

日本梨果実のポリフェノールオキシダーゼについて

小倉長雄・鎌田庸宏・佐藤隆英
中川弘毅

(農産製造学研究室)

Studies on polyphenol oxidase of Japanese pear fruits.

Nagao OGURA, Yasuhiro KAMATA, Takahide SATO
and Hiroki NAKAGAWA.

(Laboratory of Food Chemistry and Technology)

ABSTRACT

1) Polyphenol (PP) content and polyphenol oxidase (PPO) activity in nine varieties of Japanese pear were studied to elucidate the mechanism of browning of pear by crushing. Neither PP content nor PPO activity in pears were not correlated with their of browning degree.

2) PPO isoenzymes in nine varieties of pear were separated by means of polyacrylamide-gel electrophoresis and detected by zymography with catechol as substrate. Thus 3 kinds of isoenzyme in Kumoi and 9 kinds of it in Chojuro were observed, and their zymographic patterns were different according to the varieties of pears.

3) Changes in PP content and PPO activity of Kumoi during storage at 22°C were investigated. PP content was constant throughout the period of storage. Although PPO activity decreased during the early stage of storage, the activity recovered after 14 days. Core brown appeared after 14 days of storage and the degree and area of browning increased under prolonged storage.

4) Crude PPO preparation of Kumoi had optimum pH 5.8 and K_m value was 19.2 mM for catechol. Kumoi PPO showed the highest activity for chlorogenic acid and its isoenzyme having R_m 0.92 was suggested to be able to oxidize monophenol.

果実が損傷や剥皮時に褐変することは普遍的にみられる現象であるが、褐変の度合は果実の種類・品種により、また熟度によっても大きな差がみられる。この褐変はポリフェノールオキシダーゼ (EC1.10.3.1, 以下 PPO と略す) によるポリフェノール類 (PP と略す) の酸化により始まる一連の現象と考えられている (MAYERら, 1979)。褐変の強さは褐変基質である PP 含量により左右される (中林ら, 1963)。また PP 含量よりむしろ PPO 活性の強さに影響されるという報告 (竹尾, 1966)、PPO 活性や PP 含量には直接比例関係はみられず果実中に含まれる PPO の阻害物質などが影響しているとするとする報告もあり (小宮山ら, 1979, 1980) 未だ検討を要する点が多く残されている。

また果実は貯蔵中に果肉・果皮が褐変してくる現象が観察され、過熟、老化による代謝異常によるものと考えられるが、原因のひとつとして PPO の関与が考えられ

る。また PPO は多くのアイソエンザイムが報告されており褐変現象にも影響していると考えられる。

ここでは日本梨 9 品種を用いて、PP 含量、PPO 活性と破碎時の褐変の強さとの関係および各品種のアイソエンザイムについて検討した。また日本梨は比較的貯蔵可能期間が短かく、過熟時には果肉が褐変することがみられ、特に雲井はコアブラウンと呼ばれ、核に褐変が顕著に現われることが知られている品種である。この点から雲井を用いて貯蔵期間中の PP および PPO 活性の変動を調べ更に PPO の性質について検討したので報告する。

実験材料及び方法

1. 実験材料

日本梨 9 品種、雲井、石井早生、翠星、旭、長十郎、二十世紀、菊水、新高、新興を用いた。すべて本学農場

に於て栽培されたものを適期に収穫し実験材料とした。

貯蔵は22°C恒温室に30—50個貯蔵し、経時的に3—4個取出して試料とした。

2. 酵素の調製法

果実を縦に切断し、切片（果皮・果肉・核を含む）の一定量を取り、1mM アスコルビン酸・2%食塩を含む0.1M リン酸緩衝液を同量加えてホモジナイズした後、10,000×g、20分の遠心分離を行ない上澄の一部を Sephadex G-25 を用いてゲル濾過し、低分子化合物を除いた画分を粗酵素液とした。操作は4°C以下で行った。

3. 酵素活性の測定法

1cm 角の比色用セルに50mM カテコールを含む0.1M リン酸緩衝液 (pH6.2) 2.9ml をとり、0.1ml の酵素液を加え、420nm の吸光度の増大を日立自記分光光度計 556型を用いて測定した。反応は30°Cで行ない、活性は1分間に420nm の吸光度を0.001増加させる量を1単位として表示した。

4. 全ポリフェノールの定量法

Folin-Denis 法を利用して行った。果実切片5—10g にメタノール30ml を加えてホモジナイズした後、約30分湯煎上で煮沸して濾過する。残渣はメタノールを加えて再度抽出を行ない濾過する。この濾液と前の濾液を合わせて定容にする。このポリフェノール抽出液から2ml を取り、Folin 試薬2ml を加え、3分後に10%炭酸ナトリウム2ml を加えて1時間室温に放置した後、3000回転、15分遠心分離した上澄の700nm の吸光度を測定した。クロロゲン酸を標準品とした検量線から全ポリフェノール量を求めた。

5. 褐変度の測定法

破碎時に生じる褐変を小宮山ら (1979) の方法をもとに行なった。果実切片25g に脱イオン水25ml を加え、ブレンダーで破碎後30°Cに1時間保った後、メタノール100ml を加え、3重のガーゼで濾過し、濾液を脱イオン水で200ml に定容し、11,000×g 20分遠心分離し、その上澄液を400nm の吸光度を測定し褐変度とした。

6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動と活性染色

Orstein と Davis らの方法 (1964) に従い、長さ8cm 内径5mm のガラス管を用いて行った。試料用ゲルは作成せず、試料溶液と等量の40%蔗糖を加え直接濃縮用ゲル上にのせた。pH8.3のトリス-グリシン緩衝液を電解液として泳動させた。

PPO の活性染色は Wong らの方法 (1971) を参考にした。泳動後のゲルを0.05%の p-フェニレンジアミンを含む10mM カテコールに20分間浸漬し活性染色を行ない、その後10mM アスコルビン酸に5分間浸漬後、脱イオン水に浸漬した。活性染色したゲルは、デンスitomーター

により430nm の吸光度を測定し、PPO アイソエンザイムの移動度と活性の強さを求めた。

実験結果

1. 9品種の PP 含量・PPO 活性および破碎時の褐変度

日本梨9品種の PP 含量・PPO 活性と破碎時に生じた褐変の関係を検討した結果を第1表に示す。褐変の最も

第1表 日本梨9品種の PP 含量・PPO 活性および破碎時の褐変度

品 種	PP-含量 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)	PPO-活性 (単位/g 新鮮重)	褐変度 (比)
長 十 郎	294	3.92	100
旭	393	2.94	99
新 高	347	63.10	96
雲 井	360	14.10	92
石井早生	446	0.97	78
翠 星	593	1.62	75
菊 水	306	3.38	65
新 興	486	11.70	61
二十世紀	160	9.25	36

強い品種は長十郎であり、旭、新高、雲井が比較的褐変度が高い。しかし長十郎の PP 含量は低く、PPO 活性も他品種に較べて高くない。褐変の最も少ない二十世紀は PP 含量は160 $\mu\text{g/g}$ と最も少ないが、PPO 活性は比較的高い。PP 含量が最も多い品種は翠星であったが褐変度は必ずしも高くない。PPO 活性の最も高い新高は最も少ない石井早生の64倍もあったが褐変度は強くなかった。

以上の結果から、褐変度と PP 含量あるいは PPO 活性との間に比例関係は認められなかった。

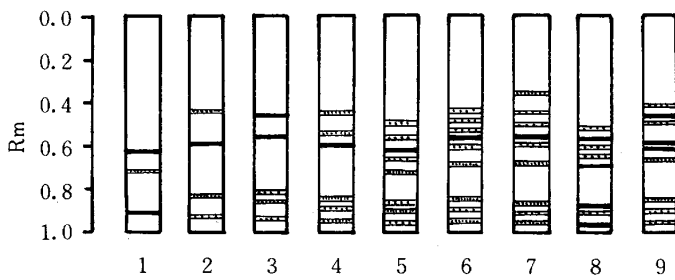
2. 9品種のアイソエンザイムについて

品種によって PPO アイソエンザイムの数とそれらの活性の強さが異なるかを、ディスク電気泳動を用いて検討した結果を第1図に示す。

品種によってアイソエンザイムの数と移動度と活性の強さは異なっていた。数は雲井で3種、石井早生で4種、翠星で5種、旭で6種、長十郎および新高で8種、二十世紀と菊水と新興で9種であった。どの品種も Rm 0.56—0.62の間に強い活性を持つものが少なくとも1つは観察された。PPO 活性の高かった新高には、活性の強い4種のアイソエンザイムが存在していることを認めた。

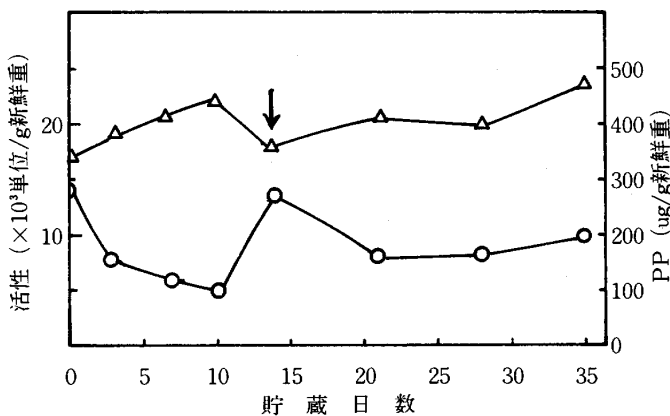
3. 貯蔵中の PP 含量と PPO 活性の変動と果実の褐変について

核に顕著な褐変が生じる品種雲井を22°Cに貯蔵し、貯



第1図 日本梨(9品種)のPPOのディスク電気泳動パターン

1. 雲井 2. 石井早生 3. 翠星 4. 旭 5. 長十郎 6. 二十世紀 7. 菊水 8. 新高 9. 新興
(基質カテコール 10 mM)



第2図 果実(雲井)の貯蔵中のPP含量・PPO活性変動及び褐変出現期△—△ PP, ○—○ PPO, ↓ 褐変出現

蔵に伴うPP含量とPPO活性の変動及び果実内部に生ずる褐変を観察した結果を第2図に示す。

PPO活性は貯蔵後10日まで減少し、以後増加し14日目に最大となり、再び減少してほぼ一定の値を保った。

PP含量は貯蔵の全期間を通じてほぼ一定であった。

核に褐色の斑点が現れるのが貯蔵後14日目であり、以後斑点は広がり核全体が褐変し果肉に広がった。褐変の現れた14日目にはPPO活性が増加し、若干PP含量の低下がみられた。

4. 雲井のPPOの性質

雲井のPPOの粗酵素を用いてキネティカルな性質を調べた。

カテコールを基質とした場合Km値は19.5mMと計算された。

pHが活性に及ぼす影響を調べた結果、最適pHは5.8にあったが、pH4.2—6.5の範囲では比較的高い活性を示した。中性およびアルカリ側では殆んど活性は認められなかった。

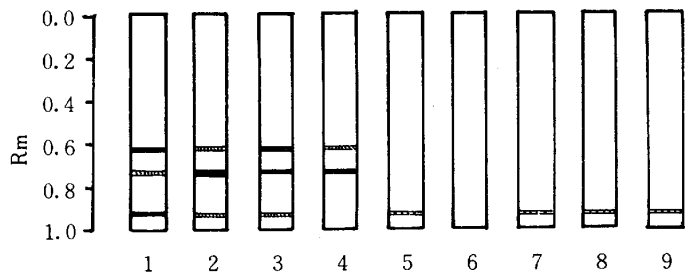
第2表 雲井のPPOの基質特異性

基 質	活 性 比
フ ェ ノ ー ル	0
ク ロ ロ ゲ ン 酸	100
コ ー ヒ ー 酸	67.5
カ テ コ ー ル	63.8
α - カ テ キ ン	18.3
没 食 子 酸	7.6
フ ロ ロ グ ル シ ン	0

(基質濃度10mM)

酵素の基質特異性を検討した結果を第2表に示す。フェノールに対しては活性を示さず、o-ジフェノールであるクロロゲン酸に一番強い活性を示し、コーヒー酸、カテコール、d-カテキンの順に活性は強かった。トリフェノールである没食子酸に対しては、わずかに活性を示したがフロログルシンに対しては活性を示さなかった。

雲井にはアイソエンザイムが3種存在することがゲル電気泳動で認められているが、活性染色の基質を替えて行ったアイソエンザイムの基質特異性を検討した結果を第3図に示す。カテコール、クロロゲン酸、コーヒー酸に



第3図 異った基質で活性染色した雲井のPPOディスク電気泳動パターン

1.カテコール, 2.クロロゲン酸, 3.コーヒー酸, 4.d-カテキン
5.没食子酸, 6.フロログルシン, 7.フェノール, 8.p-クレゾール, 9.L-チロシン (基質濃度 10 mM)

対しては3種とも活性を示し染色されたが活性の強さは異なっていた。d-カテキンは同じo-ジフェノールであるが、Rm0.92のアイソエンザイムは活性を示さなかった。没食子酸に対してはRm0.92のアイソエンザイムが僅かに活性があったが、フロログルシンに対しては活性が認められなかった。フェノール、クレゾール、L-チロシンに対してはRm0.92のバンドが僅かに染色され、活性をもつことが認められた。比色による活性測定ではフェノールに対して活性は認められなかったが、活性染色の際にはp-フェニレンジアミンを添加しており、これが酵素活

性の促進剤として働いたと考えられる (BENJAMINら 1973). Rm0.92の酵素はモノフェノールに対する活性 (クレゾラーゼ活性) を持つものと考えられる。

考 察

果実の褐変と PP 含量・PPO 活性との関連についてはいくつかの報告がなされており、中林ら (1963) は桃には褐変しやすいものと褐変の少ない品種があることから、桃の 8 品種の PP 含量・PPO 活性を調べ、PPO 活性はすべての品種に充分に存在することから褐変の強さは PP 含量によるものとした。しかし小宮山ら (1979) はスモモの 6 品種の PP 含量と褐変度は必ずしも一致しないと報告した。その後褐変度の少ない品種には PPO 活性阻害物質が存在すると報告した (1980)。茶葉の褐変度には PPO 活性が影響することも報告されている (竹尾ら 1965)。日本梨 9 品種を用いた今回の実験では PP 含量には翠星と二十世紀では 3.6 倍の差があり、PPO 活性では石井早生と新高の間には 60 倍以上の活性の差が認められ、品種間に大きな差が存在するが、破碎時の褐変の差はこれ程大きくなく、PP 含量及 PPO 活性と相互関係があるとは考えられない。褐変に関与すると思われるアスコルビン酸量や、PPO の阻害因子などの影響も考えられるが今後の検討にまきたい。

日本梨は貯蔵が長くなると果肉に褐変が生じて腐敗してゆく。この褐変と PP 及び PPO 活性との係わりを検討する目的で、雲井、長十郎の貯蔵に伴う PP・PPO 活性変動と褐変の出現時期について調べた結果、PP 含量は貯蔵期間を通じてほぼ一定であり褐変の生じた後も変化はなかった。PPO 活性は貯蔵直後から減少するが、褐変の出現した 14 日目には活性が高くなり、それ以後は減少しほぼ一定を保った。この傾向は長十郎でも見られ、褐変の出現に PPO 活性の働きが考えられる。しかし核から褐変の始まる雲井の核には PP は殆んど含まれていないことを私共は認めている (未発表)。過熟、老化に伴う果実の褐変と PPO の関連についても今後検討してゆきたい。

果実の PPO アイソエンザイムに関する報告は種々なされており、Wine grape に 8 種 (HARELら, 1973), バナナに 9 種 (MONTGOMERYら, 1975), d' Anjou pear に 8 種 (HALIMら, 1978) のアイソエンザイムが存在することが報告されている。日本梨にも 3~9 種のアイソエンザイムが存在し、品種によりその種類や活性の強さに大きな差があることを認めた。

雲井の PPO 粗酵素はカテコールに対し Km 19.5mM であり、桃 (WONGら, 1971) パートレット (LUHら, 1964) などの Km 値と大きな差はない。最適 pH が 5.8 にあつ

たが pH4.2—6.5の間では約 80% 以上の活性が認められた。このことは使用した酵素が粗酵素であるためアイソエンザイムの影響があると考えられる。桃の 4 種のアイソエンザイムはそれぞれ pH6.8, 6.5, 7.2, 7.0 に最適 pH を持ち (WONGら, 1971), またバナナ PPO は pH7 (PALMER, 1963), パートレットは pH6.2 (LUHら, 1964), リンゴ果皮の PPO は pH5.5 と 7.0 に (STELZIGら, 1972), スモモの PPO は pH4.5 に (小宮山ら, 1979) 最適 pH を持つと報告されている。

雲井 PPO はクロロゲン酸に対し最もよく働きトリフェノールのフロログルシンには作用しない。雲井 PPO は 3 種のアイソエンザイムを持ち、それぞれの酵素の基質特異性が異なっていることが認められた。Rm0.92 のアイソエンザイムはモノフェノールであるフェノール、クレゾール、L-チロシンに対して僅かではあるが活性を示し、クレゾラーゼ活性をもち広い基質を酸化できることが示唆された。

摘 要

1. 9 品種の日本梨果実の PP 含量と PPO 活性および破碎時の褐変度を検討した結果、褐変の強さと PP 含量・PPO 活性量との間には直接的な関係は認められなかった。
2. 9 品種の PPO アイソエンザイムをディスク電気泳動後の活性染色でみた所、雲井で 3 種、二十世紀で 9 種のバンドが観察され、品種によりザイモグラムパターンが異なった。
3. 雲井を 22°C に貯蔵し、貯蔵中の PP 含量、PPO 活性変動と果実の褐変度合を調べた。PP 含量は 35 日の貯蔵期間中ほぼ一定であった。PPO 活性は貯蔵直後に減少したが 14 日目には回復し、以後再び低下した。コアブラウンは 14 日目に出現し、褐変は次第に広がった。
4. 雲井の粗酵素はカテコールを基質とした時、Km 値は 19.5mM、最適 pH は 5.8 であった。クロロゲン酸に対して最も強く作用した。基質を替えたザイモグラムパターンより、クレゾラーゼ活性をもつアイソエンザイムの存在がみられた。

引用文献

- BENJAMIN, N.D. and M.W. MONTGOMERY (1973): Polyphenol oxidase of Royal Ann cherries: Purification and Characterization. *J. Food Sci.* 38: 799-806
- HALIM, D.H. and M.W. MONTGOMERY (1978): Polyphenol oxidase of d'ANJOU pears. *J. Food Sci.* 43: 603-608
- HAREL, E., A.M. MAYER and E. LEHMAN (1973):

- Multiple form of VINIFERA catechol oxidase. *Phytochem.* 12: 2649-2654
- 小宮山美弘, 原川 守, 辻 政雄(1979) 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. *食品工誌* 26: 325-330
- KOMIYAMA, Y., M. HAKAWA and M. TSUJI (1980) Polyphenol oxidase Activity of Plums (*Prunus salicina*) and their enzymatic browning during crushing. *Agric. Biol. Chem.* 44: 937-939
- LUH, B.S., J.N. TATE and G.K. YOVK (1964) Polyphenol oxidase in Bartlett Pears. *J. Food Sci.* 29: 829-836
- MAYER, A.M. and E. HAREL (1979) Polyphenol oxidases in Plants. *Phytochem.* 18: 193-215
- MONTGOMERY, M.W. and V.C. SGARBIERI (1975) Isoenzymes of Banana Polyphenol oxidase. *Phytochem.* 14: 1245-1249
- 中林敏郎, 鶴飼 雄(1963). 酸化酵素による桃果肉のかっ変現象. *食品工誌* 10: 211-216
- ORSTEIN, L. (1964) *Ann. New York Acad. Sci.* 121 Art 2, 321
- PALMER, J.K. (1963) Banana Polyphenol oxidases. Purification and Properties. *Plant Physiol.* 38: 508-513
- STELZIG, D.A., S. AKHTAR and S. RIBEIRO (1972) Catechol oxidase of red Delicious apple peel. *Phytochem.* 11: 535-539
- TAKEO, T. (1966) Tea leaf Polyphenol oxidase III. Studies on the Changes of Polyphenol oxidase activity during Black tea Manufacture. *Agr. Biol. Chem.* 30: 529-535
- WONG, T.C., B.S. LUH and J.R. WHITAKER (1971) Isolation and Characterization of Polyphenol oxidase isoenzymes of Clingstone peach. *Plant Physiol.* 48: 19-23