

3Bp22 Characterization of eggshell (membrane) derived biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering

Mahdi Khanmohammadi, ○Ali Baradar Khoshfetrat, Shahla Eskandarneshad, Sirus Ebrahimi
(Dept. Chem. Eng., Sahand Univ. of Tech., Tabriz, Iran)
khoshfetrat@sut.ac.ir

Hyaluronic acid (HA) was isolated and characterized from eggshell (membrane) as an economical source. HA was extracted by acetic acid digestion with pH-control system (about 0.53%, wet weight) and participated by alcohol after purification using charcoal followed by silica gel adsorption process. The HA concentration in the crude extracts was determined by the carbazole assay. FTIR, nano particle analyzer, intrinsic viscosity and agarose gel electrophoresis were used to characterize the derived HA. The purified HA was free of proteins ($A_{260} < 0.01$). The HA size distribution measured (average value of 523 ± 92 nm) showed a fair agreement with the value obtained for the average molecular weight (120 kDa) using viscometer and the molecular weight distribution determined by electrophoresis on agarose gel. The FTIR spectrum of HA was also in accordance with the spectrum of commercial one. Collagen precipitated from the crude extract at its isoelectric pH showed the collagen FTIR spectrum as well as two different α_1 and α_2 chains in SDS-polyacrylamide electrophoresis. The results show the potential of eggshell (membrane) to be used as an economical source for scaffold preparation in tissue engineering.

Characterization of eggshell (membrane) derived biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering

Mahdi Khanmohammadi, ○Ali Baradar Khoshfetrat, Shahla Eskandarneshad, Sirus Ebrahimi
(Dept. Chem. Eng., Sahand Univ. of Tech., Tabriz, Iran)

Key words eggshell (membrane), hyaluronic acid, collagen, tissue engineering scaffold

3Ca02 世界最深处の超深海生物が生産する新規セルラーゼの性質

○小林 英城, 秦田 勇二, 坪内 泰志, 高見 英人
(海洋研究開発機構)
hidekik@jamstec.go.jp

目的 深海は地球の表面積の約半分を占め、多くの未知生物が存在していると考えられている。特に深度7,000mを超える超深海領域では魚類の存在が確認されず、その生態系は全くわかっていない。一方、深度10,000mを超える世界最深处マリアナ海溝チャレンジャー海淵では、ヨコエビやナマコの存在が確認されているが、超高静水圧・低温・貧栄養の環境への適応機構は不明である。そこで超深海生物の生態、特にその食性に注目し、チャレンジャー海淵から採取されたヨコエビ類の消化酵素について検討した。

方法 チャレンジャー海淵より採取した深海性ヨコエビ (*Hirondellea gigas*) を破砕し、各種酵素活性の検出を試みた。酵素活性の検出は各基質を含む寒天プレートに抽出液を滴下し、ハロー形成の有無にて行った。本抽出液より、硫酸沈殿にてタンパク質溶液を調製し、検出できた酵素活性について、検討を行った。

結果 消化酵素としてアミラーゼ、セルラーゼ、マンナーゼ、キシナーゼという植物性多糖分解酵素が検出できた。アミラーゼはでんぷん質をグルコースまで分解した。セルラーゼは、カルボキシメチルセルロース (CMC) を分解して、セロビオースとグルコースを生産した。マンナーゼはグルコマンナンのみを分解し、様々なオリゴ糖を生産した。セルラーゼの性質について検討したところ、CMCのみならず、セルロース、おがくず、コピー用紙等にも反応し、グルコースを生産することが分かった。以上の結果より、*H. gigas* のセルラーゼは陸上由来のいかなる生物とも異なる新規セルラーゼを持っていることが予想された。

Property of novel cellulase produced by the deepest-sea animal

○Hideki Kobayashi, Yuji Hatada, Taishi Tsubouchi, Hideto Takami (JAMSTEC)

Key words cellulase, biomass, polysaccharide-degrading enzyme

3Ca01 界面活性剤によるセルラーゼ構成成分の安定化

○沖野 祥平, 池應 真実, 種田 大介
(日揮・技術開発部)
okino.shohei@jgc.co.jp

【背景と目的】

リグノセルロース系バイオマスのセルラーゼを用いた糖化において、界面活性剤の添加によって糖化効率が向上することが知られている。界面活性剤によるセルラーゼ構成成分のリグニンへの非特異的吸着の抑制効果が主原因として挙げられているが、リグニンを含まない純粋なセルロースを基質とした場合にも、条件によっては、糖化効率が向上することが報告されている。この現象を明らかにするため、界面活性剤 Tween80 の存在、非存在下におけるセルラーゼ構成成分の挙動を SDS-PAGE によって解析した。

【実験方法および結果】

セルラーゼ (セルラーゼ SS (ナガセケムテックス)) を 1 vol% 含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) 100 ml を 50℃、および 30℃、0.1% Tween80 の存在、非存在下にて振盪 (120 rpm) し、経時的にサンプリングした。サンプルを SDS-PAGE 解析したところ、50℃、Tween80 非存在下では CBH2 のバンド強度が数時間のうちに低下したが、50℃、Tween80 存在下では、CBH2 のバンド強度の低下は抑制され、Tween80 が比較的不安定なセルラーゼ構成成分の振盪ストレスを軽減することが示唆された。また、Tween80 非存在下では、30℃においても CBH2 のバンド強度の低下が認められたが、Tween80 存在下ではほとんど低下が認められなかった。糸状菌によるセルラーゼ生産において、Tween80 がセルラーゼ構成成分を安定化している可能性も示唆された。

本研究の一部は (独) 新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託研究として実施した。

Stabilization of cellulase components by the addition of surfactants

○Shohei Okino, Makoto Ikeo, Daisuke Taneda
(JGC Corporation)

Key words Cellulase, CBH1, Surfactant

3Ca03 キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来するキチナーゼ ChiL が示す糖転移活性の解析

○園田 紀恵, 中野 萌, 鎮目 有玲紗, 野川 優洋, 田口 悟朗, 下坂 誠
(信州大・繊維・応生系)
mashimo@shinshu-u.ac.jp

【背景と目的】 微生物が産生するキチン分解酵素を利用したキチンオリゴ糖の生産法は、強酸を用いた化学分解法に代わるものとして注目されている。本研究室では、新属新種の強力なキチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3 株を単離同定した。これまでに SAY3 株のゲノムライブラリーより 15 個のキチン分解酵素遺伝子 (*chiA~chiO*) を見出し、各遺伝子を大腸菌で発現させた組換え酵素の性質を調査している。このうち *chiL* がコードするタンパク質は、シグナル配列と family18 キチナーゼに相同な活性ドメインより構成されていた。本発表では組換え酵素 ChiL が示した顕著な糖転移活性について報告する。

【方法と結果】 *chiL* は大腸菌宿主 (発現ベクター pCold I) を用いて発現させたのち、組換え酵素 ChiL を精製した。*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) オリゴ糖に対する分解生成物は TLC または HPLC により分析した。組換え ChiL は可溶性キトサン (脱アセチル化度 80%) に有意な分解活性を示したが、不溶性のコロイドルキチンに対しては活性を示さなかった。GlcNAc 6 量体に対してはエンド型の分解様式を示し、反応初期に GlcNAc 2, 3, 4 量体を生成した。しかし、GlcNAc 3~6 量体に対する最終分解生成物は GlcNAc 2 量体のみで単量体は全く生成しなかった。この結果は ChiL が顕著な糖転移活性を保持することを示すものである。種々の GlcNAc オリゴ糖を用いた反応解析結果から ChiL の糖転移反応機構を推定した。

Transglycosylation activity of a chitinase ChiL from the chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*

○Norie Sonoda, Moe Nakano, Arisa Shizume, Masahiro Nogawa, Goro Taguchi, Makoto Shimomura
(Div. Appl. Biol., Fac. Textile Sci. and Technol., Shinshu Univ.)

Key words chitin, chitinase, transglycosylation, *Chitiniphilus shinanonensis*