

3P-169 Pretreatment and bioconversion of oil palm biomass-from waste to biochemical and biomaterial

○ Mohd Rafein Bin Zakaria^{1,2}, Satoshi Hirata¹,
Mohd Ali Bin Hassan²
(¹BRRC, AIST, ²Dept. Bioprocess. Tech. Fac. Biotech.
Biomol. Sci. Univ. Putra Malaysia)
rafein-zakaria@aist.go.jp

Oil palm biomass is lignocellulosic waste materials generated during oil palm processing to get crude palm oil. Oil palm empty fruit bunch and mesocarp fiber was produced at the mill and the other biomass such as oil palm trunk and frond was produced at the plantation. The main composition of all biomass determined was cellulose, hemicellulose and lignin like other plant biomass. Oil palm biomass is considered a suitable precursor for biochemical and biomaterial production as these materials are non-food competitive, highly available and sustainable. Several pretreatment was tested on oil palm biomass with the aim to get maximum access of cellulase to cellulose. Physical, mechanochemical, hydrothermal and combination of these pretreatments was conducted and the treatment efficiency was evaluated by the generation of glucose, xylose, and total sugar conversion yields compared to the amount of sugars from raw materials. The effects of pretreated oil palm biomass samples were analysed for physico-chemical changes by FT-IR, wide angle-X-ray diffraction and morphology observation by SEM. Hydrothermal pretreatment strategies presented herewith showed that the natural recalcitrance of oil palm biomass can be greatly reduced, resulting high conversion yields of xylose and glucose.

Pretreatment and bioconversion of oil palm biomass-from waste to biochemical and biomaterial

○ Mohd Rafein Bin Zakaria^{1,2}, Satoshi Hirata¹, Mohd Ali Bin Hassan²
(¹BRRC, AIST, ²Dept. Bioprocess. Tech. Fac. Biotech. Biomol. Sci. Univ. Putra Malaysia)

Key words palm oil, biomass, pretreatment, saccharification

3P-171 粗粉碎草本系バイオマス分解酵素産生微生物の探索

○伊藤 龍, 伊藤 雅紀, 倉根 隆一郎
(中部大・応生)
fr11015-8264@sti.chubu.ac.jp

<目的> 昨今バイオエタノールが注目されている。第一世代バイオエタノールはトウモロコシなどの食糧デンプンを原料としているため、食糧との競合が起こり、食糧問題や作物の価格上昇等深刻な問題も引き起こされている。そこで、稲わらなどの草本系、木質系バイオマスのセルロースバイオマス資源等に注目が集まっているが、脱リグニンの工程が必要不可欠で、現行の脱リグニン前処理工程ではアルカリ処理がなされており、その際生じる黒液処理問題等のために実用化への最大の壁となっている。そこで本研究では生物的脱リグニン法をめざして、リグニン分解酵素を強力に産生する新規微生物の探索を行うこととした。

<方法> 現行のアルカリ等の前処理なしの麦わらの粉碎物を唯一の炭素源とした培地を用い、土壌よりスクリーニングを行った。リグニン活性判定では、2,6-DMPを用い黄色への呈色反応により活性測定を行った。色反応がポジティブなウェルについては馴化培養を行い寒天培地に培養確認を行った。単離後、再度液体培地にて培養を行い、活性がある菌株を得た。得られた菌株の培地検討を行い、酵素の粗精製を行った。粗精製リグニン分解酵素のpH安定性と温度安定性を試験し、また、既存のリグニン分解酵素うちどの酵素であるかの簡易判定を行った。

<結果> 粗粉碎麦わらに生育した菌株のうち、2,6-DMPに硫酸マンガンを加えての活性測定で通常は必要とされるH₂O₂を加えずに黄色に呈色した菌株を二株取得することができた。その菌株二種を四種の液体培地を使った培地検討及び、粗精製酵素のpH安定性について報告する

Searching for microorganism lignin degrading enzymes of herbal biomass without current alkaline pretreatment

○ Ito Ryu, Ito Masaki, Kurane Ryuichiro
(Coll. Biosci. Biotechnol., Chubu Univ.)

Key words lignin-degrading, manganese peroxidase, herbal biomass

3P-170 2次元 NMR 多変量解析による草本系バイオマス構造変化の評価

○山本 亜里沙¹, 石原 康宏¹, 坪井 裕理², 菊地 淳²
(¹花王, ²理研環境資源)
yamamoto.arisa@kao.co.jp

【目的】 草本系バイオマスの利用には、化学的処理により生じる複雑な構造変化の解析が重要である。我々は、主成分であるグルカン、キシラン、リグニン間の結合の変化を捉える事が特に重要と考え、1H-13C間の異種核カップリングを利用したHSQC解析の適用を検討した。しかし、HSQCスペクトルで得られる多数の相関ピークの内、同定されているものはごく一部であり、それらの挙動のみに注目しても、構造変化に関与する重要な結合に由来するとは限らず、更には構造変化の全容解明も困難である。そこで、未同定のものも含めた全ピーク挙動を把握し、様々な処理条件との相関性を明らかにする為、変数間の相互関連を分析する統計的技法として一般的に用いられる、多変量解析を組み合わせた検討を行った。

【実験】 様々な条件で化学的処理を行ったバイオマス残渣に対して、ボールミルで低分子量化した後、溶媒抽出し、可溶分のHSQC解析を行った。得られた相関ピーク(138個)の強度を用いて多変量解析を行った。

【結果と考察】 化学的処理による主な構造変化には、リグニンやキシランの脱離現象がある。リグニン脱離には、主にリグニンとキシランのエステル結合の加水分解が寄与し、一部のリグニンは、キシランとの化学結合を保ったまま脱離していることが分かった。一方、グルカンと未知の結合が今回の化学的処理ではほとんど影響を受けず残存することが明らかになった。

Evaluation of Structural Change of Grass Biomass by Multivariate Analysis of Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance

○ Arisa Yamamoto¹, Yasuhiro Ishihara¹, Yuuri Tsuboi², Jun Kikuchi²
(¹Kao Corp., ²RIKEN CSRS)

Key words biomass, lignin, HSQC, PCA

3P-172 アグロバクテリウムを用いた *Ceriporiopsis subvermispora* 形質転換法の開発

○鈴木 亜美, 大槻 隆司, 宇井 定春
(山梨大院・医工総・生命)
ui@yamanashi.ac.jp

【背景・目的】 選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は、リグノセロース中のリグニンを高選択的に分解することから、バイオマス変換において有用な微生物として注目されている。しかしながら、現段階において形質転換系が報告されておらず、遺伝子操作を用いた機能解析を行うことが困難である。そこで本研究では、操作が簡便な *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) 法による *C. subvermispora* の形質転換を試みた。

【方法・結果】 アセトシリンゴン存在下で誘導培養を行った *C. subvermispora* ATCC96608 株および *A. tumefaciens* LBA4404(pBHt2) 株をマイクロチューブ中で混合し、液体共培養を行った。使用したベクター pBHt2³⁾ は、T-DNA 領域に *hph* をコードすることから、ハイグロマイシンおよびセフトキサシムを含む PDA プレート上で生育した菌糸コロニーを選抜し、同培地上で繰り返し継代培養することで形質転換体の選抜ならびに LBA4404 株の除菌を行った。得られた形質転換体候補株より DNA を抽出し、*hph* 増幅プライマーを用いて PCR を行ったところ、増幅バンドを検出することができた。また、LBA4404 株の除菌が不完全でないことを確認するために、pBHt2 の非導入領域に存在するマーカー遺伝子 *npt II* の増幅プライマーを用いて PCR を行ったところ、増幅バンドは検出されなかった。このことから、pBHt2 ベクターの *hph* を含む T-DNA 領域が ATCC96608 株のゲノム上に導入されていると考えられた。

1) Mullins ED *et al.*, Phytopathology 91:173-180 (2001)

Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora

○ Ami Suzuki, Takashi Ohtsuki, Sadaharu Ui
(Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

Key words *Ceriporiopsis subvermispora*, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation