飲料用乳酸菌の研究(第1報)*

栄養要求性の検討

樋口邦彦, 岡田裕昭, 池辺信夫 (関東ヤクルト株式会社)

昭和 39 年 12 月 19 日 受理

緒 言

諸種の乳酸菌の栄養要求性が, 多くの研究者により報告^(1,2) されているが, 乳酸飲料の製造に用いられている *Lactobacillus acidophilus* の生理的性質については, 多くの不明の点が残っている. 菌の栄養要求性を正確に把握することは, 発酵管理の手段として重要であり, 乳酸飲料の改善, 菌株改良のための基礎知識として必要である. 著者らは, 人腸内から分離した乳酸菌 *Lactobacillus acidophilus* Shirota 株⁽³⁾ (以下 S 株と略す) を中心に, 標準菌株数株についてアミノ酸, ビタミン, 核酸塩基の栄養要求性を比較検討し, それぞれの菌株の生育を満足させる最少培地を考案した.

実験材料及び方法

(1) 菌株: 第1表に示す菌株を用いた.

(2) 培地: 完全合成培地として, バイオアッセイ用標準培地⁽⁴⁾ のビオチンを Tween 80 に置換したものをを用いた. この培地は無機塩, グルコースのほか, 第2表に列挙した成分からなり, R 26 用の完全培地には, デオキシウリジンを加えた. アミノ酸は味の素社製クロマトグラム用試薬, ビタミンは東京化成, 関東化学社製試薬特級, 核酸塩基は NBC 社製, Tween 80 はアトラ

ス社製を使用した. なお, 添加量はバイオアッセイ用標準培地と同量で, デオキシウリジンは 10 mg/l, Tween 80 は 1 g/l である.

(3) 菌の培養法及び生育の測定: 試験菌株は保存寒天培地から完全培地に移植し, 24 時間培養して遠心分離し, 滅菌生理的食塩水で 3 回洗浄して 100 倍に希釈したものを 1 滴ずつ試験培地 10 ml に接種し, 38° で静置培養した. 接種菌数は約 10^6 /ml である. 菌の生育は日立 FPW 4 型光電比色計を用い, 660 m μ で比濁により測定した. 酸度は 0.1 N-NaOH で滴定した. 生菌数はトマトジュース培地上の集落形成数から計測した.

(4) Auxanography⁽⁵⁾: 基礎合成寒天培地(第 4, 5 表参照)をとかりて, 45° 前後に冷したのち, 実験方法 (3) により集めた菌体を 10^7 /ml 程度に懸濁してシャーレに流し込み, 固化させたのち, 供試アミノ酸, ビタミン, 有機塩基等の微量の結晶, または溶液状として濾紙小片にしみこませたものを, 適当な間隔で(スポット様に)載せ培養した. 38°, 2 日培養すると, 要求物質の周囲には菌の生育環が見られた.

実験結果

(1) アミノ酸, ビタミン, 有機塩基に対する要求性 完全培地から 1 種類ずつアミノ酸, ビタミン, 有機塩基等を欠落させた培地を用いて各菌株の生育を調べた(第2表). 欠落により生育が O. D. 0.05 以下に低下する物質を必須とみなした. 全菌株に必須と判定されたビタミンは, リボフラビン, パントテン酸カルシウム, ニコチン酸, ビタミン B₆, 葉酸の 5 種であった.

アミノ酸については, 全菌株共通に必須と認められたものは, アスパラギン酸(アスパラギンも同効果), グルタミン酸(グルタミン), アルギニン, イソロイシン, メチオニン, フェニルアラニン, セリン, チロシン, バリン, トリプトファン, ロイシンの 11 種であった. これらのアミノ酸のほかに, La 3532 株はシスチンを, La

第 1 表

供 試 菌 株	略 称
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Shirota 株	La S 株
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 3532	La 3532
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IAM 1043	La 1043
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Orla-Jensen R 26	La R 26
<i>Lactobacillus thermophilus</i> IFO 3863	Lt 3863

* Studies on the Lactic Acid Bacteria Employed for Beverage Production. Part I. Examination of Nutritional Requirements.

By Kunihiro HIGUCHI, Hiroaki OKADA and Nobuo IKEBE (Kanto Yakult, Co., Ltd.)

第2表 各菌株の欠落培地における生育

供試菌株	La S 株	La 3532	La 1043	La R 26	Lt 3863
完全培地から除いた物質					
無(完全培地)*	0.40**	0.26	0.37	0.21	0.37
アラニン	0.33	0.22	0.31	0.15	0.34
アスパラギン酸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
グルタミン酸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
アルギニン	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
リジン	0.32	0.25	0.36	0.20	0.34
ヒスチジン	0.23	0.01	0.30	0.00	0.36
イソロイシン	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03
メチオニン	0.03	0.02	0.03	0.01	0.05
フェニルアラニン	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
スレオニン	0.30	0.19	0.28	0.00	0.33
チロシン	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
バリン	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
トリプトファン	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
シスチン	0.20	0.00	0.12	0.09	0.18
セリン	0.01	0.05	0.00	0.03	0.01
グリシン	0.33	0.23	0.35	0.10	0.34
ロイシン	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01
プロリン	0.33	0.25	0.37	0.00	0.37
リボフラビン	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
サイアミン	0.40	0.20	0.35	0.20	0.37
ビタミン B ₆ ***	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
パラアミノ安息香酸	0.33	0.25	0.35	0.19	0.36
パントテン酸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
カルシウム	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ニコチン酸	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
葉酸	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
ウラシル	0.00	0.04	0.00	0.10	0.04
アデニン	0.14	0.14	0.25	0.05	0.24
デオキシウリジン	—	—	—	0.00	—

* バイオアッセイ用標準培地⁽²⁾のビオチンを Tween 80 で置換し、かつグアニン、キサンチンを除去した。ただし、La R 26 用培地はデオキシウリジンを追加した。

** 数字は培養 48 時間後の吸光係数を示す。

*** ビタミン B₆ の欠落試験はビリドキシン、ビリドキサールの双方とも除去した。この両者はいずれか一方の添加で菌の生育は満たされる。

R 26 はヒスチジン、プロリン、スレオニンを必須とした。

これらのアミノ酸は、それぞれの菌株に必須と考えられるが、これらのアミノ酸のみを与えても 48 時間の培養では各菌株とも生育しない。完全培地と同程度の生育量を得るための必要な物質で、著しく生育を促進する物質(生育促進物質と定義する)を検索した結果は、第3表のとおりである。すなわち、La S 株、La 1043、La 3532、Lt 3863 の4株はスレオニンを要求するが、この要求性はグリシンで置換効果が認められた。また、La

第3表 各菌株の生育促進アミノ酸

基礎培地*に加えたアミノ酸	O. D.**			
	La S 株	La 1043	Lt 3863	La 3532
なし	0.00	0.00	0.01	0.00
スレオニン	0.10	0.02	0.12	0.04
グリシン	0.09	0.01	0.09	0.02
スレオニン	0.23	0.26	0.20	—
シスチン				
スレオニン	0.25	0.26	0.21	0.20
シスチン				
ヒスチジン	0.25	0.28	0.23	0.22
スレオニン				
シスチン	0.25	0.28	0.23	0.22
ヒスチジン				
プロリン	0.29	0.30	0.27	0.26
完全培地				

* 欠落試験で必須と認められたもののみ(アミノ酸については11種)を入れたものを基礎培地とした。ただし La 3532 の基礎培地はシスチンを追加した。

** 培養 48 時間後の吸光係数を示す。

3532 に対して必須であったシスチンは、La S 株、La 1043、Lt 3863 に対して生育促進効果が認められた。有機塩基については La S 株、La 1043、La 3532、Lt 3863 の4株はウラシルを必須とし、アデニンを生育促進物質

第4表 有機塩基要求性に関する auxanography

スポットした塩基	菌 株			
	La S 株	La 3532	La 1043	Lt 3863
* プリン塩基類	アデニン	+	+	+
	アデノシン	+	+	+
	デオキシアデノシン	+	+	+
	グアニン	+	+	+
	グアノシン	+	+	+
	デオキシグアノシン	+	+	+
	キサンチン	+	+	+
	キサントシン	+	+	+
	イノシン	+	+	+
	ウラシル	+	+	+
** ビリミジン塩基類	ウリジン	+	+	+
	デオキシウリジン	+	+	+
	チミン	—	—	—
	チミジン	—	—	—
	シトシン	—	—	—
	シチジン	—	—	—
	デオキシシチジン	—	—	—

* 完全培地よりプリン塩基を除去した培地を基礎培地とした。

** 完全培地よりビリミジン塩基を除去した培地を基礎培地とした。

+ スポットの周囲に菌の生育を示したものを。

— 菌の生育が認められなかったことを示す。

として要求した. La R 26 はデオキシウリジン (他の菌株では要求性は無かった) 及びアデニンを要求した.

(2) 有機塩基の auxanography

有機塩基に対する要求性は, 各種塩基相互間の置換効果が複雑なので auxanography により詳細に検討した.

La S 株, La 3532, La 1043, Lt 3863 の 4 株は, ピリミジン塩基としてウラシルまたはその誘導体を要求し, チミン, シトシンでは置換できない. ただし La 1043 はウリジンにより生育しなかった. プリン塩基については, 4 株ともアデニン, グアニン, キサンチン及びその誘導体のいずれか 1 種を要求した (第 4 表).

La R 26 の生育にも, 上記 4 株と同様ウラシル及びプリン塩基の 1 種を必要とするが, このほかにデオキシリボシドを要求することが認められた (第 5 表). この結果は従来の報告⁽⁶⁻⁸⁾とほぼ一致する.

(3) 最少培地

以上の結果より, 固体培地で 3 日以内にコロニー形成

を許す最少培地を作製した (第 6 表). La S 株, La 1043, Lt 3863 の 3 株に対する最少培地は, 糖, 無機塩類のほかに, アミノ酸 13 種, ビタミン 5 種, 有機塩基 2 種を加えたものである. 全アミノ酸濃度を 1/2 とした場合に

第 6 表 La S 株用最少培地

アミノ酸	有機塩基
アスパラギン酸 400mg/l	アデニン 10mg/l
グルタミン酸 500 "	ウラシル 10 "
アルギニン 200 "	
イソロイシン 100 "	ビタミン
メチオニン 100 "	リボフラビン 2mg/l
フェニルアラニン 200 "	ピリドキサル 0.2 "
チロシン 100 "	パントテン酸 1 "
セリン 100 "	カルシウム
バリン 200 "	ニコチン酸 1 "
トリプトファン 100 "	葉酸 10 γ /l
ロイシン 100 "	
シスチン 100 "	Tween 80 1 g/l
スレオニン 200 "	

第 5 表 有機塩基に関する auxanography
(La R 26 株)

スポットした塩基	あらかじめ基礎培地* に添加した塩基				
	アウ デラ ニン ル	デオ オリ キジ ン	チ ミ ジ ン	デオ チ キジ ン	デア ン オデ キノ シン
プリン 塩基類	アデニン	—	+	—	—
	アデノシン	—	+	—	—
	デオキシ アデノシン	+	+	—	—
	グアニン	—	+	—	—
	グアノシン	—	+	—	—
	デオキシ グアノシン	+	+	—	—
	キサンチン	—	+	—	—
	キサントシン	—	+	—	—
	イノシン	—	+	—	—
ピリ ミジン 塩基類	ウラシル	—	—	—	+
	ウリジン	—	—	—	+
	デオキシ ウリジン	+	—	—	+
	チミン	—	—	—	—
	チミジン	+	—	—	—
	シトシン	—	—	—	—
	シチジン	—	—	—	—
	デオキシ シチジン	+	—	—	—

* 完全培地よりすべての核酸塩基を除いたものを基礎培地とした.

+...スポットの周囲に菌の生育が認められたもの.

—...生育が認められないもの.

第 7 表 La S 株の培養 48 時間後の完全培地と
最少培地の比較

	最少培地	完全培地
生菌数	22×10^8	25×10^8
吸光係数	0.28	0.36
滴定酸度	1.80/培地 1cc	2.00/培地 1cc

第 1 図 最少培地と完全培地の比較

は、生育程度は約 70% に減少した。

La 3532 の最少培地は、このほかにヒスチジンの添加を要し、La R 26 の最少培地は、さらにデオキシリボスクレオシド、プロリン、ヒスチジン、グリシンを加えたものである。

S 株の最少培地における生育は、濁度、酸度、生菌数共に完全培地と大差なかった(第 7 表)。他の株についても大体同じ傾向であった(第 1 図)。

考 察

整腸作用を目的とした乳酸飲料の製造に用いられる乳酸菌 (Shirota 株) は *L. acidophilus* と同定されていたが、本報の研究の結果、*L. acidophilus* の標準菌株 2 株及び *L. thermophilus* 1 株と極めて類似していた。栄養要求性については、近縁種の乳酸桿菌は類似の栄養要求性を持つことが知られているので (Rogosa: ビタミンの報文)、以上の事実は *L. acidophilus* Shirota 株の分類上の位置⁽⁹⁾を裏書きするものと思われる。

しかし、これらの株のアミノ酸要求性を詳細に検討すると若干の特異性が見られた。すなわち上記 4 株共、アミノ酸 11 種に対して共通した要求性を示すが、その他に *L. acidophilus* 3532 はシスチンを要求し、ヒスチジンを加えればさらに促進効果が見られた。シスチンは他の株に対しても生育促進効果を示したが、ヒスチジンは効果を示さなかった。これらの有効性の差異によって菌株の識別が可能であり、さらに応用菌株の純系維持には実際的方法として有効である。また全株共通の特性として、スレオニンまたはグリシンのうちいずれか一方の添加により生育促進効果が見られたが、既知の生合成経路からはこのような交換性は理解し難い。おそらく *L. acidophilus* 独特の生合成経路を暗示するものと考えられ興味深い。

L. acidophilus R 26 は、以上 4 株とやや異なった要求性を持ち、11 種のアミノ酸のほか、ヒスチジン、プロリン、スレオニンを要求した。また核酸塩基の要求性にも特徴があり、プリン塩基、ウラシルのほかはデオキシリボシドを必須とした。この事実はすでに近年注目をあびている問題であるが、乳酸菌の核酸合成経路に示唆を与えるものであろう。

要 約

L. acidophilus Shirota 株, *L. acidophilus* 3532, *L. acidophilus* 1043, *L. acidophilus* R 26, *L. thermophilus* 3863 の 5 株につきビタミン、アミノ酸、核酸塩基に対する要求性を検討し、かなりの類似性があることを認めたが、アミノ酸及び有機塩基に対する要求性は、菌株により少しずつ異なっていた。

L. acidophilus R 26 を除く 4 株は、等しく 11 種のアミノ酸を要求するほか、シスチン、スレオニン、ヒスチジン等の添加によって生育の促進が見られるものがあった。スレオニンの効果はグリシンにより置換された。またこれらの 4 株はウラシル及びプリン塩基を要求した。

L. acidophilus R 26 はこれら 4 株とやや性質が異なり、11 種のアミノ酸のほか、ヒスチジン、プロリン、スレオニンを要求し、また上記塩基に加えてデオキシリボシドの 1 種を要求した。これらの菌株のそれぞれの要求性を満す最少培地を作製して、生育及び酸生成をしらべたところ完全培地に比肩しうる結果を得た。

終りに臨み、本研究の御指導賜わった東大応微研齊藤日向先生に厚くお礼申し上げます。なお菌株をいただきました東大応微研、武田醸酵研、及びゲーテボルグ大学 Søren Løvtrup 教授に深謝いたします。

本報告の要約は、昭和 39 年 4 月 1 日、日本農芸化学会関東支部会において発表した。

- (1) 矢野信礼, 入江良三郎, 森地敏樹, 見坊 寛: 本誌, **36**, 750 (1962).
- (2) M. Rogosa, J. G. Franklin, K. D. Perry: *J. gen. Microbiol.*, **25**, 473 (1961).
- (3) 代田 稔: 未発表.
- (4) 赤堀四郎, 水島三一郎: 蛋白質化学, **1**, 290 (1957).
- (5) G. Pontecorvo: *J. gen. Microbiol.*, **3**, 122 (1949).
- (6) A. J. Siedler, F. A. Nayder, B. S. Schweigert: *J. Bact.*, **73**, 670 (1957).
- (7) S. Løvtrup, D. Shugar: *ibid.*, **82**, 623 (1951).
- (8) C. Biswas, H. P. Broquist: *ibid.*, **84**, 1124 (1962).