- siol.*, 31, 81 (1956).
- (6) J. H. Roe : *J. Biol. Chem.*, 107, 15 (1934).
- (7) 藤田秋治 : 「ビタミン定量法」, p. 542, 南江堂, 東京 (1955).
- (8) J. W. Dubnoff, H. Borsook : *J. Biol. Chem.*, 138, 381 (1941).
- (9) A. Millerd, J. Bonner, B. Axelrod, R. S. Bandurski : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 37, 855 (1951).
- (10) 永井康豊 : 本誌, 32, 851 (1958).
- (11) G. Nétien, M. Briffaz : *Bull. mens. soc. linnéenne Lyon*, 20, 179 (1951); *C. A.*, 46, 3202.
- (12) J. B. Carlson : *Iowa State Coll. J. Sci.*, 29, 105 (1954); *C. A.*, 48, 12910.
- (13) E. V. Miller, A. E. Miller, E. Mesiano : *Botan. Gaz.*, 117, 76 (1955).
- (14) F. A. Haskins, H. W. Chapman : *Physiol. Plantarum*, 9, 356 (1956).
- (15) E. L. Petersen, A. W. Naylor : *ibid.*, 6, 816 (1953).
- (16) V. A. Greulach : *Botan. Gaz.*, 114, 481 (1953).
- (17) M. G. Payne, J. L. Fults : *Am. Potato J.*, 32, 144 (1955); *C. A.*, 49, 10447.
- (18) C. Livingston, M. G. Payne, J. L. Fults : *Botan. Gaz.*, 116, 148 (1954).
- (19) J. Bonner, A. Millerd : *Arch. Biochem. and Biophys.*, 42, 135 (1953).
- (20) G. S. Beaudreau, L. F. Remmert : *ibid.*, 55, 469 (1955).
- (21) G. G. Laties : *Plant. Physiol.*, 28, 557 (1953).
- (22) A. P. Withrow, J. B. Wolff : *Physiol. Plantarum*, 9, 339 (1956).
- (23) F. M. R. Isenberg, C. O. Jensen, M. L. Odland : *Science*, 120, 464 (1954).

P. ovalis 並びに *P. fluorescens* による gluconate 及び 2-ketogluconate 生成に対する鉄の影響について

高 橋 健, 栢 森 寿 (東京農工大学農学部)

昭和 33 年 3 月 28 日 受 理

所謂酸化醗酵並びにそれに関連する醗酵に於ける鉄の影響についてはいくつかの報告がある。

即ち Koepsell⁽¹⁾ は *P. fluorescens* による gluconate より pyruvate, α -ketoglutarate の生成に, MacGee, Doudoroff⁽²⁾ は *P. saccharophila* の 6-phosphogluconate より 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate の生成に, 朝井, 相田⁽³⁾ 等は *Serratia marcescens* の pyruvate, α -ketoglutarate の生成に, 片桐, 柄倉⁽⁴⁾ 等は *E. coli* による pyruvate からの α -ketoglutarate の生成に各々鉄が必要であると報告している。

一方 glucose $\rightarrow$ gluconate $\rightarrow$ 2-ketogluconate の main path についてはその dehydrogenase が cytochrom に link しているので, ここにも当然鉄は関与している。

我々は主として glucose $\rightarrow$ 2-ketogluconate の経路に対する鉄の影響を調べ若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株等 応用微生物研究所第四研究室保管の *P. ovalis* 40 F (gluconate 生産菌) 及び *P. fluorescens liquefaciens* (2-ketogluconate 生産菌) で下記の如き鉄欠乏培地に 30°, 24 時間, 振盪培養したものを前培養とした。

2. 培養基及び培養方法 基本培養基はグルコース 10%, 醋酸アンモン 0.18%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%, pH 7.0~7.2 で殺菌後 CaCO_3 3.0% を加え 30° で振盪培養した。

鉄の混入を防ぐ為, 無機塩類及び醋酸アンモンは全て特級試薬を用い, グルコースは局方のものを IR 120 及び IRA 410 の樹脂を通過せしめた。水は通常の蒸溜水を更に上記樹脂を通過せしめ, オルガノ社製の水質器で樹脂通過直後 100 万 Ω 以上の抵抗を有するものをポリエチレンフラスコに溜めて使用した。

容器は鉄欠乏培地の場合全て東芝製 Terex を, 含鉄培地には同形の普通硬質ガラスのものをを用いた。

* The Influence of Iron on the Production of Gluconate and 2-Ketogluconate by *P. ovalis* and *P. fluorescens*.

By Takeshi TAKAHASHI and Hisashi KAYAMORI

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

鉄の添加は硫酸第一鉄アンモンを鉄イオンとして 5 p. p. m. 殺菌前に加え、これを含鉄培地（鉄 $\oplus$ 培地）とした。鉄欠乏培地（鉄 $\ominus$ 培地）は上記基本培地そのもので、この場合の鉄含量は正確には測定出来ないが、0.01~0.001 p. p. m. と推定する。

培養条件は種培養の場合と同様 30°, 往復振盪培養である。

3. 定 量 法

還元力：Somogyi 法の変法⁽⁶⁾。

菌体量：nephelometry によったものを乾燥重量に換算した。

溶存カルシウム：常法により蔭酸カルシウムとして KMnO_4 で滴定した。

2-ketogluconate：Stubb⁽⁶⁾等の方法により旋光度と還元力より計算により算出した。

実験結果並びに考察

1. *P. ovalis* 40 F による gluconate の生成

第1図 *P. ovalis* 40 F による gluconate の生成

- (1) 乾燥菌体量
●—● Fe $\ominus$ med. ○—○ Fe $\oplus$ med.
(2) 還元力
■—■ Fe $\ominus$ med. □—□ Fe $\oplus$ med.
(3) 溶存カルシウム
▲—▲ Fe $\ominus$ med. △—△ Fe $\oplus$ med.

したが融点降下はなく、収量より計算して、2-ketogluconate 以外の溶存 Ca の大部は gluconate である事を確認した。

以上により 2-ketogluconate の生成には鉄が可成り重要な役割を果すことが考えられるが、先ず鉄以外の金属イオンについてその影響を調べた（第1表）が鉄のみが 2-ketogluconate の生成に有用であり、他のイオンは

第1表 *P. fluor. liq.* による 2-ketogluconate 生成に対する各種無機塩類の影響

添加化合物	イオンとしての濃度 p. p. m.	実験 1*		実験 2*		
		還元力 cc/cc	溶存 Ca mg/cc	還元力 cc/cc	溶存 Ca mg/cc	乾燥菌体量 mg/cc
—	—	6.8	9.3	2.1	8.9	2.7
Fe $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	44.1	9.0	35.2	8.6	3.1
Mo $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$	0.1	8.4	9.2	3.2	9.2	2.8
Mn $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1	20.0	7.3	39.2	6.6	2.5
Zn $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	8.8	9.2	4.0	9.0	—
Cd $\text{CdSO}_4 \cdot 2\frac{2}{3}\text{H}_2\text{O}$	0.1	8.0	8.9	12.8	8.2	2.5
Co $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	46.5	3.6	49.3	3.6	1.5
Ni $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1	—	—	5.8	9.5	—
Cu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.02	14.8	9.6	3.6	8.4	2.7

* 4 日間培養

鉄の代用とはならなかった。尚第2表の中 Mn, Co については共に還元力は大きい溶存 Ca は少なく、糖が残っている事は明らかである。

次に鉄濃度と 2-ketogluconate の生成との関係を調べた（第2表）所 0.01~0.001 p. p. m. の間に明瞭な境界

第2図 *P. fluor. liq.* による gluconate 並びに 2-ketogluconate の生成

- (1) 乾燥菌体量: ●—● Fe ⊖ med. ○—○ Fe ⊕ med.
 旋光度: ▲—▲ Fe ⊖ med. △—△ Fe ⊕ med.
 (2) 総還元力: ●—● Fe ⊖ med. ○—○ Fe ⊕ med.
 (N/20 Na₂S₂O₃ cc/cc broth)
 グルコース: ▲—▲ Fe ⊖ med. △—△ Fe ⊕ med. (計算による)
 (3) 溶存 Ca (a) 全溶存 Ca ●—● Fe ⊖ med. ○—○ Fe ⊕ med.
 (b) 2-ketogluconate による溶存 Ca.
 ▲—▲ Fe ⊖ med. △—△ Fe ⊕ med.
 (c) 2-ketogluconate 以外のものによる溶存 Ca.
 ■—■ Fe ⊖ med. □—□ Fe ⊕ med.

第2表 *P. fluor. liq.* による 2-ketogluconate 生成に対する鉄濃度の影響

鉄イオン濃度 p. p. m.	還元力 cc/cc	溶存 Ca mg/cc	乾燥菌体量 mg/cc
0.1	40.5	7.5	3.1
0.01	48.8	9.7	3.2
0.001	22.8	11.2	3.0
無添加	19.2	11.6	2.9

4 日間培養

があり、これから推定すると本実験に用いた鉄欠乏培地は略 0.001 p. p. m. の鉄を含むものと考えられる。

3. グルコース、Gluconate に対する resting cell の O₂-uptake 以上により鉄欠乏培地に培養すると gluconate の酸化が著しく阻害されることが明らかになったので、Warburg's monometer により 46 時

間培養した両菌体の O_2 -uptake を比較した (第 3 図). 先ずグルコースに対する O_2 -uptake を見ると, *P. ovalis* 40F, *P. fluo. liq.* の両菌共鉄欠乏培地の方が, 含鉄培地のそれより遙かに大きい, 而してこれが単に栄養欠乏の為菌の発育が悪く, 従って単位菌体量当りの酵素量が増大したというが如きものでない事は, gluconate に対する O_2 -uptake がグルコースの場合と全く逆の結果を示す事からも明かである. 即ち鉄欠乏状態はグルコース酸化をむしろ活性化すると考えられる.

第 3 図 *P. fluo. liq.* (その (1) (2) (3)) 並びに *P. ovalis* 40F (その (4)) の resting cell による O_2 -uptake.

cell suspension 0.5 cc N/5 phosphate buffer (pH 7.0) 1.0 cc
 基質 (250 μM) 1.0 cc 総 量 3.0 cc
 基質 (1) グルコース, (2) gluconate, (3) 2-ketogluconate, (4) グルコース
 ——— Fe ⊖ 培養菌体, - - - - - Fe ⊕ 培養菌体.

次に gluconate に対する O_2 -uptake は予想の如く鉄欠乏培地のものは非常に小さい. 既往の文献⁽⁷⁾によれば酵母抽出液等の培地に培養した *P. fluo. liq.* は gluconate 酸化能がグルコース酸化能より大きい事が明にされている. 本実験の場合含鉄培地では全く同様の事が見られるのに対し鉄欠乏培地では全く逆の関係が見られる.

次に 2-ketogluconate の酸化は鉄の有無に殆んど影響されない. この結果は Koepsell⁽¹⁾ のそれと反するものである.

尚本実験に於ける O_2 -uptake が各基質の dehydrogenase の活性を示すか, それとも他の代謝に起因するものであるかは検討を要する問題であるが, resting cell 並びに cell free extract に於て M/50 NaF により何等阻害を受けないので, 各々基質に対する dehydrogenase の活性と考えてよい.

4. 培養 age とグルコース, gluconic- 及び 2-ketogluconic dehydrogenase の活性 前記の如く 46 時間培養菌体では鉄と各 dehydrogenase との間に明瞭な関係が見られるが, 同じ培養時間でも鉄の有無により可成り age が異なるので培養の各 age について, 各 dehydrogenase の活性を測定した (第 4 図). 図の数値は菌体 1 mg 当り 30 分間の O_2 -uptake である.

即ち glucose dehyd. は培養の極く初期を除き, 常に鉄欠乏培地菌体の方が大きく, max. は含鉄培地のそれの 2 倍に及ぶ.

gluconic dehyd. は全ゆる age に於て含鉄培地の方が大きい, 2-ketogluconic dehyd. は全般に鉄欠乏培地の方が大きい, max. は大差ない.

以上の諸実験により *P. fluo.* をグルコースで培養した場合 glucose dehydrogenase と gluconic と dehydrogenase は鉄の有無により全く逆の態度を示す. 即ち前者は鉄の欠乏で活性化され, 後者は阻害される. 従来鉄欠乏によって活性化される酵素系として FAD 酵素がある^(8,9,10). しかし *P. fluo.* の glucose, gluconic dehydrogenase は共に FAD 酵素とは考えられていない⁽¹¹⁾. 又 gluconic dehydrogenase も鉄酵素であるとは考えられていない⁽¹²⁾. しかしこの様に鉄に対し異った態度を取る事は両酵素の生成の鉄が異った役割をはたすのか, あるいは未だ明確でない両酵素の electron transportation が異ったものではないかと考えられる.

第 4 図 *P. fluor. liq.* の resting cell による O_2 -uptake と age との関係

cell suspension 0.5 cc N/5 phosphate buffer (pH 7.0) 1.0 cc
 基質 (250 μM) 1.0 cc 総量 3.0 cc
 質 (1) グルコース, (2) gluconate, (3) 2-ketogluconate

総括

P. ovalis 40 F 及び *P. fluor. liq.* を用い、グルコースを基質として培養した場合、鉄欠乏培地に於ては glu-cose dehydrogenase が活性化され、gluconic dehydrogenase が阻害される事を認めた。

終りに臨み、御指導を賜った朝井教授、御助言を賜った相田、室岡両氏に深謝する。

- (1) H. J. Koepsell : *J. Biol. Chem.*, 186, 743 (1950).
- (2) J. MacGee, M. Doudoroff : *J. Biol. Chem.*, 210, 617~626 (1954).
- (3) T. Asai, K. Aida, Z. Sugisaki and, N. Yakeishi : *J. Gen. Appl. Microb.*, 1, 308 (1955).
- (4) H. Katagiri, T. Tochikura : *Bull. Agr. Chem. Japan*, 21, 351 (1957).
- (5) 小林達吉, 田淵武士 : 本誌, 28, 171 (1954).
- (6) J. J. Stubb, L. B. Lockwood, E. T. Roe, B. Tabeukin, G. E. Ward : *Ind. Eng. Chem.*, 32, 1626 (1940).
- (7) 朝井勇宜, 室岡治義 : 本誌, 30, 1 (1956).
- (8) 八木国夫, 三橋 進, 小島保彦 : 生化学, 25, 442 (1953).
- (9) 八木国夫, 奥田 潤 : 酵素化学シンポジウム, 10, 219 (1954).
- (10) 須田正己 : 阪大医誌, 2, 15 (1950).
- (11) W. A. Wood, R. F. Schwerdt : *J. Biol. Chem.*, 201, 501 (1953).
- (12) T. Ramakrishnan, J. J. R. Campbell : *Bioch. et Bioph. Acta*, 17, 122 (1955).

動物皮の鞣性に関する化学的研究 (第 6 報)* 皮コラーゲンに対するタンニン酸の吸着性について

佐 藤 泰** (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 4 月 10 日 受理

I. 緒 言

皮コラーゲンとタンニン酸との結合に皮コラーゲンの遊離アミノ基が関与することは Thomas 等⁽¹⁾ 及び Bowes 等⁽²⁾ によって実験的に示された。Gallay⁽³⁾ によれば精製タンニン酸溶液の濃度と吸着量の関係は Freundlich の吸着式に適合するというが、これは限定された濃度範囲に過ぎない。Lloyd⁽⁴⁾ 及び Wilson⁽⁵⁾ は皮粉とすべての

* Chemical Studies on the Tanning Properties of Animal Skin. Part VI. On the Adsorption of Tannic Acid to Skin Collagen. By Yasushi SATO (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

** 現在名古屋大学農学部農芸化学科