

大根のポリフェノールオキシダーゼ活性

橋本 俊郎*

大根の塩蔵中に生ずる褐変は、二次加工品の品質評価に大きな影響を与える¹⁾。この褐変防止のために貯蔵中の塩漬大根と外気(酸素)との遮断、低温貯蔵、清液へのアスコルビン酸の添加などが行われ、ある程度の効果をあげている。しかし、褐変の原因や機構は明かでなく、未解決の問題として残っている²⁾。おそらく複数の要因が相乗的に作用した結果であろうと言われ、そのひとつに大根ポリフェノール類の酵素による酸化褐変説²⁾がある。これに関する酵素として生大根で3, 4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)を基質とするポリフェノールオキシダーゼ(PP0, E.C.1.14.18.1)¹⁾とピロガロールなどのトリヒドロキシベンゼンを基質とするPP0⁴⁾の存在が報告されている。

PP0は分子状酸素を利用してフェノール性物質を酸化するので、その活性測定法として、褐変生成物による吸光度の増加を測る吸光度法⁵⁾より、基質の酸化に消費された酸素濃度の減少を測る検圧法や酸素電極法⁶⁾のほうが直接的で優れている。

本試験においては生大根から調製した粗酵素画分について、PP0活性を酸素電極法で測定し、各種基質についてその作用を調べた結果、PP0活性は認められなかったので生大根にPP0は存在しないと推察した。

1. 実験方法

1. 1 アセトンパウダー及び粗酵素の調製

細切した生大根(青首と白秋大根を使用。)100gに6倍量の冷アセトン(-25℃)を加えて磨砕後、ろ過した。アセトン不溶物を5倍量の冷アセトンで洗浄後、氷冷下でアセトン臭がなくなるまで減圧乾燥し、アセトンパウダーとした。100gの生大根から1.8gのアセトンパウダーが得られた。

5gのアセトンパウダーに対し、2.5gの不溶性ポリビニルピロリドンと1000mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)を加えて室温下で15分間穏やかに攪拌後、遠心分離(10,000G×20min.)して不溶物を除去し、得られた上清に硫酸を加えて0.2~0.9飽和で沈澱する蛋白画分を集めた。沈澱物は少量の緩衝液に溶かして透析チューブに入れ、外液を0.01Mリン酸緩衝液(PH6.8)として48時間透析(冷蔵庫内)した。

不溶物を遠心分離で除き、上清を粗酵素液(約20ml)とした。

なお、比較のために生ゴボウからも同様の操作で粗酵素を調製した。

1. 2 PPO活性の測定法⁶⁾

酸素電極法の場合は、東亜電波工業(株)製の記録計CDR12Aに隔膜ガルバニ式酸素電極OE-201を接続し、酵素添加後の反応液中の溶存酸素濃度の減少を5分間測定記録して、1分間当たりの酸素減少

*食品加工部

量を PPO 活性として示した。反応容器として 15ml 容のガラス製秤量瓶（内径 28mm, 深さ 28mm）を用い、反応液総量を 10ml として室温下で測定した。酵素源としてアセトンパウダーを使用する場合は、基質溶液 10ml に対し 100mg のパウダーを加えた。基質としてピロガロール、カテコール、フロログリシン、クロロゲン酸及び L-DOPA を用い、それぞれ、0.1M リン酸緩衝液(pH6.8)に 10mM となるように溶かした。吸光度法による場合は、自記分光光度計（日立、U-3200）の Time Scan 機能を用い、3ml の 10mM 基質溶液に 0.2ml の酵素液を加え、420nm の吸光度の変化を 5 分間記録し、1 分間における吸光度の増加量で活性を示した。測定は 250℃ 下で行い、対照セルには基質溶液と熱失活させた酵素液を入れた。

3. 実験結果及び考察

3.1 Pm 活性測定における吸光度法と酸素電極法の比較

表 1 に 2 つの方法による大根の PPO 活性の測定結果を示した。

表 1 2 つの測定法による大根の PPO 活性

基 質 ^{a)}	吸光度法 ^{b)} ($\Delta 420\text{nm}/\text{min.}$)	酸素電極法 ^{c)} ($\mu\text{l O}_2/\text{min.}$)
ピロガロール	0.106	0
カテコール	0.054	0
フロログリシン	0.063	29.3
クロロゲン酸	0	0
L - D O P A	0	0

a) 各基質は 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) に、10mM となるように溶かした。

b) 3ml の基質溶液に 0.2ml の酵素液を加え、1 分間における 420nm の吸光度の増加量を示した。

c) 9ml の基質溶液に 1ml の酵素液を加え、1 分間における酸素濃度の減少量を示した。

試験した基質物質の中でピロガロール、カテコール、フロログリシンは大根酵素の添加により黄色～淡褐色に変色し、大根酵素によって酸化されたように見える。吸光度法によれば、大根にはこれらの物質に対する PPO 活性があるとみることができる。しかし、クロロゲン酸及び L-DOPA に対しては、酵素添加後も反応液の 420nm の吸光度を増加させることなく、酸化しないと思われる。表に示していないが、コヒー酸、P-クマール酸、フェルラ酸及びシナピン酸のヒドロキシ桂皮酸類に対する吸光度の増加は認められなかった。

反応中の酸素濃度の変化を調べる酸素電極法によって酸素濃度の減少が認められた物質はフロログリシンのみで、カテコール、ピロガロールのいずれも酸素濃度に変化は認められなかった。従って、PPO の定義から大根酵素はフロログリシン酸化活性を有するが、試験した他のフェノール類に対する酸化活性はなく、o-ジフェノール化合物を酸化する PPO は存在しないものと思われる。

3.2 ゴボウの PPO との比較

大根に用いた酵素の調製法で PPO が失活しないことを確認するために、ゴボウから大根と同じ調製法

で酵素を調製した。表2にアセトンパウダーを用いてPPO活性を測定した結果を示した。

表2 ゴボウと大根のアセトンパウダーのPPO活性($\mu\ell_2/\text{min.}$)^{a)}

基 質	ゴ ボ ウ	大 根
ピ ロ ガ ロ ール	4.6	0
カ テ コ ール	142	0
フ ロ ロ グ リ シ ン	2.3	0.6
ク ロ ロ ゲ ン 酸	112	0

a) 各基質は0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)に、10mMとなるように溶かした。この溶液10mlにトンパウダーを100mg加え、酸素電極法で測定した。

ゴボウは試験したフェノール化合物に強いPPO活性を示し、特にo-ジフェノール化合物に対して高い酸素吸収を示した。しかし、大根はフロログリシンに弱い活性を示したのみで、o-ジフェノール酸化活性は認められなかった。ゴボウアセトンパウダーから調製した透析粗酵素は各基質に対し、アセトンパウダーと同様の作用を示した。従って、用いた酵素調製法でゴボウPPOが失活せずに抽出されることから、大根の場合も、もしPPOが存在するならば失活せずに抽出されと考えられる。また、大根のPPO活性を抑制し、外観上、活性が無いように作用するアスコルビン酸³⁾やフェノール性物質⁷⁾は、用いた調製法で除かれることから大根にはPPOは全く存在しない、または、少なくとも大根の品質に影響を及ぼす程度のPPOは存在しないと考えた方が妥当である。

大根の粗酵素のフロログリシン酸化活性に関して、試験に用いた粗酵素はグアヤコールを基質として強いパーオキシダーゼ活性を示した。藤田ら⁴⁾は精製したカブのフロログリシン酸化酵素がパーオキシダーゼ活性を持つことを示している。植物体に広く存在するパーオキシダーゼが過酸化水素なしにIAA、NADH及びDOPAなどを酸化する活性を有することが知られている⁸⁾、⁹⁾。従って、大根の粗酵素で認められたフロログリシン酸化活性はパーオキシダーゼに由来する可能性が高く、PPOによるものでないと考察される。

4. 要約

大根根部よりアセトンパウダーを調製し、更にパウダーから緩衝液で抽出、硫酸分画及び透析して粗酵素画分を得た。ピロガロール、カテコール、フロログリシン、クロロゲン酸及びL-DOPAを基質として、酸素電極法によりポリフェノールオキシダーゼ活性を測定したところ、フロログリシンのみに活性を示した。ゴボウ粗酵素との比較及びパーオキシダーゼ活性の検出から大根根部にはポリフェノールオキシダーゼは存在しないと推察した。

参考文献

- 1) 小川敏雄：漬物製造学 p113 (株) 光琳 (1989)
- 2) 前田安彦：月刊食品 322 号 p11 (1984)
- 3) 石黒伊三雄・篠原力雄・青山方子：栄養と食糧 23, 13 (1970)
- 4) 藤田修二・東野哲三：農化 54, 429 (1980)
- 5) 中林敏郎：日食工誌 15, 199 (1968)
- 6) 農林水産技術会議事務局編：昭和 48 年度食品分析研究会報告書 P278 (1974)
- 7) 藤田修二・東野哲三：農化 53, 233 (1979)
- 8) A. Signoret and J. Crouzet: Agric. , Biol. , Chem. , 42, 1871 (1978)
- 9) O. P. Srivastava and R. B. VanHuystee: Phytochemistry, 16, 1527 (1977)