The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

[J. Ferment. Technol., Vol. 54, No. 5, p. 302～307, 1976]

Polypeptone の *Pediococcus halophilus* に対する増殖促進性*

竹 内 徳 男

愛知県食品工業試験所

Growth Factors for *Pediococcus halophilus* in Polypeptone

Tokuo Takeuchi

Food Research Institute, Aichi Prefecture, Shinpukuji-cho
Nishi-ku, Nagoya

The growth promotant in Polypepton (Daigo Eiyo) for *Pc. halophilus* was composed of two substances which were tentatively named B-fr. and P-fr. and which differed in their mode of stimulation. B-fr. which was the basic substance eluted from the column of Amberlite IRA-402 (OH^-) and formed a precipitate with the ammonium reineckate slightly stimulated the growth of *Pc. halophilus* in the synthetic medium. However, B-fr. did not give maximal growth of *Pc. halophilus* even in the synthetic medium containing betaine. Behavior of B-fr. on the bioautogram from paper partition chromatography and paper electrophoresis agreed well with that of betaine. However, betaine content of B-fr. seemed to be very small, judged from the degree of growth promotion of *Pc. halophilus*.

In the synthetic medium, P-fr. (peptidic substance) also slightly promoted growth of *Pc. halophilus*. However, when P-fr. was added to the synthetic medium containing betaine, a significant reduction of lag time and increase of cell growth was observed.

From the above results, it is possible to conclude that the stimulatory effect of Polypepton on *Pc. halophilus* up to half-maximal growth in the synthetic medium resulted from the cooperative action of P-fr. and a trace of betaine.

Based on the fact that the growth promotion of *Pc. halophilus* by P-fr. obtained from soybean *miso* was better than that of Polypepton, it was considered that the peptides resulting from the proteolytic characteristics of *Aspergillus oryzae* play an important role in fermentation of *miso* and soysauce.

緒 言

Peptone は1880年 Naegeli によって細菌用培地として用いられて以来，通常の人工培地の窒素源あるいは peptide を生育促進的，必須的に要求する乳酸菌[1,2]の栄養源として常用されている．また peptone には *Lactobacillus saké* の増殖促進性 peptide である phenylalanyl-(Val, Pro, Thr, Gly, Lys, Leu (または Ile))[3]や火落菌の生育促進性 peptide, valyl-(Glu, Met)-valine[4], alanyl-(Ala, Glu)-alanine[4] などの存在が報告されている．

坂口によれば，polypeptone に *Pc. halophilus* の増殖を促進する P-factor[5,6] (peptidic substance) が存在し，1) 合成培地への単独補足で半生育の状態まで増殖を促進し，2) betaine との共存で完全増殖させ，かつ食

* みそ，しょう油の Peptide に関する研究（第16報）
Studies on the Peptides in *Miso* and Soy-sauce (XVI)

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

塩15%以上の合成培地で *Pc. halophilus* を増殖させる作用を有するとしている．しかし，豆みそから得た低分子 peptide 区分 (P-fr.)[7~9] の *Pc. halophilus* に対する増殖促進性は合成培地への1%濃度の単独補足では無効で，betaine の共存下でのみ有効であった．この点，*Pc. halophilus* に対する豆みその peptide と polypeptone の peptide の作用性の差異を明らかにする目的で，豆みその P-fr. について行った方法と全く同一の技法で実験を行なった．

その結果，*Pc. halophilus* の増殖に与える polypeptone 中の peptide の作用は本来単独では非常に弱く，betaine の共存が必須であり，*Pc. halophilus* を半生育させる polypeptone の作用は混在する微量の betaine と peptide との協同的な作用によることを明らかにした．

実 験 方 法

試料 Polypeptone として大五栄養化学製 Polypepton (Lot no. W070) を用いた．

合成培地，増殖度測定法，増殖促進物質の分画法 既報[7] に準じたが，促進物質分画のための分子篩法は既報[10] によった．また被検液の補足試験濃度は原則的に1% Polypepton 相当量とした．

バイオオートグラフィー Polypepton の場合は既報[7] と同様な技法で行い，B-fr. も既報[8] の方法に準じた．

増殖曲線 既報[8] の方法によった．

アミノ酸の補足試験 合成培地へのアミノ酸補足量は Polypepton の1%相当量とし，Polypepton のアミノ酸含量は大五栄養化学 KK 学術課の資料によった．

実 験 結 果

Polypepton の分画区分の増殖促進性 Polypepton を既報[7] と同様な方法で分画した区分の *Pc. halophilus* に対する増殖促進性を Fig. 1 に示した．

Polypepton は合成培地へ1%量の補足によって *Pc. halophilus* の増殖を顕著に促進した．その有効成分は熱無水アルコールに比較的によく溶解し，Amberlite IR-4B (Cl^-) によるグループ分画では中，塩基性区分の効果が良好であった．さらに Dowex 50-X16, X12, X4 の3種の multi-column で分離した分子篩区分の増殖促進性は低分子区分の効果が高い傾向にあるが，豆みその分子篩区分の結果[8] と幾分異なり，高分子区分 (Effluent) にも明らかな増殖促進性が認められた．しかし，Fig. 1 の分画区分の示す増殖促進度は各区分の重量比に比例的であって，これらの方法では有効成分の満足すべき分画はできなかった．

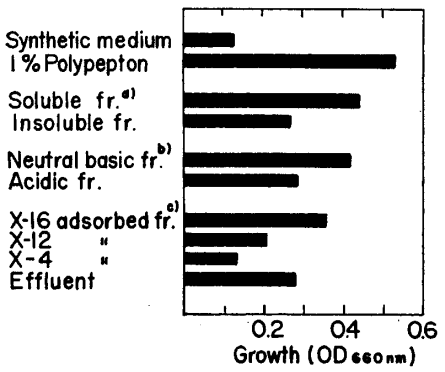

Fig. 1. Effect of supplement of several fractions on growth of *Pc. halophilus*.
Incubation was done in the synthetic medium at 30°C for 7 days.
a). Extraction with hot ethyl alcohol.
b). Separation on a column of Amberlite IR-4B (Cl^- form). See the footnote of Fig. 7 in the previous paper.[7]
c). Molecular sieve fractions on a multi-column of Dowex 50-X16, X12 and X4.

Polypepton のバイオオートグラム 1% Polypepton の補足と同濃度となるような条件で行ったバイオオートグラムを Fig. 2 に示す．

図のように緩衝液の pH を変えても有効物質の移動は認められず，増殖促進物質は中性アミノ酸と類似の

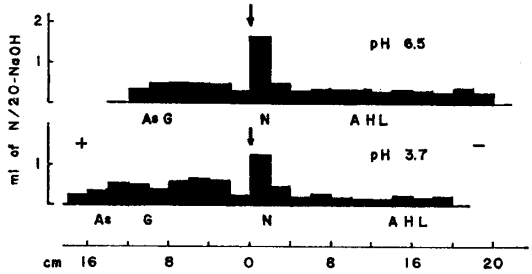

Fig. 2. Bioautograms of Polypepton from high voltage paper electrophoresis.
Paper electrophoresis was carried out under the follow conditions. pH 6.5, pyridine : AcOH : H_2O = 10.0 : 0.4 : 90, 3 KV/40 cm for 30 min. pH 3.7, Pyridine : AcOH : H_2O = 1 : 0.4 : 289, 2 KV/20 cm for 60 min.
Incubation was done in the synthetic medium at 30°C for 7 days. The abbreviations As, G, N, A, H and L represent aspartic acid, glutamic acid, neutral amino acid, arginine, histidine and lysine respectively, and their migratory position on the chromatogram. The arrow shows the position at which sample was charged.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 1. Effect of amino acids in Polypepton on growth of *Pc. halophilus*.

Amino acid	Addition mg/100 ml	OD
Alanine	8	0.153
Histidine HCl	17	0.149
Threonine	13	0.170
Proline	7	0.195
Valine	24	0.177
Serine	13	0.185
Glycine	2	0.173
Isoleucine Leucine	73	0.179
Methionine	15	0.160
Phenylalanine	34	0.183
Tryptophane	11	0.165
Arginine HCl	38	0.171
Lysine HCl	72	0.183
Tyrosine	12	0.170
Cystine	3	0.180
Aspartic acid Glutamic acid	38	0.176
Mixture of above amino acids	—	0.191
1% Polypepton	—	0.575
Synthetic medium	—	0.186

Figures show the cell growth as optical density at 660 nm after incubation at 30°C for 7 days. All amino acids tested were L form, and were added to synthetic medium in concentration equivalent to 1% Polypepton.

挙動を示した．このバイオオートグラムは豆みそ分子篩区分の結果[7]と一致していたが，Polypepton 中の有効物質の示す作用は弱い．

また1%の Polypepton 中に存在する遊離アミノ酸と等量のアミノ酸を合成培地に添加して，その促進性を試験したが，その効果は全く認められなかった (Table 1)．

Polypepton に存在する2種の増殖促進物質 Polypepton 水溶液を Amberlite IRA-402 (OH^-) カラムに吸着させ，水で流出する区分をフラクション分画した．

Fig. 3 のように，2個のニンヒドリン陽性のピークが得られ，いずれも ammonium reineckate との沈澱反応[11]を示した．最初の小ピークは betaine の流出位置と一致し，後の大ピークはアルギニンである．流出区分を図のように，L, M, N の3区分に分画し，吸着区分は2N-酢酸，ついで氷酢酸で溶離して，それぞれ O, P の2区分を得た．

これらの5区分の *Pc. halophilus* の増殖に与える効果を Fig. 4 に示した．図のように合成培地では L, M (以下 L, M の混合物を B-fr. と仮称する)，O の3区分に弱い増殖促進効果が認められた．Betaine (60 μg/ml) 培地では O 区分（以下 P-fr. と仮称する）にのみ明瞭な促進効果が認められ，P-fr. の betaine との相乗的な増殖促進効果も観察された．

さらに合成培地，betaine (80 μg/ml) 培地で示す B-fr., P-fr. の作用をそれぞれの増殖曲線から比較した．Fig. 5 のように，合成培地で B-fr., P-fr. は若干ではあるが *Pc. halophilus* の増殖を促進した．この点，Polypepton の P-fr. は豆みその P-fr. の作用[8]とは幾分異なっていた．Betaine 培地での P-fr. の効果は顕著で，増殖の誘導期を短縮しかつ優れた増殖度を示した．しかし，その程度は betaine 共存下で示す豆みその P-fr. の作用[8]より弱いものであった．また B-fr. も betaine

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

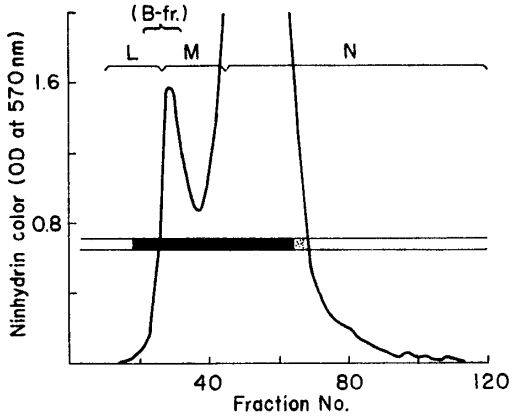

Fig. 3. Chromatogram of basic fraction of Polypepton on a column of Amberlite IRA-402.

Chromatography was carried out in the same manner as described in the footnote of Fig. 9 in the previous paper.[7] Fractions L, M and N were separated for growth test on *Pc. halophilus* and the mixture of L and M was tentatively named B-fr.

——: Absorbance of ninhydrin color, ■: clear precipitate, ▨: slight precipitate, □: no precipitate with ammonium reineckate in test for betaine-like substance

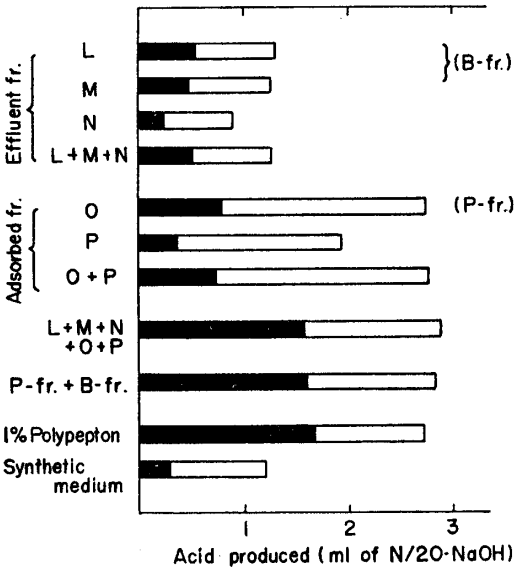

Fig. 4. Presence of two growth-promoting substances in Polypepton.

L, M and N were shown in Fig. 3. Fractions O, P were adsorbed on Amberlite IRA-402 (OH^-) resin and obtained by elution from the column. O was obtained by elution with 2N acetic acid and P was continuously eluted with glacial acetic acid. O was tentatively named P-fr. Incubation was done in the synthetic medium (■) and betaine 60 μg/ml medium (□) at 30°C for 7 days.

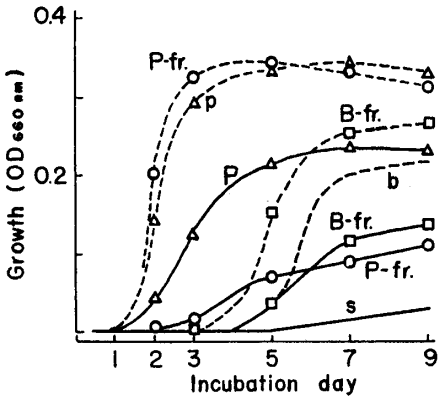

Fig. 5. Growth curves of *Pc. halophilus* in the medium supplemented with Polypepton and its subfractions (B-fr., P-fr.).

Growth test was done at 30°C with concentration of 1% equivalent of Polypepton. Solid line: synthetic medium, dashed line: betaine 80 μg/ml medium. P: Polypepton, b: betaine medium, s: synthetic medium.

培地で，誘導期の短縮あるいは増殖度も高めたが，その効果はいずれも弱いものであった．

Polypepton の B-fr. について B-fr. は Amberlite IRA-402 (OH^-) カラムからの流出位置，ammonium reineckate との沈澱反応ならびに *Pc. halophilus* の増殖に与える作用性など全て betaine と一致していた．本項では，さらに B-fr. がペーパークロマトグラフィー(以下 PPC と略記する)，高圧沪紙電気泳動(以下 PE と略記する) 的に betaine と一致することを示した．

Fig. 6 のように，PPC では R_f 0.25 付近，PE で原点付近（若干陰極側に電気浸透する）に *Pc. halophilus* の増殖促進性があり，それぞれの位置は同時に行った betaine のバイオオートグラム[8] と全く一致していた．ただし Polypepton 中の betaine は微量であり，Dragendorff 試薬[12] による呈色反応は認められなかった．

結論的に，合成培地で *Pc. halophilus* の増殖を半生育まで促進する Polypepton の作用は微量の betaine と P-fr. の協同的な作用によるもので，本来 peptide の単独補足による *Pc. halophilus* の増殖促進性は弱いものであった．しかし Polypepton の P-fr. は合成培地への単独補足で *Pc. halophilus* の増殖を微弱ながら促進し，かつ比較的に高含量な polypepton の高分子 peptide 区分 (Effluent)[13] にも微弱な促進性があるなど，豆みその P-fr. の作用とは幾分異なっていた．ともあれ，両 P-fr. の betaine 共存下で示す増殖促進性は豆みそ

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

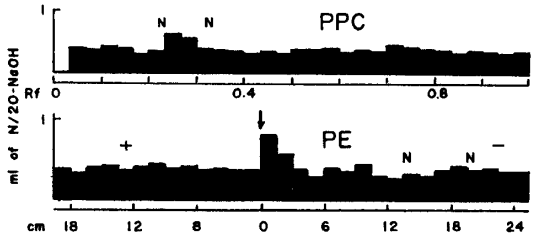

Fig. 6. Bioautograms of B-fr. obtained from Polypepton by paper partition chromatography and the high voltage paper electrophoresis.

PPC was carried out with BuOH: AcOH : H_2O = 4 : 1 : 5 as the solvent by the descending technique. PE was done with pyridine: AcOH : H_2O = 10 : 0.4 : 90 (pH 6.5) as the electrolite at 4 KV/40 cm for 35 min.

N represents the position of the spot revealed with ninhydrin. The arrow shows the position at which sample was charged. Incubation was done in the synthetic medium at 30°C for 7 days.

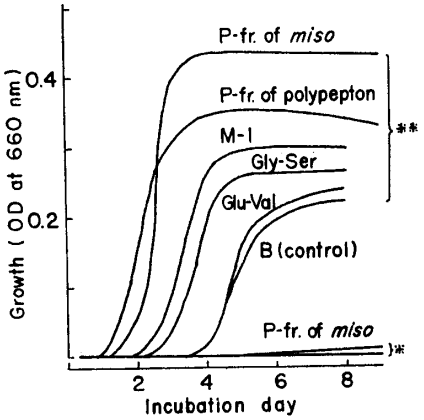

Fig. 7. Comparison of the growth promotion of soybean *miso*, Polypepton and dipeptides on *Pc. halophilus*.

Results from previous papers[8,14] are also summarized in this figure. Gworth curves of both P-fr. were determined at 1% concentration, and dipeptides were tested at 10 mg percent.

M-1: Mixture of 10 mg % of each of 7 peptides (Ala-Asp, Ala-Val, Gly-Ser, Glu-Ala, Glu-Gly, Glu-Val and Ser-Gly).

* Synthetic medium, ** Synthetic medium containing betaine (30 μg/ml).

が優れ，*Pc. halophilus* の培養には豆みその peptide の補足が有効である．この差異は Polypepton の peptide が比較的に高分子[13]であること，および増殖促進的に働く peptide の形態（概して hydrophilic な peptide が有効である）[14]の差異あるいはその種類が少ないことなどに起因していると考えられる．

考　　察

Pc. halophilus の増殖に対して P-factor の給源として取扱われている Polypepton の作用は豆みその場合と同様，P-fr. と微量な betaine による協同的な効果によるものであった．しかし両 P-fr. の betaine 共存下での促進性は豆みそが優れ，本菌の培養には豆みその peptide の補足がはるかに有効である．また前報[9]で，*Pc. halophilus* に対する豆みその P-fr. の増殖促進性は単一な peptide の示す growth factor 的な作用ではなく，微弱な促進作用を示す多種な主として低分子 peptide の協同的な効果によることを明らかにした．

これらの peptide の示す *Pc. halophilus* に対する増殖促進の関係を Fig. 7 に総括した．

図のように，合成培地に betaine の補足によって，本菌の増殖がみられ，豆みそに存在する peptide[15] (α-L-glutamyl-L-valine, glycyl-L-serine) の補足によって増殖はさらに高まるが，本菌の増殖に微弱な促進作用を示す 7 種の peptide 混合物 (M-1)[14] を補足した場合はより一層顕著な効果を示す．多種な peptide で構成される豆みその P-fr. は合成培地では全く無効であるが，betaine の共存下で誘導期を短縮し最高の増殖を示し，Polypepton の P-fr. の作用よりはるかに優れた効果を示す．

このような豆みそ peptide の優れた増殖促進性は Polypepton よりも本来促進的に作用する低分子 peptide の含量が高く，かつ恐らくは麹菌の蛋白分解作用によって生成する peptide には増殖を阻害する peptide[14] はほとんどなく，促進的に働く多種な peptide が集積しているためと考えられる．この点，*Pc. halophilus* の培養に Polypepton，酵母エキスの他にみその浸出液の補足が有効であるとの事実[16]を裏付け得る．これらの peptide は麹菌の示す all or none reaction system による蛋白分解で麹の段階[17]あるいは仕込の初期[18]に多量生成し，*Pc. halophilus* の増殖を促し，酵母 (*Saccharomyces rouxii*) による醱酵へと導くことから，みそ，しょう油の香味生成に大きく寄与しているといえる．

要　　約

Polypepton 中の *Pc. halophilus* に対する増殖促進物質は作用性の異なった 2 種の因子 (B-fr., P-fr.) から構成されていた．B-fr. は塩基性物質で，Amberlite IRA-

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

402 (OH^-) カラムからの流出位置, ammonium reineckate による沈澱反応, *Pc. halophilus* の増殖に対する作用性, ペーパークロマトグラフィーならびに電気泳動における挙動など, 全てが betaine と一致していた. P-fr. は合成培地での促進性は弱く, betaine の共存下で優れた増殖促進作用を示した. このことから, 合成培地で *Pc. halophilus* を半生育の程度に増殖を促進する Polypepton の作用は微量の betaine と P-fr. の協同的な効果によると結論した.

また, betaine 共存下での豆みその P-fr. の増殖促進性が Polypepton のそれより優れているという事実を基に, みそ, しょう油醸造における peptide の香味的役割についても考察した.

終わりに, 本研究について御懇篤なる御指導を賜わりました北海道大学農学部教授坂村貞雄先生, 高尾彰一先生, 伊沢正夫先生に衷心より御礼申し上げます. また終始, 御指導と御誘掖をいただきました恩師岐阜大学農学部友枝幹夫教授ならびに当所の後藤富士雄所長好井久雄発酵食品部長に深謝します.

文　　献

1) 児玉：北原編著　乳酸菌の研究, p. 253, 東京大学出版会 (1969).
2) 百瀬, 中垣, 秋山, 野白：醸協, **68**, 691 (1973).
3) 大林, 北原：農化, **33**, 832 (1959).
4) 百瀬, 森永, 秋山, 野白：日本醗酵工学会大会講演要旨集, p. 16 (1972), 醸協, **69**, 59 (1974).
5) Sakaguchi, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan,* **22,** 353 (1958).
6) Sakaguchi, K.: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan,* **23,** 443 (1959).
7) 竹内, 好井：醗工, **51**, 170 (1973).
8) 竹内：醗工, **53**, 1 (1975).
9) 竹内：醗工, **54**, 143 (1976).
10) 竹内, 細川, 吉田：醗工, **50**, 21 (1972).
11) Focht, R. L., Schmidt, F.H.: *Agr. Food Chem.,* **4,** 546 (1956).
12) 梅津：醗工, **39**, 213 (1961).
13) 竹内, 加藤, 好井：醗工, **40**, 375 (1962).
14) 竹内：醗工, **54**, 150 (1976).
15) Takeuchi, T.: *J. Ferment. Technol.,* **52,** 256 (1974).
16) 好井, 細川：醗工, **42**, 279 (1964), **43**, 457, 465 (1965).
17) 竹内, 好井：醗工, **45**, 29 (1967).
18) 竹内, 好井：醗工, **44**, 934 (1966).

(昭51. 1. 7受付)

訂正

前報[14] Fig. 1 の脚註, Asp-Asp は誤植で Ala-Asp と訂正する.

NII-Electronic Library Service