

1P-205 *Pichia pastoris* 細胞表面へのタンパク質過剰発現技術の開発

○山田 亮祐, 本本 雄介, 荻野 博康
(阪府大院・工)
yamada@chemeng.osakafu-u.ac.jp

【目的】酵母細胞表面提示技術は、酵母の細胞表面にペプチドやタンパク質を提示する技術であり、固定化酵素やバイオセンサーなど様々な用途への利用が検討されている。細胞表面へのタンパク質提示量はプロモーター配列、分泌シグナル配列、およびアンカータンパク質などによって制御される。本研究では、種々のプロモーター配列、分泌シグナル配列、およびアンカータンパク質から成るコンビナトリアル DNA ライブラリーを作製し、*Bacillus thermocatenulatus* 由来リパーゼを酵母 *Pichia pastoris* の細胞表面に過剰発現させることを試みた。【方法及び結果】作製したコンビナトリアル DNA ライブラリーにより形質転換した酵母細胞約 500 個のリパーゼ活性を測定し、リパーゼ活性が向上した酵母を取得した。取得した酵母は GAP プロモーター、 α -ファクター分泌シグナル配列、および α -アグルチニンアンカータンパク質によりリパーゼを提示した酵母と比較し、5 倍高いリパーゼ活性を示した。本研究で開発した酵母細胞表面へのリパーゼ過剰発現技術は、様々なタンパク質の過剰発現に応用可能な技術であると考えられる。

Combinatorial library strategy for strong overexpression of a target gene on yeast *Pichia pastoris* cell surface

○Ryosuke Yamada, Yusuke Kimoto, Hiroyasu Ogino
(Dept. Chem. Eng., Osaka Pref. Univ.)

Key words *Pichia pastoris*, Combinatorial library, cell surface display, lipase

1P-206 Combined cell-surface display- and secretion-based strategies for production of cellulosic ethanol with *Saccharomyces cerevisiae*

○Zhao Liu¹, Kentaro Inokuma², Tomohisa Hasunuma², Akihiko Kondo¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)
akondo@kobe-u.ac.jp

Engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of producing heterologous cellulases is considered a good producer of bioethanol from lignocellulose. The production of cellulases is usually pursued by two strategies: displaying enzyme on the cell-surface and secreting enzyme into the medium. However, the combination of two strategies in one yeast strain has not been studied yet.

In this study, heterologous endoglucanase (EG) and cellobiohydrolase I (CBHI) were produced in a β -glucosidase (BGL)-displaying *S. cerevisiae* using cell-surface display, secretion or combined strategy. Strain EG-D-CBHI-D and EG-S-CBHI-S (locating both EG and CBHI on the cell surface or in the medium) showed higher ethanol production (2.9 g/L and 2.6 g/L from 10 g/L phosphoric acid swollen cellulose, respectively) than strain EG-D-CBHI-S and EG-S-CBHI-D (EG and CBHI in diverse space), demonstrating that placement of EG and CBHI in the same space is favorable for cellulose-based ethanol fermentation. In addition, the cellulolytic yeast producing enzymes by cell-surface display strategy is proved more available in cell recycle batch fermentation compared to secretion strategy. This is the first study on the feasibility of combining cell-surface display and secretion strategies in one yeast strain for heterologous cellulases production, which will significantly increase our knowledge of how to engineer optimal yeast strains for biofuels production from cellulosic biomass.

Combined cell-surface display- and secretion-based strategies for production of cellulosic ethanol with *Saccharomyces cerevisiae*

○Zhao Liu¹, Kentaro Inokuma², Tomohisa Hasunuma², Akihiko Kondo¹
(¹Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., ²Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ.)

Key words cell surface display, secretion, cellulase, biofuels

1P-207 コーンコブ糖化液を用いた効率的バイオサーファクタント生産

○小西 正朗¹, 吉田 由佳¹, 堀内 淳一²
(¹北見工大, ²京工繊大院・工学科学)
konishim@mail.kitami-it.ac.jp

【目的】農産廃棄物であるトウモロコシの芯(コーンコブ)を発酵原料としてバイオサーファクタントの一種ソホロリピッド(SL)の効率生産の可能性を検討した。特に糖化工程における硫酸処理濃度と発酵阻害物質の生成量と SL の生産性への影響、スケールアップ時に必要な追加の滅菌処理の影響を評価するため、追加熱処理について検討した。

【方法・結果】糖化処理は 400 g のコーンコブに 5 倍量の硫酸を添加したものを 121°C, 60 分間熱処理し、10N NaOH で中和した後、メイセラーゼを 10 g 添加し、40°C で 3 日間酵素糖化した。反応液をろ過したものをコーンコブ加水分解液とした。SL 生産のための培養はフラスコもしくは 1L ジャーファーマンターで行い、5~10%のオリーブ油を添加した SL 生産培地に、SL 生産菌 *Starmerella bombicola* NBRC 10245 を植菌した。1~5%の範囲で処理硫酸濃度を検討した結果、1%硫酸で処理した場合、良好に SL を生産できることがわかった。しかしながら、ジャーファーマンターにスケールアップした場合、生産性が低下した。原因を検討した結果、発酵槽へ仕込むために追加の滅菌処理をしていることが原因であることがわかった。熱処理により進行するメーラード反応が N 源であるアミノ基を消費するためと予測し、窒素源を追加したところ熱反応による生産性の低下を防ぐことができた。

Efficient production for sophorolipids from corncob hydrolysate

○Masaaki Konishi¹, Yuka Yoshida¹, Jun-ichi Horiuchi²
(¹Kitami Inst. Technol., ²Grad. Sch. Sci. Technol., Kyoto Inst. Technol.)

Key words yeast, biosurfactant, biomass

1P-208 イオンビーム変異法による高温耐性エタノール発酵系状菌の構築

○星野 一宏¹, 高野 真希¹, 畑下 昌範²
(¹富山大院・理工, ²若狭湾エネ)
khoshino@eng.u-toyama.ac.jp

【目的】リグノセルロースからの効率的エタノール生産法として、加水分解酵素と発酵微生物を組合わせた同時糖化発酵が期待されている。しかし、このプロセスは加水分解酵素の至適温度に対し、エタノール発酵菌の至適発酵温度が低いため、培養温度を発酵至適温度に合わせる必要がある。そこで現在、効率的なエタノール生産を達成させるために、高温発酵株の育種が望まれている。しかし、エタノール発酵菌の耐熱化は、膜構造変化など複雑な要素が絡むため、従来の薬剤や放射線照射変異や遺伝子組換えでは達成させることは難しい。そこで本研究では、広域かつ変異頻度が期待できるイオンビーム変異法を採用し高温耐性エタノール発酵系状菌の構築とその応用を試みた。【方法と結果】エタノール発酵系状菌である *R. microsporus* 株に対しイオンビーム照射 (WERC) を実施し、高温条件下で選択・育種することで、48°C で増殖可能な 148 株を得た。本菌株の増殖速度は 40°C でグルコースの初期濃度 50 g/L で培養を行った際、親株(28°C 培養)と比較して約 2 倍に向上でき、生産性も 40°C の培養では 0.46 g/L/h と親株(28°C 培養)の約 2 倍に向上させることができた。さらに、本菌株は 45°C で培養でもエタノールの生成が確認できた。次に、本菌株を用いて 40°C で 50 g/L のグルコースを基質として 5 回の繰り返し回分培養を行った結果、培養 48 h でそれぞれ 17.0-26.8 g/L のエタノールを繰り返し生産できた。さらに、もみगरらなどに対して最適化したセルラーゼカクテルと本菌株を組み合わせた同時糖化発酵を 40°C で実施した結果、培養 96 h で 19.8 g/L のエタノールを生成できた。

Construction of thermo-tolerant ethanol-producing fungi by ion-beam mutation

○Kazuhiro Hoshino¹, Maki Takano¹, Masanori Hatashita²
(¹Grad. Sch. Sci. Eng. Educ., Univ. Toyama, ²WERC)

Key words ethanol fermentation, fungus, ion-beam mutation, thermophilic