

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6443944号  
(P6443944)

(45) 発行日 平成30年12月26日 (2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日 (2018.12.7)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 1/16 (2006.01)** C 1 2 N 1/16 Z N A G  
**C 1 2 P 7/06 (2006.01)** C 1 2 P 7/06

請求項の数 2 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2016-515856 (P2016-515856)	(73) 特許権者	304020177
(86) (22) 出願日	平成27年4月22日 (2015.4.22)		国立大学法人山口大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/002175		山口県山口市吉田 1 6 7 7 - 1
(87) 国際公開番号	W02015/166645	(74) 代理人	100107984
(87) 国際公開日	平成27年11月5日 (2015.11.5)		弁理士 廣田 雅紀
審査請求日	平成29年12月22日 (2017.12.22)	(74) 代理人	100102255
(31) 優先権主張番号	特願2014-92206 (P2014-92206)		弁理士 小澤 誠次
(32) 優先日	平成26年4月28日 (2014.4.28)	(74) 代理人	100096482
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 東海 裕作
		(74) 代理人	100188352
			弁理士 松田 一弘
		(74) 代理人	100131093
			弁理士 堀内 真
		(74) 代理人	100150902
			弁理士 山内 正子

(出願人による申告) 平成24年度、独立行政法人科学技術振興機構「戦略的創造研究推進事業先端的低炭素化技術開発 (ALCA) (低炭素化に資する発酵微生物のゲノム育種およびゲノム工学的「耐熱化」)」受託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キシロース資化能及びエタノール生産能を有する酵母

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

酵母クレイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株 (受託番号: N I T E B P - 0 1 7 3 9)、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30 で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株。

【請求項2】

請求項1記載の酵母又はその変異株を、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下で培養することを特徴とするエタノールの生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キシロース資化能及びエタノール生産能を有する酵母や、エタノールの生産方法に関し、より詳しくは、酵母クレイベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株 (受託番号: N I T E B P - 0 1 7 3 9)、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30 で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株や、前記酵母又はその変異株を用いたエタノールの生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

地球温暖化が世界中で問題となっているなかで、微生物によって様々な原料から発酵生産されるバイオエタノールが注目されている。バイオエタノールはバイオマスから生成し

た糖を発酵して生産されるエタノールであり、再生可能な自然エネルギーであること、及びその燃焼によって大気中の二酸化炭素量を増やさないことから、化石燃料、特にガソリンに代替する燃料としての将来性が期待されている。

#### 【0003】

現在、工業的なバイオエタノールの生産において、原料としては、サトウキビ、糖蜜等の糖質や、トウモロコシ、ジャガイモ、キャッサバ等のデンプンが用いられているため、食料や飼料の生産と競合するという問題が生じている。そこで、草本系や木質廃材等のリグノセルロース系バイオマスが次世代のバイオエタノール原料として着目されている。リグノセルロース系バイオマスは、セルロース、ヘミセルロース、リグニン等から構成される。これまでにリグノセルロース系バイオマスを原料としたエタノール生産についての研究が進められ、リグノセルロースを物理的、化学的処理により糖化してエタノールを生産する方法として、例えば、雑草を使用し、前記雑草を緩衝液に浸漬して当該緩衝液に電圧を印加することにより雑草の通電処理物を得る通電処理工程と、前記通電処理物を酵素により糖化物とする糖化工程と、前記糖化物を原料として酵母を添加してエタノール発酵を行う発酵工程とからなる処理方法（特許文献1参照）や、酵素糖化処理によって糖を製造し、さらにエタノール発酵によって糖からエタノールを製造する方法において、酵素糖化処理の前に、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物のエタノール水溶液を用いて、リグノセルロース系バイオマスを蒸解処理することにより糖を製造することを特徴とする前処理方法（特許文献2参照）が提案されている。しかしながら、リグノセルロースの物理的、化学的処理はコストや環境負荷の問題が解決しておらず、未だ実用化には至っていない。

#### 【0004】

キシロースは五炭糖の一種であり、リグノセルロースの約25%を占める。かかるキシロースをバイオエタノール生産の原料とすることができれば、リグノセルロース系バイオマス活用が拡大すると期待される。しかしながら、一般的なエタノール生産酵母であるサッカロマイセス・セレビシエはキシロース資化能を有さないため、サッカロマイセス・セレビシエを用いた場合、キシロースをエタノール生産の原料とすることができない。

#### 【0005】

近年、遺伝子組換え等によりキシロース資化能を付与した微生物、例えば、キシロース異性化酵素をコードするヌクレオチド配列を含む核酸構築物で形質転換し、キシロースを炭素源として利用する能力を付与された真菌宿主細胞（特許文献3参照）や、ADH1遺伝子及びADH4遺伝子を減弱化することで、キシロースからのエタノール収率を向上するように改変されたクルイベロマイセス属に属する変異体酵母（特許文献4参照）や、グリシン合成系タンパク質の遺伝子及び/又はメチオニン合成系タンパク質の遺伝子の発現機能を喪失させて、かつキシロース代謝酵素遺伝子を導入することで、キシロースの資化速度が上昇した微生物（特許文献5参照）が提案されている。

#### 【0006】

しかしながら、遺伝子組換え微生物は自然界に存在しない微生物であるため、生態系への影響の関係上、遺伝子組換え微生物を用いてエタノール生産を行なう場合には、エタノール生産を行った発酵タンクから遺伝子組換え微生物が漏出しないように、気密性の高い設備を用意する必要がある等、いわゆる物理的封じ込めに関する多くの制約を生じる。さらに、漏出した場合に備えた付随装置も必要となると共に、発酵終了時には、完全に殺菌して廃棄しなければならない等のコスト高の要因となる。また、酵母では、グルコースの存在下で他の糖の代謝に係る経路が阻害される“グルコース抑制（Glucose Repression）”の現象がよく知られており（非特許文献1参照）、グルコースを含む多様な糖で構成されるバイオマスからのエタノール生産における課題となっていた。

#### 【0007】

また、本発明者らは、耐熱性エタノール生産酵母であるクルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株を用い、糖源として様々な五炭糖や六炭糖を用いてエタノール生産を検討した（非特許文献2参照）。クルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株は耐熱性を有するため、高温での発酵が可能となる。したがって、クルイベ

10

20

30

40

50

ロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株を用いれば、発酵工程で生じた発酵熱により高温となった培養液を冷却するための設備に要するコストを低減できるが、五炭糖のみを糖源とするとエタノール生産性は非常に低いという問題があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2005-058055号公報

【特許文献2】特開2013-042727号公報

【特許文献3】特開2012-231794号公報

【特許文献4】特開2012-210169号公報

【特許文献5】特開2012-183013号公報

10

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Marian C (1999) Current Opinion in Microbiology 2:202-207

【非特許文献2】Rodrussamee N et al. (2011) Appl. Microbiol. Biotechnol. 90:1573-1586

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

上述したように、微生物を利用して、キシロースを資化してエタノールを生産する方法が提案されているが、未だ低コストで効率よくキシロースを資化してエタノールを生産可能な株は得られていないのが現状であった。そこで、本発明の課題は、キシロースを資化してエタノールを生産可能な耐熱性の酵母又はその変異株や、キシロースを資化してエタノールを生産する方法を提供することにある。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するために、まずはラオス国内において47でも生育可能な耐熱性酵母を得た。かかる耐熱性酵母の性質をさらに調べたところ、グルコース存在下、40で培養した場合にキシロースを資化可能であること、及び、キシロースを唯一の糖源として好氣的条件下で培養した場合に、キシロースを資化してエタノールを生産

30

【0012】

すなわち、本発明は、[1]酵母クルイベロマイセス・マルシアヌスNo.21株(受託番号:NITE BP-01739)、又は、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有するその変異株や、[2]上記[1]記載の酵母又はその変異株を、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下で培養することを特徴とするエタノールの生産方法に関する。

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、キシロースを資化してエタノールを生産することが可能な耐熱性の酵母を提供することができる。また、本発明の酵母又はその変異株は40でもキシロースを資化可能であることから、本発明の酵母又はその変異株を用いてエタノールを生産すれば、培養液を冷却するための設備に要するコストを低減することが可能となる。さらに、本発明の酵母又はその変異株はグルコース抵抗性を有することから、糖源としてリグノセルロース系バイオマス由来の糖化液を用いても効率よくエタノール生産を行うことが可能となる。

40

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】クルイベロマイセス・マルシアヌスNo.21株について、各種ストレス耐性試

50

験を行った結果を示す図である。

【図2】クлуйベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、グルコース抵抗性試験を行った結果を示す図である。

【図3】クлуйベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、キシロースからのエタノール生産試験を行った結果を示す図である。

【図4】クлуйベロマイセス・マルシアヌス No. 21 株について、30 又は37 で培養してキシロースからのエタノール生産試験を行った結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の酵母クлуйベロマイセス・マルシアヌス(*Kluyveromyces marxianus*) No. 21 株(以下、単に「No. 21 株」ともいう)は、本発明者らがラオス国内で分離した天然由来の株であり、受託番号 N I T E B P - 0 1 7 3 9 として、日本国千葉県木更津市かずさ鎌足 2 - 5 - 8 1 2 2 号室に所在する N I T E 独立行政法人製品評価技術基盤機構、特許微生物寄託センターに 2 0 1 3 年 1 0 月 2 4 日に寄託されている。No. 21 株は、キシロースを資化してエタノールを生産することが可能な耐熱性の酵母である。

10

【0016】

本発明の変異株としては、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30 で培養した場合にキシロース資化能及びエタノール生産能を有する No. 21 株の変異株(以下、単に「本件変異株」ともいう)であれば特に制限されず、かかる本件変異株は、No. 21 株に対して紫外線や放射線を照射する方法や、変異原となる物質と接触させる方法等の公知の変異処理方法を行い、キシロースを糖源として含有する培地により好氣的条件下、30 で培養した場合にキシロースを資化してエタノールを生産可能である株を選択することにより得ることができる。

20

【0017】

本発明において、キシロースを糖源として含有する培地としては、エタノール合成の基質となる糖成分として少なくともキシロースを含有する培地を挙げることができ、培地に含有するキシロース量としては、0.5 ~ 20%、好ましくは 1.0 ~ 15% を挙げることができる。かかるキシロースを糖源として含有する培地としては、YPD 培地(2% バクトペプトン、1% 酵母エキス、2% グルコース)、YPAD 培地(2% バクトペプトン、1% 酵母エキス、2% グルコース、40  $\mu$ l / ml 硫酸アデニン)、SD 培地(2% グルコース、0.67% L アミノ酸不含イーストニトロジェンベース)、YM 培地(0.3% 酵母エキス、0.3% 麦芽抽エキス、0.5% ペプトン、1% グルコース)、YP 培地(1% 酵母エキス、2% ペプトン)等の酵母に一般的に用いられる培地にキシロースを加えた培地を挙げることができ、キシロースと共にグルコース、スクロース、又はフルクトースといった純粋な糖やそれらの混合物を加えてもよく、また、キシロースを唯一の糖源として加えてもよい。キシロースを唯一の糖源として加えるとは、エタノール合成の基質となる糖成分としてキシロースを含み、キシロース以外の糖類を加えないことを意味し、キシロースを唯一の糖源として含有する培地としては、YP 培地にキシロースを加えた Y P X y 1 培地(1% 酵母エキス、2% ペプトン、2% キシロース)を挙げることができる。なお、キシロースを糖源として含有する培地に、補助成分として硫酸アンモニウム、硫酸マグネシウム、リン酸カリウム等の無機塩や、糖アルコールを加えてもよい。

30

40

【0018】

さらに、キシロースを糖源として含有する培地としては、リグノセルロース系バイオマス由来の糖化液を加えた培地を用いてもよく、糖化液を作製する方法としては特に制限されないが、多糖類を分解する酵素を用いて資化可能な単糖類にまで分解することにより作製する方法や、多糖類を分解する能力を有する微生物により多糖類を加水分解し、資化可能な単糖類にまで分解することにより作製する方法を挙げることができる。

【0019】

本発明において、好氣的条件下で培養するとは、分子状酸素の存在下で培養することを行い、振とう培養の場合、回転数 60 ~ 400 r p m (revolution per minute) での培

50

養を上げることができる。

【0020】

本件変異株において、キシロース資化能を有するとは、キシロースを代謝することが可能であることを意味する。かかるキシロース資化能は、キシロースを含有する培地で酵母を培養し、培養開始からの培地に含まれるキシロースの消費量を指標にして評価することができ、具体的にはY P X y 1培地により好氣的条件下、30 で酵母を48時間培養し、キシロースが50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上消費される場合に、前記酵母はキシロース資化能を有することができる。なお、キシロースの消費量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた公知の手法により測定することができる。

10

【0021】

本件変異株において、エタノール生産能を有するとは、エタノールを生産することが可能であることを意味する。かかるエタノール生産能は、酵母を培養し、培養開始からの培地に含まれるエタノールの生産量を指標にして評価することができ、具体的にはY P X y 1培地により好氣的条件下、30 で酵母を48時間培養し、エタノールが0.05% w/v以上、好ましくは0.1% w/v以上、より好ましくは0.2% w/v以上生産される場合に、前記酵母はエタノール生産能を有することができる。なお、エタノールの生産量は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた公知の手法により測定することができる。

【0022】

No. 21株や本件変異株(以下、総称して「本件酵母」ともいう)は、一般的に酵母の培養に用いられるY P D培地、Y P A D培地、S D培地、Y M培地等により培養することができる。

20

【0023】

本件酵母は、さまざまなストレスに対する耐性を有する。まず、本件酵母は、熱ストレスに対する耐性を有し、47 という高温においても良好に生育することが可能である。また、本件酵母は、酸化ストレスに対する耐性を有し、6 mMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する培地において良好に生育することが可能である。さらに、本件酵母は、浸透圧ストレスに対する耐性を有し、35%グルコースを含有する培地において良好に生育することが可能である。加えて、本件酵母は、エタノールストレスに対する耐性を有し、10%エタノールを含有する培地において良好に生育することが可能である。

30

【0024】

また、本件酵母はグルコース抵抗性を有する。グルコース抵抗性とは、前述のグルコース抑制に対する抵抗性を意味する。すなわちグルコース抵抗性は、多様な糖を資化しこれをエタノールに変換する能力の指標である。本件酵母はグルコース抵抗性を有することから、リグノセルロース系バイオマス由来の糖化液等の様々な糖類を含有する液体を用いて効率よくエタノール生産を行うことが可能となる。

【0025】

さらに、本件酵母はキシロースを資化して効率よくエタノールを生産することが可能である。本発明者らがタイ国内にて分離し、40 以上で優れたエタノール生産性を示す耐熱性酵母株クルイベロマイセス・マルシアヌスDMKU3-1042株(受託番号: N I T E B P - 291、特許第5051727号公報: 以下単に「3-1042株」ともいう)を用いてキシロースを資化した場合には、代謝産物としてエタノールよりもキシリトールが多く得られるため、エタノール生産効率が低い。しかしながら、本件酵母を用いてキシロースを資化した場合には、代謝産物としてキシリトールよりもエタノールが多く得られるため、エタノール生産効率が低い。特に通気性を高めて培養することにより、代謝産物のほとんどをエタノールとすることができ、加えて、エタノール生産時間の短縮も可能となる。

40

【0026】

本発明のエタノールの生産方法としては、本件酵母を、キシロースを糖源として含有す

50

る培地により好氣的条件下で培養する方法であれば特に制限されず、かかる本発明のエタノール生産方法により、キシロースからエタノールを効率的に生産することが可能となる。

【0027】

なお、本件酵母は30以上の高温でのエタノール発酵が可能であることから、培地中でリグノセルロース系バイオマスの酵素による糖化処理とエタノール発酵を同時に行ってもよい。

【0028】

本発明のエタノールの生産方法において、培養する温度としては特に制限されないが、好ましくは30~40、より好ましくは30~37を挙げることができる。また、培養方法としては、振とう培養、攪拌培養、振とう攪拌培養、連続培養、又はこれらの組み合わせを挙げることができ、振とう培養又は攪拌培養を好適に挙げることができる。振とう培養の場合の回転数は60~400rpm、好ましくは80~200rpmを挙げることができる。さらに、大量培養系における酵母の細胞密度を上げるためには0.1~0.3vvm (Vessel volume per minute) に相当するエアレーションを行ってもよい。通気性を高めることによって、キシロースを資化して得られた代謝産物としてキシリトールよりもエタノールの生産割合を高めることが可能となる。また、培養時間としては、1~10日、好ましくは2~7日、より好ましくは2~3日を挙げることができる。培地のpHとしては、pH4~8、好ましくはpH5~7を挙げることができる。

【0029】

本発明におけるエタノールの生産方法において、培地から生産されたエタノールを回収する方法としては、従来公知のいかなる方法も適用することができ、例えば、固液分離操作によってエタノールを含む液相と、酵母や固形成分を含有する固相とを分離し、その後、液相に含まれるエタノールを蒸留法によって分離・精製することで回収する方法を挙げることができる。

【実施例】

【0030】

(酵母の単離)

ラオス国内4つの地域において、果実、野菜、草木の葉や土からサンプルを採取し、YPD培地に植え込み、37で3日間培養後、YPD寒天平板上に広げて37で1~2日間培養しコロニーとして分離した。かかる分離したコロニーから、耐熱性を有し、キシロース資化能が高い株をスクリーニングし、そのうちの1株をNo.21と命名した。

【0031】

(酵母の同定)

前述のスクリーニングで得られたNo.21株について、その形態的、生理的、生化学的性質を一般的な方法(Kurtzman and Fell (1998))等により調べた。その結果、No.21株は、コロニーはクリーム色、湿光、隆起状で、滑らかな縁を有し、粘着性があり、多極性に出芽しており、子嚢胞子は球形で、2~4胞子/子嚢であった。また、かかる株は45で生育し、グルコースからエタノールを生産した。さらに、No.21株からゲノムDNAを抽出し、サンガー法によりその26S rDNA塩基配列(配列番号1)を決定し、BLAST homology searchを用いて酵母の既知種と比較した。その結果、クルイペロマイセス・マルシアヌスの既知株(BM4株、NBRC1777株等)と100%配列が一致した。したがって、No.21株はクルイペロマイセス・マルシアヌスと同定した。

【0032】

(各種ストレス耐性)

No.21株の工業的な有用性を確認するため、酵母を用いた培養で起こりうる種々のストレスへの耐性を検討した。YPD液体培地(pH7.0)にNo.21株又は対照株として3-1042株を一白金耳植菌し、30、18時間、好氣的条件下で培養して原菌液を調製した。次にYPD寒天培地を用意し、No.21株、3-1042株の原菌液

を Y P 液体培地によって 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍希釈してそれぞれ左から順に 5 箇所スポットし、30、45、47 の 3 温度条件下で 18 時間培養して生育を調べた。また、上記の熱ストレス（物理的ストレス）の他、酸化ストレス（5 mM 又は 6 mM  $H_2O_2$ ）、浸透圧ストレス（30% 又は 35% グルコース）、エタノールストレス（8% 又は 10% エタノール）の 3 種類の化学的なストレスを検討するため、各ストレス源を含有した Y P D 寒天培地上に上述と同様に希釈した原菌液をそれぞれスポットして培養し、生育を比較した。

#### 【0033】

図 1 に、各種ストレス耐性試験の結果を示す。図はマトリックスになっており、列は温度条件（30、45、47）を、行は各種ストレス（1. 熱ストレス、2. 酸化ス

10

#### 【0034】

熱ストレスに対しては、No. 21 株は 30、45、47 いずれの温度条件下でも良好に生育し、特に 47 では耐熱性エタノール生産株である 3 - 1042 株よりも生育が良好であった。このことから、No. 21 株は耐熱性の菌株として高温条件下で利用可能なことが明らかとなった。

#### 【0035】

酸化ストレスに対しては、No. 21 株はすべての温度条件下で 3 - 1042 株よりも良好な生育を示した。5 mM  $H_2O_2$  存在下で 3 - 1042 株はほとんど生育しなかった。一方、No. 21 株は 30、45 では良好に生育し、47 においても 5 mM の  $H_2O_2$  に対しては一定の抵抗性を持つことが明らかとなった。

20

#### 【0036】

浸透圧ストレスに対しては、No. 21 株は 3 - 1042 株とほぼ同程度の抵抗性を示した。3 - 1042 株にはわずかに劣るものの、45 まではその生育が良好であることが示され、浸透圧ストレス下でも利用可能なことが明らかとなった。

#### 【0037】

エタノールストレスに対しては、No. 21 株は 30 において 3 - 1042 株よりも良好な生育を示した。45、47 ではどちらの株も全く生育しなかった。30、8% エタノールでは、化学的なストレスの無い熱ストレスのみの場合と同程度の生育を示し、本菌株がエタノール耐性を有していることが示された。

30

#### 【0038】

##### （グルコース抵抗性試験）

上述の No. 21 株及び 3 - 1042 株の原菌液を Y P 液体培地によって 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍、10000 倍希釈して、各種糖（グルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース）を唯一の糖源とする Y P D 寒天培地（各種糖をそれぞれ 2% 含有）にそれぞれ左から順に 5 箇所スポットし、2 - デオキシグルコース（2 - DOG）を 0.01% となるように添加して 30、37、40 の 3 温度条件下で 48 時間培養してグルコース抵抗性を調べた。2 - DOG はグルコーストランスポーターによって取り込まれ、かつ解糖系において代謝されない物質であり、2 - DOG を添加することでグルコース抑制を誘導することができる。

40

#### 【0039】

結果を図 2 に示す。図はマトリックスになっており、列は培養温度（30、37、40）と 2 - DOG の有無に関する条件（[+0.01% 2 - DOG] が 2 - DOG 有）を、行は培地中の糖源（グルコース、ガラクトース、マンノース、キシロース、アラビノース）をそれぞれ示している。1 枚の Y P D 寒天培地プレートに対照の 3 - 1042 株（上段）と No. 21 株（下段）をそれぞれスポットし、撮影した写真を並べている。

#### 【0040】

グルコースは陽性対照であり、グルコースも 2 - DOG も共に細胞が取り込むため、両

50

者の間で生育に差は見られなかった。

【 0 0 4 1 】

ガラクトースについては、30、37、40の各温度で2-DOG存在下における生育が陽性対照のグルコースよりも悪くなっており、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられた。また、No. 21株と3-1042株との間で明確な差はみられなかった。

【 0 0 4 2 】

マンノースについては、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられなかった。これはマンノースの代謝がグルコースの存在によって影響を受けないという酵母の性質によるものと考えられた。また、No. 21株と3-1042株との間で明確な差はみられなかった。

【 0 0 4 3 】

キシロースについては、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられたが、No. 21株の方がその抑制効果は小さく、No. 21株はグルコース抵抗性を有する株であることが明らかになった。2-DOGへの抵抗性は特に高温(37、40)で顕著であり、No. 21株は40付近という高温条件において、たとえグルコースが存在する培養液でもキシロースを資化する能力を有していることが明らかとなった。

【 0 0 4 4 】

アラビノースについては、No. 21株及び3-1042株の両方でグルコース抑制がみられたが、No. 21株は特に高温(37、40)において3-1042株より高いグルコース抵抗性を有していることが明らかとなった。アラビノースについても、No. 21株はグルコース存在下で資化できることが示された。

【 0 0 4 5 】

(キシロースからのエタノール生産 - 1)

No. 21株が有するキシロースからのエタノール生産性を検討するため、キシロースを唯一の糖源として含有する液体YPXY1培地を用いたエタノール生産試験を行った。No. 21株及び3-1042株を30mLのYPXY1培地(pH7、キシロースを2%含有)に一白金耳植菌し、30で培養した。キシロース資化の酸素要求性を確認するため、50rpm、100rpm、150rpmの3条件で振とう培養し、生育とエタノール生産性を調べた。培養はそれぞれ96時間行い、24時間ごとに培養液を少量採取し、OD<sub>660</sub>の吸収(生育の指標)、培養液中のキシロース濃度(キシロースの資化の指標)、培養液中のキシリトール濃度(エタノール発酵に使われなかったキシロースの指標)、培養液中のエタノール濃度(エタノール生産能の指標)をそれぞれ測定した。キシロース濃度、エタノール濃度は、培養液を遠心分離(14,000rpm、1分)し、上清をメンブレンフィルター(日本ポール社製)でろ過して検液とし、高速液体クロマトグラフィー(日立ハイテクノロジーズ社製)で測定することで求めた。培地中のエタノール濃度の測定における高速液体クロマトグラフィーの分析条件として、カラムはGel pack(登録商標)GL-C610-S(日立ハイテクノロジーズ社製)を使用した。

【 0 0 4 6 】

結果を図3に示す。図はマトリックスになっており、列は左からOD<sub>660</sub>の吸収(Growth OD<sub>660</sub>)、培養液中のキシロース濃度(Xylose %w/v)、培養液中のキシリトール濃度(Xylitol %w/v)、培養液中のエタノール濃度(Ethanol %w/v)をそれぞれ表している。行は振とう条件(50、100、150rpm)を示す。図中、No. 21株を薄い灰色実線(- -)、3-1042株を濃い灰色実線(- -)でそれぞれ表している。

【 0 0 4 7 】

50rpmで振とう培養した場合は、両株ともほとんど生育せず、培養液中のキシロース濃度もほとんど変化が無く、エタノールも生産されなかった。これは、キシロースの資化に酸素(通気)が必要であることを示している。



## 【0048】

100rpmで振とう培養した場合は、両株とも良好に増殖した。培養液中のキシロース濃度も時間経過と共に減少し、それぞれの菌株がキシロースを資化したことを示している。一方、培養液中のキシリトール濃度は3-1042株の方が高く、反対にエタノール濃度はNo.21株の方が高かった。この結果は、No.21株がキシロースを資化してエタノール発酵を行ったのに対し、3-1042株はエタノール発酵以外の他の代謝にキシロースを使い、その結果、キシリトールが代謝産物として増加したと考えられた。また、No.21株は、72時間で0.3%(w/v)のエタノールを生産した。

## 【0049】

150rpmで振とう培養した場合でも、100rpm同様に両株ともキシロースを資化し、良好に増殖した。No.21株では、培養液中のキシリトールの濃度はほぼ0%であり、エタノール濃度は48時間でほぼ極大(0.2% w/v)に達した。十分な通気により、No.21株ではキシロースの資化が早く進み、エタノールが効率よく生産されたことが示された。なお、3-1042株においては、エタノールはほとんど生産されず(<0.1%)、その代わりにキシリトールが培養液中に蓄積した。

## 【0050】

これらの結果より、No.21株は培養液中のキシロースを唯一の糖源として資化し、ここからエタノールを生産する能力を有している株であることが示された。キシロースは植物系バイオマスに豊富に含まれる五炭糖である。これまでは酵母の資化性に問題があり、かかる問題が植物系バイオマスからのエタノール生産を阻害する要因になっていたが、本発明の酵母であるNo.21株はこの技術課題を解決する優れた酵母株であることが示された。

## 【0051】

(キシロースからのエタノール生産 - 2)

No.21株が37℃でもキシロースからのエタノール生産性を有することを以下の方法で確認した。No.21株、3-1042株及びキシロースを資化してエタノールを生産する能力が高いピキア・スチピチス(*P.stipitis*)株を30mLのYPXY1培地(pH7、キシロースを2%含有)に一白金耳植菌し、30℃又は37℃、160rpmで培養して生育とエタノール生産性を調べた。培養はそれぞれ120時間行い、12時間ごとに培養液を少量採取し、OD<sub>660</sub>の吸収(生育の指標)及び培養液中のキシロース濃度(キシロースの資化の指標)、培養液中のエタノール濃度(エタノール生産能の指標)をそれぞれ測定した。キシロース濃度、エタノール濃度は、上述と同様の方法で測定することで求めた。

## 【0052】

結果を図4に示す。各図中、培養液中のエタノール濃度(%w/v)を薄い灰色実線(- -)、培養液中のキシロース濃度(g/L)を濃い灰色実線(- -)、OD<sub>660</sub>の吸収を濃い灰色実線(- -)でそれぞれ表している。また、各図中、上段の軸はOD<sub>660</sub>の吸収や、培養液中のキシロース濃度(g/L)、下段の軸は培養液中のエタノール濃度(%w/v)を表す。

## 【0053】

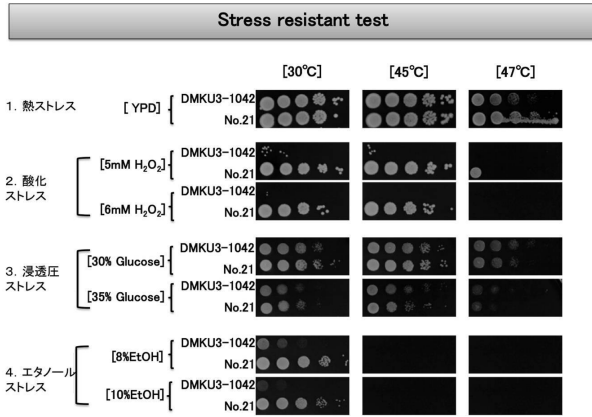
No.21株を培養した場合には、30℃だけでなく37℃でもキシロースを糖源としてエタノールを効率よく生産するが、3-1042株やピキア・スチピチス株を培養した場合には、30℃ではキシロースを糖源としてエタノールを効率よく生産するものの、37℃ではキシロースを糖源としたエタノールの生産効率が低いことが明らかとなった。

## 【産業上の利用可能性】

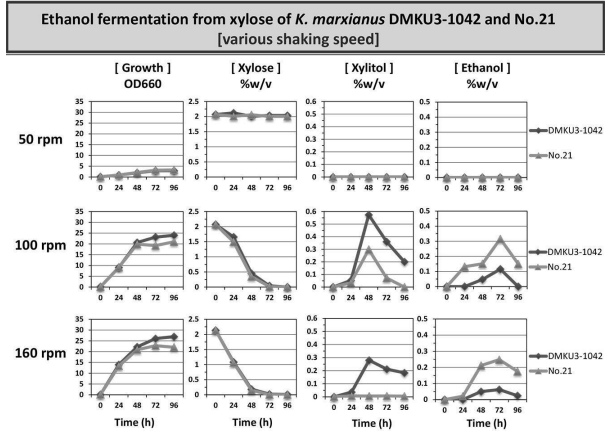
## 【0054】

本発明の酵母を用いれば、キシロースを資化してエタノールを効率的に生産することが可能であり、エタノール生産分野において有用である。

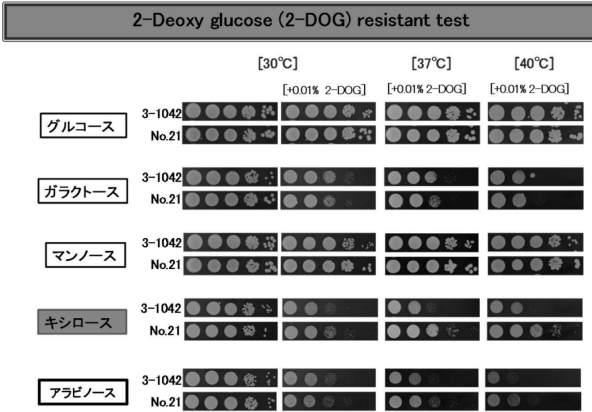
【 図 1 】



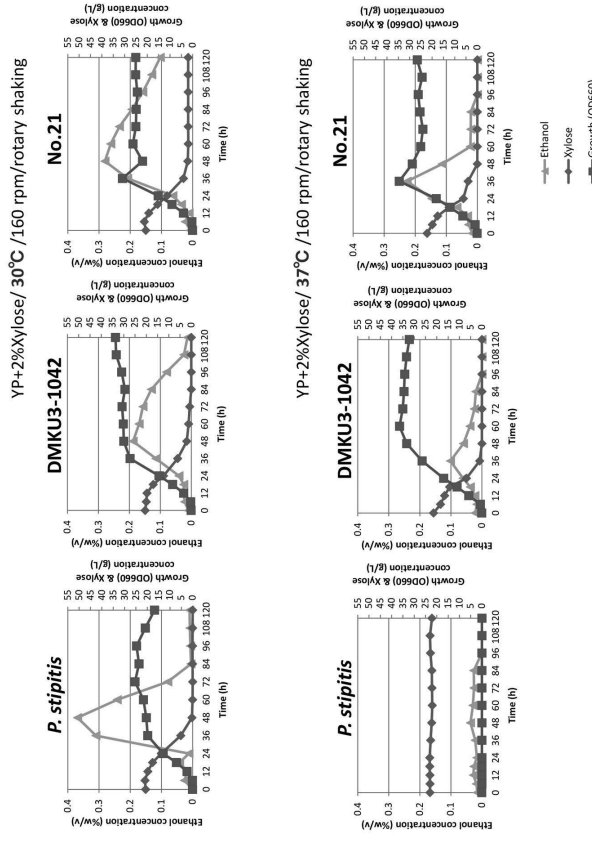
【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】



**【配列表】**

0006443944000001.app

## フロントページの続き

微生物の受託番号 NPMD NITE BP-01739

(74)代理人 100141391

弁理士 園元 修一

(72)発明者 山田 守

山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学農学部内

(72)発明者 ニチヨン スカンヤ

山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学農学部内

(72)発明者 ケオ - ウドネ チャンソム

ラオス人民民主共和国ビエンチャン市サイタニー群ドンドクキャンパス ラオス国立大学理学部内

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特許第5051727(JP, B2)

特開2012-210169(JP, A)

特開2013-21947(JP, A)

NONKLANG, Sanom et al., High-Temperature Ethanol Fermentation and Transformation with Linear DNA in the Thermotolerant Yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008年, Vol. 74, pp. 7514-7521RODRUSSAMEE, Nadchanok et al., Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011年, Vol. 90, pp. 1573-1586

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

C12P 1/00-41/00

MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)