

## キシロース発酵能を持つ新奇酵母によるバイオエタノール生産

小原 信夫 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, nobuchan1173@yahoo.co.jp)

榎 牧子 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, enoki@kaiyodai.ac.jp)

岡井 公彦 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, mokai01@kaiyodai.ac.jp)

上田 孝太郎 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科)

石田 真巳 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, ishida@kaiyodai.ac.jp)

浦野 直人 (東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科, urano@kaiyodai.ac.jp)

## Bioethanol production by novel yeasts with xylose fermentation activities

Nobuo Obara (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Makiko Enoki (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masahiko Okai (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Kotaro Ueda (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Masami Ishida (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

Naoto Urano (Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science Technology, Japan)

## 要約

バイオエタノール生産に利用される微生物(酵母)は、一般にグルコース等の六炭糖はよく発酵するが、キシロース等の五炭糖はほとんど発酵しない。本論文では、キシロースを発酵する新奇天然酵母を単離して、セルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産を行った研究を報告する。セルロース分解物を多量に含有する天然試料を、キシロース発酵酵母の採集源と捉え、東京海洋大学・高尾山・多摩川河川敷の腐植土、水再生センター活性汚泥、カブトムシ幼虫の飼育土から、酵母403株を単離した。全403株中からグルコース発酵酵母289株を選抜し、さらに289株から有望と判断される酵母8株を選抜した。これらの8株に関して28S rDNA D1/D2領域の塩基配列解析を行った処、KS-25株・KS-28株・KS-29株は*Tetrapisispora iriomotensis*、RC-19株・RC-35株は*Candida tropicalis*、RC-44株は*Saccharomyces cerevisiae*、RC-48株は*Spathaspora passalidarum*、UK-5株は*Spathaspora passalidarum*であることがわかり、特に*T. iriomotensis*と*S. passalidarum*は新奇性の高い酵母であった。*T. iriomotensis* KS-25株・KS-28株・KS-29株は、2%グルコース液からバイオエタノール7~8 g/Lを生産し、*S. passalidarum* RC-48株・UK-5株は、2%キシロース液からバイオエタノール3~4 g/Lを生産していた。さらに、2%グルコース+2%キシロース混合液からのバイオエタノール生産量は、*S. passalidarum* UK-5株が12.8 g/Lと最大であった。従って、セルロース系バイオマスを原料とする際には、*S. passalidarum* UK-5株が最適発酵酵母であると考えられた。そこで、シュレッダー裁断紙または木造建築廃材(スギのこぎり屑)の糖化原料を各酵母株で発酵した処、*S. passalidarum* UK-5株は各々11.0 g/L、3.38 g/Lのバイオエタノールを生産した。

## キーワード

酵母, *Spathaspora passalidarum*, キシロース, 発酵, バイオエタノール

## 1. 目的

地球温暖化を防止する代替クリーンエネルギーの一つとして、世界のバイオエタノール生産が急速に拡大している。2011年の時点で、世界のバイオエタノール生産シェア64%を占めていたアメリカでは年間542億klを生産し、ガソリン車は概してバイオエタノール混合率E10対応になっている。また、シェア24%のブラジルで年間210億klを生産し、自国内でE20-25を義務付け、すでに全車両がE25までの対応車となっている(柴田, 2012)。日本においても、2030年までに全国規模でE10規模の実施が可能になる量のバイオエタノールを市場供給することを見込んでいる。従って、石油代替燃料としてバイオエタノールが果たす役割は益々大きくなると思われる。現状のバイオエタノールの主要原料はトウモロコシやサトウキビ等の糖質・デンプン系バイオマスであり、これらは安価で効率的なエタノール変換が可能であるという利

点を持っている。しかし、アメリカでは全栽培トウモロコシの約30%、ブラジルではサトウキビから抽出できる砂糖類の約50%がバイオエタノール原料として利用されていて、原料の燃料化が食糧化と競合するという問題点の発生に繋がっている(Koh and Ghazoul, 2008; 小泉, 2007)。そこで、第2次世代のバイオエタノール原料としてセルロース系バイオマスの開発が始まっているが、エタノール変換効率が低いという問題点があり、実用化のためにはより高い変換効率化が必要である。セルロース系バイオマスの主成分であるセルロースとヘミセルロースを糖化すると、主に六炭糖のグルコースと五炭糖のキシロースを生成する(近藤・植田, 2010)。ところが、図1に示すように、バイオエタノールを生産する微生物(酵母)は、一般にグルコースをよく発酵するものの、キシロースを発酵する酵母は極めて希である(Barnett et al., 2000)。従来の研究では、キシロース発酵酵母*Pichia stipitis* (Skoog and Hahn-Haegeral, 1989)、キシロース発酵能を付与した遺伝子組換え大腸菌(Ingram et al., 1998)によるセルロース系バイオマスからのエタノール生産が報告されているが、いずれも浸透圧耐性が低く高濃度発酵に適さないため、セルロース系

## 従来型酵母の問題点 セルロース系バイオマス



新奇キシロース発酵酵母がセルロース系  
バイオエタノール生産の鍵

図1：セルロース系バイオマスからの効率的エタノール生産に必要な条件

バイオマスからの効率的バイオエタノール生産は実現されていない。私達はこれまで、廃糖蜜 (Ueno et al, 2001; 2002; 2003)、ビール粕 (小原他, 2009)、外来水草 (Ogawa et al, 2008; Takagi et al, 2012)、海藻 (浦野他, 2012)、シュレッター裁断紙 (Obara et al, 2012) などの様々なセルロース系バイオマスからのバイオエタノール生産に関する研究を行って来た。しかし、セルロース糖化液中のキシロースをエタノール変換する研究は行っていなかった。

本論文では、天然環境からキシロース発酵能を有する新奇酵母を単離して、セルロース系原料からの効率的バイオエタノール生産を行った研究を報告する。

## 2. 方法

### 2.1 微生物のスクリーニング用試料

キシロース発酵酵母は、セルロース系バイオマスの腐葉土を含有している天然試料 St. 1 ~ St. 5 からスクリーニングすることにした。St. 1: 東京海洋大学 (東京都港区) 品川キャンパス内の土壌、St. 2: 芝浦水再生センター (東京都港区) の活性汚泥槽、St. 3: 高尾山 (東京都八王子市) の土壌、St. 4: 多摩川上流 (東京都奥多摩町) の河川底泥、St. 5: 飼育カブトムシ幼虫の発酵土 (東京都江東区)、であった。

### 2.2 キシロース発酵酵母の単離

下記の工程①、②、③の流れに沿って、キシロース発酵酵母の単離を行った。工程① St. 1 ~ St. 5 の試料を滅菌生理食塩水に懸濁して、細菌とカビの生育を阻害する改良 YPD-平板培地 (2% グルコース、2% ペプトン、1% 酵母エキス、0.1% クロラムフェニコール、3% プロピオン酸ナトリウム) に散布し、25 °C、3日間培養した。培地上での増殖コロニーを単離して、顕微鏡観察により酵母株を単離した。工程② 単離酵母株に関して、2% グルコース-YNB 液体培地 10 mL を試験管に入れ、25 °C、2週間のダーラム管発酵試験を行い、グルコース発酵酵母株を単離した。工程③ グルコース発酵酵母に関して、2% キシロース-YNB、2% マンノース-YNB、または2% ガラクトース-YNB の各液体培地により発酵試験を行い、キシロース発酵能を持つ酵母を含む選抜酵母株を単離した。

### 2.3 選抜酵母によるバイオエタノール生産量計測

2% グルコース-YNB 液体培地、2% キシロース-YNB の各液体培地、または2% グルコース+2% キシロース-YNB の液体培地、各 10 mL に選抜酵母株を 0.1 (O.D. at 660 nm) となるように植菌して、30 °C、5日間の嫌気培養を行い、バイオエタノール生産能を酵素法 (エタノール測定 F-kit, Roche) にて計測した。

### 2.4 選抜酵母の遺伝子同定

選抜酵母に関して、28S rDNA D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> ドメインの塩基配列解析により同定を行った。酵母細胞をビーズビートング法にて破壊し、Isoplant II (ニッポン・ジーン) により DNA 抽出を行った。

NL1 Forward primer (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')、NL4 Reverse primer (5'-GGT CCG TGT AAG ACG-3')、TaKaRa Ex TaqTM DNA polymerase (TaKaRa Shuzo) を用いて、Thermal Cycler Dice (TaKaRa) を使用して PCR を行い、選抜酵母株の 28S rDNA D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> ドメインを増幅した。PCR 増幅物は Big Dye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied biosystems) によりシーケンス反応を行い、Genetic Analyser 3130x1 (Applied biosystems) により塩基配列を決定した。BLASTIN program (Altschul et al., 1997) により相同性検索を行い、酵母菌種の同定を行った。

### 2.5 選抜酵母による各種バイオマス原料からのバイオエタノール生産

バイオマス原料として、シュレッター裁断紙、木造建築廃材 (スギのこぎり屑)、海藻 (アオサ、オゴノリ、スジメ) を用いて、選抜酵母株による発酵試験を行った。原料を乾燥粉末化した試料 3 g を 3% 希硫酸 100 mL に懸濁して、121 °C で 60 分間加熱した。その後、溶液を pH 4.5 に調整して、セルラーゼ GC220 (ジェネンコア協和) 500 U を添加して、50 °C、48 時間の糖化を行った。糖化液 10 mL に各選抜酵母株を 0.1 (O.D. at 660 nm) となるように植菌して、30 °C、5日間の嫌気培養を行い、バイオエタノールを生産した。

### 2.6 選抜酵母の耐塩性試験

YPD に NaCl を各 0 M、0.5 M、1.0 M、1.5 M、2.0 M または 2.5 M 添加した液体培地を調製した。この液体培地 10 mL を試験管に入れ、25 °C、2週間のダーラム管発酵試験を行い、CO<sub>2</sub> 発生の有無を目視判定し、耐塩性能を解析した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 キシロース発酵酵母の単離

工程①、②、③によるキシロース発酵酵母を含む選抜酵母株のスクリーニング結果を図2に示す。工程①により St. 1 由来 52 株、St. 2 由来 68 株、St. 3 由来 108 株、St. 4 由来 120 株、St. 5 由来 55 株で、全 408 株の酵母を単離した。工程②によりグルコース発酵能を持つ酵母を 289 株スクリーニングした。工程③により 289 株に関して、グルコース、キシロース、マンノース、ガラクトースの発酵試験を行ったところ、表1に示す特徴的な酵母 8 株を選抜することができた。

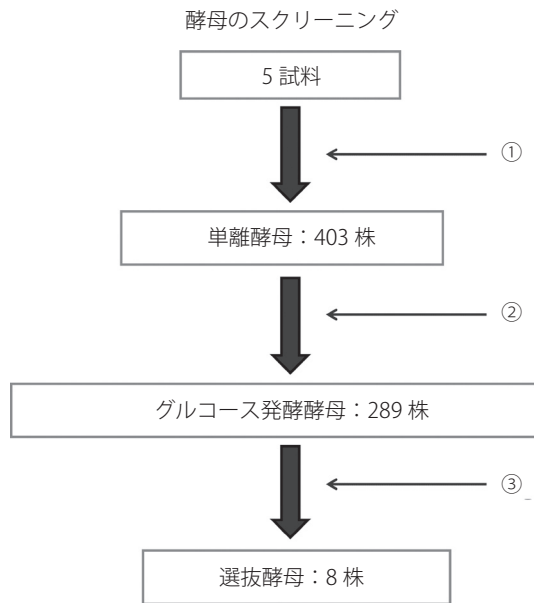


図2：キシロース発酵酵母のスクリーニング結果

選抜酵母8株はSt. 1由来のKS-25, KS-28, KS-29株、St. 2由来のRC-19, RC-35, RC-44, RC-48株、St. 5由来のUK-5株であった。比較対照として、海洋由来の高発酵酵母である *Saccharomyces cerevisiae* C-19株 (Obara et al., 2012)、キシロース発酵酵母である *Pichia stipitis* NBRC1687株 (Skoog et al., 1989) を使用した。各酵母株による単糖発酵試験結果を表1に示す。

表1：酵母の糖発酵能

	菌株	グルコース	キシロース	マンノース	ガラクトース
既存酵母	C-19	++	-	+	+
	<i>P. stipitis</i>	+	+	+	-
新奇酵母	KS-25	++	-	++	+
	KS-28	++	-	++	++
	KS-29	++	-	++	++
	RC-19	++	-	+	++
	RC-35	++	-	++	+
	RC-44	++	-	++	++
	RC-48	++	+	+	-
UK-5	++	++	++	-	

注：++：～2日、+：～5日、-：ガス発生無し

比較酵母では、*P. stipitis* NBRC1687株がキシロース発酵能を示した。選抜酵母8株はいずれもグルコース発酵能とマンノース発酵能を持っていた。さらに、ガラクトース発酵は6株が保持していた。キシロース発酵能を示す酵母はRC-48株とUK-5株の2株のみであった。セルロース系バイオマスを豊富に含有していると推定したSt. 1～St. 5 から単離した天然酵母403株のうち、キシロース発酵能を有している酵母は2株のみであったことは、キシロース発酵能を保持している酵母の存在が極めて希であることを示している。

### 3.2 選抜酵母の遺伝子同定

表2に選抜酵母8株の遺伝子同定結果を示す。St. 1由来のKS-25, KS-28, KS-29株は、いずれも *Tetrapisispora iriomotensis* であった。*T. iriomotensis* は Ueda-Nisimura (1999) により、西表島の土壌から単離・解析された酵母である。St. 1と西表島は海岸に近い場所に存在した腐葉土という点において、類似した環境と言えるであろう。St. 2由来のRC-19, RC-35株は *Candida tropicalis*、RC-44は *S. cerevisiae* であった。さらに、RC-48株およびSt. 5由来のUK-5株は *Spathaspora passalidarum* であった。*C. tropicalis* はカンジダ症の原因菌の一つとされ、*S. cerevisiae* は発酵産業での頻用酵母であるため、RC-19, RC-35, RC-44は本研究の目的からは外すことにした。*S. passalidarum* は2006年に初めて菌種登録された酵母で、木材穿孔虫から単離され、キシロース資化能を持つことが報告されている (Nguyen, 2006)。従って、*T. iriomotensis* と *S. passalidarum* は研究例が乏しく、更なる研究開発が期待できる新奇性の高い酵母と判断した。

表2：選抜酵母の同定結果

株名	菌種	相同性
KS-25	<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	100 %
KS-28	<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	100 %
KS-29	<i>Tetrapisispora iriomotensis</i>	100 %
RC-19	<i>Candida tropicalis</i>	99 %
RC-35	<i>Candida tropicalis</i>	99 %
RC-44	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 %
RC-48	<i>Spathaspora passalidarum</i>	99 %
UK-5	<i>Spathaspora passalidarum</i>	99 %

### 3.3 単糖からのバイオエタノール生産

選抜酵母8株と比較酵母C-19株、NBRC1687株によるグルコースからのバイオエタノール生産を図3に示す。*T. iriomotensis* KS-25, KS-28, KS-29株は、C-19株よりエタノール生産能が高かったため、高発酵酵母としての有効利用が期待できる。また、キシロース発酵能を持つRC-48株・UK-5株・NBRC1687株の3者を比較すると、RC-48株とUK-5株のグルコース発酵によるエタノール生産量がNBRC1687株のそれよりも高いことがわかった。

次に、*S. passalidarum* RC-48株、UK-5株とNBRC1687株、C-19株によるキシロースからのバイオエタノール生産を図4に示す。C-19株はキシロース発酵をしないため、エタノール生産量は0 g/Lであった。一方、NBRC1687株は1.75 g/Lのバイオエタノール生産を示し、*P. stipitis* がキシロース発酵能を持つとする既知報告と一致した。そして、*S. passalidarum* RC-48株は2.9 g/L、UK-5株は4.0 g/Lのバイオエタノールを生産した。すなわち、UK-5株はNBRC1687株と比べて、グルコー

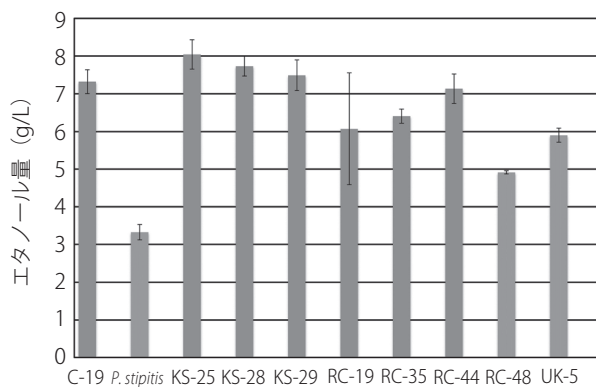


図3：グルコース発酵によるバイオエタノール生産  
注：2%グルコースYNB培地、25℃、5日間

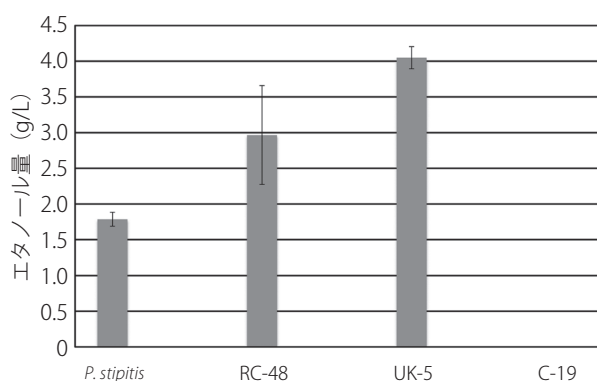


図4：キシロース発酵によるバイオエタノール生産  
注：2%キシロースYNB培地、25℃、5日間

ス発酵能が1.8倍、キシロース発酵能が2.3倍にも達しており、非常に有望な酵母株と考えられた。

さらに、セルロース系バイオマスを模倣して、選抜酵母4株を用いたグルコース+キシロース混合液からのバイオエタノール生産を行った結果を図5に示す。グルコースからのバイオエタノール生産能が高い*T. iriomotensis* KS-28, KS-29株は、グルコース+キシロース混合では、図3のグルコースのそれ

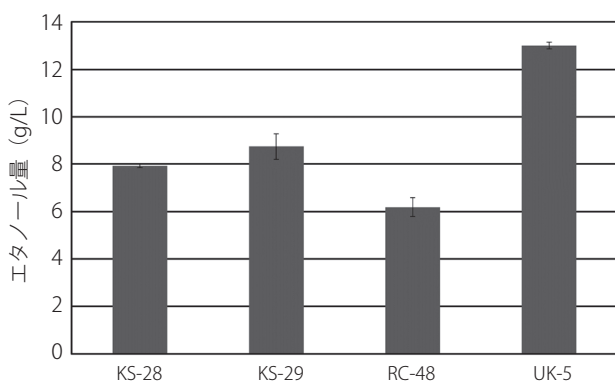


図5：グルコース+キシロース発酵によるバイオエタノール生産  
注：2%グルコース+2%キシロースYNB培地、25℃、5日間

と比べてエタノール生産能がほとんど高くならなかった。これは両酵母株がキシロース発酵能を持っていないことを示している。一方、*S. passalidarum* RC-48株は6 g/L、*S. passalidarum* UK-5株は12.8 g/Lのバイオエタノール生産能を持っており、図4のそれと比べて著しく増加していた。特に、UK-5株のバイオエタノール生産能が高く、セルロース系バイオマスに最適な酵母と考えられた。

### 3.4 選抜酵母による各種バイオマス原料からのバイオエタノール生産

シュレッター裁断紙、木造建築廃材(スギのこぎり屑)、海藻(アオサ、オゴノリ、スジメ)の各原料の糖化による単糖生成量の比較を図6に示す。いずれの原料も糖化により生成される単糖は、主にセルロース由来のグルコースとヘミセルロース由来のキシロースであり、他の単糖は極微量であった。陸圏の植物から製造されるシュレッター裁断紙とスギのこぎり屑は、海藻類と比べてキシロース成分量が多いことがわかった。よって、陸圏植物由来の原料の発酵には、キシロース発酵酵母の適用が妥当と考えられた。また、シュレッター裁断紙から生成される単糖量が極めて多く、バイオマス原料として優れていることがわかった。

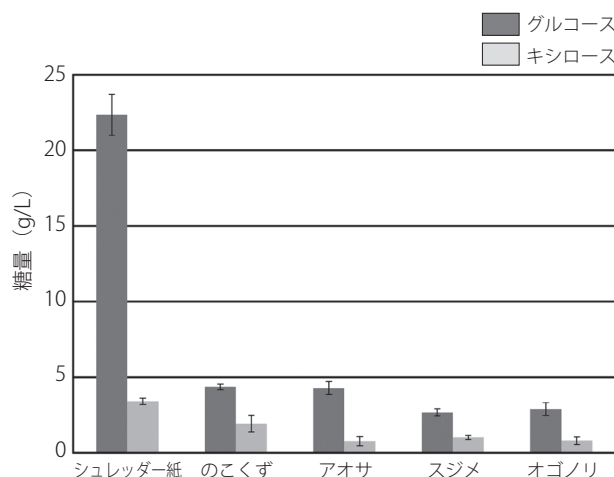


図6：各原料の糖化による単糖生成量の比較

表3に各糖化液を酵母により発酵した際の、バイオエタノール生産量を示す。シュレッター裁断紙では、UK-5株、KS-28株、KS-29株、C-19株のエタノール量が9～11 g/Lと高く、特にUK-5株では11.00 g/Lと全原料、全酵母中で最大となった。また、UK-5株はスギのこぎり屑でも3.38 g/Lと、C-19株とほぼ同等のエタノール量を生産した。よって、UK-5株はキシロース量が多い糖化液の発酵に適していることが確認された。一方、海藻原料の場合には、UK-5株のバイオエタノール生産量が1 g/L前後と、他酵母株のそれと比較して最も低くなった。よって、シュレッター裁断紙・スギのこぎり屑と、海藻(アオサ・スジメ・オゴノリ)との、酵母発酵原料としての相違を解析することが必要と思われた。

海藻原料を用いた際に、UK-5株のバイオエタノール生産量が低い理由の解明のために、各酵母株の耐塩性を調べた結果

表3：糖化液からの酵母別エタノール生産量

菌株	糖化液				
	シュレツダー紙	のこぎり	アオサ	スジメ	オゴノリ
UK-5	11.00	3.38	1.08	0.89	0.77
KS-28	10.17	2.55	3.09	1.90	2.15
KS-29	9.42	2.21	3.46	2.03	2.28
RC-44	7.73	3.07	1.57	1.26	1.68
C-19	9.43	3.53	2.17	1.76	2.25
<i>P. stipitis</i>	3.97	2.38	NT	NT	NT

注：g/L

を表4に示す。比較酵母の*S. cerevisiae*株は塩濃度1.5 Mまで増殖し、海洋由来*S. cerevisiae* C-19株はさらに耐塩性が高く、塩濃度2.5 Mでも増殖した。KS-28株、KS-29株、RC-44株はいずれも塩濃度2.0 Mまで増殖した。ところが、UK-5株は耐塩性が低く塩濃度0.5 Mまでが増殖限界であった。海藻原料を用いた際の、UK-5株の発酵能の低下は、UK-5株の耐塩性の低さに起因していると判断された。

表4：耐塩性発酵試験結果

菌株	塩濃度(M)				
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
UK-5	W	-	-	-	-
KS-28	++	++	++	++	-
KS-29	++	++	++	++	-
RC-44	++	++	++	++	-
C-19	++	++	++	++	+
<i>P. stipitis</i>	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	-	-

注：++：～1週間、+：～2週間、-：ガス発生無し、W：weak

以上の結果を踏まえ本研究では、シュレツダー裁断紙や木造建築廃材(スギのこぎり屑)などの陸圏のセルロース系バイオマス为原料とすると、グルコース発酵と同時にキシロース発酵を保持している新奇酵母*Spathaspora passalidarum* UK-5株が、効率的バイオエタノール生産に有効な酵母であることがわかった。

## 謝辞

本論文の責任著者 (Corresponding author) の連絡先を以下に示す。

氏名：浦野直人(教授)

〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科海洋環境学部門

Tel:03-5463-0588

e-mail:urano@kaiyodai.ac.jp

## 引用文献

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z.,

Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 17, 3389-3402.

Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. (2000). *YEASTS: Characteristic and identification*, 3rd Edition. Cambridge University Press.

Ingram, L. O., Gormez, P. F., Lai, X. and Moniruzzaaman, M. (1998). Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 58, Issue 2-3, 204-214.

Koh, L. P. and Ghazoul, J. (2008). Biofuels, biodiversity, and people: Understanding the conflicts and finding opportunities. *Biological Conservation*, Vol. 141, No. 10, 2450-2460.

小泉達次 (2007). バイオエタノールと世界の食糧事情. 筑波書房.

近藤昭彦・植田充美監修(2010). セルロース系バイオエタノール製造技術—食料クライシス回避のために—. NTS.

Nguyen, N. H., Sung-oui, S. U. H. and Meredith, B. (2006). Morphological and ecological similarities: Wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts. *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffiesii* sp. nov. *Mycological Research*, Vol. 110, 1232-1241.

Obara, N., Ishida, M., Hamada-Sato, N. and Urano, N. (2012). Efficient bioethanol production from paper shredder scrap by a marine-derived *Saccharomyces cerevisiae* C-19. *Studies in Science and Technology*, Vol. 1, No. 2, 127-132.

小原信夫・濱田奈保子・浦野直人・浅沼進 (2009). ビール粕を原料としたバイオエタノール生産条件の検討—食品製造廃棄物のエネルギー変換—. *日本フードシステム学会誌*, Vol. 16, 112-117.

Ogawa, G., Ishida, M., Usui, Y. and Urano, N. (2008). Ethanol production from the water hyacinth *Eichhornia crassipes* by yeast isolated from various hydrosphere. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 2, No. 5, 110-113.

柴田明夫(2012). ブラジルのバイオエタノールをめぐる動向. 独立行政法人農畜産振興機構, [http://www.alic.go.jp/johos/joho07\\_000557.html](http://www.alic.go.jp/johos/joho07_000557.html).

Skoog, K. and Hahn-Haegeral, B. (1989). Xylose fermentation with *Pichia stipitis*, *Yeast*, Vol. 5, 79-80.

Takagi, T., Uchida, M., Matsushima, R., Ishida, M. and Urano, N. (2012). Efficient bioethanol production from water hyacinth *Eichhornia crassipes* by both preparation of the saccharified solution and selection of fermenting yeasts. *Fisheries Science*, Vol. 78, Issue 4, 905-910.

Ueda-Nishimura, K. and Mikata, K. (1999). A New genus, *Tetrapisispora* gen. nov.: *Tetrapisispora irionotensis* sp. nov.: *Tetrapisispora nanseensis* sp. nov. and *Tetrapisispora arbriicola* sp. nov. from the Nansei Islands, and reclassification of *Kluyveromyces phaffii* (van der Walt) van der Walt as *Tetrapisispora phaffii* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 49, No. 4, 1915-1924.

Ueno, R., Urano, N. and Kimura, S. (2001). Characterization of

---

thermotolerant, fermentative yeasts from hot spring drainage. *Fisheries Science*, Vol. 67, Issue 1, 138-145.

Ueno, R., Urano, N. and Kimura, S. (2002). Effect of temperature and cell density on the ethanol fermentation by a thermotolerant, aquatic yeast strain isolated from hot spring environment. *Fisheries Science*, Vol. 68, Issue 3, 571-578.

Ueno, R., Hamada-Sato, N. and Urano, N. (2003). Fermentation of molasses by several yeasts from hot spring drain and phylogeny of the unique isolates producing ethanol at 55 °C. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, Vol. 90, 23-30.

浦野直人・高木俊幸 (2012). 水圏バイオマスの有効利用—効率的バイオエタノール生産方法の確立へ向けて—. *日本エネルギー学会誌*, Vol. 91, No. 11, 1189-1196.

(受稿：2014年4月24日 受理：2014年5月14日)