

甘 藷 の 酵 素 化 學 的 研 究

(第1報) 甘藷の Polyphenolase 系基質に就て

(その1) *酸化酵素模型による研究

教 授 農學博士 西 田 孝 太 郎
講 師 富 永 直 友

I 緒 言

傷害を受けた甘藷或いは磨碎された甘藷又は甘藷の汁液を放置すれば、徐々に褐變し遂に黒褐色に着色する現象は、普ねく知られた事柄である。この様な着色現象は他の植物汁液に於ても良く見られる。例へば馬鈴薯の變色現象は馬鈴薯中の Tyrosine が Tyrosinase の作用により酸化されて、Melanin 色素を生ずる爲である。またハツダケの傷口が青變するのは、Boletol が Laccase の作用により酸化されて、Anthrachinon carbon 酸を生ずるからである。その他、梨、あおき、等の黒變に就ても種々の研究が行はれ、其黒變の原因が解明された。甘藷の黒變に就ても最近米國に於て種々の研究が報告されて居る⁽¹⁾。例へば Scott, Walls, 及び Hunter(1945)等は此の變色は、甘藷中の Catecholoxidase によるもので、此の作用を防ぐには甘藷を 125° F に 30 分間熱處理すれば良いと云ふ。又最近 Rudkin 及び Nelson⁽²⁾ は甘藷より Polyphenolase 系基質として Chlorogen 酸及び該酸に極めて近縁の Phenol 化合物を分離して居る。

著者⁽³⁾ はさきに甘藷中の Peroxidase は 0.2% 濃度の SO₂ 水溶液中に於ても其活力を失はないが、Catecholase は僅かに 0.01% 濃度に於ても破壊されることを實驗した。而して變色防止には、Catecholase の活力を抹殺するだけで足りるので實際上、磨碎甘藷を 0.01% SO₂ 水溶液中に 20~30 分間浸漬すれば、良く目的を達し得ることを知つた。

現今行はれている一般的解釋に従えば、甘藷の黒變は甘藷中の Polyphenolase 系呼吸が組織の傷害によつて阻害される爲である。即ち Polyphenolase の作用によつて酸素が polyphenol を酸化して quinon 型にする。この quinon 型の Polyphenol は Dehydrogenase 系の作用によつて還元され、又元の Polyphenol に戻る。この變化が繰返されることによつて、Polyphenolase 系の呼吸が營まれる。然るに甘藷組織が傷害を受けると Dehydrogenase 系が阻害され、上記の呼吸系に於ける quinon 型 Polyphenol の還元が困難になり、生成された quinon 型 Polyphenol は蛋白質及び Amino 酸と結合し、黒褐色 Melanoid 色素を生ずるとされて居る⁽⁴⁾。

甘藷中の Polyphenolase の存在に就ては、J.M.Nelson その他の研究があるが、J.M.Nelson⁽⁵⁾ は甘藷中に、Catechol は酸化し得るが、p-cresol は酸化し得ない polyphenolase の存在することを報告して居る。又 M.Graubard⁽⁶⁾ は、甘藷壓搾汁を冷 Aceton で處理し、沈澱を 1% Na₂HPO₄ で溶解し、更に (NH₄)₂SO₄ で沈澱させ該沈澱を水に溶解した後、冷蒸溜水中で透析すると、Sweet-potato-oxidase(Catecholase)を得る。この Oxidase は orthodiphenol 即ち Catechol, Pyrogallol, Dioxyp

henylalanine, 等にのみ作用し, monophenol には作用しないと報じて居る. 又藥師寺⁷⁾は甘藷より得られる酸化酵素を, その基質に對する特異性より "Orthophenolase" と命名することを提唱して居る.

甘藷の變色は甘藷加工上種々の障碍を生ずる爲, その變色防止は甘藷加工業に於ける重要な問題とされて居る. 此の様な見地から著者等は, この變色現象のメカニズム解明の第1段階として, 甘藷の Polyphenolase 系基質の決定を行い, その決定によつて現今行われている種々の變色防止法に基礎的検討を加え, その改良進歩に資する爲, 本研究を行ふことにした.

著者等は第1着手として, 甘藷中のタンニンが甘藷 Polyphenolase 系の基質ではないかとの想定の下に, 先づ小瀬⁸⁾の研究に倣つて甘藷よりタンニンを抽出し, 次に便宜的方法として酸化酵素模型を用い上記の甘藷タンニンを基質として實驗を行うことにした.

酸化酵素模型に就ては既に古く柴田等⁹⁾の研究があり, 同氏は Co, Ni, Cr, その他の金屬錯塩が, 酸化酵素類似作用を有することを發見した. 岩崎¹²⁾¹³⁾は Cu, Zn, Cd, 等の錯塩も亦 Polyphenol を接觸的に酸化すると報じて居る. 田所¹⁴⁾は血清アルブミン, 又は卵白と CuSO₄ より得られる蛋白質の銅塩, 及び蒟蒻マンナン, アルギン酸の銅塩が, アスコルビン酸 α 化酵素の作用を有することを發見した. A. H. Cook¹⁵⁾は, Fe-phthalocyanin が Polyphenol を接觸的に酸化すると報じて居る.

著者等は初めに酸化酵素模型として Chloro-pentammine cobaltic chloride [$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$] を用いた. 該錯塩が酸化酵素類似作用を行ふことは柴田¹⁰⁾によつて發見された. 同氏によると, その酸化反應メカニズムは, 水溶液に於て不安定なる錯塩が, 安定化するに際して遊離するエネルギーによつて, 水分子が活性化され, その活性化された水分子と空中の酸素によつて基質が酸化されると云ふ. 而してこの酸化反應は一次反應であり, 且つ溫度及び pH の影響を受け, 又他物質例へば昇汞によつて阻害されることより, 該錯塩の酸化作用は酸化酵素のそれに類似するとの結論が得られて居る.

著者等は, 該錯塩の甘藷タンニンに對する行動を研究した結果, Pyrogallol 等に對する場合と同様な態度を示したので, 甘藷タンニンが Polyphenolase 系の基質であることを定性的には斷定し得るものとして, 茲に其梗概を報告することにした.

I 實驗の部

(1) 甘藷タンニンの分離

1 kg の生甘藷を賽の目に刻み, 3 立丸底フラスコに入れ, 之に 95% 酒精 1.5 kg を添加し, 70~80°C の重湯煎中で 12 時間温浸し, 後濾過し, 更に残渣に 95% 酒精 1 kg を添加し, 前と同様に温浸し, 更に同様の操作を行い, 浸出液が塩化鐵で呈色反應を示さない様になつてから, 全酒精浸出液を合して減壓で酒精を溜去し, 黄褐色粘稠物質 62 g を得た. 之に 100 cc の水を添加し, エーテルで 3 回抽出しエーテル可溶物を除いた. エーテル抽出殘液を 100 cc の醋酸エチルで 6 回抽出し, 醋酸エチル層を水洗し, 後無水硫酸ソーダで脱水し, 更に溶媒を溜去し, 黄褐色物質 0.17 g を得た. 之に水を加

え暫く加温し、直ちに濾過し、濾液に食塩を飽和し、醋酸エチルで良く抽出し、醋酸エチル層を脱水後、溶媒を溜去し淡黄色物質 0.10 g を得た。本物質は水に可溶で、且つ塩化第二鐵で黒綠色の呈色反應を興える。

(2) Chloro-pentammine cobaltic chloride の製法

塩化コバルト 10g の飽和水溶液に 20% アンモニア水 70cc を加え、更に炭酸アンモニウム 12g の飽和水溶液を加え、24 時間激しく空氣を通ずる。此の液に塩化アンモニウム 40g を加え、盪煎上で蒸發濃縮する。濃縮液に少量の塩酸を加え酸性となし、盪煎上で加温して炭酸ガスを完全に驅出する。次にアンモニア水で中和し、水で 100~150cc に稀釋した後、金網上で 10 分間靜かに煮沸する。之に濃塩酸 40cc を加え 30 分間盪煎上で加熱し、放冷すると赤紫色結晶を得る。之を濾過し残渣に 20% アンモニア水 50cc を加え、靜かに 10 分間煮沸し、後上澄液を取り、残渣に更に 50cc の 20% アンモニア水を加えて煮沸する。この兩抽出液を合して、少しく酸性となるまで塩酸を加へ、盪煎上で 1 時間加熱すると沈澱を生ずる。放冷後濾過し、稀塩酸で洗い更に冷水で洗い、赤紫色結晶 6g を得た。

上記の方法で得た赤紫色結晶の水溶液は種々の試薬を添加すると次の様な反應を呈する。

AgNO₃ (白沈)、HgCl₂ (直に赤色針狀結晶を生ず)、HCl (赤色沈澱)、K₂CrO₄ (煉瓦色小結晶)、K₂Cr₂O₇ (橙色扁平柱狀結晶)、砒酸アンモニウム (赤色柱狀結晶)。

即ち著者等の得たる赤紫色結晶は Chloro-pentammine cobaltic chloride ([Co(NH₃)₅Cl]Cl₂) であることを認め得る⁽¹⁾。

(3) Guaiacum tincture, Pyrogallol, 及び 甘藷タンニンに對する Chloro-pentammine cobaltic chloride の作用。

(a) Guaiacum tincture に對する作用。

500 分の 1 モル該錯塩溶液 2cc を 3% Guaiacum tincture 0.1cc 及び buffer 0.5cc に添加し、その變色を観察した結果は第 1 表の通りである。但し buffer は McIlvaine 及び Menzel の buffer solution を用いた。又對照液として 3% Guaiacum tincture 0.1cc, buffer 0.5cc に蒸溜水 2cc を添加したものを用了。温度は室温。

第 1 表

Time \ pH	7.0	7.6	8.0	8.5	8.9	9.6	9.9
添加直後	褐色	青灰色	濃青色	黒綠色	黒綠色	黒綠色	黒綠色
10分後	±	+	卅	〃	〃	〃	〃
20分後	+	卅	〃	〃	〃	〃	〃
30分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
40分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
50分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
60分後	卅	〃	〃	〃	〃	〃	〃

(一 ± + … 等の記號は色の濃淡を示し、一 ± + 卅 に従つて濃厚になるものとす)

上表の如く、Guaiacum tincture に該錯塩を添加すると、恰も酵素液を加えた時の様に黒緑變し、pH8.5以上では添加と同時に變色する。pH7.0~8.0に於ても暫く放置すると變色する。對照液は、pHが高くなるに従い、その淡綠色はやゝ濃くなる程度で放置しても殆ど變化はない。

(b) Pyrogallol に對する作用。

Guaiacum tincture の代りに250分の1モル Pyrogallol 溶液を用い、(a)と同様な操作を行つた所が、Pyrogallol 溶液は黒褐色に變化し、第2表の如き結果を得た。

第 2 表

Time \ pH	7.0	7.6	8.0	8.5	8.9	9.6	9.9
添加直後	淡赤紫色 —	淡褐色 ±	淡褐色 ±	褐色 +	黒褐色 ++	黒褐色 ++	黒褐色 ++
10分後	±	+	+	++	〃	〃	〃
20分後	±	+	++	〃	〃	〃	〃
30分後	+	++	〃	〃	〃	〃	〃
40分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
50分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
60分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃

上表の如く Pyrogallol の場合も、Guaiacum tincture と同様に、添加後、pH 8.0以上では直に變化し、pH8.0以下でも徐々に變化した。對照液はpHによる差は餘りないが、Guaiacum tincture の場合に比べて、経過時間による變化は大である。然し錯塩を添加したものに比ぶれば、遙かに變色は緩く且つ色も淡い。

(c) 甘藷タンニンに對する作用。

(a) (b)に於ける Guaiacum tincture, Pyrogallol の代りに、甘藷タンニン1%溶液を用いた結果は(a) (b)の場合と同様に黒褐色に變化した。即ち第3表の通りである。

第 3 表

Time \ pH	7.0	7.6	8.0	8.5	8.9	9.6	9.9
添加直後	橙 色 —	淡褐色 ±	褐色 +	褐色 +	黒褐色 ++	黒褐色 ++	黒褐色 ++
10分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
20分後	〃	〃	〃	++	〃	〃	〃
30分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
40分後	±	〃	++	〃	〃	〃	〃
50分後	〃	+	〃	〃	〃	〃	〃
60分後	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃

上表の如く甘藷タンニンの場合pH 8.0~8.5以上では、添加後直に變色し、それ以下に於ても徐々に變化する。對照液はpHによる差は殆んどなく、又長時間放置するも殆んど變色しない。

(d) HgCl_2 による阻害.

Chloro-Pentammine cobaltic chloride の酸化酵素類似作用が HgCl_2 によつて阻害されることは、柴田⁽¹⁰⁾の報する所であるが、著者等も上記3物質を基質とした場合に、酸化酵素模型に對する HgCl_2 の阻害作用を驗した。即ち pH8.5 に於て Guaiacum tincture, Pyrogallol, 甘藷タンニンに對して、 HgCl_2 1,000分の1モルが存在するときの變色と、存在しない場合の變色とを比較すると、第4表の如くである。

第 4 表

Guaiacum tinc.		Pyrogallol		甘藷タンニン	
HgCl_2 添加	無添加	HgCl_2 添加	無添加	HgCl_2 添加	無添加
淡青	黒緑	淡褐	黒褐	淡褐	黒褐

上表より3物質に就ては、何れも1,000分の1モル HgCl_2 によつて、該錯塩の酵素類似作用は阻害されることが認められた。

I 實驗經過の考察

著者等が甘藷より得た甘藷タンニンは、小瀬によるとカテコール性タンニンであり、又前述の方法で得たコバルト錯塩は、その定性反應より、柴田によつて酸化酵素模型として確認された Chloro-pentammine cobaltic chloride である。而して該錯塩は polyphenolase の基質 Guaiacum tincture, Pyrogallol に對して既述の如き態度を示し、且つ HgCl_2 によつてその作用が阻害された。夫故に著者等の得たコバルト錯塩は Polyphenolase と類似作用を有する酵素模型と認め得る。然るに該錯塩は甘藷タンニンに對しても、全く同様な作用を呈する。故に前二者が polyphenolase の基質であることより、甘藷タンニンも亦 Polyphenolase の基質であると推論することが妥當である、即ち著者等は以上定性的實驗結果の考察に基き、甘藷中の Polyphenolase 系基質は甘藷タンニンなることを認めるものである。而して該タンニンの性質に就ては後日の研究に譲ることにする。

IV 摘 要

(1) 甘藷をアルコールで浸出し、更に醋酸エチルで抽出する等の操作により甘藷タンニンを分離した。

(2) 該タンニン溶液に Chloro-pentammine cobaltic chloride 500分の1モル溶液を添加すると、特に pH がアルカリ側に於て黒褐色に變ずる。亦その變色は HgCl_2 によつて阻害される。

(3) 然るに該錯塩が Guaiacum tincture, Pyrogallol に對して黒綠色乃至黒褐色の變色を與え、且その變色は HgCl_2 により阻害されることは、柴田の報する所であり且つ著者等もそれを確認した。

(4) 故に甘藷中の Polyphenolase 系の基質は甘藷タンニンであると認める。

(附記) 本研究は文部省科學研究費の補助によるものであることを附記して謝意を表す。

文 献

- (1) 鈴木繁男：米國に於ける乾燥甘藷製造法，(1948)。
- (2) G.O.Rudkin d. J.M.Nelson: Jour. Amer. Chem. Soc. **69** (1947) 47.
- (3) 西田孝太郎，四元哲二：甘藷の化學とその利用，(昭. 23)，83。
西田孝太郎他：特許，第177213號。
- (4) 樫本克彦：有機化學の進歩，(第2輯)，p.495.
- (5) M.H.Adams, J.M.Nelson: J.Am. Chem. Soc. **60** (1938) 2474.
- (6) M.Graubard: Enzymogia **5** (1938).
- (7) E.Yakushiji: Proc. Imp. Acad. **16** (1940) 41.
- (8) 小瀬伊俊，松原宏道：岐阜高農學術報告，第50號，p.1.
- (9) 柴田雄次，柴田桂太：東化，**41** (大. 9)，35.
- (10) 柴田雄次，金子英雄：東化，**43** (大. 11)，833.
- (11) 井上 敏：無機化學製造實驗，p.360.
- (12) 岩崎友吉：日化，**61** (1940)，400.
- (13) 岩崎友吉：日化，**63** (1942)，288.
- (14) 田所哲太郎：日化，**60** (1939)，835.
- (15) A.H.Cook: J.C.Soc. (1938) 1768.

* Langenbeck の定義によれば金屬醋塩は酵素模型と云わない。

Résumé

Enzymatic Studies on Sweet Potato (I).

On the Substrate of Polyphenolase System in Sweet Potato.

Part I. Experiment with the Model-Oxidase.

Kotaro Nishida and Naotomo Tominaga

- 1) A tannin substance was isolated by extraction with alcohol and ethyl acetate from sweet potato.
- 2) When 1/500 mol chloro-pentammine cobaltic chloride solution was added to this tannin solution, the latter coloured brownish black especially in alkaline medium and also this colouring was retarded by 1/1000 mol HgCl₂ solution.
- 3) On the other hand, it has been reported by Y. Shibata that this cobalt complex gave the same greenish black and brownish black colouring to guaiacum tincture, pyrogallol and this colouring was retarded by Hg Cl₂ solution and we recognized it too.
- 4) Therefore, the authors recognized that sweet-potato-tannin was the substrate of Polyphenolase system in sweet potato. (1949, 7, 30)