- (16) C. P. SHERWIN : *J. Biol. Chem.*, 36, 309 (1918).
 (17) L. BLUM : *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 59, 273 (1908).
 (18) A. J. KRUYVER, J. C. M. VANZIIP : *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 17, 47 (1951).
 (19) S. DAGLEY, M. E. FEWSTER, F. C. HAPOLD : *J. Gen. Microbiol.*, 8, 1 (1953).
 (20) M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW, K. S. ROBINSON : *J. Biol. Chem.*, 213, 797 (1953).

Penicillium chrysogenum Q 176 によるフェニル酢酸の

酸化代謝に関する研究 (第 11 報)*

フェニル酢酸の微量比色定量法

磯野正雄 (財団法人醸酵研究所)

吉野喜久子 (武田薬品工業株式会社大阪工場)

昭和 31 年 7 月 11 日 受理

緒 言

フェニル酢酸 (PAA) の定量法として従来酸度滴定法⁽¹⁻³⁾, 比色法⁽⁴⁾, 検圧法⁽⁵⁾などが公けにされている。最近 PAN 等⁽⁶⁾は KAPLLER-ADLER⁽⁷⁾ のニトロ化法を改良し, 低温下でニトロ化する PAA の比色定量法を発表した。この定量法は操作が比較的簡単で精度も高く, 特にペニシリン工場において PAA を定量する方法としては便利である。しかしペニシリン醸酵における近時の PAA 添加法は添加すべき全量を何回にも区分して少量ずつ添加するという方法に移行しているため, この定量法もはや不適当なものとなり, さらに感度の高い定量法が要請されるようになった。

著者等は種種検討を行つた結果, PAN 等のニトロ化法と BRATTON 等⁽⁸⁾のジアゾ化法とを組合わせることにより, 初めてペニシリン醸酵の実状に則した PAA の微量比色定量法を確立したので報告する。

実 験 の 部

A. 定 量 法

I. 所要試薬 10 N 硫酸, トルエン, Na₂SO₄ (無水物), 0.1 N NaOH, ニトロ化試薬 (KNO₃ 0.2 g を濃硫酸 100 cc に溶解), 6N 塩酸, 亜鉛末, 0.05% NaNO₂ 水溶液, 0.1% NH₄SO₃NH₂ 水溶液, 0.1% β-diethyl-aminoethyl-α-naphthylamine oxalate (津田試薬) 水溶液および 94% エタノール。

II. 定量操作

抽出 PAA 50~500 γ を含む検液 1.0 cc を 10×95 mm の肉厚試験管にとり, これに 10 N 硫酸 0.1 cc, Na₂SO₄ 約 0.3 g およびトルエン 5.0 cc を加え, 試験管の口を指先でおさえながら約 1 分間強くふりまぜて PAA をトルエン層にとる。約 5 分間遠心分離し, その 1.0 cc を別の試験管に移す。0.1 N NaOH 0.1 cc を加え, 65~70° の温浴に浸し, 乾燥空気を吹きつけながら蒸発乾固する。

ニトロ化 : 蒸発乾固した検体にニトロ試薬 0.2 cc を加え, 42±0.1° の恒温水槽中に 15 分間浸してニトロ化を行う。これを冷水中に浸して冷却したのち蒸溜水 1.0 cc で稀釈してふたたび冷却する。

還元 : これに 6N 塩酸 1.0 cc と亜鉛末約 0.2 g とを加え, 室温で 15 分間放置して還元を行う。蒸溜水 4.0 cc で稀釈し, よく混和してから未反応の亜鉛末を濾去する。

ジアゾ化および発色 : この濾液 1.0 cc に NaNO₂ 水溶液 0.5 cc を加えて 2~5 分間放置し, 過剰の NaNO₂ を分解するため, NH₄SO₃NH₂ 水溶液 0.5 cc を加えて 2~5 分間放置する。エタノール 2.5 cc と β-diethyl-aminoethyl-α-naphthylamine oxalate 水溶液 0.5 cc とを加えて, 少なくとも 60 分間放置して十分発色させたのち, 別に作製した盲検を対照として波長 560 mμ における吸光度を測定する。

* Oxidative Metabolism of Phenylacetic Acid by *Penicillium chrysogenum* Q 176. Part XI.

A Colorimetric Method for the Microdetermination of Phenylacetic Acid.

By Masao ISONO (Institute for Fermentation, Osaka) and Kikuko YOSHINO (Osaka Factory, Takeda Pharmaceutical Industries, Ltd.)

濃度の算出 : 測定した吸光度を PAA 標準溶液から求められる標準定量曲線の回帰式に代入して検液中の PAA 濃度を算出する。

盲検 上記の蒸発乾固した検体の代りに 0.1 N NaOH 0.1 cc を蒸発乾固させたものにつき上記の定量操作を行って作製する。

B. 実験結果

I. ニトロ化試薬の検討 PAN 等の定量においては 20% KNO_3 -濃硫酸溶液 0.25 cc, すなわち KNO_3 全量として 50 mg を PAA のニトロ化に使用している。しかしながら著者等の定量法でこの試薬を使用するときはニトロ化試薬中に存在する硝酸によつてニトロ基の還元が阻害され、発色が完全に行われない。第 1 図は PAA のニトロ化に必要な KNO_3 の量を定めるため、ニトロ化試薬の KNO_3 濃度を变化させて PAA 100 γ の定量を実施し、最大吸光度を 100% として比較した結果を示したものである。すなわち PAA 100 γ の定量に必要な KNO_3 の最少量は約 0.15 mg で PAN 等の用いた試薬にくらべるとはるかに少ない。一方 KNO_3 による阻害はその量が少ないほど軽減され、 KNO_3 1 mg 以下でその阻害は全く認められなくなる。以上の実験結果から著者等は PAA のニトロ化に必要にして十分な KNO_3 を含みかつ還元に対する阻害のないニトロ化試薬として 0.2 % KNO_3 -濃硫酸溶液 0.2 cc (全量として 0.4 mg) を使用することにした。

II. 還元剤の検討 還元剤としては亜鉛末を選び、操作の簡易化をはかるため室温で還元を行うことにした。ニトロ化試薬は硫酸を含むから、ニトロ化した検体を蒸留水で稀釈したものに亜鉛末を加えるだけでもニトロ基の還元が行われるが、その還元は十分でない。この場合塩酸を加えることによつて還元を定量的に行わせることができる。第 2 図は塩酸を種種の濃度で用いて PAA 100 γ の定量を実施して得た結果を示したものである。すなわち亜鉛末によつて完全な還元が行われるために必要な塩酸の最低濃度は約 2.5 N で、濃度がこれより高いときはいずれも完全な還元が行われる。以上の実験結果から著者等はニトロ化した検体を蒸留水 1.0 cc で稀釈しこれに 6 N 塩酸 1.0 cc (最終塩酸濃度として 2.7 N) と亜鉛末 0.2 g とを加えて室温で還元する方法を採用した。

III. ジアゾ化試薬および発色試薬使用量の検討 著者等の定量法は還元によつてできるアミンを NaNO_2 でジアゾ化し、過剰の NaNO_2 を $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ で分解してから β -diethylaminoethyl- α -naphthylamine と

第 1 図 定量におよぼす KNO_3 量の影響

第 2 図 ニトロ基の還元におよぼす塩酸濃度の影響

第 3 a 図 定量におよぼす NaNO_2 量の影響

第 3 b 図 定量におよぼす $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ 量の影響

第 3 c 図 定量におよぼす β -Diethylaminoethyl- α -naphthylamine Oxalate 量の影響

作用させて発色させるもので、この定量に必要な各試薬を検討した。第 3a~c 図は種類の試薬量で PAA 100 γ の定量を実施して各吸光度を比較した結果を示したものである。各図で明らかのように PAA 100 γ の定量に必要な最少試薬量はそれぞれ NaNO_2 0.04mg, $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$ 0.25 mg, β -diethylaminoethyl- α -naphthylamine oxalate 0.3 mg である。なおどの試薬を過剰に加えても阻害はなく、つねに定量的な結果が得られた。

IV. 発色後の色調の変化 β -Diethylaminoethyl- α -naththylamine の作用で発色する色素は第 4 図に示すような吸収スペクトルを与え、その最大吸収は波長 560 $m\mu$ の位置にある。この色素は水に難溶なため、発色を円滑に行わせるためにはエタノールを加える必要がある。第 5 図は PAA 100 γ の定量における被検液のエ

第 4 図 フェニル酢酸 100 γ の定量により発色する色素の吸収スペクトル

第 5 図 エタノール濃度と発色速度との関係
エタノール濃度: -●-●-●=0%, -○-○-○=10%, -△-△-△=20%, -■-■-■=30%, -□-□-□=50%, -▲-▲-▲=70%

タノール濃度と発色速度との関係をしらべた結果を示したものである。すなわちエタノールを添加しない場合は 180 分後においてもなお発色が完結しないが、エタノールを高濃度に添加するほど発色速度が増し、エタノール濃度が 50% 以上の場合は 60 分以内に発色が完結する。なお発色が完結したのちの色調は安定で 6 時間後においてもその変化する事実が認められなかつた。

第 1 表 標準フェニル酢酸の定量によって得られる吸光度、相関係数、回帰式および標準推定誤差

フェニル酢酸 (γ) 吸 光 度*	Y X	蒸 溜 水 で 稀 釈					ト ル エ ン で 抽 出				
		100	200	300	400	500	100	200	300	400	500
		0.198	0.405	0.621	0.831	1.042	0.184	0.362	0.541	0.754	0.934
相 関 係 数	$r = \frac{S_{xy}}{S_x \cdot S_y}$	0.9954					0.9962				
回 帰 式	$\hat{Y} = \bar{y} + \frac{S_{xy}}{S_x^2} X$	$\hat{Y} = 469 X + 8.9$					$\hat{Y} = 524 X + 9.9$				
推定誤差 (γ)	$S_{yx} = \frac{S_y^2 - (S_{xy})^2 / S_x^2}{N - 2}$	14.1					12.7				

* 各吸光度は 5 回の測定値の平均で示した。

第 2 表 定量におよぼす o-ハイドロキシフェニル酢酸の影響

フェニル酢酸添加量	o-ハイドロキシフェニル酢酸添加量	添加酸の比*	吸光度	フェニル酢酸定量値	収 率
100	250 γ	2.50	0.204	116.3 γ	116.3%
200	250	1.25	0.385	211.6	105.8
300	250	0.83	0.563	304.9	101.6
400	250	0.62	0.772	414.4	103.6
500	250	0.50	0.954	509.3	101.9
—	250	—	0.048	—	—
—	500	—	0.097	—	—

* 添加酸の量比は o-ハイドロキシフェニル酢酸/フェニル酢酸

第 3 表 定量におよぼすペニシリン G の影響

フェニル酢酸添加量	ペニシリン G 添加量	吸光度	フェニル酢酸定量値	収 率
100 γ	5000 units	0.173	100.6 γ	100.6%
200	5000	0.360	198.5	99.3
300	5000	0.548	297.1	99.1
400	5000	0.755	405.5	101.4
500	5000	0.933	500.8	100.2
—	5000	0.003	—	—
—	10000	0.035	—	—

第 4 表 定量におよぼす Cornsteep Liquor の影響

フェニル酢酸添加量	C. S. L. 添加量	吸光度	フェニル酢酸定量値	収 率
100 γ	6%	0.195	112.1 γ	112.1%
200	6	0.365	201.2	100.6
300	6	0.555	300.7	100.2
400	6	0.765	410.8	102.7
500	6	0.935	499.8	99.9

V. 標準曲線の測定 トルエン 5.0 cc

で抽出した場合とトルエン抽出の代りに蒸溜水で 5 倍に希釈した場合とについて PAA 標準溶液の定量を実施し、PAA の濃度と吸光度との関係をしらべた結果、両者間の相関性は極めて高く定量に満足なことを認めた。第 1 表は 100, 200, 300, 400 およ

び、500 γ の PAA の定量をくりかえし実施して得た吸光度の平均値と、各測定値から求めた相関係数、回帰式および推定標準誤差を示したものである。したがって実際の定量に当つてはトルエンで抽出した場合の回帰式に吸光度を代入して PAA の濃度を算出することができる。

VI. α -ハイドロオキシフェニル酢酸、ペニシリン G および Cornsteep Liquor の影響 本法はベンゼン核のニトロ化に基いた定量法であるから、検体に含まれる芳香族化合物の影響が問題となる。ペニシリン醗酵液中の PAA の定量に当つては少くとも PAA の代謝中間物質である α -ハイドロオキシフェニル酢酸とペニシリン G との影響が考えられる。なおペニシリン醗酵の培地として一般に使用されている cornsteep liquor は芳香族アミノ酸類の存在が考えられるから、cornsteep liquor についてもその影響が考慮されなければならない。第 2, 3 および 4 表はそれぞれ α -ハイドロオキシフェニル酢酸、ペニシリン G および cornsteep liquor の PAA の定量におよぼす影響についてしらべた結果を示したものである。すなわち α -ハイドロオキシフェニル酢酸の場合はその濃度が PAA の濃度に比べて大きいときにはややその影響を受けるが、両者の比が 1 より小さいときにはその影響を無視することができる。またペニシリン G および cornsteep liquor の場合はいずれもそれらの影響が定量誤差の範囲を出ない。

要 約

著者等はフェニル酢酸をニトロ化するとともにこれを還元してアミノ基となしそのジアゾ反応によつて発色する色調を比色するフェニル酢酸の微量定量法を設定した。その定量範囲はフェニル酢酸 50~500 γ 、標準推定誤差は約 13 γ である。また本法はペニシリン醗酵液中に含まれるペニシリン G、cornsteep liquor の影響はもちろ、 α -ハイドロオキシフェニル酢酸の影響も殆ど受けないばかりでなく操作も簡単であつて、ペニシリン工場現場における定量法として推奨できるものである。

終りに臨み御懇篤な御指導を賜つた坂口謹一郎教授に謹んで御礼申上げるとともに、終始御指導と御鞭撻とを賜つた醗酵研究所長佐藤喜吉博士、主任研究員阿部又三博士ならびに武田薬工製薬部第 5 課長日下鋼治博士に深甚の謝意を表します。

(1) D. J. D. HOCKENHULL, A. D. WALKER, G. D. WILKIN, F. G. WINDER : <i>Biochem. J.</i> , 50, 605 (1952).	月例会 (1949).
(2) 青木 俊 和, 谷 口 泰 雄 : <i>J. Antibiotics (Japan)</i> , 4, 105 (1951).	(5) 磯野正雄 : 本誌, 27, 193 (1953).
(3) 古武弥久, 笹井 章, 斎藤芳江 : <i>J. Antibiotics (Japan)</i> , 4, 301 (1951).	(6) S. C. PAN, D. PERLMAN : <i>Anal. Chem.</i> , 26, 1432 (1954).
(4) 滝浦 深, 吉田恵子 : 薬学会西部支部 10	(7) R. KAPPELLER-ADLER : <i>Biochem. Z.</i> , 252, 185 (1932).
	(8) A. C. BRATTON, E. K. MARSHALL : <i>J. Biol. Chem.</i> , 128, 537 (1939).

牛 乳 の 糖 類 に つ い て*

佐々木林治郎, 谷 口 宏 吉 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 31 年 7 月 16 日 受 理

緒 言

牛乳の炭水化物は主に乳糖であるが、その他の炭水化物の存在については種々な報告がある。

SEBELIEN⁽¹⁾ は牛乳にフルフラールを生ずる物質の存在することを認め、LAXA⁽²⁾ もまたフルフラールを生ずるペントースの存在することを知り、これは飼料から由来するものであると報告している。WHITNAH⁽³⁾ は牛乳に酵母を働かせてその旋光度の変化より 0.00~0.35% のグルコースが存在することを主張し、一方 S. G. JONES⁽⁴⁾ も同様に酵母を用いてその還元力の減少より 0.02~0.15% 程度のグルコースが存在すると報告している。

* On the Existence of Carbohydrates in Cow's Milk.

By Rinjirō SASAKI and Kokichi TANIGUCHI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)