Pulp disc 法によるビタミン及びアミノ酸の微生物定量法 (第 5 報)*

ビタミン及びアミノ酸の迅速定量について

小嶋 尚 夫, 松 谷 豊 (東北大学農学部)

昭和 32 年 6 月 21 日 受 理

緒 言

既報⁽¹⁻⁴⁾においてビタミン並びにアミノ酸の微生物定量に Pulp disc 法の適用を試みたが、その成績から本法がビタミン及びアミノ酸の定量に適用しうる事を認め、Routine Work に適する種々の利点を持つことを指摘した。

本報では更に種々の条件のうち、特に接種菌量と生育帯の関係について、生育帯の発現からその後の変化の過程を追って詳細に観察し、より迅速に定量しうる条件を検討した結果を述べる。

尚、Morris 等⁽⁵⁾及び Simpson 等⁽⁶⁾もカップ法で 4~5 時間で測定可能なることを報告している。

実 験 方 法

(1) 定量を試みたビタミン及びアミノ酸と使用菌株 定量を試みたビタミンはニコチン酸、ピリドキシン、チアミンの 3 種であり、アミノ酸はリジン及びフェニールアラニンの 2 種である。夫々の定量には次の菌株を使用した。

(a) ビタミン

ビタミンの種類	使用菌株
ニコチン酸	<i>Lact. arabinosus</i> 17-5
ピリドキシン	<i>Sacch. carlsbergensis</i> ATCC 4228
チアミン	<i>Sacch. cerevisiae</i>

(b) アミノ酸

アミノ酸の種類	使用菌株
L-リジン	<i>Leuc. mesenteroides</i>
DL-フェニールアラニン	<i>Lact. arabinosus</i> 17-5

使用菌株の取り扱いはずべて第 1 報、第 3 報と同様に行った。

(2) 接種菌液 接種菌液は第 1 報の記載と同様に処理して調製し、接種菌液の濃度は前報同様に比色計により $-\log T$ を測定し、夫々記載した様な濃度のものを調製して使用した。

(3) 生育帯の観察 定量操作法その他は第 1 報で設定した方法に基づいて行ったが、接種後培養時間を追って生育帯の発現迄の時間並びにその後の生育帯の様子の変化を観察した。

実験成績並びに考察

I. 接種菌濃度と生育帯発現迄の時間 既に前報でも触れたが、接種の状態、即ち接種菌の生育時期又は接種菌量等によって生育帯発現迄に要する時間が異って来ると見られるから適当な条件を用いることによって定量を迅速に行い得る。ここでは供試したビタミン及びアミノ酸について生育帯発現迄の時間を各々の標準液系列について示し、その時間における生育帯の明確度又はその様相を附記した(第 1 表及び第 2 表)。接種菌はその生育時期によって生育帯発現時間に影響を与えるかもしれないが、乳酸菌では 15 時間前後、酵母は 1~2 日の対数期の菌を用いている。いずれも菌量を多くすることによって発現時の生育帯の明確度が高くなっているが、標準液の濃度によって差異を生じ、定量範囲からみれば最少有効濃度が高くなるから、前報で用いた標準液系列の最低濃度では生育帯が不鮮明になる場合がある。しかし接種菌濃度を高くすると、酵母によるピリドキシン、チアミン測定は 6~8 時間、ニコチン酸では 5 時間、リジンでは菌濃度によって差はあるが最短 3 時間、フェニールアラニンでは 4 時間で測定可能である。この際、一般に最少有効濃度が上り定量範囲が狭くなるが、その目的によっては従来の試験管法における比濁法の 20 時間、酸度滴定法の 72 時間に比して著しく迅速に定量を行うことができるので、この点は著しい長所としてあげられると思う。尚この迅速定量を行った場合、試料と標準液とで生育帯の発現に差異があるや否やを 1, 2 の試料について行って見たが差異は認められなかった。しかし試料によってはこの点を考慮しなければならないものもあると考えられる。定量菌の生育に遅滞や促進が見られる様な

* Studies on the Microbiological Assay of Vitamins and Amino Acids by the Pulp Disc Method. Part V. On the Rapid Determination of Vitamins and Amino Acids. By Hisao KOJIMA and Yutaka MATSUYA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tôhoku University)

ものは試験管法においても問題になる Bioassay の欠点であるので, Bioassay 全般の問題として対策を講ずる必要がある。

II. 接種菌濃度と生育帯の形状の変化 前報で生育帯の様相は各々の菌株並びに定量するビタミン又はアミノ酸の種類, その他の要因によって変化することを述べたが, ここでは3種のビタミン(ニコチン酸, ピリドキシン, チアミン)及び2種のアミノ酸(リジン, フェニールアラニン)を夫々 *Lact. arabinosus*, *Sacch. carlsbergensis*, *Sacch. cerevisiae*, *Leuc. mesenteroides*, *Lact. arabinosus* の各菌株を用いた場合について, 種々の接種菌量で接種して生ずる生育帯の様相の変化の過程を観察した(第1表及び第2表)。

第1表 接種菌量と生育帯の発現時間並びに生育帯の様相

接種菌濃度 接種量 標準液濃度 (γ /ml)	サイアミン -log T=0.70									ピリドキシン -log T=0.60									ニコチン酸 -log T=0.90								
	1%			2%			3%			1%			2%			3%			1%			2%			3%		
	0.5	1	5	0.5	1	5	0.5	1	5	0.5	1	5	0.5	1	5	0.5	1	5	1	5	10	1	5	10	1	5	10
発現迄の時間	7時間			7			7			6			6			6			5			5			5		
培養時	8時間			8時間			8時間			8時間			8時間			8時間			8時間			8時間			8時間		
間	10時間			10時間			10時間			10時間			10時間			10時間			10時間			10時間			10時間		
測定に相当と思われる時間	10時間			10			8			9			8			6			7			7			5		

備考: 培地の寒天濃度は 0.5%, 培地量は 10 ml.

* 明確度の表示法については本文に記載した。標準液濃度によって生育帯の明確度の変化に相違があるが, 生育帯の直径に変化は認められない。

第2表 接種菌量と生育帯の発現時間並びに生育帯の明確度

実験番号 接種菌濃度 接種量 寒天濃度 標準液濃度 (mg/ml)	I -log T=0.8									II -log T=0.9									III -log T=0.9								
	2.0%			1.0%			1.0%			3.0%			1.0%			5.0%			5.0%			0.5%			0.5%		
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
発現迄の時間	3時間			3			3			3			3			3			3			3			3		
培養時	4			4			4			4			4			4			4			4			4		
間	5			5			5			5			5			5			5			5			5		
測定に相当と思われる時間	4時間			4			4			5			5			3			3			3			3		

備考: 明確度の表示法は本文に記載した。培地量 10 ml, 標準液濃度によって生育帯の明確度に相違があるが, 生育帯直径に変化は見られない。又実験によって明確度の推移に若干のズレがある。

2. フェニールアラニン

接種菌濃度 接種量 標準液濃度 (mg/ml)	-log T=0.85								
	2%			3%			4%		
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0
発現迄の時間	4時間			4			4		
培養時	7時間			7			7		
間	12			12			12		
測定に相当と思われる時間	7時間			6			5		

備考: 寒天濃度 0.5%, 培地量 5 ml

生育帯発現後, 生育帯が時間の経過と共に拡大する傾向の大きいものや, 更に時間が長びくと周縁が不明確になるもの, 又生育帯にリング状に濃厚な部分(dike)を生ずるもの等が見られ, しかもこのような変化が標準液の各濃度で必ずしも同じ変化を示さない場合も見られる。以下各菌株, 各ビタミン又はアミノ酸の各々について述べる。

(1) チアミン: *Sacch. cerevisiae* の $-\log T=0.7$ の菌液 1%, 2%, 3% を接種した場合について検討したが, 1% では8時間で周縁の測定が困難であり, 10時間で0.5 γ , 1 γ の周縁が明確に区別される様になる。2%, 3%では略々同様の傾向があるが, 2%接種では8時間後, 明確度はやや劣るが10時間で測定が容易になる。3%では2%より発現の時間が早く

て生育帯の濃度も高く 8 時間ですでに測定が容易になる。尚、8 時間と 10 時間では生育帯の直径は殆んど変化がない。生育帯は全般に均一に密になる。

(2) ビリドキシン : *Sacch. carlsbergensis* の $-\log T=0.6$ の菌液を前項同様に接種して観察した。生育帯の様子はやや粗であって生育帯の中心部が盛り上った感じを与える。1%, 2%, 3% 共に各標準液濃度によって変化が見られないが、発現時間も 3% が早く 6 時間、8 時間では 2% が 1% より比較的明確で 3% では更に周縁鮮明になる。測定には 8 時間が適当である。10 時間になると生育帯が厚くなり明確度が増してくる。酵母では生育帯発現後、生育帯の発展が乳酸菌に比して早く且つ濃厚になるがその後は徐々に生育帯が拡大し周縁が不明確になるので、これらの菌濃度を用いた時の測定に適当な時間を附記した。

(3) ニコチン酸 : *Lact. arabinosus* の場合には酵母と異なって乳酸菌では生育帯は第 1 報所載の写真の様な濁濁様の生育帯を生ずる。 $-\log T=0.9$ の接種菌液を 1%, 2%, 3% 接種した場合の 5 時間と 8 時間における生育帯の明確度をみると、1% では 5 時間で生育帯はいずれの標準液濃度でも認められるが、周縁はあまり明確でなく、8 時間で明確になる。これに対し 2%, 3% になるに従って 5 時間でも鮮明な生育帯を認めることができるが、2% では 8 時間でやや濃厚になる。3% では 5 時間で既に濃厚な生育帯を示し、8 時間でも殆んど差が認められない。しかしこの場合標準液濃度についてみると濃度のうすい 1γ では菌液 1% で生育帯が認められるのに反して、2%, 3% になると生育帯が不明確になり測定が困難である。従って標準液濃度の高い方では迅速に測定できるが最少有効濃度が高くなって定量範囲は狭くなる。

(4) アミノ酸(第 4 報の写真参照) : アミノ酸の場合には生育帯の発現がビタミンの場合よりも早く、リジンでは 3 時間、フェニールアラニンでは 4 時間位で認められる様になる。種々の菌濃度における生育帯の発現迄の時間とその後の生育帯の様相の変化は第 2 表に示したが、表に掲げた数字は生育帯の明確度を示し、1 から 10 へと明確度は増し、濃厚な生育帯になる。1 から 5 迄は透過光(装置は第 3 報に示した)をあてることによって認められる程度を示し、1 から 5 に至る程測定が容易になる。5 から上は肉眼的に認めうる程度の濃い生育帯を示している。生育帯の様相を考慮に入れてこの表を見ると、菌濃度を高くするとリジンでは 5% 接種で 3 時間後に実用的に測定できるが、フェニールアラニンではやや遅く 4~5 時間である。菌濃度がうすい場合は両者とも 1~2 時間遅れる。アミノ酸の濃度によって最初生育帯の濃さに差を生じその後は徐々に濃さを増すが、酵母よりは生育帯周縁は安定で不鮮明に拡大する傾向は少い。但し菌濃度によって Dike を生ずる迄時間を要し、特に濃厚な接種ではその出現がおくれるが、生育帯周縁部(外側)の直径には殆んど変化は見られない。ここに示した以外の標準液濃度についても、またこの他のアミノ酸についても検討しなかったが、時間の経過とともに直径が大になる傾向のある場合には測定時間によって定量値に影響を与えるから測定時間を常に一定にしなければならない。又 3~4 時間で迅速定量を行う場合、標準液濃度によって生育帯の発現に遅速があるから狭い範囲しか定量できない場合がある。リジンについて、3 時間前後で測定可能な最少有効濃度を第 3 表に掲げた。以上の様に各菌濃度接種時における測定に適当な時間は異なるが表に各々の適当な時間を附記した。尚迅速定量時の定量値と普通に設定した方法で得られる定量値の間の比較検討は今後更に行いたい。

III. 寒天濃度と生育帯の明確度 迅速定量を計る場合、殊に問題になる明確度については種々の要因のうち、特に寒天濃度について供試のアミノ酸の場合を検討した(第 2 表参照)。大きな差は認められないが寒天濃度の低

第 3 表 迅速定量時の最少有効濃度 (リジン)

接種量 (%)	定 量 の 条 件		測定 時間 (時間)	生育帯の明確度			
	寒天培 地量 (ml)	寒天 濃度 (%)		100 γ/ml	50 γ	25 γ	10 γ
1.5	5	1.5	2.5	+	+	—	—
1.5	5	0.5	2.5	+	+	+	±
2.0	10	0.5	3.5	+	+	—	—
2.0	15*	0.5	2.5	+	+	—	—
3.0	15	0.5	2.5	+	+	—	—
3.0	5	0.5	2.5	+	+	—	—
3.0	10	1.0	2.5	+	+	—	—
4.0	15*	0.5	3.5	+	—	—	—

備考: 接種菌濃度 $-\log T=0.9$

* 15 ml の中、基層 10 ml, 接種菌層 5 ml.

い方が短時間で明確な生育帯を示す傾向がある。ここで使用した菌株の様に容易に明確な生育帯の得られる菌では余り差が認められないと考えられるが、第 3 報で示した *Lact. casei* 等の様に生育帯の明確度を与える条件で左右され易い場合には寒天濃度も大きな影響をもっている(リボフラビン定量では 0.5% 寒天、 $-\log T=0.9$, 0.5% 接種が最も鮮明な生育帯を与える)。

IV. 培地の層の厚さと生育帯の変化 寒天培地の厚さを変化させた場合に生育帯の明確度に影響があるや否や検討してみた。迅速定量では明確な生育帯をで

第 4 表 培地層の厚さと生育帯の明確度

接種菌濃度 接種量 寒天培地量 標準液濃度 (mg/ml)	リジン -log T=0.85 2%									フェニールアラニン -log T=0.85 2%									
	5 ml			10 ml*			15 ml			5 ml			10 ml			15 ml			
	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	0.1	0.5	1.0	
	3時間			3			3			4時間			4			4			
発現迄の時間	4	2	0	4	4	2.5	4	5.5	3.5	7時間	1.5	5	4.5	3	7	8	4	8	8.5
培時 { 3時間	4	2	0	4	4	2.5	4	5.5	3.5	7時間	1.5	5	4.5	3	7	8	4	8	8.5
4 " 4	4	3.5	1.5	5	7	4	5.5	8.5	8.5	12 "	2	6.5	6.5	4	8.5	10	4	9	10
養間 { 7 " 4	4	6.5	5.5	5	10	9	5.5	10	10	18 "	3	8	8	4	9	9	5	9	10
測定に適當な時間	5時間			4			4			7			6			5			

* 培地 10 ml で培地層の厚さは約 3 mm になる。寒天 0.5%

きるだけ短時間で得たいわけであって、リジンとフェニールアラニンについて観察した結果を第 4 表に示した。寒天層が厚くなると生育帯は濃くなって、リジンでは 4 時間、フェニールアラニンでは 6 時間で充分測定できる。液層を厚くすることによって生育帯が厚くなる事と乳酸菌ではその性質から生育が良好になる事が考えられる。尚、15 ml 以上については行わなかったが培地層の厚さを大にすることは測定時間を早める事に役立つことになる。

次に定量をより簡易化する目的で保存用の標準 Pulp disc の調製を試みた。

V. 乾燥標準バルブの調製の試み 定量の都度標準液系列に Pulp disc を浸漬する操作を省き、操作をより容易にする為と標準液調製時の操作重複による誤差を除き、より正確に定量せんと考え標準液系列に浸漬した Pulp disc を減圧下に乾燥し、これを氷室中に保存した後のものと標準液に直接浸漬した新しい Pulp disc で得られる生育帯との間の変化の有無を検討した。ビタミン及びアミノ酸の数種について検討したが、保存後日数の経過と共に生育帯の小さくなるものはチアミン、ニコチン酸であるが、これは保存中に破壊されるものと見られる。又、その他にも乾燥 Pulp disc では生育帯が小さく示されるものがある。しかしビタミンではビリドキシン、ピオチン、パントテン酸；アミノ酸ではリジン、フェニールアラニンは保存後も生育帯に変化がみられない場合もあるし、小さくなる実験例もあった。この際、乾燥 Pulp disc による拡散が浸潤状態の拡散と異なるか否かを乾燥 Pulp disc に一定量 (Pulp disc 1 枚の吸水量 0.05 ml) を加えた場合も検討したが生育帯に変化が見られなかった。よって乾燥標準 Pulp disc を作成保存することも可能と思われるが、保存法その他について更に検討を加える予定である。標準系列の液に代えて標準乾燥 Pulp disc を用いるならば定量が任意の時期に、より容易に且安定に行いうると考えられる。

尚、多数の試料を扱う場合には、更に操作の簡易化と誤差の減少を計って、シャーレの代りに 24 cm×16 cm のガラス平板を使用している。

総 括

ビタミン 3 種、アミノ酸 2 種について、種々の条件の中、特に接種菌量と生育帯の関係についてその発現からその後の変化の過程を追って詳細に観察し、より迅速に定量しうる条件を検討した。又、定量操作をより簡易化する為に保存用の乾燥標準 Pulp disc の調製を試みた。

本研究について終始御指導、御鞭撻を戴いた植村定治郎教授に感謝する。又、種々御援助を戴いた日本皮革株式会社社長伊藤勇二氏、並びに日本皮革研究所の諸氏に深謝の意を表する。

尚、本報告の一部は昭和 32 年 4 月、日本農芸化学会大会において講演した。

(1) 小嶋尚夫, 松谷 豊, 男沢熙子, 今野 周,
植村定治郎: 本誌, 32, 33 (1958).	(5) S. Morris, A. Jones: <i>Analyst</i> , 78, 15
(1953).
(2) 小嶋尚夫, 松谷 豊: 本誌, 32, 38 (1958).	(6) J. S. Simpson, D. F. Harris: <i>Analyst</i> ,
82, 210 (1957).
(3) 小嶋尚夫, 松谷 豊: 本誌, 32, 100 (1958).	
(4) 松谷 豊, 小嶋尚夫: 本誌, 32, 106 (1958).	