御式に行うようにした。その結果、操作は便利になり、また分析値の変動も或る程度減少したが、予期した程度（炭水素分析並）には低下しなかつた。現在の問題は blank 値を零にしないまでも一定に保つことで、その一つの方法として固定炉の温度を一定にあることが考えられるが、これを実際問題としてどう解決するかは目下考慮中である。

終りに臨み、本研究を終始御援助下さつた佐橋先生、住木教授、田村助教授、石井義男氏、並びに生物化学研究室の諸氏に深く感謝致します。なお研究費の一部は文部省の科研費を用い、又三田村商店より技術、器材の寄附を受けたことを併わせて感謝致します。

(1) 河野, 其の他 本誌, 28, 581 (1954).	(7) MAYLOTT, LEWIS : <i>Anal. Chem.</i> , 22, 1051 (1950).
(2) UNTERZAUCHER : <i>Ber.</i> , 73B, 392 (1947).	(8) DUNDY, STEHR : <i>ibid.</i> 23, 1408 (1951).
(3) ALUISE <i>et al</i> <i>Anal. Chem.</i> , 19, 347 (1947).	(9) OITA, CONWAY : <i>ibid.</i> 26, 600 (1954).
(4) 河野, 其の他 : 分化, 3, 224 (1954).	(10) 河野, 其の他 昭和29年4月農化東京支部会講演 (未発表).
(5) 河野, 其の他 : 分化, 3, 304 (1954).	
(6) 河野, 其の他 : 本誌, 印刷中 (1954).	

Summary

An apparatus for the automatic control of the pyrolysis in the direct determination of oxygen was proposed. The apparatus was composed from a fine capillary and a monometer, which contained 33% KOH soln. and had two electrodes (Fig. 1). The electrodes were connected to a vacuum-tube-relay so as to stop the motion of the moving furnace whenever the pressure in the reaction tube was raised, i.e. when the temp. of the furnace was rising, and when the sample began to boil or decompose. CuO-furnace for the oxidation of CO was separated from the main furnace to prevent the errors caused by the water produced by the oxidation of H₂. Standard deviations obtained from the result of an experiment using this apparatus were 0.34 ~ 0.45% (Table. 1). The main cause of these deviations to be due to the fluctuation of the blank values (Table. 2), which depended upon the temp. of the main furnace.

微生物によるニコチン及びニコチン酸の分解 (第1報)

ニコチン分解菌の分離及びその性質

田 淵 武 士 (東京教育大学農学部)

昭和 29 年 7 月 1 日 受 理

Microbial Degradation of Nicotine and Nicotinic Acid. Part 1. Isolation of Nicotine-Decomposing Bacteria and these Morphological and Physiological Properties.

By T. TABUCHI (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education)

緒 言 煙草の熟成中には可成りの nicotine が減少して煙草の喫味は緩和、改善されるが、その変化の様子は極めて不鮮明である。

古くから, BATHAME⁽¹⁾, FAITELOWITZ⁽²⁾, WEBER⁽³⁾ 等により微生物の作用で nicotine は分解される事が指摘されて来たが、その後 BUCHERER⁽⁴⁾ は4種の nicotine 分解菌を分離し、*Bacterium nicotinophagum*, *B. nicotinovorum*, *B. nicotianum* 及び *Bacillus nicotinobacter* と命名している。然し、nicotine の生化学的变化に就ては多数の報告があるのに、殆んど判っていない。従来の研究が経口的に与えた時の動物体内での変化、或は直接煙草葉を対象としているので多くの困難が伴うためである。

煙草成分中で極めて重要な地位を占める nicotine の分解機構を知るため、約 50 種の nicotine 分解菌を分離し、更にこれら微生物による nicotine の代謝生産物として 3-succinoyl pyridine⁽⁵⁾, 3-succinoyl pyridone-6⁽⁶⁾を、又 nicotinic acid よりは 3-carboxyl pyridone-6⁽⁶⁾をそれぞれ得る事が出来たので報告する。

I. 菌 の 分 離

Nicotine 分解菌を得るため色々の方法を試みたが、次の方法によつて始めて分離する事が出来た。即ち炭素

源、窒素源として nicotine のみの集積培地 (Table 1) を用い、これに土壌その他の分離材料を入れて、30° に

Table 1. Medium for the Isolation.

Nicotine	3 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Tap water	1000 cc
pH adjusted to 6.5~7.0 with H ₂ SO ₄ .	

約 1 週間培養した。皮膜、混濁等明らかに微生物の繁殖の認められたものより nicotine 寒天培地で平面培養を繰返して純粋な菌約 50 種を得た。以下にはその内の代表的な菌 10 種に就ての性質を記載する。

II. 菌の形態学的及び生理学的性質

Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria⁽⁷⁾ に記載されている方法に準じて行つた。なお菌は上記 nicotine 寒天培地に植継がれ、以下の諸試験では通常 SABOURAUD medium (glucose 2%, peptone 1%) を用いて 30° で培養した。

(1) 斜面培養に於ける菌の形態：2 日培養後菌の大きさ、形状を、又 1~7 日培養したもので反覆グラム染色、孢子の有無を調べた。25° で 10~24 時間培養した菌体で運動性、鞭毛の有無を調べた (Table 2)。

(2) 寒天斜面及び液体培地に於ける発育の状態：(Table 3)。

(3) 肉汁ゲラチン穿刺培養の状態：ゲラチン濃度 20% の肉汁ゲラチンを用いた (Table 4)。

(4) Litmus milk による培養状態：(Table 4)。

(5) 菌の生育と温度との関係：(Table 5)。

(6) 菌の生育と pH との関係：KH₂PO₄ を 1% 加え種々の pH に調整した SABOURAUD 培地で 1 週間培養した (Table 5)。

(7) 炭素源よりの生酸性：始めに合成培地を用いる AYER 等⁽⁷⁾の方法によつたが、多くは生育も生酸性も弱く判定が困難なので、酵母浸出液に糖を添加した培地で、10 日培養後の酸度を対象と比較した (Table 6)。No. 43 は炭水化物をよく同化するが生酸性はない。

(8) 窒素源の同化試験：Glucose 1%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.05% の基本培地に次の窒素化合物 0.2% を加えて斜面培養を行つた。即ち (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, NaNO₂ (0.1%), NH₄NO₃, urea, asparagine, peptone. 内 0.1% の濃度の NaNO₂ には全菌種とも生育し得なかつた (Table 7)。

(9) Indol 及び硫化水素の生成：Indol 及び硫化水素は全菌種とも生成しなかつた。

(10) 硝酸塩の還元性：SABOURAUD 培地に 0.1% KNO₃ を添加したものに菌を増殖させ、2 日後、4 日後に GRIESS の試薬で亜硝酸の検出を行つた (Table 7)。

(11) Acetoin の生成：30 日間培養後 VOGES-PROSKAUER 反応を行つた (Table 7)。

(12) 澱粉の加水分解：2% 可溶性澱粉を加えた肉汁で平面培養後、沃度溶液を加えて検した (Table 7)。

(13) ニコチン酸及び安息香酸の同化：(Table 8)。なお分離当初 pyridine を同化するものもあつたが、nicotine 培地に保存中その能力は全く失われた。又 phenol を同化するものは始めからなかつた。

Table 2. Morphological Characteristics.

Strain No.	Source of strains	Spore	Motility	Flagella	Gram stain	Cell size (microns)
41	Polluted water	-	+	Lophotrichous	-	0.5~1.1×1.5~3.0
1	Soil	-	+	Lophotrichous	-	0.5~0.7×1.0~2.0
21	Soil in seaside	-	+	Monotrichous	-	0.5~0.7×1.5~3.0
19	Weed	-	+	Monotrichous	-	0.7~0.8×1.5~2.0
43	Manure	-	+	Peritrichous	-	0.7~0.9×1.0~2.5
45	Polluted water	-	+	Peritrichous	-	0.4~0.7×1.5~3.2
64	Soil in seaside	-	+	Peritrichous	+	0.7~0.8×1.0~2.2**
2	Soil	-	-	-	+	0.5~0.7×0.8~2.0**
32	Soil	-	-	-	+	0.5~0.7×0.7~2.8**
3	Laboratory contaminant	+	*	-	+	1.0~1.4×2.0~3.5

* 0.8×1.5 microns, ellipsoidal, subterminal.

** Slightly curved and pleomorphic.

Table 3. Cultural Characteristics (SABOURAUD media, 48 hrs.).

Strain No.	Growth on agar slant	Growth in liquid medium**	
		Surface growth	Turbidity
41	Smooth, translucent, glistening, thin colonies. Medium becoming greenish-fluorescent.	Pellicle	±
1	White, smooth, glistening, thin colonies.	Pellicle	+

21	Smooth, translucent, glistening, thin colonies. Medium becoming brown.	Ring	+
19	Bright yellow, rough, dull, thin colonies.	Yellow ring	+
43	Rough, translucent, glistening, thin colonies.	Ring	+
45	White, smooth, moist, glistening, thick colonies.	Pell'cle	±
64	Yellow, smooth, glistening, thick colonies.*	Ring	++
2	Brownish yellow, smooth, glistening, thick colonies.*	Ring	++
32	White, smooth, glistening, thick colonies.*	Ring	+
3	Grayish white, rough, dull, thin colonies.	Ring	++

* When these bacteria grow on nicotine agar slant, they produce the purple pigment (diffusible to agar and later becoming brown).

** All strains did not show gas formation.

Table 4. Gelatin Stab and Litmus Milk Cultures.

Strain No.	Gelatin liquefaction* (15~20°, 20 days)	Litmus milk** (30°, 14 days)
41	No liquefaction.	Becoming alkaline.
1	Rapid liquefaction.	Peptonized and litmus reduced.
21	Slow liquefaction.	Becoming alkaline.
19	Slow liquefaction.	Coagulated and litmus reduced.
43	Slow liquefaction.	Coagulated.
45	No liquefaction.	Becoming alkaline.
64	Rapid liquefaction.	Coagulated, peptonized and litmus reduced.
2	Rapid liquefaction.	Coagulated, peptonized and litmus reduced.
32	Slow liquefaction.	Becoming alkaline.
3	Rapid liquefaction.	Coagulated, peptonized and litmus reduced.

* In all cases, cell growth was best at top and gelatin liquefaction was stratiform.

** Reaction became alkaline in all cases.

Table 6. Acid Production from Carbohydrates (10 days).

Strain No.	Xylose	Glucose	Galactose	Sucrose	Lactose	Mannitol	Glycerol
No.	Glucose	Fructose	Maltose	Raffinose	Sorbitol		
41	+	+	+	+	-	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	-	+	+	-	-
19	+	+	-	+	+	+	-
43	-	-	-	-	-	-	-
45	+	+	+	+	+	+	+
64	-	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	-	+
3	+	+	-	+	+	-	-

Table 8. Assimilation of Nicotinic and Benzoic Acids.

Strain No.	Nicotinic acid	Benzoic acid
41	+	+
1	+	+
21	-	-
19	-	-
43	+	-
45	+	-
64	+	-
2	+	-
32	-	-
3	+	-

Note: Media contained 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.15% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 and 0.3% nicotinic or benzoic acids, and were adjusted to pH 6.5 with NaOH. 30°, 10 days.

Table 5. Influences of Temperature and pH on the Growth.

Strain No.	Temperature (3 days)				pH (30°, 7 days)						
	20°	30°	37°	41°	5.0	5.5	6.4	7.4	8.2	8.8	
41	+	++	++	-	-	-	++	++	++	+	
1	+	++	++	±	-	±	++	++	++	+	
21	++	++	++	-	-	-	++	++	++	+	
19	+	++	+	-	-	-	+	++	++	+	
43	++	++	+	-	±	+	++	++	++	++	
45	++	++	++	-	-	-	++	++	++	+	
64	+	++	±	-	-	-	++	++	++	-	
2	+	++	++	-	-	-	++	++	++	-	
32	+	++	+	-	-	+	++	++	++	-	
3	+	++	++	++	±	+	++	++	+	+	

Table 7. Various Physiological Characteristics.*

Strain No.	Non-utilizable N-compounds**	Detection of nitrite	Voges-Proskauer test	Hydrolysis of starch
41		-	-	-
1		-	-	-
21		-	±	++
19	Urea	-	-	-
43	Urea	+	-	++
45		-***	±	-
64		-	++	-
2		+	++	+
32	Urea	+	+	+
3		-	-	+

* All strains were catalase positive but did not produce indol and hydrogen sulfide.

** Among $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , NH_4NO_3 , urea, asparagine and peptone after 7 days.

*** Nitrogen gas formation was observed.

Table 9. Decomposition of Nicotine.

Strain No.	Final nicotine concn. %	Final pH
41	0.08	5.0
1	0.11	5.4
21	0.13	5.6
19	0.12	6.4
43	0.14	7.4
45	0.22	5.6
64	0.33	5.9
2	0.08	7.0
32	0.32	6.2
3	0.10	7.2

Note: Medium contained 0.37% nicotine, 0.2% KH_2PO_4 and 0.05% MgSO_4 and adjusted to pH 6.4 with H_2SO_4 . Shake-culture at 30° for 7 days.

III. Nicotine の分解

Nicotine 濃度 0.37% の合成培地で 30°, 1 週間振盪培養を行つた結果を Table 9 に示す. 0.37% の初濃度

ではその毒性のため nicotine の消費は悪いが、0.2% に減ると全菌種によつて 5 日以内には 80% 以上の nicotine が消費された。なお培養後には、いずれの菌も NESSLER 反応を顕著に示した。

IV. 分類学的地位の決定

上記実験結果より、BERGEY's Manual 6 Ed.⁽⁸⁾ に分類されている近似菌と比較して、ニコチン分解菌の分類上の位置を定める。

No. 41, No. 1, No. 21, No. 19 は無孢子、極毛のグラム陰性桿菌で *Pseudomonadaceae* に属し、いずれも中性乃至微アルカリ性でよく繁殖する⁽⁹⁾。その内 No. 41 (他に類似菌 3 種) は緑色蛍光性色素を形成し、ゲラチンを液化せず BERGEY 記載菌の中で、*Pseudomonas convexa*, *Ps. mildenbergii* に比較的好く性質が似ているが、前者は monotrichous, 後者は黄色を帯びている等相違しているので新種と認め nicotine 分解力が強い事より *Pseudomonas nicotinophaga* nov. sp. と命名した。蛍光性色素を作らず、ゲラチンを液化し、37° でよく生育する No. 1 (他に類似菌 2 種) 及び No. 21 の内、前者は *Ps. putrefaciens* に最も類似しているが、鞭毛、硝酸塩還元性の点で相違し、又 No. 21 はリトマス還元せず該当する菌の記載がないので、それぞれ新種と認め、ニコチン酸、安息香酸等をもよく分解する No. 1 を *Pseudomonas cyclosites* nov. sp., No. 21 を *Pseudomonas nicotiana* nov. sp. と命名した。鮮明な黄色集落を形成する No. 19 は *Xanthomonas carotae* の変種と認め *Xanthomonas carotae* var. *nicotinovora* と命名した。

No. 43, No. 45 は無孢子、周毛のグラム陰性の桿菌で、糖よりガスを作らず、*Achromobacteriaceae* に属するが、その内 No. 43 は糖よりの生酸性が全くないので *Alcaligenes* 属のものと思われる。又如何なる培養でも色素を全く作らない No. 45 (他に類似菌 1 種) は *Achromobacter* に属し、ゲラチンを液化せず、リトマスミルクを速かに還元し、硝酸塩添加培地より多量の窒素ガスを生成するので新種と認め、*Achromobacter denitrificans* nov. sp. と命名した。

No. 64, No. 2, 及び No. 32 はいずれも無孢子、グラム陽性の桿菌 (運動性ある場合は周毛) で *Bacterium* に属し、その内淡黄色集落を形成する No. 64 (他に 11 種) は周毛を有し、ゲラチンを液化し、硝酸塩を還元せず該当菌の記載がないので新種と認め *Bacterium flavescens* nov. sp. と命名した。黄褐色集落を形成する No. 2 (他に 15 種) は *Bacterium mutabile* に近似しているが、糖より酸を作るので変種と認め *Bacterium mutabile* var. *acidoformans* と命名した。白色集落を形成する No. 32 (他に類似菌 8 種) は *Bacterium qualis* に類似しているが澱粉をも加水分解するので変種と認め *Bacterium qualis* var. *amylophilum* と命名した。

有孢子細菌は No. 3 のみであつて、*Bacillus megatherium* に類似し、*Bacillus megatherium* var. *nicotinovor*us と命名した。

煙草成分の重要なアルカロイドである nicotine を分解する微生物が土壌その他に広く分布する事は明らかであるが、ここに分離された 5 つの genus に属する多数の菌は、すべて Obligative Oxidative Catabolism⁽⁸⁾ を営む生理的性質の極めて類似した好気性菌で、更に nicotine の場合にその初期の分解経路は全く一致している⁽⁶⁾。

終りに終始御懇篤な御指導を頂いた小林達吉助教授に深謝すると共に、有益な御助言を頂いた東大朝井勇宣教授、北原寛雄教授に感謝する。又本研究は専売公社中央研究所の御援助により行つたものでここに謝意を表する。

(1) BATHAM, H. N. : <i>Soil Sci.</i> , 24, 187 (1927).	(11) 117, 152 (1953).
(2) FAITELOWITZ, A. : <i>Biochem. Z.</i> , 224, 460 (1930).	(6) 田淵 : 昭和 28 年 6 月 農芸化学会講演.
(3) WEBER, K. : <i>Lebensm. Untersuch. u. Hyg.</i> , 26, 214 (1935).	(7) <i>Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria</i> (1946).
(4) BUCHERER, H. : <i>Zbl. f. Bakt.</i> , Abt. II, 105, 166, 445 (1942).	(8) BERGEY's <i>Manual of Determinative Bacteriology</i> , 6th Ed. (1948).
(5) WADA, E. and YAMASAKI, K. : <i>Science</i> ,	(9) KLUYVER, A. J. and van NIEL, C. E. : <i>Zbl. f. Bakt.</i> , Abt. II 94, 369 (1936).

Summary

The author isolated about 50 strains of strictly aerobic bacteria which could utilize nicotine as the sole source of carbon and nitrogen. Morphological and physiological properties of these

bacteria were studied and it was found that these bacteria belonged to genera, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bacterium* and *Bacillus*.

黒黴のペクチン酸分解酵素について (第 1 報)

Depolymeric polygalacturonase の生成

斎藤日向, 蓑田泰治, 丸茂博大 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 29 年 7 月 3 日 受理

Pectic Glycosidases of *Aspergillus niger*. Part 1. On the Formation of Depolymeric Polygalacturonase

By Hiûga SAITÔ, Yasuji MINODA, Hirofuto MARUMO

(Dept. Agr. Chem., Fac. Agr., Univ. of Tokyo)

黒黴のペクチン質分解酵素の生成を追跡するのに、pectic acid を基質として粘度低下によつて測定した場合と、還元基の増加によつて測定した場合とでは、異つた生成曲線が得られる事は先に指摘した如くである⁽¹⁾。これらの曲線は勿論種種の酵素作用の和として考えられるものであるが、各の曲線を主宰する 2 種の酵素について認め得た知見を報告する。何れも pectic acid のグリコシド結合加水分解酵素であると推定され、それぞれの作用様式から depolymeric polygalacturonase (前報には depolymeric enzyme と記載、以下 DPG と略称す) 及び galacturonogenic polygalacturonase (前報には polygalacturonase - monomer producer - と記載、以下 GPG と略称す) と仮称する。

実験方法 (前報⁽¹⁾参照)

菌株 *Aspergillus niger* S₃.

培養方法: CZAPEK 氏液 (C-源は薬局法葡萄糖 3%) 100 cc を 500 cc 容振盪用フラスコに分注殺菌し、孢子懸濁水 (接種後 3~7 日の麴寒天斜面より採取, 4×10^6 /cc 程度) 2 cc を接種し 30°, 振幅 7 cm, 130 r.p.m. にて振盪培養した。

粘度低下力の測定 (depolymeric polygalacturonase の測定): 1% pectic acid 溶液 (緩衝液 1/2 量, pH 4.2) 4 cc を, OSTWALD 粘度計 (水 5 cc にて 20~30 秒のもの) に入れ, 30° の湯浴中にて恒温とし, 酵素液 1 cc を混和した直後の液の落下時間を T_0 秒, 30 分或は 1 時間作用後の液の落下時間を $T_{1/2hr}$ 或は T_{1hr} とし, 作用力 $A_{1/2hr(or 1hr)} = [(T_0 - T_{1/2hr(or 1hr)}) / (T_0 - T_a)] \times 100$ で表わす。 T_a は同一粘度計に於ける純水 5 cc (30°) の落下時間である。但し酵素力が極めて強い時は液の落下時間の中点を以て作用経過時間とし作図により外挿して T_0 を求めた。

還元基の増加による測定 (galacturonogenic polygalacturonase の測定): 還元力の定量は JANSEN, MAC DONNELL の方法⁽²⁾に準じて行つた。即ち 1% pectic acid 水溶液 (NaOH にて pH 4.2 とす) 一定量 (10~50 cc) に酵素液 1 cc, toluol 0.2 cc を加えて 30° で作用せしめ, 一定時間毎にその 5 cc をとり, 100 cc 容共栓三角フラスコ中の 1 M Na₂CO₃ 液 1 cc に加える。次いで N/10 I-IK 液 5 cc を加えて振盪し, 密栓して 20 分間室温に放置し, 2 M H₂SO₄ 2 cc で酸性とし残存 I₂ を N/20 Na₂S₂O₃ で滴定する。還元された I₂ 1 相当量は遊離 galacturonic acid 0.51 相当量 (原報は 0.513) に相当する (試料の緩衝能力によつて ± 2% 位の差を生ずる)。GPG の活性度は, 1 cc の酵素液により n 時間に分解遊離された galacturonic acid の相当量数 (Gal. meq n hr.) により表わす

振盪実験: 培養 3 日目の菌体を吸引濾過し, 蔭酸の検出のなくなるまで蒸留水にて洗滌し, その 2.5 g を 50 cc の MCILVAINE 緩衝液 pH 4.0 (其の他は後述) 中に懸濁し 30° で一定時間振盪し濾液について酵素力を測定した。

菌体よりの浸出: 培養 6 日目の菌体を同様洗滌後 2 g を 20 cc の液の中に入れ toluol 0.5 cc を加えて室温で 24 時間浸出した。乾燥菌体は室温にて 24 時間以内に減圧乾燥せしめ穩かに磨砕した後, 乾量 200 mg を緩衝液 pH 4.0, 20 cc にて toluol 添加, 室温 24 時間浸出した。