

琉球大学学術リポジトリ

沖縄県産ウリ科植物由来アルコール及びアルデヒド分解酵素抽出健康食品の開発

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村上, 恵, 高橋, 誠, 具志堅, 健作, 稲福, 桂一郎, 宮城, 健, 佐渡山, 恵一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016714

沖縄県産ウリ科植物由来アルコール及びアルデヒド分解酵素抽出健康食品の開発

○村上 恵, 高橋 誠, 具志堅 健作, 稲福 桂一郎, 宮城 健, 佐渡山 恵一

(株)沖縄発酵化学

1. はじめに

飲酒により体内に取り込まれたアルコールの多くは、体内で代謝され、アセトアルデヒドを経て酢酸となり、最終的には水と二酸化炭素に分解される。アルコールの代謝は、肝臓が担っており、肝細胞の細胞質におけるアルコール分解酵素(ADH)によって、アルコールは酸化されてアルデヒドとなる。また、生成したアルデヒドは、肝細胞のミトコンドリアにおけるアルデヒド分解酵素(ALDH)によって酸化されて、酢酸となる。そして、酢酸はアセチルCoA(コエンザイム A)に変換されてクエン酸回路に取り込まれ、エネルギーを産生しながら二酸化炭素と水に分解される。この過程において生成するアルデヒドは、速やかに酸化されるため、血中や肝臓における濃度は同時に存在するアルコールに比較して低いものであるが、その毒性は強く、アルコール中毒や二日酔いなどの原因となる物質である。特に日本人には上述の ALDH が遺伝的に少ない者や欠損している者が多く、アルデヒドを効率的に分解できないことから、適切なアルコール量が比較的少量であると言われており、わずかな飲酒量で適量を超えてしまう者が多いという問題がある。

本稿では、まず、種々の沖縄県産のウリ科植物のスクリーニングにより選定を行い、その中で最も酵素活性の高いウリ科植物を用いて、酵素含有エキスの抽出工程の確立を行った。また、マウス(ICR)を用いて酵素含有エキスを投与して30分後に20%アルコールを投与し、投与後30分、60分、90分の血液を採取し、血中のアルコール及びアルデヒド、酢酸濃度測定を行った。

また、本事業は、沖縄県地場産業振興事業費補助によって行っている。

2. 実験方法

2-1. ウリ科植物のスクリーニング

沖縄県産ウリ科植物の ADH 並びに ALDH の酵素活性を確認するため、以下の方法でスクリーニングを行った。

沖縄産の各種ウリ科植物(ヘチマ、ニガウリ、トウガン、白ウリ)を予め冷却し、冷水(10℃以下)を加えてホームミキサー(1min.)で粉碎した後、高速冷却遠心分離機を用いて遠心分離を行い、上澄み液の減圧ろ過を行い、得られたエキスを凍結乾燥したものを粗酵素サンプルとして用いた。

また、スクリーニング評価方法として以下の方法で行った。体内のアルコール代謝より、一般に ADH 活性及び ALDH 活性が高いほど、アルコールは効率的に分解される為、ADH 活性及び ALDH 活性にもとづいて、アルコール分解効果を評価した。

活性測定法は、Lumeng らの方法により行った。フローを図1に示す。

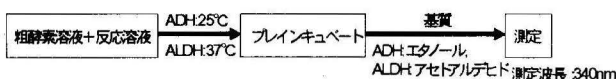


図1. 酵素活性測定方法

2-2. マウスを用いたアルコール投与後の血中濃度測定

*in vitro*においてアルコール及びアセトアルデヒド分解酵素活性が確認された為、実際 *in vivo*におけるアルコール及びアルデヒド分解能を以下の方法で確認した。

4週齢 ICR マウスを1週間の観察期間の後、供試物質(ヘチマエキス、コントロール(水))をマウス用経口ゾンデにより経口投与を行った。その後30分して20%エタノールを供試物質と同じように経口投与を行い、30、60、90分後の血液採取を行い、エタノール、アセトアルデヒド、酢酸の各種血中濃度を F-キット(株)J.K. インターナショナル)を用いて測定した。また、構成群及び投与量を表1に示す。

表1. マウスへの血中アルコール濃度測定における構成群名及び投与量

No.	群名	サンプル投与量	エタノール投与量	動物数
1	コントロール群 (水投与)	1.0g/kg	2.0g/kg	5
2	ヘチマエキス投与群	1.0g/kg	2.0g/kg	5

2-3. 酵素含有エキスの抽出工程の確立

ウリ科植物由来酵素含有エキスを製品として生産する際に除菌及び濃縮の問題があり、これらを改善する為、膜による検討を行った。

①: 除菌工程の検討

得られたエキスは、大腸菌及び一般生菌が多く確認されており、一般的には、熱をかければ殺菌することが可能であるが、今回使用しているエキスに含まれる酵素は、熱により失活する事が確認されている。そこで、フィルターにおける除菌を検討した。

②: 濃縮工程の検討

得られたエキスは、固形量が少なく、エキスをそのまま凍結乾燥すると、時間とコスト面でロスが大きくなるが、エキスを濃縮することで凍結乾燥時の効率を上げる事が可能である。エキスを濃縮する方法として、逆浸透(RO)膜を用いたエキスの濃縮法を検討した。

3. 実験結果

3-1. ウリ科植物のスクリーニング

各種ウリ科植物の、粗酵素抽出物をサンプルに用い、これらの ADH 及び ALDH 活性値の比較によりスクリーニングした。その結果を表2に示す。

結果から、酵素活性の高い植物1つを選択する為にニガウリとヘチマに注目した。ADH 活性はニガウリのほうが高いが、身体にとって有害なのは、アルデヒドであるため今回、ALDH 活性の値が高かったヘチマを選択すること

とした。

表2. ウリ科植物のスクリーニング

	収率(%) (生100g 当り)	ADH活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク質量)	ALDH活性 ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク質量)
ニガウリ	2.01	3.563	1.024
ヘチマ	2.22	3.148	1.325
冬瓜	2.00	0.8421	0.4493
白ウリ	1.06	1.003	0.5642

3-2. マウスを用いたアルコール投与後の血中濃度測定

マウスへヘチマエキス投与30分後に20%エタノールを投与し、30、60、90分後のアルコール、アセトアルデヒド、酢酸の血中濃度測定を行った。それらの結果を図2に示した。

結果から、血中のエタノール濃度に関しては、アルコール投与後の血中エタノール濃度のピークは、測定した3ポイントではエタノール投与30分であることが確認された。また、コントロールと比較してエタノール投与30分後で有意な差を示した($P < 0.05$)。そして、60分、90分後は、有意差は見られなかったが、減少の傾向が見られた。さらに、血中アセトアルデヒド濃度に関しては、ピークはエタノール投与60分であることが確認された。また、エタノール投与30、60、90分ともに、コントロールと比較して減少の傾向が見られた。

3-3. 酵素含有エキスの抽出工程の確立

3-3-1. 除菌の検討

得られたヘチマエキスは、一般生菌数及び大腸菌群が目標値(一般生菌数: 1.0×10^4 個/g以下、大腸菌群:陰性)より多いため菌数を減少もしくは陰性にしなければならぬ。そこで、一般的に菌を通さないセラミック膜フィルター(以下セラ膜フィルター)($0.2 \mu\text{m}$)を用いて検討した。その結果を表3に示す。

結果から、セラ膜フィルター($0.2 \mu\text{m}$)を用いることにより、目標値(一般生菌数: 1.0×10^4 個/g、大腸菌群:陰性)内まで除菌することが確認できた。しかし、酵素活性が減少していた。その原因として、エキス中の酵素成分と他の成分混合しフィルターに目詰まりを起こしたため、減少したと考えられる。

その為、目詰まりしない方法を検討する予定である。

3-3-2. エキス濃縮の検討

エキスを濃縮する方法として、逆浸透(RO)膜を用いてエキスの濃縮を検討した。その結果を表4に示す。

結果から、RO膜を用いることで固形量を約2倍まで濃縮することが確認された。また、濃縮液の酵素活性の低下も見られず、透過液側に酵素は確認されなかった。

これらの結果より、今後RO膜を用いて何倍まで濃縮できるのか検討する予定である。また、あまり濃縮しすぎると、Flux(流速/時間)が悪くなるのでこの関係も検討したい。

4. まとめ及び考察

今回われわれは、ウリ科植物にアルコール及びアルデヒド分解酵素が含まれていることを確認した。その中で、

最もよいと認められたウリ科植物(ヘチマ)を用いて、粗酵素含有エキスの抽出工程の確立を試みた。その結果、確立された工程は、図3の通りである。

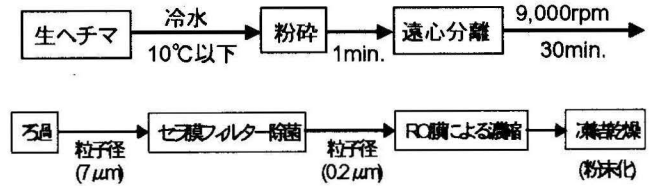
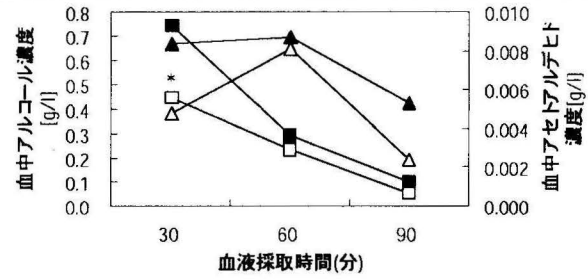


図3. 粗酵素含有エキス抽出工程

また、これらの工程で得られたヘチマエキスを用いてマウスに対するアルコール投与後の血中濃度測定より、血中エタノール濃度は水と比較して20%エタノール投与30分後で有意な差が見られた($P < 0.05$)。また、60、90分後でも減少の傾向が見られた。また、体内で有害とされる血中アセトアルデヒドについても減少の傾向が見られた。

以上の結果から、このヘチマエキスはアルコール対応肝機能保護を目的とした新しい素材になると考えられる。



■ コントロール(水):エタノール □ ヘチマエキス:エタノール
▲ コントロール(水):アルデヒド △ ヘチマエキス:アルデヒド

($P^* < 0.05$)

図2 20%エタノール投与後の経時的アルコール及びアセトアルデヒド濃度変化

表3 除菌の検討

	収率(%) (生ヘチマ 当り)	一般生菌 数 (個/g)	大腸 菌数	ADH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク質量)	ALDH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ タンパク質量)
遠心分離後	2.27	1.5×10^6	陽性	3.223	1.441
ろ過(7 μm)後	2.15	1.0×10^6	陽性	3.152	1.422
セラ膜フィルター (0.2 μm) 透過後	2.02	4.2×10^2	陰性	2.663	1.134

表4 濃縮の検討

	固形分(%)	一般生菌数	大腸菌数	ADH	ALDH
遠心分離後	2.21	1.5×10^6	陽性	3.331	1.442
ろ過(7 μm)後	2.11	1.2×10^6	陽性	3.224	1.287
セラ膜フィル ター(0.2 μm) 透過液	2.02	4.5×10^2	陰性	2.784	0.997
セラ膜後 RO透過液	1.47	50	陰性	0.003	0.005
セラ膜後 RO濃縮液	4.56	5.0×10^2	陰性	3.245	1.336