



Title	Direct Ethanol Fermentation from Raw Starch by Cell Surface Engineered Yeast
Author(s)	許, 徳雄
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48438
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	許 徳 雄
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 0 7 3 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 12 月 13 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Direct Ethanol Fermentation from Raw Starch by Cell Surface Engineered Yeast (表層提示酵母によるデンプンからの直接エタノール発酵に関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 塩谷 捨明 (副査) 教 授 原島 俊 教 授 清水 浩 助教授 片倉 啓雄 教 授 小林 昭雄

論 文 内 容 の 要 旨

近年、デンプンなどのバイオマスを原料としたバイオエタノール生産に注目が集まっている。中でも酵母によるエタノール発酵を通じたデンプン利用については、大規模な研究が行われている。その一つに、様々な組み合わせの酵素を表層に提示した表層提示酵母が提案されている。すなわち、 α -agglutinin や Flo1p といった酵母表層タンパク質を利用し、酵母の細胞表層にデンプン分解酵素 α アミラーゼやグルコアミラーゼを提示した酵母である。この表層提示酵母を用いたデンプンからの直接エタノール発酵に関する研究については、従来、目的の表層提示株の育種という分子育種の観点からの研究のみで、直接エタノール発酵プロセス構築を目指した生物化学工学的な評価・解析についての研究は皆無である。そこで、本研究では、発酵プロセスだけでなく、分離や蒸留といったプロセスも考慮した直接エタノール発酵プロセスシステムの構築を目指した、表層提示酵母システムの構築およびその定量的な評価を行うことを本研究の目的とした。

第 1 章ではまず、凝集性の異なる 2 種の酵母（凝集性酵母・非凝集性酵母）と、 α アミラーゼの発現形式の異なる（分泌発現・表層発現）2 種のベクターを組み合わせることにより、4 種の異なる表層提示酵母（表層提示システム A、B、C および D）を構築し、生デンプンからの直接エタノール発酵における各システムの特長評価を行った。回分操作による直接エタノール発酵では、表層提示システム A が最も高い発酵能 ($0.18 \text{ g} \cdot \text{g-dry-cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) を示し、表層提示システム B、C および D の発酵能はより低いものであった（それぞれ 0.06 、 0.06 、 $0.04 \text{ g} \cdot \text{g-dry-cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ）。一方、繰り返し操作を伴う発酵においては、表層提示システム A のエタノール比生産速度は繰り返し回数に伴い減少したのに対し、表層提示システム B の場合ではエタノール比生産速度は繰り返し回数によらず維持された。また、試験したすべての表層提示システム・培養系において、オリゴ糖とグルコースの蓄積は発酵中に観察されなかったことから、律速となっている反応はデンプンからオリゴ糖への分解過程であることが明らかになった。

第 2 章では、表層提示システムの凝集性が生デンプンからの直接エタノール発酵能に及ぼす影響について詳細に検討した。表層提示酵母が凝集すると、細胞表層に提示された酵素のうち巨大基質であるデンプンと会合できる分子の割合は低下すると予想される。本章では、完全な非凝集性、微弱な凝集性ならびに重度の凝集性を示す表層提示システム B'、B および D を構築し、検討を行った。表層提示システム B'、B、および D は、異なる凝集性を持つにもか

かわらず、生デンプンからのエタノール比生産速度はそれぞれ、0.06、0.06 および 0.04 $\text{g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ とほぼ同等の値を示した。この結果は、凝集の増加に従い見かけのアミラーゼ活性は減少するという、初期の仮説と矛盾した。そこで、表層提示システム D について発酵中のサンプルを顕微鏡により観察したところ、多くのデンプン粒子が酵母凝集塊の内部に取り込まれていることが明らかになった。この結果より、表層提示システム D の凝集塊内部に取り込まれたデンプン粒子が酵素の見かけの基質濃度を増加させ、その結果、表層提示システム B' と変わらないレベルのエタノール比生産速度を維持できたと考えられる。

第3章では前章までの結果を踏まえ、表層提示システム B' と D について、デンプン粒子・酵母間の表面接触が直接エタノール発酵に及ぼす効果を検討した。本章で用いたいずれの表層提示システムにおいても、細胞とデンプン粒子を共に沈殿させる充填培養法では、通常の振とう培養法と比較しエタノール比生産速度は有意に増加した。また、酵母細胞と同程度の粒子径分布をもつデンプン粒子を用意して発酵試験を行った場合にも、エタノール比生産速度の有意な上昇が見られた。上記の結果から、デンプン粒子・酵母間の表面接触は、直接発酵において律速因子である見かけの α -アミラーゼ比活性を増加させるために重要な因子であることがわかった。本研究で得られた知見から総合的に考えると、工業的スケールで効率的なバイオエタノール生産を行うためには、固体発酵プロセスの開発が今後の課題といえる。

論文審査の結果の要旨

近年、デンプンなどのバイオマスを原料としたバイオエタノール生産に注目が集まっている。中でも酵母によるエタノール発酵を通じたデンプン利用については、大規模な研究が行われている。その一つに、様々な組み合わせの酵素を表層に提示した表層提示酵母が提案されている。すなわち、 α -agglutinin や Flo1p といった酵母表層タンパク質を利用し、酵母の細胞表層にデンプン分解酵素 α アミラーゼやグルコアミラーゼを提示した酵母である。この表層提示酵母を用いたデンプンからの直接エタノール発酵に関する研究については、従来、目的の表層提示株の育種という分子育種の観点からの研究のみで、直接エタノール発酵プロセス構築を目指した生物化学工学的な評価・解析についての研究は皆無である。そこで、本研究では、発酵プロセスだけでなく、分離や蒸留といったプロセスも考慮した直接エタノール発酵プロセスシステムの構築を目指した、表層提示酵母システムの構築およびその定量的な評価を行うことを本研究の目的としている。

第1章ではまず、凝集性の異なる2種の酵母（凝集性酵母・非凝集性酵母）と、 α アミラーゼの発現形式の異なる（分泌発現・表層発現）2種のベクターを組み合わせることにより、4種の異なる表層提示酵母（表層提示システム A、B、C および D）を構築し、生デンプンからの直接エタノール発酵における各システムの特性評価を行った。回分操作による直接エタノール発酵では、表層提示システム A が最も高い発酵能（0.18 $\text{g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ）を示し、表層提示システム B、C および D の発酵能はより低いものであった（それぞれ 0.06、0.06、0.04 $\text{g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ）。一方、繰り返し操作を伴う発酵においては、表層提示システム A のエタノール比生産速度は繰り返し回数に伴い減少したのに対し、表層提示システム B の場合ではエタノール比生産速度は繰り返し回数によらず維持されていた。また、試験したすべての表層提示システム・培養系において、オリゴ糖とグルコースの蓄積は発酵中に観察されなかったことから、律速となっている反応はデンプンからオリゴ糖への分解過程であることが明らかになっている。

第2章では、表層提示システムの凝集性が生デンプンからの直接エタノール発酵能に及ぼす影響について詳細に検討している。表層提示酵母が凝集すると、細胞表層に提示された酵素のうち巨大基質であるデンプンと会合できる分子の割合は低下すると予想される。本章では、完全な非凝集性、微弱な凝集性ならびに重度の凝集性を示す表層提示システム B'、B および D を構築し、検討を行った。表層提示システム B'、B、および D は、異なる凝集性を持つにもかかわらず、生デンプンからのエタノール比生産速度はそれぞれ、0.06、0.06 および 0.04 $\text{g}\cdot\text{g-dry-cell}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ とほぼ同等の値を示した。この結果は、凝集の増加に従い見かけのアミラーゼ活性は減少するという、初期の仮説と矛盾した。そこで、表層提示システム D について発酵中のサンプルを顕微鏡により観察したところ、多くのデンプン粒子が酵母凝集塊の内部に取り込まれていることが明らかになった。この結果より、表層提示システム D の凝集塊内部に

取り込まれたデンプン粒子が酵素の見かけの基質濃度を増加させ、その結果、表層提示システム B' と変わらないレベルのエタノール比生産速度を維持できたと考えられる。

第3章では前章までの結果を踏まえ、表層提示システム B' と D について、デンプン粒子・酵母間の表面接触が直接エタノール発酵に及ぼす効果を検討した。本章で用いたいずれの表層提示システムにおいても、細胞とデンプン粒子を共に沈殿させる充填培養法では、通常の振とう培養法と比較しエタノール比生産速度は有意に増加した。また、酵母細胞と同程度の粒子径分布をもつデンプン粒子を用意して発酵試験を行った場合にも、エタノール比生産速度の有意な上昇が見られた。上記の結果から、デンプン粒子・酵母間の表面接触は、直接発酵において律速因子である見かけの α -アミラーゼ比活性を増加させるために重要な因子であることがわかった。本研究で得られた知見から総合的に考えると、工業的スケールで効率的なバイオエタノール生産を行うためには、固体発酵プロセスの開発が今後の課題といえる。

以上のように、本論文は生デンプンからの直接エタノール発酵の高効率化を図るための工学的諸問題に解決の糸口を与えている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。