

ピーマン種子抽出物から分別した抗菌性物質の特徴*

小窪 正人*¹・三角 敏明*¹・水谷 政美*²

Purification and Characterization of Antimicrobial Substances from Green Pepper Seeds

Masato KOKUBO, Toshiaki MISUMI, and Masami MIZUTANI

ピーマン種子の水抽出物から抗菌性物質を分離するため、硫酸アンモニウムによる塩析とDEAE Sepharose FF及びSephadex G200を担体とした連続するカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、ピーマン種子の水抽出物の抗菌性は、複数の物質により発現していることが推察された。さらに、これらの抗菌性物質は、いずれもタンパク質、中性糖類及び酸性糖類を構成成分としていたものの、糖及びアミノ酸組成はそれぞれ異なっており、少なくとも抗菌性を有する成分が3種存在することを示唆していた。

キーワード：ピーマン、種子、抗菌性、水抽出物、カラムクロマトグラフィー

1 はじめに

これまでにピーマン種子の水抽出物に酵母や細菌の増殖を抑制する作用のあることや種子内に抗菌性物質を最大限に生成させる条件等について明らかにしてきた^{1,2)}。本研究では、さらに種子の水抽出物からカラムクロマトグラフィー等により抗菌性物質を分離精製し、その特徴について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 水抽出物の分画³⁾

真空凍結乾燥したピーマン種子の水抽出物3gを水100mlに溶かし、氷水で冷却しながら56.1gの硫酸アンモニウム(80%飽和)を徐々に添加し、完全に溶解させた後、4℃で一夜放置した。生成した沈殿物は、遠心分離(10,000rpm、20min)により回収し、20mMりん酸カリウム緩衝液(pH7.0)5mlに溶解させた。これを同上緩衝液に対して透析(室温)した後、透析液を真空凍結乾燥し、脱硫酸試料とした。

脱硫酸試料は、同上緩衝液20mlに溶かし、DEAE Sepharose FFカラムに重層した後、同

上緩衝液で溶出した(0.7ml/min、0.5M-NaClリニアグラジエント)。溶出液は、280nmにおける吸光度によりそれぞれの画分に分別し、水に対して透析した後、真空凍結乾燥してDEAE分画試料とした。

DEAE分画試料は、水に溶かしSephadex G200カラムに重層した後、同上緩衝液で溶出した(0.2ml/min、0.2M-NaCl)。溶出液はDEAE分画試料と同様の方法で分別し、水に対して透析した後、真空凍結乾燥して最終分画試料とした。

2-2 抗菌活性の評価

抗菌活性の評価は、DEAE分画試料及び最終分画試料について行った。濃度を5mg/mlに調製した各分画試料を滅菌した後、滅菌水で5段階に希釈(0.5、0.25、0.13、0.06、0.03%)したものを試料液とした。試料液50μl、YM培地150μl及び宮崎酵母MK021(1.0×10⁶個/ml)50μlを96穴マイクロプレートに加え、27℃で培養した。24、48及び72時間後の660nmにおける吸光度を測定し、その変化により抗菌活性を評価した。

2-3 抗菌性画分の成分組成

抗菌性画分のタンパク質はBCA法⁴⁾、中性糖はフェノール硫酸法⁵⁾、酸性糖はカルバズール硫酸法⁵⁾でそれぞれ定量した。また、アミノ酸組成は、試料を6N塩酸で加水分解(110℃、24時間)し、

* 農林畜水産物を用いる食品開発に関する研究

* 1 食品開発部

* 2 応用微生物部

アミノ酸分析計（株式会社日立製作所製L-8800）で、糖組成は、試料を2.5Mトリフルオロ酢酸で加水分解（80℃、5時間）し、イオンクロマトグラフ（日本ダイオネクス製DX-500）で測定した。

3 結果及び考察

3-1 抗菌性画分の分別

ピーマン種子の水抽出物から80%飽和硫酸による塩析により、0.75gの脱硫酸試料が得られた。

この脱硫酸試料0.3gを用いて、DEAE Sepharose FFカラムによる陰イオン交換クロマトグラフィーを行った結果、5つの画分（A～E）に分別された（図1）。各画分の抗菌活性を評価したところA、D及びE画分に抗菌活性が認められ、その収量は順に98.5、68.7及び116.1mgであった。

抗菌活性の認められたA、D及びE画分のそれぞれ70.5、45.7及び67.0mgを用いて、さらにSephadex G200カラムによるゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、それぞれ3画分（A-I～III）、2画分（D-I、II）、3画分（E-I～III）に分別された（図2、3及び4）。各画分の抗菌活性を評価したところA-I、D-II及び

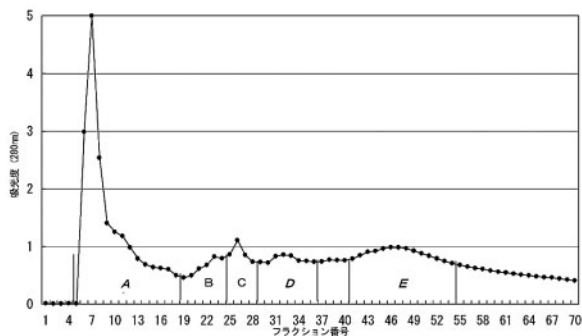


図1 DEAE Sepharose FFによる分画

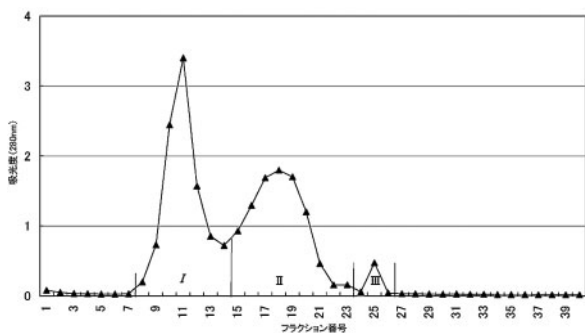


図2 Sephadex G200による分画（A画分）

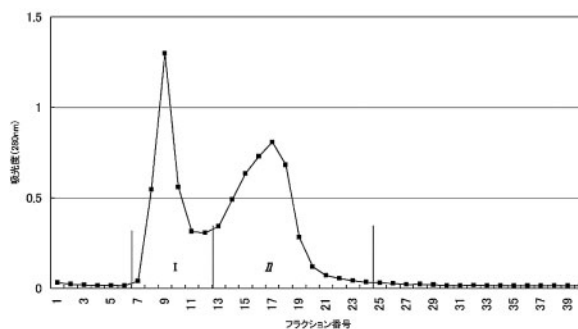


図3 Sephadex G200による分画（D画分）

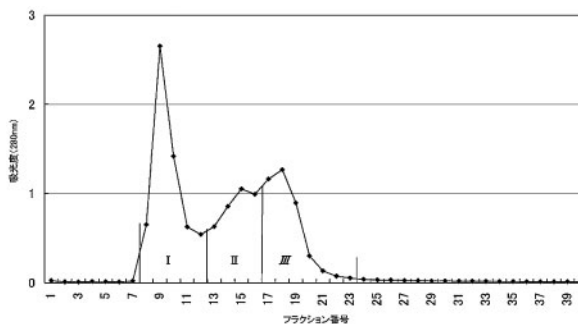


図4 Sephadex G200による分画（E画分）

E-III画分に抗菌活性が認められ、その収量は順に16.5、28.9及び15.7mgであった。

3-2 抗菌性画分の成分組成

A-I、D-II及びE-III画分のタンパク質、中性糖類及び酸性糖類を分析した結果を示した（表1）。いずれもタンパク質、中性糖類及び酸性糖類を構成成分としていたが、A-I画分の酸性糖類の割合は、D-II及びE-III画分と比較して2.9%と低かった。

糖組成をみると、A-I画分はアラビノース（44.4%）及びガラクトース（29.0%）の割合が高い反面、グルコース及びフルクトースが含まれていなかった。D-II画分はラムノース（18.5%）及びアラビノース（26.3%）の割合が高かった。E-III画分はグルコース及びアラビノースの割合が高く、その比は2：1であった（図5）。

表1 抗菌性画分の組成（構成比 %）

| | タンパク質 | 中性糖類 | 酸性糖類 |
|-------|-------|------|------|
| A-I | 76.9 | 20.1 | 2.9 |
| D-II | 59.0 | 25.4 | 15.7 |
| E-III | 63.2 | 26.3 | 10.5 |

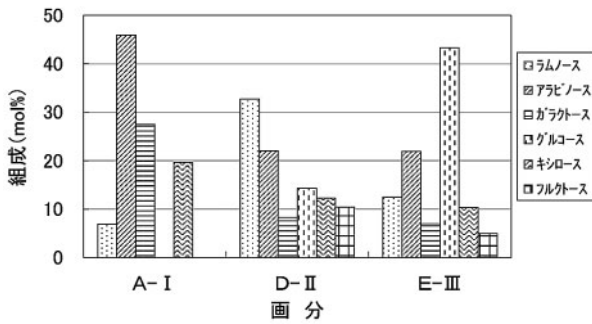


図5 抗菌性画分の糖組成

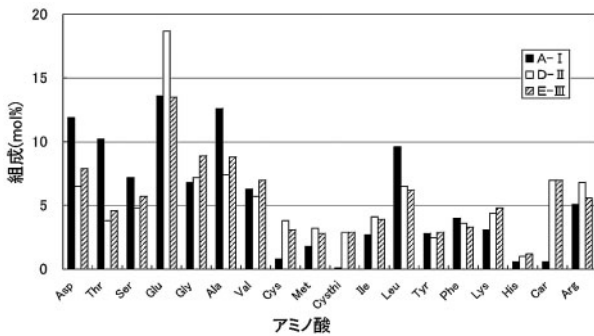


図6 抗菌性画分のアミノ酸組成

アミノ酸組成をみると、3つの画分とも主に酸性及び中性アミノ酸を多く含んでいた。A-I画分は、特にアラニン(12.6%)、アスパラギン酸(11.9%)及びスレオニン(10.2%)が多かった。D-II画分とE-III画分は、グルタミン酸含量に違いがあったが、他はほぼ同じ組成を示した(図6)。

タンパク質、中性糖類、酸性糖類の組成比、糖組成及びアミノ酸組成の結果より、A-I、D-II、E-IIIの画分は異なる物質であり、ピーマン種子中には、少なくとも3種の抗菌性物質が存在すると考えられた。

4 まとめ

ピーマン種子抽出物から抗菌性物質を分別し、その特徴について検討したところ、以下のことが分かった。

- 1) ピーマン種子の水抽出物の抗菌性は、カラムクロマトグラフィー等の分離精製を行うことにより、3種類の物質により発現していることが確認された(A-I、D-II及びE-III画分)。
- 2) A-I、D-II及びE-III画分の成分を分析した結果、いずれもタンパク質、中性糖類及び酸性糖類で構成されていた。
- 3) 糖及びアミノ酸組成を分析した結果、それぞれ異なる成分組成をしており、少なくとも抗菌性を有する成分が3種類存在することを示唆していた。なお、糖組成では、A-I画分がアラビノース、D-II画分がラムノース、E-III画分がグルコースを最も多く含んでいた。アミノ酸組成では、酸性及び中性アミノ酸の占める割合が高く、A-I画分はD-II及びE-III画分とは異なっていた。

5 参考文献

- 1) 平川良子, 水谷政美, 小窪正人, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, **48**, 105(2003)
- 2) 水谷政美, 平川良子, 小窪正人, 特願2004-197813
- 3) Mizuo Yajima, Tsutomu Takayanagi, Kazuhiko Nozaki and Koki Yokotsuka, *Food Sci. Technol., Int.* **2**, 234(1996)
- 4) 岡田雅人, 宮崎 香 編; 改訂タンパク質実験ノート上巻, 羊土社, p.13-135(1999)
- 5) 菅原龍幸, 前川昭男 監修; 新食品分析ハンドブック, 建帛社, p.103-152(2000)