

びわ果実ポリフェノールオキシダーゼの性質

牧 善 輔・田 代 操

Characteristics of Polyphenol Oxidase in Loquat

ZENSUKE MAKI and MISAO TASHIRO

A polyphenol oxidase was extracted from acetone powder of loquat with 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 6.5 and partially purified by 30~90% ammonium sulfate fractionation.

Isoelectric focusing and Sephadex G-100 gel filtration of the preparation indicated that the enzyme had an isoelectric point of 3.5 and a molecular weight of 42,000. The enzyme showed wide substrate specificity toward *o*-dihydroxyphenols. Optimum pHs were 6.8 when pyrocatechol and D-catechin were used as substrate and 5.9 in case of 4-methylcatechol as substrate. The enzyme was stable at 60°C for 30 min but it lost more than 95% of the activity after 30 min at 80°C. The enzyme maintained almost its whole activity for 24 hr at 25°C in the pH range from 4 to 6.

(Received August 12, 1985)

I 緒 言

褐変とは食品が加工または貯蔵中に褐色化する現象であり、これには酵素作用によるものと、酵素作用によらない化学反応によるものとに大別される¹⁾。酵素作用によらない褐変反応は、アミノ-カルボニル反応と呼ばれるカルボニル基とアミノ基が共存する場合に起こる反応が代表的である。一方、酵素作用によって起こる褐変現象は、ポリフェノール類がポリフェノールオキシダーゼによって酸化されて褐変しやすいキノン類を生ずるものが大部分である。

褐変はその生成を利用する食品を除いて、通常は好ましいものではない。特に果実類の加工、貯蔵中に生じる酵素的褐変はその品質を決定する重要な要素である。元来、植物組織中ではフェノール系基質はポリフェノールオキシダーゼと別れて存在しており²⁾、したがって酵素的褐変は機械的衝撃や乱雑な取り扱いの結果として当然生じるものである。しかしながら、その程度は組織中に存在するフェノール系基質の種類、量、さらにポリフェノールオキシダーゼの性質、酵素

量に関係すると考えられる。酵素的褐変を極力防止するためには、これらの関係を明らかにする必要がある、その観点から数多くの研究がなされている^{3)~7)}。

本報告では、びわ果実よりポリフェノールオキシダーゼを部分精製し、その物理化学的、酵素化学的性質を検討した結果について述べる。

II 実験材料及び方法

1) 供 試 料

市販のびわ果実の種子を取り除き、庖丁で1 cm角に切った後、1.5倍量(v/w)のアセトンを加えホモジナイズし吸引濾過した。この操作を濾液に着色がなくなるまで4~5回繰り返す。残渣を風乾し、びわ果実アセトンパウダーを得た。

2) 酵素の部分精製

びわ果実アセトンパウダー 30 g に 1.2 l の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を加え、室温で24時間攪拌し、酵素を抽出した。抽出液を遠心分離 (10,000 × g, 15 分間) で集め、それに30%飽和になるまで硫酸アンモ

ニウムを加え、遠心分離して沈澱を除去した。上清に再び硫酸アンモニウムを加え90%飽和とし、遠心分離して沈澱を得た。この沈澱を少量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、蒸留水に対して数日間透析を行い、それから遠心分離して上清を集めた。この上清を凍結乾燥し、得られた粉末をびわ果実ポリフェノールオキシダーゼ試料とした。

3) 酵素活性測定法

通常のポリフェノールオキシダーゼ活性測定には、基質としてピロカテコールあるいは 4-メチルカテコールを用いた。反応混合液は、40 mM 基質溶液 1 ml, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 2 ml, 酵素溶液 1 ml から成り、25°C の条件下、410 nm での吸光度の増加を日立124型ダブルビーム自記分光光度計で追跡した。

酵素活性の 1 単位は、上記反応系において、410 nm での吸光度を 1 分間に 0.1 上昇させる酵素量と定義した。

4) 蛋白質の定量

牛の血清アルブミンを標準蛋白質として、Lowry の方法⁸⁾で行なった。

5) 焦点電気泳動

カラムは 120 ml 容積、pH 3.5~10の carrier ampholyte (LKB社製)を用い、凍結乾燥した酵素試料 20 mg を 4°C で72時間 1 Wの定電力で電気泳動した。泳動終了後、カラム内容液を 2 ml ずつ分画し、280 nm での吸光度、pH、4-メチルカテコールを基質として酵素活性を測定した。

6) ゲル濾過

びわ果実ポリフェノールオキシダーゼの分子量を Sephadex G-100 を用いるゲル濾過法⁹⁾にて推定した。

部分精製酵素 20 mg を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 3 ml に溶解し、遠心分離後、上清を Sephadex G-100 のカラム (20×62 cm) に添加した。溶出液には上述のリン酸緩衝液を用い、流速は 8 ml/hr, 1.5 ml ずつ分画し、280 nm での吸光度と4-メチルカテコールを基質としてポリフェノールオキシダーゼ活性を測定した。分子量推定のための標準蛋白質としては、牛血清アルブミン (分子量67,000)、卵白アルブミン (分子量 45,000)、馬心臓チトクローム c (分子量 12,300) を用い、上述の条件でゲル濾過を行なった。

7) 基質特異性

8種類の基質 (ピロカテコール, 4-メチルカテコール, ドーパミン, D-カテキン, カフェ酸, D, L-ドーパ, L-チロシン, クロロゲン酸) を使用して基質特異性を調べた。基質濃度はそれぞれ最終 10, 10,

10, 5, 10, 5, 2.5, 5 mM とし、先述の方法で酵素活性を測定した。なお、各基質は市販品をそのまま使用した。

8) 至適 pH

緩衝系として McIlvaine 氏緩衝液を使用し、pH 5.0~7.4 の範囲で酵素活性を測定した。基質には、ピロカテコール, 4-メチルカテコール, D-カテキンの3種類を用いた。

9) 熱安定性

0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に酵素を溶解し、0.1 mg/ml 溶液とし、それを 60°C 及び 80°C で 0~30 分間熱処理した。各処理後、酵素液を直ちに氷冷し、1 ml の酵素液を用いて 25°C で活性を測定した。基質として、ピロカテコール, 4-メチルカテコールを使用した。

10) pH 安定性

緩衝液として pH 2~5 は 0.1M 酢酸ナトリウム-塩酸系を、pH 6~8 は 0.1M リン酸緩衝液を、pH 9~11 は 0.1M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム系を使用した。まず酵素を水に溶解し、10 mg/ml の溶液とし、各 pH の緩衝液 0.9 ml にこの酵素液 0.1 ml を分注し、25°C で24時間放置した。放置後、各 pH の酵素液 0.1 ml を分取し 2.9 ml の 0.2M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を加え、基質溶液 1 ml で酵素反応を開始した。基質として、ピロカテコール, 4-メチルカテコールの両者を用いた。

III 実験結果及び考察

1) びわ果実ポリフェノールオキシダーゼの活性

30 g のアセトンパウダーより得られた抽出液の比活性は 28.6 単位/mg 蛋白質 (基質としてピロカテコール使用)、一方、抽出液を30~90%硫酸分画して得た部分精製品の比活性は124単位/mg 蛋白質であった。

2) 等電点

焦点電気泳動の結果を Fig. 1 に示す。酵素活性は pH 3.5 付近の位置に認められ、これより本酵素の等電点は 3.5 と決定された。しかしながら、本実験の場合は酵素活性は単に4-メチルカテコールを基質として測定した結果である。高等植物中のポリフェノールオキシダーゼは荷電的にも分子量的にも異なる数種のアイソザイムより成っていることが知られている。したがって、びわの場合も等電点を異にする他のアイソザイムの存在を否定することはできないと考えられる。なお等電点に関しては他にバナナのポリフェノールオキシダーゼの値が5.2であると報告されている¹⁰⁾。本

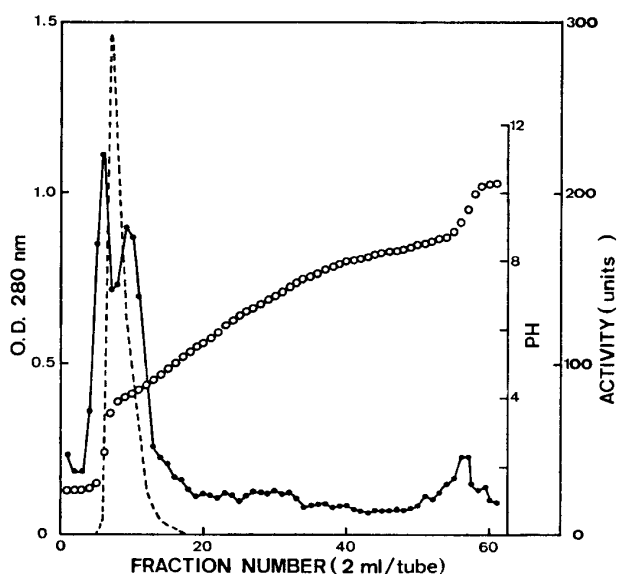


Fig. 1. Isoelectric focusing of partially purified polyphenol oxidase from loquat.
 ●—●, absorbance at 280 nm;
 , polyphenol oxidase activity;
 ○, pH.

酵素の値はこれと比較するとかなり酸性側に位置していると言えよう。

3) 分子量

Fig. 2 は凍結乾燥した部分精製びわ果実ポリフェノールオキシダーゼの Sephadex G-100ゲル濾過パターンを示している。ゲル濾過の場合も酵素活性はほぼ単一ピークとして溶出しているが、びわポリフェノールオキシダーゼが単一成分から成っているとは断定できない。しかしながら、少なくとも4-メチルカテコールに活性な酵素は分子量的にはそれほどばらついてはいないと考えられる。

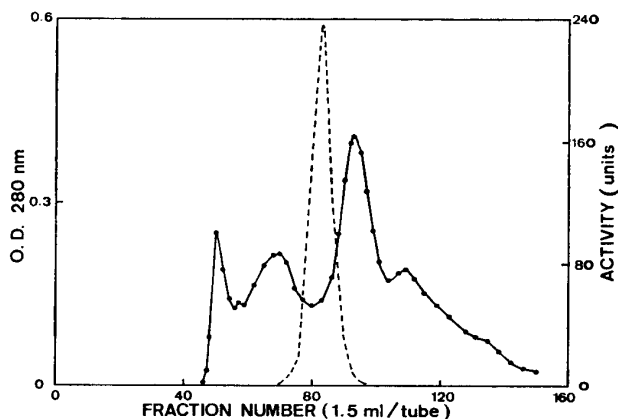


Fig. 2. Gel filtration of partially purified loquat polyphenol oxidase on Sephadex G-100.
 ●—●, absorbance at 280 nm;
 , polyphenol oxidase activity;

Sephadex G-100 でのゲル濾過における標準蛋白質の溶出位置と分子量の片対数プロットから得られた標準曲線よりびわ果実ポリフェノールオキシダーゼの分子量を推定した結果が Fig. 3 に示されている。これより本酵素の分子量は42,000と推定された。他の植物起源のポリフェノールオキシダーゼでは、バナナの酵素の分子量は、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で31,000、超遠心分析で62,000という値¹⁰⁾が、またアボガドの酵素は Sepadex G-100 のゲル濾過から分子量35,000⁸⁾であるとの報告がある。

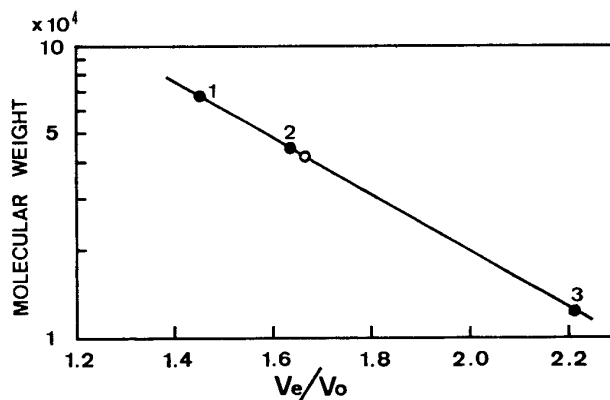


Fig. 3. Molecular weight estimation of loquat polyphenol oxidase by gel filtration on Sephadex G-100.
 1, bovine serum albumin; 2, ovalbumin;
 3, horse cytochrome c;
 ○, loquat polyphenol oxidase.

4) 基質特異性

びわ果実ポリフェノールオキシダーゼの8種の基質に対する活性を示したのが Table 1 である。酸化生成物の分子吸光係数の違いから、得られた結果を直接には解釈することはできないが、一般的特性としては本酵素は *o*-ジヒドロキシフェノールにより特異的

Table 1. Substrate specificity of loquat polyphenol oxidase.

	Concentration (mM)	Specific activity (units*/mg protein)
Pyrocatechol	10	122
4-Methylcatechol	10	126
Dopamine	10	88.8
D-Catechin	5	90.0
Caffeic acid	10	11.3
D, L-DOPA	5	6.50
L-Tyrosine	2.5	2.40
Chlorogenic acid	5	63.7

* One unit = ΔA of 0.1/min at 410 nm.

あると考えられる。しかしながら先述したように、一般に高等植物由来のポリフェノールオキシダーゼは多形を示し、数多くのアイソザイムから成っていることが報告されている。基質特異性も各アイソザイムによって異なると考えられるため、本酵素で得られた結果も構成アイソザイムの基質特異性のオーバーラップしたものとするのが妥当と思われる。

5) 至適 pH

ピロカテコール、4-メチルカテコール、及び D-カテキンの3種の基質を用いた時の本酵素の至適 pH は、Fig. 4 に示されるように、基質がピロカテコール、及び D-カテキンの場合は6.8、一方基質が4-メチルカテコールの時は5.9であった。一般に高等植物由来のポリフェノールオキシダーゼの至適 pH は5.0か

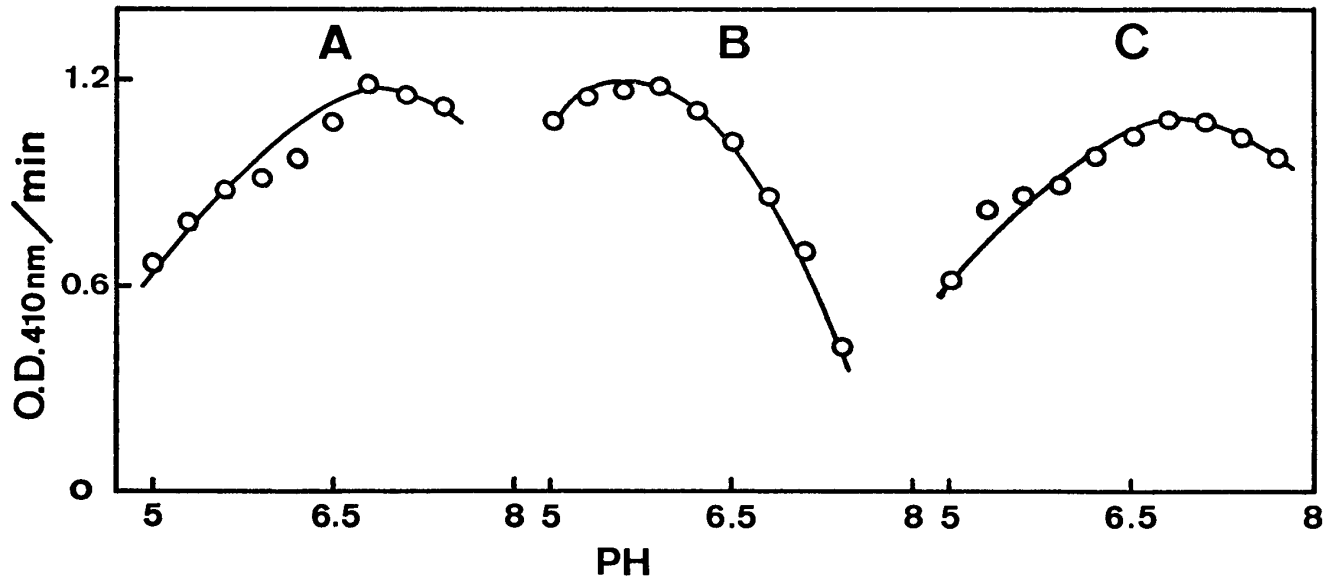


Fig. 4. Optimum pH of loquat polyphenol oxidase.

A, pyrocatechol as substrate; B, 4-methylcatechol as substrate; C, D-catechin as substrate.

ら7.0の範囲であり、本酵素の場合も同様であった。

6) 熱安定性

食品の褐変を押えるために、ブランチング処理がよく用いられる。これはポリフェノールオキシダーゼを失活させることが一つの目的である。Fig. 5 に示され

るように、本酵素は 60°C では30分間の熱処理でもほとんど失活せず、80°C、30分間の熱処理でようやく95%以上の活性が失なわれただけであった。

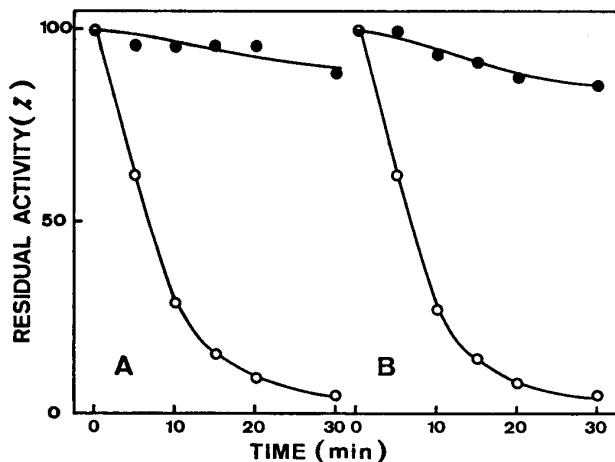


Fig. 5. Heat stability of loquat polyphenol oxidase.

A, pyrocatechol as substrate;
B, 4-methylcatechol as substrate;
●—●, 60°C; ○—○, 80°C.

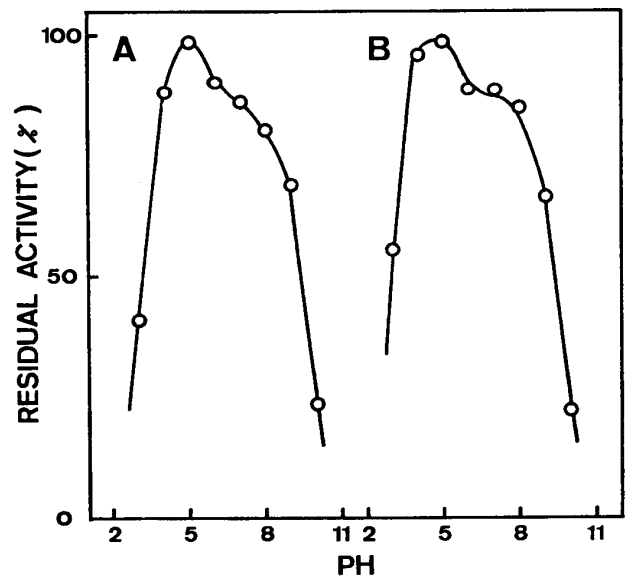


Fig. 6. pH stability of loquat polyphenol oxidase.

A, pyrocatechol as substrate;
B, 4-methylcatechol as substrate.

7) pH 安定性

pH 2~11 で 25°C 24時間放置した後のびわ果実ポリフェノールオキシダーゼの活性を Fig. 6 に示す。

pH 安定性は基質にピロカテコール, 4-メチルカテコールのどちらを用いてもほとんど同じであった。本酵素は pH 4~6 の弱酸性域で最も安定であり, その活性をほとんど保持していた。一方, 強酸性及び強塩基性 pH 下では著しい失活が生じ, 特に pH 2 以下及び pH 11 以上では完全に活性を失なった。

IV 要 約

びわ果実アセトンパウダーよりポリフェノールオキシダーゼを抽出し, 30~90%硫酸分画にて酵素を部分精製した。本酵素の等電点は, 焦点電気泳動より pH 3.5, また分子量は Sephadex G-100 のゲル透過より 42,000 と推定した。本酵素は *o*-ジヒドロキシフェノールに対して広い基質特異性を示し, その至適 pH は 6.8 (ピロカテコール, D-カテキン) と 5.9 (4-メチルカテコール) であった。熱に対しては, 本酵素は 60°C, 30分間処理ではほとんど失活せず, 80°C, 30分間処理でほぼ失活した。また, pH 4~6 の弱酸性域で

最も安定であった。

(1985年8月12日受理)

引用文献

- 1) 中林敏郎・木村 進・加藤博通: 食品の変色とその化学(1967) 光琳書院。
- 2) J. D. Ponting: The control of enzymatic browning of fruits in "Food Enzymes" (ed. by H. W. Schultz) (1960) Avi Publishing Co., Westport, Conn.
- 3) B. S. Luh and B. Phithakpol: *J. Food Sci.*, **37**, 264 (1972).
- 4) A. T. Paulson, J. Vanderstoep and S. W. Porritt: *J. Food Sci.* **45**, 341 (1980).
- 5) D. H. Halim and M. W. Montgomery: *J. Food Sci.*, **43**, 603 (1978).
- 6) V. Kahn: *Phytochem.*, **15**, 267 (1976).
- 7) W. H. Flurkey and J. J. Jen: *J. Food Biochem.*, **4**, 29 (1980).
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 9) P. Andrews: *Biochem. J.*, **91**, 222 (1964).
- 10) M. A. M. Galeazzi, V. C. Sgarbieri, and S. M. Constantinides: *J. Food Sci.*, **46**, 150 (1981).