

Ⅱ. 乳酸菌とビフィズス菌の糖代謝と発酵



信州大学名誉教授 細野 明義

はじめに

人間は長年の知恵で食品中の悪害微生物をうまく制御してきました(図1)。制御の方法として、①砂糖や塩を沢山加えて浸透圧を高める ②窒素置換や脱気を行う ③抗菌性物質を加える ④魚の干物のように水分を除去する ⑤酸やアルカリを入れ、pHを変える ⑥低温や高温(殺菌や滅菌)といった温度管理を行う、などの方法を採用してきました。更に、乳酸菌のように有益な微生物を積極的に増殖させることによって悪害微生物の増殖を制御する“発酵”という方法があります。今回は、“発酵”の生化学的意味について説明すると共に乳酸菌とビフィズス菌を中心に糖代謝について説明したいと思います。

(1) 代謝とは

代謝とは、生命の維持のために生物が行う一連の営みで、外界から取り入れた無機物や有機化合物を素材として行う分解や合成の化学反応のことをいいます。代謝は大きく異化と同化の二つに区分されます。一般に栄養分は菌体内で多くの酵素の作用によって分解作用を受けますが、こ

のことを異化作用といいます。その際、生物学的酸化が行われ、分解産物が形成されると同時にエネルギーが生じます。分解物の一部は生じたエネルギーを利用して菌体の諸成分に再合成されます。その過程を同化作用といいます(図2)。同化の過程は生合成とも呼ばれ、同化により糖質、脂質、アミノ酸、ヌクレオチドなどの生体構成物質が作られ、能動輸送や生命を営むための運動がなされます。

なお、ここでは代謝を異化と同化の二つに分けて説明しましたが、両者は互いに密接に関係していて糖質から脂質を作ることもできるし、アミノ酸から糖質をつくることもでき、画一的なものではないことを付記しておきます。

(2) 酵素と補酵素

代謝は生体触媒である酵素の作用によって行われます。酵素は生体の様々な化学反応において触媒的な機能を果たすタンパク質です。酵素の中には非タンパク質体である補酵素(コエンザイム)と結合して機能を発揮するものがあります。この場合、補酵素を必要とする酵素のことをアポ酵素といい、酵素と結合したものをホロ酵素と呼んで

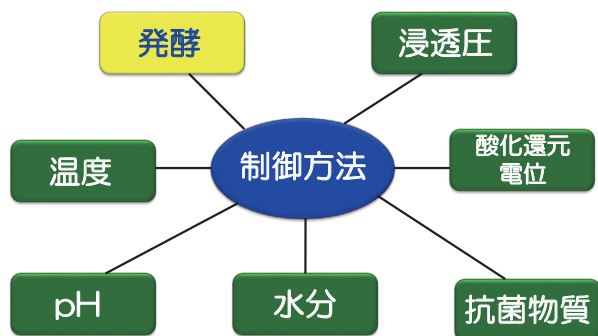


図1 食品中の悪害微生物の主な制御方法

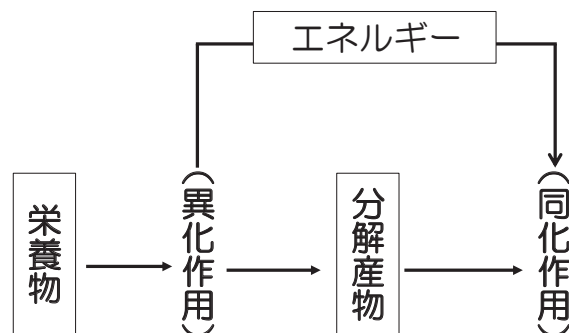
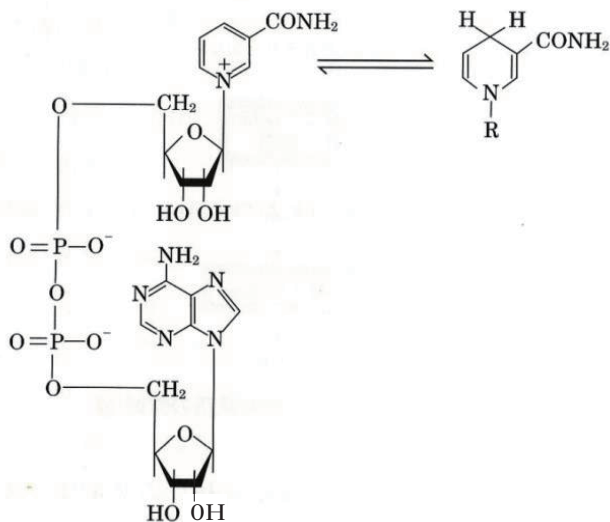


図2 代謝の概念

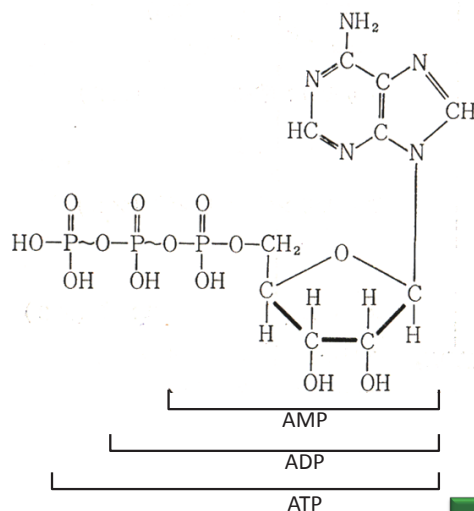


NAD: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

図3 NADの化学構造式

います。補酵素はアポ酵素と解離しうる状態で結合していますが、固く結合して複合タンパク質となっている場合は補欠分子族と呼びます。ビタミンや金属イオンが補欠分子族となる場合がありますが、乳酸菌とビフィズス菌のグルコース代謝を理解する上では直接関係がないので、ここではこれ以上触れません。

図3は、代表的な補酵素であるNAD（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）の化学構造式です。一般的にこの補酵素は脱水素酵素（デヒドロゲナーゼ）の補酵素として機能しています。酸化型 NAD^+ および還元型 NADH の2つの状態を有しています。



(3) エネルギー通貨としてのATP

それではエネルギーとは何かについて説明したいと思います。上述したように代謝の過程での異化作用によってエネルギーが生まれます。そのエネルギーはアデノシンと呼ばれる化学物質によって蓄積されます。アデノシンはアデニンとリボースからなるヌクレオシドの一つで、代謝で生まれたエネルギーを輸送する重要な役割を担っています。

つまり、アデノシンはリン酸と結合（リン酸化）することにより代謝過程で生じたエネルギーを一時的に貯えるのです。リン酸を3分子結合した場合をアデノシン三リン酸といい、ATPと呼んでいます。ATPはリン酸を1分子離してアデノシン二リン酸（ADP）になりますがそのとき高いエネルギーを放出します。放出されたエネルギーは物質の代謝や合成に重要な役割を果たすことになります（図4）。まさにATPはエネルギー通貨のような役割を果たしているのです。

(4) ATPの産生のための経路

グルコースは水と二酸化炭素からなる単純な分子であり、バイオマスの70%を占め、天然に存在する有機物の中で最も大量に存在し、かつ化学的に安定であることから、多くの生物にとって糖代謝の出発物質として利用することは有利です。生物は自然界にもっとも豊富に存在する糖質で

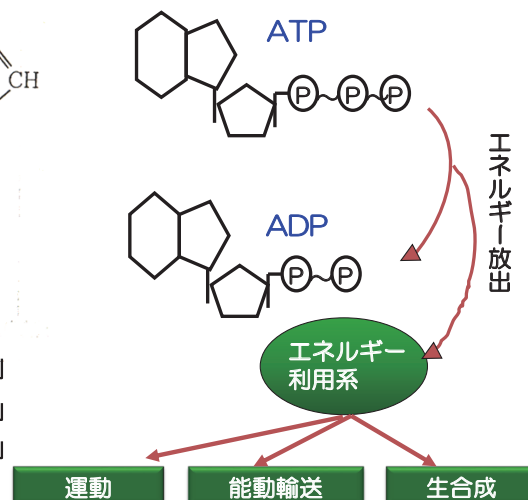


図4 ATP（アデノシン三リン酸）の化学構造とエネルギーの放出

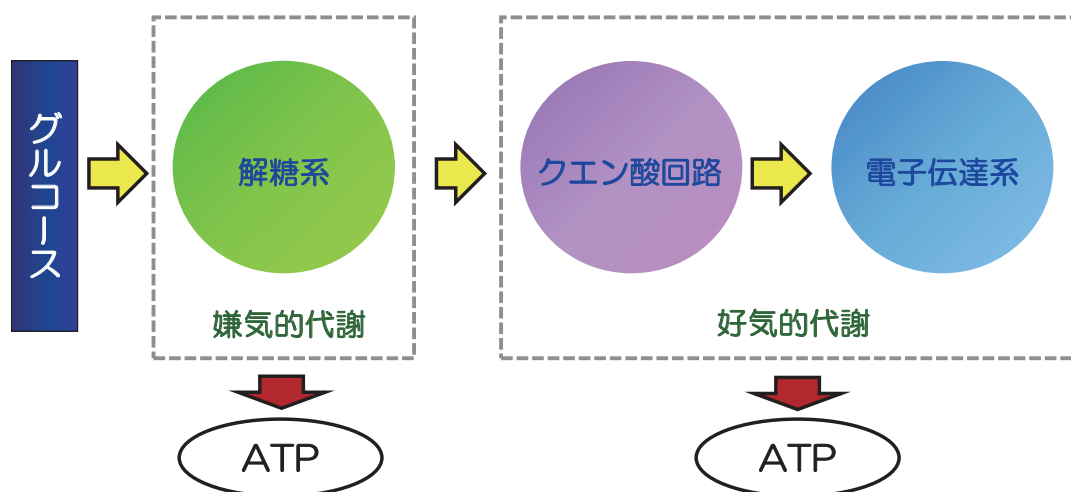


図5 糖からATPが生み出される経路

あるグルコースを分解して、エネルギー通貨ともいべきATPを生成するわけです。その生成の様式は生物によって異なり、多く作れるものと、僅かしか作れないものがあります。

グルコースを分解してATPを作り出す経路には、解糖系、クエン酸回路それに電子伝達系の三つの経路があります(図5)。解糖系と呼ばれる経路はほとんど全ての生物がもっており、もっとも原始的な代謝系とされています。嫌気状態(無酸素状態)でも起こりうる代謝系の代表的なものです。乳酸菌やビフィズス菌は解糖系しかもっていないため、後述するように僅かの量のATPを産生する能力しかありません。それに対し真核細胞をもち好気性微生物である酵母や黴の一部は解糖系の他にクエン酸回路と呼ばれる経路を、さらに人間などでは解糖系、クエン酸回路、電子伝達系の経路を全部もっているため多量のATPを産生させることが可能なのです。つまり、後述するように解糖系しかもたないホモ型乳酸発酵を行う乳酸菌では1モルのグルコースから2モルのATPしか生み出すことができませんが、解糖系の他にクエン酸回路と電子伝達系をもった生物では1モルのグルコースから最大38モルのATPを生み出すことが可能なのです。

表1 主な乳酸菌とビフィズス菌の発酵形式

ホモ型乳酸発酵	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Vagococcus</i> , <i>Enterococcus</i>
ヘテロ型乳酸発酵	<i>Leuconostoc</i> , <i>Bifidobacterium</i>

(5) 乳酸菌とビフィズス菌の乳酸発酵形式

表1に示したように乳酸菌の中にはグルコースからほぼ100%に近い収率で乳酸を生成するホモ型乳酸発酵を行う菌種と、乳酸の他にエタノールやCO₂を生成するヘテロ型乳酸発酵を行う菌種があります。

なお、発酵乳、乳酸菌飲料の製造で重要な *Lactobacillus* 属にはホモ型発酵を行う菌種とヘテロ型発酵を行う菌種、更には培養環境によってホモ型発酵になったりヘテロ型発酵になり得る通性型発酵を行う菌種があります(表2)。

(6) グルコースから乳酸に至る発酵経路

ホモ型乳酸発酵の発酵経路はエムデン・マイヤーホフ・パルナス経路(EMP経路)と呼ばれる解糖のための嫌氣的分解経路です(図6)。ヘテロ型乳酸発酵には菌種によって様々な経路がありますが、代表的なものはヘキソースリン酸経路(HMP経路)と呼ばれるもので、図7にその経路を

表2 *Lactobacillus* 属乳酸菌の発酵形式

偏性ホモ型乳酸発酵	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. johnsonii</i>
通性ヘテロ型乳酸発酵	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
偏性ヘテロ型乳酸発酵	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. reuteri</i>

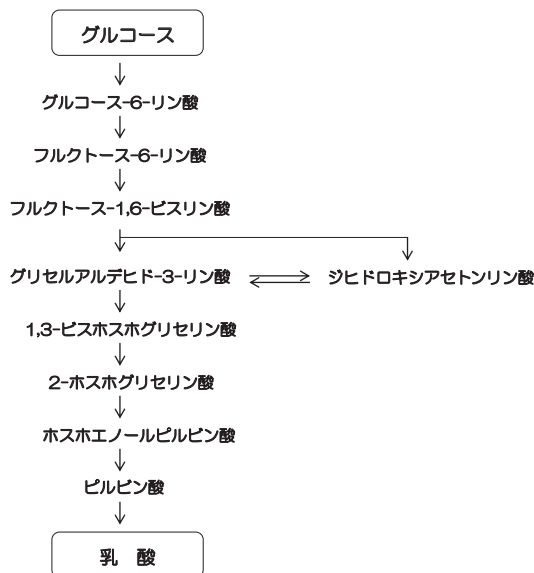


図6 ホモ型乳酸発酵(EMP経路)

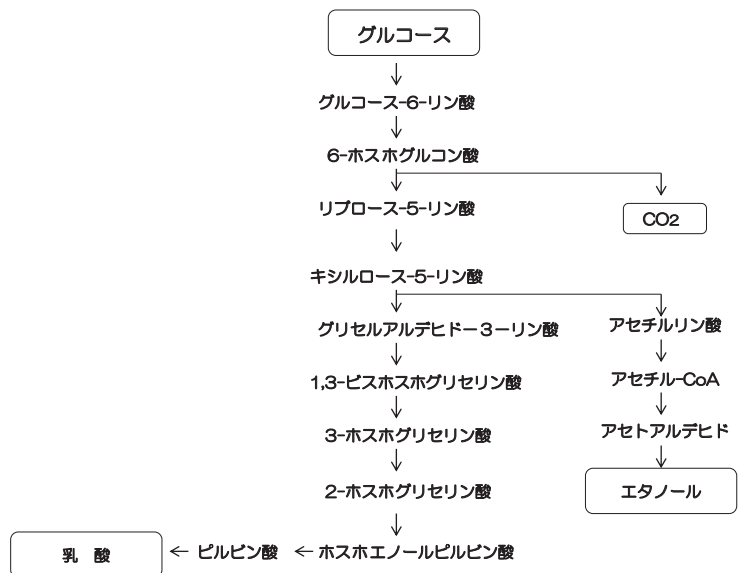


図7 ヘテロ型乳酸発酵(HMP経路)

示しました。HMP経路では通常グルコースから乳酸の他にエタノールとCO₂が生成されます。その他にアセチルリン酸から酢酸が生成される場合もあります。HMP経路とEMP経路の大きく異なる点はHMP経路では好氣的にピルビン酸が生成される点です。

図8に示したように、各発酵型式で生成されるATP(エネルギー)量は、ホモ型乳酸発酵を行う乳酸菌では1モルのグルコースから2モルのATPが、ヘテロ乳酸発酵を行う乳酸菌では1モルのグルコースから1モルのATPが生成されます。いずれも生成されるATP量は僅少であることがわかります。

一方、ビフィズス菌においては、ビフィズス菌はEMP経路やHMP経路をもたず、グルコースから乳酸や酢酸に至る経路はビフィズム経路(図9)と呼ばれるものでヘテロ型の嫌氣的な経路です。この経路により、グルコース2モルから乳酸2モルと酢酸3モルが生成され、またATPはグルコース

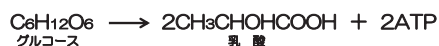
2モル当たり5モル生成されます(図8)。

以上、乳酸菌とビフィズス菌によってグルコースが分解されて乳酸に至る経路について説明してきましたが、乳酸菌もビフィズス菌もこれらの経路をもつことによってエネルギー伝達物質であるATPを獲得すると共に、次に説明するようにNADHからNAD⁺を再生させて代謝が止まらないような仕組みが整っているのです。

(7) 乳酸菌やビフィズス菌はなぜ乳酸発酵を行うのか

さて、いよいよ乳酸菌やビフィズス菌がなぜ乳酸発酵を行うかについて説明しますが、説明が複雑にならないようにするために、以下ホモ型乳酸

ホモ型乳酸発酵 (EMP経路)



ヘテロ型乳酸発酵 (HMP経路)



ヘテロ型乳酸発酵 (ビフィズム経路)



図8 乳酸菌の発酵型式および生成ATP(エネルギー)量

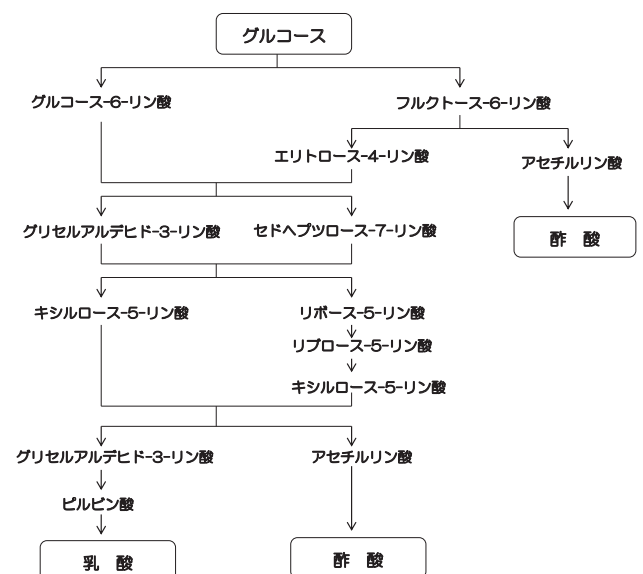


図9 ビフィズム経路

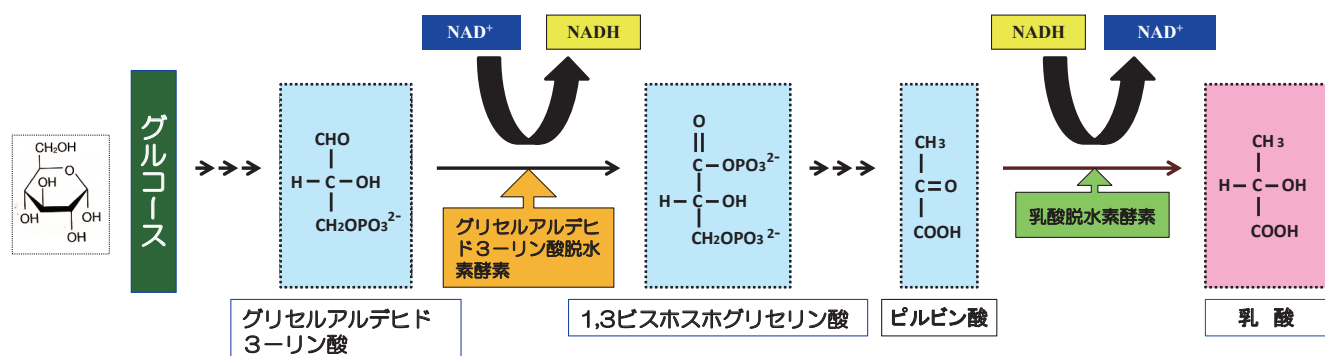


図10 ホモ発酵型乳酸菌の場合におけるNAD⁺の再生

発酵を行う乳酸菌に限定して説明したいと思います。

図10に示すようにEMP経路においてグルコースが分解して乳酸に至る過程でフルクトース-1,6-ビスリン酸からグリセルアルデヒド-3-リン酸ができ、そのグリセルアルデヒド-3-リン酸が1,3ビスホスホグリセリン酸になる段階でグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素が作用しています。この酵素は酵素として働く上で補酵素であるNAD⁺を必要とします。この反応の進行によってNAD⁺はNADHに還元されます。グルコースからピルビン酸に至る過程でNAD⁺が関与するのはこの部分だけですが、この段階でNAD⁺からNADHへの還元反応が動かなければ解糖系全体が動かなくなり、代謝が止まることとなります。もとよりNAD⁺は量的に無尽蔵ではなく極めて限定的であることからどこかでNADHをNAD⁺に再生させる必要があります。そのために乳酸菌やビフィズス菌はピルビン酸から乳酸になる経路を保持しています。その経路はピルビン酸の還元

によって乳酸をつくり出す経路であり、そこに関与するのが乳酸脱水素酵素と呼ばれる酵素です。この酵素が機能するには補酵素であるNADを必要としていることからピルビン酸から乳酸をつくることによってNADHをNAD⁺に再生させ、そのNAD⁺をEMP経路に戻し、グリセルアルデヒド-3-リン酸から1,3ビスホスホグリセリン酸が生成する反応に補酵素として供給させるのです(図10参照)。つまり、乳酸菌やビフィズス菌側からすると乳酸を作る最大の理由はNADHをNAD⁺に再生させて糖代謝を動かすためであり、乳酸菌やビフィズス菌にとって乳酸発酵の“発酵”とは無酸素状態での呼吸であり、この機能をもたなければ乳酸菌やビフィズス菌はこの地球上に存在しなかったこととなります。発酵を≪酵母・細菌などの微生物が、有機化合物を分解してアルコールや有機酸を生じること≫と説明することはあくまで発酵産物を利用する人間側からの見方に過ぎないのです。

ヘテロ型乳酸発酵を行う乳酸菌もビフィズス

表3 乳酸菌の主な培地

(1L当たり)

BCP加プレートカウント寒天培地 (公定培地)	酵母エキス(2.5g)、ペプトン(5g)、グルコース(1g)、ツイーン80(1g)、L-システイン(0.1g)、ブロムクレゾールパープル(0.04～0.06g)、寒天(15g) 〈pH 6.8～7.0〉
TYG寒天培地	トリプトン(10g)、酵母エキス(5g)、グルコース(10g)、NaCl(5g)、寒天(15g) 〈pH 7.0〉
ラクティック寒天培地	トリプトン(20g)、酵母エキス(5g)、ゼラチン(2.5g)、グルコース(5g)、ラクトース(5g)、スクロース(5g)、NaCl(4g)、酢酸ナトリウム(1.5g)、アスコルビン酸(0.5g)、寒天(15g) 〈pH 6.8〉
M17培地	ファイトン(5g)、ポリペプトン(5g)、酵母エキス(5g)、牛肉エキス(2.5g)、ラクトース(5g)、アスコルビン酸(0.5g)、β-グリセロリン酸二ナトリウム(19g)、1M MgSO ₄ ・7H ₂ O 溶液(1mℓ) 〈pH 7.1〉
MRS培地	ペプトン(10g)、肉エキス(10g)、酵母エキス(5g)、K ₂ HPO ₄ (2g)、クエン酸二アンモニウム(2g)、グルコース(20g)、ツイーン80(1g)、酢酸ナトリウム(5g)、MgSO ₄ ・H ₂ O(0.58g)、MnSO ₄ ・4H ₂ O(0.28g) 〈pH 6.2～6.6〉

組成 (培地1,000ml 当たり)

pH 6.3

ペプトン	10g
酵母エキス	1.0g
リン酸二水素カリウム	3.0g
リン酸一水素カリウム	4.8g
硫酸アンモニウム	3.0g
硫酸マグネシウム (7水和物)	0.2g
L-システイン塩酸塩 (1水和物)	0.5g
プロピオン酸ナトリウム	15g
ガラクトオリゴ糖	10g
寒 天	15g

TOS: 転移ガラクトオリゴ糖 (Transgalactosylated Oligosaccharides)

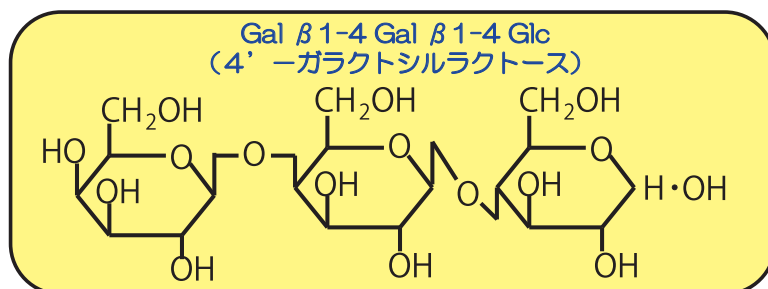


図11 ビフィズス菌の選択培地(TOSプロピオン酸寒天培地)

菌もそれぞれ特有のグルコースから乳酸に至る経路を使って上述のホモ型乳酸発酵を行う乳酸菌と同じように乳酸発酵を行っているのです。

(8) 乳酸菌とビフィズス菌の検出培地

i) 乳酸菌の検査培地

発酵乳および乳酸菌飲料は乳等省令により製品中に一定以上の乳酸菌の生菌の含有が規定され、さらに乳酸菌の菌数測定法が定められています。公定培地としてBCP加プレートカウント寒天培地が採用されています(表3)。この他にTYG寒天培地やMRS寒天培地も一般的に乳酸菌検出培地として用いられています。また、対象とする乳酸菌の分離源と同じか、それと組成が近似した天然培地が利用されることもあり、例えば脱脂乳は乳酸菌の保存培地によく用いられる天然培地です。

培養温度は、30℃ 前後ですが、一部の発酵乳では37℃ が一般的です。低温性乳酸菌では20～22℃で培養されます。いずれも2～3日でコロニーの形成が認められます。

ii) ビフィズス菌の検出培地

ビフィズス菌のみを含有している試料の菌数

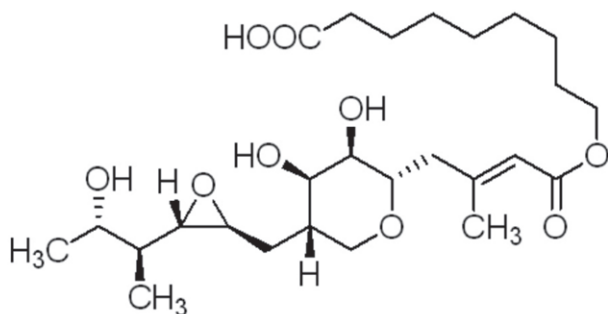


図12 ムピロシンの化学構造式

測定には市販〔例えば、栄研化学(株)、日水製薬(株)〕の嫌気性菌用培地がありますが、一般社団法人全国発酵乳乳酸菌飲料協会がガイドラインとして平成12年に示した3種のビフィズス菌の検出培地のうち図11に示したTOSプロピオン酸寒天培地はより良好な培地として我国から国際標準化機構(ISO)に提案されました。TOSとは転移ガラクトオリゴ糖(Transgalactosylated Oligosaccharides)の略で高濃度のラクトースにラクターゼを反応させ、転移反応により生成したオリゴ糖を高純度に濃縮したものです。

提案を受けたISOでは(1)誰がいつ、どこで実施しても同じ結果が得られる方法であること、(2)ビフィズス菌のみが生育し、乳酸菌が一切生育しないこと、の2つを満たすことを絶対条件として国際酪農連盟(IDF)の協力のもとにTOSプロピオン酸寒天培地の妥当性について検証がなされました。その結果、2010年にTOSプロピオン酸寒天培地にムピロシンの水溶液(1 mg/ml)を5%量加えたMUP加TOSプロピオン酸寒天培地が国際標準培地として採択されました(ISO 29981 / IDF 220)。ムピロシン(mupirocin)は*Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586から分離された無毒性の抗生物質で、化学構造式を図12に示しました。

なお、我国においてはビフィズス菌の検出法について乳等省令には記載されていませんが、一般社団法人全国発酵乳乳酸菌飲料協会が「ビフィズス菌使用発酵乳、乳酸菌飲料のガイドライン」(平成26年3月発行)を発行しています。また、IDFが刊行している“Bulletin of the International Dairy Federation”のNo.411、1-5(2007)にはビフィズス菌検出のための主要培地の詳細が記されているので参考にされるといいと思います。

《次回は「プロバイオティクスとしての乳酸菌とビフィズス菌」について解説します。》