アセトン ブタノール醱酵細菌によるビタミン B₂ の合成 (第 2 報)

ペプトンの有効成分

今井和民 (京都大学農学部)

昭和 30 年 3 月 4 日 受理

On the Formation of Riboflavin by Acetone-Butanol Fermentation
Bacteria. Part 2. Effective Substance in Peptone.

By Kazutami IMAI (Faculty of Agriculture, Univ. of Kyoto)

I. 緒 言

第 1 報⁽¹⁾において述べた如く CaCO₃ を添加したペプトン培地或いは米糠培地にアセトン ブタノール醱酵細菌を生育させても riboflavin の生成は僅少であるが、ペプトンと米糠を併用すればそれが著しく高まる事を見、まず米糠の有効成分を検索し phytic acid (或いは phytin) を見出した。本報に於いては次いでペプトンの有効成分を検索した結果に就て述べる。

II. 実験の部

実験に使用した菌株、生産物の分析方法は第 1 報⁽¹⁾と同じである。本報において使用した基本培地は米糠培地でその組成は次の如くである。精製馬鈴薯澱粉 3%, 米糠 1%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, MnSO₄·7H₂O 0.001%, NaCl 0.001%。この培地 200 cc を 300 cc 容綿栓三角フラスコに取り常法に従い蒸気殺菌を行い、別に乾熱殺菌した CaCO₃ を種菌接種直前に 1.5% 添加した。

まずペプトンをアミノ酸にまで分解したならば riboflavin 生成にいかなる影響を示すかということを知らんとして実験を行つた。即ち市販ペプトンを約 5 倍量の 35% H₂SO₄ で 7~8 時間加水分解し (この時ビュウレット反応は完全に消失している)、後バリタにて処理し濾過、濾液に CO₂ を通じて Ba を完全に除き活性炭にて処理したものに就て効力を調べた。その結果は Table 1 に示した如くペプトン加水分解液の効力は著しく、ペプトン 0.5% に相当する量の水解液を添加した場合には riboflavin 生成量は 2800 γ/100 cc に達し、米糠とペプトンを併用した培地のそれよりも寧ろ大であった。この結果からペプトンの有効成分はペプトン中に存する或る種のアミノ酸であろうと推

Table 1. Effect of Acid Hydrolyzed Peptone.

No.	Starch consumed (%)	Acetone (mg)	Fermentation product (in 100 cc)				
			Butanol (mg)	Ethanol (mg)	Butyric acid (mg)	Acetic acid (mg)	Riboflavin (γ)
1*	94.0	150	462	48	330	240	2800
2**	95.0	115	402	58	418	300	2720
3(cont.)	89.1	133	306	66	391	318	540

* The concentration of added hydrolyzed peptone corresponds to 0.5% of peptone.

** The concentration of added hydrolyzed peptone corresponds to 1.0% of peptone.

論された。そこで前記基本培地にアスパラギン、グルタミン酸、アルギニン-HCl、ヒスチジン-HCl、チロシン、アラニン、ロイシン、グリシン、シスチン等を各 10 mg/100 cc 宛単独に添加して醱酵せしめたが、いずれも殆んど riboflavin 生成に対する効果は認められなかつた。但しこの中アルギニンのみは余り強くないがいく分の効力が認められた。

そこで更にアルギニン-HCl のみを基本培地 100 cc に対し 5, 10 及び 20 mg 添加し riboflavin の生成を調べた。その結果は Table 2, No. 1, 2, 3 に示す如くやや効果を示す事を認めた。然しここで問題となるのは

Table 2. Individual Effect of Arginine or Asparagine.

No.	1	2	3	4	5	6	7
Starch consumed (%)	94.9	94.2	94.2	93.5	92.8	91.0	91.0
Fermentation Product (in 100 cc)	Acetone (mg)	149	149	151	164	145	99
	Butanol (μ)	454	500	474	444	388	258
	Ethanol (μ)	94	92	84	80	72	79
	Butyric acid (μ)	189	159	159	136	235	541
	Acetic acid (μ)	231	252	252	222	289	396
	Riboflavin (γ)	832	966	1080	500	532	834
Addition (mg/100 cc)	5.0	10	20	50	100	500	0
	arginine-HCl			asparagine			

TON 0.5% に相当する量の水解液を添加した場合には riboflavin 生成量は 2800 γ/100 cc に達し、米糠とペプトンを併用した培地のそれよりも寧ろ大であった。この結果からペプトンの有効成分はペプトン中に存する或る種のアミノ酸であろうと推

C : N Ratio である。即ち実験に使用した米糠中の窒素は 2.3 % で相当貧弱である。それ故米糠培地にペプトン、ペプトン加水分解液、或いはアルギニン等を添加して riboflavin が増成されるのは単なる窒素の量的関係に依存するのではなからうかという疑問が生じる。そこで基本

培地に アスパラギン を 50 mg, 100 mg 及び 500 mg/100 cc 添加して醗酵せしめたが、その結果はいずれも riboflavin の増加は殆んど認められなかつた (Table 2, No. 4, 5, 6). それ故 riboflavin 生成に対する効果は窒素の量に依存するのではなく、窒素の形態によるものと思われる。

このように arginine にやや効果が認められたので、次にアルギニンとアスパラギンを併用して醗酵せしめてみた。ここに特にアスパラギンを選んだ理由は、アセトン・ブタノール醗酵細菌の生育に最も有効なアミノ酸は L-アスパラギンであるという TATUM 等⁽²⁾の所説に基づいたものである。即ちアスパラギンを 50 mg/100 cc 添加した基本培地 (米糠、澱粉及び無機物より成る) に更にアルギニン-HCl を各 1, 5, 10 及び 20 mg/100 cc 宛添加し醗酵せしめた。その結果は Table 3, No. 2~5 に示した如く riboflavin の生成はアルギニンの添加量

Table 3. Combined Effect of Arginine and Asparagine.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Starch consumed (%)	92.0	93.1	93.5	94.0	94.5	92.0	92.8	89.5
Fermentation product (in 100 cc)								
Acetone (mg)	150	165	155	147	135	153	143	135
Butanol (")	466	458	434	480	485	476	436	492
Ethanol (")	84	84	100	51	70	81	82	80
Butyric acid (")	167	152	138	167	167	196	180	154
Acetic acid (")	261	240	280	261	261	242	267	300
Riboflavin (γ)	566	1167	1600	1766	2032	680	700	1232
Addition (mg/100 cc)								
Arginine	—	1.0	5.0	10	20	5.0	10	20
Asparagine	—	50.0	50.0	50	50	—	—	—
Alanine	—	—	—	—	—	50.0	50	50

Table 4. Combined Effect of Arginine and Asparagine.

No.	1	2	3	4	5	6
Starch consumed (%)	95.2	92.7	93.1	94.9	95.3	94.2
Fermentation product (in 100 cc)						
Acetone (mg)	105	105	100	108	114	104
Butanol (")	488	511	504	512	504	516
Ethanol (")	131	110	124	110	118	90
Butyric acid (")	97	88	110	112	66	101
Acetic acid (")	390	390	360	360	360	366
Riboflavin (γ)	868	870	1066	1200	1334	1798
Addition (mg/100 cc)						
Asparagine	0	5	10	15	20	50
Arginine	10	10	10	10	10	10

と共に著しく増大し、アルギニン 20 mg/100 cc 用いたものにありては 2032 γ/100 cc に達した。このようにアルギニンはアスパラギンと併用することにより著しく riboflavin 生成を刺激する事が知られたので、次にアスパラギンを他のアミノ酸で置換してもこの作用が見られるかどうかを知ろうとしてアスパラギンの代りにアラニンをを用いて試験した。即ちアラニンを 50 mg/100 cc 添加した基本培地に更にアルギニン-HCl を各 5, 10 及び 20 mg/100 cc 宛添加醗酵せしめたが、その結果は Table 3, No. 6~8 に示した

如くアスパラギンと併用した場合に比し riboflavin 生成量はずつと低かつた。

このようにアルギニンとアスパラギンの併用は riboflavin 生成に特に有効である事が推察されたので、更にアルギニン添加量を固定しておき、これにアスパラギンを種々なる量添加する実験を行つた。即ちアルギニン-HCl を 10 mg/100 cc 添加した基本培地に更にアスパラギンを 5, 10, 15, 20 及び 50 mg/100 cc 宛添加し醗酵せしめた。その結果は Table 4 に示す如くアスパラギン添加量と共に riboflavin 生成量が増加する事を認めた。

次にアルギニンの代りに尿素が用いられるか否かを知ろうとして実験を行つた。即ちアスパラギンを 50 mg/100 cc 添加した基本培地に尿素を 5, 10 及び 20 mg/100 cc 添加し醗酵せしめた所、醗酵率はそれぞれ 89.9, 89.9 及び 91.3% で riboflavin 生成量はそれぞれ 1368, 1533 及び 1666 γ/100 cc で尿素も幾分アルギニンの代りになる事を認めた。然しその分子量の関係より見れば尿素はアルギニンよりもその効力が劣る事は明らかである。以上の実験結果を riboflavin 生

Fig. 1. Riboflavin formation under the addition of amino acids.

成量について総括的にグラフで示したものが Fig. 1 である。

III. 要 約

アセトン・ブタノール醗酵細菌の riboflavin 生成に対し、ペプトンの酸加水分解液も有効である事を認めたので、その因子はアミノ酸であろうと推定し、これを調べた結果アスパラギン単独、或いはアルギニン単独ではその効果は少いが両者を併用すれば riboflavin 生成量が著しく高まることを見出した。又この場合アルギニンの代りに尿素を用いても或る程度の効果を示す事を認めた。

終りに臨み御指導を頂いた京大教授片桐英郎先生に深甚なる謝意を表する。

(1) 今井 農化, 29, 445 (1955).

FRED, E. B. *J. Bact.*, 27, 207 (1934).

(2) TATUM, E. L., PETERSON, W. H., and

Summary

As it was found that the effective substance in rice bran for the riboflavin formation was phytic acid, in the next place researches for effective substance in peptone were carried out. Acid hydrolyzed peptone showed remarkable effect on the riboflavin formation. From this result it was presumed that the effective substance in peptone would be certain amino acid or acids, and it was found that when arginine or asparagine was used individually it showed only slight effect on riboflavin formation, but when the mixture of them was added to the rice bran medium the formation of riboflavin was greatly progressed. Urea could replace arginine, but the effect of it was less than that of arginine.

イチヂク *Ficus carica* L 葉の香気成分 (第 1 報)

小幡彌太郎 (北海道大学農学部), 福士俊一 (鳥取大学農学部)

昭和 30 年 3 月 11 日 受 理

Studies on the Flavoring Matters of the Leaves of *Ficus carica* L. Part 1.

By Yataro OBATA (Dept. of Agr. Chem., Univ. of Hokkaido) and

Shun-ichi FUKUSHI (Fac. of Agr., Univ. of Tottori)

緒 言

桑科植物のイチヂク *Ficus carica* L. は古くから民間薬として知られ、凝果は緩下剤、茎もしくは葉柄からの乳液は痔に効くといわれ、葉は蛔虫駆除剤、便所の悪臭防止、蛆の発生阻止にも利用されている。しかし、これらの薬効成分についての研究報告は無く、イチヂク成分の研究としては凝果の色素成分 cyanidine^(1,2)、葉のアミノ酸類⁽³⁾、ステロール類⁽⁴⁾の外に岡原⁽⁵⁾の furocumarine の研究がある。氏はイチヂク葉のアセトン抽出物、及び熱水抽出物から $C_{11}H_{10}O_3$ m. p. 161~162° の針状晶を分離し Ficusin と命名、 H_2O_2 酸化で furane dicarboxylic acid を得、 $KMnO_4$ 酸化で hydroxycumarine を得、Ficusin は furocumarine と推定したが、ついで 1937 年⁽⁶⁾このものが既に 1933 年 H. S. JOIS⁽⁷⁾ が *Psoralea corylifolia* から分離した psoralene と同一物である事を確認した。我々はイチヂクの乾燥葉が cumarine を思わせる香気を有することに注目、この香気成分を追究し、同時に無臭の furocumarine とこれら香気成分との間の関係を明らかにしたいと考えた。我々は先ずイチヂク乾燥葉を多量のアルコールを用いて抽出し、アルコール抽出物は水蒸気蒸溜に附して揮発性成分を集め、精油と共に m. p. 168~169° の無色無臭の針状結晶を分離した。この結晶は紫外部の吸収から psoralene と同定した。ついで精油を減圧分溜に附し m. p. 140° の結晶 (I)、黄色結晶性物質 (II)、黄色油状物 (III)、無色油状物 (IV) の 4 個の化合物を分離し、これらの紫外部のスペクトル等を測定し、(IV) はテルペンアルコール、(I) は furocumarine 類似化合物、その他は未知の furocumarine 分解物である事が予想され、イチヂク乾燥葉の香気成分中には cumarine は存在しない事が判明した。なお不揮発性成分は石油エーテル、ベンゼン 1:1 の混液で抽出し、抽出液をカラムクロマトグラフィーに付しオレンジ色のバンドを分別し、この部分から m. p. 59° の無臭の結晶、及び黄色の微かに香を有する結晶性の化合物を分離した。

実 験 の 部

試料：イチヂク *Ficus carica* L 葉は風乾して後試料とした。各成分の分離は Fig. 1 の如く行つた。