

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 5, p. 447~456, 1971]

山廃酒母の亜硝酸生成菌に関する研究

(第 5 報) *Pseudomonas* sp. 37330-0 株の硝酸還元酵素系への米麴成分の働き

小西 康夫・米津 英司

(新泉酒造(株))

Nitrite Forming Bacteria in Yamahaimoto

(V) A Specific Activation of Nitrate Reducing System of the *Pseudomonas* sp. strain 37330-0 in the Presence of Rice-koji

Yasuo Konishi and Hideshi Yonetsu

(Shinsenshuzo Co., Ltd., Sakai City, Osaka)

Nitrate reducing activity of diluted cell suspension or cell-free extract of *Pseudomonas* sp. (strain 37330-0) isolated from "yamahaimoto" was increased in the presence of rice-koji or koji-extract. It was found that the nitrate reducing activity was specifically increased in the presence of L-malic acid or fumaric acid in koji-extract and that L-malic acid was the most effective substance so far tested. It was also found that koji-extract served as an electron donor in the reduction of NADP but not in the reduction of NAD by cell suspension or sonicate. Only L-malic acid and fumaric acid in koji-extract were found to be effective in the reduction of NADP and it has been observed that no other compounds so far studied could serve as electron in the reduction of nitrate so effectively as L-malic acid. It was concluded that the specific activation of nitrate reducing system of this strain by rice-koji or koji-extract was mainly due to the presence of L-malic acid in koji acting as an electron donor to NADP.

A possible model for the nitrate reducing system of this strain was presented, in which electron was transferred as the following sequence: L-malic acid $\rightarrow$ NADP $\rightarrow$ menadione $\rightarrow$ cyt. c $\rightarrow$ nitrate reductase.

緒 言

山廃酒母から分離した低温菌 *Pseudomonas* sp. 37330-0 株¹⁾ は硝酸カリ+ペプトン+ブドウ糖培地で嫌気培養すると強力な硝酸還元酵素活性 (以下 Na-R 活性と略記) を示すことを報告した。細菌の硝酸還元に関しては特に *E. coli* で多くの研究が行なわれており、最近においてもその電子伝達系はギ酸 $\rightarrow$ Na-R 系が主経路であることを示す報告^{2~12)} が多い。また *E.*

coli 以外においても例えば Nicholas ら¹³⁾ は *Pseudomonas denitrificans* の Na-R 系ではギ酸 $\rightarrow$ Na-R 系が主経路であることを報告している。しかし他方では例えば *Bacillus stearothermophilus*⁷⁾ ではリンゴ酸 $\rightarrow$ Na-R 系が示されている。従って細菌種によって電子供与体、酸素に対する不安定性、可溶化の差異等が考えられ興味のある問題と思われる。

また米麴成分中にギ酸は見出されない、従って少なくとも酒母もろみ中では Na-R 活性が発現するため

には他の電子供与体を考慮する必要があり、また本菌株の Na-R 系に対して米麹が顕著な活性上昇を与えることが判っていたので更に検討を加えた。

実験方法

1. *Pseudomonas* sp. 37330-0 株の培養 前報¹⁾の方法に準じた。ただし PN-1 培地とはペプトン (Difco 製) 1%, KNO_3 1%を含んだ培地, PN-1-G-3 培地とは PN-1 培地に更に 3% ブドウ糖を含有したものである。菌体は集菌後0.85%食塩水にて洗菌後-20°Cにて凍結保存した。
2. パラオキシ安息香酸培地 (P.O.B. 培地) 前報¹⁵⁾と同じ方法で調製した。
3. 硝酸還元酵素 (Na-R) 活性 および 亜硝酸還元酵素 (Ni-R) 活性の測定 いずれも前報¹⁾の方法に準じた。
4. 蛋白濃度の定量 前報¹⁾と同じ方法による。
5. NADP 還元および NAD 還元活性の測定 凍結菌体懸濁液 (以下サスペンションと略記) およびその超音波破碎液 (以下ソニケートと略記) を用い、本菌のブドウ糖-6-リン酸脱水素酵素活性 (E.C. 1.1.1.49) の測定の場合に準じて測定した。すなわち20.0 $\mu\text{mole/ml}$ のリン酸緩衝液 (pH 8.0), 2.0 $\mu\text{mole/ml}$ の NAD (Baehringer Mannheim 製, 0.1 N NaOH で中和) または NADP (Baehringer Mannheim 製, 2 Na 塩), 2.0 $\mu\text{mole/ml}$ のブドウ糖-6-リン酸 Ba 塩 (以下G-6-P と略記, Baehringer Mannheim 製) にサスペンションあるいはソニケートを添加, 室温で340 m μ の吸収の増加を測定した。各種有機酸をG-6-Pの代りに 10.0 $\mu\text{mole/ml}$ を加えた。
6. NADPH 酸化および NADH 酸化活性の測定 嫌気条件下での測定はツンベルグ管型セルを使用, 窒素ガス下で行なった。
7. ベンジルピオローゲンに特異的な 干酸脱水素酵素 (FDH) 活性の測定は Demoss ら⁵⁾の方法によった。
8. 麹抽出液中の有機酸の定量 上田ら¹⁶⁾の方法に従った。
9. フマラーゼ活性 (E.C. 4.2.1.2) の測定 山村ら¹⁷⁾の方法に従った。
10. 麹抽出液中の G-6-P の定量 60.0 $\mu\text{mole/ml}$ のトリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0), 3.0 $\mu\text{mole/ml}$ の MgSO_4 , 0.2 $\mu\text{mole/ml}$ の NADP, これに麹抽出液または既知濃度の G-6-P を加え, G-6-P脱水素酵素 (E.C. 1.1.1.49, Baehringer Mannheim 製の懸濁液 1

ml に 3/100 M トリス-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を 9 ml 加えて調製した) を添加, 室温で 340 m μ の吸収を測定した。10分後に反応は終了した。

ビタミン K_3 はエタノール溶液として加えた。グリセリンアルデヒド-3-リン酸は D, L-glyceraldehyde-3-phosphate diethylacetal (Baehringer Mannheim 製) 40 mg を 4 ml の水に溶かしこれに H 型 Dowex 50 $\times$ 8 (200~400 mesh) を加え 1 分間振騰, 遠沈後上清を40°Cに48時間放置, 中和して用いた。イソクエン酸は D, L-isocitric acid lactone を 0.1 N NaOH に溶かし沸騰水に10分間つけ冷却後中和して用いた。2-メチル-1,4-ナフトキノン は VK_3 と略記した。

実験結果と考察

1. Na-R 活性に対する米麹添加の影響 前報¹⁾までに示したような実験条件 (反応混合液中のサスペンションおよびソニケートの蛋白濃度が 5.0 mg/ml 程度) では反応混合液中に更に補酵素あるいは電子供与体を加えなくても反応速度は遅くなるが Na-R 活性の測定は可能である。けれども反応混合液中の蛋白濃度が 0.2 mg/ml 以下と低濃度になった場合は反応時間を長くしても見掛上 Na-R 活性は殆んど発現しない。このことから酒母仕込時に本菌をサスペンションとして添加した場合, 菌の蛋白濃度 (0.1 mg/ml 以下) から考えて Na-R 活性の発現, NO_2^- の生成蓄積が起きる可能性は殆んど考えられない。しかるに前報¹⁸⁾にも報告したごとくサスペンションの添加蛋白濃度が 0.04 mg/ml 以下でも, 無添加に比べて顕著な NO_2^- の生成蓄積が起きる。以上から仕込初期の酒母もろみ中に, Na-R 系に対する補酵素または電子供与体とその脱水素酵素等が麹より溶出し, それらの不足する希薄な Na-R 系の場合に特に有効に働くと予見せられた。それ故 Na-R 活性に対する固体米麹添加の影響をまず検討した。Fig. 1 に示したように培養条件の異なった3種のサスペンションの何れにおいても, その Na-R 活性に対する米麹添加の影響は顕著で, 無添加の場合にはサスペンションの添加蛋白濃度が 0.2 mg/ml 程度のため全く NO_3^- の消費, NO_2^- の生成は認められなかった。なおストレプトマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加してもごくわずかの NO_3^- の消費が雑菌の増殖のため米麹単独添加の場合に見られる。またブドウ糖無添加培養のサスペンションでは Ni-R 活性の比活性がとくに高く一旦生成した NO_2^- は再び消失している。また Fig. 2 および Fig. 3 に示した, 固体米麹の水抽出液 (以下抽出液と略記) においても米麹

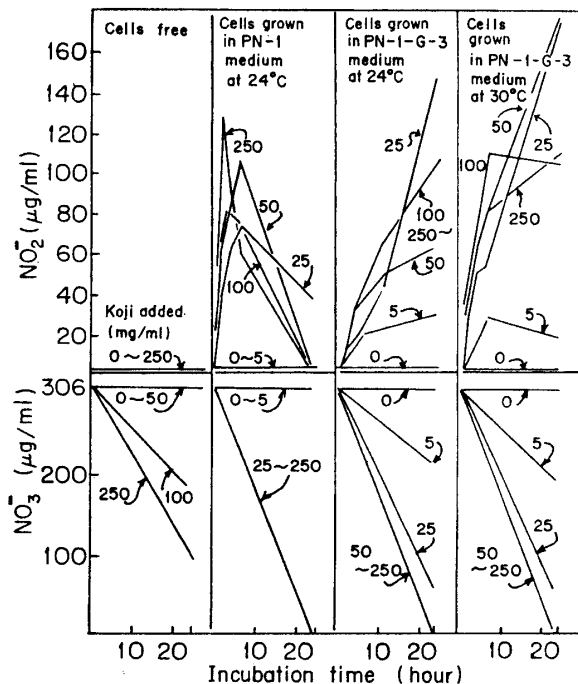


Fig. 1. Effect of additional of koji on the NO_2^- accumulation by the Na-R system of cells suspension of *Pseudomonas* sp. 37330-0. Reaction mixture contained 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin, 306 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NO_3^- and 0.45 mg/ml (as protein) of cell suspension. Reaction temperature was 20°C.

と同じ結果が得られた。また抽出液を 100°C, 5 分以上加熱処理しても変わらないが, 抽出液を一夜流水に対して透析するとその賦活作用は完全に失われる。以下米麩による Na-R 活性賦活作用の検討は抽出液で行なった。Fig. 3 に培養条件の異なった 4 種の菌体のサスペンション (蛋白濃度約 0.4 mg/ml) を用いて抽出液の影響を示した。一方抽出液は Ni-R 活性に対しては殆んど賦活作用を示さなかった。(ただし PN-1 培地, 24°C 培養の菌体はある程度賦活を受けた) すなわち抽出液の作用は Na-R 活性に対して選択的で Ni-R 活性に対して特異的であることが判った。前報¹⁾に一部報告したが本菌株は低温菌の特性を有し Ni-R 活性の形成が温度感受性であるが, この実験結果から低温培養の菌体は抽出液に対する感受性も 30°C 培養菌体に比べて高いことが判る。Ni-R 活性はサスペンションの添加蛋白濃度 0.2 mg/ml 以下では急に不可逆的な失活を起こしやすかった。これに比べ Na-R 活性は抽出液を添加すれば可なり希薄な条件下でも活性測定が可能であった。希釈による Ni-R 失活は牛血清アルブミンの添加 (2.5 mg/ml) で可なり抑制せられた。なお抽出液の Na-R 活性への選択的賦活作

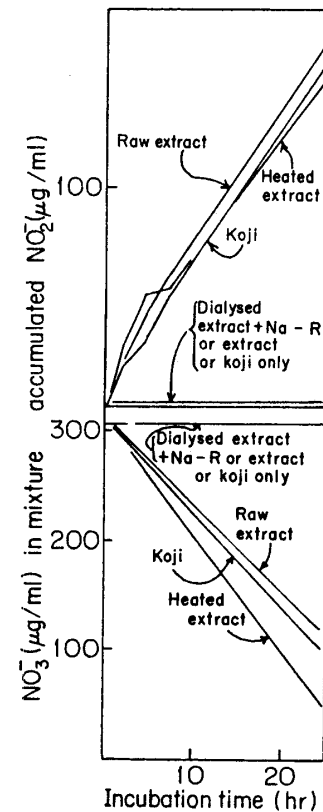


Fig. 2. Comparative effect of koji and koji extract on NO_2^- accumulation.

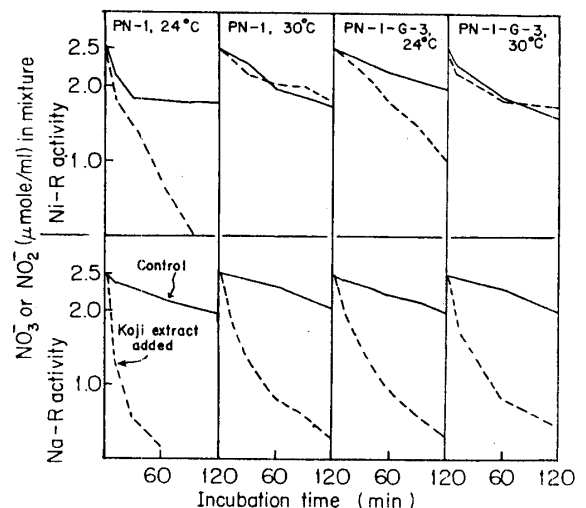


Fig. 3. Effect of koji-extract on Na-R and Ni-R activities in diluted cell suspension. Reaction mixture contained 12.0 $\mu\text{mole}/\text{ml}$ of Tris-HCl (pH 8.0) buffer, 0.395~0.408 mg/ml (as protein) of cells suspension, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NO_2^- or NO_3^- , and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of chloramphenicol.

用は抽出液を希釈すると急に失われる。例えば常法によって得た抽出液はブドウ糖濃度にして 0.5N に希釈

してあるがこれを 1/10 に希釈するとその作用は急に消失する。

2. Na-R 活性に対する各種有機酸の影響 抽出液の選択的賦活作用は抽出液を限外濾過しても変わらず、この除蛋白液を CO_3^{2-} 型にしたアンバーライト IRA-410 樹脂カラムを通過させると完全に失われる。また H 型にした IR-120 樹脂カラムで処理しても賦活作用はほとんど低下しなかった。従って抽出液中の陰イオン成分、有機酸成分の有効性が予見せられた。本実験に使用した抽出液中の有機酸組成は Table 1 に示した。それ故 PN-1-G-3 培地に 30°C 培養したサスペンション（蛋白濃度 0.18 mg/ml）を用いて各種有機酸添加の影響を検討した。対照として米麴 6.25 mg/ml を添加した区分、およびマレイン酸を用いた。各有機

Table 1. Organic acid components in koji-extract detected by silicic acid column chromatography.

	mg/ml	$\mu\text{mole/ml}$
Propionic acid	1.67	22.6
Acetic acid	6.36	106.0
Pyruvic acid	1.21	13.8
Fumaric acid	4.93	42.5
Succinic acid	1.20	10.18
Lactic acid	1.70	18.8
Glycolic acid	4.18	55.0
Malic acid	9.74	83.0
Citric acid	35.30	168.0

酸の添加濃度は Na 塩として 0.5% である。Fig. 4 に示したように固体米麴と似た効果を示す有機酸は L-リンゴ酸とフマル酸であった。乳酸、コハク酸にわずかな有効性が認められる。サスペンションの蛋白濃度 10.88~2.47 mg/ml の範囲では Fig. 5-1 に示したように特異な賦活作用を示す L-リンゴ酸およびフマル酸の最適濃度は 20.0~40.0 $\mu\text{mole/ml}$ の間にあった。次に Fig. 5-2 にソニケート（10 Kc, 20 分間）の 24,600 xg, 30 分間遠心上清（S₂₄ と略記）を使用して同じく有機酸添加の影響を示した。反応液中の蛋白濃度は約 10.0 mg/ml, NO_3^- は 25.0 $\mu\text{mole/ml}$, 反応時間は 90 分間である。ギ酸は全く無効であった。ギ酸→Na-R 系については *E. coli* において報告^{2~12)}が見られる。すなわち Ruig Herrera ら⁵⁾は最近、嫌気培養した *E. coli* K-12 株においてギ酸→Na-R 系が Na-R 活性の主経路であることを示し、還元型ピリジヌクレオチドの関与は少ないとしている。Itagaki ら¹²⁾は同じ *E. coli* 山口株でギ酸→Na-R 系が主経路であることをギ酸存在下で培養した菌体について示している。最近 Azou-

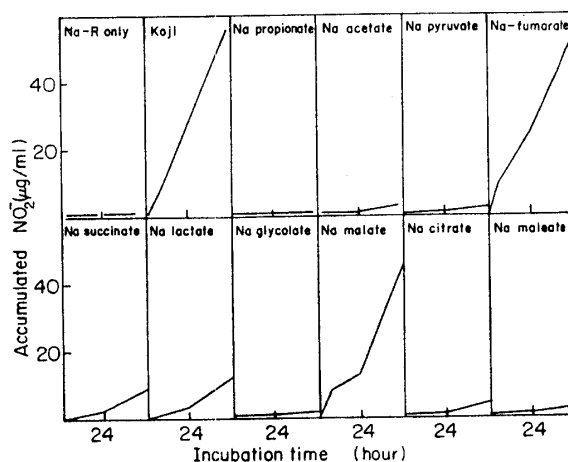


Fig. 4. Effects of koji and various organic acids on the NO_2^- accumulation by very diluted cell suspension.

Reaction mixture contained 25 mg/ml of koji or 0.05% of organic acid-Na salt, 0.018 mg/ml (as protein) of cell suspension, 306 mg/ml of NO_3^- , and 50 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin. Reaction temperature was 12°C .

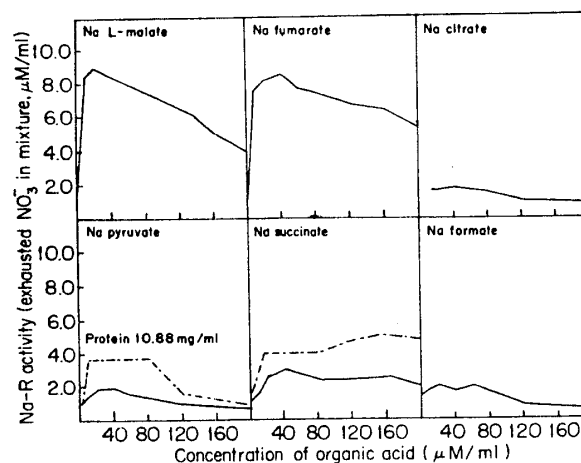


Fig. 5-1. Effect of organic acids on Na-R activity.

Reaction mixture contained 12.0 $\mu\text{mole/ml}$ of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0~200 $\mu\text{mole/ml}$ of organic acid, 10.0 $\mu\text{mole/ml}$ of NO_3^- , 10.88~2.47 mg/ml (as protein) of cell suspension. Na-R activity was expressed as NO_3^- consumed ($\mu\text{mole/ml}$) for 20 min or 10 min in case of 10.88 mg/ml protein at 30°C .

lay ら¹⁰⁾は *E. coli* K-12 HfrP₄X 株に関する研究で Na-R 活性を欠く変異株は可溶型のギ酸脱水素酵素（以下 FDH と略記）が低下することを報告し Na-R 活性と FDH 活性とが切り離せないものであることを示している。また Wimpenny ら^{8~11)}は *E. coli* K-12 に関する研究で、嫌気生育での可溶型 FDH と Na-R

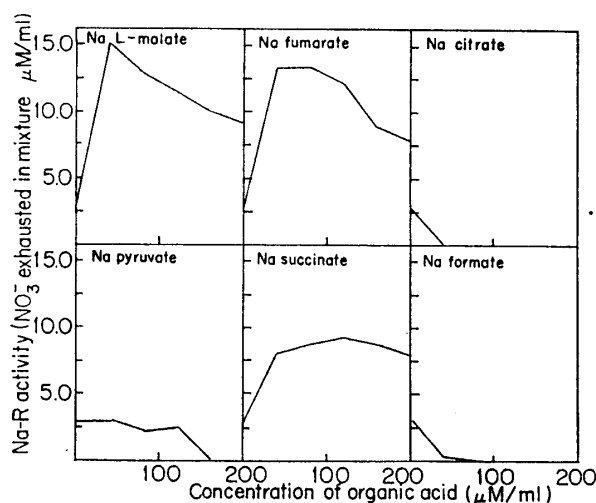


Fig. 5-2. Effect of organic acids on Na-R activity in cell free extract.

Reaction mixture contained 12.0 $\mu\text{mole/ml}$ of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 0~200 $\mu\text{mole/ml}$ of organic acid, 25.0 $\mu\text{mole/ml}$ of NO_3^- , 9.3~10.22 mg/ml (as protein) of cell-free extract. Na-R activity was expressed as NO_3^- consumed ($\mu\text{mole/ml}$) for 90 min at 30°C.

活性の相関性を示している。ピルビン酸はphosphoroclasticな酵素によってギ酸に変化して働らくとしている。Hori²⁰⁾は耐塩性 *Micrococcus* sp. ではギ酸→Na-R系が主な経路であることを示している。細菌種とNa-R系との関係については最近 Pichinoty ら²¹⁾は *Enterobacteriaceae* に主として見られ A型と他のB型に分けているが、本菌株に類縁の *Pseudomonas aeruginosa* や *Pseudomonas stutzeri* は両型を含んでいるとしている。この両型の区分とギ酸→Na-R系との関連性は未だ明確ではないが *Pseudomonas* sp. において例えば *Pseudomonas denitrificans* では¹³⁾ギ酸→Na-R系が主経路（このNa-R活性は酸素に対して不安定）であるに対比して本菌株ではギ酸→Na-R系は存在しないものと考えられ、本菌株のNa-R活性が酸素に対して安定なことと共に *Pseudomonas* 中においても必ずしも一つの型式ではないことを示している。他の培養条件、すなわちブドウ糖の有無、培養温度の違う菌体においても同じ結果が得られた。さらにNa-R活性に対して L-リンゴ酸、フマル酸のいずれがより有効であるかについて検討した。Fig. 6に示したように NO_3^- 濃度が蛋白濃度 1 mg 当り 4.11 $\mu\text{mole/ml}$ と高い条件下で比較した場合 L-リンゴ酸の方がより顕著な賦活作用を示した。さらにベンジルピオローゲンに特異的な FDH 活性はサスペンションおよび S₂₄ 共に殆んど認められなかった。

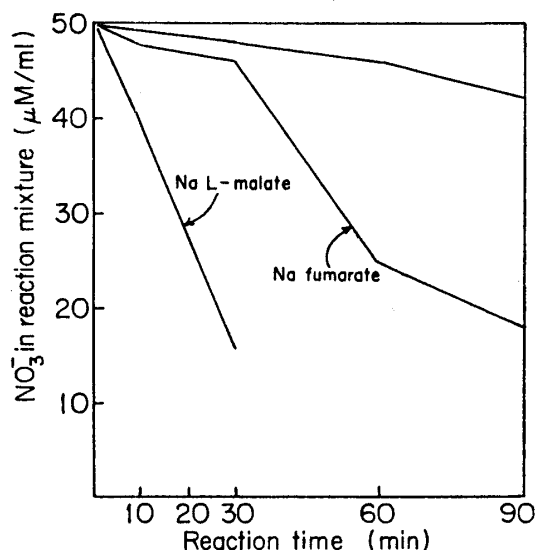


Fig. 6. Comparative effect of L-malate and fumarate on Na-R activity.

Reaction mixture contained 12.0 $\mu\text{mole/ml}$ of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 12.14 mg/ml of cell suspension, 40.0 $\mu\text{mole/ml}$ (as protein) of organic acid and 50.0 $\mu\text{mole/ml}$ of NO_3^- .

3. Na-R 活性の電子伝達系に関する検討 このような L-リンゴ酸およびフマル酸の Na-R 活性賦活作用は L-リンゴ酸→Na-R 系、あるいはフマル酸→Na-R 系としてその脱水素酵素によって、またはフマラーゼ活性をも含めた系によって電子供与体の役割を演じ（サスペンションやソニケートおよび S₂₄ は L-リンゴ酸からフマル酸を生成する、またサスペンションによる NADP 還元の場合、反応混合液中にチオシアン酸カリを添加すると L-リンゴ酸のみが電子供与体として働らく）、ユビキノンを介して Cyt b₁ へ電子を供与しているとも考えられる。また現在までに還元型ピリジンヌクレオチドの Na-R 系への関与も報じられており^{2~11, 20)}、有機酸と Cyt b₁ や Cyt c との間、または別個の経路として働いているとも考えられる。チトクロームの関与については Radcliffe と Nicholas¹³⁾は *Pseudomonas denitrificans* (この菌株の Na-R 活性は酸素に対して不安定、膜結合性) では Cyt c の関与は少ないと報告しており Cyt b→Na-R 系を示している。一方 Lam と Nicholas²²⁾によれば *Pseudomonas aeruginosa* は Cyt c を含んだ Na-R 系を持つとし、また Sadana ら²³⁾によれば精製した *Achromobacter fischeri* の Na-R 系は C 型チトクロームの吸収を示すとしている。また Hori²⁰⁾は耐塩性 *Micrococcus* sp. の膜結合性 Na-R 系において可溶型の C 型チトクロームが有効な電子供与体となっているこ

とを示している。次報において報告する予定であるが、本菌株の S_{24} またはその50%硫酸飽和上清には多量の Cyt *c* が存在しており、Wimpenny ら²⁴⁾ の報告している Cyt *c* とよく似ている、Na ジチオナイトによって還元したその還元型は NO_3^- の添加によって直ちに酸化される。*E. coli* と異なって *Pseudomonas* sp. では培地中の NO_3^- 濃度が高いと菌体内 Cyt *c* の含量が高くなる報告^{2-4, 19-24)} も少なくない。以下 L-リンゴ酸 $\rightarrow$ L-リンゴ酸脱水素酵素 $\rightarrow$ 還元型ピリジヌクレオチド $\rightarrow$ メナジオン $\rightarrow$ メナジオン還元酵素 $\rightarrow$ Cyt *c* $\rightarrow$ Na-R と経過する系を考え (メナジオンの関与については後で示した)、還元型ピリジヌクレオチドの関与について検討した。

まず反応液中の蛋白濃度が約 0.13 mg/ml の条件においてサスペンションおよびソニケートによる NADPH および NADH 酸化活性を検討した。Fig. 7 に示したごとく VK_3 が不在の場合 NADH 酸化活性は見られるのに NADPH 酸化活性は殆んど見られない。この結果は後述のサスペンションおよびソニケートによる両ピリジヌクレオチド還元において抽出液および L-リンゴ酸は NADP 還元に対してのみ有効な電子供与体として働らくこととは一見矛盾している。しかし Fig. 8 に示したごとく VK_3 が存在した場合には NADPH 酸化活性も発現して来ること、また NADH 酸化の速度は特に NO_3^- の有無には影響されないことなどから NADH が本菌の Na-R 活性に特に選択的に関与しているとは考えられない。なお VK_3

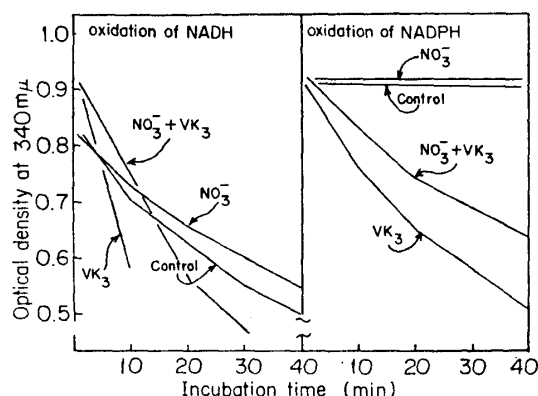


Fig. 7. Comparison of oxidation NADH and NADPH by the sonicated cell suspension. Reaction mixture contained 20.0 $\mu\text{mole/ml}$ of phosphate buffer (pH 8.0), 0.05 $\mu\text{mole/ml}$ of NADH or NADPH, 100 $\mu\text{mole/ml}$ of NO_3^- , 0.5 $\mu\text{mole/ml}$ of 2-methyl-1, 4-naphthoquinone, and 0.13 mg/ml (as protein) of sonicated (4 min) cell suspension.

は Fig. 8 に示したように単独で Na-R 活性に対し顕著な賦活作用を示し、その最適濃度はサスペンション蛋白 1 mg 当り 0.0013 $\mu\text{mole/ml}$ であり L-リンゴ酸の場合に比べてはるかに低い濃度である。

以上のようにピリジヌクレオチドの酸化と Na-R 活性との間に直接的な関係は得られなかったが、反応開始時の還元型ピリジヌクレオチドの濃度が 1.0 $\mu\text{mole/ml}$ と比較的高濃度になるように添加して Na-R 活性ならびに Ni-R 活性に対する影響を検討した。結果は Table 2 に示した。両還元型ピリジヌクレオチド共に Ni-R 活性に対してはフラビンキャリアの無い条件下ではほとんど作用しない。一方 Na-R 活性に対しては活性上昇を与えたが、いずれのピリジヌクレオチドがより有効であるかについては明確な結論は得られなかった。

次にサスペンションおよびソニケートによる両ピリジヌクレオチド還元に対する抽出液や有機酸の電子供与体としての可能性について実験した。その結果を Fig. 9 に示した。対数増殖期の終期に集菌した菌体による場合は抽出液は NADP 還元の有効な供与体となるが NAD 還元に対してはほとんど無効である。L-リンゴ酸、フマル酸も抽出液と類似した働きを示した。なおクエン酸も供与体となるが、Fig. 10 に示し

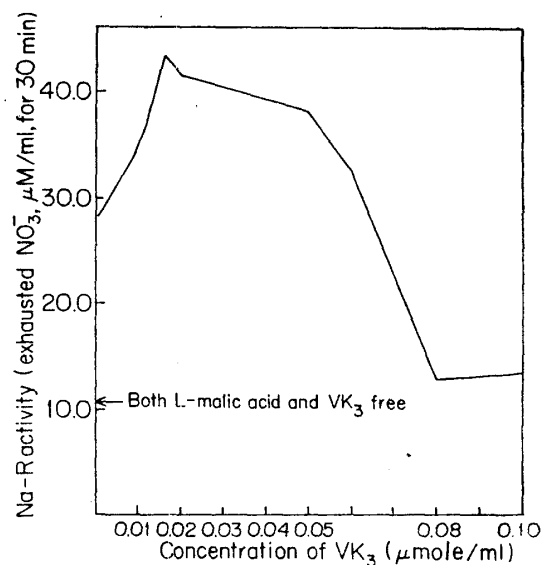


Fig. 8. Effect of addition of menadione on Na-R activity in the presence of L-malic acid. Reaction mixture contained 12.0 $\mu\text{mole/ml}$ of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 20.0 $\mu\text{mole/ml}$ of L-malate Na, 50.0 $\mu\text{mole/ml}$ of NO_3^- , 5.0 $\mu\text{mole/ml}$ of MgSO_4 , and 12.18 mg/ml (as protein) of cell suspension. Each concentration of VK_3 solution was prepared in 0.1 ml of ethanol.

Table 2. Effect of NADH on Na-R and Ni-R activities.

	Na-R		Ni-R	
	Residual NO ₃ ⁻ or NO ₂ ⁻ in mixture (μmole/ml)			
	Reaction time (min)			
	60	120	60	120
H ₂ O	2.41	2.07	1.63	0.98
NADPH	1.21	0.68	1.51	0.77
NADH	1.34	0.60	1.47	0.73

Reaction mixture contained $6.0 \mu\text{mole/ml}$ of Tris-HCl buffer (pH 8.0), $1.0 \mu\text{mole/ml}$ of NADPH or NADH, $2.5 \mu\text{mole/ml}$ of NO_3^- or NO_2^- , 0.539 mg/ml (as protein) of cell suspension.

たごとく 反応混合液中の 蛋白濃度 0.25 mg/ml では NADP 還元に対して無効であった。抽出液ならびにこれら有機酸が NAD 還元に対して無効なのは NADH 酸化活性があるため見掛上発現しなかったとも考えられた。しかし Fig. 11 に示したように反応混合液

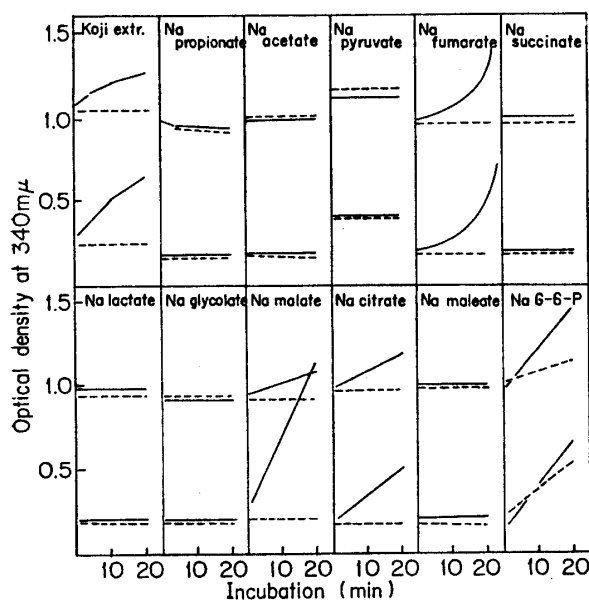


Fig. 9. Reduction of NAD and NADP by using various organic acids, G-6-P and koji extract as electron donor.

--- ; NAD, — ; NADP.

Reaction mixture contained $20.0 \mu\text{mole/ml}$ of pyrophosphate buffer (pH 8.0), $10.0 \mu\text{mole/ml}$ of organic acid-Na salt or $2.0 \mu\text{mole/ml}$ of G-6-P Na salt, $0.1 \mu\text{mole/ml}$ of NAD or NADP, $1.5 \mu\text{mole/ml}$ of Mg^{++} , and 0.287 mg/ml (as protein) of cell suspension.

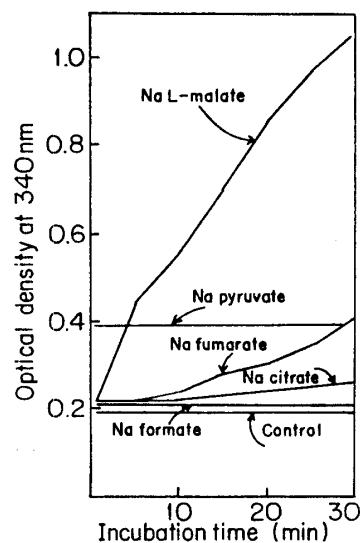


Fig. 10. Effect of organic acid on reduction of NADP concentration by diluted preparation. Reaction mixture contained $20 \mu\text{mole/ml}$ of pyrophosphate buffer, $0.1 \mu\text{mole/ml}$ of NADP, $10.0 \mu\text{mole/ml}$ of organic acid Na-salt, $1.5 \mu\text{mole/ml}$ of Mg , 0.051 mg/ml (as protein) of cell suspension.

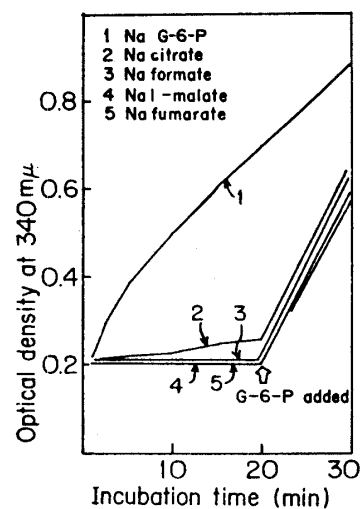


Fig. 11. Effect of G-6-P on reduction of NAD by sonicated cell suspension.

中にさらに G-6-P を加えると急に NAD 還元が起きることから事実上各種有機酸および抽出液は NAD 還元への電子供与体とはなり得ないと考えた。なおサスペンションおよびソニケートは G-6-P 脱水素酵素活性を示し NADP および NAD は共に受容体となる。なお抽出液中の G-6-P 濃度は $0.3 \mu\text{mole/ml}$ という低濃度であり $\text{G-6-P} \rightarrow \text{G-6-P 脱水素酵素} \rightarrow \text{NAD} \cdots \rightarrow \text{Na-R}$ 系の働きの可能性は低いと考えた。以上の各実験結果から L-リンゴ酸+NADP+ VK_3 系の Na-R

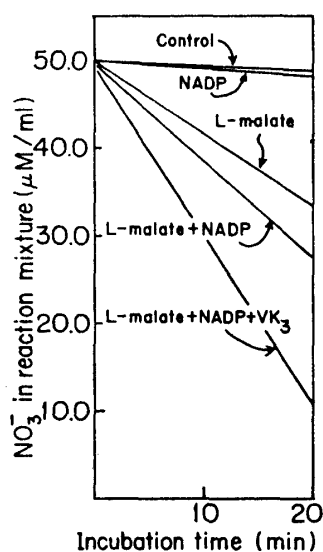


Fig. 12. Changes of Na-R activity by adding of NADP, L-malate and Menadione. Reaction mixture contained 12.0 μ mole/ml of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 20.0 μ mole/ml of L-malate Na, 5.0 μ mole/ml of $MgSO_4$, 50.0 μ mole/ml of NO_3^- , 0.2 μ mole/ml of 2-methyl -1,4-naphthoquinone, 1.0 μ mole/ml of NADP2Na, and 13.54 mg/ml (as protein) of cell suspension.

活性に対する影響を実験した。Fig. 12 に示したように NADP 単独では活性上昇は殆んど見られなかった。

4. Na-R 活性に対する他の有機物の影響 本菌サスペンションの Na-R 活性に対して L-リンゴ酸のように有効な電子供与体となり得る他の有機物について VK_3 無添加の条件下で検討した。結果は Table 3 に示した。反応混合液中の蛋白濃度 10.22 mg/ml では L-リンゴ酸存在下蛋白 1 mg 当り 30 分間に NO_3^- , 1.59 μ M/ml を消費したが、この値を 100 とした相対値で示した。

以上本菌の Na-R 系の特性と麴成分との密接な関連性について実験を行ない、その Na-R 系が L-リンゴ酸→L-リンゴ酸脱水素酵素→NADP→メナジオン→メナジオン還元酵素→Cyt c→Na-R 系であることを推定した。なおメナジオンが Na-R 系に関与していることについては Wainwright²⁹⁾ によって示されている。山廃酒母初期に出現する硝酸還元菌として各種の細菌種が報告されているが³¹⁻³⁴⁾, *Enterobacter* や *Micrococcus* に属するものは硝酸呼吸の発現には β -酸→Na-R 系を主経路とするとも考えられることから、麴成分、換言すれば酒母初期成分と生態的にも密接な関連性は少ないと考えられる。この点から見ても *Pseudomonas* のように麴成分と密接な関連性を有す

Table 3. Relative activity of Na-R in the presence of various organic compounds.

	Relative activity (%)
Control	31.8
L-Malate Na	100
Ethyl alcohol	0
L-Homoserine	0
2,3-Butyleneglycol	0
Acetoin	16.8
Glycerol	0
D-Xylitol	0
α -Glycerophosphate Na	0
D-Glucurono- γ -lactone	36.4
Uridine-5'-diphosphateglucose Na	24.5
Quinate Na	0
Shikimate Na	0
D,L-Glycerate Na	0
D-3-Hydroxybutyrate Na	0
D,L-Isocitrate Na	0
6-Phospho-D-gluconate Na	21.9
L-Arabinose	18.6
β -D-Glucose	19.4
D-Galactose	0
D-Glucose-6-phosphate Na	29.5
Allyl alcohol	0
Pyridoxine HCl	19.4
D-Mannitol	0
1,2-Propanediol	0
5-Keto-D-gluconate Na	7.8
α -Ketoglutarate Na	0
D-Gluconate Na	20.9
Acetaldehyde	0
Benzaldehyde	0
L-Alanine	18.5
L-Glutamate Na	19.4
D,L-Glyceraldehyde-3-phosphate	32.1
L-Proline	29.4
D-Glucose-1-phosphate K	43.4
D-Fructose	20.2
D-Fructose-6-phosphate Ba	3.1
D-Fructose-1,6-diphosphate K	12.9

Relative activity is expressed as a percentage of L-malate addition (in this case 1.59 μ mole/ml of NO_3^- was exhausted for 30 min at 30°C per mg of protein), which is taken as 100%. Reaction mixture contained 60.0 μ mole/ml of Tris-HCl buffer (pH 8.0), 50.0 μ mole/ml of NO_3^- , 5.0 μ mole/ml of Mg^{++} , 0.05 μ mole/ml of FADNa, 11.76 mg/ml (as protein) of cell suspension and 20.0 μ mole/ml of organic compounds unless otherwise specified. UDPG was added to 10.0 μ mole/ml, shikimate Na was added to 4.5 μ mole/ml, glyceraldehyde-3-phosphate was added to 10.48 μ mole/ml, and 6-phosphogluconate was added to 3.72 μ mole/ml.

る菌種が生態学的にも亜硝酸生成に重要な役割を有しているものと思われる。

要 約

1. 初期山廃酒母から分離した低温菌 *Pseudomonas* sp. 37330-0株は硝酸還元酵素 (Na-R) 活性を有し, その Na-R 活性は米麴添加により顕著に上昇する. 米麴のこの作用は米麴中に存在する L-リンゴ酸およびフマル酸によることを認めた. この作用は亜硝酸還元酵素 (Ni-R) 活性には働かない.

2. 少量のビタミン K₃ は顕著な Na-R 活性上昇を与える.

3. NADH, NADPH は共に Na-R 活性上昇を与える.

4. 麴抽出液は本菌株の NADP 還元に対してのみ有効な電子供与体となる. L-リンゴ酸, フマル酸も全く同じ作用を示す.

5. L-リンゴ酸→NADP→メナジオン→Cyt c→Na-R からなる Na-R 系を推定した.

終りに臨み終始御鞭撻頂いた京大片桐名誉教授, 京大農化緒方, 柄倉両教授, 京大食研山田助教授, 大阪府大農化辰巳教授に深甚なる謝意を表わします. また終始本研究を支持, 発表を許可された当社田所社長, 鳥井取締役, また実験に協力された松本, 井本両嬢に感謝致します.

この報文の大意は昭和45年4月4日, 日本農芸化学会全国大会において発表した(講演要旨集, p.359)

文 献

- 1) Konishi, Y.: this journal., **47**, 759 (1969).
- 2) Itagaki, E., Taniguchi, S.: *J. Biochem.* (Tokyo), **46**, 1419 (1959).
- 3) Iida, K., Taniguchi, S.: *J. Biochem.* (Tokyo), **46**, 1041 (1959).
- 4) Taniguchi, S., Itagaki, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, **44**, 263 (1960).
- 5) Ruiz-Herrera, J., Showa, M. K., Demoss, J. A.: *J. Bact.*, **97**, 1291 (1969).
- 6) Ruiz-Herrera, J., Demoss, J. A.: *J. Bacteriol.*, **98**, 1056 (1969).
- 7) Ruiz-Herrera, J., Demoss, I. A.: *J. Bacteriol.*, **99**, 720 (1969).
- 8) Cole, J. A., Wimpenny, J. W. T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 419 (1966).
- 9) Wimpenny, J. W. T., Cole, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 233 (1967).
- 10) Cole, J. A., Wimpenny, J. W. T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 39 (1968).
- 11) Gray, C. T., Wimpenny, J. W. T., Hughes, D. E., Mossman, M. R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 22 (1966).
- 12) Itagaki, E., Fujita, T., Sato, R.: *J. Biochem.* (Tokyo), **52**, 131 (1962).
- 13) Radcliffe, B. C., Nicholas, D. J. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 545 (1968).
- 14) Heredia, C. F., Medina, A.: *Biochem. J.*, **77**, 24 (1960).
- 15) 小西, 柄倉, 緒方: 本誌 **45**, 803 (1967).
- 16) 上田, 豊島: 本誌 **38**, 230 (1960).
- 17) 山村, 永井: 酵素研究法 Vol 2, p. 312.
- 18) 小西, 柄倉, 緒方: 本誌 **45**, 795 (1967).
- 19) Azoulay, E., Puig, J., Pichinoty, F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 270 (1967).
- 20) Hori, K.: *J. Biochem.* (Tokyo), **50**, 440, 481 (1961).
- 21) Pichinoty, F., Azoulay, E., Conchoud-Beaumont, P., le Minor, L., Rigano, C., Bigliardi-Rouvier, J., Piéchaud, E.: *Ann. Inst. Pasteur*, **116**, 27 (1969).
- 22) Lam, E., Nicholas, D. J. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 335 (1969).
- 23) Sadana, J. C., MacElroy, W. D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 16 (1957).
- 24) Wimpenny, J. W. T., Gray, C. T., Hughes, D. E., Ranlett, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 157 (1963).
- 25) Cole, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **162**, 356 (1968).
- 26) Wimpenny, J. W. T., Ranlett, M., Gray, C. T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **73**, 170 (1963).
- 27) Fujita, T.: *J. Biochem.* (Tokyo), **60**, 204, 329, 568, 691 (1966).
- 28) Fujita, T., Sato, R.: *J. Biochem.* (Tokyo), **62**, 230 (1967).
- 29) Wainwright, S. D.: *Biochim. Biophys. Acta*, **18**, 583 (1955).
- 30) 斎藤, 吉賀: 本誌, **13**, 503, 679 (1953).
- 31) 村上, 奥山, 山崎, 石山, 羽金, 能勢: 醸協誌, **49**, 350 (1954).
- 32) 村上, 村山, 渡辺: 醸協誌, **49**, 478 (1954).

-
- 33) 村上, 村山, 渡辺: 醸協誌, **50**, 116, 180 (1955). (1962).
34) 山下, 徳村, 河村: 本誌, **40**, 271, 275, 342 35) 芦沢, 斎藤: 醸協誌, **61**, 638 (1966).
(昭46.1.28受付)