酸化細菌に関する研究 (第 4 報) 螢光菌及び霊菌による α -Ketoglutaric 及び Pyruvic Acid の生成に就て

朝井 勇 宣, 相 田 浩 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 27 年 5 月 19 日 受 理

Studies on the Oxidative Bacteria. Part 4. On the Production of α -Ketoglutaric and Pyruvic Acids by *Pseudomonas* and *Serratia*.

By Toshinobu ASAI and Kô AIDA (Dept. Agr. Chem., Fac. Agr., Univ. Tokyo)

緒 言

従来酸化細菌と言われていたものは主として醋酸菌及びグルコン酸菌であるが、最近これらの他に *Pseudomonas*, *Phytomonas* 等の細菌が糖類或いはアルコール類を酸化する能力を有することがソ連の PERVOZVANSKY, 米の LOCKWOOD 等によつて発見され、又我国に於ても池田、横沢、増尾、近藤等の諸氏によつて *Pseudomonas* 属菌が純粋分離され、その菌学的性質、各種糖類、アルコール類に対する酸化能に就て研究されているが、その生産物の中には gluconic acid, 2-ketogluconic acid, lactobionic acid 等の有用な物質が含まれ、学問的にも又応用的にも注目を惹いている。池田はこれ等の酸化細菌に就て研究を行うと共に新しい酸化細菌の選択を行い、これ等の菌の他に *Serratia marcescens* が glucose 及び gluconate を酸化して 2-ketogluconic acid を生成する事実を見出し⁽¹⁾、又 *Pseudomonas*, *Phytomonas*, *Serratia* 等の性質が従来の酸化細菌である醋酸菌、グルコン酸菌と異なる点を指摘し後者を Homo-oxydative bacteria, 前者を Pseudo-oxydative bacteria と称して区別することを提唱した⁽²⁾。

著者の一人朝井は古く多数のグルコン酸菌を純粋分離し、その形態学的並びに生理学的性質に就て詳細な研究を行い酸化細菌の一新分類法を提示し、更に最近に至りこれら広い意味の酸化細菌に就て研究を進め、種々の酸化生産物の分離確認並びに酵素学的研究を行いつつあるが、今回 glucose 及び gluconate より 2-ketogluconic acid を生成する *Ps.* 33 F 及び *Serratia marcescens* No. 18 が 2-ketogluconic acid 生成後も更に培養を継続する時は α -ketoglutaric acid を著量に蓄積することを認め、その分離確認を行つたのでここに報告する。猶 α -ketoglutaric acid が細菌による炭水化物代謝の主要生産物の一つとして報告されたのは、1946 年 LOCKWOOD and STODOLA⁽³⁾ が *Pseudomonas fluorescens* NRRL No. B-6 に就て報告したのが始めてであり、*Serratia marcescens* による α -ketoglutaric acid の生成はこれに次ぐものである。

実 験 の 部

供試菌株として当教室横沢⁽⁴⁾が道路上の汚水から分離した *Ps.* 33 F 及び東大坂口研究室保存の *Serratia marcescens* No. 18 を用いた。培養条件は 500 cc 容坂口式振盪フラスコに培養液 50 cc を分注し、振幅 7 cm, 振盪数毎分 116 回の振盪機で 30° で振盪を行つた。培地組成は無機窒素源として硫酸を含む次の如きものを使用した。

Glucose	100 g.	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g.	KH ₂ PO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.1 g.	蒸 溜 水	1000 cc.	CaCO ₃	2.5%
CaCO ₃ は別に乾熱滅菌し接種時添加する。					

CaCO₃ 添加の下に glucose を基質として振盪培養を行えば *Ps.* 33 F 及び *Serratia marcescens* No. 18 共に CaCO₃ を溶解し、又還元力曲線より比較して 2-ketogluconic acid の生成が認められ、更に培養を継続すれば還元力は減少していく。LOCKWOOD 等の報告によれば 2-ketogluconic acid を生成した後更に還元力を示さなくなる迄培養を行つているが、著者等の実験によれば培養後 20 日に及んでも猶培養液は還元力を示した。又後に示す如く培養が余り長期に汎れば一旦生成した α -ketoglutaric acid も再び分解される故、余り培養が長期に汎るのは避けねばならない。前記条件にて培養 5 日目に取り出し、先ず CaCO₃ 及び菌体の一部をメッシュで濾過し、この濾液について生産物の分離及び確認を行つた。生産物の分離方法は次表の如くである。

1. 培養液 10 cc を採り塩化第二鉄及び醋酸で酸化し蒸溜液に就き Ni-dimethylglyoxim 法を試みるに

diacetyl の反応を示さず *Fs.* 33 F, *Serratia marcescens* No. 18 共に acetoin の生成は認められなかつた。

2. 2-Ketogluconic acid の分離確認： 残濾液を煮沸し計算量よりやや少量の蓚酸溶液を加え湯煎上で長時間加熱し、蓚酸を安全に反応せしめた後、遠心分離して蓚酸石灰を除き上澄液をアンバーライト IR-120 のイオン交換樹脂を通して残存 Ca を除去した。これを液体エーテル抽出器にて 50 時間以上エーテル抽出を行い可溶部と不溶部に分けた。エーテル不溶部に活性炭を加えて濾過すれば完全に透明液となる。之を少しく加温し炭酸加里溶液で充分攪拌しながら中和し減圧濃縮した後アルコールを加えて氷室に放置すれば柱状結晶を得る。これを水に溶し活性炭で脱色した後、再びアルコールを加え僅に濁る程度に止め、少しく加温して沈澱を溶解し液を透明ならしめ、氷室に放置すれば美麗な結晶が得られる。これは K 塩で FEHLING 溶液及びアンモニヤ性硝酸銀を還元する。mp. 152° で文献⁽⁵⁾による 2-ketogluconic acid の融点に一致する。メチルエステルも

mp. 172° で文献⁽⁶⁾に一致した。K-塩の結晶 0.2 g. を 1 cc の水に溶解し 0.1 cc 濃塩酸と 0.12 g α -フェニレンジアミンを加え、攪拌して数時間放置すると結晶が析出する。吸引濾過し水で洗滌した後熱水から再結するとキノキサリン誘導体の結晶が得られる。mp. 200° で文献⁽⁷⁾に一致した。

又エーテル抽出残液の一部についてグルコン酸を検したが negative であつた。

3. α -Ketoglutaric acid の分離確認： 次にエーテル可溶部を CaCO_3 及び Ca(OH)_2 にて中和し、熱水にて処理し液量を漸次増加して全部溶解する。活性炭を加えて濾過し濃縮して氷室中に数日放置すれば針状結晶の石灰塩が析出する。結晶を吸引濾過し熱水より数回再結を行い α -ketoglutaric acid の石灰塩を得た。これを再び硫酸にて分解しエーテル抽出を行い遊離の α -ketoglutaric acid を得た。これを活性炭にて脱色しシラップ状に濃縮して氷室に放置し結晶を得た。水から数回再結を行つた。Acetone に溶かし benzene を加えて再結を行う方法も良好であつた。mp. 109~110°。(文献 LOCKWOOD and STODOLA 115~116°, MEYER and JACOBSON 115~116°, BEILSTEIN 112~113°, CLUTTERBUCK 112°)

確認方法として 2,4-dinitrophenylhydrazine に導いた。即ち石灰塩の結晶に 2 N HCl に溶解した 0.7% 2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液を加え、暫時室温に放置して生じた沈澱を濾過し、1 N NaHCO_3 溶液に溶解する。HCl 酸性にすると再び結晶性沈澱を得る。dil. HCl 及び冷水にて洗滌し、メタノールに溶解し水を加えれば結晶が得られる。更に醋酸エチルから再結を行つた。mp. 222°。〔文献 LOCKWOOD and STODOLA 226° (醱酵液から得たもの), 227~228° (合成品), KREBS 222°, MARTIUS 220°〕次に同定の為に Organic Synthesis⁽⁸⁾ 及び UMBREIT⁽⁹⁾ の記載を組合せて α -ketoglutaric acid の合成を行つた。これより前記方法により 2,4-dinitrophenylhydrazine を製し、混融試験を行つたが融点の降下を認めなかつた。又前記溶媒を使用し同様の方法で paper chromatography を行い $R_F=0.60$ の値を得、遊離 α -ketoglutaric acid に一致した。

尙 *Serratia. marcescens* による α -ketoglutaric acid の生成は新知見に属するので元素分析を行つた。即ち Ca 塩の針状結晶を水から 3 回再結を行い、anilin を使用して ABDERHALDEN の乾燥器にて 4 時間乾燥を行い恒量に達せしめた後元素分析を行つた。

Found : C, 31.76% H, 2.84% ; $C_5H_4O_5Ca$ requires C, 32.59%, H, 2.19% :

Calcd. Ca, 21.75% ; Found Ca, 21.14%.

尙醱酵液より α -ketoglutaric acid を得るには醱酵液を濾紙にて残存 $CaCO_3$ 及び菌体の一部を濾過した後、ザイツの細菌濾過器にて澄明に濾過し、そのまま或は減圧濃縮した後氷室中に放置すれば 3~4 日後に α -ketoglutaric acid の Ca 塩が針状結晶として析出する。

4. Pyruvic acid の分離確認 : 上記エーテル可溶部より Ca- α -ketoglutarate の結晶を分離した母液中には残存 Ca- α -ketoglutarate と Ca-pyruvate が存在する。これを H_2SO_4 酸性としエーテル抽出を行い、エーテルを除去した後 10~20 mm の減圧でしばしば蒸溜水を添加しつつ減圧蒸溜を行えば pyruvic acid は出溜して来る。Ps. 33 F の場合には溜出液は FEHLING 溶液及びアンモニヤ性硝酸銀を還元し又シモンの反応陽性であつたが *Serratia* の場合には不明瞭であつた。2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液を加えると Ps. 33 F は赤橙色沈澱を生ずる。*Serratia* は赤色が強く、このものは 1 N $NaHCO_3$ 溶液に殆んど不溶であつた。Ps. 33 F の沈澱を 1 N $NaHCO_3$ 溶液に溶し、HCl 酸性とし、再び沈澱せしめ dil. HCl 及び冷水にて洗い、メタノール、水及び醋酸エチルより再結を行つた。mp. 218°. (文献 KREBS 216°, ALLEN 213°).

同定の為に pyruvic acid の合成を行つた。即ち酒石酸に $K_2S_2O_7$ を加え 210~220° で乾溜を行い、20 mm で減圧蒸溜し溜出液を精溜して pyruvic acid を得た。このものから前記方法により 2,4-dinitrophenylhydrazone を製し混融せるに融点の降下を示さなかつた。又 *p*-nitrophenylphenylhydrazine の 20% 醋酸溶液を添加し十分攪拌すると *p*-nitrophenylhydrazone が析出する。これをメタノールに溶し水を加えて再結を行い融点を測定すると mp. 219° で文献⁽¹⁰⁾に一致した。

5. 醱酵液のケト酸の Paper chromatography CAVALLINI 等⁽¹¹⁾ の方法を参照し醱酵液より直接ケト酸の paper chromatography を行つた。即ち醱酵液の残存 $CaCO_3$ 及び菌体の一部を濾紙にて濾過した後、2 N HCl に溶解した 0.7% 2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液を加え暫時放置すると赤橙色沈澱を生ずる。Ps. 33 F の場合には赤味が少いが、*Serratia* の場合には赤色が強かつた。長時間放置すれば glucose 及び 2-ketogluconate の場合にも赤色沈澱を生ずる。2,4-Dinitrophenylhydrazine を dil. HCl 及び冷水にて洗滌した後これをそのまま、或いは若干精製して試料に供した。即ちこの沈澱を 1 N $NaHCO_3$ 溶液に溶解するに Ps. 33 F の場合には殆んど全部溶解したが、*Serratia* の場合には赤色の不溶性沈澱が残つた。このものはエタノールに可溶であつた。1 N $NaHCO_3$ 溶液に可溶部を濾過し HCl 酸性にすれば再び沈澱を生ずる故これを dil. HCl 及び冷水にて洗滌した後 pH 7.2 の phosphate buffer に溶解し試料とした。3% アンモニヤ水飽和ブタノールを溶媒とし、東洋濾紙 No. 2* を使用し、上昇法によつて paper chromatography を行つた。Ps. 33 F の場合には 2 つ、*Serratia* の場合には一つの黄色点が得られ、これは α -ketoglutaric 及び pyruvic acid の合成品より製した 2,4-dinitrophenylhydrazine の spot によく一致し、 R_F はそれぞれ 0.03 及び 0.28 であつた。水飽和ブタノールを溶媒とした場合にも好結果が得られた。

6. Ps. 33 F 及び *Serratia marcescens* No. 18 の醱酵経過 : Ps. 33 F 及び *Serratia marcescens* No. 18 は振盪培養に於て共に glucose より 2-ketogluconate を生成し、更に培養を継続すれば α -ketoglutaric acid の生成が認められる。然し α -ketoglutaric acid もこれ等の菌による最終代謝生産物ではなく、恐らく酸化的脱カルボキシルにより琥珀酸を経て分解が進むものと考えられる。それで醱酵中に於ける glucose より α -ketoglutaric 及び pyruvic acid の消長を追跡してみた。各菌について各前記条件によつて 10 本宛培養し、毎日 1 本づつ採つて分析に供した。 α -ketoglutaric 及び pyruvic acid は FRIEDEMANN-HAUGEN 法⁽¹²⁾ を改良した清水⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾ の方法により PULFRICH の step photometer で比色定量を行つた。但し 4 N NaOH を加えて発現する赤色は不安定でその前の 10% Na_2CO_3 溶液の黄色を比色定量した方が結果が良好であつた。結果は Fig. 1 に示す如くである。pH は大体 6~7 の間にあるが僅かにこれより上下する事もある。

何れの菌に於ても培養後 24 時間で α -ketoglutaric acid の生成が認められ、後急速に増加し 168~192 時間

Table 1. Production of α -Ketoglutaric and Pyruvic Acids from 7.64% Glucose Solution by Species of *Pseudomonas*. (after 144 hrs' incubation by shaking culture)

Strain	pH	α -Ketoglutaric acid		Pyruvic acid	
		mg/100cc	yield %	mg/100cc	yield %
<i>Pseudomonas</i> 33 F	5.8	1131	14.80	521	6.82
"	35	5.9	1030	587	7.68
"	41	6.2	692	949	12.42
"	43	6.4	1067	285	3.73
<i>Ps. fluorescens</i> NRRL No. B-6	6.1	1421	18.60	104	1.36

Seed : bouillon agar culture

で最高に達する。生成量は *Serratia marcescens* No.18 が *Ps.* 33 F より優り、前者は 168 時間目に 1823mg/100 cc. 後者は 1384 mg/100 cc であつた。その後 216 時間、240 時間と培養を継続すれば α -ketoglutaric acid は分解し始める。*Ps.* 33 F に於ては pyruvic acid が生成されるが、その生成量は α -ketoglutaric acid より少い、144 時間で最大値 520 mg/100 cc に達し其の後減少するが、これは α -ketoglutaric acid の山に先行している。 α -ketoglutaric acid が pyruvic acid と C_2 或は C_3 化合物との縮合を経て生成されるという事は一つの假説として考えられるが、此の両者の関係に就ては今後の研究に俟ちたい。*Serratia marcescens* についても pyruvic acid の定量法によつて pyruvic acid としての値が得られたが、未だ確認に至つていないので総て本報告に於ては削除した。

7. 各菌株による生成量の比較： 先にも述べた如く細菌により glucose より α -ketoglutaric acid が著量に生成されるという報告は LOCKWOOD and STODOLA の *Ps. fluorescens* NRRL No.B-6 のみであるが、著者等の実験によれば *Ps.* 33 F よりも *Serratia marcescens* No. 18 の方が生成量がより大であつた。それで果して *Serratia* の方が一般的に *Pseudomonas* 属菌よりも生成量が大であるのか、又醗酵による α -ketoglutaric acid 生産の目的もあり各菌株の生成量の比較を行つた。*Pseudomonas* として当教室横沢分離の 2-ketogluconate 生産株 4 株及び American Type Culture Collection より送られた LOCKWOOD 等の報告せる *Ps. fluorescens* NRRL No.B-6, *Serratia marcescens* として東大坂口研究室保管の 13 株に就て試験した。培地及び培養方法は前実験と同様である。144 時間培養後分析に供した。本実験に於ても *Serratia* の場合、pyruvic acid の定量値を得たが確認していないので総て削除した。*Pseudomonas* による α -ketoglutaric acid 及び pyruvic の生成量は Table 1 の如くである。横沢の分離した菌株の中では *Ps.* 33 F が最も生成量が大であり 1131 mg/100 cc であつた。然し LOCKWOOD 等の *Ps. fluorescens* NRRL No. B-6 は 1421 mg/100 cc で *Ps.* 33 F よりも生成量が大であつた。*Serratia* による生成量は Table 2 の如くである。やはり *Serratia marcescens* No. 18 が最も生成量が大であつた。然し bouillon agar に前培養した菌を接種した場合には LOCKWOOD 等の菌より生成量が劣つてゐる。それで窒素代謝を抑制し菌の酸化能を増大させる目的を以て $CaCO_3$ 添加 Koji agar に前培養した所が此の場合には α -ketoglutaric acid の生成量が増大し 1899 mg/100 cc の値を得、LOCKWOOD 等の菌よりも大なる生成量を示した。但し *Ps. fluorescens* No.B-6 に於ても前培養について同様の効果があるかどうかについては未だ試験していない。

考 察 及 び 要 約

(1) LOCKWOOD and STODOLA (1946) は *Ps. fluorescens* が glucose より α -ketoglutaric acid を生成する事を報告したが、著者等も *Ps.* 33 F について此の事実を確認した。7.64% glucose 溶液に於て振盪培養により 168 時間目に 1384 mg/100 cc の α -ketoglutaric acid が生成された。

Fig. 1. Production of α -ketoglutaric acid and Pyruvic acid by *Ps.* 33 F and *S. marcescens* from 7.64% glucose Solution.

— : *Serratia marcescens* No. 18
 ---- : *Pseudomonas* 33 F
 1 : α -ketoglutaric acid
 2 : α -ketoglutaric acid
 3 : Pyruvic acid

Table 2. Production of α -Ketoglutaric acid from 7.64% Glucose Solution by *Serratia marcescens*. (after 144 hrs' incubation by shaking culture)

Strain	pH	α -ketoglutaric acid	
		mg/100cc	yield %
<i>Serratia marcescens</i>	I — 2	1139	14.91
	I — 3	1207	15.80
	I — 7	1249	16.35
	I — 9	1135	14.86
	I — 10	1173	15.35
	II — 1	1136	14.87
	II — 2	844	11.05
	II — 3	979	12.81
	II — 5	928	12.15
	II — 6	878	11.49
	II — 7	1004	13.14
	II — 10	1189	15.56
	No. 18	1291	16.90
	No. 18*	1899	24.86

Seed : bouillon agar culture

* Koji agar culture

等の呼吸型式であり、又 α -ketoglutaric acid はトリカルボン酸廻路に含まれる物質である事を考えれば、*Pseudomonas* 属菌或は *Serratia* 菌の糖の分解型式の研究は極めて興味ある問題である。WALKER⁽¹⁹⁾ 等は 2-ketogluconic acid から α -ketoglutaric acid の生成過程として次の如き経路も考えられるとしているが、

これら中間体は現在の所総て想像に過ぎず、むしろ KOESELL⁽²⁰⁾ の考えている如く 2-ketogluconic acid が pyruvic acid に分解し、更に C_2 或は C_3 化合物との縮合を経て α -ketoglutaric acid に至るものであろう。

(5) α -Ketoglutaric acid はグルタミン酸の母体であると共に生物学的酸化に依り容易にコハク酸となし得るからこの点からも興味ある物質である。

終りに臨み実験に協力された杉崎善治郎君並びに元素分析をお願いした農化元素分析室の方に感謝の意を表する次第である。又本研究費の一部は文部省科学研究費によることを附記する。

(昭和 26 年 6 月 30 日 農芸化学会東京支部第 119 回講演会にて発表済)

- (1) 池田 : 農化, 24, 56 (1950).
- (2) 池田 : 農化, 24, 151 (1951).
- (3) L.B. LOCKWOOD and F. H. STODOLA : *J. Biol. Chem.*, 164, 81 (1946).
- (4) 横沢 : 農化, 25, 556 (1952).
- (5) BERNHAUER and GÖRLICH : *Biochem. Z.*, 280, 367 (1935).
- (6) OHLE *Ber.*, 70, 2153 (1937).
- (7) OHLE *Ber.*, 67, 155 (1934).
- (8) FRIEDMAN, L. and KOSOWER E. : *Organic Synthesis*, 26, 42.
- (9) UMBREIT, W. W. BURRIS, R. H., and STAUFFER J. F., : *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, p. 209 (1949).
- (10) FERNBACH and SCHOEN : *C. r.*, 158, 1720 (1914).
- (11) CAVALLINI, FRONTALI, and TOSCHI : *Nature*, 163, 568 (1949).
- (12) FRIEDEMANN, T. E. and HAUGEN, G. E. : *J. Biol. Chem.*, 147, 415 (1943).
- (13) 清水 生化学, 22, (3), 108 (1950).
- (14) SHIMIZU, T. : *J. Biochemistry (of Japanese)*, 37, (4) 421 (1951).
- (15) WARBURG O. and CHRISTIAN, W. : *Biochem. Z.*, 238, 131 (1931); 242, 207 (1931); 254, 438 (1932); 292, 287 (1937).
- (16) DICKENS, F. : *Nature*, 138, 1057 (1936); 166, 33 (1950); *Biochem. J.*, 32, 1626 (1939); 32, 1645 (1939).

- (17) COHEN, S. S. *Nature*, 168, 746 (1951); *Science*, 111, 543 (1950).
 (18) HORECKEN, B. L. SMYRNIOTIS, P. Z. and SEEGMILLER, J. E. : *J. Biol. Chem.*, 193, 371 (1951).
 (19) WALKER, T. K.: *Advances in Enzymology*, Vol. 9, 575 (1949).
 (20) KOEPESELL, H. J.: *J. Biol. Chem.*, 186, (2) 743 (1950).

Summary

The production of α -ketoglutaric acid by *Pseudomonas fluorescens* has been described by LOCKWOOD and STODOLA (1946). By shaking culture we also confirmed that *Pseudomonas* 33 F also produced this acid and further newly found that *Serratia marcescens* No. 18 also produced this acid via 2-ketogluconic acid. From 7.64% glucose solution containing 0.1% ammonium sulphate and other mineral salts, *Pseudomonas* 33 F and *Serratia marcescens* No. 18 produced 1384 mg and 1899 mg of α -ketoglutaric acid per 100 cc of culture fluid, respectively.

The identification of α -ketoglutaric acid was conducted as its Ca-salt, 2,4-dinitrophenylhydrazine and by the paper chromatographic method. The crystal of free acid was also acquired.

高周波を利用した Urease 作用の測定*

河 野 哲 郎 (東京大学農芸化学教室)

昭和 27 年 5 月 16 日 受理

A Method to Measure the Reactions of Urease with a High Frequency Titration Apparatus.

By Tetsuro KONO (Dept. Agr. Chem., Faculty of Agr., Univ. of Tokyo)

I. 緒 言

高周波測定法⁽¹⁾により, urease の作用を測定した結果を報告する. Urease の作用に関しては, (1) 式に従つて尿素を分解すること⁽²⁾⁽³⁾, 重金属イオンにより阻害されこと⁽⁵⁾, 粗製酵素の場合は HCN 或いは glycine

により活性化されること⁽⁶⁾等が知られている. なお, 中間物としては $\text{NH}_4\cdot\text{CNO}$ (IV) が出来るという説⁽⁴⁾もある.

この反応は (1) 式からわかるように, 非電解質が電解質に変化する反応であるから, 高周波滴定装置で追跡することができる. 即ち, 蒸留水中に urease と尿素とを加えて測定すると, メーターが次第に動く. 酵素液を予め煮沸しておけばメーターは動かない. 又反応中に Ag^+ を加えるとメーターが止まる. 測定を定量的に行うためには電源電圧を一定に保ち, 反応液に CO_2 を通して pH を一定にすればよい. 又別法として, 分解液を 0.01 N HCl で高周波滴定することもできる.

II. 反 応 曲 線

(A) 酵素液: 刀豆 (*Canavalis ensiformis*) の粉末より 5 倍の 10% アセトンで抽出した.

(B) 蒸留水中での反応曲線: 高周波滴定装置の反応容器に酵素液を入れ, 水を加えて 45 cc とする. 電動攪拌しつつ, メーターを零に合わせ, 1 M 尿素液 1 cc を加える. 温度は室温 (約 28°), 果は Fig. 1~3 の通りである.

この場合, 液の pH は 6.3 (0 mV) から 7.6 (28 mV) と著しく変化し, 曲線は Fig. 1 に見る如く直線とらない. Glycine が存在すると (Fig. 2), 対照に比してメーターが大きく動くが, pH の問題と, 生成物と glycine との反応を考えねばならない. 後述のように CO_2 で pH を一定に押えた場合も同様な結果を得, 又分解液に後から glycine を加えた場合にメーターは僅かしか上昇しない.

阻害実験 (Fig. 3) では, AgNO_3 (0.01 N 2 滴) により直ちに反応が停止すること, diazobenzene sulphonic

* 高周波による化学反応の追跡 第 3 報 Studies on Chemical Reaction by a High Frequency Oscillator. Part 3