うに、フィブリルが互いに緻密にからみ合ってフィルムを成形している。フィルム中に脂質が含まれると、このフィブリル同志の緻密なからみ合いを妨げ、従ってフィルムの機械的強度が低下するものであろう。

4 総 括

鯨腱、羊腸、牛皮を脱脂精製して電気化学的方法によってフィ

ルムを成形した場合、フィルムの機械的強度として抗張力、耐圧力、引裂強度などは、乾燥状態および湿潤状態ともに著しく増大することがわかった。また、逆に脱脂精製試料に脂質を添加して同様にフィルムを成形すると明らかに機械的強度は減少することがわかった。これらの結果から、脂質はコラーゲンフィブリル同志のからみ合いを妨げるものと考えられる。

セルロース物質の酵素加水分解反応の反応特性

(昭和 45 年 7 月 13 日 受理)

荻原 允隆^{*1}・荒井 健一郎^{*1}・山本 将登^{*2}

セルロース物質の酵素加水分解反応を反応速度論的に取扱うために、まず反応速度式におけるパラメーターを求める方法を検討した。従来のほとんどの報告では還元糖の増加量からパラメーターを求めているが、著者らの市販の粉末セルラーゼを用いた実験では加水分解生成物は主としてグルコースおよびセロビオースであり、これらの割合が反応の経過とともに著しく変化することを認めたので、還元糖の測定から反応速度を追跡することは妥当でないと推定した。次に、加水分解におけるセルロース物質の重量損失からパラメーターを求める方法を検討し、24 時間加水分解後のセルロース物質の重量損失を反応速度とし、Michaelis-Menten の式を変形した Hofstee プロットを用いることによって反応速度パラメーターを精度良く求めることができた。さらにこれらのパラメーターがセルロース物質の微細構造の影響を受けることを認めたので、このようなパラメーターを用いるセルロース物質の微細構造の解析が可能であると推察した。

1 緒 言

最近、セルロース加水分解酵素セルラーゼに関する研究が多く報告されているが、その大部分は酵素の挙動に着目したもので、反応基質としては比較的取扱いやすいカルボキシメチルセルロース (CMC) や粉末セルロースなどが用いられている。この反応の反応速度についてもいくつかの報告¹⁻⁶⁾があるが、従来の研究では還元糖の増加量から反応速度を追跡した例が多い。著者らは市販の粉末セルラーゼを用いてセルロース繊維の加水分解反応を不均一系高分子反応の立場から検討してきたが、この加水分解における可溶性生成物がほとんどグルコースとセロビオースのみであり、この両者の比率は反応の経過とともに著しく変化することを認めた⁶⁾ので、還元糖の測定によって反応のパラメーターを求める方法は必ずしも妥当ではないと推定した。そこで、著者らは加水分解におけるセルロース物質の重量損失から反応速度パラメーターを求める方法を検討し、さらにこの方法を用いて二、三の改質したセルロース物質の加水分解速度パラメーターを求め、その

結果について考察した。

用いた市販の粉末セルラーゼは純度のあまり高いものではなく、また数種の活性、すなわちセルロース鎖の末端からセロビオース単位を切り取る活性、ランダムにセルロース鎖を切断する活性、セロビオースをグルコースに分解する活性などが含まれていると考えられる。したがって、酵素の反応性に重点を置いた理論的取扱いはあまり意味がないと考えられるが、著者らはこの粗セルラーゼの主反応がセルロース鎖のランダムな切断にあることを統計的に確かめており、このような混合物でも一定の組成を有する限りそのセルロース繊維の反応性に重点を置いた検討を行なうことは十分意味があると考えた。

2 実 験

2.1 試 料

試料としては溶解亜硫酸パルプを水中で離解し、水をアセトンで置換してから風乾したもの、およびこれを 40°C の所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液で 1 時間膨潤処理した後十分水洗したものを湿潤状態のままで用いた。セルラーゼは市販の粉末セルラーゼ「セルラーゼオノヅカ P 500」をそのまま用いた。

2.2 実験方法

2.2.1 セルラーゼ加水分解 セルラーゼを pH 4.1 の 1/10 規定酢酸緩衝液に溶解し、試料を加えて 40°C で所定時間保持した後、煮沸によって反応を停止させた。つぎにガラスフィルターを用いて残渣をろ別し、水洗した後、105°C で 10 時間乾燥して秤量した。

2.2.2 セルラーゼ加水分解における可溶性生成物の定量⁶⁾ 加水分解残渣のロ液に水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7.0 とし、動物性半透膜を用いて 24 時間透析した後、透析液を 30°C

*1 Yoshitaka OGIWARA, Kenichiro ARAI 群馬大学工学部 高分子化学科：群馬県桐生市天神町。

*2 Masataka YAMAMOTO 三島製紙株式会社吹田工場：大阪府吹田市御旅町。

1) 雨村明倫, 照井堯造, 醸酵工学, 43, 275, 281 (1965)。

2) 若沢 正, 丹羽富造, 一之瀬炯次, 田中辰雄, 醸酵工学, 41, 40 (1963)。

3) 松葉 豊, 醸酵工学, 41, 47 (1963)。

4) W. Gilligan, E. T. Reese, *Cand. J. Microbiol.*, 1, 90 (1954)。

5) A. D. McLaren, *Enzymologia*, 26, 237 (1963)。

6) 荒井健一郎, 荻原允隆, 角田 正, 繊維学会昭和 45 年春期研究発表会講演要旨。

で減圧濃縮した。この濃縮液を酢酸エチル-酢酸-水 (3:1:3) 系溶媒を用いてペーパークロマトグラフで展開し、各スポットの糖を標準物質の R_f と比較して同定した。これらの各スポットを水で抽出し、Somogyi 法⁷⁾により還元糖として定量した。

2・2・3 酵素反応における速度パラメーターの求め方 Michaelis-Menten の式 (1) 式を変形した Lineweaver-Burk プロット (2) 式にしたがって $1/v$ と $1/s$ をプロットするか、または Hofstee プロット (3) 式にしたがって s/v と s をプロットすることにより得られた直線を外挿してみかけの Michaelis 定数 K_m と最大速度 V を求めた。

$$v = \frac{Vs}{K_m + s} \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} \quad (2)$$

$$\frac{s}{v} = \frac{K_m}{V} + \frac{s}{V} \quad (3)$$

ここで v は反応速度、 V は最大速度、 K_m は Michaelis 定数、 s は基質濃度をあらわす。

3 結果と考察

3・1 セルラーゼ加水分解における可溶性生成物

著者らはセルロースの酵素加水分解における分解生成物の阻害効果を検討してきたが、ペーパークロマトグラフで検出できる範囲では還元性を有する可溶性分解生成物はセロビオースとグルコースのみであることを認めた。さらにこの両者の比率は表 1 に示すように経時的に変化し、またグルコースとセロビオースの阻害物質定数が約 5:2 と大きく相違していることを認めた。

Whitaker も分解生成物はグルコースとセロビオースのみであると報告している⁸⁾が、最終的には両者の比率が 1:1 になると主張している点で著者らの結果と相違している。また Garrgg らは少糖類の最少分解単位はセロトリオースであり、セロビオースはそれ以上分解されないと報告している⁹⁾。これらの相違は主として用いるセルラーゼの起源および精製程度、特にセロビアーゼの含有量の相違などに起因しているものと考えられる。

従来までのセルラーゼ加水分解反応の反応速度の検討には還元力の増加を利用するものが多かったが、このような結果から本実験の場合には還元力の増加を指標として反応速度を追究することは適当ではないと推定した。そこで、著者らは一定時間のセルラーゼ加水分解における試料の重量損失を反応速度の指標として反

表 1 溶解用亜硫酸パルプのセルラーゼ加水分解における可溶性加水分解生成物の組成

	処理時間 (hr)				
	6	12	24	48	96
グルコース (対パルプ%)	1.65	2.7	7.4	11.6	21.2
セロビオース (対パルプ%)	10.15	13.5	18.1	26.0	34.6
全重量損失 (対パルプ%)	11.8	16.2	25.5	37.6	55.8

加水分解条件：パルプ 2.0 g, セルラーゼ 1.0 g, 緩衝液 (pH=4.1) 100 ml, 温度 40°C 振盪, 15 mm 幅・72 往復/min
測定：ペーパークロマトグラフで分離・水で抽出→Somogyi 法により還元糖として定量

- 7) 日本化学会編, “実験化学講座 (第 23 巻) 生物化学 I”, 丸善 (1959), p. 413.
- 8) D. R. Whitaker, *Can. J. Biochem. and Physiol.*, 34, 102 (1956).
- 9) P. J. Garregg, M. Han, *Svensk Papperstidn.* 72, 695 (1969).

応速度パラメーターを求める方法を検討した。

3・2 反応速度の測定

一般の酵素反応では反応曲線の初期の直線部分から初速度を求め、これを用いて各種パラメーターを求める。この初速度は酵素濃度に比例する。しかし、一定時間の反応における重量損失を反応速度とみなす方法では、短時間の反応における重量損失を基準にとると測定精度が非常に低く、反応初速度を精度良く求めることはできない。たとえば、図 1 に示すように 5 時間の反応における重量損失を反応速度としても、反応速度とセルラーゼ濃度の間に直線関係は認められない。また、図 2 は処理時間を一定として試料濃度の影響を検討したものであるが、試料濃度の高いほど、またセルラーゼ濃度の低いほど初速度に近い反応速度の得られることが認められる。

これらの結果から、反応速度の測定には重量損失の測定精度の比較的良好な範囲でできるだけ短い反応時間、低いセルラーゼ濃度および高い試料濃度を用いることが望ましいことが明らかとなった。

3・3 反応速度パラメーター

図 3 にいくつかの処理時間における試料の重量損失と試料濃度との関係を示した。これを速度パラメーターを求めるために比較的多く用いられている Lineweaver-Burk プロットにとってみると直線の精度が比較的低く、反応速度パラメーターを正確に求め

図 1 各種処理時間のセルラーゼ処理におけるパルプの重量損失とセルラーゼ濃度の関係

パルプ濃度 1.0 g/50 ml
処理時間 ○: 5 時間, △: 10 時間, ●: 24 時間

図 2 セルラーゼ処理における各種濃度のパルプの重量損失とセルラーゼ濃度の関係

処理時間 24 時間
パルプ濃度 ○: 0.25 g/50 ml, △: 0.5 g/50 ml, ●: 1.0 g/50 ml

図 3 各種処理時間のセルラーゼ処理における重量損失とパルプ濃度の関係

セルラーゼ濃度 1.0%

処理時間 a: 48 時間, b: 24 時間, c: 15 時間, d: 10 時間, e: 5 時間

図 4 図 3 に示したデータの Hofstee プロット

ことはできなかった。これはこのプロットでは横軸に試料濃度の逆数をとるために低濃度部分の値に比重がかかり、重量損失の測定誤差が大きく影響した結果と考えられる。

図 3 のデータを Hofstee プロットにとると図 4 が得られる。この図では処理時間が 10 時間以下では直線の精度が比較的低いことが認められ、このバラツキは外挿法でパラメーターを求めるのに大きな障害となる。しかし、処理時間を 24 時間とすればかなり精度良く直線を求め得ることが認められる。このように非常に精度の良い直線が得られることはこの範囲では加水分解生成物による阻害効果が無視できることを示している。

つぎに、セルラーゼ濃度を変えた時の Hofstee プロットにおける直線の動きを検討した。理論的には最大速度 V はセルラーゼ濃度に比例して増大し、Michaelis 定数 K_m は一定にとどまるはずである。図 5 にセルラーゼ濃度を 0.1, 0.5 および 1.0 g/100 ml としたときの 24 時間処理における重量損失 v とパルプ濃度 s との関係を示した。これを Lineweaver-Burk プロットにとってみると各直線の精度が低いために各直線が横軸上の一点で交差せず、反応速度パラメーターを正確に求めることができなかった。図 5 のデータを Hofstee プロットすると図 6 が得られ、この場合には 3 本の直線は完全に横軸上の一点で交差し、正確な K_m を求めることができた。セルラーゼ濃度 0.1% の場合の直線でバラツキが大きいことは重量損失が少ないために実験誤差の影響が大きくなった結果と考えられる。また、酵素濃度 0.5% では $s=1.0\%$ 以下、酵素濃度 1.0% では $s=2.0\%$ 以下の範囲で直線からの偏倚が認められる。また、表 2 に示すように Michaelis-Menten の式における " K_m は V の 1/2 に相当する速度を与える基質濃度に等しい" という定義にしたがって求めた K_m と図 6 から求めた

図 5 各種セルラーゼ濃度のセルラーゼ処理における反応速度とパルプ濃度との関係

セルラーゼ濃度 ○: 0.1%, △: 0.5%, ●: 1.0%

図 6 図 5 に示したデータの Hofstee プロット

セルラーゼ濃度 ○: 0.1%, △: 0.5%, ●: 1.0%

K_m がセルラーゼ濃度の高いほど相違する傾向が認められる。これらの結果はこれらの範囲では Michaelis-Menten の式の誘導の基礎となっている“基質濃度が酵素濃度に比べて十分大きい”という条件が満たされていないことに起因すると推定できる。また、反応速度はセルロース繊維の微細構造の影響をうけて経時的に低下すると推定できるので s の小さい範囲では全試料重量に対する損失重量の割合が過大となって、24 時間処理における重量損失と定義した平均反応速度が低下することが考えられ、これも上述の現象の一因となっているものと思われる。

このように、セルラーゼ濃度の低いときに両方法により求めた K_m の値が一致することからも図 6 より求めた K_m の値の正確なことが証明されていると考えられる。

ただし、セルラーゼ自体が数種の活性を含んでいると考えられることおよび初速度の代りに初期平均速度を用いたことなどからここで得られた K_m および V の持つ意味はかなり制約されていることに留意しなければならない。しかし、これらの値が非常に高い精度で得られ、また再現性も非常に良いことは重要な意味があると考えられる。

以上の結果から、セルラーゼ処理 24 時間の重量損失を反応速

表 2 V から求めた K_m と図 6 から求めた K_m の比較

セルラーゼ濃度 (%)	1.0	0.5	0.1
V から求めた K_m^*	0.53	0.28	0.20
図 6 から求めた K_m	0.20	0.20	0.20

* Michaelis-Menten の式において K_m は V の 1/2 に相当する速度を与える基質濃度と定義される。

度としてセルロース濃度 1.0% から 10% までの範囲のデータを Hofstee プロットすることによって見掛けの K_m および V を精度よく求められることが明らかとなった。

重量損失と反応速度とは直接的には関係がないように見えるが、実際には反応速度として単位時間当りの重量損失を用いてもほとんど矛盾がなく、現象的には十分意味を持っていると考えられる。このような事実の理論的説明は現在検討中であるが、このような手法は酸加水分解の場合にはしばしば用いられている。

3・4 水酸化ナトリウム膨潤試料の反応速度パラメーター

以上の方法によって求めた K_m および V とセルロース物質の微細構造との関連性を調べるために、8% および 12% の水酸化ナトリウム水溶液で膨潤させた試料について遠心分離法による WRV¹⁰⁾ および上記の方法により求めた K_m と V を測定した。結果を表 3 に示す。

膨潤量の指標である WRV が増加するにしたがって K_m および V の増加する傾向が認められる。前報^{10,11)}において、著者らは

10) Y. Ogiwara, K. Arai, *Textile Res. J.*, 38, 885 (1968).

11) Y. Ogiwara, K. Arai, *Textile Res. J.*, 39, 422 (1969).

表 3 水酸化ナトリウム水溶液処理パルプの K_m および V

	K_m	$V \times 10^2$	WRV
未処理パルプ	0.39	1.58	67
8% 水酸化ナトリウム処理パルプ	0.65	1.85	82
12% 水酸化ナトリウム処理パルプ	1.00	2.66	92

この WRV と反応速度とは比例関係にあり、水酸化ナトリウム膨潤試料では WRV および反応速度はともに主として非晶部分の膨潤量と密接な関係にあることを認めた。表 3 における V の増加はセルロース物質の有効反応部分の量的な増加を反映しているものと考えられるが、 K_m は本来基質-酵素複合体の生成反応、逆反応および分解反応の速度定数 (k_{+1} , k_{-1} および k_2) の比 ($k_{-1} + k_2$)/ k_{+1} であり、本報のデータのみでは K_m の増加を説明することはできない。しかし、このようにセルラーゼ加水分解反応における反応速度パラメーター K_m および V がセルロース物質の微細構造と密接な関係を示していることが明らかになったので、今後これらの関係をさらに詳細に定量的に追求することによって多くの新しい知見が得られるものと推察される。

ポリアミドの光伝導性^{*1,*2}

(昭和 45 年 7 月 14 日 受理)

広橋 亮・飛鋪 靖・土肥 正明^{*3}

テレフタロイルクロリド、イソフタロイルクロリドおよびアジピルクロリドと *p*-フェニレンジアミン、ベンジジン、1,5-ナフチレンジアミン、4,4'-ジアミノジフェニルメタン、4,4'-ジアミノジフェニルスルホン、3,3'-ジクロル 4,4'-ジアミノジフェニルメタン、ヘキサメチレンジアミン、3,9-ビス(3-アミノプロピル)-2,4,8,10-テトロキサスピロ [5,5] ウンデカンとの重縮合反応により得られたポリアミドの電気伝導性および紫外領域の光伝導性が測定された。体積電気伝導の温度依存性の直線関係から有機半導体の電気伝導の活性化エネルギー (E_A) が求められた。約 200 kg/cm² で円板上に加圧、成型された試料 (表面積 1.307 cm², 厚み 0.05~0.1 cm) が用いられた。テレフタロイル系 ($\rho=10^{12}\sim 10^{15}$ ohm·cm, $E_A=0.20\sim 1.11$ eV), イソフタロイル系 ($\rho=10^6\sim 10^{14}$ ohm·cm, $E_A=0.35\sim 1.54$ eV), アジピル系 ($\rho=10^8\sim 10^{15}$ ohm·cm, $E_A=0.08\sim 0.87$ eV)。

表面伝導型セルを用いた時の光電流は測定雰囲気が大気中の湿分の影響を受け (API: $I_d=1.06 \times 10^{-11}$ Amp), 真空中 (10^{-6} Torr) と比べて著しく小さい ($I_p=4.36 \times 10^{-10}$ Amp)。

暗電流に対する光電流の比が約 1000 以上あるものの構造依存性は次の傾向が得られた (括弧のなかの数字は比を示す)。

1 緒 言

アミド結合を主鎖に持つポリペプチドの電気伝導性は Eley 等¹⁾ が中心になって詳細に検討された。これらの伝導機構はアミノ基からのプロトンによるイオン伝導機構で説明されている。一方ア

ミノ基の水素結合が網状構造を形成することによる電子伝導も Andres²⁾ が提案している。このように伝導機構的にはイオン伝導あるいは電子伝導のいずれの説とも現在論議されている³⁾。

有機化合物の電気物性の初期の段階から蛋白質の生物化学的興味および電荷の生体内での移動との関連からポリペプチドの電気伝導性が取り上げられている⁴⁾。ペプチド分子中のアミド結合は

*1 この報文を「電導性高分子物質に関する研究 (第 12 報)」とする。

*2 前報 (第 11 報), 工化, 73, 1881 (1970)。

*3 Ryo HIROHASHI, Yasushi HISHIKI, Masaaki DOIHI 千葉大学工学部写真工学科: 千葉市弥生町。

1) D. D. Eley, D. I. Spivey, *Trans. Faraday Soc.*, 56, 1432 (1960)。

2) R. J. Andres, *J. Polym. Sci.*, C (17), 213 (1967)。

3) B. Rosenberg, *J. Chem. Phys.*, 36, 816 (1967)。