

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 10, p. 861~869, 1971]

醤油醸造に關与する耐塩性乳酸菌に關する研究

(第 3 報) *Tetracoccus* No. 100 の耐塩性に対する L-Proline 効果
の酵素レベルにおける解析

上瀬 弘和・杉森 恒武

(丸金醤油株式会社京都研究所)

Studies on Halotolerant Lactic Acid Bacteria Relating to Soy Sauce Brewing

(III) Halotolerant Effect of L-Proline on Several Enzymes
of *Tetracoccus* No. 100

Hirokazu Jose and Tsunetake Sugimori

(Kyoto Research Laboratories, Marukin Shoyu Co., Ltd., Uji, Kyoto)

The characteristic effect of L-proline on the halotolerance of *Tetracoccus* No. 100, reported in a previous paper, was further studied with several enzymes. The results presented in this paper are as follows:

1. Among the stereoisomers and analogs of proline, such as L-proline, D-proline, hydroxy-L-proline, pyrrole, pyrrolidine, and L-pyroglutamic acid, L-proline was the sole compound facilitating the halotolerance of *Tetracoccus* No. 100.
2. The activity of FDP-aldolase (fructose-1, 6-diphosphate-aldolase), depressed by a high concentration of NaCl, was partly recovered by the addition of L-proline.
3. Regardless of the salt concentration, L-proline showed no effect on the action of NAD-linked lactic dehydrogenase and flavin-linked lactic dehydrogenase, both enzymes being salt sensitive.
4. The specific activity of NAD-linked lactic dehydrogenase from cells grown on L-proline-enriched hypertonic saline medium was several times higher than that of normally grown cells. This fact strongly suggests that L-proline is concerned in the formation of this enzyme.
5. The catalase activity of *Tetracoccus* No. 100 was partly inhibited by salt concentrations above 10 per cent, and was completely recovered by the addition of 10 mM L-proline.

緒 言

微生物の耐塩機構については、栄養要求¹⁻³⁾、菌体成分⁴⁾、細胞膜の透過機構⁵⁾などとの関係、それに酵素学的⁶⁻⁹⁾に論じた多くの報告があり、好塩酵素、

耐塩酵素の存在が明らかにされ興味もたれている。著者らの醤油麹から分離した *Tetracoccus* No. 100 は、通性嫌気性で Homofermenter の乳酸菌であり、高濃度食塩存在下に生育旺盛であって風味にすぐれ醤油醸造に特に有能であり、これらの菌学的性質につい

では第1報¹⁰⁾に報告した。また本菌の耐塩性は生育に必須のビタミンとアミノ酸のほかに L-proline を添加するのみで顕著に促進されるという新事実を見出した。この L-proline の耐塩性促進効果とは菌体内において遊離 L-proline のレベルが高まることによって、醗酵能および呼吸能に対する塩阻害を著しく軽減することを意味した¹¹⁾。

本報では L-proline による耐塩性促進の機構を更に明確にするために酵素レベルで調べた2,3の結果について述べる。

実験方法

1. 供試菌株 醤油工場の麹, 諸味中に広く存在する乳酸菌 *Tetracoccus* No. 100 を用いた。
2. 培地組成および培養条件 基本培地として第1報¹⁰⁾記載の minimal medium を用いた。培養は minimal medium, minimal medium+15%食塩および minimal medium+15%食塩+0.08% L-proline の3種類について行ない、30 l 容 jar fermenter を用いて $K_d=1.6 \times 10^{-6}$ で30°Cで行なった。
3. 酵素液の調製法 粗酵素液の調製方法は Table 1 に示した。洗滌菌体の Braun's disintegrater 処理は第2報¹¹⁾に準じ、各調製段階の操作および蛋白濃度を

同じにし、 E_{280} が15.5の粗酵素液を得た。

NAD 関与の乳酸脱水素酵素の精製は、北原¹²⁾の方法に準じて行なった。まず粗酵素液(E_{280} として約500)を DEAE-cellulose カラム (3×20 cm) に吸着させ、0 から1.0 M までの KCl を用いて gradient elution 法により NAD 関与の乳酸脱水素酵素活性区分を得た。再度 DEAE-cellulose カラム (1×14 cm) で精製した。

4. 定量法 各種酵素活性の測定にあたって塩阻害および L-proline 効果を検討する場合、高濃度食塩生育菌の菌体内の食塩濃度 および遊離 L-proline 濃度を考慮して、酵素反応液の食塩および L-proline の濃度はそれぞれ1.0 M および100 mM を用いた。

A. 市販の α -glycerophosphate dehydrogenase-triose-phosphate isomerase 活性の測定 Rutter¹³⁾の方法に準じて行なった。基質である DL-glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) は Fischer¹⁴⁾の方法で調製した。GAPを基質として標記市販酵素を添加し、NADHの酸化で減少する340 m μ 吸光度を測定した。本酵素は次の Fructose-1, 6-diphosphate aldolase (FDP-aldolase) 活性の測定のために使用した。

B. FDP-aldolase 活性の測定 Rutter¹³⁾の方法に準じて行なった。Minimal medium 生育菌の粗酵素液

Table 1. Preparation of crude enzyme solution of *Tetracoccus* No. 100 grown on minimal medium containing NaCl and L-proline.

Medium	Minimal medium +15.0% NaCl	Minimal medium +15.0% NaCl +0.08% L-Proline	Minimal medium
Wet cell (g)	70.0	70.0	70.0
(dry weight) (g)	20.2	23.0	22.2
↓ Disintegration	4000 rpm	4000 rpm	4000 rpm
↓ Cell-free extract (ml)	3 min	3 min	3 min
(E_{280})	240	240	240
↓	13.0	9.0	11.5
Dilution with (ml)	240	240	240
buffer soln. (E_{280})	9.0	9.0	9.0
↓ Salting-out ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 40-70 % (2 times)	60 min	60 min	60 min
↓ Dialysate (ml)	32.5	25.5	28.5
(E_{280})	18.0	21.5	15.5
↓ Dilution with buffer soln. (E_{280})	15.5	15.5	15.5

を用い, FDP-aldolase の作用により, FDP から生成した GAP を市販の α -glycerophosphate dehydrogenase-triosephosphate isomerase を用いて α -glycerophosphate に変換せしめ, NADH の酸化で減少する 340 m μ 吸光度を測定した。

C. Flavin-linked (unidentified) lactic dehydrogenase 活性の測定 北原¹²⁾の方法に準じ, minimal medium 生育菌の粗酵素液を用いて行なった。本酵素の K_m 値は乳酸基質で測定した。

D. NAD-linked lactic dehydrogenase 活性の測定 Stolzenbach¹⁵⁾の方法に準じて, minimal medium 生育菌の粗酵素液について基質としてピルビン酸および乳酸を用いて測定した。本酵素の K_m 値はピルビン酸基質で測定した。3 種類の異なった培養条件で生育した菌の粗酵素液および DEAE-cellulose カラムで精製した NAD 関与の乳酸脱水素酵素の specific activity はピルビン酸を基質として測定した。

E. Catalase 活性の測定 Euler-Josephson 法¹⁶⁾および大亦¹⁷⁾の方法に準じて, 3 種類の異なった培養条件で生育した菌の粗酵素液について基質として H₂O₂ を用いて, 分解された H₂O₂ 量を求め m mole/min/mg 蛋白量であらわした。この蛋白量は銅フォリン法¹⁸⁾により定量した。

実験結果

1. L-Pyroglutamic acid の耐塩性促進効果

Tetracoccus No. 100 の耐塩性は, 生育に必須のビタミンである thiamine (50 μ g/l), biotin (0.5 μ g/l),

Table 2. Effect of L-, DL-, D-proline, proline analogues, and pyroglutamic acid on NaCl tolerance of *Tetracoccus* No. 100.

Additions		Relative growth (%)
L-Proline	(0.8 g/l)	100
DL-Proline	(0.8 g/l)	51.4
D-Proline	(0.8 g/l)	0
L-Pyroglutamic acid	(0.8 g/l)	0
Hydroxy-L-proline	(2.0 g/l)	58.7
Pyrrole	(1.0 g/l)	5.6
Pyrrolidine	(1.0 g/l)	2.8
None	*(minimal medium)	0

* Minimal medium: glucose, 0.25 %; KH₂PO₄, 0.5 %; MgSO₄, 0.01 %; NH₄Cl, 0.3 %; thiamine, 50 μ g/l; biotin, 0.5 μ g/l; niacin, 1 mg/l; L-leucine, 300 mg/l; L-cysteine, 50 mg/l; pH 7.0. Incubation: 30 °C for 96 hr with shaking in the presence of 15.0 % NaCl.

niacin (1000 μ g/l), と L-leucine (300 mg/l), L-cysteine (50 mg/l) を含む培地に L-proline を添加するのみに促進されることおよび D-proline, hydroxy-L-proline, pyrrole, pyrrolidine などの耐塩性促進効果については先に報告した¹¹⁾。

L-Proline と構造的に酷似した L-pyroglutamic acid について試験した結果は Table 2 に示した。参考までに L-proline の光学異性体および関連物質と併記した。L-Pyroglutamic acid は全く効果を示さなかった。

2. L-Proline による FDP-aldolase 活性の塩阻害解除 前報¹¹⁾において, 無細胞抽出液を用いた場合, 10%食塩存在下における FDP から乳酸生成は L-proline 添加により明らかに回復することを認めた。そこで更に詳しく調べるために粗酵素液を用いて FDP-aldolase 活性に及ぼす L-proline 効果を試験した。

本菌の FDP-aldolase 活性は, Fig. 1 に示したごと

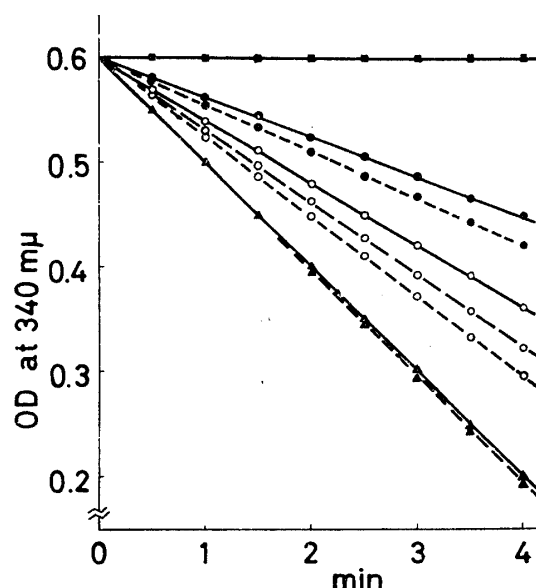


Fig 1. Effect of L-proline on the FDP-aldolase activity of *Tetracoccus* No. 100 in the presence of NaCl.

The reaction mixture, containing 133 μ M NADH, 5.33 mM FDP, NaCl, L-proline, α -glycerophosphate dehydrogenase-triosephosphate isomerase, and crude enzyme solution, was incubated at 30 °C for 4 min; pH 7.5, buffer-K-SH solution.

■—■ : Control
●—● : 1.0 M NaCl
●—● : 1.0 M NaCl+25 mM L-proline
○—○ : 0.5 M NaCl
○—○ : 0.5 M NaCl+10 mM L-proline
○—○ : 0.5 M NaCl+50 mM L-proline
▲—▲ : no NaCl
▲—▲ : no NaCl+50 mM L-proline

く, 1.0 M 食塩で約60%, 0.5 M 食塩で約40%の阻害を受け耐塩性は弱い, しかし 0.5 M 食塩による阻害は 50 mM L-proline を添加することによって約24%と減少して, L-proline による塩阻害の部分解除がみられた。

FDP-aldolase 活性の測定に用いる市販の α -glycerophosphate 脱水素酵素活性は, Fig. 2 に示したごとく, 食塩存在下で活性は低下したが, L-proline の影響をみると, 無食塩下の反応で L-proline 添加有無の差がなく, 食塩存在下では L-proline 添加によって本酵素活性は一層低下した。

Aldolase の測定に用いる α -glycerophosphate 脱水素酵素活性に対する塩阻害は L-proline によって増大することおよび無食塩下の反応で両酵素活性は L-proline の影響がないことから, FDP-aldolase 活性の塩阻害の解除に L-proline が効果を示すことがわかった。

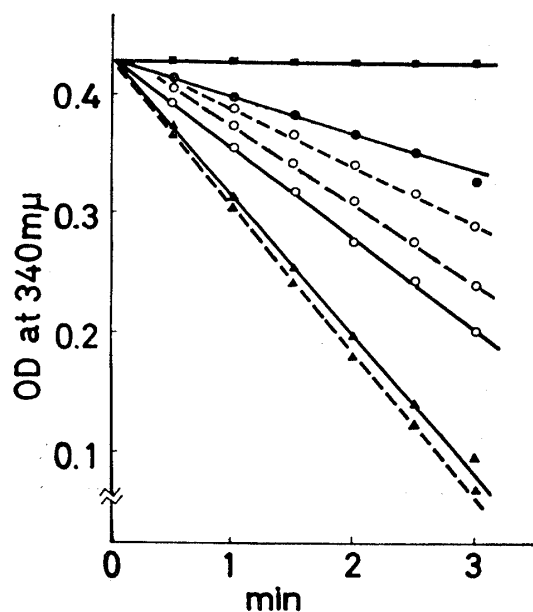


Fig. 2. Effect of L-proline on α -glycerophosphate dehydrogenase in the presence of NaCl.

The reaction mixture, containing 133 μ M NADH, 333 μ M DL-glyceraldehyde 3-phosphate, NaCl, L-proline, and α -glycerophosphate dehydrogenase-triosephosphate isomerase, was incubated at 30°C for 3 min; pH 7.5, buffer-K-SH solution.

- : Control
- : 1.0 M NaCl
- : 0.5 M NaCl+50 mM L-proline
- : 0.5 M NaCl
- : 0.5 M NaCl+10 mM L-proline
- ▲—▲ : no NaCl
- ▲—▲ : no NaCl+50 mM L-proline

酵素活性に対するこのような効果を含めて以下 L-proline 効果¹¹⁾とよぶことにする。

3. Lactic dehydrogenase 活性の耐塩性および L-proline の影響 本菌の最も重要な酵素の1つである乳酸脱水素酵素を取りあげて, NAD-linked lactic dehydrogenase 活性および flavin-containing lactic dehydrogenase 活性の耐塩性と L-proline の影響を試験した。

A. Flavin-linked (unidentified) lactic dehydrogenase 活性 本酵素の存否を検討し, Fig. 3 の結果を得た。本菌にはフラビン酵素とみられる乳酸脱水素酵素活性の存在の可能性を認めた。本酵素活性は 0.5 M 食塩で約 20%, 1.0 M 食塩で約45%の阻害を受けるが, 本酵素の関与する反応に対する L-proline 効果はなかった。本酵素の K_m 値は 1.1×10^{-2} M であった。

B. NAD-linked lactic dehydrogenase 活性 本菌での NAD 関与の乳酸脱水素酵素の存在を確かめるために, 基質として乳酸とピルビン酸を用いた。本酵素活性は Fig. 4, 5 に示した。NAD 関与の乳酸脱水素酵素の存在は乳酸およびピルビン酸の両基質の場合に

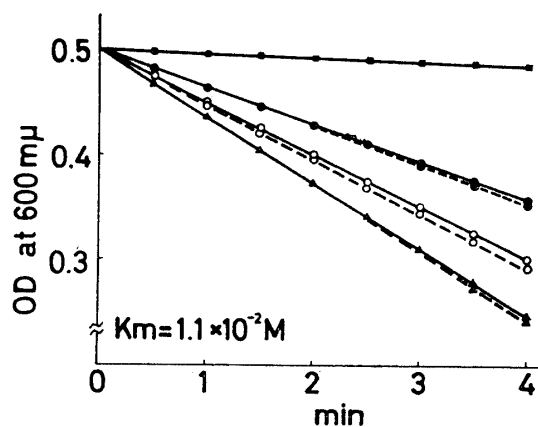


Fig. 3. Effect of L-proline on the flavin-linked lactic dehydrogenase activity of *Tetracoccus* No. 100 in the presence of NaCl.

The reaction mixture, containing 33.3 mM 2,6-dichlorophenol-indophenol, 6.67 mM lactate, NaCl, L-proline, and crude enzyme solution, was incubated at 30°C for 4 min; pH 7.0, 0.2 M phosphate buffer.

- : Control
- : 1.0 M NaCl
- : 1.0 M NaCl+100 mM L-proline
- : 0.5 M NaCl+10 mM L-proline
- : 0.5 M NaCl
- ▲—▲ : no NaCl
- ▲—▲ : no NaCl+50 mM L-proline

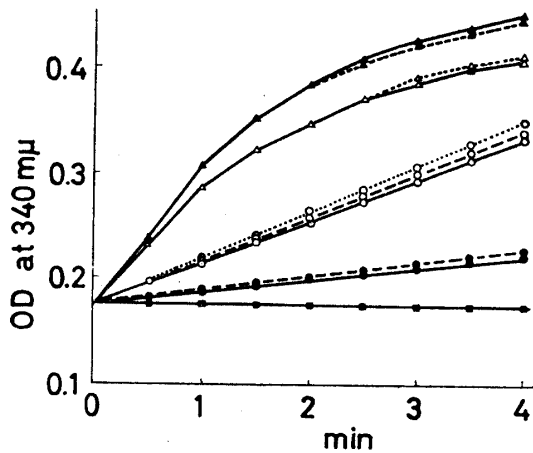


Fig. 4. Effect of L-proline on the NAD-linked lactic dehydrogenase activity of *Tetracoccus* No. 100 in the presence of NaCl.

The reaction mixture, containing 2.7 mM NAD, 0.1 M lactate, NaCl, L-proline, and crude enzyme solution, was incubated at 30°C for 4 min; pH 7.0, 0.2 M phosphate buffer.

- ▲—▲: no NaCl
- ▲···▲: no NaCl+100 mM L-proline
- △—△: 0.1 M NaCl
- △···△: 0.1 M NaCl+100 mM L-proline
- : 0.5 M NaCl
- : 0.5 M NaCl+25, 50 mM L-proline
- : 0.5 M NaCl+100 mM L-proline
- : 1.0 M NaCl
- : 1.0 M NaCl+100 mM L-proline
- : Control

確認できた。

本酵素活性は乳酸およびピルビン酸の両基質において、食塩添加により同程度の阻害を受け、0.5 M 食塩で約45%, 1.0 M 食塩で75~80%低下した。本酵素の関与する反応における L-proline 効果は認められなかった。

NAD 関与の乳酸脱水素酵素の K_m 値はピルビン酸基質で 8.3×10^{-4} M であった。フラビン酵素とみられる乳酸脱水素酵素の K_m 値は 1.1×10^{-2} M であるから、本酵素の K_m 値はその約 $\frac{1}{13}$ である。

C. NAD-linked lactic dehydrogenase 活性に及ぼす培養条件の影響 NAD 関与の乳酸脱水素酵素の関与する反応において塩阻害解除に L-proline 効果は全くみられなかったため、minimal medium の 15.0% 食塩生育菌、15.0% 食塩+0.08% L-proline 生育菌および無食塩培地に生育した正常菌から得た3種類の

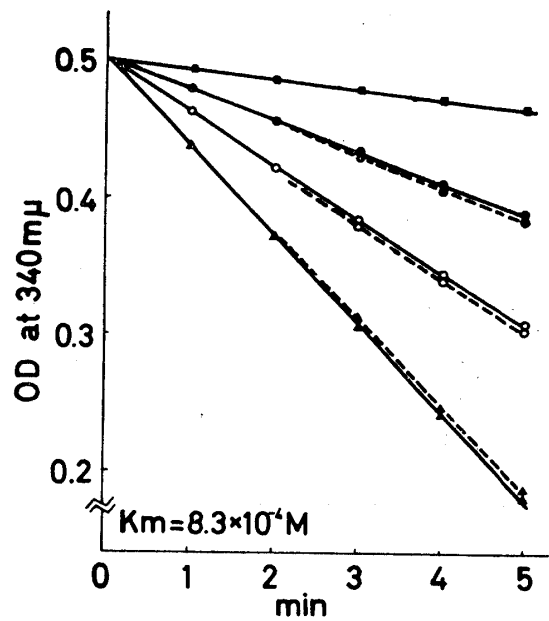


Fig. 5. Effect of L-proline on NAD-linked lactic dehydrogenase from *Tetracoccus* No. 100 in the presence of NaCl.

The reaction mixture, containing 133 μ M NADH, 1.67 mM pyruvate, NaCl, L-proline and crude enzyme solution, was incubated at 30°C for 5 min; pH 7.0, 0.1 M phosphate buffer.

- : Control
- : 1.0 M NaCl
- : 1.0 M NaCl+100 mM L-proline
- : 0.5 M NaCl
- : 0.5 M NaCl+100 mM L-proline
- ▲—▲: no NaCl
- ▲···▲: no NaCl+100 mM L-proline

NAD 関与の乳酸脱水素酵素の specific activity を比較した。

3種類の異なった培養条件で生育した菌の NAD 関与の乳酸脱水素酵素の塩阻害は、Table 3 に示したごとく、同程度であった。しかし高濃度食塩存在下 L-proline 効果によって生育した菌の NAD 関与の乳酸脱水素酵素の specific activity は、他の生育菌にくらべ数十倍高く、1.0 M 食塩存在下でも無食塩培地に生育した正常菌の食塩無添加の場合とほとんど同じであった。L-Proline を含まない高濃度食塩培地での生育菌の場合は specific activity が低く、食塩存在下の生育時にみられる lag phase の長くなる原因とも考えられる。高濃度食塩存在下に L-proline の培地への添加により短時間に旺盛に生育した菌より得られた NAD 関与の乳酸脱水素酵素は粗酵素液の調製方法を同一条件にしたとき正常菌にくらべ常に specific activity が

Table 3. NaCl inhibition of NAD-linked lactic dehydrogenase from *Tetracoccus* No. 100 grown on minimal medium containing NaCl and L-proline.

Medium		Minimal medium +15.0% NaCl		Minimal medium +15.0% NaCl +0.08% L-Proline		Minimal medium	
NaCl (M)	KCl (M)	Sp. act. ($\times 10^{-4}$)	Inhibition (%)	Sp. act. ($\times 10^{-4}$)	Inhibition (%)	Sp. act. ($\times 10^{-4}$)	Inhibition (%)
0		26.7	0	347.0	0	38.7	0
0.1		25.6	4.1	336.0	3.2	37.4	3.4
0.5		12.2	54.3	162.0	53.3	19.4	49.9
0.75		10.0	62.5	126.0	63.7	11.6	70.0
1.0		5.6	79.0	93.0	73.2	9.0	76.7
	0.5	11.1	58.4	144.0	58.5	20.7	46.5
	1.0	6.7	74.9	82.2	76.3	10.3	73.4

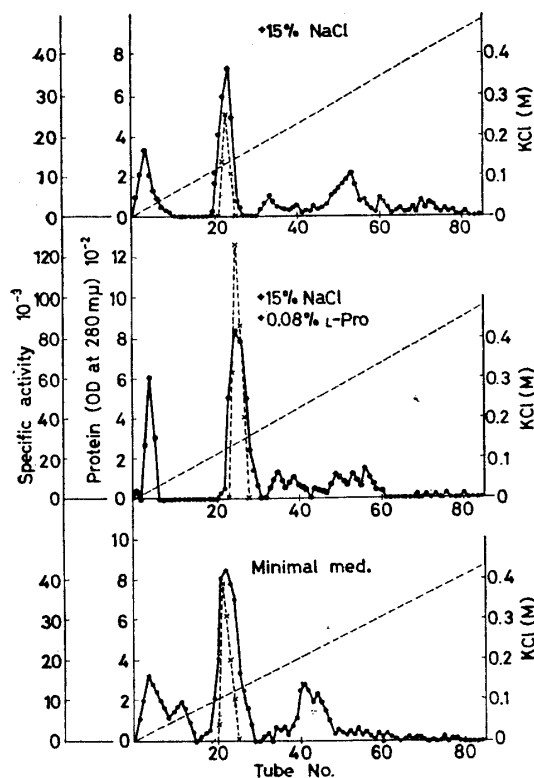


Fig. 6. Rechromatography of NAD-linked lactic dehydrogenase from *Tetracoccus* No. 100 on DEAE-cellulose.

Column: 1 cm $\times$ 14 cm. Flow rate: 10 ml/10 min. E_{280} recovery: 91 %.

●—●: Protein, ×—×: Specific activity.

十数倍高い結果を示すことから、L-proline が酵素蛋白自体に変化を与えることがわかれた。すなわち、L-proline は NAD 関与の乳酸脱水素酵素生成に強く関与することが推察された。そこで DEAE-cellulose

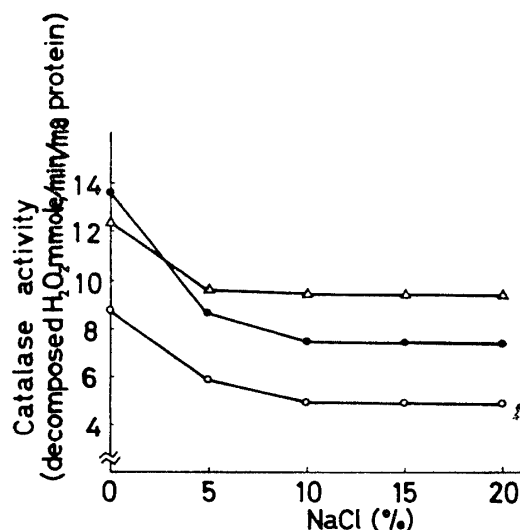


Fig. 7. Effect of NaCl on the catalase activity of *Tetracoccus* No. 100 grown on minimal medium containing NaCl and L-proline.

Reaction mixture:

0.1 M H_2O_2 2.5 ml
0.1 M Phosphate buffer (pH 6.8) 17.5 ml
Deionized water 5.0 ml
Crude enzyme solution 0.5 ml

●—●: Minimal medium-grown cell.

△—△: Minimal medium + 15.0% NaCl + 0.08% L-proline.

○—○: Minimal medium + 15.0% NaCl.

カラムおよび同カラムの再クロマトによって精製した NAD 関与の乳酸脱水素酵素を用いて再検討した。Fig. 6 に示したごとく、3 種類の異なった培養条件下で生育した菌の NAD 関与の乳酸脱水素酵素活性区分は

Table 4. Specific activity of NAD-linked lactic dehydrogenase from *Tetracoccus* No. 100 grown on minimal medium containing NaCl and L-proline.

Medium	Minimal medium + 15.0% NaCl		Minimal medium + 15.0% NaCl + 0.08% L-Proline		Minimal medium	
	no	1.0 M	no	1.0 M	no	1.0 M
Crude enzyme solution (salted-out and dialyzed)	43	8	230	51	60	15
1st. DEAE-cellulose column chromatography	200	40	900	280	280	50
2nd. DEAE-cellulose column chromatography	250	100	1250	378	390	90

Figures of specific activity in the table are multiplied by 10^4 .

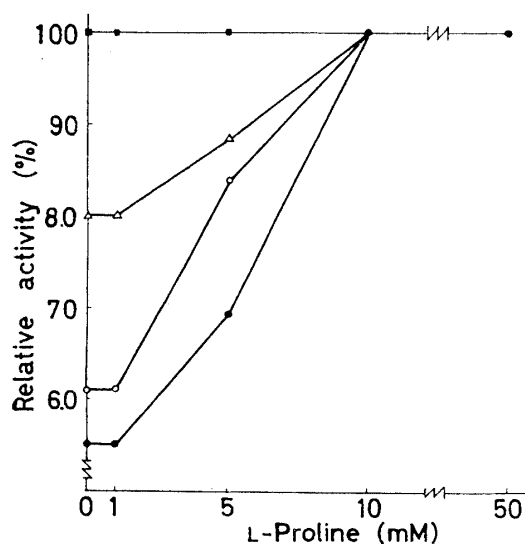


Fig. 8. Effect of L-proline on the catalase activity of *Tetracoccus* No. 100 grown on minimal medium containing NaCl and L-proline in the presence of 15.0% NaCl.

Reaction mixture:

0.01 M H_2O_2 ; 15.0% NaCl; 0~50 mM L-proline; 0.07 M phosphate buffer (pH 6.8); and crude enzyme solution.

- : Minimal medium-grown cell.
- △—△: Minimal med.+15.0% NaCl+0.08% L-proline,
- : Minimal med.+15.0% NaCl.
- : no NaCl. Activity taken as 100 and used as the reference standard.

同じフラクション No. にえられたが 3 者の specific activity の間にはかなり顕著な差異を認めた。上記精製段階における specific activity を Table 4 に示した。DEAE-cellulose カラムの再クロマトによって得

た specific activity はいずれの場合も粗酵素液にくらべて約 6 倍を示した。高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌の specific activity は L-proline のない高濃度食塩および無食塩生育菌にくらべ数倍高く、上記の粗酵素液での結果を再確認した。

4. L-Proline による catalase 活性の塩阻害解除
本菌はカタラーゼをもつが、この活性は Fig. 7 に示したごとく、minimal medium の 15.0% 食塩生育菌、15.0% 食塩 + 0.08% L-proline 生育菌 および無食塩生育菌ともに 10.0% 以上の食塩濃度で若干の塩阻害を受けたが、耐塩性は強いことがわかった。

カタラーゼ活性に対する L-proline 効果は、Fig. 8 に示した。カタラーゼ活性の塩阻害は L-proline を 10 mM 添加することにより完全に解除されうることがわかった。

考 察

Tetracoccus No. 100 の耐塩性は L-proline と構造的に酷似する L-pyroglutamic acid は全く効果を示さない。またビタミン、核酸塩基は耐塩性促進効果がなく、L-proline によってのみ促進された。この L-proline の耐塩性促進効果を 2, 3 の酵素について考察した。

Tetracoccus No. 100 は第 1 報¹⁰⁾記載のごとくヘム型のカタラーゼをもち、本酵素は FDP-aldolase 活性の場合と異なり耐塩性を有した。大亦¹⁷⁾らの *Tetracoccus soyae* のカタラーゼ活性は耐塩性を有することを明らかにしている結果と一致した。しかし本酵素は若干の塩阻害を受け、この阻害は L-proline を添加することにより完全に解除された。FDP-aldolase 活性はカタラーゼの場合にくらべ耐塩性が弱い、このよう

な FDP-aldolase 活性の関与する反応における塩阻害は L-proline 添加によって完全ではないが明らかに解除されることが認められた。

Tetracoccus No. 100 にはフラビン酵素とみられる乳酸脱水素酵素の存在の可能性および NAD 関与の乳酸脱水素酵素の存在を認めた。北原¹²⁾らは *Lactobacillus casei* に flavin-containing lactic dehydrogenase の存在を明らかにしているが、本酵素は乳酸菌に存在するという報告は非常に少ない。*Tetracoccus* No. 100 の場合は、NAD 関与の乳酸脱水素酵素の K_m 値が 8.3×10^{-4} M であり、フラビン酵素とみられる乳酸脱水素酵素の K_m 値は 1.1×10^{-2} M であることから、本菌の乳酸生成にはフラビン酵素とみられる乳酸脱水素酵素はほとんど関与しないと推論される。

Tetracoccus No. 100 の乳酸生成は主として NAD 関与の乳酸脱水素酵素によって営まれると考えられるので、本酵素の耐塩性と L-proline 効果をみた場合、本酵素は NaCl および KCl で同程度に阻害された。大亦⁹⁾らによる *Tetracoccus soyae* の乳酸脱水素酵素は耐塩性を有するという結果と相違がみられた。本酵素の関与する反応における塩阻害は L-proline の添加によって解除されなかった。しかし高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌の NAD 関与の乳酸脱水素酵素は、specific activity が高濃度食塩および無食塩培地に生育した正常菌にくらべ数倍高く、部分精製した酵素液において常に specific activity が高い結果を示すことから NAD 関与の乳酸脱水素酵素の蛋白自体に差のあることが推察された。

以上のように *Tetracoccus* No. 100 の食塩存在下での生育時にみられた L-proline の耐塩性促進効果の原因は、一つにはカタラーゼおよび FDP-aldolase にみられたごとく両酵素の関与する反応における塩阻害を解除する効果があり、また一方 NAD 関与の乳酸脱水素酵素にみられたごとく specific activity の高い酵素が得られるという効果の両面にわたってみられることが酵素レベルの解析で明らかとなってきた。NAD 関与の乳酸脱水素酵素の酵素蛋白に L-proline がどのようなメカニズムで関与しているかを解明することは興味ある問題である。

要 約

耐塩性乳酸菌 *Tetracoccus* No. 100 の L-proline による耐塩性促進効果について酵素レベルで検討し、以下のごとき結果を得た。

1. L-Proline と構造的に酷似する L-pyroglutamic

acid は耐塩性促進効果を示さなかった。

2. FDP-aldolase 活性は高濃度食塩で阻害を受けたが、L-proline を添加することによってその阻害は部分解除された。

3. 本菌にはフラビン酵素とみられる乳酸脱水素酵素の存在の可能性および NAD 関与の乳酸脱水素酵素の存在を認めた。両酵素は塩阻害を受け、L-proline は両酵素の関与する反応に対して食塩濃度に関係なく効果を示さなかった。前者の K_m 値は 1.1×10^{-2} M であり、NAD 関与の乳酸脱水素酵素の K_m 値は 8.3×10^{-4} M であった。

4. 高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌は、無食塩および高塩濃度下に生育した菌にくらべ、同一条件で調製した NAD 関与の乳酸脱水素酵素液の specific activity が数倍高く、1.0 M 食塩反応の場合でも、正常菌の無食塩反応の場合と同程度であった。L-Proline は NAD 関与の乳酸脱水素酵素生成に強く関与することが推察された。

5. 本菌のカタラーゼ活性は10.0%以上の食塩濃度で若干の塩阻害を受けたが、この阻害は 10 mM L-proline を添加することによって完全に解除されることが知られた。

・本研究は昭和46年度、日本農芸化学大会に発表した。

文 献

- 1) 植村：農化，**32**，79 (1958).
- 2) Sakaguchi, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 489 (1960).
- 3) 上野：大阪府大紀要，農学・生物学，**15**，67 (1964).
- 4) 中浜，岩井：本誌，**43**，783 (1965).
- 5) Onishi, H.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 332, 351 (1959).
- 6) Baxter, R. M., Gibbons, N. E.: *Can. J. Microbiol.*, **2**, 599 (1956).
- 7) Yamada, T., Egami, F.: *Proc. Japan Acad.*, **30**, 113 (1954).
- 8) 大亦，何森：醸酵協会誌，**26**，408 (1968).
- 9) 大亦，川崎，田部：日農化 45年度講演要旨集，P.186 (1970).
- 10) 杉森，上瀬：本誌，**48**，218 (1970).
- 11) 上瀬，杉森：本誌，**49**，302 (1971).
- 12) Kitahara, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **8**, 130 (1962).
- 13) Rutter, W. J.: *Methods in Enzymology*, **IX**,

- 479 (1966).
- 14) Fischer, H. O. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3329 (1955).
- 15) Stolzenbach, F.: *Methods in Enzymology*, **IX**, 278 (1966).
- 16) Euler, H. V. and Josephson, K.: *Ber.*, **56**, 1749 (1923); *Ann.*, 452 (1927).
- 17) 大亦, 前田: 本誌, **46**, 113 (1968).
- 18) Lowry, O. H., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

(昭46. 6. 12 受付)