(2) 0.1 *N* NaOH 溶液中での streptomycin の還元波は丸味を帯びた極大波を示し、波高と濃度とは直線関係を示さない。

(3) 1 *N* NaOH 溶液中では約 500~18 mg% の濃度では還元波の波高を最大曲率法で求めれば濃度と波高は直線関係にある。

(4) 強アルカリ性溶液を用いて streptomycin を定量する際には、分解速度を考慮しなければならない。

(5) 強アルカリ性溶液の際に得られる酸化波は定量的でない。

(6) 弱酸性、中性、弱アルカリ性溶液を用いれば非常に近接した二段波が得られるが、この波の高さは定量的でない。

〔附記〕 本研究に用いた streptomycin は醱酵研究所長佐藤喜吉博士の御配慮に依つたものである。又研究費の一部は文部省科学研究費に依つた。感謝の意を表する次第である。

- (1) G. B. LEVY, P. SCHWED and J. W. SACKETT : *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 528 (1946).
- (2) C. E. BRICKER and W. A. VAIL : *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 585 (1951).
- (3) 志方, 鎭 : 化学実験学 第 II 部 基本操作篇 II 電気的物恒数測定法 第 15 章参照
- (4) D. ILKOVIC : *Collection Czech. Chem. Comm.*, 6, 498 (1934).

Summary

Streptomycin (calcium chloride double salt) has been investigated by means of the polarographic arrangement with the dropping mercury electrode. It has been ascertained that the height of the reduction wave of streptomycin increases as the pH of the solution becomes higher. In 0.1 *N* NaOH solution, the reduction wave of streptomycin shows a roundish maximum and the addition of gelatin to the solution has no effect on this adsorption current.

For analytical purpose, it is the most suitable to use the solution of 1 *N* NaOH ($\pi_{1/2} = -1.70$ volt vs. N.C.E.). Under this condition, we must take care of the decomposition rate of streptomycin, and the linear relation is obtained between the wave-height and the concentration of streptomycin under careful measurement.

Oxidation wave of streptomycin appears when the pH of the solution is higher than 13, and these waves are not suitable for the determination of streptomycin.

好気性中温性纖維素醱酵菌に関する研究 (第 6 報)

細菌 セルラーゼ に 就 て

岡本辰夫, 朝井勇宣 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 26 年 11 月 12 日 受理

Studies on the Aerobic Mesophilic Cellulose-Decomposing Bacteria. Part 6. The Bacterial Cellulase.

By Tatsuo OKAMOTO and Toshinobu ASAI

(Dept. Agricultural Chemistry, Faculty of Agr., Univ. of Tokyo)

細菌にセルラーゼの存在する事は PRINGSHEIM⁽¹⁾ が菌体懸濁液に纖維素及びトルオール又は硝酸石灰を加えて酵素作用を行わせ、セロビオース及び葡萄糖が生成するのを phenylosazone により確認したのを初め、多くの報告があるが、細菌セルラーゼを菌体より分離する研究は、糸状菌等のセルラーゼが体外酵素であるためか比較的多く研究されているのに反して、殆んど行われていない。唯、SIMOLA⁽²⁾ は好気性纖維素分解菌 *Cellulobacillus myxogenes* の純粋培養を用い、その菌体懸濁液に纖維素及びトルオールを加え 2 日、3 日乃至 5 日間一定温度に放置した後、濾過に依つて菌体等を除き、その濾液に細粉した纖維素、磷酸緩衝液、トルオールを加え 37° に放置して還元力を測定した所、放置した日数が長くなるに従つて酵素作用の増加する事を認めた。之が cell-free に得られた細菌セルラーゼの最初のものである。その後照井・藤原両氏⁽³⁾ は *Bacillus hydrolyticus* を用いて、原纖維素よりも稀酸によつて比較的加水分解され易い状態に纖維素を変化させ、還元糖を殆んど生成しない“風化型”セルラーゼを得たが、之は纖維素より多くの還元糖を生成させる従来の“糖化型”セルラーゼとは異っている。我々は *Pseudomonas* 属細菌より cell-free に、更に粉末状にセルラーゼ製品を得、その作用条件等

を検討したので報告する。

実 験 の 部

I. セルラーゼの分離 当教室に於て分離した *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* UEDA et ASAI を繊維素のみを炭素源とする無機培地* に 30° にて 5 日間振盪培養し、培養終了後遠心分離に依り残繊維素を除き、かくして得られた菌体懸濁液に少量の SÖRENSEN 磷酸緩衝液を加えて pH を中性に保ちつつ 37° 及び冷蔵庫中 (2~3°) に放置し、順次採り出して Seitz 無菌濾過器を通した濾液に就いてセルラーゼ溶出状態を検討した結果は Fig. 1 の如くであつて、セルラーゼ溶出は 3 日乃至 4 日後に最大となり、冷蔵庫中のものはその作用力が 7 日を過ぎても落ちないが、37° のものは 5 日目より急激に下降する事が知られた。尚、Fig. 1 は SCHWEITZER 氏試薬に溶解した東洋 No. 6 定量用濾紙 1% 溶液 4 cc に M/15 SÖRENSEN 磷酸緩衝液 1 cc, cell-free 酵素液 3 cc, トルオール 0.2 cc を加え pH 6.5 としコルク栓をしパラフィンにて密栓し、37° にて 2 日間酵素作用を行わせたものであつて、縦軸は反応液 10 cc 当りの生成せる葡萄糖の mg 数を、横軸は放置した日数を示す。

Fig. 1. Elution of Cellulase from Bacterial Cells

無機塩類を除いた**。次いで予備試験の結果塩析される量が pH 5.0 附近にて最大であつたので、pH 5.0 にて順次結晶硫酸を加え、先ず 0.4 飽和にて冷蔵庫中に 1 晩放置し遠心分離に依り沈澱を分ち、上澄液には更に硫酸を加えて 0.5 飽和とし、前と同様に冷蔵庫中に 1 夜放置し遠心分離により沈澱を分ち、以下同様に 0.6 飽和に於ける沈澱も得た。更に 0.7, 0.8 飽和液を作つたがもはや塩析されなかつた。

以上の如くして得られた 0.4, 0.5, 0.6 飽和塩析物を少量の蒸留水に溶かして、再び透析に依り残存する硫酸を除き之を減圧乾燥して粉末を得た。収量は約 100 g の分解繊維素に対し、0.4 飽和塩析物 40 mg, 0.5 飽和塩析物 30 mg, 0.6 飽和塩析物 25 mg であつた。又 0.4 飽和塩析物 1 mg は、40 mg の SCHWEITZER 氏試薬より調製した繊維素より pH 6.5, 37° に 48 時間保つた場合、1.7 mg (対原繊維素 4.2%) の還元糖 (葡萄糖として) を生成し、0.5 飽和塩析物もほぼ同様の力価を有するが、0.6 飽和のものは 0.6 mg の還元糖を上と同条件にて生成するに過ぎなかつた。

なお以上の還元糖溶液は常法の如く phenylhydrazine-HCl 塩を用いて phenylosazone を作り、ピリジンからの再結を繰返えし美麗な黄色針状結晶を得た。之は glucosazone の結晶型と一致し、mp. 207°, glucosazone との混融試験の結果融点降下を示さなかつた。依つて生成還元糖は葡萄糖なる事が確認された。かくして粉末状にセルラーゼが得られたのである。尚 0.4 飽和塩析物にはアミラーゼが混入している (使用菌自体の構成酵素であるのか、或いは大量培養に用いた定性用濾紙 (東洋 No. 2) に若干の澱粉が混入しているために生成されたのかは未だ確めてない) 0.5 及び 0.6 飽和塩析物では除かれてしまつている。

II. セルラーゼの作用条件 アミラーゼの混入しない 0.5 飽和で塩析されたセルラーゼ製品を用いて、この酵素の最適 pH, 最適温度, 不活性化温度及び pH を検討した。即ち 0.1% 酵素液 3 cc, 1% 繊維素液 (SCHWEITZER 氏試薬を用いて東洋 No. 6 濾紙より調製したもの) 4 cc, M/15 SÖRENSEN 磷酸緩衝液 1 cc にトルオール 0.5 cc を加え pH 6.5 とし 37° に保ちその生成還元糖量を経時的に検討した結果、Fig. 2 の如きものが得られたので、この曲線の linear な線上にある 12 時間目に於て最適 pH 等を查べた。その結果は Fig. 3, 4, 5 に示される如く最適 pH 6.5 附近***, 最適温度 37°, 不活性化温度は各温度に 10 分間保つた場合 60 乃至 70°

* 濾紙 5%, NaNO₃ 0.5%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.1%, NaCl 及び FeCl₃ 痕跡

** 無細胞酵素液は青緑色の螢光を有していて透析に依り脱色されるが、その力価に変化は見られなかつた。

*** McILVAINE 枸橼酸緩衝液を用いた結果もほぼ同様であつた。

Fig. 2. Reaction Rate of Cellulase

Fig. 3. Optimum pH

Fig. 4. Optimum Temperature

10 minutes incubated at each temperature

Fig. 5. Inactivation Temperature

の間で急激にその活性度が低下するのが見られた。不活性化 pH は 37° に 1 時間各 pH にて保つた後直ちに pH を 6.5 に直した場合 pH 5.0 乃至 8.0 の間ではその活性度に殆んど影響ないが pH 4.3 及び 9.0 の場合は、その活性度が約 1/3 に低下するのが見られた。(尙 Fig. 3, 4, 5 に於て検定条件以外の条件は Fig. 2 の場合と同様である)。

III. 残繊維素に就いて 先に第 3 報に於て著者等は *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* UEDA et ASAI 及び *Pseudomonas viscosissima* UEDA et ASAI に依る繊維素の酸化的分解の可能性に就いて触れておいた

Table 1. Determination of Uronic Group

	Titration by 0.1 N HCl (cc)/1 g cellulose
Residual cellulose attacked by <i>Ps. fluorescens</i>	{ 3.89 3.55
Residual cellulose attacked by <i>Ps. viscosissima</i>	{ 3.04 3.84
Control cellulose	{ 3.63 3.30 3.89

0.1 N HCl 1 cc = CO₂ 2.2 mgcc は CO₂ 2.2 mg に相当す

が、上記 2 菌に依り侵された繊維素残査に就いて、DICKSON 法⁽⁴⁾を用いてそのウロン酸基を定量した結果は Table 1 の如くであつて、対照との差異は認められず、一応その酸化分解の可能性は否定し得るものと思われる。尙本定量は減圧乾燥した残繊維素 1.0 g に 12% HCl 100 cc を加え 130~140° に 5~6 時間加熱し発生した CO₂ を 0.1 N Ba(OH)₂ 水に吸収させ之を 0.1 N HCl で phenolphthalein を指示薬として滴定したものであつて 0.1 N HCl 1

又前述の如く、照井・藤原両氏は *Bac. hydrolyticus* よりの酵素製品の作用に依り繊維素から殆んど還元糖を生成しないが残繊維素の鉍酸による加水分解速度が原繊維素よりかなり大となる事から“風化型”セルラーゼの存在を報告しているが、我々も前記酵素製品及び上記菌の菌体懸濁液を用いて Fig. 2 と同条件* に於て酵素作

* 但し繊維素として東洋 No. 6 濾紙を熱湯にて開舒し細粉化したものを用いた。又反応時間も異なる。

用を行わせ、その残繊維素に就いて 1 N H₂SO₄ にて 90 分間加水分解を行い、加水分解恒数変化率 (R) を検討した結果は Table 2 の如くであつて、照井氏等の場合 40~90% の恒数変化率を示すに反し我々の場合は殆んど変化なく**、更に又 BRAIDY-GLIBBEN-GEAKE 氏法

Table 2. Nature of Residual Cellulose

	K($\times 10^{-4}$)*	R(%)*	Cu-value
12 hours incubation with enzyme soln.	1.70~1.79	0	1.75~1.85
4 days incubation with enzyme soln.	1.70~1.80	0	1.75~1.95
control	1.70~1.80		1.69~1.71
12 hours incubation with cell suspension			
of <i>Ps. viscosissima</i>	1.77~1.79	0	—
of <i>Ps. fluorescens</i>	1.75~1.79	0	—
4 days incubation with cell suspension			
of <i>Ps. viscosissima</i>	1.71~1.73	0	1.75~1.86
of <i>Ps. fluorescens</i>	1.71~1.75	0	1.75~1.90
Control	1.71~1.79		1.69~1.71

* 照井氏等⁽³⁾に依る

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{1}{1 - 0.9 X}$$

K₀ = 無接種対照の加水分解恒数

$$R = \frac{K - K_0}{K_0} \times 100(\%)$$

と変化なく**、更に又 BRAIDY-GLIBBEN-GEAKE 氏法⁽⁵⁾に依る銅価の測定結果も殆んど変化ない事から、我々の菌の場合は“風化型”セルラーゼの存在を認め難い。

総 括

1 繊維素分解細菌 (*Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* UEDA et ASAI) より得られた無細胞酵素液から硫酸による塩析に依り細菌セルラーゼを始めて粉末状に得、その作用条件を検討した (Op. pH 6.5, Op. temp. 37°; 70°, 10 分間及び pH 4.3 以下又は 9.0 以上に 1 時間保つと急速に不活化される)。更に他の 1 細菌 (*Pseudomonas viscosissima* UEDA et ASAI) と同じく該菌よりの酵素液は比較的多量の還元糖を生成し、残繊維素の性質に殆んど変化を与えない事から、この酵素は“風化型”に非ざる“加水分解型”とも称すべきセルラーゼなる事が認められた。

終りに本研究費の 1 部は文部省科学研究費によることを附記する。

** 12 時間酵素作用を行わせたものでは還元糖の生成は認められなかつたが (恐らく基質が SCHWEITZER 法に依る再生繊維素と異なるためであらう) 4 日間のものでは対原繊維素 2% 以上の還元糖が生成されていた。

- (1) H. PRINGSHEIM: *Z. physiol. Chem.*, 78, 266 (1912).
- (2) P. E. SIMOLA: *Ueber den Abbau der Cellulose durch Microorganismen* (1931).
- (3) 照井堯造, 藤原博夫: *醸工雑*, 27, 10 (昭 24).
- (4) A. D. DICKSON, H. OTTERSON and K. P. LINK: *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 775 (1930).
- (5) BRAIDY-GLIBBEN-GEAKE: *J. Textile Inst.*, T 27. (1924).

Summary

(1) Bacterial cellulase was newly obtained as powder, by salting out with ammonium sulphate from the cell-free enzyme solution prepared from an aerobic mesophilic cellulose-decomposing bacterium (*Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa* UEDA et ASAI) and then its optimum pH (6.5), optimum temperature (37°C), and inactivation pH and temperature were decided.

(2) From the facts that a large amount of reducing sugar is produced from cellulose and that the nature of the residual cellulose is scarcely affected by the action of this enzyme solution, it is considered that this enzyme does not belong to “weathering” cellulase the name of which was first proposed by TERUI and FUJIWARA, but belongs to “hydrolytic” cellulase.

分配クロマトグラフ法によるタンニン及び色素の研究

(第 5 報) シキミの花よりクェルセチンの分離⁽¹⁾

中 林 敏 郎 (九州大学農学部生物化学研究室)

昭和 26 年 11 月 21 日 受 理

Studies on Tannins and Pigments by the Method of Partition Chromatography.

Part 5. Quercetin in the Blossom of Shikimi (*Illicium anisatum* L.).

By Toshio NAKABAYASHI (Biochemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

先に大島及び著者が発表した paper chromatography による flavone 類の系統的分析法⁽²⁾を用いて、著者は