

# キク科植物のポリフェノール酸化酵素(PPO)に関する研究

韓 雲哲

2008

# キク科植物のポリフェノール酸化酵素(PPO)に関する研究

Studies on polyphenol oxidase (PPO) of composite plant

鹿児島大学連合農学研究科

生物資源利用科学専攻

韓 雲哲

2008

# 目 次

第 1 章 緒論.....	1
第 2 章 キク科植物の褐変発生に關与するポリフェノール成分と酵素活性の分布	
2-1. 緒言.....	10
2-2. 材料及び方法.....	11
2-3. 結果及び考察.....	14
2-4. 小括.....	21
第 3 章 ゴボウのポリフェノール酸化酵素の精製とその性質	
3-1. 緒言.....	22
3-2. 材料及び方法.....	23
3-3. 結果及び考察.....	28
3-4. 小括.....	50
第 4 章 リーフレタスのポリフェノール酸化酵素の精製とその性質	
4-1. 緒言.....	52
4-2. 材料及び方法.....	52
4-3. 結果及び考察.....	55
4-4. 小括.....	75

## 第5章 フキのポリフェノール酸化酵素の精製とその性質

5-1. 緒言.....	76
5-2. 材料及び方法.....	76
5-3. 結果及び考察.....	79
5-4. 小括.....	99

## 第6章 キク科植物のPPOに対する各種野菜のアルコール抽出液の阻害影響

6-1. 緒言.....	100
6-2. 材料及び方法.....	101
6-3. 結果及び考察.....	102
6-4. 小括.....	110

## 第7章 総括..... 111

参考文献.....	121
-----------	-----

謝辞.....	129
---------	-----

## 第1章 緒論

日常生活において、緑、黄、赤、紫等の鮮やかな色彩は目を楽しませると同時に我々の生活にゆとりと潤いを与えている。食生活においても色は香りや味と共に“食品のおいしさ”を表す因子として重要であり、特に野菜や果物等の食品の色や艶は料理の彩りを引き立て、食欲の増進に大きな役割を果たしている。さらに、青果物においては食品の色や艶はその食品の鮮度や栄養価等の品質変化の判断に役立っている。すなわち、野菜や果物が新鮮な場合にはその色素成分であるカロテノイドやフラボノイド等により赤、黄、紫等の鮮やかな色を呈し<sup>1), 2)</sup>、さらに表面の細胞組織が細胞液で満たされており、これにより張りがありつやつやしている。しかし、流通や貯蔵の過程で鮮度が低下した場合には色素等の変化による退色と細胞液の蒸散によるしおれ等が見られる<sup>1)~7)</sup>。したがって、これら色調の変化の度合いは鮮度低下の指標として、視覚的に直接判断できることから、特に野菜や果物の鮮度の判断基準として重要である。

野菜や果物は流通貯蔵過程において打撲や切断等の傷害を受け、傷害部は時間の経過とともに著しく褐変し、その変色度合が鮮度劣化の指標として視覚的に消費者の購買意欲を低下させるために、褐変防止対策が大きな課題となってきた<sup>7)~35)</sup>。

食品に見られる褐変には Fig. 1-1 に示したように非酵素的褐変と酵素的褐変の二つに大別できる<sup>2), 5), 35)</sup>。非酵素的褐変の代表的なものはアミノカルボニル反応で、この反応の発見者であるフランス人 Louis C. Maillard にちなみメイラール反応(メイラード反応)とも呼ばれている。非酵素的褐変は還元糖等のカルボニル基とアミノ酸やタンパク質側鎖のアミノ基が反応して起こる。ほとんどの食品がこれらの反応基質を含んでいるので、食品の加工貯蔵中にアミノカルボニル反応が起こりやすく、この反応により最終的にメラノシジンと呼ばれる高分子褐色色素や香

気成分が形成される。したがって、醤油や味噌の褐色、パンやクッキーの焼き色と香ばしい香り等はアミノ-カルボニル反応によってもたらされるものと考えられている<sup>2)</sup>。また、カラメル化も代表的な非酵素的褐変の一つである。これは糖単独の加熱反応により、カラメルと呼ばれる褐色色素が形成されるものであり、生じたカラメル色素は天然系の食品添加物として、コーラ等多くの食品に利用されている。長期貯蔵したイチゴジャムにおいても退色褐変が見られるが、これはアスコルビン酸の自動酸化に起因することが報告されている<sup>2)</sup>。さらに、中林<sup>2), 8)</sup>はコーヒー豆の焙煎に伴い、ポリフェノール的一种であるクロロゲン酸類とブドウ糖とが非酵素的に反応し、コーヒーの色が形成されることを報告している。

このように、非酵素的に生成された褐変物質はそれぞれの食品固有の色を示すものとして我々の食生活の中で受け入れられ、食品添加物等として積極的に利用されている。

一方、野菜や果物の障害部で見られるいわゆる酵素的褐変は一般的には果実や生野菜の色調の劣化とオフフレーバーを引き起こすことから、カット野菜等の食品加工や流通過程において望ましくない現象、つまり商品価値を下げるものとして認識されている<sup>9)~49)</sup>。酵素的褐変は植物性食品を切る、つぶすといった細胞を破壊する操作を施すと起こる。すなわち、液胞に存在しているクロロゲン酸類やカテキン類等のポリフェノール類が、組織が破壊されたことで葉緑体及びプラスチドに存在しているポリフェノール酸化酵素(Polyphenoloxidase, PPO)と接触可能になり、酵素的に酸化されキノン体が生じる<sup>5), 35)</sup>。このキノン体は化学反応性が高く、重合、縮合、アミノ酸やタンパク質との反応を経てメラニンやメラノイジン等の褐色色素を形成し、褐変すると考えられている(Fig. 1-1 酵素的褐変反応)<sup>2), 5), 34), 35)</sup>。自然界にはモノフェノール(クレゾール型)、*o*-ジフェノール(カテコール型)及び*p*-ジフェノール(ヒドロキノン型)を主構造とするポリフェノール類が存在し、

これらを酸化する酵素活性を Fig. 1-2 に示したようにそれぞれ、モノフェノールオキシダーゼ (EC1.10.3.1 : クレゾラーゼ) 活性、*o*-ジフェノール酸化酵素活性 (EC1.10.3.1、*o*-diphenol: oxygen oxidoreductase : *o*-ジフェノラーゼ : カテコラーゼ)、ラッカーゼ活性 (EC1.10.3.2 : ラッカーゼ) と呼ばれている<sup>2)</sup>。動物や昆虫では Fig. 1-2 に示すクレゾラーゼ活性と *o*-ジフェノラーゼ活性とを同一酵素が有するものと考えられ、この活性を特にチロシナーゼ活性と呼んでいる。したがって、広義ではこれらの活性を合わせ、ポリフェノール酸化酵素 (PPO) と呼んでいるが、自然界のポリフェノールの多くは *o*-ジフェノール型であり、ふつうは *o*-ジフェノラーゼを PPO とすることが多い。しかし、高等植物は、モノフェノールオキシダーゼ活性よりも、主に *o*-ジフェノール酸化酵素活性を示すことから、本論文では、この *o*-diphenol 活性を PPO 活性と称することとする。

前記のように、青果物の加工や流通の過程で見られる酵素的褐変はそれらの商品価値を著しく低下させることから、加工・流通業者の間でその防止が大きな課題となっている。したがって、この反応に関与する基質ポリフェノール化合物や PPO に関しては古くから数多くの研究が行われている<sup>9)~49)</sup>。これらの研究結果として、イチゴ<sup>15), 16)</sup>、リンゴ<sup>28)</sup>、バナナ<sup>30), 31)</sup>等の多くの青果物からクロロゲン酸類、カテキン類、ドーパミン等のポリフェノール化合物が反応基質として検出されている。また PPO に関しても多くの研究がなされ、PPO の性質等もかなり明らかにされてきているが、これらの研究は粗酵素或いは部分精製酵素のレベルで行なわれたものが多く、PPO の精製や精製酵素の性質等に関する研究は筆者が所属する研究室で行なわれたヘッドレタス<sup>27)</sup>、バナナ<sup>30), 31)</sup>、ニホンナシ<sup>39)</sup>、ナス<sup>40)</sup>、ウンシュウミカン<sup>42)~45)</sup>、キャベツ<sup>48), 49)</sup>等を除くと、ほとんど行なわれていない現状にある。

キク科に属するゴボウ、フキ、シュンギク等の栽培野菜及び食用野草であるのヨ

モギ、タンポポ、アザミ（根を俗にヤマゴボウと呼ぶ）等はアクが強く調理や加工の際に著しく変色する。しかし、キク科植物の酵素的褐変に関する研究報告は極めて少なく、反応に関与するポリフェノールや PPO に関してもほとんど研究されていない。わずかに、中林ら<sup>37)</sup>はキク科植物に存在する基質となるポリフェノールについて研究し、ゴボウ、フキ、タンポポからクロロゲン類を検出している。また、Panizzi ら<sup>50)</sup>はチョウセンアザミ (*Cynarascolum*) からクロロゲン酸の異性体であるシナリン (Cynarin, 1,4-dicaffeoyl quinic acid) を分離している。これらのことからキク科植物はポリフェノール成分として数種のクロロゲン酸同族体を含有し、これらが PPO によって酸化されることにより褐変が起こされると考えられるが、その詳細については不明な点が多い。一方、キク科植物の酵素的褐変に関与する PPO の報告は極めて少ない。わずかに、Bolin ら<sup>51)</sup>はレタスの貯蔵中の PPO 活性の変化について、中林<sup>37)</sup>がゴボウの PPO について報告しているものの、これらの研究はいずれも抽出液あるいは粗酵素レベルの研究であり、それぞれの野菜に含まれる PPO の精製と性質等については全く検討されていない現状にある。

そこで、キク科植物の酵素的褐変反応に関して反応に関与するポリフェノールについて明らかにするとともに PPO の精製と性質について追究し、その褐変の防止法を検討することを目的として本研究を行なった。

第 2 章ではキク科野菜にみられる酵素的褐変について抽出液及び粗酵素液を用いて、基質と酵素の両面から追究した。その結果、キク科野菜は含量の差はあるもののクロロゲン酸類を主たるポリフェノールとして含有していることが認められた。また、チロシンアンモニアリアーゼ (TAL) 活性はヨモギ等の野草で強く検出されたが、リーフレタスを除いて、栽培野菜からは検出されなかった。しかし、供試した野菜のすべてにシキミ酸経路の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性が検出されたことから、これらクロロゲン酸類はシキミ酸経



路により生成することが明らかとなった。さらに、キク科野菜 PPO は粗酵素レベルにおいてクロロゲン酸を強く酸化することを認めたことから、酵素的褐変反応におけるクロロゲン酸酸化系の関与を明らかにした。

第 3 章では、まず、ゴボウの酵素的褐変反応について、酵素反応前後の褐変液の吸収スペクトルの面から追究した。その結果、褐変反応前後の反応液の吸収スペクトルの変化からもクロロゲン酸のそれに類似することを認め、ゴボウの褐変はクロロゲン酸酸化系に起因することを明らかにした。このように、ゴボウの酵素的褐変反応にクロロゲン酸酸化系の関与が明らかになったことから、クロロゲン酸を基質として、PPO の精製を行い、精製酵素の性質について検討した。すなわち、ゴボウ抽出液よりアセトン分画、イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィー等により、電気泳動的に均一な分子量約 40,000 の PPO を得、基質特異性、pH 安定性、阻害物質の影響等、精製酵素の一般的性質を調べた。その結果、精製酵素はクロロゲン酸及びエピカテキンを強く酸化するが、両基質の酸化活性の最適 pH はそれぞれ pH 5.0 及び pH 8.0 であり、著しく相違すること等を明らかにした。

第 4 章では、リーフレタス PPO の精製とその一般的性質等について検討した。リーフレタス抽出液よりクロロゲン酸を基質として、硫酸分画、イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィー等により、電気泳動的に均一な分子量約 46,000 の PPO を得、基質特異性、最適 pH、安定性、阻害物質の影響等、精製酵素の一般的性質を検討した。その結果、精製酵素はクロロゲン酸及びエピカテキンを強く酸化するが、両基質の酸化活性の最適 pH はそれぞれ pH 5.0 及び pH 8.0 であり、ゴボウと同様に、著しく相違すること等を明らかにした。

第 5 章では、フキ PPO の精製とその一般的性質等について検討した。すなわち、フキ抽出液よりクロロゲン酸を基質として、アセトン分画、イオン交換及びゲル濾過クロマトグラフィー等により、電気泳動的に均一な分子量約 25,000 の PPO を

得た。本酵素の分子量はこれまで報告されている青果物の PPO や本研究のキク科植物の PPO の分子量と比べて著しく低いことを認めた。基質特異性、最適 pH、安定性、阻害物質の影響等、精製酵素の一般的性質を検討した結果、精製酵素はクロロゲン酸及びエピカテキンを強く酸化するが、両基質の酸化活性の最適 pH はそれぞれ pH 5.0 及び pH 8.0 であり、ゴボウやリーフレタスと同様に、著しく相違すること等を明らかにした。

以上 3~5 章の結果を要約するとキク科野菜の PPO はクロロゲン酸を最も強く酸化し、ついでエピカテキンを酸化したが、クロロゲン酸酸化活性とエピカテキン酸化活性の相対的な強さや酵素化学的な一般的性質は野菜の種類によって異なっていた。このように、キク科野菜の品種や系統により PPO の性質等にやや差はあるものの、キク科野菜の酵素的褐変はシキミ酸経路により生成したクロロゲン酸の酸化反応系により引き起こされることを明らかにした。さらに、これまで、酵素的褐変の防止には L-アスコルビン酸、L-システイン、塩化ナトリウム等が効果的であることが報告されているが、供試したキク科野菜の場合もこれら化合物により褐変が著しく抑制されることが明らかとなった。

第 6 章においては、さらにより安全性の高い褐変阻害剤の開発を目指して数種の野菜抽出液の褐変阻害効果について検討した結果、フキの褐変に対してはゴボウ茎のアルコール抽出液が、ゴボウの褐変に対してはパセリ葉のアルコール抽出液が効果的な阻害効果を示すことを明らかにした。今後はこれら阻害物質の本体を明らかにすること等により、より安全で効果の大きい酵素的褐変阻害剤の開発と実用化が望まれる。

以上のように、キク科野菜の代表的な品質劣化である酵素的褐変における基質ポリフェノールや PPO の役割及びその性質等について検討した本研究の結果は、今後、少子化や核家族化等社会生活の変化によってさらに需要の拡大が予想される力

ット野菜等の褐変防止のための基礎研究として大きな意味を持つものであると考えられる。

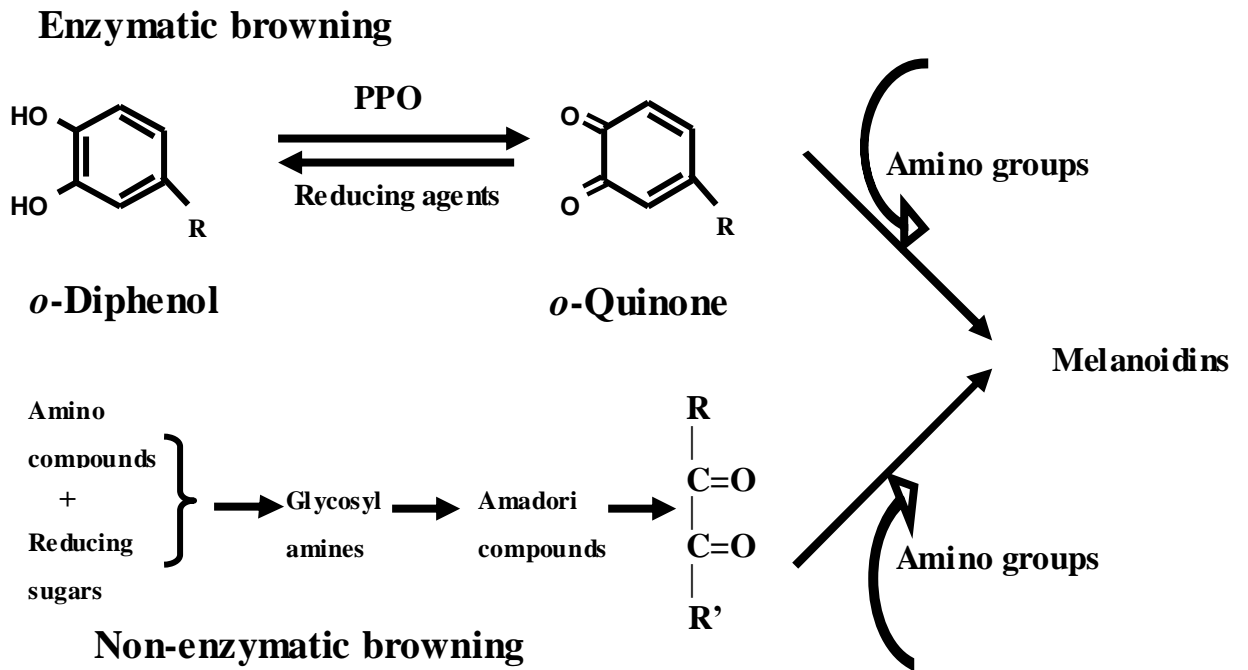
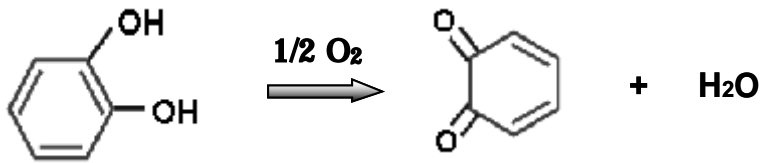
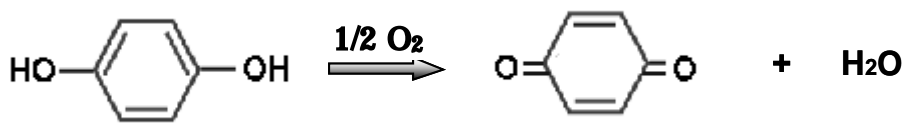


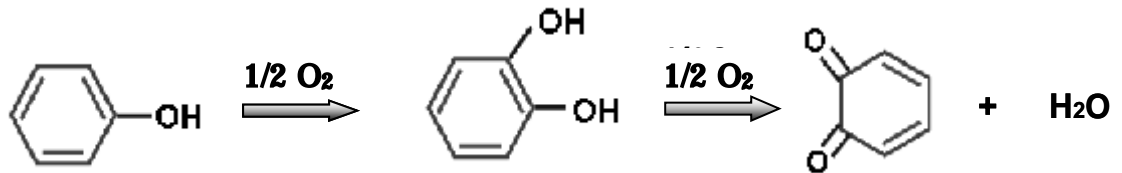
Fig. 1-1 Comparison of enzymatic and non-enzymatic (Maillard) browning reactions



EC1.10.3.1, *o*-diphenol: oxygen oxidoreductase



EC1.10.3.2, *p*-diphenol: oxygen oxidoreductase



EC1.14.18.1, monophenol, *o*-diphenol: oxygen oxidoreductase

Fig. 1-2 Polyphenoloxidase (PPO) oxidation reactions

## 第2章 キク科植物の褐変発生に關与するポリフェノール成分と 酵素活性の分布

### 2-1. 緒言

植物性食品中のポリフェノール化合物は多種多様であり<sup>2)</sup>、それぞれの食品の特徴を示すとともに、いわゆる“アク”として、酵素的褐変の基質となっている。それとともに最近ではお茶のカテキン類やワインポリフェノールのようにこれらポリフェノール化合物が抗酸化作用、抗菌作用、血圧降下作用等の機能性を有することが明らかとなり、健康食品ブームに乗り、注目を集めているものも多い<sup>2), 52)~54)</sup>。ゴボウ、フキ、シュンギク、ヨモギ、アザミ(根を俗にヤマゴボウと呼ぶ)、タンポポ、キク、ヒマワリ等のキク科植物にはイソクロロゲン酸、クロロゲン酸等の数種のクロロゲン酸同族体が含まれ、これがキク科植物の特徴的ポリフェノール成分であることが報告されている<sup>37)</sup>。従って、キク科植物の酵素的褐変は主にこれらのクロロゲン酸同族体がポリフェノール酸化酵素(EC1.10.3.1, PPO)によって酸化され変色するものと考えられる。筆者らの研究室ではカンキツ類<sup>42)~45)</sup>、ニホンナシ<sup>39)</sup>等の酵素的褐変機構について吸収スペクトルの面から褐変関連物質について検討した結果、これらの抽出液の反応に伴う反応液の吸収スペクトル変化はクロロゲン酸のそれとほぼ一致すること、抽出液には数種のクロロゲン酸同族体が含まれることを明らかにした。したがって、植物の酵素的褐変機構等を研究する際には、むしろクロロゲン酸同族体として一括定量の方が褐変の実体を表すものと考えられた<sup>36)</sup>。さらに、クロロゲン酸の一括定量法として差スペクトル法が開発された。本章ではまず、全ポリフェノールを定量するとともに、差スペクトル法を用いてキク科植物のクロロゲン酸を定量した。

一方、クロロゲン酸はコーヒー酸のカルボキシル基とキナ酸の水酸基とがエステル結合したもので、数種の同族体が知られている。これらクロロゲン酸類は植物の二次代謝産物として、L-フェニルアラニンから *p*-クマル酸を経由する、いわゆるシキミ酸経路により生合成されるものと考えられる<sup>11)~13)</sup>。この経路の鍵酵素としてフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) とチロシンアンモニアリアーゼ (TAL) とが知られているが、キク科植物におけるこれらの存在についての報告はヘッドレタスを除いてほとんどなされていないようである<sup>11), 12)</sup>。そこで、次に、キク科植物における PAL と TAL の分布について調べた。さらに、これらポリフェノール類の酸化に関与する PPO とペルオキシダーゼ (EC. 1.11.1.7, POD) の分布についても検討した。

## 2 - 2. 材料及び方法

### 2 - 2 - 1. 材料と試薬

レタス、ゴボウ、シュンギク等の野菜は佐賀市内のスーパーマーケットで購入したものを、また、タンポポ等の野草類は当学部内で採集したものを使用した。基質であるクロロゲン酸は Sigma (ミズーリ州、USA) 社より、他の試薬については片山化学工業 (大阪、日本)、和光純薬工業 (大阪、日本) より購入した。

### 2 - 2 - 2. ポリフェノール抽出液の調製

90 秒間マイクロ波加熱処理 (520 W) によって酵素を失活させたそれぞれの試料 (5 g) を 4 倍量 (W/V) のエタノールとともに室温にてミキサーで磨砕後、20 分間超音波処理 (28 Hz) をして抽出液を得た。この抽出液を吸引濾過し、濾液についてエタノール臭がなくなるまで減圧濃縮した。濃縮液中の不溶物を遠心分離

(1450×g、20分)により除去した後、その上澄液に水を加えて50 mLとしたものをそれぞれのポリフェノール抽出液とした。試料に用いた野菜については、レタス可食部(葉)、ゴボウ(根)、フキ(茎柄)、シュンギク可食部、タンポポ(地上部)、ヨモギ(地上部)をそれぞれ利用した。

#### 2-2-3. 全ポリフェノール定量

全ポリフェノール含量はFolin-Denis改良法<sup>46)</sup>を用いて測定した。すなわち抽出液1 mLに2%の炭酸ナトリウム水溶液4 mLを加え、室温で2分間放置した後、0.2 mLのFolin-Ciocaltu's phenol試薬を加えて、正確に30分間室温で放置した後に750 nmの吸光度を測定した。既知量のクロロゲン酸を用いて検量線を作成し、試料100 g当たりの全ポリフェノール量をクロロゲン酸量に換算して求めた。

#### 2-2-4. クロロゲン酸含量の測定

クロロゲン酸の定量は東野らの差スペクトル法<sup>36), 47)</sup>に準じてヘッドレタスアセトンパウダー抽出液を用いて測定した。すなわち、抽出液0.5 mL及びMcIlvaine緩衝液(pH 5.0)1 mLの混合液に酵素液0.5 mLを加え、30、5分間振動下で反応させた後、2%メタリン酸を3 mL添加し、反応を停止させ、325 nmにおける吸光度を測定した(テスト溶液)。また、抽出液0.5 mL及びMcIlvaine緩衝液(pH 5.0)1 mLに、2%メタリン酸3 mLをあらかじめ加え、ついで酵素液を0.5 mL添加したものをコントロール溶液として325 nmの吸光度を測定し、それらの吸光度差( $A_{325\text{ nm}}$ )を求めた。既知量のクロロゲン酸を用いて同量に処理したものより検量線を作成し、試料100 g当たりのクロロゲン酸量を求めた。

#### 2-2-5. 蛋白質定量



蛋白質は E. F. Hartree の方法<sup>55)</sup>に従い、牛血清アルブミンを標準物質として測定した。

#### 2 - 2 - 6. PAL 及び TAL 活性の測定

キク科植物の各試料 100 g に 0.5% ツイン-80 及び 5 mM の 2-メルカプトエタノールを含む同量の 50 mM ホウ酸緩衝液を加え、ミキサーで磨砕し、綿布でろ過した後、遠心分離を行い(25000 ×g、20 分) その上澄液を酵素液とした。なお、抽出操作は 4 で行った。

PAL 及び TAL 活性の測定は Dangyand の方法<sup>56)</sup>、TAL 活性は小机らの方法<sup>57)</sup>を改良して測定した。すなわち、酵素液 0.1 mL、100 mM の L-フェニルアラニン 0.5 mL (TAL 活性には 10 mM の L-チロシン) と 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.8) 4.4 mL 入れ全量を 5 mL とした。38 °C で 3 時間反応させたのち、PAL 活性は 290 nm、TAL 活性は 333 nm の吸光度の増加を測定した。両酵素活性は酵素 1 mL によって 1 時間当たりの吸光度増加 0.001 を 1 unit として、タンパク質量 1 mg 当たりの比活性として示した。

#### 2 - 2 - 7. PPO 及び POD 活性の測定

新鮮なキク科植物を 3~4 倍量の氷冷アセトンとともにミキサーで磨砕、濾過、残渣をさらに数回 70~80%氷冷アセトンによる磨砕を、濾液が緑色を示さなくなるまで繰り返す。最後に氷冷無水アセトンで洗い、真空乾燥して得た白色粉末(アセトンパウダー)を McIlvain 緩衝液 (pH 7.0) に 10 分間攪拌後、東洋濾紙 No. 2 で濾過した濾液を酵素液とした。

PPO 活性は基質としてクロロゲン酸を用いて、東野らの差スペクトル法<sup>47)</sup>に準じて測定した。すなわち、クロロゲン酸溶液 (0.4 mM) 0.5 mL 及び McIlvaine

緩衝液 (pH 5.0) 1 mL の混合液に酵素液 0.5 mL を加え、30、5 分間振盪下で反応させた後、2%メタリン酸を 3 mL 添加し、反応を停止させた (テスト溶液)。また、コントロールとしてクロロゲン酸溶液 (0.4 mM) 0.5 mL 及び McIlvain 緩衝液 (pH 5.0) 1 mL に、2%メタリン酸を 3 mL あらかじめ加え、ついで酵素液を 0.5 mL 添加した。テスト溶液及びコントロール溶液の 325 nm における吸光度を測定し、それらの吸光度差 ( $A_{325 \text{ nm}}$ ) を求め、その値の 1 分当たりの増加量 0.1 を 1 unit として、タンパク質量 1 mg 当たりの比活性として示した。

ペルオキシダーゼ (POD) 活性はグアヤコールを基質とする比色法により測定した<sup>48), 49)</sup>。すなわち、グアヤコール (100 mM) 0.5 mL 及び 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 4.1 mL、1%過酸化水素 0.2 mL の混合液に酵素液 0.2 mL を加え、30、5 分間振動下で反応させた後、直ちに 470 nm における吸光度を測定した (テスト溶液)。また、コントロールとしてグアヤコール (100 mM) 0.5 mL 及び 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 4.1 mL、1%過酸化水素 0.2 mL の混合液に酵素液 0.2 mL を加え、直ちに 470 nm における吸光度を測定した。それらの吸光度差 ( $A_{470 \text{ nm}}$ ) を求め、その値の 1 分当たりの増加量 0.1 を 1 unit として、タンパク質量 1 mg 当たりの比活性として示した。

## 2 - 3. 結果及び考察

### 2 - 3 - 1. 全ポリフェノール量とクロロゲン酸含量

植物の酵素的褐変は即時型と遅延型の酵素的褐変に大別される<sup>11), 12), 56)</sup>。この違いは、組織内のポリフェノールの種類と含量の違いに起因すると考えられている。本章ではキク科植物の全ポリフェノール量とクロロゲン酸量を測定し、結果を Fig. 2-1 に示した。全ポリフェノール含量は野草のヨモギが約 900 mg/100 g FW と最

も高く、ついでタンポポとゴボウが高く、いずれも 500 mg/100 g FW 以上の含量を示したが、フキ、シュンギク、リーフレタスの全ポリフェノール含量は 90~120 mg/100 g FW と比較的的低く、ヘッドレタスでは 20 mg/100 g FW 以下と極めて低い数字を表した。一方、クロロゲン酸含量においてもヨモギが 360 mg/100 g FW、ゴボウが 230 mg/100 g FW と高い値を示し、全ポリフェノール含量の約 40%の値を示したが、全ポリフェノール含量が高かったタンポポでは 20 mg/100 g FW と著しく低かった。さらに、リーフレタス、シュンギクでは約 50 mg/100 g FW と比較的的低かったものの全ポリフェノールの約 50%を占めていた。また、ヘッドレタスにはクロロゲン酸がほとんど含まれていなかった。以上のように、キク科植物ではヘッドレタスを除いてクロロゲン酸の全ポリフェノールに占める割合が高く、第 3 章で示したゴボウの褐変反応前後の反応液の吸収スペクトルの変化からも明らかのように、このクロロゲン酸類が PPO によって酸化され、酵素的褐変の主原因になると考えられる。また、本実験においてヘッドレタスにはクロロゲン酸が検出されなかったが、この原因として村田ら<sup>11), 12), 32)</sup>が報告しているように切断等の外部障害を受けた後に PAL が誘導或いは活性化され、褐変基質となるクロロゲン酸が形成されるものと考えられる。

#### 2 - 3 - 2. PAL 活性及び TAL 活性

前記のようにキク科植物のクロロゲン酸含量は種類により著しく相違することが明らかとなった。カフェ酸やクロロゲン酸のようなフェニルプロパノイド化合物の生合成の鍵酵素として PAL 及び TAL 活性が知られていることから、これらの酵素活性を調べ、その結果を Fig. 2-2 に示した。クロロゲン酸生成の鍵酵素である PAL 活性は供試したすべてのキク科植物で検出されたが、その強さは植物により相違した。すなわち、野草のヨモギ、タンポポではそれぞれ 370 unit、340 unit

と比較的高い活性を示したが、栽培野菜では最も高かったリーフレタスにおいても 160 unit と野草の約半分に過ぎず、ゴボウ、シュンギク、ヘッドレタスでは 100 unit 以下であり、フキでは 30 unit に過ぎなかった。一方、TAL 活性は野草のヨモギ 200 unit とやや高い活性が、タンポポやリーフレタスでは 30 unit とわずかな活性が検出されたに過ぎず、ゴボウ、フキ、ヘッドレタス、シュンギクでは全く検出されなかった。従って、キク科植物のクロロゲン酸生成には TAL 活性よりも PAL 活性が深く関与しているものと思われる。また、供試キク科植物で見られた PAL 及び TAL 活性の差異は今回の実験で採取した植物の成長段階、貯蔵時間に関係していると考えられる。

### 2 - 3 - 3. PPO 活性と POD 比活性

ポリフェノール類の酸化を触媒する酵素は、PPO が主体であり、POD も一部関与することが報告されている<sup>2), 37), 48), 49)</sup>。前記のようにキク科植物はクロロゲン酸を基質として含有することから、本実験ではクロロゲン酸を基質としてキク科植物における PPO 活性を測定し、同時に POD 活性を測定した結果を Fig. 2-3 に示した。mg 蛋白質あたりの PPO 活性はゴボウがいちばん高く、ヘッドレタス、リーフレタス順に比活性は高かったが、フキやヨモギでは比活性は低く、ゴボウの 1/10 以下であった。また、シュンギクやタンポポ等は低い活性を示し、特にタンポポの活性は極めて低かった。一方、POD 活性はゴボウが供試試料中では最も高く、タンポポがこれに続いた。他の植物ではシュンギク、フキ、ヨモギがゴボウの 1/3~1/4 の比活性を示したが、ヘッドレタスやリーフレタスでは POD 活性は低く、ゴボウの 1/20 以下であった。このような PPO と POD の関係は中林<sup>37)</sup>や村尾<sup>29)</sup>の報告と類似した。これらの結果からキク科植物は PPO と共に POD 活性を有し、両活性の強さは植物の種類や品種によって違うことが明らかになった。ゴボウ、ヘッド

レタス、リーフレタス、フキでは PPO の比活性が相対的に高いことから、それら野菜の酵素的褐変に PPO が大きく関与するものと考えられる。しかし、シュンギクやタンポポでは PPO 活性が低く、POD 活性が高いことから、これらの褐変には POD 活性も強く関与することが示唆された。

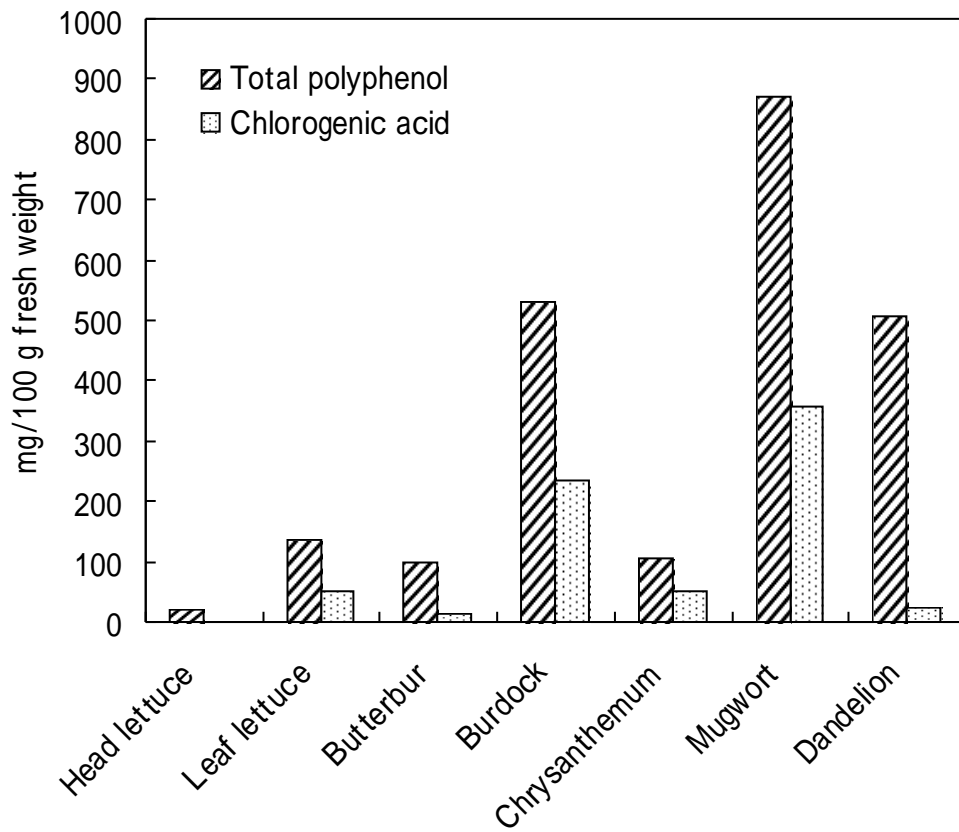


Fig. 2-1 Total polyphenol and chlorogenic acid contents of composite plants

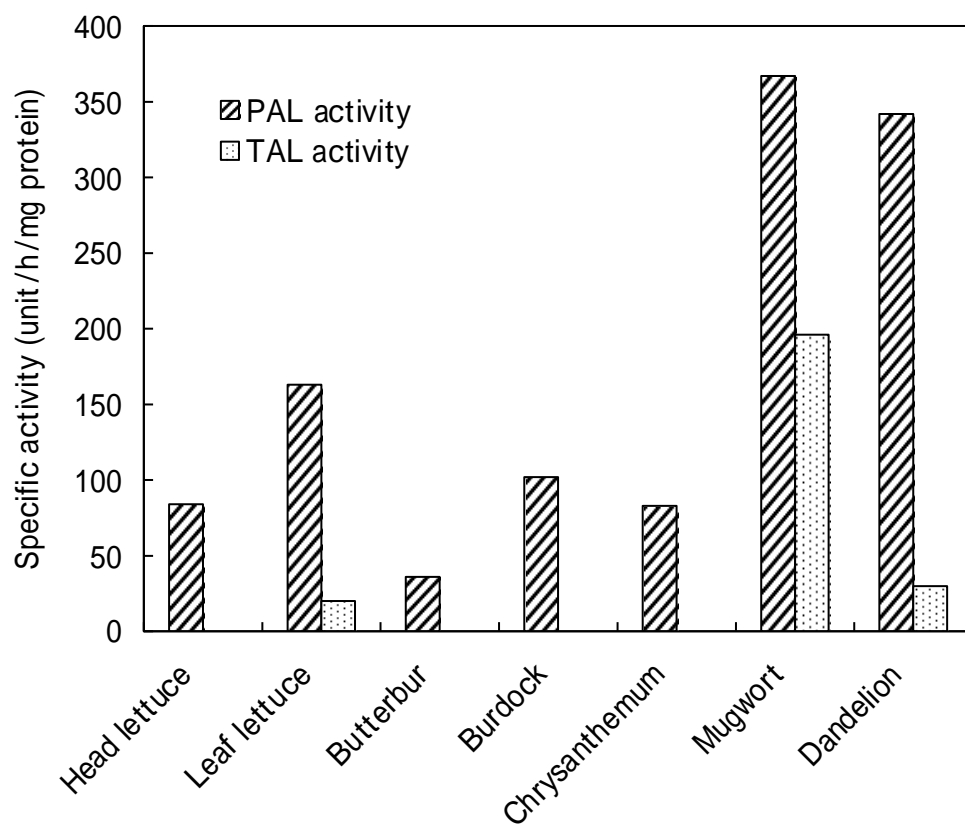


Fig. 2-2 PAL and TAL activities of composite plants

PAL: phenylalanine ammonia-lyase, TAL: tyrosine ammonia-lyase.

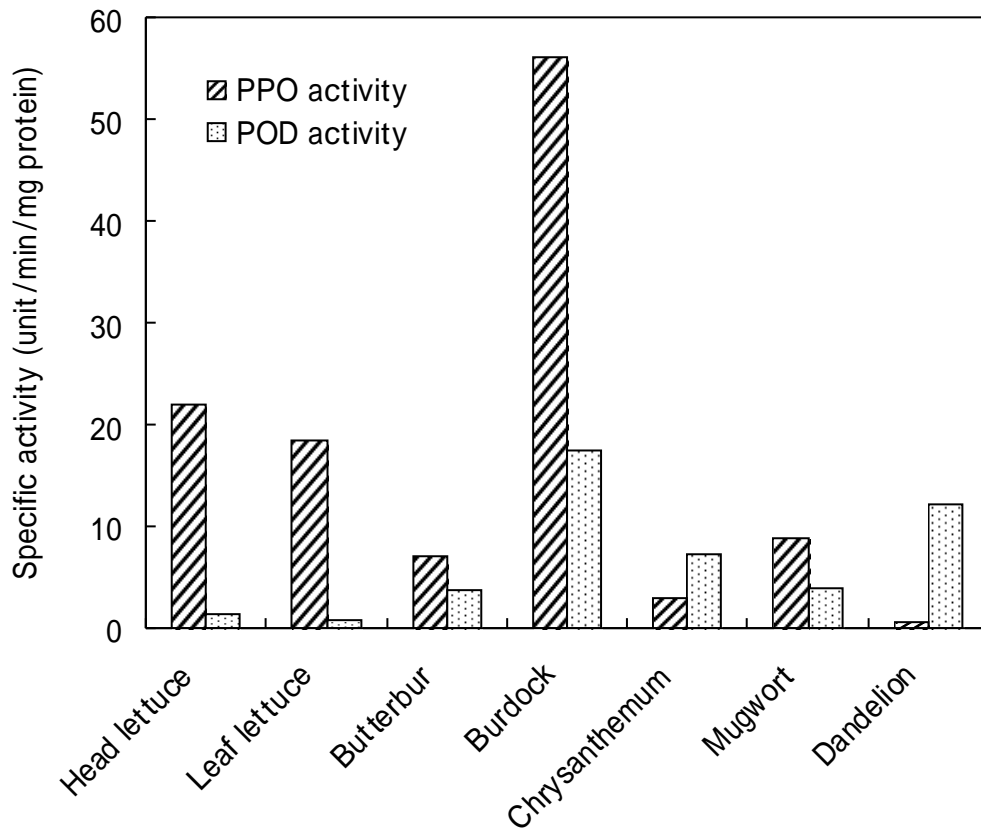


Fig. 2-3 POD and PPO activities of composite plants

POD activity: Peroxidases activity, PPO activity: polyphenol oxidase activity.



## 2 - 4. 小括

数種のキク科植物の酵素的褐変に關与する基質ポリフェノール含量、特にその主体となると考えられるクロロゲン酸量及びその生成の鍵酵素である PAL と TAL 活性について調べた。さらにポリフェノール類の酸化酵素である PPO と POD 活性の品種間差異等を調べた。

(1) キク科植物では全ポリフェノール含量は野草であるヨモギ(約 900 mg/100 g FW)とタンポポ(約 500 mg/100 g FW)が高かった。野菜ではゴボウが 520 mg/100 g FW と比較的高かったが、リーフレタス、フキ、シュンギクでは 130 mg/100 g FW の含量に過ぎず、ヘッドレタスでは 20 mg/100 g FW と極めて低かった。一方クロロゲン酸含量はヨモギ(360 mg/100 g FW)、ゴボウ(230 mg/100 g FW)であり、全ポリフェノールの 40%近くを占めることが明らかとなった。また、リーフレタスやシュンギクでは全ポリフェノールの 50%を占め、クロロゲン酸がこれら野菜の褐変反応の主要基質であると考えられた。

(2) クロロゲン酸生成の鍵酵素である PAL 活性は供試したすべてのキク科植物で検出されたが、TAL 活性はヨモギ、タンポポ、リーフレタスで検出され、その他の植物では検出されなかった。

(3) ポリフェノール酸化酵素である PPO と POD 活性は供試したすべてのキク科植物に存在したが、それらの活性は植物の起原により差があることが明らかになった。

## 第3章 ゴボウのポリフェノール酸化酵素の精製とその性質

### 3-1. 緒言

ゴボウ(*Arctium lappa* L)は中国から東アジアが原産とされるキク科植物で、根の部分が食用とされている<sup>1)</sup>。日本には平安末期に伝来し、鎌倉時代から室町時代にかけて、精進料理等の食材として普及してきた日本人にとって極めて身近な野菜の一つである。ゴボウにおいては流通や加工の際に切断等の障害により、障害部が著しく褐変し、その商品価値を低下させることから、加工業者等の間で問題視されている<sup>2), 29), 37)</sup>。この変色は常温で発色することから他の多く青果物と同様に酵素的褐変反応により引き起こされると考えられる。中林<sup>37)</sup>はゴボウ中に新鮮重量当たり0.78%のポリフェノールが存在し、その主成分はクロロゲン酸、イソクロロゲン酸等のクロロゲン酸類であることを報告している。本研究においても新鮮ゴボウ中に0.23%のクロロゲン酸類が含まれていることを第2章で明らかにした。したがって、ゴボウの褐変はクロロゲン酸が主要基質として引き起こされると考えられるが、その詳細については不明な点が多いように思われる。そこで本章ではゴボウ抽出液に見られる褐変反応について、まず、褐変反応液の吸収スペクトルの変化の面から追究した。その結果、この反応がクロロゲン酸類の酵素的酸化に起因することが明らかとなった。一方、ゴボウPPOの精製に関する研究は極めて少なく、PPOの性質等に関しても不明な点が多い<sup>2), 29), 37)</sup>。わずかに、村尾ら<sup>29)</sup>はゴボウPPOを精製し、その性質を検討しているが、精製酵素はピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化し、*o*-ジフェノール酸化活性はほとんど示さないようである。したがって、この酵素のゴボウの褐変への寄与は小さく、この酵素の他にPPOが存在し、ゴボウの褐変が引き起こされると考えられる。そこで、本章ではクロロゲン酸を基質として、ゴボウPPOを精製し、精製酵素の性質等について調べた。

## 3 - 2. 材料及び方法

### 3 - 2 - 1. 材料と試薬

熊本県旭志村で栽培されたゴボウを市場より購入し、使用した。基質であるクロロゲン酸及び(-)-エピカテキンは Sigma( ミズーリ州、USA )社、DEAE-Cellulofine AL はチッソ( 東京、日本 )、Butyl-Toyopearl 650M 及び Toyopearl HW 55-S は東ソー( 東京、日本 )、透析用セルロースチューブ透析膜( 透過分子量約 14,000 ) は三光純薬( 東京、日本 )、SDS-PAGE 用の蛋白質標準キットは和光純薬工業( 大阪、日本 ) より購入した。その他の試薬については片山化学工業( 大阪、日本 )、和光純薬工業( 大阪、日本 ) より購入した。

### 3 - 2 - 2. ゴボウの酵素的褐変反応機構の吸収スペクトル及び差スペクトルの測定

#### 1) ゴボウポリフェノール抽出液の調製

90 秒間マイクロ波加熱処理( 520 W )によって酵素を失活させたゴボウ(50 g) を 4 倍量( W/V )のエタノールとともに室温にて磨砕後、湯浴( 90 )を用いて 3 時間還流抽出し、ポリフェノール抽出液を得た。この抽出液を吸引濾過し、濾液についてエタノール臭がなくなるまで減圧濃縮した。濃縮液中の不溶物を遠心分離(1450 × g、20 分)により除去した後、その上澄液に水を加えて 100 mL としたものをそれぞれのポリフェノール抽出液とした。

#### 2) 吸収スペクトル及び差スペクトルの測定

吸収スペクトル及び差スペクトルの測定は東野ら<sup>39), 40)</sup>の法に準じて測定した。ゴボウのポリフェノール抽出液あるいはクロロゲン酸溶液( 0.4 mM ) 0.5 mL 及び McIlvaine 緩衝液( pH 5.0 ) 1 mL の混合液に酵素液 0.5 mL を加え、30 で 0、5、

10 分間振動下で反応させた後、2%のメタリン酸 3 mL を添加し、反応を停止させた。これら反応液の吸収スペクトル及び 0 分を基準とする差スペクトルを日本分光 530 型分光光度計により測定した。

### 3 - 2 - 3. 蛋白質定量

蛋白質は E. F. Hartree の方法<sup>55)</sup>に従い、牛血清アルブミンを標準物質として測定した。また、各クロマトグラフィーにおいては、吸光度 280 nm を測定し、蛋白質量の目安とした。

### 3 - 2 - 4. 酵素活性の測定法

クロロゲン酸酸化(ChO)活性は東野ら<sup>47)</sup>の差スペクトル法に準じて測定した。すなわち、クロロゲン酸溶液 (0.4 mM) 0.5 mL 及び McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 1 mL の混合液に酵素液 0.5 mL を加え、30、5 分間振動下で反応させた後、2%メタリン酸を 3 mL 添加し、反応を停止させた (テスト溶液)。また、コントロールとしてクロロゲン酸溶液 (0.4 mM) 0.5 mL 及び McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0) 1 mL に、2%メタリン酸を 3 mL あらかじめ加え、ついで酵素液を 0.5 mL 添加した。それらの吸光度差 ( $A_{325 \text{ nm}}$ ) を求め、その値の 1 分当たりの増加量 0.1 を 1 unit として酵素活性を表した。

エピカテキン酸化(EpO)活性は比色法<sup>27)</sup>により測定した。McIlvaine 緩衝液 (pH 8.0) 2.0 mL と 10 mM のエピカテキン溶液 1.0 mL を加えた混合液を 30 で 3 分間振盪後、酵素液 1.0 mL を加え、30 で再び 3 分間振盪後の 420 nm における吸光度を測定したものをテスト溶液とした。また、酵素液のかわりに脱イオン水を用い同様に反応させた後測定したのをコントロールとした。それらの吸光度差 ( $A_{420 \text{ nm}}$ ) を求め、その値の 1 分当たりの増加量 0.1 を 1 unit として酵素活性を表し

た。

### 3 - 2 - 5. 酵素の精製

酵素液の調製及び精製方法を Fig. 3-1 に示した。

#### 1) 粗酵素液の調製

約 1.6 kg のゴボウを 1.6 L の 2% NaCl、1% L-アスコルビン酸及び 1% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) を含む氷冷した 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 0.1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  緩衝液 (pH 7.0 : 以下 0.1 M リン酸緩衝液と略す) とともにミキサーで磨砕した後、綿布で濾過し、4℃、10300 × g、20 分間遠心分離を行い (以後遠心分離はすべてこの条件で行った) その上澄を抽出液とした。抽出液に -20℃ に冷却したアセトンを 20% (v/v) になるように加え、生じた沈殿を遠心分離で除いた。この上澄液にさらに終濃度 80% (v/v) となるようにアセトンを加えた。沈殿を遠心分離により集め、少量の 0.01 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 0.01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  緩衝液 (pH7.0 : 以下 0.01 M リン酸緩衝液と略す) に溶解後、脱イオン水に対して透析を行った。この膜内液について、遠心分離を行い、不溶物を除去した上澄液を粗酵素液とした。

#### 2) DEAE-Cellulofine AL カラムクロマトグラフィー

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-Cellulofine AL カラム (4.5 × 25 cm) に、粗酵素液を添加し、同一緩衝液を流下した。吸着された蛋白質画分を NaCl 濃度が 0~1.0 M となるようにグラジエント溶出を行った。活性画分を集め、1.0 M の濃度となるように硫酸アンモニウムを添加した。

#### 3) Butyl-Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィー

1.0 M 硫酸アンモニウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M カラム (1.1 × 24.5 cm) に先の DEAE-Cellulofine AL 活性画分を添加し、硫酸アンモニウム濃度が 1.0~0 M となるように 0.01 M リン酸緩

衝液を用いてグラジエントで溶出した。活性画分を集め、脱イオン水に対して透析後、透析液を限外濾過膜（アミコン社製ダイアライシスマンブラン 20）を用いて濃縮した。

#### 4) Toyopearl HW 55-S カラムクロマトグラフィー

濃縮液を 0.1 M リン酸緩衝液で平衡化した Toyopearl HW 55-S カラム(1.7×90 cm) に添加し、同緩衝液で溶出した。PPO 活性画分を集め、精製酵素として以下の実験に使用した。

### 3 - 2 - 6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

精製した酵素の均一性を確かめるために Davis の方法<sup>58)</sup> に準じて PAGE 行った。すなわち、7.5%ポリアクリルアミドゲルを使用し、pH 9.0 で、カラム当たり 0.25 mA、約 2 時間通電した。ゲルは 1%クマジーブリリアントブルーで染色し、7%酢酸で脱色した。

### 3 - 2 - 7. 分子量の推定

分子量の推定をゲル濾過法及び SDS-PAGE を用いて行った。

#### (1) ゲル濾過法

Toyopearl HW55-S カラムを用い、Andrews の方法<sup>59)</sup> に従い、分子量を推定した。すなわち精製 PPO 及び標準タンパク質を 0.1 M リン酸緩衝液で平衡化した Toyopearl HW 55-S カラム (1.7×90 cm) に添加し、同緩衝液で溶出した。ブルーデキストラン 2000 及びそれぞれのタンパク質の溶出ピーク  $V_0$  及び  $V_e$  を求め、 $V_e/V_0$  と分子量との関係を作図し、PPO の分子量を推定した。標準物質として、 $\gamma$ -globulin (分子量 : 160,000)、bovine serum albumin (65,000)、egg serum albumin (45,000)、chymotrypsinogen A (25,000) を使用した。

## (2) SDS-PAGE

蛋白質分子量マーカーとして、Cytochrome c hexamer (分子量 : 74,400)、Cytochrome c tetramer (49,000)、Cytochrome c trimer (37,200)、Cytochrome c dimer (24,800)、Cytochrome c monomer (12,400)を用い、Laemmli の方法<sup>60)</sup>により、試料 PPO と共に 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行った。それぞれのタンパク質の相対移動距離( Relative movitivity )との関係を作図し、分子量を算出した。

### 3 - 2 - 8. 酵素の一般的性質

#### 1) 基質特異性

基質としてクロロゲン酸、(-)-エピカテキン(以下エピカテキン)、カテコール、ドーパミン、DL-ドーパ、カテキン、カフェ酸、ピロガロール、没食子酸、フロロゲルシノール及びレゾルシノールのポリフェノール化合物を用い、比色法<sup>27)</sup>で測定した。

すなわち、10 mM の種々ポリフェノール化合物 0.5 mL、Mcllvaine 緩衝液(pH 5.0) 4 mL の混合液に 0.5 mL の酵素液を加え、30℃ で 0 及び 5 分間反応させた後、反応液の吸光度を 420 nm で測定した。0 分及び 5 分の吸光度差 (  $A_{420 \text{ nm}}$  ) を求め、酵素活性を表した。

2) ミカエリス定数(  $K_m$  値 )の測定 : クロロゲン酸とエピカテキンを基質とし、終濃度 0.1~50 mM の範囲で基質濃度を変化させ、3 - 2 - 4 に準じて活性測定を行い、反応速度( )と基質濃度[S]の関係を作図した。この際、反応温度は 20℃ とし、反応時の pH はクロロゲン酸では pH 5.0、エピカテキンでは pH 8.0 とした。

#### 3) 最適 pH

本酵素の最適 pH はクロロゲン酸及びエピカテキンを基質として所定の pH の

McIlvaine 緩衝液(pH 3.0~8.0)と Atkins & Pantin 緩衝液(pH 9.0~12.0)を用い、3 - 2 - 4 に準じて活性測定を行った。結果は最大活性を 100%とした相対値で表した。

#### 4) pH 安定性

pH は所定の pH の McIlvaine 緩衝液(pH 3.0~8.0)あるいは Atkins & Pantin 緩衝液(pH 9.0)と酵素液を 1:1 となるように混合し、低温室(4 )で 22 時間放置後、pH 5.0 (ChO 活性測定)及び pH 8.0 (EpO 活性測定)の McIlvaine 緩衝液で希釈した。これを酵素液として ChO 及び EpO 活性それぞれ pH 5.0 及び pH 8.0 で 3 - 2 - 4 方法に準じて酵素活性の測定を行い、結果は残存する酵素活性を最大活性 100%とした相対値で表した。

#### 5) 最適温度

反応時の温度を 20~60 まで変化させ、クロロゲン酸及びエピカテキンを基質として 3 - 2 - 4 に準じて活性測定を行い、結果は最大活性を 100%とした相対値で表した。

#### 6) 熱安定性

30~80 の所定の温度で PPO 溶液を 10 分間または 30 分間加熱処理し、クロロゲン酸及びエピカテキンを基質として残存する酵素活性を 3 - 2 - 4 の方法で測定した。結果は最大活性を 100%とした相対値で表した。

#### 7) 種々の化合物の酵素活性への影響

種々の化合物を終濃度が 5 mM 及び 10 mM となるように反応液に添加し、ChO 及び EpO 活性に及ぼす種々化合物の影響について調べた。結果は対照として化合物の代わりに脱イオン水を用いた時の活性を 100%とした相対値で表した。

### 3 - 3. 結果及び考察



### 3 - 3 - 1. ゴボウの酵素的褐変反応機構の吸収スペクトルによる検討

ゴボウのポリフェノール抽出液に PPO を作用させた場合、速やかに進行し、反応溶液の吸収スペクトル及び差スペクトルは Fig. 3-2-I のような変動を示した。その吸収スペクトルは Fig. 3-2-I (A) のように紫外部 (本実験の場合、250 ~ 350 nm) では 295 nm あるいは 325 nm 付近に吸収の肩あるいはピークを示したが、可視部 (350 ~ 400 nm) においては明瞭なピークはみられなかった。また、褐変反応進行に伴って 370 nm より長波長側での吸光度の増加と 280 nm ~ 370 nm におけるその減少が認められた。その際の差スペクトル Fig. 3-2-I (B) から明らかなように、吸光度の増加は、260 nm 及び 380 nm 付近で、その減少は 325 nm 付近で大きく、負のピークを示した。

このような褐変反応前後の反応液の両スペクトルの変動は、ニホンナシ<sup>39)</sup>やウンシュウミカン<sup>43), 44)</sup>の抽出液にそれぞれ果実から調製した PPO を作用させた場合にも認められており、それら反応液での両スペクトルの変動はそれぞれの抽出液に含まれるポリフェノール化合物に由来するものと考えている。

そこで、これら抽出液に見られたスペクトルの変化の特徴と種々ポリフェノール化合物のスペクトル変化の特徴を比較することにより、ゴボウ抽出液中で起こる褐変反応系について検討した。その結果、クロロゲン酸を用いた場合のスペクトル変化の特徴がゴボウ抽出液の場合を極めて類似した。すなわち Fig. 3-2-II (A) に示したように、クロロゲン酸を基質とした場合には 325 nm 付近に吸収ピーク、295 nm 付近に肩を有する吸収スペクトルを示し、褐変反応の進行に伴って 370 nm より長波長側での吸光度の増加と 280 ~ 370 nm におけるその減少が認められた。また、Fig. 3-2-II (B) の差スペクトルからあきらかなように吸光度の減少は 325 nm 付近で最も著しく、その増加は 380 ~ 400 nm において大きかった。

以上のように、ゴボウポリフェノール抽出液の PPO による吸収スペクトル及び

差スペクトルは、クロロゲン酸を基質とした際のそれぞれのスペクトルの変動の結果とほぼ一致した。中林ら<sup>37)</sup>が報告しているように、キク科植物にはかなりの量のクロロゲン酸同族体が存在している。したがって Fig. 3-2 の吸収スペクトルに見られる 325 nm 付近のピークは、クロロゲン酸同族体に由来し、それらがゴボウ PPO により酸化されて、同図に見られるようなスペクトル及び差スペクトルの変動の大きな要因となったと考えられる。

### 3 - 3 - 2. 酵素の精製

ゴボウ抽出液についてアセトン分画、DEAE-Cellulofine AL、Butyl-Toyopearl 650 M 及び Toyopearl HW 55-S カラムクロマトグラフィーを行い、PPO を精製した。DEAE-Cellulofine AL カラムを行なった結果が Fig. 3-3 であり、本酵素の全活性の 70%以上が 0.5~0.8 M の塩化ナトリウムを含む緩衝液により溶出する画分に存在した。この画分を活性画分として集め、Butyl-Toyopearl 650 M カラムを行った。その結果 Fig. 3-4 に示したように、本酵素は 0.5~0.8 M の硫酸を含む緩衝液により溶出したので、この活性画分を集め、脱イオン水に対して透析後、膜内液を濃縮した。濃縮液(5 mL)について Toyopearl HW 55-S カラムを行なった結果が Fig. 3-5 である。この結果から単一の PPO 活性のピークが検出され、これは蛋白質のピークと一致した。そこで、この活性画分を集め、精製酵素として以下の実験に使用した。なお、各精製段階におけるゴボウ PPO の蛋白質量、比活性、回収率などについては Table 3-1 に示した。本酵素は最終的にアセトン分画後の粗酵素液の 16.6 倍に精製され、回収率は 21%であった。

### 3 - 3 - 3. 酵素の均一性及び分子量

精製酵素の均一性を確かめるために電気泳動を行なった。その結果 Fig. 3-6 に示

したように、本酵素は SDS-PAGE (A)及び Native-PAGE (B)のいずれの電気泳動においても単一のバンドを示し、電気泳動的に均一であった。

Toyopearl HW 55-S カラムを用いたゲル濾過法及び SDS-PAGE により本酵素の分子量を推定した結果、Fig. 3-7 に示すように本酵素の分子量は、それぞれ 40,900 及び 40,000 と算出された。これらの結果から、本酵素は分子量約 40,000 のモノマーであると考えられる。一方、村尾<sup>29)</sup>らはゴボウからピロガロールを酸化する PPO を精製したが、その分子量はゲル濾過より約 25,000、SDS-PAGE により約 31,000 と推定しており、本研究のクロロゲン酸酸化酵素とまったく違う PPO と考えられる。このような本酵素の分子量はリンゴ PPO<sup>28)</sup> (65,000) やニホンナシ PPO<sup>39)</sup> (56,000) より小さかった。また、他のキク科植物と比較すると、シュンギク PPO<sup>26)</sup> (45,000)、球状レタス PPO<sup>27)</sup> (56,000) より小さかった。このような種類、品種による PPO の分子量の相違はレタスやバナナ PPO の多様性を示す一つの結果であると考えられる<sup>27), 30), 31), 61), 62)</sup>。

### **Edible burdock ( 1.6 Kg)**

- Homogenized with 0.1 M PB (phosphate buffer, pH 7.0) contained 2% NaCl, 1% L-ascorbic acid and 1% PVPP (polyvinylpolypyrrolidone)
- Centrifuged at 10300 × g at 4 °C for 20 min

### **Crude extract**

- 20~80% acetone saturation
- Centrifuged at 10300 × g at 4 °C for 20 min
- Collected precipitate and dialyzed
- Centrifuged at 10300 × g for 20 min at 4 °C

### **Crude enzyme**

- Added to DEAE-Cellulofine AL (gradient: 0~1.0 M NaCl in 0.01 M PB)
- Added to Butyl-Toyopearl 650 M (gradient: 1.0~0 M in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 0.01 M PB)
- Added to Toyopearl HW 55-S (eluted with 0.1 M PB)

### **Purified enzyme**

Fig. 3-1 Procedure of edible burdock PPO purification

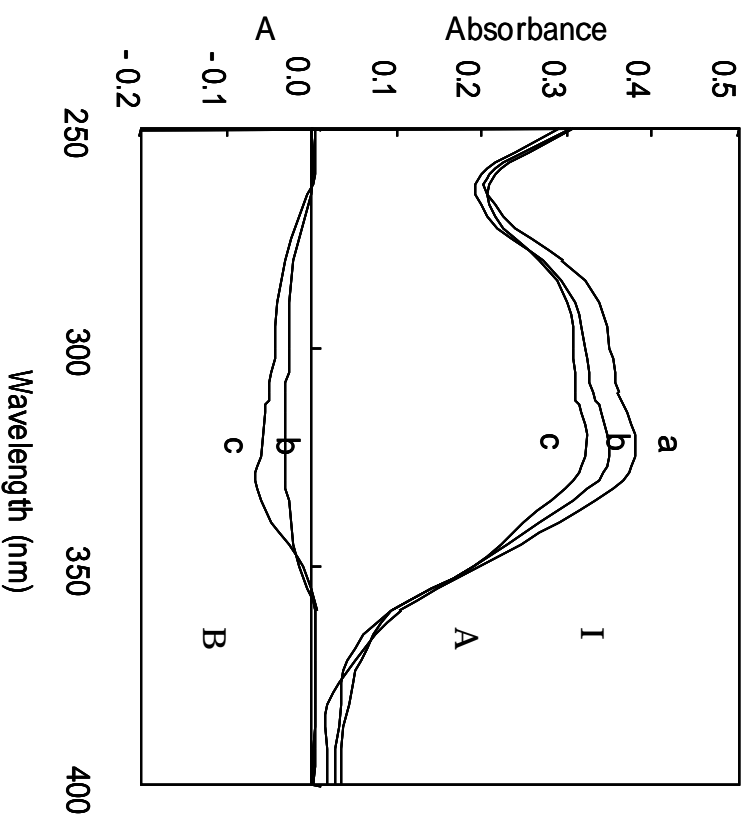


Fig. 3-2 Changes in absorption and difference spectra of edible burdock extract and chlorogenic acid solution during browning reaction by edible burdock polyphenol oxidase

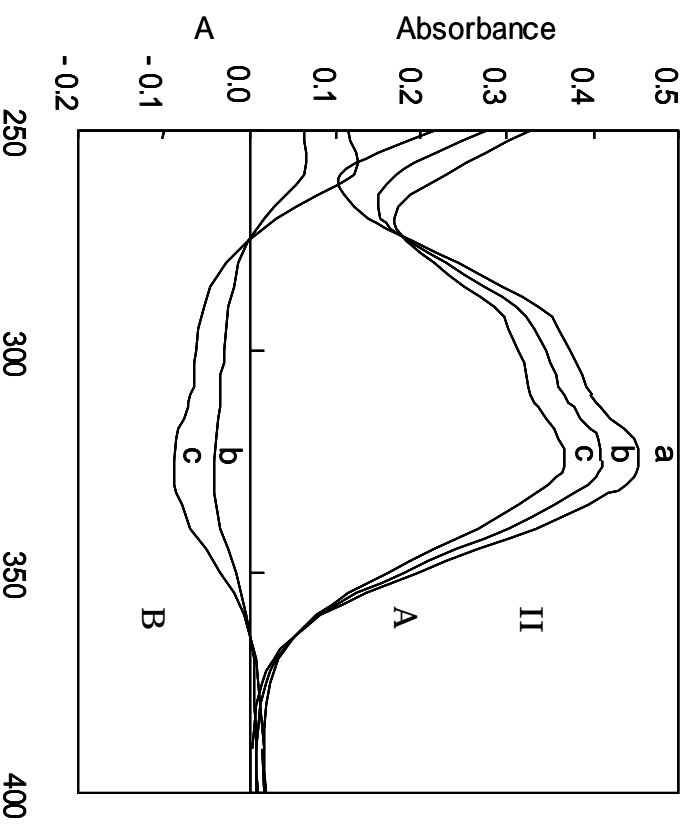


Fig. 1-I Edible burdock extract: (A) absorption spectra; a: 0 min, b: 5 min, c: 10min. (B) difference spectra.

Fig. 1-II Chlorogenic acid solution: (A) absorption spectra; a: 0 min, b: 5 min, c: 10min. (B) difference spectra.

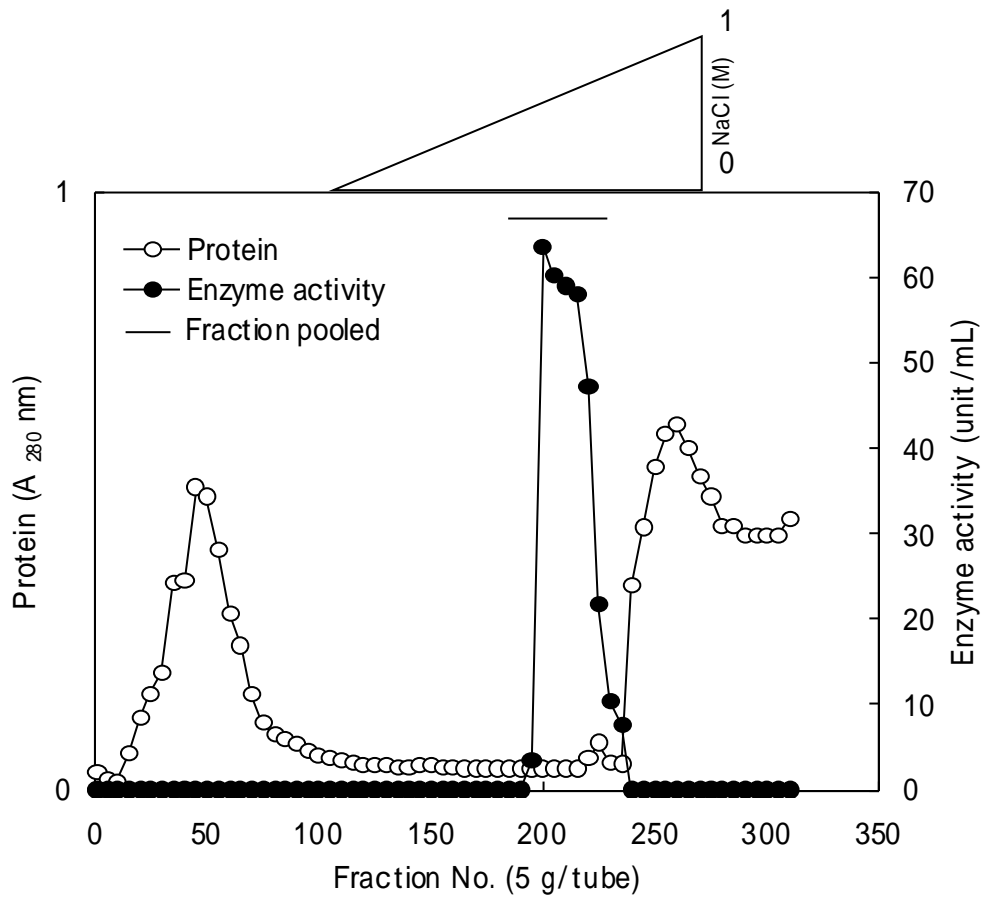


Fig. 3-3 Elution pattern of the enzyme on DEAE-Cellulofine AL column chromatography

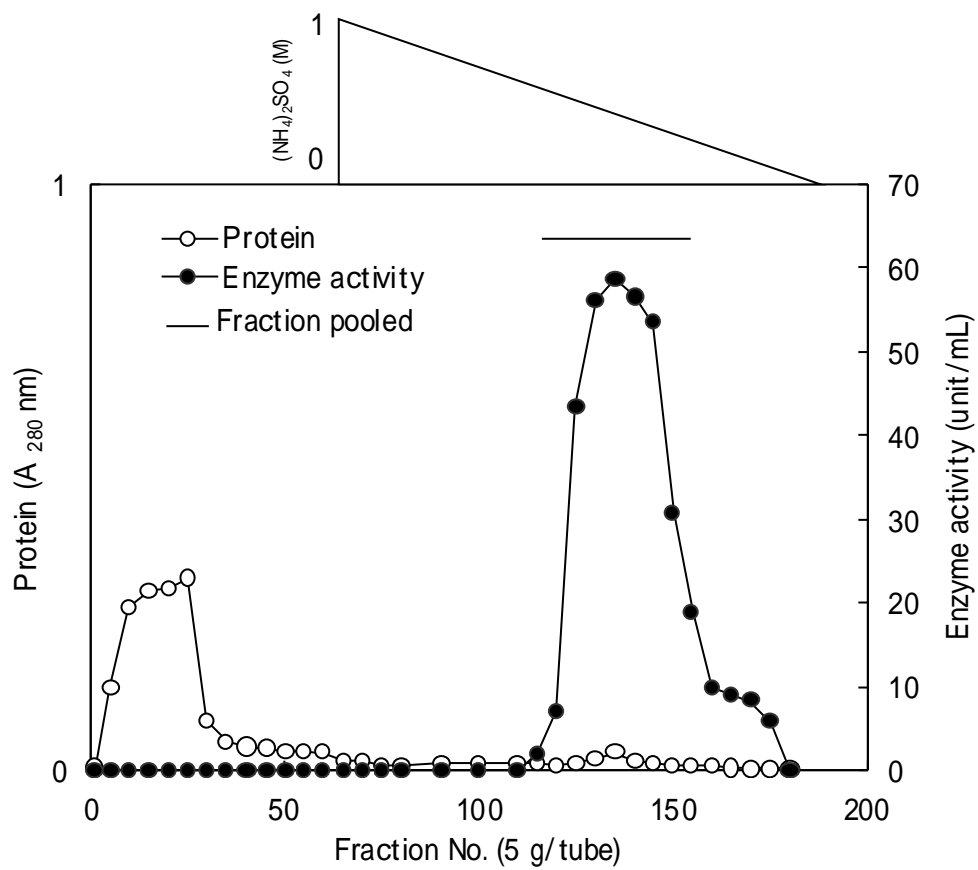


Fig. 3-4 Elution pattern of the enzyme on Butyl-Toyopearl 650 M column chromatography

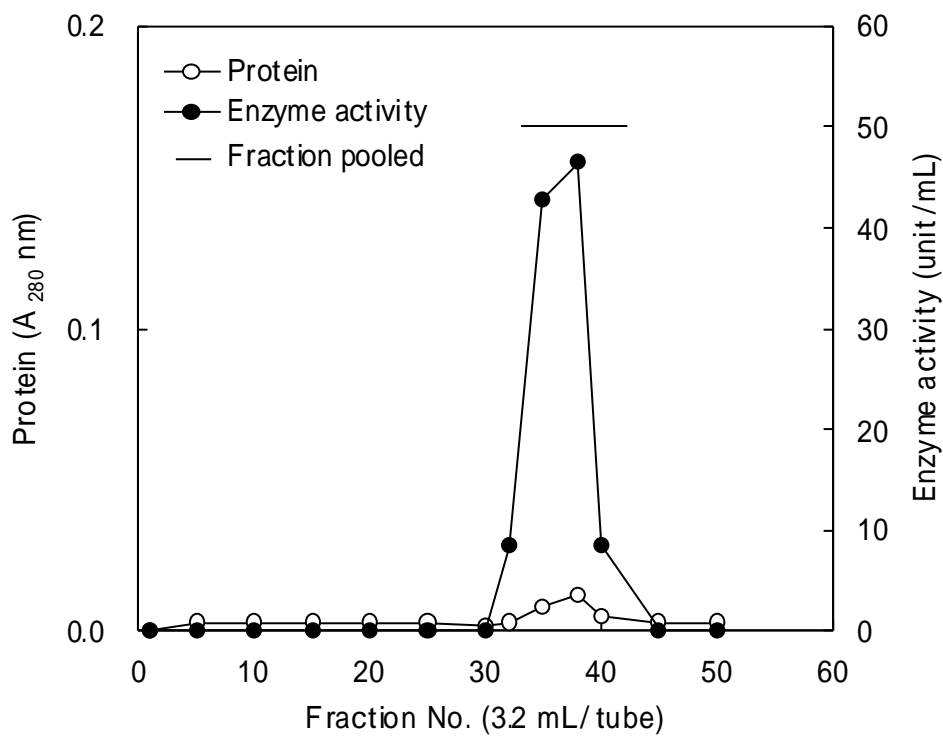
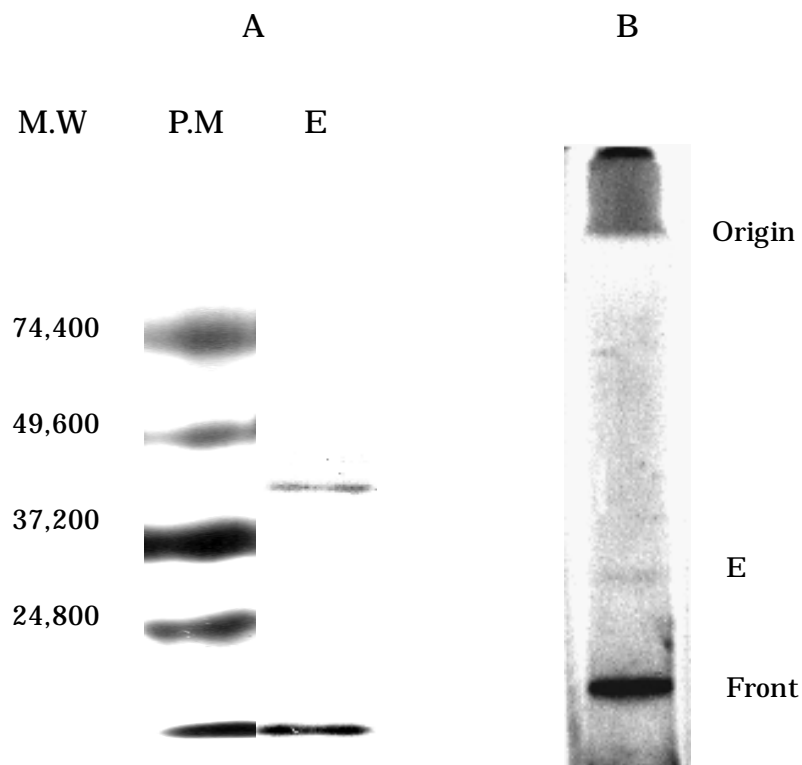


Fig. 3-5 Elution pattern of the enzyme on Toyopearl HW 55-S column chromatography



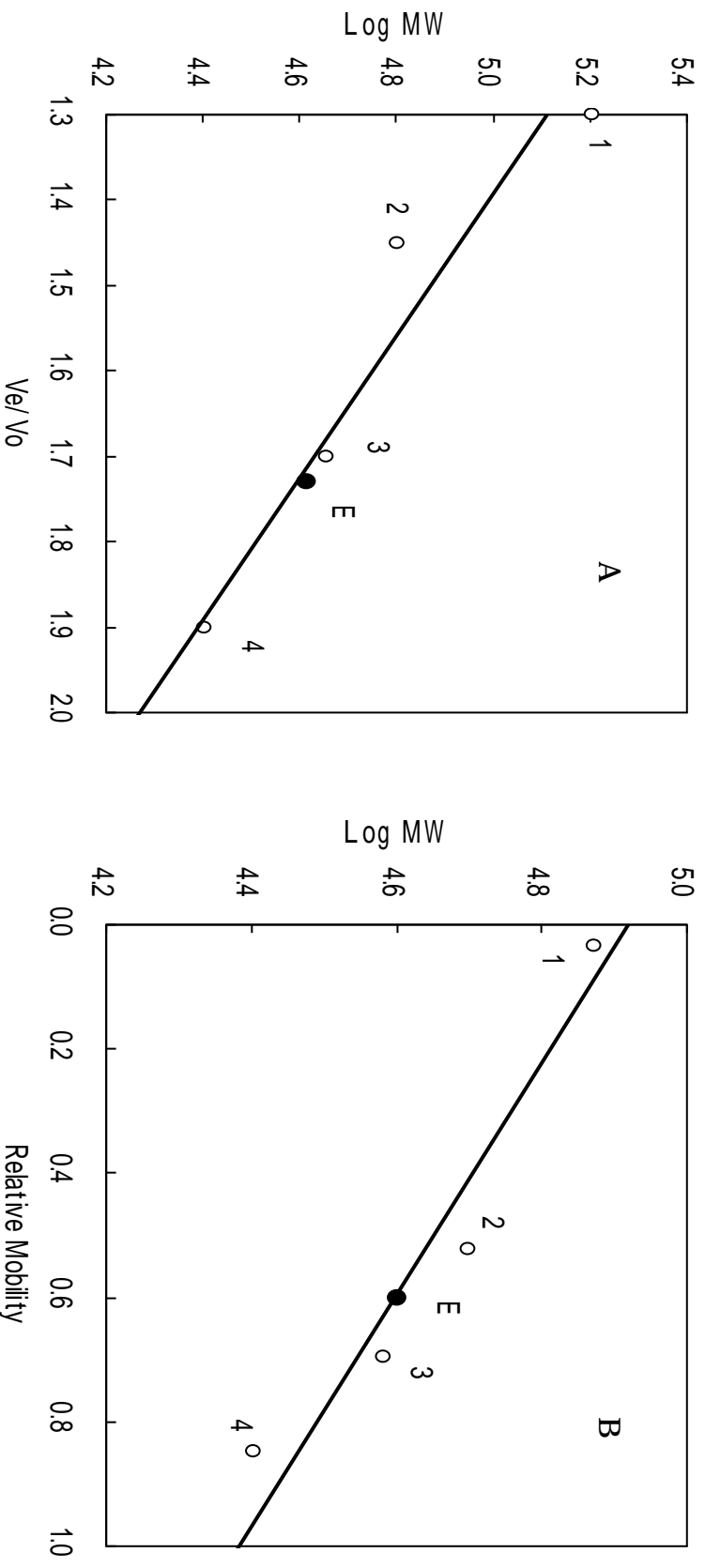
**Table 3-1** Purification of edible burdock PPO

Procedure step	Volume (mL)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (-fold)	Recovery rate(%)
Acetone saturation (20~80%)	126	4361	78	56	1.0	100
DEAE-Cellulofine AL	129	3256	23	142	2.5	75
Butyl-Toyoparl 650 M	58	1813	3	604	10.8	42
Toyoparl HW 55-S	232	930	1	930	16.6	21



**Fig. 3-6 SDS-PAGE (A) and Native-PAGE (B) of the purified enzyme**

M.W: molecular weight, P.M: protein marker, E: purified enzyme.



**Fig. 3-7 Estimation of molecular weight of the enzyme by gel filtration on Toyopearl HW 55-S (A) and SDS-PAGE (B)**

(A) MW: molecular weight,  $V_o$ : void volume of the column,  $V_e$ : elution volume of the substance, 1: -globulin (160,000), 2: bovine serum albumin (65,000), 3: egg albumin (45,000), 4: chymotrypsinogen A (25,000), E: purified enzyme.

(B) 1: cytochrome c hexamer (MW : 74,400 ), 2: cytochrome c tetramer (49,000), 3: cytochrome c trimer (37,200), 4: cytochrome c dimer (24,800), E: purified enzyme.

### 3 - 3 - 4. 酵素の一般的性質

#### 1) 基質特異性

本酵素の種々ポリフェノール化合物に対する酸化活性を調べ、最大活性値を 100 とする相対値で表わし、Table 3-2 に示した。本酵素は *o*-ジフェノール類のうちクロロゲン酸を強く酸化し、ついでエピカテキン（クロロゲン酸に対する活性の約 80%）を酸化したが、カテコール、カフェ酸に対する活性はクロロゲン酸の 30% 以下と比較的低く、カテキン、ドーパミン、DL-ドーパは酸化しなかった。さらに、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロール及び没食子酸、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンであるフロログルシノール、*m*-ジフェノールであるレゾルシノールは全く酸化されなかった。

このような高い ChO 活性はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>、リンゴ<sup>28)</sup>、ニホンナシ<sup>39)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等に認められている。これらの酵素の多くは同時に強い EpO 活性を有することも報告されている。前記のように、ゴボウ酵素も ChO 活性と同時に EpO 活性を有するが、EpO の相対活性は ChO の 80% であり、第 4 章のリーフレタスの場合（ChO に比べ、約 50% の EpO 活性）とはやや異なるようである。また、シュンギク PPO<sup>26)</sup> の場合は ChO と同様程度の EpO 活性を有するようである。一方、サクランボ<sup>21)</sup>、アボカド<sup>22), 25)</sup>等の他の植物の PPO の多くはカテコールや 4-メチルカテコール等を強く酸化し、また、バナナ PPO<sup>30), 31)</sup> やヤマイモ PPO<sup>17)</sup> はドーパミンを強く酸化することが報告されている。このような結果から、PPO の基質特異性は果実、野菜など、酵素の起源となる植物や品種等により多様であると考えられる<sup>2), 30), 31), 34), 61), 62)</sup>。

以上のように、ゴボウ PPO はクロロゲン酸とエピカテキンを強く酸化することが認められたので、以下の諸性質はこれらポリフェノールを基質として調べた。

クロロゲン酸とエピカテキンを用い、基質濃度と反応速度の関係を調べ、

Lineweaver-Burk の方法で作図した結果が Fig. 3-8 である。この図より、本酵素のクロロゲン酸及びエピカテキンに対する  $K_m$  値はそれぞれ 0.4 mM、2.7 mM と算出された。これらの値は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の  $K_m$  値 (クロロゲン酸: 0.67 mM、エピカテキン: 0.91mM) とほぼ一致したが、シュンギク PPO<sup>26)</sup>の  $K_m$  値 (クロロゲン酸: 2.0 mM、エピカテキン: 10 mM) より低かった。このようなキク科植物の PPO は ChO 及び EpO の両活性を有するが、それぞれの基質に対する  $K_m$  値は品種により相違することが明らかになった。

## 2) 最適 pH

クロロゲン酸及びエピカテキンを基質として最適 pH を調べた結果、Fig. 3-9 A に示すように、ChO 及び EpO 活性に対する最適 pH はそれぞれ 5.0 及び 8.0 に見られ、両活性で相違することが認められた。このような両活性に対する同様の pH の影響はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>、ナス<sup>40)</sup>において認められている。一方、ニホンナシ PPO<sup>39)</sup>の場合は ChO、EpO 両活性の最適 pH は 4 であり、球状レタス<sup>27)</sup>等のキク科植物の PPO の場合とは著しく相違することがわかった。したがって、ゴボウ PPO はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>、ナス<sup>40)</sup>などの PPO と同様に酸性側では ChO として、中性ないし微アルカリ側では EpO として強く作用するものと考えられる。

## 3) pH 安定性

本酵素の ChO と EpO に及ぼす pH 安定性を調べ、相対値で表し、Fig. 3-9 B に示した。本酵素は pH 5.0~7.0 の範囲で両酸化活性とも 70% 以上の残存活性を示し、安定であることが認められた。pH 5.0 以下の酸性側において不安定であり、pH 4.0 でほぼ完全に失活した。このような PPO の pH 安定性は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の場合とほぼ同様であった。一方、シュンギク PPO<sup>26)</sup>、バナナ PPO<sup>31)</sup>の場合は pH 4.0~11.0 の広い範囲において安定であることが認められている。したがって、ゴボウ PPO

は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の場合と同様に pH 安定域はやや狭いと思われる。

#### 4) 最適温度

本酵素活性に及ぼす温度の影響を調べた結果を Fig. 3-10 に示した。本酵素の最適温度は ChO と EpO の両活性とも 20 付近に認められた。同様の ChO、EpO 活性が認められている球状レタス PPO<sup>27)</sup>の最適温度は両方とも 30、シュンギク PPO<sup>26)</sup>の最適温度はそれぞれ 30、40 付近に認められており、本酵素はこれらに比べると最適温度は低いと思われる。

#### 5) 熱安定性

本酵素の安定性に及ぼす温度の影響を調べた結果、Fig. 3-11 に示した。ChO、EpO の両活性は 30~40 の範囲で 10 及び 30 分間加熱では約 70%の残存活性を示して安定であった。しかし、本酵素の熱安定性は 50 以上 (10、30 分間) の加熱処理において残存活性はほとんどなくなって不安定であったことが認められた。このような熱安定性はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>等の他のキク科植物 PPO に比べて不安定であった。また、10、30 分間の加熱処理においては ChO の熱安定性の方が EpO のそれよりやや高かった。同様の傾向は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の安定性においても見出されている。

#### 6) 種々の化合物の酵素活性への影響

本酵素活性に及ぼす種々の化合物の影響を調べ、結果は無添加の場合を 100 とする相対値で表し、Table 3-3 に示した。両活性とも他の PPO<sup>26), 27), 39), 40)</sup>と同様に金属酵素阻害剤であるシアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによりほぼ完全に阻害された。従って本酵素は他の植物 PPO と同様に金属<sup>2), 22), 25)-27)</sup> (他の例から見ておそらく銅) を含むと考えられる。

本酵素の ChO 活性はキレート剤であるエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) によって強く阻害されたが、EpO 活性への影響は ChO 活性へのそれに比べると影響は

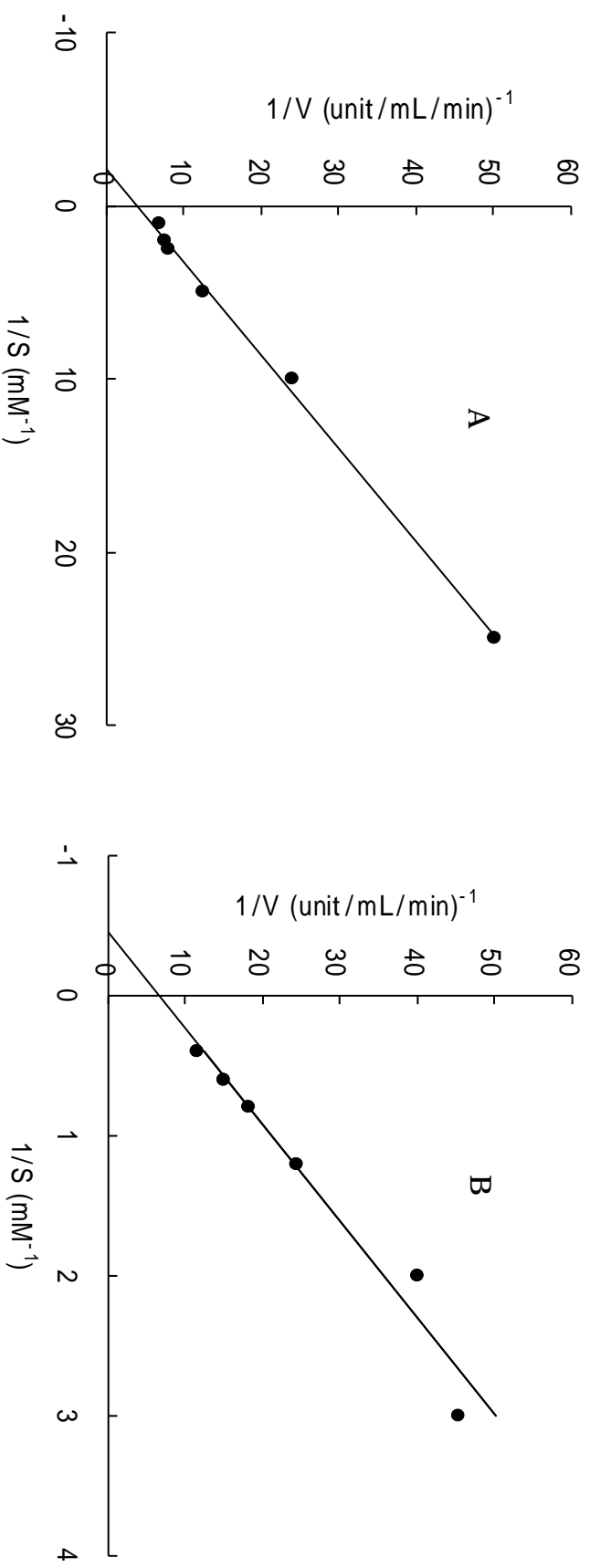
低かった。金属イオンの影響では、本酵素は  $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  により 5 mM の濃度で強く阻害されたが、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  により 10mM の濃度で 50%程度阻害された。これら金属イオンの阻害効果はシュンギク PPO<sup>26)</sup> や球状レタス PPO<sup>27)</sup> でも同様に見出されていた。また、本酵素の ChO 活性は NaF により 10mM の濃度でほぼ完全に阻害されたが、EpO 活性はほとんど阻害されなかった。

本酵素の両活性は NaCl によってもまた強く阻害された。すなわち ChO 活性は 5mM、10mM の濃度の NaCl により 60%以上の活性が阻害された。さらに、NaCl によつての EpO 活性は 5mM、10mM の濃度で 40%の活性が阻害された。同様の傾向は第 4 章のリーフレタスにも見出された。また、還元剤である L-アスコルビン酸と L-システインにより両酸化活性は強く阻害された。このことはゴボウの PPO の阻害剤として L-アスコルビン酸、L-システイン及び NaCl が極めて有効であることを示唆する。

Table 3-2 Substrate specificity of edible burdock PPO

Compounds	Relative Activity (%)
Chlorogenic acid	100
(-)-Epicatechin	80
Catechol	28
Caffeic acid	30
Catechin	0
Dopamine	0
DL-Dopa	0
Pyrogallol	0
Gallic acid	0
Resorcinol	0
Phloroglucinol	0



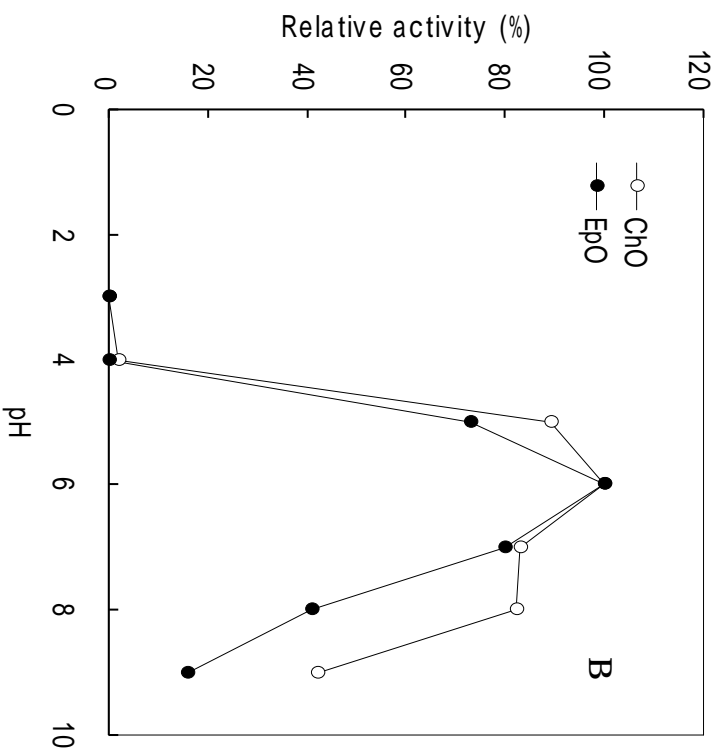
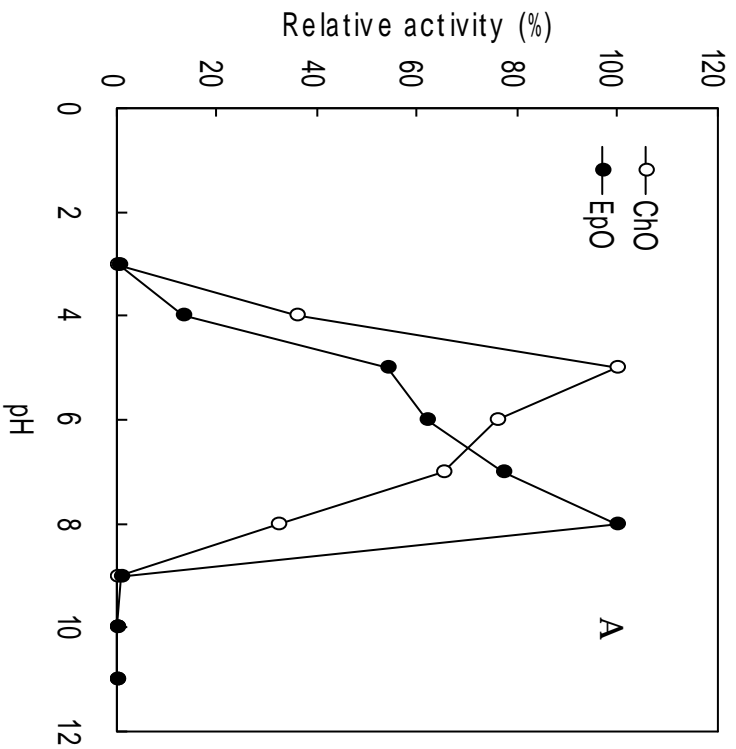


**Fig. 3-8 Lineweaver-burk plot of chlorogenic acid (A) and (-)-epicatechin (B) oxidation by the enzyme**

**A:** Chlorogenic acid oxidation was determined by increasing the concentration of chlorogenic acid from 0.1 to 5 mM using Mellvaine buffer (pH 5.0) at 20 .

**B:** (-)-Epicatechin oxidation was determined by increasing the concentration of (-)-epicatechin from 2 to 50 mM using Mellvaine buffer (pH 8.0) at 20 .

**V:** Rate of the enzyme reaction, **S:** Substrate concentration.



**Fig. 3-9 Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the enzyme**

○ : ChO; chlorogenic acid oxidase activity, ● : EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.

(A) PPO activity was measured at 20 in McIlvaine (pH 3.0 to 8.0) and Atkins & Pantin buffer (pH 9.0 to 12).

(B) PPO was preincubated in McIlvaine (pH 3.0 to 8.0) or Atkins & Pantin buffer (pH 9.0) at 4 for 22 h.

Residual ChO and EpO activities were measured under standard conditions (ChO: pH 5.0 · 20 , EpO: pH 8.0 · 20 ).

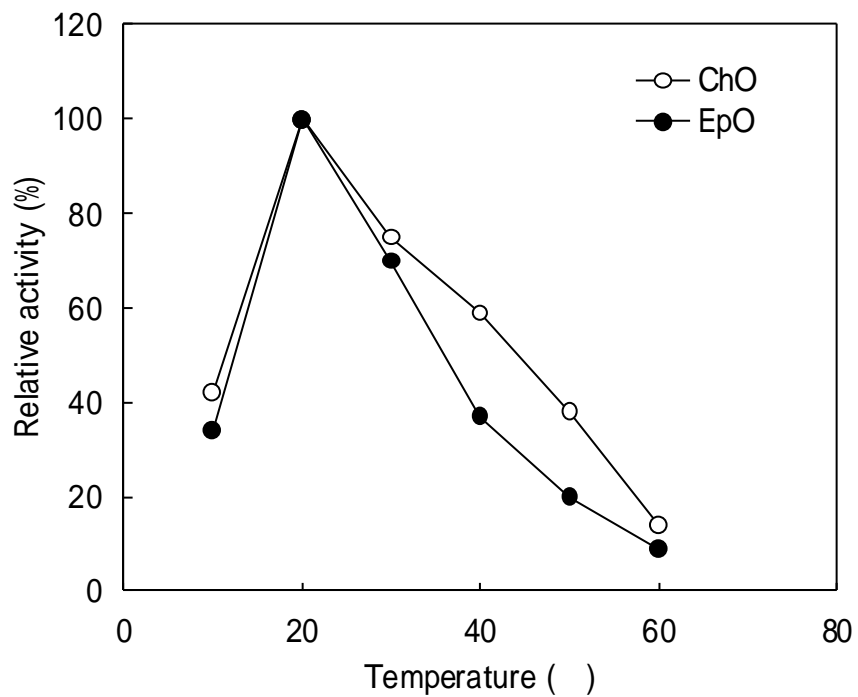


Fig. 3-10 Effect of temperature on the activity of the enzyme

: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, : EpO; (-)-epicatechin oxidase activity. PPO activity was assayed at various temperatures(20~60 °C) in McIlvaine buffer (ChO: pH 5.0, EpO: pH 8.0).

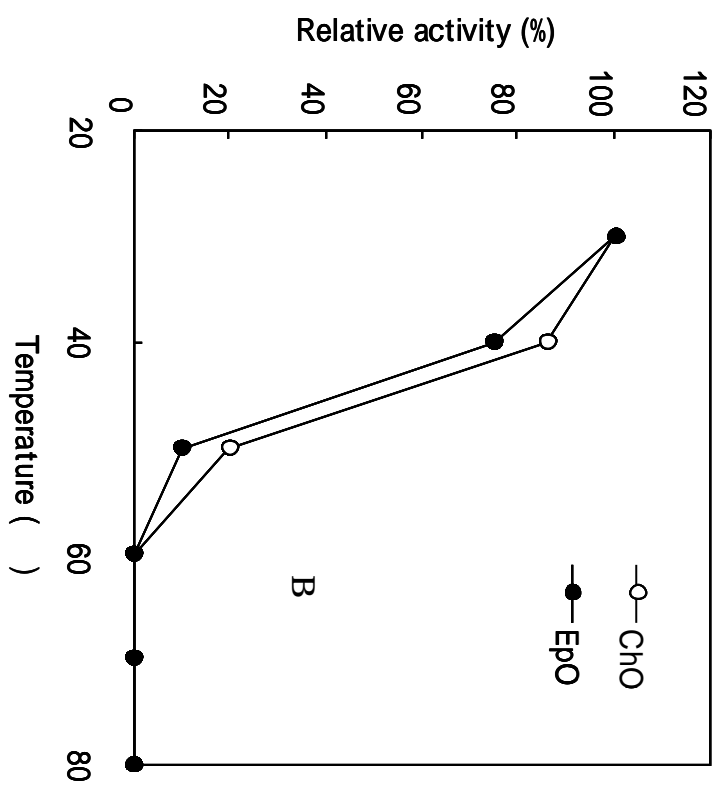
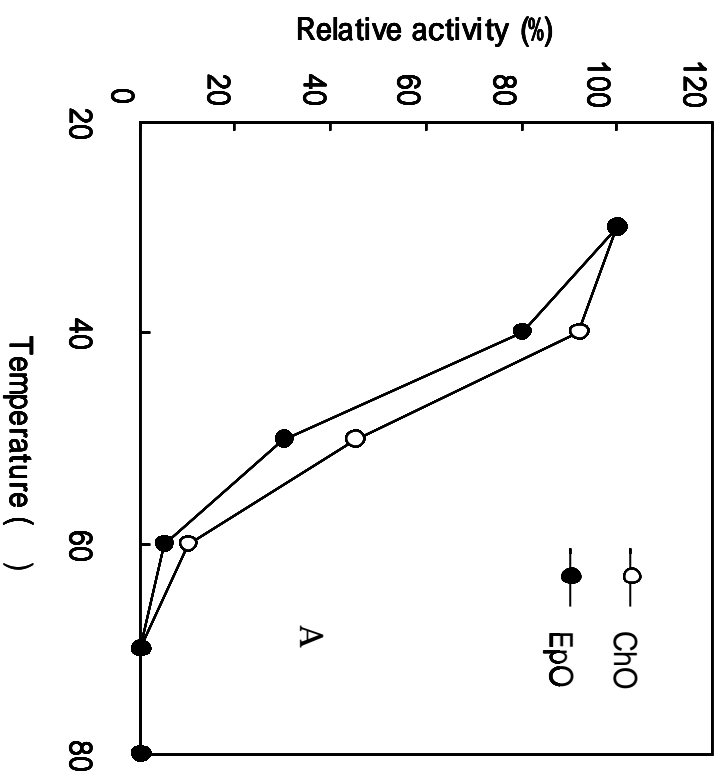


Fig. 3-11 Effect of temperature on the stability of the enzyme

○: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, ●: EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.  
 PPO solution was incubated at various temperatures (30~80 °C) for 10 min (A) and 30min (B) before measuring PPO activity.  
 Residual ChO and EpO activities were measured under standard conditions (ChO: pH 5.0 · 20 °C, EpO: pH 8.0 · 20 °C).

**Table 3-3 Effect of various compounds on edible burdock PPO**

Compounds	Relative activity (%)			
	ChO <sup>a</sup>		(-)-EpO <sup>b</sup>	
	5mM <sup>c</sup>	10mM <sup>c</sup>	5mM <sup>c</sup>	10mM <sup>c</sup>
None	100	100	100	100
Sodium diethyldithiocarbamate	8	0	0	0
KCN	1	0	0	0
EDTA	8	12	71	63
ZnSO <sub>4</sub>	96	66	- d	- d
CuSO <sub>4</sub>	80	49	68	- d
BaCl <sub>2</sub>	13	2	- d	- d
MnCl <sub>2</sub>	10	3	- d	- d
NaF	18	0	86	33
NaCl	34	23	60	60
L-Ascorbic acid	2	0	0	0
L-Cysteine	5	5	0	0

<sup>a</sup> ChO: chlorogenic acid oxidase. The enzyme activity was determined at pH 5 using Mcllvaine buffer.

<sup>b</sup> EpO: (-)-epicatechin oxidase. The enzyme activity was determined at pH 8 using Mcllvaine buffer.

<sup>c</sup> Final concentration of the compound.

<sup>d</sup> Not determined.

### 3 - 4. 小括

(1) ゴボウ抽出液の酵素的褐変反応について反応前後の吸収スペクトルの変化から追究した。その結果、クロロゲン酸がゴボウの褐変反応の主要基質となることが示唆された。

(2) ゴボウ PPO をアセトン分画、DEAE-Cellulofine AL、Butyl-Toyopearl 650M 及び Toyopearl HW 55-S カラムクロマトグラフィーを行い、精製した。精製酵素は Native-PAGE と SDS-PAGE において単一のバンドを示し、最終的に本酵素はアセトン分画後粗酵素液の 16.6 倍に精製され、回収率は約 21%であった。本酵素の分子量はゲル濾過法により 40,900 と推定され、さらに SDS-PAGE による推定分子量は約 40,000 と算出されたことから、本酵素は分子量 40,000 のモノマーであると考えられる。

(3) 精製 PPO はクロロゲン酸及びエピカテキンを強く酸化したが、カテコール等他の *o*-ジフェノール類酸化活性は低く、トリヒドロキシベンゼン酸化活性は認められなかった。本酵素の ChO 活性の最適 pH は 5.0、EpO の最適 pH は 8.0 付近に認められ、両活性とも pH 5.0~7.0 の範囲で安定であった。本酵素の ChO、EpO 両活性の最適温度は 20 付近に認められた。本酵素の熱安定性は両活性とも 40 (10、30 分間) の加熱処理において 70%以上の残存活性を示し、ほぼ安定であったが、60、30 分の加熱処理によりほとんど失活した。

(4) 本酵素の ChO、EpO 両活性はシアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによりほぼ完全に阻害された。両活性は 5mM の Ba<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> の金属阻害剤により強く阻害された。さらに、ChO 活性は NaCl によりも阻害され、その阻害程度は 5mM の濃度で 60%以上であった。また、還元剤である L-アスコルビン酸と L-システインにより両酸化活性は強く阻害された。このことはゴボウの PPO の褐変阻害剤として NaCl、L-アスコルビン酸と L-システインが極めて有

効であることを示唆する。

## 第4章 リーフレタスのポリフェノール酸化酵素の精製とその性質

### 4 - 1. 緒 言

レタス (*Lactuca sativa* L.) は古くから世界的に生食用にされていたキク科アキノノゲシ属の一年生草本植物であり、日本でも明治時代に導入され<sup>1)</sup>、食事の欧風化に伴ってサラダや肉料理等の付け合せに欠かせない存在になっている。前章においてキク科植物のうちゴボウの PPO について精製し、精製酵素の性質を調べた。その結果、ゴボウ PPO が強い ChO 活性と同時に EpO 活性を有し、両活性の最適 pH が相違すること等を明らかにした。さらに筆者らの研究室では先にキク科野菜であるシュンギク<sup>26)</sup>や球状レタスの PPO<sup>27)</sup>を精製し、その性質等について調べ、これらの精製 PPO もゴボウと同様に ChO、EpO の両活性を有するが、両活性の比活性等が相違することを明らかにしている。レタスにはリーフレタス (Leaf lettuce)、タチチシャ (Cos lettuce) 等の多くの品種や系統が栽培されている。バナナにおいては品種や系統により PPO の性質等が相違することが報告されている<sup>30), 31), 61), 62)</sup>。したがって、レタス PPO においてもそれぞれの品種や系統により PPO の性質等に差が見られるのではないかと考えられる。そこで、本実験ではクロロゲン酸を基質としてリーフレタスの PPO を精製し、精製酵素の性質等を同じキク科野菜であるシュンギク PPO<sup>26)</sup>、球状レタス PPO<sup>27)</sup>などのそれと比較を試みた。

### 4 - 2. 材料及び方法

#### 4 - 2 - 1. 材料と試薬

熊本県旭志村で栽培されたリーフレタスを市場より購入し、使用した。CM-Sephadex C-50 は Pharmacia (東京、日本)より、SDS-PAGE 用の蛋白質標準



キットは BIO RAD (東京、日本) より購入した。他の試薬は 3 - 2 - 1 に示した通りである。

#### 4 - 2 - 2. 蛋白質定量

定量については 3 - 2 - 3 と同様の方法で行った。

#### 4 - 2 - 3. 酵素活性の測定法

3 - 2 - 4 と同様の方法で行った。

#### 4 - 2 - 4. 酵素精製

酵素液の調製及び精製方法を Fig. 4-1 に示した。

##### 1) 粗酵素液の調製

1.8 kg のリーフレタスを 1.8 L の 2 % NaCl、1 % L-アスコルビン酸、0.5 % Tween 80 および 1 % polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) を含む氷冷した 0.1 M リン酸緩衝液とともにミキサーで磨砕した後、綿布で濾過し、4℃、10300 × g、20 分間遠心分離 (以後遠心分離はすべてこの条件で行った) を行い、その上澄を抽出液とした。抽出液に 80 % (w/v) 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、低温室 (4℃) で一晩放置した後、同様の条件で遠心分離を行い、沈殿を少量の 0.01 M リン酸緩衝液に溶解後、脱イオン水に対して透析を行った。この膜内液について、遠心分離を行い、不溶物を除去した上澄を粗酵素液とした。

##### 2) DEAE-Cellulofine AL カラムクロマトグラフィー

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-Cellulofine AL カラム (4.5 × 25 cm) に、粗酵素液を添加し、同一緩衝液を流下した。吸着された蛋白質画分を NaCl 濃度が 0~1.0 M となるようにグラジエント溶出を行った。

### 3) CM-Sephadex C-50 カラムクロマトグラフィー

DEAE-Cellulofine カラムでの活性画分を集め 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した CM-Sephadex C-50 カラム (2.1×25 cm) に添加し、同一緩衝液を流下した。素通りした活性画分を集め、1 M となるように硫酸アンモニウムを添加した。

### 4) Butyl-Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィー

1.0 M 硫酸アンモニウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M カラム (1.1×24.5 cm) に CM-Sephadex C-50 活性画分を添加し、硫酸アンモニウム濃度が 1.0~0 M となるようにグラジエントで流下した後、0.01 M リン酸緩衝液で溶出した。酵素活性画分を集め、脱イオン水に対して透析を行い、メンブランフィルターより限外濾過 (YM-10、透過分子量: 10,000) により濃縮した。

### 5) Toyopearl HW 55-S カラムクロマトグラフィー

前記濃縮液を 0.1 M リン酸緩衝液で平衡化した Toyopearl HW 55-S カラム (1.7×90 cm) に添加し、同緩衝液で溶出した。PPO 活性画分を集め、精製酵素として以下の実験に使用した。

#### 4 - 2 - 5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

3 - 2 - 6 と同様の方法で行った。

#### 4 - 2 - 6. 分子量の推定

分子量の推定をゲル濾過と SDS-PAGE を用いて行った。なお分子量推定の詳細な方法については 3 - 2 - 7 に示した。SDS-PAGE 蛋白質分子量マーカーとして、myosin(分子量 214,000)、 $\beta$ -galactosidase (118,000)、bovine serum albumin

(92,000)、ovalumin (52,200)、carbonic anhydrase (35,700)、soybean trypsin (28,900)、lysozyme (20,800)を用いた。

#### 4 - 2 - 7. 酵素の一般的性質

本酵素の一般的性質を 3 - 2 - 8 と同様に調べた。

### 4 - 3. 結果及び考察

#### 4 - 3 - 1. 酵素の精製

粗酵素について、DEAE-Cellulofine AL クロマトグラフィーを行った結果が Fig. 4-2 である。本酵素はカラムに吸着せず、素通りしたので、この画分を活性画分として集めた。この画分について CM-Sephadex C-50 クロマトグラフィーを行った結果、Fig.4-3 に示すように、本酵素はカラムに吸着せずに素通りしたので、この画分を活性画分として集めた。この画分について Butyl-Toyopearl 650 M クロマトグラフィーを行った結果、Fig. 4-4 に示すように、本酵素は 0.01 M リン酸緩衝液で溶出した。溶出した酵素液の活性画分 (90 mL) を集め、脱イオン水に対して透析後、限外濾過膜 (YM-10) を用いて 15 mL まで濃縮した。前記濃縮液のうち 3 mL について Toyopearl HW 55-S クロマトグラフィーを行った。その結果 Fig. 4-5 示すように、酵素活性、蛋白質とも単一ピークとして溶出したので、この画分を活性画分として集め、精製酵素として以下の実験に使用した。なお、各精製段階におけるリーフレタス PPO の蛋白質量、比活性、回収率などについては Table 4-1 に示した。本酵素は最終的に粗酵素液の 23.4 倍に精製され、回収率は 13.3% であった。

#### 4 - 3 - 2. 酵素の均一性及び分子量

前記 Fig. 4-5 に示したように精製の最終段階である Toyopearl HW 55-S クロマトグラフィーにおいて蛋白質と ChO 活性の溶出ピークは一致し、ゲル濾過的に均一であることが明らかとなった。さらに Native-PAGE 及び SDS-PAGE を行った結果、Fig. 4-6 に示すように本酵素はいずれの場合も単一のバンドを示し、電気泳動的に均一であった。

本酵素の分子量は Fig. 4-7 に示すように Toyopearl HW 55-S を用いたゲル濾過法で 45,000 と算出された。また、SDS-PAGE による本酵素の分子量は 46,000 であること (Fig. 4-6) から、本酵素は分子量約 46,000 のモノマーであると考えられる。このような本酵素の分子量はドーパミン酸化活性を有するバナナ果肉 PPO<sup>31)</sup> (42,000) の分子量よりやや大きかったが、ChO 活性を有するリンゴ PPO<sup>28)</sup> (65,000) やニホンナシ PPO<sup>39)</sup> (56,000) の分子量よりやや小さかった。さらに、他のキク科植物 PPO と比較すると、シュンギク PPO<sup>26)</sup> (45,000) の分子量とほぼ一致したが、球状レタス PPO<sup>27)</sup> (56,000) の分子量より小さかった。このような栽培品種、系統等による PPO の分子量の相違はバナナにおいても認められており<sup>2), 30), 31), 61), 62)</sup>、PPO の多様性を示す一つの結果であると考えられる。

### **Leaf lettuce ( 1.8 Kg)**

- Homogenized with 0.1 M PB (phosphate buffer, pH 7.0) contained 2% NaCl, 1% L-ascorbic acid, 0.5% Tween 80 and 1% PVPP (polyvinylpolypyrrolidone)
- Centrifuged at 10300 × g in 4 for 20 min

### **Crude extract**

- 80% ammonium sulfate saturation
- Centrifuged at 10300 × g in 4 for 20 min
- Collected precipitate and dialyze
- Centrifuged at 10300 × g for 20 min. at 4

### **Crude enzyme**

- Added to DEAE-Cellulofine AL (gradient: 0 M~1.0 M NaCl in 0.01 M PB)
- Added to CM- Sephadex C-50 (eluted with 0.01 M PB)
- Added to Butyl-Toyopearl 650 M (gradient: 1.0~0 M in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 0.01 M PB)
- Added to Toyopearl HW 55-S (eluted with 0.1 M PB)

### **Purified enzyme**

Fig. 4-1 Procedure of leaf lettuce PPO purification

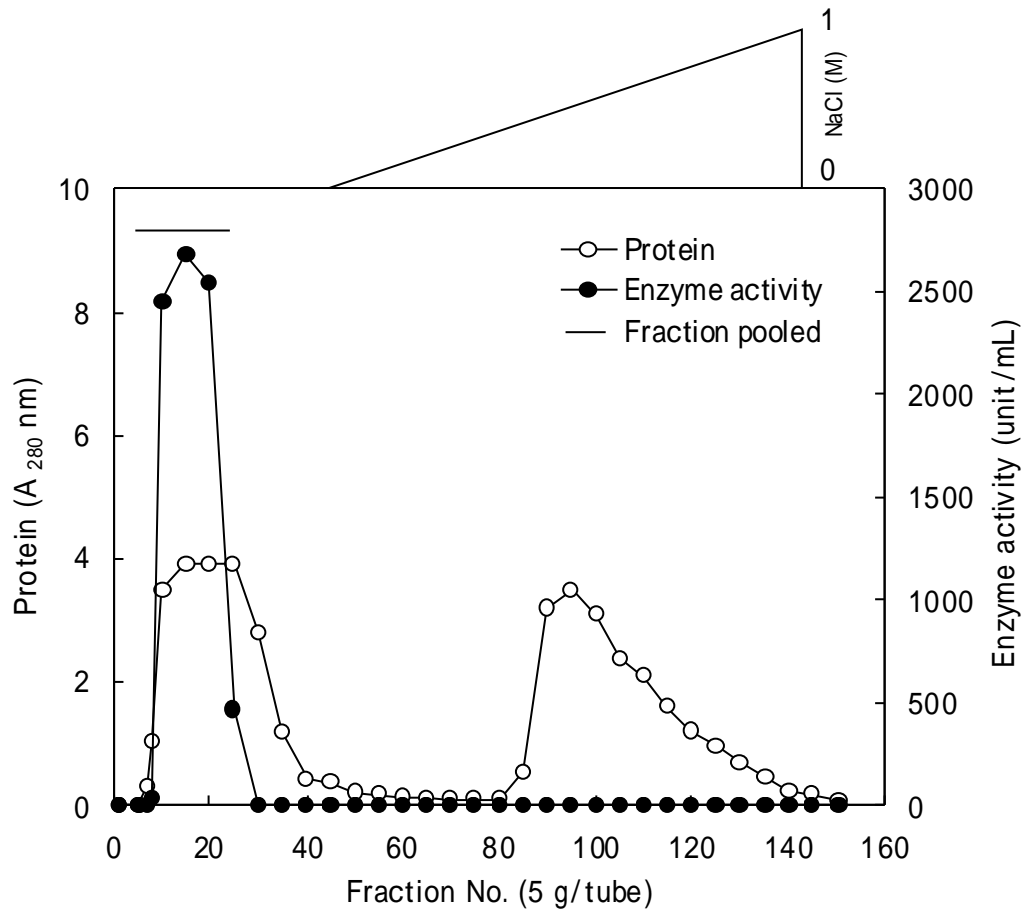


Fig. 4-2 Elution pattern of the enzyme on DEAE-Cellulofine AL column chromatography

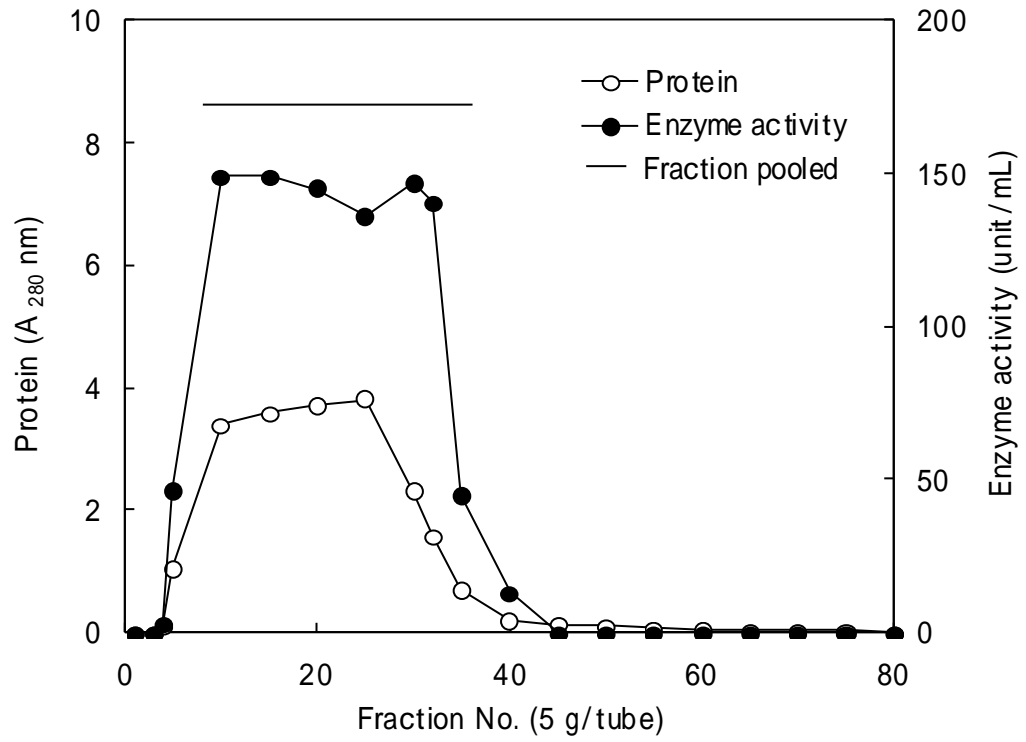


Fig. 4-3 Elution pattern of the enzyme on CM-Sephadex C-50 column chromatography

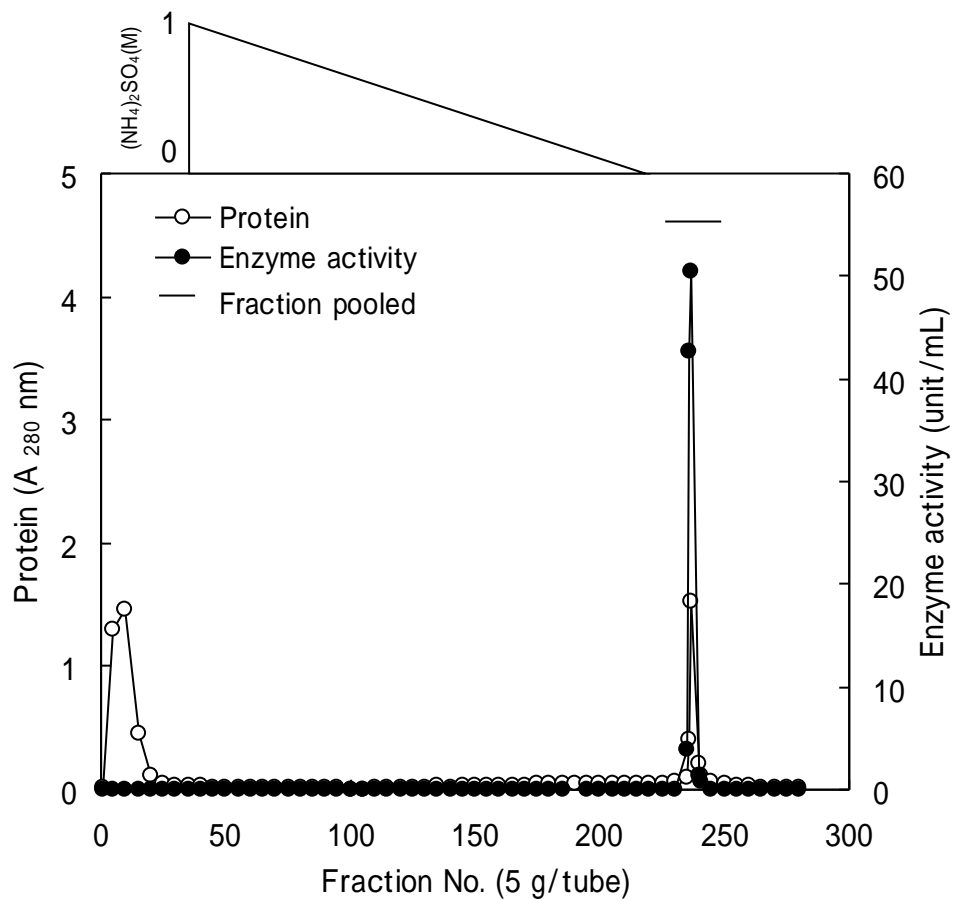


Fig. 4-4 Elution pattern of the enzyme on Butyl-Toyopearl 650 M column chromatography



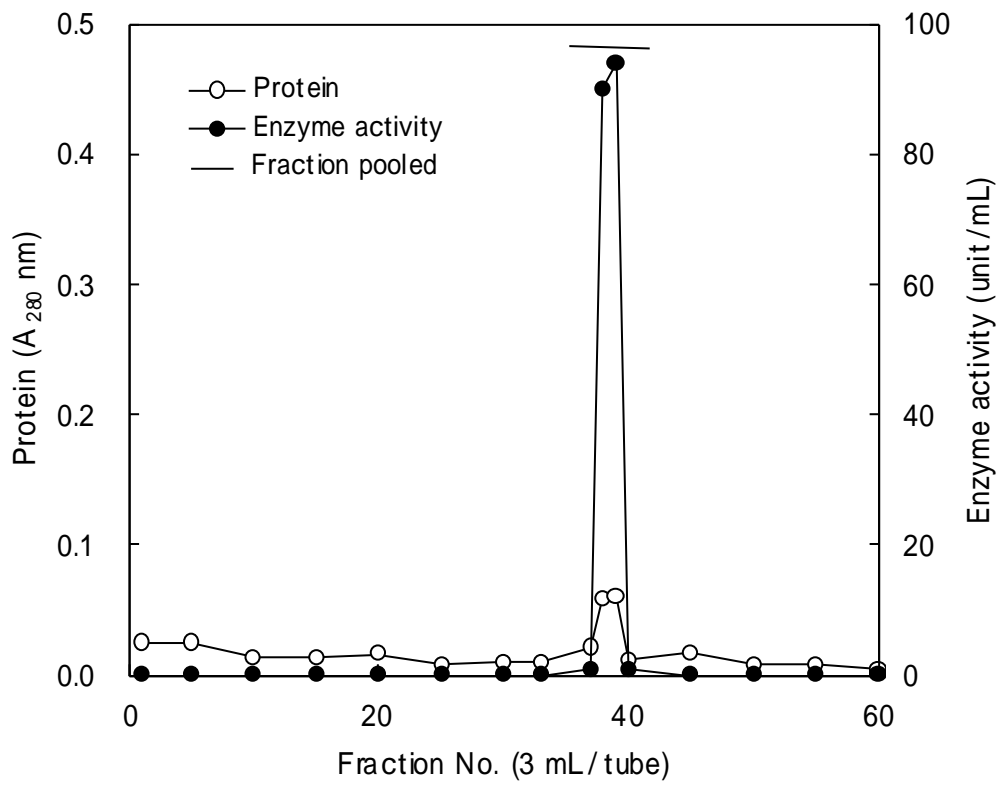


Fig. 4-5 Elution pattern of the enzyme on Toyopearl HW 55-S column chromatography

Table 4-1 Purification of leaf lettuce PPO

Procedure step	Volum (mL)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (-fold)	Recovery rate(%)
80% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturation	660	51740	2811	18.4	1.0	100.0
DEAE-Cellulofine AL	726	33980	1234	27.5	1.5	66.0
CM-Sephadex C-50	1067	25860	903	28.6	1.6	50.0
Butyl-Toyopearl 650 M	534	8060	56	144.0	7.8	16.0
Toyopearl HW 55-S	1027	6880	16	430.0	23.4	13.3

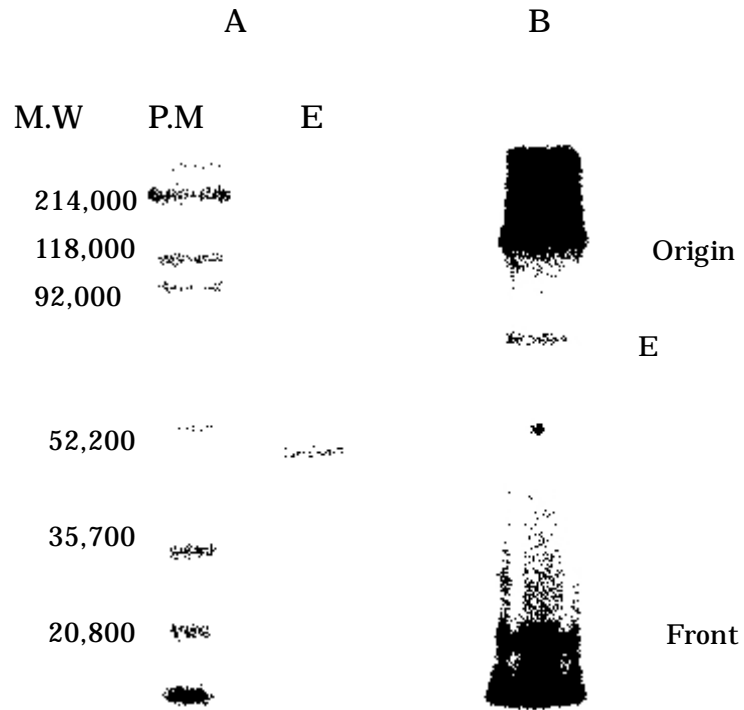
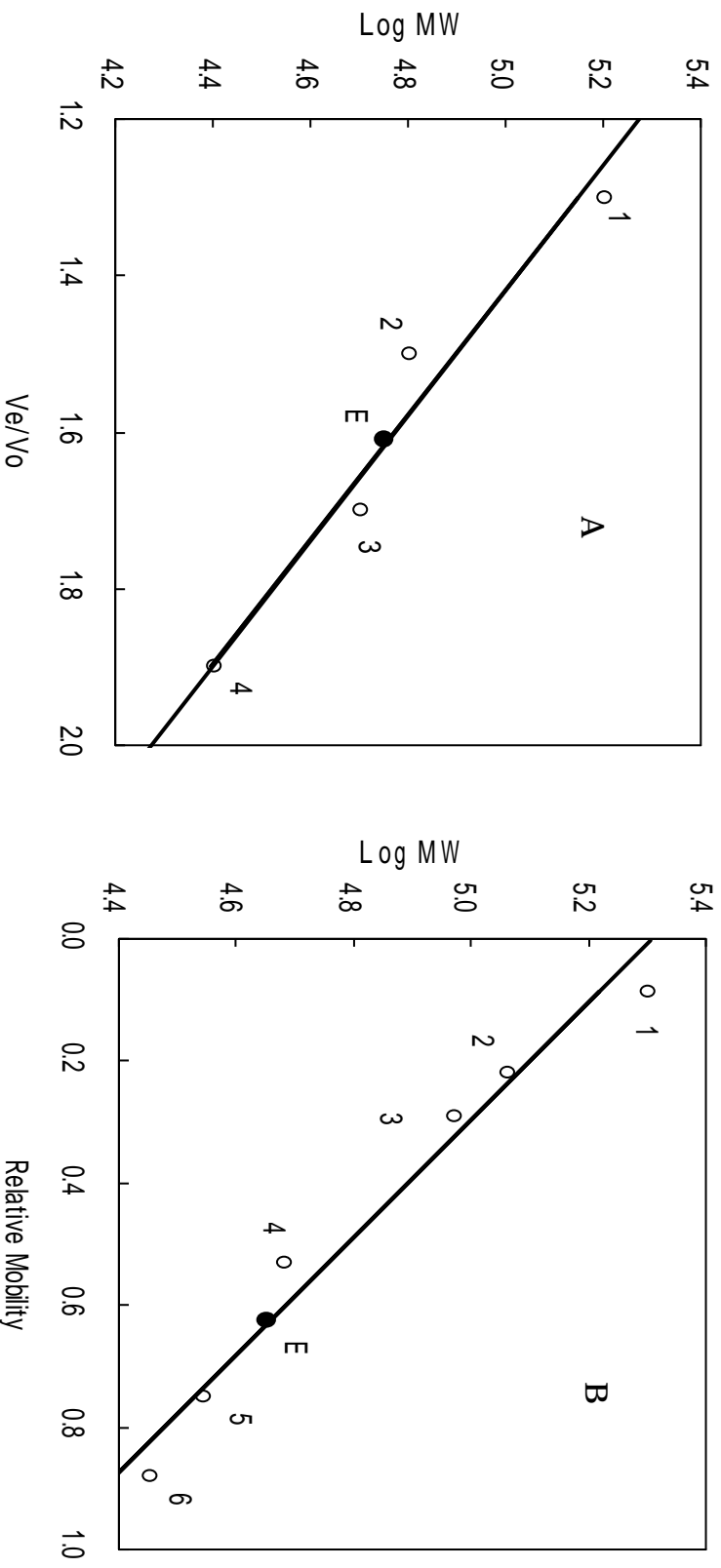


Fig. 4-6 SDS-PAGE (A) and Native-PAGE (B) of the purified enzyme

M.W: molecular weight, P.M: protein marker, E: purified enzyme.



**Fig. 4-7 Estimation of molecular weight of the enzyme by gel filtration on Toyopearl HW 55S (A) and SDS-PAGE (B)**

(A) MW: molecular weight,  $V_o$ : void volume of the column,  $V_e$ : elution volume of the substance, 1: r-globulin; (160,000), 2: bovine serum albumin (65,000), 3: egg albumin (45,000), 4: chymotrypsinogen A (25,000), E: purified enzyme.  
 (B) 1: Myosin (Molecular weight: 214,000), 2:  $\beta$ -galactosidase(118,000), 3: Bovine serum albumin (92,000), 4: Ovalbumin (52,200), 5: Carbonic anhydrase (35,700), 6: Soybean trypsin (20,800); E, purified enzyme.

### 4 - 3 - 3. 酵素の一般的性質

#### 1) 基質特異性

本酵素の種々ポリフェノール化合物に対する酸化活性を調べた結果は最大活性値を 100 とする相対値で表わし、Table 4-2 に示した。本酵素は *o*-ジフェノール類であるクロロゲン酸を強く酸化し、ついでエピカテキンを酸化したが、EpO 活性は ChO 活性の 54%であった。カテコール、カテキン、カフェ酸酸化活性は ChO 活性の 25%以下と比較的に低く、DL-ドーパ、ドーパミンは全く酸化されなかった。また、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロール及び没食子酸、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンであるフロログルシノール、*m*-ジフェノールであるレゾルシノールは全く酸化されなかった。

このような ChO 活性はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>、リンゴ<sup>28)</sup>、ニホンナシ<sup>39)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等に認められている。また、サクランボ<sup>21)</sup>、アボカド<sup>22), 25)</sup>などの PPO の多くはカテコールや 4-メチルカテコール等を強く酸化し、また、バナナ PPO<sup>30), 31)</sup>はドーパミンを強く酸化することが報告されている。さらに、リーフレタスと同じキク科に属するシュンギク<sup>26)</sup>や球状レタス<sup>27)</sup>の PPO も本実験のリーフレタスと同様に ChO 活性と同時に強い EpO 活性を有するが、いずれの酵素も ChO 活性は相対的にやや高いようである。このように、果実、野菜の PPO は起原により基質特異性に多様性を示すことが明らかである<sup>2), 30), 31), 34), 61), 62)</sup>。

以上のように、リーフレタス PPO はクロロゲン酸とエピカテキンを強く酸化することが認められたので、以下の諸性質はこれらポリフェノールを基質として調べた。

クロロゲン酸とエピカテキンを用い、基質濃度と反応速度の関係を調べ、Lineweaver-Burk の方法で作図した結果が Fig. 4-8 である。この図より、本酵素のクロロゲン酸及びエピカテキンに対する *K<sub>m</sub>* 値はそれぞれ 1.0 mM と 1.4 mM と

算出された。これらの値は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の  $K_m$  値 (クロロゲン酸: 0.67 mM、エピカテキン: 0.91 mM) とほぼ一致したが、シュンギク PPO<sup>26)</sup>の  $K_m$  値 (クロロゲン酸: 2.0 mM、エピカテキン: 10 mM) より低かった。

## 2) 最適 pH

これまである種の PPO は使用する基質により異なった最適 pH 値を示すことが報告されている。例えば、ピーマン PPO<sup>63)</sup>の場合クロロゲン酸とピロカテコールを強く酸化するが、最適 pH はそれぞれ 4.0 と 7.0 である。また、ピーマン PPO<sup>63)</sup>の場合はクロロゲン酸とピロカテコールを強く酸化し、最適 pH 値はそれぞれ 4.0 及び 7.8 に認められている。そこで本酵素についてもクロロゲン酸及びエピカテキンを基質として最適 pH を調べた。その結果 Fig. 4-9 A に示すように、ChO 及び EpO に対する最適 pH はそれぞれ 5.0 及び 8.0 に認められた。この結果は球状レタス<sup>27)</sup> (ChO: pH 4.5, EpO: pH 7.8) およびシュンギク<sup>26)</sup> (ChO: pH 4.0, EpO: pH 8.0) の場合と類似した。一方、ニホンナシ PPO<sup>39)</sup>も本酵素と同様にクロロゲン酸とエピカテキンを強く酸化するが、両基質に対する最適 pH は 4.2 であり、レタス等のキク科植物の PPO の場合とは著しく相違するようである。さらにクロロゲン酸を基質とした時、酸性側に最適 pH を有する PPO は、他にナス<sup>40)</sup>、リンゴ<sup>28)</sup>等に見出されている。一方、エピカテキン、ピロカテコール、4-メチルカテコール、ドーパミンを基質として用いた場合の最適 pH 値は、サクランボ<sup>21)</sup>、アボカド<sup>22), 25)</sup>、バナナ<sup>31)</sup>果実において中性付近に認められている。前記のように多くの青果物 PPO の ChO 活性の最適 pH は 4.0 付近である。従ってこれら青果物の ChO は酸性 PPO であると考えられる。いずれにしても、リーフレタス PPO はシュンギク<sup>26)</sup>、ナス<sup>40)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>などの PPO と同様に酸性側では ChO として、中性ないし微アルカリ側では EpO として強く作用するものと考えられる。

## 3) pH 安定性

本酵素の ChO と EpO の両活性に及ぼす pH 安定性を調べ、最大活性値を 100 とする相対値で表し、Fig. 4-9 B に示した。pH5.0~8.0 の範囲で両酸化活性とも 70%以上の残存活性を示し、ほぼ安定であることが認められた。このような PPO の pH 安定性は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の場合とほぼ同様であった。一方、同じキク科のシュンギク PPO<sup>26)</sup>、ドーパミンを酸化するバナナ PPO<sup>31)</sup>の場合は pH4.0~11.0 の広い範囲において安定であることが認められている。したがって、リーフレタスや球状レタス PPO<sup>27)</sup>の pH 安定域はシュンギク<sup>26)</sup>や他の多くの植物 PPO<sup>17), 31), 49)</sup>のそれらよりやや狭いと思われる。

#### 4) 最適温度

本酵素活性に及ぼす温度の影響を調べた結果を Fig. 4-10 に示した。本酵素の最適温度は ChO と EpO の両活性とも 30 付近に認められた。同様の最適温度は球状レタス PPO<sup>27)</sup>において見出されたが、同じキク科植物であるシュンギク PPO<sup>26)</sup>では ChO、EpO の両活性の最適温度はそれぞれ 30 、40 付近に認められており、前章のリーフレタスや球状レタス PPO<sup>26)</sup>の場合とはやや相違するように思われる。

#### 5) 熱安定性

本酵素の熱安定性に及ぼす温度の影響を調べた結果を Fig. 4-11 に示した。リーフレタス PPO は 80 、10 分間の加熱処理においては両活性とも 35%以上の残存活性を示したが、30 分間の加熱処理では著しく不安定となり、80 で、30 分間の加熱処理ではほとんど失活した。この熱安定性はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>、バナナ<sup>31)</sup>等他の植物 PPO に比べても高いものであった。また、本実験のリーフレタス PPO の場合、10 分間の加熱処理においては EpO 活性の熱安定性の方が ChO 活性のそれより、やや高かった。同様の傾向はシュンギク PPO の安定性においても見出されている。一方、球状レタス<sup>27)</sup>の場合は逆に ChO 活性の安定性の方が、

EpO 活性のそれよりやや高いようであり、レタス品種や系統により差が生じたものと思われる。

#### 6) 種々の化合物の酵素活性への影響

本酵素活性に及ぼす種々の化合物の影響を調べ、結果は無添加の場合を 100 とする相対値で表し、Table 4-3 に示した。両活性とも他の PPO と同様に金属酵素阻害剤であるシアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによりほぼ完全に阻害された。従って本酵素は他の植物 PPO と同様に金属<sup>2), 22), 25)~27)</sup>を含むと考えられる。

本酵素の ChO 活性は、また、Cu<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>等の金属イオンにより 5 mM の濃度で強く阻害された。これら金属イオンの阻害効果はシュンギク PPO<sup>26)</sup>や球状レタス PPO<sup>27)</sup>でも同様に見出されているが、本酵素に対する阻害効果の方がこれら酵素に対するものよりも大きいようであった。また、本酵素の ChO、EpO の両活性は NaF により 5 mM の濃度でほぼ完全に阻害された。さらに、本酵素の両活性は NaCl によって著しく強く阻害された。すなわち ChO 活性は 5 mM の NaCl によりほぼ完全に阻害された。EpO 活性は 5 mM、10 mM の濃度でそれぞれ 16%、93%阻害された。また、還元剤である L-アスコルビン酸と L-システインにより両酸化活性は強く阻害された。このことはリーフレタス PPO の阻害剤として L-アスコルビン酸、L-システインと NaCl 等が極めて有効であることを示唆する。



**Table 4-2 Substrate specificity of leaf lettuce PPO**

Substrate	Relative activity (%)
Chlorogenic acid	100
(-)-Epicatechin	54
Catechol	25
Catechin	21
Caffeic acid	19
DL-Dopa	0
Dopamine	0
Resorcinol	0
Phloroglucinol	0
Gallic acid	0
Pyrogallol	0

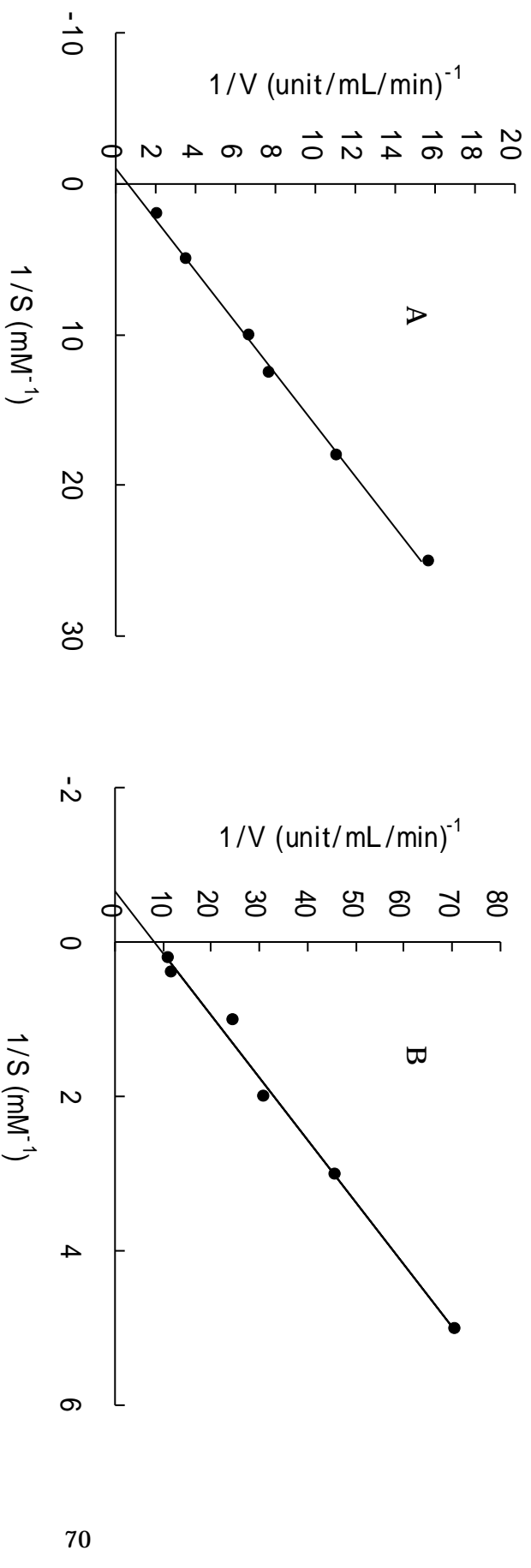


Fig. 4-8 Lineweaver-burk plot of chlorogenic acid (A) and (-)-epicatechin (B) oxidation by the enzyme

A: Chlorogenic acid oxidation was determined by increasing the concentration of chlorogenic acid from 0.1 to 5 mM using Mellvaine buffer (pH 5.0) at 30 .

B: (-)-Epicatechin oxidation was determined by increasing the concentration of (-)-epicatechin from 2 to 50 mM using Mellvaine buffer (pH 8.0) at 30 .

V: Rate of the enzyme reaction, S: Substrate concentration.

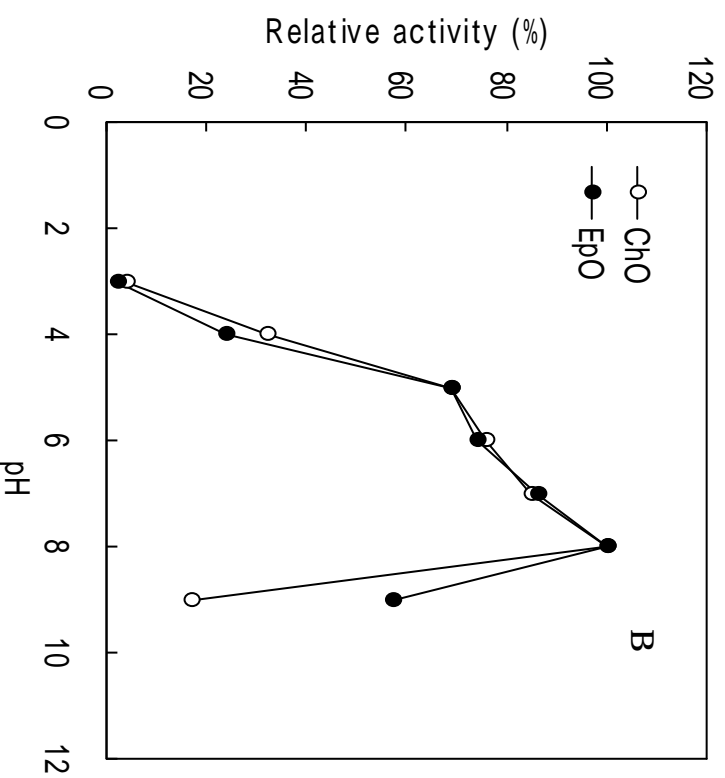
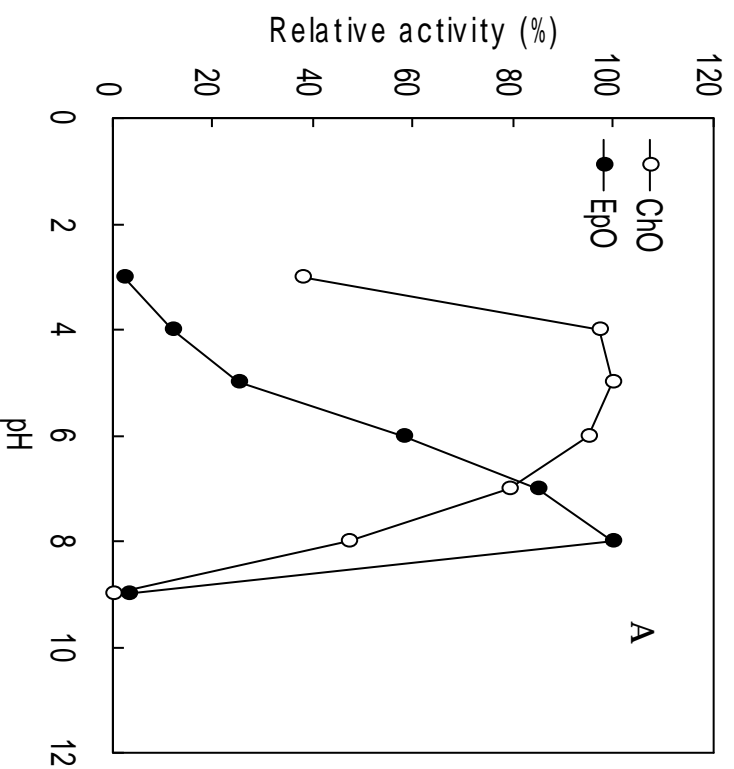


Fig. 4-9 Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the enzyme

○: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, ●: EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.

(A) PPO activity was measured at 30 min in McIlvaine (pH 3.0 to 8.0) and Atkins & Pantin buffer (pH9).

(B) PPO was preincubated in McIlvaine (pH 3.0 to 8.0) or Atkins & Pantin buffer (pH9) at 4 °C for 22h.

Residual ChO and EpO activity were measured under standard conditions (ChO: pH 5.0 · 30 min, EpO: pH 8.0 · 30 min).

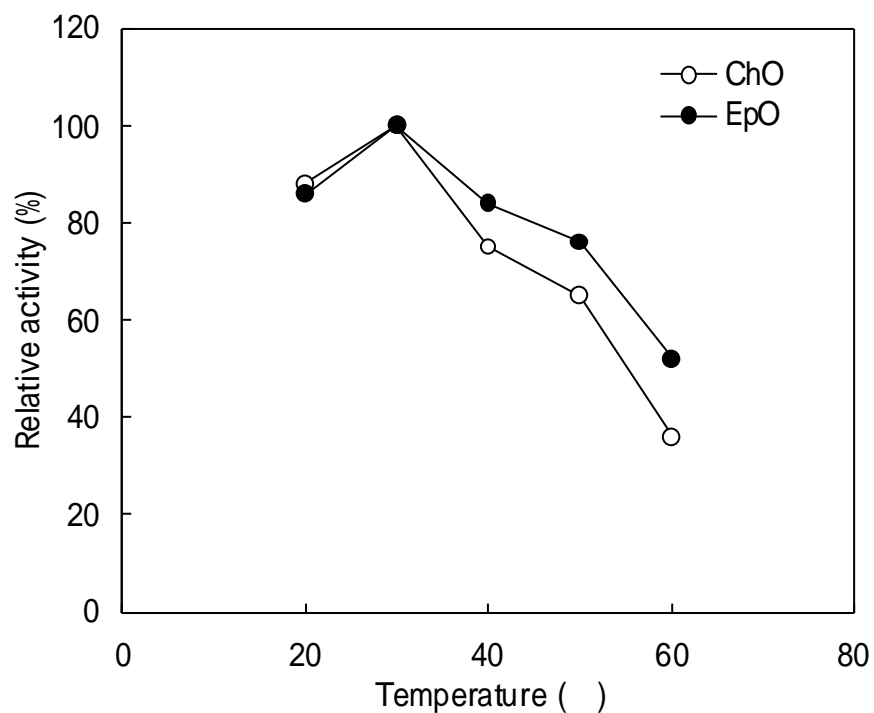


Fig.4-10 Effect of temperature on the activity of the enzyme

: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, : EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.  
 PPO activity was assayed at various temperatures(20~60 °C) in McIlvaine buffer (ChO: pH 5.0, EpO: pH 8.0).

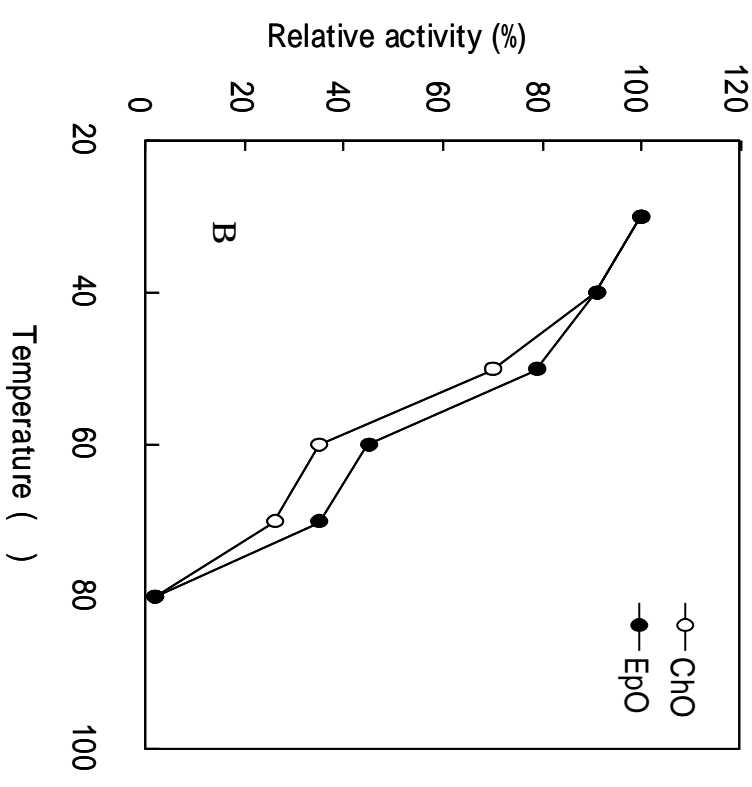
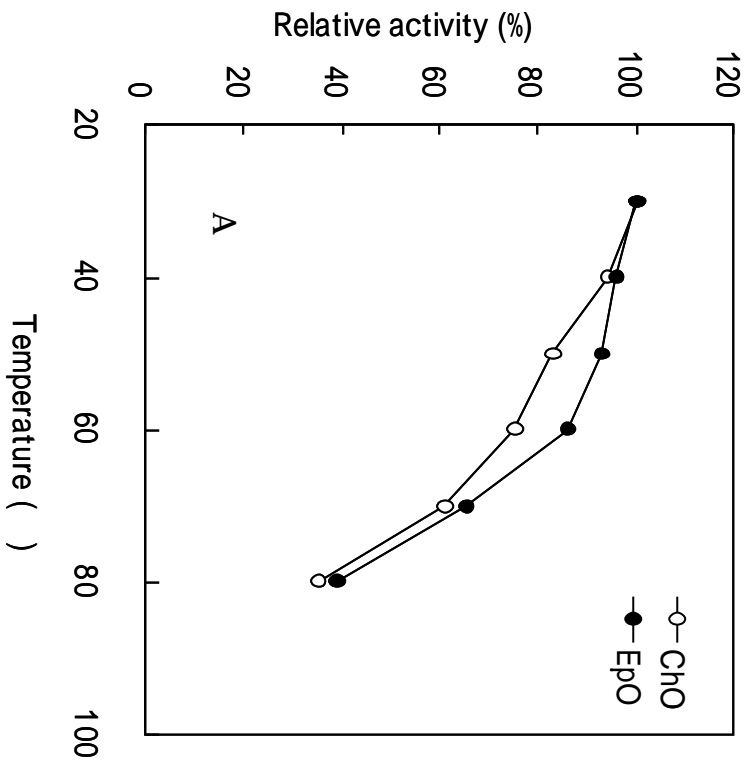


Fig. 4-11 Effect of temperature on the stability of the enzyme

○: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, ●: EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.  
 PPO solution was incubated at various temperatures (30~80 ) for 10 min (A) and 30min (B) before measuring PPO activity.  
 Residual ChO and EpO activities were measured under standard conditions (ChO: pH 5.0 · 30 , EpO: pH 8.0 · 30 ).

Table 4-3 Effect of various compounds on leaf lettuce PPO

Compounds	Relative activity (%)			
	ChO <sup>a</sup>		EpO <sup>b</sup>	
	5 mM <sup>c</sup>	10 mM <sup>c</sup>	5 mM <sup>c</sup>	10 mM <sup>c</sup>
None	100	100	100	100
Sodium diethyldithiocarbamate	0	0	0	0
KCN	0	0	0	0
EDTA	93	94	93	39
ZnSO <sub>4</sub>	81	60	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>
CuSO <sub>4</sub>	45	11	78	0
BaCl <sub>2</sub>	11	0	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>
MnCl <sub>2</sub>	0	0	— <sup>d</sup>	— <sup>d</sup>
NaF	2	0	1	0
NaCl	3	0	84	7
L-Ascorbic acid	0	0	3	0
L-Cysteine	0	0	0	0

<sup>a</sup> ChO: chlorogenic acid oxidase. The enzyme activity was determined at pH 5 using Mcllvaine buffer.

<sup>b</sup> EpO: (-)-epicatechin oxidase. The enzyme activity was determined at pH 8 using Mcllvaine buffer.

<sup>c</sup> Final concentration of the compound.

<sup>d</sup> Not determined.

#### 4 - 4. 小括

(1) リーフレタス PPO を硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水及びゲル濾過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。最終的に本酵素は硫酸分画後の粗酵素液は 23.4 倍に精製され、回収率は約 13.3%であった。

(2) 本酵素の分子量はゲル濾過法により 45,000 と推定され、さらに SDS-PAGE の結果、1 本のバンドが検出され、同法による推定分子量は約 46,000 と算出されたことから、本酵素は分子量 46,000 のモノマーであると考えられる。

(3) 精製 PPO はクロロゲン酸及びエピカテキンを強く酸化した。本酵素の ChO 活性の最適 pH は 5.0、EpO 活性の最適 pH は 8.0 付近に認められ、両活性とも pH5.0~8.0 の範囲で安定であった。本酵素の ChO、EpO 両活性の最適温度は 30 付近に認められた。本酵素は 80 ℃、10 分間の加熱処理においては両活性とも 35% 以上の残存活性を示したが、30 分間の加熱処理では著しく不安定となり、80 ℃ではほとんど失活した。

(4) 本酵素の ChO、EpO 両活性は、シアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム、フッ化ナトリウムなどの金属酵素阻害剤により阻害された。また、L-アスコルビン酸、L-システインや塩化ナトリウムにより強く阻害された。

## 第5章 フキのポリフェノール酸化酵素の精製とその性質

### 5 - 1. 緒 言

フキ(*Petasites japonicus*)は学名からもわかるように日本原産のキク科の春野菜で平安時代以前から食されていたという記録もある<sup>1)</sup>。フキの組織にはいわゆる“アク”と呼ばれるポリフェノールが多量に存在し、それが破損されることによって、急速な酵素的褐変がみられる。したがって、フキに含まれる反応基質であるポリフェノールに関しては古くから研究が行なわれ、クロロゲン酸類等が検出されている<sup>37)</sup>。分類学上フキが属するキク科野菜のPPOに関しては、我々の研究室において系統的な研究が行なわれ、これまでシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>等精製PPOについてそれらの性質等が報告されている。また、本論文の第3章及び第4章においてゴボウ及びリーフレタスPPOの精製と性質について明らかにしたが、フキのポリフェノール酸化酵素に関してはその精製が難しく、今まで成功した例がない。そこで、本章ではキク科植物のPPOに関する系統的な研究の一環としてアセトン分画、クロマトグラフィーを利用してフキのPPOの精製を試み、その性質などを調べた。

### 5 - 2. 材料及び方法

#### 5 - 2 - 1. 材料と試薬

フキは佐賀市内に自生したものをを用いた。Phenyl-Toyopearl 650 Mは東ソー(東京、日本)より、購入した。他の試薬について3 - 2 - 1に示した通りである。

#### 5 - 2 - 2. 蛋白質定量



定量については 3 - 2 - 3 と同様の方法で行った。

#### 5 - 2 - 3. 酵素活性の測定法

3 - 2 - 4 と同様の方法で行った。

#### 5 - 2 - 4. 酵素の精製

酵素液の調製及び精製方法を Fig. 5-1 に示した。

##### 1) 粗酵素液の調製

3 kg のフキを同量の 2% NaCl、1% L-アスコルビン酸および 1% Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) を含む氷冷した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) とともにミキサーで磨砕した後、綿布で濾過し、4℃、10300 × g、20 分間遠心分離を行い (以後遠心分離はすべてこの条件で行った) その上澄を抽出液とした。抽出液に 80% 飽和となるようにアセトンを加えた後、遠心分離を行い、沈殿を少量の 0.01 M リン酸緩衝液で溶解後、脱イオン水で透析を行った。この透析した液について、遠心分離を行い、不溶物を除去した上澄を粗酵素液とした。

##### 2) DEAE-Cellulofine AL カラムクロマトグラフィー

0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した DEAE-Cellulofine AL (4.5 × 25 cm) カラムに、粗酵素液を添加し、同一緩衝液を流下した。吸着された蛋白質画分を NaCl 濃度が 0~1.0 M となるようにグラジエント溶出を行った。活性画分を集め、1.5 M の濃度となるように硫酸アンモニウムを添加した。

##### 3) Butyl-Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィー

1.5 M 硫酸アンモニウムを加えた 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M (1.1 × 24.5 cm) カラムに先の DEAE-Cellulofine AL 活性画分を添加し、硫酸アンモニウム濃度が 1.5~0 M となるように 0.01 M リン酸緩衝

液を用いてグラジエントで溶出した。活性画分を集め、脱イオン水に対して透析を行い、1.5 M の濃度となるように硫酸アンモニウムを添加した。

#### 4) Phenyl -Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィー

1.5 M 硫酸アンモニウムを加えた 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Phenyl -Toyopearl 650 M (1.1×24.5 cm) カラムに先の Butyl-Toyopearl 650 M 活性画分を添加し、硫酸アンモニウム濃度が 1.5~0 M となるようにグラジエントで溶出した後、0.01 M リン酸緩衝液で溶出した。活性画分を集め、脱イオン水に対して透析を行い、限外濾過膜アミコン (YM-10、透過分子量：10,000) を用いて濃縮した。

#### 5) Toyopearl HW 55-S カラムクロマトグラフィー

濃縮液を 0.1 M リン酸緩衝液で平衡化した Toyopearl HW 55-S (1.7×90 cm) カラムに添加し、同緩衝液で溶出した。PPO 活性画分を集め、精製酵素として以下の実験に使用した。

#### 5 - 2 - 5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

3 - 2 - 6 と同様の方法で行った。

#### 5 - 2 - 6. 分子量の推定

分子量の推定をゲル濾過と SDS-PAGE を用いて行った。なお詳しい方法については 3 - 2 - 7 に示した。なお、SDS-PAGE は Laemmli<sup>60)</sup>の方法に従い、12.5%ポリアクリルアミドゲルで行った。

#### 5 - 2 - 7. 酵素の一般的性質

本酵素の一般的性質の測定は 3 - 2 - 8 と同様に行った。

### 5 - 3. 結果及び考察

#### 5 - 3 - 1. 酵素の精製

粗酵素液について DEAE- Cellulofine AL カラムクロマトグラフィーを行った結果が Fig. 5-2 である。ChO 活性は 0.5~0.8 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出したので、この画分を集め、1.5 M となるように硫酸アンモニウムを添加後、Butyl-Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィーを行った。その結果 Fig. 5-3 に示すように本酵素は 0.6~0 M の硫酸緩衝液により溶出したので活性画分を集め、脱イオン水に対して透析した。透析した酵素液を再び 1.5 M となるように硫酸アンモニウムを添加し、Phenyl-Toyopearl 650 M カラムクロマトグラフィーを行った結果が Fig. 5-4 である。本酵素は 0.5~0.8 M の硫酸を含有する緩衝液により溶出したので活性画分を集め、脱イオン水に対して透析後、限外濾過膜 (YM-10) を用いて濃縮した。濃縮液について Toyopearl HW 55-S カラムクロマトグラフィーを行った結果、Fig. 5-5 から明らかのように単一の活性ピークが検出され、これは蛋白質ピークと一致した。そこで、この活性画分を集め、精製酵素として以下の実験に使用した。なお、各精製段階におけるレタスの PPO の蛋白質量、比活性、回収率については Table 5-1 に示した。本酵素は最終的に粗酵素液の 151 倍に精製され、回収率は 11.3% であった。

#### 5 - 3 - 2. 酵素の均一性及び分子量

Native-PAGE 及び SDS-PAGE の行った結果、Fig. 5-6 に示すように本酵素はいずれの場合も単一のバンドを示し、電気泳動的に均一であった。

本酵素の分子量は Fig. 5-7 に示すように Toyopearl HW 55-S を用いたゲル濾過及び SDS-PAGE により本酵素の分子量は、それぞれ 26,000 および 25,000 と算出

された。

これらの結果から、本酵素は分子量約 25,000 のモノマーであると考えられる。このような本酵素の分子量は村尾ら<sup>29)</sup>のゴボウピロガロール酸化酵素の分子量 (31,000) と類似したが、ドーパミン酸化活性を有するバナナ果肉 PPO<sup>31)</sup>の分子量 (42,000)、ChO 活性を有するリンゴ PPO<sup>28)</sup>の分子量 (65,000) やニホンナシ PPO<sup>39)</sup>の分子量 (56,000) より小さかった。さらに同じキク科の球状レタス PPO<sup>27)</sup>の分子量 (56,000)、シュンギク PPO<sup>26)</sup>の分子量 (45,000)、第 3 章及び第 4 章のゴボウ PPO の分子量 (40,000)、リーフレタス PPO の分子量 (46,000) よりも小さかった。このような結果は同じキク科植物の PPO の多様性を示す結果の一つであると考えられる。

### **Japanese butterbur (3 Kg)**

- Homogenized with 0.1 M PB (phosphate buffer, pH 7.0) contained 2% NaCl, 1% L-ascorbic acid and 1% PVPP (polyvinylpolypyrrolidone)
- Centrifuged at 10300 × g at 4 °C for 20 min

### **Crude extract**

- 80% acetone saturation
- Centrifuged at 10300 × g at 4 °C for 20 min
- Collected precipitate and dialyze
- Centrifuged at 10300 × g for 20 min at 4 °C

### **Crude enzyme**

- Added to DEAE-Cellulofine AL (gradient: 0~1.0 M NaCl in 0.01 M PB)
- Added to Butyl-Toyopearl 650 M (gradient: 1.5~0 M in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 0.01 M PB)
- Added to Phenyl-Toyopearl 650 M (gradient: 1.5~0 M in (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 0.01 M PB)
- Added to Toyopearl HW 55-S (eluted with 0.1 M PB)

### **Purified enzyme**

Fig. 5-1 Procedure of Japanese butterbur PPO purification

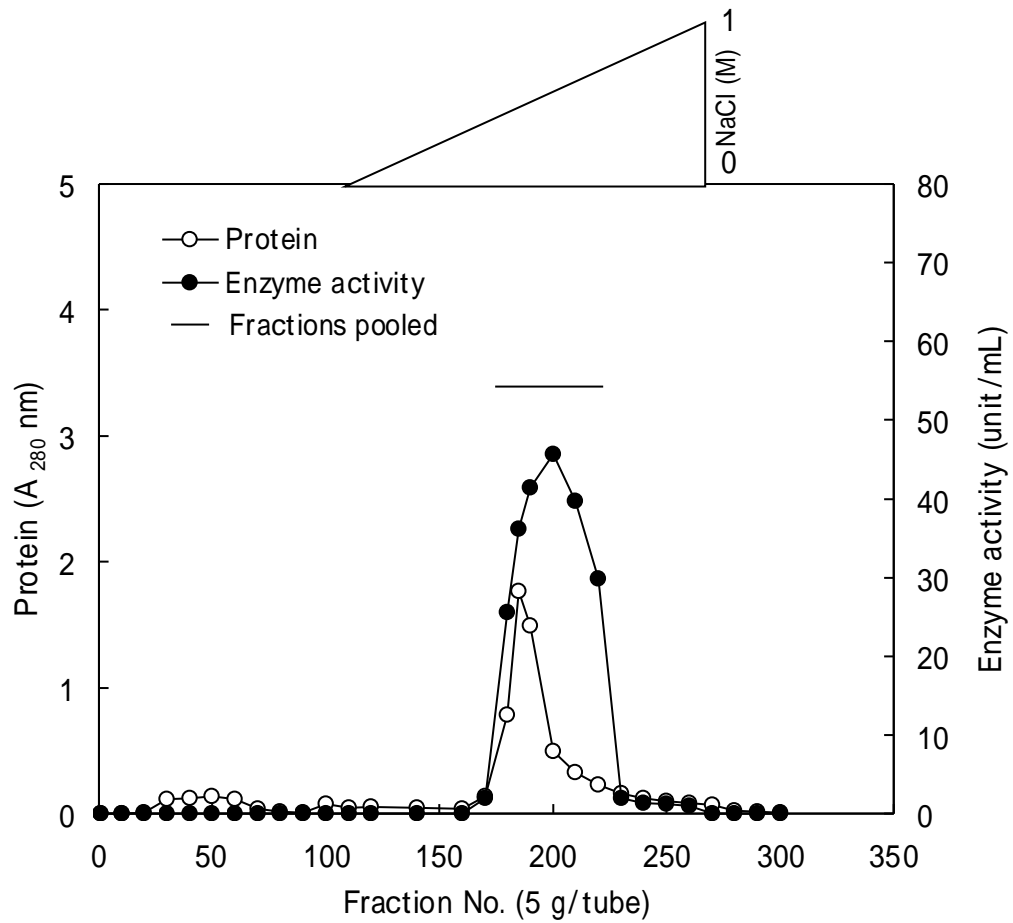


Fig. 5-2 Elution pattern of the enzyme on DEAE-Cellulofine AL column chromatography

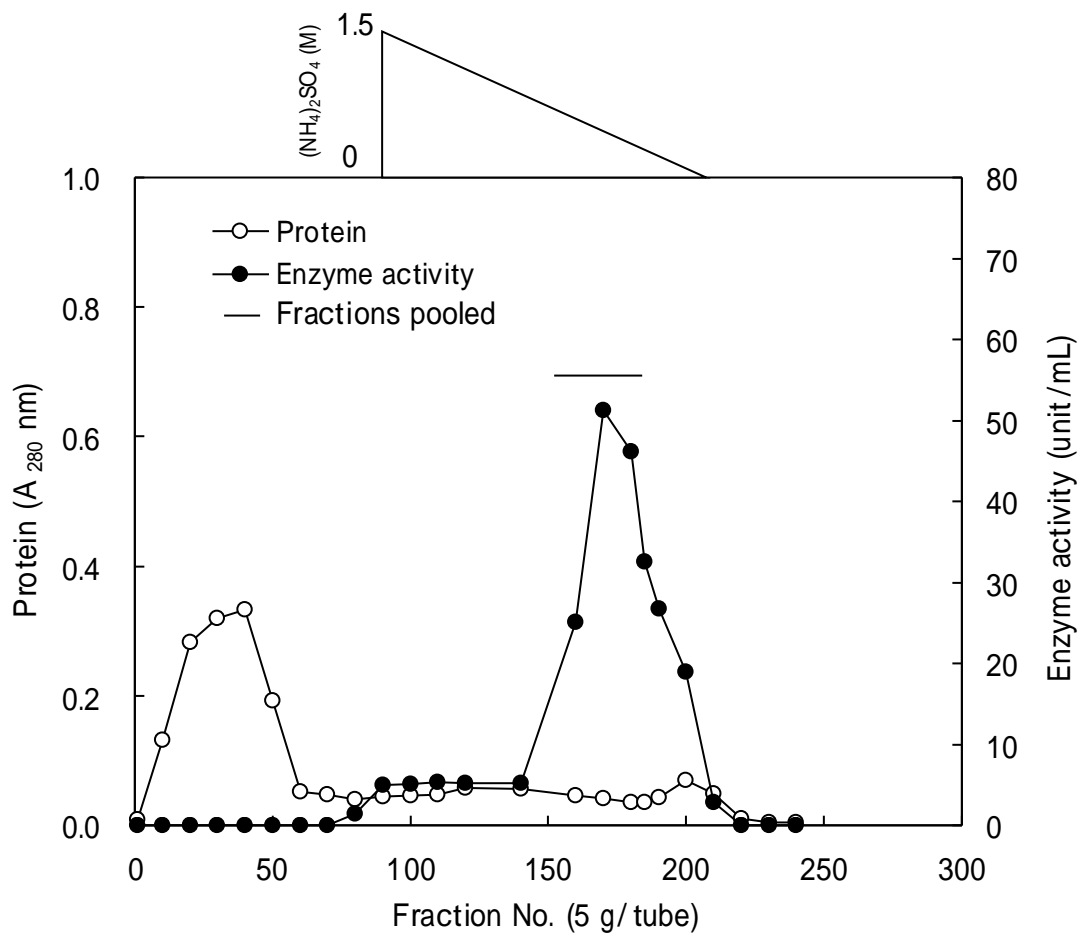


Fig. 5-3 Elution pattern of the enzyme on Butyl-Toyopearl 650 M column chromatography

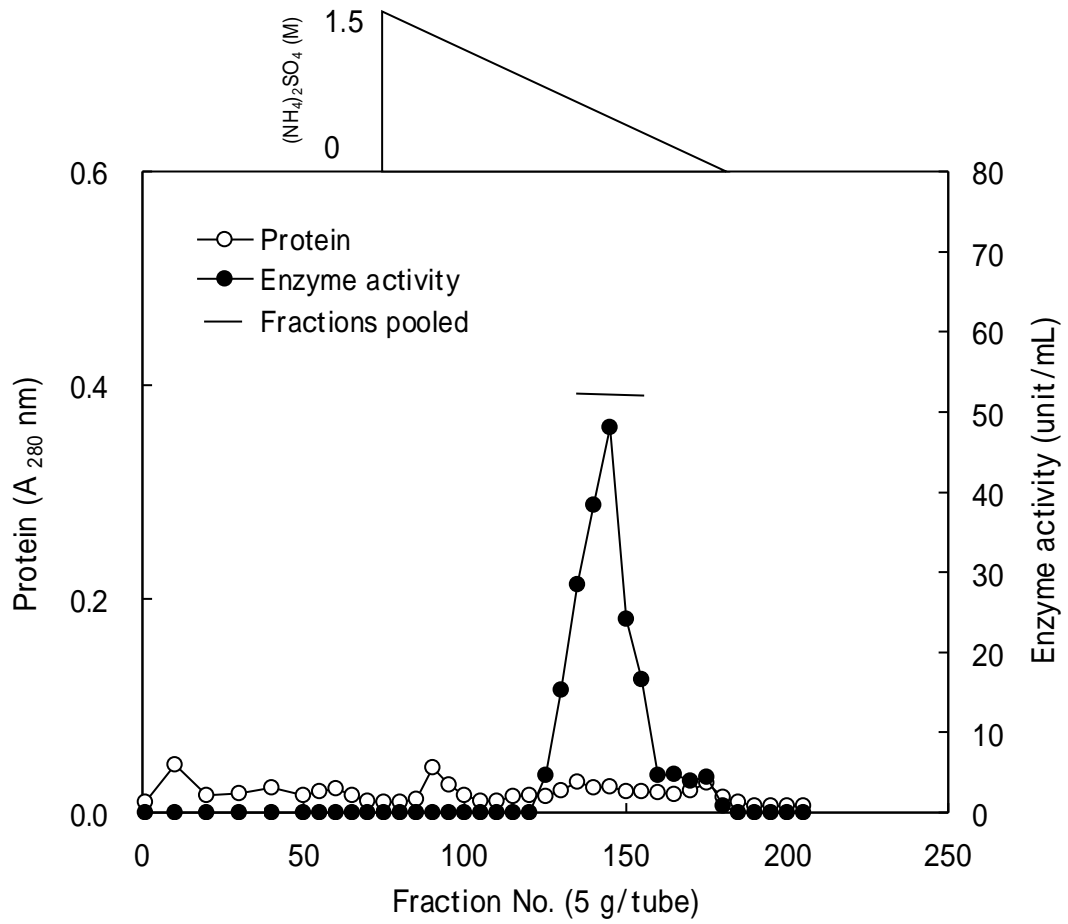


Fig. 5-4 Elution pattern of the enzyme on Phenyl-Toyopearl 650 M column chromatography



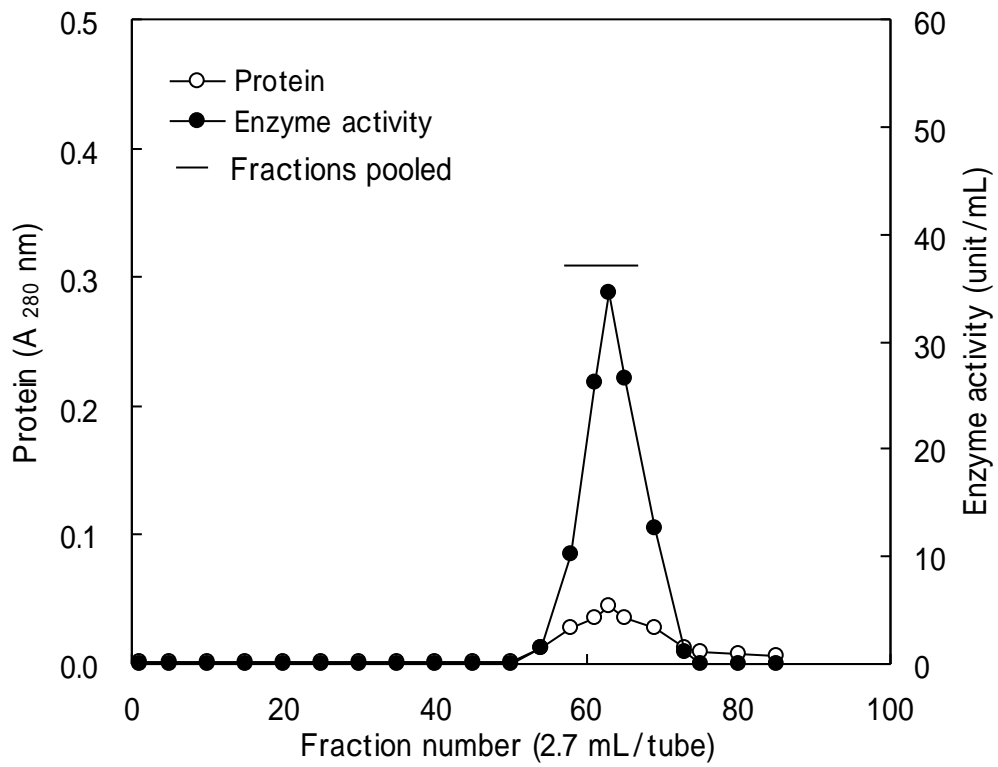


Fig. 5-5 Elution pattern of the enzyme on Toyopearl HW 55-S column chromatography

Table 5-1 Purification of Japanese butterbur PPO

Procedure step	Volume (mL)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (-fold)	Yield (%)
80% acetone sulfate	250	15900	2288	7	1	100
DEAE-Cellulofine AL	563	9188	37	248	35	58
Butyl-Toyoparl 650 M	563	2432	4.6	528	75	15
Phenyl-Toyoparl 650 M	56	2360	3.7	638	91	14.8
Toyoparl HW 55-S	700	1797	1.7	1057	151	11.3

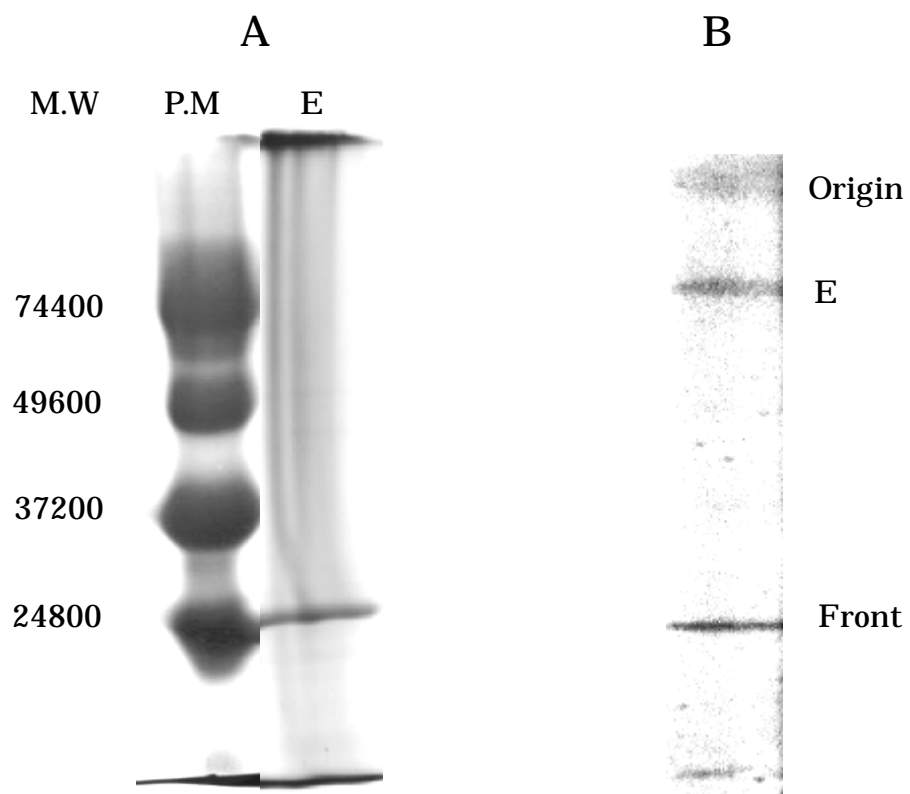
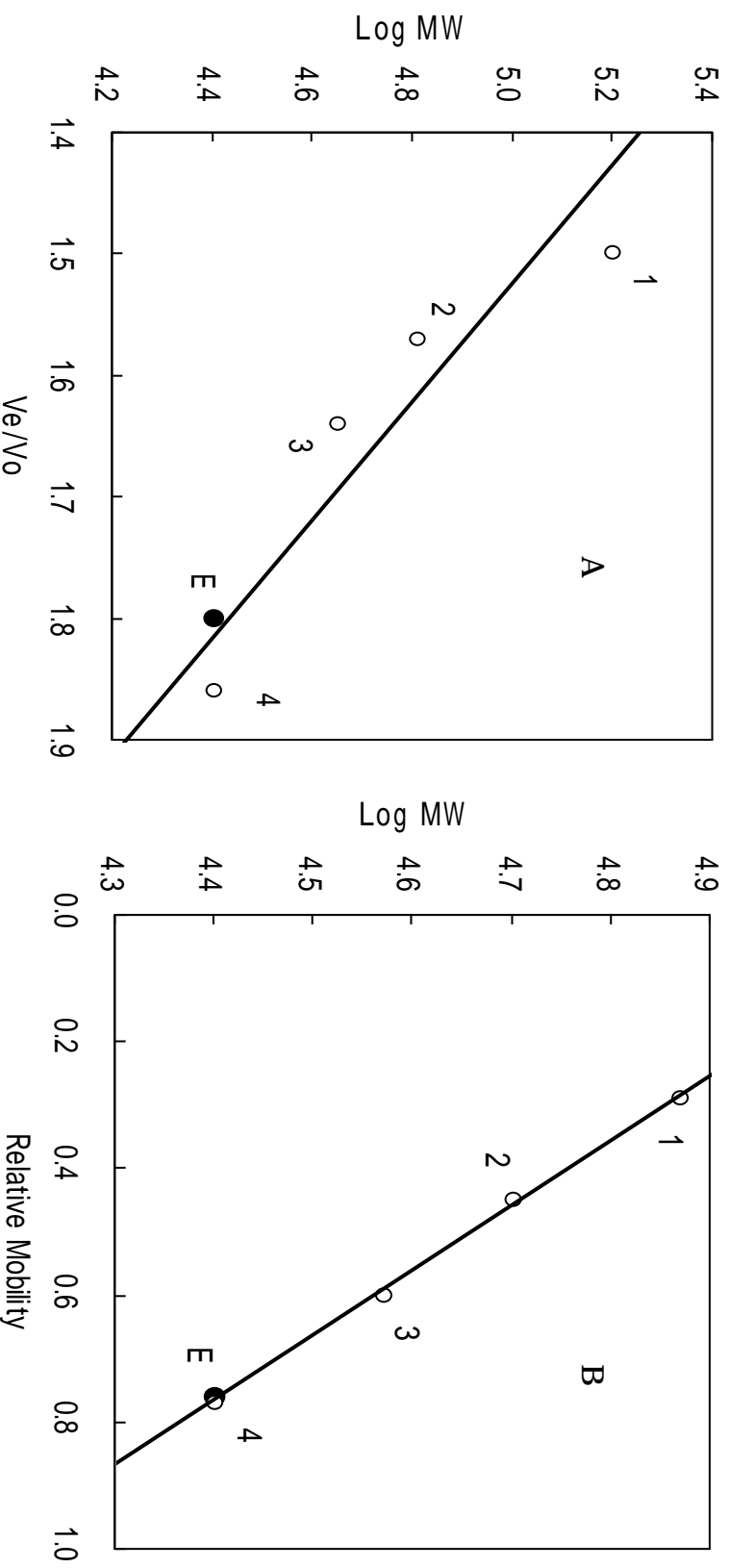


Fig 5-6. SDS-PAGE (A) and PAGE (B) of the purified enzyme  
M.W: molecular weight, P.M: protein marker, E: purified enzyme.



**Fig. 5-7 Estimation of molecular weight of the enzyme by gel filtration on Toyopearl HW 55-S (A) and SDS-PAGE (B)**

(A) MW, molecular weight;  $V_o$ , void volume of the column;  $V_e$ , elution volume of the substance; 1, r-globulin; (160,000) 2, bovine serum albumin (65,000); 3, egg albumin (45,000); 4, dymotrypsinogen A (25,000); E, purified enzyme.

(B) 1; Cytochrome c hexamer (MW : 74,400) , 2; Cytochrome c tetramer (49,000), 3; Cytochrome c trimer (37,200), 4; Cytochrome c dimer (24,800); E, purified enzyme.

### 5 - 3 - 3. 酵素の一般的性質

#### 1) 基質特異性

本酵素の種々のポリフェノール化合物に対する酸化活性について調べ、結果はクロロゲン酸酸化活性を 100 とする相対値で表し、Table 5-2 に示した。本酵素はクロロゲン酸及びエピカテキンを強く酸化した。また、カフェ酸、カテコール、カテキンなどの *o*-ジフェノールを 35%以上酸化するが、没食子酸、ピロガロール、フロログルシノールなどのトリヒドロキシベンゼンフ類やレゾルシノールなどの *m*-ジフェノールは酸化されなかった。以上の結果からフキの PPO は主にクロロゲン酸、エピカテキンなどの *o*-ジフェノール類を酸化する酵素であると考えられる。このような PPO 活性はシュンギク<sup>26)</sup>においても認められているが、球状レタス<sup>27)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等より EpO 活性は相対的に高いようである。

以上のように、フキ PPO はクロロゲン酸とエピカテキンを強く酸化することが認められたので、以下の諸性質はこれらを基質として調べた。

クロロゲン酸とエピカテキンを用い、基質濃度と反応速度の関係を調べ、Lineweaver-Burk の方法で作図した結果が Fig. 5-8 である。この図より、本酵素のクロロゲン酸およびエピカテキンに対する  $K_m$  値はそれぞれ 0.14 mM、0.7 mM と算出された。これらの値は球状レタス PPO<sup>27)</sup>の  $K_m$  値(クロロゲン酸: 0.67 mM、エピカテキン: 0.91 mM)と類似したが、シュンギク PPO<sup>26)</sup>の  $K_m$  値(クロロゲン酸: 2.0 mM、エピカテキン: 10 mM)、前章のリーフレタス(クロロゲン酸: 1.0 mM、エピカテキン: 1.4 mM)及びゴボウ(クロロゲン酸: 0.4 mM、エピカテキン: 2.7 mM)より低かった。

#### 2) 最適 pH

本酵素の ChO と EpO 活性に及ぼす最適 pH を調べ、相対値で表し、Fig. 5-9 A に示した。本酵素の ChO と EpO に対する最適 pH はそれぞれ 5.0 と 8.0 であり、

同じキク科野菜球状レタス<sup>27)</sup>、前章のリーフレタス及びゴボウと同様に酸性側では ChO として、中性ないし微アルカリ側では EpO として強く作用するものと考えられる。さらにクロロゲン酸を基質とした時、酸性側に最適 pH 値を有する PPO は、他にリンゴ<sup>28)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等に見出されていることから、これら青果物の ChO は酸性 PPO であると考えられる。一方、本酵素においてエピカテキンを基質とした場合 pH8.0 に最適 pH がみられた。同様の最適 pH 値はサクランボ<sup>21)</sup>、アボカド<sup>22), 25)</sup>、バナナ<sup>31)</sup>果実 PPO においてピロカテコール、ドーパミン等の *o*-ジフェノールを基質とした場合に認められている。

### 3) pH 安定性

本酵素の ChO と EpO に及ぼす pH 安定性を調べ、相対値で表し、Fig. 5-9 B に示した。本酵素は pH 4.0~9.0 の範囲で両酸化活性とも 70% 以上の残存活性を示し、安定であることが認められた。一方、同じキク科のシュンギク PPO<sup>26)</sup>、ドーパミンを酸化するバナナ PPO<sup>31)</sup>の場合は pH4.0~11.0 の広い範囲において安定であることが認められている。このようなフキ PPO の pH 安定性は前章のリーフレタスや球状レタス PPO<sup>27)</sup>と同様に、シュンギク<sup>26)</sup>や他の多くの植物 PPO<sup>17), 31), 49)</sup>のそれらよりやや狭いと思われる。これらの結果から本酵素の pH 安定域は球状レタス<sup>27)</sup>、前章のリーフレタス、ゴボウと同様に塩基性側でも強い活性を表した。したがって、本酵素は酸処理を行い、pH4.0 以下にすることにより、活性を抑制できると考えられる。

### 4) 最適温度

本酵素活性に及ぼす最適温度の影響を 20~60 の所定温度で調べた結果を Fig. 5-10 に示した。本酵素の最適温度は ChO と EpO とともに 30 付近に認められた。同様の ChO、EpO 活性はキク科植物のうち球状レタス<sup>27)</sup>、前章のリーフレタスでも認められているが、シュンギク<sup>26)</sup>では最適温度がそれぞれ 30、40 で、第 3 章

のゴボウでは両活性とも 20 付近に認められており、やや異なるように思われる。

#### 5) 熱安定性

本酵素の温度に対する安定性について 30~80 の所定の温度で 10、30 分間処理し、残存する酵素活性を標準条件 (ChO: pH 5.0, 30 ; EpO: pH 8.0, 30 ) で測定した。その結果、Fig. 5-11. A に示したように本酵素は 60 、10 分間加熱においても 50%以上の残存活性を示し、安定であった。また、フキ PPO は 80 、10 分間の加熱処理においても両活性とも 20%以上の残存活性を示しており、この温度安定性は前章のリーフレタス PPO と類似したが、これまで報告されているシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>等の他のキク科 PPO に比べて安定であった。一方、30 分間加熱処理 (Fig. 5-11 B) では活性は著しく低下し、80 ではほぼ完全に失活した。また、本実験のフキ PPO の場合、加熱処理においては EpO 活性の熱安定性の方が ChO 活性のそれよりやや高かった。同様の傾向は、シュンギク PPO<sup>26)</sup> や前章のリーフレタス PPO の安定性においても見出されている。一方、球状レタス<sup>27)</sup>、前章のゴボウ PPO の場合は、逆に ChO 活性の安定性の方が EpO 活性のそれよりやや高いようであり、これらの属するキク科植物の品種や系統より差が生じたものと思われる。

#### 6) 種々の化合物の酵素活性への影響

本酵素活性に及ぼす種々の化合物の影響を調べ、結果は無添加の場合を 100 とする相対値で表し、Table 5-3 に示した。両活性とも他の PPO と同様に金属酵素阻害剤であるシアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによりほぼ完全に阻害された。従って本酵素は他の植物 PPO と同様に金属<sup>2), 22), 25)~27)</sup>を含むと考えられる。

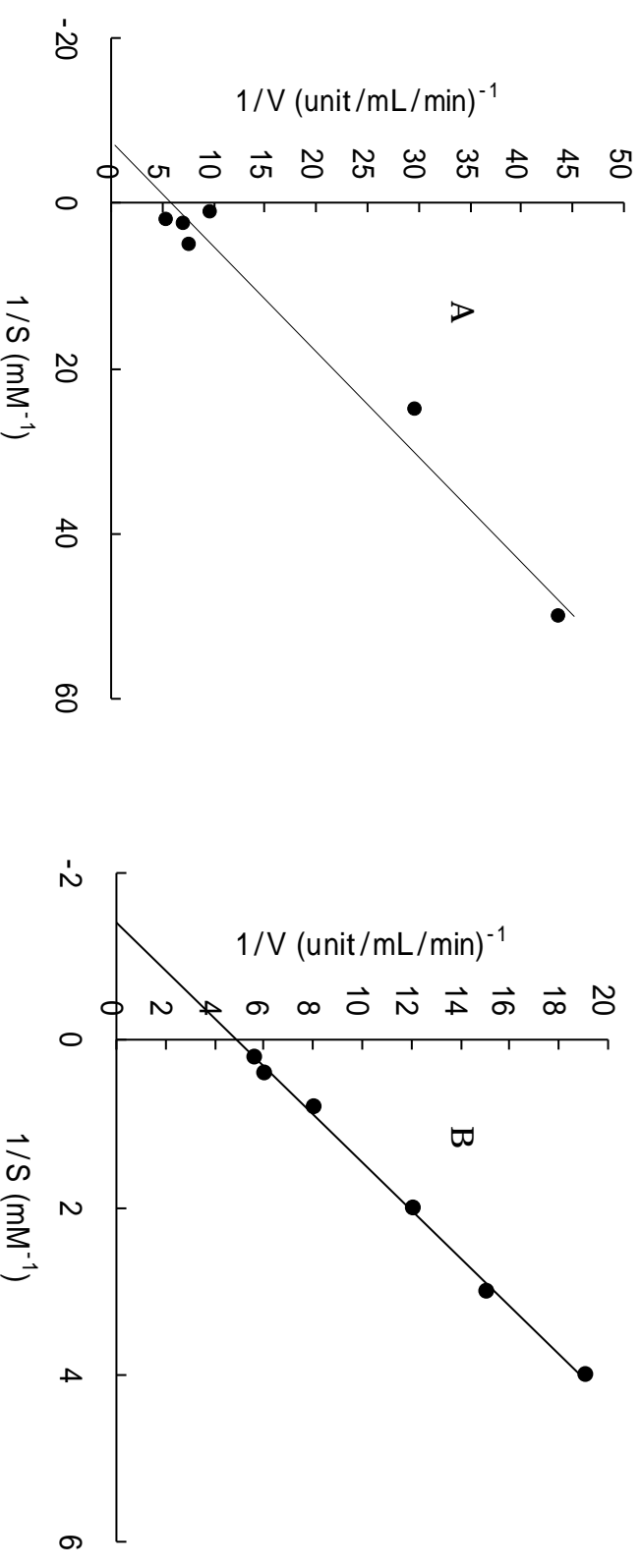
本酵素の ChO 活性は、 $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  といった金属イオンにより 10mM 濃度で 70%以上阻害された。これら金属イオンの阻害効果はシュンギク PPO<sup>26)</sup>や

球状レタス PPO<sup>27)</sup>でも同様に見出されているが、10 mM 濃度では本酵素の方の阻害効果が著しいようであった。本酵素の ChO の活性は 5 mM の NaF によりほぼ完全に阻害されたが、EpO 活性はほとんど阻害されなかった。また、キレート剤であるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)ではあまり影響はなかった。一方、前章のリーフレタス PPO、ゴボウ PPO は 10 mM 濃度の NaCl によって強い阻害されたが、フキ PPO は NaCl により阻害されなかったことから、キク科植物の PPO によってハロゲン化塩の効果が違うことが明らかとなった。さらに、還元剤である L-アスコルビン酸と L-システインにより両酸化活性は強く阻害された。このことはフキ PPO の阻害剤として L-アスコルビン酸、L-システインが極めて有効であることを示唆する。



**Table 5-2 Substrate specificity of Japanese butterbur PPO**

<b>Substrate</b>	<b>Relative Activity (%)</b>
Chlorogenic acid	100
(-)-Epicatechin	94
Caffeic acid	42
Catechol	39
Catechin	37
Dopamine	9
DL-dopa	2
Resorcinol	0
Phloroglucinol	0
Gallic acid	0
Pyrogallol	0

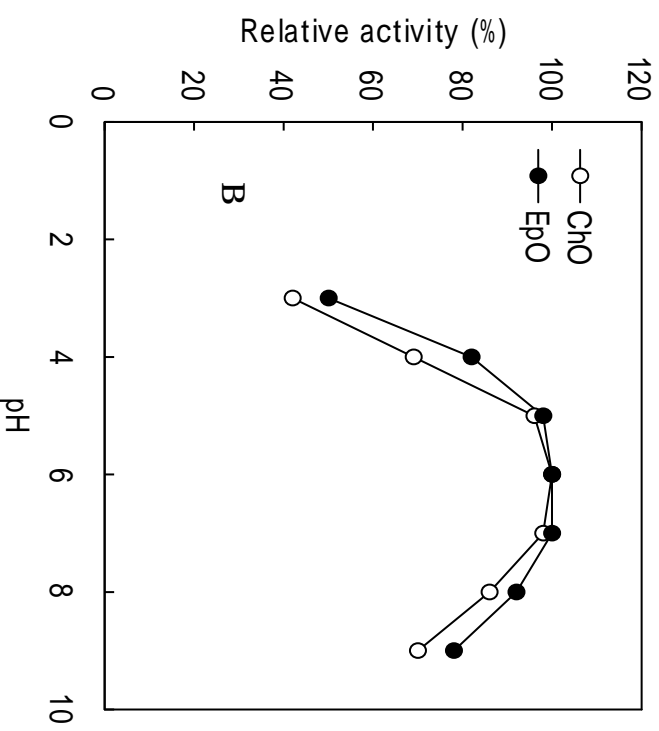
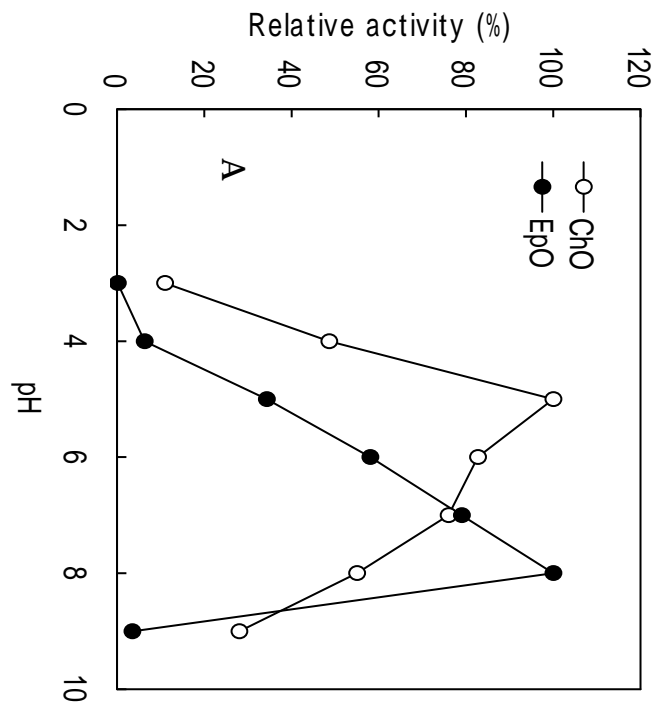


**Fig. 5-8 Lineweaver-burk plot of chlorogenic acid (A) and (-)-epicatechin (B) oxidation by the enzyme**

A: Chlorogenic acid oxidation was determined by increasing the concentration of chlorogenic acid from 0.1 to 5 mM using McIlvaine buffer (pH 5.0) at 30 .

B: (-)-Epicatechin oxidation was determined by increasing the concentration of (-)-epicatechin from 2 to 50 mM using McIlvaine buffer (pH 8.0) at 30 .

V: Rate of the enzyme reaction, S: Substrate concentration.



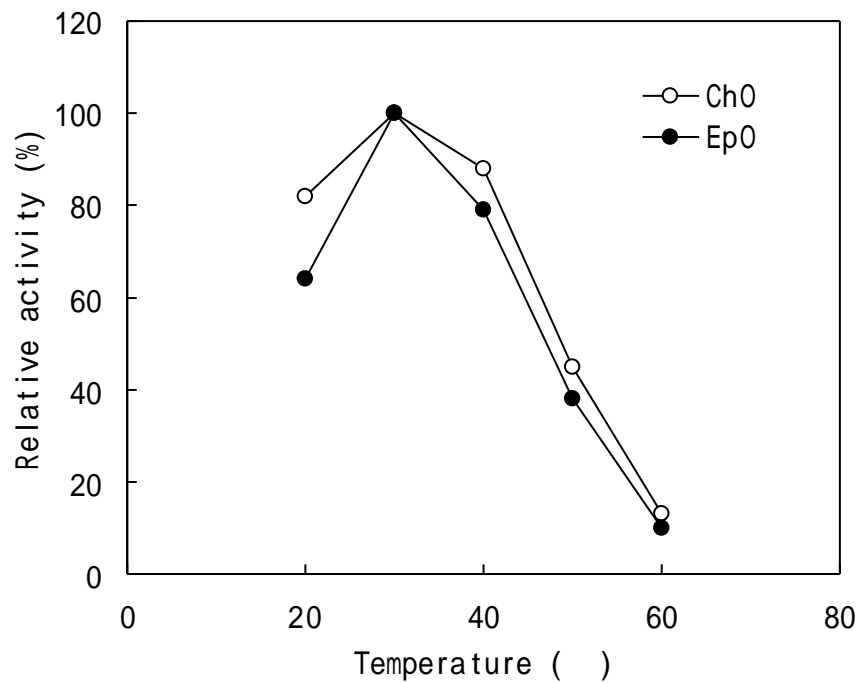
**Fig. 5-9 Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the enzyme**

: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, : EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.

(A) PPO activity was measured at 30 in McIlvaine (pH 3.0 to 8.0) and Atkins & Pantin buffer (pH9).

(B) PPO was preincubated in McIlvaine (pH 3.0 to 8.0) or Atkins & Pantin buffer (pH9) at 4 for 22h.

Residual ChO and EpO activities were measured under standard conditions (ChO: pH 5.0 • 30, EpO: pH 8.0 • 30).



**Fig. 5-10 Effect of temperature on the activity of the enzyme**

: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, : EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.  
 PPO activity was assayed at various temperatures(20~60 °C) in McIlvaine buffer (ChO: pH 5.0, EpO: pH 8.0).

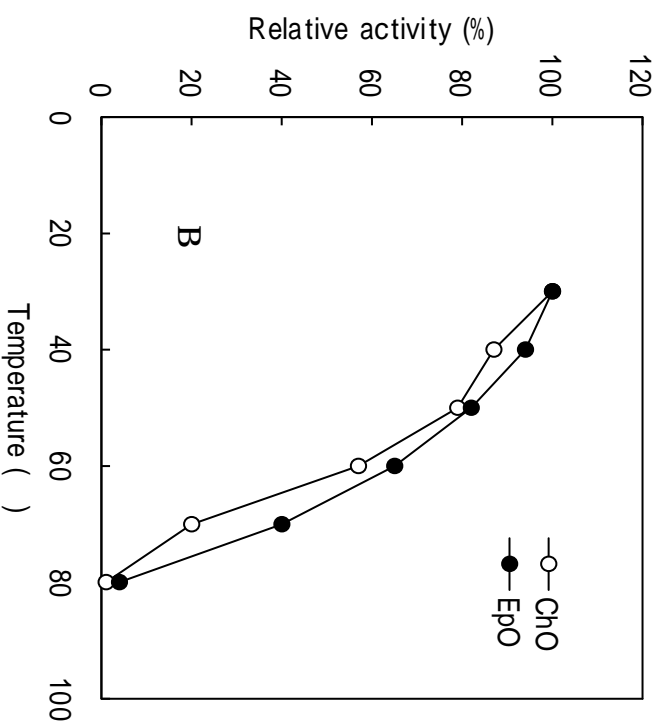
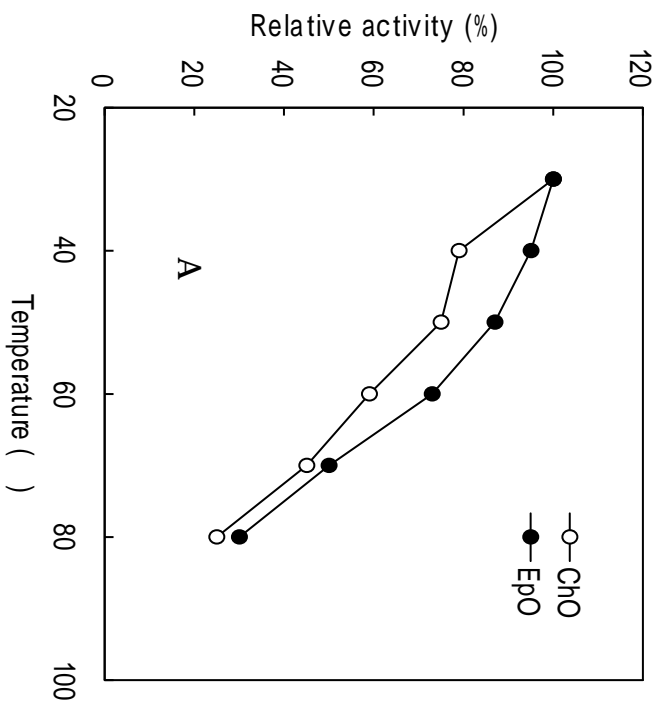


Fig. 5-11 Effect of temperature on the stability of the enzyme

○: ChO; chlorogenic acid oxidase activity, ●: EpO; (-)-epicatechin oxidase activity.

PPO solution was incubated at various temperatures (30~80 °C) for 10 min (A) and 30min (B) before measuring PPO activity.

Residual ChO and EpO activities were measured under standard conditions (ChO: pH 5.0 · 30 min, EpO: pH 8.0 · 30 min).

**Table 5-3 Effect of various compounds on Japanese butterbur PPO**

Compounds	Relative activity (%)			
	ChO <sup>a</sup>		(-)-EpO <sup>b</sup>	
	5mM <sup>c</sup>	10mM <sup>c</sup>	5mM <sup>c</sup>	10mM <sup>c</sup>
None	100	100	100	100
Sodium diethyldithiocarbamate	6	0	2	0
KCN	1	0	0	0
EDTA	81	62	100	94
ZnSO <sub>4</sub>	83	26	- d	- d
CuSO <sub>4</sub>	67	19	100	- d
BaCl <sub>2</sub>	78	28	- d	- d
MnCl <sub>2</sub>	61	25	- d	- d
NaF	3	0	100	100
NaCl	93	93	100	100
L-Ascorbic acid	0	0	6	0
L-Cysteine	0	0	0	0

<sup>a</sup> ChO: chlorogenic acid oxidase. The enzyme activity was determined at pH 5 using Mcllvaine buffer.

<sup>b</sup> EpO: (-)-epicatechin oxidase. The enzyme activity was determined at pH 8 using Mcllvaine buffer.

<sup>c</sup> Final concentration of the compound.

<sup>d</sup> Not determined.

#### 5 - 4. 小 括

フキの酵素的褐変の主原因となる PPO を電気泳動的にほぼ均一に精製した。最終的に本酵素は粗酵素液の 151 倍に精製され、回収率は 11.3%であった。

(1) 本酵素の分子量はゲル濾過法により 26,000 と推定され、さらに SDS-PAGE の結果、1 本のバンドが検出され、同法による推定分子量は約 25,000 と算出されたことから、本酵素は分子量 25,000 のモノマーであると考えられる。

(2) 精製 PPO はクロロゲン酸、エピカテキン及びカフェ酸を強く酸化した。本酵素の ChO 活性の最適 pH は 5.0、EpO 活性の最適 pH は 8.0 付近に認められ、両活性とも pH 4.0 ~ 9.0 の範囲で安定であった。本酵素の ChO、EpO 両活性の最適温度は 30 °C 付近に認められた。本酵素の ChO 活性は 50 °C、30 分の加熱において 70%以上の残存活性を示し、安定であったが、80 °C、30 分の加熱処理により完全に失活した。一方、EpO 活性は ChO に比べてやや熱安定性が高く、60 °C、30 分の加熱処理において 70%以上の残存活性を示したが、80 °C、30 分の加熱処理では ChO と同様ほぼ完全失活した。

(3) 本酵素の ChO、EpO 両活性は、シアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムなどの金属化合物により阻害された。さらに  $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 等の 10mM 濃度の金属イオンで 70%以上に阻害された。また、L-アスコルビン酸や L-システイン等の従来阻害剤よりも強く阻害された。

(4) 以上の結果から、フキの酵素的褐変は pH 4.0 以下の酸処理や 10mM 濃度の L-アスコルビン酸等により抑制可能であると考えられる。

## 第6章 キク科植物のPPOに対する各種野菜のアルコール抽

### 出液の阻害影響

#### 6-1. 緒言

最近、少子化、核家族といった社会環境の変化から、カット野菜の消費が飛躍的に増大している。この様な青果物の加工時に起こる酵素的褐変は、それら食品の外観的品質を損なうばかりでなく、褐変物質の重合による off-flavor 等香味の劣化を招くことが知られており、これを防止するためには青果物に存在するポリフェノール酸化酵素 (PPO) 活性を抑制することが効果的であることから古くから PPO の抑制に関して多くの研究がなされている<sup>2), 35), 64)~68)</sup>。PPO 不活性化の最も効果的な方法は加熱操作であるが、野菜等の品質やサラダ等として生食されることが多いという消費形態を考慮すると、加熱処理はさけ、できるだけ温和な条件が好ましいことは言うまでもない。未加熱状態での PPO 活性の抑制には、アスコルビン酸やエリソルビン酸、亜硫酸、アスコルビン酸の各種誘導体や脂肪酸エステル等抗酸化剤の添加による効果が検討されているが、これらの酸化物の品質への影響や食品添加物としての表示等の問題が残る<sup>2), 13), 64)</sup>。したがって、より安全性の高い褐変防止剤等の開発が望まれる。このような観点から酵素的褐変現象がほとんど見られない青果物に含まれる PPO 活性阻害物質について研究が進められている<sup>64)~68)</sup>。小宮山ら<sup>64)</sup>は種々の果実のアセトン可溶画分の PPO 阻害活性について追究し、スモモやブドウ抽出液が PPO 活性を阻害することを報告している。また、タマネギ抽出液がカットレタス、リンゴ果汁の PPO を阻害し、その本体はアリル化合物であることが推定されている<sup>65)~67)</sup>。筆者らの研究室においても種々のポリフェノール化合物がカブやウンシュウミカンのフロログルシノール酸化酵素活性を阻害する



ことを見出している<sup>68)</sup>。これらの結果は褐変反応がほとんど見られない他の青果物成分にも PPO 阻害物質が存在し、それを PPO 阻害剤として有効利用できる可能性を示唆する<sup>13), 23), 64)~68)</sup>。そこで本研究ではセロリ、パセリ、ニンジン、ゴボウの茎等のセリ科とキク科植物からアルコールを用いて可溶性成分を抽出し、それら抽出液のフキ、ゴボウの PPO に及ぼす阻害効果を検討した。

## 6 - 2. 材料及び方法

### 6 - 2 - 1. 材料と試薬

セロリ、パセリ、ゴボウ等の供試青果物を市場より購入し、使用した。他の試薬、また使用した機器については 3 - 2 - 1 に示した通りである。

### 6 - 2 - 2. 酵素液の調製

フキまたはゴボウ 100 g を -20℃ に冷却した 10 倍量のアセトンとともにホモジナイズし、吸引濾過器により素早くろ過した。残渣について数回アセトンで洗浄後、アセトンのにおいがなくなるまで減圧乾燥し、得られたアセトンパウダーを -20℃ に保存した。減圧乾燥して得た粉末を McIlvain 緩衝液 (pH 7.0) に 10 分間攪拌し、濾過後の濾液を PPO 溶液として使用した。

### 6 - 2 - 3. 抽出液の調製

供試野菜 5 g を切断後、30 mL のアルコールとともにホモジナイズした後、20 分間超音波処理 (28 Hz) して抽出液を得た。この抽出液を吸引濾過し、濾液についてエタノール臭がなくなるまで減圧濃縮した。濃縮液中の不溶物を遠心分離 (1450 × g、20 分) により除去した後、その上澄液に水を加えて 25 mL としたも

のをそれぞれのアルコール抽出液とした。

#### 6 - 2 - 4. 褐変度の測定

アルコール抽出液と 10 mM クロロゲン酸溶液 0.5 mL、McIlvaine 緩衝液(pH 5.0) 3.5 mL の混合液に 0.5 mL の酵素液を加え、30 °C で 5 分間反応した後、反応液の吸光度を 420 nm で測定した。0 分及び 5 分後の反応液の吸光度との差を褐変度とした。

#### 6 - 2 - 5. アルコール抽出液と PPO の阻害機構

テスト溶液：クロロゲン酸溶液(0.4~5 mM)0.5 mL 及び McIlvaine 緩衝液(pH 5.0)0.9 mL と抽出液あるいは水 0.3 mL の混合液に酵素液 0.3 mL を加え、30 °C、5 分間振動下で反応させた後、2%メタリン酸を 3 mL 添加し、反応を停止させた後、325 nm の吸光度を測定した。

コントロール溶液：クロロゲン酸溶液(0.4~5 mM)0.5 mL 及び McIlvaine 緩衝液(pH 5.0)0.9 mL と抽出液 0.3 mL あるいは水の混合液に、2%メタリン酸を 3 mL あらかじめ加え、ついで酵素液を 0.3 mL 添加した溶液の 325 nm の吸光度を測定した。テスト溶液とコントロール溶液の吸光度差 ( $A_{325\text{nm}}$ ) を求め、その値の 1 分当たりの増加量 0.1 を 1 unit として酵素活性を表した。

前記の酵素活性から反応速度( $v$ )と基質濃度[S]の関係を Lineweaver-Burk の方法により作図し、アルコール抽出液の阻害様式を検討した。

### 6 - 3. 結果及び考察

#### 6 - 3 - 1. 各種野菜のアルコール抽出液と PPO の褐変度

本実験では野菜のアルコール抽出液を用いたことから、抽出液中にポリフェノール化合物が含まれ、抽出液自体が酵素的に褐変する可能性が考えられるので、まず、6-2-4のクロロゲン酸の代わりに水を0.5 mL 加え、供試野菜抽出液のフキ及びゴボウ PPO による褐変反応について検討した。その結果、供試したすべての抽出液において褐変反応は見られなかった。したがって、供試抽出液には第3章及び第5章に示した PPO の基質特異性から考えて、褐変の基質となるクロロゲン酸、エピカテキン等のポリフェノール化合物はほとんど含まれないものと考えられる。

#### 6-3-2. 各種野菜のアルコール抽出液と PPO のクロロゲン酸の褐変に与及ぼす影響

##### 1) フキの PPO

フキの PPO とアルコール抽出液、0.01%、1% L-アスコルビン酸を 30 で 5、10、15、20、30 分反応させ 420 nm でのクロロゲン酸の褐変度を測定し、アルコール抽出液の代わりに脱イオン水を加え、同様に反応させ、クロロゲン酸の褐変に及ぼす影響について検討した。その結果、Fig. 6-1 に示したように、すべての抽出液がフキ PPO の褐変を抑制し、特にセロリ茎とゴボウ茎からの抽出液の抑制作用が強かった。また、ニンジン、パセリからの抽出液の阻害活性はやや弱かった。一方、フキ PPO の褐変は 1% L-アスコルビン酸によってほぼ完全に抑制されたが、0.01% L-アスコルビン酸での抑制効果はきわめて低く、褐変測定から 20 分後には褐変が復活した。その理由としてアスコルビン酸自身が酸化されデヒドロアスコルビン酸になることにより、PPO 作用で生成したキノンを還元して無色にしたと考えられる。

##### 2) ゴボウの PPO

ゴボウの PPO もフキ PPO と同様の方法でクロロゲン酸の褐変度を測定した。

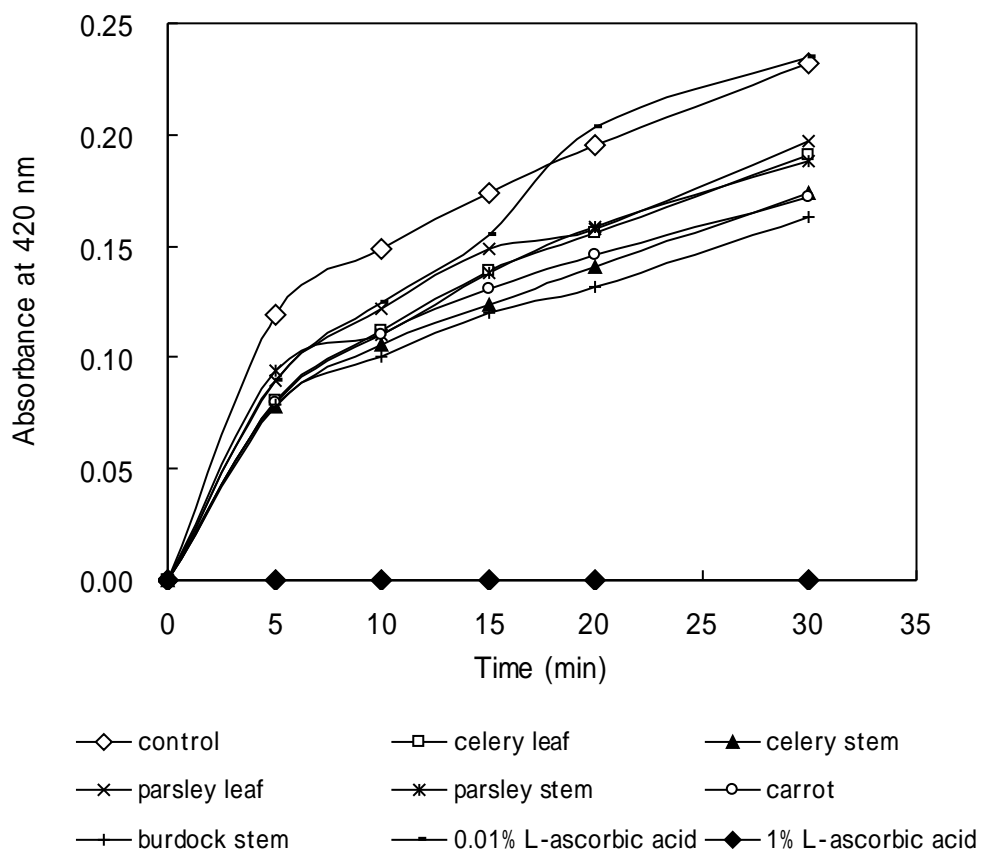
その結果、Fig. 6-2 に示したように、ゴボウ PPO はパセリ茎、ゴボウ茎の抽出液では褐変が促進され、ニンジン、セロリの抽出液では阻害影響をあまり受けず、一方、パセリ葉の抽出液では褐変が抑制され、フキ PPO と違う阻害効果を示した。すなわち、ゴボウ PPO の褐変はフキ PPO のクロロゲン酸の褐変とその様相が異なり、反応当初は、その活性が一度上がる傾向にあり、時間の経過とともに活性は下がることがわかった。これは PPO によって生じたキノンの重合体が酵素と結合して褐変を抑制したと考えられる。同様の傾向は果実アセトン抽出液のブドウ PPO、幸水ナシ PPO のクロロゲン酸の酸化・褐変影響<sup>64)</sup>でも現れている。一方、ゴボウ PPO の褐変はフキ PPO と同様に 1% L-アスコルビン酸によってほぼ完全に抑制された。さらに、ゴボウ PPO は 0.01% L-アスコルビン酸によって 5 分間抑制されたが、すぐに褐変し始め、30 分後ではコントロール褐変度の 1.5 倍の数値を示した。これらのことから植物 PPO は起源によって阻害される場合と活性化される場合があると考えられる。

### 6 - 3 - 3. 各種野菜のアルコール抽出液と PPO の阻害機構

藤田及び東野<sup>68)</sup>は温州ミカン抽出液中にその PPO (フロログルシノール酸化酵素) の阻害物質が存在することを見だし、阻害反応機構を速度論的に追究している。すなわち、温州ミカン PPO は金属イオンのうち、銅イオンにより非拮抗的に、亜鉛及びニッケルイオンにより拮抗的に阻害されること、また、種々のポリフェノール化合物により、拮抗的に阻害されることを報告し、温州ミカン抽出液に含まれる阻害物質の本体がポリフェノール化合物であることを推定している。そこで、フキ PPO に対して比較的阻害活性の高かったゴボウ茎抽出液の影響について反応速度論的に検討した。すなわち、ゴボウ茎抽出液の添加時及び無添加時の基質濃度と反応速度との関係を調べ、Lineweaver-Burk の方法により作図した結果が

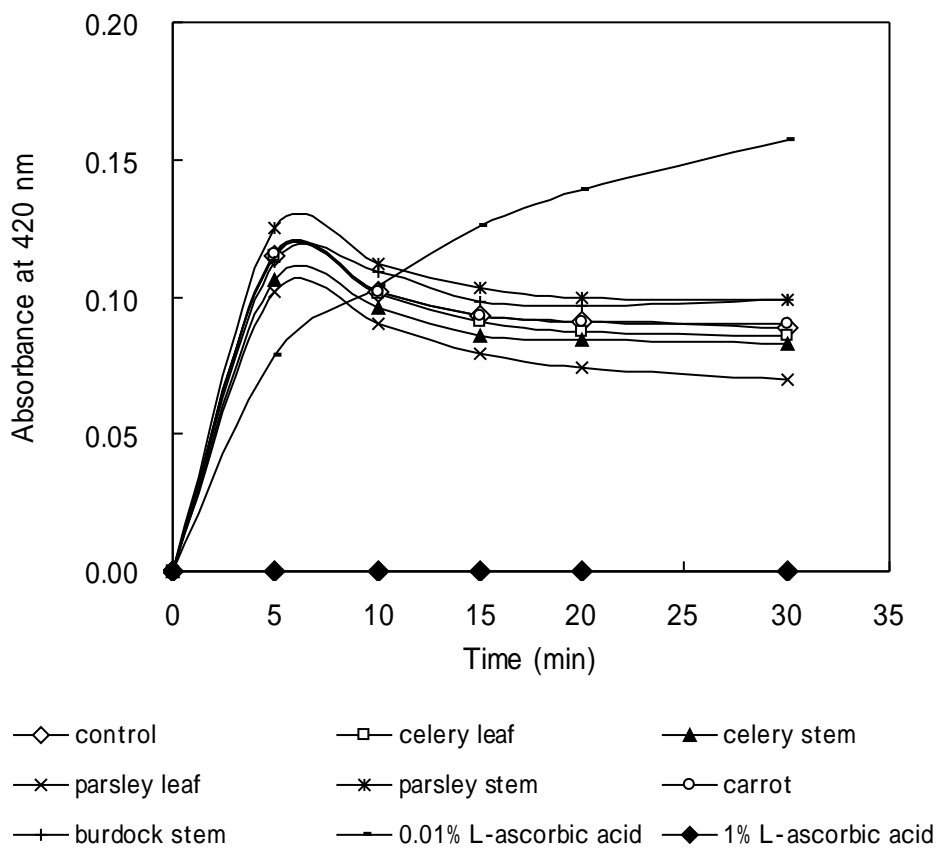
Fig. 6-3 である。この図から明らかなように、ゴボウ茎抽出液はフキ PPO を拮抗的に阻害することが認められた。本研究では確かめていないが、前記の藤田及び東野<sup>68)</sup>の結果及び本実験の結果から考えて、ゴボウ茎抽出液中に含まれる阻害物質の本体はクロロゲン酸やエピカテキン以外のポリフェノール化合物である可能性が考えられる。さらに、パセリ葉抽出液のゴボウ PPO に及ぼす影響について検討した結果、Fig. 6-4 に示すように、パセリ葉抽出液によりゴボウ PPO は非拮抗的に阻害されることが明らかとなった。このような非拮抗的阻害はキュウリ<sup>13)</sup>、タマネギ<sup>14)</sup>の抽出液でも見られ、その主な成分は揮発性成分で、PPO との疎水部分の結合によって活性を阻害すると推定されている。また、前期の藤田及び東野<sup>68)</sup>の研究からパセリは抽出液に含まれる銅イオンが阻害物質である可能性も示唆された。

以上のように、本実験で供試した数種の野菜抽出液は酵素的褐変反応を阻害することから、カット野菜等の褐変阻害剤として利用できる可能性が示唆された。今後、これらを阻害剤として実用化するためには阻害物質の本体を単離、同定する必要があると考えられる。



**Fig.6-1 Effect of alcohol extracts on the enzymatic browning caused by Japanese butterbur PPO**

PPO activity was assayed at various times (5, 10, 15, 20, 30 min) in McIlvaine buffer (pH 5.0) at 30 .



**Fig.6-2 Effect of alcohol extracts on the enzymatic browning caused by edible burdock PPO**

PPO activity was assayed at various times (5, 10, 15, 20, 30 min) in McIlvaine buffer (pH 5.0) at 30 .

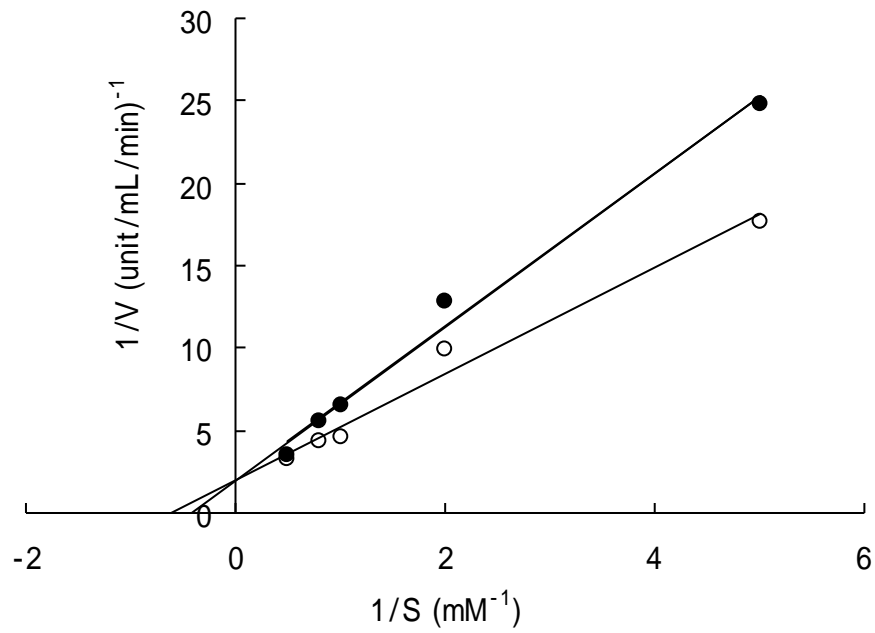


Fig. 6-3 Inhibitory effects of burdock stem extract on Japanese butterbur PPO

Control (○), Burdock stem extract(●).

V: Rate of the enzyme reaction, S: Substrate concentration.



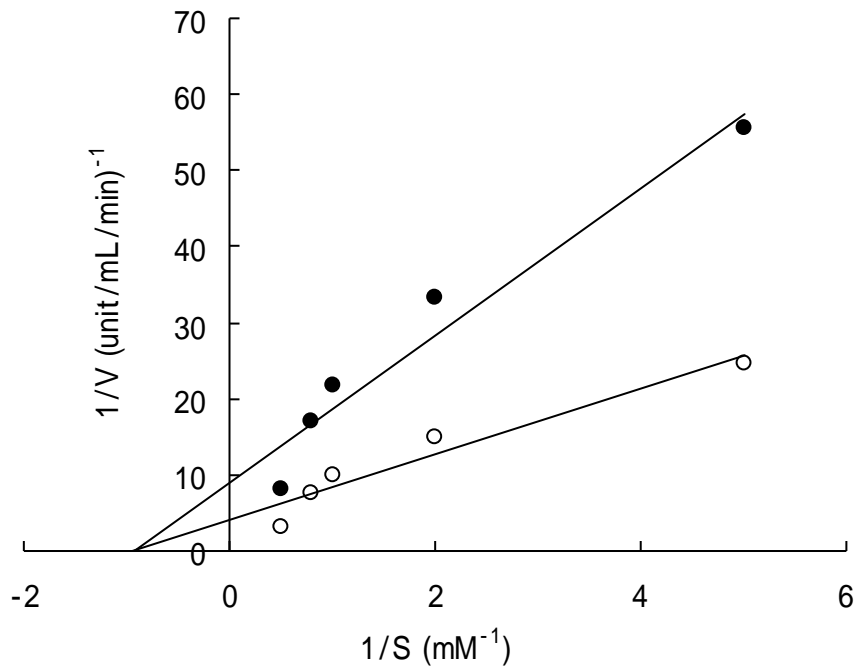


Fig. 6-4 Inhibitory effects of parsley leaf extract on edible burdock PPO

Control (○), Parsley stem extract(●).

V: Rate of the enzyme reaction, S: Substrate concentration.

#### 6 - 4. 小括

本研究ではキク科植物の褐変防止のため各種野菜からの抽出液の阻害作用について検討した。

(1) 各種野菜の抽出液とフキ、ゴボウ PPO のクロロゲン酸の褐変に与える影響を調べた結果、供試したすべての野菜抽出液はフキ PPO に対し褐変を阻害したが、ゴボウ PPO ではパセリ茎及びゴボウ茎抽出液は褐変を促進した。また、フキ PPO はゴボウ茎抽出液により、ゴボウ PPO はパセリ葉抽出液により、それぞれ強く阻害された。

(2) ゴボウ茎とパセリ葉の抽出液の阻害機構について検討した。その結果ゴボウ茎抽出液はフキ PPO を拮抗的に、パセリ葉抽出液はゴボウ PPO を非拮抗的に阻害することが明らかになった。

## 第7章 総括

青果物の加工、貯蔵中に見られるいわゆる酵素的褐変はそれら青果物の商品価値を低下させることから、褐変に関与するポリフェノール化合物やポリフェノール酸化酵素(PPO)に関しては古くから多くの研究が行われている<sup>9)~49)</sup>。しかし、PPOについては抽出された酵素が不安定なことから酵素の精製は困難とされ、粗酵素レベルでの研究が多数を占めている<sup>15), 16), 37), 41)</sup>。リーフレタス、フキ、ゴボウなどのキク科植物においてもアクが強く、酵素的褐変も著しいことからいち早く注目を集め、ポリフェノールやPPOに関しても1960年代から研究が行われている<sup>37), 51), 64)</sup>。中林ら<sup>37)</sup>の研究によるとキク科植物であるゴボウには主としてクロロゲン酸同族体を含み、それがPPOによって酸化され、ゴボウの褐変につながると報告されているが、他のキク科植物のポリフェノールに関する報告は少ない。そこで、本研究ではキク科植物の酵素的褐変について研究するためにまず、キク科植物の主要因子と考えられるクロロゲン酸類の含量を測定した。ついでポリフェノールの代謝など植物二次代謝の鍵酵素となるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)とチロシンアンモニアリアーゼ(TAL)や酸化酵素であるPPOやペルオキシダーゼ(POD)活性について粗酵素レベルで調べた。さらにこれまで精製が困難とされてきたキク科植物であるリーフレタス、ゴボウ、フキのPPOを精製し、その性質などを調べて比較研究を行った。また、比較的褐変しにくい野菜からアルコール可溶性成分を抽出し、ゴボウとフキPPOの褐変阻害効果を粗酵素レベルで検討した。本研究結果の概要は以下の通りである。

第2章においてはキク科植物に含まれる基質ポリフェノール含量、クロロゲン酸含量及び酵素的褐変に関連する酵素活性について追究した。すなわち、まず、7種類のキク科植物を用いてアルコール抽出液を調製し、抽出液中の全ポリフェノール

量、クロロゲン酸含量を測定した。

その結果、供試試料のうちゴボウ、ヨモギ、タンポポにおいて 500 mg/100 g FW 以上の全ポリフェノール含量を示し、最も低いヘッドレタスでも 20 mg/100 g FW であった。また、クロロゲン酸含量を測定した結果、ゴボウ、ヨモギが 200 mg/100 g FW 以上の含量と相対的に高い値を示したが、リーフレタス、フキ、シュンギク、タンポポでは 14~50 mg/100 g FW と相対的に低く、ヘッドレタスにはクロロゲン酸がほとんど含まれていなかった。以上のように、キク科植物のクロロゲン酸含量は全ポリフェノール量の約 2~50%を占めることが明らかとなった。さらに第 3 章で示した褐変反応に伴う反応液の吸収スペクトルの変化からも明らかのように、クロロゲン酸類が褐変反応の主要基質となると考えられる。

前記のようにポリフェノール代謝には PAL 及び TAL が大きく関与している。そこで、供試キク科植物について PAL 及び TAL 活性について測定した。その結果、PAL 活性は供試した 7 種のキク科植物のすべてに検出されたが、TAL 活性はリーフレタス、ヨモギ、タンポポで検出されたものの、ゴボウやフキなどでは検出されなかった。したがって、キク科植物のクロロゲン酸生成には TAL 活性より PAL 活性の方が深く関与しているものと思われる。また、今回の試料は市場より購入した物を用いており、本実験でみられた PAL 及び TAL 活性の差異は供試キク科植物の採取時期、野菜の貯蔵期間あるいは使用した部位によってその差が生じたのではないかと考えられるが、この点についてはさらに検討する必要がある。

引き続き褐変に直接関与する酵素活性について調べた。供試したキク科植物には活性の強さには差があったが、いずれの植物も PPO と共に POD 活性を有することが認められた。両酵素活性ともゴボウがいちばん高く、次にヘッドレタス、リーフレタスが高く、シュンギク、タンポポは低い活性を示した。このような PPO と POD の関係と POD の褐変反応への関与についてはカンキツ類<sup>42)~45)</sup>においても

認められている。

前記のように、キク科植物にはクロロゲン酸が含まれ、それが PPO により酸化され、酵素的褐変が引き起こされると考えられるが、これまでキク科植物の精製 PPO に関しては筆者らの研究室で行われたシュンギク<sup>26)</sup>及び球状レタス<sup>27)</sup>を除いて報告されていない。そこで、本研究ではキク科植物であるリーフレタス、ゴボウ、フキを材料として、クロロゲン酸を基質として PPO の精製を行い、精製酵素の性質等について調べた結果を第 3~5 章に示した。ここでは Table 7-1 に示したようにこれまで本研究室で精製したヘッドレタス及びシュンギクでの結果を同時に示し、比較した。すなわち、リーフレタスの抽出液については硫酸分画により、ゴボウ及びフキについてはアセトン分画により粗酵素液を調製後、イオン交換クロマトグラフィー、疎水及びゲルろ過クロマトグラフィーを行い、それぞれの植物についてクロロゲン酸酸化酵素(ChO)が高純度に精製された。この際それぞれの植物の ChO においては、それらの精製過程における挙動にかなりの相違が見られた。まず、精製過程においては、リーフレタスの場合、硫酸分画後の ChO は DEAE- Cellulofine AL カラムクロマトグラフィー段階でほとんどカラムに吸着せずに素通りした。一方、ゴボウ、フキのアセトン分画後の粗酵素は DEAE カラムに吸着され、0.5~0.8 M の NaCl 溶液で溶出された。このリーフレタスの PPO が DEAE- Cellulofine AL カラムに吸着されず素通りした理由については、酵素抽出中に PPO が基質ポリフェノールに作用し、最終的に生成したメラニン色素にアミノ酸あるいはタンパク質のアミノ基が結合した結果によるのではないかと考えられる。また、フキの酵素の精製においてはブチル基及びフェニール基を用いた疎水クロマトグラフィーを行う必要があった。

最終的に精製されたリーフレタス、ゴボウ、フキのそれぞれの PPO は Native-PAGE により単一バンドを示し、電気泳動的に均一であった。ゲル濾過に

よる推定分子量はそれぞれ約 46,000、40,000、25,000 であり、SDS-PAGE においてもほぼ同一分子量の単一バンドを示したことから、いずれの PPO もモノマー蛋白質であることが認められた。このような PPO の分子量は同じキク科のシュンギク<sup>26)</sup> (45,000) 及び球状レタス<sup>27)</sup> (56,000) とやや相違しており、栽培品種や系統などによる PPO の多様性<sup>2), 30), 31), 61), 62)</sup>を示す結果の一つであると考えられる。

リーフレタス、ゴボウ、フキ、それぞれの精製 PPO はいずれも *o*-ジフェノール類であるクロロゲン酸を強く酸化し、ついでエピカテキンを酸化した。カテコール、カテキン、カフェ酸などの他の *o*-ジフェノール類も酸化したが、その活性は弱く、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロール及び没食子酸、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンであるフロログルシノール、*m*-ジフェノールであるレゾルシノールは全く酸化されなかった。一方、本研究室で精製されたシュンギクの PPO<sup>26)</sup> はクロロゲン酸とエピカテキンをほぼ同程度に酸化すると共に *o*-ジフェノール類だけでなく 1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロールと没食子酸も酸化することが明らかにされている。このような ChO 活性はリンゴ<sup>28)</sup>、ニホンナシ<sup>39)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等に認められている。また、サクランボ<sup>21)</sup>、アボカド<sup>22), 25)</sup>などの PPO の多くはカテコールや 4-メチルカテコール等を強く酸化し、また、バナナ PPO<sup>30), 31)</sup>はドーパミンを強く酸化することが報告されている。このように、果実、野菜の PPO は起原とする植物により基質特異性に多様性を示すことは明らかである。

以上のように、本研究で精製した 3 種の野菜 PPO はクロロゲン酸とエピカテキンを強く酸化することが認められた。また、これまで報告されているニホンナシ<sup>39)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等の PPO はクロロゲン酸を基質とした場合とエピカテキンを基質とした場合に pH の影響等が相違することが知られている。そこで、以下の諸性質はクロロゲン酸とエピカテキンを基質として調べた。

クロロゲン酸とエピカテキンを用い、基質濃度と反応速度の関係を調べ、Lineweaver-Burk の方法で作図し、*K<sub>m</sub>* 値を求めた。リーフレタス PPO のクロロ

ゲン酸及びエピカテキンに対する  $K_m$  値はそれぞれ、1.0 mM 及び 1.4 mM と算出された。また、ゴボウ PPO 及びフキ PPO のこれら基質に対する  $K_m$  値はゴボウ (クロロゲン酸:0.4 mM、エピカテキン:2.7 mM)、フキ(クロロゲン酸:0.14 mM、エピカテキン 0.7 mM)であった。他のキク科植物 PPO では球状レタス PPO<sup>27)</sup>(クロロゲン酸:0.67 mM、エピカテキン:0.91 mM)、シュンギク PPO<sup>26)</sup>(クロロゲン酸:2.0 mM、エピカテキン:10 mM)であることが報告されており、これらの中ではフキ及び球状レタス PPO の  $K_m$  値が類似することが認められた。このようにキク科植物のクロロゲン酸に対する  $K_m$  値はいずれも 1 mM 以下であり、さらに第 2 章で明らかにしたように、これらキク科植物にはヘッドレタスを除いてクロロゲン酸が 14~200 mg/100 g FW と比較的多量に存在することから、クロロゲン酸はキク科 PPO の主な基質であることが考えられた。

これまでに PPO は使用する基質により異なった最適 pH 値を示すことが報告されている。例えば、ピーマン PPO<sup>63)</sup>の場合、クロロゲン酸とピロカテコールを強く酸化するが、最適 pH はそれぞれ 4.0 と 7.8 である。そこで、本研究ではクロロゲン酸とエピカテキンを基質として pH3~12 の範囲で最適 pH を調べた。その結果、本研究で精製した 3 種のキク科植物 PPO のクロロゲン酸とエピカテキンに対する最適 pH はいずれの酵素の場合も、それぞれ 5.0 と 8.0 であった。これらの結果は球状レタス PPO<sup>27)</sup>(ChO: 4.5, EpO: 7.8)およびシュンギク PPO<sup>26)</sup>(ChO: 4.0, EpO: 8.0)の場合と類似した。一方、ニホンナシ PPO<sup>39)</sup>も同様にクロロゲン酸とエピカテキンを強く酸化するが、両基質に対する最適 pH 値は 4.2 であり、レタス等のキク科植物の PPO 場合とは相違するようである。さらにクロロゲン酸を基質とした時、酸性側に最適 pH 値を有する PPO は、他にリンゴ PPO<sup>28)</sup>(pH 4.0)、ナス PPO<sup>40)</sup>(pH 4.0)等に見出されている。このように多くの青果物 PPO の ChO 活性の最適 pH 値は 4.0 付近である。従ってこれら青果物の ChO は酸性 PPO であると考えられる<sup>26)~34)</sup>。

一方、カテコール、4-メチルカテコール、ドーパミンを基質として用いた場合の最適 pH 値はサクランボ PPO<sup>21)</sup> (pH 8.0)、アボカド PPO<sup>22), 25)</sup> (pH 7.0)、バナナ果実 PPO<sup>31)</sup> (pH 6.5)において中性付近に認められている。いずれにしても、キク科植物の精製 PPO はピーマン PPO<sup>63)</sup> やナス PPO<sup>40)</sup> と同様に酸性側では ChO として、中性ないし微アルカリ側では EpO として強く作用するものと考えられる。

リーフレタス、ゴボウ及びフキの精製酵素溶液の pH 安定性を調べた結果、いずれの PPO も pH5~7 の範囲で ChO、EpO 両活性とも約 70%以上の残存活性を示し、ほぼ安定であることが認められた。同様の安定性は球状レタス<sup>27)</sup>及びシュンギク PPO<sup>26)</sup>においても認められた。ニホンナシ<sup>39)</sup>、ナス<sup>40)</sup>等、ほかの植物 PPO は pH 4~8 でほぼ安定であり、これら PPO に比べキク科植物 PPO の pH 安定域はやや狭いと思われる。

3 種のキク科植物の PPO の最適温度を調べた結果、リーフレタス PPO、フキ PPO は球状レタス PPO<sup>27)</sup> と同様に ChO、EpO の両活性は 30 °C 付近で認められた。また、ゴボウ PPO では両活性とも最適温度は 20 °C 付近に認められた。一方、シュンギク PPO<sup>26)</sup> の場合それぞれ 30 °C、40 °C 付近に認められている。このようにキク科植物の PPO に対する温度の影響は、品種、系統によりやや異なるように思われる<sup>34)</sup>。

3 種のキク科植物の精製 PPO の熱安定性を測定した。その結果、リーフレタス、フキ PPO は 80 °C、10 分間の加熱処理においても両活性とも 20%以上の残存活性を示しており、この熱安定性はシュンギク<sup>26)</sup>、球状レタス<sup>27)</sup>などほかの植物 PPO に比べても高いものであった。一方、ゴボウの PPO は 50 °C、10 分間の加熱処理において 20%程度の残存活性を示すにすぎず、70 °C、10 分間の加熱処理では完全に失活し、他のキク科植物 PPO に比べて不安定であった。

3 種のキク科植物から得られた精製 PPO は金属酵素阻害剤であるジエチルジチ



オカルバミン酸ナトリウムやシアン化カリウムにより強くに阻害された。したがって、今回の精製 PPO はほかの植物 PPO と同様に金属<sup>2), 22), 25)~27)</sup> (他の例からみておそらく銅) を含むものと考えられる。さらに、これら精製 PPO は  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ により 5 mM と 10 mM の濃度で阻害された。これらの金属イオンの阻害効果は、同じキク科植物であるシュンギク PPO<sup>26)</sup>や球状レタス PPO<sup>27)</sup>でも同様に認められている。さらに、いずれの PPO も還元剤である L-アスコルビンや PPO 阻害剤として知られている L-システインにより強く阻害された。さらにリーフレタス及びゴボウ PPO は 10 mM NaCl によっても強く阻害されることから、L-アスコルビン酸、L-システイン、NaCl がキク科植物の褐変防止剤として利用できるものと考えられる。

前記のように、これまでカット野菜やリンゴ果汁等の酵素的褐変の防止のために L-アスコルビン酸等の還元剤 L-システインや NaCl 等の PPO 阻害剤が安全性の高いものとして使用されてきた。最近、より安全性の高い PPO 阻害剤として、アリル化合物を多く含有するタマネギやキャベツ抽出液の利用が試みられている<sup>65)~67)</sup>。そこで、第 6 章においてはパセリ、セロリ、ニンジン等のセリ科植物とゴボウ茎等数種の野菜からアルコール可溶性成分を調製し、キク科野菜であるフキ及びゴボウ PPO による褐変阻害効果を検討した。供試したすべての野菜抽出液はフキ PPO に対し褐変を阻害したが、ゴボウ PPO ではゴボウ茎抽出液は褐変を促進した。このようにフキ PPO はゴボウ茎抽出液により、ゴボウ PPO はパセリ葉抽出液により、それぞれ強く阻害されたことから、これら抽出液の阻害様式について調べた。その結果フキ PPO はゴボウ茎抽出液により拮抗的阻害を、また、ゴボウ PPO はパセリ葉抽出液により非拮抗的阻害を受けることが明らかとなった。したがって、フキ PPO やゴボウ PPO の褐変防止にはこれらの野菜の抽出液が有望な褐変阻害物質であると考えられる。

以上のように、本研究においてはキク科野菜に見られる酵素的褐変について基質と酵素の両面から追究した。キク科野菜は含量の差はあるもののクロロゲン酸類を主たるポリフェノールとして含有していることが認められた。また、供試した野菜のいずれにもシキミ酸経路の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) とチロシンアラニンアンモニアリアーゼ (TAL) 活性が検出されたことから、これらクロロゲン酸類はシキミ酸経路により生成することが明らかとなった。さらに、キク科野菜 PPO は粗酵素レベルにおいてクロロゲン酸を強く酸化することが認められ、また、褐変反応前後の反応液の吸収スペクトルの変化からも酵素的褐変反応におけるクロロゲン酸の関与が明らかとなった。そこで、本研究ではさらにキク科野菜のうちこれまで研究されていなかったリーフレタス、ゴボウ及びフキを試料としてクロロゲン酸酸化酵素を精製し、筆者が所属する研究室で既に精製が行われている球状レタス及びシュンギクのクロロゲン酸酸化酵素との性質等の比較を行った。その結果、キク科野菜の PPO はクロロゲン酸を最も強く酸化し、ついでエピカテキンを酸化したが、クロロゲン酸酸化活性とエピカテキン酸化活性の相対的な強さは野菜の種類によって異なっていた。このように、キク科野菜の品種や系統により PPO の性質等にやや差はあるものの、キク科野菜の酵素的褐変はシキミ酸経路により生成したクロロゲン酸の酸化反応系により引き起こされることを明らかにした。

さらに、これまで、酵素的褐変の防止には L-アスコルビン酸、L-システイン、塩化ナトリウム等が効果的であることが報告されているが、供試したキク科野菜の場合もこれら化合物により褐変が著しく抑制されることが明らかとなった。さらに安全性の高い褐変阻害剤の開発を目指して数種の野菜抽出液の褐変阻害効果について検討した結果、フキの褐変に対してはゴボウ茎のアルコール抽出液が、ゴボウの褐変に対してはパセリ葉のアルコール抽出液が効果的な阻害効果を示すこ

とを明らかにした。今後はこれら抽出液に含まれる阻害物質の本体を明らかにすること等により、より安全で効果の大きい酵素的褐変阻害剤の開発と実用化が望まれる。

Table 7-1 Some properties of composite plant PPO

	Edible burdock		Leaf lettuce		Japanese butterbur		Head lettuce		Garland chrysanthemum	
MW <sup>a</sup> (KDa)	40		46		25		56 <sup>b</sup>		45	
Sub spe <sup>c</sup>	Chl <sup>d</sup> : 100		Chl <sup>d</sup> : 100		Chl <sup>d</sup> : 100		Chl <sup>d</sup> : 100		Chl <sup>d</sup> : 100	
	Epi <sup>d</sup> : 80		Epi <sup>d</sup> : 50		Epi <sup>d</sup> : 90		Epi <sup>d</sup> : 60		Epi <sup>d</sup> : 100	
Km (mM)	Chl <sup>d</sup> : 0.36		Chl <sup>d</sup> : 1.0		Chl <sup>d</sup> : 0.14		Chl <sup>d</sup> : 0.67		Chl <sup>d</sup> : 2.0	
	Epi <sup>d</sup> : 2.7		Epi <sup>d</sup> : 1.4		Epi <sup>d</sup> : 0.7		Epi <sup>d</sup> : 0.91		Epi <sup>d</sup> : 10	
	ChO <sup>e</sup>	EpO <sup>e</sup>	ChO <sup>e</sup>	EpO <sup>e</sup>	ChO <sup>e</sup>	EpO <sup>e</sup>	ChO <sup>e</sup>	EpO <sup>e</sup>	ChO <sup>e</sup>	EpO <sup>e</sup>
Opti pH <sup>f</sup>	5.0	8.0	5.0	8.0	5.0	8.0	4.5	7.8	4.0	8.0
pH sta <sup>g</sup>	5~7	5~7	5~8	5~8	4~9	4~9	4~9	4~9	4~11	4~11
Opti tem( ) <sup>h</sup>	20	20	30	30	30	30	30	30	30	40
Tem sta( ) <sup>i</sup>	30~40	30~40	30~60	30~60	30~60	30~60	- <sup>n</sup>	- <sup>n</sup>	30~60	30~60
Compound <sup>j</sup>										
KCN	1	0	0	0	6	2	0	0	30 <sup>k</sup>	- <sup>n</sup>
Na-DIECA	8	0	0	0	1	0	93	92	50 <sup>k</sup>	- <sup>n</sup>
MnCl <sub>2</sub>	10	- <sup>n</sup>	0	- <sup>n</sup>	61	- <sup>n</sup>	15	- <sup>n</sup>	3 <sup>k</sup>	- <sup>n</sup>
NaCl	34	60	3	84	93	100	46	92	25 <sup>k</sup>	63 <sup>j</sup>

<sup>a</sup> Molecular weight by SDS-PAGE. <sup>b</sup> Molecular weight by gel filtration.

<sup>c</sup> Substrate specificity. <sup>d</sup> Chl: chlorogenic acid; Epi: (-)-epicatechin.

<sup>e</sup> ChO: chlorogenic acid oxidase; EpO: (-)-epicatechin oxidase. <sup>f</sup> Optimum pH.

<sup>g</sup> pH stability; 70% remaining. <sup>h</sup> optimum temperature.

<sup>i</sup> Thermal stability; 50% remaining activity after incubation at pH 7.0 for 10min and 30 min.

<sup>j</sup> Final concentration of compound at 5mM.

<sup>k</sup> Final concentration of compound at 1mM.

<sup>n</sup> not determined.

## 参 考 文 献

- 1) 高宮和彦: 野菜の科学. 朝倉書店, p1~194 (1995).
- 2) 木村進. 中林敏郎. 加藤博通: 食品の変色の化学. 光琳, p71~157 (1997).
- 3) 太田英明: カット野菜の加工・流通における品質保持. 調理科学, **25**, 334-340 (1992).
- 4) 安部一博: カット果実・野菜の消費動向ならびに生理・化学的特性と流通技術. 調理科学, **31**, 327~335 (1998).
- 5) 村田容常: 酵素的褐変とその制御. 化学と生物, **45**, 403~410 (2007).
- 6) 大村浩久. 尊田民善: 食品の変色とスペクトルとの関係(III). 栄養と食糧, **23**, 367~373 (1970).
- 7) 小宮山美弘. 原川守. 辻政雄: 日本産スモモのポリフェノール含量と酵素的褐変について. 日本食品工業学会誌, **26**, 325~330 (1983).
- 8) 中林敏郎. 山田恭史: 焙煎によるコーヒー褐色色素の形成順序. 日本食品工業学会誌, **34**, 211~215 (1987).
- 9) Vaughn, K. C. and Duke, S. O. : Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.*, **60**, 106~112 (1984).
- 10) Vaughn, K. C., Lax, R. L. and Duke, S. O. : Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.*, **72**, 659~665 (1988).
- 11) Murata, M., Tanaka, E., Minoura, E. and Homma, S. : Quality of cut lettuce treated by heat shock: prevention of enzymatic browning, repression of phenylalanine ammonia-lyase activity, and improvement

- on sensory evaluation during storage. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 501~507 (2004).
- 12) Gloria, L-G., Mikal, S., Marita, C. : Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. *Postharvest Biol. Technol.*, **9**, 223~233 (1996).
  - 13) Fernando, G-H., Mercedes, J., Juana, C., Francisco G-C. and Josefa, E. : Tyrosinase inhibitory activity of cucumber compounds: enzymes responsible for browning in cucumber. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7764~7769 (2003).
  - 14) Lee, M-K., Kim, Y-M., Kim, N-Y., Kim, G-N., Kim, S-H., Bang, K-S. and Park, I. : Prevention of browning in potato with a heat-treated onion extract. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 856~858 (2002).
  - 15) Pedro, W-E. and Morris, W. M. : Strawberry polyphenoloxidase: its role in anthocyanin degradation. *J. Food. Sci.*, **55**, 1320~1325 (1990).
  - 16) Pedro, W-E. and Morris, W. M. : Strawberry polyphenoloxidase: extraction and partial characterization. *J. Food. Sci.*, **55**, 1320~1325 (1990).
  - 17) Fujita, S., Han, Y-Z., Kouno, C., Matsuo, T., Yamashita, M., Haraguchi, Y., Li, Y-J., Hayashi, N. and Yang, C-P. : Purification and characterization of polyphenol oxidase from edible yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). *Food Sci. Technol. Res.*, **12**, 235~239 (2006).
  - 18) Nagai, T. and Suzuki, N. : Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.). *J. Food. Sci.*, **68**, 16~20 (2003).

- 19) Kozukue, N. and Ogata, K. : Physiological and chemical studies of chilling injury in pepper fruits. III. The changes of phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in pepper seeds stored at 6 °C and 20 °C. *J. Japan. Soc. Hort.*, **40**, 416~420 (1971).
- 20) Luh, B. S. and Phithakpol, B. : Characteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peach. *J. Food Sci.*, **27**, 264~268 (1972).
- 21) Benjamin, N. D., Montgomery, M. W. : Polyphenol oxidase of royal an cherries: purification and characterization. *J. Food Sci.*, **38**, 799~806 (1973).
- 22) Kahn, V. : polyphenol oxidase in avocado. *Phytochemistry*, **15**, 267~272 (1976).
- 23) Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M. and Nicolas, J. J. : Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 926~931 (1990).
- 24) Josefa, E., Fernando, G-H., Nuria, C. and Maria, A. P. : Subcellular localization and Isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6123~6129 (2002).
- 25) Kahn, V. : Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rate. *J. Food Sci.*, **42**, 38-43 (1977).
- 26) Nkya, E., Kouno, C., Li, Y-J., Yang, C-P., Hayashi, N., Fujita, S. : Purification and characterization of polyphenol oxidase from garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium* L). *J. Agric. Food chem.*,

- 51**, 5467~5471 (2003).
- 27) Fujita, S., Tono, T., Kawahara, H. : Purification and properties of polyphenol oxidase in Head Lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Sci Food Agric.*, **55**, 643~651 (1991).
- 28) Murata, M., Kurokami, C., Homma, S. : Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus Pumula*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1705~1710 (1992).
- 29) Murao, S., Oyama, H., Nomura, Y., Tono, T. and Shin T. : Purification and characterization of *Arctium lappa* L. (Edible Burdock) polyphenol oxidase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** , 177~180 (1993).
- 30) Yang, C-P., Nong, Z-L., Lu, J-L., Lu, L., Xu, J-S., Han, Y-Z., Li, Y-J. and Fujita, S. : Banana polyphenol oxidase: Occurrence and change of polyphenol oxidase activity in some Banana cultivars during fruit development. *Food Sci. Technol. Res.*, **10**, 75~78 (2004).
- 31) Yang, C-P., Fujita, S., Asgrafyzzanan, M., Nakamura, N. and Hayashi, N.: Purification and characterization of polyphenol oxidase from Banana (*Musa sapientum* L) Pulp. *J. Agric. Food chem.*, **48**, 2732~2735 (2000).
- 32) Hisaminato, H., Murata, M. and Homma, S. : Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 1016~1021 (2001).
- 33) Julio, G., Loaiza-velarde., Francisco, A., Tomas-barbera. and Mikal, E. S. : Effect of intensity and duration of heat-shock treatments on wound-induced phenolic metabolism in iceberg lettuce. *J. Amer. Soc.*



*Hort. Sci.*, **122**, 873~877 (1997).

- 34) 藤田修二: 青果物のポリフェノール酸化酵素に関する基礎的研究. 日本食品保蔵科学会誌, **31**, 121~126 (2005).
- 35) 村田容常. 本間清一: ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御-最近の研究動向-. 日本食品科学工学会誌, **45**, 177~185 (1998).
- 36) 東野哲三: 果実類の酵素的褐変関連物質の分析. 日本食品科学工学会誌, **38**, 563~569 (1991).
- 37) 中林敏郎: 果実及び野菜類のタンニン成分(第3報). 日本食品工業学会誌, **15**, 199~206 (1968).
- 38) 東野哲三. 李忠富. 藤田修二: 差スペクトル法に基礎を置くカテキンの酵素的定量. 日本農芸化学会誌, **62**, 1351~1354 (1988).
- 39) 藤田修二. 東野哲三: ニホンナシ果実の酵素的褐変反応の吸収スペクトルによる検討. 佐賀大学農学部彙報, **61**, 21~32 (1986).
- 40) 東野哲三. 川崎宏隆. 藤田修二. 李忠富: 差スペクトル法によるクロロゲン酸酸化酵素活性の測定法及び同法によるナス精製 ChO の性質の検討. 日本農芸化学会誌, **61**, 1441~1447 (1987).
- 41) 竹内若子. 大橋千浩. 木学量子. 角野史佳. 平井菜穂子: ナスポリフェノール量がラジカル捕捉活性及び抗酸化活性に及ぼす影響. 名古屋女子大学紀要, **50**, 53~58 (2004).
- 42) 藤田修二: 温州ミカン幼果の褐変に関する研究. 佐賀大学農学部彙報, **57**, 1~62 (1984).
- 43) 藤田修二. 東野哲三: 温州ミカン未熟果の酵素的褐変とその褐変液の吸収スペクトル. 日本食品工業学会誌, **29**, 214~220 (1982).
- 44) 藤田修二. 東野哲三: カンキツ果実の果皮障害に伴う褐変とその果皮抽出

- 液の吸収スペクトルとの関係. 園芸学会雑誌, **54**, 109~115 (1985).
- 45) 藤田修二. 東野哲三: 温州ミカン未熟果の酵素的褐変とクロロゲン酸酸化酵素活性. 日本食品工業学会誌, **28**, 600~605 (1981).
- 46) 山王丸靖子. 片山脩. 檜村芳記. 金子勝芳: リンゴの褐変に及ぼすポリフェノール成分とポリフェノールオキシダーゼ活性の影響. 日本食品工業学会誌, **45**, 28~36 (1998).
- 47) Tono. T., Fujita. S., Kawasaki. H. and Li. Z. : Assay of chlorogenic acid oxidase by difference spectra spectrophotometry. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2843~2844 (1987).
- 48) Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N. and Tono, T. : Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Agric. Food chem.*, **43**, 1138~1142 (1995).
- 49) Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Hayashi, N. and Tono, T. : Isolation and characterization of two polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *J. Agric. Food chem.*, **45**, 59~63 (1997).
- 50) Panizzi, L. and Scarpati, M. L. : Constitution of cynarine, the active principle of the artichoke. *Nature*, **174**, 1062 (1954).
- 51) Bolin, H. R. : Factors affection the storage stability of shredded lettuce. *J. Food Sci.*, **42**, 1319~321 (1977).
- 52) 奥田徹: ワインの抗酸化性とフェノール化合物との関連. 日本ブドウ・ワイン学会誌, **10**, 110~111 (1999).
- 53) 島村忠勝: カテキンの生体防御作用(お茶と健康). 日本体力医学会, **53**, 43 (2004).
- 54) 原征彦. 石上正: 茶ポリフェノール類の食中毒細菌に対する抗菌活性. 日

- 本食品工業学会誌, **36**, 996~999 (1989).
- 55) Hartree, E. F. : Determination of protein: a modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**, 422-427, 1972.
- 56) Dangyand, K., Mikal, E. and Saltveit, J. : Effects of calcium and auxin on russet spotting and phenylalanine ammonia-lyase activity in iceberg lettuce. *Hortscience*, **21**, 1169~1171 (1986).
- 57) 小机えつ子. 小机信行. 土田広信: タケノコの褐変発生に関する数種酵素活性の貯蔵中の変動. 園芸学会雑誌, **68**, 689~693 (1999).
- 58) Davis, B. T. : Disc gel electrophoresis. 2. method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci*, **121**, 404~427 (1964).
- 59) Andrews, P. : The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem J.*, **96**, 595~605 (1965).
- 60) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680~685 (1970).
- 61) Galeazzi, M. A. M., Sgarbieri, V. C., Constantinides, S. M. : Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenol oxidases (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa sapientum* L). *J. Food Sci.*, **46**, 150~155 (1981).
- 62) Galeazzi, M. A., Sgarbieri, V. C. : Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidases (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa sapientum* L). *J. Food Sci.*, **46**, 1404~1406 (1981).
- 63) 李忠富. 東野哲三. 小島孝之. 藤田修二. 川崎宏隆: 低温貯蔵中におけるピーマン種子の酵素的褐変について. 佐賀大学農学部彙報, **63**, 15~24

(1987).

- 64) 小宮山美弘. 辻政雄. 岩田隆: 各種果実のアセトン可溶性画分が果実の酵素的褐変に及ぼす影響. 日本食品工業学会誌, **38**, 177~183 (1991).
- 65) 細田浩. 岩橋由美子. 與座宏一: カットレタスの褐変に及ぼすタマネギ搾汁液の阻害作用. 園芸学会雑誌, **69**, 512~516 (2000).
- 66) 細田浩. 岩橋由美子: タマネギ搾汁液によるリンゴの切片及びジュースの褐変防止. 園芸学会雑誌, **71**, 452~454 (2002).
- 67) 細田浩. 井上絵里. 岩橋由美子. 坂上和之. 多田幹郎. 永田忠博: スルフィド類によるリンゴ切片の褐変抑制. 園芸学会雑誌, **52**, 120~124 (2005).
- 68) 藤田修二. 東野哲三: 温州ミカンのフロログルシノール酸化酵素に対するポリフェノール化合物の阻害. 佐賀大学農学部彙報, **53**, 17~26 (1982).

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切な御指導、御鞭撻を賜りました藤田修二教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始懇切な御助言を賜りました佐賀大学農学部林信行教授と宮崎大学農学部辰巳保夫教授に深甚なる謝意を表します。本論文を作成するにあたり有益なご助言をいただいた琉球大学農学部秋永孝義教授、和田浩二教授に深く謝意を表します。

共に研究に勤しみ、また励ましを頂きました研究室皆さんに心より御礼申し上げます。