

廃棄果実を用いたバイオエタノールの生産技術

都築 正男^{*1)}, 石井 純^{*2)}, 近藤 昭彦^{*2)}

Production of Bio-ethanol from the Discarded Fruit

TSUDUKI Masao^{*1)}, ISHII Jun^{*2)}, KONDO Akihiko^{*2)}

糸状菌のペクチナーゼを酵母の細胞表層に提示させて発現させ、生食用としては規格外の果実を液化し、果実から直接エタノールを生成することを試みた。

廃棄果実のモデルとして奈良県特産品であるカキ果実を用いた。カキ果実はペクチン含量が多く、ペクチナーゼ処理を行わないと果汁を確保できない。そこで、工程の省力化を目的として通常の酵母にはないペクチナーゼを導入した酵母を作成し、この酵母を用いてペクチナーゼ処理とアルコール発酵を同時に行うことが可能となった。

1. 緒言

世界のエネルギー消費量は石油換算で年間 100 億トンにものぼり、石油などを燃焼させることで生じる二酸化炭素量が莫大であることから、化石資源の過剰な使用は地球温暖化などの環境問題に大きなインパクトを与える一つの要因となっている。また、石油などの化石資源は有限資源であることから、いずれ枯渇するものと考えられている。一方、石油は燃料だけではなく様々な化学製品の原料として多くの分野で利用され、欠かすことのできない資源でもある。このため、現在の生活水準を維持しながら、エネルギーの大量消費による温暖化を防止する技術や環境の整備は喫緊の課題である。この課題を解決する一つの手段として、カーボンニュートラルであるバイオエタノールの開発があげられる。バイオエタノールはブラジルやアメリカ合衆国などで多量に効率よく生産されるため、生産コストが安く、国際流通などで様々な地域へ輸送されて使用されている。しかしこのような形態で流通する場合、輸送のために化石燃料が多量に使用されるという欠点がある。効率的なエネルギー収支でバイオエタノールを生産・流通させるには生産地と消費地が近い方が望ましく、地場産の原料を用いて地場でバイオエタノールを生産し、地場で消費することが理想的である。

バイオエタノールの原料としては、デンプン系やセルロース系がある。デンプン系の原料は、食料用の農作物を利用するため、食料供給のバランスを崩す可能性がある。このため、非食料作物等を原料とするセルロース系原料からバイオエタノールを生産する技術開発が行われている。セルロースを分解して糖を得るためには、革新的な技術開発が必要で、現状ではデンプン系原料よりも生産コストが高く、セルロースの分解にかかるエネルギー効率も悪い。食料として用いず、効率的にバイオエタノールを生産する

ための原料として、廃棄果実は糖含量が多く、また日本国内各地で毎年大量に発生するのでバイオエタノールの原料になり得るものである¹⁾²⁾。

このような原料を効率的にエネルギー源として利用するためには、廃棄果実が発生する場でのバイオエタノールへの変換、使用する地場の流通システムの構築とともに、効率的な変換技術の開発も必要である。廃棄果実からバイオエタノールを製造するには、糖を多く含む果汁を得た後、アルコール発酵する。果汁を得るためには、主に物理的に搾ることによって得ることが可能であるが、奈良県の特産品であるカキのようにペクチン質が果肉に大量に含まれるために、搾るだけでは果汁を得られない果実もある。そこで、製造工程の中でエネルギーを多く必要とする搾汁の工程を省いて、バイオエタノールを得るために細胞表層工学を利用して、果実を直接アルコール発酵できる酵母を開発した。

使用した pGK406-AG³⁾は、プロモーターとしては酵母のホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 PGK1 のプロモーター、ターミネーターとして酵母の α -アグルチニン遺伝子 SAG1 のターミネーターを含む。また細胞外への移行シグナルとして酵母の α ファクターのシグナル配列を含み、その 3' 末端側に外来遺伝子挿入のためのマルチクロニングサイトがある。

マルチクロニングサイトの 3' 末端側には GPI アンカーとして α -アグルチニンの 3' 末端側の半分を含み、マルチクロニングサイトに挿入された外来遺伝子由来のタンパク質と融合タンパク質を形成させることができる。

この融合タンパク質は細胞表層に付着し、酵素などの外来タンパク質を酵母の細胞の表層に提示することができるため、単離したエンド型ペクチナーゼ遺伝子を pGK406-AG に挿入したプラスミドを用いると酵母の細胞表層にエンド型ペクチナーゼを提示することが可能である。

*1) バイオ・食品グループ *2) 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

このようにしてペクチナーゼを表層提示した酵母を作成し、柿果実を用いて、酵母細胞表層のペクチナーゼにより果実を液化し、同時に生じた果汁に含まれる糖をアルコール発酵させることを試みた。

2. 実験方法

2.1 使用培地

実験室酵母の培養には、YPDA 培地（酵母エキス 1%, ペプトン 2%, グルコース 2%, アデニン 0.6mg/L）を使用した。実用酵母の培養には、YPD 培地（酵母エキス 1%, ペプトン 2%, グルコース 2%）を使用した。酵母の形質転換には SD-Ura 培地（Yeast Nitrogen Base without Amino Acid 0.67%, グルコース 2%, アデニン 0.6 mg/L, ヒスチジン 0.2 mg/L, ロイシン 0.6 mg/L, リジン 0.3 mg/L, トリプトファン 0.4 mg/L）を使用した。形質転換体の大腸菌の培養は LB-Amp 培地（トリプトン 1%, 酵母エキス 0.5%, 塩化ナトリウム 1%, アンピシリン 100 µg/L）を使用した。糸状菌の培養は, Czapek-Dox (CD) 培地（スクロース 3%, 硝酸ナトリウム 0.3%, 硫酸マグネシウム 7水和物 0.05%, 塩化カリウム 0.05%, リン酸水素二カリウム 0.01%, 硫酸鉄 (II) 7水和物 0.001%）を使用した。また、寒天培地で使用する場合には各培地に寒天を 2% になるように加えた。

2.2 使用菌株

大腸菌は DH10B 株, 実験室酵母は *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株, 実用酵母は *S. cerevisiae* K7UT-1T 株⁴⁾を使用した。糸状菌は, クロコウジカビ *Aspergillus tubingensis* RIB2036 株を使用した。

2.3 プラスミド

A. tubingensis RIB2036 株のエンドペクチナーゼ pgaA⁵⁾遺伝子, pgaB⁵⁾遺伝子, pgal⁶⁾遺伝子を PCR 法で単離した。な

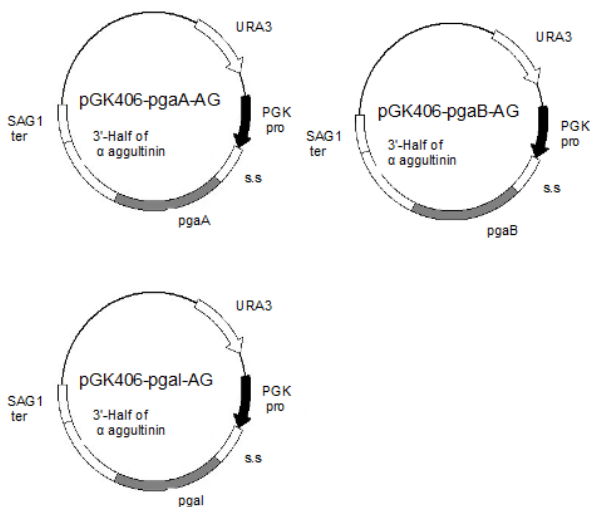


図 1 ペクチナーゼの細胞表層提示型発現プラスミド

お、各遺伝子の 5'末端には EcoRI の認識配列, 3'末端には SphI の認識配列を付加した。酵母の細胞表層に提示するために, EcoRI, SphI 処理したベクター-pGK406-AG に挿入した pgaA 遺伝子 (pGK406-pgaA-AG), pgaB 遺伝子 (pGK406-pgaB-AG) pgal 遺伝子 (pGK406-pgal-AG) を作成した (図 1)。

2.4 酵母の形質転換

pGK406-pgaA-AG, pGK406-pgaB-AG は *EcoRV* で切断し, 直鎖状にした。pGK406-pgal-AG は *StuI* で切断し, 直鎖状にした。直鎖状にしたプラスミドで酢酸リチウム法により実験室酵母 YPH499 株と実用酵母 K7UT-1 株を形質転換し, SD-Ura 培地で選抜し, それぞれ pgaA/ YPH499, pgaB/ YPH499, pgal/ YPH499, pgaB/ K7UT-1T と名付けた。

生じた形質転換体は, 酵素活性の確認後, 発酵試験に用いた。

2.5 ペクチナーゼ活性

YPDA 培地で培養した菌液を遠心分離で集菌し, 蒸留水で洗浄後, 1 mL の蒸留水に懸濁した菌液を使用した。この菌液 1 mL と 1%ペクチン (ナカライテスク (株) 製) 9 mL を混合し, 50°C で 2 時間反応させ, オストワルド粘度計 (内径 0.5 mm) で粘度の低下を測定して分解比を求めて評価した。また, 酵素液 1 mL 中のペクチナーゼが 1 時間に分解比を 1/2 に低下させる酵素活性を 10 Unit とした⁷⁾。

2.6 発酵試験⁸⁾

ペクチナーゼを表層提示した酵母を用いて, 214 g の富有柿を, 3日間, 30°C で発酵を行った。100mg の酵素剤 (ペクチナーゼ G アマノ) を用いて柿を軟化させて K701 株で発酵させたものと, 酵素剤を加えずに K701 株で発酵させたものを対照とした。発酵液には, 40 mg のメタ亜硫酸カリウムと, 600 mg の酒石酸を加えた。酵母は, 一晚培養した培養液を OD₆₀₀=100 相当になるように蒸留水で懸濁して 12 mL 加えた。

3. 結果及び考察

3.1 ペクチナーゼを細胞表層提示型で発現させた酵母の酵素活性

酵母で細胞表層発現させた組み換え型ペクチナーゼに酵素活性があるかを確認するため, YPH499 株に細胞表層提示型で pgaA, pgaB, pgal を発現させた。形質転換体は, それぞれ pgaA/ YPH499, pgaB/ YPH499, pgal/ YPH499 と名付け, それぞれ 7 株, 10 株, 11 株得られた。pgaA/ YPH499, pgaB/ YPH499, pgal/ YPH49 のすべての菌株を用いてペクチナーゼ活性を測定したところ, 非形質転換体では活性が見られなかったが, 形質転換体では活性が見られ, pgaA,

pgaB, pgaI は酵母において細胞表層型発現で活性があることが確認できた。また、同じ遺伝子を導入した菌株の酵素活性の菌株間差は、いずれの遺伝子も約 2 倍あった。

次に、それぞれ独立した 2 菌株を使用して pgaA/YPH499, pgaB/YPH499, pgaI/YPH499 のペクチナーゼ活性を比較した。その結果、pgaI のペクチナーゼ活性は pgaA, pgaB の約 1/2 であった。また pgaB の方が、pgaA より若干高い活性を示した (図 2)。

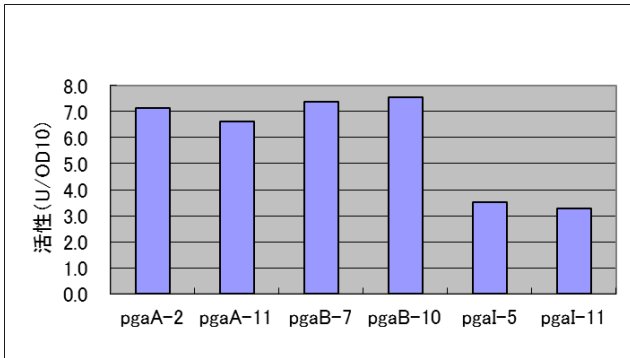


図 2 実験室酵母で細胞表層型発現させたペクチナーゼの活性の比較

このため、実用酵母である K7UT-1T 株には、pgaB を細胞表層提示型で発現させ、pgaB/K7UT-1T と名付け、3 菌株得られた。この 3 菌株のペクチナーゼ活性は、2 菌株は高い活性を示したものの、1 菌株はほとんど活性がなかった。このうち最も活性が強い菌株と pgaB/YPH499 のペクチナーゼ活性を比較するとほぼ同等であり、実用酵母でも実験室酵母と同様に pgaB が機能することが分かった (図 3)。

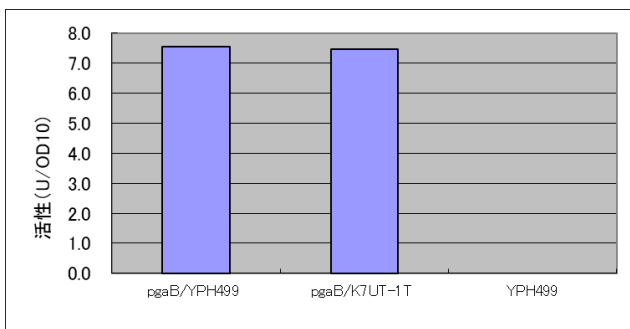


図 3 実験室酵母および実用酵母に細胞表層型発現させた pgaB の活性の比較

3.2 ペクチナーゼを表層提示させた酵母を用いた柿のアルコール発酵

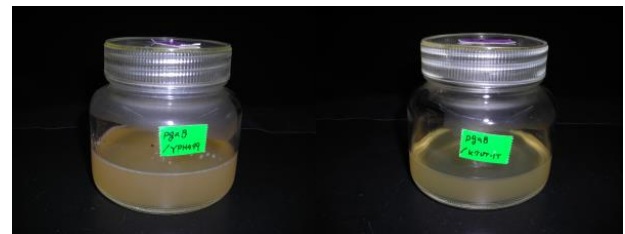
柿の果実を用いて、pgaB/K7UT-1T, pgaB/YPH499 によるアルコール発酵能を調べた。対照として 100mg の酵素剤 (ペクチナーゼ G アミノ) と清酒酵母 K701 号の併用したもの、K701 号のみの 2 種類として比較した (表 1, 図 4)。

柿果実が軟化し、果汁化が進行した度合いは、生成した柿果汁発酵液を 3000 rpm, 10 分間遠心分離した後の液量を

表 1 カキ果実のアルコール発酵試験

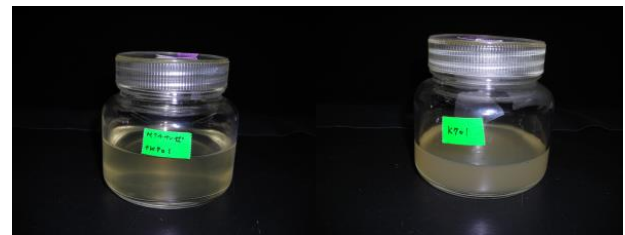
試験区	1	2
使用酵母	pgaB/ YPH499	pgaB/ K7UT-1T
酵素	-	-
上澄量 (mL)	109.4	115.8
アルコール (%)	7.9	8.35
清澄度 (濁り)	+++	++

試験区	3	4
使用酵母	K701	K701
酵素	100mg	-
上澄量 (mL)	157.4	87
アルコール (%)	8.7	8.2
清澄度 (濁り)	+	++++



1

2



3

4

図 4 カキ果実の発酵液

1: pgaB/ YPH499, 2: pgaB/ K7UT-1T,
3: K701+ペクチナーゼ, 4: K701

比較した。pgaB/K7UT-1T では、115.8 mL の発酵液が得られたのに対し、pgaB/YPH499 は、109.4 mL、酵素剤と K701 の併用では 157.4 mL、K701 のみでは 87 mL であった。柿はペクチナーゼによってペクチン質を分解しないと果汁を得ることがむずかしく、酵素剤を添加することで、1.8 倍の果汁を得ることができた。一方、ペクチナーゼを細胞表層提示型で発現させた酵母では pgaB/K7UT-1T は、ペクチナーゼなしのものに比べ、1.3 倍、pgaB/YPH499 は 1.25 倍の果汁を得られ、酵母の細胞表面のペクチナーゼによって柿果実の軟化が進行し、酵素剤には及ばないが、柿果実の液化を促進する働きが見られた。また果汁の濁りは、酵素剤と K701 の併用および、pgaB/K7UT-1T は少なく、pgaB/YPH499 と K701 のみのものはかなり濁りがあった。

発酵液のアルコール濃度は、pgaB/K7UT-1T では、8.35% であったのに対し、pgaB/YPH499 は、7.9%、酵素剤と K701

の併用では 8.7%, K701 のみでは 8.2%であった. *pgaB*/*YPH499* では宿主酵母のアルコール発酵能が実用酵母である K701 や K7UT-1T に比べて低いため, 若干アルコール濃度が低く抑えられた. 一方, *pgaB*/K7UT-1T では, K701 とほぼ同等のアルコール濃度の発酵液を生成することができた.

4. 結言

本研究で糸状菌のエンドペクチナーゼ遺伝子を酵母の細胞表層で発現させた菌株を作成し, 果実の直接アルコール発酵のモデルとして, 柿果実を用いてアルコール発酵を行った. 主な結果は次の通りである.

- (1) *A. tubingensis* RIB2036 株のエンドペクチナーゼ *pgaA* 遺伝子, *pgaB* 遺伝子, *pgaI* 遺伝子を実験室酵母で形質転換し, 活性型のエンドペクチナーゼを細胞表層提示型で発現させた. ペクチナーゼ活性の強さは *pgaB* が最も強い活性を示した.
- (2) *pgaB* 遺伝子を実用酵母で形質転換し, 活性型のエンドペクチナーゼを細胞表層提示型で発現させた. ペクチナーゼ活性は実験室酵母と同等の強さを示した.
- (3) エンドペクチナーゼを細胞表層提示型で発現させた実用酵母を用いて柿果実の発酵試験を行い, 果実の液化とアルコール発酵を一反応容器内で同時に実施できることを示した. また, 本研究成果については特許出願を行った.

謝辞

本研究にあたり, ご指導ならびにご協力いただいた神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の皆様に深謝いたします.

参考文献

- 1) 冬木啓子, 小山佐和子, 平岡祥一, 増田眞季; 農業市場研究, (18), 46-52, 2009
- 2) 冬木啓子; 農林業問題研究, (49), 286-291, 2013
- 3) Ishi, J., Izawa, K., Matsumura, S., Wakamura, K., Tanino, T., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A.; J. Biochem., (145), 701-708, 2009
- 4) Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K., and Takahashi, K.; Agric. Biol. Chem., (54), 2979-2987, 1990
- 5) Parrenicova, L., Benen, J. A., Kester, H. C., and Visser, J.; Biochem. J., (345), 637-644, 2000
- 6) Bussink, H. J., Brouwer, K. B., de Graaff, L. H., Kester, H. C., and Visser, J.; Curr. Genet., (20), 301-307, 1991
- 7) 真部孝明; フローチャートで見る食品分析の実際, 115-116, 幸書房, 2003
- 8) 川西祐成, 山中信介, 松澤一幸; 奈良県工業試験場研究報告, (11), 10-13, 1985