

## Ⅲ バイオエタノール生産用ストレス耐性酵母の 開発と特性評価

### 1. はじめに

近年、石油の枯渇や環境問題を解決するための代替エネルギーが注目されている。その中でガソリンの代替燃料として期待されているのがバイオエタノールである。バイオエタノールはバイオマス（植物由来原料）から作られるエタノールであり、燃焼しても植物が取り込んだ二酸化炭素を放出するだけで大気中の二酸化炭素を増やさないクリーンなエネルギーであると考えられている。バイオマスからのエタノール生産方法は多種多様であるが、まずバイオマスを破碎や分解（糖化）等の処理をすることで糖液を調製し、その後、微生物反応を利用して糖液からエタノールを生産することが基本の流れである。この微生物反応は酒造りにも利用されている発酵（エタノール発酵）と同じものである。エタノール発酵をする微生物には、酒類の製造で活躍する酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）やザイモナス菌（*Zymomonas mobilis*）の他に、コリネ型細菌（*Corynebacterium glutamicum*）等も知られている。しかしながら、細菌類はエタノール耐性が低い、ウイルスに弱い等の理由から、現在稼働している産業プラントのほとんどが発酵工程に酵母を利用している。また、バイオマスからのエタノール生産において、最大の課題は生産コストである。ガソリンの代替燃料として考えた場合、現状の生産コストではエタノールの価格はガソリン価格を上回ってしまうため、市場への普及は足踏み状態となっている。生産コストを下げるためには、バイオマスあたりのエタノール生産量を増やすこと、生産に必要なエネルギー消費量を減らすことなども重要となる。そこで筆者らは発酵工程の効率化・低コスト化を目的として、高効率にエタノールを生産できる酵母の開発を試みた。具体的には、エタノール生産性やストレス耐性に優れた酵母の検索と、育種による機能強化を行ったので、その概要について紹介する。

### 2. 酵母のエタノール発酵

バイオマスから得られる糖には、使用するバイオマスにより量や種類が異なるが、代表的なものとしてスクロース、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノースなどがある。このうちセルロースや澱粉の主要構成成分であるグルコースが最も多く得られることから、グルコースの発酵が最も重要となる。エタノール発酵では1分子のグルコースから2分子のエタノールが生成する（図1A）。つまり理論的には100gのグルコースから51.1gのエタノールが生成する計算になる。ところが、実際には酵母の生育等にも5%程度が利用されるため、エタノールの対糖収率は良くても95%程度だと考えられている。

つまり、目標とする酵母の性能は、発酵工程において対糖収率 95%以上を示すことである。

稲わらや廃木材等をバイオマスとして利用する場合、グルコースに次いで多く得られる糖はキシロースやアラビノースなどの五炭糖である。これら五炭糖をエタノール発酵することで、エタノール収量の増加が期待される。特にキシロースは稲わらにおいてはグルコースの半分程度の量が含まれていることから、キシロースからのエタノール生産は非常に重要である。キシロースからエタノールを生成する場合、3分子のキシロースから5分子のエタノールが生成する（図1B）。キシロースもグルコースと同様に理論的には100gのキシロースから51.1gのエタノールが生成する。グルコースは*S. cerevisiae*をはじめとして、多くの種の酵母が発酵できるのに対し、キシロースを発酵できる酵母は、ごく限られた種のみである。キシロースを発酵できる代表的な種として、*Scheffersomyces stipitis*（以前は*Pichia stipitis*）、*Candida shehatae*、*Pachysolen tannophilus*などが知られているが、*S. cerevisiae*はキシロースを発酵できない。キシロースの発酵における特徴は、ほとんどのキシロース発酵性酵母において、キシロースの発酵に微量の酸素を必要とすることである。キシロースを発酵する際、溶液中の酸素が不足するとエタノールではなくキシリトールを生成し、逆に酸素が過剰にある場合、水と二酸化炭素にまで完全に分解される。この溶液中溶存酸素量の制御の難しさが、キシロースの発酵制御を非常に困難にしている。現状では、キシロースの発酵効率は80%程度であり、稲わら由来糖液を効率良く発酵ができればエタノールの収量はグルコースだけを発酵した場合に比べ1.3倍程度になる。

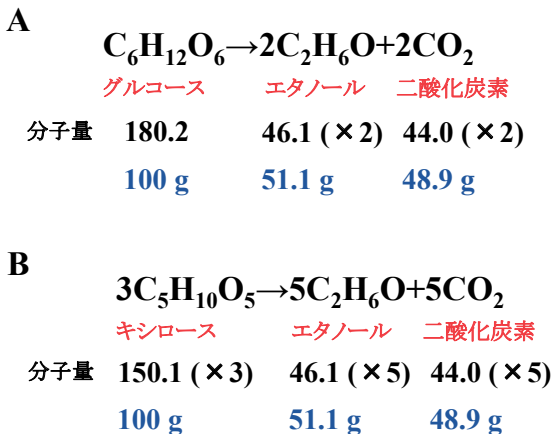


図1 エタノール発酵の化学式

A, グルコースのエタノール発酵； B, キシロースのエタノール発酵

### 3. バイオエタノール生産工程における環境ストレス

酵母にとってバイオエタノール生産工程は非常に過酷な環境である。例えば、発酵の進行に伴って発生する発酵熱は発酵槽の温度上昇を引き起こし、酵母に高温ストレスを与える。このようなストレスを受けたときに酵母は多かれ少なかれ適応する能力を有しているが、適応限度を超えたストレス下では生命活動の制限を余儀なくされる。ストレス耐性が高い酵母は適応能力が高いと考えられることから、ストレス耐性酵母を利用することがエタノール生産効率の向上に繋がると期待される。バイオマス由来の糖液には多くの場合、酵母の発酵を阻害する物質が含まれている。発酵阻害物質はバイオマスの糖化処理やその前段階に行われる前処理（脱リグニン等）で主に生成する。特に酸や加熱等の処理は、バイオマスに含まれる澱粉やセルロース、ヘミセルロース由来の糖を過分解し、フラン化合物（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール等）を生成する（図2）。他にもリグニンに由来するフェノール性化合物（バニリン、グアヤコール、4-ヒドロキシベンズアルデヒド等）や弱酸（酢酸、蟻酸等）等が生成する場合もある。これらの物質は酵母にストレスを与え、生育を阻害するだけでなくエタノール発酵も阻害するため、エタノール変換効率の低下を引き起こす大きな原因となる。また、前処理や糖化処理で使用された酸やアルカリの中和で生成する高濃度の塩、および糖化で生成した高濃度の糖は、その高い浸透圧によって細胞を脱水す

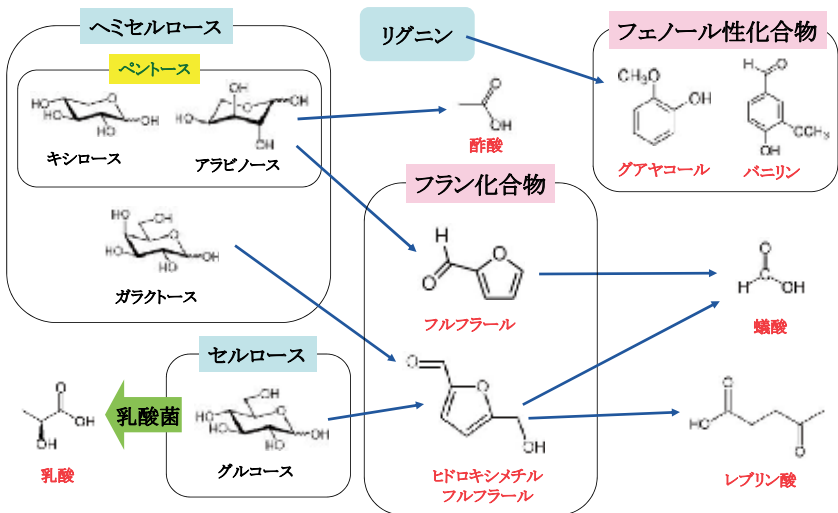


図2 バイオマスの前処理等で生成する発酵阻害物質

バイオマスを酸や熱で処理した時に生成する発酵を阻害する物質を赤字で示した。

るため、酵母にとって過酷なストレスとなる。さらに発酵生成物であるエタノールそのものも濃度が高くなると酵母にはストレスとなる。特に前述のキシロース発酵性酵母はエタノール耐性が低いため、自身の発酵産物であるエタノールにより生育が阻害され、高濃度のエタノールを生産することができないと考えられている。その他にも、糖液が乳酸菌等の細菌により汚染された場合には、糖の減少によりエタノール生産効率が低下するだけでなく、細菌の生産する乳酸等がストレスとなり、酵母の生育を阻害する。このように、バイオエタノール生産工程には様々な環境ストレスが存在し、発酵を阻害する要因となっている。また、使用するバイオマスや糖化方法により生成する発酵阻害物質の種類やその生成量が異なる。そのため、産業製造の場においてはそれぞれのストレス条件、糖液に適合した酵母を使ってエタノールを生産することが必要となる。

## 4. バイオエタノール生産用酵母の開発

### 4.1 環境ストレス耐性酵母の探索

バイオエタノール生産用のバイオマスは種類が多く、糖やエタノールへの変換技術もまた多岐にわたるため、糖液の種類に応じて様々なレベルのストレスが生じることが想定される。そこで我々は様々な糖液の発酵に対応できるように、想定されるストレスに高度に耐性を有する酵母の探索を行った。ストレスの種類としては、エタノール、高温、高浸透圧（高塩濃度、高糖濃度）、酸（乳酸、酢酸、硫酸）、アルカリ、フラン化合物（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール）、フェノール性化合物（バニリン）について試験を行った。また、エタノール生産において重要な形質である酵母のエタノール生産性についても調べた。ストレス耐性試験では、ストレス条件下での生育（増殖）をストレス耐性の指標とし、試験に供した株すべてについて段階的にストレスを与え、ストレス耐性を評価した。ストレス耐性試験に先立ち、花や果実、土壌、朽ち木、水などを分離源として酵母を採取した。研究室保存株および自然界からの新規分離株、併せて約1,700株の酵母を対象にストレス耐性を試験した結果、それぞれのストレスに対して高度に耐性を有する株を見出すことができた。表1に高度ストレス耐性株のストレス耐性をまとめた。高いストレス耐性を示した株については、それぞれ種の同定も行った。高いエタノール生産性を示した株には *S. cerevisiae* に属する酵母が多かったが、高度なストレス耐性を示す株のほとんどは *S. cerevisiae* 以外の酵母であった。ストレス耐性株の中には発酵阻害物質3種（フルフラール、5-ヒドロキシメチルフルフラール、バニリン）に耐性を持つ株や、酸と高温、塩と高温など複数のストレスに耐性を持つ株もみられた。しかしながら、高度なストレス耐性とエタノール生産性を併せ持つ株はごく僅かであった。そこで高いエタノール生産性を示す株の中から、比較的ストレス耐性の高い株に着目した。*S. cerevisiae* に属する株の中には、産業利用経験のある株 (*S. cerevisiae*

表1 発酵阻害因子に対して耐性を有する酵母の検索

化合物・処理	濃度・温度	耐性株数
酢酸	1.2 % (v/v)	2
乳酸	9 % (v/v)	1
硫酸	40 mM pH1.65	2
硫酸ナトリウム	5 % (w/v) pH1.5	3
塩化ナトリウム	20 % (w/v)	1
水酸化ナトリウム	126 mM pH12.0	3
フルフラール	60 mM	3
5-ヒドロキシメチルフルフラール	60 mM	9
バニリン	40 mM	3
エタノール	15 % (v/v)	8
高温	48 ℃	3
凝集性		84
エタノール生産性	95 %	31

NBRC 0224 株) よりもストレス耐性能が高い株も見出すことができた。後述する *S. cerevisiae* NBRC 1950 株はバニリンに対する耐性が非常に高い株であった。また、これまでに産業利用経験のない酵母株の中にも次節で紹介する *Candida glabrata* のように有用な酵母があることが確認できた。

## 4.2 ストレス耐性酵母の発酵試験

### 1) 乳酸耐性株

評価を行った酵母株のうち、*C. glabrata* NFRI 3164 株は乳酸耐性や高温耐性に優れ、かつ高いエタノール生産性を示すことから、エタノール生産に有用であると考えられた。NFRI 3164 株の乳酸耐性を活用すれば、乳酸で雑菌の増殖を抑制しつつ、エタノール発酵をすることが可能になると期待された。従来、雑菌汚染を防ぐ方法として糖液に抗生物質の添加が行われてきたが、発酵・蒸留後の残渣を家畜の飼料として用いた場合、家畜に健康被害が生じることが報告されている<sup>1)</sup>。また、抗生物質の多用は環境中に抗生物質の効かない耐性菌を生み出す危険性もある。これに対し、乳酸は乳酸菌などが作る酸の一種で自然界にも大量に存在し、環境中で容易に分解されるため、たとえ排水などに含まれていても環境に影響の少ない物質である。合成培地を使用した試験では、培地中に終濃度2% (v/v) の乳酸を添加することにより、汚染報告のある乳酸菌等の細菌はほとんど増殖できないことが確認できた。一方、NFRI 3164 株は上記乳酸添加条件においても高効率でエタノールを生産することができた<sup>2)</sup>。酵母と乳酸菌を同時に

接種して培養すると、エタノール生産量は著しく低下する（図3A）。しかしながら終濃度2%（v/v）の乳酸を加えることで乳酸菌による生産阻害は抑えられ、さらに、*S. cerevisiae* NBRC 0224株では発酵が大きく遅延したのに対し、NFRI 3164株では遅延はわずかであった（図3B）。

## 2) 酢酸耐性株

製糖副産物である糖蜜からのエタノール製造工程では、*Bacillus*属細菌等による汚染が問題となっている。そこで酢酸添加による雑菌汚染防除を検討した。その結果、酢酸耐性を有する*Schizosaccharomyces pombe* NFRI 3807株は、酢酸を添加した糖蜜からのエタノール製造に適していることが明らかとなった<sup>3)</sup>。NFRI 3807株は1%（v/v）酢酸を含む糖蜜培地でもエタノールを生産することが可能であった（図4）。0.7%（v/v）の酢酸を添加した条件でNFRI 3807株を用いて発酵を行った結果、*Bacillus*属細菌の増殖が抑えられ、エタノールを効率良く生産することができた。

## 3) 高糖・高温耐性株

エタノール製造の最終段階では、発酵後のもろみ（エタノールを含む発酵液）から蒸留等によりエタノールを精製する。このときもろみのエタノール濃度が高

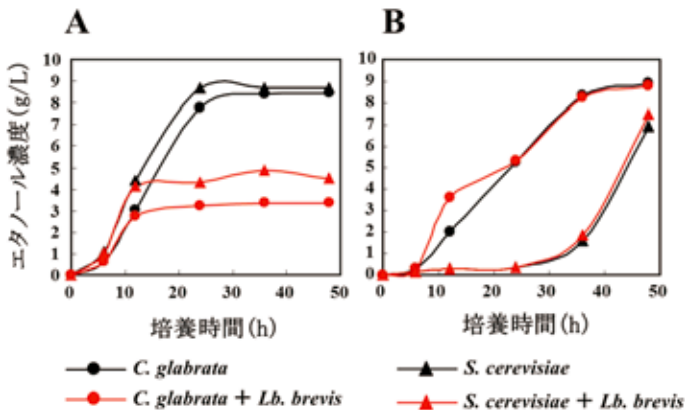


図3 *C. glabrata* NFRI 3164株のエタノール生産に与える乳酸菌および乳酸添加の影響評価

モデル混入雑菌として乳酸菌 (*Lactobacillus brevis*) を使用した。乳酸菌の存在下および非存在下における乳酸無添加 (A) および2% (v/v) 乳酸添加 (B) 培地でのエタノール生産を調べた。比較対照株として *S. cerevisiae* NBRC 0224株も同時に調べた。

いほど精製の効率が良くなることから、産業製造ではより高濃度の糖液を効率良くエタノール発酵することが重要である。澱粉質バイオマスや糖蜜等からは比較的高い濃度の糖液が得られやすく、高糖濃度液を発酵できる高糖濃度耐性株が必要となる。保存株の中で高糖濃度耐性かつ高エタノール生産性を示す3株(すべて *S. cerevisiae*) について、馬鈴薯を用いた超高密度での同時糖化発酵 (VHG-SSF) 試験を行い、高温条件下でも高い発酵能を示す *S. cerevisiae* NFRI 3225 株を選抜した (図5)。NFRI 3225 株の各種基質 (馬鈴薯, 甘藷, 甜菜, 易分解性糖質稲わら) を用いた発酵試験の結果, 投入した糖量 (六炭糖ベース) に対するエタノール収率は 90 ~ 95 % であり, 消費糖量に対するエタノール収率は 92 ~ 96% であった<sup>4)</sup>。NFRI 3225 株が糖質・澱粉質バイオマスからのエタノール生産に非常に有用であることが明らかとなった。

### 4.3 育種による機能強化

#### 1) 凝集性変異株の分離

エタノール発酵工程において、酵母の再利用はコスト削減に大きく貢献する。糖蜜のように固形分をほとんど含んでいない液体を発酵する場合、酵母の再利用を目的として凝集性酵母が使用されている。凝集性酵母は発酵中には拡散している状態だが、発酵終了時には酵母同士が結合して塊を形成 (凝集) する特性を有する。通常、酵母を回収するためには、遠心分離機を用いて酵母を沈めることで

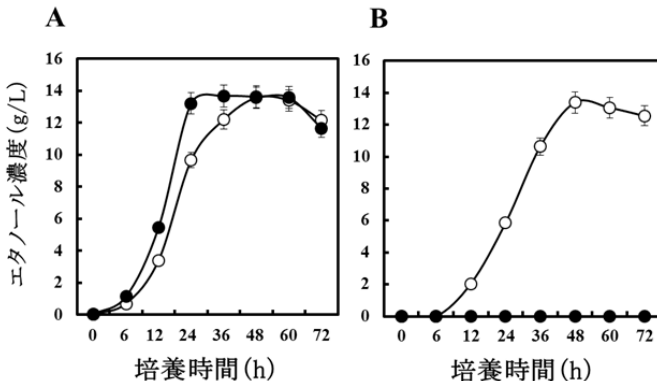


図4 *S. pombe* NFRI 3807 株のエタノール生産に与える酢酸添加の影響評価

酢酸無添加 (A) および 1% (v/v) 酢酸添加 (B) 培地でのエタノール生産を調べた。*S. pombe* NFRI 3807 株 (○), および比較対照株として *S. cerevisiae* NBRC 0224 株 (●) について発酵試験を行った。

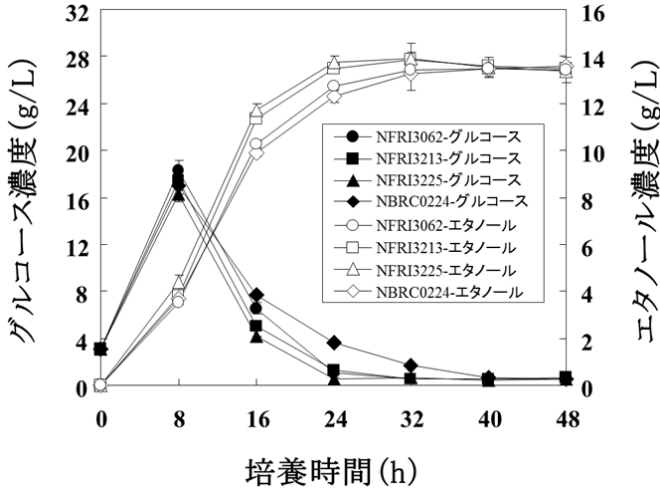


図5 馬鈴薯を用いた同時糖化発酵試験におけるエタノールおよびグルコース濃度の経時変化

粘性除去・液化処理後の茹でて潰した馬鈴薯の可溶性デンプン量をグルコース換算で30%に調整した後、糖化酵素および酵母を添加し、37℃で振とう培養を行った。酵母は高糖・高温耐性選抜株（NFRI 3062株、NFRI 3213株、NFRI 3225株）と比較対照株（NBRC 0224株）を用いた。

酵母ともろみを分離する。一方、凝集性酵母は発酵終了後、静置しておくだけで菌体は速やかに凝集・沈降するため、遠心分離を行う必要がない。そこで、糖蜜や糖化後の液体のみの発酵に利用することを想定した、*C. glabrata* NFRI 3165株（NFRI 3164株とほぼ同等の発酵能を有する株）の凝集性変異株の分離を行った。変異は自然突然変異を利用し、合成培地で培養後、すばやく菌体が沈降する画分を分取し、再培養を行った。この操作を繰り返すことにより、強い凝集性を示す凝集性変異株を取得した<sup>5)</sup>。凝集性変異株の凝集性は二価の陽イオンに依存すること、ガラクトースで阻害されることが明らかとなった。また、高温条件下やpH3.5でも凝集能を有することから、バイオエタノール製造においても有用な株であると考えられた（図6）。

## 2) 呼吸欠損変異株の分離

セルロースや澱粉を含むバイオマスからのエタノール生産においては、酵素による糖化と発酵を同時に行う同時糖化発酵（SSF）が時間効率や糖化効率の良い発酵法である。SSFにおける糖化は糸状菌由来の酵素（セルラーゼなど）が利用



されることが多く、酵素の至適温度は比較的高温（50～60℃）である。バイオマスの糖化反応において糖化効率を上げるためには、酵素反応に適した温度と攪拌が重要である。しかし、強い攪拌を行うと糖液の溶存酸素濃度が上昇し、酵母が呼吸（好気呼吸）によりエタノールを消費するため、エタノール収量の低下が生じる。そこで効率的な同時糖化発酵プロセスの構築に向けて、NFRI 3164 株の変異育種による機能強化を試みた。NFRI 3164 株を紫外線に変異処理し、呼吸をできなくした呼吸欠損変異株を分離した<sup>6)</sup>。呼吸欠損変異株は、高攪拌条件でもエタノール収率の低下はほとんど観察されなかった。さらに、親株（NFRI 3164 株）と同等の高温耐性も有しているため、42℃での同時糖化発酵が可能で

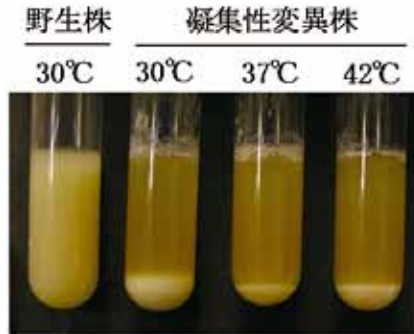


図6 凝集性変異株の凝集性における温度の影響

野生株および凝集性変異株を30～42℃で培養した。培養終了後、激しく攪拌し、60秒間静置した。

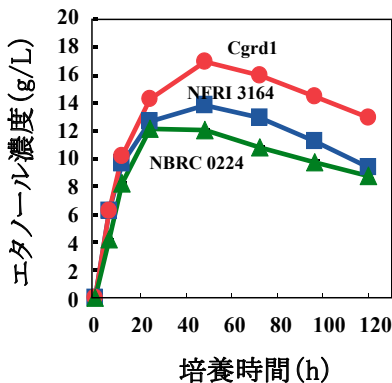


図7 高温条件下（42℃）でのアビセルの同時糖化発酵試験におけるエタノール濃度の推移

アビセル、セルラーゼおよび酵母の混合液を42℃、150 rpmで反応させ、エタノール濃度を経時的に測定した。酵母は呼吸欠損変異株（Cgrd1）およびその親株（*C. glabrata* NFRI 3164 株）、比較対照株（*S. cerevisiae* NBRC 0224 株）を使用した。

あった(図7)。高温耐性呼吸欠損酵母は、SSFに最適であることが示唆された。

### 3) 複合的ストレス耐性酵母の育種

比較的ストレス耐性の高い *S. cerevisiae* 株については、遺伝資源として活用し、複合的な環境ストレス耐性を有する株の構築に取り組んでいる。遺伝資源を用いた育種は、基本的に遺伝子組換えを行わず、古典的な育種手法を用いている。具体的には、胞子形成する株については接合による交配(交雑)を行い、胞子形成しない株については細胞融合により有用形質の付与を行っている。これまでに高温・エタノール耐性株や高温・発酵阻害物質耐性株、高温・酢酸耐性株などの作成に成功している。

## 4.4 五炭糖発酵性酵母の育種と新規酵母探索

### 1) 五炭糖発酵性酵母の変異育種

五炭糖発酵性酵母の多くはストレス耐性が低いため、実用レベルに達する株はほとんどない現状である。特にエタノール耐性や高温耐性が低いため、五炭糖発酵性酵母を使用して高濃度の基質を発酵(高濃度のエタノールを生産)することは非常に困難である。そこで既存株のエタノール耐性の強化を試みた。*S. stipitis* NBRC 1687株を紫外線(UV)照射による変異処理の後、エタノールを含む寒天培地に塗布し、生育の良いコロニーを選抜した。得られた変異株のエタノール耐性は親株とほぼ同等であったが、キシロース発酵速度が向上した変異株が取得できた<sup>7)</sup>。また、5%キシロースを含む培地での発酵試験の結果、変異株のエタノール収率は親株よりも優れていた。今回試行したUV変異とエタノールを用いた選抜による育種は、キシロース発酵能を向上させることに有効である可能性がある。

### 2) 新規五炭糖発酵性酵母の分離

稲わら糖化液にはグルコースやキシロースの他にやや含有量は少ないものの、アラビノースも含まれている。アラビノースを発酵できる酵母は非常に少なく、*Candida arabinofermentans*に代表されが、そのエタノールの生産量は非常に少ない。そこでアラビノース発酵能の高い酵母を分離するため、自然界から分離した36株のキシロース発酵性酵母についてアラビノース発酵試験を行った。その結果、3株がアラビノース発酵能を有していた。特につくば市のブルーベリー畑から分離したNY7122株は発酵能が高く、また比較的高い高温耐性を有していた。種の同定を行った結果、NY7122株は *Candida subhashii* に非常に近い種であると推測されたが、糖の発酵性がやや異なっている<sup>8)</sup>。NY7122株は仮性菌糸を形成することも明らかとなった(図8)。NY7122株はキシロースおよびアラビノースからエタノールを生産できるが、特にアラビノースに関してはこれまでに報告されているどの酵母よりも高いエタノール生産性を示した(図9)。今後、変異育種等により実用レベルにまで機能強化を図る予定である。

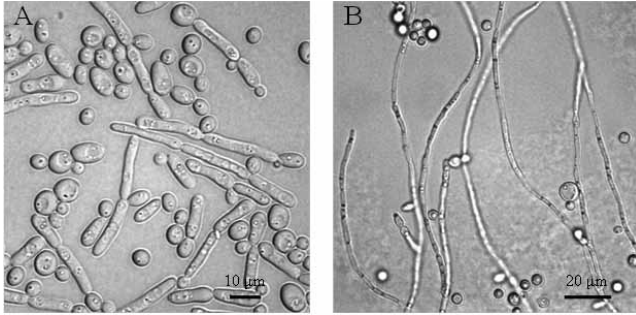


図8 NY7122 株の顕微鏡像

A, 栄養増殖細胞； B, コーンミールアガー上での仮性菌糸形成

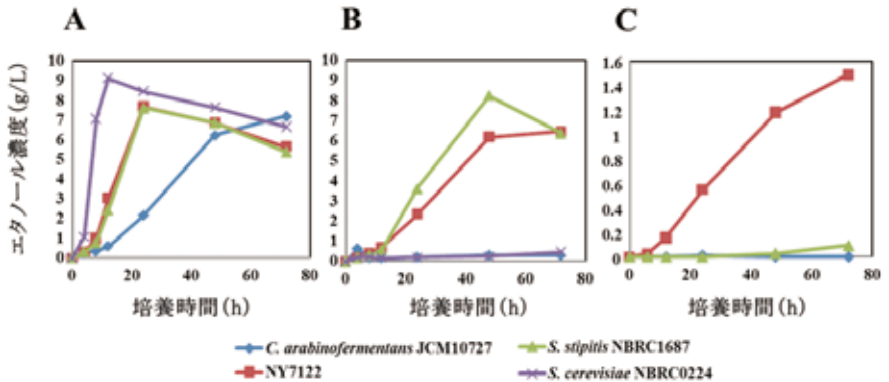


図9 NY7122 株および五炭糖発酵性酵母のエタノール生産性評価

*S. cerevisiae* NBRC 0224 株 (比較対照株), *C. arabinofermentans* JCM 10727 株, *S. stipitis* NBRC 1687 株, NY7122 株について, グルコース (A), キシロース (B), アラビノース (C), それぞれ 2% からのエタノール生産を測定した。

#### 4.5 固定化酵母の利用

4.3 に記述のとおり, 糖蜜や糖化後の液体のみを発酵する場合は, 凝集性酵母等を利用することで比較的容易に酵母の再利用が可能である。一方, 稲わらのSSFの場合, もろみに固形分が多量にあるため, 発酵後に酵母と固形分を分けて回収することは非常に困難である。そこで稲わらのSSFにおいて酵母を回収・再利用するために, 酵母を水に不溶性の高分子カプセル中に包み込んで (固定化して) 利用することを検討した。稲わらのSSFでは, 特に発酵の初期に溶

液の粘度が非常に高いため、強い攪拌が必要になり、投入した担体にも強い負荷がかかることになる。固定化酵母作製では頻繁に利用されているアルギン酸ナトリウムで酵母を固定化したところ、担体の強度不足のために発酵中の攪拌で粉砕し、回収が不可能であった。そこで高強度の担体を作製するために、関西ペイント（株）が開発した光硬化性樹脂で酵母を固定化し、稲わらのSSF試験に供した（図10）。その結果、担体の破損も見られず、また直径2mm程度の穴のあいた網を用いることで担体（直径3mm程度）ともろみを容易に分離でき（稲わらは微粉砕したものを使用）、担体を回収することができた。この固定化酵母担体を利用して稲わらの繰り返し回分SSF試験を行ったところ、各回分とも安定してエタノールを生産することができ、繰り返し利用できることが確認できた（図11）。稲わらのSSFにおいては、固定化酵母が酵母再利用とエタノール安定生産に有用であることが明らかとなった<sup>9)</sup>。

#### 4.6 耐性機構の解明

酵母のストレス耐性については様々なストレスで研究が行われ、そのメカニズムが解明されつつあるが、依然として不明な部分も多い。耐性のメカニズムに関する知見は、耐性株の育種や産業利用等の高度化に非常に重要である。酵母はストレスを受けたとき、生理レベルや代謝レベル等において適応を図る。これらの適応には遺伝子発現の変化を伴う場合も多々あり、発現の変化する遺伝子の中にはストレス耐性に重要な遺伝子も含まれている。そこで、セルフクローニング等によるストレス耐性酵母の分子育種に先駆け、ストレス耐性に関与する遺伝子の情報を収集した。実験ツールとして *S. cerevisiae* 遺伝子破壊株コレクション（非必須遺伝子を1つ破壊した約4,700株）を用い、破壊されるとストレス感受



図10 光硬化性樹脂で作成した固定化酵母担体

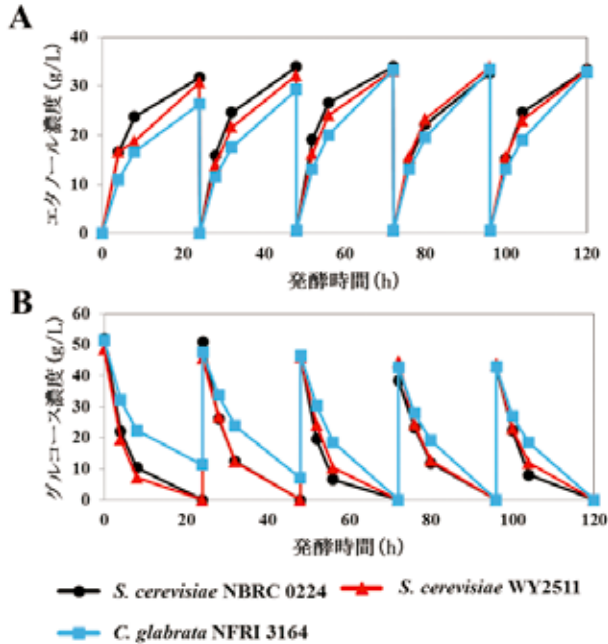


図 11 固定化酵母を利用した稲わらの繰り返し回分同時糖化発酵

3 種の酵母 (*S. cerevisiae* NBRC 0224 株, *S. cerevisiae* WY2511 株, *C. glabrata* NFRI 3164 株) を光硬化性樹脂を用いて固定化し, 20% 稲わらの同時糖化発酵を 30℃ で行い, エタノール濃度 (A) およびグルコース濃度 (B) を測定した。発酵 24 時間後に担体を回収し, 次の発酵に再利用した。

性になる遺伝子を網羅的に解析した。バニリンに感受性を示す遺伝子破壊株を検索した結果, エルゴステロール合成に関与する遺伝子の破壊株が強い感受性を示すことを見出した<sup>10)</sup>。また, エルゴステロール合成に関与する遺伝子の破壊株は, バニリン以外の発酵阻害物質にも感受性を示すことから, 発酵阻害物質耐性にはエルゴステロールが重要であると推測された (表 2)。そこで前出したバニリンに高度に耐性を有する *S. cerevisiae* NBRC 1950 株のエルゴステロール含量を調べたところ, 他の *S. cerevisiae* 株よりも高含量であることが判明した (図 12)。また, *S. cerevisiae* NBRC 1950 株ではエルゴステロール合成に関与する遺伝子の発現量が他の *S. cerevisiae* 株よりも高いことも明らかとなった<sup>11)</sup>。以上の結果から, バニリン耐性の強度とエルゴステロール含量には相関がある可能性が示唆された。発酵阻害物質耐性能の強化には, 合成に関与する遺伝子を高発現させる等してエルゴステロール含量を増加する育種が有効であると考えられた。

表 2 エルゴステロール合成関連遺伝子破壊株の発酵阻害物質感受性

遺伝子	感受性 <sup>a</sup>						
	VA	HB	GU	SY	FU	HMF	AA
<i>ERG3</i>	0.20	0.05	0.06	0.12	0.05	0.26	0.02
<i>ERG6</i>	0.29	0.03	0.03	0.04	0.03	0.08	0.02
<i>ERG2</i>	0.03	0.06	0.03	0.13	0.05	0.57	0.02
<i>ERG24</i>	0.19	0.04	0.02	0.10	0.09	0.27	0.01

<sup>a</sup> 発酵阻害物質存在下での野生株の生育 (OD630) を 1 とした時の破壊株の生育を示す。0.3 以下を感受性と定義し、網掛けで示した。

VA, バニリン; HB, 4-ヒドロキシベンズアルデヒド; GU, グアヤコール; SY, シリンガルデヒド; FU, フルフラール; HMF, 5-ヒドロキシメチルフルフラール; AA, 酢酸

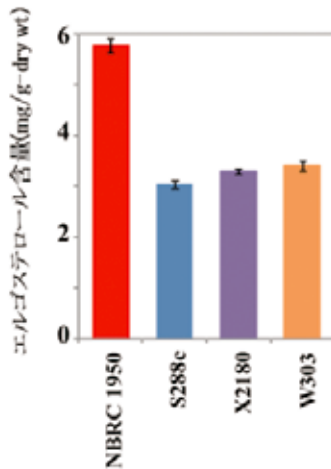


図 12 バニリン耐性株のエルゴステロール含量

*S. cerevisiae* NBRC 1950 株と *S. cerevisiae* 実験室株 (X2180 株, S288c 株, W303 株) のエルゴステロール含量を測定した。

## 5. おわりに

バイオ燃料は今後もその重要性が増すと考えられ、食料と競合しない稲わら等の作物未利用部分を原料としたバイオ燃料を如何に安く生産するかということが大きな課題である。本稿では、産業利用を想定したストレス耐性酵母の開発とその利用に関する取り組みを紹介した。ストレスの中でも特に高温耐性に関しては、発酵槽の冷却コスト削減に直結することから、研究者の注目を集めている。

筆者らも高温耐性に関与する新規マーカー遺伝子を同定しており、今後の育種等に役立てていきたいと考えている。また、酵母は遺伝子操作が比較的簡単であることから、遺伝子組換え酵母の開発を進めている研究グループも多くある。しかしながら遺伝子組換え酵母を利用するためには、環境への悪影響を避けるため、外部に洩れ出さないように封じ込める必要がある。発酵槽を密封するなど閉鎖系の施設が必要となり、また発酵残渣の適切な処理等も必要であるなど制約が多い上に、制約に対処するためのコストが加算される。このように実用が難しい現状を踏まえ、我々のグループでは新規酵母株の分離と育種によるストレス耐性酵母の開発を中心に研究を進めている。本研究では様々な糖液に対応できるように、発酵工程で想定されるストレスに対して耐性を有する酵母株の分離および育種を行った。発酵工程で生じるストレスにはエタノールや発酵熱といった普遍的なものもあれば、バイオマスの種類やその前処理・糖化方法に依存しているものも多くあることから、実用的なストレス耐性酵母の開発は前処理・糖化の研究との連携が重要となる。本研究がスムーズに進んだ要因として、馬鈴薯や稲わらのSSFを食品総合研究所の徳安グループの開発した方法<sup>12) 13)</sup>をベースに行い、微粉碎稲わら等の原料や研究情報の提供を受けるといった連携が確立していることが挙げられる。今後もより早く、より沢山のエタノールを生産する酵母を開発することで、バイオエタノールの安定的な産業製造に貢献したい。

## 6. 謝辞

本稿で紹介した研究は、農林水産省農林水産技術会議事務局委託プロジェクト研究「稲わら等の作物の未利用部分や資源作物、木質バイオマスを効率的にエタノール等に変換する技術の開発」の研究の一環として実施した。また、本研究は酵母ユニット（当時）の島純ユニット長（現：京都大学特定教授）、安藤聡主任研究員（現：野菜茶業研究所）との共同研究成果である。

（応用微生物研究領域 酵母ユニット 中村 敏英）

## 参考文献

- 1) Basaraba, R.J., Oehme, F.W., Vorhies, M.W. and Stokka, G.L., Toxicosis in cattle from concurrent feeding of monensin and dried distiller's grains contaminated with macrolide antibiotics. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **11**, 79-86 (1999)
- 2) Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida glabrata* in bioethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 1117-1122 (2008)

- 3) Saithong, P., Nakamura, T. and Shima J., Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses. *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 216-219 (2009)
- 4) Watanabe, T., Srichuwong, S., Arakane, M., Tamiya, S., Yoshinaga, M., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A., Tokuyasu, K. and Nakamura, T., Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. *Bioresour. Technol.*, **101**, 9710-9714 (2010)
- 5) Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., Characterization of spontaneous flocculation mutant derived from *Candida glabrata*: a useful strain for bioethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, **107**, 379-382 (2009)
- 6) Watanabe, I., Nakamura, T. and Shima, J., A strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* in bioethanol production. *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 176-179 (2010)
- 7) Watanabe, T., Watanabe, I., Yamamoto, M., Ando, A. and Nakamura, T., A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. *Bioresour. Technol.*, **102**, 1844-1848 (2011)
- 8) Watanabe, I., Ando, A. and Nakamura, T., Characterization of *Candida* sp. NY7122, a novel pentose-fermenting soil yeast. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 307-315 (2012)
- 9) Watanabe, I., Ando, A. and Nakamura, T., Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresour. Technol.*, **123**, 695-698 (2012)
- 10) Endo, A., Nakamura, T., Ando, A., Tokuyasu, K. and Shima, J., Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, **1**, 3 (2008)
- 11) Endo, A., Nakamura, T. and Shima, J., Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **299**, 95-99 (2009)
- 12) Sathaporn, S., Fujiwara, M., Wang, X., Seyama, T., Shiroma, R., Arakane, M., Mukojima, N. and Tokuyasu, K., Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass Bioenerg.*, **33**, 890-898 (2009)



- 13) Park, J.Y., Shiroma, R., Al-Haq, M.I., Zhang, Y., Ike, M., Arai-Sanoh, Y., Ida, A., Kondo, M. and Tokuyasu, K., A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw-calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6805-6811 (2010)