

## 精製西洋ナシポリフェノールオキシダーゼの 活性化に対する処理圧力と時間の影響

朝賀 昌志, 中西 律子, 青山 好男, 林 力丸\*

### Effect of Pressure and Duration Time on the Pressure-activation of Purified Polyphenoloxidase

Masashi Asaka, Ritsuko Nakanishi, Yoshio Aoyama and Rikimaru Hayashi\*

Polyphenoloxidase of La France pear fruit (*Pyrus communis*) mainly existed in the soluble fraction of cytoplasm at latent state. This enzyme was extensively purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, anion exchange chromatography with DEAE-Sephadex A-25 and then DEAE-Toyopearl 650M, and gel permeation chromatography with Toyopearl HW-55s. To purify the enzyme at latent state, addition of 10% glycerol to eluting buffer was required because the enzyme was activated during the freeze-storage-thaw cycle without glycerol. The purified enzyme was a monomeric protein molecular weight of which was estimated as 70,000 by high performance gel permeation chromatography and 65,000 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. While the purified enzyme was not activated by pressurization at 300 MPa and 20°C for 6 hr, the pressure-activation of the enzyme occurred at 400 MPa or higher. The enzyme activity was the highest at 600 MPa and 20°C for 6 hr.

**Key words:** high pressure, polyphenoloxidase, pear, *Pyrus communis*, activation, purification, browning.

野菜や果実に高圧処理を施すと試料は処理後大気中に放置している間に急速に褐変していく<sup>1-5)</sup>。この原因を明らかにするためにポリフェノールオキシダーゼ (1, 2-Benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1. 10. 3. 1) に対する高圧処理の影響を検討した結果, 西洋ナシではこの酵素が不活性型で存在し, 高圧処理により活性化することを抽出液および部分精製酵素で明らかにした<sup>1-3)</sup>。また, 試料を酸素バリア性の高い容器に真空包装することでこの褐変現象を防止できることも併せて報告した<sup>2), 3)</sup>。しかし, 食品は真空包装以外に多くの形態で包装されている。このため, 褐変を防止するためにポリフェノールオキシダーゼの性質を詳細に調べることが必要不可欠となってくる。

今回, 著者らは西洋ナシ (*Pyrus communis*) のポリフェノールオキシダーゼを不活性型で精製し, この酵素の活性化に対する高圧処理の影響を検討した。

\*京都大学農学部農芸化学教室, 〒606-01 京都市左京区北白川追分町。

注 本論文は *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1486-1489に掲載予定。

## 実験方法

### 1. ポリフェノールオキシダーゼの抽出方法

試料として長野県産の西洋ナシ（ラ・フランス種）を購入し、剥皮し、芯を取り除いたものを用いた。粗抽出液（Buffer-extract）は西洋ナシ（500 g）に250 mlの100 mMリン酸緩衝液（pH7.0）を加え、ホモジナイズ後、遠心分離（10,000×g, 20 min, 5℃）し、上澄液をさらし布で濾して得た。沈澱物は同緩衝液で3回抽出、遠心分離し、上澄液を粗抽出液とした。沈澱物は同緩衝液に1.5% Triton X-100を添加した溶液を用い1時間抽出した。遠心分離して得た上澄液を界面活性剤抽出液（Triton X-100-extract）とした。

### 2. ポリフェノールオキシダーゼの精製方法

ポリフェノールオキシダーゼの精製は東野らの方法<sup>6)</sup>に準じた。即ち、粗抽出液を硫酸分画（0～90%飽和）、陰イオン交換クロマトグラフィー（DEAE-Sephadex A-25とDEAE-Toyopearl 650M）、ゲル透過クロマトグラフィー（Toyopearl HW-55s）の順に行った。

### 3. ポリフェノールオキシダーゼの活性化処理

- 1) ポリフェノールオキシダーゼの高圧処理 酵素溶液を0.25 ml容低密度ポリエチレンボトル容器に充填し、高圧試験装置MFP-7000型（三菱重工業）を用い、温度20℃で100～700 MPaの圧力で処理した<sup>1-3)</sup>。
- 2) ポリフェノールオキシダーゼのSDS処理 氷温で酵素溶液に1/10容量の1% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液を添加混合した。

### 4. ポリフェノールオキシダーゼ活性の測定方法

酵素反応は20 mMリン酸緩衝液（pH6.5）に溶解した25 mMピロカテコールを基質とし、30℃で行った。活性測定は分光光度計（島津製作所）を用い、410 nmの吸光度変化を測定した。酵素活性は410 nmの吸光度を1分間に1.0増加させる量を1.0 unitとした<sup>1-3)</sup>。

### 5. ポリフェノールオキシダーゼの分子量測定方法

ポリフェノールオキシダーゼの分子量は、ゲル透過クロマトグラフィー法<sup>7)</sup>により測定した。即ち、高速液体クロマトグラフィー装置（島津製作所）にAsahipak GF-510HQカラム（旭化成）を設置し、200 mMリン酸緩衝液（pH7.0）を移動相として流速0.5 ml/minで流し、280 nmの吸光度で検出した。

### 6. ポリフェノールオキシダーゼの電気泳動実験方法

- 1) ディスク電気泳動実験方法 ディスク電気泳動法は、7%ポリアクリルアミドゲルを用い、Davisの方法<sup>8)</sup>に従って行った。タンパク質バンドの検出はクマシーブリリアントブルー染色により行った。ポリフェノールオキシダーゼ活性バンドの検出は、ゲルをピロカテコール溶液（基質液）に浸して酵素反応させることにより行った。不活性型酵素の活性バンドは、泳動ゲルを20℃、600 MPaで2時間高圧処理した後に検出した。
- 2) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動実験方法 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法は、10%ポリアクリルアミドゲルを用い、Laemmliの方法<sup>9)</sup>に従って行った。分析前に試料は2% SDS、5% β-メルカプトエタノール存在下で100℃、3分間加熱して変性させた。タンパク質バンドの検出はクマシーブリリアントブルー染色により行った。

### 7. タンパク質の定量方法

タンパク質の定量は、280 nmの吸光度、Bradford法<sup>10)</sup>にて行った。



## 結果および考察

### 1. 西洋ナシ果実中のポリフェノールオキシダーゼ分布

一般に植物細胞中のポリフェノールオキシダーゼは、オルガネラ膜に結合した状態（界面活性剤を添加して抽出）または細胞質に溶解した状態で存在している<sup>11)</sup>。そこで、粗抽出液と界面活性剤抽出液のポリフェノールオキシダーゼ活性を測定した（Table 1）。

ポリフェノールオキシダーゼ活性は粗抽出液に全体の95%以上認められ、その約5%のみが活性型であり、残りの酵素は不活性型で存在し、高压処理またはSDS処理により活性化された。一方、界面活性剤抽出液には全体の約3%とわずかしが認められないが、この酵素は高压処理では活性化されたもののSDS処理では活性化されなかった。

このことから、西洋ナシの果肉ではポリフェノールオキシダーゼはほとんどが不活性型で細胞質に溶解した状態で存在しているものと思われる。

### 2. ポリフェノールオキシダーゼの精製

大部分の活性が認められた粗抽出液の画分のポリフェノールオキシダーゼを精製した。

粗抽出液に硫酸アンモニウムを90%飽和まで添加し、得られた沈澱物を10%グリセロールを含む10 mM リン酸緩衝液（pH7.0）に懸濁し、同緩衝液で透析後遠心分離し、得た上澄液を硫酸画分とした。この画分を10%グリセロールを含む50 mM リン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーにより分画した。ポリフェノールオキシダーゼはこの樹脂に吸着されずに溶出したので、この画分を10%グリセロールを含む10 mM リン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したDEAE-Toyopearl 650Mカラムクロマトグラフィーにより分画した。その溶出パターンをFig. 1に示す。ポリフェノールオキシダーゼは3画分に分かれた。画分1と2は不活性型で高压処理もしくはSDS処理により活性型となった。一方、画分3は活性型の酵素であったが、その活性はわずかしが認められなかった。大部分の活性が認められた画分1を主要なポリフェノールオキシダーゼ画分として、Toyopearl HW-55sを用いたゲル透過クロマトグラフィーによりさらに精製した。

なお、精製過程においてポリフェノールオキシダーゼは凍結貯蔵中に不活性型から活性型に変化した。この活性化は緩衝液に安定剤として10%グリセロールを添加することで防止した（Data not shown）。

Table 1. Polyphenoloxidase in Buffer-extract and Triton X-100-extract of pear fruit.

| Extract          | Activity (units/g flesh weight) |                 |          |
|------------------|---------------------------------|-----------------|----------|
|                  | Activation treatment            |                 |          |
|                  | No                              | 600 MPa, 10 min | 0.1% SDS |
| Buffer (1st~3rd) | 1.62                            | 22.40           | 27.89    |
| Buffer (4th)     | 0                               | 0.19            | 0.40     |
| Triton X-100     | 0.07                            | 0.90            | 0.04     |
| Total            | 1.69                            | 23.49           | 28.33    |

Enzyme assay was performed in 3.0 ml of 20 mM phosphate buffer, pH 6.5, containing 25 mM pyrocatechol at 30°C. One unit of the activity was defined as a change in one absorbance per min at 410 nm.

各精製段階におけるポリフェノールオキシダーゼの精製度と回収率を Table 2 に示した。ポリフェノールオキシダーゼは粗抽出液と比較して、高圧処理活性で9倍、SDS処理活性で22倍に精製されていた。

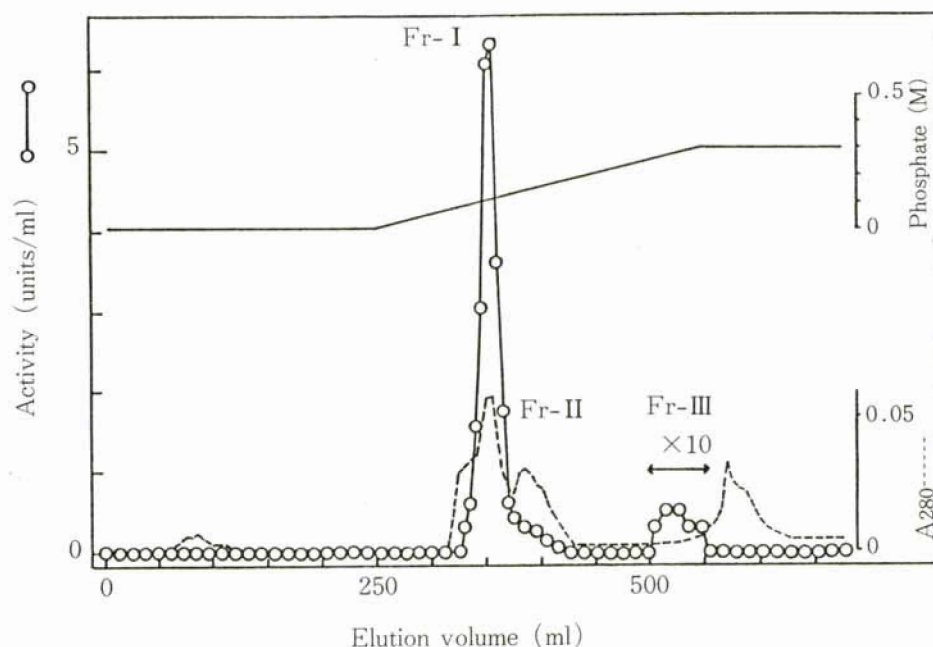


Fig. 1. Elution pattern of polyphenoloxidase from DEAE-Toyopearl 650M column.

See Table 1 for the enzyme assay. ○, polyphenoloxidase activity after pressure treatment at 600 MPa and 20°C for 10 min. The enzyme activities in the fraction III were depicted as 10 times values. ···, A<sub>280</sub>; —, phosphate concentration in the eluent.

Table 2. Purification of polyphenoloxidase from La France pear fruit flesh.

| Purification step  | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg protein) | Purification (fold) | Yield (%)    |
|--|--------------------|------------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------|
| Buffer-extract   | 198                | 6,095<br>(6,129)       | 30.8<br>(31.0)                       | 1                   | 100          |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(0 ~90% saturation) | 15.0               | 1,657                  | 110.5                                | 3.6                 | 27.2         |
| DEAE-Sephadex A-25   | 6.0                | 367                    | 61.2                                 | 2.0                 | 6.0          |
| DEAE-Toyopearl 650M  | 0.50               | 84.2                   | 168.4                                | 5.5                 | 1.4          |
| Toyopearl HW-55s   | 0.0643             | 18.4<br>(44.1)         | 286.2<br>(685.4)                     | 9.3<br>(22.2)       | 0.3<br>(0.7) |

Protein was determined by Bradford's method. Polyphenoloxidase activity was assayed after pressure treatment at 600 MPa and 20°C for 10 min; ( ), the enzyme activity after treatment with 0.1% SDS. See Table 1 for the enzyme assay.

このポリフェノールオキシダーゼ画分をディスク電気泳動法にて分析した (Fig. 2). その結果, タンパク質バンドは Rf 0.43, 活性バンドは Rf 0.42 にそれぞれ 1 本のバンドを示した. このことから電気泳動的に単一のポリフェノールオキシダーゼが不活性型で得られたと判断し, 以後の試験に供した.

### 3. 精製ポリフェノールオキシダーゼタンパク質の性質

精製したポリフェノールオキシダーゼの分子サイズはゲル透過クロマトグラフィー (Fig. 3) で約 70,000, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Fig. 4) で約 65,000 と推定された. このことから, ポリフェノールオキシダーゼは約 70,000 の単量体と思われる.

この酵素の紫外吸収スペクトルは, 272 nm に吸収極大を示した.

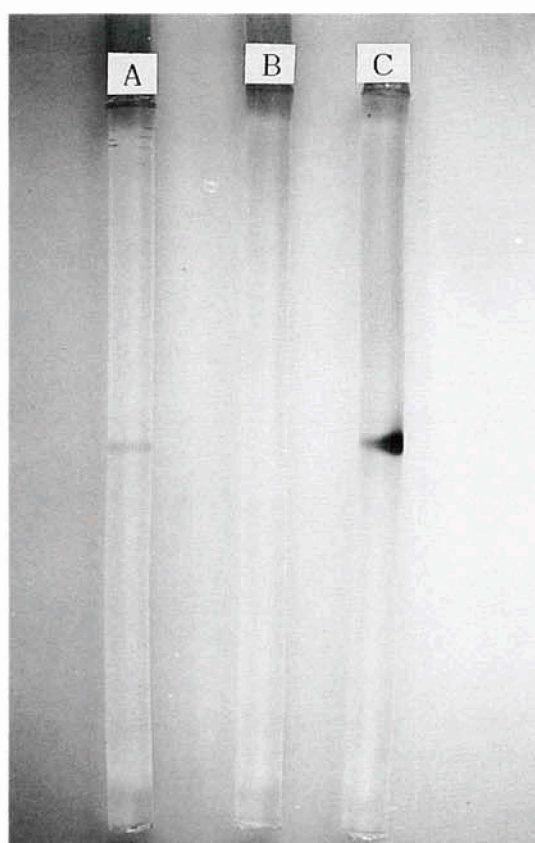
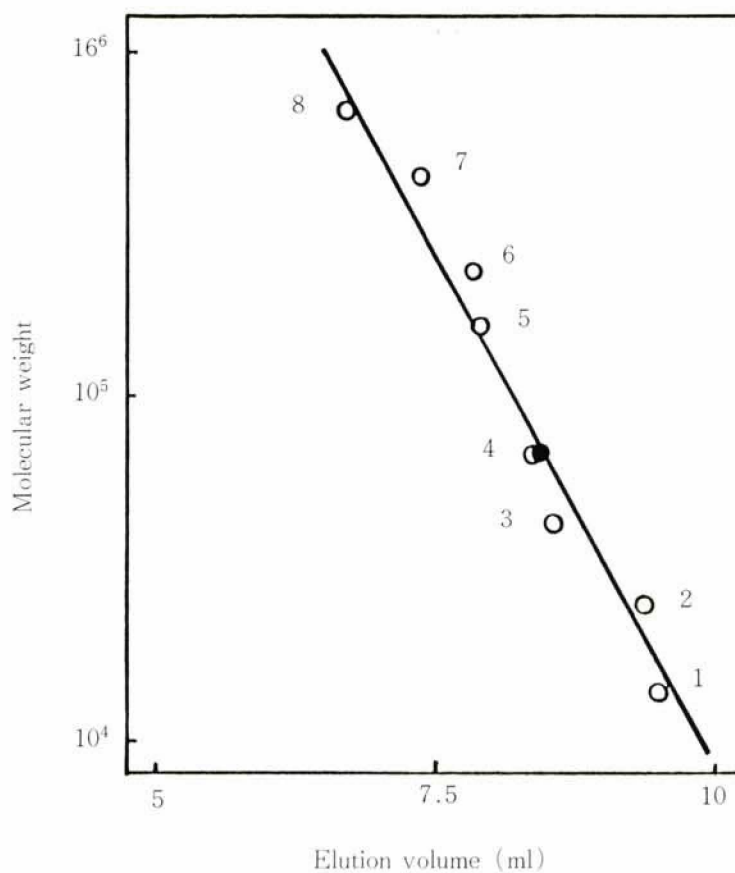


Fig. 2. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of the purified polyphenoloxidase.

Electrophoresis was carried out on 7.0% polyacrylamide gel according to Davis<sup>8)</sup>. A, gel was stained for protein. B, gel was stained for enzyme activity. C, gel was pressurized and stained for enzyme activity.



**Fig. 3.** Molecular weight estimation of the purified polyphenoloxidase by high performance gel permeation chromatography with Asahipak GF-510HQ.

The purified enzyme or a standard protein was eluted with 200 mM phosphate buffer, pH 7.0. The gel permeation calibration kit obtained from Pharmacia was used as the standard proteins.

- 1, ribonuclease A (13,700); 2, chymotrypsinogen A (25,000);  
 3, ovalbumin (43,000); 4, bovine serum albumin (63,000);  
 5, aldolase (158,000); 6, catalase (232,000); 7, ferritin (440,000);  
 8, thyroglobulin (669,000); ●, the purified enzyme.



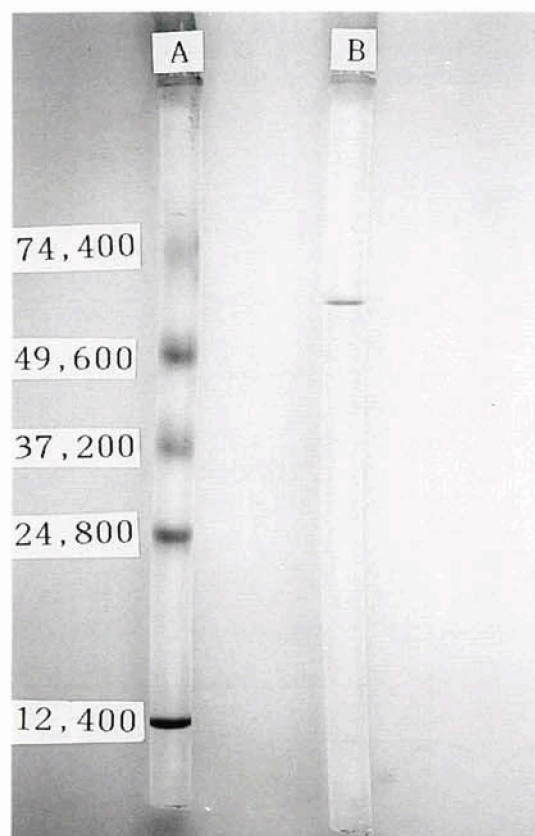


Fig. 4. Molecular weight estimation of the purified polyphenoloxidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Electrophoresis was carried out on 10.0% polyacrylamide gel according to Laemmli<sup>9)</sup>. A, standard protein obtained from Oriental Yeast Co. as marker protein for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. B, the purified enzyme.

#### 4. 精製ポリフェノールオキシダーゼの活性化に対する圧力および時間の影響

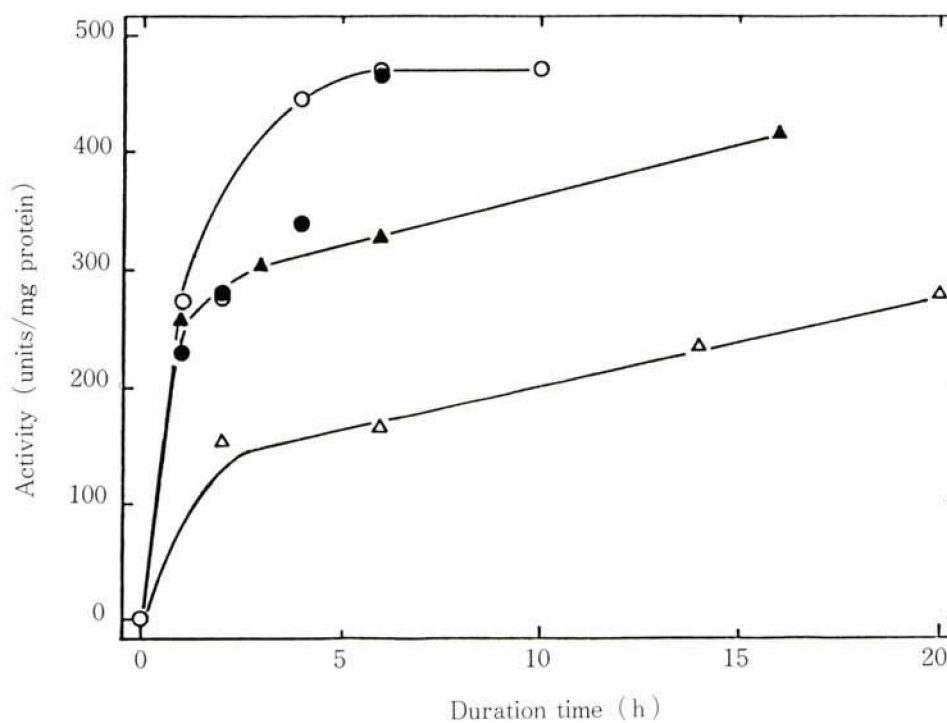
精製酵素では凍結貯蔵中に起こる活性化を防止するために安定剤として10%グリセロールが添加されている。そこで、高圧処理による活性化に対するグリセロールの影響を検討した結果、グリセロールの添加はグリセロール無添加より活性を約2倍に増加させ、高圧処理による酵素の活性化を促進させた (Table 3)。

精製したポリフェノールオキシダーゼの高圧処理による活性化に及ぼす処理圧力と処理時間の影響を10%グリセロールを含む20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で検討した (Fig. 5)。

**Table 3.** Effect of glycerol on pressure-activation of polyphenoloxidase.

| Glycerol concentration (%) | Polyphenoloxidase activity (units/mg protein) |
|----------------------------|---|
| 0                          | 73.0  |
| 5.0                        | 123.2   |
| 10.0                       | 133.0   |

Enzyme activity was assayed after pressurization at 600 MPa and 20°C for 30 min in each glycerol concentration.

**Fig. 5.** Time course of polyphenoloxidase activation by pressurization.

Polyphenoloxidase activity was determined after pressurization.  $\Delta$ , pressurization at 400 MPa;  $\blacktriangle$ , pressurization at 500 MPa;  $\circ$ , pressurization at 600 MPa;  $\bullet$ , pressurization at 700 MPa. See Table 1 for the enzyme assay.



酵素の活性化に対する処理圧力の影響をみると、400~600 MPaの圧力範囲では処理圧力の増大に伴って活性化の速度も増大したが、700 MPaの圧力ではそれ以上の増大は認められなかった。一方、300 MPaの圧力では6時間高圧処理したが活性化は認められなかった (Data not shown)。

一方、酵素の活性化に対する処理時間の影響をみると、活性は400と500 MPaの圧力では処理1ないし2時間で急激に増加し、その後直線的に増加した。600 MPaの圧力では処理時間の増加にともない活性も増加し、処理6時間で最高に達した。

高圧処理によるポリフェノールオキシダーゼの活性化は、粗抽出液中では200 MPa以上の圧力で起こり、400 MPaの圧力では処理時間5分間で既に最高に達する<sup>1-3)</sup>。しかし、精製した酵素では、より大きな圧力と時間が活性化に必要となった。

不活性型ポリフェノールオキシダーゼはソラマメ、サトウダイコン、バナナ、ハウレンソウ、アボガド、マシュルーム、ブドウ及び甲殻類で存在が認められており、酸またはアルカリ処理、界面活性剤、プロテアーゼ、尿素、脂肪酸などの処理により活性化される<sup>11), 12)</sup>。このことから、粗抽出液では内在プロテアーゼの作用、pH変化や内在の界面活性剤作用を持つ成分などが、高圧処理によるポリフェノールオキシダーゼの活性化に関与している可能性がある。

## 要 約

西洋ナシではポリフェノールオキシダーゼはほとんどが不活性型で細胞質に溶解した状態で存在していた。この酵素を硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲル透過クロマトグラフィーにより不活性型で精製した。精製酵素は電気泳動的に単一な酵素であった。精製した酵素は分子量約70,000の単量体と推定された。

精製酵素の高圧処理による活性化に対する処理圧力と処理時間の影響を検討した結果、酵素の活性化は400 MPa以上の圧力で活性化され、活性は処理する圧力と時間の増加に伴って増大した。

## 文 献

- 1) Asaka, M. and Hayashi, R. : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2439-2440 (1991).
- 2) 朝賀昌志, 青山好男, 中西律子, 林力丸 : 東洋食品工業短大・東洋食品研究所研究報告書, **19**, 111-121 (1992).
- 3) 朝賀昌志, 青山好男, 林力丸 : 生物と食品の高圧科学, 林力丸編(さんえい出版, 京都), pp. 163-168 (1993).
- 4) 島田淳子, 香西みどり, 山本文子, 畑江敬子 : 日食工誌, **37**, 511-519 (1990).
- 5) 島田淳子, 香西みどり, 山本文子, 畑江敬子 : 加圧食品—研究と開発, 林力丸編(さんえい出版, 京都), pp. 249-261 (1991).
- 6) 東野哲三, 藤田修二, 川崎宏隆, 李忠富 : 農化, **60**, 705-712 (1986).
- 7) Andrews, P. : *Biochem. J.*, **96**, 595-606 (1965).
- 8) Davis, B. J. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427 (1964).
- 9) Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
- 10) Bradford, M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 11) Mayer, A. M. and Harel, E. : *Phytochemistry*, **18**, 193-215 (1979).
- 12) Zawistowski, J., Biliaderis, C. G. and Eskin, N. A. M. : *Oxidative Enzymes in Foods*, (Robinson, D. S. and Eskin, N. A. M.), pp. 217-273, Elsevier Appl. Sci., London (1991).