

豆乳より分離した細菌胞子の発芽について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-04-13 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 寺島, 一郎, 守田, 良子, Terashima, Ichiro, Morita, Yoshiko メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00005255

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



豆乳より分離した細菌胞子の発芽について

寺 島 一 郎
守 田 良 子

結 言

豆乳は大豆を磨砕した所謂「呉」を沸騰させて、しばって作るものであるが、非常に腐敗しやすい食品である。豆乳の腐敗はその製造工程からみて、主として胞子菌によるものと思われるので、我々は豆乳より胞子菌を数種分離し、その発芽を促進させる条件についての実験を試みた。発芽することにより耐熱性を失えば、食品加工中の加熱操作で含有細菌数が減り、腐敗も制約を受けるからである。⁽¹⁾

分離菌のうち Heat shock を与える事により、発芽が非常に促進されるもの2株を得、又それらの高率な発芽を得る培地成分として、イノシン酸含有調味料を用いる事を知ったので、それらについての実験成績を報告する。

実 験

I 胞子菌の分離とその諸性質の試験

我々が分離した2株—A株及びD株—についての分離の試料、条件等は次の通りである。

A株：金沢市内の豆腐商より袋豆腐の工程中、最後の加熱処理（90°C 40分）を行わないものを実験室に持ちかえり、滅菌試験管内で90°C 40分処理し、普通寒天平板上に培養を行って、分離した。

D株：金沢市内の豆腐商より得た豆乳を100°C 5分

処理したのものについて同様に分離培養を行った。

尚、その際、豆乳関係材料4点より9株の胞子菌を得たのであるが、予備実験の結果、比較的高い発芽率の得られたのはA及びDの2株であった。

A, D両株とも有胞子桿菌で胞子は楕円形を示し、sporangia は膨大していない。寒天平板上でA株は白い円形集落を作り、D株は周囲不整形の集落を作ってよく拡がる。ブイオンではA株は均一に濁濁し、非常に落ちやすい垂れ下るような菌膜を作り、D株も濃く均一に濁濁し、こわれやすい輪状菌膜を作る。

この点、透明で皺状菌膜を作る *B. subtilis* と明瞭に異なる。牛乳培地では両株とも、はじめカードを作り、後速やかに液化してゆく。Voges-Proskauer反応（アセチルメチルカルピノール生成）及び、硝酸塩還元は両株とも顕著である。澱粉分解については、D株は強力な分解を示すが、A株は微弱であった。アンモニウム塩培地によるぶどう糖並びにマンニトールの酸生成試験では、ぶどう糖の場合両株ともガスを生ずる事なく、速かに酸を生成したが、マンニトールの場合には両株とも陰性であった。第1表にこれら諸性質を一覧表として掲げ、また *B. cereus* の性質を附記しておく。^{(2),(3)}

第 1 表 A株並にD株の生物学的諸性状

株	栄養体	胞子	Sporangia	普通寒天培地		ブイオン	牛乳に対する作用
				平板	斜面		
A	桿菌 (1.2μ $\times 3\mu$)	楕円 (1.2μ $\times 2.5\mu$)	膨大せず ○	白色円形	よく生育 あまり拡がらぬ	弱い濁濁、 落ち易い菌膜	カードつくる 後に溶解
D	桿菌 (1.2μ $\times 4.8\mu$)	楕円 (1.2μ $\times 1.9\mu$)	膨大せず ○	不整形	よく生育 よく拡がる	均一濁濁 落ち易い輪 状菌膜	同上
B. <i>cereus</i>	rod ($1\sim 1.2\mu$ $\times 3\sim 5\mu$)	oval (1 $\times 1.5\mu$)	not appreciably swollen	large, rough, flat, irregular with whiplike outgrowths, whitish with characteristic mottled appearance by transmitted light	Growth abundant, rough, opaque, whitish, nonadherent, spreading, edge irregular with whiplike outgrowths	Heavy uniform turbidity with soft, easily dis- persed sediment with or without soft ring pellicle	rapid peptonize

株	アセチルメチル カルビノール 生産	硝酸塩 還元	ゼラチン 液化	澱粉 分解	酸生成		硝酸塩 寒天斜面
					グルコース	マンニット	
A	+	+	+	±	+	-	貧弱な生育
D	+	+	+	+	+	-	同上
B. cereus	+	+	+	+	+	-	Scant or no growth

第1表から見られるように、両株の性質は、略、*B. cereus*のそれに一致する。ただA株の澱粉分解性が非常に微弱であるのと、寒天上の培養があまり広がらない点が不一致の事項である。よってA株もD株も*B. cereus*に属する菌であると推定した。

耐熱性：両株の胞子の耐熱性について試験した結果は、90°C 60分では両株とも死滅せず、A株は100°C 60分、D株は100°C 40分で死滅する事を認めた。

豆乳に対する作用：両株をそれぞれ単独に滅菌した豆乳に接種し、1夜 37°Cの恒温器内におくと、酸を生じて完全に凝固をきたす。生成した酸を滴定すると、2倍希釈豆乳 8mℓに対しA株は5.5mℓ、D株は4.8mℓ (N/20)であった。豆乳の腐敗は先づ凝固を起すから、両株とも豆乳の腐敗に関与するものと思われる。

II 分離株の発芽実験

細菌胞子の発芽を促進する物質として一般に、アミノ酸、ぶどう糖、及び核酸関係物質の三種があげられているが、⁽⁴⁾その他に胞子を予め加熱処理すること—Heat shock—が有効である例が報告されている。⁽⁵⁾

予備実験に於てA、Dの2株が90°40分のHeat shockにより発芽が促進されるらしいことを認めたので、これに関して二、三の実験を試みた。

胞子懸濁液の調製

普通寒天斜面上に37°C 10日間培養して充分胞子を形成させた後、生理食塩水を注いでガラススパチュラで胞子をかきとり、遠心管に移して、4~5回洗滌をくりかえし、保存は冷蔵庫内氷室においた。

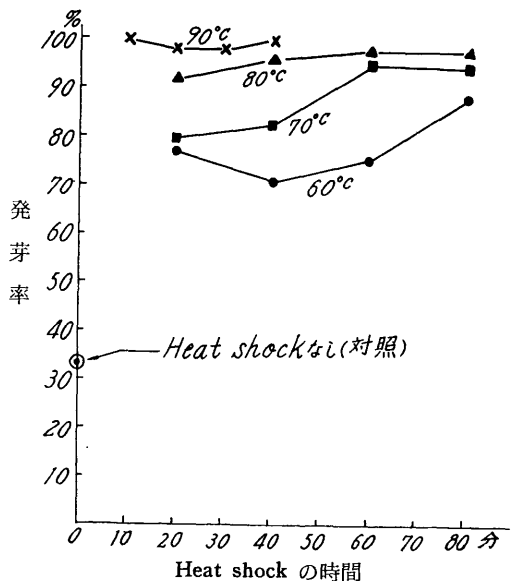
胞子数を計測する時は、胞子懸濁液を60°C 15分処理して平板混和培養を行い、24時間後に集落数を数えた。

(a) Heat shock の温度及び時間について

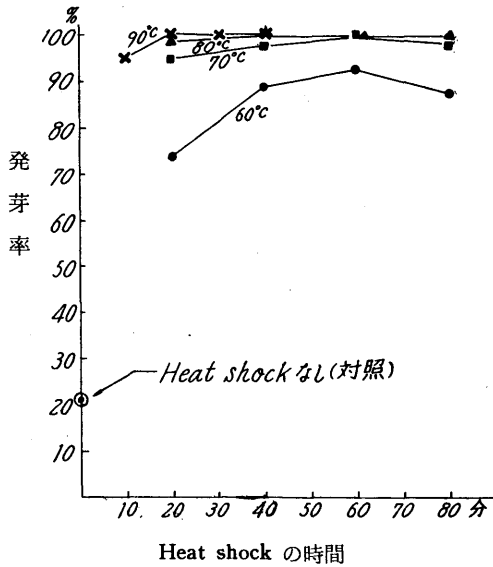
培地として鯖エキスに、L-Alanine (終濃度5mM) 及び Glucose (終濃度25mM) を加えたものを数本の試験管に用意し、各試験管に分離胞子の懸濁液を加えて、それぞれ90°C、80°C、70°C、及び60°Cの各温浴に定時間入れた後水冷し、その内の一部(0.5mℓ) をとって平板混和培養を行い、残部を60分37°Cの恒温器内においてから60°C 15分処理して平板混和培養を行った。

実験の結果を図で示すと第1図及び第2図の通りである。

第1図 A株胞子の発芽に対する Heat shock の温度と時間の影響



第2図 D株孢子の発芽に対する Heat shock の温度、時間の影響



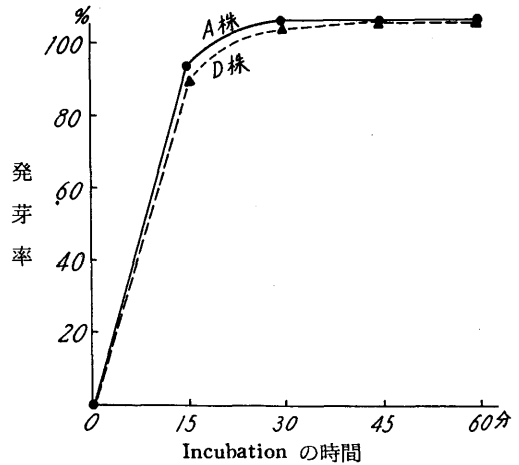
Heat shock を与えない場合は、37°C 60分培養後の発芽率が、A株の場合35%、D株の場合21%であるのに対し、Heat shock を与えればいずれの場合も著しく発芽率を高めることが認められた。そして両株とも Heat shock の温度が高くなるに従って発芽率も上昇し、90°Cの場合は20分で略100%に近い発芽率を示した。

(b) Incubation の時間について

90°C40分の Heat shock を与えた場合について、それに続く Incubation の時間と発芽との関係を見るため、15分毎に4回発芽率を求めてみた。

その成績は第3図に示す通りで両株とも非常に短時間のうちに発芽が高率に行われることを認めた。

第3図 A株及びD株孢子と Heat shock (90°C 40分) 後のIncubationの時間との関係



(c) 培地成分について

分離株の孢子の発芽に対する栄養要求を単純物質としてより明らかにしたいと考え、第2表に示す如き数種の培地について発芽実験を行った。

第2表 培地成分についての実験結果

培地の種類	発芽率	
	A株	D株
L-Alanine + Glucose	69%	45%
" + " + さばエキス	99	100
" + " + 味の素プラス	99	100
" + " + いの一番	91	100
" + " + グルタミン酸ソーダ	66	52

(註) L-Alanine は 5mM, Glucose は 25mM, 味の素プラス、いの一番及びグルタミン酸ソーダは、何れも 3.7g/dl, 発芽率はA株に対しては90°C40分、D株に対しては80°C40分 Heat shock を与え、1時間incubateして得た。

L-Alanine+Glucose のみでは Heat shock を与えてもA株で69%、D株で45%の発芽率にとどまる。高率な発芽のためには天然物としては鯖エキスが必須である。又、市販のイノシン酸含有グルタミン酸ソーダ調味料(味の素プラス或はいの一番)を加えてみたところ、鯖エキスに匹敵する効果が見られた。グルタミン酸ソーダのみではあまり効果が見られないから、調味料に含まれた核酸関係物質(イノシン酸が主である)が関係していると思われるが、イノシン酸の純品については試験する事が出来なかった。

ところ、鯖エキスに匹敵する効果が見られた。グルタミン酸ソーダのみではあまり効果が見られないから、調味料に含まれた核酸関係物質(イノシン酸が主である)が関係していると思われるが、イノシン酸の純品については試験する事が出来なかった。

以上のような実験に関係のある文献としては、Powell 及び Hunter⁽⁵⁾が *B. cereus* について行ったものがある。即ち、Adenosinと incubate する前に60°C 1時間加熱すると発芽が速く完全に行われ、又、Inosine によっても促進される事を報告しているがイノシン酸については触れていない。この実験に使用したイノシン酸含有化学調味料の中に、イノシン或はアデノシンが含まれているかどうか、目下の所不明であるがとに角、高率の発芽という目的のためには上記調味料を用いる事が出来る事が明らかとなった。

要 約

豆乳及びそれに関係ある材料より分離した孢子菌のうち、2株について孢子の発芽条件を検討し、又、生物学的諸性質を検した。

その結果、両株は澱粉分解の程度等の点ではお互に明らかに異なるけれども、共に *B. cereus* に属する菌で

あることが知られた。

両株孢子の発芽は Heat shock を与えることにより著しく促進され、又培地としては L-Alanine, Glucose 及びイノシン酸含有化学調味料から成るものを用いて、短時間に 100%に近い発芽が行われる事が示された。

文 献

- 1) 寺島・守田：本誌 第9号 昭和36年
- 2) Smith, Gordon & Clark : *Aerobic Spore forming Bacteria* 1952
- 3) Breed, Murray and Hitchens: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th. ed. (1948)
- 4) Halvorson & Church: *Bacteriological review* 21, 112 (1957)
- 5) Powell & Hunter. : *Biochem. J.* 62, 381 (1956)

On the spore germination of bacteria isolated from soybean milk

Ichiro TERAJIMA and Ryoko MCRITA

Several strains of spore-bearing bacilli were isolated from soybean milk. Biological tests were carried out about two of them and it was found they differed from each other in certain respects, but are believed to belong to the species *Bacillus cereus*. Spores of both strains showed high germination rates by the so-called heat shock method using a medium containing L-alanine, glucose and a commercial seasoning composed of sodium glutamate and inosinic acid.