

**3P-125** *Aspergillus oryzae* の菌体顆粒を用いた簡易型バイオリアクターによるセレン回収

木村 博美<sup>1</sup>, 有馬 寿英<sup>1</sup>, 永岡 美優<sup>1</sup>, 岡村 好子<sup>2</sup>, 〇阪口 利文<sup>1,3</sup>  
 (1)県大広島・環境科学, (2)広島大院・先端物質, (3)県大広島・生命科学)  
 sakaguchi@pu-hiroshima.ac.jp

【背景及び目的】*Aspergillus oryzae* は酒、味噌、醤油等の製造に利用され、その歴史から高い安全性が裏打ちされており、わが国の発酵・醸造産業で最も広く利用されている糸状菌である。これまで、演者らは、*A. oryzae* における亜セレン酸還元能を調査し、セレン回収への利用可能性について明らかにしてきた。本研究では、本菌の分生子を完全液体培地に植菌・培養後、形成させた顆粒状菌体を用いた簡易型バイオリアクターによるセレン回収について検討した。  
 【方法及び結果】本研究では、黄麹菌 *A. oryzae*RIB40 株を用いて変換・回収実験を行った。本株の分生子を PD 液体培地に植菌・培養後、顆粒状の菌体を形成させた。この球状菌体を用いて循環型バイオリアクターを作製した。このバイオリアクターによる亜セレン酸の還元、セレンの回収について調査した。その結果、初発濃度 1mM の亜セレン酸を 24 時間以内で循環液中からはほぼ全てセレン粒子に変換できることが明らかになった。

**Selenium recovery with a circulating type bioreactor by using the cell-aggregates of *Aspergillus oryzae* strain RIB40**

Hiromi Kimura<sup>1</sup>, Toshihide Arima<sup>1</sup>, Miu Nagaoka<sup>1</sup>, Yoshiko Okamura<sup>2</sup>,  
 〇Toshifumi Sakaguchi<sup>1,3</sup>  
 (1)Dept. Environ. Sci., Pref. Univ. Hiroshima, (2)Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ., (3)Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

**Key words** *Aspergillus oryzae*, selenium recovery, bioreactor, bioconversion

**3P-126** 燐炭添加により増殖促進を示す細菌の単離と抗生物質生産

〇江邊 正平, 大池 達矢, 岡南 政宏, 阿野 貴司  
 (近畿大院・生物理工学・生物工)  
 tano@waka.kindai.ac.jp

イネの籾殻を焼成して得られる燐炭は、古くから農業において土に働き込み土壌改良剤として用いられてきた。さらに、燐炭には三次元組織構造が微細孔として多く存在することから微生物の住処にも適しており、VA 菌根菌や根圏微生物が増殖・活性化することで大きな施用効果をもたらすと考えられている。そこで本研究では燐炭の有効利用を目的に、燐炭により増殖が促進される微生物のスクリーニングを行い、単離された微生物の有用性について検討した。燐炭と同様の炭素材である活性炭素を添加した寒天培地により、増殖が促進される微生物の選抜を試みた。得られた微生物が燐炭においても増殖が促進されるか実験を行い、燐炭においても増殖促進が認められた微生物を用いて植物病原菌に対する抗菌活性の有無を調べた。結果、燐炭を添加した寒天培地において著しいコロニーの拡大を示す IA 株が得られた。その増殖促進効果は燐炭の添加量の増加に伴い上昇する傾向が認められた。さらに植物病原菌と対峙試験を行ったところ成長抑制を示し、抗真菌活性物質を生産していることが示された。IA 株を燐炭添加した培地に培養を行ったところ、抗真菌活性物質の生産量は燐炭添加量の増加とともに大幅に増大した。また、生菌数の測定を行ったところ、燐炭添加培地において無添加のものに比べ大幅に高い菌数を示し、特に胞子形成率において顕著な増大が認められた。以上のことから IA 株は燐炭存在下において、増殖・抗生物質生産・胞子化が促進されるという興味深い性質を有する微生物であることが示された。

**Growth enhancement of bacteria in the presence of biochar and their antibiotic production**

〇Shohei Ebe, Tatsuya Ohike, Masahiro Okanami, Takashi Ano  
 (Grad. Sch. BOST, Kindai Univ.)

**Key words** biocontrol agent, biochar, bacterial growth enhancement

**3P-127** *Geobacter* 属細菌由来テトラクロロエテン還元脱ハロゲン化酵素の発現と機能構造解析

〇中村 龍貴, 野島 良太, 養王田 正文  
 (農工大院・工)  
 masafumi.yohda@yohda.net

有機ハロゲン化合物の嫌気的分解には、還元脱ハロゲン化酵素(RDase)が関与している。RDase は、[4Fe-4S]クラスターとコリノイドを有する触媒サブユニット RdhA と、膜貫通性ヘリックスを持つ RdhB から構成される。しかし、嫌気性細菌の大量培養が困難であることや RDase が酸素感受性が高いことから、活性型の RDase の獲得は難しい。そのため、RDase の詳細な反応機構はわかっていない。本研究では、RDase の機能・構造解析を目的に、テトラクロロエテン(PCE)RDase の触媒サブユニット(PceA)の大腸菌での発現と機能解析を試みた。PCE 分解能を有する微生物混合培養系のメタゲノムから *Geobacter lovleyi* KB1 株由来 PceA と高い相同性を有する遺伝子をクローニングし、トリガーファクター融合タグを付加した TF-PceA として大腸菌で発現させた。TF-PceA を尿素変性し、Ni Chelating カラムで精製した。嫌気的条件下で補因子の供給源として塩化鉄、硫化ナトリウム、シアノコバラミンを添加したバッファーで尿素を除去し、リフォールディングを行った。酵素活性の有無を、TF-PceA に PCE(基質/電子受容体)と Ti(III)-citrate(電子供与体)を添加し、ガスクロマトグラフィーで解析した。PCE の減少に伴い、TCE および *cis*-DCE の増加が確認された。吸収スペクトルを測定したところ、[4Fe-4S]クラスターおよびコリノイド由来するピークが検出された。TF-PceA に補因子が結合し、活性が得られた可能性が示唆された。これは、活性を有する PCE RDase を大腸菌組換え体において発現させた初めての例である。発表では、最新の研究結果についても報告する。

**Expression and Characterization of Tetrachloroethene Reductive Dehalogenase from *Geobacter* sp.**

〇Ryuki Nakamura, Ryota Nojima, masafumi Yohda  
 (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**Key words** reductive dehalogenase, bioremediation, chloroethene

**3P-128** 深海由来 *Debaryomyces* 属酵母が産生するフェノール代謝関連酵素 catechol 1,2-dioxygenase (C12O) の特徴と属内における C12O の分布

〇前田 剛志<sup>1</sup>, 加藤 未来<sup>2</sup>, 栗原 甘奈<sup>2</sup>, 能木 裕一<sup>3</sup>, 浜本 牧子<sup>1,2</sup>  
 (1)明治大院・農, (2)明治大・農, (3)海洋研究開発機構)  
 hamamoto@meiji.ac.jp

【背景と目的】環境浄化への応用を目的として高濃度フェノール分解性海洋酵母の探索を行った結果、ベンゼン環の ortho-開裂により高濃度フェノール資化性深海酵母 *Debaryomyces hansenii* (*D. hansenii*) を見出した。本研究ではフェノール分解経路の初期段階における代謝中間体、カテコールの分解反応に関わる catechol 1,2-dioxygenase (C12O) について解析を行うと共に *Debaryomyces* 属内における C12O の普遍性について検討した。  
 【方法と結果】供試 C12O は精製後、電気泳動的に単一バンドとなる標品を用いた。〔1〕C12O の酵素化学的特徴：C12O の作用によりカテコールから生成する *cis*, *cis*-muconic acid を吸光度法で定量した結果、至適温度 15~25℃、15~35℃で 90%以上の活性を保持し、既存の酵母由来 C12O では報告のない温度特性を有していた。アミノ酸配列について、トリプシン消化した C12O の LC/MS/MS 分析より *D. hansenii* 基準株においてゲノムアノテーションにより特定されている C12O 遺伝子配列から推測されるアミノ酸配列と 94%一致した。現在 MALDI-TOF-MS 分析により分子量解析を進めている。〔2〕*Debaryomyces* 属内における C12O の分布：*D. hansenii* 基準株の C12O 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションより深海酵母および既知の *Debaryomyces* 属 5 種のゲノム DNA 上に類似配列が存在することが示唆された。

**Characterization of catechol 1,2-dioxygenase by the strain of the *Debaryomyces* isolated from deep sea and the distribution of C12O among the species in the genus**

〇takayuki maeda<sup>1</sup>, miku kato<sup>2</sup>, kanna kurihara<sup>2</sup>, yuichi nogi<sup>3</sup>, makiko hamamoto<sup>1,2</sup>  
 (1)Grad. Sch. Agric., Meiji Univ., (2)Sch. Agric., Meiji Univ., (3)JAMSTEC)

**Key words** catechol 1, 2-dioxygenase, *Debaryomyces hansenii*, marine yeast