本研究について終始御指導並びに御鞭撻を戴いた植村定治郎教授, 菌株の分与に御便宜を戴いた三共製薬研究室の宮沢氏, 並びに食研の杉村氏に感謝する。又, 種々御援助を戴いた日本皮革株式会社社長伊藤勇二氏並びに日本皮革研究所の諸氏に深謝の意を表する。

尚, 本報告の一部は昭和 32 年 4 月, 日本農芸化学会大会で講演した。

(1) 小嶋尚夫, 松谷 豊, 男沢熙子, 今野 周,
植村定治郎: 本誌, 32, 33 (1958).	C. N. Frey: <i>Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.</i> , 15, 141 (1943).
(2) 小嶋尚夫, 松谷 豊: 本誌, 32, 38 (1958).	(9) 佐藤正弘, 山田一弥, 植村定治郎: 本誌, 30, 492 (1956).
(3) A. Jones, S. Morris: <i>Analyst</i> , 79, 586 (1954).	(10) E. E. Snell, J. L. Wright: <i>J. Biol. Chem.</i> , 139, 675 (1941).
(4) J. S. Simpson, D. F. Harris: <i>ibid.</i> , 82, 210 (1957).	(11) E. E. Snell, F. M. Strong: <i>Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.</i> , 11, 346 (1936).
(5) 牛場大蔵, 金城清勝, 徐 毓芝, 吉岡守正:
バイオアッセイ集談会誌, 2, 3 (1955).	(12) Capps, Hobbs, Fox: <i>J. Bact.</i> , 55, 869 (1948).
(6) 佐藤正弘, 斎藤恭子等: 本誌, 31, 675 (1957).	(13) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢 滋:
本誌, 31, 738 (1957).
(7) 男沢熙子, 小嶋尚夫, 植村定治郎: 本誌, 31, 738 (1957).	
(8) L. Atkin, W. L. Williams, A. S. Schultz,	

Pulp disc 法によるビタミン及びアミノ酸の微生物定量法 (第 4 報)*

数種のアミノ酸の定量について

松谷 豊, 小嶋 尚夫 (東北大学農学部)

昭和 32 年 6 月 21 日 受理

緒 言

さきに B 群ビタミン類の定量に Pulp disc 法が充分適用され得ることを認め, これを報告したが^(1,2), 更に第 3 報⁽³⁾において, その他のビタミン及びアミノ酸への適用を試み, 本法によってアミノ酸類が定量可能なる事を認め, 種々の条件について考察を加えた。

本報ではその中, リジン, メチオニン, グルタミン酸, フェニールアラニンについて定量を行って本法の条件と分析結果の検討を行った。その結果, この場合には十分に満足すべき成績を得, 試験管法に比べて操作の簡易な点から Routine Work に適当することを認めたので報告する。

尚, Lees 等^(4,5)及び Simpson 等⁽⁶⁾は Plate 法における要因分析を行い, 定量誤差の少いことを認め, tube 法に勝っていることを報じている。

実 験 方 法

(1) 定量アミノ酸と使用菌株: 第 3 報に供試したアミノ酸の中, リジン, メチオニン, グルタミン酸, フェニールアラニンの 4 種を次に示す菌株を用いて定量した。

アミノ酸の種類
L-リジン, DL-メチオニン
L-グルタミン酸, DL-フェニールアラニン

使用菌株
Leuc. mesenteroides
Lact. arabinosus 17-5

使用菌株の保存は第 1 報の記載と同様に行った。

(2) 定量培地は第 3 報に記載した培地を用いた。

(3) 接種菌液の調製は第 3 報と同様にして行い, 特に記載のない場合は $-\log T=0.9$ を示す heavy inoculum を用いた。その他定量操作法等は第 1 報で述べた様にして行い, 第 3 報記載の条件について検討を行った。

* Studies on the Microbiological Assay of Vitamins and Amino Acids by the Pulp Disc Method. Part. IV. On the Assay of Several Amino Acids.
By Yutaka MATSUYA and Hisao KOJIMA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tôhoku University).

実験成績並びに考察

I. 定量条件の検討

(1) 定量範囲： 供試のアミノ酸の標準液系列を次に示す濃度の範囲にわたって調製し、標準曲線を求めた。この濃度範囲以外では検討しなかった。

第 1 図 接種菌濃度と標準曲線との関係

(1) グルタミン酸, (2) リジン, (3) メチオニン, (4) フェニールアラニン

について検討を行った。供試の各菌株はいずれも接種菌原液の濃度を $-\log T=1.1$ になるように調製し (第 1 報参照), これを夫々 2 倍, 3 倍, 4 倍, 8 倍に希釈した菌液を定量用寒天培地に 1% 宛添加して既述の方法で標準曲線を求めた。この結果は第 1 図に示したが、いずれのアミノ酸も菌濃度が高くなると生育帯の直径は小となるが、それと共に生育帯の周縁が明確になる傾向を示したがフェニールアラニン、メチオニンではアミノ酸濃度の高い方の生育帯の周縁はむしろ拡大して不明確になる傾向が見られる。又菌濃度が高くなって生育帯が認め難くなる。菌濃度を低くした場合にはこれと逆の傾向が認められ、低くなるに従って漸次アミノ酸の低濃度の部分から生育帯が不明確になるので、最少有効濃度を最も低くする様に考慮してしかも一定濃度以上で接種しなければならぬ。又この実験に供した菌濃度では標準液濃度と生育帯直径との関係に変化を生じ標準曲線が平行しない。このことは殊にリジンとグルタミン酸に見られる。前報でも Pulp disc の周縁に生じた生育帯の様子について詳細に述べたが、生育帯の様子は各アミノ酸及び両菌株によって相違し、ここにあげた 4 種のアミノ酸については *Leuc. mesenteroides* を用いるとリジン及びメチオニンがより鮮明な生育帯を生じ、リジンは殊に明確であるが、*Lb. arabinosus* を用いるとグルタミン酸、フェニールアラニンもかなり明確である。又菌濃度によっては生育帯に二重の ring (dike) を生ずる場合があるが (写真参照)、殊にリジン、メチオニンにおいて菌濃度がやや稀い場合にこの傾向が認められる。しかし菌濃度を高くすることによって均一な生育帯を得ることができる。又これらの成績と上述の諸点並びに生成する生育帯の明確度を考慮してこれらのアミノ酸の定量に使用する接種菌液の適当濃度を決めると、 $-\log T=0.9$ のものを定量寒天培地に 1% 添加することによって良好な標準曲線を得ることができる。更に生育帯の周縁の明確度は培地に使用する寒天濃度によっても影響を受け、これらのアミノ酸の場合には寒天濃度が高い方が明確度が高い傾向を示した。

その他、寒天濃度と生育帯との関係は第 1 報で述べた関係と同じである (寒天濃度は製品によって異なるが、

測定結果は第 1 図に示すように各アミノ酸濃度と生育帯直径の関係が直線として得られた。図に見られる如く直線関係を示す濃度範囲は試験管を用いる定量法に比較すると最少有効濃度は高くなり、定量範囲が著しく広くなる。この範囲以下では生育帯の明確度が劣るし、濃度が高くなると周縁が不鮮明になる傾向がみられるが、接種菌濃度や寒天濃度を変化させるとこの生育帯を明確に認めうる範囲は異なってくる。試験管法より定量範囲が広い事と高い事は前報でも述べたように定量の目的によって有利な場合が多い。

(2) 接種菌濃度と生育帯との関係：

次に接種菌の接種量と生育帯との関係に

写真 生 育 帯

第1報の製品と同一のものをを用いている)。又定量用培地, 平板の層の深さと生育帯との関係はビタミンの場合と同様であるが, 層の厚さの程度によっては生育帯の明確度に若干の影響を与える場合がある。水室処理等の前処理を行って, アミノ酸の拡散を促進することを試みたが, この際には菌濃度を高くして行う必要がある。しかし特に前処理を行わなくても十分に生育帯を認めることができた。

(3) 培養時間と生育帯との関係: 第1報でも述べたように, 生育帯発現までに必要な培養時間は接種の状態即ち接種菌の生育時期又は接種菌量等によって影響されると見られるが, 上記のような適当濃度で接種するとアミノ酸の場合にはビタミンの場合よりやや早く8~12時間で鮮明な生育帯を得ることができる。又生育直径と生育帯発現迄の時間との関係は拡散と菌の生育との関係から時間が長ければ生育帯は大となる傾向がある。接種の状態が異なると生育帯発現迄の時間が異なると考えられるから, 適当な接種条件を用いることによって定量を迅速に行いうる。尚上記の接種菌濃度で生育帯発現後, 引続き培養を行うと生育帯に変化がみられ, 殊に標準液の高濃度の部分で生育帯の拡大が著しくなり, 周縁が不鮮明になる。この傾向はアミノ酸の種類によって異なるが殊にフェニルアラニンに著しいので適当な培養時間で測定することが必要である。

以上, Pulp disc 法によって供試の4種のアミノ酸の定量条件を検討したが, 一定の精度を保つために安全な条件としては上述の如く前培養を行って $-\log T=0.9$ の接種菌濃度を培地に1%添加し, 培地寒天濃度1%, 培地平板の厚さは約3mmという条件を設定して以後の実験を行った。この様な適当な条件で適当時間(8~12時間)後測定を行えば明確な生育帯を得ることができるので, 簡易に且つ短時間でアミノ酸の定量を行うことができる。

II. 試料の定量成績

上述のように設定した方法によって種々の試料中の各アミノ酸量を定量しその分析成績に検討を加えた。

(1) 試料: 定量試料として次の4種類のものをを用いたが, 夫々の調製法を次に示した。

- (a) 酵母エキス 市販(和光純薬)の乾燥酵母エキス粉末の10%水溶液。
- (b) ポリペプトン 市販(和光純薬)のポリペプトンの10%水溶液。
- (c) ポリペプトン水解物 上記ポリペプトンを7時間硫酸で分解し, 水酸化バリウムで中和せるもの。
- (d) カザミノ酸 市販(日産水研製)のカザミノ酸の10%水溶液。

(2) 試料稀釈液系列と生育帯: 各試料について稀釈液の系列を作り, 夫々の試料濃度と生育帯直径の長さとの関係を求めると第2図のようになり, 標準液系列で得られる生育帯の直径と濃度との直線関係と同じになるからこの範囲では drift は認められない。供試した各試料は各々のアミノ酸について同様な結果が得られた。即ちこの事は異った濃度で得られた分析値が互によく標準曲線にのることを示している。又この範囲外に出た場合には棄却するか, 各アミノ酸について玉利⁽⁷⁾の提唱した様に実験式を求めれば計算によって算出することができる。

第2図 試料濃度と生育帯直径との関係

A: 酵母エキス, B: ペプトン, C: ペプトン水解物, D: カザミノ酸

ちこの事は異った濃度で得られた分析値が互によく標準曲線にのることを示している。又この範囲外に出た場合には棄却するか, 各アミノ酸について玉利⁽⁷⁾の提唱した様に実験式を求めれば計算によって算出することができる。

(3) 再現性: 上記の試料について各アミノ酸量を再度定量した結果を第1表に示したが, No. I と No. II は培地を同時に調製した場合であり, No. III は培

第 1 表 Pulp disc 法の再現性 (アミノ酸)

実験番号 No.	定量値 (γ/ml)			再現率 (%)	
	I	II	III	II/I	III/I
L-グルタミン酸	A 2.4	2.2	2.3	92	96
	B 3.9	4.2	4.2	108	108
L-リジン	A 1.35	1.37	1.50	102	111
	B 4.23	4.20	4.20	99	99
DL-メチオニン	A 0.36	0.34	0.35	95	97
	B 1.40	1.43	1.60	102	110
DL-フェニールアラニン	A 0.45	0.43	0.45	96	100
	B 3.20	3.13	3.50	98	109

A: 酵母エキス, B: ポリペプトン

第 2 表 Pulp disc 法の回収率 (アミノ酸)

アミノ酸の種類	試料	酵母エキス				ポリペプトン		ポリペプトン		ポリペプトン	
		量	量	量	量	量	量	量	量	量	量
L-グルタミン酸	試料中の量	γ/ml	860	1000	600	1000	600	1000	600	1000	600
	添加量	"	250	500	500	500	500	500	500	500	500
	合計量	"	1110	1500	1100	1500	1100	1500	1100	1500	1100
	見出せる量	"	1140	1500	1050	1500	1050	1500	1050	1500	1050
	回収率	%	103	100	95	100	95	100	95	100	95
L-リジン	試料中の量	γ/ml	1500	930	1900	1540	1540	1900	1540	1900	1540
	添加量	"	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	合計量	"	2000	1430	2400	2040	2040	2400	2040	2400	2040
	見出せる量	"	1940	1380	2350	2000	2000	2350	2000	2350	2000
	回収率	%	97	96	98	98	98	98	98	98	98
DL-メチオニン	試料中の量	γ/ml	350	700	620	1300	1300	620	1300	620	1300
	添加量	"	150	500	300	500	500	300	500	300	500
	合計量	"	500	1200	920	1800	1800	920	1800	920	1800
	見出せる量	"	480	1150	900	1850	1850	900	1850	900	1850
	回収率	%	96	96	98	103	103	98	103	98	103
DL-フェニールアラニン	試料中の量	γ/ml	900	1200	1000	1300	1300	1000	1300	1000	1300
	添加量	"	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	合計量	"	1400	1700	1500	1800	1800	1500	1800	1500	1800
	見出せる量	"	1420	1660	1580	1800	1800	1580	1800	1580	1800
	回収率	%	101	98	106	100	100	106	100	106	100

第 3 表 Tube 法(酸度滴定法)の定量値との比較 (アミノ酸)

アミノ酸の種類	試料 (per ml)	10%酵母エキス	10%ポリペプトン	ポリペプトン	10%カザミ
		(mg)	(mg)	ン水解液	ノ酸
L-グルタミン酸	Pulp disc 法	2.30	4.2	4.8	8.6
	Tube 法	2.28	4.3	4.8	8.8
L-リジン	Pulp disc 法	1.50	4.20	2.15	4.60
	Tube 法	1.37	4.28	2.24	4.32
DL-メチオニン	Pulp disc 法	0.35	1.6	0.62	1.30
	Tube 法	0.36	1.4	0.60	1.17
DL-フェニールアラニン	Pulp disc 法	0.9	7.0	1.6	0.9
	Tube 法	0.9	7.0	1.4	1.0

第 4 表 共存物質による影響 (アミノ酸)

		生育帯直径 (mm)									
食塩濃度*(%)		20	10	7.5	5.0	3.0	2.0	1.0	0.5	0	
アミノ酸の種類	L-グルタミン酸 (500 γ/ml)	30.3	30.2	30.2	30.4	30.5	30.4	30.2	30.4	30.5	
	L-リジン (500 γ/ml)	30.2	30.2	30.2	31.0	30.3	30.4	30.5	30.8	30.3	
	DL-メチオニン (500 γ/ml)	30.0	30.0	30.1	30.1	30.0	30.0	30.1	30.2	30.2	
	DL-フェニールアラニン (500 γ/ml)	30.0	30.0	30.0	30.2	28.8	29.1	29.1	29.1	30.0	

* 添加後の最終濃度を示す。

地調製も別個に行った場合であるが、その定量値の変動は 10% 以内にある。

(4) 回収率: 各試料液に各々の標準アミノ酸液を添加してその回収率を測定した結果を一括して示すと第 2 表の如く 95~105% の範囲にある。

(5) 試験管法(酸度滴定法)との定量値の比較: 本法では寒天培地を用いるので、在来の比濁法や酸度滴定法に比し、定量アミノ酸の拡散という条件が入り、培養も異なった条件で行われるので、本法で得られた

定量値と酸度滴定法によって得

られた定量値を比較して見た。

実験は本法と試験管法と同時に

行って夫々の定量値を求めた。

その成績は第 3 表に示したが本

法で得られた成績は酸度滴定法

に比較して一般にやや低い価を

示したが、その差は ±15% 以

内にある。

(6) 共存物質による影響:

試料の定量の際に最も多くの場

合共存する事が予想される食塩

による影響を検討する為に、各

アミノ酸の標準液系列に添加し

た場合の影響を検討したが、第

4 表に見られる様に食塩濃度 20

%でも殆んど生育帯に影響は認

められなかった。従ってこれら

のアミノ酸の定量に当ってビタ

ミンの場合と同じく食塩はその

拡散並びに定量菌株の生育に影

響を及ぼさない。試験管中で見

られる生育阻害は何らかの形で

減退されるものと見られるが、

実際の定量に於いて高食塩含有

試料(例えば醤油、味噌等)にも

本法が適用できることを示

している。尚、その他の物

質の共存による影響につい

ては検討を行わなかったが、

Pulp disc 法では試験管法

に比較して定量物質の拡散に影響する物質が共存した場合には、定量値にその影響をうけるので、かかる場合には何らかの対策を講じなければならない。

結 語

前報で検討した 18 種のアミノ酸の中から、リジン、メチオニン、グルタミン酸、フェニールアラニンの 4 種を選んで Pulp disc 法の適用条件を検討し、その条件で 2, 3 の試料のアミノ酸含量を定量し、試験管法の分析

値との比較, その他の検討を行った。その成績から試験管法に比較して定量成績に大きな差異は認められず, アミノ酸の定量法として満足すべき成績を得ることができたので, 操作が簡易である点から Routine work に適用できると考える。

本研究について終始御指導, 御鞭撻を戴いた植村定治郎教授に感謝する。試薬その他について御便宜を戴いた三共製薬研究室の宮沢氏に感謝する。又種々御援助を戴いた日本皮革株式会社社長伊藤勇二並びに日本皮革研究所の諸氏に深謝の意を表する。

尚本報告は昭和 32 年 4 月, 日本農芸化学会大会において講演した。

(1) 小嶋尙夫, 松谷 豊, 男沢熙子, 今野 周,
植村定治郎: 本誌, 32, 33 (1958).	(5) K. A. Lees, J. P. R. Tootill: <i>ibid.</i> , 80,
531 (1955).
(2) 小嶋尙夫, 松谷 豊: 本誌, 32, 38 (1958).	(6) J. S. Simpson, D. F. Harris: <i>ibid.</i> , 82,
210 (1957).
(3) 小嶋尙夫, 松谷 豊: 本誌, 32, 100 (1958).	(7) 玉利勤治郎: ペニシリン, 臨床と効力検定,
p. 92 (1947).
(4) K. A. Lees, J. P. R. Tootill: <i>Analyst</i> , 80,
95 (1955).	

紅茶香氣生成機構の研究 (その 3)*

紅茶の揮発性カルボニル化合物の質的相違について

中 林 敏 郎 (静岡大学農学部農芸化学教室)

昭和 32 年 7 月 4 日 受 理

前報⁽¹⁾に於て著者は紅茶の揮発性カルボニル化合物 (VCC) の含量を測定した際, 予期に反して低級の紅茶ほど VCC 量が多い傾向にあることを見出した。その原因の一つとして VCC を構成する各成分の種類とその量が紅茶の香氣の良否によって異なること, 即ち良香紅茶には良香に関与するある特異な VCC が多く含まれ, 低級の紅茶ではそれが無くむしろ香りに無関係か或いは香りを悪化せしめる様な VCC が多く含まれるのではないかと、いう質的な相違が考えられる。

この点を明かにする為には各種の紅茶の VCC の構成成分の種類及び夫々の含量を明かにすべきであるが, 紅茶の VCC 特に良香に関与する成分は未だ充分には明かでなく, 各成分を夫々分離定量することも又困難である為, VCC の質的相違を検討する一つの手段として溜出する VCC 全部を 2,4-ジニトロフェニールヒドラジンに導き, それらの示す紫外部吸収スペクトルの形状を比較することによって, 紅茶の香氣と VCC との質的關係を相対的に検討しようと試みた。

実 験 の 部

1. 紅茶 VCC の 2,4-ジニトロフェニールヒドラジンの紫外部吸収スペクトル

実験に使用した蒸溜装置は第 2 報⁽¹⁾のものと同一である。但し溜出液の捕捉には 1% 2,4-ジニトロフェニールヒドラジン (8N H₂SO₄) 5 cc を入れた容器 1 個を氷冷することなしに使用した。

まず標準としてリプトン紅茶を用い, その粉砕物 1 g を蒸溜水 50 cc と共にケルダール分解瓶に入れて装置し, 油浴を用いて 105° で 30 分煮沸, 溜出液が 35 cc となった時, 受器を外して密栓し 37° に 1 夜放置, 生成した VCC-ヒドラジンの沈澱と上澄液を遠心分離して分ち, 沈澱は更に蒸溜水で 2 回遠心分離して洗滌後真空乾燥する。ここに得られた上澄液, VCC-ヒドラジンを 200 cc のエタノールに溶解したもの及びこれを 0.002 N KOH アルカリ性としたものについてその紫外部の吸収スペクトルを測定した結果を第 1 図に示した。第 1 図に於て上澄液のスペクトルが 2,4-ジニトロフェニールヒドラジンのそれと若干異っていることから, 上澄液中にも多少の VCC-ヒドラジンが溶解していることが推定されるが, 以後の実験では一応 VCC-ヒドラジンの沈澱のみについて検討することとした。

* Studies on the Formation Mechanism of Black Tea Aroma. Part III.

Qualitative Experiments on the Volatile Carbonyl Compounds of Black Tea.

By Toshio NAKABAYASHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University)