

日本－タイ・インドネシア・ラオス e-ASIA 国際共同研究 「バイオエネルギー」 平成30年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	A S E A Nバイオマス活用に向けた耐熱性微生物を利用するバイオ燃料等変換プロセスの開発
研究課題名（英文）	Development of New Processes with Thermotolerant Microbes for Bio-refinery Including Biofuels, towards Utilization of ASEAN Biomass
日本側研究代表者氏名	山田 守
所属・役職	山口大学 大学院創成科学研究科 教授
研究期間	平成29年4月1日 ～ 令和2年3月31日

1. 日本側の研究実施体制

氏名	所属機関・部局・役職	役割
山田 守	山口大学大学院・創成科学研究科・教授	研究統括およびそれぞれの国の耐熱性株分離の協力および耐熱性株のロバスト化
高坂 智之	山口大学大学院・創成科学研究科・助教	耐熱性株あるいはロバスト化株を用いた高温発酵および非温度制御発酵の検討
薬師 寿治	山口大学大学院・創成科学研究科・教授	パッケージ総括；耐熱性酢酸菌の耐熱化・ロバスト化
片岡 尚也	山口大学大学院・創成科学研究科・助教	耐熱性・耐熱化の原理解明
松下 一信	山口大学大学院・創成科学研究科・教授（特命）	酢酸菌の高温酢酸発酵特性の解析
酒井 謙二	九州大学・農学研究院・教授	パッケージ総括・好熱菌および複合微生物系を用いた非食糧バイオマスからの高光学純度L-乳酸生産
田代 幸寛	九州大学・農学研究院・准教授	好熱菌および複合微生物系を用いた非食糧バイオマスからの高光学純度L-乳酸生産，濃縮発酵液からのシナジー型乳酸ブチル分離と精製

園元 謙二	九州大学・農学研究院・教授	非食糧バイオマスからのカタボライト抑制型ブタノール発酵
善藤 威史	九州大学・農学研究院・教授	非食糧バイオマスからのカタボライト抑制型ブタノール発酵
熊切 泉	山口大学大学院・創成科学研究科・准教授	膜分離技術の開発
星田 尚司	山口大学・創成科学研究科・准教授	CBP のための酵素発現, 改変, 及び CBP 試験
赤田 倫治	山口大学・創成科学研究科・教授	CBP のための酵母発現系の構築・改良

2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

WP1: インドネシアチームならびにラオスチームと協力して、選出した複数の株について燃料米などを用いてフラスコスケールで高温発酵および非温度制御発酵試験を実施する。一方、タイチームと協力して、選出した複数の株について再生綿などを原料としてフラスコスケールで高温発酵および非温度制御発酵試験を実施する。また、前年度分離した株についてロバスト化をすすめ、ロバスト化株が獲得できれば必要に応じてゲノム解析を行う。加えて、昨年と同様に WP4 と相談しながら、要望に沿って低濃度の発酵エタノールを WP4 に提供する。

WP2: タイチームが実験室レベルで育種した実用的耐熱性酢酸菌の変異解析を行う。変異箇所の特典から開始し、それら変異の有効性を検証して耐熱性を獲得した生物学的な基盤を探る。企業とも連携して実用レベルでのデータ収集を検討する。また、ラオスのフルーツから分離した菌株の酢酸発酵特性の解析を行うとともに、その分類・同定・分子系統解析など、可能であればゲノム解析を行う。これまでに耐熱化させてきた酢酸菌について、その耐熱化に関わる内的・外的要因を探る。

WP3: 分離微生物群または汚泥・堆肥微生物群を用いて、非殺菌廃棄物バイオマスからの L-乳酸発酵の最適化および乳酸生産速度・濃度の向上を目指す。また、カタボライト抑制を回避できる実バイオマス加水分解物（混合糖）のデザインを行うとともに、ブタノール生産量・速度の向上を図る。

WP4: MOR（モルデナイト）膜は、市販の A 型膜よりも高含水な溶液の脱水に使用できるが、膜の支持体側に液、特に高含水液が触れると劣化することが明らかになった。この劣化機構を検討し、膜の耐久性を向上する。併せて、発酵との複合化に必用な、濃縮プロセスのサイズ検討を行う。

WP5: CBP（Consolidated Bio-Processing）の成功のカギがタンパク質分泌生産量にあることは間違いない。初年度の結果はまさにその問題を明らかにしており、とくにグルコアミラーゼ活性の不足は別の問題をも引き起こすことが明らかとなった。また、デンプンを完全に使用するには、 α -1,6-結合分解酵素を発現させる必要性のあることが分かった。そこで平成 30 年度は、タンパク質分泌生産量の強化を目的として、遺伝子工学的には高温発酵条件で転写活性の高いプロモーターの取得を目指し、培養工学的にはタンパク質分泌生産に適した培養条件の決定を進める。デンプンの効率的利用の課題に対しては、 α -1,6-結合分解酵素遺伝子の合成・分泌生産による解決を試みる。

3. 日本側研究チームの実施概要

5つの研究グループ（WP1-WP5）が、以下のように関係国研究者との共同研究や日本の研究者による関連研究を実施した。また一部については、日本の研究グループ間で連携して実施した。

WP1: インドネシアチーム、ラオスチームおよびタイチームと協力して、選出した複数の株についてロバスト化を進め、獲得したロバスト化株について温度を始めとした種々のストレス耐性を検討した。SSF（並行複発酵）と SHF（単行複発酵）の高温の限界を検討した。また昨年と同様に、低濃度の発酵エタノールを WP4 に提供した。

WP2: タイチームと日本チームが実験室で育種した実用的な低栄養要求性耐熱性酢酸菌の変異解析と発酵特性解析を行った。加えて、耐熱化させる添加物質の探索を行った。企業と連携して小型実用機を用いたデータ収集を行った。またラオスのフルーツから興味深い酢酸菌を分離した。酵母やザイモナス細菌との共培養による酢酸発酵試験を開始した。

WP3: L-乳酸生産については、非殺菌廃棄物バイオマスからの L-乳酸メタ発酵の単純化を図った。その結果、*Bacillus coagulans*、*Bacillus thermoamylovorans*、*Bacillus hisashii* の3種3株からなる複合微生物系によって、本来の複合種菌を用いた場合とほぼ同等の初発生産速度と最終生産量を実現するとともに L-乳酸の光学純度 100%を達成した。ブタノール生産については、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 においてカタボライト抑制を回避できるセロピオース/キシロース混合糖(1:1)を用いることで、低いカタボライト抑制と高い生産性を達成し、高密度細胞液を用いた連続発酵において従来にない高い蓄積濃度と糖利用率を実現した。

WP4: MOR 型ゼオライト膜を用いて、WP1 から提供された高温発酵エタノールの第一蒸留液(エタノール約 20%)を 90%以上まで濃縮した。同様の試験で A 型ゼオライト膜は非晶質化したが、MOR 型ゼオライト膜は濃縮試験前後で膜の XRD(X 線回折)に変化は無く、耐久性に優れていることが示された。また、合成試薬を用いたバッチ試験により、膜性能の濃度依存性を検討した。得られた濃度依存性から、濃縮試験での透過性能の経時変化を予測できた。

WP5: マルチコピープラスミドを用いてグルコアミラーゼを発現させた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* による CBP を解析したところ、耐熱性酵母 *K. marxianus* よりも優れている点が明らかになった。今後の課題は、酵母で α -1, 6 結合切断酵素を効率的に生産し、デンプンを完全に分解してエタノール収率を高めることである。

以上