

2P-138 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*によるアルギン酸からのエタノールの生産

○三上 真一, 高瀬 隆一, 村田 幸作, 河井 重幸
(京大院・農)
kawais@kais.kyoto-u.ac.jp

【序論】近年、褐藻類などの海洋バイオマスはバイオエタノール生産の原料として注目を集めている。褐藻類の主な構成多糖であるアルギン酸からのバイオエタノールの生産例は、*Sphingomonas* sp. A1 株と大腸菌の各々を用いた2例のみが報告されている。一方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*はエタノールの生産能が高く、エタノールや阻害物質に対して高い耐性を示す等の利点を持つため、工業的なバイオエタノールの生産に用いられている。そこで本研究では出芽酵母を用いたアルギン酸からのエタノールの生産を試みた。

【結果】出芽酵母はゲノム上にアルギン酸を単糖（ウロン酸）に分解する遺伝子群（エンド型とエキソ型のアルギン酸リアーゼの各遺伝子）、及びウロン酸をビルビン酸に変換する遺伝子群 [リダクターゼ (A1-R)、キナーゼ、及びアルドラーゼ（エントナー・ドウドロフ経路の鍵酵素）の各遺伝子] を持っていないため、アルギン酸を資化することが出来ない。そこでこれら遺伝子群を、出芽酵母用のコドンに最適化し、多コピー性ベクターを用いて出芽酵母に導入した。得られた出芽酵母形質転換体はエンド型のアルギン酸分解活性を示した。本形質転換体の細胞抽出液に、ウロン酸、A1-R、NADPH、及び MgSO₄を加えて反応させた反応溶液にはビルビン酸が、また、上記の溶液にさらに NADH を添加して反応させた反応溶液にはエタノールが検出された。本研究は最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

Production of bioethanol from alginate using yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a platform.

○Shin-ichi Mikami, Takase Ryuichi, Kousaku Murata, Shigeyuki Kawai
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Bioethanol, alginate

2P-140 海洋バイオマス主成分アルギン酸からのビルビン酸生産性の向上

○吉田 志織¹, 三上 真一¹, 織田 浩司², 村田 幸作¹, 河井 重幸¹
(¹京大院・農・食生科, ²マルハニチロ)
kawais@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】広大な排他的経済水域を有する日本では、海洋バイオマス、特に褐藻類由来バイオマスの有効利用が期待されている。当分野では、アルギン酸資化性細菌 *Sphingomonas* sp. A1 株 (A1 株) の乳酸脱水素酵素 (Ldh) 遺伝子欠損株 (ldh 株) を好氣的に培養することにより、50 g/l のアルギン酸 (褐藻類主成分) から 4.6 g/l のビルビン酸の生産に成功している。ビルビン酸は、A1 株のアルギン酸資化過程の中間代謝化合物であり、医薬品や高分子化合物などの原料となる有用化合物である。本研究では、ldh 株によるアルギン酸からのビルビン酸生産性の更なる向上を目指した。

【方法・結果】ldh 株を 50 g/l のアルギン酸を含有する培地 (pH7.9) 中で好氣的に培養した結果、6 日目までに培養液の pH は 9.0 まで上昇した。ldh 株を同培地中で好氣的に培養開始した後、24 時間毎に培養液の pH を 5.0、6.0、7.0、および 8.0 に調整し、pH を制御しながら培養した結果、24 時間毎に pH7.0 に制御した系で 3 日目に最大 6.0 g/l のビルビン酸が得られ、本ビルビン酸生産系における培養液の pH 制御の重要性が示された。また、より高いビルビン酸生産性を示す A1 株の育種を目指し、ldh 株ゲノム上の、ビルビン酸を基質とする酵素 (ビルビン酸脱水素酵素 E2 など) をコードする各遺伝子 (12 遺伝子) を破壊し、Ldh 遺伝子とこれら各酵素遺伝子との二重欠損株 (12 株) の作製を試みた。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

Improvement of pyruvate production from alginate: major component of marine biomass

○Shiori Yoshida¹, Shinichi Mikami¹, Hiroshi Oda², Kousaku Murata¹, Shigeyuki Kawai¹
(¹Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., ²Maruha Nichiro)

Key words alginate, pyruvate, *Sphingomonas*, biorefinary

2P-139 アルギン酸からのエタノール生産過程で分泌される毒性物質

○藤井 麻理, 吉田 志織, 村田 幸作, 河井 重幸
(京大院・農・食生科)
kawais@kais.kyoto-u.ac.jp

【背景】排他的経済水域が広大な日本において、藻体量が大きく生育速度が速い褐藻類からのバイオエタノール生産が注目されている。当分野では、アルギン酸資化性細菌 A1 株にエタノール生産能を賦与したエタノール生産性 A1 株を用いて、アルギン酸 5% (w/v) から 1.3% (w/v) のエタノール生産に成功している¹⁾。一方、本エタノール生産過程では、エタノール生産に伴い、培養液の pH が 7 付近から 9 付近まで上昇すると共に同 A1 株が最終的に死滅しており、同 A1 株の死滅を引き起こす毒性物質もエタノール生産中に培養液中に分泌されると推測される²⁾。この死滅が高濃度エタノール生産を妨げとなっていると考えられるため、本毒性物質の毒性作用を緩和し、さらに高濃度のエタノール生産を達成することを目的として本研究を行った。

【方法・結果】エタノール生産性 A1 株によるエタノール生産過程において培養液の pH が上昇することから、本培養液上澄み中の pH が毒性作用に与える影響を調べた。この結果、当該毒性作用は pH6 から 5 付近では緩和される、即ち本毒性物質による同 A1 株の死滅が抑制されることが明らかとなった。また、金属イオン等の添加による毒性作用の緩和も試みた。本研究は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの助成により行われた。

¹⁾Takeda et al. *Energy & Environ. Sci.*, 4:2575-2581 (2011).

²⁾日本生物工学会平成 24 年度大会 (2012 年 10 月 26 日) 講演要旨集, p. 244

Secretion of toxic compounds during production of ethanol from alginate

○Mari Fujii, Shiori Yoshida, Kousaku Murata, Shigeyuki Kawai
(Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Key words alginate, bioethanol, *Sphingomonas*

2P-141 エタノール生合成系強化による *Zymobacter palmae* のキシロース発酵性の向上

○近藤 早紀, 滝上 はる香, 原田 尚志, 岡本 賢治, 築瀬 英司
(鳥取大・工・生応工)
yanase@bio.tottori-u.ac.jp

【目的】リグノセルロース系バイオマスを原料としたバイオエタノール製造では、特に、草本系バイオマスの前処理可溶化液中に高濃度で含まれるヘミセルロース由来のキシロースからの高効率なエタノール回収が求められている。これまでに、*Zymobacter palmae* のゲノム DNA 上に大腸菌由来キシロース代謝酵素遺伝子群を挿入することにより、安定した C5・C6 糖並行発酵性を賦与している。今回は、*Zb. palmae* のキシロース発酵性能を向上させるために、キシロースからのエタノール生合成経路上でビルビン酸からのエタノール合成への分枝に関わるビルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) の発現強化を検討した。

【方法と結果】*Zb. palmae* および *Zm. mobilis* のゲノムから *pdc* をクローニングし、大腸菌内での発現を検討した。大腸菌内で *Zb-pdc* および *Zm-pdc* は発現するとともに、導入株は嫌気的な条件下でグルコースからエタノールを生産したことから、両 *pdc* がビルビン酸からのエタノール合成のキナーゼであることを明らかにした。次に、*Zb-pdc* と *Zm-pdc* を C5・C6 糖並行発酵性 *Zb. palmae* に導入して、高濃度キシロースでの発酵速度の向上を検討した。*Zb-pdc* と *Zm-pdc* の導入により、形質転換株の PDC 比活性は 6 倍と 4 倍を示し、導入した *pdc* が十分に発現していることが明らかになった。また、*pdc* 導入株は 150 g/l のキシロース培地で速やかに生育してキシロースを消費し、エタノールを生産したことから、*pdc* の高発現は解糖系やペントースリン酸回路を経るキシロース代謝活性を向上させると考察した。

Improvement of xylose co-fermentation by *Zymobacter palmae* by activation of ethanologenic pathway

○Saki Kondou, Haruka Takigami, Hisashi Harada, Kenji Okamoto, Hideshi Yanse
(Dept. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Tottori Univ.)

Key words ethanol, xylose, cellulosic biomass, *Zymobacter palmae*