

奨励金No. 1489

## 微細藻共培養系による革新的 C1 化学プラットフォーム

山田 亮祐  
大阪公立大学 准教授



### Production of chemicals from C1 compounds by co-culture of microalgae and yeast

Ryosuke Yamada,  
Osaka Metropolitan University, Associate Professor

種々の環境問題を背景に、C1 化合物である二酸化炭素やメタノールから有用物質を生産する技術が求められている。本研究では、メタノール代謝酵母と微細藻を共培養し、C1 化合物から D-乳酸を生産する技術を開発した。酵母 *Pichia pastoris* と、微細藻 *Chlamydomonas reinhardtii* との共培養において、pH を制御することでそれぞれの増殖能が大幅に向上し、C1 化合物から D-乳酸を生産することに成功した。

Due to various environmental problems, it is expected to produce useful chemicals from carbon dioxide and methanol. In this study, a technology for producing D-lactic acid from C1 compounds by co-cultivating methanol-metabolizing yeast and microalgae was developed. In the co-culture of the yeast *Pichia pastoris* and the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, D-lactic acid was successfully produced from the C1 compounds. Controlling pH was found to be an important factor in promoting the growth of both microorganisms.

#### 1. 研究目的

石油の価格や供給量の不安定化に伴い、石油以外の多様な天然炭素資源から種々の化合物を生産する技術の開発が求められており、その一つとして C1 化合物のメタンやメタノールが注目されている (Pfeifenschneider et al. 2017)。また、地球温暖化や種々の環境問題を背景に、C1 化合物である二酸化炭素を種々の有用化合物に変換する技術の開発が強く求められている (Ng et al. 2017)。これらの C1 化合物の有用物質への変換に、常温・常圧で反応が進行し、反応特異性が高い微生物などの生体触媒を用いれば、省資源かつ省エネルギーな環境調和型物質生産プロセスの構築が期待できる。

本研究では、メタノールを種々の有用化合物に変換可能なメタノール代謝酵母と、二酸化炭素を種々の有用化合物に変換可能な微細藻を共培養

することで、メタノールおよび二酸化炭素からの高効率な有用物質生産技術の開発を目指した。具体的には、D-乳酸を生産するメタノール代謝酵母 *Pichia pastoris* と、微細藻 *Chlamydomonas reinhardtii* を共培養し、D-乳酸生産性を評価した。

#### 2. 研究内容

##### 2.1. メタノール代謝酵母と微細藻との共培養

研究代表者らは、光合成を行う微細藻と、光合成を行わない大腸菌や酵母などの従属栄養微生物を共培養することで、微細藻の増殖能が向上することを見出している (Yamada et al. 2023)。しかし、メタノール存在下での微細藻と従属栄養微生物との共培養については報告されていない。そこで、研究代表者らが開発した D-乳酸を生産するメタノール代謝酵母 *P. pastoris* GS115/S8/Z3 (Yamada et al. 2019) と、微細藻 *C. reinhardtii* を

様々な初期細胞濃度比でメタノールを含む培地で共培養した。

図1(A)に示すように、微細藻は共培養により増殖速度が向上することが確認された。酵母の初期細胞濃度が多いほど、微細藻の増殖速度が高くなり、微細藻細胞：酵母細胞=1：20のとき、培養68時間後の微細藻細胞数は $8.06 \times 10^6$  cells/mLとなり、微細藻単培養と比較して5.1倍となった。一方で、共培養をした場合は、培養164時間以降に微細藻細胞の濃度が低下する現象が確認された。

図1(B)に示すように、酵母細胞も共培養により増殖速度が向上することが確認された。酵母の初期細胞濃度が多いほど、酵母の増殖速度も高くなり、微細藻細胞：酵母細胞=1：20のとき培養260時間後の酵母細胞数は $166 \times 10^6$  cells/mLとなり、酵母単独で培養した場合の2.9倍となった。

以上より、メタノール存在下でD-乳酸を生産するメタノール代謝酵母 *P. pastoris* GS115/S8/Z3 と、微細藻 *C. reinhardtii* を共培養すると、微細藻、酵母共に増殖速度が大幅に向上すること確認された。一方で、培養後期における微細藻 *C. reinhardtii* 細胞濃度が低下する現象が確認された。種々の検討の結果、この現象の主要因はpHの低下にあることが確認された。

## 2.2. メタノール代謝酵母と微細藻との共培養におけるpHの影響

2.1.において、培養後期に微細藻 *C. reinhardtii* 細胞濃度が低下する現象が確認され、これはpHの低下が原因であることが確認された。そこで、初期細胞濃度比を微細藻細胞：酵母細胞=1：10として、酵母 *P. pastoris* と微細藻 *C. reinhardtii* の共培養を種々のpHで行った。

図2(A)に示すように、pHを制御することで培養後期に微細藻細胞濃度が減少する現象は生じなくなった。特にpH 9.0に調整した場合、培養260時間後の微細藻細胞濃度は $22.1 \times 10^6$  cells/mLと最も高くなり、pHを調整しない微細藻単培養と比較して2.9倍となった。

図2(B)に示すように、pHを制御することで酵母の増殖特性も変化した。pH 5.0に調整した場合、培養260時間後の酵母細胞濃度は $211 \times 10^6$  cells/mLと最も高くなり、pHを調整しない酵母単培養と比較して3.7倍となった。

図2(C)に示すように、メタノール存在下でD-乳酸を生産するメタノール代謝酵母 *P. pastoris* GS115/S8/Z3 と、微細藻 *C. reinhardtii* を共培養することによりD-乳酸の生成が確認された。D-乳酸生成量はpHの影響を受け、pH 8.0および9.0で特に生成量が多くなることが確認された。図2

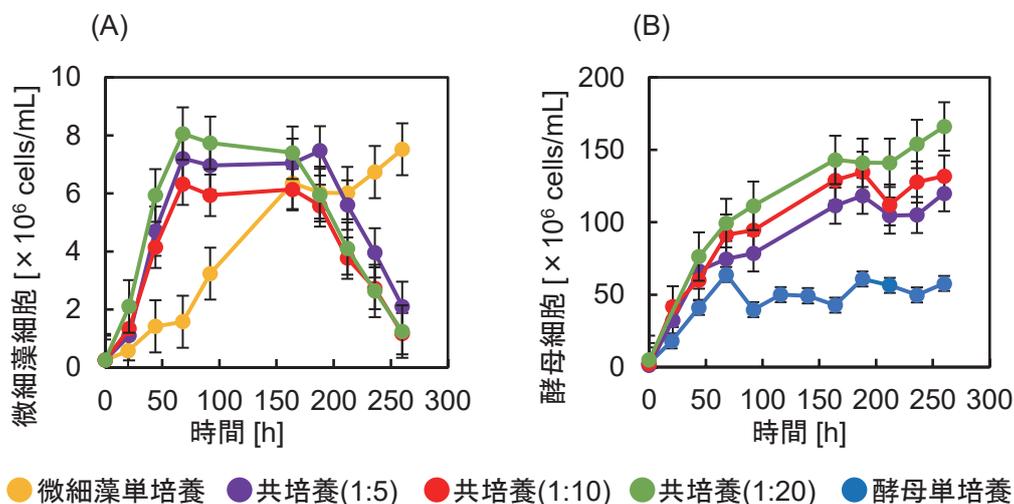


図1 メタノール存在下におけるメタノール代謝酵母と微細藻との共培養

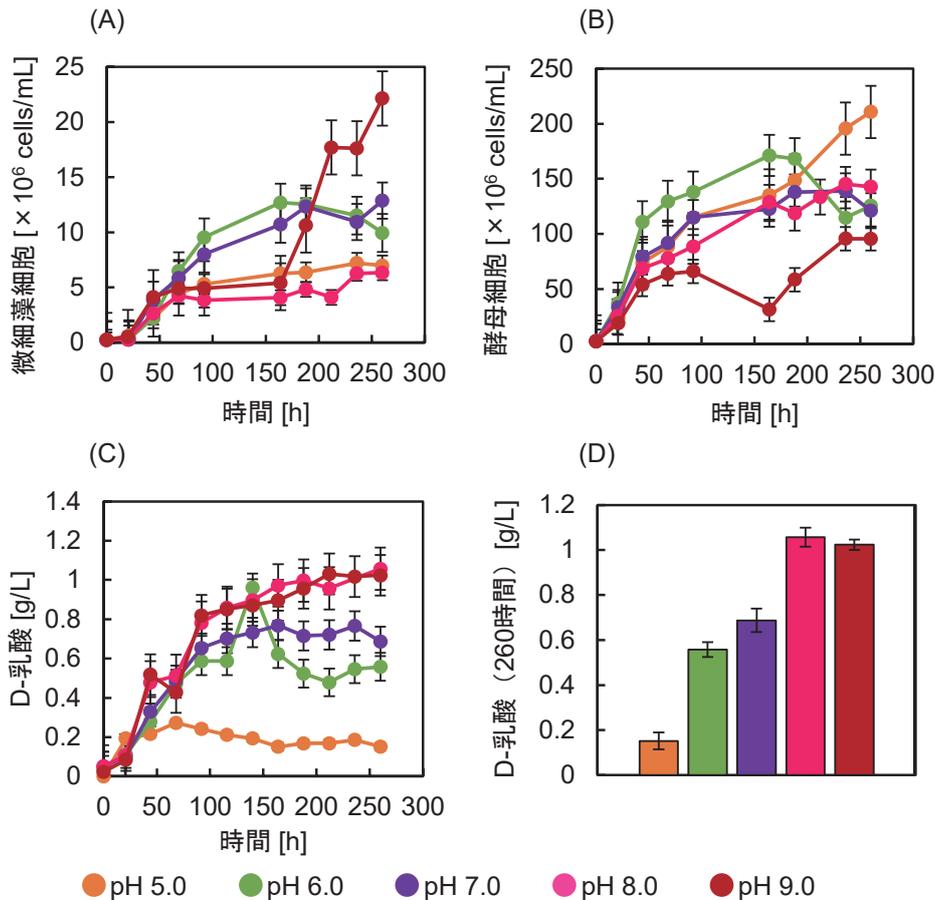


図2 メタノール代謝酵母と微細藻との共培養における pH の影響

(D) に示すように、培養 260 時間後の D-乳酸生成量は pH 8.0 の時に 1.06 g/L と最も高くなった。

以上より、酵母 *P. pastoris* GS115/S8/Z3 と、微細藻 *C. reinhardtii* との共培養において、pH を制御することでそれぞれの増殖能が大幅に向上することを明らかにした。また、この共培養系により D-乳酸を生産することに成功した。今後は、馴化や変異導入によるさらなる増殖能の向上や、代謝工学による *P. pastoris* GS115/S8/Z3 のさらなる D-乳酸生産能の向上を目指す。

### 3. 参考文献

- 1) Ng IS, Tan SI, Kao PH, Chang YK, Chang JS (2017) Recent developments on genetic engineering of microalgae for biofuels and bio-based chemicals. *Biotechnol J* 12: 1600644.
- 2) Pfeifenschneider J, Brautaset T, Wendisch VF

(2017) Methanol as carbon substrate in the bio-economy: Metabolic engineering of aerobic methylotrophic bacteria for production of value-added chemicals. *Biofuel Bioprod Biorefin* 11: 719.

- 3) Yamada R, Ogura K, Kimoto Y, Ogino H (2019) Toward the construction of a technology platform for chemicals production from methanol: D-lactic acid production from methanol by an engineered yeast *Pichia pastoris*. *World J Microbiol Biotechnol* 35: 37.
- 4) Yamada R, Yokota M, Matsumoto T, Hankamer B, Ogino H (2023) Promoting cell growth and characterizing partial symbiotic relationships in the co-cultivation of green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and *Escherichia coli*. *Biotechnol J* 18: 2200099.