

2H14-5 ポリリン酸高度蓄積酵母の育種

○松陵 慎一郎, 西川 絵梨, 向 由起夫
(長浜バイオ大院・バイオサイエンス)

【目的】リン鉱石は今後100年で枯渇する。一方で湖沼への過剰なリンの流入によって富栄養化が引き起こされる。これらの問題は水中からリンを回収して再利用することにより解決される。水中のリンをポリリン酸として蓄積する細菌を利用した生物学的脱リン法が実用化されている。本研究では、酵母を利用してリンを回収することを目指して、多くのポリリン酸を蓄積する酵母の育種を試みた。

【方法及び結果】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の三つの遺伝子を破壊することにより、多くのポリリン酸を蓄積できると考えた。高リン酸条件下で多くのリン酸を取り込ませるために、転写活性化因子Pho4の負の制御遺伝子 *PHO80* を破壊し、酸性ホスファターゼ遺伝子 *PHO5* とリン酸トランスポーター遺伝子 *PHO84* の転写を活性化させた。液胞のポリリン酸を分解させないために、ポリリン酸ホスファターゼ遺伝子 *PHM5* を破壊した。液胞サイズを大きくするために、液胞の形態と機能に関与する *FAB1* 遺伝子を破壊した。これら三つの遺伝子の単独、二重および三重遺伝子破壊株を作成し、それらの酸性ホスファターゼ活性と³¹P-NMRを用いたポリリン酸蓄積量の測定を行った。高リン酸条件下で *pho80* 変異を含むすべての株の酸性ホスファターゼ活性が上昇したので、*PHO84* 遺伝子の発現上昇によりリン酸取り込み活性が上昇することを期待した。*pho80* 変異株は、野生株よりも約7倍多いポリリン酸を蓄積した。*pho80* 多重変異株でも *pho80* 変異株とほぼ同量のポリリン酸を蓄積した。従って、*phm5* と *fab1* 変異によりポリリン酸蓄積量を上昇させることはできなかった。

Breeding of polyphosphate-hyper accumulating *Saccharomyces cerevisiae* mutants.

○Shin-Ichiro MATSUKADO, Eri NSHIKAWA, Yukio MUKAI
(Grad. Sch. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci.Tech)

Key words polyphosphate, PHO pathway, yeast, 31P-NMR

2H15-2 余剰米を原料とした固体エタノール発酵システムの開発

○本多 宏明¹, 大西 章博¹, 藤本 尚志¹, 加藤 妙子¹,
村上 幸男², 上野 真帆¹, 鈴木 昌治¹
(¹東農大・応生科・醸造, ²岩手県奥州市地域エネルギー推進室)

【目的】無蒸煮の余剰米を原料として発酵法で得られるエタノールは、石油の代替エネルギーとして注目されている。一方で、既存のエタノール発酵システムは液体発酵法が主流であるため、蒸留時に高濃度の蒸留廃液が排出されることから、その処理処分に苦慮している現状がある。本研究では液体発酵法によるエタノール生産システムに変わる新規システムとして蒸留廃液の排出を極力抑制することを可能にする固体発酵法の適用を試みた。今回は、米の性状とエタノール生成量の関係について検討した。また、半連続的な固体発酵における物質収支を明らかにし、固体発酵法の有効性を評価した。【方法および結果】供試酵素剤はコクゲンG20を用い発酵酵母は焼酎酵母を用いた。供試米には、初穀付きうるち米、うるち玄米の2種類の米10kgを各々割砕して用いた。初穀付きうるち米はうるち玄米に比べ効率良くエタノール生産ができた。発酵3日目にあらかじめもろみ全量の5%にあたる0.5kgを引き抜き、残部の9.5kgを蒸留した。蒸留後、蒸留残渣と引き抜いたもろみを混合し再発酵を行った。この操作を3回繰り返して半連続発酵を行った。この時の物質収支は、初穀付きうるち米10kgより99%エタノールが約3L生成され、3.6kgの蒸留残渣が発生し、不明分は0.4kgであった。蒸留廃液の発生は認められなかった。

Development of solid state fermentation technology for producing ethanol from surplus rice.

○Hiroaki HONDA¹, Akihiro OHNISHI¹, Naoshi FUJIMOTO¹,
Taeko KATO¹, Sachio MURAKAMI², Maho UENO¹,
Masaharu SUZUKI¹
(¹Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., ²Dept. Energy., Oshu city, Iwate pref.)

Key words solid state fermentation, surplus rice, fuel ethanol, fermentation

2H15-1 *Rhizopus* 培養液を用いた有機性廃棄物からのエタノールと乳酸の生産

○仲村 佐知子, 門倉 利守, 本多 宏明, 浅川 大輝, 中里 厚実
(東農大・醸造)

【目的】液体培地に通気攪拌培養して得られる *Rhizopus* 培養液は、多くの有機酸を生成し、清酒醸造での腐造乳酸菌を抑制するほか、酵母のアルコール耐性を増強する作用があるため新規酒類の開発にも利用できることを報告した。また、*Rh.* 培養液中には各種酵素も生産されるため酒類製造に限らず有効利用が可能であると考えられる。本報告では、近年の環境問題に対応したバイオエタノール生産に着目し、*Rh.* 培養液を用いた有機性廃棄物からのエタノールと乳酸の生産について検討した。

【方法および結果】脱水生ごみと白糠を原料として、ジャーファーマンタにより *R. arrhizus* 059M 株を用いて *Rh.* 培養液を調製し、これに直接原料を添加し、清酒酵母を加えてエタノール、および乳酸を生産した。*Rh.* 培養液調製後の原料添加方法として総原料を一段、二段、および三段で添加し、三段で添加する方法が最も効率良くエタノールが生産された。そのため、三段で添加する方法を用い、糖化酵素剤 (グルクSB) による高温糖化法と比較検討し、10日間で *Rh.* 培養液を用いた方法ではエタノールが8.2%、酵素剤では10.2%で、酵素剤による方法が上回った。しかし、*Rh.* 培養液には酵素剤に劣らぬ糖化力があり、好気性細菌の増殖と乳酸菌の活動を抑制する可能性が示唆された。また、*Rh.* 培養液中に生産されたL-乳酸は1.1%で、エタノール発酵終了まで残存していたため回収が可能であることが考えられ、エタノールと乳酸の同時生産に *Rh.* 培養液を有効活用できることが示唆された。

Production of ethanol and lactic acid from organic waste by using culture liquid of *Rhizopus*

○Sachiko NAKAMURA, Toshimori KADOKURA, Hiroaki HONDA,
Taiki ASAKAWA, Atsumi NAKAZATO
(Dept. Brew. Ferment., Tokyo Univ. Agric.)

Key words bioethanol, biomass, *Rhizopus* sp., L-lactic acid

2H15-3 微生物を指標としたよもぎ発酵液の品質管理

○芳田 理佳, 向 由起夫
(長浜バイオ大院・バイオサイエンス)

【目的】よもぎ発酵液は、よもぎの圧搾抽出液に糖蜜や天然塩などを加えて発酵させることによりつくられ、生ごみの分解促進や脱臭などに利用されている。よもぎ発酵液は様々な企業・団体でつくられているが、それらが同じ微生物を含んでいるかどうかは明らかでない。本研究では、よもぎ発酵液の品質を管理することを目的として、2種類のよもぎ発酵液にどのような微生物が含まれているのかを調べ、それらの比較を行った。【方法と結果】よもぎ発酵液の試料として、「よもぎの力」(NPO法人琵琶湖自然浄化プロジェクト)と「天恵緑汁」(日本畜産)を用いた。まず、これらの発酵液から標準寒天培地に30℃でコロニーを形成する微生物を分離し、その16S rDNA遺伝子(16S rDNA)塩基配列の同定性検索から微生物種を推定した。「よもぎの力」からは主に *Bacillus* 属細菌と *Acetobacter* 属細菌を分離した。「天恵緑汁」からは *Bacillus* 属細菌と *Lactobacillus* 属細菌を分離した。次に、発酵液から直接抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCRにより16S rDNAを増幅し、DGGE法およびクローンライブラリー法を行った。異なる年に製造された「よもぎの力」では同じようなDGGEバンドパターンを観察し、主要なバンドは *Acetobacter* 属細菌であった。「天恵緑汁」でみられるバンドのいくつかは「よもぎの力」のそれとは異なっていた。「天恵緑汁」から増幅した16S rDNAのほとんどが *Lactobacillus* 属細菌由来で、全体の7割が1種類の *Lactobacillus* 属細菌で占められていた。以上の結果から、2種類のよもぎ発酵液に含まれる主要な微生物は異なっていると結論した。

Quality control of Japanese mugwort-fermented broth by monitoring the microorganisms

○Rika YOSHIDA, Yukio MUKAI
(Grad. Sch. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech.)

Key words Quality control, Japanese mugwort, *Lactobacillus*, *Acetobacter*