

1Ip06 デザインドバイオマスによるバイオプロセスの開発：完全非食糧バイオマスからの高効率ブタノール生産

○吉田 剛士¹, 田代 幸寛², 園元 謙二^{1,3}
(¹ 九大院・農,² 西南女短・生,³ バイオアーク)
sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp

【目的】我々は乳酸発酵産物の乳酸とグルコースを用いたアセトン-ブタノール (ABE) 発酵において、pH-stat 流加培養による高効率ブタノール生産¹⁾ について報告した。本研究では、ヘミセルロースの構成糖である五炭糖と乳酸を用いて、完全非食糧バイオマスからの高効率ブタノール生産について検討した。

【方法・結果】使用菌株には、*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) を用いた。5 g/l DL-乳酸と 20 g/l 五炭糖 (キシロース、アラビノース) で回分培養を行った結果、キシロースよりもアラビノースの方がブタノール生産に適していた。さらに、DL-乳酸とグルコースの場合に比べて、乳酸消費とブタノール生産が促進され、特にブタノール対糖収率が 0.492 から 0.547 C-mol/C-mol に向上した。また、乳酸阻害を回避しながらブタノール生産濃度を向上するために、DL-乳酸とアラビノースの混合基質を添加する流加培養を行った。その結果、回分培養と比較してブタノール生産濃度が 2 倍以上増加した。以上の結果から、乳酸と五炭糖の混合基質を用いた流加培養による高効率ブタノール生産に成功した。現在、本プロセスにおける代謝解析を行っている。

1) Oshiro et al., AMB, 87, 1177 – 1185, 2010.

Development of bioprocess with designed biomass: Efficient butanol production from inedible biomass

○Tsuyoshi Yoshida¹, Yukihiro Tashiro², Kenji Sonomoto^{1,3}
(¹ Fac. Agric., Kyushu Univ.,² Dept. Life Stu., Seinan Jo. Coll.,³ Bio-Arch)

Key words designed biomass, butanol, lactic acid, pentose

1Ip09 有機溶媒二層系における水素酸化細菌形質転換株による疎水性化合物の変換

○坂井 可南子¹, 小田 航史¹, 山本 浩明², 松山 彰収², 西原 宏史¹
(¹ 茨大院・農・資生科,² ダイセル化学・GDC)
hiro@mx.ibaraki.ac.jp

【目的】水素酸化細菌に有用な反応を行う酵素を導入し、水素酸化反応をその変換反応の駆動力とすることで、環境負荷の小さい物質生産が可能になる。本研究では *Ralstonia eutropha* を宿主として *Rhodococcus erythropolis* 由来のアルコール脱水素酵素 (ReSADH) を発現させた形質転換株を作製し、疎水性化合物の水素利用変換反応について検討を行った。

【方法と結果】可溶性ヒドロゲナーゼプロモーター制御下に ReSADH 遺伝子を導入することで、*Ra. eutropha* を宿主とした本酵素の発現に成功した。作製した形質転換株 H16-SADH3 を触媒として用い、水素存在下における 4-クロロアセト酢酸エチルの (R)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルへの不斉還元をモデル反応として、水単層系および有機溶媒二層系での反応を検討した。使用する有機溶媒の選択は、基質と生成物の水層および有機溶媒層への分配特性および有機溶媒の宿主細菌に対する毒性を調査して選定した。変換量は GC を用いて、また生成物の光学純度は HPLC を用いて分析を行い、基質の初発濃度や温度・pH などの条件の反応への影響について調べた。水単層系と比較して、水/有機溶媒二層系を用いることで変換量の向上が見られた。

なお、本研究は経済産業省の産業科学技術プロジェクト「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の一環として行われた。

H₂-driven bioconversion of a hydrophobic substrate using hydrogen-oxidizing bacterium *Ralstonia eutropha* transformant in biphasic system

○Kanako Sakai¹, Koji Oda¹, Hiroaki Yamamoto², Akinobu Matsuyama², Hirofumi Nishihara¹
(¹ Dept. Biores. Sci., Ibaraki Univ.,² GDC, Daicel Chemical Ind., Ltd.)

Key words *Ralstonia eutropha*, NAD-reducing hydrogenase, alcohol dehydrogenase, biphasic system

1Ip08 水素利用微生物触媒の開発と水素による光学活性アルコール生産反応の解析

○宮田 優¹, 黒羽 隼人¹, 山本 浩明², 松山 彰収², 西原 宏史¹
(¹ 茨大院・農・資生科,² ダイセル化学・GDC)
hiro@mx.ibaraki.ac.jp

【目的】循環型社会の形成において、化学合成プロセスを環境負荷の小さいバイオプロセスへと移行することが重要視されている。これまでに NAD 還元型ヒドロゲナーゼ (SH) をもつ水素酸化細菌 *Ralstonia eutropha* に *Kluyveromyces lactis* 由来の (R)-2,3-butandiol dehydrogenase (KLB) を SH プロモーター制御下に発現させた形質転換株を作製し、両酵素の *in vivo* 共役により水素存在下で継続的にヒドロキシアセトンの不斉還元反応が進行することを示した。今回、さらに反応特性の解析、および SH の転写促進因子 HoxA の導入効果について検討を行った。【方法と結果】SH プロモーターが機能するグリセロール培養条件にて SH と KLB を共発現させた菌体を調製し、触媒として反応に使用した。バイアル瓶に基質と菌体懸濁液を入れ、水素ガス雰囲気下にて振とうすることによって反応を行い、ヒドロキシアセトンの還元は GC を用いて分析を行った。また、ヒドロゲナーゼの転写促進因子である HoxA 遺伝子は *R. eutropha* DNA から約 2.4 kb の *Pml* I-Sac II 断片を pBluescript KS (+) にクローン化した後、*lac* プロモーターごと KLB 発現ベクターへ導入して *R. eutropha* への接合伝達を行った。HoxA 導入により、SH および KLB 活性の増大と触媒としての反応性向上が確認された。なお、本研究は経済産業省の産業科学技術プロジェクト「微生物機能を活用した高度製造基盤技術開発」の一環として行われた。

Development and reaction of H₂-driven microbial catalyst using hydrogen-oxidizing bacterium *Ralstonia eutropha*

○Yu Miyata¹, Hayato Kuroha¹, Hiroaki Yamamoto², Akinobu Matsuyama², Hirofumi Nishihara¹
(¹ Dept. Biores. Sci., Ibaraki Univ.,² GDC, Daicel Chemical Ind., Ltd.)

Key words NAD-reducing hydrogenase, hydrogen-oxidizing bacteria, *Ralstonia eutropha*, alcohol dehydrogenase

1Ip10 リンの除去を目的としたビフィズス菌および乳酸菌のスクリーニングとその利用 (第2報)

○佐藤 麻由子, 唐澤 慧, 青柳 秀紀
(筑波大院・生命環境)
aoayagi@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

【目的】慢性腎臓病では腎臓機能の低下により尿素やクレアチニンなどの老廃物が体内に蓄積し、病気の進行に伴い血中のリン値が上昇する。現在、種々の高リン血症治療剤が使用されているが、便秘や副作用などの問題があり、QOL の観点から新たなリン除去法が求められている。この現状を踏まえ、我々は新たなリン除去法として腸内有用微生物の活用を考案し、リンの除去を目的としたビフィズス菌や乳酸菌のスクリーニングを試みた¹⁾。本研究では、更に高いリン除去能を有する菌株のスクリーニングと最適条件の設定を試みた。

【方法および結果】JCM 登録株のビフィズス菌 9 株、乳酸菌 10 株を用いて培養を行い、リン酸イオン濃度 (リン除去能を評価)、pH、細胞量、糖消費などをモニターした。種々検討した結果、リン除去量は 0 ~ 0.22 g-PO₄³⁻/L の範囲で菌株により異なった。全般的にビフィズス菌は乳酸菌に比べて単位菌体あたりのリン酸イオン除去量が高い値を示し、ビフィズス菌の中でも約 5 倍の違いがあった (DAPI 染色によりビフィズス菌の菌体内にポリリン酸の蓄積が認められた)。*Bifidobacterium adolescentis* などを対象に、効果的リン除去が可能な条件を種々探索した結果、適切なペプトンやオリゴ糖を含む培地を用いて *B. adolescentis* の pH 制御培養を行った結果、効果的に培地中のリン酸イオンを除去できた。(1) H22 生物工学会要旨 p. 52

Screening of bifidobacteria and lactic acid bacteria for removing phosphorus and its application (part 2).

○Mayuko SATO, Satoshi KARASAWA, Hideki AOYAGI
(Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words bifidobacteria, lactic acid bacteria, phosphorus removal