

# アスコルビナーゼの活性について

3505 市川 史弥    3511 金子 蒼平    3610 大竹 美保    3616 加藤 颯

## 要旨

酵素であるアスコルビナーゼはビタミン C (以下 VC) に対してどんな効果があるかを調べるために、アスコルビナーゼを含む野菜の1つであるキュウリを使用し、条件を変えて VC 溶液の VC 量の変化をヒドラジン法を用いて測定した。その結果、アスコルビナーゼは還元型 VC を酸化型 VC に酸化するだけで、破壊しないことが分かった。さらに、摂氏約50℃付近から活性が抑えられ、5分以内で完全に酸化し、ごく少量でも酸化し始めるということが分かった。

## 動機

サラダによく入っているトマトとキュウリの食べ合わせは、VC を破壊するのでよくないということの本を読んだ。その原因はアスコルビナーゼという酵素で、熱や酸に弱いと書いてあった。そこで、どの程度の熱や pH で活性が抑えられるのか調べることにした。

## 目的

- ・アスコルビナーゼがビタミンを壊すのか検証
- ・アスコルビナーゼの働きの検証
- ・アスコルビナーゼの活性条件の検証

## 使用器具

- ・ホモゲナイザー    ・遠心分離機    ・恒温水槽    ・試験管    ・ビーカー    ・電子天秤
- ・マイクロピペット (200 $\mu$ L、1mL、5mL)    ・スポイト    ・メスシリンダー

## 使用薬品及び試料

- ・5%メタリン酸(HPO<sub>3</sub>)溶液
- ・0.1%インドフェノール溶液：2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム0.1g を温水に溶解してろ過し、水で100ml に定容したものとする。
- ・2%チオ尿素・メタリン酸溶液：チオ尿素2g を5%HPO<sub>3</sub>酸溶液で100ml に定容したものとする。
- ・2%2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(DNP)溶液：2,4-ジニトロフェニルヒドラジン2g を9N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液に溶解して100ml に定容したものとする。
- ・アスコルビン酸(=VC)標準溶液：アスコルビン酸100mg を5%メタリン酸溶液で100ml に定容(1mg/ml)後、その溶液0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml をそれぞれ5% HPO<sub>3</sub>溶液で100ml に定容したものを、それぞれ2.5、5、10、15、20、25 $\mu$ g/ml の標準溶液とする。
- ・pH 溶液 (塩酸、酢、水酸化ナトリウム)
- ・85%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液                      ・キュウリ                      ・純水

## 実験手順

### ① 試料の精秤

### ② 定容

試料を、5%HPO<sub>3</sub>酸で100mlに定容し、試料溶液とする。

この時、アスコルビン酸濃度は1~4mg/100mlの範囲がよい。

### ③ 酸化

試験管を試料の(a)総ビタミンC定量用、(b)DAA(酸化型ビタミンC)定量用、(d)空試験用の3本、(c)各標準液のビタミンC定量用、(e)空試験用の2本(濃度の異なる標準液を測定する時は数本)用意する。(a)、(c)にはインドフェノール溶液1滴を混和し、液が紅色となったのを確かめる。(a)~(e)には表1の試薬を順次添加してよく混和する。

### ④ オサゾンの生成

(a)~(c)の定量用の試験管にふた(シールまたはビー玉)をして、37°Cの恒温水槽で3時間温置してオサゾンを生成させる。

### ⑤ オサゾンの溶解

氷水中で冷却しながら(a)~(e)の試験管に85%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を徐々に加えて、よく混和する。さらに(d)、(e)は氷水中でDNP溶液を加えて、よく混和する。

### ⑥ 吸光度測定

分光光度計で波長520nmにおける吸光度A<sub>a</sub>~A<sub>e</sub>を測定する。

### ⑦ 検量線作成

各ビタミンC標準溶液(2.5~25μg/ml)の吸光度A<sub>c</sub>からそれぞれの空試験用の吸光度A<sub>e</sub>を引いた値より、検量線を作成する。

### ⑧ 計算

試料中の総ビタミンCおよび酸化型ビタミンC量はそれぞれの吸光度から空試験の吸光度を引いた値より、検量線から求める。試料100g中のビタミンC(mg)量は、次式によって求める。

$$\text{総ビタミン C(mg/100g)} = C_1 \times \frac{D}{1000} \times \frac{100}{S}$$

$$\text{酸化型ビタミン C(mg/100g)} = C_2 \times \frac{D}{1000} \times \frac{100}{S}$$

$$\text{還元型ビタミン C(mg/100g)} = \text{総ビタミン C 量(mg/100g)} - \text{酸化型ビタミン C 量(mg/100g)}$$

C<sub>1</sub>:検量線から求めた総ビタミンCのビタミンC量(μg)

C<sub>2</sub>:検量線から求めた酸化型ビタミンCのビタミンC量(μg)

D:試料溶液の総量(ml)

S:試料の採取量

表1 ヒドラジン法によるビタミン C 定量の試薬添加量(ml)

試薬		試料総(a)	試料 DAA (b)	標準総(c)	試料空(d)	標準空(e)
酸化	試料溶液	2.0	2.0	-	2.0	-
	各ビタミン C 標準溶液	-	-	2.0	-	2.0
	インドフェノール溶液	1滴		1滴		
	チオ尿素・メタりん酸溶液	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
オゾン生成	DNP 溶液	1.0	1.0	1.0	-	-
	温置反応(37℃、3時間)				冷蔵庫	
	85%硫酸溶液	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
溶解	DNP 溶液	-	-	-	1.0	1.0
	吸光度(520nm)	Aa	Ab	Ac	Ae	Ad

VC は酸化型 VC + 還元型 VC を表す

〈検量線〉

ビタミンの値を x 軸 (μg)、吸光度計の値を y 軸とする検量線の作成。(図1)

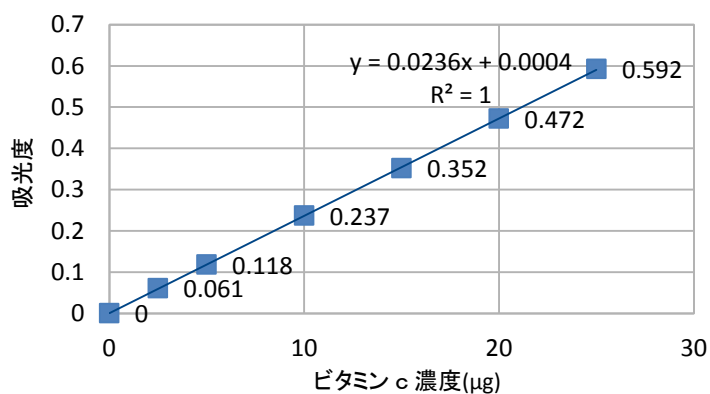


図 1

以降、これを基準として、研究を進める。

〈量〉

キュウリをホモゲナイズしたのち、遠心分離をし、その上澄み液をキュウリ液とする。(以降この溶液をキュウリ液とする。)

キュウリ液10g、1g、0.2g、0.15g、0.1g、0.025gを、VC溶液50gに入れ、15分間おき、それを試料とする。

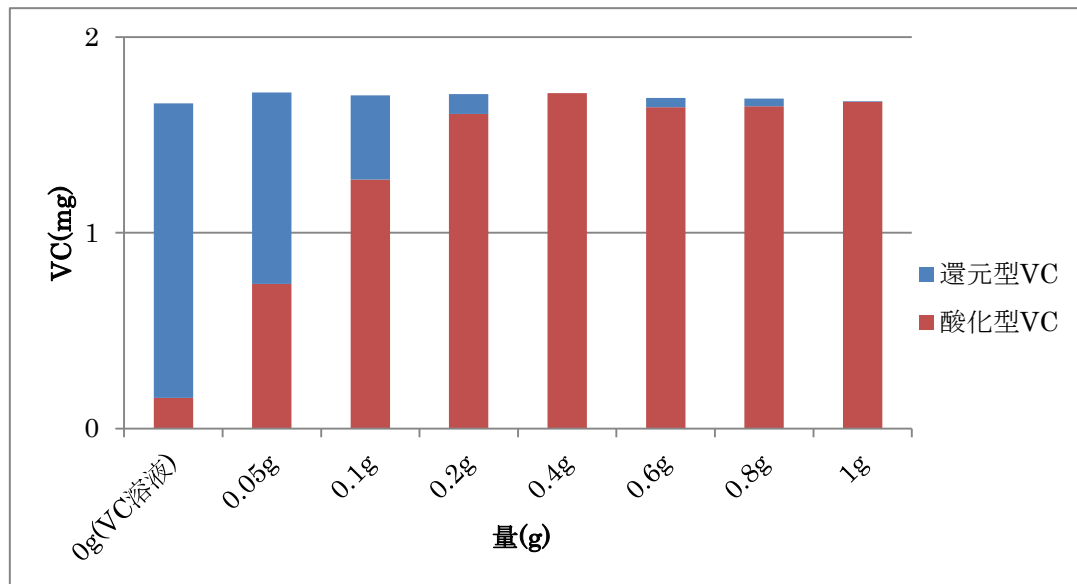


図 2 キュウリ+VC 溶液

	酸化型 VC	還元型 VC	総合 VC
0g(VC 溶液)	0.15678	1.504237288	1.661017
0.05g	0.739619	0.977754237	1.717373
0.1g	1.27161	0.430084746	1.701695
0.2g	1.60678	0.101694915	1.708475
0.4g	1.713559	0	1.713559
0.6g	1.642373	0.046610169	1.688983
0.8g	1.647458	0.038135593	1.685593
1g	1.669492	0.004237288	1.673729

考察

- ・VC 総量にほとんど変化がみられないことから、VC は破壊されていないと考えられる。
- ・ほとんどの VC が酸化されていることから、アスコルビナーゼには VC を酸化する作用があると考えられる。
- ・基準と比べると、0.05g でも働いていることから、少量でも働くということが分かる。
- ・キュウリの輪切り1枚は1枚約1g なので、キュウリの輪切り2.6枚で、トマト一つ分の VC (約20mg) を完全に酸化することができると考えられる。

〈温度〉

キュウリ液を各条件(18°C,37°C,50°C,75°C,100°C)の下15分置き、それを VC 溶液50g に入れ、再び15分置き、試料とする。

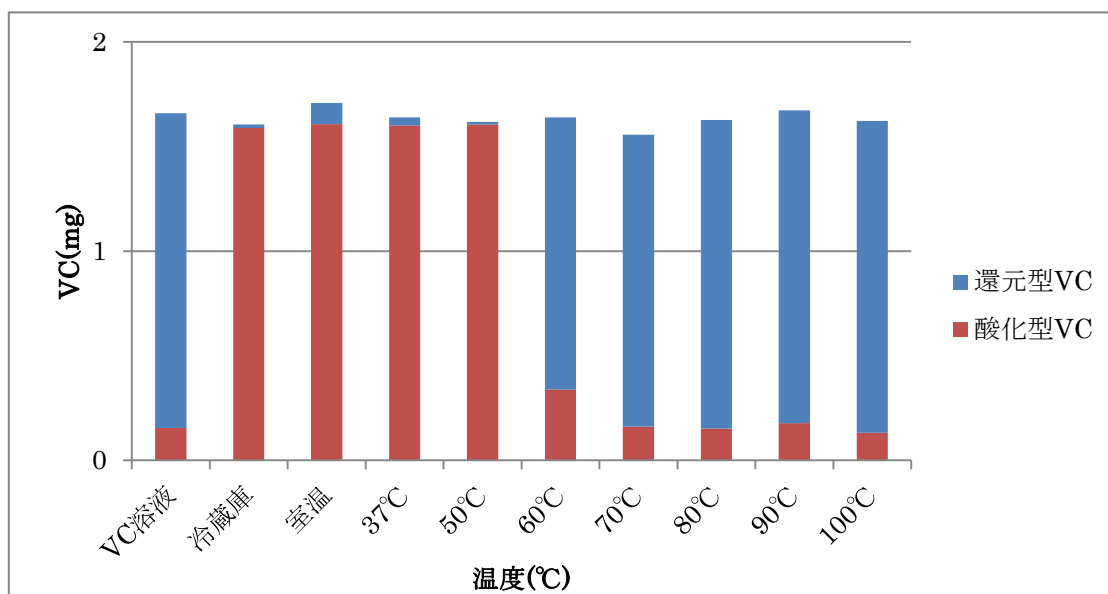


図 3 キュウリ (加熱) +VC 溶液

	酸化型 VC	還元型 VC	総合
VC 溶液	0.155085	1.504237	1.659322
冷蔵庫	1.588983	0.016949	1.605932
室温	1.60678	0.101695	1.708475
37°C	1.601695	0.038136	1.639831
50°C	1.605932	0.012712	1.618644
60°C	0.338983	1.300847	1.639831
70°C	0.161017	1.396186	1.557203
80°C	0.152542	1.474576	1.627119
90°C	0.177966	1.495763	1.673729
100°C	0.131356	1.491525	1.622881

考察

- ・50度から60度の間で大きな変化があることから、その温度の間で活性が抑えられていると考えられる。
- ・70度以降 VC がほとんど酸化されていないことから、70度以降アスコルビナーゼがほとんど働いていないと考えられる。

〈pH〉

0.2g キュウリ液を、各 pH (2.5,3,4,5,7,11,12,13) の下、VC 溶液50g に入れ、15分間放置したものを試料とする。

pH 溶液が VC 溶液に及ぼす影響も考慮して、VC 溶液に pH だけを入れたものも測った。

酸には酢、塩基には水酸化ナトリウムを用いた。

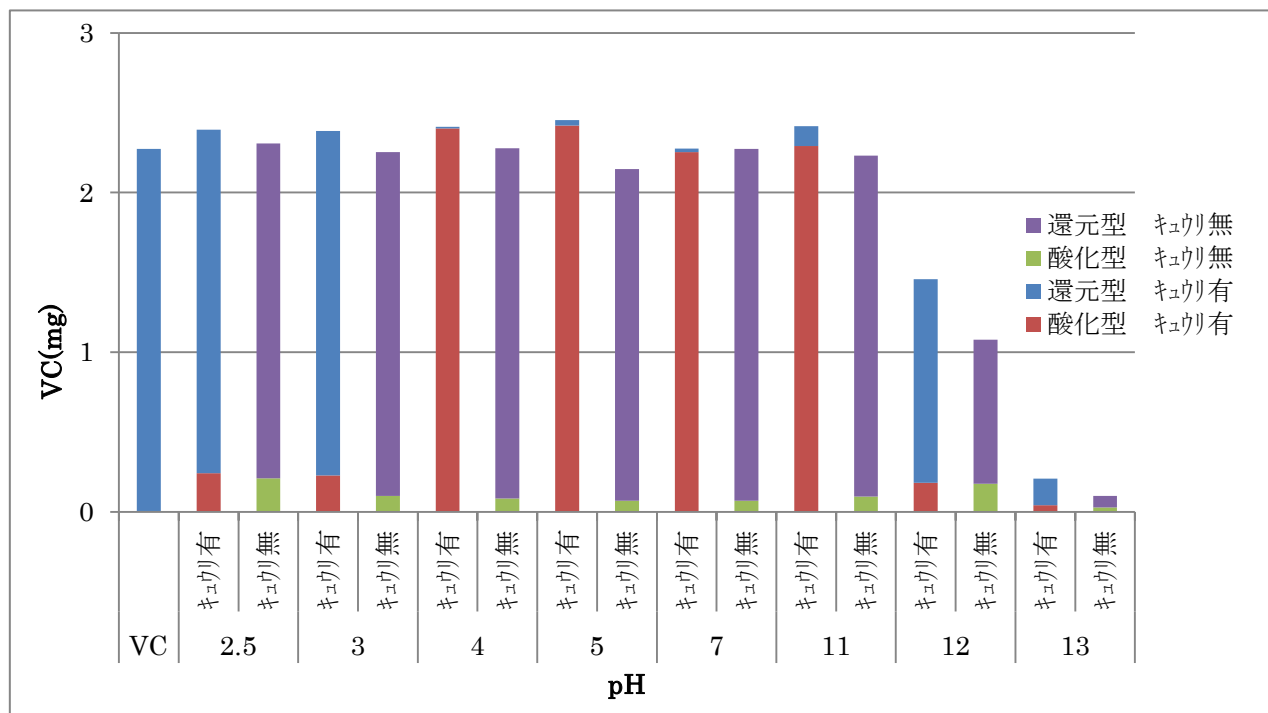


図 4 キュウリ+VC 溶液+pH 溶液

	酸化 VC(キュウリ有)	還元 VC (キュウリ有)	合計	酸化 VC(キュウリ無)	還元 VC (キュウリ無)	合計
2.5	0.241525	2.152542	2.394068	0.210169	2.097458	2.307627
3	0.228814	2.15678	2.385593	0.1	2.152542	2.252542
4	2.402542	0.008475	2.411017	0.083051	2.194915	2.277966
5	2.419492	0.033898	2.45339	0.070339	2.076271	2.14661
7	2.254237	0.021186	2.275424	0.070339	2.20339	2.273729
11	2.292373	0.122881	2.415254	0.095763	2.135593	2.231356
12	0.182203	1.275424	1.457627	0.176271	0.902542	1.078814
13	0.042373	0.165254	0.207627	0.027966	0.072034	0.1
基準 AsA	0.005508	2.26822	2.273729			

考察

- ・塩基は VC を破壊するということが分かる。
- ・pH3~4、pH12~13では VC がほとんど酸化されていないことから、pH 7 から離れた pH ではアスコルビナーゼの活性が抑えられていると考えられる。
- ・逆に、pH 7 に近い pH では、アスコルビナーゼの働きをほぼ抑制していないと考えられる。

〈時間〉

VC 溶液50g にキュウリ液10g を入れたものを0分,5分,10分,30分,40分置き、試料溶液とする。

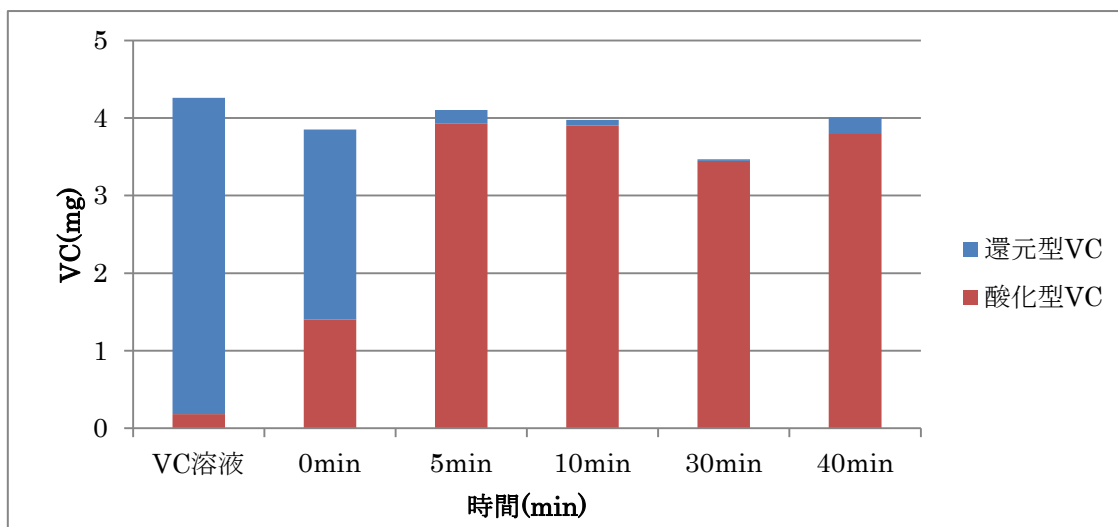


図 5 キュウリ (時間) +VC 溶液

	酸化型 VC	還元型 VC	合計
VC 溶液	0.181921	4.080226	4.262147
0min	1.402542	2.449153	3.851695
5min	3.927966	0.173729	4.101695
10min	3.902542	0.072034	3.974576
30min	3.449153	0.016949	3.466102
40min	3.792373	0.216102	4.008475

### 考察

- ・5min で大体のビタミンが酸化されているということが分かる。
- ・0min ではキュウリを VC 溶液に入れたすぐにメタリン酸でビタミンの変動をとめたが、かなりの量の VC が酸化されていたことから、アスコルビナーゼには強い酸化作用があると考えられる。
- ・5min ですべてが酸化し、それ以降は還元型への変化はみられないことから、時間がたっても酸化型から還元型への変化はないと考えられる。

### 今後の展望

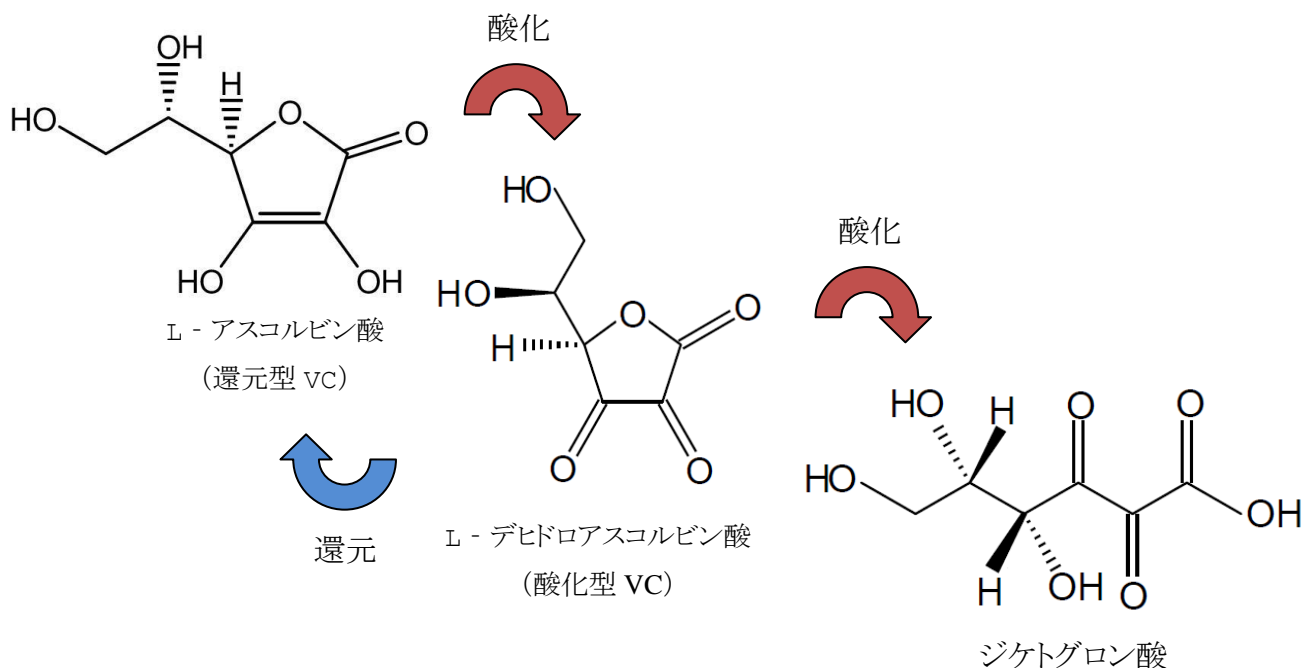
- ・実験結果が正確なのかの確認
- ・考えた条件以外にも抑制される原因があるかの検証
- ・キュウリ以外のアスコルビナーゼをもつ食物のアスコルビナーゼの働き及び、抑制条件の検証
- ・実際の食物を使った VC 酸化の実験

## まとめ

実験により、アスコルビナーゼの活性は熱や pH で抑えられるということが分かった。しかし普通の食生活において、キュウリのアスコルビナーゼの活性を熱で抑えることは難しい。そこで、VC の酸化を抑えたければ、キュウリを酢の物にしたりして食べると効果的かもしれない。

しかし、VC の酸化型、還元型については、五訂日本食品標準成分表によると、「食品中のビタミン C は、L-アスコルビン酸（還元型 VC）と L-デヒドロアスコルビン酸（酸化型 VC）として存在する。その効力値については、科学技術庁資源調査会からの問い合わせに対する日本ビタミン学会ビタミン C 研究委員会の見解（昭和 51 年 2 月）に基づき同等とみなされる」とされ、還元型と酸化型を合わせた総量（総 VC）を VC 量として示している。実際、酸化型 VC や還元型 VC と摂取すると、体内で酸化還元反応がおこり、下の図のように酸化型 VC は還元型 VC になる（還元型のほうが多い）。よって、摂取前で還元型 VC が多くても、酸化型 VC が多くても、体内ではほとんど還元型 VC として存在するので効果としてはあまり変わらない。ただ、空気中では酸化型 VC は不安定で、加水分解されてジケトグルン酸になりやすく、VC 本体に生理活性はない為、長時間空気中に放置しておくと、酸化型 VC がジケトグルン酸になり、そこで VC は破壊されたと言える。

よって、アスコルビナーゼは還元型 VC を酸化型 VC にするだけで総 VC の量は変化していないので、「トマトとキュウリを一緒に食べるのは VC が破壊されるのでよくない」という説は嘘だといえる。



## 参考文献・引用文献

・五訂日本食品標準成分表

[http://www.mext.go.jp/b\\_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031802.htm)

・H23 SSH 論文集 「ビタミン C の保存と損失に関する研究」