(3) H. E. Carter, H. W. Anderson : <i>Phytopath.</i> , 41, 393 (1951).	(9) T. Yajima : <i>J. Antib.</i> , 8A, 189 (1955).
(4) 中沢 鴻等 : 本誌, 32, 321 (1958).	(10) 中沢 鴻等 : 本誌, 32, 713 (1958).
(5) K. Isono et al. : <i>J. Antib.</i> , 10A, 21 (1957).	(11) R. G. Benedict : <i>Botan. Rev.</i> , 19, 229 (1953).
(6) T. G. Pridham, D. Gottlieb : <i>J. Bact.</i> , 56, 107 (1948).	(12) 細谷省吾, 小松信彦, 添田百枝 : <i>J. Antib.</i> , 5, 451 (1952).
(7) R. G. Benedict et al. : <i>Appl. Microbiol.</i> , 3, 1 (1955).	(13) 細谷省吾, 小松信彦, 添田百枝 : <i>J. Antib.</i> , 5, 525 (1952).
(8) A. Ammann et al. : <i>Appl. Microbiol.</i> , 3, 181 (1955).	(14) 田口久治 : 醸工, 32, 195 (1954).

乳酸菌の特殊醗酵に関する研究*

好氣的条件下におけるアセトイン形成

大林 晃, 大井 章, 北原覚雄 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 34 年 11 月 13 日 受 理

緒 言

基質や培養条件等を変える事により乳酸菌の主要生産物の改変を行おうとする所謂, 特殊醗酵の一つの試みとして microaerobes である乳酸菌を特に好気条件下で培養した場合, 菌株により極度に乳酸の生成量が減少し, 多量のアセトインが蓄積する事を認めた。

乳酸菌ではピルビン酸を基質とした場合⁽¹⁻⁴⁾, 及びピルビン酸と葡萄糖の共転反応におけるアセトインの生成^(5,6)に就いては種々研究されている。然し, 葡萄糖のみを基質とした場合には O'Kane が *Streptococcus faecalis* が好氣的にアセトインを多量に生成する事を報告している⁽⁷⁾に過ぎないので, 各種のホモ型, ヘテロ型の乳酸菌を好気培養し, アセトインの生成菌の検索及びアセトイン生成菌の菌体による二次的な葡萄糖からのアセトイン形成について検討した。

実 験 方 法

供試菌株: ホモ型乳酸菌として *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus liquefaciens*, *Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* 11, *Lactobacillus thermophilus* II 401, *Pediococcus hennebergi*, ヘテロ型菌として *Leuconostoc mesenteroides* K, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus batatas*, *Lactobacillus fermentum* で何れも研究室に保存中の乳酸菌株である。

培養: 通常乳酸菌の培養に用いる炭酸石灰を添加した, 0.5% ポリペプトン, 0.3% 酵母エキス(Difco), 0.3% 肉エキス, 葡萄糖(各種濃度)培地 100 ml を, 静置培養は 300 ml の三角フラスコ中にて培養し, 好気培養は 500 ml の振盪フラスコにて振盪培養を行い(培養温度 30°), 一定時間培養後, 培養液は遠心分離して菌体と炭酸石灰を除き, 生産物の分析に供した。

分析法: アセトインは Van Niel 法⁽⁸⁾と Westerfeld 法⁽⁹⁾を併用し, 酒精は Rothera 氏法にてアセトインの生成が検出されない時は培養液を中性で蒸溜し, アセトインの検出される時はアセトインをニッケルジメチルグリオキシムの沈殿として除去後, 中性で蒸溜して夫々 Friedman 法⁽¹⁰⁾で酒精を定量した。その他, 醋酸は水蒸気蒸溜法, 乳酸は Barker-Summerson 法⁽¹¹⁾及び硫酸酸性にて揮発性物質を水蒸気蒸溜し, 残渣をエーテル抽出し, N/10 NaOH で滴定して乳酸量を定めた。またエーテル抽出部は Rothera 氏法に従ってピルビン酸の検出を行った。更に葡萄糖は Bertrand 法, 五炭糖はオルシンー塩酸法⁽¹²⁾にて測定した。

実 験 結 果 及 び 考 察

(I) ホモ型乳酸菌の好氣的醗酵 第 1 表のように, 静置培養では何れの菌も乳酸以外の生産物は殆ど作ら

* Studies on Alternative Fermentations of Lactic Acid Bacteria : Acetoin Formation under Aerobic Condition.

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

ないが、振盪培養では消費糖に対する乳酸の収率が著しく減少し、*Sc. faecalis* では 4.7%, *Sc. liquefaciens* では殆ど乳酸を作らず約 2.6% にまで低下し、多量のアセトインが生成している。この傾向は *L. thermophilus*, *L. xylosus* に於ても認められるが、*Streptococcus* に比べアセトイン生成量は非常に少い。また *Sc. faecalis* では振盪培養にて醋酸の生成量が増加しているのは葡萄糖より中間的に生ずるピルビン酸が酸化されて醋酸になる⁽⁷⁾か、醋酸と乳酸に dismutation する⁽¹³⁾ためと考えられる。更に *L. thermophilus* は静置培養でも少量のアセトインが生ずる事及び比較的多くの醋酸の生成されるのはこの菌がカタラーゼを有し、比較的好気的菌種である点に関連していると思われる。なお何れの菌もダイアセチルやピルビン酸は検出されなかった。

第 1 表 ホモ型乳酸菌の好気培養 (A)

菌 株		<i>Sc. faecalis</i>		<i>Sc. liquefaciens</i>		<i>L. thermophilus</i>		<i>L. xylosus</i>
		静置	振盪	静置	振盪	静置	振盪	振盪
培 養 条 件	糖 mg	1,800	2,670	1,800	2,670	2,800	2,800	2,580
消 費	糖 mg	1,800	2,670	1,070	2,670	2,650	2,400	2,580
生 成	乳 酸 mg	1,480	125	925	67	1,700	750	1,590
成 物	醋 酸 mg	18	450	80	25	150	110	80
	アセトイン mg	0	870	0	915	60	500	390

培養: 100 ml, 30°, 3 日

その他のホモ型乳酸菌では第

2 表に示す如く *L. plantarum* 11, *L. casei*, *Pc. hennebergi* は振盪培養でアセトインを微量若しくは生成せず、静置培養と同じ酸酵をするが *Streptococcus* と異り振盪培養での糖消費が低下しているのはその菌の嫌気度とアセトイン形成能との間に何か関係がある様に思われる。

(II) ヘテロ型乳酸菌の好気的酸酵 ヘテロ型菌についても同様に実験を行った結果 (第 3 表), 静置培養で生成する酒精が振盪培養では生成せず、代りに殆ど酒精相当量の醋酸が定量されるが、アセトインは *Leuconostoc mesenteroides* で微量検出されるに過ぎず、ヘテロ型菌は葡萄糖の好気的代謝でアセトインを殆ど作らないと考えてよいであろう。

ホモ型とヘテロ型菌の好気的葡萄糖代謝に於けるこの差違は

第 2 表 ホモ型乳酸菌の好気培養 (B)

菌 株		<i>L. plantarum</i>		<i>L. casei</i>		<i>Pc. hennebergi</i>	
		静置	振盪	静置	振盪	静置	振盪
培 養 条 件	糖 mg	2,800	2,800	2,800	2,800	3,270	3,270
消 費	糖 mg	2,700	1,000	2,800	2,300	2,850	1,180
生 成	乳 酸 mg	2,215	680	2,250	1,750	2,580	990
成 物	醋 酸 mg	100	90	90	90	80	70
	アセトイン mg	0	60	0	100	0	0

培養: 100 ml, 30°, 3 日

第 3 表 ヘテロ型乳酸菌の好気培養

菌 株		<i>Leuc. mesenteroides</i>		<i>L. batatas</i>		<i>L. fermentum</i>		<i>L. brevis</i>	
		静置	振盪	静置	振盪	静置	振盪	静置	振盪
培 養 条 件	糖 mg	2,670	3,270	2,250	2,250	2,200	2,200	2,300	2,300
消 費	糖 mg	2,670	3,030	1,320	1,240	1,260	700	2,300	2,300
生 成	醋 酸 mg	150	860	50	320	55	130	120	580
成 物	酒 精 mg	490	0	200	0	220	0	420	0
	乳 酸 mg	700	1,020	540	550	630	380	1,070	930
	アセトイン mg	0	trace	0	0	0	0	0	0

培養: 100 ml, 30°, 3 日

葡萄糖とピルビン酸の共軛分解で見た結果⁽⁵⁾とよく一致する。

しかし、ヘテロ型菌でも好気条件でピルビン酸より多量のアセトインを生成する^(8,4)事より考え、ヘテロ型菌では静置培養で酒精になる筈の C₂-compound が振盪培養で速かに酸化され醋酸になるため、C₃-compound であるピルビン酸がむしろ還元されて乳酸になり (ヘテロ型菌の葡萄糖の好気的代謝も嫌気的条件下と同じ経路で C₂, C₃-compound になる⁽¹⁴⁾と仮定した), 中間的に生ずるピルビン酸が酸化されて醋酸になったり、縮合してアセトイン形成が行われたりしないと考えられる。

(III) 五炭糖の好気的酸酵 *Sc. faecalis*, *L. xylosus* を用い夫々の酸酵性五炭糖であるアラビノース、キシロースからのアセトインの生成を調べた結果 (第 4 表), 両者とも葡萄糖を基質とした場合と異り静置培養でも少量ながらアセトインを生成するが、振盪培養により更に乳酸の生成量が低下しアセトインの生成量が増加するのは葡萄糖を基質とした場合と同様で、特に *Sc. faecalis* では消費アラビノースに対し約 30% のアセトインの生成が認められる。また *L. xylosus* では静置培養で五炭糖を通常の乳酸酸酵形式⁽¹⁵⁾に従い、乳酸と醋酸が等モル比で生成しているが、*Sc. faecalis* の静置培養では醋酸が理論値より遙かに少く同時に乳酸が増加し、しかも揮発酸として与えられる醋酸区分にかなりの蟻酸が検出されるため通常の五炭糖よりの乳酸・醋酸酸酵式と異なる酸酵式が強要されるが、この問題については別途に研究が進められた⁽¹⁷⁾。

(IV) アセトイン生成に及ぼす糖濃度の影響

以上の結果より乳酸菌によるアセトインの生成は *Streptococcus* に属する菌が最も良好なことが判ったので、アセトインを多量得る目的で葡萄糖の高濃度でのアセトインの生成を検討した(第5表)。*Sc. faecalis* は糖濃度の増加とともに乳酸の生成割合が増加し、逆にアセトインの生成率が低下するが、*Sc. liquefaciens* では糖の消費も多くアセトインの生成率も糖濃度に影響されない。

(V) Resting cell による二次的アセトインの生成

培養条件で最もアセトイン生成の強力な *Sc. liquefaciens* の静置培養と振盪培養にて得た菌体を用い、二次的なアセトインの生成を検討した。即ち、ワールブルグ検圧計で好氣的に葡萄糖を代謝せしめ、酸素、炭酸ガスの収支を測定し、一定時間

反応後、硫酸を添加し反応を止め、反応液中の生成アセトイン、乳酸を定量した。結果は第6表に見られるように、振盪培養より得た菌体は酸素吸収量の丁度2倍のモル比の炭酸ガスを放出し、多量のアセトインを生成した。勿論、この結果のみでは葡萄糖からのアセトイン生成の機構について結論出来ないが、O'Kane の提出する⁽⁷⁾次の(1)、(2) 両反応の中(1) が主体をなして葡萄糖が代謝されたと考えられ、アセトイン生成反応は反応式(3)に従うと推定した。

この推定式に従えば、第1表に見られる *Sc. liquefaciens* の振盪培養では理論値の70%のアセトインが生成しており、この様な酸酵を乳酸菌のアセトイン酸酵と考えることが出来る。

一方、静置培養にて得た菌体は同じ条件で殆どアセトインを生成せず、前記の反応式(2)に従って葡萄糖を代謝していると考えられ、*Sc. liquefaciens* での葡萄糖からのアセトイン生成能は好氣的条件の培養で適応的に生成されることは明らかである。

(VI) *Sc. liquefaciens* の生成するアセトインの旋光性

以上の結果よりアセトインを得るには *Sc. liquefaciens* を用いるのが最も良いことが判るので、5.0%の葡萄糖培地 600 ml を 100 ml 宛6本の振盪フラスコに分ち、3日間30°で振盪培養し、これを集め遠心分離で菌体を除去(消費糖 28 g, 生成アセトイン 11.0 g, 対糖収率 39%, 理論値の80%), 中性にて溜出するアセトイン部に過剰の酸性亜硫酸曹達を加え、40°以下で減圧濃縮後重曹を加えエーテル抽出を行って得たアセトインを無水芒硝にて脱水、分溜し、140~145°の溜分のアセトイン 7.0 g を得た。このアセトインの $[\alpha]_D^{20}$ は -67.3° (0.87% 水溶液にて測定)を示した。

要 約

(1) 乳酸菌を好氣的に培養することにより多量のアセトインが生成するのを認め、種々の菌について検討し、ホモ型乳酸菌の内 *Streptococcus* に属する菌が最も多量にアセトインを形成した。特に *Sc. liquefaciens* では消費葡萄糖に対し 39% にも達するアセトインを生成し、乳酸は 2.6% しか作らなかった。

(2) ヘテロ型菌は同じ好気条件で何れもアセトインを生成しなかった。

第4表 五炭糖の好氣的酸酵

菌 株	基 質	五 炭 糖	<i>Sc. faecalis</i>		<i>L. xylosum</i>	
			アラビノース		キシロース	
培 養 条 件			静 置	振 盪	静 置	振 盪
初 消 費	糖	mg	950	950	950	950
生 成 物	糖	mg	950	650	950	950
	醋 酸	mg	160*	300	405	405
	乳 酸	mg	650	170	510	105
	アセトイン	mg	15	190	15	105

培養: 100 ml, 30°, 3 日

* クロモトロープ酸法⁽¹⁹⁾により乳酸が大量に検出される。

第5表 アセトイン生成に及ぼす糖濃度の影響

菌 株	基 質	五 炭 糖	<i>Sc. faecalis</i>			<i>Sc. liquefaciens</i>		
			3,100	5,000	9,700	2,550	4,300	8,700
初 消 費	糖	mg	3,100	5,000	9,700	2,550	4,300	8,700
生 成 物	糖	mg	2,440	4,220	4,450	2,550	4,300	8,700
	醋 酸	mg	160	150	400	200	180	550
	乳 酸	mg	1,100	2,900	2,900	625	1,200	1,500
	アセトイン	mg	545	530	340	760	1,100	2,200
	"	%*	22.3	12.5	7.6	29.4	25.6	25.3

培養: 100 ml, 30°, 3 日, 振盪培養

* 対消費糖生成率

第6表 菌体による二次的アセトイン形成

	静置培養	振盪培養
菌 体	菌 体	菌 体
O ₂ 吸 収 μM	1.0	5.0
CO ₂ 放 出 μM	1.5	9.2
乳 酸 μM	4.5	3.0
アセトイン μM	trace	4.0

菌体: *Sc. liquefaciens*

反応液: 基質葡萄糖 5.0 μM , 休止菌体 10 mg (乾燥量), M/15-磷酸緩衝液 (pH 6.0) 0.6 ml, 全容を蒸留水で 2.0 ml とす。

反応: 35°, 90 分

(3) *Sc. liquefaciens* の静置, 振盪両培養で得た両菌体の二次的アセトインの形成を検討し, 振盪培養より得た菌体は次式に従ってアセトインが生成することを推定した.

一方, 静置培養で得た菌体は葡萄糖よりアセトインを殆ど形成せず, 本菌の葡萄糖からのアセトイン形成能は好氣的培養にて適応的に生成すると考えられる.

(4) *Sc. liquefaciens* より得たアセトインは -67.3° の $[\alpha]_D^{20}$ を示した.

(5) *Sc. faecalis* は五炭糖からも好氣的に消費糖約 30% のアセトインを形成するが, 静置培養で通常考えられている乳酸菌の五炭糖酸酵形式と異り, 更に乳酸生成率の高い酸酵を示すことを見出した.

(昭和 31 年 4 月, 日本農芸化学会大会に発表した.)

(1) M. I. Dolin, I. C. Gunsalus : <i>J. Bact.</i> , 62, 199 (1951).	(11) S. B. Barker, W. H. Summerson : <i>J. Biol. Chem.</i> , 138, 535 (1941).
(2) H. D. Barner, D. J. O'Kane : <i>J. Bact.</i> , 64, 381 (1952).	(12) W. Meijbaum : <i>Z. Physiol. Chem.</i> , 258, 117 (1939).
(3) H. Katagiri, K. Imai : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 19, 9 (1955).	(13) F. Lipman : <i>Nature</i> , 140, 25 (1937).
(4) 山中 啓 : 本誌, 30, 264 (1956).	(14) M. Gibbs, J. T. Sokatch, I. C. Gunsalus : <i>J. Bact.</i> , 70, 572 (1955).
(5) 北原覚雄 : 醸工, 27, 94 (1949).	(15) E. B. Fred, W. H. Peterson, J. A. Anderson : <i>J. Biol. Chem.</i> , 48, 385 (1921).
(6) 山中 啓 : 本誌, 30, 269 (1956).	(16) E. Eegriwe : <i>Z. Analyt. Chem.</i> , 110, 22 (1937).
(7) D. J. O'Kane : <i>J. Bact.</i> , 60, 449 (1950).	(17) 福井作蔵, 大井 章, 大林 晃 : 本誌, 32, 458 (1958); 福井作蔵, 大井 章 : 本誌, 32, 462 (1958).
(8) C. B. Van Niel : <i>Biochem. Z.</i> , 187, 472 (1927).	
(9) W. W. Westerferd : <i>J. Biol. Chem.</i> , 161, 495 (1945).	
(10) T. E. Friedman : <i>J. Biol. Chem.</i> , 65, 47 (1936).	

大豆ヘキソキナーゼの調製*

伊 藤 達 郎 (京都大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 11 月 16 日 受 理

植物ヘキソキナーゼの研究が微生物, 動物に比較して進展しなかった原因の 1 つは適当な材料植物が得られなかったためと考えられる. 本報においては植物約 20 種中から活性の高かったものとして選んだ大豆, 小豆, にんにくおよび酵素研究にしばしば使用される緑豆の 4 種についてその活性を検討し, このうち大豆についてヘキソキナーゼの調製を検討したので報告する. 大豆およびにんにくは活性の高い点で植物ヘキソナーゼ研究に最も適した材料と考えられる.

実験材料および方法

大豆 (つるの子), 小豆 (大納言), 緑豆の種子は水道水につけて 1 夜吸水させた後逆性石鹼で殺菌処理し, 吸水種子の重量と等容量の水を加えてホモゲナイズし, 搾汁, 遠心分離した上澄液を粗酵素とした. にんにく地下茎は剥皮後磨砕し, 以下同様に処理したものを粗酵素として反応に供した. 大豆および緑豆で発芽を行った場合は種子を吸水させた後殺菌し, 同じく殺菌した発芽試験器中にひろげ, これを 23° または 26° の恒温器中に保った.

ヘキソキナーゼおよび ATPase 活性の測定方法は既報⁽¹⁾と同じであり, ヘキソースは D-グルコース (市販注射用) を用いた.

実験結果

1. 大豆, 小豆, 緑豆およびにんにくのヘキソキナーゼ活性 第 1 図はこれら 4 種植物の粗酵素の活性であり, 第 2 図は硫酸分別後の活性である. 硫酸分別は飽和硫酸溶液を用い, 0~0.5, 0.5~0.7 飽和の 2 画分をと

*The Preparation of Soy Bean Hexokinase.

By Taturō ITOH (Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyoto University)