

学位論文要旨

氏名 Sukanya Nitiyon

題目 **Characterization and improvement of thermotolerant ethanogenic microbes for low-cost bioethanol production from various feedstocks**

Rising demand of an alternative energy is fueled by the growing of world population and increasing of petroleum price. Bioethanol is one of alternative and renewable fuels derived from various plant biomasses by ethanogenic microorganisms. At present, bioethanol production is mainly conducted with sugar or starch base biomass such as corn, sugarcane and cassava. However, to achieve sustainable energy, the production of ethanol with low-cost lignocellulosic biomasses, which does not undermine the food supply, has been challenged. Moreover, the application of thermotolerant, stress-tolerant and highly efficient microbes for high-temperature ethanol fermentation is expected to be a crucial point for industrial application.

In this study, I focused on the development of low-cost ethanol production system. Ethanogenic microbes were screened from natural sources in tropical countries for the utilization of various biomasses and were further improved by using several procedures. The high-temperature fermentation with rice hydrolyzate by two microbes, *Kluyveromyces marxianus*, *Zymomonas mobilis* and their derivatives were investigated, and their fermentation capabilities were compared with that of *Saccharomyces cerevisiae*, which is widely used in ethanol fermentation industries. The results showed that naturally isolated microbes can be further improved and increased the ability of ethanol fermentation at high temperature. Moreover, the possibility of temperature-uncontrolled fermentation has been shown, which could be an economical process under high-temperature circumstances because it may cut down the cost of cooling units and their running when applied for industries. In addition, thermotolerant *K. marxianus* DMKU3-1042 and the thermo-adapted derivative of *Z. mobilis* TISTR548 were applied for a new technology of simultaneous fermentation and distillation under a low pressure at a high temperature. Both microbes were shown to be applicable to this new technology. Considering the concentration of ethanol, application of this technology could achieve the final ethanol concentration up to 60 % (w/v) which may reduce the cost of energy used for distillation process.

On the other hand, the capability for conversion of xylose, which is the second most abundant sugar component in lignocellulosic biomass, to ethanol in *K. marxianus* was extensively examined. *K. marxianus* BUNL-21 that was isolated in Laos was characterized and compared with that of the efficient strain DMKU3-1042 previously isolated in Thailand. The results revealed that the strain BUNL-21 possesses greater ability for conversion of xylose to ethanol, stronger resistance to 2-deoxyglucose in the case of pentose, and higher tolerance to various stresses than those of DMKU3-1042. In addition, it was found that both *K. marxianus* strains produced ethanol in the presence of 10 mM hydroxymethylfurfural or furfural, at a level almost equivalent to that in their absence. Comparison with *Scheffersomyces stipitis*, which is a native xylose-fermenting yeast, revealed that *K. marxianus* BUNL-21 was found to have ethanol fermentation activity from xylose that is slightly lower and much higher than that of *S. stipitis* at 30°C and at higher temperatures, respectively. Large accumulation of acetic acid was noticed during the conversion of xylose to ethanol of both *K. marxianus* strains which may be the reason of the lower ethanol production of *K. marxianus* than that of *S. stipitis*. These findings motivate us to do gene engineering to improve ethanol production and reduce acetic acid accumulation. However, the beneficial characteristics clearly indicate that *K. marxianus* BUNL-21 is a highly competent yeast for high-temperature ethanol fermentation with lignocellulosic biomass.

This study provides valuable information and technology for application of thermotolerant *K. marxianus* and *Z. mobilis* for low-cost bioethanol production from various feedstocks.

日本語又は英語で作成する。

(別紙様式第7号)

学位論文審査の結果の要旨

報告番号	甲 第 号	氏 名	SUKANYA NITIYON
論文審査担当者	主査	山田 守	
	副査	内海 俊彦	
	副査	松井 健二	
	副査	宮田 浩文	
学位論文題目名 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) Characterization and improvement of thermotolerant ethanologenic microbes for low-cost bioethanol production from various feedstocks (種々の原料からの低コストバイオエタノール生産のための耐熱性エタノール生産性微生物の特性と改良)			
関連論文 (題目名が英文の場合は、行を変えて和訳を括弧書きで記載する。) <基礎となる学術論文> 題目: Efficient conversion of xylose to ethanol by stress-tolerant <i>Kluyveromyces marxianus</i> BUNL-21 (ストレス耐性 <i>Kluyveromyces marxianus</i> BUNL-21によるキシロースからエタノールへの効率的な変換) 掲載誌: <i>SpringerPlus</i> , in press (2016年3月 掲載・ <input type="checkbox"/> 掲載予定) 題目: High-temperature fermentation technology for low-cost bioethanol (低コストバイオエタノールのための高温発酵技術) 掲載誌: <i>Journal of the Japan Institute of Energy</i> , 2015, 94: 1154-1162 (2015年10月 <input type="checkbox"/> 掲載・掲載予定) <参考論文> 題目: Isolation and characterization of thermotolerant ethanol-fermenting yeasts from Laos and application of whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis for their quick identification (ラオスからの耐熱性エタノール発酵性酵母の分離と解析および迅速な種の同定のための細胞を用いたMALDI-TOF/MS解析の利用) 掲載誌: <i>African Journal of Biotechnology</i> , in press. (2016年3月 掲載・ <input type="checkbox"/> 掲載予定) 題目: <i>Wickerhamomyces xylosica</i> sp. nov. and <i>Candida phayaonensis</i> sp. nov., two xylose-assimilating yeast species from soil (土壌から分離されたキシロース資化酵母 <i>Wickerhamomyces xylosica</i> の新種と <i>Candida phayaonensis</i> の新種) 掲載誌: <i>International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology</i> , 2012, 62, 2786-2792 (2012年11月 <input type="checkbox"/> 掲載・掲載予定) 題目: <i>Candida uthaithanina</i> sp. nov., an anamorphic yeast species in Nakaseomyces clade isolated in Thailand (タイで分離された <i>Nakaseomyces</i> クレードのアナモルフィックな酵母 <i>Candida uthaithanina</i>)			

の新種)

掲載誌: *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, 62, 2786–2792
(2011年2月 掲載・掲載予定)

題目: *Candida saraburiensis* sp. nov. and *Candida prachuapensis* sp. nov., xylose-utilizing yeast species isolated in Thailand
(タイで分離されたキシロース資化酵母 *Candida saraburiensis* の新種 and *Candida prachuapensis* の新種)

掲載誌: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61, 462–468
(2011年2月 掲載・掲載予定)

(論文審査の要旨)

世界のバイオ燃料需要は2030年には現在の10倍以上に達すると推定され、地球温暖化の対策として重要視されるCO2削減や人口増加に伴う食料不足とも関連して、バイオ燃料生産は第2世代あるいは第3世代バイオマス利用に向かおうとしている。しかしながら、第2世代バイオマス利用は糖化に時間とコストが掛かることから、技術革新が求められている。本研究では、そのために2つの技術開発を行ったものであり、その一つは、コスト削減のための新技術として高温発酵および非温度制御発酵さらには減圧蒸留によるエタノール濃縮について検討している。2つ目は、第2世代バイオマス利用のためのキシロースも利用できる酵母の開発とその特性の解析を行っている。

まず、エタノールの高温発酵に不可欠な、耐熱性でかつエタノール生産性の耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* および耐熱性細菌 *Zymomonas mobilis* を分離あるいは更なる耐熱化し、それらの高温発酵能を比較すると同時に効率的な高温発酵が可能であることを示している。続いて、冷却装置の無いシンプルな発酵4,000 Lタンクを用いて非温度制御発酵が可能であることを実証している。さらに、40°C以上では減圧蒸留が容易であることから、発酵に連動して減圧蒸留によるエタノール濃縮が可能である。そこで、コメを加水分解した原料を用いて5 Lレベルの試験を実施し、繰り返して発酵濃縮ができることを示した。また、減圧蒸留によってボイラー燃料に直接利用できる60%以上の濃縮を達成している。加えて、コメの加水分解物を炭素源とし、40°Cでの発酵濃縮を行う場合は、耐熱性 *K. marxianus* よりも耐熱化 *Z. mobilis* の方がより短時間で全行程を実施できることを示している。

一方、セルロース系バイオマスのエタノールへの変換のために、ヘキソースの利用に加えてキシロースを資化できる株のスクリーニングを行い、その中でもキシロースからのエタノール生産性の高い株 *K. marxianus* BUNL-21 を得た。この株は、これまで耐熱性が高いと報告されている *K. marxianus* DMKD3-1042 よりも耐熱性が強いこと、キシロース資化能力の高い *Scheffersomyces stipitis* と比べ高温でのキシロースからのエタノール生産性に優れていること、セルロース系バイオマスの利用時に発生する阻害物質に耐性であることなど、実用性が高いことが判明した。一方で、*K. marxianus* は炭素源が不足するとエタノールを酢酸に変換する負の側面をもっており、この点について転写解析等を含めた解析から代謝上の問題点を明らかにした。

以上のように、申請者は、第2世代バイオマスの利用拡大に対して問題となっているコスト削減や効率的なエタノールへの変換のために2つの新技術開発を行っており、それぞれについて筆頭著者および共著者として論文発表を行っている。また、参考論文の中に関連した研究が含まれており、一貫した研究方針でまとめられた学位論文となっている。研究内容は産業利用を目指しながらもしっかりとした基礎研究に基づいたものであり、また、多くの学会発表もあることから、発酵系分野等から一定の評価を得ている。これらのことから、質の高い研究成果を挙げていると判断される。