

## 有機溶媒耐性酵素

荻野博康

酵素は水溶液中で種々の生化学反応を触媒するが、有機溶媒存在下で容易に変性・失活し、その触媒機能を喪失する。しかし、有機溶媒存在下の酵素反応は、1) 難水溶性基質の溶解度が向上し、反応速度が向上する、2) 加水分解酵素では逆反応の合成反応を触媒できる、3) 微生物汚染を低減できる等の特徴を有している。そこで、有機溶媒存在下で機能する有機溶媒耐性酵素の開発に着手した。有機溶媒耐性酵素は、水溶液中だけでなく有機溶媒が存在する反応系においても高い活性と安定性を有し、水溶媒系、有機溶媒系、有機溶媒を含む水溶媒系、基質濃度が高く基質自体が溶媒となっている反応系、および無溶媒系での反応に用いることができる。

### 1. はじめに

現在の化学産業では機能性製品や医薬品等のファインケミカル製品の重要性がますます高まっており、製品単価の安いバルク製品から製品単価の高いファインケミカル製品の製造に移行している。このようなファインケミカル製品の多くは複雑な構造をしており、極めて純度の高いものが必要とされる。また、ファインケミカル製品の多くは難水溶性であり、その製造中間体は水存在下では不安定であることも多い。さらに、多くの有機溶媒は、水に比べ沸点が低く、製造の最終段階で除き易いため、通常、ファインケミカル製品の製造時の溶媒として有機溶媒が用いられる。ファインケミカル製品当たりの資源・エネルギー使用量や廃棄物量はバルク製品より遙かに多い。ファインケミカル製品の構造が複雑であるため、製造中に副生成物が多量に発生し、さらに、高純度にする工程や薬品を必要とするためである。それ故、現在の高エネルギー負荷や副産物の生成の問題等を解決し、環境負荷の抜本的低減を図るための革新的製造法の開発が必要とされている。

一方、酵素は常温・常圧、中性の水溶液中で触媒機能を

発揮し、決まった反応のみを進行させる基質特異性が高い。そのため、化学製品の製造プロセスの触媒として酵素を用いると、省資源・省エネルギーでしかも環境負荷の少ない環境調和型物質生産プロセスの構築が可能となる。しかし、酵素は本来水溶液中で触媒機能を発揮するものであり、有機溶媒存在下では容易に変性し、その触媒機能を喪失する。製造プロセスの触媒として用いるためには、有機溶媒存在下でも安定して触媒機能を発揮する酵素が必要である。また、有機溶媒存在下で酵素を用いると、1) 難水溶性基質の溶解性が向上し、反応速度が向上する、2) 加水分解酵素を用いた場合、逆反応である合成反応を触媒できる、3) 有機溶媒存在下では普通の微生物は生育できないので、微生物汚染を低減できる等の利点がある<sup>1,2)</sup>。

本稿では、有機溶媒存在下での酵素の利用や筆者らが手がけている有機溶媒存在下での安定な酵素の開発について概説する。

### 2. 有機溶媒存在下での酵素の利用

酵素は有機溶媒に不溶であり、有機溶媒存在下では不安定であるため、有機溶媒存在下での可溶化および安定化の手法の開発が進められている。

#### 2.1 懸濁酵素

有機溶媒濃度が高い反応溶液(微水系と呼ばれる)では、酵素の溶解性が低下するため、酵素の凝集体を懸濁して用いることになる<sup>3)</sup>。このような凝集した酵素では、全ての

大阪府立大学大学院工学研究科 (〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1)

Organic solvent-tolerant enzymes

Hiroyasu Ogino (Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan)

酵素が溶媒に接しているわけではないので、酵素の安定性は悪くない。しかしながら、触媒機能を発揮するのは溶媒に接している酵素であり、その酵素は有機溶媒により変性する。また、溶媒に接していない酵素の触媒機能は期待できず、酵素の質量あたりの活性は低い。

## 2.2 固定化酵素

酵素を担体に固定化すると安定性が向上する。そのため、様々な方法により酵素を担体に固定化する手法が開発されている<sup>4)</sup>。また、固定化により酵素の回収が容易になり、酵素の繰り返し利用が可能になる。さらに、流通反応器での有効利用も可能になることから、有機溶媒の存在の有無にかかわらず、化学反応プロセスの触媒として酵素を用いる場合、酵素の固定化は多用される。しかしながら、固定化操作による酵素の失活や拡散律速による見かけの反応速度の低下は避けられない。

## 2.3 修飾酵素

ポリエチレングリコール等の両親媒性化合物を酵素に共有結合すると、有機溶媒に可溶性酵素が調製できる<sup>5)</sup>。有機溶媒存在下での酵素の安定化も期待できる。しかしながら、共有結合の際にある程度酵素が失活する。

## 2.4 被覆酵素

酵素溶液に脂質<sup>6)</sup>や界面活性剤<sup>7)</sup>を溶解した後に凍結乾燥すると、有機溶媒にでも溶解する酵素の調製が可能である。あるいは、酵素を脂質や界面活性剤の逆ミセルに閉じ込めて溶媒との接触を避けることができる。これらの調製法は比較的容易であり、用いる脂質や界面活性剤の種類を選択することにより、高い活性を有する酵素の調製が可能となる。しかし、ミセルの崩壊や酵素を被覆している脂質や界面活性剤の剥落による酵素の失活、あるいは脂質や界面活性剤の製品中への混入が懸念される。

## 3. 有機溶媒耐性酵素を生産する有機溶媒耐性微生物の発見

有機溶媒存在下でも失活しない酵素があれば、有機溶媒存在下での反応に有用である。このような考えから、有機溶媒耐性酵素の探索が行われた。問題は如何に効率よく有機溶媒耐性酵素を見つけ出すかである。著者らは培養液に有機溶媒を添加して生育できる微生物を探索することを試みた。

リパーゼの基質である脂質は難水溶性である。基質の溶解度を向上させるために、反応溶液に有機溶媒を添加することが望ましい。また、リパーゼはエステル結合を加水分解する酵素であるが、有機溶媒存在下では加水分解反応を抑え、逆反応のエステル合成を触媒することができる。さらに、有機溶媒存在下ではエステル交換反応も触媒可能である。そこで、有機溶媒耐性リパーゼの取得に着手した。脂質を唯一の炭素源とし、有機溶媒を添加した培養液を用

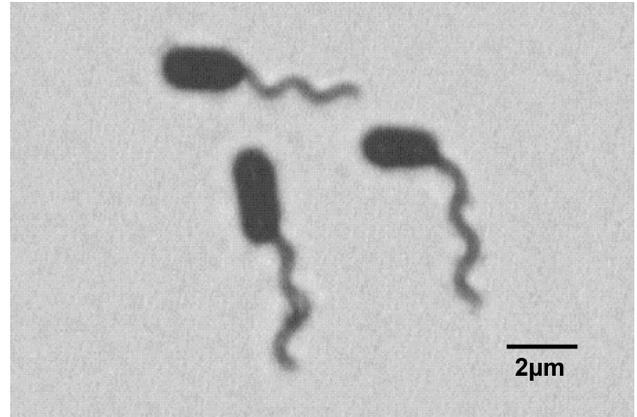


図1 有機溶媒耐性微生物 *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 株の顕微鏡写真  
鞭毛染色を施している。

いた集積培養により、有機溶媒耐性リパーゼを生産する微生物の取得を試みた。このような培養液では、脂質の分解反応を触媒するリパーゼを分泌する微生物のみが生育できる。また、分泌されたリパーゼが有機溶媒と接触し失活するようでは、微生物が生育しない。すなわち、有機溶媒存在下でも安定性の高いリパーゼを分泌する微生物のみが生育する。この方法により、*Pseudomonas aeruginosa* LST-03 株を取得した<sup>8)</sup>。また、自然界に生息する有機溶媒耐性微生物の中からプロテアーゼを生産する微生物を選択することにより、有機溶媒耐性プロテアーゼを生産する有機溶媒耐性微生物 *P. aeruginosa* PST-01 株 (図1) を取得した<sup>9,10)</sup>。

種々の微生物を有機溶媒存在下で培養した結果を図2に示す。*Pseudomonas* 属のいくつかの微生物は、シクロヘキサン存在下でも生育可能であるが、キシレンのような有機溶媒存在下では、既存の微生物は生育することができない。それに対し、有機溶媒耐性のリパーゼやプロテアーゼを生産する *P. aeruginosa* LST-03 株や *P. aeruginosa* PST-01 株はともにキシレンなどの有機溶媒存在下でも良好に生育し、有機溶媒存在下でも有機溶媒耐性酵素を生産するため有機溶媒存在下での発酵にも利用可能である<sup>11,12)</sup>。

## 4. 有機溶媒耐性微生物が産生する有機溶媒耐性酵素

*P. aeruginosa* LST-03 株が産生するリパーゼ (LST-03 リパーゼ) を精製し、有機溶媒耐性や有機溶媒存在下での活性を調べたところ、本酵素はジメチルスルホキシド (DMSO) 等の極性有機溶媒やデカン等の非極性有機溶媒存在下でも高い活性を保持していた<sup>13)</sup>。また、本酵素の遺伝子をクローニングしたところ、本リパーゼ遺伝子の下流にはリパーゼ特異的分子シャペロンの遺伝子が存在していることがわかった。本リパーゼのシグナル配列を削除し、大腸菌で発現させると、封入体を形成し、多量発現が達成できた<sup>14)</sup>。封入体は細胞破碎液から遠心分離等で容易に回

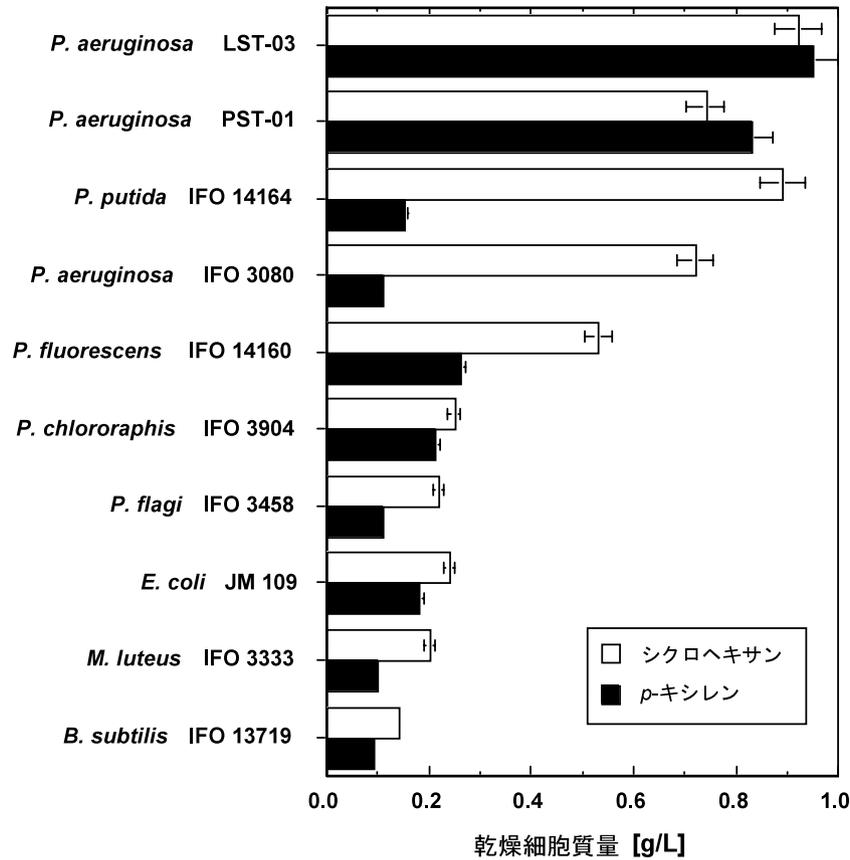


図2 有機溶媒存在下での種々の微生物の生育  
 25%有機溶媒を添加した培養液を用い、30°Cで培養し、36時間後の乾燥細胞質量を測定した。*P. putida*; *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*; *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*; *Pseudomonas chlororaphis*, *P. flagi*; *Pseudomonas flagi*, *E. coli*; *Escherichia coli*, *M. luteus*; *Micrococcus luteus*, *B. subtilis*; *Bacillus subtilis*.

表1 25%有機溶媒存在下での種々のプロテアーゼの安定性

有機溶媒	活性の半減期 [日]			
	PST-01 プロテアーゼ	サーモライシン	ズブチリシン	α-キモトリプシン
エチレングリコール	>100	>50	14.3	6.9
1,4-ブタンジオール	>100	4.4	25	0.7
1,5-ペンタンジオール	>100	1.7	>50	0.4
エタノール	>100	3	>50	27
1-ヘキサノール	>50	18.2	13.7	14.2
メタノール	>50	4.6	26.2	6
ジメチルスルホキシド (DMSO)	>50	2.6	6.4	33.6
2-プロパノール	>50	1.2	47.6	0.6
トリエチレングリコール	>50	5.1	39.7	11.1
tert-ブタノール	>50	0.8	41.6	0.5
1-ヘプタノール	>50	13.1	8.6	3.8
ジメチルホルムアミド (DMF)	25.3	0.9	39.8	2.2
1-ブタノール	24.2	0.9	47.6	0.3
アセトン	23.1	0.7	24.8	0.6
1,4-ジオキサン	17.7	0.8	29.3	0.5
トルエン	12	22.5	5.7	>100
添加無し	9.7	10.8	0.3	13.2

取でき、純度は85%以上であった。この封入体は尿素等のタンパク質変性剤で可溶化でき、さらに先のリパーゼ特異的分子シャペロンが作用すると、容易に活性化することが可能であった<sup>15)</sup>。特に、可溶化、リパーゼ特異的分子シャペロンによる活性化を行った後に、カルシウムイオンを添加すると、高い比活性を有する酵素を作成することができた。なお、*P. aeruginosa* LST-03株の染色体DNAより遺伝子クローニングして大腸菌で発現させたLip3リパーゼ<sup>16)</sup>およびLip8リパーゼ<sup>17)</sup>の有機溶媒耐性はLST-03リパーゼほど高くないことがわかっている。

一方、*P. aeruginosa* PST-01株が産生するプロテアーゼ(PST-01プロテアーゼ)を精製し、有機溶媒存在下での活性の半減期を検討した結果を表1に示す。PST-01プロテアーゼの水溶液中での活性の30°Cでの半減期は9.7日であったのに対し、種々の有機溶媒を添加したときの半減期は9.7日以上であり、有機溶媒が存在した方が安定性に優れていた。また、本プロテアーゼはサーモライシン、ズブチリシン、および $\alpha$ -キモトリプシンより概して有機溶媒存在下での安定性に優れていた<sup>18)</sup>。

### 5. 有機溶媒耐性酵素の特徴

種々のプロテアーゼの酵素溶液にメタノールを添加し、円二色性分散計を用いたCDスペクトルを測定することにより酵素の構造変化を調べた。図3に示すように、PST-01プロテアーゼのCDスペクトルは水溶液中で保温することによりわずかに変化したが、メタノール存在下ではCDスペクトルの変化はほとんど見受けられなかった。一方、 $\alpha$ -キモトリプシンのCDスペクトルはメタノール存在下では大きく変化した。種々のプロテアーゼにおいて、CDスペクトルの変化が小さい方が、活性の半減期が長いという相関が見られた。CDスペクトル変化はそれぞれの

酵素の構造の安定性を示していると考えられる。有機溶媒存在下でも構造が変化しないことは、酵素の有機溶媒安定性を示す特性の一つであるといえる。さらに、種々の二次構造を形成するポリアミノ酸を水溶液中およびメタノール存在下で保温した場合のCDスペクトル変化を測定したところ、 $\alpha$ ヘリックス構造を形成するポリアミノ酸のCDスペクトルは水溶液中およびメタノール存在下のいずれの場合でもあまり変化しないが、 $\beta$ シートを形成するポリアミノ酸のCDスペクトルはメタノール存在下で急激に変化した(図4)。PST-01プロテアーゼは比較的 $\alpha$ ヘリックスの割合が高く、 $\beta$ シートの割合が低いために有機溶媒存在下での構造安定性に優れていることが、PST-01プロテアーゼの有機溶媒耐性の一要因であると考えられる<sup>19)</sup>。

また、図5に示すように、PST-01プロテアーゼは耐熱性酵素として知られているサーモライシンと非常に類似した構造であることがわかった<sup>20)</sup>。しかし、両酵素の有機溶媒耐性は全く異なることから、何が両酵素の有機溶媒耐性の違いの原因になっているのか興味を持たれる。両酵素の構造の違いの一つにジスルフィド結合の有無があるので、PST-01プロテアーゼでジスルフィド結合を形成するシステイン残基を他のアミノ酸残基に置換した変異酵素の作成を試みた。その結果、C末端ドメインのジスルフィド結合(Cys-270とCys-297間)はPST-01プロテアーゼの活性発現に必須であり、N末端ドメインのジスルフィド結合(Cys-30とCys-58間)はPST-01プロテアーゼの有機溶媒耐性に重要な役割を担っていることが明らかになった<sup>21)</sup>。Cys-30とCys-58間のジスルフィド結合は有機溶媒存在下でのPST-01プロテアーゼの構造維持に重要であるといえる。

また、PST-01プロテアーゼ遺伝子にランダム変異を誘発し、有機溶媒耐性が変化したPST-01プロテアーゼの取

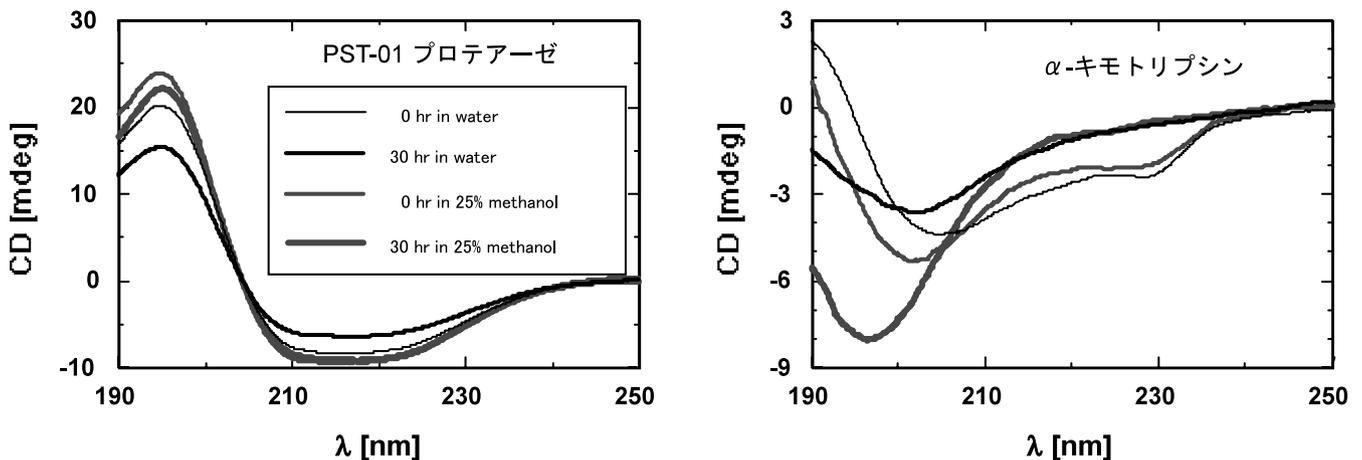


図3 メタノール存在下でのPST-01プロテアーゼと $\alpha$ -キモトリプシンのCDスペクトルの変化

プロテアーゼを25%メタノール存在下、あるいは非存在下、30°Cで30時間保温した。円二色性分散計を用い、保温前後のCDスペクトルを測定した。

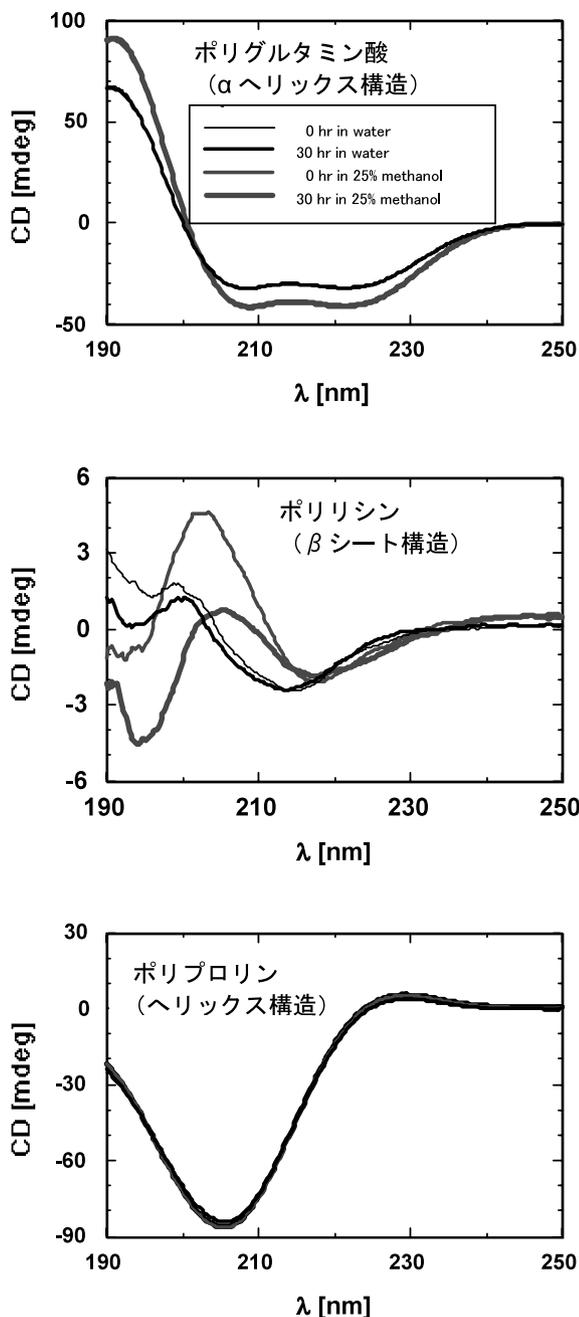


図4 メタノール存在下での種々のポリアミノ酸のCDスペクトルの変化

ポリアミノ酸を25%メタノール存在下、あるいは非存在下、30°Cで30時間保温した。円二色性分散計を用い、保温前後のCDスペクトルを測定した。

得を試みた。有機溶媒耐性が低下した二つの変異酵素の変異箇所を同定したところ、図6に示すように、共に酵素の表面に存在するアミノ残基が置換されており、酵素の表面を形成するアミノ酸も酵素の有機溶媒耐性に関与することが示された<sup>22)</sup>。

さらに、LST-03リパーゼ遺伝子にランダム変異を誘発し、DMSO存在下での安定性が向上したLST-03リパーゼ

の取得を試みた。取得した四つの変異酵素の変異箇所を同定したところ、表2に示すように、酵素の表面に存在するアミノ残基が置換されているものや、アミノ酸側鎖が酸性から中性あるいは中性から塩基性に変化しているという特徴が見られた<sup>23)</sup>。詳細は、現在解析中である。

## 6. 有機溶媒耐性酵素を用いた有機溶媒存在下での合成反応

PST-01プロテアーゼを用いて水-有機溶媒均相系でのペプチド合成を試みた。DMSO存在下でのPST-01プロテアーゼの半減期は50日以上である(表1)。種々のDMSO濃度でカルボベンゾキシ(Cbz)-ArgとLeu-NH<sub>2</sub>から生成されるペプチドCbz-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>の反応初速度および反応が平衡に達したときの収率を図7に示す。有機溶媒濃度が増加すると平衡収率が增大するだけでなく、反応速度も7倍増加した<sup>24)</sup>。また、種々のアミノ酸を用いた検討により、PST-01プロテアーゼはCbz-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>だけでなく、有機溶媒存在下では種々のペプチドを高収率で合成可能であることが明らかとなった<sup>25,26)</sup>。本酵素は、年間世界中で1万5,000トン生産されているアスパルテーム(アスパラギン酸フェニルアラニンメチルエステル)の前駆体(カルボベンゾキシアスパラギン酸フェニルアラニンメチルエステル)の合成にも利用できる。種々の有機溶媒存在下でアスパルテーム前駆体の合成反応を行ったところ、図8に示すようにメタノールやグリセロール存在下では比較的速く反応が進み、また、DMSO存在下では高い収率(83%)で合成可能であった<sup>27)</sup>。

PST-01プロテアーゼは有機溶媒存在下でも安定であり、有機溶媒存在下で高収率に合成できるアスパルテーム前駆体合成の触媒として有効であるが、反応速度はサーモライシンの半分以下である。これは、PST-01プロテアーゼとサーモライシンの基質特異性が異なるためと考えられる。そこで、両酵素の活性中心付近の構造を比較し(図9)、サーモライシンと同様になるように、PST-01プロテアーゼの活性中心付近のアミノ酸残基を部位特異的に置換した変異酵素を作成した。その結果、114番目のアミノ酸をチロシンからフェニルアラニンに置換すると、反応速度が2倍以上に高まり、サーモライシンと同様の反応速度を示した。さらに、114番目のアミノ酸残基を種々のアミノ酸残基に置換したところ、アルギニン残基やセリン残基に置換するとサーモライシンより3倍以上高い活性を示すことがわかった(図10)。

サーモライシンは高温でも安定であるが、安定性保持のために反応溶液中にカルシウムイオンを過剰に添加する必要がある。PST-01プロテアーゼは有機溶媒存在下でサーモライシンより安定であり、安定性保持にカルシウムイオン等の添加剤は必要とせず、工業プロセスで問題となるカ

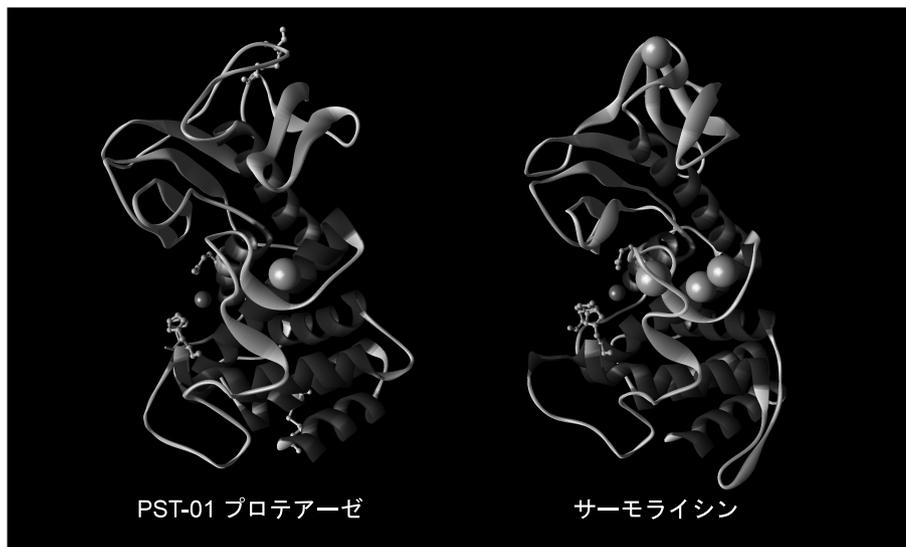


図5 PST-01 プロテアーゼとサーモライシンの立体構造

全体構造をリボンモデル，活性中心とジスルフィド結合を形成するアミノ酸をボールアンドスティックモデル，酵素に配位している亜鉛イオン（小）とカルシウムイオン（大）を充填モデルで示す。

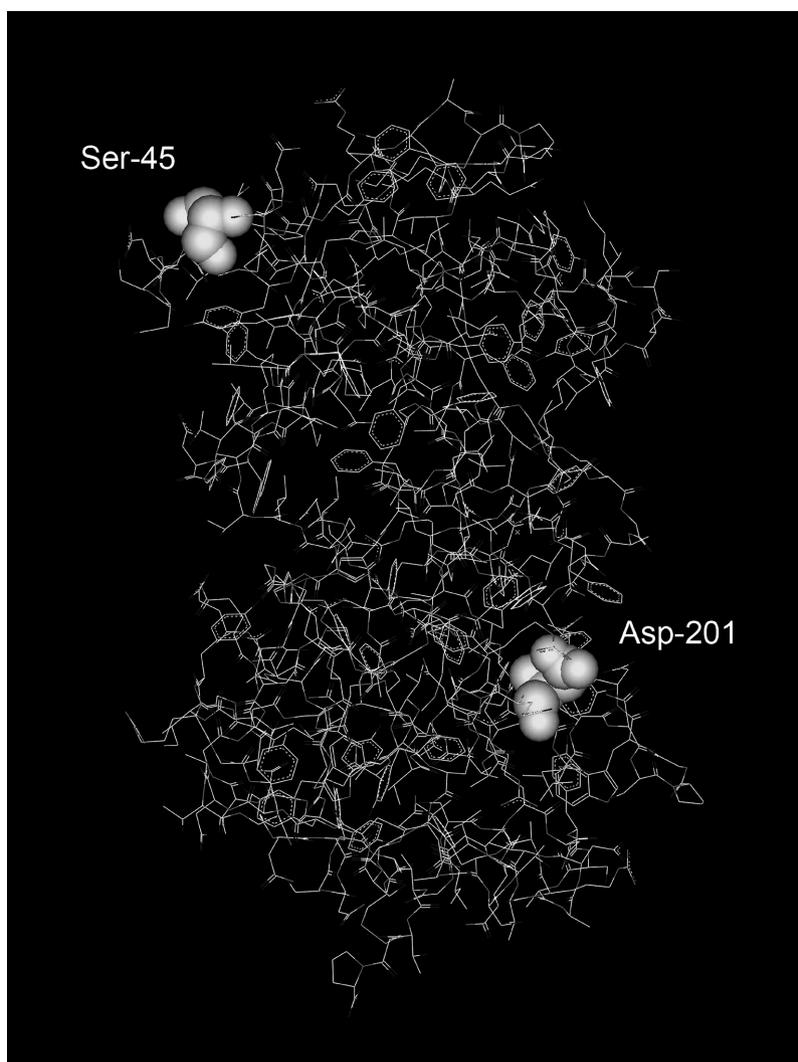


図6 有機溶媒耐性が変化した変異 PST-01 プロテアーゼの変異箇所全体構造をワイヤーモデル，変異したアミノ酸残基を充填モデルで示す。

表2 有機溶媒耐性が向上した変異 LST-03 リパーゼの変異箇所

LST-03 リパーゼ	25% DMSO 存在 下での半減期 [日]	変異箇所	溶媒接触度 [%]	等電点	
				変異前	→ 変異後
LST-03-R65	12.0	S164K	27	5.7	→ 9.7
		T188F	44	5.9	→ 5.5
		S211R	13	5.7	→ 10.8
LST-03-R88	19.7	S155L	2	5.7	→ 6.0
		G157R	7	6.0	→ 10.8
		G177V	2	6.0	→ 6.0
		S194R	5	5.7	→ 10.8
		S202W	18	5.7	→ 5.9
		D209N	5	2.8	→ 5.4
LST-03-R96	17.4	S155L	2	5.7	→ 6.0
LST-03-R162	11.2	L145H	41	6.0	→ 7.6
野生型	6.9				

ルシウムスケーリングを起こす懸念が小さい。これらのことから PST-01 プロテアーゼはアスパルテームの工業生産にとって大変優れた酵素であるといえる。

## 7. おわりに

有機溶媒耐性酵素は水溶液中だけでなく有機溶媒が存在する反応系においても高い活性と安定性を有する酵素であり、水溶媒系、有機溶媒系、有機溶媒を含む水溶媒系、基質濃度が高く基質自体が溶媒となっている反応系、および無溶媒系での反応に用いることのできる酵素である。

有機溶媒耐性酵素を用いた非水系バイオプロセスは特殊な設備を必要としない。このような酵素を用いた製造プロセスのバイオ化により、常温・常圧で反応が行えるため運転コストが低くなり、さらに、プロセスの簡略化により大

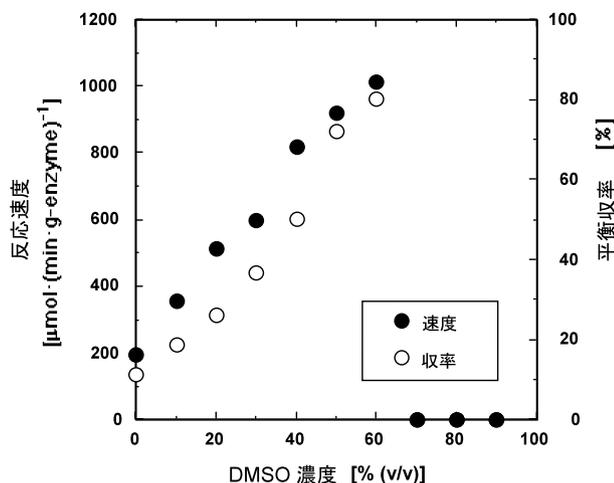


図7 ジメチルスルホキシド存在下での PST-01 プロテアーゼの Cbz-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> 合成活性

10mM Cbz-Arg と 500mM Leu-NH<sub>2</sub> を基質とし、pH7.0、30°C で反応した。

幅なコストダウンが期待できるため、極めて経済的なプロセスの構築が可能になる。また、このようなプロセスは比較的小規模であり、消費するエネルギーも少なく、立地上の制約もない。有機溶媒耐性リパーゼや有機溶媒耐性プロ

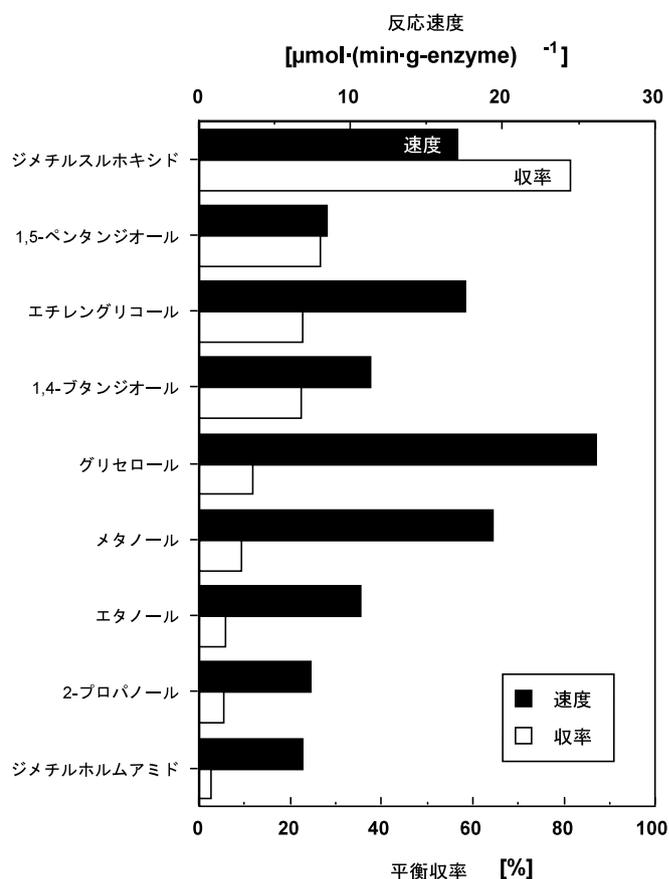


図8 PST-01 プロテアーゼを用いたアスパルテーム前駆体の合成

30mM Cbz-Asp と 500mM Phe-OME を基質とし、50% 有機溶媒存在下、pH7.0、30°C で反応した。

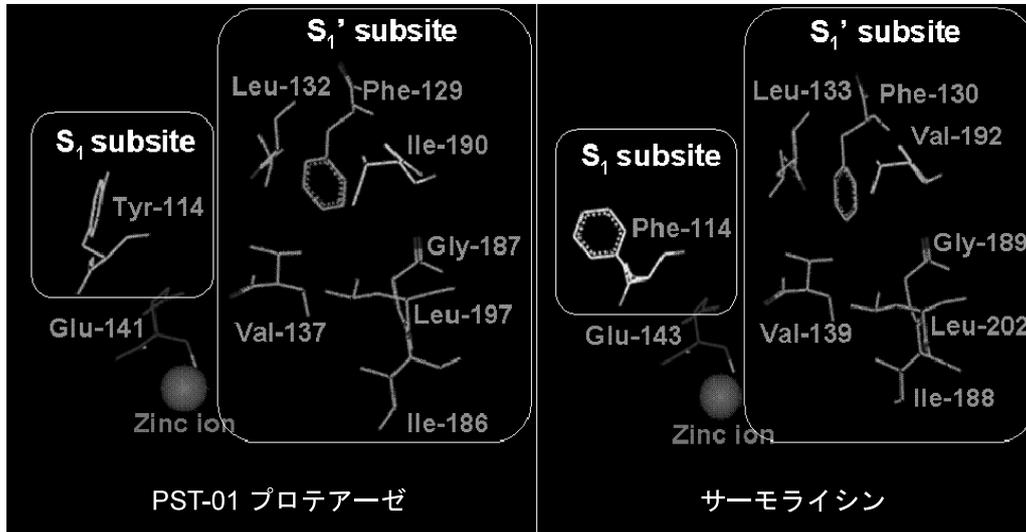


図9 PST-01 プロテアーゼとサーモライシンの活性中心付近の構造サブサイト (subsite) は予想されている基質結合部位を示す。

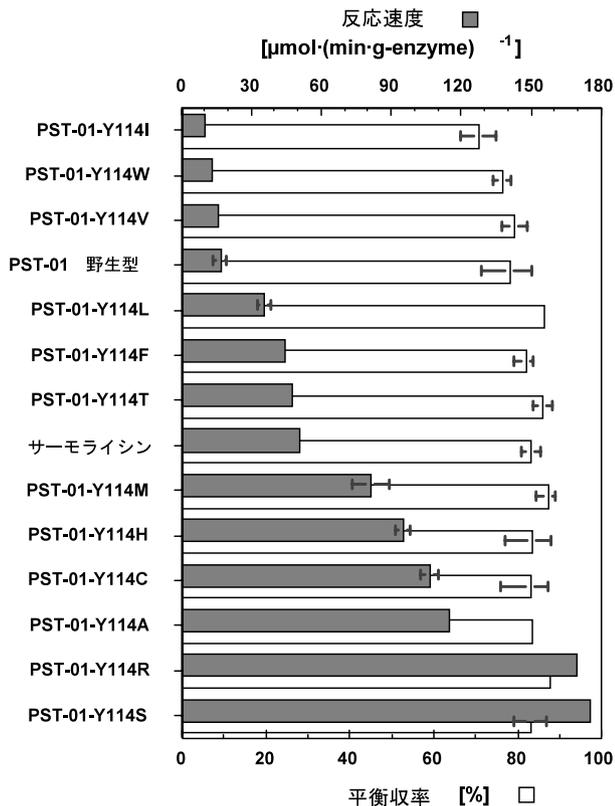


図10 種々のPST-01プロテアーゼとサーモライシンを用いたアスパルテーム前駆体合成活性の比較  
30mM Cbz-Aspと500mM Phe-OMeを基質とし、50%ジメチルスルホキシド存在下、pH7.0、30°Cで反応した。

テアーゼを用いる非水系バイオプロセスで製造されることが期待される具体的なターゲットとして、合成甘味料、ポリアミノ酸、高付加価値食品用油、バイオディーゼル、エステル系香料、医薬中間体などの化合物等が考えられる。

また、生体適応性の高い化合物を合成するコンビナトリアルケミストリー用生体触媒などにも用いられると考えられる。近年、有機溶媒耐性酵素の取得が活発に行われ、報告されている(表3)。中には、有機溶媒耐性の程度がそれほど高くないものも含まれるようであるが、今後、益々有機溶媒耐性酵素の開発が活発化することが期待される。

## 文 献

- Ogino, H. (2008) in Protein Adaptation in Extremophiles (Siddiqui, K.S. & Thomas, T. eds.), pp. 193-236, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Ogino, H. & Ishikawa, H. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 109-116.
- Zaks, A. & Klivanov, A.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3192-3196.
- 千畑一郎編 (1986) 固定化酵素, pp. 107-110, 講談社サイエンティフィック, 東京.
- 稲田祐二編 (1987) タンパク質ハイブリッド, pp. 87-128, 共立出版, 東京.
- 岡畑恵雄, 居城邦治 (1990) 化学工業, **43**, 1242-1246.
- 後藤雅宏 (1992) 化学工学, **56**, 859-860.
- Ogino, H., Miyamoto, K., & Ishikawa, H. (1994) *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 3884-3886.
- Ogino, H., Yasui, K., Shiotani, T., Ishihara, T., & Ishikawa, H. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4258-4262.
- Ogino, H., Yasui, K., Watanabe, F., & Ishikawa, H. (1996) *Ann. NY Acad. Sci.*, **799**, 311-317.
- Ogino, H., Miyamoto, K., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (1999) *Biochem. Eng. J.*, **4**, 1-6.
- Ito, T., Kikuta, H., Nagamori, E., Honda, H., Ogino, H., Ishikawa, H., & Kobayashi, T. (2001) *J. Biosci. Bioeng.*, **91**, 245-250.
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., & Ishikawa, H. (2000) *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 451-457.

表3 有機溶媒耐性であると報告されている酵素

酵 素	由 来	引 用 文 献
リパーゼ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LST-03	8, 11, 12, 13, 14, 15, 23
	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	28
	<i>Rhizopus oryzae</i>	29
	<i>Burkholderia cepacia</i> AKU-883	30
	<i>Streptomyces rimosus</i> R6-554W	31
	<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I-11	32
	<i>Bacillus sphaericus</i> 205y	33, 34
	<i>Pseudomonas</i> sp. S5	35, 36
	<i>Bacillus megaterium</i> CCOC-P2637	37
	<i>Bacillus thermoleovorans</i> CCR11	38
	<i>Penicillium chrysogenum</i> 9'	39
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 5113	40
	<i>Bacillus</i> sp. 42	41
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai	42
エステラーゼ	<i>Pyrobaculum calidifontis</i> VA1	43
	<i>Bacillus licheniformis</i> S-86	44, 45
	<i>Bacillus</i> sp.	46
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P1	47
プロテアーゼ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PST-01	9, 10, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27
	<i>Lumbricus rubellus</i>	48
	<i>Bacillus cereus</i> BG1	49
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain K	50, 51
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai	52
	<i>Bacillus licheniformis</i> RSP-09-37	53, 54
	<i>Bacillus</i> sp. APR-4	55
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PD100	56
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	57, 58
	a gamma-proteobacterium DGII	59
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-2	60
<i>Bacillus cereus</i> 146	61	
アミノペプチダーゼ	<i>Aquifex aeolicus</i>	62
	<i>Fasciola hepatica</i>	63
カタペシンL		64
α-アミラーゼ	<i>Haloarcula</i> sp. S-1	65, 66
オリゴ糖生産酵素	<i>Brachybacterium</i> sp. strain LB25	67
アルコール脱水素酵素	<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 44541	68
α-ケトエステル還元酵素	<i>Streptomyces thermocyaneoviolaceus</i> IFO 1427	69, 70
コレステロール酸化酵素	<i>Burkholderia cepacia</i> ST-200	71, 72
	<i>Chromobacterium</i> sp. DS-1	73
ペルオキシダーゼ	<i>Elaies guineensis</i>	74
チロシナーゼ	<i>Streptomyces</i> sp. REN-21	75
カタラーゼ	<i>Staphylococcus warneri</i> ISK-1	76
メチルチオアデノシンホスホリラーゼ	<i>Pyrococcus furiosus</i>	77
シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> ST-12 K	78
コレステロール変換酵素	<i>Bacillus</i> sp. BC1	

- 14) Ogino, H., Katou, Y., Akagi, R., Mimitsuka, T., Hiroshima, S., Gemba, Y., Doukyu, N., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (2007) *Extremophiles*, 11, 809-817.
- 15) Ogino, H., Inoue, S., Akagi, R., Yasuda, M., Doukyu, N., & Ishimi, K. (2008) *Biochem. Eng. J.*, 40, 507-511.
- 16) Ogino, H., Hiroshima, S., Hirose, S., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (2004) *Mol. Genet. Genomics*, 271, 189-196.
- 17) Ogino, H., Mimitsuka, T., Muto, T., Matsumura, M., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (2004) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 212-223.
- 18) Ogino, H., Watanabe, F., Yamada, M., Nakagawa, S., Hirose, T., Noguchi, A., Yasuda, M., & Ishikawa, H. (1999) *J. Biosci. Bioeng.*, 87, 61-68.
- 19) Ogino, H., Gemba, Y., Yutori, Y., Doukyu, N., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (2007) *Biotechnol. Prog.*, 23, 155-161.
- 20) Ogino, H., Yokoo, J., Watanabe, F., & Ishikawa, H. (2000) *Biochem. Eng. J.*, 5, 191-200.
- 21) Ogino, H., Uchiho, T., Yokoo, J., Kobayashi, R., Ichise, R., & Ishikawa, H. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 942-947.
- 22) Ogino, H., Uchiho, T., Doukyu, N., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358, 1028-1033.
- 23) Kawata, T. & Ogino, H. (2009) *Biotechnol. Prog.*, in press.
- 24) Ogino, H., Gemba, Y., Yamada, M., Shizuka, M., Yasuda, M., & Ishikawa, H. (2000) *Biochem. Eng. J.*, 5, 219-223.
- 25) Ogino, H., Yamada, M., Watanabe, F., Ichinose, H., Yasuda,

- M., & Ishikawa, H. (1999) *J. Biosci. Bioeng.*, **88**, 513–518.
- 26) Bobe, I.M., Abdelmoez, W., Ogino, H., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ishikawa, H. (2004) *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 365–373.
- 27) Tsuchiyama, S., Doukyu, N., Yasuda, M., Ishimi, K., & Ogino, H. (2007) *Biotechnol. Prog.*, **23**, 820–823.
- 28) Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., & Iefuji, H. (2000) *Process Biochem.*, **36**, 317–324.
- 29) Hiol, A., Jonzo, M.D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., & Comeau, L.C. (2000) *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 421–430.
- 30) Ishimoto, R., Sugimoto, M., & Kawai, F. (2001) *FEMS Microbiol. Lett.*, **195**, 231–235.
- 31) Lešćić, I., Vukelić, B., Majerić-Elenkov, M., Saenger, W., & Abramčić, M. (2001) *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 548–553.
- 32) Kakugawa, K., Shobayashi, M., Suzuki, O., & Miyakawa, T. (2002) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 978–985.
- 33) Hun, C.J., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B., & Basri, M. (2003) *Biochem. Eng. J.*, **15**, 147–151.
- 34) Rahman, R.N.Z.A., Chin, J.H., Salleh, A.B., & Basri, M. (2003) *Mol. Gen. Genomics*, **269**, 252–260.
- 35) Baharum, S.N., Salleh, A.B., Razak, C.N.A., Basri, M., Rahman, M.B.A., & Rahman, R.N.Z.R.A. (2003) *Ann. Microbiol.*, **53**, 75–83.
- 36) Rahman, R.N.Z.R.A., Baharum, S.N., Basri, M., & Salleh, A.B. (2005) *Anal. Biochem.*, **341**, 267–274.
- 37) Lima, V.M.G., Krieger, N., Mitchell, D.A., Baratti, J.C., de Filippis, I., & Fontana, J.D. (2004) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **31**, 53–61.
- 38) Castro-Ochoa, L.D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., & Ros, R.O. (2005) *Enzyme Microb. Technol.*, **37**, 648–654.
- 39) Bancercz, R., Ginalska, G., Fiedurek, J., & Gromada, A. (2005) *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 253–260.
- 40) Singh, S. & Banerjee, U.C. (2005) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **36**, 30–35.
- 41) Eltaweel, M.A., Rahman, R.N.Z.R.A., Salleh, A.B., & Basri, M. (2005) *Ann. Microbiol.*, **55**, 187–192.
- 42) Karadzic, I., Masui, A., Zivkovic, L.I., & Fujiwara, N. (2006) *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 82–89.
- 43) Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., & Imanaka, T. (2002) *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3925–3931.
- 44) Torres, S. & Castro, G.R. (2003) New horizons in biotechnology, pp. 113–122, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 45) Torres, S., Baigorí, M.D., & Castro, G.R. (2005) *Process Biochem.*, **40**, 2333–2338.
- 46) Karpushova, A., Brümmer, F., Barth, S., Lange, S., & Schmid, R.D. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **67**, 59–69.
- 47) Park, Y.-J., Choi, S.Y., & Lee, H.-B. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 820–828.
- 48) Nakajima, N., Sugimoto, M., & Ishihara, K. (2000) *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 174–179.
- 49) Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2003) *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 513–518.
- 50) Geok, L.P., Razak, C.N.A., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M., & Salleh, A.B. (2003) *Biochem. Eng. J.*, **13**, 73–77.
- 51) Rahman, R.N.Z.R.A., Geok, L.P., Basri, M., & Salleh, A.B. (2005) *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 749–757.
- 52) Karadzic, I., Masui, A., & Fujiwara, N. (2004) *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 145–152.
- 53) Sareen, R., Bornscheuer, U.T., & Mishra, P. (2004) *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **32**, 1–5.
- 54) Sareen, R., Bornscheuer, U.T., & Mishra, P. (2005) *Biotechnol. Lett.*, **27**, 1901–1907.
- 55) Kumar, D. & Bhalla, T.C. (2004) *Indian J. Exp. Biol.*, **42**, 515–521.
- 56) Najafi, M.F., Deobagkar, D., & Deobagkar, D. (2005) *Electr. J. Biotechnol.*, **8**, 197–203.
- 57) Gupta, A., Roy, I., Khare, S.K., & Gupta, M.N. (2005) *J. Chromatogr. A*, **1069**, 155–161.
- 58) Gupta, A. & Khare, S.K. (2006) *Bioresource Technol.*, **97**, 1788–1793.
- 59) Sana, B., Ghosh, D., Saha, M., & Mukherjee, J. (2006) *Process Biochem.*, **41**, 208–215.
- 60) Khan, S., Misra, A.K., Tripathi, C.K.M., Mishra, B.N., & Bihari, V. (2006) *Indian J. Exp. Biol.*, **44**, 151–156.
- 61) Shafee, N., Tan, C.-C., Mahamad, S., Rahman, R.N.Z.A., Basri, M., & Salleh, A.B. (2006) *Ann. Microbiol.*, **56**, 29–34.
- 62) Khan, A.R., Nirasawa, S., Kaneko, S., Shimonishi, T., & Hayaishi, K. (2000) *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 83–88.
- 63) Dowd, A.J., Dooley, M., Fagain, C., & Dalton, J.P. (2000) *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 599–604.
- 64) Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., & Usami, R. (2005) *Extremophiles*, **9**, 85–89.
- 65) Doukyu, N., Yamagishi, W., Kuwahara, H., Ogino, H., & Furuki, N. (2007) *Extremophiles*, **11**, 781–788.
- 66) Doukyu, N., Yamagishi, W., Kuwahara, H., & Ogino, H. (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 2444–2447.
- 67) Kosjek, B., Stampfer, W., Pogorevc, M., Goessler, W., Faber, K., & Kroutil, W. (2004) *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 55–62.
- 68) Ishihara, K., Yamaguchi, H., Hamada, H., Nakamura, K., & Nakajima, N. (2000) *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **10**, 419–428.
- 69) Doukyu, N. & Aono, R. (2001) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 146–152.
- 70) Takeda, Y., Aono, R., & Doukyu, N. (2006) *Extremophiles*, **10**, 269–277.
- 71) Doukyu, N., Shibata, K., & Ogino, H. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **80**, 59–70.
- 72) Doukyu, N., Shibata, K., Ogino, H., & Sagermann, M. (2009) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 479–490.
- 73) Sakharov, I.Yu., Castillo, J., Areza, J.C., & Galaev, I.Yu. (2000) *Bioseparation*, **9**, 125–132.
- 74) Rodakiewicz-Nowak, J. & Ito, M. (2003) *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **78**, 809–816.
- 75) Mizuno, K., Fukuda, D., Kakihara, M., Kohno, M., Ha, T.L., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000) *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 324–329.
- 76) Cacciapuoti, G., Bertoldo, C., Brio, A., Zappia, V., & Porcelli, M. (2003) *Extremophiles*, **7**, 159–168.
- 77) Doukyu, N., Kuwahara, H., & Aono, R. (2003) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 334–340.
- 78) Sardessai, Y. & Bhosle, S. (2003) *Mar. Biotechnol.*, **5**, 116–118.