

標的認識型微生物の創出とその発酵生産プロセスへの応用

仁宮 一章

(大阪大学大学院工学研究科)

研究の目的

近年、バイオマスを原料としたバイオエタノールの利用は、カーボンニュートラルの観点からその重要性が認識されてきている。このバイオエタノール生産の最も一般的な手法の一つに、酵母を用いてデンプンなどのバイオマスを醗酵させるというものがある。しかし、酵母はデンプン分解酵素 α -amylase を持っていないため我々は α -amylase を細胞表層に提示した遺伝子組み換え酵母を作成した[1,2]。ここで宿主に用いる酵母であるが、凝集性酵母は回収に遠心分離工程が不要で、設備投資を削減することができる利点があることから、宿主として望ましいと考えられる。

一般的には酵素反応は、溶液中を拡散している酵素と基質が会合することにより反応が開始する。しかしながら、表層提示酵母によるデンプンからの直接エタノール醗酵では、酵素 α -amylase は酵母表層に提示されており、また基質であるデンプン粒子も非常に巨大な分子であることから、両者ともに拡散速度は非常に低い。さらに悪いことに、凝集性酵母を表層提示システムの宿主として用いるとデンプン粒子は凝集塊内部の酵母表層に提示された α -amylase にはアクセスすることができないと予想される。このような、みかけの α -amylase 活性の低下によって、直接醗酵プロセスにおけるエタノール生産速度は大幅に低下してしまうことが懸念される[1]。

そこで、本研究では、表層提示酵母システムを用いたデンプンからの直接エタノール醗酵プロセスに対して、上述のような酵母の凝集性が及ぼす悪影響があるかを検証するために、凝集性ならびに非凝集性酵母を宿主とした 2 種類の表層提示株をもちいてエタノール生産速度を評価した。また、顕微鏡をもちいて、表層提示酵母とデンプン粒子間の表層接触の度合いを観察した。最後に、表層提示酵母とデンプン粒子との表層接触を促進させるため、両者を共沈させた状態で培養を行う充填培養法によるエタノール醗酵を行い、エタノール生産速度を評価した。

方法

凝集性ならびに非凝集性酵母を宿主とした 2 種類の表層提示株(凝集性表層提示酵母(YF207/pGA11/pUFLA)と非凝集性表層提示酵母(YF237/pGA11/pUFSA))を本研究では用いた[1,2]。培地には、1 gのデンプンを含むYP培地(yeast extract 10 g·l⁻¹, polypeptone 20 g·l⁻¹, pH 5.0)を用いた。デンプンからの直接エタノール醗酵を行うための培養方法としては、通常の懸濁培養法に加え、酵母とデンプン粒子を共沈させた状態で培養を行う充填培養法も行った[3]。エタノール濃度についてはガスクロマトグラフにより分析した。

結果

表層提示酵母を用いたデンプンからのエタノール直接醗酵において、宿主の凝集性が及ぼす影響を評価するため、まず凝集性酵母および非凝集性酵母を用いて実験を行った。エタノール比生産速度は凝集性表層提示酵母の場合 0.04 g·g dry cell⁻¹·h⁻¹となり、非凝集性表層提示酵母の比生産速度とほぼ同等の値を示した。さらに直接醗酵中のサンプルの顕微鏡観察により、多数のデンプン

粒子が酵母凝集塊の内部に存在していることが分かった。すなわち、凝集塊内部に閉じ込められたデンプンが α -amylaseにアクセスできたことによりみかけの α -amylase活性の低下を防いだといえる。また、言い換えれば、表層提示酵母とデンプンの接触がこの直接醗酵プロセスでは重要といえる。

そこで、表層提示酵母とデンプン粒子との表層接触をさらに促進させるため、通常の懸濁培養法ではなく、酵母とデンプン粒子を共沈させた状態で培養を行う充填培養法によるエタノール醗酵を行った。その結果、充填培養法の場合にはエタノール比生産速度は $0.09 \text{ g-g dry cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ となり、懸濁培養法の場合 ($0.07 \text{ g-g dry cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) と比較して上昇した。これは、酵母とデンプン粒子の表層接触の頻度が増加したことが理由と考えられるが、一方で酵母表層に提示された α -amylaseが持つデンプン認識部位に起因する酵母とデンプン粒子の相互作用は不十分であったことを示唆していた。

結論

表層提示酵母を用いたデンプンからのエタノール直接醗酵においては、表層提示酵母とデンプン粒子との表層接触を促進させることで、エタノール生産速度を向上させることができた。本研究から得られた知見は、従来の液体醗酵ではなく、菌体と基質とが分散せず近接した状態で進む固体醗酵プロセスに生かされるものと考ええる。固体醗酵プロセスの利点としては、1)醗酵初期において菌体にかかる浸透圧ストレスを回避できること、2)醗酵槽が小型ですむことから設備費を削減できる、3)生産物であるエタノールを蒸留するエネルギーコストを削減できること等がある。現在、我々のグループでは固体醗酵プロセスの構築に関する研究も進行中である。

文献

1. Khaw T. S., Katakura Y., Koh J., Kondo A., Ueda M., and Shioya S. Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70, 573-579 (2005).
2. Khaw T. S., Katakura Y., Ninomiya K., Bito Y., Katahira S., Kondo A., Ueda M., and Shioya S. Effect of flocculation on performance of arming yeast in direct ethanol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73, 60-66 (2006).
3. Khaw T. S., Katakura Y., Ninomiya K., Kondo A., Ueda M., and Shioya S. Enhancement of ethanol production by promoting surface contact between starch granules and arming yeast in direct ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* (2007) in press.