

## クエン酸が乳酸菌の生育と代謝に及ぼす影響

森田 朱香<sup>1)</sup>, 老川 典夫<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> 関西大学 理工学研究科, <sup>2)</sup> 関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科\*)

## Effect of citric acid on growth and metabolism in lactic acid bacteria

Ayaka MORITA<sup>1)</sup>, Tadao OIKAWA<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> Graduate School of Science and Engineering, Kansai University<sup>2)</sup> Department of Life Science & Technology, Faculty of Chemistry, Materials and Biotechnology, Kansai University

## Summary

Amino acid is generally divided into two groups, D- or L-form, based on its chirality. The physiological role of D-amino acid has not been clarified in details as compared with that of L-amino acid. But recently, the production mechanism and function of D-amino acid in food have been studied extensively. We found that the concentration of D-amino acid in sake brewed with kimoto tended to be high. These D-amino acids were produced mainly by lactic acid bacteria such as *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus sakei* in kimoto and increased taste of sake. We are interested in which compound in medium is effective for D-amino acid production by lactic acid bacteria. We focused on citric acid in de Man, Rogosa, Sharpe medium that is a member of citrate cycle, one of major metabolic pathways in microorganism.

In this minireview, we describe the effect of citrate on growth and metabolism in various lactic acid bacteria in relation to our studies on D-amino acid production of *Lactobacillus sakei*.

## 1. はじめに

日本酒の製造では、アルコール発酵を行う酵母を純粋に培養する酵母製造工程が重要であり、その工程には大きく分けて「生酛(きもと)」と「速醸酛(そくじょうもと)」の2種類がある<sup>1)</sup>。中でも生酛は酒蔵や日本酒製造に用いる木製の器具に生息している乳酸菌が酛中で生育し、これらの乳酸菌が生成する乳酸によって原料中に存在する硝酸還元菌や野生酵母などの雑菌を殺菌した後純粋培養した良質な清酒酵母を添加し醸造する技術であり、最初に乳酸球菌である *Leuconostoc mesenteroides* が、その後乳酸桿菌である *Lactobacillus sakei* が増殖することが知られている<sup>2)</sup>。これら生酛乳酸菌は酛中で増殖する際、乳酸のみならずさまざまな物質を菌体外に分泌生産することが報告されている<sup>3)</sup>。日本酒中にはさまざまな D-アミノ酸が存在しており、特に生酛造りの日本酒には D-Ala, D-Asp, D-Glu が豊富に含まれ、これらの D-アミノ酸が *L. mesenteroides* と *L. sakei* によって生産され、日本酒の旨みに寄与することをわれわれは報告している<sup>4,5)</sup>。これら生酛乳酸菌の D-アミノ酸の生産には、どのような培地成

分が影響するのか興味を持たれる。一般に乳酸菌の培養に用いられる MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) 培地は、ペプトン、肉エキス、酵母エキス等の有機窒素を含む基礎培地に、グルコース、クエン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、Tween80、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン等の炭素源や無機金属が含まれている (Table 1)<sup>6)</sup>。

MRS 培地の成分の中で特にクエン酸は、クエン酸回路のメンバーであり、乳酸菌のさまざまな代謝に関与すると

**Table 1** Composition of de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium

Peptone	10 g
Yeast extract	5 g
Beef extract	10 g
D(+)-Glucose	20 g
Tween 80	1 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2 g
Sodium acetate	5 g
Diammonium hydrogen citrate	2 g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2 g
Manganous sulfate tetrahydrate	0.05 g
Deionized water	1 L
pH 6.2 ± 0.2 at 25° C	

\*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

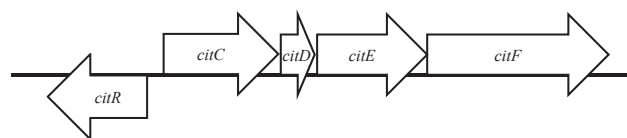
考えられ注目されてきた。

## 2. クエン酸がさまざまな乳酸菌の生育に及ぼす影響

これまでに、クエン酸が生育に影響を及ぼす乳酸菌として、*Lactococcus lactis* CRL264<sup>8)</sup>、*Lactobacillus casei* ATCC 393<sup>9, 10)</sup>、*Lactobacillus plantarum* 1919<sup>9)</sup>、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469<sup>11)</sup>、*Leuconostoc mesenteroides* 19D<sup>7)</sup>が報告されている。

*Lactococcus lactis* CRL264の場合、培地中にクエン酸のみを添加しても本菌の生育促進効果は認められなかったが、クエン酸とともにグルコースを添加すると、これらの物質が共代謝され生育が促進されることが明らかとなっている。また培地中にクエン酸のみを添加して常に培地のpHが6.5となるように調整しながら*L. lactis* CRL264を培養すると、クエン酸の代謝速度は非常に遅くなるが、その終止菌体をグルコースとブレインキュベートした後、同培地中で生育させると、培地中のクエン酸濃度は著しく減少した。このことから、クエン酸代謝経路の酵素が本菌には存在することが明らかとなった。一方、pH 4.5で本菌を培養すると、クエン酸の代謝速度は非常に速くなるが、どちらのpHで本菌を培養した場合でもクエン酸の代謝速度はグルコースの存在下で増加することがわかった<sup>8)</sup>。*L. lactis* CRL264のクエン酸輸送体をコードしている遺伝子配列は*L. mesenteroides* 19Dのそれとほぼ同一であり、2つの輸送体の機能に大きな違いがないことがわかっており<sup>12)</sup>。また、*L. mesenteroides* 19Dによるクエン酸の代謝経路も*L. lactis* CRL264のクエン酸の代謝経路と同様にプロトン駆動力を産生する経路であることがわかっており<sup>13-15)</sup>、これらのことから*L. lactis* CRL264はクエン酸の代謝によって*L. mesenteroides* 19Dで観察されたのと同様の方法でエネルギーを産生していると考えられる。また、10 mMクエン酸、60 mM乳酸、10 mMクエン酸および60 mM乳酸（終濃度）を含む培地で*L. lactis* CRL264を培養しOD<sub>660</sub>を測定し比較したところ、クエン酸だけを添加した培地で培養したもの、クエン酸と乳酸の両方を添加した培地で培養したもの、クエン酸も乳酸も添加しなかった培地で培養したもの、乳酸だけを添加した培地で培養したもの、の順にOD<sub>660</sub>が高くなった<sup>8)</sup>。このことから、クエン酸には乳酸による*L. lactis* CRL264の生育阻害を軽減させる効果があると考えられる。

*L. casei* ATCC 393及び*L. plantarum* 1919の場合、ガラクトースやグルコースを単一炭素源とする培地よりも、それらにクエン酸を添加した培地の方が、生育が促進される<sup>9)</sup>。ガラクトースのみを添加した培地あるいはガラクトースとクエン酸を両方添加した培地で前培養した*L. casei* ATCC 393及び*L. plantarum* 1919を用いて、生育に利用されるクエン酸の単位時間あたりの物質量を測定したところ、*L. casei* ATCC 393の場合、ガラクトースのみを添加した培地では0.308  $\mu\text{mol}/\text{A}_{600}/\text{h}$ であったのに対し



**Fig. 1** Localization of citrate lyase homolog genes in *Lactococcus lactis subsp. lactis* IL1403 genome. *citR*, citrate lyase regulator gene; *citC*, acetate-SH-citrate lyase ligase (EC: 6.2.1.22); *citD*, citrate lyase subunit gamma (EC: 4.1.3.6); *citE*, citrate lyase subunit beta (EC: 4.1.3.6); *citF*, citrate lyase subunit alpha (EC: 4.1.3.6).

て、ガラクトースとクエン酸を添加した培地では1.704  $\mu\text{mol}/\text{A}_{600}/\text{h}$ と約6倍の違いがあった。一方*L. plantarum* 1919の場合、それぞれ0.027  $\mu\text{mol}/\text{A}_{600}/\text{h}$ 、0.443  $\mu\text{mol}/\text{A}_{600}/\text{h}$ となり、約16倍の違いがあることが明らかとなった。これらの結果から、*L. casei* ATCC 393及び*L. plantarum* 1919のクエン酸代謝に関わる酵素は、クエン酸と糖の両方が培地中に存在する場合に誘導的に生産されると考えられ、実際*L. plantarum* 1919のクエン酸リアーゼ活性はクエン酸存在下でのみ検出された<sup>9)</sup>。このことから、*L. plantarum* 1919のクエン酸リアーゼは、クエン酸によって誘導的に生産される酵素であると考えられる。*Leuconostoc* 属の同酵素も誘導酵素であることが知られているが、*Lactococcus* 属の同酵素は構造的に存在している酵素である<sup>16, 17)</sup>。また、クエン酸そのものが*L. casei* ATCC 393及び*L. plantarum* 1919の生育に影響を与えたわけではなく、*L. lactis* CRL264の場合と同様にクエン酸とグルコースが共代謝されることによって生育が促進されると考えられる。同様の結果は、*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469を用いた実験でも確認されている<sup>11)</sup>。また*L. casei* ATCC 393では、培地中に添加されたクエン酸が代謝されることによって、本菌の対数増殖後期での糖代謝による培地の酸性化を軽減するということが報告されている<sup>9)</sup>。2001年、*Lactococcus lactis ssp. lactis* IL1403の全ゲノムが解読され、*L. lactis*のゲノム中に5つの推定クエン酸リアーゼ関連遺伝子の存在が確認されている (Fig. 1)。

*L. mesenteroides*の場合、本菌から調製された膜小胞体にクエン酸が取り込まれる割合は、クエン酸を含まない培地で培養した菌体から調製した場合でも十分大きい。クエン酸を含む培地で培養した菌体から調製した場合に比べると小さいことがわかっており<sup>14)</sup>。また、クエン酸を含まない培地で培養すると、オキサロ酢酸デカルボキシラーゼがオキサロ酢酸をピルビン酸に変換することによってオキサロ酢酸がクエン酸回路に流入することを妨げる<sup>7)</sup>。この経路はオキサロ酢酸からアスパラギン酸への生合成のバイパス経路となることから、アスパラギン酸の生合成経路にはクエン酸の代謝が大きな影響をもたらすことがわかる。このように、クエン酸が培地に含まれない時にはオキサロ酢酸デカルボキシラーゼによるバイパス経路は、クエン酸回路を経由する主なアスパラギン酸生合成経路へのフラックスを減少させることが見出されたが、クエン酸が培地に

含まれる時には別のアスパラギン酸生成経路が存在することも明らかとなっている<sup>7)</sup>。また、ワイン醸造に用いられる乳酸菌 *Leuconostoc oenos* をクエン酸存在下で培養し、培養液を核磁気共鳴法によって分析した結果、培地中のクエン酸が培養中に本菌によってアスパラギン酸に変換されることも明らかにされている<sup>18)</sup>。以上のことから、培地中のクエン酸の有無がさまざまな乳酸菌の生育や物質代謝に大きな影響を及ぼすと考えられる。

### 3. おわりに

以上のように、クエン酸はさまざまな乳酸菌の生育や代謝に影響を及ぼすことが明らかとなっており、その影響は乳酸菌の属や種によって大きく異なっている。これまでに、*Leuconostoc mesenteroides* の生育にクエン酸が関与していることが報告されている<sup>7)</sup>。しかし、同じ生醗造りで利用されている *Lactobacillus sakei* については、本菌の生育と培地中のクエン酸濃度の関係は未だ明らかになっていない。そこでわれわれは、酒造会社の酒蔵から単離されたさまざまな *L. sakei* の菌株から日本酒の旨味に寄与する D-アミノ酸の生産能が高い *L. sakei* LK-145 株を選抜し、本菌を培養する際の培地成分や培養条件を検討して D-アミノ酸をより多く生産する条件を明らかにするとともに、*L. sakei* LK-145 の生育にクエン酸が影響するのかを明らかにすることを目的として現在研究を行っている。

### 謝 辞

本研究は文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 25 年～平成 29 年）により実施している研究である。

### 参考文献

- 1) 溝口晴彦, 原昌道 (2010) 「生醗造り」に関する一考察, 日本醸造協会誌 105 : 124-138.
- 2) 増田康之, 野口智子, 高橋俊成, 井口純, 大澤朗, 溝口晴彦 (2012) 生醗における乳酸菌叢の DGGE 及び PFGE 解析, 日本生物工学会誌 90 : 684-690.
- 3) 郷上佳孝, 岡田かおり, 森山昌和, 溝口晴彦, 老川典夫 (2012) 生醗, 乳酸菌添加生醗, 速醗造りの日本酒醸造工程中の D-アミノ酸の定量的解析, Trace Nutrients Research 29 : 1-6.
- 4) Gogami Y, Okada K, Oikawa T (2011) High-performance liquid chromatography analysis of naturally occurring D-amino acids in sake. J Chromatogr B 879: 3259-3267
- 5) Okada K, Gogami Y, Oikawa T (2014) Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. Amino Acids 44: 489-498.
- 6) de Man JD, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J Appl Bact 23: 130-135.
- 7) Claire M-T, Juke SL, Philippe S, Charles D, Wil NK (1995) The citrate metabolic pathway in *Leuconostoc mesenteroides*: expression, amino acid synthesis, and  $\alpha$ -ketocarboxylate transport. J Bacteriol 178: 6209-6215.
- 8) Christian M, Diego de Mendoza, Wil NK, Juke SL (1999) Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: resistance against lactate toxicity at low pH. J Bacteriol 181: 1451-1457.
- 9) Palles T, Beresford T, Condon S, Cogan TM (1999) Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 85: 147-154.
- 10) Pablo M, Agata P, Christian M, Sergio A, Juke SL (2014)  $\text{Ca}^{2+}$ -Citrate uptake and metabolism in *Lactobacillus casei* ATCC 334. Appl Environ Microbiol 79: 4603-4612.
- 11) De Figueroa RM, Benito de Cárdenas, IL, Sesma F, Alvarez F, de Ruiz Holgado AP, Oliver G (1996) Inducible transport of citrate in *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. J Appl Bacteriol 81: 348-354.
- 12) Bandell M, MELhotte, CMarty-Teyssset, A Veyrat, H Prévost, V Dartois, C Diviès, H Prévost (1998) Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. Appl Environ Microbiol 64: 1594-1600.
- 13) Konings W N, J S Lolkema, B. Poolman (1995) The generation of metabolic energy by solute transport. Arch Microbiol. 164: 235-242.
- 14) Marty-Teyssset C, J. S. Lolkema, P. Schmitt, C. Diviès, W. N. Konings (1995) Membrane potential generating transport of citrate and malate catalyzed by CitP of *Leuconostoc mesenteroides*. J Biol Chem. 270: 25370-25376.
- 15) Marty-Teyssset C, C. Posthuma, J S Lolkema, P Schmitt, C Diviès, W N Konings (1996) Proton motive force generation by citrolactic fermentation in *Leuconostoc mesenteroides*. J Bacteriol 178: 2178-2185.
- 16) Cogan, T.M (1981) Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. diacetylactis. Journal of Dairy Research 48: 489-495.
- 17) Mellerick D, Cogan TM (1981) Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lac-*

- tis* and other heterofermentative lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research* 48: 497-502.
- 18) Ramos A, J S Lolkema, W N Konings, H Santos (1995) Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* 61: 1303-1310.