1P-117 コリネ型細菌を用いたプロトカテク酸の生産

○岡井 直子¹, 竹嶋 康誠¹, 荻野 千秋², 近藤 昭彦²
 (¹神戸大・自科・研究環, ²神戸大院・工・応化)
 akondo@kobe-u.ac.jp

[目的] 化石資源は有限であり、化成品原料・プラスチック原料のバイオマスからの生産が望まれる。本研究ではポリマー原料となる芳香族化合物を、糖を原料として微生物により発酵生産することを目的とし、プロトカテク酸 (3,4-ジヒドロキシ安息香酸) の生産を検討した。プロトカテク酸は化成品のビルディングブロックやポリマー原料として有用な化合物である。プロトカテク酸はコリネ型細菌において4-ヒドロキシ安息香酸から変換される。そこでコリスミ酸から4-ヒドロキシ安息香酸への反応を触媒するコリスミ酸ビルビン酸リアーゼ (CPL) をコリネ型細菌に導入し、糖からプロトカテク酸の生産系の構築を行った。

[方法] 大腸菌由来のコリスミ酸ビルビン酸リアーゼ遺伝子 (*ubiC*) を、*C. glutamicum* フェニルアラニン生産株に、また野生株 (ATCC13032) に導入した。*C. glutamicum ubiC* 発現株をグルコース 40g/l を含む培地を用いて 30°C で好氣的に培養し、培養上清を経時的に採取して4-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテク酸、および糖濃度を測定した。また得られた芳香族化合物について LC/MS による測定を行った。

[結果] *ubiC* を発現した *C. glutamicum* について、野生株を宿主とした場合にわずかな4-ヒドロキシ安息香酸の生成が認められたのに対し、フェニルアラニン生産株を宿主とした場合に36時間で28 mg/lの4-ヒドロキシ安息香酸を培養上清中に生成していた。同株はグルコースを発酵基質として80時間で213 mg/lのプロトカテク酸を培養上清中に生産した。現在バイオマスを原料とするプロトカテク酸の同時糖化発酵を試みている。

Production of protocatechuate by *Corynebacterium glutamicum*

○Naoko Okai¹, Yasunobu Takeshima¹, Chiaki Ogino², Akihiko Kondo²
 (¹Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., ²Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, protocatechuate

1P-119 納豆菌 *rpoB* 変異株による黒大豆納豆の製造

○木村 啓太郎¹, 久保 雄司², 稲岡 隆史¹, 中川 力夫², 舟根 和美¹
 (¹農研機構・食総研, ²茨城県工業技術セ)
 keitarou@affrc.go.jp

黒大豆は種皮に抗酸化物質アントシアニンを含むため機能性を高めた納豆の原材料として着目され、実際に商品化された事例がある。しかし、黒大豆納豆は黄大豆納豆に比べて硬いテクスチャーを持つ点に改善の余地が残されている。その原因として、黒大豆の種皮が固く、発酵による大豆タンパク質の分解が十分でないことが考えられた。大豆成分の分解に関わる酵素活性が高い納豆菌を用いれば柔らかい黒大豆納豆の製造が可能となると考え、プロテアーゼ・セルラーゼ等の菌体外分解酵素生産能が向上した納豆菌候補株 (Miyagi-4100) を取得した¹⁾。Miyagi-4100株はRNAポリメラーゼのβ-サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子に1つのアミノ酸置換変異 (S487L変異) を持つ。S487L変異は、シグマAで制御される遺伝子の転写亢進およびターミネーター配列認識増強による遺伝子発現抑制の2つ効果を持つ。Miyagi-4100株では納豆発酵に関わる菌体外分解酵素の発現量が多かった一方、レバン (Levan) 合成酵素のシロ糖による発現誘導が起らなかった。今回、納豆発酵における Miyagi-4100株の有用性を検討するため、黒大豆納豆を実際に作成してレバンおよび粘性の主成分であるポリ-γ-グルタミン酸 (γ-PGA) の生産量、納豆の硬さ等の解析を行った。試験の結果、Miyagi-4100株で作った黒大豆納豆は、より多くのレバンを含み、柔らかく仕上がった。このことから、Miyagi-4100株は黒大豆を納豆に発酵する適性が高いことが示唆された。

1) Kubo *et al.*, J Biosci Bioeng 115 (2013) 654-657

Black soybean fermentation with a *rpoB* mutant strain of *Bacillus subtilis* (natto)

○Keitarou Kimura¹, Yuji Kubo², Takashi Inaoka¹, Rikio Nakagawa², Kazumi Funane¹
 (¹NFRI, ²Ind. Technol. Inst. Ibaraki Prefecture)

Key words *Bacillus subtilis*, soybean, RNA polymerase, levansucrase

1P-118 放線菌による芳香族化合物ホモゲンチジン酸の生産

○中村 聡子, 川口 秀夫, 荻野 千秋, 近藤 昭彦
 (神戸大院・工・応化)
 akondo@kobe-u.ac.jp

石油代替資源として、植物バイオマスを原料とするバイオリファイナリーは、「CO₂資源化」プロセスとして近年注目されている。微生物による芳香族化合物の生産は、新規高付加価値のプラスチック素材としてのポテンシャルとともに、生分解性など製品化段階の付加価値も有しており、産業化への期待は高い。放線菌は、特異な二次代謝関連酵素を保持し、フェニルプロパノイド系芳香族化合物の生合成に有用な経路が存在する。また、多様な糖類を資化できるため、バイオマスからの物質生産の宿主として有用と考えられる。

本研究では、放線菌 *Streptomyces lividans* を宿主として、バイオプラスチック原料の候補探索のため、芳香族化合物であるホモゲンチジン酸 (HGA) を生産する株を構築した。HGAは、*Pseudomonas aeruginosa* などの微生物が分泌する褐色色素の前駆体として知られる。解糖系を経てシキミ酸経路により代謝され、コリスミ酸、プレフェン酸へと逐次変換され、芳香族アミノ酸であるチロシンの代謝物 4-hydroxyphenylpyruvate を経て、4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HppD) によって HGA に変換される。HppDは、放線菌 *Streptomyces coelicolor* や *Streptomyces avermitilis* のゲノムにも存在し、その酵素機能特性が報告されている。本研究では、*S. coelicolor* の HppD をコードする遺伝子をクローニングし、放線菌タンパク高発現ベクターを用いて *S. lividans* の形質転換を行った。作製した HppD 発現強化株は発酵液上清に HGA の分泌を確認した。

本研究は、文部科学省「植物 CO₂資源化研究拠点ネットワーク (NC-CARP)」の支援を受けて実施した。

Metabolic engineering for homogentisic acid production in *Streptomyces lividans*

○Satoko Niimi-Nakamura, Hideo Kawaguchi, Chiaki Ogino, Akihiko Kondo
 (Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng. Kobe Univ.)

Key words *Streptomyces lividans*, fermentation, homogentisic acid

1P-120 食品産業廃液を利用した *Euglena gracilis* の光従属栄養培養

○川野 祐美¹, 末永 智幸¹, 田岡 洋介¹, 芝上 基成², 林 雅弘¹
 (¹宮崎大・農・海洋生環, ²産総研)
 hayash-m@cc.miyazaki-u.ac.jp

Euglena gracilis はパラミロンと呼ばれる beta-1,3-グルカン細胞内に多量に蓄積する。最近、演者らはこのパラミロンを主骨格とするバイオプラスチックを開発した。本研究ではバイオプラスチック原料としてのパラミロンを生産する際に効率よく CO₂ を利用することを目的とし、食品産業廃液を利用した光従属栄養培養により CO₂ の利用率の向上を検討した。

対象株は *Euglena gracilis* Z 株 NIES48 を使い、食品産業廃液の例として廃棄アルコール飲料などの利用を念頭に、これらの光従属栄養培養への利用を検討した。市販飲料をベースとした培地を用い、LED 照明下での培養において細胞密度および細胞収量、パラミロン収量を測定した。パラミロン収量は細胞のアセトンによる脱脂、ドデシル硫酸ナトリウムによる除タンパクの後にフェノール硫酸法にて分析し、排ガス分析装置で排気中の CO₂ の測定を行った。食品廃液を利用した光従属栄養培養によって CO₂ 固定時の細胞密度は飛躍的に向上し、それに伴い培養液あたりの CO₂ 固定量も増大して効率的な CO₂ 固定系の構築が期待された。

Mixotrophic cultivation of *Euglena gracilis* using waste from food industry

○Yumi Kawano¹, Tomoyuki Suenaga¹, Yousuke Taoka¹, Motonari Shibakami², Masahiro Hayashi¹
 (¹Dept. Marine Biol. Environ. Sci., Fac. Agric., Univ. Miyazaki, ²AIST)

Key words carbon dioxide, *Euglena gracilis*, bioplastics