

3P-2033 廃紙からの同時糖化・発酵によるバイオエタノール生産

○西村 浩人¹, 武井 奨太¹, 山下 美月², 林 俊介³,
吉良 典子³, 木田 建次¹
(¹熊大院・自然科学,²熊大・工・物質生命,³日立造船)

【目的】現在、わが国の紙の生産量と消費量はともに世界3位であり、消費された後、古紙として再利用される割合は8割程度にとどまっており、残部は廃紙となっている。廃紙には各種形態があるが、酵素糖化を阻害するリグニン含量が少ないので発酵しやすいという利点がある。そこで本研究では、廃紙からのエタノール製造法に関して検討した。

【方法および結果】サンプルとしてpHを4.5~5.0に調整した紙スラリーを用いた。この紙スラリーの成分分析を行ったところ、乾物あたりのホロセルロースおよびリグニン含量は約85%および4%であった。15%紙スラリーに当研究室で育種した凝集性酵母KF-7、セルラーゼ酵素剤Ctec (30 FPU/g・セルロース添加) および栄養源を加え同時糖化・発酵試験(35℃)を行なった。その結果、発酵収率は50%に過ぎなかった。この原因として、雑菌汚染や35℃では糖化が十分進んでいないと考えられた。そこで、雑菌汚染防止のための薬剤添加と糖化条件の検討を行った結果、発酵収率70%を達成することができた。

Production of bio-ethanol from waste paper by simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

○Hiroto NISHIMURA¹, Shouta TAKEI¹, Miduki YAMASHITA²,
Shunsuke HAYASHI³, Noriko KIRA³, Kenji Kida¹
(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Kumamoto Univ.,²Dept. Appl. Chem. Biochem.,
Fac. Eng., Kumamoto Univ.,³Hitachizosen Co. Ltd.)

Key words enzymatic hydrolysis, ethanol fermentation, waste paper

3P-2035 シナジー効果を指標とした *Phanerochaete chrysosporium* 由来 CBHII の酵素進化

○池内 暁紀, 今村 千絵, 伊藤 洋一郎, 高橋 治雄
(豊田中研・バイオ)

セルロース系バイオエタノール製造において、糖化効率の向上は実用化に向けた大きな課題となっている。現在広く用いられている *Trichoderma reesei* 由来酵素製剤の糖化力をさらに向上させるためには、酵素製剤と相乗的に働きシナジー効果を示す蛋白質が重要だと考えられる。今回我々は、*Phanerochaete chrysosporium* 由来CBHII (以下、PcCBH2) が酵素製剤に対して高いシナジー効果を示す事を発見した。そこでさらなるシナジー効果向上に向けて、大腸菌無細胞合成系を用いたハイスループットなスクリーニング法を用いて、シナジー効果を指標としてPcCBH2の酵素進化を行った。その結果、野性型と比較してリン酸膨潤セルロース (PSC) の分解活性が約3倍向上した変異型PcCBH2の取得に成功した。さらに、立体構造モデルからセルロース鎖と相互作用すると予測されるアミノ酸17残基を選抜し、アラニンスクリーニング及び飽和変異導入を行った。その結果、基質結合トンネル付近のW268M変異を持つ変異体ではPSC分解活性が約2倍向上していた。また、両スクリーニングで得られた有効変異を組み合わせた変異体ではPSC分解活性が最大で約6.5倍向上しており、変異の相加効果が観察された。

Enhancement of synergistic effect of CBHII from *Phanerochaete chrysosporium* by molecular evolution using *in vitro* expression.

○Akinori IKEUCHI, Chie IMAMURA, Yoichiro ITO,
Haruo TAKAHASHI
(TCRD. Bio. Lab.)

Key words cellulase, biomass, molecular evolution, cell-free protein synthesis

3P-2034 *Clostridium cellulovorans* セルロソームにおけるペプチダーゼインヒビターの機能と役割

○目黒 裕和¹, 黒田 浩一¹, 三宅 英雄², 田丸 浩²,
植田 充美¹
(¹京大院・農・応用生命,²三重大院・生資)

【目的】セルラーゼ・ヘミセルラーゼ超複合体であるセルロソームは共役反応によりセルロースを効率的に糖化できるので、未来型ソフトバイオマス前処理技術への応用に期待が集まっている。我々はソフトバイオマスの完全分解・糖化が可能なセルロソームを生産する *Clostridium cellulovorans* の全ゲノム配列完全解読を世界に先駆けて行った。その結果から、セルロソーム構成タンパク質として、バイオマスの分解に必要なセルラーゼ等に加えて、3つのペプチダーゼインヒビターの存在を予測した。【方法及び結果】*C. cellulovorans* のゲノムからクローニングし、細胞表層工学によってペプチダーゼインヒビターを提示した酵母を用いてこれらタンパク質のペプチダーゼやプロテアーゼの阻害活性の特徴を明らかにした。さらに、これらの阻害反応から、この3つのタンパク質の役割について考察したのでまとめて報告する。

Function and its role of cellulosomal peptidase inhibitors from *Clostridium cellulovorans*

○Hirokazu MEGURO¹, Kouichi KURODA¹, Hideo MIYAKE²,
Yutaka TAMARU², Mitsuyoshi UEDA¹
(¹Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.,²Grad. Sch. Biores.,
Mie Univ.)

Key words *Clostridium cellulovorans*, cellulosome, inhibitor, cell surface engineering

3P-2036 廃糖蜜を利用できる 2-deoxy-scyllo-inosose 高効率生産大腸菌の開発

○夏地 智之¹, 角田 徹¹, 丸山 裕子¹, 矢内 久陽¹, 高橋 均¹,
高久 洋暁², 高木 正道², 和田 光史¹
(¹三井化学,²新潟薬科大)

2-deoxy-scyllo-inosose (DOI)は化学合成によって容易に多価フェノール類に変換できる化合物として注目されている。三井化学では、非可食バイオマスから有用化学品を製造する技術開発に注力しており、その一環としてDOIを中間体としたハイドロキノンやレゾルシンの製造技術開発に取り組んでいる。

既に新潟薬科大学の高木らによって、グルコースとマンニトールという高価で可食の原料からDOIを生産する組換え大腸菌が開発されているが、コスト低減化や非可食バイオマス原料への置き換えという課題が残されている。

そこで我々は非可食バイオマス原料として廃糖蜜に着目した。大腸菌はそもそも廃糖蜜の主成分であるスクロースを資化できないが、もしスクロース分解能を付与することができれば生じたグルコースをDOIに変換し、フルクトースを希少糖であるマンニトールの代わりにエネルギー源として利用することができると考えた。

我々はまず、効率よく機能する大腸菌O-157由来のスクロース分解酵素を見出した。これをDOI生産大腸菌に導入したところ、試薬スクロースからのDOI生産が可能となった。次に様々な大腸菌種を探索した結果、廃糖蜜を効率よく利用できる大腸菌種を見出し、非可食原料からのDOI生産に成功した。さらに *Zymomonas mobilis* 由来のグルコース取り込み遺伝子を導入することにより、廃糖蜜からのDOI生産速度の大幅向上を達成した。

Development of *E. coli* producing 2-deoxy-scyllo-inosose from molasses efficiently

○Tomoyuki NATSUJI¹, Toru SUMITA¹, Yuko MARUYAMA¹,
Hisaki YANAI¹, Hitoshi TAKAHASHI¹, Hiroaki TAKAKU²,
Masamichi TAKAGI², Mitsufumi WADA¹
(¹Mistui Chem.,²Niigata Univ. Pharm. and Appl. Life Sci.)

Key words deoxy-scyllo-inosose, phenol, biomass, *Escherichia coli*