

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：37401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658082

研究課題名（和文）都市型バイオマスからのバイオエタノール生産用酵母の育種

研究課題名（英文）Ethanol production from D-lactic acid by *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

田口 久貴 (TAGUCHI HISATAKA)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：90212018

研究成果の概要（和文）：*Saccharomyces cerevisiae* NAM34-4C が D-乳酸から顕著な量のエタノールを pH 3.0 で生産することを見いだした。エタノールは pH 5.5 では生産されず、L-乳酸よりも D-乳酸でエタノール生産量が高かった。さらに、Jen1p と Dld1p 構成的発現株を育種し、D-乳酸からのエタノール生産の改良をおこなった。

研究成果の概要（英文）：We found that *Saccharomyces cerevisiae* NAM34-4C produced significant amounts of ethanol from D-lactate as compared with L-lactate at pH 3.0, but not at pH 5.5. We also report the improvement of ethanol production from D-lactate by constitutive expression of Jen1p or Dld1p in *S. cerevisiae*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：バイオエタノール

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化が深刻化し CO<sub>2</sub> 循環型社会を目指したガソリンへのエタノールの添加が計画されている。各国で盛んに食料作物からバイオエタノールが生産され、食品価格高騰の問題が生じてきた。このため、セルロース系バイオマスのエタノール変換への新技術開発が進んでいる。地産地消の観点から、セルロース系バイオマスは大都市圏には不向きである。都市型バイオマスとして有望視されているのは生ゴミである。家庭や飲食店等の事業所から出る生ゴミは膨大で、一部は家畜等の餌になるが、その殆どが燃料を用いて焼却処分されている。生ゴミからのバイオエタノール生産プロセスを開発し、現在の焼却場をバイオエタノール工場に換えることができれば、多に CO<sub>2</sub> 削減が期待できる。しかし、生ゴミは有用なバイオマスであるが、

保存中に腐敗する大きな欠点がある。解決策として、乳酸菌を噴霧し、生産された乳酸により pH を低下 (pH 約 3.8) させ雑菌汚染を防ぐ。乳酸菌も自らが生産した乳酸により増殖が悪くなり、過度のグルコース消費は生じない。熊本大学と熊本市民の協力で、実際に腐敗臭がないというアンケート調査や乳酸保存した生ゴミからの発酵試験も終了している。このバイオマスを糖化した溶液中には、グルコース（原料により 5～10%）に加え、約 1%程度の乳酸が含まれる。このグルコースの 1 割から 2 割含まれる乳酸をも、エタノールに変換できれば、CO<sub>2</sub> 削減効率はさらに高まる。しかしこれまでに、乳酸からのエタノール生産に関する報告はない。

## 2. 研究の目的

都市型バイオマスである生ゴミからのバイオエタノール生産プロセスの開発を最終目的とした酵母の育種を行う。生ゴミは、有用なバイオマスであるが、保存中に腐敗するのが大きな欠点である。この解決策として、乳酸菌を噴霧し、生産される乳酸により pH を低下 (pH 約 3.8) させ、雑菌汚染を防ぐ。このバイオマスを液化・糖化した溶液中には、グルコースに加え、約 1% 程度の乳酸が含まれる。この乳酸も、エタノールに変換できれば、CO<sub>2</sub> 削減効率はさらに高まる。実験室酵母など多くの酵母は、この条件 (pH 3.8) で乳酸を資化できない。本研究では耐酸性の実用酵母から、乳酸取り込み系の遺伝子 (*JEN1*) や乳酸脱水素酵素遺伝子 (*CYB2*, *DLI1*, *DLI2*, *DLI3*) の構成化株と欠損株を育種し、乳酸から効率良くエタノールを生産できる実用酵母の育種を行う。

### 3. 研究の方法

L-乳酸、D-乳酸のどちらが、NAM34-4C のエタノール発酵に適しているかを調べ、基礎的な発酵条件の検討を行う。NAM34-4C から乳酸取り込み系の遺伝子 *JEN1* の構成株と欠損株を育種し、各変異株の資化能とエタノール発酵性を調べる。NAM34-4C の D-乳酸脱水素酵素遺伝子 *DLI1*, *DLI2*, *DLI3* の構成株と欠損株を育種し、各変異株の資化能とエタノール発酵性を調べる。掛け合わせにより

(NAM34-4C :  $\alpha$  型、NAM26-15A :  $\alpha$  型)、2重や3重の変異株を育種し、資化能と発酵性を調べる。エタノール生産性の高かった育種株を用いて、エタノール生産条件の本検討を行う。グルコースと乳酸の同時発酵を行い、実験仮説が正しいかを検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) *S. cerevisiae* 株の生育に対する D-乳酸と L-乳酸の効果

NAM34-4C 株と S288C 株の生育に対する D-乳酸と L-乳酸効果について調べた。NAM34-4C 株は、実用酵母 KF-7 由来の 1 倍体実用酵母である。S288C 株は、酵母ゲノムの配列決定 (ゲノム計画) で使用された 1 倍体実験室酵母である。MSDL (D-乳酸最少培地) 培地または、MSLL (L-乳酸最少培地) 培地中での NAM34-4C 株と S288C 株の増殖 (OD<sub>660nm</sub>) を、1 日毎に追跡した (図 1)。NAM34-4C 株は、初発の pH が 5.5 と 3.5 の両方の培地で、L-乳酸培地よりも D-乳酸培地で速く生育した。一般的に菌体量の増加にともない、培養液の pH 上昇が観察された。NAM34-4C の最大菌体量 (OD<sub>660nm</sub> = 14.9) は pH 3.5 の D-乳酸培地で、培養 4 日目に観察された。この値は、pH 5.5 での最大菌体量 (OD<sub>660nm</sub> = 4.9) の約 3 倍に相当した。

一方、S288C 株は、D-乳酸と L-乳酸のどちら

の培地でも、非常に弱い生育しか示さなかった。初発 pH 5.5 で、S288C 株の生育 (OD<sub>660nm</sub>) は培養 3 日目でも、D-乳酸と L-乳酸で 0.4 であった。また、初発 pH 3.5 では、培養 4 日目でも生育は認められなかった。データは示さないが、耐酸性を有する実用酵母である *S. cerevisiae* MIY8 (宮崎県焼酎酵母) や *S. cerevisiae* KAG 5 (鹿児島県焼酎酵母) でも、NAM34-4C のような旺盛な乳酸資化は認められていない。

これらの結果より、乳酸資化性、特に D-乳酸での資化性の高い NAM34-4C 株を選択し、以後の実験に用いた。

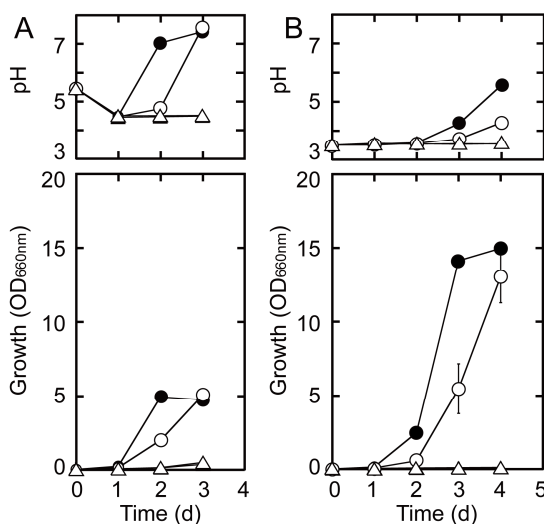


図 1. *S. cerevisiae* 株の生育に対する D-乳酸と L-乳酸の効果

*S. cerevisiae* (NAM34-4C 株と S288C 株) の増殖試験は、MSDL 培地または MSLL 培地で行った。pH 5.5 (A) と pH 3.5 (B) での増殖 (OD<sub>660nm</sub>) を測定した。シンボルは、○ : L-乳酸での NAM34-4C、● : D-乳酸での NAM34-4C、△ : L-乳酸での S-288C、▲ : D-乳酸での S-288C。3 回の独立した実験を行い、その平均値を示した。図中のバーは標準偏差を示す。

#### (2) NAM34-4C 株による D-乳酸からのエタノール生産

NAM34-4C 株の YPDL 培地 (D-乳酸) または YPLL 培地 (L-乳酸) における、各乳酸からのエタノール生産について調べた (図 2)。

pH 5.5 で、NAM34-4C 株は、D-乳酸から僅かな量のエタノール (0.03 g/L) しか生産しなかった。

初発 pH 3.5 の YPDL 培地において、エタノール生産量は、D-乳酸の消費に伴って増加し、30 時間で最大エタノール量 (0.69 g/L) に達し、その後減少した。最大のエタノール収率は、理論値の 6.9% であった。

初発 pH 5.5 の YPLL 培地において、NAM34-4C 株は、同様に L-乳酸から僅かなエタノール

(0.03 g/L) しか生産しなかった。

pH 3.5 の YPLL 培地での最大エタノール量 (0.43 g/L) は、YPDL 培地の最大エタノール量 (0.69 g/L) の 62%であった。L-乳酸培地よりも D-乳酸培地でより多くのエタノールが得られたこと、および pH 3.5 の D-乳酸最小培地での生育が、同 pH の L-乳酸最小培地より良好であったことより、炭素源に D-乳酸を選択し、以後の実験に用いた。

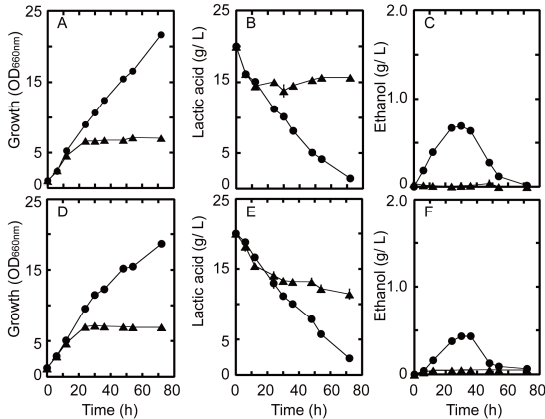


図2 NAM34-4C株による各乳酸からのエタノール生産

乳酸からのエタノール発酵試験は、pH 5.5 (▲) と pH 3.5 (●) の 50 ml の YPDL 培地 (A、B、C) または YPLL 培地 (D、E、F) で行った。増殖 (OD<sub>660nm</sub>) (A、D)、各乳酸濃度 (B、E)、エタノール濃度 (C、F) を示した。3 回の独立した実験を行い、その平均値を示した。図中のバーは標準偏差を示す。

NAM34-4C 株による D-乳酸からのエタノール生産条件の最適化をおこなった (表 1)。その結果、最大エタノール生産量は 2.7 g/L となり、初発条件のエタノール量 (0.69 g/L) の約 4 倍となった。我々の知る限り、世界で初めて乳酸からのエタノール生産条件を見いだした。

表 1 NAM34-4C による D-乳酸からのエタノール生産の最適条件

順番	培養条件 (単位)	値	EtOH (g L <sup>-1</sup> )
1st.	攪拌速度 (rpm)	60	0.69
2nd.	初発 pH	3.0	1.1
3rd.	温度 (°C)	35	1.1
4th.	YP 濃度(倍)*	1/2	1.4
5th.	D-乳酸濃度 (g/L)	30	2.7

\*: 1/2×YP 濃度は、5 g/L of Bactone yeast extract と 10 g/L of Bacto peptone を示す。  
(3) JEN1 変異株による乳酸からのエタノール

## 生産

酵母の乳酸輸送体である Jen1p の遺伝子に対して遺伝子操作を行い、NAM-JC (構成化) 株と NAM-JN (欠損) 株を育種し、これらの株による D-乳酸からのエタノール生産の結果を図 3 に示した。

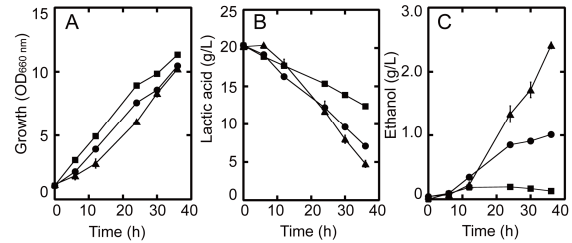


図3 NAM34-4C株、NAM-JC株、NAM-JN株によるD-乳酸からのエタノール生産

発酵は、pH 3.0、温度 35°C で 500 ml の三角フラスコ中の 50ml の YPDL 培地で行った。増殖 (OD<sub>660nm</sub>) (A)、乳酸消費量 (B)、エタノール量 (C) は、第 2 章、第 2 節、2-2-9 に記載した方法により測定した。シンボルは、以下の通りに示した。●: NAM34-4C 株、■: NAM-JN 株、▲: NAM-JC 株、少なくとも 3 回の独立した実験を行い、その平均値を示した。図中のバーは標準偏差を示す。

NAM-JC 株により生産されたエタノールの濃度は、D-乳酸消費に伴い上昇した。そして、培養 36 時間で最大値 (2.4 g/L) に達した。そのときのエタノール収率は、加えた D-乳酸から得られる理論収率の 24% であり、この最大エタノール生産量は、NAM34-4C 株の最大生産量より 2.4 倍高かった。

NAM-JN 株の培養液中の D-乳酸消費速度は、NAM34-4C 株の消費速度より遅く、36 時間で 12.4 g/L の D-乳酸が残存した。最大のエタノール生産量 (0.19 g/L) は、培養 24 時間で得られ、その量は、NAM34-4C 株の約 5 分の 1 であった。

乳酸消費速度は、NAM-JN 株、NAM34-4C 株、NAM-JC 株の順に高く、エタノール生産性及び、変異株の特性と良く一致していた。このように、D-乳酸からの効率的なエタノール生産には、JEN1 の発現が必要であることが分かり、JEN1 の構成的発現は D-乳酸からのエタノール生産を向上させることが分かった。

## (4) DLD 変異株による乳酸からのエタノール生産

実用酵母 NAM34-4C 株の D-乳酸脱水素酵素遺伝子 (DLD) 遺伝子の構成化株と欠損株を構築した。まず、構成化では、G418 耐性遺伝子である *kanMX* と、構成的プロモーターである P<sub>TDH3</sub> の配列を持つプラスミドを鋳型に、

両末端に 40 塩基の相同配列を付与させたプライマーを用いて kanMX-PTDH3 断片を PCR 増幅した。そして酢酸リチウム法によって、この断片を酵母 NAM34-4C 内に移入し、相同組み換えにより、断片が導入された G418 耐性株を選択し、各 DLD のプロモーターが、構成的プロモーター P<sub>TDH3</sub> に置き換わった構成化株を取得した。

欠損株も同様に両末端に 40 塩基の相同配列を付与させたプライマーを用いて、kanMX 断片を PCR 増幅し、酢酸リチウム法によって酵母内で相同組み換えさせ、欠損株を構築した。この時、DLD1 だけ相同組み換えの長さを同じにするため、ずらして構築した。構築した構成化株と欠損株が設計通りに構築できているか PCR と塩基配列決定によって確かめた。構成化では PCR で目的の長さの断片が認められ、さらに塩基配列決定で調べると P<sub>TDH3</sub> の直後から DLD1 の配列が始まっていることから設計通りに構築できており、DLD2、DLD3 も同様に構築できていた。欠損株も同様に PCR で目的のバンドが認められ、塩基配列決定によって設計通りに構築できた。構築した各欠損株の最少培地での増殖試験を行った結果、DLD1 遺伝子が存在すると増殖することができたが、DLD1 遺伝子を欠損させると乳酸を資化することができずに増殖できなかった。欠損株を用いて発酵試験を行った。増殖では野生株と DLD2 欠損株が同じような増殖を示し、DLD3 欠損株は増殖速度が遅くなり、DLD1 欠損株は増殖しなかった。乳酸消費では DLD1 欠損株以外は同じような乳酸消費の傾向を示した。エタノール生産では DLD1 欠損株以外は同様のエタノール生産を示していた。次に DLD 構成化株を用いて発酵試験を行った。DLD1 構成化株と DLD3 構成化株で、最初の増殖が少し遅れた。乳酸消費では DLD1 構成化株のとき、一番乳酸消費速度が速かった。エタノール生産では、DLD1 構成化株が野生株と比べて約 1.5 倍のエタノールを生産した (図 4)。以上の結果より、乳酸資化に DLD1 が必須であり、DLD1 遺伝子を構成化させると、エタノール量が野生株の約 1.5 倍となった。また、DLD2、DLD3 遺伝子を構成化しても、エタノール生産における顕著な変化は認められなかった。DLD1-JEN1 二重構成化株を、掛け合わせにより育種したが、グルコース-乳酸の同時発酵の条件決定には至らなかった。

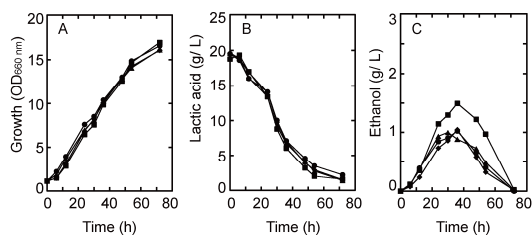


図 4 各 DLD 構成化株による D-乳酸からのエタノール生産

各構成化株は、50 mL の YPDL 培地に OD<sub>660nm</sub>=1.0 になるように植菌し、本培養を行った。1-2-4 に記載した方法で、増殖 (A)、D-乳酸量 (B)、エタノール量 (C) を測定した。シンボルは、以下のように示した。● : NAM34-4C 株 (野生株)、■ : NAPL313 株 (DLD1 構成化株)、◆ : NAPL314 株 (DLD2 構成化株)、▲ : NAPL26-1 株 (DLD3 構成化株)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) 若松 誠、谷 龍典、田口久貴、松岡正佳、木田建次、赤松 隆、Ethanol production from D-lactic acid by lactic acid-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* NAM34-4C, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有、116巻、2013、85-90  
doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.01.017.

(2) 若松 誠、谷 龍典、田口久貴、木田建次、赤松 隆、Improvement of Ethanol Production from D-Lactic Acid by Constitutive Expression of Lactate Transporter Jen1p in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有、77巻、2013、1114-1116  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/77/5/77\\_120985/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/77/5/77_120985/_article)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 田口久貴、*Saccharomyces cerevisiae* の乳酸資化・発酵における JEN1 と ADY2 の役割、日本生物工学会九州支部、2012年12月1日、別府大学

(2) 田口久貴、変異型 JEN1 を導入した *Saccharomyces cerevisiae* による乳酸からのエタノール生産、日本生物工学会九州支部、2012年12月1日、別府大学

(3) 田口久貴、ユビキチン欠損 *Saccharomyces cerevisiae* 変異株による D-乳酸からのエタノール生産、日本農芸化学会、2012年3月22-26日、京都女子大学

(4) 田口久貴、乳酸を資化・発酵できる実用酵母の構築：JEN1 欠損株の発酵試験、日本生物工学会、2011年9月26-28日、東京農工大学

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田口 久貴 (TAGUCHI HISATAKA)

崇城大学・生物生命学部・准教授

研究者番号：90212018

### (2)研究分担者

赤松 隆 (AKAMATSU TAKASHI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：50133567