

スクリーニングした *Lipomyces* 酵母と再生可能資源の利用による BDF 用油脂実用生産の目論見

長沼 孝文*・柳場 まな

はじめに

井戸を掘れば無尽蔵に湧出する化石燃料は、現状が続く限り我々に便利な生活を提供してくれるが、それが継続される保証はない。また、化石燃料は炭素循環ができないため、使用し続ける限り二酸化炭素の排出は止むことはない。これを防ぐには光合成で二酸化炭素が固定できる植物をエネルギーに利用するのが良い。また、太陽光・風力・水力など自然エネルギーは二酸化炭素の排出はないが、液体燃料ほどエネルギー密度が高くないため、石油代替として内燃機関を動かすことができない。

これらの問題点を解決するべく液体燃料の微生物生産が研究されている。植物が二酸化炭素を固定して作った糖質から、従属栄養微生物を触媒としてエタノールやブタノールの生産、あるいは微細藻類のように自身が二酸化炭素から作った糖質を原料にして炭化水素を生産するものが知られている。この流れとして、植物の糖質を原料に酵母が生産した植物油脂を回収し、石油代替の BDF (バイオディーゼル燃料) を作出するものもある¹⁾。

ところで植物油脂は、食糧や界面活性剤あるいは BDF の原料として利用できるが、日本の油脂自給率はカロリーベースで3%程度ときわめて低い²⁾。この要因の一つは、植物油脂の輸入価格は安く気候風土の要素からも国内での油糧作物栽培のメリットがないからである。しかし、世界人口の急激な増加や温暖化による地球環境の異変などにより、潤沢な輸入が保証されないことは容易に想定される。

これらをもとに、「*Lipomyces* 酵母と再生可能資源を利用した BDF 用油脂の生産」に関する研究を開始した^{3,4)}。このテーマへの追い風は、再生可能資源に含まれる糖質を油脂に変換しこれを燃料として利用することで、発生した二酸化炭素は再生可能資源中の糖質に戻されることである。すなわち、炭素循環により地球温暖化抑制に貢献できる。

図1に研究コンセプトを示した。選抜した油脂高生産 *Lipomyces* 株を再生可能資源に対応させ、植物性中性脂肪 (オレイン酸とパルミチン酸が主構成脂肪酸) をこの酵母の特徴である菌体内脂肪球として蓄積させる。これ

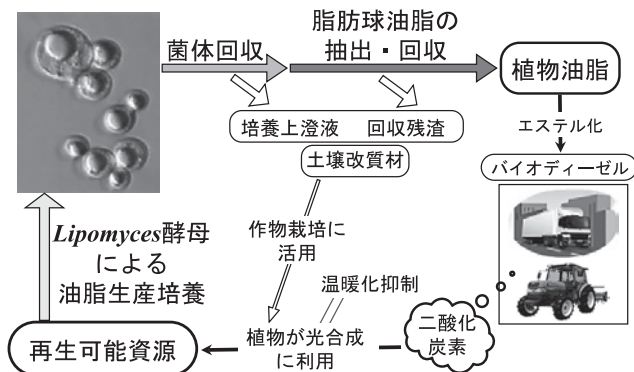


図1. *Lipomyces* 酵母と再生可能資源を利用した BDF 用油脂の生産システム

を適当な手段で抽出・回収し液体燃料の BDF 用油脂として利用する。また、集菌時の培地画分と油脂抽出・回収時の菌体残渣は土壌改質材として活用する。

この研究における目標の一つは石油や輸入油脂に匹敵する製品価格であり、そのためには低コスト生産が必要である。低コスト生産を目指した研究骨子の四つは以下のようなものである。(1) 最重要課題とした多種多様な低価値再生可能資源に対して油脂を低コストで高生産する菌株のスクリーニング。(2) 再生可能資源の選択と培地炭素源とするための処置。(3) 油脂高生産培養方法の検討。(4) 脂肪球内に蓄積された油脂の低コスト高効率抽出・回収方法の開発。

検討

(1) 油脂生産性に優れた *Lipomyces* 酵母菌株のスクリーニングと得られた菌株の性質

1) スクリーニング

一言に油脂生産性に優れたといっても、個々の酵母細胞の油脂生産性であるのか、一定容積から得られる油脂生産量であるのか、再生可能資源の油脂への変換効率であるのか、指標とするものはいくつかある。また、それぞれで正確な数値を得るためには、それなりの培養方法や測定方法を用いなければならない。我々は多数の菌株を保有しているが、これを多種類の低価値再生可能資源と組み合わせることで研究成果の適用範囲を広くできる

* 著者紹介 山梨大学大学院総合研究部・生命環境 (生命工学) E-mail: tnaganuma@yamanashi.ac.jp

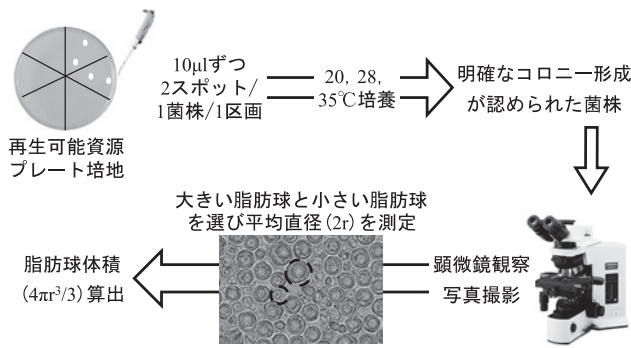


図2. プレート培養と菌体内脂肪球体積値を用いた油脂生産に優れた *Lipomyces* 酵母のスクリーニング法

と考えた。また、スクリーニング時の培養条件として、脂肪酸組成に影響する可能性が示唆されている培養温度を変化することも視野に入れた。その結果、菌株・再生可能資源・温度の組合せで約14,000通りの実験系が想定された。これに油脂生産性の指標を加えると、少人数の研究室ではとても無理であることが分かった。

また、すべての指標を対象にすると結果の解析を行う際に多くの選択肢に振り回されてしまい、菌株の長所を見失ってしまうのではないかと考えた。それでは何をもって“油脂生産性に優れた”菌株とするべきであるのか？実験の簡便さや低コスト性、そして数値では分からない情報が得られる形態観察において、この酵母の特徴である脂肪球の大きさを測定する方法を採用するのが適当であるとの結論に到った。

実験方法を図2に示した。資源毎のプレート培地を作製してそれを六つに区分して、それぞれに菌株をスポット接種した。スポット形式にしたのは、資源によっては寒天培地表面が滑らかでないため塗沫が困難であったからである。所定の温度で培養後、増殖が一定以上あった系をサンプリングし顕微鏡下で観察しながら写真を撮影した。プリントアウトしたものを使って、同数の大きな脂肪球と小さな脂肪球の直径平均値から体積を求めた。

余談になるが、サイズの大きい酵母を対象にした場合には菌体内の様子や生き様を知ることができるなど、アバウトではあっても生細胞からの情報を得るのに光学顕微鏡による観察はきわめて都合が良い。このことが、後の(4)項で述べる脂肪球内油脂の簡便で高効率な抽出・回収に関する検討に随分と活きた。

スクリーニング対象とした *Lipomyces* 菌株は野外分離株、分譲機関からの購入株、紫外線照射株など合計約430菌株である。野外株の分離源とした土は、山梨県を中心として全国にまたがって採取した。現地の方や出張者・旅行者に依頼して採取していただいたものも多数

表1. 再生可能資源に対応可能な菌株数と平均脂肪球体積値

再生可能資源	油脂高生産能力を発揮した菌株数	それらの菌株の平均脂肪球体積 (μm ³)
モモ・スモモ果汁	12	355
ジャガイモ	16	366
米糠	17	235
タピオカ	8	372
ヤーコン	9	307
キシロース	16	390
キシロオリゴ糖	7	430
セロビオース	10	464
試薬グリセリン	13	398
粗グリセリンSR	9	436
粗グリセリンSY	15	307
粗グリセリンLI	8	227

ある。

対象とした再生可能資源は高度な処理をしないで利用できる果汁やジャガイモのような農産物5種、木質を構成するセルロースやヘミセルロースの構成成分で培地に添加するにはそれなりの処理が必要なもの3種および植物油脂をエステル化した際に発生し処理された粗グリセリン系4種の都合12種類とした。

表1に各再生可能資源に対応可能な菌株数とそれらの菌株の平均脂肪球体積値を示した。炭素源がでんぶんの米糠とジャガイモとタピオカではそれぞれに対応可能な菌株数も平均体積値も異なっていた。またお互いに共通する菌株も少なかった。その要因としてでんぶんの性質が異なることも考えられるが、それ以上に夾雑物の種類や量が異なっていることが推定された。このことは粗グリセリン系においても同様であると考えられた。キシロースやキシロオリゴ糖などは試薬を用いたが、脂肪球体積値がキシロースでは高かった菌株がキシロオリゴ糖では高くないなどの現象もみられた。これらの現象をもとに再生可能資源と油脂生産性との関係のみをみると、個対個の状況下で優秀な菌株が選抜可能であると判断できた。

野外分離菌の脂肪球体積値と分離地域や植生との関係について解析を行った。植生との関係はなかったが、年間平均気温が高い地域から分離した菌株は高温培養でも脂肪球体積値が高い傾向にあった。

2) 脂肪球体積を指標としたスクリーニング菌株の性質
油脂生産性を調べる指標の一つとして菌体内脂肪球体

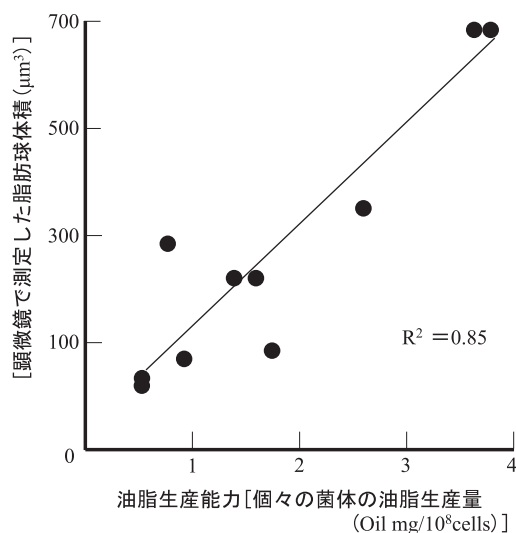


図3. 脂肪球体積値と油脂生産能力 [個々の菌体の油脂生産量 (Oil mg/10⁸ cells)] の関係

積値をもってスクリーニングを行ってきた。この体積値はあくまでも形態観察による半定量的数値として取り扱うのが適当で、油脂生産について定量的に解析するには半定量的の体積値から定量値への読み替えが必要であった。

菌体をガラスビーズで破碎した液を中性脂肪定量キットと反応させ、油脂を定量した⁵⁾。測定値を菌数で除して得た [個々の菌体の油脂生産量 (Oil mg/10⁸ cells)] を求めた。この値は菌体の各種代謝のうちで油脂生産代謝が活性化されると高くなるものであると判断して、菌体油脂生産能力と呼ぶことにした。

図3に [油脂生産能力 (Oil mg/10⁸ cells)] と [脂肪球体積 (μm³)] の関係を示した。両者には相関性が認められ、脂肪球体積値は、菌体油脂生産能力として表しても良いことが分かった。この油脂生産能力が高いということはどのような油脂生産性と関係するのかについて調べ、今後利用していくべき菌株の選択に活用したいと考え解析を行った。

一定量の培養液から得られる [油脂生産量 (Oil mg/1 ml 培養液)] に対して油脂生産能力が正の関係にある菌株グループ (油脂生産能力型) と、 [増殖菌体量 (Cells/1 ml 培養液)] が正の関係にあるグループ (増殖菌体量型) があった。

いかに低価値資源とはいっても値段が付くものや資源回収費用などを考慮すると、大量に取り扱う時にはこの部分に掛かるコストをできるだけ抑えないと製品価格上昇に直結してしまう。その低減策の一つが油脂変換率の高い菌株の使用であると考え、炭素源消費量を定量し、解析を行った。能力型は培地炭素源を効率良く油脂に変

換できる能力である [油脂変換率 (油脂生産能力 : Oil mg/10⁸ cells) / (菌消費炭素源量 : mg/10⁸ cells)] に対して正の関係があった。

また、 [油脂生産能力 (Oil mg/10⁸ cells)] と [増殖菌体量 (Cells/1 ml 培養液)] の間には、明確ではないものの負の関係がみられた。このことは子孫を作ろうとするのか、それとも己の生き残りのために高エネルギー物質の油脂を貯めようとするのか、を誘導する生物的や環境的要因が存在することを確信させた。そして、この要因を探し出すことで、菌体の代謝が容易に制御できる可能性が高いと考えている。

(2) 再生可能資源の選択と培地炭素源にするための処置 「*Lipomyces* 酵母と再生可能資源を利用した油脂の生産」研究は24-26年度JST A-STEP本格研究開発ステージハイリスク挑戦タイプ選択課題 (ライオン (株) - 山梨大学) を基本とし、これに南アルプス市 - 山梨大学包括的連携協定が加わる形でスタートした。

果樹生産が盛んな南アルプス市の希望としては、果樹剪定枝や非出荷果実の活用であった。また、遊休農地解消のためジャガイモやヤーコンを栽培し、そこで余剰となったものや災害用食糧として備蓄中に劣化したものなども候補にあがった。米糠や残飯および自治体が回収を推進した廃食油をエステル化する際に発生する廃グリセリンの活用も提案された。なお、油脂会社から発生する粗グリセリンに関してはライオン (株) により検討が行われた。

低コスト生産の第一は炭素源の価格を安く抑えることであり、炭素源を得るための資源の処置も重要である。

南アルプス市特産のモモの収穫時期は6月中旬から8月中旬であり、市場性のない非出荷モモもこの時期に発生する。年間を通して使用するためには果汁にしてからの低温保存が良いと考えた。腐敗、未熟、キズなどの状態のものを粉砕機にかけ種や皮ごと細断した。これを搾汁し果汁を得た。果汁中に含まれるサッカロース、グルコース、フルクトースは絶好の炭素源となるため、滅菌して静菌状態で保存することが必要であった。そこで、バクテリアの繁殖が抑えられる低pHにして冷凍保存を行った。

遊休農地をジャガイモ畑に変えるにはそれなりの時間と手間が必要であるため、今回は家庭で備蓄保存中に芽を吹いて劣化してしまったジャガイモを使用した。保存物を粉砕処理し、炭素源として培地に加えた。加熱滅菌処理ででんぷんの糊化が起こったが、pHや濃度に注意すれば糊化は低減でき液体培養が可能であった。残飯としては学校給食で残った炊飯米を利用した。

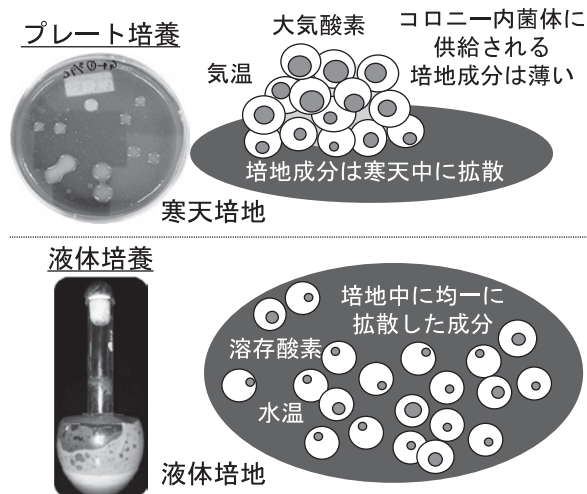


図4. プレート培養と液体培養では環境要因の影響に違いがある

廃食油のエステル化で発生した廃グリセリンはpHを低下させるとともに、生育を阻害する夾雑物の濃度を考慮することで利用可能となった。

(3) 油脂高生産能力発揮のための培養条件の検討

プレート培地でスクリーニングした菌株を、同じ組成の液体培地を使って、プレート培養と同じ条件に設定して液体培養した。しかし、液体培養ではプレート培地よりも明らかに脂肪球が小さく油脂生産能力が発揮されていないことが分かった。

この原因は、図4に示したような状況であったからであると推定した。寒天培地上でコロニーが形成される際には、培地成分や夾雑物は本来の濃度が希釈された状態で菌体に届く。また、培養条件も液体のように設定条件の厳密さはない。一方、液体培地中の菌体は設定された培地成分や夾雑物の濃度および培養条件が緩和されることなく直接的に影響する。このことは温度を35°Cとした液体培地で培養すると、プレート培地では増殖した菌株がしなくなったことから納得できた。

炭素源以外の培地構成成分の中で油脂生産に関係する窒素源について、液体培地においてこの濃度を減少させることでプレート培地のモデルとして培養実験を行った。

結果は図5に示すように、窒素源が低いと脂肪球体積即ち[油脂生産能力 (Oil mg/10⁸ cells)]は高く、プレート培地で得られた油脂生産能力を誘導したのは窒素制限が大きな要因であると考えられた。油脂生産能力型の菌株の能力を存分に発揮させるには、培地成分の量や種類を少なめに設定することが重要⁶⁾であることが示唆された。

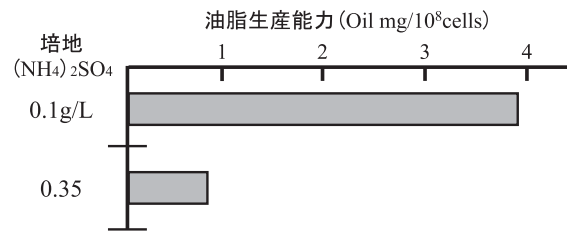


図5. 培地窒素濃度が油脂生産能力に及ぼす影響

(4) 菌体からの油脂抽出・回収条件の開発

Lipomyces 酵母から簡便かつ低コストに油脂を抽出するには、ラボレベルの抽出法のスケールアップや植物油抽出法の適用では対応し難いことが、この研究のボトルネックとして発生し、新しい方法の開発が必要になった。スクリーニング段階での顕微鏡観察において検鏡試料に圧を掛けると、脂肪球体積の大きな菌では球内の油脂が菌体外にまで漏出する現象が観られた。現在、この現象が活用できる装置を考案し製作に取り組んでいる。さらにいくつかの方法を検討し、脂肪球体積の大きな菌の特性を活かした簡便、低コスト、高効率の油脂抽出・回収方法の開発を目指している。

(5) 菌体回収時の培養液と油脂抽出残渣の利用

菌体回収時にでてくる培養液や油脂抽出残渣が有効活用できれば、この研究の有用性のバックアップが期待できる。土壌生息酵母 *Lipomyces* は菌体外に粘性多糖を生産する。これを土壌に与えると多糖に起因する保水性と粘性による土粒子団粒化が引き起こされ、通気性・保水性・保肥性向上に役立つ可能性が高い。また、タンパク質や未回収の油脂などを含む油脂抽出残渣は、土粒子団粒化に有用なミミズの格好の餌となり、活発な繁殖を促すと考えられた。予備検討における作物栽培試験などでは良好な結果が得られている。

おわりに

Lipomyces 酵母と低価値再生可能資源を利用してBDF原料の油脂生産研究を、ラボレベル実験と90 Lジャーファーメンター実証試験で行っている。スクリーニングした油脂生産能力の高い菌株が、油脂の低コスト高効率生産と油脂抽出・回収の実用化への歩みを推進してくれる。問題点はあるものの低コストでの実用生産の種火は点りつつある。

一方我々のBDFは、石油に匹敵する価格になるのかと問われれば、今は難しいと答えざるを得ない。しかし、化石燃料を使えば経済発展は望めるが、地球環境の悪化は進む。化石燃料にはでき得ない二酸化炭素循環型の燃

料を少しずつでも使っていくことは、今を存続させるためには有効であると考えている。再生可能資源から *Lipomyces* が生産したBDFのような液体燃料を使う機会が、火の手のように増えていってくれることを夢見ている。

謝 辞

これらの研究は南アルプス市、ライオン（株）黒川博史様、田邊聡君と松本美穂さん、JSTの御協力を頂いたお陰で遂行することができました。感謝致します。

文 献

- 1) 正木和夫ら：クリーンエネルギー，2013.5,15.
- 2) 正木和夫：バイオサイエンスとインダストリー，**72**, 29 (2014).
- 3) 長沼孝文：油脂，**64**, 68 (2011).
- 4) 長沼孝文：醸協，**107**, 884 (2012).
- 5) Naganuma, T. *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1213 (1982).
- 6) Naganuma, T. *et al.*: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**, 29 (1985).