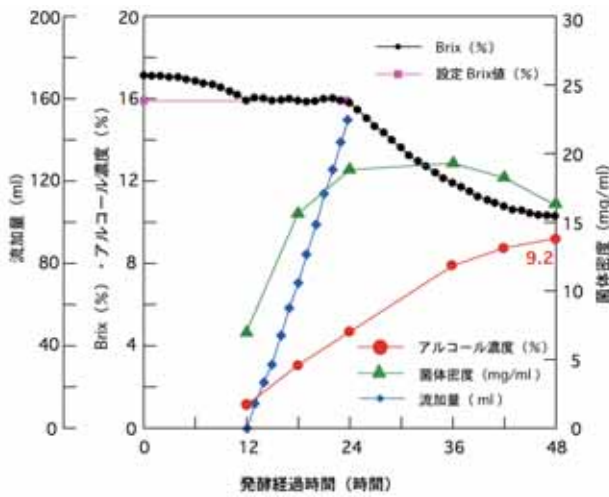


図5 40°Cにおける発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：50%グルコースMY培地150ml，酵母菌株：H2023-4（前培養：30°C，24時間振とう培養），発酵温度：40.0°C，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

30°Cで12時間振とう培養したH2023-4株とで流加培養システムを用いた発酵試験を行った．その結果を図5，6に示す．40°Cでの発酵試験では，前培養を30°Cで12時間振とう培養とした場合（図5）は，全体的に発酵に時間がかかり，48時間の培養でも到達エタノール濃度は約9%と低いものであった．菌体密度も20mg/mlに達しておらず，菌株がかなりのストレスを受けていることが示唆された．一方，前培養を15°Cで60時間静置培養後，30°Cで12時間振とう培養とした場合（図6）には，エタノール濃度が順調に増加し，45時間で10%を超えるエタノール濃度の発酵もろみの製造が可能であった．また，菌体密度も30°Cで12時間振とう培養した場合よりも向上しており，前培養条件の変更のみで，酵母菌株にストレス抵抗性を付与できることがわかった．

#### 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，39°Cで12%，40°Cでも10%を超えるアルコール濃度の発酵もろみを得ることが可能となった．親株及び本耐性変異株は前培養条件によって影響を受け，高温耐性に差が生じる．高温条件下で高いエタノール濃度の発酵もろみを製造するためには前培養条件を最適化する必要がある．

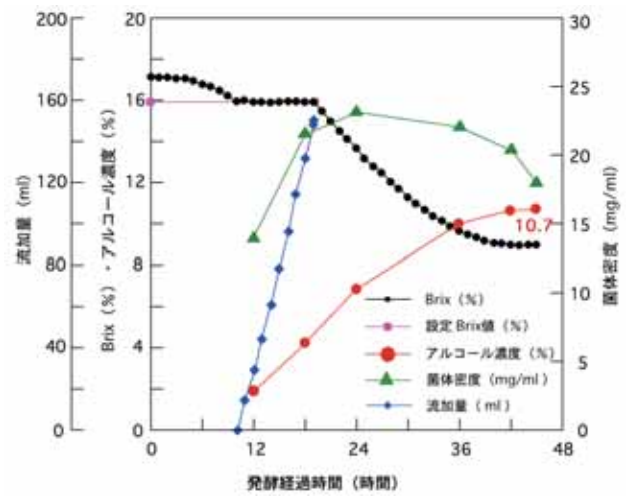


図6 40°Cにおける発酵経過

開始培地：15%グルコース2MY培地900ml，流加培地：50%グルコースMY培地150ml，酵母菌株：H2023-4（前培養：15°C，60時間静置培養後，30°C，12時間振とう培養），発酵温度：40.0°C，通気量：50ml/分，攪拌速度：250rpm

#### 参考文献

- 1) Francisco B. Pereira・Pedro M. R. Guimaraes・Jose A. Teixeira・Lucilia Domingues: Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains 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