- A. REINHARD *Wo. f. Brau.*, 1937, 36.
 (2) MOUFANG; *Das Bier*, 1918.
 (3) F. SCHÖNFELD; *J. d. V. L. B.*, 1928, 46.
 (4) A. REINHARD; *loc. cit.* (1)
 (5) 河相; 麒麟麦酒研報 (昭10).
 山口; " " (昭13).
 (6) PAWLOWSKI; *Die Brautech. Unters. Meth.*, 1932.

Zusammenfassung

Fortgesetzt von I. Mitteil. hat der Verfasser ueber die Ursache des abnormalen Gaerbildes bei der Hauptgaerung geforscht, welche fruehzeitig die Flockung der Hefe Foerdert, die vergorene Wuerze klaert, und auch die Gaerung zum Stillstand kommen laesst. Es bekundet sich in den Gaerversuchen, dass das abnormale Gaerbild abhaengig ist, sowie von der Maisch Temp. bei hoecher als 60°C., auch von dem Abmais Verfahren. Besonders, wenn man die Wuerze mit Treber kocht, findet die Bruchbildung der Hefe fruehzeitig stark statt. Aus diesen Versuchen war die Schlussfolgerung zu ziehen, dass es in 6 zeiligen Malz Treber staerkere Bruch verursachende Stoffen als in 2 zeiligen gibt, welche in heissem Wasser loeslich sind.

微生物のクエン酸分解に関する研究 (第2報)

Bact. succinicum の乾燥標本の有機酸代謝

高 橋 甫 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和27年7月26日受理

Studies on the Decomposition of Citrate by Microorganisms. Part 2. On the Acid Metabolism by the Dried Cell Preparation of *Bact. succinicum*.

By Hajime TAKAHASHI (Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

前報¹⁾において筆者等は *Bact. succinicum* の生菌を用い、醋酸酸化におよぼすパントテン酸 (PaA) 同化の影響、醋酸の完全酸化、醋酸酸化のマロン酸阻害とそのフマル酸添加による回復等から、醋酸はクエン酸を経てトリカルボン酸サイクル (TCA-サイクル) により酸化分解されることを証明した。

またクエン酸の嫌氣的分解反応が α, α' -デピリジルによりいちぢるしく阻害されるのに反し、クエン酸の酸化分解はデピリジルにより全く阻害されないことを示し、嫌氣的条件下でのクエン酸の分解は坂口教授、多田氏^(2,3)の想定した $C_6 \rightarrow C_4 + C_2$ の反応を伴うことを認めた。

しかし通常のクエン酸-ブイオン培地に生育した菌体が $Q_{CO_2} = 20$ 前後の嫌氣的クエン酸分解能を示すにもかかわらず、醋酸酸化能のある PaA-rich cell が嫌氣的クエン酸分解力を欠くことから、クエン酸の直接的な C_4 酸と C_2 酸への分解は LIPMANN 等⁽⁴⁾或いは OCHOA 等⁽⁵⁾のクエン酸合成酵素 "Condensing enzyme" とは別の酵素により接触されるか、或いは別の co-factor を更に必要とするものと想像した。

本報においては *Bact. succinicum* の乾燥標本を用い、この有機酸代謝を追求し、本菌の TCA-サイクル、デピリジル等2,3の毒物の阻害部位等について検討を加えたのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 醋酸酸化能をもつ乾燥標本と、もたない乾燥標本の調製 a) 醋酸酸化能をもつ乾燥標本: 肉エキス、ペプトン各1%, クエン酸ソーダ1%, 食塩 0.5% の培養液を pH=7.0 に補正し、菌を接種後 30, 24時間振盪培養する。培養終了後 (pH=9.0 以上) 稀 HCl で中和し、遠心分離、水洗した後、菌体を塩化カルシウム上に減圧乾燥、保存する。

このように調製した乾燥標本は作成時クエン酸に対し $Q_{O_2} = 40$, 醋酸に対し $Q_{O_2} = 30$ 程度の酸化能を示し、

3週間後においてもクエン酸に対し $QO_2=22$, コハク酸に対し $QO_2=45$, 醋酸に対し $QO_2=12$ 程度の酸化能を残存する (酸化能測定は何れも $pH=5.5\sim 5.6$).

b) 醋酸酸化能をもたない乾燥標本 前記クエン酸 ブイオン培地のクエン酸ソーダの量を半減し, 初発 pH を補正せず ($pH=5.5$), 以後の操作は全く同様にする.

この場合の乾燥標本は作成時コハク酸に対し $QO_2=92$ の高い酸化能を示すにもかかわらず, 醋酸の酸化能は $QO_2=2.0$ 程度でいちじるしく低い値を示し, 数日真空デシケーター中に放置すればほぼ完全に醋酸酸化能が消失する.

2. 乾燥標本のTCA-サイクルに属する基質の酸化能 前項のようにして作成した乾燥標本は何れも TCA-サイクルの各 member の酸化能をもち, α -ケトグルタル酸以外の基質酸化速度はほぼ同程度と見做すことが出来る. 醋酸酸化能をもたない乾燥標本を用い $pH=5.6$ で各種有機酸酸化能を測定した値を Table 1 にしめす.

3. 醋酸酸化能を欠く菌体標本の TCA-サイクルに属する基質の酸化 前実験より醋酸の酸化能を欠く乾燥

Fig. 1 The Oxidation of Various Substrates belonging to TCA-Cycle.

The dried cell preparation without the activity of acetate oxidation were used. The amounts of substrates used were as follows: citrate; $3.87 \mu M$, α -ketoglutarate; $6.6 \mu M$, succinate; $2.93 \mu M$, dl-malate; $4.72 \mu M$.

The measurements were carried out by the conventional Warburg apparatus at $30^\circ C$. Each vessel contained 0.5 ml of $M/15$ phosphate buffer $pH 5.5$, 0.1 ml of arsenate ($M/20$), substrate as described above and water to the total volume 1.6 ml in the main compartment, 0.5 ml of dried cell suspension in the side arm, and 0.2 ml of 10% KOH in the center well.

Theory means the theoretical oxygen uptake calculated on the basis that each 1 mole of these substrate except dl-malate give rise to 1 mole of acetate. In the instance of dl-malate, calculation were done on the assumption that only 1-type was oxidized. Data presented were subtracted autorepiration.

Table 1. Oxidation of Various Organic Acids belonging to the Tricarboxylic Acid Cycle by the Dried Preparation of *Bacterium succinicum*.

Substrate added	Citrate	cis-Aconitate	α -Keto-glutarate	Succinate
QO_2	25.27-38.78	36.71	6.36	71.28
Substrate added	dl-Malate	Pyruvate	Acetate	
QO_2	51.25-51.67	58.78-43.58	1.95-0	

QO_2 were determined as previously described at $pH 5.5\sim 5.6$.

Fig. 2 The Oxidation of Citrate in the Presence and Absence of Arsenate.

All the experimental conditions were same as in Fig. 1. Substrate and inhibitor were added as described in the figure.

標本が TCA サイクルに属する各基質を強力に酸化する事実が明かとなつたので、各基質の酸化終了迄の酸素吸収量を測定した。実験結果を Fig. 1 および Fig. 2 に示す。

実験条件はすべて前記に準じて行つたが、醋酸の酸化を完全に阻害する目的で arsenolysis をおこなうことが知られている⁽⁶⁾ arsenate を最終濃度 $M/420$ の割合で添加した。arsenate 添加の影響が殆んどないことは Fig. 2 から明かである。

Fig. 1, Fig. 2, より明かなように α -ケトグルタル酸以外の基質、すなわちクエン酸、コハク酸、L-リンゴ酸は何れも醋酸へ酸化されることが吸収酸素量から推定される。

コハク酸の酸化は理論値より過大であるがコハク酸は自家呼吸をかなり促進するのでこのような値がえられたものと思われる。*dl*-リンゴ酸は *d*-型も利用されると考えた場合の理論値の約半分のところで酸化が終了しているが、これは biological に不活性な *d*-型が酸化されないためである。 α -ケトグルタル酸以外の各基質は何れも 1 モルの基質から 1 モルの醋酸の生成する点で酸化が終了している。これはクエン酸の好氣的分解が TCA サイクルにより行われることを示している。

4. α -ケトグルタル酸が本菌の TCA-サイクルの中間体となるか否かの検討 以上の実験結果から *Bact. succinicum* の乾燥標本による α -ケトグルタル酸の酸化能がいちじるしく低く、かつクエン酸の酸化がすみやかに醋酸まで進行するにもかかわらず、 α -ケトグルタル酸の酸化は終了しない。これは α -ケトグルタル酸をクエン酸酸化の中間体と考えることと一応矛盾する。

この低い酸化能が基質中の少量の不純物による可能性を考慮し α -ケトグルタル酸を液体クロマトグラフ法⁽⁷⁾により精製し、精製 α -ケトグルタル酸を基質として、醋酸酸化能のある標本を用いて実験を行つた結果を Table 2 に示す。

Table 2. Oxidation of α -Ketoglutarate purified by Chromatography

Substrate added	Acetate	Citrate	α -Ketoglutarate	Succinate
Q_{O_2}	16.49	21.77	7.56	59.16

The concentration of the substrates are as follows.

Citrate = $M/50$ Other substrates = $M/100$

Table 3. The Inhibition of Citrate and α -Ketoglutarate Oxidation by Arsenite ($M/400$)

Substrate	Citrate		α -Ketoglutarate	
Arsenite	-	+	-	+
O_2 uptake (μ l)	128.6	6.0	55.4	1.0
Inhibition (%)	95.3		98.1	

この実験結果からも α -ケトグルタル酸が他の基質よりもいちじるしく酸化されがたいことは明かである。

次に α -ケトグルタル酸酸化酵素の阻害剤として知られている亜硫酸塩のクエン酸及び α -ケ

トグルタル酸の酸化におよぼす影響を見た。実験結果を Table 3 にしめすが α -ケトグルタル酸およびクエン酸の酸化は $M/400$ の亜硫酸塩で完全に阻害される。

従つて亜硫酸塩による阻害実験は一応 α -ケトグルタル酸がクエン酸酸化の中間体と考えて矛盾しない。

α -ケトグルタル酸が微生物の TCA-サイクルの中間体となるか否かは菌株により異なることが知られている⁽⁸⁾ 本実験の結果よりすれば α -ケトグルタル酸は本菌の TCA サイクルの絶対的な中間体ではないのか、或は乾燥標本の透過性のため α -ケトグルタル酸の標本中への透過が limiting となつて中間体であるにもかかわらず、他の基質にくらべ特異的の行動をとるものと考えられる。

前報において述べたように、*Bact. succinicum* の生菌のコハク酸酸化はマロン酸による阻害をうけない。菌体抽出酵素液のコハク酸酸化はマロン酸により強力に阻害されるが、乾燥標本では 20% 前後、乾燥標本を Umbreit の mill⁽¹⁰⁾ で磨砕した破壊細胞では 50~60 % 前後の阻害 (マロン酸 = $M/400$) がみとめられ、乾燥標本についても透過性を考慮すべきことを示している。

5. 各種毒物の阻害部位

a. α , α' -デピリジル 前報において α , α' -デピリジルがクエン酸の嫌氣的分解を特異的に阻害することを報告したが、この阻害剤の阻害部位が判明すれば嫌氣的分解機構を推定しうるので、この点について 2, 3 の実験を行つた。

デピリジルが生菌のクエン酸酸化を全く阻害しないことは前報に報告したが、乾燥菌体を用いても同様であつた。

デピリジルは動物組織のアコニターゼ (Fe^{++} を active center とする) を阻害することが知られている⁽⁹⁾ ので、まず乾燥標本のアコニターゼにおよぼすデピリジルの影響をみた。アコニターゼは、クエン酸・シスアコニット酸・イソクエン酸の反応を接触するからシスアコニット酸の酸化には必ずアコニターゼが関与する筈である。クエン酸およびシスアコニット酸の酸化におよぼす $M/950$ のデピリジルの影響を Fig 3 に示す。図より明かなようにデピリジルはシスアコニット酸の酸化にはほとんど影響をおよぼさない。ついで透過性を考慮して乾

Fig. 3. The Oxidation of *cis*-Aconitate in the presence and absence of α, α' -dipyridyl ($M/950$)

The dried cell preparation without the activity of acetate oxidation was used. The final concentration of Na cisaconitate and α, α' -dipyridyl were $M/95$ and $M/950$ each. The measurements were carried out at pH 5.5 and 30°C . Data presented were subtracted autorepiration.

も毒物を基質添加前に加えた場合のみ阻害がみとめられた。これらの基質の酸化に対する $M/900$ のデピリジルの阻害度を Table 4 に示す。

dl-リンゴ酸酸化は醋酸で終了するから、リンゴ酸酸化の阻害が醋酸酸化の阻害にもとづくものでないことは明かである。しかしリンゴ酸酸化の阻害の原因の1つは焦性ブドウ酸酸化の阻害にあると想像される。後述するように亜硫酸塩は焦性ブドウ酸の酸化をほぼ完全に阻害するが、亜硫酸塩の存在下では *dl*-リンゴ酸の酸化はデピリジルにより全く影響を受けない。すなわちデピリジルの阻害部位は亜硫酸と同様であることが明となった (Fig. 4)。

焦性ブドウ酸酸化の阻害が醋酸以下の酸化の阻害によるものか否かは一応検討の余地があるが、前述のように醋酸酸化能を欠く標本も焦性ブドウ酸の酸化はいちぢるしく強力であるから、デピリジルは直接焦性ブドウ酸の phosphoroclastic な分解を阻害するものと考えられる。

醋酸酸化の阻害が、どのような機構で惹起されるかは未だ明かではないが、デピリジル存在下でオギザロ醋酸の給源として少量のフマル酸を添加して見ても、いちぢるしい阻害

乾燥菌体を Umbreit の Mill.⁽¹⁰⁾ で磨碎し、破壊細胞を5時間 $M/400$ のデピリジルと接触させ、この菌体のクエン酸、シスアコニット酸の酸化能をみたがデピリジル無添加の対照にくらべこれら基質の酸化能は全く同様であった。

これらの結果から標本中のアコニターゼはデピリジルに対し安定であることが明かとなった。

ついで TCA サイクルに属する各種の基質の酸化に対するデピリジルの影響をみたところ、リンゴ酸、焦性ブドウ酸および醋酸の酸化に対し、いちぢるしい阻害をみとめた。(但し何れ

Table 4. Inhibition of *dl* Malate, Pyruvate and Acetate Oxidation by $M/900$ α, α' -Dipyridyl

Substrate	<i>dl</i> Malate*	Pyruvate**	Acetate**
α, α' -Dipyridyl	- +	- +	- +
QO_2	51.67 28.74	38.49 14.60	4.54 2.72
Inhibition(%)	44.38	62.07	69.99

*The preparation without the activity of acetate oxidation was used.

**The preparation which contain the activity of acetate oxidation was used.

Fig. 4. The Oxidation of Malate in the presence and absence of α, α' -dipyridyl by the Arsenite-inhibited Dried Cell Preparation

The dried cell preparation (11 mg per cup) which contain the activity of acetate oxidation was used. The concentration of *dl*-malate, arsenite and dipyridyl were $M/90$, $M/360$ and $M/900$ each. Other experimental conditions were same as Fig. 3.

Fig. 5. The Effect of the Addition of small amounts of Fumarate on the Acetate Oxidation in the presence and absence of α, α' -dipyridyl

- Curve 1 : 20 μM of acetate and 2 μM of fumarate were added at 0 time.
 Curve 2 : 2 μM of fumarate was added at 0 time.
 Curve 3 : Dipyridyl (M/900) was added previously and 2 μM of fumarate was added at 0 time.
 Curve 4 : Dipyridyl (M/900) was added previously and 2 μM of fumarate, 20 μM of acetate were added at 0 time.
 Curve 5 : Autorepiration.

Almost all the experimental conditions were same as Fig. 3. 7.1 mg of dried cell preparation which contain the activity of acetate oxidation was used per cup.

い。dl-リンゴ酸の酸化阻害が果して直接 malic dehydrogenase に作用するか否かは明かではないが、恐らく焦性ブドウ酸酸化の阻害によりリンゴ酸の酸化も阻害されるものであろう。

Fig. 1 および Fig. 2 から明かであるが、砒酸塩は TCA-サイクルに属する基質の醋酸迄の酸化を阻害しない。

c. d-リンゴ酸・ dl-リンゴ酸の酸化が理論値の半量で停止し、これは d-リンゴ酸が酸化されないことによつて説明出来ることはすでに述べた。

少量の dl-リンゴ酸を乾燥標本にあたえ、酸化の終了したところで、醋酸、クエン酸、コハク酸などを与えてみたところ、クエン酸およびコハク酸の酸化はあらかじめ dl-リンゴ酸をあたえない対照と同様におこるが (Fig. 7)、醋酸の酸化はほぼ完全に阻害される (Fig. 6)。dl-リンゴ酸のかわりにフマル酸あるいは l-リンゴ酸をあらかじめ与えた場合は全く醋酸酸化の阻害はみとめられない (Fig 6, Fig 8)。

これらの事実から d-リンゴ酸が醋酸の酸化を阻害することは明かであり、dl-リンゴ酸の酸化がすみやかに醋酸迄進行すること (Fig. 1)、およびクエン酸、コハク酸等の酸化が全く阻害されないことから d-リンゴ酸は特異的に醋酸酸化を阻害することは明かである。醋酸酸化の阻害剤として 2,4-デニトロフェノール、亜砒酸、モノフルオロ醋酸などが知られているが d-リンゴ酸による阻害は本報告が最初である。阻害の原因は恐らく d-リンゴ酸がオギザロ醋酸と拮抗して "Condensing enzyme" を阻害するものと想像されるので、今後検討を加える予定である。

回復はみとめられなかつた。実験の結果を Fig. 5 に示す。従つてデピリジルの醋酸酸化の阻害機構は醋酸の活性化を阻害するか、あるいは醋酸とオギザロ醋酸の縮合を接触する "Condensing enzyme" を阻害するものである。

以上の諸事実よりクエン酸の嫌氣的分解が一部次の反応機構によることはほぼ確実である。

b. 亜砒酸塩の阻害部位 前述のように亜砒酸塩はクエン酸、 α -ケトグルタル酸の酸化をいちぢるしく阻害するが、また dl-リンゴ酸の酸化をかなり強く焦性ブドウ酸の酸化をほぼ完全に阻害する。醋酸酸化能を欠く乾燥標本を用いた実験結果を Table 5. に示す。

Table 5. The Inhibition of dl-Malate and Pyruvate Oxidation by M/400 Arsenite*

Substrate	dl-Malate		Pyruvate	
Arsenite	-	+	-	+
QO ₂	59.25	20.75	43.58	2.99
Inhibition (%)		64.98		93.14

*The experiment was carried out with the preparation without the activity of acetate oxidation.

前報において亜砒酸塩は醋酸の酸化を強力に阻害することを報告したが、本実験に用いた標本は各基質を醋酸の段階迄酸化するので、こゝにみとめられた阻害は醋酸の酸化阻害によりひきおこされたものではない。

Fig. 6 The Inhibition of Acetate Oxidation by *d*-Malate.

- Curve 1 : $2 \mu M$ of fumarate was added at 0 time and $20 \mu M$ of acetate was added at the point indicated by the arrow.
 Curve 2 : No substrate was added at 0 time and $20 \mu M$ of acetate was added at the point indicated by the arrow.
 Curve 3 : $4 \mu M$ of *dl*-malate was added at 0 time and $20 \mu M$ of acetate was added at the point indicated by the arrow.
 Curve 4 : No substrate was added.
 8.2 mg of dried cell preparation was used per cup and other experimental conditions were the same as Fig. 5.

終に臨み、終始御懇篤な御指導御鞭撻をいただいた坂口謹一郎先生、有馬啓先生に厚く感謝すると共に有益な御批判をいただいた教室員諸兄に深謝する。

(昭和27年4月6日 日本農芸化学会大会において講演した。)

- (1) 高橋 市, 野村眞康 : 農化, 26, 99 (1952)
 (2) K. SAKAGUCHI, S. TADA : Z. Bakt. Parassit. II Abt., Bd. 101 (1940)
 (3) 多田靖次 : 農化, 17, 569 (1941)
 (4) G. D. NOVELLI, F. LIPMANN : J. Biol. Chem., 182, 213 (1950)
 (5) J. R. STERN, B. SHAPIRO, S. OCHOA : Nature, 166, 439 (1950)
 (6) E. R. STADTMAN, H. A. BARKER, J. Biol.

Fig. 7 The Effect of *d*-Malate on the Oxidation of Succinate and Citrate.

All the experimental conditions were same as in Fig. 6, except in this experiment $20 \mu M$ of succinate or $40 \mu M$ of citrate were added at the point indicated by the arrow. 6.7 mg of the dried cell preparation was used per cup.

Fig. 8 The Effect of *l*-Malate on the Oxidation of Acetate

- Curve 1 : $2 \mu M$ of *l*-malate was added at 0 time and $20 \mu M$ of acetate was added at the point indicated by the arrow.
 Curve 2 : $2 \mu M$ of *l*-malate was added at 0 time.
 Curve 3 : No substrate was added at 0 time and $20 \mu M$ of acetate was added at the point indicated by the arrow.
 Curve 4 : Autorepiration.

Chem., 184, 769 (1950)

- (7) C. S. MARVEL, R. D. RANDS, JR., : *J. Am. Chem. Soc.*, 72 2642 (1950)
 (8) S. J. AJL, M. D. KAMEN : *J. Biol. Chem.*, 189, 845 (1951); AJL *et al.* : *J. Bact.*, 61 379 (1951);
 AJL *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 189 859 (1951)
 (9) S. R. DICKMAN, A. A. CLOATIER : *J. Biol. Chem.*, 188, 379 (1951)
 (10) W. W. UMBREIT *et al.* *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co.
 p. 126 (1949).

Summary

Two types of dried cell preparations of *Bact. succinicum* were prepared, one having the activity of acetate oxidation and the other losing the activity of acetate oxidation almost completely.

By using the latter preparation, the author found that all the acids belonging to tricarboxylic acid cycle (TCA-cycle) except α ketoglutarate were rapidly oxidized to acetate (Table 1, Fig. 1 and 2).

Since the oxidation of each one mole of these substrates stopped at the stage of one mole of acetate, it is very favorable that the oxidation takes place via TCA cycle.

From the above results and some additional evidences (see Table 2), it is probable that if α keto-glutarate is the member of TCA-cycle in this bacteria, the permeability of the preparation limits the oxidation.

It was found that α, α' -dipyridyl, which had been proved by the authors to inhibit the anaerobic decomposition of citrate, also inhibits the oxidation of *l*-malate, pyruvate and acetate (Table 4). It was clearly demonstrated that the agent inhibited pyruvate oxidase system and at the same time either the activation of acetate or the condensing enzyme.

It was found that a new inhibitor *d*-malate inhibits almost completely the acetate oxidation at rather dilute concentration (M/900), while the oxidation of citrate to acetate was quite stable to *d*-malate (Fig. 6,7 and 8). Probably *d*-malate inhibits the condensing enzyme competing with oxaloacetate.

From the inhibition experiments above cited the mechanism of citrate breakdown in *Bact. succinicum* may be summarized as follows

Dotted lines represent the inhibition by the agents described.

In aerobic condition, citrate is oxidized exclusively via TCA cycle, because α, α' -dipyridyl does not inhibit the aerobic oxidation of citrate. In anaerobic condition, citrate is decomposed to acetate and oxaloacetate by the condensing enzyme(?), some part of the latter compound is reduced to succinate coupled with the oxidation of citrate to succinate via TCA-cycle.

There are some evidences that the condensing enzyme is not responsible for the anaerobic breakdown of citrate, since the preparation aged thirty days or more which contains both the activity of acetate oxidation and all enzyme systems belonging to TCA-cycle, does not decompose citrate anaerobically at a detectable rate.

Thus it is concluded that either some cofactor (s?) which is not necessary for the oxidation of acetate plays an important role in the breakdown of citrate, or the enzyme different from condensing enzyme is responsible for the anaerobic decomposition of citrate.

液内培養によるアミラーゼの生産に関する研究 第5報)

Limit Dextrin 分解酵素力について

養田泰治, 菊池敏典, 朝井勇宣 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和27年7月26日受理

Studies on the Amylase Production by Submerged Culture. Part 5.

On the Limit-Dextrin Hydrolysing Enzyme.

By Yasuji MINODA, Toshinori KIKUCHI, and Toshinobu ASAI

(Dept. of Agr. Chem., Fac. of Agr., Univ. of Tokyo)

緒 論

澱粉質原料の酒精醱酵の糖化過程では、その最終段階に於て残存する難分解性の residual dextrin の分解醱酵に時間がかかり、之が醱酵期間の短縮及び収率に非常に影響があり、S. C. PAN 等⁽¹⁾はこの段階を Secondary fermentation と名付けて重視している。彼等は糖化過程にては過剰の maltose が分解の進行を阻害し⁽¹⁾、又或る種の合成酵素が存在して maltose より非醱酵性の炭水化物が出来る⁽²⁾ため糖化が阻害されると述べたが、酵母の存在する場合には maltose の消費が行われる為糖化が進み、その速度は糖化酵素の量に比例するといっている⁽²⁾。故に Secondary fermentation が長びくのは maltose の阻害に依るのではなく residual dextrin が分解し難い為であろうと考えられる。一方澱粉を麦芽の amylase にて分解する場合、醱酵性糖が 70% 位生成した後、極めてゆるやかにしか分解せず、この時生じた難分解性物質が limit-dextrin と呼ばれるが、L. A. UNDE KOFLER 等は之を分解する酵素として *Asp. oryzae* より limit-dextrinase を単離している⁽³⁾。著者等は、このような酵素が residual dextrin の分解に与り酒精醱酵の最終段階に於て醱酵期間の短縮と収率に著大なる影響を持つであろうと考え、limit-dextrinase を強力に持つ菌株を探索し、その作用条件について研究を進めた。尚岡崎氏は各種糸状菌について、limit-dextrinase activity を比較せられているが⁽⁵⁾、著者は酒精醱酵の residual dextrin に対する酵素力を検討する目的を以て、麦芽より limit-dextrin を作らず、澱粉より糸状菌液内培養 amylase を用いて limit-dextrin を作り実験を進めた。したがって limit-dextrin よりむしろ residual-dextrin と称すべきであろうが、従来の limit-dextrin なる語をここではそのまま用いておく。

実 験 方 法

液内培養 300cc 坂口コルベンに米糠 2.4g, 切干粉 0.8g, NaNO_3 0.08g, 水道水 80cc を入れて 120°, 20分 殺菌後孢子 suspension 2cc を植え、30° で 65 時間振盪培養後菌体を濾過した濾液を酵素液として用う。

Limit-dextrin の調製: BACK 等⁽⁶⁾の行つた方法に大体従つたが、麦芽の代りに *Asp. oryzae* 0-9-5 の上述の如き培養濾液を用いた。先ず 200g の馬鈴薯澱粉を 1.3l の水に懸濁させて加熱糊化し、68° に冷却して濾液 35 cc を加え 2~3 分間液化せしめてから 60° に冷却して 1N HCl を用いて pH 5.5 とし、更に 140cc の酵素液を加えて 60° で約 7 時間糖化し、120°, 10 分間 autoclave をかけ、30° に冷却後市販のパン酵母 15g を加えて 30° で約 44 時間醱酵させ、遠心分離に依り酵母等を除去した液を減圧下で液量 100cc まで濃縮して、その濃縮液に 200cc のメタノールを加え、得られた沈澱を濾過した濾液に更に 200cc のメタノールを加え、得られた沈澱を再び水に溶解して、メタノールを加え同様な操作を 2 回繰返し、最後に沈澱をメタノールで洗滌後真空乾燥した。収量は 28g で沃度反応はない。平均重合度は塩酸加水分解した時の増加還元力より算出して 4 を得た。

澱粉分解力及び maltase 力の測定