

海藻のビタミンB群に関する研究 - I

ビタミン含有量について

金 沢 昭 夫

Studies on the Vitamin B-complex in Marine Algae-I

On Vitamin Contents

Akio KANAZAWA

Abstract

Generally, the vitamin B-complex widely contains both in the animal and vegetable kingdom, and a lot of reports have been published concerning its content, but as to the vitamin B-complex in marine algae, we have had only partial and fragmentary reports in two or three special sorts of it. However, much amounts of marine algae growing in the ocean is not utilized to-day. Accordingly, with the use of scores of marine algae in the southern sea-fronts of Japan as the material, content-measurement was carried out on the following vitamin B complex; namely, thiamine, riboflavin, nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, folic acid, lipoic acid, B₁₂, choline and inositol. The clarified results of the study may be used as some important referential materials in the further utilization of algae as foods and feeding materials for some domestic animals.

First, the respective vitamin-content in the specific algae was examined with the following results ascertained; namely, thiamine content was found to be within the range of 0.27-4.60 $\gamma/g.$, being abundant in *Gracilaria textorii*, *Gloiopeltis tenax*, *Chondrus ocellatus*: Riboflavin content, 0.84-23.08 $\gamma/g.$, being abundant in *Porphyra tenera*, *Gelidium amansii*, *Chondrus ocellatus*, *Gloiopeltis tenax*: Nicotinic acid content, 3.51-68.33 $\gamma/g.$, being abundant in *Porphyra tenera*, *Laurencia okamurai*, *Gracilaria textorii*: Pantothenic acid content, 0.25-12.21 $\gamma/g.$, being abundant in *Lomentaria catenata*, *Gracilaria textorii*, *Laurencia okamurai*, *Sargassum thunbergii*: Folic acid content, 46.0-857.1 $m\gamma/g.$, being abundant in *Hydroclathrus*, *clathratus*, *Gelidium amansii*, *Laurencia okamurai*: Biotin content, 18-294 $m\gamma/g.$, being abundant in *Porphyra tenera*, *Sargassum thunbergii*, *Hizikia fusiforme*, *Ulva pertusa*: Lipoic acid content, 90-985 $m\gamma/g.$, being abundant in *Gracilaria textorii*, *Porphyra tenera*, *Chondrus ocellatus*: B₁₂ content, 3.3-290.8 $m\gamma/g.$, being abundant in *Porphyra tenera*, *Chondrococcus japonicus*, *Gracilaria gigas*, *Caulerpa racemosa*: Choline content, 24-4885 $\gamma/g.$, being abundant in *Gelidium amansii*, *Porphyra tenera*: Inositol content, 55-1131 $\gamma/g.$, being abundant in *Myelophycus caespitosus*, *Gracilaria textorii*, *Caulerpa racemosa*, *Sargassum thunbergii*.

Concerning, the class-specific difference of these vitamin-contents in the three classes of Chlorophyceae, Phaeophyceae and Rhodophyceae, in case of Chlorophyceae, the scarcity of the measured samples prevented the fixed conclusion, but in case of the other two classes a considerable difference was generally confirmed. This is to say that in Rhodophyceae such vitamin B-complex as thiamine, riboflavin, nicotinic acid, pantothenic acid, B₁₂ and choline are more abundant than in Phaeophyceae. While, the biotin content was found to be less in Rhodophyceae than in Phaeophyceae by about one and half. Concerning the contents of other vitamin B-complex, in folic acid and inositol, almost no difference could be observed.

Next, after making a comparison of the vitamin content of algae assayed by author with those of vegetables, fruits, meats and fish-meats which have been well known, among

the animal and vegetable foods, for their rich vitamin-content, the following results were obtained, namely: Among vitamin B-complex in the marine algae, the contents of inositol, folic acid and thiamine are, in some classes, inferior to those of animal and vegetable foods: while, other vitamin B-complex contents, namely the contents of B₁₂, riboflavin, nicotinic acid, biotin, pantothenic acid, lipoic acid and choline were found to be equal or even superior to those of other foods.

In summary, the hitherto neglected role of the marine algae as the vitamin B-complex supplying resources was explored and fixed to be of equal or even more excellent value, as compared with such important foods as vegetables, fruits, and meats. According to the advancement of the researches concerned with the distribution of marine algae and the studies of the utilities for foods accompanied with the advanced technique of putting, dressing, and manufacturing of the marine algae, their vast potentiality as the vitamin B supplying resources would be beyond estimation.

By the way, among the vitamin B-complex, as to pantothenic acid, biotin, lipoic acid, choline, and inositol, hitherto, almost nothing was known about their existence, to say, nothing of their content in algae, so, the present author was fortunate enough to be the first one to have confirmed their existence and fixed their contents.

Farther more, it was, also, ascertained that, as was generally seen in animal and vegetable tissue, vitamin B-complex in the marine algae was found to be existing in the conjugated form. And it was after changing this conjugated form into free form that each separate assays was carried out by the present author concerning the specific form.

And in folic acid, biotin and B₁₂ there exist many homologues in respective case, so, on separate assays of these homologues was carried out respectively, and the general existence-manner of the vitamin B-complex in marine algae field was here ascertained.

目 次

海藻のビタミン含有量について	
I. 緒 言	39
II. ビオチン	40
III. ビオチンおよびその類似体	44
IV. ビオチンおよびその類似体の分別定量法	47
V. コリンおよびイノシトール	51
VI. チアミン, リボフラビン, ニコチン酸およびパントテン酸	54
VII. リポ酸	58
VIII. ビタミン B ₁₂	61
IX. 論議・総括 文 献	64 67

I. 緒 言

本邦においては古くから海藻が利用されており、現在も食用、肥料、化学薬品原料、工業用原料などとして用いられている。そのうち食用に供されている藻類は藍藻、緑藻、褐藻、紅藻のすべてに亘っているが、一般に蛋白質および脂肪などの含量が少なく、炭水化物もまた特殊のもので栄養価は低いとされている。しかしながら、栄養上重要な微量有効成分、例えば遊離アミノ酸やビタミン類に関し行なわれた近年の研究によって、ある意味では動物肉に匹敵する藻類もあることがわかり、海藻の栄養的価値が再認識されつつある。

また藻類のビタミンに関しては古くから知られていたA、Dのほか、ビタミンCも新田ら¹⁾、富山ら^{2),3)}により測定され、それらの給源として重要視されてきたが、ビタミンB群に

関しては一部の藻類について、2, 3のビタミンについて断片的に測定されているにすぎない。しかるに自然界には莫大な海藻資源が未利用のまま残されているので、未利用資源の開発のため多くの海藻におけるビタミン含有量を明らかにすることは極めて有意義なことである。

著者は海藻におけるビタミンB群即ちチアミン、リボフラビン、パントテン酸、ニコチン酸、ビオチン、葉酸、リボ酸、B₁₂、コリンおよびイノシトールなど多種類にわたって、その含量、形態、分布の状態などをしらべ、海藻の食品、飼料、餌料などとしての価値判断に再検討を加えると共に、得られた結果を海藻の高度利用に応用する目的で本研究を行なった。

その結果海藻のビタミンB群含量は陸上植物のキャベツ、ホーレンソウあるいは動物肉などに匹敵するものが多く、今まで栄養的に軽視されてきた海藻がこれらビタミン類の給源として優れた天然資源であること、今後加工技術の進歩と相まって有望な植物性食品として、あるいは少なくとも家畜の飼料などに利用されるべきものであることを明らかにした。

著者はさらに海藻中ビタミンB群は他の動植物組織と同様、結合型で存在することを明らかにし、この結合型を遊離型に変えて各型を分別定量した。

また葉酸、ビオチンおよびB₁₂などにはそれぞれ多くの類似体が存在するが、それら各類似体についてもそれぞれ分別定量し、海藻における各ビタミンB群の存在状態の全貌をも解明した。

なお海藻中の葉酸およびフオリン酸に関してはすでに著者ら⁴⁾によって発表されているので本報より除外し、残りのビタミンB群について報告することにした。ただし第IX節、論議・総括では葉酸およびフオリン酸も含めて考察を加えた。

本文に入るに先立ち、この研究を行なうに当り終始御懇切な御指導を賜った九州大学富山哲夫先生、本学柏田研一教授、柿本大壺教授、田中剛教授に謹んで感謝の意を表します。

II. ビオチン

天然物中ビオチン (Biotin) は酵母、肝臓、卵黄および牛乳などに多量含まれているが、植物種子にも比較的多く、LYNES ら⁵⁾によれば、その含量は発芽とともに増加すると報告されている。また渡辺ら⁶⁾は桂皮、甘草など生薬中の含量は 25~296 mg/g であったと報告している。しかるに目下のところ海藻のビオチンに関しては報告をみない。

著者は海藻組織のビオチンを bioassay によって測定し、その含量および形態をしらべた結果、海藻はかなり豊富なビオチン資源であることを明らかにした。

1. 実験方法

A. 試料

試料は昭和33年5月鹿児島県薩摩半島南端長崎鼻および鹿児島市付近の海岸で摘採し、直ちに氷冷して持ち帰り定量に使用した。

B. 定量法

ビオチンの *Lactobacillus arabinosus* (ATCC 8014) を用いる定量法には WRIGHT ら⁷⁾、BARTON-WRIGHT⁸⁾、LUCKEY ら⁹⁾ および新村ら¹⁰⁾の研究があるが本法では主として新村らの方法によった。

2. 結果および考察

A. 海藻中のビオチン遊離化の吟味

自然界におけるビオチンは一般に結合型で存在するが、海藻中のビオチンについては明らかではないので、まず海藻中のビオチンが結合型で存在すると予想し、結合型ビオチンを遊離型にする方法について吟味した。結合型を遊離型にするには、一般にタカジアスターゼ消化法、 H_2SO_4 加圧分解法^{7), 11), 12)} が用いられているが、そのうち $6N H_2SO_4$ を加えて加圧分解する方法がよいとされている。しかしこれは動物性試料についての遊離化法であるため、まず海藻試料に対する処理方法を設定するための実験を行なった。アナアオサ（緑藻）、ウミトラノオ（褐藻）、マクサ（紅藻）の各試料（新鮮物）4g に 1N, 2N, 3N, 4N, 5N の H_2SO_4 25cc を加え 15 lbs, 1時間加熱分解したのち、NaOH で pH 6.8 に調整し、全容 100cc として濾過後その 0.5cc をもって測定を行なった。その結果は Fig. 1 の通りである。

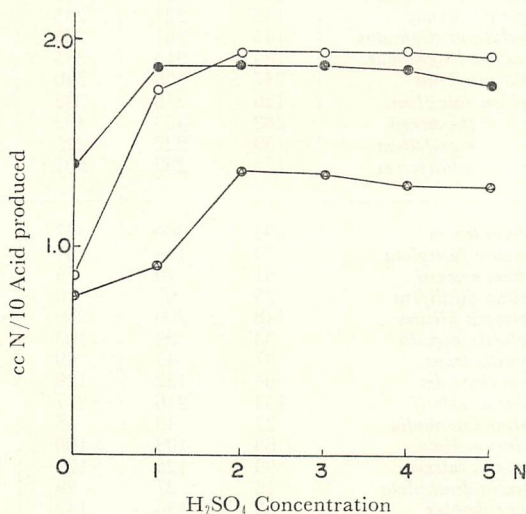


Fig. 1. Degree of liberation of biotin in seaweed by H_2SO_4

- Anaaosa, *Ulva pertusa*
- Umitoranoo, *Sargassum thunbergii*
- △— Makusa, *Gelidium amansii*

海藻中の結合型ビオチンを遊離型にするために用いる H_2SO_4 濃度は、アナアオサ、ウミトラノオ、マクサの3試料いずれも2~5Nの間では大差のないことが判ったが図の結果を考慮して今後 2N H_2SO_4 を用いることにした。

B. 海藻中のビオチン含量

海藻のビオチン含量は試料の採集場所、時期など条件の相異により異なることも考えられるが、一応前記試料について総ビオチンを測定した結果は Table 1 の通りである。無水物g当りの $m\gamma$ であらわしたが、同時に無水・無灰物、無水・無灰・無脂肪物、無水・無灰・無脂肪・無窒素物および窒素に対するビオチン含量 (γ/g) も付記した。

海藻中のビオチン含量は無水物としてあらわすと、緑藻類 115~224 $m\gamma/g$ 、褐藻類 126~282 $m\gamma/g$ 、紅藻類 18~294 $m\gamma/g$ で、全体を通じて見ると各藻類は比較的近似した値を示し、

Table 1. Biotin contents of seaweeds. (mγ per one g.)

Seaweeds		Moisture free	Moisture, ash' free	Moisture, ash, fat free	Moisture, ash, fat, nitrogen free	Biotin/Nitrogen (γ/g)
Chlorophyceae	Hitoegusa, <i>Monostroma nitidum</i>	115	172	194	198	9.6
	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	224	259	275	284	9.0
	Ribonasa, <i>U. fasciata</i>	134	150	161	168	7.5
	Kikkogusa, <i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	208	235	252	260	8.1
	Sennarizuta, <i>Caulerpa racemosa</i>	131	176	178	183	6.2
Phacophyceae	Amijigusa, <i>Dictyota dichotoma</i>	187	252	257	263	11.6
	Komongusa, <i>Spathoglossum pacificum</i>	150	225	231	239	14.2
	Herayahazu, <i>Dictyopteris prolifera</i>	163	249	256	266	12.4
	Umiuchiwa, <i>Padina arborescens</i>	160	213	228	232	12.3
	Shiwanokawa, <i>Petrospongium rugosum</i>	149	230	245	259	9.0
	Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>	162	252	259	292	10.8
	Kayamonori, <i>Scytosiphon lomentaria</i>	247	334	343	353	13.7
	Fukuronori, <i>Colpomenia sinuosa</i>	136	227	235	239	10.0
	Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>	181	301	333	348	7.9
	Habanori, <i>Endarachne binghamiae</i>	185	315	335	359	5.1
	Hijiki, <i>Hizikia fusiforme</i>	237	338	340	347	16.9
	Hondawara, <i>Sargassum fulvellum</i>	126	218	233	239	10.5
	Umitoranoo, <i>U. thunbergii</i>	282	453	492	502	25.6
	Narasamo, <i>U. nigrifolium</i>	159	222	245	257	5.3
Mametawara, <i>U. piluliferum</i>	174	290	301	309	13.5	
Rhodophyceae	Asakusanori, <i>Porphyra tenera</i>	294	364	367	398	4.5
	Garagara, <i>Galaxaura fastigiata</i>	79	144	154	159	4.6
	Makusa, <i>Gelidium amansii</i>	61	76	79	84	1.5
	Pirihiba, <i>Corallina pilulifera</i>	35	67	70	75	3.1
	Mukadenori, <i>Grateloupia filicina</i>	148	206	219	223	8.0
	Kintoki, <i>Carpopeltis angusta</i>	53	99	103	107	2.6
	Mafunori, <i>Gloiopeltis tenax</i>	37	45	49	51	2.3
	Ibaranori, <i>Hypnea charoides</i>	94	122	129	135	6.9
	Kabanori, <i>Gracilaria textorii</i>	153	216	217	223	8.5
	Kainori, <i>Gigartina intermedia</i>	27	49	55	58	2.6
	Tsunomata, <i>Chondrus ocellatus</i>	69	103	108	114	3.0
	Fushitsunagi, <i>Lomentaria catenata</i>	90	125	129	133	10.1
	Ayanishiki, <i>Martensia denticulata</i>	18	27	29	30	1.7
	Makuri, <i>Digenea simplex</i>	85	136	142	144	6.8
Kobusozo, <i>Laurencia undulata</i>	95	133	136	139	2.8	

葉酸にみられるような特に大きな差異は認められなかった。しかし緑藻、褐藻、紅藻の綱別にみると、紅藻類は概してビオチンが少なく、緑藻類および褐藻類に比較して多くのものは約1/2, 中にはそれ以下の含量を示しているものもあるが、アサクサノリは 294mγ/g という今回調査した海藻中最高の含量を示した。これを例外と考えれば、その理由または生理的意義は明らかでないが、藻類の綱別とビオチン含量の間に或る関係が存在しているように思われる。また無水・無灰物、無水・無灰・無脂肪物および主として炭水化物含量と比較するため無水・無灰・無脂肪・無窒素物に対するビオチン含量あるいは窒素に対するビオチン含量などには新しい関係は認められなかった。ただ無水物の場合と同様褐藻に多く紅藻に少ないという傾向はますます顕著にあらわれた。また海藻のビオチン含量は植物性食品中のビオチン含量¹³⁾インゲン98mγ/g, エンドウ180mγ/g, ブドウ31mγ/g, ニンジン210mγ/g, フダンソウ 260mγ/g と比較して同程度で遜色なく、現在食品としてかえりみられなかった海藻の中にもビタミン資源として一考を要するものがあることを知った。

C. 海藻におけるビオチンの形態について

海藻に存在するビオチンは陸上動植物の場合と同様一般に結合型ではないかと考えられるが、このことを確かめるために渡辺ら⁶⁾、福井ら¹⁴⁾の方法により、2, 3の海藻についてビオチンを遊離型と結合型に分けて測定した。即ち試料は摘採後、直ちに蒸留水を加えてホモジナイズし、10分間煮沸抽出したものの定量値を遊離型ビオチンとし、前記の如く2N H₂SO₄濃度で15 lbs, 1時間加圧分解したものの定量値を総ビオチンとし、両者の差を結合型ビオチンとした。その結果は Table 2 の通りである。いずれの海藻にも遊離型、結合型ビオチンの両者が存在し、実験例が少ないので明確ではないが、海藻に存在するビオチンは遊離型、結合型のいずれかに常に著しく偏する傾向はないようである。即ちアオサとタンバノリでは結合型が全体の70%以上を占めているが、シワノカワでは逆に遊離型が全体の60%以上を占めている。

Table 2. Contents of free and conjugated biotin in seaweeds (on dry basis)

Seaweeds	Free form*	Conjugated form**	Total content***
Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	42 mγ/g.	182 mγ/g.	224 mγ/g.
Shiwanokawa, <i>Petrospongium rugosum</i>	92	57	149
Tanbanori, <i>Grateloupia elliptica</i>	43	122	165

* Determined after heating samples in boiling water bath for 10 minutes.

** Conjugated form indicates the values of total content minus free form.

*** Determined after decomposing samples with 2N H₂SO₄ at 15 lbs. for an hour.

D. 海藻の自己融解によるビオチンの遊離

ビオチンの conjugase は biotinidase として THOMA ら¹⁵⁾によりブタの肝臓から分離されているが、海藻中におけるこのような conjugase の存否およびその活性度を知るための一つの方法として、アナアオサ、イバラノリのホモジネートにトルオールを加え、8, 16, 24, 48, 72, 96時間 37°C に放置して自己融解せしめた場合、遊離されるビオチンを測定した。

Table 3. Degree of liberation of biotin in seaweeds by autolysis

Samples	Incubation time of autolysis	Free biotin activity	
Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	0 hrs.	42 mγ/g.	19%
	8	42	19
	16	42	19
	24	42	19
	48	46	21
	72	56	25
	96	59	26
	Hydrolysis*	224	100
	Ibaranori, <i>Hypnea charoides</i>	0	19
8		18	16
16		19	16
24		18	16
48		23	20
72		29	25
96		32	28
Hydrolysis*		116	100

* Hydrolysis was carried with 2N H₂SO₄ at 15 lbs. for an hour.

その結果は Table 3 の通りで、アナアオサ、イバラノリいずれも自己融解によってはあまり遊離されず、自己融解96時間後においても遊離されるビオチンは総ビオチンのそれぞれ26%および28%にすぎなかった。

3. 小 括

1. 海藻中の結合型ビオチンを遊離型にするには、2N H₂SO₄ で 15 lbs, 1時間加圧分解する方法が適当であることが判ったので、この方法により各種海藻についてビオチン含量を測定した。

2. 緑藻5種、褐藻15種、紅藻15種についてビオチン含量を測定した結果、無水物中緑藻では115~224mγ/g, 褐藻では126~282mγ/g, 紅藻では18~294mγ/gで、一般に紅藻より緑藻、褐藻の方が高い値を示した。

3. 海藻におけるビオチンは遊離型および結合型の二つの形態で存在する。3例中2例は結合型が70%以上を占めていたが、1例は遊離型が60%以上を占め、従って海藻におけるビオチンの形態には一定の傾向はない。

4. 海藻の自己融解により遊離するビオチンは極めて少なく、藻体内における conjugase 作用は微弱である。

III. ビオチンおよびその類似体

第II節において海藻中のビオチン含量は、陸上植物に比較してかなり高いものがあることを認めたが、*Lactobacillus arabinosus* に対し活性を示す物質が、はたしてビオチンそのものであるかどうかを確かめる目的で、paper partition chromatography (以下 PPC) による bioautography 法を行なった。

ビオチンの PPC に関しては HARRISON¹⁶⁾ がフェノール、ブタノール、コリジン・ルチジンでそれぞれ展開後 bioassay によりその移動率を検出した報告を始め、WRIGHT ら¹⁷⁾ は *Asp. niger* の培養液のビオチンについて、桑田ら¹⁸⁾ は蚕糞中のビオチンについて、渡辺ら⁶⁾¹⁹⁾、後藤ら²⁰⁾ は桂皮、甘草、益母草など生薬中のビオチンについて、福井らは綿¹⁴⁾ および日本産醗酵生産物²¹⁾ 中のビオチン活性物質について報告している。

著者はこれらの報告にならい海藻中のビオチン活性物質を bioautography により調べた。

1. 実験方法

A. ビオチンの PPC

試料中のビオチン活性物質の PPC は WRIGHT ら¹⁷⁾ に準じて行なった。純ビオチンおよび試料溶液を 20×40cm の東洋濾紙 No. 50 に塗布し、ブタノール・醋酸・水 (4:1:5) を展開溶剤として、上昇法で約16時間 (温度 25±1°C) 展開後、その濾紙を一定間隔に切り取り、各切片を蒸留水で抽出し、その 1cc を検液として *Lactobacillus arabinosus* に対する活性を試験した。

B. ビオチンの bioassay

定量用の基礎培地組成、接種菌、培養温度と時間、標準曲線および測定法などは前節に準じた。

C. 試料調製法

海藻 1 g を細粉とし、水 20cc を加え 100°C の水浴中で 1 時間加熱抽出した後、抽出液を減圧下に蒸発乾固し、固形物を水に溶かして試料溶液とした。

2. 結果および考察

A. ビオチンの bioautography

ビオチンおよび類似体の *L. arabinosus* に対する活性度と Rf 値は Table 1 の通りである。即ちビオチン-D-スルフォキシド (Biotin-D-sulfoxide) はビオチンと同等の活性を示すが、ビオチン-L-スルフォキシド (Biotin-L-sulfoxide) はビオチンの $\frac{1}{20}$ の活性しか示さない。

Table 1. Activity and Rf value of biotin and its analogues to *Lactobacillus arabinosus*.

Biotin and analogues	Activity to <i>L. arabinosus</i>	Rf		
		n-Butanol • Acetic acid • Water (4 : 1 : 5)		
		WRIGHT et al	FUKUI et al	Author
Biotin	100	0.79—0.85	0.7 —0.9	0.80—0.85
Biotin-D-sulfoxide	100	0.57	0.5 —0.6	0.50—0.57
Biotin-L-sulfoxide	5	0.43—0.47	0.4 —0.5	0.40—0.45
Biocytin	—	0.20	0.15—0.20	0.00—0.20

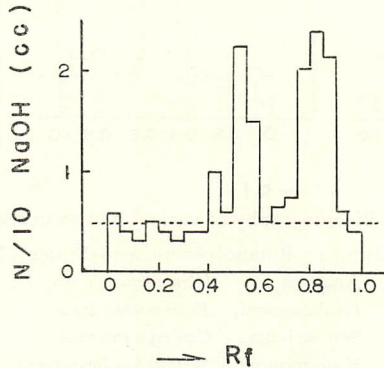


Fig. 1. Bioautography of biotin

Solvent n-Butanol•Acetic acid•Water (4:1:5)

ビオチン結晶の bioautography は Fig. 1 に示す通りで、Rf 0.82 の活性帯はビオチンによるものである。別に Rf 0.54 および 0.45 附近に活性帯が存在するが、この活性はビオチン-D-スルフォキシド および ビオチン-L-スルフォキシドによるものと考えられる。このようにビオチンの PPC で展開中に D および L-スルフォキシドが生成することは WRIGHT ら¹⁷⁾により証明されたところであるが、著者もはたして展開中に生成したものか、あるいは最初からビオチンに混在していたものか、この点を確かめるため、一度展開させた濾紙よりビオチンの活性帯だけを切り取って抽出し、再び濃縮して bioautography を行なったが、やはり D および L-スルフォキシドの活性帯を認めたので、PPC 展開中に生成されたものと判断される。なおこの現象は他の展開溶剤例えば水飽和ブタノールを使用した場合にも同様に観察された。

B. 海藻試料の bioautography

海藻試料溶液につき行なったビオチン活性物質の bioautography は Fig. 2 に示す通りである。

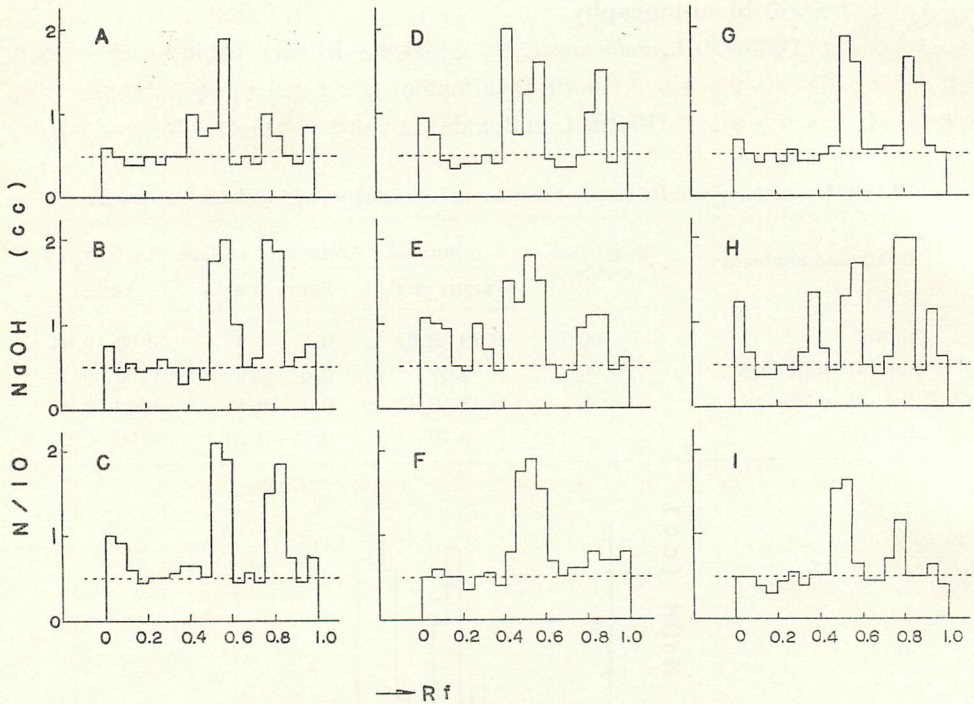


Fig. 2. Bioautography of various biotins in seaweeds

Solvent : n-Butanol•Acetic acid•Water (4:1:5)

- | | | |
|----|----------------|-------------------------------|
| A. | Anaosa, | <i>Ulva pertusa</i> |
| B. | Usubaonori, | <i>Enteromorpha linza</i> |
| C. | Sennarizuta, | <i>Caulerpa racemosa</i> |
| D. | Kayamonori, | <i>Scytosiphon lomentaria</i> |
| E. | Kajime, | <i>Ecklonia cava</i> |
| F. | Umitoranoo, | <i>Sargassum thunbergii</i> |
| G. | Kagiibaranori, | <i>Hypnea japonica</i> |
| H. | Kabanori, | <i>Gracilaria textorii</i> |
| I. | Matsunori, | <i>Carpopeltis affinis</i> |

緑藻のアナアサ(A)ではビオチン, ビオチン-D-スルフォキシド, ビオチン-L-スルフォキシド, ウスバアオノリ(B)ではビオチン, ビオチン-D-スルフォキシド, センナリズタ(C)ではビオチン, ビオチン-D-スルフォキシドの活性帯を認めた. 褐藻のカヤモノリ(D)ではビオチン, DおよびL-スルフォキシド, カジメ(E)ではビオチン, DおよびL-スルフォキシド, ウミトラノオ(F)ではD-スルフォキシド, 紅藻のカギイバラノリ(G)ではビオチン, D-スルフォキシド, カバノリ(H)ではビオチン, DおよびL-スルフォキシド, マツノリ(I)ではビオチン, D-スルフォキシドを認めた. またセンナリズタ, カヤモノリ, カジメおよびカバノリなどでは原点附近に *L. arabinosus* の成長促進因子があることを認めたが, *L. arabinosus* はビ

オシチン (Biocytin) などの結合型はほとんど利用できないので他の未知因子であろうと思われる。海藻のビオチン活性物質は緑藻、褐藻、紅藻類の綱別ではほとんど差が見られないが、ビオチン-L-スルフォキシドは存在するものとしなないものがある。これは *L. arabinosus* に対する活性度が低いため存在しても検出できなかった場合も考えられるが、この点明らかでない。しかし前述の如く PPC に際し、ビオチンから D および L-スルフォキシドが生成することは事実であるから、海藻の bioautography は類似し、最初から海藻中に含まれていたものと、展開中にビオチンから酸化生成したものと区別できないわけで、酸化されないような展開方法あるいは個々のビオチン類似体に対し特異性をもつ菌株を用いて分別定量しなければ海藻中のビオチン-D-スルフォキシド、ビオチン-L-スルフォキシドは確認できない。

3. 小 括

1. 純ビオチンの bioautography ではビオチンの他にビオチン-D-スルフォキシドおよびビオチン-L-スルフォキシドの活性帯が認められた。
2. 海藻中のビオチン活性物質としてはビオチンの他 D および L-スルフォキシドを認めたが、この両物質は前記のように PPC に際しビオチンから二次的に生成されるので、本来海藻に含まれていたか否かは現在のところ確かでない。

IV. ビオチンおよびその類似体の分別定量法

WRIGHT ら^{22), 23)} は *Asp. niger* の培養液中にビオチン関連物質として、*Neurospora crassa* に対しては活性を示すが酵母や乳酸菌に対してはほとんど活性を示さない因子を発見し、本物質が MELVILLE ら^{24), 25)} が研究したビオチン-L-スルフォキシド (Biotin-L-sulfoxide) と同一物であることを明らかにし、一方 WRIGHT 氏ら¹⁷⁾ は paper partition chromatography (以下 PPC と記す) の展開中ビオチンの酸化によってビオチン-D-スルフォキシド (Biotin-D-sulfoxide) が生成されることを証明した。

著者は前節において海藻中にビオチンの他ビオチン-D-スルフォキシド、ビオチン-L-スルフォキシドの活性を認めたが、後二者は PPC に際しビオチンからも生成するので、この両物質が最初から海藻中に含まれていたものか、それとも PPC 展開中にビオチンが酸化されて生成したものか判別できなかった。しかるにこれら物質が *Lactobacillus casei*, *Saccharomyces carlsbergensis* および *Neurospora crassa* の3種の菌に対する活性度に差異があることから、著者はそれを利用した分別定量を考案吟味したところ、ビオチン、D および L-スルフォキシドの分別定量法として使用しうることを明らかにしたので、本法により海藻中のビオチン活性3物質の含量を決定することができた。

1. 実験の部

A. ビオチン活性物質の bioassay

(1) *Lactobacillus casei* を用いる定量法：*L. casei* (ATCC No. 7469) による定量は SHULL ら^{26), 27)} の方法により行なった。bioassay はすべて常法に従い、培養は 37°C で72時間、測定は酸滴定法によった。

(2) *Saccharomyces carlsbergensis* を用いる定量法：*Sac. carlsbergensis* による定量には ATKIN ら^{28), 29)}、福井ら³⁰⁾、谷³¹⁾の研究があるが、主として ATKIN ら、福井らの方法に

よった。菌株は *Sac. carlsbergensis* 4228 (ATCC No. 9080) を使用し、培養法は基礎培地 5cc に標準液と被検液を加えて 9cc として 10 分間蒸気殺菌し、あらかじめ麦芽汁寒天培地に 30°C で 24 時間培養した *Sac. carlsbergensis* の菌体を数回洗滌し、食塩水中に一定濃度となるよう懸濁した接種菌液 1cc を加え、約 20 度に傾斜し、30°C で 16 時間培養後比濁によって測定した。

(3) *Neurospora crassa* を用いる定量法：*Neurospora crassa* による定量法には HOROWITZ ら³²⁾、HODSON³³⁾、TATUM ら³⁴⁾ の研究があるが、主として HOROWITZ らの方法に従った。菌株は *Neurospora crassa* (ATCC No. 10336) を用い、培養法は 50cc の三角フラスコに基礎培地 5cc を入れ、標準液または試料を加えて総量を 10cc とした。15 lbs で 10 分減菌後、あらかじめ麦芽汁寒天培地に 30°C で 72 時間培養した *Neurospora crassa* の孢子懸濁液 1 滴を接種し、25°~27°C に 3 日間培養した。培養後 100°C に 10 分間蒸気殺菌し、菌体を汱別し、水洗後 95°C に 2 時間乾燥して菌体重量を測定した。

B. 試料調製

海藻は摘採後直ちに蒸留水を加えてホモジナイズし、10 分間煮沸抽出したものについての測定値を遊離型とし、2N H₂SO₄ で 15 lbs, 1 時間加圧分解したものについての測定値を総量、両者の差を結合型とした。

2. ビオチン活性 3 物質の新分別定量法と本法による定量結果

A. 各菌株に対するビオチンおよび類似体の活性度

L. casei, *Sac. carlsbergensis* および *Neurospora crassa* 3 種の菌株に対するビオチン、ビオチン-D-スルフォキシドおよびビオチン-L-スルフォキシドの活性度は Table 1 に示す通りで、ビオチン-D-スルフォキシドは *L. casei* に対しては活性を示さないが、*Sac. carlsbergensis* と *Neurospora crassa* に対してはビオチンと同等の活性度を示す。ビオチン-L-スルフォキシドは *L. casei* に対してはビオチンの 1/20、*Sac. carlsbergensis* に対しては活性なく、*Neurospora crassa* に対してはビオチンと同等である。またこれらビオチンおよび類似体に対する各菌株の、生長曲線は大体一致していたので、新定量法における各菌株の生長曲線はビオチンの生長曲線を使用した。

Table 1. Activity of biotin and its analogues to assay organisms

Biotin and analogues	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Biotin	100	100	100
Biotin-D-sulfoxide	0	100	100
Biotin-L-sulfoxide	5	0	100

B. 新分別定量法による 3 種のビオチン活性物質の算出式

Neurospora crassa, *Sac. carlsbergensis* および *L. casei* の各菌株を用いて測定したビオチン活性物質の定量値を次の如くそれぞれ A, B, C とすれば

$$\begin{aligned} & \textit{Neurospora crassa} \dots\dots\dots A \\ & \textit{Saccharomyces carlsbergensis} \dots\dots\dots B \end{aligned}$$

Lactobacillus casei C

各菌株に対する活性度から

$$\text{Biotin-L-sulfoxide} = A - B$$

$$\text{Biotin} = C - \frac{(A - B)}{20}$$

$$\text{Biotin-D-sulfoxide} = B - \left\{ C - \frac{(A - B)}{20} \right\}$$

よって次にビオチン、DおよびL-スルフォキシドの既知組成混合物について、本法による回収試験を行なった結果 Table 2 に示した通り、93~120%の回収率を以て測定することができた。従って本法は従来適当な測定法なく、PPCでも分別できなかつたビオチン活性物質の分別定量法として使用できることが判った。ただDおよびL-スルフォキシド以外のビオチン活性物質としてデスチオビオチン (Desthiobiotin)^{35), 36), 37), 38)}、ビオシチン (Biocytin)^{39), 40), 41), 17)}などが天然に存在するがこれまで知られた範囲ではその分布も限られ、またその量も一般に極めて少ないことから、この場合考慮の要は少ないと思われる。

Table 2. Separate assay of a mixture of three biotin, homologues, i. e., biotin, biotin-D-sulfoxide and biotin-L-sulfoxide

No. of samples	Sampling* (mg/cc.)			Measured value (mg/cc.)			Calculated value** (mg/cc.)			Recovery (%)		
	Biotin	Biotin -D-sulfoxide	Biotin -L-sulfoxide	<i>L. casei</i>	<i>S. carls-bergensis</i>	<i>N. crassa</i>	Biotin	Biotin -D-sulfoxide	Biotin -L-sulfoxide	Biotin	Biotin -D-sulfoxide	Biotin -L-sulfoxide
1	0.050	0.050	0.050	0.060	0.105	0.163	0.057	0.048	0.058	114	96	116
2	0.080	0.040	0.020	0.075	0.122	0.146	0.074	0.048	0.024	93	120	120

* A mixture of chemically pure biotins

** Values for each homologue calculated from responses to three assay organisms

C. 海藻中のビオチン、DおよびL-スルフォキシド含量

次にこのように設定したビオチン、DおよびL-スルフォキシドの新分別定量法により、bioautographyで確認できなかった海藻中のビオチン群を測定した。その結果は Table 3 に見られるように、海藻中にはビオチン-L-スルフォキシドが総量として無水物中113~1090mg/gで最も多く、ビオチン-D-スルフォキシドが25~149mg/gでこれに次ぎ、ビオチンは0~86mg/gで最も少なかった。なかでも遊離型は特にビオチンが少なく、検出されないものも少なくないので、海藻ではビオチンは主としてビオチン-L-スルフォキシドなどの型で存在することがわかる。また結合型と遊離型とでは一般に前者の方が多く含まれているが、稀れには遊離型の方が多いものもあった。また遊離型、結合型、いずれも海藻の綱別即ち緑藻、褐藻、紅藻の間に明瞭な差異は認められなかった。

Table 3. Biotin-, biotin-D-sulfoxide- and biotin-L-sulfoxide-contents of seaweeds (on dry basis)

Seaweeds	Biotin-L-sulfoxide (mγ/g.)			Biotin-D-sulfoxide (mγ/g.)			Biotin (mγ/g.)			
	Free form	Conjugated form	Total content	Free form	Conjugated form	Total content	Free form	Conjugated form	Total content	
Chlorophyceae	Usubaaonori, <i>Enteromorpha linza</i>	44	69	113	15	10	25	0	61	61
	Fusaiwazuta, <i>Caulerpa okamurai</i>	197	219	416	18	34	52	8	68	76
	Midorige, <i>Cladophoropsis zollingeri</i>	74	133	207	5	63	68	19	67	86
Phaeophyceae	Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>	212	107	319	46	103	149	0	5	5
	Kajime, <i>Ecklonia cava</i>	211	879	1090	45	61	106	4	36	40
	Yatsumatamoku, <i>Sargassum patens</i>	144	171	315	60	22	82	0	28	28
Rhodophyceae	Naminohana, <i>Chondrococcus japonicus</i>	98	45	143	38	40	78	0	4	4
	Makuri, <i>Digena simplex</i>	83	190	273	29	42	71	0	0	0
	Mitsudesozo, <i>Laurencia okamurai</i>	109	171	280	12	13	25	0	7	7

3. 小 括

L. casei, *Sac. carlsbergensis* および *Neurospora crassa* 各菌に対するビオチン, ビオチン-D-スルフォキシドおよびビオチン-L-スルフォキシドの活性度の差異を利用したこれら3物質の新分別定量法を考案し, その方法によって海藻中のビオチン活性物質を分別定量した。

1. 新分別定量法は前記各菌株によるビオチン活性物質の定量値を次の如くA, B, Cとし下式によって算出するものである。

Neurospora crassa.....A

Sac. carlsbergensisB

L. caseiC

$$\text{Biotin-L-sulfoxide} = A - B$$

$$\text{Biotin} = C - \frac{(A - B)}{20}$$

$$\text{Biotin-D-sulfoxide} = B - \left\{ C - \frac{(A - B)}{20} \right\}$$

2. この方法により測定の結果, 海藻中にはビオチン-L-スルフォキシドが最も多く, ビオチン-D-スルフォキシドがこれに次ぎ, ビオチンが最も少なかった。またその含量には

海藻の綱別による明瞭な差異は認められなかった。

V. コリンおよびイノシトール

コリン (Choline) はメチル基転移の一端をにない、イノシトール (Inositol) は脂肪やコレステロールの代謝と関係し、この両者はいずれも生化学上重要な意義を有しているためビタミンB群の一員に数えられ、最近研究の進展と共にその生理的意義はますます重要視されつつある。しかし海藻中のコリンおよびイノシトールに関する研究は極めて少なく、古く ZELLER⁴²⁾、荻野^{43), 44)} によってコリンの存在が定性的に報告されているに過ぎない。よって四十数種の海藻についてこの両ビタミンの分布ならびに形態について研究した。

1. 実験方法

A. 定量法

(1) コリンの定量法：コリンの定量には HOROWITZ^ら32), HODSON³³⁾, TATUM^ら34) の研究があるが、本法では主として HOROWITZ らの方法に従った。菌株は *Neurospora crassa* No. 34486 (ATCC 9277) を用いた。実施方法は 50cc の三角フラスコに基礎培地 5cc を入れ標準液または試料を加えて総量を 10cc とし、15 lbs で10分間滅菌後、あらかじめ麦芽汁寒天斜面 (基礎培地+寒天1.5%, 酵母エキス 0.2%, 麦芽エキス 0.2%, コリン 1 γ /cc) に30°C で72時間培養した *Neurospora crassa* の孢子懸濁液 1 滴を接種し、28°C で3日間培養した。培養後 100°C で5分間蒸気加熱し、菌体をブフナー漏斗で濾過し、水洗後 95°C に2時間乾燥して重量を測定した。

(2) イノシトールの定量法：イノシトールの定量は ATKIN^ら29), 45) の方法によった。菌株は *Saccharomyces carlsbergensis* 4428 (ATCC No. 9080) を用い、基礎培地は ATKIN らのものを若干改良した福井^ら30) および谷^ら31) のものを使用した。実施法は基礎培地 5cc に標準液または試料を入れ、水を加えて 9cc とし、10分間蒸気殺菌し、あらかじめ麦芽汁寒天斜面に 30°C で24時間培養した *Sac. carlsbergensis* の菌体を生理食塩水で洗滌したのち、食塩水中一定濃度になるよう懸濁した接種用菌液 1cc を注加し、25度以下の角度に傾斜し、30°C で16時間培養した場合の繁殖度を比濁によって測定した。

天然に存在するイノシトールはメソ-イノシトールのみでなく、シリトール (Scyllitol), D-イノシトール, L-イノシトールも発見されているが、メソ-イノシトールが最も普遍的である。またメソ-イノシトールは酵母の発育に有効であるが、他のイノシトールはほとんど無効であるから *Sac. carlsbergensis* により測定した値はメソ-イノシトールの含量を示すものである。

B. 試料調製法

(1) コリン定量用試料の調製：海藻 0.2g に 3% H₂SO₄ 10cc を加え、15 lbs で2時間加圧分解する。冷却後飽和 Ba(OH)₂ で中和、遠沈濾別し、上清液を NaOH で中和したのち、25~100cc とする。試料中にメチオニンが多く存在すると妨害作用を示すので、この場合はパームチット処理を行なった。即ちパームチット 1g をつめたカラムに試料溶液 5cc を通し、0.3% NaCl 液で洗い、次に 5% NaCl 10cc で完全に溶出した。かくして得た試料についての測定値はコリン総量を示す。

(2) イノシトール定量用試料の調製：海藻 1g に18% HCl 20cc を加え、逆流冷却管をつけて6時間煮沸後、滲液を減圧濃縮して塩酸を反覆除去し、NaOH で中和して100cc とした。この試料についての定量値はメソ-イノシトールの総量を示す。

2. 結果および考察

A. 海藻中のコリンおよびメソ-イノシトール含量

海藻中のコリンおよびメソ-イノシトールの総量を測定した結果は Table 1 の通りである。

(1) 海藻中のコリン総量：海藻中のコリン総量は無水物中緑藻34~358 γ /g, 褐藻24~636

Table 1. Choline- and inositol-contents of seaweeds (on dry basis)

	Seaweeds	Choline content (γ /g.)	Inositol content (γ /g.)
Chlorophyceae	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	61	330
	Ribonasa, " <i>fasciata</i>	34	82
	Kikkogusa, <i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	241	339
	Hosojuzumo, <i>Chaetomorpha crassa</i>	34	223
	Sennarizuta, <i>Caulerpa racemosa</i>	358	584
	Phaeophyceae	Amijigusa, <i>Dictyota dichotoma</i>	77
Komongusa, <i>Spathoglossum pacificum</i>		87	114
Shiwayahazu, <i>Dictyopteris undulata</i>		35	40
Herayahazu, " <i>prolifera</i>		242	151
Umiuchiwa, <i>Padina arborescens</i>		27	690
Ishige, <i>Ishige okamurai</i>		636	298
Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>		618	1131
Fukuronori, <i>Colpomenia sinuosa</i>		406	116
Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>		49	408
Kajime, <i>Ecklonia cava</i>		262	379
Hijiki, <i>Hizikia fusiforme</i>		33	328
Mametawara, <i>Sargassum piluliferum</i>		37	50
Nokogirimoku, " <i>serratifolium</i>		62	132
Oobamoku, " <i>ringgoldianum</i>		71	72
Umitoranoo, " <i>thunbergii</i>		28	566
Isomoku, " <i>hemiphyllum</i>		145	467
Narasamo, " <i>nigri folium</i>		24	197
Rhodophyceae	Hiragaragara, <i>Galaxaura falcata</i>	44	70
	Makusa, <i>Gelidium amansii</i>	4885	443
	Naminohana, <i>Chondrococcus japonicus</i>	1337	449
	Himemosazuki, <i>Jania decussato-dichotoma</i>	113	35
	Sujimukade, <i>Grateloupia ramosissima</i>	1119	55
	Tanbanori, " <i>elliptica</i>	952	209
	Chabokintoki, <i>Carpopeltis rigida</i>	349	120
	Matsunori, " <i>affinis</i>	225	20
	Fukurofunori, <i>Gloiopeltis furcata</i>	1261	301
	Mafunori, " <i>tenax</i>	319	163
	Kagiibaranori, <i>Hypnea japonica</i>	688	346
	Ibaranori, " <i>charoides</i>	636	257
	Kabanori, <i>Gracilaria textorii</i>	230	668
	Okitsunori, <i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	546	322
	Shikinnori, <i>Gigartina teedii</i>	237	145
	Tsunomata, <i>Chondrus ocellatus</i>	856	111
	Fushitsunagi, <i>Lomentaria catenata</i>	240	263
	Makuri, <i>Digenea simplex</i>	87	30
	Mitsudesozo, <i>Laurencia okamurai</i>	1346	89
Kobusozo, " <i>undulata</i>	593	66	

γ/g, 紅藻87~4885 γ/g で, 緑藻は測定例が少ないので明らかでないが褐藻と紅藻を比較すると紅藻には褐藻の約3~10倍多く存在する. またこれまで報告されている陸上の植物体における含量⁴⁶⁾, 例えば乾物中ホウレンソウ 2380γ/g, トマト 0γ/g, トウモロコシ 340γ/g, ニンジン450 γ/g, バレイシヨ 670 γ/g などと比較すると, 海藻のコリン含量はこれらと同等かあるいはそれを上廻るものが多かった.

(2) 海藻中のメソ-イノシトール総量: 海藻中のメソ-イノシトール総量は無水物中緑藻 82~584γ/g, 褐藻 40~1131γ/g, 紅藻 20~668γ/g で, コリンのように緑藻, 褐藻, 紅藻の綱別による含量の差異は認められなかった. また植物性食品のイノシトール含量⁴⁷⁾(新鮮物) ホウレンソウ270γ/g, トマト460γ/g, トウモロコシ500γ/g, ニンジン480γ/g, バレイシヨ 290γ/g および魚類のイノシトール含量⁴⁸⁾ カツオ 普通肉 435γ/g, 血合肉 843γ/g と比較して, 海藻のイノシトール含量は一般に若干少なかった.

B. 海藻中におけるコリンおよびメソ-イノシトールの形態

天然界においてコリンはレシチンの成分として, またイノシトールはフィチンとして存在しているほか遊離型としても存在する. 前項においては海藻中のコリン およびメソ-イノシトールを総量として測定したが, 海藻中にも結合型および遊離型両者が存在するものと予想してこれらを分別定量した. 即ち総量から遊離型を差引いた値を結合型とする方法によった. 遊離型コリンの定量は LUECKE ら⁴⁹⁾の方法に従った. 即ち海藻試料 2g を破砕し 1% 醋酸ソーダ 50cc に懸濁し, pH 4.6 とし, 1 時間80~100°C に保ったのち遠心分離する. この上澄液に 2 倍量のアセトンを加え, 2 時間水冷してレシチンなどを析出沈澱せしめる. 上澄液からアセトンを除き, 適当に稀釈し, パームチット処理を行なったのち前記の bioassay 法によって定量した.

遊離型メソ-イノシトールの定量は福井ら¹⁴⁾の方法によった. 即ち蒸留水を加えて 10 分間煮沸した抽出液について活性度を前記の bioassay 法により測定した.

Table 2. Choline- and meso-inositol-contents of seaweeds (on dry basis)

Seaweeds		Choline content (γ/g.)			Inositol content (γ/g.)		
		Free form	Conjugated form	Total content	Free form	Conjugated form	Total content
Chloro-phyceae	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	6	59	65	174	228	402
	Midorige, <i>Cladophoropsis zollingeri</i>	5	90	95	0	158	158
	Fusaiwazuta, <i>Caulerpa okamurai</i>	6	299	305	138	332	470
Phaeo-phyceae	Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>	8	642	650	109	1105	1214
	Kajime, <i>Ecklonia cava</i>	5	305	310	216	202	418
	Futaemoku, <i>Sargassum duplicatum</i>	8	467	475	72	96	168
Rhodophyceae	Asakusanori, <i>Porphyra tenera</i>	130	2485	2615	13	35	48
	Makusa, <i>Gelidium amansii</i>	125	3410	3535	166	205	371
	Mafunori, <i>Gloiopeltis tenax</i>	3	208	211	26	158	184
	Kabanori, <i>Gracilaria textorii</i>	7	158	165	145	369	514

数種の海藻について測定した遊離型コリンおよび遊離型メソ-イノシトールの含量は Table 2 に示したように、海藻中における遊離型コリン含量は極めて少なく、大部分が結合型であるのに対し、メソ-イノシトールは遊離型がかなり多く、なかには結合型と同量程度のものもあった。

3. 小 括

主として本邦南海域で採集した約50種の海藻についてコリンおよびメソ-イノシトール含量を測定した。

1. コリン総量は無水物中数十 γ ~数千 γ /g で、紅藻類が褐藻より大きい値を示した。
2. メソ-イノシトール総量は無水物中数十 γ ~数百 γ /g で、コリンのような褐藻、紅藻の綱別による差異は認められなかった。
3. 海藻中のコリンおよびメソ-イノシトール含量は陸上植物^{46),47)}と比較した場合、コリン含量は同等かそれを上廻るが、メソ-イノシトール含量は一般に少なかった。
4. 海藻中のコリンは遊離型のもは極めて少ないが、メソ-イノシトールは遊離型もかなり多く結合型と同量程度のもも多かった。

VI. チアミン、リボフラビン、ニコチン酸およびパントテン酸

チアミン (Thiamine) は動植物組織中においては遊離型およびエステル型として存在するが、一般に生体内では大部分がエステル化している。海藻中のチアミン含量については藤田⁵⁰⁾がアサクサノリなど2, 3の海藻について、また最近三田⁵¹⁾がアオノリおよびアナアオサ中の含量について報告している。

リボフラビン (Riboflavin) は動植物組織中にはエステル型が大部分であるが、なかには遊離型のみのももある。海藻中のリボフラビンについては古く HEILBRON ら⁵²⁾は褐藻 *Fucus vesiculosus* からルミフラビンを、淡水緑藻 *Cladophora sauteri* からラクトフラビンのアセチル化合物を分離し、また渡辺⁵³⁾はルミフラビン法で57種の藻類について定量し、辻村ら⁵⁴⁾はワカメ、コンブ、アマノリなど十数種の海藻についてリボフラビン含量を測定している。

ニコチン酸 (Nicotinic acid) は動植物中に遊離型および結合型として存在し、ニコチンアミド、Coenzyme I, Coenzyme II などが知られているが、海藻中のニコチン酸についてはほとんど研究がなく、藤田⁵⁵⁾が本邦加工食品として2, 3の海藻につきその含量を報告しているにすぎない。

パントテン酸 (Pantothenic acid) は動植物中に多く結合型として存在し、Coenzyme A, *L. burgaricus* 因子および Pantothenic acid conjugated form が知られているが、海藻中のパントテン酸については報告されていないようである。

著者は数十種の海藻についてチアミン、リボフラビン、ニコチン酸およびパントテン酸の含量を測定し、他の植物性食品含量などと比較検討した。

1. 実験方法

A. 定量法

(1) チアミン：チアミンの *L. fermenti* 36を用いる定量は SARETT ら⁵⁶⁾、BENNETT ら⁵⁷⁾により研究されているが、本法では主として SARETT ら⁵⁶⁾の方法によった。培養は 35°C で16

～18時間、培養後比濁により測定した。

(2) リボフラビン：リボフラビンの *L. casei* を用いる定量は SNELL ら⁵⁸⁾、ROBERTS ら⁵⁹⁾ により研究されているが、本法では主として ROBERTS ら⁵⁹⁾の方法によった。培養は37°Cで72時間、培養後滴定により測定した。

(3) ニコチン酸：ニコチン酸の *L. arabinosus* 17-5 を用いる定量は SNELL ら⁶⁰⁾、KREHL ら⁶¹⁾、BARTON-WRIGHT⁶²⁾、SARETT ら⁶³⁾ により研究されているが、本法では主として KREHL ら⁶¹⁾の方法によった。培養は37°Cで72時間、培養後酸滴定により測定した。

(4) パントテン酸：パントテン酸の *L. arabinosus* 17-5 を用いる定量は SNELL ら⁶⁰⁾、SKEGGS ら⁶⁴⁾、HOAG ら⁶⁵⁾ により研究されているが、本法では主として SKEGGS ら⁶⁴⁾の方法によった。培養は37°Cで72時間、培養後滴定により測定した。

B. 試料の調製

海藻試料は鹿児島県薩摩半島南端長崎鼻および鹿児島市付近で摘採し、直ちに氷冷して持ち帰り実験に供した。海藻中のチアミン、リボフラビン、ニコチン酸およびパントテン酸含量は結合型を分解して遊離型となし、すべてこれらのビタミン総量として定量した。各ビタミンを遊離型とするには、次の如く陸上動植物で採られている方法に準じて行なった。

(1) チアミン：SARETT ら⁵⁶⁾の方法に従った。試料約4gを精秤し、10倍量のN/10 H₂SO₄を加え沸騰水中で30分間加熱したのち、0.5%の醋酸ナトリウム溶液を加えてpH 4.5となし、これにタカジアスターゼ200mgを加え37°Cに24時間保ち酵素分解を行なったのち、pH 6.6に調整し定量に供した。

(2) リボフラビン：STRONG ら⁶⁶⁾の方法によった。試料をN/10 HClで15 lbs、15分間加圧分解し、冷後pH 4.5として濾過し、さらにpHを6.8に調整して検液とした。

(3) ニコチン酸：KREHL ら⁶¹⁾、SARETT ら⁶³⁾の方法によった。試料1gをN H₂SO₄ 10ccに溶解し、15 lbs、30分間加圧分解したのち、pHを6.8に調整し、100ccとなし、濾過して検液とした。

(4) パントテン酸：NEILANDS ら⁶⁷⁾、KAPLAN ら⁶⁸⁾、TOEPFER ら⁶⁹⁾の方法があるが、主としてKAPLAN らの方法に従った。即ち磨砕した試料2gに10ccの1M “Tris” 緩衝液 (pH 8.3) Tris-(hydroxymethyl) aminomethane と20ccの水を加え、15 lbsで15分分解し水を加えて200ccとする。この1ccに0.1M NaHCO₃ 緩衝液0.1cc、2%腸(コウジ)フォスファターゼ0.4cc、1%ニワトリ肝臓溶液(イオン交換樹脂処理)0.2ccを加え、さらに水を加えて2ccとし、トルオールを加えて37°Cに4時間作用させ、100ccにしたのち濾過し検液とした。

2. 結果および考察

数十種の実験について測定したチアミン、リボフラビン、ニコチン酸およびパントテン酸の総量は Table 1 および 2 の通りである。

A. 海藻中のチアミン含量

海藻のチアミン含量は緑藻0.29～1.50γ/g、褐藻0.27～1.10γ/g、紅藻0.04～4.60γ/g、で紅藻類が最も多く、次いで緑藻類、褐藻類の順であった。これらチアミン含量は藤田⁵⁰⁾が測定したアサクサノリ0.82γ/g、コンブ0.86γ/g、ワカメ0.26γ/g、アラメ0.73γ/gの値とほぼ

Table 1. Total thiamine- and riboflavin-contents of seaweeds (on dry basis)

	Species	Thiamine content (γ/g.)	Riboflavin content (γ/g.)
Chlorophyceae	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	0.90	2.80
	Ribonaosa, // <i>fasciata</i>	0.57	3.74
	Usubaonori, <i>Enteromorpha linza</i>	1.50	1.20
	Midorige, <i>Cladophoropsis zollingeri</i>	0.54	2.49
	Sennarizuta, <i>Caulerpa racemosa</i>	0.78	1.97
	Kokeiwazuta, // <i>webbiana</i>	0.29	3.42
	Fusaiwazuta, // <i>okamurai</i>	0.80	7.23
	Phaeophyceae	Amijigusa, <i>Dictyota dichotoma</i>	0.75
Komongusa, <i>Spathoglossum pacificum</i>		0.36	0.84
Sanadagusa, <i>Pachydictyon coriaceum</i>		0.53	4.09
Umiuchiwa, <i>Padina arborescens</i>		0.29	0.98
Ishige, <i>Ishige okamurai</i>		0.62	6.25
Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>		0.27	3.06
Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>		0.34	2.80
Makonbu, <i>Laminaria japonica</i>		0.51	4.68
Kajime, <i>Ecklonia cava</i>		1.10	2.50
Hijiki, <i>Hizikia fusiforme</i>		0.28	2.67
Mametawara, <i>Sargassum piluliferum</i>		0.60	4.88
Yatsumatamoku, // <i>patens</i>		0.80	5.22
Nokogirimoku, // <i>serratifolium</i>		0.29	2.17
Oobamoku, // <i>ringoldianum</i>		0.31	5.74
Hondawara, // <i>fulvellum</i>		0.30	5.03
Umitoranoo, // <i>thunbergii</i>		0.38	5.30
Narasamo, // <i>nigri folium</i>		0.40	6.21
Rhodophyceae	Benimozuku, <i>Helminthocladia australis</i>	0.54	5.16
	Garagara, <i>Galaxaura fastigiata</i>	0.97	1.98
	Makusa, <i>Gelidium amansii</i>	1.60	17.95
	Hosobanaminohana, <i>Chondrococcus hornemanni</i>	1.41	10.52
	Pirihiba, <i>Corallina pilulifera</i>	0.09	0.45
	Himemosazuki, <i>Jania decussato-dichotoma</i>	0.04	0.38
	Fuirigusa, <i>Halymenia dilatata</i>	1.04	7.60
	Sujimukade, <i>Grateloupia ramosissima</i>	1.38	6.27
	Kintoki, <i>Carpopeltis angusta</i>	0.64	5.22
	Matsunori, // <i>affinis</i>	1.86	4.70
	Fukurofunori, <i>Gloiopeltis furcata</i>	0.28	1.21
	Mafunori, // <i>tenax</i>	2.45	14.69
	Tosakanori, <i>Meristotheca papulosa</i>	0.66	3.15
	Kagiibaranori, <i>Hypnea japonica</i>	1.32	1.26
	Ibaranori, // <i>charoides</i>	1.42	2.90
	Oogonori, <i>Gracilaria gigas</i>	1.80	1.04
	Kabanori, // <i>textorii</i>	4.60	6.92
	Tsunomata, <i>Chondrus ocellatus</i>	2.19	14.73
	Makuri, <i>Digenea simplex</i>	0.41	5.87
	Mitsudesozo, <i>Laurencia okamurai</i>	0.53	10.22
Kobusozo, // <i>undulata</i>	0.21	1.18	

一致するが、三田⁵¹⁾の測定したアナアオサ 3.07~7.22γ/g, アオノリ 1.17~8.89γ/g の値と比較すると低い。海藻中のチアミン含量と日常食用に供している野菜類や果実類のチアミン含量⁷⁰⁾例えば、バレイシヨ 2.95γ/g, ニンジン 7.42γ/g, チシャ 2.7γ/g, キャベツ 9.67γ/g, リンゴ 1.05γ/g と比較すると、紅藻類はほぼ同程度であるが、褐藻類は低かった。

B. 海藻中のリボフラビン含量

海藻中のリボフラビン含量は緑藻 1.20~7.23γ/g, 褐藻 0.84~6.25γ/g, 紅藻 0.38~17.95

Table 2. Total nicotinic acid-and pantothenic acid-contents of seaweeds (on dry basis)

	Species	Nicotinic acid content (γ/g.)	Pantothenic acid content (γ/g.)
Chlorophyceae	Anaosa, <i>Ulva periosa</i>	7.50	2.35
	Ribonasa, " <i>fasciata</i>	2.12	1.49
	Kikkogusa, <i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	10.41	9.05
	Hosojuzumo, <i>Chaetomorpha crassa</i>	5.95	3.10
	Sennarizuta, <i>Caulerpa racemosa</i>	21.18	5.53
Phaeophyceae	Amijigusa, <i>Dictyota dichotoma</i>	15.20	0.73
	Komongusa, <i>Spathoglossum pacificum</i>	25.21	0.29
	Shiwayahazu, <i>Dictyopteris undulata</i>	15.71	0
	Herayahazu, " <i>prolifera</i>	18.02	3.78
	Umiuchiwa, <i>Padina arborescens</i>	8.86	1.74
	Ishige, <i>Ishige okamurai</i>	15.87	3.50
	Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>	14.17	3.15
	Fukuronori, <i>Colpomenia sinuosa</i>	5.13	2.92
	Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>	3.15	3.07
	Kajime, <i>Ecklonia cava</i>	18.84	0.49
	Hijiki, <i>Hizikia fusi forme</i>	6.80	1.40
	Mametawara, <i>Sargassum piluliferum</i>	10.14	0.40
	Nokogirimoku, " <i>serratifolium</i>	21.51	0.45
	Oobamoku, " <i>ringgoldianum</i>	16.53	4.21
	Umitoranoo, " <i>thunbergii</i>	4.49	8.76
	Isomoku, " <i>hemiphyllum</i>	8.71	0.64
Narasamo, " <i>nigri folium</i>	17.18	0.49	
Rhodophyceae	Hiragaragara, <i>Galaxaura falcata</i>	8.90	7.30
	Makusa, <i>Gelidium anansii</i>	20.10	1.22
	Naminohana, <i>Chondrococcus japonicus</i>	8.15	1.30
	Sangomo, <i>Corallina officinalis</i>	3.45	5.68
	Himemosazuki, <i>Jania decussato-dichotoma</i>	2.00	2.17
	Sujimukade, <i>Grateloupia ramosissima</i>	24.46	2.32
	Tanbanori, " <i>elliptica</i>	35.89	1.99
	Kintoki, <i>Carpopeltis angusta</i>	16.90	4.60
	Matsunori, " <i>affinis</i>	3.16	1.38
	Fukurofunori, <i>Gloiopeltis furcata</i>	25.34	6.71
	Mafunori, " <i>tenax</i>	23.79	5.85
	Kagiibaranori, <i>Hypnea japonica</i>	19.92	11.10
	Ibaranori, " <i>charoides</i>	21.50	6.82
	Ogonori, <i>Gracilaria verrucosa</i>	7.81	1.83
	Kabanori, " <i>textorii</i>	33.90	9.73
	Okitsunori, <i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	2.46	2.07
	Shikinnori, <i>Gigartina teedii</i>	4.78	1.50
	Tsunomata, <i>Chondrus ocellatus</i>	29.65	7.04
	Fushitsunagi, <i>Lomentaria catenata</i>	24.24	12.21
	Makuri, <i>Digenea simplex</i>	12.42	5.36
Mitsudesozo, <i>Laurencia okamurai</i>	39.07	8.97	
Kobusozo, " <i>undulata</i>	26.86	4.46	

γ/g で、紅藻は緑藻、褐藻より多く、約3倍含まれていた。これらリボフラビン含量は渡辺⁵³⁾のルミフラビン法により測定した紅藻(26種)の平均値0.24γ/g、褐藻(26種)、緑藻(5種)の平均値0.14γ/gより高い値を示し、辻村ら⁵⁴⁾の測定したコンブ、ワカメなどの含量1.0~37.0γ/gとはほぼ一致している。また⁷¹⁾オレンジ2.2γ/g、リンゴ0.71γ/g、カブ3.44γ/g、キャベツ3.28γ/g、ニンジン3.38γ/gなど野菜類、果実類と比較すると、海藻中のリボフラビンは同程度から約3倍の含量を示している。

C. 海藻中のニコチン酸含量

海藻中のニコチン酸含量は緑藻2.1~21.1 γ /g, 褐藻3.1~25.2 γ /g, 紅藻2.0~39.0 γ /gで、いずれも近似した値を示したが、紅藻類は緑藻類, 褐藻類よりやや多い傾向がある。海藻中のニコチン酸と日常食用に供している野菜類, 果実類⁷²⁾例えば、エンドウ 10.0 γ /g, ニンジン22.0 γ /g, アンズ25.1 γ /g, リンゴ5.6 γ /g, オレンジ18.6 γ /g とを比較してみると、海藻中のニコチン酸含量は野菜類のものと同程度かそれを上廻るものが多かった。

D. 海藻中のパントテン酸含量

海藻中のパントテン酸含量は緑藻1.4~9.0 γ /g, 褐藻0~8.7 γ /g, 紅藻1.2~12.2 γ /gで、紅藻類は褐藻類と比較して、約2倍高い含量を示した。また海藻中のパントテン酸含量と本邦食品⁷³⁾例えば、アスパラガス1.2 γ /g, フダンソウ14 γ /g, ホウレンソウ17 γ /g, リンゴ4.1 γ /gなどと比較すると、海藻中のパントテン酸含量はほぼこれらに匹敵する値を示している。

著者は以上数十種の海藻についてチアミン, リボフラビン, ニコチン酸およびパントテン酸の総含量を定量したが、日常食用に供している野菜類, 果実類^{70), 71), 72), 73)}と比較して、チアミンが若干低い値を示したのみで、リボフラビン, ニコチン酸およびパントテン酸は同程度か、あるいはそれを上廻り、特にリボフラビンは陸上植物性食品の3倍程度含まれているものが多く、ビタミン資源として有望であることが判った。

3. 小 括

海藻中 (50種) のチアミン, リボフラビン, ニコチン酸およびパントテン酸含量を測定したの結果を得た。

1. チアミン含量は0.04~4.60 γ /gで、一般に紅藻類は緑藻類および褐藻類より高い値を示した。
2. リボフラビン含量は0.38~17.95 γ /gで、緑藻類, 褐藻類および紅藻類の綱別による差異は認められなかった。
3. ニコチン酸含量は2.0~39.0 γ /gで、リボフラビン同様海藻の綱別による差異は認められなかった。
4. パントテン酸含量は0~12.2 γ /gで、紅藻類は緑藻類および褐藻類より大きい値を示した。
5. 海藻中のチアミン, リボフラビン, ニコチン酸およびパントテン酸含量は陸上植物性食品と比較して、チアミンは種類によって低い含量のものもあるが、その他のビタミンは同程度かあるいはそれを上廻った。

VII. リ ポ 酸

1951年 REED ら⁷⁴⁾により肝臓および酵母から、はじめて結晶として分離されたリポ酸 (Lipoic acid) は、REED⁷⁵⁾, GUNSALUS⁷⁶⁾によれば、細菌においてピルビン酸酸化反応に補酵素として重要な役割を果しており、SANADI ら⁷⁷⁾によれば、細菌のみならずハト・ブタなどの高等動物組織中にも存在することを認められ、また人尿中にリポ酸が排泄されることも STOKSTAD ら⁷⁸⁾によって証明された。また最近高田⁷⁹⁾は麴菌中に *S. faecalis* の増殖を促進する未知因子の存在を、また桂⁸⁰⁾, 能勢⁸¹⁾は人尿中のリポ酸について報告し、細菌およ

び高等動物における代謝の役割が漸次解明されつつある。一方リポ酸は動植物組織中に遊離型あるいは結合型として広く存在するものと考えられるが、海藻におけるリポ酸はその存在についてさえ報告されていない。

著者は *S. faecalis* 10C1 を使用した bioassay 法により海藻中のリポ酸含量および形態を調べた。

1. 実験方法

A. リポ酸の定量法

和田ら⁸²⁾、平泉⁸³⁾の *S. faecalis* 10C1 を使用する bioassay 法によった。菌株は *S. faecalis* 10C1 を使用し、基礎培地は STOKSTAD⁸⁴⁾ の培地を用いたが、培地に加える酵素カゼイン分解物はベンゼンで処理したペプトンを代用した。リポ酸定量の標準曲線は 0.25~4.0mγ/cc の範囲で得られる。滅菌はオートクレーブで 15 lbs で10分間加圧処理した。培養は34°C で16時間とし、培養後 640mμ のフィルターを使用し、濁度を測定した。和田ら⁸²⁾、平泉⁸³⁾ は34°C で72時間培養後、酸滴定により測定しているが、著者は24時間以上の培養では低濃度部の増殖が高度となり標準曲線が崩れてくるので、高田^{79), 85)} の16時間培養後比濁による測定を採用し良好な結果を得た。

B. 試料

海藻試料は鹿児島県薩摩半島南端長崎鼻で摘採し、直ちに持ち帰り実験に供した。また一部は 80°C 以下で乾燥しデシケーターに保存した。

2. 実験および結果の考察

A. 海藻よりリポ酸の抽出

天然物中のリポ酸は主として結合型で存在するが、*S. faecalis* は結合型を利用できないので、抽出後遊離型としなければならない。抽出法については REED ら⁸⁶⁾、FISCHER⁸⁷⁾、和田ら⁸²⁾、平泉⁸³⁾により詳細に検討されているが、著者は海藻試料の抽出法につき比較検討した。その結果は Table 1 の通りである。海藻の風乾物および新鮮物のホモジネート (pH 6.8 磷酸緩衝液) を 100°C で5分間加熱し、遠沈後上澄をとり測定した値は甚だ低かった。酵素分解処理として、トリプシンおよびタカジェスターゼを加え (試料 1g に対し25mg)、37°C で24時間培養した場合も測定値は低かった。しかし酸加水分解処理として 1N, 2N, 4N および 6N H₂SO₄ 溶液とし、15 lbs で1時間加熱後測定した場合にはよく抽出され、特に 4N H₂SO₄ 加水分解処理で最高の値を得たのでこれを採用した。

その方法は海藻 0.2g に 4N H₂SO₄ 20cc を加え、オートクレーブで 15 lbs, 1時間加水分解し、NaOH で pH 6.8 に調整後水で 100cc とする。これを適当に稀釈してリポ酸総量測定用の試料検液とする。遊離型の抽出法は海藻 0.2g を pH 6.8 の磷酸緩衝液中で細粉し、10分間煮沸して 50cc にしたものを試料検液とし、上記リポ酸総量との差を結合型とした。

B. 海藻中のリポ酸含量および形態

約40種の海藻につき測定したリポ酸の遊離型、結合型および総量は Table 2 の通りである。なおリポ酸の既知量を添加した試料について再検率を検討した結果は 85~115% であった。リポ酸総量は緑藻で 145~515mγ/g、褐藻で 90~645mγ/g、紅藻で 125~985mγ/g で、緑藻、

Table 1. Lipic acid contents of various extracts from seaweeds

Extracts	Seaweeds (Dried material)	Chlorophyceae	Phaeophyceae	Rhodophyceae
		Midorige, <i>Cladophoropsis zollingeri</i>	Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>	Akabaginnansou, <i>Rhodoglossum pulcherum</i>
Boiling (5 min.)		0 mγ/g.	18 γm/g.	80 mγ/g.
Trypsin (incubated at 37°C, for 24 hours)		90	45	230
Takadiastase (incubated at 37°C, for 24 hours)		100	45	220
1 N H ₂ SO ₄ (autoclaved at 15 lbs., for an hour)		230	90	410
2 N H ₂ SO ₄ (")		380	280	580
4 N H ₂ SO ₄ (")		480	290	640
6 N H ₂ SO ₄ (")		320	290	600
Extracts	Seaweeds (Fresh material)	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	Fukuronori, <i>Colpomenia sinuosa</i>	Kabanori, <i>Gracilaria textorii</i>
Boiling (5 min.)		12 mγ/g.	20 mγ/g.	100 mγ/g.
Autolysis (incubated at 37°C, for 24 hours)		25	13	115
Trypsin (incubated at 37°C, for 24 hours)		73	19	108
Takadiastase (incubated at 37°C, for 24 hours)		82	66	175
1 N H ₂ SO ₄ (autoclaved at 15 lbs., for an hour)		90	160	190
2 N H ₂ SO ₄ (")		90	170	256
4 N H ₂ SO ₄ (")		125	165	270
6 N H ₂ SO ₄ (")		120	125	260

褐藻、紅藻の綱別とリポ酸含量との間には何ら関係はみられなかった。なお一般に遊離型はかなり少なく、リポ酸総量の10~20%に過ぎないが、褐藻のカジメだけは遊離型が多かった。

3. 小 括

1. 海藻のリポ酸抽出法につき種々比較検討した結果、4N H₂SO₄ で 15 lbs, 1 時間加圧分解する方法が最高の値を得たので、一般に海藻中のリポ酸定量には、この抽出法を行なわねばならないことを知った。

2. 約40種類の海藻について定量したりポ酸含量はりポ酸総量として、緑藻 145~515 mγ/g, 褐藻90~645mγ/g, 紅藻125~985mγ/g で、海藻の綱別による含量に差異はみられなかった。

3. 遊離型リポ酸は一般に少なく、リポ酸総量の10~20%に過ぎない。

Table 2. Lipoic acid contents of seaweeds (on dry basis)

	Seaweeds	Free form	Conjugated form	Total content	Free form
					Total content
		mγ/g.	mγ/g.	mγ/g.	%
Chlorophyceae	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	140	280	420	33.3
	Sujiaonori, <i>Enteromorpha prolifera</i>	15	130	145	10.4
	Midorige, <i>Cladophoropsis zollingeri</i>	75	440	515	14.6
	Kokeiwazuta, <i>Caulerpa webbiana</i>	50	190	240	20.8
	Fusaiwazuta, <i>'' okamurai</i>	85	120	205	42.0
Phaeophyceae	Amijigusa, <i>Dictyota dichotoma</i>	75	425	500	15.0
	Sanadagusa, <i>Pachydictyon coriaceum</i>	75	570	645	11.6
	Umiuchiwa, <i>Padina arborescens</i>	45	185	230	19.6
	Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>	30	330	360	8.3
	Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>	55	275	330	16.7
	Fukuronori, <i>Colpomenia sinuosa</i>	70	470	540	12.9
	Makonbu, <i>Laminaria japonica</i>	45	155	200	22.5
	Kajime, <i>Ecklonia cava</i>	85	5	90	94.4
	Ezoishige, <i>Pelvetia wrightii</i>	75	160	235	31.9
	Hijiki, <i>Hizikia fusiforme</i>	85	145	230	37.0
	Yatsumatamoku, <i>Sargassum patens</i>	15	565	580	2.6
	Hondawara, <i>'' fulvellum</i>	50	250	300	16.7
	Umitoranoo, <i>'' thunbergii</i>	70	200	270	25.9
	Narasamo, <i>'' nigrifolium</i>	200	210	410	48.8
Nokogirimoku, <i>'' serratifolium</i>	75	265	340	22.1	
Rhodophyceae	Asakusanori, <i>Porphyra tenera</i>	90	700	790	11.4
	Makusa, <i>Gelidium amansii</i>	75	495	570	13.2
	Akaba, <i>Neodilsea yendoana</i>	50	240	290	17.2
	Naminohana, <i>Chondrococcus japonicus</i>	75	175	250	30.0
	Sujimukade, <i>Grateloupia ramosissima</i>	90	440	530	17.0
	Kintoki, <i>Carpopeltis angusta</i>	20	185	205	9.8
	Matsunori, <i>'' affinis</i>	75	235	310	24.2
	Mafunori, <i>Gloiopeltis tenax</i>	50	280	330	15.2
	Ibaranori, <i>Hypnea charoides</i>	65	290	355	18.3
	Kabanori, <i>Gracilaria textorii</i>	165	820	985	16.9
	Akabaginnansou, <i>Rhodoglossum pulcherum</i>	95	675	770	12.3
	Kurobaginnansou, <i>Iridaea cornucopiae</i>	25	205	230	10.9
	Tsunomata, <i>Chondrus ocellatus</i>	85	615	700	12.1
	Makuri, <i>Digenea simplex</i>	15	110	125	12.0
	Kobusozo, <i>Laurencia undulata</i>	60	240	300	20.0

VIII. ビタミン B₁₂

ビタミン B₁₂ は広く動物界に分布し、緑色植物や植物性食品にはほとんど存在しないといわれているが、ERICSON ら⁸⁸⁾、橋本ら^{89), 90)}により海藻中に B₁₂ が発見され、植物起源にも存在することが判明した。一方 ROBBINS ら⁹¹⁾ も海藻に B₁₂ が存在することを見出し、佐藤⁹²⁾ も植物食品中アサクサノリのみ B₁₂ が存在し、他の多くの植物食品にはほとんど存在しないことを認めた。また上野⁹³⁾ は淡水藻類について、KUCEVA ら⁹⁴⁾ は黒海、バーネット海の海藻について、それぞれ B₁₂ 含量を報告している。

著者は主として本邦南方海域で摘採した40種の海藻についてビタミン B₁₂ 含量を測定し、海藻の APF あるいは B₁₂ 資源としての価値について検討した。

1. 実験方法

A. 定量法

ビタミンB₁₂の定量は *Euglena gracilis* 法および *Ochromonas malhamensis* 法の両者を用いた。

Euglena gracilis 法には PROVASOLI ら⁹⁵⁾, HUTNER ら⁹⁶⁾, ROBBINS ら⁹⁷⁾, 上田ら⁹⁸⁾, 佐藤⁹⁹⁾, 上久保¹⁰⁰⁾の研究があるが, 本法では主として佐藤⁹⁹⁾の方法によった。使用菌株は *Euglena gracilis* var *bacillaris* (ATCC 10616) により, 培養は 30°C で 4~5日とし, 培養後濁度を測定した。

Ochromonas malhamensis 法には HUTNER ら^{101), 102)}, FORD¹⁰³⁾, 上久保¹⁰⁰⁾, 宮本¹⁰⁴⁾の研究があるが, 本法では主として FORD¹⁰³⁾の方法によった。培養は 29°C で, 試験管が水平面と約 10° の角度になるよう傾斜させて 90時間培養し, のち濁度を測定した。

B. 試料の調製

天然物中の B₁₂ は hydroxocobalamin のような不安定な形で存在したり, 種々の蛋白または他の物質と結合した状態で存在する場合が多いので, この結合型 B₁₂ を遊離型に抽出して定量した。

抽出法としては種々の方法があるが, 最良とされている KCN 抽出法^{103), 105), 106), 107), 108), 104)}によった。しかし *O. malhamensis* を用いる場合, 試料の抽出に醋酸緩衝液を加えると菌の生育を阻害するので次の如く処理した。

試料 1g に水 50cc 加え, KCN を B₁₂ 1 γ に対し 1mg の割合で加え, HCl で pH 4.5~5.0 とし, 15 lbs で 5分加圧分解したのち NaOH で中和し, 100cc としたのち濾過して試料液とした。

2. 結果および考察

40種の海藻について *Euglena* 法および *Ochromonas* 法で測定した B₁₂ 含量は Table 1 の通りである。

Euglena 値は緑藻類 23.0~311.2m γ /g, 褐藻類 2.1~76.5m γ /g, 紅藻類 15.2~219.7m γ /g で緑藻, 紅藻は褐藻より 3~4倍程度多く, この傾向は橋本ら⁹⁰⁾も認めている。ROBBINS ら⁹¹⁾は種々の藻類について 10~640m γ /g を測定し, ERICSON⁸⁸⁾ は 25種の海藻について, 緑藻で平均 350m γ /g, 褐藻で平均 70m γ /g, 紅藻で平均 270m γ /g を測定し, 上野⁹³⁾は淡水藻類について, *L. Leichmannii* 法で 24~150m γ /g を測定し, KUCEVA ら⁹⁴⁾ は黒海, バーネット海 of 海藻について 4~311m γ /g を定量している。

著者の定量した含量は, これら諸氏の定量値と比較してほぼ一致したが, ただ ERICSON の定量値とは著者の方が少なかった。ERICSON は海藻の B₁₂ 含量は肝臓の半分程度もあり, 世界未利用海藻資源量は莫大なものであるから, 海藻は B₁₂ 資源として極めて有望であると発表した。著者の調べた範囲では, 海藻の種類により, 肝臓の半分に達するものもあるが, 肝臓より少ないものが大部分であった。しかし一般に, 海藻の B₁₂ 含量は内臓一般に匹敵し, 牛肉, 魚肉などよりかなり多いので, 今後海藻は食品の B₁₂ 資源として, 家畜の APF 飼料として, 利用の可能性があると考えられる。

このように海藻中の B₁₂ を *Euglena* 法で測定した結果, かなり豊富に含まれることを認めたが *Euglena gracilis* は cyanocobalamin 以外に, Pseudo-B₁₂, Factor A, Factor C にも反応を示すため, 海藻中の B₁₂ 活性が果して cyanocobalamin そのものであるかどうか, この点を確かめる目的で, cyanocobalamin のみに活性を示すといわれる *Ochromonas*

Table 1. Comparison between the values assayed by two different assay organisms, *Euglena* and *Ochromonas* (on dry basis)

Seaweeds		<i>Euglena</i> method (mγ/g.)	<i>Ochromonas</i> method (mγ/g.)	<i>Ochro.</i> <i>Euglena</i> × 100 (%)	Pseudo- B ₁₂ (mγ/g.)
Chlorophyceae	Anaosa, <i>Ulva pertusa</i>	62.8	15.7	25	5.9
	Ribonaosa, " <i>fasciata</i>	23.0	10.2	44	1.6
	Kikkogusa, <i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	27.9	13.8	49	1.8
	Hosojuzumo, <i>Chaetomorpha crassa</i>	311.2	129.2	42	22.8
	Sennarizuta, <i>Caulerpa racemosa</i>	149.4	16.4	11	16.6
Phaeophyceae	Amijigusa, <i>Dictyota dichotoma</i>	10.1	5.2	52	0.6
	Komongusa, <i>Spathoglossum pacificum</i>	7.0	6.2	89	0.1
	Shiwayahazu, <i>Dictyopteris undulata</i>	41.0	23.1	56	2.2
	Herayahazu, " <i>prolifera</i>	17.1	33.0	193	—
	Umiuchiwa, <i>Padina arborescens</i>	4.2	2.1	50	0.3
	Ishige, <i>Ishige okamurai</i>	9.0	7.5	83	0.2
	Iwahige, <i>Myelophycus caespitosus</i>	7.6	6.9	91	0.1
	Fukuronori, <i>Colpomenia sinuosa</i>	76.5	49.4	65	3.4
	Kagomenori, <i>Hydroclathrus clathratus</i>	65.8	23.6	36	5.3
	Kajime, <i>Ecklonia cava</i>	3.3	1.6	48	0.2
	Hijiki, <i>Hizikia fusiforme</i>	5.7	5.7	100	0
	Nokogirimoku, <i>Sargassum serratifolium</i>	2.1	1.2	57	0.1
	Oobamoku, " <i>ringgoldianum</i>	3.2	1.2	38	0.3
	Umitoranoo, " <i>thunbergii</i>	46.5	22.0	47	3.1
	Isomoku, " <i>hemiphyllum</i>	72.7	74.3	102	—
Narasamo, " <i>nigrifolium</i>	20.7	6.1	30	1.8	
Rhodophyceae	Hiragaragara, <i>Galaxaura falcata</i>	37.5	35.1	94	0.3
	Makusa, <i>Gelidium amansii</i>	35.9	19.3	54	2.1
	Naminohana, <i>Chondrococcus japonicus</i>	219.7	38.7	18	22.6
	Himemosazuki, <i>Jania decussato-dichotoma</i>	22.4	14.4	64	1.0
	Sujimukade, <i>Grateloupia ramosissima</i>	29.4	12.5	43	2.1
	Tanbanori, " <i>elliptica</i>	23.6	16.8	71	0.9
	Kintoki, <i>Carpopeltis angusta</i>	16.6	12.0	72	0.6
	Matsunori, " <i>affinis</i>	42.1	19.5	46	0.3
	Mafunori, <i>Gloiopeltis tenax</i>	15.2	15.2	100	0
	Ibaranori, <i>Hypnea charoides</i>	26.5	22.5	85	0.5
	Ogonori, <i>Gracilaria verrucosa</i>	212.3	87.2	41	15.6
	Kabanori, " <i>textorii</i>	75.7	39.3	52	4.6
	Okitsunori, <i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	45.4	42.5	94	0.4
	Shikinnori, <i>Gigartina teedii</i>	55.4	34.9	63	2.6
	Tsunomata, <i>Chondrus ocellatus</i>	89.2	12.0	14	9.7
	Fushitsunagi, <i>Lomentaria catenata</i>	25.2	23.6	94	0.2
	Makuri, <i>Digenea simplex</i>	83.6	16.9	20	8.3
	Mitsudesozo, <i>Laurencia okamurai</i>	100.2	65.1	65	4.4
	Kobusozo, " <i>undulata</i>	43.1	25.8	59	2.2

*malhamensis*¹⁰⁹⁾ により、同一試料、同一浸出液について測定し、*Euglena* 値と比較した。

その結果 *Euglena* 値にくらべて、*Ochromonas* 値はかなり低く、例えばアナアオサではその比が25%で、種類によっては10%程度のものもあり、一般に *Euglena* による海藻中の B₁₂ 含量の1/2~1/3は cyanocobalamin 以外の活性物質と思われる。宮本¹⁰⁴⁾も *L. Leichmannii* 法と *O. malhamensis* 法により、食品中の B₁₂ 含量を比較し、動物性試料では両者の値に差がないが、植物性試料では、かなりの差を認め、著者の結果と一致している。

また *Euglena* 値の cyanocobalamin 以外の活性物質は Pseudo-B₁₂ と思われるが、ERICSON ら⁸⁸⁾が海藻中に cyanocobalamin の他、Pseudo-B₁₂ を検出しているのに対し、

SOUTHCOTT ら¹¹⁰⁾は *Fucus*, *Laminaria* 属 8 種の海藻について, Pseudo-B₁₂ を検出できなかったと報告しており, 海藻中の Pseudo-B₁₂ の存在は明らかでない. 著者は BAKER ら¹¹¹⁾の提案した B₁₂ 類似体の分離定量法により, Pseudo-B₁₂ を測定した. 即ち *Ochromonas* 法による定量値は真の B₁₂ を示し, *Euglena* 値には Pseudo-B₁₂ が加算されているとして,

$$\text{Pseudo-B}_{12} = \frac{\text{Euglena 値} - \text{Ochromonas 値}}{8}$$

なる式で算出した. その結果は Table 1 の通りで, 0~22.6mγ/g の Pseudo-B₁₂ が存在することになる. しかし COATES¹¹²⁾ らによれば, Pseudo-B₁₂ の活性は cyanocobalamin と同等であると報告しているので, BAKER の測定値の 8 倍になる. また一方海藻中には *Euglena* に対して効力をもつ Factor A の存在も報告されているので, BAKER らの算出式による Pseudo-B₁₂ 含量には, いろいろ問題があり, これらを含めて海藻中の Pseudo-B₁₂ に関しては他に発表の予定である.

3. 小 括

海藻中の B₁₂ を *Euglena* 法および *Ochromonas* 法で定量し, 次の結果を得た.

1. B₁₂ 含量は *Euglena* 値で, 緑藻類 23.0~311.2mγ/g, 褐藻類 2.1~76.5mγ/g, 紅藻類 15.2~219.7mγ/g で, 緑藻, 紅藻に多く, 褐藻はやや少ない.
2. 海藻中の B₁₂ 含量は内臓一般に匹敵し, 動物肉などより多かった.
3. 海藻の B₁₂ は *Euglena* 値と *Ochromonas* 値との間にかかなりの差異があり, 海藻の B₁₂ 含量の 1/2~1/3 は Pseudo-B₁₂ と考えられ, この点動物組織と比較して異なっている.

IX. 論 議・総 括

自然界には莫大な海藻資源が未利用のまま残されているが, 著者はこの資源の高度利用を図る方法として, これを食品, 飼料などとしての活用を考える場合, 問題となるビタミン B 複合体に関し, これまで全く知られなかったものを含む総合的研究を行なった. 研究したビタミン B 複合体はチアミン, リボフラビン, ニコチン酸, パントテン酸, 葉酸, ビオチン, リボ酸, B₁₂, コリンおよびイノシトールで, まずその分布を定量した結果, 海藻のこれらビタミン含量は動植物性食品と比較してほとんど遜色なく, 海藻はビタミン B 複合体に富むすぐれた資源であることがわかった. 海藻のビタミン含量は試料の採集場所, 時期, 老幼および部位など条件の相異により異なると考えられるが, 昭和33年および34年5月, 鹿児島県薩摩半島南端長崎鼻で摘採した本邦南方海域の数十種の海藻について測定した. その一部の海藻につき, ビタミン B 複合体含量を総合的にまとめた結果は Table 1 の通りである.

個々のビタミンについてその含量を検討すると, まずチアミンは 0.27~4.60γ/g で, カバノリ, マフノリ, ツノマタに多く, リボフラビンは 0.84~23.08γ/g で, アサクサノリ, マクサ, ツノマタ, マフノリに多く, ニコチン酸は 3.51~68.33γ/g で, アサクサノリ, ミツデソゾ, カバノリに多く, パントテン酸は 0.25~12.21γ/g で, フシツナギ, カバノリ, ミツデソゾ, ウミトラノオに多く, 葉酸は 46.0~857.1mγ/g で, カゴメノリ, マクサ, ミツデソゾに多く, ビオチンは 18~294mγ/g で, アサクサノリ, ウミトラノオ, ヒジキ, アナアオサに多く, リボ酸は 90~985mγ/g で, カバノリ, アサクサノリ, ツノマタに多く, B₁₂ は 3.3~290.8mγ/g で, アサクサノリ, ナミノハナ, オゴノリ, センナリズタに多く,

コリンは 24~4885 γ/g で、マクサ、アサクサノリに多く、イノシトールは 55~1131 γ/g で、イワヒゲ、カバノリ、センナリズタ、ウミトラノオに多かった。

またこれらビタミン含量が海藻の綱別即ち緑藻類、褐藻類、紅藻類によって異なるか否かを見ると、緑藻類は実験例が少ないので明確でないが、褐藻類と紅藻類の間には顕著な差異が観察されるものが多かった。即ちチアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、 B_{12} 、コリンはいずれも褐藻より紅藻に多く、チアミンは約4倍、リボフラビンは3倍、ニコチン酸、パントテン酸は2倍、 B_{12} は4倍、コリンは6倍も多く含まれ、これとは反対にピオチンは褐藻より紅藻が少なく $1/2$ 程度であった。その他のビタミンB複合体、葉酸、イノシトールはほとんど差異がみられなかった。チアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、 B_{12} 、コリンおよびピオチンなどにみられる藻類の綱別による傾向は海藻の生理に関して興味ある事実を示すものと思われる。

次に各藻類のビタミン含量を検討すると、緑藻中のアナアオサはピオチン給源として、センナリズタは B_{12} とイノシトール給源としてすぐれている。褐藻中のイワヒゲにはイノシトールが多く、カゴメノリには葉酸が多く、ヒジキにはピオチンが、ウミトラノオにはパントテン酸、ピオチン、イノシトールが多く含まれている。特にイワヒゲのイノシトール、カゴメノリの葉酸は藻類中最高の含量で、すぐれたビタミン資源と考えられる。紅藻中のアサクサノリはリボフラビン、ニコチン酸、ピオチン、リボ酸、 B_{12} 、コリン給源として、マクサはリボフラビン、葉酸、コリン給源として、ナミノハナは B_{12} 、マフノリはチアミン、リボフラビン、オゴノリは B_{12} 、カバノリはチアミン、ニコチン酸、パントテン酸、リボ酸、イノシトール、ツノマタはチアミン、リボフラビン、リボ酸、フシツナギはパントテン酸、ミツデソゾはニコチン酸、パントテン酸、葉酸給源としてすぐれていた。特にアサクサノリのリボフラビン、ニコチン酸、ピオチン、 B_{12} 、マクサのコリン、カバノリのチアミン、リボ酸は海藻中最高の含量を示し、これら海藻はビタミンB複合体を極めて豊富に含むビタミン資源と考えられる。

次に著者が定量した海藻のビタミン含量と、動植物性食品中高含量として知られているキャベツ、ハウレンソウ、ニンジン、パレイショ、エンドウ、トマト、トウモロコシ、米、牛肉、豚肉、カツオおよびタイなどのビタミン含量と比較してみると、まず海藻中紅藻のチアミン含量は動植物性食品とほぼ同程度であるが、褐藻は少なかった。緑藻、褐藻のリボフラビン含量は他の食品と同程度であり、紅藻は約その3倍含まれていた。ニコチン酸含量は他の食品と同程度か、あるいはそれを上廻るものが多かった。パントテン酸含量は他の食品含量にはほぼ匹敵する値を示した。葉酸給源として、海藻中比較的含量的の高いものは動植物性食品にはほぼ匹敵するが、一般に海藻の葉酸は低い値を示した。リボ酸は動植物組織について測定した例がないので比較できないが、海藻には多量含まれているのでリボ酸給源として役立つと思われる。 B_{12} は植物性食品にほとんど含まれていないが、動物性食品と比較しても、はるかに多く、動物の内臓に匹敵するものが多かった。コリン給源として、海藻は他の食品と比較し、同等かあるいはそれを上廻るものが多かった。イノシトール給源として、海藻は一般に他の食品よりもやや劣っていた。このように海藻のビタミンB複合体のうち、イノシトール、葉酸、チアミン含量は野菜、果実ならびに動物性食品のビタミン含量と比較して海藻の種類により少ないものもあるが、その他の B_{12} 、リボフラビン、ニコチン酸、ピオチ

ン、パントテン酸、リボ酸、コリンなどは同等かあるいは遥かにそれを上廻り、すぐれた食品として利用されるべきものであることを明らかにした。

最近 TEERI ら¹¹³⁾ はヒバマタ、コンブ、ツノマタなど4種の海藻についてチアミン、リボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、葉酸、ピオチンおよび B₁₂ の7種のビタミンを測定し、そのうち紅藻ツノマタはニコチン酸、パントテン酸含量が高値を示し、野菜、果物ならびに動物性食品よりもすぐれていると報告しているが、著者の測定した値と比較してみると、パントテン酸、B₁₂ は著者の値より多く、ピオチン、チアミンは少なく、ニコチン酸、リボフラビンは同程度であった。

従来海藻のビタミンは一部の海藻で、2、3のビタミンについて断片的に報告されているに過ぎなかったが、本研究は多種類の海藻につき、10種類のビタミンB複合体を測定した結果、従来栄養的に軽視されてきた海藻が、その含有量において野菜、果実および動物性食品に劣らぬビタミン類の給源であることがわかり、今後、海洋における海藻資源の分布調査とともに、また海藻の消化吸收の研究、あるいは調理、加工技術の進歩とともに、人間あるいは動物のビタミンB給源として、利用されるべきものであることを明らかにした。

なお海藻のビタミンB複合体のうち、パントテン酸、ピオチン、リボ酸、コリン、イノシトールは、従来含量はもちろん、その存在すら知られていなかったが、著者は始めて海藻におけるこれらビタミンの存在を確認し、含量を決定した。さらに海藻中のビタミンB複合体は他の動植物組織と同様、結合型で存在することを明らかにし、この結合型を遊離型に変えて各型を分別定量した。また葉酸、ピオチンおよび B₁₂ などにはそれぞれ多くの類似体が存在するが、それら各類似体についてもそれぞれ分別定量し、海藻における各ビタミンB複合体の存在状態の全貌をも解明した。

文 献

- 1) 新田・田口・森 (1948) : 日水誌, 13, 153.
- 2) 矢吹・片山・富山 (1949) : *Ibid.*, 15, 249.
- 3) 片山・矢吹・富山 (1949) : *Ibid.*, 15, 415.
- 4) 金沢・柿本 (1958) : *Ibid.*, 24, 573.
- 5) LYNES, K. J., NORRIS, F. W. (1948) : *J. Inst. Brew.*, 54, 150.
- 6) 渡辺・後藤 (1954) : 薬学雑誌, 74, 157.
- 7) WRIGHT, L. D., SKEGGS, H. R. (1944) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 56, 95.
- 8) BARTON-WRIGHT, E. C. (1945) : *Analyst*, 70, 283.
- 9) LUCKEY, T. D., MOORE, P. R., ELVEHJEM, C. A. (1946) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 61, 97.
- 10) 新村 (1957) : ビタミン, 12, 106.
- 11) LAMPEN, J. O., BAHLER, G. P., PETERSON, W. H. (1942) : *J. Nutr.*, 23, 11.
- 12) WILLIAMS, V. R. (1945) : *J. Biol. Chem.*, 159, 237.
- 13) 佐藤ら編 (1956) : ビタミン学, p. 762, 金原出版.
- 14) 福井・坂本・谷 (1955) : ビタミン, 8, 118.
- 15) THOMA, R. W., PETERSON, W. H. (1954) : *J. Biol. Chem.*, 210, 569.
- 16) HARRISON, J. S. (1951) : *Analyst*, 76, 77.
- 17) WRIGHT, L. D., CRESSON, E. L., DRISCOLL, C. A. (1954) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86, 480.
- 18) 桑田・増田・後藤 (1954) : ビタミン, 7, 323.
- 19) 渡辺・後藤 (1954) : 薬学雑誌, 74, 160.
- 20) 後藤・川島・逸見 (1954) : 薬学雑誌, 74, 527.
- 21) 福井・坂本・谷 (1958) : ビタミン, 14, 436.

- 22) WRIGHT, L. D., CRESSON, E. L. (1954) : *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4156.
- 23) WRIGHT, L. D., CRESSON, E. L., VALIANT, J., WOLF, D. E., FOLKERS, K. (1954) : *Ibid.*, **76**, 4160, 4163.
- 24) MELVILLE, D. B. (1954) : *J. Biol. Chem.*, **208**, 495.
- 25) MELVILLE, D. B., GENGHOF, D. S., LEE, J. M. (1954) : *Ibid.*, **208**, 503.
- 26) SHULL, G. M., HUTCHINGS, B. L., PETERSON, W. H. (1942) : *Ibid.*, **142**, 913.
- 27) SHULL, G. M., PETERSON, W. H. (1943) : *Ibid.*, **151**, 201.
- 28) ATKIN, L., WILLIAMS, W. L., SCHULTZ, A. S., FREY, C. N. (1943) : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **15**, 654.
- 29) ATKIN, L., SCHULTZ, A. S., WILLIAMS, W. L., FREY, C. N. (1943) : *Ibid.*, **15**, 141.
- 30) 福井・坂本・谷 (1955) : ビタミン, **8**, 218.
- 31) 谷 (1957) : *Ibid.*, **12**, 546.
- 32) HOROWITZ, N. H., BEADLE, G. W. (1943) : *J. Biol. Chem.*, **150**, 325.
- 33) HODSON, A. Z. (1945) : *Ibid.*, **157**, 383.
- 34) TATUM, E. L., RITCHEY, M. G., COWDRY, E. V., WICKS, L. F. (1946) : *Ibid.*, **163**, 675.
- 35) MELVILLE, D. B., DITTMER, K., BROWN, G. B., VIGNEAUD, V. (1943) : *Science*, **98**, 497.
- 36) DITTMER, K., MELVILLE, D. B., VIGNEAUD, V. (1944) : *Ibid.*, **99**, 203.
- 37) LILLY, V. G., LEONIAN, L. H. (1944) : *Ibid.*, **99**, 205.
- 38) TATUM, E. L. (1945) : *J. Biol. Chem.*, **160**, 455.
- 39) WRIGHT, L. D., CRESSON, E. L., SKEGGS, H. R., WOOD, T. R., PECK, R. L., WOLF, D. E., FOLKERS, K. (1950) : *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1048.
- 40) WRIGHT, L. D., SKEGGS, H. R., CRESSON, E. L. (1951) : *Ibid.*, **73**, 4144.
- 41) WRIGHT, L. D., CRESSON, E. L., LIEBERT, K. V., SKEGGS, H. R. (1952) : *Ibid.*, **74**, 2004.
- 42) ZELLER, A. (1934) : *Biochem. Z.*, **268**, 187.
- 43) 荻野 (1941) : 日水誌, **10**, 156.
- 44) 荻野 (1943) : *Ibid.*, **12**, 48.
- 45) ATKIN, L., WILLIAMS, W. L., SCHULTZ, A. S., FREY, C. N. (1944) : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 67.
- 46) 佐橋ら編 (1956) : ビタミン学, p. 772 金原出版.
- 47) WOOLLEY, D. W. (1941) : *J. Biol. Chem.*, **140**, 453.
- 48) 堀口・柿本・柏田 (1950) : 鹿水専研究報告, **1**, 41.
- 49) LUECKE, R. W., PEARSON, P. B. (1944) : *J. Biol. Chem.*, **155**, 507.
- 50) 藤田 (1955) : ビタミン定量法, p. 275, 南江堂.
- 51) 三田 (1960) : 日水誌, **26**, 1010, 1013.
- 52) HEILBRON, I. M., PARRY, E. G., PHIPERS, R. F. (1935) : *Biochem. J.*, **29**, 1382.
- 53) 渡辺 (1937) : *Acta Phytchim.*, **9**, 255.
- 54) 辻村・田部井・和田 (1952) : 農化, **26**, 11.
- 55) 藤田 (1955) : ビタミン定量法, p. 710 南江堂.
- 56) SARETT, H. P., CHELDELIN, V. H. (1944) : *J. Biol. Chem.*, **155**, 153.
- 57) CHELDELIN, V. H., BENNETT, M. J., KORNBERG, H. A. (1946) : *Ibid.*, **166**, 779.
- 58) SNELL, E. E., STRONG, F. M. (1939) : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **11**, 346.
- 59) ROBERTS, E. C., SNELL, E. E. (1946) : *J. Biol. Chem.*, **163**, 499.
- 60) SNELL, E. E., WRIGHT, L. D. (1941) : *Ibid.*, **139**, 675.
- 61) KREHL, W. A., STRONG, F. M., ELVEHJEM, C. A. (1943) : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **15**, 471.
- 62) BARTON-WRIGHT, E. C. (1944) : *Biochem. J.*, **38**, 314.
- 63) SARETT, H. P., PEDERSON, R. L., CHELDELIN, V. H. (1945) : *Arch. Biochem.*, **7**, 77.
- 64) SKEGGS, H. R., WRIGHT, L. D. (1944) : *J. Biol. Chem.*, **156**, 21.
- 65) HOAG, E. H., SARETT, H. P., CHELDELIN, V. H. (1945) : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **17**, 60.
- 66) STRONG, F. M., CARPENTER, L. E. (1942) : *Ibid.*, **14**, 909.
- 67) NEILANDS, J. B., STRONG, F. M. (1948) : *Arch. Biochem.*, **19**, 287.
- 68) KAPLAN, N. O., LIPMANN, F. (1948) : *J. Biol. Chem.*, **174**, 37.
- 69) TOEPFER, E. W., ZOOK, E. G., RICHARDSON, L. R. (1954) : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **37**, 182.

- 70) 佐橋ら編 (1956) : ビタミン学, p. 738, 金原出版.
- 71) 佐橋ら編 (1956) : ビタミン学, p. 744, 金原出版.
- 72) 佐橋ら編 (1956) : ビタミン学, p. 756, 金原出版.
- 73) 佐橋ら編 (1956) : ビタミン学, p. 760, 金原出版.
- 74) REED, L. J., DEBUSK, B. G., GUNSALUS, I. C., HORNBERGER, C. S. (1951) : *Science*, **114**, 93.
- 75) REED, L. J. (1953) : *Physiol. Rev.*, **33**, 544.
- 76) GUNSALUS, I. C. (1954) : *Federation Proc.*, **13**, 715.
- 77) SANADI, D. R., LITTLEFIELD, J. W., BOCK, R. M. (1952) : *J. Biol. Chem.*, **197**, 851.
- 78) STOKSTAD, E. L. R., BROQUIST, H. P., PATTERSON, E. L. (1953) : *Federation Proc.*, **12**, 430.
- 79) 高田 (1960) : ビタミンB研究委員会報告書, 68.
- 80) 桂 (1960) : *Ibid.*, 69.
- 81) 能勢 (1960) : *Ibid.*, 70.
- 82) 和田・平泉・繁田 (1958) : ビタミン, **14**, 158.
- 83) 平泉 (1958) : *Ibid.*, **15**, 349.
- 84) STOKSTAD, E. L. R., HOFFMANN, C. E., BELT, M. (1950) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 571.
- 85) 高田 (1959) : ビタミンB研究委員会報告書, 59.
- 86) REED, L. J., DEBUSK, B. G., JOHNSTON, P. M., GETZENDANER, M. E. (1951) : *J. Biol. Chem.*, **192**, 851.
- 87) FISCHER, G. L. (1955) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**, 153.
- 88) ERICSON, L. E., LEWIS, L. (1953) : *Ark. Kemi*, **6**, 427.
- 89) 橋本・前田 (1953) : 日水誌, **19**, 141.
- 90) 橋本・佐藤 (1954) : *Ibid.*, **19**, 987.
- 91) ROBBINS, W. J., HERVEY, A., STEBBINS, M. E. (1951) : *Bull. Torrey. Bot. Club.*, **78**, 363.
- 92) 佐藤 (1953) : ビタミン, **6**, 212.
- 93) 上野 (1955) : *Ibid.*, **9**, 45.
- 94) KUCEVA, L. S., BUKIN, V. N. (1957) : *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **115**, 765; *Nutr. Abst. Rev.*, **28**, 470 (1958).
- 95) PROVASOLI, L., HUTNER, S. H., SCHATZ, A. (1948) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**, 279.
- 96) HUTNER, S. H., PROVASOLI, L., STOKSTAD, E. L. R., HOFFMANN, C. H., BELT, M., FRANKLIN, A. L., JUKES, T. H. (1949) : *Ibid.*, **70**, 118.
- 97) ROBBINS, W. J., HERVEY, A., STEBBINS, M. E. (1950) : *Bull. Torrey. Bot. Club.*, **77**, 423.
- 98) 上田・楨・佐藤 (1951) : ビタミン, **4**, 191.
- 99) 佐藤 (1953) : *Ibid.*, **6**, 200.
- 100) 上久保 (1956) : *Ibid.*, **11**, 328.
- 101) HUTNER, S. H., PROVASOLI, L., HAMILTON, L. D. (1952) : *Analyst*, **77**, 618.
- 102) HUTNER, S. H., PROVASOLI, L., FILFUS, J. (1953) : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **56**, 852.
- 103) FORD, J. E. (1953) : *Brit. J. Nutr.*, **7**, 299.
- 104) 宮本 (1958) : ビタミン, **14**, 415.
- 105) COATES, M. E., FORD, J. E., HARRISON, G. F., KON, S. K., PORTER, J. W. G. (1953) : *Brit. J. Nutr.*, **7**, 319.
- 106) 奥田 (1956) : ビタミン, **10**, 154.
- 107) 池田 (1956) : *Ibid.*, **10**, 280.
- 108) 上久保 (1958) : *Ibid.*, **14**, 33.
- 109) BRIGGS, G. M., DAFT, F. S. (1955) : *Ann. Rev. Biochem.*, **24**, 339.
- 110) SOUTHCOTT, B. A., TARR, H. L. A. (1953) : *Fish. Res. Board Can. Progr. Rep. Pacif. Coast st.*, **95**, 45.
- 111) BAKER, H., SOBOTKA, H., PASHER, I., HUTNER, S. H. (1956) : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **91**, 636.
- 112) COATES, M. E., FORD, J. E. (1955) : *Biochem. Soc. Symp.* (13), 36.
- 113) TEERI, A. E., BIEBER, R. E. (1958) : *Science*, **127**, 1500.