



Title	A Study on a Novel Lipase Hydrolyzing t-Butyl Esters
Author(s)	呂, 洙煥
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41453
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	呂 洙 煥
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 6 0 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科酵工学専攻
学 位 論 文 名	A Study on a Novel Lipase Hydrolyzing <i>t</i> -Butyl Esters (<i>t</i> -ブチルエステル加水分解能を有する新規リパーゼに関する研究。)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山田 靖宙 (副査) 教 授 菅 健一 教 授 卜部 格 教 授 室岡 義勝

論 文 内 容 の 要 旨

有機合成反応に酵素を応用するプロセスは、この10数年来盛んに研究され、特にリパーゼの応用は非水溶媒系中の反応を中心に顕著な発展を見ている。現在では既存の市販リパーゼとは異なる、新規活性を持つリパーゼの開発が要求されている。本学位論文は、新規リパーゼを得る手段の一つとして、既存のリパーゼでは難加水分解性である立体障害の大きい3級アルコールのエステルを加水分解しうるリパーゼ生産菌を土壌から分離し、その性質を検討した成果をまとめた物である。論文は4章からなり、第1章では、リパーゼの応用例に関する知見をまとめ、本論文の歴史的背景について述べている。

第2章では、エステル部位に立体障害の大きい3級アルコールエステルであるTBO (*t*-butyl octanoate) を単一炭素源として生育、加水分解する新規微生物YY62株の分離、同定、培養方法、産生リパーゼについて述べている。休止菌体を用いてTBO加水分解の経時変化を検討し、生産物としてオクタン酸が経時的に増加することを確認し、YY62株がTBO加水分解酵素を持つことを確認している。次にYY62株の菌学的同定を行い、形態観察、グラム染色、好気性、運動性、ユビキノ分子種の同定、GC含量の決定、16SrRNAの部分塩基配列決定を行い、*Burkholderia* sp. と同定している。また、本リパーゼの生産最適培養条件を決定している。本酵素の性質に関しては、*t*-ブチルエステル加水分解能が市販の4種類のリパーゼに対して100倍以上あること及び基質のアシル基の長さに応じて反応性が変化していることを指摘している。

第3章では、*Burkholderia* sp. YY62株の生産するリパーゼの精製過程、酵素的性質について述べている。YY62株は少なくとも2種類のエステル加水分解酵素を生産していることを見出し、YY62株菌体より各種クロマトグラフィーによる7段階の精製を行い、精製操作を確立している。次に本リパーゼの分子量を変性、未変性状態でともに約40 kDa と決定し、モノマー酵素であることを指摘している。本酵素反応における2価金属、その他の付加物の活性の及ぼす効果を調べ、その依存性がないことを明らかにしている。また、精製リパーゼのN末端から15個のアミノ酸配列を決定し既知のリパーゼのアミノ酸配列と比較している。

第4章では、研究成果を総括し、本酵素の応用に関する展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

リパーゼは一般に基質特異性が広く、粗精製状態では溶媒中でも安定であるため、光学分割、官能基、位置特異的反応、脂質の改良、洗剤等に幅広く利用されており、さらに新規反応を触媒出来るリパーゼが要求されている。本論文では現在ほとんど知られていない難加水分解性3級アルコールエステル加水分解能を有するリパーゼを検索するためTBOを用いて天然からその分解能のあるリパーゼを探索、精製した結果を記述したものであり、主な成果は次の通りである。

- (1) 自然環境の土壌よりTBOを単一炭素源とする微生物を279種分離し、22種の有望なTBO分解菌を見出している。また、簡便なTBO分解能検出法を考案している。
- (2) 上記22種中の微生物より、TBO分解能の優れたYY 62株を選び、そのTBO加水分解能を確認し、詳細な菌学的同定の結果、*Burkholderia* sp. と同定している。
- (3) 本リパーゼ生産最適培養条件を決定し、本リパーゼが市販リパーゼの100倍以上のTBO加水分解活性を持っていることを明らかにしている。
- (4) 本リパーゼの基質特異性を検討し、*t*-ブチルエステルにおいてはアシル基の長さに活性が依存し、オクチル基が最適鎖長であることを指摘している。
- (5) 細胞内酵素であるTBO加水分解能を有するリパーゼの精製法を確立し、その分子量を40 kDaと決定している。
- (6) 本リパーゼ活性に対する2価金属の影響を調べ、その依存性活性増加が無いこと、及びSer型の酵素である可能性を示している。また、N末端より15残基のアミノ酸配列を決定している。

以上のように本論文は、立体障害の大きい、酵素による難加水分解性3級エステル加水分解能を有する新規リパーゼの天然よりの探索、同定、精製法、性質を明らかにしており、醗酵工学に寄与するところが多い。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。