定 pH 培養による *Streptococcus cremoris* の菌体収量について*

入江良三郎, 岡本隆史, 森地敏樹

(農林省畜産試験場)

昭和 48 年 11 月 14 日 受理

Growth Yield of *Streptococcus cremoris* Cultivated at Controlled pH

By Ryozauro IRIE, Takashi OKAMOTO and Toshiki MORICHI

National Institute of Animal Industry, Aoba-cho, Chiba-shi

A simple system for laboratory cultivation of lactic acid bacteria at automatically controlled pH has been described. A strain of *Streptococcus cremoris* was grown at 30°C in a 300 ml quantity of culture medium containing 2% tryptone, 1% yeast extract, 5% lactose and 0.2% NaCl. The pH of the culture was held at 6.0~6.2 using NH_4OH as a neutralizer, which, in accordance with Peebles *et al.*,⁽⁴⁾ proved superior to NaOH or KOH.

It was noted that the main part of the growth curve was linear against culture period (an arithmetic linear growth).

The maximum growth yield of 4.2 mg dry wt./ml (viable count, 3.7×10^9 /ml) was attained after about 12 hours, whereas the alkali consumption continued until the sugar was exhausted. The acid produced was mainly L(+)-lactate.

The overall Y_{ATP} (grams cells formed/mole ATP formed) was about 9, as calculated on an assumption that one mole of ATP was formed per one mole of alkali consumed. However, higher Y_{ATP} value of about 15 was found in the earlier part of the growth. Some physiological and practical implications of these results were discussed.

(Received November 14, 1973)

凍結乾燥スターターや、凍結濃厚スターターを製造する場合に、技術的に問題となる点のひとつは、大量の乳酸菌菌体を簡易に、また安価に得ることである。

乳酸菌は、自分が生産する乳酸によって培地の pH を下げ、多くの場合これが制限因子になって、増殖が止ってしまう。したがって、培地を絶えず中和して pH を一定に保ってやれば、増殖が良くなることが期待される。このような培養法は、実験室的には古くから試みられており⁽¹⁾、最近では凍結濃厚スターター製造のための定 pH 培養の研究が、さかに行なわれている⁽²⁾。

私達も、実用的な定 pH 培養の基礎資料を得、あわせて乳酸菌の増殖や生酸活性に関する生理学的な問題点を明らかにするために、実験を開始した。

実験材料および方法

1. 菌株 当研究室で分離、保存している *Strepto-*

* 乳酸菌の定 pH 培養 (第 1 報)。

coccus cremoris H-61⁽³⁾を使用した。

2. 培地 トリプトン (Difco) 2%, 酵母エキス (Difco) 1%, 食塩 0.2%, 乳糖 5% のものを使用した。乳糖は、別に高圧滅菌し、使用直前に加えた。なお、この培地組成は、Peebles ら⁽⁴⁾によって、濃厚スターターの培養に用いられたのと類似のものである。

3. 前培養 リトマスミルク培養から、上記の培地 30 ml に 1 滴接種し、30°C で 16 時間静置培養したものの (生菌数 4×10^8 cells/ml) を前培養とした。

4. 接種と培養 上記の前培養の全量を、培地 270 ml (総量 300 ml) に加え、アルミはくで覆った 600 ml 容のビーカー中で、マグネチックスターラーで攪拌しながら、30°C で培養した。培養液の pH は、 NH_4OH 、NaOH、または KOH (いずれも約 3N) で、6.0 に保った。

5. pH スタット 手持ちの pH メータ (日立-堀場, H-5 型) と、微量送液ポンプ (“ベリスタ・ミニボ

第1図 pH スタットの構成

培養液中にガラス電極を入れておき、pHメータからの信号を増幅してリレーを動かし、アルカリ供給用のポンプを制御する。

ンプ” ミツミ SJ-1210 型) を利用し、これに自作の直流増幅器とリレー回路を加えて、第1図のように構成した。すなわち、培地中にガラス電極(複合型)をそう入しておき、pHメータから、pH7からのずれに比例した信号をとり出し、これを増幅してリレーを動かし、これでポンプを動かしてアルカリを培地に加えるようにした。pHメータからの信号は、温度補償用電極を外し、この電極用の端子からとり出した(温度補償用電極は、pHを直示するメータと並列に入っており、温度によってその抵抗が変わることを利用して、温度補償を行なっている。したがって、ここには1pHあたり20mV程度の直流電圧があらわれる)。なお、培養温度における温度補償用電極の抵抗(30°Cで約9k Ω)と、直流増幅器の入力抵抗との差によるpH指示値の誤差(実際にはそれほど小さくなく、pH=6付近で0.01程度)を防ぐため、7合わせと4合わせは、直流増幅器とリレー駆動回路を、すべてセットした状態で行なった。

直流増幅器とリレー駆動回路は、ごく簡単なもので、回路図は第2図のとおりである。直流増幅器(第2図a)

の可変抵抗 Vol. 1 (50 Ω) は、零点調整用(pHメータの指示が7のとき、出力がゼロになるようにする)、Vol. 2 (2 k Ω) は、バイアス調整用(pHメータの指示を7から少しずらし、出力が最大になるように調整)である。電源は、乾電池(単3, 2本)を使用した。直流増幅器の出力を、リレー駆動回路の入力として使用した。リレー駆動回路(第2図b)の可変抵抗(250 k Ω)を回して、希望のpH(6.7~5.6の範囲で可変)でリレーがonするように調整した。電源は、交流を整流、平滑化して用いた。リレーの接点で、ポンプのリモート端子(メインスイッチをonにしたままで、リモート端子を開放すれば動き、短絡すれば止る)を開閉し、ポンプを制御した。

アルカリ液は、メスシリンダーに入れておき、目盛からアルカリ消費量を読みとった。

なお、この図には示していないが、実際にはこのリレーで、第2のリレー(オムロン MK-2)を駆動し、その2つの接点を使って、ポンプの制御と、アルカリ消費量の自記記録(ポンプが動いている時間に比例した高さのピークが、記録紙上に現われるように工夫)を行なわせている。

なお、培養に使用したビーカー(テフロン被覆した攪拌子を入れ、アルミはくで覆っておく)、メスシリンダー、アルカリ用シリコンゴム管(内径1mm)は、すべて事前に高圧滅菌した。ガラス電極は、アルコールで拭いたのち滅菌水で洗い、アルミはくに小穴をあけて、ビーカー中にそう入した。

6. 分析 生菌数は食塩水で希釈後、トリプトン

第2図 直流増幅器と、リレー駆動回路の回路図

a. エピタキシャル・プレーナ形シリコントランジスタ2個による簡単な差動式増幅器。

b. Tr. 2 のコレクタ側(下方)の矩形が、リレーのコイルを示す。950 はその抵抗値(950 Ω)。コイルと並列のコンデンサ(100 μ F)は、リレーの接点の振動防止用。

(Difco) 1%, 酵母エキス (同) 0.5%, ぶどう糖 1%, 食塩 0.2%, 粉末寒天 1.5%, pH 6.8 の培地で, 30°C, 2 日間平板培養したのち計測した。

乾燥菌体量は, 培養液 10 ml をスピッツグラスにとって遠心し, 同量の蒸留水で 3 回遠心洗浄後, 100°C で恒量になるまで乾燥, 秤量して求めた。乾燥菌体量と O. D. (10~30 倍に希釈後, イトロー・クレット光電比色計で, 660 m μ のフィルターを用いて測定) の関係を探求しておき, 培養の時間経過をみるときは, O. D. から乾燥菌体量を算出した。乾燥菌体量と O. D. の関係は, 種々の時期の培養を用いて, くり返しチェックした。

乳酸は, 乳酸脱水素酵素を用いて測定した⁽⁶⁾。

乳糖は, ソモジ・ネルソン法⁽⁶⁾によって測定したが, 培地がペプトン等を含むため, 測定値が不正確なので, 糖を全部消費したか否かの目安とする程度に止めた。

実験結果

1. 培養経過

培地の pH は, 培養開始時は 6.4 付近であったが, 2 時間前後で 6.0 に達した。以後, pH は 6.0~6.2 に保たれた。ただし, pH メータの零点を, ときどき調整し直す必要があり, これを行なわないと, 最高で 0.2 程度の誤差を生じることがあった。直流増幅器とリレー駆動回路は, 一度調整しておけば, 少なくとも 24 時間は安定で再調整の必要はなかった。

酸の生成 (アルカリの消費) と, 菌の増殖の時間経過の一例 (中和剤は NH₄OH) を, 第 3 図 a に示す。アルカリ消費量も菌体量も, 培養ビーカー中の全内容物についての値である。酸生成量と乾燥菌体量とは, ほぼ並行しているが, 増殖曲線の主要部分が, 時間に対して直線的であること (したがって, この部分の比増殖率——図中の点線——は, 急速に低下している), 菌体量が頭打ちになってからも, 酸生成がしばらく続いていることが特徴的である。なお, 比増殖率 μ の定義は, つぎのとおりである。

$$\mu = \frac{1}{M} \cdot \frac{dM}{dt}$$

ただし, M は菌体量, t は培養時間である (実際には, たとえば $t=6$ 時間から $t=7$ 時間までの間の菌体量の増加分を, $t=6.5$ 時間の点の菌体量で除したものを $t=6.5$ 時間における μ とした)。

酸生成が停止した時点では, 糖をほぼ完全に消費して

第 3 図 NH₄OH を中和剤としたときの培養経過

a. 菌体量とアルカリ消費量の時間経過。いずれも全培養液についての値。最初の培地量は 300 ml なので, 菌体濃度を m (乾物量 mg/ml), アルカリ液の消費量を l (ml), その濃度を c (N) とすれば, 菌体量 (M) = $m \times (300 + l) \div 1000$ (g), アルカリ消費量 = $c \times l \div 1000$ (moles)。なお点線は, 菌体量の曲線から計算した比増殖率 ($1/M \cdot dM/dt$)。

b. a のデータから計算した Y_{ATP} 。計算法は本文参照。

おり, ホモ乳酸発酵 (乳糖 1 分子から, 乳酸 4 分子が生成) としてアルカリ消費量から計算すると, 消費糖の約 90% が乳酸になった勘定になる。こうして計算した乳酸量は, 乳酸脱水素酵素によって定量した値と, ほぼ一致した (たとえば第 3 図の例では, アルカリ消費量 152 mM に対し, 乳酸脱水素酵素による乳酸量は 160 mM)。

増殖停止時の菌体濃度は, この場合, 乾燥菌体量で約 4.2 mg/ml, 生菌数で 3.7×10^9 /ml であり, この値は同じ培地で中和せずに培養した場合の 7~10 倍に当る。また, 生菌数は, 脱脂乳培養の場合の約 7 倍である。

2. 中和剤の種類

中和剤の種類を変えた場合の結果は第 1 表のとおりである。乾燥菌体量では, 中和剤による差はあまり顕著でないが, 生菌数でみると, NH₄OH が断然すぐれている。これは, *S. cremoris* の定 pH 培養で得られる生菌数に対する中和剤 (NaOH と NH₄OH) の結果をしらべた Peebles ら⁽⁴⁾の結果と一致している。KOH や NaOH では, 菌体がかたまっ小さきなペレットを作る傾向があ

第 1 表 中和剤の種類の影響

中和剤の種類	最終の菌濃度	
	乾燥菌体量 (mg/ml)	生菌数 (10^9 /ml)
NH ₄ OH	4.2	3.7
KOH	3.9	1.5
NaOH	3.8	2.5
中和せず	0.5	0.4
脱脂乳培養	—	0.5

三種類 (いずれも約 3N) の中和剤のうちのひとつを用いて、酸生成が停止するまで (いずれの場合も 14~15 時間) 培養し、乾燥菌体量 (O.D. によらず直接) と生菌数を測定した。なお比較のため、同じ培地で中和せずに静置培養した場合と、通常の脱脂乳培養の場合の値を示した。

り、これが生菌数が少なく出る原因のひとつと考えられる (NH₄OH 中和の場合は、細胞の大部分は 4 個または 6 個の連鎖をなしている)。上記の Peebles ら⁽⁴⁾ は、NaOH を用いた場合は、粘質物の生成が認められると述べている。

3. Y_{ATP} による菌体収量の評価

この培養法での菌体収量が、ほぼ限界なのか、それとも大幅に改善の余地があるかを判断するには、Bauchop and Elsden⁽⁷⁾ の提唱した Y_{ATP} を用いると便利である。彼らは、エネルギー源として加えた基質の代謝経路がわかっている (すなわち、基質の消費量から ATP の生成量を計算できる) ことを前提に、 Y_{ATP} をつぎのように定義した。

$$Y_{ATP} = \frac{\text{生成乾燥菌体量 (g)}}{\text{生成 ATP 量 (mole)}}$$

彼らは、菌株、基質、代謝経路のことなる多くのケースで、エネルギー源が制限因子の場合、 $Y_{ATP}=8\sim 12$ (平均 10.5) という一般法則が成り立つとした。

ホモ乳酸発酵 (Embden-Myerhof 経路経由) の場合は、乳酸が 1 分子生成するごとに、正味 1 分子の ATP が生成することになるので、上の式はつぎのように書き換えられる。

$$Y_{ATP} = \frac{\text{生成乾燥菌体量 (g)}}{\text{乳酸生成量 (mole)}} = \frac{\text{生成乾燥菌体量 (g)}}{\text{アルカリ消費量 (mole)}}$$

したがって、この場合の Y_{ATP} は、アルカリ消費量と菌体量から計算できる。計算にあたっては、つぎの式を用いた。すなわち、ある時間培養したときの菌体濃度を m (乾物量 mg/ml)、アルカリ液消費量 (培養開始時の培地量 300 ml についての) を l (ml)、アルカリ濃度を c (M)、培養開始時の菌体濃度を m_0 とすれば、

$$Y_{ATP} = \frac{m \times (300 + l) - m_0 \times 300}{c \times (l + l_0)}$$

なお l_0 は、培養開始時から pH が 6.0 になるまでの酸生成量 (培地の pH-滴定曲線から算出) を、濃度 c のアルカリ液の消費量に換算したものである (サンプリングによる減量は、1 回がたかだか 0.5 ml 程度であるので、無視して差支ない)。

こうして計算した Y_{ATP} は、培養終了時 (酸生成停止時) で 9 前後であり、Bauchop and Elsden⁽⁷⁾ のあげた範囲内に入っており、それほど悪い収量ではないといえる。

Y_{ATP} を、培養時間の種々の時期に計算してみると、第 3 図 b の長い点線のように、はじめは 15~16 という高い値を示すが、次第に低下して、最後は 10 を割るようになる。この変化は一見単調であるが、見方をかえて、菌体の増加速度と酸の生成速度の比から、各時点における菌体の収率を計算すると、もっと明瞭な変化が期待される。このような意味の Y_{ATP} を、differential な性格の Y_{ATP} ということて $Y_{ATP}(\text{diff.})$ と呼び、さきに示したような Y_{ATP} を、cumulative な性格の Y_{ATP} という意味で、 $Y_{ATP}(\text{cum.})$ と呼んで区別することになれば、 $Y_{ATP}(\text{diff.})$ は次式によって計算される。

$$Y_{ATP}(\text{diff.}) = \frac{(m + \Delta m)(300 + l + \Delta l) - m \times (300 + l)}{c \times \Delta l}$$

ここで、 Δm および Δl は、菌体濃度およびアルカリ液消費量の、1 時間当りの増加分である。

$Y_{ATP}(\text{diff.})$ は、第 3 図 b のこまかい点線のように、きわめて特徴的な推移を示す。すなわち、はじめは約 15 という高いレベルを保つが、菌体量が時間に対して直線的な増加に入るところ (比増殖率 (μ) の低下が顕著になり始めるころ) から一気に低下し、10~11 でプラトーを作る。このプラトーは、菌体量、アルカリ消費量が、ともに直線的に並行して増加している部分に対応する。ついで、増殖速度の低下を反映して、 $Y_{ATP}(\text{diff.})$ は急激に減少し、増殖が停止した点 (アルカリの消費は、この後もしばらく続く) で 0 になる。この間、6 付近に第 2 のプラトーが現われるが、これは 10 付近のプラトーほどは再現性がなく、やや傾斜がゆるくなる程度のこともある。第 2 のプラトーは、増殖速度の低下に続いて生酸速度の低下が起り、しばらくの間、両者がほぼ同じ率で低下を続けることの反映である。

培養初期の高い Y_{ATP} が、培地中の何か他のエネル

ギー源の消費 (たとえば, *S. faecalis* はアルギニンエネルギー源として利用する^(7,10)) による, みかけ上のものではないかと考えられたが, この菌株は乳糖を抜いた培地では, 測定にかかるほどの生育を示さなかった。

考 察

Peebles ら⁽⁴⁾は, ぶどう糖, 乳糖各 2.5% を炭素源とする培地で, 3 株の *S. cremoris* を培養し, 培地の pH を NH_4OH で 6.0 に保って, 14~17.5 時間で $7.3 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^{10}/\text{ml}$ の生菌数を得た。彼らの菌株と, 今回用いた H-61 との間には, 細胞の大きさや連鎖の長さ (本報の場合には, 培養終了時において 4~6 個の連鎖をなすものが多かった) などの違いもあると考えられるので, かれらの結果と, 私達の $3.7 \times 10^9/\text{ml}$ とを直接比較することはできない。彼らは, 菌体量を記載していないので, これについても比較できないが, やはり生育停止後しばらくの間, アルカリ消費が続いたと述べていることからみて, Y_{ATP} が並外れて高かったとも考えにくく, 今回の成績は, かれらにはほぼ匹敵するのではないかと考えられる。

糖の濃度が一定の培地で, 菌の収量を上げようということは, Y_{ATP} を上げようということと同等である。

Bauchop and Elsdon⁽⁷⁾ 以来, エネルギー源が菌体収量の制限因子となる条件下で, Y_{ATP} が約 10 になるということは, 多くのケースについて確かめられてきた^(8,9)。たまたま, これから外れるように見える例も, 代謝経路が想定とちがっていたり, 菌体への同化分を無視していたりして, これを補正すれば, 多くの場合は 10 付近に落ちつくとされている⁽⁹⁾。

しかし Y_{ATP} が, 10 よりずっと大きくなるという例も存在する^(10,22)。たとえば, Moustafa and Collins⁽¹⁰⁾ は, *S. diacetylactis* などのパッチ法および連続法による培養で, $Y_{\text{ATP}}=17$ という高い値を報告している。この場合, 基質の濃度は低く (ぶどう糖の場合 $1 \sim 6 \mu\text{M}$), 高い Y_{ATP} 値は, このような培養の初期 (growth phase) でいえば, 必ずしも初期とはいえないが) において観察されたことに注目する必要がある⁽⁹⁾。今回の結果で, 培養の初期に $Y_{\text{ATP}}=15$ という高い値が得られたことと上記 Moustafa らの結果とは, 関係があるかもしれない。

乳酸菌の代謝経路がさらにのびて, 酢酸ができ, そのさい余分の ATP ができるので, Y_{ATP} がみかけ上 10

より高くなるという可能性がある^(18,20,21)。培養初期の高い Y_{ATP} が, これによるものか否かをチェックするために, 低い糖濃度 (0.4%) の培地で培養し, アルカリ消費の止った時点 (こゝまで $Y_{\text{ATP}}=15.7$, 糖消費量とアルカリ消費量は一致) で, ガスクロマトグラフィーによる揮発酸の分析を行なった。その結果, 酢酸のピークが認められたが, その量は総酸の 1% 以下であり, Y_{ATP} の値に影響するほどではなかった。なお, 酢酸以外のピークは認められなかった。

Y_{ATP} の理論的な上限は, 菌体成分と, その合成に必要な高エネルギーりん酸結合の数から計算した Gunsalus⁽¹¹⁾ らによれば, $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}=33$ である。また, Lehninnger⁽¹²⁾ が, 大腸菌細胞 1 個の合成に必要な ATP の数から, Y_{ATP} の上限を計算すると, $Y_{\text{ATP}}^{\text{max}}=52$ となる。

これらの値は, 能動輸送や代謝回転などに要するエネルギーを無視した, 「最大限でも, これには及ばない」という値である。しかし, Moustafa らの 17 や, 今回の培養初期にみられた 15 という値は, これらの理論的の上限よりもはるかに低く, あってもおかしくない値といえる。

最近, De Vries ら⁽²²⁾ および Stouthamer and Bettenhaussen⁽¹⁴⁾ は, Y_{ATP} の問題を再検討し, Y_{ATP} は決して 10 付近に固定したものではなく, 比増殖率の増大にともなって大きくなることを示した。かれらは, 菌体成分の合成以外に必要なエネルギーとして, 菌体の維持 (maintenance) のためのエネルギーをあげ, 比増殖率が低い場合には, 維持エネルギーの比重が相対的に増加するために, Y_{ATP} の低下をまねくとしている。

かれらはまた, 増殖とエネルギー代謝の関係は, ふうくに信じられている以上に, 密接に関連して変化すると結論しているが⁽¹⁴⁾, 培養条件をかえて比増殖率を急落させた場合, 単位菌体量当りの代謝速度の低下が, それについていけず, 一時的に, 代謝と増殖の uncoupling (したがって, Y_{ATP} の過度の急落——一定常状態の回復によって, あるレベルまで回復される) がみられる例⁽¹⁹⁾をあげている。

いずれにせよ, かれらが指摘しているように, $Y_{\text{ATP}}=10.5$ を常数 (biological constant) と考えて, これによって代謝経路を推論したり, ATP の収率を逆算したりするのは危険であるが, Y_{ATP} を, 菌体収量の評価と改善のための指標とすることは, きわめて有用と考えられ

る。

そこで、今回の結果(第3図)をみると、6時間目あたりからの $Y_{ATP}(\text{diff.})$ の急落は、ひとつには比増殖率の低下自体を、もうひとつには、それに単位菌体量当りの代謝速度の低下がついていけないことを反映しているものとも解される。また、 $Y_{ATP}(\text{diff.})=10$ 付近のプラトーは、単位菌体量当りの代謝速度の低下が、比増殖率の低下に追いついてくる過程の反映として説明できるかもしれない。

実験結果のところで述べたように、 $Y_{ATP}(\text{diff.})=10$ 付近のプラトーは、現象としては、菌体量の増加とアルカリ消費量の増加が、ともに時間に対して直線的であることの反映にはほかならないが、実は増殖曲線が、時間に対して直線的になること自体が、はなはだ奇妙な現象である。一般に、このようなタイプの増殖曲線(arithmetic linear growth)は、溶解度の小さい物質の供給が、増殖の律速段階となっていることによると考えられており、その例として、酸素の供給速度(培地中への溶解速度)が律速段階になる場合があげられている⁽¹⁸⁾。しかし、ホモ乳酸発酵を行なっている *S. cremoris* に、これをあてはめるのは無理であり、直線的増殖の機作は、いまのところ不明というほかない。

直線部分を出はずれて以後の比増殖率の急落(したがって、 $Y_{ATP}(\text{diff.})$ の 10 からの急落)と、それに続く増殖停止の原因としては、(1) 栄養分の不足、(2) 阻害性物質の蓄積、(3) 物理的な限界——M-concentration⁽¹⁵⁾ が考えられる。

このうち(3)は、次の実験により否定される。すなわち、 NH_4OH を中和剤として培養し、菌体濃度が 2.5 mg/ml 程度になったとき遠心分離し、乳糖をぬいた新鮮培地で洗浄後、新鮮培地に 4 mg/ml 程度の濃度(1回の培養では限界のところ)で再浮遊させ、定 pH 培養をつづけると、わずかな lag ののち、急激にアルカリの消費と増殖が起こり、菌体濃度は 8 mg/ml、すなわち 1 回の培養で頭打ちになる値の約 2 倍に達する。

したがって増殖の制限は、増殖が止った時点でなおかなりの糖が残っていることからみて、何か糖以外の培地成分の不足か、阻害物質の蓄積によるとみるべきであろう。

微生物が、その増殖の過程で、自己に対して阻害的な未知の物質を生産する現象は、広く認められている⁽¹⁶⁾。

Rogers and Wittier⁽¹⁾ は、pH を調節した *S. lactis* の

培養においては、非解離形の乳酸が増殖阻害を示すが、そのほかにも未知の阻害因子が存在するとのべた。そのような因子のひとつとして、Gilliland and Speck⁽¹⁷⁾ は乳酸球菌の混合培養系で D-ロイシンをあげている。

私達も、培地中に乳酸以外の増殖阻害因子が蓄積されることを示唆する結果を得ており、現在その本体について検討中である。

要 約

乳酸菌の実験室的な定 pH 培養に便利な、簡単な pH スタットを組み立て、乳糖 5% を炭素源とする培地で、*Streptococcus cremoris* を pH 6.0~6.2 で培養した。中和剤としては、Peebles⁽⁴⁾ らの指摘どおり、 NH_4OH がすぐれていた。

増殖が停止した時点で、菌濃度は乾燥菌体量で 4.2 mg/ml、生菌数で $3.7 \times 10^9/\text{ml}$ (通常の脱脂乳培養の約 7 倍)に達した。酸の生成は、増殖停止後も糖を全部消費するまで続いた。糖を全部消費した時点では、 Y_{ATP} は約 9 であったが、培養初期には 15~16 という高い値がみとめられた。 Y_{ATP} によって、菌体収量を評価することの有用性について論じた。

ガスクロマトグラフィーによる揮発酸の分析をしていただいた当時生理部小林剛技官、電気関係の工作にあたってお世話になった同部三橋俊彦技官に感謝します。

- (1) L. A. Rogers and E. O. Wittier : *J. Bacteriol.*, **16**, 211 (1928).
- (2) G. T. Lloyd : *Dairy Sci. Abstr.*, **33**, 411 (1971).
- (3) 矢野信礼, 森地敏樹, 入江良三郎, 見坊 寛 : 農化, **34**, 1046 (1960).
- (4) M. M. Peebles, S. E. Gilliland and M. L. Speck : *Appl. Microbiol.*, **17**, 805 (1969).
- (5) H. J. Hohorst : *Biochem. Z.*, **328**, 509 (1957).
- (6) N. Nelson : *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- (7) T. Bauchop and S. R. Elsdén : *J. Gen. Microbiol.*, **23**, 457 (1960).
- (8) J. C. Senez : *Bacteriol. Rev.*, **26**, 95 (1962).
- (9) W. J. Payne : *Ann. Rev. Microbiol.*, **24**, 17 (1970).
- (10) H. H. Moustafa and E. B. Collins : *J. Bacteriol.*, **96**, 117 (1968).
- (11) I. C. Gunsalus and C. W. Shuster : "The Bacteria," Vol. II, ed. by I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1961, p. 45.
- (12) A. L. Lehninger : 藤木大三郎, 大森 彬, 竹

- 田真敏, 堀内健太郎共訳 “生命とエネルギーの科学”, 第 2 版, 化学同人, 1971, p. 120.
- (13) W.P. Hempfling, S.E. Meinzer and P.J. Van Demark: *Bacteriol. Proc.*, **1969**, 143 [文献 (9) より引用].
- (14) A.H. Stouthamer and C. Bettenhausen: *Biachim. Biophys. Acta*, **301**, 53 (1973).
- (15) O. Bail: *Zeitschr. Immun. Forsh.*, **60**, 1 (1929) [T. Yanagita: *Ann. Rept. of the Inst. Food. Microbiol.*, Chiba Univ, **2**, 30 (1958) より引用].
- (16) 中山大樹: 農化, **33**, 133 (1959).
- (17) S.E. Gilliland and M.L. Speck: *J. Dairy Sci.*, **51**, 1573 (1968).
- (18) 丸山洋一: “微生物生理学”, 植村定治郎, 福見秀雄, 柳田友道編, 朝倉書店, 1960, p. 146.
- (19) D.W. Tempest, D. Herbert and P.J. Phipps: “Microbial Physiology and Continuous Culture,” ed. by E.O. Powell, C.G.T. Evans, R.E. Strange and D.W. Tempest, Her Majesty's Stationary Office, London, 1967, p. 240 [文献 (14) より引用].
- (20) H. Dirar and E.B. Collins: *J. Gen. Microbiol.*, **73**, 233 (1972).
- (21) H. Dirar and E.B. Collins: *ibid.*, **78**, 211 (1973).
- (22) W. De Vries, W.M.C. Kapteijn, E.G. Van Der Beek and A.H. Stouthamer: *ibid.*, **63**, 333 (1970).