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

定した。即ち試料 5 cc に 1 M Na₂CO₃ 溶液 0.9 cc 及び 0.1 N 沃度沃度加里溶液 5 cc を加え室温に 20 分間密栓して放置し、之に 2 N H₂SO₄ 溶液 2 cc を加え 0.02 N チオ硫酸ソーダ溶液で滴定した。

粘度の低下は OSTWALD の粘度計を用い、20° にて測定した。而して酵素の activity は次の如く現わした⁽¹⁰⁾。

$$\text{Relative Efficiency (R. E.)} = (t_a - t_b) / (t_a - t_0) \times 100$$

但し、 t_x = 酵素反応液の x 時間後の粘度 (秒数)

t_a = 加熱に依り不活性化した酵素反応液の粘度 (秒数)

t_0 = 基質を含まない酵素反応液の粘度 (秒数)

3) **Pectin-methylesterase** の作用力測定法 H. LINEWEAVER 等⁽¹¹⁾ による KERTESZ 法⁽¹²⁾ の変法を用いた。即ち 1% pectinic acid 溶液 10 cc に 1.5 M NaCl 溶液 2 cc 及び酵素液 2 cc を加え、更に 0.1 N NaOH 溶液、蒸溜水及び methyl red 指示薬数滴を加えて反応液の pH を 6.0 附近 (反応液が黄色を呈する程度) にすると共に全量を 20 cc とした。この反応液を 30 分間 30° に保ちその間常に pH が 6.0 附近にあるように 0.1 N NaOH 溶液を絶えず滴下した。かくて NaOH の総消費量を定量し、脱 methyl 作用を測定した。

実験結果並に考察

1) **Pectin-methylesterase** の存否 酵母に PM の存在しないことは LUH 等⁽⁵⁾ も認めているが、もし PM が酵母に存在するならば、次に行う酵母の PG と methoxyl 基含有量を異にする基質との関係を見る実験が無意味になるので、著者等も改めて各種酵母に就て PM の存否を調べた。

酵素液としては下記酵母をそれぞれ酵母水 (7% の葡萄糖を含む) に 25°, 3 日間培養し遠心分離によつて菌体を除去した上澄液を用いた。使用酵母は次の 35 種である。

清酒酵母協会 5 号; 同 6 号; 葡萄酒酵母 OC No. 2; 麦酒酵母 München (Untergärige); 林檎酒酵母⁽¹³⁾ No. 1 Apple; No. 2 Apple; 同 Kokko No. 1; 同 Kokko No. 2; 同 Kokko No. 3; 同 Cider No. 4; 同 Cider No. 7; 同 Cider No. 10; 同 Cider No. 17; 同 Cider II; 同 Cider VI; 同 G No. 1⁽¹⁴⁾; 同 G No. 2⁽¹⁴⁾; 同 M No. 5⁽¹⁴⁾; 同 England; Yeast U. S. A.; Fleischmann Yeast; 酒精酵母 Rasse II; 酒精酵母 Rasse XII; *S. formosensis* Nakazawa; O-Yeast (大原農研 小沢潤二郎氏より送付されたもの); H-2 (林檎酒より新たに分離); H-3 (林檎デリシヤスより新たに分離); H-4 (林檎紅玉より新たに分離); *S. fragilis* Jörgensen 0288; 同 0541; Jerez No. 5 *Torulopsis*; Chalon No. 1 *Pichia*; *S. valesiacus* Osterwalder; *S. oviformis* Osterwalder; Rein Hefe Taranto.

その実験結果を見るに、対照として行つたトマトの酵素液が 30 分間に 0.1 N NaOH 溶液 2 cc を消費するのに対して、使用した酵母は総て何等アルカリを消費しなかつた。特に *S. fragilis* 0288, *S. fragilis* 0541, 麦酒酵母 München に就ては、念の為ガラス電極 pH 計を用いて精密に測定したが pH の低下は全然見られなかつた。従つて試験した酵母は何れも PM を有しないと認められる。

2) **PG 生成量と培養日数** 予備試験の結果特に PG の力が強いと思われた *S. fragilis* 0288 及び麦酒酵母 München に就て培養日数と PG activity との関係を粘度の測定により追求した。その結果を示せば Table 1, 2 及び Fig. 1, 2 の通りである。

Table 1. Production of Pectin-Polygalacturonase by Beer Yeast München

Age of Culture (hour)	0	18	42	65	90	110	140
pH	5.4	5.4	4.6	4.6	4.4	4.4	4.4
Residual Sugar (%)	7.17	6.66	4.40	1.30	0.26	0	0
Variation of Viscosity	t_0 135	135	139	122	122	122	122
	t_4 135(0)	135(0)	96(46.23)	86(47.36)	86(47.36)	86(47.36)	86(47.36)
	t_{24} 113(0)	113(24.71)	59(86.02)	46(100)	46(100)	46(100)	46(100)

Note: ( ) = Relative Efficiency. $t_0 = 46$.

Table 2. Production of Pectin-Polygalacturonase by *S. fragilis* München.

Age of Culture (hour)	0	18	42	65	90	110	140
pH	5.4	5.4	5.0	5.0	5.0	4.4	4.4
Residual Sugar (%)	7.17	6.40	5.84	5.15	4.08	2.95	1.48
Variation of Viscosity	t_0 138	138	138	125	125	125	125
	t_2 138(0)	93(59.78)	50(95.65)	46(100)	46(100)	46(100)	46(100)
	t_{24} 138(0)	50(95.65)	46(100)	46(100)	46(100)	46(100)	46(100)

Note: ( ) = Relative Efficiency. $t_0 = 46$.

Fig. 1. Production of Pectin-Polygalacturonase by Beer Yeast München.

Fig. 2. Production of Pectin-Polygalacturonase by *S. fragilis*.

以上の結果から両菌共 25° で 3 日間培養すれば最高の activity を示し、少くともその後 3 日間は酵素力が衰えないことが明かとなつたので、以後の実験には酵素液として 3 日以上 6 日まで培養したものを用いた。

3) 基質 (pectinic acid) の methoxyl 基含有量の PG activity に対する影響。

i) 前と同様に *S. fragilis* 0238, 及び麦酒酵母 München の 2 菌種を用い、5% の葡萄糖を含む酵母水に 25°, 5 日間培養し遠心分離に依つて菌体を除去した上澄液を酵素液とした。酵素反応液の組成及び反応条件は

Table 3. Pectin-Polygalacturonase (from Beer Yeast München) Hydrolysis of Pectinic and Pectic Acid. Methoxyl Content adjusted by Alkaline Hydrolysis.

OCH ₃ content (%)	Time of Enzymic Action (hours)	0	24	48	72
0	Increase of Reducing power*	0	1.66	2.29	2.29
	ΔMeq. Galacturonic Acid†	0	0.083	0.114	0.114
2.67	Increase of Reducing Power	0	1.63	1.93	1.93
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.081	0.096	0.096
5.41	Increase of Reducing Power	0	1.15	1.15	1.15
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.057	0.057	0.057
7.92	Increase of Reducing Power	0	0.69	0.70	0.70
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.034	0.035	0.035
10.38	Increase of Reducing Power	0	0.40	0.40	0.40
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.020	0.020	0.020

* Titer (cc) of 0.02 N Na₂S₂O₃ solution.

† Increase of milliequivalents of galacturonic acid.

次の如くである。

1% pectinic acid (methoxyl 基含有量を異にするもの) 又は pectic acid 溶液 40 cc, MCILVAINE 枸橼酸緩衝液 20 cc, 酵素液 20 cc 及び toluol 1 cc.

以上の反応液を pH 3.8, 40° に保ち反応せしめ、経時的に試料 5 cc 宛採り還元力の増加を測定した。その結果を Table 3, 4 及び Fig. 3, 4 に示した。

以上、酵母の PG は基質の methoxyl 基含有量の少い程その加水分解の速度並に範囲が増大し、天然の

Fig. 3. Pectin-Polygalacturonase (from Beer Yeast München) Hydrolysis of Pectinic and Pectic Acid.

pectin とほぼ等しいと考えられる methoxyl 基含有量 10.38% の pectinic acid は最高の酵素力を示す *S. fragilis* に於ても理論値の僅か 3% しか分解されない事が判明した。この事実は、酵母には PM が存在しない事から考えて、果汁醗酵の際酵母のみによる清澄作用は余り期待出来ないことを示すものと考えられる。

ii) 更に多数の酵母に就ても以上の如き PG activity と基質の methoxyl 基含有量との関係が成立するか否かを確かめるため、pectic acid 及び pectinic acid (methoxyl 基含有量 10.38%) に就て粘度低下及び還元力の増加を測定した結果を示せば Table 5 の通りである。酵素液の調製法、酵素反応液の組成、反応条件は i) に於けると同様である。

Table 4. Pectin-Polygalacturonase (from *S. fragilis*) Hydrolysis of Pectinic and Pectic Acid. Methoxyl Content adjusted by Alkaline Hydrolysis.

OCH ₃ content (%)	Time of Enzymic Action (minutes)	0	15	30	60	90
0	Increase of Reducing power*	0	1.34	2.52	3.18	3.20
	ΔMeq. Galacturonic Acid†	0	0.067	0.126	0.159	0.160
2.67	Increase of Reducing Power	0	1.10	2.38	2.59	2.67
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.055	0.119	0.129	0.133
5.41	Increase of Reducing Power	0	1.10	1.32	1.36	1.43
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.055	0.066	0.068	0.071
7.92	Increase of Reducing Power	0	0.77	0.80	0.80	0.80
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.038	0.040	0.040	0.040
10.38	Increase of Reducing Power	0	0.40	0.40	0.40	0.40
	ΔMeq. Galacturonic Acid	0	0.020	0.020	0.020	0.020

* Titer (cc) of 0.02 N Na₂S₂O₃ solution.

† Increase of milliequivalents of galacturonic acid.

Fig. 4. Pectin-Polygalacturonase (from *S. fragilis*) Hydrolysis of Pectinic and Pectic Acid.

供試酵母 35 種 (菌名は前出) 中, 23 種は粘度の低下も還元力の増加も認めることが出来なかつたが, Table 5 に記載した 12 種は *S. fragilis* を最高とし以下僅少乍ら酵素作用を認めることが出来た。而して pectinic acid に対してよりも pectic acid に対しての方が, 矢張遙かに分解力の強いことが認められた。

Table 5. Pectin-Polygalacturonase (from Various Yeasts) Hydrolysis of Pectinic and Pectic Acid.

Substrate	Variation of Viscosity						Increase of Reducing Power†	
	pectic acid			pectinic acid (OCH ₃ =10.38%)			pectic acid 24	pectinic acid 24
	t _a	t ₃	t ₂₄	t _a	t ₃	t ₂₄		
Time of enzymic action (hours)	t _a	t ₃	t ₂₄	t _a	t ₃	t ₂₄		
<i>S. fragilis</i> 0288	92*	48(93.61)	48(93.61)	272	151(53.30)	126(64.31)	2.75	0.30
<i>S. fragilis</i> 0541	92	48(93.61)	48(93.61)	270	169(44.88)	131(61.77)	3.00	0.30
Beer yeast München	118	73(61.64)	49(94.51)	282	232(21.09)	190(38.81)	1.50	0.25
Cider yeast cider II	132	81(58.62)	53(90.80)	335	260(25.86)	226(37.58)	1.10	0.20
H-2	133	96(42.04)	58(85.22)	317	260(20.95)	219(36.02)	0.70	0.16
H-4	128	92(43.37)	65(75.90)	312	295(9.73)	222(33.70)	0.50	0.10
Cider yeast cider 3	128	90(45.78)	58(84.33)	308	272(13.68)	235(27.67)	0.50	0.10
H-3	122	100(28.57)	58(83.11)	302	267(13.61)	231(27.62)	0.50	0.10
Alcohol yeast Rasse II	138	110(30.10)	77(65.59)	310	282(10.56)	258(19.62)	0.30	0.0
Cider yeast Apple No. 2	125	98(33.75)	71(67.50)	294	280(5.62)	248(18.47)	0.30	0.0
Alcohol yeast Rasse XII	127	110(20.73)	80(57.31)	307	298(3.43)	252(20.99)	0.20	0.0
Cider yeast England	127	102(30.48)	82(54.87)	287	267(8.26)	252(14.46)	0.15	0.0

Note: ( ) = Relative Efficiency.

* = second.

† = Titer (cc) of 0.02 N Na₂S₂O₃ solution.

斯くして著者等の試験した結果では, 酵母の PG は pectic acid の方に親和力が強く, SEEGMILLER 等⁽⁹⁾の所謂 polymethylgalacturonase ではないと云える。更に弱い乍ら総数の約 1/3 が PG を有することが判り, 酵母に於ける PG の分布は案外広いのではないかと考えられる。従つて又酵母の品種に考慮を払えば, BAILEY⁽³⁾が云う様に果汁圧搾残渣より pectin を精製するに当り, 糖分除去の手段として充分これを利用し得るであろう。

要 旨

35 種の酵母に就てその pectin 分解酵素力を調べ次の事実を認めた。

1. 酵母には pectin-methylesterase は存在しない。

2. 酵母の pectin-polygalacturonase (PG) の作用力は、その基質である pectinic acid の methoxyl 基含有量に依つて強く支配され、真の基質は pectic acid である。従つて酵母の PG は SEEGMILLER 等の所謂 polymethylgalacturonase ではない。

3. Pectic acid を基質として PG の activity を調べれば酵母中には、*S. fragilis* を最高とし、他は弱い作らかなり広く分布している。

(1) C. OPPENHEIMER: <i>Die Fermente und ihre Wirkungen</i> . Band I (1936).	(7) 小沢潤二郎, 武田 晃: 農学研究, 39, 9~12 (1950).
(2) G. A. PITMAN & W. V. CRUESS: <i>Ind. Eng. Chem.</i> , 21, 1292 (1929).	(8) E. F. JANSEN & L. R. MACDONNELL: <i>Arch. Biochem.</i> , 8, 79 (1945).
(3) H. S. BAILEY: U.S. Pat., 2,387,635 (1945).	(9) C. G. SEEGMILLER & E. F. JANSEN: <i>J. Biol. Chem.</i> , 195, 327~36 (1952).
(4) H. BOCK: <i>Chem.-Ztg.</i> , 65, 461 (1941).	(10) F. WEBER & H. DEUEL: <i>Helv. Chim. Acta</i> , 29, 1872 (1946).
(5) B. S. LUH & H. T. PHAFF: Paper given at the American Chemical Society Meeting, April, 1948; <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 33, 212 (1951); <i>ibid.</i> , 36, 231 (1952).	(11) H. LINEWEAVER & G. A. BALLOU: <i>Arch. Biochem.</i> , 6, 373 (1945).
(6) I. L. ETCHHELLS & T. A. BELL: unpublished work. (1950); Z. I. KERTESZ: <i>The Pectic Substances</i> . p. 348 (1951).	(12) Z. I. KERTESZ: <i>J. Biol. Chem.</i> , 121, 589 (1937).
	(13) Institute for Fermentation, Osaka: <i>List of Cultures</i> (1953).
	(14) 朝井勇宣 農化, 14, 659 (1938).

Summary

It may be concluded from the investigation of pectic enzymes about various yeasts as follows.

1. Pectin-methylesterase is not produced by yeasts.
2. Yeast pectin-polygalacturonase activity is heavily affected by the CH_3O content of the substrate (pectinic acid). Therefore, the true substrate of yeast pectin-polygalacturonase is pectic acid and this enzyme does not belong to the so-called polymethylgalacturonase reported by SEEGMILLER *et al.*
3. Pectin-polygalacturonase is widely distributed in yeasts. *Saccharomyces fragilis* indicates the maximum activity though others generally slight.

えのきだけの生化学的研究 (第3報)

Amino Acids 及び Vitamins が菌糸体の生育に及ぼす影響

脇 田 正 二 (横浜国立大学学芸学部農学教室)

昭和 29 年 6 月 1 日 受理

Biochemical Studies on the Velvet-Mushroom, *Collybia velutipes*. Part 3. Effect of Amino Acids and Vitamins on the Growth of the Mycelium.

By Shōji WAKITA (Agricultural Institute of Yokohama National University)

えのきだけは麦芽エキスには極めてよく生育並びに発芽するが、合成培養基には生育も発芽も困難である。えのきだけの生化学的研究を遂行するためには、合成培養基に良好な生育を可能ならしめる事が強く要求される。Amino acids 及び vitamins は菌類の生育と密接な関係をもつものとして多く研究されているが、えのきだけでも一般の菌類と同様 heterotropic であるから窒素源としては amino acids のごとく有機窒素が有利であると考えられるが、同時にこれは従来の多くの研究に見るごとく growth factor としての効果をも無視することは出来ないと考える。かような見地から HENNEBERG 培養基を minimal medium として用い、growth factor としての amino acids 及び vitamins がえのきだけ菌糸体の発育に如何なる関係を有するかを試験したので報告する。

実 験 方 法

- (1) 供試菌種: *Collybia velutipes* No. 67.