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 7 報)

鉄 の 作 用

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 7. Action of Iron.

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

I. 緒 言

著者は前報⁽¹⁾において、アセトン・ブタノール醗酵細菌を著者の設定したリボフラビン生成に良好な合成培地に生育醗酵せしめる場合、培地に少量の硫酸第一鉄を添加すればリボフラビンの生成は完全に阻止される事を述べた。

アセトン・ブタノール醗酵細菌によるリボフラビン生成が鉄により阻害される現象は山崎⁽²⁾が最初に報告したところである。又近年 LEVINE 等⁽³⁾は酵母によるリボフラビン合成が鉄により阻害される事を報じている。これに反し TABENKIN⁽⁴⁾ は *Er. ashbyii* のリボフラビン生成に対し良好なる合成培地について報じているが、氏はこの培地に多量の鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 mg/100 cc) を用いている。このように、微生物によるリボフラビン合成と鉄との関係に就ては未だ明らかな説明がなされていないので、著者はこの問題について実験を行い、二、三の知見を得たのでここに報告する。

II. 実 験 の 部

実験に用いた菌株は前報までのものと同じである。又菌の培養条件、並びに生産物の分析法は第 3 報⁽⁵⁾と同じ。基本培地の組成は次の如くである。glucose 3%, aspartic acid (mono-sodium salt) 0.15%, arginine-HCl 0.015%, phytic acid 0.015%, 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%, NaCl 0.001%, B₁ (塩酸塩) 200 γ%, B₆ 100 γ%, nicotinic acid 100 γ%, PABA 1.0 γ%, folic acid 1.0 γ%, biotin 1.0 γ%。

(1) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ のリボフラビン生成完全阻止の限界濃度： 著者は先ず上記合成培地に於いてリボフラビン生成を完全に阻止する硫酸第一鉄の最低濃度を知らんとし、培地に 0.05~5.0 mg/100 cc の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加して醗酵せしめ、リボフラビンの生成、並びに醗酵の様相を調べた。その結果は Table 1 に示した如くである。

Table 1. Effect of Various Concentration of Ferrous Sulfate.

Addition of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/100 cc)		5.0	3.0	2.0	1.0	0.5	0.1	0.05	0
Fermentation Product (in 100cc)	Glucose consumed (%)	93.4	93.0	92.5	93.8	91.7	94.6	93.4	90.0
	Acetone (mg)	242	246	244	236	238	216	232	139
	Butanol (mg)	586	594	610	582	632	586	642	676
	Ethanol (mg)	150	166	152	154	134	128	100	128
	Butyric acid (mg)	40	53	42	44	35	48	66	70
	Acetic acid (mg)	116	87	106	99	115	117	102	84
	Riboflavin (γ)	0	0	0	0	0	350	700	1500
B/A*		2.42	2.41	2.50	2.47	2.66	2.71	2.77	4.14

* The ratio of amount of butanol to acetone produced.

Table 1 に見られる如く、硫酸第一鉄を添加したものはその量に関係なく皆良く醗酵したが、それを 0.5~5.0 mg/100cc まで添加したものにあつてはリボフラビンの生成は皆無であつた。然し 0.1 mg/100 cc 添加したものはリボフラビンの生産が

僅かではあるが認められ (350 γ/100 cc), 0.05 mg/100 cc 添加したもののにおいては 700 γ/100 cc のリボフラビンが生成された。即ちこの実験より $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ がリボフラビン生産を完全に阻害する限界濃度はほぼ 0.5 mg/100 cc 附近にある事が判る。この濃度は 1.8×10^{-5} mole Fe^{++} である。

(2) $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 及び $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ の阻害作用： 上に述べた如く Fe^{++} は極めて微量でリボフラビンの生成を完全に阻害する事が判つたので、次に Fe^{+++} 及び鉄の錯化合物なる黄血塩はリボフラビン生成に対し如何なる作用を有するかを知らんとし実験した。その結果は Table 2 に示した如くである。

Table 2 に見られる如くリボフラビン生産を完全に阻害する硫酸第二鉄の最低濃度は 0.36 mg/100 cc で、これは 1.8×10^{-5} mole Fe^{+++} である。これは Fe^{++} の場合と全く一致する。この事から Fe^{++} 及び Fe^{+++} の

Table 2. Effect of Ferric Sulfate and Potassium Ferrocyanide.

Addition (mg/100cc)	$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1.8	0.36	0.07	0.035	—	—	—
		—	—	—	—	3.8	0.76	—
Glucose consumed (%)		94.2	88.4	82.5	81.7	93.3	89.2	90.0
Fermentation Product (in 100 cc)	Acetone (mg)	201	195	159	143	200	143	106
	Butanol (mg)	558	514	656	714	566	674	742
	Ethanol (mg)	86	86	117	94	140	100	98
	Butyric acid (mg)	57	64	46	24	66	72	31
	Acetic acid (mg)	111	137	109	105	109	99	87
	Riboflavin (γ)	0	0	1360	1460	0	780	1520
B/A*		2.78	2.66	4.16	4.99	2.83	4.78	7.00

* The ratio of butanol to acetone produced.

各種ビタミンの影響 以上述べた如き鉄のリボフラビン生成阻害に対し各種ビタミン或は phytic acid が拮抗的な作用を持つか否かを知らんとし、基本培地に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg/100 cc 添加し (これはリボフラビン生成を完全に阻害する限界濃度である)、これに更に各種ビタミン或いは phytic acid を多量に添加し、リボフラビン生成が回復されるか否かを調べた。これらの添加濃度は (100 cc 中)、

ビオチン……10~40 γ, 葉酸……10~40 γ, Ca-パントテート 50~500 γ, PABA……10~100 γ, B₁, B₆ 及びニコチン酸……250~500 γ, B₁₂……1.5~3.0 γ, phytic acid 5~30 mg.

これらの結果は Table 3 に示した如くである。この表に見られる如く、これらビタミン及び phytic acid は

Table 3. Effect of Vitamins and Phytic Acid on the Inhibitory Action of Ferrous Sulfate.

Addition	(γ/100 cc)	Glucose	Fermentation Product (in 100 cc)						
		consumed	Ribofla-	Acetone	Butanol	Ethanol	Butyric acid	Acetic acid	B/A
		(%)	vin (γ)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	
None	{ A*	87.5	0	218	500	119	35	156	2.28
	{ B**	85.0	1510	122	758	92	33	99	6.21
Biotin	{ 10	85.9	0	236	566	104	37	111	2.40
	{ 20	88.0	0	228	542	130	31	107	2.33
	{ 40	82.2	0	232	564	131	71	87	2.43
Folic acid	{ 10	90.0	0	230	560	162	42	106	2.43
	{ 20	84.2	0	205	542	122	49	105	2.64
	{ 40	85.9	0	226	540	119	—	—	2.39
PABA	{ 10	81.5	0	210	448	71	86	189	2.13
	{ 20	80.0	0	215	442	72	71	172	2.06
	{ 40	81.0	0	203	450	67	89	165	2.22
	{ 100	80.0	0	212	454	72	63	189	2.14
Ca-panto- thenate	{ 50	85.2	0	203	562	34	37	140	2.77
	{ 250	90.5	0	209	536	104	53	107	2.56
	{ 500	93.6	0	213	596	88	58	95	2.79
B ₁	{ 250	82.0	0	195	464	66	31	210	2.39
	{ 500	79.2	0	193	420	74	32	212	2.18
B ₆	{ 250	78.4	0	193	452	24	51	201	2.34
	{ 500	78.0	0	193	436	60	57	194	2.26
Nicotinic acid	{ 250	75.0	0	188	406	54	57	208	2.16
	{ 500	81.0	0	197	450	82	59	174	2.28
B ₁₂	{ 1.5	94.6	0	205	540	92	62	94	2.63
	{ 3.0	94.2	0	186	524	100	51	108	2.82
Phytic acid	{ 5 mg	85.2	0	190	518	95	66	108	2.73
	{ 15 mg	91.7	0	200	550	132	68	100	2.75
	{ 30 mg	88.5	0	209	534	100	73	84	2.56

* A was added ferrous sulfate. ** B was not added ferrous sulfate.

い。然し $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を限界濃度たる 0.5 mg/100 cc 用いた場合には CaCO_3 1.5% 添加によりリボフラビン生成が僅かに認められる。然しその量は僅少であるから鉄の阻害作用に対し CaCO_3 が拮抗するとは考え難い。

(5) **ブタノール、アセトンの生成比 (B/A ratio) について** 今までの実験結果を通覧するにリボフラビンを多量に生成し得る合成培地を醗酵せしめた場合、ブタノール/アセトンの生成比は、鉄を加えてリボフラビンの生成を阻害せしめた場合のそれとは相当大きな差のある事が見受けられる。今までの炭酸石灰を添加しない合成培地の醗酵生産物の分析結果と、これに $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を加えた場合のそれとを、B/A の値について整理して

リボフラビン生成阻害の面に於ける作用は全く同一であろうと推論される。これに反し黄血塩の場合に於いてはその濃度は 9.0×10^{-5} mole である。即ち鉄の錯化合物もリボフラビン生成を阻害するが、その作用は硫酸鉄などに比し弱い事が判る。

(3) 鉄の阻害作用に対する

いずれも鉄のリボフラビン生成阻害作用に拮抗する事は出来なかつた。

(4) 鉄の阻害作用に対する

炭酸石灰の影響: 玉蜀黍醗の如き自然物を培地にした場合に、炭酸石灰を添加しないとリボフラビンの生成は見られない事は著者も認めているが、この原因は玉蜀黍中に存する微量の鉄のリボフラビン生成阻害作用に対し、 CaCO_3 が拮抗するためであろうという事も一応考えられる。そこで鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) を添加した基本培地に更に CaCO_3 を添加してリボフラビンの生成が起るか否かを調べた。その結果は Table 4 に示した如くである。この表に見られる如く $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 5 mg, 10 mg/100 cc 添加した場合には CaCO_3 を 1.5% 添加してもリボフラビンの生成は認められな

Table 4. Effect of CaCO_3 on the Inhibitory Action of Ferrous Sulfate.

Addition of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/100 cc)		10	5.0	0.5	0.5	0
Addition of CaCO_3 (g/100 cc)		1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Glucose consumed (%)		100	100	96.5	82.5	80.0
Fermentation Product (in 100 cc)	Acetone (mg)	70	124	87	64	74
	Butanol (mg)	268	418	328	229	175
	Ethanol (mg)	88	80	118	58	69
	Butyric acid (mg)	524	343	539	462	616
	Acetic acid (mg)	363	306	323	315	308
	Riboflavin (γ)	0	0	trace	300	1400

Table 5. Change of the Value of B/A Ratio by the Addition of Iron.

Fe-free medium			Fe-added medium			
B/A	Riboflavin formed (γ/100cc)	Glucose consumed (%)	Addition of FeSO ₄ · 7H ₂ O (mg/100cc)	B/A	Riboflavin formed (γ/100 cc)	Glucose consumed (%)
3.61	1600	96.7	20.0	2.71	0	95.9
7.74	1580	95.9	10.0	2.84	0	95.0
6.18	2000	96.6	5.0	2.42	0	93.4
4.14	1500	90.0	3.0	2.41	0	93.0
7.00	1520	90.0	2.0	2.50	0	92.5
6.21	1510	85.0	1.0	2.47	0	93.8
5.12	1500	93.5	0.5	2.66	0	91.7
			0.5	2.28	0	87.5
max.	7.74			2.84		
min.	3.61			2.28		
av.	5.71			2.65		

みると Table 5 の如くなる。即ちリボフラビンを多量に生成する培地にあつては B/A の価は相当広い偏差はあるが、いずれも大で最高 7.74, 最低 3.61 平均 5.71 である。これに反し鉄を加え、リボフラビン生成を阻止したものにあつては B/A の価はいずれも低く、最高 2.84, 最低 2.28, 平均 2.65 である。この現象は $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ を用いた場合 (Table 2) にも、或は Table 3 の場合にも明らかに認められる。この様に CaCO_3 を添加しない基本培地 (CaCO_3 を添加すれば酸醗酵に移行する故 B/A の価を云々するのは妥当でないと思われる) に於いては B/A の価は高く、これに鉄を加えてリボフラビン生成を阻止した場合にはその価が小さい事が

判る。そこでこの原因について考えて見るに、次の如き 2 つの理由が考えられる。即ち

(A) 鉄が糖代謝に直接的な作用を及ぼす結果 B/A の価が低くなる。

(B) 鉄の直接的な作用に依るものでなく、基本培地にあつても B/A の価は 2.65 位であるべき筈の所、この培地にあつてはリボフラビンを多量に生成するため、このリボフラビンが菌の酸化還元系に作用を及ぼして B/A の価を高める。

この二つの理由のいずれが妥当であるかを知るために次の如き実験を行つた。即ち基本培地に $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.5 mg/100 cc 添加し、これに更に純粋のリボフラビン 1500 γ/100 cc を添加し醗酵させる。若しリボフラビンの作用によつて B/A の価が左右されるのであれば、この場合には B/A の価は基本培地のそれと同様な高い価を示すべきであると考えられる。この実験の結果は Table 6 に示す如くである。この表に見られる如く鉄とリ

Table 6. Effect of Riboflavin on the Value of B/A Ratio.

Addition (in 100 cc)		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg)		—	—	0.5	0.5	0.5	0.5
		Riboflavin (γ)		—	—	—	—	1500	1500
Riboflavin at the completion of fermentation (γ/100 cc)		1580	1520	0	0	1380	1400		
Riboflavin formed (γ/100 cc)		1580	1520	0	0	0	0		
Glucose consumed (%)		82.4	80.0	91.8	89.3	90.9	89.3		
Fermentation Product (mg/100 cc)	Acetone	139	141	205	211	190	205		
	Butanol	674	702	570	580	548	549		
	Ethanol	70	73	106	94	94	104		
	Butyric acid	70	58	75	64	57	59		
	Acetic acid	108	110	92	106	120	123		
B/A		4.85	4.98	2.78	2.75	2.88	2.68		
av.		4.92		2.77		2.78			

ボフラビンを同時に添加したものの B/A 価は平均 2.78 で、基本培地に鉄のみを加えたものの価 2.77 と一致する。これに反し、鉄を加えぬ基本培地の価は 4.92 で、遙かに大である。この事から鉄が存在する場合にはリボフラビンを添加しても B/A の価を高める事は出来ぬ。故に B/A の価に差異を生ぜしめる原因は、前記 2 原因の中 (1) によるものであり、(2) によるも

のではないと推論される。又この実験より、鉄とリボフラビンを同時に添加したものにあつては、醗酵終了後のリボフラビン分析値より見て、リボフラビンの増減が無かつた事が判る。即ち鉄のリボフラビン生成阻害作用に対しリボフラビン自体も拮抗し得ない事が判るし、鉄がリボフラビンを破壊するもので無い事も推論される。普

通自然物を用いたアセトン・ブタノール醗酵に於いては正常醗酵を行つた場合 $B/A=2.0$ というのが広く認められている。然し著者のこの実験から B/A の値は培地の組成により変りうるものである事が判る。この事は最近の ROSENFELD 及び SIMON⁽⁶⁾ の実験、即ちアセトン・ブタノール醗酵細菌の菌体懸濁液を以てビルビン酸を醗酵せしめる場合、反応液に加里を添加すればアセトンの生成が増加し、弗化ソーダが存すればブタノール及び酪酸が増加するという事と考え合わせ興味深いものである。以上のようにリボフラビンが全然生成されぬ程度の鉄を添加すれば B/A の値が低下するが、 B/A の値が高い場合にのみリボフラビンが生成されるか、換言すれば B/A の値とリボフラビン生成との間に密接な関係があるか否かという事は更に研究を行うべき問題であろう。

アセトン・ブタノール醗酵細菌は糖より多量の炭酸ガス及び水素を生成するものであるから、鉄がこれらガス生産に影響を及ぼすか否かを知らうとし実験を行つた。その結果は Table 7 に示した如く、炭酸ガスの生産に

Table 7. Effect of Iron on the Production of Various Fermentation Product. (Data in this Table indicate the percentage on consumed glucose)

Medium	Acetone (%)	Butanol (%)	Ethanol (%)	Butyric acid (%)	Acetic acid (%)	CO ₂ (%)	H ₂ (%)	Total (%)	B ₂ (γ/100 cc)
Not added Fe	7.9	28.7	3.9	1.1	3.4	44.4	1.4	908	1860
Added FeSO ₄ ·7H ₂ O (1mg/100 cc)	8.9	24.9	4.9	1.7	4.1	44.5	1.6	90.6	0

Table 8. Effect of Iron Added at Various Times.

No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Riboflavin formed (γ/100 cc after inoculation)	24 hrs.	0*	0*	0	0	0	0	0	0	0
	48	—	—	110*	120*	100	100	100	100	—
	72	—	—	—	—	721*	824*	700	783	—
	96	—	—	—	—	700	789	1500	1600	—
	120	trace	trace	150	170	714	840	1570	1660	0
Glucose consumed (%)		90.0	92.5	93.3	93.8	88.4	95.0	90.0	91.7	93.7
	Acetone	222	213	200	203	180	176	193	189	217
	Butanol	570	522	548	560	636	634	722	702	580
	Ethanol	87	152	120	110	91	76	60	68	94
	Butyric acid	44	59	66	64	48	64	55	77	68
Fermentation product (mg/100 cc)	Acetic acid	113	92	92	95	98	96	92	97	99
	B/A	2.56	2.40	2.74	2.75	3.53	3.60	3.74	3.71	2.68

* Iron was added at this time.

The medium of No. 7 and 8 were not added iron.

The medium of No. 9 was added iron before inoculation.

ある。表中*印を附したのはその時間に FeSO₄·7H₂O を 0.5 mg/100 cc 添加した事を意味するものである。又 No. 9 は接種前に鉄を同量添加したものである。

これらの結果をリボフラビン生成状況についてグラフにて示したものが Fig. 1 である。

この実験により、醗酵開始後の培養に鉄を加えれば、その時に於いて直ちにリボフラビンの生成が停止してしまう事がはつきりと判つた。又鉄を添加する時期が遅れば B/A の値が大となる傾向も見られる。ここで鉄がリボフラビン生成を阻害する原因について考えて見ると次の 4 つの事が考えられる。

- 鉄がリボフラビンを分解する。
- 鉄の添加により、アセトン・ブタノール醗酵細菌の菌体に於けるリボフラビン生成酵素系の生産が阻害される。
- 無鉄培地に於いては、菌は Fe-porphyrin 系呼吸酵素を合成する事が出来ないため、リボフラ

は影響を与えないが、鉄が添加されると水素の生成がやや増加される傾向が認められた。

(6) 鉄の添加時期について

今まで述べた実験に於いては、鉄を添加する時期は種菌を接種する以前であつた。そこで今回は醗酵中の培養について、鉄を各般の時間に添加したならば、リボフラビンの生成が如何に作用されるかを知らんとし実験を行つた。即ち基本培地に種菌を接種し、24, 48, 72 時間後に FeSO₄·7H₂O を 0.5 mg/100 cc 宛添加し、その時のリボフラビンを定量し、更に醗酵を継続せしめ、醗酵終了後のリボフラビン量と比較した。その結果は Table 8 に示した如くで

Fig. 1. Effect of Iron on Riboflavin formation.

Fe → indicates the addition of FeSO₄·7H₂O 0.5 mg/100 cc.

ビンを多量に合成し、フラビン系酵素によつてこれをカバーしようとする。然し培地に鉄が存在すれば菌は Fe-porphyrin 系酵素を合成し得るためリボフラビンを生産しない。

(d) 鉄はリボフラビン合成酵素系の作用を阻害する。

これら原因の中 (a) は妥当と思われない。何となれば鉄とリボフラビンを同時に添加して醗酵させた場合 (Table 6) でもリボフラビンの分解は殆んど認められないし、 CaCO_3 を添加した基本培地でリボフラビンを生成せしめ、これに鉄を添加して暗中に長時間放置するもリボフラビンの減少は認められないからである。又 (b) も妥当とは考えられない。何とならば菌体に於けるリボフラビン生成酵素系の生産が阻害されるためであれば、Fig. 1 に於いて 72 時間後に鉄を添加した場合、この時間に於いては菌体の生成量も殆んど最高に達しており、而もリボフラビンを 700~800 γ /100 cc も生産しているのであるからリボフラビン合成酵素系も既に完成されていると見られる。故にも早鉄を加えても鉄の作用は現われず、リボフラビン生成曲線は上昇すべき筈である。然るに事實は、その点に於いても鉄の添加によりリボフラビンの生成は完全に停止するから、この (b) の原因も妥当とは考えられぬ。(c) の問題に関しては更に検討すべき余地があるが、アセトン・ブタノール醗酵細菌は所謂絶対嫌気性の菌であり、呼吸は行わないものと考えられている。更に第 6 報⁽⁷⁾に述べた如く、鉄以外の物質によつてもリボフラビンの生成は阻害される事から見ても、このような事は考え難い。

Fig. 1 に見られる如く鉄を添加するとその点に於いてリボフラビンの生成が直ちに停止する事、並びに上述の如き考察から著者は鉄の阻害作用は (d) の原因、即ち鉄がリボフラビン合成酵素系の作用を阻害するものであると推論するものである。

III. 要 約

著者の設定したリボフラビン生成に良好な合成培地について鉄の作用を調べた結果、次の如き知見を得た。

(1) 鉄がアセトン・ブタノール醗酵細菌のリボフラビン生成を完全に阻止する最低濃度は Fe^{++} 或は Fe^{+++} 共に 1.8×10^{-5} mole である。又黄血塩の如き鉄の錯化合物もリボフラビン生成を阻害するが、硫酸第一鉄、第二鉄に比しその作用は弱い。

(2) 鉄の阻害作用に対しビオチン、葉酸、PABA、Ca-パントテート、 B_1 、 B_6 、ニコチン酸、 B_{12} 、phytic acid 並びに CaCO_3 等は拮抗作用を示さない。

(3) 鉄を添加しない合成培地に於けるブタノール・アセトンの生成比 (B/A ratio) の値は、その培地にリボフラビン生成を完全に阻害する濃度の鉄を添加した場合のそれより遙かに大である。

(4) この原因は、生成されるリボフラビンの間接的な作用によるものでなく、鉄の直接的な作用によるものと推論される。

(5) 鉄の添加によつて、糖よりの炭酸ガス生成率は変化はないが、水素の生成率はやや増大する傾向がある。

(6) 醗酵中の基本培地に、各時期に鉄を添加すれば、リボフラビンの生成は直ちに停止する。

(7) 鉄のリボフラビン生成阻害作用について考察した結果、鉄のこの作用は、リボフラビン生成酵素系の作用を阻害するものであらうと推論した。

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，29，567 (1955)。

(2) 山崎：Biochem. Z., 307, 431 (1941)。

(3) LEVINE, H., OYAS, J. E., WASSERMAN, L., HOOGERHEIDE, J. C., and STERN, R. M.: Ind. Eng. Chem., 41, 1665 (1949)。

(4) TABENKIN, B.: U. S. P. 2,493,274 (1950)。

(5) 今井：農化，29，523 (1955)。

(6) ROSENFELD, B., and SIMON, E.: J. Biol. Chem., 186, 395 (1950)。

(7) 今井：農化，29，567 (1955)。

Summary

Using a synthetic medium which was set up by the author and was favorable for the formation of riboflavin by acetone-butanol fermentation bacteria, the author investigated on the inhibitory action of iron, and found several facts as follows:

(1) The minimum concentration of ferrous sulfate to cause perfect prevention of riboflavin formation is identical with that of ferric sulfate and it is 1.8×10^{-5} mole of Fe^{++} or Fe^{+++}

(2) Biotin, folic acid, PABA, Ca-pantothenate, B_1 , B_6 , nicotinic acid, B_{12} , phytic acid and

CaCO₃ do not show any competitive action against the inhibitory action of iron.

(3) The value of B/A ratio (the ratio of butanol to acetone produced) on Fe-free synthetic medium is always high than that of Fe-added medium.

(4) For this result it is concluded that the change of the value of B/A ratio is caused by the direct action of iron and not by the indirect action of riboflavin formed.

(5) The evolution of CO₂ is not affected, but the evolution of H₂ is slightly increased by the addition of ferrous sulfate.

(6) When iron is added to the fermenting culture, the additional formation of riboflavin is stopped immediately and perfectly at the time of the addition of iron.

(7) It is concluded that the inhibitory action of iron on riboflavin formation may be attributed to the inhibition on the action of the riboflavin forming enzyme system of acetone-butanol fermentation bacteria.

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 8 報)

砒酸ソーダの作用

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 8. Action of Arsenate.

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

I. 緒 言

著者は第 6 報⁽¹⁾に於いて、種々なる塩類がアセトン ブタノール醗酵細菌の生育、醗酵及びリボフラビン生成に及ぼす影響について報じたが、その時鉄の他に砒酸ソーダも該菌のリボフラビン合成を阻害する作用を持っている事を報じた。然し鉄は菌の生育、醗酵を全く阻害しないが砒酸ソーダは少しくそれを阻害する事を認めたので、本報に於いては砒酸ソーダのリボフラビンの合成阻害作用を更に検討した結果について述べる。

II. 実験の部

実験に用いた菌株、培養法、生産物の分析法等は第 3 報⁽²⁾と同じである。本報に於いて使用した基本培地は次の如くである (100 cc 中). glucose 3 g, aspartic acid (mono-sodium salt) 150 mg, arginine-HCl 15 mg, phytic acid 15 mg, KH₂PO₄ 50 mg, K₂HPO₄ 50 mg, MgSO₄·7H₂O 20 mg, MnSO₄·7H₂O 1.0 mg, NaCl 1.0 mg, B₁ 塩酸塩 200 γ, B₂ 100 γ, nicotinic acid 100 γ, PABA 1.0 γ, folic acid 1.0 γ, biotin 1.0 γ.

(1) 砒酸ソーダのリボフラビン生成完全阻止の限界濃度: 上記合成培地に於けるアセトン ブタノール醗酵細菌のリボフラビン生成を完全に阻止する砒酸ソーダの最低濃度を求めようとして、培地に 0.05~0.8 mg/100 cc の Na₃AsO₄·12H₂O を添加したもの、並びに対照として砒酸ソーダを添加しないものに就て醗酵を行わせ、リボフラビンの生成、並びに醗酵の様相を調べた。その結果は Table 1 に示した如くである。この表に見られ

Table 1. Effect of Various Concentration of Na₃AsO₄·12H₂O.

Addition of Na ₃ AsO ₄ ·12H ₂ O (mg/100 cc)		8.0	5.0	3.0	2.0	1.0	0.5	0.1	0.05	0	0
Glucose consumed (%)		54.0	67.0	77.5	83.8	80.0	86.7	81.7	75.0	86.7	87.2
Fermentation product (in 100 cc)	Riboflavin (γ)	0	trace	570	760	980	1560	1720	1600	1900	1840
	Acetone (mg)	114	139	139	130	108	126	114	110	114	110
	Butanol (mg)	245	384	586	696	720	770	672	664	742	828
	Ethanol (mg)	45	52	55	81	71	81	80	92	85	84
	Butyric acid (mg)	84	134	26	22	20	24	53	29	62	42
	Acetic acid (mg)	227	223	147	113	134	96	111	131	98	80
B/A*		2.15	2.76	4.22	5.35	6.67	6.30	5.89	6.04	6.51	7.53

* The ratio of amount of butanol to acetone produced.

る如く、リボフラビン生成を完全に阻害する砒酸ソーダの濃度は比較的高く 5.0~8.0 mg/100 cc 附近の所にある。しかも砒酸ソーダの醗酵阻害力がこれにともなつて来る。しかし単に砒酸ソーダが醗酵を阻害したがためにリボフラビン生成が起らなかったとは考えられぬ。何となれば砒酸ソーダを 2.0 mg/100 cc 以下の濃度を用いた