乳酸菌の栄養に関する研究 (第 3 報)*

乳酸菌の一株 No. 353 の栄養について (その 3)

児 玉 礼 次 郎 (財団法人醸酵研究所)

昭和 31 年 6 月 9 日 受 理

緒 言

著者はさきに乳酸菌の一株 No. 353 が従来知られていない特殊な栄養要求性を有すること、すなわちその生育にニコチン酸アミドを必須生長素として特異的に要求するだけでなく、迅速な、かつ豊富な生育をとげるためにはフラクトースをも必須的 C 給源として要求する事実について述べた^(1,2)。それらの実験により本菌株が完全合成培地に培養され得るに至つたが、前報⁽¹⁾にも既に提示したようにこれを適当な条件の下で利用するならば、従来なし得なかつたニコチン酸アミドの微生物学的直接定量が可能であると考えられる。一方既知乳酸菌と比較して特殊な栄養条件を必要とする本菌株の分類学的地位を明確にする必要も感じられるところである。しかし乳酸菌においては菌種とその栄養、特に生長素にたいする要求性との間には密接な関係のある場合が多く、既に ROGOSA⁽³⁾ 等は oral lactobacilli の菌種鑑別に際しその標識の 1 つとして “nutritional pattern” を掲げている。

著者は今回ニコチン酸アミドの微生物学的直接定量法を確立するに当つて検索するべき条件の 1 つである合成培地の組成設定を第 1 の目的とし、分類学的地位を明確にするための標識の 1 つとなすを第 2 の目的として No. 353 株の栄養要求性を検討した。

実 験 の 部

I. 実験方法

a. 使用菌株の保存 No. 353 株を (0.5% 酵母エキスを 0.5% ペプトン + 2% グルコース + 40% トマトジュース + 炭酸カルシウム) の寒天培地に刺穿培養して 20 日毎に植えつぎ、低温室 (10°) 中に保存する。

b. 基礎培地: 標準合成培地 II (SSM-II⁽²⁾) からグルコースを除き、C 給源として新たにフラクトースを 100mg/5cc の割合に加えた培地を基礎培地とした。但しカゼイン加水分解物としては従来の自家調製品を Bacto Vitamin Free Casamino Acids (Difco) に代え、その使用適量を検討したのち、これを 25 mg/5 cc の割合に用いた。以下この培地を標準合成培地 III (SSM-III と略記する) と呼ぶ。使用に際しては SSM-III から特定の被検栄養素を除いた 2 倍濃度の培地を作成し、これに被検栄養素を添加した場合と添加しない場合とについて菌の生育量を比較した。

c. 培養: 菌の培養には内径 15 mm の試験管を用い、各管に 5 cc ずつの培地を分注し、10 lbs, 10 分間殺菌した。接種菌は予め 5 cc の SSM-III に 40 時間培養し、無菌的に遠心分離して菌体を集め、2 回水洗後これを 5 cc の生理食塩水に懸濁する。これを 100 倍に稀釈し (“light inoculum” に当る)、その 1 滴を接種した。

d. 生育量の測定: 36° に 48 時間培養したのち、Coleman 分光光度計 (波長 650 mμ) によつて菌の生育量を比濁的に測定し、接種した管の読みと接種しない対照の読みとの差を吸光度として表わした (3 本の平均値)。

II. ビタミン要求性

No. 353 株のビタミン要求性は第 1 表に示す通りである。

(a) B₁: 第 1 表から明かなように B₁ は No. 353 株の必須生長素である。この場合 B₁ にたいする要求性は 4-methyl-5-(β-hydroxyethyl) thiazole またはコカルボキシラーゼによつて代替され、これらが等活性を示すに要する重量比は、チアゾール・HCl: B₁・HCl: コカルボキシラーゼ・HCl・H₂O = 280: 1: 1.4 である (第 1 図)。つまりコカルボキシラーゼは B₁ と分子量的にはほぼ等量に利用されるが、チアゾールの活性は極めて劣弱で B₁ の 1/500 程度に過ぎない。これらの結果から見て本菌株は B₁ を合成成するに当りチアゾール成分を合成し得ないと考えられる。次に 2, 3 の B₁ 類縁化合物の活性を比較検討したが、その結果は第 2 表から見ら

* Studies on the Nutrition of Lactic Acid Bacteria. Part III. On the Nutrition of a Strain, No. 353, of Lactic Acid Bacteria (3).

By Reijiro KODAMA (Institute for Fermentation, Osaka)

第 1 表 No. 353 株のビタミン要求性

培地ならびにビタミン添加量/5cc	48時間培養後の吸光度
培地 a	0.007
" + B ₁ ・HCl 5γ	0.323
培地 b	0
" + リボフラビン 5γ	0.323
培地 c	0
" + パントテン酸カルシウム 5γ	0.323
培地 d	0
" + ニコチン酸アミド 5γ	0.323
培地 e	0.284
" + ピリドキシン・HCl 10γ	0.330
" + ピリドキサル HCl 10γ	0.335
" + ピリドキサミン・2HCl 10γ	0.340
" + dl-アラニン 1 mg	0.335
培地 f	0.148
" + p-アミノ安息香酸 2.5γ	0.135
" + 葉酸 2.5γ	0.301
培地 g	0.331
" + B ₁₂ 0.001 γ	0.344

上表中 培地 a: SSM-III から B₁・HCl だけを除いた培地
 " b: " リボフラビン "
 " c: " パントテン酸カルシウム "
 " d: " ニコチン酸アミド "
 " e: 3 つの型の B₆ および dl-アラニンを除いた培地
 " f: p-アミノ安息香酸と葉酸とを除いた培地
 " g: B₁₂ だけを除いた培地

第 1 図 チアゾール, B₁ およびコカルボキシラーゼの活性の比較I, B₁・HCl; II, コカルボキシラーゼ・HCl・H₂O; III, チアゾール・HCl

アラニンによつて代替される。また 3 つの型の B₆ の促進効果は同等で特異性を示さない。

(d) p-アミノ安息香酸, 葉酸および B₁₂: 第 1 表から見られるように p-アミノ安息香酸および B₁₂ は本菌株の生育には要求されないが, 葉酸は明かに生育を促進する。

第 2 表 B₁ 関係化合物の活性

B ₁ 関係化合物	活性(%)
B ₁ ・HCl	100
3-(2'-methyl-4'-amino-pyrimidyl-5')-methyl-4,5-dimethylthiazolium bromide・HCl	0
3-(2'-methyl-4'-amino-pyrimidyl-5')-methyl-4-methylthiazolium chloride・HCl	0
3-(2'-methyl-4'-amino-pyrimidyl-5')-methyl-4-methyl-5-ethylthiazolium chloride・HCl	0.05~0.02
B ₁ monophosphate	50~70

れるように B₁ monophosphate だけが分子量的に B₁ の 50~70% の活性を示したに過ぎなかつた。すなわち, 供試した B₁ 類縁化合物の数が少ないという憾みはあるが, 実験範囲内においては本菌にたいして B₁ にまさる活性を有する化合物はない。

一方 FANG⁽⁴⁾ 等は *L. fermenti* 36 の B₁ 要求性がアスコルビン酸によつて一部代替されることを報じている。著者はこれを No. 353 株について検討してみたところ, 第 3 表から見られるように, 対照菌 *L. fermenti* 36 においては僅かながらそれが認められたのに反し, No. 353 株ではそれが全く認められなかつた。

(b) リボフラビン, パントテン酸およびニコチン酸アミド: ニコチン酸アミドが No. 353 株の特異的な必須生長素であることについてはこれをしばしば述べたが, リボフラビンおよびパントテン酸も本菌の生育には必須に要求される (第 1 表)。

(c) B₆ 群 3 つの型の B₆ は菌種によつてその活性度合を異にする場合があり, すなわち *L. casei*^(5,6) にたいしてはピリドキサルだけが, また *Strep. faecalis R* にはピリドキサルおよびピリドキサミンが高度に生育を促進し, *Sacch. carlsbergensis* 4228^(7,8) には 3 つの型の B₆ が同等に有効である。著者はこの関係を調べるため, B₆ 群およびこれと密接に相關する dl-アラニン^(9~11) を除いた培地を供試して No. 353 株の生育を検討したところ, 第 1 表から見られるように B₆ 群ビタミンは本菌の生育に不可欠には要求されないが僅かながらその生育を促進し, かつこの促進作用は dl-

第 3 表 No. 353 株の生育に及ぼすアスコルビン酸の影響

添加化合物/5cc	吸光度	
	<i>L. fermenti</i> 36 (培養17時間)	No. 353 株 (培養64時間)
対照培地* (無添加)	0.012	0.013
" + B ₁ ・HCl 0.01 γ	0.053	0.101
" + B ₁ ・HCl 0.005 γ	0.048	0.068
" + アスコルビン酸 1 mg	0.023	0.015
" + B ₁ ・HCl 0.01 γ	0.062	0.090
" + アスコルビン酸 1 mg		
" + B ₁ ・HCl 0.005 γ	0.060	0.050
" + アスコルビン酸 1 mg		

* No. 353 株には SSM-III から B₁・HCl とアスコルビン酸とを除いた培地を用い, *L. fermenti* 36 にはさらにフラクトースを等量のグルコースに, ニコチン酸アミドを等量のニコチン酸に代替した培地を用いた。

第 4 a 表 No. 353 株のビオチン要求性 その 1

添加化合物/5 cc	48時間培養後の吸光度
(1) 培地 h*	0.004
(2) (1)+アスパラギン酸(Aa.) 1 mg	0.070
(3) (1)+アスパラギン(Apg.) 1 mg	0.104
(4) (1)+ビオチン(B.) 0.025 γ	0.007
(5) (1)+Tween 80 (T.) 5 mg	0.007
(6) (1)+酢酸ソーダ(Naa.) 30 mg	0.002
(7) (1)+Aa. 1 mg+Apg. 1 mg	0.112
(8) (1)+Aa. 1 mg+B. 0.025 γ	0.185
(9) (1)+Aa. 1 mg+T. 5 mg	0.280
(10) (1)+Aa. 1 mg+Naa. 30 mg	0.085

* SSM-III からカゼイン加水分解物、L-トリプトファン、L-システイン、DL-アラニン、ビオチン、Tween 80 およびアスパラギンを除いた培地に、新たにアスパラギン酸を除く他の 17 種のアミノ酸 (第 7 表所載) を補添した培地。

第 5 表 No. 353 株のビタミン要求量

ビタ	要求性	菌の生育量が ビタミン量に より最も鋭敏 に制約をうける 濃度 γ/5cc	菌の生育量が 最大に達 する濃度 γ/5cc
B ₁ ・HCl	必須	0~0.05	0.1~0.5
リボフラビン	必須	0~0.10	0.1~0.5
パントテン酸カルシウム	必須	0~0.10	0.1~0.25
ニコチン酸アミド	必須	0~0.25	0.5~1.0
ビオチン	促進		0.0025~ 0.005
B ₆ 群	促進		0.1~0.25 (ピリドキサル・ HCl として)
葉酸	促進		0.01~ 0.025
p-アミノ安息香酸	不要		
B ₁₂	不要		

第 4 b 表 No. 353 株のビオチン要求性 その 2

添加化合物/5 cc	48時間培養後の吸光度
(1) 培地 h+Aa. 1 mg	0.050
(2) (1)+Apg. 1 mg+B. 0.025 γ +T. 5 mg	0.280
(3) (1)+Apg. 1 mg+B. 0.025 γ +Naa. 30 mg	0.238
(4) (1)+B. 0.025 γ+T. 5 mg +Naa. 30 mg	0.255
(5) (1)+Apg. 1 mg+T. 5 mg +Naa. 30 mg	0.272
(6) (1)+Apg. 1 mg+T. 5 mg +Naa. 30 mg+B. 0.025 γ	0.282

第 6 表 No. 353 株のプリンおよびピリミジン
要求性

添加したプリンまたはピリミジン	添加量 γ/5 cc	48時間培養後の吸光度
培地 i*(無添加)		0.004
" + アデニン硫酸塩(A.)	25	0.162
" + グアニン塩酸塩(G.)	25	0.184
" + キサンチン(X.)	25	0.217
" + ヒポキサンチン	25	0.288
" + ウラシル(U.)	25	0.002
培地 i+A.+G.+X.	各 100	0.291
" +A.+G.+X.+U.	各 100	0.424

* SSM-III からプリン及びピリミジンを除いた培地。

(e) ビオチン : ビオチンが不飽和脂肪酸^(12~14) およびアスパラギン酸^(15~17) の生成に関与することは既に周知の事実であるが、最近 BROQUIST⁽¹⁸⁾ 等はさらに *L. arabinosus* においては酢酸の生成にも間接に関与していることを論じている。一方ビオチンの存在下においてもなおオレイン酸をその生育に必須的に要求する乳酸菌⁽¹⁹⁾もあり、十分な生育をとげるためにはこの両者を同時に必要とする場合⁽²⁰⁾もある。著者はこれらの関係を No. 353 株について検討した。なおこの場合、予め培養試験を実施して、SSM-III の N 給源 (カゼイン加水分解物、L-トリプトファン、L-システイン、DL-アラニンおよびアスパラギン) が第 7 表所載の 18 種のアミノ酸とアスパラギンとの混合物によつて完全に代替され得るという事実を確かめたので、本実験に際しては N 給源としてアミノ酸を用いた培地を供試した。その結果は第 4 a 表および第 4 b 表に示す通りである。すなわち、1) アスパラギン酸、アスパラギンのいずれか 1 つはビオチンの存否にかかわらず本菌の生育には必須的に要求され、2) ビオチンはアスパラギン酸またはアスパラギンの存在下では必須的には要求されないが、本菌の生育を促進し、3) Tween 80 はビオチンの生育促進活性を満足しているうえ、ビオチンの存在下においてもなお菌の生育を促進し、4) 酢酸ソーダの明確な促進作用は認められない。

(f) ビタミン要求量 : No. 353 株の必須および生育促進ビタミンにたいする要求量を検討し、その結果を一括して表示すれば第 5 表の通りである。

III. プリンおよびピリミジン要求性

No. 353 株はその生育にプリンを必須的に要求するが、ピリミジンを必須的には要求しない(第 6 表)。 *L. delbrückii* 9649⁽²¹⁾ がヒポキサンチンおよびウラシルを必須栄養素とする例の如く、菌種によつてはある特定のプリンまたはピリミジンをその生育に要求する場合があるが、No. 353 株の場合には化合物にたいする特異性は認められず、いずれか 1 種のプリンが存在すれば生育し得る。

次に SSM-III のプリンまたはピリミジンの給源として用いたアデニン硫酸塩、グアニン塩酸塩、キサンチンおよびウラシルの混液についてその使用適量を求めた結果、本菌は上記の 4 化合物が各 100 γ/5 cc ずつの割合に含有される場合に最大の生育量を示した。この際ウラシルは本菌の生育を促進する。

第 7 表 No. 353 株のアミノ酸要求性

除いたアミノ酸	供試量 mg/5cc	48時間培養 後の吸光度	除いたアミノ酸	供試量 mg/5cc	48時間培養 後の吸光度
l-アラニン	1	0.271	l-フェニルアラニン	1	0.244
l-アルギニン・HCl	1	0.001	l-プロリン	1	0.269
l-アスパラギン酸	1	0.006	dl-セリン*	2	0.137
l-システイン・HCl	1	0.203	l-トレオニン*	2	0.180
l-グルタミン酸	1	0.001	l-トリプトファン	1	0.043
グリシン	1	0.254	dl-チロシン	2	0.085
l-ヒスチジン・HCl	1	0.006	dl-バリン	2	0.005
dl-イソロイシン	2	0.003	18種のアミノ酸全部を除いた培地		0.005
l-ロイシン	1	0.166	18種のアミノ酸全部を含む培地		0.264
dl-リシン・HCl	2	0.170	18種のアミノ酸全部とアスパラギン 1mg とを含む培地		0.455
dl-メチオニン	2	0.166			

* 96 時間培養後の吸光度を測定した。

VI. アミノ酸要求性

SSM-III の N 給

源が 18 種のアミノ酸とアスパラギンとの混合物によつて完全に代替され得るといふ事実についてはビオチンの項で既にこれを述べた。そこで No. 353 株のアミノ酸にたいする要求

性を検討するに当つては N 給源としてアミノ酸を用いた培地を供試し、18 種全部を含む場合と各被検アミノ酸を個々に除いた場合とにおける菌の生育量を比較した。その結果は第 7 表に示す通りであつて、1) アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、イソロイシン、ヒスチジンおよびバリンは本菌の生育に必須に要求され、2) ロイシン、リシン、メチオニン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびシステインは生育を促進し、3) アラニン、グリシン、フェニルアラニンおよびプロリンは要求されない。また 4) 過剰のアスパラギン酸の存在においてもアスパラギンの添加は本菌の生育を著しく促進する。なおセリンまたはトレオニンを除いた培地では菌の生育は遅滞し、培養約 40 時間にして初めて生育を開始したが、その原因については検討を加えていない。

考 案

No. 353 株がニコチン酸アミドを特異的に必須生長素としてその生育に要求する事実を応用して、このビタミンをその類縁化合物と別別に微生物学的に直接定量する方法については後報に譲るが、一方適当な条件下では B₁ の微生物学的定量において、本菌が従来この目的に用い得ると報じられている *L. fermenti* 36⁽²²⁾ に優っているのではないかと考えられる。すなわち、1) No. 353 株の B₁ にたいする要求性はチアゾール成分によつて代替されるが、その場合チアゾールの活性が極めて低弱で B₁ の 1/500 程度に過ぎないこと、2) アスコルビン酸が“B₁ sparing action”を有しないこと、3) B₁ にたいする response curve が第 1 図に示したような形状をとることなどがその理由である。

次に ROGOSA 等⁽³⁾の提示した“nutritional pattern”と照合すると、No. 353 株のビタミン要求性は *L. buchneri* のそれに類似し、唯ニコチン酸またはニコチン酸アミドの利用性が相違しているに過ぎない。したがつて後報するところの分類学上の一般的諸性質を考慮することなく、単に“nutritional pattern”だけから判断する限り、No. 353 株は *L. buchneri* の一変異株とも見做される。

要 約

乳酸菌の一株 No. 353 の栄養要求性を検討して次の結果を得た。

- (1) B₁、リボフラビン、パントテン酸およびニコチン酸アミドは本菌株の生育に必須的に、B₆ 群、葉酸およびビオチンは促進的に要求される。
- (2) B₁ 要求性はチアゾール成分によつて代替されるが、その活性は低弱で B₁ の 1/500 程度に過ぎない。しかしコカルボキシラーゼは B₁ と分子量的にはほぼ等量の活性を示し、B₁ monophosphate は約 30% 低い。
- (3) Tween 80 はビオチンの存在下においてもなお生育を促進する。
- (4) プリンは必須的に要求されるが、その要求性は化合物に特異的でない。またピリミジンは必須的には要求されないが、ウラシルは生育を促進する。
- (5) アミノ酸にたいする要求性を決定した。

終りに臨み終始御指導を賜つた醸酵研究所長佐藤喜吉博士、主任研究員中沢鴻一氏ならびに有益な御助言を頂いた阿部又三博士に深謝する。

- (1) 児玉礼次郎 : 本誌, 30, 219 (1956).
- (2) 児玉礼次郎 : 本誌, 30, 224 (1956).
- (3) M. ROGOSA et al. : *J. Bacteriol.*, 65, 681 (1953).
- (4) S. C. FANG et al. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 617 (1953).
- (5) E. E. SNELL : *J. Biol. Chem.*, 157, 475 (1945).
- (6) J. C. RABINOWITZ et al. *ibid.*, 169, 643 (1947).
- (7) E. E. SNELL : *ibid.*, 157, 491 (1945).
- (8) W. S. MC NUTT et al. *ibid.*, 169, 631 (1947).
- (9) W. S. MC NUTT et al. : *ibid.*, 182, 557 (1950).
- (10) J. T. HOLDEN et al. *ibid.*, 178, 799 (1949).
- (11) J. T. HOLDEN et al. : *ibid.*, 178, 789 (1949).
- (12) W. L. WILLIAMS et al. *ibid.*, 170, 619 (1947).
- (13) R. L. POTTER et al. : *ibid.*, 172, 531 (1948).
- (14) V. R. WILLIAMS et al. : *ibid.*, 166, 335 (1946).
- (15) J. L. STOKES et al. : *J. Bacteriol.*, 54, 219 (1947).
- (16) H. A. LARDY et al. *J. Biol. Chem.*, 179, 721 (1949).
- (17) J. L. STOKES et al. : *ibid.*, 167, 613 (1947).
- (18) H. P. BROQUIST et al. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 46, 432 (1953).
- (19) A. R. WHITEHILL et al. *Arch. Biochem.*, 15, 31 (1947).
- (20) B. L. HUTCHINGS et al. : *J. Biol. Chem.*, 169, 229 (1947).
- (21) V. J. PETERS et al. *J. Bacteriol.*, 67, 69 (1954).
- (22) H. P. SARETT et al. *J. Biol. Chem.*, 155, 153 (1944).

乳酸菌の栄養に関する研究 (第 4 報)*

乳酸菌の一新種 *Lactobacillus fructosus* nov. sp. について

児 玉 礼 次 郎 (財団法人醸酵研究所)

昭和 31 年 6 月 9 日受理

緒 言

著者はさきに乳酸菌の一株 No. 353 がその必須生長素としてニコチン酸アミドを、迅速な、かつ豊富な生育をとげるためにはフラクトースを必須的に要求する事実について報告した^(1,2)。このような栄養上の特性を具備する菌株が分類学上如何なる地位を占めるものであるかは明かにされなければならないところである。本菌の栄養要求性については既に前報⁽³⁾でこれを明かにした。著者は今回分類学上の一般的な諸性質を検討し、これを既知の類似菌種と比較することにより、本菌が乳酸菌の一新種であることを認め、これを *Lactobacillus fructosus* nov. sp. と命名した。

実 験 な ら び に 結 果

I. 形態学的性質

a. 形状, 大きさ : SSM-III⁽³⁾ に 36°, 24 時間培養した場合, 本菌はグラム染色陽性, 多くは 0.5~0.8×2.0~10.0 μ の桿状もしくは彎曲した長桿状を呈し, 中には 15~20 μ に達する細胞も認められ, 単状または数個連鎖をなす。

b. その他の性質 : [0.5% 酵母エキス+0.5% ペプトン+2% グルコース+40% トマト・ジュース (pH 6.6)] 培地を基本培地として用いた場合, その寒天斜面に割線培養すると比較的良好に表面生育をなし, 一方刺穿培養すると刺穿溝に沿っても良く生育する。刺穿培養の際, 培地に炭酸カルシウムを混和しておくと, 炭酸カルシウムが上層部から溶解される現象が見られる。液体培養の場合には菌接種後 16 時間にして既に相当に混濁し, のち柔かな沈渣を生ずる。扁平培養した集落は深部では丸味を帯びた菱形, 楕円形, または円形を示すが表面部では寒天上に隆起し, 例外なく円形を示す。なお本菌は運動性を有せず, 孢子を形成しない。

* Studies on the Nutrition of Lactic Acid Bacteria. Part IV. *Lactobacillus fructosus* nov. sp., A New Species of Lactic Acid Bacteria.

By Reijiro KODAMA (Institute for Fermentation, Osaka)