化され、ピルビン酸の酸化が盛んになる。そのような細胞に菌が侵入し、正常な経路が阻害される結果、アセチル-CoA が TCA サイクルを経て分解されてゆくのがおくれ、他の経路としてアセトアセチル-CoA, β -メチルクロトニル-CoA を経て、イボメアマロンの生成の方向にすすむ。そして呼吸が盛んである細胞であればそれだけ、病菌侵入によるイボメアマロンの生成も大になるものとみられる。事実第 1 表からわかるように、おおよそ呼吸量とイボメアマロン量とは比例する傾向がある。また経時的にイボメアマロン生成量を調べてみたが、この場合も呼吸量に比例してつくられることがわかった。一方その生成量は本菌の生長阻害に役立つ程度のものである。このような点よりして呼吸の増加は抵抗のための一条件であり、それが抵抗に結びつく一つの理由として、呼吸増加に伴うイボメアマロンの生成を考えることは無理ではなからう。

同じく呼吸増加に伴って生成されるポリフェノール量は、品種間においては、呼吸量や抵抗の程度と必ずしも比例しない(第 1 表)。クロロゲン酸のような芳香族化合物がどのようにしてつくられているかはまだ明らかでないが、Davis らの研究から、糖類が Warburg-Dickens 系を経て分解されることが一つの条件であるようにおもう^(14,15)。病菌侵入に伴って Warburg-Dickens 系が活性化することは考えられるが、このような系の活性化、またそれにつづくポリフェノール生成系の活性化が直ちに呼吸増加と結びつくわけではないらしい。

総 括

1. 病菌の侵入に伴う甘藷の呼吸増加、イボメアマロン、ポリフェノールの生成を数品種について調べてみた。その品種内で、増加した呼吸量、イボメアマロン生成量は抵抗の程度とほぼ比例することをした。ポリフェノール生成量は必ずしもそうではなかった。

2. この研究は呼吸増加(代謝活性)が抵抗のための一つの条件であるという推論に、一つの証拠を与えた。

本研究に使用した数品種の甘藷は、山本 毅氏、大河浩一氏の御好意で、愛知県農業試験場豊橋分場の、一定条件で栽培されたものから得た。厚く両氏に感謝する。

(本報告の大部分は 1955 年 6 月 11 日、日本農芸化学会中部支部第 3 回講演会で発表されたものである。)

(1) 赤沢 堯, 瓜谷郁三 : 本誌, 29, 381(1955).	(10) 赤沢 堯, 瓜谷郁三 : 本誌, 29, 377(1955).
(2) T. Akazawa, I. Uritani : <i>Nature</i> , 176, 1071 (1955).	(11) 樋浦 誠 : 岐阜高農学報, 50, 1 (1943).
(3) 瓜谷郁三 : 本誌, 27, 24 (1953).	(12) 久保田尚志, 松浦輝男 : 日化, 74, 44, 101, 105, 197 (1952); 日化, 75, 447, 450(1953).
(4) T. Akazawa : <i>J. Biochem.</i> , 21, 590(1956).	(13) J. A. Johnson, J. Bonner : <i>Proc. Natl. Acad. Science</i> , 40, 1031 (1954).
(5) 鈴木直治, 瓜谷郁三 : 日植病, 16, 54(1952).	(14) B. D. Davis : <i>Adv. in Enzymol.</i> , 16, 247 (1955).
(6) 瓜谷郁三 : 本誌, 27, 57 (1953).	(15) P. R. Srinivasan, M. Katagiri, D. B. Sprinson : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 4943 (1943).
(7) 瓜谷郁三, 鈴木繁男, 村松敬一郎 : 農園, 22, 515 (1947).	
(8) 瓜谷郁三, 赤沢 堯 : 本誌, 29, 148(1955).	
(9) I. Uritani, T. Akazawa : <i>Science</i> , 121, 216 (1955).	

プロピオン酸菌の醗酵化学的研究 (第 6 報)*

プロピオン酸の酸化(その 2)

市 川 吉 夫 (京都大学化学研究所片桐研究室)

昭和 31 年 10 月 4 日 受 理

さきに我々は静置培養によって得られた *P. arabinosum* の洗滌菌体によって $\text{CH}_3\cdot\text{CH}_2\cdot\text{COOH} + 3\text{O} \longrightarrow \text{CH}_3\cdot\text{COOH} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ なる反応が行われることを報告したが⁽¹⁾, 同じ菌体試料を用いて無酸素状態に於てピオチアミンが速かに脱色される事実が認められ、プロピオン酸の酸化はピオチアミンの還元と共軌し得ることがわかる。乾燥菌体或は菌体抽出液を酵素試料として同様の実験を行い、酵母エキスの添加がピオチアミンの還元速度の増大に効果があることを認めた。酵母エキス中の有効成分を検討した結果、プロピオン酸の酸化に際しても CoA

* Microbiological Studies on the Propionic Acid Bacteria. Part VI.

Oxidation of Propionate (2).

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

がその反応に介入する事実を推論し得た。

実 験 方 法

菌体の増殖は静置培養法によった。使用した培地の組成及び培養条件並びに洗滌菌体懸濁液の調整方法は前報に記載したとおりである。

乾燥菌体の調整は次の方法によった。即ち洗滌菌体の濃厚懸濁液 (0.21 g/ml) をベトリ皿上に薄層とし、これを無水燐酸を入れたデシケーター内に収め常温にて約 2 時間真空ポンプで吸引して水分を除き、そのまま 5~8° の冷室に貯蔵した。保存中の活性度の減退は顕著である。

次に 16 時間貯蔵後の上記乾燥菌体 200 mg を 400 mg のアルミナと混合磨砕し 10 ml の 0.02% システイン溶液にて常温で抽出し菌体を遠心分離して除いたものを酵素試料とした。

ピオチアニンの還元は Thunberg 管を用い、30° の恒温槽内で脱色に要する時間を測定した。菌体抽出液を酵素試料として用いた場合は光電比色計により 90% 脱色に要した時間を測定した。

菌体の増殖の度を測定する場合も上記比色計を用い透過光の強さを測定比較した。

菌体の酵素吸収量は Warburg 検圧計を用い 30° に於ける吸収量を測定した。なお本実験に使用したピオチアニンは *Ps. aeruginosa* の生産する色素を精製したものである。

実験結果及び考察

1. 洗滌菌体によるピオチアニンの還元

第 1 表 ピオチアニンの共存下に於ける洗滌菌体によるプロピオン酸の酸化

実験番号	1	2	3	4
試験液の組成 (全容 8ml)	M/15 燐酸塩緩衝液 (pH 6.0, ml)	4	4	4
	菌体懸濁液 (200mg/ml)	0.5	0.5	0.5
	M/100 ピオチアニン	0.1	0.1	0.2
	M/2 プロピオン酸ソーダ	0	0.3	0.3
色素の脱色時間 (分)	20	5	10.5	18.5
Q_{pc}	5	20	19	18

新鮮菌体懸濁液によるピオチアニンの脱色試験の結果は第 1 表に示したとおりである。実験 1 及び 2 から色素の還元はプロピオン酸の酸化と共軛して行われることが推測される。実験 2, 3 及び 4 から本実験条件では色素の還元時間は菌体量及び色素の添加量とほぼ比例的関係にあり基質の量に

は無関係であることがわかる。即ちこの実験は基質飽和の状態で行ったものと考えてよい。1 mg の乾燥菌体が 1 μ M の色素を脱色するのに要する時間 (分) の逆数 (表中 Q_{pc} で示した値) を求めると基質無添加の場合を除きほぼ一定の値を得た。但し洗滌菌体を使用した場合はその重量の 10% を以て乾燥菌体とした (実測値: 9.5~12%)。以下 Q_{pc} を以てプロピオン酸の酸化能を比較した。

2. 乾燥菌体によるピオチアニンの還元

乾燥菌体による色素の還元速度は第 2 表に示す如く、洗滌菌体の場合に比較すれば甚しく小さい。実験 1 及び 3 の結果からプロピオン酸の酸化とピオチアニンの還元とが共軛して行われることは明らかである。菌体の貯蔵

第 2 表 乾燥菌体によるプロピオン酸の酸化

実験番号	1	2	3	4	5	6	7	8
試験液の組成 (全容 8ml)	M/15 燐酸塩緩衝液	4	4	4	4	4	4	4
	菌体懸濁液 (16 時間貯蔵菌体 20mg/ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	M/100 ピオチアニン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	M/2 プロピオン酸ソーダ			0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	A T P (2mg/ml)					0.3		
	酵母エキス (5%)		1.0	1.0			0.5	
色素の脱色時間 (分)	120	30	50	8	11	150	40	70
Q_{pc}	0.8	3.3	2.0	13	9.0	0.7	2.5	1.4

時間が長くなるとプロピオン酸の酸化能が減少する事実が認められる。酵母エキスを反応液中に添加すれば脱色時間は著しく短縮されるが、基質無添加の場合にもその効果は顕著であって酵母エキス中の物質の酸化が色素の還元と共軛している可能性

第 3 表 凍結乾燥菌体によるプロピオン酸の酸化

実験番号	1	2	3	4
試験液の組成 (全容 8ml)	M/15 燐酸塩緩衝液 (pH 6.0)	4	4	4
	菌体懸濁液 (5 mg/ml)	0.5	0.5	0.5
	M/100 ピオチアニン	0.2	0.2	0.2
	M/2 プロピオン酸ソーダ		0.3	0.3
	A T P (2mg/ml)			0.3
	酵母エキス (5%)			0.3
色素の脱色時間 (分)	145	38	35	22
Q_{pc}	1.4	5.3	5.7	8.9

がある。酵母エキスの代りに ATP を添加するとこの場合も脱色時間の短縮が顕著に認められ、16 時間貯蔵の菌体に於ては両者の効果には大きな差異を認めない。一方調製直後の凍結乾燥菌体を酵素試料として同様の実験を試みると、この場合 ATP の添加の効果は殆ど認められないが酵母エキ

第 4 表 イオン交換樹脂による酵母エキスの有効成分の分離

スの添加はプロピオン酸の存在の下に於て尚明らかに促進効果が認められる (第 3 表)。ATP 添加の影響の有無は菌体の調整及び保存の条件の相違によるものと考えられるが、第 2, 3 表の結果から酵母エキス中には基質として作用する部分或は ATP 以外に尚プロピオン酸の酸化を促進する物質が存在することが考えられる。

3. 酵母エキス中の有効成分の検討

第 4 表に示した方法により、イオン交換樹脂を用いて酵母エキスを分離し、各区分に就てその効果を検討した。乾燥菌体に就てはその効果は顕著ではないがこの菌体を 0.01% システイン溶液で磨砕抽出して得た

第 5 表 酵母エキス区分のプロピオン酸酸化に及ぼす効果

実験番号	1	2	3	4	5	6	7	8	菌体抽出液に就ては第 5 表に示したように、酵母エキス中の陰イオン交換樹脂に吸着され、陽イオン交換樹脂には吸着されない部分に有効物質の存在することが認められる。ATP のみの添加では効果がない故有効物質は ATP 以外の酸性物質であることが推論される。前報に於て報告した如く、ヒドロキシラミ
M/15 燐酸緩衝液 (pH 6.0)	4	4	4	4	4	4	4	4	
乾燥菌体懸濁液	0.5	0.5	0.5	0.5					
菌体抽出液					2.0	2.0	2.0	2.0	
M/100 ビオチン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
M/2 プロピオン酸塩	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
ATP (2 mg/ml)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
酵母エキス区分 ①		1.0					1.0		
" ②			1.0					1.0	
" ③				1.0					1.0
色素の脱色時間	12	10	11	10	∞	15*	>240	15*	
Q _{pc}	8.3	10	9.1	10	0	6.7	<0.4	6.7	

* 90% 脱色に要した時間。

ンの存在下に於てプロピオン酸の酸化を行うとプロピオン酸及び酢酸のヒドロキシ酸の生成が認められるが、本菌がその生育にパントテン酸を要求する事実並びに琥珀酸の脱炭酸反応に CoA が介在する事実⁽⁵⁾等から考えると上述の有効物質は CoA であり、プロピオン酸は ATP の存在の下に於て CoA と結合してのち酸化作用を受けるものと考えられる。この推論を確かめるには本反応に対する CoA の効果を検討すればよいが、本報に於ては以下に述べる如き間接的な方法によりその証明を試みた。

P. arabinosum は他のプロピオン酸菌と同様パントテン酸を要求するが^(2,3)、このパントテン酸は菌体内で CoA として種々の酵素反応に関与するものと考えられている。我々は使用菌株のパントテン酸要求量を決定したのち、パントテン酸欠乏菌体を調整し、概菌体によるプロピオン酸酸化能を正常菌体と比較し、且つ欠乏菌体にパントテン酸を投与した場合の酸素吸収量に及ぼす効果を検討した。

パントテン酸要求量の決定 パントテン酸要求量を測定するために使用した基本培地は第 6 表に示した組成を有している⁽⁴⁾。この 5 ml と 0.02~2 γ のパントテン酸カルシウムを含むパントテン酸カルシウム溶液 5 ml

第 6 表 パントテン酸要求試験用培地の組成 (培地 1000 ml 中の g 数)

カゼイン水解物	12	ナイアシン	0.002
グルコース	40	ピリドキシン塩酸	0.004
酢酸ソーダ	20	α-アミノ安息香酸	0.0002
l-シスチン	0.2	ビオチン	0.0000008
dl-トリプトファン	0.2	燐酸二加里	1
アデニン	0.02	燐酸一加里	1
グアニン	0.02	硫酸マグネシウム	0.4
ウラシル	0.02	硫酸第一鉄	0.02
チアミン塩酸	0.002	硫酸マンガン	0.02
リボフラビン	0.002	食塩	0.02

第 7 表 *P. arabinosum* の増殖に及ぼすパントテン酸の影響

パントテン酸 石炭含量 (γ/ml)	2-log T		
	24時 間後	48時 間後	72時 間後
2	0.03	0.45	1.00
0.2	0.03	0.52	1.00
0.1	0.04	0.61	0.95
0.05	0.16	0.80	0.89
0.02	0.03	0.43	0.53
0.01	0.03	0.34	0.35
0.005	0.03	0.21	0.21
0.002	0.03	0.11	0.11
0	0.02	0.02	0.02
酵母 { 1 mg/ml	0.06	0.70	1.00
エキス { 0.1 mg/ml	0.04	0.28	0.28

とを混合して試験管に分注し 15 p. s. i. で 15 分間加圧殺菌する。比較のため酵母エキス (Difco) 10 mg, 1 mg を 5 ml に溶解したものをパントテン酸カルシウムの代りに添加同様に処理したものをを用いた。

グルコース、ペプトン及び酵母エキス各 0.5% を含む培地に 30° で 48 時間培養した菌体を 0.9% 塩化加里溶液で洗滌、同液で当初の培地量の 2 倍に稀釈し、この菌体懸濁液の 1 滴を上記各試験管培地に添加、32° に一定時間培養後その濁度を光電比色計を用いて測定し (570 m μ) その成育状態を比較した。菌体接種前の透過率 (T) を 100% とした時、接種直後の optical density は $2 - \log T = 0.02$ となり培養中の変化は第 7 表の如くなる。即ちパントテン酸カルシウム 0.05 γ /ml 以上を含むものは酵母エキス 1 mg/ml 添加のものと同様正常の発育を示すが、パントテン酸カルシウム 0.02 γ /ml 以下のものは、その成育は不良で且つ早期に停止する。又パントテン酸の添加しない場合は成育は全く認められない。

このような結果からパントテン酸欠乏菌体調製のために 0.04 γ /ml のパントテン酸カルシウムを含む上記培地を、正常菌体調製には 0.2 γ /ml を含む培地を用いることとした。200 ml の上記各培地にそれぞれ同じ培地 10 ml に培養した菌体を接種し、32° に 72 時間培養後菌体を集めて洗滌し菌体懸濁液を調製した。培地 100 ml 当りの乾燥菌体収量はパントテン酸欠乏培地で約 80 mg, 正常培地で約 110 mg である。

第 1 図 プロピオン酸の酸化に及ぼすパントテン酸の影響

反応液の組成 主室: M/15 磷酸塩緩衝液 (pH 6.0) 1 ml, 菌体懸濁液 1 ml (洗滌菌体 100mg), パントテン酸石灰 (4 γ /ml) 0.5 ml. 側室: M/10 プロピオン酸ソーダ 0.2 ml. 副室: 2 N KOH 0.2 ml. 全量: 3.0 ml.

したものと考えられる。

要 旨

嫌氣的条件に於てプロピオン酸の酸化はビオチアミンの還元と共軛して行われるが、この反応にアデノシン三リン酸及び酵母エキスが促進的效果を有することが認められた。酵母エキス中の有効成分は陰イオン交換樹脂によって吸着される酸性物質である。パントテン酸欠乏菌体に於てプロピオン酸酸化能が殆ど認められず、パントテン酸と予め接触せしめることにより該作用の回復が認められること、菌体抽出液に就てはパントテン酸の効果が認められないこと、プロピオン酸の酸化に際してヒドロキシラミンと反応してヒドロキサム酸を生成する物質が認められること等の事実から酵母エキス中の有効成分は CoA であることが想像される。従って静止菌体によってプロピオン酸から酢酸が生成される反応は ATP 及び CoA 関与の下に次に示すような過程を経て行われるものと推論される。

パントテン酸欠乏菌体によるプロピオン酸の酸化

このようにして得られた洗滌菌体を用い Warburg 検圧計にてプロピオン酸の酸化能を測定した。反応液の組成及び酸素吸収曲線は第 1 図に示す。正常菌体による酸素吸収は顕著であり、且つパントテン酸を反応液中に添加してもその酸素吸収には変化が認められない。これに反しパントテン酸欠乏菌体では殆ど酸素吸収が認められないが、パントテン酸を添加すると酸化能の回復が明らかに認められる。両者共酸素吸収測定開始 30 分前にパントテン酸溶液を菌体懸濁液に添加振盪した。

プロピオン酸菌にとってパントテン酸が如何なる生理的意義を有するかということに関しては現在なおその詳細は解明されるに至っていないが、プロピオン酸の酸化反応に関与していることは、以上の実験事実から容易に推論出来る。菌体抽出液に就て色素の脱色の速さに対するパントテン酸の効果を検べて見ると酵母エキスの場合と異り全く効果がない。この事実はパントテン酸が CoA としてこの反応に関係していることを示唆するもので、前に記したヒドロキサム酸は Acyl-CoA とヒドロキシラミンとの反応により生成

本研究を行うに当り、終始御懇篤なる御指導を得た恩師片桐英郎教授に深甚の謝意を表します。又本実験に使用したバントテン酸カルシウムは醸酵研究所 (現静岡大学教授) 近藤圭二氏、ピオチアニンは当研究室の倉地守氏より供与を受けたもので両氏の御好意を厚く感謝します。なお本研究費の一部は文部省科学研究所助成金によったこと、及び本報告の一部は昭和 31 年 3 月 30 日日本農芸化学会東京大会に於て発表したことを附記する。

(1) 片桐英郎, 市川吉夫: <i>Bull. Inst. Chem. Resear., Kyoto Univ.</i> , 34 , No. 6 (1956).	(4) Difco manual of dehydrated culture media, p. 158 (1948).
(2) A. G. Moat, E. A. Delwiche: <i>J. Bact.</i> , 60 , 757 (1950).	(5) H. R. Whiteley: <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.</i> , 39 , 779 (1953).
(3) E. A. Delwiche: <i>J. Bact.</i> , 58 , 395 (1949).	

ミルク・キャラメルの褐色化について (その 1)*

市販ミルク・キャラメルの組成と品質**

足立 達, 中西 武雄 (東北大学農学部畜産利用学研究室)

昭和 31 年 10 月 11 日 受理

普通, キャラメル類は練乳や水飴, 砂糖を主原料として製造されるので, 製造工程中や製品の貯蔵中に褐色化し, 又風味の変化を来たして品質を低下することがしばしばおこり, ミルク・キャラメル製造上軽視出来ない問題となっている。極く一般的に考えるならば, この褐色化とそれに随伴する諸現象とは, いわゆる, 糖類のキャラメル化の外に, アミノ・カルボニル反応によって行われることが少なくない⁽¹⁾と推定されるが, これはその製造原料の組合せからも当然期待されるところであった。今回, たまたまミルク・キャラメルの本現象を検討する機会に恵まれたので, 以下数報に亘って上記の推定の証明と共に, 本現象の発現防止を中心とした検討の結果を順次に報告してゆきたい。そこで最初にミルク・キャラメルの一般的性質を把握する目的をもって, 市販のミルク・キャラメル等の組成と品質をしらべ, 以後の検討の手懸りを得ることが出来たので, その結果を以下に報告する。

キャラメルの分析例は, 渡辺, 長谷, 半藤, 松本及び相田等⁽¹⁾によって, 水分, 蛋白質, 脂肪, 直接還元糖, 蔗糖, 糊精, カルシウムの諸項目に亘って報告されている。ただ, この分析試料は実験目的に応じて特に調製されたものである為, その限りに於ては一定の規格を持たざるを得ず, 各種のキャラメルを網羅していないものの, 他に詳しい報告を殆ど見ない現在, この報告は貴重な意味を有している。

尚, 著者が以下に使用する“ミルク・キャラメル”という語は, 牛乳の混入を強調指示する意味を持っているので, 必ずしもキャラメルと異っている訳ではないことを附記して置く。

実験と考察

[I] 一般成分分析

(1) 試料 試料に供した製品は仙台市内に於いて, 昭和 31 年 1 月に入手した市販キャラメル 13 種で, この中にはいわゆるコーヒー, ココア, チョコレートキャラメル 4 種が含まれ, その生産工場は 5 社に亘っている。

(2) 分析法 測定の必要に応じて稀釈試料を使用した⁽²⁾が, これは試料 5 g を 50~60° の温水中で溶解し, 50 ml とすることによって調製した。

(i) pH: 新興通信社製の硝子電極 pH メーターによった。(ii) 屈折率: 日立製アッペ屈折計で 15° に於いて測定。(iii) 酸度: 稀釈試料 10 ml を 0.1 N NaOH で中和し, その所要 ml 数で示す。(iv) 水分: 砒砂法による。大部分の水分が蒸発してから 99° で 6 時間乾燥する。(v) 蛋白質: ケルダール法により, 求めた全窒素に 6.38 を乗じる。(vi) アミノ酸窒素: 稀釈試料 10 ml を Formol 滴定する。(vii) 直接還元糖:

* On Browning of Milk Caramels (1). On Composition and Qualities of Market Milk Caramels. (Studies on Amino-carbonyl Reaction of Milk Products. Part XII)
By Susumu ADACHI and Takeo NAKANISHI (Laboratory of Animal Products Technology, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

** 本報告を「乳製品のアミノ・カルボニル反応に関する研究 (第 12 報)」とする。