

1P-205 納豆菌由来のセルロース分解酵素を利用したメラニン合成阻害

○大杉 忠則¹, 池田 志織¹, 大橋 友紀子¹, 山中 崇², 須見 洋行¹
 (¹倉敷芸科大・生命科学,²築野食品工業)
 ohsugi@chem.kusa.ac.jp

食品産業廃棄物でありソフトバイオマスである糠、及び代表的なバイオマスであるセルロースの有効利用を目的として、脱脂糠由来タンパク質を培地として利用し納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) を培養、それによって生産される酵素を用いてセルロースを処理した分解物中に、メラニンの生産を抑える働きを見出したので報告する。

脱脂糠タンパク RBP55 (築野食品工業) を用い 37℃、100rpm で納豆菌の振とう培養を行い、エンドおよびエキソ 1,4-グルカナーゼ活性、キシラナーゼ活性を確認した。陰イオン交換樹脂マラソン MSA を用いて培養液より酵素を分離し、得られた酵素分画を用い各種セルロースを処理し、セルロース分解物中のメラニン合成に対する影響を、マウス由来の B16 メラノーマ細胞を用いて調べた。10% FBS を含む D-MEM を培地とし、6 ウェルプレートに細胞を巻き込みコンフルエントまで培養後、培養液を吸い取り、試料を 10% 含む新しい培養液を 2.0ml 加え 48 時間培養を行った。酸処理セルロースの酵素処理分画中にメラニン合成阻害が確認できた。1 × 10⁴ 細胞当たりのメラニン量は、試料非添加では 16.0μg であったのに対し、試料添加では 5.79μg と 60% 以上のメラニン量の低下が確認された。しかし、細胞内チロシナーゼ活性を L-ドーパを基質として調べたが、大きな変化は見られなかった。また、RT-PCR においてもチロシナーゼ mRNA の顕著な減少は確認できなかった。阻害経路に関しては今後さらなる検討が必要であるが、セルロース分解産物により細胞内メラニン産生を強く抑えることが確認できた。

Inhibition of melanogenesis using cellulase of *Bacillus subtilis natto*

○Tadanori Ohsugi¹, Ikeda Shiori¹, Ohashi Yukiko¹, Yamanaka Takashi²,
 Sumi Hiroyuki¹
 (¹Dept. Life Sci., Kurashiki Univ. Sci. and Arts, ²Tsuno Co., Ltd.)

Key words *Bacillus subtilis natto*, biomass, melanogenesis, rice bran

1P-207 代謝改変による生分解性プラスチック PHBH の共重合比率の制御

藤木 哲也, 佐藤 俊輔, ○有川 尚志, 松本 圭司
 (カネカ・GP 事業開発部)
 Keiji_Matsumoto@kn.kaneka.co.jp

微生物生産ポリエステルである PHBH は 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) と 3-ヒドロキシヘキサン酸 (3HH) から成る共重合ポリマーであり、その共重合比率によって硬質から軟質の幅広い物性を示す。我々は *C. necator* を宿主として PHBH 高生産株を育種し、ポリマー物性を制御する技術開発を行ってきた。昨年の本大会では、主炭素源である植物油脂に酪酸を添加することで 3HH 組成を制御する技術について報告した。しかしながら、酪酸は工業原料としては高価であることから代替技術の開発が必要であった。そこで本研究では、*C. necator* の代謝改変によって 3HH 組成を向上させる方法を中心に検討した。

【方法】

・*C. necator* の有する β - ケトチオラーゼ遺伝子のうち、アセチル CoA とブチリル CoA を縮合し得る BktB の発現を強化し、3HH モノマーの供給経路増強を試みた。

・酪酸添加と同様の効果を得るために、*S. cinnamomensis* 由来のクロトニル CoA レダクターゼ遺伝子を導入し、細胞内でのブチリル CoA 生合成経路の構築を試みた。

・BktB の立体構造をモデリングし、比活性及びブチリル CoA に対する基質特異性の向上を目的に、アミノ酸配列の改変を行った。

【結果】

・クロトニル CoA レダクターゼ遺伝子を導入し、かつ BktB の発現量を増強することで 3HH 組成が向上し、軟質 PHBH の高生産が可能となった。

・BktB の改変により、比活性が上昇し、3HH 組成の向上がみられた。

Control of the copolymerization ratio of biodegradable plastic PHBH by modification of metabolic pathways

Tetsuya Fujiki, Shunsuke Sato, ○Hisashi Arikawa, Keiji Matsumoto
 (Kaneka Corp.)

Key words *Cupriavidus necator*, PHBH, biodegradable plastic

1P-206 バイオディーゼル燃料に由来するグリセリンを用いた抗菌活性物質生産

○大池 達矢¹, 橋上 混平², 石田 結子¹, 松川 哲也^{1,2}, 岡南 政宏^{1,2},
 梶山 慎一郎^{1,2}, 阿野 貴司^{1,2}
 (¹近大院・生物理工,²近大・生物理工)
 bm0031ot@waka.kindai.ac.jp

現在、化石燃料に代わる新しい燃料としてバイオディーゼル燃料 (BDF) の研究が進んでいる。バイオディーゼルは、植物油や動物性油脂から生産され、再生可能であることから注目されている。また、近年では食糧と競合しない *Jatropha* などを利用した開発が研究されており、東南アジア、インド、アフリカなどでは栽培が行われている。しかしながら、これらの BDF 生産には、副産物として多量のグリセリンが排出され、その処理方法が問題となっている。本研究では、この多量に排出されるグリセリンに着目し、微生物農薬候補株の培養基質としての利用を試みた。

Bacillus 属細菌の中には、iturin A などの環状リポペプチド構造をもつ抗菌活性物質を生産するものが知られており、植物病原菌に対する微生物農薬として近年、注目されている。本研究では、グリセリンおよび *Jatropha* BDF 生産時に排出される廃グリセリンを用いて培地を作製し、本菌株の増殖および iturin A 生産を測定した。その結果、本菌株が増殖可能であることを見出し、また、その培養液中からは iturin A が検出された。本研究は、多量に排出されるグリセリンの新たな利用法を示し、安価な微生物農薬の開発に寄与すると期待される。

Production of antifungal lipopeptide iturin A by glycerol as BDF by-product

○Tatsuya Ohike¹, Kohei Hashigami², Yuko Ishida¹, Tetsuya Matsukawa^{1,2},
 Masahiro Okanami^{1,2}, Shin'ichiro Kajiyama^{1,2}, Takashi Ano^{1,2}
 (¹Grad. Sch. BOST, Kinki Univ., ²Dept. Biotechnol. Sci., Kinki Univ.)

Key words *Bacillus subtilis*, biofilm, iturin A, *Jatropha* BDF

1P-208 PHBH 発酵生産における共重合比率制御技術の開発

○加藤 隆久, 佐藤 俊輔, 藤木 哲也, 松本 圭司
 (カネカ・GP 事業開発部)
 Takahisa_Kato@kn.kaneka.co.jp

微生物生産ポリエステルである PHBH は 3-ヒドロキシ酪酸 (以下 3HB) と 3-ヒドロキシヘキサン酸 (以下 3HH) からなる共重合ポリマーであり、その共重合比率によって硬質 (3HH 組成比: 8mol% 以下) から軟質 (3HH 組成比: 10 ~ 12mol%) の幅広い物性を示す。我々は *Cupriavidus necator* を宿主として PHBH 高生産株を育種し、生産性とポリマー物性の観点より発酵技術開発を行っている。

PHBH 発酵は菌体生産期とポリマー蓄積期に分けられ、炭素源の存在下に菌体生産に必要な因子 (例えばリン、窒素など) の枯渇条件下でポリマーが生産される。我々は、炭素源及びリン (菌体生産律速因子) の供給速度と PHBH 生産性及び 3HH 組成比との関係について検討した。その結果、乾燥菌体重量に対する C 源 (パーム核油) 供給速度 (以下、比基質供給速度) が 3HH 組成比を決定する因子であることを見出し、比基質供給速度を抑制すれば、3HH 組成比の高い軟質 PHBH が生産できることが分かった。しかしながら、比基質供給速度の抑制はポリマー生産性の低下につながることから、軟質 PHBH の生産性向上についてさらに検討を進めている。

Control of the copolymerization ratio of biodegradable plastic PHBH by fermentation condition

○Takahisa Kato, Shunsuke Sato, Tetsuya Fujiki, Keiji Matsumoto
 (Kaneka Corp.)

Key words *Cupriavidus necator*, PHBH, biodegradable plastic, fermentation