

ニンニク有効成分の研究

第1報 ニンニク中の酵素の分布及び未知還元性物質の存在

渡辺正・岩田四郎・大谷芳子

Studies on Active Principles in Garlic

Part I Distributions of Enzymes in Garlic and the Occurrence of Unknown Material Having Reducing Power

BY TADASHI WATANABE, SHIRO IWATA AND YOSHIKO OTANI

緒 言

ニンニクは古来民間薬として又滋養強壯食品としての効果が云いふらされている。その薬効の一部は既に Stoll 等のアリシンの発見⁽¹⁾、藤原等のアリチアミンの発見⁽²⁾によって解明されて来ている。しかしこれ等の発見はニンニクの有効作用の全てを解明してはならないように思われる。アリシンは専ら殺菌作用的見地から、アリチアミンはB₁の有効な吸収と破壊の防止の見地からその有効性がみとめられている程度である。昔から中国及び西欧諸国で各種の病気の治療に、強壯剤として用いられて来たのは前記薬効以外の有効成分の存在を暗示するので、われわれはまず酵素類（但しアリナーゼはその存在もその有効量もすでに知られているので除くことにした）の検索並にその定量的研究を行った。その結果は予想に反してすこぶる貧弱で、みとめ得る程度の量の存在した酵素はフォスファターゼだけであった。しかしアミラーゼの検索中に奇妙な現象がおり、これを追究した結果、ビタミンCの外に未知還元性物質の存在が推定された。又多分この物質とは別のものであろうと思われるが銅イオンの存在の下においてさえ、ビタミンCの破壊を著しく妨害する物質が存在することが推定された。このビタミンC破壊防止物質（Ascorbic Acid Protective Factor, 略してAAPFとする）はニンニクの外タマネギ、ラッキョウ、ノビル等のアリウム属植物に広く分布しているようである。

実 験 方 法

A ニンニク中に含有される酵素類の検索 ニンニクの中にアリナーゼが多量に含まれることは周知の事実であり、このことを研究した論文は多いからここでは一応アリナーゼを除外して、これ以外の酵素類の検索を行った。この際主として酵素類の存在の有無、すなわち定性を重んじたが、これがあいまいな場合が多いのでいきおい定量的に究明する必要ができたが、あくまでこれは存在するかしないかを確実に証明する手段としただけである。

(1) **アミラーゼ** 酵素液でのん粉糊精化力を測定する方法⁽³⁾を採用した。この方法はWohlgemuth法を光電比色計ではかるように改良した方法である。

すなわちかんしょう液 1 ml に酵素液 1 ml, でん粉溶液 1 ml を加え, 37°C の恒温水槽の中で一定時間反応させ, その後 KI-HCl 液 5 ml を加える。呈色後 1 分間以内にポシユロム光電比色計で吸光度を 720m μ で測定する。沃度でん粉反応の呈色度が低くなる程度で酵素力の大小がわかる。

試薬

1. かんしょう液: $M/10$ pH 5.0 の酢酸かんしょう液
2. 基質液: 可溶性でん粉 0.8 g を 3~5 ml の純水にけん濁し, これに 2 N のか性ソーダ液 1 ml を加え, 沸とう水溶上で加熱して透明液とし, これに 2 N の塩酸液 1 ml 加えた後, 全容を 250 ml に稀釈し, 沔紙で沔過する。実験当日調製する方がよい。
3. IK I-HCl 液: 約 1 M KI 溶液に 0.1 N になるよう I を溶解せしめた 0.1 N IKI 液 1 ml を 1 N -HCl 199 ml の中に入れてよく混合する (当日調製のこと)。
4. 酵素液: a. ニンニク液, 市販ニンニク 10 g をすりつぶし, 純水で全量を 50 ml とし, ガーゼで沔過し更に沔紙で沔過する。これをそのまま酵素液とする (5 倍稀釈液)。
b. 唾液アミラーゼ, 唾液を採取し 10 倍にうすめ沔紙で沔過し, 酢酸かんしょう液で適当に稀釈する。これは比較のため用いた。

(2) **インペルターゼ** 還元糖量測定法⁽⁴⁾を用いた。2% しょ糖液 20 ml に酵素液 5 ml, トルオール 0.3 ml を混合し 1~24 時間 37°C で反応させ, その 20 ml をとりベルトラン法で還元糖量を測定した。酵素液はニンニク 100 g に水 200 ml を加え, ポモゲナイザーですりつぶし, ガーゼで沔過, 沔液を pH 4.0 とし, 遠沈した沈澱を水で 5 倍に稀釈したものを用いる。

(3) **リパーゼ** Willstätter アルカリ滴定法改変法⁽⁵⁾を用いた。基質液 (トリアセチン 1% 溶液) 3 ml, かんしょう液 1 ml ($M/100$ pH 7.0 の磷酸かんしょう液) の混合液に酵素液 1 ml を入れ 37°C の恒温槽の中で反応させ一定時間経過後 96% アルコール 10 ml, エーテル 1 ml を添加して酵素作用を停止させ, フェノールフタレインを指示薬として生成した脂肪酸量を $N/100$ NaOH で滴定する。酵素液としてはアミラーゼの場合と同様ニンニク搾汁の等電点沈でん物の溶液を用いる。比較として大日本臓器株式会社から恵与されたすい蔵粉末 (Z-パンク) の水抽出液 (1%) を用いた。

(4) **プロテアーゼ** フォルモール滴定法⁽⁶⁾を用いた。1% カゼイン溶液 (カゼイン 1 g を 0.1 N NaOH の中に入れ加熱しながら溶解し $N/10$ HCl で中和, pH 7.6 の $M/10$ 磷酸かんしょう液を入れて全量を 100 ml にする) 1 ml に酵素液 1 ml を加え 36°C で 20 分反応させた後 pH 8.0 の 20% フォルモール液 5 ml を加え, 0.05% チモールフタレイン液 5 ml を加えて 0.05 N NaOH 液で微青色になる迄滴定する。酵素液はニンニク抽出液 (5 倍稀釈液) と比較として Z-パンク抽出液 (1%) を用いた。

(5) **ホスファターゼ** 中村による Allen 変法⁽⁷⁾を用いた。酵素液 1 ml と基質液 (グリセロ磷酸カルシウム 200 mg/dl) 1 ml, 酢酸かんしょう液 1 ml を入れ 37°C の恒温槽で一定時間反応させた後 10% トリクロール酢酸 1 ml で反応を停止させ, 沔紙で沔過, 沔液 1 ml をとり 10% H₂SO₄ 1 ml, アミド

ール試薬 1 ml, モリブデン試薬 1 ml, 水 2 ml を加え 15 分後比色定量する (720m μ)。

(6) オキシダーゼ グアヤコール反応⁽⁸⁾ で定性的に調べた。グアヤコール 1% 液 1 滴に ニンニク抽出液 (5 倍希釈) 5 ml を混合する。オキシダーゼがあれば直ちに赤くなるはずである。

(7) パーオキシダーゼ グアヤコール反応⁽⁹⁾ を用いる。ニンニク酵素液 5 ml にグアヤコール 1% 液 1 滴を混合更に 3% H₂O₂ 1 ml を添加するとパーオキシダーゼがあれば赤く変色するはずである。

B. ニンニク中に含まれる還元性物質及びビタミンC破壊防止性物質の検索

(1) でん粉沃度反応の呈色に及ぼすニンニク抽出液の反応 アミラーゼの検出を行った際濃厚ニンニク抽出液を加えると沃度でん粉反応の青色が消失する場合があったのでこの物質の正体について疑問をもち次の実験を行った。でん粉液一定量にニンニク抽出液 (5 倍希釈) 一定量, 水一定量を加え全量を 4 ml とする。この混合液にアミラーゼ力測定に用いた IKI 液 5 ml を加え一定時間経過後呈色液の吸光度を比色計で測定する (720ml)。でん粉液はアミラーゼ測定に用いた液を 4 倍に希釈する。でん粉・ニンニク液混合物の割合は次の通りである。

No. 1 でん粉液 1 ml + ニンニク液 1 ml + 水 2 ml

No. 2 でん粉液 1 ml + ニンニク液 2 ml + 水 1 ml

No. 3 でん粉液 0.5 ml + ニンニク液 1 ml + 水 1.5 ml

(2) ビタミンC 定量法 この還元性物質があるいはビタミンCであるかも知れないと思い、ビタミンC溶液ででん粉沃度反応たい色試験をくりかえした所全くパターンの異なる反応であることを知った。

それでニンニクの中にビタミンCがあることははっきりしているが、それ以外にも還元性物質があるのではないかと思ひ、燐タングステン酸法による総還元性物質の総量の定量 (但しモノ沃度酢酸によりSH-化合物を除く、又その量をビタミンCとして表す) を行い一方最もビタミンCの真価に近いと云われるヒドラジッド法によって還元性ビタミンC量を測定して、ビタミンC以外の還元性物質量を知ることにつとめる。

1 Folin 試薬法⁽¹⁰⁾ ニンニク浸出液 4 ml, 燐酸かんしょう液 (pH6.4) 2 ml, モノ沃度酢酸溶液 (18.6%) 1 ml を混合し、これを 37°C の水浴に 5 分間つけ濾紙で濾過、濾液に Folin 試薬 (タングステン酸ナトリウム 19.8 g に 85% 燐酸 10.6 g, 水 30 ml を加え加熱溶解し、これを冷却して飽和臭素水を加えた後加熱して過剰の臭素を追い出し水で 100 ml とした液) 1 ml を加え混和した後再び 10 分間 37°C の水浴に放置、流水中で 10 分以上冷却した後濾過し、濾液を 1 時間以内に比色定量する (720m μ)。盲検として Folin 試薬 1 ml の代りに 0.3 N H₂SO₄ 1 ml を用いて同様に進行。ニンニク浸出液は 5 倍希釈液を作りこれに等量の 5% メタ燐酸液を加えて作る。

2 ヒドラジッド法⁽¹¹⁾ Roe 変法によった。すなわちニンニク抽出液の全ビタミンC量をはかり次に酸化型ビタミンC量を測定して差を還元型ビタミンCとする方法である。

イ. 全ビタミンC量測定法 市販ニンニク 10 g をすりつぶし、水で 50 ml とし、濾過した後、濾液を 5 ml とり 10% HPO₃ 液 5 ml, 8% トリクロール酢酸液 10 ml を加え、ノーリット 0.5 g 入れて 2 分間振り、放置した後濾過する。この濾液 2 ml ずつを 2 本の試験管にとり 2.5% SnCl₂ - 5% HPO₃ を 2

ml ずつ加える。この中 1 本を本試験、他を盲検とする。本試験の方に 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン 2% 液 1 ml を加え、37°C の温浴の中に正確に 3 時間加熱した後直ちに氷水に入れ氷水中で振とうしながら、徐々に 85% 硫酸 5 ml を添加よく混和した後、室温に 30 分間放置、比色計で (510m μ) 吸光度を測定する。盲検は氷水中で 85% 硫酸液 5 ml を加えた後 DNP 液 1 ml を加えよく振とうした後室温に 30 分間放置して同様に測定する。

ロ. 酸化型ビタミン C の定量 共栓試験管に 2% SnCl₂-5% HPO₃ 10ml, ノーリット 0.5 g を加え CO₂ を 1 分間通じ、ニンニク抽出液 (5 倍稀釈液) 5 ml と純水 5 ml 加え再び CO₂ を通じ、ガスを CO₂ で満した後栓をして 1 分間振とう濾過して濾液を 2 ml ずつ 2 本の試験管にとり各々に 5% HPO₃ 2 ml ずつ加え以下全ビタミン C の定量の際と同様に操作して酸化型ビタミン C を定量する。

還元型ビタミン C の量は (全ビタミン C 値) - (酸化型ビタミン C 値) で表わされる。

(3) ビタミン C の破壊に及ぼすニンニク抽出液の影響 肉厚の試験管に次の様な割合にビタミン C 液とトリクロール酢酸 8% 液を混合する。

配合後直ちにその 2 ml をとり Folin 法で VC 量を測定する。その後 37°C に放置、30 分、60 分、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間放置して Folin 法によってビタミン C 量を定量する。以後室温に放置 (11~12°C) 24 時間後に測定する

No.	10m% V.C 液量	TCA 水又はニンニク抽出液
1	10ml	TCA 水 10ml
2	10	ニンニク抽出液 10ml
3	10	Cu ⁺⁺ 入り TCA 水 10ml
2	10	Cu ⁺⁺ 入りニンニク抽出液 10ml

TCA 水は 200 ml の純水に 8% TCA 液を添加 pH 3.0 に調整する。Cu⁺⁺ 入り TCA 水は上記の TCA 水 9 ml に 10⁻⁴ M Cu⁺⁺ 液 1 ml を加えて作る。ニンニク抽出液はニンニク 10 g をすりつぶし全量を水で 50 ml に稀釈した後 TCA (8%) を 2 ml 添加して除蛋白し濾過した濾液を用いる。

Cu⁺⁺ 入りニンニク抽出液はこのニンニク抽出液 9 ml に 10⁻⁴ M Cu 液 1 ml を混合して作る。なおこの様なビタミン C 保護作用がニンニク以外の物質にも見られるのではないかと思ひ、ノビル、タマネギ、ラッキョウ、キャベツ、バナナの皮、ジャガイモ等で試験してみた。その結果ビタミン C を保護する効果を持つのはニンニクの外にノビル、タマネギ、ラッキョウ、等のアリウム類及びキャベツがあり、ジャガイモ及びバナナの皮はむしろ酸化を促進する結果となった。

実 験 結 果

A. 酵素類の検出及び定量結果

1) アミラーゼ、唾液 400 倍稀釈液とニンニク 20 倍稀釈液では 第 1 表に示すように明らかに唾液では IKI-澱粉液の青色反応がうすくなり糊精化反応が進行するが、ニンニク抽出液ではこの反

第 1 表 唾液とニンニクのアミラーゼ力の比較

反応時間 (分)	0	5	10	20	30
唾 液	0.69	0.58	0.48	0.36	0.27
ニ ニ ク	0.54	0.64	0.65	0.64	0.66

(数値は吸光度)

応がおこらぬことが判明する。

第2表 Z-パンクとニンニクのリパーゼ力比較

反応時間 (分)	0	30	60
	Z-パンク		
対 照 { 酵素液	3.40	3.60	3.50
基質液	1.06	0.80	1.10
反 応 液	3.34	5.42	6.00
	ニンニク		
対 照 { 酵素液	1.22	1.01	1.20
基質液	1.06	0.80	1.10
反 応 液	2.43	2.10	2.25

(数値は0.01N NaOH滴液ml数)

第3表 酵素製剤とニンニクのプロテアーゼ力の比較

反応時間 (分)	0	20
Z-パンク	2.00	2.72
ニンニク	1.32	1.35

(数値は0.05 N NaOH 滴定値ml数)

第4表 ニンニクフォスファターゼ力

反 応 時 間 (分)	0	10	40	80
対 照 { 酵 素 液 (E)	0.00	0.055	0.00	0.013
基 質 液 (S)	0.00	0.00	0.035	0.057
対 照 合 計 (E+S)	0.00	0.055	0.035	0.070
反 応 液 (E S)	0.00	0.13	0.22	0.395
差 (E S) - (E+S)	0.00	0.075	0.185	0.325

(数値は吸光度)

第5表 ニンニク球茎中に存在する酵素類の検索結果

酵 素 名 称	検 出 方 法	存 在 の 有 無
アミラーゼ	沃度澱粉反応	-
インペルターゼ	還元力測定	-
リパーゼ	Willstätter アルカリ滴定	-
プロテアーゼ	フォルモール滴定法	-
ホスファターゼ	Allen によるモリブデン青色比色法	+
オキシターゼ	グアヤコール反応	-
パーオキシターゼ	"	+?

(-存在せず, +存在する, ++相当量存在する, +?存在するかどうか疑問である)

と時間の経過と共に沃度澱粉液の青色が徐々に消滅して行くことが判明した。

2) インペルターゼ, 過マンガン酸カリ液による滴定値は時間経時的に変化しない。煮沸酵素液も生酵素液も過マンガン酸滴定値に差がない。

3) リパーゼ, Z-パンクの場合明らかに0.01 N NaOH 滴定値に変化を生じ, 遊離脂肪酸の生成がみとめられる。ニンニク抽出液では遊離脂肪酸の生成量の増大がみとめられず, その反応生成量は明らかに対照値即ち酵素液滴定値と基質液滴定値の合計値とほぼ等しくリパーゼの存在を否定する。

4) プロテアーゼ, Z-パンクとニンニクの抽出液を比較すると第3表の通りである。

従ってZ-パンクには相当強力なプロテアーゼが存在するが, ニンニクでは否定される。

5) フォスファターゼ, 酵素活性は第4表に示す通りはっきりみとめられた

6) オキシダーゼ, 全然変化をみとめず, オキシダーゼの存在は否定された。

7) パーオキシダーゼ, 直ちに赤色に変化するので定性的にはその存在はみとめられるが, 定量的に検討した結果その存在量は疑問であった。以上の結果をまとめると次の様になる。

B. 還元性物質の存在

以前アミラーゼの測定に澱粉一沃度反応を用いたことがあるが, その時ニンニク液を過剰に入れると瞬間的に沃度一澱粉液の青色反応が消失する。今ニンニク抽出液量を少くして反応させる

この反応を追跡したのが第1図である。

この反応が一種の還元反応であると予想されたので、過マンガン酸カリ液を添加してその脱色を試みたが、これ又同様の結果が得られた。還元性物質として通常野菜類に存在するものはまずビタミンCである。これが直ちにビタミンCだけによる反応であるかどうかを確かめるためにビタミンCでこの沃度澱粉液の脱色反応をしらべた結果相当に異なる模様であったから、還元型ビタミンC量をFolin法とヒドラジッド法で定量してみた所2つの値の間に相当な差異があることが判明した。即ち第6表のようになる。

第6表 ニンニク中の未知還元性物質の定量値

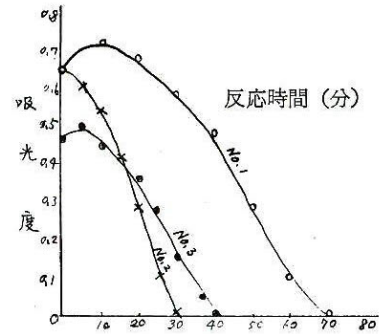
Folin法による総還元性物質* (mg/100g)	7.25
DNP法による還元型ビタミンC量 (mg/100g)	2.75
差 (mg/100g)	4.50

* ビタミンC量で表わした数値

すものと思われ、この物質とビタミンCが共同して澱粉沃度液の青色を消滅せしめるものの様である。

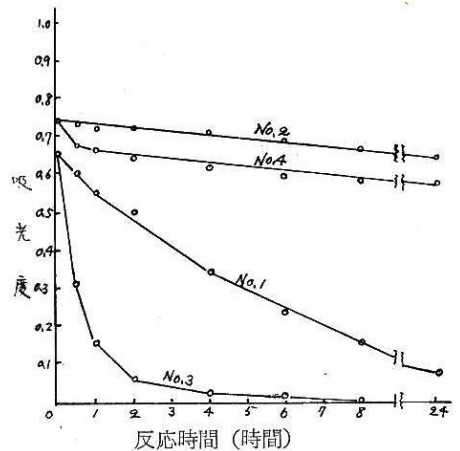
ビタミンCは水溶液の状態では非常に破壊され易いものであることは周知の事実である。殊にCu⁺⁺イオンの存在の下では一層である。所がビタミンC水溶液にニンニク圧搾汁を添加すると非常にこわれにくくなる。これはCu⁺⁺入りビタミンC液において著しい。その結果は第2図に示す通りである。

このビタミンC破壊防止因子AAPFが前記ビタミンC様還元性物質と同一である可能性も一がいに否定出来ないが、これ以外のSH化合物である公算は大きい。これはC⁺⁺イオンと複化合物を作り、Cu⁺⁺イオンのビタミンC破壊作用を阻害するものと思われる。なお第2図に示したニンニク汁は冬期(11月~2月)のニンニク(催芽時)から調製したものであるが、夏期のニンニク(6月~7月)で調製したニンニク汁はこの保護効果は小さく、かえってタマネギ、ノビル、ラッキョウ等が勝ることを示す。(第3図、第4図、第5図参照)。

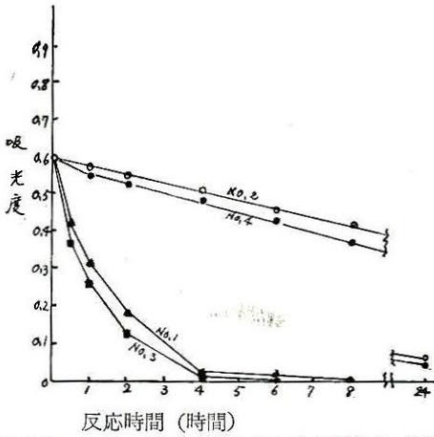


第1図 沃度でん粉反応とニンニク液
No. 1 でん粉液 1ml + ニンニク液 1ml + 水 2ml
No. 2 " 1ml + " 2ml + 1ml
No. 3 " 0.5ml + " 1ml + " 1.5ml

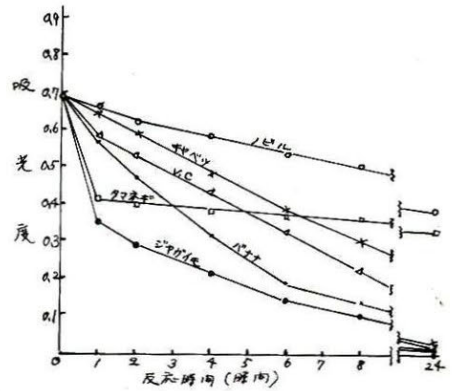
ヒドラジッド法はFolin法に比較してどちらかと云うと真値に近いと考えられるので、この差値4.50mg/100gのビタミンC相当値はこれに比較的類似した還元性物質の存在を示



第2図 ニンニク液のビタミンC保護作用(冬期)
No. 1 V.C + TCA水 No. 2 V.C + ニンニク抽出液
No. 3 V.C + TCA水 + Cu⁺⁺
No. 4 V.C + ニンニク抽出液 + Cu⁺⁺



第3図 ニンニク液のビタミンC保護作用 (夏期)
 No. 1 V₁C+TCA水
 No. 2 V₁C+ニンニク抽出液
 No. 3 V₁C+TCA水+Cu⁺⁺
 No. 4 V₁C+ニンニク抽出液+Cu⁺⁺



第4図 植物汁液のビタミンC保護作用

考 察

ニンニクは古来朝鮮と中国の人が日常食として多量に食し、健康の保持と増進に大効があると考えている。このことはアリシン及びアリチアミンの発見以来誠にもっともなことと考えられる。しかしこの外にもニンニク有効成分の存在が考えられる。殊に中国の人はほとんど全ての野菜、肉類を油で炒めて食べる。

この際ニンニクを同時に炒めることが多くニンニクに何か消化酵素的な働きをみめられないかと考えたが、不幸にして結果はネガチブであった。しかし偶然ニンニク中にはビタミンC以外の還元性物質の存在がみつめられたし、又ビタミンCの破壊を防止しビタミンCを安定化せしめる物質が見出された。

殊に Cu⁺⁺ イオンの存在の下でこの保護作用がみつめられるので、銅又は真ちゆうの鍋を使用することが多い中国料理において何らかの保護作用をすることが考えられ興味深い。しかもこの効果はニンニク以外のノビル、ラッキョウ等のアリウム類にもみつめられ、又僅かであるがキャベツにもあることから、SH-基のある特殊の化合物である公算が多い。反対にジャガイモ、バナナの皮等では反対にV.Cを破壊する因子を含むようである。この破壊因子はリンゴ、ニンジン等に含まれるアスコルビン酸オキシダーゼと同一のものかも知れない。

結 論

ニンニクに存在すると思われるアリナーゼ以外の酵素類について検索した。しかし僅にフォスファ

ターゼの存在を除いて顕著な酵素類の存在を認めることができなかった。

一方アマラーゼの検索中に奇妙な現象が発見されたので深く調べる中にビタミンC以外の未知還元性物質の存在することがわかった。又このものと多分異なるのであろうが、ビタミンCの破壊を銅イオンの存在の下においてさえ顕著に防止する物質の存在が示された。

終りに臨み終始温い御指導と御鞭たつを賜つた茶珍俊夫教授に感謝します。なおZ-パンクの粉末を寄贈された大日本臓器製菓株式会社に謝意を表します。

文 献

- (1) Stoll, A., Seebeck E. : *Helv. chim. Acta* , 31, 189 (1948)
- (2) 三浦, 藤原, 渡辺: *ビタミン*, 4, 139;209 (1951)
- (3) 赤堀四郎: *酵素研究法*, 第2巻, 朝倉書店 (昭33) , P.108
- (4) 東大農学部農芸化学教室: *実験農芸化学 (下)* , 朝倉書店 (昭32) , P.423
- (5) 日本化学会: *実験化学講座*, 第24巻, *生物化学Ⅱ* , 丸善 (昭33) , P.28
- (6) 同 , P.325
- (7) 中村道徳: *農化*, 24, 1 (1950) ; 24, 197 (1951)
- (8) 田中庄助: *農化*, 5, 842 (昭4)
- (9) 同 : *農化*, 5, 844 (昭4)
- (10) 藤田秋治: *ビタミン定量法*, 南江堂 (1955) P.566
- (11) 同 , P.592

Summary

The results of the examination of enzymes in garlic indicated that it contains only phosphatase in addition to allinase. During the course of the study, the presence of an unknown material having a reducing power was detected. This substance was found to be something other than vitamin C and to possess a property to protect the latter's destruction even in the presence of cuprous ion.