develop.

On *Asp. usamii* mut. *shirousamii* we found :

(1) Amylolytic and acid-producing powers of the mutant was almost the same as those of parent strain as shown in the Tables.

(2) The mutant was found to be a powerful saccharifying agent for alcoholic fermentation.

H. IZUKA and T. YAMAGUCHI *J. of Chem. Soc. Japan*, Vol. 26, P. 71 (1952).

Glutathione に関する研究 (第 9 報) Glutathione の定量法中沃度法.

藤田 沼田 定量法に於ける Ascorbic acid oxidase の

Glutathione に対する挙動に就て

黒 岩 芳 郎 (麒麟科学研究所尼崎分室)

昭和 29 年 8 月 28 日 受理

Researches on Glutathione. Part 9. Studies on the Iodometric Procedure among the Determination Methods of Glutathione. On the Behaviour of Ascorbic Acid Oxidase on Glutathione in FUJITA-NUMATA's Method.

By Yoshiro KUROIWA (Kirin Research Institute, Amagasaki Laboratory)

I. 緒 言

藤田・沼田法⁽¹⁾の骨子は試料抽出液を pH 6~7 に於て ascorbic acid oxidase (AAO と略す) を添加し 30° に於て 5 分間酸素を通じて ascorbic acid (AA と略す) のみを破壊し、残留 glutathione (GSH と略す) を KIO_3 を以て定量せんとするものであつて AA のみが酸化され GSH が完全に残存するならば申分はない。然しながら藤田自身の認める如く⁽¹⁾ GSH は AAO 使用如何によつて多少破壊されるものであり、又一方 GSH を pH 6~7 に置き且つその上に 30° に於て酸素を通じる事は GSH の性質上甚だ危険の如く思われたので、本報に於てはこれらの疑義解明の目的を以て種々検討を試みた次第である。その結果藤田・沼田法に於ける規定された各条件はそれぞれ多少なりとも GSH の破壊を招く事を明らかにし、特に GSH 及び AA 共存の場合に対する AAO の挙動は藤田・沼田の見解と全く異にする事を確認した事は重要である。又生体資料中 AAO に対する anti-oxidase action を有する特種な資料の存在する事を見出したので、GSH の AAO による定量に際しその適用上の注意を喚起した。

II. 実験成績

1) Ascorbic Acid に対する Ascorbic Acid Oxidase の Activity と破壊力

AAO の調製 : FUJITA and SAKAMOTO⁽²⁾ 法及び LOVETT-JANISON and NELSON 法⁽³⁾ に従つて南瓜及びなす皮部を試料とした。

Table 1. The Activity of Ascorbic Acid Oxidase and Oxygen Volume Necessary for Destruction of Ascorbic Acid.

2 cc of 20 mg % ascorbic acid in 2 % HPO_3 was used for experiment after pH was adjusted to 6.0 ~ 6.2. 0.05 cc KIO_3 was used. The theoretical : 4.27 cc N/1000 KIO_3

Activity of oxidase (units)	10 cc O_2 /min. for 5 min. at 30°		5 cc O_2 /min. for 5 min. at 30°	
	T. V. (cc)	D. D. (%)	T. V. (cc)	D. D. (%)
9.6	0.0	100.00	0.0	100.00
4.8	0.04	99.06	0.20	95.32
2.4	0.27	93.68	—	—

Note : T. V. = Titration value, D. D. = Degree of Destruction. This abbreviation was adopted in all the tables in this report.

AAO の効力検定 藤田・沼田法は 2 cc of 20 mg % AA in 2 % HPO_3 を用い pH 6, 30°, 5 分間の酸素通気処理にて之を破壊し得る酵素液を以て適当なるものとしたが著者は尙別に LOVETT-JANISON and NELSON 法⁽³⁾によつてその activity を決定後使用する事とした。

藤田・沼田法は 5 分間の酸素通気量に就て何ら指示していないが Tabel 1 に於ては 5~10 cc/min. を適当なる量として選んだ。Table 1 によれば AAO の使用量と activity の決定は通気量に関連するものである事を知る。

本報に於て GSH 或いは AA に対する「破壊」なる字句は適切を欠くかも知れないが、それぞれの還元型が酸化型となり或いはそれ以上に酸化されて KIO_3 によ

つて直接反応しない形態となる事を指すものとする。

(2) Glutathione に対する Ascorbic Acid Oxidase の破壊作用

GSH と共存する AA を AAO を以て破壊せんとする場合藤田・沼田法に規定された各条件が GSH に対して演ずる挙動を検する事とした。先ず pH の GSH に対する破壊をみるに Table 2 によれば pH 6~7 に保つ事のみによつて GSH は 30°, 5 分間に 0.31~1.24% 破壊されるものである事を知る。この関係は KERTESZ⁽⁴⁾の成績とよく一致するもので、氏によれば GSH は 30°, pH 7.4 にて 1 時間に 15~20% の自己酸化を受ける

Table 2. The Destructive Behaviour of pH on Glutathione.

2 cc of 25 mg % GSH in 2% HPO₃ were retained at 30° for 5 min. in range of pH 5.5~7.0 under the condition independent of O₂ passing and oxidase. The theoretical: 1.615 cc (N/1000 KIO₃).

pH	T.V. (cc)	D.D. (%)
5.5	1.615	0.0
6.0	1.610	0.31
6.5	1.605	0.62
7.0	1.595	1.24

という。これを 5 分間平均にすれば 1.26~1.67% 酸化される事となるからである。

AAO の影響は Table 3 によれば Table 1 の成績より 20 mg % AA を破壊するのに必要な AAO の activity 9.6 及び 4.8 units のものを選び 0.05 cc を用いたが pH 6~7, 30°, 5 分間に GSH は 1.24~2.48 % 破壊される事となる。

酸素通気の影響は Table 4 によれば通気量の増加につれて増加するが毎分 5 cc, 10 cc, 20 cc の条件に於て

Table 4. The Destructive Behaviour of O₂-Passing on Glutathione.

0.05 cc Oxygen was passed through 10~40 cc per min. in the absence of oxidase. The other experimental conditions are the same above. The theoretical: 1.6105 cc (N/1000 KIO₃)

O ₂ Passing Titration pH	5 cc/min.		10 cc/min.		20 cc/min.		40 cc/min.	
	T.V. (cc)	D.D. (%)	T.V. (cc)	D.D. (%)	T.V. (cc)	D.D. (%)	T.V. (cc)	D.D. (%)
5.5	1.595	0.63	1.595	0.63	1.595	0.63	1.590	0.93
6.0	1.580	1.56	1.580	1.56	1.580	1.56	1.575	1.87
6.5	1.575	1.87	1.575	1.87	1.570	2.18	1.565	2.49
7.0	1.565	2.49	1.565	2.49	1.560	2.80	1.555	3.12

Table 5. The Destructive Action of O₂-Passing and of Ascorbic Acid Oxidase on Glutathione.

Simultaneously with 0.05 cc oxidase was operated O₂ passing. The other conditions are the same above.

O ₂ Passing Activity of oxidase The theoretical Titration pH	5 cc/min.				10 cc/min.			
	9.6 units 1.605 cc		6.4 units 1.600 cc		6.4 units 1.600 cc		4.8 units 1.605 cc	
	T.V. (cc)	D.D. (%)	T.V. (cc)	D.D. (%)	T.V. (cc)	D.D. (%)	T.V. (cc)	D.D. (%)
5.5	1.580	1.56	1.575	1.56	1.575	1.56	1.580	1.56
6.0	1.565	2.49	1.565	2.19	1.565	2.19	1.565	2.49
6.5	1.550	3.43	1.550	3.12	1.545	3.44	1.555	3.12
7.0	1.540	4.05	1.545	3.44	1.540	3.75	1.545	3.74

る多少の実験条件の差異によつて多少その成績を異にする事がある。

以上の如く藤田・沼田法に於ける pH 6~7 に於て AAO を添加し 30° に於て 5 分間酸素通気を行うこの規定処理はその各が GSH に対して多少の破壊作用を示すもので、従つて Table 5 の成績にみられる如くこれらの総合操作に於ては著者の予期した如くかなりの破壊を招くものである事は定量各操作に当り注意を要する。

(3) Glutathione 及び Ascorbic Acid の共存溶液に対する Ascorbic Acid Oxidase の作用

GSH 及び AA の共存溶液に対する AAO の挙動を検するに Table 6 によれば GSH が単独に存在する場

は破壊率の差異は殆んど認められない。Table 4 は Table 2 の他に酸素通気の影響の加算されたもので前述の如く藤田・沼田法は通気量を規定していないが 5~10 cc/min. を適当な量として選んでも pH 6~7 の条件に於てその破壊率は 1.56~2.49% に達する。

Table 5 に於て 20 mg % AA を破壊するのに必要な AAO 量を用い酸素通気に於ける AAO の GSH に対する破壊作用を検するに Tables 3, 4, 5 に於ける各実験結果は茲に綜合されて、pH 6~7 に於て 2.19~4.05% の GSH の破壊がみられる。Table 5 はその 1 実験例を記載したものであつて実験毎に於け

合よりは、AA の共存する場合の方が常に GSH の破壊率は大となる結果を与えた。藤田・沼田によれば AAO は AA のみに作用してその間 GSH は殆んど変化を受けないと云い、かくてこそ彼等の定量法が成立した次第であるが、Table 6 によれば彼等の成績とは異り GSH と AA の AAO による酸化は同時に進行するもので更に、この場合 GSH の AA に対する保護作用が少々認められ従つて両者共存に於て却つて GSH の酸化される結果を生じたものと考えられる。

Table 6. The Destructive Behaviour of Ascorbic Acid Oxidase on Glutathione in 2% HPO_3 -Solution Concurrently Present with Ascorbic Acid.

Oxygen was passed at the rate of 10 cc/min. at 30° for 5 min. after pH was adjusted to 6.5. 0.05 cc oxidase was added (Activity: 6.4 units). Titrated with $N/1000 \text{ KIO}_3$.

Test soln. mixed with			The theoretical (cc)	T. V. (cc)	D. D. (%)
GSH	Ascorbic acid	2% HPO_3			
1 cc 50 mg %	1 cc 10 mg %	—	1.625	1.570	3.38
1 cc 50 mg %	—	1 cc	1.625	1.585	2.46
1 cc 25 mg %	1 cc 10 mg %	—	0.813	0.790	2.83
1 cc 25 mg %	—	1 cc	0.813	0.800	1.60
1 cc 10 mg %	1 cc 10 mg %	—	0.325	0.315	3.08
1 cc 10 mg %	—	1 cc	0.325	0.320	1.54

は AA が AAO によつて酸化される速度の 5 倍なる事を証明している。一方 KERTESZ⁽⁴⁾ によれば GSH と AA とは AAO の存在に於て同時に酸化されるもので、AA の GSH による完全保護は認められないという。かくて AAO の挙動は關して 3 説の存在する事となるが Table 6 の成績は KERTESZ 説に一致する事を示し、藤田・沼田説と異なる事は彼等の定量法成立原理に抵触する重要な事象と考えられる。

(4) Anti-Oxidase Action に就て

以上までの成績は総て GSH 及び AA が共に結晶溶液である場合の実験結果である。然るに天然物抽出液に対する AAO の作用に就て次の如く anti-oxidase action を呈する試料のある事を見出した。即ち 2 cc of 20 mg % AA in 2% HPO_3 を藤田・沼田の検定法に従つて完全に酸化し得る AAO 量を用いて、天然物抽出液中の AA に対して作用せしめる時、これを酸化し得ない現象であつて実験試料中此の作用あるを見出したのは柿葉及び桑葉の抽出液であつた。広く試料を求めるならば更にかかる性質の試料を見出し得るものかもしれない。

Table 7 に於ける AAO の 0.02 cc 及び 0.006 cc. はそれぞれ 0.53 mg 及び 0.16 mg ascorbic acid を酸化し得る筈であるが、表示の如く AA を満足に酸化し得ない現象を生ずるのであつて従つて KIO_3 消費値を

Table 7. Anti-Oxidase Action

(1) Persimon Leaf Ext.

1 cc of 20 times ext. of persimon leaf was titrated with $N/1000 \text{ KIO}_3$. If this value 1.16 cc were regarded as ascorbic acid alone, it should correspond to 0.102 mg. In every experiment was used 0.02 cc oxidase, which was able to oxidize 2 cc of 20 mg % ascorbic acid (0.4 mg) with 0.015 cc oxidase.

Ext. used	0.5 cc	1.0 cc	2.0 cc	3.0 cc
% HPO_3 added	2.5 cc	2.0 cc	1.0 cc	0 cc
The value calculated as ascorbic acid	0.051mg	0.102mg	0.204mg	0.306mg
$N/1000 \text{ KIO}_3$ -value after enzymatic oxidation	0 cc	0.11cc	1.07 cc	1.67cc
GSH value calculated from the KIO_3 value	0 mg%	67.54 mg%	328.49 mg%	341.79 mg%

Reference

End-point is sharp
End-point is more or less put off
End-point is put off
End-point is extremely put off

(2) Mulberry Leaf Ext.

1 cc of 15 times ext.: 0.40 cc ($N/1000 \text{ KIO}_3$). 0.4 cc value calculated as ascorbic acid: 0.352 mg. 0.006 cc oxidase as same as the above activity was used (this activity is able to oxidize 0.16 mg ascorbic acid).

Ext. used	0.5 cc	1.0 cc	3.0 cc
2% HPO_3 added	2.5 cc	2.0 cc	0 cc
The value calculated as ascorbic acid	0.018 mg	0.035 mg	0.105 mg
$N/1000 \text{ KIO}_3$ value after enzymatic oxidation	0.01 cc	0.05 cc	0.21 cc

GSH value calculated from the KIO_3 -value 9.21mg% 23.03mg% 32.33mg%

Reference

End-point is sharp
End-point is more or less put off
End-point is put off

残留しこれより GSH に換算する時は思掛けない誤謬を生ずる事となる。即ち Anti-oxidase action を呈す

る未知物質が抽出液中に存在する事を示すものである。植物試料としてキウリ、トマト、緑麦草、松葉、南瓜葉、動物試料として血液、肝臓、筋肉、胃等を検したがこの anti-oxidase action は認められなかつた。

III. 要 約

(1) 藤田・沼田法に於ける ascorbic acid oxidase の glutathione に対する挙動を検討した。

(2) 藤田・沼田法に於て ascorbic acid oxidase を作用せしめる規定条件を検するに各条件は glutathione に対して多少なりとも破壊を招くもので、その総合影響を検するに、酸素通気量を毎分 5~10 cc に限定するならば約 2.2~4.1% の破壊を生ずる結果となる事を知つた。従つて glutathione の破壊を最小限にする為には酵素を作用せしめる各操作に細心の注意を必要とする。

(3) Glutathione 及び ascorbic acid 共存溶液に対する ascorbic acid oxidase の影響をみるに glutathione は ascorbic acid と共存する事によつて glutathione 単独にて oxidase に接する場合よりは更にその破壊率を高める結果となつた。此の成績は藤田・沼田及び HOPKINS and MORGAN の成績と異り KERTESZ の成績と一致するもので、藤田・沼田の見解と異なる事は重要な事象である。

(4) 試料中の ascorbic acid を充分酸化し得る ascorbic acid oxidase 量を用いて尙これを酸化し得ない現象即ち anti-oxidase action を有する試料として柿葉及び桑葉を見出した。かかる試料の場合は思わざる誤謬を犯す結果となる事は当然であつて注意を要する。

稿を終るに当り本研究発表を許可せられた当社常務取締役大塚義男、時国益夫両氏の御厚意を感謝し、又実験に際して御指導を辱うした前所長奥田譲及び故湯川又夫両博士及び現所長熊沢武雄取締役、更に御校閲の勞をとられた京大片桐教授に深謝の意を表する。

(1) A. FUJITA and INUMATA ; <i>Biochem. Z.</i> , 299, 249 (1938).	1409 (1940).
(2) A. FUJITA and T. SAKAMOTO : <i>Biochem. Z.</i> , 297, 10 (1938).	(4) Z. I. KERTESZ : <i>Biochem. J.</i> , 32, 621 (1938).
(3) P. L. LOVETT-JANISON and J. M. NELSON : <i>J. Amer. Chem. Soc.</i> , 62,	(5) F. G. HOPKINS and E. J. MORGAN : <i>Biochem. J.</i> , 30, 1446 (1936).

Summary

I have examined the behaviour of ascorbic acid oxidase (AAO) on glutathione (GSH) in FUJITA and NUMATA's method. Its principle is to destroy ascorbic acid (AA) alone, when it is concurrently present with GSH, with AAO by O_2 -passing for 5 min. at pH 6~7 and to determine the remained GSH. I have certified that every determination condition above indicated by FUJITA and NUMATA has caused the destructive effect on pure GSH solution (Tables 2, 3, 4), and when oxygen was passed through at the rate of 5~10 cc per min. at 30°, at pH 6~7, the synthetic effect on GSH has reached about 2.2~4.1% destruction (Table 5).

On the other hand the destructive effect of AAO on GSH in solution simultaneously present with AA, has been greater than the effect on pure GSH sole solution. This is a very important fact, because it is distinctly different from FUJITA and NUMATA's idea, which constitutes the principle of their method (Table 6).

Moreover, I have found two materials which have anti-oxidase action. These have been persimmon leave and mulberry leave.

This signifies the phenomena that the sufficient amount of AAO which can oxidize pure AA which is corresponding to AA content of the material, cannot oxidize AA present in material extract honestly (Table 7).