

カンキツ果実の鮮度に関する生化学的研究

(第3報) 果実の脱水素酵素活性測定条件の検討

白石 真 一

(福岡県園芸試験場)

SHIRAISHI, S.

Biochemical Studies on the Qualities of Citrus Fruit

(3) Quantitative Investigation of the Dehydrogenases

果実の品質および鮮度保持を目的とする研究を行うにあたり、果実の代謝生理を究明する必要がある。果実の代謝生理には多くの酵素が関与しているが、特に果実の品質を研究の目的とするにあたり、糖と有機酸の代謝生理の研究が重要である。この部門の代謝は主として解糖系と呼吸系にまとめられている。今回はこの二つの系に関与している脱水素酵素について、活性の測定条件を検討した。

試 験 方 法

温州ミカン(林系)の完熟果実を供試して、第1図の工程にもとずいて粗酵素液を調製した。

超遠心分画の上澄液を脱水素酵素活性測定用の粗酵素液とした。脱水素酵素の活性測定は M. A. Stahmann らの方法によって基質、補酵素、緩衝液を調整して、

それぞれの脱水素酵素について反応液組成を検討した。装置はバックマン光電分光光度計を用いて、340nmの波長で吸光度の増減によって測定した。基質、補酵素などの調整濃度は第1表のとおり。

結 果

1. イソクエン酸脱水素酵素 (IDH)

イソクエン酸ナトリウム (1.8倍稀釈) 0.3 ml

NADP 0.3 ml

MgCl₂ 0.4 ml

粗酵素液 0.1~1.0 ml

0.15M トリス緩衝液 (pH7.5) 1.9~1.0 ml

検討の結果酵素液量は果皮の場合0.5ml, 果肉は1.0ml, 反応時間は3分間まで直線性を保つことが認められた。

2. グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6 PDH)

ダルコース-6-リン酸ナトリウム 0.3 ml

NADP 0.3 ml

MgCl₂ 0.4 ml

粗酵素液 0.1~1.0 ml

0.15M トリス緩衝液 (pH7.5) 1.9~1.0 ml

グルコース-6-リン酸脱水素酵素活性は、酵素量で果皮抽出液が0.5ml, 果肉抽出液が1.0ml, 反応時間は3分間まで直線性を示した。

3. グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素 (6 PGDH)

グルコン酸-6-リン酸ナトリウム 0.3 ml

NADP 0.3 ml

MgCl₂ 0.4 ml

0.15M トリス緩衝液 1.95~1.00ml

グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素活性は、酵素量で果皮抽出液が0.5ml, 果肉が1.0ml, 反応時間は3分間まで直線性を示した。

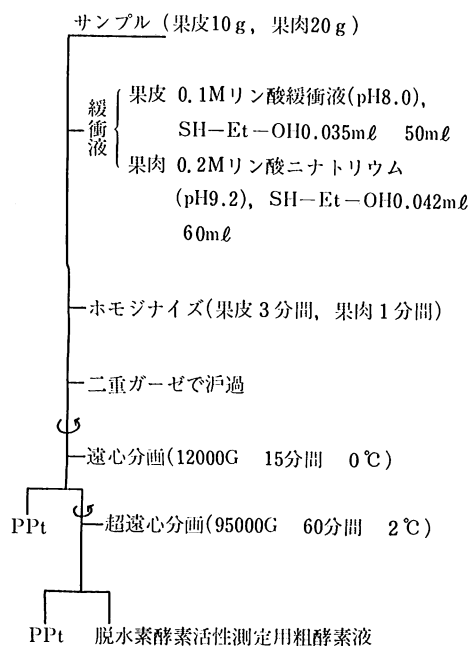
4. リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)

オキザル酢酸ナトリウム 0.3 ml

NADH 0.1 ml

MgCl₂ 0.4 ml

粗酵素液 0.05~0.2 ml



第1図 温州ミカン果実の粗酵素液の調整方法

0.15M トリス緩衝液 1.95~1.80ml
 リンゴ酸脱水素酵素活性は強く、酵素量は果皮抽出液が0.05ml、果肉抽出液が0.1mlを適量であると思え、反応時間は早く平衡に達するので30秒から1分間の活性測定が適当であった。

5. リンゴ酸酵素 (Malic Enzyme)

リンゴ酸ナトリウム 0.1~0.3 ml
 NAD 0.3 ml
 MgCl₂ 0.4 ml
 粗酵素液 0.5 ~1.0 ml
 0.15M トリス緩衝液 1.7~1.0 ml

リンゴ酸酵素活性において、基質濃度が高すぎると反応曲線が直線とならない。基質の適量は0.1mlであった。酵素量は果皮抽出液が0.5ml、果肉抽出液が1.0mlが適量

第1表 基質調整濃度

Substrate	At pH 7.5
Sodium glucose-6-phosphate	25.2mg/5ml
Sodium 6-phosphogluconate	28.4mg/5ml
Sodium oxalacetate	55 mg/5ml
Sodium isocitrate	86 mg/5ml
Sodium glutamate	49 mg/5ml
Pyruvic acid	82.5mg/5ml
Ethanol	2500μmol/1.5ml
Sodium malate	62 mg/5ml

第2表 補酵素調整濃度

Coenzyme	
Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	5.51mg/5ml
Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)	5.52mg/5ml
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)	6.35mg/5ml
Magnesium chloride (MgCl ₂)	508mg/100ml

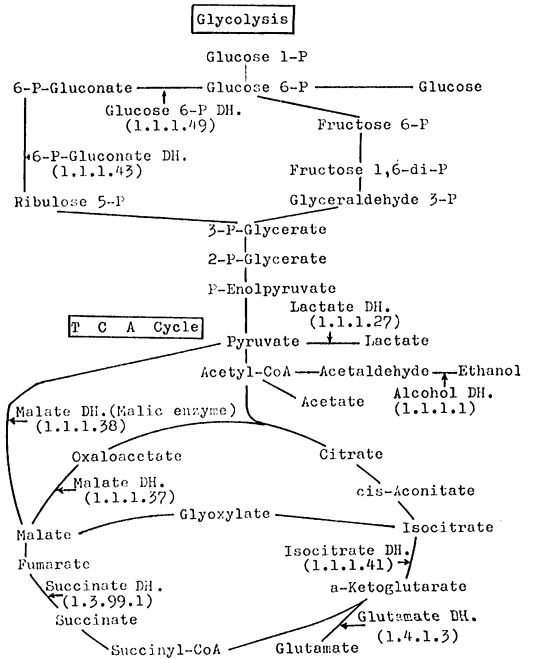
であった。反応時間は早く平衡に達するので30秒から1分間の活性測定が良好であった。

6. 乳酸脱水素酵素 (LDH)

ピルビン酸ナトリウム 0.3 ml
 NADH 0.3 ml
 MgCl₂ 0.4 ml
 粗酵素液 0.2 ml
 0.15M トリス緩衝液 1.8 ml

乳酸脱水素酵素は活性反応は非常に弱く、酵素量は0.2ml、反応時間は5~10分間を要した。

7. アルコール脱水素酵素 (ADH) グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) 両酵素とも活性弱く、酵素量0.2ml、反応時間5~10分間を要した。



第2図 解糖系とTCA系における脱水素酵素