

トマト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 Tomato Juice.

稲垣長典, 福場博保 (Chôten Inagaki and Hiroyasu Fukuba)

Laboratory of Nutrition-Chemistry, Faculty of Home Economics,
Ochanomizu University, Tokyo

Résumé

By the addition of tomato juice, the enzymatic oxidation of *L*-ascorbic acid by cucumber ascorbic acid oxidase was greatly inhibited.

The greatest activity for this inhibition was observed with the juice newly made from fresh tomato, and the longer the time for standing of this juice was, the smaller the inhibiting activity was.

The distillate of tomato juice had the powerful inhibiting activity for this enzyme, and so it is assumed that this natural inhibitor will be a volatile compound.

緒 言

トマト中に含まれているアスコルビン酸の量を常法によりインドフェノール法によつて測定した所, 個体差もあるが大體 15~25mg% という値を得た. 然しながら, このトマト汁中のアスコルビン酸量を胡瓜のアスコルビン酸酸化酵素を用いて, 酵素法によつて測定を試みた所, 酵素吸収は全然見られなかつた. この結果はインドフェノール滴定値は単に混在していた, 還元性物質によるものでアスコルビン酸によるものではないという想定を与えるものである. そこでこの還元性物質が真にアスコルビン酸によるものであるかどうかを確かめる為に, 著者の一人が前に発表⁽¹⁾した paper chromatography 法を用いて R_F 値を比較した所, アスコルビン酸液, トマト汁共に R_F : 0.38~0.39 にインドフェノールによつてスポットを与え, 又両者共にインドフェノールに対してこれ以外にスポットを與えなかつたので, トマト汁中の還元性物質の少くとも大半はアスコルビン酸であろうと考えられるに至つた. 更にこの点を確かめる為に Roe の 2,4-dinitrophenylhydrazine 法の高橋氏変法⁽²⁾によつてアスコルビン酸量を測定した所, インドフェノール法によつて 21.0mg% の値を示すトマト汁にて還元型アスコルビン酸 19.6mg%, 總アスコルビン酸量, 26.8mg% という値が得られ, 又 Polarography 法によつて結晶アスコルビン酸液を対照として, トマト汁のアスコルビン酸量を求めると, 第一図の図形が得られ, これよ

1) Contribution from Department of Food & Nutrition, Faculty of Home Economics
Ochanomizu University, No. 4.

り計算すれば、使用したトマト汁中には 29mg% のアスコルビン酸が存在する事となる。

以上より、トマト汁中にアスコルビン酸の存在することは確実と考えられるが、しからば、トマト汁中のアスコルビン酸が何故に酵素法によつては測定出来なかつたかということの理由について考察し、この原因が、トマト汁中に含まれているアスコルビン酸酸化酵素阻害物質に基くものであることを確めたので、こゝに報告する。

実験の部

1. 胡瓜汁及びトマト汁の調製

市販胡瓜及びトマトをアルマイト製卸し金を用いてすりおろし、ガーゼを用いて搾汁した後、汁液を遠心分離し (3000r.p.m., 5分間) 沈澱物を除いた後、使用した。尚調製に当つては出来る限り低温で処理し、酵素作用の失活を防いだ。

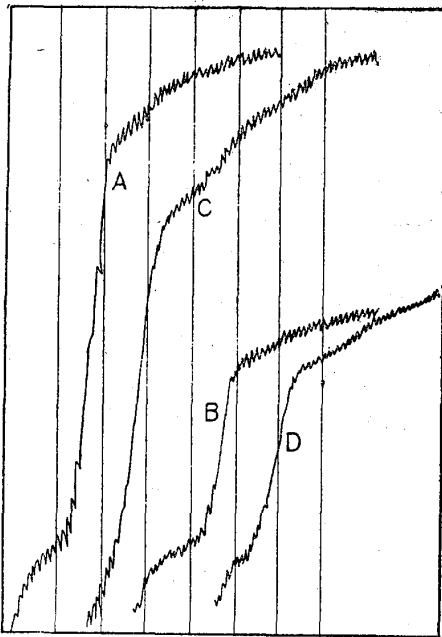


Fig. 1. Comparisons of polarograms of tomato juice with a solution of *L*-ascorbic acid.

A and B Ascorbic acid solution (40mg.%)

C and D Tomato juice

Shunt: A and C 1/1

B and D 1/2

Composition of test solution

Sample solution 0.3 ml.

0.1N KCl 0.1 ml.

Buffer Solution

(McIlvaine's citrate-phosphate buffer)

4.6 ml.

pH を 5.6 に補正した後使用した。

測定法

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

実験結果

先づ第一表の組成で反応液を組み、アスコルビン酸酸化酵素による酸素吸収を測定した。測定結果は第二図に示す通りで、明らかにトマト汁液中にアスコルビン酸酸化酵素に対す

2. トマト透析液の調製

上述の方法によつて得たトマト汁を一晩 (約 15 時間) 蒸留水を用いて、氷室中にて透析した。透析内液をトマト透析液として用いた。

3. トマト濃縮液及びトマト透析濃縮液の調製

上述の方法によつて分離したトマト汁及びトマト透析液を水流ポンプを用い、低温で約 1/3 に濃縮して得たやゝ粘稠な液を、トマト濃縮液及びトマト透析濃縮液として使用した。

4. トマト水蒸気蒸溜溜出液の分離

トマト汁 100cc を常法によつて水蒸気蒸溜し、約 20cc の溜出液を分離し、このものをトマト水蒸気蒸溜溜出液とした。

5. 緩衝液

Mc Ilvaine のクエン酸緩衝液, pH. 5.6 を使用した。

6. アスコルビン酸液

N/10 アスコルビン酸液を用いた。調製に当つては、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

TABLE I. Compositions of the reaction media. I.

	1	2	3	4
N/10 Ascorbic acid (pH adjusted to 5.6)	2.0	—	—	—
Tomato juice	—	2.0	—	—
Cucumber juice	0.5	0.5	0.5	—
Buffer (pH 5.6)	—	—	2.0	2.5

Temperature for reaction: 30°C.

TABLE II. Compositions of the reaction media. II.

	I	2	3	4	5
N/10 Ascorbic acid (pH adjusted to 5.6)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Tomato juice	—	0.5	1.0	1.5	1.5
Cucumber juice	0.5	0.5	0.5	0.5	—
Buffer (pH 5.6)	1.5	1.0	0.5	—	0.5

Temperature for reaction: 30°C.

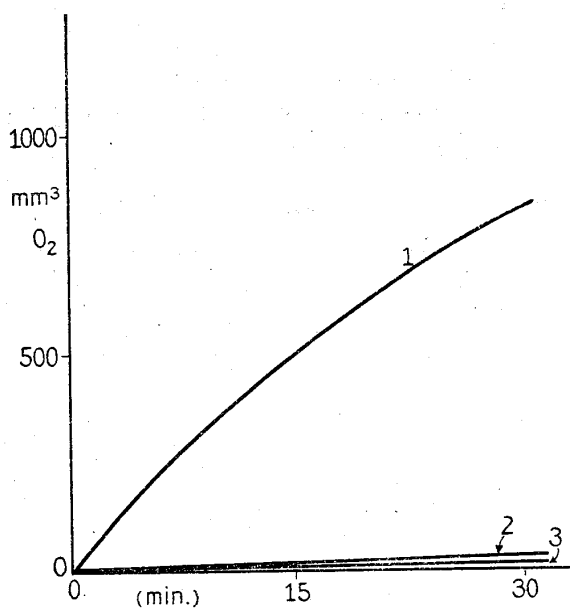


Fig. 2. Absorption of oxygen by the cucumber ascorbic acid oxidase.
(Conditions for reaction were cited in Table I.)

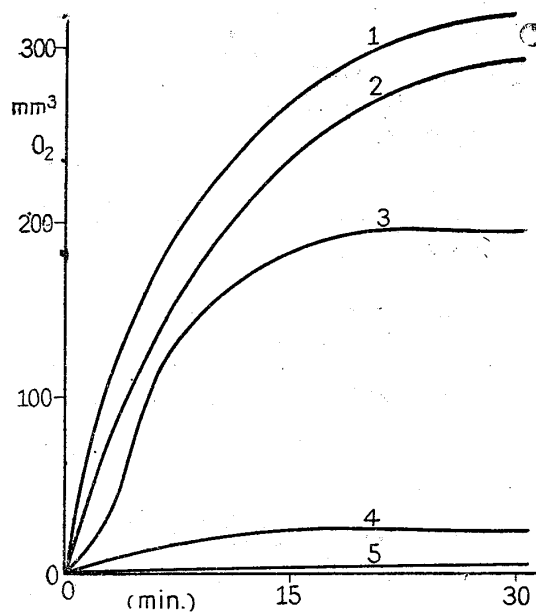


Fig. 3. Inhibition of the cucumber ascorbic acid oxidase action by the addition of various amount of tomato juice.
(Conditions for reaction were cited in Table II.)

る阻害物質が含まれている事を示している。

又トマト汁の量を変えた時の酸素吸収を第二表の組成にて測定した所、第三図に示す結果を得た。

次にこのトマト汁に含まれている阻害物質の性質を確める為に、トマト汁、トマト汁濃

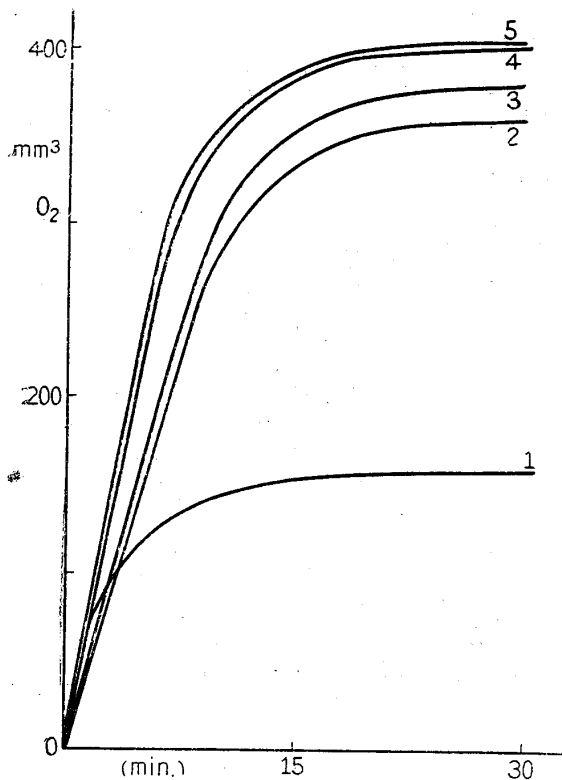


Fig. 4. Determination of the inhibiting activity of the various treated tomato juice.

Composition of reaction media.

<i>N</i> /10 <i>L</i> -ascorbic acid	0.5ml.
Cucumber juice	0.5ml.
Buffer solution (pH 5.6)	1.0ml.
Tomato juice or treated Tomato juice.	0.3ml.
1. Tomato juice	
2. Without Tomato juice	
3. Dialyzed tomato juice	
4. Concentrated tomato juice (about 1:3)	
5. Concentrated dialyzed tomato juice	

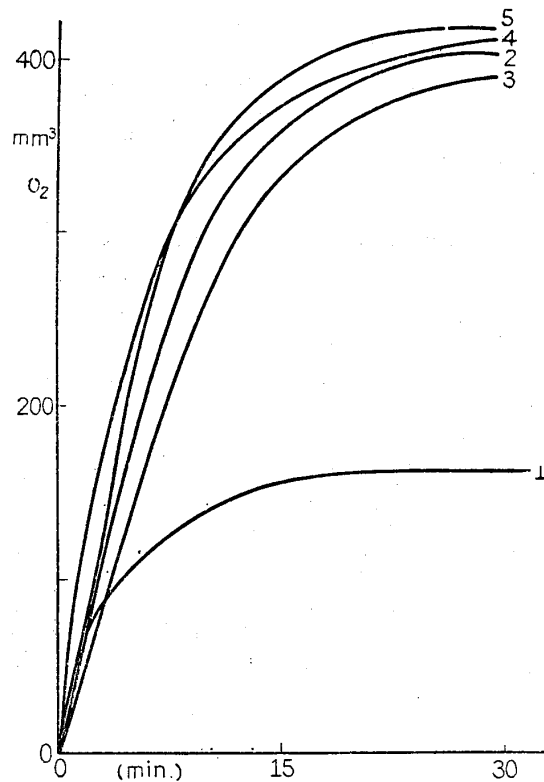


Fig. 5. Determination of the inhibiting activity of the concentrated tomato juice.

Amount of concentrated tomato juice added:

1. Fresh tomato juice	0.5ml.
2. No. addition:	
3. Concentrated tomato juice	0.1ml.
4. "	0.3ml.
5. "	0.5ml.

縮液、トマト汁透析液、及びトマト汁透析濃縮液の四者を各 0.3cc 宛 *N*/10 アスコルビン酸液 0.5cc 及び胡瓜汁 0.5cc を含む反応液に添加し、酸素吸収を測定した。この実験結果として第四図に示す曲線が得られた。この結果より本阻害物質は、加熱、透析等の操作によつて、その作用を失う事が知られる。

更にこのトマト汁濃縮液の添加量を 0.1, 0.3 及び 0.5cc に変化した時の酸素吸収量は第五図に示す吸収曲線として得られた。これらの濃縮液の添加が酸素吸収曲線に与える影響はトマト濃縮液から来るアスコルビン酸に基く基質濃度変化による吸収増加のみで、この濃縮液には全く阻害作用は認められなかつた。

この阻害物質の性質を更に確める為、トマト搾汁を室温 (10~13°C) に一定時間放置し、この間の阻害力の変化を求めた即ちトマト汁を調製し 1, 3 及び 6 時間後に阻害力を測定し、第六図を得た。この場合反応後としては、すべて *N*/10 アスコルビン酸液 0.5cc トマト汁 0.5cc 胡瓜汁 0.5cc 及び緩衝液 0.8cc の組成をもつものを使用した。この結果、本阻害物質が単に室温放置する間にもその作用力を著しく減少するような極めて不安

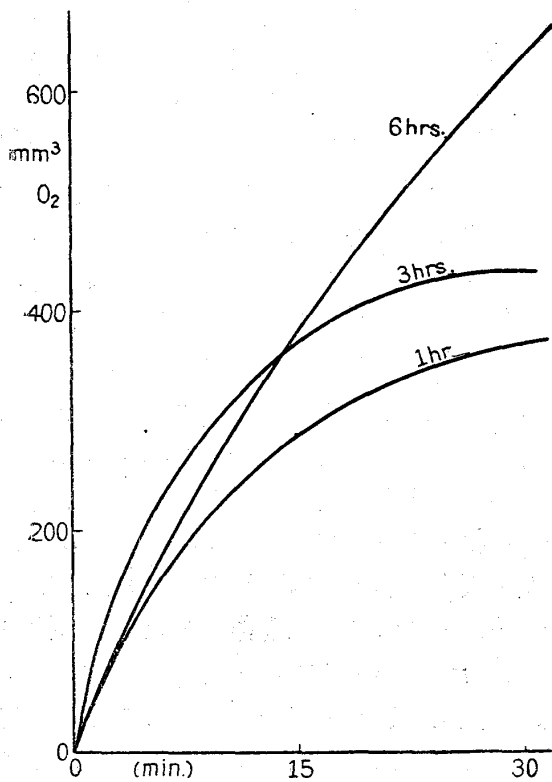


Fig. 6. Determination of the change of the inhibiting activity by the standing at room temperature.

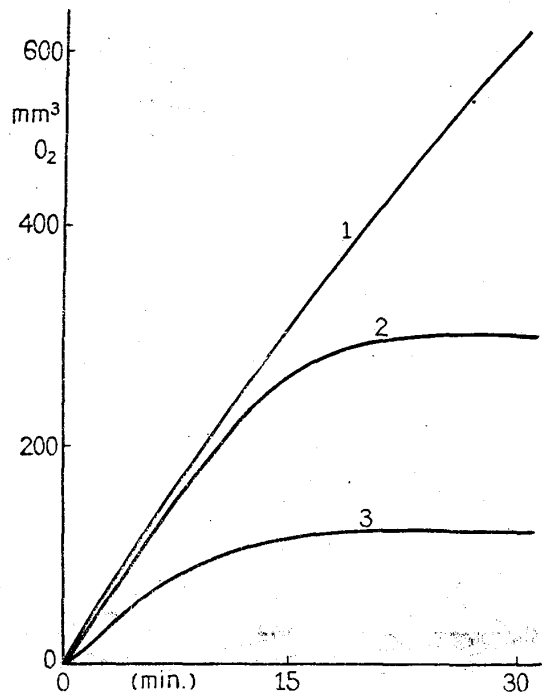


Fig. 7. Difference of the oxygen-absorption curves with the substrate concentration. Composition of reaction media:
 1. N/10 L-ascorbic acid 1.0ml., cucumber juice 0.5ml., and buffer solution 0.8ml.
 2. N/10 L-ascorbic acid 0.5ml., cucumber juice 0.5ml., and buffer solution 1.3ml.
 3. N/10 L-ascorbic acid 0.5ml., cucumber juice 0.5ml., tomato juice 0.5ml., and buffer solution 0.8ml.

定なものである事が推測されうる。

尚基質量を変化させた時の反応曲線を知る為に N/10 アスコルビン酸液を 0.5cc 及び 1.0cc とり、これに胡瓜汁 0.5cc、及び緩衝液を加えて全量を 2.3cc とし、この両反応液の酸素吸収を求めると第七図が得られた。

次にトマト汁の水蒸気蒸溜溜出液について、その阻害作用を測定した。前述の方法によつて分離した溜出液、又はトマト汁 0.5cc を N/10 アスコルビン酸液 1.0cc、胡瓜汁 0.5cc 及び緩衝液 0.3cc にて出来た反応液に添加し、酸素吸収を観察した。結果は第八図の通りで、この蒸溜液中に阻害物質が移行している事が観察された。尚蒸溜残液の添加は胡瓜のアスコルビン酸酸化酵素の酸素吸収に対し何ら変化を與えなかつた。

この水蒸気蒸溜溜出後は次のような反応を示した。

- フクシン反応 —
- ニトロプルシッド反応 —
- N/100 NaOH 滴定値 (溜出液 10cc 当り) 0.9cc

考 察

第二図、及び第三図に示される通りトマト搾汁中には強力に胡瓜のアスコルビン酸酸化酵素を阻害する物質が含まれている。天然に存在する酵素阻害剤としては trypsin inhi-

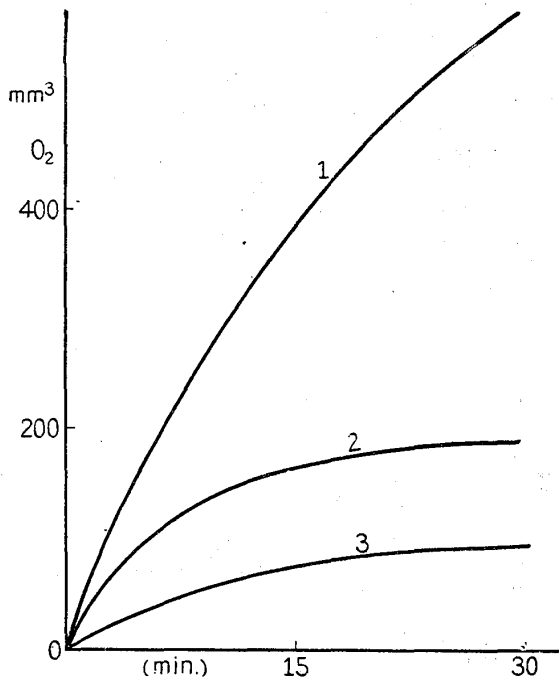


Fig. 8. The inhibiting reaction for the cucumber ascorbic acid oxidase by the addition of the distillate of tomato juice.

1. without tomato juice.
2. with tomato juice (0.5 ml.)
3. with distillate of tomato juice (0.5ml.)

bitor のような高分子性のものと、低分子性の有機、及び無機化合物に大別しうる。この阻害物質がどのような性質のものであるかを確かめる為に第四図の実験を行い、この物質が高分子化合物であるか、又は低分子化合物であるかを透析によつて確かめようとしたが、透析内液はこの阻害作用を失つてゐる事がわかつた。又低温濃縮によつて該物質が濃縮されるかどうかを確かめようとしたが、この濃縮液にも阻害作用を認める事が出来なかつた。この両実験によつては本阻害物質が高分子性のものであるか。又は低分子性のものであるかを判定する事は出来なかつたが、もし高分子化合物 であるとすれば、この化合物は塩類等の保護作用によつて阻害中心が活性となり透析等によつてこの保護作用を失うと活性中心が働き得ないような化合物であると推定する事が出来、又低分子化合物が、この阻害物質の本態であるとするならば、加熱によつて容易にその作用を失うものであるから、加熱によつて容易に化学反応を起す化合物か又は加

熱によつて消失する、揮発性化合物であると推定される。然しながら第七図に示すように単にトマト汁を室温で放置するだけでも、時間の経過と共に阻害反応が消失し、トマト汁中のアスコルビン酸が基質濃度を高める為に反応は漸次時間に対して直線的に進行するようになる。この事は揮発性化合物がこの阻害物質の本態である事を示すもののように考えられる。高分子化合物が本態である時にもトマト汁の放置によつて阻害の失活は可能であるから、更にトマト汁を水蒸気蒸溜し、揮発性物質を捕集し、このものを反応液に添加し、このものの阻害作用を確かめた所、第八図に示されるように、この蒸溜液が強力な阻害作用を示す事が明かとなつた。以上により、トマト特有の香気を含んだ水蒸気蒸溜液に移行する揮発性物質が本阻害物質の本態であると推定する事が出来る。

この揮発性物質は一般香気成分として考えられている、硫化物、アルデハイド類等ではないようで酸性を呈する事のみが現在判つてゐる。この酸性溜出液、或は酸性のトマト汁を反応液に添加する事によつて、反応後の pH に変化を生じ、このためにみかけ上の阻害が生じたという懸念もあるので、pH を測定した所、トマト汁、トマト溜出液は共に pH 2.4 であり、又胡瓜汁の pH は 6.0 であるが、pH を 5.6 調節したアスコルビン酸液 1.0cc 胡瓜汁 0.5cc 及び緩衝液 (pH 5.6) 0.3cc の反応液にトマト汁又はトマト汁溜出液 0.5cc を添加しても反応液の pH には変化が認められなかつた。

今後更にこの酸性溜出液中に含まれてゐる阻害物質の諸性質を確かめる予定である。又トマト汁の胡瓜アスコルビン酸酸化酵素に対する阻害力はトマトの品種、採取時、栽培条件等によつて相違すると考えられる二三の知見をも得てゐるが、この点についても更に確かめる予定である。

本実験は、林恵美子、伊藤あつみ、町田登美子及び尼崎貞子四氏の協力を得て行つたものである。

又本実験を行うに当り phenylhydrazine 法によるアスコルビン酸の定量について援助された、公衆衛生院、高橋徹三氏、及び polarography 測定について便宜を與えられた東大農学部、藤巻正生氏、小田切敏氏に感謝する。

結 論

1. トマト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の存在する事を確めた。
2. 本阻害物質の本態は低分子の揮発性物質である。
3. トマト汁より水蒸気蒸溜によつて分離した溜出液はトマト汁同様強力な阻害作用を示すが、このもののフクシン反応、ニトロプルシッド反応は共に陰性であり酸性を示す。

文 献

1. 稻垣長典, 相馬信子, ビタミン, 6, 568 (1953)
2. 高橋徹三, ビタミン 6, 673, 979 (1953)

(Received Dec. 26, 1953)