

## ブ　ド　ー　球　菌　の　glucose　酸　化

## 第　1　編

## 培　養　時　間、培　地　始　pH、培　養　温　度　と　の　関　係

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

武　田　正　孝

〔昭和33年7月23日受稿〕

## 言　次

- I. 緒　　言
- II. 実験材料及び実験方法
- III. 実験成績
  - 1. 培養時間と酵素活性の関係

- 2. 培地始 pH と酵素活性の関係
- 3. 培養時間と酵素活性の関係
- IV. 総括及び考案
- V. 結　　言

## I. 緒　　言

微生物の糖代謝に関しては近來極めて多くの研究がなされており、glucose の酸化経路としては Embden-Meyerhof の経路<sup>1)2)</sup>、Warburg-Dickens の経路<sup>3)4)5)6)</sup>、或は 2-ketogluconate 又は 5-ketogluconate をへる酸化経路<sup>7)8)9)</sup> などが明らかにされている。然し病原菌の糖代謝機構についての詳細な研究は少い。著者は本教室に於ける病原性細菌の糖代謝研究の一環として、Staphylococcus aureus, albus, citreus の3菌を供試菌として glucose 代謝に検討を加えた。細菌の物質代謝はその発育環境に大きく支配されることは言をまたない。そこで本実験に於ては、先づ供試菌の酵素的性状に対する培養時間、培地 pH、培養温度の影響を検討した。以下その成績を記して御批判を仰ぐ次第である。

## II. 実験材料及び実験方法

供試細菌： St. aureus, St. albus, St. citreus の教室保存の標準株。

菌培養法： 普通寒天を必要 pH に修正して行つた。

生菌浮游液調製： 培地より集めた菌体を M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.0) にて2回遠沈洗滌し、緩衝液に1時間浮游してから遠沈し、同一組成の緩衝液に浮游した。菌量決定は光電比濁計によつた。

呼吸量の測定： Warburg 検圧計により常法<sup>10)</sup> に従つた。なお CO<sub>2</sub> 発生量は反応後側室より 3-N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を注加して測定した。

基質及び阻害剤 何れも市販品を蒸溜水に溶解し、NaOH 又は HCl を以て必要 pH に修正して用いた。

glucose の定量： 3, 5-dinitrosalicylic acid による比色法<sup>11)</sup> によつた。

pyruvate の定量： 2, 4-dinitrophenylhydrazine による比色法<sup>12)</sup> によつた。

## III. 実　験　成　績

## 1. 培養時間と酵素活性の関係

各供試菌を pH 7.0 の普通寒天に接種し、温度を 37°C として培養し、10 時間、20 時間、48 時間後に夫々集菌して、各菌体の酵素活性を比較した。

先づ各菌、各培養時間に於ける終末 pH を見るため、平板培地上の菌集落周辺の培地の一部を白金耳でとり蒸溜水に混じ、pH メーターで測定したところ第1表の通り、aureus では10時間、20時間、48時間に於て夫々 7.8、7.9、8.2 の pH を示し、albus では 8.0、8.2、8.4、citreus では 8.0、8.1、8.3 であつて、培養10時間にして各菌共培地 pH は 8.0 附近に上昇し、それ以後は著差を示さなかつた。

各菌の数種基質の酸化能が培養時間により如何に影響されるかを見るため、それらの静止菌体浮游液に第2表に掲げた基質を加えて O<sub>2</sub> 消費量を測定し

第1表 培養時間と pH の移動

	始 pH	終 pH		
		10 hr.	20 hr.	48 hr.
aureus	7.2	7.8	7.9	8.2
albus	7.2	8.0	8.2	8.4
citreus	7.2	8.0	8.1	8.3

第2表 培養時間と基質酸化能(1)

St. aureus			
	10 hr.	20 hr.	48 hr.
なし	63	20	7
glucose	196	84	63
gluconate	94	28	10
ribose	162	62	18
pyruvate	153	44	7
lactate	164	81	29
acetate	126	39	7
succinate	148	35	9

菌液(湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質(終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

たところ同表の結果であつた。即ち, aureus では 10時間培養のものは酵素活性が一般に極めて大であり, 20時間, 48時間となるに従い活性の低下が認められる。基質別に見ると glucose 酸化能は培養時間が長くなつても比較的低下が少いが, gluconate, ribose 酸化能は培養時間と共に急激な低下が見られた。albus (第3表), citreus (第4表)でも同様

第3表 培養時間と基質酸化能(2)

St. albus			
	10 hr.	20 hr.	48 hr.
なし	71	35	15
glucose	260	211	161
gluconate	320	73	30
ribose	94	38	21
pyruvate	282	119	39
lactate	334	215	49
acetate	353	231	23
succinate	369	278	31

菌液(湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質(終濃度 M/100) 0.3 ml 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

第4表 培養時間と基質酸化能(3)

St. citreus			
	10 hr.	20 hr.	48 hr.
なし	112	80	38
glucose	242	182	108
gluconate	123	88	39
ribose	119	87	47
pyruvate	262	221	39
lactate	286	226	45
acetate	359	328	53
succinate	306	312	55

菌液(湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質(終濃度 M/100) 0.3 ml 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

の傾向が見られ, 特に albus では顕著であつた。

次に各菌, 各培養菌体の glucose 酸化に於ける O<sub>2</sub> 消費量, CO<sub>2</sub> 発生量, glucose 消費量, pyruvate 蓄積量と, これに対する 2,4-dinitrophenol (DNP), arsenite 添加の影響を比較した。aureus については第5表の如く, glucose を基質とした O<sub>2</sub> 消費は DNP (1/3×10<sup>-3</sup>M) により, 10時間培養菌では阻害が少く, 20時間, 48時間培養菌では阻害が強くなり, RQ の DNP 添加による低下は10時間培養菌が最も著しかつた。又 pyruvate 蓄積量に対する DNP の影響は10時間培養菌は20時間, 48時間培養菌のものと同じに異なり, 20, 48時間培養菌では pyruvate 蓄積量が DNP 添加により減少するのに対し, 10時間培養菌では逆に増大した。albus (第6表)では glucose を基質とした O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費の DNP による阻害は3菌のうち最大であり, pyruvate 蓄積は aureus 同様, 10時間培養菌で僅かながら増大し, 20, 48時間培養菌では減少した。citreus (第7表)では glucose酸化に対する DNP 添加の影響は各培養時間のものも同様であつて, O<sub>2</sub> 消費, glucose 消費は殆んど影響されず, pyruvate 蓄積は DNP 添加により増大した。

arsenite (10<sup>-3</sup>M) 添加によつては, 何れの菌, 何れの培養時間の菌体に於ても glucose より pyruvate を多量に生成するのが認められた。

pyruvate の酸化は何れの場合に於ても DNP, arsenite により著明に抑制された。

第 5 表 各時間培養菌の glucose 酸化 (1) *St. aureus*

		O <sub>2</sub> 消費 μM	CO <sub>2</sub> 発生 μM	RQ	glucose 消費 μM	pyruvate 蓄積 μM
10時間培養菌	glucose	8.6	7.7	0.89	2.7	0.7
	— + DNP	8.2	4.3	0.52	2.2	1.3
	— + arsenite	6.1	3.6	0.59	2.0	1.2
	pyruvate	8.0	11.1	1.38		
	— + DNP	1.1	1.8	1.59	/	/
	— + arsenite	0.8	1.3	1.60		
20時間培養菌	glucose	4.1	3.6	0.88	1.7	0.7
	— + DNP	3.4	2.4	0.71	1.4	0
	— + arsenite	2.8	2.3	0.82	0.9	1.0
	pyruvate	2.1	3.0	1.41		
	— + DNP	0.9	1.4	1.57	/	/
	— + arsenite	0.3	0.5	1.57		
48時間培養菌	glucose	2.7	2.4	0.88	0.9	0.5
	— + DNP	2.1	1.6	0.75	0.8	0
	— + arsenite	1.7	1.4	0.80	0.6	0.6
	pyruvate	0.9	1.3	1.42		
	— + DNP	0.3	0.5	1.58	/	/
	— + arsenite	0.1	0.2	1.57		

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 阻害剤 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr. DNP :  $1/3 \times 10^{-3}M$ , arsenite :  $10^{-3}M$

第 6 表 各時間培養菌の glucose 酸化 (2) *St. albus*

		O <sub>2</sub> 消費 μM	CO <sub>2</sub> 発生 μM	RQ	基質の消費 μM	pyruvate 生成 μM
10時間培養菌	glucose	12.5	11.4	0.91	4.0	0
	— + DNP	7.9	4.2	0.53	2.2	0.7
	+ arsenite	8.1	4.5	0.55	2.8	1.6
	pyruvate	14.5	19.9	1.37		
	— + DNP	3.2	5.0	1.57	/	/
	— + arsenite	1.3	2.1	1.59		
20時間培養菌	glucose	9.1	8.1	0.89	2.9	0.2
	+ DNP	5.8	4.0	0.69	1.8	0
	+ arsenite	6.7	5.2	0.78	2.1	1.3
	pyruvate	4.8	6.6	1.38		
	+ DNP	1.1	1.7	1.56	/	/
	+ arsenite	0.7	1.1	1.59		
48時間培養菌	glucose	7.1	6.2	0.87	2.4	0.3
	+ DNP	4.1	3.2	0.77	1.3	0
	+ arsenite	3.9	3.1	0.80	1.5	1.0
	pyruvate	1.2	1.7	1.40		
	+ DNP	0.3	0.5	1.56	/	/
	+ arsenite	0.2	0.3	1.59		

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 阻害剤 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr. DNP :  $1/3 \times 10^{-3}M$  arsenite :  $10^{-3}M$ .

第 7 表 各 時 間 培 養 菌 の glucose 酸 化 (3) *St. citreus*

		O <sub>2</sub> 消費 μM	CO <sub>2</sub> 発生 μM	RQ	glucose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
10時間培養菌	glucose	13.3	12.0	0.90	3.7	0.9
	— + DNP	13.4	8.2	0.61	3.5	2.1
	— + arsenite	7.3	4.5	0.62	2.6	2.7
	pyruvate	14.6	20.3	1.39		
	— + DNP	4.0	6.3	1.57	/	/
	— + arsenite	2.1	3.3	1.59		
20時間培養菌	glucose	10.7	9.6	0.90	3.1	0
	— + DNP	10.5	7.5	0.69	2.8	1.6
	— + arsenite	6.6	5.4	0.81	2.6	2.4
	pyruvate	12.0	16.8	1.40		
	— + DNP	3.1	4.9	1.58	/	/
	— + arsenite	1.7	2.7	1.56		
48時間培養菌	glucose	7.3	6.3	0.86	3.6	0.6
	— + DNP	7.2	5.3	0.74	2.5	1.4
	— + arsenite	4.2	3.3	0.78	1.9	2.1
	pyruvate	2.3	3.3	1.41		
	— + DNP	0.7	1.1	1.57	/	/
	— + arsenite	0.6	0.9	1.56		

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml 阻害剤, 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする。  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

DNP :  $1/3 \times 10^{-3}M$ , arsenite :  $10^{-3}M$ .

## 2. 培地起始 pH と酵素活性関係

培地 pH は菌の発育につれて漸次変化するものであるが, ここでは普通寒天培地の起始 pH を 5.8, 6.5 及び 7.2 として培養した菌体の酵素活性を比較した。

先づ培養温度を 37°C とし, 接種後 20 時間の培地終末 pH を見ると第 8 表の通り, 各菌共起始 pH に関係なく終末 pH は 8.0 附近であつた。

第 8 表 培地 pH の 移 動

	始 pH	終 pH	始 pH	終 pH	始 pH	終 pH
aureus	5.8	7.9	6.5	7.9	7.2	7.9
albus	5.8	8.1	6.5	8.2	7.2	8.2
citreus	5.8	8.0	6.5	8.1	7.2	8.1

次に起始 pH 5.8, 6.5, 7.2 の各培地に 37°C, 20 時間培養した菌体の各種基質酸化能を比較すると第 9~11 表の通りであつた。aureus (第 9 表) では一般に起始 pH 5.8 の菌は pH 7.2 のものより酵素活性が大であり, pH 6.5 のものはこの中間と言える。而して特に glucose, ribose の酸化能は起

始 pH の低いものの方が大であつた。albus でも glucose, pyruvate の酸化は起始 pH の低いものの方が大であつたが, 何れの pH の培地に発育した菌体も ribose の酸化能は小であつた。citreus に於

第 9 表 培地始 pH と基質酸化能 (1)  
*St. aureus* (37°C, 20 hr. 培養)

培地始 pH	培地始 pH		
	5.8	6.5	7.2
なし	26	25	20
glucose	222	131	84
gluconate	34	29	28
ribose	100	83	62
pyruvate	75	56	44
lactate	127	90	81
acetate	44	40	39
succinate	44	39	35

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

第10表 培養 pH と基質酸化能 (2)

St. albus			
	5.8	6.5	7.2
なし	44	40	35
glucose	309	229	211
gluconate	81	75	73
ribose	45	41	38
pyruvate	274	236	119
lactate	278	250	215
acetate	242	245	231
succinate	272	267	278

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

でも同様の傾向が見られたが, aureus の場合程顕著ではなかつた。

各菌につき, 培地起始 pH を 5.8 及び 7.2 として 37°C 20 時間培養した菌体の glucose 酸化に対する DNP ( $1/3 \times 10^{-3}M$ ) の影響を比較して第12表を得た. aureus に於ては, pH 7.2 の培養菌は前述の如く DNP 添加により glucose 酸化にともない pyruvate 蓄積は抑制されるが, pH 5.8 の培養菌では逆に DNP 添加により増大される. albuse でも同様であり, citreus では起始 pH 7.2 のものも pH

第11表 培養 pH と基質酸化能 (3)

St. citreus			
	5.8	6.5	7.2
なし	84	85	80
glucose	214	203	182
gluconate	82	86	88
ribose	88	87	87
pyruvate	235	229	221
lactate	261	253	226
acetate	384	359	328
succinate	303	323	312

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

5.8 のものも DNP 添加により pruvayte 蓄積は増大するが, 後者の方が顕著であつた。

次に培地起始 pH を 5.8 及び 7.2 とし, 37°C で 10 時間培養した菌体につき同様の実験を試みた. 結果は第13表の通りであり, 前述の如く 37°C, 10 時間培養菌体は培地起始 pH 7.2 のものも, 各供試菌共 DNP 添加により glucose 酸化にともない pyruvate 蓄積が増大するが, 培地起始 pH 5.8 の培養菌体ではこの傾向が更に増大されていた。

第12表 培地始 pH と glucose 酸化 (37°C, 20 hr. 培養)

菌	培地始 pH	基質, 阻害剤	O <sub>2</sub> 消費 $\mu M$	glucose 消費 $\mu M$	pyruvate 生成 $\mu M$
aureus	7.2	glucose	4.1	1.7	0.7
		— + DNP	3.7	1.4	0
	5.8	glucose	9.2	3.0	0.8
		— + DNP	8.3	2.8	2.0
albus	7.2	glucose	9.1	2.9	0.2
		— + DNP	5.8	1.8	0
	5.8	glucose	13.2	3.9	0.3
		— + DNP	10.3	3.0	1.2
citreus	7.2	glucose	10.7	3.1	0
		— + DNP	9.8	2.8	1.6
	5.8	glucose	15.3	4.9	0
		— + DNP	14.1	4.6	4.5

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, glucose (終濃度 M/100) 0.3 ml, DNP (終濃度  $1/3 \times 10^{-3}M$ ) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

第13表 培地始 pH と glucose 酸化 (37°C, 10 hr. 培養)

菌	培地始 pH	基質, 阻害剤	O <sub>2</sub> 消費 μM	glucose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
aureus	7.2	glucose	8.6	2.7	0.7
		- + DNP	7.9	2.2	1.3
	5.8	glucose	10.7	3.7	0.9
		- + DNP	9.2	3.0	2.3
albus	7.2	glucose	12.5	4.0	0
		- + DNP	7.9	2.2	0.7
	5.8	glucose	14.6	4.8	0
		- + DNP	12.8	4.1	2.4
citreus	7.2	glucose	13.3	3.7	0.9
		- + DNP	13.0	3.5	2.1
	5.8	glucose	17.2	5.8	0.8
		- + DNP	17.0	5.6	5.9

菌液 (湿菌量 60 ml) 2.0 ml, glucose (終濃度 M/100) 0.3 ml, DNP (終濃度  $\frac{1}{3} \times 10^{-3}M$ ) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

### 3. 培養温度と酵素活性の関係

以上菌体の酵素活性に対する培養時間, 培地 pH の影響を見て来たが, 次に培養温度の影響を検討するため, 普通寒天培地を用い培地起始 pH を 5.8 及び 7.2 とし, 更に培養温度を 25°C 及び 37°C とし 20 時間培養した各菌体の酵素的性状を比較した.

先づ基質酸化能について見ると, 培地起始 pH 7.2 の培養菌では第14表に示す如く, aureus では

第14表 培養温度と基質酸化能  
(培地始 pH 7.2) 20 時間培養

	aureus		albus		citreus	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
なし	32	20	29	35	97	80
glucose	119	84	244	211	214	187
gluconate	49	28	125	73	102	88
ribose	105	62	33	38	109	87
pyruvate	158	44	266	119	235	221
lactate	170	81	232	215	239	226
acetate	74	39	272	231	426	328
succinate	60	35	275	278	531	312

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

25°C 培養の方が一般に各基質に対する酵素活性は大であり, 特に pyruvate, lactate を基質とした O<sub>2</sub> 消費量は 37°C 培養のものに比し著しく大であつた. 然し gluconate の酸化能は何れの培養のものも小であつた. albus に於ても 25°C 培養のものが pyruvate の酸化能は大であり gluconate に於ても 25°C 培養のものの方がやや大であるが, ribose は何れの培養菌も殆んど酸化し難い. citreus では両

第15表 培養温度と酵素活性  
(培地 pH 5.8) 20 hr. 培養

	aureus		albus		citreus	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
なし	57	26	66	44	107	84
glucose	261	222	317	309	261	214
gluconate	134	34	211	81	118	82
ribose	185	100	75	45	127	88
pyruvate	234	75	306	274	285	235
lactate	227	127	262	278	266	261
acetate	191	44	234	242	425	384
succinate	154	45	306	272	414	303

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質 (終濃度 M/100) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする,  
pH 7.2, 37°C, 1 hr.

培養間に著差は見られず、25°C 培養の方が一般に酵素活性が大であるにすぎなかつた。

培地起始 pH 5.8 の培養菌では第15表に見られる如く、aureus では25°C 培養菌体の方がやはり一般に酵素活性が大であり、gluconate, pyruvate, lactate, acetate, succinate の酸化能が大であり、特に gluconate の酸化能を獲得していることは特

徴的であつた。albus でも類似の傾向が認められたが ribose の酸化能は何れの培養菌体でも小であつた。citreus では25°C 培養菌、37°C 培養菌間に特筆すべき差異は見られなかつた。

25°C 及び37°C 培養菌の glucose 酸化に対する DNP の影響を見ると、培地起始 pH 7.2 の場合は第16表に示す如くであり、aureus では37°C 培養菌

第 16 表 培養温度と glucose 酸化 (培地始 pH 7.2, 20時間培養)

	培養温度	基質, 阻害剤	O <sub>2</sub> 消費 μM	glucose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
aureus	25°C	glucose	4.7	1.8	0.3
		— + DNP	4.5	1.7	1.2
	37°C	glucose	4.1	1.7	0.7
		— + DNP	3.7	1.4	0
albus	25°C	glucose	11.2	3.2	0.1
		— + DNP	6.9	2.1	0.2
	37°C	glucose	9.1	2.9	0.2
		— + DNP	5.8	1.8	0
citreus	25°C	glucose	12.3	3.9	0
		— + DNP	12.1	3.8	2.7
	37°C	glucose	10.7	3.1	0
		— + DNP	9.8	2.8	1.6

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, glucose (終濃度 M/100) 0.3 ml, DNP (終濃度  $1/3 \times 10^{-3}M$ ) 0.3 ml 全量 3.0 ml とする, pH 7.2, 37°C, 1 hr.

第 17 表 培養温度と glucose 酸化 (培地始 pH 5.8, 20時間培養)

菌	培養温度	基質, 阻害剤	O <sub>2</sub> 消費 μM	glucose 消費 μM	pyruvate 生成 μM
aureus	25°C	glucose	13.1	4.1	0.7
		— + DNP	13.0	4.0	4.7
	37°C	glucose	9.2	3.0	0.8
		— + DNP	8.3	2.8	2.0
albus	25°C	glucose	15.2	4.3	0.2
		— + DNP	14.7	4.2	4.0
	37°C	glucose	13.2	3.9	0.3
		— + DNP	10.3	3.0	1.2
citreus	25°C	glucose	17.2	5.2	0
		— + DNP	17.4	5.4	6.3
	37°C	glucose	15.3	4.9	0
		— + DNP	14.1	4.6	4.5

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, glucose (終濃度 M/100) 0.3 ml, DNP ( $1/3 \times 10^{-3}M$ ) 0.3 ml, 全量 3.0 ml とする, pH 7.2, 37°C, 1 hr.

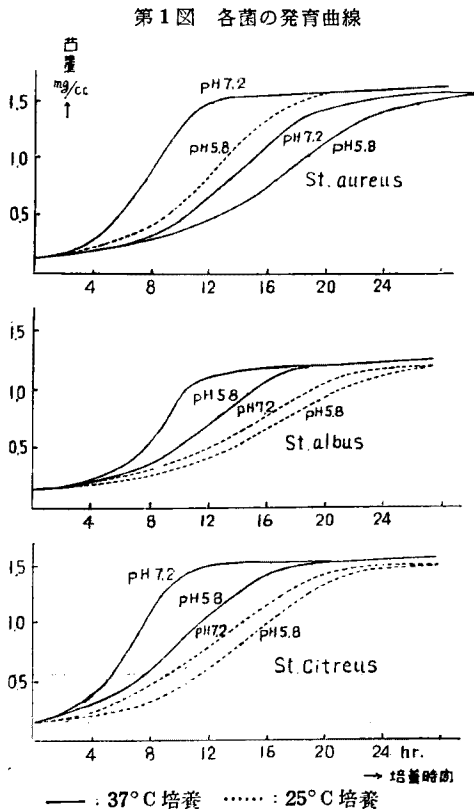
体については前述の如く glucose 酸化にともなう pyruvate 蓄積量は DNP 添加により減少するのに対し、25°C 培養菌体では glucose を基質とした O<sub>2</sub> 消費の DNP による阻害は 37°C 培養のものに比して少く、pyruvate 蓄積量は DNP 添加により増大する。albus に於ても同様のことが認められ、citreus では 37°C 培養菌体でも glucose 酸化にともなう pyruvate の蓄積量は DNP により増加するが、25°C 培養のものではこの傾向が更に著しかった。

培地起始 pH 5.8 のものについては第 17 表に示す如くであり、前に述べた通り各菌共 37°C 培養のものも glucose 酸化にともなう pyruvate 蓄積は DNP 添加により増大するのであるが、25°C 培養のものは更にこの傾向が顕著となつた。

#### 4. ブイオン培地に於ける各菌の発育曲線に対する培地起始 pH、培養温度の影響

最後に菌の発育曲線に対する培地起始 pH 及び培養温度の影響を検討するため、ブイオン培地の pH を 5.8 及び 7.2 とし、各供試菌を接種、25°C 及び 37°C に保つて培養し、各々につき 4 時間毎に菌の発育度を光電比濁計により測定した。

結果は第 1 図の如くであり、37°C 培養では培地



起始 pH 7.2 のものは各菌共大体 4 時間頃より log phase に入り 10 時間頃より stationary phase となるのに対し、起始 pH 5.8 のものは発育はやや遅れて 8 時間頃より log phase に、16~20 時間頃より stationary state になる。又 25°C 培養では発育は更に遅れ、発育曲線はゆるやかな上昇をたどる。起始 pH 7.2 では stationary state に入るのは 24 時間頃となり、起始 pH 5.8 では更に多少の遅れが認められた。

#### IV. 総括及び考案

細菌の物質代謝が培養条件に大きく支配されることは周知の通りである<sup>13)</sup>。そこで供試菌 *Staphylococcus aureus*, *albus*, *citreus* の glucose 酸化を検討するに当り、培養条件を種々変化させ、それにとりなう glucose の酸化様式の変化を追究する意図のもとに、本編では培養期間、培地起始 pH 及び培養温度と glucose 酸化との関係について実験を行つた。以下その成績を総括し考案を加えることとする。

各普通寒天培養菌体の数種基質酸化能が培養時間により如何に変化するかを O<sub>2</sub> 消費量から見ると、各菌共一般に培養時間の短いものほど酵素活性が大であり、培養時間が長くなるに従つて低下している。この低下は pyruvate, lactate, succinate などに於て特に著しく、これに対し glucose 酸化能の低下はそれほど顕著でない。即ち、培養時間の短い (10 時間培養) 菌体では TCA cycle に関する酵素活性が大であると推定されるが、この菌体は発育に於ける log phase に該当すると見做される (第 1 図)。このことは TCA cycle が単なる完全酸化のための機構であるのみならず、種々の菌体成分の合成反応にも関与するものであるとも言われていること<sup>14)</sup>と符合する。一方 glucose は発育停止後も生命維持のエネルギー源となるため、glucose 酸化の酵素活性が余り低下しないものと推定される。

glucose 酸化に於ける量的関係とこれに対する DNP の影響を各培養菌について比較すると、*aureus* (第 5 表)、*albus* (第 6 表) では培養時間の短い (10 時間) ものは、glucose を基質とした O<sub>2</sub> 消費、glucose 消費は DNP (1/3 × 10<sup>-3</sup>M) により殆んど影響されないが pyruvate の蓄積は著明に増大するのに対し、培養時間が長くなると (20, 48 時間) O<sub>2</sub> 消費、glucose 消費の DNP による阻害率は大となり、かつ pyruvate 蓄積は DNP により



減少する。DNP は Embden-Meyerhof 経路を阻害しないと考えられる<sup>16)</sup> ことから *aureus*, *albus* では10時間培養のもの即ち発育に於ける log phase の菌体の glucose 酸化は E-M 経路に多く依存し、培養時間の長いもの即ち stationary phase に入つた菌体では E-M 経路以外の経路、恐らくは Warburg-Dickeus 経路或は gluconate →  $\alpha$ -ketogluconate (又は 5-ketogluconate) をへる酸化経路が多く関与するのではないかと推定される。ただ gluconate, ribose の酸化能が10時間培養のものは極めて大であり、20又は48時間のものではこれを基質として O<sub>2</sub> 消費を殆んど示さない点が上の推定とは矛盾するようであるが、これは一つには細菌膜の透過性も関係するし、又20時間或は48時間培養菌体の glucose 酸化が W-D経路或は gluconate,  $\alpha$ -keto gluconate (又は 5-ketogluconate) をへるとしても gluconate 又は ribose 自身が中間代謝物質であるのではなくてそれらの磷酸エステルが中間代謝物質であるからではなからうか。そして更に10時間培養菌体が glucose を主として E-M 経路により酸化するとしてもこれとは別個に gluconate, ribose の酸化能を有するものと考えられる。*citreus* では各時間培養菌共 glucose を基質とした O<sub>2</sub> 消費、glucose 消費は DNP により殆んど影響されず、かつ pyruvate 蓄積は DNP 添加により増大し、何れの培養菌でも glucose 酸化に質的な変化は見受けられず、又何れの培養菌体も gluconate, ribose を基質とした O<sub>2</sub> 消費は基質無添加のもの (endogenous) と余り変わりなく、*citreus* の glucose 酸化に関与する酵素系は *Sh. flexneri* に属する菌<sup>16)</sup> と類似のもののように見受けられる。

次に培地起始 pH の影響を見ると、同じ20時間培養でも起始 pH の低い培地に培養した菌体 (5.8) では各菌共上述の培養時間の短いものと全く同様の酵素的性状を示すことが認められるが、これはやはり発育曲線のずれに起因するものと考えられる。即ち培地起始 pH 7.2の場合には20時間目にはすでに stationary phase に入っているのに対し (第1図)

起始 pH 5.8では stationary state に入る間際である。

培養温度についても同様であり、培養起始 pH 7.2の場合培養温度20°Cのものは培養時間の短いもの (10時間) と同様の性状を示し、培地起始 pH 5.8の場合にはこの傾向が更に著明であり、やはり発育曲線に於ける phase によるものと推定される。即ち 20°C 培養では 37°C 培養に比し発育は遅れ、log phase は延長され20時間菌体でも増殖の活発に行われている段階と見做しうる (第1図)。

このように培養時間、培地起始 pH、培養温度は glucose 酸化その他の酵素活性に影響をもたらすが、これらは何れもそれらの菌の発育に於ける phase に帰することが出来るものと推定された。

## V. 結 言

*St. aureus*, *albus*, *citreus* の教室保存株を供試菌として、その普通寒天培養菌体の酵素活性、特に glucose の酸化様式を検討して次の結果を得た。

1. 各菌共酵素活性は培養時間の短いもの (10時間)、培地起始 pH の比較的低いもの (pH 5.8)、培養温度の低いもの (20°C) の方が一般に大である。そしてこのことはすべて発育に於ける phase に帰することが出来るかと推定される。即ち発育に於ける log phase にある菌体は酵素活性、特に TCA cycle に関係した酵素活性が大であると思われる。
2. *aureus* *albus* では log phase にある菌体の glucose 酸化は主として E-M 経路に依存し、stationary phase に入ると、この他 W-D 経路或は glucose → gluconate → 2-keto gluconate (又は 5-keto gluconate) をへる経路も発達してくるのではないかと推定される。これに対し *citreus* ではどの phase の菌体も主として E-M 経路が発達していると思われる。

## Glucose Oxidation of Staphylococcus

Part 1. Relationship between Glucose Oxidation and the Length  
and Temperature of Culture, pH of the Medium

By

Masataka TAKEDA

Department of Microbiology Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Sakae Murakami)

With the use of the standard strains of *St. aureus*, *albus* and *citreus*, stocked in our laboratory, as experimental materials, the author studied the enzymatic activity, especially the modes of glucose oxidation, and obtained the following results:

1. Enzymatic activity of both bacteria is generally higher when the length of culture is short (10 hours) and the initial pH is low (5.8), and culture temperature is low (20° C). This fact seems to be depend upon phases of the growth; namely, the enzymatic activity of cells in the log phase, especially the enzymatic activity involved in the T. C. A. cycle, appears to be great.

2. In the case of *St. aureus* and *albus* it seems that the glucose oxidation of the cells in lag phase mainly depends on the E-M pathway, while in the cells at stationary phase it develops other pathways; namely, W-D pathway, or glucose→gluconate→2 ketogluconate (or 5-ketogluconate) pathwag. In contrast to this in the case of *St. citreus*, the glucose oxidation of cells at all phases seems to take mainly the E-M pathway.

---