

# 糖加熱分解物質が各種微生物増殖に与える影響 (II)

加藤美都子\*、田村翔\*\*、金子健一\*\*\*、村田章\*\*\*\*、林聖子\*\*\*\*\*、山岡邦雄\*

## An Influence of Thermal Decomposed Saccharide upon the Growth of Several Microorganisms (II)

Mitsuko Kato\*, Sho Tamura\*\*, Kenichi Kaneko\*\*\*  
Akira Murata\*\*\*\*, Shoko Hayashi\*\*\*\*\*, Kunio Yamaoka\*

### Abstract

It is an important theme to investigate intestinal bacteria. We have studied and reported about *Escherichia coli* which is one of the major intestinal bacterium. The growth of *Escherichia coli* was inhibited by heated solution which contains xylose and dipotassium hydrogenphosphate. This inhibition was observed with other few saccharides as well as xylose. This inhibitor was named as XPfactor in the case of xylose used as a saccharide. The previous report showed the conditions of XPfactor production and the functions in other microorganisms. This report shows the conditions and functions of XPfactor more detail, and practical applications to the daily foods.

**Key words :** Saccharide pH *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。<sup>1) 2) 3)</sup>

これまで、キシロースとリン酸水素二カリウムを 120°C で 25 分加熱すると大腸菌増殖抑制物質 (XPfactor) を生成することが認められた<sup>3)</sup>。

この結果をふまえ、前報<sup>3)</sup>では、さらに XPfactor のより詳しい生成条件を加熱温度、時間、基質濃度との関係で検討し、効率的な生成条件を求めた。また、XPfactor の大腸菌以外の微生物、特に乳酸菌に対する効果を調べた。その結果、XPfactor は大腸菌の増殖を抑制するのに対し、乳酸菌のそれは抑制せず、むしろ促進効果を示すという興味ある結果を報告した。

そこで、今回、XPfactor 生成条件を糖の種類、pH との

関連で調べ、かつ XPfactor の分離を試みた。また、XPfactor の増殖抑制効果を除去する物質について検討した。さらに、日常的な食品への応用例について可能性を調べた。これらの結果について報告する。

### 実験方法

#### 1. 使用菌株

*Escherichia coli* K12 IFO 3301  
*Yoghurt v1*

#### 2. 菌体培養方法

大腸菌は、基本培地を用い 37°C で 16 時間、乳酸菌は一般乳酸菌接種用培地 (ニッスイ) で 37°C、24 時間培養を基本とした。いずれの菌も増殖度の測定は 580nm における濁度測定で行なった。培養は特に指定のない限り好気培養を基本とした。

#### 3. 糖加熱分解物の調製方法

各糖 400mM とリン酸水素二カリウム 10mM を含む溶液を高圧滅菌器で 120°C、25 分加熱後、得られた混合溶液を XPfactor とした。糖については様々な種類について検討したが、基本的にキシロースを用いた。増殖培地にはこの糖加熱分解物の 10% 添加を基本とした。

(2006 年 11 月 24 日受理)

\* 宇部工業高等専門学校 物質工学科

\*\* 宇部工業高等専門学校 物質工学専攻

\*\*\* 三洋化成工業 (株)

\*\*\*\* 天野エンザイム (株)

\*\*\*\*\* 森永製菓 (株)

4. XPfactor 分離法

4.1 高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィーとしては HITACHI の L-6000 シリーズを用い、カラムは shodex SUGAR SH1011 を使用した。測定条件としてはカラム温度 50℃、キャリアーガス 0.01N 硫酸、流速は 1.0ml/min とした。

4.2 薄層クロマトグラフィー

薄層クロマトグラフィーの展開条件としては、n-ブタノール、酢酸、水の 4:1:2 の混合溶液を展開溶媒として用い、薄層としては Silica gel 60 を厚さ 1mm に展開したものを利用した。<sup>4)</sup>

結果と考察

1. XPfactor 生成条件

1.1 各種糖からの XPfactor 作成

前報<sup>3)</sup>で報告したように、XPfactor の基本的生成条件としては、少なくともキシロースとリン酸水素二カリウム混合溶液を 110℃以上、5 分間以上混合加熱することが必要である。キシロースとリン酸水素二カリウムの濃度についてはキシロース 400mM、リン酸水素二カリウムは 10mM が最適であった。これらの条件下で生成された XPfactor を大腸菌増殖培地中に 10%以上添加することで最低でも 16 時間は大腸菌の増殖を抑制することも確認した。

これまでは糖として主にキシロースを用いたが、他の糖とリン酸水素二カリウムで同様の効果を示す可能性を調べた (Fig.1)。

単糖類 8 種類、二糖類 2 種類について検討したところ、その効果は大きく二つの結果に分かれた。即ち、キシロースやガラクトースなど還元性を示す糖はすべて抑制効果を示し、非還元糖では抑制効果を示さなかった。これはアノマー性炭素の存在が XPfactor の生成に大きく関与していることを示唆するものである。

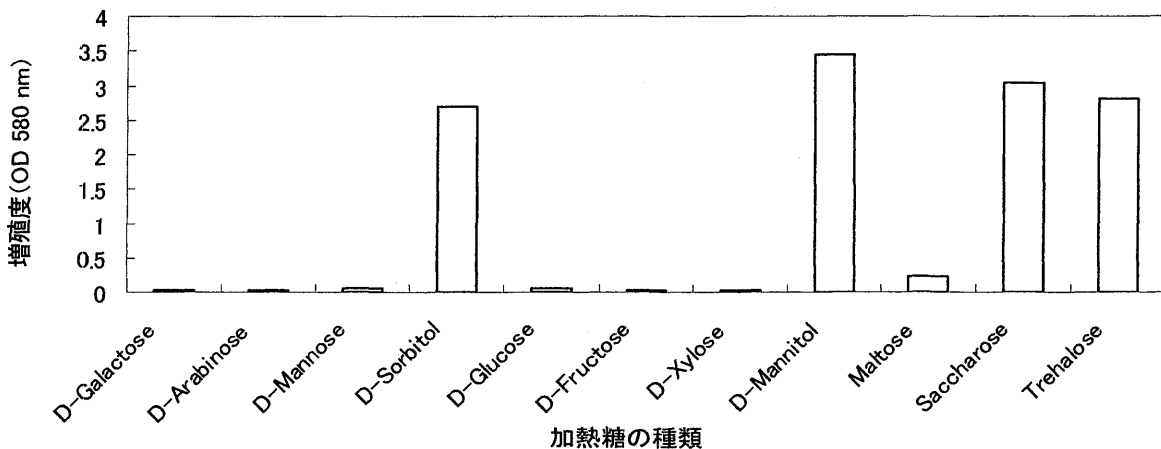


Fig.1 数種の糖を用いた場合の増殖度への影響

1.2 XPfactor 生成時のリン酸の関与

1.2.1 リン酸水素二カリウム濃度と pH の影響

XPfactor 生成の際、リン酸水素二カリウムでは効果を示したが、リン酸二水素カリウムでは示さなかったことから、次に XPfactor 生成時の pH の影響を調べた (Fig.2)。

加熱時、リン酸水素二カリウムの濃度を 0~1000 μM まで変化させたところ、100、1000 μM では抑制効果を示したが、10 μM 以下では示さなかった。各濃度でリン酸水素二カリウムを用いたときの pH を調べたところ、100、1000 μM の場合は pH が 7 以上で 10 μM 以下では 7 以下であった。このことは pH がアルカリ側であることが XPfactor 生成の必要条件である可能性を示している。この点について他のアルカリ性物質でも同様の傾向を確認した (データ略)。

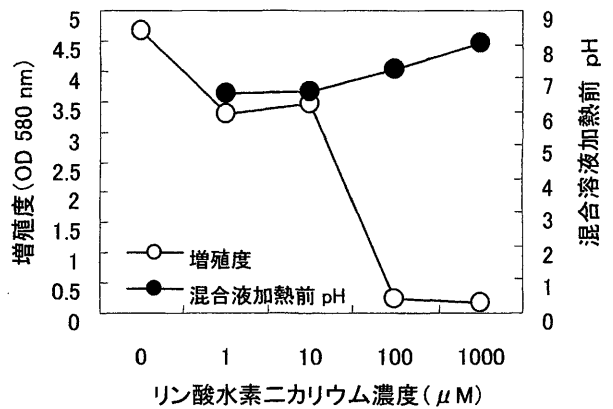


Fig.2 XPfactor 生成に対するリン酸水素二カリウム濃度と pH の影響

### 1.2.2 リン酸代替物質による有効物質の生成

XPfactor の応用的側面も考え、リン酸水素二カリウムの代替物質について調べた。水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムをリン酸水素二カリウムの代替に同モル濃度で用いたところ、いずれも強い抑制効果を示した (Fig. 3)。また、それらの代替物質と加熱する際の pH はいずれも 7 より高い値を示した。このことから pH との関連が確認された。

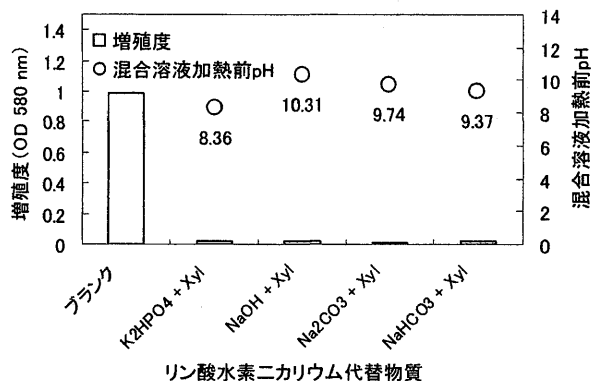


Fig. 3 リン酸水素二カリウム代替物質を用いた場合の XPfactor 生成可否

## 2. XPfactor の性質

### 2.1 XPfactor の効果を除去する物質の検討

#### 2.1.1 硝酸還元条件下でのシステインと XPfactor の相互作用

本研究の目的は XPfactor の分離、同定およびその生理的作用の解明である。これまでシステインが大腸菌の代謝に大きく関与していると報告してきた<sup>2)</sup>。そこで、システインと XPfactor との関連について検討した。硝酸還元条件下で大腸菌が増殖する場合、システインを加えると硝酸還元が抑制されるが大腸菌は増殖可能であることはすでに報告した<sup>2)</sup>。そこで、嫌気的大腸菌培地に硝酸カリウムを加え、硝酸還元条件下とし、さらに XPfactor を添加し

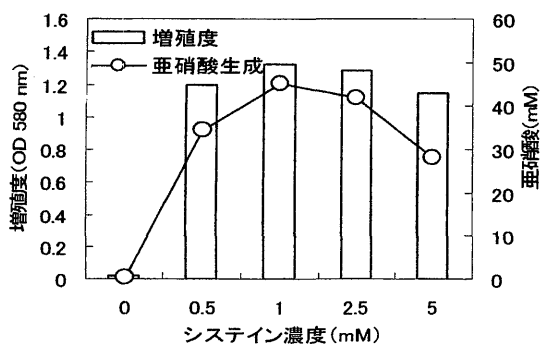


Fig. 4 システイン添加による亜硝酸生成および増殖度への影響

た (Fig. 4)。この場合も増殖は完全に抑制されたが、システインを 0.5~5mM 添加したところ増殖はほぼ回復した。この際、増殖度の回復は亜硝酸の生成とほぼ一致した。このことは硝酸還元が起こった可能性を示している。システインの硝酸還元に対する作用は XPfactor 存在下では逆の効果を示したがこの点についてはさらに検討が必要である。また、同じシステインでも酸化型のシステインを用いた場合には XPfactor の効果は除外されなかった (データ略)。

### 2.1.2 システイン、グルタチオン、アスコルビン酸と XPfactor の相互作用

次に硝酸還元下条件以外の増殖培地における XPfactor とシステイン同じく還元力を持つグルタチオン、アスコルビン酸の関係を調べた。

硝酸カリウムを加えない場合でもシステインは XPfactor の増殖抑制効果を除去するという興味ある結果を示した (Fig. 5)。グルタチオン、アスコルビン酸についても効果に大小はあるものの同じ傾向を示した (Fig. 6, 7)。このことは XPfactor の効果は培地の酸化還元電位と関係があることを示唆している。

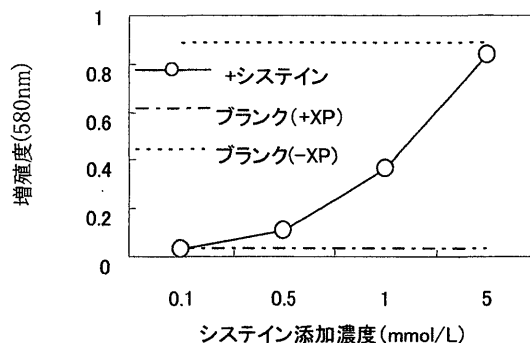


Fig. 5 システイン添加による増殖度への影響 (好気)

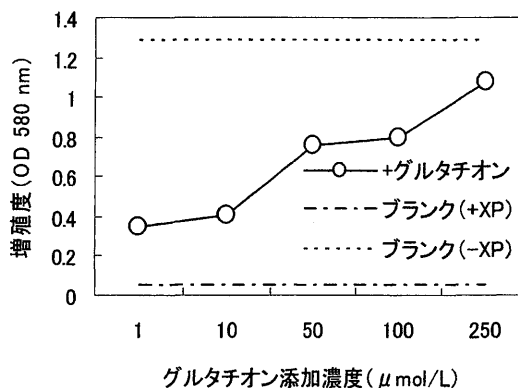


Fig. 6 グルタチオン添加による XPfactor への影響

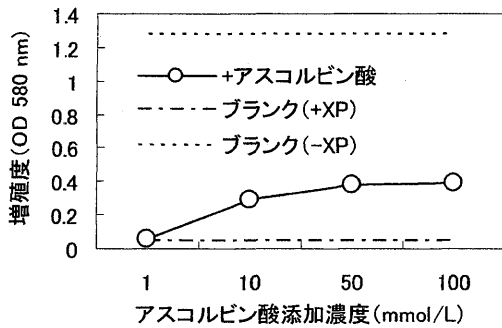


Fig. 7 アスコルビン酸添加による XPfactor への影響

2.1.3 各増殖培地中の酸化還元電位と XPfactor、システインとの関係

XPfactor の酸化還元電位 (ORP) はプラス値を示した。しかし、システインを添加すると ORP はマイナス値を示し、それと同時に増殖抑制効果も失った。これにより XPfactor が効力を発揮するためには酸化力をもつ必要があるとわかった。

Tab. 1 システイン添加時の酸化還元電位

| 糖加熱分解物      | 10% | 10% | -   | -   |
|-------------|-----|-----|-----|-----|
| システイン (5mM) | -   | 5mM | -   | 5mM |
| ORP(mV)     | 53  | 69  | -76 | -71 |

3. 有効物質の分離・精製

これまで大腸菌増殖抑制物質を含む XPfactor の生成条件、その作用機構について詳しく調べてきた。

次に、どのような成分が大腸菌の増殖を抑制しているのか、有効物質の成分推定を行った。

まず、XPfactor 溶液を薄層クロマトグラフィーで分離した (Fig. 8)。サンプルとしては、キシロース、XPfactor を用いたところ、両者の分離スポットにほとんど差が認められなかった。このことはキシロースが加熱によって大部分ほとんど変化せず、一部分解した生成物が XPfactor として作用したものと考えた。

分離後にスポット部分の薄層から成分を抽出し、成分推定を行った。成分推定には高速液体クロマトグラフィーを用いた (データ略)。しかし、分析の結果からは添加した糖以外のピークはほとんど認められなかった。これは有効物質が大変微量物質であるため現状の XPfactor 濃度では成分推定は難しいことがわかった。



Fig. 8 薄層クロマトグラフィー

4. 各種微生物の生育条件に対する XPfactor の影響

4.1 培地中の炭素源が XPfactor に与える影響 (大腸菌)

これまでの結果は培地中の炭素源としてグルコースを用いた場合の XPfactor の効果について示したものである。そこで、各種培養条件下での大腸菌以外の微生物に対する XPfactor の効果について調べた。

まず、培地中の炭素源をグルコース以外に通常よく使用される 6 種の糖類を用いて XPfactor の効果を調べた (Fig. 9)。結果に示すように、XPfactor の効果は炭素源の種類に関係なく、いずれの場合も大腸菌の増殖を大きく抑制した。

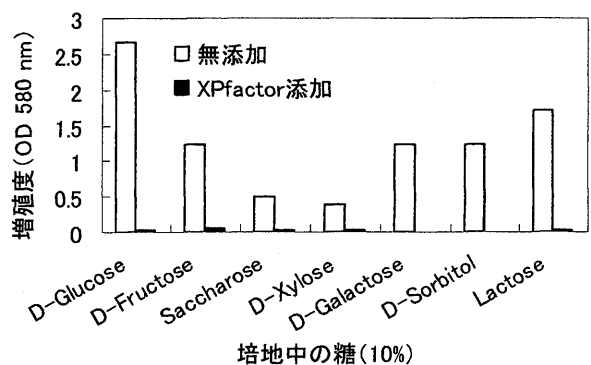


Fig. 9 培地中の炭素源が XPfactor に与える影響

4.2 培地中の炭素源が XPfactor に与える影響 (乳酸菌)

4.1 の結果をふまえ、同様の検討を乳酸菌に対して行った。XPfactor を含まない場合の増殖度を 100 として、大腸菌と乳酸菌の増殖に対する XPfactor の効果を調べた (Fig. 10)。結果に示すように、大腸菌の増殖はほぼ完全に抑制されたが、乳酸菌のそれはむしろ促進されたものが多く、少なくとも抑制は認められなかった。

このことは、腸内環境の側面から考えると、どのような糖を食品として取り入れた場合でも、腸内の大腸菌増殖は抑制され、乳酸菌のそれはむしろ促進されると考えられ、XPfactor は極めて良好な結果をもたらすと推定される。

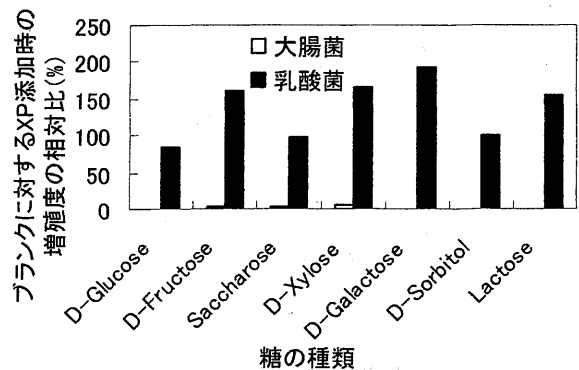


Fig. 10 培地中の炭素源が XPfactor に与える影響 (※ブランクを 100 とした相対比)

## 5. XPfactor の実用的応用面の検討

### 5.1 蜂蜜とリン酸水素二カリウムによる有効物質の生成

以上の XPfactor に関する作用を実用的応用面から考え、身近な食品群から同様な物質が生成される可能性を考えた。糖としては糖含有量が多い蜂蜜を用いた。

まず、蜂蜜とリン酸水素二カリウムを加熱混合して 0~15% まで培地に添加したところ、それぞれの単独添加では増殖にほとんど影響を与えないが、両者の混合加熱物 (HPfactor) は XPfactor の場合と同様、5% 以上で完全に増殖を抑制した。このことは身近な蜂蜜からも生成しうる可能性を示している (Fig. 11)。

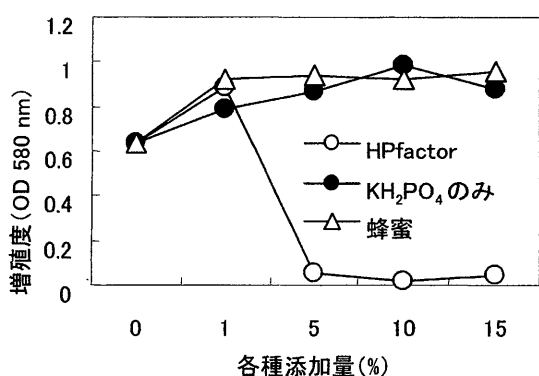


Fig. 11 糖として蜂蜜を用いた場合の factor 生成

### 5.2 蜂蜜とリン酸代替物質による有効物質の生成

次にリン酸水素二カリウム代替物質として日常的に家庭で使われる炭酸水素ナトリウムを用いた。比較のため、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムも同モル濃度で検討した (Fig. 12)。

結果に示すように、炭酸水素ナトリウムをリン酸水素二カリウムの代わりに使用した場合でも大腸菌の増殖は完全に抑制した。

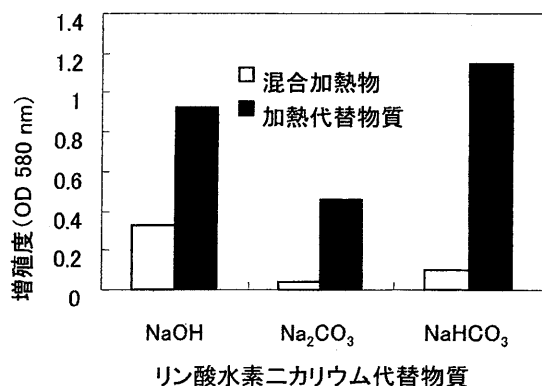


Fig. 12 リン酸水素二カリウム代替物質を用いた factor 生成

### 5.3 乳酸菌に対する HPfactor の影響

この HPfactor を乳酸菌に対して用いたところ、大腸菌の場合とはまったく逆にその増殖はむしろ大きく促進された (Fig. 13)。

このことは XPfactor の場合と同様、腸内環境の側面から考察すると蜂蜜の分解物は大腸菌の増殖を抑え、乳酸菌のそれを促進させるという大変優れた物質であることを示している。

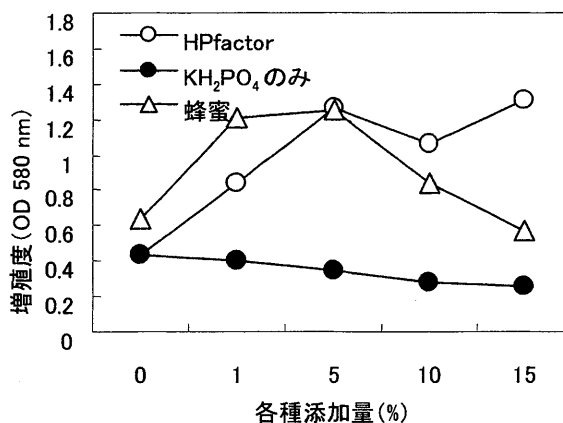


Fig. 13 乳酸菌に対する HPfactor の影響

## まとめ

1. 大腸菌増殖を抑制し、乳酸菌増殖を促進する XPfactor の生成には還元性の糖のみ有効であることがわかった。また、その際、加熱時の pH を 7 以上にする物質であれば XPfactor 生成の可能性があることがわかった。
2. XPfactor の効果はシステインのような還元性物質と混合することで除去されることがわかった。システインと同じような還元性を示す、グルタチオンやアスコルビン酸を混合した場合でも、その効果の大小はあるものの同じ傾向を示すことがわかった。また、XPfactor の効果は酸化還元性に大きく関わっていることもわかった。
3. XPfactor の分離、同定は現状の XPfactor を用いた場合、有効性生物が大変微量であるため不可能であった。
4. 炭素源にグルコース以外の糖を用いた場合、大腸菌にはどの糖を用いた場合でも増殖抑制効果を示したが、乳酸菌には、むしろ増殖促進効果を示すものもあった。
5. XPfactor の応用的側面として、糖の代わりに蜂蜜を用いた場合でも、キシロースを用いた場合と同様の効果を得

られた。

### 参考文献

- 1) Yasushi SHIGERI, Kunio YAMAOKA, and Tejiro KAMIHARA . *Biosci . Biotech . Biochem .* , **56**(10) , 1684-1685 , 1992
- 2) Kunio YAMAOKA, Mitsuko KATO, and Tejiro KAMIHARA . *Biosci . Biotech . Biochem .* , **58**(6) , 995-997 , 1994
- 3) Mitsuko KATO, Sho TAMURA, Akira MURATA, Kenichi KANEKO, Shoko HAYASHI, Kunio YAMAOKA 宇部工業高等専門学校研究報告 No52 , 33-36, 2006
- 4) 足立達  
化学と生物 4 (2)、P. 109、1965 年