

ビタミンCに関する研究（第3報）

アスコルビン酸・酸化酵素に就いて⁽¹⁾

近藤研究室

農學士 満田久輝

I. 緒 言

筆者は曩に各種の花及び葉の中のビタミンCを定量した際、其の或花葉のうちには多量のCが存在することを知つた。而して之等の材料よりCを抽出単離することを試みたが、其の操作中にアスコルビン酸・酸化酵素が働いてアスコルビン酸を酸化し更に分解することを知つたのである。

さて此の酵素に就いては既に H. Tauber⁽²⁾, W. Stone⁽³⁾, 及び Srinivasan⁽⁴⁾⁽⁵⁾等の有意義なる研究がある。同氏等は各種の植物質に於けるビタミンC酸化酵素の存在を認め、或は其の単離を試みられたのであるが、又別に E. Barron, De Meio & F. Klemperer 及び⁽⁶⁾ Stotz⁽⁷⁾等は此の酵素の活動に對して銅等の如き金屬の觸媒作用が必要であることを確めて居られる。

筆者は主として蔬菜類から此の酵素の抽出を試み、強力なる酵素を単離して其の特異作用を明かにし、更に此の酵素の應用によつて筆者が採用して居るビタミンC定量法が精確なる實驗値を與へることを證明し、なほ又此の酵素とビタミンCとの耐熱性を利用すれば、蔬菜、果實中のビタミンC保存に對して寄與し得ることを知り得たが故に以下報告する次第である。

II. 實 驗 成 績

(A) アスコルビン酸・酸化酵素の調製

南瓜、綠色蕃椒、小豆モヤシ及び雁來紅のうちにアスコルビン酸・酸化酵素が存在するや否やを豫知する爲に、先づそのうちの還元型及び酸化型のビタミンCを定量して見た。定量するには先づ搾汁して本研究の第1報に記載して置いた通りの方法に従つてCを定量したのである。其の結果を示せば第1表の通りである。

・第 1 表 2~3 物料中のビタミン C 量 (mg %)

品 名	總 ビタミンC量	還 元 型 ビタミンC量	酸 化 型 ビタミンC量	汁液のpH
南 瓜 { 外皮部 内質部	19.30	5.92	13.38	—
	9.14	2.57	6.57	7.58
青 蕃 椒	54.66	0.49	54.17	5.90
小 豆 モ ヤ シ	18.57	0.49	17.08	—
雁 來 紅	215.13	64.35	150.78	—

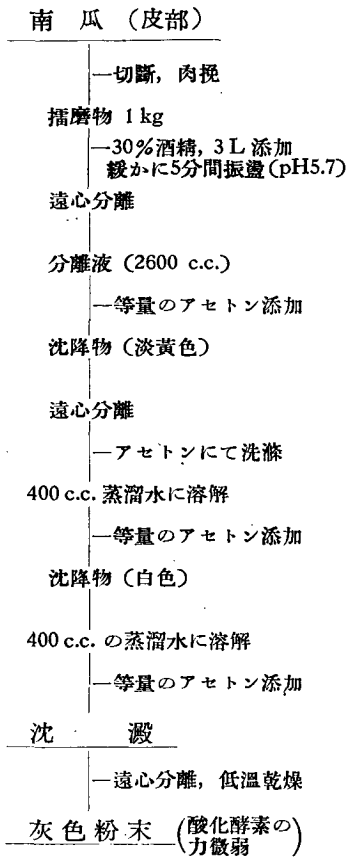
以上の結果によつて特異に思ふことは、外の材料の場合と著しく違つて南瓜の汁液の pH 價が 7.58 を示してアルカリ性を呈することである。又供試材料の何れに於ても還元型ビタミン C 量に比べて酸化型ビタミン C を多量に含有して居る。此の事實から推量すれば、之等の試料中にはアスコルビン酸・酸化酵素が存在する事は想像に難くない。此のことを實證する爲に市販アスコルビン酸液 10 c.c. (2.87 mg のアスコルビン酸を含む) に南瓜汁液 10c.c. (0.135mg の還元型ビタミン C を含む) を作用せしめて第 2 表に示すが如き實驗結果を得たのである。

第 2 表 南瓜の汁液内にアスコルビン酸・酸化酵素の存在

供 試 液	混液 1 c.c. 中の還元型 ビタミン C (mg)		供試液調製後 20 分 に於ける 1 c.c. 中 の酸化型ビタミン C 量 (mg)
	供試液の調製直後	供試液調製後 20 分	
南 瓜 汁 10 c.c. 市販アスコルビン酸液 10 c.c.	0.1502	0.0488	0.1014
蒸 溜 水 10 c.c. 市販アスコルビン酸液 10 c.c.	0.1435	0.1190	0.0245

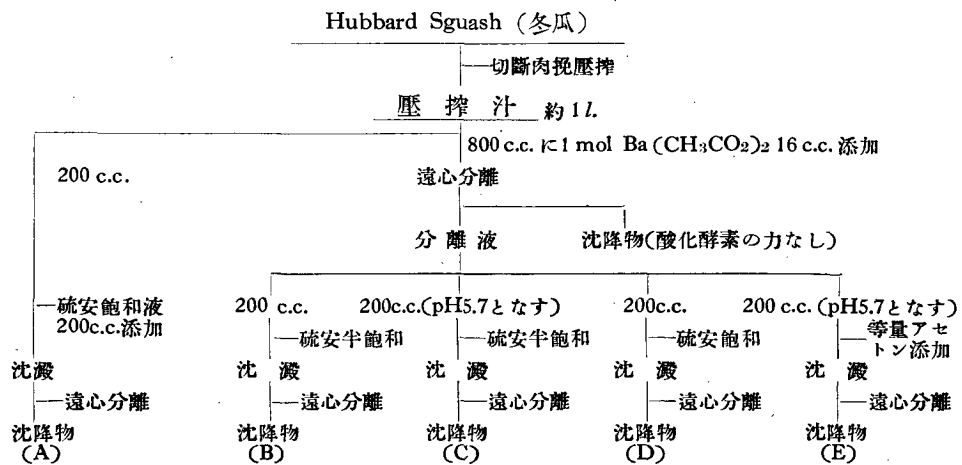
第 2 表によつて推知し得られる通り南瓜の汁液中には相當量のアスコルビン酸・酸化酵素が存在することを知り得るのである。之と同様に蕃椒、小豆モヤシ及び雁來紅のうちにも、此の酸化酵素が存在することを推知し得るのである。そこで H. Tauber⁽²⁾ の方法によつて次に圖示するが如くに南瓜汁から此の酸化酵素の抽出を試みて見た。

第一圖 南瓜汁からアスコルビン酸-酸化酵素の抽出



以上と同様な方法を Paprika 或は Hubbard Squash に應用して酸化酵素の調製を試みたが，製品の力は何れも微弱であつた。斯くの如きは調製中に酒精の使用によつて，アスコルビン酸・酸化酵素の活力が失はれた結果であると思へる。此のことは M. Srinivasan⁽⁴⁾ も認めた所である。依つて筆者は M. Srinivasan 及び Johnson, Zilva⁽⁵⁾ 等の方法に倣つて硫安を用ゐて酸化酵素を調製する方法を試みて見た。其の要領を圖示すれば第二圖の通りである。

第二圖 アスコルビン酸-酸化酵素の調製



以上の沈降物 A, B, C, D, E, を M/15 KH₂PO₄ 50 c.c. に溶解し，その 10 c.c. 宛を採りて

市販アスコルビン酸水溶液 (58 mg %) 10 c.c. に作用せしめ 4 時間後に於て残存せる還元型アスコルビン酸を定量して見た所、第 3 表に示すが如き結果を得た。

第 3 表 調製したアスコルビン酸・酸化酵素の活力試験

第二圖に示した 沈降物の種類	供 試 液		0.001 N 2,6 Dichlor-phenol-indophenol 液 1 c.c. を褪色せしめるに要せし供試液の c.c. 數
	沈降物を M/15 KH_2PO_4 50c.c. に溶解したる液(c.c.)	58 mg% のアスコルビン酸水溶液 (c.c.)	
A	10	10	40
B	10	10	40
C	10	10	40
D	10	10	40
E	10	10	40
對 照	沈降物を含まざる KH_2PO_4 液 10 c.c.	10	0.34

此の結果によれば第二圖に説示した通り、硫酸によつて沈降した A, B, C, D, 及びアセトンによつて沈降した E は何れも相當に強力なるアスコルビン酸・酸化酵素の活力を有することが明かである。

是に於て筆者は南瓜、綠色蕃椒、小豆モヤシ及び雁來紅からも酸化酵素の抽出を試みたが、何れの材料からも強力なるアスコルビン酸・酸化酵素を調製することが出来たのである。但し此の場合には主として Srinivasan 法に倣つて汁液に硫酸を約 5% に相當するだけ加へた時の沈降物を除去し、然る後更に硫酸を加へて約 35% に達せしめたのである。其の時の沈澱を集め、透析後遠心分離して沈降物を酸化酵素として採集したのである。此の沈降物の適量を M/15 KH_2PO_4 15 c.c. に溶解し、37°C に於て 4 時間市販アスコルビン酸液 15 c.c. (1 c.c. 中に 0.8497 mg のアスコルビン酸を含む) に作用せしめた所、アスコルビン酸は完全に酸化型に變化したことを實驗した。然る後この反應液に硫化水素を約 30 分間通じて酸化型を還元型となし、炭酸瓦斯を通じたる後濾過し、還元型の C を定量した結果によれば、最初に用いた供試液中の C が完全に再現して居ることを確め得た。即ちアスコルビン酸・酸化酵素による C の酸化作用は反應の一定時間内では可逆性であることは明かである。

(B) アスコルビン酸・酸化酵素の特異性

上記の實驗によつて明かな通りに筆者が調製した酵素は L-アスコルビン酸を酸化する。然るに自然物料中には L-システイン、グルタチオン、タンニン等の如きが存在することが稀ではない。之等の還元物質に対してもアスコルビン酸・酸化酵素が酸化力を及ぼし得るや否やを檢して見たのである。

即ち L-システインを含むアスコルビン酸液と L-システインを含まざるアスコルビン酸液とに對するアスコルビン酸・酸化酵素の作用結果を検して見たのである。第4表はその結果である。

第4表 アスコルビン酸・酸化酵素の特異性を示す実験
(37°Cにて20分間反應せしめた場合)

實驗番號	反 應 液 の 組 成				反應液 1 c.c. が着色する迄に滴加した 0.001 N Indophenol 液 (c.c.)
	アスコルビン酸を 0.1% と L-システインを 1% 含む液 (c.c.)	アスコルビン酸を 0.1% 含む液 (c.c.)	酸化酵素液 (M/15KH ₂ PO ₄) (c.c.)	酸化酵素を含まざる M/15KH ₂ PO ₄ (c.c.)	
1	5	0	40*	0	1.18
2	0	5	40*	0	0.01
3	5	0	0	40	1.43
4	0	5	0	40	0.1
5	5	0	40*	0	1.19
6	0	5	40*	0	0.01

*印は南瓜より調製した酵素液

≠印は雁來紅より調製した酵素液

第4表の結果によれば、アスコルビン酸・酸化酵素は L-アスコルビン酸をばよく酸化するが L-システインをば酸化しないことは明かである。此の酸化酵素がグルタチオン等に對しても L-システインに對すると同様であるや否やは更に實驗を要することである。けれども此の酸化酵素が L-アスコルビン酸に對して特異的に作用することは上記の實驗によつて推知することが出来ると思ふ。

(C) アスコルビン酸・酸化酵素の應用

(1) ビタミンC 定量法に對する吟味

(a) 還元型ビタミンCを定量する場合：一本研究の第1報に記載して置いた通、筆者は自然物料特に植物質のうちにある還元型ビタミンCを定量する場合には、先づ汁液を採集し其の Ac.c. に 0.5 N 硫酸と 5% メタ磷酸曹達液との等量混合液 Ac.c. と少量の酸性白土（汁液が着色して居る場合）とを加へて室温にて 10 分間放置後、吸引濾過して濾液について 0.001 N 2,6-Dichlorphenolindophenol 液を用ゐて還元力を滴定して還元型ビタミンCを定量するのである。夫故に若し此の濾液中に滴定用の色素を還元する物質が存在すれば、此の物質も亦ビタミンCとして定量せられることとなつて、實驗誤差の原因となるわけである。之を吟味するには前項に於て示した實驗によつて明な通、アスコルビン酸・酸化酵素は還元型ビタミンCのみを酸化するが故に滴定用の濾液に此の酵素を充分に作用せしめたる後 (pH 5.3, 37°C 20分間) 再び色素液にて還元力を検査する時、なほ還元力陽性ならば此の濾液中にはビタミンC

以外の還元性物質が存在するわけであつて定量結果は供試物中の還元性ビタミンCの眞の量を示さないことになるわけである。

然るに筆者は蜜柑の汁液を供試液となし、之に上記の如き處理を行つた濾液から a.c.c. をとつて還元型ビタミンCを滴定し、更に此の濾液 a.c.c. に酸化酵素を作用せしめたる後還元力を色素液にて検査した所、還元力が絶無であつたことを實驗したのである。此の結果によれば蜜柑汁に對しては筆者が採用した定量法によつて還元型ビタミンCを精確に定量し得ることは確である。唯々蜜柑汁のみならず一般の植物質に對しても同様なことが實驗し得られることと思ふ。

(b) 總ビタミンCを定量する場合：一筆者⁹⁾が總ビタミンCを定量する場合にはEmmerie法を藤田氏に従つて改良した方法を用ゐたのである。其の場合醋酸水銀、醋酸鉛等を用ゐて蛋白その他の夾雜物を除去したる濾液を硫化水素にて還元したる後 Indophenol 液にて還元力を滴定して總ビタミンC量を定めるのである。而して多くの植物質を供試料とする場合には此の濾液中にあつて Indophenol を還元する物質は全くビタミンCに限られて居るものやうである。筆者は甘藍について實驗を進め此の濾液に對して酸化酵素を充分に作用せしめた所、濾液中の還元物質 (Indophenol に對し) は全く酸化せられたことを確めて居る。

故に筆者が採用して居る方法を植物質に適用すれば醋酸水銀及び醋酸鉛等によつてビタミンC以外の還元物質 (Indophenol に對し) は全く除去されると認めてよいのである。然れども若し醋酸水銀等を用ゐなければ最後の濾液中にビタミンC以外の還元性物質が存在するのである。此のことを例證する爲に甘藍について次の如き實驗を行つたのである。即ち適量のL-システインを加へたる甘藍汁の一定量に所定の處理を施したる供試液の半量について總ビタミンCを定量した値を“A”とし、又他の半量に對しては酸化酵素を作用せしめたる後ビタミンCを定量した値を“B”とした。但し此の“A”, “B”のうちにはシステインの定量値をビタミンC量に換算したのも含まれて居るわけである。之と同様に上記の甘藍汁を前同量にとり、醋酸水銀、醋酸鉛等を加へることなくして供試液を調製し、(硫化水素にて還元することは行つた) その半量中の總ビタミンCを定量して“A”となし、他の半量に對しては酸化酵素を作用せしめた後ビタミンC量を定量して“B”となした。其の數値を示せば次の通であつて $A < A'$, $B < B'$ であることは醋酸水銀、醋酸鉛等の處理によつてビタミンC以外の還元物質が除去せられることを示すわけである。

A	56.70 mg %
B	6.83 "

A' 74.67 //
B' 23.56 //

以上のうちBは殆どすべてシステインの還元力より算出されたものである。故に $A-B=C$ 又は $A'-B'=C'$ として計算した時C又はC'が總ビタミンCの眞の量になるわけである。その計算値が次に示す如くに $C \doteq C'$ になつたことは上記の如き筆者の推論に誤なきことを證するのである。

$$56.70 \text{ mg \% (A)} - 6.83 \text{ mg \% (B)} = 49.87 \text{ mg \% (C)}$$

$$74.67 \text{ mg \% (A')} - 23.56 \text{ mg \% (B')} = 51.11 \text{ mg \% (C')}$$

而して一般の植物質中の總ビタミンCを定量する場合に筆者が採用した方法を適用すれば $B \doteq 0$ となるのが恒例である。故に供試料が植物質であれば筆者等が採用した方法によつて總ビタミンCを誤り少く定量し得ると思ふ。

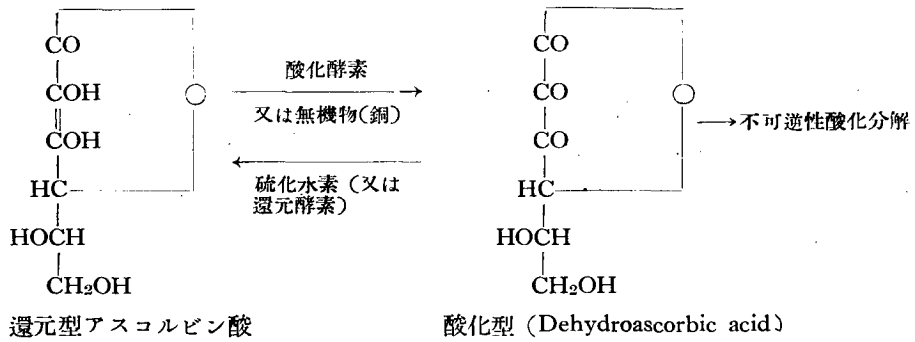
(2) ビタミンCの保存に對するアスコルビン酸・酸化酵素の應用

果實又は蔬菜類中のビタミンCは採集後の日數の経過と共に次第に減少する事は屢々報告せられた事實である。筆者も亦柿及び蜜柑(温州)について此のことを追證して見た。即ち同一果樹上にて成熟した柿果及び蜜柑を夫々30個宛採集し、之を室溫に放置しながら、そのうちの數個を選び、逐日搾汁して還元型のビタミンCを定量して見たのである。その結果を示せば第5表及び第三圖の通である。

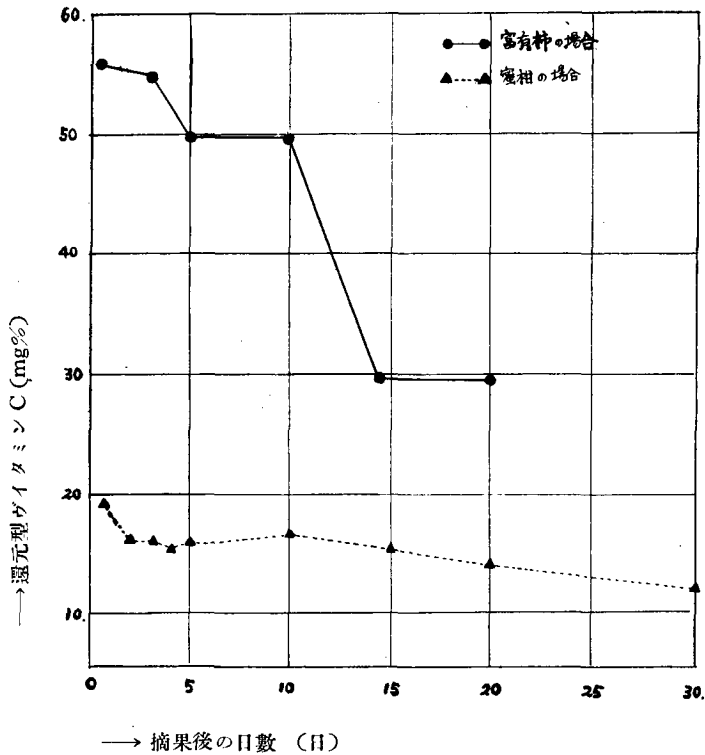
云ふ迄もなく以上の實驗結果によつては嚴密なことは斷言し得ないが、摘果後日數の経過につれて還元型Cが減少することは確な事實である。斯くの如きは主として還元型ビタミンCがアスコルビン酸・酸化酵素によつて酸化型になり、更に不可逆性酸化分解を受ける結果であると考へられる。

第5表 摘果後の日數の経過とビタミンCの減少

柿 (昭和11年11月4日 果摘果)		蜜柑 (昭和11年11月29日 果摘果)	
摘果後の日數	還元型ビタミンC (果汁中の mg%)	摘果後の日數	還元型ビタミンC (果汁中の mg%)
2	56.0	1	19.6
4	55.3	2	16.6
6	49.8	3	16.6
8	44.6	4	16.2
11	44.6	5	16.6
15	29.4	6	16.6
20	29.4	10	17.3
		20	14.4
		30	12.4



第三圖 日數の経過とビタミンCの減少



そこで若し此の酸化分解作用を豫防し得れば果實又は野菜等のビタミンCを保存し得られやうと思へる。而して此の酸化分解に參與するものはアスコルビン酸・酸化酵素が主なるものと考へられるが故に其の作用を破滅せしめることが出来ればビタミンC保存の目的を達成し得るわけである

一般に酸化酵素は熱に對しては極めて不安定であるが故に、先づ加熱によつてアスコルビン酸・酸化酵素の活力の消滅を期して見た。然し此の加熱に對するビタミンCの安定性を豫知すべきであるが故に次の如き實驗を行つて見た。即ち市販アスコルビン酸液及びレモン汁を選び、90°Cの熱水中に浸漬して逐次ビタミンCを定量して見た。その結果は第6表の通りである。

第6表 ビタミンCの熱に對する抵抗性

90°C熱水中の 加温時間 (分)	レモン汁中の還元 型ビタミンC (mg %)	保存率	水溶液中の市販 アスコルビン酸 (mg %)	保存率
0	51.37	100	162.67	100
5	48.80	95	"	100
10	48.80	95	"	100
15	46.48	90	—	—
20	46.48	90	"	100
30	46.48	90	"	100

第6表によつて明な通、還元型ビタミンCは水溶液又はレモン汁にありて90°Cの熱水中にて約30分間加熱せられても損減歩合は極めて僅である。又別に蜜柑汁を採り、其の一半を6分間直火にて加熱して液中の温度を100°Cに達せしめて1分間保ちたる後直に冷却したるものと及び加熱せざる他の一半の兩者につきビタミンCを定量して見た結果は第7表の如くであつてビタミンCは可なりな耐熱性のものであることが明瞭になつた。

第7表 蜜柑汁のビタミンCと耐熱性

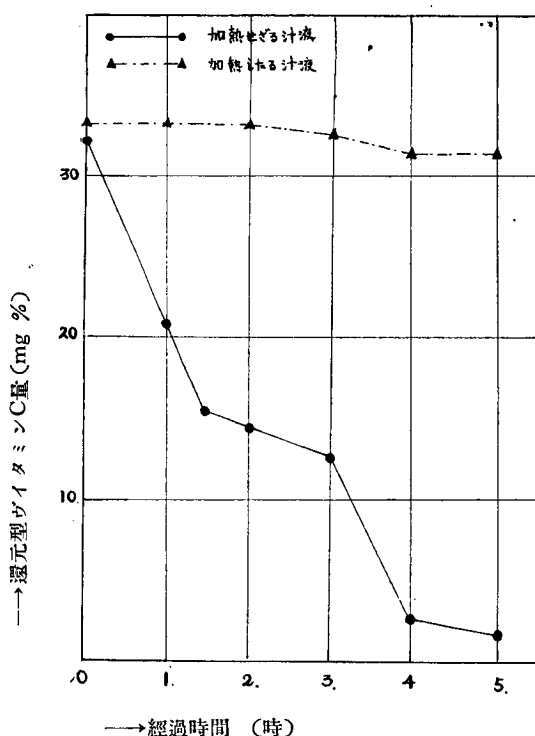
加熱せざる蜜柑汁 (mg %)			加熱したる蜜柑汁 (mg %)		
總ビタミンC	還元型	酸化型	總ビタミンC	還元型	酸化型
41.91	32.53	9.38	41.16	32.00	9.16

然れば上記の程度の加熱によつてアスコルビン酸・酸化酵素の活力を消滅することが出来れば野菜類中のCを安全に保存し得る方法も自ら發案し得られるわけである。此のことを明示する爲に甘藍について次の如き實驗を行つてみた。即ち甘藍汁（ビタミンC及び酸化酵素を多量に含む）を採り、一半については、そのまま室温に放置し、逐時ビタミンCを定量し、他の一半については直火にて5分間加熱し100°Cに熱したる後、1分間放置後直に氷冷したる後室温に放置し逐時ビタミンCを定量して見た。その結果は第8表並に第四圖の通である。

第 8 表 甘藍汁の還元型アスコルビン酸の時間的減量

経過時間 (時)	加熱せざる汁液 (mg %)	加熱したる汁液 (mg %)
0	32.53	33.08
1	20.12	33.08
1.5	15.25	33.08
2	14.25	33.08
3	12.68	32.53
4	2.54	31.48
5	1.91	31.48

第 四 圖 甘藍汁の還元型アスコルビン酸の時間的減量



第 8 表並に第四圖によれば、加熱せざる汁液にありては逐時還元型ビタミンCが急速度に減少するが、一旦急熱放冷したる汁液にありては還元型ビタミンCは殆ど安定である。

斯くの如きは前者にありては酸化酵素の働きによつてビタミンCが酸化して遂には不可逆的に分解することを示し、後者にありては急熱によつてビタミンCは何等損傷を受けないのみならず酸化酵素が死滅する結果としてビタミンCが安定に保存せられることを證明して居るのである。此の結果に徴しても野菜類の乾燥又は貯蔵（罐又は瓶詰など）に際しては急熱操作を施すことがビタミンC保存上極めて重要にして又有意義なることを力説したいと思ふ。

Ⅲ 要 約

- (1) アスコルビン酸・酸化酵素の調製法を吟味し、南瓜、冬瓜、緑色蕃椒、小豆モヤシ、及び雁來紅の汁液に硫安を加へることによつて強力なる酸化酵素を調製し得た。
- (2) 此の酸化酵素は主として還元型ビタミンCを酸化するが、それに随伴し得べきトステインの如き還元性物質を酸化しない所の特異性を有することを證明した。
- (3) 此の酸化酵素の特異性を利用して筆者が採用して居る還元型ビタミンC並に總ビタミンCの定量法を吟味した。その結果として此の兩定量法を植物質に適用する場合にはビタミンCを精確に定量し得ることを證明した。
- (4) 此の酸化酵素は耐熱的に不安定であるが、ビタミンCは之に反して耐熱的に安定であることを明にした。夫故に蔬菜又は果實の乾燥或は貯藏に當りては先づ短時間急熱して酸化酵素の活力を破滅せしめた後、加工すればビタミンCは安定に保存せられ得ることを實驗的に示した。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を賜りし近藤金助教授に深甚の謝意を捧ぐ

Ⅲ 文 獻

- (1) 日本農學大會農藝化學會（昭和13年4月10日）に於て講演
- (2) H. Tauber, I. S. Kleiner & D. Mishkind : J. Biol. Chem. **110**, (1935) 211.
- (3) W. Stone. : Biochem. J. **31**, (1937) 508.
- (4) M. Srinivasan : Biochem. J. **30**, (1937) 2077.
- (5) M. Srinivasan : Biochem. J. **31**, (1936) 1524.
- (6) E. Barron, DeMeio & F. Klemperer : J. Biol. Chem. **112**, (1935-36) 625.
- (7) E. Stotz C. J. Harrer & C.G. King : J. Biol. Chem. **119** (1937) 511.
- (8) S.W. Johnson & S.S. Zilva : Biochem. J. **31**, (1937) 438.
- (9) 満田久輝：日本農藝化學會誌 **14**, (1938) 1228

(昭和13年7月15日)