九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

# ナリンギナーゼ作用に対する糖類の影響

大村，浩久
九州大学農学部食糧化学教室

安河内，勤
大日本製糖株式会社

山藤，一雄
九州大学農学部食糧化学教室

https://doi.org/10.15017/22965

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 22 (2), pp.181-190, 1966-04. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

# ナリンギナーゼ作用に対する糖類の影響*

大村浩久・安河内　勤†・山藤一雄

# Influence of sugars on naringinase action

H. Omura, T. Yasukochi and K. Yamafuji

夏ミカンの苦味の本体はフラボノイドとリモノイドとの2種に大別され，その割合は概略前者が80％，後者が20％程度であるといわれている．近年この苦味を除去するものとして特に前者を分解する酵素ナリンギナーゼが我国でも製造されるようになり夏ミカンの加工におけるその利用が期待されるようになつた．我々はさきにこのナリンギナーゼの試作標品についてこれを実際に利用する見地から酵素の諸性質を比較検討し，[13] またとくに標品中に共存するペクチナーゼの活性を除く手段について試験した．[14] このナリンギナーゼは岸，[2~5] 中林，[6,7] 岡田等，[11] 滝口[15,16]等によつて研究が進められ，また野村[9]によつてその利用が試験されているが，酵素の製造はいずれも糸状菌を利用するものである．この反応は次の2段階から成ることが *Asp. niger* の精製酵素について岡田等[11]によつて明らかにされたが，他の菌株 *Asp. usamii* mut. *shirousamii* で得られた酵素でも同様のことが滝口[16]によつて確められた (Scheme 1).

すなわち初めにナリンギンのラムノーズと葡萄糖との間を切る酵素（ナリンギナーゼ，ナリンギンラムノシダーゼ）が働いてラムノーズを遊離しプルニンを残す．引き続いてプルニンの葡萄糖とナリンゲニンとの間に別の酵素（サリシナーゼ，プルニングルコシダーゼ）が作用してナリンゲニンと葡萄糖とに分解する．

註）このようにとくに岡田等は初めの段階に作用する酵素にナリンギナーゼの名称を使用しているが，本研究に使用した酵素液はサリシナーゼも含んでおり，ナリンギンはプルニンの段階にとどまることなくナリンゲニンまで分解される．我々は本報においてはこのようなナリンギン分解酵素という広い意味にナリンギナーゼを使用した．

従つてラムノーズおよび葡萄糖によつてこの反応が抑制されることは容易に推定される．事実岸，[5] 中林[6,7]等はこれをたしかめ，さらに果糖蔗糖などによつても阻害されることをみとめている．このことは実用上問題であつて，缶詰，ジュースなど夏ミカンの加工における酵素の利用が妨げられる．

一方これとは全く別に我々はオキシムの生体内挙動について研究を進めており，カタラーゼ，[1] プロテアーゼ，[18,19] アミラーゼ[17]など種々の酵素に対する影響を検討し，また葡萄糖脱水素酵素やピルビン酸カルボキシラーゼの基質がオキシムを形成した場合それらに対する酵素の作用がどのように変動するかなどについても試験した．[12]

そこで本報ではナリンギナーゼに対する糖類の影響について試験して実用上の資料を得るとともにオキシム化した場合酵素に対する影響に変動があるか否かについても検討した．

## 方　　法

### 1. ナリンギナーゼ

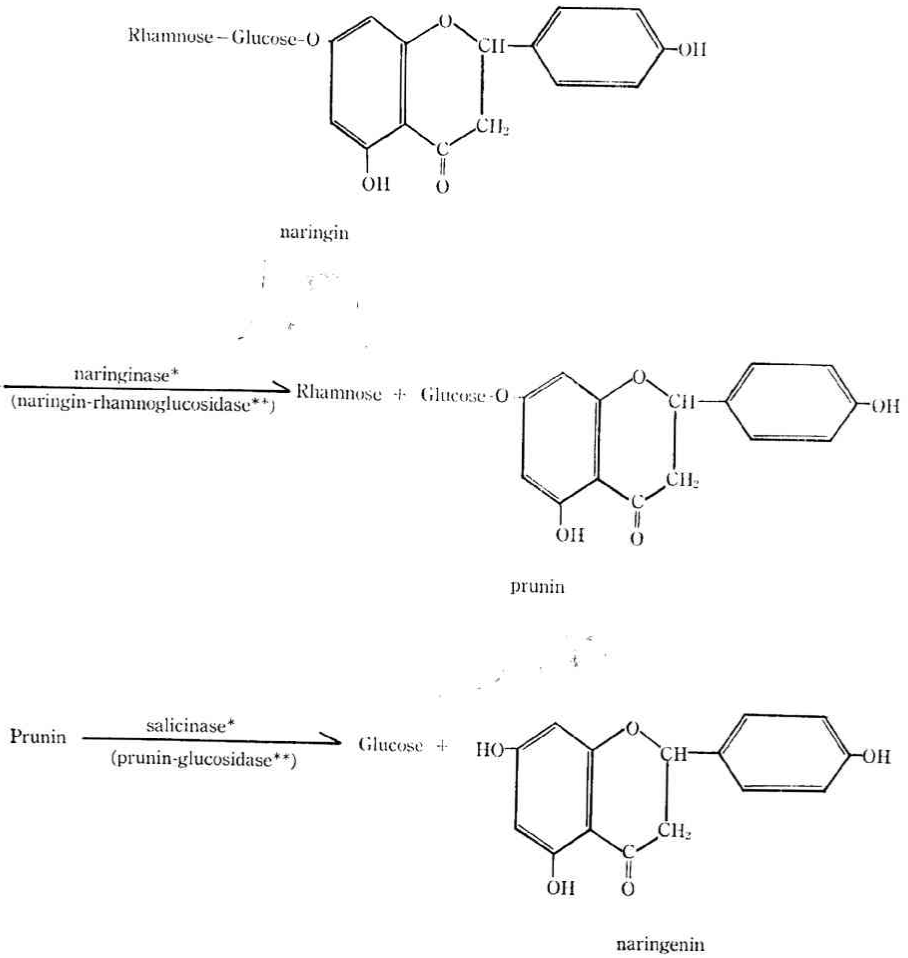
酵素標品としてはナリンギナーゼ市販品（KABAYA-naringinase）を使用した．これは前報[12]におけるナリンギナーゼ標品Aに相当する．比色法による活性の測定法で求めた反応の最適 pH は 4 付近にあるので，酵素剤を pH 4 の McIlvaine 緩衝液（0.1 M クエン酸—0.2 M $Na_2HPO_4$）で抽出し 6,000 r.p.m. で5分間遠心分離した褐色透明な上澄液を酵素液として使用した．酵素の濃度はその力価に応じて適宜定めるが通常 40°C 30分でのナリンギンの分解率が50～60％となるようにした．使用した酵素標品は濾過助剤など多量の不溶物を含んでいるが実験ではこれを含んだ製剤の百分率濃度で表わし，本報では主として0.5％抽出溶液を用いた．

### 2. ナリンギン

基質としては通常市販品（ハタ製薬）を0.03％に50～60°C に温めて水にとかした水溶液を用いたが場合によつては pH 4 の McIlvaine 緩衝液にとかして

* 柑橘苦味の除去に関する研究（第4報）

† 勤務先：大日本製糖株式会社




Scheme 1.　Enzymatic hydrolysis of naringin
* Okada et al.　** Takiguchi

使用した．

### 3. 酵素活性の測定

特記する場合のほかは前報[13]にならい，通常0.03%ナリンギン溶液2 ml（ナリンギン600 μg），0.5%ナリンギナーゼ溶液1 mlに試験糖溶液1 mlを加えて全量4 mlとし，pH 4，40°Cで30分間反応させ，反応前後のナリンギン含量を比色法により測定しその分解率を求めた．ナリンギンは試料1 mlに90%ジエチレングライコール10 mlおよび1 N NaOH 1 mlを加え，30°Cで30分間温めて発色したのち光電比色計（日立EPO-A型，青色フィルター，液層10 mm）を用いて吸光度を測定し標準直線からその含量を求めた．

上述のように使用した酵素標品ではナリンギンの分解はプルニンでとまることなくナリンゲニンまで進む．さらにこの比色法による呈色率はナリンギン＞プルニン＞ナリンゲニンであるがいずれも同様に呈色するので，酵素活性は前報に用いたようにナリンゲニンの呈色を補正したがプルニンについては補正していない測定値から求めた分解率で示している．従つて酵素活性はナリンギンよりプルニンを経てナリンゲニンに水解する2種の酵素活性すなわち本報におけるナリンギナーゼ活性を表わすものであつて，しかもプルニン補正を行つていないので実際のものよりも幾分低いことを留意しなければならない．

## 結　　果

### 1. ラムノーズ，葡萄糖

上述のようにナリンギンの酵素分解によつてはまずラムノーズ，ついで葡萄糖を生ずるので初めにこの両生成物を反応液に加えて酵素活性を測定した．この両

Table 1. Influence of rhamnose and glucose on naringinase.

| Sugar | | None | Rhamnose | | | | Glucose | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Conc. of sugar | M | 0 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 |
| | % | | 2.28 | 4.55 | 6.83 | 9.10 | 2.25 | 4.50 | 6.75 | 9.00 |
| Activity | | 57.1 | 21.4 | 12.4 | 9.0 | 7.3 | 21.8 | 14.7 | 10.8 | 8.3 |
| Inhibition, % | | | 62.5 | 78.3 | 84.2 | 87.2 | 61.8 | 76.0 | 81.1 | 85.5 |

Reaction mixture: 0.03 % naringin 2 ml, 0.5 % naringinase(in buffer, pH 4) 1 ml, sugar 1 ml. Enzymatic activity is expressed by percent decomposition of naringin at 40°C, pH 4 for 30 minutes.

Table 2. Influenec of galactose and mannose on naringinase.

| Sugar | | None | Galactose | | | | Mannose | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Conc. of sugar | M | 0 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 |
| | % | | 2.25 | 4.50 | 6.75 | 9.00 | 2.25 | 4.50 | 6.75 | 9.00 |
| Activity | | 57.1 | 42.8 | 37.1 | 31.4 | 26.3 | 51.4 | 42.8 | 37.7 | 33.7 |
| Inhibition, % | | | 25.0 | 35.0 | 45.0 | 53.9 | 10.0 | 25.0 | 34.0 | 41.0 |

The same with those of Table 1.

糖による酵素の阻害はすでにたびたび報告されているが，第1表に我々の測定結果を記載する．

この値はもちろん酵素液，測定条件などによつて多少の変動がみられるが少くもこれらラムノースおよび葡萄糖が低濃度でも顕著な阻害作用を示すことは明らかである．さら阻害度も多少ラムノースによるものが高いように思われるが著しい差異は殆ど認められないようである．

**2. ガラクトース，マンノース，キシロース**

つぎに葡萄糖によく似た構造の同じアルドヘキソースに属するガラクトースおよびマンノースについて試験した．

またラムノースはメチルペントースであるので天然に産するペントースとしてキシロースについてもその影響を検討した．

第2表および第3表からこれらの糖類によつても若干の阻害が起ることは認められた．この場合ガラクトースがマンノースよりも多少高い阻害効果をもつようであつたがラムノースあるいは葡萄糖にくらべれば問題にならない．

Table 3. Influence of xylose on naringinase.

| Conc. of xylose | M | 0 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | % | | 1.83 | 3.75 | 5.63 | 7.50 |
| Activity | | 69.5 | 57.7 | 53.5 | 48.0 | 43.8 |
| Inhibition, % | | | 17.0 | 23.0 | 30.9 | 37.0 |

The same with those of Table 1.

**3. 果糖，蔗糖**

夏ミカンの加工においても甘味剤の添加が必要であつて蔗糖が主に用いられる．さらに元来夏ミカンの中には葡萄糖のほかに蔗糖や果糖も含まれているがその含量は果実の品種，成熟の程度，産地，天候などによつて若干の変動は免れない．いずれにしてもナリンギナーゼを利用するにあたつてはこれらの糖の影響を種々の濃度について試験し一応の数値を求めておく必要がある．さらに果糖は葡萄糖に対応するケトースの代表的なものであり，蔗糖は周知のように甘味剤として最も広く利用される天然産のものであつて二糖類を代表するものである．

これらの糖によつても阻害されることはすでに岸，

Table 4. Influence of fructose on naringinase.

| Conc. of fructose | M | 0 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | % | | 2.25 | 4.50 | 6.75 | 9.00 |
| Activity | | 57.3 | 48.7 | 41.8 | 35.5 | 32.1 |
| Inhibition, % | | | 15.0 | 27.1 | 38.0 | 44.0 |

The same with those of Table 1.

Table 5. Influence of sucrose on naringinase.

| Conc. of sucrose | M | 0 | 0.125 | 0.250 | 0.375 | 0.500 | 1.000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | % | | 4.28 | 8.55 | 12.83 | 17.10 | 34.20 |
| Activity | | 58.9 | 46.5 | 40.6 | 35.9 | 31.8 | 21.2 |
| Inhibition, % | | | 21.1 | 31.1 | 39.0 | 47.7 | 64.0 |

The same with those of Table 1.

Table 6. Influence of sorbitol on naringinase.

| Conc. of sorbitol | M | 0 | 0.10 | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.60 | 0.75 | 1.00 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | % | | 1.82 | 3.64 | 5.46 | 7.28 | 10.92 | 13.75 | 18.20 |
| Activity | | 62.0 | 56.0 | 55.2 | 51.5 | 49.6 | 47.1 | 45.9 | 40.9 |
| Inhibition, % | | | 9.7 | 11.0 | 16.9 | 20.0 | 24.0 | 26.0 | 34.0 |

The same with those of Table 1.

Table 7. Influence of a mixture of sorbitol and sucrose on naringinase.

| Mixture | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| sorbitol, M | 0 | 1.6 | 1.4 | 1.2 | 0.8 | 0.6 | 0.4 | 0.2 | 0 |
| sucrose, M | 0 | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 |
| Conc. of mixture, % | 0 | 29.1 | 28.9 | 28.7 | 28.2 | 28.0 | 27.8 | 27.6 | 27.4 |
| Activity | 62.0 | 37.8 | 31.6 | 28.5 | 27.3 | 29.1 | 27.9 | 27.3 | 25.4 |
| Inhibition, % | | 39.0 | 49.0 | 54.0 | 56.0 | 53.1 | 55.0 | 56.0 | 59.0 |

The same with those of Table 1 except that the reaction mixture contains 2 ml 0.03% naringin, 1 ml 0.5% naringinase and 2 ml sugar mixture.

中林らによつて認められているがその阻害度はもちろんラムノースや葡萄糖にくらべて著しく低く，他の糖類と大差はないが蔗糖は幾分強いように思われる．

**4. ソルビトール，アスコルビン酸**

つぎに糖アルコールとしてソルビトールの影響を試験した．これも自然界にも存在し果実類や海藻類には比較的多く含まれている．しかもその構造は葡萄糖によく似ている．

第6表から明らかなようにラムノースや葡萄糖はもちろん，その他の単糖類や蔗糖などよりも阻害作用は弱い．

このソルビトールは食品添加物指定品目として許可されており湿潤調整剤，柔軟剤，香保剤，賦コク剤などに広く使用されて食品工業において各種の効果をあげているが，さらに清涼感をともなう爽快な甘味をもちその甘味度は約70（蔗糖を100として）といわれている．従つてナリンギナーゼに対する影響のみを考慮すれば最もよい甘味剤ということが出来る．しかし甘味剤として蔗糖に代えるには価格の面から制約があり菓子などにおいても一部が混合使用されているにすぎない．そこでソルビトールと蔗糖とを適当に混合しそのナリンギナーゼに対する影響を試験した．

もしソルビトールおよび蔗糖での酵素阻害が両者無関係に行われ混合液の阻害度がそれぞれの和で示されるならば第1図に示すようにその値は実測値よりもさらに高い筈である．ここでソルビトールおよび蔗糖それぞれ単独での阻害は第6表，第5表および第7表より求めたものである．従つて蔗糖の一部をソルビトールで代替することは比較的に有効なものと考えられる．

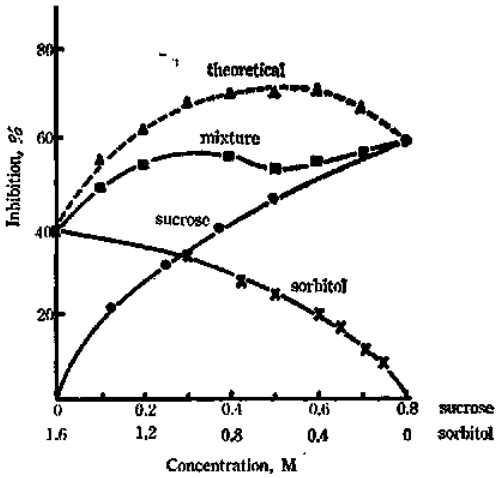



Fig. 1. Inhibition of naringinase by mixture of sorbitol and sucrose.

ミカンの食品的価値としての特徴の1つはビタミンCすなわちアスコルビン酸を豊富に含んでいることであり，缶詰，果汁などにさらに合成アスコルビン酸が添加強化される．このアスコルビン酸はソルビトールからも合成されるものであつて糖類に含めてよい化学構造をもつている．

こうしてアスコルビン酸は他の糖類にくらべてもナリンギナーゼに対する阻害作用が非常に弱く殆んど問

Table 8. Influence of ascorbic acid on naringinase.

| Conc. of ascorbic acid, M | 0 | 0.5 | 1.0 | 2.0 | 3.0 | 3.5 | 4.0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 56.3 | 56.3 | 54.0 | 50.1 | 47.9 | 47.3 | 45.6 |
| Inhibition, % | | 0 | 4.3 | 11.0 | 14.9 | 16.0 | 19.0 |

The same with those of Table 1.

題とするにはおよばないことがみとめられた．

**5. オキシム，その他**

はじめに述べたように我々はオキシムの生体内挙動，代謝などについて研究を続けている．ラムノース，葡萄糖だけでなく種々の糖類も多少の阻害作用をナリンギナーゼにおよぼすことが明らかになつたので，これらに関連して糖オキシムの影響を試験した．

Table 9. Influence of glucosoxime on naringinase.

| Conc. of glucosoxime, M | 0 | 0.1 | 0.25 | 0.3 | 0.4 |
|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 59.6 | 8.9 | 3.6 | 2.4 | 1.8 |
| Inhibition, % | | 85.1 | 94.0 | 96.0 | 97.0 |

The same with those of Table 7.

葡萄糖オキシムの阻害効果は非常に顕著であつて葡萄糖での酵素阻害を遙かに凌駕することがみとめられた（第9表）．

これに対してガラクトースオキシムおよびマンノースオキシムの場合はそれぞれの糖と同様にたいした影響はみとめられなかつた（第10表）．

葡萄糖オキシムの代りにアミンではその阻害作用は却て著しく低下することがみとめられた（第11表）．

これらの阻害作用を対応する糖のものと比較するために V/Vi を阻害剤濃度に対してプロットした．ここで V および Vi はそれぞれ対照および阻害剤共存下における反応速度であつて阻害剤の濃度に対してプロットするとほぼ直線となり，阻害度は直線の傾斜で比較された．第2図は葡萄糖関係のものであつて上述の諸表から明らかなようにオキシムの阻害は葡萄糖のものよりも著しく強く一方アミンは殆ど阻害力を持たないことが認められる．これに対してガラクトース，マンノースならびにそのオキシムについて求めた第3図からガラクトースオキシムとガラクトース，マンノースオキシムとマンノースの V/Vi の直線はそれぞれ完全に一致し阻害効果は全く同一であることを示した．

このような糖類およびオキシムの影響とは別にヒドロキシルアミン，ヒドラジンなどカルボニール試薬の影響は第12および13表に示すように殆ど認められな

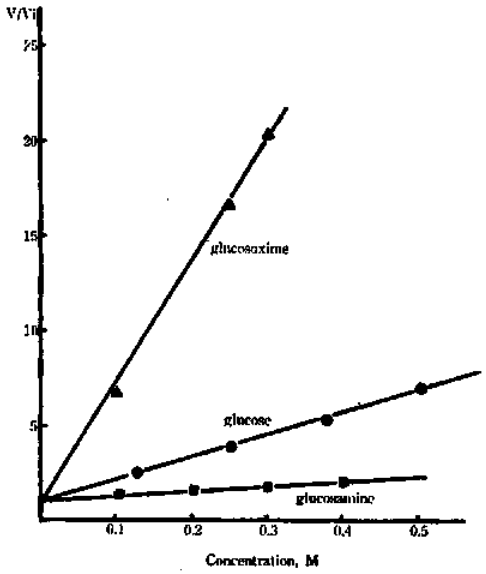



Fig. 2. Influence of glucose, glucosoxime and glucosamine on naringinase.

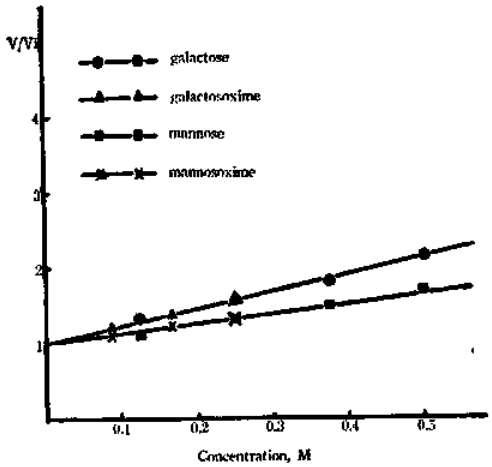



Fig. 3. Influence of galactose, mannose and their oximes on naringinase.

Table 10. Influence of galactosoxime and mannosoxime on naringinase.

| Oxime | None | Galatosoxime | | | Mannosoxime | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Conc. of oxime, M | 0 | 0.083 | 0.167 | 0.250 | 0.083 | 0.167 | 0.250 |
| Activity | 49.0 | 40.2 | 35.3 | 31.9 | 45.6 | 40.2 | 38.2 |
| Inhibition, % | | 18.0 | 28.0 | 35.0 | 7.0 | 18.0 | 22.0 |

The same with those of Table 7.

Table 11. Influence of glucosamine on naringinase.

| Conc. of glucosamine, M | 0 | 0.1 | 0.125 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 56.1 | 44.3 | 41.0 | 35.3 | 34.2 | 30.9 | 29.7 |
| Inhibition, % | | 21.0 | 26.9 | 37.1 | 39.0 | 44.9 | 48.0 |

The same with those of Table 7.

Table 12. Influence of hydroxylamine on naringinase.

| Conc. of hydroxylamine, M | 0 | 0.002 | 0.004 | 0.02 | 0.04 | 0.1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 53.8 | 53.4 | 53.7 | 53.8 | 53.8 | 50.6 |
| Inhibition, % | | 0.7 | 0.2 | 0 | 0 | 5.9 |

The same with those of Table 1.

Table 13. Influence of hydrazine on naringinase.

| Conc. of hydrazine, M | 0 | 0.00125 | 0.0025 | 0.0125 | 0.025 |
|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 61.5 | 60.9 | 60.8 | 60.6 | 60.3 |
| Inhibition, % | | 1.0 | 1.1 | 1.5 | 2.0 |

The same with those of Table 1.

Table 14. Influence of monoiodoacetic acid on naringinase.

| Conc. of monoiodoacetic acid, M | 0 | 0.005 | 0.05 |
|---|---|---|---|
| Activity | 63.3 | 51.9 | 39.5 |
| Inhibition, % | | 18.0 | 37.6 |

The same with those of Table 1.

かつた.

これらはいずれも硫酸塩を苛性ソーダで pH 4 まで中和して反応液に添加試験した.

このようなカルボニール試薬の影響はその濃度が低いために阻害作用が認められないということも考えられる. しかし例えばカタラーゼに対するヒドロキシルアミンの阻害のように酵素分子中の特定の原子団に作用するならば低濃度でも作用する筈である. 事実ナリンギナーゼは第14および第15表に示すようにモノヨード酢酸や PCMB のような SH 試薬によつては低濃度でもかなり阻害されその活性はシステインの添加によつて保護される.

Table 15. Influence of PCMB and cysteine on naringinase.

| Conc. of PCMB, M | 0 | $1\times10^{-5}$ | $1\times10^{-5}$ |
|---|---|---|---|
| Conc. of cystein, M | 0 | 0 | 0.025 |
| Activity | 68.8 | 35.1 | 44.2 |
| Inhibition, % | | 49.0 | 35.8 |

The same with those of Table 1. Reaction was started by adding naringin and cysteine into a mixture of naringinase and PCMB which had been kept at 40°C for 10 minutes.

### 6. アセトアルデヒド, α-ケトグルタル酸

以上の結果からナリンギン分解酵素はその反応生成物であるラムノースおよび葡萄糖のほかに種々の糖類によつても多少の阻害を受けることは明らかである. 糖の代表的な構造としては直鎖状をなす炭素鎖とこれに附着した水素原子および水酸基のほかにアルデヒドまたはケトンのカルボニール基があつて反応性にとんでいる. ナリンギナーゼの作用機構から糖による阻害は反応の平衡にもとづくものであつてアルデヒドあるいはケトンに支配されるものではないことは推定されるが, 一応アセトアルデヒドおよび α-ケトグルタル酸の影響も試験した.

アセトアルデヒドはごく僅かの阻害作用を示すにすぎないが, α-ケトグルタル酸は比較的に強い影響を

Table 16. Influence of actaldehyde on naringinase.

| Conc. of actaldehyde, M | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 |
|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 69.6 | 67.5 | 64.7 | 62.6 | 60.6 |
| Inhibition, % | | 3.0 | 7.0 | 10.1 | 12.9 |

The same with those of Table 1.

Table 17. Influence of α-ketoglutaric acid on naringinase.

| Conc. of α-keto glutaric acid, M | 0 | 0.05 | 0.10 | 0.15 | 0.20 |
|---|---|---|---|---|---|
| Activity | 63.3 | 60.8 | 55.1 | 50.0 | 44.3 |
| Inhibition, % | | 3.9 | 13.0 | 21.0 | 30.0 |

The same with those of Table 1.

およびしガラクトース程度のものがみとめられた．

## 考　　察

ナリンギナーゼの作用がフラバノン配糖体であるナリンギン（ナリンゲニン-7-ラムノグルコシド）からラムノース，ついで葡萄糖を遊離してナリンゲニンを生ずる2段階の反応であることから，この反応生成物であるラムノースおよび葡萄糖によつてナリンギナーゼが抑制されることは容易に理解できる．さらに種々の糖類も僅かではあるが阻害作用を示すことが認められた．これら糖類の影響は V/Vi を濃度に対してプロットすると第4図に示すように直線関係がみられるので，その傾斜によつて阻害能を比較することができる．たびたび報告されているようにラムノース，葡萄糖による阻害が著しいことは明らかであるがこの両者ではラムノースが多少強いようである．これに対して他の糖類ではガラクトースが多少強く，蔗糖，果糖，マンノース，キシロースは殆んど差がなく，ソルビトールは若干低かつたが，ラムノースおよび葡萄糖にくらべると殆んど問題はない．試験に使つた糖の種類や条件が不充分のためこれから結論を出すことはできないが6炭糖類について鎖状構造式にもとづいてこの反応における葡萄糖との拮抗を考慮すると多少の推定が得られるかと思われる．すなはちガラクトースは C4 の OH，マンノースは C2 の OH の立体配置が葡萄糖のものと異つており，一方果糖はC2がケトンでありC3からC6までは葡萄糖と同じ立体配置をもつケトースであることなどから C2 の

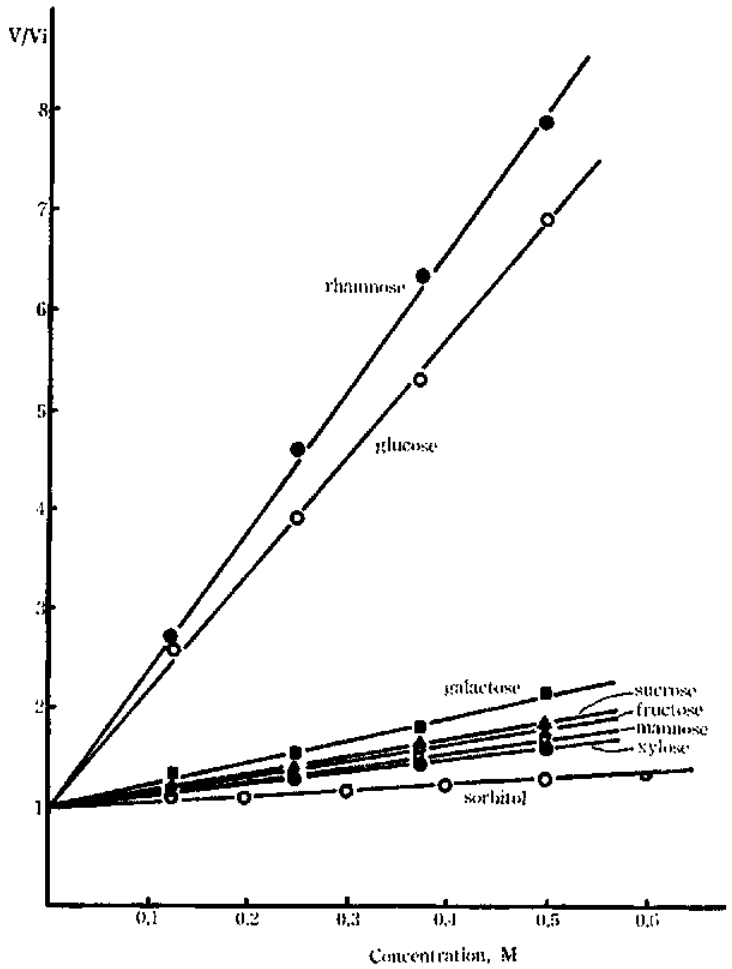



**Fig. 4. Comparison of inhibiting rates by sugars in relation to molar concentration.**

OH の立体配置が多少関係があるので葡萄糖と同じ配置をもつガラクトースが他のものよりも僅かではあるが高い阻害作用を示すものではないかと思われる．このことは葡萄糖の C1 に NOH 基をもつオキシムは強い阻害力を保持するのに対して C2 の OH が $NH_2$ で置換されたアミンは阻害力を失い他の単糖類程度に迄低下することからも説明されよう．それとともに葡萄糖の C1 のアルデヒド基が還元されて生じた糖アルコールであるソルビトールも阻害力を失うのでこのカルボニール基も勿論何等かの関係を持つているものと推定される．しかし単なるアルデヒド基が関係しているのではなくある程度の長さの炭素鎖を要求することはアセトアルデヒドならびに α-ケトグルタル酸の影響からも想像される．このカルボニール基の役割は葡萄糖に関するものについてであつて他の糖類ではすでに OH の立体配置の変化によつて阻害効果を著しく低下しているので，オキシム化のようなその他の変化の影響は殆どあらわれないと考えれば，ガラクトースオキシムやマンノースオキシムによるナリンギナーゼの阻害はそれぞれ対応する糖によるものとよく一致する事実を説明できよう．しかし葡萄糖オキシムが葡萄糖の阻害力よりも強いことは興味深い現象であつてヒドロキシルアミンなどの阻害がみとめられないことからオキシム自身の特異的な作用であることは推定される．

これまでも諸氏によつて指摘されているようにナリンギナーゼが糖類によつて阻害されることはこの酵素を夏ミカンなどの加工に利用する場合考慮しなければならない問題である．夏ミカンに含まれている糖分は

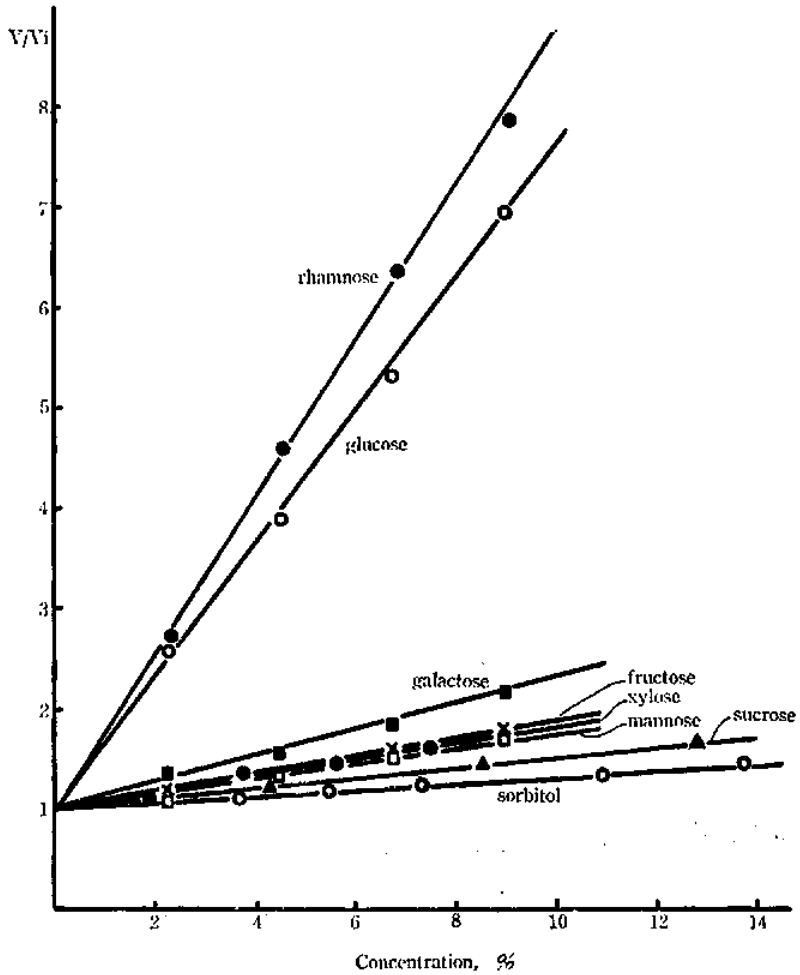



Fig. 5. Comparison of inhibiting rates by sugars in relation to per cent concentration.

品種，成熟の時期，産地，天候などによつて異なるが，全糖として5.5～7.5％，このうち約半分は蔗糖，半分は還元糖であつて葡萄糖と果糖は約半分宛わずかに果糖が少い程度であるといわれている．また新鮮果汁についても全糖6.5～7.3％，還元糖2.7～3.1％，葡萄糖1.6～1.8％，果糖1.1～1.3％の値が一例として得られておりこのほかキシロース，アラビノース等の5炭糖類も含まれている[9]．通常食品中の諸成分の含量を示すのにパーセント濃度が用いられるので第4図は第5図のように改められ分子量の大きい蔗糖の傾斜が低くなるほかは著しい相異はない．従つて少なくとも我々が試験に用いたナリンギナーゼでは夏ミカン中の蔗糖および果糖による阻害は微少であつて殆んど考慮する必要はないと思われるが，葡萄糖による阻害は無視することは出来ない．これに対してラムノーズはその高い阻害力にも拘らず夏ミカンでは問題とするにはおよばない．缶詰や果汁に夏ミカンを加工する場合には主として蔗糖を加えて糖分を補強しているのでその添加量によつては考慮しなければならないことは当然である．しかしこの場合でも可能ならば加糖前に酵素処理を行うことが望ましい．

これに対してビタミンCとしてミカン類に豊富に含まれ食品的価値を特徴づけているアスコルビン酸による阻害が殆どみとめられないことは酵素使用にあたり好都合である．

ナリンギナーゼを夏ミカンの加工に利用する場合にはさらに酵素の反応pHの問題も大きい．すなわち試験に用いたようにナリンギナーゼはpH 4において最高の活性を示すが果汁の酸度pH 3付近では半減する．[18] さらに共存するペクチナーゼとの関係や，夏ミカンの苦味はナリンギンだけにもとづくものではなくリモノイド系の苦味も含まれているなど[9]問題点が残つているので，ナリンギナーゼを用いれば夏ミカンの苦味は完全にしかも簡単に除かれるものと過信することは早計でありさらに種々の検討が行なわれなければならない．

## 総　　括

市販ナリンギナーゼについて実用上の資料を得る目的で糖類の影響を種々の濃度で試験した．

(1) ナリンギナーゼはその反応生成物であるラムノースおよび葡萄糖によつて著しく阻害された．しかしその阻害度はラムノースが多少高いようであるが著しい差はみとめられなかつた．

(2) ガラクトース，マンノース，キシロースなどによつても若干の阻害が認められた．この場合もガラクトースがわずかに強いほかは阻害度に差異はなかつた．

(3) 果糖および蔗糖によつてもマンノース，キシロースと同じ程度の阻害がみとめられたが，夏ミカン中の含有量からすればほとんど無視できる程度であつた．

(4) ソルビトールによる酵素阻害はさらに低く，またアスコルビン酸の阻害効果は最も低かつた．

(5) 葡萄糖オキシムは葡萄糖よりも強い阻害作用を示したがアミンでは著しく低かつた．これに対してガラクトースオキシムおよびマンノースオキシムのナリンギナーゼに対する影響はそれぞれ対応する糖のものと全く一致した．ナリンギナーゼは低濃度のモノヨード酢酸やPCMBのようなSH試薬によつては阻害されるがヒドロキシルアミンやヒドラジンなどカルボニール試薬では阻害されなかつた．

研究に際し種々御助言を頂き，また貴重な試料を頂戴した山口大学農学部野村男次教授に心から感謝申しあげる．

（食糧化学教室）

## 文　　献

1) 秋田利彦 (1951) 農化，**24**，391.
2) 岸　清 (1955) 科学と工業，**29**，140.
3) 岸　清 (1957) 科学と工業，**31**，329.
4) 岸　清 (1958) 科学と工業，**32**，389.
5) 岸　清 (1959) 科学と工業，**33**，185.
6) 中林敏郎 (1961) 缶詰時報，**40** (7) 1.
7) 中林敏郎 (1962) 食品工誌，**9**，28.
8) 野村男次 (1963) 食品工誌，**10**，381.
9) 野村男次 (1965) 私信.
10) 野村男次，秋山圭司，新木三郎，市山勇哲(1963) 食品工誌，**10**，115.
11) 岡田茂孝，岸清，福木寿一郎 (1962) 酵素化学シンポジウム予講集，p. 10.
12) 大村浩久，吉田勲，宗像正勝，山藤一雄 (1960) 九大農学芸誌，**17**，411.
13) 大村浩久，石崎勝也，餞島　豊，山藤一雄 (1963) 九大農学芸誌，**20**，169.
14) 大村浩久，近野孝英，石崎勝也，山藤一雄(1963) 九大農学芸誌，**20**，321.
15) 滝口　洋 (1962) 三共研年報，**14**，101.
16) 滝口　洋 (1964) 三共研年報，**16**，54.
17) 山藤一雄，青木みか (1956) Enzymol., **17**, 300.
18) 吉原典子 (1950) 農化，**23**，460.
19) 吉原典子 (1950) 九大農学芸誌，**12**，51.

**Summary**

Recently, naringinase preparations of molds such as *Asp. niger* and *Asp. usamii* mut. *shirousamii* were brought to market in Japan. Since the enzyme hydrolyses naringin, a bitter substance in fruits of *Natsudaidai* or grapefruit, the preparation is employed for removing bitterness in processing of the fruits. According to Okada et al. and Takiguchi, naringin (naringenin-7-rhamnoglucoside) is hydrolysed by releasing rhamnose and glucose as shown in Scheme 1.* Therefore, it might be understood that naringinase action is retarded by rhamnose or grucose, as established by several authors.

*Natsudaidai* contains sucrose and fructose as well as glucose. In addition, sugar was often supplemented in processing of the fruits to sweetening the products. Therefore, in order to obtain helpful data to employment of the enzyme preparation, the influence of several kinds of sugar on naringinase was investigated. Enzymatic activity was assayed by determining hydrolysis of naringin which was colorimetrically estimated by Davis' method using diethyleneglycol and sodium hydroxide.

Naringinase was strongly inhibited by rhamnose or glucose of low concentration. Inhibiting rate of rhamnose was more or less higher than that of glucose. With galactose or mannose, hydrolysis of naringin was also retarded, even with less extent than with rhamnose or glucose. In this case, galactose has a little higher ability to inhibit the enzyme than mannose has. By xylose too, naringinase was inhibited in about the same extent with mannose. Similar degree of inhibition of naringinase was observed with fructose and sucrose which are natively contained in the fruits. Sorbitol has lesser ability to reduce naringinase activity, while least inhibition was estimated with ascorbic acid. Inhibition of naringinase by a mixture of sucrose and sorbitol was also estimated in order to examine whether or not sorbitol is useful to substitution for sucrose accompanying lesser inhibiting rate. These influence could be compared by consulting the inhibiting rates in Tables and the slope of straight lines of V/Vi plotted to concentration of sugars.

When glucose had been transformed into glucosoxime, enhancement of inhibiting rate of glucose on naringinase was estimated. On the contrary, inhibition was reduced with glucosamine to the level by galactose. No alteration in inhibiting rates, however, was established, if galactos- or mannosoxime was substituted for galactose or mannose. Carbonyl reagents such as hydroxylamine and hydrazine had no effect on naringinase, whose activity was reduced by SH reagents, monoiodoacetic acid and PCMB, of low concentration. Incidentally, some inhibition with $\alpha$-ketoglutaric acid was observed, but not with acetaldehyde.

By discussing these results, it was suggested in particular that glucose content in *Natsudaidai*, about 1.6~1.8 %, has a significant effect on naringinase to inhibit the activity, whereas contents of fructose and sucrose, about 1.1~1.3 and 2.7~3.1 %, have negligible influence.

Laboratory of Food Chemistry,
Department of Food Science and Technology,
Kyushu University

*) The enzyme solution contains two enzymes which are concerned with hydrolysis of naringin to naringenin through prunin. The activity was also estimated by determining decomposition of naringin to naringenin. Therefore, in this investigation, naringinase was employed in broad sense to mean the enzymes which catalyse the hydrolysis of naringin to naringenin.