

1P-201 Protocatechuate decarboxylase 反応の強化とバイオマスを原料とした *cis*, *cis*-ムコン酸生産の効率化

○園木 和典, 諸岡 深雪
(弘前大・農生)
sonoki@cc.hirosaki-u.ac.jp

【目的】 *cis*, *cis*-ムコン酸 (ccMA) は、水素添加によりアジピン酸へと容易に変換でき、ポリエステルやポリアミド等の樹脂原料としても幅広く利用可能な化合物である。また非常に汎用性の高い樹脂原料であるテレフタル酸への変換も報告されている基幹化学品である。微生物触媒を利用してバイオマスを原料とした ccMA 生産を実施するためには、Protocatechuate decarboxylase (PDC) 反応を効率よく進行させなければならない。これまでにいくつかの PDC が報告されているが、その変換効率は低い。本研究では、バイオマスを原料とした ccMA 生産効率化のボトルネックである PDC 反応の促進とその効果を評価した。

【結果】 *Klebsiella pneumoniae*由来の PDC をコードする遺伝子 *aroY* を生産させた組換え大腸菌を用いた休止菌体反応を行った結果、投入した Protocatechuate の 30% 程度の基質しか変換されなかった。しかし、Phenolic acid decarboxylase subunit と相同性を持つタンパク質と *AroY* を共発現させた結果、2 倍以上の変換効率を確認できた。これらのタンパク質とともに vanillin dehydrogenase, vanillate demethylase, catechol 1,2-dioxygenase を発現させた組換え大腸菌を用いた休止菌体反応では、リグニン系芳香族化合物の一種であるバニリンが 95% 以上 ccMA に変換された。

本研究の一部は JST 復興促進プログラム (A-STEP) の支援を受けて実施した。

Stimulation of protocatechuate decarboxylation essential for effective production of muconate from reproducible feedstocks.

○Tomonori Sonoki, Miyuki Morooka
(Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)

Key words decarboxylase, *cis*, *cis*-muconate, protocatechuate decarboxylase, 3, 4-dihydroxybenzoate decarboxylase

1P-203 ドロップインフューエル生産技術の開発～出芽酵母のトリアシルグリセロール生合成強化～

○片平 悟史¹, 徳弘 健郎¹, 石黒 澄衛², 中村 隆宏³, 久郷 和人³, 太田 邦史³, 光川 典宏¹
(¹豊田中研, ²名大院・生命農学, ³東大院・総合文化)
e1355@mosk.tytlabs.co.jp

【背景・目的】 バイオ燃料は大気中の二酸化炭素を固定したバイオマスを原料とするため、化石燃料の代替により温室効果ガスである二酸化炭素の排出を削減できる。バイオ燃料普及のためには、エタノールやバイオディーゼルの問題点を補い、車両や燃料インフラの改造を必要とせず既存燃料に混合可能な「ドロップインフューエル」の実用化が望ましい。既存燃料への混合により、輸送用燃料の多様化による誤給油などのトラブルも防止できる。

トリアシルグリセロール (TAG) は水素化による改質などドロップインフューエルへの変換技術も開発されている。TAG は動植物や微生物の特定の細胞で大量に合成されるが、工業的な微生物生産は実現されていない。本研究は、ドロップインフューエルの実用化を目指し、出芽酵母による TAG 生産技術開発を目的とする。

【方法・結果】 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の TAG 生合成強化の代謝工学的手法として、TAG 生合成の最終反応を触媒するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ遺伝子 (*DGA1*) の過剰発現が知られている。手始めとして出芽酵母の *DGA1* に相当するヒト *DGAT1* の過剰発現を試みた。その結果 TAG 生産量は *DGA1* 過剰発現株で野生型比 80% 増に対して、*DGAT1* 過剰発現では 93% 増であった。

本研究は、JST の戦略的創造研究推進事業 (ALCA) の事業・開発課題で実施した。

Development of production technology for drop in fuel -Enhancement of triacylglycerol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*-

○Satoshi Katahira¹, Kenro Tokuhira¹, Sumie Ishiguro², Takahiro Nakamura³, Kugou Kazuto³, Kunihiro Ohta³, Norihiro Mitsukawa¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²Grad. Sch. Bioagric., Sci., Nagoya Univ., ³Grad. Sch. Arts Sci., Univ. Tokyo)

Key words drop in fuel, *Saccharomyces cerevisiae*, triacylglycerol biosynthesis

1P-202 *Rhizopus oryzae* と Cellulase を組み合わせた同時糖化発酵によるペーパースラッジからの選択的な Ethanol および Lactate の生産

○瀬戸 裕介, 高野 真希, 星野 一宏
(富山大院・理工・生命工)
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【緒言】 ペーパースラッジ (PS) は製紙工場から排出される廃棄物で国内では年間 500 万 t が排出されている。PS は主に焼却によって処理され、その時に発生するエネルギーを工場内で再利用している。しかし、この方法では炭酸ガスが大量に発生することが問題となっている。PS は Cellulose や Hemicellulose を多く含んでおり、新規バイオマスとしての有効利用が期待されている。一方、接合菌 *Rhizopus* 属は Ethanol および Lactate 生産のみならず Cellulase 分泌を行う。そこで本研究では PS から Ethanol および Lactate を生産させるため、研究室保有の *Rhizopus* 属から最適な菌の選択し、最適化した Cellulase 剤を組み合わせた同時糖化発酵 (SSF) による Ethanol および Lactate 生産を検討した。

【方法・結果】 本研究では主に PS tail (Cellulose 49%, Hemicellulose 17%, Lignin 31% および Ash 1%) を使用した。*Rhizopus* 属は本研究室保有の 76 株を使用した。各株を PS および Glucose を基質として培養し、Cellulase の分泌と Ethanol および Lactate 生産量の 2 つを指標として、*R.oryzae* NBRC4785 株を選択した。また 14 種類の Cellulase 剤を PS tail を基質として加水分解反応を行い最適な混合比を実験計画法 (DOE) により算出したところ、Cellulase T: Onozuka 3S: Accellerase = 0.31: 0.35: 0.34 の組み合わせが望ましいとされた。50 g/L の PS tail から選択した *R.oryzae* と最適化した酵素剤を用いた SSF を行ったところ、嫌気条件では Ethanol のみが 17.0 g/L 生産できた。一方、好気条件では 7.3 g/L の Ethanol と 7.7 g/L の Lactate を生産できた。

Selective production of ethanol or lactate from paper sludge by SSF with *Rhizopus oryzae* and cellulases

○Yusuke Seto, Maki Takano, Kazuhiro Hoshino
(Dept. Life Sci. Eng., Grad. Sch. Sci. Eng. Edu., Univ. Toyama)

Key words *Rhizopus oryzae*, paper sludges, SSF, lactic acid

1P-204 ミミズ含有エンドグルカナーゼ基質分解様式の検討及び分泌タンパク質の解析

○赤澤 真一¹, 村山 隼人¹, 横山 圭佑¹, 工藤 大樹¹, 小笠原 渉²
(¹長岡高専, ²長岡技科大)
s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp

【目的】 近年、持続可能な循環型社会実現の一環としてバイオマス利活用が叫ばれており、バイオリファイナリーが盛んに研究されている。特にバイオマス酵素糖化においては微生物由来セルラーゼやアミラーゼを活用した研究が盛んに行われてきたが、コストや高温での糖化など課題がある。これまでに我々はミミズ含有糖加水分解酵素の一部は低温で高活性であることを明らかにしており、ミミズ酵素を活用した低温バイオマス糖化への応用を目指してきた。しかしながら未だ未解明な部分も多いため、本研究ではクローニングが完了したエンドグルカナーゼの基質分解様式を明らかにすると共に、ほとんど明らかになっていない分泌液中に含まれる酵素群について検討した。

【方法・結果】 エンドグルカナーゼ遺伝子全長 1,371 bp のうち、シグナル配列を除去した配列を pPICZalpha-A に組み込み *Pichia pastoris* X-33 に形質転換した。各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、セルロース分解様式について TLC で検討した。その結果、本酵素はトリオース以上のオリゴ糖に作用し、単糖まで分解できないことが明らかとなった。次に、分泌液中に含まれている酵素群についてスポットアッセイ及びザイモグラム解析による検討を行った。その結果エンドグルカナーゼの他にアミラーゼやプロテアーゼ活性を見出したが主要酵素ではなかった。現在主要タンパク質の解明を試みている。

Analysis of substrate degradation patterns of earthworm endoglucanase, and investigation of secretion proteins

○Shin-ichi Akazawa¹, Hayato Murayama¹, Keisuke Yokoyama¹, Daiki Kudou¹, Wataru Ogasawara²
(¹Nagaoka Natl. Coll. Technol., ²Nagaoka Univ. Technol.)

Key words *Eisenia*, earthworm, endoglucanase, coelomic fluid