

2P-1109 大腸菌の発酵生理学的解析に適した最少培地および培養条件の検討○紀平 知枝, 前田 壮矢, 吹谷 智, 和田 大, 横田 篤
(北大院・農・応生科)

【背景・目的】大腸菌を用いた発酵生産の効率化を達成する上で、実生産に近い高糖濃度バッチ培養条件において、合成培地を用いて発酵生理学的解析を行うことは、基礎的な知見を得るために重要である。そこで本研究ではバッチ培養に付随する様々な制限要因をできる限り除去し、速やかな生育と糖消費を達成する最少培地および培養条件を決定した。具体的には無機塩発酵培地をベースとしてジャー培養によりリン酸源濃度、微量要素添加および通気条件を検討し、生育、糖消費、呼吸活性、有機酸生成量を指標に最適化を行った。

【方法・結果】大腸菌野生株W1485株を50 g/Lグルコースを含む無機塩発酵培地を用い、溶存酸素濃度を一定以上に維持するDO-STAT条件でジャーファーメンターによるバッチ培養を行った。培地組成の検討を行い、微量要素（銅、亜鉛など）の添加で、生育速度および生育量、菌体当たりの酸素消費量が顕著に上昇することを認めた。次にリン酸源としてリン酸二カリウム濃度を検討したところ、1.5 g/L以上で生育および糖消費が改善された。しかし、一時的な酸素欠乏が観察され、ピルビン酸および酢酸の蓄積が見られたため、通気条件を検討したところ、2vvmの高通気条件下で良好な結果を得た。この培養条件で本株は速やかに増殖し、培養12時間後にグルコースを完全に消費した。このときの生育量はOD660nm値として35に達した。主要生成有機酸は α -ケトグルタル酸を検出した。

Optimization of culture conditions for physiological analysis of fermentation in *Escherichia coli*○Chie Kihira, Soya Maeda, Satoru Fukiya, Masaru Wada, Atsushi Yokota
(Divi. Appl. Biosci., Grad. Sch. Agric., Hokkaido Univ.)**Key words** *Escherichia coli*, minimal medium, batch culture, culture conditions**2P-1111 n-Decanoic acid を水酸化して 3-Hydroxydecanoic acid を生産する細菌の探索**○富永 祐希¹, 斉藤 駿², 本田 康博², 倉田 淳志¹, 岸本 憲明¹
(¹ 近大院・農・応用生命, ² 近畿大・農)

【背景・目的】ローヤルゼリーにのみ含まれる稀少脂肪酸10-hydroxy-2(*E*)-decanoic acid(10HDA)は、神経細胞分化促進作用を持つことが報告され、アルツハイマー病予防への応用が期待されている。しかし、ローヤルゼリーそのものが稀少品で、安定確保することが難しい。私たちは2(*E*)-Decanoic acid ethyl ester(2DAEt)を ω 水酸化して10HDAを生産、蓄積できる酵母、*Candida maltosa* KU83-26を獲得し、73 mM 2DAEtから46 mM 10HDAに変換する培養条件を確立した。本研究では、10HDAの生産に用いる基質2DAを*n*-decanoic acid(DA)から調製することを目的に、DAを3-Hydroxy decanoic acid(3HDA)に変換後、脱水して2DAを生成する方法を検討している。そこで、DAから3HDAを生産できる細菌を探索した。

【方法】菌株のスクリーニングには、近畿大学農学部裏山の土壌を約1 g使用した。土壌試料からDAを単一炭素源として生育するコロニーを釣菌し、MM培地に移植し48 h培養した。培養液中の脂肪酸は酢酸エチルで抽出し、抽出物は塩酸-メタノールでメチルエステル化し、GC/MS分析に供して、3HDAと同定した。3HDA生産株は16S rDNAのシーケンス解析を行って、属種を同定した。

【結果】約300のコロニーを獲得し、コロニーの培養液抽出物をGC/MS分析した結果、No. 17株が3HDAを生産していた。No. 17株は、16S rDNAのシーケンス解析の結果、*Pseudomonas putida* KT2440と100 %の相同性を示した。現在、変異導入などを行って、3HDAの生産力を向上させることを検討している。

Screening of bacteria producing 3-Hydroxydecanoic acid by hydroxylation of *n*-Decanoic acid.○YUKI TOMINAGA¹, SHUN SAITOU², YASUHIRO HONDA²,
ATUSHI KURATA¹, NORIAKI KISHIMOTO¹
(¹Grad. sch. Agric. Appl. Bio. Sci., Kinki Univ., ²Fac. Agric., Kinki Univ.)**Key words** hydroxylation, *Pseudomonas***2P-1110 *Acidomonas methanolica* MB58 のメタノール代謝と生育に及ぼす二酸化炭素の影響**○片山 寛子, 松崎 亮平, 二宮 佑梨花, 三井 亮司,
田中 三男
(岡山理大・理・生化)

【目的】*Acidomonas methanolica* MB58はメタノール以外のグルコースなどでも生育するグラム陰性の通性メチロトロフ細菌である。MB58株のC₁化合物代謝に関わる遺伝子群が一連のクラスターとして局在していることを明らかにしてきた。今回、さらに下流に二酸化炭素固定に関わる遺伝子群の存在が明らかとなった。このことからメタノール代謝に加え、最も酸化型のC₁化合物である二酸化炭素固定系までが近接して存在することの意義を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】MB58株は希薄な炭素源の固体培地に植菌しても生育が見られた。このことからメタノールとは別に生育基質として二酸化炭素固定を行っていることが考えられた。そこでメタノールを含む固体培地上の菌体量を高濃度二酸化炭素下と通常空気中で培養した場合で比較したところ、高濃度の場合に菌体量は著しく上昇していた。さらに二酸化炭素のみで生育可能であるか確認するため、炭素源を含まない培地で培養を行ったが生育はみられず、二酸化炭素固定にはメタノールなどのエネルギー源を必要とすることが示唆された。液体培養においても二酸化炭素を含まない空気を通気したところ、通常空気を通気した場合と比較して生育に明らかな遅れが見られた。このことから、C₁資化経路下流に見いだされた二酸化炭素固定遺伝子群とメタノール代謝が関連している可能性が示唆された。現在C₁化合物代謝に関連する酵素の誘導に二酸化炭素の存在がどのように影響するのか検討中である。

Effect of carbon dioxide for growth on methanol in *Acidomonas methanolica* MB58○HIROKO KATAYAMA, RYOHEI MATSUZAKI,
YURIKA NINOMIYA, RYOJI MITSUI, MITSUO TANAKA
(Dept. Biochem., Fac. Sci., Okayama Univ. Sci.)**Key words** carbon dioxide, methylotroph, *Acidomonas methanolica*, ribulose monophosphate pathway**2P-1112 ガスストリッピングを用いた組み替え大腸菌によるイソプロパノール生産**○猪熊 健太郎, 岡本 正宏, 花井 泰三
(九大院・農)

【目的】近年の不安定な原油価格、CO₂排出量削減の観点などからバイオアルコール生産に注目が集まっている。バイオアルコールとしては、現在のところエタノールが広く利用されているが、エタノールよりエネルギー密度が高く、吸水性も少ない等の利点から、より長い鎖長を有するアルコール生産の研究が行われている¹⁾。特に、イソプロパノールは、エタノールより一つ炭素原子が多い2級アルコールで、容易にプロピレンに変換可能であることから、バイオプラスチック材料として有望である。イソプロパノールは*Clostridium*属細菌によって生産されているが、生産量は十分ではない。我々は、大腸菌が、*Clostridium*属細菌と比較し、増殖速度が速く、遺伝子組換えもしやすいため、より有望なホストと考、*Clostridium*属細菌のイソプロパノール生産関連遺伝子を導入した組換え大腸菌を作成し、イソプロパノール生産に成功している²⁾。本研究では、この大腸菌を用いてイソプロパノール生産を向上させるために、ガスストリッピング法によるイソプロパノール分離回収を試みた。【結果および考察】組換え大腸菌によるイソプロパノール生産においては、生産物阻害が観測されたため、培養液中からガスストリッピング法によるイソプロパノールの分離を行い、トラップで回収した。その結果、従来の結果より、大幅な生産向上に成功した。1) S. Atsumi, T. Hanai, J. C. Liao, *Nature*, 451, 7174, 86-89 (2008) 2) T. Hanai, S. Atsumi, J. C. Liao, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 24, 7814-7818 (2007)

Isopropanol production by engineered *E. coli* using gas stripping○Kentaro INOKUMA, Masahiro OKAMOTO, Taizo HANAI
(Fac. Agric., Kyushu Univ.)**Key words** bioalcohol, iso-propanol, *E. coli*, gas stripping