ずである。しかし実際は上述の如く pH 8.0 と 11.0 とにおいて実施した磷酸カルシウムクロマトグラフ分析の結果、両者の差は pH 6.8 の場合とほぼ同一であった。この事実は蛋白の正荷電が磷酸カルシウムの結合に重要な貢献をしていないことを示している。また各標品についてみても中性よりアルカリ性となってアミノ基やグアニジノ基の正荷電が減少しているにもかかわらず、非常に溶出され易くなった。このことは蛋白の荷電量の増加が正荷電減少による吸着増大の効果を打ち消すに至ったものと解されるのである。

要 約

(1) グアニジン化卵白アルブミンとよとの卵白アルブミンとの滴定曲線を求め、カルボキシル基の解離に関する部分で両曲線が完全に一致することを認めた。

(2) 陰イオン交換体 DEAE セルロースを用い、pH 6.8 においてクロマトグラフ分析を行ない、グアニジン化卵白アルブミンと卵白アルブミンはいずれもイオン強度 0.2 附近で溶出されることを認めた。

(3) アルカリ性 (pH 8.0 および pH 11.0) において磷酸カルシウムクロマトグラフ分析を行ない、グアニジン化アルブミンと卵白アルブミンは共に中性 (pH 6.8) の場合に比べて著しく溶出され易くなり、0.005 M の磷酸塩緩衝液で大部分が溶出されることを認めた。しかしアルカリ性において両蛋白のクロマトグラムの相異が中性のときに比べてさらに顕著となるという現象はみられなかった。

(4) 以上の結果、グアニジン化卵白アルブミンが磷酸カルシウムクロマトグラフ分析において、卵白アルブミンよりも著しく溶出され易くなったのは、アミノ基に比べてグアニジノ基がカルボキシル基等のアニオン基に対する相互作用が大きくてカルシウムイオンと陰イオン基との吸着に妨害作用をおよぼしたためではないことを確認した。また蛋白の正荷電は磷酸カルシウムクロマトグラフィーには重要な貢献をしていないことを知った。

(1) A. Tiselius, S. Hjertén, Ö. Levin: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 65 , 132 (1956).	(6) 水島三一郎, 赤堀四郎: 蛋白質化学 II, 共立出版, 247 (1954).
(2) 田中 弘, 米沢大造: 本誌, 37 , 1 (1963).	(7) W. L. Hughes, H. A. Saroff, A. L. Carney: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 71 , 2476 (1949).
(3) 近藤金助: 化学実験学第 2 部, 第 11 巻, 河出書房, p. 741, 昭和 17 年.	(8) Felix Haurowitz: "Chemistry and Biology of Proteins", Academic Press, Inc., N. Y., 1950, p. 65.
(4) Roger G. Bates: "Electrometric pH Determinations", J. Wiley & Sons, Inc., N. Y., 1954, p. 118.	(9) 田中 弘, 米沢大造: 本誌, 36 , 966 (1962).
(5) 米沢大造, 田中 弘: 本誌, 35 , 326 (1961).	(10) 田中 弘, 米沢大造: 本誌, 36 , 968 (1962).

〔農化 第 37 卷, 第 1 号, p. 10~16, 1963〕

微生物の孢子形成並びに発芽に関する研究 (第 2 報)*

Bacillus coagulans の replacement sporulation と諸因子の影響

天 羽 幹 夫 (醸造科学研究所吹田研究所)

昭和 37 年 4 月 20 日 受 理

1952 年に Hardwick and Foster⁽¹⁾ は *Bac. mycoides* の栄養細胞 (以下細胞と略す) を蒸留水中に入れ換えて振盪すると、数時間ないし十数時間後に細胞の 90% 以上が孢子となることを報告し、これを "endotrophic sporulation" と呼んだ。しかるに Powell and Hunter⁽²⁾ は数種の *Bacillus* について追試した結果、蒸留水中での孢子形成は最初の菌数の数% 以下に過ぎず大部分の細胞が lysis (溶菌) を起してしまうことから、lysis の産物を利用して残りの細胞が孢子を形成するものと反論した。これに対し Foster ら⁽³⁾ は、彼等の菌では lysis がほとんど起らないことを確認した。その後この培地入れ換えの方法 (replacement sporulation) は、中温性菌

* Studies on Sporulation and Spore Germination in Microorganisms. Part II. Factors Affecting Replacement Sporulation in a *Bacillus coagulans* Strain.
By Mikio AMAHA (Brewing Science Research Institute)

の胞子形成の生理ないし生化学的研究にしばしば用いられている⁽⁴⁻⁶⁾が、高温性菌については報告がない。

前報において著者ら⁽⁷⁾はトマト製品の変敗菌 *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans* の数菌株を用い復合培地での胞子形成条件を検討した結果、ペプトン寒天培地ではマンガン塩 (MnSO_4 1 p. p. m.) の添加により全菌株の胞子形成が著しく促進されること、液体培地 (振盪培地) では代表菌株 43 P の胞子形成には、マンガン以外にさらにリンゴ酸の如き TCA-サイクルの有機酸の添加を必要とすることを報告した。

本報の実験は、replacement のテクニックを利用して上記マンガン及び有機酸の胞子形成促進作用の機構を追究する目的で行なったのであるが、前記の如き Foster-派及び Powell-派の見解の相異の原因についても若干の示唆を与えるものである。

実 験 方 法

菌株 : *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans* strain 43 P. 1952 年に National Canners Association より分与されたもので前報⁽⁷⁾においては 43 P-1 と記載した。

実験方法 : 繁殖細胞を得るための培養基は Thermoacidurans broth (proteose peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, glucose 0.5%, K_2HPO_4 0.4%, pH 7.0) を基本とし、これに $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 p. p. m. 添加したものを用了。300 ml 容のフラスコ中に 50 ml の培地を入れ、同じ培地に胞子から 7 時間振盪培養した前培養 1 ml を接種して 45° で振盪培養を行なった。この方法では本菌の生育は極めて急速にほとんど lag phase なしに進行するので⁽⁷⁾、2.5, 4.0, 7.0, 12.0 時間後にそれぞれ遠心分離して生育細胞をとり、冷蒸留水で 2 回ないし 3 回洗滌後、細胞を蒸留水、食塩水等の replacement media に懸濁し、元のブロス中の細胞濃度になるよう調整する。次にこの細胞懸濁液 5 ml を無菌的に 50 ml 容の三角フラスコに入れ、45° に振盪を続け 20 時間後、及び 40 時間後に全細胞数、胞子 %, 及び懸濁液の pH を調べた。

胞子 % は常法に従いマラカイトグリーン及びサフラニンでスライド上に染色し、顕微鏡下に 3 ないし 5 視野少なくとも 500 の細胞を調べて決定した。振盪中に細胞の lysis が起る場合には、振盪後の懸濁液中の胞子 % を比較して、胞子形成の多寡を論ずることは妥当でないので、Powell and Hunter の方法⁽²⁾に従い、胞子収量 (spore yield) を算出して比較した。

$$\text{胞子収量}(\%) = \text{一定時間後の胞子}\% \times \frac{N_1}{N_0}$$

ただし N_0 は replacement media 中の最初の菌数、 N_1 は一定時間振盪後の菌数 (胞子を含む)。

N_0 及び N_1 の菌数計算は、Petroff-Hausser chamber を用い chamber 中少なくとも 5 つの異なる区割中の細胞数を数えた。

この胞子収量は replacement media 中の最初の細胞数に対する形成された胞子の割合 (%) である。各試験区毎に平行して 2 つのフラスコを振り、各々から 2 回ずつサンプルをとって合計 4 つの胞子収量を求め、その平均値をもって比較したが、かくして得られる胞子収量値はかなりのフレがあるので、各試験区間の胞子収量の差異の有意性を確めるために、“t”-test による検定⁽⁸⁾を行なった。

結 果

(1) Replacement media の種類と細胞の年齢の影響 予備実験として 43 P の細胞を蒸留水中に懸濁し 45° (生育適温) で振盪したところほとんどすべての細胞が lysis を起し胞子形成が全く認められなかったが、その後細胞の年齢及び replacement 液の種類が重要な因子であることが判明した。

第 1 表は 3 種の replacement 液中での各種年齢の細胞の胞子形成 % 及び胞子収量 % を示す。蒸留水中では 2.5 時間培養の若い細胞 (lag-phase の後期) 及び 10 時間培養の古い細胞 (静常期) は 90% 以上の細胞が溶菌してしまい胞子が全くできず、7 時間培養の細胞 (対数期の終り頃) のみが胞子形成を行ない、40 時間振盪後約 35% の胞子収量を与えた。しかし食塩水 (0.85% NaCl) または M/30 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 中では溶菌がかなり抑制され胞子形成率及び胞子収量が増大する。7 時間の細胞の 40 時間振盪後の胞子収量は食塩水中で 49.8%, 磷酸緩衝液中で 41.3% であったが、“t”-test を行なうと両者の差は $P < 0.05$ で有意であった。これらの結果から試験菌 43 P においては、生理的食塩水中に細胞を懸濁した場合に、胞子形成が早く行なわれ胞子収量も高いことがいえよう。7 時間の細胞 (対数期の末期の細胞) が最高の胞子形成を行ない、その胞子収量は 49% に過ぎないが、とにかく non-nutrient media 中で栄養分を与えずに、胞子形成を行なうのであるから、試

第 1 表 *Bac. coagulans* strain 43 P の replacement sporulation に対する懸濁液の種類と細胞年齢の影響

細胞の 年 齢	懸濁液の 種 類	最初の 細胞数 $\times 10^7$ / ml	45°で 20 時間振盪後				45°で 40 時間振盪後			
			細胞数 $\times 10^7$ / ml	胞 子 %	胞 子 収 量 %	胞 子 収 量 %	細胞数	胞 子 %	胞 子 収 量 %	胞 子 収 量 %
時間 2.5	蒸 留 水	30	3.1	0	0	0	3.0	0	0	0
	生理的食塩水	30	15.1	28.5	9.9	9.9	10.3	30.1	10.3	10.3
	磷酸緩衝液	30	10.5	0	0	0	13.2	0	0	0
時間 7.0	蒸 留 水	50	48.2	0	0	0	44.5	39.9	35.3	35.3
	生理的食塩水	50	49.6	45.8	45.4	45.4	45.1	55.2	49.8	49.8
	磷酸緩衝液	50	49.5	30.1	29.8	29.8	30.5	67.8	41.3	41.3
時間 10.0	蒸 留 水	55	18.2	0	0	0	9.8	0	0	0
	生理的食塩水	55	50.2	39.8	36.3	36.3	29.8	70.3	38.1	38.1
	磷酸緩衝液	55	54.3	24.6	24.3	24.3	38.6	50.4	35.4	35.4

(注) 磷酸緩衝液: pH 7.0 (M/30 Na_2HPO_4 6: M/30 KH_2PO_4 4 の混液)第 2 表 金属塩類の影響
(strain 43 P: 8 時間培養の細胞を使用)

Replacement media	添加した 金属塩類	45°, 42 時間後 の胞子収量%
蒸 留 水	なし	25.4 ± 2.2
	MnSO_4 1 p. p. m.	24.2 ± 2.4
	なし	45.8 ± 2.9
NaCl 0.85% (0.145 M)	MnCl_2 1 p. p. m.	40.4 ± 2.3
	" 15 "	0 (溶菌)
	" 200 "	0 (溶菌)
	CaCl_2 200 "	49.3 ± 2.6
	MgCl_2 400 "	59.4 ± 1.5
KCl (0.145 M)	400 "	18.3 ± 1.3
Na_2SO_4 (0.145 M)	—	24.2 ± 2.3
	—	15.8 ± 2.8

ルに比し MgCl_2 の場合は $P < 0.01$ で高度の有意差 (促進) であるが, CaCl_2 の方は $P > 0.05$ で有意差とはいえない (ただし CaCl_2 は 200 p. p. m. 以上加えると細胞が凝集してしまうので高濃度での試験が不可能である)。一方食塩水 (0.145 M NaCl) に KCl (400 p. p. m.) を添加した場合, あるいは食塩水の代りに同じモル濃度 (0.145 M) の KCl または Na_2SO_4 中で細胞を振った場合は, コントロールの食塩水に比し胞子収量が著しく低下しその差は有意差であった。従って K^+ 及び SO_4^{--} イオンは endotrophic sporulation に有害であると判定される。また食塩水の濃度を増大せしめると 1.7% NaCl まではコントロール (0.85%) と有意差がないが, 5.0% NaCl になると振盪中に細胞の lysis が著しく進み胞子収量は 3% という値に低下した。

(3) Replacement media の pH の影響

生育中に培地の pH が酸性に低下してしまうと胞子ができにくいことは既に知られている⁽⁹⁾が, Hardwick and Foster⁽²⁾ は *Bac. mycoides* の endotrophic sporulation の場合 pH 6.0 以下になると胞子形成が著しく阻害される事実を確認している。われわれの試験菌はその名の如く (var. *thermoacidurans*), pH 3.8 附近の酸性まで生育し得る菌株であるので, 10 時間培養の細胞をとり, これを pH 5.0 から 8.5 までの各種磷酸緩衝液に懸濁して 45° に振盪し, 48 時間後の胞子収量を調べた。第 1 図はこの実験で lysis を起さずに残存した全細胞数 % と胞子収量 % の両方を示

験菌 43 P も “endotrophic sporulation” を行なう能力を有するものと判定される。

(2) Endotrophic sporulation に対する金属イオンの影響 次に 8 時間培養の細胞を用い, 蒸留水または生理的食塩水を basal replacement media としてこれに各種の金属塩を加えて endotrophic sporulation

に対する影響を調べた。前報⁽⁷⁾の場合はペプトン培地へのマンガン塩の添加が胞子形成を著しく促進したが, 本実験で replacement media に MnSO_4 1 p. p. m. を加えても何らの効果もない。さらに濃度を増加し食塩水中に MnCl_2 を 15 p. p. m. 以上加えると細胞の完全な lysis が誘起された (第 2 表)。この Mn のネガティブな効果は若い細胞 (3.5 時間) または古い細胞 (12 時間) に対しても同様であった。

第 2 表に示した如く食塩水中に CaCl_2 (200 p. p. m.) または MgCl_2 (400 p. p. m.) を添加した場合には胞子収量が若干増大した。“t”-test の結果は, コントロール

第 1 図 *Bac. coagulans* strain 43 P の endotrophic sporulation に対する replacement 液 (M/30 磷酸緩衝液) の pH の影響 (前培養 10 時間の細胞を使用し, 最初の菌数は 5×10^8 /ml)
48 時間振盪後の □ 残存細胞 ▨ 胞子収量

したものである。最高の胞子収量は pH 7.0 で得られ、細胞の残存率もまたこの pH で最大であった。磷酸緩衝液の pH によって lysis の程度が大きく左右され殊に pH 6.0 以下では最初の菌数の 95% 以上が lysis を起すことが明らかである。このことは *Bac. terminalis* の生産する autolytic enzymes の作用最適 pH が 5.0 と 5.5 の間にあるという事実⁽¹⁰⁾と照合して注目される。

(4) グルコース添加の影響 *Bac. mycoides* の細胞を磷酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁して振盪して胞子形成を行なわせる場合グルコースを 0.2% 添加すると胞子形成が完全に阻害されることが Hardwick and Foster⁽¹¹⁾ によって報告され、このグルコースの阻害作用は彼等の提唱する sporogenesis theory の一重要根拠となっている。そこで試験菌 43 P の 7 時間及び 16 時間培養の細胞を用いて、3 種の replacement media に懸濁してグルコース添加の影響を調べた。第 3 表 Replacement sporulation に対するグルコース (0.05%) 添加の影響

第 3 表の結果の如く蒸留水及び食塩水中ではグルコース (0.05%) の添加が、43 P の 7 時間及び 16 時間培養の細胞の胞子形成を阻害するが M/30 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 中では何ら有意な影響がない。振盪後の液の pH をみると、磷酸緩衝液はわずかにアルカリ性側に傾くが、蒸留水または食塩水ではグルコースの存在により終末 pH が酸性側にとどまっている (ただし 7 時間細胞を食塩水中で振った場合は例外で胞子収量約 25%, 最終 pH は 8.03 となった)。

Replacement media	7 時間培養の細胞			16 時間培養の細胞		
	溶菌率 %	胞子収量 %	pH	溶菌率 %	胞子収量 %	pH
蒸 留 水	12	36.0	8.25	68	0	7.90
蒸留水+グルコース	10	0	6.38	85	0	5.17
磷酸緩衝液 (M/30)	39	40.8	7.12	49	28.4	7.39
同上+グルコース	50	43.1	7.41	56	30.8	7.28
生理的食塩水	10	50.5	7.92	52	36.2	8.06
同上+グルコース	39	24.6	8.03	83	0	4.93

註) 上表中の溶菌率、胞子収量及び pH は、45° で 48 時間振盪後の値を示す。溶菌率は最初の細胞数 (4×10^8 /ml) に対する溶菌消失した細胞数の %。

従ってグルコースの胞子形成阻害効果は、われわれの試験菌においては菌の代謝によって有機酸が蓄積し、pH が低下するため胞子形成が阻害されあるいは細胞の lysis が誘起される (第 1 図) と考えるのが妥当のようである。

(5) 各種阻害剤の影響 胞子形成時にアミノ酸あるいはプリンの代謝拮抗物を加えると胞子形成が阻害されることは既に Foster ら⁽⁴⁾, Krask⁽¹¹⁾, 中田ら⁽⁶⁾により報告されている。もし細胞の繁殖に必要な生化学的変化と胞子形成に際して行なわれる生化学的変化が何らかの相異があるならば、細胞の繁殖を阻害する阻害剤が、胞子形成に対しては何ら阻害を示さないこともあり得る。Replacement の方法を用いると生育 (繁殖) と切り離して胞子形成に対する影響のみを調べることが可能であるので、試験菌 43 P の endotrophic sporulation に対する酵素阻害剤、代謝拮抗物質、抗菌性物質の影響を調べた。Replacement media として 0.85% 食塩水を用い、あらかじめ各種阻害剤を一定濃度に溶かしておき (必要の場合は pH を約 6.8 に調節)、これに 8 時間培養の細胞を 6.0×10^8 /ml の濃度に添加し 45° で振盪し、42 時間後の胞子収量、溶菌率を決定した。

モノヨード酢酸、アザイド、KCN、2,4-ジニトロフェノール、ジピリジル、昇汞、亜砒酸塩は 1 mM の存在で完全に胞子形成を阻害しほとんど完全な溶菌を起させた。NaF は 20 mM の濃度で胞子収量が対象の約半分 (21%) に低下した。また金属捕捉剤 8-ヒドロキシキノリン及び EDTA は 5 mM の濃度でほとんど完全な溶菌を誘起し胞子はできない。代謝拮抗物質では, methionine sulfoxide (抗グルタミン酸), DL-ethionine (抗メチオニン) が 5 mM の存在でほとんど完全な溶菌を起させ, norleucine (抗メチオニン) 及び 2-アミノ-4-メチルピリミジン (抗ピリミジン) も 5 mM で有意 ($P < 0.05$) な阻害を示した。またストレプトマイシン、クロロマイセチン及びオーレオマイシンの 3 者は Weinburg⁽⁶⁾ の場合と同様に 25 μ /ml の濃度で完全に胞子形成を阻害し、溶菌を起させた。かくの如く予想に反しほとんどすべての阻害剤が、胞子形成を阻害した。

(6) 有機酸及びアミノ酸添加の影響 これまでの replacement の実験では試験菌の胞子収量は最高 50% に過ぎないので、次に生理的食塩水を replacement 液としこれに各種有機酸或はアミノ酸を加えてその影響を調べた。添加試験物質は、酢酸、焦性ブドウ酸、乳酸、 α -ケトグルタル酸、クエン酸、リンゴ酸、オキザロ酢酸 (エチルエステル)、L-アラニン、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-アスパラギン、DL-リジン、L-アルギニン、グリシンで、あらかじめ蒸留水にとかし必要あれば pH を 7.0 に調整しておき、各々単独に食塩水中に 0.05% の濃度に添加した。まず 7 時間培養の細胞を用いて上記諸物質の影響を調べた結果、L-

第 2 図 Age の異なる細胞の replacement sporulation に対する有機酸及び L-アラニン添加の影響

x—x L-アラニン □—□ リンゴ酸
●—● control △—△ α -ケトグルタル酸

第 4 表 生理的食塩水中での孢子形成に対するアラニン及び類縁物の影響

食塩水への添加物質	45°, 42 時間振盪後	
	溶菌率 %	孢子収量 %
なし (コントロール)	23	38.2 ± 3.5
L-アラニン	1 mM	20
	5 mM	16 (S) 65.2 ± 2.5
	10 mM	12 (S) 69.5 ± 3.1
D-アラニン	1 mM	31 (D) 20.8 ± 2.9
	5 mM	33 (D) 19.4 ± 2.1
DL-アラニン	5 mM	40 36.8 ± 3.2
焦性ブドウ酸 + NH ₄ ⁺	5 mM	42 (D) 22.3 ± 3.8
β -アラニン	5 mM	16 (D) < 0.8
DL-フェニルアラニン	5 mM	38 (D) < 0.8

(註) 試験菌 43P の 8 時間培養の細胞を使用。(S)は“t”-テストの結果有意な促進と判定されたもの、(D)は有意な阻害を示す。

当)及び 24 時間培養(静常期の末期)の細胞をとり、蒸留水、生理的食塩水及び磷酸緩衝液(M/30, pH 7.0)に懸濁して 45° に 40 時間振盪するといずれも 80% 以上の溶菌率で溶菌を起し、孢子は全くできない。またこれらの液中に MnSO₄ 1 p. p. m. を加えてみたが何らの効果も示さなかった。

従ってマンガン無添加の thermoacidurans broth 中に生育した細胞は、食塩水などの non-nutrient media 中での endotrophic sporulation の能力を欠失した細胞 (asporogenic cells) であり、この asporogenic cells にマンガンを与えても孢子形成の方向へ刺激する作用はないことになる。すなわちマンガンは、生育培地中で増殖中の細胞に孢子形成能を賦与せしめる役をなすものと判定される。

次にマンガン無添加培地で生育した細胞を磷酸緩衝液に懸濁し、これにリンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、乳酸、焦性ブドウ酸、グルコース等を 0.05% 添加してその影響を調べた。45° で 40 時間振盪後の溶菌率及び孢子収量は第 5 表の如くであった。前述のマンガン添加培地からの細胞の場合には、グルコース、乳酸、焦性ブドウ酸は孢子形成に有害または無効であったが、今回の実験ではすべての有機酸及びグルコースが孢子形成促進に有効であった(無添加区は全く孢子をつくらない)。L-アラニンはここでも最高の孢子収量を与え、10 時間培養の細

リンゴ酸、 α -ケトグルタル酸、及び L-アラニンの 3 者のみが、対象(無添加)に比し孢子収量を増大せしめ、他の酸類はむしろ有害または無効であった。第 2 図は、これら 3 物質の効果を老若各段階の細胞について調べた結果である。L-アラニンは 0.05% (約 5 mM) の添加で 2.5 時間培養から 17 時間培養に至るすべての年齢の細胞の孢子形成を促進し、7 時間培養の細胞では孢子収量 70% という最高値を与えた(45°, 48 時間振盪後)。この場合細胞の溶菌率も低く(10% 以下)、非染色標本では 90% 以上の孢子形成率と認められたが、染色法では上記の如くやや低い値となった。

リンゴ酸及び α -ケトグルタル酸は、第 1 報⁽⁷⁾の複合培地の実験でも試験菌 43P の孢子形成を促進したが、本実験においても若い細胞(7 時間培養まで)の孢子形成を促進している。しかし古い細胞(12 時間培養以上)ではむしろ孢子形成を阻害するようである。

L-アラニンが極めて有効な促進効果を示したので次にアラニンの類縁物の効果を調べた。その結果は第 4 表の如く D-アラニンは 1~5 mM で孢子形成に対し阻害的であり、DL-アラニン(5~10 mM)は無影響であった。また焦性ブドウ酸 + NH₄⁺ (5 mM) は有害であり、殊に β -アラニン、DL-フェニルアラニン(5 mM) は著しい阻害効果を示した。 β -アラニンの孢子形成阻害作用は既に *Bac. cereus* について Foster and Heiligman⁽¹²⁾ が報告している。

(7) マンガン無添加の培地に生育した細胞の孢子形成能 これまでの実験はすべて MnSO₄ 1 p. p. m. を添加した thermoacidurans broth 中に生育した細胞を用いたが、第 1 報⁽⁷⁾で詳述したマンガンの孢子形成促進作用の機構を探究するため、マンガン無添加の thermoacidurans broth 中に振盪培養してできた細胞について、replacement sporulation の能力を調べた。

上記培地中 10 時間培養した細胞(対数期の後期に相

胞では孢子収量約 54% となった。これらの事実から、マンガン無添加培地で生育した細胞は、そのままでは孢子形成へと動き出す能力を欠いており、グルコース、有機酸等が与えられれば、それらを使って sporogenesis の方向への組み換えを行なった後、孢子を形成するものと思われる。

第5表 マンガン無添加培地で生育した細胞の孢子形成能

Replacement media	添 加 物	10 時間培養の細胞		24 時間培養の細胞	
		溶菌率 %	孢子収量 %	溶菌率 %	孢子収量 %
蒸 留 水	—	95	0	85	0
生理的食塩水	—	90	0	87	0
	—	85	0	80	0
M/30 磷酸緩衝液 (pH 7.0)	リンゴ酸 0.05%	50	23	30	11
	α -ケトグルタル酸 0.05%	15	38	20	16
	乳 酸 0.05%	18	35	29	<0.3
	焦性ブドウ酸 0.05%	10	28	12	<0.3
	グルコース 0.05%	11	28	23	8.6
	L-アラニン 5 mM	8	54	27	38

考 察

前報⁽⁷⁾において試験菌 43 P は thermoacidurans broth (以下 T. broth と略す) に振盪培養した場合 MnSO_4 1 p. p. m. を添加しても孢子はほとんどできず Mn と共にリンゴ酸または α -ケトグルタル酸を添加して始めて 60% 程度の孢子形成が行なわれた。本報の replacement sporulation の実験では、Mn を強化した T. broth に生育した細胞は食塩水の中で外的栄養なしにかなり (約 50%) の孢子形成を行ない得ることが分った。一方 Mn 無添加培地に生育した細胞は、外的栄養なしでは孢子形成を行ない得ないのであるが、食塩水または磷酸緩衝液にグルコース、有機酸等の力源を加えれば、孢子形成を行ない得る。第1報の如く試験菌 43 P を T. broth 中で振盪培養をつづけた場合、Mn の存否にかかわらず5日後に至っても孢子のできない理由は、(1) このペプトン培地中に何らかの antisporulation factor がある、(2) 菌の増殖と共に各種の by-products が蓄積しそれらが孢子形成を阻害する、の2つの可能性が考えられる。前者については Foster ら⁽¹³⁾は $\text{C}_{12}\sim\text{C}_{18}$ の不飽和脂肪酸がペプトン中において孢子形成を阻害すると報告しているので彼等の方法に従い、T. broth の活性炭処理あるいは澱粉添加を試みたが、われわれの菌では何らの効果もなかった。

実験 (5) において各種酵素阻害剤、及び代謝拮抗物が孢子形成を阻害した事実、実験 (6) において有機酸やアミノ酸の添加が (L-アラニン、リンゴ酸等特定のものを除いては) 多くの場合孢子形成を阻害した事実、また逆に実験 (7) の Mn 欠培地からの細胞では有機酸の添加が孢子形成を誘導した事実等は、Foster and Heiligman⁽¹²⁾ のいう如く“孢子は細胞内で一連の酵素反応が一定のバランスの下に孢子形成の方向へ integrate された時にのみ形成される”のであろう。

なお本報では L-アラニンが replacement media 中で孢子形成を促進する事実が見出されたが、次報で詳述する如く、L-アラニンはこの菌の孢子の発芽を極めて特異的に促進する。また Mn イオンは Levinson ら⁽¹⁴⁾によると *Bac. megaterium* の孢子の発芽を促進するという。同じ物質が孢子形成と発芽の両方に促進的に働く事実は、孢子形成と発芽とはその方向が逆であるが、生化学的变化の一部が共通であることを暗示している。

要 約

Bac. coagulans var. *thermoacidurans* strain 43 P の栄養細胞を non-nutrient media に入れ換えて 45° に振盪し、いわゆる“replacement sporulation”に対する諸因子の影響を調べた。

(1) 対数期の末期の細胞を 0.85% 食塩水に懸濁した場合に最高の孢子収量 (約 50%) が得られた。蒸留水中では溶菌が甚しい。磷酸緩衝液の場合は pH 7.0 が最も良い孢子収量を与え pH 6.0 以下では溶菌率が大きい。

(2) Mg^{2+} イオンの添加は孢子形成を促進したが、 Ca^{2+} 及び Mn^{2+} は無効であり、 K^+ 及び SO_4^{2-} は有害であった。

(3) グルコース (0.05%) の添加は、蒸留水及び食塩水では明らかに有害であったが、磷酸緩衝液では何ら影響がない。

(4) 各種酵素阻害剤、代謝拮抗物質及び抗生物質を添加するといずれも孢子形成を阻害し、溶菌を惹起した。

(5) Replacement medium (0.85% 食塩水) に各種アミノ酸及び有機酸を添加して効果を調べたが、アミノ酸では L-アラニンのみが老若いずれの細胞に対しても著しく孢子形成を促進した。若い細胞では、リンゴ酸、

及び α -ケトグルタル酸の添加で孢子形成が促進されるが, 古い細胞ではむしろ有害であった。

本研究は, 米イリノイ大学 Department of Food Technology で行なったもので, 昭和 32 年 2 月日本農芸化学会関東支部講演会にて発表した。邦文での発表を許可された Z. J. Ordal 教授に感謝の意を表する。

(1) W. A. Hardwick, J. W. Foster: <i>J. Gen. Physiol.</i> , 35 , 907 (1952).	(8) G. W. Snedecor: "Statistical methods", 4th ed., Iowa State College Press, Ames, Iowa (1946).
(2) J. F. Powell, J. R. Hunter: <i>ibid.</i> , 36 , 601 (1953).	(9) G. Knaysi: <i>Bact. Rev.</i> , 12 , 50 (1948).
(3) J. J. Perry, J. W. Foster: <i>ibid.</i> , 37 , 401 (1954).	(10) R. A. Greenberg, H. O. Halvorson: <i>J. Bact.</i> , 69 , 45 (1955).
(4) J. W. Foster, J. J. Perry: <i>J. Bact.</i> , 67 , 295 (1954).	(11) B. J. Krask: <i>ibid.</i> , 66 , 374 (1953).
(5) E. D. Weinberg: <i>ibid.</i> , 70 , 289 (1955).	(12) J. W. Foster, F. Heiligman: <i>ibid.</i> , 57 , 639 (1949).
(6) D. Nakada, A. Matsushiro, T. Miwatani: <i>Med. J. Osaka Univ.</i> , 6 , 1047 (1956).	(13) J. W. Foster, W. A. Hardwick, B. Guirard: <i>ibid.</i> , 59 , 463 (1950).
(7) M. Amaha, Z. J. Ordal, A. Touba: <i>J. Bact.</i> , 72 , 34 (1956).	(14) H. S. Levinson, M. G. Sevag: <i>J. Gen. Physiol.</i> , 36 , 617 (1953).

〔農化 第 37 卷, 第 1 号, p.16~20, 1963〕

米デンプンの生化学的研究 (第 11 報)*

水稻粳米デンプンのヨウ素反応

倉沢文夫, 伊賀上郁夫, 早川利郎 (新潟大学農学部)

昭和 37 年 5 月 9 日 受 理

米飯の食味は淡白ではあるが, 米の品種の相違によって相当差異のあることを経験する。吉川⁽¹⁾は多数の品種について食味の調査をして, 食味に関係する因子として粘り, 味, 香り等をあげているが, 総合評価には味は大切ではあるが, 粘りとか, 香りが大きく影響することを認めている。既報⁽²⁾において私達は水稻粳米飯の食味(粘り, 味, 香り)の調査をして, 食味を中心として等級をつけることができた。次にこれらの品種について, 近藤等⁽³⁾の方法による上皿天秤を改良した装置を用いて米飯の粘着度を測定した結果, 米飯の食味は米飯の粘着度と密接な関係のあることを認めた。すなわち食味のよい米飯は粘着度が大きであった。

食味と味すなわちアミノ酸との関係については岡崎⁽⁴⁾の研究がある。一方米飯の性質を鑑識する方法として, デンプン-ヨウ素呈色度を測定する方法については, Halick⁽⁵⁾, Batcher⁽⁶⁾, 斎藤等⁽⁷⁾, 谷等⁽⁸⁾の研究がある。従来の研究は米飯の食味を調査し, 食味と炊飯後溶出液のデンプン-ヨウ素呈色度との関係を系統的に調査した報告はない。私達⁽⁹⁾は Batcher の方法によって白米に約 20 倍量の水を加え, 97° で 20 分間加温後, 溶出液のデンプン-ヨウ素呈色度を測定したのに粘りのある米飯は呈色度が淡く, 粘りの少ない米飯は呈色度が濃いということを知った。一方米の品種の相違によって, デンプンの性質が若干異なることを認めた⁽¹⁰⁾。

米飯の粘りの多い, 少ないということと, 白米に約 20 倍量の水を加えて加温後溶出液のデンプン-ヨウ素呈色度の淡い, 濃いということは当然米飯のデンプン組織構造の相違に基くものと思われる。

本報告においては米飯の炊飯特性とデンプンとの関係について研究することにした。すなわち数年にわたって粘りのある品種と, 粘りの少ない品種よりそれぞれデンプンを調製し, デンプンの性質について研究した。特に米飯の炊飯特性とデンプンのヨウ素呈色度との間に密接な関係のあることを認めた。得られた結果を報告する。

* Biochemical Study of Rice Starch. Part XI. Iodine Reaction of Non-glutinous Rice Starch.
By Humio KURASAWA, Ikuo IGAUE and Toshiro HAYAKAWA (Department of Agriculture, Niigata University).