

657

超高度好熱菌 *Pyrococcus furiosus* による耐熱性酵素の発酵生産  
(広島大・工・醗酵) ○清水大介、柿園俊英、西尾尚道、永井史郎

【目的】 近年イタリアで単離された超高度好熱菌 *Pyrococcus furiosus* は、嫌気条件下で 100°C を至適温度として増殖する。本菌の特徴は菌体外への耐熱性酵素の分泌生産能にあり、本研究ではこれらの中から  $\alpha$ -アミラーゼ、プルラーゼ、セルラーゼ、およびプロテアーゼの4種をターゲットとし、その高濃度連続生産系の構築を目指した。

【方法】 *P. furiosus* DSM 3638株をバイアル瓶、および四ッ口フラスコを用いたリアクターにおいて95°Cで嫌気培養した。増殖はOD<sub>578</sub>および生細胞数によって追跡し、培養系の酢酸濃度はGCによって、また残糖濃度はフェノール-硫酸法によってそれぞれ分析した。上記4種の酵素活性はそれぞれスターチ、プルラン、CM-セルロース、およびアゾカゼインを基質とし、その酵素反応物の生成量を基準として算出した。

【結果】 まずバイアルレベルで One-at-a-time法による培地の最適化を行い、ミネラルや増殖因子などの濃度を改変し、約25%の菌体量の増加をみた。次に、この改変培地を用いた開放系回分培養において、スタットpHの変動が発酵バランスと酵素活性に及ぼす影響を調べた。菌体収率  $Y_{x/s}$  は至適pHの7で最大(0.27)であったが、これより酸性側では代謝が異化側にシフトして酢酸収率  $Y_{HAc/s}$  が高く(0.5~)なり、同時に糖質分解系酵素3種の高レベル生産が見られた。活性はいずれもpH6のとき最大で、30U/l前後の値となった。一方、プロテアーゼに関してはpH7~7.5にその高生産領域があり、このとき総タンパク分解活性 325U/lを得た。現在、ケモスタット連続培養における各種の操作パラメータ(D、Sなど)の影響について検討中である。

Production of thermostable enzymes by the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*

○Daisuke Shimizu, Toshihide Kakizono, Naomichi Nishio, Shiro Nagai

(Dept. Ferment. Technol., Fac. Engg., Hiroshima Univ.)

【Key words】 Hyperthermophile, Archaea, Fermentation, Thermostable enzyme

658

イネ  $\alpha$ -amylase の糖鎖の酵素活性に及ぼす影響

(京大・工・合成・生物化学) ○寺嶋 正明、久保 敦史、伊藤 泰朗、  
加藤 滋雄

【目的】 イネ  $\alpha$ -amylase isozymeの一つであるAmy1Aには糖鎖結合部位が一カ所存在しており、糖鎖の酵素活性に及ぼす影響を研究するのに適している。そこで、部位特異性変異により、糖鎖結合部位を改変した変異酵素を作製し、両者の熱安定性、反応動力学定数を比較検討することにより糖鎖の酵素反応における機能について明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】 部位特異性変異によりAmy1Aの糖鎖結合部位NGTをQGTに改変した。酵素は酵母により分泌生産し、免疫アフィニティクロマトグラフィにより精製した。SDS-PAGEにより精製標品が単一バンドであること、変異酵素は糖鎖を持たないこと、糖鎖の分子量は約3000であることを確認した。変異体では熱安定性が低下することを明らかにした他、変異体酵素と野生型酵素では可溶性デンプンに対する動力学定数の温度依存性が著しく異なることを見いだした。このことは糖鎖の存在が酵素の基質認識特性、加水分解効率に大きな影響を持つことを示している。立体構造の明らかになっているタカアミラーゼとの比較によりAmy1Aの糖鎖は活性クレフト近傍の酵素表面に結合していると示唆され、糖鎖の基質である可溶性デンプンとの相互作用によりこのような影響が現れたと考えることができた。

Effects of Carbohydrate Chain of Rice  $\alpha$ -Amylase on its Enzyme Activity

○Masaaki Terashima, Atusi Kubo, Yasuaki Itoh, Shigeo Katoh

(Dept. Synthetic Chem. and Biological Chem., Kyoto Univ.)

【Key Words】  $\alpha$ -amylase, carbohydrate chain, site-directed mutagenesis