明かにクロル窒素を含み而かも酸アルカリに全く溶けず。乾燥器中に恒量を得せしめクロルの定量をなす。

供試量 0.1279 g AgCl 0.0344 g Cl% 6.67
 $C_{28}H_{32}NO_9Cl \cdots (C_2H_5CO_2)_2 \cdot C_2 \cdot C_{19}H_{17}O \cdot NCl \cdot (C_2H_5CO_2)$ として 6.31

5. トリロビンに對する無水醋酸の作用

トリロビン 0.2 g に無水醋酸 5 g を加へ水浴上にて 50-60° に温むるこゝ 3 時間にして成績體を多量の水中に投じ炭酸カリにて無水醋酸を分解し水に溶けざる白色物質を得たり。之をクロロフォルムに溶かし酸アルカリ水にて洗ひクロロフォルムを除去し石油エーテルを加へ置けば白色無晶形の物質となる。

本物質は水エーテル、ベンツォル、石油エーテルに溶けず、アルコール、クロロフォルム、醋酸エステルに易溶なれど未だ結晶體として得られず。窒素を含むに拘らず鹽基性なく、酸アルカリに溶けざるが故に環開裂によりて生成したる N-アセチル誘導體なるべきも未だ確なる分析數を得ず。分解點不精密にして 172-180° を示す。

次にトリロビンをクロロフォルム溶液となしジアツォメタンのエーテル溶液を加へメチル化を試みたるに盛に窒素を放散し數日の後溶媒を除去するに水に溶け易き鹽酸鹽を形成する少量の鹽基を得たり。

以上 2 種の成績體に就ては續報に於て之を明かにせん。

大正十三年七月二十八日認む

オキシ酸に對する細菌の作用(第一報)

枸橼酸に對する細菌の作用

S. Terada: Ueber die Wirkung von Mikroorganismen auf
 Oxyssäuren. I. Wirkung von Mikroorganismen auf Citronensäure.

藥學士 寺 田 正 一

最も普通なるオキシ脂肪酸に屬する乳酸、林檎酸、酒石酸及枸橼

酸に對する細菌又は酵素の作用は第一表に示す如く可なり多數の文獻を有す。此作用の結果は炭酸水、水素を生ずる他に原料と同數の炭素を有する又はより少なき炭素を有する飽和酸を生ず。

之等の報告中に最も注目すべきものは F. König の夫れにして氏は酒石酸アムモン 2 kg に空氣中の或細菌を作用せしめ 500 g の琥珀酸を得、之を以て琥珀酸製造の良法として推奨せり。

我藥學科生藥學教室に於て兩三年前藥學士横田嘉右衛門氏は朝比奈教授指導の下に König の實驗を繰返したるに 1 kg の酒石酸より僅に 20 g の琥珀酸を得たるのみなりき。而して同時に並行

第 一 表

實驗者	オキシ酸	作用せしめたる微生物又は酵素	反應成績物
Alb. Fitz B. 11, 1896	3 分子の 乳酸石灰	プロピオン酸 フェルメント	2 分子のプロピオン酸と醋酸、炭酸及水を各 1 分子宛
Alb. Fitz B. 12, 474	グリセリン 酸石灰	或種の分裂菌	蟻酸、醋酸、酪酸及痕跡の酒精
J. Liebig A. 70, 963	6 分子の 林檎酸石灰	ビールの酵母	4 分子の琥珀酸、1 分子の醋酸及 4 分子の炭酸
J. Liebig A. 70, 104	林檎酸石灰 1350g	腐敗せる乾酪	琥珀酸 375g
Alb. Fitz B. 11, 1896	林檎酸石灰	酵母又は腐敗せる乾酪	酪酸、炭酸、水及水素
"	林檎酸石灰 170g	或種の桿狀菌	琥珀酸 62.23g 及醋酸 15.1g
"	林檎酸石灰 53.6g	或種の短桿狀菌	醋酸、プロピオン酸、酪酸、琥珀酸 (0.07 g), 酒精 (0.5 g)
Alb. Fitz B. 12, 476	酒石酸石灰 100g	或種の分裂菌	醋酸及酒精
Fr. König B. 14, 211.	酒石酸石灰	或種の腐敗バクテリア	炭酸、蟻酸、プロピオン酸及酪酸
Fr. König B. 15, 172.	酒石酸アム モン 2000g	(同 上)	炭酸、醋酸及琥珀酸 500 g
Alb. Fitz B. 11, 1896	枸橼酸石灰 110g	煮沸せざる枯草洗液、 幾分の球狀菌を混在す	醋酸 (55.4 g), 琥珀酸 (0.41 g) 及酒精 (4.75 g)
Phipson J. 1852, 312.	枸橼酸曹達	腐敗せる肉	炭酸及酪酸
How J. 1852, 469.	枸橼酸石灰	腐敗せる乾酪	水素、炭酸及醋酸
Bachner J. 1851, 376	枸橼酸石灰	巴旦杏粉末の浸出液	炭酸及醋酸
Personne J. 1853, 14.	枸橼酸石灰	ビールの酵母	水素、炭酸、醋酸及酪酸

して枸橼酸を以て行へる實驗に於ては 448 g の枸橼酸より 15 g の結晶性の酸を得たり。其酸は熔融點 189° にして滴定の結果三鹽基性の酸としての分子量 176 なること重曹にて中和せる中性溶液は過マンガン酸カリウムを脱色せざる飽和の酸にして熔融點よりすればアコニット酸の分解點 191° に近けれどもアコニット酸は不飽和なるためカメレオン液を脱色する點に於て大いに異り 176 の分子量より考ふればトリカルブアリアル酸の分子量 176 によく一致すれども熔融點 166° にして之とも一致せず或不明の酸なる事を報告せり。

其後予は朝比奈教授の命を受け横田學士の後を繼ぎ略同様の實驗を行ひ 800g の枸橼酸より 246g の琥珀酸と 27 g のアコニット酸、醋酸約 21 g 及肝油臭を有する液狀酸約 10 g を得たり。

故に嚮に横田學士の取られたる不明の酸は琥珀酸にあらざるやの疑問の下に同氏の得られたる酸と予の得たる琥珀酸とを混融せしに融點に異動を認めず。又同氏の滴定の結果より二鹽基性酸としての分子量を計算せしに 118.36 にして琥珀酸の分子量 118.05 とよく一致するものなる事を知り従て横田學士の得られたる酸も琥珀酸なると明なり。

尚又予は數回の實驗を行ひ最良の場合使用せる枸橼酸の四割強の得量を以て琥珀酸を得るに到りたれども此方法を以てしては空中に存する如何なる微生物の作用により此反應を生ずる物なるや全々不明なるを以て之を明かにせむと欲し普通の細菌學的方法により微生物の純粹培養を行ひ第二表 A により示すが如き性質を有する一種の桿狀菌の作用により此化學變化を生ずるものなるを知り得たり。而して此桿菌の諸性質を第二表に於けるが如く從來知られたる多くの細菌の中其性質の最も近似する *Bacterium candicans* (Frankland) Mig. (B) と比較するに其文獻甚だ不充分にして完全なる對照は困難なれども諸種の點に於て可なりよく一致する點有ること同時に又ゲラチン上に生じたる古き聚絡が *Bacterium candicans* は赤色を帶べるに反し琥珀酸を生ず可き此菌は

第 二 表

枸橼酸より琥珀酸を生成す可き菌 A				バクテリウム カンヂカンス	
存在場所		空气中		土 壤	
運動の有無		-		-	
鞭毛染色		-			
芽胞		-		-	
グラム染色		-			
酸素の必要		+		+	
適温		28—30°		室温(大凡20°)	
外 形	ブイヨン		短桿状 (沈澱を生ず)		球菌に類似せる桿菌 菌絲をなす(沈澱を生ず)
	枸橼酸アムモニウムの培養液		桿状, 菌絲をなす (沈澱を生ず)		
	肉汁ペプトン寒天 又はゼラチン		小粒乃至短桿状		
	枸橼酸アムモニウム寒天		桿状		
穿 刺 培 養 釘 状 (痕 跡)					發育不良 穿刺溝にそひて眞珠様光澤あり
聚 絡	肉 汁 ペ プ ト ン 寒天又はゼラチン		白色露滴狀 膨隆少し 古き物は帶類黃灰色		燐 光 を 發 せ ず
	枸橼酸アムモニウム 寒天		白色露滴狀 膨隆多し 古き物は帶類黃灰色		
	馬鈴薯		微帶類黃褐色		
	凝固血精		發育不良		
培養基の 液化	ゼ ラ チ ン		-		-
	寒 天		-		
	凝 固 血 精		-		
瓦斯の 發生	炭 酸 瓦 斯		-		
	硫 化 水 素		+		
牛 乳 の 凝 固			-		
色 素 の 形 成			-		-
アミグダリンを含有するブイヨン よりベンツアルデヒドの生成			-		
インドールの生成			-		
ノイtralロートアガーの還元			-		

酸 の 生 成	ラクムス乳糖 培養基	—		
	グリセリン	+		
	マンニット	+	琥珀酸を生ず	
	スチラチット	—		
	果糖	+	琥珀酸を生ず	
	ガラクトーゼ	+	琥珀酸を生ず	
	葡萄糖	+	琥珀酸を生ず	
	蔗糖	+	琥珀酸を生ず	
	乳糖	+	琥珀酸を生ず	
	麥芽糖	—		
	デキストリン	—		
菌 膜 の 形 成	ブイヨン	—		—
	枸橼酸 アムモニウム液	—		

幽に黄色乃至灰色を帯べる點に於て大に異り未だ全々一致する菌の記載され有るを發見し得ず。將來なほ研究の上報告する事ある可し。

此菌が完全に發育し然も其化學變化を充分完結するためには次の如き條件を最も適當とす。

1. 培養液 枸橼酸5-6%を含有しアムモニアを以て中和したる溶液に KH_2PO_4 が 0.07%—0.035% の範圍内に於て KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 の3種の鹽類を大體に於て 2:1:1 の比に含有するもの
2. 培養液の温度 28-30°
3. 期間 11-16日

此條件の下には此菌の作用により起る化學反應は比較的簡單にして2分子の枸橼酸より2分子の琥珀酸と炭酸及醋酸各1分子宛を生ずる者にして此際痕跡のアコニット酸を傍成す。而して不純菌に據る實驗の場合得られたる肝油臭を有する液狀酸は本酸とは全々別種なる球狀菌の作用により生ぜしものにして培養

中ガスを發生せしも混在せし他の菌の作用に據れる物なり。此結果より考ふる時は枸櫞酸に對する此菌の作用は一面に於て琥珀酸の製法として推奨す可きものなるを知る。

而して其反應の機作の理論は暫時之を措き反應成績物の量的關係のみより考ふる時は

I.

II.

III.

の三者を考へ得れども實驗上アコニット酸を基礎とせる培養液に本菌を培養したるに繁殖甚だ徐々にして其化學變化も甚だ僅少なるものなれば(III)に於けるが如くアコニット酸が枸櫞酸より琥珀酸に到達す可き反應の中間物なりと考ふるは當を得ず。又醋酸アムモンを以て作れる同様の培養液には此菌は繁殖せざるものなれば(II)に於けるが如く全部が先づ琥珀酸と醋酸とに分解さ

れ其醋酸の半量が炭酸に變化する物を考ふるはよろしからず。従て(I)の場合の如く2分子の枸橼酸より同時に1分子は琥珀酸及醋酸となり1分子は琥珀酸及炭酸となり炭素1原子は菌體を構成す可き炭素元として用ひられ其分解により生ぜしエネルギーは菌の生活に要するエネルギーとして消費さるゝものと説明す可く尙又之等の化學變化は少くとも此菌體より得らる可き水に可溶性の或特殊なる酵素の作用により起るものと考ふるは宜しからず。

次に此菌の作用により生ずる化學變化の有様を第四表實驗4より15に於ける琥珀酸の生成量を曲線を以て表したる第一圖曲線Iについて考ふるに菌を培養してより2日間は化學變化は甚だ僅かなれども2日目の終りより3日迄の1日間に急に増加し3日目の終りより13日の終りまでの變化は横軸に對し 45° の角をなせる直線を以て表され従て化學變化は常に一定不變にして反應成績物は等差級數を以て増加すれども菌の作用す可き枸橼酸の量が或程度以下に減少せし13日の終りより16日の終りに到りては曲線は漸次横軸に並行となり琥珀酸の生成量は零に近づくと同時に逆に琥珀酸は消費さる。

尙又第四表實驗22—32の結果を表せる曲線IIは大體に於て曲線Iと同様の性質を有す。只化學變化が一定となる迄の期間が少々長き事と培養液中の枸橼酸の量が零となりてより逆に琥珀酸の消費さる可き速度が略琥珀酸の生成されしと同様の早さを以て消費さるゝ點は相違すれども一般に培養後一定の期間後急に化學變化は増大して一定の値となり作用す可き枸橼酸の量が零に近づく迄は一定不變に琥珀酸を生成し枸橼酸が零となりてよりは逆に琥珀酸を分解するものなり。

今琥珀酸の生成量は活潑に生活せる細菌の數に正比例する物とすれば此曲線より培養液内に於ける菌の繁殖の状態をも考へ得るものにして菌を培養してより數日間は菌の繁殖不充分なれども之は顯微鏡下に檢しても明かなるが如く最初は甚多數に分

裂して微細なる小粒をなし大に繁殖せむとする準備時代に有りて完全なる生長は爲されども一定期間後は急に増殖して完全なる繁殖をなし遂に一定の濃度に到達す。實際外見上培養後5-6日を経て化學變化が一定となれる後は老廢せる菌體の沈澱を見常に新鮮なる細菌の一定量存する事を想像するに難からず。

今アコニット酸は菌が老廢せむとする時生ずるものごせば第四表實驗12及13に於ける場合は實驗28, 29に於けるよりもアコニット酸の生成多きは曲線Iは曲線IIに於けるよりも菌の濃度が一定となりてより後の期間長きたため老廢菌の生成も大にして従て老廢せむとする菌の作用により生ず可きアコニット酸も多量を占む可き理なり。要するに枸橼酸に對する本菌の作用に依りても亦從來知られたる多くの例に洩れず枸橼酸より少數の炭素原子を有し然も水酸基を有せざる飽和酸なる琥珀酸醋酸及炭酸に變じ特殊の條件の下には同數の炭素原子を有し水酸基を有せざる不飽和酸なるアコニット酸を生成す。

此實驗は東京帝國大學醫學部藥學科生藥學教室に於て施行せり。朝比奈教授の懇篤なる指導に對し謝意を表す。尙又細菌學的操作に當り多くの便宜ご有益なる忠言を賜はりたる黴菌學教室の竹内教授及醫學博士松崎春一郎氏に對し謝意を表し殺菌器及孵卵器を借用せし服部教授に對しても同様謝意を表す。

實 驗 之 部

(I)空氣中より得たる不純菌による化學反應

1. 枸橼酸 800g を少量の水に溶解せしめアムモニアを以て中和し水を加へて全液を稀釋して 15 L となし之に KH_2PO_4 8.3g, MgSO_4 4.2g, CaCl_2 4.2g を加へて溶解せしむ。

今此液の一少部分をベッヘルに取り暫時空氣中に放置したる後之を全液ご合し孵卵器に入れ 26-30° の恒温に保たしめ放置す。約一週間目の終に於て液は白濁し時日の經過ご共に液は黃色を呈し液の内部より氣泡を發生するに至る。3ヶ月後に全液を蒸發濃縮したる後冷却せしめ卵白を加へて充分攪拌し次に之を煮沸し

て卵白と共に菌體を沈澱せしむ。沈澱を濾過して得たる透明の液を加熱しつゝ之に石灰乳を加へて有機酸のアモニウム鹽をカルチウム鹽となしたる後熱時に濾過して過剰の石灰及枸橼酸カルチウムを除去す。此濾液を蒸發濃縮し放冷せしむる時は結晶(A)を析出す。此結晶(A)は有機酸カルチウムなれば水中に浮遊せしめ之に過剰の硫酸を加へて酸を遊離し硫酸カルチウムを濾過したる濾液は之を水浴上に蒸發濃縮せしに多量の結晶を得たり。之を50%の酒精より再結晶して246gの184-185°の融點を有し中性溶液はカメレオン液を脱色せざる結晶を得たり。

此物質を琥珀酸と混融するに融點に變化を認めず、又アセチルクロリド又は無水醋酸と共に熱するに易く無水物となり、融點119-120°の白色羽狀の結晶となり、無水琥珀酸と混融するに融點に異物を認めず。故に此物質は琥珀酸なる事確實なり。

結晶(A)を濾別したる濾液は蒸發して一層濃厚となす時は再び結晶を析出す。此結晶を濾別して結晶(B)と濾液(C)とを得。

結晶(B)は少量の水に浮遊せしめ硫酸を加へて酸性となし硫酸カルチウムを濾別したる濾液をエーテルを以て振盪して得たるエーテル溶液よりエーテルの大部分を蒸溜する時は黄色を帶ぶる溶液より白色粉末狀の結晶を得。之を氷醋酸より再結晶して27gの分解點190-191°を示す酸を得たり。此酸はアコニット酸と混融するに分解點に異動を生ぜず、中性溶液はカメレオン液を甚しく脱色す。本品1gを取り白金黒を觸媒として水素を以て還元する時は定量的の水素を吸収し融點166°なるトリカルブアリアル酸を得たり。故に此酸はアコニット酸なる事明白なり。アコニット酸を取りたるエーテル溶液はエーテルを充分除去したるに肝油臭を有する液狀酸約10gを得たり。

濾液(C)は硫酸々性となし硫酸カルチウムを濾過したる液に硫酸ソーダを飽和せしめエーテルを以て數回振盪して得たるエーテル溶液はエーテルを溜出したる後之を蒸溜せしに106-117°の間に溜出したる液狀酸21gを得、コルベン中に少量のアコニット酸の

結晶を残留せり。

此液狀酸は醋酸臭を有す。今此一部を取り約1%のナトリウム鹽溶液をなし之に1容のエーテルを加へ振盪しつゝ2%の硫酸銅液を滴加するにエーテル層は着色せず。

又此ナトリウム鹽溶液に1容の醋酸エステルを加へ5%の過クロール鐵液を滴加し振盪するに醋酸エステル層は無色なり。

次に此揮發性酸をアムモニアを以て中和したる後硝酸銀溶液を加へたるに白色針狀の銀鹽を得たり。之を熱湯より再結晶して銀の含量を定量せり。

銀鹽 0.4306 g Ag 0.2772 g Ag% 64.38
CH₃COOAg として , 64.65

故に此揮發性酸は醋酸なり。以下三回行ひし不純菌による實驗は大體に於て(1)の場合と同様の操作によれり故に纏めて第三表に掲げたり。

第 三 表

實驗番號	孵卵器の温度	水の量	鹽 の %			枸橼酸の量 g	枸橼酸の %	期間	琥珀酸 g	アコニット酸 g	醋酸の量 g	肝油臭を有する液狀酸 g
			H ₂ KPO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂							
1	26-30°	15L	0.06	0.03	0.03	800	5.3	3ヶ月	246	27	21(110°前後に沸騰する物)	10
2	26-30°	18L	0.07	0.035	0.035	1200	1.5	6週	487	22	31(")	痕跡
3	25-30°	15L	0.06	0.03	0.03	850	5.7	4週	340	15	15(")	痕跡
4	25-30°	800cc	0.06	0.03	0.03	50	6.3	161時間	12	痕跡	0.72(滴定の結果として純醋酸として)	痕跡

但(2)に於て期間を6週と記載したれども此實驗は大正十二年の震災當時行へるものなれば瓦斯杜絶の爲孵卵器の温度低下して恒温ならざりし時日は算入せず

(II)琥珀酸を生成す可き菌の純粹培養及其性質の検査

(A)菌の純粹培養

枸橼酸アムモン 7.5%, 酸性磷酸カリ 0.07%, 硫酸マグネシウム 0.035%, 鹽化カルチウム 0.035% を含有する水溶液又は之を基礎とし寒天 1.5% を加へて作れる固形培養基には空中に存する或數種の菌以外は比較的發育不充分なれば普通の細菌學的方法により

最も簡単に枸橼酸より琥珀酸を生ず可き菌を純粹に取り出すを得たり。

(B)菌の性質

(1)培養液に對する特徴 枸橼酸アムモン固形寒天平板培養に於ては培養後2-3日にて甚しく膨隆して繁殖し乳白色にして邊圓透明なる互に融合し得る露滴狀の聚絡を形成し菌は桿狀を成し、稀に菌絲を形成し培養後甚しく時日を経過せし聚絡は云へども幽かに灰色を帶ぶるに過ぎずして色素を形成せず。穿刺培養に於ては表面にのみよく繁殖し穿刺溝に添ひては甚だ僅少の發育を見るのみ。枸橼酸アムモンの液體培養基に於ては培養後1-2日にて菌は充分繁殖し白濁を生ずれども菌膜を形成せず又液は着色せず第二圖A及びBに示すが如く數十個相連續して菌絲をなし横に多く分裂し甚だ稀に縦に分裂する桿菌なり。

ペプトン及肉汁を含有する寒天又はゲラチンによる固形平板培養基にては培養後3-5日にて發育し白色露滴狀の聚絡を形成すれども膨隆少く菌形は微細なる短桿狀をなし培養後甚しく時日を経過せし聚絡も甚だ幽かなる類黃灰色を帶ぶる事あるに過ぎずして色素を形成せざる好氣性の細菌なり。第二圖C及びDはペプトン、肉汁寒天培養液に培養して一晝夜の後撮影せしものなり。

馬鈴薯上に培養する時はよく發育して幾分帶黃類褐色の被苔を生ず。

ゲラチン又は寒天を含有する培養器或は凝固血清上に培養するに之等の培養基を液化せず。

牛乳培養液に培養し5日間を経過するに牛乳を凝固せず。

(2)温度の影響 ブイヨン中に培養せし物を22-24°又は35-37°の恒温に保つときは28-30°に保ちたる物より菌の繁殖徐々にして培養してより一晝夜の後28-30°の場合は菌形は短桿狀をなせども35-37°の時は甚だ微細なる小粒をなす。

枸橼酸アムモンの液體培養に於ては菌の作用により起る反應

成績體の量は温度により大なる影響を受く。

即 30 g の枸橼酸より温度以外の他の條件は全々同一とし 16 日間に

22—24° のときは 琥珀酸 11.2g を生じ枸橼酸を残留す

28—30° „ „ 15.7g を生じ枸橼酸を残留せず

35—37° „ „ 12.1g を生じ枸橼酸を残留す

之等の點より考ふる時は此菌の發育には 28—30° を適當とす。

(3)運動及芽胞の有無 固有運動を爲さず、Loeffler の法により鞭毛染色をなしたれども陰性なり。ペプトン、肉汁よりなる固形培養基に於ては菌は小粒をなし數ヶ月を経たる物は微細なる短桿狀をなせども芽胞を形成せず。

寒天のみよりなる固形培養基に培養するときは 3—4 日にて菌は多數に分裂し甚だ微細なる老廢形を取れども芽胞を形成せず。

(4)瓦斯發生 ペプトン、葡萄糖の液體培養液を醗酵管に入れ充分殺菌したる後之に本菌を培養するに菌はよく繁殖すれども 2 週間後に於ても瓦斯を發生せず。

ペプトン、肉汁、ゲラチン又はペプトン、肉汁寒天培養液に培養し 17 日を経過せし後痕跡の硫化水素を發生するを認めたり。

(5)多價のアルコール及糖類に對する性質

青色ラクムス、スチラチット、ペプトン

青色ラクムス、マルトローゼ、ペプトン

青色ラクムス、デキストリン、ペプトン

の各培養液に培養するに培養

後 2 週間を経るも赤變せず即酸を形成せず。

青色ラクムス、グリセリン、ペプトン

青色ラクムス、マンニット、ペプトン

青色ラクムス、レブュローゼ、ペプトン

青色ラクムス、ガラクトーゼ、ペプトン

青色ラクムス、グルコーゼ、ペプトン

の各培養液に培養せしに 1—2 日

にて赤變せり。即グリセリン、マンニット、レブュローゼ、ガラクトーゼ、グルコーゼ等よりは酸を形成す。

但青色ラクムス、マンニット、ペプトン培養液は一度赤變したる後

數週の後に再び青色を呈せり。

青色ラクムス, サッカローゼ, ペプトン } の兩培養液に於ては培養後
青色ラクムス, ミルヒツッカー, ペプトン }

6-7 日にて赤變す。即蔗糖及乳糖よりは徐々に酸を形成す。

今生成せし酸を検索せんが爲めマンニット 20g, 炭酸カルチウム 30g, 酸性磷酸加里 0.35g, 硫酸マグネシウム 0.2g, 鹽化カルチウム 0.2g, ペプトン 3.5g, 水 500cc より成れる培養液を作り之に此菌を培養し 15 日間 28-30° に放置したる後過剰の炭酸カルチウムを濾別して得たる有機酸カルチウムの水溶液を蒸發濃縮せしめ之に少量のアルコールを加へ有機酸カルチウムを沈澱せしめ未反應のマンニット, ペプトン, 其他有機性の物質を分離す。此有機酸カルチウムは常法により酸を遊離せしめ 0.7 g の融點 184-185° の結晶を得たり。此物は琥珀酸と混融する事により融點に異動を認めず。又無水醋酸と處理する時は易く融點 119-120° の無水物を生ずる等明かに琥珀酸なるを知る。

全く同様の方法を以て果糖よりは果糖 10g, 炭酸カルチウム 15g, 酸性磷酸カリ 0.35g, 硫酸マグネシウム 0.2g, 鹽化カルチウム 0.2g, ペプトン 3.5g, 水 500cc の培養液により 2 週間後に琥珀酸 1g を得たり。

尙又之を全く同様に 10g のガラクトーゼよりは 0.5g の琥珀酸を 10g の葡萄糖よりは 0.8g の琥珀酸を得たり。

次に又蔗糖よりは蔗糖 100g, 炭酸カルチウム 150g, 食鹽 25g, ペプトン 25g, 水 5L の培養液を用ひ 64 日間後に約 3g の琥珀酸を得たり。乳糖よりも同様の操作により琥珀酸を生ずる事を證明せり。

(6) 其他の諸性質 枸橼酸アムモンより多量の琥珀酸アムモンと炭酸アムモン及醋酸アムモンを形成す。

ブイヨン中に培養するにインドールを形成せず。

アミグダリン 3% を含有するブイヨンに此菌を培養して後 20 日を経過するもベンツアルデヒドを發生せず。

此菌は青色ラクムス乳精培養液に培養するに赤變せず又ノイトラールロード・アガーを還元せず。グラム染色法は *Staphylococcus*

albus の陽性なる範圍内に於て陰性なり。

(III)培養液中の無機鹽類の種類濃度及各鹽の量的關係が枸

櫞酸より琥珀酸を生成す可き桿菌の繁殖に及ぼす影響

下の如き成分の培養液に於て

7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液	A
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % 磷酸カルチウムを含有するもの	
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % 硝酸を含有するもの	
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % の鹽化カルチウムを含有するもの	B
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % の食鹽を含有するもの	C
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % の鹽化カリウムを含有するもの	
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % の鹽化マグネシウムを含有するもの	
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % の硫酸マグネシウムを含有するもの	D
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に 1 % の酸性磷酸カリウムを含有するもの	E
7.5 % 枸櫞酸アムモン溶液に各 1 % 宛の酸性磷酸カリウム及び鹽化カルチウムを含有するもの	F

A に屬する培養液には此菌は發育せず。以下の培養液に於ては菌の繁殖の程度は B, C, D, E, F. の順序に従て甚しく増加す。但此際は菌の繁殖の程度の比較は同じ直徑を有する試験管中に同容量の培養液を入れ出來得る限り少量の菌を培養したる時同一時間内に生ず可き白濁の多少により比較せしものなり。

B 以下の鹽類は B, C, D, E, F の順序に従て必要の程度を増大する物にして各イオンを完全に含有す可き爲には KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , NaCl を必要とし而して此鹽を或割合に含有する物が此菌の繁殖に最も好都合なる理にして實際上之等の鹽類を第四表實驗 1, 2, 3 に於けるが如く KH_2PO_4 0.07 %, MgSO_4 , CaCl_2 及 NaCl を各 0.035 % を含有する培養液は菌の繁殖甚だよく從て化學變化も良好の結果を示せり。今 Na イオンは或程度迄 K イオンを以て代用し得るものとして第四表實驗 4—15 に於けるが如く食鹽を省略せる培養液に培養するも其結果に大なる影響を與へず。又實驗 16 に於けるが如く各鹽の割合は變化せしめず其 % を幾分減少して KH_2PO_4 0.06 %, MgSO_4 及 CaCl_2 を各 0.030 % 宛を含有する培養液に於ては一層良好なる結果を示し尙其量を減少して實驗 17 に於けるが如く

KH_2PO_4 0.035%, MgSO_4 及 CaCl_2 を各 0.0175% 宛を含有する培養液に於ては菌の繁殖甚だ旺盛となり従て反應の終末す可き期間も甚だ短縮するものなり。之に反し實驗 18, 19, 20 の如く鹽の量を増加し KH_2PO_4 1%, MgSO_4 及 CaCl_2 を各 0.5% 宛とする時は結果甚だ不良なり。之等の現象は培養液中にて生成さる可き磷酸カルチウムが枸橼酸アムモンに可溶性なる事に起因し従て枸橼酸アムモンの濃度と大なる關係を有するものなり。故に實驗 21 に於ては鹽の%は實驗 16 と同様とし枸橼酸の割合を僅に變化せしめしに實驗 16 より好結果にしてなほ又鹽の%は實驗 17 と同等とし枸橼酸の量を變化せしめたる實驗 22—32 に於ては最も好結果なり。

次に又實驗 33 に於けるが如く酸性磷酸カリの量を鹽化カルチウムの夫れと置換せしむるか又は實驗 34 の如く硫酸マグネシウムに代用するに鹽化マグネシウムを以てし硫酸イオンを培養液中より除外する時は一層不良の結果を示せり。

即 5—6% の枸橼酸を含有する培養液に於ては KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 の 3 種の鹽酸を必要とし酸性磷酸カリの量が 0.035%—0.07% の範圍内に於て大體 KH_2PO_4 2 : MgSO_4 1 : CaCl_2 1. の割合を保つ事は此菌が完全に繁殖しかつ充分なる化學反應を営むに缺く可からざる條件なり。

(IV) 單純なる生活菌が枸橼酸に作用して起る化學變化

單純なる細菌により行ひたる 34 回の實驗の概要は第四表に掲げたれば其中にて反應の完全に終結せし實驗第 12, 13 及 29 につき其方法を詳記す可し。

(A) 實驗第拾貳 枸橼酸 360g をアムモニア水を以て中和し之に水を加へて全液を 6L となし之に酸性磷酸カリ 4.2g (全液に對し 0.07%) 磷酸マグネシウム及鹽化カルチウムを各 2.1g (全液に對し 0.035%) を加へて溶解せしむ。此液 500cc (枸橼酸 30g を含有す) づゝを 1L のコルベンに入れ流通水蒸氣中に充分殺菌したる後冷却せしめ第 4 より第 15 迄の實驗に供せり。今此一菌を取り之に此桿菌を培養し 28—30° の孵卵器中に 15 日間放置す。1 晝夜の後全液は

第 四 表

實驗 番號	孵卵器 の温度	水の 量 cc	鹽 の 量 %				枸橼 酸の 量 g	枸橼 酸の %	期間 日	琥珀 酸の 量 g	琥珀 酸の 收得 率	アコニ ト酸 の量 g	炭酸の 量 g	醋酸の 量 g
			H ₂ KPO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	NaCl								
1	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0.035	30	6	3	4.5	26.7			
2	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0.035	30	6	6	7.5	44.5			
3	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0.035	30	6	11	12.5	74.1	0.4		
4	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	2	0.25	1.48			
5	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	3	4.5	26.7			
6	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	6	7.5	44.5			
7	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	8	9.5	56.3	0.5		
8	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	11	12.5	74.1			
9	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	12	13.5	80.1			
10	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	13	14.5	85.94			
11	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	14	15.3	90.7			
12	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	15	15.6	92.52	0.1	3.1236	4.377
13	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	16	15.7	93.1	0.12	3.2269	4.248
14	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	18	14.8	87.8			
15	28-30°	500	0.07	0.035	0.035	0	30	6	19	14.5	85.94			
16	28-30°	500	0.06	0.030	0.030	0	30	6	11	13.2	78.6			
17	28-30°	500	0.035	0.0175	0.0175	0	30	6	13	15.6	92.52			
18	28-30°	500	1	0.5	0.5	0	30	6	12	0.2		0.15		0.084
19	28-30°	500	1	0.5	0.5	0	30	6	17	1		0.6		0.160
20	28-30°	500	1	0.5	0.5	0	30	6	30	3.5		2.0		1.1
21	28-30°	800	0.06	0.030	0.030	0	30	6.25	11	22.5	80.0			
22	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	2.5	1.2	7.1			
23	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	3	1.5	8.9			
24	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	3.5	9.8	58.1			
25	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	5.5	11.9	70.6			
26	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	8	14.3	84.8			
27	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	10	16.3	96.7			
28	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	10.5	16.6	98.4	痕跡		
29	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	11	16.7	99.0	痕跡	3.2160	4.251
30	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	11.5	16.2	96.1			
31	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	13	14.9	88.4			
32	28-30°	600	0.035	0.0175	0.0175	0	30	5	13.5	14.3	84.8			
33	28-30°	500	0.035	0.035	0.07	0	30	6	11	8	47.4			
34	28-30°	500	H ₂ KPO ₄ 0.07	MgCl ₂ 0.035	CaCl ₂ 0.035	0	30	6	11	3	17.8			

注意 琥珀酸、醋酸及炭酸又はアコニット酸に變化せざる殘餘の枸橼酸はカルチウム
鹽として全部回收せり。

乳濁し菌は充分繁殖すれども氣泡を發生せず、液は全々着色せず、約10日の終りに於て少量の菌體の沈澱するを見る。15日經過して後之を孵卵器より取り出し炭酸アムモニアとして存する炭酸を定量する目的を以て長短一對の導管を有するゴム栓を以て密栓し短くして液面に到着せざる導管は先づ稀硫酸を入れたる洗氣瓶次に濃硫酸を入れたる2個の洗氣瓶を経て50%の苛性アルカリを有する元素分析用の59.8600gの加里球に連結す。長くして液底に達する導管は之を炭酸瓦斯を除去せる空氣を通じ得る裝置に連結す。今此コルベンを徐々に熱して液の温度を約70°とする時は炭酸アムモニアは分解して炭酸瓦斯を發生す。此炭酸瓦斯は洗氣瓶の稀硫酸により共存せるアムモニアを失ひ2個の濃硫酸を入れたる洗氣瓶により充分脱水されて加里球に吸収さる。暫時にして炭酸の發生止みアムモニアのみ發生して稀硫酸の洗氣瓶より先へは殆ど瓦斯は移行せざるに至る可し。此時に及びコルベン内の液を沸騰せしめ他の導管よりは炭酸を含有せざる空氣を通じつゝコルベン及洗氣瓶内に残留す可き炭酸を充分追ひ出して加里球に吸収せしむ。空氣洗滌器中の氣泡も加里球内に生ずる氣泡もが同様なるに及び(空氣を通じ始めてより約20分)加里球を取り放冷せしめ秤量し62.9836gを得たり。

即 $62.9836 - 59.8600 = 3.1236\text{g}$ は30gの枸橼酸より菌の作用により生ぜし炭酸の量にして従て1分子の枸橼酸(210.1)よりは $\frac{3.1236 \times 210.1}{30} = 21.875$ の炭酸即分子量(22.002)を生ずるもの一致す。

次にコルベン内の液は構密に其半量を取り過剰の硫酸を加へて充分酸性となし水蒸氣蒸溜により溜液約700ccを取り之に水を加へて1Lとなし其100ccを取り N_{10} NaOH ($F = 1.0697$) を以て滴定し34.1ccを要せり。尙又残り900ccは苛性ナトロンを以て中和し之を蒸發濃縮して約40ccとなし之の一少部分を取り之に少量のエーテルを加へ振盪しつゝ2%の硫酸銅液を滴加するにエーテル層は無色なり。又此ナトリウム鹽溶液に一容の醋酸エステルを加へ5%の第二鹽化鐵を滴加し振盪するに醋酸エステル層は着

色せず。

殘餘のナトリウム鹽溶液に硝酸銀を加へたるに白色針狀の銀鹽を析出せり。之を熱湯より再結晶して後銀の含量を定量せり。

銀鹽 0.4115 g Ag 0.2650 g Ag%64.4

CH_3COOAg として „ 64.6

即此處に得たる揮發性酸は醋酸なり。故に前に得たる滴定の結果より 30 g の枸橼酸より得らる可き醋酸の量を計算すれば 4.377g にして従て 1 分子の枸橼酸よりは 30.65g 即 $\frac{1}{2}$ 分子(30g)の醋酸を生ず。

水蒸氣蒸溜せし後の硫酸々性の殘留液よりは之を蒸發濃縮し普通の操作により琥珀酸 7.79g を又水蒸氣蒸溜を行はざりし他の半量の液よりは出來得る限り少量の硫酸を以て酸を遊離せしめ同様にして琥珀酸 7.81g を得たり。即 30g の枸橼酸よりは 109.3g を生ず可く従て枸橼酸 1 分子より 1 分子の琥珀酸(118.1)を生ずるものと考へ得。此際アコニット酸 0.1g を得たり。

(B)實驗第拾參 (A)に記載せる培養液の 1 箇を取り菌の培養期間を 16 日とし(A)と全く同様の實驗を繰返せり。

30 g の枸橼酸より得たる炭酸 3.2269 g, 醋酸 4.248 g, 琥珀酸 15.7 g

従て 1 モルの枸橼酸(210.1)より得らる可き, 炭酸 22.6 g, 醋酸 29.75 g, 琥珀酸 109.69 g

$\frac{1}{2}$ モルの炭酸は 22.02 g, $\frac{1}{2}$ モルの醋酸は 30g, 1 モルの琥珀酸は 118.1 g

(C)實驗第二拾九 枸橼酸 330 g をアムモニア水を以て中和し之に水を加へて全液を 6.6 L となし之に酸性磷酸カリ 2.3 g (全液に對し 0.035%), 硫酸マグネシウム及鹽化カルチウム各 1.15 g (全液に對し 0.0175%)を加へ溶解せしむ。此液 600 cc (枸橼酸 30g を含有す)づゝを 1 L のコルベンに入れ流通水蒸氣中に充分殺菌したる後冷却せしめ實驗 22—32 に使用せり。

今此 1 箇を取り之に此菌を培養し 28-30° の孵卵器中に 11 日間放置したる後(A)と同様の操作により炭酸醋酸琥珀酸及アコニット酸を定量せり。

30 g の枸橼酸より得たる炭酸 3.2160g, 醋酸 4.251g, 琥珀酸 16.7g, 及痕跡のアコニット酸

従て 1 モルの枸橼酸(210.1)より得らる可き炭酸 22.52g, 醋酸 29.77g, 琥珀酸 116.96g

$\frac{1}{2}$ モルの炭酸は 22.02 g, $\frac{1}{2}$ モルの醋酸は 30 g, 1 モルの琥珀酸は 118.1g

(V)單純なる此生活菌の醋酸及アコニット酸に對する作用

KH_2PO_4 0.07 %, MgSO_4 及 CaCl_2 を各 0.035 % 宛に醋酸 6 % を含有しアムモニアを以て中和したる培養液に此菌を培養するに菌は繁殖せず。

同じ % の無機鹽類に 6 % のアコニット酸を含有しアムモニアを以て中和したる液に此菌を培養してより 16 日間經過したるに菌は幾分繁殖せり。IV (A) に同様の方法により 30 g のアコニット酸より得らる可き炭酸を定量し 0.0260 g 及揮發性酸を全部醋酸として計算し 0.07381 g を得たるのみにして顯著なる化學變化を認めず。

(VI)酵素による化學變化

(1)石綿濾過器の製法 目皿を有する濾斗内に水に浮遊せしめたる石綿を流入し厚さ 5cm の固き層をなし減壓ポンプを用ひ充分水を壓搾し水の滴下せざるに至りてより尙 15 分間吸引したる後秤量し殺菌す。

(2)一定培養液内に繁殖せし菌體の秤量 枸橼酸 30 g をアムモニアを以て中和し之に KH_2PO_4 0.175 g, MgSO_4 , CaCl_2 を各 0.09 g 宛を加へ全液を 600 cc をなしたる液に菌を培養して菌の濃度一定となり然も菌體は沈澱せざる 6.5 日目に於て上記の石綿濾過器を用ひ無菌的に濾過したる後(此濾液を 28-30° の恒温に保つに菌は繁殖せざれば濾過は完全なり)水にてよく洗ひ(1)に同様の條件の下に秤量し濾過器の目方を差引き菌の目方として 5 回の平均 1.5 g を得たり。故に之に同様の培養液には少くも 1.5 g 以上の菌より得たる酵素を作用せしむ可き必要あり。

(3)菌體と酵素との分離及其作用 此桿狀菌をペプトン肉汁寒天平板培養基に培養してより 6 日の後菌體を搔集め少量の水に浮遊せしめ之を石綿濾過器を以て水を濾別せし菌體 6g を取り之に豫め酸及アルカリを以て充分精製せる微細なる金剛砂を加へ菌體を充分磨殺したる後水 200 cc を 2 度に加へ一層磨滅攪拌して後石綿濾過器を以て濾過し此濾液を豫め殺菌せるシャンベラン

氏濾過器を用ひて無菌的に濾過したる液を注意して30gの枸櫞酸をアムモニアを以て中和し之に KH_2PO_4 0.175 g, MgSO_4 , CaCl_2 各 0.09 g 宛を溶解し水を加へて全液を400 ccとなし充分殺菌し冷却したる培養液に加へ28-30°の孵卵器内に放置す. 7.5日後に之を孵卵器より取り出し検するに無菌なり. 此液をIV實驗(A)と同様の操作により炭酸醋酸琥珀酸及アコニット酸の有無を検したるに痕跡も存在せず. 使用せし枸櫞酸をカルチウム鹽として定量的に回収せり.

之と對照の目的を以て全く之と同様の培養液に菌を培養せしものは同一期間内に同様の操作により炭酸 2.558 g, 醋酸 3.416 g, 琥珀酸 13.5 g を得たり.

第 一 圖

第 二 圖

(A)

(B)

(C)

(D)

(A) と同じ倍率に擴大せるもの

(B) と同じ倍率に擴大せるもの

レモンヂソ種子脂肪油の成分

S. Yamaguchi u. Y. Ito: Über das Samenöl von *Perilla citriodora*.

藥學士 山 口 誠 太 郎

伊 東 祐 之 助

レモンヂソ *Perilla citriodora* Makino の揮發油に關しては去る大正
八年中余等の一人(山口)が近藤教授指導の下に試験を行ひ其成績