

## 2 発酵技法についての研究

### 2-1 耐熱性酵母を用いた同時糖化発酵法の検討

#### 2-1-1 はじめに

木質系バイオマスからのバイオエタノールを生産するには、前処理、糖化、発酵、精製工程が必要である。ここで糖化と発酵を同時に行うことで、糖化段階における生成物阻害を避けることができる。現在、糖化で用いられる糸状菌由来の酵素の至適温度は約 50°C であり、発酵も同温度で行うことが望ましいが、通常酵母の至適温度は 30°C 付近であり、同時糖化発酵は実質的に非効率にならざるを得ない。近年、遺伝子工学的手法によって酵母そのものに糖化酵素を生産させ、同時糖化発酵を行う試みもなされているが、その際に発現させる糖化酵素の至適温度も約 50°C である。これまでにエタノール生産を目的として、耐熱性菌や耐熱性酵母が取得されているものの、高温におけるエタノール生産性は十分ではない。その理由の一つとしてエタノール耐性の低さが挙げられている。また、木質系バイオマスに二番目に多く含まれるキシロースは、酵母にとって難発酵性糖という問題もある。遺伝子組み換えによってキシロース発酵性酵母が育種されているが、遺伝子組み換えについては、カタルヘナ法で環境中への流出が厳しく制限されており、実用化するには専用の施設が必要であり高コストである。また、本研究では、同時糖化発酵とともにフラッシュ連続気化によるアルコール気化除去を組み合わせることでアルコールによる生成物阻害を回避することを目指しているため、酵母に耐熱性が備わっていることが望ましい。

以上を踏まえて、本研究では、木質系バイオマスの構成糖またはその多糖から高温下（50°C 付近）で高効率にエタノールを生産する酵母の開発および取得株を用いた同時糖化発酵法の開発を目的とした。耐熱性酵母を用いることで、高効率な同時糖化発酵が可能になるだけでなく、発酵槽の冷却コストを減らすことや、蒸留のコストを抑えることも期待される。

#### 2-1-2 耐熱性酵母の選抜

##### 【目的】

発酵およびフラッシュ連続気化によるアルコール気化除去を組み合わせ、アルコールによる生成物阻害を回避し、効率の良いアルコール発酵を実現するため、耐熱耐アルコール菌株の選抜を目的とした。

第一段階として、菌株保存機関から分譲されたエタノール発酵の標準株および耐熱性酵母の標準株について、培養温度 30 及び 45°C でのエタノール生成能を比較し、エタノール生成能の高い耐熱性酵母の選抜を行った。

##### 【材料および方法】

##### 供試菌株および培地

独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門 (NBRC: NITE Biological Resource Center) から分譲された、エタノール発酵の標準株 *Saccharomyces cerevisiae* 3 株、耐熱性酵母の標準株 *Kluyveromyces marxianus* 2 株の計 5 株を (表 2-1-1) を供試菌株として用いた。継代培地には YPD 液体培地 (表 2-1-2) に 2% アガロースを入れ、121°C、20 分間オートクレーブ滅菌をした後、室温で固化させたものを用いた。前培養および本培養用培地には 121°C、20 分間オートクレーブ滅

菌をした YPD 液体培地を用いた。

表 2-1-1 供試菌株

Strain No.	Strain
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 0224
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 1136
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NBRC 100929
4	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 0219
5	<i>Kluyveromyces marxianus</i> NBRC 1777

表 2-1-2 YPD 培地組成

Composition	g/l
Glucose	20
Polypeptone	20
Yeast extract	10

#### 前培養および本培養

前培養は、滅菌済み YPD 液体培地 5 ml およびマグネチックスターラーバーを含む 13.5 ml 容ラボランスクリーフ瓶に、継代培地から 1 白金耳の細胞を無菌的に接種し、マグネチックスターラー（株式会社 三商）を用いて 30 °C、12 時間の攪半培養を行った。

本培養は、滅菌済みの YPD 液体培地 8 ml およびマグネチックスターラーバーを含む 20 ml 容ラボランスクリーフ瓶に、前培養液を最終 O.D.<sub>600</sub> の値が 0.4 となるように接種し、マグネチックスターラーを用いて 30 または 45 °C の攪半培養を行った。それぞれ 3 時間毎に 200 μl ずつ採取し、100 μl を用いて O.D.<sub>600</sub> を測定し、残り 100 μl を遠心分離（20,000×g、10 分間）した後、上清のグルコースおよびエタノール濃度を分析した。グルコースが全て消費された時点で本培養を終了した。

#### 分析方法

前培養液および本培養液の O.D.<sub>600</sub> は、適宜希釈液を作成し、紫外可視分光計（UV-VIS, JASCO 社製）を用いて測定した。

上清のグルコースおよびエタノール濃度は ULTRON PS-80P カラム（信和化工株式会社製）および示差屈折検出器（Jasco 社製）を装着した高速液体クロマトグラフィー（HPLC, Jasco 社製）により分析した。溶離液はイオン交換水を使用し、流速 1 ml/min で、カラムオープン温度 80 °C で分析を行った。グルコース消費量および生成エタノール量を用いて、(2-1)式から算出される理論エタノール収率 51.1% (g-ethanol/g-glucose) を 100% として、エタノール発酵における収率を算出した。



【結果および考察】

本培養における O.D.<sub>600</sub> およびグルコース濃度を図 2-1-1 に示す。グルコース濃度測定結果から *K. marxianus* NBRC 1777 株が 30℃、45℃ともに高い増殖能力、グルコース消費能力を示していた。

本培養におけるエタノール濃度の結果を図 2-1-2 に示す。培養温度 30℃ ではいずれの菌株においても 9 時間以内にグルコースを全て消費した。生成エタノール濃度では、*S. cerevisiae* で 7.6-7.8 g/l と株間でほとんど差はなかったが、*K. marxianus* では NBRC 0219 株 6.7 g/l, NBRC1777 株 7.4 g/l と差が確認された。以上の結果から、培養温度 30℃ では *S. cerevisiae* がエタノール生産に適していた。

培養温度 45℃ では *S. cerevisiae* 3 株においてエタノール生成は確認されず、グルコース消費および O.D.<sub>600</sub> の増加も無いことから、生育できなかつたと示唆された。一方、*K. marxianus* では本培養時間が 15 時間に延長したものの、NBRC 0219 株 6.5 g/l, NBRC1777 株 7.3 g/l と培養温度 30℃ とほとんど変わらない値が得られた。特に NBRC1777 株は、培養温度 30℃ の *S. cerevisiae* と比較してもほぼ同様のエタノール生成を行っていることから、エタノール生成能の高い耐熱性酵母の標準株として選択した。

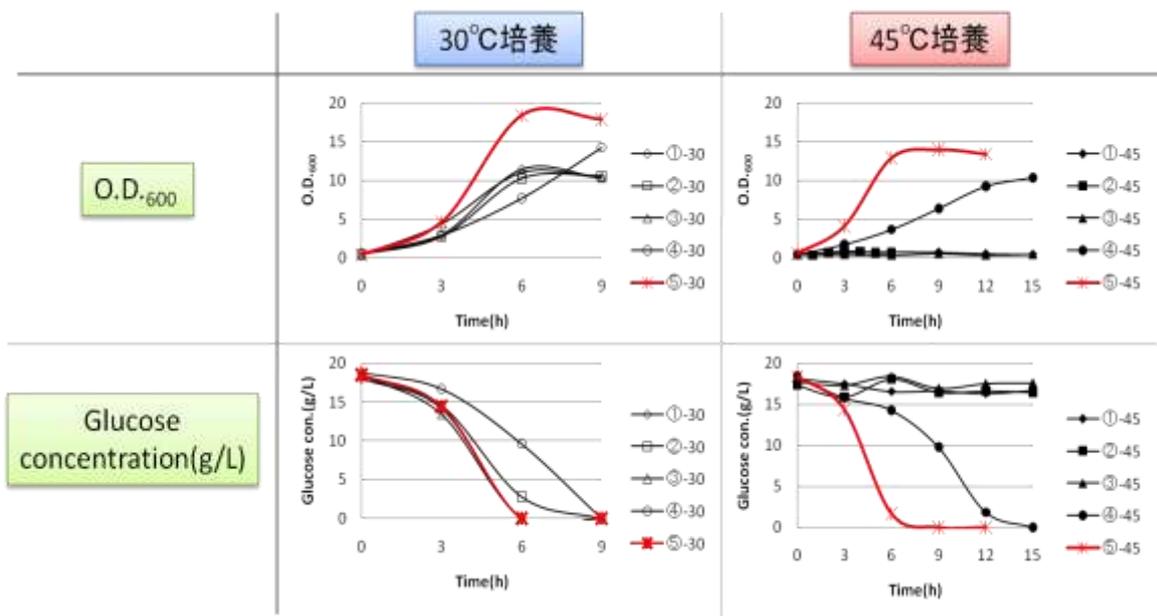


図 2-1-1 30℃及び45℃における *Saccharomyces cerevisiae* および *Kluyveromyces marxianus* の細胞増殖 (O.D.<sub>600</sub>) およびグルコース消費

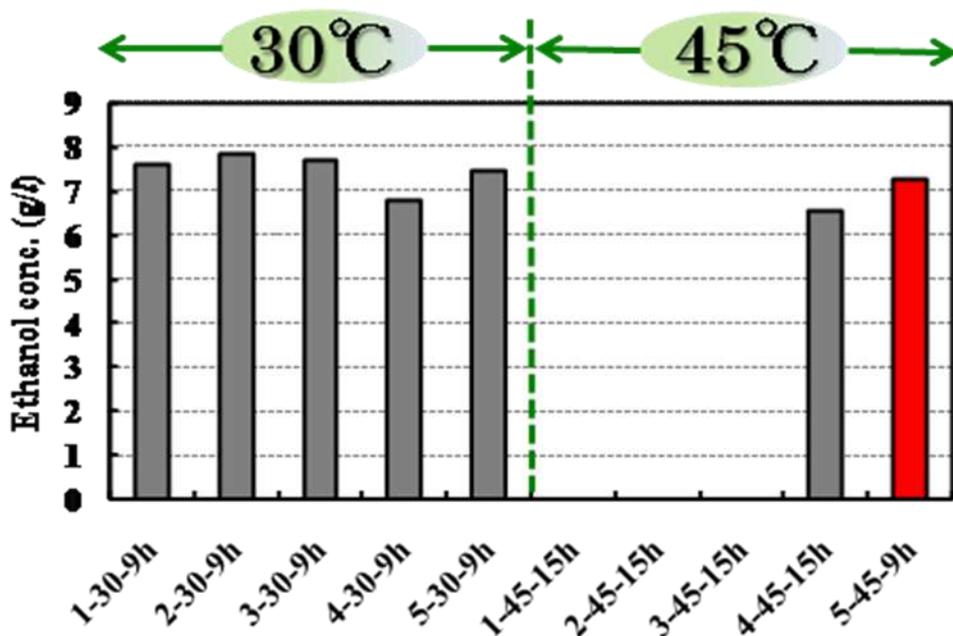


図 2-1-2 30°C及び45°Cにおける *Saccharomyces cerevisiae* および *Kluyveromyces marxianus* のエタノール濃度 (g/l)

### 2-1-3 耐熱性酵母による同時糖化発酵

2-1-2 で選抜した *K.marxianus* NBRC1777 を用いて、前処理ヒノキからエタノールが生産できるか確認するため、45°Cにおける同時糖化発酵を行った。また比較対照として、30°Cで *S.cerevisiae* を用いて同様の条件で同時糖化発酵を行った。

#### 【材料および方法】

##### 供試菌株および培地

2-1-2 で選抜した、*K. marxianus* NBRC1777 株及びエタノール生産株の標準株として *S. cerevisiae* NBRC 100929 供試菌株として用いた。前培養には YPD 培地 (表 2-1-2) を用い、同時糖化発酵用には YPD 培地の炭素源をグルコースからヒノキの前処理物 (EtOH75/W25/A1\_B10) に変え、1M クエン酸ナトリウムバッファーで pH を 5 に調製し、121°C、20 分間オートクレーブ滅菌済みした後、糖酵素液を添加したものを用いた (表 2-1-3)。

##### 前培養および本培養

前培養は 2-1-2 の方法に準じて、全て 30°Cで行った。本培養は、滅菌済みの本培養用培地およびフィルター滅菌済み酵素液を含む計 8 ml、マグネチックスターラーを含む 20 ml 容ラボランスクルー瓶に、前培養液を最終 O.D.<sub>600</sub> の値が 0.4 となるように接種し、マグネチックスターラーを用いて 30 (*S. cerevisiae*) または 45°C (*K.marxianus*) の攪半培養を行った。遠心分離 (20,000×g、10 分間) した後、上清のグルコースおよびエタノール濃度を分析した。

## 分析方法

グルコース濃度およびエタノール濃度の分析は 2-1-2 の方法に準じた。

表 2-1-3 同時糖化発酵用培地組成

	μl/本	Concentrated medium	
		Composition	g/l
Ac2	656	Polypeptone	40
40% OPBG	40	Yeast extract	20
1M citrate buffer	400		
D.W.	2904		
Concentrated medium	4000		
Total	8000		
EtOH75/W25/A1_B10	0.8g		
pH	5		

### 【結果および考察】

30℃ (*S. cerevisiae*) および 45℃ (*K.marxianus*) での同時糖化発酵の結果を図 2-1-3 に示す。培養 24 時間目まで 45℃の同時糖化発酵においてエタノール生産速度が高く、16g/l まで達したが、その後一定となった。一方、48 時間目には 30℃での同時糖化発酵との逆転がおり、その後も 30℃では緩やかに増加した。*K.marxianus* は 45℃の温度条件下では、24 時間目までエタノール生成が行われるが、その後は菌の代謝活性が低下したと考えられる。45℃ (*K.marxianus*) の培養液中には、培養後期になると不明ピークが出現した (Data not shown)。本菌株はエタノールとともに有機酸を生成することが知られており、高温下のストレスに加えて、有機酸等の副生成物の蓄積により、エタノール生成が抑制されたと考えられる。

本実験結果では約 16g/l のエタノールが得られ、絶対量に換算すると約 0.128g のエタノールが得られたことになる。ヒノキ前処理物を 0.8 g 投入しており、そこにはグルコースおよびマンノースが総量で 0.48g 含まれている。1-6 の結果から、EtOH75/W25/A1\_B10 の糖収率 37% を加味すると、理論的に得られる糖は 0.1776 g であり、そこから 100% の発酵収率が行われたとしても得られるエタノールは 0.09g となり、今回の実験で得られたエタノールより少ない。本実験では同時糖化発酵を行ったため、セルラーゼに対する生成物阻害が起らず、より効率的な糖化が進んだと示唆された。

水熱処理法などでは、高温下でグルコースやキシロースなどの単糖の一部がフルフラールや 5-HMF などに変換されることが知られている。これらの物質は発酵阻害物質であり、わずかな量でもエタノール生産に影響を及ぼす。本実験ではオルガノソルブ法およびボールミル処理を施したヒノキサンプルを基質として用いている。オルガノソルブ法では水を含み、高温下で反応させたが、本実験で正常にエタノール生産が行われていたことから、発酵阻害物質の生成を防ぎながら、糖化に効果的な前処理を行えたことが明らかになった。

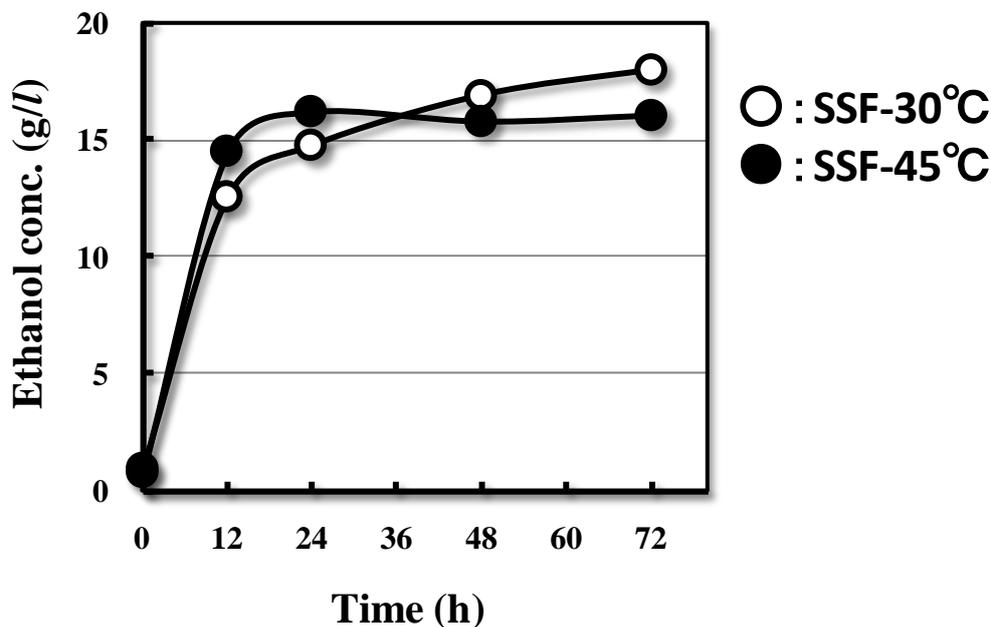


図 2-1-3 30℃および45℃における同時糖化発酵でのエタノール生産

#### 2-1-4 耐熱性酵母による市販セルロースからの同時糖化発酵

【材料および方法】

##### 供試菌株および培地

供試菌株は 2-1-3 に準じた。継代培地及び前培養培地は、2-1-3 に準じた。また、本培養培地には表 2-1-4 に示す YPD 改変培地を用いた。

表 2-1-4 YPD 改変培地

Composition	(g/l)
Cellulose or organosolv treated sample	10
Polypeptone	20
Yeast extract	10
Acremozyne*	2 g**
1 M citrate buffer	50 ml
D.W.	933 ml

##### 前培養および本培養

前培養は、200 ml の滅菌済み YPD 液体培地が入った 500 ml 容エルレンマイヤーフラスコに、継代培地から 1 白金耳の細胞をクリーンベンチ内で接種し、30℃、18 時間、150 rpm の攪半振

とう培養を行った。

市販セルロース粉末を用いた同時糖化発酵は、滅菌済みの YPD 液体改変培地 1 L が入った 2 L 容エルレンマイヤーフラスコに、前培養液を最終 O.D.<sub>600</sub> の値が 0.4 となるように接種し、フィルター滅菌済みの Acremozyme を添加後、43°C、150 rpm の攪半振とう培養を行った。それぞれ 0、6、12、24 時間に 1 ml ずつ採取し、その後は 24 時間毎に同量採取した。遠心分離 (20,000×g、10 分間) した後、上清の単糖およびエタノール濃度を分析した。

前培養液の O.D.<sub>600</sub> は、適宜希釈液を作成し、紫外可視分光計 (UV-VIS, JASCO 社製) を用いて測定した。上清の単糖およびエタノール濃度は 2-1-2 に準じた。

#### 【結果および考察】

市販のセルロース粉末からの Acremozyme (明治製菓株式会社) と耐熱性酵母の *K. marxianus* NBRC1777 株による同時糖化発酵の結果を図 2-1-4 に示す。予備検討の結果から、43°C の温度に設定した。72 時間目までエタノール濃度が増加し、その後 168 時間目まで一定となった。72 時間目以降、グルコースが蓄積し始め、168 時間まで増加した。168 時間目に反応温度を 30°C に設定したところ、再び発酵がすすみ、216 時間までグルコースが減少するとともにエタノール濃度が増加した。蓄積したグルコースが消費された 216 時間以降は、エタノール濃度は一定であった。本実験結果より、*K. marxianus* NBRC1777 株を用いて 43°C で同時糖化発酵を行う場合、72 時間で菌体の活性が落ちることが明らかになった。

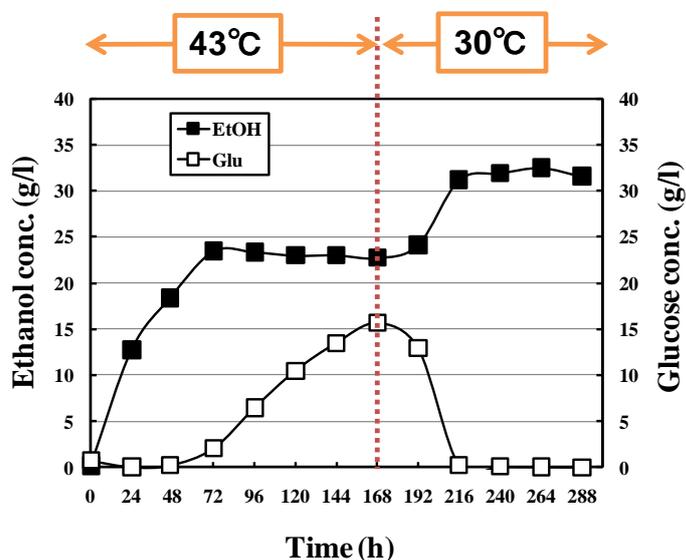


図 2-1-4 市販セルロース粉末からの同時糖化発酵

## 2-1-5 耐熱性酵母によるオルガノソルブ処理物からの同時糖化発酵

【材料および方法】

### 供試菌株および培地

供試菌株および培地は 2-3. に準じた。

### 前培養および本培養

前培養は、2-1-2 に準じた。

オルガノソルブ処理物を用いた同時糖化発酵の検討では、滅菌済みの YPD 液体改変培地 60 ml が入った 100 ml 容エルレンマイヤーフラスコに、前培養液を最終 O.D.<sub>600</sub> の値が 0.4 となるように接種し、フィルター滅菌済みの Acremozyme を添加後、43°C、150 rpm の攪半振とう培養を行った。それぞれ 0、6、12、24 時間に 1 ml ずつ採取し、その後は 24 時間毎に同量採取した。遠心分離 (20,000×g、10 分間) した後、上清の単糖およびエタノール濃度を分析した。

【結果および考察】

オルガノソルブ処理物からの Acremozyme (明治製菓株式会社) と耐熱性酵母の *K. marxianus* による同時糖化発酵の結果を図 2-1-5 に示す。全ての基質において、エタノール生産は 72 時間までに終了しており、72 時間目以降、30°C にしてもエタノール濃度は増加しなかった。また反応液中のグルコース濃度も蓄積しなかったことから (Data not shown)、Acremozyme によって加水分解可能な多糖の大部分は 72 時間までに分解されたと考えられる。エタノール濃度では、EtOH50/W50/TFA において最も高く、ついで MeOH50/W50/HCl0.4、昨年度の酢酸添加オルガノソルブ処理とボールミル粉碎処理を組み合わせた二種となった (図 2-1-5. (a))。糖化の結果 (図 1-3-9.) から推察されるエタノール濃度より高くなっており、同時糖化発酵の効果が確認された。しかしながら、前処理前のヒノキに含まれる糖を理論収率 ( $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$ ) でエタノールに変換した値を 100% とした時の結果を比較すると (図 2-1-5. (b))、固形分収率の高い昨年度の処理物が 51~53% と高く、最もエタノール濃度の高かった EtOH50/W50/TFA で 42% であった。

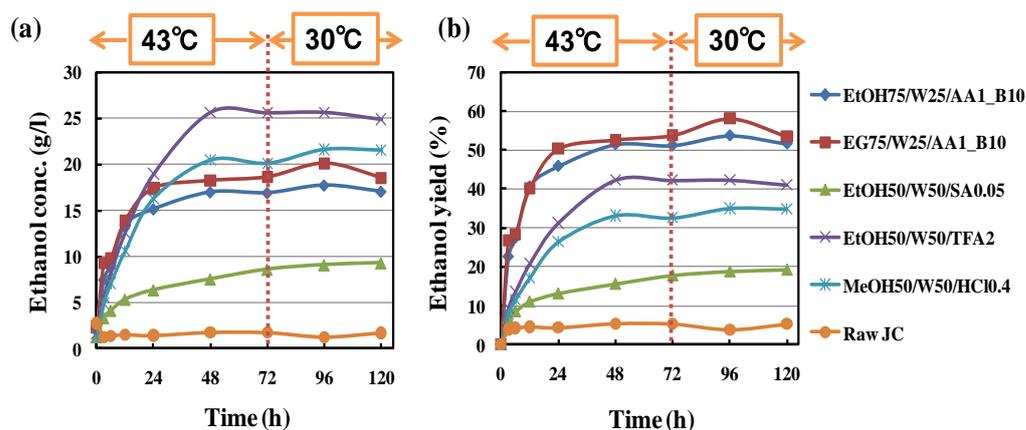


図 2-1-5 オルガノソルブ処理物からの同時糖化発酵

## 2-2 キシロース資化性エタノール生産酵母に関する検討

### 2-2-1 キシロース資化性酵母の自然界からの単離

#### 【実験方法】

自然界に生息するキシロース資化性のアルコール産生菌を探索するため、フィールドより各種サンプルを採取した。

サンプルは、公園や雑木林などで過熟して落下し、発酵した果実やその周辺土壌、雑木林などで発酵した樹液を浸出し、昆虫等を誘引している樹木やその周辺土壌、草食性の動物を飼育している土地で、排泄物が混在している土壌、食品中に自然発生したコロニーなど、多岐にわたり採取した。採取は滅菌済みのディスポーザブルスクリーキャップ試験管を使用し、培地中に回収した。培地の組成は次項に記した酵母単離用培地と同様のものである。

採取したサンプルを炭素源をキシロースのみに制限した培地中で培養した。培地の組成は表 2-2-1 に示す。

表 2-2-1 キシロース資化性酵母単離用液体培地の組成

成分	含有量
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	2g
Xylose	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.16g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.7g
NaCl	0.5g
Yeast Extract	1g

上記の成分のうち、(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO とキシロース以外の成分を D.W. 880mL に溶解し、オートクレーブで滅菌した。キシロースは別途 D.W. に溶解後 100mL にメスアップし、オートクレーブで滅菌してその他の成分と混合した。(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO は 10%水溶液を作成し、フィルターろ過によって滅菌した後、20mL をその他の成分と混合した。

採取したサンプルをこの培地中で 2~4 日間、26°C で振盪培養した後、増殖したキシロース資化性菌を含む培地を 100 μL 採取し、新たな培地 10mL に接種して培養した。

同様の操作を数回繰り返すことで継代して培養し、得られた菌をキシロース資化性菌とした。

さらに、得られたキシロース資化性菌の中からエタノール耐性を持つ菌を選抜した。

5%エタノールを含む培地を作成し、ここにキシロース資化性菌を含む培地 100 μL を接種して 26°C で 48 時間振盪培養した。培地の詳細な組成は表 2-2-2 に示す。表 2-2-2 の成分のうち、(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO とキシロース以外の成分を D.W. 830mL に溶解し、オートクレーブで滅菌した。キシ

ロースは別途 D.W.に溶解後 100mL にメスアップしてオートクレーブで滅菌後、その他の成分と混合した。(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO は 10%水溶液を作成し、フィルターろ過によって滅菌した後、20mL をその他の成分と混合した。最後にエタノール 50mL を添加し混合した。

表 2-2-2 エタノール耐性酵母単離用液体培地の組成

成分	含有量
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	2g
Xylose	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.16g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.7g
NaCl	0.5g
Yaest Extract	0.1g
Ethanol	50mL

### 菌の単離と選抜

得られたアルコール耐性キシロース資化性菌を含む培養液を滅菌水で適度に希釈し、以下の組成の寒天培地上に塗布して培養した。寒天培地の組成は表 2-2-3 に示す。

表 2-2-3 キシロース資化性酵母単離用寒天培地の組成

成分	含有量
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	2g
X y l o s e	20g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
K <sub>2</sub> H P <sub>4</sub> O	0 . 1 6 g
M g S <sub>4</sub> O7H <sub>2</sub> O	0.7g
N a C l	0 . 5 g
Y a e s t E x t r a c t	0.1g
A g a r	10g

上記の成分のうち、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  とキシロース以外の成分を D.W. 880mL に溶解し、オートクレーブで滅菌した。キシロースは別途 D.W. に溶解後 100mL にメスアップし、オートクレーブで滅菌後、その他の成分と混合した。 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  は 10% 水溶液を作成し、フィルターろ過によって滅菌した後、20mL をその他の成分と混合した。以上の操作を培地が固化する前に行い、混合した培地を滅菌済みシャーレに 10mL ずつ分注して寒天培地とした。

前段階において選抜した菌の培養液を白金耳によって寒天培地に塗布し、26°C、48 時間培養した。培養後、それぞれ寒天培地上に発生したコロニーのうち 8 つを選択して採取し、計 112 の株を単離した。これらのサンプルについて、それぞれの株を表 2-2-1 に示した組成の培地で継代して培養し、さらに増殖の良い株を選抜した。

選抜した株を新しい培地 10mL に 1 白金耳接種し、26°C、48 時間振盪培養した後、培地を回収し、培地中に含まれるエタノールの有無を GC/MS により分析した。陽性対照としてキシロース資化性のアルコール産生酵母として知られる、*Candida shehatae* ATCC 22984 株を同様の条件で培養し、測定した。

## 培地中のエタノールの測定

培地中に含まれるエタノールはガスクロマトグラフ質量分析、もしくは Ethanol Assay Kit (BioVision) によって測定した。それぞれの測定手順は以下の通りである。

### ・ガスクロマトグラフ質量分析による培地中のエタノールの測定

測定はヘッドスペースマイクロ固相抽出ーガスクロマトグラフ質量分析-選択イオン検出法 (HS-SPME-GC-MS-SIM) でおこなった。測定法の概要を以下に示す。

分析は試験水 0.1 mL を 2 mL のクリンプトップバイアルに正確に量り取り、HS-SPME-GC-MS-SIM 測定用試料液とした。HS-SPME-GC-MS-SIM は後述の分析条件に従い測定した。

### 試薬

エタノール：和光純薬工業

水：日本ミリポア製純水製造装置 Elix10 と超純水製造装置 Milli-Q Gradient を組み合わせたシステムにより製造

### 分析機器

Agilent technologies, 5973MSD with FOCUS (ATAS)

### GC-MS の分析条件

#### ・ GC

カラム：関東化学社製 MIGHTY CAP ENV-624MS (60 m x 0.25 mm i.d., 膜厚 1.4 μm)

カラム温度：40°C (1 min) → +20 °C /min → 200 °C (9 min)

注入口温度：250℃  
注入法：スプリット法（スプリット比 30:1）  
キャリアガス：ヘリウム（線速度：26.0 cm/min）  
トランスファーライン温度：250℃

・MS

イオン化法：EI  
イオン化電圧：70 eV  
イオン源温度：230℃  
検出モード：SIM法

・モニターイオン

エタノール：45（定量用イオン），31（確認用イオン）  
本分析条件においてエタノールの保持時間は5.8分であった。

・SPME

fiber：65μm PDMS/DVB  
プレインキュベーション：10 sec  
インキュベーション温度：40℃  
攪拌速度：250 rpm  
抽出時間：1 min  
脱着時間：1 min  
焼き出し：250℃, 10 min

標準溶液の調製

エタノール 0.1 mL を正確に量り取り、培養液と混合して 1% の標準溶液を調製した。この溶液をさらに培養液で希釈し、0.1, 0.01 及び 0.001% の標準溶液を調製した。

検量線の作成

2 mL のクリンプトップバイアルに標準溶液 0.1 mL を正確に量り取り、HS-SPME-GC-MS-SIM 法で測定した。m/z=45 のマスクロマトグラムから得られたピーク面積を縦軸に、横軸に標準溶液の濃度をとり直線回帰により検量線を作成した。

同定、定量

上記の検量線により、外部標準法で試料溶液中のエタノール濃度を算出した。

・ Ethanol Assay Kit による培地中エタノールの測定

培養終了後、培地中に産生されたエタノール濃度を測定した。エタノール濃度の測定には Ethanol Assay Kit (BioVision) を使用した。測定手順は以下の通りである。

Pure ethanol standard 50μL を Assay Buffer 808.7μl に混合する

混合液を 10 $\mu$ L 取り、Assay Buffer 990 $\mu$ L と混合し、10n mol/ $\mu$ L Ethanol standard とする。

10n mol/ $\mu$ L Ethanol standard を 100 $\mu$ L 取り、900 $\mu$ L の Assay Buffer で希釈し、1mM Ethanol standard とする。

測定用プレートのウェルに 1mM Ethanol standard 0、2、4、6、8、10 $\mu$ L 分注して Assay Buffer で 50 $\mu$ L とし、0、2、4、6、8、10n mol/well の検量線とする。

サンプルは濃度に応じて Assay Buffer で希釈したものを 10~30 $\mu$ L/well 使用する。

キット付属の Ethanol Probe は使用前に室温に戻しておく。

Ethanol Enzyme Mix のチューブに 220 $\mu$ L の Assay Buffer を添加し、混合しておく。

測定サンプル 1 ウェルあたり Ethanol Assay Buffer 46 $\mu$ L、Ethanol Probe 1 $\mu$ L、Ethanol Enzyme Mix 1 $\mu$ L を混合し、サンプル数に合わせて必要な量の Reaction Mix を調製しておく。

各ウェルに Reaction Mix を添加し、室温で 60 分間反応させる。

570nm の O.D.を測定し、検量線よりエタノール量を算出する。

希釈率よりサンプルに含まれるエタノール量を算出する。

## 培養条件の検討

さらに、スクリーニングにおいて選抜された 6 株と *C. shehatae* ATCC22984 について、培養条件によるアルコール産生の効率を比較するため、培養中における pH および温度の条件検討を行った。

比較条件は、pH 4.3、pH 5.8、pH 7.0、および培養温度 26 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C のそれぞれ 3 条件の組み合わせで、計 9 種類である。

培地の組成および調製法は表 1 に示したものと同様で、NaOH および HCl によって pH を調整して使用した。

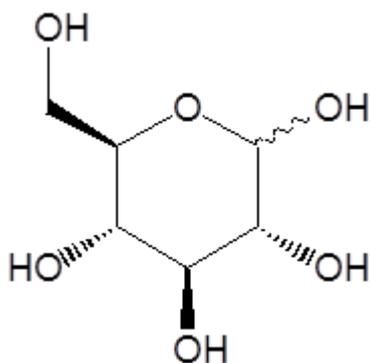
pH を 4.3、5.8、7.0 に調整した培地を試験官にそれぞれ 10mL 分注し、試験する菌株を 1 白金耳接種して 26 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C に設定したインキュベーター内で 96 時間振盪培養した。

培養終了後、培地に含まれるエタノールの量を GC/MS によって測定した。エタノールの分析方法は前項に記した条件と同様である。

## 各種炭素源を用いた培養

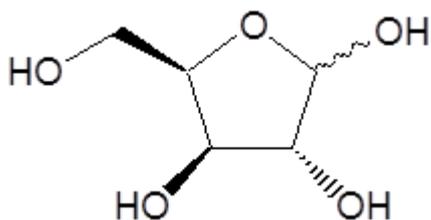
各種の炭素源を含む培地を作成し、対照株および得られた単離株による資化性、エタノール産生量の比較を行った。

炭素源としては D-グルコース、D-キシロース、D-ガラクトース、D-マンノース、L-アラビノースを使用した。アラビノースについては自然界での分布が L 体に偏っているため、試験対照も L 体とした。



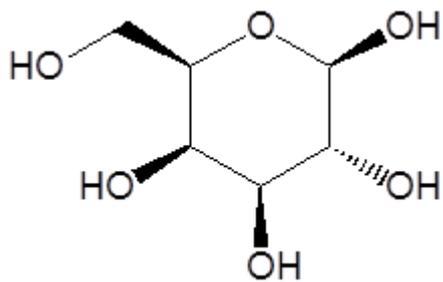
D-グルコース

略称	Glc
分子式	$C_6H_{12}O_6$
M.W.	180.16
CAS 登録番号	50-99-7
アルドヘキソース (六炭糖)	



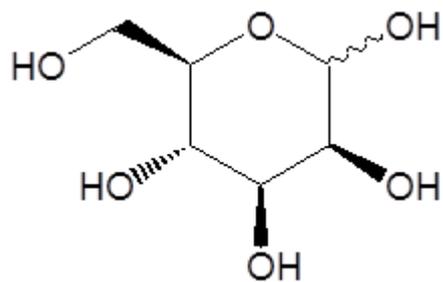
D-キシロース

略称	Xyl
分子式	$C_5H_{10}O_5$
M.W.	150.13
CAS 登録番号	58-86-6
アルドペントース (五炭糖)	



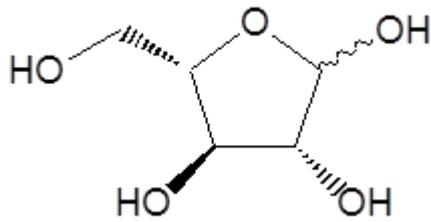
D-ガラクトース

略称	Gal
分子式	$C_6H_{12}O_6$
M.W.	180.06
CAS 登録番号	26566-61-0
アルドヘキソース (六炭糖)	



D-マンノース

略称	Man
分子式	$C_6H_{12}O_6$
M.W.	180.16
CAS 登録番号	3458-28-4
アルドヘキソース (六炭糖)	



L-アラビノース

略称 Ara  
 分子式  $C_5H_{10}O_5$   
 M.W. 150.13  
 CAS 登録番号 87-72-9  
 アルドペントース (五炭糖)

使用した培地の組成は以下の通りである。

成分	含有量 (/L)
$(NH_2)_2CO$	2 g
$KH_2PO_4$	1 g
$K_2HPO_4$	0.16 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.7 g
NaCl	0.5 g
Yeast Extract	0.1 g

この組成を基本とし、炭素源としてそれぞれ D-グルコース、D-キシロース、D-ガラクトース、D-マンノース、L-アラビノースのいずれかを 0.13 mol / L 添加した 5 種類の培地を作成した。

調製は、上記の成分のうち、 $(NH_2)_2CO$  以外の成分を D.W. 880mL に溶解し、オートクレーブで滅菌した。さらにそれぞれの糖は別途純水に溶解後 100mL にメスアップし、オートクレーブで滅菌してその他の成分と混合した。 $(NH_2)_2CO$  はフィルターろ過によって滅菌した 10%水溶液を作成し、20mL を滅菌を終了したその他の成分と混合した。

それぞれの培地に 10mL あたり 1 白金耳の菌株を接種し、嫌気条件下で 96 時間浸透培養した。培養条件は以前の条件検討の結果より、ATCC 22986 株が 26°C、pH 4.0、Sh 1-3 株が 33°C、pH 5.8、Un-1 株が 26°C、pH 5.8 とした。

対照として菌を接種しない培地を pH5.8、26°C で 96 時間インキュベートした。

## 【結果と考察】

### フィールド中のキシロース資化性菌の探索

フィールドより酵母が生息していると期待される環境を選択し、サンプルを採取した。採取地は、公園や雑木林などで過熟して落下し、発酵した果実やその周辺土壌、雑木林などで発酵した樹液を浸出し、昆虫等を誘引している樹木やその周辺土壌、草食性の動物を飼育している土地で、排泄物が混在している土壌、食品中に自然発生したコロニーなど、多岐にわたる。(図 2-2-1 - 2-2-4)

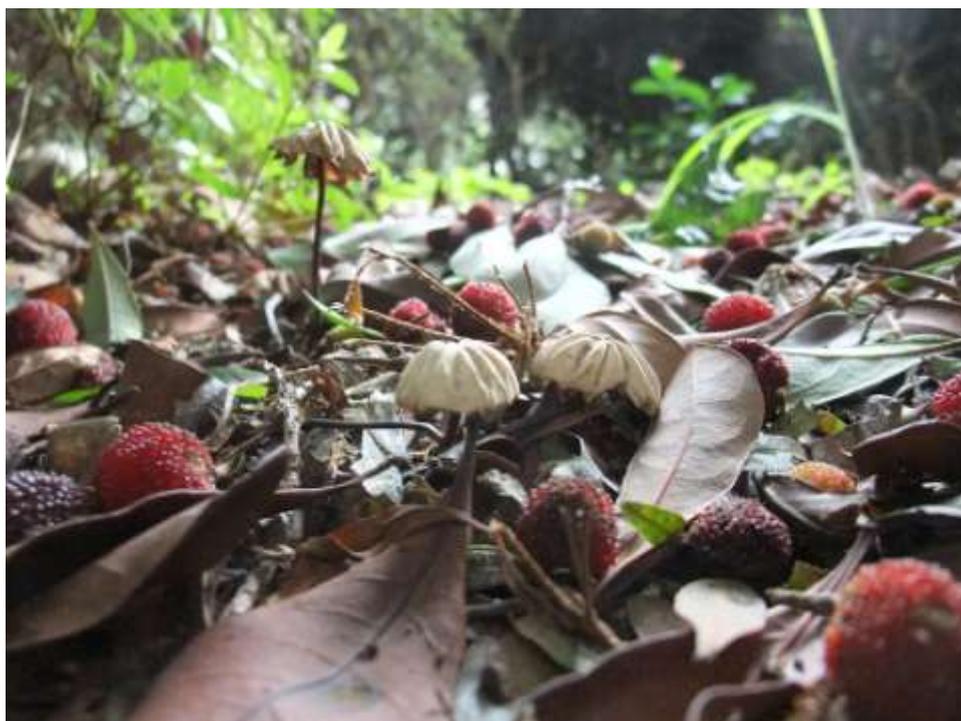


図 2-2-1 Dh サンプル採取地点



図 2-2-2 Fk1 サンプル採取地点



図 2-2-3 Fk2 サンプル採取地点



図 2-2-4 Fk7 サンプル採取地点

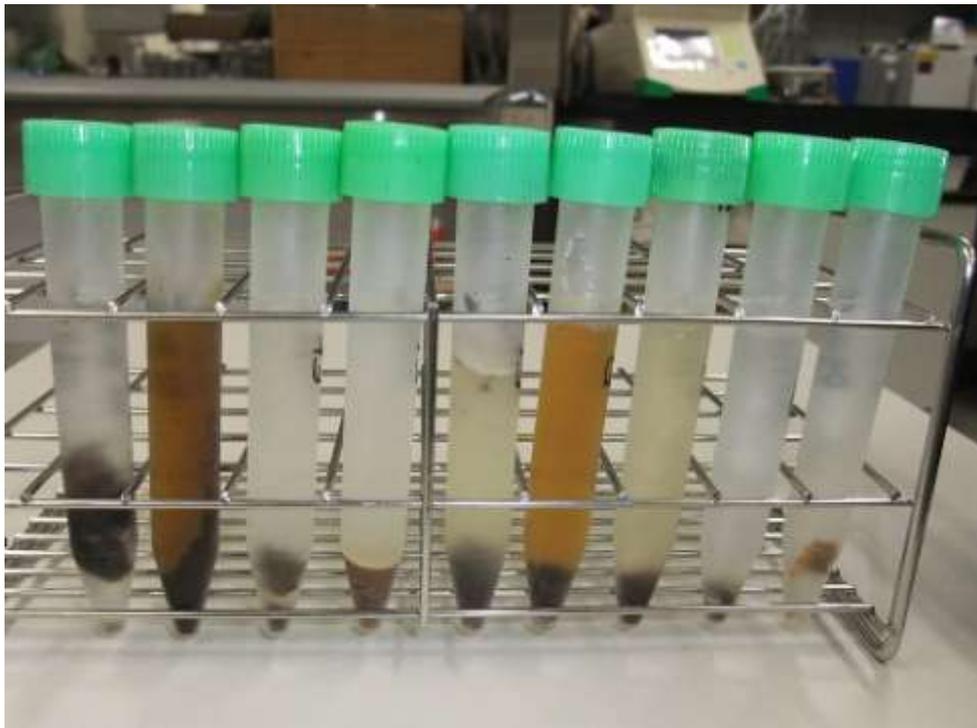


図 2-2-5 採取サンプル

採取したサンプルは滅菌したディスポーザブルのスクリーキャップ試験管にスクリーニング用培地とともに保存し、持ち帰った。(図 2-2-5)

回収されたサンプルは培養して継代を数回繰り返し、スクリーニングを行った (図 2-2-6)



図 2-2-6 キシロース資化性菌の培養

およそ 40 種類のフィールドサンプルより採取された菌を培養し、スクリーニングを行った結果、アルコール耐性があり、かつキシロース資化性を持つ菌を含むサンプルとして、以下の 14 種が選抜された。選抜したサンプルの一覧を表 2-2-4 に示す。

サンプル名	由来
Dh	茨城県つくば市二の宮付近 街路樹の腐敗した落果（ヤマモモ）より採取
Un	食品に自然発生したコロニーより採取
Sh1	和歌山県西牟婁郡白浜町堅田付近 放牧地の土壌より採取
Sh2	和歌山県西牟婁郡白浜町堅田付近 街路樹周辺の土壌より採取
Sh3	和歌山県西牟婁郡白浜町堅田付近 放牧地の土壌より採取
Fk1	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Fk2	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Fk3	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Fk4	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Fk5	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Fk6	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Fk7	京都府福知山市篠尾付近 雑木林の樹木および周辺土壌より採取
Ch	茨城県つくば市小野川付近 雑木林の樹木より採取
Kn	茨城県つくば市小野川付近 雑木林の樹木より採取

表 2-2-4 エタノール耐性を持つキシロース資化性菌サンプル

## キシロース資化性アルコール産生株の単離と選抜

選抜されたエタノール耐性キシロース資化性菌を含む培地を寒天培地に塗布し、菌株を単離した。(図 2-2-7)

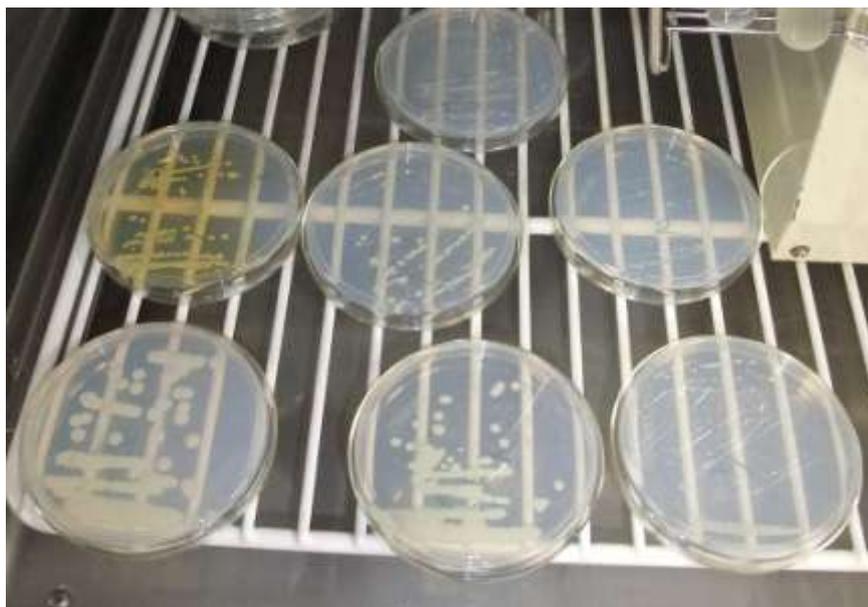


図 2-2-7 寒天培地での菌株の単離

単離した株を再び液体培地で継代して培養し、増殖が旺盛な株を選抜した (図 2-2-8)。これらの株について、48 時間培養後の培地中に含まれるエタノールを測定した結果、いくつかの株について培地中にエタノールが検出され、比較的多かったものとして、Fk3-2、Fk3-7、Fk5-6、F6k-5、Sh1-3、Un-1 の 6 種が挙げられた。

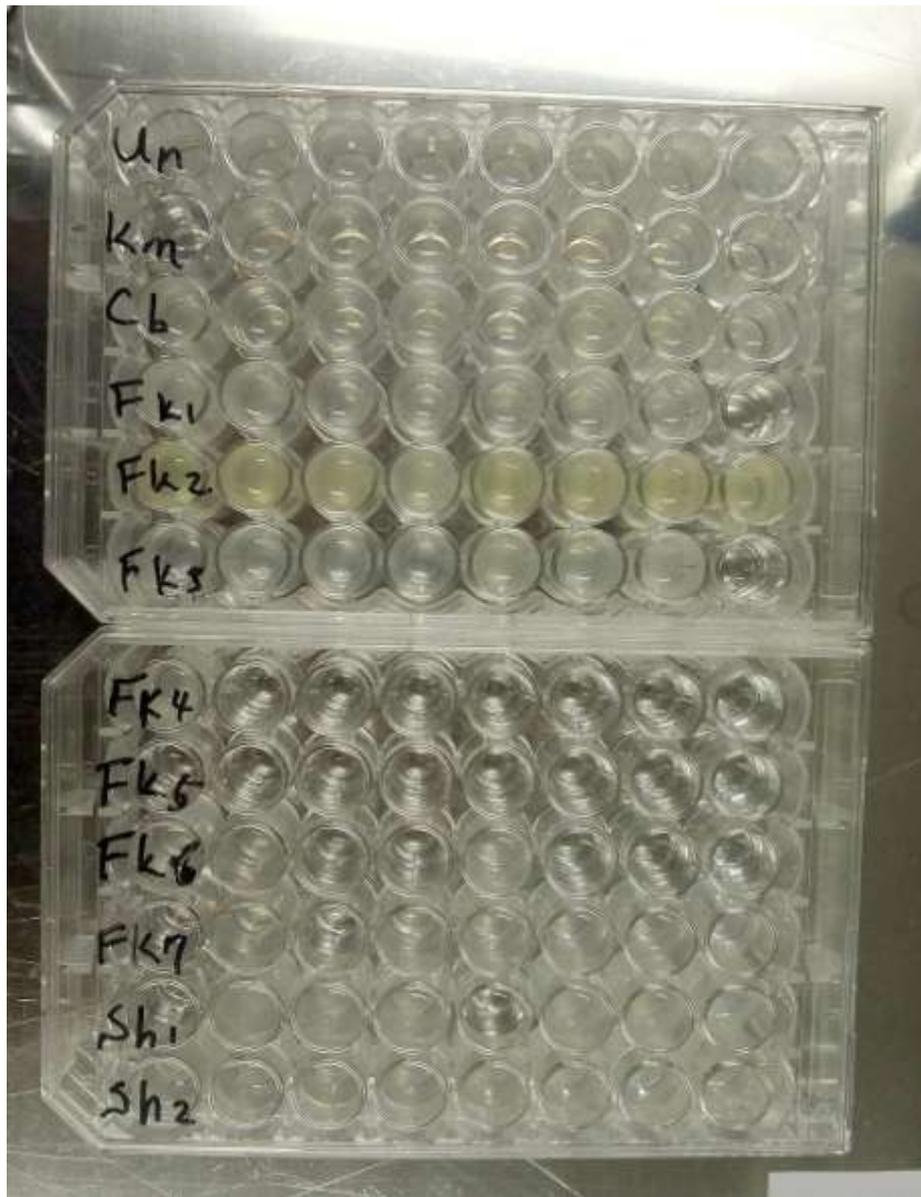


図 2-2-8 単離した株の培養

#### 培養条件によるアルコール産生能の比較

Fk3-2、Fk3-7、Fk5-6、Fk6-5、Sh1-3、Un-1 および *C. shehatae* ATCC22984 について、pH4.3、5.8、7.0 および培養温度 26、33、40℃の各条件を組み合わせ、9 条件下で 96 時間培養を行った。培養 48 時間目の各サンプルの写真を図 2-2-9・2-2-15 に示す。また、各条件下で培地中に産生されたエタノールの濃度を測定した結果を図 2-2-16・2-2-22 に示す。

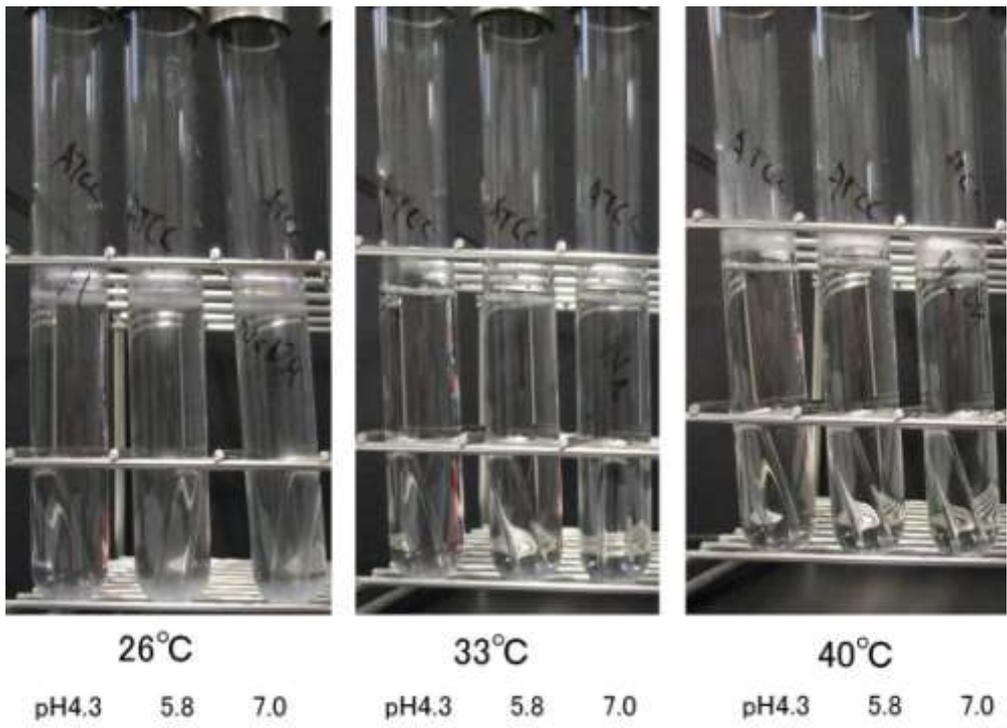


圖 2-2-9 *C. shehatae* ATCC22984 株 培養 48 時間目

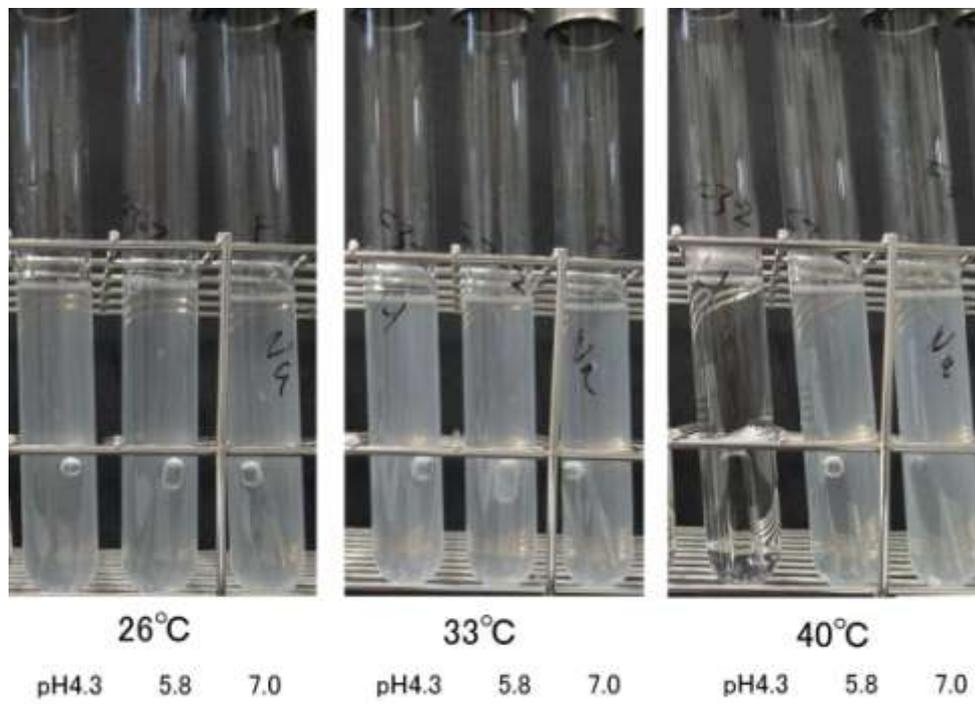


圖 2-2-10 Fk3-2 株 培養 48 時間目

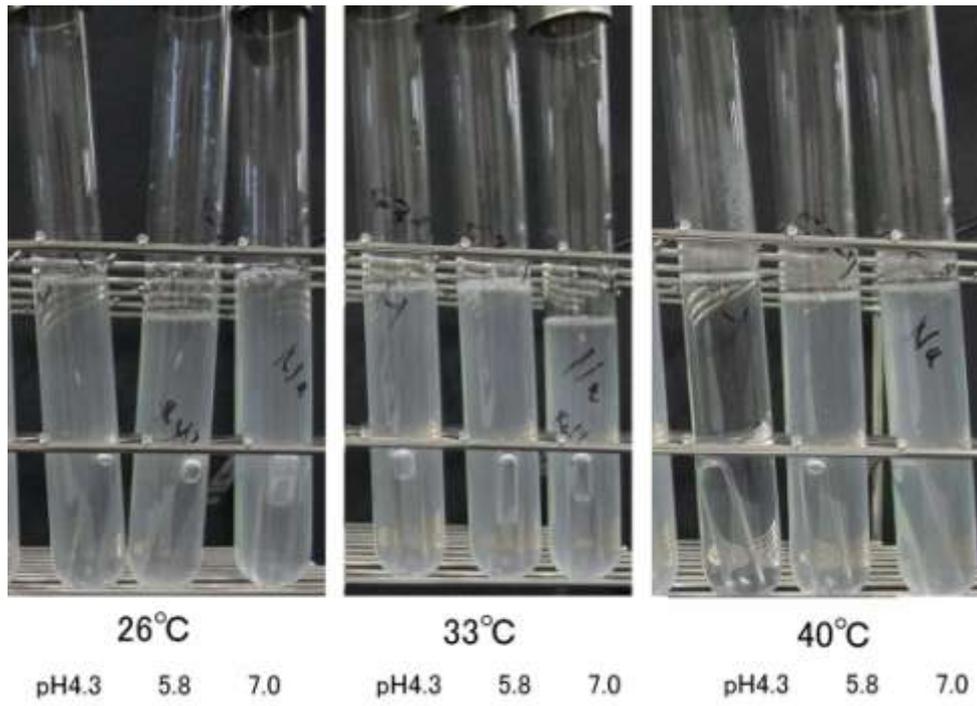


図 2-2-11 Fk3-7 株 培養 48 時間目

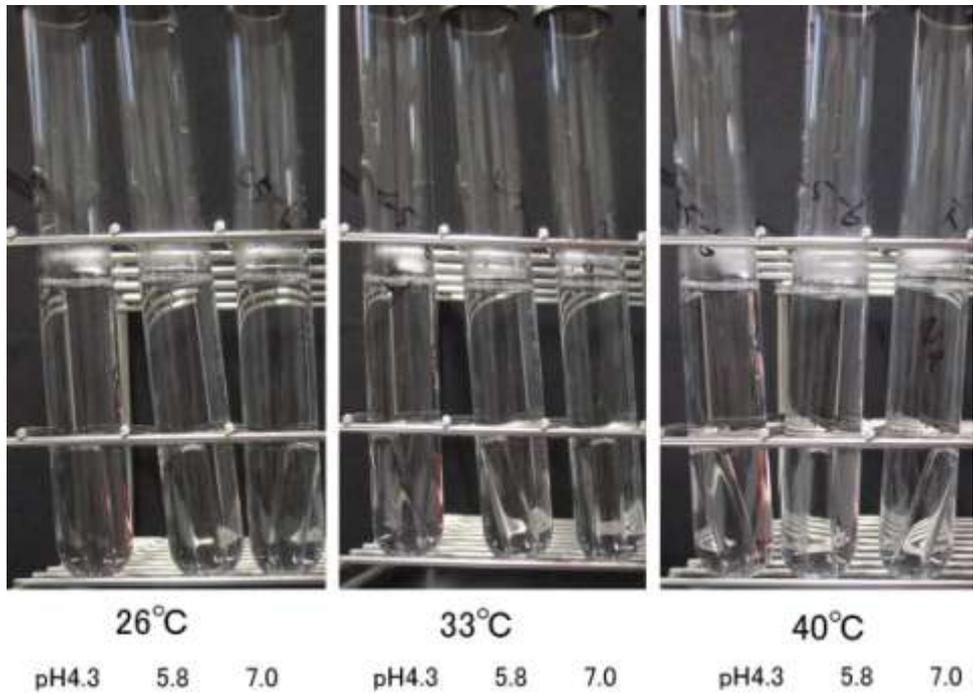


図 2-2-12 Fk5-6 株 培養 48 時間目

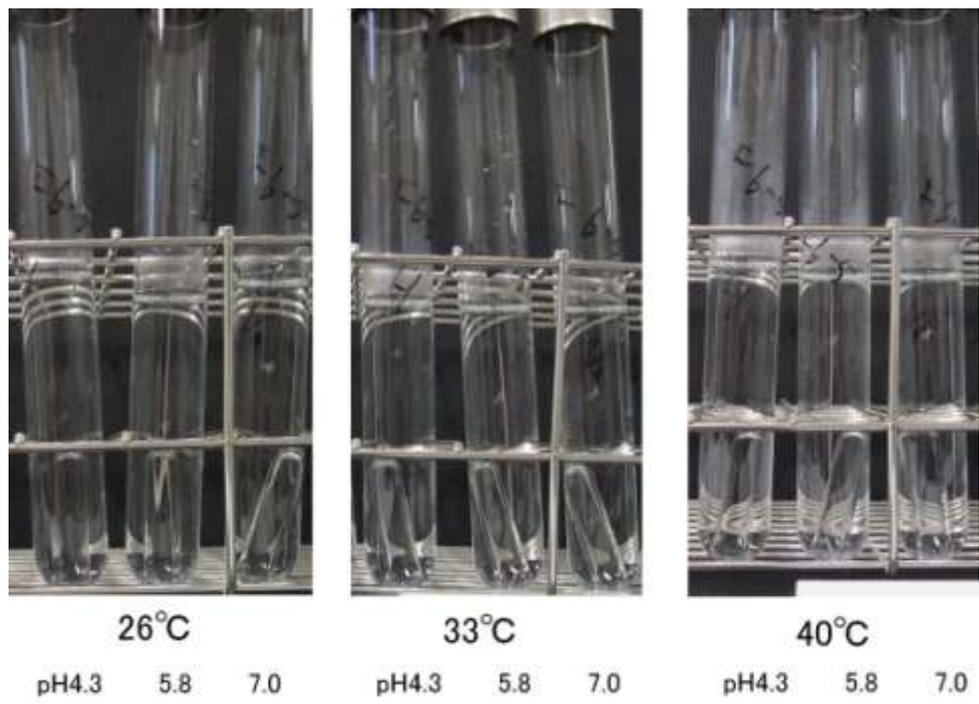


圖 2-2-13 Fk6-5 株 培養 48 時間目

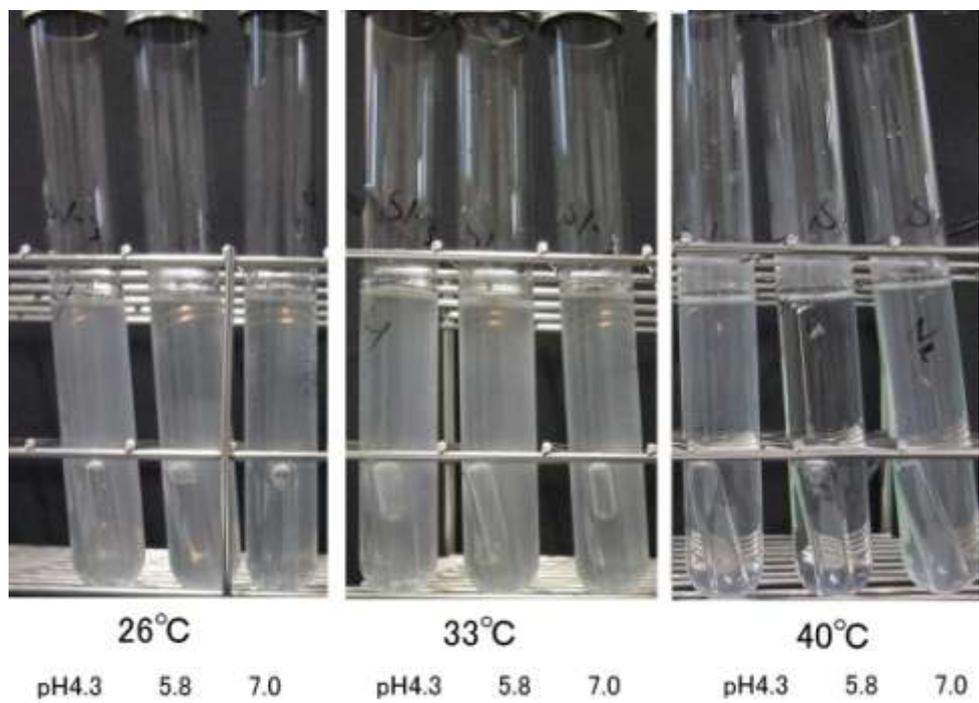


圖 2-2-14 Sh1-3 株 培養 48 時間目

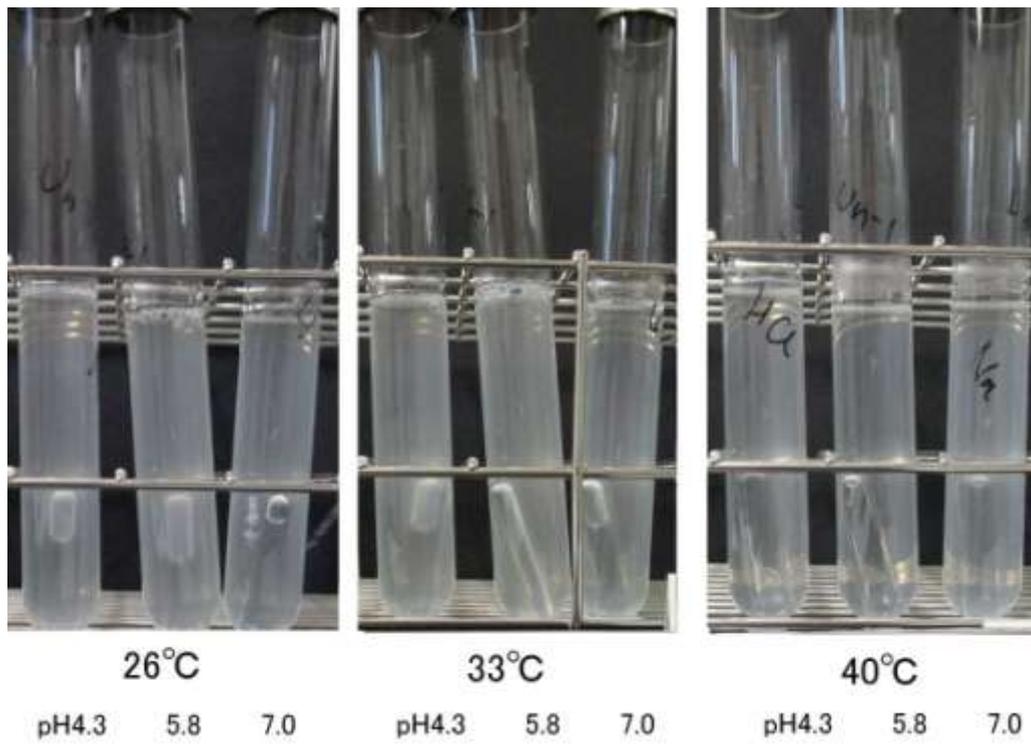


図 2-2-15 Un-1 株 培養 48 時間目

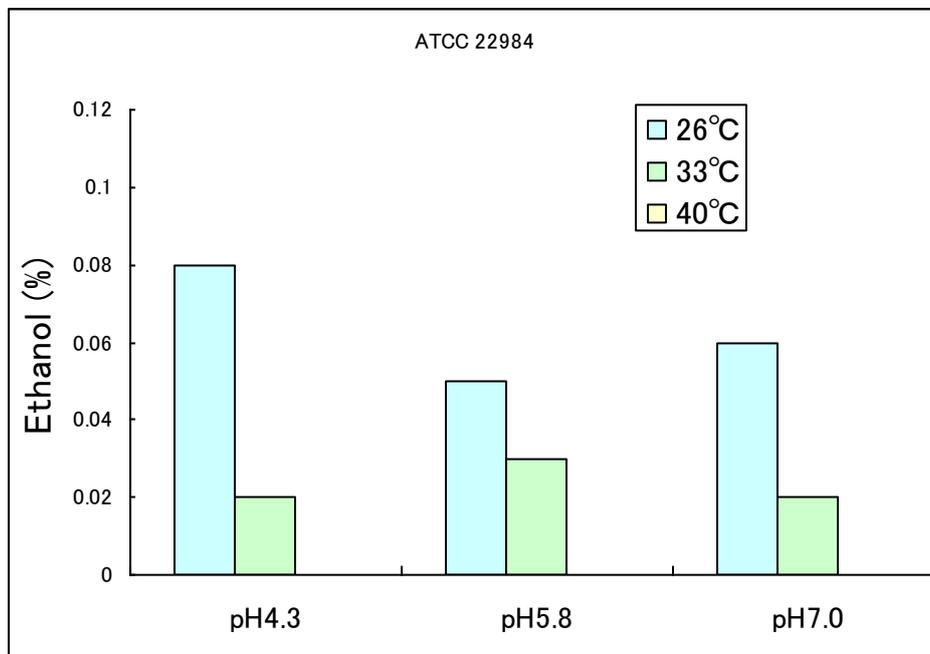


図 2-2-16 *C. shehatae* ATCC22984 によるエタノール産生量

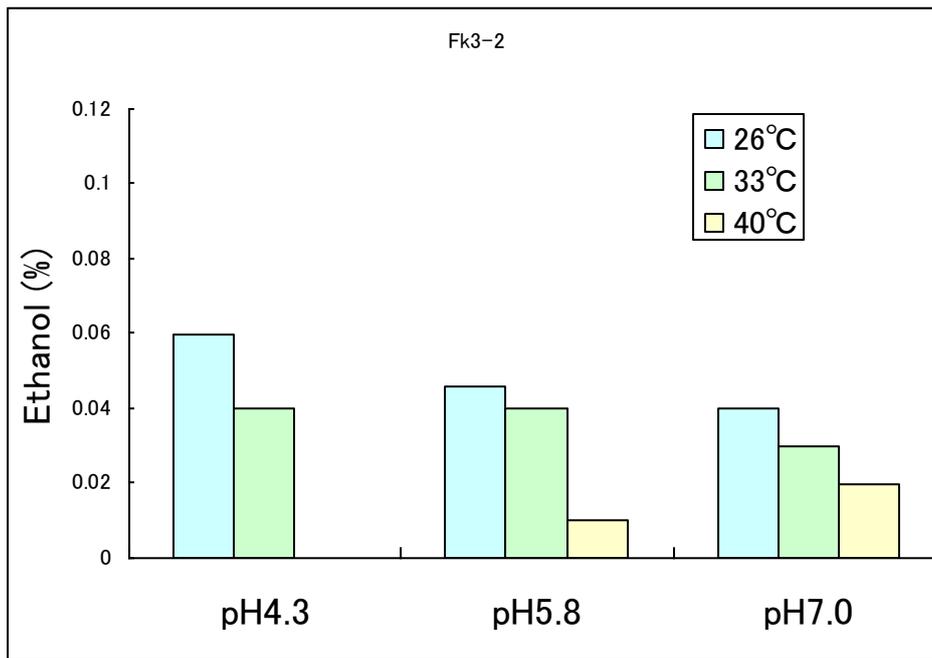


図 2-2-17 Fk3-2 株によるエタノール生産量

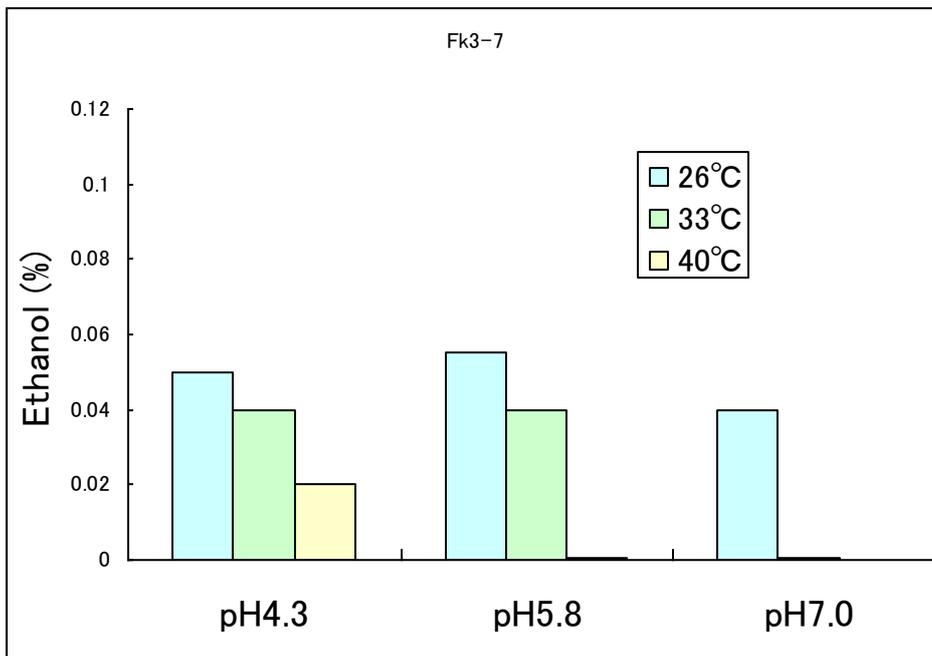


図 2-2-18 Fk3-7 株によるエタノール生産量

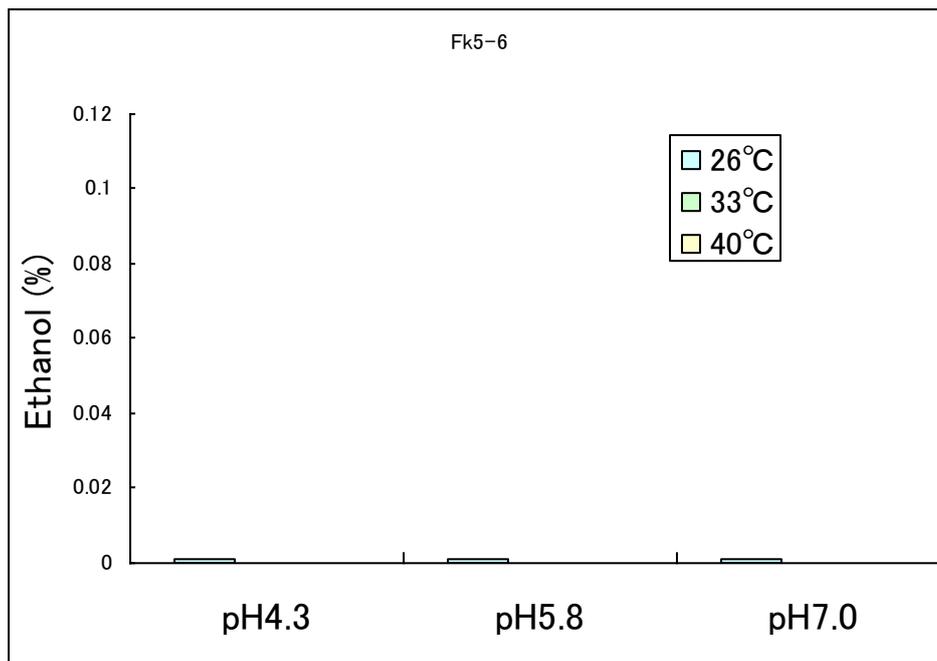


図 2-2-19 Fk5-6 株によるエタノール産生量

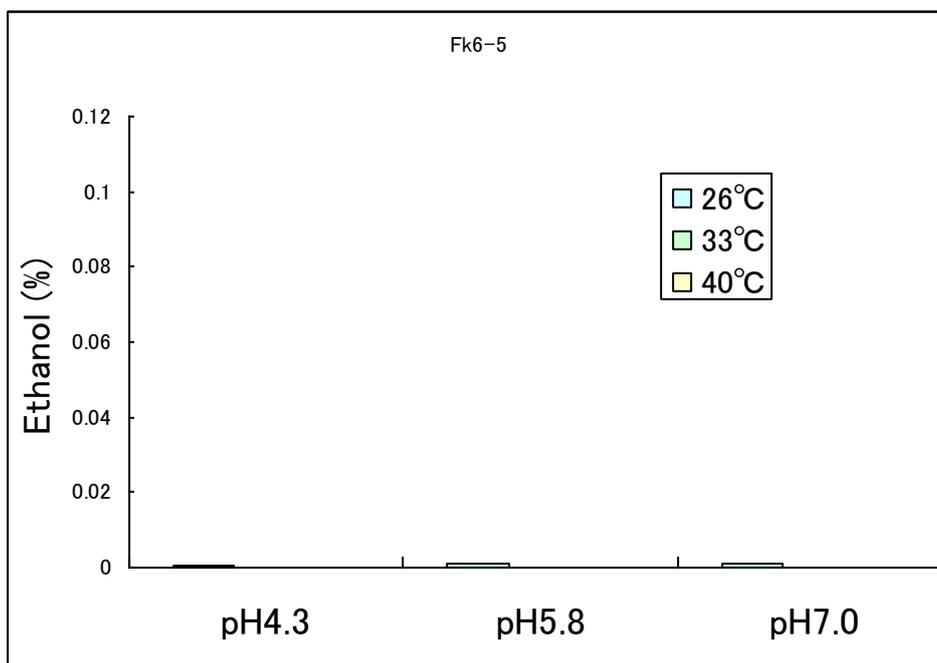


図 2-2-20 Fk6-5 株によるエタノール産生量

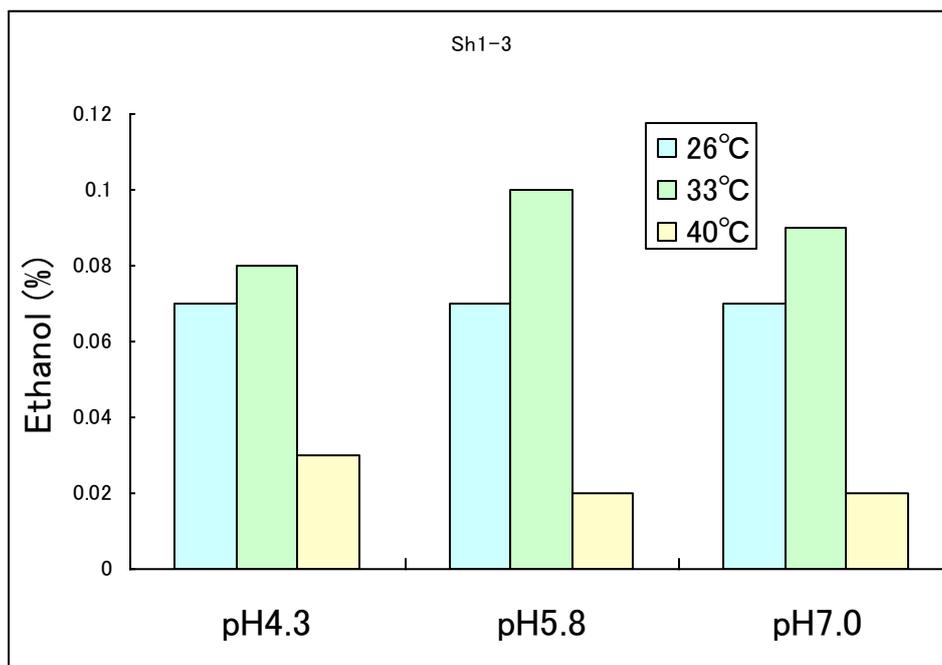


図 2-2-21 Sh1-3 株によるエタノール産生量

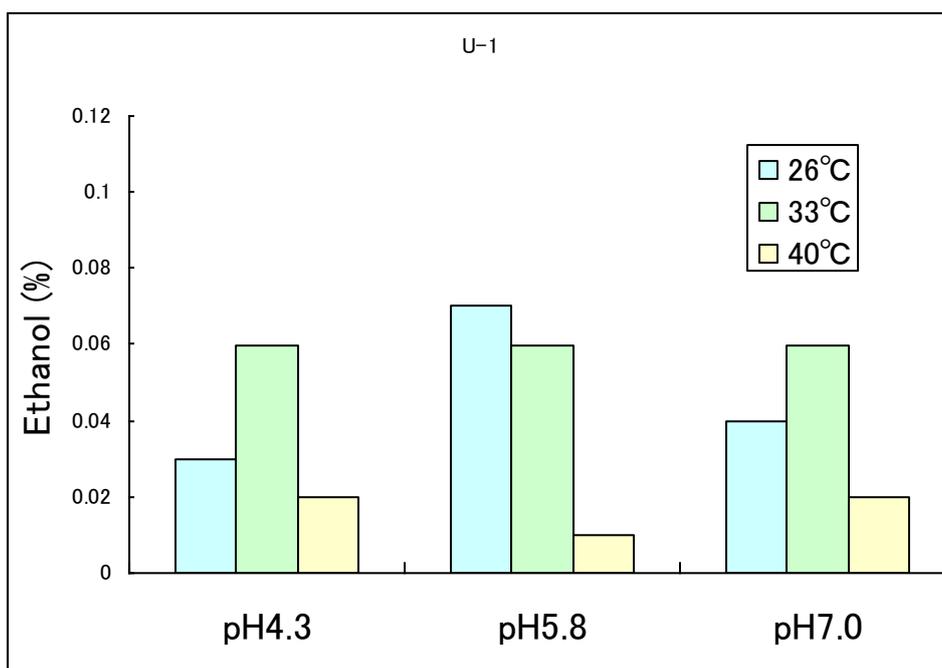


図 2-2-22 Un-1 株によるエタノール産生量

比較した培養条件と検出されたエタノール濃度の一覧を表 2-2-5 に示す。

培養条件によるエタノール産生量を比較した結果、対照とした *C. shehatae* ATCC 22984 株は温度 26°C、pH4.3 において最も高いアルコール産生量を示した。これに対して、今回単離した Sh1-3 株および U-1 株は *C. shehatae* に匹敵するアルコール産生能を示し、それぞれの至適条件は Sh1-3 が 33°C、pH 5.8、U-1 が 26°C、pH 5.8 であった。

表 2-2-5 培地中のエタノール分析結果の一覧

	26°C			33°C			40°C		
	pH4.3	pH5.8	pH7.0	pH4.3	pH5.8	pH7.0	pH4.3	pH5.8	pH7.0
ATCC 22984	0.08	0.05	0.06	0.02	0.03	0.02	0	0	0
Fk3-2	0.06	0.0457	0.04	0.04	0.04	0.03	0	0.01	0.02
Fk3-7	0.05	0.055	0.04	0.04	0.04	0.0003	0.02	0.0005	0
Fk5-6	0.0009	0.0009	0.001	0	0	0	0	0	0
Fk6-5	0.0007	0.0009	0.001	0	0	0	0	0	0
Sh1-3	0.07	0.07	0.07	0.08	0.1	0.09	0.03	0.02	0.02
Un-1	0.03	0.07	0.04	0.06	0.06	0.06	0.02	0.01	0.02

### エタノール生産における各種炭素源の使用能の比較

自然界より得られた酵母のうち、エタノール生産量が比較的多かった Sh 1-3 株および Un-1 株について、D-キシロース以外の炭素源を用いて培養したときのエタノール産生能力を比較した。対照としては引き続き *C. shehatae* ATCC 22984 株を使用した。

D-グルコース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、L-アラビノースのいずれかを炭素源として含む培地を用い、*C. shehatae* は pH4.0、26°C、Sh 1-3 は pH5.8 で 33°C、Un-1 は pH5.8 で 26°C の条件とし、嫌気下で 96 時間浸透培養した。

培養終了時には酵母を接種したすべての組み合わせにおいて、培地中に菌体の増殖が目視できた。*C. shehatae* ATCC 22984 は培養容器の底面、壁面に菌体が堆積した状態になっているのに対し、Sh 1-3 株および Un-1 株は菌体が培地中に均等に浮遊していた。

培養終了時のそれぞれの外見的性状を以下に示す。



図 2-2-23-1 培地のみ 96 時間培養後 (pH5.8、26°C)

左から D-グルコース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、L-アラビノース



図 2-2-23-2 *C. shehatae* ATCC 22984 96 時間培養後 (pH4.0、26°C)

左から D-グルコース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、L-アラビノース



図 2-2-23-3 Sh 1-3 96 時間培養後 (pH4.0、33°C)

左から D-グルコース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、L-アラビノース



図 2-2-23-4 Un-1 96 時間培養後 (pH5.8、26°C)

左から D-グルコース、D-キシロース、D-マンノース、D-ガラクトース、L-アラビノース

培養終了後、それぞれの培地に含まれるエタノール濃度を Ethanol Assay Kit (BioVision)を用

いて測定した。結果は以下の通りであった。

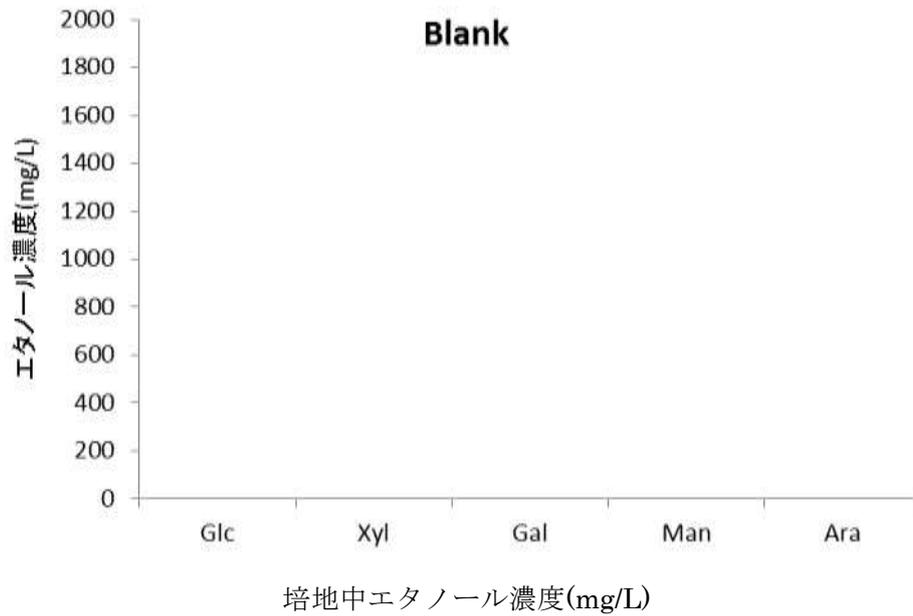


図 2-2-24-1. 培地中エタノール濃度 培地のみ

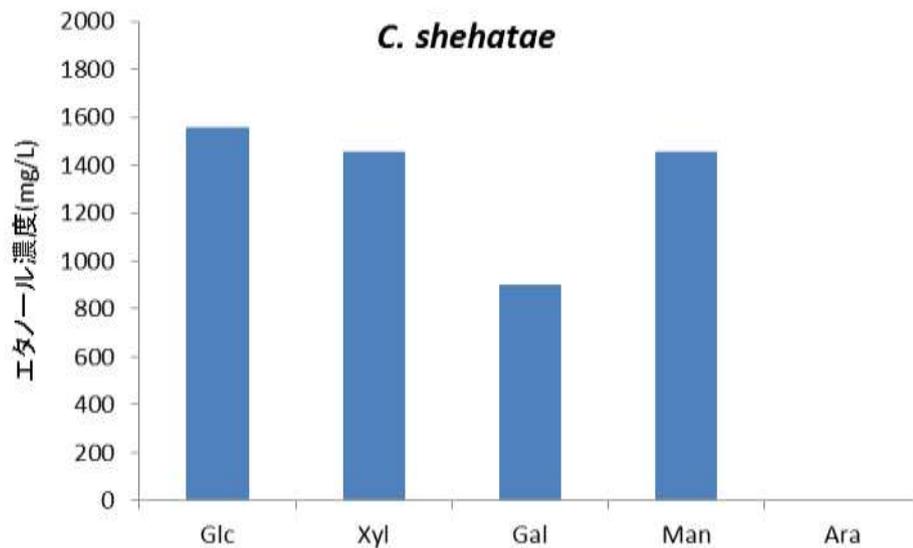


図 2-2-24-2. *C. shehatae* ATCC 22984 培養後の培地中エタノール濃度(mg/L)

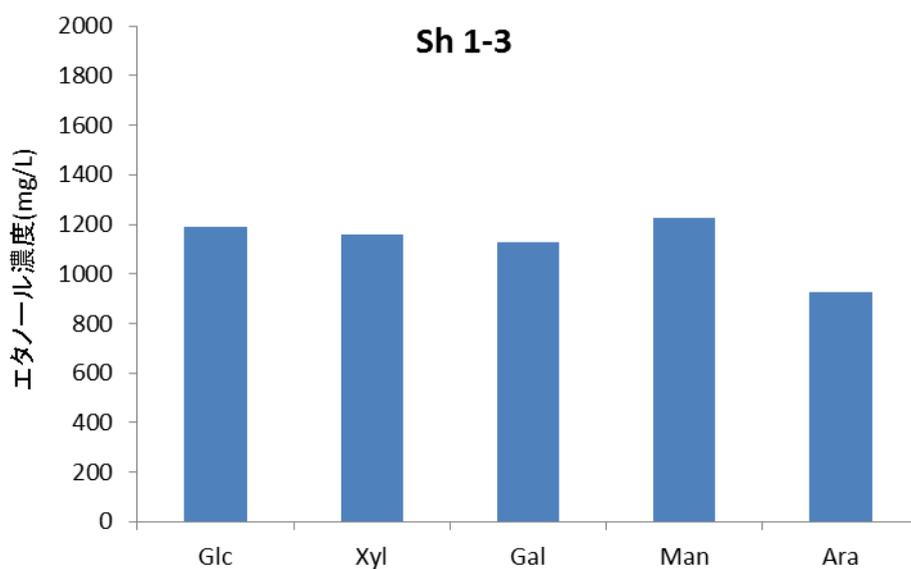


図 2-2-24-3. Sh 1-3 培養後の培地中エタノール濃度(mg/L)

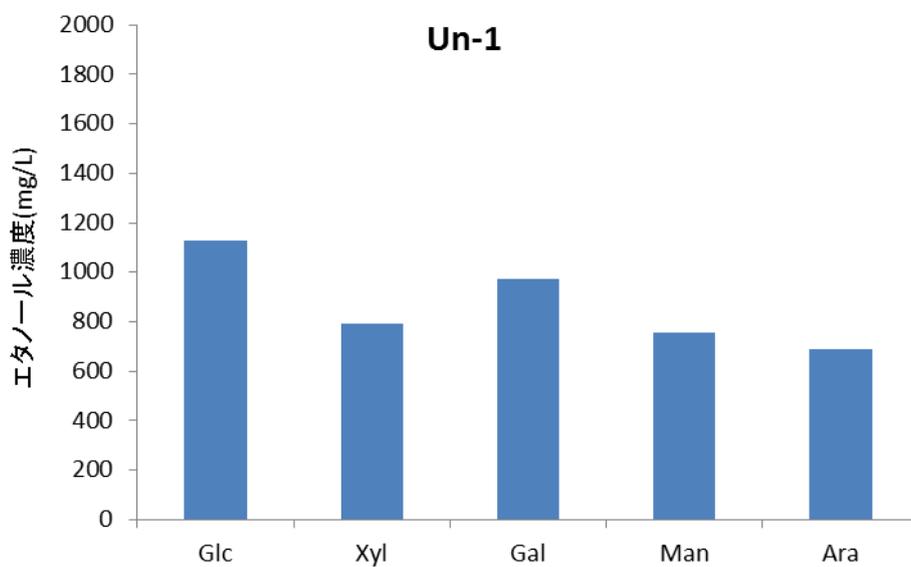


図 2-2-24-4. Un-1 培養後の培地中エタノール濃度(mg/L)

それぞれの培養条件で検出されたエタノール量を表 2-2-6 に一覧で示した。

	Glc	Xyl	Gal	Man	Ara
培地のみ	3.71	1.84	2.74	3.73	3.43
<i>C. shehatae</i>	1555.94	1457.17	902.64	1458.74	1.00
Sh 1-3	1188.66	1160.42	1125.47	1224.80	925.85
Un-1	1125.47	793.09	974.69	754.00	690.26

表 2-2-6 培地中のエタノール濃度 (mg/L)

各培地における炭素源の添加量は 0.13M で統一されているため、それぞれの組み合わせにおけるエタノール産生量をモル比 (エタノール産生量 / 炭素源量) で表記すると表 2-2-7 の通りである。

	Glc	Xyl	Gal	Man	Ara
培地のみ	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>C. shehatae</i>	0.26	0.24	0.15	0.24	0.00
Sh 1-3	0.20	0.19	0.19	0.20	0.15
Un-1	0.19	0.13	0.16	0.13	0.12

表 2-2-7 エタノール量 / 炭素源量 モル比 (M / M)

対照とした *C. shehatae* ATCC 22984 株を L-アラビノースを加えた培地中で培養した場合、増殖していることが目視で確認できるにもかかわらず、培地中にエタノールが検出できなかった。これより、*C. shehatae* ATCC 22984 株は L-アラビノース資化性を持つが、エタノールを産生するための炭素源としては利用できないものと考えられる。また、残りの 4 種の炭素源のうち D-ガラクトースについてはエタノールへの変換率が低かった。

一方、自然界から単離した Sh1-3 株および Un-1 株については、今回検討したすべての炭素源をエタノール生産に使用することができた。Sh 1-3 株についてはいずれの炭素源でもおおむね同等のエタノール変換率を示した。L-アラビノースはアラビノキシラン、アラビナン、アラビアガム、ペクチンなどの成分として植物体に含まれているため、このことは植物由来の糖液を炭素源として利用する場合の利点となると期待できる。

## 2-2-2 遺伝子組み換え酵母を用いた木質バイオエタノール生成の検討

ほぼ全てが六炭糖セルロースからなる農作物とは対照的に、木質・農業残渣などのリグノセルロース系バイオマスにはヘミセルロース成分に由来するキシロース・アラビノースを主とする五炭糖が大量に含まれている。バイオエタノール原料を農作物からリグノセルロース系バイオマスへと転換する上でこの五炭糖の微生物による発酵は開発主要命題の 1 つである。現在、エタノー

ル発酵に用いられる微生物としては大腸菌・ザイモナス細菌・サッカロミセス酵母・ピキア酵母などが挙げられる。このうちサッカロミセス酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、①アルコール生産能②アルコール耐性能③酸性条件下での培養による雑菌コンタミの軽減④発酵阻害物質耐性能、等の点において他の微生物に比べて格段に優れている。

本酵母菌の大きな欠点は五炭糖発酵能を有しないことであるが、他の酵母 (*Pichia stipitis*) 由来のキシロース還元酵素 (以下、XR) とキシリトール脱水素酵素 (以下、XDH) 遺伝子を導入した組み換え酵母はキシロースからのエタノール発酵能を獲得できる。本項では、我々が独自に開発した五炭糖発酵酵母を用いて、ヒノキ糖化液中の五炭糖発酵の可能性について検討した。

## 【研究方法】

### 糖化液の調整

ヒノキ糖化液は以下の 5 種類を用いた。

表 2-2-8 前処理条件

	処理溶媒	酸濃度 (%)	時間 (分)	温度 (°C)	最大圧力
糖化液 1	EtOH75/W25/AA1	1	30	140	0.9
糖化液 2	EG75/W25/AA1	1	30	170	0.5
糖化液 3	EtOH50/W50/SA0.05	0.05	60	200	2.4-2.5
糖化液 4	MeOH50/W50/HC10.4	0.4	45	170	1.5
糖化液 5	EtOH50/W50/HC10.4	0.4	45	170	

EtOH: エタノール; EG: エチレングルコール; MeOH: メタノール; W: 水; AA: 酢酸; SA: 硫酸; TFA: トリフルオロ酢酸; HC1: 塩酸

### 酵素糖化条件

前処理サンプルをアクレモニウムセルラーゼ (明治製菓株式会社) を用いて糖化した。50 ml 容エルレンマイヤーフラスコに基質 1.2g 及び酵素蛋白質量 0.048 g となるように調製した酵素液 (40 mg-protein/g-substrate) 10 ml を入れ、45° C, 72 時間、150 rpm の攪半振とう反応を行った。糖化後、200 u1 の反応液を採取し、遠心分離後、上清を適宜希釈し、液体クロマトグラフィーによる生成糖の分析を行った。

### *S. cerevisiae* へのキシロース代謝遺伝子の導入

宿主である *S. cerevisiae* は IR-2 株と MT8-1 株 (*MATa ade his3 leu2 trp1 ura3*) を用いた。IR-2 株は我々が産業技術総合研究所と共同で見出した凝集性株であり、他の野生型酵母に比べてキシロース代謝能が高くキシロース代謝遺伝子を導入した際にも高いキシロース発酵性能を発揮する。一方 MT8-1 株は、大阪市立大学ナショナルバイオリソースプロジェクトから入手した典型的な実験室株である。

pAUR-XXDXHXK は、*S. cerevisiae* の染色体組み込み型プラスミド pAUR101 (タカラバイオ) に、*P. stipitis* の XR・XDH 遺伝子と *S. cerevisiae* の XK 遺伝子 (キシロキナーゼをコード) をそれぞれ構成的発現 PGK プロモーターにつなげたものを導入したものである。本プラスミド内にあ

る *AUR-1* 遺伝子内部の *Bs*i*WI* 制限酵素サイトで切断した直鎖上 DNA を IR-2・MT8-1 株に形質転換し、抗生物質オーレオバシジン耐性能を有する形質転換体を選抜した。その後、ゲノミック PCR 法により酵母ゲノム上に XR・XDH・XK 遺伝子が正常に導入されたことを確認し、IR-2X・MT8-1X 株を得た。

### 発酵実験

IR-2・IR-2X・MT8-1 株は、YPD 液体培地 5mL で 30°C・48hr 培養した。遠心し回収した菌体は、キャップ付 4mL チューブに入れた 3mL 糖化液に懸濁し、150rpm・30°C で振騰した。経時的にサンプリングを行い HPLC で糖濃度・アルコール濃度を測定した。

#### 【研究結果】

#### キシロース代謝遺伝子導入によるキシロース発酵

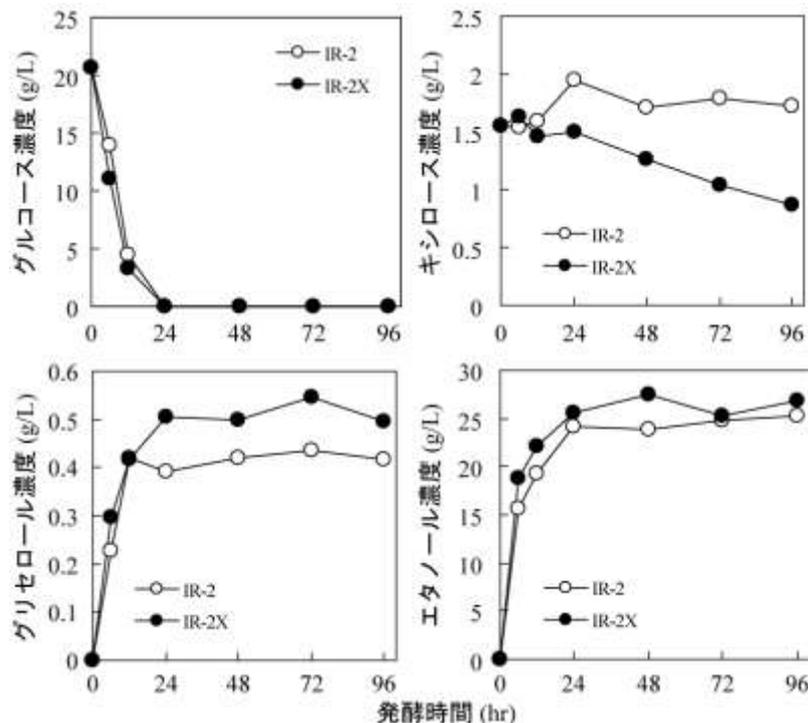


図 2-2-25 キシロース代謝遺伝子導入によるキシロース発酵

IR-2 と IR-2X 株を用いてキシロース代謝遺伝子を導入したことによるキシロース発酵に及ぼす影響を糖化液 1 を用いて解析した。いずれの株も主要発酵産物としてエタノールと少量のグリセロールが見られた。グルコース（初濃度約 20g/L）は両株ともに 24 時間で完全に消費されたが、キシロース（初濃度約 1.5g/L）については IR-2 株での消費は全く見られなかった。一方 IR-2X 株では、グルコースが枯渇した 24 時間後から徐々に減少し、96 時間後には約 1/3 が消費された。エタノール濃度で見ると、IR-2 株はグルコースが枯渇した 24 時間後からほとんど変化が見られないのに対して、IR-2X 株ではその後もわずかながら上昇を続け、全体を通して IR-2 株よりも濃度が高い傾向であった。その他の実験も含め理論的エタノール濃度より高いエタノールが検出されたが、これは糖化の際にセルラーゼ酵素を失活させていないため、発酵に伴い単糖が消費され

たことにより生成物阻害が解除され一部同時糖化発酵が起こったためと考えられる。

### 酵母宿主株の違いによるキシロース発酵の影響

IR-2X と MT8-1X 株を用いて、キシロース代謝遺伝子を導入する宿主の違いが発酵に及ぼす影響を糖化液 2 を用いて解析した。

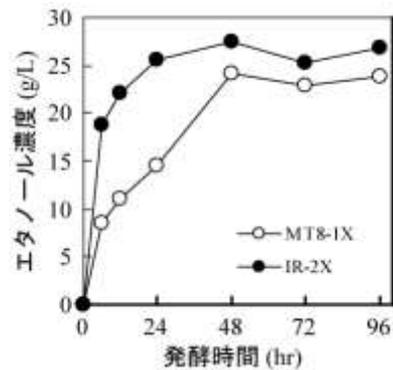


図 2-2-26 キシロース代謝遺伝子導入株のエタノール発酵の比較

図 2-2-26 のように、両株の最終的なエタノール濃度はほぼ同じであるのに対して、IR-2X 株では 24 時間後までのグルコース発酵において MT8-1X 株より迅速にエタノールが生産された。

### IR-2X 株による異なる糖化液の発酵

前処理・糖化条件の違いが発酵に及ぼす影響を解析するために、糖化液 1-5 を用いて IR-2X 株による発酵実験を行った。

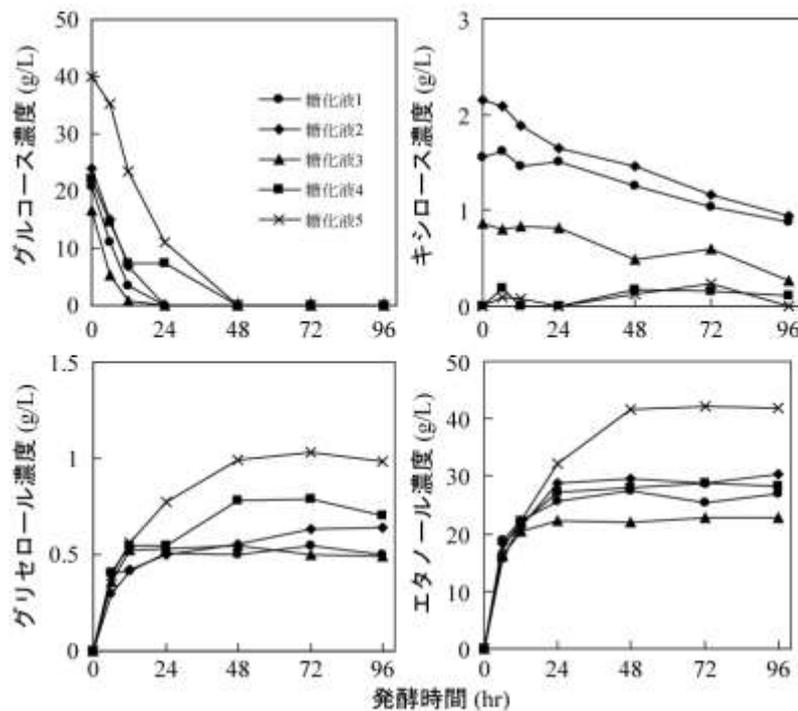


図 2-2-27 IR-2X 株のエタノール発酵試験

各糖化液の初糖濃度が異なるので単純比較はできないが、ほぼ同じ糖濃度である糖化液 1-4 ではグルコース消費・キシロース消費・エタノール生産ともほぼ同じ特性を示した。

#### 【考察】

*S. cerevisiae* にはキシロース輸送能とキシロース代謝能はあるものの、キシロースをキシロースに変換する酵素群が欠けており、通常は図 2-2-25 の IR-2 株のようにキシロース代謝(発酵)は全く確認できない。今回、2 個のキシロース代謝遺伝子を導入することで野生株にはないキシロース発酵が確認できた。グルコース共存下ではキシロース消費はその枯渇後に非常にゆっくりと進行する。今回も 96 時間の発酵後でもキシロースは 2/3 程度残っている。ただ、この消費速度については菌体量の増加によってかなりの部分が補えると考えられる。

本研究での前処理・糖化で遊離するキシロース量はグルコースの 1/10 程度であり、遺伝子組み換え酵母菌で長時間の発酵を行うメリットはそれほどない。しかし、キシロースも発酵させることでエタノール濃度はグルコースのみの発酵に比べ有意に上昇しており、今後ヘミセルロース成分の効率的な糖化条件が確立すれば重要性が増すと考えられる。

*S. cerevisiae* は、他の真核微生物に比べて遺伝子操作に必要なアミノ酸等の選択マーカーがよく分かっており、通常外来遺伝子の導入には選択要求性のある MT8-1 のような実験室株が宿主として用いられる。一方、そのアルコール生産能や耐性能は自然界から単離された IR-2 のような野生株に比べて総じて低い。実際、図 2-2-26 に示したように MT8-1X 株のエタノール生産速度は IR-2X 株よりかなり遅い。

硫酸や塩酸などで高温加水分解により糖化すると、フルフラール等の物質が生じて発酵阻害がかかることがよく知られている。今回、異なる条件で前処理・糖化した糖化液の間では発酵に差は見られなかったが、これは本研究での効果的な単糖遊離と IR-2 株による阻害物質に対する潜在的高耐性能のためだと推測できる。

#### 【結論】

酵母では通常発酵不可能な五炭糖キシロースを、優秀な野生酵母を宿主として作出した遺伝子組み換え菌を用いることでエタノールまで変換できることが示された。

### 2-2-3 アルコール脱水法の検討

(1) ガソリンに混合するバイオエタノールとして水分が低いことが求められている。通常含水量を 0.5% 以下(アルコール濃度 99.5%) が目標規格とされている。通常発酵で得られる液は 10% 程度のアルコールを含むが、これを粗蒸留して 40% 程度のアルコール水を得るのが焼酎の作り方である。これを更に精留してアルコールの濃度を高めるのが通常蒸留で得られるのは 95% 程度の水との共沸混合物であるので、一般的に 40% エタノールを得るまでのエネルギーコストは小さいが、99.5% にするには、その 3 倍程度のエネルギーがかかるとされており、その低減化は重要である。少し原点に立ち戻り、最終的にエタノールはガソリンに混合をすれば、更にいくつかの選択肢が可能である。このことについて検討した。

#### 溶液分配法の検討

(1) 40% 程度のアルコールから炭化水素溶媒でアルコール抽出が可能であるか。

(2) 90~95%程度のエタノールをガソリンと混合し、分離されてくる水を除くと共に、混合したガソリンの中の水をゼオライトで除くことは有効かを検討した。

#### ヘキサンによるエタノール抽出

90%エタノールとヘキサンを分液ロート（50ml：20ml）200ml にいれ、液液分配を行った。この分配では、エタノールは水相にほとんど分布し、ヘキサンはほとんど来なかった。逆にヘキサン相の体積が低下し、むしろヘキサンがエタノール/水素に溶解している状況が観察された。硫酸ナトリウム 10g を加えることにより、塩析効果を期待したが、実際には塩がエタノール水系に溶解せず、塩析は効果的ではなかった。他の塩析剤を試みる必要があるが、エタノール-水の水素結合に打ち勝つには、何らかの工夫が必要と思われる。当然ながら 40%エタノールからヘキサンにアルコールは移動しなかった。

塩析に類似した方法として、電解質を加えて抽出の可能性を検討した結果、90%のエタノール分がヘキサン層に移動することを確認した。

### 2-3 小括

木質系バイオマスにはヘミセルロース成分に由来するキシロースを主とする五炭糖が大量に含まれているものの、高エタノール生産菌の酵母は五炭糖を発酵できないという課題がある。本研究により、通常発酵が不可能な五炭糖キシロースを、優秀な野生酵母を宿主として作出した遺伝子組み換え菌を用いることでエタノールまで変換できることが示された。

また、自然界よりキシロース資化能およびエタノール耐性能を指標として真菌のスクリーニングを行った結果、14 菌株取得した。さらにその中から各種炭素源（グルコース、キシロース、ガラクトース、マンノース、アラビノース）から有効にエタノールを生産する 2 菌株を選抜することに成功した。

前処理後の木質バイオマスの酵素糖化とそれにより生成した単糖のエタノール発酵を同時に行う同時糖化発酵法について検討を行った。菌株保存機関から分譲されたエタノール発酵の標準株 3 株および耐熱性酵母の標準株 2 株について、培養温度 30 及び 45°C でのエタノール生成能を比較し、エタノール生成能の高い耐熱性酵母の選抜を行った。その結果、45°C においても高いエタノール生成能を示した NBRC1777 株が耐熱性酵母の標準株として適することが判明した。

耐熱性酵母として選抜した *K. marxianus* NBRC1777 株を用いて、市販セルロース粉末を炭素源として 43°C で行った同時糖化発酵の検討から、*K. marxianus* NBRC1777 株の活性は 72 時間で落ちる事が明らかになった。

微量酸添加オルガノソルブ処理後のヒノキの酵素糖化とそれにより生成した単糖のエタノール発酵を同時に行う同時糖化発酵法について検討を行った。いずれの処理物においても糖化データから推察されるエタノール濃度よりも高い値が得られ、同時糖化発酵の効果が確認された。糖化データと同時糖化発酵データに同様の傾向があり、トリフルオロ酢酸を微量添加した EtOH50/W50/TFA の溶媒を用いた処理物で最も高いエタノール濃度であった。しかし、固形分収率を鑑みたエタノール収率の結果では、EtOH50/W50/TFA の溶媒を用いた処理物は、弱酸オルガノソルブ処理にボールミル粉碎処理を組み合わせた処理物の約 8 割程度であった。