

琉球大学学術リポジトリ

甘蔗茎のインベルターゼと α -ガラクトシダーゼに関する研究(農芸化学科)

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 知念, 功, 松下, 洋一, 福田, 亘博, Chinen, Isao, Matsushita, Yoichi, Fukuda, Nobuhiro メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12000/4149 |

甘蔗茎のインベルターゼと α - ガラクトシダーゼに関する研究

知念 功*・松下 洋一**・福田 亘博*

Isao CHINEN, Yoichi MATSUSHITA, and Nobuhiro FUKUDA: Studies
on acid invertase and α -galactosidase of sugar cane stalk.

I 緒 論

1828年蔗糖発酵過程では、水を必要とすることがわかり、その過程には触媒として、インベルターゼが関与することがその時はじめてわかった。^{3) 4) 14)} それ以来この酵素は、多くの生化学者によって広く、長く研究されてきている。¹⁾ 特に酵母インベルターゼは、よく知られている。¹³⁾ その他に緑藻、微生物、^{8) 10) 17)} ミツバチ、クラゲ等の無脊椎動物をはじめとして数多くの高等植物、^{9) 11) 12) 17)} 動物でインベルターゼの存在が報告されている。

またインベルターゼという名称は、蔗糖に作用した際の反応生成物の施光度が右施性より左施性に変わるころからつけられたものであり、正確には、この酵素は、 α -グルコシダーゼと β -フラクトシダーゼに分けられる。つまり前者は、シュクロース分子のグルコース側から作用する。この酵素は、シュクロースの他にメルチトース等に作用する。後者は、フラクトース側に作用する。この酵素は、同様にシュクロースの他にラフィノース等に作用することが知られている。この2者を総称してインベルターゼと呼んでいる。またこのインベルターゼは、これらの糖の他にスタキオース、イヌリン、イリジン、ゲンチアノース、バルバスコース等に作用することが知られている。^{14) 19)}

一方甘蔗茎中に存在するインベルターゼについても研究がなされており、この茎には、酸性および中性インベルターゼが存在し、⁶⁾ 存在形態からみると遊離型⁶⁾および結合型⁷⁾インベルターゼがある。酸性インベルターゼは、茎の先端の若い組織に存在し、遊離型として存在し、高温で降雨量が多く、茎の成長が旺盛な時に、この酵素活性が高いことからこの酵素は、茎の生育に関与していると思われる。一方中性インベルターゼは、成長した蔗糖含量の高い茎の部分に存在している。^{5) 16)}

本研究では、この茎に存在する遊離型酸性インベルターゼの酵素学的諸性質及茎での生理的役割を知る必要上、本酵素を精製し、基質特異性等を調べた。またこの酵素の精製過程で混在していた α -ガラクトースについても酵素学的性質を調べた。以下にこれらの結果を詳しく報告する。

* 琉球大学農学部農芸化学科

** 経済連南九州飼料会社

II 実験方法

1. 甘蔗茎からの酵素抽出法²⁾

²⁾ 前報と同様に、株出甘蔗(NCO 310)を圧搾し、遠心し、得られる蔗汁上清に硫酸を加え60%飽和沈澱を作り、遠心し、溶解したものをセファディックG-25ゲル濾過にかけ脱塩したのち、凍結乾燥を行い粉末にしたものを粗酵素として用いた。

2. 酵素活性測定法²⁾

1) ²⁾インベルターゼ活性測定法

前報と同様に0.1M蔗糖0.5mlに酵素溶液0.5mlに酵素溶液0.5mlを加え、pH 5.5, 45°Cで、30分間反応を行なったのち、Somogi Nelson法で、還元糖を定量し、本酵素活性を求めた。また基質としてメルチトースおよびラフィノースを用いる場合も、同様に調整し、操作し、本酵素活性を求めた。

2) ¹⁹⁾ α -ガラクトシダーゼ活性測定法

基質としてp-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (sigma社)を用い、この溶液0.5mlに酵溶液(10~20 μ g)を加え、pH 5.5, 60°Cで30分間反応を行なったのち、1M炭酸ナトリウム溶液1mlを加え、波長410nmで吸光度を測定した。その値をp-Nitrophenyl μ gに換算し、酵素量20 μ g、反応時間30分間当りで表し、本酵素活性を求めた。またp-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside, p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside, p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosideを基質として用いる場合も同様に0.2%溶液を作り、同様な操作を行ない、酵素活性を求めた。

3. 精製

1) ²⁾DEAEセルロースカラムクロマトグラフィー

前報と同様に調整した同セルロースを10 \times 5cmカラムにつめたのち、McIlvaine緩衝液(pH 5.5)で平衡化し、試料をのせ、同緩衝液で溶出を行なった。次に0.2M食塩を加えた同緩衝液で溶出を行なった。その結果得られる分画(5ml)は、280nmで吸光度を測定すると共に上法に従ってインベルターゼ活性を測定した。

2) ²⁾セファデックスカラムクロマトグラフィー

蔗汁等からの糖の除去、脱塩、及び上項で得られる活性分画の精製は、セファデックG-25および200ゲルでカラムクロマトグラフィーを行なった。これらのゲルの調製法、操作法については、前報²⁾で詳しく記述したのでここでは、省略する。

4. ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動法

²⁾ 前報と同様に、精製酵素の純度を調べるため、7.5%ゲルを作り、pH 8.0で、1チューブあたり、1~3mAで約2時間通電し、電気泳動を行なった。発色には、0.044%Coomassie Brilliant Blue溶液を用いた。また同酵素の炭水化物を染色するにあたっては、同法で泳動を行なったゲルを過ヨウ素酸、Schiff試薬で染色した。過ヨウ素酸溶液は、3%酢酸溶液を用いて1%溶液を作った。Schiff試薬は、塩基性フクシン0.2g、ピロ亜硫酸ナトリウム2gに濃塩酸2mlを加えたのち、蒸留水で100mlにして調製した。なお染色は、泳動を行なったゲルを15%TCA溶液に30分間つけたのち、蒸留水でよく洗い、過ヨウ素酸溶液に50分間ひたした。再び蒸留水でよく洗浄し、一晚蒸留水につけ過剰の過

ヨウ素酸を除去した。次に暗所で, Schiff 試薬に 50 分間つけ, 発色したのち, 蒸留水でよく洗い, 3~7.5%酢酸溶液につけ, 脱色し, 保存した。

5. ペーパークロマトグラフィー

上述の酵素反応法により, 甘蔗茎 α -ガラクトシダーゼをラフィノースに作用させ (45°C, 30分) その反応液をペーパークロマトグラフィーにかけ, α -ガラクトシダーゼの確認を行なった。ロ紙は, 東洋口紙No 50 (40×40) を用い, 1.5cm間隔で1%糖溶液をスポットした。展開溶液は, n-ブタノール: 酢酸: 水 (4: 1: 5) を用いた。発色液としては, 2.59%Anilinl hydrigen phthalate 溶液と0.2%Naphthoresorcinol 溶液をもちいた。標準糖溶液としては, 1%キシロース, フラクトース, ガラクトース, グルコース, シュクロース, ラフィノース溶液を用いた。

III 実験結果

1. Somogi Nelson 法により還元糖量を定量する際の食塩および硫酸濃度の影響

蔗汁よりインベルターゼを精製する過程で, 硫酸や食塩を多く使用するため, これらの塩類の活性定量法におよぼす影響を調べた。Fig. 1 に示したように, 硫酸濃度が測定溶液中に1%以上存在するとその還元力は, 著しく減少し, 10%以下になった。一方食塩の場合は, 1%存在すると約70%に減少した。そのため本研究では, 酵素精製過程でこれらの塩を用いる場合は, 活性測定前に, この酵素溶液をセファディクスG-25カラムクロマトグラフィーにかけ脱塩を行なった。

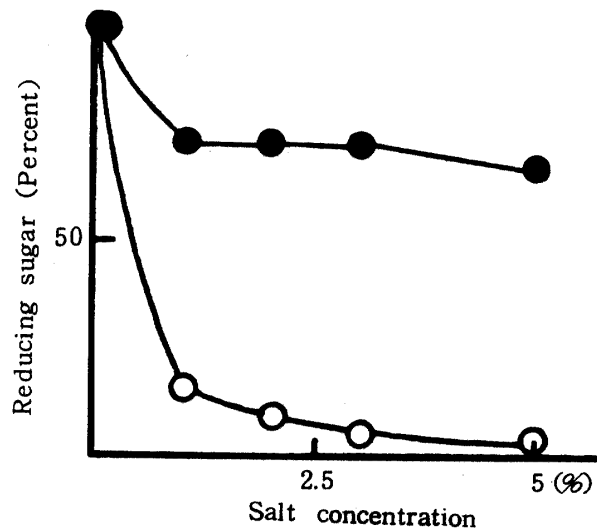


Fig. 1 Effect of salt concentration on determination of Glucose .

(●—●) sodium chloride
(○—○) ammonium sulfate

2. 甘蔗茎汁液インベルターゼの定量

甘蔗茎汁液には, シュクロースのほかにフラクトースやグルコースが2~3%含まれているため, 直接インベルターゼ活性を, この汁液を用いて測定することはできない。そのためFig. 2に示したように汁液をセファディクスG-25カラムクロマトグラフィーに分け, これらの糖類を除去したのち, この活性を定量した。その結果, 汁液インベルターゼ活性は, 200 μ g グルコース/汁液ml / 30分となった。

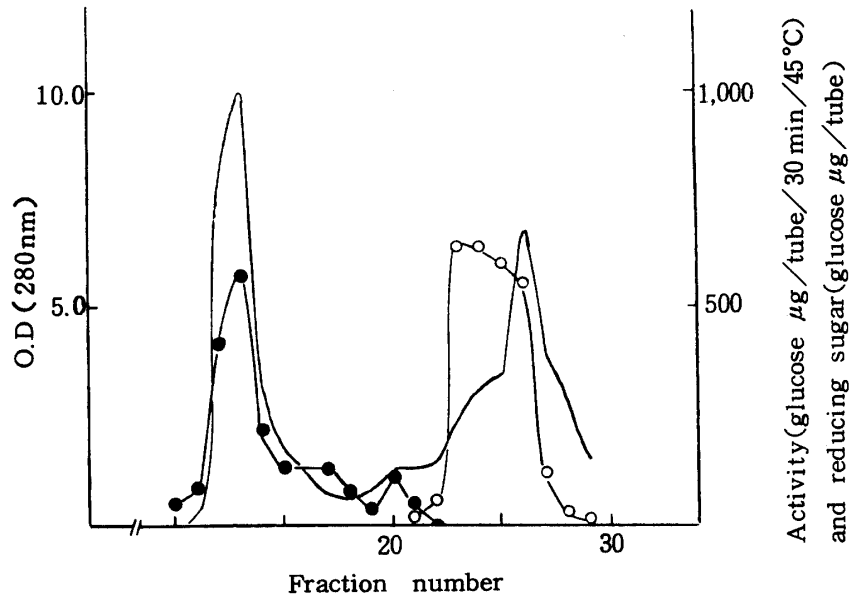


Fig. 2 Sephadex G-25 column chromatography of sugar cane juice .

(—) protein concentration, (●—●) invertase activity

(○—○) reducing sugar .

one fraction 5 ml column size 2.5 × 30 cm.

3. 茎の生育とインベルターゼ活性の関係

甘蔗茎の節間を先端より下に、1節、2節～5節とし、その節間について、糖度、重さ、長さ、太さ、タンパク含量、インベルターゼ活性を測定した。Fig. 3に示したように、節の重さ、長さ、太さは、先端より下に行くにしたがい、その値は、高くなり4～5節間ではほぼ一定となり、節間の生育が完成していることを示唆していた。タンパク含量は、逆に低くなった。一方糖度では、還元糖量は、下に行くにしたがいその値は、高くなり、4節間でピークに達し、5節間ではわずかながら低くなった。蔗糖量は、下に行くにしたがい急激に高くなる傾向がみられた。インベルターゼ活性は、下に行くにしたがい高くなり、4節間でピークに達した。

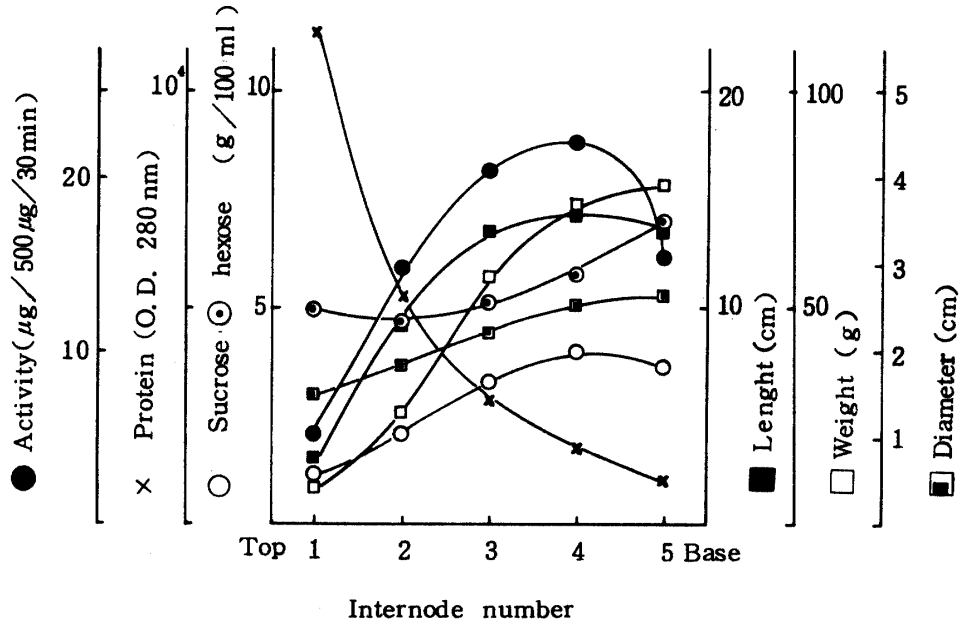


Fig. 3 Relationship of acid invertase activity to growth of sugar cane .

4. 精製

1) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー

上述の方法で調製したDEAE セルロースカラに、粗酵素約7gをのせ、上述の方法で溶出した結果

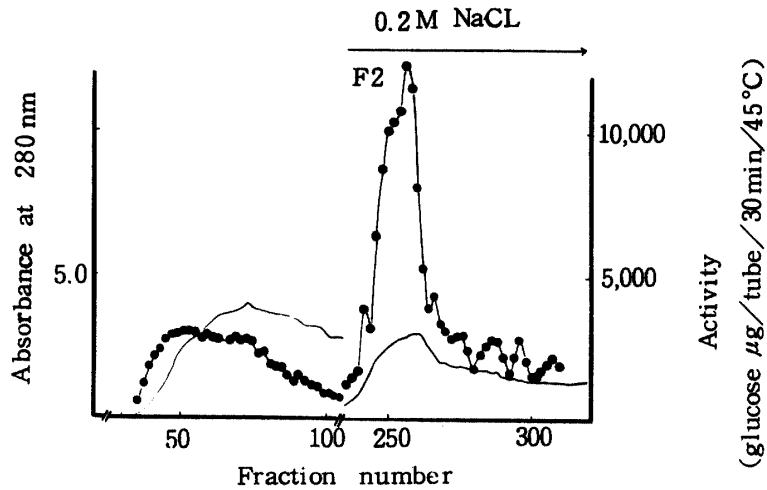


Fig. 4 Elution profile of immature sugar cane invertase on DEAE cellulose column chromatography .

(—) protein concentration. (●—●) activity.

Fig.4 が得られた。インペルターゼ活性は、0.2 M食塩を加えた緩衝液で溶出してはじめて、高い活性

ピークとなって表われた。この活性分画をF-2としてあつめ、次のゲル濾過法によりさらに精製した。

2) セファディクスG-200カラムク

ロマトグラフィー

上述の方法で調整したセファディクスG-200カラムに先に得られた活性分画F-2をのせ、クロマトグラフィーを行い、インベルターゼを精製した。その結果、Fig.5が得られた。主要タンパクピークは、Fr. no 70~90で見られたが、活性ピークは、Fr. no 50~60で見られた。この活性分画をほぼ精製されたものとし、この分画について、純度、諸性質を調べた。

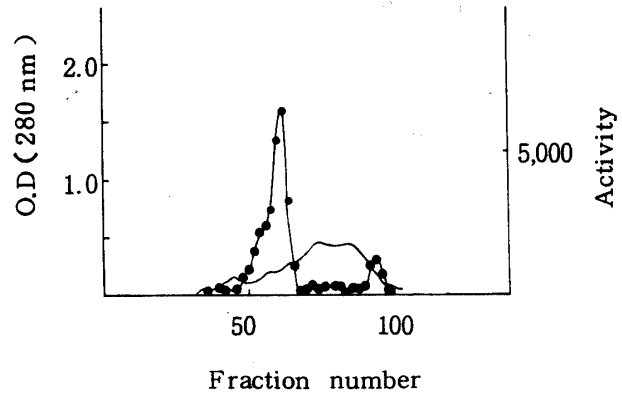


Fig. 5 Sephadex G-200 column chromatography of fraction 2 obtained by the DEAE cellulose column chromatography.

(—) protein concentration. (●—●) activity.

one fraction 10 ml, column size 3.7×138 cm.

5. ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動

上述の様に、最終的にセファディクスG 200カラムにかけて精製したインベルターゼ活性分画の純度を知るため、上述の方法に従い、電気泳動を行なった。その結果、Fig. 6 が得られた。泳動ゲルをCoomassie Brilliant Blue 溶液で染色した場合、2つのタンパクバンドが見られた。一方同ゲルを過ヨウ素酸、Schiff試薬で染色しても、この2つのタンパクバンドは染色された。この結果は、この両バンドは、糖タンパク質であることを示唆している。

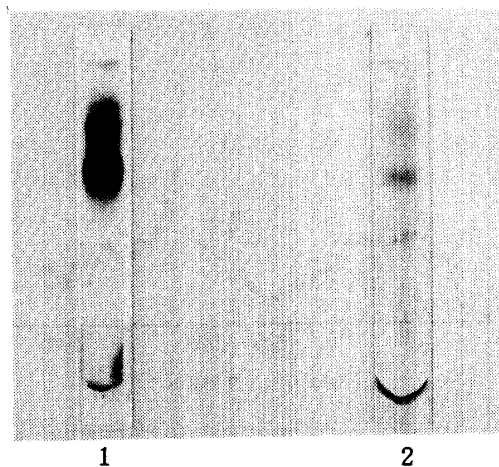


Fig. 6 Polyacrylamide disc gel electrophoresis (pH 8.0) of sugar cane invertase purified by sephadex G-200 gel column chromatography.

1, stained by coomassie brilliant blue.

2, stained by periodic acid-schiff reagent.

6. 基質特異性

Table.1 に示したように、精製した酵素の基質特異性を調べた。シュクロースおよびラフィノースに

Table 1. Substrate specificity of partially purifying invertase.

| Substrate | Specific activity (glucose $\mu\text{g}/100$ $\mu\text{g}/30 \text{ min}/45^\circ\text{C}$) | Substrate | Specific activity (nitrophenol $\mu\text{g}/100$ $\mu\text{g}/30 \text{ min}/45^\circ\text{C}$) |
|------------|--|--|---|
| Sucrose | 66.61 | p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside | 31.94 |
| Raffinose | 67.38 | p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside | 2.738 |
| Melezitose | 2.35 | p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside | 5.08 |
| Inuline | 3.19 | p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside | 0.46 |

対しては、強い水解活性がみられたがメルチトースおよびイヌリンに対しては、殆んどみられなかった。次に合成基質を用いた場合は、p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside に対しては、著しく高い水解活性がみられた。p-nitrophenyl-2-acetoamide-2-deoxy- β -D-glucopyranoside および p-nitrophenyl-2-acetoamide-2-deoxy- β -galactopyranoside に対してもわずかながら水解活性がみられた。

7. 基質濃度の影響

前述のように、この精製酵素は、ショ糖、ラフィノースおよびp-nitrophenyl- α -D-galacto-

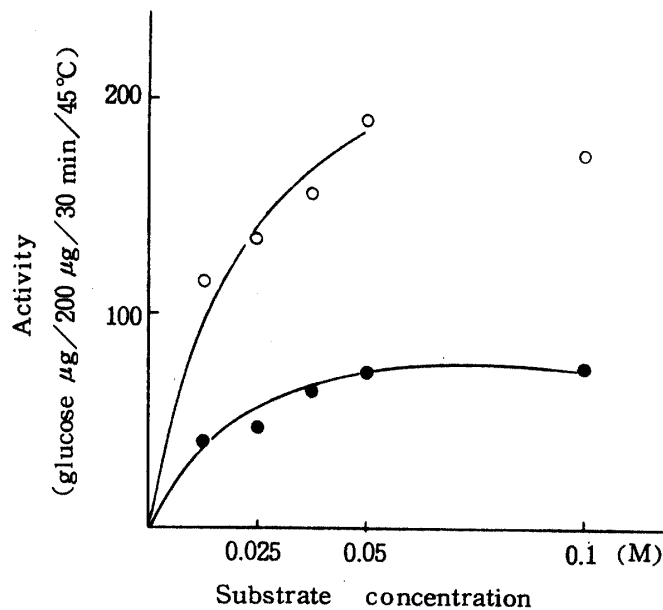


Fig. 7 Relationship of sugar cane invertase activity to sucrose (●—●) and raffinose (○—○) concentrations.

pyranosideに対し強い水解活性が見られるため、これらに対する性質をさらに調べるため、ショ糖、ラフィノース濃度の影響を調べた。Fig. 7に示したように、この両糖は、0.05 M濃度以上ではその水解活性は、一定になった。

8. 熱安定性

pH 5.5の緩衝液に溶解した酵素溶液を、それぞれ40, 50, 70℃で、30分間加温したのち、遠心し、その上清を酵素液として用いた。基質としては、シュクロース、ラフィノースを用いた。その結果、Fig. 8に示したように、基質としてシュクロースを用いた場合は、その基質に対する水解活性は、45℃

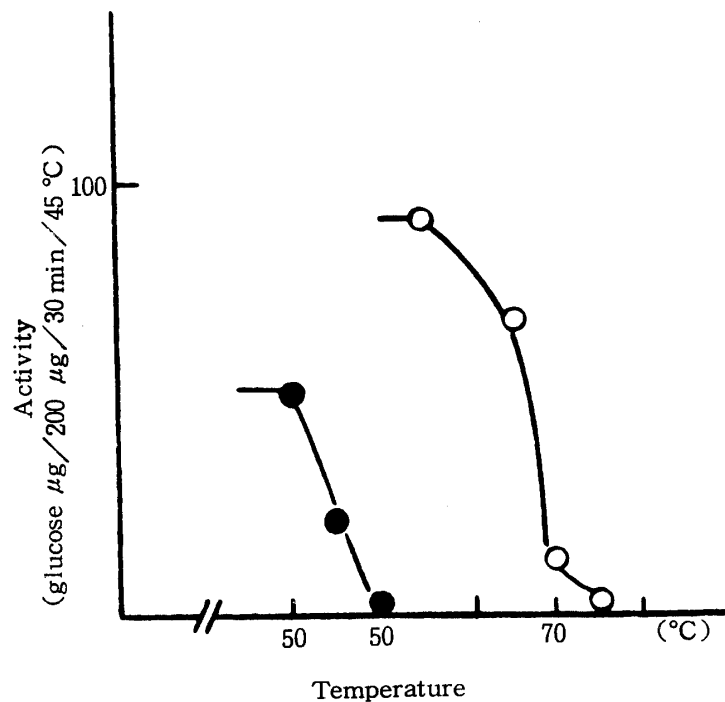


Fig. 8 Heat stability of sugar cane invertase (●—●) used sucrose and (○—○) raffinose as a substrate.

以上では、急激に低くなった。ラフィノースを用いた場合は、その基質に対する水解活性は、55℃で低くなりはじめ、70℃では、殆んどその活性を失っていることがわかった。この結果は、この酵素液には、シュクロースのみに作用する酵素とラフィノースのみに作用する酵素が別々に存在することを示唆しているため次のような実験を行なった。

9. 反応生成物のペーパークロマトグラフィー

この酵素溶液とラフィノース溶液を、上述の方法のとおり加え、45℃で、30～180分間反応させたのち、その溶液を、ペーパークロマトグラフィーにかけた。その結果をFig. 9に示したように、ラフィノースのスポットのほか、ガラクトースとシュクロースのスポットがみられた。フラクトースのスポットもわずかながらみられた。以上の結果は、この酵素液には、シュクロースに作用するβ-フラクトシダーゼとラフィノースに作用するα-ガラクトシダーゼが存在することを示唆している。

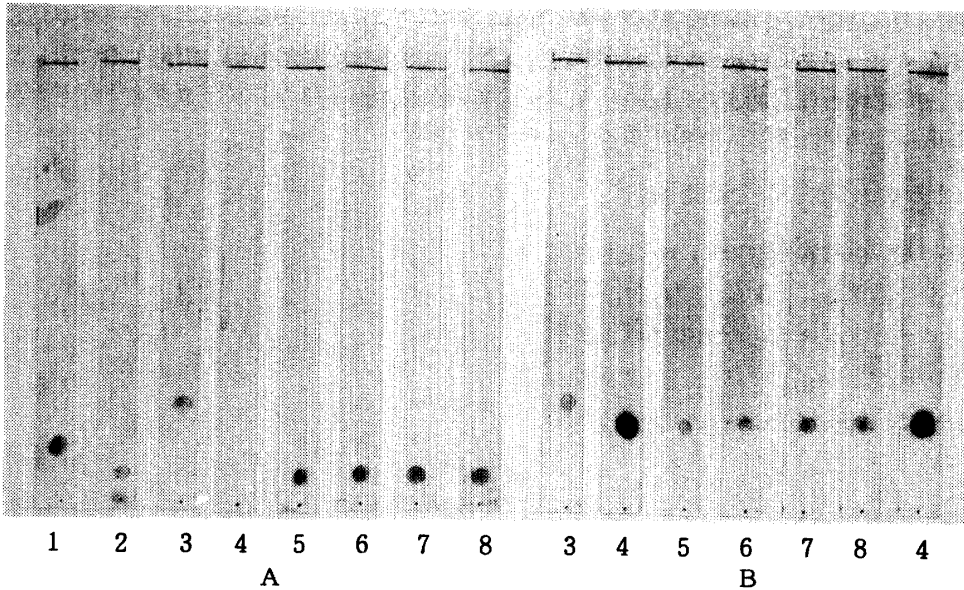


Fig. 9 Paper chromatography of reaction mixtures which was produced by α -galactosidase and raffinose reaction (45°C).

Used butanol-acetic acid-pure water (4:1:5) as a developing solvent.

1, sucrose, 2, raffinose, 3, fructose. 4, galactose.

5, reaction mixture 30min (reaction time)

6, 60 min 7, 90 min, 8, 120 min

A, color producing reagent—2.59% aniline hydrogen phthalate.

B, color producing reagent—0.2% naphthoresorcinol.

10. α -ガラクトシダーゼの至適温度

上述のように、この酵素液には、インベルターゼ以外に、 α -ガラクトシダーゼが存在することから、

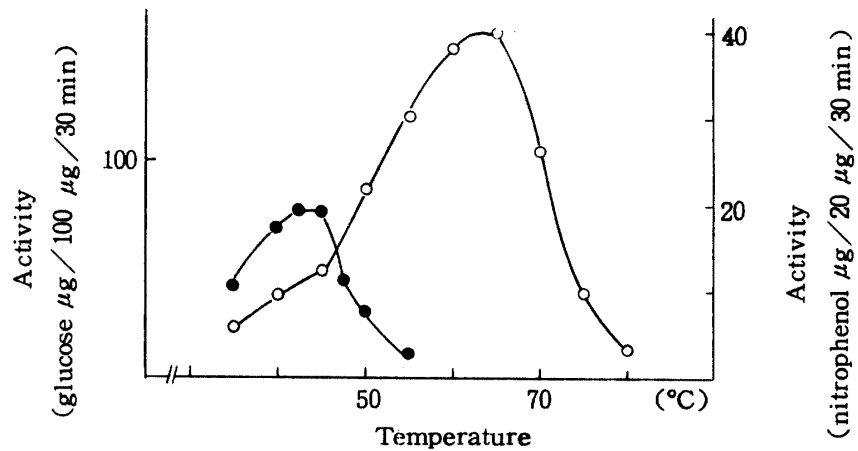


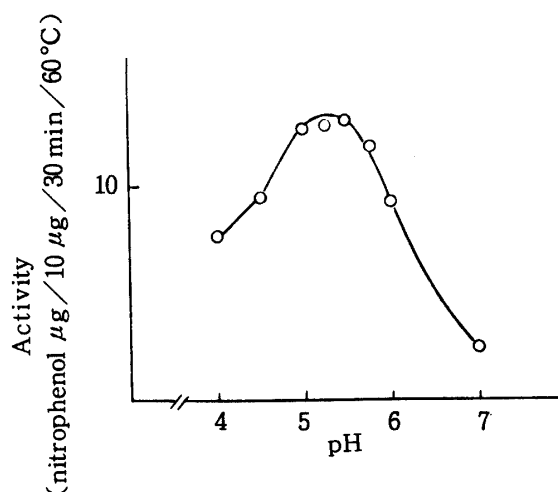
Fig. 10 Relationship of sugar cane invertase activity to reaction temperature. (●—●) used sucrose and (○—○) p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside as a substrate.

p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside 基質として用いて、 α -ガラクトシダーゼの至適温度を調べた。またインベルターゼについても再確認するため、その温度を調べた。Fig. 10に示したように、インベルターゼの場合は、前報と同様に、45°Cで至適温度がみられた。 α -ガラクトシダーゼの場合は、その温度は、高く、60°C付近にあることがわかった。

11. α -ガラクトシダーゼの至適 pH

前項と同じ酵素、基質を用いて、pH 4から7までの反応液を調整し、60°Cで30分間反応を行ない、 α -ガラクトシダーゼの至適 pHを調べた。その結果、Fig. 11に示したように、その至適 pHは、5.5にあり、インベルターゼのその値と一致していた。

Fig. 11 pH dependence of sugar cane α -galactosidase.
Used p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside as a substrate.



12. α -ガラクトシダーゼ活性におよぼすガラクトース濃度の影響

今後この酵素の活性を測定したり、精製したりする際、この酵素に対するガラクトース等の影響を知る必要があるため、前述にしたがって、反応溶液を調製し、この液にガラクトースを 3×10^{-2} M 濃度まで、

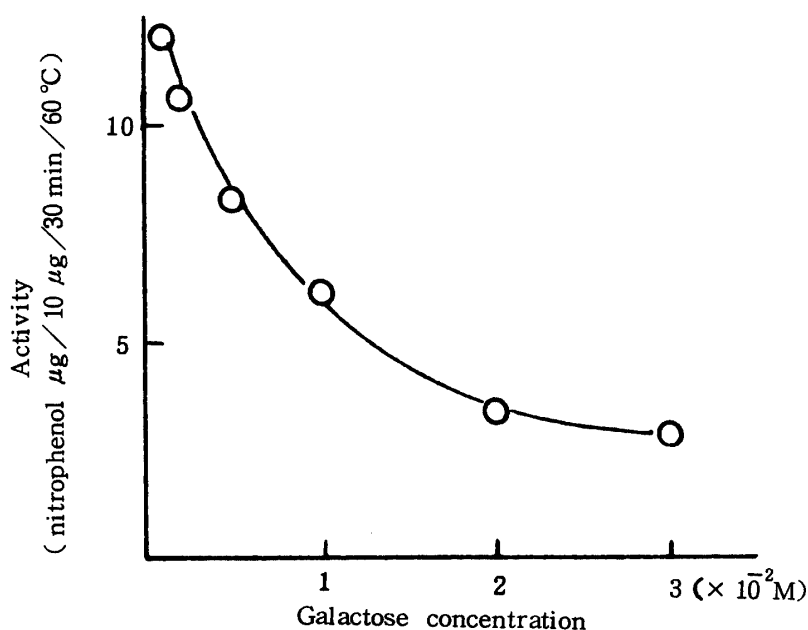


Fig. 12 Relationship of sugar cane α -galactosidase activity to galactose concentration.
Used p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside as a substrate.

種々変えて加え、60°Cで、30分間反応を行い、本酵素活性におよぼすガラクトース濃度の影響を調べた。Fig. 12に示したように、本酵素は、反応液内にガラクトースが存在すると著しく阻害を受け、その濃度が0.01モル存在するとその活性は、約50%にまで減少し、0.02モル以上では、30%以下にまで減少した。またガラクトース存在下での本酵素活性におよぼす至適pHを調べた。この場合、反応液中には、ガラクトースを0.01モル加え、その反応液のpHを4から7まで種々変えて設定し、反応を行なった。その結果をFig. 13に示した。ガラクトースを加えた場

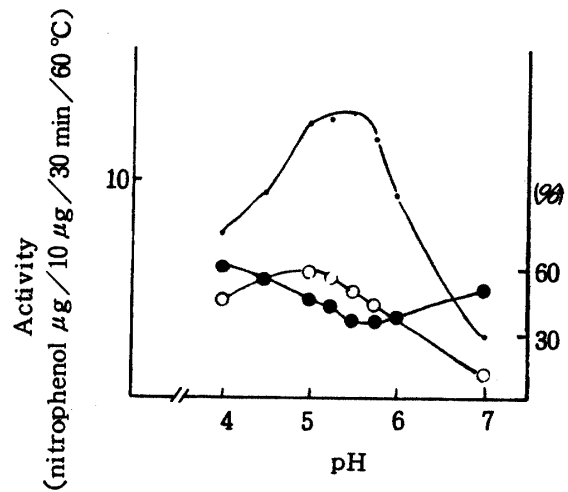


Fig. 13 pH dependence of sugar cane α -galactosidase.

Used *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside as a substrate.

(○—○) α -galactosidase activity

(○—○) α -galactosidase activity in 0.01M galactose.

(●—●) inhibitory effect of galactose.

合、その酵素の至適pHは、5.0になった。ガラクトースを加えなかった場合の活性を100とし、それを加えた場合の活性割合を求めた結果、その値は、pH 5.5で最も低くなり、このpHでこの酵素に対し、ガラクトースは、阻害作用が強いことがわかった。

IV 考 察

M. D. Hatch⁷⁾らは、甘蔗茎酸性インベルターゼと糖度、生育率、温度および水分等との関係を研究し、この酵素が茎の生育に関与していることを示唆している結果が得られている。著者は、同茎のインベルターゼについて、節間ごとに、生育及び糖類濃度との関係を調べた結果この酸性インベルターゼ活性は、糖度が低く、比較的ヘキソースが高い節（完全に生育しきった節間）で高いことから、この酵素は、シュクロースに作用し、その反応生成物のグルコースやフラクトースをエネルギー源等として提供し、茎の生育に寄与していることを示唆し、M. D. Hatchらの結果を支持しているものと思われる。

甘蔗茎汁から、インベルターゼをDEAEセルロースおよびセファデックスG-200カラムクロマトグラフィ等により、最終的に約2,000倍に純化されたが、この分画は、電気泳動的に4つのタンパクバンドが見られた。セファデックスG-200カラムクロマトグラフィーにかけた段階で、活性ピークが2つ見られることから、前報で述べたようにこの酵素は、2つあり、そのため2つのバンドがあらわれたとも考えられる。またこの活性分画は、インベルターゼ活性の外に α -ガラクトシダーゼ活性、 β -グルコシダーゼ活性、 β -ガラクトシダーゼ活性がみられるため、さらに精製し、検討する余地がある。

α -ガラクトシダーゼは、アーモンド、アンズ、ウマゴヤシ、コーヒー種子、麦芽、下面酵母、微生物、カタツムリ等でその存在が知られており、甘蔗茎でのこの酵素の存在の報告は、これまでに見当たらない。またこの酵素活性は、一般的に低いと言われているが、甘蔗茎の場合、精製酵素を用いていることもあるが、その活性定量においては酵素量(20 μ g)が少なくてすむことから、恐らくは甘蔗中で

のその濃度は、インベルターゼよりも高いと予想される。現在その濃度は、測定中である。一方この酵素の基での役割は、糖蓄積過程で、シュクロース等がラフィノースの様に多糖化することを阻止していると思われる。一方この酵素は、ガラクトースと親和性があること、また糖転移作用を有するとも云われていること、またバガスにガラクトースが多いといわれていることから、茎の繊維の形成にも関与しているものではないかと考えられる。

α -ガラクトシダーゼは、その酵素の起源によりその性質が多少異なるが、²⁰⁾ Streptomyces 9917 S₂ の α -ガラクトシダーゼとこの甘蔗茎の酵素とは、至適 pH、至適反応温度でよく似ている。またこの酵素は、ガラクトース、メリビオース、ラフィノース、アラビノース、キシロース等で阻害を受けることが知られているが甘蔗茎の同酵素も、pH 5.5 でガラクトースにより著しく阻害を受けている。他の糖による阻害作用については、現在検討中である。

V 要 約

甘蔗茎インベルターゼ活性は、蔗糖濃度が低く、還元糖量が比較的高く、茎の太さ、長さが十分生育した第4節間で高かった。

甘蔗茎インベルターゼを蔗汁より、60%硫酸飽和沈澱法、DEAEセルロースおよびセファディクス G-200 カラムクロマトグラフィーにより、約 2,000 倍に精製した。この精製分画は、電気泳動的に2つのタンパクバンドがみられた。またこのバンドは、過ヨウ素酸-Schiff 試薬でも染色された。

この精製酵素分画は、シュクロース、ラフィノース、p-Nitrophenyl- α -D-galactopyranoside に対し、強い水解活性が見られた。p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside および p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galactopyranoside に対してもわずかながら水解活性が見られた。

この酵素分画の熱安定性を調べた結果、シュクロースを基質として用いて活性を測定した場合、45°C 以上では、不安定であった。ラフィノースを基質として用いた場合は、55°C 以上で不安定であった。

この分画をラフィノースに反応(45°C, 30分間)させ、この反応液をペーパークロマトグラフィーにかけた結果、ラフィノース、ガラクトース、シュクロースのスポットとフラクトースのスポットがみられた。この酵素分画には、インベルターゼ以外に α -ガラクトシダーゼが存在することを示唆している。

この α -ガラクトシダーゼの至適温度は、60°C であり、至適 pH は、5.5 であった。またこの酵素(20 μ g) は、ガラクトースにより阻害を受け、ガラクトース 0.01M 濃度で 50%、0.02 M 濃度で 30% 以下に酵素活性が低下した。またこの阻害作用は、pH 5.5 で最も強かった。

引 用 文 献

1. 赤堀四郎 1964 蛋白質核酸酵素 12 444
2. 知念 功・江川義和・外間宏一・四方治五郎 1977 甘蔗幹基酸性インベルターゼの研究 琉球大学農学部学術報告 24 217-229
3. Dedonder, R. A., 1961 Glycosidases and transglycosidation Ann. Rev. Biochem. 30 347-82
4. Dixon, M. 1970 in the chemistry of life (Needham, J. ed.) p. 15 Cambridge University Press, Cambridge.
5. Gayler, K. R. and Glasziou K. T. 1972 Regulatary roles for acid and neutral

- invertases in growth and sugar storage *Physiol. Plant* **27** 25~31
6. Hatch M. D. Sacher, J. A. and Glasziou K. T. Sugar accumulation cycle in sugar cane. I. Studies on enzymes of the cycle.
 7. Hatch, M. D. and K. T. Glasziou 1963 Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plants grown in controlled environment *Plant Physiol.* **38** 344~348
 8. Kiel, R. A., Tanzer, T. M. and Woodiel F.N. 1977 Identification, separation and preliminary characterization of invertase and β -galactosidase in *Actinomyces viscosus* *Infect. Immun* **16** 81~87
 9. Matsushita, K. and Uritani, I 1974 *Plant Physiol* **54** 60~66
 10. Metzberg, R. L. 1963 *Arch Biochem. Biophys* **100** 503
 11. 村田孝雄 1973 サツマイモ切片におけるインベルターゼの誘導, *農化* **47** 557~562
 12. 中村紀雄, 新井勇治, 岩波洋造, 1975 花粉の α -糖合成酵素とインベルターゼの性質 *農化* **49** 469~479
 13. Neuman, N. P. and Lampen, J. O. 1967 Purification and properties of yeast invertase *Biochem.* **6** 468~475
 14. Neuberg, C, and Mandle, I, in Sumner, J. B., and Myrback, K, 1950. The enzymes, chap. 14, Academic Press Inc., New York., pp 527~550
 15. Oishi, K. and Aida, K, 1972 Blood group substance-degrading enzymes obtained from *Streptomyces* sp. 1972 *Agr. Biol chem* **36** 578~587
 16. Sacher, J. A., Hatch, M. D. and Glasziou T. Sugar accumulation cycle in sugar cane III. Physiol and metabolic aspects of the cycle in immature storage tissues *Plant, Physiol.* **38** 348~354
 17. 菅原四郎, 増田宏志, 坪田弘之 1965 帯畜大研究報告 **5** 117
 18. Sumner, J. B. and Somers, G. F., 1953 *Chemistry and Methods of Enzymes*, Academic Press Inc., New York, N. Y.
 19. Tsou, K. C. and Helen, C. F. Su 1964 A study of yeast α -galactosidase with naphthyl α -D-galactopyranosides as chromagenic substrates. *Anal, Biochem* **8** 415~423
 20. Walkenfels, K. and Malhatca O. P., 1961 *Advan Chabohydcate, Chem.* **16** 239

Summary

Acid invertase activity of sugar cane was high at the fourth internode from the top of the stalk, which was low in sugar concentration (7% per juice), relatively high in reducing sugar concentration (about 2%), and enough large in the length, and the diameter.

This enzyme was purified from sugar cane juice using ammonium sulfate fractionation, DEAE cellulose, and Sephadex G-200 gel column chromatography with about 2,000 fold increase in specific activity.

This purified enzyme preparation was found to be three bands by disc gel electrophoresis, and glycoprotein by staining the gel with periodic acid-Schiff reagent. The enzyme preparation hydrolysed sucrose, raffinose, p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, p-nitrophenyl-2-aceto-amido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside, and p-nitrophenyl-2-deoxy- β -D-galactopyranoside. Thermal stability of the enzyme preparation was different from the substrates used by enzyme assay, the enzyme was stable at less than 45°C by using sucrose as a substrate, and at less than 55°C by using raffinose. Reaction mixtures (45°C, 30min) of the enzyme preparation and raffinose were found to contain raffinose, galactose, sucrose, and fructose by paper chromatography. These results suggested to be contained α -galactosidase as well as acid invertase in this enzyme preparation.

This α -galactosidase activity was maximum at 60°C and at pH 5.5 by using p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside as a substrate. The activity was inhibited by galactose, and lost 50% at the concentration of 0.01M, and 70% at 0.02M. The inhibition was maximum at pH 5.5.