

1P-185 緑藻 *Chlamydomonas orbicularis* を用いた海水塩存在下での油脂高生産条件の開発

○中西 昭仁¹, 賀 詩欣¹, 藍川 晋平², 張 嘉修³, 近藤 昭彦², 蓮沼 誠久¹
 (¹神戸大・自科・研究環, ²神戸大院・工・応化, ³成功大学・化工)
 hasunuma@port.kobe-u.ac.jp

現在、新たな燃料資源として循環型資源のバイオマスが注目を集めている。一方で陸生バイオマスの利用においては、競合作物の多い中での耕作地や耕作に適する水資源確保などの問題を内包しており、また実用化を目指す際には高いバイオマス増殖能や資源生産能が求められる。緑藻は光合成において高い光変換効率と増殖能を持つこと、いくつかの種では細胞内に脂質を高含有させる脂質生産能が知られている。我々は本研究にて、台湾近海から細胞内に油脂を高含有できる海産緑藻 *Chlamydomonas orbicularis* の単離に成功した。光強度や CO₂ 濃度、培地中の海水塩濃度の各種条件下において培養を行い、増殖は細胞数、バイオマス生産は乾燥重量、脂質生産は GC/MS を用いた同定と定量によって評価した。結果、*C. orbicularis* は緑藻の中でも高い増殖能と脂質生産能を示し、さらに脂質の構成比を比較したところ培養条件によって差が出ることも確認できたので併せて報告する。

Development of high lipid producing system by green alga *Chlamydomonas orbicularis* under sea salt condition

○Akihito Nakanishi¹, Shih-Hsin Ho¹, Shimpei Aikawa², Jo-Shu Chang³, Akihiko Kondo², Tomohisa Hasunuma¹
 (¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ³Dept. Chem. Eng. NCKU)

Key words *Chlamydomonas orbicularis*, oil production, salinity tolerance, green algae

1P-187 超耐熱性古細菌由来 β-グルコシダーゼの糸状菌 *Trichoderma reesei* における発現

○志田 洋介¹, 石川 一彦², 栗原 宏征³, 平松 紳吾³, 山田 勝成³, 小笠原 渉¹
 (¹長岡技科大, ²産総研・バイオマスリファイナリー研セ, ³東レ)
 owataru@vos.nagaokaut.ac.jp

セルロース系バイオマス糖化工程において問題となるのが糖化コストであり、酵素の再利用という観点から酵素の安定性および耐熱性の向上が求められている。我々はセルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるセルラーゼ系の耐熱化を目指しており、本研究ではその第一段階として *T. reesei* を宿主とした超耐熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の β-グルコシダーゼ (BGLPf) の発現について報告する。

T. reesei のセルラーゼ遺伝子のうち最も高い発現量を示す *cbh1* のプロモーターの支配下に BGLPf 遺伝子を挿入した発現カセットを構築し、*T. reesei* QM9414 株の形質転換を行った。得られた形質転換体をセルラーゼ生産条件下で培養したところ、極めて高い β-グルコシダーゼ活性が検出され、100℃で 10 min 処理してもその活性は失われなかった。最終的にウェスタン解析によって BGLPf の発現が成功していることを確認した。また、BGLPf 遺伝子のコドン使用頻度について検討を行い、コドン使用頻度を *T. reesei* で最も頻度の高いものに変更することで効率的に発現できることが明らかとなった。さらに、コドン使用頻度を変更していない場合、転写レベルで発現量が低いことが明らかとなった。

Expression of the extremely thermostable beta-glucosidase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*

○Yosuke Shida¹, Kazuhiko Ishikawa², Hiroyuki Kurihara³, Shingo Hiramatsu³, Katsushige Yamada³, Wataru Ogasawara¹
 (¹Nagaoka Univ. Technol., ²BRRC, AIST, ³TORAY Ind.)

Key words *Trichoderma reesei*, *Pyrococcus furiosus*, cellulase, heterologous production

1P-186 海洋性シアノバクテリアによるバイオリファイナリーのためのグリコーゲン生産

○西田 篤実¹, 藍川 晋平^{1,2}, 蓮沼 誠久^{3,4}, 近藤 昭彦^{1,2}
 (¹神戸大院・工・応化, ²JST・CREST, ³神戸大・自科・研究環, ⁴JST・さきがけ)
 akondo@kobe-u.ac.jp

食糧生産と競合しないバイオリファイナリーを構築するための新たなバイオマス資源として、シアノバクテリアが注目されている。シアノバクテリアは貯蔵糖として細胞内にグリコーゲンを蓄積し、グリコーゲンは糖化・発酵工程を経てエタノールへ変換することが可能である。また、海洋性種を用いれば未利用である海洋・海水も活用可能である。しかしながら、海洋性シアノバクテリアの細胞増殖能、グリコーゲン生産能は十分に評価されてこなかった。そこで本研究では、海洋性シアノバクテリア *Synechococcus* sp. PCC7002 に注目し、培養条件を検討することでグリコーゲン生産量向上を目指した。また *S* sp. PCC7002 のバイオマス資源としての有用性を調べるため、細胞からグリコーゲンを抽出しエタノール発酵生産を試みた。

310 mM の NaCl を含む MA2 培地を用いて、光強度、CO₂ 濃度、NaNO₃ 投与量がグリコーゲン生産量に及ぼす影響を調べたところ、600 μmol photons m⁻² s⁻¹、2% CO₂、15 mM NaNO₃ 条件下でグリコーゲン生産量は最大となり 3.52 g L⁻¹ であった。この値は現在報告のある α-ポリグルカンとしてはシアノバクテリア・微細藻類の中でも最大である。得られたグリコーゲンを α-アミラーゼを用いた糖化、酵母による発酵に供したところ、理論収率の 72% の収率でエタノールを生産することに成功した。

Glycogen production for biorefinery using oceanic cyanobacteria

○Atsumi Nishida¹, Shimpei Aikawa^{1,2}, Tomohisa Hasunuma^{3,4}, Akihiko Kondo^{1,2}
 (¹Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²CREST, JST, ³Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ⁴PRESTO, JST)

Key words bioethanol, cyanobacteria, glycogen, *Synechococcus*

1P-188 高濃度セルロース基質含有培地での白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 UV 変異導入株による直接エタノール発酵

○廣田 佳幸, 山崎 有美, 亀井 一郎, 目黒 貞利
 (宮崎大・農・森林環)
 kamei@cc.miyazaki-u.ac.jp

白色腐朽菌 *Phlebia* sp. MG-60 株は、酸、アルカリ、糖化酵素を外部から添加することなく、コナラ木粉をエタノールへと変換可能である。これまでに、広葉樹未晒クラフトパルプを発酵基質とした検討により、基質濃度 10% (w/w) の固相条件に近い場合でも菌糸体破砕物を接種することで直接エタノール発酵が可能であることが示された。しかしながら、基質濃度を 20% (w/w) としたときに、生成エタノール濃度が低下した。このときの 5・10・20% (w/w) の培養液を用い、Filter Paper 活性を測定した結果、基質濃度が増加するにつれ、セルラーゼ活性が低下することが分かった。この結果から基質濃度を 20% (w/w) とした場合、生成エタノール量が低下した要因として、セルラーゼ活性の低下が考えられた。

そこで、我々は、MG-60 株のプロトプラストを調製し、UV 照射により、セルラーゼ活性を向上させた変異株の作出に取り組んだ。調製したプロトプラストに UV 254 nm を 30 秒照射したところ、変異株 65 株をピックアップすることができた。MG-60 株の Wild type と作出した変異株のエタノール発酵能を 2% (w/w) のアビセルを発酵基質として比較したところ、変異株 3 株から、約 1.5 倍高いエタノール生成が観察された。

これらのことから、変異株によるセルロース加水分解能の向上が期待できる。現在、UV 変異導入株を用い、高濃度セルロース基質含有培地への適用について、検討を行っている。

Direct ethanol production from high concentration of cellulose by the UV-mutants derived from white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60

○Yoshiyuki Hirota, Yumi Yamasaki, Ichiro Kamei, Sadatoshi Meguro
 (Dept. Forest Environ. Sci., Fac. Agric., Univ. Miyazaki)

Key words white-rot fungus, ethanol fermentation, *Phlebia* sp. MG-60, biomass