

1D10-2 Proteome analysis of a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum* cultured under biotin-sufficient conditions

○Liyuan LI, Masaru WADA, Atsushi YOKOTA
(Lab. Microb. Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

【Aim】 *C. glutamicum* F172-8 is a H⁺-ATPase-defective mutant obtained spontaneously from *C. glutamicum* ATCC 14067. This mutant showed higher rates of both glucose consumption and glutamate production than the parent under biotin-limited conditions. Under biotin-sufficient conditions (60 μg/L biotin), where no glutamate production was observed, this mutant showed 2.6-fold higher glucose consumption rate than the parent. To elucidate metabolic changes taking place in the mutant under 60 μg/L biotin, proteome analysis was conducted.【Method and Result】 Fermentation analyses demonstrated that the mutant produced about 5 times as much lactate and twice as much acetate as those produced by the parent. Based on the constructed proteome map of *C. glutamicum* ATCC 14067, quantitative proteome analysis of the cell samples from both exponential phase and stationary phase were carried out. In the mutant, several glycolytic enzymes, TCA cycle enzymes, H⁺-ATPase subunits were found to increase at exponential phase, but no such difference was observed at stationary phase. On the other hand, fumarase, malate:quinone oxidoreductase and acetate kinase were expressed at higher level in the mutant than in the parent at both phases. These changes in proteomic signature will be discussed in relation to the enhanced glucose metabolism in the mutant.

Proteome analysis of a H⁺-ATPase-defective mutant of *Corynebacterium glutamicum* cultured under biotin-sufficient conditions

○Liyuan LI, Masaru WADA, Atsushi YOKOTA
(Lab. Microb. Physiol., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, H⁺-ATPase, proteomics

1D10-4 好塩性緑藻 *Dunaliella bardawil* からのアミノ酸アナログ耐性株によるプロリン高生産変異株の単離

○松谷 直樹, 柿園 俊英, 中島 豊, 西尾 尚道
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】好塩性緑藻 *D. bardawil* は、2～4Mの高い食塩濃度下でも増殖でき、また広い生育温度やpH領域を持つなど優れた環境適応性を備えている。これまで太陽光を用いた大規模開放系において高濃度 β-カロテンが生産されている。本研究では、本緑藻を用いて、従来の化学合成法・発酵法よりも安価なアミノ酸生産系を開発することを目的に、プロリン(Pro)生合成のフィードバック阻害を解除させたアミノ酸アナログ耐性株の単離を試みた。【方法及び結果】Proのアナログである L-Azetidine-2-carboxylic-Acid (AZC)、また、Pro 生合成経路上流のグルタミン酸に着目し、そのアナログである Glutaric acid(GA)の存在下で緑藻 UTEX2538 を培養した。寒天培地では AZC の最小増殖阻害濃度は約 25mM であった。種々の濃度系列の AZC 添加培地より AZC 耐性株のスクリーニングおよび Pro 生産株のスクリーニングと継代培養を行なった。GAについても同様の操作を行ない耐性株を単離した。その後、野生株 UTEX2538 と種々の濃度系列から単離した AZC耐性株、GA耐性株についてPro生産の比較・検討を行なった。

Isolation of proline overproducing mutants of *Dunaliella bardawil* isolated as two amino acid analog resistance

○Naoki MATSUTANI, Toshihide KAKIZONO, Yutaka NAKASHIMADA, Naomiti NISHIO
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Dunaliella bardawil*, proline, L-Azetidine-2-carboxylic-Acid, Glutaric acid

1D10-3 単細胞緑藻 *Haematococcus pluvialis* の従属栄養培養におけるアスタキサンチン生成の検討

○杉浦 俊浩, 柿園 俊英, 西尾 尚道, 中島 豊
(広島大院・先端・生命機能)

【目的】アスタキサンチン (ASX) は赤色のカロテノイドであり、強力な抗酸化作用を持つため食品添加物や医薬品としての需要が期待されている。ASXの生産源として、本緑藻はもっとも有望な微生物の1つであり、環境ストレスにより胞子嚢であるシスト細胞になると ASX を蓄積する。現在、太陽光または室内光を用いた大規模なカロテノイド生産が行われているが、光を用いる独立栄養培養は天候や細胞濃度による光の過不足の問題がある。これまでに酢酸を炭素源とした従属栄養培養によるASX生産を目的とし、比較的高温条件下で培養すると酢酸を培養途中に添加することでシスト化を促進できたが、加えた酢酸の取り込みが弱いという問題があった。そこで本研究では旺盛な酢酸資化性と ASX 生成を高く維持する従属栄養条件を検索することを目的とした。【方法と結果】*H. pluvialis* を炭素源として酢酸を加えたBM2培地において、種々の条件のもとで従属栄養培養を行い、酢酸を途中添加して細胞のシスト化を促進させる。そして、通気や振とう方法について検討を行い、添加した酢酸の資化能やアスタキサンチン含量への影響について検討した。

Astaxanthin formation under heterotrophic culture of a unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*

○Toshihiro SUGIURA, Toshihide KAKIZONO, Naomiti NISHIO, Yutaka NAKASHIMADA
(Dept. Mol. Biotech., Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, heterotrophy culture, cyst

1D10-5 ステビア熱水抽出発酵液由来乳酸菌の農薬減少効果

岡本 啓湖¹, ○古藤 康太郎¹, 木村 臣佑²
(¹福農高 専攻科, ²(株)ビーアンドエル)

【目的・方法】*Stevia rebaudiana* Bertonii の茎を主原料としたステビア熱水抽出発酵液の施肥により栽培された農産物中の残留農薬の未検出が市場で確認されている。本研究ではこの原因解明の為に、(1)ステビア熱水抽出発酵液より乳酸菌を純粋分離し、16S rDNA塩基配列解析により同定した。(2)有機塩素剤であるケルセン乳剤、合成ピレスロイド剤であるトレボン乳剤添加培地での分離菌の培養液中に含まれる 4,4'-Dichlorobenzophenone 及び Ethofenprox の各濃度を GCMS-QP2010 (島津製作所) により測定し、分離菌の農薬に対する減少率を検討した。(3)(2)で減少が確認された各農薬 (0.1～1000ppm) を含有した GYP 液体培地、農薬無添加 (対照) 培地の各 4.9ml に、分離乳酸菌液 0.1ml を添加後、30℃で3日間培養し、連日増殖能を OD₆₆₀ で測定後、対照培地との相対増殖能を算出し、その結果から分離菌の農薬減少効果と増殖能の関連について検討した。【結果】分離乳酸菌は 16S rDNA 全塩基配列解析結果より *Lactobacillus kefir* と 98% の相同性を示したが、系統樹上、及び API50CHL による炭水化物資化性能の結果では *Lactobacillus buchneri* に近縁であった。(*Lactobacillus* sp. FJAS201)。本菌は培養24時間で含有 4,4'-Dichlorobenzophenone を 11.72%、また Ethofenprox を 71.25% 減少させることが明らかになった。さらに同農薬含有培地での本菌の相対増殖能は、ケルセン乳剤及びトレボン乳剤の 0.1～100ppm 濃度範囲で農薬濃度上昇に伴い増加した。

Pesticide-decreasing ability of lactic acid bacterium isolated from the fermented hot-water extract of stevia-powder

Keiko OKATO¹, ○Yasutarou KOTOU¹, Shinsuke KIMURA²
(¹Fukuoka junior college of agriculture, ²Ltd. B and L)

Key words *Lactobacillus*