

植物組織抽出液による Dehydroascorbic Acid の還元

牧 善 輔

Reduction of Dehydroascorbic Acid by Plant Tissue Extracts

ZENSUKE MAKI

緒 言

植物組織殊に豌豆, Cauliflower 等の抽出液により, glutathione の存在する所で dehydroascorbic acid(D.H.A) が還元されて ascorbic acid(A.A.)になると云うことは, 已に Crook¹⁾, Yamaguchi²⁾ 氏等により報告されており, 更に Mapson 氏は同じく豌豆の抽出液によって酸化型の glutathione (GSSG) が還元されて glutathione (GSH) になると述べている。著者は先に Escherichia coli の菌体を用いて, D. H. A. の還元における水素供与体について報告したが³⁾, 今回は之と比較する為に, 大豆, 豌豆の種実並びに数種の植物の抽出液を用いて, D. H. A. の還元力を実験した。

実験方法

Dehydroascorbic acid の調製。市販の結晶 l- ascorbic acid 15mg. をとって 10cc. 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。

Glutathione キリンビール会社製の精製 glutathione を用い実験の都度秤量し水溶液として用いた。酸化型 glutathione は G. S. H. の水溶液に当量のブローム水溶液を加えて酸化し過剰のブロームはすみやかに空気を通じて追出し, 又酸化が不十分な時は更に空気酸化を行った後沃度酸カリで滴定して glutathione の完全に酸化され

ていることを確めた。

還元力の測定。D. H. A. の植物組織抽出液による還元を測定するには前報⁴⁾と同様の大型試験管を用い, 之に抽出液 2.5~10cc. 及び G. S. H. 9mg. を加え M/15 phosphate buffer (pH 6.2) を加えて 58cc. となし 25° C の water bath 中に浸漬し 5 分間窒素ガスを通じて液中の酸素を追い出し, 引きつづき窒素ガスを通じながら D. H. A. 2cc. (3mg.) を加えて, その直後より 5 分毎に反応液 5 或は 10cc. をとり, 5%メタ磷酸 5 或は 10cc. 中に加えて反応を止め, この液を遠心分離して得た上澄液を用いて, A. A. の量及び KIO₃ に対する還元力を次の様にして測定した。即ちこの液を一定量の標準 dichlorophenol indophenol 液に対して滴定し, その還元力より A. A. の量を計算し, 次にこの液 5cc. に沃度加里を加え N/1000 KIO₃ 溶液を用いて滴定し, A. A. 及び G. S. H. による還元力の和を測定した。之の値より先に測定した A. A. による KIO₃ の消費量を引いた値は G. S. H. により還元されたものと考えられる。植物組織より酵素の抽出に当っては一定量の植物組織を乳鉢で十分に破碎し, 之に 4~9 倍量の M/15 phosphate buffer (pH 6.2) を加え攪拌抽出後遠心沈澱した上澄液を用いた。かくして得た抽出液中の酵素力は大豆抽出液の場合温度 6° C の冷蔵庫に貯蔵中著しく活度が低下した。即ち抽出直後の活度を 100 とすれば 24 時間後 94%, 96 時間後 62%, 5 日後には僅かに 24% に減少したので, 酵素液調製後はすみやかに冷却し, 同一の酵素液を用いる実験は 2 日にわ

たらないようにして、新たに同じ条件で抽出した酵素液を用いた。

結果及び考察

浸水大豆抽出液による D. H. A. の還元。大豆種実を室温に 16 時間浸水した後、乾燥生大豆に対し、10 倍の M/15 磷酸緩衝液 (pH 6.2) による抽出液を用いた場合の実験結果は Table 1 及び Fig. 1 の如くであって Substrate に比し酵素液の量が比較的少ない場合は始めから 5~10 分は略々時間に比例して A. A. が生じるから、最初の 5 分間に生じた A. A. の量を以て抽出液の酵素力を表示するものと考えて差支えない。それ故に各抽出液の酵素活度の比較には此の値を用いることにした。KIO₃ の滴定値より計算すると、酵素液 5cc. 及び 2.5cc. を用いた場合で反応後 30 分に於て残存する G. S. H. は夫々 0.87 mg. 1.33mg. であった。0 分時に於ける A. A. は酵素液中に存在する A. A. の為により多少異った値を示している。D.

Fig. 1 浸水大豆抽出液による D. H. A. の還元

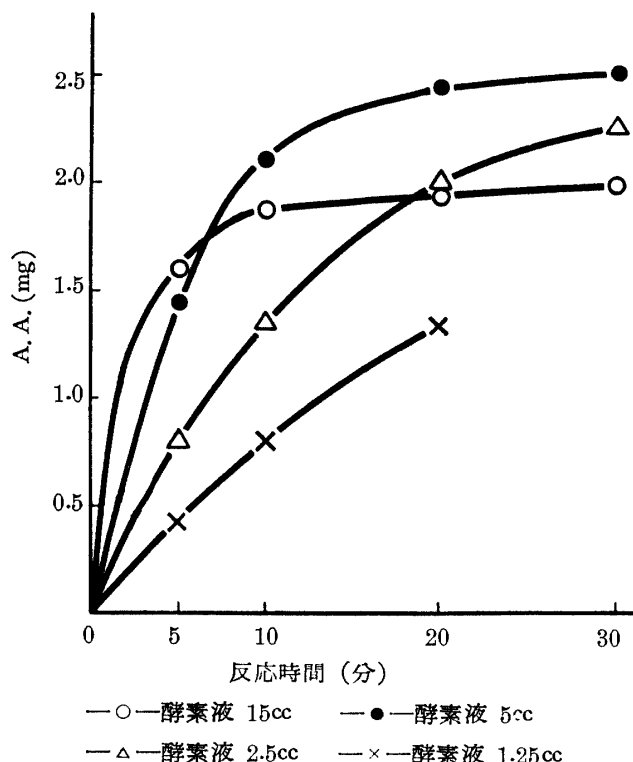


Table 1 浸水大豆抽出液による D. H. A. の還元

酵素量 反応時間	15cc(1.5g)	5cc(0.5g)		2.5cc(0.25g)		1.25cc(0.125g)	0 *	
	A. A. mg	A. A. mg	KIO ₃ cc	A. A. mg	KIO ₃ cc	A. A. mg	A. A. mg	KIO ₃ cc
0 分	1.05	0.36	1.54	0.25	1.47	0.18	0.0	1.24
5 分	2.66	1.82	1.53	1.05	1.43	0.60	0.0	1.24
10 分	2.92	2.46	1.50	1.62	1.40	0.99	0.0	1.26
20 分	3.00	2.82	1.48	2.24	1.39	1.53	0.0	1.25
30 分	3.07	2.89	1.49	2.53	1.38			

A. A. mg. は反応液 60cc 中に存在する A. A. の mg であり、KIO₃ は反応液に等量のメタ磷酸 5% 液を加えた液 5 cc に KI を加え N/1000 KIO₃ による滴定値である。* は酵素液を加えない場合である。

H. A. 及び G. S. H. のみを加え、酵素液を加えないで窒素を通じ純化学的反應による D. H. A. の還元を測定したが、ここに用いた pH 6.2 の buffer 中では全く D. H. A. は還元されなかった。D. H. A. 及び酵素液を加え、G. S. H. を加えないときは D. H. A. は僅かではあるが還元される。之は酵素抽出液中に多少の G. S. H. が含まれているためと考えられる。

青豌豆抽出液による D. H. A. の還元。青豌豆 5 倍抽出液 15cc. (豌豆として 3g) を反応液に加えて D. H. A. の還元をみた結果は Table 2 である。始めの 10 分間は略々直線的に反応している。この酵素液を 100°C に 10 分間

Table 2

酵素液 反応時間	15 cc(3g)		100°C 10 分加熱	
	A. A. mg	KIO ₃ cc	A. A. mg	KIO ₃ cc
0 分	0.31	1.62	0.49	1.83
5 分	1.20	1.62	0.48	1.85
10 分	2.06	1.64	0.49	1.87
20 分	3.88	1.71	0.51	1.88
30 分	4.08	1.82	0.56	1.88

A. A. mg. は反応液 60cc 中に存在する A. A. mg 数である。

加熱して同様の実験を行った結果 A. A. 及び KIO₃ 滴定

値は殆んど変化しなかった。Table 1, 2 を比較すると大豆に於ては KIO_3 滴定値が殆んど変わらずむしろ減少しており、D. H. A. の還元は $D. H. A. + 2 G. S. H. \rightarrow A. A. + G. S. S. G.$ の関係によって行われるのであって、D. H. A. 及び G. S. H. の還元力の総和は変わらない為であると考えられる。

豌豆では僅かではあるが KIO_3 滴定値が増加しており、酸化されて生じた G. S. S. G. が再び還元されるものと考えられるので之を確める為に次の実験を行った。

酸化型 glutathione の還元。 phosphate buffer (pH6.2) に G. S. S. G. 及び酵素液を加え窒素ガスを通じて先の実験と同様の条件で5分間毎に反応液 5cc. 或は 10cc. をとり、之を等量の5%メタ磷酸液に加えて反応を止め、この液 5cc. に対する KIO_3 の滴定値並びに indophenol 色素法による A. A. の定量値を算出して Table 3 の結果を得た。豌豆に G. S. S. G. を還元して G. S. H. を生ずる

Table 3

反応時間	酵素液 豌豆 15cc		大豆 15cc	
	A. A. mg	KIO_3	A. A. mg	KIO_3
0 分	0.06	0.06	0.06	0.11
10 分	0.12	0.24	0.06	0.13
20 分	0.26	0.37	0.06	0.15
40 分	0.61	0.65	0.06	0.19
60 分	0.96	0.81	0.06	0.26

酵素が存在することは Mapson 氏も述べているが、A. A. mg. は反応液 60cc 中に存在する A. A. の mg 数である。この実験によっても明かに G. S. S. G. が還元される。 KIO_3 の滴定値が増加するのみならず、indophenol 法により定量した A. A. の量も増加するのは G. S. S. G. が還元されて生じた G. S. H. により酵素液中の D. H. A. が還元されるためである。一方大豆では D. H. A. を還元する酵素は豌豆に比し強かったのに対し G. S. S. G. は殆んど還元されない。

窒素ガスの代わりに水素ガスを通じて反応を行った場合。E. coli の菌体を用いて D. H. A. の還元を行ったときは水素ガスが H-donator となり他に H-donator を加えなくてもよく D. H. A. の還元が行われたが、大豆抽出液では H-donator として G. S. H. が必要であり水素では

その代りをなし得ない。然しながら、G. S. H. を加えれば窒素の場合と略同様の強さの還元作用が見られた。D. H. A. と G. S. H. のみによる純化学的な反応は水素ガスのときと同様 pH6.2 では全く D. H. A. を還元しなかった。(Table 4)

Table 4

	G.S.H. を加えない		G.S.H. を加える	
	窒素	水素	窒素	水素
0 分	0.07	0.07	0.12	0.10
5 分	0.24	0.09	0.60	0.58
10 分	0.32	0.14	0.97	0.93
15 分	0.39	0.18	1.26	1.22
20 分	0.47	0.25	1.45	1.41

還元された AAmg 数であり酵素液は G. S. H. を加えないときは大豆抽出液 15cc を G. S. H. と加えたときは 1.25cc を用いた。

大豆の発芽による酵素力の変化。 昨年収穫の大豆 (平均の一粒重 0.27g) を水洗後 0.1%昇汞水で洗い更に蒸留水で洗滌して一夜蒸留水に浸漬し、翌朝充分に水を切り、水を含ませた濾紙上に掛けて室温で発芽させて、発芽による酵素力の変化をみた結果 Table 5 の如くである。乾燥生大豆では酵素力は余り強くないが、浸水することにより急に活度を増し、発芽 2 日目位より再び減少する。乾物量に対する酵素力を比較すると、一夜浸水することにより乾燥生大豆の約 10 倍に増加している。

Table 5

	酵素力	乾物量%	乾物 1g につき
生大豆	0.26	76.6	0.34
浸水後	1.35	41.6	3.2
発芽 1日目	0.90	37.1	2.4
2日目	0.25	37.2	0.67
3日目	0.13	35.9	0.36
4日目	0.13	31.4	0.41
6日目	0.11	26.9	0.41

酵素力は組織 1g 当り 5 分間に還元する A. A. の mg 数で表す。

大豆種子成熟期に於ける酵素力の変化。 7月21日平均一粒重量 0.12g の頃より充分に成熟し多少黄色を帯びた 8月23日迄酵素力は余り大きな変化はなかったが、完熟した乾燥大豆粒では可成り酵素力が減少する。然しな

がら一年を経過した貯蔵大豆粒に比較すると約 3.5 倍の酵素力を有している。(Table 6)

Table 6

採取日	平均重 g	酵素力	乾物量%	乾物 1g につき
7月21日	0.12	0.99	20.5	4.83
7月25日	0.34	1.13	20.0	5.65
8月1日	0.51	1.07	27.0	3.96
8月5日	0.67	1.17	30.4	3.67
8月11日	0.55	1.55	34.2	4.53
8月23日	0.73	1.15	34.3	3.35
完熟大豆	0.31	0.96	77.0	1.24

酵素力は組織 1g 当り 5 分間に還元する A. A. の mg で表す。

各種植物組織抽出液の D. H. A. 還元酵素力。手に入り易い数種の植物組織を用いて同様な方法によりその D. H. A. 還元酵素力を測定した結果が Table 7 であるが、この他に、ささげの種実及び莢、人参の根、柿の果

Table 7 植物組織抽出液の D. H. A. 還元酵素力

	酵素力	乾物量%	乾物 1g に対し
青大豆実	1.17	30.4	3.67
葉	0.04	42.6	0.09
青えんどう実	0.29	32.0	0.90
さやいんげん実	0.18	14.2	1.26
とうがらし実	0.13	7.0	1.85
葉	0.08	17.9	0.44
大根根	0.02	6.2	0.32
葉	0.03	8.8	0.34
きり実	0.02	4.3	0.46
南瓜実	0.01	16.5	0.06
はくさい	0.10	3.4	2.94
きゃべつ	0.11	6.0	1.83
みつば	0.02	4.0	0.50

酵素力は組織 1g. 当り 5 分間に還元する A. A. の mg 数で表す。

実及び葉、桃、とまとの果実ねぎの葉について測定したが全く D. H. A. 還元酵素は存在しなかった。一般に果実類は少く、柿の様に多量の A. A. を含むものでも還元酵素は認められない。豆科の植物の種実には強いが、ささげの種実及び莢には無かった。はくさい、きゃべつの葉には強い酵素がみられるがみつばの葉、大根及び柿の葉には殆んど存在しなかった。尚ねぎの葉の抽出液を反応液に加えると急速に G. S. H. が酸化された。

要 約

1. 浸水大豆等の植物組織抽出液を用い pH 6.2 に於て G. S. H. を H-donor として嫌氣的条件に於て D. H. A. を還元することが出来る。
2. 大豆抽出液による D. H. A. の還元の際に反応が進行しても G. S. H. 及び A. A. の還元力の総和は変わらないが、豌豆では還元力の総和が時間と共に次第に増加することが認められる。之は G. S. S. G. が再び還元される為である。
3. 乾燥生大豆を浸水すると急に還元酵素力は増加し、発芽により再び減少してゆく。

文 献

- 1) Crook, E. M., Morgan, E. J., Biochem. J., 38, 10 (1944)
- 2) Yamaguchi, M., Joslyn, M. A., Plant physiol., 28, 757 (1951)
- 3) Mapson, L. W., Biochem. J., 49, 592 (1951)
- 4) 牧 善 輔 西京大学術報告2, 65 (1955)

(1955年10月受理)