Summary

A study has been done on the polygalacturonase action of *Clost. acetobutylicum* E4, *Clost acetobutylicum* K17, and *Cl. butyricum* W5. These organisms were useful for the fermentation retting of barks of plant fibre materials. The crude enzyme was prepared from fermentation media of *Cl. acetobutylicum* E4. When cations in the media were removed by Amberlite IR-120, protopectinase was also taken out of the media. The breakdown of pectic acid was determined by WILLSTÄTTER-SCHUDEL's hypiodite method and by OSTWALD viscosimeter. When this enzyme acted on pectic acid, its viscosity decreased slightly and its reducing power increased a little. The optimum pH value for this enzymatic action was determined as 6.0 an observation of viscosity and 6.0 to 6.2 by the determination of reducing value. The enzyme was inactivated at 70° when the solution was kept on the temperature for 20 minutes. It was found that nickel, manganese and zinc ions accelerated the action of depolymeric polygalacturonase, when they were added in the concentration of 0.8 gram ion per litre. After this enzyme acted on 0.3% pectic acid solution for 7 hours to 16 days, D-galacturonic and digalacturonic acids were detected by paper chromatography. Trigalacturoinic acid was not produced except by the enzyme of *Cl. felsineum* var. *sikokianum* W2.

By the results of experiment in which W2 and the three bacteria were compared each other in activity of polygalacturonase, W2 bacteria produced enormously large amount of depolymeric enzyme, W5 a little, E4 and K17 slightly. But saccharifying polygalacturonase was produced a little by W2 and slightly by the other three organisms.

家 兎 の 消 化 に 関 す る 研 究 (第 6 報)

飼料特に野生白クローバーのマンガン含量について

亀高正夫*, 畠山清雄, 谷井功一 (東北大学農学部畜産学科)

昭和 29 年 5 月 18 日 受 理

Studies on the Digestion in the Rabbit. Part 6. On the Manganese
Content of Feeds, especially of the White Clover

By Masao KAMETAKA, Kiyoo HATAKEYAMA and Ko'ichi TANII

(Dept. of Animal Husbandry, Tohoku Univ.)

著者等はマンガンをも index として家兎の消化の状態を明らかにしようとしているので、飼料特に野生白クローバーに含まれるマンガン量を知るために、その定量法を検討した。まず断続弧光法によるスペクトル図より定性的及び半定量的にマンガンの存在を認め、次に比色的に定量する条件を検討した後、その含量を確認した。なお、数種の飼料についてマンガン含量を明らかにし、比較したのでそれらの成績を報告する。

実 験 及 び 成 績

I. 断続弧光法

a) 試料：野生白クローバー乾草を白金皿にとり、約 700° で焼灼灰化して得られた灰分を試料とした。

b) 方法：灰分 0.5 g をとり、王水で処理した後、蒸発乾涸し、それに炭素の粉末を 1:1 の割合に混合し、めのうの乳鉢で粉碎混合する。それを炭素電極の中につめた後、断続弧光法によりスペクトルを撮影した。次に本研究の第 4 報⁽¹⁾により明らかにせられた化学分析による既知の割合に従い、灰分の中の状態と大差のないように人工的に数種の元素を混合した試料を調製した。それは次の通りの割合のものである。即ち 0.5 g 中に K 27%, Na 20%, Ca 15%, Fe 1% が含まれるように KCl, NaCl, CaO, Fe₂O₃ をとり、これに Mg と Al とは MgO 及び Al₂O₃ として 0.5, 1, 2, 4% 及び 4, 2, 1, 0.5% の割合になるようにそれぞれその含量を変えて加えた。

これら 4 種の試料を別別に蒸発皿にとり、濃 HCl 1~2 cc を添加し蒸発乾涸する。この操作を 3 回くりかえした後、焼灼したものについて前記と同じ方法によりスペクトルを撮影し、そのスペクトル線の黒化度に基いて半

* 東京大学農学部農芸化学科

定量的に Fe, Al, 及び Mg の含量を判定した。

c) 成績 最も主なるスペクトル線より確認された元素は, Table 1 の通りである。なお, マンガンのスペクトル線は Photograph に示されている。

Table 1. Main Elements Identified from their Wave Length found in the Spectrogram of the Wild White Clover Ash

Elements	Wave length (Unit Å)		
Ca	2398.6,	3158.9,	3179.3
Fe	2599.4,	3020.6	
Mg	2779.8		
Mn	2794.8		
Si	2881.6		
Al	3092.7		
Cu	3247.5,	3274.0	
Na	3302.3		
K	4044.1,	4047.2	

These values of wave length are given in the "Wave length Tables" by G. R. HARRISON (1939).

次に半定量的に確認された元素, Fe, Al, Mg はそれぞれ 1, 0.5, 3.5% 前後であり, Mn はこれらの値から $10^{-2}\%$ の程度と推定された。

分析試料を調製するときに, いきなり王水で処理をし特に Si を分離することなくこれを蒸発乾涸させたので, Table 1 に示したごとく Si の線が見出された。然し, Si は炭素の粉末の中に含まれているので, このスペクトル線のすべてが試料中の Si であるとは断定出来ないが, 試料を含め炭素粉末についての成績と比較して, 試料が Si を含んでいることは認められた。

植物の灰分の分光分析法については, FARMER⁽²⁾ 及び水田氏⁽³⁾ の報告がある。又 JAYCOX⁽⁴⁾ 及び LUNDEGA-RDH⁽⁵⁾ は定量的に分析することが可能であると報告しているが, 著者等の場合上記の分光分析法では期待した

程精度の高い定量値は得られなかつた。

II. 光電比色計による比色法

a) マンガン基本溶液の調製: 予め $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ によつて検定し, その後 SO_2 で脱色した KMnO_4 溶液を稀釈し, 1 cc 中に 500 γ のマンガンを含む溶液を調製して, 基本溶液とした。

b) 検量線の作製: 一定量のマンガンを含む溶液 50 cc をとり, 濃 H_2SO_4 2 cc, 85% H_3PO_4 溶液 2 cc, 0.2% AgNO_3 溶液 0.5 cc, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 1 g を順序に加え, 熱板上で加熱し約 1 分間煮沸した後おろす。なお, この発色時の条件は NYDAHL⁽⁶⁾ の報告に準じた。

発色した溶液を 100 cc に稀釈し, 全量をセルに移した後藤・武者式光電池比色計⁽⁷⁾ で測定し, そのよみ μA を記録する。3 回の測定によつて得られた平均値より $-\log T$ を求め作図すれば, Fig. 1 の通りである。なお, 光電池比色計の操作については SNELL⁽⁸⁾ 及び辰己氏⁽⁹⁾ の報告を参照した。

Fig. 1. Manganese Standard Curve Estimated with the GOTO-MUSHA's Photoelectric Colorimeter

c) 検液の調製: 灰分検液の調製は COPPENET⁽¹⁰⁾ の報告に準じた。即ち野生白クローバー乾草 3 g を約

Photograph

The sign ↑ shows the manganese line at 2794.8 Å, as compared the arc spectrogram of iron steel at the upper part of this photograph

700° で灰化し、2 cc の王水で 3 回処理し、次に 2 cc の濃 H_2SO_4 で HCl を追出した後、蒸留水で 100 cc に稀釈したものを検液とした。

d) 成績： 検液の一部について、b) と同じ方法で発色させた後、光電池比色計により測定し、Fig. 1 よりマンガン含量を算出した。又別に基本溶液と同時発色させた後、DUBOSCQ 型比色計で比色定量した。更に野生白クローバーの灰分中にマンガンの硅酸塩が存在するかどうかを知るために、常法通り HF で処理し、以後同様にして発色定量した。

これらの成績は Table 2 に示されている。この表よりわかるように、DUBOSCQ 型比色計による測定値も光電池比色計による値と大差ない成績が得られ、又試料灰分中には硅酸マンガンの存在は一応考えられない。

III. Beckman Spectrophotometer による比色法

a) 最大吸収波長の決定 1 cc 中 15.04 γ のマンガンを含む $KMnO_4$ 溶液について、その吸光度を測定し、526 $m\mu$ に最大吸収を示す成績が得られた。その成績は Fig. 2 に示されている。なお従来の報告では最大吸収の波長として 525 $m\mu$ ⁽¹⁾ が採用されているが、著者等の使用した装置では 525 $m\mu$ の吸光度は 526 $m\mu$ のそれより低く、又 526 $m\mu$ と 527 $m\mu$ との吸光度には差がなかつたので、正確な目盛で測定出来る 526 $m\mu$ を採用することにきめた。

b) 検量線の作製： 1 cc 中に 0.235~6.580 γ のマンガンを含む $KMnO_4$ 溶液について、526 $m\mu$ の波長における吸光度を測定し、最小二乗法によつて回帰線を求め作図すれば、Fig. 3 の通りである。なお、別に 1 cc 中 15.04~20.68 γ のマンガンを含む $KMnO_4$ 溶液について吸光度を測定し、それらの測定値もこの回帰線上にあることを明らかにした。

c) 発色相の安定度： 発色時に H_3PO_4 添加の有無及び $(NH_4)_2S_2O_8$ の量を変えた場合に、色相の安定度にかなる影響があるかについて実験した成績は、Table 3 の通りである。又別に 1 cc 中 0.67 γ のマンガンを含む米稈の灰分調製液についての成績によれば、1 g の $(NH_4)_2S_2O_8$ を用いた場合 H_3PO_4 を添加すれば 72 時間まで、添加しなくとも 48 時間までは色相に変化のないことが明らかにされている。

これらの成績から発色後測定までに許される時間は H_3PO_4 を添加しなくとも 48 時間、又 H_3PO_4 を添加すればなおそれ以上放置しても発色相に変化がないことが明らかにされた。然し著者等は遅くとも発色後 5 時間で測定している。

d) 成績： 野生白クローバー乾草及び数種の飼料について、上記の通りに調製せられた検液を発色させ、526 $m\mu$ の波長で測定し検量線から算出して得られた成績は、Table 4 の通りである。

Fig. 2. Absorbance Curve Estimated with the Potassium Permanganate Solution, Containing 15.04 γ of Manganese

Fig. 3. Estimation Curve of Manganese at 526 $m\mu$
 $y = 0.050x + 0.002$

Table 3. Absorbance in Progressive Hours after the Appearance of Colour with the Potassium Permanganate Solution Containing 3.76 γ of Manganese per cc.

$(NH_4)_2S_2O_8$	H_3PO_4	Hours after appearance of colour					
		0~24	48	72	96	120	144
1 g	Added	0.186	0.186	0.186	0.186	0.183	0.181
"	None	0.186	0.186	0.183	0.180	0.178	0.175
2 g	Added	0.186	0.186	0.186	0.186	0.186	0.184
"	None	0.187	0.186	0.184	0.184	0.182	0.179

Fig. 1 に示されているように、光電池比色計では 1 cc 中 1 γ 程度のマンガンを含む溶液が測定出来るが、Beckman spectrophotometer を使用すれば、1 cc 中 20 γ の濃度の溶液まで測定可能でその測定範囲が前者よ

Table 4. Manganese Contents in the Wild White Clover Hay and Several Feeds Determined by the Colorimetric Method with the Beckman Spectrophotometer

Feed	Manganese content (p.p.m.)
Rice bran	160
Defatted rice bran	223
Wheat bran	128
Wild white clover hay	43
Green oat hay	112
Plain grass hay	84
Concentrate mixture for laying hen	41
Do. for. growing chick	68
Do. for starting chick	62

ペクトルを撮影し, その図より Mn の存在を認めた. なお, その他 Ca, Fe, Si, Mg, Al, Na, K, 及び Cu の存在をも認めた. Fe, Al, Mg, 及び Mn については半定量的に $\%$ としてそれぞれ 1, 0.5, 3.5 及び 10^{-2} 程度の含量を知り, Mn を除いては前報化学分析の成績と大差のない成績が得られた.

2) 野生白クローバー乾草に含まれる Mn を, DUBOSCQ 型比色計及び光電池比色計によつて比色定量し, 更に波長 526 m μ を選定して Beckman spectrophotometer により定量した. それらの成績によれば, 乾草中の Mn 含量は 34~43 p.p.m. であつた.

3) 数種の飼料のマンガン含量を測定した成績は次の通りであつた. 米糠 160, 脱脂米糠 223, 粃 128, 青刈燕麦乾草 112, 野乾草 84, 配合飼料 41 (成鶏用), 68 (中雛用), 62 (初雛用).

本実験に際し, スペクトルの撮影及び光電池比色計による測定について御協力を得た東北大学金属材料研究所分析化学研究室, 後藤教授及び大槻, 渡辺の両氏に対し感謝の意を表する.(本報告は昭 27.4 農化大会, 昭27.8 農化東北支部大会及び昭 29.4 農化大会で講演した)

- (1) 亀高, 晴山: 農化, 28, 309 (1954).
- (2) V. C. FARMER: C. A., 45, 2368 (1951).
- (3) 水田: 日化, 70, 410 (1949); 72, 344 (1951).
- (4) E. K. JAYCOX: Anal. Chem., 22, 1115 (1950).
- (5) H. LUNDEGÅRDH: Leaf Analysis, 120 (1951).
- (6) F. NYDAHL: C. A., 43, 8304 (1949).
- (7) 武者: 化学の研究, 8 集 53 (1950).

- (8) F. D. SNELL and C. T. SNELL: Colorimetric Methods of Analysis 14 (1948).
- (9) 辰己: 獣医学の進歩, 38 (1951).
- (10) M. COPPENET: Ann. Agron., 19, 798 (1949).
- (11) SANDELL E. B.: Colorimetric Determination of Traces of Metals, 434 (1950).
- (12) 田中: 日化, 72, 136 (1951).
- (13) F. B. MORRISON: Feeds and Feeding, 1155 (1950).

Summary

(1) The presence of manganese and its content in feeds, especially in the wild white clover, is observed

(2) The presence of manganese is found at 2794.8 Å in the spectrogram of the wild white clover ash taken by the uncontinuous arc method of spectrochemical analysis. Besides this, calcium, iron, silicon, magnesium, aluminium, sodium, potassium and copper are also found in the ash.

The contents of iron, aluminium, magnesium and manganese are estimated semi-quantitatively. The result shows that they are ca. 1, 0.5, 3.5 and 10^{-2} in percentage respectively.

Their contents, except manganese, almost coincides with the result of chemical analysis of the ash, already reported in Part 4 of this study by one of the authors.

(3) The manganese content in the wild white clover hay is determined colorimetrically by the GOTO-MUSHA's photoelectric colorimeter and the Duboscq colorimeter.

The permanganate colour appears soon after the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ as the oxidising agent, its appearance being catalysed by the silver ion, and is stabilised by the addition of phosphoric acid.

り大きい. Table 2 の野生白クローバーは盛岡市上田で Table 4 のは仙台市北 6 番丁で採取されたもので, 採取地によつて大差がないことが示されたが, 野草の中には野生白クローバーよりもマンガン含量の多いものがある. このことは田中氏のイタドリ葉等の報告⁽¹²⁾からも推考出来る. 又米国における放牧草としての白クローバーについての定量値と比較すると, 著者等の試料で得た値は低い. 本邦農家で常用されている米糠或は脱脂米糠は粃よりマンガン含量が多いことがわかつた.

摘 要

1) 断続弧光法により野生白クローバーの灰分のス

The absence of manganese silicate in the ash is found colorimetrically. The result shows that the manganese content after the treatment with hydrofluoric acid is the same as after the untreated.

The wild white clover hay contains from 34 to 43 p. p. m. of manganese, which is also checked from the values determined by the Beckman Spectrophotometer at 526 m μ .

In two figures, it is shown that the manganese is precisely determined to the extent of 20 γ per cc of the solution by the Beckman Spectrophotometer, though it is scarcely able to be determined over 1 γ per cc by the photoelectric colorimeter.

The manganese content in several kinds of feed are shown in Table 4.

酵母の Pectin 分解酵素に関する研究

古市 誠, 岡本辰夫 (弘前大学農産製造学教室)

昭和 29 年 5 月 25 日 受理

Studies on the Yeast Pectic Enzymes

by Makoto FURUICHI and Tatsuo OKAMOTO (Laboratory of Agricultural

Products Technology, University of Hirosaki)

緒 言

微生物の生成する pectin 分解酵素中 pectin-polygalacturonase (以下 PG と略記する) に就ては従来専ら菌類、細菌類に関して多くの研究が行われて来たが、酵母に就ては少数の報告があるに過ぎない。

以前, C. OPPENHEIMER⁽¹⁾ に依れば PG は酵母には全く存しない。又 PITMAN 等⁽²⁾ は 1% の pectin を溶かした林檎果汁中に *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus* 等を接種し 4 カ月後に pectin 量, 粘度, jelly 化力等を調べた所変化ないことを認めた。更に BAILEY⁽³⁾ に依つて pectin 抽出液の糖類の除去に酵母が利用されているが、これは酵母が PG を含まないと云う前提に立つたものと考えられる。

然し一方、僅かでも醗酵した林檎粕から抽出された pectin の jelly 化力は、未醗酵の粕からのものに比してかなり低下する現象が H. BOCK 等⁽⁴⁾ に依つて見出されており、又最近 LUH 等⁽⁵⁾ は多数の酵母に就て調べた結果 *S. fragilis*, *S. thermotolerans*, *Candida pseudotropicalis*, *Torulopsis lactosa* の如き極少数の酵母には明かに PG の存することを認め、更にその酵素の性質、反応生成物に就て報告している。同様に ETCHHELLS 等⁽⁶⁾ に依れば試験した 143 種の酵母中、僅か 4 種類 (*S. fragilis*, *S. fragilis* の 1 変種, *S. cerevisiae*, unidentified yeast Y-659) のみが pectin を分解した。我国に於ても小沢⁽⁷⁾ が麦芽汁に培養した麦酒酵母に PG の存在することを認めている。

上述のように酵母中には例え存在するとしても僅か数種の非常に限られたもののみ PG が存在すると考えられる。而して LUH 等⁽⁵⁾ 及び小沢⁽⁷⁾ の実験は何れも methoxyl 基の含量を考慮せず単に pectin を基質としている。反之、E. F. JANSEN 等⁽⁸⁾ は pectin-methylesterase (以下 PM と略記する) を除いた市販品 Pectinol を用い pectin 質の methoxyl 基含有量が PG の酵素力に如何なる影響を及ぼすかを検討し、PG の真の基質は pectic acid であるべきことを明かにした。然し最近 SEEGMILLER 等⁽⁹⁾ の報告では pectic acid より寧ろ pectinic acid の方を早く分解する酵素 — Polymethylgalacturonase — の存在を認めている。

これらの点を考慮して、著者等は酵母に於ける PG の存否並に PG の activity と pectin の methoxyl 基含有量との関係を多数の酵母に就いて検討したので茲に報告する。

実 験 方 法

1) 基 質 林檎粕より調製した pectinic acid (moisture 9.55%, ash 0.45%, methoxyl 基 9.35%, galacturonic acid 69%) 及びこれに計算量の alkali を添加して脱 methyl させた pectinic acid 並びに pectic acid を用いた。

2) Pectin-polygalacturonase の作用力測定法 還元力の増加及び粘度の低下の測定に依つて酵素作用を調べた。

還元力の増加は WILLSTÄTTER-SCHUDEL の hypiodite 法の E. F. JANSEN 等⁽⁷⁾ に依る変法を用いて測