- (12) J. M. NELSON : Copper Enzyme, 76 (1950).
 (13) G. C. WEBSTER : *Ann. J. Bot.*, 39, 739 (1952).
 (14) G. C. WEBSTER : *Science*, 117, 530 (1953).
 (15) 鈴木直治 日植物講演会 (1954年4月).
 (16) R. HILL and E. E. HARTREE *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 4, 115 (1953).
 (17) D. KEILIN *Proc. Roy. Soc. (London)*, [B] 104, 206 (1928).
 (18) W. O. JAMES : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 4, 59 (1953).
 (19) O. R. GODDARD and C. HOLDEN *Arch. Biochem.*, 27, 41 (1950).
 (20) D. KEILIN and E. F. HARTREE *Proc. Roy. Soc. (London)*, [B] 129, 277 (1940).
 (21) W. H. MILLER and C. R. DAWSON : *J. Ann. Chem. Soc.*, 63, 3375 (1941).
 (22) 瓜谷 : 農化, 27, 781 (1953).
 (23) 瓜谷, 星谷, 滝田 : 農化, 27, 785 (1953).
 (24) A. STRECKER : *Ann.*, 123, 363 (1862).
 (25) A. SCHÖNBERG, R. MOUBASHER and A. MOSTAFA *J. Chem. Soc.*, 176 (1948).
 (26) R. MOUBASHER and IBRAHIM *J. Chem. Soc.*, 702 (1949).
 (27) A. SCHÖNBERG and R. MOUBASHER : *Chem. Rev.*, 50, 261 (1952).
 (28) R. WILLSTÄTTER and A. PHENNENSTIEL : *Ber.*, 37, 4745 (1904).

Summary

1) The terminal oxidase participating in the sound sweet potato is mainly cytochrome oxidase. In the black-rotten sweet potato, cytochrome oxidase certainly takes part in respiration of the sound part next to the injured part, but it might be possible that the other oxidase concerns, as a terminal oxidase, in respiration of the sound part of black-rotten sweet potato.

2) Among the polyphenol substances separated from the black-rotten sweet potato, chlorogenic acid and methyl caffeate were oxidized most quickly by the polyphenol oxidase of sweet potato, and isochlorogenic acid, pseudochlorogenic acid were the next. Each of these substances was oxidized more rapidly than catechol.

3) As reported previously, the sound part next to the injured part of black-rotten sweet potato turned green in the presence of air, when it was dipped in NaHCO_3 solution. The coloration is considered to occur through the following process :

(1) the esters of caffeic acid such as chlorogenic acid, accumulated in black-rotten sweet potato, are oxidized by polyphenol oxidase, (2) *o*-quinone substances which were produced as the result of the oxidation, oxidized amino acids through Strecker degradation to be reduced substance which may contain amino group, (3) the bases condensed with the quinone substances in the alkaline condition to give the bluish pigment in the similar process to ninhydrin reaction.

The authors wish to express their appreciation to Prof. Yusuke SUMIKI, Prof. Saburo FUNAHASHI, and Prof. Takeshi MORI for their guidance and advices.

固形麴と液体麴に就て

坂口謹一郎 (東大農化), 岡崎 浩 (三共研究所), 竹内増親 (朝日麦酒)

昭和 30 年 1 月 11 日 受理

A Note on the Comparison of Kôji and Submerged Cultures.

By Kin'ichi SAKAGUCHI (Fac. of Agr., Univ. of Tokyo), Hiroshi OKAZAKI (Sankyo Co., Research Lab.) and Masuchika TAKEUCHI (Asahi Beer Brewing Co.)

同一の麴菌を固形物に生やした場合と液内通気培養にした場合とで菌体の量, autolysis の度合, 呼吸や酵素の関係等にどんな差があるかを知ることが麴菌の応用上大切なことである。たまたまアスベストを麴材料に用いた BINDAL⁽¹⁾ 等の報告にヒントを得て下記の実験を行い, その一斑を窺うことが出来たのでここに報告する。著者等の「アスベスト麴法」が麴や米を材料とした場合と又振盪培養が工場の液体麴とそれぞれ何の程度までのパラレルズムがあるかはなお検討の余地もあるが, 少なくとも大体の傾向に於て間違いのないものと思う。

実験方法

I. Asbestos 麴

1. アスベスト調製 アスベストは角閃石アスベスト, 蛇紋石アスベストの2種に大別され, 前者は繊維不規則なるも高温に耐える特徴を有し, 後者は直角に繊維交叉し良質であるという。筆者等は上記のいずれかは

明であるが和光純薬と小宗化学の製品とを比較し後者を採用に耐えうるものとして採用した。

先ず粗製品を 5~10% NaOH に 28 時間 100° に熱し、水洗する。次に 1:9 稀 HNO₃, 約 50~60% NaOH, 濃 HCl にて順次同様処理し、最後に酸の反応を呈しなくなるまで、蒸留水で洗滌したのち乾燥し、これを 0.3 g 内外ずつ小型坩堝に移して灼熱すること 8 時間ののち放冷して供試品とする。この灼熱時間の適度はアスベストにより予め予備試験で定める必要がある。上記処理のうち濃 NaOH 処理は KJELDAHL 分析に耐え得る品となさんがために行う。又水洗に当つてはなるべく細い繊維を流出させるようにする。如上の精製によつて得られた供試品は、酸処理、アルカリ処理をしても減量せず、又処理液に Fe の反応は見られず、又これを任意の pH を有する液に投入してもその pH を変化せしめない。これを硫酸及び K₂SO₄, CuSO₄ と熱したのち、アルカリ性で水蒸気蒸溜しても KJELDAHL-N は認められない。

2. アスベスト培養法 正確に上記精製アスベスト 1 g を 100 cc 容三角フラスコに取り、2 cc の下記培養液を添加し、120°, 15 分の殺菌ののち、約 20 時間 30° に放置したもの、下記菌株の孢子懸濁液 (2.9 × 10⁶ spores per cc.) 0.5 cc を接種し 30° において培養する。

培養液の組成* 澱粉 4%, 酒石酸アンモン M/20/l, Na₂HPO₄ M/20/l, KCl M/100/l, MgSO₄ M/500/l, CaCl₂ M/1000/l, FeSO₄ M/100,000/l, pH 5.0.

3. 菌体量の測定 生育せるアスベスト麴をグーチ坩堝*₁に移し、毎回 10 cc の蒸留水で 5 回洗滌する。この間温度はなるべく低く保ち、5~15 分間で終了するようにする。尚この洗滌液は後記項目の定量用として保存する。かくして洗滌の終了したアスベスト麴を蒸気浴中で乾燥後秤量し、次にそのまま坩堝中で恒量になるまで灼熱したのち秤量し、前者の値から後者の値を差引いた値を以つて菌体量とした。従つてこの値は菌体中の灰分量が含まれていない。尚この方法による定量誤差は予備実験の結果菌体量として 10~30 mg に対し ±0.5 mg 程度である。

4. 菌体粗蛋白含有量：上記の方法によつて洗滌したアスベスト麴を KJELDAHL 分解瓶に移して分解し、窒素の定量を行い、この値に 6.25 を乗じて菌体粗蛋白量とした。

5. 菌体量測定の際の洗滌液の一定量について常法により、全窒素、アミノニヤ態窒素、澱粉、直接還元糖を定量した。糖還元力の定量は FEHLING-LEHMANN-SCHOORL 法による。

6. アミラーゼ力：アスベスト麴（アスベストとして 1 g）に 20 cc の蒸留水と少量のトルオールを加えて室温で 15~18 時間抽出した濾液 5 cc に対し 2% soluble starch 50 cc, MCILVAINE buffer (pH 4.8) 5 cc, 蒸留水 5 cc を混じ 30° において作用させ、生ずる還元力をグルコースとして表わし、グルコシッド結合分解率を算出した。この配合において 1 時間でグルコシッド結合分解率 10% を示す酵素力を便宜上 100 として比較した。尚、予備実験の結果、アミラーゼはアスベストに吸着されないこと、又沃度澱粉反応消失力とグルコシッド結合分解率とは各培養日数の麴においてはほぼ比例することをみとめたので、敢て糊精化力の表示は行わなかつたのである。

II. 液 体 麴

アスベスト麴の場合と同じ培養液 100 cc を坂口コルペンに採り、120°, 15 分の殺菌ののち 30° に 1 夜 放置したのち、孢子懸濁液（前記に同じ）25 cc を接種し 30° で reciprocating shaker で培養した。

菌体量はよくふつた培養液 10 cc を予め秤量せるグーチ坩堝に移し、菌体を濾別し、洗滌したのち乾燥秤量しその菌体をそのまま KJELDAHL 定量に用いた。濾液はこれを 100 cc にし、この 10 cc ずつについてアスベスト麴同様、各因子を定量した。又別に培養液を菌体もろとも 5 cc とりこれに 45 cc の水及び少量のトルオールを加え室温に放置して菌体内アミラーゼの抽出を行い濾液を用いてアミラーゼの定量を行つた。尚すべて培養中に蒸発する水分についての換算補正は行わなかつた。

III. 使用 菌 株

- (1) *Aspergillus oryzae* s. str. A (2) *Aspergillus oryzae* var. *gibbosus* M 2-1
- (3) *Aspergillus oryzae* NRRL No. 692.

実験結果ならびに考察

* 赤堀、萩原：酵素化学シンポジウム 1951 年度の発表を参考にした。

* このグーチ坩堝の底部はあらかじめ精製した一定量のアスベストを濾板上にうすくしきつめておく。

以上の方法によつて行つた 3 菌株のアスベスト麹及び液体麹の経時的定量結果はそれぞれ Table 1~3 の a, b, 及び Fig. 1~3 に示す。

Table 1 *Aspergillus oryzae* s. str. A.

a. Asbestos Culture

Incubation days	1	2	3	4	5	6
Analyzed.						
Residual starch% to initial starch	83.6%	34.9	6.2	6.2	4.7	4.2
Direct reducing sugar % to initial starch				2.2	1.9	2.1
Total nitrogen % to initial Total-N	61.0%	49.1	15.3	31.2	31.8	34.6
NH ₃ -N % to initial Total-N		4.1	9.8	27.4	28.9	32.5
Mycelium mg/cc medium	4.2 mg	13.4	14.8	14.6	11.8	12.4
Crude protein content of mycelium	50.3%	41.6	33.8	16.4	26.1	22.7
Amylase unit/1 cc medium	35	111	125	123	141	148
pH	5.4	5.4	7.0	7.6	7.6	7.8

Initial medium contains 39.70 mg of starch, 0.50 mg of reducing sugar 1.341 mg of total-N and 1.31 mg of NH₃-N per cc.

b. Submerged Culture

Incubation Days	1	2	3	4	5	6	7	8
Analyzed								
Residual starch % to initial starch	80.5%	21.6	10.6	7.8	8.8	8.4	6.8	
Direct Reducing Sugar % to initial starch	32.0%	8.8	1.8	1.2	1.0	1.2	2.3	
Total nitrogen % to initial Total-N	92.1%	24.1	17.3	17.6	43.5	55.8	70.0	
NH ₃ -N % to initial Total-N	58.8%	13.4	4.2	9.9	31.8	44.5	58.3	
Mycelium mg/lcc medium	5.0 mg	11.2	14.0	16.4	17.4	14.4	14.6	
Crude protein content of mycelium %	52.5%	23.7	41.5	34.9	29.7	30.8	22.8	
Amylase unit/lcc medium	25.7	0.0	14.6	31.2	75.5	114	99.5	
pH	4.8	3.6	5.4	7.2	7.8	8.0	8.2	8.4

Initial medium contains 40.76 mg of starch, 0.57 mg of reducing sugar, 1.402 mg of total-N and 1.35 mg of NH₃-N per cc.

Table 2 *Aspergillus oryzae* var *globosus* nov. var., M2-1

Incubation Days	a. Asbestos Culture				b. Submerged Culture			
Analyzed	2	4	6	8	2	4	6	8
Residual starch % to initial starch	15.8%	6.3	5.6	5.5	20.6	7.1	7.0	6.7
Direct reducing sugars % to initial starch	2.9%	1.9	2.0	1.2	6.3	2.5	2.3	1.8
Total-nitrogen % to initial Total-N	10.7%	20.6	28.0	23.0	13.0	22.6	41.5	57.6
NH ₃ -N % to initial Total-N	2.5%	5.6	16.9	19.8	5.9	20.4	38.1	46.5
Mycelium mg/lcc medium	15.4mg	13.0	13.1	13.7	15.4	17.7	15.4	10.7
Crude protein content of mycelium %	36.3%	31.3	30.2	24.8	44.3	35.6	31.7	33.4
Amylase unit/lcc medium	103	87	103	110	0.4	44.6	54.2	61.5
pH	6.8	7.4	7.0	7.2	3.8	7.2	7.6	7.6

Initial medium contains 39.28 mg of starch, 0.65 mg of reducing sugar, 1.32 mg of total-N and 1.30 mg of NH₃-N per cc.

Table 3 : *Aspergillus oryzae* NRRL No. 692

Incubation Days	a. Asbestos Culture				b. Submerged Culture			
Analyzed.	2	4	6	8	2	4	6	8
Residual starch % to initial starch	10.62%	5.7	5.2	4.5	14.3	6.9	5.4	8.6
Direct reducing sugar % to initial starch	2.11%	2.0	1.5	1.4	1.7	2.2	0.9	1.3
Total-nitrogen % to initial total-N	16.72%	32.4	25.8	19.1	5.4	19.4	45.1	67.3
NH ₃ -N % to initial Total-N	5.1%	3.3	3.2	2.8	1.2	6.3	36.9	59.9
Mycelium mg/lcc medium	15.0mg	13.9	13.9	12.4	12.5	17.8	15.0	10.1
Crude protein content of mycelium %	32.6%	26.6	25.7	29.3	43.8	38.7	36.4	40.0
Amylase unit/lcc medium	115	190	220	200	4.6	50	53	47
pH	5.0	7.2	7.0	6.8	5.0	7.0	7.8	8.4

Initial medium contains 39.3 mg of starch, 0.21 mg of reducing sugar, 1.346 mg of total-N, and 1.275 mg of NH₃-N per cc.

以上のデータにより考察すれば次の通りである。

1. 菌体の増加及び自己消化について 菌体量はアスベスト麹では2日目附近において最高を示したのちゆるやかに減少する。Submerged culture (以下 SC とする) では2日目以後更に増加し、4日乃至5日に至つて最高を示し、以後は急に減少する。菌体量の最高値は3菌株とも常にアスベスト麹よりも SC の方が約1.2倍位高い傾向を示している。又菌体最高を示した後の減少速度が SC の方が急なことは自己消化がはげしいことを示す。このことは窒素源の消長のデーターからも首肯される。一たん窒素が菌体に同化されたのち再び培養基中に溶出する速度は SC の方がアスベスト麹よりもはるかに急であり量的にも多い。両培養法における菌体自己消化速度の差を実測によつて示した報告は本報がはじめてであろう。

2. 菌体粗蛋白含有量: 菌体の蛋白質含有量は両培養法とも常に培養初期のものの方が後期のものよりも高い傾向を示している。このことは酵母、バクテリア等においても認められる現象である。しかし3菌株ともに SC の方が Asbestos 麹よりも常にやや高い傾向をみとめることができる。この事実は簡単に説明することは出来ないが、一つの考え方として、SC にあつては通気攪拌によつて急速な菌体の増殖が行われ次々と蛋白含有率の高い菌体が生成するに反してアスベスト麹にあつては、若い菌糸の伸長と同時に分生胞子の発育が盛に行われ、常に胞子の形成された古い菌体と若い菌糸が共存するために蛋白含有率の平均値が下廻るのではないかと想像される。平面寒天上に糸状菌コロニーが生育するとき常に中心部に胞子の形成を伴いつつ周辺に菌糸が伸長してゆく状が、そのまま麹基質中に展開されているとみなして差支えあるまい。

3. pH の変化: 培養中の pH の変化は古くから問題にされるところであるが、ことに最近生化学研究の発展は pH 環境の各種酵素の生成ならびに活力に対する影響、たとえば *Aspergillus oryzae* の酸生産と pH との関係⁽²⁾ 酵素の potential activity と effective activity の関係⁽³⁾、或は deaminase と decarboxylase との相関⁽⁴⁾等を逐次具体的な実験データとして明確化しつつある。この点については両培養法の間には大した差違がみとめられず、ただ *Asp. oryzae* NRRL 692 を除く他の2株は SC においてはいずれも初期において pH 3.6 ~ 3.8 に下るのが認められる。この事実は生育初期における酸性物質の生産か、或いは NH₃-N の同化急激なために酒石酸根を遊離して下るものか、或いは他に複雑な機構が存在するものか、記憶すべき現象として今後にゆずることにした。

4. アミラーゼの生成について: アミラーゼの生成は両培養法の間大きな差がみとめられる。先づアスベスト麹においては、菌体の生成に並行してアミラーゼは順調に増加し、菌体量の最高時期に前後してその増加は次第にゆるやかになる。これに反し SC においては初期における菌体の増殖は旺んに行われてもアミラーゼはほとんどみとめられず漸く後期において上昇をみる。しかも培養液 1cc 当りのアミラーゼ力はアスベスト麹の方が常に高値を示し NRRL 692 の如きは約4倍を示す。

両者のアミラーゼ生成にかくの如き顕著な差違のあらわれる理由は早急には解明しえない。恐らくは両法に於ける酸素供給の量的の差又は形式上の差によるものであらう。SC に適する菌株と固形麹に適する菌株等菌株の差も亦重視しなければならない⁽⁵⁾。M2-1、及び A. の2株が前記の通り SC の初期において pH が下るので或いはこのためにアミラーゼ生産が抑えられるか又は破壊されるかして初期の力価が低いのかとも思われるが、NRRL 692 の場合は pH がなんら両法の間に差なく、しかもやはり SC の方がアミラーゼ生成が少い。いずれにしても更に詳細な今後の研究に待たねばならぬがアミラーゼの生産は菌体の分生胞子形成と直接又は間接の関係があるのではなからうか、すなわちアスベスト麹においては菌糸の新生と胞子生成とが並行してすすむに反し、SC にあつては初期において菌糸の生成のみ行われ、器官の形成がおくれるためアミラーゼの生成がおくれるのではないかと考えられるのである。

5. 菌体量とアミラーゼ: 菌株間におけるアミラーゼの生産力と菌体生成力とは外見上の関係はみとめられない。即ち3菌株とも菌体量の最高値は約 15 mg/cc の order であるが、アミラーゼの生産量は相互に大に差がある。SC の菌体量がアスベスト麹のそれに比し僅か上廻り乍らアミラーゼ力ははるかに低い。かつて坂口及び秋山⁽⁴⁾は麹におけるアミラーゼの生成は麹そのものの呼吸力に並行することを観察したが、これらの点をも考合して今後の問題としたい。

以上の説明と考察によつて両培養法の差違に関する若干のヒントを得たと思うのである。ただこの実験が一種類の合成培養液を用いてのデーターである点大いに不充分であり、更に今後各種の栄養源をかえて検討すると共

に上記考察にもとづく種の定量をつけ加え、逐次初期の目的を達したいと考える次第である。

総 括

1. 深部培養法と麴法の糸状菌生理に及ぼす影響の相異をみようとして本実験を行つた。麴法に於て菌体量及び培養基質成分の消長を正確に知るためにアスベスト培養法を提案した。
2. 菌体量は液体麴の方が麴法に比しやや上回る傾向を認めた。
3. 菌体の自己消化は麴法の方が遙かに緩徐である。
4. 菌体蛋白含有率は両法とも培養初期のものの方が高い。
5. 菌株間におけるアミラーゼの生産量と菌体量とは並行しない。又一定の菌体量又は培養基量に対するアミラーゼ生産量は麴法の方が著しく高い。

終に臨み有馬助教授の助力に対して深謝する。本報告の要旨は日本農芸化学会東京支部例会、昭和27年4月26日において口演した。

(1) A. N. BINDAL and M. SREENIVASAYA :
J. Sci. & Ind. Research, 3, 386 (1945);
C. A. 40, 5779 (1946).	(3) 坂口, 塩田 : 農化, 23, 426 (1950).
(4) F. F. GALE : Chemical Activities of
Bacteria, 1951, p. 71.
(2) 坂口 : 農化, 7, 748 (1931).	(5) 坂口, 秋山 未刊行.

Summary

In Japan, the application of the submerged cultures of *Aspergillus oryzae* and black Koji mold strains to the alcohol industry has lately become prevalent accompanied with the old koji or moldy bran process. The present studies were carried out to investigate the differences between the both processes with a special reference to metabolism and the enzyme production of the molds.

1. For the purpose of the accurate estimations of the mold weight and the metabolized products in Koji process, a model, "Asbestos Koji method" was devised, in which the same culture solution as used in the submerged culture was applied by soaking asbestos with the solution.

2. Two strains belonging to *Asp. oryzae* and a strain of the black Koji mold group were used in the experiments.

The yields of the mycelium in the submerged process were generally a little higher than those of the Koji processes.

3. The crude protein content of the mycelium was always higher in the earlier growth phase in the both processes.

The autolysis of the mycelium was apparently more intensive in the submerged process.

4. The amylase production per cc of the medium or per g of the mycelium was markedly higher in the Koji-process than in the submerged. The amylase producing ability was revealed to have little correlation with the weight of the mycelium produced.

プロピオン酸菌の醗酵化学的研究 (第 2 報)

嫌気的条件下に於ける基質の分解

市 川 吉 夫 (京都大学化学研究所片桐研究室)

昭和 29 年 12 月 18 日 受 理

Microbiological Studies on Propionic Acid Bacteria. Part 2. Anaerobic
Decomposition of the Substrates by *Propionibacterium arabinosum*

By Yoshio ICHIKAWA (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

プロピオン酸醗酵は各種の炭水化物、有機酸、アルコール等を基質としてプロピオン酸、醋酸、琥珀酸及び炭酸ガスを生成する無酸素醗酵の一形式である。Propionibacterium 属の細菌により行われるこの醗酵の大きな特徴は、3-, 4-, 5- 及び 6- 炭糖、及びポリアルコールより、同様の生産物を生成することである。

ペントースに就てその醗酵の mechanism を検討した報告は殆ど見られないが、グルコースを基質とした場合には MEYERHOF scheme による解糖が行われることが多くの実験事実によつて支持されており、(例えば WOOD