乳酸菌の栄養に関する研究 (第7報)* *Lactobacillus fructosus* の炭水化物利用性 (その2)

児 玉 礼 次 郎 (財団法人醸酵研究所)

昭 和 32 年 3 月 7 日 受 理

緒 言

Lactobacillus fructosus はフラクトース (Fr) を唯一の C-給源として用いた培地に良好な生育をとげるが、さらにこの培地にグルコース (Gl) を添加すると菌の生育特に対数期における生育が著明に促進されるという事実については既に前報⁽¹⁾で述べた。ところが Fr を唯一の C-給源として用いる場合、使用する菌の状態によっては Fr を培地とともに加圧殺菌しないと菌の生育が全く起らないか、起っても著しく遅れるという事実が認められる。培地を加圧殺菌すると乳酸菌の生育が促進されるという事実は従来 Snell 等⁽²⁾, Smiley 等⁽³⁾, Orla-Jensen⁽⁴⁾ および Rogers⁽⁵⁾ 等によって認められている。これらの研究者はこの場合の菌の生育促進がピルビン酸、アセトアルデヒド、メチルグリオキサール、フルフラール、グリコールアルデヒド、アスコルビン酸、システインおよびグルコシルグリシンのいずれか1つの物質の添加によって代替し得られたことから、培地を加圧殺菌することによってできる Gl の分解生成物に基因するものであろうと推論した。しかし著者はアスコルビン酸とシステインとを含有する培地にピルビン酸、アセトアルデヒドあるいはフルフラールを添加しても上述のような加圧殺菌効果が現われないが、Gl を添加するとその効果が現われるという事実を認めた。本報では培地の加圧殺菌が *L. fructosus* の C-給源利用性に及ぼす影響並びにこれに関連した C-給源利用性について述べる。

実 験 の 部

I. 実験方法

- (a) 供試培地： 改変 Thompson 合成培地⁽⁷⁾の Gl を等量の Fr で、ニコチン酸を等量のニコチン酸アミドで代替した培地 (SSM-III) を用いた。
- (b) 供試菌株：*L. fructosus* strain 353.
- (c) 接種、培養および生育量の測定： 前報⁽¹⁾に準じた。

II. Fr の資化に及ぼす培地の加圧殺菌の影響

Fr を培地とともに 10 ポンド、10 分間加圧殺菌した場合と、Fr だけを別に蒸留水に溶解して同じ条件で加圧殺菌したのち培地に無菌的に添加した場合とでは菌の生育が明らかに異なる。その1例を示すと第1図の通りである。すなわち Fr を培地とともに加圧殺菌することによって lag が著しく短縮されることが判る。この際 Fr

第1図 フラクトースの加圧殺菌方法の相違による *L. fructosus* の生育の相違

曲線 I：フラクトースだけを蒸留水に溶解して 10 ポンド、10 分間加圧殺菌したのち培地に無菌的に添加した場合の生育。
 曲線 II：フラクトースを培地とともに 10 ポンド、10 分間加圧殺菌した場合の生育。

の蒸留水溶液を加圧殺菌して用いる代りに無菌濾過して用いてもそれと全く同様の関係が得られた。

(a) 培地の殺菌条件と菌の生育量との関係：培地の加圧殺菌が供試菌の生育に大きな影響を及ぼすことが判明した以上、その加熱の度合について綿密な検討を加えて見なければならない。そこで 5~15 ポンドの蒸気圧の下で 5~15 分間加熱した培地に菌を接種し、菌の生育状態を比較して見たところ第1表に示すような成績を得た。すなわち Fr を培地とともに加圧殺菌することによって生ずる生育促進の度合は培養初期 (培養 16 時間) では蒸気圧に比例しており、15 ポンドの場合に最大の生育量を得る。しかし培養後期 (培養 40 時間) では 10 ポンドの場合は 15 分以上、15 ポンドの場合は 10 分以上加熱するとかえって生育量

* Studies on the Nutrition of Lactic Acid Bacteria. Part VII. Carbohydrate Utilization of *Lactobacillus fructosus*. (2)

By Reijiro KODAMA (Institute for Fermentation, Osaka)

第 1 表 培地の加圧殺菌の蒸気圧および時間と菌の生育量との関係

蒸気圧 (ポンド)	加熱時間 (分)	吸 光 度		
		培養時間(時)		
		16	24	40
5	5	0.069	0.310	0.475
	10	0.086	0.320	0.455
	15	0.102	0.332	0.465
10	5	0.146	0.337	0.435
	10	0.200	0.356	0.455
	15	0.197	0.355	0.418
15	5	0.232	0.371	0.434
	10	0.227	0.332	0.385
	15	0.205	0.276	0.323
Fr を蒸溜水に溶解して 10 ポンド, 10 分間殺菌 したのち添加した時		生 育 しない	0.030	0.398

第 2 表 接種菌の前培養日数の影響

Fr の殺菌 方法	接種菌 の前培 養日数	吸 光 度			
		培養時間(時)			
		16	24	40	64
培地とともに 10 ポン ド, 10 分間 加圧殺菌	2	0.305	0.395	0.445	0.455
	7	0.240	0.375	0.445	0.470
	10	NG*	NG	0.335	0.455
	15	NG	NG	0.340	0.440
	21	NG	NG	0.368	0.450
Fr だけを 無菌濾過	2	0.050	0.383	0.477	0.530
	7	NG	0.027	0.405	0.480
	10	NG	NG	NG	NG
	15	NG	NG	NG	NG
	21	NG	NG	NG	NG

* 生育しない

が減少する。したがって供試培地の殺菌条件として 10 ポンドで 10 分, または 15 ポンドで 5 分が適当であって, これは Smiley⁽⁹⁾ 等の結果とほぼ一致している。

(b) 菌の前培養日数との関係: Fr を培地とともに加圧殺菌しないと *L. fructosus* の生育が遅れるか, あるいは全く生育しないという事実は接種菌の前培養日数と密接な関係がある。今 [0.5% 酵母エキス+0.5% ペプトン+2% Gl+40% トマト・ジュース] に炭酸カルシウムを混和した寒天斜面培地に 2~21 日間培養した菌体の懸濁液を前報⁽¹⁾と同様の方法で調製し, その 1 滴ずつを接種菌となして, Fr を 10 ポンド, 10 分間加圧殺菌した場合と無菌濾過して添加した場合とについて菌の生育経過を比較した結果を示すと第 2 表の通りである。すなわち本実験では前培養 2~7 日の菌は無菌濾過した Fr を用いた培地でも生育したが, 前培養 10 日以上菌は全く生育しなかった。しかし前培養 10 日以上菌でも Fr を培地とともに加圧殺菌した場合は lag は長い結局は生育した。

(c) Gl による加圧殺菌効果の代替: 従来培地の加圧殺菌が乳酸菌の生育を促進するという事実については (1) Snell 等⁽²⁾, Smiley 等⁽³⁾および Orla-Jensen⁽⁴⁾の研究における如くアセトアルデヒドまたはビルビン酸のような水素受容体になり得る物質の生成に基因すると考えられる場合, (2) Rabinowitz 等⁽⁶⁾の述べるような還元性物質の生成に基くと考えられる場合, および (3) Rogers 等⁽⁵⁾が *L. gayoni* について認めたように培地中にグルコシルグリシンのような特殊の栄養素が生成する場合の 3 様の原因が指摘されている。著者の実験に供試した培地はシステインおよびアスコルビン酸を含有しているから (2) の場合を考慮する必要は先ず無い。したがって差当り (1) の場合について検討を加えて見た。すなわち菌は, Fr を培地とともに加圧殺菌した場合には生育する (前記自然物培地の寒天斜面に 18 日間培養した菌体を接種菌として供試した) が, しかし Fr を無菌濾過して添加した培地には生育し得ない場合, この培地にさらにビルビン酸 (NaOH で中和して用いた), アセトアルデヒドあるいはフルフラールを添加することによって菌の生育がどんな影響をうけるかについて実験した。その結果は第 3 表に示す通りであって, これら 3 種の物質は *L. fructosus* の生育には何等の影響をも与えなかった。

第 3 表 糖の分解生成物の影響

C-給源および添加物 mg/tube (5 cc)	殺菌方法	吸 光 度		
		培養時間(時)		
		16	24	40
Fr 100	無菌濾過	NG*	NG	NG
" + ビルビン酸	1	NG	NG	NG
" + アセトアルデヒド	1	NG	NG	NG
" + フルフラール	1	NG	NG	NG
" + Gl 50	"	0.165	0.389	0.478
Fr 100 (対照)	培地とともに 10 ポンド, 10 分加圧殺菌	NG	0.035	0.358

* 生育しない

また第 3 表から知られるように, Fr と上記 3 種の物質との共存によっては菌が生育し得ない場合でも Fr を培地とともに加圧殺菌するかあるいは Fr と Gl とが共存すると菌は迅速, かつ豊富に生育し得, 特に後者の場合においてそれが顕著である。もっともこの際無菌濾過した Gl を唯一の C-給源として与えるだけでも本菌は生育するが, その生育量は極めて僅かに過ぎず, Fr をその迅速, かつ豊富な生育に必須的

第 4 表 Gl 添加量と生育開始時間との関係

C-給源 mg/tube (5 cc)	殺菌方法	吸 光 度					
		培 養 時 間 (時)					
		16	19	23	38	46	62
Fr 100	無菌濾過	NG*	NG	NG	NG	NG	NG
" + Gl 50	"	0.065	0.212	0.307	0.444	0.480	
" + Gl 20	"	0.025	0.160	0.254	0.415	0.440	
" + Gl 10	"	0.009	0.117	0.240	0.422	0.447	
" + Gl 5	"	NG	0.002	0.087	0.408	0.440	
" + Gl 2	"	NG	NG	0.005	0.370	0.410	0.442
Fr 100(対照)	培地とともに 10 ポンド, 10 分加圧殺菌	NG	NG	0.005	0.326	0.368	0.407

* 生育しない

第 5 表 Gl とグルコン酸との生育促進作用の比較

C-給源添加量 (無菌濾過して用いた) mg/5 cc			吸 光 度					
Fr	Gl	グルコン 酸ソーダ	前培養10日の菌を接種 菌として用いた場合			前培養18日の菌を接種 菌として用いた場合		
			培養時間(時)			培養時間(時)		
			24	40	64	20	48	
100			NG*	0.070	0.375	NG	NG	
100		2.5	NG	0.250	0.408	NG	NG	
100		5	NG	0.297	0.445	NG	NG	
100		10	NG	0.313	0.473	NG	NG	
100		20	NG	0.353	0.490	NG	NG	
100	50		0.232	0.483	0.515	0.100	0.490	

* 生育しない

10~50 mg/tube の割合に共存すると接種後 16 時間にして既にかかなりの生育が認められるが, Gl が 5 mg/tube に共存した培地では接種後 19 時間で, また Gl が 2 mg/tube に共存した場合および Fr を培地とともに加圧殺菌した場合には 23 時間で始めて生育を開始し, Gl が共存しない培地には全く生育しなかった. これらの結果は第 4 表に示す通りである.

III. Gl とグルコン酸との生育促進作用の相違点

L. fructosus は Fr を唯一の C-給源として含有する加圧殺菌培地に結局は良好な生育を遂げるが, この場合 Gl またはグルコン酸を添加すると菌の生育が促進されるという事実については既に前報⁽¹⁾で述べた. またこの際 Gl とグルコン酸とは生育促進作用の現われ方が異なること, すなわち Gl においては培養の初期に, グルコン酸においてはむしろ培養後期に現われるという事実をも指摘した. ところが上記の諸実験成績から無菌濾過した Fr を C-給源として用いても菌がこれを資化し得ず, したがって生育し得ない場合でも, この培地に Gl を添加するとその量に比例して迅速に豊富な生育を遂げることが判明した. そこで著者はグルコン酸にも Gl と同様に供試菌を生育させる活性があるかどうかを検討して見た. すなわち前培養 10 日の菌と 18 日のそれとを供試し, 無菌濾過した Fr の存在下における Gl またはグルコン酸の菌の生育にぼす影響を比較して見たところ第 5 表に示すような成績が得られた. 第 5 表から知られるように菌が Fr を唯一の C-給源として生育し得る状態では Gl もグルコン酸もともに供試菌の生育を明らかに促進するが, Fr だけでは菌が生育し得ないような状態では Gl は菌を生育させることができるが, グルコン酸は生育させ得ない.

考 察

L. fructosus はその前培養の日数によっては C-給源として Fr だけを含む培地に生育し得ない. そのような状態の菌も培地に Gl を添加するかまたは Fr を培地とともに加圧殺菌すると良好な生育を遂げ, 特に前者の場合においてそうである. Orla-Jensen 等⁽⁴⁾によれば含糖培地を加圧殺菌すると糖の 1 部が他の物質に分解または転移するが, その多くは Fr は Gl に, Gl は Fr にそれぞれ転移するという. 著者の実験において *L. fructosus* が Fr を資化し得ず, したがって全く生育し得ない場合でも, Fr を培地とともに加圧殺菌するか, または Gl を添加するとその両者が共軌的に菌を満足に生育させるという事実から見て, 培地の加圧殺菌の効果は Fr から転移した Gl に基因するものではないかと考えられる. したがってそのような状態では菌が迅速, かつ豊富に生育

に要求するという供試菌の特性には何等変りがない. これらの事実から Fr を培地とともに加圧殺菌することによって発現する生育促進作用が Gl によって代表されることは明らかであり, また前培養が長びくことによって無菌濾過した Fr を資化し得ない状態にある *L. fructosus* が満足な生育を遂げるためには Gl と Fr との両者を同時に必要とすることが帰結される.

(d) Gl 添加量と生育開始時間との関係: *L. fructosus* が Fr を唯一の C-給源として与えてもこれを資化し得ず, その迅速, かつ豊富な生育に Gl と Fr との共存を必要とする際, Gl の共存量が多い程菌の生育開始時期が早い. すなわち Fr 100 mg/tube (5 cc) の存在で Gl が

するためには Gl と Fr との両者を同時に必須的に要求するものであると帰結される。接種菌の前培養日数が短い時は良好な C-給源であるにも拘らず、これが長くなるとその C-給源だけでは全く生育し得ず、単独では極めて資化しにくい他の 1 種の糖を補添することによって始めて菌が満足な生育を遂げ得るという例、さらに加圧殺菌によってそれが代替されるという例はまだ無く、この点本菌種がその最初の例であると考えられる。*L. fructosus* が Fr にたいする資化性を喪失しても Gl にたいする資化性を保有する事実、また同様の条件の下で資化されない Fr と単独では僅かにしか資化されない Gl とが共存すると本菌が迅速、かつ豊富に生育し得る事実など、本菌の C-給源利用性は特異的であり、またこの事実は Fr の生理的意義の 1 つを暗示するものと考えられる。

要 約

L. fructosus はその前培養日数が短い時には無菌濾過したフラクトースを唯一の C-給源となして良好な生育を遂げることができるが、前培養日数が長くなると生育が遅れるか、または全く生育することができない。しかし前培養日数が長くてもフラクトースを培地とともに加圧殺菌するかまたはグルコースを添加すると満足な生育を遂げることができる。グルコースを添加する際はその添加量が多い程、生育を開始するに至る時間が短い。すなわち供試の菌は接種時の状態によっては迅速、かつ豊富な生育を遂げるためにフラクトースとグルコースとの両者を同時に必須的に要求する。グルコン酸も培地とともに加圧殺菌したフラクトースの存在下でグルコースと同様の生育促進作用を示すが、これはグルコースとは異って菌がフラクトースを資化し得る場合にだけ菌の生育促進作用を発現し、フラクトースを資化し得ない場合には *L. fructosus* に生育を開始させることはできない。

(1) 児玉礼次郎：本誌，31，105 (1957).	52，374 T (1933).
(2) E. E. Snell et al. : <i>Arch. Biochem.</i> , 18，495 (1948).	(5) D. Rogers et al. : <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , 82，140 (1953).
(3) K. L. Smiley et al. : <i>J. Bacteriol.</i> , 45，445 (1943).	(6) J. C. Rabinowitz et al. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 169，631 (1947).
(4) A. D. Orla-Jensen : <i>J. Soc. Chem. Ind.</i> ,	(7) 児玉礼次郎：本誌，30，219 (1956).

乳酸菌の栄養に関する研究 (第 8 報)*

Lactobacillus fructosus の炭水化物利用性 (その 3)

児玉礼次郎 (財団法人醸酵研究所)

昭和 32 年 3 月 7 日 受理

緒 言

Lactobacillus fructosus がフラクトース (Fr) を一方的に良く醗酵し、グルコース (Gl) を僅かに醗酵するだけで、その他の糖類を全く醗酵しない事実については既に前報⁽¹⁾でこれを述べた。Pederson⁽²⁾ はヘテロ型桿状乳酸菌のうち多種類の糖に対して資化性をもたない 1 群を "inactive group" として分類し、*L. mannitopoeus*, *L. fructivorans* などをこれに包括している。著者は Botanisches Institut (Geisenheim am Rhein) から *L. mannitopoeus* の分譲をうけ、その C-給源資化性を検討して見たところ、この菌株は Gl を資化しにくく、Fr を資化し易いという点で *L. fructosus* に類似していたが、同時にマルトースおよびキシロースをも良く資化するという点で *L. fructosus* とは異なるものであった。すなわち *L. fructosus* のように特定の 1 種の糖だけを良く資化し、従ってこれを必須的栄養素として生育に要求する乳酸菌は他にまだ知られていない。著者^(3,4) はさきに *L. fructosus* が迅速、かつ豊富な生育をとげるために遊離型の Fr を必須的に要求すること、およびこの生育が Gl の共存によって著明に促進されることを明らかにした。同時に接種菌の前培養日数によっては Fr を C-給源としただけでは生育し得ないが、しかしこの場合でもこれに Gl を添加すると両者の共軛的作用によって満足に生育し得るようになることを指摘した。これらの事実は *L. fructosus* にたいする Fr の生理的意義を暗示

* Studies on the Nutrition of Lactic Acid Bacteria. Part VIII. Carbohydrate Utilization of *Lactobacillus fructosus*. (3)

By Reijiro KODAMA (Institute for Fermentation, Osaka)