

乳酸菌に対する増殖促進物質の研究 (その1)

山岡 邦雄*・秋本 美都子*

Studies on the growth promoting factor for Streptococcus. (part 1)

Abstract

Streptococcus faecalis 10C1 was found to be unable to grow in a lipid deficient medium when glucose was sterilized separatory from the other components of the medium. On the other hand a sufficient growth of the organism occurred by adding autoclaved mixtures of glucose and alkali to the medium omitting glucose.

This fact indicates that some active factors (named as auto-clave factor) were produced by autoclaving glucose with alkali.

We examined the condition to prepare the autoclave factor.

通性嫌気性菌 (*Streptococcus faecalis* 10 C1) は、アミノ酸、ビタミン、核酸塩基等を含み、脂質一般を欠く培地では増殖できないが、グルコースをアルカリ状態で加熱滅菌した液と合わせた培地中では増殖可能となる。このことは、このアルカリ中での加熱により、何らかの増殖促進物質 (Autoclave factor 以下 Ac. F. とする。) が生成したことを示唆している。著者らは、その増殖促進物の生成条件の決定、及びその単離を目的として実験を行ない、新しい知見を得たので報告する。

1. 実験法

(1) Ac. F. の生成; 原則的に 5×10^{-2} mol/l の KOH 水溶液に、10%濃度になるようにグルコースを添加する。(他の糖の場合も同濃度とする。) この糖-アルカリ水溶液を水蒸気加圧下 120°C で 10分間加熱滅菌すると、液中に Ac. F. の生成が認められる。(以下この加熱操作を Ac. T. とする。)

(2) 蒸留分離; Ac. T. 液を蒸留分離するには、ウィットマーの精留装置を用いた。

(3) 使用菌株; *S. faecalis* 10 C1

(4) 培養法; *S. faecalis* 10 C1 によるリポ酸定量用の基本培地¹⁾ から、プロピオン酸及びグルコースをのぞき、適量の各種添加物を加え、水蒸気加圧下 120°C

で10分間加熱滅菌し、冷却後あらかじめ、別に殺菌したグルコース溶液を最終濃度 0.5%になるように無菌的に加えた。前培養には、グルコースと共に加熱滅菌した培地 5 ml を用い、 37°C で約16~20時間培養し、増殖が定常状態にある菌を生理食塩水で希釈し、基本培地 5 ml に乾燥重量で約0.5 μg 接種し、 37°C で16~20時間培養した。菌の増殖度測定法などは上原¹⁾らの方法に従った。

2. 結果

(1) アルカリ濃度と Ac. F. 生成量の関係

グルコース濃度10%で、KOH濃度を 10^{-5} mol/l ~ 1.0 mol/l まで変化させ、Ac. F. 生成量が、どのように変わるかを調べた。(Fig. 1)この結果からわかるように 5×10^{-2} mol/l の KOH 濃度のさい、最も Ac. F. 生成量が多いことがわかる。また、Fig. 1 に同時に示した、Ac. T. 処理後の pH 値は、この加熱操作により、何らかの酸性物質が生成したことを示している。しかし、この結果だけでは、Ac. F. との直接の結びつきは不明である。但し、pH が 5.6~5.8 ぐらいを境に、その上下 pH 域で増殖が認められなかった。

(2) グルコース濃度と、Ac. F. 生成量との関係。

5×10^{-2} mol/l KOH 水溶液中のグルコース濃度を变化させて、Ac. F. 生成条件を調べた。(Fig. 2)この

* 宇部工業高等専門学校工業化学科

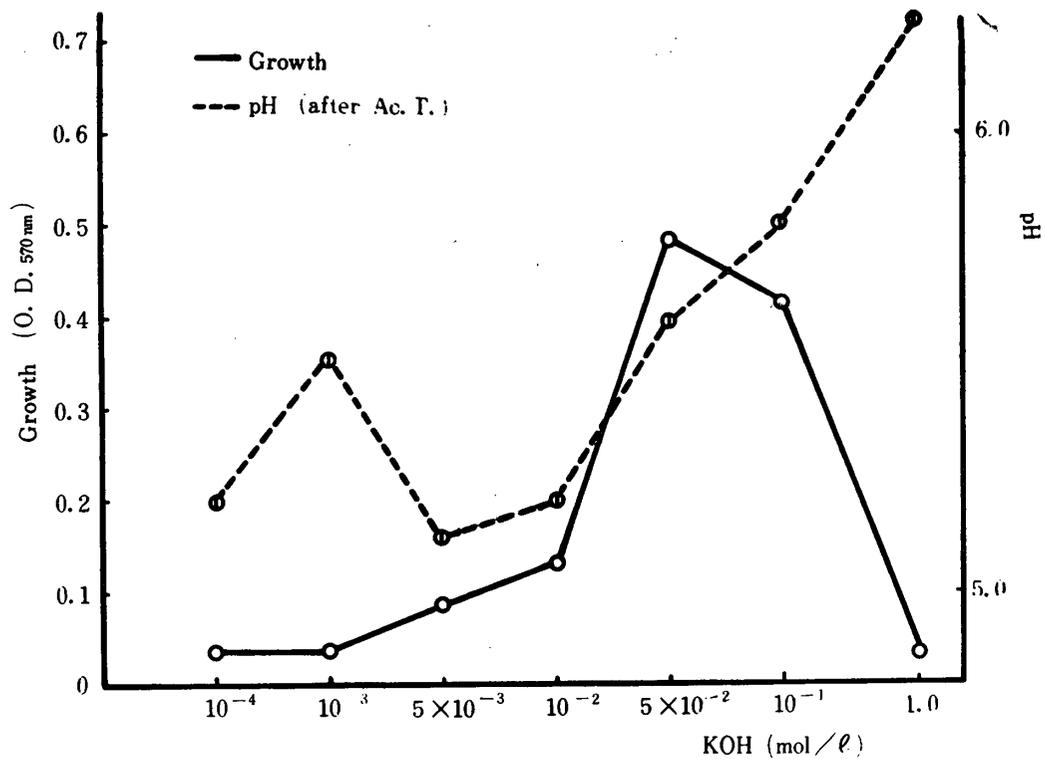


Fig. 1 Effect of alkali on Ac. F. production

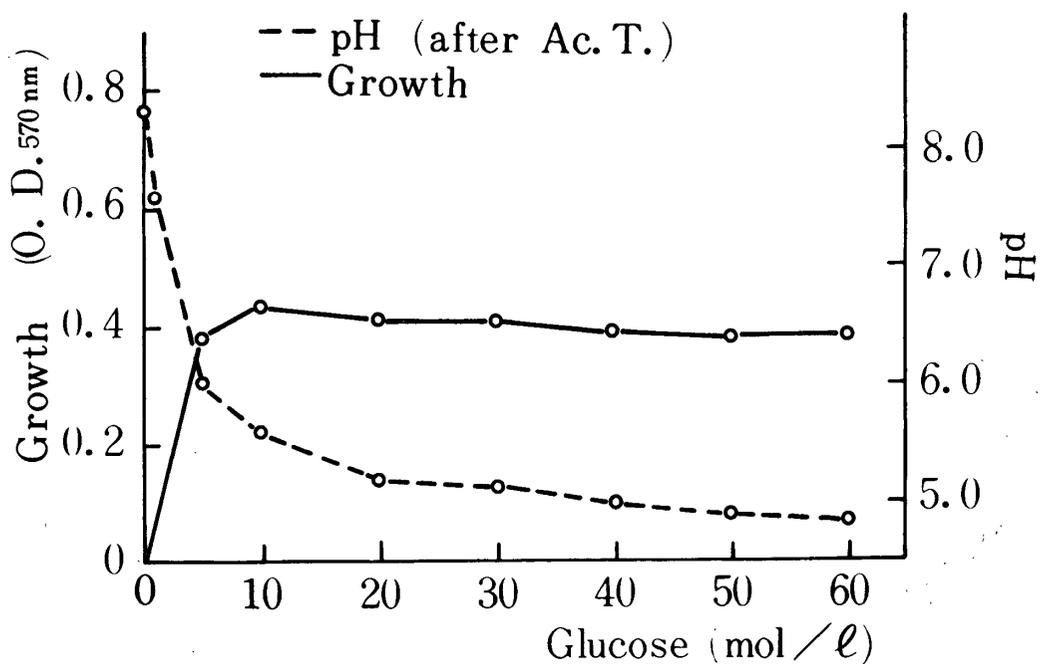


Fig. 2 Effect of glucose on Ac. F. production

結果、糖濃度10%を至適濃度とした。

(3) 加熱滅菌時間と、Ac. F. 生成量との関係。

水蒸気加圧下120°Cで加熱滅菌する時間を変化させたところ、5分間以上加熱しても、Ac. F. 生成量に変化は見られなかった。(Fig. 3) 従って、殺菌効果とも考え合わせ、10分間加熱を適当と考えた。

(4) Ac. T. 液の添加量と菌の増殖度との関係。

Ac. T. 液の添加量を変え、培地全量を5mlに調整し、増殖変化を調べた。(Fig. 4) この結果、0.1mlの添加で、十分な増殖が認められた。

(5) 各種糖類による Ac. F. 生成の可否。

グルコース以外の糖類を同じくオートクレーブ処理し、グルコースの場合の活性と比較した。(Fig. 5) グルコース以外の糖の場合にはすべて炭素源としてグルコースを添加した。この結果、Ac. F. を生成し得る糖と、生成し得ない糖の間に大きな差があり、特に、2糖類、3糖類から生成し得ず、単糖類からはいずれも Ac. F. を生成した。

(6) Ac. T. 液の蒸留分離について。

グルコースとアルカリを Ac. T. した液を pH 7 に調整後、蒸留し、100°Cまでに蒸留可能部分と、残留物とに分けた。この蒸留液をさらに3分して、pH 1, 7, 2に各調整し、この液を再蒸留して各々、蒸留液と、残留液とに分離した。各画分はすべて pH 6.8 に再調整し、増殖活性を調べた。その結果、pH 1 調整液からの蒸留液には活性が認められたが、他の pH 7, 12に調整した液からの蒸留液には、増殖活性は全く認められなかった。また、第一段階での蒸留は pH 7で行なったが、活性因子も蒸留されている。これは蒸留フラスコ中に共存するグルコースのために、加熱により反応が進行し、pH 低下をひき起し、蒸留されたものと推定される。従って、第一段階の蒸留操作で、糖は蒸留されずに残り、第二段階での蒸留のさい、pH 7, 12, 調整液中で加熱によるグルコース分解はなかったと考えられる。(pH の低下なし)

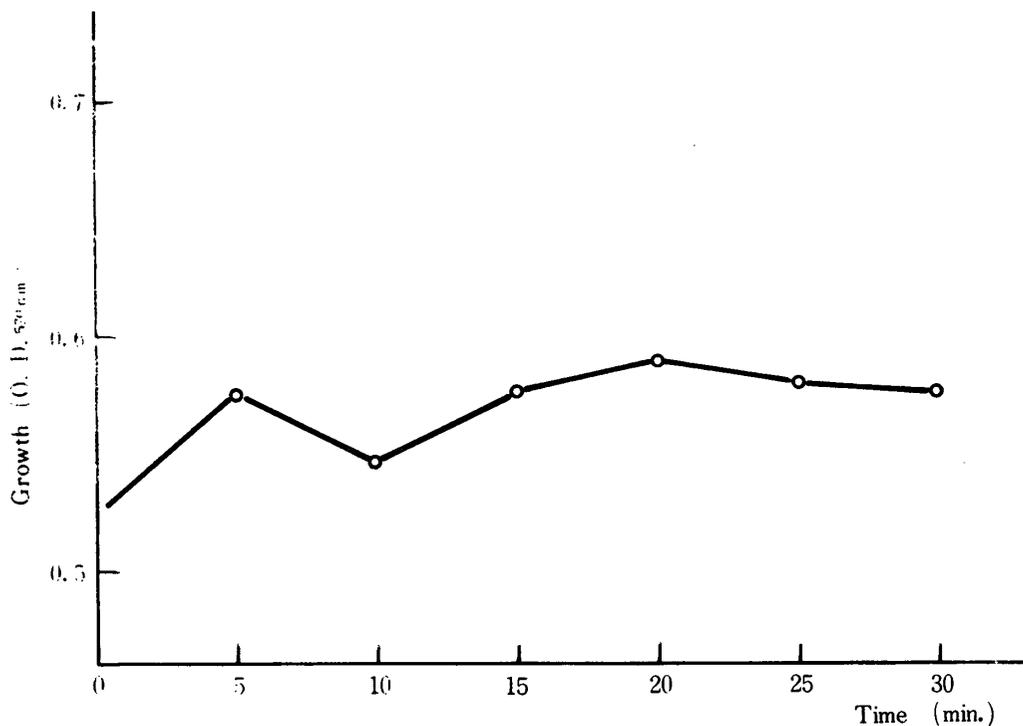


Fig. 3 Effect of Ac. T. time on growth

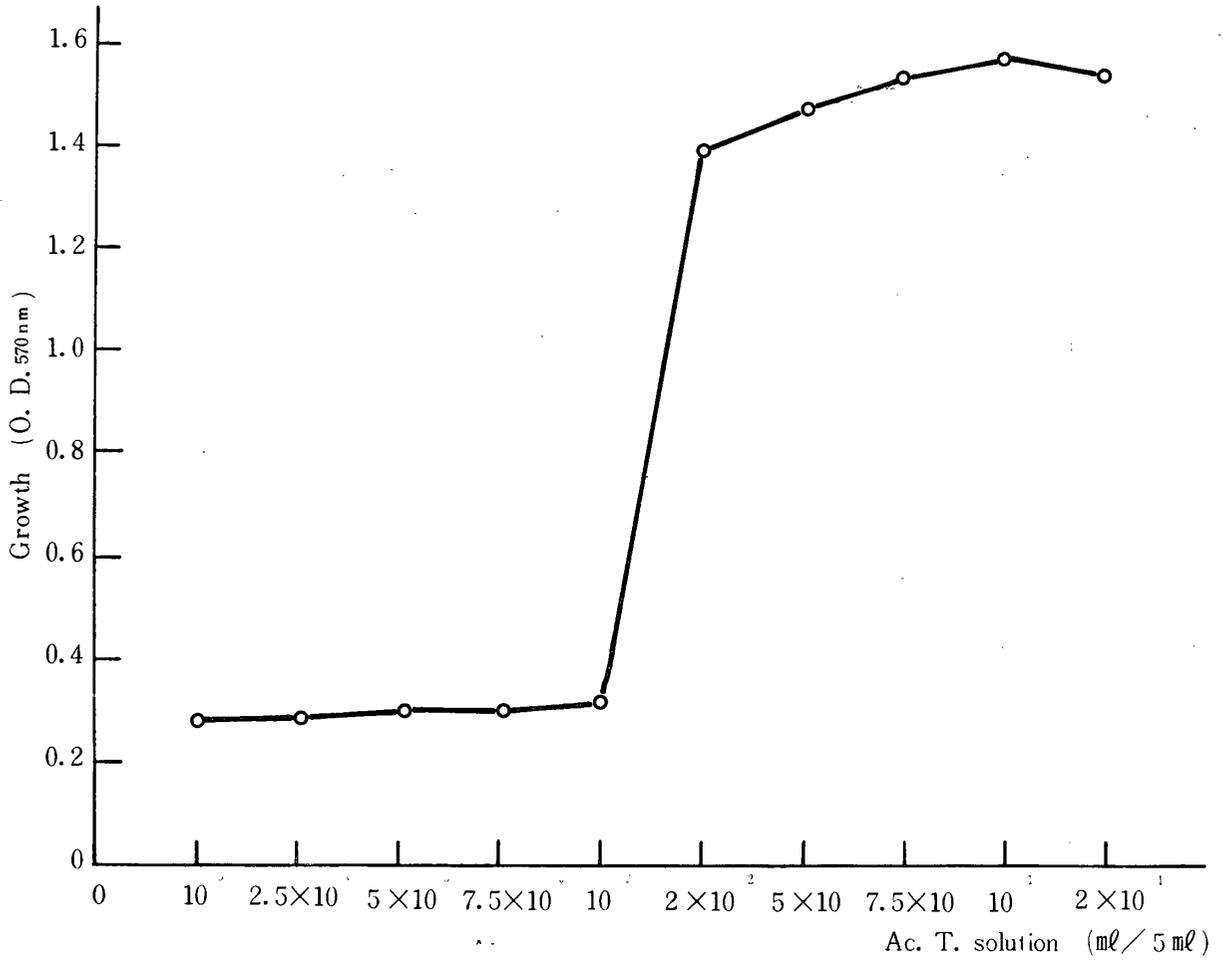


Fig. 4 Effect of Ac. T. solution on growth

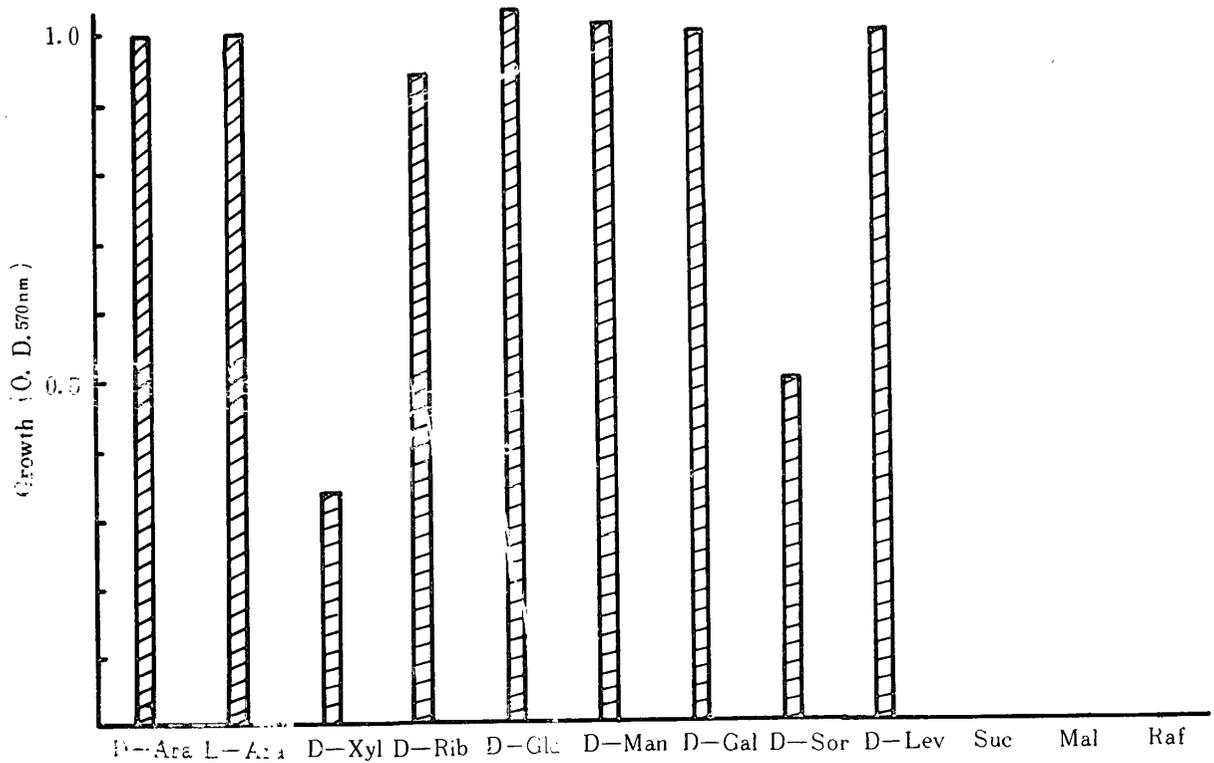


Fig. 5 Ac. F. production by some saccharides

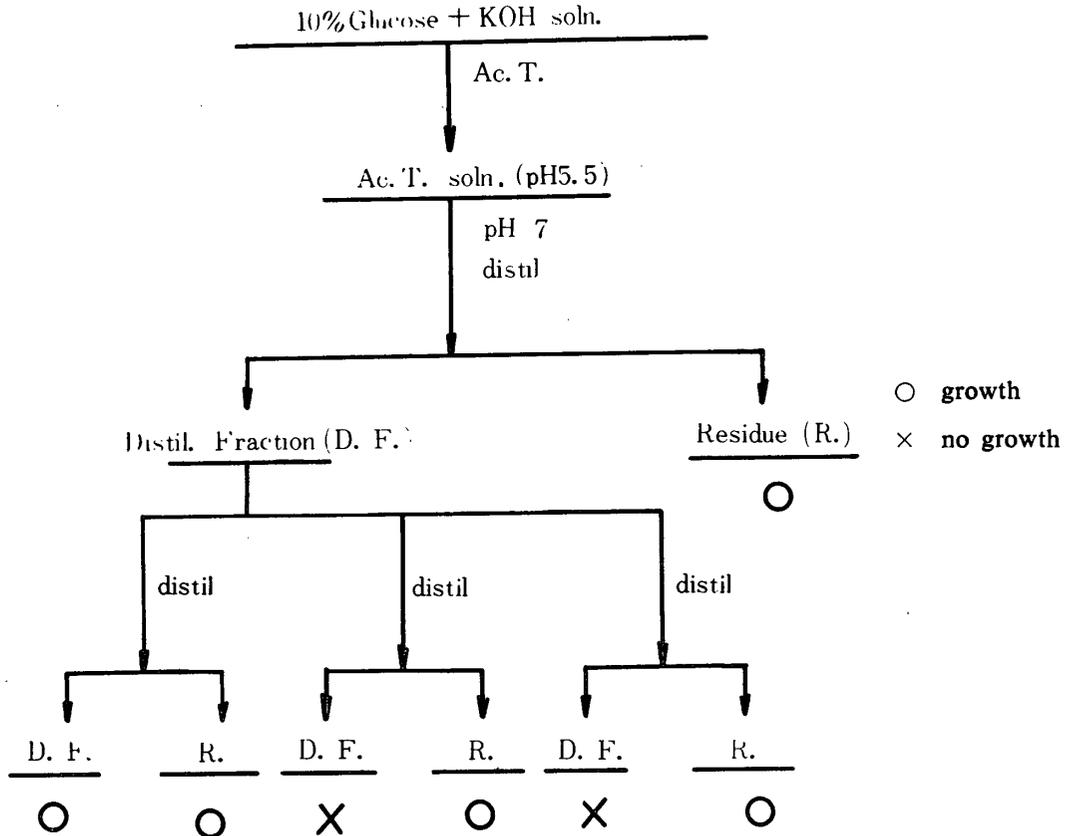


Fig. 6 Fractional distillation of Ac. T. solution

3. 考 察

使用菌株 *S. faecalis* 1 OC1 は脂質欠乏培地で、リポ酸定量用菌株として使用されている。また、この菌株は酢酸により増殖可能である点と合わせ考えるならば、ピルビン酸酸化系がこの菌の増殖にとって大切であるという上原ら²⁾の考えを肯ずかせる。

また、Fig. 2 に示すように、Ac. F. 添加も増殖促進する事実は、Ac. F. もピルビン酸酸化系に何らかの関与を行なったと推定できる³⁾。

ピルビン酸酸化系が、脂質合成に密接に関連している点、及び、この菌の培地が、脂質欠乏培地であることは、この Ac. F. がリポ酸、酢酸の代替作用をして、ピルビン酸酸化と、それにひきつづいて起る脂質合成に影響を与えたとも考えられる。

Ac. F. の生成条件としては、Fig. 1, 2, 3 に示す結果から、一応、 5×10^{-2} mol/l 濃度の KOH 水溶液に 10% のグルコースを加えて、水蒸気加圧下 120°C、10 分間、加熱滅菌することで、十分量の Ac. F. が得られることが分った。また、その活性も、Ac. T. 液 0.1 ml 以

下で十分認められ、糖の含有量 10% と考え合わせれば、培地 5 ml あたり、糖換算で、たかだか 10mg 以下で最大増殖値を示している。

これらのことは、Ac. F. が非常に微量で強い活性を有することを示しており、その作用機構（ピルビン酸酸化系）と考え合わせれば興味ある現象と云えよう。

Fig. 3 に示した各種糖類による Ac. F. 生成の可否についての結果で、サッカロース、マルトース、ラフィノースなどの、二、三糖類からは Ac. F. は全く生成しないことがわかる。それに対し、単糖類からはいずれも活性物質の生成が認められた。これらの事は、二糖類に於ける結合部位、特に、グルコースの 1 の位置が結合している場合に Ac. F. 生成についての何らかの関係が示唆されているように考えられる。この点に関しては更に多くの糖類、及びその分解条件などを組み合わせて考える必要がある⁴⁾⁵⁾。Ac. F. が酸性物質かどうかを調べる目的で行なった実験(6)に於る結果は、この物質が明らかに酸性物質であること、及び 100°C 前後に沸点をもつ低沸点物質の可能性を示している。沸点に関しては共沸混合物などを考慮しなければならないが、いずれにして

も、100°Cより余り高くはないと思われる。

一方、J.C. Sowden⁴⁾らが示した、ヘキソースのアルカリ分解生成物は、グリセルアルデヒド、乳酸、メチルグリオキサール、ギ酸、ケトン、アセトンなどであるという報告がある。これらの中で、酸性を示す物質としては、乳酸と、ギ酸が、Ac. F. の可能性として考えられる。しかし乳酸、ギ酸での増殖試験では Ac. F. のような強い活性は認められなかった。従って、J. C. Sowden らの示した分解生成物以外の物質を検討する必要がある。また、Ac. F. が単一物質ではない可能性も考えられるのでこの点からの究明も行ないたい。

4. まとめ

(1) $5 \times 10^{-2} \text{mol/l}$ の KOH 水溶液中に10%になるようグルコースを加え、120°C、10分間、水蒸気加圧下に加熱すると、*S. faecalis* 1OC1 に対する、増殖促進物 (Ac. F.) が生成する。

(2) この Ac. F. は単糖類からの生成は可能だが、

二、三糖類からの生成はまだ認められない。

(3) この Ac. F. は酸性物質である事が認められた。

終りに、この菌株をお送り下さり、終始御指導下さった、京都大学工学部工業化学科、上原悌次郎助教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 上原悌次郎：ビタミン **22**, 298 (1960)
- 2) 上原悌次郎, 山岡邦雄, 福井三郎：農化, **42**, 222 (1968)
- 3) 上原悌次郎, 山崎哲雄, 山岡邦雄, 福井三郎：農化, **43**, 159 (1969)
- 4) J. C. Sowden : Adv. in Carbohydr. Chem. **12**, 35 (1957)
- 5) P. E. Shaw : Carbo hyd, **5**, 226 (1967)

(昭和50年6月14日受理)