

報 文

わさびの利用に関する研究 (第6報)

ペルオキシダーゼの作用に及ぼす塩化カルシウムの影響

小 島 操 (静岡薬科大学)

緒 言

前報¹⁾に於て食塩水を抽出液に用いた場合は、蒸溜水を用いた場合に比べて、ペルオキシターゼ抽出効果があるが、反応液に添加した場合は、液性が酸性に傾くと、逆にペルオキシダーゼ阻害性を有することを認めた。この場合食塩水の代わりに CaCl_2 液を添加すると、阻害性は更に大となる。 CaCl_2 は脱水馬鈴薯の褐変妨害剤²⁾として、又毒ビタミンCの安定剤³⁾等としての研究があり、アルカリ土類塩化物のわさび粉製造への利用⁴⁾もある。 Ca^{2+} はアミラーゼ、プロテアーゼ等の不可欠原子であることは一般に認められている。少量のアルカリ土類イオンはペルオキシダーゼに促進的に作用する⁵⁾。又組織内ポルフィリン体量を変化させる⁶⁾。今回は反応液に CaCl_2 液の添加による阻害性を再検討すると共に、 CaCl_2 其の他の中性塩類液を抽出液に用いた所、食塩水と同様に抽出効果があり、 CaCl_2 液の場合は Ca^{2+} が抽出性を有することを知つたので報告する。

実 験 の 部

〔実験Ⅰ〕 抽出液のpH

ペルオキシダーゼ抽出液のpHが作用力に及ぼす影響について検討を加えるため、下記緩衝液を抽出液に用いて次の如く実験した。

抽出液……WALPOLE 緩衝液 (pH3.6及び5.0), MC ILVAINE 緩衝液 (pH3.6, 5.0, 6.8及び8.0) の6種
酵素液……前報¹⁾に準じて処理したわさび根 (静岡県伊豆産ダルマ種) を卸し金ですり卸して、その10gを上皿天秤で300cc容共栓ガラスコフラスコ中に秤り、上記抽出液を加えて200ccとなし、密栓後時々振盪し、1時間室温放置後濾過し、濾液を〔A〕液とする。〔A〕液の $\frac{1}{2}$ 部を70°Cに10分加温し、冷後濾過し、濾液を〔B〕液とする。対照としては蒸溜水を用いて、上と同様の方法で調製した液を用いた。

実験方法……前報¹⁾の如く、近藤・森田の方法に準じてペルオキシダーゼ力を比色定量した。但し反応液組成中の緩衝液はMC ILVAINEのpH5.0或は6.8を用いた。又作用力は〔A〕液の対照液のそれを100%とし、之に対する相対作用力(%)で表わした。

実験結果及び考察……実験結果は Tab.1 に示す如くである。〔A〕液を用いた場合は反応液pHが5.0の方が6.8の場合よりも作用力は何れも大で、対照液(蒸溜水抽出液)の場合は前者の100%に対し、後者は82.4%となる。抽出液として用いたWALPOLEとMC ILVAINEとを比較すると、前者のpH3.6では271%、後者のpH3.6では400%で、後者の作用力が大、pH5.0の場合にも同様に後者の方が大である。しかし同じ緩衝液ではpHが異つても殆ど増減は認められなかつた。〔B〕液を用いた場合はWALPOLEのpH3.6及び5.0, MC ILVAINEの3.6使用液は作用力が0となつた。之はWALPOLEの場合は加温により酢酸が揮散したためと考えられ、MC ILVAINEの場合は低いpHのためと考えられるが詳細については不明である。MC ILVAINEのpH5.0, 6.8, 或は8.0の場合は〔A〕液の場合と同様の傾向を示すが、作用力は〔A〕液に少し劣る。前報¹⁾に於て〔B〕液の最適pHは6.8と報告し、本実験結果とくい違ふが、之は試料中の夾雑物によるものであろう。尚MC ILVAINE緩衝液による抽出能は PO_4 イオンがペルオキシダーゼを促進する⁵⁾ことを実証している。

〔実験Ⅱ〕 緩衝液に塩化カルシウム液の添加 (其の1)

抽出液としてMC ILVAINE緩衝液に CaCl_2 液を添加したものをを用いた場合のペルオキシダーゼ力について次の如く実験した。

抽出液……MC ILVAINE緩衝液 (pH3.6, 5.0, 6.0, 6.8及び8.0) に $\frac{1}{10}$ 量の10% CaCl_2 を添加した液 (CaCl_2 液の濃度は0.2%となる)

Table 1. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of buffer solution to Wasabi root.

Enzyme		Soln. A		Soln. B	
Solvent	pH	5.0	6.8	5.0	6.8
		(%)	(%)	(%)	(%)
WALPOLE buffer	pH3.6	271	266	0	0
"	pH5.0	256	250	0	0
MC ILVAINE buffer	pH3.6	400	384	0	0
"	pH5.0	358	342	348	310
"	pH6.8	388	368	384	340
"	pH8.0	394	368	340	318
Distilled water (control)		100	82.4	82.4	68.2

酵素液……〔実験 I〕に準じ, [A], [B]両液を調製した. 対照としては CaCl_2 液無添加の緩衝液を抽出液として用いた液を採った.

実験方法……〔実験 I〕に準じたが, 反応液の緩衝液は MC ILVAINE の pH5.0 を用い, ペルオキシダーゼ力は最高値を示した [A] 液の pH8.0 の作用力を 100% とし, 之に対する相対作用力 (%) で表わした.

実験結果……実験結果は Tab. 2 に示す如くである. pH8.0 の緩衝液

に CaCl_2 を添加したものが最高値を示し, 対照として CaCl_2 を添加しない緩衝液のみで抽出したものに比し僅かに勝り, 他の pH に於ても同様に CaCl_2 添加液の方が対照液に比して勝れている. [B] 液に於ては pH3.6 の緩衝液使用の場合は〔実験 I〕と同様に不活性化するが, 他の pH に於ては作用力は [A] 液に劣るが, CaCl_2 添加液が対照液に勝っている. 即ち CaCl_2 を 0.2% の割合に添加した液は僅かではあるがペルオキシダーゼ抽出効果のあることが判明した.

緩衝液に塩化カルシウム液の添加 (其の 2)

抽出液として pH5.0 の MC ILVAINE 緩衝液に CaCl_2 液を種々の濃度に添加したものをを用いた場合のペルオキシダーゼ力について次の如く実験した.

抽出液……a) pH5.0 の MC ILVAINE 緩衝液 (対照), b) 緩衝液に $\frac{1}{10}$ 量の 10% CaCl_2 を添加 (1% CaCl_2 となる), c) 緩衝液に $\frac{1}{5}$ 量の 10% CaCl_2 を添加 (2% CaCl_2 となる), d) 緩衝液に $\frac{1}{10}$ 量の 10% NaCl を添加 (1% NaCl となる), e) 緩衝液に $\frac{1}{5}$ 量の 10% NaCl を添加 (2% NaCl となる), f) 緩衝液に $\frac{1}{10}$ 量の 10% CaCl_2 及び NaCl の添加 (1% CaCl_2 及び 1% NaCl となる), g) 2% CaCl_2 , h) 2% NaCl の 8 種

酵素液の調製及び実験方法は〔実験 I〕に準じたが, 反応液の緩衝液は MC ILVAINE の pH5.0 を用い, ペルオキシダーゼ力は対照 a) の [A] 液を 100% とし, 之に対する相対作用力 (%) で表わした.

実験結果及び考察……実験結果は Tab. 3 に示す如くである. C) の [A] 液即ち緩衝液に $\frac{1}{5}$ 量の 10% CaCl_2 を添加したものを抽出液として用い, 無加温の抽出液が最高のペルオキシダーゼ力を示し, 対照 a) の [A] 液の 100% に対し, 179%, 次いで f) の [A] 液の 178%, e) 及 b) 液の 173%, d) の [A] 液の 161% となり, CaCl_2 液のみの 135% 及び NaCl のみの 105% よりも作用力は大であり, 同濃度に於ては NaCl よりも CaCl_2 の方が抽出率は良い, [B] 液に於ても大体同じ様な傾向で, 〔実験 I〕に於て判明した如く, 緩衝液のみでも抽出効果があるが, CaCl_2 , NaCl の如き塩類を添加することにより, 更に抽出率は高まり, 之等二者の相乗効果がある様に思われる.

〔実験 II〕 抽出液に塩化カルシウムを用いた場合

抽出液に CaCl_2 液を種々の濃度で用いた場合のペルオキシダーゼ力を次の如く実験した.

Table 2. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of buffer solution and CaCl_2 solution to Wasabi root.

Enzyme		Soln. A		Soln. B	
Solvent	Added reagent	CaCl_2	Nothing	CaCl_2	Nothing
		(%)	(%)	(%)	(%)
MC ILVAINE buffer	pH3.6	95.4	91.2	0	0
"	pH5.0	95.0	91.2	77.3	76.7
"	pH6.0	97.0	94.6	84.0	83.9
"	pH6.8	90.5	81.2	81.1	79.0
"	pH8.0	100	92.7	76.7	76.6

Table 3. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of CaCl_2 solution or NaCl solution to Wasabi root.

Solvent Enzyme	a	b	c	d	e	f	g	h
	MC ILVAINE pH5.0 (%)	1% CaCl_2 in a (%)	2% CaCl_2 in a (%)	1% NaCl in a (%)	2% NaCl in a (%)	1% CaCl_2 and NaCl in a (%)	2% CaCl_2 (%)	2% NaCl (%)
Soln. A	100	173	179	161	173	178	135	105
Soln. B	66.7	135	146	121	150	143	115	77.2

抽出液……0.2%, 1%及び2%の CaCl_2 液

酵素液の調製及実験方法……[実験 I] に準じたが, 反応液の緩衝液は MC ILVAINE の pH5.0 或は WALPOLE の pH5.0 を用い, 対照として用いた蒸留水抽出液及び 1% CaCl_2 液抽出液については, 反応液に加える蒸留水 15cc の代りに Tab. 4 の如く 10% CaCl_2 を添加した場合の作用力を比色定量した. ペルオキシダーゼ力は対照として用いた蒸留水抽出液の [A] 液の作用力を 100% とし, 之に対する相対作用力 (%) を以て表わした. 尚対照液及び 1% CaCl_2 抽出液については, 液量と同量の 1%, 2%, 5% 及び 10% CaCl_2 液を加えて 2 時間放置し, ペルオキシダーゼ力を定量した.

実験結果……実験結果は Tab. 5 に示す如くである. Tab. 5-1 に示す如く, ペルオキシダーゼ力は抽出 CaCl_2 液の濃度が高まるに従つて大となる. Tab. 5-2 には [B] 液即ち 70°C 10 分加温処理酵素液について, 反応液に使用する緩衝液に WALPOLE と MC ILVAINE とを用いた結果を示した. MC ILVAINE を用いた場合は前後¹⁾ に示した結果と同様にペルオキシダーゼ力は激減するが, 之は緩衝液と CaCl_2 とが反応して, 反応液の pH を下げることに原因し, CaCl_2 液のみの影響とは考えられないことが判明したので, WALPOLE を用いた所, 殆ど増減はなかつた.

Tab. 5-3 は酵素液に直接 CaCl_2 液を反応させた場合であるが, 蒸留水抽出液及び 1% CaCl_2 抽出液の両者共に CaCl_2 により阻害される.

[実験 IV] Ca^{2+} 沈澱試薬或は Cl^- 沈澱試薬の使用

CaCl_2 液のペルオキシダーゼ抽出効果は Ca^{2+} によるものか, 或は Cl^- によるものかを検討するために, Ca^{2+} 沈澱試薬として, a) エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), b) 塩化アンモン+蔞酸+アンモニア水或は, c) 蔞酸アンモンを用い, Cl^- 沈澱試薬として硝酸銀を用いて次の如く実験した.

(A) Ca^{2+} 沈澱試薬の使用

a) EDTA の使用……M/100-EDTA 試液についてキレート滴定法所載の方法²⁾ に基いて予め 1% CaCl_2 液の Ca^{2+} を捕集した場合, CaCl_2 液 10cc について, EDTA 試液 93.0cc を要した. 故に CaCl_2 液 5cc に EDTA 試液 50cc 及び pH10 の緩衝液 ($\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NH}_4$

Table 4. Classification of exp. solution

Group	Water (cc)	10% CaCl_2 soln. (cc)	Total (cc)
1	14	1	15
2	10	5	15
3	5	10	15
4	0	15	15

Table 5. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after addition of CaCl_2 solution to Wasabi root.

Table 5-1 Buffer solution in exp. solution is MC ILVAINE pH5.0

Solvent	Enzyme	Soln. A (%)	Soln. B (%)
Dist. water		100	65.5
0.2% CaCl_2		192	180
1% CaCl_2		214	183
2% CaCl_2		220	206

Table 5-2. Buffer solution in exp. solution is MC ILVAINE or WALPOLE, and CaCl_2 solution is added to it

Group	Buffer soln. in exp. soln.	MC ILVAINE pH5.0		WALPOLE pH5.0	
	Solvent (pH)	Dist. water (%) (pH)	1% CaCl_2 (%) (pH)	Dist. water (%)	1% CaCl_2 (%)
1		22.6(4.4)	46.0(4.4)	58.7	173
2		7.4(3.8)	19.1(4.0)	60.3	171
3		5.2(3.7)	6.1(3.8)	59.5	178
4		4.0(3.6)	5.5(3.6)	59.8	180
Control		65.5(5.0)	18.3(5.0)	65.5	178

Table 5-3 CaCl_2 solution is added to enzyme solution

Added reagent	Solvent	Dist. water (%)	1% CaCl_2 (%)
1% CaCl_2		98.5	208
2% "		91.4	206
5% "		72.4	202
10% "		51.2	178

(212)

(小島) わさびの利用に関する研究 (第6報)

OH) 10ccを加え、蒸留水を加えて100ccとし、 CaCl_2 液に緩衝液を上記の使用量と等量加え100ccとした場合、緩衝液のみの場合、EDTA 試液に緩衝液を加えた場合及び蒸留水の場合のペルオキシダーゼ抽出効果と比較実験したが、EDTA 試液及びキレートに抽出効果があり、更に緩衝液pHが10の場合も対照として使用した蒸留水抽出液よりも作用力が大になった故、 Ca^{2+} の効果はわからなかつた。

b) 塩化アンモン、蓚酸及びアンモニア水の使用

キレート滴定法所載の方法⁸⁾により、塩化アンモン140g、蓚酸アンモン6gに蒸留水を加えて加温溶解し、冷後濃アンモニア水14ccを加へ、全量を1Lにした液を用いて Ca^{2+} を捕集したが、試液自身抽出力を有し、a)の場合と同様に Ca^{2+} の効果はわからなかつた。

c) 蓚酸アンモンの使用

3.5%蓚酸アンモン液は1% CaCl_2 液に対し、 $\frac{1}{8}$ 量で Ca^{2+} は蓚酸カルシウムとして沈澱する。実験には CaCl_2 液に対し、1) $\frac{1}{8}$ 量、2) $\frac{1}{4}$ 量、3) $\frac{1}{2}$ 量、4) $\frac{3}{4}$ 量、5) 等量、6) 1.5倍量、7) 2倍量の蓚酸アンモン液を添加し、濾過後全量を CaCl_2 液量の3倍量にして抽出液として使用し、蒸留水、蓚酸アンモン液の2倍稀釈液及び CaCl_2 液の3倍稀釈液を抽出比較液として〔実験I〕の方法に準じて〔A〕液を調製し、近藤・森田の方法に準じてペルオキシダーゼ力を比色定量した。この場合反応液の緩衝液はMC ILVAINE のpH5.0を用い、蒸留水抽出液の作用力を100%とし、之に対する相対作用力(%)を以て表わした。

実験結果……実験結果は Tab. 6 に示す如くである。即ち Ca^{2+} を丁度捕集するに足る $\frac{1}{8}$ 量の蓚酸アンモン液添加液抽出が対照の183%で添加液中最も小なる値を示し、 $\frac{1}{4}$ 量では264%、 $\frac{1}{2}$ 量では209%で、添加量が $\frac{1}{8}$ 量の前後に於ては大なる値を示した。尚蓚酸アンモン液の添加量が多くなるに従つて作用力が大になるのは、蓚酸アンモン液のみの場合の566%でわかる様に、残留蓚酸アンモン液の抽出能を示すものである。之の結果は Ca^{2+} が抽出能を有することを示すものである。

(B) Cl^- 沈澱試薬の使用

Cl^- 沈澱試薬として N/10- AgNO_3 液を用いれば1% CaCl_2 液は約3倍量の AgNO_3 液で AgCl として沈澱する。実験には CaCl_2 液に対し $\frac{1}{2}$ 量、等量、2倍量或は3倍量の AgNO_3 液を添加し、濾過後全量を CaCl_2 液量の5倍量にして抽出液として使用し、蒸留水、 CaCl_2 液の5倍稀釈液及び AgNO_3 液の5倍稀釈液を抽出比較液として、前実験と同様に作用力を定量した。

実験結果……実験結果は Tab. 7 に示す如く、作用力が殆ど変化しない故、 Cl^- はペルオキシダーゼ抽出能は有しない様である。

(C) 塩化アンモン或は硝酸カルシウムの使用

上記の実験に於て Ca^{2+} 沈澱試薬に蓚酸アンモン液を用いれば、 Ca^{2+} は蓚酸カルシウムとして沈澱するが、 Cl^- は NH_4Cl となり、 Cl^- 沈澱試薬として AgNO_3 液を用いれば、 Cl^- は AgCl として沈澱するが、 Ca^{2+} は $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ として溶液中に残存する故、 NH_4Cl 及び $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 液のペルオキシダーゼ抽出能を次の如く実験した。

即ち NH_4Cl 液は0.1%、5%及び10%液を使用し、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 液は1%、2%及び4%液を使用し〔実験I〕に準じて作用力を対照液(蒸留水抽出液)と比較定量した。

実験結果……Tab.8に示す如く、 NH_4Cl 液、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 液共に濃度が増すに従い、作用力は大となる。即ち両者共にペルオキシダーゼ抽出能を有する。

〔実験V〕各種中性塩類のペルオキシダーゼ抽出能

CaCl_2 液と同モル濃度(3/10M)の NaCl 、 KCl 、 CaCl_2 、 Na_2SO_4 、 NaNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Table 6. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of CaCl_2 solution and $(\text{COONH}_4)_2$ solution to Wasabi root

Solvent	$\text{CaCl}_2 + \frac{1}{30}$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	$\text{CaCl}_2 + \frac{1}{6}$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	$\text{CaCl}_2 + \frac{1}{3}$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	$\text{CaCl}_2 + \frac{1}{2}$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	$\text{CaCl}_2 + 1$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	$\text{CaCl}_2 + 1.5$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	$\text{CaCl}_2 + 2$ Vol. $(\text{COONH}_4)_2$	CaCl_2 only	$(\text{COONH}_4)_2$ only
Dist. water (control)	100%	296	264	183	209	350	450	600	566
Relative activity (%)								329	

Table 7. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of CaCl_2 solution and AgNO_3 solution to Wasabi root

Solvent	Dist. water (control)	CaCl_2 + 1/2 Vol. AgNO_3	CaCl_2 + 1 Vol. AgNO_3	CaCl_2 + 2 Vol. AgNO_3	CaCl_2 + 3 Vol. AgNO_3	CaCl_2 only	AgNO_3 only
Relative activity (%)	100%	165	169	161	150	160	140

及び NH_4Cl 液を抽出液として用いた場合のペルオキシダーゼ力を比較した。

実験方法……実験〔I〕に準じたが、〔A〕液について、反応液のpHは5.0に於て行つた。

作用力は対照（蒸溜水抽出液）のそれを100%として、相対作用力（%）を以て表わした。

実験結果……実験結果は Tab.9 に示す如く、塩類液使用は何れも作用力大で $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 液が725%で最高で CaCl_2 , Na_2SO_4 , NaCl , NaNO_3 , KCl , NH_4Cl の順となり、 NH_4Cl 液に於ても530%で対照液に比し、はるかに勝る値である。傾向はCa塩類が勝り、Na塩類、K塩類、 NH_4 塩類の順であつた。

Table 8. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of NH_4Cl solution or $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution to Wasabi root

Solvent	Dist. water (control)	0.1% NH_4Cl	5% NH_4Cl	10% NH_4Cl	1% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	4% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
Relative activity (%)	100%	161	540	544	410	481	514

Table 9. Changes of peroxidase activity (expressed in relative activity, %) after an addition of 2/10 M salt solution to Wasabi root

Solvent	Dist. water (control)	NaCl	KCl	CaCl_2	Na_2SO_4	NaNO_3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	NH_4Cl
Relative activity (%)	100%	668	636	702	695	646	725	530
Order	8	4	6	2	3	5	1	7

要 約

- 1) わさびペルオキシダーゼについて
 - a) 抽出液のpHには影響されないが、緩衝液 (WALPOLE 及び MC ILVAINE) に抽出能がある。
 - b) 反応液へ CaCl_2 液添加の場合の作用力の低下は主にpHの変化によるもので、 CaCl_2 個有の性質ではない。
- 2) CaCl_2 液のペルオキシダーゼ抽出能は主に Ca^{2+} による。
- 3) わさびペルオキシダーゼの抽出液として $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , Na_2SO_4 , NaCl , NaNO_3 , KCl 或は NH_4Cl の7種の同モル溶液を用いた所、何れも蒸溜水抽出液よりペルオキシダーゼ力は大で、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 液最も大で羅列の順に減ずる。

終りに臨み、御指導並びに御校閲を賜つた大阪大学照井堯造教授、寺本四郎教授及び本学小沢樹夫教授、試料を御提供下さつた静岡県林業指導所築地録太郎所長及び静岡田丸屋商店望月雅二氏に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 小島：本誌，35，12 (1957)。
 - 2) M. SIMON et al : Food Technol. 9, 271 (1955)。
 - 3) S.E. ERIKSON and R.E. BOYDEN : Kentucky Agr. Expt. Sta., Bull No. 511, 3 (1947), C.A. 45, 3093 (1951)。
 - 4) 山本・岩田：特許公告，No. 7939 (昭29)。
 - 5) A.J. SMIRNOW : Biochem. Z., 155, 1 (1925)。
 - 6) 神前：酵素学，523頁 (昭27，至文堂)。
 - 7) 上野：キレート滴定法，128頁 (昭31，南江堂)。
 - 8) 上野：キレート滴定法，126頁 (昭31，南江堂)。
- (昭和 32, 3, 23 受理)