

739 通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* の 2,3-butanediol 非生成株による高収率水素生産

○伊藤武志, 中島田豊, 柿菌俊英, 西尾尚道 (広大・院・先端・分子生命機能)

【目的】通性嫌気性細菌 *Enterobacter aerogenes* は自然界に広く存在しており、幅広い糖類の質化性を有している。また、通性嫌気性菌であるため培養が非常に容易であるとともに、生産物の水素による阻害が無いという特徴を持っている。しかし、水素収率が低いことが欠点として挙げられる。そこで本研究は、*E.aerogenes* HU101 を用い代謝工学的手法を用いて、2,3-ブタンジオール非生成株を作成し、グルコースからの水素生産に関する代謝解析を行った。

【方法と結果】本研究では、NTG (N-methyl-N-N-nitro-N-nitrosoguanidine) を変異剤として用い、アセトイン陽性反応であるフォーゲス・プロスカウエル (VP) 反応を利用し、2,3-ブタンジオール生成がみられない変異株 VP-1, VP-2 の 2 株を取得した。VP-1 株は 2,3-ブタンジオール収率だけでなく乳酸収率にも減少が見られ、酢酸収率が増加し、その結果、水素収率が約 2.0 molH₂/mol-glucose とこれまで確認された変異株より高い水素収率を示した。この値は水素収率減少の要因である、乳酸、2, 3-ブタンジオール生産をブロックした場合の理論値と一致する。また VP-2 株は水素収率が最大で 1.2 molH₂/mol-glucose で VP-1 株ほど高い増加が見られず、乳酸収率に高い増加が見られた。現在これら変異株の最適培養条件の検討を行っている。

Enhanced hydrogen production by 2,3-butanediol deficient mutants of *Enterobacter aerogenes*

○ Takeshi Ito, Yutaka Nakashimada, Toshihide Kakizono, Naomichi Nishio (Dept. Mol. Biotechnol., Grad. Sch. Adv. Sci. Matter, Hiroshima Univ.)

Key words *Enterobacter aerogenes*, 2,3-Butanediol, Voges-Proskauer test, Hydrogen production

741 Genetic modulations to increase antithrombotic hirudin production in recombinant *saccharomyces cerevisiae*

○Jin-Ho Seo, Myoung-Dong Kim, Yung-Jin Jo, Kwang-Hyun Cha (Dept. Food Sci. Technol. Sch. Agric. Biotech., Seoul Natl. Univ., Korea)

Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains were developed to overproduce an anticoagulant hirudin. The delta-sequences of the yeast retrotransposon *Ty1* and *URA3* were used as target sites for a hirudin expression cassette. High copy-number transformants were successfully selected using a dominant selection antibiotic, G418. The copy numbers of the hirudin expression cassette integrated into delta-sequences of the yeast chromosome ranged from five to ten copies per cell. Production of hirudin in the delta-integrated recombinant *S. cerevisiae* system increased over twofold compared with the YE_p-based episomal hirudin expression system. A linear relationship between the copy number of the hirudin expression cassette and hirudin expression level was observed up to 10 copies. A double delta system truncated with the unnecessary bacterial genes and consequently reduced insert size for integration showed a fourfold increase in transformation efficiency at given DNA concentrations and as a result, the constructed recombinant yeast strain had a 1.3-fold enhancement in hirudin expression level compared with a single delta system.

Genetic modulations to increase antithrombotic hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

○ Jin-Ho Seo, Myoung-Dong Kim, Yung-Jin Jo, Kwang-Hyun Cha (Dept. Food Sci. Technol. Sch. Agri. Biotech., Seoul Natl. Univ., Korea)

Key words Hirudin, *Saccharomyces cerevisiae*, Copy-number, Integration, Mitotic stability, G418

740 グルコースを基質とした水素 —メタン二段階発酵システムの開発

○南 久生, 中島田豊, 柿菌俊英, 西尾尚道 (広大・院・先端・分子生命機能)

【目的】当研究室では以前から通性嫌気性菌 *Enterobacter aerogenes* を用いた水素生産を検討してきた。*E.aerogenes* は糖より高速に水素を生産するとともに有機酸、アルコールを生産する。そこで、*E.aerogenes* を用いてグルコースよりまず水素を生産し、その培養廃液に含まれる副産物をメタン発酵しメタンとしてエネルギー回収を行なう二段階発酵システムを開発することとした。

【方法および結果】メタン発酵は東広島市内の食品製造工場より採取したメタン発酵汚泥を UASB リアクター (800 ml) を用い、人工廃液で馴養した。馴養の結果、*E.aerogenes* が生産する乳酸、酢酸、2,3-ブタンジオール、エタノールをほぼ完全にメタン化した。水素発酵は菌体充填床型リアクター (60 ml) を用い、野生株と当研究室の伊藤によって作製された二種類の 2,3-ブタンジオール非生成株を用い連続培養したところ、野生株が一番効率良く水素を生産した。野生株を用い 10 g/l の基質濃度で希釈率が 0.93(h⁻¹) のとき 28 mmol/l/h の水素生産速度に達した。副産物としてギ酸 8 mM、乳酸 11 mM、酢酸 14 mM、2,3-ブタンジオール 24 mM、エタノール 37 mM が生産された。この培養廃液をメタン発酵したところ、ほぼ完全に副産物を消費し、メタンを生成した。現在、UASB メタン発酵条件を検討中である。

Hydrogen and methane production from glucose using two step fermentation system

○ Hisao Minami, Yutaka Nakashimada, Toshihide Kakizono, Naomichi Nishio (Dept. Mol. Biotechnol., Grad. Sch. Adv. Sci. Matter, Hiroshima Univ.)

Key words *Enterobacter aerogenes*, hydrogen, methane, two step fermentation

742 微生物変換による L-リジンからの L-ホモグルタミン酸の生産

藤井 匡, ○伊藤将士, 町田和弘, 熊沢雅輝, 上松 仁, 野村秀雄, 恒川 博 (メルシャン・生物資源研)

【目的】我々はキラルな医薬品の原料として重要な L-ホモグルタミン酸 (L-HG) が L-リジンから *Flavobacterium lutescens* を用いた微生物変換によって生産できること、さらに、この変換反応を触媒する酵素 LAT と P6C デヒドロゲナーゼ (PCD) の遺伝子 (lat, pcd) について既に報告している (1, 2)。今回は L-HG の生産性の向上を目指して組換え *F. lutescens* の作成ならびに変換培養条件の最適化を行なった。

【方法と結果】L-HG 変換反応では PCD が律速になっていたため、lat と pcd を載せたプラスミド pCF341 を *F. lutescens* に導入して wild/341 株を作製し L-HG の生産速度を上げた。次に L-HG の蓄積量上げるために wild/341 株を用いて変換培養条件の検討を行い、グルタミン酸と金属塩の添加効果を見いだした。さらに、高濃度のリジン及び NH₄Cl による変換への阻害が認められたため、その解除を目的として NTG 処理により野生株にリジン耐性と NH₄Cl 耐性を付与した EN6 株を宿主とした EN6/341 株を作製した。こうして最適化された培養条件で EN6/341 株は約 40g/L の L-HG を生産した。(1) J. Biochem. 128, 391-397 (2000). (2) J. Biochem. 128, 975-982 (2000).

Bioconversion of L-lysine to L-homoglutamic acid

Tadashi Fujii, ○ Masashi Itoh, Kazuhiro Machida, Masateru Kumazawa, hitosi Agematu, Hideo Nomura, Hiroshi Tsunekawa (Mercian Corp. Biores. Lab.)

Key words L-ホモグルタミン酸, L-2-アミノアジピン酸, L-リジン, 微生物変換, キラルビルディングブロック