

アマナツ (*Citrus natsudaidai* HAYATA) 種子中の

リモニン D 環ラクトンハイドラーゼの分離*

森下敏子, 藤井治子

(武庫川女子大学家政学部食物学科)

Extraction of Limonin D-ring Lactone Hydrolase from the Seeds of AMANATSU (*Citrus natsudaidai* HAYATA)

Toshiko Morishita and Haruko Fujii

Department Food Sciences, Faculty of Home Economics,

Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan

It was seemed that limonin D-ring lactone hydrolase was the enzyme transferred limonoate A-ring lactone to limonin.

According to the method proposed by Hasegawa, limonoate D-ring lactone hydrolase was isolated and refined from the seeds of *Citrus natsudaidai* HAYATA, and it was caused to act on the crude limonoid. DEAE-cellulose column was used to refine the crude enzyme. It was recognized the higher activity at 0.22M of graduated NaCl solution.

Furthermore, by the Biogel column chromatography, it was detected the three peaks. One of them showed the highest activity, its specific activity was 346 times as compared with the crude enzyme.

緒言

カンキツ果汁の搾汁後の苦味発生の原因としてリモノイドの一種であるリモニンの形成があげられており, 果汁加工工場及び果汁業界ではリモニンによる苦味形成が問題とされている^{1,2)}.

リモニンはカンキツ類の種子に多く存在し, 新鮮な果実にはほとんど存在しない。しかし, 果肉中には無味のリモネート A 環ラクトンが存在し, 酸性の果汁中で時間の経過と共にリモニンに変化する。この変化にはいくつかの要因が考えられるが, その1つにリモニン D 環ラクトンハイドラーゼの関与による酸性下でのリモニン生成促進があると考えられている²⁾。

本研究では無味のリモネート A 環ラクトンを苦味

を有するリモニンへ変換させるリモニン D 環ラクトンハイドラーゼをアマナツ種子 (*Citrus natsudaidai* HAYATA) より抽出し, 果汁の苦味生成の抑制方法を検討することを目的として行った。

実験方法

1. 原材料

アマナツ種子は熊本県果実農業協同組合より1989年4月に入手したものを使用した。

2. 粗酵素の抽出³⁾

種子表面のぬめりを取るために十分水洗し, 40℃で温風乾燥した。これを遠心式粉碎機 H-103N(日本精機製作所)で粉碎した後, 石油エーテルを用いて脂質迅速抽出装置 FE-4P(三田村理研)で40℃で15分間脱脂を行った。この粉末試料を5倍量の3%塩化ナトリウム溶液に浸漬し, 5℃で一夜放置し, 遠心分離(0℃, 10×10³rpm, 10min.)を行った。上

* 本研究は, 平成元年度科学研究費補助金一般研究 C の一部を用いて行った。

澄をイオン交換水で、5℃で12時間透析を行い食塩分を除いた後、再び遠心分離(0℃, 10×10^3 rpm, 10 min.)を行って沈殿物を除いた。上澄に2.5倍量の-20℃のアセトンを加え、5℃で6時間アセトン沈殿を行った後、遠心分離(0℃, 10×10^3 rpm, 10 min.)を行って沈殿物を集めた。アセトンを揮散させた後、少量の0.01Mのリン酸カリウム緩衝液で沈殿物を溶解し、これをリモニンD環ラクトンハイドラーゼの粗酵素液とした。

3. イオン交換クロマトグラフィーによる酵素の精製
DEAEセルロースカラム(3.0×45 cm)をpH6.0の0.01M リン酸カリウム緩衝液で平衡化した後、粗酵素液を添加し、同リン酸緩衝液で夾雑するタンパク質を流出した。流出液は試験管に10 mlずつ分取し、280nmにおける吸光度を測定した⁴⁾。展開は5℃で行った。流出液の吸光度が0.01以下に低下したことを確認した後、吸着された酵素タンパク質を塩化ナトリウム溶液のグラジエントにより溶出させた。pH6.0の0.01M リン酸緩衝液を混合槽とし、0.7Mの塩化ナトリウムを含むpH6.0のリン酸カリウム緩衝液を補給槽としてグラジエントし、カラムに吸着された酵素タンパク質を溶出した。

4. 酵素活性の測定

基質材料は予備実験によりリモネートA環ラクトン含量の高いカンキツの葉を用いた。川野ナツダイダイ(*Citrus natsudaidai* KAWANO)の葉2 gを乳鉢で摩砕し、5倍量のメタノールを加え、濾過した後、濾液に4 mlのクロロホルムを加えてリモノイドを抽出した。さらに5倍量の水で水洗浄を2回繰り返した後、クロロホルム層を集め、クロロホルムを揮散した後、2倍量のメタノールで溶解し、0.45μmのメンブランフィルターで濾過したものを基質リモノイドとした。この基質リモノイド1に対して粗酵素液を1の割合(体積比)で加えて30℃で反応させ、経時的に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によりリモニン量を測定した。活性の単位は酵素液0.1 mlにより30分間に1ppmのリモニンを生成する力価を1単位とした。

5. ゲル濾過による酵素の精製

イオン交換クロマトグラフィーにより得られた最も活性の高い酵素画分を試料前処理用カートリッジULTRACENT-10(東ソー)を用いて遠心分離(0℃, 4×10^3 rpm, 30min.)して脱塩・濃縮し、ゲル濾過負荷試料とした⁵⁾。

バイオゲルカラム(2.5×110 cm)をpH6.0の

0.01M リン酸緩衝液で平衡化したのち、試料を添加し、溶離を行った。溶出は5℃で行い、溶出液は5 mlずつ分取し、230 nmにおける吸光度を測定した。

6. タンパク質の定量

タンパク質の定量はFolin-Lowry法により行った⁶⁾。

7. ディスク電気泳動

各精製段階における精製度の検定を目的としてポリアクリルアミドディスク電気泳動を行った。

ゲル濃度12.6%, トリシューグリン緩衝液を用い、カラム1本当たり2 mAで90分間泳動を行った。染色はアミドブラック染色液で行った⁷⁻¹⁰⁾

8. HPLCの測定条件

装置は日本分光製, UVIDEC-100 III, ポンプ部TWINCLEを用いた。カラムはナカライテスク製Cosmosil 5C₁₈ packed column(4.6×150 mm)を用いた。移動相はメタノール/水=75/25(v%)を用い、カラム温度35℃, 感度0.08AUFS, 流速0.2 ml/min., 波長215 nmで測定を行った。

結果および考察

イオン交換クロマトグラフィーによる溶出図をFig. 1に示した。フラクションナンバー123から126にピークA, 137から141にピークB, 146から152にピークCの3つのピークが得られた。各々のピークにおける食塩濃度は、ピークA, B, Cの順に0.22M, 0.33M, 0.38Mを示した。

各ピークの酵素活性を調べるために、ピークA,

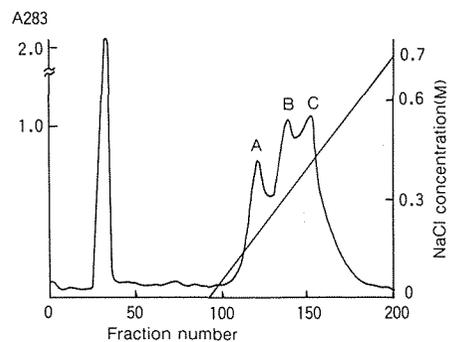


Fig. 1. Ion exchange chromatogram of Limonin D-ring lactone hydrolase on a DEAE cellulose column

Mixing chamber; 0.01M potassium phosphate buffer (pH6.0) Reservoir; 0.01M potassium phosphate buffer (pH6.0) containing 0.7M NaCl
Column size; 3.0×40 cm

Table 1. Limonin concentration in the crude limonoid treated with enzyme (by ion exchange chromatography)

Peak fraction of enzyme	Concentration of limonin (ppm)	Y/X
control	2.24	0.34
peak A	4.05	0.79
peak B	3.62	0.63
peak C	3.58	0.48

X: Peak area of limonoate A-ring lactone analyzed with HPLC

Y: Peak area of Limonin analyzed with HPLC

Table 2. Limonin concentration in the crude limonoid treated with enzyme (by gel filtration)

Peak fraction of enzyme	Concentration of limonin (ppm)	Y/X
control	0.62	0.07
peak I	5.09	1.00
peak II	4.26	0.77
peak III	3.20	0.57

X: Peak area of limonoate A-ring lactone analyzed with HPLC

Y: Peak area of limonin analyzed with HPLC

B, Cを各々粗リモノイドに作用させHPLCでリモニンを定量し、酵素活性の測定を行った結果をTable 1に示した。

コントロールに比べ、ピークA, B, C共にリモニンの増加が認められ、リモニン生成量はピークBはピークAに対し14%低く、ピークCはピークAに対し16%低いことが認められた。またリモネートA環ラクトンとリモニンの割合はピークAは0.79、ピークBは0.63、ピークCは0.48でピークB, Cに比べ、食塩濃度0.22Mで溶出されたピークAの活性が高く、これよりピークAではリモネートA環ラクトンからリモニンへの変換が顕著であることを認めた。これは長谷川により食塩濃度0.11から0.22Mの間で検出されたピークは活性が顕著に高いという報告¹⁾と一致した。活性の高いピークAについてさらにバイオゲルカラムにより精製を行った。

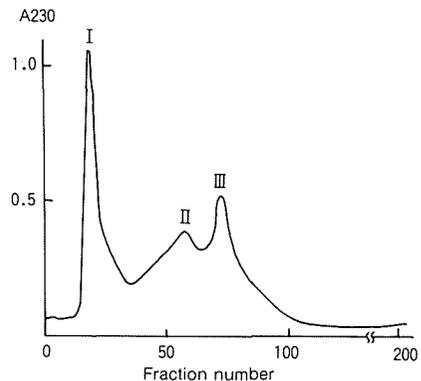
ゲル濾過による溶出図をFig.2に示した。ゲル濾過により、3つの酵素画分が検出された。溶出順にフラ

クションナンバー18から20をピークI、55から63をピークII、66から71をピークIIIとした。3つのピークについて各々粗リモノイドに作用させ、HPLCでリモニン量を測定することにより酵素活性を求めた結果をTable 2に示した。ピークIはリモニン生成量がピークIIより52%、ピークIIIより63%高く、またリモネートA環ラクトンとリモニンの割合は、ピークIは1.00、ピークIIは0.77、ピークIIIは0.57を示した。これよりピークIに高い活性が認められたため、ピークIをリモニンD環ラクトンハイドラーゼと推定した。

粗酵素および各精製段階の酵素画分についてポリアクリルアミドディスク電気泳動を行った結果をFig.3に示した。精製段階を経るに従ってバンドはより鮮明に変化し、バイオゲルによる精製後は3本のバンドが認められた。

粗酵素および各精製段階におけるタンパク量、活性、比活性^{11,12)}をTable 3に示した。各精製段階を経るに従い、活性の上昇が認められた。リモニンD環ラクトンハイドラーゼと推定したピークIでは比活性として粗酵素飽和液より346倍まで精製されたことを認めた。しかし、ポリアクリルアミド電気泳動の結果より混在するタンパク質も認められるためさらに精製を繰り返し、より活性を高める方法を検討する必要があると思われる。

以上の結果より、アマナツ種子中にはリモニンD環ラクトンハイドラーゼが存在し、本酵素がカンキツの苦味の主成分であるリモニンの生成に関与していることを認めた。加工、調理、貯蔵などの際に、酵素が

**Fig. 2.** Gel filtration of limonin D-ring lactone hydrolase on a biogel column

Phosphate buffer; 0.01M potassium phosphate buffer (pH6.0)

Column size: 2.5×110 cm

活性化し, リモネート A 環ラクトンに作用し, 苦味を有するリモニンに変化させることが推定されることより, 本酵素の特性をさらに検討し, リモニン生成を防ぐ方策を検討することが果汁の苦味を抑制するうえで肝要であると思われる。

謝 辞

本研究の実験に当たりご助言下さった, 武庫川女子大学家政学部 清原利文教授, 西尾康三教授, ご助力下さった木下絵理さん, 秦万紀子さん, 阿形和美さんに深謝します。

文 献

- 1) 長谷川信, 化学と生物, **21**, 823-827(1983).
- 2) Eskin, N. A. M., 植物性食品の色素・香味・組織—その化学と生化学—, 医歯薬出版, 東京, pp. 78-91(1930).
- 3) Maier, V. P., Hasegawa, S. and Hera, E., *Photochemistry*, **8**, 407-409(1969).
- 4) 大岳望, 鈴木照憲, 高橋信孝, 室伏旭, 米原弘, 物質の単離と精製, 東京大学出版会, 東京, pp. 103-106(1978).
- 5) 曾根寿命, 機器分析実験法(下), 化学同人, 京都, pp. 573-585(1974).
- 6) 阿南功一, 紺野邦夫, 田村善蔵, 松橋通生, 松本重一郎, 基礎生化学実験法(5)—化学的測定, 丸善, 東京, pp. 102-103(1976).
- 7) Durante, M., Bernardi, R., Lupi, M. C. and Sabelli, P., *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 852-855(1989).
- 8) Gogorcena, Y. and Ortiz, J. M., *J. Horticultural Sci.* **63**, 687-694(1988).
- 9) Meyer, B., Biehl, B., Said, M. B. and Samarakoddy, R. J. *J. Sci. Food Agric.*, **48**, 285-304(1989).
- 10) 三橋富子, 藤木すみ, 田島真理子, 妻鹿絢子, 荒川信彦, 家政誌, **40**, 295-299(1989).
- 11) 小川美江子, 加藤順, 有賀豊彦, 中嶋睦安, 名取正産, 日食工誌, **34**, 520-523(1987).
- 12) 伊藤禧男, 志村進, 日食工誌, **34**, 629-634(1987).

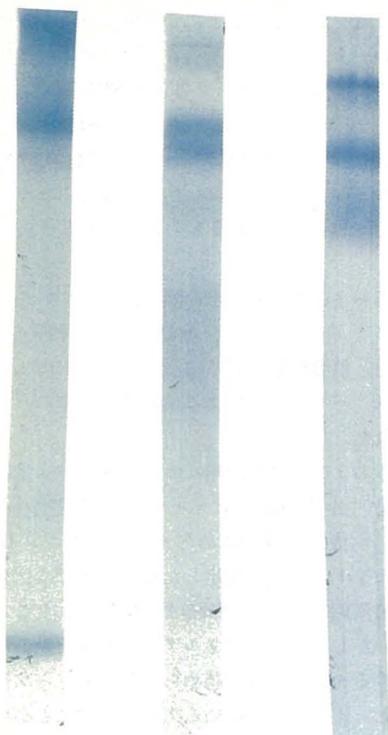


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of enzyme extracted from the Natsudaidai seeds
 Lane 1; crude enzyme
 Lane 2; enzyme refined with ion exchange chromatography
 lane 3; enzyme refined with gel filtration

Table 3. Purification of limonin D-ring lactone hydrolase extracted from Natsudaidai seeds

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)
Crude enzyme	1383	27.6	0.02
Ion exchange chromatography	17.28	1.81	0.10
Gel filtration	0.645	4.47	6.93