クコの成分に関する研究 (第5報)

クコ葉水抽出物中の一定条件下で乳酸菌の
生育を促進する物質について (その2)

西山隆造, 彼谷俊夫*

(東京都立農業高等学校食品化学科, *千葉大学文理学部化学科)

昭和 43 年 6 月 12 日 受 理

Studies on Components of KUKO (*Licium chinense* MILLER) Part V. Substances in Aqueous Extract of KUKO leaves Effective in Stimulating the Growth of Lactic Acid Bacteria (2)

By Ryuzō NISHIYAMA and Toshio KAYA*

Tokyo Metropolitan Agricultural High School ;

*Department of Chemistry, College of Arts and Sciences, Chiba University

Non protein nitrogenous substances in the aqueous extract of KUKO leaves were fractionated by means of column chromatography on ion exchange resin, zone electrophoresis and cellulose column chromatography. The presence of active principles responsible for acid formation of lactic acid bacteria under a certain condition was examined in each fraction.

Twenty two amino acids including α -aminoadipic acid, α -aminopimelic acid, ethanolamine, and β -alanine were detected. A mixture of these amino acids showed marked influence on acid formation of lactic acid bacteria, but any single amino acid was less effective in the stimulation of growth as compared with the mixture of amino acids. In a homologous series of monoamino dicarboxylic acids the acid formation was stimulated with the increase in the length of carbon chain.

Adenine, guanine, xanthine, adenosine and an unidentified nucleotide were detected and these nucleic acid derivatives stimulated the acid formation by lactic acid bacteria.

(Received June 12, 1968)

緒 言

著者らの1人西山は、前報⁽¹⁾において、クコ葉抽出物中の、牛乳培地に発育する乳酸菌に対して生酸促進作用を示す物質が両性物質であることを指摘した。そこで、さらにその有効成分を解明し、とくに何か特殊な生酸促進物質が存在するか否かを確かめる目的で、クコ葉の水抽出物をイオン交換クロマトグラフィー、電気泳動法、セルロースカラムクロマトグラフィーなどにより分離し、目的の乳酸菌に対する有効成分がアミノ酸および核酸関連物質であることをつきとめたので、ここに報告する。

実験方法

1. 試料 : クコ葉は静岡県浜松農場より分譲されたクコ茶用の自然風乾物を使用した。

2. 供試菌株 : 東京大学応用微生物研究所より分譲された *Lactobacillus bulgaricus* IAM 1120 (以下 LB 株と略す) および *Streptococcus faecalis* IAM 1262 (ATCC 8043) (以下 SF 株) と、北里大学北里研究所よりの *Lact. acidophilus* (以下 LA 株) および *Lact. casei* (以下 LC 株) を使用した。

3. 使用培地 : 基礎培地としての牛乳培地および前培養培地の組成は前報⁽²⁾に準じた。

4. 生酸度および生酸比率 : 菌の生酸度はいずれも前報⁽²⁾に準じて、培養後の酸生成量を 0.1N 水酸化ナトリウムで中和滴定により測定し、培地 2ml あたりの滴定値で示した。また生酸比率は対照培地における生酸度に対する添加培地におけるそれを百分率にて示した。

5. クコ葉抽出物の調製方法 : 第 1 図のように, 60 %エタノール抽出液を濃縮し, さらにこれをセロハン透析した。

6. イオン交換クロマトグラフィー : Dowex 50 W X 4 (H^+ 型) を詰めた 3 本のカラム (10×40 , 4×40 および 2.5×25 cm) に試料液を通し, 両性物質を樹脂に吸着させた。水洗後, 0.3%アンモニア水を用いて溶離し, 1 ml/min の流速で 10 ml ずつ捕集した。また Amberlite IR-4 B (OH^- 型) をカラム (2.5×25 cm) に詰め, 上記 Dowex 50 に吸着させた溶出液の一部をこの樹脂

に通し, 吸着液と通過液とに分けた。この溶出には 0.1 N 塩酸を用いた。第 2 図はクコ葉抽出物中のアミノ酸および核酸関連物質の同時分別方法を示した。

7. 電気泳動法

(1) 濾紙電気泳動法

アミノ酸の検出 : 濾紙は東洋濾紙 No. 52 (30×15 cm) を, 電解液としては水・ピリジン・酢酸 (100 : 1 : 1) を用い, 泳動条件は 300 V, 15 mA, 1 時間とした。また必要に応じペーパークロマトグラフィーで 1 次元展開後, 泳動を行なった。呈色試薬としてはニンヒドリン 0.2% ブタノール溶液を用いた。

核酸の検出 : 濾紙は東洋濾紙 No. 51 (30×15 cm) を, pH 7.6 リン酸 (ナトリウム) 緩衝溶液および pH 7.6 ホウ酸緩衝溶液を用い, 泳動条件は 200 V, 8 mA, 2 時間である。また必要に応じペーパークロマトグラフィーで 1 次元展開後, 泳動を行ない, 有機塩基, スクレオシドおよびスクレオチドの検出を行なった。確認には紫外線検出器 (ミツミ科学 SJ-1031 型) を用い, 黒色スポットを調べた。

(2) ゾーン電気泳動法 : U 字型のカラムの一方の脚 (30×30 cm) に水・ピリジン・酢酸 (100 : 1 : 1) に懸濁させたセルロースパウダー (東洋濾紙製 100 メッシュ) を詰め, これに試料を上記の少量, タートラジン 2

mg およびセルロースパウダー少量と混和し, かゆ状とし, カラムの上部に入れ, さらにその上から 3cm ほど緩衝溶液に懸濁させたセルロースパウダーを詰めたのち, ゾーン電気泳動を行なった. 泳動条件は 100V, 20mA, 3昼夜である.

8. ペーパークロマトグラフィー

(1) アミノ酸の検出: 濾紙は東洋濾紙 No. 52 (13×13cm, 20×20cm) を, 溶媒はフェノール (0.1% アンモニア水 20% 添加), およびブタノール・酢酸・水 (4:1:1) を用い, 1, 2 次元上昇法により展開し, 上記濾紙電気泳動法とあわせてクコ葉抽出物中の遊離アミノ酸の検出を行なった.

(2) 核酸の検出⁽³⁾: 濾紙は東洋濾紙 No. 51 を, 溶媒はブタノール・アンモニア (水飽和ブタノール 100 ml, 15N アンモニア水 1 ml), またはイソプロピルアルコール・塩酸 (イソプロピルアルコール 170 ml, 濃塩酸 41 ml に水で 250 ml としたもの) を用い, 1 次元上昇法により展開を行なった. またヌクレオチドに対しては試料を塩酸で加水分解したものについて分解生成物の有機塩基の検出および円型クロマトグラフィーにより, ブタノール・酢酸・水 (4:1:1) を用いて展開し, アニリンフタル酸を噴霧してリボースの検出を行なった.

9. セルロースカラムクロマトグラフィー⁽⁴⁾: 長さ 100cm, 径 2cm のカラムを用い, あらかじめ, 溶媒ブタノール・酢酸・水 (4:1:1) に懸濁させたセルロースパウダーを詰め, これに試料を上記溶媒の少量, メチル

オレンジ 5mg およびセルロースパウダー少量と混和し, かゆ状としてカラムの上部に入れ, 溶媒を用いて下降法により展開, 色素液流出開始後 10ml ずつのフラクションに捕集した.

実験結果および考察

1. クコ葉抽出物のイオン交換クロマトグラフィー

透析外液を用いたイオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸および核酸関連物質の分離状況は第3図に示した. この結果から, 同じ成分のフラクションごとに一括して 10 区分にまとめ, それぞれの区について一定量ずつを牛乳培地に添加し乳酸菌を接種して 6 日間培養し, その間 24 時間ごとに菌の生酸性をしらべた. 第4図は 48 時間培養した際の各区分ごとの乳酸菌生酸性について示したものである. この結果, 個々の乳酸菌については LA, LB および SF 株の生酸性は区分 4, 7~10 が高かったが, 区分 1, 2 は逆に抑制された. LC 株は区分 1 を除いたすべての区分が効果を示したが, なかでも区分 7 がもっとも高く, 4, 8, 9 がこれについだ. これらから全体的には大体同じような傾向を示し, 前半では区分 4 がもっとも高く, あとは 7 以降の後半がいずれも高かったもので, これらの区分に共通した有効成分が存在するものと思われる.

2. クコ葉抽出物中の遊離アミノ酸

カラムクロマトグラフィーにより濃縮された区分より検出したものをあわせて, クコ葉抽出物中の遊離アミノ酸のクロマトグラムを第5図に示した. その結果, クコ

第3図 イオン交換クロマトグラフィーによるクコ葉抽出物のアミノ酸および核酸関連物質の分離

Rf は核酸についてはイソプロパノール塩酸, アミノ酸についてはブタノール酢酸で展開したものを併記した.

.....: アミノ酸 1. アラニン, 2. β -アラニン, 3. α -アミノアジピン酸, 4. γ -アミノ酪酸, 5. α -アミノピメリン酸, 6. アスパラギン, 7. アスパラギン酸, 8. グルタミン酸, 9. グルタミン, 10. グリシン, 11. ヒスチジン, 12. イソロイシン, 13. ロイシン, 14. リジン, 15. フェニルアラニン, 16. ビバロニン酸, 17. プロリン, 18. セリン, 19. スレオニン, 20. チロシン, 21. バリン, 22. 未確認スポット, 23, 24. ペプチド

---: 核酸関連物質 A. キサンチン, B. グアニン, C. アデニン, D. アデノシン, E. 未確認核酸関連物質

第4図 イオン交換クロマトグラフィーにより得られたクコ葉抽出物の各分画の乳酸菌生酸促進性
 斜線は試料添加量 0.5%, 黒は同じく 1% の場合の生酸促進性を示す。

第5図 クコ葉抽出物中の遊離アミノ酸のペーパー
 クロマトグラム

1. アラニン, 2. β -アラニン, 3. α -アミノアジピン酸, 4. γ -アミノ
 酪酸, 5. α -アミノピメリン酸, 6. アスパラギン, 7. アスパラギン
 酸, 8. グルタミン酸, 9. グルタミン, 10. グリシン, 11. ヒスチジ
 ン, 12. イソロイシン, 13. ロイシン, 14. リジン, 15. フェニルア
 ラニン, 16. ビベコリン酸, 17. プロリン, 18. セリン, 19. スレオ
 ニン, 20. チロシン, 21. バリン, 22. 未確認スポット (ニンヒドリン
 黄色), 23, 24. ペプチド。

葉抽出物よりアミノ酸 21 種と, ペプチドと思われるも
 のを含む未確認スポット 3 種を検出した。さらにエタノ
 ールアミンの存在も確認された。

3. α -アミノアジピン酸および α -アミノピメリン酸 の分離

乳酸菌生酸促進性の認められた区分 4 中にアスパラギ
 ン酸やグルタミン酸と異なる 2 種の酸性アミノ酸が検出
 されたので, この区分を Amberlite IR-4B で処理した
 のち, その吸着部をさらにゾーン電気泳動法により分離
 し, 濃縮したフラクションについて標準品と対比した結
 果, α -アミノアジピン酸および α -アミノピメリン酸で

第6図 ゾーン電気泳動における α -アミノアジピ
 ン酸および α -アミノピメリン酸の分離状況

—: アミノ酸 3. α -アミノアジピン酸, 5. α -アミノピメリン酸,
 7. アスパラギン酸, 8. グルタミン酸。
: オキシグルタミン酸。

あることを確認した。ついで α -アミノアジピン酸については、その濃縮されたフラクションからアルコールを用いて再結晶を行ない、結晶 20 mg を得た。第6図はその分離状況を示した。

4. モノアミノジカルボン酸が乳酸菌発育におよぼす影響

Neurospora crassa⁽⁵⁾ に対して α -アミノアジピン酸がリジンの代りに利用されることが報告されている。この乳酸菌に対する作用をみる目的で α -アミノアジピン酸を含む他の α -アミノピメリン酸、アスパラギン酸およびグルタミン酸などのモノアミノジカルボン酸が乳酸菌に対してどのような影響があるかを検討した。第7図はこれらのモノアミノジカルボン酸の添加量が、それぞ

れの乳酸菌の発育におよぼす影響について示したものである。その結果、L-アスパラギン酸は LC 株を除く他の乳酸菌に対しては、いずれも添加量が増すにつれて次第に抑制された。L-グルタミン酸は LA, LB および LC 株ではほとんど対照と変わらなかったが、SF 株において、添加量が増すにつれてやや生酸度が抑えられた。 α -アミノアジピン酸と、 α -アミノピメリン酸は DL 体を用いたので、D 型混入による影響が明らかではない。DL- α -アミノアジピン酸は LB, LC および SF 株においてはほとんど対照と変わらなかったが、LA 株においては少量の添加の際にやや生酸度が増した。また DL- α -アミノピメリン酸は LB, LC 株とも対照とほとんど変わらなかったが、LA および SF 株においてはその生酸度の増

第7図 モノアミノジカルボン酸の乳酸菌におよぼす影響

○—○ L-アスパラギン酸, ●—● L-グルタミン酸, △—△ DL- α -アミノアジピン酸, □—□ DL- α -アミノピメリン酸.

加はわずかであるが他の 3 種のアミノ酸よりも高かった。アミノ酸相互の関係をみると、LC 株においてはどのアミノ酸も対照と変わらなかったが、LB 株においては、L-アスパラギン酸だけが抑制され、他のアミノ酸はいずれも対照と変わらなかった。LA および SF 株においては、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、DL-アミノアジピン酸そして DL-アミノピメリン酸と炭素数に比例して生産度が少しずつ増加する傾向が認められた。

5. β -アラニンの分離とその乳酸菌生酸促進性

乳酸菌生酸促進性のあった区分 7~10 中に濾紙電気泳動において γ -アミノ酪酸と中性アミノ酸との間の塩基性側に泳動するアミノ酸のスポットが検出されたので、上記部分を一括し Amberlite IR-4B にて処理、その通過液をさらにセルロースカラムクロマトグラフィーを用いて目的物質を分離し、その濃縮されたフラクションからアルコールを用いて再結晶を行ない、結晶 50 mg を得た。それについて標準品との混合ペーパークロマトグラフィーにより β -アラニンであることを確認した。第 8 図にその分離状況を示した。そこで、 β -アラニンは細菌の発育必須因子の一つであるパントテン酸の構成成分であることから、これが乳酸菌に対する影響について検討した。第 9 図は β -アラニンおよびパントテン酸カルシウムを牛乳培地にそれぞれ一定量ずつ添加した際の乳酸菌の生酸性を示したものである。この結果、 β -アラニンは LA 株においては添加量の増加とともに次第に抑制されたが、LB, LC および SF 株はいずれも生酸促進性がみられた。パントテン酸カルシウムは LA 株において β -アラニンとは反対にやや生酸度が増したが、他の乳酸菌

(1) Amberlite IR-4B (通過液)

(2) セルロースカラムクロマトグラフィー

(メチルオレンジ)

第 8 図 カラムクロマトグラフィーにおける β -アラニンの分離状況

第 9 図 乳酸菌の発育におよぼす β -アラニン添加量の影響とパントテン酸との関係

●—● β -アラニン, ●.....● パントテン酸カルシウム。

においてはほとんど対照と変わらなかった。

6. クコ葉抽出物中の核酸関連物質

イオン交換クロマトグラフィーにより濃縮された区分より 3 種のピリミジン塩基とヌクレオシドおよびヌクレオチド各 1 種ずつを検出した。

(a) 有機塩基およびヌクレオシド：有機塩基およびヌクレオシドは電解液 pH 7.6 リン酸緩衝液により陰極側に泳動するので、ヌクレオチドと区別できる。さらに pH 7.6 ホウ酸緩衝溶液によりヌクレオシドは陽極に泳動するので有機塩基と区別できる。そこで、1 次元ペーパークロマトグラフィーで展開後、濾紙電気泳動を行なって標準品と比べた結果、有機塩基としてアデニン、グアニンおよびキサンチンを、ヌクレオシドとしてアデノシンを検出した。

(b) ヌクレオチド：イオン交換クロマトグラフィー

一により分離された区分7~10よりヌクレオチドを検討するために、これらの区分を一括したのち Amberlite IR-4B (OH⁻型) で処理して、ヌクレオチドを吸着したものについてゾーン電気泳動を行なって分離し、濃縮したフラクションを1次元ペーパークロマトグラフィーで展開後、濾紙電気泳動を行なって標準品と比べ、さらに塩酸による加水分解を行なってその生成物より有機塩基(グアニン)、リボースの検出を行なった結果、グアニル酸であることを確認した。つぎに濃縮したグアニル酸の溶液に等量の0.1M 過ヨウ素酸ソーダにより酸化の有無⁽⁶⁾をしらべた結果、過ヨウ素酸により分解されなかった。しかしながら2' または3' グアニル酸とはペーパークロマトグラフィーでは一致せず、なお検討中である。

7. クコ葉抽出物中のアミノ酸および核酸関連物質の乳酸菌生酸促進性

(a) 検出されたアミノ酸の乳酸菌生酸促進性: クコ葉抽出物中に検出されたアミノ酸のうち、すでに酸性アミノ酸やβ-アラニンの乳酸菌に対する影響は検討したが、その他のアミノ酸についても同様にこれらを牛乳培地に単独または混合して添加した際の乳酸菌に対する影響について検討を行ない、その結果を第1表に示した。この際、アミノ酸の添加量は、クコ葉抽出物透析外液中の粗たん白質を4.4%として牛乳培地100ml中に抽出液を1%添加するものとして、1アミノ酸あたり平均2mgとして計算した。その結果からアミノ酸を単独で添加した場合は、どの乳酸菌に対しても著しい影響を示したものはなく、いずれもその生酸比率は±10%程度の増減にとどまった。つぎに混合アミノ酸の乳酸菌に対する影響はLAおよびSF株においては、いずれも生酸比率が4~6%の増加をみたが、LB株は変わらなかった。一方、LC株においては20%以上の増加を示した。なお、エタノールアミンの乳酸菌に対する影響はLCおよびSF株においてはほとんど変わらなかったが、LAおよびLB株において6~8%の増加を示した。

(b) 検出された核酸関連物質の乳酸菌生酸促進性: クコ葉抽出物中に検出された核酸関連物質の添加量が各種乳酸菌の発育におよぼす影響について検討を加えた。その結果は第10図に示すごとくで、LA株においてはグアニン、キサンチンがよく生酸促進性を示したが、アデノシンはほとんど変わらず、アデニンは抑制された。LB株においてはいずれも促進性が認められ、なかでもグアニンが著しかった。LC株においてはグアニン、ア

第1表 クコ葉中に検出されたアミノ酸の乳酸菌生酸促進性

No.	供試アミノ酸	供試菌株			
		LA	LB	LC	SF
1	L-Alanine	—	—	±	—
2	β-Alanine	±	+	+	+
3	DL-α-Aminoadipic acid	+	±	±	±
4	γ-Aminobutyric acid	—	±	±	±
5	DL-α-Aminopimelic acid	+	±	±	+
6	L-Asparagine	+	±	—	±
7	L-Aspartic acid	—	—	±	—
8	L-Glutamic acid	±	±	±	±
9	L-Glutamine	+	—	—	±
10	Glycine	±	±	±	—
11	L-Histidine HCl·H ₂ O	±	±	±	—
12	L-Isoleucine	±	±	+	—
13	L-Leucine	—	±	+	—
14	L-Lysine	—	±	+	—
15	L-Phenylalanine	+	±	±	±
16	DL-Pipecolic acid	+	—	—	±
17	L-Proline	+	±	±	±
18	L-Serine	±	—	+	±
19	L-Threonine	+	—	+	+
20	L-Tyrosine	+	+	+	+
21	L-Valine	+	±	+	±
(22)	(Ethanolamine)	+	+	±	±
生酸度 { 対 照		2.28	2.45	0.66	2.30
度 { アミノ酸混合		2.43	2.45	0.80	2.40
生酸比率 { 対 照		100	100	100	100
比率 { アミノ酸混合		106.5	100	121.2	104.3

牛乳培地 2ml, 試験物質はいずれも1種当り2mg/培地100ml添加, 48時間培養。

+ 対照にくらべ生酸度が高いもの, — 生酸度が低いもの, ± 生酸度が変わらないもの。

デニンが促進性を示し、アデノシンは変わらず、キサンチンは添加量が増加するとやや抑制された。またSF株においてはグアニンについてキサンチンおよびアデノシンがそれぞれ促進性を示したが、アデニンは抑制された。第11図は牛乳培地100mlに各核酸関連物質を0.4mgずつ添加混合して24時間ならびに48時間培養した際の乳酸菌生酸促進性を示したものである。この結果はいずれの乳酸菌も促進性を示し、生酸比率で12~17%の増加を示した。

(c) 検出されたアミノ酸と核酸関連物質との混合体の乳酸菌生酸促進性: クコ葉抽出物の乳酸菌に対する生酸促進作用がアミノ酸および核酸関連物質に起因することが明らかになったので、これらを混合した際の影響をしらべた。この結果、第12図に見られるように、LA

第 10 図 乳酸菌の発育におよぼす核酸関連物質添加量の影響

●—● アデニン, ●—● キサンチン
●—● グアニン, ●—● アデノシン

菌株	培養時間 (h)	0.1N NaOH 滴定数 (ml)			生酸比率 % (48 時間培養)
		1	2	3	
LA	24	1.0	1.0	1.0	(LA)
	48	1.0	1.0	1.0	115
LB	24	1.0	1.0	1.0	(LB)
	48	1.0	1.0	1.0	112
LC	24	1.0	1.0	1.0	(LC)
	48	1.0	1.0	1.0	117
SF	24	1.0	1.0	1.0	(SF)
	48	1.0	1.0	1.0	116

第 11 図 クコ葉抽出物中の核酸関連物質混合添加の乳酸菌生酸促進性

牛乳培地 2 ml, 試料*添加量は 1 種あたりそれぞれ 0.4 mg% 添加。
 斜線は 24 時間, 黒は 48 時間培養の対照と比較して促進した分を示す。

* 試料はアデニン, グアニン, キサンチンおよびアデノシンの 4 種。

株においてはアミノ酸だけを混合した場合は生酸比率として +6.5%, 核酸関連物質だけを混合した場合は +15% の増加を示したが, これらの両者を混合添加した場合は +10% と核酸関連物質だけを混合した場合よりもやや増加率が低下した。これは LB および SF 株においても同様で, アミノ酸と核酸関連物質とを混合すると互に拮抗しあって, それぞれ別々に添加した場合の相加平均的な傾向を示した。ただ生酸力の衰えたいわゆるスロースターターが酵母エキスなどによって著しい生酸力の回復を示す⁽⁸⁾ことから, 長期間冷蔵保存して著しく生酸力

第 12 図 クコ葉抽出物中に検出されたアミノ酸と核酸関連物質との混合体の乳酸菌生酸促進性

試料添加量; クコ葉抽出アミノ酸 21 種各 2 mg および核酸関連物質 4 種各 0.4 mg (培地 100 ml 中)。

△—△ 試料添加, △—△ 試料添加のスロースターター
 ●—● 無添加, ○—○ 無添加のスロースターター

の衰えた LB 株を用いて実験した結果は第 12 図に併記したが, 正常スターターの場合と異なってむしろ相乗効果として働く傾向を示した。これらの結果から, クコ葉抽出物中の各種アミノ酸および核酸関連物質をそれぞれ分離し, 検討を加えて乳酸菌生酸促進物質として明らかにしたが, 乳酸菌のうち LA および LB における生酸比率がさほど増加していないことから, これら以外の成分が存在することも考えられ, さらに検討を必要とする。また, クコ葉抽出物の生酸促進性はクコの生育時期によっても異なり, どの乳酸菌においても, 春の生育初期におけるクコ葉よりもむしろ秋から冬にかけて採集される葉から促進性の強い抽出物が得られる傾向がみられた。

結 論

クコ葉の抽出物からイオン交換クロマトグラフィー, 電気泳動法, セルロースカラムクロマトグラフィーなどにより含窒素成分を分離し, 一定条件下で乳酸菌に対する生酸促進性を追求した結果, つぎの結果を得た。

(1) クコ葉抽出物中にアミノ酸 21 種とエタノールアミンとを確認した。

(2) 実施の培養条件下で乳酸菌生酸促進性の認められた区分より, 酸性アミノ酸として α -アミノアジピン酸および α -アミノピメリン酸を分離した。アスパラギン酸およびグルタミン酸とあわせてこれら 4 種のモノアミノジカルボン酸についてしらべた結果, 炭素数の増加に従い乳酸菌の生酸性が少しずつ高まる傾向がみられた。

(3) 乳酸菌生酸促進性の認められた区分より β -アラニンの結晶を得たが, パントテン酸を添加しても著しい生酸促進性は示さなかったので, β -アラニンがパントテン酸合成の前駆体として役立っているものではないことがわかったが, β -アラニンを牛乳培地に添加した場合, LA 株においては生酸性は抑制されたが, LB, LC および SF 株においてはいずれも生酸促進性がみられた。

(4) クコ葉抽出物についてアデニン, グアニン, キサンチン, アデノシンおよび未確認のヌクレオチド 1 種を検出した。これら核酸関連物質の混合体はどの種の乳酸菌に対しても生酸促進性を示した。

(5) クコ葉抽出物中に検出されたアミノ酸の混合体は, LA および SF 株において 4~6% の生酸性の増加を, LC 株においては 20% 以上の増加を示した。なお, エタノールアミンは, LC および SF 株においてはほとんど影響を示さなかったが, LA および LB 株では 6~8% の生酸性の増加を示した。

以上の事実より, クコ葉水抽出物の一定条件下で乳酸菌の生育を促進する効果は特殊な生酸促進物質が存在するためではなく, クコ葉水抽出物中の数種のアミノ酸および核酸関連物質の総合効果によることがわかった。なお, ビタミン類についてはクコ葉抽出物について調べてない。チアミンおよびリボフラビンがクコ葉中にも存在することが報告⁽⁹⁾されているが, 乳酸菌に必要なビタミン類はほとんど牛乳培地より供給されており, そのうちでチアミン, リボフラビン, ビオチン, ビリドキシンおよびパラアミノ安息香酸は牛乳培地に添加しても生酸性は高まらなかった。それ故, 本研究に用いた実験条件では生酸性に影響をおよぼさなかったと推定できる。ただ, ビタミン B₁₂ は牛乳培地より供給される量が少ないため, B₁₂ の添加によって生酸性が高まるのが認められた。しかしながら, 牛乳培地にクコ葉水抽出物を加えた場合に比して B₁₂ を加えるとさらに生酸性が高まるので, クコ葉水抽出物による生酸性促進の効果は B₁₂ とは別のものと考えられる。イノシットは牛乳培地中に相当量存在すると考えられるのに一部菌株については, 培地に添加すると生酸性の増すのが認められるので, この点については検討中である。ただクコ葉水抽出物中の生酸促進性を示すものは, 本報告および前報の実験で明らかにしたように, イオン交換樹脂に捕集されるのでクコ葉水抽出物の生酸促進性はイノシットとは無関係と推論できる。

終りにのぞみ, 貴重な試料を恵みくださったクコの会理事長加藤勇太郎氏に厚く感謝する。また本研究にあたり, 深いご理解とご激励を賜った東京都立農業高等学校長栗崎寅市先生に厚く感謝の意を表する。なお, 本実験の一部は財団法人下中奨励助成費によった。あわせて謝意を表する。

(1) 西山隆造: 農化, **43**, 197 (1969)。

(2) 西山隆造: 食品工誌, **12** (8), 313 (1965)。

(3) E. Chargaff, J. N. Davidson: "The Nucleic Acids", Vol. 1, Academic Press Inc., 1955, p. 252。

(4) 信濃 栄, 彼谷俊夫: 農化, **32**, 10 (1957)。

(5) E. Windsor: *J. Biol. Chem.*, **192**, 595 (1951)。

(6) 日本化学会編: 実験化学講座, **23**, 丸善, 1957, p. 447。

(7) 谷口宏吉, 長尾昭雄, 津郷友吉: 日畜会報, **36** (9), 376 (1965)。

(8) 津郷友吉, 谷口宏吉: 同上, **33**(2), 130 (1962)。

(9) 宮沢文吾, 田中長三郎: 有用野生植物図説, 養賢堂, 1918, p. 269。