- (10) 川村 : 農化, 24, 385 (1951).
 (11) E. RUÍZ BALDEÓN : *Actas y trabajos Congr. peruano quim., 3º Congr., 2, 448* (1949) [*Chem. Abstr., 45, 6119 d* (1951)].
 (12) L. E. WISE and E. K. RATLIFF : *Anal. Chem., 19, 459* (1947).
 (13) R. L. WHISTLER, J. BACHRACH, and D. R. BOWMAN : *Arch. Biochem., 19, 25* (1948).
 (14) 川村 : ヘミセルロース・多糖類化学 (東京: 共立出版) 印刷中 (1954).
 * 古い文献につき御教示下された九州大学の岩田久敬教授に感謝する。

Resumo

Kruda "holocelulozo" estis preparita el senŝeligitaj faboj (semoj de *Vicia faba*) per sinsekvaj ekstraktadoj per etanolo, malvarma akvo, varma akvo, kaj takadiastazo (analizo en Tabelo 1).

Hemicelulozoj (hemi-oj) estis apartigitaj laŭ la metodo de BUSTON⁽⁹⁾ (Tabelo 2); la rezulto fariĝas kiel en Tabelo 5 post korektado (Tabelo 3). Tiu ĉi holocelulozo entenas 40.5% da hemi-o (laŭ determinado de reduktaj sukeroj post hidrolizado per 2% HCl ĉe 98° por 5 horoj), 37.4% da apartigita kruda tuta hemi-o, kaj 28.8% da korektitaj hemi-oj, kiuj konsistas el 1 parto da hemi-o A kaj 4 partoj da hemi-o C. Hemi-o A precipitiĝas ĉe pH 4.2~5.0, tamen ĝi entenas 22.3% da kruda proteino. La ekstraktado de hemi-oj per diversaj koncentrecoj (2~16%) de NaOH (Fig. 1) donis la rezulton, ke la kvanto de hemi-o A akirita multiĝas laŭ la koncentreco de NaOH, dum la kvanto de hemi-o C apenau ŝanĝiĝis en 6~16% NaOH. Tiu eksperimento montras, ke hemi-o A (plej facile precipitebla kaj tial ĝenerale de relative grandaj molekuloj) estas ekstraktata pli kaj pli multe laŭ la koncentreco de NaOH, dum hemi-o C (plej malfacile precipitebla kaj tial de relative malgrandaj molekuloj) estas ekstraktata plejparte per 4~6 % NaOH. Nur ŝpuro da hemi-o B ekzistas en faboj (Tabelo 2).

Kvalitaj provoj (Tabelo 4) montras, ke la hidrolizato de kruda holocelulozo enhavas pentozon, sed ne ketozon nek uronacidon nek galaktozon. La hidrolizato entenas 17.8% da pentozo. La paperkromatografio montras la ekziston de glukozo kaj arabinozo kaj malmulte da ksilozo.

Glutathione に関する研究 (第 8 報) Glutathione の定量法中沃度法, 小川定量法に於ける KIO₃ 滴定の Ascorbic acid に対する挙動に就て

黒 岩 芳 郎 (麒麟科学研究所尼崎分室)

昭和 29 年 6 月 21 日 受 理

Researches on Glutathione. Part 8. Studies on the Iodometric Procedure among the Derermination Methods of Glutathione. On the Behaviour of the Iodometric Titration on Ascorbic Acid in OGAWA's Method.

By Yoshiro KUROIWA (Kirin Research Institute, Amagasaki Laboratory)

I. 緒 言

自然界に於て glutathione (GSH と略す) と共存する物質中 cysteine 及び thioneine を除いて SGH と ascorbic acid (AA と略す) は共に沃度を消費する主要なる物質であり同時に 2,6-dichlorphenol-indophenol (DI と略す) を還元する物質である. GSH の定量法中沃度法に於て特に小川法⁽¹⁾ 及び藤田・沼田法^(2,3) をその代表的なものとして撰択した理由は既報⁽⁴⁾ の通りである. 而して小川法は AA 及びこの類似物質を GSH と共に KIO₃ にて 0° 滴定を行つてその総和を求め, 一方 DI を用いて GSH の存在を妨げない酸度を利用して AA 及びこの類似物質を AA と見做して GSH に換算し, 全沃度消費量より差引いて GSH を測定せんとするものである. GSH の沃度滴定は既報⁽⁵⁾ の如く規定された四つの条件下に滴定時間 1 分以内に於て理論値に従つて明確に滴定され得る. 然るに AA の沃度滴定終了時間は酸度及び温度に顕著に支配されるものであつて小川法に於て AA と GSH 共存の場合に 0° 於て沃度消費総量を求めんとする時, 両者の KIO₃ に対する滴定終了時間は異なるものである事に注目しなければならない. 小川は滴定時間の問題に関し Fe⁺⁺⁺ の滴定に及ぼす影響に就て KI 及び澱粉添加より滴定開始まで 1 分間放置する時は N/4 sulfosalicylic acid (S. S. A. と略す) に於てその影響のある事を認めているが⁽⁶⁾, 滴定開始後の滴定時間に就て指示を与えた報告は見当らない.

本報に於ては KIO_3 滴定の AA 結晶及び生体資料の AA に対する挙動を究明し、時間的に滴定終点を判定する事によつて小川法は初めて成立するものである事を明らかにし、従つて滴定終了時間の測定を提唱すると同時にその改良法に就て述べようと思う。尙序でながら AA のみの測定ならば小川法に於ける如き DI 法の代りに室温にて KIO_3 によつて一層正確に AA を求め得る筈である。従つて GSH 及び AA 共存の場合 GSH を $\text{H}\cdot\text{COH}$ にて破壊する方法が考えられるが $\text{H}\cdot\text{COH}$ は QUENSEL and WACHHOLDER⁽⁷⁾ も既に認めている如く同時に AA の一部破壊を招くものである故に GSH の存在に於ては小川法に於ける如く AA のみを DI 法により求める以外に途はない

II. 実 験 成 績

(1) Ascorbic acid 純粋溶液の pH と滴定時間及び滴定温度との関係 AA の KIO_3 滴定終了時間は酸度及び滴定温度に顕著に支配される事は Table 1 に示す如く実験的に証明する事が出来た。0° 滴定に於てその影響は特に大きい、而して AA の KIO_3 滴定の場合は GSH の場合と異り測定値は comma 以下 3 桁に読み取る事は肉眼点に困難で 2 桁は可能の程度であつて終点は多少明瞭性を欠く事を附言する。

Table 1. Relation between pH and the Iodometric Titration Time of Ascorbic Acid Solution at 0°, 5° and 15°C.

0.5 cc of Ascorbic acid soln. (25 mg % in H_2O) and 1 cc of 5% KI are added to 10 cc of buffer soln. of various pH (McILVAINE). Titrated with $N/1000 \text{ KIO}_3$ by minute. Purity of ascorbic acid: 93.9%. Theoretical: 1.334 cc $N/1000 \text{ KIO}_3$ calculated.

a) At 0°											
pH \ min.	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc
0.5	0.30	0.43	0.63	0.79	0.91	1.04	1.14	1.21	1.24	1.29	1.33
0.75	0.45	0.65	0.95	1.10	1.21	1.27	1.31	1.33	"	"	"
1.00	0.59	0.89	1.20	1.29	(3.5min.) 1.33	"	"	"	"	"	"
1.25	0.76	1.12	1.28	1.33	"	"	"	"	"	"	"
1.50	0.91	1.22	1.33	"	"	"	"	"	"	"	"
2.00	1.21	1.33	"	"	"	"	"	"	"	"	"
2.50	1.33	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
3.00	1.33	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
3.25	1.33	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
b) At 50°											
pH/min	1/2	1	2	3	4	5	c) At 15°				
	cc	cc	cc	cc	cc	cc	1/2	1			
0.5	0.49	0.64	0.95	1.19	1.29	1.33	0.49	0.64			
0.75	0.59	0.87	1.13	1.27	1.33	"	0.75	0.87			
1.00	0.65	0.96	1.15	1.29	1.33	"	1.00	1.15			
1.25	0.89	1.13	1.29	(2.5min.) 1.33	"	"	1.25	1.33			
1.50	1.11	1.29	(1.5min.) 1.33	"	"	"	1.50	"			
2.00	1.33	"	"	"	"	"	2.00	"			
2.50	1.33	"	"	"	"	"	2.50	"			
3.00	1.33	"	"	"	"	"	3.00	"			
3.25	1.35	"	"	"	"	"	3.25	"			

次で小川法の $N/4 \text{ S.S.A.}$ を中心に一般に用いられる抽出試薬に就てその pH と滴定時間との関係を AA の

Table 2. Relation between pH of the Extracting Reagent and the Iodometric Titration Time of Ascorbic Acid Solution at 0°, 5° and 15°C.

0.5 cc of Ascorbic acid soln. (25 mg % in H_2O) and 1 cc of 5% KI are added to 10 cc of 2% HPO_3 or $N/4 \text{ HCl}$ or $N/4 \text{ S.S.A.}$ Purity of ascorbic acid: 98.0% Titrated with $N/1000 \text{ KIO}_3$. Theoretical: 1.392 cc

a) At 0°										
Extracting reagent	pH \ min	0	1	2	3	4	5	6	7	
	about	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	
2% HPO_3	1.80	1.06	1.29	1.39	"	"	"	"	"	
$N/4 \text{ HCl}$	0.75	0.48	0.65	0.91	1.10	1.19	1.28	1.33	1.39	
$N/4 \text{ S.S.A.}$	0.95	0.67	0.93	1.23	1.31	1.39	"	"	"	

純粋溶液に就て検した成績は Table 2 に示す如く、全く緩衝液に於けると同様の結果を示し結局小川法に於ける $N/4 \text{ S.S.A.}$ の 0° 滴定に於ては AA の純粋溶液の場合には約 4 分間を必要とする結果となつた。

(2) Ascorbic acid 純粋溶液の pH2 調整と滴定終了時間 KIO_3 による 0° 滴定に於

b) At 5°		c) At 15°					
Extracting reagent	min. pH	1/2	1	2	3	4	Within 1 min.
2% HPO ₃	1.80	cc	cc (1.5 min.)	cc	cc	cc	cc
N/4 HCl	0.75	0.50	0.72	1.06	1.23	1.39	1.39
N/4 S. S. A.	0.95	0.80	1.08	1.27	1.39	1.39	1.39

Table 3. The Iodometric Titration Time of Glutathione and Ascorbic Acid in the Mixed Solution after pH of N/4 S. S. A. is Adjusted to 2 or not.

1 cc of x mg % GSH in N/4 S. S. A. and 1 cc of y mg % ascorbic acid in N/4 S. S. A. are filled to 10 cc with N/4 S. S. A. Titrated with N/1000 KIO₃ after the solution is adjusted to pH 2 with NaOH or not.

Mixed solution		N/4 S. S. A. as it is					After adjusting to pH 2
x mg % Glutathione	y mg % Ascorbic acid	1/2 min.	1 min.	2 min.	3 min.	3 1/2 ~ 4 min.	Within 1 min.
25	10	cc	cc	cc	cc	cc	cc
25	20	1.33	1.51	1.68	1.76	1.93	1.93
12.5	20	2.95	4.05	4.68	4.90	5.05	5.05
12.5	20	2.28	2.93	3.78	4.13	4.38	4.38
12.5	10	1.46	1.71	2.10	2.38	2.50	2.50

て GSH は規定された四つの条件下理論値に従い、⁽⁵⁾且この場合 1 分間以内にて滴定終了可能である。この規定された pH 条件は 0.75~2.0 であり、一方 Table 1 によれば AA の 1 分間滴定可能範囲は pH 2.0~3.25 である事を知る故に両者を満足せしめるものは pH 2 となる。故に溶液を pH 2 に調整する事によつてこの滴定終点を引く欠点を除去し得る筈であり Table 3 に於て之を実証する事が出来た。

(3) 小川法の生体資料抽出

溶液とその pH 2 調整に於ける Ascorbic acid の滴定終了時間 N/4 S. S. A. の生体資料抽出液に於ける AA の pH と滴定時間との関係を検する為に先ず抽出液の GSH を H·COH を以て、又 AA を AA-oxidase を以て破壊し、然る後 AA 結晶を溶解せしめて資料となし、0° に於ける pH 2 調整と pH その儘の 2 条件に於ける滴定終了時間の影響を DI による測定値の KIO₃ 滴定値への換算値と比較検討を試みた。Table 4 によれば Table 3 即ち AA の純粋溶液の場合と異り滴定は更に時間的に終点を引き 0°, pH 2 条件に於て約 2 分間、

Table 4. The Iodometric Titration Time of Ascorbic Acid Dissolved in the Vital Material Extract after pH of N/4 S. S. A. is Adjusted to 2 or not.

To destroy ascorbic acid and glutathione in extract, 30 cc of N/4 S. S. A. extract of plant tissues are adjusted to pH 6.5 with x cc of 2 N NaOH, into which oxygen gas is passed for 30 min. at 30° after addition of 1.5 cc ascorbic acid oxidase, and then, x cc of 2 N HCl and 2 cc of 5% H·COH are added and allowed to stand for 1 hr. or more. To 1 cc of extract above treated, 0.5 cc of ascorbic acid soln. in N/4 S. S. A. and 3.5 cc N/4 S. S. A. are added, and titrated with N/1000 KIO₃ at pH 2-adjusting or N/4 S. S. A. as it is at 0° by minute. The ascorbic acid content determined by indophenol is recognized as the theoretical. In this case, the remained ascorbic acid oxidase does not exert influence on ascorbic acid, because ascorbic acid is added in extract cooled at 0°, just before titration.

a) Tomato (1:5) extract

min. pH	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH 2	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc
N/4 S. S. A.	1.03	1.08	1.10	"	"	"	"	"	"	"	"
Indophenol → KIO ₃	0.60	0.75	0.91	1.02	1.08	1.10	"	"	"	"	"
	$0.003872 \times 5 \times \frac{1}{0.20} \times \frac{1}{0.088} = 1.100$ cc										

b) Persimon leave (1:20) extract

min. pH	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH 2	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc	cc
N/4 S. S. A.	1.01	1.08	1.10	"	"	"	"	"	"	"	"
Indophenol → KIO ₃	0.34	0.53	0.83	1.01	1.09	1.10	"	"	"	"	"
	$0.003978 \times 5 \times \frac{1}{0.20 \sim 0.21} \times \frac{1}{0.088} = 1.130 \sim 1.076$ cc										

小川法の N/4 S. S. A. に於ては約 5 分間を必要とする結果となつた。尙生体資料として上記の外に大根、松葉、唐がらし、ふじ葉、南瓜葉に就ても試みたが結果は同様であり、又この関係は当初より GSH を破壊し或は Zn 還元処理後 GSH を破壊して、残留 AA に就ても同様であつた。

AA の純粋溶液に比して生体資料抽出液に於ける AA の滴定終了時間の遅延に関し H·COH の存在が危惧さ

Table 5. Effect of H·COH on the Iodometric Titration Time of Ascorbic Acid.

9 cc of ascorbic acid soln. (25 mg % in N/4 S. S. A.) is mixed with 0.6 cc of 5% H·COH or H₂O. 0.5 cc of the above prepared soln. is added to 4.5 cc N/4 S. S. A. and titrated with N/1000 KIO₃ at 0°. Theoretical: 1.41 cc

min. Mixed with	1/2	1	2	3	4
H·COH	cc 0.62	cc 0.91	cc 1.28	cc 1.40	cc 1.41
H ₂ O	0.61	0.90	1.25	1.38	1.41

れたのでその影響を検したが Table 5 によればその懸念はなく、結局その終点を引く物質は生体資料中に存在する未知物質に起因するものであると云う事が出来る。

(4) N/20 S. S. A. 及び 2% HPO₃ の生体資料抽出溶液に於ける Ascorbic acid の滴定時間 生体資料抽出液に於て AA の小川法の N/4 S. S. A. に於ける KIO₃ 滴定は前述の如く約 5 分間を必要とし、これを pH 2 に調整する時は約 2 分間に短縮し得る利点を有するが、一方 pH 2 調整の場合には盲驗値を得る為に H·COH 及び AA-oxidase を以て抽出液中の GSH 及び AA を破壊後測定しなければならない繁雑操作を必要とする欠点がある。何とならば抽出試薬自身に対する盲驗値に比して pH 2 調整の場合の盲驗値は一般に高い故である。故に pH 2 に近く且 GSH の DI に対する影響の無い酸度の抽出液として N/20 S. S. A. 及び 2% HPO₃ を撰択した。この場合には抽出液自身に対する盲驗値と生体抽出液中の GSH 及び AA 破壊後の盲驗値とは殆んど一致する故に簡単に前者を以て生体資料抽出液の盲驗値と見做す事が出来る利点を有する。これらの抽出液を用いる時はその酸度より Table 6 によれば両者は同様に約 3 分間を必要とする事を知る。

Table 6. Effect on the Iodometric Titration Time of Ascorbic Acid in the Vital Material Extracted with N/20 S. S. A. and 2% HPO₃.

Glutathione present in the plant tissue extract is destroyed with H·COH as same as Table 4 and thus the remained ascorbic acid in the extract is used for experiment. 1 cc extract above treated is added to 4 cc of N/20 S. S. A. or 2% HPO₃ and titrated with N/1000 KIO₃. The theoretical is standardized by the value estimated by indophenol.

a) Pigweed (1:5) extract

min. Ext.	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N/20 S. S. A.	cc 0.08	cc 0.09	cc 0.10	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "
2% HPO ₃	0.06	0.08	0.10	"	"	"	"	"	"	"	"
Indophenol → KIO ₃	$0.0010668 \times \frac{1}{0.12 \sim 0.13} \times \frac{1}{0.088} = 0.101 \sim 0.093 \text{ cc}$										

b) Onion (1:5) extract.

min. Ext.	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N/20 S. S. A.	cc 0.06	cc 0.11	cc 0.14	cc 0.15	cc 0.17	cc 0.18	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "
2% HPO ₃	0.07	0.11	0.14	0.15	0.17	0.18	"	"	"	"	"
Indophenol → KIO ₃	$0.0010668 \times \frac{1}{0.085 \sim 0.080} \times \frac{1}{0.088} = 0.143 \sim 0.152 \text{ cc}$										

c) Tomato (1:5) extract

min. Ext.	1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N/20 S. S. A.	cc 0.01	cc 0.02	cc 0.03	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "	cc "
2% HPO ₃	0.01	0.02	0.03	"	"	"	"	"	"	"	"
Indophenol → KIO ₃	$0.0022066 \times \frac{1}{0.85 \sim 0.90} \times \frac{1}{0.088} = 0.030 \sim 0.028 \text{ cc}$										

故に小川法の N/4 S. S. A. 濃度抽出液を滴定時にこの濃度に稀釈するか、除蛋白能に就て配慮しなければならないが、当初より N/20 S. S. A. を用いる事によつて 3 分間滴定時間を採用し以て沃度法を近似値的に成立せしめる事が出来る。かくの如く滴定時間を短縮せんとする試みは唯に滴定操作時間の簡易化の意味ではなくて Fe⁺⁺⁺ 存在の問題、KI 解離の問題、沃度と GSH 或は AA 以外の物質との反応の問題等を考慮して測定誤差因子の導入を成るべく避けんとする目的に他ならないのであつて、これらの問題を考慮するならば S. S. A. より 2%

HPO₃ の使用が望ましいと考えられる。尙 HPO₃ の使用に就て UHRENBROOCK⁽⁸⁾ の否定説があるが、これは不当と判断され承服出来ない。かくて小川法を或る程度改良する事が出来る。

III. 要 約 及 び 結 論

Ascorbic acid 純粋溶液に対する KIO₃ の挙動

(1) Ascorbic acid の KIO₃ による滴定時間は溶液の酸度及び滴定温度の影響を受ける。例えば pH 0.5 溶液にて理論値を得るためには 0° 滴定にては 10 分間、5° にては 5 分間を要するが 15° にては 1 分間以内にて足りる。又 1 分以内にて滴定可能 pH 範囲は 0° にては pH 2 以上、15° にては pH 0.5 以上の関係にある。

(2) これらの関係は 0° 滴定を採用する小川法の N/4 S. S. A. に適用する時は ascorbic acid の滴定終了時間は約 4 分間を必要とする。

(3) 0° 滴定に於て 1 分以内滴定可能 pH 範囲は glutathione に於ては pH 0.75~2.0, ascorbic acid に於ては pH 2.0~3.25 である故に pH 2 に於て両者を同時に 1 分以内にて滴定し得る筈であり又これを実証する事が出来る。

生体資料抽出液中の Ascorbic acid に対する KIO₃ の挙動

(4) Ascorbic acid は小川法の N/4 S. S. A. 0° 滴定に於て滴定終了時間は約 5 分間を必要とする故に、小川法に従つて沃度全消費量を測定する時は滴定時間を考慮に入れねば誤謬を起す

(5) 小川法の N/4 S. S. A. 抽出液を pH 2 に調整する時は約 2 分間を以て滴定終了する事が出来るが、この場合盲値測定は生体資料抽出液の glutathione 及び ascorbic acid をそれぞれ H·COH 及び ascorbic acid oxidase 処理液に就て行わねばならない複雑操作を必要とする。

(6) この終点を引く物質は生体資料中に存在する。

小 川 法 の 改 良

(7) Ascorbic acid 及び glutathione の KIO₃ 測定に於て pH 2 に近く且 ascorbic acid のみを indo-phenol にて測定に際し glutathione の存在を妨げない酸度 N/20 S. S. A. 濃度を用いる時は約 3 分間にて滴定終了可能であつて滴定時間を短縮する事が出来る。この関係は 2% HPO₃ にても同様である。

(8) 生体資料に対して N/20 S. S. A. 或は 2% HPO₃ 抽出を行う時は抽出液の盲値は抽出剤のそれを近似的に用いる事が出来る利点を有する。

(9) 故に小川法に於て ascorbic acid を測定する時は N/4 S. S. A. 抽出液を N/20 S. S. A. 濃度に稀釈するならば滴定時間を約 3 分間に短縮する事が出来る。

(10) 2% HPO₃ は N/20 S. S. A. 抽出と全く同様に処理し得るものであつて滴定に長時間を要する点より Fe⁺⁺⁺ の存在、KI の解離、沃度と他物質との反応等の諸問題を考慮するならば S. S. A. よりは 2% HPO₃ の採用の方が望ましい。

稿を終るに当り本研究発表を許可せられた当社常務取締役大塚義男、時国益夫両氏の御厚意を感謝し、御指導御鞭撻を辱うした当研究所長熊沢武雄取締役、前所長奥田譲及び故湯川又夫両博士、更に御校閲の勞をとられた京大片桐英郎教授に深謝の意を表する。

(1) 小川政彦：農化，14，65 (1938)。

(2) 藤田秋治，沼田 勇：Biochem. Z., 299, 262 (1938)。

(3) 藤田秋治，沼田 勇：Biochem. Z., 299, 249 (1938)。

(4) 著者：農化，24，482 (1951)。

(5) 著者：農化，25，93 (1951)。

(6) 小川政彦：農化，15，768 (1939)。

(7) W. QUENSEL and K. WACHHOLDER
Z. f. physiol. Chem., 231, 65 (1935)。

(8) K. UHRENBROOCK：Z. f. physiol. Chem., 236, 192 (1935)。

Summary

The behaviour of KIO₃ on ascorbic acid (AA) and glutathione (GSH) in OGAWA's method⁽¹⁾, has been examd. and discussed. The iodometric titration of GSH was carried out theoretically under the four conditions described in preceding paper⁽⁵⁾ and within 1 min. It must be, therefore, observed that the iodometric titration times (ITT) of GSH and AA present in soln. are

differently estmd. at 0° in OGAWA's method. The author will propose the necessity of GSH-detrn. with a definite ITT by the following exptl. results, otherwise the remarkable error is induced.

The dependence of ITT on pH and temp. of GSH pure soln. was shown in Table 1. This relation was as same as the extg. reagents used for GSH. ITT of AA in *N*/4 S.S.A. at 0° on OGAWA's terms was about 4 min. (Table 2), but in the vital material (VM) ext., about 5 min. (Table 4). From the studies of pH ranges of GSH and AA possible to be titrated within 1 min., it was found that both were titrated within 1 min. at pH 2 (Table 3). But it was required 3 min. for titration of AA in VM ext., even though pH was adjusted to 2 (Table 4). The substance which put off the end point of the titration was proved to be present in VM (Table 5). When pH of VM ext. was adjusted to 2, the blank test value should be estmd. after GSH and AA in soln. were destroyed by HCOH and AA-oxidase resp. As this treatment was tedious and complicated, the author adopted 3 min.-titration in *N*/20 S. S. A. or 2% HPO_3 . Because these reagents showed about pH 2 and they have advantage that the blank test value to *N*/20 S. S. A. or 2% HPO_3 may be recognized as that of VM ext. itself. The author has a view that 2% HPO_3 is more suitable than *N*/20 S. S. A., considering the problems attendant on the iodometric titration, such as the presence of Fe^{+++} , dissocn. of KI and reaction between iodine and the other substances in extract.

黒黴のペクチン酸分解酵素について (第 3 報)

Depolymeric Polygalacturonase の性質

斎藤日向 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 29 年 7 月 3 日 受理

Pectic Glycosidases of *Aspergillus niger*. Part 3. On the Properties of Depolymeric Polygalacturonase

By Hiûga SAITÔ (Dept. Agr. Chem., Fac. Agr., Univ. of Tokyo)

ペクチン質分解酵素の中で、グリコシド結合の加水分解酵素は pectinase 或は polygalacturonase の名称で比較的良好に研究されているが、その単離純化が不充分であるために、酵素化学的な諸性質については結果が不揃であり、附随的なデータとして報告されている場合が多い。著者は前報⁽¹⁾に報じた如く、黒黴の生成酵素の中の depolymeric polygalacturonase (以下 DPG と仮称) を、その生成条件の統制と吸着精製法の検討とにより、かなりの純度に精製し得たと思われるので、以下その諸性質を報告する。

実験方法 前報⁽²⁾参照

実験結果及び考察

作用最適 pH : 2% 基質水溶液に MCILVAINE 緩衝液の等量を加えて所要の pH 値に齎した。測定結果は Fig. 1 の如くで、pectin に対する粘度低下力測定による場合は pH 3.5 に最適 pH が認められ、従来 fungal origin の polygalacturonase の最適 pH と承認されている値^(3,4) に一致する。Pectic acid を基質として粘度低下力を測定した場合はこれより遙かに高く pH 4.6 附近に最適 pH があり、むしろ tomato origin の "depolymerase" の最適 pH (pH 4.5) に近い。Pectic acid に対する還元基増加力を測定するとこれ等の値の中間に山が認められ、而も 2 時間作用の場合の山は 24 時間作用の山よりも僅かに中性側に

Fig. 1. Optimal pH of DPG action on pectin or pectic acid

Reaction mixture of each pH value was prepared by adding the equal volume of appropriate buffer to the 2% substrate solution. Viscosity-reducing activity for pectin and pectic acid, and reducing group-liberating activity for pectic acid were determined by the method described in previous report in use of purified DPG solution of uniform activity (21 DPG u/cc).