L-アスコルビン酸の分解に関する研究 (XIV)*

L-アスコルビン酸の褐変分解 (その 4)

神谷 真太郎 (静岡大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 7 月 24 日 受 理

前報⁽¹⁾においてアルカリ溶液中における L-アスコルビン酸 (L-AsA) の褐変は、酸性溶液中における場合とは異なることを推定しておいたが、この点を明らかにするため種々検討を行なった。

従来から L-AsA のアルカリ溶液中における変化分解に関しては多くの研究がなされているが、それらを総括すると、L-AsA はアルカリ溶液中では容易にデヒドロアスコルビン酸 (DAsA) に酸化され、更に進むとラク톤を開いてジケト L-グロン酸 (DKG) となり、そのエノール型イオンと平衡して存在する⁽²⁾ことが知られている。DKG 以降の分解に関しては、従来殆んど研究が行なわれておらず、DKG はさらに分解がすすむと L-スレオン酸と蔞酸に分解するという推定がなされているのみで特に褐変現象との関係を明らかにした報告は極めて少い。最近藤村および池田⁽³⁾が DAsA 溶液に濃アルカリを加えると溶液は著しく赤変するが、これは $\lambda_{\max}$ 515 m μ の吸収をもつ不明の赤色物質の生成によることを報告しており、又別に Hasselquist⁽⁴⁾らは DAsA を 2N NaOH 溶液に溶解加温し、2 ケのレダクトンの生成をペーパー・クロマトグラフ (PPC) により認めている。

以上のように DKG 以降の分解機構と褐変との関係については今日なお不明の部分が多い。

著者はさきに⁽⁵⁾ L-AsA のアルカリ性 H_2O_2 分解をおこなって、分解産物として L-スレオン酸、グリセリン酸、グライコール酸、ギ酸、蔞酸及び CO_2 の発生を証明したが、これらの知見に基づいて L-AsA のアルカリ溶液中における分解と褐変との関係を検討した。

実 験 の 部

1. 実験材料及び方法

- (i) DAsA は前報⁽⁶⁾に準じて調製した。
- (ii) L-スレオン酸及びグリセリン酸は夫々 L-AsA のアルカリ性 H_2O_2 酸化⁽⁵⁾およびグリセリンの硝酸々化⁽⁶⁾によって合成した。
- (iii) DKG のエノール型は J. Kenyon, N. Munro⁽⁸⁾ の方法に従って調製した。
- (iv) L-AsA, グライコール酸, 乳酸, ギ酸は市販品を使用した。
- (v) ペーパー・クロマトグラフ (PPC) はすべて前報⁽⁶⁾に準じた。

2. 実験結果

(i) L-AsA の 10% NaOH による加熱分解 L-AsA 1 g を 10% NaOH 10 cc に溶解し、95° の湯煎中で加熱分解すると著しく褐変する。10 時間加熱し、2,6-ジクロルフェノールインドフェノール試薬 (2,6-DCP 試薬) に対する還元力が全く消失したところで反応を止め、第 1 図記載の如く各フラクションに分け、生成物を PPC (BuOH : ACOH : H_2O = 4 : 1 : 1, 0.1% B. P. B.) によって調べた。

フラクション I, II: 無色板状晶, 300 mg, m. p. 103°, 混融試験の結果蔞酸であることを確認した。

フラクション III: PPC によりグリセリン酸 (R_F 0.35), グライコール酸 (R_F 0.55) および乳酸 (R_F 0.65) のスポットが認められ、更にグリコール酸は 2,7-dihydroxy naphthalene 法により、又乳酸は Uffelman. Guajacol 両反応によってそれぞれ確認された。

フラクション IV: PPC により R_F 0.23 の位置に L-スレオン酸の単一スポットが認められたので、文献⁽⁶⁾に従ってブルシン塩を調製して証明した。アルコールから再結 m. p. 208°, L-スレオン酸・ブルシン塩と混融しても融点降下を示さず。

分析値: $C_4H_8O_4 \cdot C_{23}H_{26}O_4N_2 \cdot 3H_2O$ として 理論値: C 57.64%, H 6.87% 実験値: C 57.83%, H 7.06%。
L-スレオン酸の収量 795 mg.

* Studies on the Decomposition of L-Ascorbic Acid. Part XIV. Browning Reaction of L-Ascorbic Acid. (4)

By Shintaro KAMIYA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Iwata)

フラクシオン V: 酸性を示し, フェーリング溶液及びアンモニヤ性硝酸銀溶液を還元し, かつ昇汞水溶液を熱時白濁させるので, ギ酸と推定した. 又 PPC (3% アンモニヤ性エタノール, 0.1% B.P.B.-クエン酸溶液) により R_F 0.35 の位置にギ酸のスポットをみとめた.

(ii) L-AsA アルカリ分解産物の 10% NaOH による加熱分解 上述の L-AsA の 10% NaOH 分解産物である L-スレオン酸, グリセリン酸, 乳酸および蔞酸の生成機構および褐変との関係を明らかにするために, これらを夫々 1g ずつ 10% NaOH 10 cc に溶解し, 10 時間湯煎上で加熱すると DAsA はつよく, L-スレオン酸はよく褐変分解したが, その他の物質は全く分解せず, かつ褐変しなかった. DAsA 及び L-スレオン酸の褐変溶液は第 1 図と同様に処理し, PPC により前者から L-スレオン酸 (R_F 0.23), グリセリン酸 (R_F 0.35), グライコール酸 (R_F 0.55), 乳酸 (R_F 0.65), 蔞酸 (テイリング) およびギ酸 (R_F 0.34) を, 後者からグリセリン酸 (R_F 0.35), グライコール酸 (R_F 0.55), 乳酸 (R_F 0.65) およびギ酸 (R_F 0.34) が検出された. 又共に CO_2 の発生もみられた.

(iii) L-AsA の 10% NaOH 溶液中における室温分解 L-AsA 1g を 10% NaOH 10 cc に溶解し, 放置すると溶液は著しく赤褐色に着色する. 約 1 週間室温に放置すると 2,6-DCP 試薬を全く還元しなくなるからこれを第 1 図に準じて処理し, 蔞酸 (m.p. 103°, 286 mg) 及び L-スレオン酸 (プルシン塩 m.p. 207~8°, 831 mg) を得た.

(iv) DAsA の 10% NaOH による常温分解 DAsA 1g を 10% NaOH 10 cc に溶解し, 10 分間室温に放置後直ちに IR-120 イオン交換樹脂で処理すると, 可成りの CO_2 の発生が認められた. 又 PPC によってその生成物を調べると, 2,6-DCP 試

薬により R_F 0.40, 0.31 の 2 ケのスポットが, 又アンモニヤ性硝酸銀試薬により R_F 0.40, 0.31, 0.12 の 3 ケのスポットが検出された. R_F 0.31 および 0.12 のスポットは同時に展開した DKG のエノール型およびキシロソンに夫々一致した. 尚 0.1% B.P.B. により蔞酸及び L-スレオン酸の生成をしらべたが, 確認できなかった. 又 L-AsA を同様に 10% NaOH に溶解し, 5 時間後 PPC で生成物を検索した結果, R_F 0.31, 0.40 の 2 ケのレダクトンを, R_F 0.13 にキシロソンの存在をそれぞれみとめた.

(v) L-AsA の 2% NaOH による加圧分解 L-AsA 2g を 2% NaOH 溶液 20 cc に溶解し, オートクレーヴ中で 140°, 2 時間加圧分解をおこなった. 分解後生成したヒューマス様残渣を濾別し, 濾液を第 1 図と同様に処理し, L-スレオン酸 (R_F 0.23), グリセリン酸 (R_F 0.35), グライコール酸 (R_F 0.55), 乳酸 (R_F 0.65) およびギ酸 (R_F 0.32) を夫々 PPC 及び定性試験によって証明した.

又 DAsA, L-スレオン酸, グリセリン酸, グライコール酸, 乳酸およびシュウ酸を 2% NaOH で加圧分解した. DAsA およびスレオン酸のみ褐変分解し, 分解産物として両者からグリセリン酸, グライコール酸, 乳酸およびギ酸を PPC および定性試験によって確認した. 蔞酸は検出されなかった.

考 察

L-AsA のアルカリ溶液を室温, 加熱および加圧下加熱などの種々の条件を用いて褐変させ, その分解産物として得られた有機酸およびレダクトンに基づき, その分解機構をつぎの通りに推定した.

いずれの条件の場合でも L-AsA は一旦 DKG まで酸化されるが, 常温では更に脱炭酸して L-キシロソンおよび 2 種のレダクトンが生成される. この中の 1 つ (R_F 0.30) は DKG のエノール型であると推定される. 又長時間放置すると更に分解が進んで L-スレオン酸と蔞酸を生成する. 加熱した場合には更に分解がすすんで L-スレオン酸はグリコール酸, グリセリン酸および乳酸を生成する. 又加圧分解の場合には蔞酸が認められない

第 2 図 L-AsA のアルカリ溶液中における分解機構

から, DKG が逐次脱炭酸により L-スレオン酸に至るものと推察される. L-スレオン酸はグリコール酸, グリセリン酸, および乳酸に分解される. 乳酸は従来糖のアルカリ溶液中の分解産物として知られており, 次のような生成機構が推定されている⁽⁹⁾.

従って L-AsA のアルカリ分解の際にも恐らく中間にグリセリンアルデハイド及びメチルグリオキサールを経て乳酸を生成するものと推察される. 次に L-AsA のアルカリ溶液中における分解と褐変との関係について考察してみると, L-スレオン酸の褐変は L-AsA および DAsA のそれに比較して著しく弱いので, 褐変は主として L-AsA から L-スレオン酸に至る過程において起こるものと考えられる. すなわち DAsA, DKG およびその脱炭酸によって生ずるキシロソソなどのジカルボニル化合物又はそれらのエノール型化合物 (レダクトン) が酸化重合などの複雑な分解をおこしてメラノイジン素の形成がおこなわれるものと推定される.

要 約

L-AsA 及び DAsA のアルカリ溶液を室温, 加熱など種々の条件下で褐変させ, 2 ケのレダクトン及び乳酸, L-スレオン酸, グリセリン酸, グリコール酸, 乳酸およびギ酸などを検出し, それらの生成機構と褐変との関係について検討を加えた結果, L-AsA の褐変は大部分 DAsA から L-スレオン酸に至る間に生成すると予想される不安定なカルボニル化合物が重合褐変するのに起因することを推定し得た.

本実験を行なうに当り御指導頂きました静岡大学農学部助教授中林敏郎博士に厚く御礼申し上げます.

(1) 神谷真太郎: 本誌, 34, 8 (1960).

(2) H. von Euler, H. Hasselquist: *Arkiv.*

- Kemi.*, 5, 50 (1952).
 (3) 池田静徳 : 農化大会講演要旨 (1958).
 (4) H. Hasselquist : *Arkiv. Kemi.*, 8, 385 (1955).
 (5) 神谷真太郎, 中林敏郎 : ビタミン, 13, 246 (1957).
 (6) 神谷真太郎 : 本誌, 33, 398 (1959).
 (7) 山口誠太郎 : 実験有機化学, 南江堂, p. 532.
 (8) J. Kenyon, N. Munro : *J. Chem. Soc. London*, 1948, 159.
 (9) 佐橋佳一 : 生物化学, 産業図書, p. 12.

乳酸菌の D-, L-乳酸に対する選択的透過性について*

大林 晃, 岩野貞雄, 日下 巖, 北原覚雄 (東京大学応用微生物研究所)

昭和 34 年 6 月 12 日 受 理

緒 言

D-, L-両乳酸脱水素酵素をもちながら, D-, L-の何れか一方の乳酸しか生成しない乳酸菌では, その intact cell を用いて測定した乳酸脱水素酵素の活度と, その菌体を音波やリゾチームにて溶菌した後測定した活度とは大いに異り, D-乳酸を生成する菌では溶菌により L-脱水素酵素力が増大し, D-酵素力は殆ど変化せず, L-乳酸を生成する菌では D-, L-が逆の傾向を示すことを認めた。

この現象は酵素力測定の際の基質である D-, L-乳酸の細胞内の透過が夫々の菌により異なる結果と考えるのが最も妥当であろうが, その外に溶菌によりその菌の乳酸生成に関係しない乳酸脱水素酵素が diaphorase 系とより容易に共転し得るようになるとか, D-, L-脱水素酵素の何れかが細胞表面により近く存在しているという酵素の局在などが原因として挙げられる。

近年, 細菌の透過性に関する研究が種々行われ, その綜説⁽²⁾も数々見られるが, Gale 等⁽³⁾は表面活性剤の添加により *Streptococcus faecalis* が菌体内の遊離アミノ酸を速かに失うことを見出し, これは表面活性剤を添加した菌体の electrophoretic mobility が変化する⁽⁴⁾ことから明らかにように, 表面活性剤が菌体表面の性状を変え, 細胞膜の透過性を変化させるためであると解釈している。

われわれは intact cell に表面活性剤を添加して D-, L-乳酸脱水素酵素力を測定した結果, 溶菌した時と同じ酵素力変化の傾向を示したので, 上に述べた現象は乳酸菌が D-, L-乳酸に対し異った透過性をもつためと考えに至った。また菌体に種々の処理を施し, この乳酸に対する透過性の変化を検討し, 更に DL-乳酸生成菌についても実験を行った。

実 験 方 法

使用菌株 :

D-乳酸**生成菌として *Lactobacillus delbrückii* No. 1 及び No. 3, L-乳酸**生成菌として *Lactobacillus thermophilus* A, *Lactobacillus bulgaricus*, DL-乳酸生成菌として *Lactobacillus plantarum* 11, *Lactobacillus sake* O 12, *Lactobacillus japonicus*, *Lactobacillus brevis* X 4221, *Pediococcus hennebergi* 253 の計 9 株で, どれも当研究室にて分離, 固定し保存しているものである。

Intact cell :

各時間麦汁・ブイヨン培地に培養した菌体を遠心分離にて集め, 更に 3 回蒸留水で洗滌して, intact cell として使用したが, この洗滌操作等における菌体表面の状態の変化を考慮して手早く実験を行った。

乳酸脱水素酵素力の測定 :

基質 D- 又は L-乳酸 (曹達塩) 600 γ (遊離酸として), M/10 磷酸緩衝液 (pH7.0) 0.2 ml, 細胞懸濁液又は酵素試料 0.2 ml, 5×10^{-4} M 2,6-dichlorophenol indophenol 0.1 ml を混じ, 蒸留水にて全反応液を 0.8 ml とし, 反応温度 35° で色素の褐色時間を分, 秒で表わした。

* On the Stereospecific Permeability of Lactic Acid Bacteria to D- and L-Lactic Acids.

By Akira ŌBAYASHI, Sadao IWANO, Iwao KUSAKA and Kakuo KITAHARA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

乳酸菌の酵素に関する研究 第 18 報

** D-乳酸は左旋性, L-乳酸は右旋性である。