

419 乳酸菌ATPaseの*in vivo*における活性化

(山梨大・工・化学生物工) 黒澤 尋、○石光崇志、中村和夫、天野義文

【目的】乳酸菌 *Lactobacillus bulgaricus* は細胞内に生成した乳酸アニオンを、プロトンと共にATPaseを通じて細胞外へ排出している。このため細胞内pHは常に細胞外よりも高く維持されている。このプロトンの濃度勾配をプロトン駆動力といい、細胞の耐酸性と種々の栄養素の取り込みに関与している。したがって、ATPaseが正常に機能しなくなると、細胞は恒常性が保たれなくなり死滅してしまうものと考えられる。本研究では、乳酸菌の耐酸性を高めることを目的として、*L.bulgaricus* のATPase活性の強化を試みた。さらに、強化したATPase活性の特性を明らかにすると共に、強化菌の耐酸性を評価した。

【方法及び結果】*L.delbrueckii* ss. *bulgaricus* JCM1002をMRS培地で培養した。菌体を超音波破碎し、遠心分離により膜画分を調製した。*in vitro*において膜画分のATPase活性を高める効果のある因子の検索をしたところ、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸などの中鎖不飽和脂肪酸を膜画分に添加することによりATPase活性が賦活されることが分かった。*in vitro*と同様の賦活効果を*in vivo*において再現するために低濃度のデカン酸存在下で*L.bulgaricus* の馴養を行った。その結果、馴養菌から得られた膜画分のATPase活性は、通常の約2倍の活性を有していた。また至適pH、Km値などの酵素活性の諸性質も異なることが明らかになった。

*In vivo* activation of lactic acid bacteria ATPase

Hiroshi Kurosawa,○Takayuki Ishimitsu, Kazuo Nakamura, Yoshifumi Amano

(Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Yamanashi Univ.)

[Key words]ATPase, *L.bulgaricus*, activation

## 420 オキシム代謝に関与するニトリルヒドラーゼに関する研究\*

(富山県立大・工・生物工学研究センター) 加藤康夫、○津田孝志、浅野泰久

【目的】演者らはこれまで、新規微生物酵素アルドキシム脱水酵素の生産菌として土壌より *Rhodococcus* sp. YH3-3株を単離し<sup>1)</sup>、各種のニトリル合成へと応用してきた<sup>2)</sup>。本菌のオキシムの代謝経路について検討したところ、同菌の無細胞抽出液中にニトリルヒドラーゼの存在を見出した。今回は本酵素の生産条件及び精製について検討した結果について報告する。

【方法及び結果】酵素活性の測定は、3-シアノピリジン(1)を基質としてpH7.2のHEPES-Na緩衝液中で酵素反応を行い、Hibar LiChrosorb-NH<sub>2</sub>カラムを用いるHPLC分析にて、(1)の減少またはニコチンアミド(2)の生成を直接定量することにより行った。本菌株はコバルトイオンを含む培地で培養することで、本酵素活性を強く発現した。また、各種のオキシム、ニトリルおよびアミドを加えることで、比活性が向上した。本酵素は各種のアルキル、アリール、及びアラルキルの各種ニトリルに広く作用し、対応するアミドを与えた。菌体を超音波破碎することにより本酵素活性は完全に失われたが、吉草酸等の有機酸の添加で失活より保護された。クロトノニトリル、酢酸ナトリウム、及びNZ-アミンを含む培地で培養した菌体より無細胞抽出液を調製し、硫酸分画及び各種クロマトグラフィーにより本酵素を高度に精製した。その他、本酵素の諸性質についても併せて報告する。1) 日本農芸化学会平成8年度大会講演要旨集、p274 2) 日本生物工学会平成8年度大会講演要旨集、p190 \*微生物のオキシム代謝に関する研究(第六報)

Studies on nitrile hydratase in aldoxime metabolism.

Yasuo Kato, Takashi Tsuda, Yasuhisa Asano (Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

【Key words】aldoxime dehydratase, nitrile hydratase, *Rhodococcus* sp., nitrile, amide