

## 学 位 論 文 要 旨

|     |  |
|-----|--|
| 氏 名 | 韓 雲 哲  |
| 題 目 | キク科植物のポリフェノール酸化酵素 (PPO) に関する研究<br>(Studies on Polyphenol Oxidase (PPO) of Composite Plant) |

ゴボウ等のキク科植物は日本で古来より消費されている野菜の一つであり、調理加工中に“アク”と呼ばれているポリフェノール酸化酵素 (EC 1.10.3.1, *o*-diphenol: oxygen oxidoreductase, PPO) に起因すると考えられる好ましくない褐変が生じる。そのため、キク科植物の PPO やポリフェノール (PP) 等に関しては古くから研究されているが、多くは粗酵素レベルで行われており、各品種中の PPO 活性等についての報告は極めて少ない。さらに、キク科植物の PPO は不安定であることから、酵素の精製や精製酵素の性質等についての報告もほとんど無い。そこで本研究では、キク科植物における PP 及び PPO 等の分布、酵素の精製及び精製酵素の性質等について追究した。本研究結果の概要は以下の通りである。

① 供試したキク科植物のうちゴボウ及びヨモギでは 230 mg% FW のクロロゲン酸 (Chl) が主要な PP として検出され、いずれの場合も全 PP 含量の 50% 以上を占めた。これに対し、リーフレタス、フキ、シュンギクでは Chl 含量は 50 mg% FW 以下であり、特にヘッドレタスでは 0.4 mg% FW にすぎなかった。また、Chl 生成の鍵酵素である L-フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性は供試したすべてのキク科植物で検出されたが、チロシンアンモニアリアーゼ活性は、ヨモギなど一部の植物にしか認められなかった。酵素的褐変に関与する PPO 及びペルオキシダーゼ活性はそれらの強さには差があるものの、すべてのキク科植物に存在することが明らかとなった。

② ゴボウ、リーフレタス及びフキの PPO を種々のクロマトグラフィーにより、電気泳動的に均一に精製した。それぞれの酵素の分子量は 40,000、46,000 及び 25,000 と推定された。三酵素とも Chl 及びエピカテキン (Epi) を強く酸化し、両基質に対する  $K_m$  値はリーフレタス 1.0 mM, 1.4 mM、ゴボウ 0.4 mM, 2.7 mM、フキ 0.14 mM, 0.7 mM であった。三酵素とも Chl 酸化活性の最適 pH は 5 付近に、Epi 酸化活性のそれは 8 付近に認められ、pH 5-7 の範囲で安定であった。ゴボウ酵素の最適温度は 20 °C であったが、他の酵素のそれは 30 °C であった。本酵素活性は L-アスコルビン酸、L-システイン、DIECA、KCN 等により強く阻害された。

③ キク科植物の酵素的褐変を防止するために、数種の野菜抽出液の影響を調べた。供試したすべての抽出液はフキ PPO による褐変を阻害したが、ゴボウ PPO に対しては逆に促進するものもあった。また、ゴボウ茎抽出液はフキ PPO を拮抗的に、パセリ抽出液はゴボウ PPO を非拮抗的に阻害した。阻害物質の本体を明らかにすることにより、これら野菜抽出液が新規褐変阻害剤として利用可能なことが示唆された。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

Han YunZhe

題 目

Studies on polyphenol oxidase (PPO) of composite plant  
(キク科植物のポリフェノール酸化酵素 (PPO) に関する研究)

Such composite plants as edible burdock and leaf lettuce are most popular vegetables in Japan. Un-desirable browning, which is mainly due to oxidation of polyphenols by polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1, *o*-diphenol: oxygen oxidoreductase, PPO), occurs in damaged tissue during processing of these vegetables. To prevent such browning, some investigations have been done to characterize polyphenols and crude PPO of these vegetables. The spectral profiles of the composite vegetable extracts during browning reactions suggested that the oxidation of chlorogenic acid and its analogues mainly causes the enzymatic browning of them. However, little is known about chlorogenic acid oxidizing PPO (ChO) in these vegetables. In this study, ChOs of such composite vegetables as edible burdock, leaf lettuce, and Japanese butterbur were purified, and the properties of the purified ChO were investigated.

The chlorogenic acid contents of burdock and mugwort were 230 mg FW or above and comprised 50% of total polyphenols. However, chlorogenic acid contents of leaf lettuce, butterbur and chrysanthemum were 50 mg FW or below. The chlorogenic acid content of head lettuce was only 0.4 mg FW. L-phenylalanine ammonia lyase, which is one of the key enzyme of chlorogenic acid synthesis, detected in all composite plants used. However tyrosine ammonia lyase was not detected in leaf lettuce.

The edible burdock PPO was purified ~16.6-fold with a recovery rate of 21% by acetone fractionation, and various chromatography. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 40,000 by SDS-PAGE. The purified enzyme quickly oxidized chlorogenic acid and (-)-epicatechin. The *K<sub>m</sub>* value (Michaelis constant) of the enzyme was 0.4 mM for chlorogenic acid (pH 5.0, 20°C) and 2.7 mM for (-)-epicatechin (pH 8.0, 20°C). The optimum pH of the enzyme was found at 5.0 for ChO and 8.0 for (-)-epicatechin oxidase (EpO) activities, respectively. In the pH ranges from 5 to 8, both ChO and EpO activities were quite stable at 4°C for 22 h. The optimum temperatures of ChO and EpO activities were 20°C. The both activities were strongly inhibited by L-ascorbic acid and L-cysteine at 5 mM. The leaf lettuce and Japanese butterbur PPOs were also purified by various chromatography. The molecular weight of two enzymes were estimated to be about 46,000 and 25,000, respectively by SDS-PAGE. The purified enzymes also quickly oxidized chlorogenic acid and (-)-epicatechin. The *K<sub>m</sub>* value of the leaf lettuce and Japanese butterbur PPOs was 1.0 mM and 0.14 for chlorogenic acid (pH 5.0, 30°C) and 1.4 mM and 0.7 mM for (-)-epicatechin (pH 8.0, 30°C), respectively. The optimum temperatures of ChO and EpO activities of both enzymes were 30°C. Another enzymatic properties of these two enzymes were similar to those of edible burdock PPO. Alcohol extract of such vegetables as celery, parsley, carrot and burdock stem inhibited enzymatic browning by edible burdock and Japanese butterbur PPO.

It seems that this study will help to understand the mechanism of enzymatic browning and its prevention.

## 学位論文審査結果の要旨

|   |  |
|---|--|
| 学位申請者<br>氏 名  | 韓 雲哲   |
| 審査委員  | 主査 佐賀 大学 教授                      藤 田 修 二   |
|   | 副査 佐賀 大学 教授                      林        信 行  |
|   | 副査 宮崎 大学 教授                      辰 巳 保 夫   |
|   | 副査 琉球 大学 教授                      秋 永 孝 義   |
|   | 副査 琉球 大学 教授                      和 田 浩 二   |
| 審査協力者   |  |
| 題 目   | キク科植物のポリフェノール酸化酵素 (PPO) に関する研究<br>(Studies on Polyphenol Oxidase (PPO) of Composite Plant) |
| <p>ゴボウ、フキ等のキク科植物は日本で古来より消費されている野菜の一つであり、調理加工中に“アク”と呼ばれているポリフェノール酸化酵素 (EC 1.10.3.1、<i>o</i>-diphenol: oxygen oxidoreductase, PPO) に起因すると考えられる好ましくない褐変が生じるため、キク科植物の PPO やポリフェノール (PP) 等に関しては、粗酵素レベルでの研究が古くから行われているが、それらの性質等については不明な点が多い。また、キク科植物の PPO は不安定であることから、酵素の精製や精製酵素の性質等についての報告もほとんど無い現状にある。本研究は、キク科植物における酵素的褐変の防止を目的として、PP 及び PPO 等の分布、酵素の精製及び精製酵素の性質等について追究したものである。</p> <p>① キク科植物の酵素的褐変に関与する PP 含量及び酵素活性等について、粗酵素レベルで検討した。供試したキク科植物のうちゴボウ及びヨモギでは 230 mg% FW のクロロゲン酸 (Ch1) が主要な PP として検出され、いずれの場合も全 PP 含量の 50% 以上を占めることを認めた。これに対し、リーフレタス、フキ、シュンギクでは Ch1 含量は 50 mg% FW 以下であり、特にヘッドレタスでは 0.4 mg% FW にすぎないこと</p> |  |

を明らかにした。また、植物における Chl 生成の鍵酵素である L-フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性は供試したすべてのキク科植物で検出されたが、チロシンアンモニアリアーゼ活性はヨモギなど一部の植物にしか認められないこと、さらに、酵素的褐変に関与する PPO 及びペルオキシダーゼ活性はそれらの強さには差があるものの、すべてのキク科植物に存在することを明らかにした。

② ゴボウ、リーフレタス及びフキの PPO を種々のクロマトグラフィーにより、電気泳動的に均一に精製し、それぞれの酵素の一般的性質等について追究した。すなわち、ゴボウ、リーフレタス及びフキの酵素の分子量はそれぞれ 40,000、46,000 及び 25,000 と推定された。いずれの野菜の PPO とも Chl 及びエピカテキン (Epi) を強く酸化し、両基質に対する  $K_m$  値はリーフレタス 1.0 mM, 1.4 mM、ゴボウ 0.4 mM, 2.7 mM、フキ 0.14 mM, 0.7 mM であること、三酵素とも Chl 酸化活性の最適 pH は 5 付近に、Epi 酸化活性のそれは 8 付近に認められ、pH 5-7 の範囲で安定であること、ゴボウ酵素の最適温度は 20 °C であったが、他の酵素のそれは 30°C であること、本酵素活性は L-アスコルビン酸、L-システイン、DIECA、KCN 等により強く阻害されることを明らかにした。

③ キク科植物の酵素的褐変を防止するために、数種の野菜抽出液の影響を調べた。供試したすべての抽出液はフキ PPO による褐変を阻害したが、ゴボウ PPO に対しては逆に促進するものもあること、また、ゴボウ茎抽出液はフキ PPO を拮抗的に、パセリ抽出液はゴボウ PPO を非拮抗的に阻害することを明らかにした。今後は、阻害物質の本体を明らかにすることにより、これら野菜抽出液が青果物の新規褐変阻害剤として利用可能なことが示唆された。

以上のように、本研究においてはキク科植物の酵素的褐変に関連する基質ポリフェノールや酵素活性の分布等を明らかにするとともに、不安定であることからこれまで精製の行われていなかったゴボウ、リーフレタス及びフキのポリフェノール酸化酵素を電気泳動的に均一に精製し、それらの一般的性質等について明らかにしている。本研究の結果は青果物の酵素的褐変に関する重要な基礎的知見を提供するとともに、これら研究の成果がキク科野菜流通時の酵素的褐変の抑制に使用されることにより、経済効果も高いと考えられることから、審査員一同、本論文が博士（農学）の学位論文として十分価値があるものと判定した。

| 学力確認結果の要旨   |                     |
|---|---------------------|
| 学位申請者<br>氏名   | 韓 雲哲                |
| 審査委員  | 主査 佐賀 大学 教授 藤 田 修 二 |
|   | 副査 佐賀 大学 教授 林 信 行   |
|   | 副査 宮崎 大学 教授 辰 巳 保 夫 |
|   | 副査 琉球 大学 教授 秋 永 孝 義 |
|   | 副査 琉球 大学 教授 和 田 浩 二 |
| 審査協力者   |                     |
| 実施年月日   | 平成20年 1月 17日        |
| 試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答   |                     |
| <p>主査及び副査は、平成20年1月17日の公開審査会において、学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について口答により試験を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることが出来た。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者としての学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p> |                     |

|  |      |
|--|------|
| 学位申請者<br>氏名  | 韓 雲哲 |
| <p>(質問1) キク科植物のポリフェノール酸化酵素 (PP0) の分子量がフキ (約 25000) とゴボウ及びリーフレタス (約 40000) で異なっているが、これは起源植物の進化の度合いに起因するのか。</p> <p>(回答1) 確かにフキ PP0 約 25000 とゴボウ及びリーフレタス PP0 のそれら約 40000 とは異なっている。しかし、これら PP0 はそれぞれ SDS 電気泳動的に均一であり、いずれもモノマータンパク質であると考えられる。したがって、より進化の程度が低いフキでは PP0 が活性化する時に自己のプロテアーゼによって活性中心と関係のないタンパク質部分が分解され、分子量が低くなったのではないかと考えられる。</p> <p>(質問2) フキ PP0 はほかのキク科植物と比べて幅広い基質特異性を有するが、これも進化の程度の差によるのか。</p> <p>(回答2) そうではないかと考える。</p> <p>(質問3) フキ PP0 はゴボウ及びレタスの PP0 と異なり、NaCl の阻害を受けていない。この理由をどう考えるか。</p> <p>(回答3) 先ほど述べたようにフキと他の二つの PP0 はそれぞれ分子量により二つのグループに大別できる。進化の度合いが低く分子量の小さいフキ PP0 は NaCl や NaF のようなハロゲン化合物により阻害を受けるが、本実験の PP0 及びシュンギクなどほかのキク科植物 PP0 はこれらの阻害を受けないようである。従って、ハロゲン化合物の影響によって大きく二つのグループに分けられることも考えられる。</p> <p>(質問4) 酵素活性と基質含量のどちらがより酵素的褐変に強く関与すると考えられるか。</p> <p>(回答4) レタスの場合は基質含量が低く、PAL 等により基質であるクロロゲン酸が生成した後に褐変が起こる、いわゆる遅延型の褐変であるといわれている。従って、どちらかといえば基質含量の方が強く影響するのではないかと考える。</p> <p>(質問5) 本研究では基質含量を新鮮重あたりで調べている。乾物重あたりに換算するとほとんど基質含量に差がないのではないか。したがって、むしろ酵素の方の影響の方が強いのでは。</p> <p>(回答5) これまでの酵素的褐変についての文献の多くでは基質含量の方がより強く関与すると報告されている。従って、強いていえばやはり基質含量の方が酵素的褐変に強く関与すると考える。</p> <p>(質問6) フキやタンポポはより野生種に近いと考えられる。従って、ツワブキとも比較する必要があるのでないか。</p> <p>(回答6) その通りであると考えられるが、多量のツワブキを試料として得ることは困難である。</p> <p>(質問7) 野菜抽出液の酵素的褐変の阻害効果について検討しているが、その本体は何であると</p> |      |

考えているか。

(回答7) 今回は検討できなかったのですが、本体については不明である。これまで本研究室の検討結果ではポリフェノール化合物が基質アナログとして阻害することも報告されており、今後検討していきたい。また、阻害様式の反応速度論的研究からパセリ抽出液が今後阻害剤として有望であると考えられる。

(質問8) パセリの場合はビタミンC含量が極めて高いのでその効果もあるのでは。

(回答8) もちろんそれも考えられるので、今後詳細に検討する必要がある。

(質問9) エピカテキン酸化活性の最適 pH は 8 であるが、この pH は自然の状態ではあり得ない。この酵素が実際的に酵素的褐変に関与すると考えるか。

(回答9) 組織が破壊されると pH は 4 付近になると考えられる。従って、クロロゲン酸酸化酵素活性の最適 pH や差スペクトルによる検討から明らかのようにクロロゲン酸酸化系がむしろキク科植物の酵素的褐変の主反応であると考えられる。