

e-ASIA 共同研究プログラム 「バイオエネルギー」 日本—タイ・インドネシア・ラオス 国際共同研究 平成 29 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
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～平成 32 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・准教授	パッケージ総括；耐熱性酢酸菌の耐熱化・ロバスト化
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、それぞれの国から分離した耐熱性酵母の中からデンプン系バイオマス利用に優れた株を分離する。また、必要に応じて耐熱性酵母の分離方法や種の同定あるいは発酵特性等の解析において指導や協力を行う。同様に、タイチームと協力して、セルロース系バイオマス利用に優れた株を分離する。また、必要に応じて耐熱性酵母の分離方法や種の同定あるいは発酵特性等の解析において指導や協力を行う。加えて、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: これまでに得ている耐熱性酢酸菌を、実用的な条件で発酵できるように実験室進化させる。現在保有している耐熱性株から実用的な条件で高温発酵できる株を育種する。タイチームが育種した実用的耐熱化株のゲノム解析を行う。タイやラオスにおいて自然界（植物・自然発酵系）から分離された酢酸菌の分類と高温酢酸発酵能の評価を行う。

WP3: (1) L-乳酸生産:メタ乳酸発酵における非殺菌廃棄物バイオマスからの L-乳酸発酵の最適化を図り、複合微生物系関与株のフィードバック分離を検討する。(2) ブタノール生産: (ヘミ)セルロース性混合糖からのブタノール生産におけるカタボライト抑制回避条件設定による生産量と速度の向上を図る。各種混合糖を設定し、酸生成とソルベント生成を発酵状況のモニタリングから培養条件の遷移的設定を行う。

WP4: 耐酸性を持つ脱水膜の開発と、その性能評価を 2 成分の合成溶液を用いて行い、供給液の温度や組成が異なる場合での膜性能を予測する手法を開発することを目的とする。従来の高分子膜を凌駕する脱水性能を持つ、A 型ゼオライト膜が開発されているが、この膜は酢酸水溶液中では、構造破壊が起こり、使用出来ない。近年我々が開発した MOR 型ゼオライト膜は、75℃で 90wt%酢酸・10wt%水の混合液の分離ができることが分かっている。一方、高含水溶液中での膜の安定性や、その他の酸を含む水溶液を用いた場合の性能や、膜性能の温度依存性などは分かっていない。そこで、酢酸や酪酸、エタノールと水の 2 成分混合液を用いて、膜性能の評価を行う。液組成や温度が膜性能（透過速度と分離性能）に与える影響を検討する。

WP5: 効率的な CBP を構築するために、初年度はエタノール生産酵母での酵素発現とその基礎的評価を行い、CBP の課題を明らかにすることを目的とする。現在保有している α -アミラーゼ遺伝子 2 種、グルコアミラーゼ遺伝子 2 種を組合わせてエタノール生産酵母に導入し、原料として可溶性デンプンを用いて CBP を評価する。エタノール発酵経過を発酵液からの二酸化炭素の放出で調べるとともに、必要に応じて最終エタノール濃度を HPLC またはバイオセンサーを用いて測定する。酵素活性と発酵能の最適温度のバランスを評価するために、温度を変えた CBP 及びグルコースを原料とするエタノール発酵を行い、これらの比較から改善点を明らかにする。

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の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燃料米や再生綿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した。特に、高温発酵ではSSF（並行複発酵）とSHF（単行複発酵）を実施し、比較した。また、前年度分離した株についてロバスト化をすすめた。加えて、低濃度の発酵エタノールをWP4に提供した。

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った。企業と連携して実用レベルでのデータ収集を開始した。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った。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・外的要因に関わる解析を行った。

WP3: 種々の複合微生物群を接種した標準モデル生ゴミ培地を用いて、pH 振動制御法による回分メタ発酵によるL-乳酸生産を行った。リグノセルロース加水分解を想定した種々の混合糖を炭素源として、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4を用いた連続発酵によるブタノール生産を行った。

WP4: MOR 型ゼオライト膜の合成条件を検討し、既往の膜と同等の高い水選択性と、既往の膜に比べて1.2倍高い透過性を持つ膜を得た。合成の再現性の検討も行った。酸性溶液中で膜の透過性は約30%低下したが、水選択性は維持された。

WP5: 一貫生物プロセス（CBP）による発酵生産成功のカギが、原材料の多糖を分解する酵素活性の高さであることは間違いない。平成29年度には、耐熱性酵母を用いることでデンプンからのCBPにおいて高温で発酵速度を高められることが明らかになった。一方で、まだグルコアミラーゼ活性が十分ではないこと、さらに、グルコアミラーゼだけでなく複数種類の酵素がデンプンの完全な利用には必要であることが明確になった。