

ソバ (*Fagopyrum esculentum* MOENCH) の チアミンとその分解因子について

飯島隆志・水谷幸子*・黒沢辰一・建石耕一
信州大学農学部 食品化学研究室

緒 言

チアミンは、生体内で遊離型及びピロリン酸エステル型として存在し、後者は、細胞内に取り込まれた遊離型チアミンと ATP から生合成され^{1,2)}, クエン酸サイクルを中心とするエネルギー転換系を代表として、幾つかの重要な生体内物質代謝系に關与する酵素の補酵素として、生化学的役割を果たすことはよく知られている³⁾。

したがって、ソバの生育段階とチアミンとの間に何らかの關連が存在するのではないかと期待があり、また、筆者らは、既にエノキタケ (*Flammulina velutipes*) について同様の実験を行っているので⁴⁾, その結果とも対比する意味もあって、本実験では、ソバの生育過程とチアミンとの關連について検討した。

また、生物界には、チアミンを分解する因子の存在が確認されており、一つは分解酵素チアミナーゼ (アノイリナーゼ) であり⁵⁻⁷⁾, 他方は、チアミン分解耐熱性因子である⁸⁻¹¹⁾。

特に従来の報告で、ルチンがこのチアミン分解耐熱性因子の一つの成分であるとされており¹¹⁾, 一方ソバの植物体特に葉にルチンが多く含有されているとされているので¹²⁾, こうした意味でも興味深いものがあり、筆者らは、これら分解因子の面についても、ソバの生活史と關連させて検討したので、この結果を報告する。

本実験は1979, 1980年の両年にわたって実験を繰返して確認した結果である。

実 験 方 法

1. 材 料

信州大学実験圃場で栽培し、種子 (0日とした) 及び発芽後10日め, 20日め, 30日めのソバの根, 莖, 葉にそれぞれ分別して実験材料に供し、別にそれぞれ水分を定量して、乾物重当りに換算して比較した。

2. チアミンの定量

0.1 N 硫酸酸性下で抽出し、パームチット吸着、フェロシアン化カリウム酸化によるチオクローム法¹³⁾で行った。日立203型蛍光光度計を用い、硫酸キニーネ0.1N硫酸水溶液を標準

*現在 株式会社永谷園本舗
1981年9月30日受付

物質に用いて測定した。

3. チアミナーゼ活性測定

松井の方法¹⁴⁾に準拠した。試料に約3倍量の0.01 M McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) を加えながら磨砕し、遠心分離 (8,000~9,000 r. p. m, 30分) した上清を粗酵素液とした。

この液 2 ml に 0.2 M 緩衝液 5 ml, 10 μ g/ml チアミン水溶液 0.3 ml を加え、一定温度で一定時間反応させた後、10% メタリン酸 2 ml を加えて、10分間沸騰浴を行い、反応を停止させて主検とした。

盲検は、酵素液を15分間沸騰浴を行って酵素を失活させたものについて、上記同様に反応させた。

酵素活性は、おのおの残存チアミンをフェロシアン化カリウムで酸化し、生成したチオクロームの蛍光強度により、次式にしたがって分解率 x を求めてチアミナーゼ活性とした。

$$x(\%) = \frac{f_B - f_H}{f_B} \times 100$$

f_H : 主検の読み

f_B : 盲検の読み

4. チアミン分解耐熱性因子活性測定

松井の方法¹⁴⁾に準拠した。前記チアミナーゼ活性測定実験の場合と同様の抽出液上清について、15分間沸騰浴を行って酵素を不活性とし、これを試料溶液とした。

この溶液 2 ml に 0.2 M McIlvaine 緩衝液 5 ml, 10 μ g/ml チアミン水溶液 0.3~0.4 ml を加え、一定温度で一定時間反応させた後、10% メタリン酸 2 ml を加えて反応させたものを主検とした。

盲検には、一定温度一定時間の反応を行わなかったものを用いた。分解活性は、加えたチアミンの分解率で示した。

5. チアミン分解耐熱性因子活性に及ぼす金属イオン等の影響測定

耐熱性因子による分解活性に及ぼす金属イオン、EDTA 及び L-システインの影響について、生育日数20日の根、同30日の茎、葉からの抽出上清を用いて検討した。

抽出上清を15分間沸騰浴を行い、この 1 ml に 0.2 M McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 2.5 ml, 2 μ g/ml チアミン水溶液 1 ml, 10mM 金属イオン等の溶液 0.5 ml を加え、70°C で30分間反応させ、他に金属イオン等の溶液を加えない盲検を作ってチアミンの分解率を測定して比較した。

6. チアミン分解耐熱性因子の活性に及ぼす酸及びアルカリの影響測定

松井の方法¹⁴⁾に準拠した。耐熱性因子の分解活性に及ぼす酸及びアルカリの影響を生育日数20日の葉を用いて検討した。

15分間の沸騰で酵素を不活性にした抽出上清 5 ml に 0.5N 塩酸又は 0.5N 水酸化ナトリウ

ム 5 ml を加えて、15°C に24時間放置した後、それぞれ pH7.0 に補正した。

この溶液 5 ml に、2 µg/ml チアミン水溶液 2 ml を加えて、70°C で30分反応させ、他に酸又はアルカリで処理しない盲検を作って比較した。

7. 耐熱性チアミン分解因子の透析性の検討

松井の方法¹⁴⁾に準拠した。生育日数20日めの葉から抽出した上清を15分間沸騰浴を行った後、この中から40ml を透析チューブにとり、これを 0.1 M McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 120 ml 中に入れ、5°C で12時間放置した。その結果内液41ml, 外液117ml であった。

この内液、外液、内液と外液を合せたものについてチアミン分解率を測定した。まず、内液 1 ml に 0.01 M McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 3 ml, 2 µg/ml チアミン水溶液 2 ml を加えたもの、次に、外液 3 ml に 0.01 M McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 1 ml, 2 µg/ml チアミン水溶液 2 ml を加えたもの、そして、内液 1 ml, 外液 3 ml に 2 µg/ml チアミン水溶液 2 ml を加えたものを、それぞれ 70°C で30分間反応させた。他に盲検を伴いチアミンの分解率を測定して、各処理区の比較をした。

8. システインによるチアミンへの戻り量測定¹⁹⁻²⁰⁾

この実験には、生育日数10日めの茎を用いた。抽出上清を15分間沸騰を行い、この溶液 1 ml に 0.2 M McIlvaine 緩衝液 (pH 7.0) 2.5ml, 2 µg/ml チアミン水溶液 1 ml を加えた試験管 3 本を用意し、それぞれ a, b, c とした。

a には 10% メタリン酸 1 ml を加え、70°C で30分間保温した後蒸留水 0.5ml を加えて、70°C で30分間保温した。

b は 70°C で30分間反応させた後、10% メタリン酸 1 ml を加えて反応を停止させ、蒸留水 0.5ml を加え、70°C で30分保温した。

c は 70°C で30分間反応させた後、20mg/ml L-システイン水溶液 0.5ml を加えて 70°C で30分間さらに反応させてから、10% メタリン酸 1 ml を加え、反応を停止させ、以下 a, b, c についてチオクローム法で蛍光強度を測定した。

a, b, c それぞれの蛍光強度を f_a, f_b, f_c として、 B_1SSB_1 型チアミン量を次式で求めた。

$$B_1SSB_1 \% = \frac{f_c - f_b}{f_a - f_b} \times 100$$

これは、分解されてチオクローム陰性反応を示した物質のうち、 B_1SSB_1 型のはシステインによってチアミンに戻り、陽性反応を示すとされていることによるものである^{19,20)}。

実 験 結 果

1. ソバの生育に伴うチアミンの量的、質的变化

ソバの発芽後10日、20日、30日めの根、茎、葉について、遊離型チアミン、エステル型チアミン、総チアミン別に比較したのが図1である。

これをさらに、ソバの植物体全体で示したのが図2である。

これらの結果から、葉に最も多くチアミンを含み、また、どの器官においても、遊離型チアミンがエステル型チアミンより多く、80%前後が遊離型として存在することがわかった。

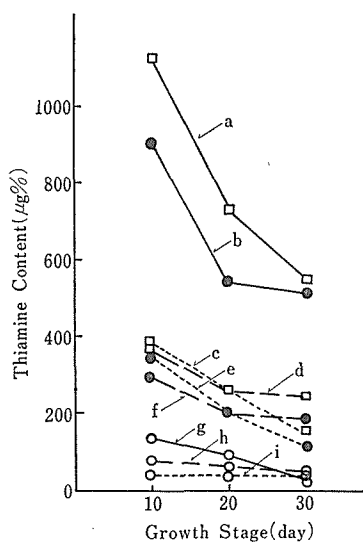


Fig. 1. Quantitative and qualitative changes of thiamine content in the roots, stems and leaves of common buckwheat at each growth stage.

- a. leaf's total thiamine
- b. leaf's free-type thiamine
- c. root's total thiamine
- d. stem's total thiamine
- e. root's free-type thiamine
- f. stem's free-type thiamine
- g. leaf's ester-type thiamine
- h. stem's ester-type thiamine
- i. root's ester-type thiamine

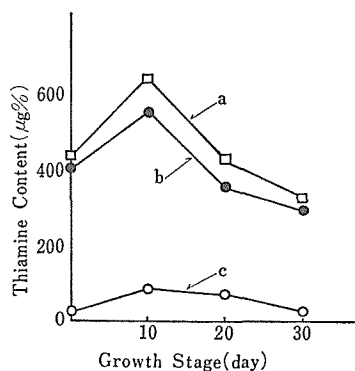


Fig. 2. Quantitative and qualitative changes of thiamine content in common buckwheat at each growth stage.

- a. total thiamine
- b. free-type thiamine
- c. ester-type thiamine

生育過程では、どの器官においても生育日数10日め頃に最大量のチアミンが含有され、以後減少した。特に葉における減少が著しかった。

2. チアミナーゼの検索

ソバの種子及び発芽後10日、20日、30日めの根、茎、葉におけるチアミナーゼの存在について検索したが、我々の実験では、いずれの温度、pHにおいても、また、どの生育段階、どの器官においても、チアミナーゼの存在は確認されなかった。

3. チアミン分解耐熱性因子の検索

1) 分解活性の経時的変化

0.2 M McIlvaine 緩衝液を用い pH 7.0 及び 8.0、温度70°Cで、反応の経時的変化を測定した。

結果は、図3～5に示すように、種子においては分解活性が認められなかったが、その他

では、各器官の各生育段階において分解活性が認められ、70°Cでは、pH 8.0の場合30分、pH 7.0で120分頃にピークを示した。

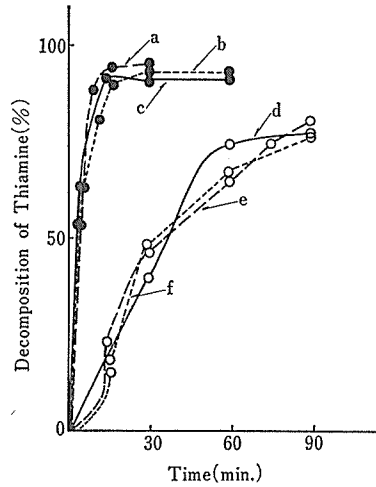


Fig. 3. Time course of the thermostable anti-thiamine activity in the roots of common buckwheat at each growth stage and at each pH. The growth stage was indicated by days after germination. The reaction mixture was incubated at 70°C.

- a. 20 days, pH 8.0 b. 30 days, pH 8.0 c. 10 days, pH 8.0
 d. 10 days, pH 7.0 e. 20 days, pH 7.0 f. 30 days, pH 7.0

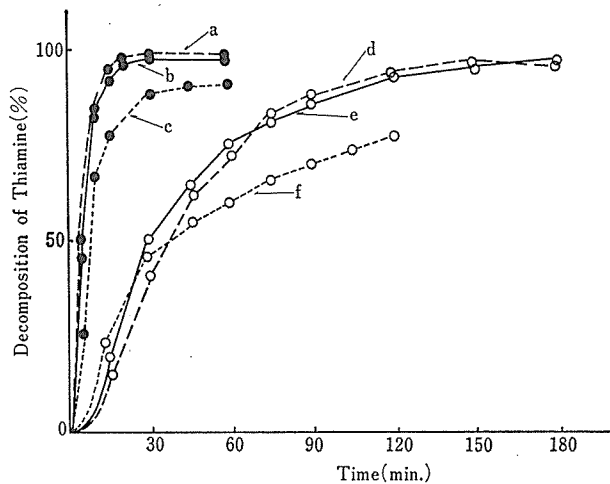


Fig. 4. Time course of the thermostable anti-thiamine activity in the stems of common buckwheat at each growth stage and at each pH. The reaction mixture was incubated at 70°C.

- a. 20 days, pH 8.0 b. 10 days, pH 8.0 c. 30 days, pH 8.0
 d. 20 days, pH 7.0 e. 10 days, pH 7.0 f. 30 days, pH 7.0

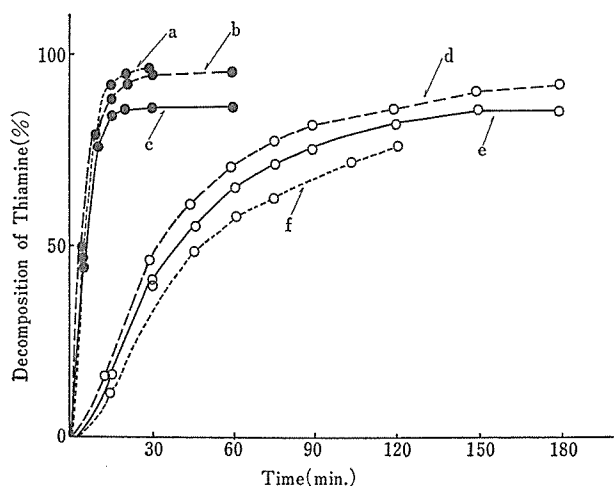


Fig.5. Time course of the thermostable anti-thiamine activity in the leaves of common buckwheat at each growth stage and at each pH. The reaction mixture was incubated at 70°C.

- a. 30 days, pH 8.0 b. 20 days, pH 8.0 c. 10 days, pH 8.0
 d. 20 days, pH 7.0 e. 10 days, pH 7.0 f. 30 days, pH 7.0

2) pHの影響

緩衝液には、0.2 M McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0~8.0) 及び0.2 M Atkins 緩衝液 (pH 8.0~11.0) を用い、70°C、30分で反応させた。

その結果を図6~8に示した。

根、茎、葉のどの場合でも、pH6.0以上で活性が見られ、pHの上昇とともに活性が増大した。しかし、pH9.0以上では、チアミンがpHの影響だけでかなり分解されるので、明らかな分解率を出すことができなかつた。このため至適pHは8.0附近であろうと考えられた。

3) 温度の影響

根では生育日数20日、茎葉では同30日のものを供試して検討した。

0.2 M McIlvaine 緩衝液 (根では pH 7.0, 茎、葉では pH 7.0及び8.0) を用い、各温度で、pH 7.0では30分、pH 8.0では茎10分、葉で5分、それぞれ反応させた結果を図9に示した。

この結果、pH 7.0では50°C以上で、pH 8.0では40°C以上で活性が見られ、温度の上昇と

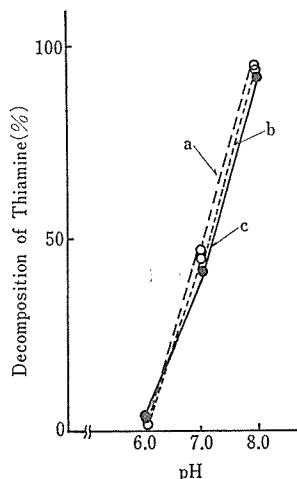


Fig.6. Effect of pH on the anti-thiamine activity in the roots of common buckwheat at each growth stage.

The reaction mixture was incubated at 70°C for 30 min.

- a. 20 days b. 30 days c. 10 days

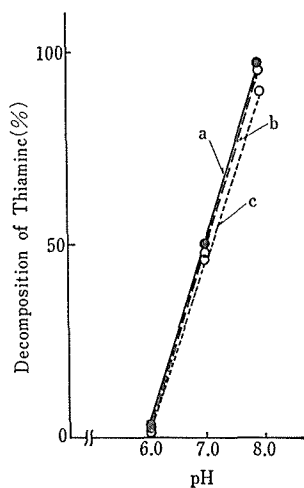


Fig. 7. Effect of pH on the anti-thiamine activity in the stems of common buckwheat at each growth stage.

The reaction mixture was incubated at 70°C for 30 min
 a. 30 days b. 20 days c. 10 days

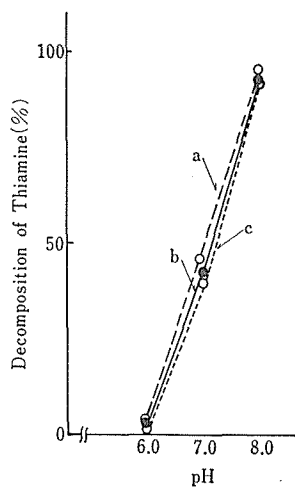


Fig. 8. Effect of pH on the anti-thiamine activity in the leaves of common buckwheat at each growth stage.

The reaction mixture was incubated at 70°C for 30 min.
 a. 20 days b. 10 days c. 30 days

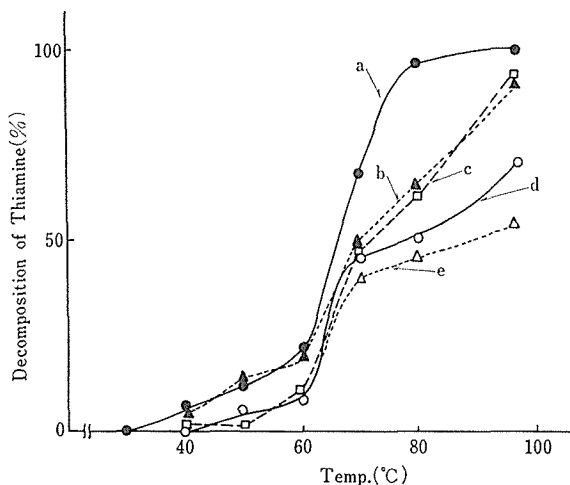


Fig. 9. Effect of temperature on the anti-thiamine activity of common buckwheat at each growth stage and at each pH.

a. stems, 30 days, pH 8.0 b. leaves, 30 days, pH 8.0
 c. roots, 20 days, pH 7.0 d. stems, 30 days, pH 7.0
 e. leaves, 30 days, pH 7.0

ともに増大した。特に60°C以上では、その増大が著しかった。

Table 1. Effect of several compounds on the thermostable anti-thiamine activity in common buckwheat.

Additive	Final Conc. (M)	Anti-thiamine activity remaining (%)		
		Roots 20 days	Stems 30 days	Leaves 30 days
None		100	100	100
CuSO ₄	10 ⁻³	99	104	128
CaCl ₂	10 ⁻³	81	71	100
Mg (CH ₃ COO) ₂	10 ⁻³	95	97	84
CoCl ₂	10 ⁻³	103	109	109
MnCl ₂	10 ⁻³	139	123	181
EDTA	10 ⁻³	8	9	18
L-Cys	10 ⁻³	0	0	0

Reaction mixture, containing 1 ml of thiamine solution (2 μ g/ml), 2.5 ml of 0.2 M McIlvaine buffer solution (pH7.0), 0.5 ml of 10mM solution of several compounds and 1 ml of solution of thermostable thiamine-decomposing factor, was incubated at 70°C for 30min.

Table 2. Effect of acid or alkali on the thermostable anti-thiamine activity in common buckwheat.

Additive	Decomposition of thiamine (%)
acid	44.36
alkali	45.83
none	48.18

Five ml of the boiled solution extracted from the leaves with 5ml of 0.5 N HCl or 0.5 N NaOH was kept at 15°C for 30 min, followed by adjustment of pH of each solution to 7.0.

And then, 5 ml of each solution containing 2 ml of thiamine solution (2 μ g/ml) was incubated at 70°C for 30 min.

Table 3. Dialytic property of the thiamine-decomposing factor in common buckwheat.

Solution	Decomposition of thiamine (%)
Inside sol. (1ml)	13.78
Outside sol. (3ml)	38.08

The boiled solution extracted from the leaves was dialyzed against McIlvaine buffer solution, pH 7.0, at 5°C for 12 hours.

4) 金属イオン等の影響

表1に示したように、ソバの根、茎、葉いずれの器官におけるチアミン分解耐熱性因子も、Mn²⁺、Co²⁺によって活性化され、茎、葉では、さらにCu²⁺によっても活性化された。

一方、EDTA及びL-システインによって著しく活性が阻害された。

5) 酸及びアルカリの影響

結果は、表2のとおりであった。これによると、耐熱性分解因子による分解活性は、酸やアルカリで処理したものも、無処理のものも殆んど変らなかった。

したがって、耐熱性因子は酸にもアルカリにも安定な物質であると考えられた。

6) 透析性

表3に示す結果を得た。内液と外液の体積比が1対3であるとき、分解率の比もほぼこれに等しかった。

したがって、この透析内外液は平衡に達しており、透析性が認められた。このことは、チアミン分解耐熱性因子は透析性のある物質、すなわち、低分子の物質であると考えられた。

7) システインによるチアミンへの戻り^{18,19)}

実験方法の項で述べた方式で求めた結果、生育日数10日目の茎における耐熱性因子により反応を受けて、チオクローム陰性になったチアミン同族体 (B_1SSB_1) からシステインによってチオクローム陽性のチアミンに戻った量は次のようであった。

$$B_1SSB_1 \% = 65.26$$

この結果、ソバのチアミン分解耐熱性因子によって分解されたチアミンもシステイン添加によって、半分以上が元のチアミンに戻ったことになるといえよう。

考 察

まず、ソバの種子及び発芽後10日、20日、30日経過した植物体の、根、茎、葉についてチアミンの量的、質的变化を検討したが、本実験の結果、器官別ではいずれの生育段階においても葉に最大量のチアミンを含有し、また、生育過程では発芽後10日頃に、各器官とも最大のチアミンを含有していた。

これらのことは、葉のもっとも生育旺盛な時期にあたり、高等植物では、葉においてチアミンが生合成されていると推察されている^{1,2)}ことと符合して興味深いものがある。

なお、どの生育段階、どの器官においても、その含有されるチアミンは70%以上が遊離型で存在し、種子では95%が遊離型チアミンであった。

種子における多量の遊離型チアミンの存在は、従来報告されている¹⁶⁾多くの穀類の場合と一致し、貯蔵組織である種子に遊離型のチアミンが多いのは合目的性が考えられる。

一方、葉においてもエステル型より遊離型のチアミンが多かったことは新しい知見で、植物の種類で異なるのか、今後の検討課題として残された。

なお、ソバの種子には多量のチアミンを含むことを認めたが、このことは従来¹²⁾とも一致し、食品としても注目される。

次に、チアミナーゼの検索を行ったが、本実験の範囲では、種子、根、茎、葉のいずれにも、また、どの生育段階においてもその存在が確認されなかった。このことはエノキタケにおける結果と一致した⁴⁾。

一方、チアミン分解耐熱性因子の存在は、種子において確認できなかったが、根、茎、葉においては、どの生育段階においてもその存在が確認された。

この因子の存在は、この本体がフラボノイド類なのかフェノール類なのかについての同定が本実験では行われていないので推察にすぎないが、もし、ルチンだとすれば、ソバの葉に

ルチンが多く含有されているという従来¹²⁾の報告に一致するもので興味深いものがある。

なお、この因子が種子に存在しなかったことは、筆者らの報告したエノキタケの胞子に多く存在したことと対比して興味深い。

次に、このチアミン分解耐熱性因子の性質を検討したが、いずれの器官、いずれの生育段階においても共通して見られたことは、pH 6.0では70°C以上、pH 7.0では50°C以上、pH 8.0では40°C以上で活性が見られ、温度の上昇と共に分解活性が増大したことである。特に60°C以上では、その増大が著しかった。

金属イオン等の影響では、各器官の耐熱性因子が、いずれも Mn^{2+} 、 Co^{2+} によって活性化され、莖葉においては Cu^{2+} によっても活性化された。

Mn^{2+} による活性化は、岡本によるワラビのチアミン分解耐熱性因子においても認められている¹⁷⁾。一方、EDTA、システインによっては阻害された。以上のことは、筆者らのエノキタケにおけるチアミン分解耐熱性因子の性質⁴⁾と一致した。

システインによってチアミンに戻ることでできる分解生成物は $BiSSB_1$ であるとされ、チアゾール核の1位のSと2位のCとの間が開裂して、S-S結合によりチアミン・ダイサルファイドを形成するとされている^{19,20)}。

本実験結果では、チアミン分解耐熱性因子によるチオクローム陰性の分解生成物はその半分以上が、システインによって元のチオクローム反応陽性のチアミンに戻ることが認められた。したがってソバのチアミン分解耐熱性因子によるチアミンの分解生成物はその半分以上がチアミン同族体である $BiSSB_1$ であろうと考えられた。

要 約

(1) ソバの生育に伴うチアミンの量的、質的变化

ソバの種子及び発芽後10, 20, 30日を経た根、莖、葉について、遊離型、エステル型それぞれのチアミン含量を定量して比較した結果、どの器官でも最大量のチアミンを含んだ生育日数は10日頃で、以後は減少した。また葉に最も多く含有した。

含有されたチアミンの形態別では、各生育段階ともに、遊離型の方が多く、その割合は70%以上を示した。

(2) チアミナーゼの検索

ソバのどの生育段階、どの器官においても、チアミナーゼの存在は認められなかった。

(3) チアミン分解耐熱性因子の検索

種子では、チアミン分解耐熱因子の存在は確認できなかったが、その他の器官の各生育段階でその存在が認められた。

pH 6.0では70°C以上、pH 7.0では50°C以上、pH 8.0では40°C以上で分解活性が認められた。また、この因子は、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} などで活性化され、EDTA、システインで阻害された。酸にもアルカリにも安定で、また、透析性のある物質であると考えられた。

この因子によるチオクローム陰性の分解生成物は、システインによって半分以上がチオクローム陽性のチアミンに戻ることがわかった。

本研究に対し、御援助を戴いた梶返真理氏に対し、厚く謝意を表します。

引用文献

- 1) H. MITSUDA, Y. TAKII, K. IWAMI, K. YASUMOTO : *J. Nutri. sci. Vitaminol.* **21**, 19, 189 (1975)
- 2) 中山英男, 林 良二 : ビタミン, **45**, 36 (1972)
- 3) 能勢善嗣 : ビタミン, **49**, 465 (1975)
- 4) 栄井 明, 飯島隆志 : 信州大学農学部紀要 **18**, 1, 93 (1981)
- 5) 藤田秋治 : ビタミン, **1**, 46 (1948)
- 6) 藤田秋治, 沼田 勇 : 医学生物, **5**, 230 (1944), 日生化誌, **18**, 325, 339 (1944)
- 7) A. FUJITA : *J. Vitaminol.*, **18**, 67 (1972)
- 8) 岡本武士郎 : ビタミン, **6**, 26 (1953)
- 9) 川上 正 : ビタミン, **7**, 1069 (1954), *J. Vitaminol.*, **7**, 208 (1955)
- 10) 中林敏郎 : ビタミン, **8**, 410 (1955), **12**, 20 (1957), *J. Vitaminol.*, **3**, 129 (1957)
- 11) 長谷川栄一 : ビタミン, **8**, 415, 421 (1955), *J. Vitaminol.*, **2**, 31 (1956)
- 12) 岩田久敬 : 改著食品化学, 養賢堂, p.307 (1961)
- 13) 藤田秋治 : ビタミン定量法, 南江堂, pp.215~251 (1955)
- 14) 松井清夫 : ビタミン, **5**, 594 (1952)
- 15) K. MURATA, R. TANAKA, M. YAMAOKA ; *J. Nutri. Sci. Vitaminol.*, **20**, 351 (1974)
- 16) 菊池正彦, 山根洋重 : ビタミン, **46**, 291 (1972)
- 17) 岡本武士郎 : ビタミン, **6**, 26 (1953)
- 18) 長谷川栄一 : ビタミン, **8**, 415 (1955)
- 19) 玉置友三郎 : ビタミン, **11**, 184 (1956)
- 20) 細田四郎 : ビタミン, **14**, 231 (1958)
- 21) 飯島隆志 : 園芸学研究集録, **5**, 59~60 (1951)

**Studies on the Thiamine and its Decomposing Factor
in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* MOENCH)**

By Takashi IJIMA, Yukiko MIZUTANI,*

Shinichi KUROSAWA and Kōichi TATEISHI

Laboratory of Food Chemistry, Fac. of Agr. Shinshu Univ.

Summary

This report describes the quantitative and qualitative changes of thiamine content in the various organs of common buckwheat during their growth. Presence and several properties of thermostable thiamine decomposing factor are also described.

Among the organs of common buckwheat, the highest level of thiamine was present in the leaves. In all organs, thiamine content increased up to 10 days after germination and then decreased gradually. The qualitative analysis of thiamine revealed that the content of free-type thiamine was higher than that of ester-type through all growth stages and in all organs as well.

Thiaminase activity was not detected in the extract of common buckwheat under the condition of this experiment, while the thiamine-decomposing factor which was thermostable and dialyzable was detected in the extract of all parts of common buckwheat except its seed. This activity was higher at alkaline pH region and the significant activity was detected at temperatures above 60°C. Addition of Mn^{2+} stimulated the thiamine-decomposing activity considerably, while the activity was highly inhibited by EDTA and L-cysteine. This factor was stable in both alkaline and acidic solutions.

*Present address : Nagatanien Honpo Co., Ltd. Tokyo.