

結核菌の抗 Streptolysin S 作用に就いて

金沢大学結核研究所薬理製剤部（主任：伊藤 亮教授）

細 川 孝 一

(受付:昭和33年10月1日)

緒 言

溶血性連鎖状球菌の溶血毒 Streptolysin S (St-S)¹⁾ に対し阻止的効果を発揮するものとしては Trypan blue 系色素^{2), 3)}, 血清⁴⁾, 酵素⁵⁾, その他種々の物質⁶⁾ が報告されている。就中 Trypan blue 系色素の抗 St-S 作用は極めて強大であつて、これら色素は *in vitro* のみならず *in vivo* に於てもよく抗溶血効果を発揮し、適量の Trypan blue の投与によつて動物は St-S による崩血死から免れることが出来る。一方 Sulfonamide 剤や細菌の生産物である各種抗生

物質は溶連菌感染に対し救命的効果を示すにも拘らず、St-S に対する抗毒作用がない。

処で St-S の溶血作用に対する一般細菌の影響に関しては未だ報告が行われていないのであるが、著者等は最近たまたま St-S を或る種の結核菌の菌浮遊液で処理すると St-S の溶血作用が消失するという興味ある事実を見出した。本論文はこの結核菌の抗 St-S 作用に関する現在迄の実験成績を述べたものである。

実 験 方 法

1 菌株

本研究に使用した結核菌は人型 6 株 (H₂, Frankfurt, 河上, 青山 B, H₃₇Rv, H₃₇Ra), 牛型 2 株 (No. 10, BCG) 及びこれら各菌株の Streptomycin 耐性株, 鳥型結核菌竹尾株, *M. tuberculosis* "607", *M. phlei*, 着色抗酸菌 "石井株"⁷⁾ の総計 20 株である。結核菌培養は Sauton 培地で行つた。尚結核菌以外の細菌はすべて普通ブイヨンで培養した。

2 Streptolysin S

岡本教授等^{8), 9)} によつて分離された精製 Streptolysin S, I-N-Fraction (家兎赤血球に対する溶血限界濃度 1:20 mill) を使用。本標品 10mg を生理的食塩水 10ml に溶解 (0.1%) したものを原液として氷室に保存し、実験の都度この原液から食塩水で所要稀釀液を新調した。

3 溶血試験

既報⁴⁾の術式に従つて食塩水で 1ml 宛の St-S の 2-2.5 倍遞下稀釀液列を作り、之に 1% 家兎赤血球浮遊液 1ml 宛を混和し 37°C の孵卵器に納める。成績

判定は 1 及び 2 時間後に行ひ、溶血の程度を— (非溶血), ±, +, ++, +++ (不完全溶血), ++ (完全溶血) として記録した。但し本論文ではすべて 2 時間後の溶血成績のみを記載した。

4 結核菌の抗溶血作用検査術式

Sauton 培養の結核菌体を濾紙上に集め、蒸溜水でよく洗滌した後、乾燥した濾紙間に挿圧して水分を除いて秤量する (湿潤菌量)。菌体を乳鉢中に入れ湿潤菌量の 10 倍量の食塩水を滴加しながら十分に磨碎して菌浮遊液 (原液) を作る。この原液を更に食塩水で稀釀して所要濃度の菌浮遊液を調製する。所要数の遠心沈降管に菌液の各種稀釀液 1.8ml と St-S (1:10,000) 0.2ml を加えてよく混和した後、室温に 30 分間放置する。次いで 10 分間遠心 (4,000 rpm) して菌体を分離し、上清液に就いて溶血試験を行い、その溶血力を、菌液の代りに同量の食塩水を加えて室温に放置した対照液の溶血力と比較した。又菌体沈渣は加熱殺菌した後、蒸溜水で洗滌し、110°C で乾燥して菌量を秤量した (乾燥菌量)。

実験成績

I 結核菌の抗 St-S 作用

1) 人型結核菌 H₂についての実験：

第1表の実験は、人型結核菌 H₂の菌浮遊液 1.8ml に St-S (1:10,000) 0.2ml を加え室温に30分放置し其の遠心上清液に就いて溶血力をしらべた成績である。即ち、菌液処置を行わなかつた対照 St-S は 1:20mill 稀釀液迄溶血作用を示したのに對し、St-S を菌浮遊原液で処置した場合には其の遠心上清液は全く溶血作用を示さなかつた。又 1:2 稀釀菌液処置 St-S では、其の 1:200,000 稀釀液に相当する第一管に僅かに溶血が見られたのみであつた、而して H₂ の抗 St-S 作用は菌液の稀釀度に比例して減弱し 1:50 稀釀菌液を以つての実験では、遠心上清液は対照 St-S とほぼ同等の溶血力を示した。

第2表は生菌と死菌とに就いて H₂ 菌の抗 St-S 作用を比較した成績である：

同一条件で培養した H₂ 株の培養コルベン 2本をとつて、1本はそのまま型のごとく菌採取して菌液を調製する。他の 1本は 100°C 1時間加熱殺菌した後、以下同様にして菌液を作り、この 2種の菌浮遊液に就いて抗 St-S 作用を検索した。

ここで注目されるのは生菌液に於ける強い抗 St-S 効果に比べ、加熱死菌液では抗 St-S 作用甚だ微弱であつて、僅かに原液と St-S とを混和した試験管の溶血力が対照 St-S の約 1/2 に低下したのみであつて、1:2 稀釀菌液では最早や抗 St-S 作用は全く認められなかつた。

2) 諸株結核菌の抗 St-S 作用：

第3表は人型、牛型、鳥型結核菌及び非病原性抗酸菌等総計11株の菌種に就いて菌浮遊液の抗 St-S 作用の有無強弱を比較した成績を一括したものである。この表から Mycobacteria の中にも H₂ 菌と同様に強い抗 St-S 作用を示すものもあれば、又一方全く作用を呈しない菌株もあるというわけで、之等菌株の St-S に対する態度には著しい差異のあることが明らかであ

る。例えば人型結核菌でも Frankfurt 株、H₃₇ Ra 株は H₂ 株と同程度の顯著な抗 St-S 作用を示したのであるが、青山 B 株、河上株等は前者に比して抗 St-S 作用に於て遙かに劣る處があつた。又動物に対する毒力との関係では、毒性のない H₃₇ Ra 株が強毒株 H₂ と同一程度の強い抗 St-S 作用を呈したのであるが、一方強毒株 H₃₇ Rv、河上株ではその作用が甚だ弱いということから、菌の抗 St-S 作用と毒力との間には何ら特別の関連性のないことが分る。

処で、人型並びに牛型結核菌では程度の差こそあれ、被験菌株のすべてに抗 St-S 作用が実証されたのであるが、之に反し鳥型結核菌や M. tuberculosis "607", M. phlei, 着色抗酸菌 "石井株" 等の様な哺乳動物に対し非病原性とされている菌株は何れも St-S 溶血に対し何等影響を示さなかつた。

II 結核菌の性状とその抗 St-S 作用

上記の実験成績によつて、或る種の結核菌、特に哺乳動物に対し病原性があるとされている菌株が St-S の溶血作用に対し阻止的影響を發揮する性質を有することが明らかとなつたのであるが、結核菌の中でも菌株によって抗 St-S 力に著しい差異のあることに徴して、同一菌株でも其の生物学的性状の変動に伴つて抗 St-S 作用にも消長が表われるのではないかと考えられる。そこで菌の生物学的性状に影響を及ぼすと考えられる培養条件の変化や薬剤耐性獲得と抗 St-S 作用との関係について検討を加えた。

1) 培養日数による影響：

培養の新旧度が結核菌の抗 St-S 作用に如何なる影響を及ぼすかを知るために、H₂ 菌を、培養後 4 カ月間に亘つて其の抗 St-S 作用を逐時的に検索した(第4表)。表に明らかな様に、40 日培養から調製した菌浮遊液と 122 日培養の菌浮遊液とでは其の抗 St-S 力に殆んど差異がなく、新旧両菌液共に 1:10 稀釀菌液に於ても尚

よく St-S に対して阻止的効果を示した。

2) 培養メデウムによる影響 (第5表) :

H_2 菌を Sauton, Long, Dorset 培地及びグリセリンープイヨンの4種培地に培養し、各菌体について抗 St-S 作用を比較検査した。其の結果、これ等4種菌体の間には抗 St-S 力に於て何等差異がないという成績であった。

3) 薬剤耐性と抗 St-S 作用 :

人型及び牛型結核菌の各菌株について、*Streptomycin (SM)* 耐性株と SM 感性株との抗 St-S 作用を比較検討したが、何れの菌株でも両者の間には抗 St-S 作用に於て差異が認められなかつた。

III 諸他細菌の St-S 溶血に対する影響

叙上の如く、St-S に対する阻止作用が人型、牛型菌株に限られて観察され非病原性抗酸菌には全く認められないことから、この作用が *Mycobacteria* 属菌に共通した性能ではないことが分る。然らば *Mycobacteria* 以外の一般細菌について如何? *E.coli*, *Proteus* 菌, *Bact. areogenes*, *Bact. cloacae*, *B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. mesentericus*, *Pneumococcus*, *Staphylococci*, 赤痢菌(9株), サルモネラ菌群(9株), *Vibrio denecke*, 総計30種の細菌について、結核菌に於けると同様の実験術式で、St-S 溶血に対する菌液の影響を検査した。其の結果 *B. subtilis* 及び *B. mesentericus* の2菌を除いて他はすべて、St-S 溶血に対し何ら影響を示さなかつた。而して *B. subtilis* 及び *B. mesentericus* の両細菌では、菌浮遊液の St-S 溶血に対する阻止効力は結核菌 H_2 株のそれに匹敵するという成績であつた。

IV 菌浮遊液の遠心上清液の抗 St-S 作用

既述の実験によつて或る種類の結核菌が St-S 溶血を阻止する性能を有することが実証されたわけである。処で此の結核菌の抗 St-S 作用の機序に関しては、結核菌の抗 St-S 作用が菌体自身によるものか一例えば菌体による St-S の直接的不活性化或は吸着一、又は菌体から放出される特殊な物質によつて溶血が抑制され

る、かの2つの可能性が考えられる。この問題に対しては、菌浮遊液から菌体を除去した場合、抗 St-S 作用が如何になるかが重要な意味をもつてゐる。本項では菌浮遊液の遠心上清液、更に其の Seitz 濾液に就いて抗 St-S 作用の検索を行つた。

先ず H_2 菌浮遊液を作り、之を遠心(4,000 rpm)して上清液を分取する。遠心上清液を更に Seitz-filter で濾過して無菌濾液を作り、これら2つの材料に就いて抗 St-S 作用を検査した(第6表)

第6表では上清液或は Seitz 濾液の2倍稀釀液 1ml に St-S 1:50,000 液 0.1ml を加え(St-S の作用濃度 1:500,000), 次いで1%家兎赤血球 1ml を混和した後 37°C, 2時間で溶血成績を判定した。この表で明らかなる如く、St-S のみの対照試験管では2時間以内に完全溶血が起きたのに對し、遠心上清液及び Seitz 濾液は何れも其の 1:8 稀釀迄 St-S 溶血を完全に阻止し、更に上清液では最高 1:128 稀釀液迄、又 Seitz 濾液では最高 1:68 稀釀液迄溶血阻止効果が認められた。即ちこの実験によつて、菌液の遠心上清液や無菌の Seitz 濾液が菌浮遊液と同じく抗 St-S 作用を有することが明らかとなり、茲に結核菌の抗 St-S 作用が菌体自体の直接的作用によるものではなくて、むしろ菌浮遊液調製の際、菌体より放出される“抗 St-S 性物質”によるものであるとの考えが確かめられたわけである。

1) 菌液調製条件の吟味 :

強力な抗 St-S 作用の菌浮遊液濾液(菌濾液と称す)を得るために、菌浮遊液調製時に於ける温度、時間、メデウムの pH 等に就いて検討を加え次の結果を得た:

(a) 菌液調製時の温度が 5-50°C の範囲では菌濾液の抗溶血力に大差がない。

(b) 菌液調製後直ちに遠心して菌体を除いた場合と、菌液調製後 2 時間放置した後菌体を除去した場合とでは、菌濾液の抗 St-S 力に差異がない。

(c) 菌濾液調製には中性メデウムが最適である。

2) 菌濾液の“抗 St-S 性物質”の理化学的性状：

(a) 透析試験。

菌濾液をセロファン膜を用いて、氷室で 0.85% 食塩水に対して透析を行つたが、菌濾液の抗 St-S 作用には 5 日間の透析によつても殆んど変化がなかつた。

(b) 加熱に対する抵抗試験。

第 7 表は菌濾液を種々の条件で加熱した場合に於ける抗 St-S 作用の影響をしらべた成績であるが、菌濾液の抗溶血作用は 100°C

60 分間の加熱によつて完全に、又 60°C, 30 分加熱で一部破壊されるが、56°C 60 分の加熱では影響がなかつた。

(c) 酵素による影響。

結核菌の抗 St-S 性物質の化学的本質を窺知するため Protease (Pepsin, Trypsin, Papain), Lipase, Amylase の影響について検索した、第 8 表に示した様に、結核菌の抗 St-S 作用は、Trypsin, Papain, Lipase 及び Amylase によつて少しも障害されなかつたのであるが、Pepsin によつて極めて容易に破壊されることが分つた。

考 察

上述の実験成績は結核菌の或る菌株、特に哺乳動物に対し抗原性を有するとされている結核菌が、Streptolysin S 溶血に対し阻止的影響を発揮すること、而もこの結核菌の抗 Streptolysin S 作用が菌塊を破碎、懸濁せしめる時に菌集落の離散崩壊によつて菌体からメデウム内に放出される抗溶血性物質の作用によるものであることを実証したものである。

Streptolysin S に対し阻止的作用を示すものとしては既に Trypan blue 系色素、血清、酵素その他種々の物質が知られていることは緒言に述べた処であるが、本研究に於ける如き細菌及びその産生物質による抗 St-S 作用に就いては、著者の知る限りでは従来全く報告がない。

而して結核菌以外の諸種細菌に就いて検査した結果では、B. subtilis 及び B. mesentericus の 2 種細菌に結核菌に於けると同様の抗 St-S 作用が認められた事実から、自然界では抗 St-S 作用をもつた細菌の存在が決して稀有のものではないことが分る。

併し、抗酸性菌属の中でも鳥型菌や非病原性抗酸菌には抗 St-S 作用が全く認められなかつたことや、人型、牛型結核菌の中でも菌株によつて抗 St-S 力に著しい差異が見られ、而も一

方同一菌株に就いては培養条件や薬剤耐性獲得等の様な生物学的環境の変動にも拘らず、常に一定した抗 St-S 効果が得られた等の事実は、結核菌の抗 St-S 作用が菌株特有の性質であることを示すものと言えよう。

結核菌の抗 St-S 作用が菌浮遊液に就いて検出されるばかりでなく、菌体を除去した遠心上清液や Seitz 濾液に就いても全く同様に実証されたことから、この作用が菌体から放出される特殊な物質によるものであろうことは明らかである。而も抗 St-S 作用が、低温でも極めて短時間内に菌塊の破碎によつて濾液中に検出されることから、結核菌の抗 St-S 性物質が、食塩水で菌体内部から抽出されたものではなくて、むしろ菌体の極く表在性に存在している物質が一例えば結核菌の特異な Cord 形成に関与する一種の菌体接着剤の如きもの一磨碎操作による菌塊の崩壊によつてメデウム内に放出されるに至つたものと考えられるのである。

扱、次に結核菌の産出する抗 St-S 性物質の本質如何の問題であるが、抗 St-S 作用がセロファン膜非透過性であり、而も熱によつて破壊されることから、抗 St-S 性物質がおそらく高分子性化合物であるということが推測される。

一方酵素による消化試験では抗 St-S 作用が Lipase, Amylase に対して安定であるが Pepsin によつて容易に失効することはその本態が蛋白質性であることを示すものであるが、一方

Trypsin, や Papain の如き蛋白酵素が何等影響を示さなかつた事実は之と稍々矛盾するかに見えるのであつて、この点に関しては明確な結論を下すに至つていない現状である。

結

1. 人型及び牛型結核菌の或る菌株では、菌浮遊液及び其の遠心上清濾液は Streptolysin S 溶液に対し阻止的作用を示した。併し、鳥型結核菌並びに非病原性抗酸菌では、この様な抗 Streptolysin S 作用は認められなかつた。

2. 結核菌の抗 Streptolysin S 力は、菌株によつて著明な差異が認められたが、同一菌株では培地の種類や培養日数の新旧による変動はなかつた。又 Streptomycin 耐性結核菌株は抗 Streptolysin S 作用に於て感性母菌株と何ら異なる処がなかつた。

論

3. 結核菌の抗 Streptolysin S 作用は、

(a) セロファン膜非透過性であつた。

(b) 100°C 30分の加熱によつて破壊された。

(c) Pepsin によつて容易に不活性化されたが、Trypsin, Papain, Lipase, Amylase によつて影響されなかつた。

4. 結核菌以外の細菌では、B. subtilis 及び B. mesentericus が結核菌と同様に抗 Streptolysin S 作用を示した。

文

- 1) 岡本謙：細菌学の新領域，106，1953。
- 2) 伊藤亮：日本薬物学雑誌，30，124，1941。
- 3) Rosenthal, K. and Bernheim, A. W. : J. Immunology, 68, 53, 1952. 4)
- 伊藤亮：日本薬物学雑誌，28，41，1940。 5)
- Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373, 1949. 6) 大西淳：金大結研年報，10(下)，

献

- 37, 1952. 7) 染谷四郎, 林治：日本細菌学雑誌, 7, 605, 1952. 8) Okamoto, H., Miura, K., Ito, R. und Kyoda, S. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 13, 23, 1940.
- 9) Okamoto, H., Kyoda, S. und Ito, R. : Ibid., 14, 99, 1941.

Table 1. Anti-lytic Effect of Tuberle Bacillus,
Strain H₂, on Streptolysin S

Dilutions of bacterial suspension	Dilutions of streptolysin S							
	1: 200,000	1: 500,000	1: 1 mill	1: 2 mill	1: 5 mill	1: 10 mill	1: 20 mill	1 : 50mill
undiluted	-	-	-	-	-	-	-	-
1 : 2	+	-	-	-	-	-	-	-
1 : 4	++	+	+	++	-	-	-	-
1 : 10	##	##	##	##	+	+	+	-
1 : 20	##	##	##	##	+	+	-	-
1 : 50	##	##	##	##	+	+	+	-
Control	##	##	##	##	#	++	+	-

- no hemolysis; ±, +, ++, ## partial hemolysis; ## complete hemolysis.

Table 2. Comparison of the Anti-lytic Activity on Streptolysin S of the Living and the Heat-killed Tuberle Bacilli

Dilutions of lysin	Tuberle bacillus H ₂									Control	
	Heat-killed culture*					Living culture					
	Dilutions of bacterial suspeneion										
	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 10	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 10	1 : 1		
1 : 200,000	##	##	##	##	-	+	++	##	##		
1 : 500,000	##	##	##	##	-	-	+	##	##		
1 : 1 mill	++	##	##	##	-	-	+	++	##		
1 : 2 mill	++	##	##	##	-	-	+	++	##		
1 : 5 mill	+	+	+	+	-	-	-	+	+		
1 : 10 mill	±	+	+	+	-	-	-	±	+		
1 : 20 mill	-	±	±	±	-	-	-	-	-		
1 : 50 mill	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

* The culture was heated at 100°C. for one hour

Table 3. Comparison of the Anti-lytic Activity on Streptolysin S of Various Strains of Mycobacteria

Strain		Dilutions of bacterial suspension bacillary dry weight (mg/ml)	Dilutions of streptolysin S							
			1: 200,000	1: 500,000	1: 1 mill	1: 2 mill	1: 5 mill	1: 10 mill	1: 20 mill	1: 50 mill
Human tubercle bacilli	Frankfurt	undiluted (24) 1: 10	-	-	-	-	-	-	-	-
	H37Rv	undiluted (30) 1: 10	#	#	+	+	-	-	-	-
	H37Ra	undiluted (20) 1: 10	#	-	#	-	-	-	-	-
	Aoyama B	undiluted (30) 1: 10	#	#	#	#	#	-	-	-
	Kawakami	undiluted (30) 1: 5	#	#	#	#	#	-	-	-
Bovine tubercle bacilli	BCG	undiluted (21) 1: 10	#	#	+	+	+	-	-	-
	Bovine No.10	undiluted (25) 1: 5	#	#	#	#	#	-	-	-
M. tuberculosis "607"	undiluted (28)	#	#	#	#	#	#	+	-	-
M. avium	undiluted (28)	#	#	#	#	#	#	+	-	-
M. phlei	undiluted (23)	#	#	#	#	#	#	+	-	-
Chromogenic mycobacterium Ishii strain	undiluted (16)	#	#	#	#	#	#	+	-	-
Control		#	#	#	#	#	#	+	-	-

Table 4. Influence of Age of Culture upon the Anti-streptolysin Activity of Tuberle Bacillus "H₂"

Age of culture in day	Dilutions of bacterial suspension	Dilutions of streptolysin S							
		1: 200,000	1: 500,000	1: 1 mill	1: 2 mill	1: 5 mill	1: 10 mill	1: 20 mill	1: 50 mill
40	1: 2	+	+	-	+	-	-	-	-
	1: 4	++	++	+	+	+	-	-	-
	1: 10	##	##	+	+	+	-	-	-
67	1: 2	±	-	-	-	-	-	-	-
	1: 4	++	+	+	+	-	-	-	-
	1: 10	##	##	+	+	+	-	-	-
95	1: 2	+	±	-	-	-	-	-	-
	1: 4	++	+	+	+	-	-	-	-
	1: 10	##	##	##	+	+	-	-	-
122	1: 2	+	±	-	-	-	-	-	-
	1: 4	++	++	+	+	-	-	-	-
	1: 10	##	##	+	+	+	-	-	-
Control .		##	##	##	##	+	+	+	-

Table 5. Influence of Culture Medium on the Anti-streptolysin Activity of Tuberle Bacillus "H₂"

Medium (Age of culture in day)	Dilutions of bacterial suspension	Dilutions of streptolysin S							
		1: 200,000	1: 500,000	1: 1 mill	1: 2 mill	1: 5 mill	1: 10 mill	1: 20 mill	1: 50 mill
Sauton (62)	1: 2	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 4	+	+	+	+	+	-	-	-
	1: 10	##	##	+	+	+	-	-	-
Long (95)	1: 2	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 4	±	-	-	-	-	-	-	-
	1: 10	++	++	+	+	+	-	-	-
Dorset (64)	1: 2	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 4	+	+	+	+	+	-	-	-
	1: 10	##	##	+	+	+	-	-	-
Glycerol broth (62)	1: 2	-	-	-	-	-	-	-	-
	1: 4	+	+	+	+	+	-	-	-
	1: 10	##	##	+	+	+	-	-	-
Control .		##	##	##	##	+	-	-	-

Table 6. The Anti-Streptolysin Activity of the Supernatant and the Seitz Filtrate of Bacterial Suspension of Tuberle Bacillus

Each tube contains 1 ml of a dilution of the material to be tested, 0.1 ml of streptolysin S (1;50,000), and 1 ml of the red cell suspension.

Material	Dilutions of material									Control
	1: 1	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	
Supernatant	-	-	-	-	±	+	++	+++	###	###
Seitz filtrate	-	-	-	-	+	++	++	+++	###	###

Table 7. Effect of Heating on the Anti-lytic Activity of Bacterial Filtrate of Tuberle Bacillus

Heating		Dilutions of filtrate									
Temp. (°C)	Time (min.)	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	
100	60	++	##	##	###	###	###	###	###	###	
	30	±	±	+	##	##	##	##	##	##	
60	60	-	-	-	±	+	++	##	##	##	
56	60	-	-	-	-	+	++	##	##	##	
Control		-	-	-	-	+	++	##	##	##	

Table 8. Effect of Enzymes on the Anti-streptolysin Activity of Tuberle Bacillus

Enzymes, contained in 1 ml of bacterial filtrate	Loss of anti-St S activity after 60 min. at 37°C.
100 γ pepsin	+
10 γ "	+
1 γ "	-
100 γ trypsin	-
100 γ papain	-
100 γ lipase	-
100 γ α-amylase	-
100 γ β-amylase	-