

2D10-3 内在性水素生産細菌を利用した牛糞の水素発酵○横山 浩, 荻野 暁史, 和木 美代子, 田中 康男
(畜草研)

【目的】家畜排泄物の処理、及び資源回収法として水素発酵が注目されている。牛糞には水素生産細菌のみでなく、メタン菌などの水素消費細菌も存在すると推測される。そこで、水素消費細菌を抑制しながら水素を生産する水素発酵条件を検討した。また、牛糞に含まれている水素生産細菌を解析するために、水素発酵後の牛糞スラリーに出現する菌叢を解析した。【方法および結果】種菌の添加なしに牛糞スラリー（固形分 18 g/L）を、様々な温度で嫌氣的にバッチ培養した。その結果、60度と75度に2つの水素生産発酵温度ピーク温度が存在した。60度発酵では、4日後をピークとしてその後、水素消費細菌により一旦生産された水素が消費され水素濃度が低下した。一方、75度発酵では、水素生産菌の活性を保持しつつ、水素消費細菌の活性は抑制された。2つの発酵温度で、おもに酢酸が副産物として生成された。至適pHは、2つの発酵温度で7.0前後であった。2つの発酵温度における菌叢を、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis 法で解析した。その結果、60度発酵では水素生産活性を持つ*Clostridium thermocellum*や*Clostridium stercorarium*に類似した細菌が検出された。75度発酵では、海底の熱水噴出口などの高温環境に生育する水素生産高度好熱細菌である*Caldanaerobacter subterraneus* に類似した細菌が検出された。これらの細菌が、牛糞からの水素生産に関与する可能性が示唆された。

Hydrogen production from cow manure using hydrogen-producing bacteria within the manure○Hiroshi YOKOYAMA, Akifumi OGINO, Miyoko WAKI,
Yasuo TANAKA
(Natl. Inst. Livestock Grassland Sci.)**Key words** hydrogen production, hydrogen-producing bacteria, cow manure**2D10-5 乳酸生産酵母において特異的に高発現する遺伝子の解析と利用**○石田 亘広¹, 大西 徹², 多田 宣紀², 高橋 治雄¹
(¹豊田中研,²トヨタ自動車)

【背景・目的】CO₂循環型社会に貢献できる材料としてポリ乳酸が注目されており、様々な宿主でその原料である乳酸の生産技術が試みられている。我々は、遺伝子組換え酵母を用いたL-乳酸およびD-乳酸の高効率生産技術について既に報告しているが^{1), 2)}、今回、本組換え酵母において特異的に高発現する遺伝子を取得する目的で、DNA マイクロアレイ解析を実施した。

【方法・結果】宿主株であるワイン酵母 OC2 株と L-LDH (L-Lactate dehydrogenase) 遺伝子が導入された乳酸生産酵母を 1L ジャーにて発酵させ、発酵初期、中期の各菌体より、RNAを調整した。本試料を用いてDNA マイクロアレイ解析を行った結果、乳酸生産酵母において複数の遺伝子が特異的に発現していることが確認された。その中の一つである *HOR7* (Hyper osmolarity responsive) 遺伝子は、乳酸に応答して高発現することが観察されたため、本プロモーターは乳酸の高生産に利用できる可能性がある。そこで*HOR7*プロモーター制御下でL-LDH遺伝子が発現できるよう染色体導入型ベクターを構築し、新たな乳酸生産酵母を作製した。その結果、*HOR7*プロモーターを利用した組換え酵母は、これまでのプロモーターと比較して、乳酸生産能の向上に貢献することが確認された。

¹⁾ Ishida, N. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, p1964 (2005).²⁾ Ishida, N. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 101, p172 (2006).**Analysis and application of the high expression gene in the lactic acid-producing yeast.**○Nobuhiro ISHIDA¹, Toru ONISHI², Nobuki TADA²,
Haruo TAKAHASHI¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²Toyota Motor Corp.)**Key words** *Saccharomyces cerevisiae*, lactic acid fermentation, *HOR7* promoter**2D10-4 セルロース系バイオマスから水素ガスを生産する菌叢の構築と解析**○栗原 一生¹, 新西 崇史¹, 中島 潤¹, 水野 志穂², 栗冠 真紀子¹,
木村 哲哉¹, 栗冠 和郎¹
(¹三重大・生資,²東邦ガス・基盤技研)

【目的】水素ガスは持ち運び、貯蔵が可能であり、燃焼の際に大気汚染物質を発生しないという利点からクリーンエネルギーとして注目されている。本研究では未利用資源であるバイオマス系セルロースに着目し、低いpHでセルロース分解活性が高く、効率的に水素ガスを生成する微生物菌叢を構築することを目的とした。

【方法と結果】100種類の土壌をサンプリングし、スクリーニングした結果、セルロース分解能および、水素ガス生成活性が高い菌叢を構築することに成功し、これをOF-1として、ボールミルセルロースからの水素生成についてジャーファメンターによる培養pHの最適化を行った。その結果、pH5.5で2.2mol H₂/mol-hexoseの水素生成効率を得られた。各pH条件における菌叢をDGGE法によって解析したところ、どのpHにおいても類似した菌叢であった。最も強く検出されたバンドについてシークエンスを行ったところ、最適 pH での優占菌は *Clostridium cellulosi*, *Uncultured Thermoaerobacteriaceae bacterium*, *Clostridium thermosaccharolyticum* の3種類であった。現在、菌叢の解析を進めると同時に、ミネラル溶液の培地への添加の水素生産効率に及ぼす影響について検討を行っている。

Construction and analysis of microbial consortium that produce hydrogen gas from cellulosic biomass○Issei KURIHARA¹, Tkashi SHINNISHI¹, Jun NAKAJIMA¹,
Shiho MIZUNO², Makiko SAKKA¹, Tetsuya KIMURA¹,
Kazuo SAKKA¹
(¹Fac. Biores., Mie Univ., ²Toho Gas Co.,Ltd)**Key words** hydrogen, microbiotas, cellulose, *Clostridium***2D11-1 *Lactobacillus rhamnosus* による連続乳酸発酵**○竹内 太志, 小口 雄二郎, 寺田 直人, 桐村 光太郎, 木野 邦器
(早大・理工・応化)

【目的】資源循環型社会の構築に向け、生分解性ポリマーの原料となる L-乳酸の安定で低コストな生産法が求められている。そこで、安定で安価に供給可能な間伐材に着目し、それから調製した糖液を原料とした乳酸発酵プロセスを検討した。一般的には回分式発酵法が実施されているが、本研究では工業化には至っていない連続発酵法を検討し、間伐材由来糖液からの高効率な乳酸生産プロセスの構築を目的とした。

【方法・結果】報告されているL-乳酸を生産する菌株の中から *Lactobacillus rhamnosus* を選定した。*Lb.rhamnosus* は、グルコースの資化性に優れ、ポリ乳酸の物性に必要である光学純度の高い L- 乳酸を選択的に生産した。*Lb.rhamnosus* の遊離菌体による連続発酵では、菌体の系外への流出が著しかったため、菌体をアルギン酸カルシウムゲルで包括固定化した。固定化菌体の調製と維持に関し検討したところ、高価な窒素源である Yeast extract の使用量の 80 %削減と 0.5 % Peptone の削除が可能になった。本プロセスにおいて、生産条件を検討したところ、遊離菌体を用いた回分式発酵法と比べ、約4倍にあたる乳酸生産速度、約10 g/l/hを達成した。

Continuous Lactic Acid Fermentation by *Lactobacillus rhamnosus*○Taishi TAKEUCHI, Yujiro OGUCHI, Naoto TERADA,
Kohtaro KIRIMURA, Kuniki KINO
(Dept. Appl. Chem., Sch. Sci. Eng., Waseda Univ.)**Key words** continuous lactic acid fermentation, immobilized cell, *Lactobacillus rhamnosus*, acid-treated woody hydrolysate