- (7) CHRISTENSEN, JOHNSON, PETERSON J. *Biol. Chem.*, 127, 421 (1939).
 (8) HÜCKEL: Theoretische Grundlagen d. organischen Chemie, 3. Aufl., 1. Bd. Leipzig (1940) S. 380.
 (9) 北原: 醸工, 27, 125 (194.).
 (10) BUCHNER: *Ber.*, 31, 568 (1898).
 (11) 北原: 農化, 15, 19 (1939).
 (12) WAGNER-JAUREGG FREUDENBERG's Stereochemie, Leipzig u. Wien (1933) S. 858.
 (13) WISLICIENUS *Annalen*, 167, 302 (1873).
 (14) HERZOG, SLANSKY: *Z. physiol. Chem.*, 78, 240 (1911).

Summary

Racemiasse can be extracted by water with a potential yield of 10~12%, when dried cells of *L. plantarum* are ground with fine silver sand. The racemiasse solution can be dried up in a desiccator under reduced pressure, without any loss of its activity.

No action of lacticodehydrogenase was ever revealed in the racemiasse preparations thus obtained, while the dehydrogenase was found perfectly in the ground cells from which racemiasse has been removed, because of a strong cell-binding property of the dehydrogenase.

The conclusion mentioned in the previous paper, that "the reason why *L. plantarum* in which only D-type of lacticodehydrogenase exists, can again dehydrogenate L-lactic acid, is attributed to the action of the D-enzyme co-operated by racemiasse" has been confirmed in the present paper.

No reliable evidence was obtained for the pyruvic acid hypothesis on which racemiasse was considered as a mixture of D- and L-lacticodehydrogenases, and it dehydrogenated D- and L-lactic acids into pyruvic acid.

It may be most probable to consider that lactic acid hydrate is reversibly dehydrated to enol-lactic acid by the action of racemiasse as shown in Scheme 5.

Lipoxidase に 就 て (第 2 報) 植物及び微生物に於ける

Lipoxidase の分布 (その 1)

福 場 博 保 (東京大学農学部生物化学教室)

昭和 26 年 12 月 12 日 受 理

Studies on Lipoxidase. Part 2. Distribution of Lipoxidase in Plants and Microbes.

By HIROYASU FUKUBA (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

Lipoxidase の分布は現在まで主に植物を対象として研究されて来た。動物体に於ける存在は、BANKS⁽¹⁾⁽²⁾等が鯉の筋肉中に鯉油の酸敗を促進する熱に不安定な酵素の存在を見出し、この酵素が lipoxidase であろうと唱えたのが最初で、その後 LEA⁽³⁾は豚の筋肉に、又 WATTS 及び PENG⁽⁴⁾も豚の筋肉中に、HOVE⁽⁵⁾は鼠の肝臓中に本酵素らしいものを見出したと報告している。併し最近 BANKS⁽⁶⁾はこの酵素中にはヘミン蛋白が含まれており、その性質が lipoxidase と全く異り、その最適 pH も lipoxidase より著しく低く、この酵素作用力が酵素液中に存在するヘミン量に比例する事から、単にヘミンによる酸化であつて、lipoxidase によるものではないと考えられるに至つた。

植物に於ける分布の研究は相当に行われ、大豆、落花生、豌豆、小麦胚芽、アルファルファ等の野菜、アスパラガス、大根、馬鈴薯などに存在する事が明かにされ、VAN FLEET⁽⁷⁾などは組織化学的な実験も行い、アルカリ性の medium にて発芽させた植物の発芽時に作用が最も強く現われる事を報告している。又 HOLMAN⁽⁸⁾も同様発芽時に於ける作用力の消長と大豆種子中の脂肪の含量及びその組成の変化について詳細な研究を行い、lipoxidase の脂肪代謝に対して果す役割について推論を行つている。

然し現在迄の所、微生物体内に lipoxidase が存在するか否かについては報告されていない。著者は二、三の植物及び微生物中に於ける分布について実験を行つた。

実 験 の 部

植物種子より酵素液の調製: 実験に使用した植物種子(大豆を除く)5g に pH 6.5 の磷酸緩衝液(M/15) 30 cc 及び精製海砂を加え、よく磨碎して酵素を抽出した後、遠心分離し、落花生その他脂肪を多く含む種子を材料にした時には最上層に集るクリーム層を除き、次層の半透明な抽出液を酵素液として分離する。又脂肪を多

く含まない種子の場合には上層の透明な抽出液を酵素液として分離する。大豆の場合には石油エーテルにて脱脂した後、上述の方法によつて抽出分離した抽出液を使用した。

諸類を使用した場合には、諸をおろし金を用いておろし、馬鈴薯はこのおろし薯を直ちに搾汁して得られる汁液を酵素液として使用し、甘藷の場合には、このおろし藷に対して同重量の pH. 6.5 磷酸緩衝液を加えた後常法によつて磨砕抽出を行つた抽出液を分離使用した。

微生物の培養及び酵素の抽出：糸状菌は Bllg. 5° の麵汁を培養基として用い、30° にて 4~5 日間培養した後、菌蓋と培養液を分離し、菌蓋はよく蒸溜水を用いて洗滌した後 30 cc の pH. 6.5 磷酸緩衝液を用いて常法により抽出液を分離した（酵素液 1 cc 当り乾燥菌体量 14~21 mg）酵母類は Bllg. 10° の麵汁を用い、細菌類はグイオン培地を用いて、30° にて 2~3 日間振盪培養した後、菌体を遠心分離して集め、洗滌後種子の場合と同様に磷酸緩衝液にて抽出し、抽出液を得た（抽出液 1 cc 当り乾燥菌体量 73~119 mg）。

測定法：第 1 報に述べたクロチン比色法によつて測定し、80 γ/cc のクロチン液 0.2 cc を加えた場合 10 分間反応を行わせた後に於ける、反応液 1 cc 当りの酸化褪色クロチン量によつて、酵素力の強弱を測定した。

結 果 及 び 考 察

実験に用いた植物種子をその含有する油脂の乾燥性によつて分類すると次の通りである。

- 1) 乾性油：大麻、亜麻、赤松及び黒松。
- 2) 半乾性油：大豆、胡麻、菜種、大根、山東菜、甘栗南瓜、西瓜、米及び小麦。
- 3) 不乾性油：落花生、蓖麻、椿及び茶。

併しこれらの実験を行つた種子中 lipoxidase 作用を見出したものは僅かに大豆及び落花生の 2 種のみで、他の種子の場合には全然その酵素作用が認められなかつた。この結果、植物種子に含まれている油脂の乾燥性と lipoxidase との間には何等特別な関係が存在しないものと考えられるが、酵素作用の認められなかつた各種子の場合には、全くこれらの種子中には lipoxidase が存在しないのか又は大豆の場合に準じて行つた抽出方法が悪い為に存在する酵素が抽出されなかつたものか更に検討を加えている。又種子の成熟又は発芽の一時期に限つて酵素力が出て来る場合も考えられ、これらの点についても研究を重ねている。又南瓜種子の場合には lipoxidase の逆作用を行う saturase の存在が報告⁽⁹⁾されているので、この saturase の為に lipoxidase 作用が現れて来ない場合も考えられる。小麦については Garnet 及び Manitoba No. 3 の 2 種の小麦を材料として使用し、共に lipoxidase 作用が認められなかつたが、1943 年 K. J. SUMNER⁽¹⁰⁾は thiocyanogen 法によつて測定し小麦は大豆に比較して約 1/400 の lipoxidase 活性を示すと報告している。この thiocyanogen 法についてはその後二三の人々によつて lipoxidase 作用の測定に用いる時には種々の原因によつて結果が大きく出る欠点のある事が指摘されているとはいえ、この実験にて得られた結果とは異つた結果になつている事は更に吟味を要する点と考えら

れる。又大根汁中には lipoxidase 作用が認められたにも拘らず、大根種子中には本酵素作用の見出されなかつた事は興味ある点と思う。

上記の種子について行つた実験にて豆類にのみ lipoxidase が認められたので、豆類の数種を用いてその作用力を比較した。又落花生に就ては大粒種、中粒種、小粒種、立茎種の 4 種を用いて品種の相違によつて酵素作用がどの位違つて来るかを実験した結果は第 1 表の通りである。この結果大豆が最も強力であるが、大豆及びエンドウを除き他の豆類は殆んど同様な酵素力が認められた。インゲン豆、小豆、エンドウ、ウズラ豆等油脂を殆んど含まない種子中に lipoxidase 作用を相当強力に認め得たことは先の油脂を多く含んでいる種子の場合と対照して興味ある結果と思われる。又落花生について行つた品種

Table 1. Distribution of Lipoxidase in Peas and Beans.

Seeds	Amounts of croton oxidized (γ/cc.)
大豆 (soybean)	17.7
ウズラ豆 (garden bean)	13.8
サ、ゲ (cow pea)	12.5
小豆 (azuki bean)	12.4
インゲン豆 (garden bean)	10.6
エンドウ (pea)	8.8
落花生 (pea nut)	
種ヶ島在来種(大粒種) (Tanegashima, great grain)	8.9
神奈川中粒種 (Kanagawa, medium grain)	11.5
神奈川小粒種 (Kanagawa, small grain)	10.4
立駱駝 B 8 (Tachirakuda B. 8)	11.5

による影響は、大粒種が若干低い値を示したのみで、他はほぼ同様な作用力を示した。

藪類では、甘藷(金時、農林一号、華人、護国、ポルトリー、ウエンホーリー、沖縄百号、大白、紅赤及び關東一号)の各品種、及び馬鈴薯(赤目種)についてその作用を実験したが、馬鈴薯の場合には酸化クロチン量は 13.2 γ/cc であったが、甘藷の場合には全然その作用を認めなかった。

Table 2. Distribution of Lipoxidase in Microbes.

Fungi :	Lipoxidase activity
<i>Aspergillus sojae</i>	+
" <i>flavus</i>	+
" <i>glaucus</i>	+
" <i>niger</i>	+
" <i>elegans</i>	+
<i>Rhizopus usamii</i>	+
" G. 34 YAMASAKI	+
" G. 36 YAMASAKI	+
" <i>tritici</i>	+
<i>Penicillium rugulosum</i>	±
" 15	±
Yeasts :	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (brewer's yeast)	-
" " (baker's yeasts)	-
<i>Torula utilis</i>	-
<i>Rhodotorula</i>	-
Bacteria :	
<i>Bacillus natto</i>	-
" <i>subtilis</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Pseudomonas fluo</i>	-
<i>Sarcina flava</i>	-

油脂が酸敗する時に微生物、殊に *Aspergillus* 等の糸状菌の繁殖によつて酸敗が促進される事は古くから言われた所であるが、この現象が lipoxidase によるものではなからうかと考えて、微生物中に於ける本酵素の分布を数種の糸状菌、酵母及びバクテリアについて検索した所、第 2 表の結果が得られ、*Aspergillus*, *Rhizopus* 属の糸状菌ではその存在が認められたが、*Penicillium* 属の糸状菌ではその存在が判然としなかった。又本酵素は endoenzyme であつて、培養液中には lipoxidase 作用が認められなかった。又実験を行つた酵母及びバクテリアのいずれからも lipoxidase 作用は認められなかった。殊に酸化酵素の強力に含まれている *Sarcina flava*, 脂肪代謝の活潑な *Torula utilis*, carotene 含量の多い *Rhodotorula* 中に lipoxidase 作用の認められなかった事は興味ある点である。

総 括

1) 植物及び微生物についてその lipoxidase 分布を検索した。

2) 実験を行つた 22 種の植物種子中豆類(大豆、

小豆、ウズラ豆、インゲン豆、エンドウ、サ、ゲ及び落花生)についてのみ本酵素作用が認められ、品種の相違による活性度の相違は僅少であつた。

3) 藪類では、馬鈴薯には見出されたが、甘藷では見出す事が出来なかった。

4) 糸状菌、酵母、バクテリアについて同様 lipoxidase の分布を検討し、*Aspergillus* 及び *Rhizopus* 属の糸状菌にのみその作用を見出した。

本研究に當り種々御指導頂いた佐橋、丸尾両先生に厚く感謝致します。又微生物の培養等について種々御世話下さいました東大坂口研究室山本銀三氏に感謝致します。

(本研究は昭和 25 年 4 月 8 日農芸化学会大会講演会にて発表した)。

- (1) BANKS, A. : *J. Soc. Chem. Ind.* (London), 56, 13 T (1937).
- (2) BANKS, A. : *J. Soc. Chem. Ind.* (London), 63, 8 (1944).
- (3) LEA, C. H. : *J. Soc. Chem. Ind.* (London), 56, 376 T (1937).
- (4) WATTS, B. M. and Peng, D.-H. : *J. Biol. Chem.*, 170, 441 (1947).
- (5) HOVE, E. L. : *Science*, 98, 433 (1948).
- (6) BANKS, A. : *Advances in Enzymology*, 8, 442 (1948).
- (7) VAN FLEET, D. S. : *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 740 (1943).
- (8) HOLMAN, R. T. : *Arch. Biochem.*, 17, 459 (1948).
- (9) ZELLER, E. A. and Maschek, F. : *Biochem. Z.* 312, 354 (1942).
- (10) SUMNER, R. J. : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 15, 14 (1943).

Summary

The author examined the distribution of lipoxidase in 17 kinds of fatty seeds, but contrary to the presumption the correlation between the iodine value of these fats and the lipoxidase activity could not be demonstrated. The distribution of this enzyme in non-fatty peas and beans was examined.

This enzyme was found also in the potato juice, but not in the extract of sweet potatoes.

To research the action of lipoxidase on the rancidity of fats caused by the generation of microbes, the distribution of this enzyme in microbes was examined; this was found in *Aspergillus* and *Rhizopus*, but not in yeasts and bacteria.

Lipoxidase に就て (第 3 報) Lipoxidase の最適 pH に就て

福 場 博 保 (東京大学農学部生物化学教室)

昭和 26 年 12 月 12 日 受 理

Studies on Lipoxidase. Part 3. The Optimum pH of Lipoxidase.

By Hiroyasu FUKUBA (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

緒 言 Lipoxidase の最適 pH については SUMNER 及び SMITH は基質として, methyl linoleate (以下 M. L. と略記する) を用いて実験した結果 6.5 であると報告しているが, この場合用いた基質は緩衝液に溶解しないために適当な乳化剤を加えて乳化し基質と酵素との接触面を増加させる方法を探っているが, 乳化条件の相違, 乳化後の経過時間による変化によつて著しい差異を生じ, 再現性に乏しい実験となるので, この値に対しても十分に信頼出来ない状態である. この欠点を除く為に HOLMAN⁽²⁾ は均一な溶液の得られる sodium linoleate (以下 S. L. と略記する) を基質として用いて, この場合には lipoxidase の最適 pH は 8.4~9.5 の広い範囲にわたつて観察されると報告している. 然し S. L. を用いた場合には, 再現性の高い実験を行う事は可能になるが, 石鹼液の溶解度が pH の増加に従つて変化する為に, pH による有効基質濃度の変化と, 作用力の変化との二つの因子による見掛け上の最適 pH として 8.4~9.5 という値が得られる可能性が出て来る. この問題を解決するためには lipoxidase 作用を受け得る水溶性の基質で, その溶解度が pH によつて著しく変らないものが見出されなくては解決しないものと考えられる. Polyoxyethylene sorbitan monolinoleate がその目的に副い得るように考えられるが, 合成操作が複雑で, 合成途中で autoxidize され易い危険性があるので, 更に簡単に合成される polyoxyethylene linoleate (以下 P. L. と略記する) を合成し, このものを基質として用いて, lipoxidase の最適 pH を求めた.

実 験 の 部

(I) Polyoxyethylene linoleate の合成 E. G. の polyoxyethylene oleate の合成法⁽³⁾ に準じて行つた ethylene chlorhydrine より合成した ethylene oxide を使用時まで魔法瓶に容れて貯える. Linoleic acid は常法によつて M. L. を分溜した後, NaOH にて鹼化し, 稀硫酸を用いて分解した後, よく洗滌し乾燥して分取する. この linoleic acid (16 g) に対して 1 g の NaOH を少量の水に溶解した後添加し, 還流冷却器を付けて 135~140° に加熱する. 更にこれに ethylene oxide (22 g) を徐々に通じ, 全部通じた後, 3 時間更に加熱して反応させる. 反応後反応物を水中に加え, 上層の未反応の脂肪酸層を除き, 乳濁液よりエーテルにて P. L. を抽出する. エーテル抽出物を洗滌し, 次に活性炭にて脱色精製した後エーテルを追出し, P. L. を分離する. このようにして脂肪酸 1 mole に対して約 10 mole の ethylene oxide chain が附着したものが得られ, このものはよく水に溶解し乳濁液を与えた.

(II) 界面張力の測定 POWNEY⁽⁴⁾⁽⁵⁾ の方法に準じて, 第 1 図の装置によつて測定した. 尚界面張力は pH, 石鹼液の濃度によつて変化すると共に, 石鹼液中に存在する炭酸ガス⁽⁶⁾ 及び塩類濃度⁽⁷⁾ によつても著しく変化する事が明にされているので, 緩衝液としては 0.25% Na₃PO₄, Na₂HPO₄, 及び NaH₂PO₄ 液を混合して, 求める pH 値の緩衝液を調製した. 又炭酸ガスを追出す為に測定前 10 分間窒素ガスを激しく通気した. 界面張力の測定に當つて最も誤差を生じ易い点は, 十分に生長しない xylene 滴がピペットから離れて

Fig. 1. Apparatus for the determination of interfacial tension.