

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-179890

(P2013-179890A)

(43) 公開日 平成25年9月12日(2013.9.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 R	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2012-46270 (P2012-46270)	(71) 出願人 304036754 国立大学法人山形大学 山形県山形市小白川町1丁目4-12
(22) 出願日 平成24年3月2日(2012.3.2)	(74) 代理人 110001508 特許業務法人 津国
特許法第30条第1項適用申請有り 平成24年1月30日 山形大学工学部広報室の「工学部月例記者懇談会資料」に発表 讀賣新聞 平成24年1月31日付山形12版の第35面に発表 山形新聞 平成24年1月31日付の社会総合面に発表 米澤新聞 平成24年1月31日付日刊の第1面に発表 朝日新聞 平成24年2月8日付12版の第30面に発表	(74) 代理人 100078662 弁理士 津国 肇
	(74) 代理人 100131808 弁理士 柳橋 泰雄
	(74) 代理人 100119079 弁理士 伊藤 佐保子
	(74) 代理人 100135873 弁理士 小澤 圭子
	(74) 代理人 100141357 弁理士 鈴木 音哉

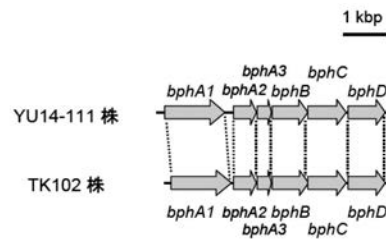
(54) 【発明の名称】 新規微生物及びこれを用いるポリ塩化ビフェニルの分解方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 PCB 汚染油として大量(大容量)に存在する比較的低濃度の PCB を、生物製剤により処理するだけで、短時間に浄化処理する方法を提供する。

【解決手段】 特定な配列からなるアミノ酸配列と95%以上の相同性を有するそれぞれのアミノ酸配列からなるビフェニル分解酵素群をコードするDNAを含み、ポリ塩化ビフェニル分解活性を有する、コマモナス属に属する微生物を培養して得られた菌体を含む生物製剤とポリ塩化ビフェニルとを接触させる。

【選択図】 図2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

配列番号 2 ~ 11 に示す各アミノ酸配列と 95% 以上の相同性を有するそれぞれのアミノ酸配列からなるピフェニル分解酵素群をコードする DNA を含み、ポリ塩化ピフェニル分解活性を有することを特徴とする、コマモナス属に属する微生物。

**【請求項 2】**

前記 DNA が、配列番号 1 に示す塩基配列又はこれと 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなる請求項 1 に記載の微生物。

**【請求項 3】**

前記微生物が、受託番号 NITE P-1215 として寄託されているコマモナス・テストステロニ YU14-111 株である請求項 1 又は 2 に記載の微生物。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 いずれか一項に記載の微生物を培養して得られた菌体を含む生物製剤とポリ塩化ピフェニルとを接触させることを特徴とするポリ塩化ピフェニルの分解方法。

**【請求項 5】**

前記生物製剤は、請求項 1 ~ 3 いずれか一項に記載の微生物を培養して得られた菌体の凍結融解物であるか、又は当該菌体と賦形剤とを含む凍結乾燥物である請求項 4 に記載のポリ塩化ピフェニルの分解方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、新規微生物及び当該微生物菌体を用いてポリ塩化ピフェニルを分解する方法等に関する。より詳細には、特定のピフェニル分解酵素群を有する新規なコマモナス属に属する微生物及びそれを用いてポリ塩化ピフェニルを効率よく分解する方法等に関する。

**【背景技術】****【0002】**

ポリ塩化ピフェニル類（以下、「PCB」と称する場合がある。）は、ピフェニルの 1 個以上の水素原子を塩素原子で置換した化合物の総称をいう。置換塩素の数及び位置によって多くの異性体が存在するが、金属に対して安定で、絶縁性、不燃性、高脂溶性、可塑性などに優れているため、電気製品、熱媒体、絶縁油、可塑剤、塗料及びノンカーボン紙の溶剤など、非常に幅広い分野で使用されてきた。しかし、生体に対する毒性が高く、脂肪組織に蓄積しやすく、発癌性があり、また皮膚障害、内臓障害、ホルモン異常を引き起こすことから、現在ではその使用が禁止されている。PCB は、化学的に安定で長期間にわたって自然分解することなく残留するため、人体への影響のみならず地球環境にも深刻な影響をもたらすことが問題となっている。

**【0003】**

国内でこれまでに製造・販売された PCB は、およそ 55000 トンと見積もられ、2016 年までに処理する計画が立てられているが、使用状況の正確な把握が難しく、その処理コストも高いことから、その分解処理が進んでいないというのが現状である。また、PCB 濃度が 10 mg / kg 程度の微量 PCB の割合が約 2 割、11000 トンもあると考えられ、微量 PCB を含む大量の処理物が存在すると推定される。

このような PCB 廃棄物の分解方法としては、従来から、焼却方法以外に、脱塩素化分解法、水熱酸化分解法、水素供与物質による還元熱化学分解法、紫外線照射法等による光分解法が知られている。これらのうち、紫外線分解法は、PCB を極性有機溶媒中に溶かして紫外線を照射することにより脱塩素化し、残留する PCB を生物処理又は触媒処理等によって無害化するものであり、常温、常圧処理できるため安全性が高いという利点がある。

**【0004】**

特許文献 1 に記載された方法は、最初に PCB を紫外線に曝して脱塩素処理を行い、次に大型発酵プラントの細菌で分解に至るものである。しかしながら、この処理法は、60

10

20

30

40

50

～ 80 重量 / 容量 % にもなる高濃度 P C B 汚染油を一度に大量処理する点に問題があり、紫外線照射工程に続く微生物処理工程で大量の培地を加えて P C B 濃度を調整しなければならず、微生物の培養、増殖と P C B の分解とを同時に行わなければならないという困難性があった。

#### 【 0 0 0 5 】

微生物による P C B 分解は、ビフェニル分解に関与する酵素群によって行われる。例えば、ビフェニル又はその誘導体（例えば P C B）の分解微生物シュードモナス属細菌（*Pseudomonas* sp.）KKS102株では、図 1 に示す経路で分解が行なわれることが知られている（例えば、非特許文献 1 参照）。この経路において、P C B は、まず、ビフェニルジオキシゲナーゼ（B p h A 酵素）により、2 つの水酸基（O H）が付加される。B p h A 酵素は 4 つのサブユニット（B p h A 1、B p h A 2、B p h A 3、B p h A 4）から構成されている。そして、図 1 に示す通り、B p h A 1 と B p h A 2 とが複合体を形成し、基質との結合及び酸素添加反応を触媒し、フェレドキシンが電子伝達体として機能し、フェレドキシンリダクターゼが N A D 又は N A D P H とフェレドキシンの酸化還元反応を触媒する。

10

#### 【 0 0 0 6 】

ついでジヒドロジオールジヒドロゲナーゼ（B p h B 酵素）によって、B p h A の産物から 2 つの水素が除かれた後、2, 3 - ジヒドロキシビフェニルジオキシゲナーゼ（B p h C 酵素）により、B p h B 産物に酸素 1 分子が付加され、H O P D A（B p h D の誘導基質）が生成する。ついで、2 - ヒドロキシル - 6 - オキソ - 6 - フェニルヘキサ - 2, 4 - ジエン酸ヒドロラーゼ（B p h D 酵素）が、H O P D A を安息香酸と 2 - ヒドロキシペンタ - 2, 4 - ジエノエートとに分解する。そして 2 - ヒドロキシペンタ - 2, 4 - ジエノエートヒドラターゼ（B p h E 酵素）、4 - ヒドロキシ - 2 - オキソバレレートアルドラーゼ（B p h F 酵素）及びアセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ（B p h G 酵素）によりアセチル C o A とピルビン酸に転換されると考えられる。

20

#### 【 0 0 0 7 】

これまでにビフェニル資化性菌として報告されている微生物は、シュードモナス属細菌（*Pseudomonas* sp.）KKS102株（例えば、非特許文献 1 並びに特許文献 2 及び 3 参照）、コマモナス・テストステロニ（*Comamonas testosteroni*）TK102株（非特許文献 2）及びロドコッカス・オパカス（*Rhodococcus opacus*）TSP203株（非特許文献 3）などがある。

30

#### 【 0 0 0 8 】

シュードモナス属細菌 KKS102 株においては、ビフェニル分解酵素遺伝子群は、クラスターをなしており、そのビフェニル分解酵素遺伝子群の塩基配列は、例えば、GenBank 等のデータベースに受入番号 D17319 等として登録されている。コマモナス・テストステロニ TK102 株も類似しているが異なる遺伝子群を有し、例えば、そのビフェニル分解酵素遺伝子群の塩基配列は、GenBank 等のデータベースに受入番号 AB086835 として登録されている。

#### 【 0 0 0 9 】

しかしながら、特許文献 2 及び 3 によれば、シュードモナス属 KKS102 系統の微生物は、P C B の中でも特に分解の難しい五塩化物をも分解することができるが、その分解速度は必ずしも速くないという問題点があった。そのため、P C B 分解能は持たないが、KKS102 系統の微生物の生育因子を分泌してその増殖を助けると共に P C B を乳化するバイオサーファクタントを分泌するシュードモナス属 KKL101 系統の微生物と混合培養するという P C B 分解方法が提案されている。

40

#### 【 0 0 1 0 】

一方、コマモナス・テストステロニ TK102 株を用いて P C B を分解している特許文献 1 に記載の方法によれば、P C B を完全に分解するためには、紫外線であらかじめ脱塩素化処理を施した P C B であっても 4 8 時間から 7 2 時間という長時間に渡る煩雑な培養操作を必要とする。また、コマモナス・テストステロニ TK102 株は、高濃度の P C B 存在下であっても生育が可能であるが、主として置換塩素数 3 以下の P C B を分解する性質を有し、置換塩素数が 5 又は 4 の P C B の分解は困難であることが記載されている（例えば、特

50

許文献4、段落番号0027及び0028参照)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】特開2001-46547号公報

【特許文献2】特許第2706718号公報

【特許文献3】特許第2967950号公報

【特許文献4】特許第3411800号公報

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Kikuchi Y. et al, Journal of Bacteriology, Vol.176, No.6, p.1689-1694, 1994.

【非特許文献2】Shimura M. et al, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 81, No. 6, pp.573-576, 1996.

【非特許文献3】Mukerjee-Dhar G., Shimura M., and Kimbara K. Enzyme and Microbial Technology. Vol.23 p34-41 1998.

【非特許文献4】K. Kimbara et.al. Agric. Biol. Chem., 52 (11), 2885-2891, 1988

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

分解対象物を高濃度PCB汚染油とした場合は、有機溶媒中のPCBを紫外線処理等によりPCB濃度を低下させ、その後、有機溶媒を回収して溶媒回収残液中のPCBを分解しうる微生物と培養処理する微生物処理工程に付しており、微生物の増殖とPCBの処理とを同時に行っている。このため、PCB分解細菌にPCBを分解させることによる生体負荷が大きくなり、処理時間や材料費の点でコストが高く経済的な実現性が乏しいという問題があった。

【0014】

そこで本発明は、PCB汚染油として大量(大容量)に存在する比較的低濃度のPCBを、生物製剤により処理するだけで、短時間に浄化処理することを目的とし、そのために用いるポリ塩化ビフェニル分解活性を有する微生物及び当該微生物を用いてPCBを分解する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者らは、米沢市内及びその近郊で採取した土壌や浄水場の活性汚泥から採取した試料を用い、ビフェニルを炭素原とした合成培地でビフェニル分解菌をスクリーニングした結果、生育速度の高い微生物を見出した。この微生物の遺伝子を解析したところ、16SrDNA解析等によりコマモナス・テストステロニであることが分かったが、そのビフェニル分解酵素遺伝子群は、従来報告されているコマモナス・テストステロニTK102株のbphオペロンとは異なり、むしろアシドボラックス由来のKKS102株由来のbphオペロンと類似していることが分かった。そして、本発明の微生物が高い生育速度とビフェニル分解活性を有し、微量PCBの分解に特に適したすぐれた生物製剤として利用しうることを見出し、本発明を完成した。

【0016】

すなわち、本発明のコマモナス属に属する微生物は、配列番号2~11に示す各アミノ酸配列と、それぞれ95%以上、好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるビフェニル分解酵素群をコードするDNAを含み、ポリ塩化ビフェニル分解活性を有することを特徴とする。

【0017】

好ましい実施形態において、前記DNAは、配列番号1に示す塩基配列又はこれと90%以上、好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の相同性を有する塩基配列

10

20

30

40

50

からなることを特徴とする。また、前記微生物は、受託番号NITE P-1215として寄託されているコマモナス・テストステロニYU14-111株であることが好ましい。

【0018】

異なる観点において、本発明は、上記微生物を培養して得られた菌体を含む生物製剤とポリ塩化ビフェニルとを接触させることを特徴とするポリ塩化ビフェニルの分解方法を提供する。前記生物製剤は、上記微生物を培養して得られた菌体の凍結融解物であるか、又は当該菌体と賦形剤とを含む凍結乾燥物であることが好ましい。

【発明の効果】

【0019】

本発明のコマモナス属に属する新規微生物は、その凍結融解菌体が高いPCB分解活性を示すことから生物製剤として使用することができ、従来の方法に比べてより効率的にポリ塩化ビフェニルを分解することができる。また、乾燥菌体として保存できるので、腐敗や変敗を防止し、輸送性や貯蔵性を高めるとともに、PCB分解工程への添加が容易であることから作業性が向上し、再現性よくPCBを分解することができる。さらに高度な製剤化（造粒や成形）が可能となり（二次加工性が上がる）、他の活性特徴を有する細菌との混合が可能になる。

10

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】ビフェニル分解微生物によるビフェニル分解経路を表す模式図である。

【図2】本発明に係るコマモナス・テストステロニYU14-111株と、コマモナス・テストステロニTK102株とのbphオペロンの構造を比較した模式図である。

20

【図3】本発明に係るコマモナス・テストステロニYU14-111株により、高濃度PCBの分解反応を行ったときの反応時間と残存PCB量との関係を示すグラフである。

【図4】本発明に係るコマモナス・テストステロニYU14-111株により、低濃度PCBの分解反応を行ったときの反応時間と残存PCB量との関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

[ビフェニル資化微生物のスクリーニング]

本発明の微生物の種類としては、ゲノム上にビフェニル分解（以下、PCB分解ともいう）酵素群の遺伝子を有し、生育速度の速い微生物であればよく、このような微生物は通常ビフェニルを単一の炭素源として生育し得る微生物からのスクリーニングを繰り返し行うことにより見出される。生育したビフェニル資化菌（群）の中から、生育速度の速い菌株を単離し、16SrDNA解析及びアピキット等を用いる細菌同定検査により、コマモナス・テストステロニ(*Comamonas testosteroni*)であることを同定した。

30

さらに本発明の微生物は、後述する遺伝子解析の結果、従来から報告されているコマモナス・テストステロニTK102株が有するビフェニル分解酵素群とは異なる酵素群をコードする新規な微生物であることが分かった。天然にビフェニル分解酵素を産生する微生物としては、シュードモナス属、コマモナス属、ブルクホルデリア属、スフィンゴモナス属、ロドコッカス属、ラルストニア属等に属する多くの細菌があるが、ビフェニル資化性菌のスクリーニング段階でビフェニル分解活性が高くかつ生育速度が速い微生物を選択することは、先に挙げた微生物間においてbphオペロン配列の組換えを起こし得たPCB分解活性に優れる新規な微生物の取得が期待できる。

40

【0022】

或いは、得られた微生物からビフェニル分解酵素遺伝子をクローン化し、これらに部位特異的突然変異誘発法等によって変異を導入することで、さらにPCB分解活性の向上した遺伝子群を作製することができる。なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。また、エラー導入PCRやDNAシャッフリング等の手法により、遺伝子の変異導入やキメラ遺伝子を構築することもできる。エラー導入PCR及びDNAシャッフリング手法は、当技術分野で公知の手法であり、例えば、エラー導入PCRについてはChen K, and Arnold FH.

50

1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 5618-5622を、またDNAシャフリングやカセットPCR等の分子進化工学的手法は、例えば、Kurtzman, A. L., Govindarajan, S., Vahle, K., Jones, J. T., Heinrichs, V., Patten P. A., Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins. Curr. Opin. Biotechnol., 12, 361-370, 2001等に記載されている。これらの手法によって作製された突然変異遺伝子を、もとの微生物のゲノムDNAと置換するか、プラスミドDNAやコスミドDNAにクローン化して宿主微生物に導入し、新規な微生物を作製することも可能である。

#### 【0023】

本発明の新規な微生物は、コマモナス・テストステロニYU14-111株（ロット番号YU14-11-03）として、2012年1月27日付けで、受託番号NITE P-1215として独立行政法人製品評価技術基盤機構特許微生物寄託センターに寄託されている。なお、本発明のコマモナス・テストステロニYU14-111株は、マスターセルバンクにて複数の菌体に分けて保管されており、ロット番号YU14-11-03はその中の1つの菌体を表す。

#### 【0024】

[ピフェニル分解酵素群及びそれらをコードする遺伝子]

本発明に係る新規なコマモナス属に属する微生物が有するピフェニル分解酵素群は、例えば、配列番号1に示す塩基配列又はこれと90%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAによってコードされ得る。ここで、配列番号1に示す塩基配列は、微生物由来のbphオペロンを含む11279塩基対からなり、少なくとも、2-ヒドロキシペンタ-2,4ジエノエートヒドラターゼ(BphE; 配列番号2)、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼ(BphG; 配列番号3)、4-ヒドロキシ-2-オキシバレレートアルドラーゼ(BphF; 配列番号4)、推定膜タンパク質(BphX; 配列番号5)、ピフェニルジオキシゲナーゼサブユニット(BphA1; 配列番号6)、ピフェニルジオキシゲナーゼサブユニット(BphA2; 配列番号7)、ピフェニルジオキシゲナーゼフェレドキシサブユニット(BphA3; 配列番号8)、シス-2,3-ジオールデヒドロゲナーゼ(BphB; 配列番号9)、ジヒドロキシピフェニルジオキシゲナーゼ(BphC; 配列番号10)及び2-ヒドロキシ-6-オキシ-6-フェニルヘキサ-2,4-ジエン酸ヒドロラーゼ(BphD; 配列番号11)の10個の酵素タンパク質をコードする。

#### 【0025】

本発明に係るピフェニル分解酵素群は、例えば、ピフェニル分解活性を害さない範囲内において配列番号2~11に記載のアミノ酸配列に一個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を有するもの(以下「相同体」又は「ホモログ」と称する場合もある。)を挙げることができる。ここで数個とは、具体的には20個以下、好ましくは10個以下、より好ましくは5個以下である。

また、前記相同体は、配列番号2~11に示されるアミノ酸配列と95%以上、好ましくは97%以上、より好ましくは98%以上のホモロジーを有するタンパク質であってもよい。ちなみに上記ピフェニル分解酵素群の各タンパク質についてのホモロジー検索は、例えば、GenBankやDNA Databank of JAPAN(DDBJ)を対象に、FASTAやBLASTなどのプログラムを用いて行うことができる。配列番号2~11に記載のそれぞれのアミノ酸配列を用いて、GenBankを対象にBLAST programによりホモロジー検索を行った結果、配列番号2~11の配列は、従来から公知のコマモナス・テストステロニTK102株のピフェニル分解酵素群とは約90%の相同性しか有さないことが分かった(下記表1参照)。

#### 【0026】

そこで、本発明のコマモナス・テストステロニYU14-111株のbphオペロンの塩基配列を解析し、コマモナス・テストステロニTK102株のbphオペロン(GenBank受入番号AB086835)と比較した結果を図2に示す。塩基配列レベルでの相同性は約90%程度であり、全体的に塩基置換が認められる他に、特徴的な違いとしてbphA1遺伝子とbphA2遺伝子の間にYU14-111株では約170塩基のギャップがあるのに対し、TK102株ではこのようなギャップが認められなかった。なお、当該遺伝子の塩基配列から推定した、Bph

10

20

30

40

50

A 1 ~ B p h D の各酵素についてアミノ酸配列の相同性を計算した結果を以下の表 1 に示す。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

酵素名	アミノ酸残基数		相同性 (%)
	YU14-111株	TK102株	
BphA1	458	458	92.1
BphA2	193	193	87.6
BphA3	109	109	93.6
BphB	<u>276</u>	<u>282</u>	92.8
BphC	293	293	94.2
BphD	286	286	94.1

10

【 0 0 2 8 】

表 1 に示したように、上記 6 個のタンパク質についてのアミノ酸配列の相同性はすべて 9 5 % 以下であり、本発明に係るコマモナス・テストステロニ YU14-111 株のピフェニル分解酵素は、従来から公知のコマモナス・テストステロニ TK102 株のそれらとは異なると考えられる。なお、本発明に係る配列番号 1 の塩基配列と相同性の高い塩基配列を検索したところ、アシドボラックス属 (*Acidovorax* sp.) KKS102 株の b p h オペロン (GenBank 受入番号 AB546270) と実質的に同一の配列を有することが分かった。これは、アシドボラックスとコマモナスとの間で、(あるいは、さらに他の菌株を介して) DNA の水平伝播が起こったものと推測される。これらの細菌は、古典的な分類では、グラム陰性、桿菌、胞子を形成しない極鞭毛を有し、G + C 含量が 5 0 % 以上である細菌としてシュードモナス属に分類されていたが、最近の 1 6 s r R N A の相同性等に基づく系統解析によって、新たな属として再分類されたものである (古川謙介、*生物工学* 第 8 9 巻 第 9 号 549-552, 2011 参照)。

20

30

本発明は、これらの類縁菌の中から見出された新規な微生物が、本発明の P C B 分解方法に用いる上で極めて有用な性質を有するという事実に基づくものであり、以下に、その培養方法及び P C B 分解方法への使用について詳細に説明する。

【 0 0 2 9 】

[ポリ塩化ピフェニル分解活性を有する細菌コマモナス・テストステロニ YU14-111 株の培養法及び生物製剤の調製法]

最初に、高いポリ塩化ピフェニル分解活性を有する細菌コマモナス・テストステロニ YU14-111 の培養法について述べる。培地は非特許文献 4 を参考に pH が 6 . 8 ~ 7 . 0 までとなるように調整した合成培地が良く、さらにピフェニルを炭素源として 0 . 0 5 ~ 0 . 1 % ( w / v ) まで加えたものが望ましい。さらにピフェニルは、あらかじめジメチルスルホキシドにて溶解したものを加えても良い。本培養に至る前に 3 段階の前培養を行う事が、細菌を適切に生育する上で望ましい。手順は、培地量の 1 0 倍以上の容積の試験管などに前に述べたピフェニルを 0 . 0 5 ~ 0 . 1 % ( w / v ) まで加えた合成培地を 2 ~ 3 m l まで入れ、1 5 ~ 1 8 % ( w / w ) までに調整したグリセロールへ菌体量として  $OD_{660} = 0 . 1 \sim 0 . 8$  までとなるように - 8 0 以上で凍結保存したコマモナス・テストステロニ YU14-111 株をできるだけ速やかに解凍したものを播種し、振盪回転を 1 2 0 r p m、温度を 3 0 ~ 3 5 まで、 $OD_{660} = 0 . 4 \sim 0 . 8$  まで培養し、次に培地量が 5 倍以上の容積のフラスコなどに入れた同じくピフェニルを 0 . 0 5 ~ 0 . 1 % ( w / v ) まで加えた合成培地 2 7 ~ 3 0 m l までにその全量を投入し、振盪回転を 1 2 0 r p m、温度を 3 0 ~ 3 5 まで、 $OD_{660} = 0 . 4 \sim 0 . 8$  まで培養し、さらに培地量の 5

40

50

倍以上の容積のフラスコなどにピフェニルを0.05~0.1% (w/v)まで加えた合成培地270~300mlまでに全量を投入し、振盪回転を120rpm、温度を30~35℃まで、 $OD_{660} = 0.4 \sim 0.8$ まで培養する。本培養は温度と空気または酸素の曝気を制御でき、さらに攪拌翼を装備しその翼形状はタービン型でも良く、回転数も制御できるファーマンターなどの自動培養装置を用いるのが望ましい。前培養と同じく合成培地2.7~3Lまでに対し、ピフェニルを0.02~0.05% (w/v)までとなるように加えて、そこへ前培養した培養液全量を投入する。攪拌翼の回転数は400~600rpmまでとし、空気の場合は4~5L/minまでとし、温度は30~35℃までとなるように調節する。培養液中の酸素濃度を高めるために排圧ユニットを用いるとなお良い。その場合は排圧を0.005~0.01MPaまでとなるよう調節すると良い。細菌の生育と共に炭素源であるピフェニルが消費されるが、さらにピフェニルを0.02~0.05% (w/v)までとなるように継続的に加えていくことが望ましく、さらにピフェニルはあらかじめジメチルスルホキシドにて溶解したものを加えても良く、最終的により高塩素化されたポリ塩化ピフェニルの分解活性を獲得した細菌が得られる。培養中の培養液のpHは細菌の最終収量に影響を与えるため、その範囲は7.0~9.0までとするのが望ましく、pHの調整にはアンモニウム塩を0.02%~0.05% (w/v)までとなるように断続的に加えるのが良く、硫酸アンモニウムでも良い。また硫酸アンモニウムの選択は、培養中に消費する窒素源を補充する上でも望ましい。最終の培養液の $OD_{660} = 2.5 \sim 3.0$ までで、湿重量が15~20gまでの高活性なポリ塩化ピフェニル分解細菌であるコマモナス・テストステロニYU14-111が得られる。

10

20

#### 【0030】

次に、ポリ塩化ピフェニル分解活性を有する細菌コマモナス・テストステロニYU14-111を速やかに高い回収率で得られる培養法について述べる。培地はTerrific Brothを改変したイースト・エキストラクト2.4%とトリプトン1.2%を主成分とし、リン酸水素二ナトリウム塩とリン酸二水素ナトリウム塩それぞれ70mMを、6対4の比率で混合した緩衝成分を含み、オートクレーブによる滅菌の後にpH6.8~7.0で調整したものが望ましい。緩衝成分にカリウム塩を用いるとコマモナス・テストステロニYU14-111株の生育初期における増殖が思わしくない。前に述べたTerrific Broth改変培地へピフェニルを追加炭素源として0.02~0.05% (w/v)まで加えたものが望ましい。さらにピフェニルは、あらかじめジメチルスルホキシドにて溶解したものを加えても良い。本培養に至る前に3段階の前培養を行う事が望ましく、培地量の10倍以上の容積の試験管などに0.05~0.1% (w/v)までのピフェニルを含む合成培地2~3mlまでを入れ、15~18% (w/w)までに調整したグリセロールへ、 $OD_{660} = 0.1 \sim 0.9$ までとなるように-80℃以上で凍結保存したコマモナス・テストステロニYU14-111株を速やかに解凍したものを播種し、振盪回転を120rpm、温度を30~35℃まで、 $OD_{660} = 0.6 \sim 0.8$ まで培養し、次に培地に対し5倍程度の容積のフラスコなどに入れた同じく0.05~0.1% (w/v)までのピフェニルを含むTerrific Broth改変培地27~30mlまでにその全量を投入し、振盪回転を120rpm、温度を30~35℃まで、 $OD_{660} = 0.6 \sim 0.9$ まで培養し、さらに培地に対し5倍程度の容積のフラスコなどに入れた同じく0.05~0.1% (w/v)までのピフェニルを含むTerrific Broth改変培地300mlに全量を投入し、振盪回転を120rpm、温度を30~35℃まで、 $OD_{660} = 0.6 \sim 0.8$ まで培養する。本培養は温度と空気または酸素の曝気を制御でき、さらに攪拌翼を装備しその翼形状はタービン型でも良く、回転数も制御できるファーマンターなどの自動培養装置を用いるのが望ましい。前培養と同じく合成培地2.7~3Lまでに対し、ピフェニルを0.02~0.05% (w/v)までとなるように加えて、そこへ前培養した培養液全量を投入する。攪拌翼の回転数は400~600rpmまでとし、空気の場合は4~5L/minまでとし、温度は30~35℃までとなるように調節する。培養液中の酸素濃度を高めるために排圧ユニットを用いるとなお良い。その場合は排圧を0.005~0.01MPaまでとなるよう調節すると良い。細菌の生育と共に炭素源であるピフェニルが消費されるが、さらにピフェニルを0.02~0

30

40

50



． 0 5 % ( w / v ) までとなるように継続的に加えていくことが望ましく、さらにビフェニルはあらかじめジメチルスルホキシドにて溶解したものを加えても良く、最終的に、 $OD_{660} = 14 \sim 20$  までで、湿重量が 100 ~ 150 g までのポリ塩化ビフェニル分解細菌であるコマモナス・テストステロニユ14-111が得られる。

#### 【 0 0 3 1 】

前に述べたそれぞれの方法で得られた菌体は、重力あるいは遠心による回収時において、生理食塩水あるいは 20 mM のリン酸緩衝液で少なくとも 2 回洗浄することが望ましく、リン酸塩はリン酸ナトリウム塩を用いるのが良い。また、菌体に対し糖アルコール等の賦形剤を加えて、糖アルコールはアルファ、ベータあるいはデルタ型のマンニトールでも良く、最終的に - 20 ~ - 80 までに温度制御された冷凍庫等で保存でき、凍結乾燥させた場合は 15 ~ 25 の常温で保存できるポリ塩化ビフェニル分解生物製剤が得られる。

10

#### 【 0 0 3 2 】

[ポリ塩化ビフェニルの分解反応]

本発明のポリ塩化ビフェニルの分解方法は、上記微生物を培養して得られた菌体を含む生物製剤とポリ塩化ビフェニルとを接触させることを特徴とする。本発明の好ましい実施形態では、このようにして得られた生物製剤を、比較的低濃度のポリ塩化ビフェニル汚染油と接触させたときに高い PCB 分解活性を発揮することができる。

#### 【 0 0 3 3 】

本発明で対象とするポリ塩化ビフェニルとしては、ビフェニル化合物に塩素原子が置換した化合物が含まれ、その置換塩素原子の数は 1 ~ 10 個である。平均置換塩素原子数は、一般に 2 ~ 6 個である。本発明では、これらのポリ塩化ビフェニルから選択された少なくとも一種を用いることができ、それぞれ単独で又は二種以上を任意に組み合わせたものも用いることができる。一般に、ポリ塩化ビフェニルは単一化合物として存在せず、塩素原子の数や置換位置が異なる混合物として存在する。従って、塩素原子の数及び置換位置の組み合わせからして 209 種の異性体が存在し、市販品には 100 を越える異性体が存在している。

20

#### 【 0 0 3 4 】

本発明の分解方法で処理できる PCB としては、3, 4, 4', 5 - テトラクロロビフェニル、3, 3', 4, 4' - テトラクロロビフェニル、3, 3', 4, 4', 5 - ペンタクロロビフェニル、2, 3, 3', 4, 4' - ペンタクロロビフェニル、2, 3, 4, 4', 5 - ペンタクロロビフェニル、2, 3', 4, 4', 5 - ペンタクロロビフェニル、2', 3, 4, 4', 5 - ペンタクロロビフェニル等が挙げられるがこれらに限定されない。

30

#### 【 0 0 3 5 】

PCB は、通常 PCB 単体の混合物として市販されており、これらがコンデンサやトランスに使用されている。その具体例としては、鐘淵化学 (株) の KC - 200 (2 塩化ビフェニル)、KC - 300 (3 塩化ビフェニル)、KC - 400 (4 塩化ビフェニル)、KC - 500 (5 塩化ビフェニル)、KC - 600 (6 塩化ビフェニル)、KC - 1000 (KC 500 / トリクロロベンゼン = 60 / 40 (質量比) の混合物) や、三菱モント (株) のアロクロール 1254 (54% Chlorine) 等が挙げられる。

40

#### 【 0 0 3 6 】

本発明に係るポリ塩化ビフェニルの分解反応は、上記 PCB を 0.05 ~ 1000 mg / L、好ましくは 1 ~ 100 mg / L 程度含む溶液中に、本発明の生物製剤を 0.2 ~ 20 重量%、好ましくは 2 ~ 12 重量% 程度添加することにより行うことができる。反応条件は、約 20 ~ 40、好ましくは 25 ~ 35、さらに好ましくは約 30 に温度を制御し、pH は 6 ~ 9 とし、攪拌した状態で約 12 ~ 72 時間処理することが好ましい。このような処理は、密閉式で攪拌式の培養装置を用いて行うことができ、小型の専用装置を用いて行うことが好ましい。PCB 分解装置が小型化できることにより、微量 PCB を保管するような貯蔵所でも直接処理作業を行うことができる。

50

## 【実施例】

## 【0037】

以下に本発明の製造方法の詳細について、実施例等を挙げて説明する。なお、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【0038】

## [実施例1] ビフェニル資化微生物のスクリーニング

スクリーニングに使用した合成培地(W培地)は、非特許文献4の記載を参考として、以下のような組成とした。

## 【0039】

## 【表2】

組成	含有量
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	9.8 g/L
$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	1.0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.95 mg/L
MgO	10.75 mg/L
$\text{CaCO}_3$	2.0 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.44 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/L
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.28 mg/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.06 mg/L

10

20

## 【0040】

pHが異なる3種類(pH6.3~6.5、pH7.3~7.5及びpH8.0~8.5)の培地を準備し、これに炭素原として、終濃度0.1%となるようにビフェニルを加えた。山形県米沢市内及びその近郊の17ヶ所の土壌及び活性汚泥から採取した小さじひとつかき程度のサンプルを培地に添加し、30、120rpmで約1週間、振盪培養を行った。濁度が上昇した培養液の一部を新しい培地に植え継ぎ、同条件で振盪培養を行う作業を数回繰り返した。

30

## 【0041】

ビフェニル資化微生物(群)の生育が見られた13種類の集積培養の中から、比較的速い生育が見られた、土壌サンプルNo.14(米沢浄水管理センター汚泥)を選抜し、微生物を単離した。すなわち、集積培養したビフェニル資化菌の培養液20μLを、0.04%ビフェニルを含む合成培地プレートに蒔いて30で一晚培養したところ、数多くの小さいコロニーの生育が見られた。密集して生育したところから、新しい0.04%ビフェニル合成培地プレートに線引き、展開した。生育したシングルコロニーを、0.1%ビフェニル液体培地に植菌してビフェニル資化性を確認すると共に、0.04%ビフェニル合成培地マスタープレートに植菌してコロニーの形状を観察した。

40

その結果、液体培養にてビフェニル資化性の確認された菌は、プレート上で約0.5mmの白色のコロニーを形成した。マスタープレートから再度シングルコロニーとして単離した微生物のビフェニル資化性を確認するとともに、16SrDNA解析を行った結果、コマモナス・テストステロニの16SrDNA配列と100%一致した。このようにして単離された菌をYU14-111株と命名し、グリセロールストックを作製した。

なお、このようにして得られた菌株の生化学的性質をアピ同定キット アピ20NE(シスメックス・バイオメリユー株式会社製)を用いて調べた結果、以下のようなデータが得られ、この結果からもコマモナス・テストステロニであることが確認された。

## 【0042】

【表 3】

## YU14-111株 生化学的性質

グラム染色	陰性	
オキシダーゼ	+	
硝酸塩還元	+	
インドール産生(トリプトファン)	—	
発酵(グルコース)	—	10
アルギニンジヒドロラーゼ	—	
ウレアーゼ	—	
β-グルコシダーゼ	—	
プロテアーゼ	—	
β-ガラクトシダーゼ	—	
資化性		
グルコース	—	
アラビノース	—	20
マンノース	—	
マンニトール	—	
N-アセチルグルコサミン	—	
マルトース	—	
グルコン酸	+	
カプリン酸	—	
アジピン酸	+	
リンゴ酸	+	30
クエン酸	±	
酢酸フェニル	—	

## 【 0 0 4 3 】

[実施例 2] YU14-111株の b p h オペロンの解析

ビフェニル資化菌におけるビフェニル / P C B 分解については、既知の分解細菌において、酸素分子を P C B の塩素置換の少ない 2 , 3 - 位に導入後、環開裂、加水分解を経て、塩化安息香酸へと分解する経路が知られている。

既知の P C B 分解細菌の B p h A 1 ( ビフェニル - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ サブユニット ) のアミノ酸配列の比較から、保存性の高い領域を数カ所選び ( Lys-Val-Phe-Lue-Asn-Gln-Cys ( 配列番号 1 4 ) 、 Gln-Phe-Cys-Ser-Asp-Met-Tyr ( 配列番号 1 5 ) 、 Glu-Gln-Asp-Asp-Gly-Glu-Asn ( 配列番号 1 6 ) など ) 、 degenerate プライマーを作製した。YU14-111株を、 $OD_{660} = 0.6 \sim 1.0$  まで培養した培養液  $0.1 \sim 1.2 \text{ ml}$  から遠心集菌した菌体を、適量の T E 緩衝液 (  $10 \text{ mM Tris-HCl}$  ,  $1 \text{ mM EDTA}$  ,  $pH 8.0$  ) に懸濁し、 $80 \sim 100$  で  $15 \sim 20$  分間加熱後、遠心した上清を YU14-111株の熱抽出物として使用した。これを鋳型とし、作製した degenerate プライマーを用いて、 $94$ 、 $3 \text{ 分}$  [  $94$ 、 $30 \text{ 秒}$   $52$ 、 $30 \text{ 秒}$   $68$ 、 $1 \text{ 分}$  (  $30 \text{ サイクル}$  ) ]  $68$ 、 $3 \text{ 分}$ 、の反応条件で P C R を行い、増幅された D N A 断片を、アガロースゲルより抽出・回収した。D N A の抽出・回収および精製は、ヨウ化ナトリウム 50

または類似の塩によりアガロースを溶解し、DNAをシリカゲル膜に吸着させる方法にて行った。精製したDNA断片の塩基配列は、ダイデオキシ法により決定し、YU14-111株のBphA1遺伝子(bphA1)の一部をコードしていることを確認した。

#### 【0044】

得られたYU14-111株のbphA1既知配列を利用して、上流および下流に続く未知領域の配列を、インバースPCRにより解析した。まず、bphA1の一部を含むDNA断片をプローブとして、各種制限酵素処理したYU14-111株のゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーションを行った。YU14-111株のゲノムDNAの調製は、菌体を溶菌後、タンパク質を除去し、DNAをアルコール沈殿させる方法を用いて行った。制限酵素としては、EcoRI, BamHI, DraI, HincII, NcoI, NdeI, SmaI, SacII, SphI, XhoI などを用いた。サザンハイブリダイゼーションは、DNAをナイロン膜に転写・固定し、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識したプローブの調製、および化学発光によるシグナルの検出は、Nucleic Acid Labelling and Detection Systemなどを用いて行った。インバースPCRに適当な、約1.9~6kbpのシグナルが検出された制限酵素XhoI, SacII, およびSmaIを選択し、YU14-111株のゲノムDNAを各々の制限酵素で処理した後、セルフライゲーションを行ったものを鋳型として、94℃、3~5分 [94℃、30秒 58~59℃、30秒 68℃、1分~6分 20秒(30サイクル)] 68℃、3~5分、の条件でインバースPCRを行った。得られた約1.2~5.7kbpの増幅断片をアガロースゲルから抽出・精製し、塩基配列を決定した。

10

#### 【0045】

なお、インバースPCRに用いたプライマーの配列は以下のとおりである。

Primer bphA-inv Fw: 5'-GCCCAATGAGGTGGAAGTG-3' (配列番号12)

Primer bphA-inv Rv: 5'-GCACATTGACCAGTTACCG-3' (配列番号13)

20

#### 【0046】

新たに既知となった配列を利用して、サザンハイブリダイゼーションにより同様に制限酵素SphI, XhoI, Sall, およびPstIを選択し、インバースPCRを、94℃、3~5分 [94℃、30秒 52~64℃、30秒 68℃、1分~8分(24~30サイクル)] 68℃、3~5分の条件で行い、得られた約1.2~3.5kbpの増幅断片の塩基配列を決定することで、さらに上流および下流の解析を行った。最終的に、YU14-111株のBphE、BphG、BphF、BphX、BphA1、BphA2、BphA3、BphB、BphC、およびBphD遺伝子を含む、11,279塩基対の配列(配列番号1)を決定した。

30

#### 【0047】

[実施例3] 高濃度ポリ塩化ビフェニルの分解反応

ポリ塩化ビフェニル分解細菌(製剤)の調製は、-20~-80℃で凍結保存した菌体を2回洗浄した後、20mMりん酸塩緩衝液で再懸濁することでポリ塩化ビフェニル分解細菌溶液を調製した。

次に、ポリ塩化ビフェニル分解反応を、材質が全てガラスか少なくとも容器の内面がガラスライナーとなった反応容器にて、前述のポリ塩化ビフェニル分解細菌溶液をOD<sub>660</sub>=6.0となるようこれへ投入し、さらにポリ塩化ビフェニルに対する細菌溶液を分散させるため界面活性剤であるTriton X-100を0.005%となるよう加え、100mg/LのカネクロールKC-300を反応液全量は500μlとなるように投入した。反応は50rpmで転倒攪拌し、反応温度は30℃にて全体の温度が均一となるようにして行った。

40

#### 【0048】

一定の時間毎に反応容器から分解反応物を採取し、分解の変化をポリ塩化ビフェニルの残量とするガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS: Agilent Technologies 7890A/5975C)で測定した結果を以下の表3及び図3に示した。ガスクロマトグラフィー質量分析計へ導入する試料の調製方法については、文献(Miyauchi et al. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING Vol.105, No.6, 628-635. 2008)を参考に、あらかじめポリ塩化ビ

50

フェニルの分析ピークに重ならない物質を内部標準物質としたアントラセンと塩酸を添加したポリ塩化ビフェニル抽出反応液にその倍量の酢酸エチルを加えて、遠心分離を2700から6400×gまでで10分間行い、有機相側の清を回収した。遠心分離の際、有機相と水相の間にエマルジョンが解消されない場合は、少量のエタノールを添加すると良い。またポリ塩化ビフェニルの抽出効率を高めるために、この操作を2回繰り返した。抽出液を硫酸ナトリウムにて脱水後、適宜、酢酸エチルでGC/MSの感度に応じて希釈しGC/MSへ注入し、計測した。

【0049】

【表4】

時間 [h]	KC-300濃度 [mg/L]	
	平均	S.D.
0	100	—
3	57.7	5.23
6	43.9	4.17
12	31.4	1.07
24	25.6	4.61
48	18.3	1.36

n = 3

10

20

【0050】

表3及び図3に示したように、YU14-111株は、100mg/Lのポリ塩化ビフェニルの分解反応開始12時間後まで急速にその分解を進め、 $31.4 \pm 1.07$  mg/Lまでポリ塩化ビフェニルを減少させた。また、48時間後には $18.3 \pm 1.36$  mg/Lまでポリ塩化ビフェニルを減少させた。この結果は、先行例(特許文献4)におけるComamonas testosteroni TK102株のポリ塩化ビフェニル分解活性データ(Kimbara et. al., Japanese Journal of Water Treatment Biology Vol.34 No.1. 57-65 1998)と比較した場合、YU14-111株は、ポリ塩化ビフェニル(カネクロールKC-300)の分解において、反応開始後12時間以内の分解速度にて優位であり、分解活性にて非劣性であると考えられる。

【0051】

30

【実施例4】低濃度ポリ塩化ビフェニルの分解反応

ポリ塩化ビフェニル分解細菌(製剤)の調製は、実施例3と同様に行った。次に、ポリ塩化ビフェニル分解反応を、材質が全てガラスか少なくとも容器の内面がガラスライナーとなった反応容器にて、前述のポリ塩化ビフェニル分解細菌溶液をOD<sub>660</sub> = 1.0となるようこれへ投入し、5mg/LのカネクロールKC-300を反応液全量が0.5~1mlとなるように投入した。反応は50rpmで転倒攪拌し、反応温度は30にて全体の温度が均一となるようにして行った。

【0052】

実施例3と同様の分析条件により、上記PCBの分解反応を解析した。その結果を以下の表4及び図4に示す。

40

【0053】

【表 5】

時間 [h]	KC-300濃度 [mg/L]	
	平均	S.D.
0	5.0	—
0.5	3.0	0.13
1	2.2	0.53
1.5	2.0	0.12
2	1.9	0.13
4	1.5	0.03
8	1.3	0.21
16	1.0	0.06

n = 3

## 【 0 0 5 4 】

表 4 及び図 4 に示したように、YU14-111株は、5 mg / L のポリ塩化ビフェニルの分解反応開始 1 時間後までで急速にその分解を進め、 $2.2 \pm 0.53$  mg / L までポリ塩化ビフェニルを減少させた。さらに、16 時間後には  $1.0 \pm 0.06$  mg / L までポリ塩化ビフェニルを減少させ、分解率は 80 % 以上であった。この結果から、YU14-111株は、先行例（特許文献 4）における *Comamonas testosteroni* TK102 株のポリ塩化ビフェニル分解活性データ（Kimbara et. al., Japanese Journal of Water Treatment Biology Vol.3 4 No.1. 57-65 1998）と比較した場合、短時間で極めて高い分解活性を示した。

## 【 0 0 5 5 】

[実施例 5] YU14-111株の PCB 異性体分解特性

実施例 3 及び 4 と同様の方法により、カネクロール KC - 300 等の商用 PCB を用いて本発明の菌株の PCB 異性体分解特性を調べた結果を以下の表 6 に示す。表 6 において、分解率表示欄の 100 mg / l は、高濃度 PCB 分解反応において、細菌溶液を  $OD_{660} = 60$  となるように投入し、48 時間転倒攪拌した後の結果であり、5 mg / l は、低濃度 PCB 分解反応において、細菌溶液を  $OD_{660} = 10$  となるように投入し、16 時間転倒攪拌した後の結果である。

## 【 0 0 5 6 】

10

20

30

【表 6】

PCB異性体	分解率 [%]	
	100 mg/l	5mg/l
26 22'	65.4	36.1
24 25	100	91.7
23'	100	99.6
24' 23	100	97.2
262'	65.6	25.1
34 34'	100	75.7
252'	65.8	34.8
44' 242'	81.5	63.2
263' 236	69.5	49.4
232' 264'	69.2	49.8
245	100	89.7
253'	86.4	63.3
243'	100	95.9
254'	75.6	43.8
244'	100	100
342' 234 233'	98	91
242'6' 234'	98.8	96.3
2362'	77.6	44.1
232'6'	78.6	39.4
252'5' 263'5'	72.3	38.5
242'5'	72.2	43
242'4' 2452' 2464'	72.2	35.1
343'	100	85.8
232'5'	71.8	40.3
344' 232'4' 2363'	84.8	58.2
2342' 2364' 263'4' 253'5'	72.4	41.5
232'3'	79.6	55.5
2453' 2353'	100	73.4
2354' 233'5'	100	76.9
2454'	77.3	51.8
253'4'	74.7	44.7
243'4' 2362'5'	77.1	48.7
2362'4'	100	73.6
2343'	100	100
2344' 233'4' 2352'5' 2362'3'	95.1	84.7
2452'5' 2352'4'	83.4	48.6
2452'4'	86.5	51.2
2452'3' 23452' 232'4'5'	100	47.9
2342'5'	93.2	46.1
2342'4'	100	63.8
343'4' 2363'4'	84	46.7
2342'3'	100	100
2453'4'	82.4	46.9
2343'4'	100	44.9

10

20

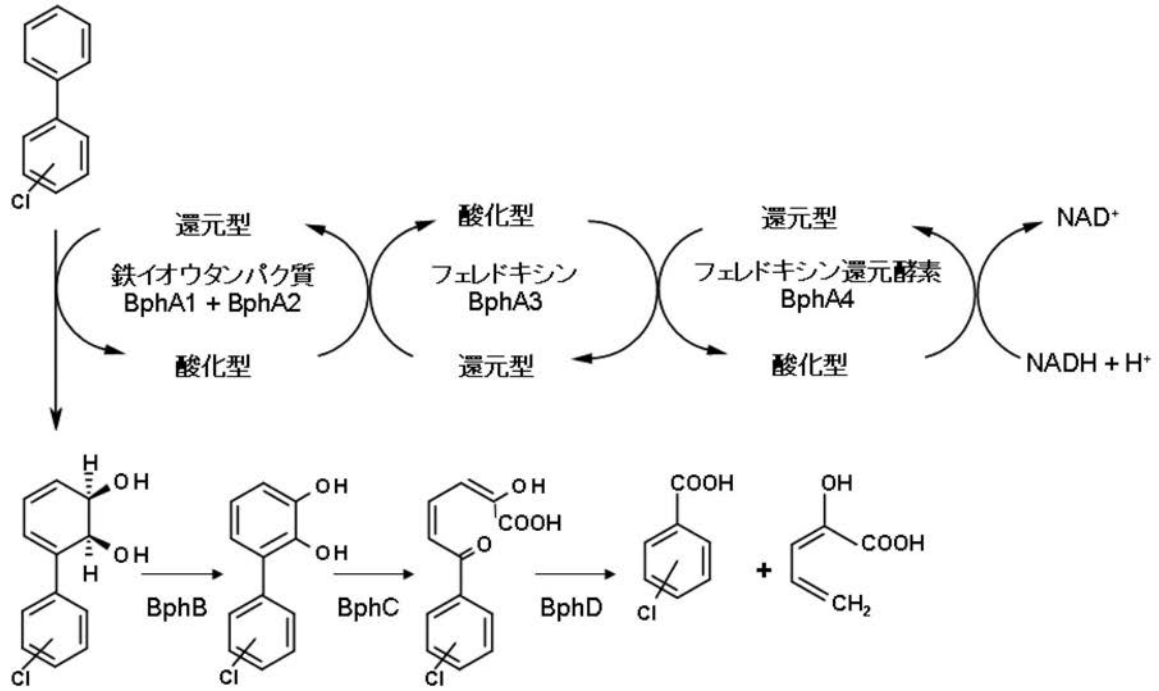
30

40

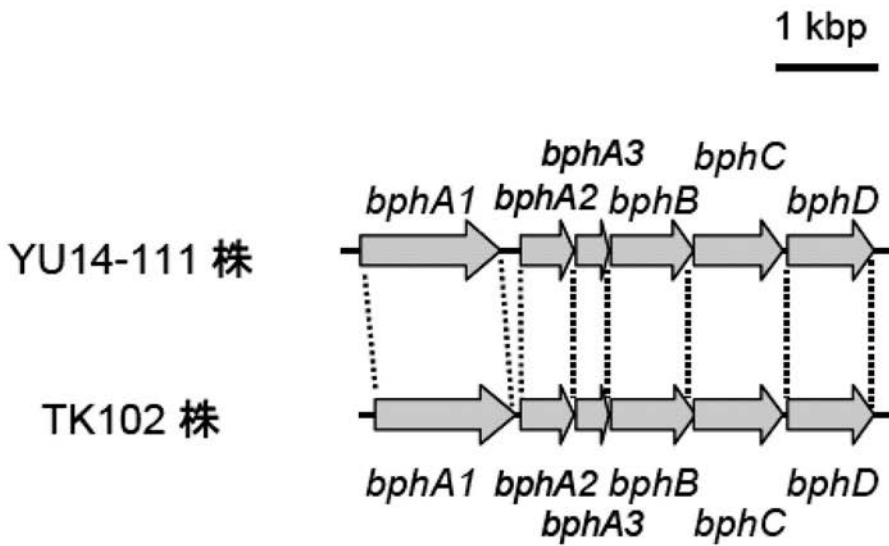
## 【 0 0 5 7 】

先行例（特許文献 4）における *Comamonas testosteroni* TK102株のポリ塩化ビフェニル分解活性データ（Kimbara et. al., Japanese Journal of Water Treatment Biology Vol .34 No.1. 57-65 1998）と比較した場合，YU14-111株は、5塩素置換ポリ塩化ビフェニルに対する分解活性を持ち、より多くの異性体を分解する特性がある。

【 図 1 】

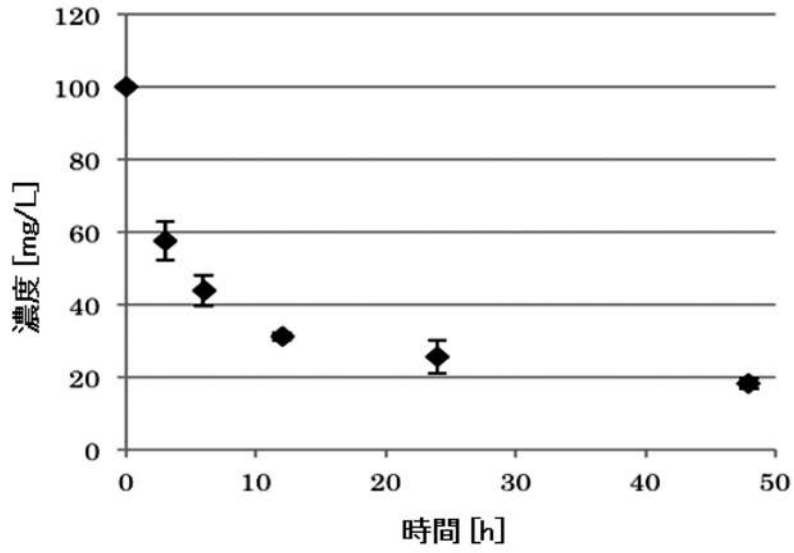


【 図 2 】

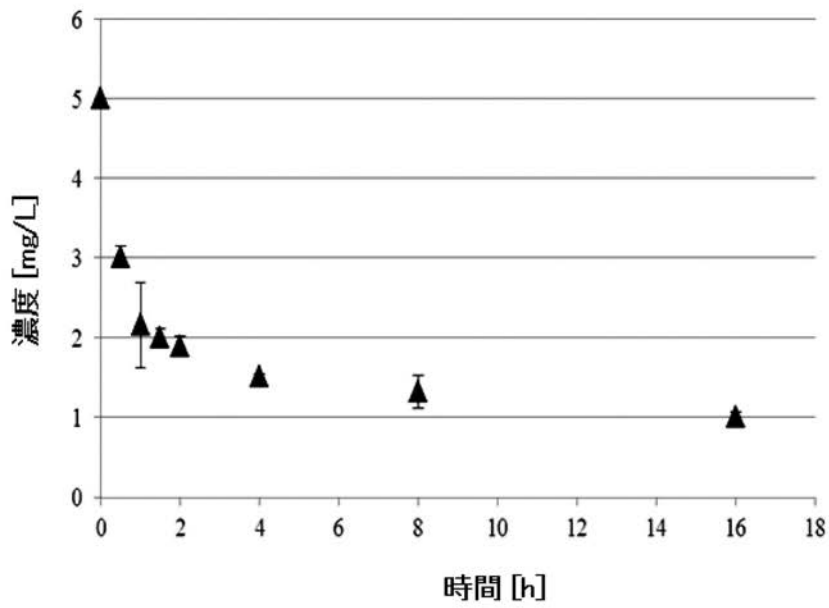




【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2013179890000001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100146422  
弁理士 田中 聖
- (74)代理人 100147533  
弁理士 岡崎 祐一
- (74)代理人 100116528  
弁理士 三宅 俊男
- (72)発明者 原 富次郎  
山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学工学部内
- (72)発明者 高塚 由美子  
山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学工学部内
- (72)発明者 室月 祥枝  
山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学工学部内
- (72)発明者 三嶋 瑠璃子  
山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学工学部内
- (72)発明者 木島 龍朗  
山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学工学部内
- (72)発明者 神尾 好是  
宮城県仙台市泉区紫山5-19-3
- (72)発明者 田中 俊也  
青森県上北郡六戸町大字犬落瀬字堀切沢60-944
- Fターム(参考) 4B024 AA17 CA01 CA09 CA11 CA20  
4B065 AA01X AC20 CA54