

バイオエタノール製造に利用できる花酵母を求めて

秋山繁治

Research of Flower Yeasts for Bioethanol Production

Shigeharu AKIYAMA

The aim of our study is to identify the flower yeast which has abilities to produce bioethanol from wood biomass. Recently, bioethanol has gained attention all over the world as an alternative energy source to oil. However, there is a high likelihood that food prices rise and people are confronted with a food shortage by using large amounts of corn and potatoes, which are raw materials of bioethanol. So we considered the possibility of bioethanol produced from wood. We isolated yeast from the azalea flowers and confirmed that flower yeasts have three requisite abilities for bioethanol production from wood biomass (alcoholic fermentation ability, cellulose resolution ability and xylose assimilation ability) and measured the strength of these abilities. As a result, we found five yeasts which have these three abilities. Furthermore, we researched the base sequences of yeasts which have these abilities and identified them. According to the experiment, we found that three out of five yeasts matched *Metschnikowia pulcherrima*. Therefore, we have great expectations for bioethanol made from wood biomass by using flower yeast.

<キーワード> 花酵母, バイオエタノール, アルコール発酵能, セルロース分解能, キシロース資化能

はじめに

野生酵母(花酵母)についての研究は、生命科学コースの生命科学課題研究で、2007年に「花に生息する酵母(花酵母)を題材として、いろいろな角度からアプローチすることで、自然界における生物相互の関係ならびに野生酵母のもつ機能を理解することは意義のあることと考え、多様性、生態、特性、およびその生息する花との関係について考察すること」を目指して出発した¹⁾。

まず、花から酵母を採取し、形態、染色体数、アルコール発酵能、セルロース分解能を指標に分類することに取り組んだ。酵母の分離源として、第1段階では、学校周辺で採取した花、第2段階では、校内及び近隣の野山、花屋で購入した花、第3段階では、中国地方のいろいろな地域のツツジの花を用いて実験した。

その結果、(1)蜜が多く、虫が集まるツツジを分離源に選ぶことによって多様な菌株を得ること、(2)形態によって分類は、4つのグループに分けるのが限界であったが、基礎的な区別の段階には使えること、(3) *Saccharomyces*属でない酵母もアルコール発酵をしていること、(4)酵母にも、セルロース分解能をもったも

のが存在すること、(5)セルロース分解能とアルコール発酵能を同時にもつ酵母が存在することが確認できた。

そして、アルコール発酵能とセルロース分解能を同時にもつことに着眼して、木質バイオマスを原料にしてバイオエタノールを生産できる野生酵母を見つけることを目指した。

バイオエタノールは石油などに代わる再生可能エネルギーとして注目されており、実際に各国で生産が進んでいる。しかしながら、その原料となるサトウキビ、トウモロコシなどはこれまで食料や家畜飼料として供給されてきたもので、食料や家畜飼料との競合が生じ、結果として農作物の価格高騰を招いている状況がある。そこで、これまで利用価値がないとされてきた廃材などの木質バイオマスを原料としてバイオエタノールの生産する方法の開発が期待されている。木質バイオマスの主成分は、セルロース、ヘミセルロースであり、セルロースはグルコースが、ヘミセルロースはキシランが主成分である。それらを原料にして効率的にエタノールを生成することがバイオエタノールを生産するにあたり重要になると考えた。2007年から2015年まで、生徒が引き継ぎながら取り組んできた方法及び成果をまとめた。

目的

微生物を用いてグルコースをエタノールに変換することは容易であるのに対し、キシロースをエタノールに変換することは困難であることが知られている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はエタノール発酵に適した微生物で、大学や研究機関で広く使われているが、キシロースをエタノールに変換することができない。また、*S. cerevisiae* よりもエタノール生産能が高い野生酵母が存在するという報告もある。そこで私たちは *S. cerevisiae* ではない野生酵母の中から、木質バイオマスからバイオエタノールを生産するのに利用できる菌株を見つけることを目指した。

材料

岡山大学構内に生息するツツジの花（分離源）から採取した野生酵母を用いた。

手順

ツツジの花から野生酵母（花酵母）単離し、その菌株について、バイオエタノールの生産に必要な能力である(1)アルコール発酵能、(2)セルロース分解能、(3)キシロース資化能の有無とその能力の強さを調べ、有望株について最終的に塩基配列（18SrDNA）を解析し、ホモロジー検索によって種を同定する。DNA配列の解析は外部に依頼した。

方法

1. 酵母の単離

柱頭、やく、花びらの中心などを滅菌した綿棒で擦り取り、綿棒ごと液体培地（YPG）1 ml に入れて懸濁した。その懸濁液少量（0.3 ml 程度）を、分離用の平板培地（YPG: Yeast extract 1%, クロラムフェニコールを最終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ となるように添加）にスプレッドした。30°C で数日～10日間静置培養し、形成されたコロニーの外観から判断して、酵母菌と思われるコロニーを識別して分離した。単コロニー分離を繰り返し、最終的に独立コロニーとし、分離した酵母菌株（独立コロニー）は5°C で保存した。

2. 能力の有無の確認

分離株についてアルコール発酵能、セルロース分

解能、キシロース資化能の有無を調べた。

(1) アルコール発酵能の有無の確認（ダーラムテスト）

- ① グルコース（10%）を含む YPG 液体培地 5 ml の入った試験管に蓋を取ったエッペンドルフチューブを入れて、120°C で20分滅菌した。
- ② 細胞密度が 1×10^6 個/ml になるように培養液を調整し、30°C で24時間静置培養した。発酵していれば CO_2 が発生するので、結果としてチューブが浮き上がってくる。チューブが浮くかどうかで発酵能の有無を確認した（図1）。

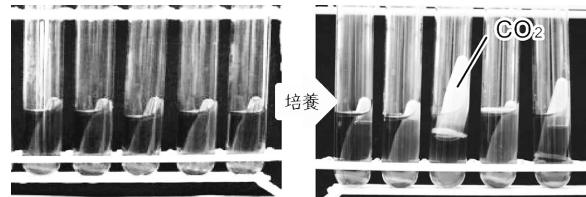


図1 アルコール発酵能の確認

(2) セルロース分解能の有無の確認

セルラーゼの活性測定の難しさは、セルロースという基質が水に溶けないことに起因する。そこで、水に溶けるようにしたセルロース誘導体であるカルボキシメチルセルロース（Carboxymethyl cellulose: CMC）を含む寒天に酵素液を反応させて活性を簡易的に調べる方法で調べた。反応後コンゴレッドで染色して、コロニーの周辺にクリアゾーンができたなら分解能があると判断した（図2）。

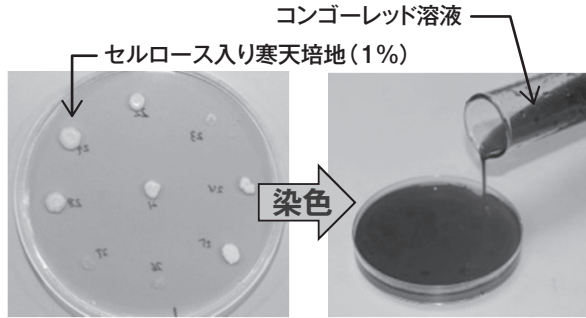
- ① シャーレ（YPG+CMC 1% 寒天培地）1枚に9株植菌し、25°C で3日間培養した。
- ② ①のシャーレにCMC(0.1%)を含む寒天（1%）液を流し込み（重層）、37°Cで一晩培養した。
- ③ コンゴレッド（0.1%）溶液で1時間染色し、その後NaCl（1 mol/l）溶液で数回洗浄した。
- ④ コロニー周辺のクリアゾーン形成の有無を確認した。

(3) キシロース資化能の有無の確認

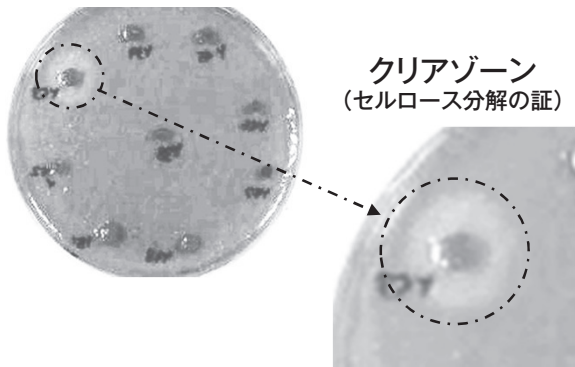
培地にコロニーができたなら分解能があると判断する。

- ① シャーレ（YPG+キシロース 2% 寒天培地）に酵母を植菌した。
- ② ①を30°C で7日間培養しコロニーを形成している場合には、培地上のキシロースを資化し増殖したと判断した（図3）。

〈実験〉



〈染色後〉



※結果が見やすくなるよう、画像の色を少し加工している。

図2 セルロース分解能の確認

〈実験〉

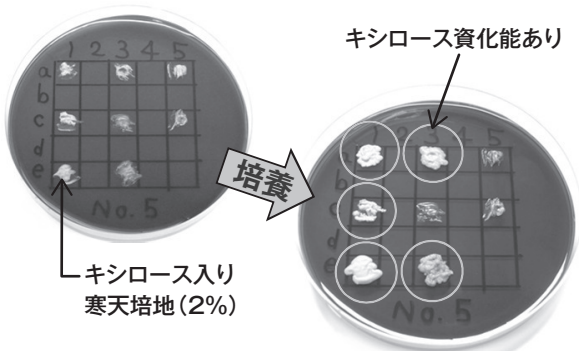


図3 キシロース資化能の確認

3. 能力の強弱

分離株についてアルコール発酵能, セルロース分解能, キシロース資化能の能力の強さを調べた。

(4) アルコール発酵能の強さの測定

アルコール発酵能の有無を確認する実験において, 1日以内にチューブが浮き上がった場合には, 高アルコール発酵能を持つ酵母として判断した。

(5) セルロース分解能力の強さの測定

セルロース (CMCを使用) は粘性があるので分解されれば粘度が低下する。粘度低下の程度で分解能力の強さを測定する。

①遠沈管にCMC (2%) 水溶液 5 mlと酵母を加

え, 2週間振透培養した。

②①にクリップを上から落とし, クリップが遠沈管の底に達するまでの時間を測定した。時間が短いほど, セルロース分解能が強いと判断した。

(6) キシロース資化能の強さの測定

糖度計で糖度を測定し, 糖度が低下するかを確認し, その値をもとに資化能の強弱を判定する。

①キシロース (5%) 液体培地 5 mlを入れた試験管を120℃で20分間滅菌した。

②細胞密度が 1×10^6 個/mlになるように培養液を調整した。

③28℃で120時間静置培養した。

④③の溶液 (培地) を手持屈折計 (REF501) のプリズム面に1, 2滴落とした。

⑤採光板を閉じ, 先端面を明るい方に向けて接眼鏡を覗き, 目盛りを読んだ。

4. 塩基配列 (18SrDNA) の解析

選別された菌株の全DNAを抽出した後, 18SrDNAをPCRで増幅し, その塩基配列を実験室酵母 *S. cerevisiae*のそれと比較するとともにBLAST解析をおこなった (ホモロジー検索で既知の種と比較して酵母を分類した)。

【使用したプライマー】

PCR	18-F	5'-ATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
プライマー	18-R	5'-GATCCTTCCGCAGGTTCCACC-3'

PCR条件

PCR-Kit	TaKaRa EX-HS
PCR条件	94℃30秒 68℃1分 30サイクル, 総量20μl

結果

1. 酵母の単離

地点から採取したツツジから分離操作をおこなった結果, 酵母と判定される株計196菌株を単離した。

2. 能力の有無の確認

(1) (2)アルコール発酵能・セルロース分解能

単離した196菌株のうちアルコール発酵能のみをもつ酵母は69菌株, セルロース分解能のみをもつ酵母は112菌株であった。そのうち高アルコール発酵能とセルロース分解能の両方をもつ酵母を12菌株得ることに成功した。

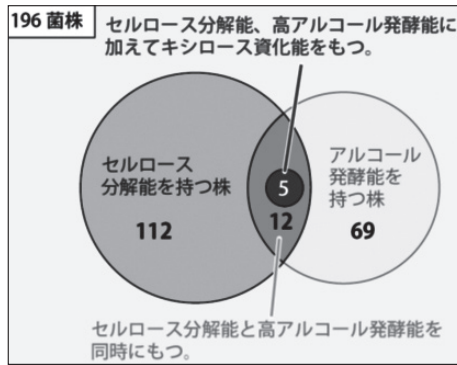


図4 単離した196菌株の各能力

(3) キシロース資化能

高アルコール発酵能とセルロース分解能の両方をもつ12菌株のうち、さらにキシロース資化能をもつ株が5菌株見つかった。この5菌株を「酵母1」～「酵母5」とした。

3. 能力の強弱の確認

(4) アルコール発酵能の強弱

高アルコール発酵能とセルロース分解能の両方をもつことを確認した12菌株はすべて高いアルコール発酵能をもっていることを確認した。

(5) セルロース分解能の強弱

「酵母1」～「酵母5」の5菌株と、対照実験としてセルロース分解能を持たない*S. cerevisiae*と酵母なしの計7種類でCMCの粘度低下を調べた結果、「酵母1」、「酵母3」がセルロース分解能が高いということがわかった。

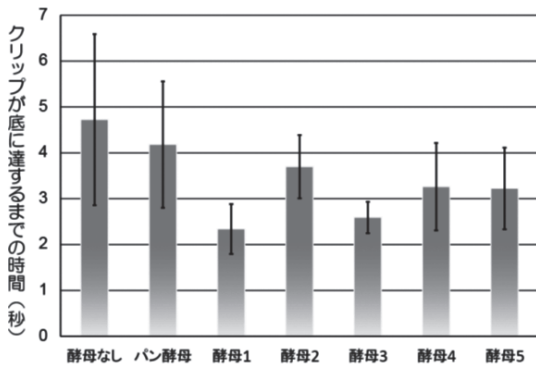


図5 セルロース分解能の強弱

(6) キシロース資化能の強弱

(5)で用いた酵母について手持屈折計で糖度を測定した結果、「酵母5」が最もキシロース資化能が高いということがわかった。

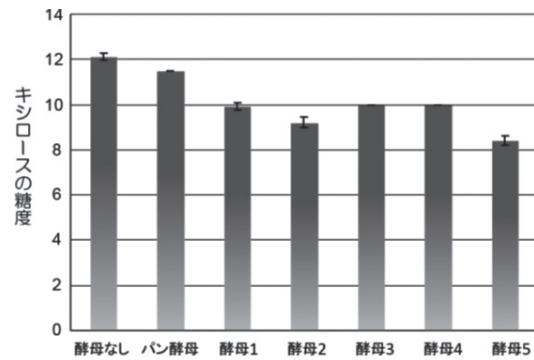


図6 キシロース分解能の強弱

4. 塩基配列の解析

高アルコール発酵能、セルロース分解能、キシロース資化能の3つの能力を同時に持つ5菌株の塩基配列を解析した結果、「酵母1」・「酵母2」・「酵母5」は同種であることが分かり、その塩基配列は *Metschnikowia pulcherrima* と100%一致した。また、「酵母3」株は、3菌株とは違う種であることが分かった。「酵母4」は繁殖力が弱くて解析に必要な量を培養できなかった。また、「酵母1」・「酵母2」・「酵母5」と塩基配列が100%一致した。

*M. pulcherrima*は、昨年、オーストラリアのワイン研究機関で発見され、ワインの製造に使われており、その仲間がグルコースやガラクトースを使ったアルコール発酵をする能力を持ち、かつセロビオース（セルロースをセルラーゼで分解すると生じる）やキシロースを資化する能力を持つことが確認（*Viticulture & Enology*）されている。これらの性質は木質バイオマスからのバイオエタノールの生産に必要な能力であり、得られた酵母は実際にバイオエタノール生産に利用できる可能性があることが確認できた。

考 察

アルコール発酵能、セルロース分解能、それぞれの能力の強弱の実験ではダーラムテストや手持屈折計を用いた濃度測定、クリップを落として時間を測定する方法を用いたが、さらに精度の高い測定が必要だと考えている。アルコール発酵ではガスクロマトグラフィー、セルロース分解能では粘土計、キシロース資化能ではHPLC（高効率液体クロマトグラフィー）を用いる方法などを考えている。

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Metschnikowia pulcherrima gene for 18S rRNA	1448	1448	100%	0.0	100%	AB023473.1
Metschnikowia chrysoperlae strain Gibson-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1443	1443	100%	0.0	99%	AY452054.1
Candida picachoensis strain Gibson-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1435	1435	100%	0.0	99%	AY452053.1
Candida pimensis strain Gibson-1.1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1432	1432	100%	0.0	99%	AY452055.1
Metschnikowia pulcherrima 18S rRNA gene, strain JCM 9846, partial sequence	1413	1413	99%	0.0	99%	AB013578.1
Metschnikowia bicuspidata strain NRRL YB-4993 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	99%	0.0	99%	JQ698902.1
Metschnikowia bicuspidata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1380	1380	99%	0.0	99%	DQ520881.1
Metschnikowia zobellii gene for 18S rRNA	1380	1380	99%	0.0	99%	AB023468.1

パン酵母

図7 酵母3と相同性が高い菌株

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Saccharomyces cerevisiae strain YJM789 35S ribosomal RNA gene, external transcribed spacer 2, and 26S ribosomal	1441	1441	99%	0.0	99%	JQ277730.1
K.waltii DNA for 18S ribosomal RNA	1491	1491	99%	0.0	99%	X89527.1
Lachancea thermotolerans CBS 6340 chromosome H complete sequence	1485	4457	99%	0.0	99%	CU928180.1
Lachancea thermotolerans strain NRRL Y-8284 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	99%	0.0	99%	FJ153136.1
Lachancea sp. CFL-2008 strain ES12S06 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	99%	0.0	99%	FJ153106.1
Lachancea sp. CFL-2008 strain SC6L01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	99%	0.0	99%	FJ153105.1
Lachancea sp. CFL-2008 strain SC5L02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1485	1485	99%	0.0	99%	FJ153104.1
Zygosaccharomyces sp. IFO 11067 gene for 18S rRNA, partial sequence	1485	1485	99%	0.0	99%	AB087384.1

図8 酵母1, 酵母2, 酵母5と相同性の高い菌株

まとめと今後の課題

ツツジの花からアルコール発酵能やセルロース分解能などの能力をもつ酵母菌を計196菌株得ることができ、木質バイオマスからバイオエタノールを生成する過程において、有用と考えられる3種の能力をもつ酵母菌を5菌株得ることに成功した。アルコール発酵能・セルロース分解能・キシロース資化能のそれぞれの能力の強弱は、同じ種の中でも酵母の菌株間（「酵母1」・「酵母2」・「酵母5」）によって差があることが分かった。また、塩基配列の解析により、得られた菌株の既知の種との類縁性を示すことができた。

この研究に取り組む前の段階では、酵母はパンや酒の製造に利用され、アルコール発酵をするというイメージしかなかったが、本研究に携わってからアルコール発酵だけでなく、セルロースを分解することや、

キシロースを資化するなど、様々な能力をもつ酵母が野生に存在していることを知り、視野を大きく広げることができた。

この研究は、学会や高校生の発表会で高い評価をいただき、2011年度・第9回高校生科学技術チャレンジJSEC2011で「アジレント・テクノロジー賞」、2012年度・高校化学グランドコンテスト最終選考会で「審査委員長賞」を受賞した³⁾。現在も、バイオエタノール製造に利用できる野生酵母の実用化を目指して、先輩から後輩へ研究を引き継いで取り組んでいる。

謝辞

2006年度に酵母の研究を立ち上げたときから、専門的な立場から継続してご指導をいただいた福山大学生命工学部の秦野琢之先生に心から感謝します。

参考文献

- 1) 竹居セラ・秋山繁治. 花酵母の採取・分離と花の種類との関係. 化学と生物. vol. 49. No. 7 (2011)
- 2) 中田久保編『醸造酵母の特性と花酵母』花酵母研究会 (2006)
- 3) 澤田春那・小嶋由加里・川井里香・田中璃彩・秋山繁治. 2つの能力を野生酵母に求めて (バイオエタノール製造に利用できる野生酵母を求めて). 『高校生・化学宣言PART 6・高校化学グランドコンテストドキュメンタリー』 (2013)