

[J. Ferment. Technol., Vol.51, No.9, p. 647~652, 1973]

Tetracoccus sp. No.100 の乳酸脱水素酵素の 性質に及ぼす L-Proline 効果†

上瀬 弘和・杉森 恒武

丸金醤油株式会社京都研究所

Halotolerant Effect of L-Proline on Properties of NAD-linked Lactic Dehydrogenase of *Tetracoccus* sp. No. 100*

Hirokazu Jose and Tsunetake Sugimori

Kyoto Reseach Laboratories, Marukin
Shoyu Co., Ltd., Uji, Kyoto

The characteristic effect of L-proline on the halotolerance of *Tetracoccus* sp. No. 100, a lactic acid bacterium relating to soy sauce brewing, has been studied with regard to the properties of NAD-linked lactic dehydrogenase (LDH) in cells grown under various conditions.

As for the molecular weight, the LDH obtained from three kinds of cells grown on hypertonic saline medium (M-1), L-proline-enriched hypertonic saline medium (M-2), and ordinary medium (M-3), was roughly the same, approximately 67,000, according to the gel filtration method. Thermostability and pH-stability of these enzymes were similar. On the other hand, the optimal pH for the activity of LDH from cells grown on M-2 medium, pH 6.5, differed from that of the other two enzymes, pH 7.0. The disc-electrophoresis of the three kinds of LDH revealed that the enzyme from cells grown on M-2 was charged more electronegatively than the others.

Such a modification of an enzyme molecule, depending on the amounts of salt and L-proline in the culture medium, appears to be significantly related to the characteristic behavior of the LDH from cells grown on M-2.

緒 言

著者らは、醤油乳酸菌 *Tetracoccus* sp. No. 100 の耐塩性促進物質を調べたところ、各種アミノ酸、核酸塩基、ビタミンのうち L-proline のみが耐塩性促進効果を示すこと (L-proline 効果) を見出した。^{1~3)} 高

濃度食塩存在下に L-proline を添加することによって耐塩性が促進された菌の proline 含量をみると菌体内遊離型は無食塩培地に生育した正常菌の場合にくらべて著しく多量であるが、結合型の含量には大差なかった。高濃度食塩存在下では本菌の呼吸能、醗酵能、fructose-1,6-diphosphate-aldolase 活性および catalase 活性は阻害されるが、L-proline を添加することによって塩阻害が解除されることを認めた。また高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌の乳酸脱水素酵素 (LDH) の比活性は正常菌の場合にくらべて数倍高く得られ、L-proline は本酵素の生成に関与することが強く推察された。本報では、高濃度食

† 醤油醸造に関与する耐塩性乳酸菌に関する研究 (第5報)

Studies on Halotolerant Lactic Acid Bacteria Relating to Soy Sauce Brewing (V)

* Presented at the 4th International Fermentation Symposium Kyoto; Abstracts, pp. 220 (1972).

塩生育菌, 高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌, および無食塩培地に生育した正常菌の三種類の菌体の LDH の差異を比較検討した結果について述べる。

実験方法

1. 供試菌 醤油工場の麹, 諸味中に広く存在する耐塩性で homofermenter の乳酸菌 *Tetracoccus* sp. No. 100 を用いた。

2. 培養条件 第1報¹⁾記載の minimal medium, minimal medium + NaCl 150 g/l 培地, および minimal medium + NaCl 150 g/l + L-proline 0.8 g/l 培地を用いて 30l 容 jar fermenter で $K_d=1.6 \times 10^{-6}$ で対数期後半まで培養した。Minimal medium を M-3, M-3 培地+NaCl 150g/l を M-1, M-1 培地+L-proline 0.8 g/l を M-2 として以後記載した。

3. LDHの精製 3種類の培地に生育した菌より得た LDH の精製は北原⁴⁾の方法に従って行なった。精製方法の詳細は第3報³⁾記載のとおりである。M-1, M-2 および M-3 の3種類の培地に生育した菌より得た LDH はそれぞれ, E-1, E-2 および E-3 として以後記載した。

4. LDH活性の測定 第3報³⁾記載のごとく, LDH 活性はピルビン酸基質で, NADH の酸化を 340 nm 吸光度で測定する Stolzenbach⁵⁾の方法によって行なった。LDH の酵素反応に対する pH の影響は 30°C で 0.1M phosphate buffer を用いて pH 5.5 ~8.0 の範囲で調べ, 温度の影響は pH 7.0 の 0.1 M phosphate buffer を用いて 10~50°C の範囲で試

験した。

5. LDHの安定性試験 LDH の pH に対する安定性は pH 4.5~8.5 の範囲で 5°C で 24hr 放置して調べ, 温度に対する安定性は pH 7.0 の 0.1M phosphate buffer を用いて 5~60°C の範囲で 20時間 water bath に放置し, 加熱処理後の残存 LDH 活性は, 第3報³⁾記載のごとく 30°C で測定した。

6. 蛋白質の定量 精製した酵素液の蛋白濃度は, 標準物質として結晶 bovin serum albumin を用いて, Lowry⁶⁾の方法により定量した。

7. 分子量の測定 分子量は 5°C で 0.005 M phosphate buffer (pH 7.0) 用いて Sephadex G-100 カラム (I. D. 2.64cm×98cm) で, Andrews⁷⁾の方法に従って求めた。標準物質は bovine serum albumin (MW = 67,000), ovalbumin (MW = 45,000), chymotrypsinogen A (MW = 25,000) および myoglobin (MW = 17,800) を用いた。Void volume ($V_0=155$ ml) は blue dextran を用いて求めた。

8. ディスク電気泳動 電気泳動分析は Davis⁸⁾のポリアクリルアミドゲル法に従って行なった。通電はカラム1本当たり 4mA で60分間行なった。蛋白バンドの染色は Chrambach⁹⁾の方法に従ってコマジー・ブリリアント・ブルーを用いて行なった。蛋白バンドは 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) で抽出して LDH 活性の測定を行なった。

実験結果

1. LDHの精製 E-1, E-2 および E-3 の3種類の LDH の精製過程の結果は Table 1 に示した。3種類の LDH は DEAE-cellulose カラムクロ

Table 1. Purification of NAD-linked lactic dehydrogenase (LDH) of *Tetracoccus* sp. No. 100 grown on medium containing NaCl and L-proline.

Purification step	Specific activity of LDH (Δ OD/min/mg protein $\times 10^{-4}$)		
	E-1*	E-2*	E-3*
Crude enzyme solution (salted-out and dialyzed)	88	200	73
1st DEAE-cellulose column chromatography	400	640	280
2nd DEAE-cellulose column chromatography	715	1,160	600
3rd DEAE-cellulose column chromatography	800	1,560	610

* E-1 : LDH from minimal medium plus 15% NaCl culture (M-1).

E-2 : LDH from minimal medium plus 15% NaCl and 0.08 % L-proline culture (M-2).

E-3 ; LDH from minimal medium culture (M-3).

Minimal medium : glucose, 2.5 g/l ; KH_2PO_4 , 5 g/l ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l ; NH_4Cl , 3 g/l ; thiamine · HCl, 50 $\mu\text{g/l}$; biotin, 0.5 $\mu\text{g/l}$; niacin, 1000 $\mu\text{g/l}$; L-leucine, 0.3 g/l ; L-cysteine, 0.050 g/ ; pH, 7.0.

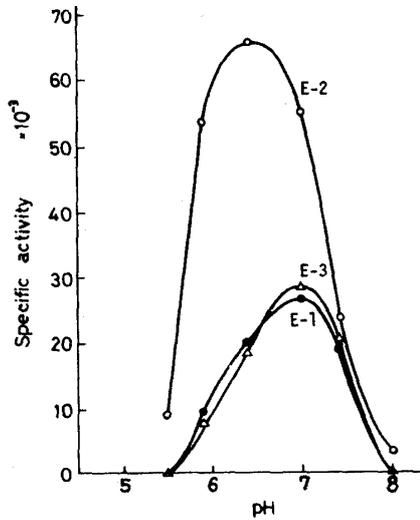


Fig. 1. Effect of pH on the NAD-linked lactic dehydrogenase activity of *Tetracoccus* sp. No. 100.

The enzyme activities were assayed in the pH range from 5.5 to 8.0 with 0.1 M phosphate buffer at 30°C. The specific activity is defined as the change in absorbancy at 340 nm per min per mg protein.

マトグラフィーを3回くりかえすことにより, 粗酵素液より約8倍に精製できた。精製した E-2 の LDH の比活性は E-1 および E-3 の場合にくらべて二, 三倍高かった。これら精製酵素液は本酵素の安定性, 活性そのほか諸性質を調べるために供した。

2. 酵素活性に及ぼす pH の影響 E-1, E-2

および E-3 の 3 種類の LDH の酵素反応に対する pH の影響を Fig. 1, 2 に示した。3 種類の LDH はともに中性付近においてシャープな pH 活性曲線を示したけれども E-2 の LDH 活性の最適 pH は 6.5 であり, 他の 2 種類の酵素の最適 pH 7.0 にくらべ明らかに異なった。最適 pH での E-2 の LDH の比活性は E-1 および E-3 の場合の約 2.5 倍という高い比活性を有した。0.5 M NaCl 存在下のこれら酵素活性に及ぼす pH の影響は無食塩反応の結果と同じであった。そして本酵素活性は 0.5 M NaCl によって約 50% 阻害された。この阻害は 0.5 M KCl の場合でも同様に観察された。

3. 安定性に及ぼす pH の影響 E-1, E-2 および E-3 の 3 種類の LDH の pH に対する安定性を

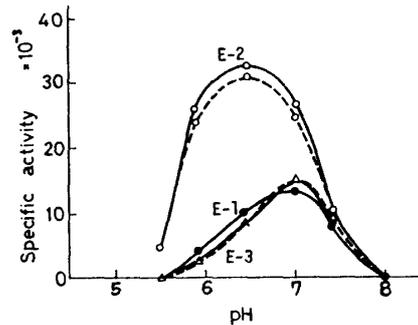


Fig. 2. Effect of pH on the NAD-linked lactic dehydrogenase activity of *Tetracoccus* sp. No. 100 in the presence of 0.5 M NaCl (—) and 0.5 M KCl (---).

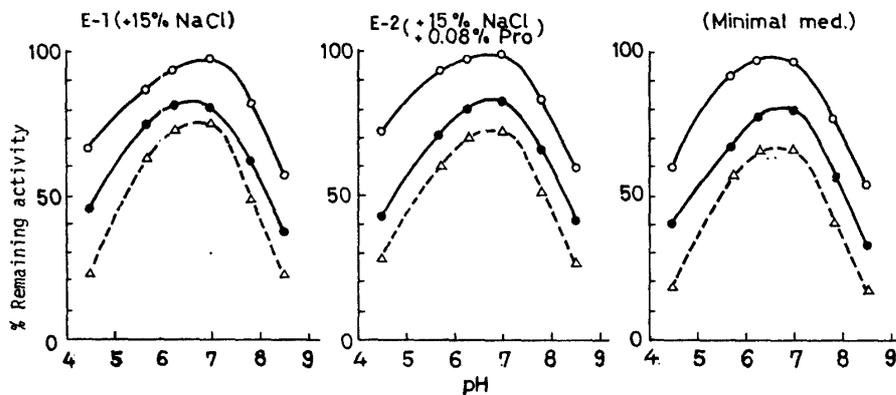


Fig. 3. Effect of pH at 5°C on the stability of the NAD-linked lactic dehydrogenases, E-1, E-2, and E-3.

The enzyme solutions (protein, 4 mg %) were incubated at the indicated pH at 5°C for 2 hr and 24 hr. The remaining activities were expressed as percentages of the initial specific activity of E-1, E-2, and E-3 (310×10^{-4} , 655×10^{-4} and 320×10^{-4} , respectively).

—○— : 2 hr ; —●— : 24 hr ; --△-- 24 hr in 0.5 M NaCl solution.

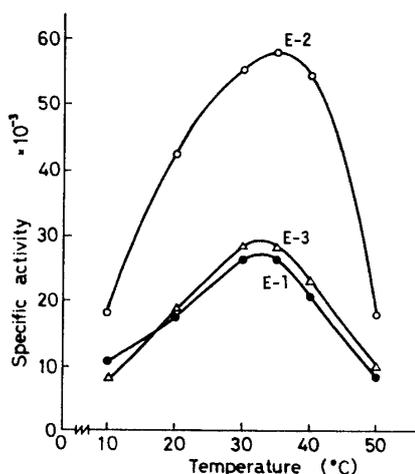


Fig. 4. Effect of temperature on the NAD-linked lactic dehydrogenase activity of *Tetracoccus* sp. No. 100.

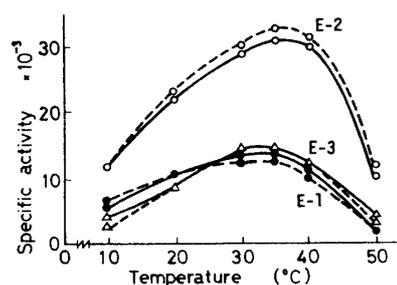


Fig. 5. Effect of temperature on the NAD-linked lactic dehydrogenase activity of *Tetracoccus* sp. No. 100 in the presence of 0.5 M NaCl (—) and 0.5 M KCl (---).

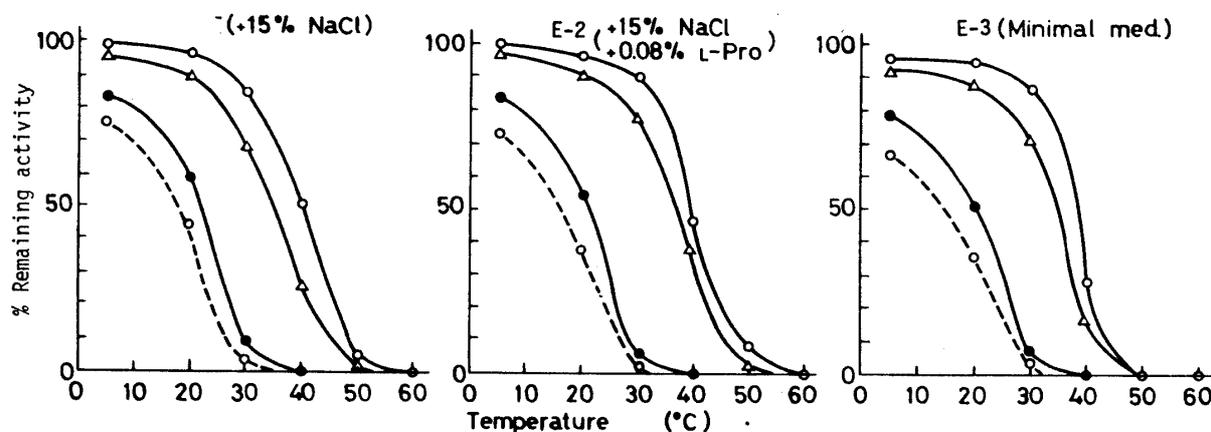


Fig. 6. Effect of temperature at pH 7.0 on the stability of NAD-linked lactic dehydrogenases, E-1, E-2, and E-3.

The enzyme solutions (protein, 4 mg %) in 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 were incubated in a water bath at various temperatures for 1, 6, and 20 hr.

The remaining activities were expressed as percentages of the initial specific activity of E-1, E-2, and E-3 (310×10^{-4} , 655×10^{-4} and 320×10^{-4} , respectively).

—○— : 1 hr; —△— : 6hr; —●— : 20hr; --○-- : 20hr in 0.5 M NaCl solution.

Fig. 3 に示した. 3種類の LDH はともに pH 6~7 で安定であったが pH 8.0 以上, pH 5.0 以下で不安定であった.

4. 酵素活性に及ぼす温度の影響 E-1, E-2 および E-3 の 3 種類の LDH の酵素反応に対する温度の影響を Fig. 4, 5 に示した. これら酵素の最適温度は約 35°C であり, 10°C および 50°C では活性は低かった. 0.5M NaCl および 0.5M KCl 存在下のこれら酵素活性に及ぼす温度の影響は無食塩反応の結果と同じであった. そして本酵素活性は 0.5 M NaCl および 0.5M KCl によって約 50% 阻害された.

5. 安定性に及ぼす温度の影響 E-1, E-2 および E-3 の 3 種類の LDH の温度に対する安定性を Fig. 6 に示した. これら酵素液は 5°C で安定であっ

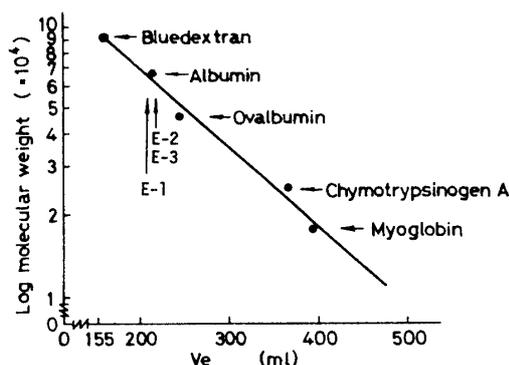


Fig. 7. Gel-filtration on a calibrated Sephadex G-100 column of NAD-linked lactic dehydrogenases of *Tetracoccus* sp. No. 100 grown on three kinds of medium.

たが, 30°C, 20時間で殆んど完全に失活した。0.5M NaCl 存在下ではこれら酵素の温度不安定性は若干促進された。

6. 分子量 E-1, E-2 および E-3 の3種類の LDH の分子量の測定結果は Fig. 7 に示した。3種類の LDH の分子量はいずれも bovine serum albumin と同程度の 67,000 であった。

7. 電気泳動分析 E-1 と E-2 の 濾紙電気泳動分析を 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) で 1cm 巾あたり 1.2 mA, 4 時間行なったところ, これら二者

の酵素の泳動差は 4 cm あることが判った。そこで, E-1, E-2 および E-3 の3種類の精製 LDH についてポリアクリルアミドゲルを用いるディスク電気泳動分析をおこなったところ Fig. 8 に示すように, 3種類の酵素ともに明瞭な single band を示し, E-2 の LDH は他の二者にくらべてマイナス荷電が大であった。Table 2 に示したごとく, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) で抽出した酵素蛋白のバンドはいずれも LDH 活性が若干低下したが, E-2 の LDH の比活性は E-1 および E-3 の場合にくらべ二, 三倍高いことを再確認した。

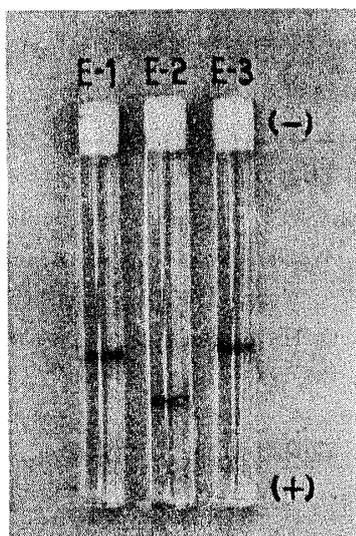


Fig. 8. Disc-electrophoresis of NAD-linked lactic dehydrogenases from *Tetracoccus* sp. No. 100. The three kinds of purified NAD-linked lactic dehydrogenase (about 50 μ g of protein) prepared by chromatographing three times on DEAE-cellulose were used for the polyacrylamide gel electrophoresis.

Table 2. Disc-electrophoresis of NAD-linked lactic dehydrogenases, E-1, E-2, and E-3, from *Tetracoccus* sp. No. 100.

	Specific activity of LDH (Δ OD/min/mg protein $\times 10^{-4}$)		
	E-1	E-2	E-3
Before electrophoresis	800	1560	610
After electrophoresis	700	1400	550

The protein band on the polyacrylamide gel column was extracted by 1 ml of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0, and 0.8 ml of the extract was used for the NAD-linked lactic dehydrogenase assay.

考 察

前報⁹⁾において用いた LDH は DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを 2 回行ない粗酵素液より約 6 倍に精製した。本報では 1 回 DEAE-cellulose カラム処理を増すことにより約 8 倍に精製することが出来, 得られた標品は電気泳動的に明瞭な single band を示した。

前報⁹⁾において, 本菌の最も重要な酵素である LDH の比活性が L-proline 効果によって増大することを示した。すなわち, 高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌の LDH (E-2) の比活性は, 食塩不存在下の反応で他の L-proline を含まない高濃度食塩生育菌の LDH (E-1), それに無食塩培地に生育した正常菌の LDH (E-3) の場合にくらべて数倍高かった。食塩の添加によっていずれの比活性も減少したが上述の傾向は維持され, したがって 1 M 食塩存在下の反応時の E-2 の比活性は E-3 の無食塩反応時の場合と同程度であった。一方, E-1 は比活性が低かった。このように L-proline 効果, すなわち高塩濃度下の生育促進の主原因の 1 つとして, 酵素の比活性の増大によるものと考えられた。そこで, 本報では LDH の比活性がこの L-proline 効果によって高くなる原因を追求するために上述の E-1, E-2 および E-3 の性質を比較検討した。

まず isozyme の存在の可能性は, カラムクロマトグラフィーにおいて LDH 活性を示したピークは 1 個であり, しかもいずれも同一の位置に溶出したことおよび電気泳動的においても単一のバンドを示したことおよびゲル濾過法によって測定した分子量もほぼ同じであることからでは非常に少ないものと思われるが, ディスク電気泳動分析において, E-2 のマイナス荷電が他の二者にくらべて大であった。LDH の pH, 温度に対する安定性および最適作用温度は 3 種類の標

品の間には差は認められなかったが、E-2 の最適作用 pH が 6.5 であるのに対して E-1 および E-3 では 7.0 を示して明らかに異なった。

以上のごとく、L-proline 効果によって LDH の最適作用 pH が少し酸性側にずれ、また電気泳動におけるマイナス荷電の増加が認められたことは、E-2 の蛋白構造が他の二者にくらべて異なっており、それが LDH の比活性を高くする原因ではないかと思われる。

前報²⁾において、著者らは *Tetracoccus* sp. No. 100 の L-proline 効果生育菌は 菌体内遊離 proline 含量が増大することを述べた。同じ頃 Pálfi¹⁰⁾らは植物組織において 浸水時、土壌の salt 濃度が高くなると proline 含量が増大することを示している。

また Tempest¹¹⁾らは最近 *Bacillus subtilis* var. *niger* が培地の食塩濃度の増大とともに 菌体内遊離 proline 含量が特異的に増大することと、*Aerobacter aerogenes* の場合は食塩濃度の増大とともに菌体内グルタミン酸脱水素酵素活性および遊離 glutamic acid 含量が増大するということを報告している。これらの事実は、著者らの見出した L-proline 効果にも関連するものとして興味もたれる。

要 約

耐塩性乳酸菌 *Tetracoccus* sp. No.100 の LDH の性質に及ぼす L-proline 効果について、minimal medium の高濃度食塩生育菌、高濃度食塩存在下に L-proline 効果によって生育した菌、および無食塩培地に生育した正常菌の 3 種類の菌の精製 LDH (それぞれ E-1, E-2 および E-3 と記載する) を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. ゲル濾過法で求めた 3 種類の LDH の分子量はいずれも 67,000 であった。

2. 3 種類の LDH の温度安定性、pH 安定性には差はなかった。しかし E-2 の LDH 活性の最適 pH は 6.5 であり他の 2 種類の酵素 E-1 および E-3 の場合は最適 pH が 7.0 であって、L-proline 効果生育菌の LDH のみが差異を示した。

3. 3 種類の LDH のディスク電気泳動分析の結果 L-proline 効果生育菌の場合はマイナス荷電が他の二者にくらべて大であることを認めた。

本研究は昭和47年度、日本農芸化学大会に発表した。

文 献

- 1) 杉森, 上瀬: 醸工誌, **48**, 218 (1970).
- 2) 上瀬, 杉森: 醸工誌, **49**, 302 (1971).
- 3) 上瀬, 杉森: 醸工誌, **49**, 861 (1971).
- 4) Kitahara, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **8**, 130 (1962).
- 5) Stolzenbach, F.: *Methods in Enzymology* (W. A. Wood), Vol. IX. 278, Academic Press Inc., New York (1966).
- 6) Lowry, O. H., Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 7) Andrews, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
- 8) Davis, B. J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, Part. 2, 404 (1964).
- 9) Chrambach, A., Reisfeld, R. A., Wyckoff, M., Zaccari, J.: *Anal. Biochem.*, **20**, 150 (1967).
- 10) Pálfi, G., Juhász, J.: *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, **19**, 79 (1970).
- 11) Tempest, D. W., Meers, J. L.: *J. Gen. Microbiol.*, **64**, 171 (1970).

(昭48. 5. 7受付)