ラセミ乳酸生成乳酸菌の研究 (第2報)* *Lactobacillus saké* の生育因子とそのラセミアーゼ形成**

大 林 晃, 北 原 覚 雄 (東京大学応用微生物研究所)

昭 和 34 年 4 月 1 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾において普通乳酸菌の培養に用いられる半合成培地に生育するラセミ乳酸生成菌のラセミアーゼ形成に就いて検討し、ラセミアーゼの助酵素である DPN の前駆物質と考えられているニコチン酸の培地への添加量を制限することにより aporacemias 形成も coenzyme の生成不足となる結果、ラセミアーゼ力が減少し、活性の乳酸が生成されることを報告した。これに対し *L. saké* に属する菌は培養条件により aporacemias の形成が容易に変化するので、ラセミアーゼ形成の研究上最も適当な菌と考えられ、その培地組成とラセミアーゼ生成との関係に就いて実験を行って来たが何れも麴汁、麦芽汁、酵母エキス等の天然培地を使用したため明確な結論を引出すことが出来ず、そのため組成の明らかな合成培地を用いて検討を試みようとしたが、常用の半合成培地[†]には生育しなかった。このため先ず第一段階として、この半合成培地に生育させる条件を検討し、或種の生育因子を要求することを認めたので、その追求を行った。

実 験 及 結 果

使用菌株：使用した *L. saké* に属する菌は type culture として保存している菌株 T. S. の他、C 09, G 01, O 12 の 4 株で何れも著者らの研究室にて酵母より分離、同定したものである。

I) *Lactobacillus saké* の生育因子の分布 半合成培地に種々の天然物料を添加し生育度を調べた結果、第1表に見る如くカゼイン酵素分解物、ペプトン (ポリペプトン、武田)、酵母エキス (粉末、武田) は何れも使用した菌株の生育を起させる活性を有していた。

II) カゼインのトリプシン分解物中の生育因子 上の実験では市販のカゼイン分解物を使用したもので、更に確認する意味で、ミルクカゼインを洗滌してビタミン類を除去、結晶トリプシンにて加水分解し、分解物を同じく半合成培地に添加して分解時間による生育因子の消長を調べた。結果は第2表に見られるが、*L. saké* の生育因子はカゼインのトリプシン分解により生成される或種のペプチドであろうと推定される。

第1表 *L. saké* の生育因子の分布

添加物 2.0 mg/2 ml	<i>L. saké</i> T. S.	<i>L. saké</i> C 09	<i>L. saké</i> G 01	<i>L. saké</i> O 12
	0	0	0	0
カゼイン酵素分解物	1.75	2.15	2.10	1.95
ポリペプトン	1.60	2.10	2.20	1.90
粉末酵母エキス	0.90	1.30	1.20	1.30

培養：2 ml, 30°, 3 日 生育度：N/10 NaOH の滴定数で表わす

1) 生育因子の濃縮：酵母エキス、ペプトン、カゼイン酵素分解物中に生育因子の存在するのを認めたが、ビタミン類等を含まぬ点から、生育因子の検討にカゼイン

第2表 カゼインのトリプシン分解による生育因子の生成

添加 分解時間	菌株	N/10 NaOH ml/2 ml			
		T. S.	C 09	G 01	O 12
0時間		0	0	0	0
3 "		0.53	0.60	0.63	0.50
5 "		0.85	0.90	0.95	0.85
15 "		1.55	1.65	1.65	1.80

培養：2 ml, 30°, 3 日
 各々カゼイン 5 mg/2 ml 相当量を添加

のトリプシン分解物を使用することにした。

カゼインの結晶トリプシン分解物に三塩化醋酸を加えて未消化の蛋白質を除去し、三塩化醋酸をエーテルで抽出除去後、セロファン膜にて蒸溜水に対して透析を行い、その透析外液の減圧濃縮液 (Fraction A) を Jutisz 等の方法⁽²⁾に準じ、1 N-HCl で処理した活性アルミナに吸着、5% の醋酸にて溶出し、再び 20% 醋酸処理の活性炭に吸着させ、5% 醋酸にて流出液がニンヒドリン反応を呈さなくなる迄洗滌後、醋酸エチル及び H₂S 飽和の水にて

* Studies on DL-Forming Lactic Acid Bacteria. Part II. *Lactobacillus saké*, its Growth Factors and Racemias Formation.

By Akira ÔBYASHI and Kakuo KITAHARA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

** 乳酸菌の酵素に関する研究 第15報 (Studies on the Enzymes of Lactic Acid Bacteria. Part XV.)

† アミノ酸類としてカゼインの塩酸分解物を用いた合成培地⁽¹⁾。

第 3 表 生育因子の濃縮

Fraction A		Fraction B	
添加量 窒素 $\gamma/2\text{ml}$	N/10 NaOH ml/2ml	添加量 窒素 $\gamma/2\text{ml}$	N/10 NaOH ml/2ml
0	0	0	0
90	0.55	15	0.60
180	0.95	30	1.25
360	1.80	60	2.15
540	2.15	120	2.40

培養: 2 ml, 30°, 3 日 (*L. saké* C 09)

窒素量: Kjeldahl 法にて全窒素量を測定

第 4 表 濃縮生育因子部のペーパークロマトグラム

R_F	活性度*	ニンヒドリン反応	ビュレット反応
0	1.40	卅	+
~0.10	0.60	++	卅
~0.18	0.60	+	
~0.21	0.15	+	
~0.52	0	+	±
~0.62	0	+	—
~0.69	0.25	+	—
~0.77	0.85	++	+
~0.84	0.95	卅	++
~0.92	0.25	+	—
~1.00	0	—	—

* 半合成培地に添加し培養後の N/10 NaOH 滴定値

培養: 2 ml, 30°, 3 日 (*L. saké* C 09)展開剤: *n*-ブタノール: 醋酸: 水 (4:1:1, v/v/v)

で 120°, 24 時間加水分解後, 構成アミノ酸をペーパークロマトグラフにて検討し, ロイシン (又はイソロイシン), フェニルアラニン, パリン, プロリン, アラニン, スレオニン, グリシン, リジンの 8 つのスポットを得た. 又 Consden 等の方法⁽⁸⁾で HCl 溶液中で酸化窒素ガスを通じ, 遊離のアミノ基を脱アミノし, その後加水分解した場合, 上の 8 種のアミノ酸のうちフェニルアラニンのみが消失するので, 有効物質は phenylalanyl-ペプチドであろうと考える.

更に R_F が 0.70~0.84 の範囲では相当の幅があるので, これを R_F 0.70~0.76, 0.76~0.84 の二区に分けても両区分共に 8 種のアミノ酸から構成され, Consden 処理でフェニルアラニンの消失が認められる点で一致していた.

次に, 上の二種類の展開剤で分離, 抽出した生育因子に結晶トリブシンを作用させ, 作用時間による活性度の変化及びペーパークロマトグラフによる検討を行ったが, 6 時間後も活性度の変化はなく, ペーパー上にも始めと同一のみにスポットを得, この生育因子はトリブシンにて最早加水分解されないことが推定される.

しかし, 1 N-HCl にて湯煎上で加水分解した場合は 2 時間で, 6 N-HCl では 30 分で完全に失活する.

4) R_F 0 に存在する生育因子: 第 4 表に見られる如く *n*-ブタノール: 醋酸: 水の展開剤によるクロマトグラフで R_F 0 の部分にも活性が認められるので, 同様に抽出, 水飽和フェノールで再び展開, 活性部 (R_F 0.20~0.35) を切り取り抽出し, 6 N-HCl で加水分解し, 前記の生育因子と同じ 8 種のアミノ酸の他にメチオニンのスポットをペーパー上に得られ, 両方の生育因子のアミノ酸組成は類似していた.

第 5 表 *L. saké* の生成乳酸の旋光性

濃縮生育因子添加量 (窒素として)		2 mg	4 mg
初	糖	mg	1,800
消	費	糖	mg
乳酸	{ 取得量	mg	690
	{ 旋光性	DL	950
ラセミアーゼ	活性度	550	900

培養: 70 ml, 30°, 3 日 菌株: *L. saké* C 09

* この場合, 醋酸曹達添加培地では *L. saké* はラセミアーゼを形成しない⁽⁹⁾ので, これを除去した半合成培地を使用した.

溶出し (Fraction B), 濃縮を行った. 両区分を半合成培地に添加して *L. saké* の生育度を測定した結果, 第 3 表より計算される如く, この操作により活性度はその窒素量に対し約 8 倍に増大した.

2) 生育因子のペーパークロマトグラフ: 上記の如く濃縮した生育因子を *n*-ブタノール: 醋酸: 水 (4:1:1, v/v/v) を展開剤として上昇法でペーパークロマトを行い, その各部を別々に抽出し, ニンヒドリン反応, ビュレット反応と対比しながら活性度を同様に測定

した結果は第 4 表に見られ, R_F 0, 即ち移動しない部分及び R_F 0.70~0.84 の間に認むべき活性が検出された. 活性部分は何れもニンヒドリン, ビュレット反応を呈するが, この展開剤ではアミノ酸は全て R_F 0.05~0.68 の範囲に来るので, 活性をもつものがペプチドであろうことは間違いないと思う.

3) R_F 0.70~0.84 に存在する生育因子: 濃縮生育因子を常状にペーパークロマトを行い, その都度ニンヒドリン反応, 活性度を対比して R_F 0.70~0.84 の部分を切り取り, 蒸留水にて抽出, 減圧濃縮し, この濃縮液を水飽和のフェノールにて上昇法で展開したが, ニンヒドリン反応を呈するスポットは R_F 0.67~0.81 に唯一つしか認められなかった.

以上の結果から直ちにこの物質が単一のものとは確定出来ないが, 同様に二種の展開剤で分け得た活性部の抽出物を 6 N-HCl

III) 濃縮生育因子添加半合成培地において *L. saké* の生成する乳酸の旋光性 前述の方法で濃縮した生育因子を半合成培地*に添加し, *L. saké* の生成する乳酸の旋光性, ラセミアーゼ

第 6 表 *L. saké* のビタミン類要求性

供試菌株	T. S.	G 01
培地より除去	ml N/10	NaOH
チ ア ミ ン	1.85	1.35
リ ボ フ ラ ビ ン	0.55	0.35
ピ リ ド キ シ ン	2.00	1.45
ピ リ ド キ サ ル	1.90	1.40
パ ン ト テ ン 酸 (Ca)	0.80	0.55
葉 酸	1.75	1.20
p-アミノ安息香酸	1.85	1.30
ビ オ チ ン	1.85	1.30
ビ タ ミ ン B ₁₂	1.95	1.30
ニ コ チ ン 酸	0.15	0.10
ア デ ニ ン	0.90	0.65
グ ワ ニ ン	1.65	0.95
キ サ ン チ ン	1.75	1.20
ウ ラ シ ル	1.90	1.30
完 全 培 地	2.20	1.50
R. P. A. N.*	1.95	1.30

培養: 2 ml, 30°, 3 日

* ビタミン類としてリボフラビン, パントテン酸, アデニン, ニコチン酸の4種のみを添加

活性を測定した結果, *L. saké* は DL-乳酸を生成し, ラセミアーゼはこの培地で充分合成し得ることが判った(第5表)。従って, *L. saké* のラセミアーゼの検討には更に培地組成の追求が必要である。

IV) *L. saké* のビタミン要求 *L. saké* の培地を検討するため生育因子の濃縮物を添加した半合成培地から個々のビタミン類を除いて培養し, *L. saké* のこれらのビタミンに対する要求をしらべた。その結果は第6表に見られる如く, 供試菌は何れもリボフラビン, パントテン酸, アデニン, ニコチン酸を要求し, ビタミン類としてはこれら4種のみの添加で充分に生育することが知られた。

V) 種々の天然物中の生育因子の比較 カゼインのトリプシン分解物中にも生育因子が二種あるのが判ったので, 始めに述べた酵母エキス, ペプトン等に分布する生育因子がカゼイン分解物中のものと同一であるか否かをペーパークロマトグラフにて比較した。

第 1 図 生育因子活性物のバイオオートグラム

培養: 2 ml, 30°, 3 日 使用菌株: *L. saké* C 09, G 01

試料括弧内は同じ傾向を示すもの

に R_F 0.40~0.50 に活性があった。これらは何れも前のトリプシン分解カゼイン中のものとは異なり, R_F 0.09~0.16 区分のものが最も普遍的に存在すると思われる。エタノール: アンモニア: 水 (80: 4: 16, v/v/v) にて展開した時は R_F 0.15~0.24, 0.40~0.50 に夫々位置している。

第 7 表 清酒, 麴汁の生育因子活性度

添加量 ml/2 ml	N/10 NaOH ml/2ml	
	麴汁*	清酒
0	0	0
0.05	0.80	1.35
0.10	1.10	1.70
0.20	1.40	2.20

* 糖度 20% として使用

供試菌株: *L. saké* C 09

更に, この中で最も興味あるのは清酒中には麴汁に比べ遙かに生育因子が多量に存在することで(第7表), この *L. saké* が清酒醸造の酒母に主に分布することと何か関係ある様に思われる。

考 察

乳酸菌が生育因子としてペプチドを要求することについては多くの研究がなされている。即ち *Lactobacillus casei* における strepogenin, 火落菌⁽⁴⁾, 正油醗中の乳酸菌 *Pediococcus soyae*⁽⁵⁾ のペプチド様物質の要求などが挙げられる。なかでも strepogenin は Woolley らの長年の研究でその構造も決

用いた試料はその各々を半合成培地に添加し, 生育因子活性をもつ事が判った酵母エキス, ポリペプトン, 麴汁, 清酒, ミルクカゼインの *Asp. oryzae* の蛋白分解酵素による消化物のペーパークロマトグラフを行い, バイオオートグラフ法にて活性物質の R_F を検討した(第1図)。その結果 n -ブタノール: 醋酸: 水 (4: 1: 1) にて展開した際は皆 R_F 0.09~0.16 に活性が認められ, ポリペプトンと麴菌のプロテアーゼ消化カゼインは別

定された⁽⁶⁾。しかしそれは単一物質でなく、互に共通なある特定の構造をもっており、ペプチドホルモンであるオキシトシンが強い streptogenin 活性をもつこと⁽⁷⁾は注意しなければならない。*L. saké* でも要求するペプチドが単一なものではないので、それら相互の構造上の関係は更に検討しなければペプチドの生理的意義は判らない。しかし、Snell は種々のペプチドを用い、乳酸菌の生育とペプチドの関係を詳細に研究し、*L. casei* ではビタミン B₆ を欠く培地で、D-アラニン、L-アラニンの細胞膜透過を拮抗的に阻害するので、その透過阻害を受けない L-アラニンのペプチドが生育を促進するのではないかと考えているが⁽⁸⁾、このようなことが他のペプチドについても同じく言えるかどうかは不明である。

また、*L. saké* に対しては streptogenin やその類似構造をもつ seryl-histidine, seryl-histidyl-leucine は全く効果がなかった。

次に或程度生育因子を濃縮し得たので、このものを半合成培地に添加した培地では *L. saké* は DL-乳酸を作り、この培地ではラセミアーゼが充分合成されることが判ったが、このラセミアーゼ形成については次報⁽⁹⁾で一緒に考察を加える。

要 約

(1) *Lactobacillus saké* は生育にペプチドを要求するが、そのものは単一物質に限定されない。

(2) カゼインのトリプシン分解物中の生育因子はロイシン (又はイソロイシン)、フェニルアラニン、バリン、プロリン、アラニン、スレオニン、グリシン、リジンの 8 つのアミノ酸より成る phenylalanyl-ペプチドである。

(3) *L. saké* はリボフラビン、パントテン酸、アデニン、ニコチン酸を必須ビタミン類とする。

(4) 濃縮生育因子添加半合成培地で *L. saké* は充分なラセミアーゼを合成する。

ストレプトゲニン等のペプチドを分譲頂いた大阪大学理学部赤堀研究室の方々に感謝致します。

(昭和 31 年 4 月、日本農芸化学会大会にて発表)

(1) 大林 晃, 北原覚雄: 本誌, 33, 623(1959).

(2) M. Jutisz, E. Lederer: *Nature*, 159, 445 (1947).

(3) R. Consden, A. H. Gordon, A. J. P. Martin: *Biochem. J.*, 41, 590 (1947).

(4) 田村学造, 鈴木弥彦: 本誌, 32, 778(1958).

(5) K. Sakaguchi: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22, 353 (1958).

(6) R. B. Merrifield, D. W. Woolley: *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 358, 4646 (1956).

(7) D. W. Woolley, R. B. Merrifield: *ibid.*, 76, 316 (1954).

(8) H. Kihara, E. E. Snell: *J. Biol. Chem.*, 197, 791 (1952).

(9) 大林 晃, 北原覚雄: 本誌, 33, 835(1959).

ラセミ乳酸生成乳酸菌の研究 (第 3 報)*

Lactobacillus saké のアポラセミアーゼ形成**

大 林 晃, 北 原 覚 雄 (東京大学応用微生物研究所)

昭 和 34 年 4 月 1 日 受 理

緒 言

乳酸菌に普通用いる半合成培地に生育する一般のラセミ乳酸生成菌については、ラセミアーゼの補酵素である DPN の前駆物と考えられるニコチン酸を培地に制限することにより、DPN の生成不足を来しその結果、ラセミアーゼ活性が減少し、活性乳酸が作られることを報告した⁽¹⁾。*Lactobacillus saké* に属する菌は生育に或種のペプタイドを必要とし⁽²⁾、半合成培地に生育しないため上記 coracemias 形成の実験より除外した。しかし此の菌

* Studies on DL-Forming Lactic Acid Bacteria. Part III. Formation of Apo-racemias in *Lactobacillus saké*.

By Akira ÔBAYASHI and Kakuo KITAHARA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

** 乳酸菌の酵素に関する研究 第 16 報 (Studies on the Enzymes of Lactic Acid Bacteria. Part XVI.)