

糖加熱分解物質の各種微生物増殖に与える影響

加藤美都子、田村翔、仲本隆史、伊藤啓吾、山岡邦雄

An Influence of Thermal Decomposed Saccharide upon the Growth of Several Microorganisms

Mitsuko KATO, Sho TAMURA, Takashi NAKAMOTO, Keigo ITOU, and Kunio YAMAOKA

Abstract

It is an important theme to investigate intestinal bacterium. We have studied and reported about *Escherichia coli* which is one of the major intestinal bacteria. Growth of *Escherichia coli* was inhibited by heated solution, which contains xylose and dipotassium hydrogenphosphate. This inhibition was observed with other few saccharides. This inhibitor was named as XPfactor in the case of Xylose as a saccharide. This report shows the conditions of XPfactor production. Furthermore, the function of XPfactor to other microorganisms are reported.

Key words : Saccharide Dipotassium hydrogenphosphate *Escherichia coli* Lactic acid bacterium

緒論

人体内に常在する腸内細菌について調べることは重要な研究課題となっている。本研究室ではその中でも最も一般的とされる大腸菌に関する研究を行ってきた。^{1) 2)}

これまで、キシロースとリン酸水素二カリウムを 120℃ で 25min 加熱すると大腸菌増殖抑制物質 (XPfactor) が生成することが認められた。また、他の糖類について同じ生成物が生じるか検討したところフルクトース等も抑制物質 (FPfactor) を生成した。

これらの結果をふまえて XPfactor のより詳しい生成条件を加熱温度、加熱時間、基質濃度との関係で検討し、より効率的な生成条件を求めた。

また、XPfactor が大腸菌以外の微生物に影響を及ぼすのか、どのような培養条件で最も効果を示すのか検討した。

実験方法

1. 使用菌株

Escherichia coli K12 IFO 3301

Bacillus subtilis

Saccharomyces cerevisiae

(2005年11月22日受理)

宇部工業高等専門学校 物質工学科

Yoghurt v1

2. 菌体培養方法

大腸菌と枯草菌は基本培地²⁾にて 37℃、16 時間、清酒酵母は酒合成培地で 25℃、24 時間、乳酸菌は一般乳酸菌摂取用培地 (ニッスイ) を用い 37℃、24 時間培養を基本とした。増殖度の測定は 580nm における濁度測定で行なった。

3. 糖加熱分解物の調製方法

各糖 400mM とリン酸二カリウム 10mM を含む溶液を 120℃、25 分加熱後、これを糖加熱分解物とした。培地には 10% 添加を基本とした。

結果と考察

1. XPfactor の生成条件

①糖とリン酸水素二カリウムの混合加熱、個別加熱による XPfactor 生成

まず、糖とリン酸水素二カリウムの加熱を両者を混合した場合と個別に行った場合とで比較した。即ち、キシロース 800mM 水溶液とリン酸水素二カリウム 20mM 水溶液の等量を混合し、120℃、25 分で加熱後、反応液を培地に 10% 添加した場合 (混合加熱) と、両水溶液を個別に加熱した後に混合して培地に添加した場合 (個別加熱) の大腸菌増殖への影響を調べた (Fig. 1)。

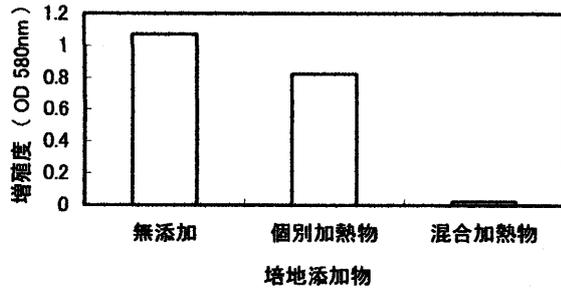


Fig. 1 糖とリン酸水素二カリウムの混合加熱、個別加熱による加熱生成物の大腸菌増殖抑制効果

混合加熱によってできた溶液を添加した場合は大腸菌の増殖をほぼ完全に抑制したが、個別加熱によってできた溶液を添加した場合は大腸菌の増殖を抑制しなかった。このことは、糖とリン酸水素二カリウムを混合後、加熱することにより大腸菌の増殖を抑制する物質が生成することを示している。この物質がキシロースとリン酸水素二カリウムから生成したことから XPfactor とした。

② E. coli の増殖に対する XPfactor 濃度の影響

XPfactor を培地に 10% 添加することで大腸菌の増殖を抑制することは認められたので、XPfactor の添加量を変化させることで大腸菌の増殖に対しどのような影響を及ぼすか、添加量を 1%、5%、10%、20% と変えて調べた (Fig. 2)。

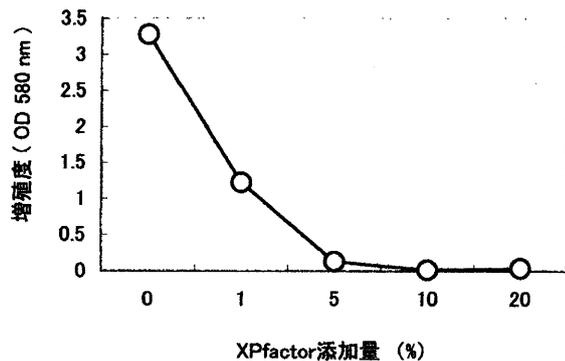


Fig. 2 E. coli の増殖に対する XPfactor 濃度の影響

XPfactor 10% 以上では大腸菌増殖をほぼ完全に抑制した。しかし、5% 添加以下では濃度低下に従い増殖は回復した。

③ XPfactor 添加による E. coli の増殖経時変化

これまで XPfactor が大腸菌に対してどのような影響を及ぼすか培養開始後約 16 時間後の結果を元に考察した。つぎに、XPfactor の大腸菌の増殖経時変化に対する影響を検討した (Fig. 3)。この際、摂取量を多くし、経時変化を観察しやすくした。

10% 以上の添加では 10 時間経過しても増殖を完全に抑制した。しかし、5% 以下の添加では 10 時間を経過する前に次第に菌の増殖が進行しているのが認められた。しかしながら無添加の場合に比べ、数時間は増殖が抑制されていることから XPfactor は単に大腸菌を死滅させるのではないとわかる。

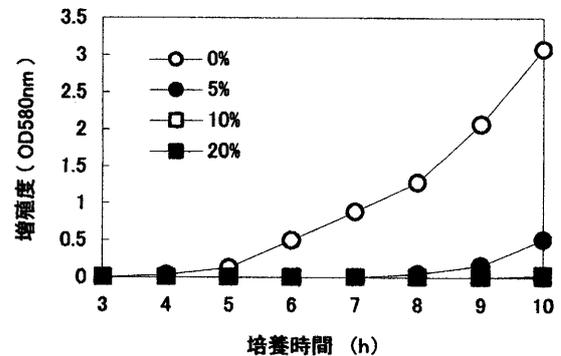


Fig. 3 XPfactor 添加による E. coli の増殖経時変化

④ XPfactor 生成時の加熱時間、加熱温度の影響

これまで、XPfactor 生成には 120°C、25min で混合加熱を行った。より高濃度の XPfactor を得るために加熱温度や加熱時間の面での XPfactor 生成条件を検討した (Fig. 4)。加熱温度は 100°C、110°C、120°C、加熱時間は 5、10、25、50min で行なった。

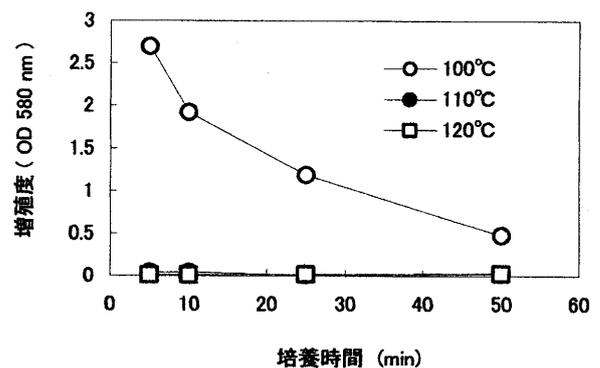


Fig. 4 大腸菌の増殖に対する XPfactor 生成時の加熱時間、加熱温度の影響

実験結果を Fig. 4 に示す。100°C 加熱のものは長時間加熱しても増殖抑制効果をほとんど発揮しなかった。一方、110°C、120°C 加熱では 5 分間加熱するだけで完全に大腸菌の増殖を抑制した。即ち、抑制物質生成反応は 110°C であれば加熱は 5 分以内で十分であると推定される。今回の実験で、加熱温度 110°C 以上、加熱時間 5 分間以上、これらの条件を満たすとき XPfactor が生成されることが確認さ

れた。

⑤XPfactor 生成時の糖濃度の影響

これまで XPfactor 生成の際、キシロース 400mM、リン酸水素二カリウム 10mM の濃度で XPfactor を作成してきた。そこでつぎにリン酸濃度を一定にし、糖濃度を变化させて XPfactor 生成可能な糖濃度の限界を検討した。加熱時のキシロース濃度を 4、40、400、3500mM で XPfactor が生成されるかどうかを確認した (Fig. 5)。

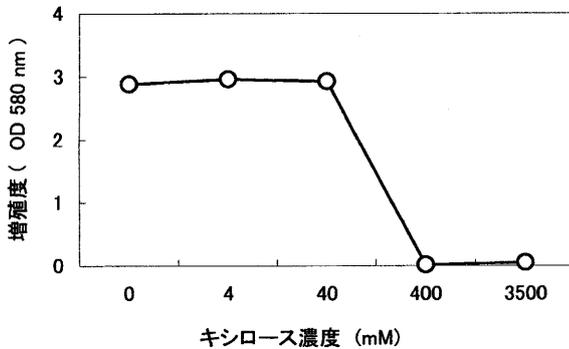


Fig. 5 XPfactor 生成時のキシロース濃度の影響

キシロース濃度を通常の 1/10 にすると大腸菌増殖抑制効果は表れなかった。したがって、現段階ではキシロース濃度 400mM を XPfactor 生成の限界とした。しかし、この限界値は糖がキシロースの場合であり、他の糖の場合は XPfactor 生成可能な濃度は異なることが考えられる。

⑥XPfactor 生成時のリン酸濃度の影響

先の実験ではリン酸濃度を一定にし、糖濃度を变化させた場合の結果を示した。そこで、逆に糖濃度を 400mM で一定にし、リン酸濃度を变化させ、XPfactor を生成可能なリン酸濃度の限界を調べた。通常、XPfactor を生成するときのリン酸水素二カリウム濃度は 10mM である。今回は 1、0.1、0.01、0.001mM の範囲の濃度で XPfactor が生成されるかどうかを検討した (Fig. 6)。

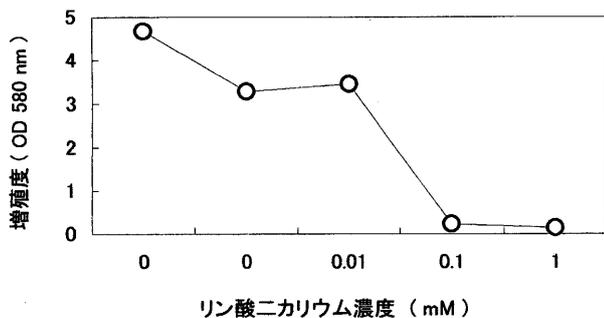


Fig. 6 XPfactor 生成時のリン酸濃度の影響

その結果、リン酸水素二カリウムの通常濃度の 1/100

である、0.1mM という低濃度で XPfactor が生成することが認められた。

2. XPfactor が各種微生物に及ぼす影響

①各種培養条件下での *E. coli* の増殖に及ぼす XPfactor の影響

大腸菌の各種培養条件下での増殖抑制に影響を及ぼす XPfactor の作用機構について検討した。まず、通性嫌気性菌である大腸菌に対して、好気、嫌気の両条件下における XPfactor の増殖抑制効果を検討した (Fig. 7)。比較のため静置条件についても調べた。

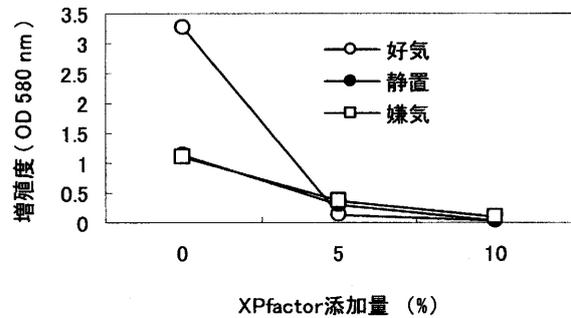


Fig. 7 好気、静置、嫌気培養における大腸菌増殖に対する XPfactor の効果

好氣的条件下では大腸菌の増殖度も大きい、XPfactor の増殖抑制効果も極めて高くなることが確認された。嫌気条件下では好気条件下ほど大きな効果は認められなかった。XPfactor は大腸菌に対して有効であり、好氣的条件下において特に強い効果を発揮することが示された。

②各種培養条件下での酵母の増殖に及ぼす XPfactor の影響

XPfactor は原核生物である大腸菌には増殖抑制効果を示すことはわかったので、真核生物である酵母に XPfactor が増殖抑制効果を示すかどうかを調べた (Fig. 8)。大腸菌と同様に好気、嫌気の両条件下において検討した。酵母は清酒酵母を用いた。

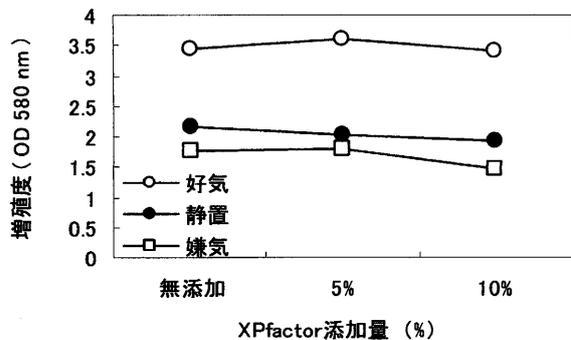


Fig. 8 好気、静置、嫌気培養における清酒酵母に対する XPfactor の効果

原核生物の大腸菌には増殖抑制効果を示したものの、真核生物の清酒酵母には好気、嫌気いずれの条件下でも増殖抑制効果を示さなかった。

③ 枯草菌、乳酸菌の増殖に及ぼす XPfactor の影響

XPfactor は真核生物の清酒酵母にはまったく効果がなかった。大腸菌はグラム陰性である。そこで同じ原核生物ではあるがグラム陽性菌の枯草菌で同様の実験を行なった (Fig. 9)。

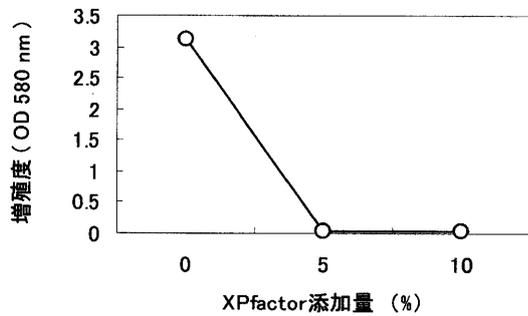


Fig. 9 枯草菌に対する XPfactor の効果

XPfactor は真核生物の清酒酵母にはまったく効果がなかった。大腸菌はグラム陰性である。そこで同じ原核生物ではあるがグラム陽性菌の枯草菌で同様の実験を行なった (Fig. 9)。

XPfactor は大腸菌と同じように枯草菌の増殖を抑制した。これより、グラム陰性、陽性は XPfactor の作用には関係していないことが推定された。つぎに大腸菌と同じ原核生物であり、腸内細菌である乳酸菌に XPfactor がどのような影響をもたらすか検討した (Fig10)。

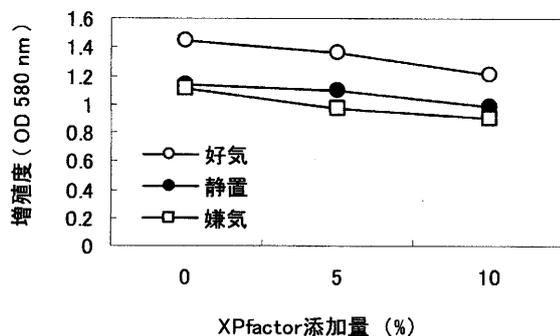


Fig. 10 好気、静置、嫌気培養における乳酸菌増殖に対する XPfactor の効果

原核生物である乳酸菌に XPfactor は増殖抑制効果を示さなかった。即ち、XPfactor の抑制効果は真核・原核生物、グラム陰性・陽性とは関係ないことが実証された。したがって XPfactor が抑制効果を示すのは何か他の要因があると考えられる。1つの原因としては清酒酵母のアルコール発酵や、乳酸菌の乳酸発酵よりも大腸菌の発酵能力が劣っている可能性が考えられる。しかし、これには更なる検討が必要である。

今回、腸内細菌である大腸菌と乳酸菌について XPfactor の効果を検討した。その結果、XPfactor は悪玉菌である大腸菌の増殖は抑えるが、善玉菌の乳酸菌にはまったく関与しないことが確認された。XPfactor はこれらの特徴をもち、さらに生成条件も安易であるため実用的な側面を考えると腸内において大きな効果を発揮すると考えられる。

今後の課題としてはキシロース以外の他の糖から同様な factor の生成を検討するとともに、XPfactor の反応機構について詳しく調査し、XPfactor 作用対象微生物の関連性を調査する必要がある。また、リン酸水素二カリウムに変わる代替物質の検討も必要である。

まとめ

1. 大腸菌の増殖を抑制する XPfactor はキシロース 400mM、リン酸水素二カリウム 10mM を含む溶液を 110°C 以上、5 分間以上混合加熱することで生成することが認められた。
2. XPfactor の効果の有無はグラム陰性、陽性、真核、原核生物に無関係であることが確認された。

参考文献

- 1) Yasushi SHIGERI, Kunio YAMAOKA, and Teijiro KAMIHARA . *Biosci . Biotech . Biochem .* , 56(10) , 1684-1685, 1992
- 2) Kunio YAMAOKA, Mitsuko KATO, and Teijiro KAMIHARA . *Biosci . Biotech . Biochem .* , 58(6) , 995-997, 1994