

細菌のアセトイン代謝について

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

前 田 恭 弘

〔昭和 34 年 9 月 14 日受稿〕

目 次

<p>第 1 篇 アセトインの生成</p> <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. 発育菌のアセトイン生成</p> <p>2. 静止菌のアセトイン生成</p> <p>IV. 総括及び考按</p> <p>V. 結 言</p> <p>第 2 篇 アセトインの分解</p> <p>I. 緒 言</p>	<p>II. 実験方法及び実験成績</p> <p>1. 菌の発育に於ける C 源としてのアセトインの影響</p> <p>2. 発育途次のアセトインの分解</p> <p>3. 静止菌のアセトインを基質とした O₂ 消費</p> <p>4. 静止菌のアセトイン酸化に於ける量的関係</p> <p>III. 総括及び考按</p> <p>IV. 結 言</p> <p>参考文献</p>
--	---

第 1 篇 アセトインの生成

I. 緒 言

生物細胞によるアセトインの生成に関しては多くの研究があり、古くは酵母についての Neuberger & Hirsch¹⁾, Neuberger & Ohle²⁾ の報告があり、その後酵母について Gross & Werkman³⁾, 動物組織について Green et al⁴⁾, Stotz et al⁵⁾, Berg & Westerfeld⁶⁾, 赤堀等⁷⁾, 山村等⁸⁾, 植物組織について Tomiyasu⁹⁾, Singer & Peusky¹⁰⁾ などの報告がある。

細菌についても近年数多くの研究が見られ、11-17), その生成機構に関しても詳細な検討がなされている。

アセトインは焦性ブドウ酸の脱炭酸的縮合によつて生成されるため^{12,15,16,17,18)}, 結果的に見ると細菌によるアセトイン生成は一つの酸処理, 従つて培地 pH の低下を防止する機構とも考えられている。

又一方アセトイン産生の有無は菌鑑別に利用され、例えば *A. aerogenes* と *E. coli* との大きな差異として知られている。

筆者は、*E. coli*, *A. aerogenes*, *S. typhi*, *Staphy. aureus* の 4 菌を供試菌として発育菌, 静止菌のアセトイン生成に関する種々の条件, 並びにアセトイン

生成に於ける量的関係を検討することとした。

II. 実験材料及び実験方法

供試細菌: *E. coli* (*communis*), *A. aerogenes*, *S. typhi* (578), *Staphy. aureus* (寺島株) の各標準株の教室保存のもの。

アセトインの定量: Westerfeld の方法¹⁹⁾ により比色定量した。

グルコースの定量: 3,5-ジニトロサルチル酸を用いる比色法²⁰⁾ によつた。

焦性ブドウ酸の定量: 2,4-ジニトロフェニルヒドラゼンを用いる比色法²¹⁾ によつた。

乳酸の定量: P-ヒドロキシベンゾエニルを用いる比色法²²⁾ によつた。

サク酸の定量: 試料を硫酸酸性として水蒸気蒸溜し, 溜出液を M/100 NaOH で滴定した。

pH の測定: 島津製 pH メーターを用いた。

菌発育度の判定: 光電比濁計により濁度を測定して判定した。

静止菌浮游液の調製: 普通寒天 18 時間培養の菌体を集め, M/50 磷酸緩衝液 (0.85% NaCl 加, pH 7.0) を以て 2 回遠沈洗滌し, 同一組成の緩衝液に浮遊せ

しめた。

菌量は光電比濁計により濁度を測定し、あらかじめ作成した標準曲線と対比して決定した。

O₂ 消費量の測定：ワールブルグ検圧計により常法²³⁾に従って行った。

基質及びその他の添加物はすべて市販品を水にとかして用いた。

III. 実験成績

1. 発育菌のアセトイン生成

各供試菌を下記グルコース加培地に接種して37°Cで静置して培養し、1日毎にアセトイン生成量及びpHを測定した。培地は大試験管に15 cc ずつ分注し、

第一磷酸カリ	0.35 g
第二磷酸ソーダ	2.5 g
食 塩	3.0 g
硫酸第一鉄	0.001 g
硫酸マグネシウム	0.01 g
ペプトン	10.0 g
グルコース	2.0 g

pH 7.2

第1表 培養日数とアセトイン生成量, pH の変化
(ペプトン・グルコース培地)

		培養日数			
		1日	2日	3日	4日
E. coli	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	0	0	0	0
	終 pH	5.4	5.8	5.8	5.9
H. aerogenes	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	287	306	322	360
	終 pH	5.6	6.0	6.2	6.3
S. typhi	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	27	32	38	41
	終 pH	5.6	5.8	5.9	6.0
St. aureus	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	39	46	50	54
	終 pH	5.7	6.0	6.3	6.5

第2表 培地 C 源とアセトイン生成量

培地 C 源		対 照 (C 源なし)	焦性ブドウ酸	乳 酸	サ ク 酸	コ ハ ク 酸
E. coli	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	0	0	0	0	0
	終 pH	7.9	6.8	6.9	7.0	6.2
A. aerogenes	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	36	137	148	40	105
	終 pH	7.8	7.0	7.0	7.1	7.0
S. typhi	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	2	8	11	3	7
	終 pH	8.0	7.0	6.8	7.3	6.6
St. aureus	アセトイン $\mu\text{g}/\text{cc}$	5	9	15	7	10
	終 pH	7.9	6.9	7.2	7.0	6.8

吉供試菌の普通寒天18時間培養菌を生理的食塩水に1 mg/cc となるよう浮游したのから2白金耳ずつ接種して37°Cに静置して4日間培養し、1日毎にその1 cc ずつをとって測定に供した。

結果は第1表の如くであり、E. coli でに4日後に至るも全くアセトインの生成は認められず、A. aerogenes では第1日より著明なアセトインを生成し、1, 2, 3, 4日目に夫々287, 306, 322, 360 $\mu\text{g}/\text{cc}$ の生成を認めた。

S. typhi, St. aureus では共に僅かのアセトインを生成するにすぎなかつた。

又各供試菌のうち A. aerogenes が培地 pH の低下も最も少なかつた。

上記培地でグルコースの代りに他のC源、焦性ブドウ酸、乳酸、サク酸、コハク酸を添加した場合、及び対照としてC源無添加の場合について同様にアセトイン生成量、及び培地 pH を測定した。

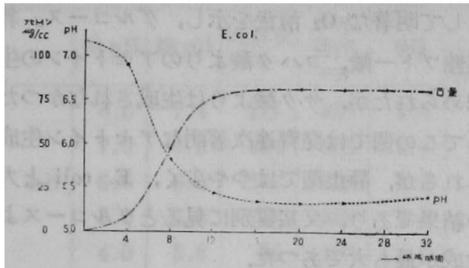
培養1日後の成績は第2表の如くである。

E. coli では培地C源に関係なくアセトインの生成は見られず、S. typhi, St. aureus では何れも僅かであるが、A. aerogenes では焦性ブドウ酸をC源とした場合は137 $\mu\text{g}/\text{cc}$ 、乳酸では148 $\mu\text{g}/\text{cc}$ 、コハク酸では105 $\mu\text{g}/\text{cc}$ となつてかなりの生成が認められ、サク酸ではC源無添加の対照と大差なかつた。

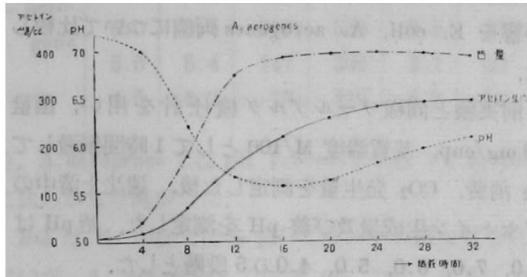
次に各菌につき、上と同様のグルコース加培地を用い、培養初期(32時間迄)の発育度、培地 pH の変動、グルコース消費量、アセトイン及びその他の分解産物の蓄積量を4時間毎に測定した。培地は100 cc 容コルベンに90 cc ずつ入れ菌を接種後、37°Cに保ち、4時間毎にその6 cc ずつを取り出して測定に供した。

先づ菌の発育、pH の変動、アセトイン生成量の関係を見ると、E. coli では第1図の如く菌の増殖

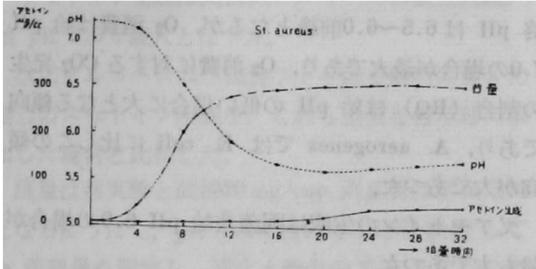
第1図 菌発育度とアセトイン生成量及び pH の変化



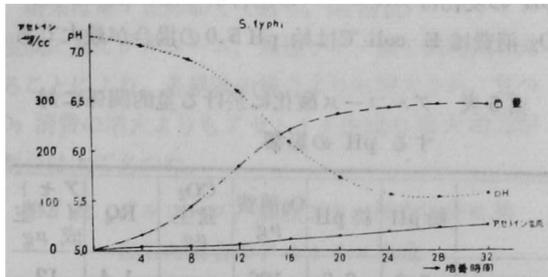
第2図 菌発育度とアセトイン生成量及び pH の変化



第3図 菌発育度とアセトイン生成量及び pH の変化



第4図 菌発育度とアセトイン生成量及び pH の変化



は培養4時間目頃より急激となつて log phase に入り、12時間目頃から増殖は衰え、16時間目頃より stationary phase となると見做される。

培地 pH は菌の増殖と大体平行的に低下し、4時間目以後急激に、12時間目以後は徐々に低下し、16時間目には pH 5.2附近となり、それ以後はやや上昇する傾向が見られた。

アセトイン蓄積は全く認められなかつた。

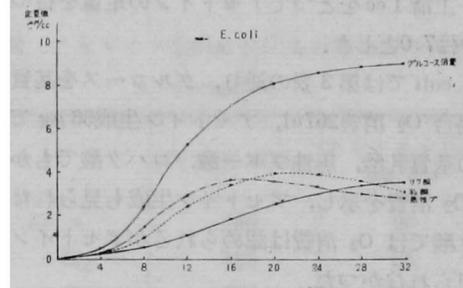
A. aerogenes では菌の増殖は E. coli とほぼ同

様であり、pH は4時間目以後、急激に低下し12時間目に約5.5となり、それ以後は徐々に上昇し、その上昇は E. coli に於けるよりもやや著しかつた。又アセトイン蓄積は菌の増殖曲線と大体平行し4時間目頃より急激に、20時間頃より徐々に増大した。

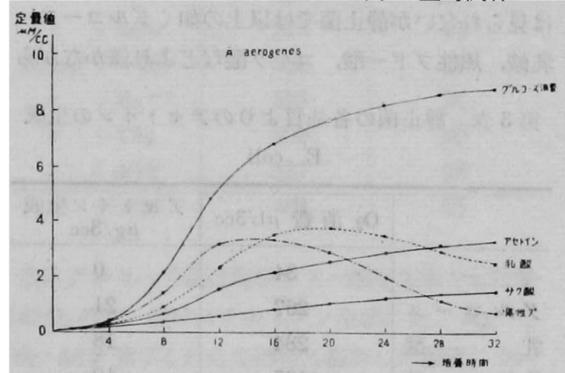
S. typhi, St. aureus では第3, 4図の如くであり、アセトイン蓄積は培養時間と共に極めて徐々に上昇するにすぎず、発育曲線、pH 曲線は E. coli と類似の型であつた。

次にグルコースの消費量、アセトイン、乳酸、焦性ブドー酸、サク酸の蓄積量の時間的变化を E. coli, A. aerogenes の2菌について示すと第5, 6図の如くである。

第5図 グルコースの分解に於ける量的関係



第6図 グルコースの分解に於ける量的関係



E. coli (第5図) ではグルコースの消費は菌の増殖と平行して4時間目頃より急激に増大し20~24時間目頃よりは徐々に増大する。

乳酸、焦性ブドー酸の蓄積はグルコースの分解とともに漸次増大するが16~20時間目を頂点とし、それ以後徐々に減少する傾向が見られ、サク酸は時間と共に徐々に増大する傾向が見られた。

これに対し A. aerogenes (第6図) ではグルコース消費は菌の増殖と平行的に増大し、乳酸、焦性ブドー酸の蓄積は最初時間と共に増大し、16~20時間目頃を頂点として以後減少することは E. coli の場合と同様であるが、その減少速度、特に焦性ブド

一酸の減少が急激であつた。又サク酸蓄積は *E. coli* に於けるよりやや少いようであつた。

2. 静止菌のアセトイン生成

静止菌のアセトイン生成能を見るため、*E. coli*, *A. aerogenes* の2菌を供試菌とし、その普通寒天18時間培養菌を集菌、洗滌後、緩衝液に浮遊し、グルコースその他の基質を加えて振盪した場合のアセトイン生成について検討した。

先づ添加基質の影響を見ると第3, 4表の如くである。

基質はグルコース、乳酸、焦性ブドー酸、サク酸、コハク酸とし、ワールブルグ検圧計を用い、菌量(湿菌量) 20 mg/cup, 基質濃度 M/100となるように加えて37°C 1時間振盪し、O₂消費を測定した後遠沈し、上清1ccをとつてアセトインの定量を行つた。pH は7.0とした。

E. coli では第3表の通り、グルコースを基質とした場合 O₂ 消費267μl, アセトイン生成33μgであり、他の基質乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸でもかなりの O₂ 消費を示し、アセトイン生成も見られたが、サク酸では O₂ 消費は認められるがアセトイン生成は見られなかつた。

前述の如く、*E. coli* では発育途次アセトイン生成は見られないが静止菌では以上の如くグルコース、乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸などより僅かながら

第3表 静止菌の各基質よりのアセトインの生成

E. coli		
	O ₂ 消費 μl/3cc	アセトイン生成 μg/3cc
—	34	0
グルコース	267	21
乳 酸	284	18
焦性ブドー酸	195	10
サ ク 酸	172	0
コ ハ ク 酸	217	8

第4表 静止菌の各基質よりのアセトインの生成

A. aerogenes		
	O ₂ 消費 μl/3cc	アセトイン生成 μg/3cc
—	48	0
グルコース	292	33
乳 酸	263	22
焦性ブドー酸	317	18
サ ク 酸	186	0
コ ハ ク 酸	265	15

生成が認められた。

A. aerogenes では第4表の如く、これらの基質を基質として明著な O₂ 消費を示し、グルコース、乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸よりのアセトインの生成が認められたが、サク酸よりは生成されなかつた。

而してこの菌では発育途次著明なアセトイン生成が見られるが、静止菌ではやや少く、*E. coli* と大差ない結果であり、又基質別に見るとグルコースよりの生成が最も大であつた。

次にグルコース、或は焦性ブドー酸を基質とした O₂ 消費、CO₂ 発生、アセトイン生成に対する pH の影響を *E. coli*, *A. aerogenes* 両菌について比較した。

前実験と同様ワールブルグ検圧計を用い、菌量 20 mg/cup, 基質濃度 M/100 として1時間振盪して O₂ 消費、CO₂ 発生量を測定した後、遠沈上清中のアセトイン生成量及び終 pH を測定した。始 pH は 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0の5段階とした。

グルコースを基質とした場合には第5表に示す如くであり、両菌共に何れの pH で反応を開始しても終 pH は 6.5~6.0前後となるが、O₂ 消費は始 pH 7.0の場合が最大であり、O₂ 消費に対する CO₂ 発生の割合 (RQ) は始 pH の低い場合に大となる傾向であり、*A. aerogenes* では *E. coli* に比しこの傾向が大であつた。

又アセトインの生成は両菌共始 pH 6.0の場合が最も大であつた。

焦性ブドー酸を基質とした場合には反応前後の pH の変化はグルコースの場合よりは一般に少く、O₂ 消費は *E. coli* では始 pH 5.0の場合が最大であ

第5表 グルコース酸化に於ける量的関係に対する pH の影響

	始 pH	終 pH	O ₂ 消費 μg	CO ₂ 発生 μg	RQ	アセトイン生成 μg
<i>E. coli</i>	8.0	6.3	196	—	1.4	12
	7.0	6.0	277	413	1.5	15
	6.0	5.8	235	378	1.6	20
	5.0	5.6	146	235	1.6	10
	4.0	5.5	76	136	1.8	8
<i>A. aerogenes</i>	8.0	7.8	212	389	1.4	19
	7.0	6.8	257	370	1.4	30
	6.0	6.3	182	315	1.7	36
	5.0	5.2	97	196	1.9	27
	4.0	5.9	64	133	2.0	15

第6表 焦性ブドウ酸々化に於ける量的関係に
対する pH の影響

	始 pH	終 pH	O ₂ 消費 μg	CO ₂ 発生 μg	RQ	アセト イン生 成 μg
E. coli	8.0	7.4	117	236	2.0	3
	7.0	7.2	190	391	2.1	14
	6.0	6.5	241	485	2.0	15
	5.0	6.2	257	498	1.9	10
	4.0	5.8	86	183	2.1	5
A. aero- gens	8.0	7.5	277	500	1.8	3
	7.0	7.1	282	566	2.0	17
	6.0	6.5	216	539	2.5	23
	5.0	6.4	147	395	2.7	20
	4.0	6.2	78	219	2.8	14

り, A. aerogenes では pH 7.0~8.0であつて E. coli に比しかなり高かつた。

RQ は E. coli では各 pH に於いて大差は見られないが, A. aerogenes では始 pH の低くなるにつれて RQ は大となつた。

アセトイン生成は両菌共グルコースの場合同様, 始 pH 6.0で最大となつた。

次にグルコース及び焦性ブドウ酸を同時に加えた場合のアセトイン生成を, これら基質を各単独に添加した場合と比較した。

菌量は前実験と同様20 mg/cup, 両基質は各 M/100 となるようにし, pH 7.0に於いて1時間振盪して O₂ 消費量を測定し, 遠沈上清中のアセトインの定量を行つた。

結果は第7表の如くであり, O₂ 消費, アセトイン生成に共にグルコース, 焦性ブドウ酸を同時に加えることにより, 各単独の場合よりも増大され, 且つ O₂ 消費の増大よりもアセトイン生成の増大の方が割合は大であつた。

第7表 グルコース, 焦性ブドウ酸を同時に添
加した場合のアセトイン生成

		O ₂ 消費 μl/3cc	アセト イン生 成 μg/3cc
E. coli	グルコース	262	23
	焦性ブドウ酸	176	17
	グルコース+焦性ブドウ酸	512	76
A. aero- gens	グルコース	286	30
	焦性ブドウ酸	317	19
	グルコース+焦性ブドウ酸	627	98

第8表 アセトイン生成に於ける促進物質の影響
E. coli

	O ₂ 消費 μl/3cc	アセトイン生成 μg/3cc
グルコース	254	21
" + Mg ⁺⁺	296	28
" + VB ₁	260	37
" + ATP	312	32
" + total	357	78
焦性ブドウ酸	182	19
" + Mg ⁺⁺	216	28
" + VB ₁	180	32
" + ATP	227	25
" + total	246	67

total · Mg⁺⁺ + VB₁ + ATP

第9表 アセトイン生成に於ける促進物質の影響
A. aerogenes

	O ₂ 消費 μl/3cc	アセトイン生成 μg/3cc
グルコース	280	29
" + Mg ⁺⁺	324	38
" + VB ₁	285	44
" + ATP	356	37
" + total	370	94
焦性ブドウ酸	306	16
" + Mg ⁺⁺	335	24
" + VB ₁	305	30
" + ATP	357	28
" + total	404	65

次にグルコース或は焦性ブドウ酸を基質とした場合の O₂ 消費, 並びにアセトイン生成に対する Mg⁺⁺, VB₁, ATP 及びこれらを同時に添加した影響について見た。

Mg⁺⁺ は 10⁻⁴M, VB₁ は 10⁻⁴M, ATP は 0.1 mg/cc となる様にワールブルグ検圧計容器の主室に菌液と共に入れ, 15分後に基質を混入して1時間振盪した。

E. coli では第8表の如くであり, グルコース, 焦性ブドウ酸を基質とした場合共に, O₂ 消費は Mg⁺⁺, ATP 添加により増大し, Mg⁺⁺, VB₁, ATP の三者を加えるとその増大は更に著しく, 又アセトイン生成もこれら各添加物によつて増大し, 三者を同時に加えると更に著しくなつた。而して各場合共にアセトイン生成量の増大は O₂ 消費増大よりも割合が大であつた。

A. aerogenes に於いても第9表の如く、*E. coli* に於ける成績と同様であつた。

IV. 総括及び考按

供試菌の発育途次に於けるアセトインの生成について先づ検討する。

グルコースをC源とした培地では *E. coli* は培養4日後に至る迄全くアセトインは生成せず、*S. typhi*, *St. aureus* では僅かに生成が認められるにすぎないが、*A. aerogenes* では培養1日目より著明な生成が見られる。グルコース以外のC源、乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸などの場合にも *A. aerogenes* ではグルコースに於けるよりは劣るが、かなりのアセトイン生成が見られ、サク酸をC源とした場合にはその生成は僅かである。

グルコースをC源とした培地に於ける培養初期の菌の発育、pHの変化、アセトイン蓄積量の関係を見ると、各菌共培養4時間目頃より log phase に入り、16~20時間頃より stationary phase に入ると見做され、*E. coli*, *S. typhi*, *St. aureus* では pH は菌発育と共に低下し24時間頃より一定の値をとるか、僅かづつ上昇するが、*A. aerogenes* では12~16時間目頃より上昇の傾向を示し菌の増殖と平行してアセトインの蓄積が見られる。

而してアセトイン、乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸の蓄積の量的関係を *E. coli*, *A. aerogenes* について比較すると両菌共に乳酸、焦性ブドウ酸の蓄積は培養12時間頃を頂点として以後減少し、サク酸の蓄積は培養時間と共に徐々に増大する傾向が見られるが、ただ異なる点は *A. aerogenes* ではアセトイン蓄積が大であると同時に培養12時間頃以後の焦性ブドウ酸の減少が急激であることであり、これはこの菌では焦性ブドウ酸よりアセトインを生成する機構が発育して居るためではないかと考えられる。

アセトインの生成は細菌とつて一つには pH 低下の防止機構と考えられて居り、*A. aerogenes* に於ては他菌よりも菌の発育度に比し pH 低下が著しくなく、培養12時間頃より培地 pH はやや上昇を示すことと符合するものである。

次に静止菌のアセトイン生成を *E. coli*, *A. aerogenes* について検討する。

普通寒天培地より集菌、洗滌した菌体の浮游液に基質を加えて振盪し、アセトインの生成量を測定すると、両菌共にグルコースその他の基質よりかなりのアセトインを生成し、発育途次に於いてはアセト

インの蓄積が見られない *E. coli* に於いてもアセトイン生成機構は幾分か存在するものと考えられる。

ひるがえつて両菌の焦性ブドウ酸々化に於ける差異を見ると、Ajl²⁴⁾ は焦性ブドウ酸を基質とした O₂ 消費は両菌共亜硫酸により阻害され、CO₂ 発生は *E. coli* では亜硫酸で阻害されるが *A. aerogenes* では阻害されないことを認めている。

筆者の実験で pH による影響を比較すると、O₂ 消費の至適 pH は *E. coli* では 5~6 前後、*A. aerogenes* では 7~8 前後であり、*A. aerogenes* では低 pH に於ける RQ 値は *E. coli* よりも大であり、即ち O₂ 消費に比して CO₂ 発生の割合が大となり、従つて *A. aerogenes* では低 pH に於ける焦性ブドウ酸→アセトインの機構が、*E. coli* よりも発達していると思はれる。

さてアセトインの生成は両菌共グルコースを基質とした場合最大であり、次いで乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸であるが、サク酸よりは殆んど生成されない。

これは勿論アセトインが C₃ 化合物（焦性ブドウ酸）の脱炭酸的縮合により生成されるためと考えられる。

グルコースなどの基質よりのアセトイン生成は焦性ブドウ酸を過て行われると考えられるが、これらの菌では前述の如く焦性ブドウ酸よりもむしろグルコースよりの生成が大なる傾向が見られ、且つグルコース、或は焦性ブドウ酸各単独よりもむしろこの両者を同時に加えた方が生成量が大であり、これは焦性ブドウ酸→アセトインの反応にエネルギーを必要とし、このエネルギー源としてグルコースが役立つて居るものと推定される。

アセトイン生成には VB₁, ATP, Mg⁺⁺ が必要とされて居り、本実験に於いても両菌共にこれらの co-factor がアセトイン生成を促進することが確認されて居り、上記推定を裏付けるものと考えられる。

V. 結 言

E. coli, *A. aerogenes*, *S. typhi*, *St. aureus* を供試菌とし発育菌、並びに静止菌のアセトイン生成について検討して次の結果を得た。

1. *E. coli* は発育途次アセトインを生成せず、*A. aerogenes* ではグルコース、乳酸、焦性ブドウ酸、コハク酸などをC源とした培地で著明なアセトインを生成し、*S. typhi*, *St. aureus* では僅かである。
2. アセトイン産生菌 *A. aerogenes* では焦性ブ

ドー酸蓄積が培養中期以後急激に減少するが、非産生菌 *E. coli* では減少は比較的緩徐である。

3. 静止菌では各菌共にグルコース、乳酸、焦性ブドー酸、コハク酸などから若干のアセトインを生成する。この至適 pH は6.0附近にある。

4. *E. coli*, *A. aerogenes* の静止菌による焦性ブドー酸々化に対する pH の影響を比較すると、*A. aerogenes* では低 pH に於ける焦性ブドー酸の脱炭

酸が *E. coli* に於けるより大で、焦性ブドー酸→アセトインの機構が *E. coli* よりも発達していると思われる。

5. アセトイン生成は菌にグルコース、焦性ブドー酸を同時に添加すると、各単独の場合よりは著しく大となり、又 VB_1 , Mg^{++} , ATP などによつても促進される。

第2篇 アセトインの分解

I. 緒言

前篇に於いては発育途次の菌及び静止菌のグルコース、焦性ブドー酸などよりのアセトイン生成に関して実験を行い、*A. aerogenes* は発育途次著明のアセトインの蓄積し、*E. coli* では全く蓄積せず、*S. typhi*, *St. aureus* では僅かの蓄積が認められ、各菌間に顕著な差異が見られるが、静止菌では大した差異は認められず、何れの菌もグルコース、焦性ブドー酸、乳酸、サク酸などから僅かながら、アセトインを生成することを述べた。

従つて各菌共アセトインは代謝に無関係な物質ではなく、ただ環境（発育という）によつて蓄積するものと、然らざるものがあると考えられる。

そこで本篇では各菌のアセトインの分解能及び、その分解に於ける量的関係について検討した。

II. 実験方法及び実験成績

E. coli (*communis*), *A. aerogenes*, *S. typhi* (57S), *Staphy. aureus* (寺島株) の各標準株を用い、前篇記載の実験方法に従つて、発育菌、静止菌によるアセトインの分解、並びに分解産物などの量的関係を見て行くこととする。

1. 菌の発育に於けるC源としてのアセトインの影響

菌によるアセトインの分解について検討する一手段として、先づ各菌の最少の栄養素を加えた培地にC源としてアセトインをM/100となるよう添加し、各菌を5代継代し、継代の可否を見た。

水	1.0 l	
磷酸第一カリ	0.35 g	
磷酸第二ソーダ	2.5 g	
食塩	3.0 g	
硫酸第一鉄	0.001 g	pH 7.2

硫酸マグネシウム 0.01 g

上記組成の基礎培地に更に各菌に応じて、先人の報告を参照し、次の如きN源、ビタミン類を添加した。

E. coli, *A. aerogenes* : 塩化アンモニウム M/100, *S. typhi* ²⁵⁾ : グルタミン酸M/100, シスチンM/500, トリプトファン M/1000.

St. aureus ²⁶⁾ : グリシン0.05 g/l, アラニン0.12, バリン0.15, ロイシン0.17, プロリン0.07, アスパラギン酸0.20, グルタミン酸0.10, メチオニン0.07, トリプトファン0.05, アルギニン0.05, ヒスチジン

第10表 各菌の発育に於けるC源としてのアセトインの効果

培地成分	継代	I	II	III	IV	V
	NH ₄ ⁺	+	-	-	-	-
" +アセトイン	+	+	+	+	+	+

培地成分	継代	I	II	III	IV	V
	NH ₄ ⁺	+	-	-	-	-
" +アセトイン	+	+	+	+	+	+

培地成分	継代	I	II	III	IV	V
	グルタミン酸・シスチン・トリプトファン	+	+	±	-	-
" +アセトイン	+	+	+	+	+	+

培地成分	継代	I	II	III	IV	V
	各種アミノ酸・ビタミン類	+	+	+	±	-
" +アセトイン	+	+	+	±	-	-

各種アミノ酸ビタミン類：本文参照

0.05, 及びチオグルコール酸ソーダ M/500, ニコチンアミド10⁻⁵, チアミン10⁻⁵M.

これら培地, 及びこれにアセトインを加えた培地に各菌を接種し, 5代継代の可否をしらべた.

結果は第10表の如くであり, 各菌共アセトイン無添加培地では継代不能であり, *St. aureus* ではアセトイン添加培地でも不能であつたが, 他の菌ではアセトインを添加すると可能であつた.

2. 発育途次のアセトインの分解

次にアセトインを加えた培地に菌を接種し, 発育途次のアセトインの分解及び分解産物の蓄積量を測定した.

培地は前記基礎培地に, 発育を良好にするためペプトン10 g/lを加え, 更にアセトインを M/100となるよう添加したものをを用い, 100 cc 容コルペンに80 cc 培地を入れ, 各菌の普通寒天18時間培養菌体を生理的食塩水に1 mg/cc となるような浮游したものの2白金耳を接種し, 37°Cで静置培養し4時間毎に5 cc ずつを取り出して定量に供した.

E. coli では第1図の如くであり, 菌の発育ともなつてアセトインは消費されて行き, 菌発育が停止するにつれ消費も衰える.

分解産物としては焦性ブドー酸蓄積が最も多く, 菌の増殖の最も盛んな時期 (log phase) では焦性ブドー酸蓄積も急激に増大し, 培養12時間頃を頂点として以後やや減少する傾向が見られる. 乳酸蓄積は焦性ブドー酸に比しやや少く, その蓄積量は時間と共に徐々に増大し, サク酸蓄積量も時間と共に漸次増大する傾向にあるという結果であつた.

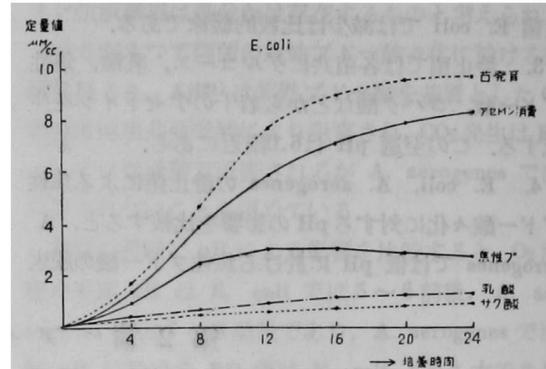
他の菌でも分解産物の量的関係は同様あつたが, *A. aerogenes* では焦性ブドー酸蓄積量が, 他菌の場合に比しやや小であつた.

又 *St. aureus* では前記実験で最小N源, ビタミン類添加培地にアセトインを加えても, グルコースに代るC源となり得ず, 5代継代は不可能であつたに拘らず, ペプトン添加の培地ではアセトインは明らかに消費され, 他菌同様焦性ブドー酸, 乳酸, 醋酸などの分解産物の蓄積が認められた.

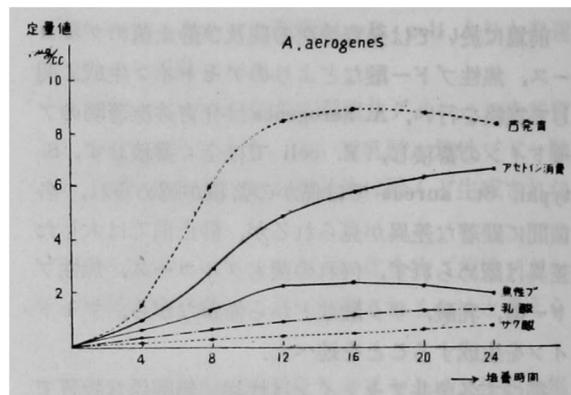
そこでアセトイン消費に対する分解産物蓄積の割合の最も大なる時期, 培養16時間目を選び, アセトイン添加, 及び無添加 (対照) 培地に於けるアセトイン消費量, 分解産物蓄積量の関係を一括表示すると第11表の如くである.

各菌共対照培地に於ける乳酸, 焦性ブドー酸, サク酸蓄積量は極めて小であるのに対し, アセトイン

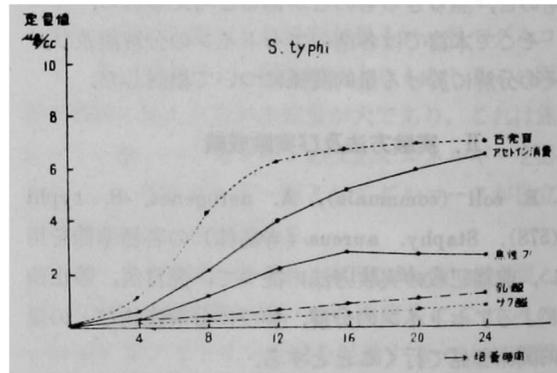
第7図 菌の発育とアセトインの分解



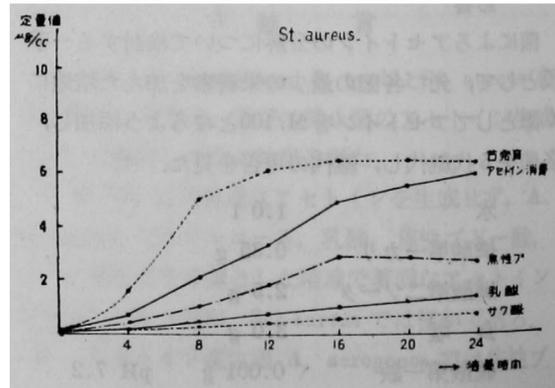
第8図 菌の発育とアセトインの分解



第9図 菌の発育とアセトインの分解



第10図 菌の発育とアセトインの分解



第11表 培養24時間後のアセトイン分解産物

		μM/cc	アセトイン消費	乳糖酸積	焦性ブドウ酸積	サク酸積
E. coli	対照培地	/	0.8	0.2	0.3	
	アセトイン加培地	7.2	1.3	3.2	1.0	
A. aerogenes	対照培地	/	0.9	0.9	0.4	
	アセトイン加培地	6.3	1.2	2.3	0.6	
S. typhi	対照培地	/	1.8	0.7	0.3	
	アセトイン加培地	6.7	1.0	3.0	0.8	
St. aureus	対照培地	/	1.6	0.7	0.4	
	アセトイン加培地	6.0	1.2	2.9	0.8	

添加培地では著明なこれら分解産物を認め、従つてこれらは主としてアセトインの分解によつて生成したものと見做し得る。

而してアセトイン1M消費に対する乳糖、焦性ブドウ酸蓄積量の合計は各菌平均0.6M前後となり、A. aerogenes ではやや少く、St. aureus ではやや大であつた。

3. 静止菌のアセトインを基質とした O₂ 消費

各供試菌の普通寒天18時間培養菌を集菌、洗滌後緩衝に浮游せしめ、アセトイン及びその他の基質に於ける O₂ 消費量を測定した。

O₂ 消費量測定はワールブルグ検圧計を用い菌量は St. aureus 以外は湿菌量20mg/cup, St. aureus は60mg/cup とし、基質濃度 M/100, pH7.0, 反応時間1時間とした。

第12表 各菌の O₂ 消費量

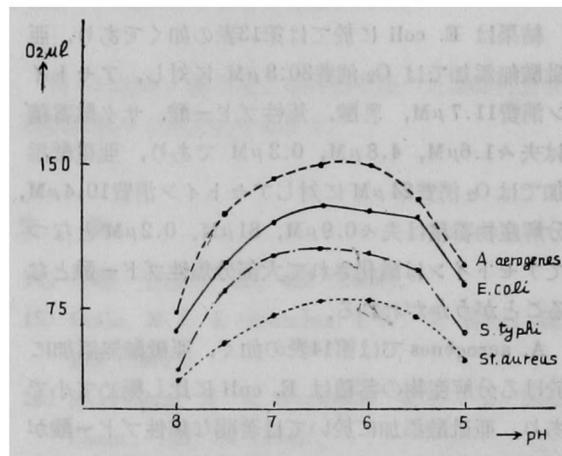
	E. coli	A. aerogenes	S. typhi	St. aureus
—	27	34	20	48
アセトイン	166	127	112	77
グルコース	264	284	227	240
乳糖	292	276	186	187
焦性ブドウ酸	188	304	136	145
サク酸	157	165	92	150
コハク酸	184	252	127	154

結果は第12表に一括した如く、St. aureus 以外の菌ではアセトインを基質としてかなりの O₂ 消費を示し、比較として同時に測定したグルコース、乳糖、焦性ブドウ酸、サク酸、コハク酸等の場合に比し、それ程劣らない O₂ 消費量値が認められた。

然し、St. aureus では他の菌に比し、アセトインを基質とした O₂ 消費は小であつた。

アセトインを基質とした O₂ 消費を pH 8.0, 7.5, 7.0, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0 に於て夫々測定し pH の関係を求めると、第11図の如くなり、各菌共 pH 7.0~6.0 で於て O₂ 消費が大であり、その両側では急激に低くなり、この間に至適 pH があり、この範囲では余り差異はないようであつた。

第11図 アセトイン酸化に於ける pH の影響



4. 静止菌のアセトイン酸化に於ける量的関係

次に静止菌浮游液にアセトイン (M/100) を添加し、1時間振盪後の O₂ 消費量、アセトイン消費量、及び分解産物としての乳糖、焦性ブドウ酸、サク酸の蓄積量を測定した。尚焦性ブドウ酸を特異的に阻害する阻害剤亜砒酸 (10⁻³M) 添加の影響をも検討した。亜砒酸は検圧容器に菌液と共に入れ、あらかじめよく接触せしめ、15分後に側室よりアセトインを混入するようにした。菌量は各菌共80mg/cup, pH 7.0とした。

第13表 静止菌のアセトイン酸化

E. coli					
	O ₂ 消費	アセトイン消費	乳糖酸積	焦性ブドウ酸積	サク酸積
アセトイン	30.8	11.7	1.6	4.8	0.3
〃 + 亜砒酸	24.7	10.4	0.9	8.1	0.2

第14表 静止菌のアセトイン酸化

A. aerogenes					
	O ₂ 消費	アセトイン消費	乳糖酸積	焦性ブドウ酸積	サク酸積
アセトイン	27.4	7.2	0.6	0.4	0.3
〃 + 亜砒酸	18.3	6.2	0.2	5.0	0.1

第15表 静止菌のアセトイン酸化

S. typhi

	O ₂ 消費	アセトイン消費	乳酸蓄積	焦性ブドウ酸蓄積	サク酸蓄積
アセトイン	20.2	5.4	0.6	1.2	0.2
“ + 亜硫酸	16.0	4.8	0.5	3.1	0.2

結果は E. coli に於ては第13表の如くであり、亜硫酸無添加では O₂ 消費30.8 μM に対し、アセトイン消費11.7 μM、乳酸、焦性ブドウ酸、サク酸蓄積は夫々1.6 μM、4.8 μM、0.3 μM であり、亜硫酸添加では O₂ 消費24 μM に対しアセトイン消費10.4 μM、分解産物蓄積は夫々0.9 μM、81 μM、0.2 μM となつてアセトインは酸化されて大部分焦性ブドウ酸となることがかがわれる。

A. aerogenes では第14表の如く、亜硫酸無添加に於ける分解産物の蓄積は E. coli に比し極めて小であり、亜硫酸添加に於いては著明な焦性ブドウ酸が蓄積し、やはりアセトインは焦性ブドウ酸をへて分解され、亜硫酸無添加ではこれが殆んど完全酸化されるものと見做された。

S. typhi, St. aureus では第15, 16表の如く、E. coli と大体同様の傾向が認められた。

第16表 静止菌のアセトイン酸化

St. aureus

	O ₂ 消費	アセトイン消費	乳酸蓄積	焦性ブドウ酸蓄積	サク酸蓄積
アセトイン	16.3	4.4	0.2	0.8	0.3
“ + 亜硫酸	12.7	3.8	0.3	2.6	0.4

IV. 総括及び考按

供試菌のアセトイン分解能を検討する一手段として、アセトインを唯一のC源とした最少栄養培地に継代しうるか否かを見ると、E. coli, A. aerogenes ではN源を無機アモニウム塩とし、アセトインをC源として5代以上の継代が可能であり、S. typhi ではアスパラギン酸、トリプトファン添加培地でアセトインをC源として継代可能であるが、St. aureus では前記の如き各種アミノ酸混合物及び発育素を添加した培地ではグルコースをC源としては継代可能であるに拘らず、アセトインでは不能である。従つて St. aureus 以外の菌ではこのような最少栄養培地でもアセトインをC源として利用しうると見做さ

れる。

而してペプトンを主体とした培地にアセトインを加えて菌を培養すると他の菌は勿論 St. aureus でもアセトインの分解が明らかに認められる。従つて St. aureus では最少栄養培地ではアセトインはエネルギー源、或は媒体成分の合成材料としては不適當であり、ペプトン加培地ではC源添加なくとも発育しうるので、僅かながらアセトインの分解は起るものと考えられる。

ペプトン、アセトイン加培地に於ける発育途次のアセトインの分解を見ると、各菌共アセトインは菌増殖と大体平行して消失して行き、分解産物として主に焦性ブドウ酸、乳酸が蓄積される。

焦性ブドウ酸、乳酸の蓄積も菌の増殖と大体平行して居り、乳酸よりも焦性ブドウ酸蓄積量の方がやや大であつて、これはアセトインが分解され先づ焦性ブドウ酸となるためと考えられる。

菌別に見ると、E. coli では菌濃度に比しアセトイン消費量が他菌より大である。

次に静止菌によるアセトインの酸化を見ると、各菌共普通寒天培養菌もかなりのアセトイン酸化能を持ち、特に E. coli で大であり、St. aureus は他菌に比し小であつて、これも St. aureus がアセトインをC源とし得ない理由の一つと考えられる。

アセトイン酸化の至適 pH を見ると各菌共一様に pH 6~7 附近であり、これは前篇に記したグルコース、或は焦性ブドウ酸よりのアセトイン生成に於ける至適 pH より僅かに高いようである。

従つて発育に於けるアセトイン生成が A. aerogenes と E. coli とで異なるのは pH の関係ではなくして、むしろ主として発育時の代謝機構そのものが異なるためと見做される。

静止菌によるアセトイン酸化に於ける量的関係を検討すると、各菌共に O₂ 消費 1 M に対し約0.3~0.4 M のアセトイン消費が見られ、菌別に見ると E. coli では O₂ 消費に対するアセトイン消費の割合がやや大である。

分解産物としては焦性ブドウ酸の蓄積が大であり、乳酸は極めて少く、菌別に見ると A. aerogenes では他菌に比し焦性ブドウ酸蓄積が少く、この菌ではアセトイン→焦性ブドウ酸の反応速度が小であり、焦性ブドウ酸以下の酸化が大であるのに対し、他菌ではこの逆であるものと考えられる。

亜硫酸添加に於いては各菌共アセトイン 1 M 消費に対し 1 M 近くの焦性ブドウ酸を蓄積しアセトイン

は先づ酸化され焦性ブドー酸となるものと推定される。

V. 結 言

E. coli, *A. aerogenes*, *S. typhi*, *St. aureus* を供試菌とし発育途次並びに静止菌のアセトインの分解について検討して次の結果を得た。

1. 各菌の最小栄養素 (N源, 発育素) を加えた培地で, アセトインをC源として *St. aureus* 以外の菌は継代可能であるが, *St. aureus* は不能である。
2. ペプトン, アセトイン添加培地では各菌ともアセトインを分解し, 分解産物としては焦性ブドー

酸, 乳酸を蓄積し, 特に焦性ブドー酸蓄積が大である。

3. 静止菌では各菌共アセトインを基質としてかなりの O_2 消費を示すが, *St. aureus* ではやや小である。

4. 静止菌のアセトイン酸化産物としては焦性ブドー酸が主であり, アセトインは先づ酸化されて焦性ブドー酸に至るものと推定される。

終りに臨み, 御指導と御校閲を賜った恩師村上教授に深甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Neuberg, C. & Hirsch, J.: *Biochem. Z.*, **115**, 282 (1921).
- 2) Neuberg, C. & Ohle, H.: *Biochem. Z.*, **127**, 327; **128**, 610 (1922).
- 3) Gross, N. H. & Werhman, C. H.: *Arch. Biochem.*, **15**, 125 (1947).
- 4) Green, et al.: *J. Biol. Chem.*, **145**, 69 (1942).
- 5) Stotz, et al.: *J. Biol. Chem.*, **152**, 41 (1944).
- 6) Berg, R. L. & Westerfeld, W. W.: *J. Biol. Chem.*, **152**, 113 (1944).
- 7) 赤堀他: *ビタミン*, **4**, 387 (1951).
- 8) 山村他: *酵素化学, シムボジウム*, **8**, 101 (1953); **9**, 57 (1954); *ビタミン*, **6**, 483; 839 (1953).
- 9) Tomiyasu, Y.: *Enzymologia*, **3**, 263 (1937).
- 10) Singer, T. P. & Pensky, J.: *Arch. Biochem.*, **31**, 457 (1951).
- 11) Rowatt, E.: *Biochem. J.*, **49**, 453 (1951).
- 12) Nossal, P. M.: *Biochem. J.*, **50**, 591 (1952).
- 13) Moat, A. G. & Lichstein, H. C.: *J. Bact.*, **66**, 324 (1953).
- 14) 片桐: *生化学*, **25**, 457 (1954).
- 15) Dolin, M. I. & Gunsalus, I. C.: *J. Bact.*, **62**, 199 (1951).
- 16) Silverman, M. & Werkman, C. H.: *J. Biol. Chem.*, **138**, 35 (1941).
- 17) Gale, E. F.: *The Chemical Activities of Bacteria*.
- 18) Juni, E.: *Federation. Proc.*, **9**, 396 (1950); *J. Biol. Chem.*, **195**, 715 (1952).
- 19) Westerfeld, W. W.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 495 (1945).
- 20) 標準生化学実験: 18
- 21) 標準生化学実験: 36
- 22) 標準生化学実験: 35
- 23) Umbreit, W. W.: *Manometric Techniques*
- 24) Ajl, S. J.: *J. Bact.*, **59**, 499 (1950).
- 25) 稲田: *岡山医学会雑誌*, **71**巻, **6**の1号, 2997 (1959).
- 26) 水野, 小坂: *日本細菌学雑誌*, **7**巻3号, 229 (1952).

Acetoin Metabolism of Bacteria

By

Yasuhiro Maeda

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

Part I On the Production of Acetoin

Using *E. coli*, *A. aerogenes*, *Sal. typhi* and *Staph. aureus* as test organisms, the author studied on the production of acetoin by the growing cells and the resting cells of these microorganisms and the following results were obtained.

- 1) While *E. coli* did not synthesize acetoin on its growth, *A. aerogenes* showed marked production of acetoin on growth on the media containing glucose, lactate or pyruvate as C-source. In the case of *Sal. typhi* and *Staph. aureus*, a small production of that was observed.
- 2) An accumulation of pyruvate into culture media was rapidly decreased from about the resting phase in the culture of *A. aerogenes* that was capable of synthesizing acetoin. On the other hand, the accumulation of pyruvate was decreased its amount fairly gradually by *E. coli* that had no capacity of acetoin synthesis.
- 3) The resting cells of either species could produce acetoin to some degree at the expense of glucose, lactate, pyruvate and succinate. The optimum pH of this reaction was found to be at about 6.0.
- 4) From the study on the effect of pH on oxidation of pyruvate by the resting cells of *E. coli* and *A. aerogenes*, it could be postulated that the mechanism yielding acetoin from pyruvate in low pH could work more sufficiently at *A. aerogenes*, than at *E. coli*.
- 5) The production of acetoin was accelerated very highly by the simultaneous addition of glucose and pyruvate into the media, and also was accelerated by the addition of VB₁, Mg⁺⁺ or ATP.

Part 2 On the Degradation of Acetoin

Using the 4 strains of bacteria as in the preceding paper, part I, the author studied on the degradation of acetoin by the growing cells and the resting cells of these microorganisms. The following results were obtained.

- 1) All the microorganisms tested except *Staph. aureus* could grow by utilizing acetoin as C-source on the media containing the minimal nutritional requirement, namely N-source and vitamins. But *Staph. aureus* did not show the growth for a lack of capacity utilizing acetoin.
 - 2) As peptone and acetoin was added simultaneously into the media, all the species of bacteria could degrade acetoin and yielded a large amount of pyruvate and a little amount of lactate as the metabolite.
 - 3) Generally the resting cells of all species showed a fairly large O₂-uptake at the expense of acetoin as substrate. However, the O₂-uptake was somewhat small in the reaction by *Staph. aureus* compared with by the other bacteria.
 - 4) As for the oxidation products of acetoin by the resting cells of the microorganisms pyruvate was found to be a predominant metabolite. Acetoin had possibly been undergone oxidative decarboxylation in the first place and resulted in pyruvate.
-