

2P-142 エタノール発酵性 *Zymomonas mobilis* 内でのラッカーゼ遺伝子の発現

○杉岡 駿, 伊原 貴敬, 原田 尚志, 岡本 賢治, 築瀬 英司
(鳥取大・工・生応工)
yanase@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】木質系バイオマスを原料としたバイオエタノールの製造においては、バイオマス原料の前処理工程で副生するリグニンやヘミセルロースに由来する過分解物による発酵速度の低下が問題とされ、発酵阻害物除去プロセス開発や発酵菌への阻害物耐性の賦与が急務とされている。木材前処理糖化液からの高効率なバイオエタノール製造の実績を持つ C5・C6 糖並行発酵性を賦与した高速発酵細菌である *Zm.mobilis* のさらなる Robust 化を目標として、発酵阻害の原因とされるリグニン由来芳香族アルデヒド類の分解に関与するラッカーゼ遺伝子の導入と発現を検討した。

【方法と結果】木材の前処理可溶化液(黒液)中には、高濃度のフルフラールや酢酸に加え、リグニン過分解物であるアルデヒド類が混在する。まず、前処理可溶化液のラッカーゼ処理による発酵阻害の低減を検討した。リグニン過分解物とされる Vanillin, Benzaldehyde, *p*-Hydroxybenzaldehyde, Syringaldehyde, を各 500ppm, 1000ppm と *Trametes versicolor* 由来のラッカーゼを培地に添加して 30℃ で反応処理後、C5・C6 糖並行発酵性 *Zm.mobilis* を用いて発酵性試験を行ったところ、ラッカーゼ処理によりキシロース発酵の上昇が確認された。そこで、*Bacillus* 由来のラッカーゼ遺伝子 (*cotA*) のクローニングと導入を検討した。*Zm.mobilis* 由来の強力なプロモーターである *P_{gap}* 制御下に挿入した *cotA* は *Zm.mobilis* 内で高い発現が認められたが、導入株を用いた前処理可溶化液の発酵阻害低減は観察されなかった。現在、ラッカーゼの細胞内局在性と発現強化を検討している。

Cloning and expression of bacterial laccase gene in ethanologenic *Zymomonas mobilis*

○Shun Sugioka, Hiroki Ihara, Hisashi Harada, Kenji Okamoto, Hideshi Yanase
(Dept. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words ethanol, laccase, lignin, *Zymomonas mobilis*

2P-143 *Cellobivrio*由来セルラーゼのエタノール発酵性 *Zymobactor palmae*での細胞表面発現

○箱木 達也, 森岡 剛, 玉井 圭介, 原田 尚志, 岡本 賢治, 築瀬 英司
(鳥取大・工・生応工)
yanase@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】CBP による未利用リグノセルロース系バイオマスからの高効率バイオエタノールに最適な発酵細菌の開発を目標とし、セルロース糖化能と発酵能をもつ発酵細菌の代謝工学的育種を検討している。これまでエタノール発酵性に優れた *Zymobactor palmae* にルーメン細菌由来 β-グルコシダーゼ (BGL) と *Cellulomonas* 由来エンドグルカナーゼ (EG) の遺伝子を導入して共発現させることにより、直接エタノールを生産できる株を取得している。今回は導入するセルラーゼ遺伝子の組み合わせと *Zb.palmae* での発現したセルラーゼの細胞内局在性を検討した。

【方法と結果】セルロース糖化発酵性賦与のためにこれまでに導入したセルラーゼ遺伝子はグラム陽性細菌由来であり、グラム陰性細菌である *Zb.palmae* 内でのセルラーゼの細胞外分泌効率は不十分であった。そこでグラム陰性細菌である *Cellobivrio japonicus* 由来のセルラーゼ遺伝子をクローン化し、大腸菌内での発現と高分子セルロースやセロオリゴ糖に対する加水分解特性を検討し、EG として *cel5B* を、BGL として *cel3A* を選択した。*Zb.palmae* 内で発現した *Cel5B* と *Cel3A* の細胞内局在性を検討した結果、低濃度の界面活性剤で菌体を懸濁することで洗菌液にセルラーゼが遊離されたことから、*Cel5B* や *Cel3A* が *Zb.palmae* 細胞表面に非共有的に結合して発現していると考えた。

Cell-surface display of *Cellobivrio* cellulases on ethanologenic *Zymobactor palmae*

○Tatsuya hakogi, tsuyoshi morioka, keisuke tamai, hisashi harada, kenji okamoto, hideshi yanase
(Dept. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words ethanol, cellulosic biomass, cellulase, *Zymobactor palmae*

2P-144 マイクロ波前処理と高速発酵細菌を用いたベンチプラント SSCF による木質バイオマスからのバイオエタノール生産

吉岡 康一¹, 渡辺 隆司¹, 大代 正和², 桂 陽子², 松下 響³, 富永 詠美子³, 小島 基⁴, ○築瀬 英司⁴
(¹京大・生存研, ²日本化学機械製造, ³トヨタ自動車, ⁴鳥取大・工・生応工)
yanase@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】酵素糖化・発酵により木材などのリグノセルロースをバイオ燃料へ変換するためには、リグニンにより被覆された植物細胞壁多糖を露出させる前処理と、前処理物を高効率で糖化・発酵するプロセスの開発が必要である。本研究では、木質系バイオマスからバイオエタノールを高効率で生産する目的で、リグニンの被覆を破壊するマイクロ波照射装置および前処理法を開発するとともに、同時糖化並行発酵 (SSCF) プロセスに最適化したエタノール発酵細菌 *Zymomonas mobilis* BC01 株を選抜・育種し、開発した組換え細菌を用いてバイオエタノール生産をベンチスケールで実証した。

【方法と結果】前処理装置に関しては、3 次元電磁界シミュレータによる計算機実験と実測実験により超低コストのタワー型マイクロ波照射装置を開発した。この装置を用いて、ユーカリ材を前処理し、処理物を *Zm. mobilis* を用いた SSCF プロセスによりエタノールに変換した。前処理パルプと発酵阻害物除去可溶化液の混合原料にセルラーゼ酵素カクテルを添加して予備液化後、育種発酵細菌を植菌してベンチプラントで SSCF を行い、最終エタノール濃度 5% 以上、収率 90% を達成した。

Bench-scale production of cellulosic bioethanol from wood biomass by the microwave pretreatment and SSCF with the genetically engineered *Zymomonas mobilis*

Koichi Yoshioka¹, Takashi Watanabe¹, Masakazu Daidai², Yoko Katsura², Hibiki Matsushita³, Emiko Tominaga³, Motoki Kojima⁴, ○Hideshi Yanase⁴
(¹RISH, Kyoto Univ., ²Japan Chem. Eng. & Machinery Co. Ltd., ³TOYOTA MOTOR CORP., ⁴Dept. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words ethanol production, cellulosic biomass, metabolic engineering, *Zymomonas mobilis*

2P-145 *Mucor*属接合菌を用いた製紙廃棄物からの効率的エタノール生産

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

【目的】製紙工場では製紙製造工程で発生した繊維残渣がペーパースラッジ (PS) として排出される。PS は主に焼却処理されているが、多量の CO₂ および焼却灰が発生することが問題となっている。この対策の一つとして、PS は Cellulose や Hemicellulose から構成されていることから、PS からの Ethanol 生産が注目されている。一方、*Mucor* 属接合菌には 5 炭糖および 6 炭糖を効率よく Ethanol へ変換できる菌株が存在する。しかし PS は多量の無機物等を含んでおり、このような環境下で効率よく Ethanol へ変換できる菌株は未知である。そこで本研究では PS から Ethanol を生産できる *Mucor* 属接合菌の検索を行い、選択した菌株と Cellulase を用いた同時糖化発酵 (SSF) による PS からの高効率な Ethanol 生産について検討した。

【方法・結果】使用した PS の成分は 18% Cellulose, 11% Hemicellulose, 23% 有機成分, 48% 無機成分である。初めに、当研究室保有の *Mucor* 属接合菌 84 株を用い、PS から Ethanol 生産可能な菌株の検索を行った。その結果、*M.circinelloides* NBRC 4563 が最も高い Ethanol 生成量を示した。この菌株を用いて Glucose および Xylose を炭素源として培養したところ、発酵効率はそれぞれ 95.7% および 23.4% であった。本菌株を用い、PS の加水分解に最適化した Cellulase cocktail を組み合わせた SSF による Ethanol 生産を行った結果、36 h で 6.97 g/L の Ethanol を生成できたが、その発酵効率は 49% と低かった。この原因として PS に含まれる無機物による阻害が考えられる。そこで、PS に多量に含まれる CaCO₃ を HCl を用いて除去したところ、PS の糖質含量は 50% となった。これを基質とした SSF を行った結果、Ethanol 生成量は 17.8 g/L に達した。

Development of efficient ethanol production from paper sludge by ethanol-producing *Mucor* sp. *Zygomycota*

○Maki Takano, Kazuhiro Hoshino
(Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama)

Key words *Mucor*, paper sludge, ethanol, SSF