

## *Sporolactobacillus inulinus* の好氣的代謝

小崎道雄 飯野久和 <sup>1</sup>安西幸子 <sup>2</sup>新村洋一

### Aerobic Metabolism of Glucose by Facultative Anaerobe *Sporolactobacillus inulinus*

Michio Kozaki, Hisakazu Iino, Yukiko Anzai<sup>1)</sup>, and Yoichi Niimura<sup>2)</sup>

Although facultative anaerobe *Sporolactobacillus inulinus* lacks electron transport chain, this genus grow well under aerobic condition the same as anaerobic culture and final metabolic product on aerobic condition is only acetic acid instead of lactic acid of anaerobic condition.

Therefore related enzymes to pyruvate metabolism (lactate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase complex, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase) and closely enzymes on metabolism of acetylCoA (phosphotrans acetylase, acetate kinase, acetyl-CoA hydrolase, acetaldehyde dehydrogenase, and alcohol dehydrogenase) were measured enzymatic activities respectively.

The catabolism from pyruvate to acetic acid under aerobic condition took place by pyruvate dehydrogenase complex, acetyl-CoA phosphotrans acetylase and acetyl kinase. NADH produced from EMP pathway and acetyl-CoA reoxidized by NADH oxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from NADH oxidation scavenged with NADH peroxidase of *S. inulinus*.

So we proposed metabolic pathway of glucose to acetate under aerobic condition of *S. inulinus*.

<sup>1)</sup>Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture

<sup>2)</sup>Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Agriculture

通性嫌氣性細菌は、一般に好氣条件下では呼吸により、また嫌氣状態の時は発酵によりエネルギー代謝を行い増殖する。しかし、通性嫌氣性細菌である乳酸菌はカタラーゼや呼吸鎖を欠如しているため<sup>1)</sup>、酸素に対する耐性が低く、好気下の生育は嫌氣的条件にくらべ劣ると言われてきた。しかし、著者等が発見した新属新種の *Amphibacillus xylanus* Apol株はカタラーゼ、呼吸鎖共に有しないにもかかわらず、よく好気条件下でも生育する<sup>2)3)4)</sup>。したがって、好氣的生育に必ずしも呼吸鎖およびカタラーゼを必要としないと考えられる。有胞子乳酸菌の *Sporolactobacillus inulinus* はホモ乳酸発酵菌で、

呼吸鎖、カタラーゼを欠き<sup>5)</sup>従来から好氣的な生育は困難とされ、好氣的代謝は必ずしも十分に検討されていなかった。

本報では、*S. inulinus*の好気条件下での生育を検討し、乳酸菌であるにもかかわらず、酢酸を生成する別の代謝系のあることを知り、その場合の代謝系および発生する酸素の無毒化を調べた。

#### 実験方法

1. 供試菌株の培養、比増殖速度および菌体収集

供試菌株：有胞子乳酸菌の代表株である

1：東京農業大学農学部農芸化学科、2：東京農業大学生物産業学部食品科学科

*Sporolactobacillus inulinus* NRIC 1133<sup>6)</sup>を供試した。

嫌気および好気培養：Table 1のGYP培地を基礎とした。嫌気培養はN<sub>2</sub>置換をおこない、titanium (II) citrateを添加して培地の酸化還元電位を下げた。また好気培養は綿栓をほどこし、振とう培養した。

比増殖速度：GYP培地を用い、前培養液を1/100量接種後、最大比増殖速度 ( $\mu$  max) を算出した。

菌体収量：前培養菌体を40mMリン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し、本培養液の1/100量を接種した。48時間培養後、同一の緩衝液で洗浄し凍結乾燥後、その質量値から消費グルコース当たりの菌体質量を算出した。また、グルコース量は、酵素法 (グルコースCテストワコー) により測定した。

Table 1. Components of GYP medium

glucose 10g	yeast ex. 10g
pepton 10g	sodium acetate 10g
salt B soln* 0.5ml	fill up 1000ml

\*salt B soln: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 40mg/ml,  
MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2mg/ml, NaCl 2mg/ml

## 2. グルコースによる代謝生産物の測定

培養：代謝産物の測定を容易にするため、グルコース (0.4%)、イーストエキス (0.3%)、ペプトン (0.3%) と基本培地の濃度を下げ、酢酸ナトリウムを除いたGYP培地を用い培養した。本培地に緩衝能を付与する目的で0.6Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) を添加した。この培地に緩衝液に懸濁した洗浄培養菌体を、接種後、24時間培養し、その上澄液を代謝産物の測定に用いた。

代謝物の測定：代謝産物として有機酸 (酢酸、

乳酸)、エタノールおよび消費グルコースを測定した。有機酸は培養液を遠沈し、菌体を除去後、上澄液をメタノールで除タンパクし、塩酸でpHを調整した。これを60℃、20Kg/cm<sup>2</sup>で1分間1.0ml流しHPLCで測定した。また、生成エタノールはBMY F-Kitを、消費グルコース量はグルコースCテストワコーにより測定した。

## 3. 粗酵素標品調査法

粗酵素標品の調製：好氣的代謝を検討するための粗酵素の調整には、対数増殖後期まで増殖させた菌体を使用した。菌体1gに3mlの40mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加え、ホモゲナイズ後、2mlのリゾチームを添加し、37℃で5分間保温、フレンチプレス (16,000 psi) により菌体破碎後、超音波処理し、遠沈後の上澄液を前述の緩衝液により8時間透析を行った。内液の沈澱を除去し、その上澄液を粗酵素標品とした。

グルコースを基質とした代謝経路の確定：グルコースからの代謝経路には主にEMP (Embden-Meyerhof-Parnas) 経路、ED (Entner-Doudoroff) 経路およびPhosphoketolase経路がある。これらのいずれの経路かを確定するため、EMP経路には6-Phospho fructokinaseを、ED経路の確認に、Phosphogluconate dehydratase活性を調べた。またPhosphoketolase経路にはPhosphoketolase活性をみた。これらは、上記酵素の生成物を定量し求めた。

## 4. ピルビン酸代謝の確認

ピルビン酸以降の代謝を調べるため、lactate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase complex, pyruvate oxidase (phosphorylating), pyruvate oxidase (CoA-acetylating) およびpyruvate decarboxylaseの活性を測定した。

lactate dehydrogenase活性測定：ピルビン酸を基質とする逆反応で、NADH ( $\epsilon_{340} = 6220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

の酸化を340nmの吸光度の減少により嫌氣的に測定した。

pyruvate dehydrogenase complex活性測定：本酵素complexは、pyruvate dehydrogenase, dihydrolipoamide acetyltransferase, lipoamide dehydrogenaseの多酵素複合体である。この酵素活性は、NAD還元を340nmの吸光度の増加により嫌氣的に測定した。

pyruvate oxidase (phosphorylating) 活性測定：ピルビン酸ナトリウムを基質としてO<sub>2</sub>の吸収を酵素電極を用いて測定した。すなわち10mM MES緩衝液 (pH6.5), 0.1mM FAD, 0.2mM TTP, 1mM塩化マグネシウム, 粗酵素を含む反応液2.0mlを37℃, 15分間保温し, 1Mピルビン酸ナトリウム20μlの添加で反応させた。1単位は上記条件下で1分間に1μmoleのO<sub>2</sub>を吸収する酵素量とした。

pyruvate oxidase (CoA-acetylating) 活性測定：ピルビン酸ナトリウムを基質とし, O<sub>2</sub>吸収を酵素電極を用いて測定した。

pyruvate decarboxylase活性測定：粗酵素液にlactate dehydrogenaseが共存するため活性測定が不能である。したがって, 反応生成物のアセトアルデヒドを検出した。

## 5. Acetyl-CoA代謝関与酵素の活性

phosphotransacetylase測定法：acetyl-CoAの生成にともなう233nmの吸光度の増加を測定した。20mM HEPES緩衝液 (pH 7.4), 0.3mg/ml GSH, 0.083μM CoA, 10mM 硫酸アンモニウム, 粗酵素を含む反応液3.0mlを37℃で保温, 0.2M acetyl phosphate 50μlの添加により反応を開始した。1単位は1分間に1μmoleのacetyl-CoAを生成する酵素量とした。

acetyl-CoA hydrolase測定法：acetyl-CoAの生成は, 5,5'-dilhiobisがacetyl-CoAを還元し生ずるTNBの412nmの吸光度の増加から嫌氣的に測定

した。

acetate kinase測定法：acetyl phosphateの生成をhydroxylamineと塩化鉄 (FeCl<sub>3</sub>) 存在下, ヒドロキサム酸鉄として呈色, 540nmの吸光度の増加から測定した。

acetaldehyde dehydrogenase測定法：acetaldehydeの減少をNADHの340nmの吸光度の増加から嫌氣的に測定した。

alcohol dehydrogenase測定法：アセトアルデヒドの生成をNADHの340nmの吸光度の増加から測定した。

resting cellの酸素吸収測定法：GYP培地で対数増殖期後期まで好気培養後, 菌体を50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄, 懸濁し37℃で60分放置し, 遠沈後, 再び同じ緩衝液で洗浄してresting cellを調整し, 凍結乾燥後, 恒量値を出した。酸素吸収は, resting cellを含む50mMリン酸緩衝液の2.0mlを37℃で15分保温後, 電子受容体を添加し測定した。

無細胞抽出液の酸素吸収：粗酵素調整法と同様に無細胞を取り, resting cellの酸素吸収法を用いた。

## 6. 活性酸素消去酵素の検索

NADH peroxidase活性測定：*S. inulinus*は好気条件下でNADH oxidaseによるNADHの酸化から過酸化水素を生成すると考えられる。また, 細胞内で酸素がスーパーオキシドアニオンを生成する。したがって, 活性酸素の消去が必要である。そこで活性酸素消去酵素の検索を行った。NADHの減少を340nmの吸光度の減少により嫌氣的に測定した。すなわち, 50mMリン酸緩衝液 (pH7.0), 0.1mM EDTA, 0.2mM NADH, 50μM FAD, 粗酵素の反応液2.4mlを37℃で保温, 250mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10μlの添加で反応を開始した。1単位は, 1分間に1μMのNADHを酸化する酵素量とした。

NADPH peroxidase活性測定：NADPHの減少を340nmの吸光度の減少により嫌氣的に測定したが、測定法はNADHの時と同様である。

cytochrome C peroxidase活性測定：ferrocytochrome Cの酸化に伴う550nmの吸光度の減少を測定した。50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0), 1.0mM EDTA, 4mM cytochrome C, 粗酵素の反応液1.0mlを37℃, 250mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4μl添加して反応を開始した。1単位は1分間に1μmolのcytochrome Cを酸化する酵素量とした。

NADPH peroxidase活性測定：NADPHの減少を340nmの吸光度の減少により嫌氣的に測定したが、測定法はNADHと同様である。

cytochrome C peroxidase活性測定：ferrocytochrome Cの酸化に伴う550nmの吸光度の減少を測定した。50mMリン酸緩衝液 (pH7.0), 1.0mM EDTA, 4mM cytochrome C, 粗酵素の反応液1.0mlを37℃, 250mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4μl添加して反応を開始した。1単位は1分間に1μmolのcytochrome Cを酸化する酵素量とした。

iodide peroxidase活性測定：I<sup>-</sup>を基質としてI<sub>3</sub><sup>-</sup>の生成を350nmの吸光度の増加により測定した。50mMリン酸緩衝液 (pH7.0), 1.0mM EDTA, 0.5mMヨウ化カリウム, 粗酵素液を含む反応液1.0mlを37℃で保温, 250mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4μlの添加で反応を開始した。1単位は1分間に1μmolのcytochromeを酸化する酵素量とした。

ascorbate peroxidase活性測定：ascorbateの酸化に伴う265nmの吸光度の減少を測定した。1単位は1分間に1μmolのascorbateを酸化する酵素量とした。

chloroperoxidase活性測定：monochlorodimedonを基質としてdichlorodimedonの生成を278nmの吸光度の減少により測定した。1単位は1分間に1μmolのdichlorodimedonを生成する酵素量とした。

## 結果および考察

*S. inulinus*は、ヘム鉄存在下でのみ原始的な呼吸鎖をもつことわかった乳酸菌ではあるが、一般には呼吸鎖やカタラーゼを欠如していて酸素耐性は有するものの、好気条件下では嫌気条件下に較べ増殖は劣ると言われてきた。しかし、*S. inulinus*の好気条件下での増殖に対する検討は十分に行われていなかった。

本報では、まず嫌気、好気両条件下での増殖を調べた。その結果、最大比増殖速度は両条件下でほぼ等しい値が得られた。すなわち、*S. inulinus*は好気下でも生育が良好であり、しかもTable 2に示したように菌体収量は嫌気下の2倍以上が測定された。その理由としては、好気下での生育では乳酸発酵によらないATPの生成が示唆された。グルコースからの代謝産物をTable 3に示したが、嫌気条件下では消費糖に対し定量的に乳酸を生成するのに対し、好気下の生育ではその代謝産物が酢酸のみであって乳酸もエタノールも確認されなかった。また、炭素回収率も61.8%と低下した。

このことから、供試菌*S. inulinus*は好気条件下では嫌気に較べ約2倍以上とよく生育することが判明し、しかも好気の場合は乳酸発酵の形式をとらず、酢酸のみを生成するATP生産を行っていることがわかった。

Table 2. Effect of Oxygen on growth of *S. inulinus* NRIC 1133

Culture condition	Growth yield (dry weight g/mol glucose)	Maximum specific growth rate (μ max h <sup>-1</sup> )
Anaerobic	13.6	0.45
Aerobic	39.6	0.41

**Table 3.** Effect of oxygen, on end-products of *S. inulinus* NRIC 1133

Culture condition	Consumed suger (mM)	Endproduct (mM)			Carbon recovery (%)
		lactate	acetate	ethamnol	
anaerobic	22.7	42.2	0	0.2	93.2
aerobic	22.4	0	41.5	0	61.8

**Table 4.** Activities of enzymes involved in pyruvate metabolism in *S. inulinus* NRIC 1133

Enzymes	Specific activities ( $\times 10^3$ U/mg protein)	
	Anaerobic	Aerobic
lactate dehydrogenase	22900	7450
pyruvate dehydrogenase complex	2.7	8.6
pyruvate oxidase (phosphotrans acetylase) (CoA-acetylating)	0	0
pyruvate decarboxylase	0	0

**Table 5.** Activities of enzymes involved in acetyl-CoA metabolism in *S. inulinus* NRIC 1133

Enzymes	Specific activities ( $\times 10^3$ U/mg protein)	
	Anaerobic	Aerobic
Phosphotransacetylase	2180	2035
Acetyl-CoA hydrolase	0	0
Acetate kinase	258	241
Aldehyde dehydrogenase (CoA-acelylating)	0 5.2	0 5.9
Alcohol dehydrogenase	17	25

そこで好気条件下の*S. inulinus*の代謝経路を検討した。グルコースからピルビン酸に至るにはEMP (Embden-Meyerhof pathway), ED (Entner-Doudoroff pathway) およびPhospho-ketolaseによる代謝が考えられるため, それらの経路に参与する主要酵素すなわちEMPにおける6-Phosphofructokinase, EDに対するPhospho-ketolaseについて定量的に活性の有無を調べた。その結果, Phosphofructokinase活性のみが認められ, EMP経路で糖を代謝していることが明らかになった。そこで好気条件下のときの酢酸生成経路を知る目的でピルビン酸代謝に参与する酵素活性を調べ, その結果をTable 4に示した。嫌気条件下ではlactate dehydrogenaseが好気条件下に較べ約3倍の活性であったが逆にPyruvate decarboxylase complexは好気条件下においておよそ3倍の活性が認められた。また, Pyruvate oxidaseおよびPyruvate decarboxylaseの存在は認められなかった。従って, 嫌気条件下では*S. inulinus*によるATP生産はグルコースよりEMP経路を経てピルビン酸に代謝され, さらにlactate dehydrogenaseにより乳酸を生成することが示唆された。一方, 好氣的な生育ではピルビ

ン酸までは同一経路であるものの, その後Pyruvate decarboxylase complexによりピルビン酸はNADによる酸化的脱炭酸を行いacetyl CoAを生成することが推定された。このことからacetyl CoAの代謝関与が予想される, それに関わる酵素活性の有無を調べた。

acetyl CoAの代謝にはPhosphotransacetylase, acetyl-CoA hydrolase, acetate kinase, acetaldehyde dehydrogenaseおよびalcohol dehydrogenaseが関与する。それらの酵素活性測定はTable 5の通りの結果が得られた。すなわち, acetyl phosphateを生成するphosphotransacetylaseおよびacetate kinaseは活性を有し, またalcohol dehydrogenaseも嫌気, 好気両条件下では差がなかった。しかし酢酸を生成するacetyl-CoA hydrolaseの活性がなかった。このことからピルビン酸からの酢酸生成には酸素の有無に関係なく, 好気代謝経路に酸素は直接関与していないことが明らかになった。

そこで, resting cellを用いて酸素の吸収を測定した。その結果, 電子受容体としてグルコースを添加したときだけTable 6のように酸素吸収がみられた。またこの吸収は呼吸鎖阻害剤のア

**Table 6.** The rate of oxygen consumption by resting cells of *S. inulinus* NRIC 1133 in the presence of electron donors

Electron donors	Concentration (mM)	Oxygen consumption (nmol/ml/mg dry cells)
glucose	5	55.8
lactate(D,L-)	10	0
pyruvate	10	0
succinate	10	0
NADH	10	0
NADPH	10	0

**Table 7.** Effect of respiratory inhibitors on oxygen consumption by *S. inulinus* NRIC 1133

Inhibitors	Oxygen consumption (%)
Cotrol(5mM glucose)	100
1mM NaN <sub>3</sub>	91
5mM KCN	91

ジ化ナトリウムや青酸カリウムでTable 7に示されるように阻害を受けなかった。従って呼吸とは異なる酸素代謝であろうと推察し、無細胞抽出液を用いさらに酸素吸収の原因を調べた。その結果、Table 8に示したように*S. inulinus*の無細胞抽出液にはNADHを電子受容体としO<sub>2</sub>で直接酸化するNADH oxidase活性がみられた。

すなわち、好氣的代謝の場合EMPおよびpyruvate dehydrogenase complexで生成された

**Table 8.** The rate of oxygen consumption by Cell-free extract of *S. inulinus* NRIC 1133 in the presence of electron donors

Electron donors	Concentration (mM)	Oxygen consumption (nmol/min/mg protein)
glucose	5	0
pyruvate	10	0
lactate(D,L-)	10	2
succinate	10	2
NADH	10	84
NADPH	10	23

**Table 9.** Active oxygen scavenging enzyme in the cell free extract of *S. inulinus* NRIC 1133

Enzymes	Specific activity (× 10 <sup>-3</sup> U/mg protein)
NADH peroxidase	250
NADPH peroxidase	32
Cytochrome C peroxidase	0
Iodide peroxidase	0
Ascorbate peroxidase	0
Peroxidase	0
Speroxide dismutase	29 (U/mg protein)

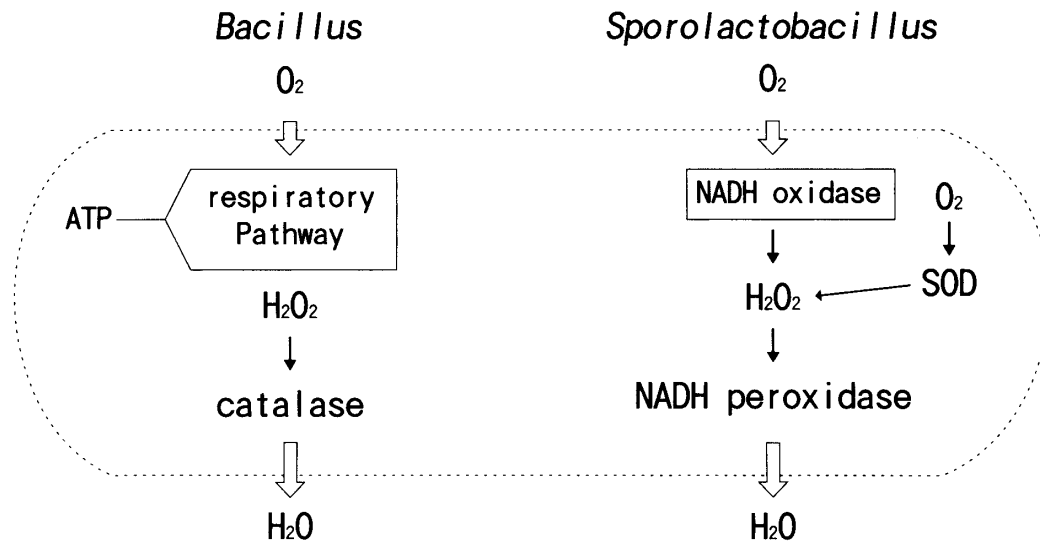
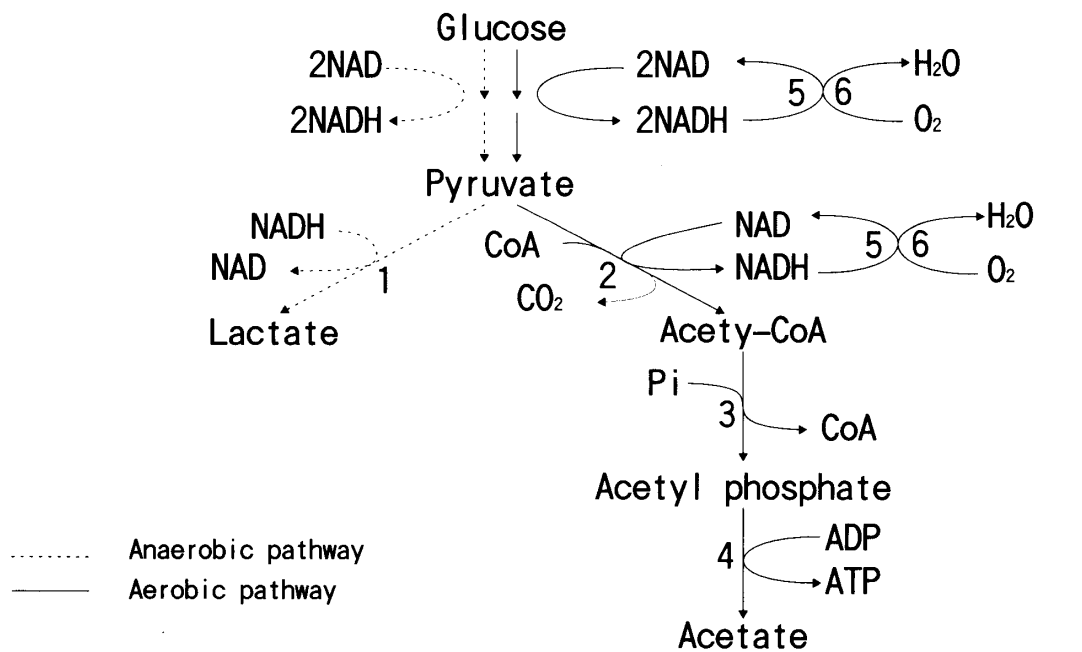


Fig. 1. Oxygen metabolism in *Bacillus* and *Sporolactobacillus*



Enzymes : 1...lactate dehydrogenase ; 2...pyruvate dehydrogenase complex ; 3...phosphotrans acetylase ; 4...acetate kinase ; 5...NADH oxidase ; 6...NADH peroxidase.

Fig. 2 Proposed pathway for pyruvate metabolism in *S. inulinus*



NADHをNADへ再酸化されず、NADH oxidaseによって直接酸化することがわかった。これらの結果から、さらにNADH oxidase活性について検討を加えたところ好氣的条件下で、嫌氣的条件下での約3倍に上昇し本酵素が好氣的代謝回路のNADH再酸化の主力であることが示唆された。

ただ、*S. inulinus*のNADH oxidaseは酸素電極とcatalaseを用いた試験から過酸化水素生成型であった。したがって、過酸化水素の蓄積はcatalaseを欠如している本株には致命的である。これら活性酸素の消去が細胞で必要であり、それらを知るために消去酵素の検索を行った。

消去酵素として考えられたのはNADH peroxidase, NADPH peroxidase, cytochrome C peroxidase, ascorbate peroxidase, chboro peroxidase, peroxidaseであるから、それら酵素の活性を調べた。Table 9はその結果であるが、過酸化水素を消去するNADH peroxidaseおよびO<sub>2</sub>消去酵素のsuperoxide dismutaseは活性が強く認められた。したがって両酵素が*S. inulinus*における活性酵素の生成を抑制していると推察した。しかし、superoxide dismutaseの反応生成物が酸素と過酸化水素であるため、過酸化水素消去酵素であるNADH peroxidaseについて検討した。その結果、本酵素活性は好氣条件下で嫌氣条件下の約3倍に上昇し、*S. inulinus*の好氣的生育が可能になる重要な役割をもつと考えられた。

以上のように、通性嫌氣性ホモ型乳酸菌の*S. inulinus*は従来好氣条件下での生育は困難と考えられていたが、検討の結果、嫌氣条件下に比べ最大比増殖速度は同じで菌体収量は2倍以上が測定された。両条件下での生産物を調べたところ、嫌氣培養では乳酸を生成するが、好氣条件下では酢酸のみであった。その理由としては好氣的な場合EMP回路を経てピルビン酸を生成後Pyruvate dehydrogenase complexによりNADによる酸化的脱炭酸し、ピルビン酸からacetyl-

CoAとなり酢酸を生成することが明らかとなった。しかし、嫌氣的条件下でグルコースからピルビン酸が生成する際に発生するNADHは最終生成物の乳酸が生成されるときにNADに酸化され、これに対し好氣的条件下ではグルコースからピルビン酸生成までに発生するNADHに加え、酢酸を生成するまでにもNADHが発生する。また、生成される活性酵素はNADH peroxidaseおよびSODにより、その生成が抑止されることが判明した。

このように、NADH oxidase(NADH peroxidase)による酸素代謝系がグルコースからピルビン酸を経て酢酸を生成する好氣的代謝経路にリンクすることで*S. inulinus*の好氣的生育が可能になるものと考えられた。その代謝系をFig. 1に示して*Bacillus*と対比し、総括的にFig. 2のように提示した。

#### 参考文献

- 1) SCHLEGEL, HANS G : *General Microbiol.* CAMBRIDGE UNIV. PRESS, 274 (1986)
- 2) NIIMURA, Y., YANAGIDA, F., UCHIMURA, T., OHARA, N., SUZUKI, K. and KOZAKI, M. : *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2271(1987)
- 3) NIIMURA, Y., KOH, E., UCHIMURA, T., OHARA, N. and KOZAKI, M. : *FEMS Microbiol. letter*, 79 (1989)
- 4) NIIMURA, Y., KOH, E., YAMAGATA, F., SUZUKI, K., KOMAGATA, K. and KOZAKI, M. : *Int. J. Sys. Bacteriol.*, 40, 297(1990).
- 5) 北原覚雄：乳酸菌の研究（北原覚雄編著 東京大学出版会），50 (1966).
- 6) YAMAGATA, F., SUZUKI, K., KOZAKI, M. and KOMAGATA, K. : *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 33, 33 (1987).