- (5) 駒形和男 : 本誌, **35**, 981 (1961).
 (6) 飯塚 廣, 駒形和男 : 本誌, **36**, 663 (1962).
 (7) D.H. Bergey et al. : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 5 Ed., 1938 (Williams & Wilkins).
 (8) R.S. Breed : *ibid.*, 6 Ed., 1947 (Williams & Wilkins).
 (9) R. S. Breed et al. : *ibid.*, 7 Ed., 1958 (Williams & Wilkins).
 (10) P. Hauduroy : Dictionnaire des bactéries pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes, 1953 (Masson).
 (11) J.W. Wright : *Memo. Natl. Acad. Sci.*, **7**, 422 (1895).
 (12) M. Levine, L. Soppeland : *Bull.*, No. 77, 41, Iowa State Agri. College, 1926 (文献 (9) より引用).
 (13) 角田 廣 : 東穀検会報, **19**, 14 (1954).

[農化 第 37 卷, 第 2 号, p. 80~84, 1963]

マロン酸エチル法による糖の比色定量*

原田篤也, 金納義二**, 鎌倉 攻*** (大阪大学産業科学研究所)

戸田 恭子, 中井 礼子 (神戸女学院大学)

昭和 37 年 8 月 17 日 受 理

緒 言

還元糖の定量法には滴定あるいは比色による方法などがある。比色定量法をわけると、糖類の還元性に基づく反応を利用した方法と、糖類を強酸とともに加熱して生ずるフルフラールまたはその誘導体が、芳香族アミン、フェノール、または SH 化合物などと有色物質を生ずる反応を利用した方法とがある。この報告にのべている比色定量法はそういった呈色反応にもとづくものと異なり、糖自身と直接反応して色素をつくる反応にもとづいている。

著者の 1 人原田⁽¹⁾は 1950 年単糖類とくにアルドースが弱アルカリ性のもとでマロン酸エチルと反応して美しい紫赤色を生ずることをみいだした。最近この反応をふたたびとりあげ、この呈色物質は 558 mμ と 579 mμ とに強い吸収を示すこと、単糖類のアルドース、とくに 5 炭糖のアルドースが強い呈色を示すこと、またセロピオース、マルトースのような 2 糖類ではきわめて弱い呈色しか示さないことなどを明らかにしてきた⁽²⁾。ここでのべる研究はこの呈色反応を利用し、2 糖類の存在下において単糖類を定量しようという目的で行った。

なお種々なカルボニル化合物とマロン酸エチルとの反応からして、現在のところ少なくとも一つの分子中にカルボニル基とヒドロキシ基との存在が必要であり、まずこのカルボニル基とマロン酸エチルの活性メチレン基とが微アルカリ性で反応するものと予測されるが、いかなる機構で長波長のところに強い吸収を示す色素をつくるかは不明である。

実 験 方 法

材料 マロン酸エチル、*n*-プロパノールはともに市販の 1 級製品を再蒸溜したものを用いた。糖類は市販の特級あるいは 1 級品を 110° 減圧にて結晶水をのぞいたものを使用した。これらの糖類を展開剤としてピリジン、水、*n*-ブタノール (4:3:6)、発色剤としてアニリン、水素、フタル酸塩を用いて、ペーパークロマトグラフィーでしらべた結果、グルコース、キシロース、セロピオース製品中には不純の糖がみいだされなかった。マルトース製品中には不純の糖のスポットがみいだされ、これはグルコースであり 1 mg 中 2~5 μg ふくまれていることがわかった。したがってこの製品についてはペーパークロマトグラフィーによりマルトースの R_F 値を示す部分のみ溶出し、溶出液より再結晶しこれをマルトース標品として用いた。

装置 反応は 10 ml 容のマイクロキエルダール管中にて行い、蒸発を防ぐためガラス球を反応管の口にのせた。通常の試験管を用いたのでは反応中充分な攪拌が行われないためか、結果に再現性が乏しい。反応に用いた湯浴

* Colorimetric Estimation of Sugars with Ethyl Malonate.

By Tokuya HARADA, Yoshiji KIN-NOU and Ko KAMAKURA (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University), Kyoko TODA and Reiko NAKAI (Kobe Women College)

** 現在, キリンビール株式会社

*** 現在, 新光製糖株式会社

は2本のガスバーナーにて適当に温度を調節したもので $\pm 1^\circ$ 程度の誤差があった。

操作 1 ml の糖水溶液をキェルダール管にとり、ついで 2 ml の炭酸ソーダ水溶液を加え、最後にマロン酸エチルをふくんだ *n*-プロパノール溶液 2 ml を加え、よく攪拌した後、金網カゴに固定し、定温の湯浴につけ、一定時間反応させた。特に示さない場合反応温度 90° 、反応時間 12 分とした。この間金網カゴをときどき動かし反応液を攪拌した。対照として糖溶液のかわりに水を添加したものをを用いた。反応終了後流水にて冷した後、発現した色素を吸収の頂点 $558 \text{ m}\mu$ にて日立光電比色計 (型 GPO-2) を用い 1 cm 幅のガラスのセル中で測定した。

実験結果および考察

1. 定量の最適条件 糖とマロン酸エチルとの呈色反応に対し、炭酸ソーダ、マロン酸エチルの濃度、反応温度、反応時間がどのように影響するかを知るため、前報告⁽²⁾で強く呈色することを知らしたキシロースを選んで試験した。キシロース濃度は反応液 5 ml 中 $200 \mu\text{g}$ とした。

炭酸ソーダの濃度： マロン酸エチル 2% (v/v) (約 0.13 M) の場合における種々な炭酸ソーダ濃度の呈色度に対する影響を第1図に示した。その結果炭酸ソーダの終末濃度 0.13 M 附近において最も強い呈色を示すことを知った。

マロン酸エチルの濃度： 炭酸ソーダ 0.13 M における種々なマロン酸エチルの濃度の呈色度に対する影響を第2図に示した。その結果マロン酸エチルの終末濃度 2%~2.4% (v/v) (約 0.13 M~0.16 M) の範囲で最大の呈色を示した。

第1図 マロン酸エチル 2% 下における種々な炭酸ソーダ濃度による吸光度の変化 (キシロース, $200 \mu\text{g}/5 \text{ ml}$)

第2図 炭酸ソーダ 0.13 M 下における種々なマロン酸エチル濃度による吸光度の変化 (キシロース, $200 \mu\text{g}/5 \text{ ml}$)

上記の実験によって求められた炭酸ソーダとマロン酸エチルとのそれぞれの最適のモル濃度の比率はほぼ 1 に近い。この事実およびこの濃度のマロン酸エチルと炭酸ソーダのみを加えて加熱し、その後糖を加えさらに加熱をつづけても呈色を示さないこと (この場合マロン酸エチルは加水分解されてマロン酸とエタノールとなる。マロン酸塩はもはや呈色を示さない) からしてマロン酸エチル自身が糖と反応し、大部分のマロン酸エチルは加水分解され、生じたマロン酸は炭酸ソーダによって中和され、ある pH の範囲に保たれ、その範囲で呈色反応も安定化するものと考えられた。もし糖を炭酸ソーダ溶液中で加熱処理した後、マロン酸エチルを加えても呈色はおこらない。したがってアルカリ性が強すぎれば、十分に呈色の反応がおこらない前にマロン酸エチルが加水分解されてしまうほかに糖の分解反応のおこる可能性も強い。呈色の最適条件では反応前の pH が 11.3 であり、反応後の pH は 9.3 であった。この程度の pH の範囲をたもたせるために、マロン酸エチルとほぼ等モルの炭酸ソーダが必要と考えられる。なお炭酸ソーダのかわりに種々なアルカリ側の緩衝液を用いて反応をこころみたが、現在のところ炭酸ソーダより以上のものをみだしていない。

炭酸ソーダおよびマロン酸エチルの濃度： つぎに炭酸ソーダとマロン酸エチルとのモル濃度の比率を 1 にしておいて、それらの濃度の呈色度に対する影響を第3図に示した。その結果 0.13 M から 0.16 M の間で最大の呈色を示した。濃度が高いと呈色度の減ずるのは前にのべたような理由によるのであろう。

第3図 炭酸ソーダ・マロン酸エチル濃度 (1:1) による吸光度の変化
(キシロース, 200 μ g/5 ml)

第4図 キシロースとマロン酸エチルの呈色反応に対する温度および時間の影響
(キシロース, 200 μ g/5 ml)

第5図 種々なキシロース濃度による吸光度の変化

第6図 種々なグルコース濃度における吸光度の変化

反応温度と反応時間：炭酸ソーダ 0.13 M, マロン酸エチル 2% (v/v) 濃度において反応温度と時間との呈色に対する影響を第4図に示した。その結果反応温度 90° では10分において最大の呈色となり20分まで呈色の減少はなく、この温度が最適であることを知った。95°, 100° では反応液の蒸発がはげしいと共に、一度生成した紫赤色の色素がさらに分解する。反応液の色は流水で冷した後室温に放置しても2時間までは測定される程度の減少はない。なおこれらの最適の反応条件はグルコースにおいてもほぼ同様に得られた。

2. キシロース, グルコースの濃度と呈色 上記の実験によって決定された最適条件下, すなわち糖液 1 ml に 0.325 M 炭酸ソーダ溶液 2 ml を加え, さらにこれに 5% (v/v) のマロン酸エチルをふくんだ *n*-プロパノール溶液 2 ml を加え, 90° で12分間反応させ, 反応液中キシロース 20~200 μ g, グルコース 200 μ g~2 mg の濃度における呈色の変化をしらべた (第5図, 第6図)。その結果キシロースでは 40~200 μ g, グルコースでは 200 μ g~2 mg の間における糖濃度と 558 m μ における吸光度とは直線関係にあることがわかった。しかし色の発現時における $\pm 1^\circ$ の温度の差の影響によるためか系の異なる場合における吸光度の値は多少変化する。したがって実際に未知の糖液を定量する場合には, 既知の3種の糖濃度溶液を対照として同時に反応させるのがよい。キシロースではグルコースの呈色の約10倍の呈色の強さを示したが, すでに報告した如く⁽²⁾キシロースのほかアラビノース, リボースにおいても同様強い呈色を示すので5炭糖類の定量法としてかなりすぐれているものと考ええる。グルコースの場合呈色が弱いと同時に再現性もキシロースよりかなり低い。

3. 2 糖類存在下におけるグルコースの定量 セロビオースあるいはマルトースの存在下におけるグルコースの定量を第1表に示した。グルコース単独の場合の種々な濃度における吸光度の値は第6図において得た数値と比較して多少異なり, この程度の誤差は測定時の僅かな反応温度の変化などにより生じてくる。第1表にみら

第 1 表 セロビオースあるいはマルトース存在下における
グルコースの定量

グルコースのみ		グルコース+ セロビオース			グルコース+マルトース		
グルコ ース (mg)	吸光度	グルコ ース (mg)	セロビ オース (mg)	吸光度	グルコ ース (mg)	マルト ース (mg)	吸光度
0	0	0	2.0	0.025	0	2.0	0.020
0.2	0.074	0.2	1.8	0.085	0.2	1.8	0.078
0.4	0.145	0.4	1.6	0.147	0.4	1.6	0.150
0.6	0.215	0.6	1.4	0.214	0.6	1.4	0.195
0.8	0.290	0.8	1.2	0.300	0.8	1.2	0.291
1.0	0.360	1.0	1.0	0.401	1.0	1.0	0.357
1.2	0.435	1.2	0.8	0.481	1.2	0.8	0.427
1.4	0.507	1.4	0.6	0.533	1.4	0.6	0.520
1.6	0.580	1.6	0.4	0.586	1.6	0.4	0.592
1.8	0.655	1.8	0.2	0.655	1.8	0.2	0.665
2.0	0.740	2.0	0	0.740	2.0	0	0.740

れる如くセロビオースあるいはマルトースの存在により多少発色が増大している傾向がみとめられる。前に報告した如く⁽²⁾ 10^{-3} M 附近においてマルトースとセロビオースは同重量のグルコースに対してそれぞれ約 3.4%, 3.0% の 558 m μ における吸収を示すのでこの範囲でグルコースの定量を妨害するのであろう。しかしグルコースの定量自身キシロースの場合にくらべ、かなり再現性において劣っているので、このていどのマルトースの影響はほとんど無視され得る。2 糖類存在下における単糖類の定量法についてはグルコー

スオキシダーゼを用いる方法、酵母による醗酵法、乳酸菌を用いるバイオアッセイ法などが知られているが、化学的な定量法としては Tauber-Kleiner の方法⁽³⁾が知られているにすぎない。彼等の方法においては原報および私どもの実験よりして 0.1~0.5 mg の範囲で測定し得るが、2 mg のマルトースはこの定量を妨害する。現在多くの人々により Tauber-Kleiner の方法よりもっとかんたんな精確な 2 糖類の存在下における単糖類の化学的な定量法の出現がのぞまれている。しかし目下のところ Tauber-Kleiner 法も私たちの方法も一長一短があり、直ちにどちらがすぐれているとは断定できない。今後マロン酸エチル法の改良、あるいはマロン酸エチルにかわる新しい活性メチレン化合物の登場を期待する。なおイソマルトース、ゲンチオビオースなど 1,6 結合をもった 2 糖類はグルコースの同重量に対し、それぞれ約 15%, 26% の呈色を示す。したがってかかる 2 糖類の存在する場合におけるグルコースの定量は困難である。

4. Somogyi-Nelson 法^(4,5), Tauber-Kleiner 法⁽³⁾と比較してマロン酸エチル法によるキシロースの定量とその再現性 20~200 μ g (反応液中) のキシロースを用いマロン酸エチル法, Somogyi-Nelson 法, Tauber-Kleiner 法のそれぞれにより得られた値を第 2 表に示す。この表に示した種々な濃度のキシロースのマロン酸エチル法による吸光度の値は第 5 図において示した値と比較して僅か異っている。この程度の差は定量の際の反応温度の僅かな差などによる。さらにこの再現性を知るために糖濃度 110 μ g あるいは 200 μ g (反応液中) のものを用い、それぞれ 7 本ずつ定量し、その吸光度より次式を用いて標準偏差を求めた (第 3 表)。 $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}}$ 。第 2 表, 第 3 表からしてキシロースの定量としては Somogyi-Nelson 法, マロン酸エチル法, Tauber-Kleiner 法の順にすぐれていることがわかる。しかし Somogyi-Nelson 法はいずれの 2 糖類にも強く呈色を示す。した

第 2 表 マロン酸エチル法, Somogyi-Nelson 法,
Tauber-Kleiner 法によるキシロース定量の
比較

キシロ ース	マロン酸 エチル法 吸	Somogyi- Nelson 法 光	Tauber- Kleiner 法 度
20	0.009	0.039	0
40	0.050	0.077	0
60	0.105	0.105	0
80	0.192	0.146	0
100	0.280	0.180	0.006
120	0.370	0.230	0.077
140	0.450	0.269	0.194
160	0.530	0.288	0.311
180	0.596	0.336	0.374
200	0.690	0.376	0.476

第 3 表 マロン酸エチル法, Somogyi-Nelson 法,
Tauber-Kleiner 法による キシロース定量の
再現性

マロン酸 エチル法 キシロース 110 μ g	Somogyi- Nelson 法 キシロース 200 μ g	Tauber- Kleiner 法 キシロース 200 μ g
1	0.332	0.373
2	0.327	0.377
3	0.327	0.372
4	0.324	0.371
5	0.339	0.372
6	0.343	0.377
7	0.325	0.374
平均値	0.331	0.374
標準偏差	0.0068	0.0022

がってキシラン加水分解物中におけるキシロースの定量には Somogyi-Nelson 法は用いられないし, またそのような目的に適う方法は知られていない. マロン酸エチル法はかかる目的に使用され得る可能性が高く, 目下この点につき研究を続行中である.

要 約

マロン酸エチル法による糖の定量について研究し, 以下のことを明らかにした.

(1) 糖とマロン酸エチルとの呈色反応の最適条件を求め, 定量操作を次の如くきめた. 1 ml の糖溶液 (キシロースなどでは 40~200 $\mu\text{g/ml}$, グルコースでは 0.2~2 mg/ml) をマイクロエルダール管 (10 ml 容) にとり, これに 2 ml の 0.325 M の炭酸ソーダ溶液を加え, さらに 2 ml の 5% (v/v) のマロン酸エチルの *n*-プロパノール溶液を加える. これをよく攪拌後, 90° で 12 分間ときどきかくはんして反応させる. 発現した色を 558 $\text{m}\mu$ の波長にて光電比色計で測定する.

(2) この定量法はキシロースのような 5 炭糖に対しては鋭敏であり, 再現性もあり, かつかんたんに操作できるので特にすぐれている.

(3) この定量法はセロビオース, マルトースの存在下におけるグルコースのかんたんな定量法として使用し得ると考える.

終りにのぞみ, この研究に対し御助言, 御鞭撻をうけた二国教授, またこの研究に関連して貴重な薬品を提供していただいた東北大麻生教授, 阪大上原教授, 研究室の福井, 檜作両博士らに深く感謝する.

(1) 原田篤也: 林産科学, 5, 23 (1950).

99, 249 (1932).

(2) T. Harada: *Biochim. Biophys. Acta*, 63, 334 (1962).

(4) N. Nelson: *ibid.*, 153, 375 (1944).

(5) M. Somogyi: *ibid.*, 160, 61 (1945).

(3) H. Tauber, I. S. Kleiner: *J. Biol. Chem.*,

[農化 第 37 卷, 第 2 号, p. 84~89, 1963]

フラボノイド配糖体加水分解酵素に関する研究 (第 1 報)*

ナリンジナーゼ I とヘスペリジナーゼ I の結晶化並びにその作用機作

岡田茂孝, 岸 清, 東原昌孝, 福本寿一郎 (大阪市立工業研究所)

昭和 37 年 9 月 3 日 受 理

フラボノイド系色素配糖体は植物界に広く存在し, そのアグリコン部の構造は有機化学的立場からよく解明されているが, これが植物組織中での挙動, 特に配糖体加水分解酵素との関係や, 植物分類学的見地からの研究は殆んど行われておらず, また配糖体の糖結合様式も疑問の点が多々あり, かかる見地からも配糖体加水分解酵素の研究は興味あるものである.

しかし著者等があえてかかる配糖体加水分解酵素の研究を展開した真意は, わが国柑橘類加工の最大の隘路が果汁工業における夏柑苦味の問題と温州みかん缶詰の白濁現象であり, 前者はナリンジン⁽¹⁾, 後者はヘスペリジン⁽²⁾, とともにラムノース, グルコースより成る 2 糖類を糖構造として有するフラボノイド配糖体が原因とされ, これを酵素化学の見地から解明し, 柑橘類の高度加工を可能ならしめんとする目的のためである.

かかる配慮の下に著者らの研究室で, 岸^(3,4)はナリンジンを加水分解する酵素を *Aspergillus niger* に属すると考えられる一株 (以下 *Asp. niger* と呼称する) の麴抽出液より得, この酵素の生成条件, 酵素化学的性質について報告を行ってきたが, この抽出液は更に同系フラボノイド配糖体であるヘスペリジンに対しても強い作用力を有することを認めた. それ故, われわれはこの作用が果して単一酵素によって行われるか否か, もし異なる酵素蛋白によって行われるとすれば, その作用機作の相異は何によって支配されるかに多くの興味をもち, 既に

* Studies on Flavonoid-hydrolyzing Enzymes. Part I. Crystallization of Naringinase I and Hesperidinase I and their Actions.

By Shigetaka OKADA, Kiyoshi KISHI, Masataka HIGASHIHARA and Juichiro FUKUMOTO
(Osaka Municipal Technical Research Institute)