

2Aa10 *Ureibacillus thermosphaericus* を用いた木質系バイオマス加水分解液の発酵阻害物質除去

○奥田 直之^{1,2}, 坪浦 真由美¹, 仁宮 一章², 片倉 啓雄², 塩谷 捨明²
(¹月島機械・砂糖・バイオ技術部, ²阪大院・工・生命先端)

【目的】木質系バイオマスからのバイオエタノール生産において、酸や熱による加水分解液に含まれる発酵阻害物質の除去は重要な課題の一つである。本研究では従来の過剰石灰処理 (overliming) に代わる方法として、リグニン分解能が確認されている好熱性細菌 *Ureibacillus thermosphaericus* を用いた生物処理を試みた。

【方法および結果】建設廃木材のヘミセルロースを希硫酸で加水分解して得られた糖液に対し *U. thermosphaericus* を 2.4 g-dry cell/l を加え 50° C で 24 h 好氣的に処理した。処理後の加水分解液を用いると、*Saccharomyces cerevisiae* TJ1 の比増殖速度およびエタノール比生産速度は overliming と同等まで向上した。本菌は糖の質化性を持たないため糖のロス は overliming より小さかった。フルフラールとヒドロキシメチルフルフラールを添加した模擬糖液を本菌で処理し LC-MS 分析したところ、それぞれのアルデヒド基が酸化されたカルボン酸が検出された。一方、廃木材加水分解液ではこれらフラン類の減少が小さく、主な有機酸もほとんど減少しなかったことから、*U. thermosphaericus* 処理によるエタノール生産の向上にはリグニン由来のフェノール性化合物の減少も寄与していることが示唆された。

Biological detoxification of lignocellulose hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus*

○Naoyuki OKUDA^{1,2}, Mayumi SONEURA¹, Kazuaki NINOMIYA², Yoshio KATAKURA², Suteaki SHIOYA²
(¹Sugar & Bio Technical Group, Tsukishima Kikai Co., Ltd., ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Key words lignocellulosic materials, *Ureibacillus thermosphaericus*, detoxification, ethanol production

2Aa12 水素酸化細菌 *Rhodococcus opacus* でのアルコール脱水素酵素の発現による水素利用微生物触媒の開発

○服部 佑¹, 松山 彰収², 山本 浩明², 橋本 義輝³, 小林 達彦³, 西原 宏史¹
(¹茨大院・農・資生科, ²ダイセル化学・総研, ³筑波大院・生命環境)

【目的】持続可能な発展のためには既存の物質生産プロセスから、より環境負荷の小さいプロセスへと転換することが重要である。本研究では環境負荷物質を生じない水素酸化反応をバイオプロセスの反応駆動力として利用することを目的とし、NAD還元型ヒドロゲナーゼをもつ *R. opacus* MR-11 株への NADH 依存型アルコール脱水素酵素の導入による水素利用微生物触媒の開発を検討した。

【方法と結果】*Rhodococcus-E. coli* シャトルベクター pREIT19 を利用して、MR-11 株における *Kluyveromyces lactis* 由来 (R)-2,3-butanediol dehydrogenase (KLB) の発現を試みた。KLB 遺伝子上流に SD 配列を付加するためのプライマーを使用し、PCR によって KLB 遺伝子の一部を増幅した。増幅断片のシーケンスを確認した後、完全長の KLB 遺伝子を編集して同シャトルベクターに導入することで、組換えプラスミドを構築した。エレクトロポレーションによる MR-11 株への導入を行い、形質転換体をコロニー PCR により選抜した。現在、誘導条件の検討を進めている。また、疎水性基質の微生物変換への適用を検討するため、MR-11 株の有機溶媒耐性について調べた。

なお、本研究は経済産業省の産業科学技術プロジェクト「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の一環として行われた。

Development of H₂-driven microbial catalyst by expressing alcohol dehydrogenase in the H₂-oxidizing *Rhodococcus opacus* cells

○Yu HATTORI¹, Akinobu MATSUYAMA², Hiroaki YAMAMOTO², Yoshiteru HASHIMOTO³, Michihiko KOBAYASHI², Hirofumi NISHIHARA¹
(¹Dept. Biores. Sci., Ibaraki Univ., ²R&D Center, Daicel Chemical Industries, Ltd., ³Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words NAD-reducing hydrogenase, hydrogen-oxidizing bacteria, *Rhodococcus opacus*, alcohol dehydrogenase

2Aa11 低濃度コハク酸含有発酵液を対象としたリカライト膜によるエタノールの濃縮

○池上 徹, 森田 友岳, 中山 俊一, 根岸 秀之, 北本 大, 榊 啓二
(産総研)

【目的】石油代替え液体エネルギー資源あるいは基幹化学原料となるアルコール類の生産の原料として、バイオマスの積極的な活用が不可欠である。バイオエタノールの省エネルギー型蒸留代替技術として疎水性シリカリカライト膜を用いる分離法が注目されているが、その分離性能は、発酵副産物のコハク酸によって著しく低下する。本研究では、コハク酸含有量を抑制した発酵液を対象とすることにより、分離膜性能の劣化を軽減したバイオエタノールの分離・濃縮技術の確立を目的としている。

【方法および結果】*Candida krusei* IA-1 株を用いて、グルコース 12% (w/w)、コーンステイープリカー (CSL) 0.5% (w/w)、ペプトン 0.2% (w/w) から成る培地でエタノール発酵液 (コハク酸 0.01% w/w、エタノール 5.8% w/w) を調製した。その発酵液を pH 4.5 に調整して供給した場合の分離膜性能は、エタノール/水 -2 成分系の場合と比較して、透過流束が 43% となり、透過エタノール濃度の低下は 9 ポイントにとどまり、パン酵母を利用した発酵液を供給した場合よりも、分離性能劣化の程度は大きく改善した。また、発酵液の活性炭による吸着処理によって、透過エタノール濃度の低下はなく、透過流束が 56% となり、さらなる改善効果が認められた。培地調製に用いる CSL やペプトンは分離膜性能に負の効果を及ぼし、それらの添加前と比較して、透過流束および透過エタノール濃度は各々 15~20%、9 ポイント低下することも明らかとなった。

Pervaporation performance using silicalite membranes of ethanol fermentation broths containing low-concentration succinic acid

○Toru Ikegami, Tomotake Morita, Shunichi Nakayama, Hideyuki Negishi, Dai Kitamoto, Keiji Sakaki
(AIST)

Key words ethanol production, *Candida krusei*, silicalite, pervaporation

2Aa13 *Ralstonia eutropha* を宿主とする水素利用微生物触媒の開発と反応

○小田 航史¹, 松山 彰収², 山本 浩明², 西原 宏史¹
(¹茨大院・農・資生科, ²ダイセル化学・総研)

【目的】高温・高圧条件といったエネルギー消費型の化学合成プロセスから、環境負荷の小さいバイオプロセスへの変換が重要視されている。本研究の目的は NAD 還元型ヒドロゲナーゼをもつ水素酸化細菌 *Ralstonia eutropha* を宿主とする水素利用微生物触媒を開発し、その反応特性を解析することである。

【方法と結果】*Kluyveromyces lactis* 由来の NADH 依存型アルコール脱水素酵素 (KLB) 遺伝子をヒドロゲナーゼプロモーター制御下にグラム陰性菌用広宿主域ベクターに連結し、*R. eutropha* H16 株に導入して形質転換体を作製した。NAD還元型ヒドロゲナーゼと KLB の発現を誘導した形質転換体を微生物触媒、KLB 反応の基質をヒドロキシアセトンとして、水素ガス存在下における (R)-1,2-propanediol への変換をモデル反応とした。また、非水系反応場における疎水性基質の微生物変換への適用を検討するため、本菌の有機溶媒耐性について調べた。菌体への影響が少なかったデカン等を用いた水/有機溶媒二相系での変換反応を試みたところ、水系での反応と同程度のレベルで反応が進行した。

なお、本研究は経済産業省の産業科学技術プロジェクト「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の一環として行われた。

Development and reaction of H₂-driven microbial catalyst using a hydrogen-oxidizing bacterium *Ralstonia eutropha*

○Koji Oda¹, Akinobu Matsuyama², Hiroaki Yamamoto², Hirofumi Nishihara¹
(¹Dept. Biores. Sci., Ibaraki Univ., ²R&D Center, Daicel Chemical Industries, Ltd.)

Key words NAD-reducing hydrogenase, hydrogen-oxidizing bacteria, *Ralstonia eutropha*, alcohol dehydrogenase