

# 小麦粉発酵性細菌 *Enterobacter cloacae* GAO における 乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製とその特徴について

田村 朝子, 長野 宏子<sup>\*1</sup>, 大森 正司<sup>\*2</sup>,  
庄司 善哉<sup>\*3</sup>, 荒井 基夫<sup>\*4</sup>

(駒澤苫小牧短期大学, <sup>\*1</sup>岐阜大学教育学部, <sup>\*2</sup>大妻女子大学家政学部,  
<sup>\*3</sup>秋田大学教育学部, <sup>\*4</sup>大阪府立大学農学部)

平成 8 年 7 月 3 日受理

## Purification and Characterization of Lactate Dehydrogenase (LDH) from the Leavening Bacterium *Enterobacter cloacae* GAO

Asako TAMURA, Hiroko NAGANO,<sup>\*1</sup> Masashi OMORI,<sup>\*2</sup> Zenya SHOJI<sup>\*3</sup> and Motoo ARAI<sup>\*4</sup>

Komazawa University Tomakomai Junior College, Tomakomai 053

<sup>\*1</sup> Faculty of Education, Gifu University, Gifu 501-11

<sup>\*2</sup> Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University, Chiyoda-ku, Tokyo 102

<sup>\*3</sup> Faculty of Education, Akita University, Akita 010

<sup>\*4</sup> College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Sakai 593

*Enterobacter cloacae* GAO, a leavening bacterium, was studied for its assimilation of organic acids contained in a culture broth. *E. cloacae* GAO produced lactic acid and formic acid therefore, the lactate dehydrogenase (LDH) of *E. cloacae* GAO may affect the production of hydrogen gas by the bacterium. We investigated the purification and characteristics of the lactate dehydrogenase from *E. cloacae* GAO. The last purification step resulted in the specific activity of the enzyme being increased 48.5-fold with a yield of 4.6%. The molecular weight of the purified enzyme was approximately 115,000 by gel filtration, being composed of four subunits each with a molecular weight 31,000 as evaluated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 7.5 and 30°C, respectively. The lactate dehydrogenase was stable at 40°C and between pH 7 and 9, and the enzyme activity was strongly inhibited by Cu<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>. The enzyme predominantly contained glutamic acid in its amino acid composition.

(Received July 3, 1996)

**Keywords:** *Enterobacter* エンテロバクター, hydrogen production 水素産生, lactate dehydrogenase 乳酸脱水素酵素, purification 精製.

### 1. 緒 言

*Enterobacter cloacae* GAO は, 自然発酵法である老麺 (ラオミン) 法を用いて発酵させた包子より分離, 同定された細菌である. *E. cloacae* GAO は, 小麦粉発酵時に, 酵母が炭酸ガスを発生するのに対して, 水素ガスを発生することがこれまでの研究で明らかとなっている (長野等 1987, 1989; Nagano *et al.* 1991). *E. cloacae* GAO の産生するガス量は, 他の *Enterobacteriaceae* の細菌に比べて格段に多く, またその 80% 以上は水素ガスで占められている. また, *E. cloacae*

GAO のガス産生の至適条件を用いて製造した饅頭は, 小麦粉生地の特徴が生かされた非常においしいものであった. これは, 生地の膨化が均一であったことから生地表面もなめらかで, 官能的にも優れていることになるものと考えられた. したがって, *E. cloacae* GAO の水素生成機構を解明することは, 饅頭の風味形成を知る上においても, また水素ガスの多目的利用性の上からも非常に重要なことと考えられる. われわれは, これまでに主に *E. cloacae* GAO の水素ガス産生の至適条件について pH, 温度, 栄養源などの面から検討

してきた (Tamura *et al.* 1995). その結果, 菌の生育可能な pH は 4.0~9.0 で, 至適 pH は 6.8, 水素ガス産生に有効な栄養源は, 炭素源としてはグルコース, 窒素源としてはカザミノ酸, 無機塩類ではリン酸であることが明らかとなった (Tamura *et al.* 1995). また, *Enterobacteriaceae* に属する細菌と *E. cloacae* GAO の間でガス産生, および培養中におけるグルコース, アンモニア, アミノ酸の消長について比較したところ, 比較に用いた細菌すべてにおいて, 水素産生が認められたが, *E. cloacae* GAO の水素産生量が最も多かった (田村等 1996). さらに, *E. cloacae* GAO の培養液中の有機酸分析を行ったところ, 乳酸やギ酸が培養にともなって生成してくること (田村等 1995) が明らかとなった. このことから, *E. cloacae* GAO による饅頭の膨化が主として水素ガスによること, そしてさらに乳酸やその他の有機酸がその過程において蓄積してくることが推測される. *Escherichia coli* (以降 *Es. coli*) や *Clostridia* ではグルコースから生じるピルビン酸を直接脱炭酸するか, ギ酸を経て脱炭酸しヒドロゲナーゼにより水素を生成するといわれており, 乳酸脱水素酵素 (LDH) 等も水素産生系として, *E. cloacae* GAO においては重要な酵素であると推測された. さらに *Enterobacteriaceae* のいくつかの菌株について, 水素産生量と乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性との関係を調べたところ, 正の相関性が認められ報告してきた (田村等 1996). 乳酸脱水素酵素 (LDH) は, これまで主に乳酸菌に関する報告 (Dennis and Kaplan 1960; Mizushima and Kitahara 1962; Gasser *et al.* 1970; Ito and Sasaki 1994) が多く認められ, 腸内細菌を対象としたものは *Es. coli* が精製 (Tarmy and Kaplan 1968; Futai 1973) されているのみで *Enterobacter* 属の乳酸脱水素酵素 (LDH) に関する報告はほとんど認められない. 先に述べたように乳酸脱水素酵素 (LDH) が水素産生の一つのカギとなる酵素であると考えられるところから, 本酵素を精製し, 各種条件下での本酵素のタンパク質の挙動, 活性変動について検討した. 本報文では *E. cloacae* GAO の乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製を行い, その諸性質を明らかにした.

## 2. 実験方法

### (1) 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の測定

乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の測定は, ピルビン酸を基質として, NADH の酸化を 340 nm で測定する紫外外部吸収法 (Wroblewski-Ladue 法) (Wroblewski

and Ladue 1955) を用いた. 酵素単位 1 unit は 1 分間に 1  $\mu$ mol の NADH を酸化させるのに必要な酵素量とした. またタンパク質の定量には Lowry 法 (Lowry *et al.* 1951) を用い, 牛血清アルブミンを標準として定量を行った.

### (2) 乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製

乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製は, まず *E. cloacae* GAO を 0.1% カザミノ酸添加 G 培地 (Kramer *et al.* 1980) を用いて 37°C, 24 時間培養を行い, その後遠心分離 (10,000 $\times g$ , 30 min) し, 得られた菌体を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で懸濁させた (wet cell 1 g/2 ml of buffer). それをフレンチプレス (1,000 kg/cm<sup>2</sup>, 大岳製作所) で菌体破碎し, 遠心分離 (25,500 $\times g$ , 60 min) で得られた上清を粗酵素画分とした. これを 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した DEAE-cellulose カラム (5.0 $\times$ 50 cm) に通し, 全量 1,200 ml の同緩衝液中 0~0.6 M の NaCl の濃度勾配で溶出させ, イオン交換クロマトグラフィーを行った. ここで得られた活性画分を, さらに蓚酸とカップリングさせた Sepharose 4 B カラム (0.7 $\times$ 10 cm) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行った (Taguchi *et al.* 1982; O'Carra and Barry 1972; Cuatrecasas 1970). アフィニティークロマトグラフィーは, 0.2 M NaCl と 0.2 mM NADH を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) でカラムを平衡化させた後, 同緩衝液に続いて, 0.2 M NaCl を含んだ 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を流して活性画分を得た. この操作を 2 回反復して行った. イオン交換クロマトグラフィーは 4°C で行い, アフィニティークロマトグラフィーは室温で行った. 得られた酵素は, Laemmli の方法 (Laemmli 1970) にしたがって, SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動によって検討した.

### (3) 乳酸脱水素酵素 (LDH) の諸性質

#### 1) 分子量の測定

分子量の測定は, SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動と, Sephadex G-100 (3.5 $\times$ 50 cm) を用いてのゲルろ過で行った. ゲルろ過は, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した同カラムを用い, Andrews の方法 (Andrews 1964) にしたがって, 分子量の推定を行った. 分子量マーカーとしてアルコールデヒドロゲナーゼ (MW 150,000), 牛血清アルブミン (66,000), 炭酸脱水素酵素 (29,000), チトクローム c (12,400) を用いた.

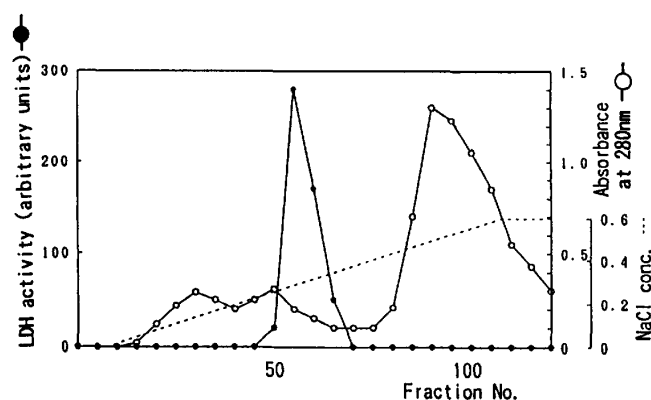
小麦粉発酵性細菌 *Enterobacter cloacae* GAO における乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製とその特徴について

Fig. 1. Ion-exchange chromatography of the crude lactate dehydrogenase on DEAE-cellulose

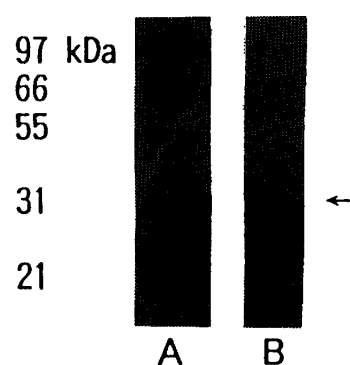


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified lactate dehydrogenase

A: Marker proteins. The marker proteins used were phosphorylase (MW 97,000), bovine serum albumin (66,000), glutamic dehydrogenase (55,000), carbonic anhydrase (31,000), and trypsin inhibitor (21,000). B: Purified lactate dehydrogenase. Twelve percent SDS-PAGE.

Table 1. Purification of the lactate dehydrogenase from *Enterobacter cloacae* GAO

|                               | Total activity (unit) | Total protein (mg) | Specific activity (unit/mg) | Recovery (%) |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|--------------|
| Crude enzyme                  | 975                   | 755                | 1.29                        | 100          |
| DEAE-cellulose chromatography | 277                   | 32.7               | 8.46                        | 28.4         |
| 1st affinity chromatography   | 155                   | 6.19               | 25.0                        | 15.9         |
| 2nd affinity chromatography   | 45.1                  | 0.93               | 48.5                        | 4.6          |

## 2) 至適反応 pH および pH 安定性

50 mM リン酸緩衝液を用い、至適反応 pH は、30℃ で pH 4.5~9.5 の各 pH における酵素活性を測定した。pH 安定性は、酵素を 30℃ で各 pH に 30 分間放置した後、pH 7.5 に戻して残存活性を測定した。

## 3) 至適反応温度および温度安定性

至適反応温度は、pH 7.5 で、20~60℃ の各温度における酵素活性を測定した。温度安定性は、pH 7.5 で各温度に 10 分間保持した後、急冷し、30℃ で残存活性を測定した。

## 4) 金属イオン

精製酵素に、金属イオンが 1 mM になるように添加し、30℃ で 10 分間処理した後、酵素活性を測定した。

## 5) アミノ酸分析

精製酵素を 6 N HCl により 105℃ で 24 時間、酸加水分解を行い、島津アミノ酸分析システムで、OPA 法を用いて分析を行った。

## 3. 実験結果および考察

### (1) 乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製

DEAE-cellulose によるイオン交換クロマトグラフィーの結果を Fig. 1 に示した。その結果、イオン交換クロマトグラフィーにおいて、No. 55~No. 61 のフラクション (約 0.3 M の NaCl 濃度) において酵素の溶出が認められ、比活性は 1.3 unit/mg から 8.5 unit/mg に上昇した。次いでアフィニティークロマトグラフィーにより、比活性は 48.5 unit/mg に上昇し、最終収率は 4.6% であった。各過程ごとの精製程度を Table 1 にまとめた。精製酵素の SDS ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動を Fig. 2 に示した。SDS 電気泳動の結果、分子量 31,000 に単一なバンドが認められたことから、電気泳動的にも均一な乳酸脱水素酵素 (LDH) であることが明らかとなった。

### (2) 精製乳酸脱水素酵素 (LDH) の諸性質について

ゲルろ過による分子量の推定結果を Fig. 3 に、至適反応温度などの諸性質についての測定結果を Fig. 4 に、

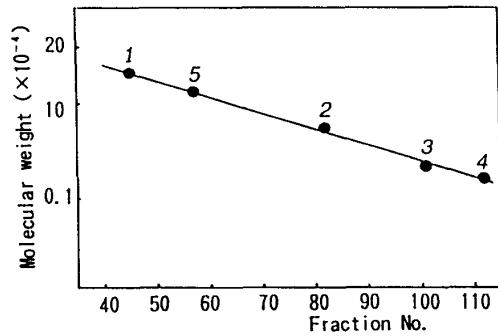


Fig. 3. Molecular weight evaluation of the lactate dehydrogenase of *Enterobacter cloacae* GAO by gel filtration on Sephadex G-100

The standard proteins used were 1) alcohol dehydrogenase (MW 150,000), 2) bovine serum albumin (66,000), 3) carbonic anhydrase (29,000), 4) cytochrome *c* (12,400), and 5) the lactate dehydrogenase of *E. cloacae* GAO.

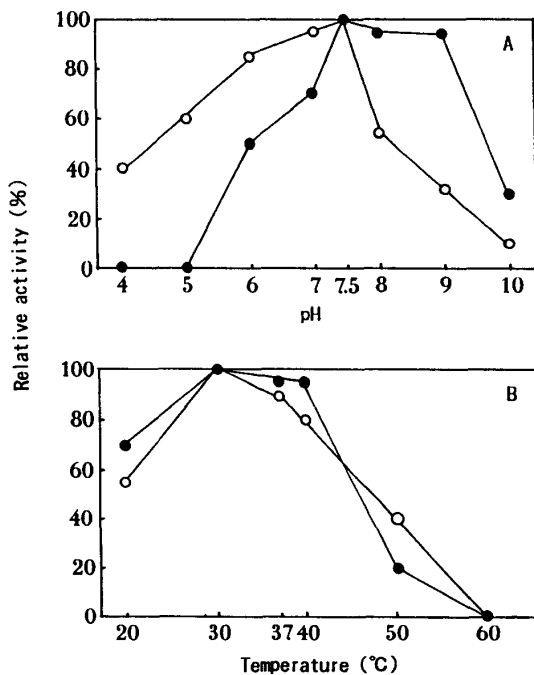


Fig. 4. Effects of pH and temperature on the activity of the purified lactate dehydrogenase

A: Optimum pH (○) and pH stability (●). B: Optimum temperature (○) and thermal stability (●).

金属イオンに対する影響については Table 2 に、アミノ酸組成については Table 3 にそれぞれ示した。電気泳動とゲルろ過によって、本酵素の分子量は 115,000 (31,000 の 4 量体) と推定された。これは *Es. coli* B (Tarmy and Kaplan 1968) の 115,000 (31,000 の 4 量体), *T. caldophilus* GK-24 (Taguchi *et al.* 1982) の

Table 2. Effect of metal compounds on the activity of the lactate dehydrogenase

| Metal compound    | Relative activity (%) |
|-------------------|-----------------------|
| None              | 100                   |
| MgSO <sub>4</sub> | 71                    |
| CuSO <sub>4</sub> | 23                    |
| MgCl <sub>2</sub> | 92                    |
| MnCl <sub>2</sub> | 28                    |
| FeCl <sub>2</sub> | 79                    |
| ZnCl <sub>2</sub> | 80                    |
| BaCl <sub>2</sub> | 79                    |
| LiCl              | 107                   |
| KCl               | 103                   |
| NaCl              | 106                   |
| FeCl <sub>3</sub> | 70                    |
| AlCl <sub>3</sub> | 102                   |

Lactate dehydrogenase was preincubated at 30°C with 1 mM of each metal compound in a 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) for 10 min. The enzyme activity was determined at 30°C.

120,000 (31,000 の 4 量体) と類似するものであった。至適反応 pH は 7.5 であり、pH 7.0~9.0 の範囲で酵素活性は安定であった。至適反応温度は 30°C で、40°C まで 95% の酵素活性が残存していたが、50°C においては 20% の酵素活性しか認められず、60°C では完全に失活した。*Streptococcus thermophilus* (Ito and Sasaki 1994) も *E. cloacae* GAO と同様に、酵素活性が 25~37°C の狭い範囲で安定であった。金属イオンについては Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> で大きく活性阻害が認められた。アミノ酸組成については、グルタミン酸を最も多く含んだ酵素であることが明らかとなった。アミノ酸組成については、分子量が本酵素と同一であったことから、*Es. coli* B (Tarmy and Kaplan 1968) の D-LDH のアミノ酸組成と比較し、さらに *Es. coli* B と類似したアミノ酸組成をもつウシ M<sub>4</sub> の L-LDH と Table 3 で比較した。その結果、*E. cloacae* GAO の LDH は、アスパラギン酸の含量が非常に低く、中性アミノ酸の含量もやや低い傾向にあったが、その他のアミノ酸についてはほぼ同量含まれていることが明らかとなった。なお、L-乳酸 (L-乳酸ナトリウム、和光純薬) を基質として NAD<sup>+</sup> の還元を測定したところ NAD<sup>+</sup> を還元しなかったことから、本酵素は D-LDH の可能性が高い

小麦粉発酵性細菌 *Enterobacter cloacae* GAO における乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製とその特徴について

Table 3. Amino acid composition of the lactate dehydrogenases

| Amino acid    | <i>Enterobacter cloacae</i> GAO | <i>Escherichia coli</i> * | Bovine M <sub>4</sub> * |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Aspartic acid | 3.2                             | 10.1                      | 10.4                    |
| Threonine     | 9.8                             | 5.4                       | 3.9                     |
| Serine        | 5.8                             | 5.2                       | 7.1                     |
| Glutamic acid | 22.3                            | 11.2                      | 9.9                     |
| Proline       | trace                           | 3.8                       | 4.2                     |
| Glycine       | 13.2                            | 7.3                       | 8.2                     |
| Alanine       | 3.3                             | 8.7                       | 6.4                     |
| Valine        | 4.1                             | 7.3                       | 9.4                     |
| Methionine    | trace                           | 2.7                       | 2.6                     |
| Isoleucine    | 4.8                             | 5.5                       | 7.4                     |
| Leucine       | 8.3                             | 10.5                      | 11.1                    |
| Tyrosine      | 2.2                             | 3.8                       | 2.4                     |
| Phenylalanine | 6.4                             | 3.8                       | 2.5                     |
| Histidine     | 3.2                             | 2.8                       | 2.7                     |
| Lysine        | 8.5                             | 5.8                       | 8.4                     |
| Arginine      | 5.0                             | 6.1                       | 3.4                     |

Units are expressed as mol%. \* Tarmy and Kaplan, 1968.

と推測されるが、詳細については本酵素の触媒活性をも含めて次回に報告したいと考えている。

#### 4. 要 約

小麦粉発酵性細菌である *E. cloacae* GAO の培養液の有機酸分析を行ったところ、乳酸、ギ酸が生成してることが明らかとなった。このことから、*E. cloacae* GAO の水素ガス生成系に乳酸脱水素酵素 (LDH) が関与していることが推測された。本研究では、*E. cloacae* GAO から乳酸脱水素酵素 (LDH) の精製を行い、その特徴を明らかとした。その結果、酵素の最終収率は 4.6% で、その時比活性は 48.5 倍に上昇し、電気泳動とゲルろ過の結果、分子量は 115,000 (31,000 の 4 量体) と推定され、*Es. coli* B (Tarmy and Kaplan 1968) と同一の分子量であった。本酵素は D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) で、*Es. coli* B のものと同じタイプのものであった。また、至適反応 pH は 7.5 で、至適反応温度は 30℃、酵素活性は pH 7.0～9.0 の範囲と 40℃ まで安定であった。金属イオンについては、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>で大きく活性が阻害された。さらに本酵素のアミノ酸組成では、グルタミン酸が最も多く含まれていることが明らかとなった。

#### 引 用 文 献

- Andrews, P. (1964) Estimation of the Molecular Weights of Proteins by Sephadex Gel-Filtration, *Biochem. J.*, **91**, 222-233
- Cuatrecasas, P. (1970) Protein Purification by Affinity Chromatography, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059-3065
- Dennis, D., and Kaplan, N. O. (1960) D- and L-Lactic Acid Dehydrogenase in *Lactobacillus plantarum*, *J. Biol. Chem.*, **235**, 810-818
- Futai, M. (1973) Membrane D-Lactate Dehydrogenase from *Escherichia coli* Purification and Properties, *Biochemistry*, **12**, 2468-2474
- Gasser, F., Doudoroff, M., and Contopoulos, R. (1970) Purification and Properties of NAD Dependent Lactic Dehydrogenase of Different Species of *Lactobacillus*, *Arch. Microbiol.*, **105**, 303-312
- Ito, Y., and Sasaki, T. (1994) Cloning and Nucleotide Sequencing of L-Lactate Dehydrogenase Gene from *Streptococcus thermophilus* M-192, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1569-1573
- Kramer, V. C., Calabrese, D. M., and Nickerson, K. W. (1980) Growth of *Enterobacter cloacae* in the Presence of 25% Sodium Dodecyl Sulfate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 973-976
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275
- Mizushima, S., and Kitahara, K. (1962) Purification and Properties of Lactic Dehydrogenase of *Lactobacillus casei*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **8**, 130-141
- 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉 (1987) リンゴ浸漬水より分離した饅頭醗酵性細菌 (*Enterobacter cloacae*) の同定について, *農化*, **61**, 357-359
- 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉 (1989) 老麺法発麵による生地および饅頭の加工特性, *家政誌*, **40**, 221-225
- Nagano, H., Omori, M., and Shoji, Z. (1991) Characteristics of Wheat-Flour Dough Using *Enterobacter cloacae* GAO with and without Yeast, *J. Food Sci.*, **56**, 106-108
- O'Carra, P., and Barry, S. (1972) Affinity Chromatography of Lactate Dehydrogenase, *FEBS Lett.*, **21**, 281-285
- Taguchi, H., Yamashita, M., Matsuzawa, H., and Ohta, T. (1982) Heat-Stable and Fructose 1, 6-Bisphosphate-Activated L-Lactate Dehydrogenase from an Extremely Thermophilic Bacterium, *J. Biochem.*, **91**, 1343-1348
- Tamura, A., Nagano, H., Omori, M., Shoji, Z., Iibuchi, S., and Arai, M. (1995) Improvement in Hydrogen Productivity by a Leavening Bacterium, *Enterobacter cloacae* GAO, and Its Application to *Mantou*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 2137-2139
- 田村朝子, 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉, 荒井基夫 (1995) 日本農芸化学会 1995 年大会講演要旨集, 北海道, 191
- 田村朝子, 長野宏子, 大森正司, 庄司善哉, 荒井基夫 (1996) 小麦粉発酵性細菌 *Enterobacter cloacae* GAO と *Enterobacteriaceae* 細菌における水素ガス産生の比較検討, *家政誌*, **47**, 711-716
- Tarmy, E. M., and Kaplan, N. O. (1968) Chemical Characterization of L-Lactate Dehydrogenase from *Escherichia coli* B, *J. Biol. Chem.*, **243**, 2579-2586
- Wroblewski, F., and Ladue, J. S. (1955) Lactic Dehydrogenase Activity in Blood, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 210-213