

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6145583号
(P6145583)

(45) 発行日 平成29年6月14日 (2017. 6. 14)

(24) 登録日 平成29年5月19日 (2017. 5. 19)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19 Z N A
C 1 2 P 7/06 (2006. 01)	C 1 2 P 7/06

請求項の数 1 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2016-562191 (P2016-562191)	(73) 特許権者	000005326
(86) (22) 出願日	平成26年12月5日 (2014. 12. 5)		本田技研工業株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/082332		東京都港区南青山二丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02016/088275	(74) 代理人	110000800
(87) 国際公開日	平成28年6月9日 (2016. 6. 9)		特許業務法人創成国際特許事務所
審査請求日	平成29年2月16日 (2017. 2. 16)	(72) 発明者	土田 芳樹
微生物の受託番号	NPMD NITE BP-01963		埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会
早期審査対象出願			社本田技術研究所内
		(72) 発明者	栗原 育美
			埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会
			社本田技術研究所内
		(72) 発明者	今井 友裕
			埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会
			社本田技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高効率エタノール発酵菌

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

五炭糖及び六炭糖から効率的にエタノールを産生する発酵菌であって、
 特許微生物寄託センターに受託番号N I T E B P - 0 1 9 6 2として寄託されている
 菌に、セルフクロニングしたトランスアルドラーゼ遺伝子、アルコールデヒドロゲナー
 ゼ遺伝子及びピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を導入した菌であり、
 特許微生物寄託センターに受託番号N I T E B P - 0 1 9 6 3として寄託されている
 ことを特徴とする高効率エタノール発酵菌。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

リグノセルロース系バイオマスを用いたバイオエタノール生産において、糖化溶液を発
 酵するための微生物に関する。

【0002】

特に、リグノセルロース系バイオマスを用いたバイオエタノール生産において、五炭糖
 (以下、C5糖ということがある。)、及び六炭糖(以下、C6糖ということがある。)
 から効率的にエタノール生産することができる微生物に関する。

【背景技術】

【0003】

バイオエタノールは、バイオマスから産生される枯渇することのない再生可能資源とし

て期待されている。また、バイオエタノールを燃焼させて発生する二酸化炭素はカーボンニュートラルであることから、バイオエタノールの利用が進むことによって、地球温暖化の主な原因である二酸化炭素の上昇を抑制すると考えられている。

【0004】

バイオエタノールは、バイオマスを発酵させ、蒸留してエタノールを精製する。バイオエタノールの収率を高めるために糖化溶液から多くのアルコールを生成する必要がある。バイオエタノール生産の過程で一般的に用いられている酵母は、キシロース、アラビノースなどの五炭糖をアルコールに変換できないため、発酵原料としては六炭糖のみが用いられてきた。

【0005】

10

原料によって異なるものの典型的なバイオマスには、35～45%のセルロース、25～40%のヘミセルロース、15～30%のリグニンが含まれていると言われている。したがって、六炭糖が重合しているセルロースだけではなく、五炭糖であるキシロース等を主として含有するヘミセルロースを基質として利用することは効率的なエタノール生産につながることになる。

【0006】

キシロースはグルコースの次にバイオマス中に多く含まれている糖であると言われており、五炭糖を効率的に利用することはバイオエタノール生産において大きな課題となっている。

【0007】

20

これまでに、遺伝子組換えによるキシロース利用能の付与や、キシロースを利用してエタノールを産生する微生物の利用等により、キシロースを少しでも利用する技術が開示されている。

【0008】

特許文献1には、キシローストランスポーター活性を有する遺伝子を宿主細胞に導入することによって、キシロース(C5糖)をキシルロースに変換し、解糖系のペントースリン酸経路に組み入れ、発酵に利用する発明が開示されている。

【0009】

特許文献2には、アラビノーストランスポーターを付与した酵母によって、アルコールを生成する技術が開示されている。特許文献1と同様にアラビノース(C5糖)をアラビトール、キシルロースを経て解糖系のペントースリン酸経路に組み入れ、発酵に利用するものである。

30

【0010】

非特許文献1には、大腸菌由来のキシロース資化遺伝子をザイモナスに組み込むことにより、キシロース資化能を付与することが開示されている。

【0011】

非特許文献2には、ピキア属酵母が、キシロースを利用してエタノールを生産することが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0012】

【特許文献1】特開2012-170422号公報

【特許文献2】米国特許出願公開第2013/189788号明細書

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Zhang, M., et al., Science, 1995. Vol. 267, pp. 240-243.

【非特許文献2】Bicho, P.A., et al., Appl. Environ. Microbiol., 1988, Vol. 54, p. 50-54.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0014】

しかしながら、特許文献1の発明は、*Candida guilliermondii*由来のキシローストランスポーター活性のあるタンパク質を宿主として *Saccharomyces cerevisiae* に導入している。すなわち外来遺伝子を導入することになる。また、特許文献2の発明もトランスポーター遺伝子は異なるものの、宿主に対して異なる種の遺伝子を導入する発明である。

【0015】

また、非特許文献1に記載の技術は、キシロース資化遺伝子を導入するものであり、上記特許文献1及び2とは技術思想は異なるが、外来遺伝子を導入することになり変わらない。

【0016】

そのため、上記特許文献1及び2、非特許文献1に記載の発明は、いずれも国連で採択された「生物の多様性に関する条約のバイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」を実施するために我が国において施行されているいわゆるカルタヘナ法に則した封じ込め策を講じる必要がある。従って、バイオセーフティを保証するための施設を必要とすることから、当該菌体を利用してエタノールを生産することはコストの面で不利である。

【0017】

また、非特許文献2に記載の技術によって、ピキア属酵母を利用することは、野生型のピキア属酵母はキシロース利用性が低く、エタノール産生効率はさほど高くない。

【0018】

本発明は、外来遺伝子を導入することなく、エタノール産生効率の高い高効率エタノール発酵菌を得ることを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0019】

前記課題を解決するために、本発明の高効率エタノール発酵菌は、五炭糖及び六炭糖から効率的にエタノールを産生する発酵菌であって、特許微生物寄託センターに受託番号NITE BP-01962として寄託されている菌に、セルフクローニングしたトランスアルドラーゼ遺伝子、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子及びピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を導入した菌であり、特許微生物寄託センターに受託番号NITE BP-01963として寄託されていることを特徴とする。

【0020】

野生型 *Meyerozyma guilliermondii* は、グルコース資化能に加えキシロース資化能を備えているとはいっても、バイオエタノール生産に十分なキシロース利用能を備えているわけではない。これに対して、本発明の高効率エタノール発酵菌（以下、BP-01963株ということがある。）は、*Meyerozyma guilliermondii* の親株を菌株育種することによりキシロースの利用効率の高い菌を選抜して得た発酵菌（受託番号：NITE BP-01962、以下、BP-01962株ということがある。）に、セルフクローニングしたトランスアルドラーゼ遺伝子、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子及び、ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を導入したものである。

【0021】

前記トランスアルドラーゼ遺伝子、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子及び、ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子はいずれも、*Meyerozyma guilliermondii* の遺伝子である。

【0022】

前記トランスアルドラーゼ遺伝子は、ペントースリン酸経路中の酵素であり、これを強化することによりキシロースを利用しやすくなると予測される。また、前記アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子は、アセトアルデヒドからエタノールを生産する。また、ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子はピルビン酸を脱炭酸してアセトアルデヒドと CO_2 とを生成する。

【0023】

この結果、本発明の高効率エタノール発酵菌は、外来遺伝子を導入することなく、親株

10

20

30

40

50

より高いエタノール産生効率を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】BP-01963株と、BP-01962株、N株との希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液における糖濃度と発酵収率との関係を示すグラフである。

【図2】アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液におけるBP-01963株によるグルコース及びキシロースの消化量と、エタノールの生成量との経時変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0025】

次に、添付の図面を参照しながら本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

10

【0026】

子囊菌系酵母であるMeyerozyma guilliermondiの野生株は、グルコース資化能に加えてキシロース利用能を備えているが、そのキシロース利用能はバイオエタノール生産に十分とは言えない。そこで、本実施形態の高効率エタノール発酵菌は、子囊菌系酵母であるMeyerozyma guilliermondi N株を親株として、アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液に変異剤を加えた培地で馴化培養して、該培地で生育する菌を選抜することにより得られた発酵菌（受託番号：NITE BP-01962）に、セルフクローニングしたトランスアルドラーゼ遺伝子（以下、TAL遺伝子と略記する。）、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（以下、ADH遺伝子と略記する。）及び、ピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（以下、PDC遺伝子と略記する。）を導入したものである。

20

【0027】

前記アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液は、例えば、次のようにして得たものを用いることができる。まず、埼玉県熊谷市産の稲わらを等量の25質量%アンモニア水に80℃の温度で3時間浸漬した後、アンモニアを放散させることにより前処理する。次に、前記前処理が施された稲わらに、pH調整後、糖化酵素（MeijiSeikaファルマ株式会社製、商品名：アクレモニウムセルラーゼ）を添加し50℃の温度に72時間保持して酵素糖化を行い、酵素糖化液を含むスラリーを得る。次に、前記スラリーをフィルタープレスにより固液分離し、回収された液体分を前記アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液とする。前記アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液は、例えば、3～15質量%のグルコースと、1～10質量%のキシロースとを含んでいる。

30

【0028】

前記変異剤としては、例えば、N-エチル-N-ニトロソウレア（ENU）、メタンスルホン酸エチル（EMS）等のエチル化剤、5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）等の塩基類似化合物、ニトロアミン、ニトログアニジン等のニトロソ化合物等を用いることができる。

【0029】

BP-01962株は、前記親株を前記アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液に変異剤を加えた培地で馴化培養して、該培地で生育する菌の選抜を繰り返すことにより得られた変異株である。従って、BP-01962株は、Meyerozyma guilliermondiの野生株又はN株に比較して、外来遺伝子を導入することなく、キシロース資化性及びエタノール発酵性能が向上している。

40

【0030】

BP-01962株にさらに、セルフクローニングしたTAL遺伝子、ADH遺伝子及び、PDC遺伝子を導入した本実施形態の高効率エタノール発酵菌は、本出願人により独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室）に寄託されている。受託日は2014年11月19日、受託番号は、NITE BP-01963である。

【0031】

前記TAL遺伝子、ADH遺伝子及び、PDC遺伝子は、いずれもMeyerozyma guilliermondiの遺伝子であるので、セルフクローニングしたこれらの遺伝子をBP-01962

50

株に導入しても、外来遺伝子を導入することにはならない。

【0032】

この結果、BP-01963株は、BP-01962株又はN株に比較して、外来遺伝子を導入することなく、キシロース資化性及びエタノール発酵性能がさらに向上している。

【0033】

BP-01963株に対する、セルフクローニングしたTAL遺伝子、ADH遺伝子及び、PDC遺伝子の導入は、例えば、次のようにして行うことができる。

【0034】

導入したい遺伝子及びそのターミネーター部（以下、遺伝子+ターミネーター部という。）をPCR増幅する。導入に用いたいプロモーター部をPCR増幅する。これらは何れも本発明で用いた菌株であるMeyerozyma guilliermondiの染色体からPCR増幅する。

【0035】

PCR増幅したDNA断片をプロモーター、遺伝子+ターミネーター部の順になるよう、インフュージョン法を用いて、大腸菌用の市販ベクターにクローニングする。クローニングされたベクターを大腸菌に形質転換し、ベクターを増幅する。増幅したベクターからプロモーター及び遺伝子+ターミネーター部を制限酵素で切出す、あるいは増幅したベクターからPCR増幅することにより、相同組換え用のDNA断片を得る。

【0036】

得られたDNA断片を菌株に相同組換えし、所望の菌株を得た。相同組換えにはエレクトロポレーション法を用いた。この方法によって遺伝子を導入すると、染色体上に複数コピー導入することができるため、導入した酵素の活性を増強することができる。

【0037】

相同組換え用DNA断片としては、例えば、キシロースレダクターゼのプロモーター、トランスアルドラーゼ+ターミネーターを用いると良い。キシロース資化の際に機能するキシロースレダクターゼのプロモーターを用いることによって、トランスアルドラーゼが効率良く作用すると考えられるからである。

【0038】

キシロースレダクターゼのプロモーターは具体的には下記配列番号1及び配列番号2のプライマー、トランスアルドラーゼ遺伝子及びターミネーター部分は下記配列番号3及び4のプライマーを用いて増幅した。

【0039】

配列番号1：AAGGCTTGGGAACCTTCTTT

配列番号2：AGCAATTGATGATTAATTTT

配列番号3：ATGACCAATTCTCTTGAACA

配列番号4：AAATTGTGCCGTGTCAAAC

また、GAPDHのプロモーター、アルコールデヒドロゲナーゼ+ターミネーターを用いると良い。GAPDHは解糖系に存在する強力なプロモーターであることから、解糖系の酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼのプロモーターとして使用することにより、効率よく作用するものと考えられる。アルコールデヒドロゲナーゼはアセトアルデヒドをエタノールに変換する作用を持つとともに、NADH依存の場合にはNAD⁺を生産するため、NAD⁺依存のキシリトールデヒドロゲナーゼの作用を強化する作用がある。

【0040】

GAPDHのプロモーターは具体的には下記配列番号5及び配列番号6のプライマー、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子及びターミネーター部分は下記配列番号7及び8のプライマーを用いて増幅した。

【0041】

配列番号5：GTTGTAGCGGAGGCTCAATT

配列番号6：TGTATAATTTAAATGTGGGT

配列番号7：ATGTCAATTCCAGAATCCAT

10

20

30

40

50

配列番号 8 : CACCTTGGCTGGAAGTGCTG

PDC 遺伝子は、PDC 遺伝子のプロモーターを GAPDH のプロモーターに置換することにより強化した。配列番号 9 および配列番号 10 で表される配列の間に、配列番号 5 および配列番号 6 のプライマーで増幅される GAPDH のプロモーターを導入することで得られる DNA 断片を相同組換することで置換を行った。配列番号 9 の配列が PDC 遺伝子のプロモーターの終端、配列番号 10 の配列が PDC 遺伝子の始端を表す。

【0042】

配列番号 9 : AGATTGCTGCAAAAATCATC

配列番号 10 : ATGACAGAAATTACTTTGGG

10

また、この方法により得られた菌株は、遺伝子を導入しているが、セルフクローニングであるため、カルタヘナ法上、非組換菌扱いになる範疇に属するものとなっている。

【0043】

次に、希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液を用いて、BP-01963 株と、BP-01962 株、N 株との発酵収率を比較した。

【0044】

前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液は、次のようにして得たものを用いた。まず、米国アイオワ州産のコーンストーバを 2 倍量の 3.7 質量%硫酸に 170℃の温度で 10 分間浸漬した後、常温に戻すことにより前処理する。次に、前記前処理が施されたコーンストーバに NaOH 水溶液を添加して pH 4 に調整後、糖化酵素 (Meiji Seika ファルマ株式会社製、商品名：アクレモニウムセルラーゼ) を添加し 50℃の温度に 72 時間保持して酵素糖化を行い、酵素糖化液を含むスラリーを得る。次に、前記スラリーを遠心分離により固液分離し、回収された液体分を NaOH 水溶液で pH 6 に調整し、前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液とした。前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液は、例えば、3～15 質量%のグルコースと、1～10 質量%のキシロースとを含んでいる。

20

【0045】

次に、15 質量%の希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液を培地とし、該培地に BP-01963 株の培養液を培地の OD₆₀₀ が 2.0 となるように添加し、30℃の温度で 100 時間培養を行った。前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液は、グルコース 45 g/L、キシロース 38 g/L を含み pH 6 であった。そして、前記培養後に前記培地を採取してエタノールの濃度を GC-FID (ジューエルサイエンス株式会社製、商品名：GC390B) により測定し、次式 (1) により発酵収率を算出した。結果を図 1 に示す。

30

【0046】

発酵収率 = 生成エタノール濃度 / (グルコース濃度 + キシロース濃度) / 0.5114
 (1)

(グルコース濃度及びキシロース濃度は培養開始前の初期濃度である)

次に、20 質量%の希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液を培地とし、該培地に BP-01962 株の培養液を培地の OD₆₀₀ が 0.5 となるように添加し、30℃の温度で 100 時間培養を行った。前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液は、グルコース 64 g/L、キシロース 48 g/L を含み pH 6 であった。そして、前記培養後に前記培地を採取してエタノールの濃度を GC-FID (ジューエルサイエンス株式会社製、商品名：GC390B) により測定し、式 (1) により発酵収率を算出した。結果を図 1 に示す。

40

【0047】

次に、26 質量%の希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液を培地とし、該培地に *Meyerozyma guilliermondi* N 株の培養液を培地の OD₆₀₀ が 0.5 となるように添加し、30℃の温度で 100 時間培養を行った。前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化

50

液は、グルコース 64 g/L、キシロース 48 g/L を含み pH 6 であった。そして、前記培養後に前記培地を採取してエタノールの濃度を GC-FID（ジーエルサイエンス株式会社製、商品名：GC390B）により測定し、式（1）により発酵収率を算出した。結果を図 1 に示す。

【0048】

図 1 から、BP-01963 株は、N 株よりも低濃度の前記希硫酸処理コーンストーバ由来酵素糖化液に対して、BP-01962 株及び N 株よりもエタノール発酵性能に優れていることが明らかである。

【0049】

次に、26 質量%のアンモニア処理稲わら由来酵素糖化液を培地とし、該培地に BP-01963 株の培養液を培地の OD₆₀₀ が 2.0 となるように添加し、30℃の温度で 120 時間培養を行った。前記アンモニア処理稲わら由来酵素糖化液は、グルコース 73.8 g/L、キシロース 28.3 g/L を含み pH 6 であった。そして、所定時間毎に前記培地を採取し、キシロースの濃度を HPLC（東ソー株式会社製、商品名：LC-8020）により、エタノールの濃度を GC-FID（ジーエルサイエンス株式会社製、商品名：GC390B）によりそれぞれ測定した。結果を図 2 に示す。

【0050】

図 2 から、培養開始から 120 時間後にはグルコース及びキシロースの全量が消化されており、エタノール濃度は培養時間が長くなるほど高くなることがわかる。また、培養開始から 48 時間後にはグルコース濃度が殆どゼロになっているが、その後もキシロース濃度は低下し、エタノール濃度は増加を続けていることから、BP-01963 株はグルコースの全量が消化された後は、キシロースを基質としてエタノール発酵を行っていることが明らかである。

【符号の説明】

【0051】

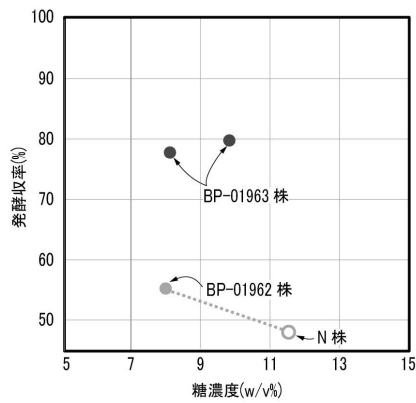
符号なし。

10

20

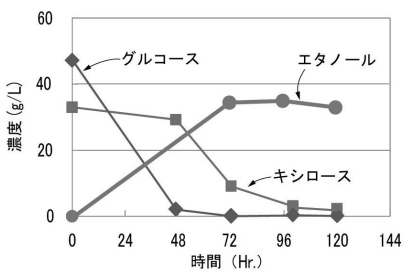
【図 1】

FIG.1



【図 2】

FIG.2



【配列表】

0006145583000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 小池 郁

埼玉県和光市中央1丁目4番1号 株式会社本田技術研究所内

審査官 布川 莉奈

(56)参考文献 特開2011-024500 (JP, A)

特開2011-193788 (JP, A)

国際公開第2011/065539 (WO, A1)

GRANSTROM, T et al., Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2001年, Vol.55, p.36-42, Abstract, Introduction, Fig.3

FONSECA, Cesar et al., L-Arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012:, Applied Microbiology and Biotechnology, 2007年, Vol.75, p.303-310, Abstract, Fig.2d

HAN, Li-li et al., Breeding of Higher Ethanol Fermentation of Xylose Strain with Protoplast Fusion and Mutagenesis, LIQUOR MAKING, 2008年, Vol.35, No.2, p.38-41, Abstract, 表1-3、図1-5

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

C12P 1/00-41/00

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)