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 4 報)

玉蜀黍中に存する生長素の抽出

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 4. Extraction of Growth Factors from Maize.

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

I. 緒 言

前報⁽¹⁾において述べた如くアセトン ブタノール醱酵細菌の生長素に関しては古くから種々の報告がある。而して著者は該菌によるリボフラビンの合成を研究する上にグルコース、アスパラギン、アルギニン、phytic acid 及び無機塩類より成り立つ合成培地に菌を生育、醱酵せしめてリボフラビンの生成を調べる必要に迫られた。而して著者はアセトン ブタノール醱酵細菌に対して最も良好なる培地は玉蜀黍醪である事に着目し、玉蜀黍中には該菌に対する特別良好な未知の生育因子が存在するのではなかろうかと考え、玉蜀黍より菌の生育を刺激する物質の抽出を試み、玉蜀黍の water extract にそれが存する事を見、これを濃縮、分別して重要な 3 つのフラクション (F I, F II, F III) を得た。而してこれら F I, F II, F III を添加すれば前記合成培地に於いて菌は極めて良好に生育、醱酵する事は既に前報⁽¹⁾に述べた。少しく報告が前後する憾があるが、本報においてこれらフラクションの抽出、並びに分別濃縮について述べる。

II. 実 験 の 部

実験に使用したアセトン・ブタノール醱酵細菌の菌株、培養、醱酵生産物の分析法等は第 1 報⁽²⁾に述べた如くである。

I. 生 長 素 の 抽 出

著者は先ず玉蜀黍より或る方法で生長素を抽出し、玉蜀黍を醱酵不能乃至は醱酵不良なる状態におちいらしめ、これを基本培地として、抽出液中の有効成分を追跡しようと試みた。先ず玉蜀黍粉をアセトン、石油エーテル、ベンゾール、プロパノール、醋酸メチル、醋酸エチル、及びエタノール等で抽出した。この場合プロパノール以外は Soxhlet 抽出器で 20 時間抽出した。プロパノールの場合は玉蜀黍をプロパノールに長時間浸漬し濾過する事を数回繰り返した。このような溶剤で抽出された玉蜀黍を乾燥し 5% 醪となし、これに菌を接種した結果は Table 1 に示した如くいずれも良く醱酵し、無処理のものと全く差が認められなかつた。然しエタノールで抽出されたものにあつては醱酵がやや不良となる事が認められた。

Table 1. Fermentation on Maize Mash Extracted with Various Solvents.

Fermentation product (mg/100 cc)	Acetone	320	354	321	344	344	309	313	300	313	309	337	311	286	232
	Butanol	650	688	642	676	672	658	642	608	648	658	664	640	514	400
	Ethanol	100	81	73	103	84	52	68	61	63	94	86	88	82	40
	Butyric acid	46	65	114	68	35	76	86	68	68	77	77	36	86	68
	Acetic acid	142	106	87	111	111	113	105	119	101	98	97	155	105	118
Starch consumed (%)		90	91	94	88	86	86	88	89	89	85	86	89	—	78
Extraction	none	acetone		petroleum ether		benzole		propanol		methyl acetate		ethyl acetate		ethanol	

次いで玉蜀黍粉に水を加え乳鉢で磨り、マッチェで吸引濾過する事を数回繰り返したのものにあつては醱酵状況が相当悪くなる。同様の操作を水の代りに 5% HCl, 10% H₂SO₄ 或いは 1 N 醋酸を用いて行い、後水で洗つたものは醱酵が著しく悪くなり、殊に 1 N 醋酸を用いた場合には殆んど醱酵しなくなる事を知つた。これらの結果は Table 2 に示した如くである。

然るにこのように醋酸で処理した玉蜀黍に、玉蜀黍の水抽出液を添加すると極めて良好に醱酵するようになる (Table 3)。この原因を考えて見るに、醋酸によつて生育因子が抽出されてしまう事以外に、菌の生育に必要な

Table 2. Fermentation on Maize Mash
Extracted with Water or Acids.

Fermentation product (mg/100 cc)	Acetone	190	48	41	—
	Butanol	360	61	60	—
	Ethanol	62	40	20	—
	Butyric acid	98	126	6	—
	Acetic acid	174	290	341	—
Starch consumed (%)		70	18	20	8
Extraction	Water	5%	10%	1N	
		HCl	H ₂ SO ₄	Acetic acid	

Table 3. Fermentation on Acid Treated
Maize Mash.

Fermentation product (mg/100 cc)	Acetone	318	134	175
	Butanol	640	168	300
	Ethanol	76	112	68
	Butyric acid	73	12	127
	Acetic acid	145	292	255
Starch consumed (%)		85	30	52
Addition	Water ext. of maize		SPEAKMAN Salts	M/30 Phos- phate buffer (pH 6.4)

(Table 3). このような事より醋酸処理により菌が生育し難くなるのは、無機物欠乏の理由もあるが主原因は生育因子の抽出であると推論出来る。

以上の結果から著者は醋酸処理玉蜀黍の 5% 醗及びこれに SPEAKMAN 塩類を添加したものの 2 種を基本培

Table 4. Extraction Method of Growth Promoting Substances
from Maize.

無機物が醋酸によつて取除かれる事が強く考えられる。即ち無処理玉蜀黍と、醋酸で処理したものについて全窒素、澱粉及び無機物を分析して見ると前二者には殆んど大きな差は認められないが、無機物含量においては無処理 1.1%, 醋酸処理 0.2% と大きな差が認められた。そこで醋酸で処理した玉蜀黍に SPEAKMAN 塩類を添加して見た。この塩類は SPEAKMAN⁽³⁾ の提唱したものでアセトン・ブタノール醗酵細菌にとつて良好な塩類混合物である。然るに結果は Table 3 に示した如く、やや醗酵して来るがブタノールの生産量僅かに 168 mg で、正常醗酵の 640 mg に比すれば著るしく不良であり、澱粉消費率も僅かに 30% にすぎなかつた。又 buffer action の欠乏が原因となつて

いるかどうかを知ろうとして、1/30 M phosphate buffer を加えて見たがこの場合も醗酵は不良であつた

又玉蜀黍中の生長素の安定度を知らんとして、玉蜀黍粉を N/50 NaOH, N/20 NaOH 及び N/10 HNO₃ で湯浴上で 2 時間加熱し、後 HCl 及び NaOH で中和し醗酵せしめたところ、N/50 では完全に醗酵したが、N/20 では殆んど醗酵を行わなかつた。これに反し N/10 HNO₃ で処理したものはブタノール 127 mg/100 cc を生成したので、玉蜀黍中の生長素は酸に強く、アルカリに弱いものであらうと推論される。

II. 生長素の分別濃縮

玉蜀黍水抽出液から生長素を分別濃縮する方法は Table 4 に示した如くである。今この Table 4 に従つてその生長素を追跡した過程を述べる。即ち水抽出液を湯浴上で加熱し凝固して来る蛋白の沈澱 (a) と濾液 (b) とに分ける。醋酸処理玉蜀黍に (a) を添加 (以下各物質

の添加量は総て水抽出液を基準として 6% 玉蜀黍に還元した量である) しても醗酵せず SPEAKMAN 塩と (a) を併用しても醗酵は不良である。これに反し (b) を添加したものはそれだけで完全に醗酵する。この事から生長素は (a) に来ていない事が判る (Table 5 参照, 以下同様)。次いでこの濾液を濃縮し等量のアセトンを加えて生ずる沈澱 (c) は効果なく, SPEAKMAN 塩と併用するも醗酵は悪い。これに反しその濾液からアセトンを追つたもの (d) は, それのみで強い効果を持っている。次ぎにこの (d) をシラップになるまで濃縮しこれをエタノールで処理すると樹脂状の沈澱 (e) が得られる。このものを添加すると相当良く醗酵するが, これを少量の水に溶かしエタノール処理する事を 2 回繰り返したものの (f) を添加した場合には醗酵は不良となる。これに SPEAKMAN 塩を添加しても醗酵は余り良くならない。又エタノール溶液からエタ

Table 5. Fermentation on Acetic Acid Treated Maize Mash under the Addition of Various Fractions Extracted from Maize,*

Addition*	Fermentation product (mg/100 cc)				
	Acetone	Butanol	Ethanol	Butyric acid	Acetic acid
(a)	not fermented				
(a)+Sp. salts	172	328	50	6	283
(b)	338	652	65	57	126
(c)	not fermented				
(c)+Sp. salts	196	362	42	22	210
(d)	322	640	108	39	156
(e)	300	522	66	45	141
(e)+Sp. salts	328	600	60	46	165
(f)	130	200	30	25	195
(f)+Sp. salts	250	480	54	75	114
(g)	200	340	46	53	173
(g)+Sp. salts	220	440	52	36	156
(f)+(g)	320	700	100	64	145
(f)+(h)	316	656	110	105	138
(f)+(i)	234	410	62	18	240
(f)+(j)	310	614	104	44	165
(f)+(FI)	174	344	42	22	210
(f)+(FII)	212	400	30	31	264
(f)+(k)	200	410	80	44	225
(f)+(FI)+(k)	250	450	66	24	253
(f)+(FII)+(k)	220	442	84	39	243
(f)+(FI)+(FII)	320	630	110	26	193
(f)+(FI)+(FII)+(k)	313	620	100	35	208
(f)+(FI)+ash of (FII)	154	280	60	22	300
ash of (f)+(FI)+(FII)	124	230	40	33	322
(FI)+(FII)	not fermented				
(FI)+(FII)+(l)	380	740	100	24	88
(FI)+(FII)+(m)	not fermented				
(FI)+(FII)+(n)	not fermented				
(FI)+(FII)+(l)	385	710	100	18	78
(FI)+(FII)+Sp. salts	124	230	40	33	322
(FI)+(FII)+ash of (l)	120	178	28	30	300
(FI)+(FII)+(FIII)+(O)	380	720	100	18	77
(FI)+(FII)+(FIII)+Sp. salts	356	660	140	33	98

* Extraction method of these fractions is shown in Table 4.
Sp. salts=SPEAKMAN's salts

ノールを追つた (g) のみを添加した場合も醗酵は不良で, これに SPEAKMAN 塩を添加しても醗酵は余り向上しない。これに反し (f) と (g) を併用 (この場合は各単用の場合の 1/2 量宛を使用) すると醗酵は著るしく向上した。故にここで生長素が 2 部分に分たれる事が判つた。ついで (g) を硫酸酸性にてエーテル抽出する。

このエーテルに溶解した部分 (h) と (f) を併用すれば良好に醗酵する事が判つた。(h) を CaCO_3 にて処理しこれにエタノールを加えると沈澱 (i) を生ずるがこのものと (f) を併用した場合には醗酵は悪い。これに反し (i) を濾過した濾液 (j) と (f) を併用すれば醗酵は良好であるから有効物質は (j) に来た事が判る。(j) を乾燥し無水アルコールにて処理し不溶部 (FII) と可溶部に分ける。可溶部にエーテルを添加して生ずる沈澱を (k) とする。濾液からアルコールとエーテルを追ひ水 5 cc に溶かす。この溶液を (FI) とする。このようにして得られた (FI), (FII) 及び (k) の 3 者についてその効力を調べた。即ち (f)+(FI), (f)+(FII) 及び (f)+(k) を醗酵せしめたが, その結果はいずれも (f)+(j) に劣つていた。そこで次の 3 つの組合せを作つて見た。即ち (f)+(FI)+(k), (f)+(FII)+(k), (f)+(FI)+(FII), (f)+(FI)+(FII)+(k)。その結果, 前 2 者は後 2 者に比して醗酵状況が悪かつた。即ち前 2 者の生成された全 solvent 量は 766 mg 及び 746 mg であつたが後 2 者のそれは 1060 mg 及び 1033 mg であつた。

以上の結果から (k) は無効のものであり (FI) 及び (FII) が有効なものである事が推論された。このように玉蜀黍の water extract から有効な 3 成分 (f), (FI) 及び (FII) を分離する事が出来た。これら 3 者の中, その抽出の過程から考えて見ても, 又実測の結果も (f) が最も多量の無機物を含んでいた。そこで (f) が有効なのはその中に含まれる無機物によるものではなからうかという事も考えられる。そこで (f)+(g) が (g)+

SPEAKMAN salts よりもずっと有効であつたのは、(f) 中に SPEAKMAN salts (この組成は KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, NaCl 0.001%) の組成以外の無機物が存し、それが有効に働いているためではないかと考えられる。そこで (f) の代りに (f) の ash を用いて見た。即ち (FI) + (FII) + ash of (f) を添加した。然し結果は極めて不良で、全 solvent 生成量は 394 mg にすぎなかつた。(f) の分析結果は次の如くである。

(A) 水分 13.0%

第 4 属 (Ba, Sr, Ca) …negative

(B) 灰分 15.1%

第 5 属 Mg …negative, K, Na …positive

(i) Cation (硫化水素法)

(ii) Anion

第 1 属 (Ag, Hg, Pb) …negative

これは主として磷酸で、少量の硅酸が混在。

第 2 属 (Hg, Pb, Bi, Cu, Cd, As, Sb, Sn) …negative

(C) 全糖 (glucose として) 56.9%.

第 3 属 (Ni, Co, Fe, Zn, Mn, Al, Cr) …negative

この中還元糖 3.9%.

即ち (f) の灰分の主体は K, Na, 及び磷酸にすぎなかつた。以上の結果から (f) が有効なのは主としてこの中に含まれる生長素によるものと推察される。但し (FI) 及び (FII) のみを醋酸処理玉蜀黍に添加した場合は全く醗酵しないが、これに (f) の ash を添加すると幾分の醗酵が見られる事、並びに醋酸処理玉蜀黍は殆んど全く醗酵しないが、これに SPEAKMAN salts を添加すると幾分の醗酵が見られる事などから (f) 中の ash も有効に作用している事が判る。

次いで (f) 中の有効成分を精製し、無機物を去る目的で PAURI の三室電気透析器を用いて、15 g の (f) を電気透析してみた。電気透析を応用して物質を純化したり、或は分離を行つた研究は古くから行われている。即ち SEVERIN⁽⁴⁾ はカルノシン、クレアチン、クレアチニンの分離を行い、岡⁽⁵⁾ はゼラチンの灰分除去を行い、高橋、白浜⁽⁶⁾ は寒天についてこれを行つた。又 FOSTER 等⁽⁷⁾ は FOSTER の電析装置の中室に蛋白分解液を入れ、塩基性アミノ酸は陰極室に移行する事を見た。その他オキシグルタミン酸に電析を応用する方法⁽⁸⁾、或は diastase の精製⁽⁹⁾、invertase の精製⁽¹⁰⁾、ペクチン質の精製⁽¹¹⁾ 等多くの報告がある。著者は PAURI の電気透析器を用いて 15 g の (f) を 200-cc の水に溶解して電析を行つた。陰極膜にはコロジオン膜、陽極膜には絹布にクロームゼラチンを塗布した膜を用いた。両極室の液を透析完了まで時々蒸留水で更新し、陽極室のものは NaOH で中和し、陰極室のものは H_2SO_4 で中和しそれぞれ濃縮し 50 cc とする。このようにして得られた陰、陽極室の液及び中室の液の 3 者について (FI) 及び (FII) の混合物を用いその効力を調べた。その結果は陰極室の濃縮液 (I) を用いた場には完全に醗酵したが、その他のものでは全く醗酵を起さなかつた (Table 5)。この事から (f) の有効成分は陰極室に移行した事が判る。ところが (I) の中にはカチオン (この場合は主として K, Na) が移行した事は明らかであるから、(I) の効果が果してこのもののみの影響か否かを知るために (I) の代りに SPEAKMAN salts 及び (I) を焼いた ash を用いてみた。即ち (FI) + (FII) + SPEAKMAN salts, (FI) + (FII) + ash of (I) 及び (FI) + (FII) + (I) の 3 者の効果を比較するに、前者の場合は醗酵不良であつたが、後者は前と同じく醗酵完全であつた (Table 5)。

この事から (I) の有効なのは無機物のみによるものでなく、主としてこの中の生育因子による事が明らかである。ついで (I) を更に濃縮しアセトンを加えて沈澱 (o) を生ぜしめる (無機物は殆んど全部この沈澱に来る)。これを濾別し、アセトンを追い濃縮したものを (FIII) とする。(FIII) は殆んど無機物を含まぬ。ここで (FI) + (FII) + (FIII), (FI) + (FII) + (o) 及び (FI) + (FII) + (FIII) + (o) の 3 者についてその効力を調べた所、前 2 者においてはいずれも接種後 24 時間で醗酵は停止してしまうが、後者は完全に醗酵を行つた。この事から (o) の重要性が一応考えられたが、(o) の代りに SPEAKMAN salts を用いた場合即ち (FI) + (FII) + (FIII) + SPEAKMAN salts においては醗酵はほぼ完全に行われ (FI) + (FII) + (FIII) + (o) に近い分析結果を示した。即ち (o) の効果は全く無機物 (主として硫酸加里) によるものである事が判明した (Table 5)。以上の如くにして (FI), (FII), 及び (FIII) なる有効成分を分別濃縮する事が出来た。これらの中 (FI) 及び (FIII) は殆んど無機物を含んでいないが (FII) は多量の ash (24.5%, 主体はカルシウム) を含んでいた。然しこの (FII) の無機物が醗酵に全く影響を及ぼしていない事は Table 5 の (f) + (FI) 及び (f) + (FI) + ash of (FII) 及び (f)

+(FI)+(FII) の分析結果を見れば明白である。

III. 要 約

1N 醋酸で処理した玉蜀黍粉を5%醗にした場合、アセトン ブタノール醗酵細菌はこの培地に殆んど生育し得ない。又この培地に SPEAKMAN 塩類を添加しても醗酵は貧弱である。然しこれに玉蜀黍粉末の水抽出液を添加すれば完全な醗酵を行う事を認めたので、醋酸処理を行った玉蜀黍醗及びこれに SPEAKMAN 塩類を添加したものを基本培地として用い、玉蜀黍粉末水抽出液中の生育因子を追求し有効な3つのフラクションに分けた。

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, 523 (1955).	<i>J. Biol. Chem.</i> , 56, 545 (1923).
(2) 今井 農化, 29, 445 (1955).	(8) GULLAND, J.M., and MORRIS, C.J.O. : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1934, 1644.
(3) SPEAKMAN, H.B. : <i>J. Biol. Chem.</i> , 58, 396 (1923).	(9) FRICKE, R., und KAJA, P. <i>Ber.</i> , 57, 310 (1924).
(4) SEVERIN, S.E. <i>Z. physiol. Chem.</i> , 230, 109 (1934).	(10) 武富 工化, 1938, 420.
(5) 岡 : 工化, 1927, 396.	(11) EMETT, A. M. : <i>Biochem. J.</i> , 20, 564 (1926).
(6) 高橋, 白浜 : 農化, 8, 1259 (1932).	
(7) FOSTER, G.L., and SCHMIDT, C.L.A.	

Summary

It was found that acetone-butanol fermentation bacteria could not grow on the mash from which ground maize was extracted with 1N acetic acid. But when the water extract of maize was added to this medium it grew vigorously.

And using this acetic acid treated maize mash or salts added mash as standard the author traced the growth factors in the water extract of maize, and fractionated them into three fractions.

アセトン ブタノール醗酵細菌によるビタミン B₂ の合成 (第5報) ビオチンの効果及び純合成培地の設定

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 5.

Effect of Biotin and Setting Up of Absolute Synthetic Medium.

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

I. 緒 言

著者は前報までに述べた如く、アセトン・ブタノール醗酵細菌のリボフラビン生成に関し、玉蜀黍より抽出した生長素の濃縮物を添加した合成培養基を用いて実験した結果、該菌のリボフラビン生成に対しアルギニン、アスパラギン及び phytic acid の他にも一つ重要な物質が必要である事を推論した。本報に於いてはこの物質がビオチンである事を見出し、而もリボフラビンを多量に生成し得る純合成培地を設定する事が出来たのでここに報告する。

II. 実 験 の 部

実験に用いたアセトン ブタノール醗酵細菌の菌株、培養法、並びに生産物の分析は第3報⁽¹⁾と同じである。第3報に述べた如く目的とする物質がアミノ酸ではあるまいとの結論を得たので、次に微量で有効な或る生長素ではなからうかと考えた。次の組成を有する基本培地にビオチン 1.2 γ/100 cc, ビタミン B₁ 塩酸塩 200 γ/100 cc, B₆ 100 γ/100 cc, ニコチン酸 100 γ/100 cc, 及び葉酸 1.0 γ/100 cc を混合して添加し醗酵を行わしめた。

(培地組成) glucose 3%, arginine-HCl 0.015%, asparagine 0.15%, phytic acid 0.016%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, MnSO₄·7H₂O 0.001%, NaCl 0.001%, CaCO₃ 1.5%, FI, II, III 1/2 濃度 (第3報⁽¹⁾参照)。