麦芽根シュウ酸オキシダーゼを用いたショウガ 搾汁液中のシュウ酸分解

山下純隆*・久保田朗*・深堀奈保子*

Decomposition of Oxalic Acid in Ginger Juice by Adding the Roots of Barley Seedlings Containing Oxalate Oxidase

Sumitaka YAMASHITA*, Akira KUBOTA* and Naoko FUKAHORI*

* Fukuoka Agricultural Research Center, 587, Yoshiki, Chikushino-shi, Fukuoka 818-8549

The decomposition of oxalic acid was performed in 0.1 M succinate buffer (pH 3.5) and in the diluted ginger juice (adjusted to pH 3.5 by the addition of citric acid) by adding the roots of barley seedlings containing oxalate oxidase, using stirred tank and packed-bed reactors. When oxalic acid was oxidized by oxalate oxidase of the barley seedlings roots under 1-atm oxygen pressure in the stirred tank reactor, the decomposition rate of oxalic acid during the initial 15-min reaction reached to 452 mg/h·g-dry roots in the buffer solution containing oxalic acid of 378 mg/l and to 104 mg/h·g-dry roots in the ginger juice (diluted by ten times with deionized water) containing oxalic acid of 90 mg/l. Repeated batch decomposition of oxalic acid resulted in a rapid decline of the initial decomposition rate with increasing time of repetition, and the decomposition rate fell to a half of the initial rate after repetition of more than 3 times. When the decomposition of oxalic acid was carried out in the packed-bed reactor and by continuous addition of the reacting solution with oxygen from the upper side of the reactor, the decomposition remained at the rate of 77 and 28 mg/h·g-dry roots at SV of 41.7 h⁻¹ for the buffer solution and the diluted ginger juice, respectively.

(Received Sep. 21, 1998 ; Accepted, Jan. 25, 1999)

健康志向の高まりに伴い、野菜等の農産物搾汁液を原料にした様々な飲料が製造されている。しかし、これら原料農産物の中にはカルシウムの体内吸収を阻害し、腎臓結石との関連が示唆されている¹⁾²⁾ シュウ酸を多く含むものがある。シュウ酸は、食品衛生法で食品製造用剤として添加が許可されているものの、最終的に食品から除去することが定められており、味覚上も好ましくない³⁾。

農産物搾汁液中のシュウ酸を除去するには、カルシウム塩を添加してシュウ酸カルシウムとして析出させる方法や、イオン交換樹脂を用いる方法が考えられるが、前者の方法では析出・分離に長時間を要したり、除去するための十分量を添加することが法律上不可能であったり、添加物から遊離した酸により風味が損なわれたりす

る。また、後者では、シュウ酸以外の陰イオンをも除去してしまうという欠点がある。

これに対し、シュウ酸だけを分解するような酵素を用いれば、原料素材の風味を損なうことなく、短時間で特異的にシュウ酸を除去することが可能になると考えられる。そこで、シュウ酸分解酵素として麦芽根シュウ酸オキシダーゼを用いて、攪拌槽型及び充填層型のリアクターを利用し、緩衝液やショウガ搾汁液中のシュウ酸の分解除去を行ったので、その結果を報告する。

実験方法

1. 供試原料

シュウ酸分解試験に供したシュウ酸溶液は和光純薬工業(株)製シュウ酸を 378 mg/l 濃度 (10×Km⁴⁾) 含む 0.1

* 福岡県農業総合試験場 (〒818-8549 福岡県筑紫野市吉木 587)

M コハク酸緩衝液 (pH 3.5)⁵⁾である。また、農産物には、ガン予防効果が高い⁶⁾とされる野菜の中から、シュウ酸含量が多いショウガを選定した。ショウガをミキサーで粉碎した後、搾汁し、セライト 545 でろ過清澄化して試料液とした。リアクターによるシュウ酸分解の試験には、これを脱イオン水で 10 倍に希釈し、クエン酸で pH 3.5 に調製したもの (シュウ酸濃度 90 mg/l) を用いた。

2. 供試酵素

シュウ酸を分解するための酵素素材として、大麦、ソルガム、細菌及びコケ等に見いだされているシュウ酸オキシダーゼ (E.C.1.2.3.4., 以下、OXO)^{4)7)~9)}に着目し、その中からビール醸造時の麦芽採取後に大量に産生し、かつ食品への利用に際し、安全性が高い大麦の麦芽根を選定した。

OXO を含む麦芽根は、SUGIURA ら⁵⁾の方法を参考に調製した。すなわち、大麦 ‘ミハルゴールド’ の種子を 20℃ で 10 日間発根させ、根部を切りとり、80℃ で 3 分間加熱処理した。これに、アセトンを加え、脱水後、乾燥させた。細胞壁に強く結合した OXO¹⁰⁾の抽出は、収率が低いに行わず、乾燥させた麦芽根を固定化酵素とみなして、そのまま、あるいは細断しただけで供試した。乾燥麦芽根の OXO 活性は、-20℃ で 1 カ月以上安定であった。

3. 酵素単位及び酵素活性

OXO の反応は次のとおりである。

加熱処理し、乾燥させた麦芽根には過酸化水素を基質とするパーオキシダーゼ (E.C.1.11.1.7) の活性も認められたので、酵素単位は過酸化水素の生成量ではなく、シュウ酸の分解量をもとに換算した。すなわち、シュウ酸を含む緩衝液に麦芽根を添加し、溶存酸素の供給が十分となるような酸素加圧 1 atm、攪拌速度 400 rpm、液中への酸素通気量 1 VVM という条件下¹¹⁾、37℃、pH 3.5 で 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ の速度でシュウ酸を分解する酵素量を 1 U とした。この条件下で、乾燥麦芽根の OXO 活性は 87 U/g であった。

4. 麦芽根 OXO に及ぼす温度と pH の影響

100 ml 容の三角フラスコに、細断した 0.01g の乾燥麦芽根とシュウ酸を含む 0.1 M コハク酸緩衝液 10 ml を入れ、酸素ポンベによる酸素 1 atm 加圧下、往復振とうにより反応させ、シュウ酸の減少量を測定した。麦芽根

OXO の反応至適温度と熱安定性を調べるため、前者は pH 3.5 で 10 分間反応させ、後者はそれぞれの温度に pH 3.5 で 2 時間放置した後、37℃ で 10 分間反応させた。また、至適 pH と pH 安定性を求めるため、前者は 37℃ で 10 分間反応させ、後者はそれぞれの pH に 37℃ で 3 時間放置後、pH 3.5 で 10 分間反応させた。

5. 酵素活性に及ぼすショウガ試料液の添加割合の影響

0.1 M コハク酸緩衝液とショウガ試料液との混合液に、シュウ酸を 900 mg/l 濃度になるように添加し、コハク酸と NaOH で pH 3.5 に調製した試験液 10 ml 及び細断した 0.01 g の乾燥麦芽根を 100 ml 容の三角フラスコに入れ、酸素ポンベによる酸素 1 atm 加圧下、往復振とうさせてシュウ酸の減少量を測定した。

6. 攪拌槽型リアクターによるシュウ酸の分解

反応槽に 1800 ml 容攪拌槽型リアクター (サクラ精機製 TBR-2, 190 mmL $\times$ 110 mmID) を用いて、1000 ml 規模でシュウ酸の分解反応を行った。酸素ポンベによりリアクターのヘッドスペースを酸素で置換した後、酸素 1 atm 加圧下、温度 40℃、攪拌速度 400 rpm で反応させた。また、2 時間反応後に、ただちに新鮮な緩衝液と交換して反応させる反復回分反応も行った。

7. 充填層型リアクターによるシュウ酸の分解

反応槽に 23 ml 容ガラスカラム (130 mmL $\times$ 15 mmID) を用いて、乾燥麦芽根 2 g (174 U) を充填し、酸素ポンベによりカラムの空隙を酸素で置換した後、カラム上部から原料液を滴下する下向流方式により、温度 40℃ で反応させた。反応に必要な溶存酸素の供給は、カラム上部から酸素を 20 ml/min で通気する方法¹²⁾で行った。空間速度 (SV) は、カラムの総容積 (V) と通液量 (f) から算出し、 $SV=f/V$ (h^{-1}) とした。シュウ酸分解速度 (v) は、減少したシュウ酸濃度 (C)、通液量 (f) 及び麦芽根量 (e) から算出し、 $v=C\times f/e$ (mg/h $\cdot$ g-麦芽根) とした。

8. 分析方法

シュウ酸は、サンプルを 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過した水溶性のものについて、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した¹³⁾。

高速液体クロマトグラフ：島津製作所 (株) 製 LC-6A, カラム：島津製作所 (株) 製 SCR-101H (30 cmL $\times$ 7.9 mmID), カラム温度：40℃, 移動相：過塩素酸で調整した水 (pH 2.1), 流速：0.8 ml/min, 検出波長：210 nm, 注入量：5 μL 。

酵素反応の確認は、生成する過酸化水素の呈色による

SUGIURA ら⁵⁾の方法により行った。

実験結果及び考察

1. 温度及び pH に対する活性と安定性

精製 OXO を用いた SUGIURA ら⁵⁾は、反応至適温度は 35℃ で、70℃ 以下では極めて安定であると報告している。乾燥麦芽根そのままを用いた本試験では Fig. 1 に示すように、反応至適温度は 55℃ 付近にあり、これ以上の温度では急速に活性が低下するが、90℃ までは活性が認められた。また、60℃ までは 2 時間安定であったが、それ以上の温度では活性の低下が認められ、80℃ に 2 時間保つと活性が無くなった。

精製 OXO の反応至適 pH は 3.2⁵⁾、粗酵素では pH 3.5⁴⁾ と報告されているのとはほぼ同様に、本試験においても Fig. 2 に示すように、pH 3.5 付近が最も活性が高く、pH が高くなるに伴って急激に活性が低下するが、pH 6.0 までは活性が認められた。また、pH 3.5 付近が最も安定であり、pH 4~7 まではその 75% 程度の活性が維持された。

これらのことから、本酵素をシュウ酸を含有する農産物搾汁液に使用し効率的なシュウ酸分解を図る場合、反応温度では 50~60℃ が採用できるために微生物対策上

Fig. 1 Effects of temperature on oxalate oxidase activity of barley seedling roots

Relative activity was measured at pH 3.5 for 10 min incubation.

Stability was measured after heating for 2 hr at pH 3.5 at various temperatures. Reaction was performed in 0.1 M succinate buffer.

●, relative activity ; ○, residual activity

Fig. 2 Effects of pH on oxalate oxidase activity of barley seedling roots

Relative activity was measured at 37℃ for 10 min incubation.

Stability was measured after incubation at 37℃ for 3 hr at various pH. Reaction was performed in 0.1 M succinate buffer.

●, relative activity ; ○, residual activity

は有利であるが、pH では、特に野菜搾汁液の場合、pH が 5~6 の範囲にあるものが多いため、酸添加等による pH 調整が必要になる。

2. ショウガ試料液の添加割合と酵素活性

ショウガ試料液(搾汁原液)では、乾燥麦芽根だけでなく、精製 OXO (ペーリンガー・マンハイム(株)製、大麦起源)を用いても、酵素反応によるシュウ酸の減少がほとんど認められないことから、緩衝液に対する試料液の添加割合と酵素活性の変化を検討した。結果を Fig. 3 に示す。試料液の添加割合が増加するほど、酵素活性は低下し、試料液 100% ではわずか 4% の活性しか発揮されないことが判明した。試料液に対して、加熱処理、プロテアーゼ処理、EDTA 添加、PVP 添加、陽イオン交換樹脂などによる処理を行っても、活性の増加は認められなかった。しかし、透析または陰イオン交換樹脂による処理を行うと、緩衝液を用いた時に近い活性が発揮された。これらのことから、活性低下の原因はマイナスに荷電した低分子物質の影響によるものと推察された。SUGIURA ら⁵⁾は、 10^{-3} M 濃度の NaCl、 Na_2SO_4 及び NaNO_3 が精製 OXO の活性をそれぞれ 43、75 及び 16%

Fig. 3 Effects of ginger juice added on oxalate oxidase activity of barley seedling roots

Ginger juice containing oxalic acid of 900 mg/l was added to 0.1 M succinate buffer (pH 3.5). The mixture was adjusted to 900 mg/l of oxalic acid and concentration by adding oxalic acid and to pH 3.5 by adding succinic acid and NaOH.

まで低下させると報告している。試料液の Cl^- , SO_4^{2-} 及び NO_3^- の濃度をイオンクロマトグラフにより測定した結果、それぞれ 3.6, 5.3 及び $6.4 \times 10^{-3} \text{M}$ の値であり、ショウガ試料液における OXO の活性低下には、これらの陰イオンが複合的に関与していると考えられた。

3. 攪拌槽型リアクターを用いた緩衝液中のシュウ酸分解

378 mg/l 濃度 ($10 \times K_m$) のシュウ酸を含む 0.1 M コハク酸緩衝液 (pH 3.5) 1000 ml を出発原料として、乾燥麦芽根 1 g を用いて攪拌槽型リアクターを用いたシュウ酸分解に及ぼす酸素加圧の影響を検討した。また、同時に酸素 1 atm 加圧下で滞留時間 2 時間の回分反応を繰り返して行った。結果を Fig. 4 に示す。空気常圧下及び酸素加圧下のいずれも乾燥麦芽根 1 g (87 U) を使用しているにもかかわらず、空気常圧下では酸素加圧下に比べて分解速度が低いことから、溶存酸素の供給が律速になっていると思われる。酸素加圧下におけるシュウ酸分解の初速度は、452 mg/h, g-乾燥根にも達した。また、回分反応を繰り返す度に急速に分解速度が低下し、3 回目の反応では初回反応開始時の半分以下の分解速度になったが、3 回目終了した反応 6 時間における総

Fig. 4 Repeated batch decomposition of oxalic acid in the buffer solution under 1-atm oxygen pressure in the stirred tank reactor

One g of the dried barley seedling roots was added to 1000 ml of 0.1 M succinate buffer (pH 3.5) containing 378 mg/l ($10 \times K_m$) of oxalic acid. The numbers of I~IV indicate the time of repetition of batch decomposition.

○, 0-atm air; ●, 1-atm O₂.

シュウ酸分解量は 974 mg/g-乾燥根に達した。それぞれの反応終了後の緩衝液中には酵素活性が認められないことから、これらの分解速度の低下は、酵素の漏出によるものではなく、失活によるものと思われる。

4. 攪拌槽型リアクターによるショウガ搾汁液中のシュウ酸分解

クエン酸で pH 3.5 に調整した 10 倍脱イオン水希釈のショウガ搾汁液 (シュウ酸濃度 90 mg/l) 1000 ml に乾燥麦芽根 1 g (87 U) または 3 g (261 U) を添加し、ショウガ搾汁液中におけるシュウ酸濃度の変化を空気常圧下または酸素加圧下で追跡した。Fig. 5 に示すように、時間の経過とともにシュウ酸濃度が減少しているが、緩衝液の時ほどは速やかでない。また、酸素加圧下では空気常圧下下比べて分解速度が向上しているが、その初速度は 104 mg/h, g-乾燥根に留まっている。さらに、3 g の乾燥麦芽根を使用した場合、使用量に比例したシュウ酸の減少は見られないが、反応開始 2 時間後にシュウ酸はほとんど消失している。より大量の麦芽根を使用し、それに応じた溶存酸素の供給を行えば、さらに短時間でシュウ酸分解が可能であることを示している。

Fig. 5 Effects of oxygen pressure and the amount of the barley seedlings roots on the decomposition of oxalic acid in the diluted ginger juice in the stirred tank reactor

One thousand ml of the ginger juice was prepared by ten times dilution with deionized water and adjusted to pH 3.5 by addition of citric acid.

○, 0-atm air-1g of the dried barley seedling roots; ●, 1-atm O_2 -1g of the dried barley seedling roots; △, 1-atm O_2 -3g of the dried barley seedling roots.

このようにして得られたシュウ酸を含有しない搾汁液には、酵素反応により生じた過酸化水素の存在が呈色反応により確認された。この搾汁液にカタラーゼ (E.C. 1.11.1.6) 処理と加熱処理を行い、呈色反応が認められなくなるまで過酸化水素を分解除去したものは、ショウガ特有の風味を保持し、その味覚はシュウ酸に由来していると思われる苦みが消失していた。

5. 充填層型リアクターを用いたシュウ酸分解

2g (174 U) の乾燥麦芽根を充填したガラスカラムの上部から酸素を通気しながら、シュウ酸を含む緩衝液または10倍脱イオン水希釈ショウガ搾汁液を種々の流速で滴下した時の流出液のシュウ酸濃度の変化をFig. 6に示す。攪拌槽型と同様、緩衝液に比べてショウガ搾汁液ではシュウ酸の分解速度が約23~37%まで低下した。空間速度 $SV = 41.7 \text{ h}^{-1}$ (960 ml/h) で通液した時の、シュウ酸分解速度は、緩衝液では $77 \text{ mg/h} \cdot \text{g}$ -乾燥根に、ショウガ搾汁液では $28 \text{ mg/h} \cdot \text{g}$ -乾燥根に留まった。また、同じ緩衝液を一定の空間速度 $SV = 21.5 \text{ h}^{-1}$

Fig. 6 Effects of the flow rate (SV) on the decomposition of oxalic acid in the buffer solution and in the diluted ginger juice in the packed-bed reactor

The column (130 mmL×15 mmID) packed with 2g of the dried barley seedling roots was prepared. $SV \text{ (h}^{-1}\text{)}$ was calculated by dividing the flow rate (l/h) by the total volume (0.023 l) of the column. The decomposition rate of oxalic acid was obtained by multiplying the amount of oxalic acid decomposed (mg/l) by the flow rate (l/h) and dividing it by the amount of barley seedling roots added (g). The solid lines are the decomposition in the buffer solution. The broken lines are the decomposition in the diluted ginger juice.

○, oxalic acid concentration in the leachate;
●, decomposition rate of oxalic acid.

(495 ml/h) で連続的に通液したときの流出液のシュウ酸濃度と分解速度をFig. 7に示す。連続的に通液すると攪拌槽型の場合と同様に分解速度の低下が起こり、徐々にシュウ酸濃度の高い流出液になった。通液開始5時間後には初発速度の半分以下に分解活性が低下し、通液6時間後における総シュウ酸分解量は 233 mg/g -乾燥根に留まった。

一般的に、充填層型リアクターの単位体積当たりの固定化酵素の負荷量を大きくできるので、反応効率では最も優れている¹⁴⁾。しかし、単位乾燥麦芽根当たりのシュウ酸分解量で比較すると、Fig. 4とFig. 7より反応

Fig. 7 Continuous decomposition of oxalic acid in the buffer solution in the packed-bed reactor

The buffer solution containing oxalic acid was added to the reactor at SV of 21.5 h^{-1} .

○, concentration of oxalic acid in the leachate; ●, decomposition rate of oxalic acid.

開始6時間後の総シュウ酸分解量において、攪拌槽型リアクターの方が充填層型よりも4倍以上優れていた。

要 約

攪拌槽型や充填層型リアクターを利用して、シュウ酸オキシダーゼにより、緩衝液やショウガ搾汁液中のシュウ酸の除去を試みた。

攪拌槽型リアクターにより酸素加圧1 atm 下でシュウ酸オキシダーゼを含む乾燥麦芽根を反応させると、反応開始15分間のシュウ酸分解速度は緩衝液では $452 \text{ mg/h} \cdot \text{g}$ -乾燥根に、ショウガ搾汁液では $104 \text{ mg/h} \cdot \text{g}$ -乾燥根に達した。また、反復回分反応を行うと、反復回

数が増える度にシュウ酸分解速度は急速に低下し、3回目の反応では初回反応開始時の半分以下の分解速度になった。充填層型リアクターにより酸素通気を行いながら、空間速度 $\text{SV} = 41.7 \text{ h}^{-1}$ で通液した時の、シュウ酸分解速度は緩衝液では $77 \text{ mg/h} \cdot \text{g}$ -乾燥根に、ショウガ搾汁液では $28 \text{ mg/h} \cdot \text{g}$ -乾燥根に留まった。

本研究の終始に亘り助言を賜りました九州大学農学部食糧化学工学科松本 清教授に感謝申し上げます。

文 献

- 1) ピーター・クーバー：薬物中毒必携，(医歯薬出版，東京)，p. 508 (1989)。
- 2) 医学大辞典，(南山堂，東京)，p. 922 (1978)。
- 3) 香川 彰：農業および園芸，68，906 (1993)。
- 4) CHIRIBOGA, J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 116, 516 (1966)。
- 5) SUGIURA, M., YAMAURA, H., HIRANO, K., SASAKI, M., MORIKAWA, M. and TUBOI, M.: *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 2003 (1979)。
- 6) CARAGARY, A. B.: *Food Technol.*, 46, 65 (1992)。
- 7) PUNDER, C.S. and KUCHHAL, N.K.: *Phytochemistry*, 28, 2909 (1989)。
- 8) KOYAMA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 743 (1988)。
- 9) SUZUKI, Y. and MEEUSE, J.D.: *Plant Cell Physiol.*, 6, 25 (1965)。
- 10) BERNA, A. and BERNIER, F.: *Plant Mol. Biol.*, 33, 417 (1997)。
- 11) 山下純隆・深堀奈保子・馬場紀子・古田正範：食科工，24，164 (1997)。
- 12) 山下純隆・太田修明・末永 光：日食工誌，38，608 (1991)。
- 13) 島津製作所第一科学計測事業部：島津高速液体クロマトグラフ応用データ集，改訂版，p. 9。
- 14) 千畑一郎・土佐哲也・松野隆一・佐藤忠司・森孝夫：固定化生体触媒，千畑一郎編，(講談社，東京)，p. 338 (1991)。

(平成10年9月21日受付，平成11年1月25日受理)