(1934).
(9) E. J. COHN, L. MCMEEKIN, J. L. ONCLEY, J. M. NEWELL and W. Z. HUGHS : *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 3386 (1940).
(10) N. J. BERRIDGE : *Nature*, 149, 194 (1942).

Summary

The inhibitory action of blood serum on coagulation of milk by rennin is specific to the sorts of animals. Sera of pig and horse are comparatively strong. The data were obtained mainly by using diluted horse serum. This inhibtor is considered to be a protein or protein-like substance from its inactivation by heat (65～70°) and some reagents (alcohol, formalin, acetone and mercuric chloride). Although it is not clear that in which fraction of serum the inhibitor is present, the fraction precitated by 0.4～0.5 saturation with ammonium sulfate shows the strongest inhibitory action. This inhibtor is adsorbed by activated clay.

It inhibits most strongly the milk coagulation by rennin. This inhibitory action seems to be due to its immediate action on rennin, as a clear quantitative relationship is observed between serum and rennet when both are mixed and kept before adding to milk in order to allow the reaction to be completed by itself.

糸状菌に於て蔗糖から非還元性寡糖を生成する酵素（第6報）
Fructose 残基の OH 化合物への転移

倉沢文夫，斎藤昭三，本間伸夫，山本幸正（新潟大学農学部生物化学教室）

昭和28年8月31日受理

Non-Reducing Oligosaccharide (produced from Sucrose)-Synthesizing Enzyme in *Aspergillus oryzae* Part 6. The Transfer of Fructose-Residue to OH-Compounds

By Humiwo KURASAWA, Shōzō SAITO, Nobuo HONMA and Yukimasa YAMAMOTO.
(Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University)

緒　　論

前報[1]に於て蔗糖を炭素源とする *Asp. oryzae* 菌体からは寡糖を生成する酵素を，米麹からは所謂従来の invertase を得た．而して前者を β-h-fructosidase (s)，後者を β-h-fructosidase (h) とした．

一方酵母 invertase などによる蔗糖の加水分解の際に少量のアルコールを添加しておくとフラクトース残基がアルコールに転移するという．即ち石沢及び三輪等[2]は酵母 invertase による加水分解の際にフラクトースの他に β-h-fructoside を得ている．BACON[3] も酵母 invertase について全然同一の結果を得ている．依つて前述の β-h-fructosidase (s) 及び β-h-fructosidase (h) を蔗糖に作用させた際にアルコール類を添加してフラクトース残基の転移について実験せるに興味ある結果が得られたので報告する．

本研究を遂行するにあたり終始御指導下さいました恩師農学博士三宅捷先生並びに御討論下さいました理学博士三輪知雄先生に謹んで感謝の意を表します．又実験に使用した糸状菌を御恵与下さいました食糧研究所中野政弘氏に御礼申し上げます．本研究は昭和28年4月日本農芸化学会に於て講演した．

実　験　の　部

1. **酵素の調製**　β-h-Fructosidase (s)（既報の酵素 TF(F)）及び β-h-fructosidase (h)（既報の酵素 KS(F)）を用う．

2. **試薬の調製**　メタノールは純正化学会社製を精製して用う．他の試薬は既報と同一のものを用う．

3. **実験の方法**　Sucrose phosphate buffer solution，酵素液，メタノール，H_2O を3角瓶中に入れ，少量のトルオールを加え，30° 恒温器中に入れ，1定時間作用させた後1定量を採りペーパークロマトグラフィによつて試験した（以下ペーパークロマトグラフィを PC と略記する）．

4. **実験の結果**

a) 添加アルコールの濃度の決定：蔗糖の invertase による加水分解に際し，アルコールへの果糖残基の転

移する際の添加アルコールの濃度を決定するため，種種の濃度のメタノールを用いた．結果は Table 1, Fig. 1の如くである．

Table 1. The Transfer of Fructose-Residue to Methanol.

Reaction mixture :

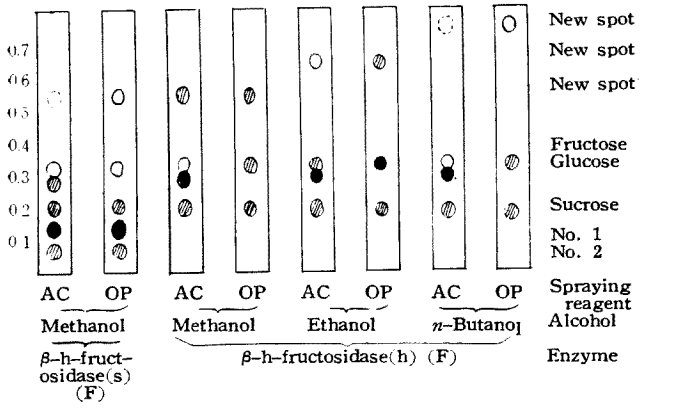
1 *M* Sucrose phosphate buffer solution (pH 5.0)	10 cc
Enzyme solution (pH 5.0)	10 cc
Methanol	0～2.5 cc
H_2O	2.5～0 cc

Temp. : 30°.　spraying reagent : Aniline-HCl salt.

Enzyme	Time (hr.)	Sugar	Methanol conc. %(V/V) 0	1.3	2.2	4.4	6.6	8.8	11.0
β-h-Fructosidase (S)	1	Oligos. No. 2							
		〃 No. 1	+	+	+	+	+	+	+
		Sucrose	++	++	++	++	++	++	++
		Glucose	+	+	+	+	+	+	+
		Fructose							
		New spot*							
	3	Oligos. No. 2							
		Oligos. No. 1	+	+	+	+	+	+	+
		Sucrose	++	++	++	++	++	++	++
		Glucose	+	+	+	+	+	+	+
		Fructose							
		New spot*							
	22	Oligos. No. 2	++	++	++	++	++	++	++
		Oligos. No. 1	++	++	++	++	++	++	++
		Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
		Glucose	++	++	++	++	++	++	++
		Fructose	+	+	+	+	+	+	+
		New spot*					±	+	+

Enzyme	Time (hr.)	Sugar	Methanol conc. %(V/V) 0	1.3	2.2	4.4	6.6	8.8	11.0
β-h-Fructosidase(h)	1	Sucrose	++	++	++	++	++	++	++
		Glucose	+	+	+	+	+	+	+
		Fructose	+	+	+	+	+	+	+
		New spot*							±
	3	Sucrose	++	++	++	++	++	++	++
		Glucose	+	+	+	+	+	+	+
		Fructose	+	+	+	+	+	+	+
		New spot*							±
	22	Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
		Glucose	++	++	++	++	++	++	++
		Fructose	++	++	++	++	++	++	++
		New spot*		±	+	+	+	++	++

* R_F of new spot is 0.52 and was thought be methyl-β-fructoside (of. Table 2).



Intensity of coloration ● intense, middle, ○ weak, (·) very weak

Fig. 1. Paper chromatogram of the product by adding various alcohols.

Reaction mixture

1 Mol sucrose phosphate buffer solution	10 cc
Enzyme solution (pH 5.0)	10 cc
Alcohol (10% V/V)	2.2 cc

Incubated at 30° for 22 hours, pH 5.0.
Spraying reagent AC = Aniline-HCl salt
OP = Orcine-H_3PO_4salt

以上の結果から大体 10%(V/V) 程度が良い結果を与えるものと思われる．

b) 各種アルコール添加時の生成物： メタノール，エタノール，*n*-ブタノール及びイソアミルアルコールを用いて，フラクトース残基の転移を PC でしらべた．結果は Table 2, Fig. 1の如くである．

ここに生じた新しい spot を呈する物質は orcine-H_3PO_4 にて呈色され，酵母 invertase(β-h-fructosidase)で加水分解されるから，それぞれ各添加アルコールの β-h-fructoside と考えられる．相対 R_F 値は文献[2,3]に示されたものと相似している．

c) アルコール以外の OH 化合物に就て： アルコール以外の OH 化合物にフラクトース残基が転移するか否かを PC で検索した．

Reaction mixture : 1 Mol sucrose phosphate buffer solution (pH 5.0) 10 cc, enzyme solution (pH 5.0) 10 cc, OH-compounds 1.0 g. or 0.5 g.

OH-化合物としては *d*-キシロース，*d*-ラムノース，*d*-ガラクトース，*l*-アラビノース，*d*-マルトース，*d*-マンノース，フェノール，リンゴ酸を用う．3時間及び 22 時間の反応液について生成物を検索した．予期される spot 以外には認められなかつた．

Table 2. The Transfer of Fructose-Residue to Various Alcohols.

Reaction mixture
1 Mol sucrose phosphate buffer solution 10 cc
Enzyme solution (pH 5.0) 10 cc
Alcohol (10% V/V)) 2.2 cc
Temp. : 30°, spraying reagent : Aniline-HCl salt.

Alcohol	Sugar	Enzyme (F) β-h-fructosidase (s) 3 hr.	β-h-fructosidase (s) 22 hr.	β-h-fructosidase (h) 3 hr.	β-h-fructosidase (h) 24 hr.
Methanol	Oligos. No. 2		++		
	〃 No. 1	+	++		
	Sucrose	++	+	++	+
	Glucose	+	++	++	++
	Fructose		+	+	++
	New spot*		+	±	++
Ethanol	Oligos. No. 2		++		
	〃 No. 1	+	++		
	Sucrose	++	+	++	+
	Glucose	+	++	++	++
	Fructose		+	+	++
	New spot**			±	+
n-Butanol	Oligos. No. 2		+		
	〃 No. 1	+	++		
	Sucrose	++	+	++	+
	Glucose	+	++	++	++
	Fructose		+	+	++
	New spot***				+
Isoamyl alcohol	Oligos. No. 2		+		
	〃 No. 1	+	++		
	Sucrose	++	+	++	+
	Glucose	+	++	++	++
	Fructose		+	+	+
	New spot				
Control (H_2O)	Oligos. No. 2		+		
	〃 No. 1	+	++		
	Sucrose	++	+	++	+
	Glucose	+	++	++	++
	Fructose		+	+	++
	New spot				

New spot* may be methyl-β-h-fructoside, new spot** is ethyl-h-fructoside and new spot*** n-butyl-β-h-fructoside.

d) メタノール添加時のフラクトース残基の転移率： b) にて定性的に実験し，アルコールへフラクトース残基の転移を認めたが，その量的の関係をメタノールに就て実験をした．尙 β-h-fructosidase (s) はそれ自身フラクトース転移が行われ，その転移率は時間と共に変化するので正確な転移率は求め得られない．結果 Table 3 の如し．

Table 3. The Transfer of Fructose-Residue by the Addition of Methanol

Reaction mixture : $M/5$
Sucrose phosphate buffer solution 10 cc
Enzyme solution 10 cc
Methanol (or H_2O) 3 cc
pH 5.0, Temp. 30°.

A. By the action of β-h-fructosidase(s) (F)

Time (hr.)	Total reducing sugar: Glucose (mg)	Total reducing sugar: Glucose (mg) Difference from 0 min. (A)	Aldose: Glucose (mg)	Aldose: Glucose (mg) Difference from 0 min. (B)	(2B−A)/B×100*	B/A×100**
(i) In adding methanol						
0	2.4	—	1.3	—	—	—
1	9.5	7.1	7.8	6.5	90.7	91.5
3	15.6	13.2	12.4	11.1	81.0	84.0
5	20.7	18.3	14.9	13.6	65.4	74.3
21	29.3	26.9	15.9	14.6	15.7	54.2
28	31.6	29.2	16.2	14.9	4.0	51.0
63	31.5	29.1	16.1	14.8	3.3	50.8
(ii) Control (H_2O)						
0	2.4	—	1.3	—	—	—
1	9.6	7.2	8.0	6.7	92.5	93.0
3	21.1	18.5	19.1	12.8	55.4	69.1
5	25.4	23.0	15.2	13.9	20.1	60.4
21	31.9	29.2	16.2	14.9	4.0	51.4
28	31.9	29.5	15.9	14.3	− 6.2	48.4
63	31.4	29.1	16.2	14.9	4.6	51.2

B. By the action of β-h-fructosidase(h) (F)

Time (hr.)	Total reducing sugar: Glucose (mg)	Total reducing sugar: Glucose (mg) Difference from 0 min. (A)	Aldose: Glucose (mg)	Aldose: Glucose (mg) Difference from 0 min. (B)	(2B−A)/B×100*	B/A×100**
(i) In adding methanol.						
0	4.5	—	4.4	—	—	—
4	11.0	6.5	8.2	3.8	28.9	58.4
22.5	29.0	24.5	18.0	13.6	19.9	55.5
28.5	33.5	29.0	20.7	16.3	22.1	56.2
44.0	39.1	31.9	21.6	17.2	15.7	53.9
(ii) Control (H_2O)						
0	4.8	—	4.5	—	—	—
4	17.3	12.5	10.6	6.1	− 4.9	48.8
22.5	35.6	30.8	20.7	16.2	+ 0.9	52.3
28.5	38.8	34.0	21.8	17.3	3.5	50.9
44.0	40.0	35.2	22.2	17.7	1.1	49.9

Total reducing sugar (by BERTRAND)
Aldose (by WILLSTÄTTER-SCHUDEL)

* (2B−A)/B×100……Degree of transfer of fructose residue
** B/A×100……Degree of aldose in total reducing sugar B=Aldose (calculated as glucose) A=Total reducing sugar (calculated as glucose)

両酵素のメタノールへの転移率を比較するに β-h-fructosidase (s) ではそれ自身転移してはつきりしたメタノールへの転移率はわからないが，それ自身の転移がないと思われる 21 時間，28 時間，63 時間作用させた時にメタノールを加えた場合と無添加を比較すると 4.0→15.7，−6.2→4.0，4.6→3.3 にして転移の割合が少ない．一方 β-h-fructosidase (h) の場合には4時間，22.5 時間，44 時間を比較すると 0.9→19.9，3.5→22.1，1.1→15.7 にしてある程度転移していることがわかる．

考　　察

私達は既報[1]に於て fructosidase に β-h-fructosidase (s) と β-h-fructosidase (h) があることを認めた．両者共糖の β-h-fructoside の位置を切ることは共通であるが，前者ではフラクトース残基を他の糖例えば蔗糖等に転移する力が強く，水に転移する力が弱い．これに対して後者は水へ転移する力が強く，糖へ転移する力が全然ないか或いはあつても極めて弱いものと考えられる．今両酵素をそれぞれ蔗糖に作用させた際に HOH

(水)，蔗糖以外の OH 化合物即ちメタノール，エタノール，*n*-ブタノール，イソアミルアルコール，*d*-キシロース，*d*-ラムノース，*d*-ガラクトース，*d*-マンノース，*d*-マルトース，*l*-アラビノース，フェノール，及びリンゴ酸に作用させた所が β-h-fructosidase (s) ではメタノールの場合にフラクトース残基が僅かに転移し，β-h-fructosidase (h) ではメタノール，エタノール，ブタノールにフラクトース残基が転移した．而してその転移作用は β-h-fructosidase (h) の場合には β-h-fructosidase (s) の場合よりも作用が強かつた．而して私達は両酵素の作用機構を，

酵素 β-h-fructosidase (h)

1) Glucosido-fructoside + Enzyme → Glucose + Fructosido-enzyme

2) Fructosido-enzyme + H_2O → Fructose + Enzyme

酵素 β-h-fructosidase (s)

1) Glucosido-fructoside + Enzyme → Glucose + Fructosido-enzyme

2a) Fructosido-enzyme + Sugar → Fructosido-sugar + Enzyme

3) Fructosido-sugar + Enzyme → Fructosido-enzyme + Sugar

4) Fructosido-enzyme + H_2O → Fructose + Enzyme

と考えた．依つてメタノールなどの低分子1価アルコールへの転移は水への転移と共通反応であるので β-h-fructosidase (h) は作用強く，β-h-fructosidase (s) の場合は作用が弱いのは 2a) の反応が主として進行するためである．然しながら β-h-fructosidase (s) で僅かながら作用が認められるのは4）の作用があるためと思われる．2）の反応に於てもアルコールの分子量が大になると起りにくいものと考えられる．又他の OH 化合物として種種の単糖，複糖類，又は芳香族アルコール，オキシ酸等を用いたが両者ともフラクトース残基の転移は認められなかつた．

上述のようにメタノールにフラクトース残基を転移する方法についても β-h-fructosidase (s) と β-h-fructosidase (h) は異つている．依つて私達が第5報にて提出した β-h-fructosidase (s) と β-h-fructosidase (h) との考え方の確認を深めた．

結　　論

β-h-Frucosidase (s), β-h-fructosidase (h) による蔗糖の分解の際にメタノールを添加した際のフラクトース残基のメタノールへの転移について実験をした．而して β-h-fructosidase (h) ではフラクトース残基はある程度メタノールに転移し，更にエタノール，*n*-ブタノールにも転移することを認めた．一方 β-h-fructosidase(s) ではそれ自身糖に転移するので，はつきりしないがメタノールへの転移は少ないことを認めた．更にアルコール以外の OH 化合物として単糖類，複糖類，芳香族アルコール，オキシ酸についても同様のことを試みたが両酵素共転移させる力を有さなかつた．

以上よりして β-h-fructosidase には β-h-fructosidase (s) と β-h-fructosidase (h) が存在することを認めた．

(1) 倉沢文夫，斎藤昭三，本間伸夫，山本幸正：農化，29，211，336 (1955).
(2) 三輪知雄，石沢敬子：酵素化学シンポジウム (1952).
(3) J. S. BACON : *Biochem. J.*, 50, 3 (1951).

Sésumé

In previous reports we recognized that enzymes which decomposed sucrose into glucose and fructose had two types, one of which synthesized oligosaccharides from sucrose and then hydrolysed them to glucose and fructose ; the other hydrolysed sucrose to glucose and fructose directly. We named the former β-h-fructosidase (s), the latter β-h-fructosidase (h). We examined the transfer of fructose-residue to hydroxy compound by the action of β-h-fructosidase (s) and of β-h-fructosidase (h). β-h-Fructosidase (h) could transfer fructose-reside to methanol, ethanol, and *n*-butanol considerably; β-h-fructosidase (s) could transfer fructose-residue to methanol alone a little.