- (1) STUTZER, A. *J. f. Landw.*, 28, 114 (1891)
- (2) BARNSTEIN, F. : *Landw. Vers. Stat.*, 54, 327 (1900)
- (3) SCHJERNING, H. *Z. anal. Chem.*, 39, 545 (1900)
- (4) ALTEN, F. : *Bodenkunde u. Pflanzenernähr.*, 8, 335 (1933)
- (5) 神立, 保井 本誌, 25, 27 (1951)
- (6) 近藤 : 栄研報, 11, 140 (1941)
- (7) 武藤 : 本誌, 24, 325 (1951)
- (8) DITTRICH, W. *Planta.*, 12, 69 (1931)
- (9) CHIBNALL, A. C. *J. Biol. chem.*, 90, 189 (1931)
- (10) VICKERY, H. B. : *ditto*, 132, 325 (1940) ; 144, 719 (1942)
- (11) BLOCK, R. J 105, 457 (1934)
- (12) KLEIN, G. : *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. IV Spezielle Analyse. III, 392 (1933)

Summary.

We designed to study on the distribution of the nitrogen compounds in the leaf of radish, and results obtained are as follows;

- (1) About 65% of total nitrogen in the leaf is non proteinous, especially nitrate and amino nitrogen;
- (2) BARNSTEIN's method precipitates many non-protein nitrogenous compounds with true protein and most of which are amino compounds.
- (3) From the precipitate by BARNSTEIN's method arginine, histidine, glutamic acid, aspartic acid, ammonia and purine-picrate (m. p. 235°C probably hypoxanthine-picrate) are isolated and leucine, alanine, cystine, phenylalanine, valine, serine and asparagine detected by paper partition chromatography.

Lima bean の Phosphorylase*

中 村 道 徳 (東京大学農学部農芸化学科)

昭和 27 年 7 月 23 日 受 理

Lima Bean Phosphorylase.*

by Michinori NAKAMURA (Dept. of Agr. Chem., Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

Phosphorylase は澱粉及びグリコゲン等の合成及び加磷酸分解 (phosphorolysis) に関与する酵素であつて, Corn 等⁽¹⁾によるとその作用機構は次のように表わすことが出来る.

即ち phosphorylase は α -1,4-glucosidic linkages を持つ既存の oligo- 又は polysaccharide の非還元性末端に glucose-1-phosphate (G-1-P) の glucose 残基を α -1,4 結合を作つて附加して炭水化物の鎖長を伸し, amylose 型の多糖類を合成し, 磷酸残基は無機磷酸として放出する. 又は逆に澱粉型の多糖類の非還元性の末端から順次加磷酸分解して G-1-P を生成し, 多糖類の鎖長を短縮する (phosphorylase は α -1,6 結合の生成及び分解は行わない)⁽²⁻⁴⁾. 従つて, 本酵素による多糖類の合成反応に於ては適当な外的条件 (温度, pH 等) と共に酵素, 基質 (G-1-P), 及び適当な炭水化物源 (これを primer 又は activator と呼んでいる) の存在を必要とする⁽⁵⁾. 動物筋肉の結晶酵素では上記 3 要素以外に更に適当な還元剤 (cysteine, glutathione 等) 及びアデニル酸の存在が本

*澱粉の生成及び分解に関する酵素化学的研究 第17報

Studies on the Enzymic Formation and Degradation of Starch. XVII

本報告の要旨は昭和27年6月28日, 第129回日本農芸化学会東京支部講演会に於て発表した.

酵素が full activity を発揮するのに必要である。(1) 植物酵素は何れも未だ結晶化されていないが、相当精製されたもの、例えば馬鈴薯⁽⁵⁻⁸⁾、甘藷⁽⁹⁾、刀豆⁽¹⁰⁾、蚕豆⁽¹¹⁾等に於ては上記 3 要素の存在が必要且つ充分な条件であると信ぜられている。

今までに精製された phosphorylase は殆んど全部上記の作用機構に適合するものであるが、例外として lima bean と甘藷の酵素が primer を必要としないことが報告されている。(4) 前者は GREEN 等⁽⁵⁾により、後者は井上等⁽¹²⁾により精製されたが、何れもその合成反応に於て種々の primer を添加した場合も添加しない場合も、澱粉合成の初速度(無機磷酸の遊離で測定する)が同じであることを見出し、之等酵素による澱粉合成反応には primer の存在は必要でないと結論している。著者は甘藷酵素に対する primer 添加の効果を追試し、精製甘藷酵素は合成反応に於て primer の存在が必要であることを確認した^(9,13)。lima bean 酵素は GREEN 等の馬鈴薯 phosphorylase に関する研究の最後に簡単に触れられているものであつて、詳細なデータは示されていないが、彼等の用いた lima bean 酵素の精製度は馬鈴薯酵素の精製度と略々同じであり、且つ此のものは馬鈴薯酵素の polyhexose catalyst source にはならないから、酵素標品中に primer が混在しているためではないと記載されている。彼等は此の現象を説明するものとして、(1) polyhexose catalyst が本酵素の integral part であるか、又は (2) 反応機構が馬鈴薯酵素等とは異り polyhexose の協同を必要としない、と云う 2 つの可能性を示唆している。lima bean 酵素についてはその後追試されておらず、phosphorylase の作用機構の例外となつていて、その理由は不明のまま残されている^(2, p. 1028)。

著者は此の点を明かにするため lima bean 酵素に対する primer 添加の効果を再検討した。馬鈴薯酵素の精製法に準じて lima bean の水抽出液を硫酸分別及び透析を繰返して精製したが、8 回硫酸で再沈澱して得られた最純酵素標品 (Prepn. LB. B₈) でも、その specific activity (= phosphorylase activity in units (37°)/mg. protein) は 0.62 (原抽出液は 0.14 位) であつて (馬鈴薯酵素は同じ方法で 4 回硫酸分別を行うと 2.0~2.5 位になる⁽⁸⁾)、本酵素の精製度は非常に低かつた。PEAT 等⁽¹⁴⁾の醋酸鉛沈澱-重曹溶液溶出法でも酵素の精製度を上げることは出来なかつた。従つて以下に報告する実験に於てはすべて上記最純標品 (Prepn. LB. B₈) を用いた。

本酵素標品を用いて primer 濃度のみを変えて澱粉合成反応(無機磷酸の遊離を測定する)の過程をみた実験の 1 例を Fig. 1 に示した。図にみられる如く primer を全然添加しないと無機 P の遊離の初速度が大になる。MICHAELIS-MENTEN の式から誘導される式 $S/v = (K_s/V) + (S/V)$ (S = 基質濃度; v = 初速度; K_s = MICHAELIS 恒数; V = 最大速度) によつて S/v を S に対してプロットすると直線が得られ。此の直線の intercept は K_s/V に、slope は $1/V$ に等しい^(15,16)から K_s の値は intercept/slope として求めることが出来る。* 反応溶液 3.5ml. 中、初めの 3 分間に遊離される無機 P の量を初速度とし、primer を此の場合基質の一種として上式によつてプロットした 1 例を Fig. 2 に示した。グラフから上記の方法によつて求めた K_s の値 (即ち $V/2$ を与える primer 濃度) は、2 回の実験に於て、反応液 3.5ml 当り可溶性澱粉として 1.02mg 及び 1.07mg. (平均 1.05mg) であつてほぼ 30mg. 100ml に相当する。此の値は精製馬鈴薯酵素 (41mg.

Fig. 1. The Effect of Added Primer on Purified Lima Bean Phosphorylase in the Synthesis of Starch from Glucose-1-phosphate.

The reaction mixture contained 1 ml. 0.5 M acetate buffer (pH 6.0), 0.5 ml. purified lima bean phosphorylase (Prepn. LB. B₈; 1/20 diluted), 1 ml. 0.1 M glucose-1-phosphate, and various amounts of Lintner's soluble starch as indicated on the curves. Total volume, 3.5 ml. Incubation temperature, $37 \pm 0.1^\circ$. At time intervals, samples were withdrawn from the digests, deproteinized with 5% HClO₄, and analyzed for inorganic phosphorus.

*slope の値から V を求め、activity- pS 曲線上で $V/2$ に相当する点をグラフ的に求めても K_s が得られる。
 K_s は又他の方法によつても求めることが出来る^(15,16)。

LINTNE'S sol. starch/100ml.⁽⁸⁾; 97mg. ZULKOWSKI'S sol. starch/100ml.⁽⁷⁾ 及び結晶筋肉酵素⁽¹⁾ (20mg. glycogen/100ml.) について得られている値とcomparableなものである。

Fig. 1 に於て, primer を全然添加しない場合でも, 反応の経過につれて漸次無機 P の遊離がみられるようになる。此のことは酵素標品又は基質中に少量ながら primer source が混在しているためではないかと思われる。このことを確かめるために Fig. 3 に示した実験を行つた。馬鈴薯より硫酸分別を繰返した酵素 (Prepn. P₆) は, primer を添加すると G-1 P より無機 P を遊離して澱粉を合成する (曲線 I) が, primer を全然添加しないと無機 P の遊離 (及び澱粉の合成) は殆んどみられない (曲線 IV)。primer を添加しない系に, 100° に 3 分間加熱して不活性化した lima bean 酵素を primer source として加えると, 無機 P 遊離の有様は曲線 II の如くなり, Prepn. LB. B₈ 中に primer source になり得るものが混在していることを示している。β amylase-limit dextrin は馬鈴薯酵素の primer source にならない^(8,17)

Fig. 3. Presence of Primer Polysaccharide in Purified Lima Bean Phosphorylase.

The standard digest (curve IV) contains 1 ml. 0.5 M acetate buffer (pH 6.0), purified potato phosphorylase (Prepn. p₆), and 1 ml. 0.1 M glucose-1-phosphate. Other digests contain in addition to the above mentioned: curve I, 25 mg. soluble starch; curve II, 0.5 ml. boiled lima bean enzyme (Prepn. LB. B₈); and curve III, 0.5 ml. boiled lima bean enzyme, treated with purified sweet potato β-amylase, and heat-inactivated. Total volume of each digest: 3.5 ml. Incubation temperature: 37 ± 0.1°.

At time intervals samples were withdrawn, deproteinized with 5% HClO₄, and analyzed for inorganic phosphorus.

小である。従つて, Fig. 1 の実験に於て, 酵素標品中に含まれている primer のために起る Ks 測定値の誤差は, 5% よりもはるかに小さいものであつて, この程度の誤差は初速度の測定, 及びグラフ法による Ks 値の測定に於ける誤差に比べて無視してよいものと考えられる。

Fig. 2. Determination of the Primer Concentration Which Gives Half Maximal Velocity.

Data from an experiment similar to that given in Fig. 1. The initial velocities were calculated as the amounts of inorganic phosphorus liberated in the first 3 minutes in 3.5 ml. reaction mixtures.

から, 上記煮沸 lima bean 酵素を β-amylase で処理し, 次いで再び加熱して β-amylase を不活性化したものを, primer source として primer

無添加の馬鈴薯酵素系に加えると曲線 II の如くなり, 殆んど曲線 IV と等しくなる。このことは lima bean 酵素標品中に含まれていた primer が, β-amylase 処理により primer としての能力を殆んど失つたことを示している。

最純 lima bean 酵素標品 (Prepn. LB. B₈) 中にも少量ながら primer が含まれていることは上記の実験からも明かであるが, それではどの位の量が含まれているのであろうか。このように僅かな量の高糖類を定量するよい方法はないから正確なことはわからないが, 酵素標品中に含まれている primer が Ks の測定にどの位の影響を及ぼすかは大体知ることが出来る。今仮りに Prepn. LB. B₈ 1 ml. 中に可溶性澱粉としてほぼ 2 mg. の primer が含まれているものとする—即ち Fig. 3 の実験に於て煮沸 lima bean 酵素 0.5 ml と共に 1 mg. の primer が反応液中に入つてきたものとする—馬鈴薯酵素の活性は primer 飽和の場合 (曲線 I) に比べて初速度が約 1/40 になるはずである。此の場合には Fig. 1 の実験に於て酵素溶液 (1/40 ml. LB. B₈) と共に反応液中に入ってくる primer の量は 2 mg. × $\frac{1}{40}$ = 0.05 mg. になり, Ks として求めた値 (約 1.05 mg./3.5 ml.) に比べて約 5% である。Fig. 3 の曲線 I と II とを比較すれば明かな如く, 曲線 II の初速度は曲線 I のそれに比べて 1/40 よりも遙かに

実験の部

1. Lima bean phosphorylase の精製 lima beans^{*1)}を粉砕し、粉挽きを通し細粉にする。3~4 倍重量の蒸留水及び少量の toluene を加えて、時々振盪しながら室温で3~4時間抽出し、压榨脱汁後遠心して黄色濁濁せる粗酵素液を得た。加熱処理、硫酸分別、透析等は馬鈴薯酵素の精製に準じて行い^(5,8)最終製品は0.45 飽和硫酸中に懸濁せしめ、氷室中に保存した。沈澱は殆んど純白色で、その水溶液は殆んど無色透明である。かくして得られた最純酵素標品 LB. B₈ は酵素懸濁液 1ml. 当り酵素活性⁽¹⁸⁾ 7.58u. 蛋白質含量 (GO. NALL 等⁽¹⁹⁾ の biuret 反応比色法で測定した) 12.3mg. であるから、specific activity (蛋白質 1mg. 当りの酵素活性) は $7.58/12.3=0.62$ である。

2. Phosphorylase activity の測定 G-1-P より澱粉を合成する反応に於て、澱粉の生成と無機燐酸の遊離とは平行するから、無機 P を測定して酵素活性の目安とした。実験条件は Fig. 1 の説明に記載した。本実験に使用した G-1-P は HANES⁽⁶⁾ の方法に準じて酵素的に調製し、K 塩として結晶せしめたものを、水溶液から等容の EtOH を加えて再結晶する操作を繰返して精製したものである。Fig. 3, 曲線 II から推測されるように本標品はなお僅かながら primer を含んでいるものようであるが、本報告に於ける実験の如く、初速度のみを問題とする場合には差支えない程度である。可溶性澱粉は LINTNE: 法により馬鈴薯澱粉より調製した。

3. 精製 lima bean phosphorylase に対する primer 添加の効果 実験条件及び結果は Fig. 1 の通りである。なお本実験に於ける反応生成物の沃度反応は primer が少量のものほど青藍色が深いようである。Primer として少量の dextrin (Merck: 沃度反応赤色) を加えて行つた定性的試験に於ては、時間の経過と共に生成物の沃度反応が赤紫色→紫色→青色と変化し、本酵素の作用により amylose 型の澱粉が生成することを示している。

4. 精製 lima bean phosphorylase 中に含まれる primer の証明 本実験に使用した精製馬鈴薯 phosphorylase (Prepn. P₆; specific activity = 3.36) は既報⁽⁸⁾の方法によつて調製したものであり、精製甘藷 β -amylase ^{*2)} は BALLS 等の方法⁽²⁰⁾により隼人甘藷より purified concentrate の程度迄精製したもので specific activity (蛋白質 1mg. 当りの β -amylase 活性⁽¹⁸⁾) = 284 である。実験条件及び結果は Fig. 3 の通りである。

考 察

GREEN 等の報告には、精製した lima bean 酵素の性質についてのデータが出されていないから、詳細の所は不明であるが、彼等が述べている所によると彼等の lima bean 酵素の精製度は馬鈴薯酵素のそれとほぼ同じであるとのことである。此の「精製度」が specific activity を意味するものとする、彼等の最純馬鈴薯酵素の specific activity は 3.08 (38°) であるから、之を著者の条件 (37°) に直すと 2.87 に相当する。^{*3)} 又彼等の得た精製 lima bean 酵素は馬鈴薯酵素の primer source にならないから primer を混在していることはないと言われている。これらの点から考察すると GREEN 等の酵素標品は、著者の最純酵素標品よりもはるかに精製されているものようである。彼等の用いている G-1-P は馬鈴薯酵素を用いた場合、primer を添加しなければ無機 P の遊離を示さないから、G-1-P の方に多量の primer が混在していたとも考えられない。従つて、GREEN 等が著者のものより「純度」が高いと思われる酵素標品を用いながら、何故 primer 添加の効果を見出し得なかつたかは、現在の所説明することが出来ない。然しながら著者の上記実験結果、並びに他の植物及び動物 phosphorylases に関する多くの研究⁽²⁻⁴⁾からして、GREEN 等の実験には何処か不備な点があつたのではないかと推察せざるを得ない。

今著者の上記実験結果が正しいものとする、phosphorylase の作用機構は一少くとも現在迄にある程度精製されているものに於ては例外なく一本報告の最初に示した一般式⁽¹⁾

^{*1)} Baby lima beans (Chester B. Brown Co., Morrill, Nebr.) を用いた。本試料をアメリカから送つて下さつた和田捷八、山田翠洋の両氏に厚く感謝する。

^{*2)} 東大農化丸尾文治助教授より頂い。同氏に厚く感謝する。

^{*3)} 温度 t_1 及び t_2 に於ける酵素活性を μ_1 及び μ_2 , 温度係数 Q_{10} を a とすると $\log \frac{\mu_2}{\mu_1} = (t_2 - t_1)/10 \cdot \log a$ なる関係がある。此の場合 $a=2$ として計算した。

terminal glucose units + glucose-1-phosphate $\rightleftharpoons$ maltosidic chain units + inorganic phosphate
に適合することになる。

本研究に当り御指導を頂いた佐橋佳一教授、丸尾文治助教授に感謝する。

結 論

Lima bean の phosphorylase を硫酸分別及び透析を繰返して精製した。得られた最純酵素標品の純度は精製馬鈴薯酵素に比べてかなり低かった。GREEN 等⁽⁵⁾は精製 lima bean phosphorylase による G-1-P より澱粉を合成する反応に於ては primer の添加を必要としないと報告しているが、著者の酵素標品を用いた場合 primer の添加が必要であることがわかった。本酵素による澱粉合成反応に於て最大速度の $\frac{1}{2}$ を与える primer 濃度 (酵素-primer 間の解離恒数, 即ち K_s に相当する) は可溶性澱粉 (LINTNER) として約 30mg./100ml である。著者の得た lima bean 酵素は最純標品に於てもなお僅かながら馬鈴薯酵素の primer source になりうる多糖類 (このものは β -amylase 処理により primer としての能力を失う) を含んでいるが、上記 K_s の測定に著しい影響を与えるほどではない。

- (1) CORI, C. F., CORI, G. T., and GREEN, A. A. : *J. Biol. Chem.*, 151, 39 (1943).
- (2) HASSID, W. Z., DOUDOROFF, M., and BARKER, H. A. : in SUMNER, J. B., and MYRBAECK, K. (Eds.), *The Enzymes*. Vol. I, part 2, p.1014. The Academic Press, Inc. (New York, 1951).
- (3) HASSID, W. Z. : in McELROY, W. D., and GLASS, B. (Eds.), *Phosphorus Metabolism*. Vol. I. p. 11. The Johns Hopkins Press (Baltimore, 1951).
- (4) MARUO, B. in NIKUNI, J. (Ed.), *Starch Chemistry*. p. 279. Asakura Shoten (Tokyo, 1951).
- (5) GREEN, D. E., and STUMPF, P. K. : *J. Biol. Chem.*, 142, 355 (1942).
- (6) HANES, C. S. : *Proc. Roy. Soc. London*. B 129, 174 (1940).
- (7) WEIBULL, C., and TISELIUS, A. : *Arkiv Kemi, Mineral. o. Geol.*, 19A, No. 19, 1-25 (1945).
- (8) NAKAMURA, M. : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 26, 260, 267 (1952).
- (9) NAKAMURA, M. : *ibid*, 25, 413 (1952).
- (10) SUMNER, J. B., CHOU, T. C., and BEVER, A. T. : *Arch. Biochem.*, 26, 1 (1950).
- (11) HOBSON, P. N., WHELAN, W. J., and PEAT, S. : *J. Chem. Soc.*, 1950, 3566.
- (12) INOUE, Y., and ONODERA, K., unpublished; cited from ONODERA, K., in NIKUNI, J. (Ed.), *Starch Chemistry*, p. 482. Asakura Shoten (Tokyo, 1951).
- (13) NAKAMURA, M. : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 302 (1951).
- (14) BARKER, S. A., BOURNE, E. J., and PEAT, S. : *J. Chem. Soc.*, 1949, 1705.
- (15) LINEWEAVER, H., and BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934).
- (16) WILSON, P. W. : in LARDY, H. (Ed.), *Respiratory Enzymes*. 2nd. ed., p. 16. Burgess Publishing Co. (Minneapolis, 1949).
- (17) SVANSON, M. A., and CORI, C. F. : *J. Biol. Chem.*, 172, 815 (1948).
- (18) NAKAMURA, M., YAMASAKI, K., and MARUO, B. : *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 197 (1951).
- (19) GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J., and DAVID, M. M. : *J. Biol. Chem.*, 177, 751 (1949).
- (20) BALLS, A. K., WALDEN, M. K., and THOMPSON, R. R., *ibid*, 173, 9 (1948).

Summary

In the synthesis of amylose-type polysaccharide from glucose-1-phosphate by the action of phosphorylase, it requires the collaboration of the pre-existing polysaccharide—usually designated as primer or activator—for the priming of the reaction. There have been reported, however, two exceptions in this general requirement of added primer; one is purified phosphorylase from lima bean reported by Green and Stumpf (5), and the other is the one from sweet potato reported by Inoue and Onodera (12). I have previously reported (9) that the purified sweet potato phosphorylase actually requires added

primer in the synthesis of starch.

Now, the lima bean phosphorylase was purified by the method of Green and Stumpf by the extraction of powdered lima beans with water, the heat treatment, and the repeated ammonium sulfate fractionations and dialyses. The purest enzyme preparation (LB. B₈) thus far obtained has a specific activity of 0.62, which is indicative of much inferior purity when compared with 2.5-3.0 of purified potato enzyme. Nevertheless, this preparation requires added primer in the synthesis of starch from glucose-1-phosphate, as seen in a typical experiment represented in Fig. 1. A plot of S/v versus S according to an equation $S/v = (K_s/V) + (S/V)$ gives a straight line, from the intercept and slope of which the dissociation constant between enzyme and primer was calculated to be approximately 30mg. Lintner's soluble starch per 100 ml. (cf. Fig. 2), which is comparable to the values found previously for potato and crystalline muscle phosphorylases. This purest preparation still contains a trace of polysaccharide, which can serve as a primer source of purified potato enzyme, and the priming activity of which is disappeared on treatment with β -amylase (cf. Fig. 3). The amount of polysaccharide contained in this preparation was not determined, but the error in the estimation of the K_s value is very small, for it is clear from the figures that the amount of polysaccharide is far less than 2mg. soluble starch per ml. enzyme preparation, which corresponds to an error of approximately 5%.

It can be said from the above experiment that lima bean phosphorylase also requires added primer in the synthesis of starch. Thus, the general mechanism of action of phosphorylases can now be written, without exception, according to Cori, *et al.* (1), as follows.

Terminal glucose units + glucose-1-phosphate $\rightleftharpoons$ maltosidic chain units + inorganic phosphate.

酵母の凝集形成に関する研究 (第 2 報)

麦芽仕込粕の稀酸分解液より抽出せる酵母凝集促進物質に就て

工 藤 四 郎 (麒麟科学研究所)

昭和 27 年 7 月 23 日 受 理

Über die Bruchbildung der Brauerei Hefe. II. Mitteil. Über Bruch verursachende Stoffe
aus von Säure hydrolysierten Malz Treber.
von Shiro Kudo (Kirin Institut für Brauerei)

著者はたまたま麦酒の仕込粕 (malz Treber) の利用として、其の稀酸加圧分解液に酵母の培養を試みしところ、酵母が異常に凝集する事実を観察した。此の現象の原因として、仕込粕乃至麦芽、大麦より由来する成分である事を認め、之等より抽出を試みしに、驚くべき微量 (例えば十万分の一程度) に於ても、麦汁醗酵中の麦酒酵母を、又は pH 4.6 の緩衝液懸濁の酵母を、速に且つ鮮かに器底に沈降せしむる物質を得た。此の酵母凝集促進物質を Bärmigen と名付け、以下之に就て研究を行つた。

麦芽仕込粕に半量の 0.5% HCl を加え、圧力 3kg, 時間 30m にて分解せる搾液を、アンモニアにて pH5.8 に中和後、酵母を培養せしに、分解液其のまゝにては余り良好な増殖率を示さなかつたので、種種前処理を試みた其の中で、たまたま脱酸其の他醗酵阻害因子を除く目的で、分解液を直ちにセロファン膜で透析を行いたる培地に、(pH 5.0) 麦酒酵母 (圧搾酵母として 0.5%) を接種せしところ、異常に酵母が液中凝集する事実を観察した。試みに蒸留水、又は水道水に同一酵母を同一量添加しても斯る凝集は起らず、乳濁するのみである。透析液及び蒸留水 (又は水道水) の pH を 2.8~9.6 まで変化せしめても、前者は常に顕著なる凝集を起すに反し、後者は依然として乳濁のまゝにある。従つて Treber の分解液其のまゝを中和したる液に於ては、かかる凝集が見ら