- (1) 津郷友吉, 今村経明 : 本誌, 27, 838(1953).
- (2) 今村経明, 斎藤芳枝, 津郷友吉 : 本誌, 29, 261 (1955).
- (3) J. N. Currie : *J. Agr. Res.*, 2, 1(1914).
- (4) D. D. Miller, N. S. Golding : *J. Dairy Sci.*, 32, 101 (1949).
- (5) Orla Jensen : *The Lactic Acid Bacteria* (1919).
- (6) 東大農化教室 : 実験農芸化学, 下巻, p. 602 (1952).
- (7) H. E. Walter et al. : Papers given at 53 th Ann. meeting of A. D. S. A. (*J. Dairy Sci.*, 41, 718 (1958)).
- (8) 今村経明 : 本誌, 34, 383 (1960).
- (9) 津郷友吉, 今村経明 : 本誌, 27, 838(1953).
- (10) J. W. Foster : *Chemical Activities of fungi* 2nd ed., p. 501 (1949).
- (11) W. H. Hoecker et al. : Papers given at 38 th Ann. meeting of A. D. S. A. (*J. Dairy Sci.*, 26, 772 (1943)).
- (12) C. B. Lane, B. W. Hammer : *J. Dairy Sci.*, 21, A 161 (1938)).
- (13) 松山 晃 : 本誌, 28, 299, 304 (1954).
- (14) 佐々木林治郎, 津郷友吉 : 乳の化学, p. 26 (1957).

アセトンを還元してイソプロパノールを 生成する細菌に就て (第 4 報)*

Lactobacillus brevis var. *hofuensis* の酸化還元 反応に関する酵素学的研究 (其の 1)

星野一雄, 宇田川清, 渡部賢三 (協和醸酵工業株式会社)

昭和 34 年 9 月 14 日 受 理

著者の一人, 星野⁽¹⁾がイソプロパノールを異常に生成したアセトンブタノール醗酵醪より分離した一新細菌 *Lactobacillus brevis* var. *hofuensis* は, イソプロパノール, アセトン等の酸化還元反応に関与する特性をもつ。前報に於てはこの反応の菌体による証明を報告したが, 本報では更に本反応の機構に就て酵素学的検討を行うものである。

イソプロパノール, アセトン間の反応をもつ微生物としては酵母が最もよく知られ, 其の他二, 三の細菌に就ても報告がある。著者は前報に於てそれらの微生物と本菌のアセトン還元能力に関する比較を行ったが, 本菌の示す還元力は強く酵母を遙に凌駕するものであった。即ち, 本菌はこの反応を研究する最適の材料であると考えられる。

酵素反応としてはイソプロパノール, アセトン間の反応は, 従来酵母酒精脱水素酵素の一副次反応とされ, Barron⁽²⁾の研究によれば substrate specificity としてエタノールの 6.6% とされている。然るに Theorell⁽³⁾は肝臓酒精脱水素酵素がエタノール以外に高級アルコールと反応することを認めたが, イソプロパノールとは反応しないと報じている。かくの如く酵素としてイソプロパノールを主基質とするものは報告が無く, 酒精脱水素酵素の side reaction としても少々不詳である。本菌はエタノール, グリセリン等を生成することは既に述べたが, これらの酒精類の生成に関与する酵素と本反応の酵素との異同は当然考慮すべき点である。

本報に於ては intact cell, dried cell, crude cell-free extract によるイソプロパノール, アセトン間の反応の証明, crude cell-free extract の示す諸反応の比較, 補酵素の決定及びアセトン還元に於て果糖糖の役割等に就て検討した。

既述の如くエタノール, アセトアルデハイド反応はイソプロパノール, アセトン反応と最も関係の深いものであり, 対称反応として常に併せて検討した。

実験材料及び実験方法

Lactobacillus brevis var. *hofuensis* の培養及び菌体の調製は前報⁽⁴⁾に述べた方法による。

* Studies on Organism Producing Isopropanol from Acetone. Part IV. Enzymological Studies on the Oxido-Reduction of *Lactobacillus brevis* var. *hofuensis*. (1)

By Kazuo HOSHINO, Kiyoshi UTAHAWA and Kenzo WATABE (Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

乾燥菌体 : Dried cell の調製法としては凍結乾燥法とアセトン乾燥法の二つを適用した。前者は intact cell を凍結乾燥機で乾燥し, 更に CaCl_2 上室温で乾燥放置した。後者は intact cell を -15° アセトン中に suspend する Gunsalus⁽⁵⁾ の方法による。

Crude cell-free extract : Sonic oscillator による方法と SiO_2 と共に磨砕する方法とに就て行った。前者は洗滌菌体を pH 6.5, M/15 phosphate buffer に 0.15 gm wet per ml の割に suspend し, Raytheon magnetic constriction sonic oscillator (9 kC, 50 watt) で 30 分処理後 13,000 r. p. m., 20 分冷凍遠心して得た抽出物を以て crude cell-free extract とした。 SiO_2 による磨砕は wet cell を 2.5 倍重量の殺菌剤 SiO_2 と共に乳鉢で磨砕し phosphate buffer で抽出, 同様に遠心して得たものである。

補酵素 : Cell-free extract による補酵素の還元を実験するため DPN, TPN を必要とするので, LePage⁽⁶⁾ 法により豚の肝臓から調製した。純度は TPN 73%, DPN 78% である。

Glucose-6-phosphate (G-6-P), 6-phosphogluconate (6-PG) : Horecker⁽⁷⁾ 法により glucose より調製した。

定量方法 :

- 1) アセトン; Böhme 及び Winkler⁽⁸⁾ 法。
- 2) 麴; McIlroy⁽⁹⁾ 法による。
- 3) 酵素蛋白量; Warburg 及び Christian⁽¹⁰⁾ 法及び Kjerdahl 法による。

Activity の測定 : Cell 及び cell-free extract のイソプロパノール, アセトン又はエタノール, アセトアルデヒド等の酸素還元能力は次の諸法により測定した。

- 1) 2,6-dichlorophenol indophenol の脱色。
- 2) O_2 -up take.
- 3) アセトンの還元率測定。
- 4) イソプロパノール又はエタノールによる還元型補酵素の生成。
- 5) 還元型補酵素によるアセトン又はアセトアルデヒドの還元。

以上の中 1, 2, 3 は cell 及び cell-free extract の何れにでも使用可能であって, その詳細は前報⁽¹¹⁾に於て述べた。又 4, 5 は cell-free extract のみに適用出来るもので, 前者は脱水素酵素, 基質 (alcohol) による reduced pyridine nucleotide の生成, 後者は中間酵素に依って生成した TPNH を以て, 後より添加する基質 (アセトン, アルデヒド) の還元を何れも 340 m μ 吸収で見えるもの。Racker⁽¹²⁾, Stafford⁽¹³⁾ 等の実験を参考にした。

電位の測定 : 2,6-dichlorophenol-indophenol, methylene blue, janus green, neutral red, neo tetrazolium, methylviologen 等の酸化還元指示薬を使用し, 前項の 2,6-dichlorophenol-indophenol 同様, 変色の強さを以て表示した。

実験結果

Intact cell, dried cell, crude cell-free extract によるアセトンの還元 : 菌体による反応に就ては前報に既述した。即培地より遠心洗滌して得た wet cell 及び之を飢餓培地中に incubate して得た菌体は phosphate buffer 中でアセトンを還元する。この際飢餓培養による差は殆んど見られないが, 糖の存在は必要であり, グルコースを補わない時は還元率は 1/10 以下に止るのであって, 糖の重要な役割を示している。

Dried cell, crude cell-free extract によるアセトンの還元は intact cell 同様に起り, グルコースの添加によって促進される(第1図)。但, cell に比し稍弱く, 調製操作による酵素の破壊が推察される。特に sonic oscillator による抽出では残渣にも同様の反応が見られ, 酵素の抽出不完全を物語っている。又 sonic 抽出では 30 分以上の処理は酵素の抽出を増加せず, 却って破壊を伴う事を知った。本実験は液深を 2 cm (液量 18 ml) とし, 経時的に 1 ml 宛 sampling し, 遠心後単位を 2,6-dichlorophenol-indophenol の脱色に依って測定した (第1表)。

第1表 Sonic oscillator による酵素の抽出

min.	unit per ml
15	1.240
30	1.500
45	2.160
60	3.030
90	2.000
120	1.420

供試々料の単位 : 7,140 μ /ml

アセトン還元と anaerobiosis : 本題の培養に於る実験は前報⁽¹³⁾に述べたが, cell-free extract に就て $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を添加して検討した。結果は第2表に示す如く嫌

第 1 図 菌体, 乾燥菌体, 抽出物及抽出残渣によるアセトンの還元

intact cell: 0.052 gm wet per ml
dried cell: 0.01 gm dried matter per ml
crude cell-free extract: 6.2 mg protein per ml
sonic residual: 12.5 mg per ml
acetone: 0.02 M temp: 37°
(1) intact cell+glucose (2) dried cell+glucose
(3) crude cell-free extract+glucose
(4) sonic residual+glucose (5) intact cell
(6) dried cell (7) crude cell-free extract
(8) sonic residual

言われ, それらの dyes の変色状況により系の電位が推定出来る. 本菌はイソプロパノールの他にエタノール, グリセロール, 乳酸, ブチレングリコール等を脱水素する性質をもち, その 2,6-ジクロールフェノールインドフェノール脱色に就ては前報に於て論議した. 本実験に於ては菌体によるこれらの脱水素系と各種の酸化還元試薬との反応を見た. test system は 2,6-dichlorophenol-indophenol 反応を他の dye に就ても適用したものであるが, 2,6-dichlorophenol-indophenol, tetrazolium 以外は嫌気を保つため液上に流動 paraffine を重層し

第 3 表 *L. brevis* var. *hofuensis* による基質と酸化還元指示薬との反応

dye	2,6-dichloro-phenol-indophenol	methylene blue	neo tetrazolium	janus-green	neutral red	methyl viologen
substrate	E_0'					
ethanol	+0.217	+0.01	-0.07	-0.08	-0.33	-0.446
propanol	+	+	+	+	+	—
isopropanol	++	++	++	++	++	—
butanol	+	+	—	+	—	—
isobutanol	++	+	+	+	—	—
sec-butanol	+++	++	+++	++	++	—
glycerol	+	+	+	+	+	—
1,4-butyleneglycol	+	++	++	+	—	—
1,3-butyleneglycol	++	++	++	++	++	—
2,3-butyleneglycol	+++	++	+++	++	—	—

酸素の吸収: 前述の如く本菌の cell 及び cell-free extract は基質 (イソプロパノール, エタノール等) の存在する時には methylene blue を還元する. 而して之を好気下に行えば O_2 を吸収する故, ワールブルグ検圧計を以てこの O_2 -uptake を測定し得る. 但し本菌は methylene blue を添加しなくとも酸素の吸収は多少弱まるが観察されるのであって, これらをイソプロパノール, エタノールの二つの基質に就て実験した結果を第 2 図に掲げた. 之よりイソプロパノールの O_2 -uptake velocity はエタノールより大であり, この傾向は cell, cell-free extract の何れを問わず, 又 methylene blue の有無に不拘認められ, 且イソプロパノール濃度はエタノールに比し dilute であることを観察した. 以上の関係は前報に記述した 2,6-dichlorophenol-indophenol 脱色の場合と一致する.

補酵素の還元: 脱水素酵素系による補酵素の還元反応は多数の研究により証明され, 且酵素反応を化学量論

第 2 表 Cell-free extract によるアセトン還元に対するハイドロサルファイトの効果

	アセトン還元率(%)
glucose 添加	95.0
glucose+ $Na_2S_2O_4$	89.8
glucose, $Na_2S_2O_4$ 添加せず	10.0
CH_3COCH_3 : 0.004 M, $Na_2S_2O_4$: 0.01 M	
Protein: 5.8 mg per ml, 37°, 6 hrs.	

気の効果は認められず, アセトンの還元は菌体同様好気下で進行するものと思われる.

酸化還元系の示す電位: 本菌によるイソプロパノールの酸化反応では 2,6-ジクロールフェノールインドフェノール, メチレンブルー等の酸化還元試薬を還元変色せしめることは既に述べた. これらの試薬は更に低い電位をもつ脱水素系より酵素的に離れた水素によって還元されるものと

た. この結果は一定時間の指示薬の変色強度を記号によって表示した(第 3 表). 同表よりイソプロパノール酸化系の電位は sec-butanol, 1,3-butyleneglycol の酸化系と共に相当低く, -0.3 volt 以下と推定される. エタノール酸化系は neutral red を還元し得ず, 本菌に於ては isopropanol 系より高電位にあるものと思われる. 尚これらの反応は intact cell, crude cell-free extract の何れによっても生起する.

第2図 菌体及び抽出物による酸素の吸収
 cell: 200 mg (wet) in ml
 cell-free extract: 2.5 mg protein in ml
 — イソプロパノール 0.1M — エタノール 0.5M

第3図 Crude cell-free extract による基質の酸化と pyridine nucleotide の還元

tris (hydroxymethyl)-aminomethane buffer pH 8.6, substrate 0.033M, DPN, TPN 25μM, Protein 36γ (Ethanol, TPN および Ethanol, DPN, TPN) 360γ (その他)

- (1) isopropanol, TPN, DPN (4) ethanol, TPN
 (2) " TPN (5) " DPN
 (3) ethanol, TPN, DPN (6) isopropanol, DPN

第4表 乾燥菌体によるアセトン還元に対する NaF, CH₂I·COOH の影響

反応時間(時)	アセトン還元率 (%)			糖消費率 (%)		
	2	4	6	2	4	6
glucose 添加せず	0	0	0	11.2	—	29.7
glucose 添加	0	5.3	40.4	3.6	13.6	17.6
glucose 添加, acetone 添加せず	10.9	71.6	98.8	9.9	34.3	45.2
glucose+NaF 0.02 M	0	11.2	45.8	0.2	11.2	21.2
glucose+CH ₂ I·COOH 0.01 M	0	0	0	0	0	0
glucose+CH ₂ I·COOH 0.005 M	0	0	2.3	0	0.7	6.9
glucose+CH ₂ I·COOH 0.0025 M	0	0	3.9	0	—	7.7

濃度: acetone 0.004 M, glucose 0.0025 M
 cell (dried) 0.01 g in ml

的に処理するに使用される。

例えば Racker⁽¹⁴⁾ は yeast alcohol dehydrogenase による DPN の還元を報じ, De-Moss⁽¹⁵⁾ は *Leuconostoc mesenteroides* から DPN, TDN を還元する酒精脱水素系を確認した。また Bonnichsen⁽¹⁶⁾ は horse liver ADH の DPN-link, Stafford⁽¹³⁾ は wheat germ の ADH が DPN, TPN に link することを報じている。本菌のイソプロパノール及びエタノール脱水素に於ても電位等より補酵素の還元が考えられるので、豚肝臓より得た DPN, TPN を以てその還元を spectrophotometric

に測定した。結果は第3図に示す如く両基質に関し DPN, 又は TPN を要求するものの前者は specificity 低く TPN-link が強い。又基質の面より見ればイソプロパノールではエタノールの場合に比し生成する TPNH 量は大であるがその生成初速度は劣るのであって、此点前項の酸素吸収とは substrate specificity に関して相反する結果となり、重要な所見と考える。この事実に基づいては次報に於て更に検討する。

解糖とアセトンの還元: Cell 及び cell-free extract によるアセトンの還元に対してはグルコースが顕著な効果を示すことは既に述べたが、この現象を解明するに当っては本菌の解糖経路を明らかにしなければならぬ。

グルコースの代謝として微生物に於て問題とされるものは Embden-Meyerhof による嫌気酸酵としての

pathway と Gunsalus⁽²⁰⁾ 及び Wood⁽²¹⁾ 等の提案した hexosemonophosphate shunt がある。本菌のアセトン還元を除くは寧ろ好気条件を可とする事はしばしば述べた。ここに注目すべきことは本菌の aldolase 反応は酵母に比し遙かに微弱であり、更にアセトンの還元に対する NaF, CH₂I·COOH の影響を試験した結果、第4表に見られる如くアセトンの還元は NaF

第4図 抽出物と基質による TPN の酸化還元
glycylglycine buffer (pH 7.5) 0.014M, $MgCl_2$ 0.007M, TPN 200 μ M, G-6-P, 6-PG 300 μ M, acetone 10 mM (1), 5 mM (3), methylethylketone 10 mM, acet-aldehyde 20 mM, protein 0.2 mg in ml (1) (2), 0.5 mg in ml (3), Total volume 2.8 ml.

に依って寧ろ促進される傾向を示す。これらの事実より本菌の解糖経路としては後者を有力と見る可能性を得た。故にこの pathway の中間体と思考される glucose-6-phosphate (G-6-P), 6-phosphogluconate (6-PG) を使用し cell-free extract と TPN を以て基質の還元反応との couple を見た。即ち添加した TPN は cell-free extract 存在下に G-6-P 又は 6-PG に依って還元されて TPNH と

なり、この TPNH は後刻添加するアセトン又は methylethylketone を還元する。またこの際アセトンの代りにアセトアルデハイドを添加すればHの移行は極めて速であって、TPNH は瞬時に消失する。このアセトン、アセトアルデハイド両基質の特異性も又 O_2 -uptake の場合と相反するものであるが、此点は更に次報に於て論及する (第4図)。

考 察

Lactobacillus brevis var. *hofuensis* のもつアセトン還元機構を解明する為 intact cell, dried cell, crude cell-free extract に就てイソプロパノール、アセトン等の酸化還元反応に関して検討を加えた。アセトンの還元反応は三者共に認められ、之が酵素反応によるものである事を推測し得る。既述の如く本菌はその糖の醗酵過程に於てエタノール、乳酸、酢酸と共にイソプロパノールも生成するものであって、この反応は代謝の一環を果しているものと思われる。

本菌のもつ各種脱水素系の電位の中エタノール系のそれは Kalchar⁽²⁰⁾ の値 -0.163 volt (pH 7.0) に近いものと思われるが、イソプロパノール系の値は Wurmser⁽²¹⁾ の報する -0.263 volt (pH 7.0) よりも低い電位が推測される。これらの電位は Borsook⁽²²⁾ 等の得た pyridine nucleotide の電位に近く、これらの基質の脱水素に当っては酵素的に pyridine nucleotide への水素の流が考えられる。dye の存在する時には更に Wilson⁽²³⁾ 等の指摘する flavoprotein の役割が考慮されるが、本実験に於ては特に此の点に関し酵母を対称として substrate specificity の面より検討すべきものと考えらる。

本菌のイソプロパノール、アセトン等の酸化還元反応が flavoprotein と密接な関係にあると思われる事は前報に例証したが、本実験よりイソプロパノール酸化系の電位差が酵母の場合より低い数値を得た事は flavoprotein との関連に就て示唆に富む結果を与えるものと考えらる。近年脱水素酵素系の解明が進むに従いその電位差の移動に補酵素が関与することは Crane⁽²⁴⁾ の flavoprotein complex 等に就て報告されている。本菌のイソプロパノール酸化系の電位も flavoprotein の関与により既報の数値より相当低く恐らく -0.3 volt 以下を維持し、之がイソプロパノールの酸化を推進するものと考えられる。本題と関連して興味深い事実は Müller⁽²⁵⁾ 及び Barron⁽²⁶⁾ 等に依って行われた yeast cell 及び yeast alcohol dehydrogenase によるエタノール、イソプロパノールの酸素吸収の数値であってエタノール：イソプロパノール = 1000 : 0 (cell), 1000 : 66 (ADH) の比を得ており、本菌の場合とは相反する結果である。尚 DeMoss⁽¹⁵⁾ の *Leuconostoc mesenteroides* の TPN-linked alcohol

dehydrogenase もイソプロパノール, アセトン等の反応を catalyze しないと言う結果を報じており興味深い。

Crude cell-free extract による TPNH の生成及び生じた TPNH によるアセトアルデヒド, アセトンの還元反応に於ては前者が速度大であつて, この点 O_2 -uptake に於ける基質の特異性とは相反する結果を得た。この事実は前述の酵母の O_2 -uptake に於けるエタノール, イソプロパノール両基質に対する速度と考え合わせ, 本菌のイソプロパノール脱水素とエタノール脱水素両系の flavoprotein affinity, 更に両酵素の異同に迄発展する問題を含むものと考えられるが, 此の点に関しては次報に於て論及する。

アセトンの還元を除してグルコースのもつ効果は顕著であつて解糖系と密接な結付が考えられるが, 本実験の結果はグルコースがその解糖経路に於て H-donor として働き, その仲介は TPN によることを大略明にし得た。DPN-specificity は TPN に比べて低く, エタノール, アセトアルデヒド反応に於ても同様の傾向を示し, 此点 DeMoss⁽¹⁵⁾ の *Leuconostoc* の場合に似ていると言える。

要 約

- (1) *Lactobacillus brevis* var. *hofuensis* の intact cell, dried cell 及び crude cell-free extract によるアセトンの還元を証明した。
- (2) アセトンの還元はグルコースの添加により向上する。
- (3) 嫌気条件はアセトン還元に必ずしも良い結果を与えない。
- (4) アセトンの還元は NaF に依つて促進される。
- (5) Intact cell 及び cell-free extract を使用し, 各種の酸化還元指示薬によって本菌のもつ諸脱水素系の電位を見た。
- (6) エタノール, アセトアルデヒド系の電位は -0.15 volt, イソプロパノール, アセトン系では -0.3 volt 近傍にある。
- (7) Cell 及び cell-free extract により基質 (alcohols) 存在下に酸素吸収が起ることを証明した。
- (8) 酸素吸収はメチレンブルーの存否に拘らず起る。
- (9) 酸素吸収速度はイソプロパノールがエタノールに勝る。
- (10) Cell-free extract による pyridine nucleotide の還元試験を試みた。
- (11) イソプロパノール, エタノール両脱水素反応に於ては TPN 又は DPN を要求し, TPN-specificity が強い。
- (12) 本脱水素反応速度はエタノールの場合がイソプロパノールに勝る。
- (13) アセトン及びアセトアルデヒド還元の際に H-donor としてのグルコースの役割を明らかにした。
- (14) この反応に於ける速度はアセトアルデヒドがアセトンに勝る。

本研究に当り終始御懇切な御指導を頂きました応用微生物研究所長朝井教授, 農学部山田教授, 有馬教授に深甚なる感謝を捧げます。又実験に種々御教授頂きました応用微生物研究所第一研究部北原教授, 第五研究部丸尾教授, 第一研究部福井助教授に厚く御礼申し上げます。又研究と発表に便宜を与えられました協和醸酵工業株式会社社長加藤井三郎氏, 副社長桑田猛氏, 専務渡辺博氏に感謝申し上げます。

(本報告は昭和34年7月18日, 日本農芸化学会関東支部第194回講演会に於て講演した。)

(1) 星野一雄: 本誌, 33, 212 (1959).	(8) H. Böhme, O. Winkler: <i>Z. Physiol. Chem.</i> , 296, 274 (1954).
(2) E. S. C. Barron, S. Levine: <i>Acta. Biochem.</i> , 41, 175 (1952).	(9) R. J. McIlroy: The chemistry of the polysaccharide (1947).
(3) D. Theorell, R. Bonnichsen: <i>Acta. Chem. Scand.</i> , 5, 1105 (1951).	(10) O. Warburg, W. Christian: <i>Biochem. Z.</i> , 310, 384 (1941).
(4) 星野一雄, 宇田川清, 渡部賢三: 本誌, 34, 328 (1960).	(11) 星野一雄: 本誌, 34, 333 (1960).
(5) I. C. Gunsals: <i>Meth. Enz.</i> , 1, 51 (1955).	(12) E. Racker: <i>J. Biol. Chem.</i> , 184, 313 (1950).
(6) G. A. LePage: <i>J. Biol. Chem.</i> , 168, 623 (1947).	(13) H. A. Stafford, B. Vermesland: <i>Arch. Biochem.</i> , 44, 404 (1953).
(7) J. E. Seegmiller, B. L. Horecker: <i>J. Biol. Chem.</i> , 192, 175 (1951).	(14) E. Racker: <i>Physiol. Revs.</i> , 35, 1 (1955).

- (15) R. D. DeMoss : *J. Bact.*, 68, 252(1954).
 (16) R. K. Bonnicksen : *Acta. Chem. Scand.*, 4, 715 (1950).
 (17) H. Theorell, B. Chance : *Acta. Chem. Scand.*, 5, 1127 (1950).
 (18) I. C. Gunsalus, M. Gibbs : *J. Biol. Chem.*, 194, 871 (1952).
 (19) W. A. Wood : *Bact. Revs.*, 19, 222(1955).
 (20) H. M. Kalckor : *Chem. Revs.*, 28, 71 (1941).
 (21) R. Wurmser, S. Filitti-Wurmser : *J. Chim. Phys.*, 33, 577 (1936).
 (22) H. Borsook : *J. Biol. Chem.*, 135, 543 (1940).
 (23) K. Burton, T. H. Wilson : *Biochem. J.*, 54, 86 (1953).
 (24) F. L. Crane, J. G. Hauge, H. Beinert : *Federation Proc.*, 14, 199 (1954).
 (25) D. Müller : *Biochem. Z.*, 268, 152(1934).
 (26) E. S. G. Barron, S. Levine : *Acta. Biochem.*, 41, 175 (1952).

肉類の貯蔵に関するポーラログラフ的研究 (第 9 報)*

牛肉の有機酸並びに遊離アミノ酸類に及ぼす γ 線照射の影響

小原哲二郎, 小笠原八十吉 (東京教育大学農学部農業化学科)

昭和 34 年 10 月 15 日 受 理

緒 言

第 8 報⁽¹⁾に於いて著者等は, ポリセロで真空包装した γ 線照射牛肉の 20° 貯蔵過程に於ける臭, 色, Walkiewicz 反応, pH, 水分量並びに抽出液蛋白量の変化に関する実験を行ない, ポリセロ包装の照射肉では長時日の室温貯蔵に堪え得ることを明らかにした。

著者等は既に第 6 報⁽²⁾に於いて, 薄いポリエチレンで真空包装した γ 線照射牛肉の有機酸並びに遊離アミノ酸類特にクレアチニン及びクレアチンの変化に関する実験を行ない, 70.3 $\times 10^4$ r 照射肉の場合には非照射肉と異った結果は認められなかったが, 259 $\times 10^4$ r 照射肉の場合には著しい変化を示すことを明らかにした。けれどもそれらはいずれも γ 線照射直後の結果であって, 20° 貯蔵過程に於ける詳細な検討を行ったものではなかった。また, 薄いポリエチレンの真空包装では, 貯蔵性の高まった照射牛肉に於いても長時日の室温貯蔵には堪えなかったことも既に明らかにした^(2,3)。

そこで本実験に於いてはポリセロ包装を採用した第 8 報⁽¹⁾で得られた同一照射肉を使用して, 同時に 20°, 52 日後に至るまでの有機酸並びに遊離アミノ酸類, 特にクレアチニン及びクレアチンの変化を比較検討し, 蛋白液の変化を明らかにする上の参考資料を提供した。

実 験 方 法

I. 試料の調製及び照射 第 8 報⁽¹⁾で得られた同一照射肉を使用して本実験を行った。従って試料の調製, 照射並びに貯蔵方法は第 8 報⁽¹⁾と全く同一である。

II. ペーパークロマトグラフの方法 有機酸並びに遊離アミノ酸類特に遊離クレアチニン及びクレアチンを展開する際の試料溶液の調製並びにペーパークロマトグラフの方法は第 6 報⁽²⁾に記載の方法と同一に行った。有機酸のスポットは 0.04% ブロムフェノールブルーの 95% エタノール溶液噴霧法⁽⁴⁾により, またクレアチニン及びクレアチン呈色は Jaffé 反応法⁽²⁾によった。アミノ酸の種類の決定は第 5 報⁽⁵⁾に記述の呈色方法に従って行った。

III. スペクトル測定によるアミノ酸類及び乳酸含有量の決定方法 遊離アミノ酸量はペーパークロマトグラフ法により分離した濾紙上のスポットを切りとった抽出処理液の吸収スペクトル法^(6,7)に, 更に面積法⁽⁸⁾と稀釈法⁽⁹⁾を併用して決定した。ただしこの場合の吸収スペクトル法は柴田氏の提唱するニンヒドリン呈色法^(9,10)により, 日立製光電分光光度計 (EPU-2 型) を使用して決定した。

520 m μ のスペクトル測定による遊離クレアチニン及びクレアチン量の決定方法は第 6 報⁽²⁾に記載の方法と同

* Polarographic Studies on Storage of Meats. Part IX. Influence of Gamma-Ray Irradiation on Organic Acids and Free Amino Acids of Beef.

By Tetsujiro OBARA and Yasokichi OGASAWARA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education)