

Table IV. Yield(%) of Phenylmercuriacetate

A ₁	A ₂
40.19	43.96
40.66	42.10
40.51	42.55

Table V. Analysis of Variance of Table IV.

Source of Estimate	Sum of Squares	D. F.	Mean Square	Estimate			
				F ₀	F(0.05)	F(0.025)	F(0.01)
Between classes	87604	1	87604	17.53*	7.71	12.2	21.20
Within classes	19987	4	4997				
Total	107591	5					

* : indicate the significance at the 5% level.

北村二郎, 新井幸子, 岡田喬子: 黒変米菌代謝産物について (第2報)¹⁾

Ziro Kitamura, (Miss) Satiko Arai and (Miss) Takako Okada: Studies on the Metabolic Products of *Aspergillus chevalieri* (Mangin) Thom et Church II.

さきに黒変米菌 *Aspergillus chevalieri* (Mangin) Thom et Church の Czapek-Dox (10%蔗糖) 培地での培養菌体から flavoglucin, auroglucin, parietin 及び echinulin の分離を報告したが¹⁾, その後培養液について代謝産物の検索を行い, 若干の知見を得たのでここに報告する.

一般に合成培地として Czapek-Dox 培地 (10%蔗糖で pH 6.8) を使用する時は N 源として NaNO₃ が利用され, そのため培養液はアルカリ性に傾くのが普通である. しかし, このカビの場合にはその発育とともに培地は酸性に傾き 20 日後には pH 4.5~4.8 となり酸性物質の代謝を予想せしめるものがある. 実際に J. R. Loeb²⁾ らはこのカビが米に寄生する際に脂肪酸が生成されることを認めてはいるが詳細については報告していない. 著者らはこの研究において Fig. 1 の分離法によつて揮発性酸として, ギ酸, 酢酸また不揮発性酸としてシユウ酸, クエン酸, リンゴ酸およびコハク酸の存在を確認するとともに二, 三の不明物質の存在をも認めることができた.

本実験に際し御便宜を賜つた宮道学長に謹謝する.

実 験 の 部

使用菌種 昭和30年9月, 農林省食糧研究所より分譲をうけた *Asp. chevalieri* (Mangin) Thom et Church を Czapek-Dox 寒天斜面培地に継代培養し氷室に保存したものを用いた.

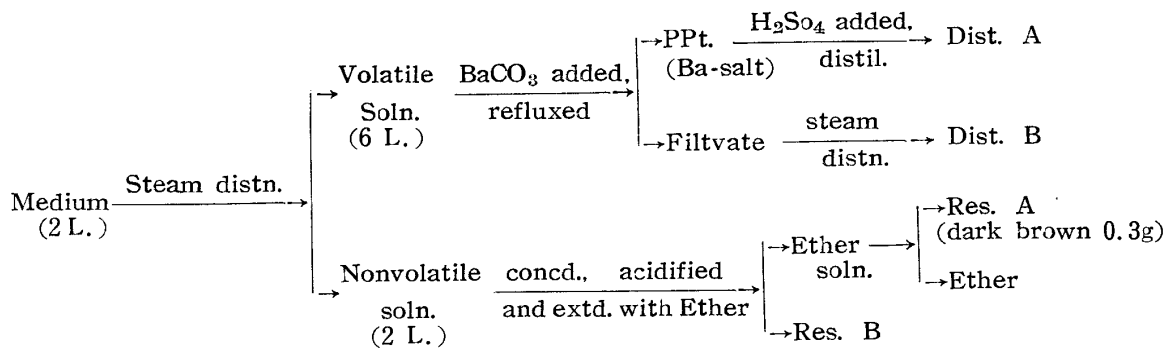
培養方法 次の組成の Czapek-Dox 培地を使用した. NaNO₃ 2.0g., KH₂PO₄ 1.0g., KCl 0.5g., MgSO₄·7H₂O 0.5g., FeSO₄ 0.01g., 蔗糖 100g. を水にとかし 1000cc とする pH 6.8 である. 1L. 3角コルベンに 200cc づつ分注し, 綿栓, 間歇滅菌 (100°, 20分, 3日間) をおこない菌を接種し 28~30°, 20日間培養した. 培養液は黄色から次第に暗褐色となる. pH 4.5~4.8 である.

代謝産物の分離と確認 濾過により菌体を除いた培養液は常法³⁾ に従つて Fig 1 のように処理し代謝産物の分離検出を試みた. 即ち培養液は約3倍量の溜液を得るまで水蒸気蒸溜を行い, 揮発性物質を含む濾液と不揮発性残液に大別した. 溜液には計算量よりやや過剰の炭酸バリウムを加え, 還流冷却器を附して1時間煮沸, 冷却吸引濾過し, 揮発酸の Ba 塩と濾液に分けた. 濾液は再び水蒸気蒸溜をなし溜液 (Dist. B) を得た. 揮発酸の

Ba 塩は硫酸で分解し蒸溜して溜液 (Dist. A) を得た。Dist. A は揮発酸の, Dist. B は酸以下の揮発性物質の検出に供した。最初の水蒸気蒸溜の不揮発性残液は減圧濃縮し, 硫酸々性にし (暗褐色絮状沈澱が析出する) エーテル抽出を行いエーテル可溶部 (Res. A) と不溶部 (Res. B) に分ける。エーテル可溶部はエーテルを溜去すれば暗褐色樹脂状物を残すが陶土板上に放置すれば暗褐色粉末となる。

Dist. A: 佐竹ら⁴⁾の方法により hydrazide となしペーパークロマトグラフィーを行つた。さきに得た溜液にアンモニアを加え, 過剰のアンモニアを除きアンモニウム塩を作り, 更に塩化バリウムを加えて Ba 塩とな

Fig. 1. Separation of the Metabolic Products of *Asp. chevalieri*



し, これに hydrazine hydrate 及び hydrazine sulfate の水溶液を加え, 生じた硫酸バリウムを濾別し, 濾液を水浴上でシロップ状にまで濃縮したものを試料とした。

東洋濾紙 No. 50 (2×40cm), 展開溶媒 Isoamylalcohol : Collidin : Water (20 : 4 : 1), 一次元上昇法, 15~18時間, 呈色は 10% アンモニア性硝酸銀溶液を *n*-Butanol に飽和させたものを噴霧し, 乾燥器中で僅かに加温すれば褐色の地に暗褐色の Spot が現われる。

得られた Rf 値は 0.15, 0.22, 0.68 で佐竹らのそれとは多少異なるが標準としてギ酸と酢酸の hydrazide について行つた値 (0.15, 0.22) と一致し, その存在を確認できたが 0.68 の Spot は不明である。

Dist. B: 次のような反応により還元性物質の存在を推定し得たにすぎなかつた。i) アンモニア性硝酸銀液により黒色沈澱を生ずる (Tollen 反応)。ii) フェーリング溶液を微に還元する。iii) フクシン亜硫酸溶液により淡赤色を呈する (Schiff 反応)。

アルコール, アセトン, フルフロールの反応はいづれも陰性である。

Res. A: 主としてペーパークロマトグラフィーにより不揮発性脂肪酸の検索を行つた。

展開溶媒 i) *n*-Butanol, Formic acid, Water (4 : 1.5 : 1)⁵⁾, ii) Phenol, Formic acid, Water (30g : 0.4cc : 10cc)⁶⁾, 一次元上昇法, 16~20時間, 室温, よく風乾してギ酸を完全に除いてから 0.1% B. P. B. のアルコール溶液を微アルカリ性としたものを吹きつければ紫青色の地に黄色の Spot を生ずる。得られた Rf 値は i) 0.18, 0.22, 0.28, 0.44, 0.75, ii) 0.18, 0.21, 0.28, 0.40, 0.69 でありわれわれの得た標準有機酸の Rf 値から試料中の有機酸はシユウ酸 (0.18, 0.21), クエン酸 (0.28, 0.28), リンゴ酸 (0.44, 0.40) およびコハク酸 (0.75, 0.69) であることを確認したが (0.22, 0.18) の酸は不明である。

1) (第1報) 北村, 栗本, 横山: 薬誌 76, 972 (1956).

2) J. R. Loeb, R. Y. Mayne: Cereal Chemistry 29, 163 (1952).

3) 宮路: "応用微生物学" 実施篇 (岩波書店) 125 (1947).

4) 佐竹, 関: 化学の領域, 4, 557 (1950).

5) J. W. H. Lugg, B. T. Overell: Australian J. Sci. Res., 1, 98 (1948).

6) J. B. Stark, A. E. Goodban, H. S. Owens: Anal. Chem., 23, 413 (1951).