

# アルコールの高効率生産微生物の育種に関する研究

## - 高温耐性酵母の取得について -

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、48 時間で 18%、66 時間で 20% の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。発酵温度を低下させると初期発酵速度の低下や冷却コストの上昇などを招くことから、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について検討を行った。その結果、得られた高温耐性協会 9 号酵母は 38°C までは親株の 30°C 発酵時の発酵速度と比較して同等若しくは有意に発酵速度の向上が認められたことから、至適生育温度が上昇していることが示唆された。また、耐性株は高温抵抗性が 2 種類に大別できることから、高温耐性に関与している遺伝子群も 2 種類に大別できるものと考えられる。

### 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。

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、廃水処理施設が大きく、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、そのためには発酵原液の糖濃度を高める必要がある。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

受けるため、単発酵で 14% 以上のアルコールを得ることは困難となっている。

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ために、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ためである。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が低温で行われることで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いためである。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とを開発し、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ため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。したがって、高効率でエタノール発酵を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。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>1)~5)</sup>としており、当該目的に使用できる可能性は低い。

そこで、本研究では高温に対して抵抗性を有するアルコール耐性酵母の取得を試みたので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌株

酵母菌株は当センターに保存している協会 9 号酵母を使用し、米由来高発酵性糖液を用いた流加培養システムで高濃度アルコールの発酵もろみの製造を行わせることにより、アルコール耐性が高い酵母とした。

### 2.2 耐性酵母の取得

米由来高発酵性糖液を用いて得られた発酵もろみ約 1.5 ℓ を 4℃ に 2 週間清置し、上清をデカントにより除去して高密度菌体懸濁液約 100ml を得た。この 0.1ml を Brix20% の米糖化液 7.5ml に接種して、30℃ 及び 37℃ で生育が認められるまで振とう培養を行った。生育が認められた試験管の培養液 0.1ml をエタノール濃度を 5, 10, 15% とした米糖化液プレートに塗布して 37℃ 及び 42℃ の恒温器で生育が認められるまで培養して生育してきたコロニーを高温耐性酵母として取得した。

### 2.3 発酵試験

米糖化液 7.5ml に生育してきたコロニーを接種して 30℃ で振とう培養を 48 時間行った。得られた培養液 0.1ml を新しい米糖化液 7.5ml に接種して 30, 34, 38, 39℃ で振とう培養を行い、2 時間毎に CO<sub>2</sub> の発生に伴う重量の減少を測定した。

## 3. 結果及び考察

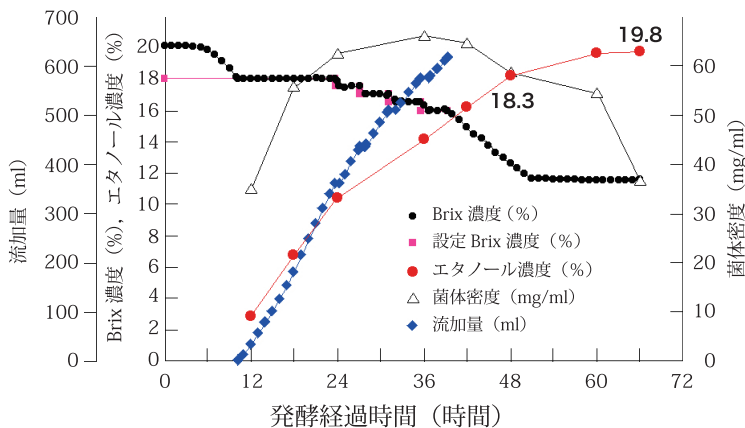


図 1 米由来高発酵性糖液を用いた流加培養システムにおける発酵経過

### 3.1 流加培養システムによる発酵

図 1 に米由来高発酵性糖液を用いた時の醗酵経過を示す。高発酵性糖液を用いることで菌体密度は 60mg/ml を超え、48 時間で約 18%、66 時間で約 20% のエタノール濃度の発酵もろみが得られた。この発酵もろみ中に生存している菌体はアルコールに対して抵抗性を持つものと推察される。

### 3.2 高温耐性酵母の取得

表 1 に各種条件で生育してきたコロニー数を示す。アルコール濃度が 10% までは 42℃ でも 37℃ でもコロニーの生育が認められたものの、アルコール濃度が 15% ではいずれの温度でもコロニーの生育は認められなかった。また、前培養の温度による違いは認められなかった。生育してきたコロニーのうちコロニーの形態が正常で、より大きいものから 20 コロニーを高温耐性酵母として取得した。また、そのうち生育のよい 5 株について発酵試験を行った。

### 3.3 発酵試験 (30℃)

図 2 に取得した高温耐性酵母の 30℃ における発酵試験の結果を示す。いずれの耐性菌でも親株と比較して若干ラグが延長されるものの発酵速度は向上しており、そのため発酵終了までの時間は親株とほぼ同時になった。このことから、耐性菌は高温耐性を獲得することで至適温度付近でも発酵能が改善されることが示唆された。

表 1 高温耐性酵母の出現コロニー数

前培養温度	37℃			42℃		
	EtOH 5%	EtOH 10%	EtOH 15%	EtOH 5%	EtOH 10%	EtOH 15%
30℃	93	13	0	62	12	0
37℃	84	18	0	59	16	0

開始培地：Brix 20% 米糖化液 900ml  
 流加培地：Brix 50% 米糖化液 600ml  
 平均糖濃度：Brix 32.0%  
 酵母菌株：協会 9 号酵母  
 発酵温度：28.5℃  
 攪拌速度：250rpm  
 通気量：50ml/分

### 3.4 発酵試験 (34℃)

図3に取得した高温耐性酵母の34℃における発酵試験の結果を示す。いずれの耐性菌も親株の30℃の場合と比較して発酵速度が向上しており、高温耐性を獲得することで至適生育温度が上昇したことが示唆された。また、耐性株により発酵速度に差が生じており、耐性の強弱が影響しているものと考えられる。

### 3.5 発酵試験 (38℃)

図4に取得した高温耐性酵母の38℃における発酵試験の結果を示す。耐性株 No.1, 2, 5 では親株の30℃における発酵速度とほぼ同じであったにもかかわらず、No.3, 4 では明らかに発酵速度が低下しており、高温耐性に明確な差が生じていることがわかった。

### 3.6 発酵試験 (39℃)

図5に取得した高温耐性酵母の39℃における発酵試験の結果を示す。全ての耐性菌で親株の30℃における発酵速度と比較して発酵速度が低下しており、取得した高温耐性酵母の高温耐性は38～39℃付近にあ

ると予測された。また、No.1, 2, 5 と No.3, 4 では38℃での発酵試験と同様に高温耐性に明確な差が生じていることがわかった。

## 4. おわりに

米由来高発酵性糖液を原料として流加培養システムを用いることで高濃度アルコールの発酵もろみを得ることが可能となった。ここで得られた酵母菌体は高濃度アルコール生成の履歴を持つことから、この菌体を用いることによりアルコールと高温に対して耐性を有する耐性株の取得が可能になると予測した。本研究で得られた耐性株は38℃での発酵においても30℃における親株の発酵速度に匹敵する発酵速度を有することから、高温耐性を獲得したと考えられる。

これらの耐性菌は30℃～38℃でも親株の30℃における発酵速度と比較して同等以上であり、高温耐性の獲得により、至適発酵(生育)温度が上昇していることが示唆される。また、試験した耐性株の数が少

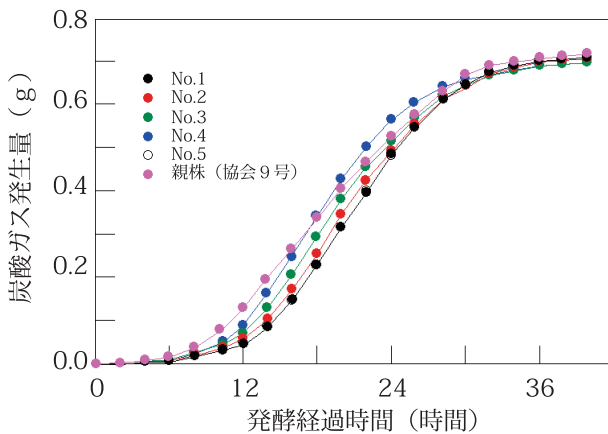


図2 耐性菌の30℃における醗酵経過  
使用培地：Brix 20% 米糖化液 7.5ml

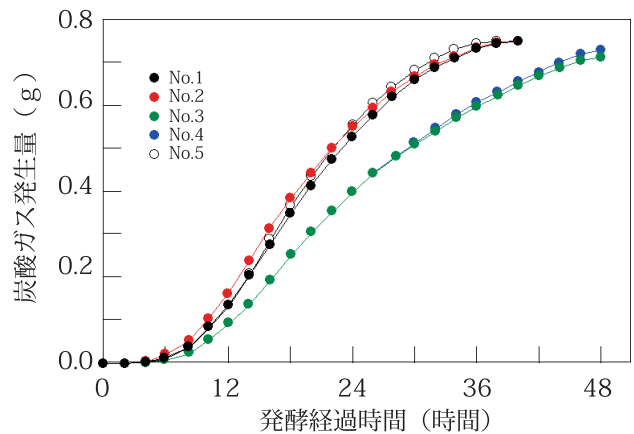


図4 耐性菌の38℃における醗酵経過  
使用培地：Brix 20% 米糖化液 7.5ml

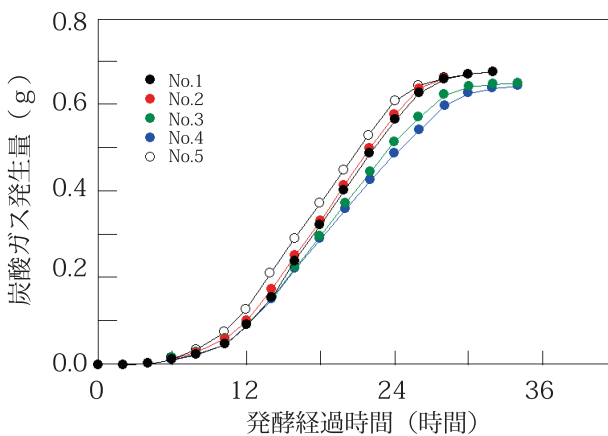


図3 耐性菌の34℃における醗酵経過  
使用培地：Brix 20% 米糖化液 7.5ml

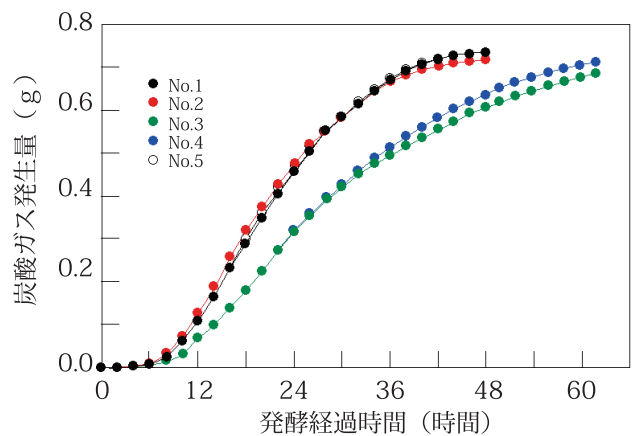


図5 耐性菌の39℃における醗酵経過  
使用培地：Brix 20% 米糖化液 7.5ml

ないが高温耐性菌は大きく分類して2種類に分けられると考えられることから、高温耐性に関与する遺伝子群も2つに大別されることが示唆される。今回は試験管を用いた発酵試験を行ったため、生成したエタノールが飛散していることから明確なアルコール耐性は検討していないが、今後は開発した流加培養システムを用いて高温条件下でのアルコール生成について検討を行っていく。

#### 参考文献

- 1) 高峯和則, 瀬戸口真治, 亀澤浩幸ほか, 平成7年度研究報告(1995)
- 2) 国税庁長官, 特開平 10-215860 (1998)
- 3) 大関株式会社, 特開平 10-262652 (1998)
- 4) 鹿児島県, 特開 2003-169667 (2003)
- 5) 七尾淳也, 特開 2006-67812 (2006)