

韃靼そば粉におけるルチノシダーゼ活性の測定条件の検討

Investigation of measurement conditions in the activity of rutinoidase

竹俣 遥人

指導教員 関 洋子

東京工科大学 応用生物学部 食品加工学研究室

キーワード：韃靼そば、ルチノシダーゼ、ルチン、ケルセチン、酵素活性

1. 緒言

韃靼そばは普通そばと異なる品種で、別名「苦そば」と言われる程苦味の強いそばである。韃靼そば粉には普通そば粉と比較して30~160倍のルチンが含まれている¹⁾。ルチンは抗酸化作用を介して酸化ストレスを抑制し²⁾、筋委縮を防ぐ効果があるため、サルコペニアの予防・改善に効果があると報告されているが³⁾、韃靼そば粉ではルチンの分解酵素であるルチノシダーゼの活性が非常に強く、加水によってすぐに作用して、韃靼そば粉に含まれるルチンが苦味成分とされているケルセチンに分解されてしまう⁴⁾⁵⁾⁶⁾。そのため、ルチンを多く保持するためにはルチノシダーゼの活性を阻害する必要があり、阻害効果は酵素活性を測定することで評価できる。酵素活性測定にはまず、対象となる酵素の至適pHおよび温度の検討が必要であるが、ルチノシダーゼにおいてはpH 4~pH 6および30℃で高い活性を示すことが報告されている⁷⁾。さらに、酵素の反応速度は基質濃度に依存するため⁸⁾、酵素活性測定において反応液の組成は重要となるが、ルチノシダーゼ活性測定における反応組成についての詳しい報告はない。そこで本研究ではルチノシダーゼ活性の測定条件の検討を行う。まず、ルチノシダーゼ活性測定の反応温度を検討し、その後、活性測定における反応液組成の条件検討を行う。これらの結果より、ルチノシダーゼ活性の測定条件を決定する。

2. 試料

韃靼そば粉(国産)は大学近くの小売店で購入した。韃靼そば粉0.5gまたは0.1gを正確に量り取り、韃靼そば粉0.5gに水10mLまたは50mL、韃靼そば粉0.1gに水10mLをそれぞれ添加し、2日間透析を行った。終了後、濾紙(安積濾紙株式会社製)で濾過したものを粗酵素液とした。

3. 方法

3-1. 反応温度の条件検討

酵素反応は安田ら(1992)の方法を参考に行った。ルチン25mgにメタノール5mLを添加してルチンを溶かし、0.02M酢酸緩衝液(pH 5.0)20mLを加えたものを基質液(25mg/25mL)とした。基質液500μLに酵素液(0.5g/10mL)100μLを加え、5℃、20℃、30℃でそれぞれ0~60分反応後、10分ごとに停止液(メタノール)800μLを加え、反応を停止した。また、5℃の条件のみ、基質液500μL、酵素液100μL(0.1g/50mL)を加え測定を行った。これらをシリンジフィルター(0.22μm)でろ過後、HPLCを用いて測定を行った。HPLCは次の条件で測定した。検出器：UV、カラム：Luster 5μm C18、150×4.6mm(Dikma Technologies Inc.)、移動相：A(0.1%リン酸：メタノール=7:3)、B(メタノール=100)、カラム温度：40℃、流速：1.0mL/min、注入量：20μL、検出波長：360nm、グラジエント：0分：B 5%→32分：B 100%→40分：B 5%→45分：B 5%

3-2. 反応液組成の条件検討

ルチノシダーゼ活性を測定するために、ルチン

25 mg にメタノール 15 mL を添加してルチンを溶かし、0.02 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 35 mL 添加したものを基質液 (25 mg/50mL) とした。また、酵素液として、0.5 g/10mL、また、0.1 g/50mL を 2 倍、5 倍にしたものを作製し、基質液、300 μ L、500 μ L、にそれぞれの酵素液を加え、5 $^{\circ}$ C で 0-60 分間反応させた。開始から 15 分ごとに停止液 (メタノール) 800 μ L を加え、HPLC で測定した。HPLC の条件は 3-1 と同様に行った。

4. 結果

4-1. 反応温度の条件検討

酵素反応を 5 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C で行った結果、酵素液 (0.5 g/10mL) 100 μ L を加えて測定した 5 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C においては 0 分で生成物量が検出範囲を超過し、測定不能であった。基質液 500 μ L に酵素液 (0.1 g/50mL を 2 倍希釈したもの) 100 μ L を添加し反応させた結果、0 分でピーク面積 176123 から 60 分で 2681307 まで段階的に増加した。

4-2. 反応液組成の条件

基質液 300 μ L に酵素液 (濃度 0.5 g/10mL) 100 μ L を添加し、5 $^{\circ}$ C で反応させた結果、0 分で生成物の検出範囲を超過し、酵素活性を測定できなかった。次に、基質液 500 μ L に酵素液 (0.1 g/50mL を 5 倍希釈したもの、および、2 倍希釈したもの) 100 μ L を添加し、5 $^{\circ}$ C で反応させた結果、5 倍希釈では 0 分でピーク面積 111839 から 60 分で 800129 まで、2 倍希釈では 0 分でピーク面積 176123 から 60 分で 2681307 まで段階的に増加した。

5. 考察

本研究における韃靼そば粉のルチノシダーゼ活性測定は、基質液 (25 mg/50 mL) 500 μ L に酵素液 (0.1 g/50mL を 2 倍希釈したもの) 100 μ L を添加し、5 $^{\circ}$ C、60 分で反応させるという条件となった。今回、安田ら (1992) の条件を参考に酵素活性を行ったが、ルチノシダーゼ活性が非常に強く、同条件では測定できなかった。韃靼ソバ粉に含まれるルチノシダーゼは 2 種類あり、韃靼ソバの品種が異なると活性の強さが異なることが報告されている

ことから⁹⁾、品種によってルチノシダーゼの組成が異なると言える。本実験で用いた韃靼そば粉は国産であることが記載されているが、どのような品種であるかは記載されていない。現在、国産の韃靼そば粉の品種は 8 種類報告されており¹⁰⁾、ルチノシダーゼの活性が極端に弱い品種や、逆に活性が強い品種も存在すると報告されている⁹⁾。よって、韃靼そば粉のルチノシダーゼを測定する際には、一度測定条件の確認および検討を行う必要があると言える。

6. 結論

本研究ではルチノシダーゼの活性の測定条件の検討を行った。その結果、基質液 (25 mg/50mL) 500 μ L に、酵素液 (0.1 g/50 mL を 2 倍希釈したもの) 100 μ L を添加し、5 $^{\circ}$ C、60 分で酵素活性が測定できることが明らかとなった。

7. 参考文献

- 1) 藤野ら (2006) 日本作物学会講演会要旨・資料集, Vol. 222nd, Page 240-241.
- 2) Ahmed et al. (2022) Oxidative Medicine And Cellular Longevity, Vol. 2022, Page 2710607.
- 3) Chang et al. (2021) Antioxidants, Vol. 10, No. 2, Page 286.
- 4) 安田ら (1992) 日本食品工業学会誌, Vol. 39, No. 11, Page 994-1000.
- 5) 小原ら (1989) 日本食品工業学会誌, Vol. 36, No. 2, Page 121-126.
- 6) 奈賀ら (2015) 韃靼ソバの苦み特性と制御, 東洋食品工業短期大学紀要, No. 3, Page 18-22.
- 7) 川上晃 (1995) 日本食品科学工学会誌, Vol. 42, No. 11, Page 892-898.
- 8) 畠山ら (2020) 初めて学ぶ生命科学の基礎, Page 79-80.
- 9) Suzuki et al. (2014) Breeding Science, Vol. 64 No. 4 Page 339-343.
- 10) 農研機構
<https://www.naro.go.jp/collab/breed/0100/0104/index.html>, 2023/10/16 閲覧