

食品の低温障害に関する研究 (I)

バナナのポリフェノールオキシダーゼ

大崎規矩夫・村上恭子

I 緒 言

果実や疎菜などの青果物の最適貯蔵温度はその種類によってかなりの違いが見られる。熱帯性あるいは亜熱帯性のバナナ、パパイヤ、レモン、ピーマン、キュウリ、サツマイモなどは他の青果物に比べて最適貯蔵温度が高く(7~15°C)、低温貯蔵(0~10°C)によって変質や腐敗などの低温障害を起し易い。例えばバナナは黒皮し、またピーマンやキュウリは陥凹(pitting)を生じるなど食品の風味を損うだけでなく、商品性の低下をきたす。

この低温障害の原因については、大きく二つ考えられ、一つは代謝調節機構の異常現象であり、もう一つは植物組織の構造の破壊から生ずる機能の低下が考えられる⁽¹⁻⁵⁾。

植物界に広く分布するポリフェノールオキシダーゼによる褐変現象は代謝障害の化学的变化の主因をなすものと考えられる。そこで低温によってもっとも褐変現象を受け易いバナナのポリフェノールオキシダーゼについて実験を行ない、2, 3の知見を得たので報告する。

II 実験方法

1. 粗ポリフェノールオキシダーゼの調製

図1に示すように市販バナナの果肉を用い、褐変を防ぐために1%アスコルビン酸水溶液を加えて磨砕、抽出したものに冷アセトンを加えてアセトン粉末を調整し、さらにリン酸緩衝液で抽出後、硫酸分別、透析したものを酵素液とした。

2. ポリフェノールオキシダーゼ活性の測定

ワールブルグ検圧計で常法により酸素の吸収を測定して活性を求めた。測定は主室に0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 1.0ml, 基質 0.5ml(終濃度 $6 \times 10^{-3}M$), 水 2.0ml, 側室に酵素液 0.5mlを加えて、あらかじめ10分間振盪させて所定の温度に達せしめたのち反応を開始した。反応温度 25°C, 30分間の酸素吸収量を求めて酵素活性とした。

3. 吸収スペクトルおよび褐変の測定

島津分光光度計 QV-50 を用いて測定した。

III 実験結果及び考察

1. 酵素活性におよぼす pH の影響

予備実験においてバナナのポリフェノールオキシダーゼ活性は、基質としてカテコールを濃

Fig. 1. Preparation of Crude Polyphenoloxidase from Banana Pulp.

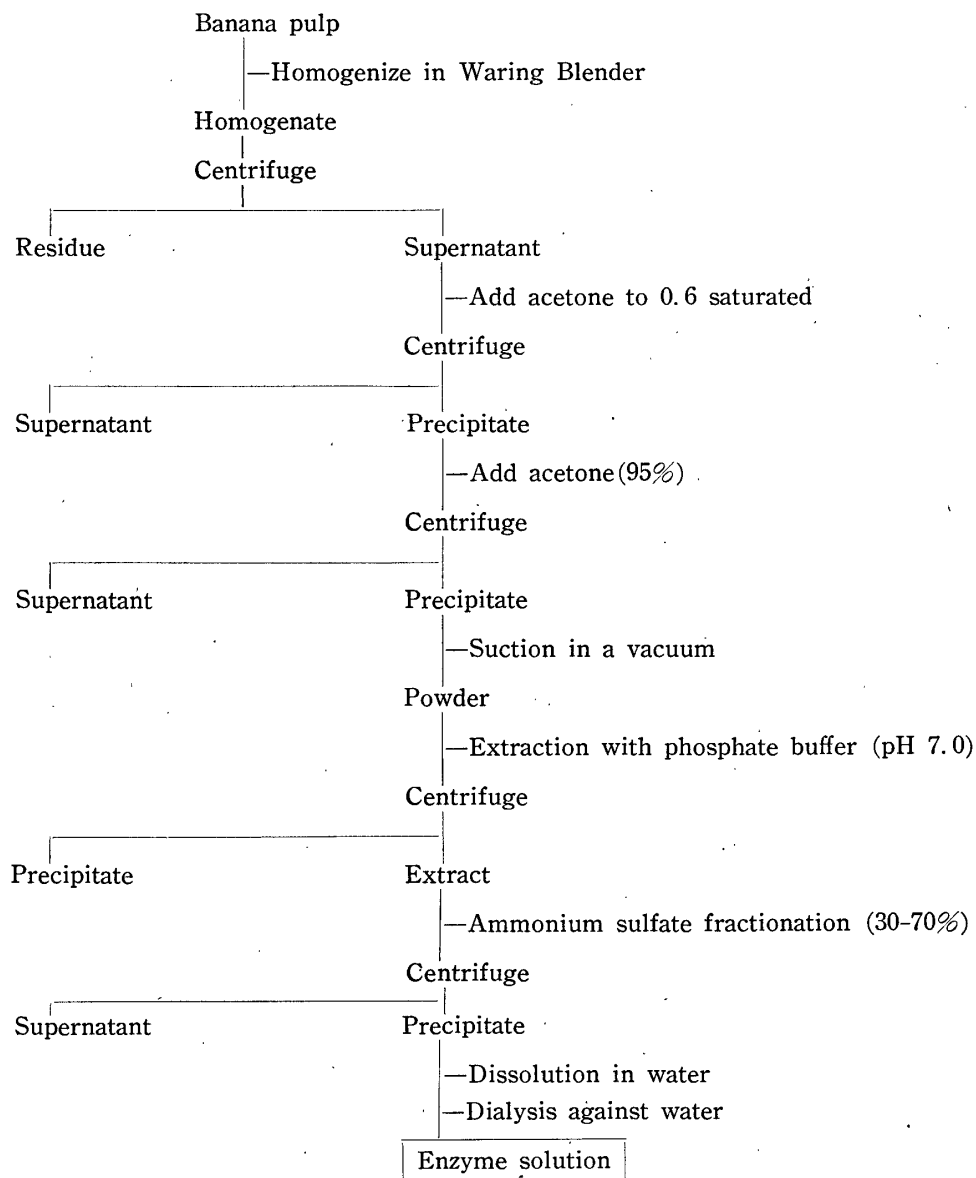
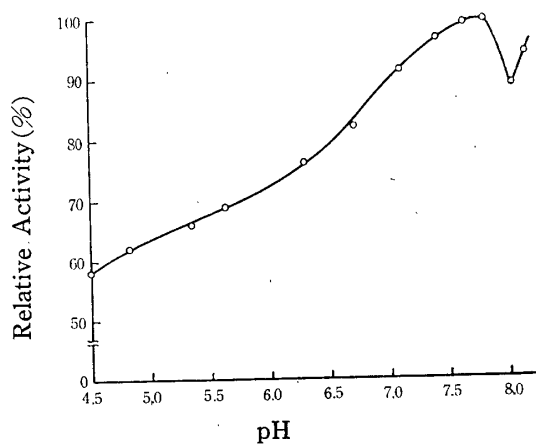


Fig. 2. Effect of pH on the Enzyme Activity.



Reaction mixture ; enzyme solution 0.5ml, catechol 0.5ml ($6 \times 10^{-3}M$ in final conc.), H_2O 2ml, 0.1M phosphate buffer 1.0ml. O_2 uptake ul was estimated in a Warburg manometer at $25^\circ C$ for 30 minutes.

度 $6 \times 10^{-3}M$ で行なったときが最も強い酸素吸収を示したので以後の実験では全てこの条件で行なった。

図2に示すように酵素活性は pH7.8 附近で最も大きく pH8 附近で少し低下したが pH8.1 から再び増加した。また pH 4.5~6.5 まではかなりゆるやかな上昇を示し pH 4.5 でも最大時の60%の活性を示した。この最適 pH をリンゴ, ナシ, モモなどの食品⁽⁶⁻¹¹⁾と比較してみるとこれらの食品では 4~6 附近にそのピークをもつものに対して, バナナではそのピークがアルカリ側にあることは特異のように思われる。

2. 酵素の基質特異性

食品のカテコール, ジオキシフェニールアラニン (L-DOPA), クロロゲン酸, ピロガロールおよびコーヒー酸に対する活性を表1に示す。本実験における酵素液は, 試料 20g に水 15

Table 1. Substrate Specificity of Some Fruits and Vegetables.

Food	Substrate	Relative Activity (%)				
		Catechol	L-DOPA	Chlorogenic acid	Pyrogallol	Coffeic acid
Banana		100	69.5	70.6	69.4	13.5
Apple		100	92.0	245.5	89.6	143.5
Peach		100	93.5	160.4	345.7	120.4
Potato		100	120.7	221.2	83.6	123.5
Burdock		100	62.8	396.5	78.1	271.4
Eggplant		100	281.3	480.0	89.4	336.5
Grape		100	52.7	327.4	15.1	236.8
Pear		100	33.1	112.9	36.6	71.9

Substrate Concentration : $6 \times 10^{-3}M$

ml を加えて Waring blender にて磨砕, 遠心分離した上澄液を用いた。また基質濃度はすべて $6 \times 10^{-3}M$, pH 7.0 で行なった。

この結果より, バナナはカテコールで最も強く, リンゴ (国光), ジャガイモ (男爵), ゴボウ, ナス, ブドウ (デラウェア), ナシ (廿世紀) はクロロゲン酸で, また桃 (白桃) はピロガロールで最も強い活性を示した。バナナの活性は, カテコールを 100 とした場合, クロロゲン酸, DOPA およびピロガロールで 70%, コーヒー酸ではわずかに 13.5% であった。このようにクロロゲン酸とコーヒー酸において他の食品とかなりの相異がみられた。なお表には示さなかったが, ピーマンとトマトはカテコールと DOPA ではまったく酸素吸収を示さず, 特にトマトではトリフェノールであるピロガロールのみに活性を示した。

3. 温度の影響

図3に示すように最適温度は 20~22°C 附近にピークがある。これは酵素の最適温度としてはかなり低い温度のように思われる。また測定温度を 10°C まで下げてもその活性はわず

Fig. 3. Effect of Temperature on the Enzyme Activity.

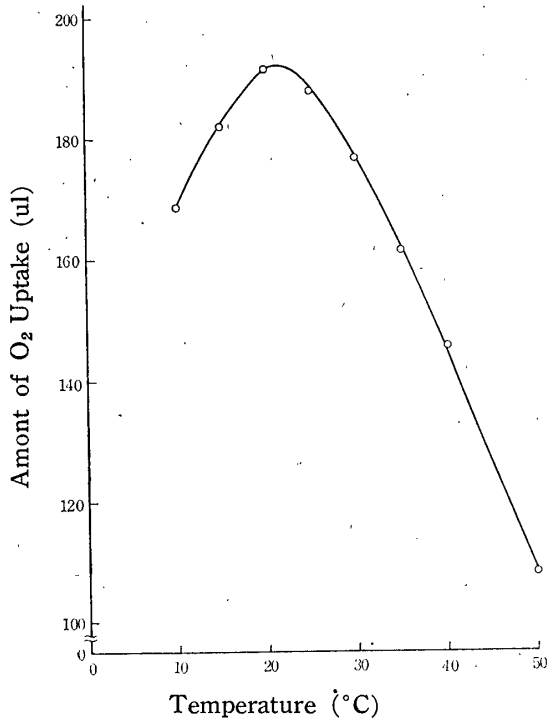
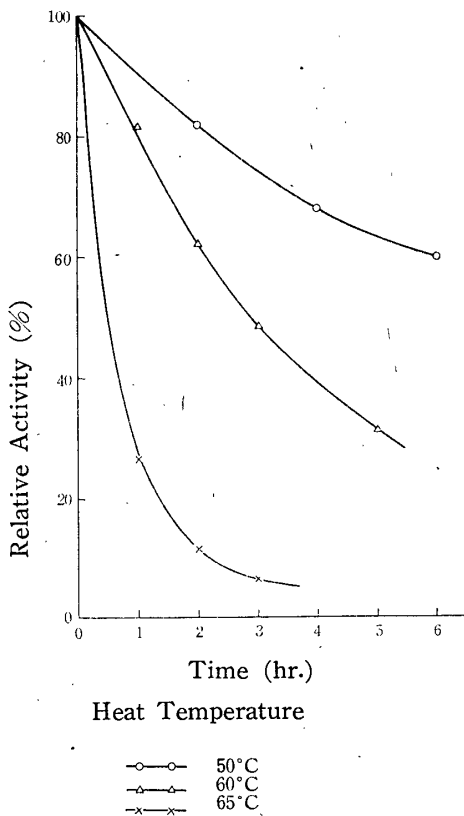


Fig. 4. Thermal Stability of Enzyme.



か10%程度低下するのみで、低温でも高い活性を示す。この結果は T. Takeo 等¹¹⁾ が茶葉を用いた実験で最適温度は 35°C 附近にあり、また測定温度の降下とともに酵素活性も急激に低下するという結果とかなり異なる。バナナのポリフェノールオキシダーゼがこのように低温度でも強い活性を示すということは、バナナを 10°C 以下に貯蔵した場合には、バナナが急速に褐変化する原因の1つであるように考えられる。

4. 酵素の耐熱性

酵素液を 50°C、60°C および 65°C に保温し、一定時間毎にその活度を測定した。図4に示すように 50°C では6時間保温してもその60%の活性を保持するが、60°Cでは約50%まで低下する。また65°Cになると3時間でほとんど活性は失活する。なお 40°C では6時間保温しても活性の低下はほとんど見られず、また 70°C では1時間で全く失活してしまう。このように 60°C 以上になると時間とともに急速に失活してくるが、40°C 以上ではかなり安定で、特に粗酵素液のまま 5°C に貯蔵した場合は2ヶ月以上経過しても活度の低下はほとんどなく、また酵素液の着色も見られなかった。

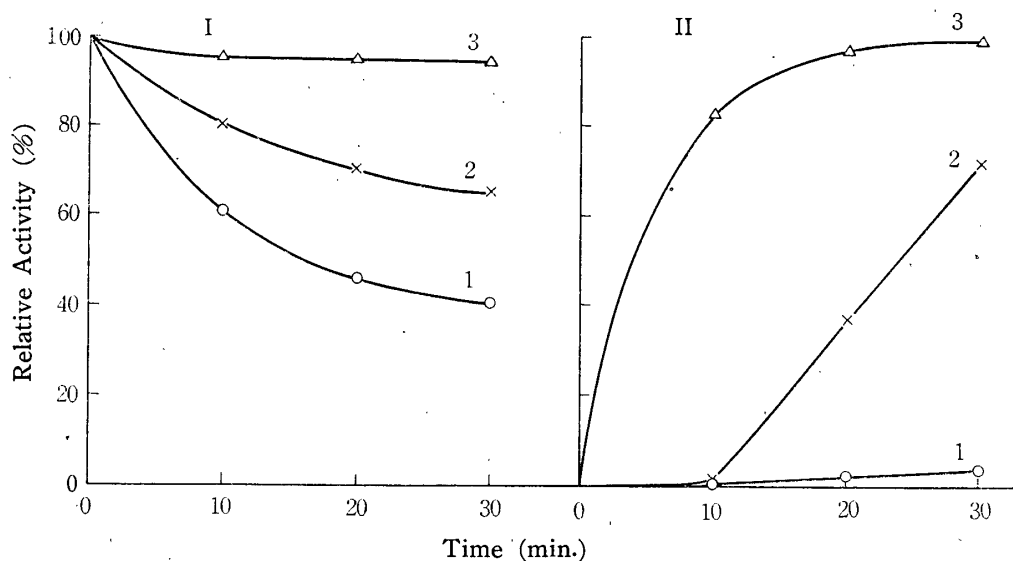
5. 阻害剤の影響

阻害剤として NaHSO₃ と Na-mercapto-benzothiazole を用いた場合の阻害作用を図5に示す。

実験はマノメーターの主室にリン酸緩衝液 1ml、水 1~2ml、阻害剤 0~1ml および酵素液 0.5ml を加え、側室に基質 0.5ml を加えて所定の温度に達せしめたのち測定を行なった。

図 5-I の NaHSO₃ では反応時間の経過と

Fig. 5. Effect of Inhibitors on the Enzyme Activity.



I. NaHSO₃ Concentration

Curve 1: 10⁻²M

Curve 2: 5 × 10⁻³M

Curve 3: 10⁻³M

II. Na-mercaptobenzothiazole Concentration

Curve 1: 10⁻⁴M

Curve 2: 5 × 10⁻⁵M

Curve 3: 10⁻⁵M

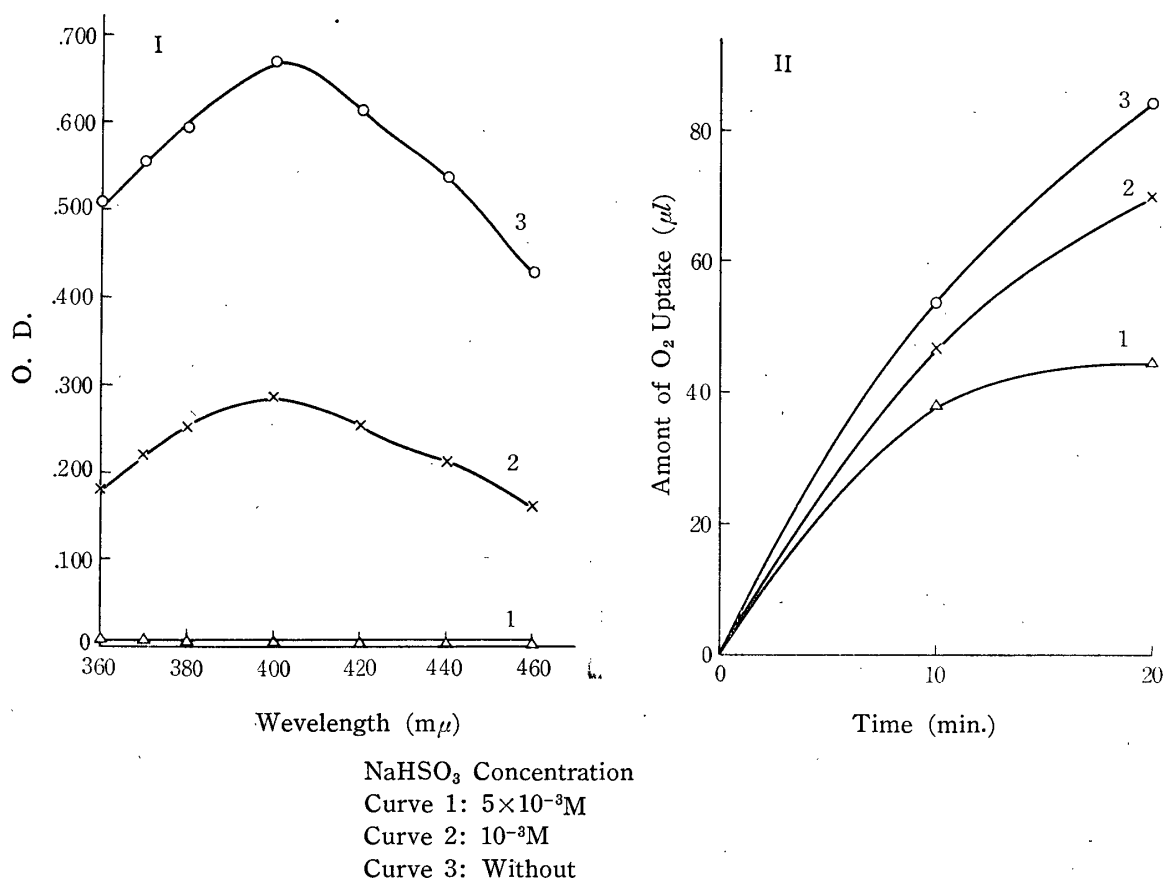
ともに阻害度も大きくなって行く。即ち、NaHSO₃濃度が 10⁻³M 程度ではほとんど阻害されないが、5 × 10⁻³M では10分で20%、20分で30%、30分で35%、さらに 10⁻²M では10分で40%、30分で60%が阻害される。一方図 5-II に示すように Na-mercaptobenzothiazole では NaHSO₃ の場合とは反対に反応時間の経過とともにその阻害度は減少し、酵素活性は回復して行く。即ち、10⁻⁵M では10分で約20%阻害されるが、30分では完全に回復する。また 5 × 10⁻⁵M では反応10分まではほぼ完全に阻害されているが、それ以後は急速に回復し、30分では70%まで回復する。このような阻害様式の違いはアスコルビン酸や Na-diethyldithiocarbamate にも見られ、アスコルビン酸は NaHSO₃ の場合もまた Na-diethyldithiocarbamate は Na-mercaptobenzothiazole の場合と同様の型を示した。この阻害作用の違いは一般阻害剤とキレート剤の相違によるものと思われる。

なおこの実験において、阻害剤を添加した場合に酸素吸収量と反応液の着色(褐変)度が比例しないことが認められた。即ち NaHSO₃ の場合、濃度が 5 × 10⁻³M 以上では反応時間30分で全く着色しないが、10⁻³M では20分で淡黄色に着色してくる。また Na-mercaptobenzothiazole の場合は Curve 1(10⁻⁴M) では30分でも全く着色しないが、Curve 2(5 × 10⁻⁵M) では10分以後の酸素の吸収とともにかなり比例して着色する。

大村等⁽⁹⁾はリンゴのポリフェノールオキシダーゼ反応で酸素の吸収量と反応液の着色度は比例することを認めているが、著者等も予備実験において、バナナの場合も同様に比例することを認めた。

そこで NaHSO₃ を添加した場合の酸素吸収と褐変の関係をj知るために図 6 に示す実験を行った。

Fig. 6. Relationship between O₂ Uptake and Coloration in the Presence of NaHSO₃, in visible Range.



実験はまず酵素反応の停止に最適のトリクロル酢酸 (TCA) の添加量を決定するために予備実験を行なった。即ち反応液の総量を 4.0ml とした場合、5% TCA の添加量を 0.4ml としたとき酵素反応 (酸素吸収) が停止すると同時に着色した反応液の色調が30分以上安定であることを確かめた。TCA 添加量が 0.4ml よりも少ない場合には酵素反応は完全には停止せず、その結果反応液の着色が増して行く。一方多過ぎると色が時間とともに脱色して行く。

本実験は主室にリン酸緩衝液 1.0ml, H₂O 1~2ml, NaHSO₃ 0~1ml, 酵素液 0.3ml, 側室 A にカテコール 0.3ml (終濃度 4 × 10⁻³M), 側室 B に 5% TCA 0.4ml を加えて所定の温度にして測定を開始した。カテコールを加えて 20 分後の酸素吸収を測定した後、直ちに TCA を添加して反応を停止させ、可視部 (360~460mμ) の吸光度を測定した。

図 6-I に示すように、NaHSO₃ 添加濃度が 5 × 10⁻³M (curve 1) では全く着色せず、10⁻³M では淡黄色に着色してくる。また無添加の curve 3 では褐色に着色してくる。curve 2 と 3 では 400mμ にピークがあり 440mμ でわずかに肩が見られる。

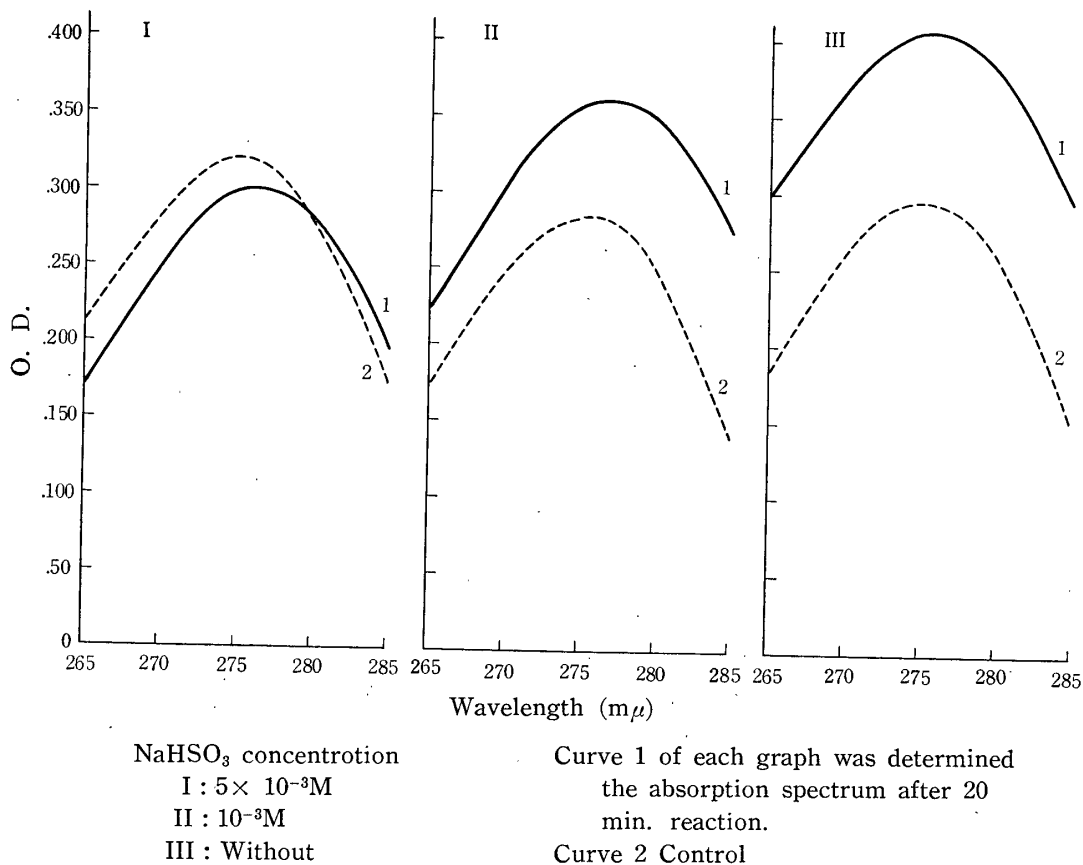
一方図 6-II の curve 1 に示すように、I の curve 1 では反応液の着色は全く見られなかったにも拘らず、酸素の吸収は、20分で対照液 (curve 3) の約 50%を示す。また curve 2 も着色度に比してはるかに高い酸素吸収を示す。

この結果から、阻害剤の添加によってカテコールがキノンかあるいは着色一步前まで酸化や

重合はするが、呈色するほど重合が進んでいないことを示すものと思われる。

この同じ反応において紫外部の吸収スペクトルがどのように変化するかを知るために、 NaHSO_3 の添加による UV 吸収スペクトルを測定した。(図 7)

Fig. 7. Changes of UV Absorption Spectrum in the Presence of NaHSO_3 .



吸光度の測定は図 6 に示した反応液を 25 倍に希釈して 265~285 μ で行なった。各グラフの curve 2 は盲験として反応の最初から TCA を添加して酵素反応を停止したものである。

この結果から可視部の場合と同様に酸素吸収の増大とともに紫外部の吸光度も増大する。この吸収増大も呈色前の化合物の増加によるものと思われる。また各波長のピークが酵素反応液においてわずかに長波長側に移行する。

IV 要 約

バナナのポリフェノールオキシダーゼの 2,3 の性質について実験を行なった。

1. 最適 Hp は基質としてカテコールを使用した場合 pH7.8 附近にある。このように最適 pH をアルカリ性側に有することは特異のように思われる。

2. 基質特異性はカテコールを 100 としたとき、L-DOPA, クロロゲン酸およびピロガロールでは 70, コーヒー酸では 15 以下であった。リンゴ, 桃, ジャガイモ, ゴボウ, ナス, ブドウ, ナシなどに比べてクロロゲン酸に対する活性が低かった。

3. 最適温度は 20~22°C 附近にあり、かなり低温度に活性を示した。反応温度 10°C でも最高時にしてわずか 10% の低下を示しただけであった。バナナの低温貯蔵における褐変原因の一因とも考えられる。

4. 阻害剤 NaHSO₃ は反応時間の経過とともに阻害度も増大するのに対して、Na-mercaptobenzothiazole では反応時間の経過とともに阻害度は減少して酵素活性は回復してくる。阻害度は NaHSO₃ の濃度 5×10⁻³M, 反応時間30分で 35%, 10⁻²M では 60% であった。一方 Na-mercaptobenzothiazole では 5×10⁻⁵M で 10 分で完全に阻害されるが、30分では 70%まで回復する。

さらに NaHSO₃ を添加した場合、酸素の吸収量（酵素活性）と反応液の褐変度は一致せず、ある濃度までは酸素の吸収が見られても着色しない。これは基質が酸化、重合しても呈色までに至らない重合度のためと考えられる。

文 献

- 1) Smith, W. H. : Nature, 181, 225 (1958).
- 2) Hulme, A. C. *et al* : J. Sci. Food, Agr., 15, 303 (1964).
- 3) Pardee, A. B. *et al* : J. Biol. Chem., 176, 1085 (1948).
- 4) Tyler, D. B. : Biochem. J., 76, 293 (1960).
- 5) Lyons, J. M. *et al* : plant Phsiol., 39, 262 (1964).
- 6) 中林 : 農化 28, 212 (1954).
- 7) 中林等 : 食品工誌 10, 212 (1963).
- 8) Luh, B. S. *et al* : J. Food. Sci., 28, 829 (1964).
- 9) 大村等 : 栄養と食糧 24, 242 (1971).
- 10) Takeo T. : Agr. Biol. Chem. 29, 558 (1965)
- 11) *ibid.* 30, 155 (1966).