- (2) G. TANRET : *Compt. rend.*, 192, 1056 (1931).
 (3) A. J. KLUYVER and F. L. W. VAN ROO-SMALEN : *Biochem. Z.*, 245, 13 (1932).
 (4) S. VEIBEL : *Biochem. Z.*, 239, 350 (1931); 252, 305 (1932).
 (5) A. STEINER and C. F. CORI : *Science*, 82, 422 (1935).
 (6) K. MYRBÄCK and B. ORTENBLAD : *Biochem. Z.*, 288, 329 (1936).
 (7) K. M. BRANDT : *Biochem. Z.*, 309, 190 (1941); *u. f. C. A.* 37, 2770 (1943).
 (8) R. PAYEN : *Can. J. Research*, 27 B, 749 (1949).
 (9) M. ELANDER and K. MYRBÄCK : *Arch. Biochem.*, 21, 249 (1949).
 (10) R. J. BOUTHILET, N. E. NEILSON, E. M. MRAK, and H. J. PHAFF : *J. Gen. Microbiol.*, 3, 282 (1949).
 (11) L. C. STEWART, N. K. RICHTMYER and C. S. HUDSON : *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 2277 (1949); 72, 2059 (1950).
 (12) R. ROBISON and W. T. J. MORGAN : *Biochem. J.*, 22, 1277 (1928).

Summary

An improved method has been described for the preparation of trehalose from dry and compressed baker's yeast. By this method it has been found that baker's yeast contained trehalose in remarkably varying amounts and the highest trehalose content of one dry yeast to be 14.5% on the dry basis.

The several characteristics of crystalline trehalose were studied : mp., 96.0~96.3° [α]_D²⁰ = 179.1° (c, 2) which was not influenced by the change of the concentration of trehalose. Trehalose indicated a great strong resistance for acid compared with maltose and 10 hours of hydrolysis in *N* H₂SO₄ at 100° was required to achieve a complete splitting of the sugar. The velocity constant of hydrolysis at 80°, calculated as a unimolecular reaction was 5.93×10^{-4} , while K for maltose was 3.04×10^{-3} .

To determine rapidly and fairly the trehalose content of small samples of yeast, the method by hydrolysis or by optical rotation may be adapted satisfactorily, but the latter seemed to be more desirable.

酵母の Trehalose に関する研究 (第 2 報)

パン酵母貯蔵中に於ける Trehalose 含量の変化に就て

佐藤友太郎, 津村信蔵 (農林省食糧研究所)

昭和 28 年 1 月 22 日 受理

Trehalose and Yeast. Part 2. Variation of the Trehalose Contents of Baker's Yeast during the Storage.

By Tomotaro SATO and Shinzo TSUMURA (Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry)

先にパン酵母の trehalose の分離, 定量法並に分離した結晶 trehalose の比旋光度, その他 2, 3 の性質に関する知見を報告したが, これについてパン酵母貯蔵中の trehalose 含量の変化を glycogen 及び yeast gum の変化と共に検討を加えたので茲に報告する。

圧搾パン酵母中の trehalose 含量が酵母の age によつて変化する事は, すでに TANRET⁽¹⁾, STEINER-CORI⁽²⁾ MYRBÄCK, ORTENBLAD⁽³⁾, BRANDT⁽⁴⁾ 等によつて認められ, 又最近 STEWART *et al.*⁽⁵⁾ も圧搾酵母はその age を増すに従つて trehalose 含量が減少する事を確認し, 20° 貯蔵中の酵母は 6 日間に 90% 以上の trehalose を減少すると報告している。又 PAYEN⁽⁶⁾ は乾燥酵母製造のための乾燥操作は glycogen の大部分を減少させるが全炭水化物量には殆んど変化なく, glycogen の減少量だけ trehalose 含量が増加するという興味ある報告を行つている。

以上の如く trehalose の消長と glycogen との間には何等かの関係が存在するのではないかと考え, trehalose 含量の変化のみならず, 同時に glycogen 及び yeast gum の変化も併せて検討した。

実 験 の 部

(I) 定量方法の検討

(1) Trehalose 定量法: Trehalose の定量に関してはすでに第 1 報に於て報告したが、その後 NH_4SO_4 では加水分解に 10 時間を要するので不便である事と、後述の glycogen, gum の加水分解に於ては 4% HCl を使用するので、trehalose でも 4% HCl を用いて定量出来ないかと検討を加えた。なお除蛋白剤としては前報の $HgSO_4$ の代りに STEWART *et al.*⁽⁵⁾ の 20% $ZnSO_4$ を用いる事とした。trehalose の 4% HCl による加

水分解の結果は Table 1 の如くである。

Table 1. Hydrolysis of Trehalose by 4% HCl Solution.

Duration of hydrolysis (hr.)	0.5	1	1.5	2	3	4	5
Rate of hydrolysis (%)	51.1	74.7	90.3	95.7	98.9	97.7	97.8

即ち 3 時間で最高に達し 99% 加水分解するので、今後 trehalose の定量法として 4% HCl で 100° で 3 時間加水分解することとした。

(2) Glycogen 及び Gum の定量法: 従来酵母の glycogen 定量法として最も広く行われている方法は、STOCKHAUSEN, SILBEREISEN⁽⁷⁾の方法であるが、われわれはこの方法を採用し若干改変して次の如く行つた。

圧搾酵母 20 g を 300 cc のエルレンマイヤーフラスコにとり、これに 65% KHO 60 cc を加え reflux の下に 3 時間加熱する (砂皿上)。冷却後 100 cc のメスフラスコに移し水を加えて fill up する。次にその溶液を全部濾紙に移し時計皿で蔽つて冷蔵庫中にて 1 夜濾過する。濾液 50 cc を 250 cc のビーカーにとり、これに 96% アルコール 150 cc を加え (著者等は濾液 40 cc, アルコール 120 cc で行つた)。これに 2-3 滴の飽和食塩溶液を加え硝子棒を以つて攪拌後 1 夜放置すると glycogen 及び gum は完全に沈殿する。沈殿を攪拌しないように上澄液のみを小型濾紙にて濾過し、ビーカー底の沈殿は 75% アルコールにて数回傾瀉法によつて洗滌し、濾液が黄色を呈しなくなるまで洗滌する。

なお更に無水アルコールで 2 回沈殿を洗滌する。濾紙上及びビーカー中の沈殿を 2% KOH にとかし 100 cc に fill up する (A 液)。この中 40 cc をとり新に調製したフェーリング液 80 cc を加え硝子棒で烈しく攪拌して gum の銅化合物を沈殿させる。翌日これを濾過し 2% KOH で濾紙が無色になるまで洗滌する。沈殿を 4% HCl に溶解し、なお同塩酸で洗滌して総量約 80 cc とする。これを湯熱中に 3 時間加水分解し冷却後 KOH で中和、水を加えて 100 cc に fill up し、その中 40 cc をとり、ケルダール・ベルトラン法によつて糖分を定量し葡萄糖として計算する (その価を b とする) (著者等は 10 cc をとりベルトラン法の改変法によつて糖の定量を行つた)。別に A 液より 40 cc をとり、濃塩酸を加えて 4% HCl とし約 80 cc とし、前と同様にして 3 時間加水分解冷却中和後 100 cc に fill up する。その一部をとりて糖分を定量する (その価を a とする)。(a-b) × 0.927 を以て glycogen, b × 0.9472 を以て yeast gum 量とする。

以上の STOCKHAUSEN, SILBEREISEN⁽⁷⁾の方法に対して最近 PAYEN⁽⁶⁾は批判を加えて改良法を提唱している。PAYEN によれば従来の STOCKHAUSEN その他による glycogen の分析数値は比較的高いように思われるが、これはアルカリ抽出液にアルコールを加えて glycogen 及び gum を沈殿させる際にエタノールを 3 倍量使用しているからであつて、この時は glycogen 及び gum のみならず trehalose をも沈殿させるのである。メタノールを使用すれば、trehalose の沈殿は生じないからこの方法が妥当であり、且つ使用量もメタノールの場合は 2 倍量でよいと報告している。

そこで沈殿用アルコールについて検討を加えた。一定濃度の glycogen 溶液を作りこれにそれぞれ 3 倍量のエタノール、2 倍量のメタノール、3 倍量のメタノールを加えて攪拌し glycogen を沈殿させた後その沈殿を集め 4% HCl にて 100° で 3 時間加水分解した結果 glycogen の回収率は Table 2 の如くであつた。

Table 2. Recovery of Glycogen by the Precipitation with Alcohol.

Alcohol used	3 vol. of Ethanol			3 vol. of Metanol			3 vol. of Metanol		
NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	
Recovery (%)	98.4	96.4	97.8	84.3	84.6	86.0	86.4	84.3	

即ち STOCKHAUSEN の述べている如くエタノール 3 倍量では glycogen の殆んど完全に沈殿されるが PAYEN のメタノール使用法では 3 倍量でも完全には回収されず 85% 程度に過ぎない。

又エタノール 3 倍量では trehalose をも沈殿するという点について検討を試みた。即ち精製 glycogen に約 1/2 量の trehalose を加えて混合溶液を作り、これにそれぞれ 3 倍量のエタノール、2 倍量のメタノールを加えて沈殿を生ぜしめ、この沈殿を 4% HCl で加水分解して糖分を測定し、これを仮りに glycogen と見做して回収率を算出すると次の如くなる。Table 2 に示す glycogen の回収率と全く一致している。即ちエタノール

Alcohol used	3 vol. of Ethanol		2 vol. of Metanol.	
NO.	1	2	3	4
Recovery (%)	97.8	96.4	86.0	86.2
Baker's yeast	Glycogen (%)		Yeast gum (%)	
A	12.0		11.9	
A	12.2		11.9	
B	12.9		11.4	
B	12.5		11.5	

ル 3 倍量使用しても trehalose は沈澱されない事が確認された。以上の若干の検討の結果 PAYEN の改変法は疑問の点があるので STOCKHAUSEN 方法を採用することとした。この方法によつて 2 種のパン酵母について glycogen 及び gum の定量を行つたところ、左に示す如く良く一致する平行実験結果を得た。

(II) 実験結果

良く洗滌して出来る限り夾雑物を除いた商品パン酵母を一定量宛をとり、それぞれ 0~5°, 20°, 及び 25° に貯蔵する。一定時間後その一部をとつて trehalose, glycogen, gum の定量を行い、パン酵母貯蔵中に於けるこれ等の炭水化物含量の変北を示すと Table 3 の如くである。

Table 3. Variation of the Carbohydrate Contents* of Baker's Yeast during the Storage.

Baker's yeast	Temp. of storage (°)	Duration of storage (day)	Trehalose		Glycogen		Gum	
			Content (%)	rate (%)	Content (%)	rate (%)	Content (%)	rate (%)
I	0~5°	0	8.8	100	15.5	100	8.9	100
		10	7.0	79.9	12.5	81.0	12.0	133.9
		20	5.7	65.2	9.9	64.1	9.9	110.3
		31	3.0	33.7	9.5	61.6	9.4	94.3
I	20°	0	8.8	100	15.5	100	8.9	100
		3	7.8	88.5	12.2	77.9	11.5	128.4
		4	7.3	82.5	11.1	71.9	11.4	127.3
		5	6.6	74.7	10.5	68.2	10.7	119.5
		6	6.6	74.8	10.5	68.1	10.5	118.1
		7	6.2	70.8	10.1	65.3	7.8	87.6
II	25°	0	5.7	100	10.2	100	6.0	100
		1	—	—	9.9	97.0	4.8	79.9
		2	5.5	96.2	9.0	87.7	9.5	158.5
		3	4.7	82.1	9.1	89.6	—	—
III	25°	4	4.6	79.5	8.3	81.4	4.6	76.4
		0	—	—	9.2	100	5.2	100
		1	—	—	7.4	80.8	7.9	152.7
		2	—	—	7.0	76.3	10.4	202.2
		3	—	—	7.4	81.0	10.8	209.0
		4	—	—	6.1	66.4	7.3	140.8

* % in dry matter

Fig. 1. Variation of the Carbohydrate Contents of Baker's Yeast I during the storage at 0~5°.

Fig. 2. Variation of the Carbohydrate Contents of Baker's Yeast I. during the Storage at 20°.

尚 yeast I に於ける貯蔵中の変化を図示すると Fig. 1, 2 となる。

考 察 及 び 結 論

(I) Trehalose はパン酵母の貯蔵中徐徐ではあるが減少する事が認められる。0~5° の低温に於ては減少の割合は極めて緩慢であり、10日後にもなお 80% 残存する。30日後には 34% 程度となり、時日の経過と共に減少の割合がかなり著しくなるように思われる。20~25° の貯蔵でも概して緩やかな減少を示し 1 週間後なお 70% 残存率を示し、STFWART *et al.* の如く 6 日間で 95~100% の減少の事実は見られなかつた。要するに trehalose は貯蔵中に若干ではあるが減少する事が認められる。即ち trehalose は貯蔵性炭水化物と見る事が出来る。

(II) Glycogen も大体に於て trehalose と同様な割合を以て減少するが、減少量は trehalose よりも大であり、0~5° で 10 日間で乾物で 3%、20°, 3 日間で 3.5% の glycogen が減少する事が認められた。貯蔵に際しては乾燥の場合と異なり、glycogen が減少して trehalose が増大する現象は見られず、何れも減少するばかりである。

(III) yeast gum は trehalose 及び glycogen と全く異なる様相を示した。即ち貯蔵後急激な増加を示して最高に達し、その後は再び急激な減少曲線を示すと云う興味ある現象を示した。多い場合には最初の 2 倍量にも達した。橋谷氏⁽⁸⁾によれば gum は貯蔵中に減少すると云い、又 WARKANY⁽⁹⁾は yeast gum は酵母を肥育する場合に最初の 28~65% 増大すると述べ、自己醗酵中には 20 時間で 2.7% 減少したが、その後 24 時間は減少しなかつたと報告している。これ等既往の研究結果とは全く異なる現象を示したが、如何なる機作によつて増加するものであるか不明であるが、以上の実験事実よりすれば yeast gum は trehalose や glycogen の如き貯蔵性炭水化物とは本質的に異なるもののようである。

(本研究の要旨は昭和 27 年 4 月農芸化学会大会に於て報告した。)

- (1) G. TANRET : *Compt. rend.*, 192, 1056 (1931).
- (2) A. STEINER and C. F. CORI : *Science*, 82, 422 (1935).
- (3) K. MYRBÄCK and B. ORTENBLAD : *Biochem. Z.*, 288, 329 (1936).
- (4) K. M. BRANDT : *Biochem. Z.*, 309, 190 (1941).
- (5) L. C., STEWART, N. K. RICHTMYER, and C. S. HUDSON : *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 2059 (1950).
- (6) R. PAYEN : *Can. J. Research*, 27 B, 749 (1949).
- (7) F. STOCKHAUSEN and K. SILBEREISEN : *Wochschr. Brau.*, 52, 145 (1935).
- (8) 橋谷義孝 : 酵母学
- (9) J. WARKANY : *Biochem. Z.*, 150, 271 (1924).

Summary

(1) The variation of the content of trehalose during the storage was slow ; at 0-5° after 10 days the contents decreased 20% , at 20~25° after 7 days 30% . It was ascertained that trehalose was one of the reserved carbohydrate of yeast.

(2) Glycogen displayed the same tendency as trehalose and decreased at same rate during the storage. But the eliminated weight of glycogen was greater than trehalose, for yeast contained more glycogen.

(3) In the beginning of the storage, yeast gum began to increase remarkably and reached to the maximum (to the double of the initial content) and then decreased rapidly below the initial content. This fact, which is contrary to previous investigators, is very interesting and by this fact yeast gum seemed to be a kind of carbohydrate other than glycogen trehalose which are called as the reserved carbohydrates of yeast.