II. 軟腐病甘藷の醗酵 当学部農場に於て貯蔵中軟腐病菌 (*Rhizopus nigricans* によると云わる) に犯されブヨブヨに軟化した甘藷の皮部を除き輪切して乾燥したものを試料とした。このものは澱粉価 68.29%, 粗蛋白質 3.0% であつた。試験醗の組成及び醗酵成績はそれぞれ Table 4 及び Table 5 に示す如くである。

Table 4. Composition of the Test Mashses of Soft-rotten Sweet Potato.

No.	Sound Sample (g)	Soft-rotten Sample (g)	Soybean Cake (g)	Tap-water (cc)	Conc. of Mash. g of Sweet potato per 100 cc water	Starch value, mg	
						Test mash only	Test mash + Inoculum
1	15	0	1	150	10	10.600	10.952
2	10	5	1	100	10	10.548	10.873
3	7.5	7.5	1	100	10	10.522	10.847
4	5	10	1	100	10	10.497	10.822
5	0	15	1	100	10	10.445	10.777

Table 5. Result of Analysis of Fermented Mashses of Soft-rotten Sample

No.	Time after inoculation (hrs.)	Iodine reaction for Starch	pH	Acidity(cc)	Acetone Produced			
					mg/100 cc	Total (mg)	% based on Starch Value	Rate
1	65	—	4.8	2.2	796	1,258	11.51	100
2	65	±	5.0	2.1	738	1,173	10.79	93.0
3	65	±	5.0	2.2	718	1,149	10.45	90.8
4	69	+	4.8	2.4	652	1,030	9.52	82.7
	92	+	4.6	2.4	627	991	9.16	79.6
5	69	+	5.0	2.6	617	993	9.22	80.1
	92	+	4.6	2.9	612	985	9.15	79.5

Table 5 中 No. 1 (健全甘藷のみ) は head の形成最も早く他は之に次いだ。何れも良く醗酵した。そして No. 5 (軟腐病甘藷のみ) でも No. 1 に比して対澱粉アセトン収量は約 80% であつて、黒斑病甘藷に比してその醗酵ははるかに容易であつて実用に供し得ると考えられる。

本研究は文部省科学研究費によつて行われたもので、昭和 27 年 10 月岐阜大学で開かれた中部地区農林学会で講演したことを附記する。

Summary

Fermentation tests was carried out using black-rotten and soft-rotten sweet potatoes. The former was the sample which was artificially spoiled by incubating sound sweet potato at 22° for 20 days after inoculating with spores of *Ceratostomella fimbriata*, and the latter was obtained from the cellar which was naturally spoiled by microbes during the storage (*Rhizopus nigricans* is said to be responsible). The results of fermentation tests are summarized as follows :

(1) Fermentation of mashses of black-rotten sample (plus 1/15 soybean cake) was found very difficult; the rate of acetone yield obtained is as follows: 7 in the 10% mash, 8.2 in the 8% mash, and 10.5 in the 6% mash of black-rotten sample, respectively, compared with 100 in the 10% mash of sound sample (the same amount of soybean cake was also used). Fermentation of black-rotten sample has somewhat been improved by mixing with large amount of sound sample; e.g., the rate of acetone yield from black-rotten sample could be increased to about 50, 85, and 88 compared with 100 of sound sample when 2, 5, and 14 parts of sound sample were mixed with 1 part of black-rotten sample respectively.

(2) Fermentation of soft-rotten sample was not so difficult as black-rotten one. About 80 per cent acetone was obtained from 10% mash of soft-rotten sample (plus 1/15 soybean cake) compared with sound one (the same amount of soybean cake was also used). Acetone yield from soft-rotten sample was gradually increased as the increasing rate of the sound sample mixed.

茶葉酸化酵素の研究 (第 1 報) 阻害剤の影響と基質の特異性

大 島 康 義, 中谷己佐子 (九州大学農学部生物化学研究室)

昭和 28 年 3 月 20 日 受 理

Studies on the Oxidase of Tea Leaves. Part 1. The Effects of Inhibitors and the Specificity of Substrates.

By Yasuyoshi ÔSHIMA, and Misako NAKATANI. (Biochemical Laboratory, Fac. Agr., Kyushu University.)

植物の呼吸の階程が動物のそれと同じであるという結果は近年ますます明かにされつつあるが、なお植物体に

は動物の cytochrome oxidase⁽¹⁾ (小麦胚) 以外に polyphenoloxidase⁽²⁾ (馬鈴薯, 波稗草) や未詳の non-metal enzyme (人蔘の葉) が報ぜられている⁽³⁾。馬鈴薯に於ては近年まで polyphenoloxidase が dehydrogenase 系から H⁺ を受けとり直接 O₂ と結びつく酵素即ち末端呼吸酵素 (terminal oxidase) と考えられていたが, SCHADE⁽⁴⁾等によつて CO の阻害が光により回復する事が明にされ cytochrome oxidase も同時に働いていると考えられるようになった。斯くの如く cytochrome oxidase と polyphenoloxidase が何故共存しているかは、植物呼吸の大きな問題である。茶葉に於ては従来紅茶製造との関連もあるので比較的多くの研究が行われているが、主なものとしては ROBERTS⁽⁵⁾⁻⁽⁷⁾ の cytochrome-peroxidase 説と LAMB, SREERANGACHAR 等⁽⁸⁾⁻⁽¹¹⁾ の polyphenoloxidase 説が挙げられる。著者等は検圧法を用いて、阻害剤の影響からこの二説を検討すると共に基質に対する特異性を考察した。

実 験 の 部

1. 酵素剤の調製 茶葉は学内の在来品種の一芯二葉を摘採し、無水 acetone 等量を加え 5° 附近の低温で blender にかき、後 acetone 可溶分 (タンニンその他) を充分瀧別洗滌し、残渣を減圧乾燥せるものを酵素剤とした。このようにして調製した酵素剤は 0~5° の冷蔵庫に貯蔵すれば頗る安定で、2 カ月貯蔵した後も活性度の 90% 以上が残存していた。

2. 活性度の測定 Warburg manometer を使用し 30°, 振盪速度 100 回/分、約 15 cc の容器で測定した。活性度測定の標準として catechol を基質として用いた。アスコルビン酸-catechol 混液はアスコルビン酸が割に不安定な為使用しなかつた。ガス相は O₂ とし、中央室に 10% KOH 0.2 cc と濾紙の小片を入れ CO₂ を吸収せしめた。基質は側室に入れておき反応開始時に酵素剤を分散させた主室に投入した。全液量は磷酸緩衝液 pH 6.4 を以て 3 cc となる如くした。

3. 阻害剤の影響 前述の酵素剤 50 mg に対して catechol 2 mg を基質とし種種の阻害剤各濃度添加の場合の O₂ 吸収量を Table 1 に示す。

(a) Nitrophenol 類による阻害: 4-nitrocatechol 及び *p*-nitrophenol は polyphenoloxidase に特異な阻害剤として知られているが⁽¹²⁾ *o*-nitrophenol, *m*-nitrophenol, 3-nitrocatechol についても実験を行つた。*o*-Nitrophenol は溶解度小なる為 10⁻³M は実験されず、それ以下の濃度で阻害の影響は認められなかつたので、Table 1 には示さなかつた。*p*-Nitrophenol は 10⁻³M 程度で阻害は非常に小で、4-nitrocatechol は僅か阻害を示している。BONNER⁽¹¹⁾ は茶葉 acetone 調製酵素剤に於て *p*-nitrophenol の阻害を認めているが、之は次に示す基質特異性が *o*-diphenol に強く monophenol は非常に弱いから、nitrophenol も monophenol 誘導体である為酵素に対する特異性が小さく阻害作用が弱いと考えられる。*m*, *p*. の置換基の関係について、阻害の強さは nitrophenol の場合では、*m* > *p*, nitrocatechol では *m* < *p* で両者等しくなく、逆の関係を示している。

(b) KCN による阻害: CN の阻害は 10⁻³M で現れ、10⁻²M では相当に強く現れた。Cytochrome oxidase であるならば 10⁻³M 程度で顕著な阻害を受ける筈であり、ROBERTS の云う如く如何に酵素系が複雑であるとしても、之を以て cytochrome oxidase と断定するのは妥当でないと思われる。

(c) CO による阻害: 以上の阻害剤の影響からはその強さ、濃度の関係から何れとも判然とせぬ為 CO による阻害を同様な条件で実験した。この時ガス相は、CO : O₂ = 80 : 20 に置換して行つた。Cytochrome oxidase の阻害は光により回復し、polyphenoloxidase では回復しない為、100 W 電球を水面上 3 cm (容器上 5 cm) に取付け、この照射時の阻害と装置全体を黒布で覆つた時の暗所時の阻害を比較し、これを Fig. 1 に示す。Fig. 1 に示す如く CO により阻害されるが、之は光照射で回復は認められないので、この場合の酸素吸収は cytochrome oxidase の参加がないようである。実際の生葉に於て、polyphenoloxidase が末端呼吸酵素として働いているかどうかは、此の実験のみでは不明であるが、少くとも酵素剤調製による如き、或は他の原因に基く傷害で組織の破壊された場合 (例えば紅茶製造時の揉捻の如き) の酸化酵素系は cytochrome oxidase でなくて polyphenol oxidase が主として働いている可能性が推察される。

4. 基質特異性 活性度測定の実験と同様種種の polyphenol 類及び diamine 類を基質として O₂ 吸収量を測定し、catechol の場合を 100 として比較した。その結果を Table 2 に示す。

基質は D-catechin, tyrosine を除き、各 2 mg を用いた。D-catechin は他の polyphenol 類に比し分子

Table 1. Effects of Various Inhibitors on Tea Oxidase.

Units of relative activity are expressed by O_2 uptake (μl). Acetone prepared tea leaves 50 mg. per vessel in every cases. Concentration of treated substrate: catechol 2 mg. per vessel.

Inhibitor	Concn. (M)	Time (min.)				Inhibition (%)
		3	9	15	21	
None.	—	31	75	115	149	0
3- NO_2 -catechol	10^{-3}	31	76	117	150	—
4- NO_2 -catechol	10^{-3}	23	57	93	125	16.1
<i>p</i> - NO_2 -phenol	3.5×10^{-2}	30	68	101	145	2.7
<i>m</i> - NO_2 -phenol	5×10^{-2}	24	60	89	122	18.1
KCN	10^{-3}	21	54	80	102	31.5
KCN	10^{-2}	13	34	52	68	54.4

量約 2 倍なる為 4 mg, tyrosine は溶解度小なる為 1 mg を用いた.

Orthodihydroxy 或は 1, 2, 3-trihydroxy が酸化され易く, 就中特に D-catechin が他のどの polyphenol より速かに酸化される. 茶葉酸化酵素が茶葉タンニンの基本をなす catechin に対し, 強く特異性大である事は, 紅茶製造に於ける茶葉酸化過程に重要な意義を有するものと思われる. 3 価 phenol では pyrogallol が酸化大であるが, そのカルボン酸誘導体である gallic acid は殆んど酸化されず, ester 化されると酸化され易くなり, アルキル基が大なる程酸化され易くなる.

Diamine 類では paraphenylen diamine が最も酸化され易く, -OH 基と - NH_2 基の相違が示される.

考 察

紅茶製造に於ては揉捻及び醗酵中にタンニンが酸化されて着色の原因

Table 2. Substrate Specificity of Tea Oxidase.

Units of relative activity are expressed by O_2 uptake (μ) per 30 min. Acetone prepared tea leaves 50 mg. per vessel in every cases.

• Concentration of each substrates: 2 mg. per vessel. But tyrosine: 1 mg. D-catechin: 4 mg.

Substrate	O_2 uptake (μl)	Relative activity	Substrate	O_2 uptake (μl)	Relative activity
Catechol	95	100	Ethyl-gallate	40	42.1
Pyrogallol	140	147.3	Methyl-gallate	15	15.8
D-Catechin	280	294.7	Gallic acid	2	2.5
Hydroquinone	65	68.4	Protocatechuic acid	2	2.5
Tyrosine	60	63.1	<i>p</i> -Phenylenediamine	70	73.7
Resorcline	5	5.2	<i>m</i> -Phenylenediamine	20	25.1
Phloroglucine	5	5.2	<i>o</i> -Phenylenediamine	20	25.1
<i>p</i> -Cresol	3	3.1			

となる. この間に酸素が摂取されているが, これに直接関与する酵素が cytochromeoxidase, polyphenol-oxidase の何れであるかという事は, 植物の葉が損傷された場合の酸化機構という基本的問題と, 紅茶製造という実際の立場とから興味ある重要問題である.

上述の CO による阻害反応の実験結果によれば, 光による回復がないので, この場合の末端酸化酵素は cytochromeoxidase でないように思われる. 実際に生葉に於ける呼吸系は実験状態とは異り, Kailin 系を含むものであつて cytochrome 系の関与が当然考えられる. 然し損傷を受けたような条件下にはタンニン酸化が主として行われ, タンニン酸化が, 或は呼吸系の一部に含まれるかも知れないが, 全部でないとしても, この場合の末端酸化酵素が主として polyphenoloxidase であろう事が推察出来るように思われる. BONNER⁽³⁾によれば, 茶葉の polyphenoloxidase は損傷時にタンニンの酸化に働くが呼吸には関係している様子はないと報告している. 既に ROBERTS は茶葉中に cytochrome oxidase の存在を確かめているが, 茶葉中の正常呼吸末端酵素が cytochrome oxidase か否かを決定するにはなお今後の研究を要すると思われる.

Fig 1 Inhibition of Carbon monoxide.

Acetone prepared tea leaves 50 mg. per vessel in every cases.

Concentration of treated substrate: catechol 2 mg. per vessel.

Curve I: Gas phase... O_2

Curve II: Gas phase... O_2 : CO=20:80.

基質特異性についてみるに, gallic ester のアルキル基が大きくなると酸化され易くなるから, catechin の gallic ester もかなり酸化され易いと思われるが, 遊離の catechin との比較は興味がある. この点については今後実験を行う予定である.

要 約

- (1) 茶葉の酸化酵素に対する nitrophenol 類の阻害作用は Table 1 の如く, 3-nitrocatechol はなく, *p*-nitrophenol は弱く, 4-nitrocatechol, *m*-nitrophenol は軽微である.
- (2) KCN の阻害は $10^{-3}M$ では弱く, $10^{-2}M$ でやや顕著に現れるが, かかる阻害では cytochrome oxidase と考え難い.
- (3) CO による阻害は光線では回復しないので, このような条件で働くのは, cytochrome oxidase でなく polyphenoloxidase であると考えられる.
- (4) 基質としては, orthohydroxy, 或は 1,2,3-trihydroxyphenol が酸化され易く, 就中特に catechin が他のどの polyphenol よりも特異性が大きい.
- (5) Gallic acid は酸化される程度が弱い, ester にすると強くなる.

-
- (1) W.D. JAMES : *Ann. Rev. Biochem.*, 15, 417 (1946).
 - (2) E.S.G. BARRON : *Advances in Enzymology*, 3, 149 (1943).
 - (3) J. BONNER : *Plant Biochemistry*, Academic Press, (1950) p. 200.
 - (4) Hilton LEVY and Arthur L. SCHADE : *Arch. of Biochem.*, 18, 85 (1948)
 - (5) E.A.H. ROBERTS and SARMA : *Biochem. J.*, 32, 1819 (1938).
 - (6) E. A. H. ROBERTS : *Biochem. J.*, 33, 836, 842 (1939) ; 34, 500 (1940) ; 35, 909, 1209 (1941).
 - (7) E.A.H. ROBERTS and D.J. WOOD : *Biochem. J.*, 47, 175 (1950) ; 49, 414 (1951) ; 50, 292 (1952).
 - (8) J. LAMB and H.B. SREERANGACHAR : *Biochem. J.*, 34, 1455 (1940).
 - (9) H.B. SREERANGACHAR : *Biochem. J.*, 35, 1106 (1941) ; 37, 661, 669 (1943).
 - (10) D. BAKER and J. M. NELSON : *J. G. Physiol.*, 26, 269 (1943).
 - (11) Lien Piao LI and J. BONNER : *Biochem. J.*, 41, 105 (1946).

Summary

- (1) The results of the studies on inhibitory effects of catechol- and phenol-derivatives on the tea oxidase were shown in Table 1, i.e., 3-nitro-catechol gave no inhibition, *p*-nitro-phenol a little, and 4-nitro-catechol and *m*-nitro-phenol some inhibition.
 - (2) The inhibition by potassium cyanide was minute at the concentration of $10^{-3}M$, but it was somewhat considerable at the concentration of $10^{-2}M$. Thus the inhibition could not be attributable to cytochrome oxidase.
 - (3) Since the inhibition by CO was not recovered by the light radiation, it was considered that the oxidase working under this condition was not cytochrome oxidase but polyphenoloxidase.
 - (4) Concerning the results of the specificity of tea oxidase to the substrate it was observed that orthohydroxy or 1, 2, 3-trihydroxy phenol was easily oxidized, above all catechin was the most oxidizable.
 - (5) Gallic acid was only a little oxidized, but its esters were easily oxidized.
-