

## 温州ミカン幼果の褐変に関する研究

藤 田 修 二

(園芸工学研究室)

昭和59年4月11日 受理

## Studies on the Browning in the Young Fruit of Satsuma Mandarin

Shuji FUJITA

(Laboratory of Food Science and Horticultural Engineering)

Received April 11, 1984

### Summary

Most of browning occurred in fruits and vegetables during cooking or processing are due to the enzymatic oxidation of polyphenolic compounds by polyphenol oxidase (EC 1. 10. 3. 1). Concerning the polyphenolic compounds and polyphenol oxidase, many informations have been obtained. In *Citrus*, the browning is rarely found in the mature fruit, except for the browning of peel, so called "Kohansho," caused by physiological disorder. Little is known about the polyphenol oxidase and the enzymatic browning of the fruit. When the young fruit of satsuma mandarin is cut, a remarkable browning is observed in the section of the fruit. The present study deals with the mechanism of the browning reaction found in the young fruit.

The browning reaction was inhibited by the inhibitors of polyphenol oxidase and retarded by heat treatment. These results suggest that the browning reaction is caused by the polyphenol oxidase. The crude polyphenol oxidase obtained from the young fruit strongly oxidized trihydroxybenzenes such as phloroglucinol and pyrogallol, but weakly did *o*-diphenols. The same enzyme activity was found in the mature fruit of other citrus species and cultivars. A remarkable browning of the extract from the young fruit was caused by the treatment with the crude enzyme. The difference spectra were measured during the browning reaction. The changes of the difference spectra indicate that the browning reaction is ascribable largely to the oxidation of chlorogenic acid analogues and slightly to that of trihydroxybenzenes. The young fruit contained significant amount of chlorogenic acid analogues.

Chlorogenic acid oxidase, pyrogallol oxidase A, pyrogallol oxidase B and phloroglucinol oxidase were purified from an extract of the young fruit and their properties were examined. Pyrogallol oxidase B oxidized only 1, 2, 3-trihydroxybenzenes such as pyrogallol and gallic acid, while phloroglucinol oxidase did 1, 3, 5-trihydroxybenzenes such as phloroglucinol and phloroglucinolcarboxylic acid. These substrate specificities revealed that these two enzymes were the new types of polyphenol oxidase, "trihydroxybenzene oxidase." Phloroglucinol oxidase showed remarkable peroxidase activity. The enzyme was also distributed in the cruciferous vegetables such as turnip and cabbage. Pyrogallol oxidase A, however, oxidized pyrogallol and DL-dopa.

From the above results, it is concluded that these trihydroxybenzene oxidase as well as

*o*-diphenol oxidase play an important role on the oxidation and the browning of polyphenolic compounds in the fruits.

## 目 次

第 1 章 緒 論	2
第 2 章 カンキツ類とくに温州ミカン幼果の褐変現象とポリフェノール酸化酵素活性	4
第 1 節 温州ミカン幼果の褐変現象	5
第 2 節 幼果粗酵素液による種々のポリフェノール類の酸化と褐変	5
第 3 節 果実発育過程におけるポリフェノール酸化酵素活性およびポリフェノール含量の変化	8
第 4 節 種々カンキツ果実のフェノール酸化酵素活性およびその果実内分布	9
第 5 節 小 括	12
第 3 章 温州ミカン幼果の褐変反応の基質となるポリフェノール化合物	12
第 1 節 天然基質溶液および種々のポリフェノール溶液の褐変と褐変液の吸収スペクトル	12
第 2 節 天然基質溶液よりポリフェノール類の分別およびそれらの褐変反応と吸収スペクトル	17
第 3 節 小 括	26
第 4 章 温州ミカン幼果の褐変とそれに関与するポリフェノール酸化酵素系	26
第 1 節 幼果の酵素的褐変反応系	26
第 2 節 クロロゲン酸酸化酵素系	29
第 3 節 ピロガロール酸化酵素系	32
第 4 節 小 括	37
第 5 章 温州ミカン幼果およびカブのプロログルシノール酸化酵素系の比較	38
第 1 節 プロログルシノール酸化酵素活性の測定法の検討	38
第 2 節 温州ミカン幼果のプロログルシノール酸化酵素系	39
第 3 節 幼果のプロログルシノール酸化酵素のペルオキシダーゼ活性	44
第 4 節 プロログルシノール酸化酵素系の阻害因子	46
第 5 節 カブのプロログルシノール酸化酵素系	52
第 6 節 小 括	55
第 6 章 総 括	57
後 記	60
文 献	60

## 第 1 章 緒 論

色は視覚的に直接判断できるので、鮮度等食品の品質を判定する指標として重要な役割を果たすことになり、消費者は色を見て食品の購入の可否を決めることが多い。したがって、色は食品の商品的価値を支配するもっとも重要な性質とみなされており、食品を製造、販売する側でもできるだけ好ましい色を保持するように努力している。しかしながら、色は不安定で加工、貯蔵条件の劣悪などにより著しく変化する。たとえば、果実や野菜などの植物性食品の多くは打撲、切断などの機械的損傷により、室温等の比較的温和な条件のもとで褐変ないし、黒変する。この種の変色は主としてそれら食品に含まれるポリフェノール化合物が酵素により酸化されて生じたキノンが重合し、あるいは、それが他のアミノ化合物等と反応してメラニン様の色素を形成することに起因するものと考えられている。ポリフェノール化合物を含む植物には通常これを酸化する酵素が含まれている。このポリフェノールを酸化する酵素にはペルオキシ

ダーゼのような鉄ポルフィリン酵素とポリフェノール酸化酵素のような銅酵素の2種がある。しかし、ペルオキシダーゼによるポリフェノールの酸化に必要な過酸化水素が植物体に多量に存在することは通常考えられず、また、共存するカタラーゼの活性はきわめて高く、生成した過酸化水素を直ちに分解するので、ペルオキシダーゼが褐変の主原因となるとは考えられない。むしろ、今日ではポリフェノール酸化酵素(EC 1. 10. 3. 1, *o*-diphenol: oxygen oxidoreductase)が主要であると考えられている。<sup>1)</sup>

このポリフェノール酸化酵素によるいわゆる酵素的褐変現象は食品素材の変色はもとより、栄養価の減少や香気の変化等の食品の変質をともなっており、一般に、その製品の商品的価値を低下させることが多い。そのために加工、貯蔵上の観点からこれら食品、とくにリンゴ、モモ、ナシなど褐変が著しくみられる園芸食品を中心として、それらに含まれるポリフェノール化合物やポリフェノール酸化酵素に関しては多くの研究<sup>2-37)</sup>が行われており、ポリフェノール化合物の種類や酸化酵素の性質など、かなり明らかにされている。

また、ポリフェノール化合物およびポリフェノール酸化酵素は広く植物界に分布していることから、植物体におけるポリフェノール化合物の合成経路あるいはそれらの役割といった生理的側面からの研究<sup>38-40)</sup>もかなり行われている。

このような研究の進展にともなって、それぞれの酵素は起源とする植物により基質特異性などの性質が相違すること、また、その酵素に多くのアイソザイムが存在することも証明されてきた。<sup>41-51)</sup> さらに、同じ植物でも品種、系統あるいは果実の熟度や部位等によっても、そのアイソザイムのパターンやポリフェノール化合物の種類あるいは含量が異なることも指摘されているが、それら酵素の多くはクロロゲン酸、カテキール、DL-ドーパ等の *o*-ジフェノール類を強く酸化するようである。<sup>52-56)</sup>

しかしながら、温州ミカン等のカンキツ果実においては通常このような褐変現象は認められないとされている。したがって、カンキツ果実においては酵素的褐変はほとんどないものとみなされ、果実に含まれるポリフェノール酸化酵素や基質となるポリフェノール化合物に関する研究報告はきわめて少ない。わずかに、生理的側面からカンキツ樹木の耐凍性とポリフェノール酸化酵素との関係<sup>57)</sup>、育種学的見地からカンキツの幼茎のポリフェノール酸化酵素のアイソザイムパターンと品種との関係<sup>58)</sup>等の検討がみられ、また、果汁の品質という観点からバレンシアオレンジ砂じょうのポリフェノール酸化酵素に関して研究<sup>59)</sup>が行われているが、いずれの研究においても酵素の性質あるいは含まれるポリフェノール化合物の種類等についてはほとんど解明されていない。

以上のように、カンキツ類の酵素的褐変現象は未だ問題となっておらず、その褐変反応についても未解明の状況にある。しかしながら、著者は通常人目にふれることの少ない温州ミカンの幼果\*が成熟果と異なり、切断等の傷害により著しく褐変することを認め、この変色が酵素的要因によることを推定してきた。

一方、最近、温州ミカンの代替えとして増植が奨励されているワシントンネーブル、セミノール、ハッサク等の中・晩柑類の貯蔵に際して、虎斑症とよばれる一種の果皮の褐変現象が多発し、商品価値低下の観点から大きな問題となりつつある。カンキツ類はモモ、ナシ、リンゴ等の果実と異なり、収穫や選果の際にかなり粗雑に取扱われる傾向があるために打撲等の損傷を受けやすいことから、それらによる組織破壊によって虎斑症のような褐変が酵素的に引き起こされる可能性も十分考えられる。

\* 本論文でいう幼果とは開花後4～6週の未熟な果実を指す。

さらに、ポリフェノール化合物としてレモン等の果実にフロログルシノールの配糖体が存在することが報告されている。<sup>60,61)</sup> これらのことから、カンキツ類においても一様に酵素的褐変の下地はあるにもかかわらず、これまで温州ミカンやワシントンネーブル等の成熟果において褐変現象が表面化しなかったのは、他の果実類とのポリフェノール化合物の種類や含量あるいはポリフェノール酸化酵素の性質などにおける相違、さらには成熟にともなうそれらの変化等の差異に由来するのではないかと推定される。

したがって、カンキツ類に含まれるポリフェノール化合物やポリフェノール酸化酵素の特異性等に関する基礎的な研究を行い、それらについて明らかにすることは今後重要な問題に発展すると推定される虎斑症のようなカンキツ類の褐変現象の原因究明とその防止対策を考える上に重要な手掛りを与えるものと考えられる。

本研究はカンキツ果実にも酵素的褐変現象が存在することを明らかにし、本酵素反応の特異性とその反応機構の解明を試みたものである。なお、実験材料としてはもっとも入手しやすい温州ミカン幼果を主として用いた。まず、カンキツ類のポリフェノール酸化酵素に関して、粗酵素レベルでその性質、分布、酵素活性の発育中での変化等について調べた。その結果、この酵素は従来報告されているポリフェノール酸化酵素がカテコール、クロロゲン酸等の *o*-ジフェノール類を強く酸化するのと異なり、フロログルシノールやピロガロールなどのトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化することを認め、それが温州ミカンはもとより種々のカンキツ類にも広く分布することを明らかにした。

つぎに、酵素的褐変反応を迅速かつ正確に測定し、経時的な解析を可能にする方法として差スペクトル法を導入した。温州ミカン幼果の褐変反応においては差スペクトルの変動から、その粗酵素はフロログルシノール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するが、その褐変の主体はクロロゲン酸系であろうと推定された。また、幼果にはかなり多量の未詳のクロロゲン酸同族体が存在することを明確にした。

一方、カンキツ酵素のようにトリヒドロキシベンゼン類に対して高い基質特異性を有するポリフェノール酸化酵素は園芸食品においてはきわめて稀であり、その酵素を分別し、性質を明らかにした報告は未だなく、本酵素の関与する褐変反応には興味を持たれる。さらに、ポリフェノール酸化酵素は比較的に不安定であることから、粗酵素レベルで多くの研究がなされてきたが、著者は温州ミカン幼果よりクロロゲン酸酸化酵素、2種のピロガロール酸化酵素およびフロログルシノール酸化酵素の4種の酵素を分離し、それら酵素の関与する反応系について検討を加えた。分別されたそれぞれの酵素の性質を調べた結果、塩基性画分に存在するピロガロール酸化酵素およびフロログルシノール酸化酵素が、いわゆる *o*-ジフェノラーゼとは異なる新しい型のポリフェノール酸化酵素であること、また、このフロログルシノール酸化酵素がカブなどのアブラナ科植物にも分布することを初めて明らかにした。

このように、本研究において植物のポリフェノール酸化酵素として *o*-ジフェノラーゼばかりでなく、トリヒドロキシベンゼン類に特異的な酸化酵素を初めて明確にしたことは植物界におけるポリフェノール化合物の酸化や褐変反応を考察する上できわめて意義深いと考えられる。

## 第2章 カンキツ類とくに温州ミカン幼果の褐変現象と ポリフェノール酸化酵素活性

温州ミカン（三保早生）果実を切断し、室温（20℃）に1時間放置すると開花後4～6週の果実においては著しい褐変現象がみられるが、8週（7月中旬）以降の果実ではこのような変

色はほとんど認められない (Fig. 1). 本章では、まず、この変色が酵素的反応によるものであることを確かめ、その粗酵素液による種々のポリフェノール化合物の酸化および褐変反応について調べた。ついで、このような褐変現象が開花後 8 週以降の果実では認められないことと関連して、温州ミカン果実の発育過程におけるポリフェノール含量およびポリフェノール酸化酵素活性の変化、ならびに種々カンキツ果実におけるポリフェノール酸化酵素の分布等について調べた。

## 第 1 節 温州ミカン幼果の褐変現象

### 1-1 緒 言

Fig. 1 に示したように、温州ミカン幼果（開花後 4～6 週の果実）は明瞭な褐変反応を呈する。このような褐変は室温放置という比較的温和な条件下でも認められることから、リンゴ、モモなど他の多くの果実<sup>41-61)</sup>と同様、ポリフェノール酸化酵素による酵素的反応に起因するものと考えられる。そこで、このことを確かめるために加熱処理および数種のポリフェノール酸化酵素阻害物質を用いて、褐変反応に及ぼす影響を検討した。

### 1-2 試料および方法

試料として佐賀大学附属農場果樹園で栽培の温州ミカン幼果（三保早生、生果重 4～6 g）を用いた。

加熱処理は電子レンジ（日立製作所、MR K610L 型）を用いて 60 秒間行った。

阻害物質としては L-アスコルビン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、亜硫酸ナトリウムおよびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムの溶液（それぞれ  $10^{-2}$  M）を用い、切断直後の果実を 15 分間浸漬した後、これより取出し、20 分間室温（20°C）に放置した。

### 1-3 結果および考察

加熱および数種の化合物の溶液で処理後の幼果切断面の変色現象を観察した結果が Fig. 2 である。幼果は切断により果皮部とくにアルベド部が急速に褐変するが、マイクロ波により加熱処理を行った場合にはこのような変色現象は認められない。さらに、L-アスコルビン酸、EDTA、亜硫酸ナトリウムおよびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムの溶液に果実を浸漬することにより、この変色は抑制された。このように加熱および酵素阻害剤等の処理により、果実の変色が阻止あるいは抑制されたことから、幼果の切断面にみられる変色は酵素的褐変反応に起因することが示唆された。

## 第 2 節 幼果粗酵素液による種々のポリフェノール類の酸化と褐変

### 2-1 緒 言

前節のように幼果の褐変は酵素的反応によって引き起こされることが示唆された。このような褐変反応においては他の多くの果実、野菜<sup>41-61)</sup>と同様にポリフェノール酸化酵素が強く関与するのではないかと考えられる。そこで、まず、幼果のポリフェノール酸化酵素について調べた。

### 2-2 実験方法

#### 1 酵素液の調製

前節と同時期の幼果よりアセトン粉末を調製した。これを 10 倍量 (W/V) の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し、氷冷下に 1 時間放置して酵素を抽出した。抽出液を遠心分離 (8,000 rpm, 10 分間：以後、特記しない限りこの条件で行う) して得た上澄液に硫酸アンモニウムを添加し、その 20～90% 飽和で塩析される画分を遠心分離により集めた。これを 0.05 M リン酸緩衝

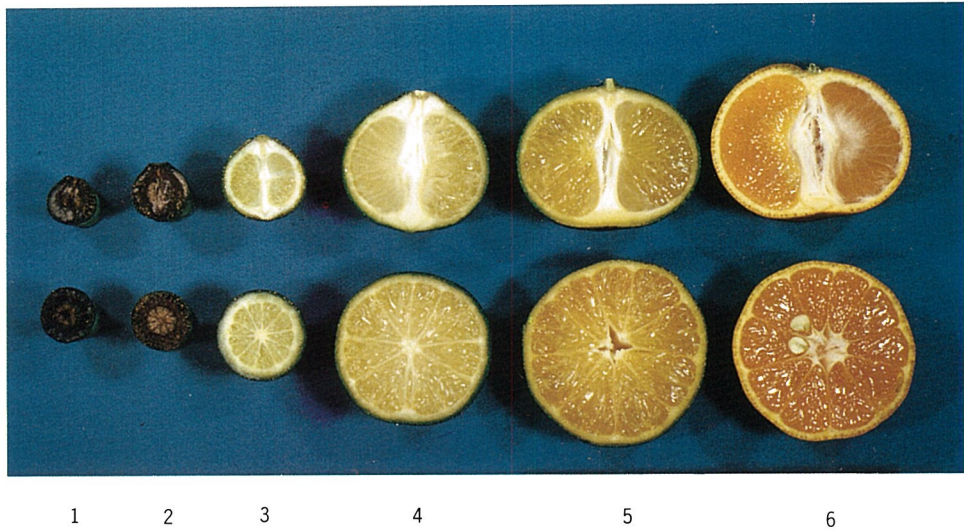


Fig. 1 Browning of satsuma mandarin during the fruit development.  
 1) harvested at 20, June    2) harvested at 1, July  
 3) harvested at 21, July    4) harvested at 25, August  
 5) harvested at 21, September    6) harvested at 21, October



Fig. 2 Effects of heat treatment and various compounds on the browning of young satsuma mandarin fruit.  
 1) control    2) heating by micro wave    3) L-ascorbic acid  
 4) EDTA    5) sodium sulfite    6) sodium diethyldithiocarbamate

液 (pH7.0) に溶解し、同一緩衝液に対して2日間透析した膜内液を酵素液とした。

## 2 酵素吸収量の測定

ワールブルグ検圧計の主室に酵素液0.2mlおよび0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.8) 1.3ml, 側室に  $2 \times 10^{-2}$ Mの基質溶液0.5ml (終濃度,  $5 \times 10^{-3}$ M), 副室に20%水酸化カリウム0.1mlを入れ, 30°Cで15分間振盪後, 側室の基質を主室に移して反応させ, 酸素吸収量を測定した。

## 3 褐変度の測定

$2 \times 10^{-2}$ Mの基質溶液0.5mlおよび1.3mlの0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.8) に酵素液0.2mlを加え, 30°Cで振盪下に反応させ, 反応液の420nmにおける吸光度を分光光度計 (日立製作所, 124型) により測定した。この吸光度の増加量 ( $\Delta E_{420nm}$ ) を褐変度とした。

### 2-3 結果および考察

粗酵素液による種々のポリフェノール化合物の酸化反応について調べた。Fig. 3 に示したように, 粗酵素液は1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンであるフロログルシノールを最も速やかに酸化し, これに続いて1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼン構造を持つピロガロールおよび没食子酸を酸化した。また, 褐変反応においては Fig. 4 に示したようにピロガロールの場合が最も強く, 没食子酸がこれに続いたが, フロログルシノールの褐変度はこれらに比べるとかなり低かった。このように, これらトリヒドロキシベンゼン類の酸化と褐変の速度は必ずしも一致しなかったが, 同様の傾向は他の果実, 野菜類においても認められている。<sup>21,62)</sup>

一方, *o*-ジフェノール類ではクロロゲン酸をかなり酸化するが, その活性値はピロガロールの50%以下であった。また, DL-ドーパ, カテコールなどもわずかに酸化され, それらの反応液は褐変したが, レゾルシノール, ヒドロキノン等の *m*-および *p*-ジフェノール類は酸化されず, 反応液の褐変もみられなかった。

従来の報告にみられる果実, 野菜の酵素の多くは *o*-ジフェノール類に対して高い酸化活性を

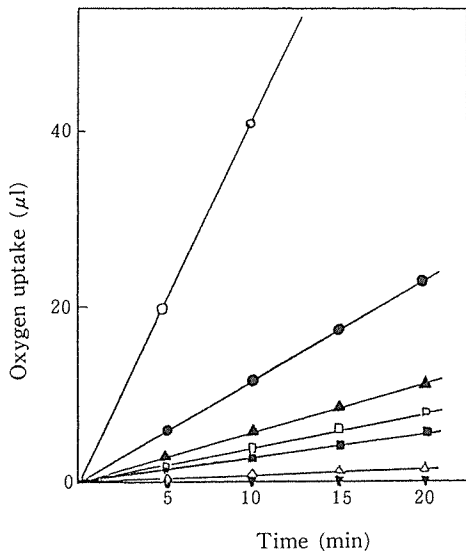


Fig. 3 Oxidation of various polyphenols by the crude enzyme.

—○— phloroglucinol, —●— pyrogallol,  
—▲— gallic acid, —□— chlorogenic acid,  
—△— catechol, —■— DL-dopa,  
—▼— resorcinol and hydroquinone.

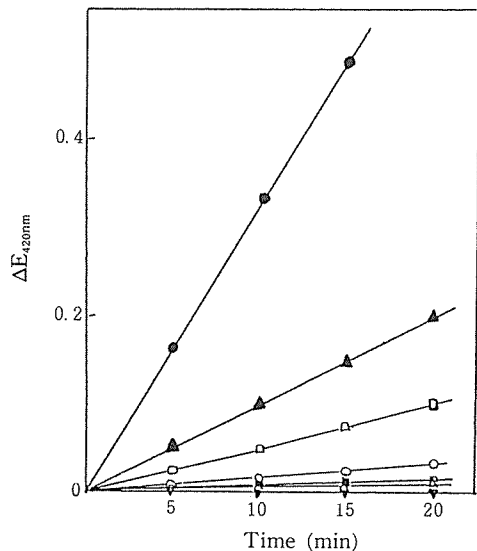


Fig. 4 Browning of various polyphenols by the crude enzyme.

Abbreviations are the same as in Fig. 3.

有し、また、その中にはピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を酸化するものもみられるが、その活性はいずれも *o*-ジフェノールに対するものと比べてかなり低い。<sup>48,49,55,63)</sup> これに対して、温州ミカン幼果の酵素液は高いトリヒドロキシベンゼン酸化活性を有し、ジフェノール類に対する活性はきわめて低いので、この酵素液中には植物性食品では新しい型の酵素、すなわち、トリヒドロキシベンゼン酸化酵素が含まれるものと考えられる。

### 第3節 果実発育過程におけるポリフェノール酸化酵素活性および ポリフェノール含量の変化

#### 3-1 緒 言

温州ミカン幼果は著しい褐変現象を呈することが認められたが、このような変色は成熟果においては観察されない (Fig. 1)。この原因として、ポリフェノール酸化酵素活性、基質となるポリフェノール類、酵素あるいは褐変反応の阻害物質の含量等の変動が考えられるので、これらについて検討した。

#### 3-2 試料および方法

##### 1 試 料

佐賀大学附属農場果樹園で栽培の三保早生温州のうち、栽培条件が同一の株について比較的開花期の近い果実 (5月25日に開花) を選んで印を付し、1974年6月中旬から11月中旬まで約2週間ごとにそれら果実を40個ずつ採取した。

##### 2 酵素活性の測定

前節と同様に酵素液を調製し、酵素活性を測定した。この際、フロログルシノール酸化活性 (PhO) は検圧法による初速度から算出した酸素吸収量、 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg N}$  で表示した。また、ピロガロール、没食子酸およびDL-ドーパ酸化活性 (PPO) は測定しやすい褐変反応の初速度から420nmにおける吸光度の増加量の0.01を1単位として  $\text{unit}/\text{min}/\text{mg N}$  を算出し、この値で示した。この際、全窒素はケルダール法により定量した。

##### 3 全ポリフェノールおよび還元型アスコルビン酸の定量

乳鉢で磨砕した果皮より、5%メタリン酸で60°C、30分抽出後、全ポリフェノールはFolin-Denis法<sup>64)</sup>により、カテコール量として定量し、還元型アスコルビン酸含量はヒドラジン法<sup>65)</sup>により定量した。

#### 3-3 結果および考察

各発育ステージの果実の酵素液のポリフェノール酸化酵素活性の変化を調べた結果が Fig. 5 である。各時期の果実の酵素液はいずれもトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化したが、これらに比べ、DL-ドーパ酸化活性はかなり低かった。フロログルシノール酸化活性およびピロガロール酸化活性とも発育初期 (6月中旬) と着色時期 (10月中旬) にピークを示したが、その他の時期では活性値の変動はほとんど認められず、両時期の50%以下の活性値であった。また、没食子酸酸化活性も両時期にピークを有するが、その活性値はピロガロール酸化活性と比べてやや低かった。このような果実発育ステージにおける初期と後期のポリフェノール酸化酵素活性のピークの出現についてはモモの果実においても観察されている。<sup>52,53)</sup> これら両時期は果実の発育上重要な生理的変動期であり、これら酵素は旺盛な呼吸などの代謝作用に関係するものであろうと考えられる。

一方、褐変反応の基質となるポリフェノールの含量は Fig. 6 に示したように初期には高く、果実発育にともなって急激に減少した。また、還元型アスコルビン酸含量は初期には低く、9月以降、果実の肥大成長が鈍り、成熟が始まるとともに著しく増大した。このような還元型ア



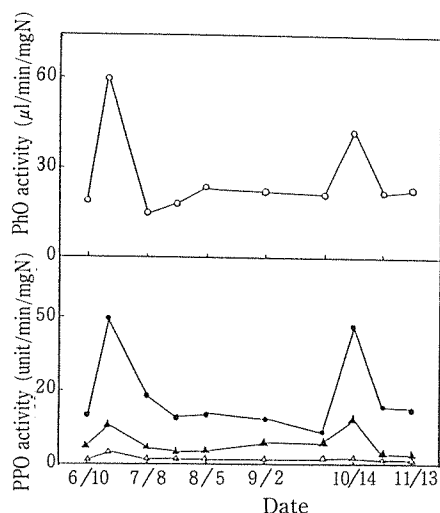


Fig. 5 Changes of polyphenol oxidase activity during fruit development.

—○— phloroglucinol oxidase,  
—●— pyrogallol oxidase,  
—▲— gallic acid oxidase,  
—△— DL-dopa oxidase.

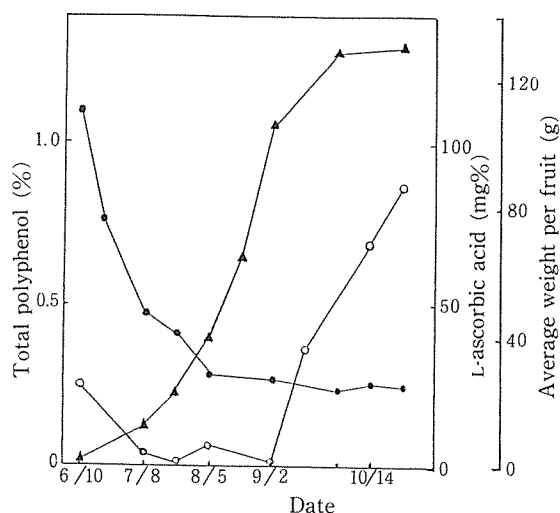


Fig. 6 Changes of content of total polyphenol and L-ascorbic acid in the peel during fruit development.

—●— total polyphenol, —○— L-ascorbic acid, —▲— average of body weight.

スコルビン酸含量の変化については他のカンキツ果実においても同様な傾向が認められている。<sup>66-68)</sup> この原因として、Vines および Oberbacher<sup>69)</sup> はアスコルビン酸酸化酵素活性が幼果期に高く、成熟期には著しく低下することを挙げている。

後記（第4章および第5章）のように温州ミカンのポリフェノール酸化酵素活性は還元型アスコルビン酸により著しく阻害される。これらのことから、幼果切断面にみられる顕著な褐変はこの時期に酵素活性およびポリフェノール含量が高く、また、反応を阻害する還元型アスコルビン酸含量が低いために起こるものと考えられる。一方、着色時期の果実が高い酵素活性を有するにもかかわらず褐変しないのは、基質となるポリフェノール含量が低く、還元型アスコルビン酸含量が高いことに主として起因するのであろうと推定される。

#### 第4節 種々カンキツ果実のフェノール酸化酵素活性およびその果実内分布

##### 4-1 緒 言

温州ミカン幼果の褐変現象が果皮、とくにアルベド部分で観察されること、その酵素液が *o*-ジフェノール類よりもトリヒドロキシベンゼン類を速やかに酸化し、かつ褐変すること、さらに、酵素活性が果実発育過程の各時期に見出されることをこれまで明らかにした。これに対し、Brummer および Roe<sup>59)</sup> により報告されているバレンシアオレンジ砂じょうの酵素は DL-ドーパをもっとも強く酸化することから、*o*-ジフェノール酸化酵素の一種と考えられ、温州ミカンの酵素とは性質を異にするようである。このようなことから、カンキツの種類あるいは果実部位によってポリフェノール酸化酵素の性質、とくに基質特異性に相違がみられるのではないかと考えられる。

そこで、これらの点を明らかにするために、果実各部位の酵素活性を比較し、さらに、種々のカンキツ類についてトリヒドロキシベンゼン酸化酵素活性の有無を調べた。

##### 4-2 試料および方法

温州ミカンとは前節と同じ果実を、夏ダイダイは佐賀県の農家より購入、その他の果実は佐賀大学農学部果樹園芸学教室より分与されたものを試料とした。

温州ミカンの果皮および果肉、夏ダイダイにおいてはアルベド、フラベド、果肉の各部位、他のカンキツにおいては果皮より、第2節と同様に酵素液を調製し、酵素活性を測定した。

#### 4-3 結果および考察

温州ミカンおよび夏ダイダイの果実各部位のポリフェノール酸化活性を調べた。結果は第3節と同様に表示した。

温州ミカン果実については6~7月の果実においては各部位に分け難いので8月初旬および11月中旬の果実について調べた。

Table 1 に示したように、両時期とも各部位にフロログルシノール酸化活性およびピロガロール酸化活性が認められ、それら活性は果皮の方が果肉よりもかなり高かった。

一方、夏ダイダイにおいても Table 2 に示したように、温州ミカンと同様に各部位の酵素ともフロログルシノールおよびピロガロールを強く酸化した。また、それら酵素活性はフラベド部がもっとも強く、アルベド、果肉の順に低下した。

しかしながら、両カンキツおよび各部位においても DL-ドーパ酸化活性は著しく低かった。このように、各部位における酵素活性の強さには差がみられたが、酵素の性質、とくに基質特異性には差が認められなかった。

以上のように温州ミカンばかりでなく、夏ダイダイにおいても強いトリヒドロキシベンゼン酸化酵素活性が認められたので、他のカンキツ果実についても検索した。供試したカンキツは田中の分類<sup>70)</sup>によればつぎのようになる。

カンキツ属

初生カンキツ亜属

a) シトロン区 レモン

Table 1 Polyphenol oxidase activity in the peel and pulp of satsuma mandarin.

	Polyphenol oxidase activity			
	Phloroglucinol	pyrogallol	Gallic acid	DL-dopa
(Harvested at 5, August)				
Peel	24.1	10.5	3.8	1.5
Pulp	6.2	4.2	1.5	0.4
(Harvested at 13, November)				
Peel	24.3	11.5	2.3	0.3
Pulp	16.3	2.3	1.3	0.6

Table 2 Polyphenol oxidase activity in the flavedo, albedo and pulp of Kawano natsudaidai.

	Polyphenol oxidase activity			
	Phloroglucinol	Pyrogallol	Gallic acid	DL-dopa
Flavedo	11.1	17.0	5.6	3.7
Albedo	10.7	13.4	5.5	2.6
Pulp	10.3	10.9	3.9	3.9

b) ザボン区 晩白柚, 安政柑, 晩王柑, 八朔, グレープフルーツ, 河内晩柑

c) ダイダイ区 鳴門, 三宝柑, 日向夏, 宇樹橘, 川野ナツダイダイ, トロビタ, オレンジ日向, 福原オレンジ, 森田ネーブル

後生カンキツ亜属

a) ユズ区 カボス

b) ミカン区 九年母, ピキシー, 温州ミカン, タンゼロ(ミカン×グレープフルーツ)

酵素活性は検圧法により反応初期の10分間の酸素吸収量を求め, フロログルシノール酸化酵素の場合を100とした相対値で表わし, 酸化活性を比較した。

Fig. 7に示すように, 供試したカンキツのすべてに $\alpha$ -ジフェノール酸化活性よりも著しく高いトリヒドロキシベンゼン酸化活性が認められた。その中で, シトロン区およびザボン区の多くの果実はフロログルシノールを強く酸化し, また, ダイダイ区の果実の多くはピロガロールをもかなり強く酸化するように思われた。しかしながら, これら供試果実は採取時期, 収穫後の

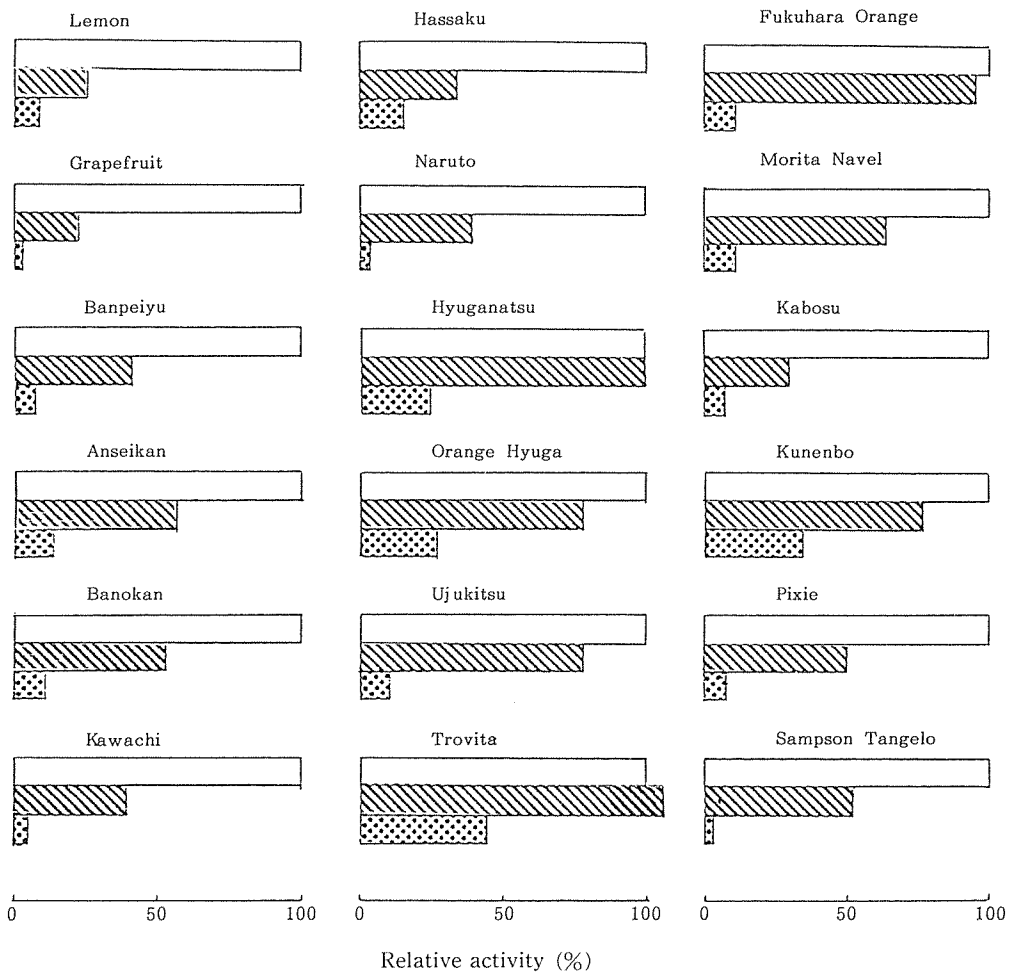


Fig. 7 Polyphenol oxidase activity in the peels of various citrus fruit.

□ phloroglucinol, ▨ pyrogallol, ▤ DL-dopa.

貯蔵条件が一定でなく、したがって、活性値の正確な比較はできなかった。いずれにしても、種々カンキツ果実の酵素が著しく高いトリヒドロキシベンゼン酸化活性を有することは、他の多くの植物酵素<sup>12-30)</sup>が *o*-ジフェノール酸化活性しか有しないことと比べてきわめて特徴的である。

このように、温州ミカン等種々のカンキツ果実の酵素は *o*-ジフェノール類よりトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化することが認められた。酵素の基質特異性は酵素的褐変反応系を考察する上で重要な因子ではあるが、これとともに基質となるポリフェノールの種類や含量もまた大きな要因となる。たとえば、大村および尊田<sup>62,71)</sup>は、リンゴ酵素はクロロゲン酸を強く酸化するが、その褐変反応にはむしろカテコール酸化系が重要な役割を果たすことを報告している。したがって、温州ミカン幼果における褐変反応の主反応を論ずる場合にも酵素ばかりでなく、基質についても追究し、それらを総合して考察すべきであろうと考えられる。

### 第5節 小 括

温州ミカン幼果の切断面にみられる褐変が酵素的に引き起こされることを明らかにし、また、その酵素はフロログルシノール、ピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するが、これと比べて *o*-ジフェノール酸化活性は著しく低いことを認めた。

果実の発育過程を通じて温州ミカンのポリフェノール酸化酵素はトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化すること、また、その活性の強さは発育の各時期で変動し、発育初期（6月中旬）および果実着色時期（10月中旬）にピークが存在することを明らかにした。一方、褐変の基質となるポリフェノールの含量は初期には高く、果実の発育にともなって急激に低下し、また、還元型アスコルビン酸含量は初期には低く、9月以降、急速に増加することが認められた。

果実の各部位にトリヒドロキシベンゼン酸化酵素の活性が見出された。また、その活性は果皮、とくにフラベド部でもっとも高く、アルベド、果肉の順に低下した。さらに、温州ミカンばかりでなく、種々のカンキツ果実の酵素はすべてフロログルシノール、ピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化することを明らかにした。

## 第3章 温州ミカン幼果の褐変反応の基質となるポリフェノール化合物

園芸食品には種々のポリフェノール化合物が含まれ、それらが酵素的褐変の一つの原因となる。したがって、前章で認められた温州ミカン幼果の褐変反応の機構を知るためには、まず、幼果に存在するポリフェノール化合物とその幼果の酵素による褐変反応について明らかにする必要がある。しかしながら、カンキツ果実の褐変基質であるポリフェノール化合物に関する研究はきわめて少なく、わずかに、レモン<sup>60)</sup>やグレープフルーツ<sup>72)</sup>においてフロログルシノールの  $\beta$ -グルシコドであるフロリンの存在が、オレンジ等<sup>73,74)</sup>において極微量のクロロゲン酸およびコーヒー酸の存在が知られているにすぎず、また、それら化合物のカンキツ酵素による酸化および褐変反応についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本章では温州ミカン幼果の褐変反応の基質となるポリフェノール化合物について検索し、それら化合物の酸化および褐変反応について検討した。

### 第1節 天然基質溶液および種々のポリフェノール溶液の褐変と 褐変液の吸収スペクトル

#### 1-1 緒 言

前章で明らかにしたように、ピロガロール等のポリフェノール化合物はミカン酵素により酸

化され、反応液の可視部の吸光度、すなわち、褐変度は増加する。このことから、これら化合物の吸収スペクトルは褐変反応にともなう何らかの変化を示すことが考えられる。したがって、もし、この吸収スペクトルの変化が反応基質によりそれぞれ異なった特徴を有するならば、幼果より調製したポリフェノール溶液（以下、天然基質溶液と呼ぶ）の吸収スペクトルの変化の特徴と種々のポリフェノール化合物のそれらとを比較することによって、幼果に含まれる反応基質を直接的に推測できるのではないかと考えた。そこで、本節においては幼果の褐変反応について、まず、吸収スペクトルの面から追究した。この場合、紫外部吸収スペクトルは反応液の色調とは直接には関係しないが、それは反応基質であるポリフェノールに由来するものと考えられるので、本節においては可視部とともに紫外部の吸収スペクトルについて検討した。

## 1-2 実験方法

### 1 天然基質溶液の調製

マイクロ波加熱処理により酵素を失活させた幼果300gに95%エタノール750mlを加えて磨砕し、ポリフェノール成分を抽出した。抽出液を遠心分離した後、上澄液を集め、エタノールを減圧下で溜去した。これを濾過（東洋濾紙 No.2 使用）後、濾液に水を加えて200mlとし、天然基質溶液として使用した。

### 2 粗酵素液の調製

幼果に2倍量(W/V)の0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)を加え、氷冷下で磨砕した。汁液を遠心分離して得られた上澄液に硫酸アンモニウムを添加し、20~70%飽和で塩析される画分を集め、少量の0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解した。これを同一緩衝液に対して24時間透析後、膜内液を遠心分離して不溶物を除去し、粗酵素液とした。

### 3 吸収スペクトルおよび差スペクトルの測定

天然基質溶液または試薬ポリフェノール溶液（終濃度  $10^{-3}\text{M}$ ）0.15mlおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8) 2.75mlに粗酵素液0.1mlを添加し、30°Cで振盪下に反応させた。反応液は蒸留水で適宜希釈後、その吸収スペクトルを自記分光光度計（日立製作所 557型）により測定した。本装置は果汁および褐変液のような比較的不透明な試料の吸収スペクトルの測定が可能であり、また、反応0分（酵素液の添加から測定終了まで約3分30秒を要したが、その時点を経過した）における反応液の吸収スペクトルを基準とするスペクトルの変化（差スペクトル）をも自動的に記録できる。そこで、紫外および可視吸収スペクトルとともにこの差スペクトルをも測定した。

## 1-3 実験結果

### 1 天然基質溶液の褐変と吸収スペクトル

天然基質溶液の吸収スペクトルはFig. 8(A)に示したように、0分では紫外部(230~350nm)において285nmおよび325nm付近に吸収のピークがみられたが、可視部(350~560nm)においてはリンゴ果汁の場合<sup>75)</sup>にみられるような吸収のピークないし肩は認められなかった。また、褐変反応の進行にともなう、可視部ではその測定波長の全域にわたって吸光度が増加したが、紫外部では280~350nmにおける吸光度の減少がみられた。その差スペクトル(Fig. 8(B))から明らかなように可視部における吸光度の増加は375nmでもっとも顕著であり、紫外部における吸光度の減少は325nmで最大であった。

なお、対照として加熱、失活させた酵素液を用いて同様に反応させ、反応液の吸収スペクトルおよび差スペクトルを測定したが、この場合は反応液の褐変は進行せず、吸収スペクトルおよび差スペクトルの変化は認められなかった。

### 2 種々のポリフェノール化合物の褐変と吸収スペクトル

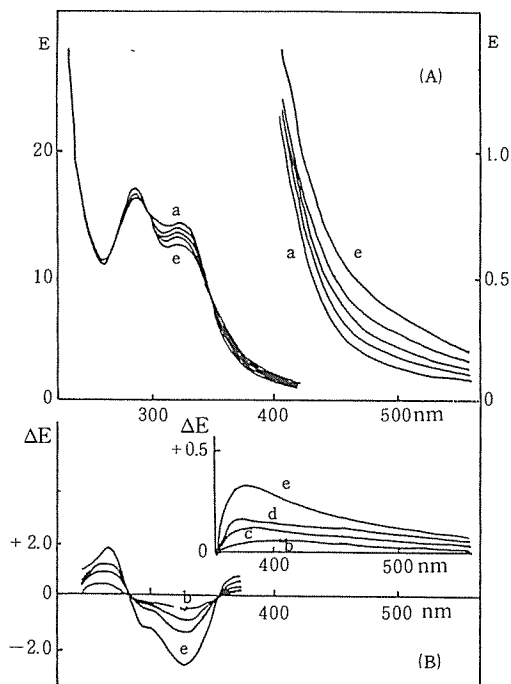


Fig. 8 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of the system of polyphenol oxidase (PPO) - natural substrate during the browning reaction.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min,  
d ; 30min, e ; 60min.

前述のように、天然基質溶液の吸収スペクトルは褐変反応の進行にともなって特徴のある変動を示すことが明らかとなった。そこで、前章においてミカン酵素により酸化されることが認められた種々のポリフェノール化合物を基質とするモデル反応系における吸収スペクトルおよび差スペクトルを測定し、天然基質溶液の場合と比較した。

#### (1) トリヒドロキシベンゼン系

1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロールおよび没食子酸を基質とした場合、褐変反応はきわめて速やかに進行し、反応液は10分間で褐色、30分間で暗褐色を呈した。

ピロガロール系の吸収スペクトルにおいては0分では280nm付近に吸収のピーク、330nm付近に肩を示し、反応の進行にともない褐変液の吸光度には測定した紫外および可視部の全域にわたり著しい増加が認められた (Fig. 9 (A)). Fig. 9 (B)に示した差スペクトルから明らかに、吸光度の増加率は330nm付近で最大であった。

また没食子酸の場合、Fig. 10 (A)に示したように、0分においては260nm付近に吸収のピークがみられ、反応時間の経過とともに280nm以上の紫外部および可視部における吸光度が増加した。差スペクトルからは300~320nmにおいて吸光度の顕著な増加が認められた (Fig. 10 (B)).

一方、1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼンであるフロログルシノール反応系においては、酸化反応はきわめて速やかに進行するが、その反応液の褐変度は低く、30分後においてもわずかな着色がみられる程度であった。しかしながら、その吸収スペクトルおよび差スペクトルは Fig. 11 (A)および(B)に示したように、とくに紫外部において特徴のある変化を呈した。すなわち、反応の進行にともなって紫外部の吸光度は著しく増加し、その増加は272nmにおいてもっとも大きかったが、400nm以上の可視部では吸光度はわずかに増加の傾向がみられるにすぎなかった。

#### (2) o-ジフェノール系

クロロゲン酸およびコーヒー酸を基質とする反応系においても反応液の褐変がみられ、それらは10分後では淡褐色、30分後では褐色を呈した。

クロロゲン酸の場合、Fig. 12 (A)のように、0分においては325nm付近に吸収のピーク、295nm付近に肩が認められ、反応の進行につれて370nmより長波長側での反応液の吸光度は増加したが、290~370nmにおけるそれは著しく減少した。差スペクトルから明らかに、反応液の吸光度の増加は400nm付近で、また、減少は325nm付近で最大であった (Fig. 12 (B)). この

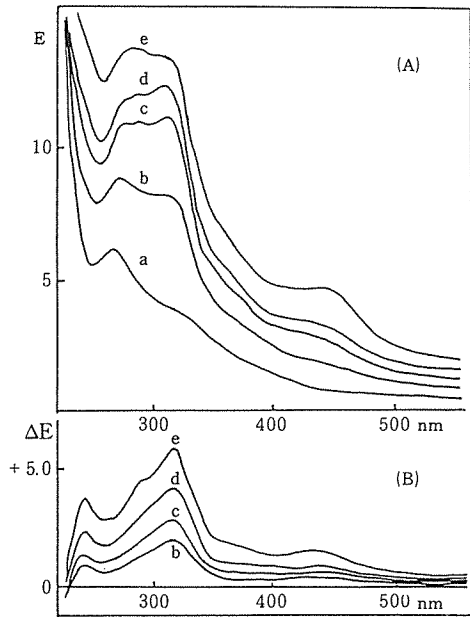


Fig. 9 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-pyrogallol system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min, d ; 30min, e ; 60min.

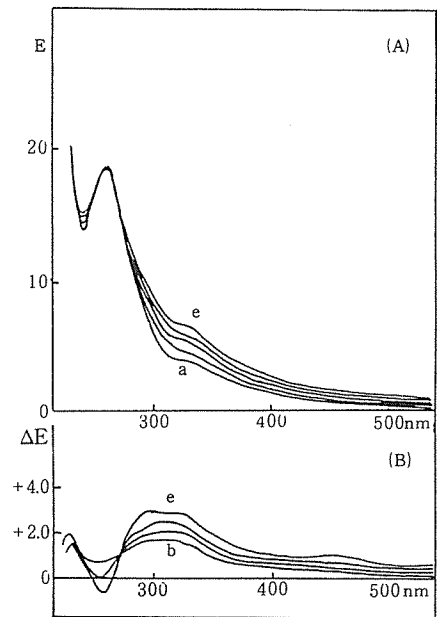


Fig. 10 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-gallic acid system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min, d ; 30min, e ; 60min.

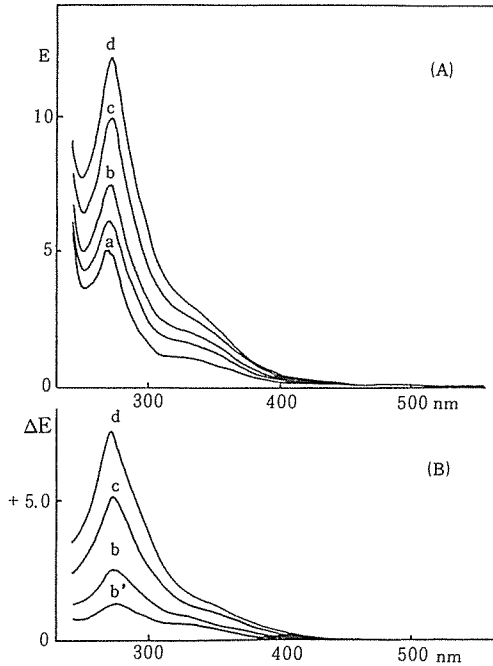


Fig. 11 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-phloroglucinol system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min, d ; 30min, e ; 60min.

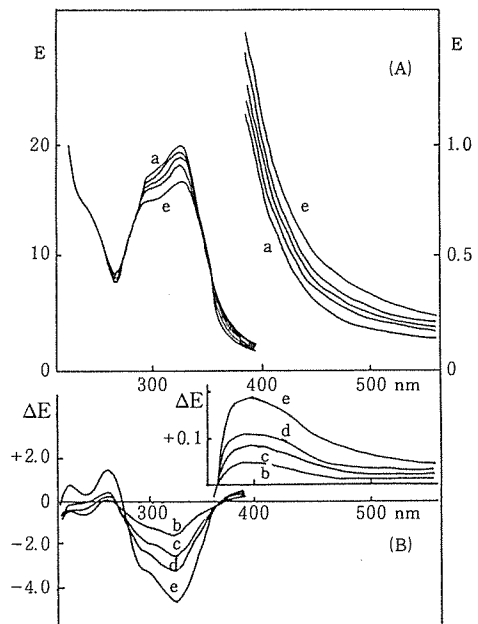


Fig. 12 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-chlorogenic acid system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min, d ; 30min, e ; 60min.

ようなスペクトル, とくに差スペクトルの変化は Fig. 8 に示した天然基質溶液の場合とかなり類似するようである。

一方, コーヒー酸の場合にも反応の進行にともなって紫外部における反応液の吸光度の減少と可視部におけるその増加が認められたが, その吸収スペクトルおよび差スペクトルの変化の特徴はクロロゲン酸および天然基質の場合とはやや相違した。すなわち, Fig. 13(A)のように0分においては

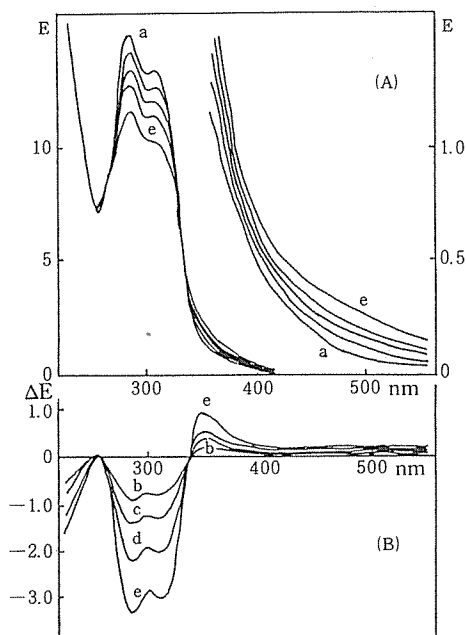


Fig. 13 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-caffeic acid system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min,  
d ; 30min, e ; 60min.

285nmおよび315nm付近に吸収のピークを示し, 反応の進行につれて335nmより長波長側での吸光度の増加と260~330nmにおけるその減少が観察された。また, Fig. 13 (B)の差スペクトルにみられるように, 吸光度の増加は360nm付近で, その減少は285nm付近で最大であった。

さらに, カテコールおよびDL-ドーパを基質とする反応系では, 60分後の反応液においてわずかな褐変がみられる程度であり, それらの吸収スペクトルの変化は天然基質溶液の場合とはかなり相違した。すなわち, Fig. 14のように両基質とも280nm付近に吸収のピークが認められ, 反応の進行にともなって反応液の吸光度は測定波長の全域にわたって増加する傾向にあった。しかし, その変化量は小さく, リンゴ酵素<sup>76,77)</sup>を用いた反応系にみられるような吸収スペクトルの変化の特徴は見出されなかった。

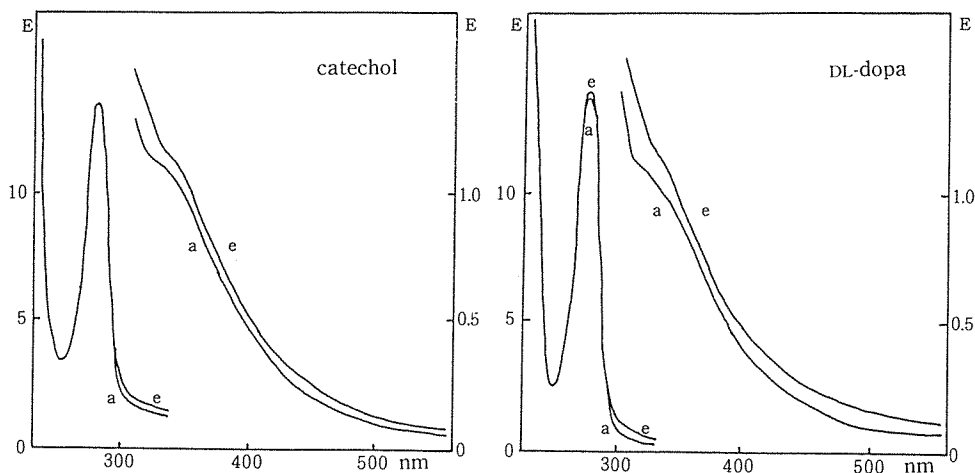


Fig. 14 Absorption spectra of PPO-catechol and PPO-DL-dopa systems.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min, d ; 30min, e ; 60min.



## 1-4 考察

天然基質およびピロガロール、クロロゲン酸等のポリフェノール化合物はミカン酵素により速やかに酸化され、それらの反応液は著しく褐変した。これらの反応の進行にともなう、反応液の吸収スペクトルには Fig. 8~14 に示すような変化がみられた。すなわち、いずれの反応系においても可視部 (350~560nm) での吸光度は反応時間の経過とともに増加することが見出されたが、このような可視部の全域にわたる吸光度の増加は、リンゴ等の食品においても認められており、それはメラノイジンのような褐色色素の生成によるものと考えられている<sup>62,71,75-77)</sup>。ミカン酵素による褐変反応にともなう反応液の吸光度の増加速度はそれぞれの基質により相違はするものの、可視部におけるこれら基質のスペクトルには明瞭な吸収のピークはみられなかった。また、褐変反応にともなう差スペクトルの変化には、それぞれの基質間で若干の相違が認められるものの、それらを比較することにより幼果の褐変の主反応系を予測するのは困難である。これに対して、反応液の紫外部の吸収スペクトルは基質によりそれぞれ特有のピークを示し、それらスペクトルは反応時間の経過にともなう著しく変化することが認められた (Fig. 8~14)。また、そのスペクトルの変化の特徴は差スペクトルにおいて顕著に見出されたので、これら吸収スペクトルおよび差スペクトルの変化の特徴と天然基質溶液におけるそれとを比較し、可視部での結果とあわせて幼果で起こる褐変の主反応系を類推しようと試みた。すなわち、天然基質溶液の場合は褐変反応にともなう紫外部 (280~350nm) における吸光度の減少と、360nm より長波長側での吸光度の増大がみられた (Fig. 8)。また、ピロガロール、フロログルシノール等のトリヒドロキシベンゼン類においては測定した紫外および可視部のほぼ全域にわたる吸光度の増大がみられ (Fig. 9~11)、さらに、*o*-ジフェノールであるカテコールおよび DL-ドーパの場合にもミカン酵素による褐変度は低いが、同様に吸光度は増大する傾向にあり (Fig. 14)、これらの結果は天然基質の場合とは著しく相違した。

一方、コーヒー酸の場合には紫外部における吸光度の減少と可視部における吸光度の増大は認められたが、その差スペクトルの変化の特徴は天然基質溶液の場合とは明らかに相違するように思われる (Fig. 8, 13)。これに対してクロロゲン酸の場合には280~360nm における吸光度の減少および370nm より長波長側での増加が認められ、とくに、差スペクトルの変化の特徴は Fig. 8 (B) および Fig. 12 (B) から明らかなように天然基質溶液の場合とかなり高い類似性を示した。一方、植物界においてはイソクロロゲン酸やネオクロロゲン酸等のクロロゲン酸同族体もまた Fig. 12 に示したクロロゲン酸と同様の吸収スペクトルを有することが知られている<sup>6-8,71,78-80)</sup>。したがって、天然基質溶液中にはこれらクロロゲン酸同族体が含まれ、ミカン酵素によるそれら化合物の酸化によって、Fig. 8 のような吸収スペクトルの変化がみられるものと考えられる。

## 第2節 天然基質よりポリフェノール類の分別およびそれらの褐変反応と吸収スペクトル

### 2-1 緒言

前節において、褐変液の吸収スペクトルおよびその変化より天然基質溶液中にはクロロゲン酸あるいはその同族体が含まれ、それらの酸化が著しい褐変の原因となることが考えられた。そこで、幼果にみられる褐変反応系におけるこれら基質の存在を証明し、その褐変の主反応系を明らかにするために、本節においては天然基質溶液中のポリフェノール化合物の分別を行い、分別された各画分の褐変反応および吸収スペクトルの変化について追究した。

### 2-2 実験方法

#### 1 ポリフェノール類の分画

## (1) 酢酸鉛による分画

前節で調製した天然基質溶液について、まず、Fig. 15 に示す手順で中性酢酸鉛により分画した。

## (2) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

試料溶液を0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したカラム (2.0×9.0cm) に添加し、同一緩衝液で洗浄後、吸着画分を0.05Mリン酸緩衝液および0.2Mの塩化ナトリウムを含む0.05M緩衝液により段階的に溶出した。

## 2 加水分解

## (1) 塩酸加水分解

酢酸鉛処理による天然基質溶液の沈殿画分に同量の2N塩酸を加え、沸騰湯浴中で2時間加水分解した。加水分解液にエーテルを添加し、振盪、静置後、エーテル層と母液とに分け、それぞれを分析に供した。

## (2) 酵素的加水分解

酢酸鉛処理後の母液 (3ml) に0.05M酢酸緩衝液 (pH5.0) 5mlおよびβ-グルコシダーゼ (シグマ社) 10mgを加えて、37°Cで5時間反応させ加水分解した。加水分解液に5倍量 (v/v) のエタノールを加え脱塩後、実験に供した。

## 3 ペーパークロマトグラフィー

ポリフェノール成分等の検索は東洋濾紙No51 (20×20cm) を使用するペーパークロマトグラフィー (1次元あるいは2次元上昇法、展開溶媒および呈色試薬はそれぞれの実験結果の項に示す) により行った。

## 4 全ポリフェノールの定量

全ポリフェノールはHammerschmidt および Pratt<sup>78)</sup> のFolin-Denis改良法に準じてクロロゲン酸量として定量した。

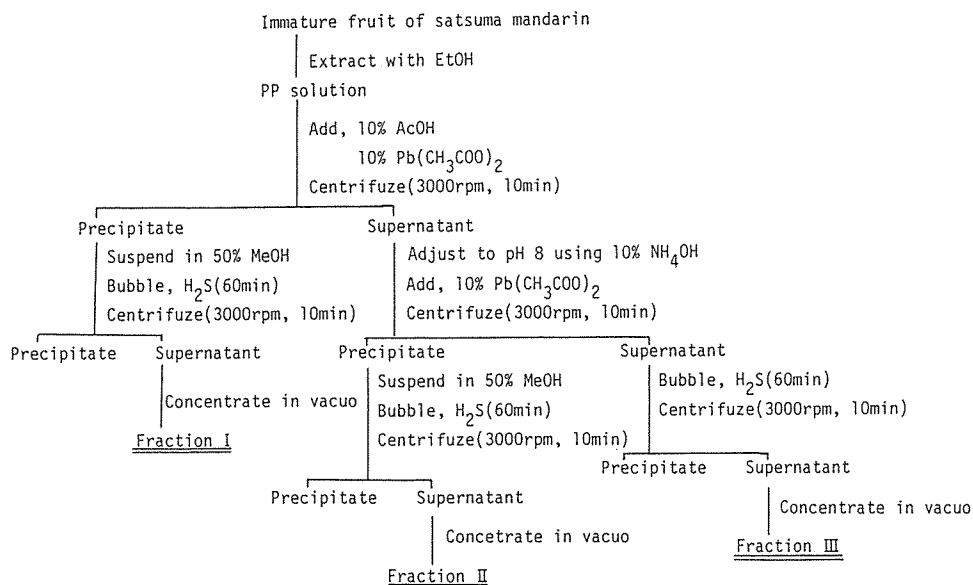


Fig. 15 Fractionation of polyphenols by the treatment with lead acetate.

## 5 吸収スペクトルおよび差スペクトルの測定、褐変度の測定、酵素液の調製

これらはすべて前節と同様に行った。

## 6 フロリンの調製

標準物質のフロリンは Vandercook および Stephenson の方法<sup>60)</sup>にしたがってレモン果皮より中性酢酸鉛処理およびシリカゲルクロマトグラフィーにより調製した。この物質は呈色反応、加水分解反応、ペーパークロマトグラフィー等により同定した<sup>60)</sup>。

### 2-3 結果および考察

#### 1 酢酸鉛処理によるポリフェノール化合物の分別

中林<sup>82)</sup>が報告した酢酸鉛処理による分別法に準じて、Fig. 15 に示す手順で温州ミカン幼果のポリフェノール成分を分別した。本分別法では中性酢酸鉛によりカテコール型およびピロガロール型のポリフェノール類は沈殿するが<sup>81,82)</sup>、フロログルシノール型のポリフェノール類は沈殿しないといわれている。まず、酢酸酸性下で酢酸鉛処理することにより沈殿する画分（フラクションI）を分離した。さらに、その母液をアンモニアにより微アルカリ性（pH8）とし、再び沈殿する画分（フラクションII）を得た。また、この母液を硫化水素処理して鉛塩を除去したものをフラクションIIIとした。それぞれの画分の0.2mlに0.1Mリン酸緩衝液（pH6.8）2.7mlおよびミカン粗酵素を0.1ml添加し、30°Cで反応させ、この反応液の褐変度の変化を測定した。なお、本節では470nmにおける吸光度の増加（ $\Delta E_{470nm}$ ）を褐変度とした。Fig. 16 に示したように、フラクションIおよびフラクションIIが強く褐変したが、フラクションIIIは褐変しなかった。このように天然基質溶液中の褐変反応基質が沈殿画分に存在することから、それらはカテコール型あるいはピロガロール型のポリフェノール化合物である可能性が示唆された。

#### 2 フラクションIおよびIIの吸収スペクトルの変動

フラクションIおよびIIを基質とする褐変反応系について、つぎに、吸収スペクトルの面から追究した。まず、フラクションIにミカン酵素を作用させた際の反応液の吸収スペクトルおよび差スペクトルの変動を調べ、結果をFig. 17 に示した。フラクションIのスペクトルは325nm付近に吸収のピーク、295nm付近に肩を有し、褐変反応の進行にともなって370nmより長波長側での吸光度の増加および290~360nmにおける著しい吸光度の減少（差スペクトルでは負の増加）がみられた。このようなスペクトルの変動の特徴は前節のクロロゲン酸を基質とする反応系の場合ときわめて類似した。クロロゲン酸類は通常酸性下では酢酸鉛処理によっては沈殿しないとされている<sup>81,82)</sup>。しかし、Fig. 17 に示したフラクションIの吸収スペクトルおよびその変動がクロロゲン酸類の特徴を示すものであること<sup>79,83-85)</sup>から、フラクションIに含まれるポリフェノール化合物は新しい型のクロロゲン酸同族体である可能性が考えられる。

一方、Fig. 18 に示すように、フラクションIIの吸収スペクトルは280nmおよび325nm付近に吸収のピークを有し、クロロゲン酸のそれとはやや相違する。しかし、このフラクションに

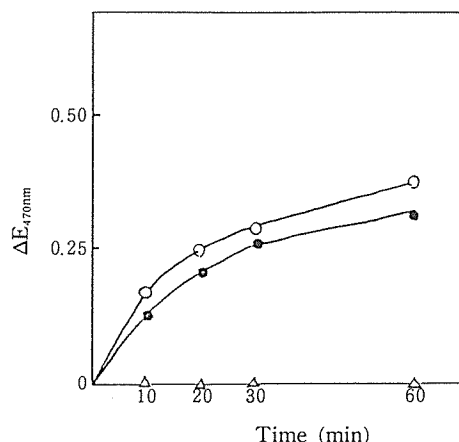


Fig. 16 Browning reaction of lead precipitate fractions (fraction I and II) and mother liquor fraction (fraction III) of natural substrate (NS, ethanol extract of young satsuma mandarin fruit).

●— fraction I, ○— fraction II,  
△— fraction III.

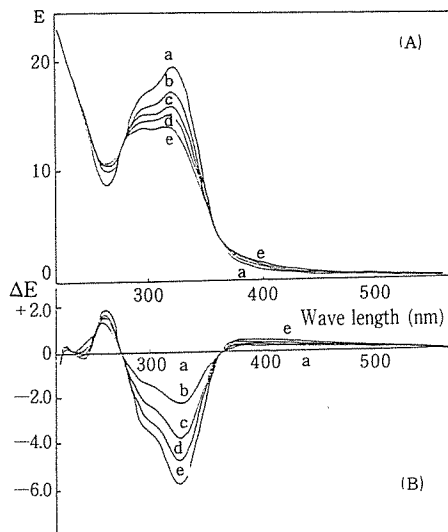


Fig. 17 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-fraction I system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min,  
d ; 30min, e ; 60min.

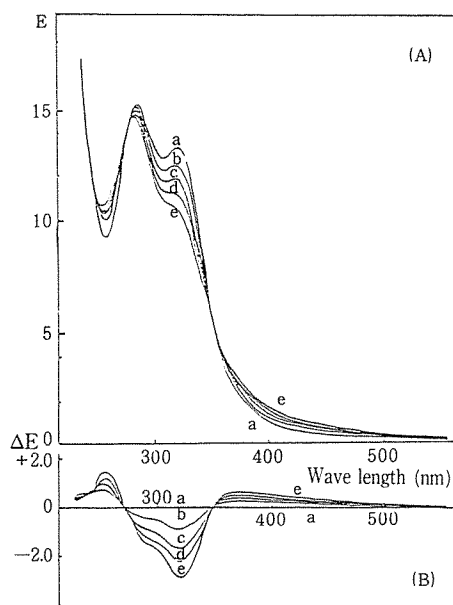


Fig. 18 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-fraction II system.

a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min,  
d ; 30min, e ; 60min.

ミカン酵素を作用させた場合の差スペクトルの変動 (Fig. 18 (B)) がクロロゲン酸の場合と類似することから、フラクシオンIIの吸収スペクトルにみられる325nm 付近の吸収のピークはクロロゲン酸類のそれ<sup>79,83-85)</sup>に由来することが考えられる。したがって、この場合にもクロロゲン酸類のミカン酵素による酸化反応が褐変の主反応となることが予想される。

### 3 フラクシオンIIのDEAE-セルロースによる分別

前記のように吸収スペクトルの面からの追究により、フラクシオンIIには数種のポリフェノール化合物が混在することが考えられた。そこで、この画分についてさらにDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーにより分別し、得られた画分の褐変反応等について検討した。すなわち、フラクシオンII (10ml) をDEAE-セルロースカラムに添加し、溶出画分を5mlずつ分取した。各フラクシオンについてポリフェノール化合物の目安として320nm および280nm における吸光度<sup>102,103)</sup>を測定した。その結果、Fig. 19 に示したように素通り画分 (フラクシオンII<sub>A</sub>) および0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) による溶出画分 (フラクシオンII<sub>B</sub>) に大きなピークが認められた。そこで、これら画分を別々に集め、減圧濃縮後、それぞれ10ml (カラム添加量) に定容した。両画分の褐変度および褐変反応の際の吸収スペクトルの変動を調べ、結果をFig. 20~22 に示した。フラクシオンII<sub>B</sub>はミカン酵素により強く褐変し (Fig. 20), その際の反応液の吸収スペクトルおよび差スペクトルの変動の特徴はFig. 21 に示すように、フラクシオンI およびクロロゲン酸のそれらとほぼ一致した。一方、フラクシオンII<sub>A</sub>の褐変度は低く (Fig. 20), Fig. 22 に示したようにミカン酵素の作用により、270~330nm における吸光度の増加の傾向がみられたが、その変化量は小さかった。したがって、フラクシオンII<sub>A</sub>に含まれるポリフェノール化合物の温州ミカン幼果の褐変反応に果たす役割はもしあるにしても著しく小さいもの

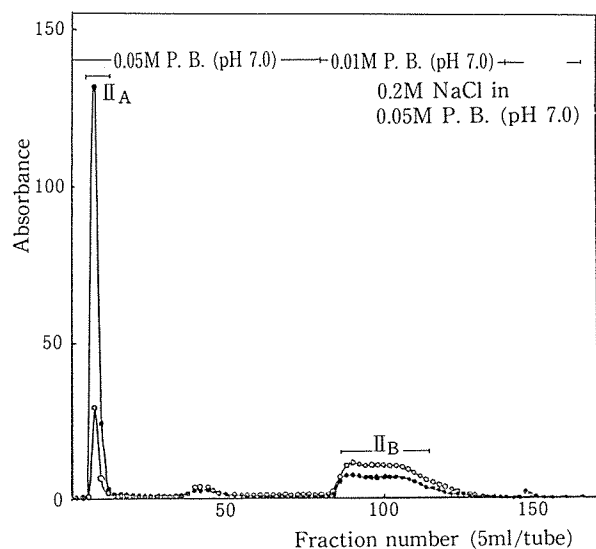
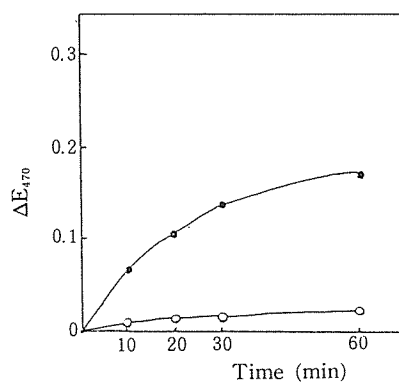
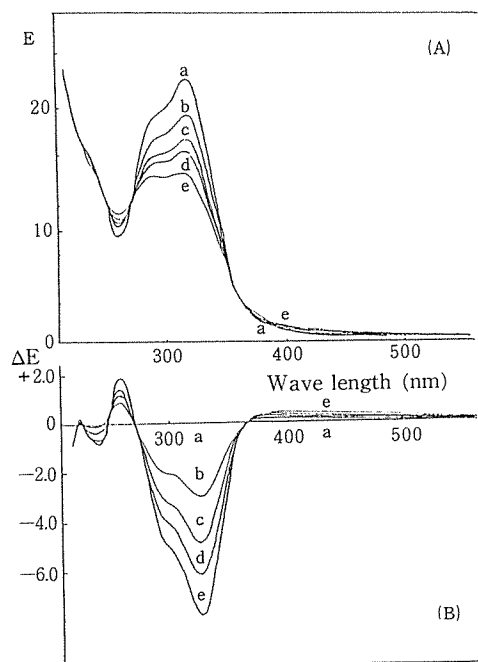
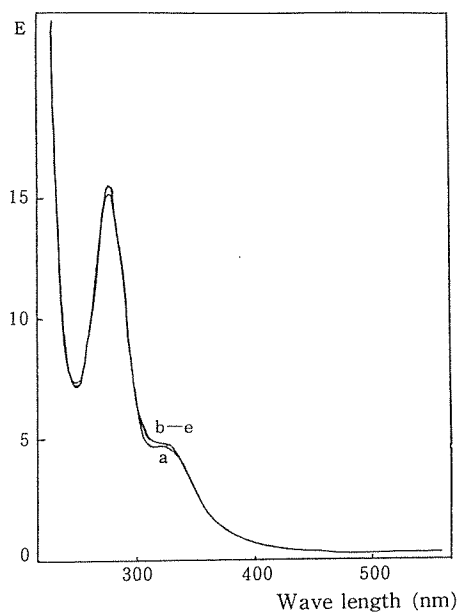


Fig. 19 Elution pattern of fraction II on DEAE-cellulose.

 ●— OD<sub>280nm</sub>, ○— OD<sub>320nm</sub>.

 Fig. 20 Browning reaction of fraction II<sub>A</sub> and II<sub>B</sub>.

 ○— fraction II<sub>A</sub>, ●— fraction II<sub>B</sub>.

 Fig. 21 Absorption spectra (A) and difference spectra (B) of PPO-fraction II<sub>B</sub> system.

 a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min,  
d ; 30min, e ; 60min.

 Fig. 22 Changes of absorption spectra of PPO-fraction II<sub>A</sub> system.

 a ; 0min, b ; 10min, c ; 20min,  
d ; 30min, e ; 60min.

であろうと考えられる。

このように、酢酸鉛処理およびイオン交換クロマトグラフィーによって温州ミカン幼果の主要褐変物質はフラクション I および II<sub>B</sub> の画分に分別された。フラクション I および II<sub>B</sub> の褐変反応にともなう反応液の吸収スペクトルおよび差スペクトルの変動の特徴がそれぞれクロロゲン酸のそれらとほぼ一致したことから、これら両画分に含まれる主要反応基質はクロロゲン酸あるいはその同族体であろうと推察される。

#### 4 クロロゲン酸同族体の検出

フラクション I および II<sub>B</sub> について 2% 酢酸 (AW 2:98) による一次元ペーパークロマトグラフィーを行い、それらの呈色反応等を調べた。その結果、Fig. 23 に示したように、フラクション I および II<sub>B</sub> ともにジアゾ化パラニトロアニリン試薬および塩化第二鉄-フェリシアン化カリウム試薬等<sup>82)</sup>、ポリフェノール化合物の呈色試薬に陽性のスポットが検出された。それぞれの

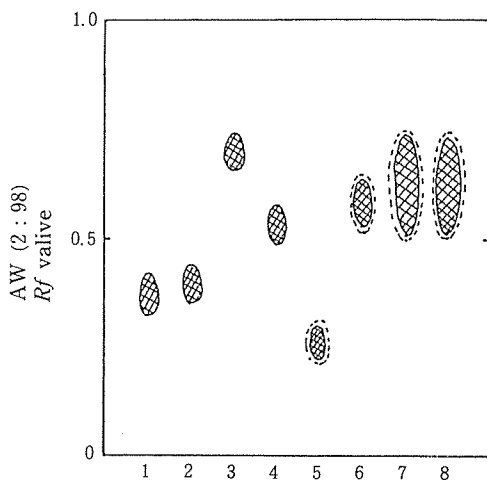





Fig. 23 Paper chromatogram of fraction I and II<sub>B</sub>.

- 1) gallic acid, 2) *p*-coumaric acid,
  - 3) pyrogallol, 4) phloroglucinol,
  - 5) caffeic acid, 6) chlorogenic acid,
  - 7) fraction I, 8) fraction II<sub>B</sub>.
-   $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  
 Diazotized *p*-nitroanillin (DPNA),  
 Fluorescence under UV-light.

スポットはクロロゲン酸と同様に 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) により 10 倍に希釈した酵素液を展開、乾燥後の濾紙に噴霧した後、30°C の恒温器中に 30 分放置することにより強く褐変した。また、紫外線下で青白い蛍光を発し、それはアンモニア蒸気下では緑色に変化した。それらスポットの  $R_f$  値もクロロゲン酸のそれと近接することが認められた。

さらに、フラクション I および II<sub>B</sub> を 1 N 塩酸中で加水分解し、それらの構成成分を調べた結果、Table 3 に示したように両画分の加水分解液のエーテル抽出物よりコーヒー酸が検出された。一方、母液からは Table 4 に示したようにキナ酸が検出され、それ以外の成分 (例えばシキミ酸) は検出されなかった。これらの結果から、フラクション I および II<sub>B</sub> に含まれるポリフェノール化合物はクロロゲン酸様物質であることが認められた。そこで、フラクション I および

Table 3 Paper chromatography of the ether extract of the hydrolyzates\* of fraction I and II<sub>B</sub>.

	$R_f$ values			
	BAW (4:1:2)	AW (2:98)	BeAW (125:75:3)	BPW (14:3:3)
Fraction I	0.84	0.24	0.53	0.57
Fraction II <sub>B</sub>	0.84	0.24	0.54	0.57
Caffeic acid	0.84	0.24	0.54	0.57
Chlorogenic acid	0.65	0.56	0.14	0.24

Abbreviations: B;butanol, A;acetic acid, W;water, Be;benzene, P;pyridine

\*They were obtained by hydrolysis of PP with 1 N HCl.

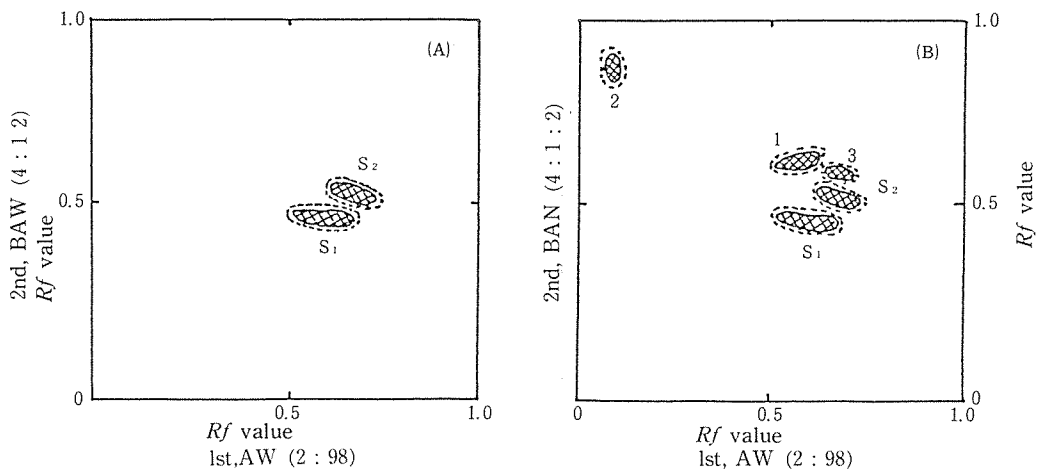
Table 4 Paper chromatography of the mother liquor of the hydrolyzate of fraction I and II<sub>B</sub>.

	<i>R<sub>f</sub></i> values		
	BAW (4:1:2)	EAW (9:2:2)	BFW 4:1:2)
Fraction I	0.39	0.14	0.42
Fraction II <sub>B</sub>	0.39	0.14	0.41
Quinic acid	0.39	0.14	0.41
Shikimic acid	0.53	0.15	0.54

Abbreviations: B;buthanol, A;acetic acid, W;water, E;ethyl acetate, F;formic acid.

II<sub>B</sub>のポリフェノール含量をクロロゲン酸として定量した。その結果、両画分にはそれぞれ約690 mg%および250mg%, 合計940mg%のポリフェノール類が含まれ、これは天然基質溶液中の全ポリフェノール含量(約2480mg%)の約38%に相当することが認められた。

つぎに、フラクシオン I および II<sub>B</sub>に含まれるクロロゲン酸様物質についてペーパークロマトグラフィーにより検討した。すなわち、フラクシオン I について二次元ペーパークロマトグラフィーを行った結果、Fig. 24 (A)に示したように前記のポリフェノール類の呈色試薬に陽性のスポット S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>が見出された。これら S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>ともに紫外線下で青白い螢光を発生し、その螢光はアンモニア蒸気下で緑色に変化した。また、両スポットともミカン酵素により褐変し、その褐変度は S<sub>1</sub>の方が S<sub>2</sub>より高かった。フラクシオン II<sub>B</sub>についても同様にペーパークロマトグラフィーを行った結果、前記 S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>と同じ *R<sub>f</sub>* 値および呈色反応を示す 2 個のポリフェノール化合物が検出されたが、他のスポットは見出されなかった。また、フラクシオン I および II<sub>B</sub>にクロロゲン酸を重ねてプロットし展開した場合の結果を Fig. 24 (B)に示した。なお、この図には文献<sup>(83-85)</sup>の *R<sub>f</sub>* 値より求めた位置にイソクロロゲン酸およびネオクロロゲン酸のスポットを同時に記入している。この結果から明らかなようにスポット S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>の位置はクロ

Fig. 24 Two dimensional paper chromatogram of fraction I and II<sub>B</sub>.

1) chlorogenic acid, 2) isochlorogenic acid, 3) neochlorogenic acid,

(A) fraction I and II<sub>B</sub>, (B) fraction I, II<sub>B</sub> and chlorogenic acid analogues.

⊗ FeCl<sub>3</sub>-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, ● DPNA, ○ fluorescence under UV-light.

ロゲン酸あるいは既知のクロロゲン酸同族体のそれらと相違し、また、それらの位置はジカフェイルキナ酸であるイソクロロゲン酸と著しく異なるが、モノカフェイルキナ酸であるクロロゲン酸やネオクロロゲン酸の位置に近接することが認められた。これらの実験結果から、フラクション I および II<sub>B</sub>に含まれる褐変反応成分 (S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>) の本体はモノカフェイルグループに属するクロロゲン酸同族体<sup>82)</sup>であろうと考えられるが、その詳細はさらに検討を要する。

### 5 S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>の吸収スペクトル

フラクション I および II<sub>B</sub>のペーパークロマトグラム上のスポット S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>を切り取り、それぞれ 5 ml の水で抽出後、抽出液の吸収スペクトルを調べた結果を Fig. 25 に示した。S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>

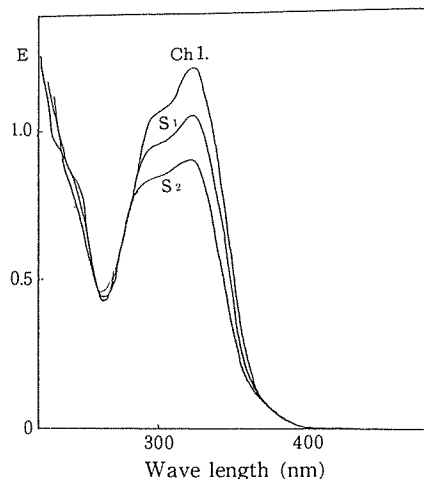


Fig. 25 Absorption spectra of spot S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub>.  
S<sub>1</sub>) spot S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>) spot S<sub>2</sub>,  
Chl) chlorogenic acid.

両成分ともに 325 nm 付近に吸収のピーク、295 nm 付近に肩を有し、それら吸収スペクトルは、クロロゲン酸のものとはほぼ等しかった。同様な吸収スペクトルはクロロゲン酸のほか種々のクロロゲン酸同族体<sup>6-8,78-80)</sup>においても認められている。このように、吸収スペクトルの面からもスポット S<sub>1</sub>および S<sub>2</sub>がクロロゲン酸同族体であることが確かめられた。

### 6 フロリンの検出

前記酢酸鉛処理後の母液 (フラクション III) に含まれるポリフェノール化合物の検索を行った。この画分にはレモン果皮の場合<sup>60)</sup>、フロリンが検出されており、温州ミカンの場合にもその化合物の存在が予測される。まず、フラクション III について二次元ペーパークロマトグラフィーを行った結果、Fig. 26 (A) に示したように、この画分には前記ポリフェノール類の検出

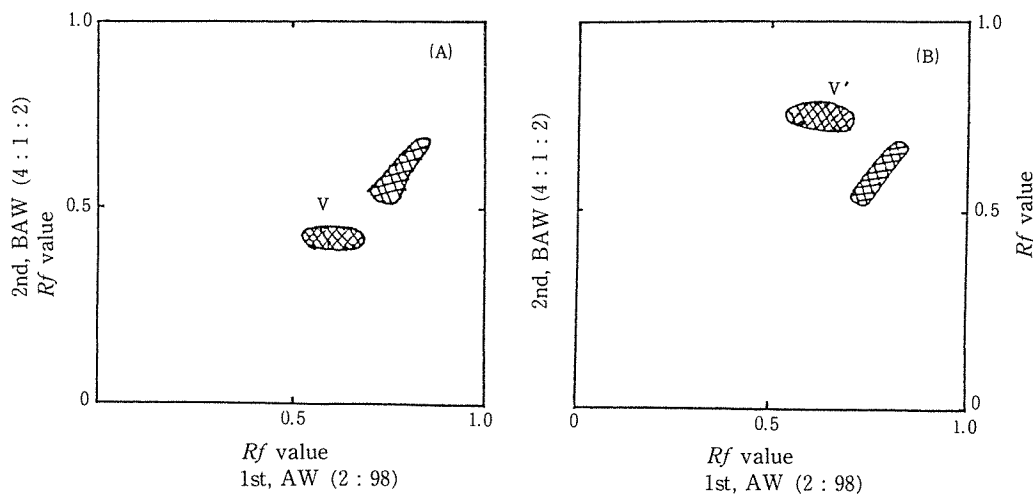


Fig. 26 Two dimensional paper chromatogram of fraction III and its hydrolyzate.

(A) fraction III, (B) hydrolyzate of fraction III.

⊗ FeCl<sub>3</sub>-K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, ⊘ DPNA, V, V' vaniline-HCl.



試薬に陽性の2個のスポットが検出されたが、両スポットとも紫外線下で蛍光を発しなかった。このうち、スポットVはバニリン-塩酸試薬に陽性であり、その *Rf* 値および呈色反応はレモンより調製したフロリンのそれら<sup>60)</sup>と一致した。さらに、この化合物がフロリンであることを確かめるために、フラクションIIIに $\beta$ -グルコシダーゼを作用させて得た加水分解液についてペーパークロマトグラフィーを行った。その結果、Fig. 26 (B)に示したようにスポットVは消失し、新たにスポットV'が生じた。このV'は呈色反応および *Rf* 値がフロログシノールのそれらと一致し、さらに、加水分解液の吸収スペクトルも Fig. 27 に示したようにフロログシノールのそれとほぼ一致した。したがって、スポットVはフロリンであり、それが $\beta$ -グルコシダーゼにより加水分解されてフロログシノールを生じたものと考えられる。しかし、Fig. 16 に示したように、このフロリンを含むフラクションIIIはミカン酵素によりほとんど褐変しな

かった。著者はフロリンがクエン酸酸性下でも加水分解されることを認めており、もし、これが幼果の $\beta$ -グルコシダーゼによるかあるいは酸性下で加水分解されてフロログシノールを生じたとしても、フロログシノール酸化物の褐変度は前章および前節で示したようにきわめて低い。したがって、このフロリンが温州ミカン幼果の褐変反応に寄与する割合は著しく低いものであろうと推定される。

以上のような温州ミカン幼果の天然基質溶液から分別された各画分の褐変反応、吸収スペクトルおよびその変動、ペーパークロマトグラフィー等の結果から、本節の実験のフラクションIおよびII<sub>B</sub>に検出された幼果の褐変反応の主要成分S<sub>1</sub>およびS<sub>2</sub>の本体は未詳のクロロゲン酸同族体であると考えられ、それらの含量は約940mg%にも達することが認められた。このような褐変の基質となるポリフェノール化合物の種類および含量は食品のポリフェノール酸化酵素の性質、とくに基質特異性ととともに、その食品の酵素的褐変反応を考察する上で重要な因子となるであろう。例えばリンゴの場合、そのポリフェノール酸化酵素はクロロゲン酸類に強く作用する<sup>104)</sup>が、ポリフェノール含量はむしろカテキン類が高く、クロロゲン酸類の量は低いようである<sup>105)</sup>。このリンゴの褐変反応に関して、大村および尊田<sup>71,75-77)</sup>は褐変色素液のゲル濾過パターンや吸収スペクトルの変化から検討し、リンゴの褐変の主反応系がカテコール酸化系であろうと推定している。温州ミカンの場合には前章で明らかにしたように、粗酵素液はフロログシノールやピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するのに対し、クロロゲン酸酸化活性はやや弱いようであった。しかし、本実験において幼果よりかなり多量のクロロゲン酸同族体が検出されたことから、この物質が温州ミカン幼果の褐変反応の主要基質と考えられる。なお、フロリンの存在も認められたが、これはミカン酵素によってはほとんど褐変しないことから、主要基質とは思われない。したがって、酵素活性はやや弱いにしてもクロロゲン酸酸化酵素系が幼果の褐変の主反応系であろうと推定される。

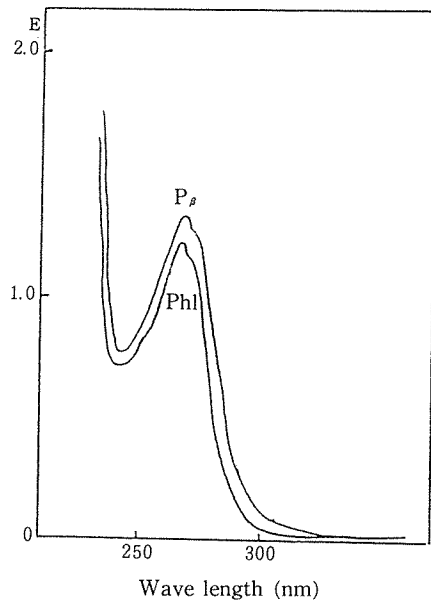


Fig. 27 Absorption spectra of hydrolyzate of fraction III and phloroglucinol.  
P<sub>β</sub>) hydrolyzate of fraction III,  
Phl) phloroglucinol.

### 第3節 小 括

温州ミカン幼果に含まれる褐変反応の基質となるポリフェノール化合物について、主として吸収スペクトルの面から追究した。

幼果の天然基質溶液および種々のポリフェノール化合物はミカン酵素により酸化され、それらの反応液は著しく褐変した。その際の褐変液の吸収スペクトルは各々の化合物によってそれぞれ特徴のある変動を示すことが認められ、また、その特徴は差スペクトルにおいて顕著に見出された。そこで、これら吸収スペクトルおよび差スペクトルを比較することにより、幼果で起こる褐変の主反応系を類推した。温州ミカン酵素はフロログルシノール、ピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するが、天然基質溶液の酸化反応にともなう吸収スペクトル、とくに差スペクトルの変化はトリヒドロキシベンゼン類のそれよりもむしろクロロゲン酸のものとかなり類似することが認められた。

中性酢酸鉛処理、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー等による分画およびペーパークロマトグラフィーによって、天然基質溶液中には未詳のクロロゲン酸同族体およびフロリンが存在することを明らかにした。これらのうち、クロロゲン酸同族体は温州ミカン幼果に少なくとも940mg% (この値は全ポリフェノール量の38%に相当する) 含まれ、ミカン酵素により著しく褐変した。また、フロリンはそのままの形ではミカン酵素により酸化されず、加水分解後生じるフロログルシノールは速やかに酸化はされるが、その褐変度はきわめて低かった。

以上のことから、幼果の著しい褐変の主反応系はクロロゲン酸を基質とするものであると考えられた。また、幼果の粗酵素液はフロログルシノール、ピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するが、これらトリヒドロキシベンゼン酸化系の温州ミカン幼果の褐変反応において果たす役割はかなり低いものと推察された。

## 第4章 温州ミカン幼果の褐変とそれに関与する ポリフェノール酸化酵素系

これまでに報告されている酵素的褐変反応に関する研究は粗酵素レベルないしそれに近い状態で行われたものがほとんどである。本論文においても第2章および第3章において粗酵素レベルでの研究を行い、カンキツ類、とくに温州ミカン幼果の褐変反応の特徴をとらえてきた。また、前章においては、幼果に含まれる褐変反応の基質としてクロロゲン酸同族体等のポリフェノール化合物が存在することを明らかにした。したがって、これらポリフェノール化合物が幼果に含まれるポリフェノール酸化酵素系によって酸化され、褐変が起こるものと考えられるが、この褐変が単一のポリフェノール酸化酵素系によるものか、あるいはまた、それぞれの基質に対応した酵素系による複合反応なのか不明である。したがって、幼果の褐変反応の機構を理解する上からも酵素を分離、精製して、精製酵素の性質およびその褐変反応について明らかにする必要がある。そこで、本章では温州ミカン幼果のポリフェノール酸化酵素を分別、精製し、それぞれの酵素の性質およびそれら酵素による褐変反応系について検討した。

### 第1節 幼果の酵素的褐変反応系

#### 1-1 緒 言

前章において、天然基質溶液が幼果の粗酵素液により著しく褐変することを認めた。そこで、この褐変機構の解明を目的として、まず、天然基質溶液の褐変反応を指標とする酵素の分別を

行い、得られた酵素標品の性質等について検討した。

## 1-2 実験方法

### 1 天然基質溶液の調製

天然基質溶液は第3章第1節と同様にして調製した。

### 2 酵素活性の測定

種々のポリフェノール化合物に対する酸化活性（酸素吸収量で示す）は第2章第2節と同様に検圧法により、また、褐変度は比色法により測定し、470nmにおける吸光度の増加量( $\Delta E_{470nm}$ )で表示した。

なお、クロマトグラフィーの際には次の示す比色法により測定した。すなわち、天然基質溶液0.15mlおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)2.75mlに酵素液0.1mlを添加し、30°Cで振盪下に反応させた。一定時間反応させた後、ただちに470nmにおける吸光度を測定した。反応前(0分)と反応後の吸光度の差( $\Delta E_{470nm}$ )はFig. 28に示したように反応初期10分間は直線的に増大したので、この値より酵素液ml当り、1分間の吸光度の増加量を算出し、その0.01を1単位として酵素活性を表示した。

### 3 タンパク質の定量

タンパク質量はHartree<sup>86)</sup>の方法により牛血清アルブミンを標準として定量した。また、クロマトグラフィーにおいては280nmにおける吸光度を測定し、タンパク質量とした。

### 4 ディスク電気泳動および活性染色

ディスク電気泳動装置(ミツミ科学産業製、精密安定電源、S J 1061型使用)により、Davis<sup>87)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、7.5%ポリアクリルアミドに試料を添加し、pH9.5で、カラム当り2.5mA、約2時間通電し、タンパク質を泳動させた。タンパク質は0.25%クマジブリリアントブルーで染色し、7.5%酢酸で脱色した。また、活性染色は次に示す方法で行った。すなわち、 $5 \times 10^{-2}M$ の種々のポリフェノール化合物を含む0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)および天然基質溶液を同緩衝液で5倍に希釈した液にゲルを浸漬し、30°Cで30分間放置後、それぞれの基質による着色部位を肉眼的に観察した。

### 5 分子量の測定

Andrews<sup>88)</sup>の方法にしたがい、0.2Mの塩化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したセファデックスG-100カラム( $2.2 \times 82cm$ )を用いて、10ml/hrの流速で標準および酵素タンパク質のゲル濾過を行った。ブルーデキストラン2000およびそれぞれのタンパク質の溶出位置、 $V_o$ および $V_e$ を求め、 $V_o/V_e$ と分子量との関係を作図し、酵素タンパク質の分子量を推定した。なお、標準タンパク質として、キモトリプシンノーゲンA(分子量25,000)、卵アルブミン(同、45,000)、牛血清アルブミン(同、67,000)および $\gamma$ -グロブリン(同、160,000)を使用した。

## 1-3 結果および考察

### 1 酵素の部分的精製

酵素の抽出および硫酸アンモニウム分画：第

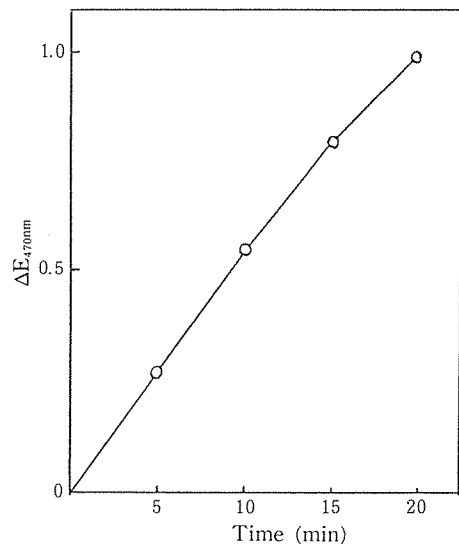


Fig. 28 Browning of natural substrate (NS) by PPO.

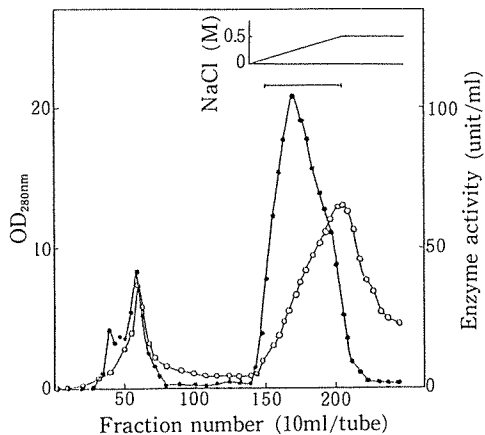


Fig. 29 Column chromatography of the crude enzyme on DEAE-cellulose.

●— enzyme activity, ○—  $OD_{280nm}$ ,  
 — fraction pooled.

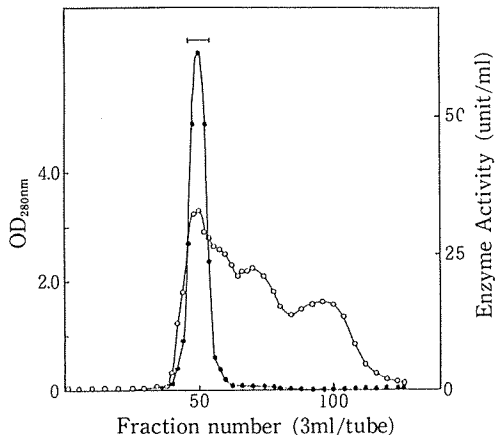


Fig. 30 Gel filtration on Sephadex G-100.

●— enzyme activity, ○—  $OD_{280nm}$ ,  
 — fraction pooled.

3章第2節と同様にして酵素を抽出後、硫酸アンモニウム分画したものを粗酵素液とした。

**DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー：**粗酵素液200mlを0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) で平衡化したカラム (3.8×20cm) に添加し、吸着画分を0～0.5Mの塩化ナトリウムを含む同一緩衝液によりグラジエント溶出した。10mlずつ分取した溶出画分について酵素活性および280nmにおける吸光度を測定した。Fig. 29に示したように、0.2～0.5Mの塩化ナトリウムを緩衝液により溶出する画分に全活性の75%以上が存在したので、この画分を集め、メンブランフィルター (アミコン社製、PM-10メンブラン使用) により約 $\frac{1}{2}$ に濃縮後、0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.0) に対して24時間透析した。

**C M-セファデックス C-50カラムクロマトグラフィー：**透析内液を0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.0) により平衡化したカラム (2×40cm) に添加し、同一緩衝液を流下した。酵素活性を示すタンパク質の大部分はこのカラムに吸着されずに素通りしたので、活性画分を集め、メンブランフィルターで15mlまで濃縮した。

**セファデックス G-100カラムクロマトグラフィー：**濃縮液 (3 ml) を0.2Mの塩化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.0) により平衡化したカラム (2.2×80cm) に添加し、同一緩衝液を用いて溶出した。Fig. 30から明らかなように、単一の活性のピークを示す画分が得られたので、この画分を集め、部分精製酵素標品として以下の実験に使用した。

この部分精製の各段階における酵素活性、タンパク質量等を測定した結果がTable 5である。最終段階における本酵素の精製倍率は約100倍であった。

## 2 分子量の測定

セファデックス G-100を用いたゲル濾過により本酵素の分子量を測定した。Fig. 31に示す結果より求めたその推定分子量は約107,000であった。

## 3 部分精製酵素の性質

本酵素標品による種々のフェノール化合物の酸化および褐変反応について調べ、結果をTable 6に示した。

本酵素標品は1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼンであるピロガロールおよび没食子酸とともに *o*-ジフェノールであるクロロゲン酸をもかなり強く酸化し、それらの反応液を速やかに褐変

Table 5 Purification of polyphenol oxidase of satsuma mandarin.

	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	1420	26.3	21300	0.57	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturation	389	20.0	16338	2.10	3.7	76.7
DEAE-cellulose	752	2.13	11280	7.04	12.4	53.0
CM-Sephadex C-50	248	3.50	9176	10.57	18.5	43.1
Sephadex G-100	256	0.65	8640	55.38	97.2	40.6

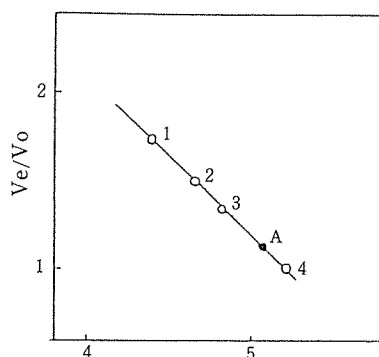


Fig. 31 Molecular weight estimation of the enzyme by gel filtration on Sephadex G-100.

- 1) cytochrome C,  
2) chymotrypsinogen A,  
3) ovalbumin,  
4) albumin (bovine),  
A) the enzyme preparation.

Table 6 Oxidation and Browning of various polyphenols by the partially purified enzyme.

	O <sub>2</sub> uptake (μl/min/ml)	Browning rate (ΔE <sub>470nm</sub> /min/ml)
Pyrogallol	29.0	0.44
Gallic acid	16.8	0.43
Chlorogenic acid	10.5	0.17
Catechol	3.0	0.05
DL-dopa	1.0	0.04
Phlogoglucinol	6.5	0.005
Resorcinol	0	0
Hydroquinone	0	0

することが認められた。しかしながら、粗酵素液中で著しく高かったフロログシノールの酸化反応は本酵素標品ではきわめて低かった。

このように、本酵素標品はピロガロール、没食子酸およびクロロゲン酸を強く酸化し、それらの反応液は褐変するが、第2章で明らかにした粗酵素液の基質特異性から考えて、これらの活性はそれぞれ別の酵素によって起こるのではないかと推察される。そこで、この点を明らかにするために、本酵素標品についてディスク電気泳動を行い、天然基質溶液、ピロガロール、クロロゲン酸およびDL-ドーパを基質とする活性染色を試みた。

Fig. 32 に示したように、幼果の天然基質溶液による着色バンドの位置はクロロゲン酸のそれとほぼ一致したが、ピロガロールおよびDL-ドーパによる着色位置とは相違することが認められた。このような結果および前章のように多量のクロロゲン酸同族体が天然基質溶液中に存在することから、本酵素標品中には少なくとも2つのポリフェノール酸化酵素が存在し、その一つであるクロロゲン酸酸化酵素系が天然基質溶液の褐変の主反応系となるものと推定される。

## 第2節 クロロゲン酸酸化酵素系

### 2-1 緒言

前節において、天然基質溶液の褐変反応にはクロロゲン酸酸化酵素系が強く関与することを

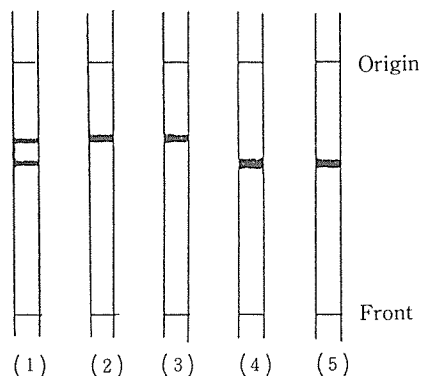


Fig. 32 Isozyme pattern of the enzyme preparation.

Coomassie brilliant blue (1), NS (2), chlorogenic acid (3), pyrogallol (4) and DL-dopa (5).

### 1 pH の影響

クロロゲン酸酸化活性および天然基質とクロロゲン酸の褐変反応に及ぼす pH の影響を調べ、結果を Fig. 33 に示した。酸化活性の最適 pH 値および褐変反応の最大速度を示す pH 値はいずれも 7.2 付近にあり、pH5 以下の酸性側および pH9 以上のアルカリ側では酸化活性および褐変反応ともほとんど認められなかった。

このように、本酵素が中性ないし微アルカリ側に最適 pH 値を有することはモモ等<sup>13-22)</sup>、他の植物のポリフェノール酸化酵素の多くが pH4~6 の酸性側に最適値を有することと比べて特徴的である。

つぎに、酵素液を pH3~11 の緩衝液 (McIlvaine : pH3~8, Atkins and Pantin : pH9~11) で、それぞれ 2 倍に希釈し、4℃に20時間放置後、10倍量の 0.1M リン酸緩衝液により pH を 6.8 に調整して残存する酵素活性および処理酵素液による天然基質およびクロロゲン酸の褐変反応について調べた。Fig. 34 で明らかなように、本酵素は pH5~8 の範囲で安定であり、天然基質およびクロロゲン酸の褐変反応もこの範囲で一定値 (最高値) を示した。

### 2 加熱の影響

本酵素液を 40~80℃の各温度で 5 分間処理し、残存する酵素活性を pH6.8, 30℃で測定した。また、処理酵素液による天然基質およびクロロゲン酸の褐変反応についても調べた。それらの結果は無処理の場合を 100 とする相対値で表わし、Fig. 35 に示した。

本酵素は 50℃の加熱処理においては 90% 程度の残存活性を示したが、それより高い温度では残存活性は急激に低

推察した。

そこで、本節ではこの推察が正しいかどうかを確かめるために、部分精製酵素のクロロゲン酸酸化活性およびそれによる天然基質溶液とクロロゲン酸の褐変反応について検討した。

### 2-2 実験方法

#### 1 酵素液

前節において調製した部分精製酵素を使用した。

#### 2 酸化活性および褐変度の測定

クロロゲン酸酸化酵素活性は第 2 章第 2 節と同様に検圧法により測定した。また、天然基質溶液およびクロロゲン酸の褐変度は前節の方法により測定した。

### 2-3 結果および考察

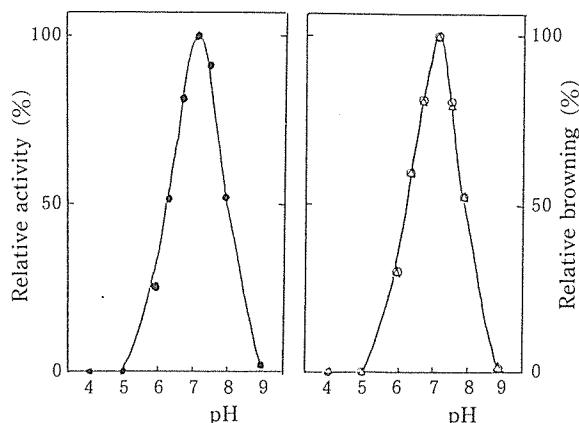


Fig. 33 Effect of pH on chlorogenic acid oxidase activity and the browning reaction of NS and chlorogenic acid.

—●— chlorogenic acid oxidase activity,  
—△— browning of NS,  
—○— browning of chlorogenic acid.

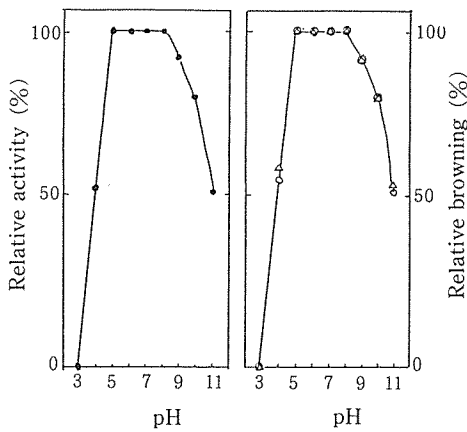


Fig. 34 Chlorogenic acid oxidase activity and browning reactions of NS and chlorogenic acid with the enzyme kept under various pH.

●— chlorogenic acid oxidase activity,  
 △— browning of NS,  
 ○— browning of chlorogenic acid.

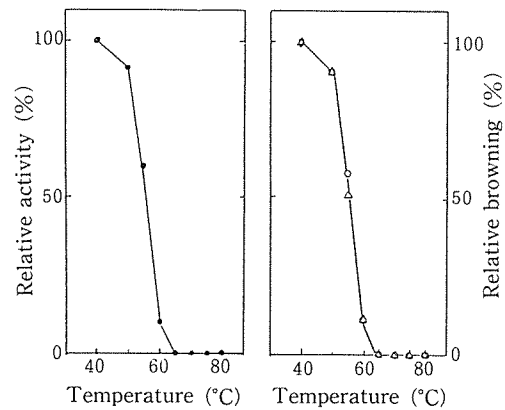


Fig. 35 Chlorogenic acid oxidase activity and browning reactions of NS and chlorogenic acid by the enzyme treated with various temperature.

●— chlorogenic acid oxidase activity,  
 △— browning of NS,  
 ○— browning of chlorogenic acid.

下し、65°Cの加熱処理によりほぼ完全に失活した。天然基質溶液およびクロロゲン酸の褐変反応についても55°C以上の高温において加熱の影響が顕著に表われ、65°Cの加熱処理酵素による反応液の褐変はまったく認められなかった。

このように、本酵素は加熱処理に対して不安定であり、モモ<sup>48)</sup>、アボカド<sup>55)</sup>、ナシ<sup>89)</sup>等の果実の酵素が70~80°Cの各温度でかなり高い残存活性を有するのに比べ、やや熱安定性の低い酵素であるといえよう。

### 3 種々の化合物の影響

阻害剤等、種々の化合物を終濃度、 $5 \times 10^{-4}$ Mとなるように反応系に添加し、それらのクロロゲン酸酸化酵素活性および天然基質溶液とクロロゲン酸の褐変反応について調べた。結果は無添加の場合を100とする相対値で表した。

Table 7 から明らかなように、本酵素活性はシアン化カリウムおよびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによって強く阻害され、天然基質溶液およびクロロゲン酸の褐変反応もこれらによって抑制された。また、L-アスコルビン酸およびチオ尿素によっても酵素活性は阻害され、両者の褐変反応は抑制された。金属イオンの影響については $Zn^{2+}$ が酵素活性および褐変反応を阻害し、抑制する傾向を示した。

Table 7 Effect of various compounds on oxidation and browning of chlorogenic acid and browning of natural substrate.

	Relative activity (%)	Browning (%)	
		N. S.	Chl.
Control	100	100	100
KCN	0	5	5
Sodium diethyldithiocarbamate	48	29	32
EDTA	94	88	93
Thiourea	88	57	72
L-ascorbic acid	72	49	68
MnCl <sub>2</sub>	100	103	100
CoCl <sub>2</sub>	100	95	123
MgSO <sub>4</sub>	100	95	100
ZnSO <sub>4</sub>	71	66	72

(Final concentration,  $5 \times 10^{-4}$ M)

このように、酵素活性および両者の褐変反応に及ぼす阻害剤等の影響にもきわめて高い類似性が認められた。また、茶葉等<sup>15,97)</sup>の精製ポリフェノール酸化酵素は緑色あるいは青色を呈し、活性中心に銅を含んでいること、酵素活性はシアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム等によって強く阻害されること、さらに、これら酵素は *o*-ジフェノール類を特異的に酸化することが報告されている。本実験においては未だ部分精製の段階であるので、酵素標品に含まれる金属については未検討であるが、本酵素液が緑色を呈すること、*o*-ジフェノールであるクロロゲン酸を強く酸化することおよびシアン化カリウム等により強く阻害されることから、本酵素は活性中心に金属(銅)を含む一種の *o*-ジフェノール酸化酵素であろうと推定される。

以上のように、クロロゲン酸酸化酵素活性および天然基質溶液とクロロゲン酸の褐変反応に及ぼす pH, 加熱, 種々の化合物等の影響がきわめて類似すること、さらに、前節で明らかにしたように天然基質溶液およびクロロゲン酸による酵素タンパク質の着色部位がほぼ一致することなどから、天然基質溶液の酸化および褐変反応は主としてこのクロロゲン酸酸化酵素により促進されるものと考えられる。また、前章においては、天然基質溶液が多量のクロロゲン酸同族体を含んでいることを明らかにした。したがって、このクロロゲン酸酸化酵素系が温州ミカン幼果の顕著な褐変反応の主反応系であろうと考えられる。

### 第3節 ピロガロール酸化酵素系

#### 3-1 緒 言

第2章で明らかにしたように、幼果の粗酵素液はピロガロールを強く酸化する。さらに、第1節の部分精製酵素標品もかなり強いピロガロール酸化活性を示した。このようなピロガロール酸化酵素活性はブドウ<sup>37)</sup>、モモ<sup>48)</sup>などの果実でも認められているが、これらにおいてはいずれもカテコール等の *o*-ジフェノラーゼ活性に比べて、この酵素活性は著しく低く、幼果酵素のような高いピロガロール酸化活性については未だ報告されておらず、その本体は不明である。そこで、本節では温州ミカン幼果よりピロガロール酸化酵素の分離、精製を試み、精製酵素の性質および反応機構について検討した。

#### 3-2 実験方法

タンパク質の定量、ディスク電気泳動、分子量の測定はいずれも本章第1節と同様に行った。酵素活性は第2章第2節と同様に検圧法により酸素吸収量を測定し、タンパク質mg当り、毎分吸収される酸素量が  $1 \mu\text{l}$  のときを1単位として表示した。また、クロマトグラフィーの際には褐変度の測定により求め、酵素液ml当り、毎分420nmにおける吸光度を0.01増加させるときを1単位とした。

#### 3-3 結果および考察

##### 1 ピロガロール酸化酵素の精製

第3章第2節と同様に温州ミカン幼果より酵素タンパクを抽出し、硫酸アンモニウム分画を行った。得られた沈殿画分を少量の0.05Mクエン酸緩衝液(pH6.0)に溶解し、同一緩衝液に24時間透析して粗酵素液を得た。

粗酵素液を0.05Mクエン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したDEAE-セルロースカラム(3.8×20 cm)に添加し、同一緩衝液を流下したところ、Fig. 36に示したように、本酵素活性を示す大部分のタンパク質はこのカラムに吸着されずに素通りした。この活性画分を集め、メンブランフィルターにより約 $\frac{1}{3}$ に濃縮後、0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)に対して24時間透析した。

透析内液を0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したCM-セファデックスC-50カラム



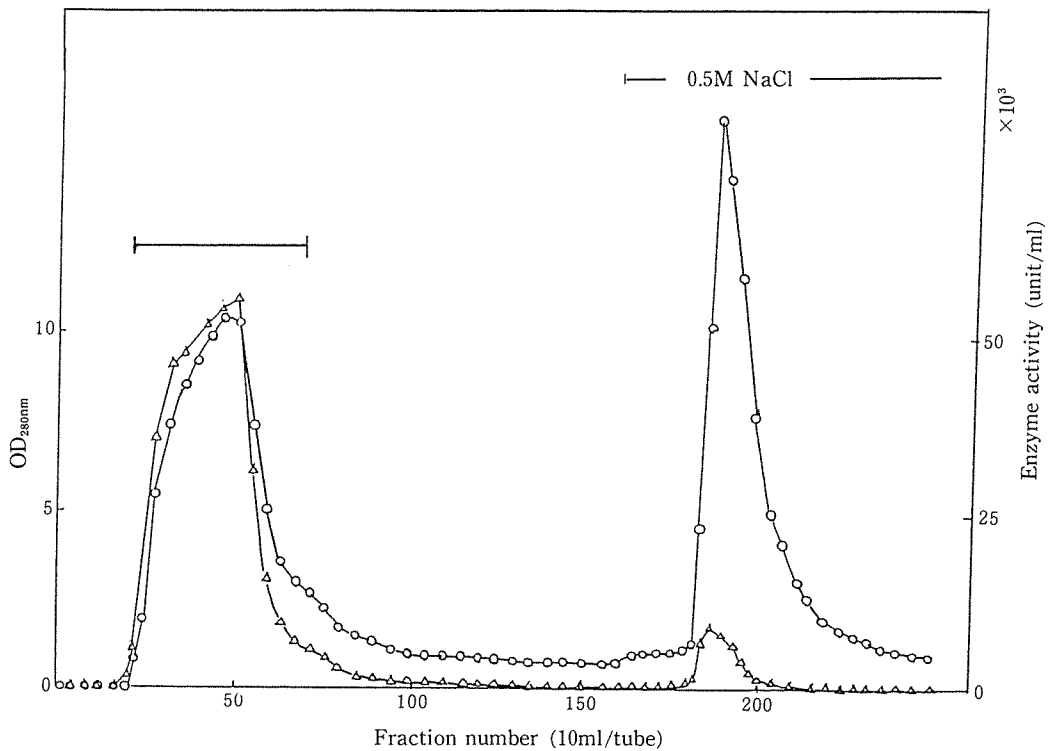


Fig. 36 Column chromatography of the enzyme on DEAE-cellulose.  
 $\Delta$ — enzyme activity,  $\circ$ —  $OD_{280nm}$ , — fraction pooled.

(2.0×40cm) に添加し、同一緩衝液で洗浄後、0.2M, 0.3M および 0.5M の塩化ナトリウムを含む同一緩衝液により段階的に溶出した。本酵素活性を含むタンパク質は 0.2M の塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出されたので、活性画分を集め、メンブランフィルターで濃縮した。

濃縮液を 0.2M 塩化ナトリウムを含む 0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したセファデックス G-100 カラム (2.2×80cm) に添加後、同一緩衝液により 10ml/hr の流速で溶出し、5 ml ずつ分取した。その結果、45～56 フラクションに本酵素活性が認められたので、活性画分を集め、メンブランフィルターにより濃縮後、同一の条件で再ゲル濾過を行った。Fig. 37 から明らかなように、本酵素は単一ピークとして溶出されたので、この画分を集め酵素標品とした。

この精製過程の各段階における酵素活性等を調べた結果が Table 8 である。最終段階において本酵素は約 110 倍に精製された。

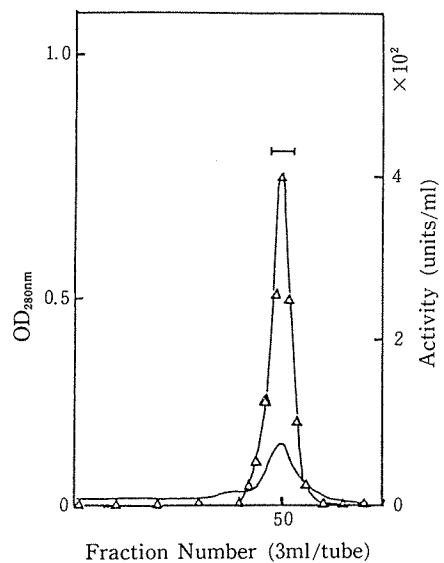


Fig. 37 Second gel filtration of pyrogallol oxidase B on Sephadex G-100.  
 $\Delta$ — enzyme activity, —  $OD_{280nm}$ , — fraction pooled.

Table 8 Purification of pyrogallol oxidase B.

	Volume (ml)	Protein (mg)	Total Activity (unit)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	970	23571	21340	0.91	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> saturation	276	4527	19044	4.01	4.4	89.2
DEAE-cellulose	403	1604	13823	8.62	9.5	64.8
CM-Sephadex C-50	204	82	3570	43.8	48.1	16.7
Sephadex G-100	125	13.5	1338	99.1	108.9	6.3
Sephadex G-100	69	4.8	483	101.1	111.5	2.3

## 2 酵素の均一性および分子量

本酵素標品の均一性を調べるためにディスク電気泳動を行った結果が Fig. 38 である。本酵素は単一バンドを示し、ディスク電気泳動的に均一であることが認められた。

また、ゲル濾過法により本酵素の分子量の測定を行った。Fig. 39 の結果から、本酵素の推定分子量は約 59,000 と算出された。

## 3 種々のポリフェノール化合物の酸化

本酵素標品は Fig. 40 に示したように、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼン型のピロガロールおよび没食子酸を強く酸化したが、クロロゲン酸酸化活性は認められず、フロログルシノールや他の *o*-, *m*-および *p*-ジフェノール類は酸化しなかった。ピロガロールおよび没食子酸はサトイモ、モモ等<sup>41-43,55,63,90)</sup>のような他の植物酵素によっても酸化されるが、これら酵素はいずれもクロロゲン酸やカテコールに対する酸化活性がピロガロール酸化活性に比べて著しく強いようであり、ミカンの本酵素のようにピロガロール酸化活性のみを有し、ジフェノール類を酸化しない酵素に関してはまったく報告をみない。したがって、本酵素は 1, 2, 3-トリヒドロ

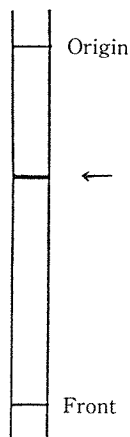


Fig. 38 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of pyrogallol oxidase B.  
An arrow indicates the position of the enzyme.

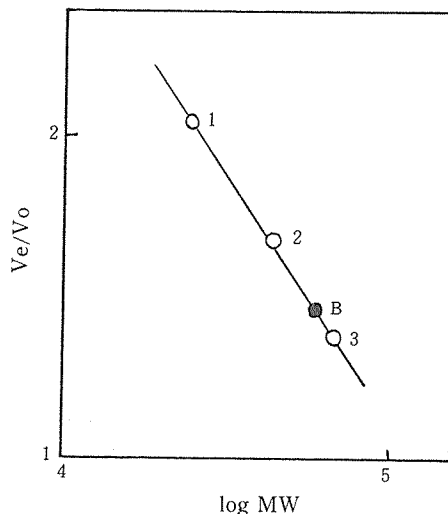


Fig. 39 Molecular weight estimation of pyrogallol oxidase B by the gel filtration on Sephadex G-100.

1) cymotrypsinogen A,  
2) ovalbumin, 3) albumin (bovine)  
B) pyrogallol oxidase B.

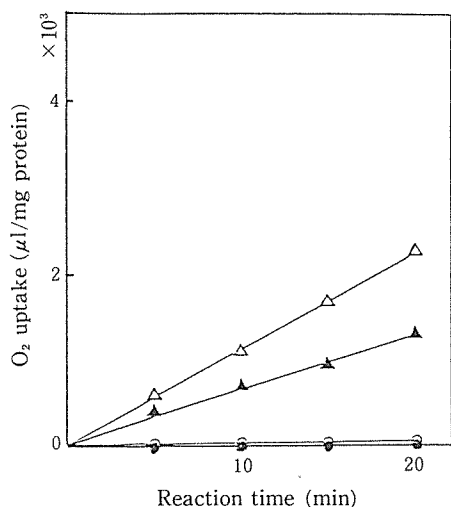


Fig. 40 Oxidation of various polyphenols by pyrogallol oxidase B.

—△— pyrogallol, —▲— gallic acid,  
—○— phloroglucinol, —●— chlorogenic  
acid, catechol, DL-dopa, hydroquinone and  
resorcinol.

キシベンゼン類に特異的な新しい型のポリフェノール酸化酵素であると考える。

これまで、ポリフェノール酸化酵素は *o*-ジフェノール類およびその関連化合物を供与体とし、酸素を受容体とすることから、

系統名：*o*-diphenol : oxygen oxidoreductase

常用名：*o*-diphenol oxidase

と命名されている。この命名法にしたがうと本節で精製した酵素は

系統名：1, 2, 3-trihydroxybenzen : oxygen oxidoreductase

常用名：Pyrogallol oxidase

と命名できると考える。

このように、ピロガロール酸化酵素の大部分は DEAE-セルロースに吸着せず、塩基性の画分に存在し、この酵素はピロガロール類のみを酸化することが認められた。

一方、本章第1節の部分精製酵素（この酵素は DEAE-セルロースに吸着し、CM-セファデックス C-50に吸着しないことから酸性画分に存在すると考えられる）にもかなり強いピロガロール酸化活性がみられたが、この酵素は DL-ドーパをも酸化することから、本節の精製酵素とはやや性質を異にすると考えられる。そこで、塩基性画分の酵素をピロガロール酸化酵素 B、酸性画分の酵素をピロガロール酸化酵素 A として、ピロガロールに対する Michaelis 定数 ( $K_m$ ) を測定した。すなわち、種々の濃度のピロガロールに酵素を作用させ、基質濃度と反応初速度との関係を調べ、Lineweaver-Burk の方法により作図した。それらの結果が Fig. 41 であり、これより酵素 B の  $K_m$  値は 7.1mM、また、酵素 A のそれは 0.97mM と求められた。

以上のように、両酵素の基質特異性や  $K_m$  値が相違することから、ピロガロールの酸化には 2 つの異なった酵素系が存在し、それぞれ性質を異にすることが推察される。

#### 4 ピロガロール酸化酵素系に及ぼす種々の因子の影響

前記の点を確認するために、ピロガロール酸化酵素 A および B の性質ならびに両酵素の反応系に及ぼす pH 等種々の因子の影響について検討した。

##### (1) pH の影響

Fig. 42 から明らかなように、両酵素活性に及

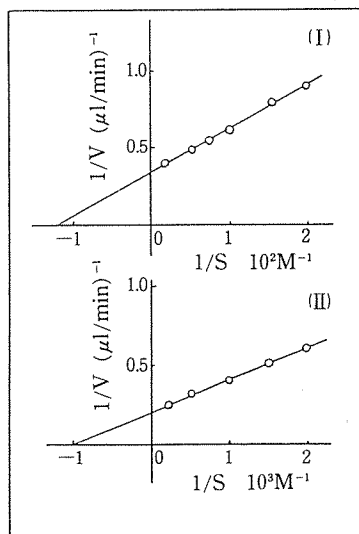


Fig. 41 Lineweaver-Burk plots of pyrogallol oxidation by pyrogallol oxidase A and B.

I) pyrogallol oxidase B,  
II) pyrogallol oxidase A.

ばす pH の影響はほぼ一致し、両酵素の最適 pH は 7.2 付近に認められた。このような酵素活性に及ぼす pH の影響は前節のクロロゲン酸酸化酵素の場合ときわめて類似した。

つぎに、両酵素の安定性に及ぼす pH の影響を前節と同様にして測定した。Fig. 43 に示すように、酵素 B は pH6 以上では安定であったが、pH5 以下の酸性側においては不安定であり、pH3 ではほぼ完全に失活した。これに対して、酵素 A は pH5~9 の範囲で安定であり、酵素 B と比べて pH5 以下の酸性側での安定性がやや高いことが示された。

## (2) 加熱の影響

酵素液を 40~100°C の各温度で 5 分間処理し、残存する酵素活性を pH6.8, 30°C にて測定した。結果は無処理の場合を 100 とした相対値で表わし、Fig. 44 に示した。

ピロガロール酸化酵素 B は 100°C の加熱処理においても 70% 程度の残存活性を示し、加熱処理に対してかなり安定であるのと比べ、酵素 A は 70°C の加熱処理によりほぼ完全に失活した。すなわち、ピロガロール酸化酵素 B は他の植物酵素<sup>48,55,89)</sup>が 80°C, 5 分間の処理によりほぼ完全に失活するのと比べてもかなり高い熱安定性を有するといえよう。

## (3) 種々の化合物の影響

阻害剤等、種々の化合物を終濃度  $5 \times 10^{-4}M$  となるように反応系に添加し、両酵素によるピロガロールの酸化反応に及ぼす影響を調べた結果が Table 9 である。両酵素反応ともシアン化

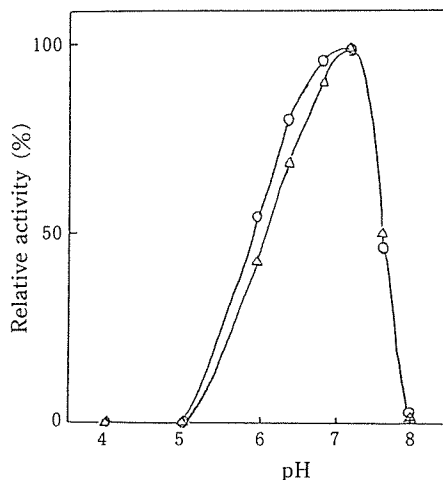


Fig. 42 Effect of pH on the activities of pyrogallol oxidase A and B.

—○— pyrogallol oxidase A,  
—△— pyrogallol oxidase B.

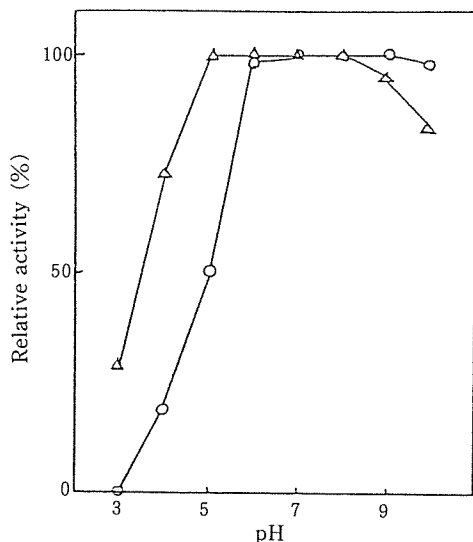


Fig. 43 Effect of pH on the stability of pyrogallol oxidase A and B.

—○— pyrogallol oxidase A,  
—△— pyrogallol oxidase B.

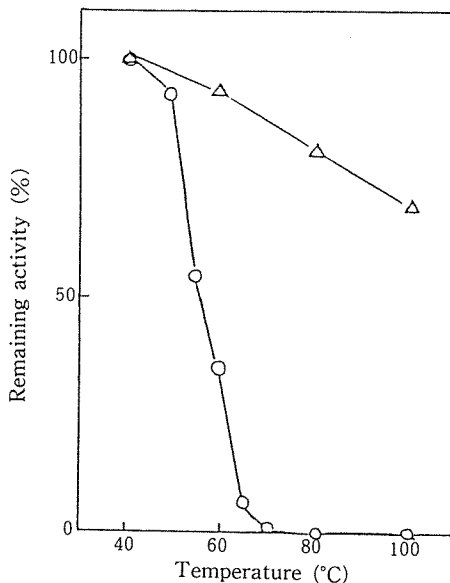


Fig. 44 Thermal stability of pyrogallol oxidase A and B.

—○— pyrogallol oxidase A,  
—△— pyrogallol oxidase B.

Table 9 Effect of various compounds on the enzyme activities.

	Relative activity (%)	
	PyO A	PyO B
Control	100	100
KCN	48	0
Sodium diethyldithiocarbamate	104	0
Thiourea	100	82
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	41	45
L-ascorbic acid	115	0
CoCl <sub>2</sub>	108	147
MnCl <sub>2</sub>	155	97
ZnSO <sub>4</sub>	68	56
MgSO <sub>4</sub>	104	104

(Final concentration,  $5 \times 10^{-4}M$ ) PyO : pyrogallol oxidase

カリウムにより阻害されたが、その阻害の程度は酵素Bに対する方が酵素Aに対するよりもやや高かった。また、酵素Bを顕著に阻害したジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムやL-アスコルビン酸は酵素Aに対してはほとんど影響を及ぼさなかった。さらに、金属イオンの影響もやや相違した。すなわち、両酵素反応とも  $Zn^{2+}$  による阻害は認められたが、 $Co^{2+}$  は酵素Bのみを、 $Mn^{2+}$  は酵素Aのみをそれぞれ賦活化するようであった。

このように、ピロガロール酸化酵素AおよびBの基質特異性、両酵素の活性に及ぼすpH、加熱、種々の化合物の影響等にはかなりの相違が認められたことから、温州ミカン幼果には2種類のピロガロール酸化酵素系が存在することが明らかとなった。しかしながら、前章においてはこれら酵素の基質となるポリフェノール化合物の確認はできなかった。したがって、この酵素系の幼果の褐変反応への関与は否定はできないが、もし、関与するとしても前節のクロロゲン酸酸化酵素系と比べるとその割合は著しく低いものと考えられる。

#### 第4節 小 括

温州ミカンの褐変系としてクロロゲン酸酸化酵素系、2種のピロガロール酸化酵素（AおよびB）系の存在を認め、それぞれの酵素を分別した。

クロロゲン酸酸化酵素はクロロゲン酸およびその同族体を強く酸化し、ピロガロール酸化酵素A（酸性画分）はピロガロールとともにDL-ドーパをも酸化した。しかし、ピロガロール酸化酵素B（塩基性画分）はピロガロール類のみを酸化し、*o*-ジフェノール類は酸化しなかった。

これら3つの酵素系の最適pHはいずれも7.2付近の微アルカリ側に認められた。クロロゲン酸酸化酵素およびピロガロール酸化酵素Aはやや熱に不安定で65～70℃、5分間の加熱処理によりほぼ完全に失活した。一方、ピロガロール酸化酵素Bは100℃、5分間の加熱処理においても70%程度の残存活性を示し、加熱に対してかなり安定であることが認められた。

これら3酵素の活性に及ぼす種々の化合物、とくに金属イオンの影響にはやや相違がみられるが、いずれもシアン化カリウムにより顕著に阻害された。

また、クロロゲン酸および天然基質溶液の褐変反応に及ぼすpH、加熱および種々の化合物の影響はきわめて類似することが認められた。

## 第5章 温州ミカン幼果およびカブのフロログルシノール 酸化酵素系の比較

第2章および第3章で明らかにしたように、温州ミカン幼果の粗酵素液はフロログルシノールをきわめて強く酸化し、その基質であるフロログルシノールは配糖体(フロリン)として存在する。しかし、フロログルシノールの褐変度はクロロゲン酸、ピロガロール等に比べて著しく低く、また、フロリンはミカン酵素によりほとんど酸化されないことから、幼果の顕著な褐変反応に果たすこのフロログルシノール酸化酵素系の役割はきわめて小さいものと推定される。しかしながら、フロログルシノール酸化酵素およびフロリンがカンキツ類全般にわたって存在することから、この酵素系の生理的役割については興味を持たれる。一方、フロログルシノール酸化酵素はほかの二、三の植物<sup>91-94)</sup>で見出されているが、これらを分離してその性質を明らかにした報告はみられず、また、キャベツ<sup>91)</sup>や西洋ワサビ(ワサビダイコン)<sup>94)</sup>の酵素はペルオキシダーゼであるといわれている。さらに、最近、トマトなど<sup>45,90,95)</sup>において本来ペルオキシダーゼとみなされる酵素がポリフェノール酸化酵素活性をも有するという報告もなされてきた。したがって、ミカン酵素の場合も両活性を同時に有する可能性が考えられる。しかしながら、これら研究の多くは粗酵素あるいは部分精製酵素のレベルで行われたものであるもので、はたしてそれがそうなのか疑問が残る。また、そのペルオキシダーゼの性質についても必ずしも明確にされたとはいえない。

そこで、本章においては、まず、温州ミカン幼果よりフロログルシノール酸化酵素を分別、精製し、精製酵素の性質およびペルオキシダーゼとの関係を調べた。さらに、キャベツ等のアブラナ科植物においてもトマト酵素と同様な関係があるのかどうかを追究した。

### 第1節 フロログルシノール酸化酵素活性の測定法の検討

#### 1-1 緒言

ポリフェノール酸化酵素活性の測定には検圧法、酸素電極法、比色法等が用いられているが、酵素の精製にあたっては一般に操作が比較的簡単で多量の試料の測定が容易な比色法が使用されている。しかしながら、第2章で明らかにしたように、ミカン酵素によるフロログルシノールの反応液の褐変度はきわめて低いので、このフロログルシノール酸化酵素を精製するにあたって、まず、比色法にかわる酵素活性の測定法について検討した。

#### 1-2 実験方法

酵素吸収量は第2章第2節の方法に準じて検圧法により測定した。すなわち、ワールブルグ検圧計の主室に酵素液0.2mlおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)1.3ml、側室に $2 \times 10^{-2}$ Mのフロログルシノール溶液0.5mlおよび副室に20%水酸化カリウム溶液0.1mlを入れ、30°Cで15分間振盪後、側室の基質溶液を主室に移し、経時的に酸素吸収量を測定した。

また、紫外部(272nm)における吸光度はフロログルシノール溶液( $2 \times 10^{-2}$ M)0.5mlおよび0.1Mリン酸緩衝液(pH6.8)1.3mlに酵素液を0.2ml添加し、30°Cで一定時間反応させた後、ただちに反応液の0.5mlをとり、これに5mlの水を加え、液長10mmの石英セルにて測定した。

#### 1-3 結果および考察

フロログルシノール酸化系はFig. 11(第3章)に明示したように反応を通じて272nmに吸収のピークを示し、その波長における吸光度は反応時間に比例して増大する。一定時間反応後と反応前の吸光度の増加量( $\Delta E_{272nm}$ )は同一反応系で測定した酸素吸収量とFig. 45に示すような

高い相関を示した。したがって  $\Delta E_{272nm}$  はフロログシノールの酸化反応を十分反映するものと考えられる。

また、 $\Delta E_{272nm}$  の測定は検圧法と比べて、容易でかつ多数の試料の測定が可能である。そこで、フロログシノール酸化酵素の精製の際にはこの分光学的方法を使用した。すなわち、前記条件で10分間反応させ、 $\Delta E_{272nm}$  を測定し、これより酵素液  $ml$  当り、毎分の  $\Delta E_{272nm}$ , 0.1 を1単位として酵素活性を表した。

## 第2節 温州ミカン幼果のフロログシノール酸化酵素系

### 2-1 結 言

前章において分別した酵素標品ではフロログシノール酸化活性は粗酵素液と比べて著しく低い、あるいはほとんど認められないことから、幼果にはこれら酵素とは別の画分に強いフロログシノール酸化酵素活性が存在するものと考えられる。本節では、温州ミカン幼果よりフロログシノール酸化酵素を分別、精製し、

精製酵素の性質を調べた。

### 2-2 実験方法

第4章第1節と同様にしてタンパク質の定量、ディスク電気泳動および分子量の測定を行った。

フロログシノール酸化酵素活性は検圧法により測定した。また、クロマトグラフィーの際には前節の分光学的方法を使用した。

酵素標品に含まれる金属の分析は原子吸光分析により行った。すなわち、原子吸光分光光度計 (Perkin-Elmer 303 型) を用い、鉄は  $2480 \text{ \AA}$ 、銅は  $3250 \text{ \AA}$  において測定した。

吸収スペクトルは自記分光光度計 (日立製作所 124 型) により記録させた。

### 2-3 実験結果

#### 1 酵素の分別、精製

前節の分光学的方法により酵素活性を測定し、酵素の精製を行った。本酵素活性を示すタンパク質の大部分は CM-セファデックス C-50 カラムクロマトグラフィー (Step wise) の段階までは第4章第3節のピロガロール酸化酵素 B と同一の画分に存在した。そこで、この画分を集め、0.02M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析脱塩後、この緩衝液で平衡化した CM-セファデックス C-50 カラム ( $2 \times 40 \text{ cm}$ ) に添加し、0~0.5M の塩化ナトリウムを含む同一緩衝液によりグラジエント溶出を行った。その結果 Fig. 46 に示したように、本酵素活性は 0.2~0.3M の塩化ナトリウムを含む緩衝液で溶出される画分に認められた。そこで、この活性画分を集め、第4章第1節と同じ条件により、セファデックス G-100 ゲル濾過および再ゲル濾過を行った。その結果、Fig. 47 に示すように酵素活性は単一のピークとして溶出したので、この画分を集め、フロログシノール酸化酵素標品とした。

この酵素の精製の各段階における酵素活性、タンパク質量等を測定した結果が Table 10 である。本酵素は最終的に 2,400 倍に精製されたが、その精製過程において DEAE-セルロースクロ

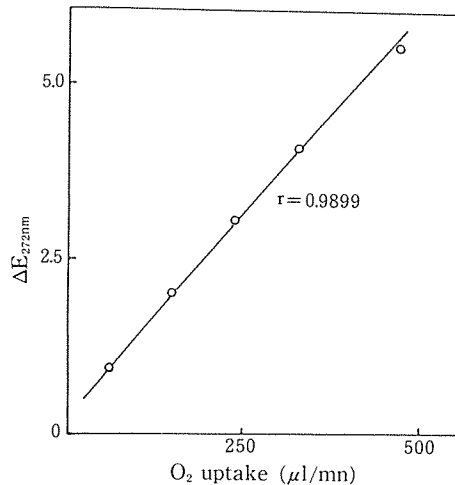


Fig. 45 Correlation between oxygen uptake and  $\Delta E_{272nm}$  during phloroglucinol oxidation by phloroglucinol oxidase.

マトグラフィー後の全活性の著しい増大が認められた。これは酵素タンパク質と結合状態にあった阻害物質がこのカラムに吸着され、除去されたためであると考えられる。

## 2 酵素の均一性、分子量、吸収スペクトル

本酵素標品の均一性を確かめるためにディスク電気泳動を行った。本酵素は Fig. 48 に示したように、単一バンドを示し、電気泳動的に均一であった。

つぎに、セファデックス G-100 を用いるゲル濾過法により分子量の測定を行った結果を Fig. 49 に示した。これより本酵素の分子量は約 27,000 と求められた。

また、本酵素液は赤褐色を呈し、その吸収スペクトルにおいては Fig. 50 のように、275nm,

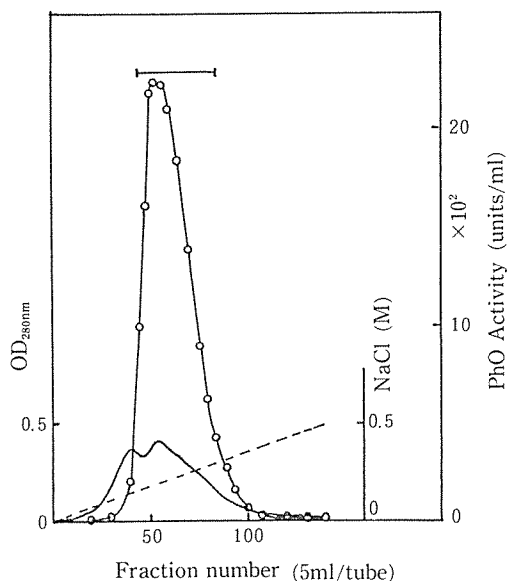


Fig. 46 Second column chromatography on CM-Sephadex C-50.

— OD<sub>280nm</sub>,  
 ..... NaCl concentration,  
 ○— enzyme activity,  
 ┐ fraction pooled.

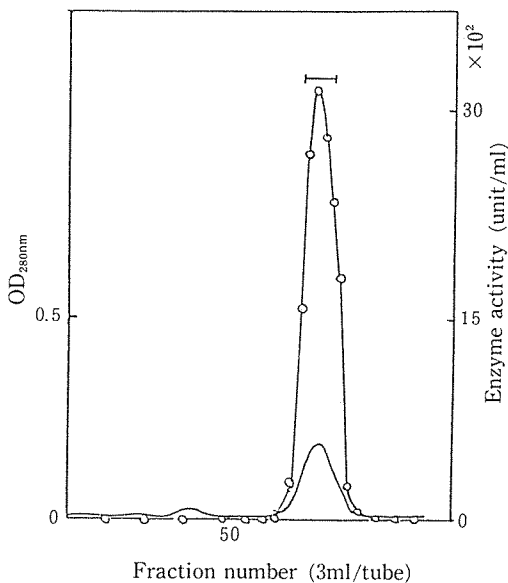


Fig. 47 Second gel filtration of phloroglucinol oxidase on Sephadex G-100.

— OD<sub>280nm</sub>, ○— enzyme activity,  
 ┐ fraction pooled.

Table 10 Purification of phloroglucinol oxidase from satsuma mandarin fruits.

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
1. Original extract	47628	12936	0.27	1	100
2. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20-70% saturation	9482	10695	1.13	4.2	83
3. DEAE-cellulose	3220	59048	18.3	67.9	456
4. CM-Sephadex C-50					
1st (stepwise)	164	29462	180.2	667.4	228
2nd (gradient)	136	27972	205.6	761.5	220
5. Sephadex G-100					
1st	41.3	20201	489.4	1813	156
2nd	15.9	10478	656.1	2430	81



405nm, 500nm および630nm 付近に吸収の極大が認められた。原子吸光分析の結果、本酵素標品には0.5ppm程度の鉄が検出されたが、銅および他の金属の存在は確認できなかった。

### 3 種々のポリフェノール化合物の酸化

本酵素標品による種々のポリフェノール化合物の酸化反応について調べた結果が Fig. 51 である。本酵素は1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン型のフロログルシノールおよびフロログルシノールカルボン酸を速やかに酸化したが、ピロガロール等の1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼン類および*o*-, *m*-, および*p*-ジフェノール類は酸化しなかった。

フロログルシノールを基質としたときの基質濃度と反応速度との関係を Lineweaver-Burk の方法で作図した結果が Fig. 52 である。これより求めた本酵素のフロログルシノールに対する  $K_m$  値は0.67mM であった。

### 4 フロログルシノール酸化酵素系に及ぼす種々の因子の影響

#### (1) pH の影響

本酵素の活性に及ぼすpHの影響について調べた。Fig. 53に示したように本酵素の最適pHは7.6~8.0に認められた。

また、第4章第2節と同様にして本酵素のpH安定性を調べた。Fig. 54に示したように本酵素はpH6~9でほぼ安定であり、このようなpH安定性は前章のピロガロール酸化酵素Bのそれと類似した。

#### (2) 加熱の影響

本酵素液を40~100°Cの各温度で5分および30時間加熱処理し、その影響について検討した。

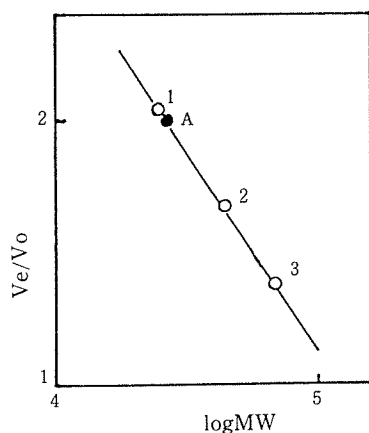


Fig. 49 Molecular weight estimation of phloroglucinol oxidase.

- 1) chymotrypsinogen A,  
2) ovalbumin, 3) albumin (bovine),  
A) phloroglucinol oxidase.

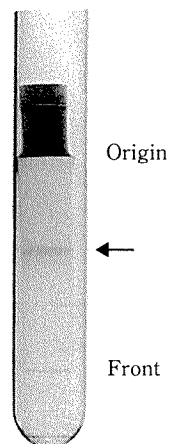


Fig. 48 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of the enzyme.  
An arrow indicates the position of the enzyme.

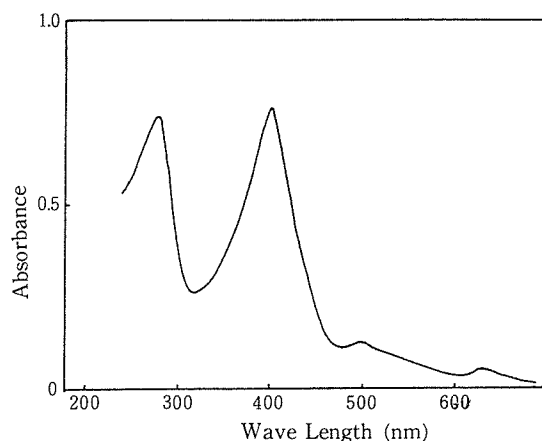


Fig. 50 Absorption spectrum of phloroglucinol oxidase.

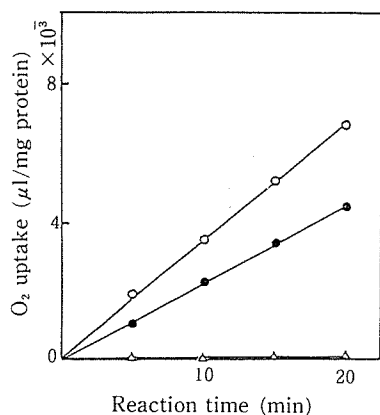


Fig. 51 Oxidation of various polyphenols by phloroglucinol oxidase.

○— phloroglucinol,  
●— phloroglucinolcarboxylic acid,  
△— pyrogallol, gallic acid, chlorogenic acid, catechol, DL-dopa and hydroquinone.

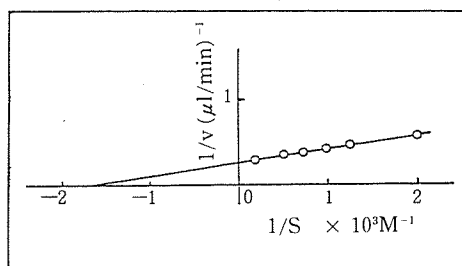


Fig. 52 Lineweaver-Burk plots of the phloroglucinol oxidation by the enzyme.

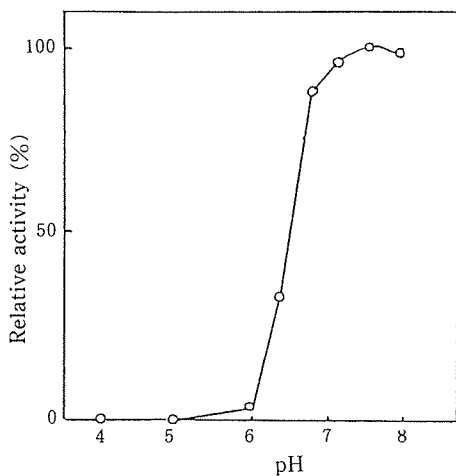


Fig. 53 Effect of pH on phloroglucinol oxidase activity.

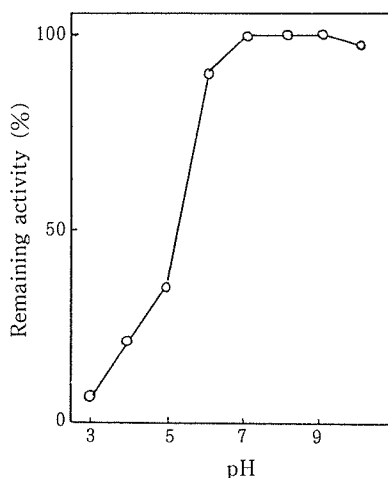


Fig. 54 Effect of pH on the stability of phloroglucinol oxidase.

Fig. 55から明らかなように、本酵素は100°C、30分間の加熱処理でもなお30%程度の残存活性を示し、熱安定性はきわめて高かった。この熱安定性は前章のピロガロール酸化酵素Bよりも著しく高いものであり、このように、本酵素がきわめて高い熱安定性を有することは本酵素の特徴の一つであるといえよう。

### (3) 種々の化合物の影響

反応系に終濃度  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  となるように種々の化合物を添加し、本酵素活性に及ぼす影響を調べた結果がTable 11である。本酵素はシアン化カリウム、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムによって著しく阻害された。さらにフェリシアン化カリウムおよびL-アスコルビン酸によっても顕著な阻害をうけた。

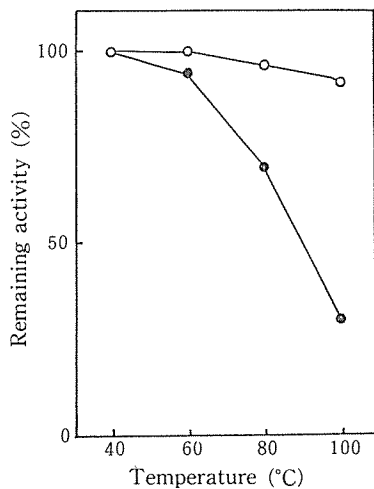


Fig. 55 Effect of temperature on the stability of phloroglucinol oxidase.

—○— 5min, —●— 30min.

Table 11 Effect of various compounds on phloroglucinol oxidase activity.

Compounds*	Relative activity (%)
None	100
Potassium cyanide	10
Sodium diethyldithiocarbamate	0
Potassium ferricyanide	0
Thiourea	98
Sodium fluoride	98
L-ascorbic acid	0
MnCl <sub>2</sub>	453
CoCl <sub>2</sub>	81
CuSO <sub>4</sub>	0
FeSO <sub>4</sub>	123
NiCl <sub>2</sub>	70
MgSO <sub>4</sub>	102
ZnCl <sub>2</sub>	83

(\*Final concentration,  $5 \times 10^{-4}$ M)

金属イオンの影響では、本酵素活性は $Mn^{2+}$ により著しく、 $Fe^{2+}$ によってやや賦活化されたが、逆に、 $Cu^{2+}$ によりほぼ完全に、 $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ によってもやや阻害された。このような金属イオンの影響は前章のクロロゲン酸酸化酵素やピロガロール酸化酵素AおよびBの場合とはかなり相違した。

#### 2-4 考 察

温州ミカン幼果よりフロログルシノール酸化酵素を約2,400倍に精製し、ディスク電気泳動的に均一な酵素標品を得た (Fig. 47~49, Table 10)。その溶液は赤褐色を呈し、275nm, 405nm, 500nm および630nm 付近に吸収極大を示した (Fig. 51)。このような酵素液の色調および吸収スペクトルは、他の植物のポリフェノール酸化酵素とはかなり相違し、むしろ、西洋ワサビなどのペルオキシダーゼと類似するように思われる<sup>96~99)</sup>。すなわち、Takeo および Baker<sup>97)</sup> は茶葉の精製ポリフェノール酸化酵素の溶液が黄緑あるいは緑色を呈し、 $Cu^+$ に由来する605nm と  $Cu^{2+}$ に由来する407.5nm に吸収極大を有することを、また Gregory および Bendall<sup>15)</sup> も茶の茎のポリフェノール酸化酵素が279nm と611nm に吸収極大を有することを報告している。一方、Hosoya<sup>99)</sup> はカブのペルオキシダーゼの溶液が赤色を呈し、402~406nm, 492~499nm および635~643nm に主として鉄イオンに起因する吸収極大を認めている。さらに、Yamazaki および Piette<sup>98)</sup> も西洋ワサビのペルオキシダーゼについてカブ酵素と同様の結果を報告している。原子吸光分析の結果、ミカンの本酵素標品が鉄を含むことが認められたことから考えて、405nm および630nm 付近にみられた吸収極大は鉄イオンに起因するものと推定される。

本酵素は1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン類のみを特異的に酸化し、その最適pHは7.6~8の微アルカリ側に認められた (Fig. 53, 54)。前章のクロロゲン酸酸化酵素、ピロガロール酸化酵素AおよびBの最適pHは7.2付近であった。このようにカンキツのポリフェノール酸化酵素のいずれもが微アルカリ側に最適pH値を有することは、他の植物酵素の多くが酸性側にそれを有することと比べて、きわめて特徴的であるといえる。

さらに、本酵素は100°C, 30分間の加熱処理においてもなお30%程度の残存活性を示した (Fig. 55) が、この熱安定性は前章のピロガロール酸化酵素や他の植物酵素と比べて著しく高いもの

であり、この熱安定性もまた本酵素の特徴の一つとしてあげられる。

本酵素活性に及ぼす種々の化合物、とくに金属イオンの影響は前章の 3 種のポリフェノール酸化酵素および他の植物酵素に対するそれらとはかなりの相違を示した。すなわち、本酵素は  $Mn^{2+}$  によって著しく賦活化され、 $Cu^{2+}$  によっては逆にほぼ完全に阻害されたが、他の酵素ではこれら金属イオンの影響は比較的小さかった。

以上のように、フロログルシノール酸化酵素はこれまで報告されているポリフェノール酸化酵素および前章の酵素とは一般的性質がかなり相違する。また、本酵素がフロログルシノールおよびその誘導体であるフロログルシノールカルボン酸に対して特異的であることから、この酵素は次のように命名できるものとする。

系統名: 1, 3, 5-trihydroxybenzen : oxygen oxidoreductase

常用名: Phloroglucinol oxidase

### 第 3 節 幼果のフロログルシノール酸化酵素のペルオキシダーゼ活性

#### 3-1 緒 言

前節において精製したフロログルシノール酸化酵素の色調や吸収スペクトルは茶葉等<sup>15,96,97)</sup>とは異なり、西洋ワサビ<sup>98)</sup>やカブ<sup>99)</sup>のペルオキシダーゼのものと同様である。さらに、本酵素はこれらペルオキシダーゼと同様に金属として鉄を含むことから、本酵素はペルオキシダーゼ活性をも同時に有するのではないかと考えられる。そこで、本酵素のペルオキシダーゼ活性について調べ、フロログルシノール酸化酵素活性との関連について検討した。

#### 3-2 実験方法

前節で精製したフロログルシノール酸化酵素を使用し、フロログルシノール酸化活性は検圧法あるいは分光学的方法(クロマトグラフィーの場合)により測定した。

ペルオキシダーゼ活性はグアヤコールを基質とする比色法<sup>53)</sup>により測定した。すなわち、グアヤコール(終濃度  $10^{-3}M$ )を含む  $0.05M$  クエン酸緩衝液 (pH 5.0)  $4.6ml$  に  $0.1\%$  過酸化水素水  $0.2ml$  および酵素液  $0.2ml$  を添加し、 $30^{\circ}C$  で 5 分間反応させた後、ただちに  $470nm$  における吸光度を測定した。酵素活性は酵素液  $ml$  当り、1 分間の吸光度の増加量  $0.1$  を 1 単位として表わした。

#### 3-3 結果および考察

本酵素の種々の pH におけるペルオキシダーゼ活性について調べたところ、Fig. 56 に示すように、本酵素はペルオキシダーゼ活性を有することが認められ、その最適 pH は 5 付近に存在した。前節のフロログルシノール酸化酵素のそれは  $7.6$  付近の微アルカリ側であり、両酵素活性の最適 pH 値は著しく相違するようである。しかしながら、Fig. 57 から明らかなように、セファデックス G-100 クロマトグラフィーにおけるフロログルシノール酸化酵素およびペルオキシダーゼの両活性、タンパク質濃度 ( $OD_{280nm}$ ) および鉄イオン ( $OD_{405nm}$ )<sup>98,99)</sup> の溶出ピークの位置がよく一致することから、本酵素はゲル濾過的に均一であると考えられる。さらに、前節で明らかにしたように、本酵素はディスク電気泳動的にも均一であることから、同一酵素がフロログルシノール酸化活性とペルオキシダーゼの両活性を有するものと推定される。

つぎに、酵素の安定性に及ぼす pH の影響および加熱の影響について調べた。Fig. 58 から明らかなように、ペルオキシダーゼは pH 6~9 の範囲で安定であり、このような pH 安定性はフロログルシノール酸化酵素活性のそれとはやや相違した。また、Fig. 59 に示したように、ペルオキシダーゼは  $90^{\circ}C$ 、5 分間の加熱処理によりほぼ完全に失活し、フロログルシノール酸化酵素活性と比べて、熱安定性は著しく低いことが認められた。

さらに、前節において、フロログルシノール酸化活性に対して影響を与えた種々の化合物の

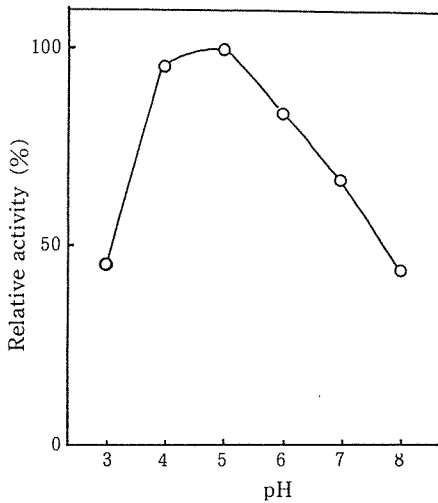


Fig. 56 Effect of pH on peroxidase activity of the enzyme.

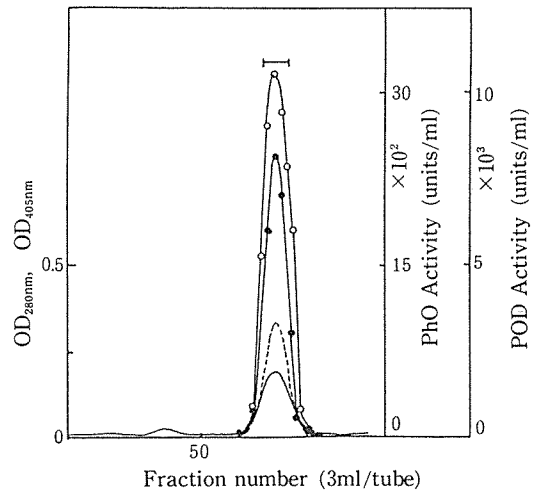


Fig. 57 Gel filtration of the enzyme on Sephadex G-100.

— OD<sub>280nm</sub>, ..... OD<sub>405nm</sub>,  
 ○— phloroglucinol oxidase (PhO) activity,  
 ●— peroxidase (POD) activity,  
 └— fraction pooled.

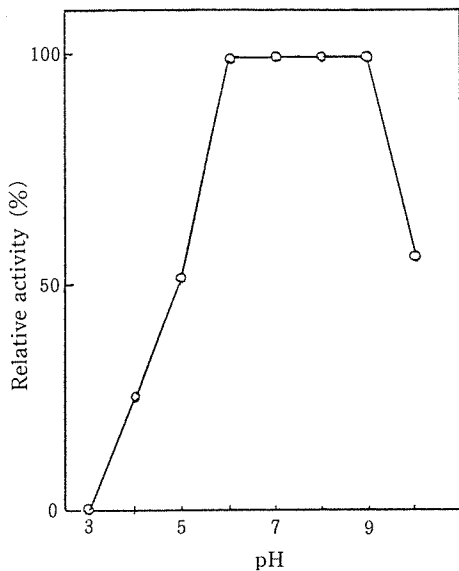


Fig. 58 Effect of pH on the stability of peroxidase activity of the enzyme.

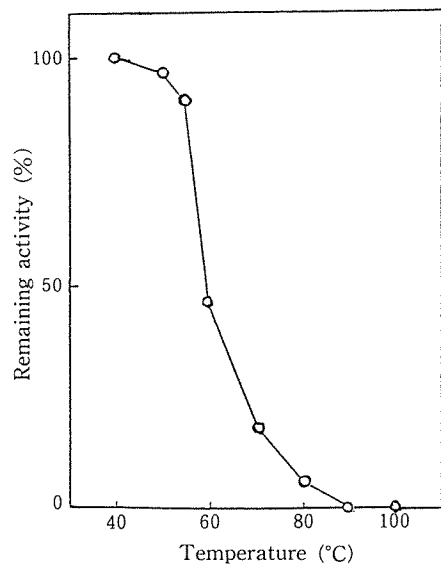


Fig. 59 Thermal stability of peroxidase activity of the enzyme.

ペルオキシダーゼ活性に及ぼす影響について検討した。すなわち、各化合物を終濃度  $5 \times 10^{-4}M$  となるように反応系に添加し、pH5.0, 30°Cで活性を測定した。Table 12 から明らかなように、ペルオキシダーゼ活性もシアン化カリウム、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムおよびL-アスコルビン酸により阻害されたが、それらの阻害効果はフロログルシノール酸化活性に対する場合よりもかなり低かった。

Table 12 Effect of various compounds on peroxidase activity.

Compounds	Relative activity (%)
None	100
Potassium cyanide	38
Sodium diethyldithiocarbamate	77
Potassium ferricyanide	98
Thiourea	95
Sodium fluoride	102
L-ascorbic acid	82
MnCl <sub>2</sub>	110
CuSO <sub>4</sub>	101
NiCl <sub>2</sub>	101
ZnCl <sub>2</sub>	101

また、金属イオンの影響については、 $Mn^{2+}$ がわずかに賦活化する傾向にあったが、その他の金属イオンの影響はほとんど認められなかった。

このように、前節においてフロログルシノール酸化酵素活性を顕著に賦活化した  $Mn^{2+}$  はペルオキシダーゼ活性に対してはわずかな賦活効果を示すに過ぎなかった。そこで、 $Mn^{2+}$  の存在下における基質濃度と反応速度との関係を調べた。Fig. 60 に示したように、 $Mn^{2+}$  はフロログルシノール酸化酵素活性に対しては見かけの  $K_m$  値を減少させ、 $V_{max}$  値を増加させたが、ペルオキシダーゼ活性に対しては  $K_m$  値のみを増加させ、両活性に対する  $Mn^{2+}$  の賦活化の様式は相違した。すなわち、 $Mn^{2+}$  はフロログルシノール酸化活性に対しては  $K_m$  値および  $V_{max}$  値の

両方を変化させるので、その触媒能力および基質選択能力を賦活化するものと考えられ、一方、ペルオキシダーゼ活性に対しては  $K_m$  値のみを変化させるので、その触媒能力のみを賦活化するものと考えられる。

以上のように、温州ミカン幼果のフロログルシノール酸化酵素はペルオキシダーゼ活性をも同時に有することが明らかとなった。しかし、両活性の最適 pH 値、両活性の安定性に及ぼす pH および加熱の影響、さらに、種々の化合物、とくに金属イオンの影響が著しく相違することから、両酵素活性の活性中心は異なる部位に存在するものと推察される。

#### 第4節 フロログルシノール酸化酵素系の阻害因子

##### 4-1 緒言

本章第2節において、温州ミカン幼果中にフロログルシノール酸化酵素の阻害物質が存在し、それが DEAE-セルロースにより吸着除去されることが考えられた。ハウレンソウ等の植

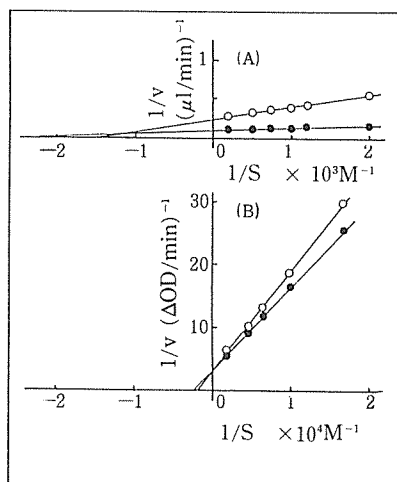


Fig. 60 Effect of manganese on phloroglucinol oxidase and peroxidase activities of the enzyme.

- absence of manganese,
- presence of manganese.
- (A) phloroglucinol oxidase activity,
- (B) peroxidase activity.

物<sup>24,106)</sup>においてはポリフェノール酸化酵素が $\alpha$ -クマル酸等のフェノール化合物によって阻害されることが報告されており、茶葉<sup>97)</sup>の酵素の精製に際してはその阻害因子であるフェノール化合物がDEAE-セルロースに吸着され、除去されることが知られている。また、第3章で明らかにしたように、温州ミカン果実にはフロリン、クロロゲン酸等のフェノール化合物がかなり多量に存在する。このようなことから、温州ミカンのフロログルシノール酸化酵素の阻害因子もフェノール化合物と関係があるのではないかと考えられる。一方、本章第2節ではフロログルシノール酸化酵素が $\text{Cu}^{2+}$ や $\text{Zn}^{2+}$ のような金属イオンによって著しく阻害されることを見出した。本節では幼果に含まれるフロログルシノール酸化酵素の阻害因子の本体について追究するとともに、これに関連して種々のポリフェノール試薬および金属イオンの本酵素に対する阻害反応について検討した。

#### 4-2 実験方法

フロログルシノール酸化酵素としては本章第2節で精製した酵素標品を使用した。

フロログルシノール酸化酵素活性は本章第1節に記した検圧法により測定し、試料液の活性阻害率は次式により算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{試料液添加の場合の酸素吸収量}}{\text{試料液無添加の場合の酸素吸収量}} \right) \times 100$$

#### 4-3 結果および考察

##### 1 DEAE-セルロースに吸着される阻害因子の分画と性質

本章第2節で酵素タンパク質を溶出した後のDEAE-セルロースについて、それに吸着された阻害因子を1Mの塩化ナトリウムを含む0.05Mクエン酸緩衝液(pH6.0)により溶出した。阻害因子を含む画分を集め、減圧濃縮後、濃縮液を水充填したセファデックスG-25カラム(2.2×50cm)に添加し、水で溶出した。5mlずつ分取した各フラクションについて、その0.2mlを試料液として反応系に添加してフロログルシノール酸化酵素活性に及ぼす影響を調べた。その結果、フラクション番号11~15および22~30に阻害因子が存在することを認めた(Fig. 61)。そこで、これら画分を別々に集め、それぞれをF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>として以下の実験に使用した。F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>の本酵素活性に対する阻害率はそれぞれ12%および22%であった。

F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>はともにFig. 62に示すように、やや不明瞭ながら、275nm付近に吸収のピーク、320nm付近にその肩を有する吸収スペクトルを呈した。このスペクトルは第3章第1節で明らかにした幼果の天然基質溶液のものとかかなり類似する。第3章においてはこれら紫外吸収のピークが幼果に含まれるフロリンやクロロゲン酸等のポリフェノール化合物に由来するのであろうと推定したが、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>のような不明瞭なスペクトルは、メラニンやリグニン等の高分子フェノール化合物あるいはタンパク質、ペプチド等の紫外吸収スペクトルとも類似するようにも思われる。そこで、阻害因子F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>の本体がフェノール性の化合物であるのかあるいはタンパク質等の物質であるのかについて明らかにするために、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>の二、三の性質について追究した。

F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>を沸騰湯浴中で5~60分間加熱し、それぞれの熱安定性を調べた。結果は加熱処理をしないF<sub>2</sub>の阻害率を100とする相対値で表わした。Fig. 63に示したように、F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>とも100°C、60分間の加熱処理においても活性阻害率は変化せず、これら阻害因子の本体は加熱に対しきわめて安定であることが認められた。

F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>を濾紙上にプロットし、Table 13に示すような発色剤による呈色反応を試みた。F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>はともにジアゾ化パラニトロアニリン、塩化第二鉄等のポリフェノール化合物の発色試薬に対し陽性であり、紫外線下において青白い蛍光を発したが、ニンヒドリン反応は認め

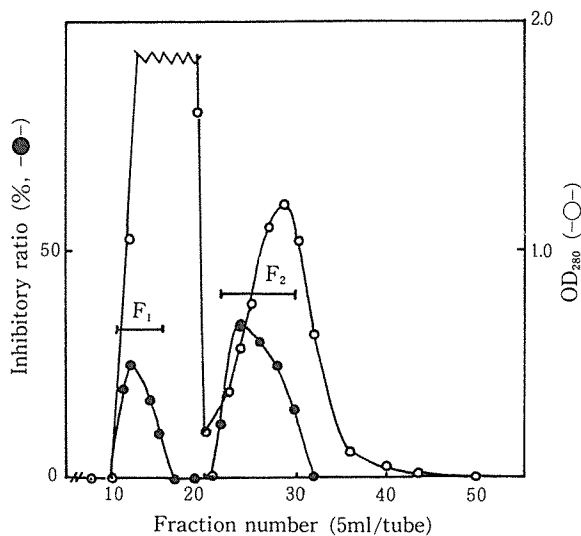


Fig. 61 Sephadex G-25 gel filtration of partially purified inhibitory factor by DEAE-cellulose.

$$\text{Inhibitory ratio (\%)} = \left(1 - \frac{\text{O}_2 \text{ uptake in the reaction system}}{\text{O}_2 \text{ uptake in the control system}}\right) \times 100$$

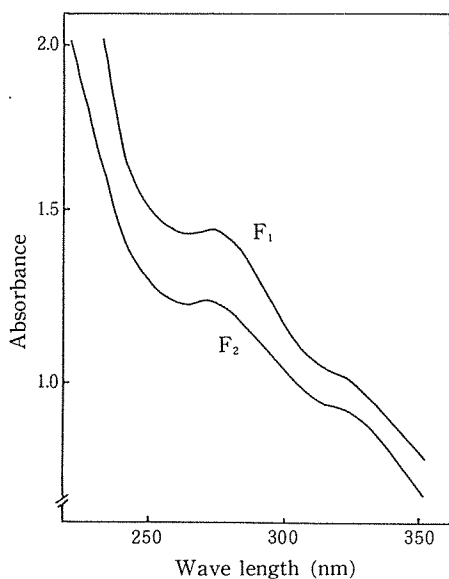


Fig. 62 Ultraviolet absorption spectra of  $F_1$  and  $F_2$ .

られなかった。さらに、第2章第3節と同様にFolin-Denis法によりポリフェノール含量を測定した結果、 $F_1$ および $F_2$ はそれぞれクロロゲン酸として $357\mu\text{g/ml}$ および $58\mu\text{g/ml}$ のポリフェノールを含有することが認められた。

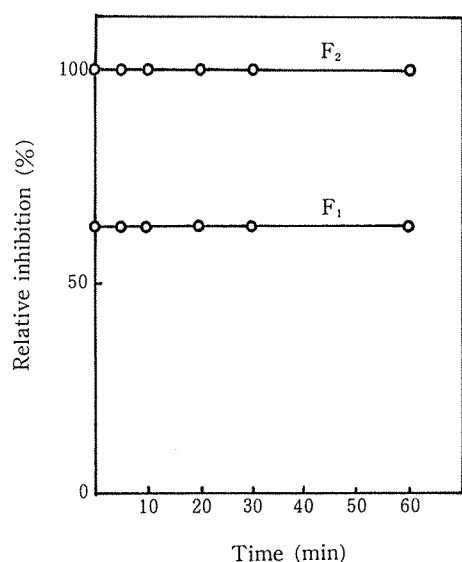
以上のように、 $F_1$ および $F_2$ は高温度の加熱処理に対して安定であること、ポリフェノール化合物の発色試薬に対して強く呈色すること、さらに両画分がかなり多量のポリフェノール化合物を含有することなどから、 $F_1$ および $F_2$ に含まれる阻害因子はポリフェノール化合物ではないかと考えられる。そこで、このことをより明確にするために、種々のポリフェノール化合物の影響について詳細な検討を行った。

## 2 種々のポリフェノール化合物および金属イオンの阻害

種々のポリフェノール化合物を終濃度、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ となるように反応系に添加してフロログルシノール酸化酵素活性に及ぼす影響について調べた。

Table 14 に示したように、*m*-ジフェノール類およびモノフェノールを除き、供試した化合物はいずれも本酵素活性を強く阻害した。すなわち、*p*-ジフェノールであるヒドロキノンの阻害効果が最も大きく、ついで、クロロゲン酸、ドーパミン等の*o*-ジフェノール類がかなり強い阻害効果を示した。また、ピロガロール、没食子酸も酵素活性を阻害したが、レゾルシノール



Fig. 63 Thermal stability of F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>.Table 13 Color developing reaction of F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub>.

Color-producing reagent	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>
Ferric chloride	++	++
Ferric chloride-Iron ammonium sulfate	+++	+++
Diazotized <i>p</i> -nitroaniline	++	++
Ammoniacal silver nitrate	++	++
Aniline-Phthalic acid	+	+
Ninhydrine	-	-
Fluorescence under UV light	+	+

+ Positive (weakly), ++ Positive (medium), +++ Positive (strongly), - Negative.

等の $m$ -ジフェノール類およびモノフェノールである $p$ -クマル酸の阻害効果はこれらに比べるとかなり低かった。

このように、本酵素活性は程度の差はあるにしても種々のポリフェノール化合物により阻害されることが明らかとなったので、つぎに、これら化合物の阻害様式について検討した。すなわち、種々のポリフェノール化合物の存在下における基質濃度と反応初速度との関係を調べ、Lineweaver-Burkの方法により作図した。Fig. 64~67に示すように、それら化合物はいずれも本酵素活性を拮抗的に阻害することが認められた。また、これらの図より算出した酵素と阻害剤との複合体の解離定数( $K_i$ )をTable 15に示した。さらに、F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>の阻害様式について同様に検討した結果、Fig. 68に示したように、両画分ともポリフェノール化合物と同様にフロログルシノール酸化酵素活性を拮抗的に阻害した。一方、本章第2節でCu<sup>2+</sup>等の金属イオンも顕著に本酵素活性を阻害することを明らかにしたが、これら金属イオンのうちCu<sup>2+</sup>は非拮抗的に、Ni<sup>2+</sup>およびZn<sup>2+</sup>は拮抗的に阻害することが認められた(Fig. 69)。これら金属イオンの

阻害様式はF<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>および種々のポリフェノール化合物のそれらとは明らかに相違した。

このようなF<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>の吸収スペクトル、熱安定性、呈色反応さらにはフロログルシノール酸化酵素に対する阻害様式等から、阻害因子F<sub>1</sub>およびF<sub>2</sub>の本体はフェノール性の化合物であろうと推定される。この化合物が温州ミカン幼果に存在するどのようなポリフェノール類に由来するのかは明らかにできなかったが、これら阻害因子がDEAE-セルロー

Table 14 Inhibitory effects of polyphenolic compounds on phloroglucinol oxidase activity.

Polyphenolic compounds	Relative activity (%)
None	100
Chlorogenic acid	28
Dopamine	27
Catechol	41
Caffeic acid	43
Resorcinol	92
Orcinol	94
Hydroquinone	17
Pyrogallol	50
Gallic acid	47
<i>p</i> -coumaric acid	82

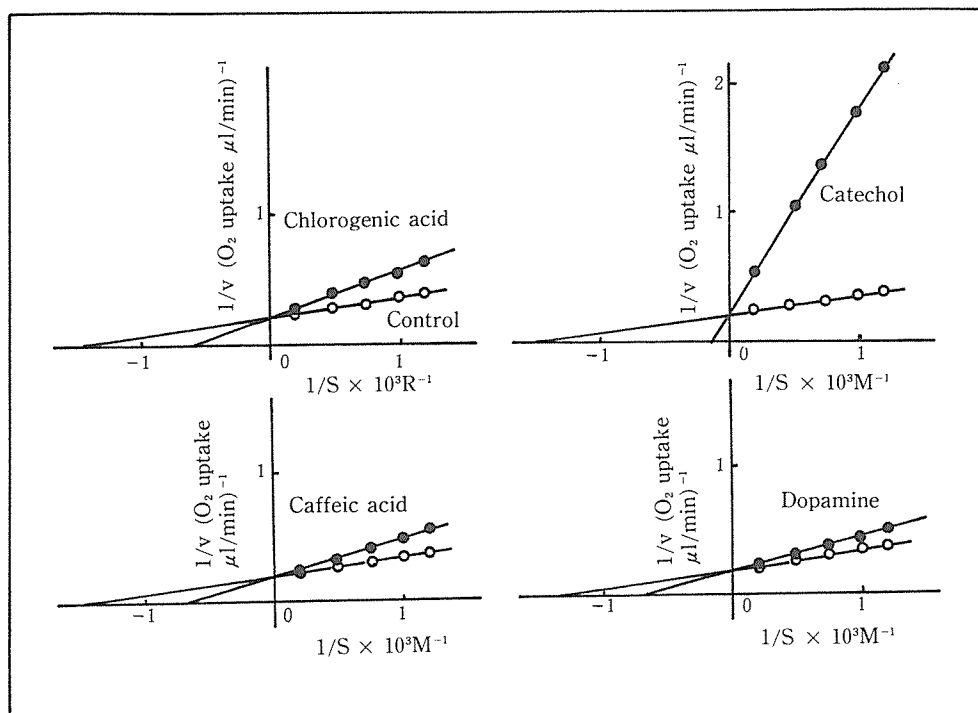


Fig. 64 Inhibitory effects of *o*-diphenols on phloroglucinol oxidase activity.

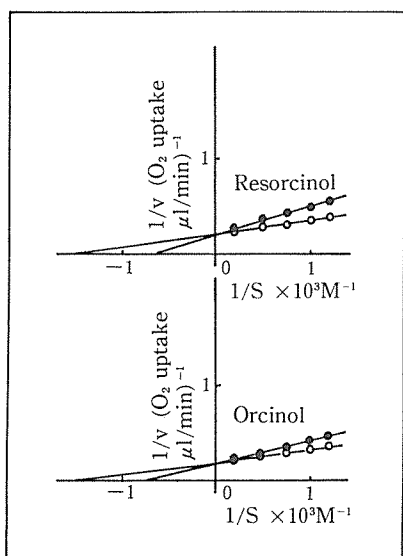


Fig. 65 Inhibitory effects of *m*-diphenols on phloroglucinol oxidase activity.

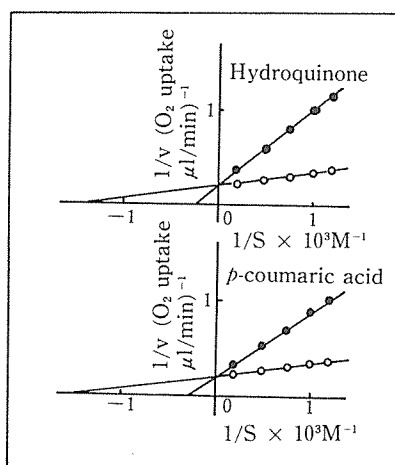


Fig. 66 Inhibitory effects of hydroquinone and *p*-coumaric acid on phloroglucinol oxidase activity.

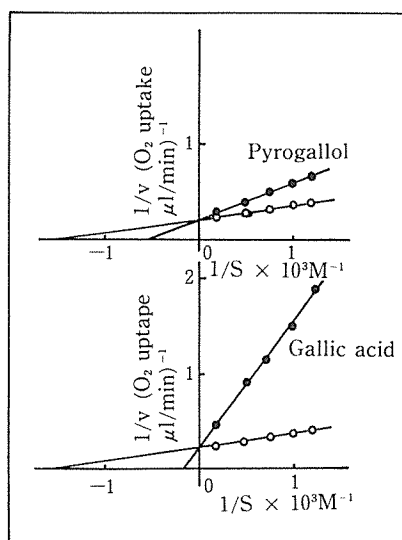


Fig. 67 Inhibitory effects of 1,2,3-trihydroxybenzenes on phloroglucinol oxidase activity.

Table 15  $K_i$  values of various polyphenolic compounds.

Polyphenolic compounds	$K_i$ value ( $\times 10^{-6}M$ )
Chlorogenic acid	4.3
Dopamine	6.6
Catechol	6.0
Caffeic acid	3.7
Resorcinol	290
Orcinol	275
Hydroquinone	0.13
Pyrogallol	7.9
Gallic acid	5.1
<i>p</i> -coumaric acid	130

$K_i$  values were calculated from the data in Fig. 64~67.

スに吸着される酸性物質であること、また、それらの吸収スペクトルにおいて320nm付近に吸収の肩がみられること等から、 $F_1$ 、 $F_2$ の本体は幼果に多量に含まれるクロロゲン酸等のフェノール酸と関係があり、それが酵素液の調製中に酸化され、段階的に重合して $F_2$ さらに $F_1$ へと変化したのであろうと考えられる。

以上のように、フロログルシノール酸化酵素がほかのポリフェノール類により阻害されること、また、第3章第2節で示したように天然基質溶液中には遊離のフロログルシノールはほとんど存在しないことから、幼果の酵素はフロログルシノールを強く酸化するが、この反応系の幼果の褐変反応に関与する割合はきわめて低いものといえよう。しかしながら、第2章で明らかにしたように、種々のカンキツ類の成熟果において顕著なフロログルシノール酸化活性が認められること、また、オレンジ等<sup>60,72~74)</sup>の果実においてかなり多量のフロリンが存在し、活性を阻害するほかのポリフェノール類がほとんど含まれないことから、それらの成熟果実にみられる虎斑症のような褐変反応においては、この酵素系がかなり関係するのではないかと考えられる。

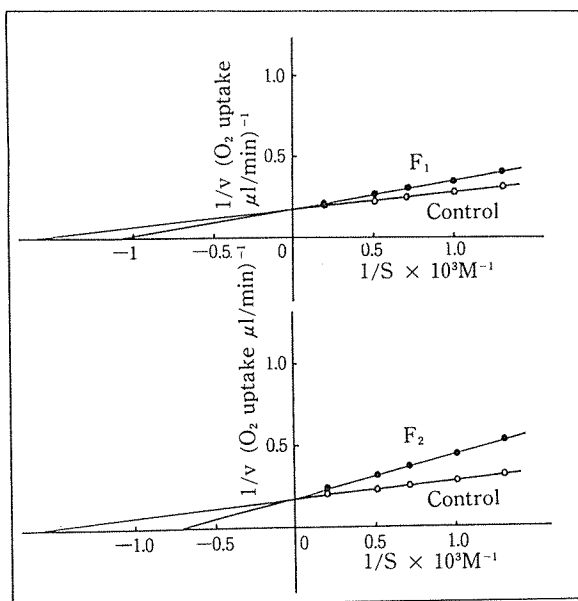


Fig. 68 Inhibitory effects of  $F_1$  and  $F_2$  on phloroglucinol oxidase activity.

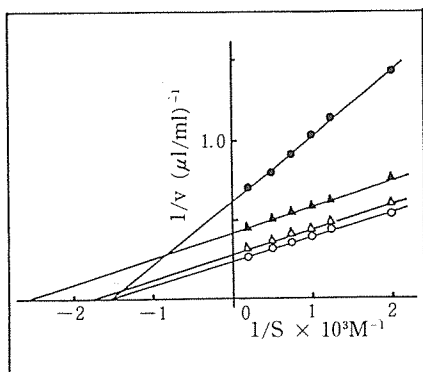


Fig. 69 Inhibitory effects of some metal ions on phloroglucinol oxidase activity.

- control,
- presence of  $\text{Cu}^{2+}$  (final concentration,  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ),
- △—△— presence of  $\text{Zn}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ),
- ▲—▲— presence of  $\text{Ni}^{2+}$  ( $10^{-4} \text{ M}$ ).

### 5-2 試料および方法

カブは佐賀大学農学部圃場で栽培した耐病ひかりを使用した。その他の野菜は市場より購入し、これらよりアセトンパウダーを調製した。

このアセトンパウダーより第2章のカンキツ類の場合と同様に粗酵素液を調製した。

ポリフェノール酸化酵素活性は第2章第2節と同様に検圧法により、また、ペルオキシダーゼ活性は本章第3節に記した比色法により、それぞれ測定した。また、クロマトグラフィーの際のフロログルシノール酸化酵素活性は本章第1節の分光学的方法により測定した。

タンパク質含量、分子量の測定、ディスク電気泳動および吸収スペクトルの測定は第4章第1節に記した方法によった。

### 5-3 結果および考察

#### 1 種々のアブラナ科植物のフロログルシノール酸化酵素

数種のアブラナ科植物の粗酵素液による種々のポリフェノール類の酸化について調べた。結果はアセトンパウダー g 当りの毎分の酸素吸収量で表わし、Table 16 に示した。いずれの植物の酵素もフロログルシノールを強く酸化し、ついで、ピロガロールもわずかに酸化したが、*o*-ジフェノール酸化活性はこれらに比べてきわめて低かった。また、カブ(根部)およびダイコン(根部)において著しく高い活性が認められた。

#### 2 カブのフロログルシノール酸化酵素の精製と性質

前記のように、種々のアブラナ科植物にもフロログルシノール酸化酵素が分布することが明らかとなった。一方、ミカンのこの酵素はペルオキシダーゼ活性を有するなどかなり特徴のある性質を示したが、アブラナ科植物の場合にもこれと類似した性質がみられるのではないかと考えられる。そこで、この点を明確にするために、強い酵素活性が認められたカブの酵素の精製を行い、その性質について調べた。

##### (1) 酵素の精製

カブ酵素を本章第2節のミカン酵素の場合とほぼ同様の手順により精製し、最終的に Fig. 70

## 第5節 カブのフロログルシノール酸化酵素系

### 5-1 緒言

これまでに、種々のカンキツ果実にフロログルシノール酸化酵素が存在することを認めるとともに、温州ミカン幼果よりこの酵素を精製し、精製酵素の性質等についても明らかにしてきた。このようなフロログルシノール酸化活性は前記のように、キャベツや西洋ワサビ等のアブラナ科植物に見出されているので、カブ、ダイコン等のほかのアブラナ科植物にも本酵素が存在し、それら植物の褐変反応に関与するのではないかと考えられる。

そこで、本節ではまず、数種のアブラナ科植物について本酵素活性の検索を行い、さらに、カブよりフロログルシノール酸化酵素を精製し、その性質等を調べ、ミカン酵素の場合と比較した。

Table 16 Polyphenol oxidase activities of cruciferous vegetables

	Enzyme activity (O <sub>2</sub> uptake $\mu$ l/min/g aceton powder)				
	Phloroglucinol	Pyrogallol	chlorogenic acid	Catechol	DL-dopa
Chinese cabbage	93.2	18.6	3.6	2.9	3.0
Cabbage	218.0	22.3	6.3	3.2	3.6
Japanese raddish (leaf)	127.1	14.9	3.5	1.2	1.2
Japanese raddish (root)	370.5	29.1	5.2	3.2	3.4
Turnip (leaf)	249.9	19.9	4.6	2.4	2.5
Turnip (root)	415.0	16.6	4.8	3.5	3.7

に示すような単一のピークを有するフロログルシノール酸化酵素標品を得た。

本酵素は Table 17 に示したように、抽出液の約33倍に精製されたが、この精製倍率はミカン酵素 (Table 10, 2400倍) と比べて著しく低かった。カブ酵素の精製過程において硫酸アンモニウム分画後にみられた比活性の著しい低下は抽出液中に本酵素の賦活化因子が存在することを、また、DEAE-セルロースクロマトグラフィー後に認められた全活性のわずかな増加は阻害因子が存在することをそれぞれ示唆するものと思われる。ミカン酵素の場合には後者の全活性の増加のみ著しく高いことを認め、前節においてはこの阻害因子がポリフェノール化合物であると推定した。したがって、このような酵素活性に影響を及ぼす因子の有無あるいは多寡によって、カブ酵素とミカン酵素の精製倍率の差が生じたものと考えられる。

## (2) 電気泳動, 分子量, 吸収スペクトル

カブの精製酵素標品は Fig. 71 に示したようにディスク電気泳動的に均一であり、また、その分子量はセファデックス G-100ゲル濾過の結果 (Fig. 72) より、約27,000と推定された。さらに、本酵素の溶液は赤色を呈し、その吸収スペクトルにおいて Fig. 73 のように、277nm, 403nm, 492nm および633nm に吸収極大を示した。

このような酵素液の色調および吸収スペクトルはミカン酵素のそれらと著しく類似し、推定分子量もほぼ同一であった。

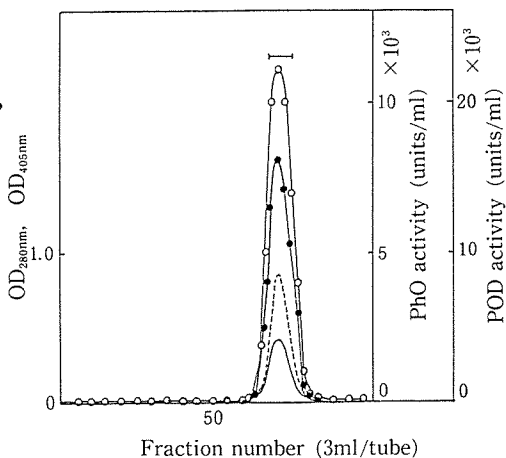


Fig. 70 Second gel filtration of the enzyme on Sephadex G-100.  
 —○— OD<sub>280nm</sub>, ..... OD<sub>405nm</sub>,  
 —○— phloroglucinol oxidase (PhO) activity,  
 —●— peroxidase (POD) activity,  
 └─┘ fraction pooled.

Table 17 Purification of phloroglucinol oxidase from turnip.

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)
1. Original extract	5226	103796	19.8	1
2. Ammonium sulfate 20-70% saturation	1540	8820	5.8	0.3
3. DEAE-cellulose	1325	10725	8.1	0.4
4. CM-Sephadex C-50	68	10455	153.8	7.8
5. Sephadex G-100	14.2	6022	424.1	21.4
6. Sephadex G-100	6.6	4316	650.0	32.8

## (3) 酵素の性質

Fig. 74 から明らかなように、本酵素標品はミカン酵素と同様にフロログルシノールおよびフロログルシノールカルボン酸を強く酸化したが、ピロガロール、クロロゲン酸等の他のポリフェノール類はほとんど酸化しなかった。また、基質濃度と反応初速度との関係を調べた結果が Fig. 75 である。これより求めた本酵素のフロログルシノールに対する  $K_m$  値は  $0.67\text{mM}$  であり、この値もまたミカン酵素のそれと一致した。

さらに、カブ酵素にも顕著なペルオキシダーゼ活性が認められ、Fig. 70 (前出) のようにセファデックス G-100 ゲル濾過における両活性の溶出位置は一致した。さきにも述べたように本酵素はディスク電気泳動的に均一であり、これらのことは本酵素がミカン酵素と同じくフロログルシノール酸化活性とペルオキシダーゼ活性の両活性を有することを示唆するものである。

このような両酵素の関係については、最近、トマト<sup>95)</sup>やアボカド<sup>45)</sup>の酵素においても見出されており、トマトではそのペルオキシダーゼがポリフェノール酸化酵素活性をも有し、両活性の最適 pH 値はほぼ一致している。これに対し、カブ酵素の場合は Fig. 76 から明らかなように、フロログルシノール酸化活性の最適 pH 値は 7.6 付近にあり、ペルオキシダーゼの pH5 とは著しく相違することが認められた。

さらに、両活性に及ぼす加熱および種々の化合物の影響にもミカン酵素と同様にかなりの相違がみられた。すなわち、Fig. 77 に示したように、フロログルシノール酸化活性はペルオキシダーゼに比べて加熱に対してかなり安定であった。このフロログルシノール酸化酵素の熱安定性はミカン酵素よりもやや高かった。また、Table 18 から明らかなように、両酵素活性はシアン化カリウムやジエチルジチオカ

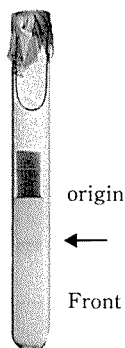


Fig. 71 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of the enzyme.

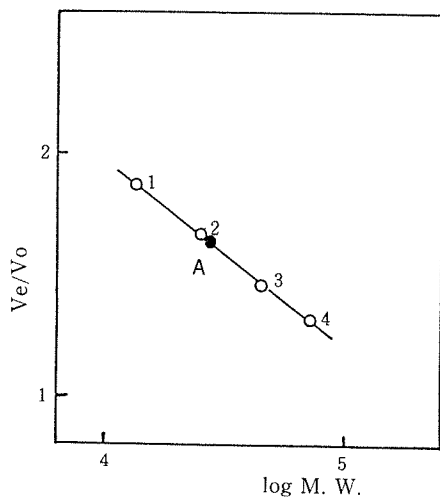


Fig. 72 Molecular weight estimation of the enzyme.

- 1) cytochrome C, 2) chymotrypsinogen A,  
3) ovalbumin, 4) albumin (bovine),  
A) phloroglucinol oxidase.

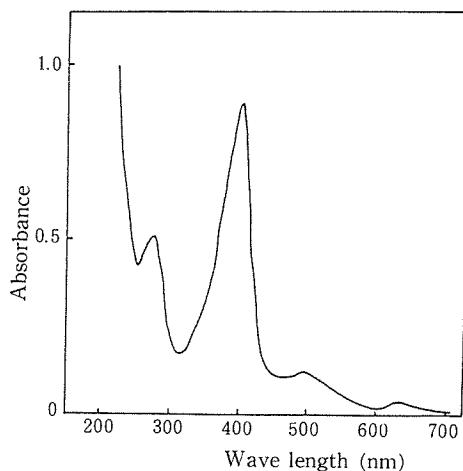


Fig. 73 Absorption spectrum of the enzyme.

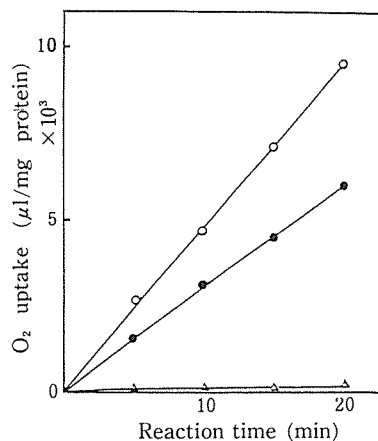


Fig. 74 Oxidation of various polyphenols by the enzyme.

—○— phloroglucinol,  
—●— phloroglucinolcarboxylic acid,  
—△— pyrogallol.

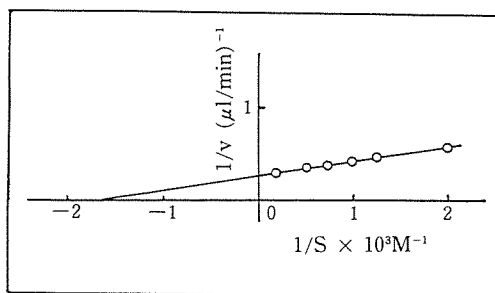


Fig. 75 Lineweaver-Burk plots of phloroglucinol oxidation by the enzyme.

ルバミン酸ナトリウムにより阻害されたが、それら化合物の阻害効果はフロログルシノール酸化酵素活性に対する方がペルオキシダーゼ活性に対するよりも大きかった。さらに、フロログルシノール酸化活性を著しく賦活化した  $Mn^{2+}$  や強い阻害効果を示した  $Cu^{2+}$  はペルオキシダーゼ活性に対してはほとんど影響を及ぼさなかった。

以上のように、酵素液の色調、吸収スペクトル、酵素の分子量ならびに諸性質において種類の異なるミカンとカブの酵素の間に高い類似性が認められたことは植物分類学上においてもはなはだ興味深いものがある。

## 第6節 小 括

温州ミカン幼果よりフロログルシノール酸化酵素をイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等により2400倍に精製した。この酵素標品はディスク電気泳動的に均一であり、その分子量は約27,000と推定された。本酵素の溶液は赤褐色を呈し、275nm, 405nm, 500nm および630nm 付近に吸収極大を示した。

本酵素はフロログルシノール等の1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン類のみを特異的に酸化した。また、本酵素のフロログルシノールに対する  $K_m$  値は0.67mMであった。

本酵素の最適pHは7.6付近であり、またpH6以上において安定であった。本酵素は100°C, 30分間の加熱処理においても30%程度の活性を残存し、加熱に対してきわめて安定であった。さらに本酵素はジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムおよびL-アスコルビン酸に

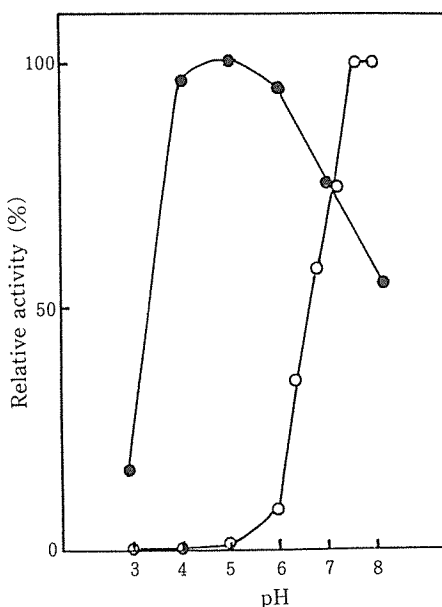


Fig. 76 Effect of pH on phloroglucinol oxidase and peroxidase activities of the enzyme.

—○— phloroglucinol oxidase activity,  
—●— peroxidase activity.

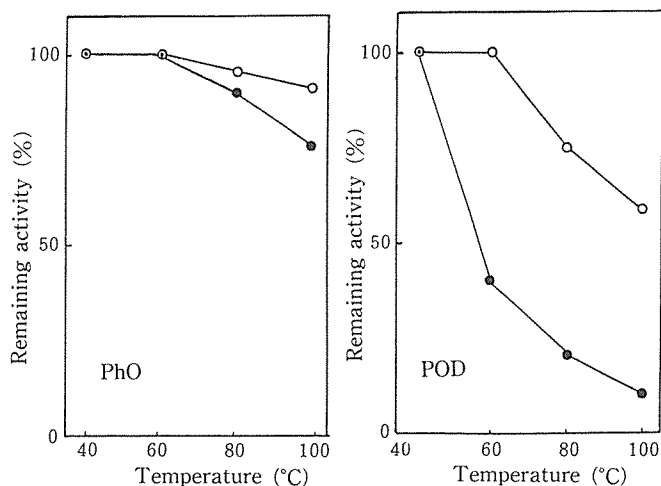


Fig. 77 Thermal stability of phloroglucinol oxidase and peroxidase activities of the enzyme.

—○— 5min, —●— 30min,  
PhO; phloroglucinol oxidase,  
POD; peroxidase.

よって著しく阻害された。金属イオンの影響では、本酵素は  $Mn^{2+}$  により著しく賦活化されたが、 $Cu^{2+}$  によっては逆にほぼ完全に阻害された。

本酵素は金属として鉄を含み、顕著なペルオキシダーゼ活性をも同時に有することが認められた。ペルオキシダーゼの最適 pH は 5 付近であり、pH6~9 の範囲で安定であった。また、ペルオキシダーゼは  $90^{\circ}C$ 、5 分間の加熱処理によりほぼ完全に失活し、さらにフロログルシノール酸化活性に対して著しく影響した  $Mn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$  等の金属イオンのペルオキシダーゼに対する影響は小さかった。

このようなことから、本酵素はフロログルシノール酸化酵素とペルオキシダーゼの両活性を有するが、それらの活性中心はそれぞれ異なった部位に存在するものと推定された。

このフロログルシノール酸化酵素がカブ等のアブラナ科植物にも分布することを明らかにし、カブより本酵素を精製した。この酵素標品の色調、吸収スペクトル、物理化学的性質およびペルオキシダーゼとの関係等、カブ酵素とミカン酵素との間にはきわめて高い類似性が認められた。

温州ミカン幼果にはフロログルシノール酸化酵素の阻害因子が存在することを認めたので、これについても追究した。フロログルシノール酸化酵素活性は種々のポリフェノール化合物によって拮抗的に阻害された。その際、*p*-ジフェノール類の阻害度が最も高く、ついで *o*-ジフェノール類もかなり活性を阻害するが、*m*-ジフェノール類およびモノフェノールの阻害効果はやや低かった。また、金属イオンについては  $Cu^{2+}$  は非拮抗的に、 $Zn^{2+}$  および  $Ni^{2+}$  は拮抗的に活性を阻害し、ポリフェノール類とは阻害様式が相違した。一方、幼果に含まれる阻害因子は塩化第二鉄等のポリフェノールの呈色試薬に陽性であること、その因子の

Table 18 Effect of various compounds on phloroglucinol oxidase and peroxidase activities.

Compounds*	Relative Activity (%)	
	PhO	POD
None	100	100
Sodium diethyldithiocarbamate	0	15
Potassium cyanide	10	80
EDTA	36	95
Thiourea	100	113
Sodium fluoride	101	103
L-ascorbic acid	0	0
$MnCl_2$	423	103
$FeCl_2$	162	—
$CuSO_4$	0	97
$ZnSO_4$	73	95
$NiCl_2$	75	92
$CoCl_2$	89	96
$MgSO_4$	100	95

(\*Final concentration,  $5 \times 10^{-4}M$ )



吸収スペクトルおよび物理化学的性質、さらにはそれが本酵素活性を拮抗的に阻害することから、その本体は幼果に多量に含まれるクロロゲン酸同族体等のポリフェノール化合物であろうと推定した。

## 第6章 総 括

リング等の園芸食品にみられる酵素的褐変現象は香気成分の劣化や栄養価の減少を伴っており、それらの商品価値を低下させることから、加工、貯蔵の観点より数多くの研究が行われている。一方、温州ミカン等のカンキツの成熟果においてはこのような褐変現象はほとんど問題とされていなかった。しかし、それらの幼果の切断面は著しく褐変し、さらに近年、増殖や転換が進められているセミノール等の中・晩生カンキツ類においては主として貯蔵中に虎斑症とよばれる果皮褐変症が発生し、それらカンキツ類の生産の増大に伴って大きな問題となりつつある。本研究はこのような褐変現象に着目し、反応機構の解明を試みたものである。

本研究においては、まず、温州ミカン幼果の切断面に生じる褐変が酵素的であることを証明し、粗酵素レベルでカンキツ類の褐変反応の特徴を捕えた。また、褐変反応を迅速に解析する手段として差スペクトル法を導入し、これにより反応機構の経時的解析が可能であることを明らかにした。さらに、温州ミカン幼果のポリフェノール酸化酵素として、ピロガロール酸化酵素A、Bおよびフロログルシノール酸化酵素を分別、精製し、それらの性質および褐変反応に果たす役割を明確にした。また、これらのうち、ピロガロール酸化酵素Bおよびフロログルシノール酸化酵素はこれまで植物界では知られていない新しい型のフェノール酸化酵素、すなわちトリヒドロキシベンゼン酸化酵素であることを初めて明らかにした。以下に本研究の概要を示すものである。すなわち、第2章においては、温州ミカン幼果の切断面に生ずる褐変が酵素的に引き起こされることを証明するとともに、この酵素的褐変反応系が広く各種のカンキツ果実に存在することを明らかにし、その反応系について粗酵素レベルでの特徴を追究した。

温州ミカン幼果の粗酵素液はフロログルシノール、ピロガロール等のトリヒドロキシベンゼン類を強く酸化するが、これと比べて、*o*-ジフェノール酸化活性は著しく低いことを認めた。

果実の発育過程を通じて温州ミカンの粗酵素はトリヒドロキシベンゼン類を酸化することが認められた。また、その活性の強さは発育の各時期で変動し、発育初期（6月中旬）と果実の着色時期（10月中旬）に活性のピークが存在することが明らかとなった。これに対して、褐変反応の基質となるポリフェノールの含量は発育初期には高く、果実の発育に伴って急激に低下し、また、還元型アスコルビン酸含量は初期には低く、9月以降急速に増加することが確かめられた。したがって、幼果にみられる褐変はこの時期に酵素活性が著しく高く、反応を阻害する還元型アスコルビン酸の含量が低いことに起因するものと推定された。

また、果実の各部位にトリヒドロキシベンゼン酸化酵素活性が見出されたが、それは果皮、とくにフラベド部でもっとも高く、アルベド、果肉の順に低下した。さらに、温州ミカンのみならず、種々のカンキツ果実にフロログルシノール酸化酵素およびピロガロール酸化酵素のトリヒドロキシベンゼン酸化酵素活性が分布することが明らかとなった。

第3章においては、温州ミカン幼果の褐変反応について吸収スペクトルの面から追究し、反応機構を経時的に解析する手段として差スペクトル法を導入した。

幼果より調製した天然基質溶液および種々のポリフェノール化合物はミカン酵素により酸化され、反応液の吸収スペクトルはそれぞれの化合物によってきわめて特徴のある変動を示すことが見出された。また、それらの特徴は差スペクトルにおいて顕著に認められた。天然基質溶

液の酸化反応にともなう差スペクトルの変動の特徴とクロロゲン酸のそれとの間にはかなり高い類似性がみられた。

DEAE-セルロースクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー等によって、天然基質溶液中にはクロロゲン酸同族体およびフロログルシノールの配糖体であるフロリンが存在することが明確となった。このうち、クロロゲン酸同族体はミカン酵素により速やかに酸化され、反応液は著しく褐変した。一方、フロリンはそのままの形ではミカン酵素により酸化されず、また、その加水分解物であるフロログルシノールの褐変度はきわめて低かった。したがって、幼果の顕著な褐変反応の主要基質はクロロゲン酸同族体であろうと推定された。

第4章および第5章においては、温州ミカン幼果の褐変反応に関与するポリフェノール酸化酵素系について追究した。

温州ミカン幼果にはクロロゲン酸酸化酵素、フロログルシノール酸化酵素、酸性および塩基性画分のピロガロール酸化酵素AおよびBの4種のポリフェノール酸化酵素が存在することを明確にし、それぞれの酵素をイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過等により分別した。

これら酵素のうち、まず、第4章ではクロロゲン酸酸化酵素、ピロガロール酸化酵素AおよびBの性質とそれら酵素による褐変反応系について検討した。

クロロゲン酸酸化酵素はクロロゲン酸およびその同族体を強く酸化し、ピロガロール酸化酵素AはピロガロールとともにDL-ドーパをも酸化することが認められた。しかし、ピロガロール酸化酵素Bはピロガロールおよび没食子酸を強く酸化するが、*o*-ジフェノール酸化活性は検出されなかった。

これら3つの酵素の最適pHはいずれも7.2付近にあることが認められた。幼果は弱酸性の状態にあるが、この時期には酵素活性およびポリフェノール含量が高く、酵素活性を阻害する還元型アスコルビン酸含量が低いことから、これら酵素の最適pH値が微アルカリ側にあるにしても幼果の著しい褐変が起こり得るものと推察された。

クロロゲン酸酸化酵素およびピロガロール酸化酵素Aは加熱処理に対してやや不安定であったが、ピロガロール酸化酵素Bは100°C、5分間の加熱処理においても70%程度の残存活性を示し、他の植物のポリフェノール酸化酵素と比べても、なおかなり熱安定性が高いことが認められた。また、これら3酵素の活性に及ぼす種々の化合物の影響にはやや相違がみられるが、いずれもシアン化カリウム等により阻害されることから、活性中心に金属(銅)を含むポリフェノール酸化酵素の一種であると考えられた。

さらに、ピロガロール酸化酵素Bは基質特異性から新しい型の酵素であると考えられたので次のように命名した。

系統名: 1, 2, 3-trihydroxybenzene: oxygen oxidoreductase

常用名: Pyrogallol oxidase

また、天然基質溶液およびクロロゲン酸の褐変反応に及ぼすpH、加熱および種々の化合物の影響はほぼ一致することが認められた。

一方、フロログルシノール酸化酵素は前記の酵素とは著しく異なった性質を有することを第5章において明らかにした。

本酵素は1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン類のみを酸化した。また、本酵素は100°C、30分の加熱処理においてもなお30%程度の活性が残存し、加熱に対してきわめて安定であった。このような熱安定性はピロガロール酸化酵素Bと比べても著しく高いものといえる。さらに、本酵素は $Mn^{2+}$ により著しく賦活化され、 $Cu^{2+}$ によってはほとんど完全に阻害されることが見出されたが、クロロゲン酸酸化酵素、ピロガロール酸化酵素AおよびBに対するこれら金属イオ

ンの影響は小さかった。本酵素の最適 pH は 7.6～8 であったが、前記の 3 つの酵素のそれらも 7.2 付近にあり、このように温州ミカンのポリフェノール酸化酵素がいずれも微アルカリ側に最適 pH 値を有することは、他の植物酵素の多くが酸性側に最適値を有することと比べてきわめて特徴的である。

フロログルシノール酸化酵素は金属として鉄を含み、顕著なペルオキシダーゼ活性をも同時に有することが明らかとなった。しかし、フロログルシノール酸化酵素およびペルオキシダーゼの両活性に及ぼす pH、種々の化合物の影響、さらには酵素の安定性に及ぼす pH および加熱の影響が著しく相違することから、両活性の活性中心は異なった部位に存在するものと推定された。

このようなフロログルシノール酸化酵素はカブ等のアブラナ科植物にも存在することを明確にした。さらに、カブ酵素とミカン酵素との間には酵素液の色調、吸収スペクトル、酵素の分子量および物理化学的諸性質ならびにペルオキシダーゼとの関係などにおいてかなり高い類似性が認められた。

このように、ミカンおよびカブの酵素はフロログルシノール酸化酵素活性とペルオキシダーゼ活性とを同時に有するが、両活性の活性中心が相違することおよびそれら酵素がフロログルシノール等の 1, 3, 5-トリヒドロキシベンゼン類に対してきわめて高い基質特異性を示すことから、ミカンおよびカブの本酵素はペルオキシダーゼとしてより新しい型のフェノール酸化酵素、すなわち、トリヒドロキシベンゼン酸化酵素として考える方が妥当であり、本酵素は

系統名：1, 3, 5-trihydroxybenzene : oxygen oxidoreductase

常用名：Phloroglucinol oxidase

と命名できると考える。

さらに、温州ミカン幼果に存在するフロログルシノール酸化酵素の阻害因子についても検討した。フロログルシノール酸化酵素活性は種々のポリフェノール化合物により拮抗的に阻害され、その阻害の程度は *o*-ジフェノール類が最も高く、ついで、*o*-ジフェノール類が高かったが、*m*-ジフェノール類およびモノフェノールの阻害はこれらに比べると低かった。また、 $\text{Cu}^{2+}$  は非拮抗的に、 $\text{Zn}^{2+}$  および  $\text{Ni}^{2+}$  は拮抗的に本酵素活性を阻害することを認めた。一方、幼果に存在する阻害因子は塩化第二鉄反応等、ポリフェノール類の呈色反応に陽性で、それが本酵素活性を拮抗的に阻害すること、その溶液の吸収スペクトル等から、阻害因子の本体は幼果に多量に含まれるクロロゲン酸同族体等のポリフェノール化合物であろうと考えた。したがって、このフロログルシノール酸化酵素系は幼果における活性は著しく高いが、幼果での顕著な褐変反応への寄与率は比較的小さいものと推定される。しかし、ネーブル、ハッサクなどの中・晩柑類においては本酵素活性が著しく高く、フロログルシノールの配糖体（フロリン）は多量に存在するが、クロロゲン酸等、他のポリフェノール化合物がほとんど見出せないことから、これらにみられる虎斑症においてはこの酵素系もかなり関係するのであろうと推測される。

以上のように、本研究によって、温州ミカン幼果の褐変反応に関して酵素および基質の両面から詳細な検討を行い、クロロゲン酸酸化酵素系による褐変反応がその主体をなすことを明らかにした。さらに、温州ミカン幼果より 2 種のフェノール酸化酵素、すなわち、フロログルシノール酸化酵素およびピロガロール酸化酵素 B を初めて分別し、これらが新しい型のフェノール酸化酵素であることを証明した。このように、本研究において、植物のポリフェノール酸化酵素として *o*-ジフェノール酸化酵素ばかりでなく、フロログルシノール酸化酵素やピロガロール酸化酵素の存在を初めて明確にしたことは植物界におけるポリフェノール類の酸化や褐変反応を考察する上できわめて意義深いものと考えられる。

## 後 記

本論文は著者が昭和47年以降、佐賀大学農学部において行った研究の一部<sup>107~116)</sup>をとりまとめたものである。本論文をまとめるにあたり御指導、御鞭達を賜った九州大学、大村浩久教授に深い感謝の意を表する。佐賀大学、東野哲三教授には本研究の計画当初より終始御懇篤なる御指導と御鞭達を賜った。ここに深甚なる謝意を表する。また、本論文の著述に際し、有益な御助言を賜った九州大学、箆島豊教授ならびに藤枝國光教授に深謝の意を表する。

また、佐賀大学、岩政正男教授、大宝明教授、稲葉喬教授をはじめ佐賀大学農学部の諸先生方には種々の御助言を賜った。ここに深謝の意を表する。さらに、佐賀大学農学部園芸学科および付属農場の職員の方々には試料の採取等、種々の御便宜をいただいた。ここに感謝の意を表する。さらに、本研究を行うにあたり、協力いただいた佐賀大学農学部園芸工学研究室の卒業生諸氏に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Josly, M. A. and J. D. Ponting (1951). *Adv. Food Res.*, **3**, 1.
- 2) Sakamura, S. and Y. Obata (1963). *Agric. Biol. Chem.*, **27**, 121.
- 3) Luh, B. S., E. T. Hsu and K. Stachwicz (1967). *J. Food Sci.*, **32**, 251.
- 4) 鍛塚昭三 (1968). 稲ポリフェノールの化学的研究, 九州大学学位論文.
- 5) 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 116.
- 6) 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 199.
- 7) Wang, C. Y. and W. M. Mellentin (1973). *Hortscience*, **8**, 321.
- 8) Thompson, D. P. (1981). *J. Food Sci.*, **46**, 738.
- 9) 東野哲三 (1970). 日食工誌, **17**, 447.
- 10) Tono, T. (1971). *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 619.
- 11) 東野哲三・藤田修二・伊藤達郎 (1974). 栄養と食糧, **27**, 467.
- 12) Palmer, P. K. (1963). *Plant Physiol.*, **38**, 508.
- 13) Takeo, T. (1965). *Agric. Biol. Chem.*, **29**, 558.
- 14) Knapp, F. W. (1965). *J. Food Sci.*, **30**, 930.
- 15) Gregory, R. P. F. and D. S. Bandall (1966). *Biochem. J.*, **101**, 569.
- 16) Dizik, N. S. and F. W. Knapp (1970). *J. Food Sci.*, **35**, 282.
- 17) Thomas, P. and P. M. Nair (1971). *Phytochemistry*, **10**, 771.
- 18) Chan, H. T. and H. Y. Yang (1970). *J. Food Sci.*, **35**, 169.
- 19) Stelzig, D. A., S. A. Akhtar and A. Ribeiro (1972). *Phytochemistry*, **11**, 535.
- 20) Luh, B. S. and B. Phithakpol (1972). *J. Food Sci.*, **37**, 535.
- 21) 大宝 明 (1972). 栄養と食糧, **25**, 709.
- 22) Skalaki, C. and W. A. Sistrunk (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 1060.
- 23) Thomas, P. and M. T. Janave (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 1149.
- 24) Pifferi, P. G., L. Baldassari and R. Cultera (1974). *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 263.
- 25) Murr, D. P. and L. L. Moris (1974). *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **99**, 3.
- 26) Pifferi, P. G. and R. Cultera (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 786.
- 27) Weaver, C. and H. Charley (1974). *J. Food Sci.*, **39**, 1200.
- 28) Pendharker, M. B. and P. M. Nair (1974). *Phytochemistry*, **13**, 1373.
- 29) Kahn, V. (1975). *J. Food Agric.*, **26**, 1319.
- 30) Mihalyi, K. and L. V. Vigyazo (1976). *Acta Alimentaria*, **5**, 69.

- 31) Golson, A., V. Kahn and A. Y. Sadowski (1977). *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1253.
- 32) Ben-Shalom, N., V. Kahn, E. Harel and A. M. Mayer (1977). *Phytochemistry*, **16**, 1153.
- 33) Mayer, A. M. and E. Harel (1979). *Phytochemistry*, **18**, 193.
- 34) Flurkey, W. H. and J. J. Jen (1980). *J. Food Sci.*, **45**, 1622.
- 35) Walter Jr, W. M. and A. E. Purcell (1980). *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 941.
- 36) Interesse, S. F., P. Ruggiers, G. D'Avella and F. Lampaelli (1980). *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 459.
- 37) Wisseman, K. W. and C. Y. Lee (1981). *J. Food Sci.*, **46**, 506.
- 38) 瓜谷郁三 (1975). 岩波講座, 現代生物化学 (第11巻), 天野恒久, 植竹久雄, 福見秀雄編, P 203, 岩波書店, 東京.
- 39) Uritani, I. (1978). Progress in Phytochemistry, Vol. 5, ed. by L. Reinhold, J. B. Harborn and T. Swain, p. 29, Pergamon Press, Oxford.
- 40) McClure, J. W. (1979). Biochemistry of Plant Phenolics, ed. by T. Swain, J. B. Harborn and C. F. VonSumere, p. 525, Plenum Press, New York-London.
- 41) 塩田芳之 (1968). 日食工誌, **15**, 547.
- 42) Wong, T. C., B. S. Luh and J. R. Whitaker JR (1971). *Plant Physiol.*, **48**, 19.
- 43) Benjamin, M. D. and M. W. Montgomery (1973). *J. Food Sci.*, **38**, 799.
- 44) Montgomery, M. W. and V. C. Sgarbieri (1975). *Phytochemistry*, **14**, 1245.
- 45) Kahn, V. (1976). *Phytochemistry*, **15**, 267.
- 46) Kahn, V. (1977). *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 233.
- 47) Zenin, C. T. and Y. K. Park (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 646.
- 48) Halin, D. H. and M. W. Montgomery (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 603.
- 49) Park, Y. K., H. H. Sato, T. D. Almeida and R. H. Moretti (1980). *J. Food Sci.*, **45**, 1619.
- 50) Paulson, A. T., J. Vanderstoep and S. W. Porritt (1980). *J. Food Sci.*, **45**, 341.
- 51) Galeazzi, H. A. M., V. C. Sgarbieri and S. M. Constantinus (1981). *J. Food Sci.*, **46**, 150.
- 52) Harel, E., A. M. Mayer and H. R. Lener (1970). *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 542.
- 53) Fluke, W. H. and J. J. Jen (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 1826.
- 54) Shalom, N. B., V. Kahn, E. Harel and A. M. Mayer (1977). *J. Sci. Food Agric.*, **28**, 545.
- 55) Kahn, V. (1977). *J. Food Sci.*, **42**, 38.
- 56) Glennie, C. W. (1981). *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 33.
- 57) Kutateladze, D. S. (1973). *Subtrop. Kult.*, **2**, 67.
- 58) Esen, A. and P. K. Soonst (1974). *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, **99**, 484.
- 59) Brummer, J. H. and B. Roe (1970). *J. Food Sci.*, **35**, 116.
- 60) Vandercook, C. E. and R. G. Stephenson (1966). *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 450.
- 61) Mayer, V. M. and D. M. Metzlen (1967). *Phytochemistry*, **6**, 1127.
- 62) 尊田民喜・大村浩久 (1973). 栄養と食糧, **26**, 531.
- 63) Hasegawa, S. and V. P. Maier (1980). *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 891.
- 64) Folin, O. and W. Denis (1915). *J. Biol. Chem.*, **22**, 305.
- 65) 東大農芸化学教室 (1971). 実験農芸化学 (上巻), P 153, 朝倉書店, 東京.
- 66) 黒崎敏晴・川上いつゑ (1974). 園学雑, **43**, 189.
- 67) Eak, I. L. (1964). *Botan. Gaz.*, **125**, 186.
- 68) Golsen, R. (1965). *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **86**, 280.
- 69) Vines, H. M. and M. F. Oberbacher (1963). *Plant Physiol.*, **38**, 333.
- 70) 田中長三郎 (1954). Species problem in Citrus, p 1, Society for the promoter of Science, Tokyo.
- 71) 大村浩久・尊田民喜 (1970). 栄養と食糧, **23**, 367.
- 72) Horwitz, R. M. and B. Gentili (1961). *Arch. Biophys. Biochem.*, **92**, 191.
- 73) Horwitz, R. and B. Gentili (1960). *J. Org. Chem.*, **25**, 2183.
- 74) Freedman, S. O., A. I. Siddiqi, J. Krupey and A. M. Sohoni (1962). *Am. J. Med. Sci.*, **244**, 548.
- 75) 大村浩久・尊田民喜 (1969). 栄養と食糧, **22**, 497.
- 76) 大村浩久・尊田民喜・井上浩輔 (1971). 栄養と食糧, **24**, 242.

- 77) 尊田民喜・稲富良文・浅田要一郎・吉川秀樹・大村浩久 (1974). 九大農芸誌, **28**(3), 71.
- 78) Hammerschmidt, P. A. and P. E. Pratt (1978). *J. Food Sci.*, **43**, 556.
- 79) 中林敏郎・渡辺千賀子 (1976). 日食工誌, **23**, 124.
- 80) 岡村成通・渡辺正登 (1979). 農化, **53**, 165.
- 81) 森光国・原田陽一・坪井良至 (1965). 日食工誌, **12**, 88.
- 82) 中林敏郎 (1967). 食品の変色とその化学, p 64~115, 光琳書院, 東京.
- 83) Luh, B. S., E. T. Hsu and K. Stachowicz (1967). *J. Food Sci.*, **32**, 251.
- 84) Schaller, D. R. and J. H. Venelbe (1970). *J. Food Sci.*, **35**, 762.
- 85) Walter Jr, W. M., A. E. Purcell and G. K. McCollum (1979). *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 938.
- 86) Hartree, E. F. (1972). *Anal. Biochem.*, **48**, 422.
- 87) Davis, B. J. (1964). *J. New York Acad. Sci.*, **121**, 404.
- 88) Andrews, P. A. (1965). *Biochem. J.*, **96**, 595.
- 89) Rivas, N. J. and J. R. Whilaker (1973). *Plant Physiol.*, **52**, 501.
- 90) Cash, J. N., W. A. Sistrunk and G. A. Stutte (1976). *J. Food Sci.*, **41**, 1388.
- 91) Chmielnicka, J. (1967). *Acta Pol. Pharm.*, **24**, 199 [C. A. **67**, 87850g (1967)]
- 92) Rubin, R. A. and T. M. Ivanova (1964). *Life Sci.*, **2**, 281.
- 93) Oku, H. (1968). Proceeding of International Symposium on Plant Biochemical Regulation in Viral and Other Diseases on Injury, Phytopathol. Soc. of Japan. p 253.
- 94) Ivanova, J. M. and B. A. Rubin (1962). *Biokhimiya*, **27**, 622.
- 95) Signoret, A. and J. Crouzet (1978). *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1871.
- 96) 兵藤 宏 (1967). 化学と生物, **5**, 441.
- 97) Takeo, T. and J. E. Baker (1973). *Phytochemistry*, **12**, 21.
- 98) Yamazaki, I. and L. H. Piette (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 47.
- 99) Hosoya, T. (1960). *J. Biochem.*, **47**, 369.
- 100) 田村良行・森田雄平 (1976). 植物酵素・蛋白質研究法, p 205, 共立出版, 東京.
- 101) Handbook of Chromatography Vol. I (1972). ed. by G. Zweig and J. Shenema, p 421, CRC Press, Ohio, USA.
- 102) 米山智恵子・櫛田忠衛 (1980). 日食工誌, **27**, 623.
- 103) Lattanzio, V. and A. Marchesini (1981). *J. Food Sci.*, **46**, 1907.
- 104) 中林敏郎 (1954). 農化, **28**, 212.
- 105) 中林敏郎 (1968). 日食工誌, **15**, 73.
- 106) Oda, Y., S. Ohe, G. Sato and H. Matsuoka (1978). *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 253.
- 107) 東野哲三・藤田修二 (1976). 栄養と食糧, **29**, 125.
- 108) 藤田修二・東野哲三 (1976). 栄養と食糧, **29**, 457.
- 109) 東野哲三・藤田修二・小宮博喜 (1978). 栄養と食糧, **31**, 95.
- 110) 藤田修二・東野哲三 (1979). 農化, **53**, 233.
- 111) 藤田修二・東野哲三 (1980). 農化, **54**, 201.
- 112) 藤田修二・東野哲三 (1980). 農化, **54**, 429.
- 113) 藤田修二・東野哲三 (1981). 日食工誌, **28**, 600.
- 114) 藤田修二・東野哲三 (1982). 日食工誌, **29**, 214.
- 115) 藤田修二・東野哲三 (1982). 佐賀大農彙, **53**, 17.
- 116) 藤田修二・東野哲三 (1983). 日食工誌, **30**, 650.