1Ap10 新規なキシロースイソメラーゼ遺伝子を利用したキシロース発酵性酵母の育種

○徳弘 健郎¹, 片平 悟史¹, 名倉 理紗¹, 大熊 盛也², 守屋 繁春³
(¹豊田中研,²理研・BRC-JCM,³理研・ASI)
tokuhiro@mosk.tytlabs.co.jp

【背景・目的】バイオマスの構成糖であるキシロースをエタノールに変換できれば、バイオエタノールの生産取率を増大させることができる。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はキシロースを資化することができないが、*Pichia stipitis* 由来のキシロースレダクターゼ (XR) およびキシリトールデヒドロゲナーゼ (XDH) を導入することによりキシロース発酵性が付与できることが知られている。しかし、この経路では中間代謝物のキシリトールが蓄積するためにエタノール収率が低いという問題がある。一方、キシロースイソメラーゼ (XI) を用いた代謝系ではキシリトールが蓄積せず、高収率なエタノール生産が期待できる。そこで、我々が見出した新規なキシロースイソメラーゼ (XI) を用いた、キシロースからの高収率なエタノール生産酵母の創製と、その評価を本研究の目的とした。

【方法・結果】*S. cerevisiae* のキシロース代謝経路遺伝子 (*XKSI*, *RPEI*, *RKII*, *TALI*, *TKLI*) をゲノムインテグレーションにより発現強化し、さらにアルドースレダクターゼ遺伝子 (*GRE3*) を破壊して不要な反応を抑制した。次に XI 遺伝子を安定的に高発現することにより、キシロースを炭素源として増殖可能な酵母菌株が作製できた。キシロース単独およびグルコース、キシロース混合糖を含む無機塩培地でのエタノール発酵を行ったところ、キシリトールの蓄積は見られず高収率なエタノール発酵が可能であった。また既存の XI を発現する酵母に比べてキシロース発酵性能が高いことが明らかとなった。

Ethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing novel xylose isomerase

○Kenro Tokuhiro¹, Satoshi Katahira¹, Risa Nagura¹, Moriya Ohkuma², Shigeharu Moriya³
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc.,²RIKEN・BRC-JCM,³RIKEN・ASI)

Key words biomass, xylose isomerase, ethanol fermentation, yeast

1Ap11 新規なキシロースイソメラーゼを生産する酵母を用いたソフトバイオマスからのエタノール生産

○伊藤 純二¹, 徳弘 健郎², 片平 悟史², 光川 典宏², 則武 義幸¹
(¹トヨタ自動車,²豊田中研)
ito@junji.tec.toyota.co.jp

【背景・目的】

セルロース系バイオマスからエタノールを製造する際、エタノール収率・速度を向上する事が重要である。バイオマスの糖化とエタノール発酵を同時に行う同時糖化発酵は、糖化で生じた糖を微生物により速やかに資化するため、酵素の生成物阻害が低減されて、収率・速度の向上が期待されている技術である。本研究では高いキシロース変換効率を示す、新規キシロースイソメラーゼ (XI) 遺伝子を導入した酵母と市販酵素剤を用いた同時糖化発酵で、前処理ソフトバイオマス (圧搾/蒸煮処理ネビアグラス) からのエタノール生産を行う事を目的とした。

【方法・結果】

XI 遺伝子を導入した酵母と市販酵素剤を用いた同時糖化発酵の反応条件を、セルロースとキシロースを含む混合糖を使用して検討した。結果、エタノール生産量が高くなる反応条件を確認した。得られた反応条件を基に、圧搾/蒸煮処理ネビアグラスからのエタノール生産を試みた。結果、XI 遺伝子導入酵母と市販酵素剤を用いた同時糖化発酵を行うことで、圧搾/蒸煮処理ネビアグラスを効率的にエタノールに変換できることを確認した。

Bio-ethanol production from lignocellulosic biomass by using a yeast strain producing novel xylose isomerase.

○Junji Ito¹, Kenro Tokuhiro², Satoshi Katahira², Norihiro Mitsukawa², Yoshiyuki Noritake¹
(¹Toyota Motor Corp.,²Toyota Cent. R&D Labs. Inc.)

Key words ethanol, biomass, xylose isomerase, yeast

1Ap12 イオン液体処理が結晶性セルロース酵素糖化に与える影響

○中元 亜耶¹, Uju Uju¹, 庄田 靖宏¹, 後藤 雅宏^{1,2}, 石田 亘広³, 徳原 渡⁴, 則武 義幸⁴, 荻野 千秋⁵, 神谷 典穂^{1,2}
(¹九大院・工・応化,²九大・未来化セ,³豊田中研,⁴トヨタ自動車,⁵神戸大・工・応化)
nori_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

【背景・目的】

近年、化石燃料に代わるエネルギーとして、再生可能な原料から生産されるバイオエタノールが注目されている。本研究では、木材等に含まれる非可食性セルロースからのバイオ燃料生産を目的とし、セルロース溶剤として注目されているイオン液体 (ionic liquid, IL) を用いた酵素糖化プロセスについて検討した。これまでに、IL が重量比 20% 共存する条件下においても、セルロースの酵素糖化が進行することが確認された。本研究では、より短時間で酵素糖化反応を達成可能なイオン液体の探索を目的として検討を行った。

【方法・結果】

イミダゾリウム系 IL として [Bmim][Cl], [Emim][DEP], ピリジニウム系 IL として [Bmpy][Cl] を選択した。これらの IL を用いて結晶性セルロース (Avicel) を 120℃ で異なる時間処理した。室温にした後、セルラーゼ水溶液を直接添加することで、セルロースの再生 (結晶構造緩和) と酵素による糖化反応を同一反応場 (IL-水混合系) で行い、反応により生成した還元糖を定量した。その結果、[Bmpy][Cl] を用いた場合、他の IL に比べ酵素糖化反応時間の短縮が可能となったことが明らかとなった。本研究の一部は、“バイオマスエネルギー先導技術研究開発”の一環として NEDO からの委託を受けて実施された。

Effect of ionic liquid pretreatment of crystalline cellulose on enzymatic saccharification efficiency

○Aya Nakamoto¹, Uju Uju¹, Yasuhiro Shoda¹, Masahiro Goto^{1,2}, Nobuhiro Ishida³, Wataru Tokuhara⁴, Yoshiyuki Noritake⁴, Chiaki Ogino⁵, Norihiro Kamiya^{1,2}
(¹Dept. Appl. Chem., Kyushu Univ.,²Center for Future Chem., Kyushu Univ.,³Toyota Cent. R&D Labs. Inc.,⁴Toyota Motor Corp.,⁵Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

Key words ionic liquids, cellulose, enzymatic saccharification, pyridine

1Ap13 セルラーゼ分泌酵母によるイオン液体処理バイオマスからのエタノール生産

片平 悟史¹, 中村 里沙¹, 徳原 渡², 則武 義幸², 中島 一紀³, 神谷 典穂⁴, 荻野 千秋⁵, 石田 亘広¹
(¹豊田中研,²トヨタ自動車,³東北大院・工,⁴九大・未来化セ,⁵神戸大・工・応化)
e1168@mosk.tytlabs.co.jp

【背景・目的】

バイオマスからのバイオエタノール生産を目的に、イオン液体を利用した新しい前処理・糖化・発酵技術 (i-CBP; ionic liquid-based consolidated bioprocessing) の開発を目指している。昨年度の本大会において、イオン液体処理バイオマスは、少量の糖化酵素であっても効率的に糖化されることを中心に報告した。本報告では、セルラーゼ分泌型組換え酵母を構築し、イオン液体処理バイオマスを基質とした糖化・発酵について評価した。

【方法・結果】

i-CBP を目指す場合、イオン液体処理バイオマスを効率よく糖化可能な最小限の酵素の組合せで、組換え酵母を構築する必要がある。好適な糖化酵素の組合せを同定する目的で、複数の糖化酵素遺伝子をクローニング、または酵母のコードン使用頻度に合わせて遺伝子を全合成し、各酵素を単独で分泌生産する組換え酵母を構築した。これらの培養上清液を組み合わせた複数の酵素カクテルをイオン液体処理バガスに添加し、バイオマス糖化効果を評価した。その結果、ある組合せにおいて高い糖化効果を確認することができた。またイオン液体処理バガスに対するエタノール生産結果についても報告する。

本研究の一部は、“バイオマスエネルギー先導技術研究開発”の一環として NEDO からの委託を受けて実施された。

Ethanol production from ionic liquid pretreated biomass with cellulase expressing yeast.

Satoshi Katahira¹, Risa Nakamura¹, Wataru Tokuhara², Yoshiyuki Noritake², Kazunori Nakashima³, Norihiro Kamiya⁴, Chiaki Ogino⁵, Nobuhiro Ishida¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc.,²Toyota Motor Corp.,³Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ.,⁴Center for Future Chem., Kyushu Univ.,⁵Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

Key words ionic liquid, *Saccharomyces cerevisiae*, consolidated bioprocessing