即ち、穀類関係試料から特徴的に分離される Chromogenic type 及び Fluorescent type *Pseudomonas* はステロイド酸化能を殆んど持っていないが、これに反し油田、天然ガス田関係試料より分離される Achromogenic type 及び Fluorescent type *Pseudomonas* は半数以上がステロイド酸化能を持っていると言える。また酸化能の程度に関しては、菌株選択時のペーパークロマトグラフィーの結果からみると Achromogenic type *Pseudomonas* の中に強力な酸化能を有しているものが比較的多い。

要 約

- (1) 細菌のステロイド酸化能の比較試験を行い、併せて優良菌株の選出を試み次の結果を得た。
- (2) 供試菌株として当研究室において新たに分離した菌株、並びに保存標準株の中で *Pseudomonas* 属 162 菌株, *Micrococcus* 属 24 菌株につき progesterone, Reichstein's comp. S に対して酸化能の比較及び選択を行った結果, *Ps. ovalis*, *Ps. inertia*, *Ps. nitroreductans*, *Ps. rathonis* に属するものに優良菌株を認めた。
- (3) ステロイド酸化能を有する *Pseudomonas* 属菌株の分類学上の位置については、かつて著者の 1 人 (飯塚) 等の提案した本属の 3 大群別、即ち Fluorescent type, Achromogenic type, Chromogenic type とステロイド酸化能との間に、相関性のあることが認められた。

本研究に対して御指導を賜った当研究所津田恭介教授に感謝し、また供試菌株について御援助いただいた駒形和男氏、実験に御協力下さった橋本綾子氏に感謝する。本研究費の一部には文部省科学研究費を使用した。

(1) 飯塚 広, 内藤 敦, 服部昌子: 本誌, 32, 674 (1958).	(6) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann: <i>Science</i> , 111, 6 (1950).
(2) H. Iizuka, A. Naito, A. Hattori: <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 4, 67 (1958).	(7) E. L. Dulaney, W. J. McAleer, M. Koslowski, E. O. Stapley, J. Jaglom: <i>Appl. Microbiol.</i> , 3, 336 (1955).
(3) A. Zaffaroni, R. B. Burton, E. H. Keutmann: <i>J. Biol. Chem.</i> , 177, 109 (1949).	(8) 飯塚 広, 駒形和男: 日農化関東支部例会発表, 昭和 32 年 7 月 (1957).
(4) R. J. Block, E. L. Durrum, G. Zweig: <i>A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis</i> (1955).	(9) 飯塚 広, 駒形和男: 本誌, 34, 27 (1960).
(5) R. J. Block: <i>Paper Chromatography</i> (Laboratory Manual) (1952).	

細菌による 6 β , 14 α -Dihydroxyprogesterone 及び 6 β -Hydroxycomp. S の生成*

(ステロイドと微生物に関する研究 第 3 報)

飯塚 広, 内藤 敦, 大木英二, 佐藤良博, 服部昌子 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 34 年 12 月 28 日 受理

緒 言

前報^(1,2)に引続き当研究室所有の各種細菌について同様に progesterone (I) 及び Reichstein's comp. S (III) に対して酸化能有無の比較選択試験を行ったところ, progesterone (I) に対してのみでなく, Comp. S (III) に対しても強力な酸化能を有する 1 菌株を発見した。この菌株について progesterone 酸化に及ぼす各種培養条件を検討し、最適条件にて大量培養を行った。この酸化成績体は 6 β , 14 α -dihydroxyprogesterone (II), 6 β -hydroxycomp. S (IV) であり、此等は細菌によっては初めて得られたものである。なおその後、白坂氏等も 6 β -hydroxycomp. S (IV) を *Bacillus cereus* によって得たという報告がある⁽³⁾。

なお本研究は 1959 年 4 月、日本農芸化学会大会で発表した。

* Production of 6 β , 14 α -Dihydroxyprogesterone and 6 β -Hydroxycomp. S by Bacteria. (Studies on Steroid and Microorganisms. Part III.)

By Hiroshi IIZUKA, Atsushi NAITO, Eiji OHKI, Yoshihiro SATO and Masako HATTORI (The Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

実 験 の 部

1. ステロイド酸化能を有する細菌の選択方法 前報と同様であるので本報では記述を省略する⁽²⁾。

2. 酸化成績体の検出 各種細菌 300 余株について選択した結果, その中の 1 菌株 *Achromobacter* sp. strain K 40-5 (本菌株は当研究室において新たに分離したものでその分類学的位置については別に報告する⁽⁴⁾) が progesterone (I) に対して作る酸化成績体はペーパークロマトグラフィー⁽⁵⁾によると, かつて著者等が *Aspergillus* 属菌株によって得た 11α -hydroxyprogesterone 及び $6\beta, 11\alpha$ -dihydroxyprogesterone とは異った位置のスポットを作り, かつ融点も異なる (粗結晶 m. p. $235^{\circ}\sim 238^{\circ}$) ところから新物質と推定した. そこでこの酸化成績体を高収量にて得るために培養条件の検討及び大量培養を以下の如く行った.

3. 培地組成と培養時間 出来得るだけ高濃度に基質を添加し, 短時間で酸化を完了させるために種々の培地を調整しての予備試験の結果, 次に示す A 及び B 培地を適当と認めた. 特に B 培地は菌株接種後 48 時間の短時間で基質 progesterone (I) を完全に酸化することが出来た.

調整した培地は 500 ml 容肩付コルベンに 60 ml ずつ分注し 15 lbs (120°) で 15 分加圧殺菌を行う. 醗酵法としては progesterone (I) を各コルベン当り (培地 60 ml) 50 mg/ml メタノール溶液を 1.5 ml 添加した後 *Achromobacter* sp. strain K 40-5 を接種し, 30° , 118 r. p. m. にて培養を行う. 両培地について progesterone (I) を完全に酸化するまでの時間, pH の変化の 1 例を示すと次の通りである.

A 培 地		B 培 地	
グルコース	1.0%	グルコース	1.0%
ペプトン	1.0%	ペプトン	1.0%
肉エキス	1.0%	K ₂ HPO ₄	0.3%
NaCl	0.3%	NH ₄ NO ₃	0.3%
pH	7.2	NaCl	0.3%
		MgSO ₄	0.02%
		FeSO ₄	0.001%
		pH	7.4

培地	初発pH	progesterone 添加量	酸化醗酵の時間	最終 pH
A	7.2	75 mg/60 ml 培地	75 時間	8.6~8.8
B	7.4	75 mg/60 ml 培地	48 時間	7.8~8.0

4. 基質添加法と添加時間 前記の方法にて調整した培地 A・B を用いて次の試験を行った.

a: 菌株接種と同時に 50 mg progesterone/ml メタノール溶液を 2 ml 添加.

b: 菌株接種後 15 時間して 50 mg progesterone/ml メタノール溶液 2 ml を添加.

c: 菌株接種後 15 時間して 100 mg progesterone を結晶のまま添加.

以上の各条件に従って 30° , 118 r. p. m., 48 時間振盪培養を行った. その結果を示すと第 1 表の如くである. ペーパークロマトグラフィーの結果は第 1 図に示す.

第 1 表中の m. p. は培養液より酸化成績体を常法通り酢酸エチルにて抽出後, アセトンより再結した粗結晶のものについての測定値である.

第 1 表からわかるように, a の条件では A・B 両培地共高融点の新酸化物を生成しているが, b 及び c の条件ではいずれも基質をそのまま回収しているに止まっている (progesterone (I) m. p. $=128\sim 130^{\circ}$). それ故に本菌株では基質添加方法としてはメタノールに 50 mg progesterone/ml の割合に溶かし, 菌株接種直前に培地に添加することが適当と考えられる.

第 1 表 Progesterone の添加法及びその時期と progesterone の酸化

添加法	A 培 地			B 培 地		
	初発 pH	最終 pH	酸化成績体 粗結晶 m. p.	初発 pH	最終 pH	酸化成績体 粗結晶 m. p.
a	7.2	8.2	$225\sim 8^{\circ}$	7.4	7.6	$235\sim 8^{\circ}$
b	7.2	8.0	$114\sim 5^{\circ}$	7.4	7.6	$128\sim 30^{\circ}$
c	7.2	6.4	$127\sim 9^{\circ}$	7.4	7.6	$111\sim 113^{\circ}$

第 1 図 ペーパークロマトグラフィー; progesterone の添加法及びその時期と progesterone の酸化

5. 大量培養と酸化成績体

A. Progesterone (I) を基質とした場合： 以上の実験の結果 *Achromobacter* sp. strain K 40-5 による progesterone (I) の酸化を行い、 $6\beta, 14\alpha$ -dihydroxyprogesterone (II) を生成する最適条件は次の如くである。前記B培地 (pH 7.4) に1コルベン (培地 60 ml) に対し progesterone 50 mg/ml メタノール溶液を1.5 ml を添加し、次に菌株を接種して 30° , 48 時間, 118 r. p. m. で振盪培養を行う。最終 pH 7.8~8.0 である。この際生成される progesterone (I) の酸化成績体は $6\beta, 14\alpha$ -dihydroxyprogesterone (II) のみである。

B. Reichstein's comp. S (III) を基質とした場合： ここで使用した *Achromobacter* sp. strain K 40-5 は progesterone (I) に対して強力な酸化能を有していることがわかったので、次に同一条件にて Comp. S (III) の酸化を試みた。即ち培養法としては pH 7.4 に調整したB培地に Comp. S (III) 30 mg/ml メタノール溶液を1 ml を添加し、ついで菌株を接種し 30° で 72 時間振盪培養 (118 r. p. m.) を行った。最終 pH 8.4~8.6 である。この際には Comp. S (III) から生成される酸化成績体は 6β -hydroxycomp. S (IV) のみである。

6. 酸化成績体の分離同定⁽⁶⁾

A. $6\beta, 14\alpha$ -Dihydroxyprogesterone (II) : Progesterone (I) 4 g を基質として上記方法にて酸化醗酵を行い、培養液は等量の酢酸エチルで三回抽出を行う。酢酸エチル抽出液は稀重曹、次に水で洗滌、芒硝で脱水後、減圧で溶媒を溜去して 3.9 g 油状物を得た。アセトンより一回再結し 0.45 g の粗結晶を得、更にエーテル-酢酸エチル再結で、融点 245° $[\alpha]_D +125^\circ$ ($c=1.0$ CHCl_3) の $6\beta, 14\alpha$ -dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione (II) 0.2 g を得た。前記の油状物並びに再結母液全部を合して減圧濃縮し、Florisil クロマトで分離した。即ちベンゼンによって progesterone (I) 粗結晶 0.76 g, またベンゼン：クロロホルム (1:1) によって $6\beta, 14\alpha$ -dihydroxyprogesterone (II) 粗結晶 1.09 g を得た。さらに $6\beta, 14\alpha$ -dihydroxyprogesterone (II) の粗結晶からは再結によって融点 245° の純品 0.58 g を得た。元素分析の結果、分析値は C;72.80, H;8.73% であり、 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_4$ としての計算値は C;72.83, H;8.06% となる。紫外線吸収スペクトルの $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 236 m μ ($\epsilon=16,300$), nujol で赤外線吸収スペクトルをとると波数 3534, 3401 cm^{-1} (OH), 1695 cm^{-1} (20 CO), 1661 cm^{-1} (3 CO), 1623 cm^{-1} (Δ^4) の吸収をみとめた。

$6\beta, 14\alpha$ -Dihydroxyprogesterone (II) は無酢-ピリジンによる常法アセチル化で融点 $173\sim 5^\circ$ の結晶を得た。 $[\alpha]_D +120^\circ$ ($c=1.1$ CHCl_3) 元素分析の結果、分析値は C;70.87, H;8.30% であり、 $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ としての計算値は C;71.10, H;8.30% となる。紫外線吸収スペクトルの $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 236.5 m μ ($\epsilon=14,200$), nujol で赤外線吸収スペクトルをとると波数 3546 cm^{-1} (OH), 1727 cm^{-1} (acetyl CO), 1692 cm^{-1} (20 CO), 1667 cm^{-1} (3 CO), 1618 cm^{-1} (Δ^4) の吸収をみとめた。

B. 6 β -Hydroxycomp. S (IV) : Comp. S (III) 4 g を用いた酸化醗酵液の酢酸エチル抽出液は, progesterone の場合と同様後処理し, 基質 1.7 g を回収, monohydroxyl 化体 6 β , 17 α , 21-trihydroxypregn-4 ene 3,20-dione (IV) 1.4 g を得た. m. p. 224~6°, $[\alpha]_D +60.5^\circ$ ($c=0.63$ EtOH) 元素分析の結果は分析値は C;69.25, H;8.27% であり, $C_{21}H_{30}O_5$ としての計算値は, C;69.58, H;8.35% となる. 紫外線吸収スペクトルの $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 234.8 m μ ($\epsilon=15,600$), nujol で赤外線吸収スペクトルをとると波数 3597, 3484 cm^{-1} (OH), 1706 cm^{-1} (20 CO), 1653 cm^{-1} (3 CO), 1618 cm^{-1} (Δ^4) の吸収をみとめた.

6 β -Hydroxycomp. S (IV) を無酢-ビリジンによる常法アセチル化で元素分析値から diacetate m. p. 186.5 ~187.5° を得た. $[\alpha]_D +75.2^\circ$ ($c=0.8$ CHCl_3), 元素分析の結果分析値は C;67.51, H;7.66% であり, $C_{25}H_{34}O_7$ としての計算値は C;67.24, H;7.68% となる. 紫外線吸収スペクトルの $\lambda_{\text{max}}^{\text{CH}_3\text{OH}}$ 234.3 m μ ($\epsilon=19,200$), nujol で赤外線吸収スペクトルをとると波数 3424 cm^{-1} (OH), 1751, 1724 cm^{-1} (acetyl CO), 1701 cm^{-1} (20 CO), 1681 cm^{-1} (3 CO), 1634 cm^{-1} (Δ^4), 1247 cm^{-1} (acetate の C-O-C) の吸収をみとめた.

要 約

(1) 各種細菌 300 余株について progesterone を基質として酸化能の比較試験を行ったところ, その中の 1 菌株 *Achromobacter* sp. strain K 40-5 が強力な酸化能を有していることがわかった.

(2) 各種培養条件を検討した後に大量培養を行った結果, 酸化成績体としては progesterone (I) を基質とした場合には 6 β , 14 α -dihydroxyprogesterone (II) を, 又 Comp. S (III) を基質とした場合には 6 β -hydroxycomp. S (IV) を作るが, これ以外の酸化成績体は作らなかった. なお此等の酸化成績体は細菌によっては初めて得られたものである.

本研究に対し, 御指導を賜った津田恭介教授に感謝の意を表する. 又元素分析の労をとられた山内宏子氏, 林和子氏, 赤外線吸収を担当された黒沢七瀬氏に感謝する. 尚, 本研究費の一部には文部省科学研究費を使用した.

(1) 飯塚 広, 内藤 敦, 服部昌子: 本誌, 32, 674 (1958).	(5) 発表. 昭和 34 年 9 月 (1959).
(2) 飯塚 広, 内藤 敦: 本誌, 34, 469 (1960).	(5) A. Zabbaroni, R. B. Burton, E. H. Keutnann: <i>G. Biol. Chem.</i> , 177, 109 (1949).
(3) S. Sugawara, M. Tsuruta, M. Shirasaka, M. Nakamura: <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 80, No. 2, 383 (1959).	(6) K. Tsuda, H. Iizuka, E. Ohki, Y. Sato, A. Naito, M. Hattori: <i>J. Gen. Appl. Microbiol.</i> , 5, 7 (1959).
(4) 飯塚 広, 駒形和男: 日農化関東支部例会	

細菌アミラーゼに関する研究 (第 28 報)*

細菌アミラーゼの産生機構 (その 11)

酵素産生に及ぼす金属塩添加の影響 (1)

福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典, 覚前 貢 (大阪市立大学理学部)

昭和 34 年 12 月 29 日 受理

α -アミラーゼは Ca 塩の添加によってその安定性を増大することはかなり古くから知られている. 最近種々起源を異にする α -アミラーゼが結晶状に分離され, その殆んどが Ca を含むことが明かにされた. かくして α -アミラーゼは一種の metalloenzyme であることが判り, この見地から α -アミラーゼの活性と Ca との関係について研究が進められている.

著者等⁽¹⁾はさきに *Bacillus amyloliquefaciens* Fukumoto の洗滌細胞を用い, 可溶性澱粉を呼吸炭素源とした場合のアミラーゼ産生に対する数種金属塩の影響を検討したが, その実験では酵素産生に格別顕著な影響を及ぼす金属塩は見出されなかった. しかしその後酵素活性の発現と金属塩との関係についての最近の知見を考慮し

* Studies on Bacterial Amylase. Part XXVIII. Formation of Bacterial Amylase. (XI) Influence of Metal Salts on Enzyme Formation. (I)

By Juichiro FUKUMOTO, Takehiko YAMAMOTO, Daisuke TSURU and Mitsugu KAKUMAE (Faculty of Science, Osaka City University)