細菌サッカラーゼに関する研究 (第7報)*

多糖類区分と蛋白区分の結合様式

根 来 秀 夫 (大阪市立工業研究所)

昭和 31 年 9 月 27 日 受 理

サッカラーゼの化学的本態に関しては、古くから多数の研究があり、高度に精製された酵素標品の化学的性状ならびに作用機作の面から蛋白体と多糖類の複合体であろうという推論が多数の研究者⁽¹⁻⁸⁾によって支持されている。又 Oparin⁽⁴⁾ は酵母サッカラーゼが多糖類 (マンナン) と複合体を形成することによって活性が最もよく保持されるのであろうと述べ、サッカラーゼが細胞内において他の蛋白体或いは多糖類区分の間で活性な複合体或いは不活性な複合体を生成する可能性があることを示している。又 Thorsell, Myrbäck⁽⁵⁾ はパン酵母のサッカラーゼは細胞内で複合体として存在し、そこで自己の活性を保持していると主張している。著者はさきに⁽⁶⁻⁸⁾ *Bac. subtilis* var. *saccharolyticus* n. sp. の適応細胞又は酵母細胞内に含まれる特定の多糖類区分はそれぞれ生成サッカラーゼのタイプを支配することを報告したが、これらの事実は古くから種々論議されているサッカラーゼの化学的本態並びにその活性構造を知る上に極めて興味深い示唆を与えるものと考えられる。かかる見地から著者はこれらの区分が如何なる機構でサッカラーゼの形成に関与し、又酵素活性を支配するかを解明するために種々の見地から検討中であるが、ここには先ず予備的にこれらの多糖類区分と蛋白区分の結合様式を追究した結果、サッカラーゼ産生とよく符合する関係が認められたのでそれらについて一括して報告する。

実 験 の 部

実験方法

(1) 本菌の適応細胞多糖類

肉汁ペプトンに 3% になる如く蔗糖を加えた培養基に 37° で 60 時間培養した細胞を集め、充分水洗した後約 50 倍量の 2% NaOH で 37° に 24 時間抽出した菌体を濾別し、除蛋白後透析し 80% アルコールで沈澱する区分を集めた。詳細なる調製法ならびにこの多糖類区分の化学的性状については本研究第 4 報⁽⁶⁾に報告した。

(2) 酵母細胞多糖類

ビール酵母の細胞を水洗後 2% NaOH で抽出し、除蛋白後フェーリング溶液で沈澱した。その操作法ならびに化学的性状は本研究第 4 報⁽⁶⁾に報告した如くである。

(3) サッカラーゼの活性度測定法ならびにサッカラーゼの生成条件は既報^(8,9)の如くである。

実験結果

I. 結合に関するアミノ酸及び細胞多糖類構成糖の検索 先ずサッカラーゼ蛋白中如何なるアミノ酸残基が本菌の適応細胞多糖類との結合に関与するかを検討した。

即ち 0.1% 多糖類溶液及び 0.1% アミノ酸溶液 1cc を加え pH 7 で常温に 1 時間 incubate した後多糖類区分無添加の場合と比較して遊離アミノ酸を Willstätter, Waldschmidt-Leitz⁽¹⁰⁾ の方法に従いフェノールフタ

第 1 表 本菌の適応細胞多糖類とアミノ酸の結合

アミノ酸	N/20 アルコール性 KOH 消費量 cc		アミノ糖	N/20 アルコール性 KOH 消費量 cc	
	多糖類無	多糖類有		多糖類無	多糖類有
グリシン	0.26	0.26	リジン	0.14	0.13
アラニン	0.21	0.22	アルギニン	0.12	0.05
ヴァリン	0.15	0.15	ヒドロオキシプロリン	0.15	0.15
ロイシン	0.16	0.15	ヒスチジン	0.13	0.13
イソロイシン	0.15	0.16	トリプトファン	0.10*	0.10
セリン	0.18	0.18	アスパラギン酸	0.28	0.26
スレオニン	0.15	0.16	グルタミン酸	0.25	0.24
チスチン	0.14	0.14	アスパラギン	0.13	0.14
フェニールアラニン	0.10	0.12	メチオニン	0.14	0.14
チロジン	0.12	0.11			

* Studies on Bacterial Saccharase. Part VII. The Mechanisms of the Protein-Polysaccharide Complex Formation.

By Hideo NEGORO (Osaka Municipal Technical Research Institute)

第 2 表 適応細胞多糖類の構成糖とアルギニンの結合 (I)

糖 類	N/20 アルコール性 KOH 消費量 cc
無 (対照)	0.25 (100%)
葡 萄 糖	0.24 (96%)
キシロース	0.16 (64%)
マンノース	0.24 (96%)

第 3 表 適応細胞多糖類の構成糖⁽⁶⁾とアルギニンの結合 (II)

糖 類	KMnO ₄ (1 cc=1 mg Cu) 消費量 cc	
	アルギニン無	アルギニン有
葡 萄 糖	5.50 (100%)	5.20 (95%)
キシロース	4.60 ("	3.85 (84%)
マンノース	4.00 ("	3.60 (90%)

第 4 表 キシロース-アルギニンの結合性と細胞多糖類-アルギニン結合性の比較

キシロース	多 糖 類 アルギニン	KMnO ₄ (1 cc=1 mg Cu) 消費量 cc			
		0		2 mg	
		0	2mg	0	2mg
1 mg		1.15	0.15	1.15	0.15
2 mg		2.15	1.25	2.15	1.25

ズであろうと推定される。

次にキシロースと細胞多糖類のいずれが蛋白区分と結合しやすいかを検討した。

即ちアルギニンとキシロースを incubate した場合及びこれに更に多糖類を加えて incubate した場合について遊離キシロースの量を求めると第 4 表の如くなる。

これらの結果からキシロースと蛋白区分の結合性は適応細胞多糖類と蛋白区分の結合性よりも大きいことが想像される。

II. 蛋白体-多糖類の結合様式とサッカラーゼ産生の関連 前述の蛋白区分と多糖類区分の結合様式についての推論が果して妥当であるかどうかを確かめる一つの手段としてこれらの推論とサッカラーゼ産生との関連性を追究した。

先ずアルギニンのサッカラーゼ形成に対する影響を検討した。即ち細胞多糖類を次の条件でアルギニン或いはチロジン (対照) と共に常温に 20 時間 incubate したもののについて lag phase 短縮の有無をみた。

第 1 図 アルギニンのサッカラーゼ形成阻害

1. アルギニン処理多糖類添加
2. 未処理多糖類添加
3. チロジン処理多糖類添加
4. 多糖類無添加

配合 : 細胞 25 mg
 蔗糖 1%
 磷酸緩衝液 1/4 モル
 多糖類区分 10 mg
 (NH₄)₂SO₄ 1/20 モル
 水 } 全量 60cc

レインを指示薬として N/20 アルコール性 KOH で滴定した。

なお対照として水、アルコール多糖類溶液のアルカリ消費量を求めその値を差引いた。その一例を示せば第 1 表の如くである。

この結果アルギニンが特異的に本菌の細胞多糖類区分と結合していることが推察される。

次にアルギニンを対象として蛋白区分との結合に与する細胞多糖類の構成糖⁽⁶⁾を検索した。

即ちグルコース、キシロース及びマンノースの各 0.2% 溶液 1 cc 及びアルギニン 0.2% 溶液 1-cc を混じ pH 7.0 で 1 時間常温に incubate した後遊離のアルギニンを前と同様に求めて第 2 表の如くである。

又上と同様の条件で incubate したもののについて遊離の残糖をマイクロペルトラン法により求めると第 3 表の如くである。

これらの結果からこの結合に与する糖はキシロース

Incubation の条件 :

No.	本菌の細胞多糖類 (100 mg/80 cc)	アルギニン (1 mg/cc)	チロジン (1 mg/cc)	H ₂ O
1	20 cc	5 cc	0 cc	0 cc
2	20	0	0	5
3	20	0	5	0

上記の条件で incubate した多糖類区分を透析後それぞれ多糖類として 10 mg を供試細胞に加え下記の配合で 35° に振盪し、サッカラーゼ分泌量を経時的に追跡すれば第 1 図の如くなる。

この結果、適応細胞多糖類の有するサッカラーゼ産生の lag phase の短縮ならびに増大の効果はアルギニンと共に incubate することによって消失することが認められた。

次にアルギニン及びキシロースをそれぞれ単独に添加した場合、両者を共存せしめた場合及び無添加の場合についてサッカラーゼ分泌量を求めると第 2 図の如くなる。

この結果アルギニンのサッカラーゼ形成阻害はキシロースにより、又キシロースの阻害はアルギニンによってほぼ完全に相殺さ

第 2 図 アルギニン及びキシロースの阻害作用と
その中和

1. 無添加 (対照) 3. キシロース添加
2. アルギニン添加 4. キシロース, アルギニン添加

配合 : 細胞 21.5 mg }
 糖 1% }
 1% 糖 1% } 全量 60 cc
 1/4 モル }
 アルギニン 10 mg }
 キシロース 50 mg }
 (NH₄)₂SO₄ 1/20 モル }
 水 }
 水 }

上記配合で 35° に振盪しサッカラーゼ分泌量を経
時的に追跡した。

第 5 表 酵母多糖類とアミノ酸の結合

アミノ酸	N/20 アルコール性 KOH 消費量 cc	
	多糖類無	多糖類有
グリシン	0.26	0.27
アラニン	0.20	0.22
ヴァリン	0.15	0.15
ロイシン	0.15	0.15
イソロイシン	0.14	0.16
セリン	0.18	0.20
スレオニン	0.14	0.16
チスチン	0.12	0.12
フェニールアラニン	0.10	0.12
チロジン	0.12	0.04
リジン	0.14	0.13
アルギニン	0.12	0.14
ヒドロキシプロリン	0.15	0.15
ヒスチジン	0.13	0.12
トリプトファン	0.10	0.10
アスパラギン酸	0.28	0.26
グルタミン酸	0.26	0.24
アスパラギン	0.13	0.14
メチオニン	0.14	0.14

第 6 表 蒟蒻マンナン-チロジンの結合性と酵母多
糖類-チロジンの結合性の比較

アミノ酸	N/20 アルコール性 KOH 消費量 cc				
	酵 母		蒟蒻マンナン		0
	2 mg	4 mg	2 mg	4 mg	
アルギニン	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
チロジン	0.05	0.02	0.00	0.00	0.14

れる事が認められた。この事実は蛋白区分と多糖類区分相互の結合についての推論とよく符合し、キシロース及びアルギニンの阻害機構を示唆するものと考えられる。

III. 酵母多糖類と蛋白区分の結合様式 A₂ 型サッカラーゼの場合と比較対照しながら酵母多糖類と蛋白区分の結合様式と酵母型サッカラーゼ産生との関係を次の如く追究した。

先ず酵母多糖類区分結合に関与するサッカラーゼ蛋白中のアミノ酸残基としてチロジンを推定した。その実験的根拠の一例を示せば第 5 表の如くである。

なお実験条件は第 1 表の場合と同様である。

次にこの酵母型サッカラーゼの産生を特異的に阻害する蒟蒻マンナンとチロジンの結合性を酵母多糖類とチロジンの結合性と比較対照した結果は第 6 表の如くである。

この結果蒟蒻マンナンとチロジンの結合性は、酵母多糖類とチロジンの結合性よりも大きいことが推定されるので、蒟蒻マンナンの阻害は酵母多糖類がサッカラーゼ産生に関与する過程に対する拮抗的な阻害であろうと考えられる。

以上の多く多糖類区分と蛋白区分の結合についての推論は産生機構に関する多数の実験結果とよく符合するのみならず、又別に研究中であるサッカラーゼの化学的本態についての実験結果からもこの推論の妥当性が考えられる⁽¹¹⁾。それらの点に関しては後に報告する予定である。

総 括

本菌の適応細胞多糖類或いは酵母多糖類との結合に関与するサッカラーゼ蛋白区分のアミノ酸残基を検索し、前者にはアルギニンが、後者にはチロジンがそれぞれ関与していること、又蛋白区分との結合に関与する細胞多糖類の糖はキシロースであると推定された。

又キシロースと蛋白区分との結合性は適応細胞多糖類と蛋白区分のそれよりも大なること、又蛋白区分と蒟蒻マンナンの結合は蛋白区分と酵母多糖類の結合よりも大なることが推定された。

これらの推論はサッカラーゼ産生機構に関する多数の実験結果とよく符合することが認められた。

終りに臨み本研究を指示され終始御懇篤なる御指導を賜った当研究所化学第四課長福本寿一郎博士に厚く感謝致します。又本研究の一部に協力された平野幸夫君に謝意を表します。

又本研究の一部は昭和 30 年 3 月 30 日, 農化大会にて講演した。

(1) 武富 昇 : 工化, 43, 955 (1940); 44, 553 (1941).	(6) 根来秀夫 : 科学と工業, 29, 286 (1955).
(2) K. Myrbäck : Z. physiol. Chem., 158, 160 (1926).	(7) 根来秀夫 : 同上, 30, 142 (1956).
(3) J. B. Sumner, D. J. O'Kane : Enzymologia, 12, 251 (1948).	(8) 根来秀夫 : 本誌, 31, 153(1957).
(4) A. I. Oparin, M. S. Bardinskaya : Izvest. Akad. Nauk S. S. S. R. ser Biol. No. 2, 3~7 (1955); 科学の領域, 10, 506 (1956).	(9) 根来秀夫, 福本寿一郎 : 科学と工業, 28, 292 (1954).
(5) W. Thorsell, K. Myrbäck : Ark. Kemi., 3, 323 (1951).	(10) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz : Ber., 54, 2988 (1921).
	(11) 根来秀夫, 福本寿一郎 : 第 9 回酵素化学シンポジウム講演集, 18 (1956).

柑橘果汁の褐変に関する研究 (第 1 報)*

夏橙濃縮果汁の褐変について

今井 寛, 酒井宏美, 藤谷 健, 大西隆三 (広島県食品工業試験場)

昭和 31 年 9 月 27 日 受理

緒 言

近年我国の果汁工業は急速なる進展をみせ, 年々その生産額が増大している。しかし果汁は生産期と需要期に季節的なずれがあるため貯蔵期間が長く, その間に褐変, 変質による品位低下が起る。特に褐変は果汁の品位を損うこと大であって, この防止は果汁製造における重要課題である。

一般に食品の褐変に関する研究は従来数多くあり, 本邦に於ても大亦ら⁽¹⁾の醬油, ミリンに関する研究, 足立⁽²⁾の乳製品に関する研究などがあるが, 柑橘果汁に関するものは野村⁽³⁾の一連の研究が殆んど唯一のものである。しかし米国では Joslyn⁽⁴⁾, Loeffler⁽⁵⁾ らの柑橘果汁の褐変, 変質に関する研究が多くある。温州みかん及び夏橙は我国の特産物であり, 夏橙果汁はその特有の香味を愛賞されるが, 温州みかん果汁に比して特に褐変が著るしい。著者らは夏橙濃縮果汁の褐変について現象的な面から基礎的検討を行い, その概略を知ることができたのでここに報告する。

実験及び結果

1. 試 料

試料として用いた夏橙 1/5 濃縮果汁は夏橙 (広島県産) を搾汁後脱気, 瞬間殺菌を行い, 真空濃縮したもので, その分析結果を第 1 表に示す。果汁灰分中の金属の定性分析を行った結果, Fe, Cu, Al, Ca, Mg, K, Na 及び

第 1 表 試 料

成 分	含有量 (%)
全 糖*	29.9 (グルコースとして)
直接還元糖*	17.6 (グルコースとして)
酸	12.1 (クエン酸として)
ベ ク チ ン**	0.15
全 窒 素***	0.34
フォルモール窒素	0.095
総ビタミン C****	0.175
還元型ビタミン C****	0.145
灰 分	1.72
屈折計糖度	48.2°
pH	2.4

* ベルトラン法により定置 ** コロイド滴定法⁽⁶⁾により定置

*** ケルダール法により定置 **** 今井, 藤谷法⁽⁷⁾により定置

Si が確認され, Zn, Sn, Cr 及び Pb の存在が推定されたが確認に至らなかった。分析法は化学分析と発光分光分析を併用した。

2. 褐変の発現

果汁の色調表示には Loeffler⁽⁵⁾の光電比色計を用い blue filter の透過度で表示する方法, 野村⁽³⁾の同じく blue green filter の透過度で表示する方法, Hamburger ら⁽⁸⁾の分光光電光度計を用い, 480 m μ 及び 600 m μ の吸光度で表示する方法などがあるが, 著者らは Joslyn⁽⁴⁾の方法を応用して, Lovibond tintometer を使用し, 各試料は測定都度濃縮度が原果汁

* Studies on the Browning of Citrus Juice. Part I. On the Concentrated Natsudaikai Juice.
By Hiroshi IMAI, Hiroyoshi SAKAI, Tsuyoshi FUJITANI and Ryūzō ŌNISHI (Food Industrial Experiment Station, Hiroshima Prefecture).