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)

2年前に両酵素の結晶化に成功し、その酵素的性質並びに作用機作について講演発表⁽⁵⁻⁷⁾をつづけてきたが、ここにそれを総括して整理報告する。

なお基質に対する作用様式の項において説明する如く、ナリンジン、ヘスペリジンの完全分解にはさらに別個の酵素が必要である点から、本結晶酵素をナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I とそれぞれ表示する。

実 験 の 部

実験方法

(1) 供試酵素液： 麴 100 部に対し大豆粕 5 部、柑橘類果皮 10 部、硫酸 1 部を配合し、これに水 85 部を加えて常法により殺菌した培養基に、*Asp. niger* の 1 株 GrM-03⁽⁸⁾ を 28° で 4 日間培養し、その麴麴の水 5 倍抽出液を粗酵素液とした。

酵素化学的性質並びに作用様式の検討には結晶酵素標品を使用した。

(2) 酵素力価の測定法

ナリンジナーゼ I： ナリンジン（ざぼんより Poore の方法⁽⁸⁾により抽出再結したもの）5 mg を終末 M/25 McIlvaine 緩衝液（pH 4.2）4 ml に溶解し、これに酵素液 1 ml を加えて 40°、30 分間反応せしめ、生成する還元糖を Somogyi 法（High alkalinity 試薬）により定量し、1 mg の還元糖を生ずる酵素力を 1 単位とした。

ヘスペリジナーゼ I： ヘスペリジン（武田薬工光工場崎谷氏より分与されたもの）5 mg を終末 M/25 McIlvaine 緩衝液（pH 3.8）存在の下に 1 N-NaOH に溶解し、1 N-HCl を加え中和すると同時に酵素液 1 ml を加えて全量を 5 ml として上記条件で反応せしめた。

(3) 連続濾紙電気泳動： M/50 磷酸緩衝液 pH 7.0, 18 mA, 300 V の条件で行った。

(4) 総蛋白質の定量： Folin-Ciocalteu 法⁽⁹⁾によった。

(5) 分解生産物の決定： 分解生産物の分離はブタノール、ピリジン、水（6：4：3）を展開剤とするペーパークロマトグラフィーを用い、アニリン-ハイドロジェンフタレートによる呈色により判定した。

実験結果

(1) ナリンジナーゼ I とヘスペリジナーゼ I の分離精製 麴麴の水 5 倍抽出液に磷酸緩衝液（pH 7.0）を 0.1 M になる如く加え、更に CaCl_2 を当量添加して Ca-ゲルを形成せしめ、自然濾過により得た濾液を硫酸 0.2 飽和として生ずる沈澱を除く。濾液にさらに硫酸を追加して 0.6 飽和とし 1 夜冷所に放置した後、少量の珪藻土を添加し吸引濾過する。得られる沈澱を蒸留水に溶解し、4 日間流水に透析した後、内液に 4% リバノール液を 0.3% に達するまで滴下し（pH 5.2）生ずる沈澱を遠心分離する。この沈澱に 0.5 M 酢酸ソーダを加えて酵素を溶出し、活性白土でリバノールを完全に除き、1 夜流水に透析後、0.2 M 酢酸緩衝液（pH 5.0）で緩衝化した Duolite A-2 樹脂に酵素を吸着せしめ 0.1 M 磷酸緩衝液（pH 7.0）でこれを溶出し、これに硫酸を 0.7 飽和まで加えて、生ずる塩析物を蒸留水に 3 日間透析する。その透析内液をアセトンで分割沈澱すると、ナリンジナーゼ I はアセトン濃度 30~40% 区分に、ヘスペリジナーゼ I は 40~60% 区分に集る。

アセトン 30~40% の沈澱区分を少量の蒸留水に溶解し、濾紙電気泳動を行うと、本酵素は陽極側に流下する。流下液を集めアセトンで濃縮した後、ごく少量の蒸留水に溶し、氷冷下で徐々にアセトンを滴下することにより酵素は結晶として析出する（写真 1）。

40~60% の沈澱区分は蒸留水に溶解後、pH 2.8, 40°, 2.5 時間の酸処理を行い、不溶性の沈澱を遠心分離で

写真 1 ナリンジナーゼ I の結晶

写真 2 ヘスペリジナーゼ I の結晶

第 1 表 ナリンジナーゼ I 及びヘスベリジナーゼ I の分離精製

	全容 ml	蛋白態 窒素 N mg	ナリンジナーゼ I		ヘスベリジナーゼ I	
			全活性%	u/N mg	全活性%	u/N mg
麴菌培養抽出液	5000	5940	100	6.2	100	12.5
磷酸カルシウム処理 硫酸塩析 (0.2~0.6 飽和) 透析						
透析内液	750	931	80	31.8	80	64.0
リバノール添加, 沈澱 酢酸ソーダに溶し, 活性白土で リバノール除去						
濾液	500	377	42.2	41.3	47.6	93.8
透析 デュオライト A 2 樹脂で脱色						
溶出液	800	204	39.2	95.3	41.6	152
アセトン分別沈澱						
30~40% 沈澱	30	44.8	22.5	188	10.8	180
連続濾紙電気泳動 pH 7.0						
陽極部	125	8.8	5.5	231	1.1	9.3
透析濃縮 アセトン添加						
結晶 ナリンジナーゼ I		4.7	3.2	255	0	0
40~60% 沈澱	30	50.8	1.4	17.6	17.1	250
酸処理 pH 2.8, 40°						
濾液	30	37.5	0.3	3.3	15.1	323
連続濾紙電気泳動 pH 7.0						
陰極部	130	10.8	0	0	9.8	677
透析濃縮 アセトン添加						
結晶 ヘスベリジナーゼ I		8.2	0	0	8.4	764

除き, 上澄を濾紙電気泳動すると, ヘスベリジナーゼは僅かに陰極側に移動する. この流下液をアセトンにて濃縮し写真 2 に示す如きヘスベリジナーゼ I の結晶を得た.

これら両酵素の分離精製の過程と酵素活性の推移は第 1 表に示す通りである.

(2) 酵素化学的性質 ここに得た結晶酵素標品について酵素化学的性質の若干を検討した.

i) 作用最適 pH : McIlvaine (酸性側), Sørensen 磷酸塩 (中性附近) 及び硼酸塩 (アルカリ性側) 緩衝液をそれぞれ終末 0.1 M となる如く配合して, 40° で 10 分間反応せしめた場合, 第 1 図に示す如くナリンジナーゼ I の作用最適 pH は 4.5 附近に, ヘスベリジナーゼ I のそれは 3.5 附近にあることを知った.

ii) 作用最適温度 : McIl-

第 1 図 結晶ナリンジナーゼ I 及びヘスベリジナーゼ I の作用最適 pH

使用緩衝液

pH 2~6, 0.1 M McIlvaine buffer
pH 5~8, 0.1 M Phosphate buffer
40°, 10 分間反応, 基質濃度 0.1%

○—○ H: ヘスベリジナーゼ I
○……○ N: ナリンジナーゼ I

第 2 図 作用最適温度

pH 4.0, M/20 McIlvaine buffer, 基質濃度 0.1%, 10 分間反応

○—○ H: ヘスベリジナーゼ I
○……○ N: ナリンジナーゼ I

第3図A pH安定性

使用緩衝液
 pH 1~3 0.1M McIlvaine buffer+1H-HCl
 pH 3~5 0.1M "
 pH 5~8 0.1M Phosphate buffer
 pH 8~10 0.1M Borate buffer
 40°, 2時間処理

第3図B 熱安定性

pH 4.0, M/20 McIlvaine buffer 5分間処理
 ○—○ H:ヘスペリジナーゼI
 ○---○ N:ナリンジナーゼI

vaine 緩衝液 (pH 4.0) を用い反応時間 10 分間を条件とすると第2図にみる如く, ナリンジナーゼIの作用最適温度は 50° 附近, ヘスペリジナーゼIのそれは 60° 附近であった。

iii) 安定性:

酵素を pH 1.8~9.8 の範囲の緩衝液に 40° で2時間保った後, その残存酵素力を測定した結果, 第3図Aの如く, ナリンジ

ナーゼIは pH 5.5~8.0 の間で, ヘスペリジナーゼIは pH 3.0~8.5 の間で安定であった。

耐熱性は pH 4.0, 5 分間加熱を条件とすれば, 第3図Bに示す如く, ナリンジナーゼIは 55° まで, ヘスペリジナーゼIは 65° まで安定であった。

(3) 基質に対する作用様式 結晶ヘスペリジナーゼIのヘスペリジンに対する作用曲線は第4図に示す通りで, 分解率は約 50% で停止する。一方粗酵素液では 100% まで分解することから, 結晶に得た酵素をヘスペリジナーゼIと仮称することとした。次にヘスペリジンをヘスペリジナーゼIで分解した後, 別の区分の酵素(ヘスペリジナーゼIIと仮称する)を加えてさらに反応を継続すると分解率は 100% まで上昇する。

この分解過程の反応生成糖を検索するために各反応液を濃縮し, それらのペーパークロマトグラムを求めれば, 写真3Aに見る如く, 粗酵素液によって生成される糖はグルコースとラムノースであり, ヘスペリジナーゼIによって生ずる糖はラムノースのみであることが判明した。また基質をヘスペリジナーゼIで分解した液を濃縮す

第4図 ヘスペリジンに対するヘスペリジナーゼの作用

(基質濃度 0.1%, M/25 McIlvaine buffer pH 4.8, 40° 反応.)
 (分解率は酸加水分解を 100 として計算)

写真3 分解物のペーパークロマトグラフィー

AはヘスペリジナーゼI, BはナリンジナーゼI

Rはラムノース, Gはグルコースを示す

(ブタノール:ピリジン:水=6:4:3, 2重展開)

の機作によることを明かにした。

さらに培養液中にナリンジナーゼ並びにヘスペリジナーゼを産生する五十数株の菌株について、それぞれのナリンジナーゼのナリンジンに対する並びにヘスペリジナーゼのヘスペリジンに対する作用機作を比較検討した結果、その分解様式は全く上式と同一であることが判明し、かかる分解形式は比較的広く分布しているものと考えられる。

要 約

糖抽出液からナリンジン、ヘスペリジンを分解する酵素を分離、精製し、その酵素的性質並びに作用機作を比較検討した結果は次の如く要約できる。

(1) ナリンジン、ヘスペリジンを分解する酵素は全く別々のものであり、またそれらはラムノースとグルコースの間を切る酵素ナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I と、グルコースとアグリコンの間を切る酵素ナリンジナーゼ II 及びヘスペリジナーゼ II よりなることが明らかとなった。

(2) このうちナリンジナーゼ I 及びヘスペリジナーゼ I はそれぞれ結晶状に得ることができた。

(3) 結晶状に得たナリンジナーゼ I の作用最適 pH は 4.5 附近、ヘスペリジナーゼ I は pH 3.5 附近であり、作用最適温度はそれぞれ 50° 及び 60° 附近であった。

さらにあたり、ヘスペリジンを分与下された武田薬品工業株式会社光工場崎谷幾雄氏に深謝する。

本報告の要旨は、昭和 35 年 4 月日本農芸化学会大会において講演発表した。

(1) 朝比奈泰彦, 犬伏元太郎: 薬誌, 49 , 130 (1929).	(7) 福本寿一郎, 岡田茂孝, 板谷公和: 同上, p. 34 (1962).
(2) G. Zemplén, A. K. Tettamanti: <i>Ber.</i> , 71 , 2511 (1939).	(8) H. D. Poore: <i>Ind. & Eng. Chem.</i> , 26 , 639 (1934).
(3) 岸 清: 科工, 29 , 140 (1955).	(9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: <i>J. Biol. Chem.</i> , 193 , 265 (1951).
(4) 岸 清: 同上, 31 , 328 (1957).	(10) S. Hattori, I. Noguchi: 植物, 71 , 37 (1958).
(5) 福本寿一郎, 岸 清, 岡田茂孝, 東原昌孝: 日農化大会講演要旨, p. 26 (1960).	(11) D. H. Hall: <i>Chem. & Ind.</i> , 57 , 473 (1938).
(6) 福本寿一郎, 岡田茂孝, 岸 清, 東原昌孝: 同上, p. 6 (1961).	(12) 岸 清: 科工, 33 , 185 (1959).

[農化 第 37 巻, 第 2 号, p. 89~93, 1963]

細菌による糖の異性化反応に関する研究 (第 3 報)*

グルコン酸によるグルコース異性化酵素の阻害について

高 崎 義 幸, 田 辺 脩 (工業技術院発酵研究所)

昭和 37 年 9 月 10 日 受 理

緒 言

前報^(1,2)において *Bacillus megaterium* A-1 によるグルコース異性化酵素の諸性質について報告したが、このグルコース異性化酵素がグルコースの酸化物であるグルコン酸および 2-ケトグルコン酸により阻害されることを認めた。Parr⁽³⁾ および Kahana⁽⁴⁾ らはグルコース-6 リン酸イソメラーゼがグルコン酸-6 リン酸により阻害されることを認め、Parr はグルコース-6 リン酸が六炭糖リン酸酸化経路と Embden-Meyerhof 経路の中間物であるところからグルコース-6 リン酸イソメラーゼが炭水化物代謝の regulator の役割をするのでないかと考えている。著者らはグルコース異性化酵素とグルコース脱水素酵素との間に何らかの関連があるのでないかと

* Studies on the Isomerization of Sugars by Bacteria. Part III. Inhibition of Glucose Isomerizing Enzyme with Gluconic Acid.

By Yoshiyuki TAKASAKI and Osamu TANABE (Fermentation Research Institute Agency of Industrial Science and Technology Inage, Chiba City)