

2D10-4 馬乳酒から分離した *Lactobacillus* sp. 0-1 株の溶存酸素条件による代謝産物の変化

○多賀 直彦¹, 大野 哲志¹, 松崎 弘美²
(¹九州東海大農・バイオ,²熊本県大・環境共生)

【目的】当研究室でモンゴルの馬乳酒から分離した乳酸菌は、広い初発pHと培養温度で高い増殖能を示し、振とうフラスコ培養と静置フラスコ培養で同様に増殖したので、様々なストレスに耐性を有することが考えられた。本研究は、馬乳酒から分離した乳酸菌の代謝産物に対して酸素ストレスが与える影響の検討を目的として、発酵槽培養により溶存酸素濃度飽和および制限条件で培養した。
【方法・結果】使用菌株は、16S rDNA の部分配列解析で同定された *Lactobacillus* sp. 0-1株を用いた。発酵槽での培養試験は、DO電極で測定した溶存酸素濃度飽和および制限条件で pH 4～7 制御および無制御で行い、培地は 10 g/L-glucose GYP培地を用いた。有機酸濃度はHPLCあるいは酵素法で測定し、エタノール濃度は酵素法で測定した。その結果、pH無制御あるいは低pH条件では乳酸生産速度は低くなったが、他のpH制御培養では良好に乳酸を生産した。溶存酸素濃度飽和条件では制限条件より乳酸生産速度は劣ったが良好に乳酸を生産した。全ての培養でエタノールと酢酸は生産しておらず、乳酸のD/L比は1.06から1.22の範囲だった。以上の結果から、本研究に用いた株は、酸素ストレスにより最終代謝産物が酢酸およびエタノールに変化しないことが示された。

Metabolites changes of *Lactobacillus* sp. 0-1 isolated from fermented mare milk by dissolved oxygen levels

○Naohiko TAGA¹, Tetsushi OHNO¹, Hiromi MATSUSAKI²
(¹Dept. Biosci., Sch. Agric., Kyushu Tokai Univ., ²Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

Key words fermented mare milk, lactic acid bacteria, aerobic culture

2D11-1 遺伝子組み換えワイン酵母による効率的な L- 乳酸生産

○石田 亘広¹, 齋藤 聡志², 徳弘 健郎¹, 長森 英二¹, 大西 徹², 北本勝ひこ³, 高橋 治雄¹
(¹豊田中研,²トヨタ自動車,³東大・院・農)

【目的】ポリ乳酸は、CO₂循環型（カーボンニュートラル）社会の構築に貢献できる材料として注目されている。原料であるL-乳酸の生産技術としては、乳酸菌を用いた検討が主流である。しかし乳酸菌の場合、高い栄養要求性や高密度培養といった課題が生じている。L-乳酸の低コスト生産技術確立のために、我々は遺伝子組み換え酵母を利用した生産プロセスの開発に取り組んでいる。
【方法】遺伝子組み換え酵母によるL-乳酸の生産は、従来、2 μ DNAを含んだYEpベクターでの試みが主流であった。今回我々は、酵母XII番染色体に位置する *pyruvate decarboxylase 1* (*PDC1*) プロモーター下流に *L-lactate dehydrogenase* (*LDH*) 遺伝子を導入し、*PDC1* ORF遺伝子のみが破壊される遺伝子発現系を試みた。本手法で作製した組み換え酵母は、導入された *LDH* 遺伝子が内在の *PDC1* プロモーター制御下で発現される特徴をもつ。
【結果】本手法で作製した組み換え株と、YEpベクターを使って作製した株とを比較した。その結果、*PDC1* 部位への染色体導入株では、*LDH* 遺伝子が染色体中に1～2コピーしか挿入されていないにも関わらず、高いLDH活性を示した。また、10%グルコース含有YPD培地による発酵試験の結果、高いL-乳酸生産を確認することができた。

Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered wine yeast

○Nobuhiro ISHIDA¹, Satoshi SAITOH², Kenro TOKUHIRO¹, Eiji NAGAMORI¹, Toru ONISHI², Katsuhiko KITAMOTO³, Haruo TAKAHASHI¹
(¹Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ²Toyota Motor Corp., ³Grad. Sch. Agri. Life Sci, Univ. Tokyo)

Key words lactic acid fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, genome integration

2D10-5 Production of Itaconic Acid using Indonesia Sago Starch by *Aspergillus terreus* TN484-M1

○Lies DWIARTI¹, Megumi OOTSUKA², Shigenobu MIURA³, Mitsuyasu OKABE², Tomohiro ARIMURA³
(¹Science of Biological Resources, The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, ²Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422-8529, ³Tokyo Laboratories, Musashino Chemical Laboratory Ltd., 16-2 Miyamae-1 Chome, Suginami-ku, Tokyo 168-0081)

We analyzed chemical composition of Indonesia sago starch such as water content, dietary fiber, protein content, ash content and crude lipid content. Sago starch was analyzed using HCl, HNO₃, alpha-amylase (Spitase HS), glucoamylase (XL-4) and *Acromonium* cellulase, with variations in the pH and concentration. Hydrolysis using 0.5 U/ml of glucoamylase exhibited the highest of itaconic acid production up to 78.2 g/l or 55.9% based on the initial sago starch concentration. Design of experiment for medium composition gave 81 variations with the highest of itaconic acid production was 60.56% based on the initial sago starch concentration, when the production medium only contained 80 g/l of sago starch and 2.4 g/l of MgSO₄·7H₂O mineral. The best hydrolysis agent and the optimum medium composition were used for scale-up of itaconic acid fermentation in an 3-l airlift bioreactor (ALB). The itaconic acid production in the 3-l ALB was 46.7 g/l from 140 g/l of sago starch concentration.

Production of itaconic acid using indonesia sago starch by *Aspergillus terreus* TN484-M1

○Lies DWIARTI¹, Megumi OOTSUKA², Shigenobu MIURA³, Mitsuyasu OKABE², Tomohiro ARIMURA³
(¹Science of Biological Resources, The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, ²Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, 836 Ohya, Shizuoka 422-8529, ³Tokyo Laboratories, Musashino Chemical Laboratory Ltd., 16-2 Miyamae-1 Chome, Suginami-ku, Tokyo 168-0081)

Key words Indonesia sago starch, Itaconic acid, *Aspergillus terreus* TN484-M1, Airlift bioreactor

2D11-2 遺伝子組み換えワイン酵母による高光学純度な L- 乳酸の効率的生産

○齋藤 聡志¹, 石田 亘広², 大西 徹¹, 徳弘 健郎², 長森 英二², 北本勝ひこ³, 高橋 治雄²
(¹トヨタ自動車,²豊田中研,³東大・院・農)

【目的】自動車用材料に展開可能な低コストで高性能なポリ乳酸を得るためには、モノマーであるL-乳酸の高効率生産と高光学純度を達成する必要がある。我々は、酵母を用いたL-乳酸生産の開発に取り組んでおり、先の演者らにおいて、*PDC1* プロモーターを用いた *LDH* 遺伝子の染色体導入が、L-乳酸の効率的生産に寄与することを報告した。さらなる高生産を目指し、*LDH* 遺伝子の導入コピー数を増やした株を構築し、本株のL-乳酸生産量および光学純度について解析を行った。
【方法】ワイン酵母における *PDC1* mRNAの発現を、RT-PCRによって解析した。次に、先の報告で述べた乳酸生産酵母を宿主に、*LDH* 遺伝子の導入コピー数を増やした組み換え酵母を作製した。本株について発酵試験を行い、L-乳酸の生産量および光学純度について測定した。
【結果】ワイン酵母におけるRT-PCRの結果、*PDC1* は*TDH3* よりも高発現していることが確認された。本結果は、高い糖濃度条件下において、*PDC1* プロモーターが高発現プロモーターとして機能することを示唆している。発酵試験の結果、導入コピー数の上昇に比例して、L-乳酸生産の向上が確認された。また得られたL-乳酸は、高い光学純度を示していた。

Genetically engineered wine yeast produced high concentration of L-lactic acid with extremely high optical purity

○Satoshi SAITOH¹, Nobuhiro ISHIDA², Toru ONISHI¹, Kenro TOKUHIRO², Eiji NAGAMORI², Katsuhiko KITAMOTO³, Haruo TAKAHASHI²
(¹Toyota Motor Corp., ²Toyota Cent. R&D Labs. Inc., ³Grad. Sch. Agri. Life Sci, Univ. Tokyo)

Key words lactic acid fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, optical purity