耐塩微生物の生育と酸化還元電位について

東 和 男・山 本 泰・好 井 久 雄

(東京農業大学 醸造学科)

(昭和 59 年 12 月 5 日受理)

The Effect of Oxidation-Reduction Potential on the Growth of the Salt-Tolerant Microorganisms A Study of Oxidation-Reduction Potential (Part I)

Kazuo HIGASHI, Yasushi YAMAMOTO, and Hisao Yoshii

(Department of Brewing and Fermentation, Tokyo University of
Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156)

The relationship between the oxidation-reduction potential (ORP) and the growth of salt-tolerant lactic-acid bacteria and salt-tolerant yeast was investigated.

1) Under the broth condition of rH 10-16, *Pediococcus halophilus* grew well. In sodium-thioglycolate-deficient media, the ORP of a log phase decreased, however, that of a stationary phase increased. In sodium-thioglycolate-sufficient media, the ORP of a log phase was stable, and then that of a stationary phase increased slightly.

2) The ORP of broths in which *Saccharomyces rouxii* was cultivated decreased in a preceding period of a log phase, however, it was stable afterward. *S. rouxii* grew well in rH 19 of broths.

The ORP of broths in which *Torulopsis versatilis* was cultivated decreased rapidly in a preceding period of a log phase, subsequently it decreased gradually. *T. versatilis* developed well in rH 13-15 of broths.

3) The ORP of agar media in which *P. halophilus* was cultivated for 10 days was rH 11-13. The value was suitable for its growth.

Considering from the decrease in pH of agar media, *S. rouxii* grew well under an oxidative condition, while *T. versatilis* grew well under a somewhat reductive condition. The phenomenon was the same as that of broths.

緒 言

微生物の生育は温度, pH, 栄養素, 代謝産物のほか酸化還元電位 (Oxidation Reduction Potential, 以下 ORP と略す) などの環境条件に影響される^{1,2)}。ORP が高ければ好気性菌の生育は良いが, 嫌気性菌の生育は悪くなる。通常, 乳酸菌³⁾の培養電位は rH 5~12, 酵母³⁾のそれは rH 13~16 と報告されている。*Brevibacterium* 属³⁾による L-グルタミン酸発酵は rH 9 を, *Rhizopus* 属³⁾による乳酸発酵は rH 13 を示す。このように ORP は各発酵に特有な一定値を示すため, ORP を発酵管理の指標とすることができる。

酸化還元電位に関する研究 (第 1 報)

本報では耐塩性乳酸菌・耐塩性酵母の生育と ORP の関係について検討した結果について報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株 *Pediococcus halophilus* IAM 1676, ¹⁾ *Saccharomyces rouxii* B-1 (当研究室保存株), *Torulopsis versatilis* T-2 (当研究室保存株) を供試した。

2. 培地・培養 乳酸菌にはペプトン・酵母エキス培地 (Table 1), 酵母には大西⁴⁾の培地 (Table 2) を基本としたものを用い, ORP 調節用のチオグリコール酸ナトリウム (以下, STG と略す) は乳酸菌で 0, 0.1, 0.2, 0.3%, 酵母で 0, 0.05, 0.10, 0.15% とした。

液体培養は試験管に上記培地を 10 ml 宛分注し (無シ

Table 1 Composition of medium for lactic acid bacteria (%)

Glucose	1.0
Peptone	1.0
Yeast extract	0.5
NaCl	12.0
Na acetate	1.0
Na thioglycolate	0~0.3
pH	7.4

Table 2 Composition of medium for yeast (%)

Glucose	5.0
Casamino acids	0.4
Yeast extract	0.2
NaCl	15.0
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄	0.05
CaCl ₂	0.01
Inositol	10.0 (mg/l)
Ca pantothenate	0.2 (mg/l)
Na thioglycolate	0~0.15
pH	5.0

ール区), これを流動パラフィンで 3 mm 被ったもの(シール区)を用い, 30°C で培養を行い, 分光光度計(島津 KK 製スペクトロ 20)により 660 nm における培養液の吸光度を測定して生育量を求めた。なお, 乳酸菌は無シール・シールの液体培地で, 酵母はシールしたもので培養した。固体培養は平板培養のほか, 乳酸菌についてはスチール・ウール法⁵⁾, 二重皿平板法, パウチ法⁶⁾(酒見医科器械舗)で嫌氣的に培養した。

3. ORP の測定 pH メーター(東亜電波 KK 製 HM 7 B)を電位差計とし, 複合電極 PS-115 C を付して ORP を測定した。測定値に比較電極の電位を加え Eh とし, rH は次式より求めた。

$$rH = 2 \times \left(\frac{Eh}{0.0001981 \times (273 + T)} + pH \right)$$

Eh : V, T : 測定温度 (°C)

測定電位は時間とともに下降したが, 30 分後にはほぼ安定したので, この値を終極電位とした。なお, 相羽⁷⁾は窒素ガスを通泡しなくとも正確な電位を測定出来ると報告しているので, 窒素ガスを通泡しないで測定した。

結果及び考察

1. 液体培地の ORP と *P. halophilus* の生育 (I)

STG 無添加, 及び 0.1, 0.2, 0.3% 添加液体培地に *P. halophilus* を 96 時間培養した際の ORP, pH 及び生育を Fig. 1 に示した。

対照の ORP は初発時には STG 無添加が rH 15, STG 添加が rH 10 を示したが, 96 時間後の上昇は前者では rH 1.6, 後者では rH 1.0 で, STG 添加により

Fig. 1 Effect of ORP and pH on growth of *P. halophilus* **Fig. 2** Effect of ORP and pH on growth of *P. halophilus*

ORP を低位に保ち得ることが確認された。

STG 無添加区では対数期に ORP は低下したが, 定常期に上昇し, また STG 添加区では対数期に ORP は変動しなかったが, 定常期にやや上昇した。STG 0.1% 添加区では対数期の生育がやや良好であったが, STG 無添加・添加による定常期の生育の差異は殆ど認められなかった。

2. 液体培地の ORP と *P. halophilus* の生育 (II)

STG 無添加(無シール, シール), 0.1% 添加(シール)液体培地の ORP, pH 及び生育を Fig. 2 に示した。

対照の ORP は初発時に STG 無添加区のシール・無シール区ともに rH 15.4 であったが, 96 時間後には無シール区 rH 21.3, シール区 rH 17.0 に上昇したことより, 流動パラフィンによるシールが ORP の上昇を抑制することは明白と考えられた。STG 0.1% 添加の対照は初発時に rH 11.3, 96 時間後に rH 13.3 と ORP をかなり低位に保持できた。

STG 無添加区では ORP は対数期に低下したが, 定常期には上昇した。なお, 無シール区では生育が開始されるまでは ORP が上昇した。STG 添加区では ORP は対数期に変動しなかったが, 定常期にやや上昇した。STG 添加区, STG 無添加区(シール), そして STG 無添加区(無シール)の順に対数期の生育が良好であったが, 定常期では生育の差異は認められなかったことと, Fig. 1 と併せて rH 10~16 の範囲において *P. halophi-*

Fig. 3 Effect of ORP and pH on growth of *S. rouxii*

lus は類似した生育を示すことが判明した。なお、*Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. bifidus* の培養電位は rH 9.3³⁾ と報告されており、*P. halophilus* のそれと類似している。

3. 液体培地の ORP と *S. rouxii* の生育 STG 無添加、及び 0.05, 0.10, 0.15% 添加液体培地（シール）に、*S. rouxii* を 7 日間培養した際の ORP, pH 及び生育を Fig. 3 に示した。

対照の ORP は初発時には STG 無添加区が rH 19.0 であり、7 日後に rH 22.3 に上昇した。しかし、STG 0.15% 添加区は初発時に rH 12.8 であり、7 日後には rH 13.8 とごく僅かの上昇にとどまった。

STG 無添加・添加区ともに誘導期には ORP はやや上昇したが、対数期の前期に低下し、その後は一定の値を示した。STG 無添加区では本菌の生育及び pH 低下は良好であることより、本菌の生育最適 rH は 19 近辺であり、乳酸菌より酸化的環境で良好に生育することを認めた。

4. 液体培地の ORP と *T. versatilis* の生育 STG 無添加、及び 0.05, 0.10, 0.15% 添加液体培地（シール）に *T. versatilis* を 7 日間培養した際の ORP, pH 及び生育を Fig. 4 に示した。

Fig. 4 Effect of ORP and pH on growth of *T. versatilis*

Fig. 5 Time course of ORP in agar media of *P. halophilus*

STG 無添加・添加区いずれも誘導期には ORP がやや上昇したが、対数期の前期に急激に低下し、その後は徐々に低下した。本菌の生育及び pH 低下は STG 0.05% 添加区の rH 13~15 で良好であり、酵母³⁾の培養電位ともほぼ一致した。

5. 寒天培地の ORP と *P. halophilus* 及び *S. rouxii*, *T. versatilis* の生育 STG 0.1% 添加培地による普通平板法及びスチール・ウール法、二重皿平板法、パウチ法などの嫌気培養法で *P. halophilus* を培養し、数百個のコロニーを形成したプレート の ORP を経時的に測定した結果を Fig. 5 に示した。いずれの培養法においても 10 日後の ORP は rH 11~13 で、液体培地より低い電位を示した。

STG 無添加、及び 0.1% 添加寒天培地に *S. rouxii*, *T. versatilis* を培養し、数百個のコロニーを形成したプレートは ORP 及び pH を Fig. 6 に示した。対照の ORP は、培養開始時に STG 無添加区では rH 17.4 であったが 9 日後に rH 25.7 に上昇し、一方培養開始時に STG 添加区では rH 9.2 であったが 9 日後に rH 18.7 に上昇した。*S. rouxii*, *T. versatilis* の培養電位は、9 日後に酸化状態（STG 無添加）では rH 21~22、還元状態（STG 添加）では rH 10~18 と両者ともほぼ同等に低下した。しかし、生育の指標となる pH 低下は、*S. rouxii* では酸化状態が速かつ大であるのに対し、*T. versatilis* では還元状態で迅速かつ大であることより、液体培地と同様に *S. rouxii* は酸化状態、*T. versatilis* はより還元的状態で生育良好であることが判明した。

Fig. 6 Effect of ORP on pH of agar media of *S. rouxii* and *T. versatilis*

要 約

耐塩性乳酸菌，耐塩性酵母の生育した培養液の酸化還元電位（ORP）の関係について検討し，次の結果を得た。

1) *P. halophilus* は液体培地において rH 10~16 の範囲で，ほぼ良好に生育した。チオグリコール酸ナトリウム無添加区では対数期に ORP は低下したが，定常期に上昇し，またチオグリコール酸ナトリウム添加区では対数期の ORP は変動せず，定常期にやや上昇した。

2) *S. rouxii* の液体培養の際の ORP は，対数期の前期は低下したが，その後は一定の値を示し，rH 9 近辺で良好に生育した。

T. versatilis の液体培養の際の ORP は，対数期の前期は急激に低下したが，その後は徐々に低下を続け，rH 13~15 で良好に生育した。

3) *P. halophilus* は寒天培地において 10 日間培養後

に rH 11~13 となり，生育に適した ORP が保持された。

耐塩性酵母の寒天培地における生育は，pH 低下の様相から液体培地におけると同様に *S. rouxii* は酸化状態，*T. versatilis* はより還元的状態で良好となることが判明した。

参 考 文 献

- 1) 植村定治郎，福見秀雄，柳田友道編：「微生物生理学」朝倉書店 東京 p.277 656 (1955)
- 2) 植村定治郎：「微生物生態論」学会出版センター 東京 p.95 (1978)
- 3) 本江元吉：農化 32 A 101 A 113 (1958)
- 4) H. OHISHI : *Bull. Agric Chem. Soc. Japan* 24 226 (1960)
- 5) 鈴木祥一郎，上野一恵：「嫌気性菌（第2版）」医学書院 東京 p.13 (1978)
- 6) B. O. BLADEL, R. A. GREENBERG : *Appl. Microbiol.* 13 281 (1965)
- 7) 相羽富夫：醬研 2 252 (1976)