

**2P-181 出芽酵母での細胞外発現を指向したエキソ型アルギン酸リアーゼの比較解析**

○平山 誠<sup>1</sup>, 松岡 史也<sup>1</sup>, 村田 幸作<sup>2</sup>, 河井 重幸<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>摂南大・理工)  
 kawais@kais.kyoto-u.ac.jp

**【背景】** 大型褐藻類は有望なバイオマス資源であり、主要糖質はアルギン酸である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は安全かつ有用な物質生産微生物であるが、アルギン酸を資化できない。最近、DEH 輸送遺伝子など 4 遺伝子の導入により、アルギン酸分解物 DEH からエタノールを生産できる出芽酵母が開発された<sup>1)</sup>。当分野でも、DEH 資化性出芽酵母の作出を進めている。当該酵母の細胞外でエキソ型アルギン酸リアーゼ(アルギン酸を DEH にまで分解)を発現させることにより、アルギン酸資化性出芽酵母の作出が可能である。本研究では、エキソ型アルギン酸リアーゼの出芽酵母での細胞外発現を目指して、大腸菌発現系を用いて調製した 3 種類の精製組換えエキソ型アルギン酸リアーゼ (A1-IV、Atu3025、および Alg17c) の比較解析を行った。

**【結果】** 最も高い比活性を示したのは A1-IV であった。また、A1-IV は 3 時間で 0.7 mg/mL、Atu3025 は 9 時間で 0.6 mg/mL、Alg17C は 15 時間で 0.1 mg/mL の DEH を各々 1.0 mg/mL のアルギン酸から生産した。各酵素の低温保存安定性に関しては、A1-IV の活性が 1 日で半減した一方、Atu3025 および Alg17C の活性は 4 日後においてもほぼ保持されていた。また、NaCl が活性へ及ぼす影響を調べたところ、A1-IV および Atu3025 が NaCl 存在下で大きく活性を下げ一方、Alg17C の活性は 200 mM の NaCl 存在下でも保持されていた。以上より、各酵素とも各々に固有な特徴を示すことが明らかとなった。

<sup>1)</sup>Nature 505:239-243 (2014).

**Comparative analysis of three exo-type alginate lyases for their extracellular expressions in *Saccharomyces cerevisiae***

○Makoto Hirayama<sup>1</sup>, Fumiya Matsuoka<sup>1</sup>, Kousaku Murata<sup>2</sup>, Shigeyuki Kawai<sup>1</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Sci. Eng., Setsunan Univ.)

**Key words** alginate lyase, *Saccharomyces cerevisiae*, Polysaccharide lyase family 15, Bioethanol

**2P-182 高活性水蒸気を用いたバイオマス前処理における蒸煮と破砕の効果**

○古谷 卓也<sup>1</sup>, 平野 健<sup>1</sup>, 浅田 元子<sup>2</sup>, 佐々木 千鶴<sup>2</sup>, 中村 嘉利<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>徳島大院・先端技科, <sup>2</sup>徳島大院・ソシオ)  
 chizurusasaki@tokushima-u.ac.jp

リグノセルロース系バイオマスを原料として用いる際に重要なのが、リグニンの被覆構造の除去によって基質となるセルロースを露出させる前処理工程である。前処理法の一つとして、本研究では水蒸気爆砕処理法を用いる。これは高温高圧水蒸気による加水分解効果と、急激な減圧による破砕効果を併せ持つ物理化学的前処理法である。しかし、商業化のための装置の大型化は急激な減圧が困難になるという問題点がある。そこで本研究では比較的大型化が容易な高温蒸気蒸煮工程の前処理効果を検討し、減圧による破砕処理の有無で処理効果を比較する。また、加水分解工程における蒸気供給時間の必要値についても検討した。

原料はスギとし、圧力 45 atm、蒸煮時間 5 min、破砕有り条件において酵素糖化効率(生成グルコース量/爆砕処理物中のセルロース量×1.1)×100)が 91.8 % と最も高い数値を示した(酵素:メイセラーゼ(明治製菓)、0.1 g/g-substrate)。必要蒸気供給時間を検討するために、蒸気供給時間を変化させて、その後破砕処理を行った。酵素糖化の結果、蒸気供給時間 2 min の時点で酵素糖化率は 84.7 % と 5 min 供給し続けた時と大きな差が見られなかった。このことから、蒸気供給時間は 2 min で十分であり、3 min の蒸気供給時間を削減出来た。破砕無し条件では圧力 45 atm、蒸煮時間 5 min で酵素糖化率 63 % と低下したが、処理物へ 1 分間ミル処理を施すことで急激な減圧による破砕処理を用いずとも糖化率 93 % を達成した。

**Effects of steaming and crushing on biomass pretreatment using high activity steam**

○Takuya Furutani<sup>1</sup>, Takeshi Hirano<sup>1</sup>, Chikako Asada<sup>2</sup>, Chizuru Sasaki<sup>2</sup>, Yoshitoshi Nakamura<sup>2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Adv. Technol. Sci., Tokushima Univ., <sup>2</sup>Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ.)

**Key words** steam explosion, steam treatment, woody biomass, enzymatic conversion

**2P-183 An efficient biomass degradation system by using synergistic action of accessory enzymes**

○Lili Jia<sup>1</sup>, Geisa A.L.G. Budinova<sup>1</sup>, Yusaku Takasugi<sup>1</sup>, Tsutomu Tanaka<sup>2</sup>, Hirofumi Ichinose<sup>3</sup>, Noriho Kamiya<sup>1,4</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., <sup>3</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>4</sup>CFC, Kyushu Univ.)  
 nori\_kamiya@mail.cstm.kyushu-u.ac.jp

Second-generation bioethanol, produced from agriculture residues, as a substitute for fossil fuels has received widespread attention. However, due to the complex matrix of polysaccharides, the accessibility of cellulose is generally prevented. The addition of accessory enzymes to degrade hemicellulose is an alternative approach to make cellulose more accessible, and to yield more saccharides simultaneously.

In this study, the synergism between different enzymes was investigated in the hydrolysis of different pretreated bagasses. The amount of hemicellulose, especially arabinan, and cellulose crystallinity, following each pretreatment method, were found to affect the synergism between cellulase and xylanase, for glucon and xylan conversion. We thus tested the addition of arabinofuranosidase to the system, and found the enhancement of synergistic saccharification of a model arabinoxylan substrate. Moreover, the enzyme immobilization and recycling are promising strategies to reduce the cost in the hydrolysis process. The synergism between immobilized enzymes is being investigated and the preliminary data will be also presented.

**An efficient biomass degradation system by using synergistic action of accessory enzymes**

○Lili Jia<sup>1</sup>, Geisa A.L.G. Budinova<sup>1</sup>, Yusaku Takasugi<sup>1</sup>, Tsutomu Tanaka<sup>2</sup>, Hirofumi Ichinose<sup>3</sup>, Noriho Kamiya<sup>1,4</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ., <sup>2</sup>Grad. Sch. Eng. Kobe Univ., <sup>3</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>4</sup>CFC, Kyushu Univ.)

**Key words** synergistic effect, lignocellulosic materials, accessory enzymes, enzyme immobilization

**2P-184 ICP-MSを用いた硫酸還元菌由来[NiFeSe]型ヒドロゲナーゼの同定**

○三島 朱加<sup>1</sup>, 井本 知志<sup>1</sup>, 森川 大地<sup>1</sup>, 根本 理子<sup>1</sup>, 稲垣 賢二<sup>1</sup>, 田村 隆<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>岡山大院・環境生命, <sup>2</sup>JST・さきがけ)  
 tktamura@cc.okayama-u.ac.jp

**【目的】** 世界の化石燃料に依存したエネルギー供給には限界が懸念され、代替エネルギーとして水素燃料が注目を集めている。現在は燃料電池の高価な触媒と天然ガスに依存した水素生産が水素燃料の普及への足枷となっているが、嫌気性微生物群が保有しているヒドロゲナーゼ(Hase)を水素燃料電池や水素製造に活用できれば、水素エネルギーの用途拡大が現実性を持つ。硫酸還元菌群が保有している[NiFeSe]型 Hase は、1.5%程度の酸素に耐性を示す優れた酵素である。本研究では、既知の[NiFeSe]型 Hase と高い相同性をもつ未同定 ORF をゲノム情報から探索して、ネイティブ PAGE ゲルで Hase の活性染色をした後に ICP-MS によってセレンを同定する方法を確立した。【方法と結果】*Desulfomicrobium baculatum* と *Desulfovibrio vulgaris* においてセレノシステイン(Sec)を含んでいる[NiFeSe]型 Hase が同定されている。相同性の高い Hase をコードする *D. africanus* などの 7 つのホモログは、その終止コドン UGA が Sec をコードするセレン含有酵素であると推察された。それらの細胞抽出液を超速心分離して 6.0 % (w/v) native-PAGE に供して、Hase 活性染色を行った。さらに検出されたバンドにおいて ICP-MS 分析によりセレンを検出した。Se が検出された *D. africanus* 由来 Hase など 7 種のホモログを簡便に精製するために、*D. vulgaris* をモデル宿主として接合伝達ベクター pC18R6sacBH を用いた形質転換法を検討している。

**Identification of [NiFeSe]-hydrogenases from sulfate reducing bacteria using ICP-MS**

○Ayaka Mishima<sup>1</sup>, Satoshi Imoto<sup>1</sup>, Daichi Morikawa<sup>1</sup>, Michiko Nemoto<sup>1</sup>, Kenji Inagaki<sup>1</sup>, Takashi Tamura<sup>1,2</sup>  
 (<sup>1</sup>Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., <sup>2</sup>PRESTO, JST)

**Key words** *Desulfovibrio*, hydrogenase, selenium