胞子をつくる乳酸生産菌に就て (第1報)

中山大樹, 坂口謹一郎 (東大農学部農藝化学教室)

昭和24年12月15日受理

Studies on the Spore-Bearing Lactic Acid-Forming Bacilli. Part I.

By Ôki NAKAYAMA and Kin-ichiro SAKAGUCHI

(Agricultural Chemical Laboratory, University of Tokyo)

乳酸を多量につくり、しかも耐熱性の胞子をつくる菌としては GIORN (1894)⁽¹⁾, HUSSONG 及び HUMNER (1928)⁽²⁾, DEMETER (1931)⁽³⁾, HOROWITZ-WLASSOWA (1932)⁽⁴⁾, WERKMANN 及び ANDERSEN (1938)⁽⁶⁾, PETERSON (1940)⁽⁵⁾, RENCO (1942)⁽⁷⁾, GORDON (1949)⁽⁸⁾ 等の記載がある。これらの多くは記載が余り完全でないが、所謂乳酸菌と見なされているものもあれば、単なる有胞子菌として取りあつかわれているものもある。著者等は緑麦芽から糖類の醗酵性等に於て互に僅に異つた 19 株の耐熱性胞子を生産し、且つ Homo 醗酵的に乳酸をつくる桿菌を分離したので茲に報告する。これ等の菌は諸種の性質を総合すると、系統發生學的には *Lactobacillus* から *Bacillus*, 又は *Clostridium* の間の一段階を表わす存在とも考へられて興味深いばかりでなく、その耐熱性や保存性は質地應用上乳酸製造又は乳酸菌製劑製造等に於て、從來の菌に比して多くの利點があることと思われる。最近 BLAISTEN⁽¹¹⁾ は有胞子乳酸菌を用いて d-乳酸の製造を報じている。

菌の分離：平面培養を水寒天で覆つて半嫌氣的に行つた他は、*Lactobacillus delbrückii* 分離の常法に従つて行つた。試料は昭和22年11月の、大日本麥酒工場の緑麦芽を用いた。以下、主として Committee on Bacteriological Technic of the Society of American Bacteriologists の方法に従つて記載する。特に斷らない限り、培養温度は 40°C とする。

形態：' 兩端半球狀をなす眞直な桿菌で、液體培地中、固體培地上共に長連鎖をなすことは少い。包囊、衰退形は見られない。生活細胞の巾は 0.5~0.8 μ で、麥芽汁等の含糖培地では長さ 5 μ 前後の長桿菌となり、兩端にメチレン青に染まり易いくわ粒を現すが、酵母汁寒天等の無糖培地上では 3 μ 前後の短い形となり、くわ粒が消失する。含糖、無糖培養共に運動性を示さない。麥芽汁寒天の若い培養ではグラム陽性、抗酸染色陰性。

胞子は細胞の terminal 又は subterminal の位置に着生し、長さ 1.4~1.7 μ , 巾 1.0~1.2 μ の卵形で、胞子囊細胞はラケット型に膨れる。

培養的性質：炭酸石灰を加えた麥芽汁寒天平面培養では、炭酸石灰を溶解する小形聚落を作る。48°, 2日培養後の聚落は直径 3mm 以下、レンズ狀、星狀、等を呈し、白色或は汚白色である。同じ培地の寒天斜面には磁器様白色光澤を有するやゝ粘潤な生育を示し隆起する。同じく穿刺培養には孔に沿うて一樣に生育する。表面聚落も見られる。酵母水と葡萄糖を添加したゼラチン穿刺では、孔に沿うて貧弱に生育し、液化せず、色素を生産しない。肉汁寒天斜面には汚白色濕潤平滑な聚落を作るが、含糖培地にくらべると生育が悪い。

酵母汁-ペプトン-寒天斜面の生育は肉汁寒天よりやゝ良い。麥芽汁等の含糖培地を強く溷濁して 24 時間後に pH を 4.4~4.0 に下げ、數日後に清澄となる。菌膜は作らないが器壁に菌環を作る。酵母汁-ペプトン水は長期に亘つて弱く溷濁し極めて軽度の表面生育を行うが、少し動揺すると下方に擴散してしまう。pH の變化はない。

生理的性質 25~50° の間で生育生酸し、60° では生育せず 40~50° で生育が最も旺盛である。最初の pH が 4.3~9.5 の間であれば生育する。4.0 以下では生育しない。

インドール、色素、アムモニア、硫化水素を生成せず、亞硝酸を分解せず、硝酸を還元し、カタラーゼ反應を呈する。これらの試験には葡萄糖を加えた酵母水を用いたのであるが、特にカタラーゼ反應と硝酸還元性は、沈降炭酸石灰を加えて緩衝してやらないと結果が異なる。VOGES-PROSKAUER 試験は僅かに陽性である。

麥芽汁からガスを發生しない。牛乳を 1~4 日後に酸變、凝固し、リトマスを脱色するが、カゼインをペプトン化しない。最終 pH は 4.4~4.0 である。6 株についてしらべたところ、Glucose, Levulose, Galactose, Arabinose, Xylose, Trehalose, Maltose, Sucrose, Dextrin, Mannitol からはすべて生酸し、Rham-

nose, Sorbitol, Glycerol, Starch には作用する菌株としない菌株がある。Inulin はどの菌株にも作用されない。可溶性澱粉からの生酸性とヨード反應の消失とは必ずしも並行しない。それは菌によるアミラーゼの特性と思われる。

醗酵試験 8株について葡萄糖醗酵試験を試みた結果、右旋性乳酸を生成する Homo-fermentor なることがわかった。培地は武田製ポリペプトン 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.02%, 粗製葡萄糖 10%, CaCO_3 11% を、10% 酵母水に加えたもの 300 cc, 容器は 500cc 三角瓶, 接種は 24 時間の麦芽汁培養 5 cc, 培養は 48° 7日間である。残糖はペルトラン法, 總酸は培地中の Ca の定量により, 揮發酸は硫酸酸性液の水蒸気蒸溜によつて定量し, 蒸溜残渣のエーテル浸出物中に琥珀酸がないことを確めて, 不揮發酸を乳酸, 揮發酸を醋酸として算出した。(Table 1 参照)

Table 1. Fermentation Products

Strains	Residual glucose	Volatile acid (as acetic)	Non-volatile acid (as lactic)	Lactic acid (Glucose consumed) $\times 100$	Analysis of Zn-lactate	
					H ₂ O	ZnO
P-8	0.60%	0.60%	5.41%	80.9%	13.14%	28.51%
P-10	1.26	0.61	5.46	88.9	13.22	28.70
P-11	0.76	0.66	5.94	92.3	13.51	28.85
P-12	0.82	0.69	6.21	95.8	13.43	28.92
P-13	0.60	0.71	6.47	96.5	13.04	29.00
P-14	0.31	0.69	6.29	90.0	13.65	28.76
P-15	0.30	0.73	6.59	94.2	13.38	28.90
P-17	0.17	0.73	6.61	92.6	12.96	29.07

孢子形成條件: HOROWITZ-WLASSOWA の菌は葡萄糖が缺乏せねば孢子を形成せず, HUSSONG 等の菌は寒天では孢子を作るが, 牛乳中では作らないことが報告されている。著者等の菌は, 麦芽汁, 麵液, 2% 葡萄糖を加えた酵母汁及びそれらに寒天を加えた培地の上では孢子を形成しない。水寒天, 石膏塊上でも作らない。酵母, 牛肉, 糖, 麴, 馬鈴薯, 玉蜀黍, 大豆, 枯草, 土壤, 人蔘の煎汁に寒天を加えた培地の上では孢子を作る。以上のことから, 孢子形成の條件としては水分, 温度, 前培養の條件の他に, 通氣度, 窒素源及び無機イオン, 炭素源及びそれが直接關係を持つ pH 等が考えられる。

以下の實驗に於いて, 培養温度は 40°, 特に斷らない限り培地は 2% の寒天を加えた斜面, Inoculum は P-8 菌の 24~48 時間の白麴麦芽汁寒天斜面培養の殺菌水懸濁液とする。生活細胞をカルボールフクシンで軽く染色して孢子の檢出を行つた。

(イ) 通氣度の影響 酵母水寒天斜面上では 24 時間後に半数以上が孢子を着生したが, 同じものを水銀柱 20 mm 以下の減壓下に置いたもの, 大氣壓下に穿刺培養したもの, 10 mm の深さの液體培養では 72 時間後にも孢子を着生せず, 2 mm の液層にして濕室で培養したものでは, 3 日後に極く僅に孢子を着生した。以上の結果から本菌は好氣的な條件のもとで孢子を生成するものと結論する。

(ロ) pH の影響 酵母水寒天の pH を磷酸と NaOH で加減して培養し, 44 時間及び 92 時間後に檢鏡した。pH 7.0 及び 7.5 のものは孢子形成も遊離も早く, pH が 5.0 に下がるといずれもおくれる。pH が 4.4 以下

Table 2. Influence of Initial pH upon the Formation of Spores (P-8)

	After 44 hours				After 92 hours			
	4.4	5.0	7.0	7.5	4.4	5.0	7.0	7.5
Initial pH	4.4	5.0	7.0	7.5	4.4	5.0	7.0	7.5
Final pH	4.4	5.0	6.0	6.0	4.4	5.0	6.0	6.0
Growth	—	±	±	±	—	±	+	+
Ratio of spore formation	0/0	0/1000	1/5	1/5	0/0	1/60	1/2.5	1/1.5
Naked spore ratio	0/0	0/0	1/1.5	1/1.1	0/0	0/50	9/10	19/20

になると全く胞子を形成しない。(Table 2 参照)

(ハ) 葡萄糖濃度の影響 酵母水寒天に結晶葡萄糖を加えて試験したところ、0.5 % 以下の時は 44 時間後の pH が 4.6 以上に留まり、胞子を生じたが、1.0 % 以上の場合は pH が 4.2 となり、生じなかつた。

(Table 3 参照)

Table 3. Influence of the Concentration of Glucose upon the Spore Formation (P-8)

	After 40 hours					After 92 hours				
Glucose	5.0	1.0	0.5	0.25	0.1	5.0	1.0	0.5	0.25	0.1
Final pH	5.4	4.2	4.6	5.4	5.4	5.4	4.2	4.6	5.4	5.4
Growth	—	+	±	±	±	—	+	+	+	+
Ratio of spore formation	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000	0/1000	1/10	1/50	1/1.5
Naked spore ratio	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/50	0/20	0/50

(ニ) 醗酵性炭素源の影響 酵母水寒天に 2 % の糖類を加えて接種培養したところ、2 日後に pH を 4.4 以下に下げる炭素源の場合は胞子を生ぜず、4.6 以上の場合は生じた。(Table 4 参照)

Table 4. Influence of Carbon Sources upon the Spore Formation

	Strains	Ratio of spore form.			pH		Strains	Ratio of spore form.		pH
		after 24 hours	after 48 hours					after 24 hours	after 48 hours	
Lactose	P-17	0	1/100	4.8		Starch	P-17	1/100	1/1	5.6
Sucrose	"	1/10	1/10	5.4		"	P-8	0	1/100	5.6
Maltose	"	0	0	4.4		"	P-12	1/2	1/2	5.6
Levulose	"	0	0	4.2		"	P-13	0	1/100	5.0
Galactose	"	0	0	4.0		Glycerol	P-17	0	0	4.4
Xylose	"	0	0	4.4		"	P-12	1/50	0	4.4
Trehalose	"	0	0	4.0		Sorbit	P-17	1/100	1/1	6.8
Inulin	"	1/50	1/20	7.0		"	P-8	0	1/200	4.4
Dextrin	"	1/100	1/50	5.6		"	P-11	1/100	0	4.4
Mannit	"	0	0	4.2						

胞子の性質： P-8 菌の酵母水寒天上の胞子を pH 7 の *M*.15 磷酸緩衝液中に 10,000,000/cc に懸濁したものは 100°, 20 分間の加熱⁽¹²⁾に耐えた。又別に CaCO_3 を添加した麦芽汁寒天斜面に 48 時間培養した菌は同じ条件に 5 分間耐えた。この場合鏡検では生活細胞のみしか認められず、その異常な耐熱性が顕微鏡的には生活細胞と區別出来ない胞子様細胞によるものか、極めて稀に混在する胞子によるものか興味ある事實である。殺菌水で 2 回遠心洗滌した胞子を麦芽汁、酵母汁、pH 4.6~5.6 の稀鹽酸、pH 7.6~9.6 の苛性ソーダ液、5, 10, 20 % の食鹽水、2.5 % 硼酸水、蒸留水中に懸濁して 37° に培養するときは 10 時間以内に端發芽する。10 % 炭酸ソーダ液、pH 3.6 以下の稀鹽酸中では殆ど發芽しない。水銀柱 20 mm 以下の減壓下でも麦芽汁中で發芽、生酸する。

概 要 緑麦芽からホモ乳酸醗酵により *d*-乳酸を 95 % まで生産する有胞子桿菌 8 株を分離し、その形態生理的に胞子生産の條件を研究した。これ等の菌株は糖類の醗酵性で互に多少ずつ相異なるほかは同一の性質を示し、既知の菌では WERKMAN 等又は HOROWITZ-WLASSOWA の菌とそれらの記載の範囲内では比較的似ている。これ等の菌の分類上の所屬については未だ詳細に論ぜられていないが、耐熱性の胞子を生産する桿菌であるから、當然 *Bacillaceae* FISCHER (*Jahrb. wiss. Bot.*, 27, 139, 1895 ; Bergey's Manual, 1948) 中の一屬として従來の乳酸菌類 *Lactobacteriaceae* ORLA-JENSEN (ORLA-JENSEN : *J. Bact.*, 6, 271, 1921) の外に乳酸生成菌としての一 NEW 分野を開くものと見られる。然しながら、従來胞子生産の知られなかつた球菌や *Vibrio* もその生産が報せられてゐる點 (GIBSON, 1935 ; STARKEY, 1938) などを考え合せて、これ等の菌を

Table 5. Spore-bearing Lactic Acid Formers.

Organisms	<i>Bacillus calfactor</i>	<i>Bacillus calidolactis</i>	<i>Lactobacil. sporogenes</i>	WERKMAN's organisms	The author's <i>Bacilli</i> .
Form	0.7~0.8 ×2.8~3.2	0.7~1.4 ×2.6~5.0	0.6×3~5		0.5~0.8 ×2.5~7.0
Motility	+	—	+		—
Spores	terminal	terminal or subterminal	terminal		terminal or subterminal
Surface growth	+	+		+	+
Growth temperature	30~60	45~75	50	45~50	55~50
Catalase	+			+	+
Reduction of Nitrates	+	—		+	+
SH ₂ -production	+	—			—
Indole production	+	—			—
CO ₂ -production	+	—	—	—	—
Acid from Lactose	—	+	+		+
" " Arabinose	—		+		+
Lactic acid		d		d	d
Authors	DEMETER	HUSSONG HAMNER	HOROWITZ- WLISSOWA	WERKMANN ANDERSEN	NAKAYAMA SAKAGUCHI

假に乳酸菌類に屬せしめて類縁を求むれば、Catalase 陽性、硝酸鹽を還元し表面發育を營み、グラム陽性、瓦斯を生ぜず、運動性のない點は *Microbacterium ORLA-JENSEN* によく一致するが菌形の大きな點、50° 附近によく生える點、又胞子をつくる點で著しく異なる。又北原博士の所謂 Wild-Lactobacillus とは（北原：乳酸菌、灘酒研究會、昭.25）好溫性に於て、又 d-乳酸をつくること等で一致するが、胞子をつくる點等で異なるのである。従つて乳酸菌類に屬せしめるとすれば、やはり一新種は勿論一新屬をも設けなければならぬことは明かである。

附記：本報は昭和24年4月日本農學會大會で講演したのであるが、その後著者等の研究室の天羽氏は腐敗罐詰から、大阪大學産業科學研究所原田氏は綠麥芽から類似菌を分離し、著者の一人中山は從來主としてデルブリュッキ型菌として保存された菌 10 株に胞子生産を認め、又山羊乳、山羊糞、麩、草葉等からも分離する等本菌の分布は相當廣いことが知られる。終に臨み京大片桐、北原兩教授の貴重なる御助言と阪大原田講師の寫眞版についての御助力に深甚なる謝意を表する。

Fig. 1. Spores of the strain P-17 on bran extract agar (×660)

- (1) GIORN *Sec. Ital. d. Igiene*, 16, 5 (1894)
- (2) HUSSONG and HAMNER : *J. Bact.*, 15, 186 (1928)
- (3) DEMETER *Zent. f. Bakt.*, II, 82, 71 (1931)
- (4) L. M. HOROWITZ-WLISSOWA : *Zent. f. Bakt.* II, 82, 331 (1931)
- (5) C. H. WERKMANN and A. A. ANDERSON *J. Bact.*, 35, 69 (1938)
- (6) S. C. PAN W. H. PETERSON, and, M. J. JOHNSON : *Ind. Eng. Chem.*, 32, 709 (1940)
- (7) RENCO *Annal of microbiology*, 2, 3 (1942)
- (8) R. E. GORDON and N. R. SMITH : *J. Bact.*, 58, 3, 327 (1949)
- (9) BERGEY : *Manual of determinative bacteriology*. (1948)
- (10) 天羽幹夫, 坂口謹一郎 : 罐壘詰時報, 28, 5, 63 (1949)
- (11) S. B. LEE : *Ind. Eng. Chem.*, 41, 1868 (1949)

Summary

Eight strains of aerobic, thermophilic, and spore-forming bacilli, which produce *d*-lactic acid up to 95% of sugar consumed, have been isolated from green malts, wheat bran and soil. They are identical with *Microbacterium* ORLA-JENSEN in those characteristics such as decomposing hydrogen peroxide, reduction of nitrates, positive GRAM stain as well as a vigorous surface growth, but differ markedly in their thermophilic property and the formation of typical thermo-resistant endospores. They also stand apart from ordinary spore-forming rods in the ability of abundant formation of lactic acid. From the phylogenetic point of view, they might possibly be regarded as an intermediate form between *Lactobacetriaceae* ORLA-JENSEN and *Bacillaceae* FISCHER (1895).

The characteristics of the organism are as follows : *Spores* Oval, terminal or sub-terminal, 0.8~1.2 by 1.4~1.7 microns. Killed in 20 min. at 100°C. Formed on yeast-, meat-, rice bran-, wheat bran-, potato-, corn-, soy bean-, or carrot extract agar, but not formed on bouillon agar added with more than 1% of glucose, where the pH value turns to lower than 4.5. *Sporangia* sometimes swollen at poles. *Rods* 0.4~0.8 by 3~6 microns with rounded ends, occurring singly, in pairs, or in short chains, showing bipolar staining with methylene blue, GRAM-positive. Non acid-fast. *Agar colonies* Circular, convex, white and entire (wort). *Glucose gelatine stab* : Surface growth white and raised, poor filiform growth along line of stab. No liquefaction. *Wort* : Turbid heavily showing "silky waves", flocculent sediments. Ring on the wall in old cultures. *Milk* : Coagulated, acid, litmus reduced. *Catalase* : positive. *Nitrates* reduced. *Voges-Proskauer* positive. *Indole* and SH₂ not formed. No gas produced from carbohydrates. *d*-Lactic acid produced from glucose in homo fermentative way. Acid from glucose, levulose, galactose, arabinose, trehalose, lactose, maltose, sucrose, dextrin and mannitol. No acid from inulin. Amylase present in most strains. Growth at 20°C, abundant at 37° and 50°. No growth at 60°. Aerobic, facultative.

有 胞 子 乳 酸 菌 の 分 離

花 岡 明, 原 田 篤 也 (大阪大學産業科學研究所)

昭和 24 年 12 年 月 17 日 受 理

Isolation of Spore-Forming Lactic Acid Bacteria.

By Akira HANAOKA and Tokuya HARADA (Inst. of Sci. and Ind. Research, Osaka Univ.)

緒 言 工業的に乳酸を得るには培養基に中和剤として炭酸石灰を添加する。かゝる中和剤を用いても醗酵後の pH は 5~6 と酸性に傾くのが通例である。又工業的に使用可能な強力乳酸醗酵菌は中和剤無添加の場合にも乳酸を多量に生産し、酸度を高め pH を酸性側に強く低下する。かゝる見地からすれば強力乳酸醗酵菌は乳酸に対する抵抗性が他の乳酸生産力の乏しい乳酸菌に比して大なるものと考えられる。

片桐, 北原氏⁽¹⁾は酒母より分離した乳酸菌を連鎖球菌と桿状菌とに分け、前者は一般に後者に比して乳酸生産力が大である事を示したが、緩衝液を用いた種々の pH に對する繁殖力を檢すると、既に存在する酸度に對する抵抗性(繁殖)の差異は認められないので、その結論として乳酸の最高生産力に關する兩種の菌種間の差異は、菌體自體(直接若くは間接に)の生産する酸に對する抵抗性の強弱に基くものであらうと述べた。

乳酸の用途が廣くなり、その工業化の益々擴大されている現在、強力乳酸醗酵菌分離の企ては各所でなされてゐる。然しながらその分離法は從來の炭酸石灰添加扁平培養法と熱淘汰法とを混じた方法であつて、強力な乳酸