TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo University of Marine Science and Technology (東京海洋大学)

水圏の耐熱性酵母およびプロトテカに関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 上野, 良平 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/743

水圏の耐熱性酵母およびプロトテカに関する研究

平成 13 年度

(2001)

東京水産大学　大学院

水産学研究科

食品生産学専攻

上野　良平

東京水産大学附属図書館
2002 0338

水圏の耐熱性酵母およびプロトテカに関する研究

目 次

		Page
第1章	序論	1
1.1	既往の研究	1
1.2	本研究の目的	4
第2章	水圏の耐熱性酵母およびプロトテカの基礎的性状	5
2.1	温泉排水から酵母様真核微生物の分離	5
2.2	高温域においてグルコースの発酵能または *n*-ヘキサデカン資化能をもつ株のスクリーニング	7
2.3	高温域におけるグルコースの発酵特性	14
2.4	増殖の温度依存性	18
2.5	生理学的性状に基づく酵母の同定	21
2.6	生理学的性状に基づくプロトテカの同定	29
2.7	18S rDNA の塩基配列に基づく分子系統上の位置	31
第3章	プロトテカ RND16 株のグルコース嫌気代謝の解析	40
3.1	嫌気条件下における発酵特性	40
3.2	高濃度グルコースを基質とするエタノール生産能	52
第4章	耐熱性酵母およびプロトテカの応用の可能性	57
4.1	酵母 RND13 株によるエタノール生産	57
4.2	プロトテカ RND16 株による石油（炭化水素）分解	76
第5章	総合考察	91
参考文献		93
謝辞		100
和文要旨		101
英文要旨		103

第1章 序 論

1.1 既往の研究

耐熱性真核微生物と好熱性細菌

温泉、温排水または海中火山の噴気孔周辺などの高温水圏には、好熱性および耐熱性細菌が生息しており、それらに関する研究例は数多い。 一方、高温水圏由来の真核微生物に関する報告例は極めて少なく (Sorokin and Myers, 1953; Enami and Fukuda, 1977; Ohta et al., 1997)、特に酵母および酵母様微生物に限れば過去にほとんど研究されていない。 最近になって、温泉環境における細菌と酵母(*Debaryomyces vanriji*)の関係が生態学的に調べられ、好熱細菌 *Bacillus* sp. の生産するチアミンは、酵母の生育限界温度を引き上げる可能性のあることが報告された(Rikhvanov et al., 1999)。 しかし、*D. vanriji* という種自体は既知の中温性酵母(以下に定義)に過ぎず、その後の応用研究の展開も認められない。 さらに、この1研究例を除けば高温水圏に生息する酵母および酵母様微生物に関する報告例は存在しない。 温度の高い水圏には(もし存在すれば)どのような酵母様微生物が生息しているのであろうか。

酵母は一般的に中温性であり、その生育可能な上限温度は28°C から38°C の間である(Hagler and Ahearn, 1987)。 他方、Arthur と Watson (1976) は生育可能上限温度について42°C まで増殖する酵母を耐熱性酵母、45°C まで増殖する酵母を好熱性酵母と定義した。 しかし細菌の場合、好熱性細菌は55℃以上で増殖可能な種(または株)であると定義されており (村松, 1997)、従って45℃が生育上限である酵母について「好熱性」と呼ぶことは一般的には違和感があると考えられた。 そこで、1980 年代以降の応用酵母学分野では 40°C 以上で生育する種(株)をまとめて耐熱性酵母と呼ぶようになった(Hacking et al., 1984; Banat et al., 1992)。 以上の背景から本研究では、後者を以って耐熱性酵母を定義することにした。 耐熱性をもつ酵母および酵母様真核微生物種(株)は数が少なく、真正菌類についてみると、酵母 *Kluyveromyces marxianus* var.

marxianus（生育可能上限温度 52°C, Banat et al., 1992）、数種の *Candida* 属酵母（生育上限温度 40 - 48°C, 後藤, 1975）などが知られている程度である。 すなわち、耐熱性酵母は通常の酵母株の生育温度、または人類の生活圏における環境温度と比較してやや高温域まで増殖可能であるに過ぎず、一部の細菌のように、100°C 以上の超高温環境下で生存できる酵母の報告例は無い（Lachance and Starmer, 1998）。

耐熱性酵母に期待される利用価値

好熱性細菌（特に超好熱性細菌）は、生命起源の探求および好熱性酵素の探索という目的から見て、魅力ある研究対象である。 一方、真核生物である耐熱性酵母に期待できる特有の魅力とは何であろうか。 産業酵母は多くの酵母と同様に中温性であるが、近年では酒造のみならず、石油の代替燃料としてエタノールの生産にも利用されている（鈴木ら, 1983）。 また、一部の酵母は炭化水素を分解資化することから、その分解産物である長鎖アルコールや長鎖カルボン酸の生産に利用されており、また環境中に流出した炭化水素類の除去を目的として微生物製剤への応用も試みられている（Mauersberger et al.,1996）。

微生物による燃料用エタノール生産の現状をみると、廃糖蜜などのバイオマスを用いるエタノール生産が世界各地で広く行われるようになった。 バイオエタノールの生産は、中温性酵母による発酵法で行われ、年間生産量は全世界で 2500 万トン、そのうちブラジルではサトウキビを原料として 1200 万トンから 1300 万トンが生産されている (横山, 2001)。燃料用以外にも医薬品用、化粧品用、一般工業用原料等としても生産されており、その製造量は年々増加している。 廃糖蜜等の有機廃棄物を発酵分解してエタノールを生産させる場合には発熱を伴う。 その上、温帯域の夏季および熱帯地方では気温の高さが加わり、発酵槽の温度が 40°C 以上に達する（Shingh et al., 1998）。 一方、酵母によるエタノール生産温度は 30 - 35°C が最適で、40°C 以上では、エタノールはほとんど生産されない（鈴木ら, 1983; Banat et al., 1992）。 従って、夏季や熱帯域においては微生物に適した発酵条件を形成するために、発酵槽の冷却コストが必要となり、エタノール生産は採算性に乏しい。 そこで耐熱性酵母を用いることによって夏季または熱帯域においても、より速く安

価に大量のエタノールを生産する研究が行われて来た。 さらに、エタノールが高温でより高濃度に生産できれば、蒸留のコストも下げることができる。 これらの研究は全て陸上由来の、または既往の保存株から選抜、育種された酵母を用いて行われ (D' Amore et al., 1989; Hacking et al., 1984; Banat et al., 1992; Kida et al., Ward et al., 1995; Brady et al., 1995; Gera et al., 1997; Hack and Marchant, 1998)、高温水圏由来の耐熱性酵母を利用したエタノール生産に関する知見はない。 温度の高い水圏には、高温環境下におけるバイオエタノール生産という使用目的に耐えうる未知の酵母または酵母様微生物が存在している可能性がある。 さらに、もし存在すれば、その高温環境におけるエタノール生産能は既往の陸上耐熱性酵母と比較して勝っているのか、またそれはどのような分類学的、生理学的、および化学的性状をもつ種類であろうか。

次に、酵母による炭化水素の分解除去に関する研究例をみると *Candida maltosa* の *n*-アルカンおよび芳香族炭化水素の代謝が研究されており、環境中に流出して水圏を汚染する炭化水素の分解除去に利用も可能であると考えられる (Cook et al., 1973; Ahearn et al., 1976)。 1990 年度アメリカの例では、水圏を汚染している炭化水素のほとんど (95%) は、工場、油田、船舶からの慢性的な流出に起因しており (大石, 1999)、養殖業や水産生物稚魚の生育場として極めて重要な役割を持つ内湾海水面および内水面の環境を悪化させている。 これらの汚染水域において酵母を微生物製剤として使用するためには、内湾および内水面が外洋に比べてはるかに pH, 温度, および栄養塩濃度の環境要因の変化を受け易いことを考慮する必要がある。 *C. maltosa* は高い炭化水素分解能をもつが、典型的な中温性酵母であり高温に弱い。 その上、高 pH 環境にも弱く、pH > 6.5 の環境では生育不能であることも報告されている (Mauersberger et al.,1996)。 従って、*C. maltosa* の限定された生育特性は水圏におけるバイオレメディエーションへの利用に際し、不利に働くと考えられる。 温度の高い水圏には、高温高活性な炭化水素分解特性を有する未知の酵母または酵母様微生物が存在しているであろうか。大変興味が持たれる。

これまで述べてきたように、酵母は、既に燃料用エタノール生産および炭化水素の資化による有用物質生産に利用されており、流出炭化水素の分解除去への応用も可能と考えられている。 しかし一方で、これらの酵母は我々の生活圏で日常的に発生しうる程度の

高温環境下での利用に問題があることも事実である。 従って、耐熱性酵母に期待される能力とは、「中温性酵母の生育温度よりやや高い温度域 (35-50℃程度) で、我々が既に酵母を産業利用している場合と同じ仕事を効率的に行えること」であると考えられる。

1.2 本研究の目的

本研究では、高温水圏 (温泉排水) から高温におけるエタノール生産能または炭化水素資化能を有する真核性微生物株の分離を試み、分類学的、生理学的、生化学的および分子系統に関する諸性状を明らかにし、従来から産業用に用いられて来た株または頻繁に試験研究されて来た株と比較することを目的とした。

なお、本研究で扱う真核微生物は酵母および従属栄養微細緑藻類に限定した。

第2章　水圏の耐熱性酵母およびプロトテカの基礎的性状

この20年間、数は限られているものの、40°C 以上の高温環境下に増殖してエタノール生産能を示す酵母株の分離および探索に関する研究が行われてきた。 まず、耐熱性酵母の育種に関する研究例をみると、プロトプラスト融合による方法 (Seki et al., 1983; Kida et al., 1992)、半数体同士の交雑による方法 (Kawamura 1999) などがある。 さらに野生酵母から耐熱性を持つ株を分離する方法 (Banat et al., 1992)、および多数の保存酵母株から耐熱性の高い株を選抜する方法 (Hacking et al., 1984; D'Amore et al., 1989) も見られる。 しかしながら、高温環境下におけるエタノール生産という目的に沿って、高温水圏から耐熱性酵母が分離された例はない。 さらに、高温で原油や炭化水素類を高効率に分解しうる酵母および酵母様真核微生物に関する知見も全く知られていない。

以上のように、高温水圏に由来し、高温で高効率にエタノール生産または炭化水素類の分解を行うことが可能な真核微生物の探索は全く未知の領域であり、このような応用微生物学的な観点のみならず、分類学および生化学的にも意義があると考えられる。 本章では、温泉排水から耐熱性を有する酵母様微生物の分離を行い、その基礎的性状を明らかにすることを目的とした。

2.1　温泉排水から酵母様真核微生物の分離

西谷 (1997) は焼酎の醸造に適した酵母の探索を目的として、様々な環境から多数の野生酵母の分離を試みたところ、得られた株の温度特性について予想外の事実を見出した。 東南アジアの諸地域から分離された主な酵母のほとんどは低温ないし中温域 (30℃) 以下に増殖適性を有し、現在使用されている焼酎酵母に比べて低温型の酵母であった。 一方、中国東北地域 (旧満州) の高粱酒醪および熊本県天草沖の海底から分離した酵母のなかには、40℃以上の温度にも耐えうる高温型の酵母も存在したという。 これらの結果は、酵母の生存する環境温度と酵母の温度特性が必ずしも一致しないことを示している。 しかしながら本研究では、環境温度が高く保たれているような水圏であれば、

そこに生育する真核微生物には耐熱性が必要であり、高温に適応可能な微生物のみを選択的に取得できる可能性があると考えた。 しかし第1章で述べたように、既知の耐熱性酵母の生育限界温度は 50℃程度に過ぎず、温泉の源泉および海中火山の噴気孔に代表される極めて水温の高い場所から酵母様微生物が得られる可能性は低い。 本研究ではこれらの事実を考慮し、水温が 40℃程度まで低下した温泉排水から酵母様微生物の取得を試みた。

実 験 方 法

[温泉排水の採水]

温泉排水試料は、1999 年 4 月 30 日、静岡県下田市蓮台寺温泉の温泉排水溝から採取した。この排水溝では、少なくとも試料採取日には、常に温泉水の流入が認められた。 採水場所は2地点であり、それぞれの地点の水温は 40℃および 35.5℃であった。 あらかじめオートクレーブで高温高圧滅菌 (121℃ - 20 min) したポリエチレン製の採水ビンを用いて、1 採水地点につき 5L ずつ (合計 10 L) の温泉排水を採取した。 水温 40℃の地点は温泉水が排水溝へ流入している場所である。 水温 35.5℃の地点は、同じ排水溝の約 50 m 下流に位置し、その場所を境にして下流側には熱帯性魚類 (グッピーおよびモザンビークティラピア) の生息が認められた。 これら2種の魚類は、稚魚から成魚まで様々な成育段階の個体が多数観察されたことから、排水溝中で繁殖していると考えられた。 この事実は、採水を行った排水溝が一年中、高温に保たれた水圏環境を提供していることを示し、もし酵母様真核微生物が排水中に存在するならば、それらは高温の水圏環境に適応したものである可能性が高いといえよう。

[酵母様真核微生物の分離]

上記の2地点から得た各 5 L の排水は各々別に、0.45 μm Omnipore Membrane Filter (Millipore Corporation, Bedford, MA) を用いて 5 mL まで排水中の微生物を含む微粒子を濃縮した。 この 5 mL の試料水 を 100 μL ずつに分けて, 0.01% chloramphenicol を含む酵母用の増殖培地である YPD 寒天培地 (2% glucose, 2% peptone, 1% yeast

extract, and 2% agar) に塗布し、40℃で 3 日間インキュベートした。

培地上に出現した酵母様コロニーから釣菌し、細胞の形態を光学顕微鏡下で観察した。それぞれの単一コロニーに由来する酵母様真核微生物株は、40℃でコロニーの採取と画線培養を YPD 寒天培地上で 5 回繰り返すことにより得られた。 全ての株は 25℃において YPD 寒天培地上で継代培養を行った。

結 果 お よ び 考 察

水温 40℃の排水から得られた酵母様微生物は 18 株であった。 一方、水温 35.5℃の排水から得られた数は 40℃の排水由来の株数に比較して増加し、30 株であった。 顕微鏡観察の結果、合計 48 株は採水場所に関わらず、Fig. 1 に示すとおり、形態的特徴から明らかに 4 タイプ (グループ A,B,C および D) に分類された。 40℃の排水試料より得た酵母株を RND1 –18、35.5℃の試料から得られた酵母株を RND A1 – D7 と命名した。 各グループに属する株数と採水地点の温度の関係を Table 1 に示す。 各グループのうち、株数が最も多いのは採水場所の水温の違いに関わらず、グループ A に属するものであった。その他の 3 グループについては、それぞれほぼ同数株ずつが存在した。 A,B および C に属する株の全ては、YPD 寒天培地上で出芽による良好な増殖を示したが、 D については常に内生胞子の放出によってのみ増殖し、酵母の特徴である出芽は認められなかった。

2.2 高温域においてグルコースの発酵能または *n*-ヘキサデカン資化能をもつ株のスクリーニング

前述の結果から、温泉排水には多数の酵母様微生物が存在することが明らかになった。ここでは得られた 48 株の中から、高温においてグルコースの発酵能および *n*-ヘキサデカン資化能を有する株の選抜を行った。

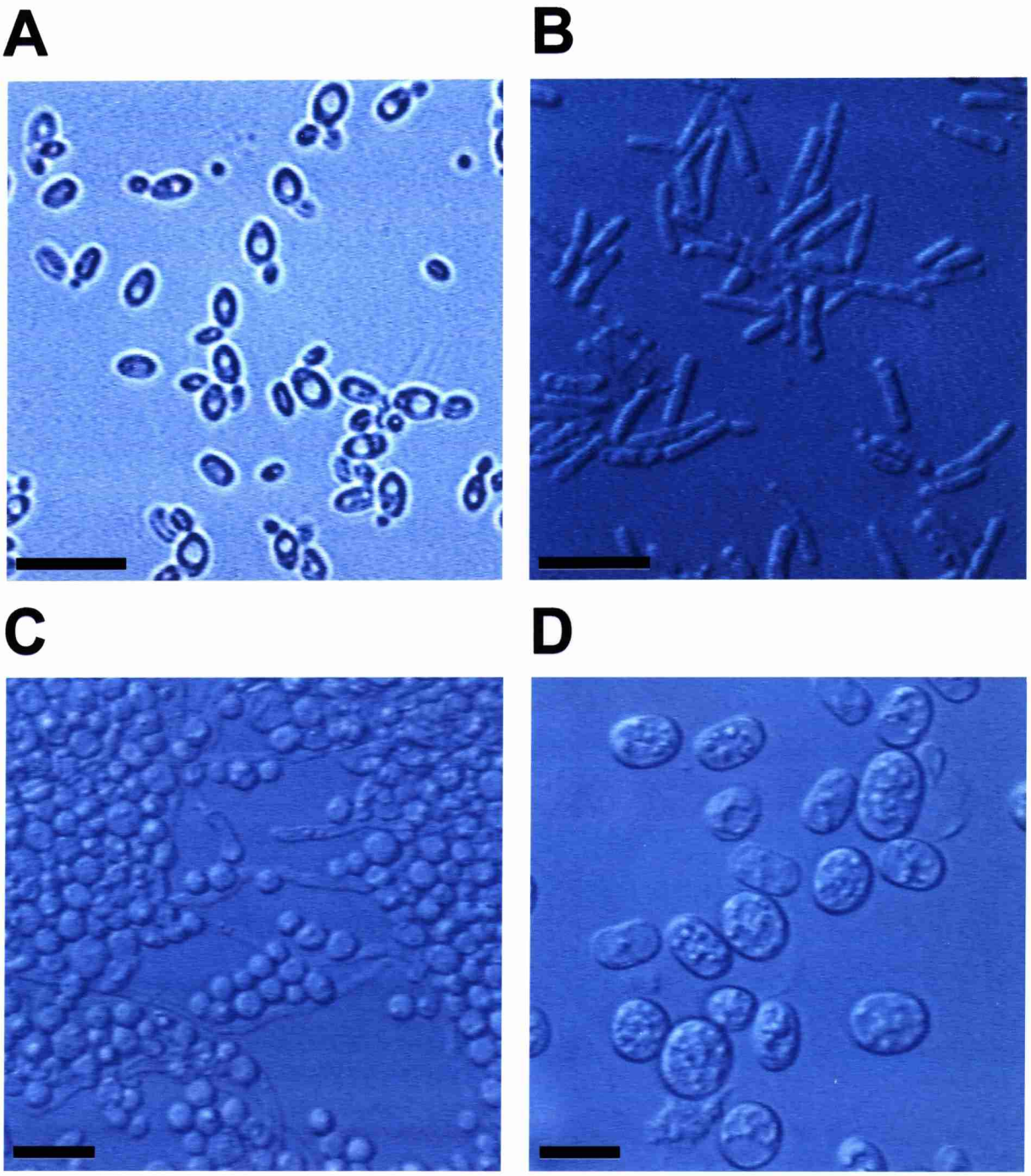

Fig.1 A,B,C,D Cell morphology of the thermotolerant yeast-like isolates after growth on YPD agar plates for 5 d at 25°C. *Bar* 10 µm. (A) RND13 of group A, (B) RND14 of group B, (C) RND17 of group C, (D) RND16 of group D.

Table 1 Number of yeast-like isolates obtained from water samples at the Rendaiji hot spring.

Morphological group	Water temperature at the site of sampling	
	40℃	35.5℃
A	6	11
B	5	4
C	3	7
D	4	8

実 験 方 法

[ダラム管を用いた高温域における発酵能の確認]

2.1 で分離された 48 株から、40℃および 45℃で強いグルコースの発酵能を有するものを Barnett ら (1990) の方法に従って選抜した。

(1) 培地

ダラム管を入れた 10 mL サイズの試験管に、酵母用の増殖培地である 5 mL の YPD 液体培地 (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract) を加え、アルミ製キャップを被せた後、オートクレーブで高温高圧滅菌 (121℃ - 20 min) した。

(2) 植菌と発酵条件

各株は YPD 寒天培地上で 5 日間培養した後、一白金耳量の細胞を無菌的に上記の液体培地を含む試験管に植菌し、14 日間、40℃および 45℃でインキュベートした。 両方の温度条件において、試験開始後の 24 h 以内にダラム管内に目視できる量のガスが蓄積した株を、特に高温でグルコースの発酵能が優れている (強い) と判定し、スクリーニング通過株とした。

[高温域における *n*-ヘキサデカン資化能]

(1) 培地

10 mL サイズの試験管に、酵母用の最少培地で炭素源を含まない 0.67% YNB 培地 (Difco yeast nitrogen base without amino acids) 4.95 mL を入れ、その上に 0.45 μm Omnipore Membrane Filter を通して滅菌した 50 μL の *n*-ヘキサデカンを重層した (終濃度 1% (v/v))。 試験管内を好気的かつ無菌条件に保つために、試験管口を発泡シリコン栓で塞いだ。 Table 2 に示すように、YNB は微量成分であるビタミン以外に炭素源を含まないので、*n*-ヘキサデカンがほぼ唯一の炭素源となる。

(2) 植菌と培養条件

各株は YPD 寒天培地上で 5 日間培養した後、0.85% NaCl 中で洗浄した細胞を無菌的に、初濃度 2×10^5 cells/mL になるように上記液体培地を含む試験管に植菌し、14 日間、35℃および 40℃でインキュベートした。 35℃または 40℃のいずれかの温度条件で、試

Table 2 A formula of yeast nitrogen base w/o amino acids (Difco).

Chemicals	Conc.
Nitrogen source (g/L)	
$(NH_4)_2SO_4$	5
Growth factors (μg/L)	
Para -Aminobenzonic acid	200
Biotin	20
Folic acid	2
myo -Inositol	10000
Nicotinic acid	400
Pantothenate (Ca)	2000
Pyridoxine hydrochloride	400
Riboflavin	200
Thiamine hydrochloride	400
Trace element sources (μg/L)	
H_3BO_4	500
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	40
KI	100
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	200
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	400
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	200
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	400
Salts (g/L)	
KH_2PO_4	0.85
K_2HPO_4	0.15
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
NaCl	0.1
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1

験開始後の 1 週間以内に、目視観察で明瞭な増殖が認められたものをスクリーニング通過株とした。

結 果 お よ び 考 察

[高温域において発酵能をもつ株]

40℃または 45℃で YPD 液体培地の 2%グルコースを発酵可能な株数および株名を Table 3 に示す。 40℃における発酵試験結果をみると、全ての株は 2 週間以内に目視可能な量のガスを発生した。 しかしながら、スクリーニングの条件である 24 h 以内に発酵した株数は少なく、9株であった。 これら9株のうちの 7 株は、水温が 40℃の排水試料に由来する株であり、35.5℃の排水由来の株はわずか 2 株であった。 また発酵温度 45℃では、40℃におけるスクリーニングを通過した 9 株中の 8 株が 24h 以内に発酵を示した。 この 8 株を最終スクリーニング通過株とし、それらの名称は Table 3 にアステリスクを付けて示す。 なお、45℃では、24h 以降に発酵能を示す株は認められなかった。

次に 40℃と 45℃の両方の温度条件において 24 h 以内に発酵が確認された株、すなわち最終的にスクリーニングを通過した 8 株の内訳を細胞形態に基づくグループ別に示すと、グループ A に属するものが 6 株、B が 1 株、C が 1 株であり、グループ D に属するものは存在しなかった。

Hacking ら (1984) は、14% (w/w) グルコースを含む酵母用発酵培地を用いて、糖発酵能を有する酵母 7 属 55 株の 37℃および 40℃におけるエタノール生産量を調べた。その結果、エタノールの発酵収率が 50%を超えた株数は、37℃では 28 であったのに対し、40℃ではわずか 12 であった。 この研究結果は、3℃の温度上昇が急激な発酵能低下を招くことを示している。 つまり発酵性酵母にとって、40℃前後の温度条件はより低温域で本来有している発酵能を同レベルに維持できるか否かという点で、非常に重要な温度帯であることがわかる。 本研究のスクリーニングで得られた 8 株の酵母様微生物のもつ、高温域におけるエタノール発酵能は、本章 2.3 および第 4 章 4.1 で詳細に検討する。

Table 3 Number of the yeast-like strains capable of fermentation and/or growth at elevated temperatures.

Type of performance	Origin and morphological group of the strains							
	40℃ [a]				35.5℃ [b]			
	A	B	C	D	A	B	C	D
Fermentation within 24 h								
at 40℃	RND 8*, 12*, 13*, 18*	RND 14*	RND 17*	RND 16**	RND A-2*, D-4*	-	-	-
at 45℃	RND 8*, 12*, 13*, 18*	RND 14*	RND 17*	-	RND A-2*, D-4*	-	-	-
Growth on *n*-hexadecane								
at 35℃	-	-	-	RND 7, 9, 10, 16**	-	-	-	RND A-1, A-5, B-2, C-1, D-2, D-3, D-6, D-7
at 40℃	-	-	-	-	-	-	-	-

[a] Strains originated in the water sample at 40℃
[b] Strains originated in the water sample at 35.5℃
* Strains selected from a viewpoint of fermentation at 40℃ and 45℃
** Strains selected from a viewpoint of growth on *n*-hexadecane at 35℃

[高温域における *n*-ヘキサデカン資化能]

35℃で 1% (v/v) *n*-ヘキサデカンを資化して生育した株は、水温 40℃の排水由来の株が 4 株、水温 35.5℃の排水由来のものが 8 株であった。 全ての株の細胞形態はグループ D に属するものであった。 しかし、40℃において資化能を示す株は認められなかった。

過去に炭化水素資化酵母の資化・分解特性について、高温域におけるその性能を具体的に述べた研究例はない。 しかし常温で *n*-アルカン類の資化能が高く、その分解代謝が詳細に研究されている *Candida maltosa* は、中温性酵母であることを考慮すると、恐らく 40℃付近の温度条件では *n*-アルカン類の資化・分解が困難であろうと予想される。 本研究の第4章 4.3 では、上記の *n*-ヘキサデカンを資化して生育した 12 株の中から 1 株を選び、その高温域における *n*-アルカン類の分解能を詳細に検討した。 この 1 株は、35℃で *n*-ヘキサデカンを資化するばかりでなく、前述の高温域におけるグルコースの発酵能試験において、40℃で 24 h 以内に発酵能を示した株である (45℃では発酵不可)。 なお、ここで選抜した 1 株の名称は後述するごとく酵母ではなく、*Prototheca zopfii* の亜種であり、Table 3 にアステリスクを 2 つ付けて示してある。

2.3 高温域におけるグルコースの発酵特性

2.2 で目視観察の結果、高温域における活発な発酵が確認された 8 株は、実際にどの程度のエタノール生産能を有しているであろうか。 ここではグルコースを発酵できる上限温度および 40℃ - 50℃ におけるエタノール発酵収率を明らかにした。 また、35℃で *n*-ヘキサデカン資化能をもつ株についても、グルコースを発酵できる上限温度を調べた。

実 験 方 法

[グルコースを発酵できる上限温度]

(1) 供試株

2.2 において、高温域における発酵能または *n*-ヘキサデカン資化能から選抜した 9 株 (Table 3 でアステリスクをつけた株) について、グルコースを発酵できる上限温度を調べ

た。

(2) 培地

ダラム管を入れた 10 mL サイズの試験管に、5 mL の YPD 液体培地 (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract) を加え、アルミ製キャップを被せた後、オートクレーブで高温高圧滅菌 (121℃ - 20 min) した。

(3) 植菌と発酵条件

各株は YPD 寒天培地上で 5 日間培養した後、一白金耳量の細胞を無菌的に上記の液体培地を含む試験管に植菌して 24 h インキュベートした。 発酵は、24h 以内にダラム管内に蓄積するガスによって確認した。 初めに 30, 35, 37, 40, 42 および 45℃の各温度で実験を行い、45℃で発酵が確認された場合は、さらに 45℃から 1℃間隔で培養温度を上昇させ、ガスの発生が認められなくなる温度を決定した。

[40°C 以上の高温域におけるエタノール発酵収率]

これまでの実験では、発酵能の有無を「目視しうる量のガスをグルコースから発生する」という指標を用いて判定してきた。 しかし、ガスの発生を伴うグルコース嫌気代謝では、酵母では主にエタノール発酵により CO_2 を発生するのが普通であるが、H_2 のみを発生する発酵を行う可能性は否定できない。 また、本研究では高温における高効率なエタノール生産も目的としているため、エタノール発酵能の強弱について定量的に調べる必要がある。ここでは 40℃以上の高温条件で完全嫌気条件の下、温泉排水由来の真核微生物が持つエタノール発酵収率について検討した。

(1) 供試株

前述した [グルコースを発酵できる上限温度] で使用した温泉排水由来の 9 株の内、*n*-ヘキサデカン資化能によって選抜された RND16 株を除く 8 株を用いた。

(2) 植菌と発酵条件

全ての株は YPD 寒天培地上で 36 - 48 h (温度条件:25℃) 培養した後、1 白金耳量の細胞を YPD 液体培地 10mL を含む L 字型試験管に植菌した。 各々の酵母株は 37℃ - 120rpm の条件下で 1 日間振とう培養を行った。 さらに、この培養液から 200μL を採取し

て、500 mL サイズの枝付羽付三角フラスコ中に用意した 100mL の YPD 液体培地に植菌し、37℃ - 120rpm の条件下で定常期初期まで振とう培養を行った。 この培養液を遠沈管に 45mL ずつ採取し、1600 ×*g* で 5 分間の遠心分離を行い、沈殿した菌体から湿菌体 0.1g を採取した。 この湿菌体を 5%グルコース 10mL によく懸濁し、BBL GasPak Anaerobic System Enveropes (Becton Dickinson and Company) を備えた嫌気ジャーの中で、40, 45 および 50℃の完全嫌気条件下で 24 h 発酵を行った。 この実験では対照株として中温性の産業酵母 (ビール酵母 BSRI YB23-3 株) を用い、温泉排水由来の株と同一の嫌気ジャーで発酵を行った。 ビール酵母は高温で増殖および発酵が不可能であったため、培養と発酵は全て 25℃で行った。 この場合、発酵は 120 h 行った。

(3) エタノール濃度および発酵収率

発酵液から遠心分離によって菌体を除去した後、上層液をねじ口試験管に移した。 これを 80℃で 15 分間水浴して菌体外酵素を失活させた後、脱イオン水で希釈してエタノール濃度の測定用サンプルとした。 エタノール濃度は Beulter (1984a) の方法に従い、F-kit Ethanol (Boehringer Mannheim Co., Ltd.) を用いて行った。 エタノール発酵収率はゲイ・ルサックの式に従い、1 モル のグルコースを基質として、2 モルのエタノールが生成された場合を 100%として、実際にエタノールが生成された割合(%)で示した。

結 果 お よ び 考 察

[グルコースを発酵できる上限温度]

温泉排水由来の酵母様微生物がグルコースを発酵できる上限温度を Fig.2 に示す。 供試 9 株の内、グループ A に属する 6 株は全て 48℃まで発酵が認められた。グループ C に属する RND17 株の上限温度も 47℃と高かったが、グループ D に属する RND16 株は上限温度がやや低く、42℃まで発酵可能であった。 しかし、RND16 株は元々高温における *n*-ヘキサデカンの資化能によってスクリーニングされた株であり (本章 2.2)、 YPD 培地中のグルコースを 40℃では発酵するが、45℃で発酵できないことが既に明らかにされているので、この結果は妥当なものである。 一方、特筆すべき結果が得られたのはグループ B に属する RND14 株であり、発酵が 55℃まで確認された。なお、この株は 56℃培養でガス

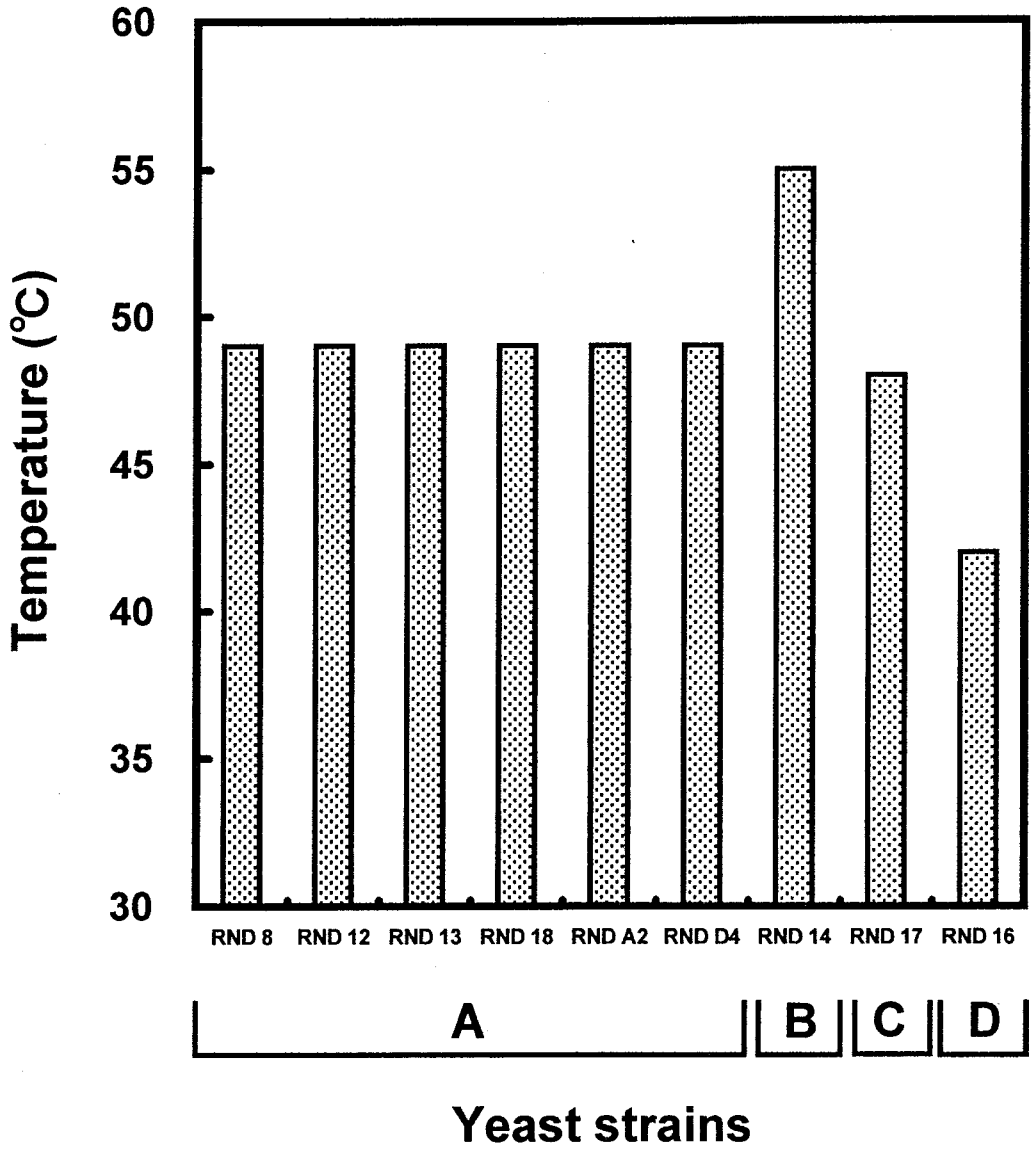

Fig. 2 Maximum fermentation temperature of yeast-like isolates on YPD liquid medium. RND8, 12, 13, 14, 16, 17, 18 : yeasts obtained from the drainage at 40℃. RND A2, D4 : yeasts obtained from the drainage at 35.5℃. Morphological groups are shown below the figure.

を発生しないが、実験終了後に培養温度を 55℃に下げると 4 h 後にはガスを発生した。なお、この特性には再現性が認められた。 すなわち、RND14 株の細胞の少なくとも 1 部は、56℃の高温下で 24 h 生存していたことになる。 既往の知見では、子嚢菌酵母 *Kluyveromyces marxianus* には 50℃までエタノール発酵可能な耐熱性株も知られているが (Banat et al., 1992)、55℃で発酵を行う酵母は報告例をみない。

[エタノール発酵収率]

Figure 3 に、温泉排水由来の 8 株のエタノール発酵収率を示す。 本試験では栄養塩を添加しない条件で発酵させたにもかかわらず、40℃では、グループ A に属する株が高い収率を示した。

とりわけ、RND13 株は 72.1%と最も高い値を示し、ビール酵母が 25℃で 120 h の発酵後に示した 57.0%の値をはるかに上回った。 発酵温度を 45℃まで上昇させると、6 株は発酵収率の低下が認められたが、グループ A に属する RND8 株およびグループ B の RND14 株は、その値が 40℃で発酵させた場合に比較して上昇した。 なお、発酵温度を 50℃まで上昇させると、全ての株のエタノール生産量は極度に低下し、株間で有意な差は認められなかった。 全体を通してみると、RND13 株は 40℃で最も高い発酵収率を示すばかりでなく、45℃においても比較的高い値を保っていることから、本研究において温泉排水から得られた酵母様微生物の中では、40℃以上の高温におけるエタノール生産に最も適した株であると考えられた。 RND13 株を用いた産業レベルの高濃度グルコースの発酵については、第 4 章 4.1 で詳細に述べる。

2.4 増殖の温度依存性

温泉排水由来の株の中には、高温域におけるエタノール生産能または *n*-ヘキサデカン資化能をもつものが存在し、少なくとも 40℃で生育可能であった。 しかし、これらの増殖最適温度と増殖可能上限温度が中温性酵母に比較してどの程度に高いのかについては不明であるため、次に増殖の温度依存性を検討した。

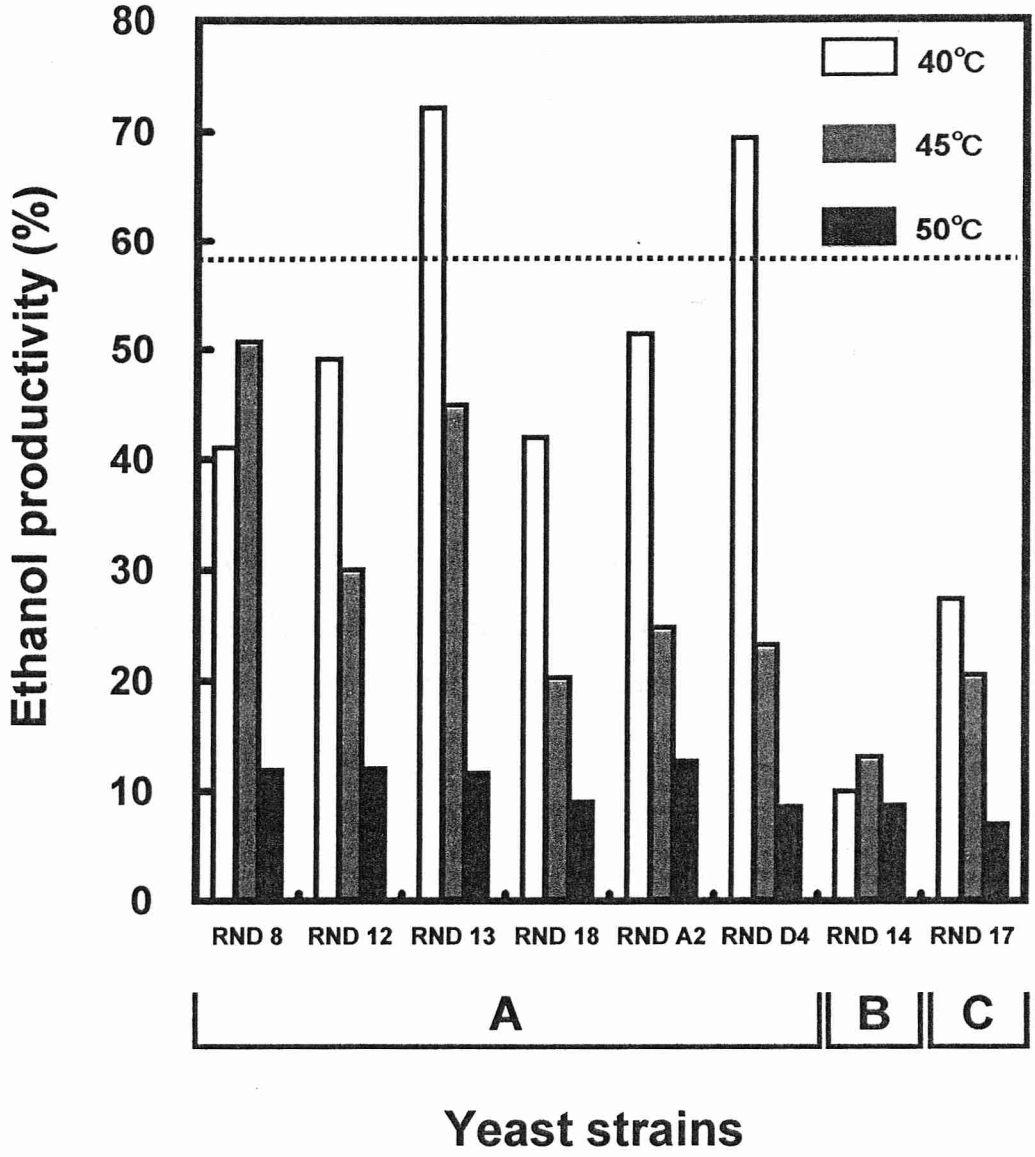

Fig. 3 Ethanol productivity of thermotolerant yeast-like isolates. For eight strains of thermotolerant yeasts, fermentation was carried out for 24 h at 40℃, 45℃, and 50℃. For BSRI YB23-3 (brewer's yeast), fermentation was carried out for 120 h at 25℃. A dotted line across the figure shows the data of BSRI YB23-3. Morphological groups are shown below the figure.

実 験 方 法

[増殖に及ぼす温度依存性]

(1) 供試株

高温域におけるエタノール生産能または *n*-ヘキサデカン資化能から選抜した 9 株 (Table 3 のアステリスクを付けた株) について、増殖の温度依存性を調べた。 対照株として中温性酵母 2 株を使用し、温泉排水由来株の高温域における増殖能の優位性について検討した。 この試験に用いた中温性酵母株は、ビール酵母の一種である *Saccharomyces cerevisiae* BSRI YB23-3 株および *Debaryomyces hansenii* BP19 株である。 BSRI YB23-3 株はサッポロビール(株) 醸造技術研究所より分譲されたものである。 BP19 株は、東京水産大学食品生産学科生化学研究室が東京都大田区に位置する東京都立野鳥の森公園内の汽水池から分離し、継代培養されてきたものである。

(2) 培地

10 mL サイズの L 字型試験管に、10 mL の YPD 液体培地 (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract) を加え、試験管内を好気的かつ無菌条件に保つために、試験管を発泡シリコン栓で塞いだ後、オートクレーブで高温高圧滅菌 (121℃ - 20 min) した。

(3) 植菌と培養

全ての株は YPD 寒天培地上で 36 - 48 h 培養 (温度条件: 25℃) した後、初濃度 OD_{660} = 0.1 となるように上記培地を含む L 字型試験管に植菌した。各々の株は 20 – 45℃の温度条件の下、120rpm で振とう培養を行った。培養中の試験管は 2 h 毎に取り出し、濁度計 MINI PHOTO 518 (Taitec Co., Ltd) により、細胞の増殖に由来する濁度変化を調べた。予め濁度と各株の細胞濃度の関係はトーマ血球計を用いて調べておき、各計測時における細胞濃度は実験終了後に算出した。最大増殖速度は、次の式により求めた。

$$\mu_{max} = (\log N_{t2} - \log N_{t1}) / \log 2\ (t2 - t1)$$

N_{t1} はある時点における細胞濃度 (cells/mL)、N_{t2} はその 2 h 後の細胞濃度 (cells/mL) を示す。

結 果 お よ び 考 察

[増殖速度および定常期における細胞濃度の温度依存性]

温泉排水由来の9株の内、グループAに属する全て (6株) は各温度条件でほとんど同一の増殖曲線を示した。 従って、ここではその中の1株であるRND13株のデータのみを記載した。増殖速度に及ぼす温度の影響をFig.4Aに示す。 温泉由来の各グループから1株づつを合計4株の増殖速度をみると、その最大値 (0.09 – 0.81 h^{-1}) は 全ての株について35または37℃で得られた。一方、2株の中温性酵母はより低温側の30℃で最大増殖速度を示した。 温泉排水由来の株は、20 – 30℃の比較的低い温度条件下では、高温域に比較して増殖速度は低くなるが、定常期における細胞濃度は高温域に比較して遜色なく、20 - 42℃の幅広い温度域でほぼ同じ細胞濃度まで到達することが示された (Fig. 4B)。 一方、中温性酵母は30℃を越えると、定常期に得られる細胞濃度は温度の上昇とともに低下した。以上の結果をまとめると、温泉排水由来の酵母様微生物は常温で中温性酵母と同様に生育するが、より高温まで適応して増殖可能であるという特徴をもっていた。なおFig.4に示すように、温泉排水由来の4株の全ては40℃で良好な増殖を示すことから、耐熱性真核微生物と呼んで差し支えないと考えた (第1章参照)。 さらにこれら4株は、既に高温域におけるグルコースの発酵能あるいは *n*-ヘキサデカンの資化能に関するスクリーニングを通過しており、応用研究への可能性を有しているという点で価値があると考えられる (本章2.2および2.3)。本研究では、この4株 (RND13, RND14, RND16 および RND17株) の内、40℃で高エタノール発酵収率をもつRND13株および、35℃で *n*-ヘキサデカンの資化能を示したRND16株に的を絞って行った。 ただし、分類学上の位置に関してはRND14およびRND17株についても検討した。

2.5 生理学的性状に基づく酵母の同定

第1章で述べたように、高温水圏由来の真核微生物に関する研究例は非常に少なく、温泉排水中にはどんな種類の酵母様微生物が含まれているのかは分類学的にも興味深い。 ここでは代表的な4株について生理学的性状を中心とした方法に従って、種の同定を行った。

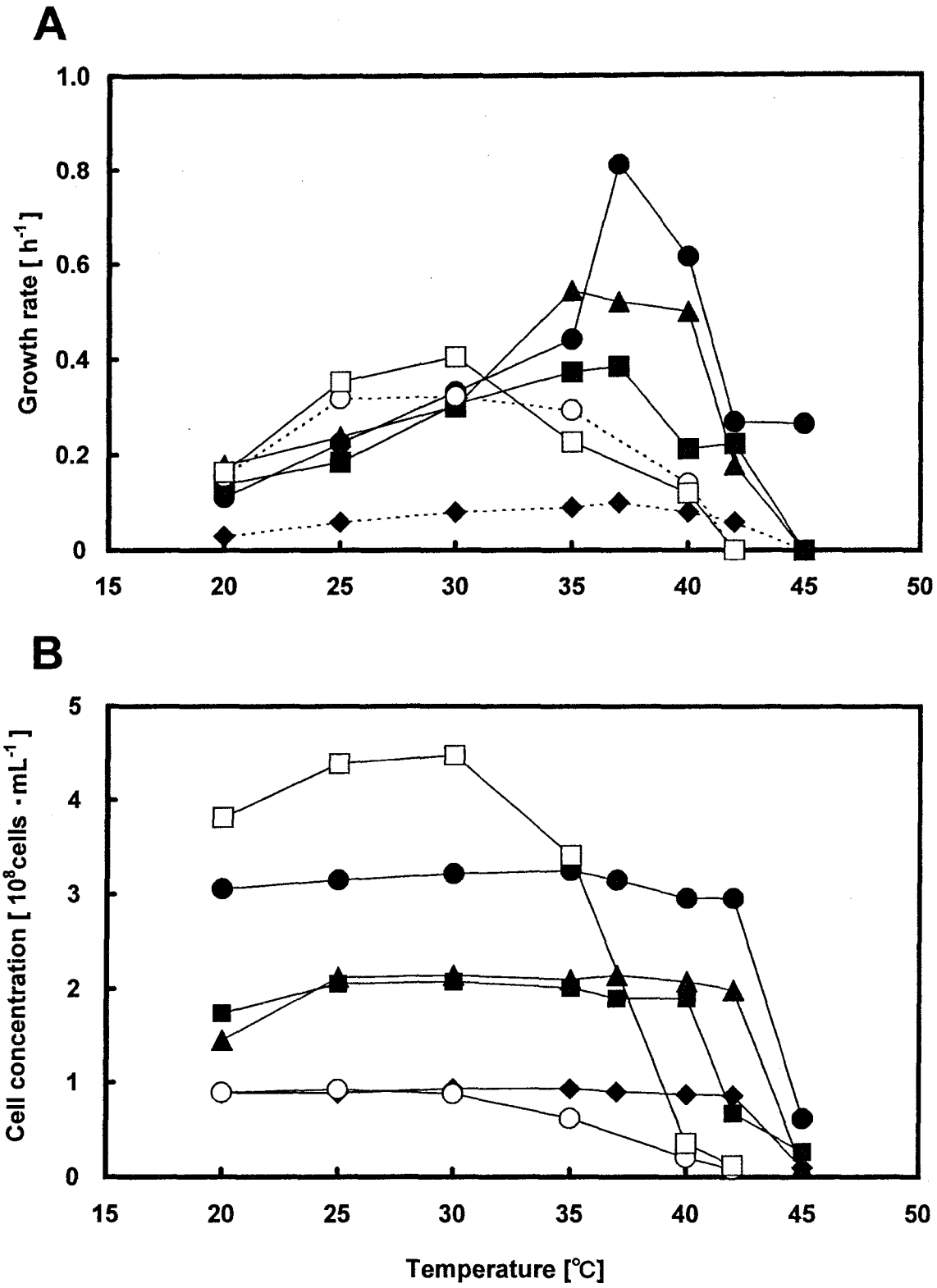

Fig. 4 Effect of temperature on growth rates (A) and on cell concentrations at stationary phase (B) of the yeast-like isolates. ●: RND13, ■: RND14, ▲: RND17, ◆: RND16, ○: BSRI YB23-3 (brewer's yeast), □: BP19 (*Debaryomyces hansenii*)

実 験 方 法

本章 2.1 で細胞形態に従って分類したグループ A,B,C および D から、それぞれ 1 株ずつを 2.4 で示した理由によって選び (グループ A: RND13 株, グループ B:RND14 株, グループ C: RND17 株, グループ D: RND16 株)、生理学的性状を中心とした方法で種の同定を行った。 同定試験は Barnett et al. (1990) および Kurtzman and Fell (1998) の方法に従って 68 項目の試験を行い、その結果と検索ソフト (J.A. Barnett: Yeast Identification Program, Version 4. Cambridge University Press, New York, 1996) による検索結果によって該当種を推定した。

[糖の発酵能]

糖類の微好気環境下における分解・発酵能に関する試験は 7 項目である。 各 50mM の糖を 1 種類とダラム管を含む 5mL の YNB 培地に、 10^7 cells/mL の細胞濃度になるように各株を植菌して、25℃で 4 週間培養した。 発酵能は、ダラム管内に目視できる量のガスが蓄積した場合を陽性と判定した。

[各種炭素源および窒素源の資化能]

単一種の有機化合物を唯一の炭素源として与えた場合の資化能 (増殖) に関する試験は 43 項目である。 酵母細胞は 0.85% NaCl で 2 回洗浄した後、各 50mM の炭素源を 1 種類のみ含む 5mL の YNB 培地に 2×10^5 cells/mL の細胞濃度になるように植菌し、25℃で 4 週間培養した。 炭素源の資化能は目視観察により増殖の有無で判定した。

単一種の窒素化合物を唯一の窒素源として与えた場合の資化能 (増殖) に関する試験は 9 項目である。 試験開始前に、酵母細胞は 0.85% NaCl で 2 回洗浄した後、窒素源を含まない 5mL の 1.17% YCB 培地 (Difco yeast carbon base, 以下 YCB 培地) 中で、10 日間 窒素源を絶った。 細胞は遠心分離 (1600×*g*) で回収し、各 5mM の窒素源を 1 種類含む 5mL の YCB 培地 (Difco yeast carbon base) に 2×10^5 cells/mL の細胞濃度になるように植菌し、25℃で 4 週間培養した。窒素源の資化能は目視観察により増殖の有無で判定した。

[Diazonium blue B テスト]

Diazonium blue B テストは、子嚢菌酵母と担子菌酵母を区別するために行った。各株を25℃で16日間、YM寒天培地 (0.3% malt extract, 0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 1% glucose, and 2% agar) で培養した後に、55℃で16 h 放置した。その後、培地上のコロニーをDBB試薬に浸し、室温で2分以内に暗赤色に染まった場合を Diazonium blue B reaction 陽性 (担子菌酵母) とした。対照株として、*Saccharomyces cerevisiae* (negative control) および *Trichosporon ovoides* (positive control) を用いた。なお、DBB試薬は Diazonium blue B salt (SIGMA, St. Louis, MO) を 1mg/mL の濃度になるように、4℃の 0.1M Tris - HCl buffer (pH 7.0) 中に試験直前に溶解して調製した。

[菌体外デンプン様多糖類の有無]

Cryptococcus 属を含む一部の酵母は、デンプンに酷似する多糖類を菌体外に生産する。この多糖類の有無は炭素源の資化能試験を終了した時に、2～3 滴のヨウ素液を培養液に入れ、培養液がヨウ素デンプン反応によって青から緑色を呈した場合を、陽性と判定した。

[シクロヘキシミド耐性の有無]

シクロヘキシミドは真核細胞のリボゾームにおけるペプチド鎖延長における転移反応を阻害することにより、タンパク質合成を阻害する。しかし、一部の酵母はシクロヘキシミドに対して耐性があり、その耐性の程度は分類の指標となりうるため、本研究では 0.01%および 0.1%のシクロヘキシミドに対する各株の耐性を試験した。各株は 0.01% および 0.1%のシクロヘキシミドを含む YNB 液体培地中で、25℃ - 120rpm の条件下で 28 日間振とう培養を行い、増殖の有無を確認した。

[グルコースを基質とする酢酸の好気的生産]

Dekkera および *Brettanomyces* 属の酵母はグルコースから好気的に多量の酢酸を生産するため、この性質はこれらの属の酵母を他属と区別するのに有効である。酢酸生産性試験用寒天培地 (5% glucose, 0.5% yeast extract, 0.5% $CaCO_3$, and 2% agar) 上

で各株を培養し、培地中に溶解せず均一に分散している$CaCO_3$ 粉末が10日以内に株の生産する酢酸によって中和されることによって、コロニーの周囲に透明なハロを形成した場合を、陽性と判定した。

[細胞およびコロニーの形態]

偽菌糸、菌糸、内生胞子 および外生胞子 (分生胞子または担子胞子) の形成能は、アセテート培地 (0.25% yeast extract, 0.1% glucose, 0.98% potassium acetate, 0.12% NaCl, 0.07% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 2% agar)、ゴロドコア培地 (0.1% glucose, 1% peptone, 0.5% NaCl, and 2% agar)、コーンミール寒天培地 および V8 寒天培地を用いて確認した。 コーンミール寒天培地は、42g のトウモロコシを 1L のイオン交換水に漬けて60℃で 1h 放置し、ろ紙 (Whatman No. 1 filter paper, Whatman International Ltd., Maidstone, England) を用いてろ過した後、ろ液に 12g の寒天を加えて、高温高圧滅菌 (121℃ - 20 min)したものを用いた。 V8 寒天培地 (V8 vegetable juce (Campbell Soup Company Ltd., Camden, NJ) 350 mL, 0.5% baker's yeast, 1.4% agar) は、80℃-90℃で 10 分間加熱処理を行った後、寒天が固化する前に 1M HCl を適量添加して pH 6.8 に調整した。 これらの培地の特徴は、酵母にとって通常の増殖用培地よりも (高濃度のカリウム塩およびナトリウム塩の存在等の) 過酷な生育環境を提供し、菌糸および胞子の形成を促進する点にある。 各株をこれらの培地に植菌して 18℃および 25℃で培養した。1ヶ月、3ヶ月 および 6ヶ月後にそれぞれの培地上に生育した細胞の形態を、光学顕微鏡で観察した。

各株の有する色素 (カロテノイド) の生産能は、YPD 寒天培地で培養した際のコロニーの色がピンク、橙 または赤色である場合を陽性と判定した。 なお、酵母の中にはグルコースからカロテノイド以外に黄色系の色素としてリボフラビン (水溶性物質) を産生するものがある。 この可能性を否定するために、上記の判定が陽性の株は 50mM のグルコースを含む YNB 液体培地中で再試験を行うことにした。

結果および考察

[生理学的手法による同定結果]

同定を行った4株の生理学的性状試験結果をTable 4に示す。68項目の全試験結果を酵母同定ソフトに入力すると、RND13株（グループA)、RND14株（グループB）およびRND17（グループC）株はそれぞれ、*Torulaspora delbrueckii*、*Dekkera sp.* および *Candida albicans* と同定された。

次に、上記の種の同定結果と各々の属の特徴を確認のため照合すると、RND13株は出芽により増殖し、偽菌糸および菌糸を形成しなかった。糖の発酵能をもつが、硝酸塩を資化せず、Diazonium blue B テストには陰性であった。これらの性質は *Torulaspora* 属の特徴と一致した。RND14株はグルコースから酢酸を多産し、これは *Dekkera* 属の特徴に一致した。RND17株は多極出芽によって増殖し、栄養細胞は球状に近い楕円形であり、偽菌糸の形成能をもっていた。また、糖の発酵能を有し、液体培養の水面付近に薄い菌膜(pellicles)を形成した。デンプン様多糖類が菌体外へ生産されることはなかった。以上の性質は *Candida* 属の性質と合致した。なお、RND17株による炭素源の資化能の結果（Table 4）を他の3株と比較すると、非常に多種類の炭素源を活発に資化するにもかかわらず、ß-グリコシド結合をもつ2糖および3糖類を資化しないことが明らかである。この性質は *Candida albicans* に特徴的なものである。実験方法では述べなかったが、さらに牛血清アルブミン存在下（濃度について規定なし）の37℃で液体培養を行うと、2-3 h後に *C. albicans* に特徴的なgerm tubeが出現することを確認した。このような具体的証拠から、RND17株が *C. albicans* である可能性は非常に高いと考えられた。

RND16株（グループD）は、本章2.1で述べたように、酵母の増殖用培地であるYPD寒天培地上では常に内生胞子の放出により増殖したが、同定試験で用いた全ての偽菌糸、菌糸、内生胞子および外生胞子の形成能検査用培地上でも、それ以外の増殖形態を示すことはなかった。ところが現在知られる酵母には、内生胞子の放出によってのみ増殖する種類は知られていない。つまり、RND16株は他の3株と異なり、「コロニーおよび細胞の形態は酵母に酷似するが、酵母でない微生物」である可能性が高いと考えられた。

Table 4 Specific characteristics of the four yeast-like strains isolated from hot spring drainage. Growth was assessed by the method of Barnett et al. (1990). Fermentation and growth were examined at 25°C. Symbols: + = positive, l = latent (rapidly developing a positive reaction after a lag), s = positive but slow, w = weak, ws = weak and slow, lw = latent but weak, v = variable response, - = negative

Fermentation :

	Carbon source	Strains			
		RND13	RND14	RND17	RND16
1	D-Glucose	+	w	+	+
2	D-Galactose	-	-	s	-
3	Sucrose	ws	-	ws	-
4	Maltose	-	-	+	-
5	Lactose	-	-	-	-
6	Raffinose	-	-	-	-
7	Inositol	-	-	-	-

Assimilation of carbon compounds :

	Carbon source	Strains			
		RND13	RND14	RND17	RND16
1	D-Glucose	+	+	+	+
2	D-Galactose	-	-	+	ws
3	Maltose	±	±	+	ws
4	Methyl α-D-glucopyranoside	-	-	±	-
5	Sucrose	+	+	+	s
6	α,α-Trehalose	+	±	+	w
7	Melibiose	-	-	±	ws
8	Lactose	-	±	-	w
9	Cellobiose	ws	s	-	w
10	Melezitose	±	-	-	-
11	Raffinose	±	±	±	-
12	Inulin	-	-	-	-
13	Starch	-	-	s	-
14	D-Xylose	±	s	+	-
15	L-Sorbose	-	-	l	-
16	D-Glucosamine	-	-	-	-
17	D-Ribose	-	-	-	-
18	L-Arabinose	-	-	s	-
19	D-Arabinose	-	-	-	-
20	L-Rhamnose	-	-	-	-
21	Salicin	-	-	-	-
22	Arbutin	-	-	-	-
23	Glycerol	s	s	l	+
24	Erythritol	-	-	-	-
25	Ribitol	-	-	+	-
26	Xylitol	-	-	+	-
27	L-Arabinitol	-	-	-	-
28	D-Glucitol	-	-	+	-
29	D-Mannitol	-	-	+	-
30	Galactitol	-	-	-	-

Table 4. (Continued)

Assimilation of carbon compounds :

Carbon source		Strains			
		RND13	RND14	RND17	RND16
31	Inositol	-	-	-	-
32	D-Glucono-1,5-lactone	+	-	+	-
33	2-Keto-D-gluconate	+	+	+	+
34	D-Gluconate	+	-	-	-
35	D-Glucuronate	-	-	-	-
36	D-Galacturonate	-	-	-	-
37	DL-Lactate	s	+	+	+
38	Succinate	s	+	+	+
39	Citrate	-	-	l	l
40	Methanol	-	-	-	-
41	Ethanol	l	+	+	+
42	Propane-1,2-diol	-	-	-	w
43	Butane-2,3-diol	-	-	+	+

Assimilation of nitrogen compounds :

Nitrogen source		Strains			
		RND13	RND14	RND17	RND16
1	Nitrate	-	-	-	-
2	Nitrite	-	-	-	-
3	Ethylamine	-	+	l	-
4	L-Lysine	l	+	l	s
5	Cadaverine	-	+	+	+
6	Creatine	-	-	-	-
7	Creatinine	-	-	-	ws
8	Glucosamine	+	+	+	+
9	Imidazole	-	-	-	-

Other Characteristics :

Characteristics		Strains			
		RND13	RND14	RND17	RND16
1	0.01% Cyclohexymide growth	-	-	+	ws
2	0.1% Cyclohexymide growth	-	-	+	-
3	Starch formation	-	-	-	-
4	Acetic acid production	-	+	-	-
5	DBB color test	-	-	-	-
6	Carotenoid production	-	-	-	-
7	Budding cells	+	+	+	-
8	Filamentous growth	-	+	+	-
9	Bipolar budding	-	-	-	-

2.6　生理学的性状に基づくRND16株の同定

前述のごとく、RND16株は酵母ではない可能性が示された。そこで、本章2.5の同定試験で使用した同定書 (Kurtman CP, Fell JW. *The Yeasts, a taxonomic study*, Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, 1998) を用いて、「酵母ではないが、酵母と間違えられることの多い微生物」に限って再検索を行うと、「内生胞子の放出によってのみ増殖する酵母様微生物」として、従属栄養微細緑藻である *Prototheca* 属の可能性が考えられた。そこで、RND16株の諸性状が *Prototehca* 属のそれと一致しているか、また *Prototehca* 属であれば、属内のどの種類に相当するのかを検討した。

Prototheca はかつて酵母や fungi を含む真正菌類である (曽根田, 1975) とされていたが、現在では光合成を行う独立栄養の微細藻である *Chlorella* が葉緑体形成能を失い、従属栄養微生物として独自に変異を遂げた属であると考えられている。特に緑藻植物門 トレボウクシア藻綱に属する緑藻である *Auxenochlorella protothecoides* と同じ祖先を共有する微生物であるという見方が一般的である (Pore, 1972; Huss and Sogin, 1990; Huss et al., 1999)。生態学的には、その主な生息環境は多くの *Chlorella* と同様に水圏であり、栄養塩濃度の高い排水からの分離例も多いが、他方では酵母と同様に樹木が生産する樹液上に形成される Slime flax にも生育することが知られている。

実 験 方 法

[属の判定]

Pore (1998) の方法に従い、RND16株が *Prototheca* 属であるか否か検討した。全ての試験は *Prototheca* Isolation Medium (PIM, Pore 1998) を用いて行った。PIM培地は *Prototheca* 属微細藻を選択的に生育させる特別な培地であり、細菌および酵母の混入と生育を防ぐ目的で、フタル酸水素カリウムおよび5-フルオロシトシンを含んでいる (Table 5)。

Table 5 *Prototheca* Isolation Medium (PIM).

Chemicals	Concentration (g/L)
Potassium hydrogen phthalate	10
NaOH	0.9
$MgSO_4$	0.1
KH_2PO_4	0.2
NH_4Cl	0.3
Thiamine hydrochloride	0.001
Glucose	10
5-Fluorocytosine	0.25

[種の同定]

上記の属の判定試験でRND16株の諸性状が*Prototheca*属のそれと一致した場合、Pore (1998) の方法に従って、種の同定を行った。

結果および考察

[同定結果]

RND16株は*Prototheca*属の特徴である諸性状を有しており (Table 6)、また種の検索を行うと *Prototheca zopfii* であった (Table 7)。 さらに、*n*-ヘキサデカンを資化して増殖することから、*P. zopfii* の亜種である *P. zopfii* var. *hydrocarbonea* に分類された。 しかし、RND16株は本章2.2および2.3で示したとおり、高温でグルコースを発酵してガスを発生するが、*Prototheca*属の嫌気代謝には、ガスの発生を伴うグルコース代謝は (常温においても) 存在しないとされている (Pore, 1998)。 RND16株の性状はこの点において、既往の知見における*Prototheca*属微細藻に関する記載と明らかに異なっていた。

2.7 18S rDNAの塩基配列に基づく分子系統上の位置

かつて微生物種の同定は専ら生理学的な手法に基づいて行われてきたが、過去10年間におけるPCR (Polymerase Chain Reaction) の急速な普及をはじめとする分子生物学的な手法の発展に伴い、生理学的同定結果と遺伝学的同定結果に矛盾が生ずる事例が報告されるようになった。特に細菌の分類学的解析においては、1987年の国際細菌類分類命名委員会特別委員会において遺伝学的同定結果の重要性が強く認識され、現在では、リボゾーム小サブユニットのRNAをコードする16S rDNAの塩基配列決定が必須項目となっている。 真核微生物である酵母の分類に関しても1990年代に入り、核由来(ホスト) のリボゾーム小サブユニットのRNAをコードする18S rDNAの塩基配列決定がなされるようになったが、各種酵母由来のrDNA塩基配列情報の蓄積は細菌のそれに比較すると著しく遅れを取っていた。 しかし、この2 - 3年における急速な解析により、酵母においてもrDNA塩基配列情報の蓄積が、菌種同定の目的に使用可能なレベルに達しつつあ

Table 6 Characteristics of RND16 for diagnosis of the genus.

Characteristics	Isolate RND 16
Growth on *Prototheca* isolation medium (PIM)[a]	+
Formation of autospores	+
Resistance to rose bengal staining	+
Oxygen requirement for growth	+
Thiamine requirement for growth	+
Assimilation of ammonium chloride	+
Budding cells	-
Development of basidium	-
Development of hyphae	-
Production of chlorophylls or carotenoids	-

[a] Pore 1998

Table 7 Characteristics of RND16 for identification in the genus *Prototheca*. For abbreviations see Table 4.

Characteristics	Isolate RND 16
Assimilation	
Fructose	+
Galactose	- or ws
1-Propanol	+
Trehalose	- or w
Hexadecane	+
Morphology	
Dauer cell < 8.5 μm	+ (16.0, 9.6)[a]
Dauer cell > 8.5 μm	-
Spheroidal	v
Ellipsoidal	v

[a] Values expressed as means of the major and minor axis of 100 cells grown on a YPD agar plate (μm)

る。特に 1999 年から 2000 年にかけて、非常に多くの種を含む *Candida* 属に分類される全酵母種の rDNA 配列情報が明らかにされたことの意義は大きい (DDBJ/EMBL/GenBank における各種酵母の rDNA 配列情報の登録年を参照)。

以上の背景を踏まえ、ここでは本章 2.5 および 2.6 で生理学的に種の同定を行った酵母 2 株 (RND13 株と RND17 株) と *Prototheca* 1 株 (RND16 株) が有する核由来(ホスト)の 18S rDNA 塩基配列のほぼ全長を解析し、各株について分子系統上の位置を推定した。

実 験 方 法

[18S rDNA 塩基配列の決定]

各微生物株のゲノム DNA は Xing and Aharon (1988) および Kim ら (1997) の方法によって抽出、分離 および精製を行った。 このゲノム DNA を鋳型として、以下に示す PCR 条件で RND13 株および RND17 株の 18S rDNA を増幅した。

(1) プライマー: Universal fungal primer (White et al., 1990)
NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')
NS8 (5'-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3')

(2) 反応液: Takara Ex Taq Buffer (宝酒造) を用いた。

(3) プログラム: (95℃, 5 min) × 1 cycles
(94℃, 1 min → 55℃, 1 min → 72℃, 1.5 min) × 30 cycles
(72℃, 8 min) × 1 cycles

RND16 株の 18S rDNA は、以下に示す PCR 条件で増幅した。

(1) プライマー: Eukaryote-specific primers (Medlin et al. 1988)

Forward (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')

Reverse (5'-TTGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3')

(各プライマーに対する固有の名称はない)

(2) 反応液: Takara Ex Taq Buffer (宝酒造) を用いた。

(3) プログラム: (95℃, 5 min) × 1 cycle

(94℃, 1 min → 55℃, 1 min → 72℃, 2 min) × 30 cycles

(72℃, 8 min) × 1 cycle

得られた PCR 産物の塩基配列は ABI-373 DNA シーケンサーで決定し、BLAST similarity program (Hschul et al., 1990, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) によって、データベース中の登録配列との相同性を比較した。各配列間の進化距離の計算は Kimura (1980) の方法で行い、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) によって系統樹を構築した。これらの計算は CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994) を用いて行った。なお、本実験で決定した RND13 株と RND16 株の 18S rDNA の配列は DNA Data Bank of Japan に、AB071282 および AB066502 として登録した。

結果および考察

[18S rDNA の塩基配列に基づく分子系統上の位置]

温泉排水由来の酵母 2 株および *Prototheca* 1 株が有する核由来の 18S rDNA 塩基配列のほぼ全長を解析し、系統解析を行った。構築した系統樹を Fig. 5 に示す。RND13 株は、子嚢菌酵母、*Candida glabrata* (CBS 138 株) および *Kluyveromyces delphensis* (NCYC 768 株) に近縁であることが判明し (Fig. 5A)、生理学的方法による同定結果とは異なる結果であった。しかし系統樹から明らかなように、RND13 株は生理学的方法により決定された種である *Torulaspora delbrueckii* に対してもかなり遺伝的に

近いことが明らかにされた (RND13 株と *T. delbrueckii* CBS1146 株の 18S rDNA identity は 97%)。 RND13 株の分類学的位置 (新種か否かの判断を含む) に関してはさらなる研究が必要である。 RND17 株の塩基配列データは *Candida albicans* の rDNAs に極めて高い相同性 (>99%) を示し、この結果は生理学的同定結果と一致していた (Fig. 5B)。 RND16 株の結果をみると、*Prototheca zopfii* (SAG 263-1 株) との間の 18S rDNA identity は 99.7%であり、生理学的同定結果とも一致したため、RND16 株は *P. zopfii* に分類された。 従って、本章 2.2 および 2.3 で示された RND16 株のもつグルコースからガスを発生する嫌気代謝は、*Prototheca* 属に知られていない代謝である。 RND16 株のグルコース嫌気代謝については、第3章で詳細に述べる。 なお、*P. zopfii* と類縁関係にあると考えられている Trebouxiophyceae (トレボウクシア藻綱) および Chlorophyceae (緑藻綱) に属する藻種との系統関係をみると、*P. zopfii* が他の緑藻類の rDNA 配列と比較して例外的に高い mutation rate を示すにもかかわらず (変異がかかり易い系統であれば、系統樹上のトポロジーが、より divergent になると予想される)、2 株の *P. zopfii* 株 (SAG 263-1 と RND16) がほとんど同一の配列を有していたことは予想外の結果であった (Fig. 5C)。 ここで考えられる可能性は、*P. zopfii* という種類が実は緑藻とは無関係な微生物であるために、Fig.5C に見られる様に、他の緑藻種との間に著しい遺伝的距離を示すのではないかということである。 しかし、RND16 株の rDNA 配列に対して高い相同性を示す配列の検索結果 (Table 8) をみると、それらは全て *Chlorella* 属を含む真核微細緑藻類の rDNAs であり、この事実は RND16 株の塩基配列における mutation rate が高くとも、なお真核微細緑藻類に特有な rDNA 配列部分を残していることを示している。

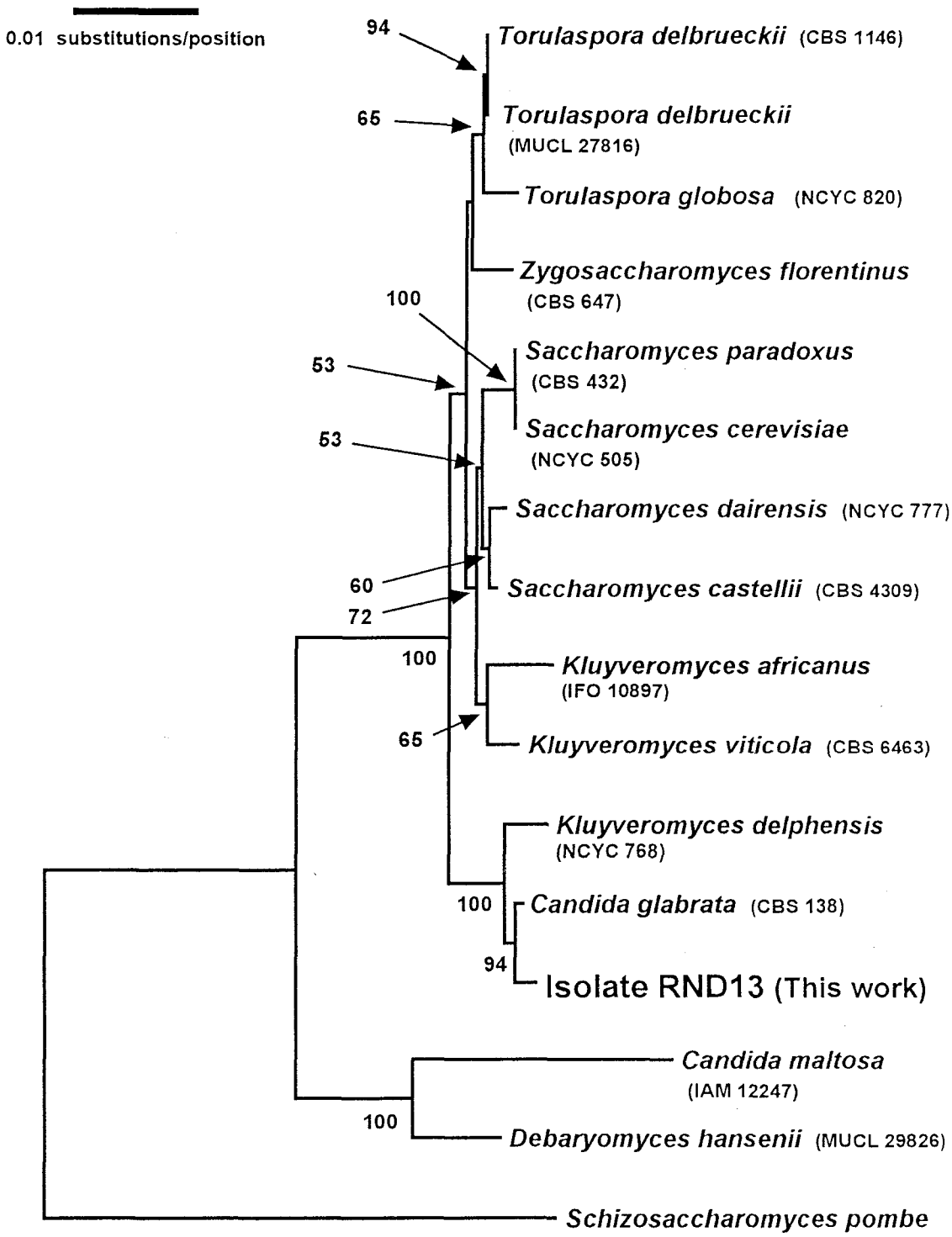

Fig. 5A A neighbor-joining tree resulting from analysis of 18S rDNA sequences of RND13 and related taxa. The numerals represent the bootstrap values (1000 replicates) when greater than 50% .

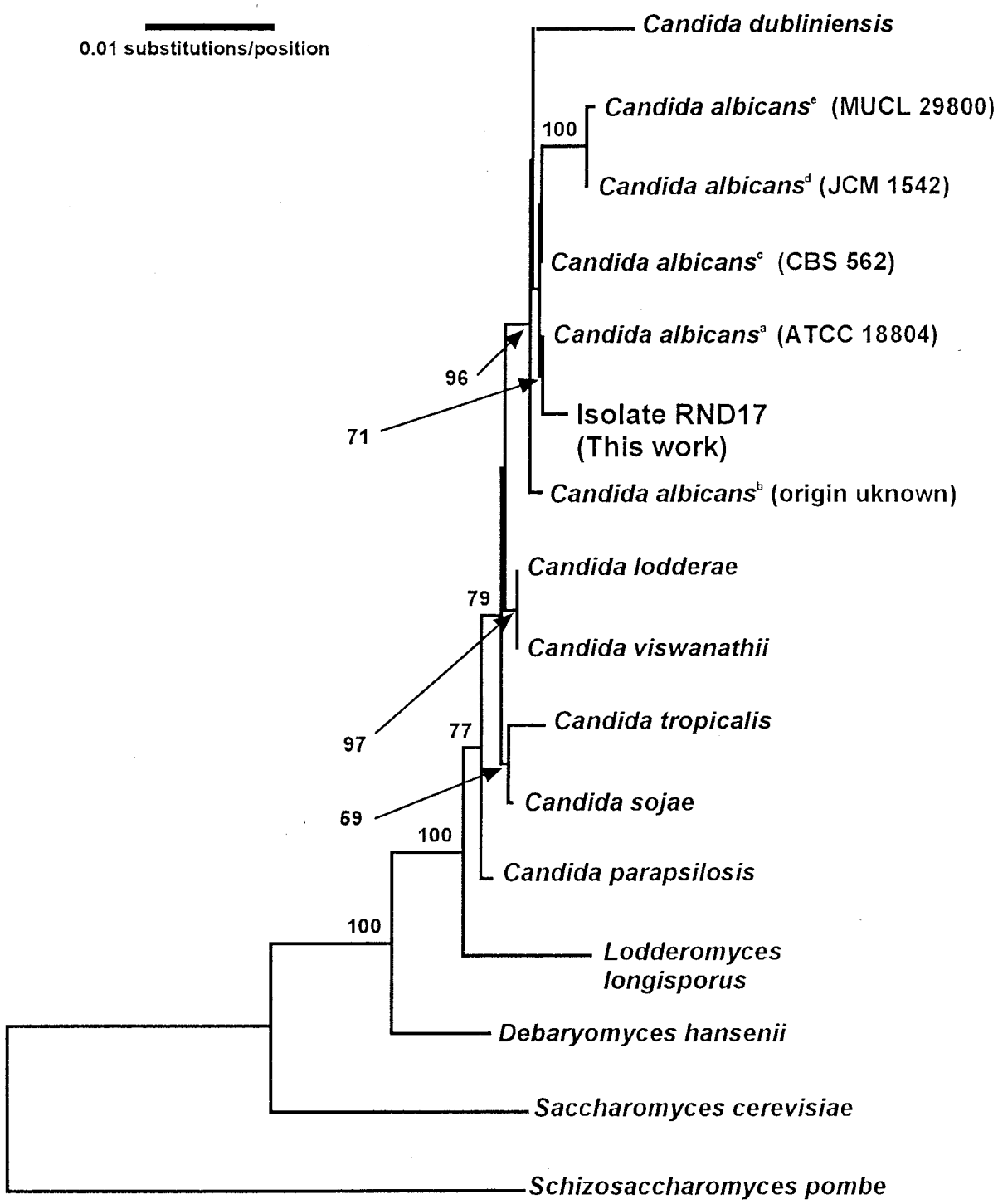

Fig. 5B A neighbor-joining tree resulting from analysis of 18S rDNA sequences of RND17 and related taxa. The numerals represent the bootstrap values (1000 replicates) when greater than 50% .

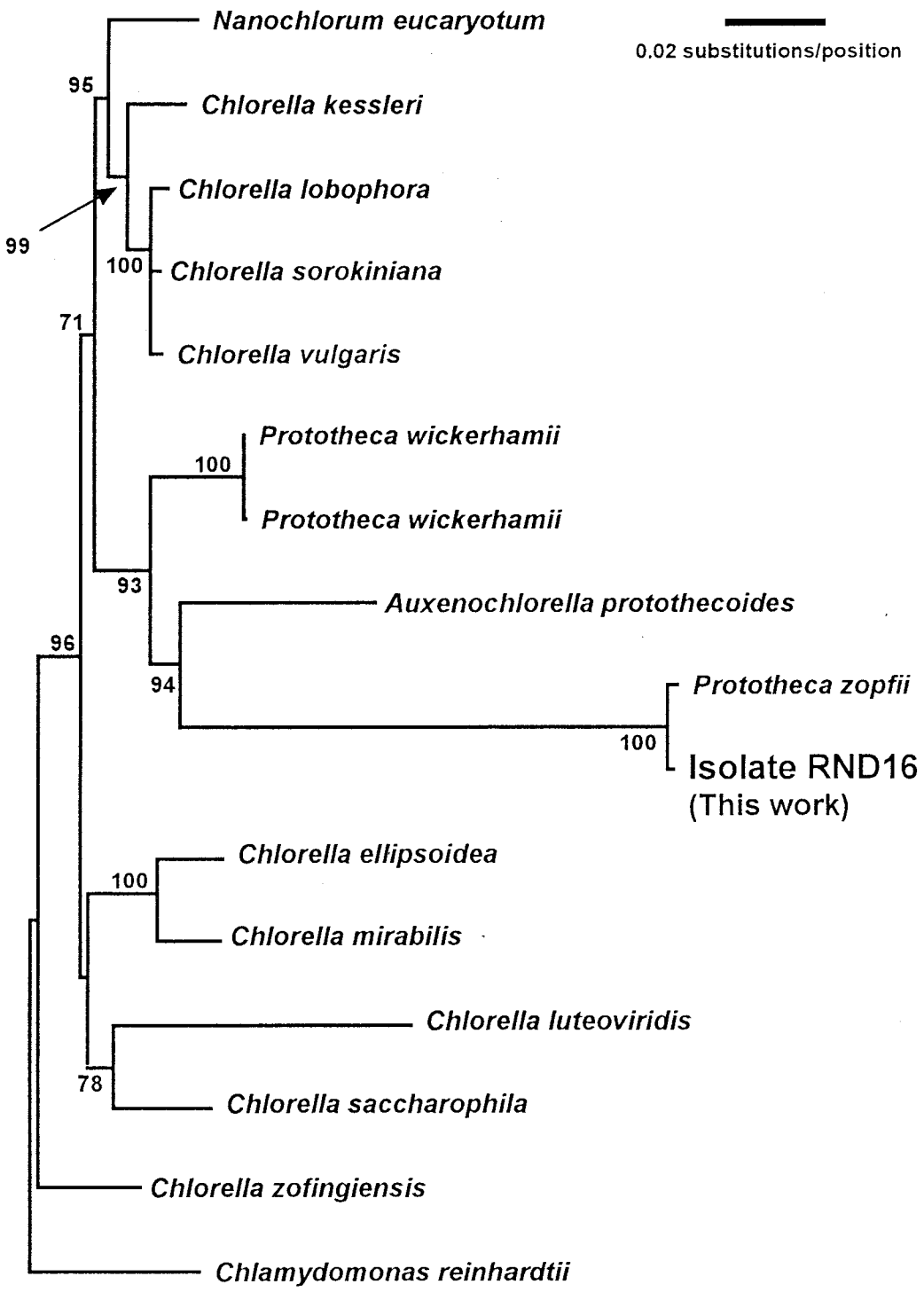

Fig. 5C A neighbor-joining tree resulting from analysis of 18S rDNA sequences of RND16 and related taxa. The numerals represent the bootstrap values (1000 replicates) when greater than 50% .

Table 8 Results of BLAST similarity search. The 20 sequences that showed highest homology to the rDNA of the strain RND16 are shown.

Species	Strain	Identity (%)
1. *Prototheca zopfii*	SAG 263-1	99.7
2. *Myrmecia astigmatica*	IB T76	92.7
3. *Friedmannia israeliensis*	—	92.3
4. *Nannochloris* sp.	—	91.4
5. *Nanochlorum eucaryotum*	Mainz 1	91.4
6. *Pseudochlorella* sp.	CCAP 264-2	91.0
7. *Chlorella angustoellipsoidea*	MES A7-4	91.0
8. *Chlorella saccharophila*	SAG 211-9a	90.8
9. *Chlorella saccharophila*	SAG 211-9b	90.8
10. *Planophila terrestris*	—	90.6
11. *Hormotilopsis gelatinosa*	—	90.6
12. *Planophila terrestris*	UTEX 1709	90.3
13. *Micractinium pusillum*	Hegewald 1983-3	90.0
14. *Muriella terrestris*	ASIB V38	90.0
15. *Prototheca wickerhamii*	Pore 1283	89.5
16. *Prototheca wickerhamii*	SAG 263-11	89.5
17. *Dicloster acuatus*	SAG 41.98	89.2
18. *Chlorella minutissima*	SAG 1.80	89.0
19. *Chlorococcopsis minuta*	—	89.0
20. *Chlorella vulgaris*	—	88.8

第3章 プロトテカ RND16 株のグルコース嫌気代謝の解析

3.1 嫌気条件下における発酵特性

一般に、*Prototheca* 属微細藻によるグルコースの発酵産物は乳酸を含む有機酸であり (Pore, 1998)、その中でも *Prototheca zopfii* は 1 モルのグルコースを 2 モルの乳酸に変換し、ガス発生を伴わない典型的なホモ乳酸発酵を行うことが知られている (Begum and Syrette, 1970)。 ところが温泉排水由来の *Prototheca zopfii* RND16 株は、既往の知見とは異なり、グルコースからガスを発生する嫌気代謝を有していた。 本章では RND16 株の持つグルコース嫌気代謝を詳細に調べ、その生化学的意義を考察した。

実 験 方 法

[N_2/H_2/CO_2 下における発酵]

第2章 2.3 [40°C 以上の高温域におけるエタノール発酵収率] と同様の方法で、RND16 株を 25℃または 40℃で培養した。 藻体は遠心分離 (1600×*g*・5 min) によって回収し、0.85% NaCl で 2 回洗浄した後、再び遠心分離 (1600×*g*・5 min) でペレットとした。次に炭素源を含まない YNB 培地を藻体のペレットに添加し、良く攪拌して藻細胞を同液中に懸濁した。 懸濁液は細胞内に残っている炭素源を消費させる目的で 25℃または 40℃で 24 h 放置した。 藻細胞は、発酵試験の直前に遠心分離を行って回収した。

上記の操作と平行して、9 本の 10 mL サイズの試験管にアルミキャップを被せ、180℃ - 2 h の条件で乾熱滅菌した。滅菌終了後の各試験管に、5%のグルコースを含む YNB 培地 10 mL を無菌的に注ぎ、これを発酵試験用の培地とした。 次に炭素源を 24 h 絶った状態で放置しておいた前述の藻体の中から 0.2 g (湿重量) を滅菌スパーテルで取り、発酵試験用の培地の入った試験管に入れて懸濁した。

嫌気発酵は、3 つの嫌気ジャーの中で別々に行った。それぞれのジャーは 3 通りの異なる発酵時間条件 (48 h, 96 h および 144 h) を設定するために準備した。 藻細胞を接種

した9本の試験管の中から3本づつを組にして、各々のジャーの中に入れた。藻細胞中に炭素源が残っていないことを確認する目的で、グルコースを含まないYNB培地に藻細胞を接種した試験管を対照区として用意した。 さらに別の対照区として、気相部から液相部に溶解するCO_2量を測定するために、グルコースを含むが藻細胞を含まないYNB培地の入った試験管を用意した。 これらの対照実験に使用する試験管は、発酵試験と同様に嫌気ジャーの中に置いた。 全ての試験管は、BBL GasPak Anaerobic System Envelopes (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD) を備える嫌気ジャーの中で25℃または40℃でインキュベートした。 嫌気ジャー内部の気相部の組成 (v/v) は、Anaerobic System Envelopesの働きにより、ジャーを蓋で密栓してから1 h 以内にN_2: 50 - 71%, H_2: 25 - 40%, CO_2: 4 - 10% (O_2 < 0.2%) となる (メーカーによる公表値)。 なお、藻の前培養、炭素源の消化 および嫌気培養の一連の操作は、一貫して同じ温度条件下 (25℃または40℃) で行った。 それぞれの嫌気ジャーは、培養時間が終了すると蓋を開け、3本の試験管中の発酵液は別々に発酵産物の測定に供した。

次のステップとして、同じ嫌気ジャーを用いてRND16株のエタノール発酵能に対する栄養塩添加の影響を検討した。 この実験では*P. zopfii*であるRND16株に加え、*Candida albicans* と同定された酵母RND17株を用いた。 嫌気培養は栄養塩を含まない5%グルコース液、または栄養塩に富む改変YPD液体培地 (5% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract) 中で行った。*Prototheca* RND16株は25℃または40℃で144 hまで、*Candida* RND17株は40℃で48 hまでインキュベートした。

[N_2下における発酵]

RND16株は$N_2/H_2/CO_2$下における嫌気発酵の場合と同様に前培養を行い、細胞内に残存する炭素源を消費させた。 遠心分離によって回収した藻細胞の0.1g (湿重量)を無菌的に、5%グルコースを含む5mLのYNB培地が入った10mLサイズのバイアルビン中に接種した。 次にバイアルビン中の空気を窒素ガスで置換し、ブチルゴム製の中蓋を有するねじ口キャップで密栓した後、25℃または40℃で144 hインキュベートした。 嫌気培養に用いたバイアルビンは各温度条件につき3本ずつ用意した。 対照区としては5%グルコースのみを含むYNB入りバイアルビンを用意し、同様にインキュベートした。

[発酵産物の同定および定量]

バイアルビンを用いた N_2 下の発酵実験の場合のみ、気相部の CO_2 および H_2 の濃度を測定した。嫌気培養時間が終了したサンプルは、25℃で1分間転倒攪拌し、容器内を気液平衡状態とした。CO_2 および H_2 は、気相部ガスの一部を採取してガスクロマトグラフィーによって測定した。 分析条件は以下のとおりである。

CO_2 測定

使用機種: GC-14BPT (Shimadzu Co., Ltd.)

使用カラム: Porapak Q (3mm × 2 m, 60/80 mesh)

カラム恒温槽温度: 60℃

試料注入量: 100 μL

キャリアーガスと流量: He (40 mL/min)

DET / INJ 温度: 100℃

データ処理形式: C - R7A

H_2 測定

使用機種: GC-14BPT (Shimadzu Co., Ltd.)

使用カラム: MS-5A (3mm × 3 m, 60/80 mesh)

カラム恒温槽温度: 80℃

試料注入量: 100 μL

キャリアーガスと流量: Ar (28 mL/min)

DET / INJ 温度: 100℃

データ処理形式: C - R7A

次に発酵液から遠心分離 (1600×*g* - 10 min) によって細胞を除き、即座に液相部中に残存する無機炭素濃度 (IC すなわち溶存炭酸濃度) を TOC アナライザーを用いる赤外線分析法で測定した。 残りの発酵液は 80℃で 15 分間水浴させ、細胞外酵素を失活させた。 発酵液中の有機体炭素濃度 (TOC) は、サンプルの一部を採取して希釈した後、再

び TOC アナライザーを使用して測定した。 分析条件は以下のとおりである。

IC / TOC 測定

使用機種: TOC - 5000A (Shimadzu Co., Ltd.)

燃焼管温度: 680℃ (TOC 測定時のみ使用)

試料注入量: 4-8 μL

キャリアーガスと流量: CO_2を含まない高純度空気 N_2/O_2 (80% : 20%) (150 mL/min)

グルコース、エタノールおよび各種有機酸濃度は酵素法により、F-kit (Boehringer Mannheim Co., Ltd.) を用いて測定した。 エタノールはアルコールデヒドロゲナーゼとアルデヒドデヒドロゲナーゼを用いて、Beulter (1984a) の方法により測定した。 グルコースは Kunst ら (1984) の方法により、ヘキソキナーゼとグルコース- 6 -リン酸デヒドロゲナーゼを用いて定量した。 乳酸は Noll (1984) の方法に従い、D- および L-乳酸デヒドロゲナーゼを用いて測定した。 酢酸の定量は Beulter (1984b) の方法により、アセチル CoA シンテアーゼ、クエン酸シンターゼ および リンゴ酸デヒドロゲナーゼを用いて行った。 ギ酸は Schaller と Triebig (1985) の方法により、ギ酸デヒドロゲナーゼを用いて測定した。これらの定量はメスフラスコを用いて、各方法が定める検量線の範囲内に測定対象物の濃度が収まるようにイオン交換水で希釈した後に行った。

結 果 お よ び 考 察

[$N_2/H_2/CO_2$ 下における発酵産物]

Prototheca RND16 株が 25℃で 5%のグルコースを発酵した時の発酵産物を Table 9 に示す。液相部の CO_2 濃度は、嫌気培養時間が長くなるに従って上昇した。 一方、2 種類の対照区におけるサンプルからは、ごく微量の CO_2 (発酵サンプルの 1/10 程度) が検出されたに過ぎなかった。RND16 株は D-乳酸、エタノールおよび酢酸を生産した。 D-乳酸とエタノールはほぼ等モルずつ生産されたが、酢酸の生産量は少なく、モル濃度で D-乳

Table 9 Products of glucose fermentation by *Prototheca zopfii* RND16 at 25℃ in YNB under a $N_2/H_2/CO_2$ atomosphere. YNB solution without amino acids contained 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, growth factors, trace elements, and metallic salts. Three anaerobic jars were prepared at the start of fermentation. Each anaerobic jar contained three independent replicates (*A-C*), (*D-F*), (*G-I*), after which each jar was opened at 48h, 96h, and 144h, respectively. The organism was cultivated under an atomosphere of $N_2/H_2/CO_2$ (50-71% : 25-40% : 4-10%) with O_2 concentration less than 0.2%. ND not detectable

Fermentation products and additional data	Period of fermentation (h)									
	0	48			96			144		
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Concentration (mM)										
D-Lactic acid	ND	5.6	10.8	6.7	12.1	11.9	14.1	16.1	16.5	16.9
L-Lactic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethanol	ND	5.2	8.2	6.2	12.7	12.5	15.8	17.4	17.0	18.8
Acetic acid	ND	0.8	0.9	0.8	1.2	1.2	1.4	1.5	1.5	1.5
Formic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Residual glucose (mM)	277.5	267.5	262.0	266.4	263.1	259.2	258.1	259.2	256.4	249.8
CO_2 (mM) [b]	ND	7.8	8.5	8.0	11.4	11.0	11.2	12.7	12.7	13.1
CO_2 in control samples 1 [b,c] (mM)	ND	1.12 ± 0.02 [e] (J - L) [a]			1.14 ± 0.05 [e] (M - O) [a]			1.07 ± 0.06 [e] (P - R) [a]		
CO_2 in control samples 2 [b,d] (mM)	ND	1.27 ± 0.02 [e] (S - U) [d]			0.93 ± 0.07 [e] (V - X) [d]			1.20 ± 0.02 [e] (Y - A1) [d]		
Total organic carbon ($\times 10^3$ ppm)	19.7	19.0	18.8	19.0	18.7	18.5	18.7	18.8	18.6	18.4
pH	5.34	3.28	3.13	3.23	3.05	3.04	2.97	3.00	2.98	2.96

[a] The control samples (J-A1) were prepared and incubated in the same manner as the fermentation experiments.

[b] Amount of CO_2 remaining in the liquid phase

[c] Uninoculated controls containing glucose

[d] Glucose-free controls inoculated with algae

[e] Amount of CO_2 expressed as mean±SD (n=3) for the control samples.

酸またはエタノールの 1/10 程度であった。 一方、グルコースを含まずに藻細胞のみを接種した対照区からは、有機酸およびエタノールがほとんど検出されなかった。

次に RND16 株が 40℃で 5%グルコースを発酵した時の発酵産物を Table 10 に示す。2 種類の対照区からはともに、CO_2 がほとんど検出されなかった。 また、グルコースを含まずに藻細胞のみを接種した対照区では、25℃の場合と同様に有機酸およびエタノールのいずれもほとんど認められなかった。 RND16 株による 40℃の発酵パターンをみると、D-乳酸の生産は発酵初期に停止した。発酵液の pH についても 25℃の発酵の場合ほど低下が認められず、これは乳酸発酵の停止を裏付ける結果と考えられた。 対照的に、エタノール生産は 25℃の場合に比較して著しく促進された。 また、エタノール発酵と同時に発生すると考えられる発酵液中の CO_2 濃度は、25℃で検出された濃度と比較しうる値を示した。 40℃における液相への炭酸ガス溶解度は、非常に低下するという事実を考慮すれば、藻細胞が実際に生産した CO_2 量は、25℃における生産量を凌ぐであろうと推察された。

$N_2/H_2/CO_2$ 下における発酵について全体をまとめると、液相部に残存した CO_2 量とエタノール生産量の間には温度条件に関わらず相関性が認められた。 例えば発酵初期にエタノール濃度が著しく上昇している場合、液相部の残存 CO_2 濃度も上昇した。 一方、発酵開始から 144 h が経過すると、エタノール生産速度は低下してくるが、CO_2 濃度の値も、上昇が鈍るか (25℃) または低下した (40℃)。 発酵液中の TOC の減少は、藻細胞によるグルコースの消費に由来すると考えられる。 RND16 株は 40℃の高温において、発酵パターンを変化させるばかりでなく、より迅速にグルコースを消費することが明らかになった。なお、RND16 株は温度条件に関わらず、グルコースから嫌気的に L-乳酸およびギ酸を生産しなかった。

[N_2 下における発酵]

RND16 株を N_2 下で発酵させた場合、温度条件に関係なく (25℃または 40℃)、 エタノールのみが主要な発酵産物として同定され、乳酸の生産は低レベルに抑えられた (Table 11)。 40℃で発酵させた後にバイアルビンから回収した気相部サンプルは、25℃における気相部の約 2 倍量の CO_2 を含んでいた (Table 12)。 本実験における気相部 CO_2 のクロマトグラムを Fig. 6 に示す。興味深いことに、同様の傾向は液相部のエタノール濃度に関

Table 10 Products of glucose fermentation by *Prototheca zopfii* RND16 at 40℃ in YNB under a $N_2/H_2/CO_2$ atomosphere. YNB solution without amino acids contained 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, growth factors, trace elements, and metallic salts. Three anaerobic jars were prepared at the start of fermentation. Each anaerobic jar contained three independent replicates (*A*-*C*), (*D*-*F*), (*G*-*I*), after which each jar was opened at 48h, 96h, and 144h, respectively. The organism was cultivated under an atomosphere of $N_2/H_2/CO_2$ (50% : 25-40% : 4-10%) with O_2 concentration less than 0.2%. ND not detectable

Fermentation products and additional data	Period of fermentation (h)									
	0	48			96			144		
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
Concentration (mM)										
D-Lactic acid	ND	5.2	5.6	2.2	5.3	2.8	3.6	3.6	4.3	4.4
L-Lactic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethanol	ND	33.2	41.0	29.6	48.8	43.8	51.0	53.3	61.8	47.3
Acetic acid	ND	0.7	1.0	1.1	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.3
Formic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Residual glucose (mM)	277.5	249.8	248.7	253.7	231.5	237.6	232.6	227.0	220.4	232.0
CO_2 (mM) [b]	ND	6.3	7.9	5.3	9.0	8.7	10.2	5.8	7.0	5.7
CO_2 in control samples 1 [b,c] (mM)	ND	0.25 ± 0.07 [e] (J - L) [a]			ND [e] (M - O) [a]			0.07 ± 0.11 [e] (P - R) [a]		
CO_2 in control samples 2 [b,d] (mM)	ND	0.70 ± 0.04 [e] (S - U) [a]			0.44 ± 0.23 [e] (V - X) [a]			0.32 ± 0.14 [e] (Y - A1) [a]		
Total organic carbon ($\times 10^3$ ppm)	19.7	18.3	18.1	18.7	17.9	18.3	18.0	17.7	17.0	17.7
pH	5.34	3.14	3.13	3.20	3.08	3.15	3.15	3.18	3.15	3.15

[a] The control samples (J-A1) were prepared and incubated in the same manner as the fermentation experiments.
[b] Amount of CO_2 remaining in the liquid phase
[c] Uninoculated controls containing glucose
[d] Glucose-free controls inoculated with algae
[e] Amount of CO_2 expressed as mean±SD (n=3) for the control samples.

Table 11 Products of glucose fermentation by *Prototheca zopfii* RND16 in YNB under a N_2 atmosphere (in the liquid phase). YNB solution without amino acids contained 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, growth factors, trace elements, and metallic salts. A, B and C in the table indicate three independent cultures. The organism was cultivated under an atomosphere of N_2/CO_2 (99.7-100% : 0-60ppm) with O_2 concentration less than 0.3%. ND, not detectable

Fermentation products and additional data	Temperature						
	25℃			40℃			25℃ and 40℃
	A [a]	B	C	A [a]	B	C	Cell free control [a]
Concentration (mM)							
D-Lactic acid	3.9	3.3	4.1	5.8	4.4	5.4	ND
L-Lactic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethanol	38.3	31.3	44.7	79.8	63.8	66.5	ND
Acetic acid	1.3	1.1	1.1	1.1	1.3	1.2	ND
Formic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Residual glucose (mM)	238.1	249.8	215.4	228.1	213.7	209.8	277.5
CO_2 (mM)	4.6	4.3	6.7	9.5	7.1	7.1	ND

[a] Used for determination of CO_2 and H_2 in the gaseous phase (Table 12)

Table 12 Products of glucose fermentation by *Prototheca zopfii* RND16 in YNB under a N_2 atmosphere (in the gaseous phase). YNB solution without amino acids contained 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, growth factors, trace elements, and metallic salts. The organism was cultivated under an atomosphere of N_2/CO_2 (99.7-100% : 0-60ppm) with O_2 concentration less than 0.3%. *A* the same as the sample described as *A* in Table 3, ND not detectable, *tr* trace

Fermentation products	Samples		
	25℃ - A	40℃ - A	20℃ and 40℃ - Cell free control
Concentration (v/v %)			
CO_2	20.8	42.5	tr
H_2	ND	ND	ND

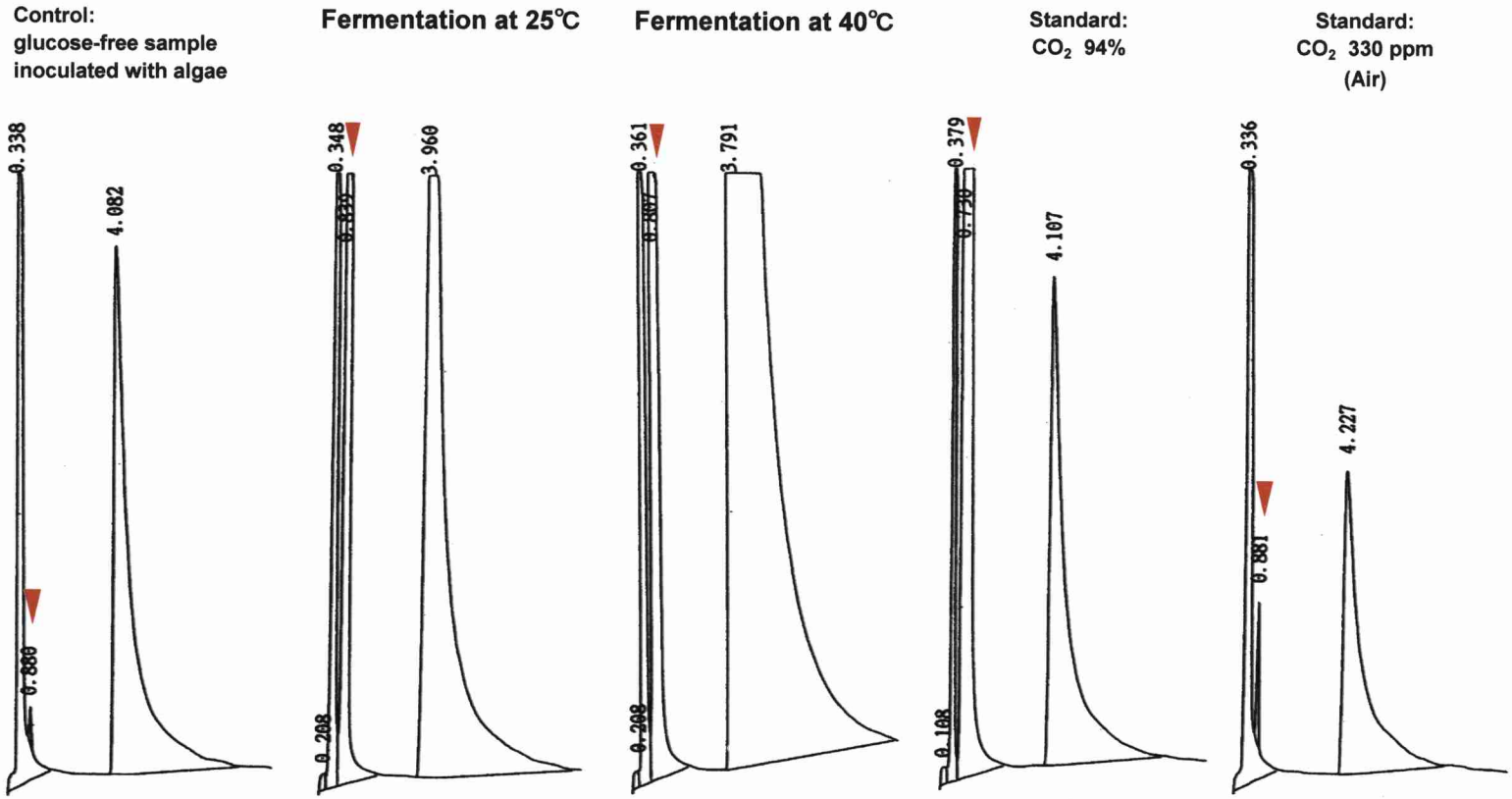

Fig. 6 Gas chromatographic tracing of gaseous samples retrieved after fermentation for 144 h under N_2. Arrowheads indicate the peaks of CO_2.

しても認められた。 40℃における発酵液は、25℃に比較して約2倍のエタノールを含んでいた (Table 11)。 RND16株はL-乳酸、ギ酸およびH_2を生産しなかった (Tables 11 and 12)。

[エタノール発酵能に及ぼす栄養塩の影響]

RND16株 (*Prototheca zopfii*) および RND17株 (*Candida albicans*) が5%グルコースを発酵した場合、エタノール生産量に及ぼす栄養塩の影響を Table 13 に示す。 YNB培地中におけるエタノール生産のデータは Table 9 および Table 10 から引用した。RND16株のエタノール生産量は栄養塩を添加することにより増加し、その影響が特に40℃で顕著であった。 一方、栄養塩を添加していない5%グルコース液中で発酵を行わせると、エタノール生産量は温度条件に関係なく非常に低くなった。 次に40℃における耐熱性酵母 RND17株のエタノール生産についても、*Prototheca* RND16株と同様に、栄養塩の添加に伴うエタノール生産量の増加が認められた。 しかし、栄養塩がエタノールの増産に及ぼす影響は RND16株ほど顕著ではなかった。

[RND16株が有する発酵の生化学的意義]

耐熱性を有する従属栄養微細藻 *Prototheca zopfii* RND16株の $N_2/H_2/CO_2$ 下におけるグルコース嫌気代謝についてまとめると、25℃の常温ではヘテロ乳酸発酵細菌に類似する発酵を、40℃の高温では耐熱性酵母に類似するエタノール発酵を行った (Tables 8 and 9)。 一方、N_2 下では温度条件に無関係にエタノール発酵のみが優占した。以上の結果は、*P. zopfii* がホモ乳酸発酵を行うという報告 (Begum and Syrett, 1970) とは大きく異なるものであった。

Chlorella 属の微細藻類は、その核由来 DNA の有する G+C 含量 (mol% G+C) の値が 44 - 75% と種類により大きく異なることが知られ (Huss et al., 1999)、著しい遺伝的多様性を示唆している。 この多様性に富む *Chlorella* 属の微細藻類を、グルコースの嫌気代謝産物のパターンを用いて分類しようとした過去の試みは、「異なる *Chlorella* の株は様々な発酵パターンを持つが、そのパターンの相違に従い導き出されるグループは、別の生理生化学的性状によって分類されていた種類 (グループ) と一致すること」を明らかに

Table 13 Effect of nutrients on ethanol production from 5% glucose under a $N_2/H_2/CO_2$ atomosphere. The organism was cultivated under an atomosphere of $N_2/H_2/CO_2$ (50% : 25-40% : 4-10%) with O_2 concentration less than 0.2%. Values are expressed as mean ± SD (n=3). — fermentation without nutrient, YNB fermentation in YNB solution without amino acids, YPD fermentation in Modified YPD medium containing 5% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract

Period of fermentation (h) and nutrient supplementation	Ethanol (mM)		
	Protothecа zopfii RND16		*Candida albicans* RND17
	25℃	40℃	40℃
96h [a] or 24h [b]			
—	13.2 ± 1.8	7.5 ± 0.3	252.4 ± 13.7
YNB [c]	13.7 ± 1.8	47.8 ± 3.7	319.1 ± 5.3
YPD	32.6 ± 9.0	104.7 ± 2.9	445.2 ± 71.0
144h [a] or 48h [b]			
—	15.0 ± 1.3	9.1 ± 0.9	282.6 ± 20.2
YNB [c]	17.7 ± 0.9	54.1 ± 7.2	313.0 ± 23.6
YPD	48.0 ± 2.8	114.6 ± 10.6	367.5 ± 63.1

[a] Period of fermentation for *Protothecа zopfii* RND16

[b] Period of fermentation for *Candida albicans* RND17

[c] Values in the presence of YNB components were derived from Table 2.

した (Begum and Syrett, 1970; Vinayakumar and Kessler, 1975)。一方、遺伝学的な手法による *Chlorella* および *Prototheca* 属の分類に関する知見をみると、Huss ら (1988) は *Prototheca* 属内の異なる種類について、各種間の DNA:DNA ハイブリダイゼーション交雑度が極めて低いこと、また各種の G+C 含量 (mol% G+C) が広範囲な値を示すことから、*Chlorella* 属に類似する属内の各種間における遺伝的多様性を示した。このような遺伝的多様性は、普通 *Chlorella* 属の各種内 (1 種類内) には認められないが、例外的に *Chlorella sorokiniana* の異なる株間においては認められ (Huss et al., 1986, 1999)、さらに *Prototheca* 属については *Prototheca zopfii* の株間にも認められる (Kerfin and Kessler, 1978)。*Chlorella sorokiniana* は、その種に属する株間の rDNA 塩基配列の相同性が 99.5% - 99.8% と非常に高い (Huss, 1999) にもかかわらず、グルコース発酵産物のパターンは 他の *Chlorella* の種と異なり、株間の相違が顕著に認められた (Vinayakumar and Kessler, 1975)。従って、*Chlorella sorokiniana* の株間に認められたような 高い rDNA 塩基配列相同性と発酵パターン多様性との間の矛盾が、遺伝的多様性を有する種類 *P. zopfii* の株間にも存在している可能性が (本章の発酵実験の結果および第2章 2.7 の rDNA 解析の結果から) 示唆された。*Prototheca* における、rDNA 塩基配列相同性とグルコース嫌気代謝多様性の関連については、さらに実験を行う必要がある。

次に RND16 株のエタノール生産における栄養塩依存性に関連する報告を探すと、耐熱性酵母では栄養塩の添加が、高温におけるエタノール発酵能を高めることが知られている (D'Amore et al., 1989)。特に高温における解糖系酵素の生産にマグネシウムを要求する可能性が強く示唆されてきた (Dombek and Ingram, 1986; D'Amore et al., 1988; D'Amore et al., 1989)。耐熱性酵母である RND17 株の 40℃におけるエタノール発酵実験で再確認された栄養塩依存性が、*Prototheca zopfii* RND16 株の発酵にも認められる (Table 13) ことは非常に興味深い。

3.2 高濃度グルコースを基質とするエタノール生産能

本章 3.1 の実験から、*Prototheca zopfii* RND16 株はこれまで *Prototehca* 属から報告例

のないエタノール発酵を行い、その能力は栄養塩の存在によって高温で促進されることが明らかになった。 ここではさらに、酵母によるエタノール生産に用いられる産業レベルの高濃度グルコース (15%) を基質として与え、高温で嫌気発酵させた場合に栄養塩の存在下で、RND16 株がどの程度のエタノール生産能を有しているか調べた。

実 験 方 法

[嫌気培養]

第2章 2.3 [40°C 以上の高温域におけるエタノール発酵収率] と同様の方法によって、40℃で前培養を行った。 藻体は遠心分離 (1600×*g*・5 min) によって回収し、0.85% NaCl で 2 回洗浄した後、再び遠心分離 (1600×*g*・5 min) でペレットとした。 次に藻体のペレットに炭素源を含まない YNB 液を添加し、良く攪拌して藻細胞を同液中に懸濁した。懸濁液は、細胞内に残っている炭素源を消費させるために 40℃で 24 h 放置した。 藻細胞は発酵試験の直前に遠心分離を行って回収した。

嫌気培養は 100 mL の PYN 培地 (15% glucose, 0.35% peptone, 0.3% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, and 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) を含む 500 mL サイズの枝付羽付三角フラスコ中で行った。 温度条件は 40℃とした。 炭素源を 24 h 絶った状態に放置した藻体の中から 3 g (湿重量) を滅菌スパーテルで取り、発酵試験用の培地の入ったフラスコに入れ懸濁した。 フラスコ口に 7.5 mL の濃硫酸を含むウオータートラップ (Vaugham-Martini and Martini, 1998) を取り付け、フラスコ内を嫌気かつ無菌状態に保ったまま、発酵によって生産された CO_2 ガスを外部へ放出させた。 振とう培養は 40℃ - 120rpm の条件下で行った。

[グルコースとエタノールの測定およびデータ解析]

発酵液を一定時間ごとに採取し、ウォータートラップを通して CO_2 の排出が確認されなくなった時点 (504 h) で培養を終了した。 発酵液から遠心分離 (1600×*g* - 10 min) によって細胞を除いた後、80℃で 15 分間水浴させて細胞外酵素を失活させた。 残存グルコ

ースおよびエタノールは、本章 3.1 [発酵産物の同定および定量] に示した方法で測定した。本実験では、基質として与えた 15%グルコースの全てがエタノールに変換された場合を 100%とするエタノール発酵収率 (本実験では発酵収率 A と呼ぶ) のみならず、消費されたグルコースのみを対象とするエタノール発酵収率 (本実験では発酵収率 B と呼ぶ) の経時変化についても検討した。

結 果 お よ び 考 察

[RND16 株がもつ高濃度グルコースの発酵能]

Figure 7A に嫌気条件下の 40℃における RND16 株のグルコース消費およびエタノール生産を、さらに Fig. 7B には本実験の結果から計算した 2 種類のエタノール発酵収率の経時変化を示す。504 h の培養後、RND16 株は PYN 培地中で 1.8%のエタノールを生産した。 これは発酵収率 A の値に換算した場合 22.9%に相当する。 産業酵母を用いた燃料用アルコール生産では、最低でも 5%以上のエタノール濃度を得るケースが普通であることから (D'Amore et al., 1989) 、この株を高温におけるエタノール生産という目的に使用することは無理があると判断した。 しかし既往の知見では嫌気条件下で全くエタノール生産能をもたないと考えられてきた *Prototheca* 属の株が、酵母でさえ一部の耐熱性株のみが可能である40℃の高温におけるエタノール発酵を、高浸透圧条件の下で21 日間もの長期に渡って行ったことは予想外の結果であった。 また本実験から計算した培養終了時の発酵収率 B は 57.5%であり、RND16 株は高濃度グルコースを基質とした場合でも、本章 3.1 に示した 5%グルコースを含む YNB 培地中における発酵と同様に、エタノール以外の物質 (有機酸等) を生産している可能性が示唆された。

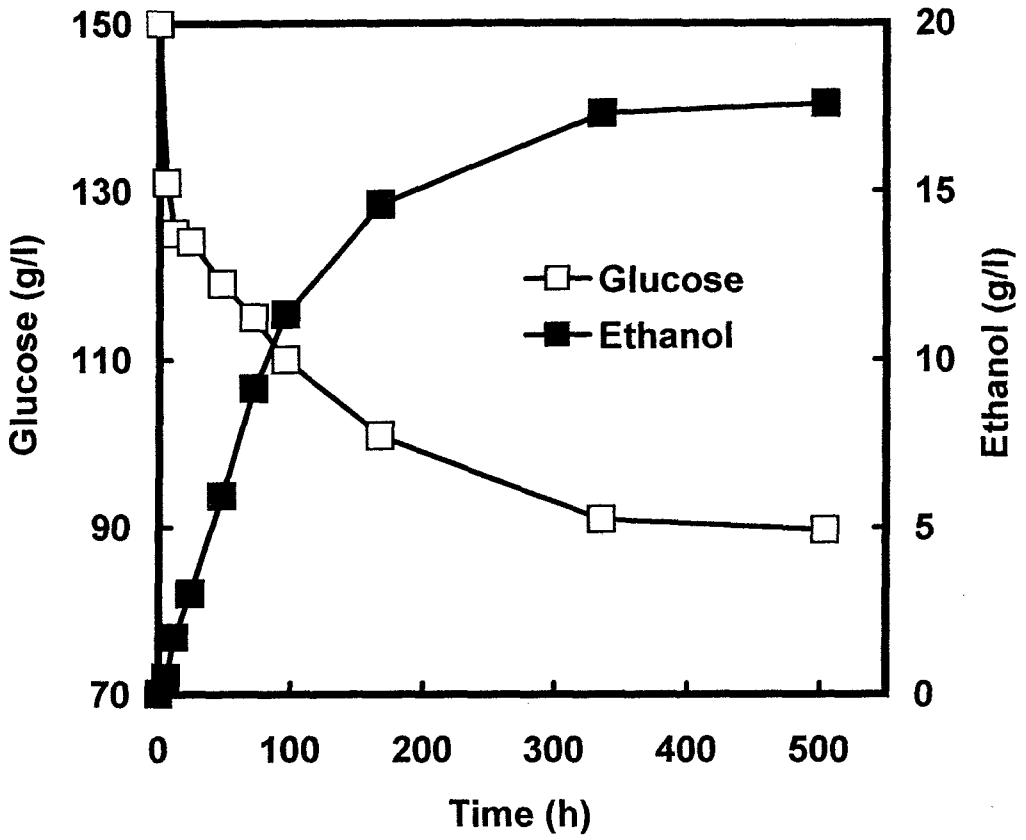

Fig. 7A Time courses of changes in the ethanol and glucose concentrations during fermentation of 15% glucose. RND16 was grown in PYN medium at 40℃. □: Glucose, ■: Ethanol

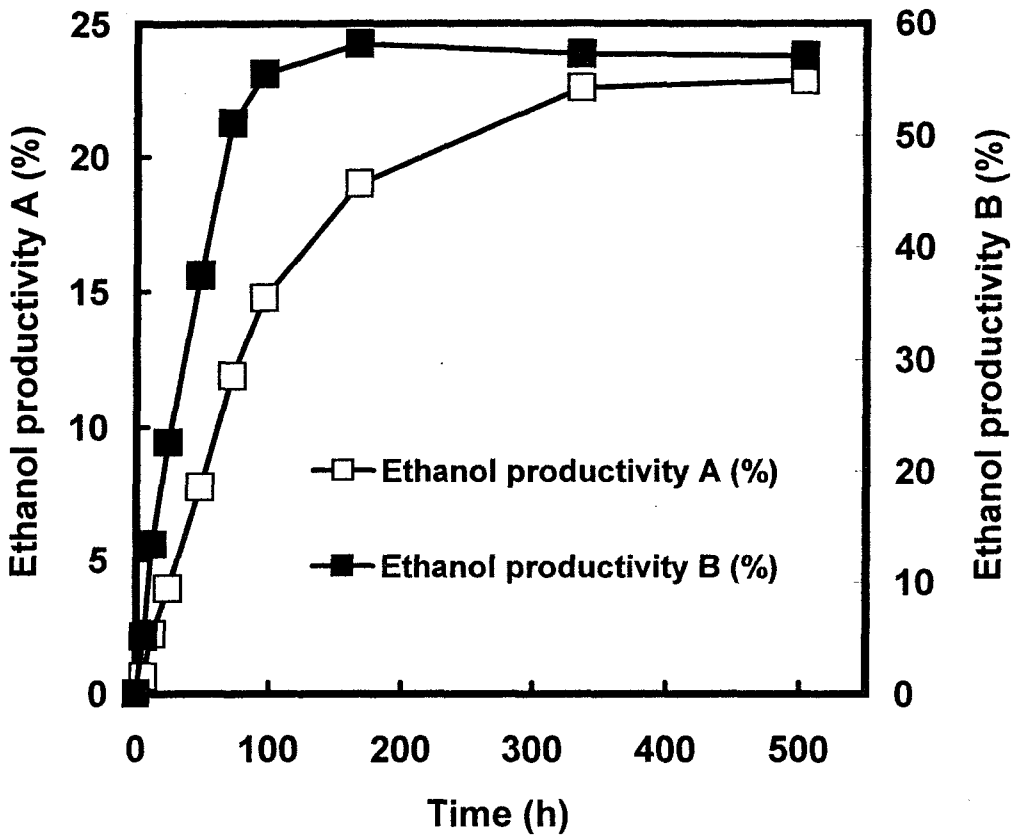

Fig. 7B Time courses of chages in the ethanol productivities during fermentation of 15% glucose. RND16 was grown on in PYN medium at 40℃. □: Derived from initial sugar, ■: Derived from consumed sugar

第4章 耐熱性酵母およびプロトテカの応用の可能性

第2章で示されたエタノール発酵収率から、RND13株は40°C以上の高温域におけるエタノール生産に最も適した酵母と考えられた。 また、酵母様微細緑藻である *Prototheca zopfii* var. *hydrocarbonea* RND16株は35℃で *n*-ヘキサデカンの資化能をもつことから、温度の高い水圏における炭化水素類の除去に使用できる可能性がある。

本章では、酵母RND13株を用いて40°C以上の温度環境の下、実際にバイオエタノール生産に使用する高濃度 (15-25%程度) の糖類を基質とした時のエタノール生産能を、また *P. zopfii* RND16株については、その常温および高温域 (25 - 40°C) における1% (v/v) *n*-アルカン類の分解除去能を、それぞれ評価した。

4.1 酵母RND13株によるエタノール生産

酵母RND13株は、温泉排水由来の酵母の中では、高温で高いエタノール発酵収率を示した。 ここでは高温で産業レベルの高濃度グルコース (15%) および希釈廃糖蜜 (全糖濃度 23%) を発酵させ、そのエタノール生産能を既存の産業用酵母の中では耐熱性に優れると報告されている株と比較した。

実 験 方 法

[供試株の選定]

RND13株の比較対照株として *Saccharomyces cerevisiae* 日本酒酵母協会7号 (以下に協会7号と呼ぶ) を使用した。 本来は、耐熱性をもち40℃以上の高温で増殖およびエタノール生産能が可能であると報告されてきた株を用いるべきであるが、それらは個人または企業の所有株であり入手が困難であった。 他方、協会7号は清酒酵母の中で比較的高温で発酵能が高いことが知られ (高橋、吉沢, 1988)、また耐熱性酵母を用いた高温におけるエタノール生産実験に対照株として実際に使用されている (高橋、吉沢, 1988)。本研究では、先ず協会7号酵母のもつ耐熱性の程度を一般の中温性酵母と比較する目的

で、その40℃における増殖能を検討した。 10mLのYPD液体培地を含む試験管に1白金耳量を接種し、40℃ - 120rpmの振とう培養を行った。 インキュベート開始から20 hは増殖が認められて0.7×10^8 cells/mLの細胞濃度に達したが、それ以降は細胞濃度が急激に減少し、30 - 35℃で得られた定常期における細胞濃度 (3.0×10^8 cells/mL) に達することはなかった。 この時に、細胞の死滅に起因するオルガネラの溶出が顕著に認められた。つまり協会7号は、第2章 2.4 において40℃でほとんど増殖不能であった 2株の中温性酵母株 (ビール酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BSRI YB23-3 および *Debaryomyces hansenii* BP19 株) に比較して (Fig. 4) やや耐熱性に優れるが、40℃以上で常に増殖が可能な耐熱性酵母ほどには、高温に適応できない株であると考えられる。

第1章で述べたように、一般の産業酵母は中温性であり、30 - 35℃で活発にエタノールを生産するが、40℃ではほとんど増殖および発酵を行わないという事実を考慮すると、RND13株の高温域における発酵能を検討する場合の比較対照として用いるには無理がある。 他方、前述のように40℃以上でエタノール生産が可能であると報告されている酵母株は入手が困難であった。 従って、本研究では協会7号を対照株として用いることにした。

[菌体の調整]

2.3の [40°C以上の高温域におけるエタノール発酵収率] と同様の方法により、37℃ (RND13株) または30℃ (協会7号) で前培養を行った。 藻体は遠心分離 (1600×*g*・5 min) によって回収し、0.85% NaClで2回洗浄した後、再び遠心分離 (1600×*g*・5 min) でペレットとした。

[15%グルコースの発酵]

嫌気培養は100 mLのPYN培地 (15% glucose, 0.35% peptone, 0.3% yeast extract, 0.2% KH_2PO_4, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$, and 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) を含む500 mL サイズの枝付羽付三角フラスコ中で行った。 前述の菌体ペレットの中から1,3 および5g (湿重量) を滅菌スパーテルで取り、PYN培地の入ったフラスコに入れ懸濁した。 これによって、培養

液中の初期菌体濃度は 1,3 および 5% (w/v) となる。フラスコロに 7.5 mL の濃硫酸を含むウオータートラップ (Vaugham-Martini and Martini, 1998) を取り付け、30, 40 および 43℃の温度条件で 120rpm の振とう培養を行った。

[希釈廃糖蜜の発酵]

廃糖蜜はフードサイクルシステムズ株式会社 (埼玉) から供与された外国産の製品を 4 倍希釈して用いた。希釈廃糖蜜の全糖濃度とグルコース濃度をそれぞれ オルシノール-硫酸法 (Marshall and Neuberger, 1972) と 酵素法 (Kunst et al., 1984) によって測定したところ、23.0% (w/v) および 8.9% (w/v) であった。嫌気培養は 100 mL の希釈廃糖蜜を含む 500 mL サイズの枝付羽付三角フラスコ中で行った。前述の菌体ペレットの中から 3g (湿重量) を滅菌スパーテルで取り、希釈廃糖蜜の入ったフラスコに入れ懸濁した。これによって、培養液中の初期菌体濃度は 3% (w/v) となる。フラスコロに 7.5 mL の濃硫酸を含むウオータートラップ (Vaugham-Martini and Martini, 1998) を取り付け、40℃の温度条件下で 120rpm の振とう培養を行った。

[グルコース、エタノール および生細胞率の測定]

15% グルコースの発酵実験では嫌気培養開始から 6, 12, 24 および 48 h 後、希釈廃糖蜜の発酵実験では 2, 4, 6, 12, 24, 36 および 48 h 後に、発酵液を各 5mL ずつ採取した。発酵液から遠心分離 (1600×*g* - 5 min) によって細胞を除いた後、80℃で 15 分間水浴させて細胞外酵素を失活させた。残存グルコースおよびエタノールは、本章 3.1 [発酵産物の同定および定量] に示した方法で測定した。生細胞率は細胞を 1% (w/v) のメチレンブルーを含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.6) で染色し、メチレンブルー還元能を有する細胞の割合 (%) として求めた。

結 果 お よ び 考 察

[15%グルコースを基質とする RND13 株の発酵に及ぼす細胞接種濃度の影響]

Figure 8 にグルコース消費、Fig. 9 にエタノール生産の経時変化を示す。RND13 株は

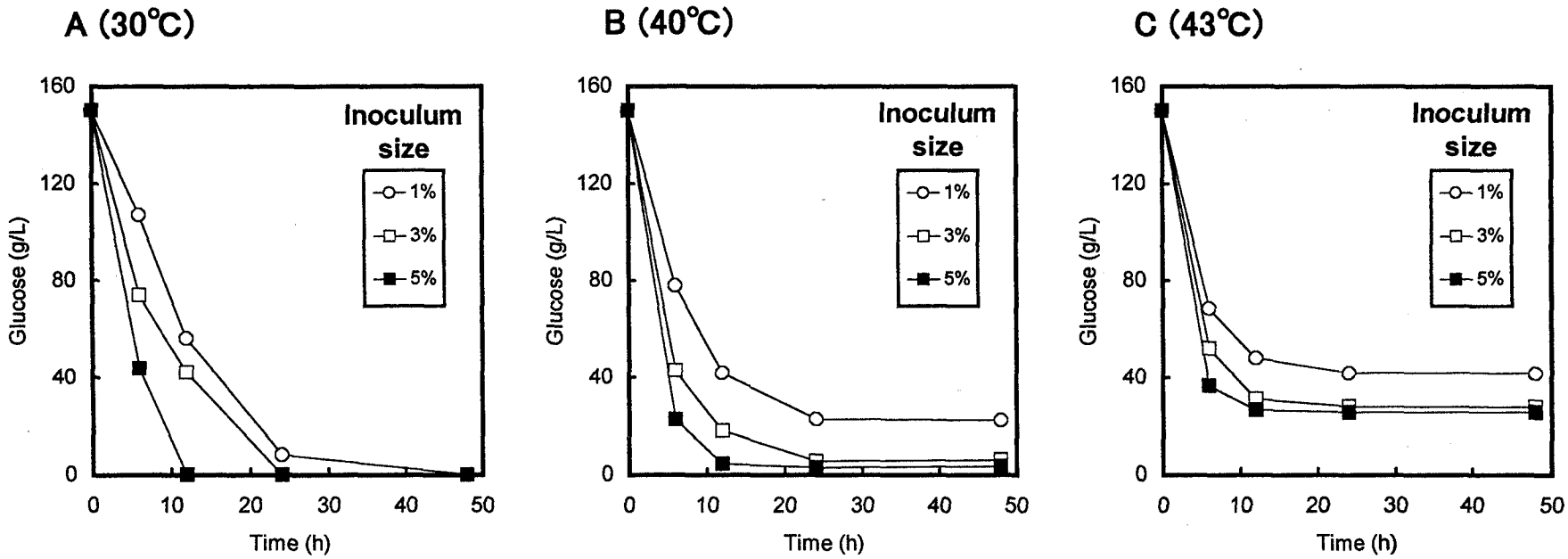

Fig. 8 Relations between increasing inoculum size and consumption of glucose during fermentation of 15% glucose by RND13. Cultures were started with 1% (○), 3% (□) and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) 30°C, (B) 40°C, (C) 43°C.

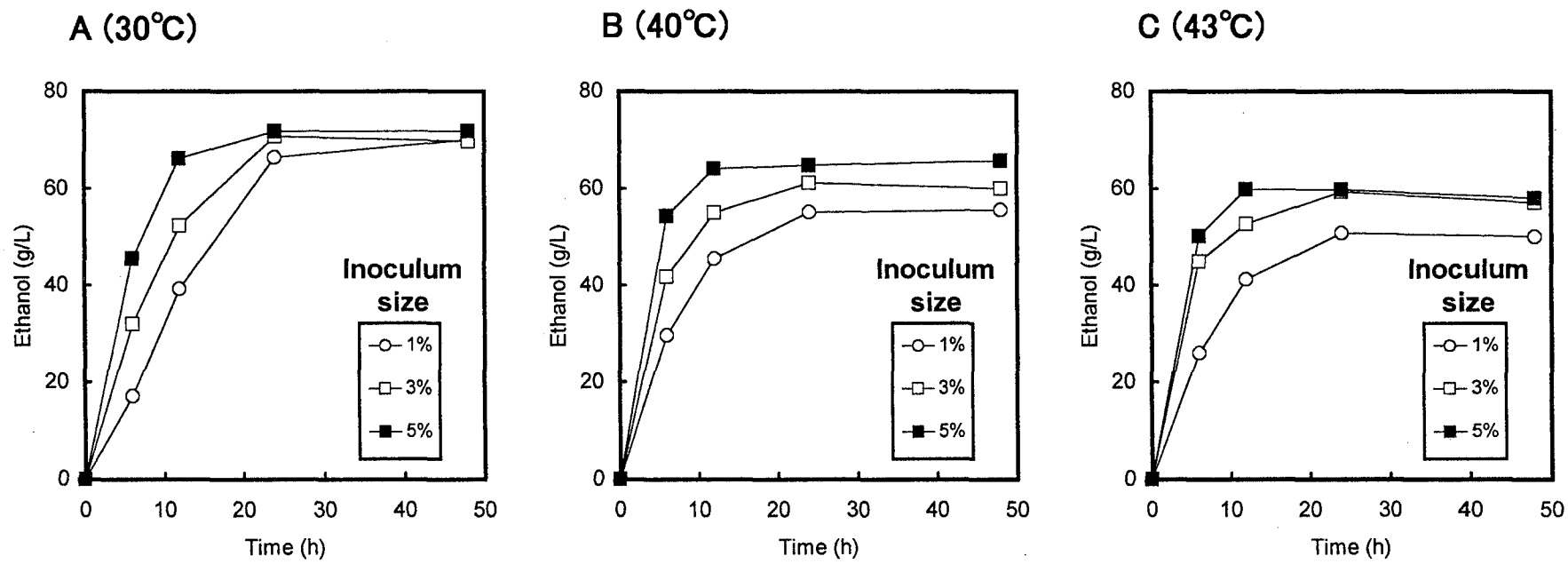

Fig. 9 Relations between increasing inoculum size and ethanol production during fermentation of 15% glucose by RND13. Cultures were started with 1% (○), 3% (□) and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) 30°C, (B) 40°C, (C) 43°C.

30℃で 15%グルコースを完全に消費し (Fig. 8A)、7.0 - 7.2% のエタノールを生産した (Fig. 9A)。 温度を 40℃に上げて発酵を行うと、細胞接種量が高い場合、RND13 株は 30℃の場合と同様にほとんど全てのグルコースを消費した (初期細胞濃度 3% および 5% の場合, Fig. 8B) が、初期細胞濃度が 1%の条件のみは 2.2% のグルコースが残存した。 エタノール濃度は細胞接種量の増大に伴って 6.6%まで上昇したが、この値は 30℃の発酵時より若干低いものである (Fig. 9B)。 さらに高温の 43℃で発酵を行っても、40℃の発酵実験と同様に、細胞接種量の増加がグルコースの消費およびエタノールの生産を促進した。 しかし、RND13 株はグルコースを完全に消費することができず、エタノール濃度の値にも若干の低下が認められた (5.0 – 6.0%, Figs. 8C and 9C)。 次に Figs. 8 と 9 の結果に基づき、発酵初期 (嫌気培養開始後 0 - 6 h) のエタノール生産速度およびグルコース消費速度に及ぼす初期細胞濃度の影響をまとめた (Figs. 10A and 10B)。 これによると、30℃ および 40℃ のいずれの温度においても、エタノール生産およびグルコース消費の速度は細胞接種量の増大に伴い促進された。 また、40℃における値は、30℃の培養に比較して高かった。 しかしながら、温度条件をさらに43℃まで上昇させても、エタノール生産速度およびグルコース消費速度の値が 40℃の発酵時より目立って高くなることはなかった。

[15%グルコースを発酵中の RND13 株の生細胞率に及ぼす温度および細胞接種濃度の影響]

細胞初期濃度が、RND13 株の生細胞率の経時変化に及ぼす影響を Fig. 11 に示す。 30℃では初期細胞濃度の値に関係なく、発酵終了時に 90%以上の細胞が生存したことから、RND13 株は常温において高いエタノール耐性を有していることがわかる (Fig. 11A)。 しかしながら 40℃および 43℃の高温では、培養時間の経過とともに細胞は死滅した (Figs. 11B and 11C)。 他方、RND13 株は好気条件の下では 40 - 42℃の温度域で良好な増殖を示すことが明らかとなっている (Fig. 4) から、本実験で観察された細胞の死滅は、高温条件とエタノール毒性の 2 つの条件が重なって引き起こされた可能性が高い。 本実験を 40℃で行った場合の総細胞濃度 (生細胞と死細胞の合計) の経時変化を Fig. 12A に、生細胞濃度の経時変化を Fig. 12B にそれぞれ示す。 Figure 12A は培養開始後少な

A

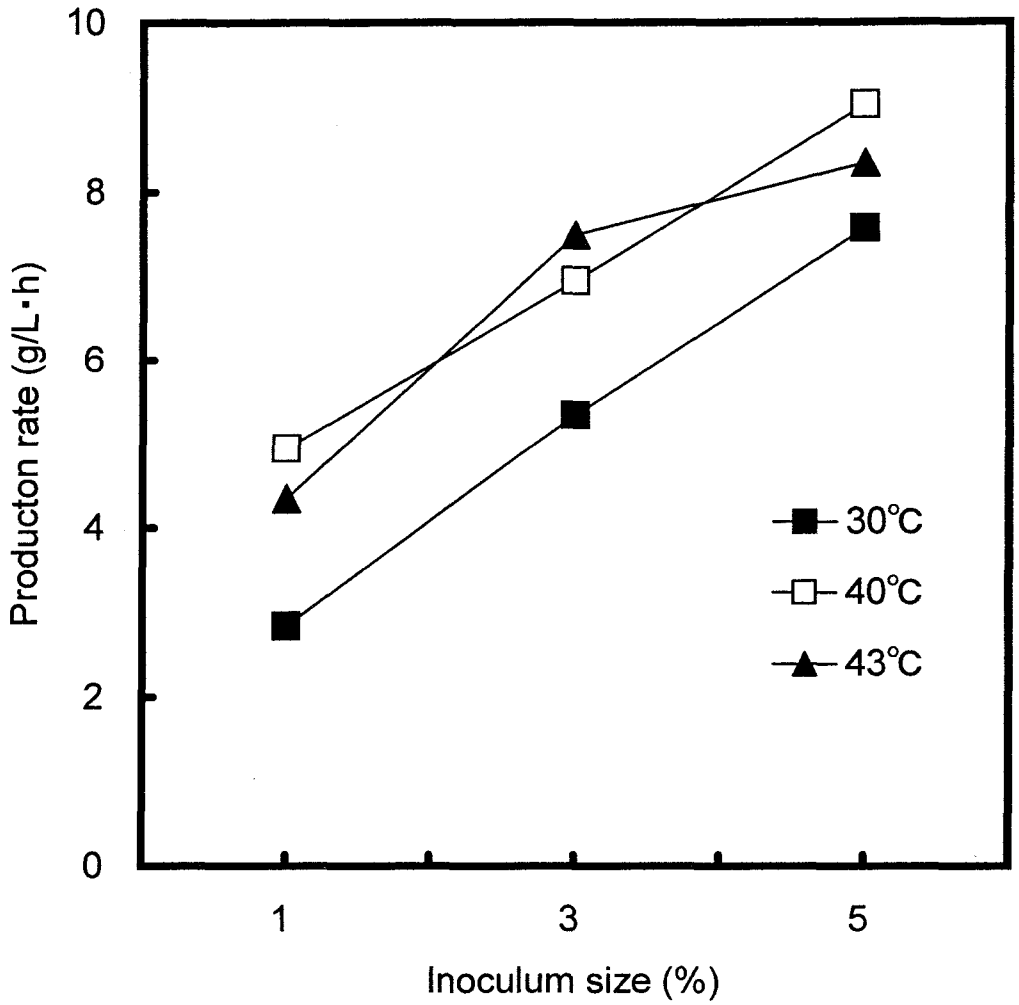

Fig. 10A Relations between increasing inoculum size and ethanol production rate during fermentation of 15% glucose (0 - 6 h). RND13 was grown on 15% glucose at 30°C (■), 40°C (□) and 43°C (▲).

B

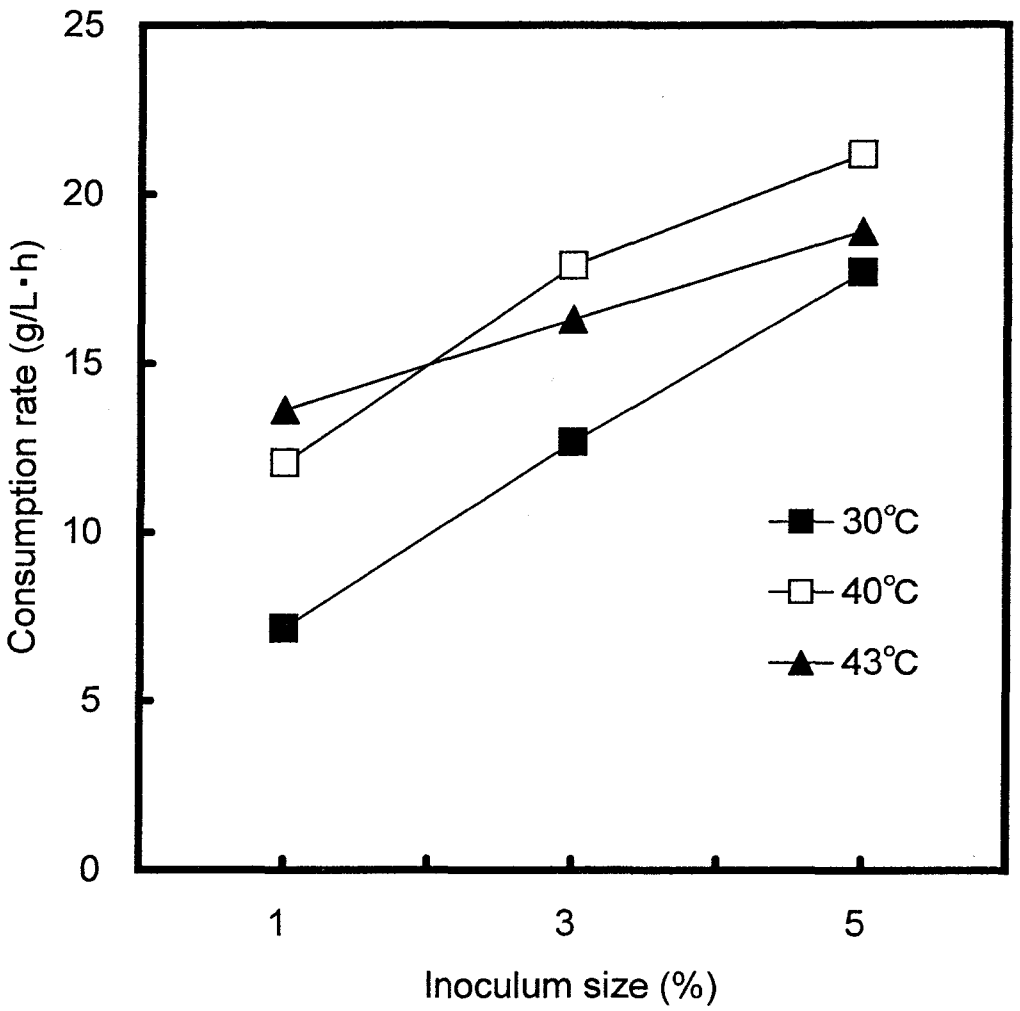

Fig. 10B Relations between increasing inoculum size and glucose consumption rate during fermentation of 15% glucose (0 - 6 h). RND13 was grown on 15% glucose at 30°C (■), 40°C (□) and 43°C (▲).

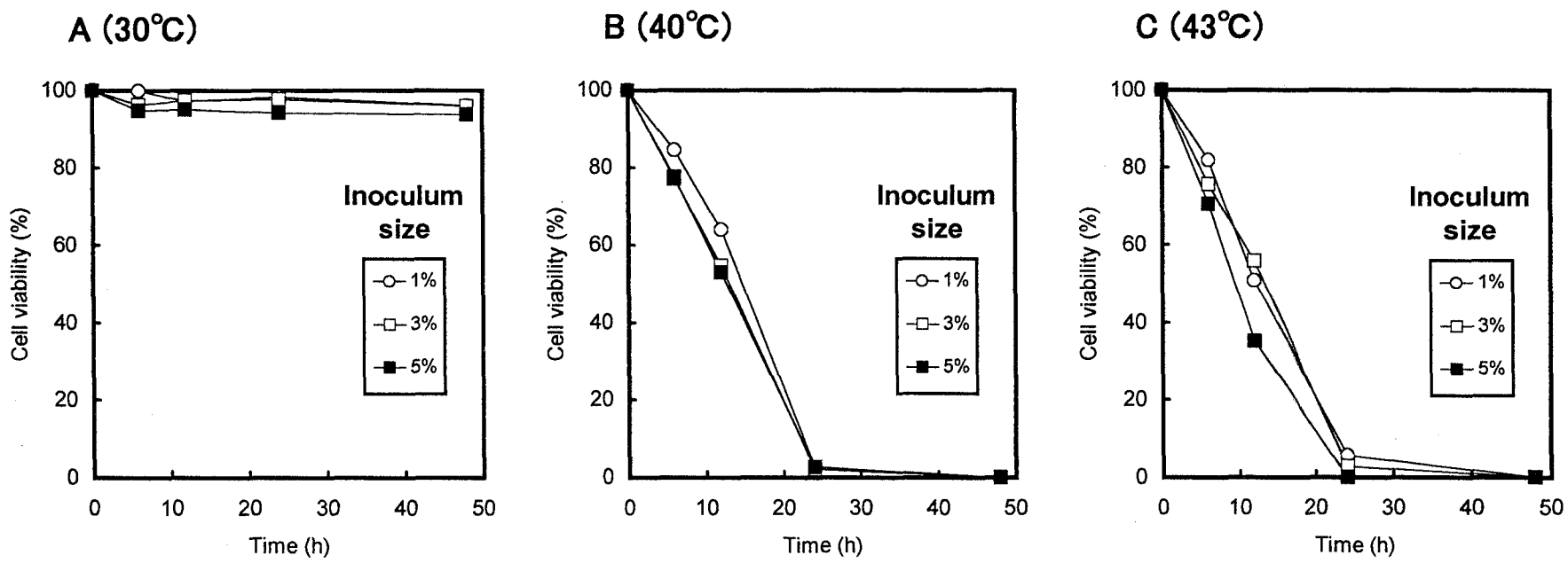

Fig. 11 Relations between increasing inoculum size and cell viability during fermentation of 15% glucose by RND13. Cultures were started with 1% (○), 3% (□) and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) 30℃, (B) 40℃, (C) 43℃.

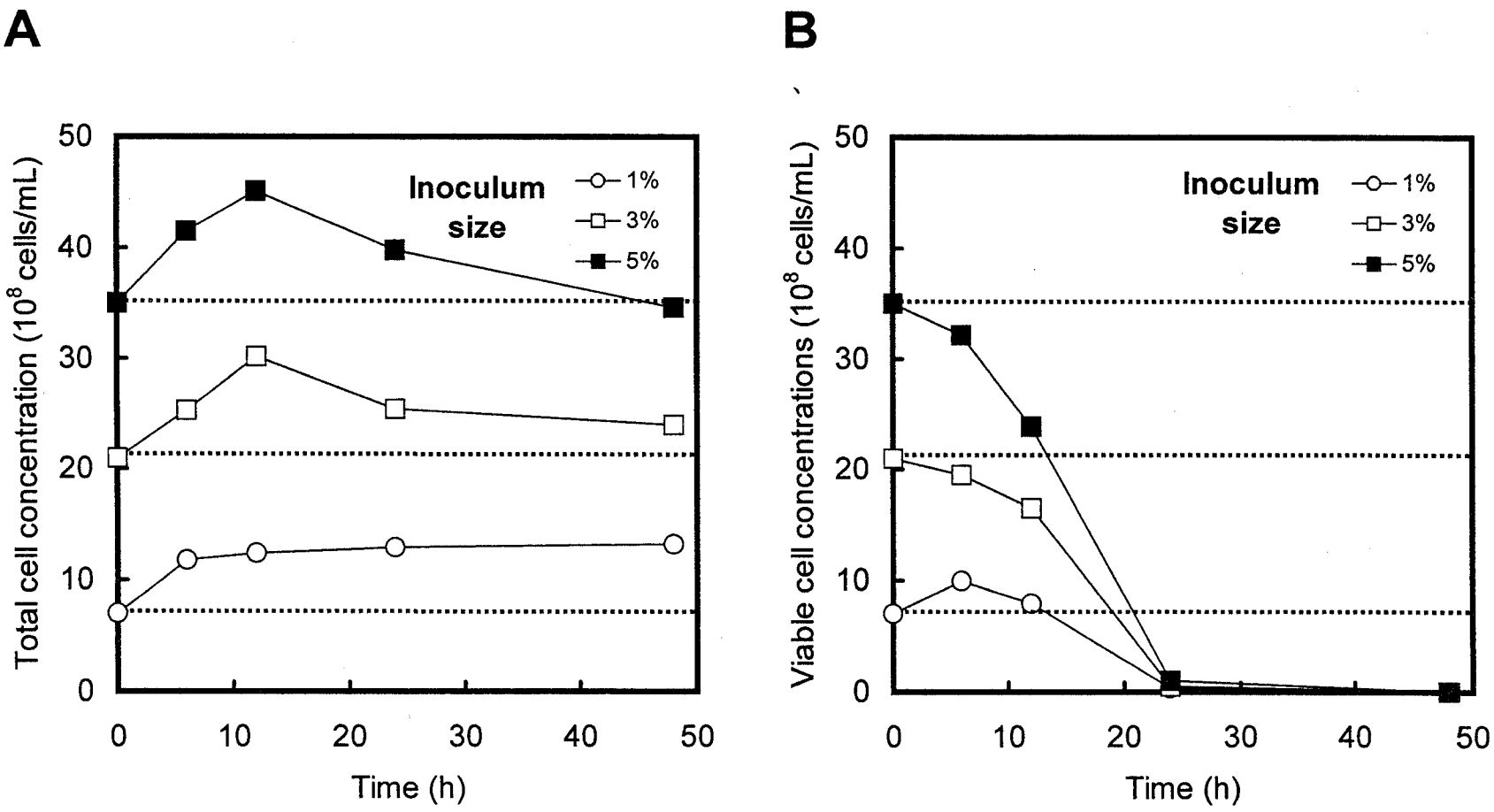

Fig. 12 Changes in cell concentration during fermentation of 15% glucose at 40℃ started with 1% (○), 3% (□) and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) Total cell concentration; (B) Viable cell concentration. The dotted lines across the figure indicate the levels of initial cell concentration.

くとも 12 h までは総細胞濃度の値が上昇していることを示し、この事実は RND13 株の嫌気的増殖を裏付けている。 従って、40℃におけるエタノール生産はほとんどが、生菌の生産する酵素によって行われたと考えられる。 しかし初期細胞濃度が 3 および 5% と高い場合、発酵開始から 12 h の時点における生細胞濃度は既に初期細胞濃度の値を大きく下回っており、細胞の接種量が高過ぎると、細胞の死滅が促進されると考えられた (Fig. 12B)。

[15%グルコースを基質とする協会 7 号の発酵に及ぼす細胞接種濃度の影響]

Figure 13 にグルコース消費、Fig. 14 にエタノール生産 および Fig. 15 に生細胞率の経時変化を示す。 協会 7 号は測定したこれら全てのパラメーターについて、耐熱性酵母 RND13 株と同様の変化傾向を示し、特筆すべき違いは認められない。 しかし、発酵初期 (0 - 6h), のエタノール生産速度に着目すると、有意な差が認められた (Figs. 16A, 16B and 16C)。 30℃および 40℃における協会 7 号のエタノール生産速度は、初期細胞濃度が 1%の場合、30℃で 4.9 g/L·h、40℃で 4.7 g/L·h を示し、初期細胞濃度が 5%の場合、30℃で 9.6 g/L·h、40℃で 10.5 g/L·h を示したことから、初期細胞濃度の違いにかかわらず、温度条件が生産速度に及ぼす影響は少ないと考えられた。 他方 RND13 株のエタノール生産速度は、初期細胞濃度が 1%の場合、30℃で 2.8 g/L·h、40℃で 4.9 g/L·h を示し、初期細胞濃度が 5%の場合、30℃で 7.6 g/L·h、40℃で 9.0 g/L·h を示したため、等しい初期細胞濃度条件の下では、40℃における生産速度は 30℃に比較して有意に高いと考えられた。 さらに 43℃における結果を見ると、協会 7 号のエタノール生産速度は、初期細胞濃度が 1%の場合、2.9 g/L·h、5%の場合は 9.0 g/L·h であるが、RND13 株は初期細胞濃度が 1%の場合 4.3 g/L、5%の場合は 8.4 g/L·h を示した。 つまり 43℃における RND13 株の生産速度は、初期細胞濃度が低い場合に限って協会 7 号より有意に高かった。 全体を通してみると、RND13 株のエタノール生産速度は、30℃では協会 7 号より低かったが、43℃の高温では菌体量が少ない場合 (1%) に限り、協会 7 号酵母よりも高い値を示した。 なお、嫌気培養終了時 (48 h) におけるエタノール濃度を比較すると、温度条件にかかわらず2株の間に大きな差は存在しない (Figs. 9 and 14)。

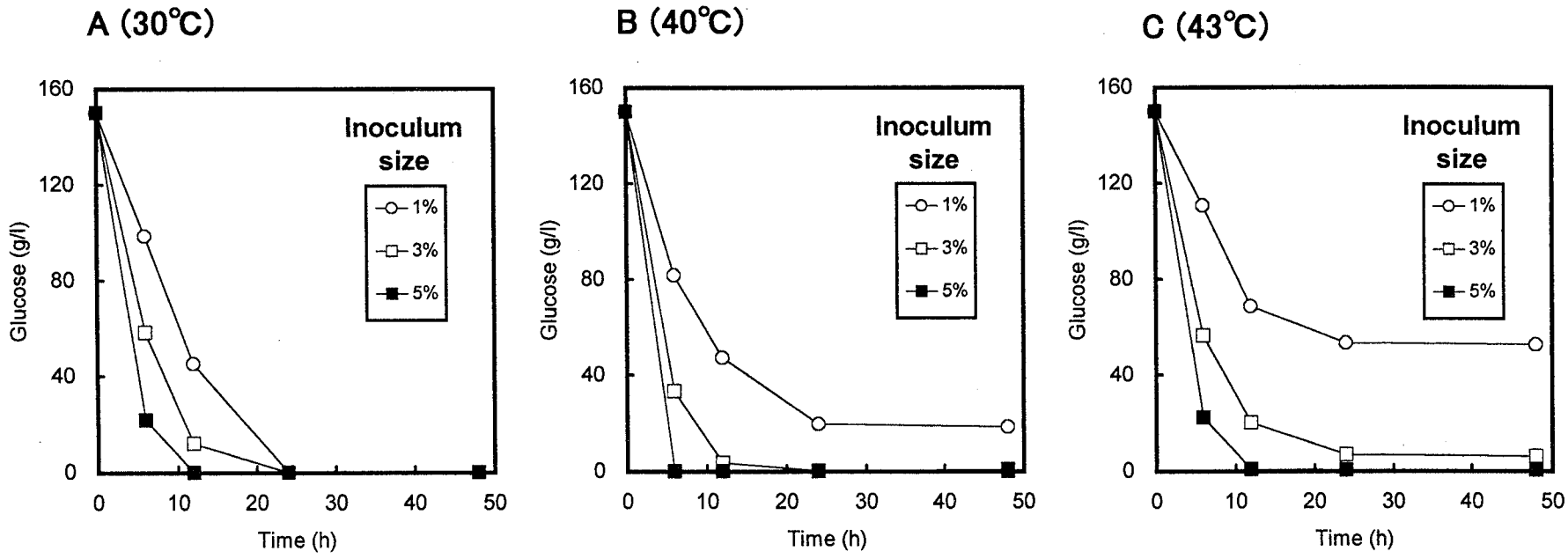

Fig. 13 Relations between increasing inoculum size and consumption of glucose during fermentation of 15% glucose by 'Kyokai-7gou'. Cultures were started with 1% (○), 3% (□) and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) 30℃, (B) 40℃, (C) 43℃.

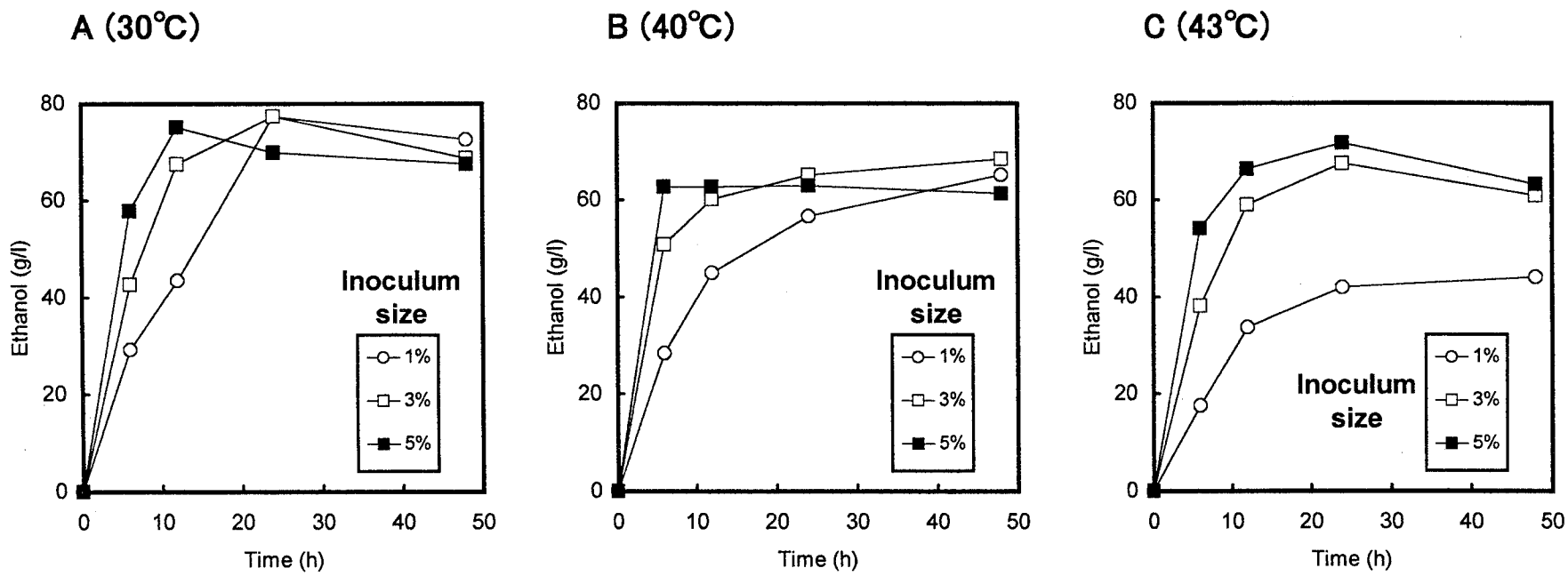

Fig. 14 Relations between increasing inoculum size and ethanol production during fermentation of 15% glucose by 'Kyokai-7gou'. Cultures were started with 1% (○), 3% (□) and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) 30℃, (B) 40℃, (C) 43℃.

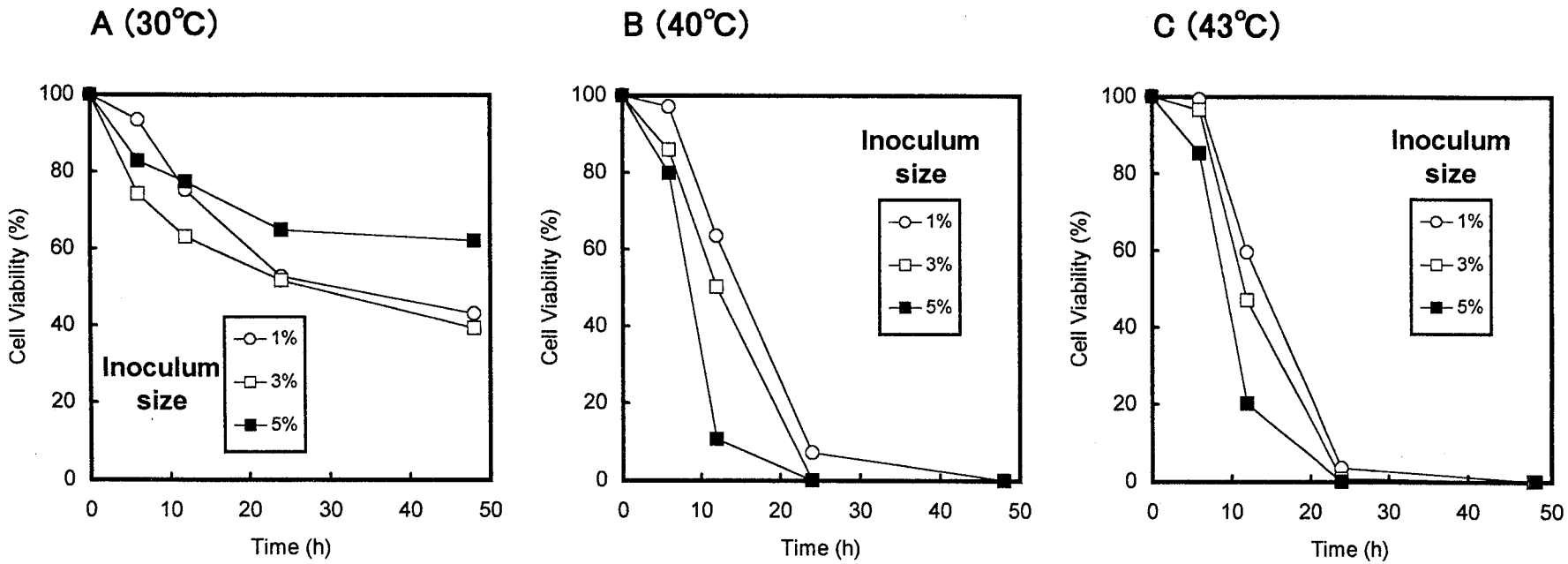

Fig. 15 Relations between increasing inoculum size and cell viability during fermentation of 15% glucose by 'Kyokai-7gou'. Cultures were started with 1% (○), 3% (□), and 5% (■) wet weight cell inoculum. (A) 30℃, (B) 40℃ (C) 43℃.

A (30℃)

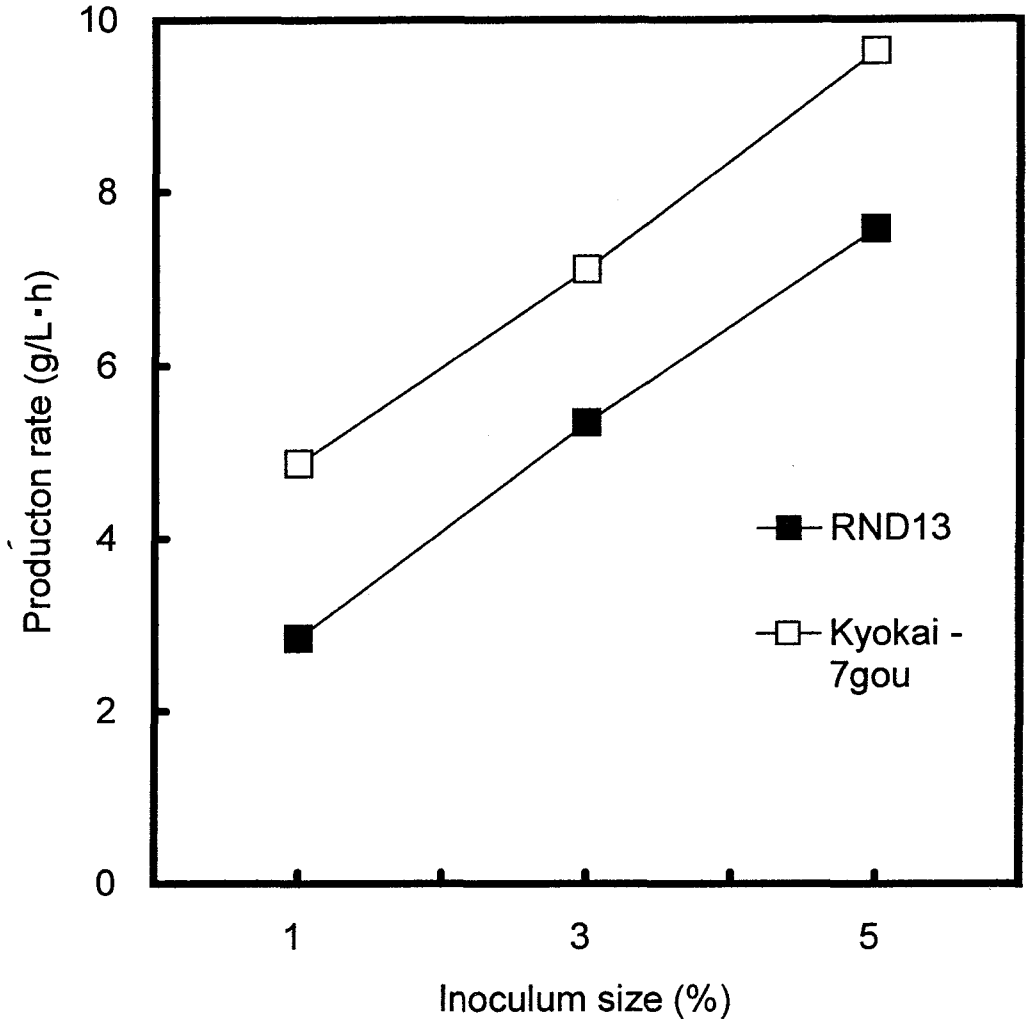

Fig. 16A Relations between increasing inoculum size and ethanol production rate during fermentation of 15% glucose (0 - 6 h). RND13 (■) and 'Kyokai-7gou' (□) were grown on 15% glucose at 30℃.

B (40℃)

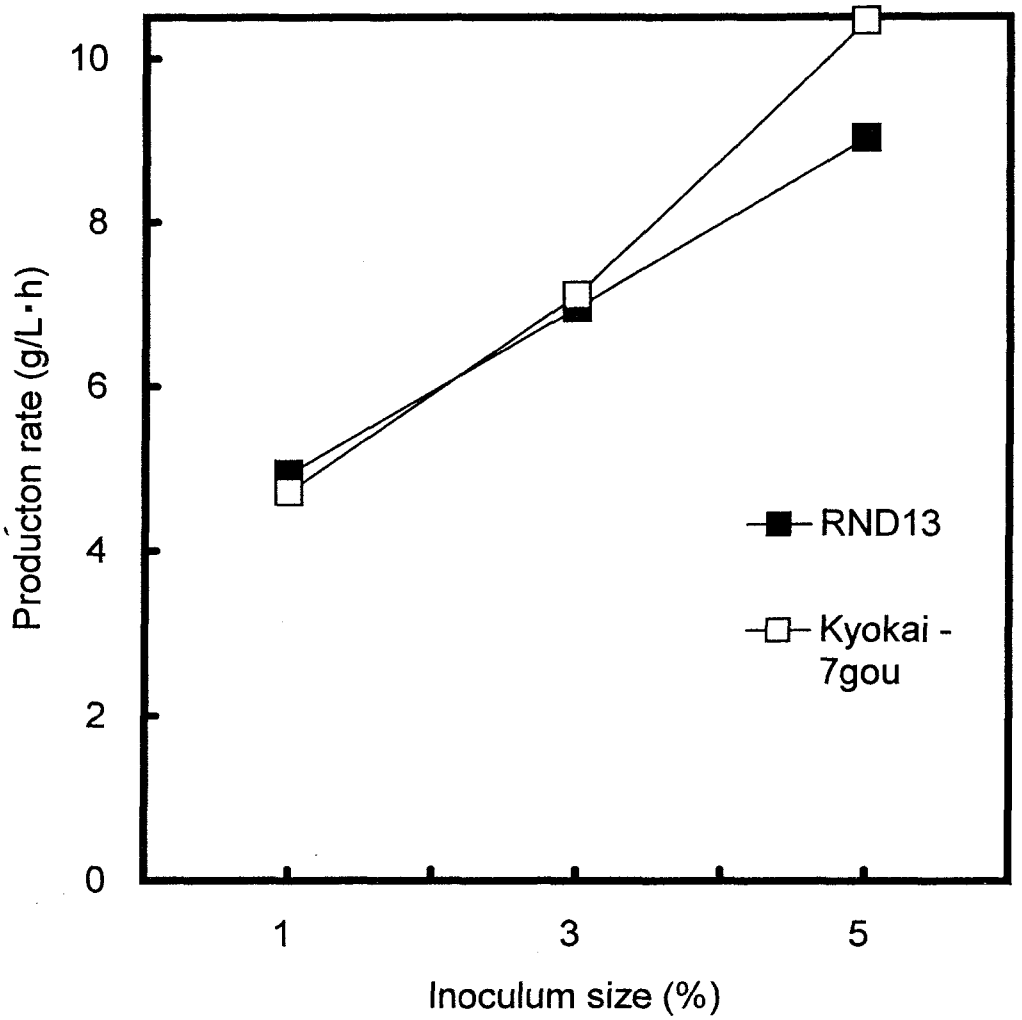

Fig. 16B Relations between increasing inoculum size and ethanol production rate during fermentation of 15% glucose (0 - 6 h). RND13 (■) and 'Kyokai-7gou' (□) were grown on 15% glucose at 40℃.

C (43°C)

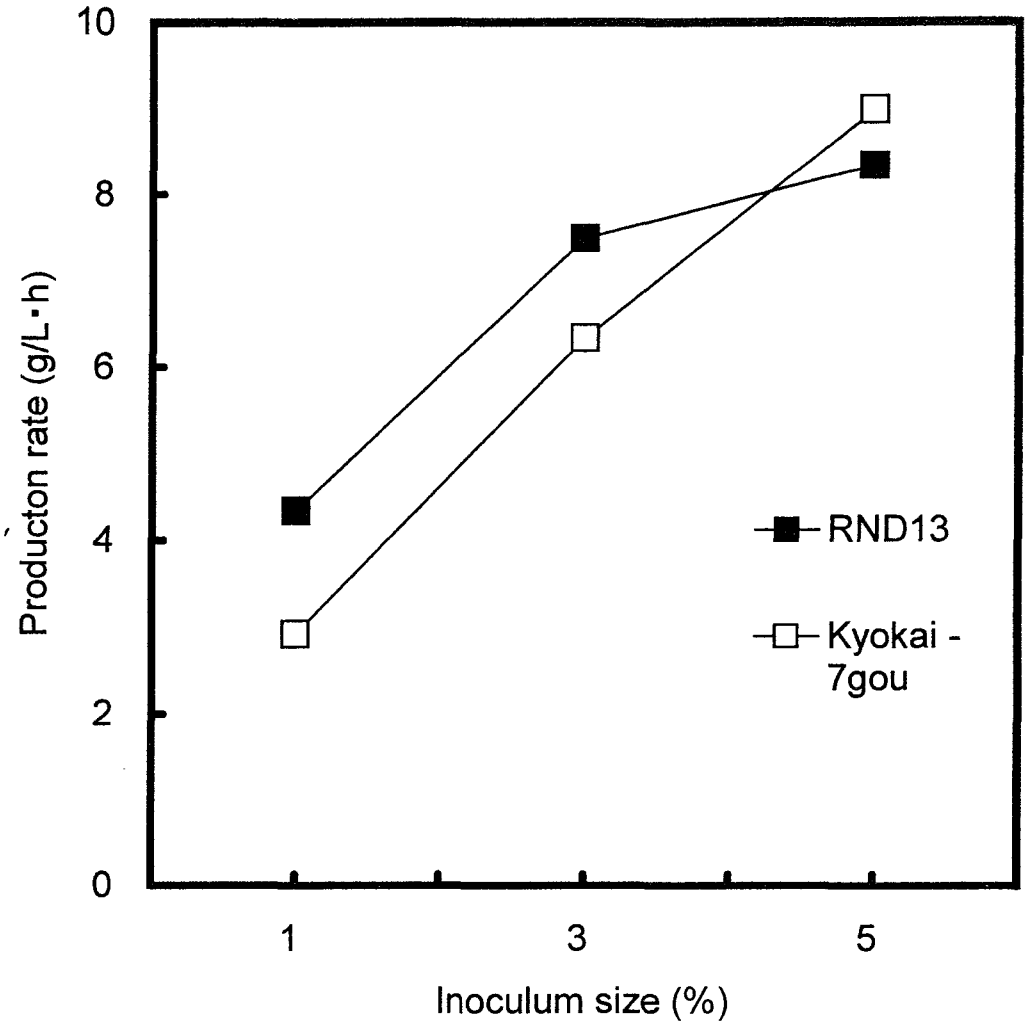

Fig. 16C Relations between increasing inoculum size and ethanol production rate during fermentation of 15% glucose (0 - 6 h). RND13 (■) and 'Kyokai-7gou' (□) were grown on 15% glucose at 43°C.

[廃糖蜜を基質とするエタノール発酵]

Figure 17 に希釈廃糖蜜を発酵中のエタノール濃度の経時変化を示す。 RND13 株は、嫌気培養開始直後から活発にエタノール生産を行い、発酵初期の生産速度は協会 7 号を上回った。 しかし、6 時間を超えるとエタノール生産量は逆転し、RND13 株の発酵が次第に衰えたのに対し、協会 7 号はその後 24 h まで発酵を行った。 廃糖蜜は、その成分としてグルコース以外に、スクロースおよびラフィノースを多量に含んでいる。 RND13 株は、高温で高効率にグルコースの発酵を行うが、第2章 2.5 の生理学的性質に示されたように、ラフィノースを発酵しない。 また、スクロースを発酵するが、その能力は弱い。一方、*Saccharomyces cerevieiae* (協会 7 号) はラフィノースおよびスクロースに対し、強い発酵能を示すことが知られる (Kurtman and Fell, 1998)。 それ故、嫌気培養後期に認められたエタノール濃度の逆転は、協会 7 号がこれらの 2 糖および 3 糖類を分解したことに起因すると考えられる。

[RND13 株を用いたエタノール生産の可能性]

本実験では、高温環境において RND13 株がもつ 15%グルコースの発酵能を検討した。既往の知見からは、*Saccharomyces diastaticus* の耐熱性株が 15%グルコースから 24 h の嫌気培養によって 6.4%のエタノールを、また土壌由来の *Kluyveromyces marxianus* 野生株は 14% グルコースから 42 h の嫌気培養によって 6.4 - 6.8% のエタノールを生産した (いずれも温度条件は 40℃) ことが報告されている (D' Amore et al., 1989; Banat et al., 1992)。 これに対して本実験では RND13 株により、40℃で 15% グルコースから 6.6%のエタノールを得ており、この値は前述の 2 例に近い値と考えられる (Fig. 8B)。 特に前者の *S. diastaticus* の発酵では、本研究と同一の培地、初期細胞濃度および振とう条件の下で行われたことを注記したい。 さらに RND13 株は、30℃よりも 40 および 43℃の高温で、より迅速にエタノール生産を行という長所を有していた (Figs. 10A)。RND13 株を用いた高温におけるエタノール生産の最適条件は (回分発酵に関する限り) 生産速度と生産量の値を高い水準で両立可能な 40℃、初期細胞濃度 5%の条件であると考えられる。 しかし 40℃の発酵では、エタノール生産量が 30℃の場合に比較して 0.6 - 1.4%低下していることも事実である (Figs. 9A and 9B)。 このエタノール生産の低下は、

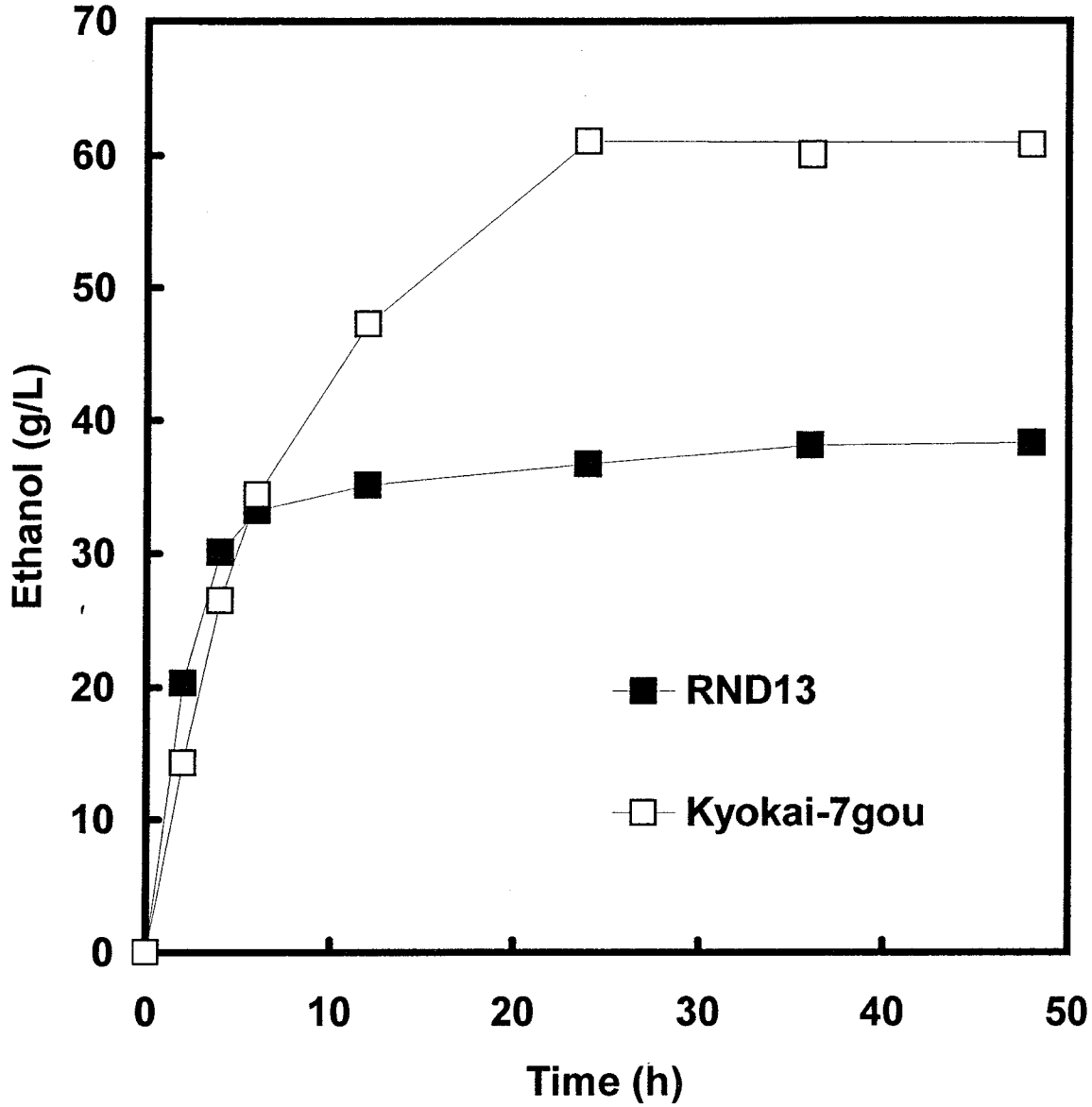

Fig. 17 Time courses of changes in ethanol concentration during fermentation in molasses containing 23% total sugar (w/v). ■: RND13, □: Kyokai - 7gou

高温環境下で高濃度エタノールがもつ毒性に起因している可能性が高い (D'Amore et al., 1989)。 この予想を裏付けるように、40℃および 43℃では嫌気培養時間が長くなるに従い、著しい細胞の死滅が観察された (Figs. 11B and 11C)。 一般的に *Candida* 属および *Kluyveromyces* 属の酵母は、*Saccharomyces* 属と比較して耐熱性に優れるが、エタノール耐性に関しては劣るとされる (Hacking et al., 1984; Banat et al., 1992; Kadam and Schmidt, 1997)。 実際、第2章 2.7 で明らかにされたように、RND13 株は *Saccharomyces* 属酵母よりも *C. glabrata* および *K. delphensis* の方に近縁であった (Fig. 5A)。 しかしながら、Nolan ら (1994) および Riordan ら (1996) は、著しい耐熱性をもつが高温でエタノール耐性に乏しい *K. marxianus* (D'Amore et al., 1989; Hacking et al., 1984) をアルギン酸ビーズに固定し、45℃で連続的に 2%グルコースを 6 日間および、4%スクロースを 20 日間の繰返し回分発酵を行った。 これらの研究例では、細胞の固定化の効果ばかりでなく、基質となる糖の濃度を低く抑えたことによっても高温における酵母のエタノール阻害が軽減され、長期間の発酵が可能になったものと考えられる。 もし RND13 株について、このような条件で繰返し回分発酵が可能であれば、この株がもつ発酵初期の高いエタノール生産速度が有利に働くであろう。

RND13 株は廃糖蜜の発酵能に問題がある。 しかし、高温におけるグルコースの発酵能は高く、もし長期間に渡って繰り返し回分培養が可能であれば、コーンマッシュ (トウモロコシデンプンを糖化したもの：アメリカ合衆国では安価に市販されている) から高効率でエタノール生産を行うことは可能であると考えられる。

4.2 プロトテカ RND16 株による石油 (炭化水素) の分解

Prototheca zopfii の中には *n*-アルカンを資化、または原油中で様々な炭化水素類 (芳香族炭化水素, シクロアルカン, アルキルベンゼン, *n*-アルケン等) を分解する株が複数存在し (Walker and Pore, 1978)、これらは *P. zopfii* var. *hydrocarbonea* という亜種に分類されている。 特にこの亜種の Type strain である ATCC 30253 株は、高い炭化水素類分解能をもつことから、その分解特性が集中的に研究されてきた (Walker et al., 1975; Walker et al., 1975; Koenig and Ward, 1984; Suzuki et al., 1998; Yamaguchi et

al., 1999)。 ATCC 30253 株はグルコースを炭素源として与えると37℃で生育可能であるが、*n*-アルカンおよび原油を炭素源とした場合は25℃を超える温度域で生育できないことが知られる (Koenig and Ward, 1984)。 一方、*Prototheca* 属の微細藻全体についてみると、グルコースを炭素源として38℃で増殖可能な株数は極めて少ないことが知られており (Kessler, 1977)、 ATCC 30253 株は *Prototheca* 属の藻類の中では耐熱性が高い部類に入ると考えられる。 従って、耐熱性をもつATCC 30253 株でさえ、その *n*-アルカン分解または資化に関わる酵素が高温で失活するのであれば、他の *Prototheca* についても、25℃以上の温度域で炭化水素を資化する株は存在しないであろうと考えられた (Koenig and Ward, 1984)。ところが温泉排水由来の *Prototheca* RND16 株は、35℃で *n*-ヘキサデカン資化能を有していた (第2章 2.2)。

ここでは、*n* -ヘキサデカンを炭素源とした場合の増殖能 および *n* -アルカンを炭素源として生育させた場合の炭化水素分解能の温度依存性について、RND16 株と ATCC 30253 株を比較した。なお、ATCC 30253 株は 10℃の低温環境下で炭化水素類を資化することが既に報告されているため (Koenig and Ward, 1984)、本実験では25℃を超える高温側の炭化水素分解特性の解明に的を絞った。

実 験 方 法

[供試株]

RND16 株の比較対照として使用した *Prototheca zopfii* var. *hydrocarbonea* (ATCC 30253 株)は、American Type Culture Collection から購入した。 以下の実験は RND16 株および ATCC 30253 株を用いて同様に行った。

[増殖に及ぼす温度の影響]

(1) 培地

10 mL サイズの試験管に、酵母用の最少培地で、炭素源を含まない 0.67% YNB 培地 4.8 mL を入れ、その上に 0.45 μm Omnipore Membrane Filter を通して滅菌した *n*-ヘキサデカンを 200 μL 重層した (終濃度4% (v/v))。 試験管内を好気的かつ無菌条件に保つ

ために、試験管口を発泡シリコン栓で塞いだ。

(2) 藻細胞の接種と培養条件

各株はYPD寒天培地上で5日間培養した後、0.85% NaCl中で洗浄した細胞を無菌的に、初濃度 2.4×10^5 cells/mL になるように上記のYNB培地を含む試験管に接種し、25, 30, 35, 38℃ および40℃で20日間の静置培養を行った（予備実験で藻を接種せずに振とうを行うと、高温で炭化水素の揮発が著しかったため)。 光照射は行わなかった。 一定時間おき（培養開始から8日目までは1日毎、それ以降は2日毎）にトーマ血球計を用いて細胞濃度を決定し、増殖曲線を得た。

[*n*-アルカン分解におよぼす温度の影響]

(1) 培地

実験は、炭素源を含まない0.67% YNB培地 19.8 mL を含む 50 mL サイズのフラスコ中で行った。 炭素源として、*n*-テトラデカン、*n*-ペンタデカン、*n*-ヘキサデカン および *n*-ヘプタデカンを等重量づつ含む *n*-アルカン標準品 (Crude Oil Internal Standard, SUPELCO Co., Bellafonte, PA) を用いた。この *n*-アルカン混合物を 0.45 μm Omnipore Membrane Filter を通して滅菌した後、その 0.2 mL を各フラスコ中のYNB培地に重層した。この操作により、培地中に含まれる炭化水素の終濃度は 1% (v/v) となり、また4種類の *n*-アルカンは各々0.19% (w/v) となる。 なお、本来は微生物分解を受けにくい多環芳香族化合物について分解能を調べる必要があるが、本研究では時間上の制約から、芳香族は実験に含めなかった。

(2) 培養条件

藻細胞の接種は [増殖に及ぼす温度の影響] で示した方法と同様に行った。 上記のYNB培地および*n*-アルカン標準品を含むフラスコを12個用意し、細胞を接種した後、各温度条件 (25, 30, 35 および 38℃) で静置培養を 5 - 20 日間行った。 光照射は行わなかった。培養中に発生する炭化水素の揮発を修正する目的で、藻細胞を含まないが *n*-アルカン標準品を含むフラスコを4個用意し、培養と同様にインキュベートした。

(3) 残存炭化水素の測定

培地中の *n*-アルカン量の測定は、Walker and Colwell (1974) および Koenig and

Ward (1983) の方法に従った。 培養開始から 5 日毎に、藻細胞を接種した 12 個のフラスコから 3 個づつを、藻細胞を接種していない 4 個の対照区フラスコから 1 個をそれぞれ取り出し、測定に供した。 それぞれのフラスコ中の *n*-アルカンは、培養液と等量のヘキサンで抽出した。 内部標準物質として 38.5 mg のドデカノールを用いた。 培地中の水層部の大半をパスツールピペットを付けたアスピレーターを用いて除去した後、各 8g の Na_2SO_4 を加え、25℃で 24 h 放置して抽出液の脱水を行った。次に、ろ紙 (Whatman No. 6 filter paper) を通して抽出液から Na_2SO_4 および藻細胞を除き、ロータリーエバポレーターによって 25℃でヘキサンを揮散させた。 残った炭化水素を 20 mL の CS_2 に溶解後、ガスクロマトグラフによって測定した。分析条件は以下のとおりである。

n-アルカン (C_{14}-C_{17}) 測定

使用機種: GC-14BPSF (Shimadzu Co., Ltd.)

使用カラム: Hewlett-Packard HP-5 capillary column (0.32 mm × 30 m)

カラム恒温槽温度: 2.5℃/min の昇温率で 140℃から 210℃まで上昇

試料注入量: 1 μL

キャリアーガスと流量: He (1 mL/min)

DET / INJ 温度: 260 / 250℃

データ処理形式: C – R6A

4 種類の *n*-アルカンの残存量は、それぞれ 3 検体の培養の平均値として示した。なお、藻細胞の分解および資化によって減少した *n*-アルカン量 (正味の分解量) は、炭化水素の全減少値から、藻を接種していない対照区に認められた揮散量を差し引くことによって推定した。

結 果 お よ び 考 察

[増殖の温度依存性]

4% (v/v) ヘキサデカンを炭素源として与えた場合の増殖曲線を Fig. 18 に示す。

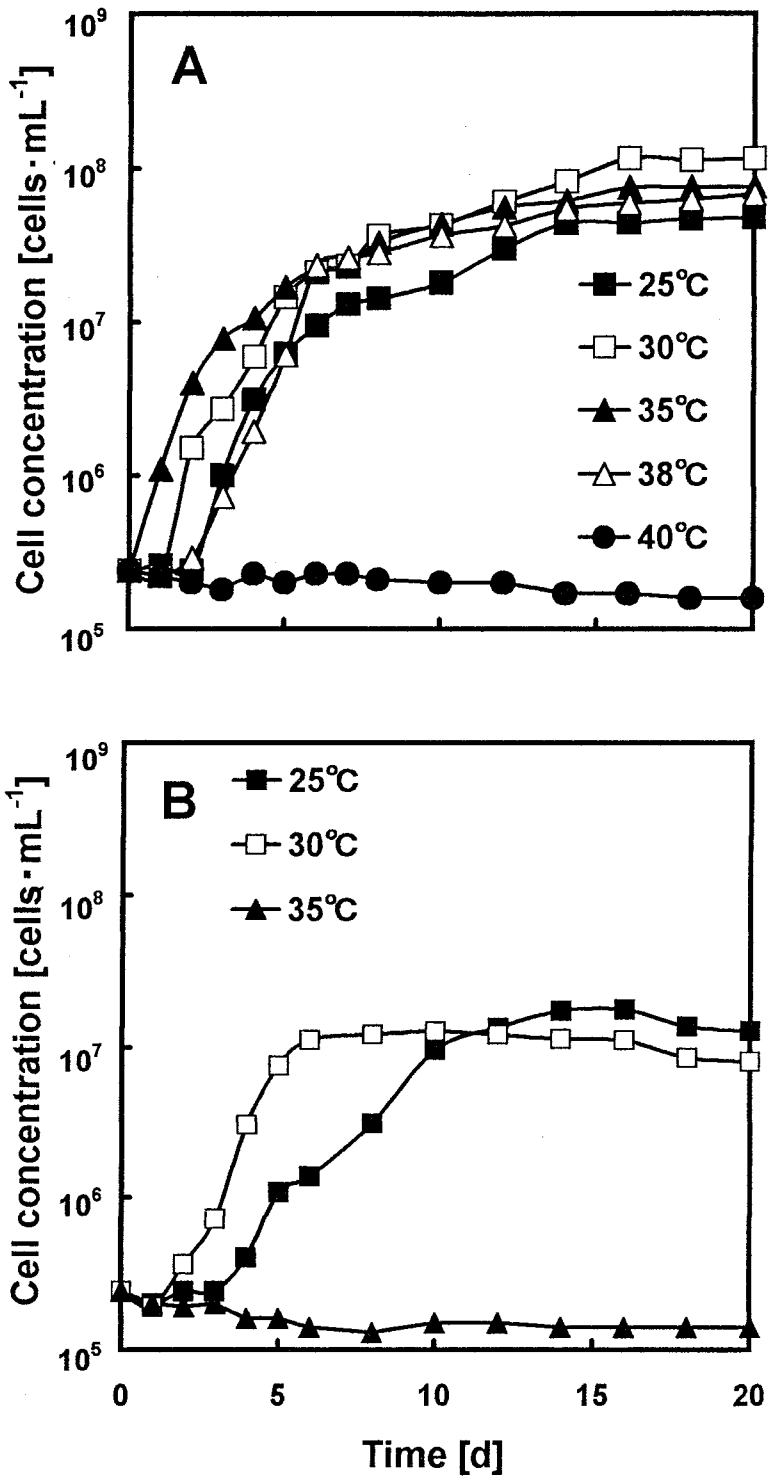

Fig. 18 Effect of temperature on the growth of two *Prototheca zopfii* strains on *n*-hexadecane. (A) RND16, (B) ATCC 30253.

RND16 株は 25℃から 38℃の広範囲な温度条件の下で増殖したが、40℃では増殖が認められなかった (Fig. 18A)。 増殖速度および培養終了時に得られた細胞濃度の値から、30℃および 35℃が増殖の至適温度と考えられた。 38℃では、対数増殖期に入る前に 2 日間の誘導期が認められたが、その後は良好に増殖した。 他方、ATCC 30253 株の増殖可能な上限温度は 30℃に過ぎなかった (Fig. 18B)。 しかしながら、ATCC 30253 株は前述の通り 25℃を超える温度条件下では増殖できないと報告されており、30℃における増殖は既往の知見と異なる結果であった。 本実験では最少培地として YNB を用いているが、*P. zopfii* のもつ炭化水素または原油の分解能に関する過去の研究例では、例外なく Bristol 培地 (微細緑藻類の生育に適した培地として知られる、 Bold, 1949) が使用されている。 従って培地中に含まれる微量成分の違いが、ATCC 30253 株の生育上限温度を引き上げた可能性が考えられた。 しかしながら、その影響を差し引いても、RND16 株のもつ耐熱性は ATCC 30253 に比較して、高いといえよう。

[*n*-アルカン分解の温度依存性]

RND16 株の増殖に伴う *n*-アルカンの減少を、Figs. 19 (25℃), 20 (30℃), 21 (35℃) および 22 (38℃) に示す。 それぞれの図は A: 残存炭化水素合計量、 B: 各種 *n*-アルカンの残存量 および C: 揮散量を考慮した後の各種 *n*-アルカンの残存量 の 3 枚のグラフから成り立っている。 なお、測定の一例として 35℃で培養 10 日目に残存した *n*-アルカンのクロマトグラムを Figs. 23 に示す。 次に、ATCC 30253 株の増殖に伴う *n*-アルカンの減少を、Figs. 24 (25℃) および 25 (30℃) に示す。 RND16 株は 38℃まで、ATCC 30253 株は 30℃まで *n*-アルカンを分解して生育し、この結果は増殖試験の結果と同じであった。 *n*-アルカンの分解能の温度依存性に関しては、最大分解 (減少) 速度を Fig. 26A に、さらに 20 日間の培養後に分解された (減少した) 量を Fig. 26B に示す。 RND16 株の分解速度は 30 - 35℃で最も高い値を示し、ATCC 30253 株に比較して、低温度域 (25 - 30℃) においても約 2 倍の分解速度をもつことが明らかである (Fig. 26A)。 同様の傾向は、20 日間の培養後に分解された *n*-アルカン量の温度依存性にも認められた (Fig. 26B)。 次に、各 *n*-アルカンの種類 (C_{14} - C_{17}) ごとの分解パターンをみると、揮発の影響を無視すれば、炭素鎖のより短い *n*-アルカンから順に減少している (Figs. 19B,

RND16 · 25°C

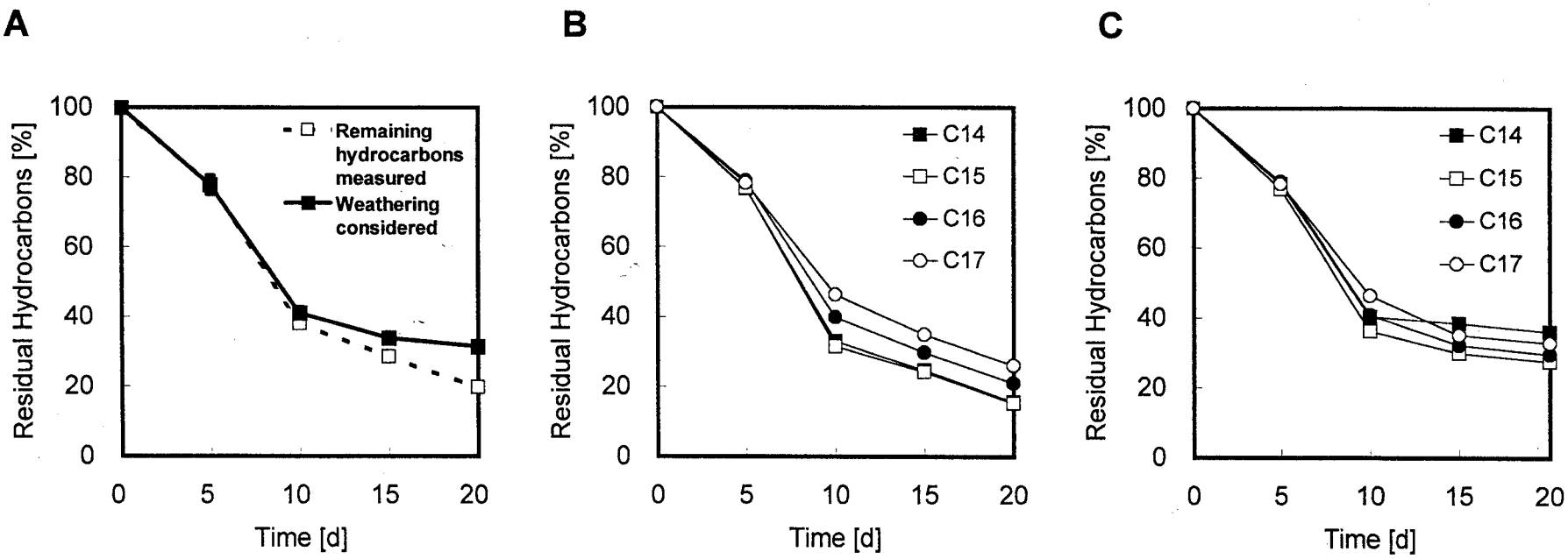

Fig. 19 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* RND16 at 25°C. Model paraffinic oil (0.2mL) comprises equal percents of tetradecane, pentadecane, hexadecane and heptadecane by weight. Data are expressed as means of three indipendent cultures for each incubation time. Where shown, vertical bars represent standard deviations (n=3). (A) Total amount of oil. (B) Individual hydrocarbons. (C) Individual hydrocarbons after the effect of weathering was considered.

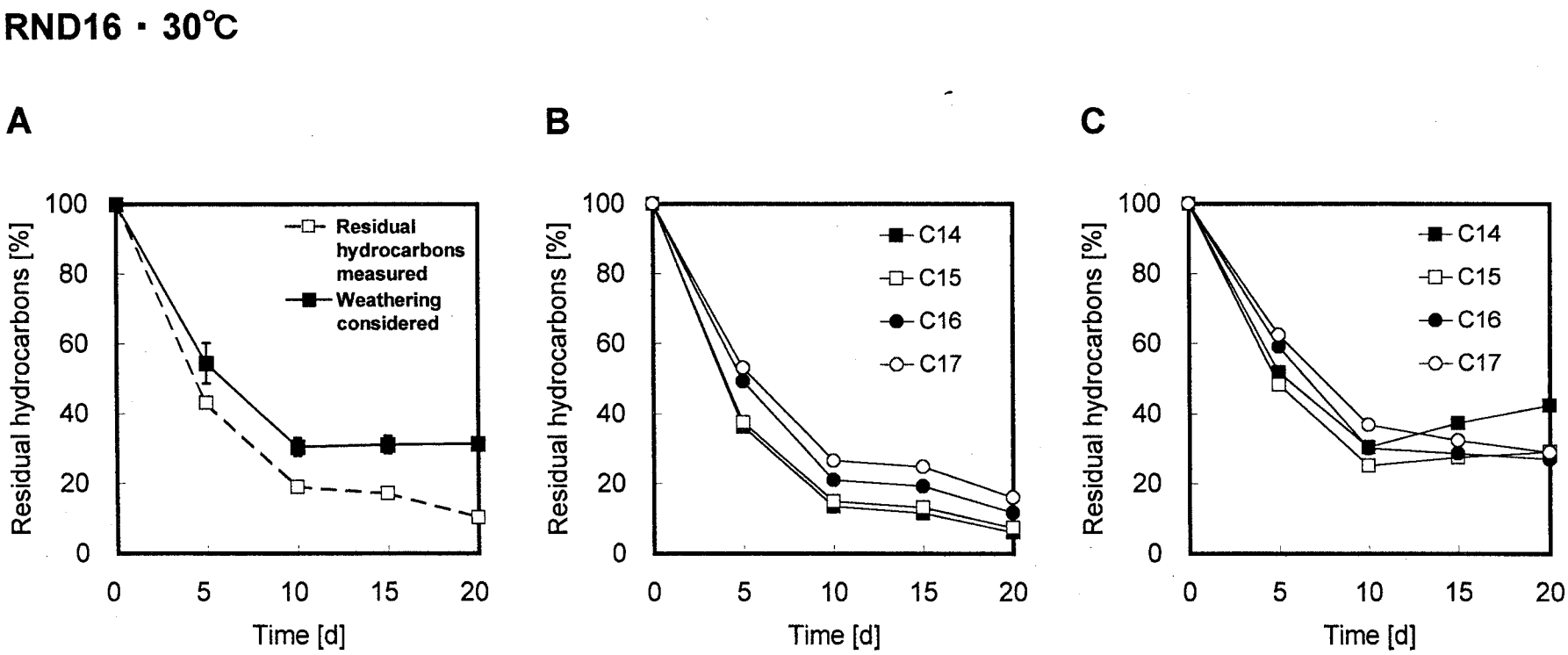

Fig. 20 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* RND16 at 30℃. Model paraffinic oil (0.2mL) comprises equal percents of tetradecane, pentadecane, hexadecane and heptadecane by weight. Data are expressed as means of three indipendent cultures for each incubation time. Where shown, vertical bars represent standard deviations (n=3). (A) Total amount of oil. (B) Individual hydrocarbons. (C) Individual hydrocarbons after the effect of weathering was considered.

RND16 · 35°C

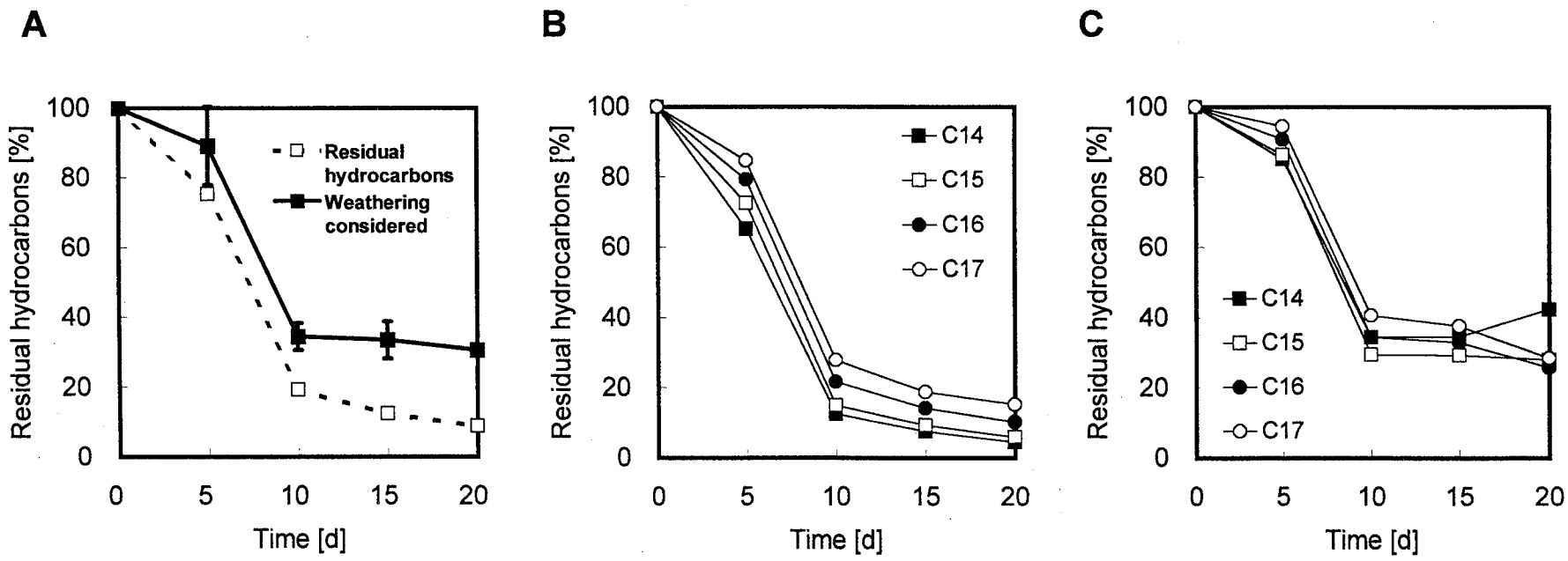

Fig. 21 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* RND16 at 35°C. Model paraffinic oil (0.2mL) comprises equal percents of tetradecane, pentadecane, hexadecane and heptadecane by weight. Data are expressed as means of three indipendent cultures for each incubation time. Where shown, a vertical bars represent standard deviations (n=3). (A) Total amount of oil, (B) Individual hydrocarbons, (C) Individual hydrocarbons after the effect of weathering was considered.

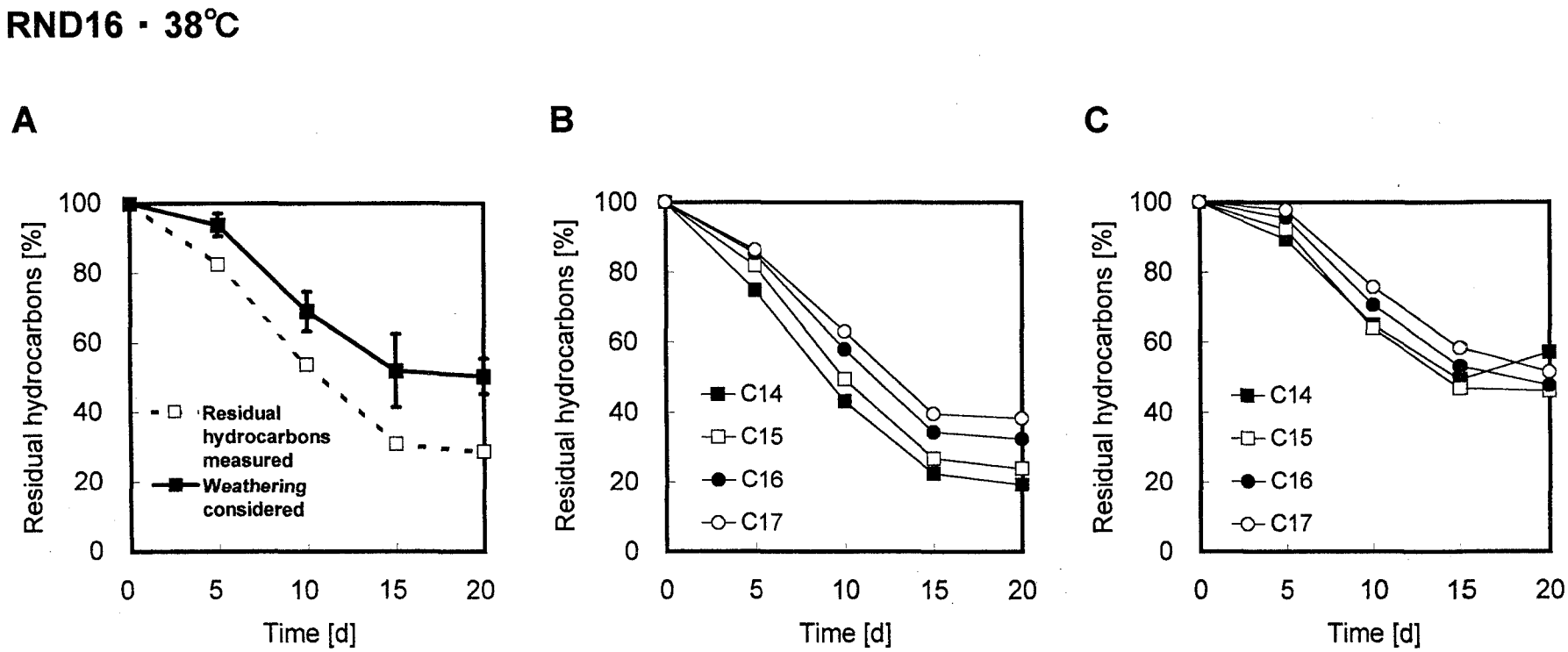

Fig. 22 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* RND16 at 38°C. Model paraffinic oil (0.2mL) comprises equal percents of tetradecane, pentadecane, hexadecane and heptadecane by weight. Data are expressed as means of three indipendent cultures for each incubation time. Where shown, a vertical bars represents standard deviations (n=3). (A) Total amount of oil; (B) Individual hydrocarbons; (C) Individual hydrocarbons after the effect of weathering was considered.

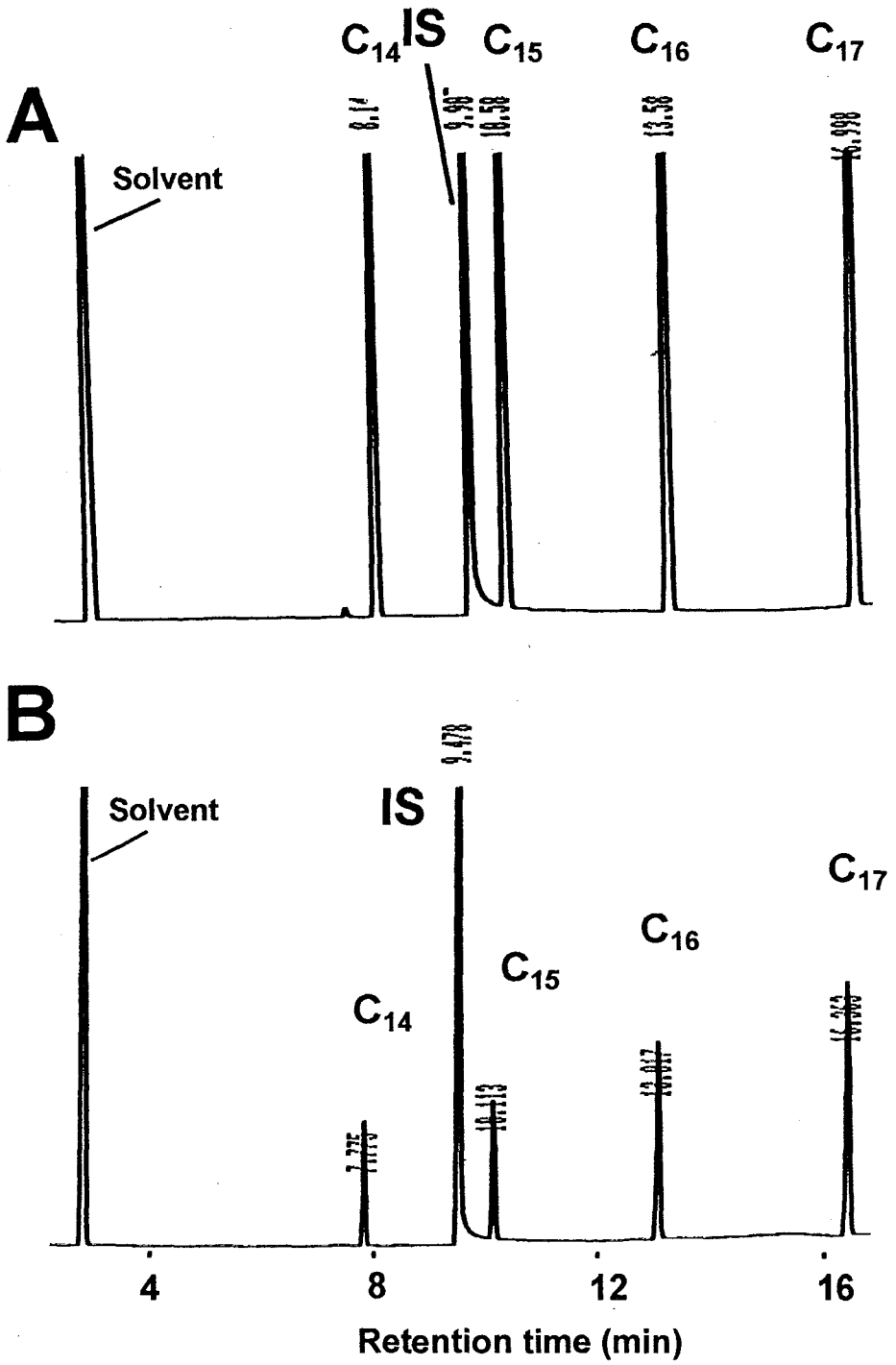

Fig. 23 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* RND16. (A) Before experiment, (B) After 10days of degradation by *P. zopfii* RND16 at 35℃. IS: Internal standard

ATCC 30253 · 25℃

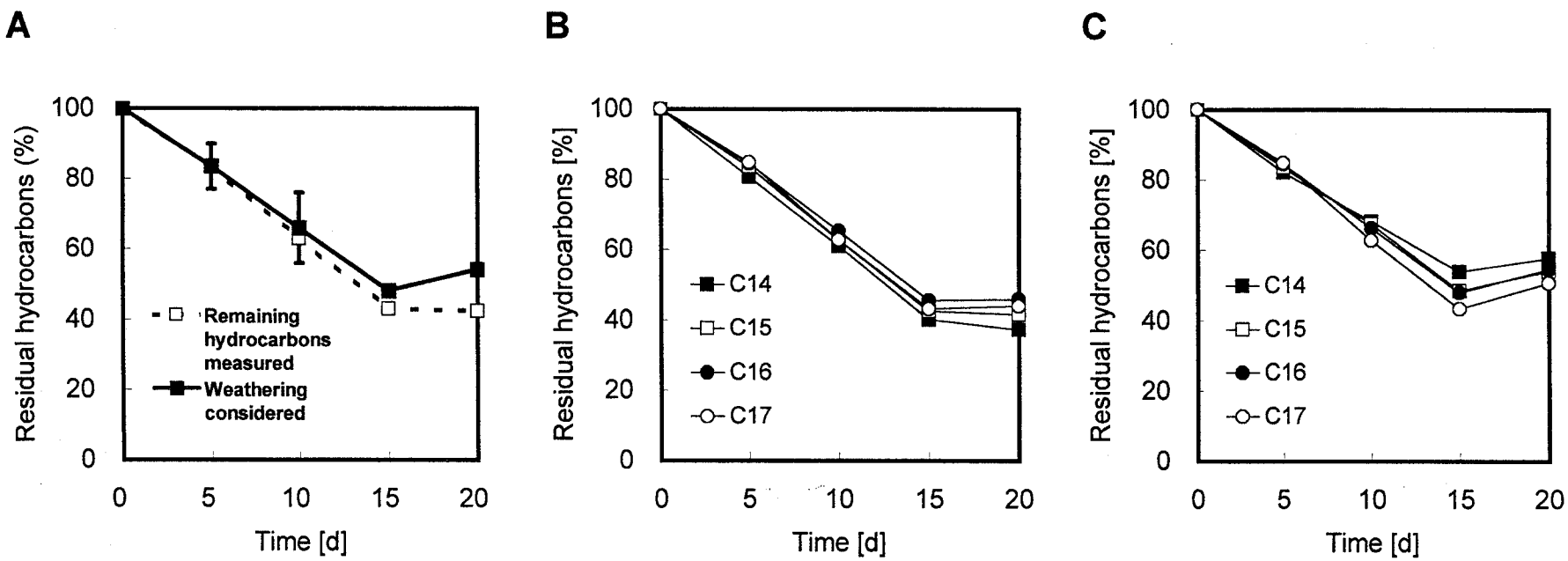

Fig. 24 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* ATCC 30253 at 25℃. Model paraffinic oil (0.2mL) comprises equal percents of tetradecane, pentadecane, hexadecane and heptadecane by weight. Data are expressed as means of three indipendent cultures for each incubation time. Where shown, a vertical bars represent standard deviations (n=3). (A) Total amount of oil; (B) Individual hydrocarbons; (C) Individual hydrocarbons after the effect of weathering was considered.

ATCC 30253 · 30°C

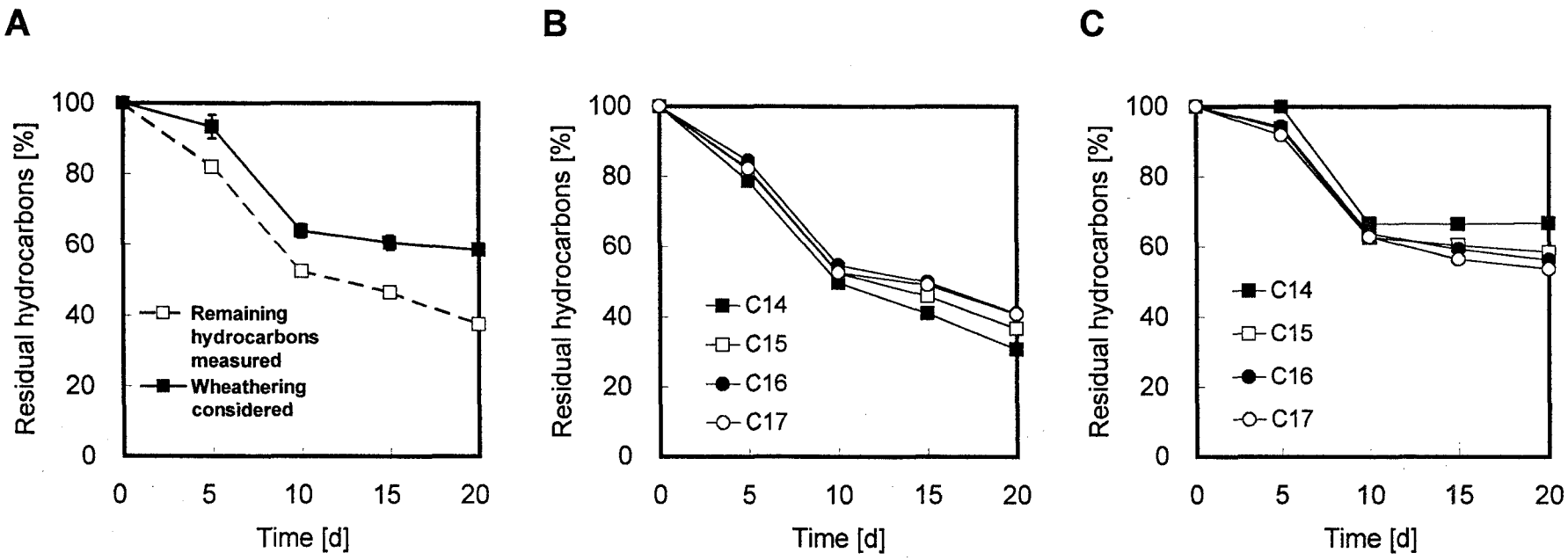

Fig. 25 Degradation of *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) by *P. zopfii* ATCC 30253 at 30°C. Model paraffinic oil (0.2mL) comprises equal percents of tetradecane, pentadecane, hexadecane and heptadecane by weight. Data are expressed as means of three indipendent cultures for each incubation time. Where shown, a vertical bars represent standard deviations (n=3). (A) Total amount of oil; (B) Individual hydrocarbons; (C) Individual hydrocarbons after the effect of weathering was considered.

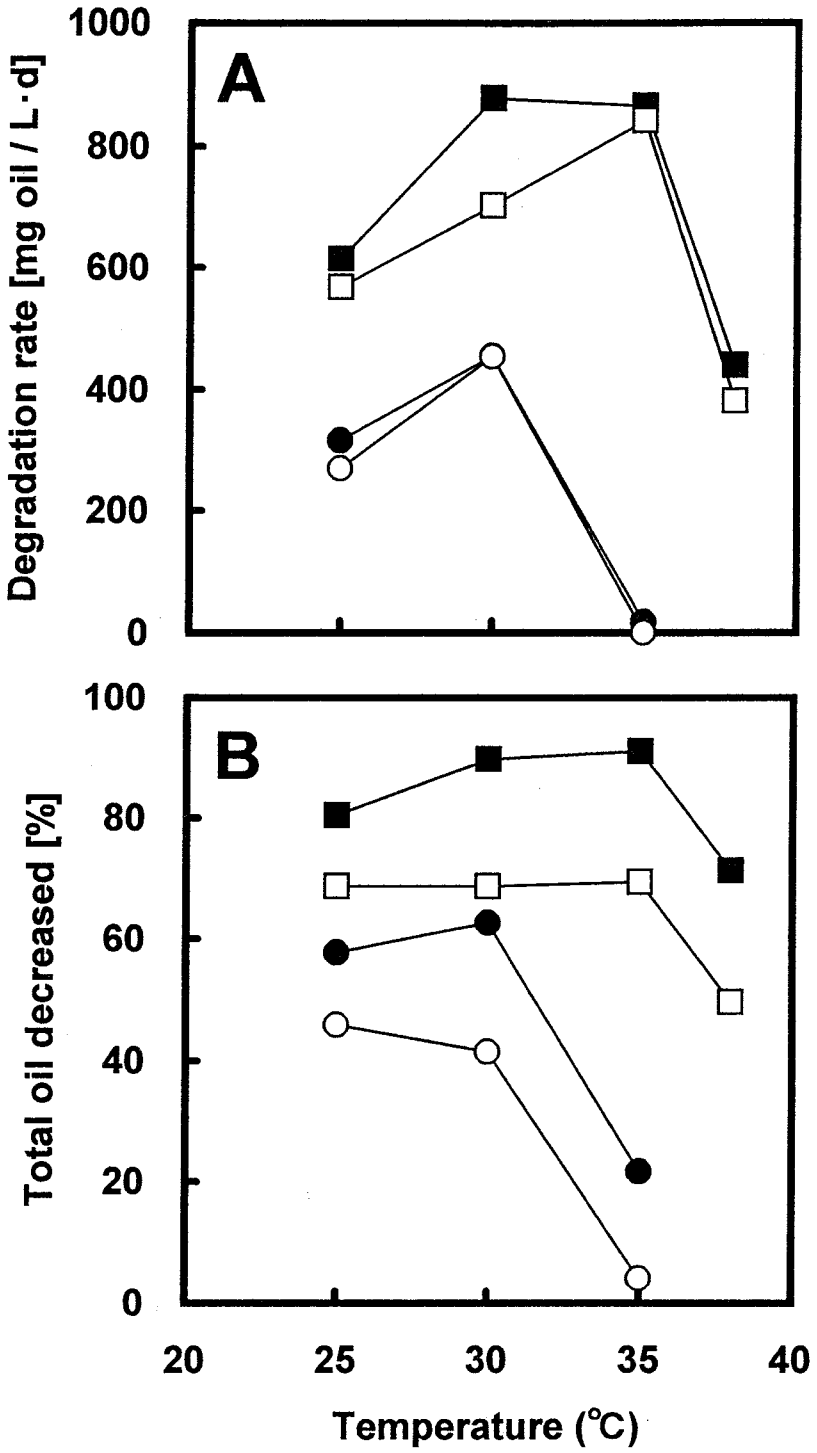

Fig. 26 Effect of temperature on the maximum degradation rate (A) and on degree of decrease in the amount of oil after growth on 1% (v/v) *n*-alkanes in YNB medium for 20 days (B). ■: RND16, □: RND16 (weathering considered), ●: ATCC 30253, ○: ATCC 30253 (weathering considered)

20B, 21B, 22B, 24B and 25B)。 しかし、(藻による分解と考えられる) 揮発の影響を取り除いた後のデータによれば、RND16 株は特に *n*-ペンタデカンに代表されるような短い炭素鎖をもつアルカンを好んで資化する傾向が認められた (Figs. 19C, 20C, 21C and 22C)。 他方、ATCC 30253 株は、長い炭素鎖をもつアルカン (特に *n*-ヘプタデカン) を優先的に資化した (Figs. 24C and 25C)。 30℃以上の温度域では培養日数が 10 日を超えると、揮発の影響を取り除いた後のデータについて、計算上からは残存炭化水素量の上昇がみられる (Figs. 20C, 21C, 22C and 25C)。 この計算上の上昇は、もし藻細胞が存在しなければ、ある時点までに揮発するはずであった炭化水素が、それ以前に藻によって分解されたことに起因するものと考えられる。

[RND16 株を用いた水圏から *n*-アルカン類除去の可能性]

前述のように、ATCC 30253 株は高い炭化水素分解能をもつことから、多くの研究者によってその分解特性が研究されて来た。 実際にこの藻は 25℃で、他の石油分解微生物と比較しても同等の *n*-アルカン分解速度を示すことが知られている (Suzuki et al., 1998)。しかし、Koenig と Ward (1984) が指摘したように、この株は日常的に発生しうる程度の高温における *n*-アルカン類の分解能に問題があり、これは本実験でも再確認された。 一方、温泉排水の RND16 株は静置培養において 38℃でも *n*-アルカン類を分解でき、しかもその分解能は 25℃を超える温度域で高活性となることが明らかであった。 また、低温における分解速度も速くATCC 30253 株に比較して 1.94 倍の値が得られた。 これらの結果から RND16 株は、温帯域の夏季および熱帯地方においても、効率的に水圏の *n*-アルカン類を除去できるであろうと考えられた。 また、好気的増殖を加速させるためのエアレーションがなくとも高分解活性を示すことから、淀んだ工場排水池および炭化水素で汚染された土壌におけるバイオレメディエーションにも応用できる可能性がある。

第5章 総合考察

本研究では、高温水圏（温泉排水）から高温でエタノール生産能または炭化水素資化能を有する真核性微生物の分離を試み、得られた株の基礎的性状を明らかにするとともに応用の可能性を検討した。以下に成果の要点および今後の展開について述べる。

[酵母]

酵母として40℃以上の高温環境下で迅速な発酵を示すRND13株を得た。この株は、嫌気条件下で15%グルコースから40℃で6.6%、43℃で 6.0% のエタノールを生産した。これらの結果から、RND13株は陸上由来の耐熱性酵母や保存酵母の中から耐熱性を以って選抜された株と同レベルのエタノール生産能をもっていると考えられた。この株は生理学的性状から *Torulaspora delbrueckii* と同定された。一方、18S rDNA に基づく分子系統上の位置からは *Candida glabrata* および *Kluyveromyces delphensis* に最も近縁であることが示唆され、生理学的性状から推定した種と矛盾する結果であったが、いずれにせよ *Saccharomyces cerevisiae* に近縁な、強い発酵能を有する子嚢菌酵母であることは明らかであった。RND13株は希釈廃糖蜜からもエタノールを生産したが、その40℃における生産量は低く、実用化には問題がある。しかし、高温におけるグルコースの発酵速度が高いことから、低い基質濃度の下で長期間の繰り返し回分培養ができれば、コーンマッシュから高効率でエタノール生産を行うことは可能であると考えられる。また、本研究では55℃の高温下でグルコースの発酵能を示す *Dekkera sp.* RND14株も得たが、そのエタノール生産量は低かった。

従って、温泉排水から得られた耐熱性酵母の有効利用を図るためには、これらの株間、または産業酵母との間でプロトプラスト融合を行い、前述のRND13株およびRND14株の弱点を改善させる必要があると考えられる。例えば、耐熱性は劣るが廃糖蜜中のラフィノースおよびスクロースに対して強力な発酵能を示す *Saccharomyces cerevisiae* と40℃以上の温度域に耐性がありエタノール生産速度に優れる RND13株の間、またはエタノール生産能は低いが前例がないほど高い耐熱性をもつRND14株とRND13株の間でプロト

プラスト融合を行い、より高温環境下におけるエタノール生産に適した融合体を得る方向で研究を行う予定である。

[プロトテカ]

温泉排水由来の真核微生物の中には、酵母様のコロニーおよび細胞形態を示す従属栄養微細緑藻である *Prototheca* と考えられる株が複数含まれており、これらは 35℃で *n*-ヘキサデカンに対して資化能を示した。 その中から RND16 株を選び生理学的性質によって同定したところ、*Prototheca zopfii* であった。 また 18S rDNA に基づく分子系統上の位置を推定したところ、他の緑藻種から著しい遺伝的距離を示したが、 *P. zopfii* SAG 263-1 株とは極めて近縁であった。 RND16 株のもつグルコース嫌気代謝をみると、$N_2/H_2/CO_2$ 下においては 25℃でヘテロ乳酸発酵を、40℃ではエタノール発酵能を示した。また、N_2 下では温度に関係なくエタノール発酵が優占した。 他方、*Prototheca* 属微細藻のグルコース嫌気代謝産物は乳酸を含む有機酸であることが知られ、ガス (CO_2 または H_2) を産生する代謝は存在しないと考えられていた。 従って、RND16 株のもつアルコール発酵は、属内において知られていない代謝であることが示された。 次に、RND16 株の *n*-アルカン資化能の温度依存性を調べると、25℃の常温に比較して 30 および 35℃の高温側で資化速度および資化量の値が高くなり、また 38℃まで *n*-アルカンを資化することができた。 既往の知見によると、 *P. zopfii* は 25℃を超える温度域で *n*-アルカン類および原油中の炭化水素を炭素源として生育できなくなることが知られている。 従って、RND16 株は高温で高い *n*-アルカン分解および資化特性を備えているという点で新しく、温帯域の夏季および熱帯地方においても、 *n*-アルカンで汚染された水圏のバイオレメディエーションに役立つであろうと考えられたが、今後は高温域における芳香族炭化水素の分解能について試験を行う必要がある。 現在、筆者の所属する生化学研究室では、炭化水素で汚染された工場排水池等で高温条件の下、迅速な *n*-アルカンおよび原油の分解を行うことを目標として、RND16 株に適した固定化担体の検索を行っている。

参 考 文 献

Ahearn DG, Crow SA, Berner NH, Meyers SP (1976) Microbial cycling of oil in estuarine marshlands. In: Wiley M (ed) Estuarine processes, vol. **1** USES, Stress and adaptation to the estuary. Academic Press, New York, pp483-492

Arthur H, Watson K (1976) Thermal adaptation in yeast growth temperatures, membrane lipid and cytochrome composition of psychrophilic and thermophilic yeasts. J Bacteriol **128**:56-68

Banat IM, Nigam P, Marchant R (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World J Microbiol Biotechnol **8**:259-263

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1990) Laboratory methods for identifying yeasts. In: Yeasts, characteristics and identification, 2nd ed. Cambridge University Press, New York, pp25-35

Begum F, Syrett PJ (1970) Fermentation of glucose by *Chlorella*. Arch Mikrobiol **72**:344-352

Beutler H-O (1984a) Ethanol. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol Ⅵ. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, pp598-606

Beutler H-O (1984b) Acetate, determination with acetyl-CoA synthase. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol Ⅵ. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, pp639-645

Bold HC (1949) The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. Bull Torrey Bot Club **76**:101-108

Brady D, Marchant R, McHale L, McHale AP (1995) Isolation and partial characterization of β-galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media. Enzyme Microb Technol **17**:696-699

Cook WL, Massey JK, Ahearn DG (1973) The degradation of crude oil by yeasts and its effect on *Lesbistes reticulatus*. In: Ahearn DG, Meyer SP (eds) The microbial degradation of oil pollutants. Louisiana State University, Center for Wetland Resources, Baton Rouge, pp279-283

D'Amore T, Panchal CJ, Stewart GG (1988) Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. Appl Environ Microb **54**:110-114

D'Amore T, Celotto G, Russel I, Stewart GG (1989) Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. Enzyme Microb Technol **11**:411-416

Dombek KM, Ingram LO (1986) Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Appl Environ Microb **52**:975-981

Enami I, Fukuda I (1977) Mechanisms of the acid- and thermophily of *Cyanidium caldarium* Geitler Ⅳ. Loss of these characteristics due to enzyme treatment. Plant and Cell Physiol **18**:707-710

Gera R, Dhamija SS, Gera T, Dalel S (1997) Intergeneric ethanol producing hybrids of thermotolerant *Kluyveromyces* and non-thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Lett **19**:189-193

Hack CJ, Marchant R (1998) Characterization of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. J Ind Microbiol Biotechnol **20**:323-327

Hacking AJ, Taylor IWF, Hanas CM (1984) Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C. Appl Microbiol Biotechnol **19**:361-363

Hagler AN, Ahearn DG (1987) Ecology of aquatic yeasts. In: Rose AH, Harrison JS (eds) The Yeasts, Academic Press, London, pp.181-205

Huss VAR, Dörr R, Grossmann U, Kessler E (1986) Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. Ⅰ. *Chlorella sorokiniana*. Arch Microbiol **145**:329-333

Huss VAR, Wein KH, Kessler E (1988) Deoxyribonucleic acid reassociation in the taxonomy of the genus *Chlorella*. Ⅳ. *Chlorella protothecoides* and its relationship

to the genus *Prototheca*. Arch Microbiol **150**:509-511

Huss VAR, Sogin ML (1990) Phylogenetic position of some *Chlorella* species within the Chlorococcales based upon complete small-subunit ribosomal RNA sequences. J Mol Evol **31**:432-442

Huss VAR, Frank C, Hartmann EC, Hirmer M, Kloboucek A, Seidel BM, Wenzeler P, Kessler E (1999) Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). J Phycol **35**:587-598

Kadam KM, Schmidt SL (1997) Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. Appl Microbiol Biotechnol **48**: 709-713

Kawamura D (1999) Breeding of yeast strains able to grow at 42°C. Biosci Biotechnol Biochem **63**:560-562

Kerfin W, Kessler E (1978) Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Prototheca*. Ⅱ. Starch hydrolysis and base composition of DNA. Arch Microbiol **116**:105-107

Kessler E (1977) Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Prototheca*. Ⅰ. Hydrogenase, acid tolerance, salt tolerance, thermophily, and liquefaction of gelatin. Arch Microbiol **113**:139-141

Kida K, Morita S, and Sonoda Y (1992) Repeated-batch fermentation process using a thermotolerant flocculating yeast constructed by protoplast fusion. J Ferment Bioeng **74**:169-173

Kim CS, Lee CH, Shin JS, Chung YS, Hyung NI (1997) A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic Acids Res **25**:1085-1086

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol **16**:111-120

Koenig DW, Ward HB (1983) *Prototheca zopfii* Krüger strain UMK-1 Growth on acetate or *n*-alkanes. Appl Environ Microbiol **45**:333-336

Koenig DW, Ward HB (1984) Growth of *Prototheca zopfii* Krüger on crude-oil as a function of pH, temperature, and salinity. System Appl Microbiol **5**:119-123

Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J (1984) D-Glucose, UV-methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol VI. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, pp163-172

Kurtzman CP, Fell JW (1998) The Yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp1-1055

Lachance M-A, Starmer WT (1998) Ecology and yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 21-30

Mauersberger S, Ohkuma M, Schunck W-H (1996) *Candida maltosa*. In: Wolf K (ed) Nonconventional Yeasts in Biotechnology, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp411-580

Marshall RD, Neuberger A (1972) In: Gottschalk A (eds) Glycoproteins. Elsevier Publ Co., pp253, 284

Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene **71**:491-499

Nolan AM, Barron N, Brady D, McAree T, Smith D, McHale L, McHale AP (1994) Ethanol production at 45°C by an alginate-immobilized, thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* following growth on glucose-containing media. Biotechnol Lett **16**:849-852

Noll F (1984) L-(+)-Lactate. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol VI. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, pp582-588

Ohta H, Shirakawa H, Uchida K, Yoshida M, Matuo Y, Enami I (1997) Cloning and sequencing of the gene encoding the plasma membrane H^+-ATPase from an

acidophilic red alga, *Cyanidium caldarium*. Biochimica et Biophysica Acta **1319**:9-13

Pore RS (1972) Nutritional basis for relating *Prototheca* and *Chlorella*. Can J Microbiol **18**:1175-1177

Pore RS (1998) *Prototheca*, a yeastlike alga. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) The yeasts, a taxonomic study. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 881-887

Rikhvanov EG, Varakina NN, Sozinov DY, Voinikov VK (1999) Association of bacteria and yeasts in hot springs. Appl Environ Microbiol **65**:4292-4293

Riordan C, Love G, Barron N, Nigam P, Machant R, McHale L, McHale AP (1996) Production of ethanol from sucrose at 45°C by alginate-immobilized preparations of the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Bioresource Technol **55**:171-173

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol **4**:406-425

Schaller K-H, Triebig G (1985) Formate, determination with formate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol VI. Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, pp668-672

Seki T, Myoga S, Limtong S, Vedon S, Kumnuanta J, Taguchi H (1983) Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. Biotechnol Lett **5**:351-356

Singh D, Banat IM, Nigam P, Marchant R (1998) Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery. Biotechnol Lett **20**:753-755

Sorokin C, Myers J (1953) A high-temperature strain of *Chlorella*. Science **117**:330-331

Suzuki T, Yamaguchi T, Ishida M (1998) Immobilization of *Prototheca zopfii* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons. Process Biochem

33:541-546

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res **22**:4673-4680

Vaugham-Martini A, Martini A (1998) Determination of ethanol production. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 107

Vinayakumar M, Kessler E (1975) Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genus *Chlorella*. X. Products of glucose fermentation. Arch Microbiol **103**:13-19

Walker JD, Colwell RR (1974) Microbial petroleum degradation: Use of mixed hydrocarbon substrates. Appl Microbiol **27**:1053-1060

Walker JD, Colwell RR, Petrakis L (1975) Degradation of petroleum by an alga *Prototheca zopfii*. Appl Microbiol **30**:79-81

Walker JD, Colwell RR, Vaituzis Z, Meyer SA (1975) Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii*. Nature **254**:423-424

Walker JD, Pore RS (1978) Growth of *Prototheca* isolates on *n*-hexadecane and mixed-hydrocarbon substrate. Appl Environ Microbiol **35**:694-697

Ward C, Nolan AM, O'Hanlon K, McAree T, Barron N, McHale L, McHale AP (1995) Production of ethanol at 45°C on starch-containing media by mixed cultures of the thermotolerant, ethanol producing yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 and the thermophilic filamentous fungus *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. Appl Microbiol Biotechnol **43**:408-411

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfaud DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Orlando, Florida, pp315-322

Xing S, Aharon G (1988) A method for RNA isolation from marine macro-algae. Ana Biochem **174**:650-657

Yamaguchi T, Ishida M, Suzuki T (1999) An immobilized cell system in polyurethane foam for the lipophilic micro-alga *Prototheca zopfii*. Process Biochem **34**:167-171

大石正道. (1999) 海洋への原油流出の真の原因は何か。 生態系と地球環境のしくみ, 日本実業出版社, 東京, 148-149.

木田建次. (1997) 育種によるアルコール発酵の効率化。 酵母からのチャレンジ, 技報堂出版, 東京, 246-256.

鈴木周一. (1983) アルコール生産。 バイオマスエネルギー変換, 講談社サイエンティフィック, 東京, 66-98.

曽根田正己. (1975) 酵母属とその性質。 微生物の分類と同定 (下), 学会出版センター, 東京, 197-257.

高橋康次郎、吉沢 淑. (1988) 高温発酵性酵母の利用と育種改良。 醸協 83, 442-447.

西谷尚道. (1997) 南国の酒をつくる焼酎酵母。 酵母からのチャレンジ, 技報堂出版, 東京, 169-179.

村松正實. (1997) 分子細胞生物学辞典, 東京, 296.

横山伸也. (2001) エネルギーとしてのバイオマス。 バイオエネルギー最前線, 森北出版, 東京, 53-79.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なるご指導ならびに御鞭撻を賜りました東京水産大学 食品生産学科 木村 茂教授および浦野 直人助教授に深甚なる謝意を表します。 また、本論文の作成に適切なるご助言と御指導を頂いた同学科の渡辺 悦生教授、藤井 建夫教授、和田 俊教授に心からお礼申し上げます。

さらに、本研究の遂行にあたり、多くのご指導とご援助を頂きました理化学研究所の鈴木基文博士に深く感謝いたします。

和文要旨

酵母は、糖蜜から燃料エタノールの生産または炭化水素から長鎖脂肪酸と長鎖カルボン酸の生産に利用されている。 また、炭化水素資化能をもつ酵母は、原油等の炭化水素で汚染された水圏のバイオレメディエーションにも利用可能と考えられている。 しかし、酵母は一般的に高温に弱く、これらの目的に酵母を使用する場合に、利用できる地域や季節が限定されることが問題であった。 そこで本研究では、日常的に発生しうる程度の高温環境下 (35 - 45℃) で前述の使用目的に耐えうる様な酵母または酵母様真核微生物の株を、温度の高い水圏である温泉排水に求め、それらの分類学的、生理学的、生化学的、および分子系統に関する基礎的性状を明らかにするとともに、高温条件下におけるエタノール生産能または炭化水素資化能を調べることを目的とした。

静岡県下田市蓮台寺の温泉排水 (35.5℃と 40.0℃) から、酵母様の形態を示す真核微生物 48 株を分離し、それらのうち酵母 RND13,14 および 17 株とプロトテカと考えられた RND16 株の 4 株の性状を解析した。 この 4 株は液体培地中で 42～45℃の高温まで生育し、最大増殖速度は 37℃または 35℃で得られた。 グルコースを発酵できる上限温度はさらに高く、42～55℃であった。 生理学的な特徴により、RND13,14 および 17 と RND16 株はそれぞれ、酵母 *Torulaspora delbrueckii*, *Dekkera sp.*, *Candida albicans* および 従属栄養微細緑藻 *Prototheca zopfii* と分類された。 また 18S rDNA の塩基配列に基づく系統解析の結果、RND13 株は子嚢菌酵母 *Candida glabrata* および *Kluyveromyces delphensis* に非常に近縁であり、生理学的同定結果と異なった。 他方、RND17 および RND16 株の系統解析結果は、生理学的手法による結果を支持した。

高温におけるエタノール生産能について検討したところ、特に RND13 株は 40℃の高温において 5%グルコースからエタノールへの変換効率が 24 時間で 72.1%と高い値を示し、この値は 25℃ - 120 時間におけるビール酵母による変換効率の 57.0%より高かった。

RND13 株について、産業レベルに近い高濃度グルコース (15%) を基質とした場合の

高温域におけるエタノール生産能を調べたところ、RND13 株は 40℃、細胞接種濃度 5% (w/v) の条件でグルコースをほぼ完全に利用し、6.6%(w/v)のエタノールを生産した。これは本株の 30℃発酵時に得られたエタノール濃度 7.0 - 7.2%に匹敵する値であった。しかし 43℃ではグルコースを完全に利用することができず、エタノール生産量も 6.0% と若干の減少が見られた。なお、ここで得られた 40℃および 43℃におけるエタノール生産量は、既往の研究で陸上由来の耐熱性酵母を用いて得られた値と同レベルであった。

次に耐熱性プロトテカである RND16 株のグルコース嫌気代謝について調べると、この株は $N_2/H_2/CO_2$ 下において 25℃でヘテロ乳酸発酵を、40℃ではエタノール発酵能を示した。

また、N_2 下では温度に関係なくエタノール発酵が優占した。このようなエタノール生産を伴う発酵は、*Prototheca* 属微細藻に報告例のない新たな知見であった。なお、*Prototheca zopfii* の藻株には、原油を含む炭化水素類を分解または資化するものが存在し、水圏を汚染する炭化水素除去という観点からも注目される微細藻であるが、温度条件について 25℃を超えるとこの能力を失うことが報告され、微生物製剤としての利用範囲が限られることが示唆されて来た。しかし、RND16 株は、これまで *P. zopfii* では不可能と考えられてきた 25℃を超える温度域における *n*-アルカン分解資化能をもっていた。1% (v/v) の *n*-アルカン (C_{14}-C_{17}) を唯一の炭素源として与え、この株を生育させると 38℃まで増殖が可能であり、さらに 30 – 35℃で得られた *n*-アルカン分解速度および 20 日培養後の分解量は、より低温の 25℃における培養に比較して高かった。さらに、RND16 株は 常温域 (25℃) においても、これまで試験研究されてきた炭化水素分解性 *Prototheca zopfii* 株である ATCC 30253 株と比較して、約 2 倍の *n*-アルカン分解速度を示した。このように広範囲な温度域において *n*-アルカン分解資化能を示した RND16 株は、温帯域の夏季および熱帯地方において、炭化水素汚染水域におけるバイオレメディエーションに利用できる可能性があると考えられた。

本論文は、高温水圏における耐熱性酵母の分離、51℃以上で発酵性を示す酵母 ならびにグルコースから嫌気的にエタノール生産を行いかつ 30 – 38℃で *n*-アルカンの分解資化能をもつプロトテカに関する初めての報告例である。

Summary

Forty-eight thermotolerant eukaryotic strains, with yeast-like morphology, were isolated from hot spring drainage at Rendaiji, Shimoda city, Shizuoka prefecture, Japan. The taxonomic, physiological and biochemical properties of four selected strains (RND13, 14, 17 and 16) were investigated. All of the four grew well on a liquid culture at temperatures up to 42~45°C, with maximum growth rates at 37°C or 35°C, whereas the maximum fermentation temperatures were higher, ranged 42~55°C. On the basis of physiological taxonomy, RND13, 14, 17 and 16 were found to be *Torulaspora delbrueckii*, *Dekkera* sp., *Candida albicans* and yeast-like green micro-alga *Prototheca zopfii* var. *hydrocarbonea*, respectively. In the phylogenetic analyses based on the small-subunit rDNA (18S rDNA) sequences, RND13 was closely related to *Candida glabrata* and *Kluyveromyces delphensis*, but was not directly grouped together with *Torulaspora delbrueckii*. The observed discrepancy between physiological taxonomy and molecular phylogeny warrants further studies to clarify the taxonomic position of RND13. In contrast, the phylogenetic positions of RND17 and RND16 supported the results of physiological taxonomy.

In the next step, we have investigated the abilities of the thermotolerant strains to ferment 5% glucose to ethanol at elevated temperatures. Above all, RND13 had higher ethanol productivity of 72.1% at 40°C for 24 h than that of 57.0% obtained by brewers' yeast at 25°C for 120 h. Then, RND13 was evaluated for its ethanol producing ability at elevated temperatures at a high substrate concentration (15% (w/v) glucose) close to the level reflecting industrial practice. RND13 was capable of utilizing glucose almost completely at 40°C with increasing inoculum size, producing ethanol up to 6.6% (w/v) which was comparable to the levels (7.0 – 7.2%) at 30 °C. The maximum rate of ethanol production by RND13 was found to be 9.0 (g/l · h) at 40°C in an inoculum sized 5% (w/v). At 43°C, however, RND13 could not utilize glucose to completion and showed a slight drop in the extent of produced ethanol

(6.0% (w/v)). Thus, the culture at 40°C with a 5% cell inoculum was considered to be the optimal condition for ethanol production at higher temperatures as far as the batch fermentation is concerned.

Regarding the fermentative pattern of RND16 (*P. zopfii*), it was found to produce an appreciable amount of ethanol and CO_2 from glucose under anoxic conditions at both 25°C and 40°C; this type of alcohol fermentation has not yet been reported in the genus *Prototheca*. According to the results of fermentation in the presence of YNB (Difco, Yeast Nitrogen Base w/o amino acids), D–lactic acid, ethanol, CO_2 and a trace of acetic acid were produced from glucose, but L-lactic acid, formic acid and H_2 were not. At 25°C, D-lactic acid and ethanol were produced in approximately equimolar proportions under $N_2/H_2/CO_2$, whereas ethanol production was predominant under N_2. At 40°C, an increase in ethanol production was observed when compared to production at 25°C, irrespective of the gas composition in the atmosphere. Furthermore, we have investigated the temperature profile of RND16 during growth on *n*-alkanes (25-40°C). RND16 was able to degrade 1% *n*-alkanes (C_{14}-C_{17}) at the temperatures up to 38°C and degraded oils more rapidly at 30-35°C than at 25°C. This result differed from the previous finding that the temperature conditions above 25°C did not allow *P. zopfii* to grow on hydrocarbons.

This is the first report on the isolation of thermotolerant yeasts from hot spring environment, capable of fermentation over 51°C, and on the *Prototheca zopfii* strain capable of ethanol fermentation and of growth on *n*-alkanes at elevated temperatures (30-38°C).