

可逆的復元酵素：好塩性アミラーゼ・プロテアーゼの産業利用

徳永正雄

鹿児島大学 農学部 生物資源化学科

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

e-mail: tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

要旨

深海耐塩性細菌 *Oceanobacillus iheyensis* のプロテアーゼ・サチライシン遺伝子をクローニングし、大腸菌および *Brevibacillus choshinensis* で発現させた。*B. choshinensis* で大量発現に成功したので、精製し、基本的な酵素化学的性質を検討したところ、至適 pH が 10-11 とアルカリ性プロテアーゼであり、最適反応温度は 60°C であった。また、*Chromohalobacter salexigens* からサーモライシン遺伝子をクローニングし、大腸菌においてその発現を試みたところ、大腸菌内では不活性型のプロ型で発現し、活性型の成熟型にはプロセシングされなかった。そこで、精製したプロ型サーモライシンの活性化について *in vitro* で検討した。一方、醤油モロミから分離された好塩菌が生産する α -アミラーゼについて、有機溶媒耐性能を調べたところ、クロロホルム、トルエンなどに高い耐性を示すことが判明した。

1. 緒言

プロテアーゼは、食品産業・皮革工業・廃棄物利用など産業的に重要な酵素であり、中でもサチライシンとサーモライシンは、もともと工業利用されているプロテアーゼの代表である⁽¹⁾。極限環境生物は、通常生物が生息できない極限環境で生き抜く特殊能力を持っており、その生産する酵素はそれぞれの極限環境に適応して高い安定性を示すことなど、産業的利用が注目されている⁽²⁾。そこで極限環境微生物である深海耐塩性細菌 *Oceanobacillus iheyensis* と海洋好塩性細菌 *Chromohalobacter salexigens* が持つサチライシンとサーモライシンについてその産業的利用を考えた。これらプロテアーゼの遺伝子をクローニングし、大腸菌においてその発現を試みた。また、上述の産業利用には、大量生産・大量精製の過程が必須であるので、蛋白質の大量生産系として注目されている *Brevibacillus* 発現系を検討して、高効率生産系の確立をめざした⁽³⁾。サチライシンについては、部分精製も試み、基本的な酵素化学性質を明らかにした。一方、好塩菌由来の好塩性サーモライシンは、大腸菌においてプロ型で大量に発現した。プロテアーゼは一般に不活性なプロ型で発現し、活性型の成熟型にプロセスされ利用される。この活性化のプロセスは、プロテアーゼの利用において極めて重要であり、そのメカニズムは興味深い。そこでプロ型から成熟型へのプロセスを検討し、好塩的特徴を見つけた。

また、変性作用に極めて高い耐性を示す好塩性酵素の特性に注目し、醤油もろみから分離した好塩性菌が生産する α -アミラーゼについて、有機溶媒存在下における新しい酵素反応形式を探索する目的で、その有機溶媒耐性を調べたところ高い耐性能が確認され、今後さらに詳しい検討により、重要な展開が期待される。

2. 実験

2. 1 菌株と培地

Oceanobacillus iheyensis は、理化学研究所バイオリソースセンター (JCM) から購入した。*Chromohalobacter salexigens* は、NCIMB (National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria) から購入した。 α -アミラーゼを生産する好塩性菌、#28, #79, *Kocuria varians* は、醤油発酵モロミから分離した当研究室保存菌株から、2%でんぷんを含む Nutrient Broth-寒天プレートを用いて、 α -アミラーゼ生産によるハロー形成を指標にスクリーニングして取得した。

大腸菌は、LB 培地を用いて 37°C で培養し、サチライシン、サーモライシンを発現生産させる際には、18°C で培養した。*Brevibacillus choshinensis* は、TM もしくは 2SL 培地を用い 30°C で培養した⁽³⁾。

2. 2 酵素活性測定法

プロテアーゼ活性は、終濃度 1%のカゼインを 0.1 M 炭酸緩衝液 pH10 (サチライシンの場合) もしくは 50 mM リン酸緩衝液 pH7.5 (サーモライシンの場合) 中で酵素と 30-60 分反応させ、終濃度 10%のトリクロロ酢酸を添加することで反応を止め、その後遠心して、上澄みに回収された分解物の吸光度 280nm を測定して活性とした。またサチライシンの場合は、カゼインに代えて合成基質 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide も用いた。活性染色は、非変性系のポリアクリルアミドゲル (Laemmli 電気泳動系⁽⁴⁾ から SDS を除いた) でサンプルを分離し、カゼインもしくはゼラチンを含有したゲルに重層した。反応後アミドブラックでゲル内の蛋白質を染色し、プロテアーゼ活性で分解され白く抜けたバンドを検出した。α-アミラーゼの活性測定は、合成基質 Gal-Glu₅-*p*-nitrophenol を用いた発色キット (L-コクサイ・アミラーゼアッセイ) を用いた。

2. 3 酵素の精製

His-tag を付加したサチライシンおよびサーモライシンは、Ni-NTA カラム(Novagen)、もしくは His-Trap FF カラム(GE Healthcare)を用いて精製した。50 mM リン酸緩衝液 pH7.4、0.14 M NaCl で粗酵素液を調製し、同緩衝液で平衡化した上記カラムに掛けた。同緩衝液で十分洗浄した後、20, 50, 100, 200 および 300 mM のイミダゾールで溶出し、溶出パターンを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析した。

α-アミラーゼの精製は、デキストリンカラム(GE Healthcare)を用いた。培養上清を少量の場合は 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.0 で 5 倍に希釈し、同緩衝液で平衡化したデキストリンカラムに掛けた。よく洗浄した後、100 mM マルトースで α-アミラーゼを溶出した。培地 100 ml 以上を処理する場合は、培地に 80%飽和硫酸を加えて、蛋白質を硫酸沈殿させ、これを上記緩衝液で溶解後、デキストリンカラムに掛け、同様に溶出した。溶出パターンは SDS-PAGE で分析した。

2. 4 その他

SDS-PAGE は、Laemmli の方法を用いた⁽⁴⁾。免疫染色は、目的試料を SDS-PAGE に掛け、ニトロセルロース膜に転写したのちに、抗ヒスチジンタグ抗体—パーオキシダーゼ複合体を用いて発色させた。蛋白量の定量は、BCA法⁽⁵⁾、もしくは 280nm の吸光度を測定した。

3. 結果・考察

3.1 *Oceanobacillus iheyensis* 由来サチライシンと *Chromohalobacter salexigens* 由来サーモライシンの発現生産・精製・性質検討

Oceanobacillus iheyensis は、南西諸島伊平屋海嶺水深 1050m から収集された堆積物より分離された好アルカリ性・高度耐塩性のグラム陽性細菌である⁽⁶⁾。本菌は、pH9.5 で NaCl 濃度 0-18% で生育可能である。最適塩濃度は、pH6.5-10.0 の範囲で NaCl 濃度 3% である。生育温度範囲は 15-42°C で、30°C が最適生育温度である。本菌のゲノム解析情報より、この菌の OB2598 遺伝子は、産業的に最もよく利用されているプロテアーゼである *Bacillus licheniformis* 由来のサチライシン Carsberg (UniProtP00780) と高い相同性を持った（両者の一次構造を比較すると 45% が同一のアミノ酸、78.8% が同種のアミノ酸からなっている）サチライシン様プロテアーゼであることが示唆された (*Oceanobacillus iheyensis* subtilisin-like protease, OihS と名付けた)。

Fig. 1 は、OihS (Oi) と *Bacillus licheniformis*(BI) 由来のサチライシン Carsberg の一次構造を比較したものである。同一アミノ酸を四角で囲んである。

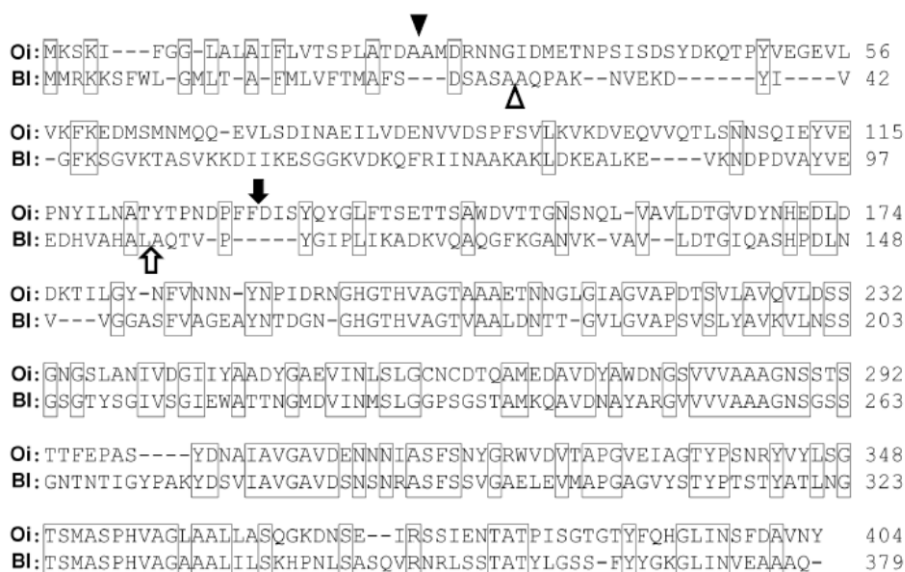


Fig. 1. Alignment of primary sequence of subtilisin OihS and subtilisin Carsberg.

Identical amino acid residues were boxed. The cleavage sites of pre- and pro- sequences were showed with triangle and arrow.

Bacillus licheniformis(BI)由来のサチライシン Carsberg は、prepro-サチライシンとして合成され、pre 配列に導かれて培地中に pro-サチライシンとして分泌され、さらに pro 配列が切断されて、成熟型のサチライシンに活性化されることが知られている (pre, pro

配列の切断箇所を三角と矢印で示している)。配列の相同性より、OihS も同様に prepro→pro→成熟型とプロセッシングされ、活性化されると予想された (Fig. 2)。Fig. 1 に、一次配列の予想切断部位を BI 同様に三角印と矢印で示した。

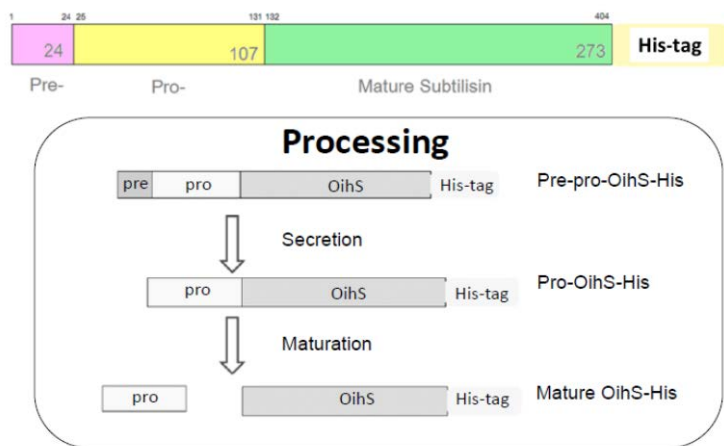


Fig. 2. Illustration of OihS structure and its putative maturation. OihS was expressed with His-tag at carboxy-terminus to be purified efficiently.

O.ihayensis を一週間培養後、培地中に分泌されたプロテアーゼ活性をモデル基質による活性測定と活性染色法で検出した。Fig. 3 に生育曲線 (実線) とプロテアーゼ活性 (破線) の推移を示した。生育は 12 時間で定常状態に入り、一方、プロテアーゼ活性は 1 週間目まで徐々に増加、蓄積した。

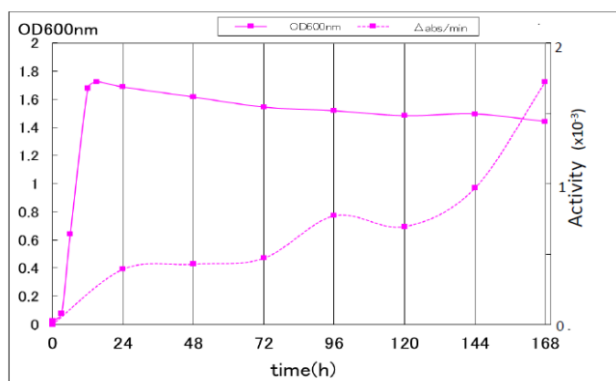


Fig. 3. Growth curve of *O.ihayensis* and time course of protease activity found in the culture medium.

Fig. 4 に、電気泳動後の活性染色の結果を示した。培養一週間後の培地を集め、約 20 倍濃縮後分析した。濃縮により不溶性画分が生じたので遠心分離により分画した。上澄み画分を lane 1(S)に、不溶性画分を lane 2 (P)に流し、活性バンドを検出した(実際は、青色のゲルに白抜きの活性バンドが検出されるがここでは、見やすいように、バックが黄色、バンドが茶色で表わされている)。高分子領域に強い活性のバンドが数本あり、またゲルの中央部分(矢印)に一本のプロテアーゼのバンドが検出された。lane 3 は、次項に詳細に記述するが、大腸菌で発現した OihS サンプル(分子量推定 30,000 程度)を流したもので、このことよりこのバンドが、*O. iheyensis* が培地中に分泌生産した OihS プロテアーゼであり、確かに本菌は OihS プロテアーゼを分泌生産していることが示された。ただし、活性では検出できたが、このままでは生産量が低く、タンパク質染色では検出限界以下という少ない生産量であった。

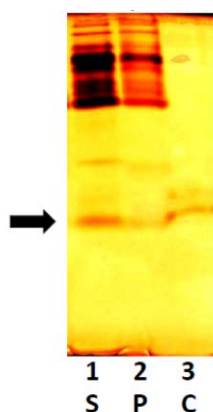


Fig. 4. Active staining of protease activity.

そこで次に、*O. iheyensis* 菌体より定法どおりゲノム DNA を精製し、ゲノム配列情報をもとに PCR 法で OB2598 遺伝子 (OihS プロテアーゼ遺伝子) の分離を試みた。その結果、ゲノム情報から推定される長さの DNA 断片が増幅でき、塩基配列を決定したところ OB2598 遺伝子 (全長 1215bp) が分離できたことが確認できた。遺伝子発現実験を始めるに当たり、まず最も汎用されている大腸菌を宿主に用いることを試みた。OB2598 遺伝子を大腸菌 pET 発現ベクターにクローニングしたが、その際用いる遺伝子領域として、本来の prepro-type (全長)、pro-type、成熟型 type の 3 種類の発現ベクターを構築した (Fig. 2 のプロセッシングモデル参照)。この 3 種の発現ベクターを大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し、OihS の発現を試みた。その結果 (SDS-PAGE) を Fig. 5 に示す。

まず成熟型として発現させた場合、OihS タンパク質が発現できたが (Mature C, S, P, 矢印) 残念ながら活性を持たない (Active stain 参照) 不溶性の封入体として菌体沈殿画分に局在した。Pro-type で発現させた場合、今度は、活性を可溶性画分に検出できたが、

残念ながら発現量が極僅かで、タンパク染色では検出限界以下であり、実用に耐えるものではなかった。さらに、prepro-type (OihS 全長) の発現を試みたが、発現誘導を掛けた直後から菌の生育が極端に阻害され、生産物は検出できなかった。この現象は、生産物が大腸菌の分泌経路に何らかの理由で“詰まって”しまい、菌の生育が抑えられるもので、他の発現系でもしばしば観察される事象である。以上の結果から、元々、グラム陽性菌由来の分泌型プロテアーゼをグラム陰性菌で分泌発現させるのには、限界があることが分り、グラム陽性菌を新たな宿主に用いた分泌発現系を試みることにした。

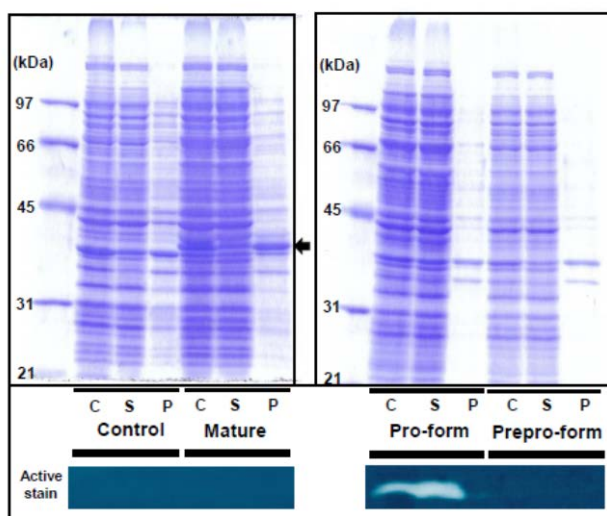


Fig. 5. Expression of OihS in *E. coli* cells.

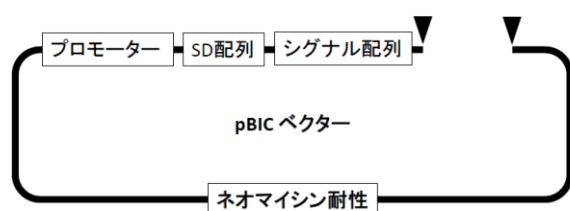


Fig. 6. Expression vector of *Brevibacillus choshinensis*.

Brevibacillus choshinensis は、日本で開発された優れたタンパク質分泌生産菌であり、クローニングや発現手法も簡単で容易に使用できる系である⁽³⁾。Fig. 6 に発現ベクター pBIC の構造を模式的に示した。図中の黒矢印の2点間に pro-type OihS 遺伝子を挿入し発現ベクター-pBIC-OihS-His を構築した。これを *Brevibacillus choshinensis* に形質転換し、30°Cで培養して、培地中に分泌発現された OihS タンパク質を分析した。

Fig. 7(A)に、24時間培養後の培地上清の SDS-PAGE を示した。Lane 1 がコントロールで、lane 2 が発現ベクターpBIC-OihS-His を形質転換したものであるが、lane 2 に矢印で示した新しいタンパクバンド2本が検出できた。このタンパクバンドを精製するために、培地上清を Ni-NTA アフィニティカラムに掛け、吸着したタンパク質をイミダゾールで溶出した。溶出画分の SDS-PAGE を図 7(B)に示した。下のバンドが 50 mM、上のバンドが 100 mM イミダゾールで溶出された。このバンドが発現した OihS 関連タンパク質であることを証明するために、抗ヒスチジンタグ抗体による免疫染色を行い、結果を Fig. 7(C)に示した。両バンドが抗ヒスチジンタグ抗体に反応して紫色の染色像が

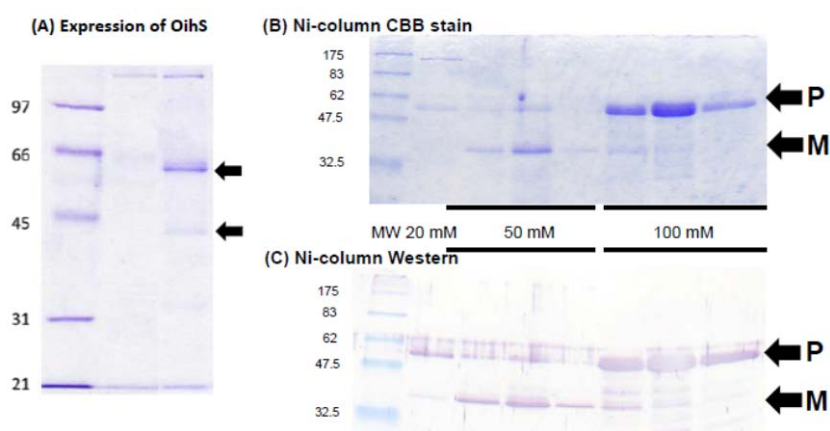


Fig. 7. Expression and purification of OihS in *Brevibacillus choshinensis*.

確認できた。分子量から考えて、上のバンドが pro-OihS、下のバンドが、成熟型 OihS であろうと考えられた。上のバンドを Problot 膜に転写し、アミノ酸配列分析装置にかけて、N末端からのアミノ酸配列を決めたところ、AMDRN となり予想された pro-type OihS のN末端アミノ酸配列と一致し、この上のバンドが pro-OihS であることが証明された。また、下のバンドを活性染色法でプロテアーゼ活性を確認したところ、明快なバンドが得られこれが活性型の OihS であることが確認できた。なお、pro-OihS は予想どおりプロテアーゼ活性は示さなかった。

Ni-NTA カラムから 50 mM イミダゾールにより溶出することにより、活性型 OihS が精製できたので、このプロテアーゼの基本的な酵素化学的性質を調べた。

最適反応 pH は、pH10-11 と明らかにアルカリ性 pH での活性が高く好アルカリプロテアーゼであることが判明した。また、最適反応温度は 60°C と高く、興味深いことに、37°Cでの反応速度は 60°Cでの反応速度の 2~3% しかなく、強い温度依存性を示した。そこで、本酵素の熱安定性を調べた。本酵素を 40-90°C各温度で 10 分間熱処理し、その後残存活性を測定した。本酵素は、60°C処理まで安定であり、その後、熱失活した。こ

の時、2 mM の Ca^{++} イオンを添加すると、約 10 °C 安定化し、70 °C までほぼ安定であることが示された。さらに耐塩性を調べるため 0-1.0 M の NaCl 存在下でプロテアーゼ活性を測定したところ、塩濃度の上昇にともなって、徐々に活性は阻害され、強い耐塩性は認められなかった。ただし、この菌の生育最適塩濃度 0.5M NaCl 濃度では、70%の活性を保持していた。塩による活性阻害は、モデル基質 N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (Suc-AAPF-pNA)では、より顕著で、0.5M NaCl 濃度では完全に活性は阻害された。

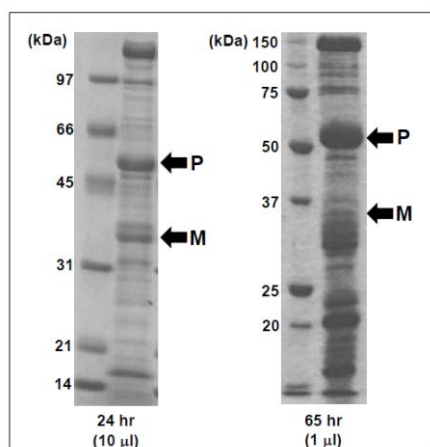


Fig. 8. Large scale culture of cells in Fed-batch jar fermenter culture.

強い耐塩性は検出されなかったものの熱に安定で、好アルカリ性のプロテアーゼの分泌・精製に成功したので、大量生産をめざして、ジャーフェーマンターを用いた流下培養を試みた。3 リーターのジャーに 2 リーターの培地を入れ、65 時間培養した。24 時間培養後（左図）と 65 時間培養後（右図）の培地上清を SDS-PAGE にかき、その結果を Fig. 8 に示した。バンドの濃さで発現蛋白量を計算したところ、24 時間後には、pro-type OihS（矢印 P）が、200 mg/liter、成熟型（矢印 M）が 80 mg/liter、また 65 時間後には、pro-type OihS が、3 g/liter、成熟型が 250 mg/liter の発現量であった。65 時間後/24 時間後の比率は、pro-type が 15 倍、成熟型が 3 倍となり、この培養条件では pro-type の蓄積が、pro-type から成熟型へのプロセッシングの速度を 5 倍も上回っていることが分かった。一般に、pro-type から成熟型へのプロセッシングは自身の分解活性に依存していることが分っている。本酵素のプロテアーゼ活性は、最適 pH が 10-11、最適反応温度が 60 °C であり、本培養条件（中性付近、30 °C）は、この最適活性条件から大きくかけ離れており、そのためプロセッシング速度が遅く、pro-type が蓄積したものと考えられた。今後 pro-type の活性化条件を詳しく検討する必要があるが、予備的実験として、この pro-type OihS タンパク質を部分精製し、*in vitro* の実験系で成熟型への転換を調べた。pro-type を pH10、40 °C でインキュベーションし、pro-type と成熟型の挙動を調べたと

ころ、インキュベーション時間に依存して **pro-type** が減少し、それに伴って成熟型が増加することが分り、アルカリ条件において、速い速度で **pro-type** から成熟型へのプロセシングが起こることを示すことができた。 **pro-type** を大量に精製できれば、自己分解が早い活性型よりも保存が容易である事も考えられ、今後プロテアーゼの新しい供給方法として確立できる可能性がある。

サチライシンと同様に産業的に汎用されているタンパク質分解酵素サーモライシンについても好塩性細菌を用いて調べた。 *Chromohalobacter salexigens* のゲノム DNA を鋳型にして P C R 法によりサーモライシン遺伝子を増幅・分離し、大腸菌発現ベクター pET20b にクローニングした。この発現ベクターを大腸菌で発現させると C 末端に His-tag が付加した「プロ型サーモライシン-His-tag」タンパク質を発現させることができ、さらに Ni-NTA カラムにより簡便に精製できるはずである。 実際、Fig.9 に矢印で示したように、Ni-NTA カラムに吸着し、イミダゾールで溶出される大量のバンドが確認できた (Fig. 9, E1, E2)。このバンドが **pro** 型のサーモライシンであることは、N 末端アミノ酸配列解析で確認した。

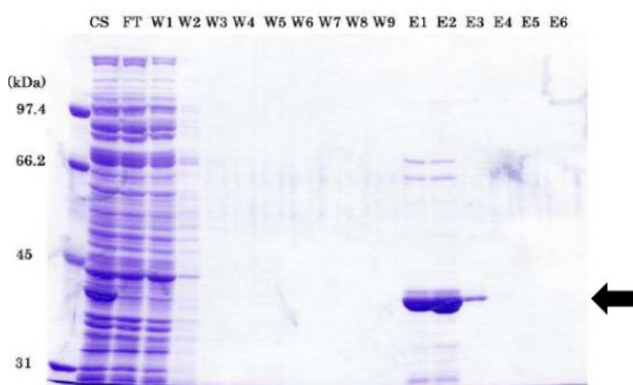


Fig. 9. Purification of pro-thermolysin-His-tag expressed in *E. coli* with Ni-NTA column.

CS, crude homogenate; FT, flow-through fraction; W1-W9, washed fractions; E1-E6, eluted fractions with imidazole. Pro-thermolysin-His-tag was shown with arrow.

プロ型サーモライシンが、大量に精製されたことは、大腸菌菌体内や精製過程では、プロ型サーモライシンから成熟型サーモライシンへの活性化が起こらないことを示している。好塩性菌の酵素なので、精製したプロ型サーモライシンに NaCl を添加してインキュベーションしたところ、プロセシングが起こり、成熟型サーモライシンが得られた。

成熟型サーモライシンは活性化されてプロテアーゼ活性を持つはずなので、これを確認するために、カゼインを基質に用いて、プロテアーゼ活性を測定した結果を Fig. 10 に示した。すなわち、成熟型サーモライシン量を変化させ、カゼインと反応させた。反応後、分解産物のペプチドをトリクロロ酢酸添加上清に回収し、吸光度 280nm の値を測定してプロテアーゼ活性とした。30 ng までプロテアーゼ量の増加に伴って、直線的に活性が増加し、成熟型がプロテアーゼ活性を持つことが証明された。

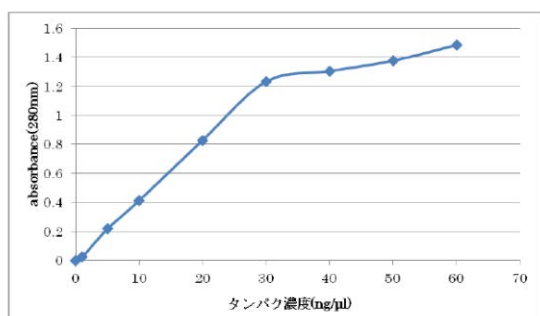


Fig. 10. Relation between enzyme amount and activity.

今後、塩の種類を始めとした活性化の条件をさらに詳細に検討し、プロテアーゼの新しい安定的な供給方法を検討したい。

3. 2 好塩性 α -アミラーゼの有機溶媒耐性について

すでに我々は、でんぷんを含有したプレート上に形成されたハローを指標にして、醤油発酵モロミから α -アミラーゼを生産する好塩菌をスクリーニングし、高い生産量を示した *Kocuria varians* 培養液から α -アミラーゼを精製して報告した⁽⁷⁾。今回さらにスクリーニングを実施し、新たに α -アミラーゼの生産量が高い2菌株を分離し、#28株と#79株とした。これら3株の好塩菌を2 M NaClを含むNutrient Broth培地で培養し、その培養上清をデキストリンカラムに掛け、一工程のみで α -アミラーゼを均一に精製した。この精製方法は、従来報告した方法に比べて簡便かつ迅速な方法であり、今後の本研究にとって大きな成果と考えられる。 Fig. 11 に本方法で精製した3株の α -アミラーゼ分子の電気泳動図を示した。#76株が生産する α -アミラーゼはすでに報告した *Kocuria varians* 由来の α -アミラーゼと類似して、2種類の分子種が存在することが判明した。一方、#28株由来の α -アミラーゼは単一分子種であった。見かけの分子量は、いずれも 98 kDa 程度であった。本年は時間の関係から、とりあえず、この単一分子種の#28株由来の α -アミラーゼの有機溶媒耐性を調べた。今回は、水とほとんど混和しない疎水性が極めて高い典型的な有機溶媒、クロロホルム、トルエン、キシレンを添加して、

活性に対する影響を調べることにした。#28 株の培養上清に終濃度 5 mM となるように CaCl₂ を加え、さらに 20% 濃度の各有機溶媒を添加し、20°C で 1-22 時間インキュベーションして、残存活性を測定した。その結果を Table 1 にまとめた。

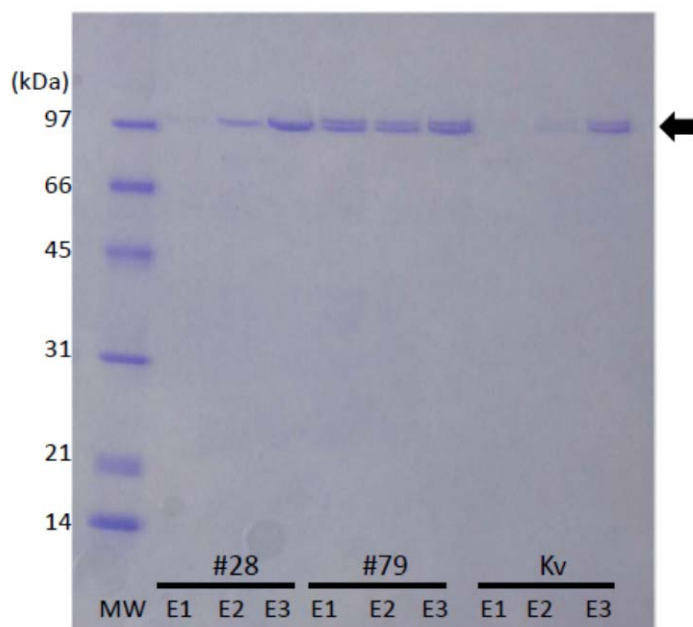


Fig. 11. SDS-PAGE profile of purified alpha-amylase.

MW, molecular weight marker; E1-E3, eluted fractions. Alpha-amylase band was shown with arrow. Samples, #28, #79 and *Kocuria varians*, were shown in this order.

Table 1. Alpha-amylase activity after treatment with organic solvents (20%(V/V)). The enzymatic activity after one hr incubation without organic solvent was used as 100% activity.

有機溶媒 種類	活性 (%) 1 時間後	活性 (%) 3 時間後	活性 (%) 22 時間後
無添加	100	100	100
クロロフォルム	98	95	100
トルエン	102	98	100
キシレン	100	100	98

コントロール実験として、#28 株の培養液を 20°C で 22 時間インキュベーションしたところ全く活性の低下は認められなかった。Table 1 に示した様に、クロロフォルムな

どの有機溶媒を添加しても、活性の変動は誤差範囲内で、いずれの有機溶媒にも高い耐性を示した。今後、有機溶媒濃度、タンパク質濃度、処理時間、処理温度などの諸条件を変化させ、さらに幅広い条件で検討したい。また、今後は水と混和する有機溶媒の添加効果を検証することが重要と考えられ、今後の検討課題である。

4. 謝辞

本研究を実施するにあたり、公益財団法人サンケイ科学振興財団より研究助成をいただきました。心から感謝申し上げます。

5. 引用文献

1. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.
Kumar CG, Takagi H. *Biotechnol Adv.* 1999;17:561-594.
2. Extremozymes--biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms.
Elleuche S, Schröder C, Sahm K, Antranikian G. *Curr Opin Biotechnol.* 2014;29:116-123.
3. *Brevibacillus* expression system: host-vector system for efficient production of secretory proteins. Mizukami M, Hanagata H, Miyauchi A. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11:251-258.
4. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Laemmli UK. *Nature.* 1970;227:680-685.
5. Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
6. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1050 m on the Iheya Ridge.
Lu J, Nogi Y, Takami H. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;205:291-297.
7. Salt-dependent thermo-reversible α -amylase: cloning and characterization of halophilic α -amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians*.
Yamaguchi R, Tokunaga H, Ishibashi M, Arakawa T, Tokunaga M. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89:673-684.

Halophilic enzymes with high reversibility : industrial development of amylases and proteases

Masao Tokunaga

Applied and Molecular Microbiology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

e-mail: tokunaga@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp

Subtilisin homologue gene of halo-tolerant bacterium, *Oceanobacillus iheyensis*, isolated from deep sea, was cloned and expressed in *Escherichia coli* and *Brevibacillus choshinensis*. Highly efficient expression of this protease was achieved in *B. choshinensis*, and basic enzymatic properties of partially purified enzyme were investigated: it was alkaliphilic protease with optimum pH at 10-11 and its optimum reaction temperature was found to be 60 °C. Thermolysin homologue gene from halophilic marine bacterium *Chromohalobacter salexigens* was isolated and expressed in *E. coli*. It was expressed in *E. coli* as an inactive pro-form. The purified pro-thermolysin was processed to active mature thermolysin *in vitro*. Alpha-amylase-producing halophilic bacteria were isolated from soy sauce mash, and organic solvent-tolerance of alpha-amylase was examined: an alpha-amylase from strain #28 showed distinct tolerance to several organic solvents.