

52

助成番号 0052

塩類が野菜の酸化酵素を阻害するメカニズムの解明

助成研究者：大羽 和子 (名古屋女子大学 家政学部)
 共同研究者：山本 淳子 (名古屋女子大学 家政学部)
 藤江 歩巳 (名古屋女子大学 家政学部)

食品の加工調理において、食塩は欠かすことのできない添加物である。塩味調味料としての役割に加え、食物のおいしさを左右する色、味、テクスチャーに大きく影響を与える。

りんごやじゃがいもなど、ポリフェノール含量が比較的多く、ポリフェノールオキシダーゼ (PPO と略す) 活性も高いものでは、皮をむいたり傷をつけると酵素的褐変が起こるが、食塩水に浸漬して褐変を防止することがよく行われている。しかし、食塩による褐変防止のメカニズムは十分に解明されているとはいえない。

本研究では、食塩による野菜・果実の褐変防止のメカニズムを解明する目的で、PPO 活性に及ぼす食塩の影響について酵素化学的に追求した。まず、りんご、じゃがいもと黒緑豆もやしの磨砕液の褐変および PPO 活性に及ぼす食塩の影響を検討した結果、褐変および PPO 活性の食塩による阻害の程度は食材により異なるが、食塩濃度が高い程より強く阻害されることが観察された。これらの果実・野菜から粗酵素液を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、PPO のバンドを活性染色すると、各材料によって異なる複数のアイソザイムが存在することが判明した。また、アイソザイム間で食塩に対する感受性が若干異なることが示唆された。次に、食塩による PPO 活性の阻害のメカニズムを解明する目的で、常に均一な試料の入手が可能な黒緑豆もやしから硫酸分画、ブチルトヨパール疎水クロマトグラフィーおよびクロマトフォーカシングによって PPO を精製した。クロマトフォーカシングカラムでは 6 本の活性ピークが検出された。pH 6.7 で溶出された PPO の活性が最も高く、その回収率は 12% で 426 倍に精製された。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、分子量が 35,000 のほぼ単一蛋白質にまで精製されたことが確認された。基質としてクロロゲン酸を用いて精製酵素の性質を調べると、クロロゲン酸に対する K_m 値は 1.3mM であり、5.0 mM 以上の濃度で基質阻害がみられた。本酵素は 15 分間、70°C におくと 80% が失活し、50°C で 60%、30°C で 30% 失活したので、熱に対して比較的不安定な酵素であるといえる。クロロゲン酸濃度と食塩濃度を変えて酵素反応速度を測定し、Line-Weaver Burk プロットをとり、食塩による PPO の阻害様式を調べた結果、非拮抗型阻害であり、その阻害定数 K_i 値は 0.22M であった。この食塩濃度は、通常褐変防止に用いられる濃度であるので、野菜や果実の PPO 活性が食塩により非拮抗的に阻害され、その結果褐変が防止されると推察される。

17

助成番号 0052

塩類が野菜の酸化酵素を阻害するメカニズムの解明

助成研究者：大羽 和子 (名古屋女子大学 家政学部)

共同研究者：山本 淳子 (名古屋女子大学 家政学部)

藤江 歩巳 (名古屋女子大学 家政学部)

1. 研究目的

野菜や果物類に含まれる酸化酵素は、それらの貯蔵、加工・調理に際し、嗜好特性や機能性成分の分解など好ましくない作用をすることが多い。例えば、ポリフェノールオキシダーゼは酵素的褐変を引き起こし食欲を低下させる。アスコルビン酸オキシダーゼは野菜や果物の重要な機能性成分であるビタミンCを酸化し、分解に導く。外食産業への依存度が急速に進んでいる現在、野菜や果物を加工・調理してから食するまでの時間が長くなっているため、酵素的褐変やビタミンの損失の防止が以前にも増して重要になってきた。野菜や果物の加工・調理に際して、酵素的褐変を防止したり、保存性を増大させるために食塩がよく使われる。食塩の褐変防止効果は先人によって経験的に見出され継承されてきたが、そのメカニズムは科学的に十分解明されているとはいえない。

本研究は、食塩による褐変防止のメカニズムを解明する目的で、食塩によるポリフェノールオキシダーゼ活性の阻害のメカニズムをタンパク質レベルで解明することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 実験材料

市販のりんご、じゃがいも、黒緑豆もやしを材料に用いた。

2.2 磨砕液の褐変の測定

りんごの果肉、じゃがいもの柔組織、黒緑豆もやしを同量の脱イオン蒸留水とともに4℃で磨砕し、磨砕液を遠心分離(12,000×g, 10分)し上清を得た。褐変の程度は室温に放置し420nmの吸光度の増加を測定して求めた。

2.3 ポリフェノールオキシダーゼ(PPO)の活性測定

(1) 粗酵素液の調製

すべての操作は低温(0~4℃)で行い、使用器具および緩衝液も低温にした。

りんご果肉、じゃがいも柔組織および黒緑豆もやしの胚軸部分を脱イオン蒸留水でよ

く洗浄し、30mM β -メルカプトエタノールを含む 0.1M-Kリン酸緩衝液 (pH7.5) とともにホモブレンダーで 1 分間磨砕し、磨砕液を二重のナイロンガーゼで濾過した。集めた濾液を 12,000xg で 10 分間遠心分離して上清を得た。この上清を 50mM K-リン酸緩衝液 (pH7.5) で平衡化したセファデックス G-25 カラムに通し、タンパク質画分を集め粗酵素液とした。

(2) PPO 活性の測定

反応液 1.0ml は酵素液、2.5mM クロロゲン酸、50mM K-リン酸緩衝液 (pH6.8) からなり、25°C で 420nm の吸光度の増加を追跡した。1 分間に 1 μ mol のクロロゲン酸を酸化する酵素量を 1unit とした。

2.4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動¹⁾

SDS-ポリアクリルアミドゲル (12.5%) に粗酵素液をチャージして電気泳動を行った後、タンパク質バンドおよび PPO のバンドを検出した。タンパク質バンドはクマッシン染色または銀染色により検出した。PPO バンドは \hat{O} ba 等の方法²⁾ に従って活性染色を行い検出した。

3. 結果および考察

3.1 野菜や果物の褐変に及ぼす食塩の影響

りんごの果肉、じゃがいもの柔組織 (主に外随部) および黒緑豆もやしの水磨砕液および 3 種類の塩溶液すなわち、①0.5M NaCl、②0.5M NaCl に相当する濃度の Salt (96.55% NaCl、0.42% KCl、1.46% MgCl₂、0.58% MgSO₄、0.99% CaSO₄)、③0.45M NaCl+0.05M MgCl₂ 溶液中での磨砕液の褐変を検討した。その結果、りんご磨砕液の褐変は 3 種類のどの塩溶液でも完全に阻害された。黒緑豆もやし磨砕液の褐変も 3 種類の塩溶液で阻害されたが、阻害の程度は約 50% であった。じゃがいも磨砕液の褐変に対する塩類の阻害の程度は 0.5M NaCl と Salt 溶液ではわずかであり、0.45M NaCl + 0.05M MgCl₂ 溶液で 27% 阻害されたので、材料によって塩による褐変の防止効果が異なることが示唆された。

3.2 ポリフェノールオキシダーゼ活性の食塩による阻害

植物におけるメラニン生合成経路を Fig.1 に示した。PPO が褐変の初発段階を触媒する酵素であり、食塩によって活性が阻害されるといわれている。そこで、りんご、じゃがいもと黒緑豆もやしから粗酵素液を抽出し、クロロゲン酸を基質にして PPO 活性を測定し、結果を Fig.2 に示した。食塩無添加時の PPO 活性は、食塩濃度を増加するにつれてより多く阻害された。どの材料の PPO も食塩濃度が 1M 以上では PPO 活性の約 80% が阻害された。PPO にはアイソザイムがあることが報告されているので、粗酵素液

中のタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離しゲルを活性染色した。その結果、りんごには強い活性を示す2本のPPOアイソザイムバンドがゲル上で検出され、じゃがいもには5本の、黒緑豆もやしには6本のバンドが検出された。りんごの2本のPPO活性バンドは、食塩溶液中でも赤色まで発色したが、褐色にまでは変化しなかった。じゃがいもの5本のPPO活性バンドのうち1本は検出されたが、他の4本のバンドは検出できないレベルにまで阻害された。黒緑豆もやしの6本のPPO活性バンドのうち1本は検出されたが、他のバンドは消失した。したがって、個々の試料によってPPOアイソザイムの性質が異なること、また個々のアイソザイムの食塩による阻害の感受性も幾分異なることが示唆された。

3.3 黒緑豆もやし胚軸のポリフェノールオキシダーゼの精製

均一な材料が年中入手可能な黒緑豆もやしの胚軸からPPOを精製した。

3.3.1 硫酸分画による酵素精製

粗酵素液のPPO活性を100%としたときの0~40%飽和硫酸沈殿画分のPPO活性は11%、40~70%飽和硫酸沈殿画分の活性は80%、70%飽和硫酸上清画分の活性は9%であった。40~70%飽和硫酸沈殿画分に8割のPPO活性があり、この画分にPPOを含むタンパク質の大部分が沈殿したといえる。このステップでのPPO活性の回収率は、粗酵素液に対して78%であった。

3.3.2 カラムクロマトグラフィーによる酵素精製

(1) Butyl Toyopearl カラムクロマトグラフィー

Butyl Toyopearl 疎水クロマトグラフィーによる溶出パターンをみると、PPOは0.92M 硫酸濃度で1つの活性ピークとして溶出した。280nmの吸光度で測定したタンパク質はPPO活性のピークより、前に大部分が溶出されたが、活性ピークより後にも第2のピークがみられた。PPO活性の回収率は硫酸分画のステップの2倍に増加した。

(2) クロマトフォーカシング

PBE 94 カラムによるクロマトフォーカシングの溶出パターンをFig.3に示した。pH7から4のpH勾配を形成させると、PPOは、pH 6.8、6.7、6.3、6.0、5.3、4.8の6本の活性ピークに分離した。中でもpH 6.7のPPO活性が最も高かった。本研究では、pH 6.7のPPOを精製酵素とした。このステップでは、活性の回収率は低くなったが、他のタンパク質との分離が極めてよかった。

3.3.3 酵素の精製ステップのまとめ

黒緑豆もやし胚軸のPPOの精製ステップをTable 1にまとめた。粗酵素液のPPO活性は黒緑豆もやし胚軸1g当たり0.178unitであり、タンパク質1mg当たり0.10unitであった。40~70%飽和硫酸沈殿画分の活性は、0.21unit/mg proteinで粗酵素液の2倍に精製され、粗酵素液に対して78%の回収率(以下、回収率はすべて粗酵素液の活性

を 100 とした相対値で示す) であった。Butyl Toyopearl の活性ピーク画分は、3.61 unit/mg protein で 36 倍に精製され、156%の回収率となった。クロマトフォーカシングでは、pI 6.7 の PPO 活性は 42.6 unit/mg protein で 426 倍に精製され、回収率は 12% であった。pI 6.8 の PPO アイソザイムは 48.3 unit/mg protein で 483 倍に精製され、8% の回収率であった。

Takeuchi ら³⁾ は、光照射した黒緑豆幼植物の主要な PPO の pI は 5.4 であり、精製酵素のタンパク質 1mg 当たりの活性は 432mmol/min であったと報告している。本研究で用いた市販の黒緑豆もやし胚軸の主要な PPO の pI は 6.7 で、タンパク質 1mg 当たりの活性は 42.6 μ mol/min と著しく低かった。Takeuchi らも述べているように、光を照射することにより、活性の強い pI 5.4 の PPO が顕著に誘導されるためであると考えられる。

3.4 黒緑豆もやし胚軸のポリフェノールオキシダーゼの性質

3.4.1 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量の決定

各精製ステップの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の銀染色によるタンパク質バンドを Fig.4 に示した。クロマトフォーカシング後の pI 6.7 の PPO は、分子量 35,000 の 1 本のタンパク質バンドとして検出された。したがって、pI 6.7 の PPO はほぼ単一タンパク質にまで精製されたといえる。

3.4.2 酵素反応速度と基質濃度の関係

基質(クロロゲン酸)濃度と酵素反応速度との関係を調べ、Fig.5 に示した。クロロゲン酸の濃度が 4.0mM で最高活性(226munit/g)が得られ、5.0mM 以上の濃度では基質阻害がみられた。Lineweaver-Burk プロットから見かけの K_m 値を測定すると、クロロゲン酸に対する K_m 値は 1.3mM であった。りんごの PPO の K_m 値はクロロゲン酸に対して 4.1mM⁹⁾、梨の PPO のクロロゲン酸に対する K_m 値は 16.1mM¹⁰⁾、バナナの PPO のクロロゲン酸に対する K_m 値は 30mM⁴⁾ であると報告されているので、本酵素は他の果実の PPO に比べてクロロゲン酸との親和性が高いことが示唆された。

光照射した黒緑豆幼植物の PPO (pI 5.4) は、DL-DOPA に対する K_m 値が 31.3mM であった³⁾。DL-DOPA を用いて基質濃度と PPO の反応速度との関係を調べた結果、DL-DOPA 25mM でも基質飽和でないことを観察したので、黒緑豆もやし胚軸の PPO は DL-DOPA よりもクロロゲン酸の方に親和性が高いことが示唆された。

3.4.3 酵素の熱安定性

PPO (pI 6.7) の熱安定性を Fig.6 に示した。PPO 活性は 70°C 湯中で 5 分後に 50% に、15 分後に 20% に、1 時間後には 10% 以下に低下した。50°C 湯中では 5 分後に活性が 55% に、15 分後に 40% に、1 時間後には約 20% に低下した。30°C 湯中でも活性が 5 分後に 75% に、15 分後に 70% に、1 時間後には約 50% に低下した。特に 70°C と 50°C

においては5分後には約1/2のPPOが失活した。

黒緑豆もやし胚軸のPPOは、70℃の湯中において50%失活するのに5分間を要したが、梨のPPOは12分間⁵⁾、アボガドのPPOは8分間⁶⁾、オリーブのPPOは15分間⁷⁾を要した。バナナつぼみのPPOは70℃湯中で1時間後に20%失活したにすぎなかった²⁾。また、いちごのPPOは70℃湯中におくと3分間で50%失活した⁸⁾。本酵素は50℃湯中に5分間放置すると45%失活したが、バナナや梨のPPOは1時間後でも全く失活が認められなかった。以上の結果、本酵素は他の果実のPPOに比べて熱に対して不安定な酵素であることが示唆された。

3.5 黒緑豆もやし胚軸のポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼす食塩の影響

3.5.1 PPOアイソザイムの活性に及ぼす食塩の影響

クロマトフォーカシング後のpIの異なる6種のアイソザイム(pI 6.8、6.7、6.3、6.0、5.3、4.8)の活性に及ぼす食塩添加の影響をFig.7に示した。どのアイソザイムも食塩濃度が高くなるにつれて活性阻害が増大した。食塩濃度が0.1Mでは食塩無添加の活性の30~45%が阻害され、0.25M NaClでは約50%、1M NaClでは75~90%が阻害された。6種類のアイソザイムの食塩による阻害の程度は個々で若干異なるものの全体として類似していると推察される。

3.5.2 PPO活性の食塩による阻害様式

精製されたPPO(pI 6.7)を用いて、クロゲン酸(基質)濃度と食塩濃度を変えてPPO活性を測定し、PPO活性の食塩による阻害様式を解析した(Fig.8)。上記の食塩濃度でLineweaver-Burkプロットをとると、4本の直線がX軸上で交差したので、食塩による阻害様式は非拮抗型阻害であることが示唆された。

食塩の阻害定数 K_i 値は、Lineweaver-Burkプロットの勾配と食塩濃度の2次プロットの直線から0.22Mであると算出された。バナナつぼみのPPOの食塩に対する K_i 値は、アイソザイムIが0.14M、アイソザイムIIが0.04Mであった²⁾。バナナのつぼみのPPOより黒緑豆もやし胚軸のPPOの方が食塩に対する親和性が若干弱いと考えられる。

通常私たちは野菜・果実の褐変防止のために約1%の食塩水を用いる。この濃度は本研究で得られたNaClに対する K_i 値(1.27%)に近似しているので、PPO活性が阻害される一方で、切断面の酵素と基質が塩水により洗われ、希釈されるためにポリフェノール類の酸化が抑制され、褐変が防止されるものと考えられる。

3.5.3 PPOの熱安定性に及ぼす食塩の影響

Fig.6に示すように、食塩無添加のPPO活性を100%とした場合、0.1M NaCl存在下でのPPO活性は、70℃湯中で5分間に40%に、15分後に20%に、1時間後には10%以下に低下した。したがって、用いた食塩濃度(0.1M)では、本酵素の熱失活にほとんど影響を与えないと推察される。しかし、バナナつぼみのPPOの場合、食塩の添加が

明らかに熱失活を促進させる効果があった²⁾。黒緑豆もやしを加熱処理する際は、PPOが熱に対して比較的不安定なため、調理中に褐変防止のための特別な処理をする必要はないが、生で保存したり、調理する場合には、褐変を防止するために食塩処置を施すほうがよいと考えられる。

4. 結論および今後の課題

本研究において、野菜や果物には数種類のPPOが存在することをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とカラムクロマトグラフィで明らかにした。黒緑豆もやし胚軸の最も活性の高いアイソザイムをほぼ単一タンパク質にまで精製し、その性質を解析するとともに、食塩がPPO活性を非拮抗的に阻害することを解明した。食塩による阻害定数 K_i 値は0.22Mであった。この食塩濃度は一般の酵素阻害剤の濃度と比較すると高いので、食塩が酵素タンパク質に構造変化を引き起こし、活性を抑制すると考えられる。本研究で得られた K_i 値は、我々が日常褐変を防止するために使用する食塩濃度であるので、褐変防止に使われる食塩は主にPPO活性を阻害する作用をしていると推察される。

本研究では食品のおいしさ(色)にかかわる酸化酵素の1つであるPPO活性に及ぼす食塩の影響について酵素化学的に解析したが、植物に広く存在しビタミンCの酸化に関与する、アスコルビン酸オキシダーゼ活性に対する食塩の影響についても検討を加え、銅を活性中心にもつ酸化酵素に共通にみられる現象かどうかを解析することが望まれる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたソルトサイエンス研究財団に深く感謝いたします。

5. 引用文献

- 1) Laemmli, Nature, 227, 680 (1970)
- 2) Ôba K., Iwatsuki N., Uritani I., Alvarez A.M. and Garsia V.V., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1027 (1992)
- 3) Takeuchi W., Takahashi H. and Kojima M., Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1134 (1992)
- 4) Palmer J. K., Plant Physiol., 38, 508 (1963)
- 5) Halim D. H. and Montgomery M.W., J. Food Sci., 43, 603 (1978)
- 6) Kahn V., J. Food Sci., 42, 38 (1977)
- 7) Ben Shalom N., Kahn V., Harel E. and Mayer A. M., J. Sci. Food Agric., 28, 545

(1977)

- 8) Wesche-Ebeling P. and Montgomery M. W., J. Food Sci., 55, 1320 (1990)
- 9) Janovitz-Klapp A., Richard F. and Nicolas J., Phytochemistry, 28, 2903 (1989)
- 10) Riyas N. J. and Whitaker J. R., Plant Physiol, 52, 501 (1973)

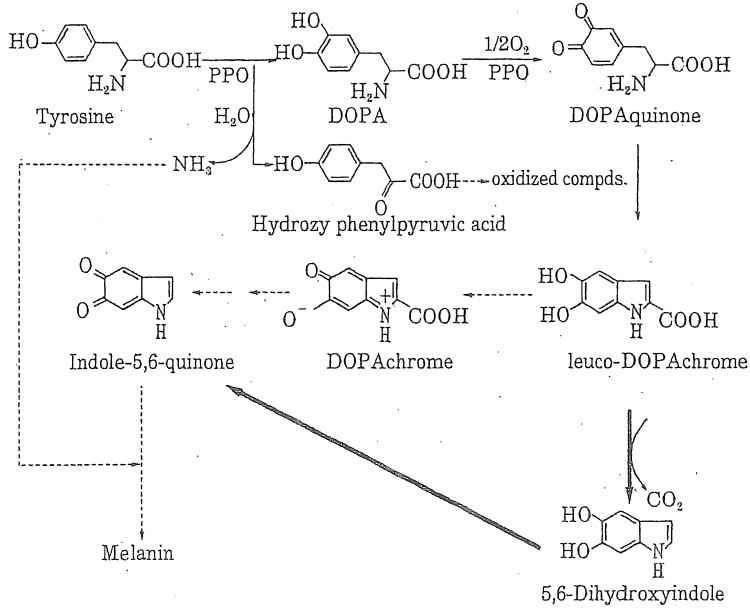


Fig.1 A modified pathway of melanin biosynthesis in plants

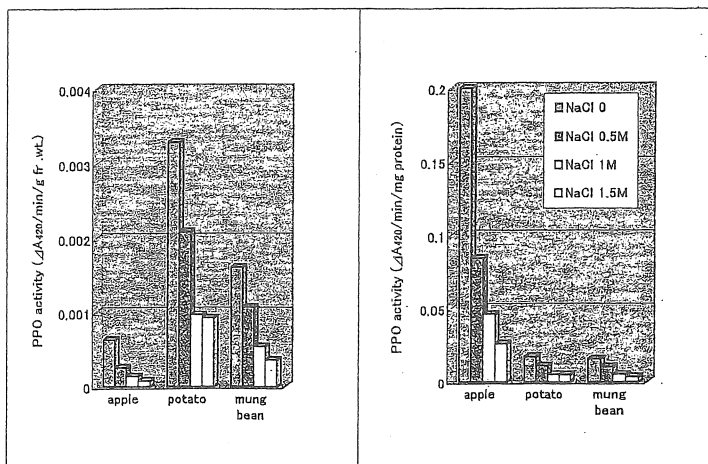


Fig.2 Inhibition of PPO activity by NaCl

Fig.3 Chromatofocusing

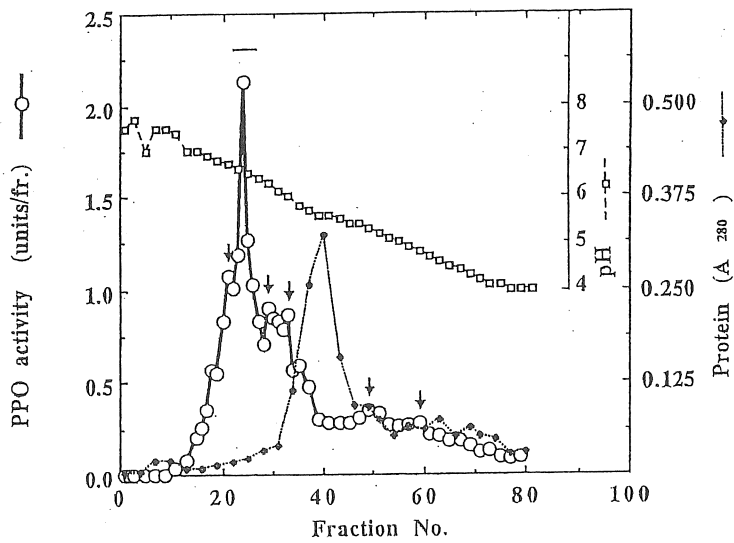
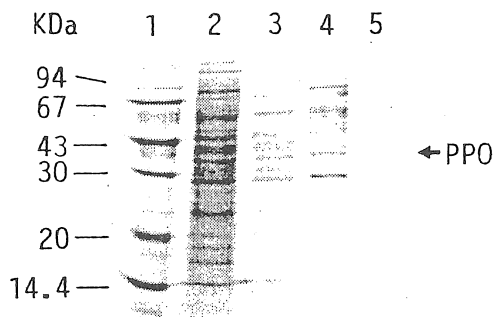


Table 1 Summary of purification of mung bean PPO

	PPO activity (unit/g)	Protein (mg/g)	Sp.activity (unit/mg)	Fold	Yield (%)
Crude extract	0.178	1.81	0.10	1.0	100
Ammonium sulfate(40-70)	0.138	0.66	0.21	2.0	78
Butyl-toyopearl	0.278	0.08	3.61	36.0	156
Chromato-focusing (pH6.7)	0.021	0.0005	42.60	426.0	12

Fig.4 SDS-PAGE Zymogram



- 1: Molecular weight standards
- 2: 12000xg Supernatant
- 3: Ammonium sulfate
- 4: Butyl Toyopearl
- 5: Chromatofocusing

Fig.5 Lineweaver-Burk Plots of Mung Bean PPO

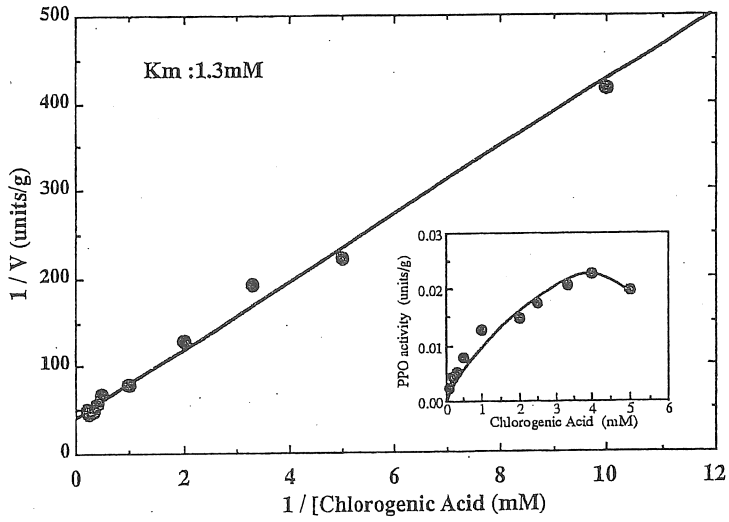


Fig.6 Heat Stability of Mung Bean PPO

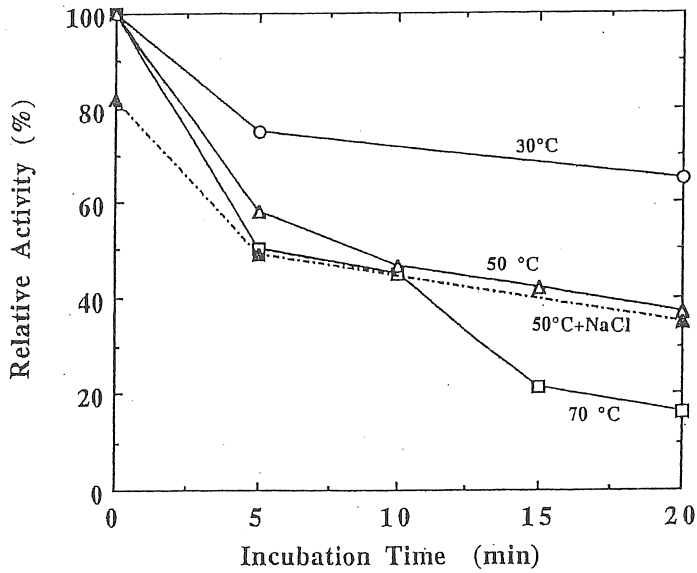


Fig.7 Effect of NaCl on Mung Bean PPO Activity

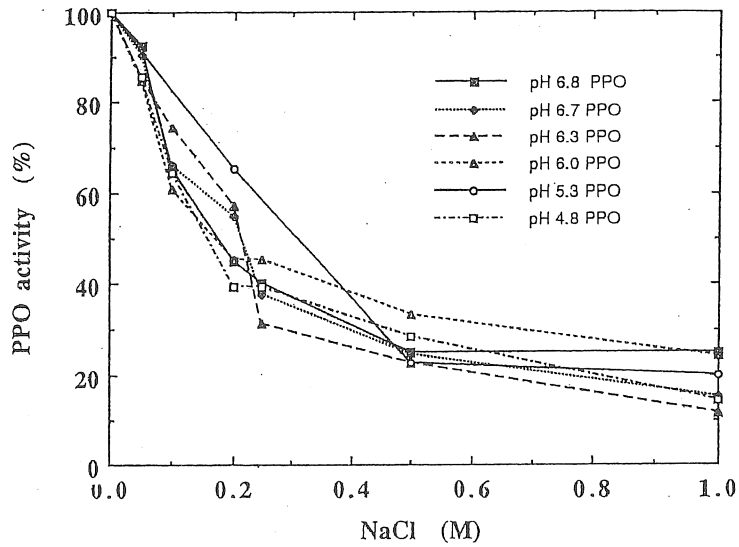
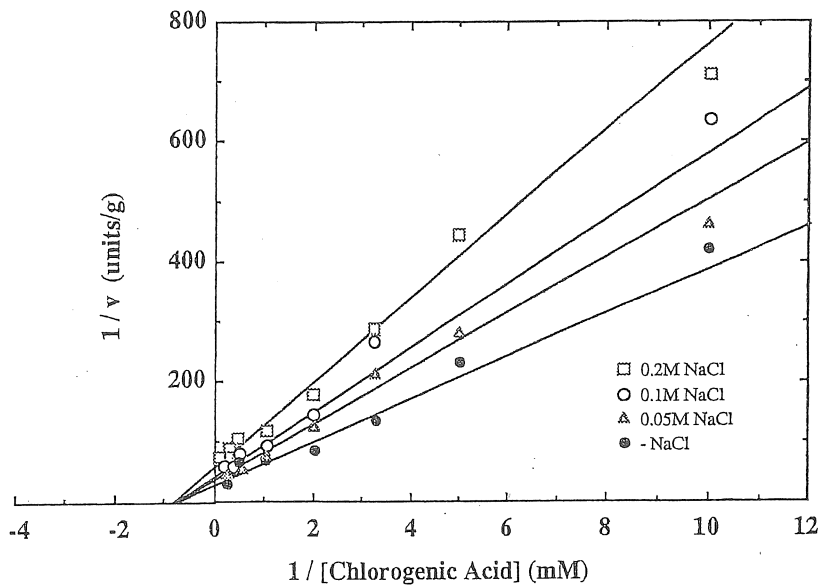


Fig.8 Lineweaver-Burk Plots of Mung Bean PPO



Mechanism for the suppressive effect of salts on polyphenol oxidase activity of vegetables

Kazuko ÔBA, Atsuko YAMAMOTO and Ayumi FUJIE

Department of Food Science and Nutrition, Nagoya Women's University

Summary

Polyphenol oxidase (monophenol dihydroxyphenylalanine:oxygen oxidoreductase :EC 1.14.18.1; PPO) is widely distributed in plants, and responsible for the browning reactions during handling, storage, processing, and cooking of vegetables. The browning reaction is initiated by the oxidation of phenolics to quinones by PPO. The browning reaction affects the nutritional quality and appearance of vegetables and fruits. Peeled apple fruits and potato tubers were usually soaked in NaCl solution to prevent the browning reaction on the surface of them. To elucidate the mechanism for suppressive effect of salts on PPO activity of vegetables, we purified PPO from mung bean sprouts by ammonium sulfate fractionation, butyl Toyopearl column chromatography and chromatofocusing. Six isozymes of PPO were detected from mung bean sprouts by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and chromatofocusing. PI of an isozyme, which has the highest activity, was 6.7. The PPO isozyme was purified as a single protein and the molecular mass was determined as 35 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The apparent K_m for chlorogenic acid was 1.3 mM. Inhibition by substrate was observed at higher concentration of chlorogenic acid than 5.0 mM. NaCl inhibited PPO activity from apple fruits, potato tubers and mung bean sprouts. Lineweaver-Burk plots of the purified PPO (pI 6.7) isozyme in the absence and presence of NaCl showed that inhibition by NaCl was non-competitive with the substrate chlorogenic acid. K_i value for NaCl was 0.22M (1.3%), that is the concentration of NaCl used for preventing the browning reaction of vegetables. These results suggest that NaCl inhibits non-competitively PPO activity, and results in preventing of enzymatic browning of vegetables.