

## 低温貯蔵中におけるピーマン種子の酵素的褐変について

李 忠富・東野 哲三・小島 孝之・藤田 修二・川崎 宏隆  
(園芸工学教室)

昭和62年4月9日受理

### Occurrence of Enzymatic Browning of Sweet Pepper Seed during Low Temperature Storage

Zhong-Fu LI, Tetsuzo TONO, Takayuki KOJIMA,  
Shuji FUJITA and Hirotaka KAWASAKI

(Laboratory of Food Science and Horticultural Engineering)

*Received April 9, 1987*

#### Summary

The browning derived from chilling injury was observed in seeds of sweet pepper stored at a low temperature. The phenol oxidizing system considered to be closely related to this browning reaction was investigated.

Polyphenoloxidase (EC 1. 10. 3. 1) was partially purified from the fresh seeds by a combination of ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulofine column chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The enzyme oxidized *o*-diphenols such as chlorogenic acid and (-)-epicatechin, but not monophenol, *m*- and *p*-diphenols. Optimum pH of the enzyme was about 3. 5~4. The enzyme activity was inhibited by potassium cyanide and sodium fluoride. Two polyphenols were detected from the seed extract as natural substrate of the enzymatic browning by paper chromatography. One of them was chlorogenic acid and the other its analog. The content of chlorogenic acid and the enzyme activity in the seeds were determined by the spectrophotometric method based on difference spectra. The chlorogenic acid content decreased at a similar speed during preservation at 2°C and 15°C. The activity of chlorogenic acid oxidase dropped during the lower temperature storage, but a little change in the activity was noted during the higher temperature storage.

#### 緒 言

果実、野菜類の傷害による褐変現象はそれらの未熟期に顕著なことが知られている<sup>5, 6)</sup>。しかし、ピーマンは未熟期の緑熟果実が食用として利用されるにも拘らず、常温条件下では通常褐変はみられず、完熟期に紅色に着色するのみである。ところが、低温障害をうけるとその一症状として種子の褐変現象が観察される。これまでに、ピーマンの低温障害の発生機構については2, 3の報告がみられる。例えば、山内ら<sup>1)</sup>はピーマンの低温貯蔵中に種子の褐変に伴いアスコルビン酸 (AsA) 含量が急激に減少することを認め、また、小机ら<sup>3, 4)</sup>はその冷蔵 (1°C) 中

にクロロゲン酸 (Chl) 含量が1日後に収穫時の約3倍に増加したと報告している。一方、著者ら<sup>9)</sup>は食品中のポリフェノール (PP) の酵素分析法の開発を目的として、種々植物酵素源の検索を行ったところ、ピーマン種子より得られた酵素液が最も強いポリフェノール酸化酵素 (PPO) 活性を有することを見出した。したがって、ピーマンの低温貯蔵中に発現する種子の褐変現象は一種の酵素的反応によるものではないかと考えられる。しかし、これまでの研究では、ピーマン酵素の性質についてはほとんど触れられておらず、またその反応の基質となる PP 化合物の種類についても明らかにされていないようである。そこで、本研究においては、まずピーマン種子の PPO を部分精製し、その一般的性質を調べるとともに、その天然基質についても検索した。さらに、これら褐変成分の低温貯蔵中における変動について追究したので報告する。

## 材料および方法

### 1 材 料

実験開始当日早朝に佐賀市郊外 (富士町) の農家の畑から採取したピーマン (アキノ) 果実を使用した。

### 2 試験液の調製

ピーマン果実をいずれも2等分し、その1切片ずつ約100gを集めた。これをマイクロ波処理 (シャープR-546型電子レンジ、定格高周波出力520Wで90秒間加熱) した後、果皮と種子とに分けてそれぞれ10gずつをとり、5~10倍量の2%メタリン酸および適量の石英砂を加え、乳鉢を用いて磨砕抽出した。抽出液を遠心分離 (3000 rpm, 15分間) し、得られた上澄液を試験液とした。なお、ペーパークロマトグラフィーにはエタノール抽出液を用いた。

### 3 酵素標品の調製

クロロゲン酸酸化酵素 (ChlO) 活性測定のための酵素液には、0.1Mのリン酸緩衝液 (pH 7) による抽出液を硫酸分画したものを使用した。Chlの分析のための酵素剤にはピーマン種子のアセトン粉末抽出液を用いた。

### 4 酵素活性の測定

ChlO活性は既報<sup>10)</sup>と同様、酵素液1ml当たり1分間の吸光度差を測定し、その0.01を1単位として表わした。なお、貯蔵試験の場合にはChlの $\mu\text{Mole}/\text{mg protein}$ で示した。

### 5 ペーパークロマトグラフィー

PP成分の検索は東洋濾紙No51 (20×20cm) を使用する2次元ペーパークロマトグラフィー (展開液1次元; 酢酸・水2:98, 2次元; ブタノール・酢酸・水4:1:2) により行った。

### 6 PP化合物の定量

全PP含量はFolin-Denis改良法<sup>11)</sup>によって測定した。  
Chl含量は酵素分析法<sup>7)</sup>によって測定した。

### 7 AsA含量

AsA含量は差スペクトル法<sup>8)</sup>により測定した。

## 8 褐変度の測定

褐変度は  $OD_{420}$  値で表わし、中林<sup>9)</sup>の方法により測定した。

## 9 タンパク質の定量

タンパク質は牛血清アルブミンを標準として、Hartree<sup>2)</sup>の方法に準じて定量した。また、クロマトグラフィーにおいては280 nm における吸光度を測定した。

## 10 貯蔵方法

1985年8月10日および9月27日収穫のピーマン果実の貯蔵試験をそれぞれ試験(I)および(II)とし、いずれも20個ずつ有孔ポリエチレン袋(厚さ0.03mm)に詰め、これを段ボール箱に入れ、2°Cおよび15°Cの室内にそれぞれ約1ヵ月間貯蔵した。

## 実験結果および考察

### 1 PPO の部分精製

(1) 酵素の抽出 新鮮なピーマンから採取した種子100 gに約3倍量の0.1Mリン酸緩衝液(pH 7)を加え、ホモジナイザーで磨砕し、1時間放置後、綿布で濾過した汁液を遠心分離(8000 rpm, 20分間、以後同様に行う)した。得られた上澄液を粗抽出液として以下の実験に使用した。

(2) 硫酸分画 酵素抽出液に硫酸を添加し、80%硫酸飽和で塩析された画分を遠心分離により集め、少量の0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)に溶解した後、Visking-tubeを用いて同一緩衝液に対して24時間透析した。膜内液を遠心分離して不溶物を除去したものを粗酵素液とした。

(3) DEAE-セルロファイン・カラムクロマトグラフィー 粗酵素液を0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)で平衡化したDEAE-セルロファイン・カラム(2×7 cm)に添加し、同一緩衝液を流下したところ、PPO活性の多くは吸着されずにそのまま素通りしたので、この素通り画分を集め、メンブランフィルター(アミコン社 PM-10)で約 $\frac{1}{2}$ に濃縮後、0.02Mリン酸緩衝液(pH 7)に対して24時間透析した。

(4) セファデックスG-100ゲル濾過 膜内液を0.02Mリン酸緩衝液(pH 7)で平衡化したセファデックスG-100カラム(2.2×76cm)に添加した後、同一緩衝液で溶出した。Fig. 1に示したように、PPOはほぼ単一のピークとして溶出したので、このピークの画分を集め、PPO標品とした。以上の実験操作はいずれも約4°Cで行った。

以上の精製過程の各段階における酵素の比活性等を調べた結果をTable 1に示した。

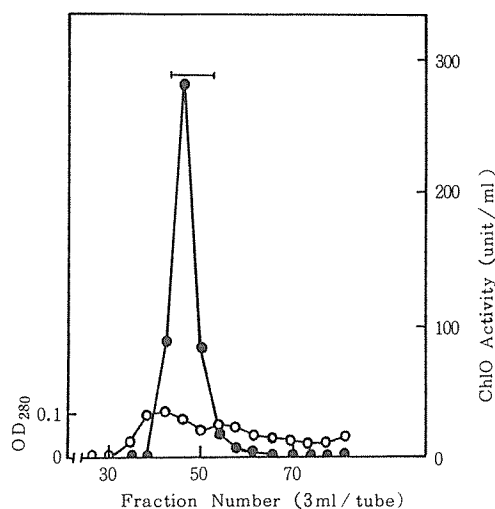


Fig. 1 Gel Filtration on Sephadex G-100.

DEAE-cellulofine fraction was applied to the sephadex G-100 column (2.2×76 cm) equilibrated with 0.02 M phosphate buffer (pH 7) and elution was performed with the same buffer.

—●— PPO activity; —○—  $OD_{280}$ ; —|— fraction pooled.

Table 1 Purification of Polyphenoloxidase from Sweet Pepper Seed

Procedure	Total Protein (mg)	Total Activity (unit)	Specific Activity (unit/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude Extract	3474	383306	110.3	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Saturation	1931	340480	176.3	1.6	89
DEAE-Cellulofine	1340	247699	184.8	1.7	65
Sephadex G-100	35	56259	1607.4	14.6	15

最終の段階では粗抽出液の約15倍に精製された。

## 2 酵素の性質

(1) 基質特異性 本酵素の pH 4 における種々PP化合物に対する酸化活性の経時的変化を Fig. 2 に示した。反応初期の5分間において、Chlの酸化速度が最も大きかったが、その後15分間変化がみられなかった。(—)エピカテキンの酸化はそれに続いて速く、5分後も速度は増大した。また、カテコール、ドーパミンもわずかに酸化されたが、モノフェノール、*m*-および*p*-ジフェノールに対する酸化活性はいずれも全く認められなかった。

(2) 最適pH PPO活性に及ぼすpHの影響を調べ、結果を Fig. 3 に示した。Chlを基質とした場合は pH 3.5~4.0に、カテコールを基質とした場合は pH 6.5~7.0に最大活性値が認められた。

(3) pH安定性 PPO液のpHを緩衝液 (pH 3~8: McIlvaine 緩衝液; pH 9~11: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>緩衝液) で3~11に調整し、4°Cで24時間放置した。その後、各酵素液のpHを7に調整し、残存する酵素活性を測定した。結果は最大活性値を100とする相対値で表わし、Fig. 4 に示した。本酵素は pH 5~9の範囲で安定であったが、pH 4以下では活性が著しく低下し、pH 2以下では活性は0となり、酵素は完全に失活した。

(4) 最適温度 20~65°Cの各温度で5分間反応させて酵素活性に及ぼす温度の影響を調べた。結果は最大活性値を100とする相対値で

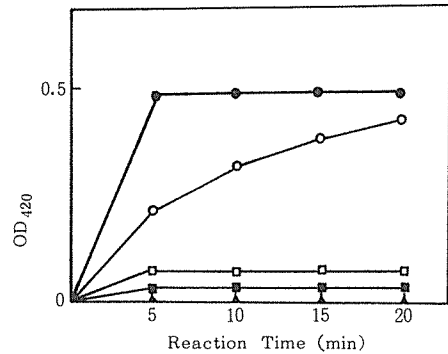


Fig. 2 Browning of Various Polyphenols by the Partially Purified Enzyme (pH 4).  
 ●— chlorogenic acid; ○— (—) epicatechin; □— caffeic acid; ■— catechol, dopamine; ▲— p-coumaric acid, hydroquinone, resorcinol.

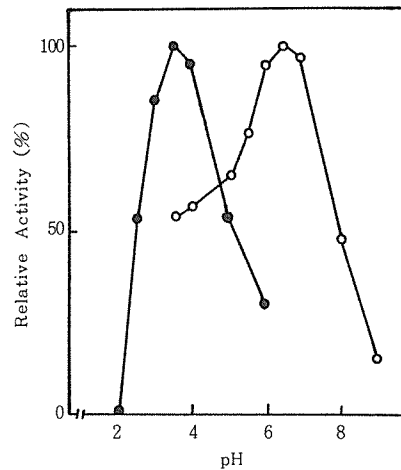


Fig. 3 Relationship between pH and the Enzyme Activity.

The reactions were carried out for 5 min at 30°C in pH 2~9 (pH 2~8: McIlvaine buffer was used but pH 2 solution was adjusted with HPO<sub>3</sub>, and pH 9: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> buffer was used). Polyphenoloxidase activity was determined by the spectrophotometric method as described in the experimental section.

●— chlorogenic acid oxidase; ○— catechol oxidase.

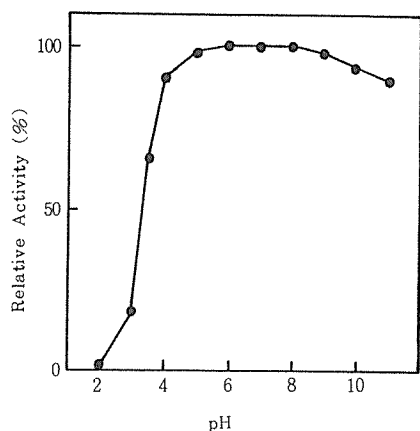


Fig. 4 Effect of pH on the Stability of the Enzyme.

The enzyme solutions were kept under various pH for 24 hr at 4°C. After the treatment, remaining ChlO activity was measured at pH 4.

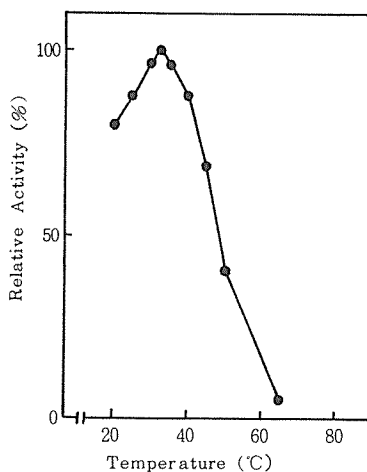


Fig. 5 Effect of Temperature on the Activity of the Enzyme.

The reaction mixture was composed of 0.5 ml of  $5 \times 10^{-4}$  M chlorogenic acid, 4 ml of McIlvaine buffer (pH 4) and 0.5 ml of PPO solution. After incubation for 5 min at 30°C, the reaction was terminated by adding 5 ml of 4%  $\text{HPO}_3$ .

表わし, Fig. 5 に示した. 本酵素の最大活性値は32.5°C付近に認められた.

(5) 熱安定性 酵素液を40~80°Cの各温度で5分および30分間加熱処理した後, 直ちに氷水中で冷却し, 残存活性を30°Cで測定した. 結果は無処理 (30°C) の場合を100とする相対値で表わし, Fig. 6 に示した. 本酵素は50°Cで5~30分間の加熱処理に対しては安定であったが, それより高い温度では活性が低下し, 80°C, 5分間の加熱処理により完全に失活した.

(6) 種々化合物の影響 種々化合物を $10^{-4}$  Mとなるように反応系に添加し, それらの酵素活性に及ぼす影響について調べた. 結果は無添加の場合を100とする相対値で表わし, Table 2 に示した. 本酵素活性はシアン化カリウムやフッ化ナトリウムによって強く阻害され, また食塩のような塩化物によってもやや阻害されるようであったが, EDTA やジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム等による影響はほとんどみられなかった. なお, 金属の影響は塩化物以外は認められなかった. このような種々化合物による影響および最適 pH 等の諸性質は日本ナシ PPO<sup>10)</sup>とかなり高い近似性が認められた. しかし, 本酵素は未だ部分精製の段階であることから, 必ずしも単一の酵素の作用とは断言し得ない.

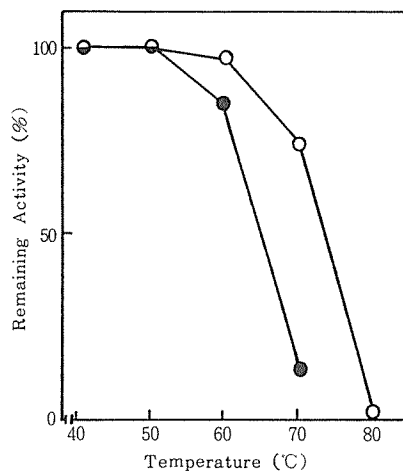


Fig. 6 Thermal Stability of the Enzyme.

The enzyme solutions were heated at various temperatures for 5 and 30 min. After the treatment, remaining ChlO activity was measured at 30°C.

○— 5 min; ●— 30 min.

Table 2 Effect of Various Compounds on the Enzyme Activity

Compounds*	Relative Activity (%)
None	100
EDTA	97
Na-DIECA	106
KCN	7
NaF	18
NaCl	88
NiCl <sub>2</sub>	70
MnCl <sub>2</sub>	71
CoCl <sub>2</sub>	75
ZnSO <sub>4</sub>	103
CuSO <sub>4</sub>	104

\* Final concentration,  $10^{-4}$ M; Na-DIECA, sodium diethyldithiocarbamate; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid. PPO activity was determined by the same method as shown in Fig. 3

Table 3 Two-Dimensional Paper Chromatography of Extract of Sweet Pepper Seed

Spot	R <sub>f</sub> Value		Colour Reaction					
	AW (2:98)	BAW (4:1:2)	UV	UV+NH <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub> +K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	DPNA	Phenol Reagent	Enzyme
S.1	0.55	0.76	Blue	Green	Blue	Brown	Blue	Brown
S.2	0.55	0.59	Blue	Blue	Blue	Brown	Blue	Brown
S.3	0.73	0.50	—	—	—	Orange	—	—
S.4	0.75	0.44	—	—	—	Brown	Blue	—
S.5	0.72	0.31	—	—	—	Orange	—	—
Chlorogenic Acid	0.55	0.76	Blue	Green	Blue	Brown	Blue	Brown

Abbreviation: B, Butanol; A, Acetic acid; W, Water.

DPNA, Diazotized p-nitroaniline. UV, Fluorescence under UV-light.

Phenol reagent, Folin-ciocalteu's phenol reagent.

Enzyme, Polyphenoloxidase treatment.

### 3 ピーマン種子より ChI 同族体の検出

(1) ペーパークロマトグラフィー ピーマン種子のエタノール抽出液について, 2次元ペー

パークロマトグラフィーを行い、その呈色反応、Rf 値等について調査した。その結果、Table 3 に示したように、ジアゾ化パラニトロアニリン試薬に陽性の5個のスポット(S.1~S.5)が検出され、その中S.1 および S.2 が PP の呈色試薬である塩化第二鉄-フェリシアン化カリウム液に陽性であった。しかし、フラバノールの呈色試薬であるバニリン-塩酸液にはいずれも陰性であった。また、S.1 および S.2 はともに紫外線下で青白い蛍光を発生し、S.1 の蛍光はアンモニア蒸気下で緑色に変化し、ピーマン酵素により両スポットとも強く褐変した。なお、S.1 と Chl 溶液の Rf 値は一致し、またピーマン種子の抽出液と Chl 溶液とを同一濾紙にプロットし展開したところ、S.1 と Chl のスポットとは完全に重なった。

(2) S.1 および S.2 のスペクトル 次に、ペーパークロマトグラム上の S.1 および S.2 部分を切り取り、それぞれ70%エタノールで抽出後、減圧濃縮した。その濃縮液の吸収および差スペクトルを測定し、結果を Fig. 7 に示した。S.1 および S.2 の吸収スペクトルは類似する形状を示し、290~295 nm および 315~325 nm 付近にそれぞれ吸収のピークがみられた。しかし、両者の差スペクトルにおいては、やや相違がみられた。すなわち、S.1 のそれは260 nm 付近にシャープな、375 nm 付近に低く幅広い正のピークが、また325 および 295 nm 付近に大きな負のピークおよび肩がみられた。このような差スペクトルの特徴は Chl 溶液のそれとほぼ一致していた。したがって、前記の呈色試験、Rf 値等の結果とも併わせ考えて、S.1 を Chl であろうと推定した。同様な結果は小机<sup>3)</sup>も認めている。これに対して、S.2 の差スペクトルにおいては260 nm 付近に低い正のピークおよび365 nm 付近に幅広い正のピークがみられた。また、320 nm および 290~295 nm 付近に大きな負のピークおよび肩が認められた。このように、S.2 の吸収および差スペクトルの特徴およびその呈色反応が Chl のそれらとかなり類似することから、S.2 は Chl の同族体であろうと考えられる。しかし、ピーマン種子の抽出液からはカテキン類およびその他の *o*-ジフェノール類は検出されなかった。以上のことから、Chl およびその同族体がピーマン種子の褐変反応の主要基質であろうと推察される。

#### 4 低温貯蔵中における Chl 含量および ChlO 活性の変動

(1) 貯蔵中の外観の変化 試験(I) (8月10日~9月10日)のピーマンは2°C貯蔵開始4~5日後に、試験(II) (9月27日~10月27日)のそれは7~8日後に種子の褐変が発生した。1ヵ月経過後では、試験(II)の果実の数%にピットングがみられるに過ぎなかったが、試験(I)の場合は果実総数の約60%がピットングを起していた。一方、15°C貯蔵の場合は両区とも、1ヵ月後には水分の蒸散による果実の萎凋やしわの発生がみられたが、種子の褐変や果皮のピットング等はほとんど認められなかった。

(2) PP および AsA 含量の変化 試験(I)のピーマンの2°C (低温区) および15°C (対照区)

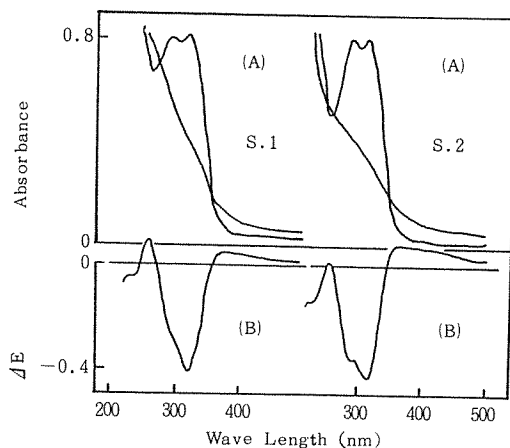


Fig. 7 Absorption Spectra (A) and Difference Spectra (B) of S.1 and S.2.

Table 4 Changes in the Contents of Chlorogenic Acid, Total Polyphenol and Ascorbic Acid during Storage of Sweet Pepper (Experiment I)

Compounds	Day	Day				
		0	1	3	10	30
<i>Seed</i>						
2°C	Chlorogenic Acid (mg%)	223.2	160.3	111.7	81.0	0
	Total Polyphenol (mg%)	489.4	421.6	396.6	369.6	220.7
	Ascorbic Acid (mg%)	16.1	—	—	—	8.9
15°C	Chlorogenic acid (mg%)	—	200.4	269.4	105.8	82.0
	Total Polyphenol (mg%)	—	537.2	631.5	430.3	440.3
	Ascorbic Acid (mg%)	—	14.3	—	—	8.2
<i>Peel</i>						
2°C	Ascorbic Acid (mg%)	78.2	63.5	88.3	76.0	78.1
	Total polyphenol (mg%)	238.7	204.0	268.8	250.1	203.8
15°C	Ascorbic Acid (mg%)	—	81.7	63.0	70.0	87.0
	Total Polyphenol (mg%)	—	256.1	241.8	226.8	203.9

貯蔵中における Chl, 全 PP および AsA 含量の変化を測定した。Table 4 に示したように、貯蔵中に低温区、対照区ともに種子の Chl 含量の低下が認められたが、前区の方がその減少速度が大きく、1ヵ月後には0となった。全 PP 含量も Chl の場合とほぼ同様な低下の傾向がみられた。なお、果皮中の全 PP 含量はほとんど変動がなく、また、Chl の存在は認められなかった。一方、AsA の含量は両区の種子および果皮とも貯蔵中には大きな変動は認められなかった。

試験(I)の結果から、低温の影響を表わす指標として種子の Chl 含量が最も適することがわかったので、試験(II)では、種子の Chl 含量を指標として、その変化を測定した。すなわち、Chl 含量は Fig. 8 に示したように、低温区では環境温度の急激な変化によるためか、貯蔵1日後に僅かな増加がみられたが、その後は全般的に減少の傾向がみられ、1ヵ月経過後では実験(I)と同様にほぼ0となった。対照区では、初期の変温による影響は少なく、貯蔵7日まで急減したが、その後は緩やかな低下に転じ、1ヵ月後も実験開始時の10%程度の Chl が残存した。

(3) ChlO 活性の変動 ChlO 活性の変動を調べた結果を Fig. 9 に示した。低温区では、貯蔵1日後変温の影響によりやや増加がみられたが、その後7日まで急激に低下し、その後は対照区に比べ、低レベルの活性を示した。一方、対照区では、貯蔵初期に若干の増減がみられたが、全体としては大きな変化は認められず、低温区より常に高い ChlO 活性が認められた。

以上の結果から、低温貯蔵中にみられるピーマン種子の褐変は、低温処理によって誘発され

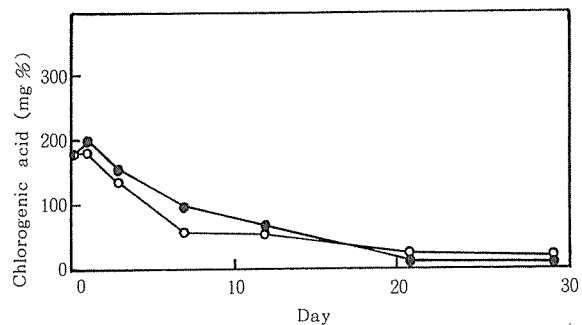


Fig. 8 Change in Chlorogenic Acid Content during Storage of Sweet Pepper Fruit (Experiment II).  
—●— 2°C; —○— 15°C.



た一種の酵素的褐変であろうと思われる。すなわち、2°Cでは低温障害による生体膜の崩壊あるいはその透過性の増加により、ピーマン種子に含まれるChlとPPOとが直接接触する機会が増え、その結果としてChlが酸化され、酵素的褐変が進行するのであろうと考えられる。さらに、酵素的酸化によって生成したベンゾキノンが二次的反応により重合し、あるいは一部は酵素タンパク質と直接反応して、メラニン様の色素を生成するとともに、酵素自体は不活性化して行ったのであろうと推察される。

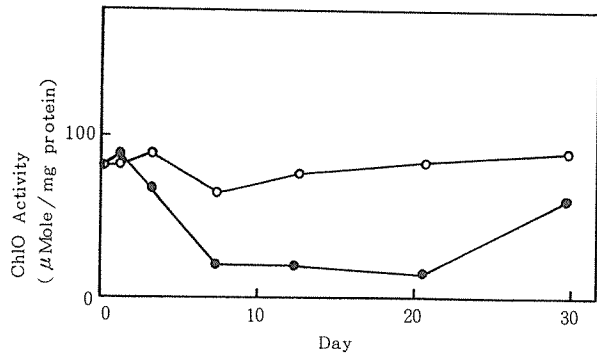


Fig. 9 Change in Chlorogenic Acid Oxidase Activity during Storage of Sweet Pepper Fruit (Experiment II).  
—●— 2°C; —○— 15°C.

### 摘 要

ピーマンの低温障害に伴う種子の褐変機構を明らかにする目的で、ピーマン種子のポリフェノール酸化酵素を部分精製し、その性質およびその天然基質であるポリフェノールについて調査した。また、これら褐変成分の低温貯蔵中の変化を追跡した。

(1) 硫酸分画, DEAE-セルロファイナクロマトグラフィーおよびセファデックスG-100ゲル濾過により、ピーマン種子の酵素を抽出液の約15倍に精製した。本酵素はクロロゲン酸 (Chl) および(-)-エピカテキン等の *o*-ジフェノール類のみを酸化した。その最適 pH は Chl を基質とした場合は3.5~4.0, カテコールを基質とした場合は6.5~7.0にあり、pH 5~9の範囲で安定であった。また、最適温度は32.5°C付近にみられ、80°C, 5分間の加熱処理により完全に失活した。本酵素はシアン化カリウム, フッ化ナトリウム等によって強く阻害された。

(2) ピーマン種子に含まれる天然基質をペーパークロマトグラフィーにより検索した。その結果、2種類のポリフェノールが検出され、その一つは Chl であり、他はその同族体であることが推定された。

(3) 2°C (低温区) および15°C (対照区) で貯蔵したピーマンの Chl 含量およびその酸化酵素活性の変動を追跡した。その結果、Chl 含量は両区とも同様な経過で低下する傾向がみられた。これに対して、クロロゲン酸酸化酵素の活性は、低温区においては貯蔵中に速やかな低下がみられたが、対照区においては大きな変化は認められなかった。

### 引 用 文 献

1. A.O.A.C (1955). Official and Tentative Method of Analysis of A.O.A.C., 8th, Ed, p. 144.
2. Hartree, E.F. (1972). *Anal. Biochem.*, **48**, 422.
3. 小机信行, 緒方邦安 (1971). 園学雑, **40**, 300.
4. Kozukue, N. and K. Ogata (1976). *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **45**, 210.
5. 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 199.

6. 東野哲三, 藤田修二 (1976). 栄養と食糧, **29**, 125.
7. 東野哲三, 川崎宏隆, 藤田修二, 李 忠富 (1987). 農化, **61**, 印刷中.
8. 東野哲三, 藤田修二 (1985). 日食工誌, **32**, 295.
9. 東野哲三, 李 忠富, 川崎宏隆, 藤田修二 (1986). 日本食品工業学会第33回大会講演集, p. 79.
10. 東野哲三, 藤田修二, 川崎宏隆, 李 忠富 (1986). 農化, **60**, 705.
11. 山内直樹, 稲葉 誠, 緒方邦安 (1978) 園学雑, **47**, 273.