

# 掘越特殊環境微生物プロジェクトの研究成果

## 目次

1. 溶媒耐性微生物	2
2. 三角形の好塩性古細菌	4
3. トレハラーゼ	5
4. beta-グルコシダーゼ	7
5. 耐熱性プルラーゼ	9
6. 耐熱性 alpha-アミラーゼ	11
7. マンノ糖含有糖質	13
8. セレン含有微生物菌体	16
9. 耐熱性 beta-1,3-グルカナーゼ	17
10. 染料脱色法	19
11. マルトテトラオース	21
12. ヘパリン、コンドロイチン硫酸分解酵素	23
13. 新規な好塩好アルカリ性嫌気性細菌	26
14. メタン生成細菌	28
15. 微生物分離	31
16. 磁性粉末	33
17. 生体触媒安定化剤	35

## 1. 溶媒耐性微生物

トルエン耐性菌とその培養法

### 研究成果の概要

通常の微生物が生育可能な 100 倍以上の高濃度のトルエン存在下で生育するシュードモナス細菌を分離。本菌は脂肪炭化水素類を始め、脂環式、芳香族炭化水素類、アルコール類、エーテル類、及びケトン類等の各種有機溶媒に幅広い溶媒耐性。(写真)



トルエン耐性菌(IH-2000)の電子顕微鏡写真

#### 1) 新菌株

- ・有機溶媒に耐性を有するシュードモナス属及びエッシエリヒア属に属する菌株

シュードモナス属:シュードモナス・プチダ(FERM P-9228,IFO-3928)

シュードモナス・アルギノーザ(IFO-3924)

シュードモナス・フルオレセンス(IFO-3507)

シュードモナス・エスピー(FERM P-9226,9227)

エッシエリヒア属:エッシエリヒア・コリ(IFO-3806)

- ・30vol%以上のトルエン存在下でも、生育阻害を受けない菌株

シュードモナス属:シュードモナス・プチダ(IH-2000)

#### 2) 培養法

有機溶媒 0.3%以上を含む培地で培養

#### 3) 耐性遺伝子

溶媒感受性変異株より、耐性遺伝子の可能性を明らかにし、トルエン耐性に関与する遺伝子をクローニング

### 成果の展開可能なシーズ、用途等

- 1) 有機溶媒存在下での微生物による各種物質の生産あるいは生産性向上
- 2) 育種による有用既存菌の耐性の向上

### 特許出願

#### 1) 新規微生物

特 願 : 昭 62-048662(昭 62.3.5) 特開昭 63-216473(昭 63.9.8)

出 願 人 : 新技術事業団、井上明、掘越弘毅

請求の概要 : 脂肪族炭化水素、脂環式炭化水素、芳香族炭化水素、アルコール、エーテル、ケトンおよびその誘導体に耐性を有するシュードモナス・プチダに属する微生物。

## 2) 新規微生物

特 願：昭 62-048663(昭 62.3.5) 特開昭 63-216474(昭 63.9.8)

出 願 人：新技術事業団、井上明、掘越弘毅

請求の概要：脂肪族炭化水素、脂環式炭化水素、芳香族炭化水素、アルコール、エーテル、ケトンおよびその誘導体に耐性を有するシュードモナス・エスピー。

## 3) 微生物の培養法

特 願：昭 62-074500(昭 62.3.30) 特開昭 63-240778(昭 63.10.6)

出 願 人：新技術事業団、井上明、掘越弘毅

請求の概要：シュードモナス属またはエッシェリヒア属に属し、有機溶媒に耐性を有する微生物を 0.3%以上の有機溶媒を含む培地で培養する方法。

## 《外国出願》

### 1) New microorganism

米国出願：163,576(3.3'89),デンマーク,EPC(西独,仏,英,スイス,スウェーデン)出願  
特願昭 62-048662,昭 62-048663 に同じ

### 2) Method for culturing microorganism

米国出願：174,958(3.29'89),デンマーク,EPC(西独,仏,英,スイス,スウェーデン)出願  
国内出願：特願昭 62-074500 に同じ

## 報告書他

- 1) 井上明:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.1(平成元年9月), 新技術事業団
- 2) 掘越弘毅、井上明「トルエン耐性微生物」  
バイオサイエンスとインダストリー,Vol.46,p.3192-3193(1988)
- 3) A.Inoue and K.Horikoshi, A Pseudomonas Thrives in High Concentrations of Toluene.  
Nature,Vol.338(No.6212)p.264-266(1989)
- 4) 井上明「有機溶媒耐性菌とその利用」Bio Industry,Vol.6,No.1,P.93-98(1989)

〔研究者名〕 井上明、掘越弘毅

## 2. 三角形の好塩性古細菌

世界で初めての三角形状を有する微生物

### 研究成果の概要

石川県能登の塩田土壌から、世界で初めて、三角形平板状の形態を持つ菌(図-1)の発見に成功。

#### 1) 新菌株

高度好塩性古細菌の新種、ハロアーキュラ・ジャポニカ。一辺の長さ 2~5μm、厚さ 0.5μm の三角形平板状で、鞭毛、運動性を有するグラム陰性菌。赤色のコロニーを形成する。通常細菌に対しては殺菌的な環境である、海水の約 8 倍の塩濃度(20%)で良好に生育。温度 42DEG C、中性を至適生育環境とする。

顕微鏡微速度写真及びカラー画像処理を用いた解析により、本菌が三角形の菌から三角形と四角形の菌へ、その四角の菌から三角形の菌が生じる対称的な分裂をすることが明らかとなった。(図-2)

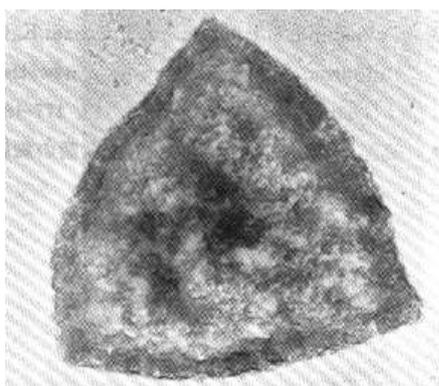


図-1：電子顕微鏡写真

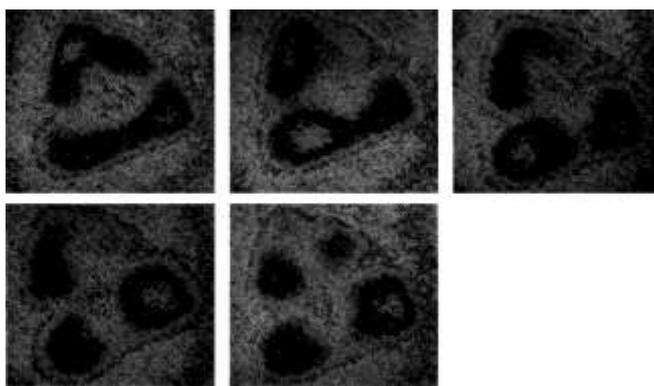


図-2：細胞分裂様式

### 報告書他

- 1) 音在清高、高品知典:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.19(平成元年 9 月) 新技術事業団
- 2) Hamamoto,T.,Takashina,T.,Grant,W.D.and Horikoshi.K.  
Asymmetric cell division of a triangular halophilic archaeobacterium:FEM  
S Microbiol Letters,56,221-224(1988)
- 3) Takashina,T.,Hamamoto,T.,Otozai,K,Grant,W.D.and Horikoshi,K.  
Haloarcula japonica sp.nov.,a new triangular halophilic archaeobacterium:  
System.Appl.Microbiol.,13,177-181(1990)
- 4) 高品知典、掘越弘毅:三角古細菌の細胞分裂を見る、化学、45、口絵カラー(1990)

〔研究者名〕 音在清高、高品知典、掘越弘毅

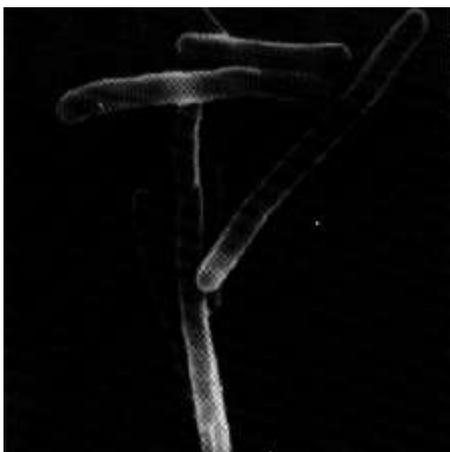
### 3. トレハラーゼ

新規コリネバクテリウム属細菌、新規トレハラーゼおよびその製造法

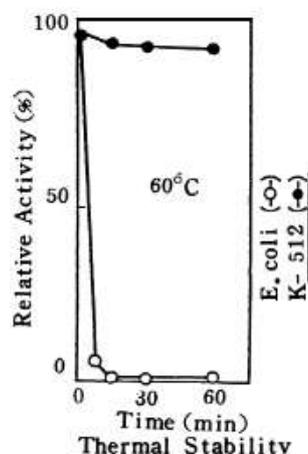
#### 研究成果の概要

新規トレハラーゼ(トレハロース分解酵素)を菌体内および菌体外へ生産するコリネバクテリウム属細菌を分離。

本菌を用いる耐熱性に優れた新規トレハラーゼの製造法を開発。(写真)、(図)



写真：トレハラーゼ生産菌 (K-512) の電子顕微鏡写真



図：K-512 トレハラーゼと大腸菌トレハラーゼの熱安定性

#### 1) 新菌株(FERM P-8484、8485、8486)

菌体内および菌体外へ新規トレハラーゼを生産するコリネバクテリウム属細菌

#### 2) 新規トレハラーゼの性質

至適 pH:6.5~7.5、至適作用温度:60DEG C 近傍

熱安定性:pH7.0、60DEG C で 15 時間以上安定

pH5.0~10.0 で、60DEG C、30 分では安定

#### 3) 遺伝子組み換え

新規コリネバクテリウム属に属する微生物由来の耐熱性トレハラーゼ遺伝子 DNA をベクターを介して大腸菌へ導入し、形質転換体を得た。

#### 4) 新規トレハラーゼの製造法

コリネバクテリウム属細菌を pH5~9、55~65DEG C で培養し、菌体内・外へトレハラーゼを生産させる新規トレハラーゼの製造法、および耐熱性トレハラーゼ遺伝子 DNA をベクターを介して大腸菌へ導入し、形質転換した大腸菌を培養して生産する耐熱性トレハラーゼの製造法。

## 成果展開可能なシーズ、用途等

### 耐熱性トレハラーゼ

新規トレハラーゼを生産するコリネバクテリウム属細菌および形質転換した大腸菌

- 1) 固定化酵素、これを用いるバイオリクター
- 2) 診断薬

## 特許出願

- 1) 新規トレハラーゼおよびその製法

特 願：昭 61-179588(昭 61.7.30) 特開昭 62-275682(昭 62.11.30)

出 願 人：新技術事業団、永山孝三、掘越弘毅、中村信之

請求の概要：耐熱性に優れた新規トレハラーゼおよびこれを生産する微生物を培養し、菌体外あるいは菌体外かつ菌体内に新規トレハラーゼを生成・蓄積させる製造法。

- 2) 耐熱性トレハラーゼ遺伝子 DNA、該 DNA を含む組み換え体プラスミド、形質転換体及び耐熱性トレハラーゼの製法

特 願：昭 63-51779(昭 63.3.7) 特開平 1-225485(平 1.9.8)

出 願 人：新技術事業団、永山孝三、掘越弘毅

請求の概要：好熱性細菌コリネバクテリウム属菌由来の耐熱性トレハラーゼ遺伝子 DNA、大腸菌用ベクタープラスミドおよびこれを連結した組み換え体プラスミドとこれにより形質転換したエッシェリヒア属の微生物。これらの微生物を培養する耐熱性トレハラーゼの製造法。

## 報告書他

- 1) 永山孝三:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.65(平成元年 9 月)  
新技術事業団
- 2) 永山孝三:日本農芸化学会 昭和 61 年度大会発表(昭和 61 年 4 月)  
「トレハラーゼを生産する好熱性細菌の分離とその性質」  
「好熱性細菌 *Corynebacterium* sp.(SBPK-512 菌)の生産するトレハラーゼの精製とその性質」
- 3) 永山孝三:日本農芸化学会昭和 62 年度大会発表(昭和 62 年 4 月)  
「大腸菌トレハラーゼの精製及び好熱性細菌 No.K-512 菌トレハラーゼとの比較検討」
- 4) 永山孝三:日本農芸化学会 昭和 63 年度大会発表(昭和 63 年 4 月)  
「トレハラーゼ遺伝子のクローン化と発現」  
トレハラーゼ生産菌(K-512)の電子顕微鏡写真  
K-512 トレハラーゼと大腸菌トレハラーゼの熱安定性

〔研究者名〕 永山孝三、中村信之、掘越弘毅

#### 4. beta-グルコシダーゼ

新規耐熱性 beta-グルコシダーゼおよびその製造法、形質転換微生物

##### 研究成果の概要

新規 beta-グルコシダーゼを生産するサーマス属に属する新菌株を分離。本菌を用いて耐熱性に優れた新規 beta-グルコシダーゼの製造法を開発。(図1)、(図2)

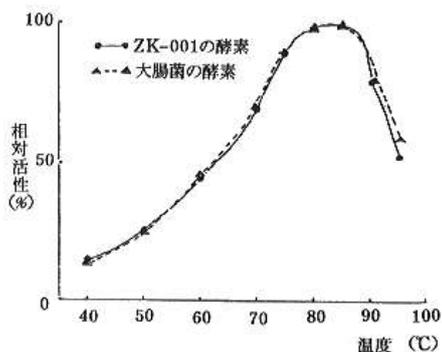


図1：酵素の作用温度曲線

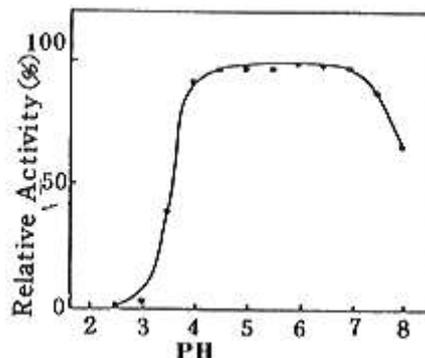


図2：酵素活性のPHの影響

##### 1) 新菌株(FERM P-9184、9185、9186)

耐熱性に優れた新規 beta-グリコシダーゼを生産するサーマス属に属する新菌株 ZK-001

##### 2) 新規 beta-ケルコジダーゼの性質

本酵素は、セルロースのセルラーゼによる分解産物であるセロビオースあるいはセロオリゴ糖の beta-グリコシドを効率良く分解するものでなく、beta-ガラクトシドである乳糖に対しても高い分解活性を有する。

至適 pH:4.5~6.5

至適作用温度:80~85DEG C

##### 3) 酵素の製造法

サーマス属に属する新菌株を pH5.5~8.5、40~80DEG C で培養する新規 beta-グルコシダーゼの製造法

##### 4) 遺伝子組み換え

耐熱性 beta-グルコシダーゼ遺伝子 DNA をベクターを介して大腸菌に導入、形質転換体を得た。本形質転換体を培養して耐熱性 beta-グルコシダーゼを製造。

##### 成果展開可能なシーズ、用途等

耐熱性 beta-グルコシダーゼ

セロピアーゼ活性の利用

- 1) バイオマス(セルロース)の有効利用(食料、燃料として)  
ラクターゼ活性の利用(ガラクトース、グルコースによる活性阻害小)
- 2) 乳糖分解乳(液)などの食品への利用

#### 特許出願

- 1) サーマス(Thermus)属に属する新菌株、新規な beta-ガラクトシダーゼ及びその製造法  
特 願：昭 62-026216(昭 62.2.9) 特開昭 63-196267(昭 63.8.15)

出 願 人：新技術事業団、高瀬光徳、掘越弘毅

請求の概要：サーマス属に属する高度好熱性の新菌株およびその菌株を培養して得られる新規 beta-ガラクトシダーゼならびにその製造法。

- 2) 耐熱性 beta-ケルコシダーゼ遺伝子 DNA、該 DNA を含む組み換え体プラスミド、該プラスミドを含む形質転換微生物及び耐熱性 beta-グルコシダーゼの製造法

特 願：昭 63-51778(昭 63.3.7) 特開平 1-225484(平 1.9.8)

出 願 人：新技術事業団、高瀬光徳、掘越弘毅

請求の概要：サーマス属に属する微生物由来の耐熱性 beta-グルコシダーゼ遺伝子 DNA、これを含む組み換え体プラスミド、これを導入した形質転換微生物及びこれを培養する耐熱性 beta-グルコシダーゼの製造法。

#### 《外国出願》

- 1) New strain belonging to genus thermus, new beta-galactosidase and process for producing same

米国出願：153,296(2.5'88)、デンマーク、EPC(英、仏、西独、オランダ)出願

国内出願：昭 62-026216 に同じ

#### 報告書他

- 1) 高瀬光徳:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.75(平成元年 9 月) 新技術事業団
- 2) 高瀬光徳:日本農芸化学会 昭和 62 年度大会発表(昭和 62 年 4 月)  
「Thermus 属細菌の beta-グルコシダーゼ遺伝子のクローニングと発現」
- 3) M.Takase,K Horikoshi:A thermostable B-galactosidase isolated from a bacterial species of the genus Thermus, Appl. Microbiol Bacteriol(1988)29:55~60
- 4) M.Takase,K.Horikoshi:Purification and Properties of a beta-Galactosidase from Thermus Sp.Z-1,Agric.Biol.Chem.(1989)53:559~560

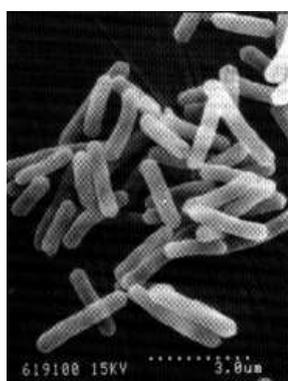
〔研究者名〕 高瀬光徳、掘越弘毅

## 5. 耐熱性プルラナーゼ

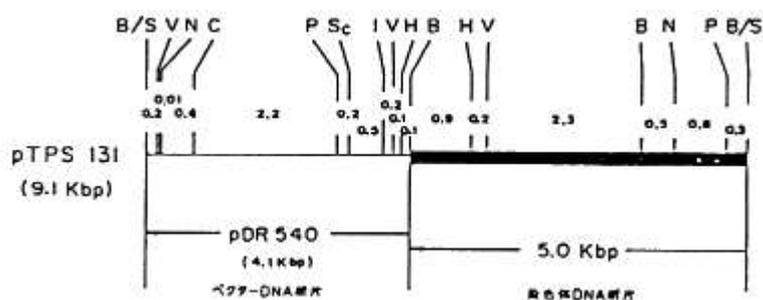
新規耐熱性プルラナーゼ、糖類の製造法

### 研究成果の概要

新規耐熱性プルラナーゼ(澱粉糖の 1,6 結合を分解する枝きり酵素)を生産するサーマス属に属する微生物を分離。本菌を用いて菌体外および/または菌体内耐熱性プルラナーゼの製造法を開発。さらに、本酵素とアミラーゼを併用して澱粉あるいはその加水分解物から糖類を製造する方法を開発。また耐熱性プルラナーゼ遺伝子の分離と組み換えによる大腸菌の形質転換を行った。(写真)、(図)



写真：耐熱性プルラナーゼ生産菌の電子顕微鏡写真



図：耐熱性プルラナーゼ遺伝子を含むプラスミド

#### 1) 新菌株(FERM P-8881、8882、8883)

新規耐熱性プルラナーゼを生産するサーマス属細菌

#### 2) 新規耐熱性プルラナーゼの性質

至適 pH:5.5~6.0、至適作用温度:70DEG C 近傍

熱安定性:pH6.0、30 分処理で 60DEG C まで安定

#### 3) 新規耐熱性プルラナーゼの製造法

サーマス属細菌を 37~74DEG C で培養する製造法

#### 4) 遺伝子組み換え

耐熱性プルラナーゼ遺伝子 DNA、これを含む組み換えプラスミドおよび形質転換体

#### 5) 糖類の製造法

本酵素をアミラーゼと併用して澱粉あるいはその加水分解物に作用させる糖類の製造法。

### 成果展開可能なシーズ、用途等

耐熱性プルラナーゼ

澱粉糖製造効率の向上

1) 製造工程での細菌汚染を防止しながら酵素反応を行うことができる

2) 耐熱性酵素を通常の菌から製造できる

## 特許出願

### 1) 新規なプルラン分解酵素およびその製法

特 願：昭 61-180650(昭 61.7.31) 特開昭 63-36780(昭 63.2.17) 特許 1536567 号

出 願 人：新技術事業団、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：サーマス属に属する新菌株およびその菌株を培養して得られる新規な菌体内  
および/または菌体外耐熱性プルラナーゼならびにその製造法。

### 2) 糖類の製造法

特 願：昭 61-186575 (昭 61.8.8) 特開昭 63-42696(昭 63.2.23)

出 願 人：新技術事業団、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：サーマス属に属する新菌株およびその菌株を培養して得られる新規な菌体内  
および/または菌体外耐熱性プルラナーゼならびにその製造法。本酵素とアミ  
ラーゼを併用し澱粉またはその加水分解物からの糖類の製造法。

### 3) 耐熱性プルラナーゼ遺伝子 DNA、該 DNA を含む組み換え体プラスミド及び形質転換体

特 願：昭 62-233247(昭 62.9.17) 特開昭 64-7.74991(昭 64.3.20)

出 願 人：新技術事業団、指原信廣、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：好熱性細菌サーマス属菌由来の耐熱性プルラナーゼ遺伝子 DNA、大腸菌用ベ  
クタープラスミドおよびこれを連結した組み換え体プラスミドとこれにより  
形質転換した大腸菌。

## 報告書他

1) 中村信之:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.87(平成元年 9 月)

新技術事業団

2) 指原信廣:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.107(平成元年 9 月)

新技術事業団

3) N.Sashihara,N.Nakamura,H.Nagayama&K.Horikoshi,FEMS Microbiol.Lett., 49,385-388  
(1988).

〔研究者名〕 中村信之、指原信廣、掘越弘毅

## 6. 耐熱性 alpha-アミラーゼ

新規 alpha-アミラーゼ及びその製造法、澱粉糖の製造法

### 研究成果の概要

耐熱性等に優れた新規 alpha-アミラーゼ(デンプン等に作用して alpha-マルトース(麦芽糖)産生する酵素)を生産するサーマス属に属する新菌株を分離。本酵素を用いる澱粉糖の製造法を開発。(図)

#### 1) 新菌株(FERM P-8881、8882、8883)

耐熱性等に優れた新規 alpha-アミラーゼを生産するサーマス属に属する新菌株

#### 2) 新規 alpha-アミラーゼの性質

至適 pH:5.5~6.0

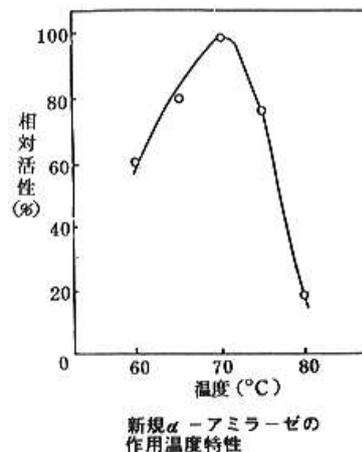
至適作用温度:約 70DEG C

#### 3) 酵素の製造法

サーマス属に属する新菌株を pH5~8、37~74°Cで好氣的に培養する新規 alpha-アミラーゼの製造方法

#### 4) 澱粉糖の製造法

澱粉および/または澱粉の加水分解物に新規 alpha-アミラーゼまたはこれと alpha-1,6-グルコシターゼを作用させる澱粉糖の製造法



図：新規 alpha-アミラーゼの作用温度特性

### 成果展開可能なシーズ、用途等

alpha-アミラーゼ

#### 1) 澱粉糖の製造(澱粉の液化)

#### 2) 繊維の糊抜き

### 特許出願

#### 1) 新規な alpha アミラーゼ及びその製造法

特 願：昭 62-188457(昭 62.7.28) 特開昭 64-34288(昭 64.2.3)

出 願 人：新技術事業団、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：サーマス属に属する新菌株、およびその菌株を培養して得られる新規菌体外 alpha-アミラーゼならびにその製造法。

#### 2) 澱粉糖の製造法

特 願：昭 62-188458(昭 62.7.28) 特開昭 64-34296(昭 64.2.3)

出 願 人：新技術事業団、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：澱粉および/または澱粉の部分加水分解物に新規 alpha-アミラーゼを作用させる澱粉糖の製造法。

#### 報告書他

- 1) 中村信之:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.87(平成元年 9 月)  
新技術事業団
- 2) N.Nakamura,N.Sashihara,H.Nagayama and K.Horikoshi  
Characterization of Pullulanase and alpha-Amylase Activities of a Thermus sp.  
AMD-33 starch /starke 41 No.3,p.112-117 (1989)
- 3) 指原信廣:昭和 62 年度 日本農芸化学会関東支部大会 講演要旨集、p.4(1987)  
「好熱性細菌 Thermus sp.AMD-33 の生産する alpha-アミラーゼ」

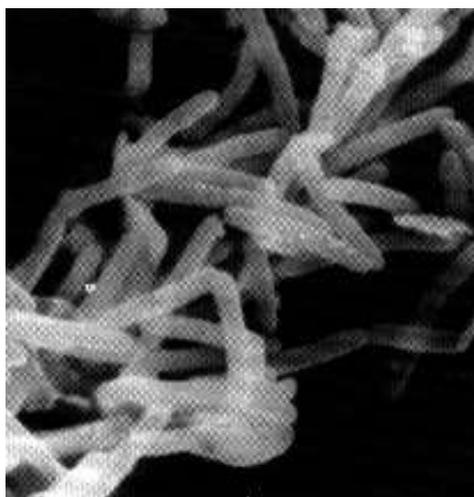
〔研究者名〕 中村信之、相原信廣、掘越弘毅

## 7. マンノ糖含有糖質

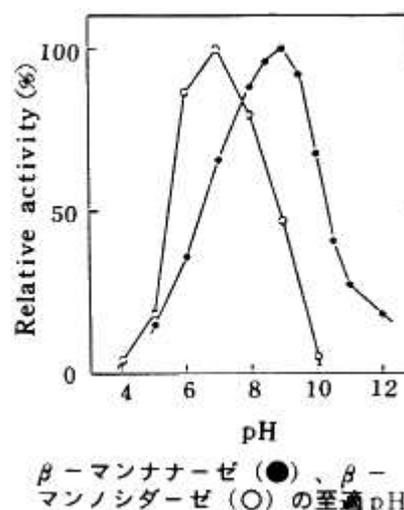
新規 beta-マンナーゼ・新規 beta-マンノシダーゼ、マンノ糖含有糖質の製造法

### 研究成果の概要

beta-マンナーゼおよび/または beta-マンノシダーゼ(マンナン分解酵素)を生産する好アルカリ性バチルス属細菌を分離し、これらの酵素の製造法を開発。さらに、これら酵素を利用してマンノ糖含有糖質の製造法を開発。また beta-マンナーゼ遺伝子で形質転換した大腸菌をつくった。(写真)、(図)



写真：新規 beta-マンナーゼ、beta-マンノシダーゼを生産する好アルカリ性バチルス属細菌の電子顕微鏡写真



図：beta-マンナーゼ (●)、beta-マンノシダーゼ (○) の至適 pH

#### 1) 新菌株(FERM P-8856、8857、8858、8859、8860)

beta-マンナーゼおよび/または beta-マンノシダーゼ生産能を有する好アルカリ性バチルス属細菌

#### 2) beta-マンナーゼの性質

至適 pH8~10、至適作用温度 65DEG C 近傍

#### 3) beta-マンノシダーゼの性質

至適 pH6~7、至適作用温度 50DEG C 近傍

#### 4) 酵素の製造法

好アルカリ性バチルス属細菌を pH7.5~11.5、30~50DEG C で、好氣的に培養し、beta-マンナーゼおよび/または beta-マンノシダーゼを製造。

#### 5) マンノ糖含有糖質の製造法

新規 beta-マンナーゼおよび/または新規 beta-マンノシダーゼを beta-1,4-D-マンノピラノシド結合を有する糖類基質に作用させるマンノ糖含有糖質の製造法。

## 6) 形質転換した大腸菌

好アルカリ性バチルス属細菌由来の beta-マンナーゼ遺伝子 DNA をベクターを介して大腸菌へ導入し、形質転換体を得た。また、beta-マンナーゼ遺伝子 DNA のコードするアミノ酸配列および塩基配列を明らかにした。

## 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) マンノ糖含有糖質の製造
- 2) 天然未利用資源(マンナン等)の有効利用

## 特許出願

- 1) beta-マンナーゼおよびその製法

特 願：昭 61-179586(昭 61.7.30) 特開昭 63-56289(昭 63.3.10)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：好アルカリ性バチルス属に属する新菌株、およびその菌株を培養して得られる新規 beta-マンナーゼならびにその製法。

- 2) beta-マンノシダーゼおよびその製法

特 願：昭 61-179587(昭 61.7.30) 特開昭 63-36779(昭 63.2.17)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：好アルカリ性バチルス属に属する新菌株、およびその菌株を培養して得られる新規 beta-マンノシダーゼならびにその製法。

- 3) beta-マンナーゼおよび beta-マンノシダーゼ生産を有する好アルカリ性バチルス属新菌株およびその利用法

特 願：昭 61-180651(昭 61.7.31) 特開昭 63-36775(昭 63.2.17)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：好アルカリ性バチルス属に属する新菌株、およびその菌株を培養して得られる新規 beta-マンナーゼ及び beta-マンノシダーゼならびにその製法。

- 4) マンノ糖含有糖質の製造法

特 願：昭 61-192607(昭 61.8.18) 特開昭 63-49043(昭 63.3.1)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：新規 beta-マンナーゼおよび/または新規 beta-マンノシダーゼを beta-1,4-D.マンノピラノシド結合を有する糖類基質に作用させるマンノ糖含有糖質の製造法。

- 5) beta マンナーゼ遺伝子 DNA、該 DNA を含む組み換え体プラスミド及び形質転換体

特 願：昭 63-53774(昭 63.3.9) 特開平 1-228477(平 1.9.12)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、掘越弘毅

請求の概要：好アルカリ性バチルス属細菌由来の beta-マンナーゼ遺伝子 DNA、これを

ベクターに連結した組み換え体プラスミド、このプラスミドで形質転換した大腸菌。

6) 新規な beta-マンノシダーゼとその製法

特 願：平 1-135468(平 1.5.29) 特開平 2-242678(平 2.9.27)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：非還元末端から順次 beta-マンノシド結合を加水分解し、マンノースを生成する新規 beta-マンノシダーゼ。

7) beta-マンナンナーゼおよびその製法

特 願：平 1-219951(平 1.8.25)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：beta-マンナンに特異的に作用し、alpha-マンナンに作用しない基質特異性を有する新規 beta-マンナンナーゼ。

## 報告書他

- 1) 秋野利郎:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.165(平成元年 9 月)  
新技術事業団
- 2) 秋野利郎:日本農芸化学会 昭和 62 年度大会発表(昭和 62 年 4 月)  
「好アルカリ性菌 *Bacillus* sp.AM-001 の生産する beta-マンナンナーゼの精製とその性質」
- 3) T.Akino:Production of beta-mannosidase and beta-mannanase by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Appl.Microbiol.Biotechnol*(1987)26,323-327
- 4) T.Akino:Characterization of Three beta-Mannanases of an Alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric.Biol.Chem.*,52(3)773-779(1988)
- 5) T.Akino: Characterization of beta-Mannosidase of an Alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric.Biol.Chem.*,52(6)1459-1464 (1988)
- 6) 秋野利郎:日本澱粉学会昭和 62 年度大会発表(昭和 62 年 10 月)  
「好アルカリ性菌 *Bacillus* sp.AM-001 の生産する beta-マンノシダーゼの精製とその性質」
- 7) T.Akino: The cloned beta-mannanase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. AM-001 produces two beta-mannanases in *Escherichia coli*. *Arch.Microbiol.*,152 10-15(1989)
- 8) T.Akino: Two *Bacillus* beta-Mannanases Having Different COOH Termini Are Produced in *Escherichia coli* Carrying PMAH5. *Appl. Environ.Microbiol.*,55(12) 3178-3183 (1989)

〔研究者名〕 秋野利郎、掘越弘毅

## 8. セレン含有好微生物菌体

セレン含有好アルカリ性バチルス属菌体

### 研究成果の概要

高濃度のセレン化合物含有下で生育し、セレン蓄積性を有する微生物の分離に成功し、セレン含有微生物菌体の製造法を開発した。(写真)

#### 1) 新菌株(FERM P-8487、8488)

好アルカリ性バチルス属に属する細菌

生育 pH:8~12

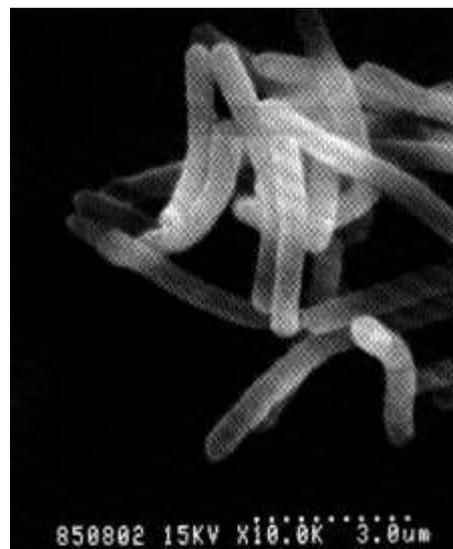
生育温度:30~37DEG C

#### 2) 蓄積可能なセレン化合物

水溶性の亜セレン酸ナトリウム、セレン酸ナトリウム、亜セレン酸、セレン酸、二酸化セレン

#### 3) 菌体の製造法

培地中のセレン化合物濃度が 0.1~500 ミリモルの範囲で、pH8~12、温度 30~37DEG C で好氣的に培養し菌体を製造。



写真：セレン含有微生物菌体の電子顕微鏡写真

### 成果展開可能なシーズ、用途等

セレン耐性を有する微生物

#### 1) 医薬品(有機型セレン・・・抗ガン剤、重金属中毒の解毒剤、抗炎症剤等)の製造

### 特許出願

#### 1) セレン含有微生物菌体の製造方法

特 願：昭 60-232715(昭 60.10.18) 特開昭 62-91177(昭 62.4.25)

出 願 人：新技術事業団、秋野利郎、中村信之、掘越弘毅

請求の概要：セレン蓄積性を有する好アルカリ性微生物を、セレン化合物を含有するアルカリ性培地で生育させることによるセレン含有微生物菌体の製造法。

### 報告書他

#### 1) 秋野利郎：日本農芸化学会 昭和 61 年度大会発表 (昭和 61 年 4 月)

「セレン耐性好アルカリ性菌の分離とその性質」

〔研究者名〕秋野利郎、掘越弘毅

## 9. 耐熱性 beta-1,3-グルカナーゼ

耐熱性アルカリ beta-1,3-グルカナーゼ、耐熱性中性 beta-1,3-グルカナーゼの製造法

### 研究成果の概要

アルカリ側と弱酸性から中性に至適 pH をもつ 2 種類の耐熱性 beta-1,3-グルカナーゼ(beta-1,3-グルカン分解酵素)を菌体外へ生産する好アルカリ性菌を分離。本菌を用いる beta-1,3-グルカナーゼの製造法を開発。

本菌の生産する beta-1,3-グルカナーゼ遺伝子が大腸菌へ遺伝子組み換えを行った。(図)

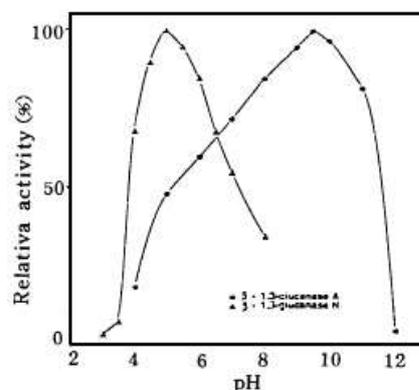


図: beta-1,3-グルカナーゼ A,N の至適 pH

#### 1) 新菌株(FERM P-10256)

菌体外に beta-1,3-グルカナーゼを生産する好アルカリ性バチルス属細菌

#### 2) 遺伝子組み換え大腸菌(FERM P-10848)

耐熱性中性 beta-1,3-グルカナーゼを生産する遺伝子組み換え大腸菌

#### 3) beta-1,3-グルカナーゼの性質

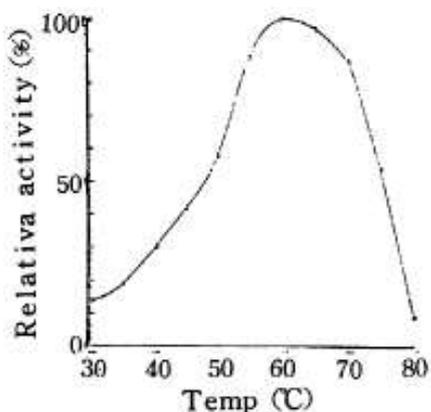


図: beta-1,3-グルカナーゼ A の至適温度

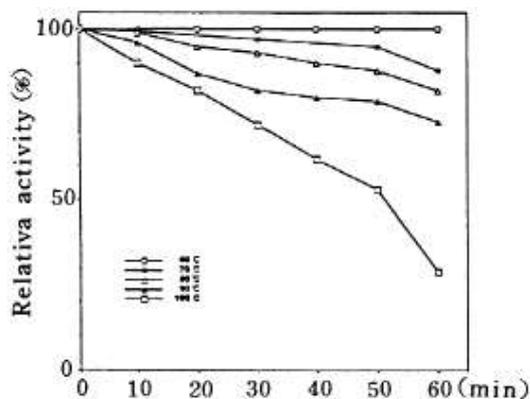


図: beta-1,3-グルカナーゼ A の温度安定性

酵素名	beta-1,3-グルカナーゼ A	beta1,3-グルカナーゼ N
至適 pH	8.5~10.0	4.5~6.0
至適温度	60~65DEG C	60~65DEG C
pH 安定性	4~12(40DEG C 30min)	4~11(40DEG C 30min)
温度安定性 (残存%)	100DEG C 20min90% 100DEG C 80min0%	100DEG C 10min60% 100DEG C 50min60%

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 未利用多糖 beta-1,3-グルカンをグルコース等の有効な糖に分解ビール醸造法等の改良の可能性
- 2) 従来なかったアルカリ側で活性のある beta-1,3-グルカナーゼ
- 3) 従来とはまったく異なった耐熱性酵素

### 特許出願

- 1) beta-1,3-グルカナーゼおよびその製法

特 願：昭 63-220375(昭 63.9.5) 特開平 2-69183(平 2.3.8)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：beta-1,3-グルカナーゼを菌体外へ生産する好アルカリ性バチルス属細菌、本菌を用いる beta-1,3-グルカナーゼの製造法及び酵素。

- 2) 耐熱性 beta-1,3-グルカナーゼ遺伝子 DNA、該 DNA を含む組み換えプラスミド及び形質転換体と耐熱性 beta-1,3-グルカナーゼ及びその製造法

特 願：平 1-185928(平 1.7.20)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：耐熱性 beta-1,3-グルカナーゼ遺伝子 DNA 組み換え体等、本組み換え体を用いる beta-1,3-グルカナーゼの製造法及び酵素。

### 報告書他

- 1) 能木裕一:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.175(平成元年 9 月)  
新技術事業団
- 2) 能木裕一:日本農芸化学会 昭和 63 年度大会発表(昭和 63 年 4 月)  
「好アルカリ性菌の生産する beta-1,3-グルカナーゼ」
- 3) 能木裕一:日本農芸化学会 昭和 63 年度大会発表 (平成元年 4 月)  
「好アルカリ性菌 Bacillus sp.AG-430 の耐熱性 beta-1,3-Glucanase 遺伝子のクローニング」
- 4) Yuichi Nogi and Koki Horikoshi:Appl Microbial Biotechnol(1990)32:704-707  
"A thermostable alkaline beta-1,3-glucanase produced by alkalophilic Bacillus sp. AG-430."

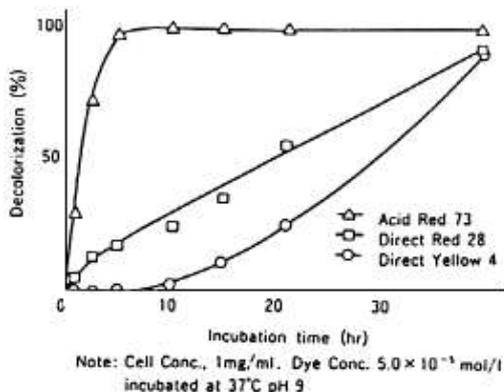
〔研究者名〕 能木裕一、掘越弘毅

## 10. 染料脱色法

好アルカリ性微生物による染料脱色法

### 研究成果の概要

染料分解能を有する微生物を分離し、この微生物を用いて染料の脱色法を開発。(図1)、(図2)



	RB-1	<i>Liparia sp.</i> *	<i>Bacillus sp.</i> *	<i>Aeromonas sp.</i> *	<i>Serratia sp.</i> *	<i>Pyrodinomonas sp.</i> *
Monoazo						
P- Aminonaphthol	6	17	15	15	23	17
Sulfone Acid Orange 7	2.9	42	22	25	48	21
Methyl Red	6.6	—**	—	—	—	—
Diaz						
Direct Red 28	22	x***	83	96	x	76
Direct Yellow 4	39	y	42	60	73	85
Acid Red 73	25	—	—	—	—	—
Triphenylmethane						
Basic Green 4	8.9	—	—	—	—	—
Basic Violet 1	2.5	58	x	96	x	41
Ambazopyrone						
REBR	16	—	—	—	—	—
Methylene						
Basic Orange 21	33	x	x	x	x	x
Azoxymer						
Polys-319	38	—	—	—	—	—

Culture Condition: Cell Conc. 1mg/ml. Dye Conc.  $5.0 \times 10^{-3}$  mol/l  
pH: RB-1: 9 Others: 7 at 37°C Without Shaking  
\*: C. Tamoto, T. Ogawa, E. Iizuka, SEN-I GAKKASHI 40, 9, 324 (1984)  
\*\*: % Experiment \*\*\*: Undecolorized

図1：RB-1によるジアゾ染料の脱色特性

図2：RB-1と他の微生物の染料脱色性の比較  
(脱色率50%に至るまでの時間〔hr.〕)

#### 1) 新菌株(FERM P-9183)

アルカリゲネス属に属する好アルカリ性細菌 RB-1

生育 pH(至適):6.0~10.5(9 前後)

生育温度(至適):20~47DEG C(37~40DEG C)

#### 2) 脱色可能な染料

モノアゾ系、ジアゾ系、アントラキノン系、メチン系、トリフェニルメタン系、モノアゾ系ポリマー等

#### 3) 脱色法

培養物あるいは菌体を用いて pH7~10.5、温度 20~47DEG C(特に pH8~9、温度 37DEG C)で脱色。

### 成果展開可能なシーズ、用途等

染料の脱色

- 1) 産業廃液中の着色成分の除去
- 2) アルカリ条件下での着色成分の脱色

### 特許出願

1) 染料の脱色方法および染料分解能を有する微生物

特 願：昭 62-048661(昭 62.3.5) 特開昭 63-216472(昭 63.9.8)

出 願 人：新技術事業団、福永信幸、掘越弘毅

請求の概要：好アルカリ性アルカリゲネス属に属する微生物を用いたモノアゾ系、ジアゾ系、アントラキノ系、トリフェニルメタン系、メチン系およびモノアゾ系ポリマー染料の脱色法。

#### 報告書他

- 1) 福永信幸:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.211(平成元年9月)  
新技術事業団
- 2) 福永信幸:日本農芸化学会昭和62年度大会発表(昭和62年4月)  
「染料を脱色する好アルカリ性細菌の分離とその性質」

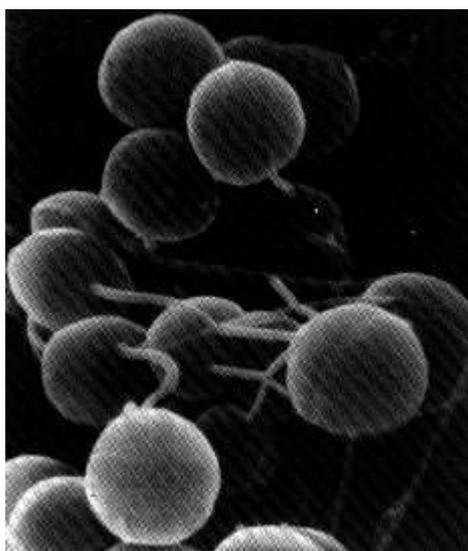
〔研究者名〕 福永信幸、掘越弘毅

## 11. マルトテトラオース

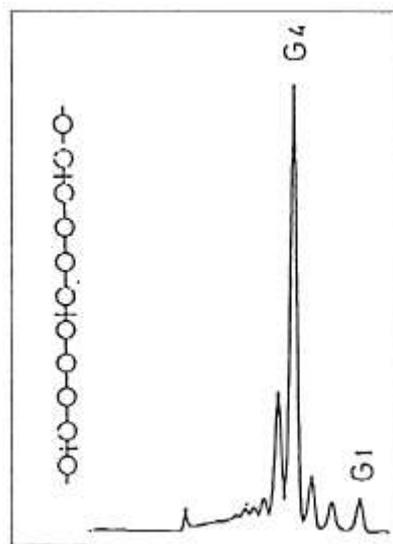
### マルトテトラオースの製造法

#### 研究成果の概要

菌体外へアミラーゼおよびプルラーゼを生産するマイクロコッカス属に属する新菌株を分離。本菌の培養液またはその処理物をアミロース、アミロペクチン、澱粉などに作用させると短時間に収率よくマルトテトラオースが得られる。(写真)、(図)



写真：菌の電子顕微鏡写真



図：馬鈴薯デンプン分解産物の HPLC 分析

#### 1) 新菌株(FERM P-9878)

マイクロコッカス属に属する新菌株  
本菌は低温、高アルカリでも生育

#### 2) 培養液処理物

培養上澄液、濃縮液、硫酸塩析物、部分精製標品など

#### 3) マルトテトラオースの製造法

基質濃度 0.5~10%、温度 60DEG C 以下(好ましくは 30~50DEG C)pH7~9、酵素量(アミラーゼで)0.1~2 単位/g 澱粉作用時間 5~80hrs

#### 成果展開可能なシーズ、用途等

アミラーゼ、プルラーゼ生産菌

#### 1) マルトテトラオース(診断用アミラーゼの活性測定用基質)の製造

## 特許出願

1) マルトテトラオースの製造法

特 願：昭 63-40836(昭 63.2.25) 特開平 1-218598(平 1.8.31)

出 願 人：新技術事業団、木村拓平、掘越弘毅

請求の概要：マイクロコッカス属に属し、菌体外アミラーゼ及びプルラナーゼを生産する微生物の培養液またはその処理物をアミロース、アミロペクチン、澱粉等に作用させるマルトテトラオースの製造法。

## 報告書他

1) 木村拓平:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.223(平成元年 9 月)  
新技術事業団

2) 木村拓平他:日本農芸化学会 昭和 63 年度大会発表(昭和 63 年 4 月)  
「好アルカリ性低温細菌、Micrococcus sp.No.207 の澱粉分解酵素」

3) 木村拓平他:日本農芸化学会 平成元年度大会発表(平成元年 4 月) 「アルカリ低温菌、Micrococcus sp.の生産するアミラーゼの精製と性質」

4) T.Kimura and K.Horikoshi:Production of Amylase and Pullanase by an Alkalopsychrotrophic Micrococcus sp.,Agric.Biol.Chem.,53,2963-2968(平成元年 11 月)

5) T.Kimura and K.Horikoshi:Purification and Characterization of alpha-Amylases of an Alkalopsychrotrophic Micrococcus sp.,Starch,42,403-407(平成 2 年 10 月)

6) T.Kimura and K.Horikoshi:Characterization of pullulan-hydrolysing enzyme from an alkalopsychrotrophic Micrococcus sp.,Appl Mrcrobiol Brotechnol 34 52-56(平成 2 年 10 月)

7) T.Kimura and K.Horikoshi:Effect of Temperarure and pH on the Production of Maltotetraose by alpha-Amylase of an Alkalopsychrotrophic Micrococcus, J.Ferment.Bioeng.,70, 134-135 (平成 2 年 8 月)

〔研究者名〕 木村拓平、掘越弘毅

## 12. ヘパリン、コンドロイチン硫酸分解酵素

新規ヘパリナーゼ、新規コンドロイチナーゼとその製造法

### 研究成果の概要

新規ヘパリナーゼ(ヘパリン及びヘパリチン分解酵素)および新規コンドロイチナーゼ(コンドロイチン硫酸分解酵素)を菌体外へ生産するバチルス属に属する新菌株を分離。本菌を用いて当該酵素の製造法を開発。(図1)、(図2)



図1：酵素の菌体外生産

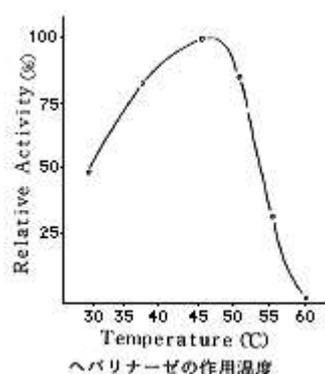


図2：ヘパリナーゼの作用温度

#### 1) 新菌株(FERM P-10408)

菌体外へヘパリナーゼ及び耐熱性コンドロイチナーゼを生産するバチルス属に属する新菌株

#### 2) ヘパリナーゼの性質

至適 pH:7.2~7.8、至適作用温度:45~50DEG C

活性化/安定化:Ca<sup>2+</sup>

#### 3) コンドロイチナーゼの性質

至適 pH:5.5~6.5、至適作用温度:50~80DEG C

#### 4) 酵素の製造法

新菌株を培養し、菌体外へヘパリナーゼ及びコンドロイチナーゼを生産させる方法

### 成果展開可能なシーズ、用途等

#### 新規ヘパリナーゼ

1) バイオアッセイ(体組織や体液中のヘパリン検出)

2) 医薬(抗トロンビン剤等の低分子ヘパリン断片調整用)

#### 新規コンドロイチナーゼ

1) コンドロイチン硫酸(アイローション、化粧品などの添加物)の生産

2) 人体組織、体液におけるコンドロイチン硫酸の検出

## 特許出願

1) バチルス属に属するヘパリナーゼ生産微生物、新規ヘパリナーゼ及びその製法

特 願：昭 63-297807(昭 63.11.25) 特開平 2-142470(平 2.5.31)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：ヘパリンおよびヘパリチン資化能を有する新規バチルス属に属する細菌および本菌が生産する新規ヘパリナーゼとその菌体外への製造法。

2) 耐熱性コンドロイチナーゼ及びその製造方法

特 願：平 1-204770(平 1.8.9)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：新規バチルス属細菌により、50DEG C から 80DEG C の作用温度で活性を有する耐熱性コンドロイチナーゼを製造。

3) ヘパリナーゼをコードするプラスミド、このプラスミドを保持するヘパリナーゼ生産株及びヘパリナーゼの製造法

特 願：平 1-240864(平 1.9.19)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：新規バチルス属細菌からのヘパリナーゼ生産 DNA を大腸菌に導入し、同酵素を製造

4) 低分子量ヘパリンの製造法

特 願：平 2-41298(平 2.2.23)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：新規バチルス属細菌より得られるヘパリナーゼ、菌体等で、40～55DEG C で処理することにより、低分子量ヘパリンを製造。

5) 低分子量コンドロイチン硫酸の製造方法

特 願：平 2-41297(平 2.2.23)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：コンドロイチン硫酸を新規バチルス属細菌より得られるコンドロイチナーゼあるいは菌体等により、50～90DEG C で処理し、低分子量コンドロイチン硫酸を製造。

6) コンドロイチン硫酸から誘導される不飽和二糖の製造方法

特 願：平 2-41299(平 2.2.23)

出 願 人：新技術事業団、掘越弘毅

請求の概要：コンドロイチン硫酸を新規バチルス属細菌より得られるコンドロイチナーゼあるいは菌体等により、50～90DEG C で処理し、不飽和二糖を製造。

### 《外国出願》

- 1) Heparinase-producing microorganism belonging to the genus bacillus, new heparinase and process for producing same

米国出願 440,061(11.22.'89),EPC (英、西独、仏)出願中

国内出願 特願昭 63-297807 に同じ

### 報告書他

- 1) ウェイン・ベラミー 掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.239(平成元年9月)  
新技術事業団

〔研究者名〕 ウェイン・ベラミー、掘越弘毅

### 13. 新規な好塩好アルカリ性嫌気性細菌

新属新種の好塩好アルカリ性・嫌気性菌、好塩好アルカリ性アミラーゼ

#### 研究成果の概要

デンプンを資化しアミラーゼを菌体外に産生する能力をもつ、新規な好塩好アルカリ性・嫌気性の細菌を分離。(図1)、(図2)

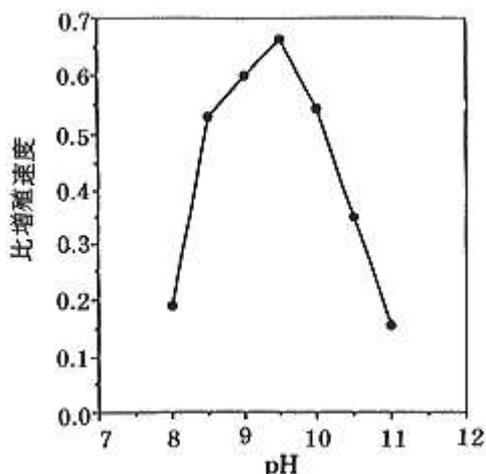


図1：本菌の生育に対する pH の影響

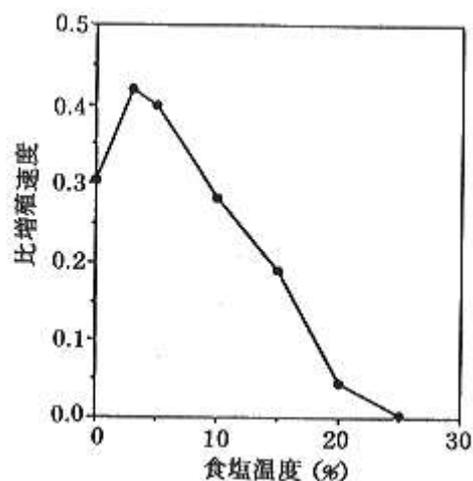


図2：本菌の生育に対する食塩濃度の影響

#### 1) 新菌株(FERM P-9919)

新属新種の好塩好アルカリ性・嫌気性菌、ハロアルカリビウム・スポロゲヌム

#### 2) 新菌株の性質

- ・幅広い塩濃度範囲で生育可能な中度好塩性菌(食塩濃度 0.1~4.3M)
- ・偏性好アルカリ性菌(至適 pH:9~10・pH8 未満では生育不能)
- ・通性嫌気性菌(好氣的にも嫌氣的にも生育可能)
- ・運動性を有する孢子形成桿菌
- ・カタラーゼ・オキシダーゼ両活性ならびにチトクローム
- ・キノンなどの好気性菌に特有な構成成分を持たない
- ・デンプンを資化して生育し、アミラーゼを菌体外に生産する

#### 成果展開可能なシーズ、用途等

嫌気性・好アルカリ性好塩性菌

好塩好アルカリ性アミラーゼ

- 1) 澱粉工業における澱粉糖の製造
- 2) 石油の微生物回収
- 3) 酸素除去システムへの応用

## 特許出願

1) ハロアルカリビウム・スポロゲヌム

特 願：昭 63-53293(昭 63.3.7) 特開平 1-225479(平 1.9.8)

出 願 人：新技術事業団、芝 弘孝、掘越弘毅

請求の概要：運動性を有し、通性嫌気性であり、オキシダーゼ、カタラーゼ、チトクローム及びキノンを含有せず、0.1~4.3M の食塩濃度において生育可能であるハロアルカリビウム・スポロゲヌム。

## 報告書他

1) 芝 弘孝:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 P.295(平成元年 9 月)

新技術事業団

2) 芝 弘孝他:日本農芸化学会昭和 63 年度大会発表(昭和 63 年 4 月)

「米国西部高塩環境からの嫌気性・好塩性菌の分離と性質」

3) 芝 弘孝他:日本農芸化学会平成元年度大会発表(平成元年 4 月)

「絶対好アルカリ性・嫌気性好塩菌の分類学的研究」

4) H.Shiba and K.Horikoshi:Isolation and characterization of novel anaerobic, halophilic eubacteria from hypersaline environments of western America and Kenya,in Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology, eds. by M.I.S.da Costa,J.C.Duarte,and R.A.D.Williams,pp.371-374,Elsevier Applied Sciehce, London (June 1989)

5) H.Shiba et al.:Genus. Haloalcalibium, a new type of facultatively anaerobic, haloalkalophilic eubacteium,in IUMS Congress:Bacteriology & Mycology-Osaka,Japan (September, 1990)

〔研究者名〕 芝 弘孝、掘越弘毅

## 14. メタン生成細菌

新規高度好塩性、好アルカリ性メタン生成細菌および高速メタン発酵法

### 研究成果の概要

従来、分離が極めて困難であった特殊環境メタン生成細菌の高効率分離手法を開発した。同法を用い、広く国内外サンプルを対象にスクリーニングを実施した結果、多数の好塩性、好アルカリ性、好熱性、耐低温性、重金属耐性等の特殊環境メタン生成細菌の分離に成功した。これらの分離菌の中で特に、米国西部高塩環境から分離されたものは新属新種の高度好塩性メタン生成細菌、日本の東北地方湖沼底泥から分離されたものは新種の好アルカリ性メタン生成細菌と同定された。さらに、メタン生成のための複数基質を資化可能で、かつ基質間で資化速度が異なるメタン生成細菌に関する高速メタン発酵法を開発した。

今後、これらの特殊環境メタン生成細菌を利用することで、エネルギー回収型の廃棄物・廃水処理法として用いられているメタン発酵法の従来技術の飛躍的革新が期待されると共に、遺伝子工学的育種への応用等が期待される。(写真1)、(写真2)

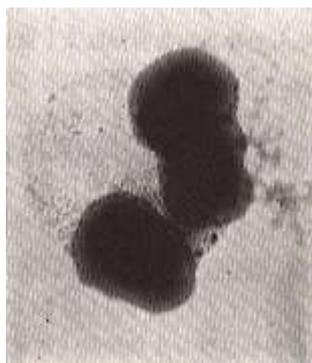


写真1：高度好塩性メタン生成細菌の電子顕微鏡写真



写真2：好アルカリ性メタン生成細菌の蛍光顕微鏡写真

#### 1) 新菌株(高度好塩性細菌)・・・新属・新種

メタノサリナリウム・フラジェルム NY-218(FERM BP-2079)

生育至適 NaCl 濃度:2.5~3.0M

生育至適 pH:8.0~8.5、生育至適温度:35~37DEG C

メタン生成活性:15~45DEG C

資化基質:メタノール、メチルアミン

・同菌は高度好塩性、好アルカリ性を併せ持つとともに 15~20DEG C の低温においてもメタン生成活性を維持する耐低温性でもある。

#### 2) 新菌株(好アルカリ性)・・・メタノサルシナ属

メタノサルシナ・アルカリフィラ NY-728(FERM BP-2309)

生育至適 pH:8.1~8.7、生育至適温度:34~42DEG C

メタン生成活性:15~45DEG C

資化基質:H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>、酢酸、メタノール、メチルアミン

- ・同菌は好アルカリ性であるとともに 15~20DEG C の低温においてもメタン生成活性を維持する耐低温度の菌である。

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) メタン発酵の応用分野拡大(低温・常温メタン発酵、海洋バイオマス等の有効利用)
- 2) 既存システムの高塩濃度阻害、高 pH 阻害対策
- 3) メタン発酵用リアクターのコンパクト化
- 4) 特殊環境性を支配する遺伝子の供給源

### 特許出願

- 1) 高度好塩性メタン生成細菌

特 願：昭 62-255995(昭 62.10.9) 特開平 1-98474(平 1.4.17)

出 願 人：新技術事業団、中津川直樹、掘越弘毅

請求の概要：高度好塩性メタン生成細菌、メタノサリナリウム・フラジェラム

- 2) 好アルカリ性メタン生成細菌

特 願：昭 63-053294(昭 63.3.7) 特開平 1-225480(平 1.9.8)

出 願 人：新技術事業団、中津川直樹、掘越弘毅

請求の概要：生育至適 pH8.1~8.7 を有するメタノサルシナ・アルカリフィラ

- 3) 高速メタン発酵法

特 願：昭 63-053295(昭 63.3.7) 特開平 1-228600(平 1.9.12)

出 願 人：新技術事業団、中津川直樹、掘越弘毅

請求の概要：複数の基質を資化でき、基質間で資化速度に差異があるメタン生成細菌を用い、資化速度の遅い基質を発酵の主な対象とするメタン発酵法において、前記の資化速度の遅い基質とそれよりも資化速度の速い基質を用いることで、短時間に高菌体濃度を実現する高速メタン発酵法。

### 《外国出願》

- 1) Extremely Halophilic Methanogenic Archaeobacteria

米国出願 255,015(10.7'88),EPC(英、仏、西独)出願

国内出願 昭 62-255995 に同じ

- 2) Alkalophilic methanogen and fast methane fermentation method

米国出願 318,907 (3.6'89), EPC(英、仏、西独、スイス) 出願

国内出願 昭 63-053294、昭 63-053295 に同じ

## 報告書他

- 1) 中津川直樹:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.333(平成元年9月)  
新技術事業団
- 2) 中津川直樹:昭和62年度日本醗酵工学会大会発表(昭和62年11月)  
「新規高度好塩性メタン生成細菌の探索と分離」
- 3) 中津川直樹:日本農芸化学会 昭和63年度大会発表(昭和63年4月)  
「新規な好塩性・好アルカリ性メタン生成細菌の諸性質」  
「新規な好アルカリ性メタン生成細菌の探索と分離」
- 4) 中津川直樹:化学工業会 第211回秋季大会シンポジウム  
「新規な好アルカリ性メタン生成細菌(Strain NY-728)の培養特性」

〔研究者名〕 中津川直樹、掘越弘毅

## 15. 微生物分離

微生物分離・培養容器、嫌気性菌分離用希釈液

### 研究成果の概要

#### 1) 微生物分離・培養容器

容器内の試料の分布状態を極力乱すことなく、また菌叢相互の汚染を生じることなく、特定部分の試料のみを取り出せ、採取量を制御可能な容器。(図)

#### 2) 嫌気性分離用希釈液

偏性嫌気性菌の高効率分離に適する希釈液(液中濃度 0.05%以上の還元剤、無機塩類、寒天および精製水を含む希釈液)・・・還元剤の量を調整することにより、所定の嫌気度を達成し得る。(図)

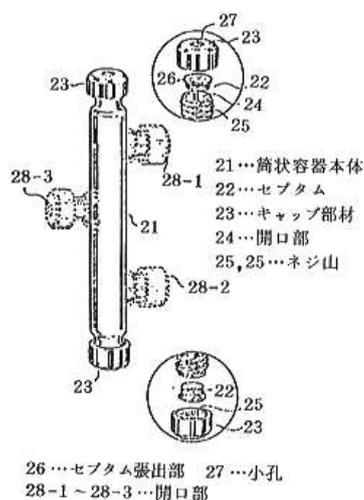


図1：微生物分離・培養容器

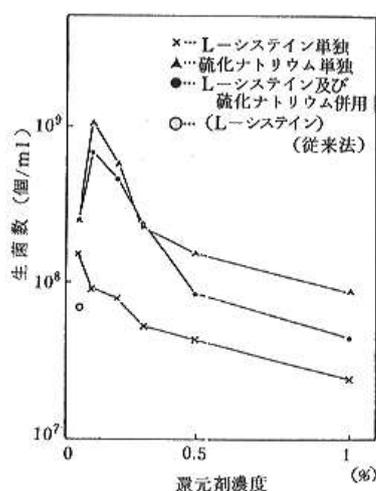


図2：嫌気性分離用希釈液を用いた偏性嫌気性菌(メタン生成細菌)の分離特性

### 成果展開可能なシーズ、用途等

- 1) 微生物分離・培養容器(走磁性、走光性、走化性等を有する微生物の効率的な分離と培養)
- 2) 嫌気性分離用希釈液(1の容器と組合せることにより、嫌気性微生物の高効率な分離と培養が可能)。

### 特許出願

- 1) 微生物の分離および培養用容器

特 願：昭 61-125086(昭 61.8.15) 実開昭 63-31799(昭 63.3.1)

出 願 人：新技術事業団、中津川直樹、掘越弘毅

請求の概要：少なくとも2か所に、着脱可能で穿刺可能なセプタムが装着され、これを中央に穿刺用開孔を有するキャップ部材で固定した開口部を有する筒状の容器。

2) 嫌気性分撃用希积液

特 願：昭 61-191541(昭 61.8.15) 特開昭 6349074(昭 63.3.1)

出 願 人：新技術事業団、中津川直樹、掘越弘毅

請求の概要：0.05%以上の濃度の還元剤と無機塩類、寒天および精製水を含む嫌気性分離用  
希积液

**報告書他**

1) 中津川直樹：掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.333(平成元年 9 月)  
新技術事業団

〔研究者名〕 中津川直樹、掘越弘毅

## 16. 磁性粉末

アルカリ生成酵素による磁性粉末の製造法

### 研究成果の概要

鉄イオンを含有する溶液に、アルカリ生成酵素あるいは本酵素を有する微生物を作用させることにより磁性粉末等を製造する方法を開発。(写真)

- 1) 鉄イオン  $\text{Fe}^{2+}$  および/または  $\text{Fe}^{3+}$  を含有する塩。  
例えば塩化物硫酸塩など。
- 2) アルカリ生成酵素  
(基質と反応してアルカリ性物質を生成する酵素)
  - ・加水分解酵素(ウレアーゼ、アスパルギラーゼ等)
  - ・酸化還元酵素(硫酸還元酵素、亜鉛硝酸還元酵素等)
  - ・アルカリ生成酵素を生産する菌体
- 3) 反応条件 目的生成物に対応した酸化還元条件下で、酵素の至適温度付近で数時間から数日反応させる。
- 4) 生成物
  - ・50~500nm の均一なマグネタイト微粒子
  - ・ゲーサイト等のオキシ水酸化物及びその酸化物
- 5) 特徴
  - ・生成物の微小性
  - ・生成物の均一性
  - ・酵素固定化法等を利用した局所的生成法



写真：磁性粉末の電子顕微鏡写真

### 成果展開可能なシーズ、用途等

均一微細な磁性粉末

- 1) 磁気記録用または磁性硫体用
- 2) バイオリアクター用担体
- 3) 細胞あるいは生体高分子等の分離用
- 4) 薬剤キャリアー

局所的製造法

- 1) マイクロカプセルの磁化
- 2) 繊維の磁化
- 3) ガラスの磁化

### 特許出願

1) 磁性粉末の製造法

特 願：昭 62-204815.(昭 62.8.18)

出 願 人：新技術事業団、浜谷 徹、掘越弘毅

請求の概要：鉄イオンを含有する溶液をアルカリ生成酵素およびその基質を用いてアルカリ化する工程を含む酸化鉄、水酸化鉄およびオキシ水酸化鉄の少なくとも1つの製造法

### 《外国出願》

1) Method for preparing magnetic powder

米国特許 USP4,945,049(7.31'90),PCT(西独)出願中

国内出願 特願昭 62-204815 と同じ

### 報告書他

1) 浜谷 徹:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.357(平成元年9月)  
新技術事業団

2) 浜谷 徹他:日本農芸化学会 昭和 63 年度大会 講演要旨集、p.50,2Ga14(1988)  
「ウレアーゼ反応にともなうマグネタイト微粒子の生成」

〔研究者名〕 浜谷 徹、掘越弘毅

## 17. 生体触媒安定化剤

重水添加による生体触媒の安定化

### 研究成果の概要

生体触媒(酵素・菌体)安定化剤として重水が有効であることを見出した。重水の添加は、同時に雑菌による汚染を抑制できることがわかった。(図1)、(図2)

#### 1) 生体触媒

- ・ 酵素、固定化酵素
- ・ 菌体、固定化菌体

#### 2) 重水

- ・ 反応(保存)液中 30~100%含有する

#### 3) 効果

- ・ 酵素、菌体等生体触媒の安定化
- ・ 微生物の生育抑制効果

### 成果展開可能なシーズ、用途等

重水・・・生体触媒の安定化剤

- 1) 固定化酵素あるいは菌体の安定化
- 2) バイオセンサーの保存液

### 特許出願

- 1) 生体触媒安定剤

特 願：昭 63-2048(昭 63.1.8) 特開平 1-179689(平 1.7.17)

出 願 人：新技術事業団、浜谷 徹、掘越弘毅

請求の概要：重水を含む生体触媒(酵素、菌体)安定化剤

### 報告書他

- 1) 浜谷 徹:掘越特殊環境微生物プロジェクト研究概要集 p.362(平成元年 9月)  
新技術事業団

- 2) 浜谷 徹他:日本澱粉学会 昭和 62 年度大会発表(昭和 62 年 9月)  
「重水中のインベルターゼの生産及び熱安定化作用」

〔研究者名〕 浜谷 徹、掘越弘毅

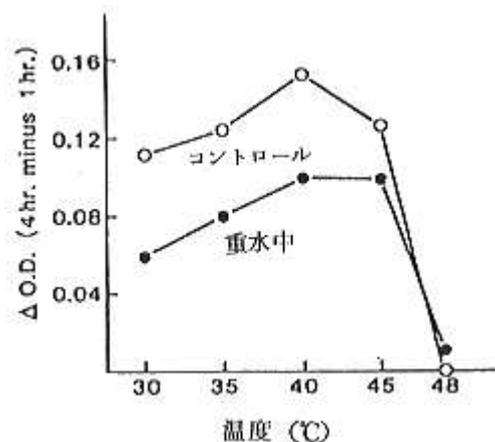


図1：大腸菌の重水による生育抑制効果

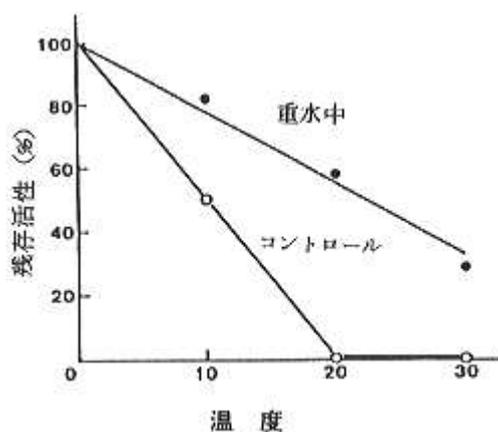


図2：酵母インベルターゼの重水による安定化効果