

ブ ド ー 球 菌 の glucose 酸 化

第 2 編

培 地 C 源 と glucose 酸 化 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〕

目 次

- | | |
|--|---|
| <p>I. 緒 言</p> <p>II. 実験材料及び実験方法</p> <p>III. 実験成績</p> <p>1. 静止菌の gluconate, ribose に対する適応の難易</p> <p>2. 各培地発育菌の基質酸化能</p> | <p>3. glucose を C 源とした培地に発育した菌体の glucose 酸化</p> <p>4. gluconate を C 源とした培地に発育した菌体の glucose 酸化</p> <p>IV. 総括及び考案</p> <p>V. 結 言</p> |
|--|---|

I. 緒 言

前編に於ては *Staphylococcus aureus, albus, citreus* の各供試菌の glucose 酸化と培養時間、培地起始 pH、培養温度の関係に検討を加えた。これら種々の条件は glucose 酸化、その他の酵素活性に大いに関係するのであるが、これは菌体の発育に於ける phase の関係に帰することが出来ることをのべた。

本編に於ては培地 C 源を glucose 或は gluconate とした液体培地を用い、振盪培養した菌体及び静置培養した菌体の酵素活性、特に glucose 酸化について検討した。

細菌が培地成分に適応し、又振盪培養することにより、より好氣的な代謝経路への変換が起きることはよく知られている。細菌の種類により、このような適応現象或は代謝経路の変換に難易のあることは当然であるが、筆者はブドー球菌は比較的困難な菌に属すると考えるが、これら供試菌に於ては果してどの程度までこれらの現象が起るものかを追求した。

II. 実験材料及び実験方法

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

菌培養法: 次の組成の液体培地に C 源として

glucose 又は gluconate を 2 g/l の割に添加し、静置培養では 300~500 ml 容コルベンの上層までこの培地を入れなるべく空気との接触を少くして静置し、振盪培養ではコルベンに少量の培地を入れ空気との接触をよくして振盪して行つた。培養温度は 37°C とした。

培地組成

| | |
|----------|--------|
| 第一磷酸カリ | 0.35 g |
| 第二磷酸ソーダ | 2.5 |
| 硫酸マグネシウム | 0.01 |
| 硫酸第一鉄 | 0.001 |
| 食塩 | 3.0 |
| ペプトン | 10.0 |
| 酵母エキス | 0.1 |
| 水 | 1.0 l |

なお普通寒天培養菌体を用いる場合には 37°C、20 時間培養のものを用いた。

生菌浮游液の調製: 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 時間浮游してから再び遠沈し、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 検圧計により常法に従つた。

基質及び阻害剤: 何れも市販品を蒸留水に溶解

し、NaOH 又は HCl を以て必要 pH に修正して用いた。

glucose 定量： 3, 5-dinitrosalicylic acid による比色法¹¹⁾ によつた。

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

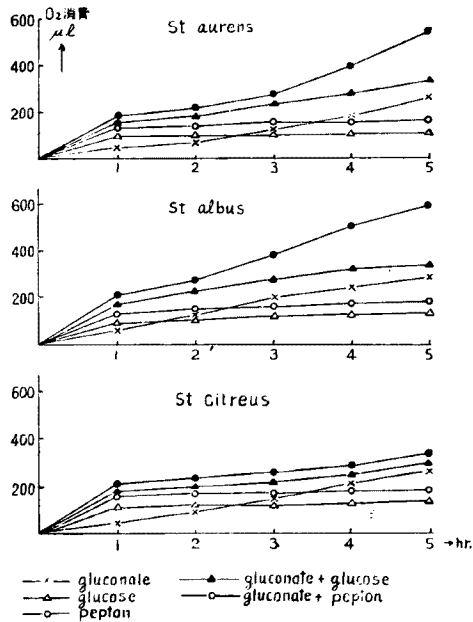
lactate の定量： 濃硫酸及び p-hydroxydiphenyl による比色法¹⁷⁾ によつた。

III. 実験成績

1. 静止菌の gluconate, ribose に対する適応の難易

実験に先立ち、これらの供試菌体の gluconate, ribose に対する適応の難易を検討するため、普通寒天18時間培養の菌体浮游液に基質として gluconate (M/100) 単独で、及び glucose (M/3000), 或は pepton (100 γ/cc) と共に加えて O₂ 消費量を測定した。結果は第1図に示す如くであつて、各菌共 gluconate 単独では O₂ 消費量は極めて小さく、citreus では glucose 或は pepton と同時に添加しても gluconate に対する適応は殆んど認められず、aureus, albus では pepton と同時に添加した場合のみ3時間目頃より僅かながら O₂ 消費量が增大し、

第1図 静止菌の gluconate に対する適応



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

gluconateに適応するのが認められた。

ribose では第1表の如く、ribose (M/100) 単独で添加した場合のみならず glucose (M/3000),

第1表 静止菌の ribose に対する適応

| | aureus | albus | citreus |
|-----------------------------|--------|-------|---------|
| ribose (M/100) | 89 | 113 | 209 |
| glucose (M/3000) | 193 | 272 | 347 |
| pepton (100γ/cc) | 209 | 287 | 332 |
| 酵母エキス (100γ/cc) | 276 | 309 | 386 |
| ribose+glucose | 212 | 276 | 367 |
| ribose+pepton | 219 | 293 | 351 |
| ribose+glucose+pepton | 207 | 306 | 330 |
| ribose+glucose+pepton+酵母エキス | 297 | 316 | 391 |
| 基質なし | 87 | 103 | 192 |

菌液 (湿菌量 60 mg) 2.0 ml, 基質, 緩衝液を加え全量 3.0 ml となるようにする, pH 7.2, 37°C, 5 hr.

pepton (100 γ/cc), 酵母エキス (100 γ/cc) と同時に添加した場合にも、各菌共5時間に至るも ribose に対する適応は認められなかつた。

次に菌体浮游液に glucose 或は gluconate+pepton を添加して2時間 37°C で振盪するという前処理を施した後遠沈し、菌体を一度緩衝液で洗滌してから再び緩衝液に浮遊せしめたものにつき、

第2表 菌体の前処理と酵素活性

| 前処理基質 | O ₂ 消費測定時の基質 | O ₂ 消費量 μl | | |
|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------|-------|---------|
| | | aureus | albus | citreus |
| — | — | 41 | 59 | 87 |
| | glucose | 119 | 182 | 263 |
| | gluconate | 49 | 63 | 92 |
| | ribose | 53 | 69 | 107 |
| glucose (M/100) | — | 39 | 42 | 81 |
| | glucose | 97 | 161 | 217 |
| | gluconate | 42 | 112 | 123 |
| gluconate (M/100) + pepton (100γ/cc) | — | 47 | 63 | 98 |
| | glucose | 156 | 211 | 296 |
| | gluconate | 112 | 96 | 186 |
| | ribose | 83 | 19 | 152 |

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

glucose, gluconate, ribose を夫々基質とした O₂ 消費量を測定したところ第 2 表の結果であつた。即ち aureus では glucose で前処理した菌体の gluconate, ribose 酸化能は基質を添加せずに前処理したもの (対照) と変りなく、gluconate を以て前処理した菌体は僅かに gluconate 酸化能は大となつてゐるが、ribose 酸化能は大とならなかつた。

albus では glucose で前処理した菌体、gluconate で前処理した菌体は共に gluconate の酸化能がやや大となつてゐたが、ribose 酸化能は対照と変らなかつた。

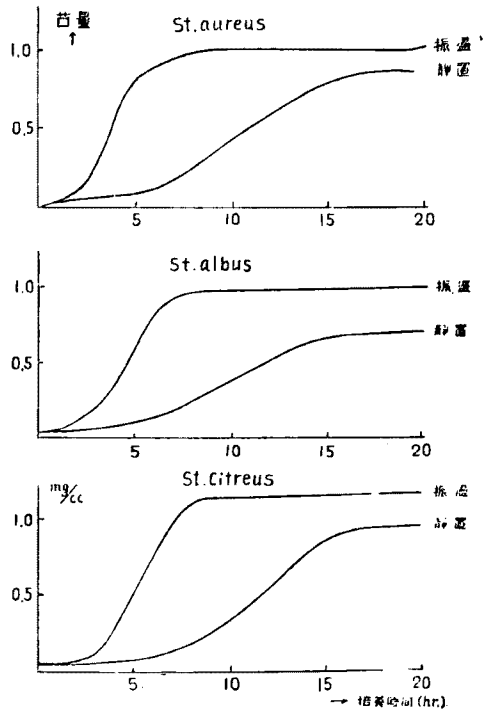
citreus では glucose 及び gluconate で前処理した菌体共に gluconate 及び ribose 酸化能の増大は認められなかつた。

2. 各培地発育菌の基質酸化能

細菌の酵素活性は培養時間に関係することを前編に於て知つたので、実験を行うに先立ち各菌、各培養法に於ける発育曲線を作つた。即ち静置培養では 300~500 ml 容コルベンになるべく上部まで液体培地を入れて空気との接触を少くして行い、振盪培養はコルベンに少量の培地を入れて振盪するようにした。夫々の発育曲線は第 2 図の如くであつて、aureus, albus, citreus 共に振盪培養では 2 時間頃より log phase に入り 8 時間頃より stationary phase となるのに対し静置培養では 5 時間頃より徐々に log phase となり 15~18 時間頃より stationary phase となつた。

そこで各培養菌体の酵素的性状を見るに當つて phase を合致せしめるために振盪培養では 4 時間及び 10 時間のもの、静置培養では 10 時間及び 20 時間のものを用いて行ふこととした。

第 2 図 各菌の発育曲線



次に pepton を N 源とし、C 源として glucose を添加した培地、C 源を gluconate とした培地、pepton のみの培地の各々に、各菌を接種し静置及び振盪培養した菌体の酵素的性状を検討した。先づ各培地に於ける培地 pH の移動を見ると第 3 表の如く pepton 培地では各場合共に pH は上昇し、pepton-glucose 培地、pepton-gluconate 培地共に pH の低下を認め、この pH 低下は aureus が最も著しかつた。然し静置培養と振盪培養とを比較す

第 3 表 菌発育による培地 pH の移動

| | 培地 | 静置培養 (20時間) | | 振盪培養 (10時間) | |
|---------|------------------|-------------|------|-------------|------|
| | | 始 pH | 終 pH | 始 pH | 終 pH |
| aureus | pepton | 7.2 | 7.8 | 7.2 | 7.8 |
| | pepton-glucose | 7.2 | 5.0 | 7.2 | 5.1 |
| | pepton-gluconate | 7.2 | 5.4 | 7.2 | 5.3 |
| albus | pepton | 7.2 | 7.7 | 7.2 | 7.6 |
| | pepton-glucose | 7.2 | 5.6 | 7.2 | 5.8 |
| | pepton-gluconate | 7.2 | 5.8 | 7.2 | 6.0 |
| citreus | pepton | 7.2 | 7.8 | 7.2 | 7.7 |
| | pepton-glucose | 7.2 | 5.5 | 7.2 | 5.7 |
| | pepton-gluconate | 7.2 | 5.8 | 7.2 | 5.9 |

ると各菌共、大なる差異は認められなかつた。

次に glucose を C 源とした培地, gluconate を C 源とした培地及び比較のため pepton のみの培地に於ける静置及び振盪培養菌体の glucose, gluconate,

ribose, pyruvate, lactate, acetate, succinate を夫々基質とした O₂ 消費を比較した, aureus では第 4 表に示す通り, 振盪培養のものは静置培養のものに比し一般に O₂ 消費量が大なる傾向があり, 特に

第 4 表 培養法と酵素活性

aureus

| 培養条件 基 質 | pepton | | | | pepton-glucose | | | | pepton-gluconate | | | |
|-------------|--------|--------|-------|--------|----------------|----|-----|----|------------------|----|-----|-----|
| | 静 置 | | 振 盪 | | 静 置 | | 振 盪 | | 静 置 | | 振 盪 | |
| | 10 hr. | 20 hr. | 4 hr. | 10 hr. | 10 | 20 | 4 | 10 | 10 | 20 | 4 | 10 |
| な し | 51 | 18 | 62 | 24 | 43 | 17 | 54 | 19 | 48 | 20 | 58 | 21 |
| glucose | 163 | 72 | 203 | 96 | 151 | 62 | 182 | 98 | 166 | 73 | 191 | 93 |
| gluconate | 82 | 25 | 116 | 63 | 72 | 27 | 113 | 63 | 96 | 49 | 182 | 102 |
| ribose | 123 | 61 | 183 | 72 | 121 | 52 | 117 | 61 | 102 | 47 | 132 | 67 |
| pyruvate | 69 | 29 | 196 | 89 | 58 | 26 | 129 | 80 | 60 | 28 | 131 | 91 |
| lactate | 86 | 38 | 212 | 92 | 69 | 37 | 171 | 96 | 67 | 40 | 162 | 83 |
| acetate | 81 | 32 | 121 | 61 | 77 | 40 | 112 | 53 | 82 | 32 | 107 | 57 |
| succinate | 84 | 28 | 197 | 79 | 76 | 26 | 181 | 69 | 66 | 29 | 210 | 92 |

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.

pyruvate, lactate, succinate に於て顕著であつた。而して pepton 培地, pepton-glucose 培地に於ては, 静置培養菌体は gluconate 酸化能が培養時間が長くなるに従い著明に低下するのに対し振盪培養菌体では gluconate 酸化能の低下は著しくなく, 又 pepton, gluconate 培地に於ては静置培養のものも培養時間が長くなつても gluconate 酸化能の低下が著明でなかつた。

aureus に於て見られたこの傾向は albus (第 5 表), citreus (第 6 表) に於ても認められた。

3. glucose を C 源とした培地に発育した菌体の glucose 酸化

以上の如く各培養法により酵素活性に若干の差異が認められるが glucose 酸化様式に如何なる相異があるかを以下検討した。

glucose 添加培地静置及び振盪培養菌体の glucose

第 5 表 培養法と酵素活性

albus

| 培養条件 基 質 | pepton | | | | pepton-glucose | | | | pepton-gluconate | | | |
|-------------|--------|----|-----|-----|----------------|----|-----|-----|------------------|----|-----|-----|
| | 静 置 | | 振 盪 | | 静 置 | | 振 盪 | | 静 置 | | 振 盪 | |
| | 10 | 20 | 4 | 10 | 10 | 20 | 4 | 10 | 10 | 20 | 4 | 10 |
| な し | 62 | 29 | 73 | 27 | 51 | 18 | 64 | 20 | 56 | 23 | 61 | 28 |
| glucose | 143 | 62 | 266 | 103 | 106 | 63 | 253 | 107 | 111 | 69 | 271 | 109 |
| gluconate | 162 | 43 | 276 | 193 | 102 | 41 | 281 | 174 | 132 | 93 | 293 | 153 |
| ribose | 69 | 30 | 79 | 28 | 62 | 21 | 68 | 24 | 60 | 29 | 67 | 30 |
| pyruvate | 81 | 39 | 137 | 97 | 68 | 27 | 147 | 86 | 76 | 31 | 151 | 84 |
| lactate | 96 | 51 | 223 | 107 | 74 | 36 | 238 | 144 | 94 | 58 | 266 | 137 |
| acetate | 112 | 56 | 273 | 126 | 123 | 59 | 264 | 132 | 103 | 48 | 283 | 116 |
| succinate | 98 | 61 | 291 | 119 | 104 | 66 | 251 | 107 | 89 | 51 | 292 | 134 |

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 6 表 培養法と酵素活性
citreus

| | pepton | | | | pepton-glucose | | | | pepton-gluconate | | | |
|-----------|--------|----|-----|-----|----------------|----|-----|-----|------------------|----|-----|-----|
| | 静置 | | 振盪 | | 静置 | | 振盪 | | 静置 | | 振盪 | |
| | 10 | 20 | 4 | 10 | 10 | 20 | 10 | 20 | 10 | 20 | 4 | 10 |
| なし | 42 | 23 | 134 | 104 | 36 | 20 | 106 | 74 | 41 | 26 | 113 | 81 |
| glucose | 108 | 79 | 289 | 202 | 91 | 62 | 274 | 126 | 98 | 64 | 279 | 152 |
| gluconate | 45 | 24 | 137 | 110 | 38 | 20 | 124 | 86 | 45 | 27 | 229 | 146 |
| ribose | 49 | 30 | 143 | 111 | 38 | 29 | 117 | 77 | 48 | 26 | 156 | 109 |
| pyruvate | 72 | 53 | 312 | 211 | 51 | 31 | 309 | 104 | 66 | 40 | 326 | 96 |
| lactate | 98 | 61 | 332 | 209 | 89 | 42 | 327 | 112 | 77 | 49 | 374 | 124 |
| acetate | 123 | 79 | 364 | 216 | 121 | 62 | 391 | 136 | 107 | 71 | 388 | 142 |
| succinate | 116 | 80 | 350 | 247 | 134 | 71 | 345 | 119 | 119 | 76 | 379 | 151 |

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.

酸化に於ける O₂ 消費, glucose 消費, pyruvate, lactate の生成の量的関係とこれに対する DNP 添加の影響を見ると aureus では第 7 表に見られる通りであつて, 静置培養では 10 時間, 20 時間培養菌共に 1/3 × 10⁻³M DNP 添加により O₂ 消費, glucose 消費共にわずかながら促進が見られ, pyruvate 生成は増大し, 10⁻³M DNP 添加では O₂ 消費, glucose 消費共にやや抑制されるが, pyruvate 生成は著明に増大した。これに対し振盪培養菌では 4 時間, 10 時間培養菌共に, 3 × 10⁻⁴M DNP 添加によ

り O₂ 消費, glucose 消費のかなりの抑制と, pyruvate 生成の消失が認められた。

albus (第 8 表) について見ると 1/3 × 10⁻³M, 10⁻³M DNP 添加により静置培養菌体では O₂ 消費, glucose 消費の多少の抑制は見られるが pyruvate 生成量は増大し, 振盪培養菌体では O₂ 消費, glucose 消費の抑制と pyruvate 生成の著明な抑制がみられた。

citreus (第 9 表) については, DNP 添加により, 静置培養菌は培養時間に拘わらず O₂ 消費, glucose

第 7 表 glucose 添加培地培養菌の glucose 酸化
St. aureus

| | | O ₂ 消費 μM | glucose 消費 μM | pyruvate 生成 μM | lactate 生成 μM | |
|----|--------|--------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-----|
| 静置 | 10 hr. | glucose | 7.2 | 2.9 | 0.8 | 1.1 |
| | | + DNP 1/3 × 10 ⁻³ M | 7.3 | 3.0 | 1.4 | 1.4 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 7.0 | 2.7 | 2.9 | 1.3 |
| | 20 hr. | glucose | 3.4 | 1.2 | 0.4 | 0.6 |
| | | + DNP 1/3 × 10 ⁻³ M | 3.6 | 1.3 | 1.4 | 0.7 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 3.0 | 1.0 | 1.2 | 0.7 |
| 振盪 | 4 hr. | glucose | 9.1 | 2.9 | 0.5 | 0.6 |
| | | + DNP 1/3 × 10 ⁻³ M | 7.1 | 2.0 | 0 | 0.6 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 5.0 | 1.4 | 0 | 0.4 |
| | 10 hr. | glucose | 4.0 | 1.1 | 0.4 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3 × 10 ⁻³ M | 3.2 | 0.9 | 0 | 0.5 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 2.8 | 0.8 | 0 | 0.6 |

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

第 8 表 glucose 添加培地培養菌の glucose 酸化
 St. albus

| | | O ₂ 消費 μM | glucose 消費 μM | pyruvate 生成 μM | lactate 生成 μM | |
|-----|--------|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-----|
| 静 置 | 10 hr. | glucose | 5.7 | 2.1 | 0.3 | 0.5 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 5.0 | 2.3 | 1.2 | 0.6 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 4.8 | 2.0 | 1.8 | 0.8 |
| | 20 hr. | glucose | 3.1 | 1.2 | 0.2 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 2.7 | 1.1 | 0.4 | 0.6 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 2.4 | 0.9 | 0.8 | 0.6 |
| 振 盪 | 4 hr. | glucose | 11.2 | 3.7 | 0.2 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 9.8 | 3.2 | 0 | 0.5 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 7.1 | 2.2 | 0 | 0.2 |
| | 10 hr. | glucose | 4.5 | 1.7 | 0.1 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 4.6 | 1.3 | 0 | 0.5 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 3.0 | 0.9 | 0 | 0.3 |

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

 第 9 表 glucose 添加培地培養菌の glucose 酸化
 St. citreus

| | | O ₂ 消費 μM | glucose 消費 μM | pyruvate 生成 μM | lactate 生成 μM | |
|-----|--------|------------------------------|------------------|-------------------|------------------|-----|
| 静 置 | 10 hr. | glucose | 4.2 | 1.5 | 0.5 | 0.6 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 5.1 | 1.9 | 1.3 | 0.8 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 4.5 | 1.7 | 1.7 | 0.8 |
| | 20 hr. | glucose | 3.1 | 1.1 | 0.3 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 3.9 | 1.4 | 0.9 | 0.5 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 3.6 | 1.3 | 1.4 | 0.5 |
| 振 盪 | 4 hr. | glucose | 12.1 | 3.1 | 0.7 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 11.4 | 2.9 | 0.4 | 0.5 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 10.0 | 2.7 | 0.2 | 0.6 |
| | 10 hr. | glucose | 9.1 | 2.6 | 0.4 | 0.4 |
| | | + DNP 1/3×10 ⁻³ M | 8.7 | 2.5 | 0.3 | 0.5 |
| | | + DNP 10 ⁻³ M | 7.6 | 2.0 | 0.2 | 0.5 |

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

消費が著しく増大し, かつ pyruvate 生成量も, 著しく大となり, 振盪培養菌体では 4 時間, 10 時間共に O₂ 消費, glucose 消費はやや抑制され, pyruvate 生成もわずかながら抑制されるのを認めた.

4. gluconate を C 源とした培地に発育した菌体の glucose 酸化

前述 (第 4, 5, 6 表) の如く, pepton のみの培地或は glucose を C 源とした培地の場合は各菌共培養時間が長くなつても glucose 酸化能の低下は少いが, gluconate 酸化能は「静置」では培養時間と共に急激に低下する。これに対し gluconate を C 源とした培地に発育した菌体は, 何れの供試菌でも

「静置」, 「振盪」共に gluconate に適応しており, 培養時間が長いものでも gluconate 酸化能は比較的低下が少ない。そこで gluconate 添加培地発育菌体の glucose 酸化が上述の glucose 添加培地発育菌体と異なるか否かを見るため, glucose の酸化に対する DNP の影響を上と同様に検討した。

aureus では第10表に示す通り, 静置培養10時間のものも, 20時間のものも glucose 酸化に於ける O₂ 消費, glucose 消費は DNP により殆んど影響されず, pyruvate 蓄積は DNP 添加により増大する。これに対し振盪培養4時間のものも10時間のもの

も O₂ 消費, glucose 消費は DNP 添加によりかなり阻害され, pyruvate 蓄積も阻害される。このように glucose 培地発育菌は「静置」, 「振盪」共に glucose 培地発育菌の夫々と全く同様の態度であつた。

albus (第11表) に於ても gluconate 発育菌は glucose 発育と全く同様であり, 更に citreus (第12表) に於ても glucose 培地発育菌と同様であつて, 各菌共 gluconate 培地発育菌も glucose 酸化に於ては glucose 培地発育菌と相異ないと考えられた。

第10表 gluconate 添加培地培養菌体の glucose 酸化

St. aureus

| | | | O ₂ 消費 μM | glucose 消費 μM | pyruvate 生成 μM | lactate 生成 μM |
|----|--------|---------|-------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| 静置 | 10 hr. | glucose | 8.3 | 2.9 | 0.9 | 1.2 |
| | | + DNP | 8.4 | 3.0 | 1.5 | 1.5 |
| | 20 hr. | glucose | 4.2 | 1.8 | 0.5 | 0.0 |
| | | + DNP | 4.1 | 1.7 | 1.1 | 1.6 |
| 振盪 | 4 hr. | glucose | 10.4 | 3.2 | 0.7 | 0.8 |
| | | + DNP | 8.8 | 2.8 | 0 | 0.5 |
| | 10 hr. | glucose | 5.8 | 1.6 | 0.4 | 0.6 |
| | | + DNP | 4.0 | 1.1 | 0 | 0.3 |

菌液 (湿菌量 60 mg) 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.

第11表 gluconate 添加培地培養菌体の glucose 酸化

St. albus

| | | | O ₂ 消費 μM | glucose 消費 μM | pyruvate 生成 μM | lactate 生成 μM |
|----|--------|---------|-------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| 静置 | 10 hr. | glucose | 6.1 | 2.3 | 0.4 | 0.5 |
| | | + DNP | 6.0 | 2.3 | 1.4 | 0.7 |
| | 20 hr. | glucose | 4.0 | 1.4 | 0.2 | 0.4 |
| | | + DNP | 3.9 | 1.3 | 0.9 | 0.6 |
| 振盪 | 4 hr. | glucose | 11.3 | 3.1 | 0.3 | 0.5 |
| | | + DNP | 8.8 | 2.8 | 0 | 0.4 |
| | 10 hr. | glucose | 5.2 | 1.5 | 0.2 | 0.4 |
| | | + DNP | 4.1 | 1.2 | 0 | 0.4 |

菌液 (湿菌量 60 mg) 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, pH 7.2, 37°C, 1 hr.

第 12 表 gluconate 添加培地培養菌体の glucose 酸化
St. citreus

| | | | O ₂ 消費 μM | glucose 消費 μM | pyruvate 生成 μM | lactate 生成 μM |
|-----|--------|---------|-------------------------|------------------|-------------------|------------------|
| 静 置 | 10 hr. | glucose | 4.9 | 1.9 | 0.7 | 0.8 |
| | | + DNP | 5.2 | 2.0 | 1.8 | 0.9 |
| | 20 hr. | glucose | 3.8 | 1.3 | 0.5 | 0.5 |
| | | + DNP | 3.6 | 1.5 | 1.2 | 0.7 |
| 振 盪 | 4 hr. | glucose | 11.8 | 3.1 | 0.5 | 0.5 |
| | | + DNP | 10.1 | 2.9 | 0.2 | 0.3 |
| | 10 hr. | glucose | 6.2 | 1.6 | 0.3 | 0.4 |
| | | + DNP | 5.7 | 1.5 | 0 | 0.4 |

菌液 (湿菌量 60 mg) 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.

IV. 総括及び考案

前編では菌体の酵素活性と培養時間, 培地起始 pH, 培養温度との関係を追求め, 各供試菌共一般に培養時間の短い (10時間) 場合, 培地起始 pH の低い (pH 5.8) 場合, 培養温度の低い (20°C) 場合の菌体, 即ち発育の行われている (log phase) 段階の菌体は酵素活性が大であり, 特に aureus では ribose の, albus では gluconate の酸化能が大であることを知った。

そこで本編では先づ普通寒天20時間培養の菌体を用い, その静止菌の gluconate, ribose に対する適応の難易を見た。即ち, 静止菌浮遊液に gluconate を単独で, 及び glucose 又は pepton と共に添加して振盪したところ, gluconate と pepton とを同時に添加した場合のみ aureus, albus に於て僅かながら gluconate に適応する傾向が認められるにすぎず ribose ではこれを単独で, 及び glucose, pepton, 酵母エキスと共に添加した何れの場合にも, 各菌共全く ribose に対する適応は認められなかつた。

又静止菌浮遊液に glucose, gluconate を加えて2時間振盪後洗滌した菌体の gluconate, ribose 酸化能を見ると, aureus では gluconate で前処理した菌体が gluconate に僅かに適応し, albus では glucose で前処理したもの, gluconate で前処理したものが gluconate に僅かに適応しているのみであり, citreus では何れの前処理菌も gluconate,

ribose への適応が認められない。

このように各菌共一般に gluconate, 又は ribose の酸化能は培養時間菌の発育に於ける phase に最も大きく支配され培養時間が長くなつて一旦酸化能を失つたものは容易には再び獲得しないものと考えられる。

次に液体培地を用い, C源を glucose 或は gluconate とし, 静置培養及び振盪培養した菌体の glucose 酸化を検討する。

各培養法による発育曲線 (第1図) よりするに, 各菌共振盪培養では4時間目, 静置培養では10時間目が夫々 log phase の中～後期に相当し, 振盪培養では10時間目, 静置培養では20時間目が stationazy phase に相当すると目されるので, これらの各菌体について比較することにする。

先づ数種基質酸化能を見ると, 振盪培地発育菌体では各供試菌共, gluconate をC源とした培地に発育したものは勿論, glucose をC源とした培地に発育したものも gluconate 酸化能は培養時間が長くなつても余り低下しない。又 ribose 酸化能は aureus, citreus では, glucose 培地及び gluconate 培地に於て培養時間が長くなつても比較的低下が少い。即ち glucose 或は gluconate をC源とした培地で振盪培養した菌体について見ると, 培養時間が長くなつても aureus, citreus では gluconate, ribose の酸化能が大であり, albus では gluconate の酸化能が大である。

これに対し静置培養では, pepton のみの培地及

び glucose を C 源とした培地に発育した菌体は前編でのべた普通寒天培養菌体と同様、培養時間が短いものは aureus では ribose 酸化能が大であり、albus では gluconate 酸化能が大であるが、培養時間が長くなれば著明にこれら酸化能が低下する。然し gluconate を C 源とした培地に発育した菌体は各菌共培養時間に拘わらず gluconate 酸化能は比較的大である。

このように gluconate に対する態度は各菌、各培養法によりまちまちであるが、glucose 酸化経路を推定するため DNP による阻害実験の結果を検討すると各菌共静置培養では 12, 24 時間培養菌共に glucose を基質とした O₂ 消費、glucose 消費に対する DNP の影響は小であり、pyruvate 蓄積は DNP により増大する傾向が見られるのに対し、振盪培養では 4, 10 時間培養菌共に O₂ 消費、glucose 消費の DNP による阻害率は静置培養菌に於けるよりもはるかに大であり、かつ pyruvate 蓄積は DNP により減少する傾向が認められる。DNP は E-M 経路を阻害しないと考えられていることからして、各菌共静置培養菌体の glucose 酸化は E-M 経路に主として依存し、振盪培養菌体は E-M 経路以外のもの、即ち W-D 経路、或は gluconate → 2-ketogluconate (又は 5-ketogluconate) をへる経路の関与が多いのではないかと考えられる。

而して gluconate を C 源とした培地に静置培養したものは培養時間が長くなつても gluconate の酸化能が大であるが、その glucose 酸化は DNP による阻害実験よりするにやはり E-M 経路に依存するものと想像される。

参 考

- 1) Roster, J. W., Bact. Rev. 11, 167, (1947)
- 2) Gunsalus, I. C., Horecker, B. L. and Wood, W. A. Bact. Rev., 19, 89, (1955)
- 3) Dickens, F.: Biochem. J., 32, 1626, (1938)
- 4) Dickens, F. and Glock, G. E.: Nature, 166, 33, (1950)
- 5) Scott, D. B. M. and Cohen, S. S.: J. Biol. Chem., 188, 509, (1951)
- 6) Horecker, B. L. and Smyrniotis, P. Z.: Arch. Biochem., 29, 232, (1950)
- 7) Entner, N. and Stanier, R. Y.: J. Bact., 62, 181, (1951)
- 8) 増尾外: 酵素シンポジウム, 8集, 105, (1953)

V. 結 言

St. aureus, albus, citreus の教室保存株を供試菌とし液体培地を用い、培地 C 源を glucose 又は gluconate とし、静置培養及び振盪培養したものの glucose 酸化様式を検討して次の結果を得た。

1. 各菌共 glucose を C 源とした培地では静置培養すると gluconate の酸化能が小であり、かつ培養時間と共に急激に低下するのに対し、振盪培養では培養時間に関係なく gluconate の酸化能が比較的大となる。更に glucose 酸化に対する DNP の阻害効果の差異よりして、静置培養では glucose 酸化が E-M 経路に主として依存し、振盪培養では W-D 経路又は glucose → gluconate → 2-ketogluconate (又は 5-ketogluconate) をへる経路が発達していると推定される。

2. gluconate を C 源とした培地では振盪培養では勿論、静置培養に於ても gluconate 酸化能は比較的大であるが、glucose 酸化は上述の glucose を C 源とした場合の、静置培養、振盪培養に於ける所見と全く同様であつた。

3. staphylococcus に属する菌は一般に培地 C 源に対する適応は比較的困難な部類に属すると思われ、特に ribose に対する適応は困難であり、gluconate 酸化能も培養条件、特に培養時間、即ち発育に於ける phase に最も多く支配され、一旦酸化能を失つた菌体は gluconate と接触せしめても適応は比較的困難である。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚な謝意を表します。

文 献

- 9) Stokes, F. N. and Campbell, J. J.: Arch. Biochem., 30, 121, (1951)
- 10) Umbreit, W. W., et al.: Manometric Techniques and Tissue Metabolism, (1949)
- 11) 標準生化学実験: 18, (1953)
- 12) 標準生化学実験: 36, (1953)
- 13) Gale, E. F.: Bact. Rev., 7, 139, (1943)
- 14) Krebs, O.: Biochem. J., 51, (1952)
- 15) 平野清寿: 第27回日本細菌学会総会(熊本), (1956)
- 16) 藤本剛平: 岡山医誌, 69巻9号, 2455, (1957)
- 17) 標準生化学実験: 35, (1953)

Glucose Oxidation of Staphylococcus

Part 2. Relationship between the C-source of Medium and
Glucose Oxidation

By

Masataka TAKEDA

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

Using the standard strains of *St. aureus*, *albus* and *citreus* stocked in our laboratory, the author pursued the modes of glucose oxidation of bacteria, either by still standing culture or shaking culture in liquid medium with glucose or gluconate as the C-source, and obtained the following results:

1. Oxidation abilities of gluconate of these bacteria, cultured in the medium with glucose as the C-source by still standing method, are low shaking method the oxidation of gluconate increases relatively high irrespective of the length of culture. Furthermore, considering inhibitory effect of DNP against the oxidation of glucose, in the still standing culture the oxidation of glucose may be thought to depend mainly on the E-M pathway and in the shaking culture it develops to the W-D pathway or glucose \rightarrow gluconate \rightarrow 2-keto-gluconate (or 5-ketogluconate) pathway.

2. In the case where gluconate is used as the C-source, the oxidation of gluconate is relatively great in shaking culture and even in stationary culture; but the oxidation of glucose in this case proved to be exactly identical with that where glucose has been used as the C-source.

3. The Adaptability to the C-source of medium of bacteria belonging to *Staphylococcus* seems to be in general of relatively less, especially the adaptability to ribose, and gluconate is. The Oxidation of ribose and gluconate upon the phase of growth rather than the C-source of the medium.
