

## 培地の成分知っていますか？

駒 大輔\*・山中 勇人・森芳 邦彦・大本 貴士

生物工学系の研究者・技術者・学生であれば、日常的に実験材料として培地を用いている人は多いであろう。今日では、各メーカーから信頼のおける培地基材ないし調製済み培地が入手できるようになったため、一般的なルーチンワークに使用する培地基材を一昔前のように自製する機会はほとんどない。したがって、培地成分について議論することや深く考えることはあまりないであろう。

培地と一言でいっても、対象とする微生物により用いる培地は大きく異なる。たとえば、独立栄養細菌と従属栄養細菌では当然のことながらその組成は大きく異なる。天然培地と合成培地（後述）でも、しかりである。さらに表記が同じ天然培地でも、用いる基材やその配合により含まれる成分に違いがある。したがって、培地の成分を一言で語ることは不可能である。そこで本稿では、大腸菌や枯草菌などの一般的な従属栄養細菌を培養するために、研究室で日頃のルーチンワークによく使う天然培地を取り上げてその成分について考えてみたいと思う。具体的には、認知度が比較的高いと思われる3つの培地、LB培地、nutrient broth (NB培地)、ソイビーン・カゼインダイジェスト培地 (SCD培地) を例に挙げて、その構成成分について解説する。

### 天然培地とは

LB培地、NB培地、SCD培地の三者は、用いる培地基材が天然物に由来することから天然培地と呼ばれる。これに相對するものとして、合成培地という言葉がある。これは微生物の増殖に必要な各種栄養素を、すべて化学薬品を用いて補う培地である。合成培地の場合はその化学組成が明瞭であり、実験の再現性も非常に高いと言える。一方、天然培地の場合、その化学組成は完全に明らかというわけではなく、かなり雑多な化合物の集合体である。しかしながら、天然培地は広範な微生物に対して高い生育・発育支持力を示すために、さまざまな場面で幅広く利用されている。

微生物が増えるということは、微生物が必要な栄養素を取り入れて代謝し、結果、細胞分裂するということである。栄養要求性の低い微生物は、グルコースなどの炭

素源と、アンモニウム塩のような窒素源、硫黄源、リン酸塩、および数種の微量ミネラルを添加した合成培地で増殖する。これは微生物が、それらの限られた化合物から、自身の増殖に必要な要素や各種生体構成成分をすべて構築することができる代謝系を兼ね備えているからである。しかし、すべての微生物が同様の代謝系を備えているわけではなく、一部の必須成分が合成できない場合もある。そのような場合には微生物は栄養要求性を示し、培地への特定成分（たとえばアミノ酸やビタミンなど）の添加が要求される。多種類の微生物を取り扱う場合や、よく解明されていない微生物を取り扱う場合は、栄養要求の多様性や不透明性のために、合成培地を用いて一様に取り扱うことは難しい。天然培地が日常のルーチンワークによく用いられる理由のひとつは、そのような異なる栄養要求性を一様に満たすのに、含まれている多様な成分が有効なためである。一方で、多様な成分のいくつかは、特定の微生物に対して生育阻害的に作用する場合があることも肝に銘じておかなければならない。

### LB培地、NB培地、およびSCD培地

天然培地と一言でいっても、その種類は非常に多様であり、医学細菌学分野、食品衛生学分野、農芸化学分野などの研究分野、また対象とする微生物種によって日常のルーチンワークで使用する培地は異なってくる。たとえば、医学細菌学分野や食品衛生学分野で使用するような血液培地を筆者らの研究分野（応用微生物）においてはあまり用いない。しかしながら、血液培地にしても、前述の3種類の培地にしても、構成成分の中軸をなす培地基材にペプトンとエキス類を用いるという点は共通している。ペプトンとエキス類のいずれか一方のみを加えた天然培地も少なからずあるが、両者を組み合わせて用いることで微生物がより良好な生育を示すことも多い。

LB培地、NB培地、SCD培地のうち、生物工学系の学生が研究室で頻繁に利用するのはLB培地ではなかろうか。LB培地は大腸菌の培養に適した培地であるが、一般細菌全般の培養にも広く用いられている。この培地の由来は最近話題の「細胞夜話」にも詳細に記載されて

\* 著者紹介 地方独立行政法人大阪市立工業研究所（研究員） E-mail: koma@omtri.or.jp

表1. 各種培地の材料組成 (g/l)

培地材料	原料	LB 培地 <sup>a</sup>	NB 培地 <sup>b</sup>	SCD 培地
ペプトン	獣肉	0	5	0
	ミルク カゼイン	10	0	17
	大豆	0	0	3
エキス	牛肉	0	3	0
	酵母	5	0	0
塩化ナトリウム	—	10	0	5
リン酸水素二カリウム	—	0	0	2.5
グルコース	—	0	0	2.5

<sup>a</sup>LB培地 (Miller) の組成を示した。<sup>b</sup>メーカーによって組成が異なる場合がある。

いるので、興味のある方はそちらを参照していただきたい。一方、NB培地やSCD培地は、おもに食品や医薬品の微生物管理などの分野において用いられている<sup>2,3)</sup>。この三者を取り上げた理由は、これらの培地が一般的な細菌の培養に用いられている点で共通するが、基材として用いられるペプトンとエキス類が異なっているためである。表1に三者の培地組成をまとめた。LB培地ではカゼインペプトンと酵母エキス、NB培地では獣肉ペプトンと牛肉エキス、SCD培地ではカゼインペプトンと大豆ペプトンが培地基材として用いられる。したがって、これらの三者の培地成分を知るためには、それぞれのペプトンとエキス類の成分について知る必要がある。

### ペプトン類

ペプトンとはタンパク質を酵素で消化したものの総称である。カザミノ酸のような酸で加水分解したものを含めることもある。おもに、ポリペプチド、ジペプチド、そしてアミノ酸を含んでいる。培地に添加する目的は窒素源、特にアミノ酸源とされるが、必ずしも精製タンパク質を原料とするわけではないため、実際は炭素源や、リン源、硫黄源、ミネラル源、ビタミン源なども兼ねている。しかし、ペプトン中に含まれるミネラルやビタミン、また含硫アミノ酸は限られており、ペプトンを培地に用いる際には、エキス類を添加したり、栄養要求性の特に高い菌株の場合には別途に必要な成分を添加したりすることが多い。

タンパク質を酵素で消化し低分子化するメリットは2つある。1つ目は、微生物による栄養素の取込みを促進させること、2つ目は、オートクレーブ滅菌時の熱によ

る凝集を回避できることである。このうち前者がより重要である。タンパク質自体は細胞膜を透過して菌体内に取り込まれないので、細胞外にプロテイナーゼ<sup>注)</sup>をあまり分泌しない大腸菌をはじめとする多くの微生物は、タンパク質をそのまま培地に添加しても利用することが困難である。一方、*Bacillus*属細菌のような細胞外にプロテイナーゼをよく分泌する微生物は、タンパク質を利用して生育することが可能である。ところが、そのための酵素生産には多少の時間がかかるため、培養における誘導期 (lag phase) が長くなってしまう。微生物は低分子であるアミノ酸を簡単に取り込むことができ、また比較的多くの微生物がペプチダーゼを分泌生産すると言われているので、酵素消化によりアミノ酸やペプチドにまで低分子化されたペプトンは多くの微生物が利用でき、また培養における誘導期の短縮を可能とする。

ペプトンの成分組成の差異を決定する要因は①原料、②消化酵素、③製造工程である。原料として代表的なものにはミルクカゼイン、獣肉、心筋、ゼラチン、そして大豆がある。原料が異なれば含まれるタンパク質のアミノ酸組成は大きく異なり、また含有する他の成分の種類・量も違ってくる。消化酵素としてはトリプシン、パンクレアチン (膵液中の酵素の混合物)、ペプシン、パパイ、細菌由来酵素 (*Bacillus subtilis* のプロテイナーゼなど) が代表的である。それらの選択は、コストの点もあろうが、おおむねタンパク質との相性 (消化性) の良し悪しによるところが大きい。製造工程の違いは、メーカーによって消化の時間や温度、粉末化時の熱処理などが異なるため、トリプトファン、システイン、ビタミン含量などに影響する。また製造工程の違いは、メーカーの異なる同種のペプトン粉末を水に溶解した時のpHにも表れているようである (エキス類に関しても同様である)。

したがって、使用するペプトンの種類によって得られる培養結果が大きく左右されることも多く、ペプトンの選択の際にはそれぞれの特徴を考慮しつつ慎重に検討する必要がある。また最近ではBSE問題の影響等もあり、目的によっては、原料も酵素も非動物由来のものを選択する必要がある場合もある。以下に代表的なペプトンの一般的な特徴を記載する<sup>4)</sup>。

①カゼインペプトン：安価である。トリプトファンに富む。含硫アミノ酸が少ない。トリプシンまたはパンク

注) ここではタンパク質を基質とする酵素をプロテイナーゼ、低分子のペプチドを基質とする酵素をペプチダーゼとし、ペプチド結合を加水分解する酵素の総称であるプロテアーゼと区別した。

レアチンで消化.

- ②獣肉ペプトン：トリプトファンに乏しい. 含硫アミノ酸が多い. ビタミンや発育因子が多い. ペプシンまたはパパインで消化.
- ③心筋ペプトン：獣肉ペプトンと同様だが, 発育促進効果が高い. 高価である.
- ④ゼラチンペプトン：シスチン, トリプトファンが少ない. 炭水化物をほとんど含まないため, 菌の過剰増殖を抑える.
- ⑤大豆ペプトン：炭水化物が多い. ビタミン (特にチアミン) が多い. エキスとして取り扱われている (後述). パパインで消化.

前述のとおり, ペプトンはよく窒素源 (アミノ酸源) として添加されているが, それではいったいどの程度のペプチドないしアミノ酸がペプトンに含まれているのであろうか? Difco 社 (現在はBD社と合併) のペプトンやエキス類の成分分析値の詳細がDifco マニュアルに記載されており<sup>5)</sup>, 本稿ではこれを用いて議論していく. 表2はDifco マニュアルのデータをまとめたものである. 総窒素量 (TN) は, ケルダール法<sup>2)</sup>により定量した数値であり, おもにペプチドとアミノ酸に由来すると考えられる. 大まかな計算ではあるが, ペプトンのTNがペプチドとアミノ酸に由来し, また平均的なタンパク質中の窒素含量を16%とすると, TNに窒素-タンパク質換算係数6.25を乗じることでペプトン中のペプチド・アミノ酸のおおよその総量を見積もることができる<sup>5,6)</sup>. そうすれば, Bacto Tryptone, Bacto Peptone, Bacto Soytone は, それぞれ約81, 97, 59%のペプチド・アミノ酸を含有することになる. なお, この中でBacto Soytone, すなわち大豆由来ペプトンは他のペプトンと異なり, 炭水化物やビタミン, ミネラルを豊富に含むのが特徴であり, TNが少ない. このため, このペプトンはエキスの用途に用いる場合が多く, 他のペプトンと併用して使用される. SCD培地が, エキス類を含まず, カゼインペプトンと大豆ペプトンから構成されているのはこのためである (表1).

ペプチド・アミノ酸含有量の観点からは獣肉ペプトン (Bacto Peptone) が優れていると捉えることができる. しかし実際はそれほど単純ではなく, 他の要素も重要である. たとえば, 培地に含まれる多種のペプチド・アミノ酸のうち, より低分子のペプチドやアミノ酸の含有量が高い方が微生物の栄養の取り込みに有利であろうことが想像できる. そこで, 表2に示されているアミノ態窒素量 (AN) の値が重要な意味合いを持つ. アミノ態窒素

表2. 各種ペプトンのおおよその成分組成 (%)

成分	Bacto Tryptone (ミルク カゼイン)	Bacto Peptone (獣肉)	Bacto Soytone (大豆)
炭水化物	7.7	6.9	24.0
総窒素量 (TN)	13.0	15.5	9.4
アミノ態窒素量 (AN)	5.2	3.1	3.1
無機物	6.7	4.2	10.8
ビタミン類	<1	<1	<1

は遊離状態のアミノ基の窒素のことであり, 遊離アミノ酸や低分子ペプチドが増えるにつれて高い値を示す. すなわち, 総窒素量に占めるアミノ態窒素量の割合 (AN/TN) は原料タンパク質の分解の程度を示す指標として捉えることができ, 値が高い場合には, より低分子化されたペプチドやアミノ酸成分の含有比率が高いことを意味する. 表2よりBacto Tryptone, Bacto Peptone, Bacto SoytoneのAN/TNは, それぞれ約0.40, 0.20, 0.33である. このことから, 3種類の中では, Bacto Tryptone がより低分子化されたペプチド・アミノ酸を含むペプトンであると推測される.

また, 構成アミノ酸の組成比も重要である. たとえばセリン, バリン, プロリンなどは菌に対して発育阻害作用を持つと言われている. 他にも, ペプトンが熱を受けた際に生成する酸化ペプトン (含硫アミノ酸の分解により生じるコロイド状硫黄と考えられている) は, 発育に有害であるとされている<sup>4)</sup>. たとえば, 獣肉ペプトンはカゼインペプトンよりも加熱による発育阻害の影響が大きく, これは含硫アミノ酸が多いためであると考えられている. 一方で, 獣肉ペプトンはビタミン類を多く含むため, エキス添加量が少なくても, 広範な微生物に対して高い発育支持力を有することが知られている. したがって, 市販の製品の中には, カゼインペプトンと獣肉ペプトンを混合した「混合ペプトン」と言われるものが存在する (コラム参照).

### エキス類

エキス類を培地に加える主たる目的は, 炭素・窒素源としてよりも, ビタミンなどの生育促進物質を培地に補うことである. 肉エキスは, 肉を水で浸出したものを (加熱して) 濃縮したものである. 肉エキスでは, 濃縮時に熱による成分の変性が起こっており, 高濃度で使用する と微生物の生育を阻害することがあるので, 通常0.3–0.5%程度の濃度で使用する. また, 欧米で肉エキスと

いえば牛肉エキスを指すが、国産品はかならずしもそうではない。牛肉の代替としてカツオを用いている。これは、鰹節製造時における廃液（煮汁）を利用したものであるが、一般細菌の培養においては牛肉エキスと比較して遜色がないとされている。一方、酵母エキスの材料はパン酵母ないしビール酵母であり、それらの熱水浸出液、自己融解物、または酵素消化物である。肉エキスよりも高い生育促進効果を示す場合が多いが、脂肪酸の含量が多く、これが生育阻害を生じる原因となることもまれにある。これらがどの程度のビタミン類を含んでいるのかを表3に示した。ペプトン類と比較して、両エキスがビタミン類を多く含んでいるのは一目瞭然である。表3には各種のペプトンとエキス類の無機物含量も併せて示した。マグネシウムは生体内で核酸の増幅酵素や修飾酵素などに必要とされ、培地に付加的に添加されることも多いが、ペプトン類よりもエキス類に多く含まれている。また、エキス類はリン酸やカリウムなども多く含んでいる。ペプトン類と比較すると、エキス類の方が万遍なく各種無機物を含んでいるようである。ペプトン類の中でもエキスの用途で用いることが多いBacto Soytoneは、エキス類と同様に各種無機物が豊富である。

### ペプトンとポリペプトン

ペプトンがタンパク質の酵素消化物の総称であることは先に述べた。ところで、ペプトンと似た用語にポリペプトンというものがあり、特に意識せずにペプトンと同様な意味で使用されていることもあるが、両者は本当に同じ意味なのだろうか。

ポリペプトンという用語が使用されるのには主に2つのケースがある。1つは、2種類以上のペプトンを混合した混合ペプトン、特にカゼインペプトンと獣肉ペプトンの混合物をポリペプトン (polypeptide) と称するケースである<sup>7)</sup>。BD社の Polypeptide Peptone (BBLブランド) という商品名のペプトンは、カゼインペプトンと獣肉ペプトンの等量混合物、すなわち混合ペプトンである。

一方、多くの方がご存知だと思うが、日本製薬株式会社からは末尾に「e」のないポリペプトン (Polypepton) が販売されている。この名称は商標登録されており、S, N, NP,...といったいくつかの種類が販売されているが、それらはすべて混合ペプトンではない。

よって、前者 (polypeptide) と後者 (Polypepton) は日本語で記載するとポリペプトンとなり同一であるが、区別して考える必要がある。

表3. ペプトン・エキス類の各種ビタミンおよび無機物類の含有量<sup>a)</sup>

ビタミン類 および 無機物類	ペプトン類			エキス類	
	Bacto Tryptone	Bacto Peptone	Bacto Soytone	Bacto Beef Extract	Bacto Yeast Extract
ビタミン類 (μg/g)					
Biotin	0.1	0.2	0.2	0.1	3.3
Choline chloride	350.0	2000.0	2200.0	1171.5	300.0
Cyanocobalamin	<0.1	<0.1	<0.1	0.5	<0.1
Folic acid	0.3	0.3	3.0	3.3	1.5
Inositol	1400.0	2400.0	2100.0	4113.2	1400.0
Nicotinic acid	97.8	21.9	19.1	774.7	597.9
4-Aminobenzoic acid	3.7	<0.5	9.0	20.0	763.0
Pantothenic acid	5.3	5.9	13.0	91.0	273.7
Pyridoxine	0.6	1.7	11.0	7.3	43.2
Riboflavin	<0.1	3.9	<0.1	0.4	116.5
Thiamine	0.4	<0.1	1.2	<0.1	529.9
Thymidine	93.4	413.0	113.2	1093.4	17.5
無機物類 (%)					
Calcium	0.013	0.008	0.055	0.068	0.013
Chloride	0.186	1.086	0.165	1.284	0.380
Iron	<0.001	0.004	0.008	<0.001	<0.001
Magnesium	0.017	0.007	0.161	0.239	0.075
Phosphate	2.669	0.445	0.820	5.458	3.270
Potassium	0.229	0.203	2.220	5.477	3.195
Sodium	2.631	1.759	3.404	2.315	1.490
Sulfate	0.241	0.244	2.334	0.629	0.091
Sulfur	0.740	0.410	1.660	0.707	0.634

<sup>a)</sup>Difco マニュアルより抜粋<sup>5)</sup>。

## バイオよもやま話

エキス類ではこれら以外にも、心臓浸出液（ハートインフュージョン）、麦芽エキス、ポテトエキス、トマトジュースといったものが有名である。心臓浸出液は細菌用の培地に使用され、肉エキスよりも生育促進効果が高いとされている。麦芽エキスやポテトエキスは炭水化物を多く含み、真菌用培地に常用される。トマトジュースは乳酸菌の培養の際などに生育促進物質として添加されることがある。

### その他

塩化ナトリウムは主として菌体内外の浸透圧を調整するために添加する。微生物の分裂においては、細胞質の増大と細胞壁の合成が重要であるが、培養の初期段階では、そのバランスが崩れて細胞壁の合成が不完全な状態で細胞分裂がおこることがしばしばある。その時にできるプロトプラストは低張液では容易に溶菌してしまうが、塩化ナトリウムを添加することで防ぐことができる。

グルコースは多くの微生物が利用できる単糖であり、速やかに代謝されるために、微生物の生育を促進させる。しかしながら、グルコースの代謝に伴って培地中に酸が蓄積するため、pHが低下し、微生物にダメージを与える場合がある。産生される酸を中和するために、培地に緩衝剤としてリン酸水素二カリウムなどを併せて加える場合がある。SCD培地の場合はこれに相当する（表1）。

### 培地中のペプチド・アミノ酸

先にペプトン中のペプチド・アミノ酸について議論したが、それでは実際の培地はどの程度のペプチド・アミノ酸を含むのであろうか。ペプトンであるBacto Tryptone, Bacto Peptone, Bacto Soytoneが、それぞれ約81, 97, 59%のペプチド・アミノ酸を含むことは先に述べた。ペプトン以外にも、LB培地に添加する酵母エキスや、NB培地に添加する肉エキスにもペプチドやアミノ酸は含まれている。これらについても同様に計算すると、酵母エキスには68%のペプチド・アミノ酸が含まれ、肉エキスには70%のペプチド・アミノ酸が含まれる。これらの数値から、表1の培地組成に基づいて、各培地に含まれているペプチド・アミノ酸量を計算する

と、LB培地では1.2%、NB培地では0.7%、SCD培地では1.6%と見積もることができる。すなわち、3者の培地の中ではSCD培地が最も多くペプチド・アミノ酸を含んだ培地であり、その含有量はNB培地の2.3倍にも達すると推測できる。

また、培地のAN/TNについても先と同様に計算してみる。酵母エキスと肉エキスのAN/TNがそれぞれ0.55と0.34であるから、表1の培地組成に基づいて、LB培地、NB培地、SCD培地のAN/TNを計算すると、それぞれ0.45, 0.25, 0.39となる。このデータは、LB培地は他の培地と比較して、より低分子化されたペプチド・アミノ酸を含む培地であることを示唆する。

なお、本稿ではDifcoマニュアルに記載のデータにより議論したが、最新のDifco & BBLマニュアル第2版に記載されているデータとはアミノ酸成分量の若干の違いが見られる。また、ビタミン類の含有量など一部の成分については分析値の記載がなくなっている。

### おわりに

ルーチンワークで使用する培地の成分（おもにペプトンとエキス類）について簡単に概説した。多少なりとも培地成分について知識を持っておくことは、日常のルーチンワーク時のトラブルに対処する際に役立つばかりでなく、菌株の分離などを行う場合にも、新たなアイデアを導く手助けになるものと考えている。各メーカーともに製造法や成分の詳細が不明であることが多く、培地成分すべてを知ることは不可能であるが、理解の一助となれば幸いである。

### 文 献

- 1) 藤元宏和：細胞夜話, 星雲社 (2008).
- 2) 第十五改正日本薬局方 (2006).
- 3) 島田俊雄：食品衛生検査指針 微生物編, p.48, 日本食品衛生協会 (2004).
- 4) 坂崎利一ら：新細菌培地学講座, 近代出版 (1986).
- 5) Difco Manual 11 th Edition (1998).
- 6) 堤 忠一：食品分析法, p.87, 光琳 (1992).
- 7) 山崎真狩ら：新生物化学実験講座17 微生物実験法, p.15, 東京化学同人 (1992).