

## イチゴ汁中のアスコルビン酸酸化酵素 阻害物質について

### Natural Inhibitor for Ascorbic Acid Oxidase Contained in Strawberry Juice<sup>1)</sup>

稲垣長典・福場博保・松下アヤ子\*

(Chôten Inagaki, Hiroyasu Fukuba, and Ayako Matsushita)  
Laboratory of Nutrition-Chemistry, Faculty of Home Economics,  
Ochanomizu University, Tokyo

#### Résumé

We have reported the presence of the natural inhibitor in tomato juice for the cucumber ascorbic acid oxidase and also we have assumed that this inhibitor was volatile organic compounds. Pursueing further researches on the same inhibitors, we could find that strawberry juice also had this inhibiting action for the ascorbic acid oxidase, while the characters of this inhibitor were completely different from those of former.

The inhibiting substances did not dissolve in ethyl ether or chloroform when the strawberry juice was shaken with these solvents, and was adsorbed into anion exchange resin (Amberlite IRA-411) and eluted with 50% ethyl alcohol. The inhibiting activity was not destroyed even after this alcohol eluate was burnt to ashes.

Seven anions were found in the ash, namely:  $\text{BO}_3^{--}$ ,  $\text{PO}_4^{--}$ ,  $\text{CrO}_4^{--}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$ ,  $\text{CO}_3^{--}$ ,  $\text{Cl}^-$ , and  $\text{NO}_2^-$ , and especially the reaction with  $\text{CrO}_4^{--}$  was distinctly recognized.

Even adding one ml of M/100,000 solution of  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  to the reaction media composed of 0.5 ml of cucumber ascorbic acid oxidase, 0.5 ml of N/10 ascorbic acid solution (pH adjusted to 5.6 with NaOH), and 1.0 ml of citrate-phosphate buffer (pH 5.6), the oxygen absorption by this enzyme was greatly inhibited, and so it is assumed that the  $\text{CrO}_4$  ion is one of those which are concerned in this inhibiting action of strawberry juice.

Judging from the inhibiting action of the ash solution obtained from the strawberry juice and also  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  solution on the oxidative action of  $\text{CuSO}_4$  for the ascorbic acid, it is assumed that this inhibition was not performed by the combination of this anion with apo-enzyme, but with prothetic group of the enzyme.

<sup>1)</sup> Contribution from Department of Food & Nutrition, Faculty of Home Economics, Ochanomizu University, No. 5

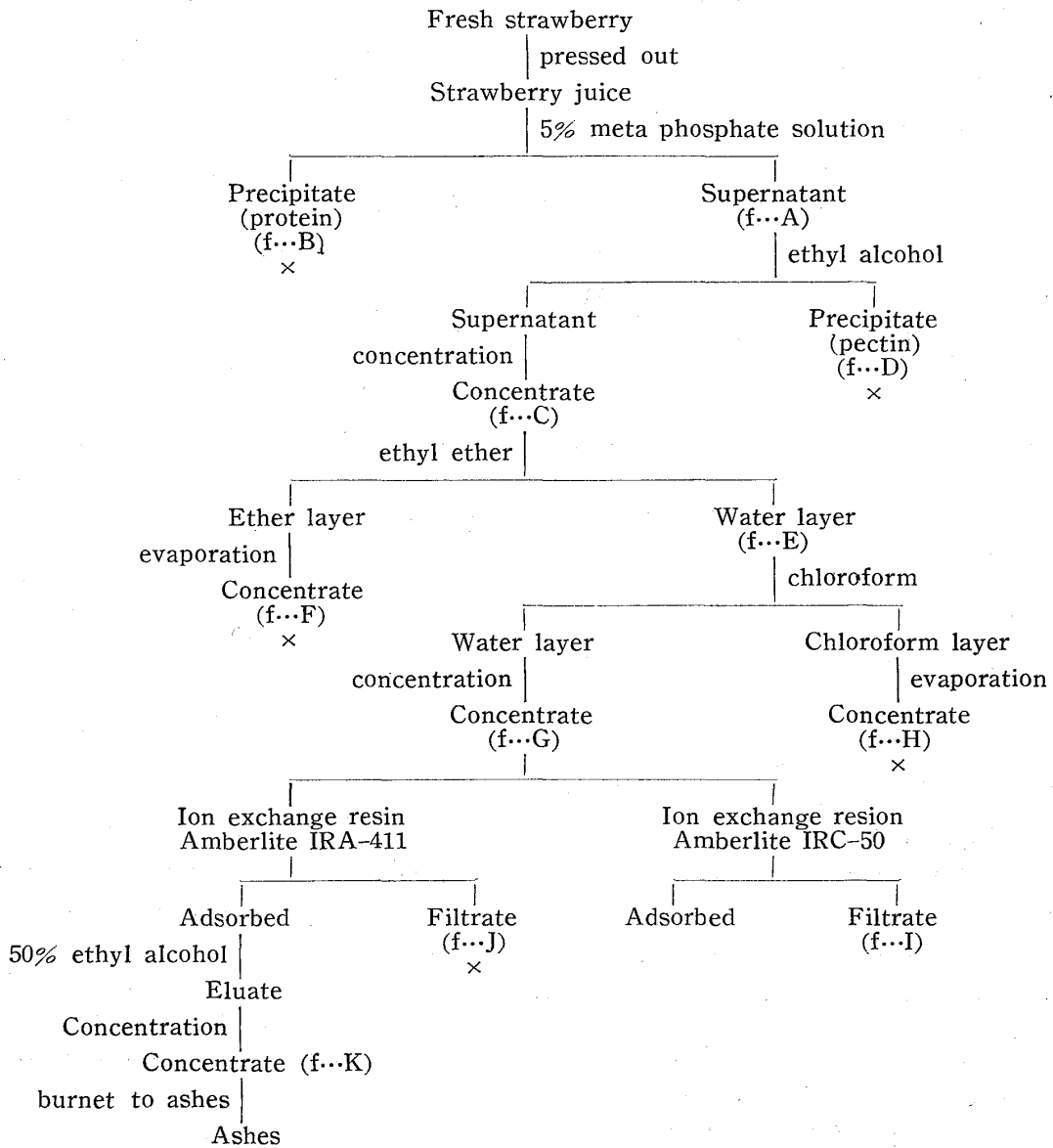
\* 熊本女子大学講師 (内地留学生)

緒 言

C. R. Dauson<sup>(1)</sup>等はアスコルビン酸酸化酵素に対する阻害剤として cyanide, sulfide, potassium ethylxanthate, 及び carbon monoxide を挙げ, また Somogi<sup>(2)</sup>等は種類の植物及び人乳中にこの酵素の作用力を阻害する物質の存在することを報告している。しかし我々はこの後者の報告についてはその詳細を知る機会に恵まれていない。最近我々は<sup>(3)</sup>トマト汁中にアスコルビン酸酸化酵素を強力に阻害する物質の存在することを報告し, このものが低分子の揮発性物質であることを明にした。このような阻害物質が他の果菜類に存在するか否かを実験したところ, イチゴ汁中にも胡瓜中のアスコルビン酸酸化酵素を強力に阻害する物質の存在することを確認し, この阻害物質の性質がトマトの場合と異なるものであることを認めたのでここに報告する。

実 験 方 法

Table 1. Fractionation of Strawberry Juice



## 1. 供試材料

実験に用いた胡瓜及びイチゴは市販品で、4月下旬より7月初旬までの新鮮な品を選んで使用した。

## 2. 試料の調製法

実験に使用した胡瓜汁、イチゴ汁、イチゴ汁濃縮汁、イチゴ汁透析液、イチゴ汁水蒸気蒸溜溜出液等は前報に記載した方法あるいは前法に準じた方法によって調製した。

またイチゴ汁を第1表の方法により、フラクション A ( $f-A$ ) よりフラクション K ( $f-K$ ) に分け、各フラクションの阻害作用を測定した。また、吸着に使用したイオン交換樹脂アンバライト IRA-411. 及び IRC-50 は各使用前 8%NaOH 液または 1%  $H_2SO_4$  液にて洗滌し活性化した後、蒸溜水にて洗滌後使用した。

## 3. 緩衝液

McIlvaine のクエン酸、リン酸緩衝液 pH 5.6 を使用した。

## 4. アスコルビン酸液

$N/10$  アスコルビン酸液を用いた。なお調製に当っては、アスコルビン酸を上記緩衝液に溶解した後  $N/2$  の NaOH 液を計算量加えて pH を 5.6 に補正し使用した。

## 5. 測定法

ワールブルグの検圧計を用い、 $30^\circ C$  の恒温水槽中で酸素の吸収量を測定した。

## 実験結果

## 1. イチゴ生汁による阻害

第2表の組成にて反応液を組み、酸素吸収を測定した結果、第1図の図形が得られ、イチゴ汁中には胡瓜のアスコルビン酸酸化酵素に対する阻害物質の存在している事が推定できる。

Table 2. Composition of the reaction media. (Temperature for reaction:  $30^\circ C$ .)

	1	2	3	4	5
$N/10$ Ascorbic acid (pH adjusted to 5.6)	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
Strawberry juice	...	0.5	1.0	1.5	...
Cucumber juice	0.5	0.5	0.5	0.5	...
Buffer	1.5	1.0	0.5	...	2.0

## 2. イチゴ濃縮液、透析液による阻害

前報にて報告したと同様にして濃縮液を調製し、また、イチゴ汁を約60時間室温にて蒸溜水を用いて透析した時の透析内液、及びセロファン袋の内部に生じた沈澱物を更に緩衝液に溶解した液について、その阻害力の変化を測定した。なお、反応液としては  $N/10$  アスコルビン酸液 0.5 ml. 胡瓜汁 0.5 ml. 緩衝液 0.5 ml. 及び生イチゴ汁または各種処理イチゴ汁1.0 ml. の組成のものを使用した。

実験結果を第2図に示す。本実験により本阻害性物質が濃縮操作によってその作用力を失うことなく濃縮されうるものであることが知られる。

## 3. イチゴ汁水蒸気蒸溜溜出液による反応

トマト汁中のアスコルビン酸酸化酵素阻害物質は、水蒸気蒸溜によって捕集することができた、イチゴ汁の場合には、実験2によって、濃縮操作によって作用力を高め得ることが知られたが、更にトマト汁同様に揮発性物質による阻害がみられるか否かを知るために水蒸気蒸溜物 1.0 ml. を前述の実験と同様組成の反応液に添加し、その作用をしらべた。その結果は第3図に示すところであるが、このような揮発性阻害物質を認めることはできなかった。

#### 4. イチゴ汁各フラクションの阻害力測定

第1表に示す方法によって、f-A より f-K までの11のフラクションに分け各フラクションについてその阻害力の変化について測定を行った。本測定においては、各フラク

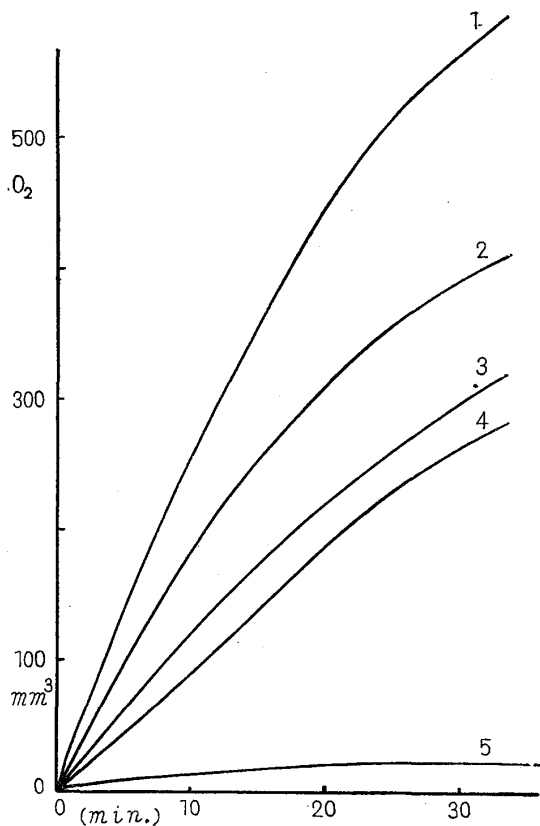


Fig. 1. Inhibition of the cucumber ascorbic acid oxidase action by the addition of strawberry juice. (Conditions for reaction were cited in Table 2)

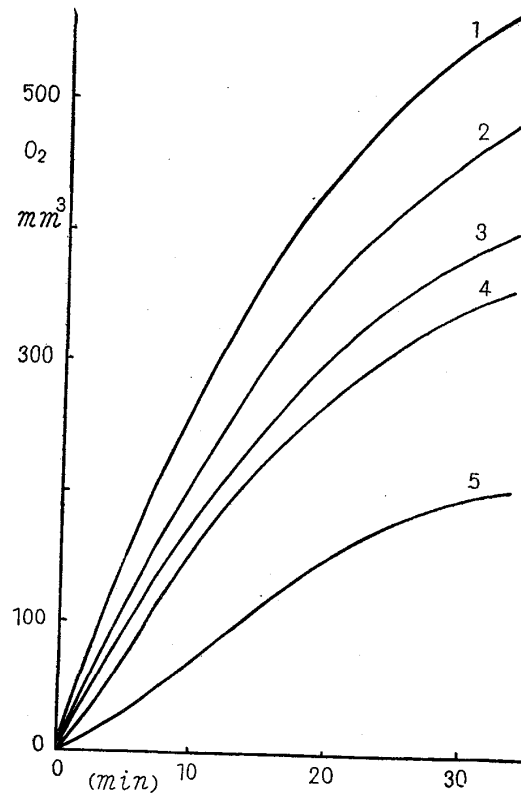


Fig. 2. Changes of the inhibiting activity of strawberry juice for the cucumber ascorbic acid oxidase by the various treatments.

Composition of reaction media:

<i>N</i> /10 <i>L</i> -ascorbic acid	0.5 ml.
Cucumber juice	0.5 ml.
Buffer solution (pH 5.6)	0.5 ml.
Strawberry juice or treated juice	1.0 ml.

1. Without strawberry juice
2. Inner solution of dialyzed juice against distilled water
3. Solution of precipitate formed in the cellophane sack while dialysis.
4. Raw strawberry juice
5. Concentrated strawberry juice (about 1:5)

ション溶液 1.0 ml. をアスコルビン酸液 0.5 ml. 胡瓜汁 0.5 ml. 及び緩衝液 0.5 ml. にて組み立てられた反応液に添加し、酸素吸収量を測定した。

メタリン酸 (5%) にて除蛋白操作し、蛋白部 (f-B) を分離した後、溶液にペクチン性の沈澱の出なくなるまでエチルアルコールを加え、ペクチン質を除く。この除蛋白及び除ペクチン操作を施した液にエチルエーテル及びクロロホルムを加えて、各溶剤可溶性部を分離した。このようにして得られた f-A より f-H までの各フラクションについての測定結果は第4図に示す通りで、f-A, f-C, f-E 及び f-G に阻害物質は移行するようである。

次に、このようにして得られた f-G をイオン交換樹脂 IRA-411 及び IRC-50 を用いて更に分別を行ったところ、第5図のように、この活性物質はアニオン交換樹脂に吸着されることを知った。この吸着された活性物を種々の溶出剤を用いて溶出を試みたところ

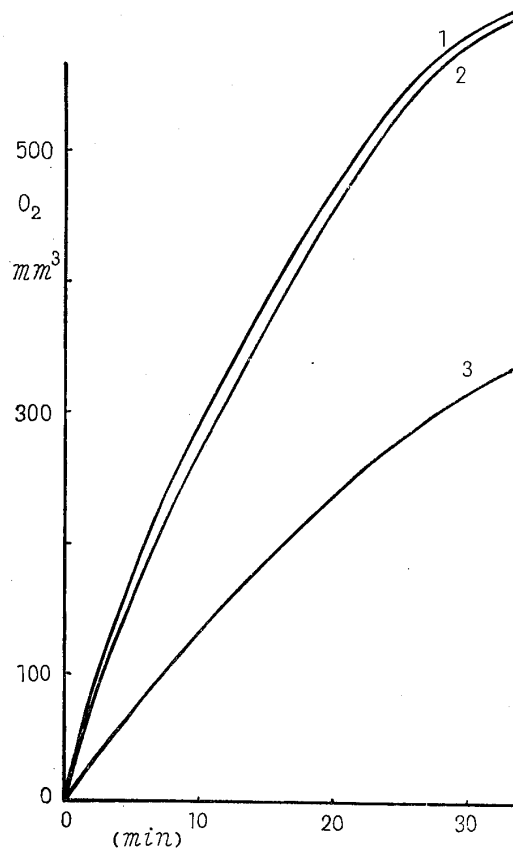


Fig. 3. Determination of the inhibiting activity of the distillate of strawberry juice for the cucumber ascorbic acid oxidase.

(Composition of reaction media was the same as that of Fig. 2)

1. Steam distillate of strawberry juice
2. Without strawberry juice
3. Raw strawberry juice

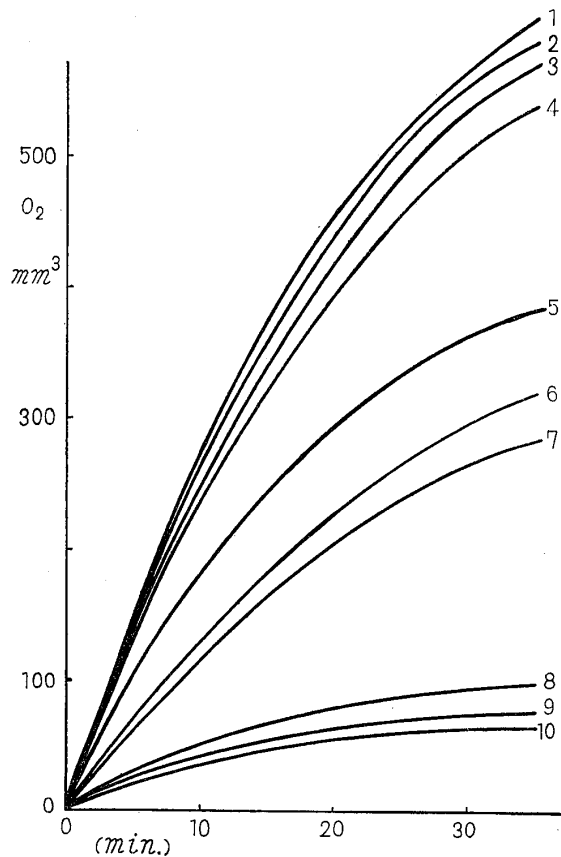


Fig. 4. Determination of the inhibiting activities of various fractions of strawberry juice for the cucumber ascorbic acid oxidase.

(Method for fractionation of strawberry juice was cited in Table 1)

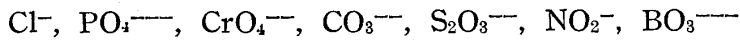
1. Without strawberry juice
2. f.....D
3. f.....B
4. f.....H
5. f.....F
6. Raw strawberry juice
7. f.....A
8. f.....G
9. f.....C
10. f.....E

ろ、同様第5図に示す通り、50%エチルアルコールにて溶出可能であった。

また、この f-K を蒸発皿中にて蒸発炭化せしめた後に、これを坩堝中で加熱燃焼し灰を集め、この灰について同様阻害作用を測定したところ、第6図に示すように、この灰溶液に著しい阻害作用の存在することを認めた。

5. アニオンの定性分析

以上の実験により、本阻害物質がイチゴ汁に含まれていた無機アニオンによることを知ったので、一般無機アニオン定性分析に従って、アニオンの検出を行い、次の7種を検出することができた。



以上の中でも殊に  $\text{CrO}_4^{2-}$  による反応が最も顕著であった。

6. 無機塩類溶液による阻害作用の測定

実験5にて検出された各アニオンを含む各種塩類の M/100 溶液を調製し、前記と同様反応液に 1.0 ml あて添加した時の酸素吸収を測定した。測定に使用した塩類は、NaCl,  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NaNO}_2$ , 及び  $\text{H}_3\text{BO}_3$  である。 $\text{PO}_4^{3-}$  については、このものがイチゴ汁自身にも含まれていると想像されるが、また除蛋白操作のために添加し

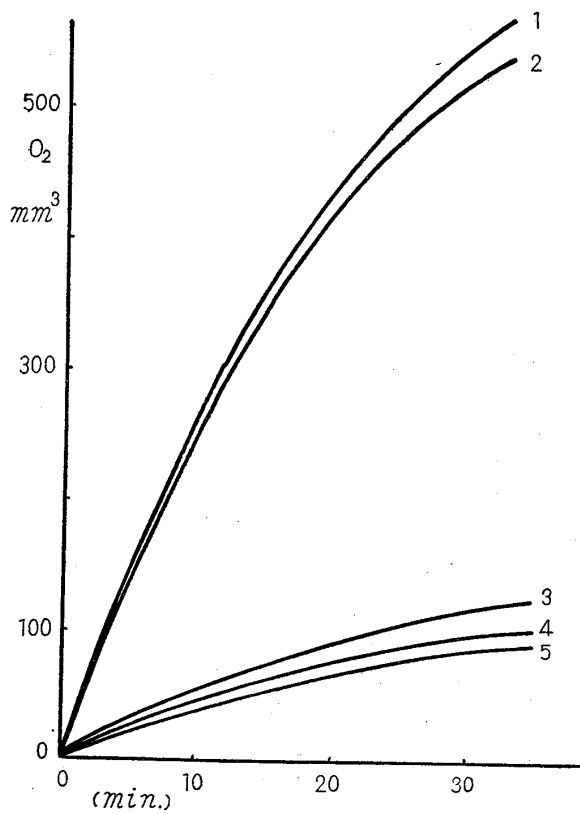


Fig. 5. Determination of the inhibiting activities of various fractions of strawberry juice for the cucumber ascorbic acid oxidase.  
 1. Without strawberry juice  
 2. f.....J                      4. f.....K  
 3. f.....I                        5. f.....G

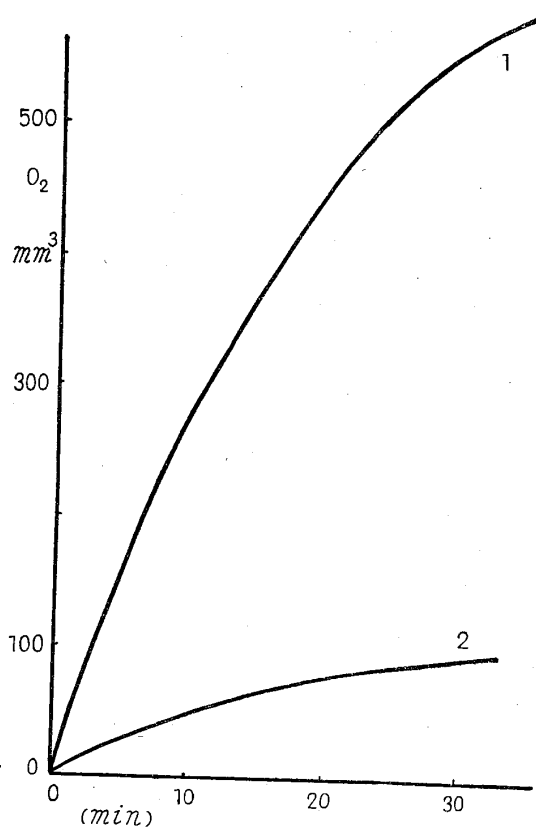


Fig. 6. Inhibition of the cucumber ascorbic acid oxidase by the addition of ash solution obtained from the fraction K of Table 1.  
 1. Without strawberry juice  
 2. Ash solution

たメタリン酸にも由来するものと考えられる。また緩衝液として McIlvaine のリン酸クエン酸緩衝液を使用しているため、この緩衝液と、醋酸緩衝液、硼酸リン酸カリ緩衝液を使用した時における酸素吸収量の相違を測定したが、緩衝液による吸収量の相違は著しくはなく、リン酸クエン酸緩衝液の時に最も高い吸収値を示したので  $\text{PO}_4^{3-}$  には阻害作用はないものと考えられる。

各種無機塩類による測定結果は、第7図に示す通りで、 $\text{K}_2\text{CrO}_4$  に強力な阻害作用を認めることができ、また  $\text{NaNO}_2$  にも若干阻害力を認める事ができた。

以上の実験にて、イチゴ汁の酵素作用阻害反応に  $\text{CrO}_4^{2-}$  が関係しているようであるので、次に  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  の M/10 より M/10,000 まで各種濃度の溶液を調製し、その阻害力の変化を測定し、第8図を得た。

またこの灰汁あるいは  $\text{CrO}_4^{2-}$  によるアスコルビン酸酸化酵素の阻害反応が、酵素と阻害物質がどのように結合して行われるものであるかを知るために、M/100 及び M/1,000

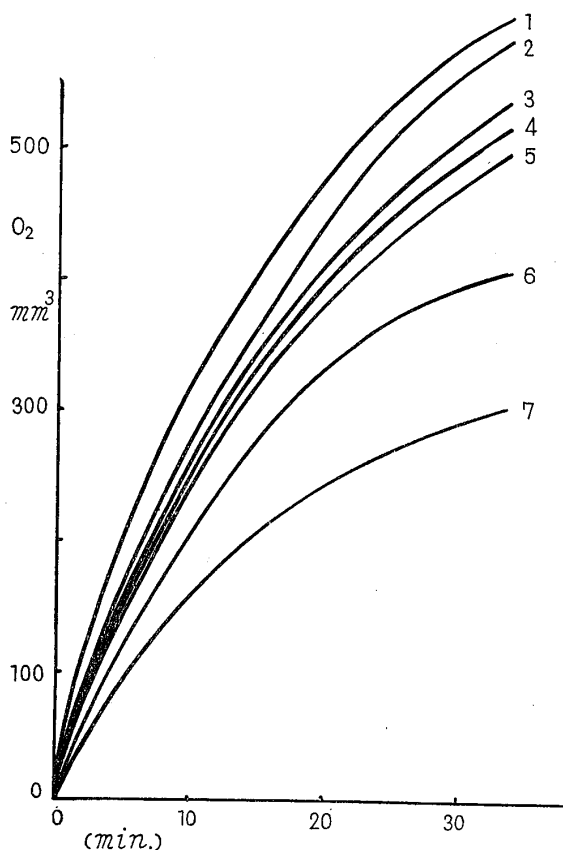


Fig. 7. Inhibition of the cucumber ascorbic acid oxidase action by the addition of various inorganic anions. (Composition of reaction media was the same as that of Fig. 2)

(Concentration of each anion solution M/100)

- |                                      |                             |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ | 5. $\text{H}_3\text{BO}_3$  |
| 2. Without addition                  | 6. $\text{NaNO}_2$          |
| 3. $\text{NaHCO}_3$                  | 7. $\text{K}_2\text{CrO}_4$ |
| 4. $\text{NaCl}$                     |                             |

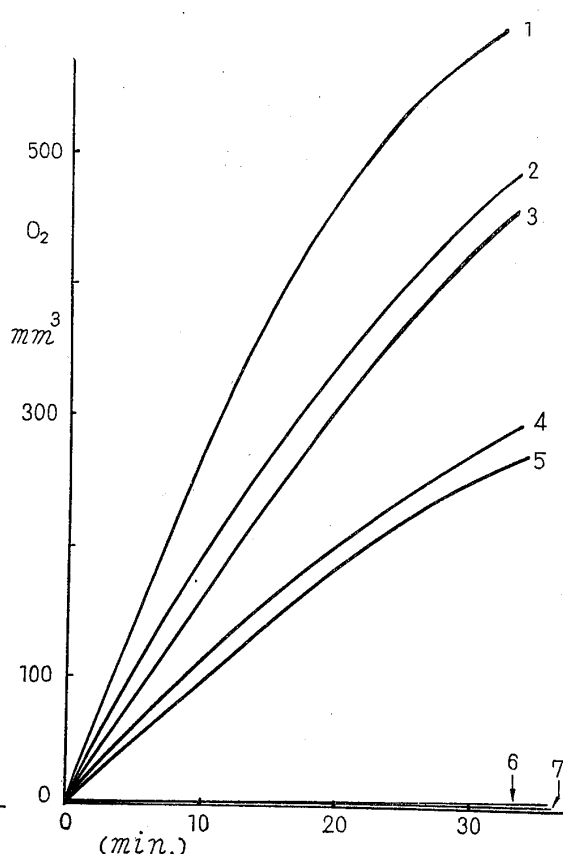


Fig. 8. Differences of the absorption of oxygen by the cucumber ascorbic acid oxidase with the addition of various concentrations of potassium chromate solution.

- |                     |         |
|---------------------|---------|
| 1. Without addition | 5. M/50 |
| 2. M/10,000         | 6. M/20 |
| 3. M/1,000          | 7. M/10 |
| 4. M/100            |         |

の  $\text{CuSO}_4$  溶液に灰汁あるいは濃度の異った  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  溶液を加えて、 $\text{Cu}^{++}$  によるアスコルビン酸の酸化にこれら阻害物質が有効であるか否かを実験した。実験結果は第9、及び第10図である。

### 考 察

前報にて報告したトマト汁と異り、イチゴ汁中に含まれているアスコルビン酸酸化酵素阻害物質は無機アニオンによることが実験1より実験4によって知ることができ、更にこのアニオンを分析したところ、 $\text{CrO}_4^{--}$  の反応が顕著であった。その他6種のアニオンが検出されたが、すべてその反応は微弱である。実験6に示したように、 $\text{NO}_2^{--}$  によってもアスコルビン酸酸化酵素は阻害されるが、このものの定性反応は極めてわずかで、イチゴ汁による本酵素の阻害反応に主役を演じているものとは考えられない。このことは、

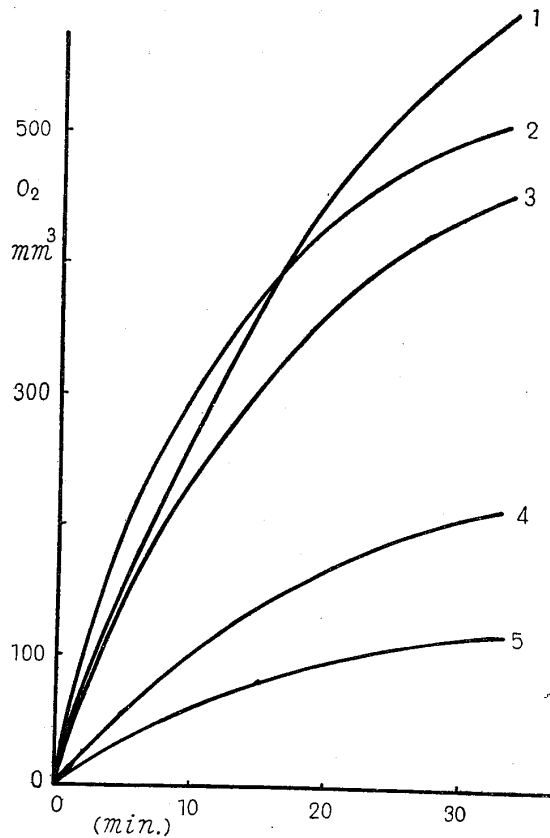


Fig. 9. Inhibiting activity of the strawberry ash solution on the oxidative action of  $\text{CuSO}_4$  against the ascorbic acid.

Composition of reaction media:

- $N/10$  L-ascorbic acid 0.5 ml.
- $\text{CuSO}_4$  solution 0.5 ml.
- Buffer solution (ph 5.6) 0.5 ml.
- Strawberry ashes solution 1.0 ml.
- 1. Oxygen absorption curve by the cucumber ascorbic acid oxidase instead of  $\text{CuSO}_4$
- 2. Oxygen absorption curve by  $M/100$   $\text{CuSO}_4$
- 3.  $M/1,000$   $\text{CuSO}_4$
- 4.  $M/100$   $\text{CuSO}_4$  + ashes solution
- 5.  $M/1,000$   $\text{CuSO}_4$  + ashes solution

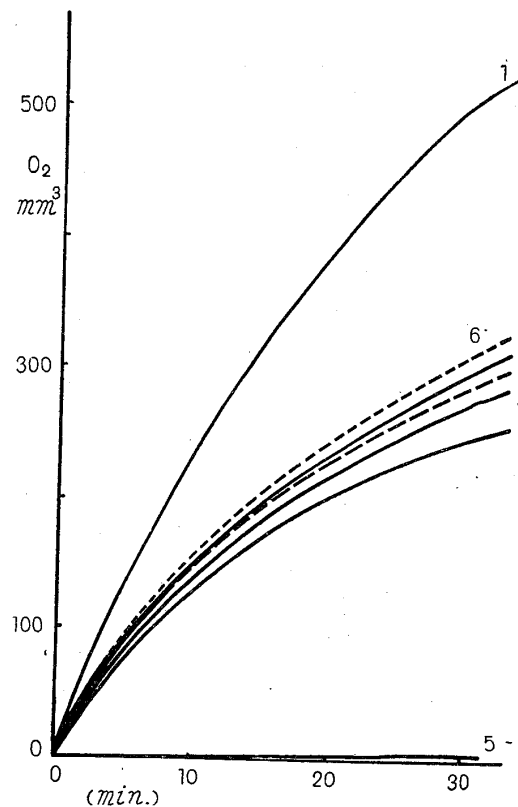


Fig. 10. Inhibition of the oxidative action of  $\text{CuSO}_4$  for the ascorbic acid by the addition of  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  solution.

(Composition of the reaction media was the same as that of Fig. 9)

- 1.  $M/100$   $\text{CuSO}_4$
- 2. " +  $M/1,000$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$
- 3. " +  $M/100$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$
- 4. " +  $M/50$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$
- 5. " +  $M/10$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$
- 6.  $M/1,000$   $\text{CuSO}_4$
- 7. " +  $M/1,000$   $\text{K}_2\text{CrO}_4$



$\text{BO}_3^{--}$  についても同様である。しかしながら、これらイオンが相乗作用によって、各の働きを倍加していることは考えられるところである。なお  $\text{CrO}_4^{--}$  が阻害に大きな役割を果しているならば、類似したイオンである  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$  は如何という問題が出て来るが、 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$  はほぼ  $\text{CrO}_4^{--}$  と同様な阻害作用を持ち、同一濃度における阻害度はほとんど等しい値を持つ。

アスコルビン酸酸化酵素は銅酵素で、活性基として銅イオンを持っているので、阻害剤には、直接、銅イオンと結合して酵素作用をおさえるものと、担体である蛋白と結合して、酵素作用をおさえるものとの両者がある。この  $\text{CrO}_4^{--}$  または  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{--}$  が、もし銅イオンと結合する性質をもち、そのために酵素作用が阻害されるものであれば、アスコルビン酸の銅酸化に対しても阻害作用を示し、蛋白と結合するものであれば銅酸化に対する阻害作用はほとんどみられないはずである。また、本実験条件によって得られる酸化曲線とほぼ同一酸化曲線は  $\text{M}/100$   $\text{CuSO}_4$  溶液, 1 ml. を  $\text{N}/10$  アスコルビン酸液 0.5 ml. に添加した時得られることを確かめたので、この条件にてイチゴ汁より得た灰汁、及び  $\text{CrO}_4^{--}$  を一定量添加した時の酸素吸収量の変化を測定したところ、第9図及び第10図のような阻害曲線が得られ、この実験より、この阻害物質はアスコルビン酸酸化酵素の活性基である銅イオンと結合して、酵素作用をおさえるものであることを推定することができた。

アスコルビン酸酸化酵素に対しては、トマト汁中に含まれているような揮発性有機物、イチゴ汁に含まれている無機アニオン等の天然阻害物質以外にもまた類を異にした阻害性物質が存在するようであり、この点については目下研究続行中である。

## 結 論

1. イチゴ汁中には胡瓜のアスコルビン酸酸化酵素を強力に阻害する物質が存在する。
2. この阻害物質は無機アニオンであり殊に  $\text{CrO}_4^{--}$  がこの阻害物質の主体と推定される。
3. 本阻害物質はアスコルビン酸酸化酵素の活性基である銅イオンと結合して、酵素作用を阻害するものと考えられる。

## 文 献

1. C. R. Dawson and W. B. Tarpley: The Enzymes, Chemistry and Mechanism of Action., 2 (1951)
2. C. J. Somogi, Z. Vitaminforsch., 16: 134 (1945)  
W. Neuweiler, Z. Vitaminforsch., 18: 335 (1947)
3. 稲垣長典・福場博保: お茶の水女子大学自然科学報告, 4: 235 (1954)

(Received July 10, 1954)