

[成果情報名] 異種遺伝子を含まない酵母を用いた高効率キシロース発酵法の開発

[要 約] 実用的な高効率バイオエタノール生産法を構築するために、異種遺伝子を用いずにキシロース発酵能が強化された *Saccharomyces cerevisiae* 酵母を開発する。本酵母を使用して同時異性化発酵を行うことにより、リグノセルロース系バイオマスに含まれるキシロースを効率良く発酵できる。

[キーワード] バイオエタノール、キシロース、酵母、同時異性化発酵、セルフクローニング

[担 当] バイオマス利用・エタノール変換技術

[代表連絡先] 電話 029-838-7991

[研 究 所] 食品総合研究所・食品バイオテクノロジー研究領域

[分 類] 研究成果情報

[背景・ねらい]

稲わら等リグノセルロース系バイオマス原料を利用してバイオエタノールを効率的に生産するには、これら原料に多量に含まれるキシロースのエタノールへの変換が重要な課題である。しかしながら、醸造産業等でエタノール発酵に最もよく利用されている *Saccharomyces cerevisiae* 酵母はキシロースを利用することができず、遺伝子組換えによるキシロース発酵能の付与が行われている。既に我々も、高キシロース発酵性遺伝子組換え酵母株 *Candida glabrata* 3163 dgXK1 を用いて、キシロースイソメラーゼを添加した同時異性化発酵を行うことにより、従来困難であったキシロースの高温（40℃）発酵法の開発に成功している（平成24年度食品試験研究成果情報）。しかし、遺伝子組換え体の利用は、拡散防止措置の必要性等から、実用化の際の障害となることが予想される。そこで、同種遺伝子のみを使用するセルフクローニングによって *S. cerevisiae* を改良し、*C. glabrata* 3163 dgXK1 と同等の同時異性化発酵能を有する酵母株を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 食品総合研究所カルチャーコレクションから、40℃で高いキシロース発酵能を示す *S. cerevisiae* St10-1-1 株を単離した。本株は 3163 dgXK1 の親株 *C. glabrata* NFRI 3163 株よりは低いものの、既知の高キシロース発酵性 *S. cerevisiae* ATCC 24860 株より、40℃で顕著に高いキシロース発酵能を示す（図1）。
2. St10-1-1 株のキシロース発酵能をさらに増強するため、セルフクローニングによるキシロキナーゼ遺伝子（*XKS1*）高発現株の作出を行う。まず、St10-1-1 ゲノム DNA を鋳型にセルフクローニングに必要な遺伝子領域を PCR によって増幅し、それらを連結することで、リンカー配列や異種遺伝子を含まない DNA 断片を構築する（図2）。次に、St10-1-1 の突然変異により単離したリジン要求性変異株に、この DNA 断片を導入し、リジン非要求性株を選抜する。得られた St10 TEF1p-*XKS1* 株のゲノム中には、野生型 *XKS1* に加えて、高発現型 *XKS1*（*TEF1p-XKS1*）が存在する。
3. スラリー濃度 20% (w/w) の稲わら糖化液に相当する 5.6% (w/v) グルコース及び 4.2% (w/v) キシロースを含む培地を用いて同時異性化発酵を行うことにより、St10 TEF1p-*XKS1* は、親株 St10-1-1 や *C. glabrata* 3163 dgXK1 よりも早くキシロースを消費し、48時間発酵で 4.3% (w/v) のエタノールを生産する（図3）。St10 TEF1p-*XKS1* のエタノール収率は理論収率の 85% であり、3163 dgXK1 の収率（80%）を上回る。

[成果の活用面・留意点]

1. 今後、St10 TEF1p-*XKS1* がセルフクローニング株に該当することを担保するためのより詳細な科学的根拠を集積する必要がある。
2. St10 TEF1p-*XKS1* は 3163 dgXK1 と比べ副産物（グリセロール、キシリトール）の生成量が多いことから、これらを抑制すると更にエタノール収率が增加する可能性がある。

[具体的データ]

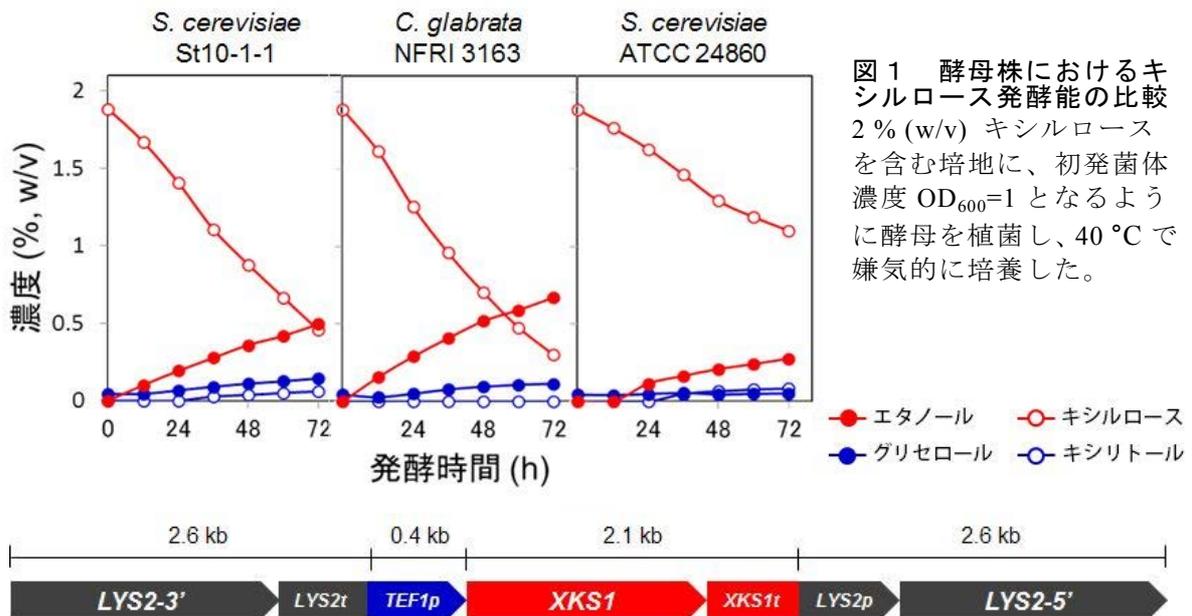


図1 酵母株におけるキシロース発酵能の比較
2% (w/v) キシロースを含む培地に、初発菌体濃度 $OD_{600}=1$ となるように酵母を植菌し、40 °C で嫌氣的に培養した。

図2 セルフクロニングに用いた DNA 断片の構造

翻訳伸長因子プロモーター (*TEF1p*) をキシロロキナーゼ遺伝子 (*XKS1*) に連結することにより、高発現型 *XKS1* (*TEF1p-XKS1*) を作成した。この両端に、リジン要求性相補マーカー遺伝子 *LYS2* の 3'-末端側半分 (*LYS2-3'*) と 5'-末端側半分 (*LYS2-5'*) を付加し、*S. cerevisiae* 染色体上の *LYS2* 遺伝子座で相同組換えが起こるようにした。遺伝子名の後の *p* はプロモーター領域を、*t* はターミネーター領域を示す。

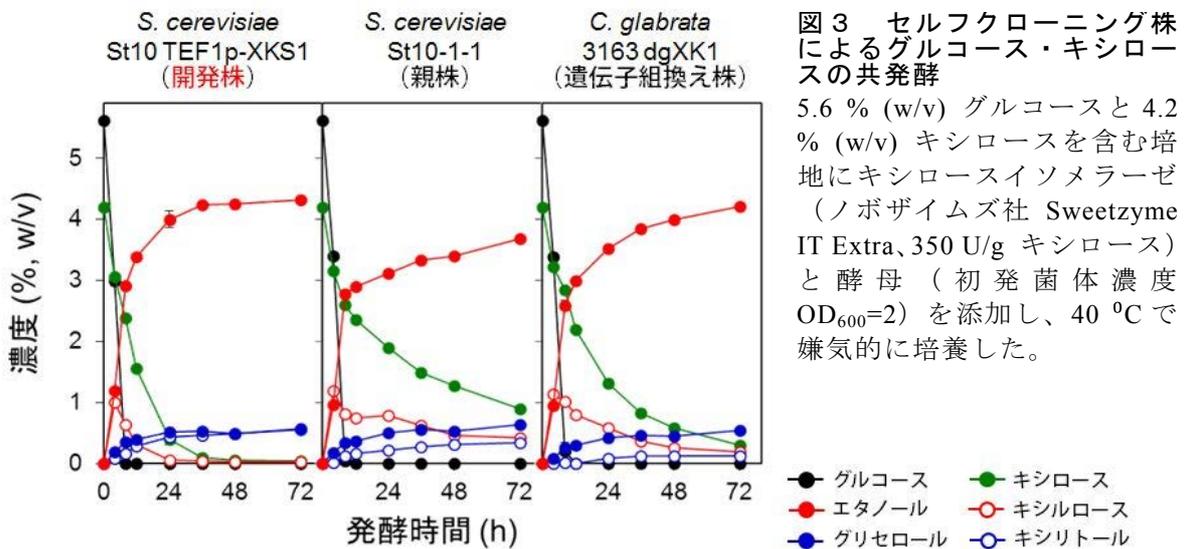


図3 セルフクロニング株によるグルコース・キシロースの共発酵
5.6% (w/v) グルコースと 4.2% (w/v) キシロースを含む培地にキシロースイソメラーゼ (ノボザイムズ社 Sweetzyme IT Extra, 350 U/g キシロース) と酵母 (初発菌体濃度 $OD_{600}=2$) を添加し、40 °C で嫌氣的に培養した。

(榊原祥清)

[その他]

中課題名 : セルロース系バイオマスエタノール変換の高効率・簡易化技術の開発
中課題番号 : 220c0
予算区分 : 交付金、委託プロ (バイオ燃料)
研究期間 : 2012~2013 年度
研究担当者 : 榊原祥清、中村敏英、徳安健
発表論文等 : 榊原祥清ら 「キシロースを高温で発酵する方法」 特開 2014-14360