Rhodotorula 属菌種のカロチン生成に就いて (第 2 報)*

Rhodotorula 属 Rh-100 株のカロチン生成に及ぼす阻害剤の影響 (1)

中 川 昌 平, 辰 己 忠 次 (大阪府立大学農学部農芸化学科)

昭和 34 年 9 月 5 日 受 理

多くの微生物の色素生成が diphenylamine (DPA) によって阻害されることは既に Kharash 等⁽¹⁾ によって報告されているが, カロチノイドを生成する菌に就いても阻害作用のあることが Van Niel 等⁽²⁾ (*Rhodospirillum*), Lederer⁽³⁾ (*Rhodotorula rubra*), Turian⁽⁴⁾ (*Mycobacterium phlei*) によって報告されている. これらの研究者は DPA は飽和 polyene の脱水素化を阻害するものであって不飽和 polyene の生成は飽和 polyene の脱水素化に基くことを提案した. 最近 Goodwin⁽⁵⁾ は *Phycomyces blakeleeanus* を用いて DPA が多くの不飽和 polyene (α -, β -, γ -カロチン, lycopene) の生成を阻害し同時に飽和 polyene (δ -カロチン, neurosporene, phytofluene) の生成を増加するという実験およびトマトの貯蔵中の変化の実験⁽⁶⁾ から次のように結論した. DPA によって β -カロチンの生成経路は阻害されるが飽和 polyene の生成経路は阻害されないので飽和 polyene と不飽和 polyene の生成経路は別であって, 飽和, 不飽和何れの polyene も未知の common precursor から生成されるというのである. 他方で Turian⁽⁷⁾ はグルコースが炭素源である時 phenol が *Mycobacterium phlei* のカロチン生成を DPA と同様に阻害することを見出し, また resorcinol は phenol の 1/2~1/3 程度の阻害であることを報告している. 筆者は Rh-100 のカロチン生成機構を研究するに当り既に使用されている DPA 等の阻害剤の Rh-100 のカロチン生成に対する影響を検討する必要を認め, これに関して行った実験の結果を報告する.

実験結果および考察

培養は第 1 報⁽⁸⁾ の実験方法に於て述べた如く行つたが, 塩化第二鉄は β -カロチン生成を阻害することが判明したので基本培養液から除いた. ただし保存培養には塩化第二鉄を加えた. 菌体収量, 油脂含量, カロチン含量 (β -カロチンとして) の定量は第 1 報⁽⁸⁾ に述べた如くである.

1. DPA 阻害に就いて DPA の添加量をいろいろと変えたグルコースあるいはグリセリン培養液に Rh-100 を 4 日間振盪培養して, えた菌体の収量, 油脂含量, カロチン含量を測定した. その結果を第 1 表に示す. グルコース培養液では DPA 濃度の増加と共に菌体収量が著しく減少し同時にカロチン生成に対する阻害作用も大きく現れてくるが, グリセリン培養液では DPA の阻害作用が更に大きく現れてくることが判明した. Turian⁽⁴⁾ は *Mycobact. phlei* のカロチン生成を阻害する DPA の効果を $1/10^4$ 濃度の硫酸第一鉄で完全に消滅せしめることができたと報告しているが, Goodwin は *Phycomyces* に就いて同様な実験を行つたところ DPA の阻害作用を消滅できなかったと報告している. 筆者は Rh-100 に就いて

第 1 表 Rh-100 のカロチン生成に対する DPA の影響

DPA 濃度 w/v	炭素源	菌体収 量 g/100 cc	油脂含 量 g/100 g	カロチ ン含量 $\mu\text{g/g}$
$1/3.5 \times 10^4$	グルコース	0.289	—	—
$1/4 \times 10^4$	"	0.656	—	微量
$1/5 \times 10^4$	"	0.839	35.1	12.0
対 照	"	1.080	43.4	48.5
$1/3.5 \times 10^4$	グリセリン	0.117	—	—
$1/5 \times 10^4$	"	0.402	—	微量
$1/7 \times 10^4$	"	0.729	41.2	14.9
対 照	"	0.904	43.2	22.0

第 2 表 Rh-100 のカロチン生成に於ける DPA の阻害効果と塩化第二鉄の関係

(1) グルコース培養液

DPA 濃度 w/v	FeCl ₃ 濃度	菌体収量 g/100 cc	カロチン含量 $\mu\text{g/g}$
$1/3.5 \times 10^4$	—	0.147	—
$1/4 \times 10^4$	—	0.682	3.8
$1/6 \times 10^4$	—	0.908	14.1
$1/4 \times 10^4$	$1/10^5$	0.967	—
$1/6 \times 10^4$	$1/10^5$	1.194	7.7
対 照	—	0.962	46.5

(2) グリセリン培養液

DPA 濃度 w/v	FeCl ₃ 濃度	菌体収量 g/100 cc	カロチン含量 $\mu\text{g/g}$
$1/5 \times 10^4$	—	0.456	—
$1/7 \times 10^4$	—	0.702	9.5
$1/10 \times 10^4$	—	0.792	18.6
$1/7 \times 10^4$	$1/10^5$	0.941	16.8
$1/10 \times 10^4$	$1/10^5$	1.374	34.0
対 照	—	0.908	24.5

* Studies on the Carotenogenesis of *Rhodotorula* sp. Part II. The Effects of Inhibitors on Carotene Synthesis by *Rhodotorula* sp. Rh-100 strain. (1)

By Masahira NAKAGAWA and Chuji TATSUMI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Osaka Prefecture)

第 3 表 *Rh-100* のカロチン生成に対する塩化第二鉄の効果

(1) グルコース培養液

FeCl ₃ 濃度 w/v	菌体収量 g/100cc	カロチン含量 μg/g
$1/5 \times 10^4$	0.858	24.0
$1/20 \times 10^4$	0.960	36.4
$1/100 \times 10^4$	1.060	47.0
対 照	0.928	48.5

(2) グリセリン培養液

FeCl ₃ 濃度 w/v	菌体収量 g/100cc	カロチン含量 μg/g
$1/5 \times 10^4$	1.459	7.1
$1/20 \times 10^4$	1.338	10.6
$1/100 \times 10^4$	1.274	15.0
対 照	1.071	19.2

しても直接影響するのではないかと考え、塩化第二鉄のカロチン生成に対する効果をグルコース、グリセリンの両培養液に就いて検討した。第 3 表にその結果を示す。グルコース、グリセリン何れの培養液に於ても塩化第二鉄無添加の場合はカロチンの生成は良好であるが、塩化第二鉄の添加量の増加と共にカロチンの生成は減少する。菌体収量はグリセリン培養液では塩化第二鉄の添加量の増加と共に増大したが、グルコース培養液では $1/10^5$ 濃度が比較的良好でこれ以上の濃度では減少し菌体に赤色を帯びてくることが観察された。この赤色色素はメチルアルコール、ベンゼン等の有機溶剤には溶けない。なお *Rh-100* の保存、種培養の培養基にはグルコース炭素源では $1/10^5$ 、グリセリン炭素源では $1/2 \times 10^4$ 濃度になるよう塩化第二鉄を添加した。無添加の場合は累代培養で生育が非常に悪くなることが判った。またここに記載しないがソルビットを炭素源とした場合もグリセリンと略同様な結果であった。

阻害剤の作用が使用する菌の種類によって異なることは当然であるが培養基の組成、特に炭素源によっても異なることが上記の実験によって明かになった。

3. Phenol, resorcinol, kojic acid の影響に就いて Turian⁽⁷⁾ は *Mycobact. phlei* のカロチン生成に於て DPA と同様に phenol も $1/5000$ 濃度で阻害作用のあることを報告している。筆者は phenol, resorcinol, kojic acid をグルコース、グリセリンの両培養液に添加して *Rh-100* のカロチン生成に及ぼす影響を検討した。その結果を第 1, 第 2 図に示す。グルコース培養液に於ては phenol は $1/2000$ 濃度では生育をかなり阻害しカロチン生成を大きく阻害し、 $1/3000$ 濃度では生育をなお阻害するがカロチン生成を対照に比し幾らか増加させており、resorcinol は $1/2000$ ~ $1/5000$ 濃度では生育をあまり大きく阻害しないがカロチン生成をその濃度の増大と共に増加させており、kojic acid は生育を高濃度で幾らか阻害するがカロチン生成を大きく促進していることが認められた。グリセリン培養液に於ては phenol $1/2000$ 濃度が生育を非常に大きく阻害したことを除いては大体グルコース培養液に於けると同様な影響を示した。

これら 3 種の化合物中カロチン生成を

て塩化第二鉄を用いて同様な実験を行った。先ずグルコース培養液では生育阻害は消滅したが、カロチンの生成は相当する濃度の DPA 単独阻害の時の約 $1/2$ で、かえって阻害作用の増大することが判明した。これに対してグリセリン培養液では生育阻害の消滅はもちろんのこと、カロチンの生成もまた DPA 単独阻害の時の約 2 倍で、DPA $1/10^5$ 、塩化第二鉄 $1/10^6$ の濃度に於ては対照よりも良好であった。

2. 塩化第二鉄の効果に就いて 筆者はこれまで菌の生育のための微量成分として塩化第二鉄を基本培養液に添加してきたが第 2 表に示した如くグルコース、グリセリンの両培養液に於てカロチン生成に対する DPA の阻害作用が塩化第二鉄を添加することによって一方では増大し他方では消滅することから、基本培養液に添加する塩化第二鉄の量が生育はもちろんカロチン生成に対

第 1 図 *Rh-100* のカロチン生成に対する phenol, resorcinol, kojic acid の影響 (グルコース培養液, 4 日培養)

●.....● kojic acid } β-カロチン
 ●-----● resorcinol }
 ●——● phenol }
 ○.....○ kojic acid } 菌体収量
 ○-----○ resorcinol }
 ○——○ phenol }

最も促進した kojic acid (その時の濃度は 2×10^{-3} w/v) がグリセリン培養液に於ける生育の如何なる時期で著しく促進作用を示すかを検討したところ (第 3 図), 生育の初期即ち 24~48 時間に於てカロチン生成の増加が大きく, しかもこの時期に於ける菌体収量は 96 時間に於ける約 1/4 であった. このようなことから添加された kojic acid がカロチン生成に利用されるのではないかと考え, 塩化鉄反応を利用して培養前後に於ける kojic acid を測定したところ kojic acid の減少は全く認められなかったので kojic acid は促進剤として作用していると考えられる. kojic acid のカロチン生成を促進する作用は phenol, resorcinol 等の促進効果のあることから一応フェノール性 OH 基によるものであらうと考えられるが, また kojic acid のケトン基が水素の受容体となることも考えられるので kojic acid の代りに 5-methyl kojic acid を添加して培養を行ったところ全く促進作用が認められなかった. 従って kojic acid のフェノール性 OH 基がカロチン生成に促進的効果のあることがうかがえる.

要 約

Rhodotorula 属菌種 *Rh-100* の生育, カロチン生成に対する diphenylamine の阻害作用を検討し何れの場合も阻害をうけるが, 塩化第二鉄によって生育阻害はグルコース, グリセリンの両培養液では除かれカロチン生成阻害はグルコース培養液では更に増大しグリセリン培養液では完全に除かれた. 塩化第二鉄は生育に必要な微量成分であるが, 高濃度に於てカロチン生成に対して阻害作用を示した. phenol, resorcinol, kojic acid は適当な濃度に於てカロチン生成を促進するが kojic acid の効果は著しい. kojic acid の促進作用にはそのフェノール性 OH 基の関与することがうかがえる.

本報告の要旨は 1957 年の日本農芸化学会大会に於て講演した.

第 2 図 *Rh-100* のカロチン生成に対する phenol, resorcinol, kojic acid の影響 (グリセリン培養液, 4 日培養)

●.....● kojic acid } β-カロチン
○.....○ resorcinol }
●.....● phenol } 菌体収量

第 3 図 *Rh-100* のカロチン生成に対する kojic acid の経時的効果 (グリセリン培養液)

●.....● 対 照 } β-カロチン
○.....○ 対 照 } 菌体収量
●.....● kojic acid }
○.....○ kojic acid } kojic acid 濃度 2×10^{-3} w/v

- (1) M. S. Kharasch, E. A. Conway, W. Bloom: *J. Bact.*, 32, 533 (1936).
- (2) C. B. van Niel, J. H. C. Smith: *Arch. Mikrobiol.*, 6, 219 (1935).
- (3) E. Lederer: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 20,

611 (1938).

- (4) G. Turian: *Helv. Chim. Acta*, 33, 1988 (1950).
- (5) T. W. Goodwin, J. Malini, J. S. Willmer: *Biochem. J.*, 53, 531 (1953).

- (6) T. W. Goodwin, J. Malini: *Nature*, 170, 104 (1952). (1951).
 (7) G. Turian: *Helv. Chim. Acta*, 34, 1060 (1960).
 (8) 中川昌平, 辰己忠次: 本誌, 34, 195 (1960).

肉類の貯蔵に関するポーラログラフ的研究 (第 5 報)*

牛肉蛋白波と肉成分変化との関係 (その 2)

小原 哲二郎, 小笠原 八十吉 (東京教育大学農学部農業化学科)

昭和 34 年 9 月 14 日 受理

緒 言

著者等は第 4 報⁽¹⁾に於いて、牛肉水抽出液蛋白波に及ぼす 19 種類のアミノ酸濃度の影響に関する検討を行ない、システイン、ヒスチジン、アルギニン、トリプトファン、アスパラギン酸、オキシプロリン及びプロリンは牛肉抽出液蛋白波に著しく影響して特徴ある波に変形させることを明らかにした。

また第 3 報⁽²⁾に於いて、15° 貯蔵過程に於ける牛肉抽出液中の Walkiewicz 反応, pH, Cu-Folin 呈色度並びに蛋白波相互間の関係を比較検討し、いずれの部位から得られた牛肉試料の場合にも、同一試料内に於ける Walkiewicz 反応, pH, Cu-Folin 呈色度並びに蛋白波相互の間には、常に密接な関係を取りつつ、貯蔵の進むにつれて一定の変化を示すことを明らかにした。このような比較実験と相平行して、著者等は同時に 15° 貯蔵過程に於ける牛肉の中肉、肩ロース並びにバラ肉中の遊離アミノ酸類の変化をペーパークロマトグラフィーにより測定し、それら肉中の遊離アミノ酸類の消長と蛋白波の変化との関係を比較検討した。以下その結果について報告する。

実 験 方 法

I. 牛肉試料の包装方法: 屠殺解体後 4 日間放冷 (0°) した去勢牛、中肉、肩ロース並びにバラ肉の新鮮肉または排気せずにポリエチレン包装した 15° 貯蔵肉即ち第 2 報⁽³⁾ 及び第 3 報⁽²⁾ で処理した同一試料を使用した。

II. ペーパークロマトグラフの方法: 牛肉 1g を磨砕、終濃度 80% になるようエタノールを加え、かゆ状にし、クーラーをつけて 79.8° で 3 分間加温後放冷濾過する⁽⁴⁾。減圧下 65° で濾液中のエタノールと水分除去、残液に蒸留水 15ml と活性炭 100mg を添加する⁽⁴⁾。活性炭処理後の濾液の水分を減圧下 65° で除去する。残渣に 0.5ml になるように蒸留水を加え、その 0.015ml をとり、東洋濾紙 No. 51 に添付した。フェノール・水 (7:3) 混液と *n*-ブタノール・氷酢酸・水 (4:1:2) 混液とによる二次元ペーパークロマトグラフィーにより、温度 13° で 15cm だけ上昇展開させた。また同一濾紙上に試料と既知アミノ酸との混液を各アミノ酸毎に添付、一次、二次別々に展開し、その R_F を求めた。更にこれによって考えられる既知アミノ酸を二次元法により展開させ、確実を期した。

アミノ酸スポットの検出は 0.2% のニンヒドリンの含水ブタノール呈色法によった。正確にアミノ酸の種類を決定するために、ニトロプルシド反応⁽⁵⁾、白金試薬による呈色^(6,6)、 KIO_4 ・ネッスラー試薬による呈色⁽⁷⁾、 α -ナフトール・次亜臭素酸 Na 試薬による呈色⁽⁸⁾と坂口反応⁽⁹⁾、ジアゾ反応⁽¹⁰⁾、ミロン反応⁽¹¹⁾、イサチン呈色^(12,13)並びに桂皮アルデヒド呈色⁽¹¹⁾を併用した。以上の呈色はいずれも噴霧法⁽¹¹⁾によった。

アミノ酸含有量の決定は、スポットを切りとった抽出処理液の吸収スペクトル^(14,15) による方法が望ましく、その測定結果については第 9 報で改めて報告するが、ここでは面積法⁽¹⁶⁾ と稀釈法⁽¹¹⁾ を併用する方法をとった。前者は 2~10% の誤差はさけられないし、後者は 10~50% の誤差を生ずる。従って、本実験では大凡の含有量を決定し、概略の傾向を知るにとどまった。

III. 蛋白波の測定方法: 第 2 報⁽⁹⁾ に既述の測定方法^(17,18) で得た同一の蛋白波を本実験に掲載した。

実 験 結 果 並 び に 考 察

I. 中 肉

(1) 遊離アミノ酸の消長: 著者等の検出した 15° 貯蔵過程に於ける中肉遊離アミノ酸類の変化を示すと第

* Polarographic Studies on Storage of Meats. Part V. Relation between Protein Waves of Beef and Changes of its Components. (2)

By Tetsujiro OBARA and Yasokichi OGASAWARA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education)