- (4) 高橋雅弘 : 農化, 28, 395 (1954). 30, 164 (1943).
 (5) W. J., ROBBINS and R. MA : *Am. J. Botany*, 32, 509 (1945). (7) F. KÖGL, and N. FRIES : *Rec. Trav. Chim.*, 59, 747 (1938).
 (6) M. MARCZYNSKI *Am. Midland Nat.*

Summary

1. The present study was carried out on the role of amino acids and vitamins upon the growth and fructification of *Collybia velutipes* (CURT.) QUEL.

2. *Collybia velutipes* grew vigorously and well fruited on malt extract medium, but very scarcely grew on the synthetic medium.

3. The culture medium for this experiments was the HENNEBERG's synthetic solution containing separately the amino acids of 25 sorts as the special growth substance rather than as the ordinary nutritive substance.

4. Among the amino acids of 25 sorts, *l*-alanine, *l*-leucine, *l*-lysine, cysteine, *dl*-norleucine, *dl*-serine, *l*-histidine, *dl*-valine, *l*-phenylalanine, *dl*-norvaline, *l*-cystine, isoleucine, *l*-glutamic acid, *dl*-tryptophan, proline and *dl*-aspartic acid were proved somewhat effective for the fungus growth (Table 2).

5. As far as the results of this experiments are concerned, any amino acid did not so much promoted the mycelial growth separately.

6. As to the vitamin the vitamin B group such as vitamin B₁, B₂, B₆, choline chloride, nicotinic acid and calcium pantothenate were added separately.

7. Among them, vitamin B₁ and B₂ were very stimulus to the fungus growth. When these vitamins were added in the high concentration, V. B₁ 13~1600 γ and V. B₂ 13~104 γ per 25 cc of the medium, the mycelium grew vigorously and its dry weight increased in spite of less consumption of glucose in the medium (Table 3). But the excess of vitamin B₁ as much as 1600 γ per 25 cc of the medium, seemed to prevent the fungus fructification.

フォルモール滴定法による麹菌 Proteinase 力の 1 つの表示方法に就て

松 島 欽 一 (三重大学農学部醸酵学教室)

昭和 29 年 6 月 2 日 受 理

A Convenient Method of Representing Proteolytic Activity of "Koji-Molds"
by SÖRENSEN's Method.

By Kin'ichi MATSUSHIMA (Dep. of Agric. Chem., Fac. of Agric., Mie University)

緒 言

麹菌 proteinase 力の測定には従来各種の方法が採用せられているが⁽¹⁾, それらの中でもフォルモール滴定法は最も広く用いられるものの 1 つである。本法は衆知の如く基質より遊離したカルボキシル基をアルカリで滴定して酵素力を比較するものであるが, 併し乍ら茲に得た滴定値と酵素濃度との間には一般に比例的な関係は存在しない。従つて滴定値から酵素の活性度を比較判定することは困難である。尤も, 個々の酵素試料の活性度の相対的強弱関係を比較考慮せんとする場合には単に滴定値そのままの比較を以てしてもその目的が達せられるのであつて, 實際既往の諸家の研究に於ても此の種の比較方法を用いている例が甚だ多い。処が, 實際に得られた滴定値より種種なる酵素試料の活性度の比率 或いは又同一酵素剤の活性度の変化の割合等を判定したい場合が往往にして生ずる。尤も, 斯る場合各種濃度の酵素量に就て予め標準曲線を描いておいて之より酵素活性度を出すとか, 或いは又酵素作用が単分子反応に従う場合にはその反応速度恒数から活性度を求めるという方法もあるが, 更に簡単に滴定値から活性度を比較し得る方法があれば甚だ便利である。筆者は斯る見地から種種検討を加えた結果, 滴定値を簡単に変形することによつて直ちに活性度と比例的関係を有する数値に導き得る方法を, 更に之に基いて 1 つの酵素力単位の設定を試みた。

実 験 の 部

(1) 最小自乗法による係数の算出と、変形値（滴定値の）と酵素濃度との直線的関係に就て。

酵素液： 麹菌を麹に培養して（30°, 3日間）1%食塩水で抽出した透明濾液，又はタカヂアスターゼ（原末）を水に溶解せしめたものを酵素液として使用した。

作用条件： 5% Gelatin soln. 10 cc + MCILVAINE buffer soln. (pH=6.0) 5 cc + Enzyme soln. x cc + dist. water (5- x) cc = 20 cc

上の作用混液を 40° の恒温水槽中に保ち酵素液を各 1 cc, 2 cc, 3 cc, 4 cc 及び 5 cc 宛加えて作用開始 3 時間後にその 5 cc をとり，フェノールフタレインを指示薬としてフォルモール滴定法により $N/10$ NaOH を以て滴定した。なお対照としては基質+緩衝液と酵素液とに就て別別に滴定し，実際の滴定値からその和を差し引いたものを測定値とした。その結果は Table 1 及び Fig. 1 に示す如くである。

Table 1. Hydrolysis of Gelatin by Varying Quantities of Enzyme.

Enzyme (cc)	Control	After 3 hrs.	Difference
	(N/10 NaOH cc/5cc of Digestate)		
1	1.68	2.50	0.82
2	1.79	2.96	1.17
3	1.90	3.35	1.45
4	2.01	3.65	1.64
5	2.12	3.96	1.84

此の結果からも，滴定値と酵素濃度との間には何等比例的な関係は認められないのであるが，今両者の対数を以てグラフに描くと Fig. 2 の如くに直線関係が成立する。従つて今測定値を y ，酵素量を x とおけば Fig. 1 に示した曲線は次式で示し得る。

$$y = ax^b \dots \dots \dots (1)$$

そこで Table 1 の測定値から最小自乗法によつて (1) 式に於ける a 及び b の値を求めると， $a=0.84$ ， $b=0.49$ なる値を得る。即ち Fig. 1 の酵素量と滴定値の関係を示す曲線は， $y=0.84 x^{0.49}$ となる。

更に同一条件で他の 2 3 の麹菌酵素試料を用いて測定を行つた結果から前同様 (1) 式に於ける a 及び

Table 2. Empirical Determination of the Value of "a" and "b" in the Equation, $y=ax^b$, which represents the Relationships of Proteolytic Activity (y) versus Quantity of Enzyme (x), by means of the Least Squares.

Experimental No.	1		2		3	
	(Asp. oryzae)		(Asp. sojae)		(Taka-Diastase)	
The relation between enzyme activity and quantity of enzyme	x	y	x	y	x	y
	(cc)	(N/10 NaOHcc)	(cc)	(N/10 NaOHcc)	(mg)	(N/10 NaOHcc)
	1	0.72	1	0.64	5	0.56
	2	1.02	2	0.92	10	0.80
	3	1.24	3	1.13	15	0.98
	4	1.43	4	1.31	20	1.14
	5	1.60	5	1.46	25	1.26
Induced values of a and b by means of the least squares.	a: 0.72 b: 0.49		a: 0.65 b: 0.50		a: 0.43 b: 0.51

Fig. 1. The curvilinear relationships of gelatinolytic activity versus quantity of enzyme.

Fig. 2. The relationship of the activity versus enzyme concentration in a double logarithmic graph.

b の値を算出した結果は Table 2 の如くである。

その結果何れの酵素試料を用いた場合も最初の実験に於けると同様に，(1) 式の b の値として $b=0.50$ ，又はそれに極めて近似的な値が得られた。従つて上記作用条件下に於ては麹菌 proteinase の作用力と酵素濃度との間には，

$$y = ax^{0.5} \dots \dots \dots (2)$$

なる一般式が成立するものとしてよい。而して (2) 式を変形すれば，

$$y^2 = a^2 x \dots \dots \dots (3)$$

茲に $y=Y$ ， $a^2=A$ とおけば，

$$Y = Ax \dots \dots \dots (4)$$

となり、変数 x, Y 間の直線関係を示す式を得る。即ち、麹菌 proteinase の酵素濃度と作用力（滴定値）の 2 乗値との間には比例の関係が成立する、ということになり、今この間の消息を Table 2 の実験結果に就てグラフに示すと Fig. 3 の如くである。

Fig. 3. The linear and curvilinear relationships of the gelatinolytic activity versus quantity of enzyme for several fungal enzyme preparations.

Note: A; Normal plot. B; Square transformation of data. Ordinate; Enzyme activity in cc of N/10 NaOH. Abscissa; Enzyme concentration.

尚酵素濃度又は作用時間と酵素作用力との関係に就ては古くから有名なる式として SCHÜTZ の法則があるが上に得た滴定値の 2 乗値と酵素濃度とは比例する（作用時間一定）と云う点では該法則に一致するものではあるが、併し乍ら他方酵素濃度を一定にした場合作用力の 2 乗と作用時間との間には比例関係は成立せず (Fig. 4), この点同法則とは一致しない。尚最近 MILLER 及び JOHNSON⁽²⁾ はババイン其の他の酵素試料を以てヘモグロビン又はグルテンを分解せしめ、生じた可溶性窒素をケルダール法により測定した結果、アルカリの消費量の 3/2 乗値と酵素濃度との間に直線関係が成立することを認めている。

(2) Proteinase 力の表示方法に就て 麹菌 proteinase の活性度をゼラチンを基質としてフォルモール滴定法によつて比較せんとする場合には、滴定値そのままの値を以てしては酵素活性度の相互関係を量的に云々することは困難であるが、滴定値を 2 乗することによつて簡単に酵素活性度と比例した数値に導き得ることは以上の実験結果から明らかである。従つて本法によつて麹菌 proteinase の酵素力を比較するに際しては滴定値の 2 乗値そのままを以てしてもよいし、或いは又任意の活性度を有するものを基準として相対の活性度を求め

Fig. 5. The linear and curvilinear relationships of the proteolytic activity versus quantity of enzyme for Taka-Diastase acting on casein.

Fig. 4. The relationships of the proteolytic activity versus quantity of enzyme or period of incubation. (The data are plotted in the square transformation)

て比較することも出来る訳であるが、茲に 1 つの単位が与えられれば便利である。以上の実験に於ては凡て基質としてゼラチンを用いたのであるが、カゼイン (5%) を基質とした場合にもゼラチンの場合と全く同様の比例関係が成立する (Fig. 5)。而して 1 つの単位を設定するに際して先ず最初に問題となるのは基質の撰択であつて、常に同一

品質の純品が得られることが理想的条件である。この点ゼラチンは製造元を異にするに従つてその品質に相当著しい変動がある⁽³⁾のに比べて、カゼインは良質（例えば Hammersten casein）のものさえ使用すれば

比較的上記条件が満足されると思われ、既往に於てもカゼインを基質として種類の測定方法による酵素単位を規定した例も 2 3 認められる⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾。併し乍ら、筆者の経験からすればフォルモール滴定法を用いる限りに於ては、麴菌 *proteinase* の凝乳作用によつてカゼイン作用液は著しく白濁を来し恰も乳状を呈するが故にアルカリによる滴定に際してその終点を把握するにやや困難を感じるものであつて、白濁状から漸次紅色に移行する滴定の過程に於て終点の判定に個人差が相当影響する危険性がある。特に本法では滴定値の更に 2 乗値を以て比較せんとするのであるからその誤差はますます大となる恐れがあり、以上の観点からカゼインを基質として本法に適用することは好ましくないと考える。この点ゼラチンは滴定の終点が極めて明確に把握出来て好都合であるが、他面上述の如く品質に相当変動があるという欠点がある。併し乍ら同一品質のゼラチンを使用する限りに於ては単位の設定も意味なきものに非ず。斯る観点から敢てここに 1 つの酵素単位の設定を試みた次第である。

Gelatin formol unit : 市販粉末ゼラチン 5 g を正確に秤量し、之に蒸溜水を加えて加温溶解せしめ 40° の温度に於て定容に満す。茲に得た 5%ゼラチン溶液を 40° に保ちつつその 10 cc 宛を試験管にとり、MCILV-AINE 緩衝液 (pH=6.0) 5 cc 及び酵素液* 5 cc (何れも 40° に予め保ちてあるもの) を加える。

以上の作用混液を 40° の恒温水槽中に保ち正確に 3 時間作用せしめた後、その 10 cc を中和フォルモール液 5 cc を有する三角フラスコ中に移して酵素作用を停止せしめ、フェノールフタレイン 0.5 cc (0.5 g/100 cc 50% alcohol) を加えて N/10 NaOH で滴定する。同様に煮沸酵素液を用いて滴定した対照値を差引いた値を以て滴定値とする。

Fig. 6. Proteolytic activity for Taka-diastase acting on gelatin.

酵素力単位は上記条件下に於て滴定値の 2 乗値が N/10 NaOH の cc 数 0.1 に相当する分解を行う酵素量を以てする。従つて今もし或る酵素試料に就て滴定値 3.0 cc を得たとすれば、その酵素試料は 90 単位の酵素量を有することになり、本法によつて得た単位を “Gelatin formol unit” と呼称することにする。尙 Fig. 6 より明らかなる如く酵素濃度と (滴定値)² との比例関係には自から一定の限界があり、大体 150 単位以内に於てのみ直接本法を適用し得るが、それ以上の活性度を有する酵素試料の場合には適宜稀釈した液を用うべきことは勿論である。

摘 要

麴菌 *proteinase* のゼラチン分解力をフォルモール滴定法によつて測定した結果、酵素濃度と滴定値の 2 乗との間に比例的関係が成立することを認め、この事実に基づいて 1 つの酵素力単位を設定した。

終りに臨み、終始激励と御指導を辱うした東大応用微生物研究所北原寛雄教授に衷心より感謝の意を表すると共に、御助言、御鞭撻を戴いた三重大学 田中庄助教授、並びに常々御声援を寄せられつつある北海道大学農学部小幡彌太郎教授に深厚の謝意を捧ぐるものである。

* 菌株によつてはその麴抽出液が着色濁濁して不透明なものがある。筆者の経験では短毛株の抽出液は一般に透明而も淡色であるが、菌糸が長くなるに従つてその抽出液の着色度或いは不透明度が増大する傾向があるように思われる。前者の場合は抽出液そのままを酵素液として用いても滴定の終点が明確に把握出来るが、後者の場合には滴定の正確を欠く憾みがあるので、斯る際には例えばアルコール沈澱法等によつて可及的精製した酵素試料を用いる必要がある。

(1) 松島欽一： 醸酵工学., 31, 367 (1953).

(2) B. S. MILLER and J. A. JOHNSON : *Arch. Biochem.*, 32, 200 (1951).

(3) 松島欽一： 醸酵工学., 31, 446 (1953).

(4) GROSS G. : *Arch. exp. Patholog. u. Pharmacol.*, 58, 158 (1906); FULD-BERG-MANN-MEYER, K. : *Berl. Klin. Woch-*

schr., 45, 1673 (1903); 大島幸吉 : *J. Coll. Agr. Hokkaido Imp. Univ.*, 19 (3), 152 (1923).

(5) 萩原文二 : 標準生化学実験(文光堂, 昭 28) p. 208.

(6) T. H. NORTHROP : *J. Gen. Physiol.*, 16, 267 (1933).

Summary

Based on the linear relationship between the fungal enzyme concentration and the square transformation of the titration values obtained by the SØRENSEN's method, a proposed unit of the proteolytic activity is defined as the activity contained by a quantity of the fungal enzyme materials which gives an increase in amino acids released from gelatin in a 10 ml aliquot from the digestate corresponding to the intersection of the straight line with the transformed ordinate representing 0.1 ml of *N*/10 alkali, and the unit is suggested to call 'Gelatin formol unit'.

放射状菌に関する研究

Streptomyces 1545 株の生産する新抗黴、抗植物病原菌物質

Hygroscopin に就て (II)

中沢 鴻一, 隠岐 金蔵, 田所 勲 (醸酵研究所)

本庄美喜男, 人見 弘, 上柳次三郎 (武田研究所)

昭和 29 年 6 月 3 日 受 理

Studies on Streptomycetes.

Hygroscopin, an Antibiotic Substance active against Fungi and Phytopathogens.

By Kōiti NAKAZAWA, Kinzō OKI, Isao TADOKORO (Institute for Fermentation, Osaka)

Mikio HONJO, Hiroshi HITOMI, and Jisaburō UEYANAGI (Research Laboratory attached to Takeda Pharmaceutical Industries Co. Ltd)

前報⁽¹⁾に於て我々は *Streptomyces hygroscopicus* の 1 新変異株が培養液中に抗黴、抗植物病原菌物質を生産する事を確め、この抗生物質を Hygroscopin と命名し、その菌株の生物学的特性並に培養抽出条件に就て報告した。

本報に於ては Hygroscopin (粗油状物質) の各種菌類に対する抗菌力について述べる。

1) **Hygroscopin (crude) の各種菌類に対する抗菌力** ここに使用した黴、酵母、植物病原菌等の菌株はすべて当研究所保存菌株である。

抗菌力の検定は寒天稀釈法を用い、黴、酵母、不完全菌等は glucose-bouillon 培地を用い、23°, 48時間後に又植物病原菌は potato-sucrose 培地を用い、23°, 72時間後に、又比較的遅く發育し来る菌株はそれぞれ対照と比較して發育阻止濃度を決定した。Hygroscopin (crude) を用いて黴、不完全菌、酵母、植物病原菌等に対する抗菌力を調べた結果は、Table 2, 3, 4 のとおりである。一般に強力な抗菌力を有するが特に植物病原菌に対しては強力に作用した。同じ属でも species に依る差異が相当見られる。黴、不完全菌類等では *Aspergillus glaucus*, *Penicillium* sp., *Pen. chrysogenum*, *Rhizopus nigricans*, *Monascus Anka*, *Monascus purpureus*, *Alternaria tenuis*, *Dematium pullulans*, *Neurospora sitophila* 等に対しては 100 万倍程度で發育を阻止し、酵母類では *Sporobolomyces salmonicolor* のみが 100 万倍程度である。植物病原菌では 100 万倍以上の稀釈で發育を阻止されるもの多く中でも稲条葉枯病菌、大豆紫斑病菌、馬鈴薯炭疽病菌、稻小黑菌核病菌、甘蔗黑星病菌、稻熱病菌、大豆褐紋病菌、インゲン褐斑病菌等は 750 万倍稀釈に於ても尚發育を阻止された。特に稻熱病菌に対して強力に作用する事実は興味ある所である。尚細菌類に対しては作用力弱く *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Staph. aureus*, *B. subtilis*, *Ps. aeruginosa* 等は 1 万倍でも發育を阻止されなかつたが抗酸性菌に対してはかなり強く作用し *Mycobacterium phlei* は 400,000 倍 *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Rv は 500,000 倍でその發育を阻止された。

又 *Trichophyton interdigitale* (purpureum, gypseum) は 75,000 倍、*Candida albicans* は 350,000 倍でそれぞれ發育を阻止された。

Table 2. Antifungal Activity of Hygroscopin (crude)

Test organisms	γ/cc	Test organisms	γ/cc	Test organisms	γ/cc	Test organisms	γ/cc
<i>Aspergillus niger</i>	1.5	<i>Aspergillus glaucus</i>	0.75	<i>Aspergillus oryzae</i>	15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	35
" <i>candidus</i>	3.5	" <i>nidulans</i>	7.5	" <i>ostianus</i>	7.5	" <i>ochraceus</i>	3.5