

**1L14-5 水-有機溶媒二相系を用いた乳酸抽出発酵法の構築**

○梅本 真司<sup>1</sup>, 前田 裕介<sup>1</sup>, 福間 真一<sup>1</sup>, 打味 奈緒子<sup>1</sup>, 村田 雅洋<sup>1</sup>, 本田 孝祐<sup>1</sup>, 大政 健史<sup>1</sup>, 長森 英二<sup>2</sup>, 嶋村 隆<sup>2</sup>, 高橋 治雄<sup>2</sup>, 大竹 久夫<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪大院・工・生命先端, <sup>2</sup>豊田中研)

[目的] ポリ乳酸はカーボンニュートラルな性質を有していることから環境低負荷なプラスチックとして注目されている。しかし、ポリ乳酸は原料である乳酸を発酵生産する際に多くのコストやエネルギーが掛かることから汎用プラスチックよりも高価格であるという問題を抱えており、普及の妨げとなっている。そこで、本研究ではコストやエネルギーの問題を解決する手段として水-有機溶媒二相系を用いた抽出発酵について検討を行った。[方法] 菌株として豊田中研とトヨタ自動車が作製した遺伝子組換え酵母 *S. cerevisiae* を使用した<sup>1)</sup>。抽出溶媒として *oleyl alcohol* で希釈した *tri-n-decylamine* (TDA) を使用した。培地に抽出溶媒を重ねた水-有機溶媒二相系を用いて抽出発酵を行い、非中和乳酸発酵および中和乳酸発酵と乳酸生産量を比較した。

[結果及び考察] 毒性試験および抽出実験の結果、TDAが抽出剤として比較的毒性が低く、抽出効率が高いことが示された。フラスコスケールで抽出発酵を検討したところ、TDA濃度が低い抽出溶媒を使用することで非中和乳酸発酵よりも高い乳酸生産量を示したが中和乳酸発酵の生産量には及ばなかった。現在、ジャーファーメンタースケールでも検討中である。

1) Ishida, N. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1964 (2005)

**Application of extractive fermentation for lactic acid production**

○Shinji UMEMOTO<sup>1</sup>, Yuhsuke MAEDA<sup>1</sup>, Shin-ichi FUKUMA<sup>1</sup>, Naoko UTSUMI<sup>1</sup>, Masahiro MURATA<sup>1</sup>, Kohsuke HONDA<sup>1</sup>, Takeshi OMASA<sup>1</sup>, Eiji NAGAMORI<sup>2</sup>, Takashi SHIMAMURA<sup>2</sup>, Haruo TAKAHASHI<sup>2</sup>, Hisao OHTAKE<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., <sup>2</sup>Toyota Cent. R&D Labs. Inc.)

**Key words** poly-L-lactic acid, extractive fermentation

**1L15-2 酵母 *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 株による バイオサーファクタント (マンノシルエリストールリピッド) の生産**

○森田 友岳, 小西 正朗, 福岡 徳馬, 井村 知弘, 北本 大 (産総研)

[目的] バイオサーファクタント (BS) は微生物によって生産される天然の界面活性剤であり、糖脂質型、脂肪酸型、アミノ酸型、高分子型に分類される。多くの BS は合成界面活性剤に比べ、高い界面活性、優れた配行性 (液晶形成能)、幅広い生理活性、などを発揮することが知られている。糖脂質型 BS であるマンノシルエリストールリピッド (MEL) は、植物油を原料として酵母による発酵プロセスで量産可能であるが、その生産酵母の種類は限られている。本研究では、既知の MEL 生産酵母のリボゾーム DNA (rDNA) 配列を基準にして同源性検索を行い、MEL 高生産株の探索を試みた。[結果] 同源性検索の結果、*Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877 株の rDNA 配列が既知の MEL 生産酵母と 97% 以上の同源性を示した。本酵母を大豆油 (炭素源) と硝酸ナトリウム (窒素源) を含む培地で培養し、その培養液中の生産物を TLC と HPLC で解析することで本酵母が MEL 高生産株であることを確認した。さらに、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR による構造解析と GC-MS による脂肪酸組成の解析結果、本酵母が生産する MEL の構造は既知のものと同じであった。興味深いことに、本酵母の MEL 生産性はエリストールを添加することで顕著に向上した (エリストール非共存下と比較して約 70-90% 上昇)。本酵母の休止菌体を用い、大豆油とエリストールを一週間毎に培地中に添加する連続培養の結果、MEL の培地中への最大蓄積量は 142 g/L (5 g/L/day) に達した。

**Production of the glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma rugulosa* NBRC 10877**

○Tomotake MORITA, Masaaki KONISHI, Tokuma FUKUOKA, Tomohiro IMURA, Dai KITAMOTO (AIST)

**Key words** biosurfactant, mannosylerythritol lipid, *Pseudozyma*, yeast

**1L15-1 Whole cell catalyst を用いた酪酸からのブタノール生産**

○馬場 俊一<sup>1</sup>, 進藤 秀彰<sup>1</sup>, 林 実希<sup>1</sup>, 田代 幸寛<sup>2</sup>, 小林 元太<sup>2</sup>, 園元 謙二<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>佐大・有明プロ, <sup>3</sup>九大・バイオアーク)

[目的] これまでにアセトン・ブタノール生産菌の静止菌体すなわち Whole cell catalyst を用いた酪酸からのブタノール生産法を構築し、本反応ではグルコース代謝により得られる還元力が必要であることが明らかとなった。そこで本研究では、人工電子供与体の添加による高効率ブタノール生産システムの構築を目的とした。【方法・結果】使用菌株には *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC13564) を用いた。TYA 培地で本培養を 12-15 時間行い、遠心分離操作により集菌を行った。初発 pH 6.5 で、酪酸 10 g/L、グルコース 20 g/L の窒素源を含まないリン酸培地に、終濃度 0.1 mM のメチルビオローゲン (MV) を添加し反応を行った。MV 無添加の場合、ブタノール生産濃度は 7.75 g/L、ブタノール対炭素源収率は 0.612 C-mol/C-mol であったのに対し、MV 添加の場合、ブタノール生産量は 10.1 g/L、ブタノール対炭素源収率は 0.679 C-mol/C-mol となり、グルコースのみを炭素源とした場合の理論収率 0.667 C-mol/C-mol を超える値となった。現在、本プロセスの最適化および連続化を検討中である。

**Butanol production from butyric acid by whole cell catalyst**

○Shun-ichi BABA<sup>1</sup>, Hideaki SHINTO<sup>1</sup>, Miki HAYASHI<sup>1</sup>, Yukihiko TASHIRO<sup>2</sup>, Genta KOBAYASHI<sup>2</sup>, Kenji SONOMOTO<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Fac. Agric., Kyushu Univ., <sup>2</sup>ASRP, Saga Univ., <sup>3</sup>Bio-Arch., Kyushu Univ)

**Key words** *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4, butyric acid, butanol, whole cell catalyst

**1L15-3 CALB 表層提示酵母の創製ならびにエステル合成反応への応用**

○大野 卓見<sup>1</sup>, 谷野 孝徳<sup>2</sup>, 青木 亨<sup>3</sup>, 福田 秀樹<sup>2</sup>, 近藤 昭彦<sup>4</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・自科, <sup>2</sup>神戸大院・自科・分集科, <sup>3</sup>大日本インキ化学工業株式会社, <sup>4</sup>神戸大・工・応化)

[背景・目的] 酵素反応プロセスは、エネルギーおよび有害物質の量を低減できるなどの点から期待されている技術である。しかし一般に固定化酵素剤は耐久性が低く、非常に高価であり、大規模利用に際しては大きな経済的負担を伴う。我々はこの点を克服するために酵素を酵母の細胞表層に提示させ、容易に再生産可能な酵素剤として利用することを提案してきた。本研究では、各種の有機合成反応へと応用され優れた特性を示すことが知られている *Candida antarctica* 由来リパーゼ B (CALB) 表層提示酵母を作成し、これを用いたエステル合成反応の実施を試みた。【方法・結果】アンカータンパク質として *Saccharomyces cerevisiae* 由来 Flo1 タンパク質の凝集機能ドメインを含む N 末端側 1099 アミノ酸から成る FS アンカーを用い、その C 末端側に CALB を遺伝子的に融合し、酵母 *S. cerevisiae* MT8-1 株へ導入することで CALB 表層提示酵母を創製した。CALB 表層提示酵母は野生株と比較して有意な加水分解活性を示し、ウエスタンブロット解析ならびに細胞表層のプロテアーゼ処理によって CALB の表層提示を確認した。また凍結乾燥処理を施した CALB 表層提示酵母が 1-ブタノール中でアジピン酸のエステル化反応を触媒することが示された。

**Development of yeast cells displaying *Candida antarctica* lipase B and its application for ester synthesis reaction**

○Takumi OHNO<sup>1</sup>, Takanori TANINO<sup>2</sup>, Toru AOKI<sup>3</sup>, Hideki FUKUDA<sup>2</sup>, Akihiko KONDO<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., <sup>2</sup>Div. Mol. Sci., Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., <sup>3</sup>Dainippon Ink and Chemicals, Incorporated, <sup>4</sup>Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

**Key words** *Candida antarctica* lipase B, cell surface display, yeast