2Fa05 沖縄微生物ライブラリーの機能評価（土壌改良の可能性）

○松井 徹¹, 新里 尚也¹, 波平 知之¹, 渡嘉敷 唯章²,
豊里 哲也², 池端 真美², 高良 亮²
(¹琉大・熱生研, ²(株) トロピカルテクノセンター)

【目的】国内唯一の亜熱帯地域である沖縄地方から分離した微生物の利用を目的に検討を行い、ラセミフェニルコハク酸を立体選択的に分解する放線菌(1)、スルホランを分解する新種と考えられるプロテオバクテリア *Shinella yambaruensis* (2) 等について報告してきた。本報では、土壌改良への利用が期待できるインドール酢酸 (IAA) 生産菌などに関する検討を行った。

【方法及び結果】評価には、沖縄本島、八重山諸島を含む地域より収集した土壌から HV 培地を用いて分離した菌株ライブラリーを用いた。微生物の有する土壌改良機能として不溶性リン酸塩の可溶性活性 (プレート法)、Trpからの IAA 生産能 (HPLC法)、シデロフォア生産性 (プレート法) について評価した結果、リン酸 Ca 可溶性活性株約 140 株、IAA 生産株約 400 株、シデロフォア生産株約 40 株が得られた。Trpからの IAA 生産には 4 つの主要経路が報告されており、IAA 生産株については、IAA 生産経路中間体を基質とした IAA 生産能を評価し、経路を推定した。その結果、インドール 3-ピルビン酸を経由する菌が多数を占めたが、トリプタミン、インドール 3-アセトアミドを経由する菌が認められ、インドールアセトニトリルから IAA を生産する菌はなかった。また、リン酸塩可溶性活性、IAA 生産、シデロフォア生産のいずれも有する菌株が認められ、16SrRNA 塩基配列による系統解析により、*Pantoea* sp., *Stenotrophomonas* sp. 類縁菌と同定された。文献: 1) *Chemosphere*, 2) *IJSEM*

Phenotypic analysis for Okinawa-microbial-library (application as biofertilizer)

○Toru MATSUI¹, Naoya SHINZATO¹, Tomoyuki NAMIHIRA¹,
Tadaaki TOKASHIKI², Tetsuya TOYOSATO², Mami IKEHATA²,
Ryo TAKARA²
(¹TBRC, Univ. Ryukyus, ²Trop. Technol. Center, Ltd.)

Key words Okinawa, microbial library, indole acetic acid, phosphate solubilization

2Fa08 *Gluconobacter frateurii* による副生グリセリンを原料としたグリセリン酸生産

○羽部 浩, 福岡 徳馬, 北本 大, 榊 啓三
(産総研・環境化学)

【目的】石油資源のみに依存しない原料転換対策としてバイオリアファイナリーが注目されている。軽油代替のエコ燃料であるバイオディーゼル燃料 (BDF) の製造過程で必ず一割程度グリセリンが副生するため、その有効利用法の開発が求められている。そこで我々は副生グリセリンを原料とし、化学品や医薬品の中間体、化粧品素材として将来有望なグリセリン酸 (GA) の生産プロセスを開発した。

【方法及び結果】微生物保存機関より入手した酢酸菌 88 株について、GA 生産量、GA の光学純度、ジヒドロキシアセトン生成量等を測定した。そのうち GA 高生産株として選抜した *Gluconobacter frateurii* NBRC103465 株を用いて、5 L 容ジャーによる GA 生産条件の検討を行った。最適条件のもと 220 g/L の初発グリセリンから 92 g/L の GA が生産され、さらにグリセリンの供給法を改良することで培地中への蓄積量は 137 g/L に達した。電気透析と晶析法を組み合わせることで、簡便に純度の高い GA カルシウム塩が得られる。実際の BDF 製造プロセスから排出される副生グリセリンをほとんど前処理なしで原料とする手法も考案し、80 g/L 以上の GA 生産に成功している。なお本研究は、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 平成 20 年度産業技術研究助成事業の一環として実施したものである。

Production of glyceric acid by *Gluconobacter frateurii* using raw glycerol

○Hiroshi HABE, Tokuma FUKUOKA, Dai KITAMOTO,
Keiji SAKAKI
(ISC, AIST)

Key words glycerol, biodiesel fuel, glyceric acid, biorefinery

2Fa06 Optically active compounds production by *Pseudomonas putida* HKT554.

○Said RAMADHAN^{1,2}, Hirofumi MINAMI^{1,2},
Tomoyuki NAMIHIRA¹, Naoya SHINZATO¹,
Toru MATSUI^{1,2}, Yasuhiro TANAKA³
(¹TBRC, Univ. Ryukyus, ²Grad. Sch. Eng. & Sci, Univ. Ryukyus, ³Yamanashi Univ.)

Pseudomonas putida HKT554, isolated from Okinawa island as dibenzothiophene degradation showed a constitutive degradative activity for various aromatic compounds, such as naphthothiophenes. This activity is mainly based on naphthalene dioxygenase system, known as a biocatalyst with a wide substrate specificity and an unique catalytic activity. Here we report the possibility of water/solvent-two phase enantioselective-oxidation for volatile substrates with *P. putida* HKT554.

Styrene and thioanisole were used for volatile aromatic substrates in this study. HKT554 oxidized styrene and thioanisole to give R-phenylethanediol, and R-methylphenyl sulfoxide, respectively. Two-phase reaction or cultivation using hydrophobic solvent such as n-hexadecane significantly increased the production efficiency due to the prevention of the substrates volatilization. To further increasing the productivity, optimizing a medium composition for high cell density cultivation for strain HKT554, modified from the medium, TK25, which was reported for HCDC of recombinant *E. coli* K-12 (1). Among the compositions, high concentration of phosphate salt was inhibitory to the growth of strain HKT554. Combining this cultivation technique with the two phase system are currently under progress.

Ref. 1) T. Matsui et al. *J. Biotechnol.*, 134: 88-92 (2008), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 80:779-783 (2008)

Optically active compounds production by *Pseudomonas putida* HKT554.

○Said RAMADHAN^{1,2}, Hirofumi MINAMI^{1,2},
Tomoyuki NAMIHIRA¹, Naoya SHINZATO¹, Toru MATSUI^{1,2},
Yasuhiro TANAKA³
(¹TBRC, Univ. Ryukyus, ²Grad. Sch. Eng. & Sci, Univ. Ryukyus, ³Yamanashi Univ.)

Key words naphthalene dioxygenase, sulfoxidation, *Pseudomonas putida*, two-phase reaction

2Fa09 *Acetobacter* 属細菌における NAD⁺-ADH, PQQ-ADH 活性と酢酸生成との関連

○桜井 健太, 新井 博之, 石井 正治, 五十嵐 泰夫
(東大院・農生科・応生工)

酢酸菌はエタノールを酸化して酢酸を生成する。本研究では、*Acetobacter aceti* NBRC14818 と *Acetobacter pasteurianus* NBRC3283 を用いて、培養条件と酢酸生成との関係を調べることを目的とした。振とう培養下では、どちらの株も培養液中に酢酸を蓄積し、エタノール消費後蓄積した酢酸をさらに酸化する diauxic な生育を示した。静置培養下では *A. aceti* はエタノールを早く消費するにもかかわらず、培養液中に酢酸をあまり蓄積しなかった。一方、*A. pasteurianus* は振とう培養時と同様に培養液中に酢酸を蓄積した。NAD⁺-ADH と PQQ-ADH 活性を測定したところ、振とう培養下の *A. aceti* は *A. pasteurianus* よりも高い NAD⁺-ADH 活性と低い PQQ-ADH 活性を示した。静置培養下では、NAD⁺-ADH 活性が *A. pasteurianus* では検出されなかったのに対し、*A. aceti* では振とう培養時よりも高い活性が検出された。PQQ-ADH 活性については *A. pasteurianus* は *A. aceti* よりも高い値を示した。また、*A. aceti* は *A. pasteurianus* よりも高い菌膜形成性を示した。これらの結果から、静置培養下では NAD⁺-ADH 活性が酢酸の蓄積に影響を及ぼし、菌膜形成を促進することが示唆された。

Correlation between NAD⁺-ADH and PQQ-ADH activities and acetic acid production in *Acetobacter* bacteria

○Kenta SAKURAI, Hiroyuki ARAI, Masaharu ISHII,
Yasuo IGARASHI
(Dept. Biotech., Univ. Tokyo)

Key words *Acetobacter*, alcohol dehydrogenase, acetic acid, pellicle