

水圏に生息する天然酵母の単離と有効利用

浦野 直人*・三矢 太亮・岡井 公彦

はじめに

海洋を中心とする水圏（遠洋，沿岸，河川，湖沼，排水路など）には，さまざまな酵母や酵母様微生物（プロトテカ，黒色酵母など）が生息し，食物連鎖の一役を担っている．そこで，水圏の表層水や底泥を採集し酵母単離用の寒天培地（YPD＋クロラムフェニコール）に塗布して培養（20–40℃）すると，数日後に多種多様なコロニーが出現する．コロニー形成細胞を顕微鏡観察すると，さまざまな形態の酵母を発見できる．水圏酵母は生息環境に応じて，耐塩性・耐熱性・耐酸性・エタノール高生産・高分子有機物資化・油分解・色素生産など産業上興味深い性質を保持しているものが多く，この分野は宝の山を埋蔵している未踏科学と称しても過言ではない．筆者らは20年以上にわたり，水圏酵母と酵母様微生物の単離解析とバイオマス¹⁻¹⁴やバイオレメディエーション¹⁵⁻²⁶への利用に関する研究を行ってきた．本稿では筆者らの研究の一部である，水圏から単離したバイオエタノール高生産能と強酸性水中和能を持つ酵母に関して概説する．

高発酵能を持つ天然酵母

酒類やパンは酵母発酵により製造されるが，その技術発展を辿ると，四大文明に始まる5000年の人類史を遡ることになる．農耕の発達に伴い，人々は農産物を水に浸漬させガス発生する摩訶不思議な澱を添加することで発酵食品を製造した．発酵後の澱から高活性な澱の回収を繰り返すことが，優れた香味の酒やパンの製造と酵母の純粋培養へとつながっていった．酵母の発酵技術が人類最古のバイオテクノロジーと呼ばれる所以である．古く，発酵澱は食品種に応じてビール酵母，ワイン酵母，パン酵母などと慣習的に命名されていたが，微生物の分類同定技術の発展に伴い，澱を構成する酵母種はいずれも *Saccharomyces cerevisiae* とその亜種であることが明らかになった．このことから，*S. cerevisiae* = 「高発酵能を持ち，高い食安全性を持つ酵母種」が，科学者や醸造技術者の共通認識となり，今日に至っている．

筆者らは日本各地の水圏からバイオエタノール高生産能を持つ酵母の単離を行っており，ここでは2013年の

酵母単離例を紹介する．図1に示すように，東京湾岸の3か所から海水を採集して，単離酵母のライブラリを作製した．ライブラリから高発酵酵母を選抜する流れを図2に示す．一次，二次スクリーニングでは常法（ダーラム管中のCO₂蓄積を目視）を用いて，CO₂生成酵母を選抜した．三次スクリーニングでは，選抜酵母のCO₂生成量を簡便に測定できる装置を開発した（図3）．試験管の酵母＋培地懸濁液をシリンジに移して，シリンジ内の空気を除去した後，先端部を焼いて封印した．酵母懸濁液を含むシリンジを25℃に保温して，内部に溜まるCO₂量を測定した．スクリーニング過程での単離酵母数を図4に示す．最初に東京湾岸由来824株の酵母ライブラリを作製した．一次スクリーニングでは2%グルコー

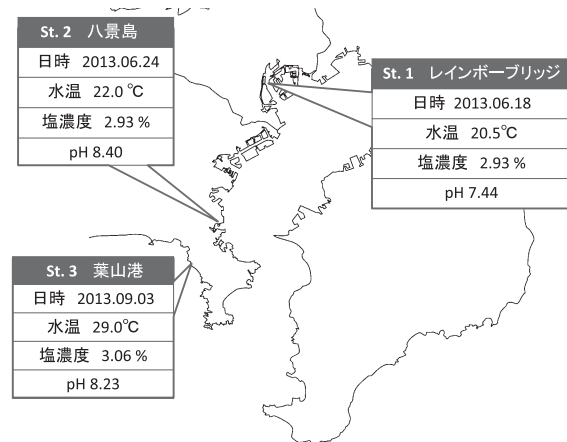


図1. 東京湾における酵母ライブラリの作製

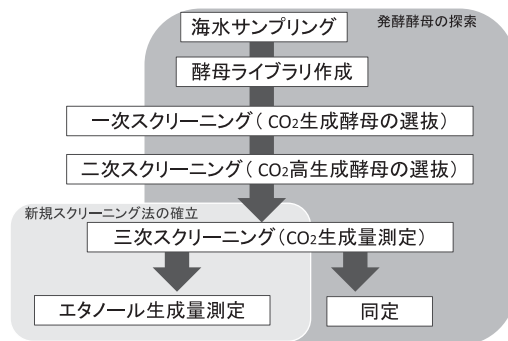


図2. 高発酵酵母のスクリーニング

* 著者紹介 東京海洋大学学術研究院海洋環境学部門（教授） E-mail: urano@kaiyodai.ac.jp

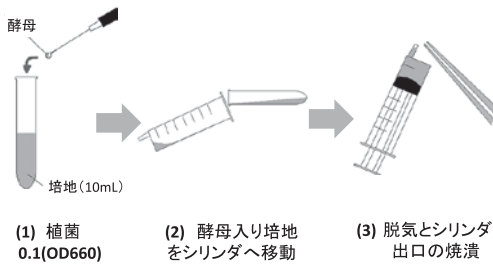


図3. 酵母によるCO₂生成量の計測システム

八景島	葉山港	レインボーブリッジ
281株	56株	487株
1次スクリーニング ダーラム管発酵試験		
《気泡が発生した株数》		
八景島	葉山港	レインボーブリッジ
121株	13株	87株
2次スクリーニング 30%グルコース入り培地ダーラム管発酵試験		
《気泡が発生した株数》		
八景島	葉山港	レインボーブリッジ
47株(以下, HK)	4株(以下, HY)	4株(以下, TB)
3次スクリーニング CO ₂ 生成量の正確な定量		

図4. 一次二次スクリーニング結果

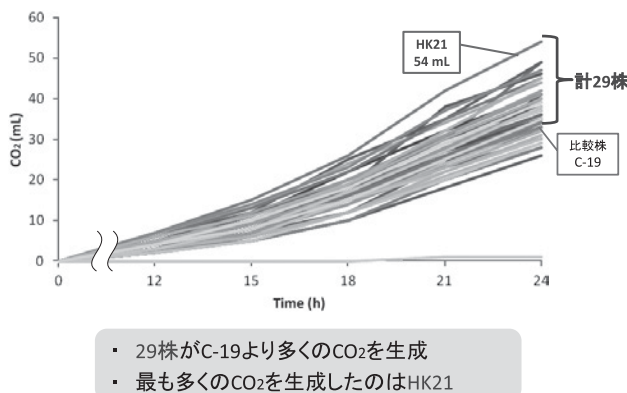


図5. 三次スクリーニング (CO₂生成量)

ス培地を用いて、CO₂生成酵母221株を選抜した。二次スクリーニングでは30%グルコース培地を用いて、CO₂生成酵母55株を単離した。次に三次スクリーニングによるCO₂生成量測定結果を図5に示す。比較対象として、別途に東京湾から単離した高エタノール生産酵母*S. cerevisiae* C-19を使用した。29株の酵母がC-19より高いCO₂生成能を示したが、上位4株(HK21, HK6, HK9, HK27)を同定したところ、4株はすべて*Saccharomyces*

エタノール濃度と二酸化炭素量の相関関係

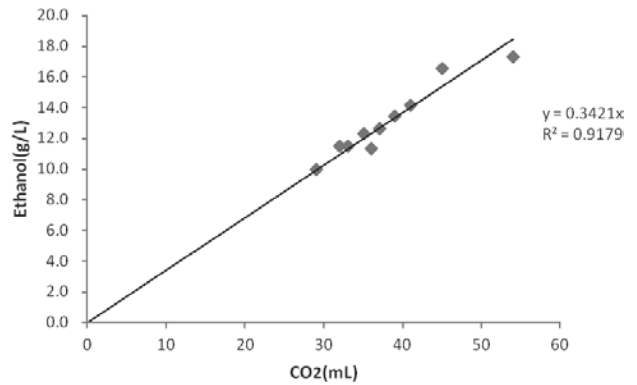


図6. 3次スクリーニング酵母によるエタノール生産

表1. 高発酵酵母種同定 (28S rDNA D1/D2領域)

No.	菌種
HK21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HK6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HK9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HK27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

表2. *Saccharomyces cerevisiae*の糖類発酵能

	協会-7号	C-19株	標準株(NBRC10217)
グルコース	++	++	++
アラビノース	—	++	—
マルトース	—	++	—
ラフィノース	—	+	—
ガラクトース	—	++	—
スクロース	++	++	—
デンプン	—	+	—
マンノース	++	++	—

~7日:++ 7日~:+ CO₂発生無し:—
発酵用培地: YNB + 炭素源2%, pH 7, 30°C

*cerevisiae*であった(表1)。さらに、酵母のCO₂生成量とエタノール生成量の関係を図6に示す。両値の相関性から、CO₂生成能を追跡することで、高エタノール発酵酵母(*S. cerevisiae*)を単離できることを確認した。水圏には多種多様な酵母が生息しているが、高発酵能の範疇でスクリーニングを行うと、高い確率で*S. cerevisiae*が選抜されてきた。人類が5000年かけて辿った発酵科学の道のりを、筆者らもまた辿っているといえるであろう。

廃海藻からのバイオエタノール生産

陸圏由来 *S. cerevisiae* によるバイオエタノール生産報告は多々ある。では、水圏由来 *S. cerevisiae* の利点は何処にあるだろうか。たとえば、海洋由来 *S. cerevisiae* の耐塩性が高いことは推定通りであった。筆者らが他に発見した利点として、糖類発酵能の比較を表2に示す。7種の単糖と1種の高糖（デンプン）の発酵能に関して、*S. cerevisiae* 3株（日本酒酵母協会7号、基準酵母NBRC 10217、海洋由来C-19）間で比較した。C-19は8種糖類すべての発酵能を保持しており、他2株の2-3種発酵能と比べて優位にあった。したがって、種々の糖質を含有する海洋バイオマスの高発酵酵母として、水圏由来 *S. cerevisiae* の選抜が有効であると考えられた。

さて、日本人は海藻食民族といえる。これは世界第6番目の排他的経済水域を持つこと、四海流の接点（潮目）が存在することなどの地理的な影響であろう。日本沿岸は主に浅瀬で緑藻、深場で紅藻や褐藻が大量繁茂し、さらにコンブ、ワカメなどの養殖も盛んなため、海藻の一大生産地となっている。よって、バイオマス資源となる未利用雑海藻や食品加工廃海藻が大量生産されるため、これらの有効利用が期待される。筆者らは廃海藻を原料とするバイオエタノール生産の研究に着手し、海藻の糖質がエタノール変換可能な成分と解釈している。図7に海藻を構成する多糖種と海洋での年間生産量を示すが、海藻重量の50%以上を多糖類が占めている。原料として廃海藻を使用する際には、最初に多糖の単糖への変換工程（糖化）を経る。糖化では海藻を希硫酸（1-3%）で加水分解後、糖化酵素（セルラーゼ）処理する。図8に海藻の糖化液組成を示す。糖化液中のグルコース濃度と全還元糖濃度は、緑藻（アオサ）>紅藻（オゴノリ）>

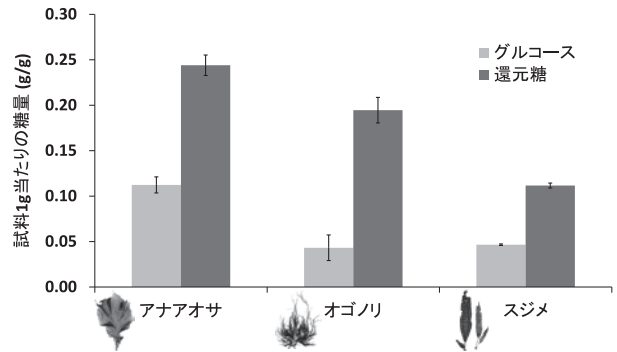
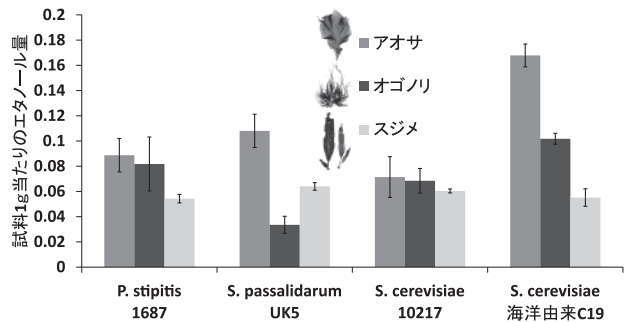


図8. 海藻糖化液の糖濃度



・海洋由来C19株が海藻糖化液の発酵に最も適していた。
 ・C19によるアオサ糖化液の発酵量が最も多く0.16 g/gであった。

図9. 酵母による海藻糖化液のエタノール発酵

褐藻（スジメ）の順に高かった。各糖化液を主な高発酵酵母を用いて発酵した結果を図9に示す。各海藻原料からのエタノール生産量は、耐塩性・単糖資化性に優れたC-19がもっとも高く、またいずれの酵母でも緑藻（アオサ）>紅藻（オゴノリ）>褐藻（スジメ）の順にエタノール生産量が高かった。緑藻の原料化について考察すると、アオサは日本やアジア各地の富栄養化内湾で異常発生して、しばしば大きな環境問題を引き起こしている。したがって、アオサのエタノール変換効率の高さと環境問題から、アオサをバイオマス資源に使用することの有効性が示された。一方、図7に示すようにバイオマス資源量は褐藻が最大で、特に日本人はコンブやワカメの消費量が多く、加工廃棄物が大量生産される。したがって、廃褐藻の有効利用を期待し、褐藻からのエタノール生産効率を向上させる研究を開始することになった。

スーパー酵母の創製に向けて

筆者らは褐藻からのバイオエタノール生産効率向上のために、以下の戦略を立てた。図10に示すように、褐藻の骨格多糖であるセルロースは、安価なセルラーゼによりグルコースへ変換することで酵母発酵が可能にな

緑藻	紅藻	褐藻
セルロース β-1,3-キシラン β-1,4-マンナン アミロース アミロペクチン	セルロース ヘミセルロース β-1,3-キシラン β-1,4-マンナン 寒天 カラギーナン 紅藻デンプン	セルロース ヘミセルロース アルギン酸 フコイダン ラミナラン
約4万t/year	約270万t/year	約470万t/year



図7. 海藻を構成する多糖類と海洋での年間生産量

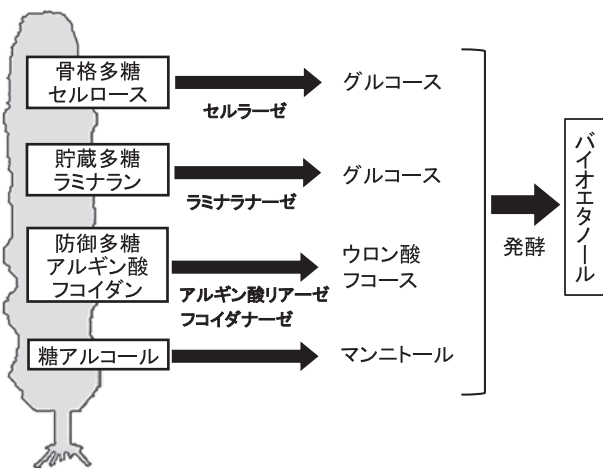


図10. 褐藻のバイオエタノール変換

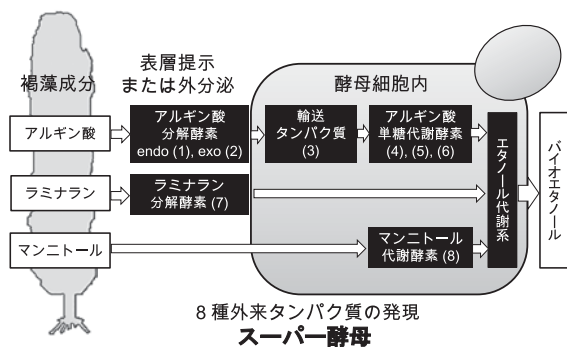


図11. ワカメの高効率バイオエタノール変換を可能にするスーパー酵母の創製

る。ところが、褐藻が多量含有する貯蔵多糖のラミナラン、防御多糖のアルギン酸は市販のラミナラーゼやアルギン酸リアーゼが高価で利用不可能である。さらに、これらの糖化産物の多くは酵母が発酵できない。そこで筆者らは、褐藻のからのバイオエタノール生産効率化のため遺伝子組換え酵母の育種を開始した。具体的には、北大の尾島・井上らが、海洋細菌からラミナラーゼ（ラミナランをグルコースに分解する酵素）、アルギン酸リアーゼ（アルギン酸をウロン酸に分解する酵素）とウロン酸の輸送と細胞内代謝酵素群、単糖マンニトールの代謝酵素などの8種の遺伝子を単離した。さらに、東大の田之倉・宮川らが、単離酵素群の高活性化や最適反応条件の統一化のために、タンパク質工学を用いた高機能化酵素の創製を行っている。そして、筆者らはこれら8種酵素の遺伝子群を宿主*S. cerevisiae*へ導入して、スーパー酵母の創製を行っている。この研究の全体像を図11に示す(本研究は文部科学省・東北マリンサイエンス拠点形成事業において、東京海洋大学-北海道大学-東京大

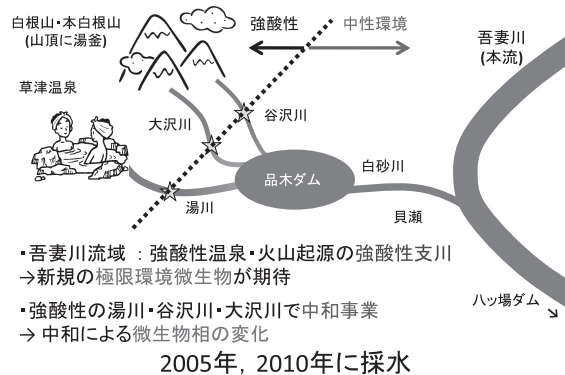


図12. 吾妻川流域の強酸性河川

学の共同研究として遂行している。詳細データは記載しない。).

アルカリ化酵母の発見と利用展開

水圏の有用酵母は*S. cerevisiae*のみでなく、さまざまな酵母種が単離利用される。その一例を述べると、日本の淡水圏には強酸性河川が存在し、そこには一般の淡水圏には存在しない新奇酵母も生息している。群馬県草津地方の吾妻川は硫酸性の強酸河川 (pH 1-4) であり、魚介類生息、農作物生産、飲料水使用が不可能なことで、かつては近隣住民から死の川として恐れられてきた。昭和初期の中和事業（石灰水投与）により吾妻川中流～下流域の河川水は中和された(図12)。筆者らが吾妻川支流の中和地点前後の河川水において微生物の単離を行ったところ、中和地点から上流域には細菌の生息がほとんど見られず、主に酵母の微生物相が形成されていることがわかった。そして単離された酵母の多くがpH 1-2で生育する耐酸性や好酸性を保持していた。さらに、pH 3-4の酸性培地での増殖と連動して酸性環境を中和する新奇酵母を発見し、筆者らはこれをアルカリ化酵母と称した。図13に高活性アルカリ化酵母*Candida fluviatilis* CeA16の増殖と中和に及ぼす培地成分の検討結果を示す。培地①～⑦での結果から、酵母の中和にはカザミノ酸が大きく関わっていることがわかった。そこで、カザミノ酸溶液 (pH 3-4)、各アミノ酸溶液 (pH 3-4) にてアルカリ化酵母を培養したところ、アミノ酸種により活性差があるものの、単一のアミノ酸溶液にて酵母による中和反応が発生することがわかった(データ詳細は記載せず)。よって、筆者らはアルカリ化酵母中和機構を図14に示すように考察している。アルカリ化酵母は酸性環境におかれるとアミノ酸分解酵素(アミノ酸デアミナーゼ、アンモニアリアーゼなど)を生産し細胞外へ分泌する。酵素がアミノ酸のアミノ基を脱離して、アン

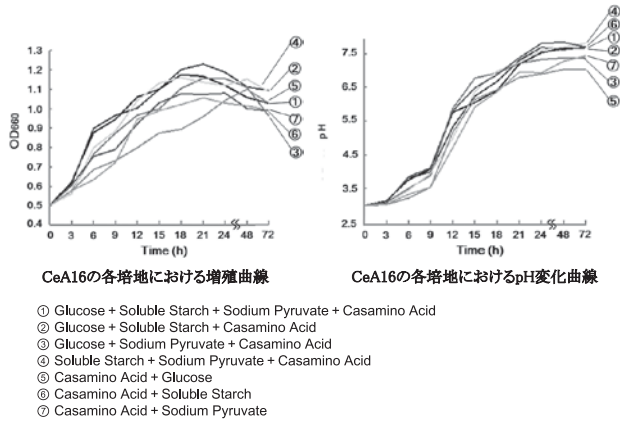


図13. アルカリ化酵母の中和に及ぼす培地成分

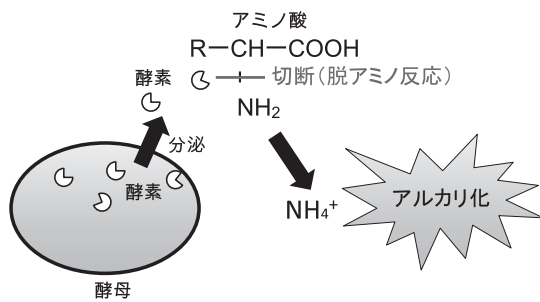


図14. アルカリ化酵母による酸性水中和機構

モニウムイオンを生成し、酸性環境を中和して、酵母の周囲を中性に保つ。さらに、アルカリ化酵母はバイオフィームなどを構成することでアンモニウムイオンの拡散を防ぎ、細胞体の中和環境を維持すると推測している。

次に、アルカリ化酵母の有効利用を試みている。日本の淡水圏には河川や湖沼などに大小の強酸性環境が点在しているが、石灰水による中和は環境への2次的負荷が多く、今後は行われない可能性が高い。そこで、環境に優しい中和法の一つとしてアルカリ化酵母の利用を提案する。酸性水中和用バイオリアクターの試作を図15に示す。アルカリ化酵母 *Candida fluviatilis* CeA15をアルギン酸ゲルに固定化してカラム充填し、pH 3.6の酸性水(カザミノ酸含有)を連続通水したところ、pH 7付近の中和水を1か月以上安定的に生成することができた。さらに、中和水中のアンモニウムイオンを除去するために、ゼオライトを充填した第2リアクターを適用したところ、アンモニウムイオンを含まないpH 7付近の

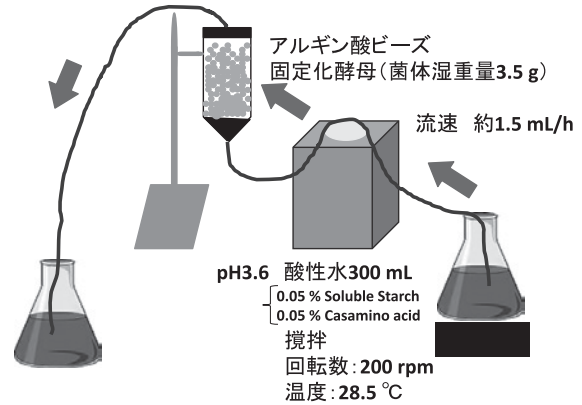


図15. 酸性水中和バイオリアクター

中和水を生成することができた(データ詳細は記載せず)。本研究は現在、アルカリ化酵母 *C. fluviatilis* CeA15とCeA16の酸性水中和アミノ酸分解酵素とその遺伝子発現機構の解明、強酸性環境水の中和用スケールアップ・バイオリアクターの構築へと進展している。

文 献

- 1) Takagi, T. *et al.*: *Fish. Sci.*, **81**, 763 (2015).
- 2) Obara, N. *et al.*: *Fish. Sci.*, **81**, 771 (2015).
- 3) Obara, N. *et al.*: *Studies Sci. Tech.*, **4**, 71 (2015).
- 4) Uchida, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 664 (2014).
- 5) Takagi, T. *et al.*: *Fish. Sci.*, **78**, 905 (2012).
- 6) Obara, N. *et al.*: *Studies Sci. Tech.*, **1**, 49 (2012).
- 7) Ogawa, G. *et al.*: *Annal. Microbiol.*, **58**, 261 (2008).
- 8) Ogawa, G. *et al.*: *African J. Microbiol. Res.*, **2**, 110 (2008).
- 9) Ueno, R. *et al.*: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **90**, 23 (2003).
- 10) Ueno, R. *et al.*: *Arch. Microbiol.*, **177**, 244 (2002).
- 11) Ueno, R. *et al.*: *Fish. Sci.*, **68**, 571 (2002).
- 12) Ueno, R. *et al.*: *Fish. Sci.*, **67**, 138 (2001).
- 13) Urano, N. *et al.*: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **87**, 23 (2001).
- 14) Urano, N. *et al.*: *Fish. Sci.*, **64**, 633 (1998).
- 15) Ueno, R. *et al.*: *Studies Sci. Tech.*, **1**, 31 (2012).
- 16) Ueno, R. *et al.*: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **75**, 1654 (2011).
- 17) Ueno, R. *et al.*: *Canadian J. Microbiol.*, **54**, 66 (2008).
- 18) Ueno, R. *et al.*: *Microbiology*, **153**, 3879 (2007).
- 19) Ueno, R. *et al.*: *Fish. Sci.*, **72**, 1027 (2006).
- 20) Ueno, R. *et al.*: *J. Phycology*, **41**, 1286 (2005).
- 21) Ueno, R. *et al.*: *Marine Biotech.*, **6**, 373 (2004).
- 22) Ueno, R. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **223**, 275 (2003).
- 23) Urano, N. *et al.*: *Marine Biotech.*, **4**, 559 (2002).
- 24) Urano, N. *et al.*: *Fish. Sci.*, **68**(suppl. 1), 639 (2002).
- 25) Ueno, R. *et al.*: *Fish. Sci.*, **68**(suppl. 1), 641 (2002).
- 26) Ueno, R. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 160 (2002).