

乳酸菌に対する増殖促進物質の研究（その2）

山岡 邦雄*・加藤 美都子*

Studies on the growth promoting factor for *Streptococcus faecalis*.

(Part 2)

Kunio YAMAOKA, Mitsuko KATŌ

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 AcF) were produced by autoclaving glucose with alkali.

Crude crystal of AcF was obtained and some chemical properties of AcF were studied. Crude crystal of AcF contained two components at least.

1. 緒 論

通性嫌気性菌の一種である乳酸菌 (*Streptococcus faecalis* 10C1) はアミノ酸、ビタミン、核酸塩基等を含み、脂質一般を欠く脂質欠乏培地において、エネルギー源であるグルコースを他の培地成分と別々に滅菌した後混合した培地では増殖出来ないが、グルコースをアルカリ水溶液として滅菌した後、培地に加えると、菌は増殖可能となる。このことはグルコースをアルカリ状態で滅菌することにより、*S. faecalis* 10C1に対し、増殖効果を示す何らかの物質が生成したことを示す。前報^{1),2)}に於て、この増殖促進物質を autoclave factor (以下 AcF とす) とし、その生成条件及び調製方法について述べた。また同時に、この AcF が増殖活性を示す点で酢酸と類似している点を指摘した。我々は引き続きこの AcF を単離、同定することを目的として実験を行ったところ、この粗結晶が複数の物質から成り立ち、分析の結果から、酢酸以外の物質を含んでいる可能性を認めた。この新しい別の物質については不明の点が多いが、同じく増殖活性を持っているものと考えられる。

2 実験方法

- (1) 使用菌株 *Streptococcus faecalis* 10C1
- (2) 培養方法 原則的に上原³⁾の方法に従い、培地の作成、培養を行った。
- (3) AcF の生成方法 グルコース 100g と水酸化カリウム 2.5g を水にとかし 1ℓ とする。この溶液をオートクレーブ中 2 気圧、120°C で 10 分間加熱し、褐色の AcF 処理液を得る。この処理液に濃塩酸 4.15ml を加え、ウイットマー蒸留装置で処理液の 80% を留出せしめる。この留出液を PH10 に調整した後ロータリーエバポレーターで減圧下約 70°C で濃縮乾固する。析出した物質を AcF 粗結晶とする。収量は 100g グルコースから約 1g である。
- (4) ガスクロマトグラフィー分析 粗結晶を少量の水にとかし、酸性とした後、エーテルを等量加え、よく振とう後、エーテル層からサンプリングして柳本 GCG550FP ガスクロマトにて分析する。使用したカラムは (DEGS) で、カラム温度は 102°C、インジェクション温度 195°C、検出器温度は 205°C である。
- (5) NMR 分析 AcF 粗結晶を少量の重水にとかし常

* 宇部工業高等専門学校工業化学科

法により NMR 吸収法によるピークを求める。なお使用する NMR は日電子 JNM-PMX60 である。

- (6) 官能基の検出 梅沢ら⁴⁾の方法に依り行。但しレダクトンの検出については Von Euler⁵⁾の方法による。即ち, AcF を濃厚な水溶液とし, PH 7 に調整後飽和酢酸鉛水溶液を過剰に加え鉛沈澱を析出させた。この沈澱を一旦乾燥させ重量測定後60%エタノールに懸濁し PH6.8 に調整した。この懸濁液を 0°C に放置後遠心分離し, 上清液の増殖活性をしらべた。

3. 結果と考察

(1) *Streptococcus faecalis* 10C1 (以下 *S. faecalis* 10C1 とする) のリボ酸定量条件を上原ら³⁾が検討しているがその場合, 糖を他の培地と共に加熱滅菌処理している。又, 上原ら¹⁾は各種還元性物質が増殖活性を示すことを報告しているがこの場合は糖を他の培地と別々に加熱滅菌処理している。我々は, 上原ら¹⁾の増殖条件を用い原則としてグルコースを別に滅菌することにより AcF 粗結晶の活性を調べた。又, リボ酸定量条件に於ける酢酸の作用と比較する目的で酢酸による増殖活性も対照として検討した。AcF の生成各段階における増殖活性を Fig.1. に示す。最初の加熱滅菌操作後の溶液の増殖性を 100 として以下表わした。Fig.1. に示すように活性物質は強酸性下で蒸留されるがアルカリ溶液中では蒸留されないことがわかった。又かなりの活性が粗結晶中に残存することが確認された。以上のことから活性物質が酸性物質であろうと考えることが可能となった。

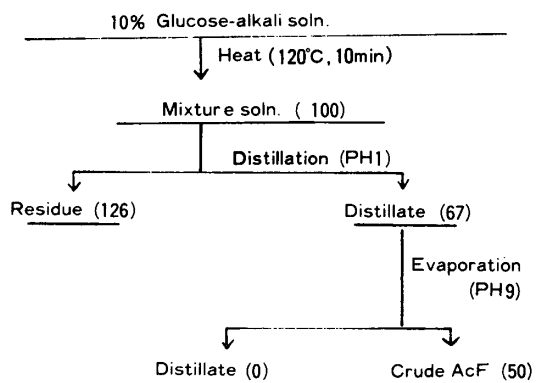


Fig. 1. Recovery of growth effect of AcF.

Growth effect of mixture solution is taken as 100.

(2) 次に AcF 粗結晶添加量と増殖との関係を調べた。結果は Fig.2. に示す。比較のためリボ酸定量条件下での活性を示す。酢酸ナトリウムを対照として添加した。

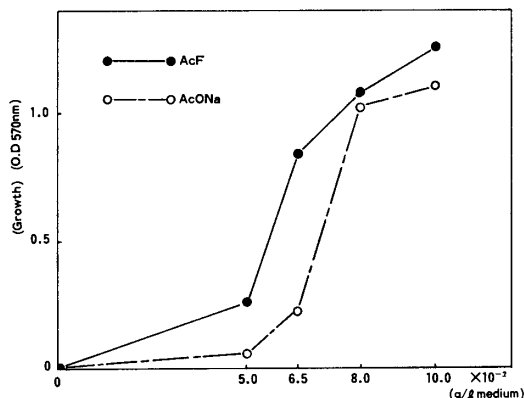


Fig. 2. Growth effect of AcF and AcONa

粗結晶の各ロット別にややバラツキがあるものの, だいたい酢酸ナトリウムの示す増殖活性曲線と似た活性を示した。粗結晶はうす茶色, あるいはこげ茶色を呈し, 吸湿性も大で, 外観上は結晶酢酸ナトリウムと著しくその性質を異にしている。従って増殖活性が粗結晶中に含まれている酢酸ナトリウムのためだと考えるなら, かなりの不純物の存在が予想される。又, 活性が酢酸ナトリウムよりやや高い粗結晶が得られたことは考えられる不純物も又, 増殖活性を示すのではないかと推定される。

(3) 得られた粗結晶を精製するために, 再結晶を試みた。方法は原則的に梅沢ら⁴⁾の方法を用いた。各種溶媒に対する AcF 粗結晶の溶解度を調べた。結果は Table 1. に示す。各種溶媒に対する溶解度は, AcF 粗結晶, 酢酸ナトリウム・グルコースの間に大きい差が認

Table 1. Solubility of AcF

Solvent	AcF	AcONa	Glucose
Water	++	++	++
Methanol	+	+	+
Ethanol	+	+	+
Ether	-	-	-
Acetone	-	-	-
Chloroform	-	-	-
Benzene	-	-	-
Toluene	-	-	-

(++) shows easily soluble

(+) shows soluble.

(-) shows slightly soluble.

められなかった。メタノールからの再結晶, 水, エタノール混合溶媒からの再結晶を試みたが, 粘稠な物質が得られたにとどまった。又 AcF 粗結晶の mp 測定を行ったところ Table 2. に示すように, 酢酸の高温度における mp が AcF のそれにやや近いことがわかった。又酢酸ナトリウムとの類似性を調べるために混融試験を行ったところ, やや mp の低下が認められた。

Table 2. mp of AcF

	mp	
AcF	320~330°C	
AcONa	55~58°C	324°C
Glucose	150°C	
AcF+AcONa	316~325°C	

(4) 梅沢ら⁴⁾の方法で官能基試験を行った結果を Table 3. に示す。比較対照のため酢酸ナトリウム・グルコースについても調べた。ヨードホルム反応と 2, 4 ジニトロフェニルヒドラジンによる $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})-$, $\text{CH}_3\text{CO}-$, $-\text{CO}-$ の検出反応に於て AcF は著しい陽性を示した。この陽性反応は酢酸ナトリウム・グルコースとの比較実験からグルコース残留による可能性は認められず, 酢酸ナトリウムは構造からも可能性はない。銀鏡反応, ヒドロキサム酸試験, フェーリング反応等については明確な結論は得られなかった。粗結晶をより精製することによりはっきりした結果が得られると思われる。

Table 3. Detection of functional group

	AcF	AcONa	Glucose
Bromine test	-	-	-
Silver mirror reaction	?	-	+
Hydroxamic acid method	?	-	-
Lucas' test	-	-	-
Iodoform test	+	-	-
Fehling's test	?	-	+
2,4-dinitrophenyl hydrazone test	+	-	-

(+) shows clearly detectable.

(-) shows not detectable.

(?) shows obscure.

(5) AcF 粗結晶と酢酸ナトリウムの NMR 分析を行った。結果を Fig. 3. に示す。AcF と酢酸ナトリウムのピークは殆んど重なったが 3.3ppm 付近のピークが酢酸ナトリウムについては認められなかった。このことは複数の物質が混在していることを示している。

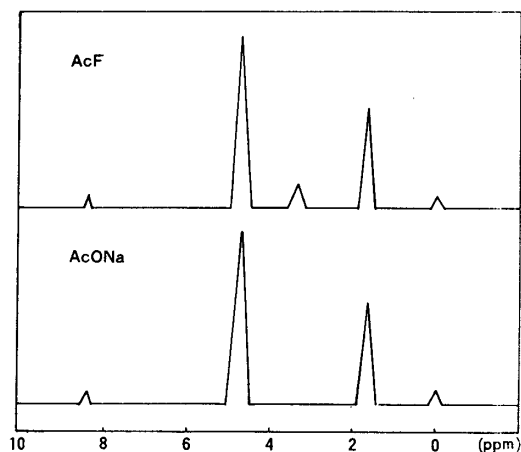


Fig. 3. NMR spectrum of AcF

(6) 結果を Fig. 4. に示すように AcF のガスクロマトグラフィーには $R_t=3.8\text{min}$ のところに明瞭なピークが現われ $R_t=5.1\text{min}$ のところに肩が現われた。 $R_t=3.8\text{min}$ のピークは酢酸と考えられるが, $R_t=5.1\text{min}$ の肩は不明である。酸性水溶液中からエーテル層への転

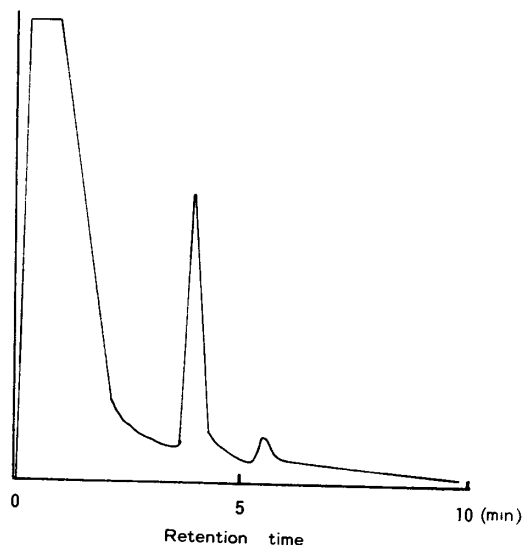


Fig. 4. Gas chromatography of AcF

Column ; DEGS Injection temp ; 195°C
 Column temp ; 102°C Detector temp ; 205°C
 Carrier gas ; 30ml/min (N₂)
 H₂ gas ; 40ml/min Air ; 0.9 l/min

溶率を60%程度と仮定するとAcF中の酢酸は約20%前後の低濃度が予想される。このことは他成分の存在を予想させると同時に、より低温での分析等考慮する必要があるであろう。

(7) Von Euler⁵⁾らはうすい水酸化ナトリウム水溶液中のグルコースを加熱すると強い還元性を示すレダクトンが得られることを報告している。得られたAcF粗結晶についてレダクトンの検出を行った。この結果AcF中にレダクトンを認めたがその量が少いために増殖活性等については検討中である。

以上のことから、グルコースのアルカリ分解により得られたAcF粗結晶は*S. faecalis* 10C1に対する増殖促進効果が著しく高く、酢酸と類似した効果及び増殖傾向を示した。しかしガスクロマトグラフィー、NMR分析から少なくとも2種以上の化合物の混合したものであることが認められた。各種定性反応から $\begin{matrix} -C- \\ || \\ O \end{matrix}$ の存在が考えられた。又この物質が酸性条件下でのみ蒸留可能であることは、この化合物が-COOHを含む可能性を強く示唆している。赤外吸収スペクトルによる分析も試みたが試料が粗結晶であるため明確な結果が得られなかった。前報²⁾にも報告したようにJ.C. Sowden⁶⁾らの報告にある糖のアルカリ分解生成物のいずれもAcFと同じ傾向は示さなかった。これからは粗結晶をより精製すると共にレダクトン等を中心に研究を進めたい。

4. 要 約

AcFは著しい増殖促進効果を*S. faecalis* 10C1に

対して示す。AcFをガスクロマトグラフィー、NMRスペクトル分析した結果このAcF粗結晶中には少なくとも2種以上の化合物が存在していることを確認した。又レダクトン等の存在も考慮すべきである。

5. 謝 辞

本研究にあたり終始御指導下さった京都大学工学部上原悌次郎助教授に厚くお礼申し上げます。又本研究に当り共に協力してくれた宇部工業高等専門学校卒業生松本太志、吉元弘志、山本国夫、原田初典、加藤良治、吉岡弘志、山本悟、有本初枝、江村洋治、豊永義一、山田隆雄、青木一郎、長谷川恒夫、飯田実、原田一代、西嶋英明、山田正敦、原田浩、三坂款、大石昌幸、黒木昭徳の諸君に感謝する。

文 献

- 1) 上原悌次郎, 山崎哲雄, 山岡邦雄, 福井三郎; 農化 **43** 159 (1969)
- 2) 山岡邦雄, 秋本美都子; 宇部工業高等専門学校研究報告 **21** 35 (1975)
- 3) 上原悌次郎; ビタミン **22** 298 (1960)
- 4) 梅沢純夫; 実験有機化学 (1974)
- 5) Von Euler; レダクトンの化学 (1933)
- 6) J.C. Sowden; *Adv. in Carbohydr. Chem.* **12** 35 (1957)

(昭和55年9月1日受理)