

455 ニトリルヒドラーターゼに関する研究(第3報)

(京大農化、日東化学工業*(株)) ○長沢 透、龍野孝一郎*、難波弘憲
武内浩二、山田秀明

1)目的 我々は、合成ポリマーの原料などに大量生産されるアクリルアミドを微生物のニトリルヒドラーターゼを用いて生産する方法を検討してきた。当研究室で分離された *Pseudomonas chlororaphis* B23 は強いニトリルヒドラーターゼ生産能を有し、最適反応条件下ではアクリロニトリルをほぼ100%の転換率で水和し、400g/Lのアクリルアミドを生産蓄積できる。我々は、工業的スケールでのアクリルアミド生産を目的とし、既に本酵素の誘導条件、高活性変異株の選育等を検討してきた。本報では、*P. chlororaphis* B23 のニトリルヒドラーターゼを精製し、その諸性質を明らかにした。

2)方法と結果 蔗糖、鉄イオンを含む培地に、インデューサーとしてメタアクリルアミドを加えて培養を行い、得られた *P. chlororaphis* B23 の菌体から、硫酸分画、各種クロマトグラフィーを行い本酵素の精製を試み、精製酵素に硫酸を添加し箱晶状に単離した。本酵素の分子量は約100,000 Daで、25,000 Daのサブユニット4個より成っている。本酵素は1分子当たり4g 原子の鉄を含む。本酵素は灰褐色を呈し、可視領域に広い吸収を有し、720 nmに極大吸収を示す。可視部の吸収スペクトルは酵素活性と強い相関性を示す。本酵素は化学量論的にニトリルをアミドに変換し、酸やアンモニアの生成は認められない。アロピオニトリル、ブチロニトリル、アクリロニトリル等の炭素数3~6個の脂肪族ニトリル化合物は本酵素の良好な基質となるが、アセトニトリルにはほとんど作用しない。本酵素は、アセトニトリルに生育した *Arthrobacter* J-1が生成するアセトニトリルヒドラーターゼとは、各種物理化学的性質、Cofactor、吸収スペクトル、基質特異性が全く異なる新しい酵素である。

Studies on Nitrile Hydratase (No. 3)

Toru Nagasawa, Koichiro Ryuno†, Hironori Nanba, Koji Takeuchi, and Hideaki Yamada
Dept. of Agricultural Chemistry, Kyoto University, *Nitto Chemical Industry Co., Ltd.

456 PVA分解菌のPVA分解酵素生産に関する基礎的研究

(阪大・工・環境) ○道広康暉・橋本 奨・藤田正憲

1)目的 ポリビニルアルコール(PVA)分解菌は、PVAを単一炭素源とする培地でPVAを酸化分解し増殖できるが、その酵素生産条件等に関しては明らかにされていない。ここでは、PVA分解菌が生産するPVA分解酵素の基礎的性質、酵素生産条件および酵素の細胞外分泌方法等に関して若干の検討を行った。

2)方法 PVA分解菌は、*Pseudomonas vesicularis* var *polyalyticus* PH株を用いた。培養は、PVA、Tryptone、Corn Steep Liquor等を基質とした培地で30°C、rotary shakerにて数日間行った。PVA分解粗酵素液としては、培養液を遠心して集菌し、上澄液と細胞に分けて、上澄液はそのまま用い、細胞はリン酸bufferに懸濁したものを(Intact Cell)とそれを超音波処理により菌体を破壊した上澄液(Cell Free Extract)の二種類を調製し試験に供した。PVA分解活性は、粗酵素液とPVAをL字管に入れ、30°Cで数時間振とうしPVAの減少量を測定し求めた。ここで培養上澄液の活性を菌体外活性とし、Intact CellとCell Free Extractの活性を菌体内活性とした。

3)結果 本菌株の生産するPVA分解酵素は構成酵素であり、菌体の内外に生産される。菌体内活性と菌体外活性では、実験の全てを通して菌体内活性の方が大きかった。よって酵素を取得する場合には、菌体を大量に増殖させる必要があり、そのための安価で効率の良い培地を検討したところ、基質としてCorn Steep Liquorが最も適していた。酵素の取得法として、菌体の浸透圧処理を行い、菌体内酵素の体外放出を試みたが約50%しか菌体外に放出されなかった。又、菌体のアセトンパウダー等の調製に関しても検討を行った。

Basic Study on the Production of PVA Degrading Enzyme by *Pseudomonas* sp. PH.

†Yasuteru Michihiro, Susumu Hashimoto and Masanori Fujita.

Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering, Osaka University.