

Escherichia Coli による Dehydroascorbic Acid の還元

牧 善 輔

Reduction of Dehydroascorbic Acid by Escherichia Coli

ZENSUKE MAKI

緒 言

Escherichia Coli の suspension が dehydroascorbic acid (D.H.A.) を ascorbic acid (A.A.) まで還元し得ると云う事実は、已に Gunsalus,¹⁾ Stewart,²⁾ Mapson,³⁾ Eddy⁴⁾ の氏等によって報告され、そのうち Mapson氏は Esch. Coli によるこの還元は定量的に行われる故に D. H. A. の定量に利用出来ると述べている。著者は食品中の A. A. の定量にあたって Esch. Coli を用いるべく数種の Esch. Coli についてその還元性に就て実験し、併せて D. H. A. を還元するに必要な水素供与体について検討した。

実験方法

Dehydroascorbic acid の調製。市販の結晶 1-ascorbic acid 30 mg. をとって 20 c.c. の再溜水に溶かし一滴のブロームを加えて酸化した後すみやかに空気を通じて過剰のブロームを追い出した液を用いた。但し本液は実験の都度調製した。

緩衝液として M/15 phosphate buffer (PH 6.2) を用い、之も再溜水を以て調製した。

還元力の測定。D. H. A. の Esch. Coli による還元を測定するには 2 個のガラス管を大型の試験管の栓にとりつけその一方は底に達するようにしておき、この試験管に 20 cc. の phosphate buffer solution と 1 cc. の 1M-glucose 或は其の他の substrate を加えて反応液の PH を 6.2 とし 35°C の water bath に入れ、一方の管より窒素

を通じて液中の酸素を追い出した後一定濃度の下記細菌の懸濁液 5 c.c. 及び D. H. A. 1 c.c. を加えて 5 分毎に反応液 5 c.c. をとって 5% メタリン酸 5 c.c. 中に加えて反応を止め、之を 2,6-dichlorophenol indophenol の標準液で滴定して、生じた A. A. の量を測定した。水素を substrate とするときには glucose 溶液の代りに水 1 c.c. を加え窒素の代りに水素ガスを通じた。尚この場合には indophenol 色素による A. A. の定量の他に Roe⁵⁾ 氏の法に従って D. H. A. を定量し、D. H. A. が還元されることを確めた。

細菌の懸濁液の調製。細菌の懸濁液は培養液を遠心分離して菌体を集め、0.25% の食塩水で洗滌した後この菌体を同じく 0.25% の食塩水に濁懸したものをを用いた。

この懸濁液の濃度は光電比色計を用いてフィルター 66 にしてその吸光係数が一定になるように調節した。このようにして得た懸濁液 1 c.c. 中には約 2×10^{10} の菌体を有し、その 5 c.c. をとって water bath 上で乾燥恒量にした後秤量し、食塩の量を減じた所菌体重量は平均 20 mg/5 c.c. であった。

結果及び考察

Dehydroascorbic acid の還元。実験に用いた Esch. Coli は京大醸酵生理学教室より譲り受けたもの 3 種及び当研究室で糞便より分離したもの 4 種計 7 種であって、之等の菌を 0.5% glucose 添加肉汁に 38°C に 18 時間培養して得た菌体について上記の如く D. H. A. の還元力を

測定した結果3種類のみが還元力を有し、中でも菌種 No. 1 が最も強く、hydrogen-donator として水素を通じるときは最初の10分間は殆んど直線状であり、反応液

中の D. H. A. の86%を還元し、15分間では93.5%を還元した。(Table 1)

Table 1. Esch. Coli による D. H. A. の還元

反応時間	菌種 H ₂ -donator	No. 1		No. 2			No. 3	
		glucose	H ₂	glucose	H ₂	H ₂ *	glucose	H ₂
5分		40.0	54.5	38.2	39.8	37.2	13.1	13.1
10分		76.0	86.3	70.0	75.8	73.5	29.2	27.7
15分		91.7	93.5	87.0	89.5	86.4	46.5	41.4
20分		92.7	93.5	89.9	92.1	89.8	62.1	53.8

いずれも還元されて生じた A.A. を%で表した。

H₂-donator に H₂ を用いるときは control として 100°C に10分加熱した菌体の suspension を用いて行ったが、0.5%の還元が認められるのみで時間の経過により変らなかった。

*Roe 氏法によって D.H.A. を定量した。

菌種 No. 2, 3 も多少その力は劣るが D. H. A. 還元性を示した。この3種の菌の糖類の醗酵性その他の性質は次の通りである。尚以後の実験には主として No. 1 の菌を用いた。

Table 2

菌種	No. 1	No. 2	No. 3
glucose の醗酵	+	+	+
sucrose の醗酵	-	-	+
lactose の醗酵	+	+	+
indol の生成	+	+	+
methyl red 試験	桃色	桃色	桃色
V. P. 反応	-	-	+

之等の菌による D. H. A. の還元はいずれも 60°C 1時間の加熱により不活性となり、KCN には阻害されなかった。

培養液の組成及び培養時間による還元力の消長。培養液として肉汁を用い、之に 0.5% glucose, 0.5% lactose 及び 0.5% succinate を添加したものと比較した結果は Table 3. の通りである。(38°C に18時間培養、還元力の測定には H₂-donator として H₂-gas を用いた。)

培養液として 0.5% glucose 添加肉汁を用いて培養時間を変えた結果は次の通りである。(Table 4)

Table 3

時間	glucose	lactose	succinate	肉汁のみ
5分	54.4	19.3	10.1	7.5
10分	86.3	42.7	19.5	13.2
15分	89.2	64.5	29.3	20.5
20分	89.2	80.9	39.8	28.3

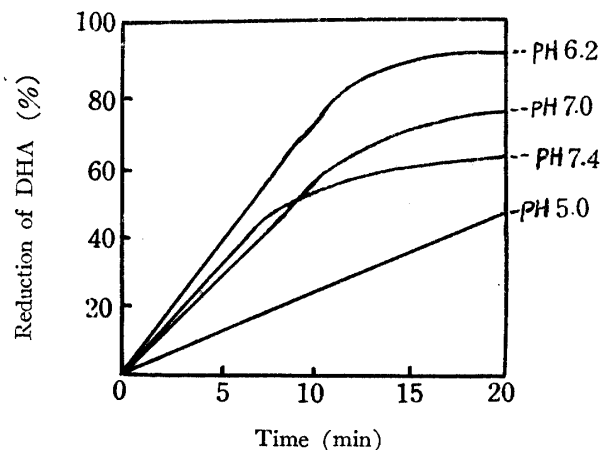
Table 4

反応時間	培養温度		25°C	
	38°C	培養時間	18時間	48時間
5分	54.4	8.3	2.0	30.6
10分	86.3	17.5	2.5	60.1
15分	89.2	24.0	2.8	84.2
20分	89.2	33.0		90.0

このように 0.5% の glucose を添加して 38°C に18時間培養後その菌体を用いるのが最も還元力に富んでいた。D. H. A. の還元における最適 PH について。Stewart 氏等²⁾は PH 6.2 において急速に還元されると報告した。そこで本菌に就て還元力と PH の関係を実験してみた、即ち M/15 phosphate citric acid buffer を用いて PH 5.0 に M/15 phosphate buffer を用いて PH 6.0, 6.2, 6.4, 7.0, 7.4, にして D. H. A. の還元力を測定した結果、

同じく PH 6.2 が最も適しておった。PH が中性或はアルカリ性になると反応の初期に於ては還元力は余り変わらないが、次第に還元速度が低下する。PH 5 では反応速度が非常に小となった。

Fig. 1. 種々の PH における D. H. A. の還元



Hydrogen donator の種類。D. H. A. の A. A. への還元は D. H. A. に水素が添加される事によって行われるのであるから、その為には適当な hydrogen donator が必要である。そこで著者は hydrogen donator として 5 種の糖及び琥珀酸塩、林檎酸塩を用い、反応を行って見た。

但し反応進行中は system 中に窒素を通じて嫌気状態にしておいた。hydrogen donator に水素を用いる場合は窒素の代わりに水素を反応の進行中常に通じるようにした。

尚之と同時に之等を substrate とした場合の methylen blue の脱色に要する時間を測定して dehydrogenase との関係のみた。methylen blue の還元は D. H. A. の還元と全く同じ条件に於て行い、phosphate buffer PH 6.2, 35°C で窒素或は水素を通じ 30 mg/100 c.c. の methylen blue 1 c.c. の脱色に要する時間を測定した。D. H. A. の還元力は 1 時間に乾物量 1 mg の細菌により還元されて生じる A. A. の mg 数で表した。

このようにして glucose, fructose 及び水素瓦斯は他の物質に比較して、hydrogen donator としてすぐれており、又これら物質が methylen blue の脱色に要する時間も又短い。xylose, lactose, sucrose, malate は殆んど D. H. A. を還元せず、従って methylen blue の脱色に要する

Table 5 種々の substrate を hydrogen donator に用いたときの D. H. A. 及び methylen blue の還元

基 質	D.H.A. の還元	M.B. の還元	基 質	D.H.A. の還元	M.B. の還元
glucose	0.46	11分	succinats	0.06	53分
fructose	0.43	11分	malate	0	120分*
sucrose	0.01	110分	H ₂ gas	0.48	17分
xylose	0	100分	blank	0	120分*
lactose	0	120分			

* malate, blank の場合は 120 分で metoylen blue の色調は非常に褐色されたけれども完全に脱色されなかった。

時間も blank の場合と殆んど変わらない事が解かった。然しながら D. H. A. を還元しなかった菌 (No. 4) を用いて、同じように培養し、glucose を hydrogen donator として試みた所 D. H. A. は全く還元されなかったが、methylen blue は 8 分間で脱色された。このことより本菌 (No. 4) による D. H. A. の還元には dehydrogenase 系の他に適当な H₂-carrier が必要であると考えられる。

Table 6. Esch. Coli (No. 2) による D.H.A. 及び methylen blue の還元

基 質	D.H.A. の還元	M.B. の還元	基 質	D.H.A. の還元	M.B. の還元
glucose	0.33	70分	succinate	0.09	16分
fructose	0.44	50分	malate	0.05	70分
sucrose	0.05	19分	blank	0.04	28分
H ₂ gas	0.27	10分			

即ち菌 No. 2 による D. H.A. の還元には、hydrogen donator として fructose, glucose, H₂ gas が適当であり、succinate は之に次ぎ、其の他は blank と殆んど差がない、この点は Table 5 の結果とよく一致する。然しながら methylen blue の還元性は全く異り、blank にても 28 分間で完全に脱色するのに対し glucose, fructose では blank に比しむしろその還元を阻害する結果が得られた。glucose, fructose によるこの阻害の原因は不明であるが、菌体を 0.25% の食塩水で 2 度洗滌しても同様の結果が得られた。

要 約

1. 7種の Esch. Coli についてその D. H. A. の還元性を調べた所3種の菌がその能力を持っていた。
2. glucose 添加肉汁に 38°C 18時間培養した菌体を用いて, PH 6.2 に於て水素を通じ嫌気的狀態にして反応させた所反応液中の D. H. A. を 15分間に 93.5%還元することが出来た。
3. Hydrogen donator としては菌種によって差があるが, 水素, glucoseが最も適しておる。Esch. Coliは Succinic acid dehydrogenase を含む故に, succinate も hydrogen donator となり得るが, その還元力は余り強くない。
4. 菌種によっては glucose を substrate とした場合は methylen blue は還元しても, D. H. A. を還元しないものもあり, 又 D. H. A. に対しては還元性を示すけれども methylen blue に対しては殆んどこれを現わさないでむしろ glucose の添加により blank のとき

の methylen blue の還元性が阻害されるものもある。

この実験を行うについて京大醱酵生理学教室より Esch. Coli をわけていただいたことに対し厚く感謝の意を表し, ご校閲を賜った京都大学藤村吉之助教授に深謝する。

文 献

- 1) Gunsalus, D. E., Stickland, L. H., Tarr, H. L. A., J. Biol. Chem., **141**, 853 (1941).
- 2) Stewart, A. P., Sharp P. E., Industr. Eng. Chem., **17**, 373 (1945).
- 3) Mapsen, L. W., Ingram, M., Biochem. J., **48**, 551 (1951).
- 4) Eddy, B. P., Biochem. J., **50**, 601 (1952).
- 5) Eddy, B. P., Ingram, M., Mapson, L. W., Biochem. J., **51**, 375 (1952).
- 6) Roe, J. H., Mills, M. B., J. Biol. Chem., **174**, 201 (1948).

(1954年12月受理)