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

and WERKMAN⁽¹⁾; STONE and WERKMAN⁽²⁾; STONE, WOOD and WERKMAN⁽³⁾; WERKMAN, STONE and WOOD⁽⁴⁾ ペントースの場合もこの過程に投入されるものと考えられている。かくして生成されたピルビン酸は酸化されて醋酸及び炭酸ガスを生成する (WOOD, ERB and WERKMAN⁽⁵⁾)。一方プロピオン酸は同氏等によりピルビン酸が乳酸を経て更に還元されて生成されるものと考えられたが、その後 WOOD-WERKMAN reaction による琥珀酸生成の機構が明かになるに及んで (WOOD and WERKMAN⁽⁶⁾; PHELPS, JOHNSON and PETERSON⁽⁷⁾; KREES and EGGLESTON⁽⁸⁾; CARSON, FOSTER, RUBEN and BARKER⁽⁹⁾) このような方法で生成した琥珀酸の脱炭酸により生成されるものと考えられるようになった (例えば, DELWICHE⁽¹⁰⁾; JOHNS⁽¹¹⁾)。

吾等は先に分離した propionic acid bacteria 中の一種 *Propionibacterium arabinosum* を用いて各種基質に対する作用検討した結果, EMBDEN-MEYERHOF scheme 以外の糖分解経路が存在し得る事実を推定した。

実験の方法

(A) 培養試験: グルコース, ペプトン, 酵母エキスを各 0.5% を含む液体培地 10 ml に乳酸塩寒天培地より菌体を接種, 30° に 30 時間嫌氣的に培養した後, これを基質 2%, ペプトン 1%, 酵母エキスを 0.3% 及び微量の食塩を含み pH 7.2 に調整した試験用培地 200 ml に添加し醗酵を行わしめた後, 菌体を遠心分離して上澄を分析に供した。

(B) 酵素試験 上記の試験管培養菌体を, これと同一の組成を有する 200 ml の培地に加え, 減圧としたデシケーター内に収めて, 30° に 30~36 時間培養を行い, 遠心分離して菌体を集め, これを原容に等しい量の 0.9% 塩化加里溶液にて 15 分間洗滌する。遠心分離後更に同じ操作をくり返して得た洗滌菌体を少量の蒸溜水に懸濁して酵素試料とした。培養液 200 ml からの洗滌菌体の平均収量は 2.1 g 乾燥後の重量は約 0.2 g であった。

(C) 分析方法: 還元糖の量は iodometry により求めた滴定値と還元糖の分子量とより計算して求めた。乳酸は FRIEDEMANN 等⁽¹²⁾ の方法により定量した。揮発酸は OSBURN 等⁽¹³⁾ の方法によりその種類と量とを決定した。

不揮発酸は総酸と揮発酸との差を琥珀酸として表わした。但し, ペーパークロマトグラフィの結果乳酸の存在を認めたものに就ては, FRIEDEMANN 等の方法により求めた乳酸の値を差引いて琥珀酸の量とした。炭酸ガスは 15% 苛性加里溶液に吸収せしめて測定した。

実験結果及び考察

A) 乳酸, グルコース, アラビノースの醗酵試験 乳酸ソーダ, グルコース及びアラビノースを基質とし 30°, 14日間, 減圧下に培養を行つた結果は Table 1 の如くなる。

Table 1. Fermentation Test on Lactate, Glucose and Arabinose by *P. arabinosum*

	Lactate	Glucose	Arabinose
Substrate added (mM)	272	105	106
Substrate remained "	21	7	5
Substrate consumed "	251	98	101
Propionic acid formed "	160	131	87
Acetic acid formed "	80	65	77
CO ₂ formed "	93	85	89
Succinic acid formed "	—	1	1

この結果から乳酸に対しては, FITZ の提出した醗酵式 $3 \text{ lactate} \rightarrow 2 \text{ propionate} + \text{acetate} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ と同様の式が得られる。又グルコースに対しては $3 \text{ glucose} \rightarrow 4 \text{ propionate} + 2 \text{ acetate} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$ と考え得る。この式は, グルコースよりピルビン酸 2 mol. が生成され, この過程に於て生成する 4 H^+ が, 爾後の還元反応に用いられて, 乳酸の場合と同様の過程をとるものと考えれば, 理論的にも上の式と同一の化学式が得られる。アラビノースの場合はこれらに比して生成揮発酸中のプロピオン酸の割合は小となる。後述の *L*-ラムノースの分解試験の結果から, この場合, アラビノースが C_2 と C_3 とに分解されることが予想される。

—

B) 乳酸の生成及び消滅 上の実験に於ては, グルコース, アラビノースを醗酵した場合, 液中に乳酸の存在を認め得なかつた。併し乍ら乳酸塩が容易に醗酵される事実, 及びプロピオン酸の生成は乳酸の直接還元によらず, ピルビン酸を経て行われるという BAKER 氏⁽¹⁴⁾ の報文より, この菌が lactic dehydrogenase を有するとの推論の下に, 醗酵途中の培養液に就て乳酸の分析を行つた処, Table 2 に示す如く, 醗酵の初期に於て乳酸の存在を認めた。

E. A. DELWICHE⁽¹⁵⁾ は *P. pentosaceum* を用いた実験に於て, 醗酵の初期には醋酸が先ず生成され, pH の低下と共にプロピオン酸の生成の顕著となることを報告している。上述の諸報告に於て, プロピオン酸の生成過

Table 2. Appearance and Disappearance of Lactate in Fermented Liquor.

Substrate	Glucose (2.38 g per 100 ml)			
Period of incubation(days)	4	7	12	20
Sugar consumed (%)	16.1	65.5	74.5	75.5
Lactic acid formed (% on consumed sugar)	6.9	1.2	0.45	—

Substrate	Arabinose (1.90 g per 100 ml)			
Period of incubation(days)	4	8	13	21
Sugar consumed (%)	20.1	70.8	75.2	76.4
Lactic acid formed (% on consumed sugar)	2.6	2.6	0.54	—

ズの分解を行い、生成する揮発酸を分析した。洗滌菌体 2.1 g, ラムノース 70.5 mM を、pH 6.0 の 1/30 M phosphate buffer 30 ml 中に加え、トルオール添加の下に、15 時間、30° に保つた後、これについて揮発酸のペーパークロマトグラフィを試みた処、プロピオン酸を検出し得ず、醋酸及び酪酸の存在を認めた。依つて OSBURN⁽¹³⁾ 等⁽¹³⁾ の方法により定量を行い Table 3 の結果を得た。

即ち、ラムノースは C₂ と C₄ とに切断されることが推定され、従つてペントースは C₂+C₃ の切断を受けることが予想される。

D) グルコン酸、2-ケトグルコン酸の分解 *P. arabinosum* はグルコン酸石灰を炭素源とする培養基

に於てもグルコースの場合と同じくよく発育し、同様の生産物を蓄積する。基質の相違による生成揮発酸の変化を検討する為、ソルビトール、グルコース、グルコン酸、2-ケトグルコン酸に対する本菌の分解試験を行つた。同時に比較のため乳酸の分解を同じ条件で試みた。即ち、洗滌菌体 0.5 g を 0.9% KCl 溶液 10 ml 中に懸濁せしめた細菌浮遊液 10 ml, 1/5 M 基質溶液 10 ml, pH 5.6 1/15 M phosphate buffer 10 ml を THUNBERG's tube に混和し、減圧状態に保つて、30° の恒温槽中にて 3 時間反応せしめ、生成する揮発酸量を測定した。其の結果は Table 4 に示す如く、基質の酸化の度合の進むに従つて生成揮発酸中にプロピオン酸の占める割合は次第に小となる。

Table 4. Enzymatic Decomposition of Some C₆-Compounds

Substrat	Volatile acids formed from 66.7 mM of substrate in 3 hrs. (mM)	Propionic % in volatile acids (%)
Sorbitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	28.0	93.0
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	25.6	69.5
Gluconate (C ₆ H ₁₂ O ₇)	22.4	55.5
2-Ketogluconate (C ₆ H ₁₀ O ₇)	24.0	40.3
Lactate (C ₃ H ₅ O ₃)	36.8	66.5

とによつて、上述のいずれの基質を選んだ場合に於ても、生成する揮発酸の割合はピルビン酸の場合と一致する筈である。この想定を確かめる為、基質としてピルビン酸への変化の段階が明らかな乳酸を用い、又水素受容体として、methylene blue を用いて同様の条件で反応を行わせた。その結果は Table 5 に示す如く、微量の methylene blue の存在では生成する揮発酸の割合には殆ど変化が認められないが、その量が増加するとピルビン酸の場合と同様の結果を示すようになる。

プロピオン酸生成の初期段階が lactate → pyruvate → oxal acetate → malate →, の如き過程を経るものとすれば、この間の反応は次の如く共転して行われるものと考えられる。

程中, fumarate → succinate の反応が行われる事実が推論されており、醗酵液中の乳酸の消長は次の如き酸化還元反応に由来するものと推測される。d-FISCHER ester + pyruvate → NEGELIN ester + lactate ; lactate + fumarate → pyruvate + succinate ; lactate + oxal acetate ⇌ pyruvate + malate

C) ラムノースの分解 本菌がラムノースより生酸し得ることは、前報に於て報告したが、アラビノースの如き五炭糖の分解過程を検討するためラムノース

Table 3. Enzymatic Decomposition of Rhamnose by *P. arabinosum*

Substrate consumed	40.9 mM
Butyric acid formed	31.4
Acetic acid formed	38.4

醋酸及びプロピオン酸がそれぞれピルビン酸の酸化脱炭酸及び WOOD-WERKMAN の経路を経る一連の還元反応の結果生成されるものと考え、この際のピルビン酸の酸化還元度合が、基質のそれに左右された為、Table 4 に示す如き変化が認められたものとの推論が成立つ。若しこのような考え方が妥当であるとすれば、基質のピルビン酸への影響を除外すること

Table 5. Decomposition of Lactate in the Presence of Methylene Blue

Substrate	66.7 mM of lactate				pyruvate
Methylene blue added (%)	0	0.001	0.04	0.1	—
Volatile acid formed (mM)	35.6	36.8	34.4	30.0	20.8
Propionic % in volatile acids	68.0	64.8	35.6	36.0	34.1

多量の methylene blue を添加することにより乳酸酸化の場合の水素受容体は methylene blue に置換され、且つこのものの酸化が、オキザル醋酸の還元と共軛することは、これらの酸化還元電位の値より考えても甚だ困難であるものと考えられる。従つてオキザル醋酸の還元はピルビン酸の醋酸への酸化と共軛して行われ、恰もピルビン酸を基質とした場合と同様の結果を生じるものと推測される。

C) EMBDEN-MEYERHOF の系路によらざるグルコースの分解 WOOD 等⁽¹⁵⁾は、第1番目の炭素に放射性同位元素を導入したグルコースのプロピオン酸菌による分解試験を行つた結果、生成する炭酸ガス中に最も高濃度に放射性炭素を含む事実を認めている。我々が先に行つたグルコン酸、2-ケトグルコン酸等の分解試験に於て、これらのものがグルコースと同様の速度で分解することが認められた。又、アラビノースの如き五炭糖も容易に醗酵されて揮発酸を生成する。これらの事実より、グルコースよりグルコン酸を経る EMBDEN-MEYERHOF の系路によらぬ糖分解の過程が本菌の有する酵素群中に存在することが予想される。かかる系路は *E. coli*⁽¹⁶⁾, *Pseudomonas strains*⁽¹⁷⁾ 等の細菌に於て既に指摘されているが、我々は *P. arabinosum* に就て同様の経路の存在が認められるか否かを検討するため、BARKER and LIPMANN⁽¹⁴⁾ の方法に従い、NaF の存在の下にグルコースに菌体を作用せしめた。先に用いたと同様の組成の試験液中に 1/40 M の NaF を共存せしめ、更に Difco yeast extract 0.2% を添加する。これを同様の条件で4時間反応せしめた後分析を行つた。その結果は Table 6 に示す如く、phosphoglyceric acid の分解を完全に阻害するものと認められる濃度の NaF の共存の下に於て、尚グルコースを、NaF の存在しない場合とほぼ同様の速さで酸化することが出来る。この反応液をとり、菌体を除去して湯煎上で濃縮し、この濃縮液に就て、ブタノール-醋酸-水 (4:1:1) を展開剤とし、B.C.G 及びアムモニア添加硝酸銀溶液を発色剤として、還元性物質及び酸性物質のペーパークロマトグラフィを行つた処グルコン酸及び未知の還元性物質の存在を認めた。又、NaF と共に 1/5000 M NH₂OH を添加して同様の反応を行つた濃液より、同じくペーパークロマトグラフィの結果、グルコン酸、2-ケトグルコン酸、及び未知の酸性で且つ還元性を呈する物質の存在を指摘することが出来た (Table 6)。

Table 6. Decomposition of Glucose in the Presence of NaF

	NH	NaF added	NaF and NH ₂ OH added
Glucose added (mM)	66.7	66.7	66.7
Volatile acid formed (〃)	24.9	20.0	—
Propionic % in volatile acid	70.2	60.0	
Spots gained on the paper chromatogram			
	R _F		
Gluconic acid (11~21)		+	+
2-Ketogluconic acid (3)			+
Unknown reducing subst. (8)		+	
" " , acid subst. (6)			+

以上の事実より本菌にはグルコースよりグルコン酸、ケトグルコン酸を経てペントースに至り、更にこのものが分解を受けし醋酸、ピルビン酸に至る酵素系が存在する可能性がある。勿論 EMBDEN-MEYERHOF の系路の存在することは、多くの人人によつて立証されており、我々も亦その存在を否定するに足るなんらの実験結果も得ていない。むしろ、この兩者或いは又更に他の系が併存しているものと考えられる。

要 旨

さきに我々が分離したプロピオン酸菌の一種、*Propionibacterium arabinosum* に就て、種種の基質の嫌氣的分解を試みた。グルコースは乳酸と同じ割合で、プロピオン酸、醋酸を生成するが、その他の基質から生成される揮発酸の割合は、基質の構造に応じて変化する。この変動は、中間体として生成するピルビン酸の爾後の反応に対する基質の影響と考えられる。又本菌によるグルコースの分解の系路は、従来その存在を指摘されて来た EMBDEN-MEYERHOF の系路以外に、グルコン酸を経る系路の存在が考えられる。

本研究の遂行に当り、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を得た恩師片桐教授に深く感謝の意を表します。又本研究費の一部は文部省科学研究助成金によつたことを附記して感謝の意を表明する。

(本報告の一部は昭和29年4月、日本農芸化学会に於て発表した。)

(1) H. G. WOOD and C. H. WERKMAN : <i>Biochem. J.</i> , 28, 745 (1934).	(4) C. H. WERKMAN, R. W. STONE and H. G. WOOD : <i>Enzymologia</i> , 4, 24 (1937).
(2) R. W. STONE and C. H. WERKMAN : <i>Iowa State Coll. J. Sci.</i> 10, 341 (1936).	(5) H. G. WOOD, C. E. WOOD and C. H. WERKMAN : <i>Iowa State Coll. J. Sci.</i> , 11, 287 (1937).
(3) R. W. STONE, H. G. WOOD and C. H. WERKMAN : <i>J. Bact.</i> , 33, 101 (1937).	(6) H. G. WOOD and C. H. WERKMAN : <i>Biochem. J.</i> , 32, 1262 (1938).

- (7) A. S. PHELPS, M. J. JOHNSON and W. H. PETERSON : *Biochem. J.*, 33, 726, 1606 (1939).
 (8) H. A. KREBS and L. V. EGGLESTON : *Biochem J.*, 34, 1383 (1940); *ibid.*, 35, 676 (1941).
 (9) S. F. CARSON, J. W. FOSTER, S. RUBEN and H. A. BAKER : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 27, 229 (1941).
 (10) E. A. DELWICHE : *J. Bact.*, 56, 811 (1948).
 (11) A. T. JOHNS : *Nature*, 164, 620 (1949).
 (12) T. E. FRIEDEMANN, M. COTONIO and P. A. SHAFFER : *J. Biol. Chem.*, 73, 335 (1927).
 (13) O. L. OSBURN, H. G. WOOD and C. H. WERKMAN : *Ind. Eng. Chem., Anal. ed.*, 8, 270 (1936).
 (14) H. A. BARKER and F. LIPMANN : *Arch. Biochem.*, 4, 361 (1944).
 (15) F. W. LEAVER and H. G. WOOD : *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41, No. 1 suppl. (1953).
 (16) D. B. M. SCOTT and S. C. COHEN : *Biochem J.*, 52, 23, 33 (1953).
 (17) W. WOOD and R. F. SCHWERDT : *Bacterial Proc.*, 146, (1952).

Summary

Fermentation of glucose, arabinose and lactate with *P. arabinosum* were anaerobically carried out. It was found that lactate would be decomposed into propionate and acetate by the following process which was already proposed by FITZ ; 3 lactate $\rightarrow$ 2 propionate + acetate + CO₂ + H₂O.

Fermentative decomposition of glucose was carried out and the following formula was proposed from the experimental results ; 3 glucose $\rightarrow$ 4 propionate + 2 acetate + 2 CO₂ + H₂O. With resting cells, sorbital, gluconate and 2-ketogluconate were so easily decomposed into glucose, and propionate and acetate were always produced though the proportion of these acids was not constant. In addition to the above experimental results, fermentability of arabinose was verified and moreover glucose was decomposed even in the presence of 20 mM sodium fluoride. The possibility of other pathways of glucose decomposition beside EMBDEN-MEYERHOF scheme would be suggested to exist.

プロピオン酸菌の醗酵化学的研究 (第 3 報)

琥珀酸の脱炭酸によるプロピオン酸の生成

市 川 吉 夫 (京都大学化学研究所片桐研究室)

昭和 30 年 1 月 14 日 受理

Microbiological Studies on Propionic Acid Bacteria. Part 3.

Formation of Propionate from Succinate

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

プロピオン酸菌による醋酸及びプロピオン酸の生成は、基質の分解過程に於て生成したピルビン酸が次の如き反応により酸化又は還元されて形成されるものと考えられていた。

併しながら、BARKER-LIPMANN⁽²⁾はプロピオン酸菌の醗酵に関する fluoride inhibition の現象を検討した結果、プロピオン酸が、ピルビン酸、乳酸の直接還元により生成される可能性はないと結論した。WOOD-WERKMAN⁽³⁾ はこれより前に、琥珀酸の脱炭酸によるプロピオン酸の生成が、本菌の行うプロピオン酸醗酵の主要経路であるとの想定を行つたが、琥珀酸がプロピオン酸と炭酸ガスに分解する事実を実験的に証明し得なかつた。その後、WOOD-WERKMAN⁽⁴⁾、KREBS-EGGLESTON⁽⁵⁾ 等により、炭素ガス固定による琥珀酸生成の機構が、所謂 WOOD-WERKMAN 反応として明かとなるに及んで、この両方の反応を組合せた新しいプロピオン酸生成の機構が提出された。