

ニガウリのアスコルビン酸オキシダーゼ活性

柚木崎 千鶴子*¹・黒木 美香*²・井野 寿俊*³・赤木 功*⁴

Ascorbate Oxidase Activity of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.)

Chizuko YUKIZAKI, Mika KUROGI, Hisatoshi INO and Isao AKAGI

宮崎県総合農業試験場（総合農試）で育成・栽培された佐土原 3 号（S3），宮崎 N1 号（N1），宮崎 N2 号（N2），宮崎 N3 号（N3）および宮崎 N4 号（N4）の 5 品種のニガウリを用いてアスコルビン酸（AsA）酸化量あるいはアスコルビン酸オキシダーゼ（AAO, EC 1. 10. 3. 3）活性を測定した結果，ニガウリ果肉 AAO 活性の至適温度は 30 ~ 40 °C で，70 °C を越えると完全に失活することがわかった。また，ニガウリ果肉 AAO 活性の至適 pH は，pH 4.5 ~ 5 付近であった。また，5 品種の中では N3 が最も AAO 活性が高く，60 °C においても他の品種の 2 倍以上の活性が保持されていた。

一方，S3 の部位毎の AsA 酸化量を比較すると，胎座が最も高く，AAO 活性では果肉が最も高かった。

キーワード：ニガウリ，アスコルビン酸オキシダーゼ，品種，部位

1 はじめに

近年宮崎県では，ニガウリの生産量が年々伸びており，平成 17 年の生産量は 5,588 t で沖縄県に次いで全国第二位である。さらなる需要増を目指して，総合農試では消費者の多様なニーズに対応するため，N1, N2, N3 および N4 を育成した。N1 は，従来の S3 と並ぶ主要品種として位置づけられ，露地栽培に向くよう草勢が強い。N2 は，通常の半分の大きさで一度の食事で使い切る大きさを想定した。N3 は，美しい白色で彩色料理に向く。N4 は，イボがないので収穫や輸送時に傷みにくい。我々は，以上のような特徴を有する育成品種を用いて，平成 17 年にビタミン C 含量を調べ，品種間差および部位間差があることを明らかにした¹⁾。ビタミン C は，抗酸化活性を有することが知られているが，AAO の働きで容易に酸化される。そこで，ニガウリの AAO の特徴を調べるとともに，各品種による AAO 活性の差異を検討した。

2 実験方法

2-1 原材料および前処理

平成 19 年 3 月に総合農試でハウス栽培された S3, N1, N2, N3 および N4 の 5 種類のニガウリを交配後 17 ~ 20 日で収穫した。即日，部位毎に分け，果肉はタテ二つ割りにし，胎座および種子はそれぞれ真空包装し分析まで -80 °C で保存した。

2-2 粗酵素液の抽出^{2) 3)}

-80 °C 凍結サンプル 100 g に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 300 mL を加えて磨砕した後，8,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った。その上澄液につき硫酸処理を行い 20% ~ 80% 飽和において生じた沈殿物を集め，0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7) に対して透析を行い，得られた内液を粗酵素液とした。粗酵素液のタンパク質濃度は，牛血清アルブミンを標準として，プロテインアッセイ試薬（日本バイオ・ラッド）を用いブラッドフォード法で定量した。

2-3 酵素活性測定

1mM L(+)-アスコルビン酸標準品 (AsA, 和光純薬工業) を含む 2% メタリン酸溶液 0.5 mL を試験管に取り，0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8) 0.5 mL を加えて pH を約 6 とし，これに AAO 液 0.1 mL

* 1 食品開発部
* 2 宮崎大学農学部
* 3 宮崎県総合農業試験場
* 4 財団法人宮崎県産業支援財団

を添加し, 所定の温度で所定の時間反応させた後, 直ちに2%メタリン酸溶液 3.9 mL を加えて反応を停止させた。反応液を 3,000 rpm で5分間遠心分離して上清の 243 nm における吸光度を測定した。AsA 溶液, 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 8), 2%メタリン酸溶液, AAO 液の順に混合したものをコントロールとし, 同様に上清の 243 nm における吸光度を測定し, サンプル液との差スペクトル ΔE_{243} を AsA 酸化量とし, タンパク質 1mg あたりの ΔE_{243} を AAO 活性値とした。至適 pH の試験においては, 10 mM AsA 溶液 0.1 mL に pH 3 ~ 8 に調整したリン酸緩衝液 0.8 mL および粗酵素液 0.1 mL を加えて 30 °C で 5 分間反応させた後, 0.5 mL を分取し 2%メタリン酸溶液 4.5 mL を加えて反応を停止させた。反応液を 3,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清の 243 nm における吸光度を測定した。なお, 別に反応液の pH を測定し結果を補正した。

3 結果および考察

3-1 作用時間の影響

S3 果肉の粗酵素液を用いて 30 °C で 2 ~ 70 分間反応させて AsA 酸化量を測定した。その結果, 12 分までは直線的に増大したが, 12 分以降は反応速度が低下し 20 分以降はほとんど変化がなかった (図 1)。以上の結果より, 直線的に AsA 酸化量が增大する範囲内で反応時間を 5 分として, 以降の試験を行うこととした。

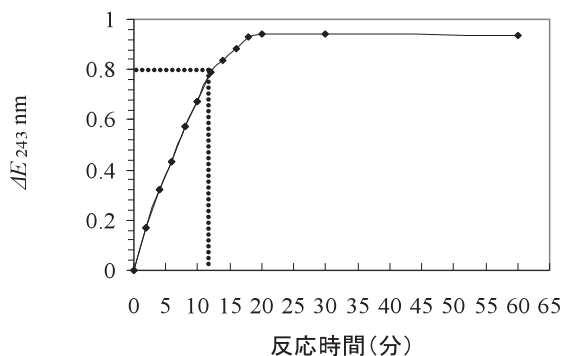


図 1 S3 果肉粗酵素液の AsA 酸化量の経時変化

3-2 温度の影響

5 品種のニガウリ果肉を用いて, 20 °C ~ 70 °C まで 10 °C 毎に AAO 活性を測定した結果, S3, N1, N2 および N4 は, 30 ~ 40 °C で最も活性が高く, 50

°C を超えると急激に活性が低下した。一方, N3 は, いずれの温度帯においても最も活性が高く, 60 °C で活性の低下が見られるものの, 他の品種の 2 倍以上の活性を保持していた。また, いずれの品種においても, 70 °C ではほぼ完全に失活することがわかった (図 2)。

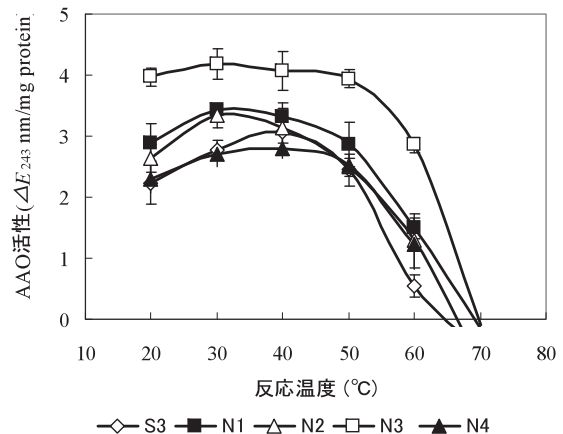


図 2 ニガウリ果肉の AAO 活性に及ぼす温度の影響

平均値 ± 標準偏差 (n=3)

3-3 pH の影響

5 品種のニガウリを用いて, pH 2.64 ~ 7.53 まで pH を変化させて AAO 活性を測定した結果, N2 および N4 では pH 4.5 付近, S3, N1 および N3 では pH 5 付近に至適 pH がみられた。また pH 4 ~ 7 では, N3 の活性が最も高かった (図 3)。

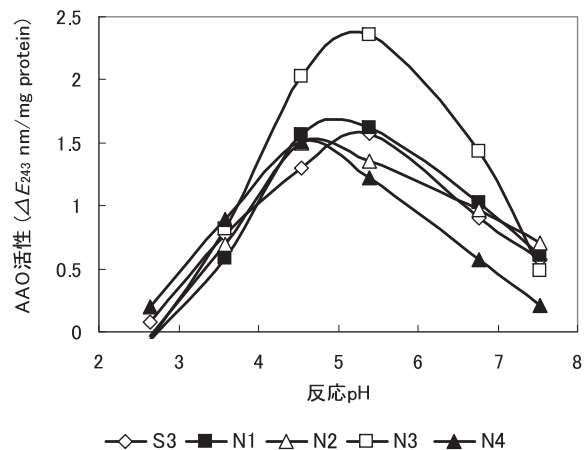


図 3 ニガウリ果肉 AAO 活性に及ぼす pH の影響

3-4 アスコルビン酸オキシダーゼの部位間差

S3 の果肉、胎座および種子の-80℃凍結品から 2-2 に示した方法で粗酵素液を抽出し、20℃～70℃まで 10℃毎に AsA 酸化量を測定した結果、果肉では 20～40℃に、胎座および種子では 40℃付近に至適温度帯があることがわかった(図 4)。

また、それぞれの部位のタンパク質含量は、果肉が 2,015 mg/mL、胎座が 6,393 mg/mL、種子が 13,254 mg/mL と差があるため、タンパク質 1 mg あたりで表記する AAO 活性では、果肉が最も高く、次いで胎座、種子の順であった(図 5)。

しかしながら、ジュース等で全果搾汁するような場合には、総量としての AAO 活性が問題になると考えられるので、中心部に存在する胎座や種子に 70℃以上の条件が加わって、AAO が完全に失活するような加熱条件の選定が重要になると考えられた。

4 まとめ

総合農試で育成・栽培された S3, N1, N2, N3 および N4 の 5 品種のニガウリを用いて AsA 酸化量あるいは AAO 活性を測定した結果、以下の知見が得られた。

- 1) ニガウリ果肉 AAO 活性の至適温度は、30～40℃で、70℃を越えると完全に失活した。
- 2) ニガウリ果肉 AAO 活性の至適 pH は、pH 4.5～5 付近であった。
- 3) ニガウリ果肉 AAO 活性は、20～70℃のいずれの温度帯でも N3 が最も活性が高く、60℃においても他の品種の 2 倍以上の活性が保持されていた。
- 4) ニガウリ果肉 AAO 活性は、pH 4～7 において N3 が最も活性が高かった。
- 5) ニガウリ (S3) の部位毎の AsA 酸化量を比較すると胎座が最も活性が高かった。しかしながら、タンパク質含量に差があるため、AAO 活性としては、果肉が最も高かった。

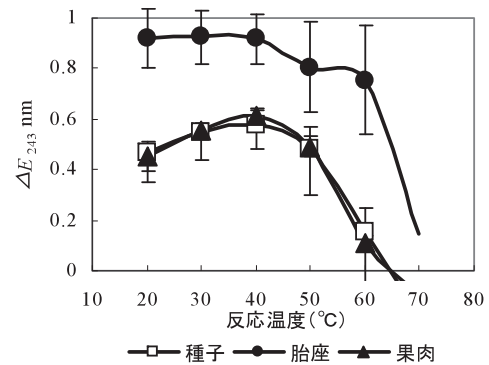


図 4 S3 果肉、胎座および種子の AsA 酸化に及ぼす温度の影響

平均値±標準偏差 (n=3)

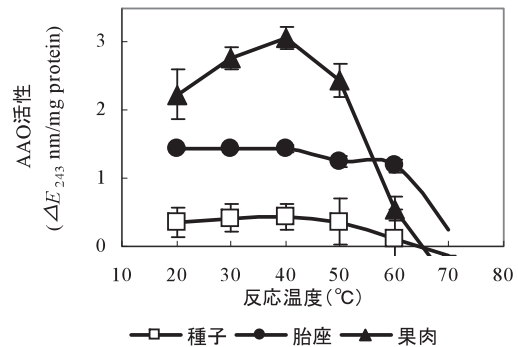


図 5 S3 果肉、胎座および種子の AAO 活性に及ぼす温度の影響

平均値±標準偏差 (n=3)

5 参考文献

- 1) 柚木崎千鶴子, 福山明子, 白木己歳, 井野寿俊, 赤木功, ニガウリに含まれるビタミン C 量品種間差および部位間差, 宮崎県食品開発センター研究報告, 99-101 (2005)
- 2) 岡田雅人, 宮崎香, 改訂タンパク質実験ノート上, 羊土社, 36-42 (2003)
- 3) 東野哲三, 藤田修二, 差スペクトル法による温州ミカンのアスコルビン酸酸化酵素活性の測定, 日本食品科学工学会誌, 31, 4, 248-253 (1984)