

セルロース系バイオエタノール研究 ー育種とセルフクローニングによる高性能発酵菌の 構築と全体プロセス検討ー

Research on Production of Cellulosic Ethanol

– Development of High-Efficiency Yeast Strain using Mutagenesis and Selection and Self-Cloning,
and Study of Entire Process –

土 田 芳 樹*

Yoshiki TSUCHIDA

塚 越 範 彦*

Norihiko TSUKAGOSHI

要 旨

ABSTRACT

バイオマスの非可食部を原料とする第二世代バイオエタノール生産プロセスの高効率化に必要な、阻害物質存在下で高い発酵収率を示す発酵菌を構築した。構築には育種とセルフクローニングの組合せを用い、両者の組合せが発酵菌構築に有用であることを示した。セルフクローニングは、非組換え菌としての取扱いが可能な範囲での遺伝子組換えである。

バイオマス糖液を利用した育種により、糖液中の阻害物質への耐性とエタノール発酵収率の両者を高めた。その育種株をベースにトランスアルドラーゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子をセルフクローニングで強化した株は、より高濃度のエタノール発酵が可能となった。

全体プロセス検討では、阻害物質であるフェノール類の生成を抑制するバイオマス前処理条件を見出し、同前処理条件および構築した発酵菌を用いたプロセスで、1 dry-ton のコーンストーバから 213 L のエタノールを生産可能であることを示した。

A fermentation organism capable of producing a high fermentation yield in the presence of inhibitors, necessary for the realization of increased efficiency in the process of production of second-generation bioethanol from inedible plant biomass, has been developed. The construction of the organism involved a combination of mutagenesis and selection and self-cloning, and results indicated the effectiveness of this combination in the creation of fermentation organisms. Self-cloning is a form of genetic modification implemented within a scope that makes it possible to treat the organism as non-genetically-modified.

Mutagenesis and selection using biomass hydrolysates increased both the organism's tolerance to inhibitors in hydrolysates and its ethanol fermentation yield. Using the selected strain as a base, genes for the expression of transaldolase and alcohol dehydrogenase were enhanced by self-cloning. The developed strain was able to produce a higher concentration of ethanol.

An examination of the entire process led to the discovery of a biomass pre-treatment condition that would control the production of phenols, which act as inhibitors. A process using this pre-treatment condition and the developed fermentation organism would be able to produce 213 L of ethanol from 1 dry-ton of corn stover.

1. ま え が き

化石資源枯渇の懸念や CO₂ 排出量削減の必要性への対応として、オイルリファイナリに替わるバイオリファイナリが提唱されている。バイオリファイナリは再生可能資源であるバイオマスを出発原料とし有用物質を生産するプロセスであるが、最も開発が進んでいるプロセスの一つに、バイオエタノール生産プロセスがある。サトウキビやトウ

モロコシの可食部を利用するバイオエタノール（第一世代）に続き、非可食部を利用するセルロース系バイオエタノール（第二世代）も実用化研究が進んでいる。バイオマスを分解して得た糖を菌体で発酵する糖化発酵法による、年産数千万ガロンの工場が世界では 2014 年から 2015 年にかけて複数開所している。我々は糖化発酵法によるセルロース系バイオエタノールの研究を行い、全体プロセス効率向上のために、阻害物質耐性が向上した発酵菌を構築した。

*基礎技術研究センター

2. エタノール生産プロセス概要

2.1. バイオマスの構成

植物バイオマスは主にセルロース、リグニン、ヘミセルロースから構成される (Fig. 1)。セルロースは六炭糖であるグルコースが β -1,4結合で強く結合してできた高分子であり、いわゆる繊維質として植物の構造を支える。セルロースは、その分解酵素であるセルラーゼを持つ生物が少なく、分解されにくい。

リグニンは六員環を多く含む高分子であり、セルロースを包むように強固に一体化して植物体を構成している。ヘミセルロースはリグニンとセルロースを結合する役割を持つとされる。ヘミセルロースの構造は一部に五炭糖を含む。

2.2. プロセス構成: 前処理, 糖化, 発酵, 濃縮

バイオエタノール生産プロセスの概要を Fig. 2 に示す。

サトウキビの絞り汁に含まれるショ糖やグルコースは、多くの発酵菌が直接利用できる。トウモロコシの可食部に含まれるデンプンはグルコースが α -1,4結合で弱く結合してできており、安価な酵素であるアミラーゼでの処理により発酵菌が利用できる。このため第一世代バイオエタノール生産プロセスは比較的容易である。

第二世代バイオエタノール生産プロセス (以下、第二世代プロセス) では、セルロースとリグニンやヘミセルロースが一体化した構造を破壊し、さらにセルロースを分解してグルコースとして利用する。第二世代プロセスの難しさはこのバイオマスの強固な構造に起因する。

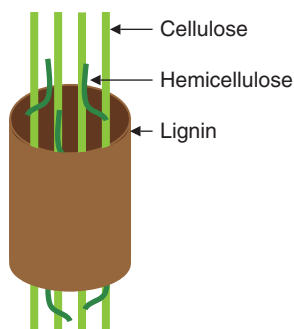


Fig. 1 Illustration of biomass structure

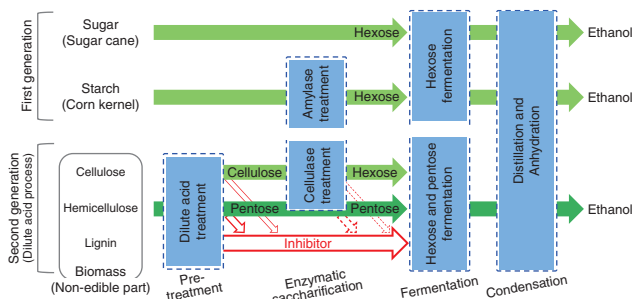


Fig. 2 Schematic diagram of bio-ethanol production process

Table 1 Characteristics of fermentation inhibitors

Category	Description	Inhibition mechanism	Countermeasure		
			Pre-treatment	Fermentation condition	Genetic modification
Phenols	Hydrophobic	Damage to membrane	Suppress production	—	—
Aldehydes	Oxidative	Oxidation of enzymes, etc.	—	—	Overexpression of ADH to reduce aldehydes
Organic Acids	Dissociation depends on pH	Damage due to change in intracellular pH	—	Fermentation pH control	Overexpression of TAL subject to damage by acetic acid

第二世代プロセスはガス化法と糖化発酵法に大別される。糖化発酵法はいくつかの工程に分けられる。

前処理工程ではリグニン分解を伴う。熱化学的手法が有効であり、水熱処理やアルカリ処理、酸処理が用いられる。

糖化工程ではセルラーゼを水溶液として添加し、セルロースをグルコースに分解する。セルラーゼが高価であることが糖化工程の課題の一つである。

前処理および糖化工程では、ヘミセルロースに主に由来する五炭糖も生成する。バイオマスを最大限利用してプロセス効率を向上するために、第二世代プロセスでは五炭糖を発酵に利用することも必須とされる。多くの生物は五炭糖を効率的に利用できないため、遺伝子組換えや育種などの遺伝子改変が必要となる。発酵工程では六炭糖および五炭糖をエタノールに変換する。

濃縮工程では、蒸留および脱水が行われる。蒸留には多くの熱エネルギーが必要なため、発酵液のエタノール濃度は高いほうが良い。

2.3. 発酵阻害物質

前処理工程でリグニンやヘミセルロースが様々な化学物質に変性する。生じた五炭糖や六炭糖の一部が過分解される。これら化学物質には発酵工程で菌の働きを大きく阻害する阻害物質が含まれる。阻害物質生成の経路を模式的に Fig. 3 に示した。阻害物質は発酵工程の収率を大きく低減するため、エタノール生産プロセス全体への影響が大きい。Table 1 に阻害物質の種類と特性を簡単にまとめた。

発酵阻害物質のうち酢酸は、トランスアルドラーゼ

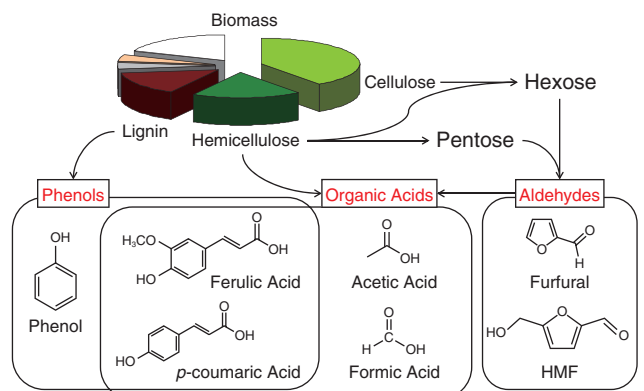


Fig. 3 Schematic diagram of production of fermentation inhibitors

(TAL)と呼ばれる五炭糖資化に重要な酵素の活性を低下させることが知られている。一方でアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) という酵素が、アルデヒド類を還元し弱毒化させることが分かっている⁽¹⁾。

2.4. バイオマス種類

第二世代プロセスでは原料となるバイオマスとして、稲わらや小麦わら、トウモロコシの茎や葉であるコーンストーバ、サトウキビの搾りかすであるバガスなどの農業残渣が主に研究されている。

第二世代プロセス研究を最も強力に推進してきた米国では、トウモロコシの茎や葉といった農業残渣であるコーンストーバの利用が見込まれている。国連食糧農業機関の公表データ⁽²⁾から推計すると、コーンストーバは稲わら、小麦わらについて世界の農業残渣で三番目に多いことが分かり、第二世代プロセスの主流となる可能性が高いと考えられる。

2.5. 前処理手法

前処理手法は水熱処理、アルカリ処理、希硫酸処理などが知られており、米国では希硫酸処理法の研究が進んでいる。希硫酸処理の特徴として、ヘミセルロースの分解が容易に進み、ヘミセルロース分解酵素が不要である一方、阻害物質の酢酸が多く発生することが知られている。またアルデヒド類も多く確認され、これは五炭糖および六炭糖の過分解によることが、熱分解シミュレーションで確認されている。

前処理およびその後の糖化工程では、バイオマスからの糖の収量を向上させると、同時に阻害物質濃度も向上する傾向にある。この発酵収率に関するトレードオフ関係には、前処理および糖化工程と発酵菌の阻害物質耐性が相互に関連しながら寄与するため、一体的な改良が必要である。

3. 本研究の対象と手法

3.1. 本研究の目的

第二世代プロセスでの大きな課題として、糖化酵素が高価であることが挙げられる。本研究では市販酵素の現状性能を前提とし、その使用量を減らすことを狙った。それには強力な前処理による糖化の促進が必要だが、同時に阻害物質濃度が増えることとなる。第二世代プロセスの効率向上のために、発酵菌の阻害物質耐性強化、すなわち阻害物質存在下での発酵収率向上を本研究の目的とした。

3.2. バイオマス種と前処理手法の選択

バイオマスの種類や前処理手法の選定により、阻害物質や糖など発酵に供される糖液の組成が決まり、さらに発酵工程で求められる発酵菌の特性が定まる。発酵菌の阻害耐

性強化には、ターゲットとするバイオマス種と前処理を決定する必要がある。

本研究ではコーンストーバをターゲットとし、その前処理手法は希硫酸処理を選択した。

3.3. ベース菌選択

発酵菌構築にあたってのベース菌選択に際して、プロセス効率向上に必要な五炭糖資化能を天然に持つことを重視した。通常の菌は五炭糖資化能を持たないため遺伝子組換えで外来遺伝子を導入する必要があるのに対し、*Meyerozyma guilliermondii* (以下、本菌) は天然に五炭糖資化能を持つため非組換え菌としての構築が可能である。生物工学的な遺伝子組換えを行う場合でも、菌体が天然に持つ遺伝子のみを対象とする限りはセルフクローニングと呼ばれ、遺伝子組換え生物を規制するカルタヘナ法の対象から除外されるため非組換え菌扱いとなる。非組換え菌扱いであれば、社会的に受容されやすく行政手続きが簡便であるなど世界的にも利点があるため、本菌を発酵菌構築のベース菌として選択した。

3.4. 代謝経路強化手法

発酵菌体内の代謝経路を改変することで、糖や阻害物質に対する発酵菌の反応を改善することができる。本菌のエタノール発酵経路を簡略化して Fig. 4 に示す。

本研究では、発酵菌の阻害物質耐性強化の手法を、次の通りとした。まず阻害物質を含むバイオマス糖液で育種を行い、更なる強化が必要な個所のプロモータを遺伝子組換えし、組換えによる代謝バランスの乱れを調整するため再度育種を行う。プロモータは特定の酵素の生体内での発現量をコントロールするため、遺伝子組換えにより所望の酵素の発現量を増やせる一方で、代謝経路ネットワークのバ

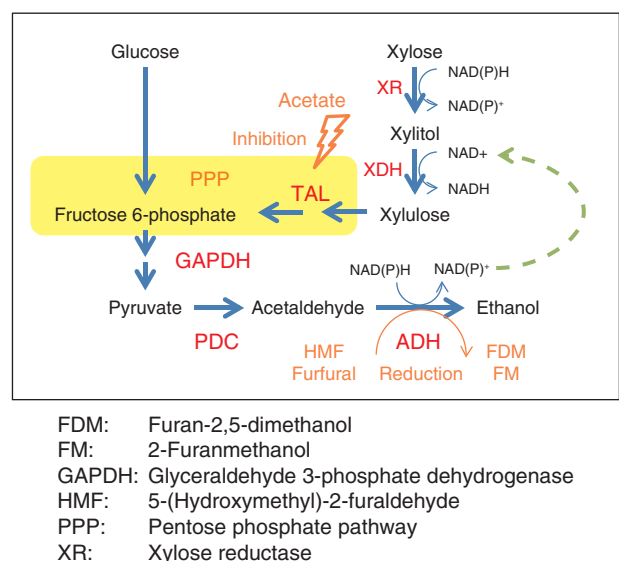


Fig. 4 Metabolic pathway of *Meyerozyma guilliermondii*

ランスが崩れることが予想される。崩れたバランスを育種によって整え、高性能な発酵菌が獲得できると考えた。

3.5. 育種

植物や動物の品種改良では、突然変異や交配を利用し望ましい特性を持つ生体を選択しているが、菌体でも同様の改良、すなわち育種が可能である。DNA に変異が導入された多数の菌体を例えば六炭糖を含まず五炭糖のみを含む培地で育てると、多くの変異体のうち五炭糖を資化できる株のみが生き延びることになる。さらには資化速度の速いものが他を圧倒して育つため、変異体の中でもより望ましい性質の株を取得できる。

育種の速度を上げるには、突然変異を人為的に高頻度起こす必要があるが、不均衡変異導入法によりそれが可能である。生体内では DNA 複製時に複製エラーが恒常的に起きている。この校正機能の人為的な抑制により、不均衡変異法では高頻度に、かつ DNA のランダムな位置に突然変異を起こすことができる。不均衡変異導入法では複製エラーをより高頻度起こす改良型の DNA 修復酵素、または同等の効果を持つ変異剤カクテルを用いる。

本研究ではバイオマス由来糖液を作成し、育種に用いた。これにより実際のバイオマス糖液に耐性を持つ菌体を選択できるため、プロセス適合性の高い菌体の構築が可能になる。代謝ネットワーク調整のための再育種も不均衡変異導入法で行った。なお不均衡変異導入法による育種は、開発元である共同研究先の株式会社ネオ・モルガン研究所が実施した。

3.6. セルフクローニング

実バイオマス糖液を用いて育種した発酵菌の阻害物質耐性をさらに向上するために、セルフクローニングの範疇で遺伝子組換えを行った。

TAL は五炭糖をエタノール発酵する経路に存在するが (Fig. 4)、酢酸存在下での活性低下がパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で報告されている⁽³⁾。酢酸存在下での TAL の振舞いが、本菌でもパン酵母と同様であることをメタボローム解析から推定した。データベース⁽⁴⁾上のパン酵母の TAL 配列と最も相同性が高い本菌の遺伝子配列を本菌の TAL として発現を強化することとした。TAL 強化により、酢酸耐性向上、増殖促進 (五炭糖資化促進)、発酵収率の向上を狙った。なおメタボローム解析用サンプルは、CS 糖液での発酵開始後 24 時間時点と 72 時間時点の培養液をそれぞれ採取し、メタノール添加による生体反応停止を行った。定量には内部標準法を採用した。

パン酵母の ADH は大別して 8 種類あることが知られている⁽⁴⁾。本菌で強化する ADH の選定にあたっては、反応が正方向であること、アルデヒド類還元能を持つこと、補酵素の NADH 依存性が推定されることを考慮し、パン酵

母の ADH1 に相同性の高い本菌の遺伝子配列を選定した。ADH の強化により、アルデヒド耐性向上と発酵収率の向上を狙った。

TAL および ADH 強化は、次の手順で行った。フルオロオロチン酸含有プレートで、自然変異により本菌のウリジン要求性株を得た。ウリジン要求性株はオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子 *ura3* に変異が入っていると考えられ⁽⁵⁾、*ura3* の修復によるウリジン要求性の解除および TAL、ADH の強化を同時に相同組換えで行うべく、Fig. 5 に示す DNA 断片を導入した。TAL には定常的かつ強力な発現のためにグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼのプロモータを採用し、ADH にはキシロース存在時の発現強化を狙ってキシロースレダクターゼのプロモータを用いることとした。プロモータは開始コドン上流の 1000 bp とし、ターミネータは終止コドン下流の 400 bp とした。形質転換には Zymo Research 社の Frozen-EZ Yeast Transformation II を用いた。

3.7. 育種およびセルフクローニングの効果

本研究では当初、稲わらをアンモニア水溶液で熱処理したバイオマス糖液 (RS 糖液) を用い、育種を行った。育種により、キシロースやアラビノースなどの五炭糖資化能の向上、発酵副生成物の低減、TCA 回路への炭素源流入制限による菌体増殖抑制およびエタノール生産量増大、抗酸化物質の発現量増大などの効果があったことが、育種前後の株のメタボローム解析から分かった。

上記育種株に、セルフクローニングによる TAL および ADH 強化を行った。TAL および ADH の発現量がそれぞれ 2 倍、1000 倍程度に増加したことを、同様のセルフクローニングを行った株の Real Time PCR 試験で確認した。Real Time PCR のサンプル調整は、RNA 抽出および DNase 処理に RNAqueous-4PCR Kit、cDNA 作成に High Capacity RNA-to cDNA Kit を用い、RNA 定量に Fast SYBR Green Master Mix Kit を用いた。

セルフクローニング株のメタボローム解析からは、ペントースリン酸経路 (PPP) が促進されていることが分かり、TAL 強化の効果が確認された。同解析からは更に、XDH が PPP のボトルネックとなっていることが示唆された。今回の ADH 強化では NAD⁺ 供給量を増やし XDH の活性

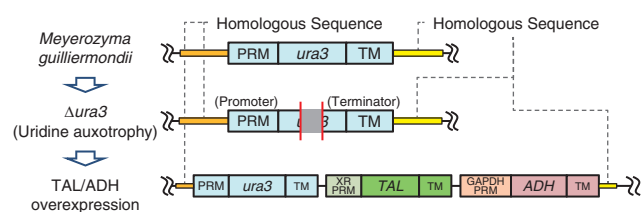


Fig. 5 Schematic diagram of DNA segment used for self-cloning

向上を狙った (Fig. 4) もの、必ずしも目論見通りとならなかったことが示唆された。ADH の発現量が 1000 倍程度に増大しているにも関わらず XDH のボトルネック解消が見られなかったことから、今回強化した ADH が実際には NADH 依存性でなかったと推定される。

強化した ADH の発現量からは、発酵菌の代謝に何らかのアンバランスが生じることが予想されたが、実際にセルフクローニング株数株のエタノール耐性が全て低下していることが分かった。エタノール耐性低下のメカニズムは現時点で不明だが、別の複数の TAL および ADH 強化株でも同様の傾向を示していることから、今回のセルフクローニング工程が株の代謝バランスを崩したことが強く示唆された。このような代謝のアンバランス解消を狙い、次に再育種を行った。

4. 発酵菌の性能

4.1. 構築した発酵菌の性能

セルフクローニング株のエタノール耐性低下を受け、エタノール耐性付与を主な狙いとした再育種を行った。育種前、育種後、セルフクローニング後、再育種後の各株の発酵収率を Fig. 6 に示す。発酵試験には 20 w/w% のコンストوباを希硫酸処理した糖液を用いた。糖液は試薬添加分も含めてグルコースを 63.2 g/L、キシロースを 34.5 g/L 含むため、この糖液からのエタノールの理論収量は 49.96 g/L となる。発酵は固液分離後の清澄液を pH6.0 に調整した糖液で 96 時間行った。

TAL および ADH のセルフクローニングのみでは、PPP 促進、エタノール耐性低下など、正負両者の効果により限定的だった発酵収率の向上が、再育種により促進されたものとする。遺伝子組換えと育種の組合せによる発酵菌性能の向上を目指した本研究コンセプトの正しさが示されたと言える。

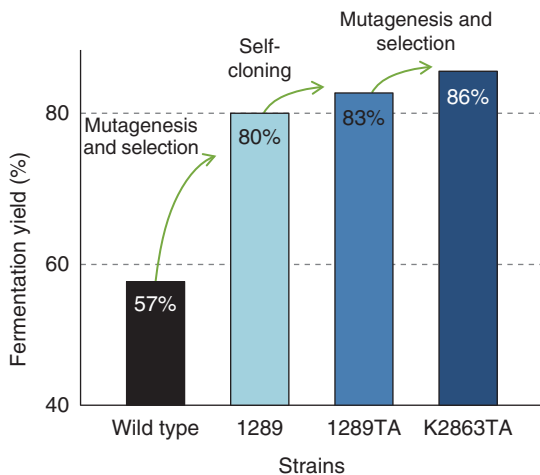


Fig. 6 Increase in fermentation yield by development of strain

4.2. スケールアップ時の性能

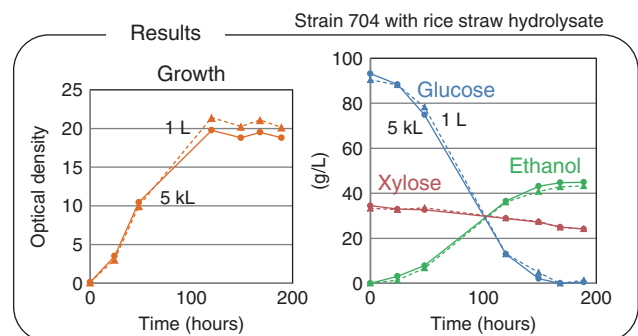
本研究では 5 kL 容量の発酵槽を含むエタノール生産プロセスを構築した。発酵工程のスケールアップでは、槽内温度の不均一性、攪拌やタンク下部の高圧による菌体へのダメージなどが問題となりうる。5 kL プロセスでは 1289 株と同様に RS 糖液で育種した株を用い、RS 糖液で発酵を行ったところ、対照区の 1 L スケール試験とほぼ同等の結果を示した (Fig. 7)。本菌を用いて少なくとも 5 kL までのスケールアップが可能であることが確認された。

4.3. 育種および遺伝子強化の方向性と発酵菌性能向上

育種により構築した発酵菌の一株を用いて、希硫酸処理コンストوباのスラリーでの発酵試験を行った。さまざまな糖液濃度での試験のため、10% 以上の糖濃度のものは、試薬糖を添加して調整した。Fig. 8 に示す通り、糖濃度が高くなるにつれて発酵収率は低下する。これは糖液中の阻害物質が増加することと、生成物阻害、すなわち自らが生産するエタノールによる阻害を受けること、両者の影響による。なお図中のエタノール濃度のラインは、発酵後の糖液に含まれるエタノール濃度を示す。

発酵収率と糖濃度を変化させた場合に、全体プロセスコストが一定値となるラインを Fig. 8 に示した。このラインに近いほど低コストでのエタノール製造が可能になるため、発酵収率のラインと最も近い糖濃度 (8%) の糖液を用いて、セルフクローニング株の再育種を行った。その結果、同糖濃度での発酵収率の向上に成功した。

生成物阻害への対応として、セルフクローニング株に高エタノール濃度耐性を選択圧とする再育種を、糖濃度 11% の糖液を用いて行った。その結果生産するエタノール濃度の向上が見られた。これらの事例からは、発酵菌の構築に



Experiment condition

Fermentation scale	1 L	5 kL
Jar size	2 L vol.	5.5 kL vol.
Biomass	Rice straw	
Sugar conc.	12.2 w/w%	
Agitation	Rotor blade	Pump circulation

Fig. 7 Comparison of 1 L- and 5 kL-scale tests

において、糖液組成や濃度、生産させたいエタノール濃度などをあらかじめ設定する必要性が示されたとともに、設定した条件に沿う形での発酵菌性能向上が図れることが示された。

4.4. ストレス応答と発酵菌性能向上

トランスクリプトームとDNA変異解析、メタボローム解析結果を統合し、代謝系のボトルネックを解明する代謝流れ解析を試みた。その結果、構築した発酵菌が五炭糖資化の際にストレス応答状態であることが示唆された。ストレス応答反応は阻害物質などのストレスに対して菌体の生存を図るものであるが、生成物による阻害もこのストレスの一因となる。

生成物阻害ストレスに対して応答せず、最終的に自らが生産したエタノールにより死滅して発酵が終了する現象が、高濃度のエタノール発酵を行う日本酒用パン酵母で確認されている。このような生成物阻害によるエタノール生産自主規制を解除する、すなわち強制的にエタノール生産を継続させることにより、高濃度エタノールを生産する発酵菌が構築できると考えられる。その試みの一つとして、TAL および ADH に加えて Fig. 4 に示すピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) を強化し、エタノール生産量の向上を狙った。PDC が TAL および ADH 強化後のボトルネックとなっていることがメタボローム解析により示唆されたためである。その結果、PDC の強化前に対して生産エタノール量が向上しており (Fig. 8)、エタノール生産自主規制の一部が解除できた可能性がある。

上記エタノール生産の自主規制と併せて他の阻害物質によるストレス応答を解除することで阻害物質やエタノール存在下でもエタノール発酵を継続する菌体が構築でき、エタノール収率の更なる向上が可能と考えられる。

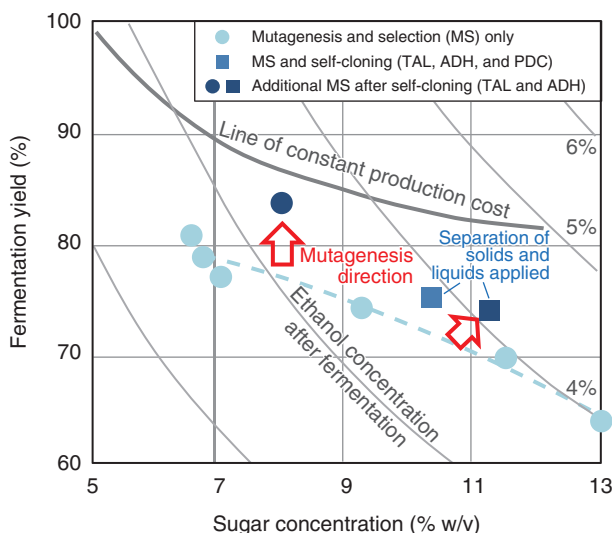


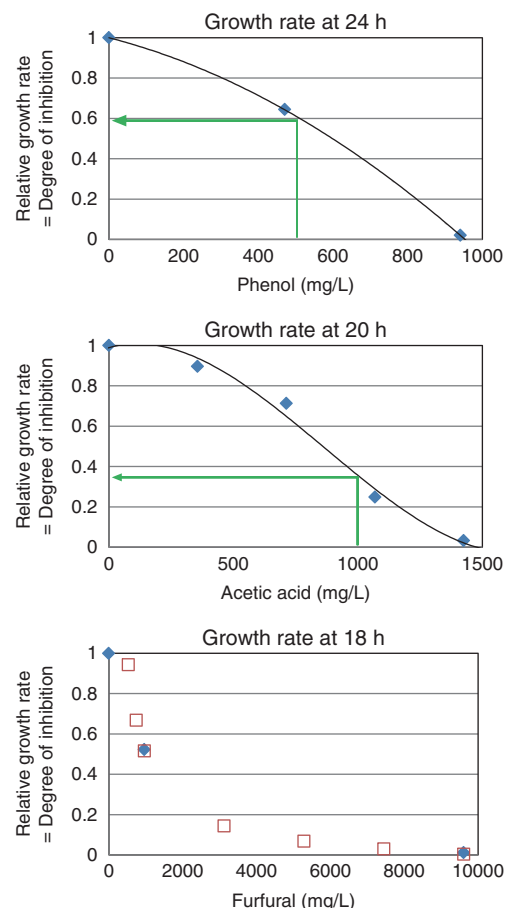
Fig. 8 Dependence of fermentation yield on sugar concentration

5. 発酵プロセスと全体収支

5.1. 阻害物質許容濃度の推定と前処理条件決定

Table 1 に示した阻害物質について、本菌の増殖を遅らせる効果を定量化した。

まず各阻害物質単独での増殖阻害効果を、次の様に数値化した。増殖阻害効果がないと考えられる合成培地に、各阻害物質をいくつかの濃度で添加し、その阻害度を調べた (Fig. 9)。Table 1 の通りフェノール類、アルデヒド類、有機酸類では阻害メカニズムが異なることが、添加濃度と一定時間後の菌体数の関係を表す曲線の違いに反映されている。これら曲線から、各阻害物質による増殖への影響を読み取ることができる。例えば培地に含まれる 500 mg/L のフェノールの影響により、増殖速度が合成培地での 0.6 倍程度になる。同様に 1000 mg/L の酢酸の影響により増殖速度が 0.35 倍となるが、培地に両者が含有される場合は複合的な影響がその積、すなわち $0.6 \times 0.35 = 0.21$ 倍で近似できることが分かった。この様にして、糖液が含有する阻害物質濃度を測定することにより、本菌の増殖を遅ら



Vertical axes indicate standardized growth rate.
(Culture OD with X mg/L inhibitor ÷ Culture OD without inhibitor)
Typical examples of phenols, aldehydes, organic acids are shown.
Optical density (610 nm) at ca. 20 hours was measured.
Organic acid concentration was multiplied by the dissociation constant for estimation of the concentration upper limit, in order to reflect the actual inhibition effect.

Fig. 9 Estimation of upper limit for inhibitor concentration

Table 2 Process conditions

Pre-treatment	Corn stover	Dry biomass ground to 3 mm pieces Mix at ratio of biomass : 2.5 % w/v Dilute acid = 1:2 Maintained at 170°C for 10 minutes
	Rice straw	Dry biomass ground to 3 mm pieces Mix at ratio of biomass : 25 % w/v aq. ammonia = 1:0.7 Maintained at 80°C for 3 hours
Saccharification	Substrate: 16.4 % w/w Enzyme: 0.4 mg/g-BM Maintained at 50°C for 72 hours at pH 5	
Fermentation	Substrate: 14.0 % w/w Sugar concentration: 6.2 % w/w Maintained at 30°C, at 28 mg/L/h aeration for 67 hours at pH 6	
Quasi-SSF	Saccharification and fermentation changed as follows Saccharification: 72 → 20 hours + 4 hours cooling Fermentation: 67 → 76 hours Process hours: 139 + cooling time → 100 hours	

せる効果を定量化した。

この推定法は、簡単のために各阻害物質濃度の影響の積を用いており、また全ての阻害物質を網羅できないことから、その精度に限界がある。そのため以下をパラメータとして扱い、パラメータフィッティングによる精度向上を図った。まず、種類が多岐にわたり定量が困難なフェノール類は定量したフェノールの一定量倍とした。一般に阻害効果が指摘されるメイラード反応産物の影響も一定値とした。

この推定法によってバイオマス糖液中の阻害物質のバランス検討が可能になったため、糖液中に許される *p*-クマル酸などフェノール類の上限値を定めた。フェノール類は発酵条件や遺伝子改変による対応が難しく、発生量を抑える必要があるためである (Table 1)。

別途、熱分解シミュレーションにより希硫酸処理条件 (濃度, 温度, 保持時間) による阻害物質と糖の発生量の関係を求め、阻害物質発生量が上限値以下でかつ糖収量が多くなるよう前処理条件を定めた (Table 2)。

このように前処理糖化工程を含めた全体プロセスの条件と、発酵菌の阻害物質耐性強化を並行して検討することにより、第二世代プロセスへの適用が可能な発酵菌が構築できた。

5.2. 糖液濃度と発酵収率

第二世代バイオエタノール生産プロセスの実用化には、各工程のコストダウンが必要とされる。そのためには効率向上が求められるが、ある工程の効率は別工程の効率とのトレードオフとなる場合が多い。これまでに述べた阻害物質濃度と糖濃度の関係の他、糖収率を上げるために糖化酵素量を増やすとトータルコストが抑制できない、糖濃度が低いと得られる生成エタノール濃度も低く蒸留エネルギーが過大になるなどの関係である。

このため各プロセス条件を変えたときに全体コストがどう変化するかのパラメータスタディを行い、コストミニマム条件を探ることとした。Fig. 8 に示した発酵収率と糖濃度

を変化させた時にコストが一定値になるラインを見ると、水色で示す発酵菌を使用した場合、糖濃度 11% 程度で発酵を行うよりも、糖濃度 7 から 8% 付近で発酵を行った方がコストラインに近く、トータルコストが抑えられることを示す。コストラインの形状から、低糖濃度でのコスト削減には限界があることが示されており、トータルコストの一層の削減には蒸留エネルギーや装置コストの削減のために、より高糖濃度条件での発酵収率の向上が必要と分かる。

5.3. 準 SSF プロセス化

バイオエタノール生産プロセスの一つとして Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) がある。これは、同一容器内で酵素糖化とエタノール発酵を同時に行うことにより、プロセス時間の削減が可能とされているものである。また、糖化プロセス後に固液分離をせずスラリのまま発酵させる為、糖化槽と発酵槽を統合でき固液分離工程を削減できるので、イニシャルコストの低減につながる。

SSF では糖化と発酵の条件を同一にして行うが、本研究で用いた糖化酵素の至適条件 (50°C, pH 4) と、発酵菌の至適条件 (30°C, pH 6) では差が大きいため、全く同じ条件での糖化発酵は現実的ではない。そこで、同一容器内で糖化および発酵を逐次的に行う準 SSF を検討した。3 L スケールの専用装置を作成し、20 時間の酵素糖化の後、降温および pH 調整を行い、発酵菌を添加してエタノール発酵を行った。準 SSF により、39 時間の短縮と装置の効率化が図れることが明らかとなった (Table 2)。

5.4. 物質収支

バイオエタノールの物質収支およびエネルギー収支は酵素糖化やエタノール発酵以外のプロセスにも大きく依存している。我々はバイオエタノールの物質収支を計算するにあたり、NREL レポート⁽⁶⁾を参考にした。発酵残渣からメタン発酵や残渣燃焼および発電を行うことで製造プロセスの全エネルギーを供給できると仮定して、物質収支を算出した。使用したコーンストーバ中にセルロースとヘミセルロースが合計で 57 w/w% 含まれている場合、Table 2 の条件で酵素糖化を行い糖収率が 63%、準 SSF で発酵を行い発酵収率が 86% となり、その後の蒸留および濃縮工程を経るとバイオマス 1 dry-ton から 213 L の無水エタノールが得られる計算となった。

6. まとめ

本研究を通して、次の結果を得た。

- (1) 五炭糖質化酵母をベースとすることにより、非組換え菌扱いとなる第二世代プロセス用エタノール発酵菌を構築した。
- (2) セルロースおよびヘミセルロース含有量が合計で

57 w/w% のコーンストーバを 1 dry-ton 用いた場合、構築した発酵菌の利用を含む本研究の条件では、213 L のエタノールが得られる。

また、次の知見を得た。

- (1) 発酵菌の構築に、遺伝子組換えと育種の組合せが有効であることを示した。既知の酵素のみを組換えるだけでなく、未知の酵素を含めた代謝経路ネットワーク全体の改変が必要であるためと理解される。
- (2) どのような糖液にも対応できる万能な発酵菌構築は現実的でなく、バイオマス種や各工程を限定したプロセス専用の発酵菌が必要であり、プロセス条件を限定したうえで発酵菌を構築する必要がある。

参考文献

- (1) Liu, Z. L.: Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 90, p. 809-825, (2011)
- (2) <http://faostat.fao.org/site/728/DesktopDefault.aspx?PageID=728#ancor>
- (3) Hasunuma, T., Sanda, T., Yamada, R., Yoshimura, K., Ishii, J., Kondo, A.: Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbial Cell Factories*, Vol. 10, p. 2-13, (2011)
- (4) www.yeastgenome.org
- (5) Foreau, E., Courdavault, V., Simkin, A. J., Pichon, O., Crèche, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., Papon, N.: Optimization of the URA-blaster disruption system in *Candida guilliermondii*: efficient gene targeting using the URA3 marker, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 91, p. 117-120, (2012)
- (6) Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol, <http://www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf>, NREL, May 2011

■ 著 者 ■



土田 芳樹



塚越 範彦