「二酸化炭素排出抑制に資する革新的技術の創出」 平成21年度採択研究代表者 H24 年度 実績報告

# 近藤 昭彦

## 神戸大学大学院工学研究科・教授

海洋性藻類からのバイオエタノール生産の開発

# §1. 研究実施体制

- (1)「近藤昭彦」グループ①研究代表者:近藤 昭彦(神戸大学大学院工学研究科、教授)②研究項目
  - ・藻類のシステムバイオロジー解析
  - ・微細藻類からの効率的バイオエタノール生産
- (2) 「清水浩」グループ

①主たる共同研究者:清水 浩(大阪大学大学院情報科学研究科、教授)②研究項目

・藻類のシステムバイオロジー解析と代謝モデリング

(3) 「邢新会」グループ

①主たる共同研究者:邢新会(清華大学化工系、教授)②研究項目

・有用微細藻選抜に資する微細藻類新規ゲノム改変技術の開発

(4) 「川井浩史」グループ

①主たる共同研究者:川井浩史(神戸大学自然科学先端融合研究環、教授)②研究項目

- ・海水環境における高増殖・高密度培養の技術開発
- ・形質転換技術の開発
- (5) 「三宅親弘」グループ

①主たる共同研究者:三宅親弘(神戸大学大学院農学研究科、准教授)②研究項目

- ・酸素への電子伝達反応の制御
- ・光化学系Iでの循環的電子伝達反応の制御
- (6) 「秋本誠志」グループ

①主たる共同研究者:秋本 誠志(神戸大学自然科学系先端融合研究環、准教授)②研究項目

・微細藻の光エネルギー捕集機能の評価と強化

(7)「張嘉修」グループ

①主たる共同研究者:張嘉修(成功大学大学院化学工学専攻、教授)
 ②研究項目

・高炭水化物生産能を有する微細藻種の単離と大量培養法の確立

### §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

#### (1) 近藤グループ

#### 研究目的・方法

塩水環境下で炭水化物を高生産する微細藻類の育種において,鍵となる物質代謝経路の 同定を目指し,藻類のシステムバイオロジー解析を行う.本年度は、グリコーゲン代謝お よび解糖系を制御する反応制御遺伝子を欠損させた変異株の代謝解析を行い、そのプロフ ァイリングデータに基づき、グリコーゲン生産を律速する代謝反応の特定を目指した. また、グリコーゲンはアミラーゼにより糖化することで、微生物による発酵過程を経てエ タノールに変換することができる.本研究では、ラン藻グリコーゲンの分解に最適な酵素 を選出し、当該酵素を酵母細胞表層に提示発現させることにより、糖化同時発酵によるバ イオエタノール生産システムの確立を目指す.本年度はバイオエタノールをより効率よく 生産するために、ラン藻細胞からの効率的なグリコーゲン抽出法の開発およびラン藻を炭 素源としたバイオエタノール生産プロセスを検討した.

#### 結論

#### 1) 藻類のシステムバイオロジー解析

グリコーゲン代謝に影響する遺伝子を欠損させた変異体の中間代謝産物を分析した. Rre37 は窒素制限により誘導発現される反応制御因子で、グリコーゲン代謝、糖代謝に影響 する.これまでの研究から窒素制限により蓄積した 2-オキソグルタル酸(2OG)が NtcA の 発現を誘導し、その NtcA が Rre37 などの反応制御因子を発現させると考えられてきた.し かしながら、Rre37 が窒素制限条件での代謝物(グリコーゲンおよび中間代謝物質)の経時 変化に及ぼす影響は調べられておらず、Rre37 の機能は詳細に解明されてこなかった.そこ で、コントロール株と Rre37 遺伝子欠損株(Δrre37:理化学研究所 小山内博士から譲渡) の窒素制限条件でのグリコーゲン蓄積量を、本プロジェクトで構築した水系サイズ排除ク ロマトグラフィーにより分析した.その結果、Δrre37 は窒素制限後グリコーゲン蓄積まで にコントロール株より時間を要し、培養開始6時間後までグリコーゲンの蓄積が見られな かった(Fig. 1-1).この結果より Rre37 はグリコーゲン蓄積の初期応答に関係している事が 示唆された.そこで Rre37 の細胞内代謝物プロファイルを調べるためにキャピラリー電気泳 動/質量分析計(CE/TOFMS)および超高速液体クロマトグラフィー/質量分析計

(UPLC/QTOFMS)を用いて、コントロール株との比較代謝解析を行った.また代謝物量に 影響する遺伝子発現量の解析をリアルタイム PCR を用いて行った. Figure 1-2 に窒素制限前 と窒素制限6時間後のコントロール株に対するΔ*rre37*株の中間代謝物質量および遺伝子発 現量の比を示した(3倍に増加している代謝物を赤で、1/3以下に減少している代謝物を青 で示し、同等の代謝物は白で示した.代謝物量は円で遺伝子発現量は菱形で示した).窒素 制限6時間後のΔ*rre37*株はコントロール株に比べて、グリコーゲン前駆体である ADP-glucose 量が少なく、グリコーゲン同化に関わる GlgA, GlgC 遺伝子、グリコーゲン異 化に関わる GlgX, GlgP 遺伝子の発現量はほとんど同じであった. さらに、Δrre37株では窒 素条件下の初期応答である 2OG の蓄積がコントロール株に比べて遅く, Figure 1-3 に示した リアルタイム PCR によって得られた窒素制限後の NtcA 遺伝子の発現量はΔrre37株ではコ ントロール株に比べて低かった. これらの結果から、2OG の蓄積が不十分であり NtcA 遺伝 子が誘導されなかったため、Δrre37株ではコントロール株に比べてグリコーゲン蓄積に時 間を要したと考えられる. しかし、これらの結果はこれまで報告されているシグナル伝達 経路 (2OG→NtcA→Rre37) だけでは説明できない. Rre37 は NtcA の制御のみならず、他の 因子 (たとえば反応制御因子もしくは環境ストレス)により制御を受けており、窒素制限 条件以降初期ではその他の因子による制御により発現誘導しているのではないかと考えら れた. また Rre37 は Rubisco Large subunit 遺伝子の発現量に影響しており (Fig. 1-2)、その 結果、Δrre37株ではペントースリン酸経路の中間代謝物質が蓄積したと考えられる. 以上 の結果より Rre37 はグリコーゲン蓄積の初期応答に関係しており、過剰発現することでグリ コーゲン生産速度を向上させることができると考えられた. 今後は Rre37 過剰発現株を作製 し、グリコーゲン生産速度の向上を目指す.







窒素制限前 窒素制限6時間後Fig. 1-2 窒素源投与量制限による中間代謝物質の蓄積量の違い(△*rre37*/control)

色調と量比の関係





# Fig. 1-3

窒素源投与量制限後のΔrre37とコントロー ル株のNtcA遺伝子の発現量比

#### 2) 微細藻類からの効率的バイオエタノール生産

従来、ラン藻由来のグリコーゲンから酵母によりエタノールが生産された例はない、そ こでまず,ラン藻から 30%KOH により抽出したグリコーゲンを炭素源として市販アミラー ゼ存在下で Saccharomyces cerevisiae MT8-1 株によるエタノール生産を行った(Fig. 1-4)と ころ, 11.5 g/L のグリコーゲンから 6 g/L のエタノールを生産できた. しかしながら, グリ コーゲンの抽出と抽出液の中和は煩雑な作業となるため、これらの前処理を行わない手法 の検討を行った. 20g 乾燥重量/L の A. platensis 細胞(乾燥重量あたり 61%のグリコーゲン を含む)を炭素源として用い, α-アミラーゼとグルコアミラーゼをそれぞれ 0.3 U/mL と 0.1 U/mL 加えて S. cerevisiae MT8-1 株によるエタノール生産を行った(Fig. 1-5). その結果, ア ミラーゼを加えない条件ではエタノールは全く生産されなかったが、アミラーゼを加えた 条件では 96 h で 2.5 g/L のエタノールが生産された.次に,市販アミラーゼの添加を省くた めに, Streptococcus bovis 由来の a アミラーゼと Rhizopus oryzae 由来のグルコアミラーゼを 発現させた酵母 S. cerevisiae MT8-18GS を用いて、エタノール生産を行った. その結果、酵 素を添加した場合と同様に 96 h で 2.2 g/L のエタノールが生産されたが(Fig. 1-6),グリコ ーゲン消費量に対するエタノール収率は32%と低かった.一方で、グリコーゲンはアミラ ーゼ非存在下で 6 g/L 程度まで減少したことから, A. platensis がグリコーゲンを資化したと 考えられた.そこで,本研究ではラン藻の細胞壁であるペプチドグリカンを分解するリゾ チームを用い, A. platensis が消費するよりも早く, グリコーゲンを細胞外に抽出することを 試みた.アミラーゼ(0.3 U/mL の α アミラーゼと 0.1 U/mL のグルコアミラーゼ)存在下で 1 g/L リゾチームによるグリコーゲン抽出量を調べたところ, リゾチームを加えていない条 件では4g/Lのグルコース濃度だったのに対して、リゾチームを加えた条件では6g/Lのグ ルコースが得られた (Fig. 1-7). したがって, リゾチームが A. platensis からのグリコーゲン の溶出を促進することが明らかとなった.そこで、前処理を加えていない 20g dry cell weight/LのA. platensis を炭素源として、1g/Lのリゾチームを加え、アミラーゼを発現させ た酵母によりエタノール生産を行った(Fig.1-8). その結果, 消費グリコーゲン量あたり 86.5 %の収率で 6.5 g/L のエタノールを生産できた. 我々のエタノール生産プロセスのエタ ノール収率、エタノール濃度、前処理プロセス手順について従来の微細藻類を炭素源とし たエタノール生産の研究と比較した(Table. 1-1). バイオマス重量あたりのエタノール収率 はこれまでの研究の中で最高値であった.また,Table 1-2 にバイオエタノール生産のため の様々な炭素源からのエタノール収率を示した.これまでコーンなどと同程度の値が得ら れており、スピルリナがバイオエタノールを生産する資源として非常に有用であることが 明らかとなった.以上のように我々は高効率でラン藻からエタノールを生産できる前処理 の必要ないプロセスを開発することに成功した. 今後の研究では、リゾチームを酵母の細 胞表層に提示させることで、リゾチーム添加を除き、エタノール生産プロセスを更に改良 していく予定である.



**Fig. 1-4** アルカリ抽出した *A. platensis* グリ コーゲンを炭素源とした *S. cerevisiae* MT8-1 株によるエタノール生産



**Fig. 1-6** *A. platensis* を炭素源とした *S. cerevisiae* MT8-18GS 株によるエタノール 生産

10

**Fig. 1-5** アミラーゼ存在下での A. platensis を炭素源とした S. cerevisiae MT8-1 株によ るエタノール生産



**Fig. 1-7** リゾチームが *A. platensis* からのグ リコーゲン抽出に及ぼす影響



**Fig. 1-8** A. platensis を炭素源とした S. cerevisiae MT8-18GS 株によるエタノール生産

Ethanol	Species name of	Ethanol yield	Ethanol	
production	cyanobacteria or	(mg/g dry-cell	conc.	Substrate pretreatment steps
technique	green algae	weight)	(g/L)	
	A. platensis	350	6.5	None
				Drying at 60°C
	Chlorococcum sp	n d	3.6	60°C heat treatment
	Chibrococcum sp.	11. <b>u</b> .	5.0	400 mL /min CO <sub>2</sub> bubbling,
				and drying at 60°C
				Freeze-thawed
Fermentation	C infusionum	260	nd	dried at 60°C
hy yeast	C. injusionum	200	11. <b>u</b> .	extraction at 120°C with
by yeast				0.75% (v/v) NaOH for 30 min
				Liquefaction by 0.005%
				$(w/v) \alpha$ -amylase at 90°C
	Chlamydomonas	225	11.7	for 30 min
	reinhardtii	235	11./	and saccharification by
				0.2% (w/v) glucoamylase
				at 55°C for 30 min

Table 1-1 Ethanol production and yield from cyanobacteria and green algae and pretreatment steps

n.d., not determined

Bioethanol source	Ethanol yield (L/kg dry-biomass weight)
Cyanobacteria (A. platensis)	0.44
Barley	0.41
Corn	0.46
Oat	0.41
Rice	0.48
Wheat	0.40
Sweet sorghum	0.08
Sugarcane	0.07
Cassava	0.15
Switch grass	0.38

 Table 1-2 Ethanol yield from various bioethanol sources

#### (2) 清水グループ

#### 研究目的・方法

海洋藻類の有用物質生産宿主としての性能を高度化するためには「オミクスを高度に 活用した合理的生産プロセスの探索」が必要である.ゲノムや細胞内の代謝物質の量の情 報などをもとに現状の細胞の特徴を把握するとともに、変化を与えることによってそのよ うな改変が行えるかを予測し、また、実際に改変を行った結果を予測と照らし合わせるこ とで、現状の細胞の状態を捉え直し、さらなる改良を加えるための基盤とすることが望ま れる.本研究においては、微細藻の培養条件や遺伝子改変を行った際に、どのように代謝 が変化し、有用物質生産能が変化するのかを予測するシステムと、実際に代謝がどのよう に変化したのかを評価するシステムの構築を目指すこととする.これらのシンセティック バイオエンジニアリングを用いて有用物質生産の能力を飛躍的に高める株を構築すること を目的とする.

#### 結論

代謝の予測システムの開発に関して、これまでに、モデル微細藻類 Synechocystis sp. PCC 6803 と本研究プロジェクトの中心的微細藻類 Arthrospira platensis NIES-39 の代謝モデルを 構築した.本年度は構築した代謝モデルを用いて、窒素の供給を制限した培養条件を想定 した代謝シミュレーションを行った.その結果、窒素制限によりグリコーゲンの蓄積が予 測され、微細藻類において窒素制限によるグリコーゲン蓄積が向上する実験結果に対応す る結果が得られた.

代謝状態を評価するシステムの開発に関しては, Synechocystis sp. PCC 6803 において, 光独立栄養条件 (光合成による CO<sub>2</sub> 固定のみを炭素源) における代謝フラックス解析手法 を開発した. Synechocystis sp. PCC 6803 を培養し, <sup>13</sup>C 標識炭酸塩を培地に添加した後, 1 分間隔でサンプリングおよび細胞内中間代謝物質の抽出を行った. 取得したサンプルから <sup>13</sup>C 濃縮度と細胞内濃度を,ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS),キャピラリー電気泳 動質量分析計 (CE-MS),神戸大近藤チームが所有する液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて測定した. 得られた <sup>13</sup>C 濃縮度の経時変化の情報と代謝物質濃度の情 報より,代謝フラックスを求めた. その結果,カルビンサイクルのフラックスは大きく, 酸化的ペントースリン酸経路のフラックスは非常に小さいことが示唆された (Fig. 2-1). さ らに,独立栄養条件,従属栄養条件,混合栄養条件の異なる栄養条件下において,CE-MS を用いたメタボローム解析と,DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析に よるシステムバイオロジー解析を行い,各栄養条件下における細胞状態の特徴を明らかと した (原著論文 12).

代謝律速点の決定に関する研究に関しては、代謝ターンオーバーを詳細に解析するため、これまでに開発した最短 30 秒間隔で培養液のサンプリングおよび細胞内の代謝物質を 抽出するシステムを改良し、最短 10 秒間隔で行うことを可能とした.また、H23 年度にゲ ノムスケール代謝モデル用いて抽出した微細藻類による物質生産性を向上させ得る破壊候 補遺伝子について、本年度は、実際に候補遺伝子の破壊株を構築した.さらに、これまで に開発した代謝解析手法を用いて、光量の変化など代謝に影響を与える環境条件や、遺伝 子破壊株の代謝解析を開始し、代謝律速点の決定手法の開発を進めた.



Fig. 2-1 代謝物質中の<sup>13</sup>C 標識割合の経時変化と代謝フラックス計算結果.時間 0 min において,培地に<sup>13</sup>C 標識炭酸塩を添加し,その後の代謝物質中の<sup>13</sup>C 標識割合の経時変化を測定した.時間の経過に伴い,各測定物質の質量数 M の割合が低下し,<sup>13</sup>C 標識で標識された質量数が大きい代謝物質の割合が増加する結果を捉えることに成功した.計算により求めた代謝フラックスを赤字で示す(単位 mmol/g-dry cell weight/h).

(3) 邢グループ

#### 研究目的・方法

本研究の主要目的は新規ゲノム迅速変異-常圧常温プラズマ(ARTP)を用いて微細藻 類新規ゲノム改変技術の開発することである.本年度は ARTP の発生特性を数値的にモデ ルシミュレーションし、プラズマの分布特徴を検討した. A. platensis 変異体バンクから得ら れた三つの代表的変異体を用いて、プロテオームとゲノミックスの解析によって ARTP 変 異メカニズムの検討を試みた. さらに、海水での培養を目指し、耐塩性を持つ A. platensis の ARTP 変異プロトコルを確立した.

# 結論

#### a. ARTP 発生特性についてのシミュレーション

#### a-1. 一次元プラズマ分布のシミュレーション

前年度の結果に基づいて,ARTP 放電区を一次元非定常流体としたモデルを立て,同軸

型プラズマ発生器放電区特性 (Fig. 3-1) を数値的にシミュレーションした.計算結果との 比較のために,放電区の可視化画像をとり,画像処理によって放電区のプラズマ強度分布 を解析した.電極ギャップスペースが変化と一定の場合,ARTP 放電区での電子,He<sup>\*</sup>,He<sup>2\*</sup>, He<sup>+</sup>,He<sup>2+</sup>,N<sup>2+</sup>数密度の半径方向の分布のシミュレーション結果をそれぞれ Figure 3-2 と Figure 3-3 に示した.電極ギャップスペースが一定の場合,planar-type generator ( $r_{in} \rightarrow \infty$ )に相 当する ARTP 放電区での電子,He<sup>\*</sup>,He<sup>2\*</sup>,He<sup>+</sup>,He<sup>2+</sup>,N<sup>2+</sup>数密度の半径方向の分布は対称にな った (Fig. 3-3).画像処理によって得られたプラズマジェットの半径方向での分布 (grayscale values) は対称的であり,計算結果と一致した.





**Fig. 3-1** Schematic of the co-axial-type ARTP generator (a), calculation domain (b) and the mesh generation (c)

**Fig. 3-2** Calculated radial distributions of the time-averaged number densities of different chemical species with different electrode gap spacings ( $r_{in}$ =8.0 mm,  $i_d$ =14.0 mA/cm<sup>2</sup>)



Fig. 3-3 Calculated radial profiles of the time-averaged species number densities and the electron energy with different radii of the inner electrode (L=1.6 mm,  $i_d$ =14.0 mA/cm<sup>2</sup>).



**Fig. 3-4** Typical discharge image of the RF APGD with I=0.74 A and Q=10.0 slpm, and the corresponding radial distribution of the grayscale values of the discharge image by imaging analysis.

## a-2. 定常モデルによるプラズマの二次元的分布シミュレーション

ARTP 放電区での一次元プラズマ分布のシミュレーションに基づき,照射区(Jets)でのプラズマ二次元分布を定常モデルによって計算し(Fig. 3-5),その流れ方向でのプラズマ

分布を Figure 3-6 に示した. He<sub>2</sub>\*数密度が流れ方向に沿って広く分布した. 計算結果を確認 するために, ARTP 放電区の等価インピーダンスや電子数密度測定方法を確立した.



**Fig. 3-5** Schematic of the calculation domain for the 2-D modeling of the ARTP jets

**Fig.3-6** Variations of the chemical species number densities along the flow direction

#### b. 代表的 A. platensis 変異株の Omics 分析と CO<sub>2</sub> 曝気培養特性

#### b-1. 変異体のプロテオミクス解析 と遺伝的安定性

昨年度までに確立した A. platensis 変異体バンクから代表的変異体の変異メカニズムを 探索するために、3 つの変異株と野生株のプロテオミクス解析を試みた(Fig. 3-7, 3-8). こ れらの変異体は野生株に比べて、増殖速度、多糖含量、葉緑体と凝集性に異なった特性を 持っている(Fig. 3-9 上段). プロテオミクスによる解析結果から、変異体 3-B2 と 3-A10 は 解糖系とグリコーゲン合成経路が強化され、多糖含量の上昇に関与したと推測されたが、 変異体 4-B3 では carbonic anhydrase (No 21)と ATP synthase (No 17)のレベルが増加し、増殖 速度の増加に寄与したことを裏付けた. また、これらの変異株が遺伝的に安定しているこ とを継代培養で確認できた.



**Fig. 3-7** 変異株と野生株の 2 D 電気泳動の結 果

**Fig. 3-8** プロテオミクス解析による変異体の 代謝経路の変化推定

上記変異体のプロテオミクス解析結果をさらに裏付けるために,重要と思われる三つの蛋白質(No.2, No.15, No.21)の発現レベルを RT-PCR で調べた (Fig. 3-9). No.2 は putative succinate semialdehydedehydrogenase, No.15 は putative glucan synthase, No.21 は carbonic

anhydrase である. 三つの変異株におけるその三つの酵素の発現レベルはそれぞれの増殖, 多糖と葉緑体含量の変化に一致し, Fig. 3-8 のプロテオミクス解析の部分的結果を証明した.



Transcription level of No.2, No.15 and No.21 proteins in three mutants by RT-PCR

**Fig. 3-9** RT-PCR による変異株の三つの酵素発現レベルの分析(下)および増殖曲線, 多糖と葉緑体(上)の変化

## b-2. 代表的変異体の Genomics 解析

上記三種類の A. platensis 変異体のゲノム Resequencing 結果に基づき, Bioinformatics 解 析を行い, アミノ酸の変化を生じた SNP と DIP 変異の評価を行った (Table 3-1). 野生株 (Control) に相対して, 変異体 3-A10, 3-B2 と 4-B3 の SNP はそれぞれ 1033, 839, 1044 で, DIP はそれぞれ 232, 210, 232 であった. この結果から, ARTP が A. platensis のゲノム に多くの変異サイトを引き起こした.

Variation	Control	3-A10	<b>3-B2</b>	<b>4-B3</b>
SNP	239423	239424	237828	239447
SNP compare filter Control	_	2912	2330	2934
Non-synonymous SNP filtered Control	_	1033	839	1044
DIP	7916	7895	7789	7911
<b>DIP</b> compare filter Control	_	443	458	464
Non-synonymous DIP filtered Control	_	232	210	232

Table 3-1 A. platensis の代表的変異株と野生株 SNP と DIP 解析結果

SNP: Single Nucleotide Polymorphisms DIP: Inserts and deletes nucleotides from a sequence

#### b-3. CO2 曝気培養特性

上記代表的変異体の CO<sub>2</sub>曝気培養特性を調べるために,空気通気を行う変異体同時培養装置を構築した.空気曝気培養装置を用いて,異なる塩濃度下で培養したスピルリナ野生株と変異株の形態学的変化と CO<sub>2</sub>固定速度を Figure 3-10 に示した.これらの結果の違いは,スピルリナの変異,溶存酸素濃度,塩濃度の総合的影響を反映した.





Fig. 3-10 曝気培養装置で培養したスピルリナの顕微鏡写真と CO2 固定化速度

c. ARTP による耐塩性を持つ A. platensis 変異体の創出

スピルリナは多細胞であるため、単細胞からの変異を行うために、培養したスピルリ ナから単細胞化操作を行い、単細胞を得ることに成功した(Fig. 3-11). この結果は次年度 の ARTP による単細胞スピルリナの変異研究の基礎となった.

スピルリナを海水で培養できるように、その耐塩性を持つ変異体を育種することが必要である. ARTP による耐塩性のあるスピルリナ変異育種操作手順を確立した(Fig. 3-12).





Fig. 3-11 多細胞のスピルリナから分離した単細胞の顕微鏡写真



Fig. 3-12 ARTP による単細胞化されたスピルリナからの耐塩性変異体の育種プロトコル

(4) 川井グループ

#### 1) 海水環境下での高増殖および高密度培養技術の開発

研究目的・方法

本プロジェクトで目標としている海水環境下における Arthrospira platensis NIES-39 の 高増殖および高密度培養に向けて,低コストで閉鎖的または半閉鎖的に効率よく培養でき る手法を検討する.また,培養空間の効率的な利用に向けて付着性ラン藻で,かつ光合成 色素系が異なる S. subsalsa NIES-527 などの育成を考え,至適培養条件の検討を行う.

A. platensis の低コストな培養技術の開発を目指し、培養庫内で 28°C,光強度 200 または 1,000 µmol photons/m<sup>2</sup>/s で、NaHCO<sub>3</sub> を添加しない SOT 培地または海水を 1~1/4 に希釈した培地を用いた場合、2% CO<sub>2</sub> を添加した空気を通気して培養した場合の生育の違いを調べた.また、改変培地や、本プロジェクト秋本 G の培養実験で示されている、フィルターを用いた照射光のスペクトル改変が生育におよぼす影響を検証するため、神戸大学内の温室において、温度制御の可能な大型水槽内に容量 20 L (0.32×0.22×0.38 m)の透明ポリカーボネート (PC) 容器を浮かべた培養装置を考案・設置し、培養実験を行う (Fig. 4-1). 培養時には培養容器直上の光量子量(照射光量)をモニターする.



Fig. 4-1 神戸大学内温室における半開放系培養システム

S. subsalsa NIES-527 と兵庫県淡路市の岩屋港から単離した新奇の S. subsalsa は現在無 菌化されておらず,何れの株も無菌化すると枯死してしまうため, S. subsalsa の生育に必須 な共存細菌の存在が考えられた.そこで,<u>D</u>enaturing <u>G</u>radient <u>G</u>el <u>E</u>lectrophoresis (DGGE) 法 (Fig. 4-2) を用いて,生育に必須な細菌を S. subsalsa と混生する細菌から単離・同定し, S. subsalsa との二員培養系を確立することを目指した.



Fig. 4-2 DGGE 法の原理と共存バクテリア相の比較実験手順

また,基質に付着して生育する本種の効率的な培養法を検討するため,積層型フラス コを用いた培養実験を行った (Fig. 4-3).培養には容量 1L (0.175×0.12×0.05 m:表面積 225 cm<sup>2</sup>)の5層積層型フラスコに PES 強化海水培地を充たした後,*S. subsalsa* 0.179g (d.w.)を 播種し,これをさらに6個積層し,上部から,LED 光源により照明し,28°C,180 μmol photons/m<sup>2</sup>/s 条件下で約4週間静置培養し,藻体を回収後,バイオマスを測定した.



Fig. 4-3 S. subsalsa の積層培養実験

#### 結論

A. platensis NIES-39 は NaHCO<sub>3</sub> を添加しない SOT 培地では,培養光強度 200 μmol photons/m<sup>2</sup>/s では NaHCO<sub>3</sub> 添加時と同等の生育速度が見られ,培養開始時の細胞濁度 OD<sub>750</sub>=0.1 が 144 時間後に OD<sub>750</sub>=1.2 になった.光強度 1,000 μmol photons/m<sup>2</sup>/s では,培養開始 120 時間後に OD<sub>750</sub>=1.4 で生育が止まり死滅したが, 2% CO<sub>2</sub> を通気した場合,死滅す ることなく培養開始時の細胞濁度 OD<sub>750</sub>=0.1 が 167 時間後に OD<sub>750</sub>=2.2 まで増殖した (Fig. 4-4).



Fig. 4-4 温室内での培養における A. platensis の生育(左)と培養温度(中), 照射光量の変化(右)

光強度 200  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s では, CO<sub>2</sub> 通気の有無に よる生育速度の違いは見られなかったが, 過去の研究例か らより高濃度の CO<sub>2</sub>を通気することにより低い光強度でも 生育速度が増加する可能性が示唆されているので, 今後検 討を行う.また, 1/4 に希釈した海水を用いた培地では NaNO<sub>3</sub> と FeEDTA を添加することにより光強度 1,000  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s で, 培養開始時の細胞濁度 OD<sub>750</sub>=0.1 が 240 時 間後に OD<sub>750</sub>=2.4 になる程度の培養が可能であることが示 された (Fig. 4-5).



Fig. 4-5 2%CO2 添加時のA. platensis の生育

S. subsalsa については DGGE 法を用いて,各培養(様々な細菌叢を含む培養)における 成長と,細菌叢の比較を行った結果,比較的良好に成長した培養では数種の細菌が含まれ ており,一方,成長が悪い培養では細菌が確認されなかった (Fig. 4-6). この結果から S. subsalsa の安定培養には, Limnobacter sp. を含む細菌の共存が必要であることが示唆された. また,これらの種との微生物マット形成が S. subsalsa の増殖促進に関わっている可能性が示 された.

					•													-	9 4		1	•										į
	1		12	ł	1	-	1			H	Ħ	H		-	ļ	۲		Î	1	1	1	Ì	ĥ	i.	-	i	ŝ	1			ł	ę
																							•1				ļ					
						-			-	-	-	-																1	-			
嫘玥	4	2	16	8	7	7	7	6	6	s	\$	s	s	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2
						_			עב	38						-								ĥ	38							
a-Jhe.	1	2	1	8	3	26	12	25	24	45	50	56	38	35	11	18	43	35	15	34	41	40	3	18	30	38	51	38	в	28	31	33
UNa.	1	2	3	4	s	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	28	21	28	29	30	31	32
の本数			3	2	1	2	2	3	2	3	4	1	2	1	8	3	4	5	3	3	4	4	3	3	4	5	3	5	8	8	3	8

Fig. 4-6 DGGE 法による S. subsalsa 培養株の細菌群集構造解析

S. subsalsa の積層培養実験では、培養期間 27 日で 1.252 g の乾燥藻体が得られ、藻体生産量は 1.8 g DW/m<sup>2</sup>/day と推定された.この際、光源に近い上層部では早期に退色、枯死が起こったが、中層部で良好な生育が見られた.今後、光量の調節、培地の循環または振とうなどにより、より好適な培養条件を検討するとともに、A. platensis との積層培養の可能性も検討する.

#### 2) 形質転換技術の開発

#### 研究目的

PORM

システムバイオロジーに基づく改変微細藻の創出を達成するため, A. platensis NIES-39 株における安定した形質転換技術を確立することを目的とする.

方法

ラン藻の多くは制限酵素をもっており、これが外来 DNA による形質転換を阻んでいる と考えられる. A. platensis NIES-39 株では 2010 年に解読されたゲノム情報から、制限酵素 とそれに対抗する DNA メチラーゼは 7 個あると推定された. そこで、これらの DNA メチ ラーゼのうち、3-6 個の様々な組み合わせのメチラーゼを導入したプラスミドを作製し、 形質転換コンストラクトを導入したプラスミドと大腸菌内で共存させ、接合法とエレクト ロポレーション法で A. platensis へ遺伝子導入し、相同組換えおよびトランスポゾンによる 遺伝子変異株の作製を試みる. また、メチラーゼ遺伝子を過剰に発現させるためにメチラ ーゼ遺伝子の上流に大腸菌内でタンパク質を大量発現させる際に用いられる trc プロモータ ーや tac プロモーターを組み込んだコンストラクトを作製する. trc プロモーターの下流に 4 個のメチラーゼ遺伝子(NIES39\_A03450, NIES39\_A05830, NIES39\_J02960, NIES39\_K04030) を導入したプラスミドと tac プロモーターの下流に 3 個のメチラーゼ遺伝子 (NIES39\_K04650, NIES39\_L01710, NIES39\_O02600)を導入したプラスミドを作製し, これら のプラスミドを保持した大腸菌を作製する. また, 多くのグラム陰性細菌を宿主として自 己複製できる MoBiTec 社の広域宿主ベクターpBHR1 の A. platensis NIES-39 への導入を試み る.

#### 結論

pRLm123456 pRLm123457 pRLm123467 pRLm123467 pRLm124567 pRLm124567 pRLm134567 pRLm1234 pRLm1235 pRLm1236 pRLm12345 pRLm12346 pRLm12347 pRLm123 pRLm124 0 K046 pRLm125 pRLm126 pRLm127 pRLm1237 pRLm12356 pRLm1245 pRLm1235 pRLm127 pRLm134 pRLm135 pRLm136 pRLm137 pRLm145 pRLm146 pRLm147 pRLm156 pRLm167 pRLm12357 pRLm12367 pRLm12456 pRLm12457 pRLm12467 pRLm12567 pRLm13456 pRLm1246 pRLm1246 pRLm1247 pRLm1256 pRLm1257 pRLm1267 pRLm1345 pRLm1346 pRLm1346 pRLm1357 pRLm1367 4650 L0171 0 L01710 pRLm1345 pRLm1346 pRLm1356 pRLm167 pRLm234 pRLm235 pRLm1456 pRLm1367 pRLm2345 pRLm1367 pRLm1456 pRLm1457 pRLm1457 pRLm23455 pRLm2346 pRLm2346 pRLm2357 pRLm2357 pRLm2357 pRLm2357 pRLm23457 pRLm23467 pRLm23567 pRLm24567 pRLm34567 pRLm235 pRLm236 pRLm237 pRLm245 pRLm246 pRLm256 pRLm256 pRLm257 pRLm123456 A03540 - A05 60 - K04030 - K046 50 - LI RLm267 pRLm267 pRLm345 pRLm346 pRLm347 pRLm356 pRLm357 pRLm357 pRLm456 pRLm457 pRLm467 Xant Ecoliti Sact Kpm Bamili Salt Pse pRLm2367 pRLm2456 pRLm2457 pRLm2467 pRLm2567 pRLm34567 pRLm3457 pRLm3567 pRLm3567 pRL542 pRLm567 PI m4567

3~6 個の様々な組み合わせの DNA メチラーゼ遺伝子を pRL542 に導入し,45 種類のプラス ミドを作製した.

Fig. 4-7 様々な組み合わせのメチラーゼ遺伝子を導入したプラスミドの作製

これらの DNA メチラーゼプラスミドと昨年度作製した相同組換えを行うプラスミドを 大腸菌 HST08 や XL-1 Blue MRF に導入し, 27 種類を接合法で,6 種類をエレクトロポレー ション法により A. platensis NIES-39 へ遺伝子導入を試みた (Fig. 4-8). また,これらのメチ ラーゼプラスミドを保持する大腸菌に pBHR1 を導入し,接合法により A. platensis NIES-39 への遺伝子導入を試みた (Fig. 4-9). さらに tac プロモーターと trc プロモーターでメチラー ゼ遺伝子を過剰発現させるプラスミドを保持する大腸菌に相同組換えを行うプラスミドや pBHR1 を導入し,接合法により A. platensis NIES-39 への遺伝子導入を試みた.現在,本種 の生育を効果的に阻害することが確認できた抗生物質を用いたセレクションを行っている が現時点では導入は確認されていない. 今後はエレクトロポレーション法による導入も試 みる.





Fig. 4-8 メチラーゼ遺伝子過剰発現コンストラクトの作製

**Fig. 4-9** 広域宿主ベクター を利用した **GFP**発現コンス トラクトの作製

#### (5) 三宅グループ

#### 研究目的・方法

物質生産増強を目的とした代謝経路改変において、エネルギーのトレード・オフを制 御することを目的とする. 具体的には、炭素代謝での物質変換に関わるエネルギー化合物 ATP の供給能の増強を目標とする. そこでは、光合成生物の生命維持(成長維持)に要求 される ATP 量の確保を保証し、物質生産のための代謝経路への、余剰の ATP を生み出すた めの ATP 産生系の強化・制御を行う.本年度は a. O<sub>2</sub>に依存したオルタナティブ・エレクト ロン・フロー(AEF)のラン藻細胞における検出系の構築, b. O<sub>2</sub>に依存したオルタナティブ・ エレクトロン・フロー(AEF)の葉緑体における検出系の構築と電子伝達反応での O<sub>2</sub>の必要 性の解明, c. 光合成誘導期における O<sub>2</sub>に依存したオルタナティブ・エレクトロン・フロー (AEF)の役割解明を目的に研究を行い、下記の成果を得た.

#### 結論

# a. O<sub>2</sub> に依存したオルタナティブ・エレクトロン・フロー(AEF)のラン藻細胞における検 出系の構築

ラン藻細胞チラコイド膜光合成電子伝達系を電子が流れると、膜内外で電圧勾配が生じる.この結果、チラコイド膜内のカロテノイド吸収スペクトルが変化(電気二色性 ECS)し、カロテノイド光吸収波長(515 nm)での透過率変化が電子伝達活性(ECS 解析により評価)を反映する. ECS 解析は、生細胞を材料に使用できる利点があり、光合成での O<sub>2</sub>発生と同時解析が可能である.

本年度は, ECS 解析により, *Synechocystis* sp PCC6803 (S. 6803)を用いて, 光合成に伴い O<sub>2</sub> 依存の AEF が機能していること, そして, 光強度の増大が AEF 活性を増加させること を見出した.

# b. O<sub>2</sub> に依存したオルタナティブ・エレクトロン・フロー(AEF)の葉緑体における検出系の構築と電子伝達反応での O<sub>2</sub>の必要性の解明

光合成では、カルビン回路を駆動させるために、NADPH と ATP がそれぞれ2および3 分子要求される.これら NADPH/ATP は、光合成電子伝達反応(PLEF)により供給されるが、 PLEF だけでは NADPH/ATP を満たすことができず, AEF が要求されることが示唆されてきた.

本年度は、NADPH と ATP がそれぞれ1分子要求される電子伝達反応系でさえ、O<sub>2</sub>に 依存した AEF が駆動する必要があることを明らかにした(6). この成果は、ラン藻光合成 での O<sub>2</sub>要求のメカニズム解明に貢献するものである.

# c. 光合成誘導期における O<sub>2</sub>に依存したオルタナティブ・エレクトロン・フロー(AEF)の 役割解明

光合成には光が必要であるが、光照射後速やかに光合成が 100%の能力で駆動するわけではなく、誘導期を経て定常状態に達する. ラン藻 S. 6803 での ECS 解析により、誘導期に O2に依存した AEF が機能することを見出している(A).

本年度は、この誘導期が長く、 $O_2$ に依存した電子伝達反応の解析が容易であるイネ生 葉を用いて、AEFの役割解明を行った(7). 低 $O_2$ 分圧(1 kPa)と比べ大気 $O_2$ 分圧(21 kPa)下、 光合成誘導が促進されること、そして $O_2$ に依存した電子伝達反応が機能していることを明 らかにした.この結果は、ラン藻と同様にAEFが光合成駆動に貢献していることを明らか にするものである. (c) FDAS

# (6) 秋本グループ

研究目的・方法

46 - 53 ns

微細藻をパルスレーザーで光励起した後, 微細藻の 光化学系を構成する各色素から発せあねる蛍光の強度 変化を時間の関数として観測することにより, エネルギ ー移動過程・電子移動過程を検討する:11時に, (i) フィ コエリスリン→フィコシアニン→アロフィコシアニン →クロロフィルのエネルギー移動効率の検討, (ii) エネ ルギートラップとなる色素の同定と過剰エネルギー失 活過程の検討, (iii) 反応中心におけ 57電97移動過程の検 討, を行う. (i)-(iii)によって得られる結果と秋本らが所 有する他の光合成生物に関するデ-2697-2992を較すること により, 微細藻に特徴付けられる光エネルギー捕集機能 を明らかにし, 大量培養に向けての問題 たを考察する. 結論

#### a. 藻類の光エネルギー捕集能力 -2.4-0 ps

本年度は、ラン藻 Appenhrospina ptopensis7 を異なる光800 Wavelength/nm Wavelength/nm 質・光量の単色 LED 下で培養し、「培養光の波長」-「バ 」 イオマス量」-「励起エネルギー移動過程」の相関を検 討した. A. platensis 培養に関する重要な知見として、青



**Fig. 6-1** ラン藻 A. platensis の Fluorescence Decay-Associated Spectra.

色光は励起エネルギー移動過程を阻害する方向に働くこと,が得られた(1).この性質は 培養光の光量には依存しなかった.また,フィコビリンからのエネルギー移動は,「フィコ ビリン→光化学系 I」のエネルギー移動と「フィコビリン→光化学系 II→光化学系 I」のエ ネルギー移動のバランスでコントロールされており,光化学系 I に用いられるエネルギーの 相対量は培養光質・光量に依存しなかった.現在,培養光として太陽光を用い, A. platensis を効率よく培養する方法を模索中である.

クロロフィル b を持つ特異なラン藻 Prochloron (2) の光合成初期過程について解析を 行い, ラン藻の色素系にクロロフィル a とは異なるクロロフィルを導入することの利点お よび問題点を検討した.

#### b. 藻類の光エネルギー捕集の環境適応

培地に含まれるイオン量とラン 藻におけるエネルギー移動過程の相 関を検討した. ラン藻 Synechococcus PCC7002 の場合,窒素欠乏下ではフィ コビリンの形成が阻害され、フィコビ リンからクロロフィルへのエネルギ ー移動の効率が低下した.また、リン 欠乏下では, 色素タンパク質複合体間 の相互作用が弱くなる傾向があるこ とがわかった. ラン藻 A. platensis を海 水培地で培養すると,フィコビリンの 形成が阻害されると共に、低エネルギ ークロロフィルの形成が阻害され, エ ネルギー移動過程が大きく変化した (Fig. 6-2). ラン藻 A. platensis は海水中 では強光下で生育しないことが知ら れているが、この低エネルギークロロ フィル形成が、強光耐性に関与してい るものと思われる. 今後, 海水中でラ ン藻A. platensisを培養するための光質 を検討していく.





#### (7) 張嘉修グループ

#### 研究目的・方法

本研究では微細藻由来の炭水化物(デンプン,グリコーゲン,セルロース)の供給量 の向上を目指し、シアノバクテリア以外の海洋性微細藻類からのバイオエタノール生産技 術の確立を目指している.本年度は単離した台湾在来緑藻由来の炭水化物からのバイオエ タノール生産技術の開発を行い、下記の成果を得た.

#### 結論

#### a. 炭水化物高蓄積株 Chlorella vulgaris FSP-E の培養手法の確立

C. vulgaris FSP-E 株の培養条件を、光強度、藻体濃度、窒素濃度、窒素濃度制限期間の観 点から検討した. Figure 7-1 に示したように 2%CO<sub>2</sub>、光強度 450 µmol photons/m<sup>2</sup>/s の条件下で 窒素濃度制限によりタンパク質含有量は乾燥重量あたり 58.8%から 20.1%まで減少したが、 炭水化物含有量は 13.3%から 54.4%まで増加した. このときのバイオマス生産速度と炭水化 物生産速度はそれぞれ 1.363 g/L/d と 0.687 g/L/d であった. 4 日間の窒素欠乏処理により炭 水化物含有量は乾燥藻体重量の 50.4%、デンプン含有量は 31.2%に達した (Table 7-1). 組成 分析の結果、炭水化物中の 93.1%がグルコースからなることを見出した. これらの結果より、 C. vulgaris FSP-E 株がバイオエタノール生産の炭素源として有望であることが明らかとなっ た (8).



**Fig. 7-1** Time-course profiles of nitrate concentration, protein content, carbohydrate content, and lipid content during the growth of *C. vulgaris* FSP-E. (Light source: TL5; total light intensity = 450  $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s; CO<sub>2</sub> aeration = 2.0%; CO<sub>2</sub> flow rate = 0.2 vvm)

Components	Composition based on dry								
	cell mass (%, w/w)								
Carbohydrates	50.39±0.44								
Starch	31.25±1.28								
Glucose	46.92±0.44								
Xylose+Galactose	3.023±0.16								
Rhamnose	$0.447 \pm 0.09$								
Protein	23.28±0.03								
Lipid	11.59±1.55								
Others	14.74±1.90								

**Table 7-1** Characterization of biochemical composition for indigenous *C. vulgaris* FSP-E obtained from the batch culture during 5.25 days (nitrogen starvation = 4 days) (Light source: TL5; total light intensity = 450 $\mu$ mol photons/m<sup>2</sup>/s; inoculation = 0.14 g/L; CO<sub>2</sub> aeration = 2.0%; CO<sub>2</sub> flow rate = 0.2 vvm)

#### b. Chlorella vulgaris FSP-E の糖化条件の検討

培養後の C. vulgaris FSP-E を 10 g/L の細胞濃度で酢酸バッファーに懸濁し, 10 分間 超音波で処理した.次に 121°C で 20 分間オートクレーブし, 45°C, 200rpm で撹拌しな がら,糖化酵素ミックスを加えた. Figure 7-2 に C. vulgaris FSP-E 細胞内に含まれる全 グルコースに対して,糖化処理により得られたグルコースの収率と細胞内に含まれる 全還元糖に対して,得られた還元糖の収率を示した.糖化酵素ミックスは Pseudomonas sp. CL3 strain の培養液上清を濃縮し,調整した.Enzyme 1 (0.65 U/mL endoglucanase, 1.5 U/mL β-glucosidase, 0.09 U/mL amylase) は BHM 培地で培養した Pseudomonas sp. CL3 株 の培養液上清,Enzyme 2 (0.65 U/mL endoglucanase, 0.3 U/mL β-glucosidase, 0.75 U/mL amylase) はデンプンを多く含む BHM 培地で培養した Pseudomonas sp. CL3 株の培養液 上清から調整した.Enzyme 1 で処理 1 日後の還元糖収率は 69.8%であったのに対し, グルコース収率は 30.5%であった.これらのことから Enzyme 1 の酵素活性は C. vulgaris FSP-E からグルコースを得るためには不充分であった.一方,Enzyme 2 で処理した場 合,処理後 1 日後のグルコース収率が 79.1%であり,Enzyme 1 の 2 倍程度の活性を示 した.また処理後 3 日後には 90.0%のグルコース収率を示した.したがって,Enzyme 2 によって C. vulgaris FSP-E からグルコースを得られることがわかった.

#### c. Chlorella vulgaris FSP-E バイオマス濃度が糖化酵素ミックスの糖化効率に及ぼす影響

培養後の C. vulgaris FSP-E を 10~40 g/L の細胞濃度で酢酸バッファーに懸濁し,10 分間超音波で処理した後,121°C で 20 分間オートクレーブし,45°C で 200 rpm で撹拌 しながら,Enzyme 2 で処理した.そして Chlorella vulgaris FSP-E バイオマス濃度が糖化 効率に及ぼす影響を Figure 7-3 に示した.10 g/L から 20g/L に細胞密度を増加させても, グルコース収率は 90%に維持されたが,20 g/L から 40 g/L に増加させたところ,60% 近くまで低下した. Enzyme 2 での糖化条件下では 20 g/L の最適なバイオマス濃度であった.



Fig. 7-2 Effect of enzymatic composition on glucose and total sugars yield. (Enzyme 1 contains endoglucanase: 0.65 U/mL,  $\beta$ -glucosidase: 1.50 U/mL, amylases: 0.09 U/mL; Enzyme 2 contains endoglucanase: 0.65 U/mL,  $\beta$ -glucosidase: 0.30 U/mL, amylases: 0.75 U/mL; Control means that non-added enzyme and without pretreatment)



Fig. 7-3 Effect of microalgal biomass concentration (or biomass-to-enzyme ratio) on glucose concentration and glucose production yield via enzymatic hydrolysis using enzyme 2. (Enzyme 2 is consisting of endoglucanase: 0.65 U/mL,  $\beta$ -glucosidase: 0.30 U/mL, Amylase: 0.75 U/mL)

# d. 酸濃度とバイオマス濃度が酸加水分解効率に及ぼす影響

微細藻類に含まれる炭水化物(主にデンプンおよびセルロース)を酵母などの発酵 微生物が資化できる単糖まで分解するために酵素処理以外にも酸加水分解が用いられ ている.培養後の C. vulgaris FSP-E を凍結乾燥させた後,0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,3.0, 5.0% (v/v)硫酸に懸濁し,121℃で20分間オートクレーブした.加水分解後のサンプ ルの上清のグルコース量および全糖量を調べたところ,硫酸濃度を上げることで,グ ルコース収率が10.0%から96.0%に向上し,2%以上の濃度の硫酸ではほぼ100%の収率 が得られた(Fig. 7-4).環境影響,生産コストの面から考えて,1%硫酸を用いた方法 が最もコスト効率の良い加水分解法であるとわかった.

バイオマス濃度を 10 g/L から 60 g/L に増加させることで加水分解効率は 98.0%から 93.6%にわずかに低下し, 80 g/L に増加させることで 76%に低下することが分かり (Fig. 7-4b),最適なバイオマス濃度は 50-60 g/L であると明らかになった.



**Fig. 7-4** Effect of (a) sulfuric acid concentration and (b) microalgal biomass concentration (or biomass-to-acid ratio) on acidic hydrolysis efficiency of *C. vulgaris* FSP-E

e. *C. vulgaris* FSP-E を炭素源とした SHF と SSF プロセスでの酸加水分解, 酵素加水分解 によるエタノール生産

乾燥重量あたり 46.7%の炭水化物, 43.5%のグルコースを含む C. vulgaris FSP-E を炭

素源とした SHF(Separate hydrolysis and fermentation: 糖化後発酵)プロセスでの Zymomonas mobilis ATCC 29191 によるエタノール生産を行った(Fig. 7-5a). 培養後の C. vulgaris FSP-E を 20 g/L の細胞濃度で酢酸バッファー(pH 6)に懸濁し, 10 分間超音 波で処理した後, 121°C で 20 分間オートクレーブし, 45°C, 200rpm で撹拌しながら, Enzyme 2(0.61 U/mL endoglucanase, 0.3 U/mL β-glucosidase, 0.75 U/mL amylase)で 48 時 間処理した. その結果グルコース濃度は 7.8 g/L, グルコース収率は 87.2%であった. 得られた糖化液を炭素源として, 30°C で Z. mobilis によるエタノール生産を行ったとこ ろ, 3.6 g/L のエタノールが生産され, 消費グルコースあたりのエタノール収率は 89.3% となった. 酵素加水分解による C. vulgaris FSP-E に含まれるグルコースあたりのエタノ ール収率は 80%であった.

また,乾燥重量あたり 50.9%の炭水化物,48.0%のグルコースを含む *C. vulgaris* FSP-E を炭素源とした SSF (Similtaneous saccharification and fermentation:同時糖化発酵) プロセスでの *Z. mobilis* ATCC 29191 によるエタノール生産を行った (Fig. 7-5b). 培養 後の *C. vulgaris* FSP-E を 20 g/L の細胞濃度で酢酸バッファー (pH 6) に懸濁し,10 分 間超音波で処理した後,121°C で 20 分間オートクレーブした懸濁液を炭素源として, Enzyme 2 (0.61 U/mL endoglucanase, 0.3 U/mL β-glucosidase, 0.75 U/mL amylase) を加え, 30°C で *Z. mobilis* によるエタノール生産を行った.グルコース濃度はエタノール生産開 始 12 時間までは 0.5 g/L だったが,その後,徐々に減少し,検出限界以下となった.36 時間後にエタノール濃度は 4.2 g/L となり,バイオマス乾燥重量あたりのエタノール生 産量は 0.21 g ethanol/g dry biomass であった.36 時間以上の発酵でエタノール生産量は 増加せず,最大のエタノール濃度は 4.3 g/L であり,SSF プロセスでのエタノール収率 は SHF プロセスでのそれよりも高く,92.3%であった.

さらに希酸前処理後の C. vulgaris FSP-E を初発原料とし、SHF プロセスでの Z. mobilis ATCC 29191 によるエタノール生産を行った (Fig. 7-6). C. vulgaris FSP-E を凍結 乾燥させた後、1.0% (v/v) 硫酸に懸濁し、121°C で 20 分間オートクレーブした処理液 (グルコース濃度 23.6 g/L) を炭素源とした. そして、発酵開始 6 時間後に 11.7g/L の エタノールを生産することに成功し、対糖エタノール収率は 97.0%を示した. また C. vulgaris FSP-E に含まれるグルコースあたりのエタノール収率は 87.6%であった. そし て本研究で得られた結果を従来の緑藻を炭素源としたエタノール生産の結果と比較し た (Table 7-2). 赤字で示した本研究で得られたほとんどの結果より高い値 (0.23 g ethanol/ g dry biomass) を示した. これらの結果より台湾在来種のバイオエタノール生産への適用性 の高さが明らかになった (9).



**Fig. 7-5** Time courses of ethanol and glucose production by *Z. mobilis* cells via (a) SHF and (b) SSF process (Substrate: 20 g/L of pretreated microalgal biomass; enzyme dosage: endoglucanase: 0.65 U/mL,  $\beta$ -glucosidase: 0.30 U/mL, Amylase: 0.75 U/mL)



**Fig. 7-6** Effect of acid hydrolysis on microalgal biomass for ethanol production by SHF process. (Control means that fermentation with original incubation medium)

 Table 7-2 Comparison of the performance of ethanol concentration and ethanol yield of indigenous C.

 vulgaris FSP-E via different hrdrolysis methods with the performance from other relevant literatures

Hydrolysis method	Hydrolysis sources	Hydrolysis type	Initial algal biomass concentration	Glucose (g/L)	Ethanol (g/L)	Ethanol yield (g ethanol/
	<u> </u>	<u>arr</u>	(g/L)			(g algae))
Enzymatic	Cellulases + Amylases	SHF	50	N.D	N.D	0.080
Two-stage <sup>a</sup>	Sulfuric acid + Cellulases	SHF	N.D	5.4	2.02	0.079
Physical	Supercritical CO <sub>2</sub>	SHF	10	N.D	3.83	0.383
Enzymatic	Amylases + Glucanase + Xylanase	SHF	22	8.6	N.D	N.D
Thermal -chemical	Sulfuric acid	SHF	50	28.5	14.6	0.292
Enzymatic	Amylases	SHF	50	N.D	11.73	0.235
Enzymatic	Cellulases + Xylanases + Amylases	SHF	100	23.3	N.D	N.D
Enzymatic	Cellulases + Amylases	SHF	20	7.78	3.55	0.178
Enzymatic	Cellulases + Amylases	SSF	20	N.D	4.27	0.214
Chemical	Sulfuric acid	SHF	50	23.6	11.66	0.233

N.D: not determined

<sup>a</sup>: Algal biomass was homogenized in a homogenizer.

<sup>b</sup>: The extracted microalgal biomass was obtained after supercritical oil extraction process.

<sup>c</sup>: Algal biomass was pretreated by mechanical disintegration.

# §3. 成果発表等

(3-1)原著論文発表

論文詳細情報

- Seiji Akimoto, Makio Yokono, Fumiya Hamada, Ayaka Teshigahara, Shimpei Aikawa, Akihiko Kondo, "Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy", Biochimica et Biophysica Acta, 1817, 2012, 1483–1489
- Fumiya Hamada, Makio Yokono, Euichi Hirose, Akio Murakami, Seiji Akimoto, "Excitation energy relaxation in a symbiotic cyanobacterium, *Prochloron didemni*, occurring in coral-reef ascidians, and in a free-living cyanobacterium, *Prochlorothrix hollandica*", Biochimica et Biophysica Acta, 1817, 2012, 1992–1997
- Zhi-Bin Wang, Pei-Si Le, Nan Ge, Qiu-Yue Nie, He-Ping Li, and Cheng-Yu Bao, "One-dimensional modeling on the asymmetric features of a radio-frequency atmospheric helium glow discharge produced using a co-axial-type plasma generator", Plasma Chemistry and Plasma Processing, 32 (4), 2012, 859-874
- 4. He-Ping Li, Zhi-Bin Wang, Nan Ge, Pei-Si Le, Hao Wu, Yuan Lu, Li-Yan Wang, Chong Zhang, Cheng-Yu Bao, Xin-Hui Xing, "Studies on the physical characteristics of the radio-frequency atmospheric-pressure glow discharge plasmas for the genome mutation of *Methylosinus trichosporium*", IEEE Transactions on Plasma Science, 40 (11), 2012, 2853-2860
- He-Ping Li, Zhi-Bin Wang, Pei-Si Le, Nan Ge, Cheng-Yu Bao, "Characteristics of radio frequency atmospheric pressure glow discharges with different electrode configurations", High Voltage Engineering, 38, 2012, 1588-1594
- Daisuke Takagi, Hiroshi Yamamoto, Katsumi Amako, Amane Makino, Toshio Sugimoto, Chikahiro Miyake, "O<sub>2</sub> supports 3-phosphoglycerate-dependent O<sub>2</sub> evolution in chloroplasts from spinach leaves", Soil Science and Plant Nutrition, 58, 2012, 462-468
- Chikahiro Miyake, Yuji Suzuki, Hiroshi Yamamoto, Katsumi Amako, Amane Makino, "O<sub>2</sub>-enhanced induction of photosynthesis in rice leaves: the Mehler-ascorbate peroxidase (MAP) pathway drives cyclic electron flow within PSII and cyclic electron flow around PSI", Soil Science and Plant Nutrition, 58, 2012, 718-727

- Shih-Hsin Ho, Shu-Wen Huang, Chun-Yen Chen, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo, and Jo-Shu Chang, "Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E", Bioresource Technology, 2013 (Published online; http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.100).
- Shih-Hsin Ho, Shu-Wen Huang, Chun-Yen Chen, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo, and Jo-shu Chang, "Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock", Bioresource Technology, 2013, (published online; http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech. 2012.10.015)
- Ancy Joseph, Shimpei Aikawa, Kengo Sasaki, Fumio Matsuda, Tsutomu Tanaka, Akihiko Kondo, "Utilization of lactic acid bacterial genes in *Synechocystis* sp. PCC6803 for the production of lactic acid.", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry., in submission (under revision)
- 11. Shimpei Aikawa, Ancy Joseph, Ryosuke Yamada, Yoshihiro Izumi, Takahiro Yamagishi, Fumio Matsuda, Tomohisa Hasunuma, Hiroshi Kawai, Jo-shu Chang, Akihiko Kondo, "Direct conversion from Spirulina to ethanol without pretereatment and enzyme hydrolysis processes." in submission (under revision)
- Katsunori Yoshikawa, Takashi Hirasawa, Kenichi Ogawa, Yuki Hidaka, Tsubasa Nakajima, Chikara Furusawa, Hiroshi Shimizu, "Integrated transcriptomic and metabolomic analysis of the central metabolism of *Synechocystis* sp. PCC 6803 under different trophic conditions", Biotechnology Journal, 2013, (published online; DOI: 10.1002/biot.201200235)

# (3-2) 知財出願

① 平成24年度特許出願件数(国内 0件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)