

高圧処理による果実ポリフェノールオキシダーゼ活性の変化

朝賀 昌志, 中西 律子, 村井 恵子, 青山 好男

Change in Fruit Polyphenoloxidase Activity Caused by High-pressure Treatment

Masashi Asaka, Ritsuko Nakanishi, Keiko Murai and Yoshio Aoyama

Polyphenoloxidase activity in buffer extract and Triton extract was determined for a variety of fruits. The results suggest that the enzyme in pear, Japanese pear, loquat, cherry, peach, apricot, and Japanese apricot mainly exists in the soluble fraction of cytoplasm (buffer extract), while the enzyme in strawberry exists as a membrane-bound polyphenoloxidase (Triton extract).

Effect of high pressure treatment on the polyphenoloxidase was studied. The activity of soluble polyphenoloxidase from cherry was increased by pressurization at 300 MPa or higher, being highest at 500 MPa. While the activity of soluble polyphenoloxidase from apricot was decreased by pressurization at 400 MPa or higher. The activity of polyphenoloxidase from pear, Japanese pear, loquat, and cherry was increased by pressurization. On the other hand, the activity of polyphenoloxidase from peach, apricot, and Japanese apricot was decreased by pressurization. The membrane-bound polyphenoloxidase activity of strawberry was decreased by pressurization. The change in polyphenoloxidase activity by pressurization was independent of the type of soluble or membrane-bound enzyme.

The apricot polyphenoloxidase in unpressurized and pressurized extract showed the same optimum pH. On the other hand, the cherry polyphenoloxidase in unpressurized extract showed optimum pH at 4.5 and a slight activity at neutral conditions (pH 5.5-7.5). By pressurization of the extract at 500 MPa, the enzyme activity was increased, and the pH-activity curve showed no peak.

The result on native-polyacrylamide slab gel electrophoresis for the buffer extract of cherry showed that 2 active forms and 4 latent forms of polyphenoloxidase existed in the unpressurized extract and latent enzymes were activated by pressurization. It was suggested that the cherry polyphenoloxidase was activated by a limited conformational change of the enzyme.

Key words : high pressure, fruit, polyphenoloxidase, membrane-bound enzyme, soluble

注 本論文は“高圧生物科学と高圧技術”, 鈴木敦士・林力丸編(さんえい出版, 京都), pp.93-100 (1997) 掲載論文を一部補正し, 転載したものである。

enzyme, activation, latent enzyme, optimum pH, polyacrylamide slab gel electrophoresis.

西洋ナシポリフェノールオキシダーゼ (1, 2-Benzendiol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.1) は果実に不活性型で存在し, 高圧処理により活性化する¹⁻³⁾。高圧処理を施した野菜や果実を大気中に放置すると急速に褐変していく^{4,5)}が, 西洋ナシでも見られるこの現象は高圧処理によるポリフェノールオキシダーゼの活性化が原因の一つであると考えてきた¹⁻³⁾。また, 不活性型西洋ナシポリフェノールオキシダーゼは, 分子サイズがゲル透過クロマトグラフィーで70,000, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で65,000を示す単量体と推定された^{6,7)}。このことから, 西洋ナシポリフェノールオキシダーゼの高圧処理による活性化は酵素タンパク質の3次構造の変化によるものと推察した⁶⁾。

今回, その他の果実に含まれるポリフェノールオキシダーゼの存在形態と高圧処理による活性変化の有無, 最適pHに対する高圧処理の影響, 高圧活性化の機構を調べ, 高圧活性化が西洋ナシポリフェノールオキシダーゼに独特のものかどうかを検討した。

実験方法

1. 実験材料

西洋ナシ (ラ・フランス), 桜桃 (佐藤錦, 北光), 和ナシ (幸水), ピワ, アンズ, 白桃 (水蜜桃), イチゴ (豊の香, 女峰), リンゴ (陸奥, ふじ, サンふじ, サンつがる, 王林, ジョナゴールド, スターキング) は市場より購入し, ウメ (紅梅) は当研究所の農場で収穫した。

2. ポリフェノールオキシダーゼの抽出方法

ポリフェノールオキシダーゼは前報^{6,7)}と同様の方法で抽出した。桜桃とイチゴを除く果実は剥皮, 除芯後細かくきざんだ。試料に同量の100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えホモジナイズしさらし布で濾した後, 濾液を遠心分離 (10,000×g) した。上澄液を緩衝液抽出画分 (buffer extract) とした。沈澱は同緩衝液で3回抽出, 遠心分離した。その後, 沈澱を1.5% Triton X-100を含む100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁して1時間攪拌した後, 遠心分離した。得られた上澄液をトリトン抽出画分 (Triton extract) とした。なお, 抽出操作は0-5℃で行った。

3. 高圧処理方法

抽出液を0.7 ml 容ガラス容器に充填しテフロン蓋で密封した。この試料を高圧試験装置 MFP-7000 型 (三菱重工業) を用い, 温度20℃で100-700 MPa の圧力で10分間処理した。

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 (pH 6.5) に溶解した25 mM ピロカテコールを基質として30℃で行った。活性測定は分光光度計 (島津製作所) を用い, 波長410 nm の吸光度変化を測定した。酵素活性は1分間に吸光度を1.0増加させる量を1 unit とした。なお, 最適pH の測定は20 mM リン酸緩衝液または酢酸緩衝液中で測定した。

5. Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

ポリフェノールオキシダーゼのNative-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析は,

Davisの方法に準じて行った⁹⁾。すなわち、7.5%ポリアクリルアミドスラブゲル（パジェルNPU-7.5L，アトー製）に試料0.025 mlを充填し、5℃でゲル1枚当たり20mAの定電流で泳動した。

ポリフェノールオキシダーゼは、泳動したゲルを25 mMピロカテコールを含む20 mMリン酸緩衝液（pH 6.5）に10分間浸漬して活性染色した。タンパク質はクマシーブリンリアントブルー染色により検出した。

結 果

1. ポリフェノールオキシダーゼの果実での存在形態

果実ポリフェノールオキシダーゼの存在形態をTable 1に示した。表中の++は強い活性，+は弱い活性，±はトレース，-は無活性を表している。西洋ナシ，和ナシ，ビワ，桜桃，アンズ，ウメ，白桃は主に緩衝液抽出画分に存在し，イチゴはトリトン抽出画分に存在していた。リンゴは、品種により存在形態が異なり一定しなかった。

Table 1. Plant polyphenoloxidase activity in buffer extracts and Triton extracts.

Plant	Variety	Buffer extract	Triton extract
Pear	La France	++	±
Japanese Pear	Kosui	++	±
Cherry	Sato-nishiki	++	±
Loquat		++	±
Japanese apricot	Kobai	++	±
Apricot		++	-
Peach	Suimituto	++	+
Strawberry	Toyonoka, Nyoho	-	++
Apple	Mutsu, Fuji, San-fuji, San-tsugaru, Ohrin, Jonagold	-	++
	Starking	++	+

++ : strong activity, + : weak activity, ± : trace, - : no activity

2. ポリフェノールオキシダーゼ活性に対する高圧処理の影響

1) 緩衝液抽出画分ポリフェノールオキシダーゼに対する高圧処理の影響

高圧処理による桜桃ポリフェノールオキシダーゼの活性変化をFig. 1，アンズポリフェノールオキシダーゼの活性変化をFig. 2に示した。桜桃の活性は300 MPa以上の圧力で処理することにより増加し，500 MPaで最大となった。一方，アンズの活性は圧力処理で増大せず400 MPa以上の圧力で処理すると低下し，700 MPaの処理では20%に低下した。

他の果実ポリフェノールオキシダーゼの高圧処理による活性変化をTable 2にまとめた。高圧処理により活性が増加した酵素は上向き矢印，活性が低下した酵素は下向き矢印により示した。西洋ナシ，桜桃，和ナシ，ビワの酵素は，高圧処理によりいずれも活性が増加したが，その活性増加の程度は試料により異なった。西洋ナシでは，200 MPa以上の圧力で活性化し，500 MPaの圧力処理で10倍以上になり，これが最大であった。活性化が最も小さかったのは和ナシで，500

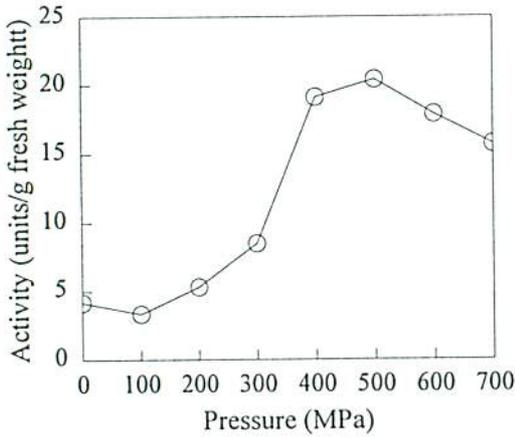


Fig. 1. Change of cherry polyphenoloxidase activity in buffer extract by pressurization.

The extract was treated with various pressures at 20°C for 10 min. The enzyme assay was done in 3.0 ml of 20 mM phosphate buffer, pH 6.5, containing 25 mM pyrocatechol, at 30°C. One unit of activity was defined as a change in one absorbance unit per min at 410 nm.

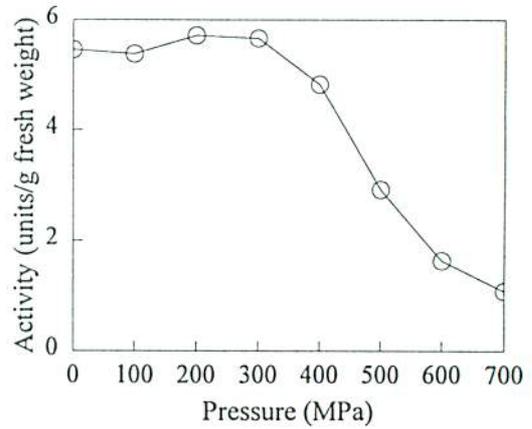


Fig. 2. Change of apricot polyphenoloxidase activity in buffer extract by pressurization.

See Fig. 1 for conditions of the enzyme assay.

Table 2. Change of polyphenoloxidase activity in buffer extract from various origins by pressurization.

Enzyme origin	change of activity*	Treated pressure(MPa)**	Activation fold
Pear	↑	500	10.7
Japanese pear	↑	600	1.7
Cherry	↑	500	4.9
Loquat	↑	500	4.5
Apricot	↓	600	0.2
Japanese apricot	↓	700	0.4
Peach	↓	500	0.45

* Upward arrows represent that the enzyme activity was increased by pressurization. Downward arrows represent that the enzyme activity was decreased by pressurization.

** Treated pressure means pressure value which gave the highest or lowest activity.

MPa以上の圧力処理で活性が増加し、600 MPaの処理で未処理の最大1.7倍であった。

逆に、アンズ、ウメ、白桃の酵素は高圧処理により低下した。アンズは400 MPa以上の処理で低下し、700 MPaの処理で20%になった。白桃は500 MPa以上の圧力処理で活性が低下し、それ以上の圧力処理でもほとんど同じ活性を示した。

2) トリトン抽出画分ポリフェノールオキシダーゼに対する高圧処理の影響

高圧処理によるイチゴポリフェノールオキシダーゼの活性変化を Fig. 3 に示した。活性は、400 MPa 以上の圧力処理で低下し、600 MPa で10% になった。リンゴの酵素の高圧処理による活性変化は品種により異なった。ほとんどの品種が活性化したが、一部は活性化を示さず失活し、高圧処理による変化は一定しなかった (data not shown)。

3. 高圧処理で失活したポリフェノールオキシダーゼ

高圧処理で活性が低下したアンズについて、500 MPa で処理した試料と未処理の試料のポリフェノールオキシダーゼの最適 pH を比較した結果を Fig. 4 に示した。アンズの酵素は最適 pH 6.5 を示し、高圧処理してもほとんど変化せず、活性が全体的に低下していた。

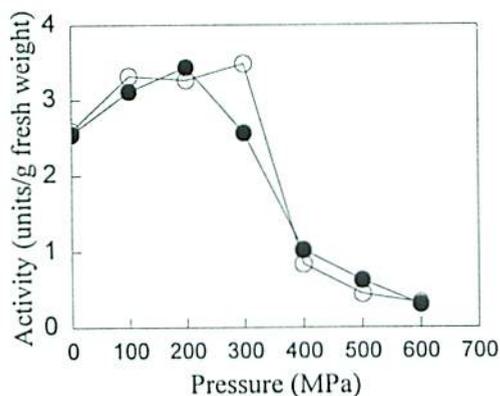


Fig. 3. Change of strawberry polyphenoloxidase activity in Triton extract by pressurization.

○, Toyonoka; ●, Nyoho.
See Fig. 1 for conditions of the enzyme assay.

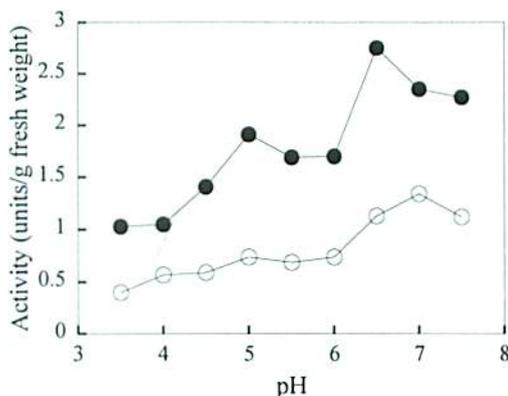


Fig. 4. pH-activity curve of apricot polyphenoloxidase in buffer extract.

○, pressurized at 500 MPa and 20°C for 10 min; ●, unpressurized.
See Fig. 1 for conditions of the enzyme assay.

4. 高圧処理で活性化するポリフェノールオキシダーゼ

1) ポリフェノールオキシダーゼの最適pH

一方、高圧処理で活性化した桜桃ポリフェノールオキシダーゼについて、酵素の最適pHを比較した結果を Fig. 5 に示した。未処理の酵素の最適pHは4.5を示し、中性付近ではほとんど活性を示さなかった。これに対し、高圧処理するとpH4.5付近の活性も増加するが、中性付近の活性はそれ以上に増加し、はっきりとしたピークを示さなくなった。

2) Native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析

桜桃の緩衝液抽出画分をNative-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分析した結果を Fig. 6 に示す。ゲルに充填した酵素量は、未処理の試料が0.2 units (ただし高圧処理で0.8 unitsに増加)、500 MPa で高圧処理した試料が0.8 unitsである。なお、活性型と不活性型の両酵素を同条件で分析するために、未処理と高圧処理した試料は各々2カ所に充填して泳動した。泳動後ゲルを中央で切断し、一方はそのまま活性染色し、他方はゲルを高圧処理した後活性染色した。ゲルの高圧処理は、ゲルを純水とともにナイロンラミネート袋に密封し、20°C、500 MPa で10分間

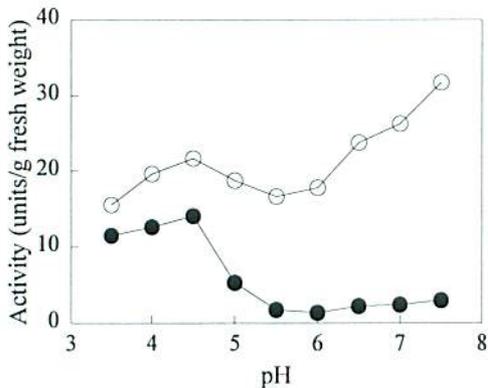


Fig. 5. pH-activity curve of cherry polyphenoloxidase in buffer extract.

○, pressurized at 500 MPa and 20°C for 10 min; ●, unpressurized. See Fig. 1 for conditions of the enzyme assay.

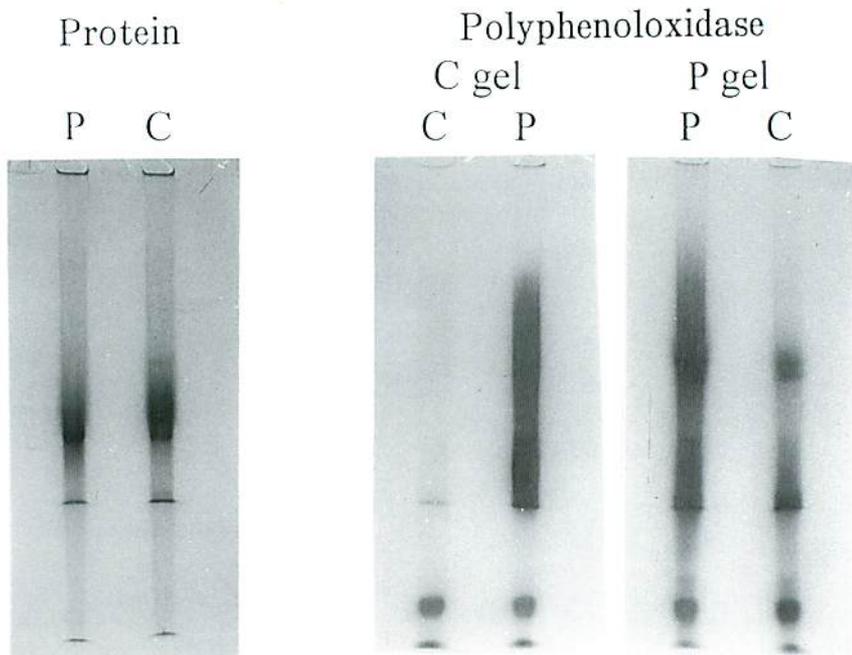


Fig. 6. Native-polyacrylamide slab gel electrophoresis of the buffer extract from cherry.

Electrophoresis was done on 7.5% polyacrylamide slab gel by the method of Davis⁹. C, unpressurized extract; P, extract pressurized at 500 MPa and 20°C for 10 min. Protein bands was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Polyphenoloxidase band was stained with the enzyme assay solution (see Fig. 1). C gel was unpressurized after electrophoresis and P gel was pressurized at 500 MPa and 20°C for 10 min before activity staining.

行った。

ポリフェノールオキシダーゼの活性染色をみると、未処理の抽出液はRf 0.7とRf 0.9の少なくとも2種類が認められた(Cゲル-C)。未処理の抽出液を泳動後に高圧処理すると、Rf 0.4付近にはっきりとした2バンド、Rf 0.56に1バンドと先のRf 0.7のバンドよりわずかに遅い位置に1バンドの4種類のバンドが出現した(Pゲル-C)。一方、高圧処理した抽出液を泳動する(Cゲル-P)と、未処理のRf 0.7のバンドより遅い部分に2種類の広く広がったバンドが出現

した。

タンパク質染色をみると、未処理と高圧処理した試料の両方にRf 0.7のバンドがみられ、それよりやや遅い位置には未処理の試料にのみバンドが認められた。

考 察

一般に、緩衝液抽出画分は溶解型酵素、トリトン抽出画分は膜結合型酵素といわれている⁹⁾ので、西洋ナシ、和ナシ、桜桃、アンズ、ウメ、白桃のポリフェノールオキシダーゼは主に溶解型、イチゴは主に膜結合型といえる。高圧処理によるポリフェノールオキシダーゼ活性の変化をみると、活性化するのは西洋ナシ、和ナシ、桜桃、ビワの溶解型酵素であった。したがって、高圧処理による活性化と酵素の存在形態との間に関係は認められない。なお、リンゴはほとんどの品種で酵素が主に膜結合型で存在し高圧処理で活性化したが、一部の品種では異なった。この違いが品種によるか栽培条件の違いかは明らかでない。リンゴのポリフェノールオキシダーゼは加熱で活性化するが、品種により活性化を示さないものもある¹⁰⁾。加熱処理と高圧処理の違いがあるが、同じことに起因しているのかもしれない。

高圧処理による活性化前後の桜桃ポリフェノールオキシダーゼの最適pHの変化を西洋ナシ¹⁻³⁾の場合と比較してみる。西洋ナシでは、未処理の抽出液のポリフェノールオキシダーゼの最適pHは4.0を示し、中性付近で活性がほとんどないが、活性化処理するとpH 4.0付近の活性は変わらずpH 6.5に最適pHを示すようになった¹⁻³⁾。桜桃の場合、高圧処理による活性化により酸性側の活性も増加した点と最適pHのピークがはっきりとしなくなった点に特徴がある。

桜桃ポリフェノールオキシダーゼのNative-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析で、Cゲル-Cに2種類の活性バンドが認められ、Pゲル-Cではさらに4種類の活性バンドが出現した。このことは、桜桃では少なくとも2種類の活性型酵素と高圧処理で活性化する少なくとも4種類の不活性型酵素が存在することを示している。タンパク質のRf 0.7のバンドが活性型酵素、それより移動度のやや遅い位置に未処理の試料にのみ認められるバンドが不活性型酵素の一つと思われる。一方、高圧処理した抽出液は、移動度の遅い2種類の広くブロードしたバンドが出現した(Cゲル-P)。新たに出てきたブロードなバンドが高圧処理で活性化した酵素と考えられる。電気泳動分析で酵素の移動度が変化する原因として表面電荷、大きさ、形の変化が考えられる。しかし、活性化した酵素がブロードなバンドを示すことからみて、ペプチドの解離会合ではなく、3次構造の変化による形または表面電荷の変化が原因と思われる。

以上のことから、ポリフェノールオキシダーゼが不活性型で存在し、高圧処理で活性化するという現象は西洋ナシに独特のものではなく、広く果実に共通する現象といえる。

ま と め

ポリフェノールオキシダーゼは、西洋ナシ、和ナシ、桜桃、アンズ、ウメ、白桃では主に溶解型、イチゴでは主に膜結合型で存在していた。高圧処理で活性化したのは、西洋ナシ、和ナシ、桜桃、ビワの酵素であった。酵素の存在形態と高圧処理による活性変化の間に関係は認められなかった。

桜桃ポリフェノールオキシダーゼの最適pHは活性化により変化したが、アンズではほとんど変化せず全体に活性が低下した。

桜桃ポリフェノールオキシダーゼのNative-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分析の結果、活性型の酵素が少なくとも2種類、不活性型の酵素が少なくとも4種類認められた。これら不活性型酵素の高圧処理による活性化は、タンパク質の3次構造変化によると思われる。

ポリフェノールオキシダーゼが不活性型で存在し、高圧処理で活性化するという現象は西洋ナシに限らず、広く果実に認められた。

文 献

- 1) Asaka, M. and Hayashi, R.: *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2439-2440 (1990).
- 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: 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).
- 5) 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).
- 6) Asaka, M., Aoyama, Y., Nakanishi, R. and Hayashi, R.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1486-1489 (1994).
- 7) 朝賀昌志, 中西律子, 青山好男, 林力丸: 高圧バイオサイエンス, 功刀滋・嶋田昇二・鈴木敦士・林力丸編 (さんえい出版, 京都), pp. 94-101 (1994).
- 8) Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427 (1964).
- 9) Mayer, A. M. and Harel, E.: *Phytochemistry*, 18, 193-215 (1979).
- 10) Yemnicioglu, A., Ozkan, M. and Cemeroglu, B.: *J. Food Sci.*, 62, 508-510 (1997).