

2011-5 *Ralstonia eutropha* H16 の polyhydroxybutyrate depolymerases の分類

○内野 圭一¹, 齊藤 光實¹, Jendrossek Dieter²
(¹神奈川大・理・生物, ²Inst. microbiol., Univ. Stuttgart)

【背景】polyhydroxybutyrate (PHB) は、様々な細菌が蓄積する細胞内貯蔵物質である。蓄積したPHBは、細胞内の分解酵素によって加水分解される。代表的なPHA生産菌 *Ralstonia eutropha* は、ゲノムプロジェクトが完了し、9つものPHB分解酵素を持っていることが明らかとなった。これらの酵素の生理学的な重要性について検討した。

【方法】活性測定は、(1) in vivo および (2) in vitro で行った。(1) PHBを蓄積した *E. coli* または、*R. eutropha* の細胞を緩衝液に移し、3-hydroxybutyrate (3HB) の分泌量を分光光度計で定量した。(2) PHAを蓄積した細胞から、密度勾配遠心法によって調製した native PHB を緩衝液に懸濁したのち、遠心上清の3HBを定量した。加硫黄分解は、native PHBにCoAを加えたのち、遠心上清の3HB-CoAをHPLCで定量した。

【結果と考察】PhaZa1は、in vivo で3HBの分泌に影響があり、in vitro で加水分解ではなく、加硫黄分解を行った。PhaZbのアミノ酸配列は、シグナルペプチドを含むと予測されたため、細胞内には存在しないと思われる。PhaZcは、in vivo で3HBの分泌に影響をもたなかったため、主に3HB-oligomerの分解に関与していると思われる。PhaZd1は、in vitro では加水分解反応を示したが、in vivo で3HBの分泌に影響がなかったため、通常の細胞内では活性が無いと思われる。これらのことは、細胞内PHBの分解に関して生理学的に重要なのは、PhaZa1型の酵素であり、その反応は主に加硫黄分解であることを示している。

Classification of polyhydroxyalkanoate depolymerases of *Ralstonia eutropha*

○Keiichi UCHINO¹, Terumi SAITO¹, Dieter Jendrossek²
(¹Dept. Biol. Sci., Kanagawa Univ., ²Inst. microbiol., Univ. Stuttgart)

Key words PHB depolymerase, *Ralstonia eutropha*

2013-3 サブファミリーI.4に属する *Bacillus* sp. HH-01 由来新規リパーゼ

○上條 亮¹, 齋藤 明広², 西田 芳弘², 安藤 昭一³
(¹千葉大院・自科, ²千葉大・園芸, ³千葉大院・融合科学)

【目的】大豆油由来ガム質から単離した中温性の *Bacillus* sp. HH-01 は食用油分解活性を示す。食用油分解酵素として、これまでに中温性の *Bacillus* 属ではサブファミリー I.4 に属する数種のリパーゼが知られている。本研究では HH-01 株が保有する食用油分解酵素の諸性質を解明することを目的とした。

【方法と結果】サブファミリー I.4 に属する食用油分解酵素の活性中心付近のアミノ酸配列は保存性が高い。この部分をPCRによって増幅し、得られた塩基配列を基にインバースPCRを行い、ORFの5'、3' 両末端の塩基配列を明らかにした。この両末端の配列から新たにプライマーを設計し、ゲノムDNAを鋳型としてPCRによりORF全長をクローニングした。pETシステムにより大腸菌で推定シグナル配列を除いた酵素を発現させ、Niアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、諸性質を解析した。その結果、本酵素はサブファミリー I.4 に属する *B. subtilis* LipA と82%のアミノ酸配列相同性を示した。至適温度・pHおよび温度・pH安定性、基質特異性、分子量を解析したところ、概ねサブファミリー I.4 の既知の酵素と一致した。以上より、本酵素はサブファミリー I.4 に属することがわかった。ただし、本酵素の至適温度については約30℃であり、*B. subtilis* LipA と比較して約10℃低いことが明らかになった。

A novel subfamily I.4 lipase from *Bacillus* sp. HH-01

○Takashi KAMIJO¹, Akihiro SAITO², Yoshihiro NISHIDA², Akiyazu Ando³
(¹Grad. S. Sci. Tech., Chiba Univ., ²Fac. Horticult., Chiba Univ., ³Grad. Adv. Inte. Sci., Chiba Univ.)

Key words *Bacillus* sp., lipase, lipid degradation

2013-1 招待講演 Application of ionic liquids in enzymatic reaction and their recovery

Sung Ho HA¹, Sang Hyun LEE¹, ○Yoon-Mo KOO^{1,2}
(¹ERC Adv. Biosep. Technol., Inha Univ., Korea, ²Dept. Biol. Eng., Inha Univ., Korea)

Room temperature ionic liquids (ILs) have recently been very popular as green solvents due to their unique physicochemical properties of negligible vapor pressure, non-flammability, excellent thermal stability and a strong ability to dissolve a wide range of organic and inorganic compounds. They also have great potential as reaction media or co-solvent for enzymatic reaction. Their use can improve activity, selectivity, and stability of enzyme. In this presentation, the application of ILs in biocatalysis and their recovery will be addressed. First, the use of ILs in biocatalysis will be presented. For the lipase-catalyzed kinetic resolution of phenylethanol derivatives, enhanced enzyme activities and thermal stabilities were obtained in ILs. Higher enzyme activities were observed in [Edmim][Tf₂N] and [PPmim][Tf₂N] among ILs tested. The activities of lipase in ILs were also well maintained even after 24 hrs incubation at 80°C. In lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil, production yield in ILs was 8 times higher than the conventional solvent free-system. It was around 15% higher than the FAMES production system using *tert*-butanol as an additive. For Lipase-catalyzed direct esterification of glucose in pure ILs, we have developed a new procedure referred to as 'water-mediated supersaturation' to prepare a high concentration of sugars in ILs. The glucose concentrations in the supersaturated [Emim][TfO] and [Bmim][TfO] were 19 and 10 times higher, respectively, than the solubility of glucose in the ILs at 25 °C. Higher dissolved concentration of glucose in the supersaturated solution led to an increase in the reaction rate and conversion. Next, the use of ILs will be demonstrated as stabilizers for enzyme. ILs were used as additives to protect the inactivation of enzymes by shrinking of gel during the sol-gel immobilization process. The lipases coimmobilized with ILs showed higher activity and stability than those immobilized without ILs. Lastly, the recovery of ILs will also be discussed. The magnetic response of the mixture of [Bmim][FeCl₄] and water was investigated. The [Bmim][FeCl₄] rich phase in the mixture forming two phases was easily separated under an external magnetic field. Under a gradually varied magnetic field, the concentration of the mixture varied as a function of the magnetic field strength. Ultrasonic atomization was also applied to recover ILs from ILs/water mixture. [Bmim][BF₄] was successfully recovered with more than 95% recovery from 50% [Bmim][BF₄] aqueous solution after ultrasonic atomization of the mixture.

Application of ionic liquids in enzymatic reaction and their recovery

Sung Ho HA¹, Sang Hyun LEE¹, ○Yoon-Mo KOO^{1,2}
(¹ERC Adv. Biosep. Technol., Inha Univ., Korea, ²Dept. Biol. Eng., Inha Univ., Korea)

Key words ionic liquids, biocatalysis, recovery