

高圧処理による酸化酵素の失活 — 加熱との比較 —

青山 好男, 朝賀 昌志, 中西 律子, 村井 恵子

Inactivation of Oxidative Enzymes
by High Pressure TreatmentYoshio Aoyama, Masashi Asaka,
Ritsuko Nakanishi and Keiko Murai

Effect of high pressure treatment on some oxidative enzymes, lipoxygenase, catalase and peroxidase was investigated in comparison with that of thermal treatment. Lipoxygenase and catalase were inactivated at 400 to 700 MPa. Inactivation kinetics of these enzymes followed first order reaction. Activation volumes of their inactivation reaction were calculated from the slope of curves plotted with inactivation velocity constant versus pressure. Peroxidase was not inactivated even at 700 MPa.

The relationship between thermal stability and pressure stability of some oxidative enzymes was discussed, in which the results on enzymes described in the previous paper were included.

Key words : oxidative enzyme, high pressure thermal treatment, inactivation, activation volume, lipoxygenase, catalase peroxidase.

高圧処理は加熱処理と異なり, 食品の品質への悪影響が少ないことから, さまざまな食品への応用が検討されてきた。しかし食品加工の技術としてはいくつかの問題点が指摘されている。酵素活性残存も, その一つである¹⁻⁴⁾。

高圧処理の酵素活性への影響を調べた報告は多いが, その多くは加水分解酵素に関するものであり, 酸化酵素に関するものは比較的少ない。しかしながら多くの酸化酵素が食品のフレーバーや色などの劣化に深く関連しており, 食品中に残存すると問題になる場合が多い⁵⁾。前報で4つの酸化酵素について調べ, 2つの酵素について高圧での失活挙動を明らかにすることができた⁶⁾。この研究では, さらに3つの酸化酵素について加熱処理との比較に主眼をおいて, 高圧処理による酵素失活のキネティックスを調べた。調べた酵素の中には耐圧性が高くデータがとれないものもあった。ここでは前報での結果と合わせて4種類の酸化酵素についての高圧処理, 加熱処理での失活に関するデータから, 酸化酵素の耐圧性と耐熱性との関係について考察した。

実験方法

1. 酵 素

試験に用いた酵素は7種類 (グルコースオキシダーゼ, アスコルビン酸オキシダーゼ, スーパーオキシドディスムターゼ, チロシナーゼ, リポキシゲナーゼ, カタラーゼ, ペルオキシダーゼ) で, すべて和光純薬より入手した。これらの酵素の諸性質については Table 1 にまとめた^{7,8)}。ま

た試験に用いた試薬はすべて特級で、和光純薬から入手した。

Table 1. Some oxidative enzymes tested in this study

Enzyme (Code number)	Origin M.W., Subunit	Assay
Tyrosinase (EC 1.14.18.1)	Mushroom 119 kDa, α_2	Colorimetry with L-tyrosine
Lipoxygenase (EC 1.13.11.12)	Soy bean 100 kDa, α_2	Oxygen uptake
Catalase (EC 1.11.1.6)	Bovine lever 251 kDa, α_4	Oxygen generation with hydrogen peroxide
Peroxidase (EC 1.11.1.7)	Horse radish 40 kDa, α	Colorimetry with guayacol
Glucose oxidase (EC 1.1.3.4)	Aspergillus niger 182 kDa, α_2	Colorimetry with <i>o</i> -dianisidine
Ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3)	Cucumber 132 kDa, α_2	Oxygen uptake
Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	Bovine erythrocyte 32 kDa, α_2	Colorimetry with cytochrome C

2. 高圧処理

酵素は 10^{-7} ~ 10^{-5} Mの濃度で0.05M HEPES 緩衝液 (pH7.0) に溶解し、0.5mlプラスチック容器 (ポリプロピレン製) にとり、密栓した。さらに水の入った小袋に入れ、高圧処理装置で加圧した。一定の加圧処理の後取り出し残存酵素活性を調べた。高圧処理装置は三菱重工業高圧処理試験機 MFP7000 で、処理条件は圧力 300-700MPa、温度20℃、昇圧速度 8MPa/sec、昇圧後、所定時間保持後降圧した。昇圧時に断熱圧縮のため 2℃/100 MPa の温度上昇がみられた。

3. 加熱処理

酵素の加熱処理は以下のようにして行った。試験管に加圧処理で用いたものと同一の緩衝液 9 ml を用意し、恒温水槽に浸漬しておき、あらかじめ所定温度にしておいた後10倍濃度の酵素液 1 ml を注入し、その時点から一定時間経過ごとにピペットでサンプルを採取し氷水で冷却した。

4. 酵素活性の測定

各酵素活性の測定方法は以下の通りである。

(1)グルコースオキシダーゼ：酵素反応で生じる過酸化水素による *o*-ジアニシジンの酸化によるキノン色素を 436nm の吸光度の増大で測定した。反応は0.56M グルコース水溶液0.5ml、0.2mM *o*-ジアニシジン (0.1M リン酸緩衝液pH7.0) 2.4ml、 1.25×10^{-4} M パーオキシダーゼ (0.1M リン酸緩衝液 pH7.0) 0.1ml、 8.6×10^{-8} M グルコースオキシダーゼ (50mM HEPES 緩衝液 pH7.0) で行った。

(2)アスコルビン酸オキシターゼ：アスコルビン酸を基質として消費される酸素を酸素電極で追跡した。反応混液は0.5mM L-アスコルビン酸 (104mM リン酸緩衝液 (0.5mMEDTA) pH 5.6) 1.0ml、 1.9×10^{-6} M アスコルビン酸オキシターゼ (50mM HEPES 緩衝液 pH7.0) 0.1ml を混合し25℃で行った。

(3)スーパーオキシサイドディスムターゼ：活性酸素の生成系としてキサンチン-キサンチンオキ

シダーゼを、検出系としてチトクロムCを用いてスーパーオキシドディスムターゼの活性によりチトクロムCの還元が阻害され、吸光度(550nm)が減少することにより測定した。反応は0.05Mリン酸緩衝液(0.1mMEDTA含有, pH7.8) 2.6ml, 0.3mMチトクロムC(0.05Mリン酸緩衝液(0.1mMEDTA含有, pH7.8) 0.1ml, 1.5mMキサンチン(0.05Mリン酸緩衝液(0.1mMEDTA含有, pH7.8) 0.1ml, 1.8×10^{-6} Mキサンチンオキシダーゼ(0.05Mリン酸緩衝液(0.1mMEDTA含有, pH7.8) 0.1ml, 9.4×10^{-8} Mスーパーオキシドディスムターゼ(50mM HEPES緩衝液pH7.0) 0.1mlを混合し25℃で行った。

(4)チロシナーゼ：L-チロシンを基質として生成するo-キノンによる280nmでの吸光度の増加を追跡した。反応は1mM L-チロシン(0.05Mリン酸緩衝液pH7.0) 2.7ml, 7.8×10^{-6} Mチロシナーゼ(50mM HEPES緩衝液pH7.0) 0.3mlを混合し, 25℃で行った。

(5)リポキシゲナーゼ：リノール酸を基質として酸素の消費速度を酸素電極で測定した。反応は 7.5×10^{-3} Mリノール酸溶液(0.05Mリン酸緩衝液pH7.0) 1.25mlと 2.0×10^{-5} Mリポキシゲナーゼ(50mM HEPES緩衝液pH7.0) 0.25ml混合し, 25℃で行った¹²⁾。

(6)カタラーゼ：過酸化水素の分解により発生する酸素の増加を酸素電極により測定した。反応は0.08%過酸化水素(0.05Mリン酸緩衝液pH7.0) 1.5ml, 5.0×10^{-7} Mカタラーゼ(50mM HEPES緩衝液pH7.0) 0.1mlを混合し, 25℃で行った。

(7)ペルオキシダーゼ：水素受容体としてグアヤコールを用い, 生成するテトラグアヤコールの470nmでの吸光度の増大を測定した。反応は0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0) 2.0ml, 20mMグアヤコール(0.05Mリン酸緩衝液pH7.0) 0.2ml, 0.08%過酸化水素(0.05Mリン酸緩衝液pH7.0) 0.2ml, 2.0×10^{-7} Mペルオキシダーゼ(50mM HEPES緩衝液pH7.0) 0.1mlを混合し, 25℃で行った。

吸光度の測定には島津製作所の可視紫外分光光度計UV160A(電子冷熱式恒温セルホルダー, XYプロッター)を使用した。また酸素電極は飯島電子工業生化学用DO測定装置MD1000を用いた。

高圧処理, 加熱処理後の酵素活性の未処理の酵素活性に対する比率(百分率)を求めて残存活性とした。

結 果

1. 高圧処理による酸化酵素の失活

本試験装置で処理可能な上限圧力の700MPaまでの高圧処理で失活した酵素はグルコースオキシダーゼ, アスコルビン酸オキシダーゼ, リポキシゲナーゼ, カタラーゼである。これらは耐圧性に相違があるが, 各圧力での失活曲線は片対数グラフ上で直線となり, 一次反応に従っていた。これらの酵素は各圧力での失活曲線の傾きから失活反応の反応速度定数を求めることができ, 圧力と反応速度定数の対数をプロットしたところ直線となり, 活性化体積を求めることができた(Table 2)。例としてリポキシゲナーゼの失活曲線をFig. 1に示す。耐圧性は異なっているが, 他の酵素についても同様な曲線が得られた。

スーパーオキシドディスムターゼ, ペルオキシダーゼは20℃, 700MPa, 20分の高圧処理ではほとんど失活しなかった(残存活性は90%以上であった)。チロシナーゼは20℃では700MPa, 30分処理でも失活せず, 逆に活性の増加がみられた。加圧時の温度が30, 40℃の場合酵素活性は減少した。しかし他の酵素と異なり, 一次反応には従わなかった。温度が高いほど, 活性は低下した。

データが得られた4種の酵素について耐圧性を表現するために, 圧力と $t_{1/2}$ (未処理の酵素

Table 2. Activation volume and activation energy of inactivation of some oxidative enzymes

Enzyme	Activation volume (ml/mol)	Activation energy (kcal/mol)
Tyrosinase	—	41
Lipoxygenase	-39	85
Catalase	-18	70
Glucose oxidase	-50	56
Ascorbate oxidase	-38	46

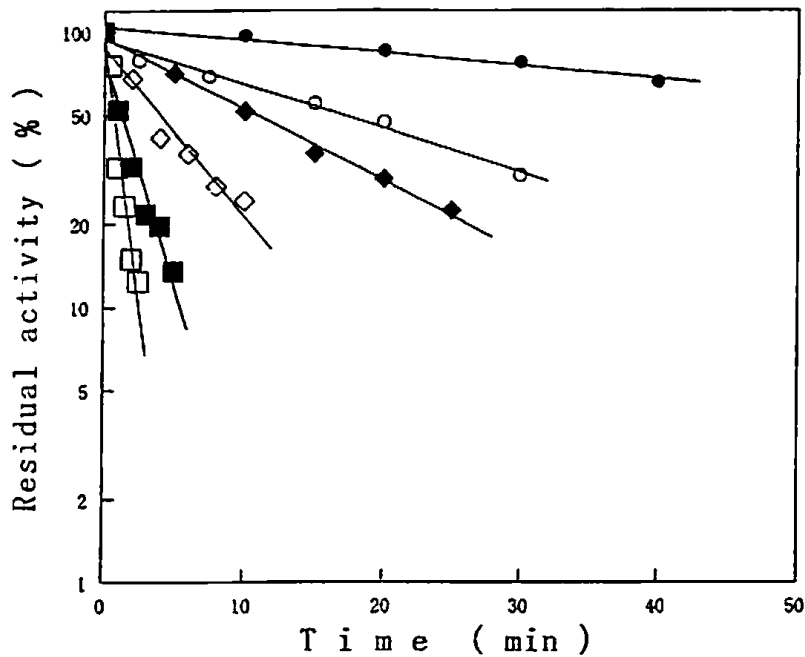


Fig. 1. Pressure inactivation of lipoxygenase at 20°C.

●:450MPa, ○:500MPa, ◆:550MPa, ◇:600MPa,
■:650MPa, □:700MPa.

活性の50%を失うのに必要な時間(分)の関係を図示した (Fig. 2).

2. 加熱による酸化酵素の失活

グルコースオキシダーゼ, アスコルビン酸オキシダーゼ, リポキシゲナーゼ, カタラーゼ, チロシナーゼは比較的耐熱性は弱く, 50°Cから75°Cの温度範囲で加熱失活曲線が得られた. これらの曲線は片対数グラフ上で直線となり, 一次反応に従っていた. 例としてリポキシゲナーゼの加熱失活曲線を Fig. 3 に示す. これらのデータのアレニウスプロットから活性化エネルギーが算出された. 他の酵素についても同様な曲線が得られた.

スーパーオキシドディスムターゼ, ペルオキシダーゼは耐熱性が強く, 80°C, 20分の処理でもほとんど失活しなかった. 耐圧性との比較のための試験であり. これらの酵素は耐圧性が強くデータがとれなかったため, 80°C, 20分以上の処理での失活試験は行わなかった.

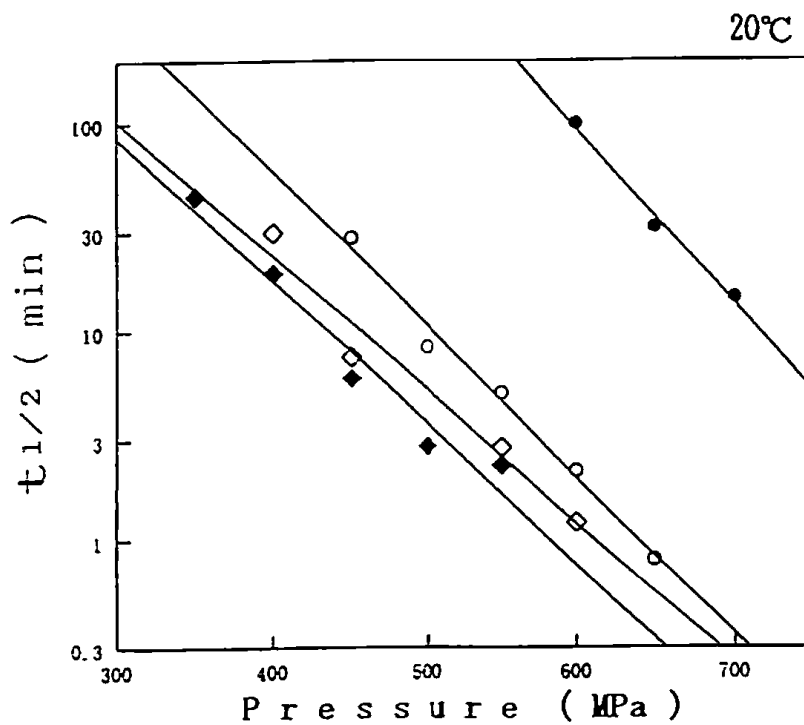


Fig. 2. Pressure stability of some oxydative enzymes

" $t_{1/2}$ " represents pressurizing time (min) for which results in the half-loss of original enzyme activity.

●:Catalase, ○:Lipoxigenase, ◆:Ascorbate oxidase,
◇:Glucose oxidase.

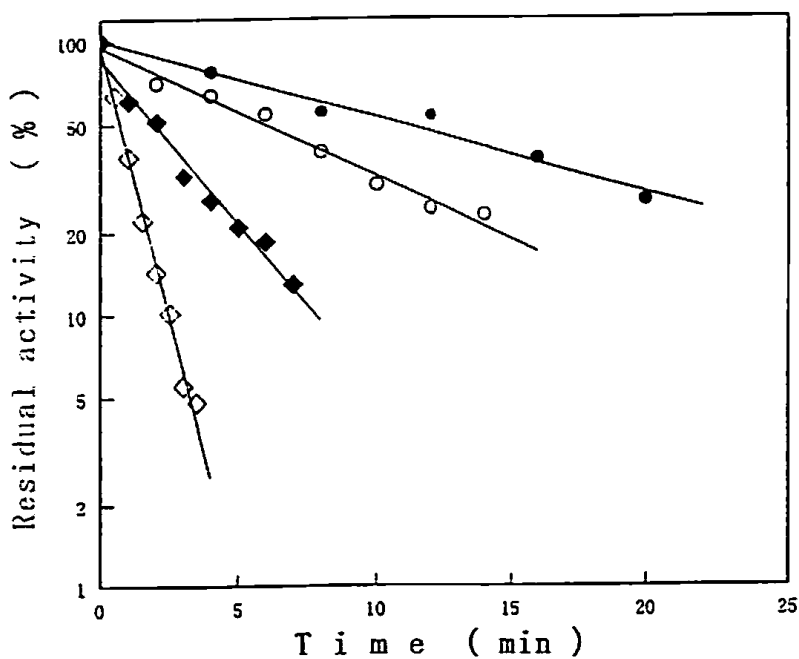


Fig. 3. Thermal inactivation of lipoxigenase at 0.1MPa.

●:67.5°C, ○:70.0°C, ◆:72.5°C, ◇:75.0°C.

5種の酵素について耐圧性を表現するために、温度と $t_{1/2}$ （未処理の酵素活性の50%を失うのに必要な時間（分））の関係を図示した（Fig. 4）。

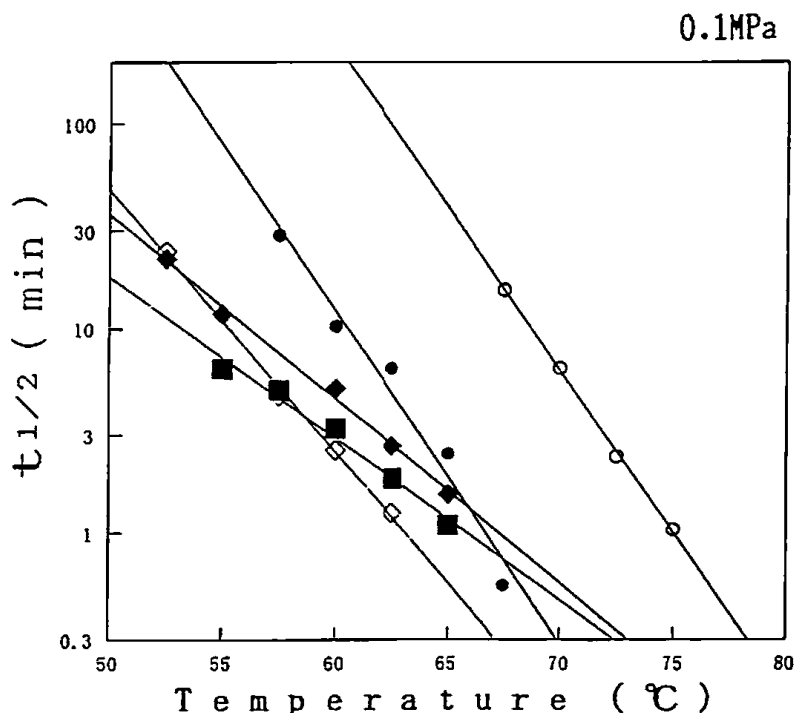


Fig. 4. Thermal stability of some oxidative enzymes.

" $t_{1/2}$ " represents heating time (min) for which results in the half-loss of original enzyme activity.

●:Catalase, ○:Lipoxigenase, ◆:Ascorbate oxidase,
◇:Glucose oxidase, ■:Tyrosinase.

考 察

1. 高圧の酸化酵素への影響

タンパク質のような高分子は、その高次構造を形成している水素結合などの弱い結合が300MPa以上の圧力で変性すること、酵素の種類によって、変性に必要な圧力が異なることが知られている。これはタンパク質でも複雑な高次構造をもつものほど、高圧処理により影響を受けやすいと考えられ、分子量の小さい酵素ほど耐圧性が高いことも報告されている。また比較的低い圧力では酵素の変性は可逆的であることが知られている。本研究でも酵素の種類により耐圧性が異なることが分かった。調べた酵素については定量的なものではないが、比較的分子量の小さいスーパーオキシドディスムターゼ、ペルオキシダーゼは耐圧性が強く、分子量の比較的大きいグルコースオキシダーゼやアスコルビン酸オキシダーゼは耐圧性が小さい傾向があった。また本研究では高圧処理後の酵素活性を測定しているため、高圧下での酵素の状態については不明であり、高圧処理で失活しなかった酵素が高圧下で可逆的な変性を起していたかどうかは明らかでない。高圧処理した酵素の活性は直後と数日放置したものについても測定したが差がないため、不可逆的な変性と考えられる。

酸化酵素の高圧での失活挙動から活性化体積が得られた。活性化体積が負である場合は、活性化状態で初期状態より体積が減少し、反応の速度定数が圧力とともに増すことを意味している⁹⁾。負の値が大きいほど圧力の増加に伴い失活反応がより促進されること、失活に対する圧力の効果が高いことを示している。ここでは圧力により失活がもっとも促進されるのはグルコースオキシダーゼで、次にアスコルビン酸オキシダーゼ、リポキシゲナーゼではほぼ同レベル、カタラーゼはあまり圧力の増大によって失活が促進されなかった。

2. 酸化酵素の耐圧性と耐熱性

多くの酵素で耐圧性と耐熱性の関連性は高いが、中にはチロシナーゼのように比較的耐熱性が弱いにもかかわらず、耐圧性は強いものがあつた。またわずかであるが、活性化のような現象が起こっていた。西洋ナシポリフェノールオキシダーゼでは明らかに高圧による活性化が起こっており¹⁰⁾、これらポリフェノールオキシダーゼ系の酵素は高圧による構造変化の観点から興味深いと考えられる。

調べられた酵素は耐圧性、耐熱性の相対的な強さから、次のように3つのグループに分けられた。

(1) 耐圧性が非常に強い（耐熱性も強い）

スーパーオキシドディスムターゼ、ペルオキシダーゼ

(2) 耐圧性が比較的強い（耐熱性も強い）

カタラーゼ、リポキシゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ

(3) 耐圧性が強いが、耐熱性が弱いもの

チロシナーゼ

3. 酵素失活における高圧処理と加熱処理の比較

酵素活性に対する高圧処理と加熱処理の影響を調べた結果、酵素を失活させる温度と圧力の関係については温度60～70℃が圧力500～600 MPaに相当していることが分かった。通常食品原料の内在酵素を不活性化するためのブランチングとして90～100℃の熱水に40秒から5分程度浸漬する加熱処理が行われている。本実験の結果から温度が10℃上昇したときと同等の失活効果を酵素に与えるために必要とされる圧力の上昇は200～400 MPaであつた。加熱処理で100℃まで上昇させることは設備や経済性の面でそれほど高いコストではないが、酵素を失活させるために要する高圧処理には加熱に比較できないほど高いコストがかかる。このことは酵素失活の面では高圧処理は加熱処理に比べて不利なことを示している。加熱との併用などで酵素失活をはかることや食品中の酵素の除去を併用するなどの工夫が必要であると考えられる。

要 約

酸化酵素の高圧処理による失活を加熱処理と比較して調べた結果、次のような結果が得られた。

- (1) リポキシゲナーゼとカタラーゼは400から700 MPaで失活した。その失活は一次反応であつた。失活速度と圧力のプロットから活性化体積が求められた；リポキシゲナーゼ： -39ml/mol ，カタラーゼ： -18ml/mol 。ペルオキシダーゼは700 MPaでも失活しなかった。
- (2) 前報で調べた4つの酸化酵素の結果も含めて、7つの酸化酵素が耐圧性、耐熱性の相対的な強さから3つのグループに分けられた。耐熱性の強い酵素は耐圧性も強い傾向があつた。グルコースオキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、カタラーゼの4つの酵素について、酵素活性が50%低下するために必要な圧力-時間および温度-時間の関係を求

め、耐圧性、耐熱性をグラフに図示することができた。

- (3) 60~70℃の加熱と同等の酵素失活を与える圧力は500~600MPaであった。また温度が10℃上昇したときと同等の失活効果を酵素に与えるために必要とされる圧力の上昇は200~400MPaであった。これらのことは酵素失活の面で高圧処理は加熱処理に比べて不利なことを示している。

文 献

- 1) 林力丸編；食品への高圧利用，さんえい出版（1989）。
- 2) 林力丸編；加圧食品，さんえい出版（1990）。
- 3) 林力丸編；高圧科学と加圧食品，さんえい出版（1991）。
- 4) 林力丸編；生物と食品の高圧科学，さんえい出版（1991）。
- 5) Robinson, D. S. & N. A. M. Eskin: *Oxidative Enzymes in Foods*, (1993)。
- 6) Y. Aoyama, M. Asaka, R. Nakanishi: *Developments in food engineering*, pp.861-863 (1994)。
- 7) 丸尾文治，宮田信雄：酵素ハンドブック，朝倉書店，東京（1982）。
- 8) IUBMB: *Enzyme Nomenclature*, Academic Press Inc., New York (1992)。
- 9) K. J. Laidler, P. S. Bunting: *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Claredon Press, New York (1973)。
- 10) M. Asaka, Y. Aoyama, R. Nakanishi & R. Hayashi: *Biosci. Biotech. Biochem*, 58 1486-1489 (1994)。