

〔山梨大発研報告 16 15~20 1981〕

甲州および Muscat Bailey A ブドウのポリフェノール オキシダーゼの電気泳動パターン*

中村 和夫・天野 義文・加賀美 元男

Electrophoretic Patterns of Polyphenol Oxidase from Koshu and Muscat Bailey A grapes *

KAZUO NAKAMURA, YOSHIFUMI AMANO, and MOTOO KAGAMI

Depart. of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Yamanashi
University, Kofu 400

In order to compare the characteristics of Koshu with Muscat Bailey A grape, an electrophoretic study on the polyphenol oxidase was performed by using polyacrylamide gel electrophoresis.

In both varieties, the crude enzyme preparation from unripe grapes showed a higher specific activity than that from ripe ones.

Isozyme patterns of both varieties were essentially similar with unripe grapes, but different with ripe grapes.

Pattern of the isozyme bands differed between both varieties when *o*-diphenol or *p*-cresol was used as a substrate, though a band at R_f 0.3 was detected with both varieties. Only the enzyme from ripe Koshu grape acted on pyrogallol.

Acetic acid treatment of the gel after electrophoresis resulted in the increase in the enzyme activity, and in the number of bands. The effect was especially marked in ripe Koshu grape, this clearly showing the characteristic difference between both varieties.

果実の酸化褐変反応に関与する酵素であるポリフェノールオキシダーゼについて、多くの研究^{1)~4)}がなされている。ブドウのポリフェノールオキシダーゼについても、ブドウ果実破碎時の褐変現象²⁾、ワイン醸造工程における褐変³⁾、酵素の性質⁴⁾などに関する数多くの研究報告が欧州系ブドウを用いてなされている。また、近年、電気泳動技術の発展に伴い、ポリフェノール

オキシダーゼの電気泳動パターンから品種の判別⁵⁾、ブドウ採取時期とアイソザイムの関係⁶⁾、薬剤の影響⁷⁾を検討することが行われている。

我国においても、甲州種を含む数種の在来種ブドウからワインを生産することが行われているが、本邦産ブドウのポリフェノールオキシダーゼに関する研究は見当たらない。

我々は、前報⁸⁾において甲州種ブドウの果醪がきわめて高いポリフェノールオキシダーゼ活性を有することを報告した。本研究では、甲州種ブドウから粗酵素溶液を抽出して電気泳動を行い、ブドウの成熟度、各

*日本産ブドウのポリフェノールオキシダーゼに関する研究・第2報（甲州種ブドウ果汁の酸素消費速度とその制御：醸工，52，92（1979）を第1報とする）

種ポリフェノールおよび酸による活性化がポリフェノールオキシダーゼの電気泳動パターンにおよぼす影響を検討した。また、同時に Muscat Bailey A 種についても同様の検討を行い甲州種ブドウの特徴を明らかにしたので報告する。

供試料および実験方法

供試ブドウ 山梨県内で1980年に収穫した次の2品種のブドウを試料とした。甲州種ブドウ(白ワイン用品種)および Muscat Bailey A種ブドウ(赤ワイン用品種)の未成熟ブドウとして開花日より60日後(7月収穫)のもの、成熟ブドウとして開花日より130日後(10月収穫)のものを用いた。

粗酵素溶液調製法 甲州種, Muscat Bailey A種ブドウとも、収穫直後の果粒を用いた。粗酵素溶液の調製法は Kidron ら³⁾の方法に準じて行った。すなわち、100gの果粒に対して、0.4Mショ糖と10mM, L-アスコルビン酸ナトリウムを含んだ0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 100mlを加え、ミキサーで14,000 rpm, 30秒間ホモジナイズした。得られたホモジネートを二層に重ねたナイロン布(100メッシュ)で搾汁し、その搾汁液を3,000 rpm, 5分間、0℃で遠心分離した。遠心分離して得られた上澄にはポリフェノールオキシダーゼ活性が殆どなく、活性の大部分は沈澱物の区分に残存していることが確認された。そこで、この沈澱物をポリフェノールオキシダーゼ活性画分として、これに0.4Mショ糖を含んだ0.005Mリン酸緩衝液(pH 7.0)を加え、懸濁して凍結保存し、試料とした。

酵素の可溶化は次のようにして行った。沈澱物に1.0%のトリトンX-100を含んだ0.005Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 100mlを加え、4℃で30分間攪拌抽出し、この懸濁液を15,000 rpmで30分間、0℃で遠心分離して上澄を回収した。沈澱には再び同緩衝液を加えて抽出し遠心分離した。この操作を3~4回くり返した。そして、酵素の比活性が高い抽出液を集めて粗酵素溶液とした。

スラブ型ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動電気泳動の操作は、永井⁹⁾、鈴木¹⁰⁾の方法に準じて行った。

泳動終了後、酵素活性バンドの染色は Benjaminら¹¹⁾の方法に従って行った。染色されたゲルプレートは、乾燥してフィルム状ポリアクリルアミド薄膜にして保存した。

活性バンドの表示は R_f 値を用いた。すなわち、陰極からのバンドの移動距離を、tracking dyeの移動距離で割った値で示した。

酵素活性測定法 酵素溶液0.5ml, 20mMカテコール溶液2.0ml, 0.1Mクエン酸-0.2Mリン酸二ナトリウム緩衝液(pH 6.0) 1.5mlを加え、全量を4.0mlにした。25℃, 10分間反応させた後、420nmにおける吸光度を測定した。吸光度を1分間当りに、0.001増加させる酵素量を1単位と定義した。

蛋白質質量測定法 ミクロ・ケルダール法¹²⁾によって測定し、粗蛋白質量として表した。

実験結果および考察

ブドウ成熟度によるポリフェノールオキシダーゼ活性の相違 甲州種および Muscat Bailey A種の未成熟と成熟ブドウ果実から、トリトンX-100を含んだ緩衝液を用いて抽出した粗酵素溶液の比活性を、両品種の成熟度に対して Fig.1 に示した。酵素の比活性は、甲州種, Muscat Bailey A種ともに未成熟果実のほうが成熟果実よりも高い値を示した。

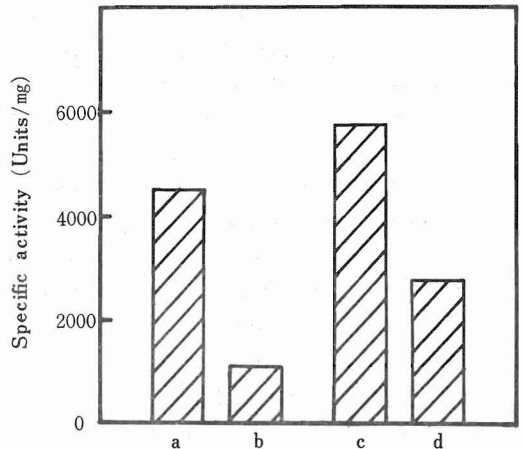


Fig. 1. Polyphenol oxidase activity of Koshu grape and Muscat Bailey A grape. (a) Unripe berries from Koshu grape; (b) Ripe berries from Koshu grape; (c) Unripe berries from Muscat Bailey A grape; (d) Ripe berries from Muscat Bailey A grape. The enzyme solution used was the extract with 1% Triton X-100 of the precipitate after centrifugation of crude homogenates of grapes at 3,000 rpm.

Kidronら³⁾は、ブドウのポリフェノールオキシダーゼの季節的变化を Semillon と Clairette (白ワイン用品種)、Carignane (赤ワイン用品種) について追跡し、どの品種でも未成熟期は酵素活性が高く、成熟すると糖度は上昇するが酵素活性、*o*-ジフェノール量は減少すると報告している。甲州種、Muscat Bailey A種についての結果も、Kidronら³⁾の報告と同様の傾向を示した。

ブドウの品種および成熟度の相違と電気泳動パターン 甲州種と Muscat Bailey A 種ブドウの未成熟および成熟果実を試料とし、その酵素抽出液をスラブディスク電気泳動にかけた。ブドウの成熟度および品種の違いによる酵素活性バンドのパターンの変化を比較検討した。

カテコールを基質としたときの泳動パターンをFig. 2に示した。成熟期のブドウでは、甲州種の場合、2

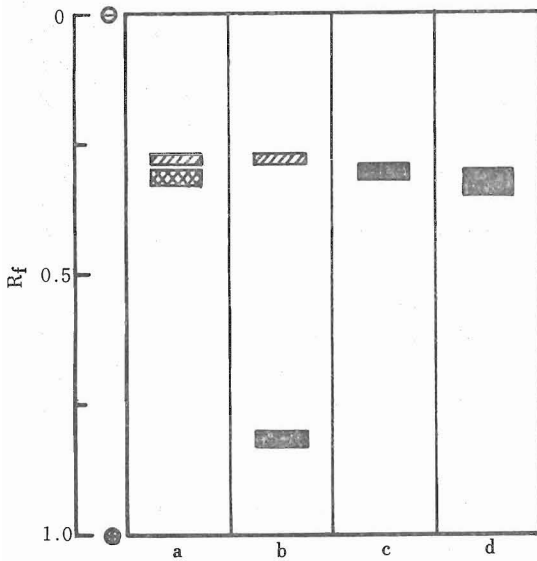





Fig. 2. Effect of maturities of Koshu grape and Muscat Bailey A grape on the polyacrylamide gel electrophoretic patterns of polyphenol oxidase. (a) Unripe berries from Koshu grape; (b) Ripe berries from Koshu grape; (c) Unripe berries from Muscat Bailey A grape; (d) Ripe berries from Muscat Bailey A grape. The gel was stained with catechol as the substrate. The activity of band on the gel was indicated; , Low; , Medium; , High.

本のバンドが現れたのに対し、Muscat Bailey A種では1本で、品種による違いが認められた。未成熟期では、甲州種と Muscat Bailey A種ともに $R_f = 0.3$ 付近の活性バンドのみが現われて両品種の間で泳動パターンに差は見られなかった。

Wolfe⁵⁾は、各品種の成熟ブドウについてデンブングル電気泳動を行い、ポリフェノールオキシダーゼおよび他の酵素の電気泳動パターンを利用して、共通した R_f 値をもつ活性バンドの有無でブドウの品種を系統分類している。甲州種ブドウについてもブドウの起源を知る上でポリフェノールオキシダーゼをはじめとする他の酵素の電気泳動パターンの比較研究は有効であろうと考えられる。

次に成熟度との関係では甲州種では、未成熟および成熟ブドウの双方に $R_f = 0.3$ の共通なバンドが現れた。未成熟ブドウでは $R_f = 0.3$ とそれに隣接したバンドのみであったが、成熟ブドウでは $R_f = 0.8$ に活性を示すバンドが現れた。 $R_f = 0.3$ のバンドが10分以内に呈色したのに対し、 $R_f = 0.8$ のバンドは15分以降25分以内で呈色した。この $R_f = 0.8$ のバンドは Muscat Bailey A種では検出されず、成熟した甲州ブドウに特徴的なバンドであった。このように活性の発現に要する時間的な差に関して、Redhaven peach⁶⁾の電気泳動パターンにおいて5分以内に現れるバンドと2時間ほど経過してから現れるものがあるとの報告がなされている。また、Concord種⁶⁾では R_f 値の大きいバンドの酵素活性は、成熟したブドウの方が未成熟ブドウより大きいことが示されている。

一方、Muscat Bailey A種ブドウの活性バンドは、未成熟および成熟の両方とも、 $R_f = 0.3$ 付近のバンドしか検出されず、成熟期による相違が認められなかった。

基質の相違による電気泳動パターン カテコール、クロロゲン酸等のフェノール基質に対する活性バンドの検出を行った。

成熟甲州種ブドウの泳動パターンを Fig. 3 に示した。主なバンドは R_f 値が 0.3 と 0.8 のバンドであった。カテコール、コーヒー酸、D-カテキン、L-ドーパの活性バンドは蒸留水で洗浄しても呈色が消えなかったが、クロロゲン酸を基質とした場合、1~2時間でバンドは消失した。このような退色現象について Paulsonら⁷⁾は、クロロゲン酸のバンドは非常に水に溶解しやすく速かにゲルの網目から拡散しやすいと報告している。よって本研究ではクロロゲン酸の活性バンドを処

理する時は基質に浸した後、アスコルビン酸に2分間浸し、直ちにグリセリン溶液に浸してからゲルの乾燥を行った。同様の現象がp-クレゾールの場合にも生じた。また、L-ドーパとピロガロールの場合、他のフェノールには見られない $R_f=0.25$ の活性バンドが検出された。ピロガロールの場合、活性バンドが呈色するのに要する時間はカテコールに比べて長かった。L-チロシンに対しては反応が全く検出されなかった。

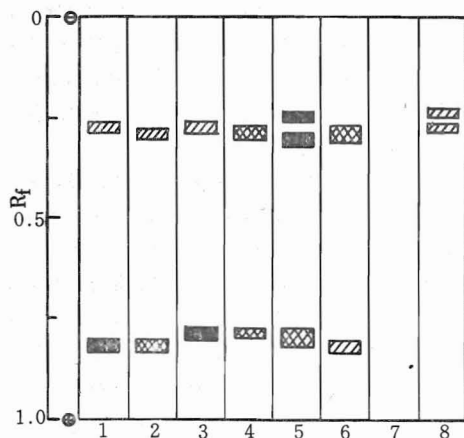


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of polyphenol oxidase from ripe Koshu grape.

Substrates : (1) Catechol ; (2) Chlorogenic acid ; (3) Caffeic acid ; (4) D-Catechin ; (5) L-DOPA ; (6) p-Cresol ; (7) L-Tyrosine ; (8) Pyrogallol.

一方、Fig. 4に成熟 Muscat Bailey A種ブドウの泳動パターンを示したが、各フェノール基質に対して $R_f=0.3$ のバンド1本しか見られなかった。ピロガロール、L-チロシンを基質とした場合、活性バンドが認められなかった。

各種フェノール類に対する甲州種の成熟と未成熟ブドウとを比較すると、未成熟ではどのフェノールでも $R_f=0.3$ のバンドしか現れず、またピロガロールとL-チロシンとに反応がなく、成熟ブドウとは異なっていた。一方、Muscat Bailey A種では成熟ブドウの結果と未成熟ブドウの結果は全く同じであった。

以上の結果より、(1)甲州種ブドウと Muscat Bailey A種ブドウの泳動パターンは、カテコールやクロロゲン酸等の *o*-ジフェノールに対して反応が鋭敏で類似したバンドを示すこと、(2)モノフェノールではp-ク

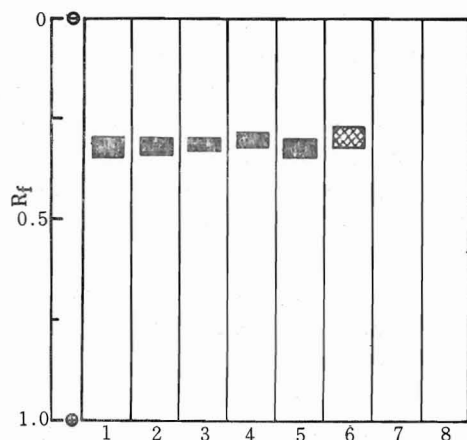


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of polyphenol oxidase from ripe Muscat Bailey A grape. The numbers are the same as those used in Fig. 3.

レゾールには反応を示すがL-チロシンに対しては反応しないこと、(3)ピロガロールに対して甲州種には反応があるが Muscat Bailey A種には存在しないことが明らかになった。

ポリフェノールオキシダーゼの多くは¹⁾、D-カテキン、コーヒー酸、カテコール等の *o*-ジフェノールをよく酸化する。しかし、モノフェノールおよびピロガロールに対する酸化反応は各々のポリフェノールオキシダーゼの間で異なる場合が多い。*o*-ジフェノラーゼであるベルベットビーンの酵素の場合¹³⁾、*o*-ジフェノール類を基質とした時の泳動パターンは同じ位置に各基質の活性が検出されるが、L-チロシンには反応しない。Harelら¹⁴⁾はブドウのポリフェノールオキシダーゼが *o*-ジフェノール類の他にp-クレゾールを酸化すると報告している。本研究においても、成熟した甲州種ブドウのポリフェノールオキシダーゼはp-クレゾールに対し R_f 値の異なる2個のバンドをもち、ピロガロールにも活性を示すことが特徴であった。また、Muscat Bailey A種の場合、ピロガロールに対しては活性バンドが検出されず、p-クレゾールのみバンドが現れた。この結果はブドウの品種によっても基質特異性が異なることを示している。

酢酸による電気泳動パターンの変化 酢酸によるポリフェノールオキシダーゼの泳動パターンの変化を、Flurkeyら¹⁵⁾の方法に準じて検討した。

各種フェノールを基質とした時の泳動パターンが、

acid shock (酸刺激) によって変化するか否かを、成熟した甲州種と Muscat Bailey A 種ブドウについて検討した (Fig. 5, Fig. 6)。

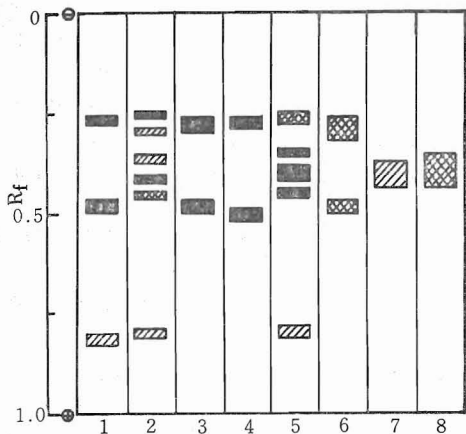


Fig. 5. Effect of acid shock on the polyacrylamide gel electrophoretic patterns of polyphenol oxidase from ripe Koshu grape.

After the gel was stained with each substrate, the gel was immersed in 7% acetic acid. The numbers are the same as those used in Fig. 3.

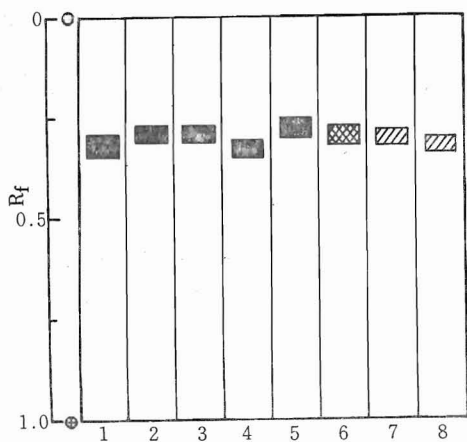


Fig. 6. Effect of acid shock on the polyacrylamide gel electrophoretic patterns of polyphenol oxidase from ripe Muscat Bailey A grape.

After the gel was stained with each substrate, the gel was immersed in 7% acetic acid. The numbers are the same as those used in Fig. 3.

成熟甲州種の場合 (Fig. 5), カテコールが基質の時, Fig. 3のパターンと比較して活性バンドの呈色度が強くなった。また酢酸処理によって新たに $R_f=0.47$ のバンドが現れた。一方, $R_f=0.8$ のバンドは活性が弱くなった。クロロゲン酸の場合はカテコールの場合よりも更にバンド数が増加し, 新たに $R_f=0.25, 0.37, 0.41, 0.45$ の位置にもバンドが現れ, 酢酸処理によって活性化されるバンドが存在することがわかった。また, L-ドーパもクロロゲン酸と同様のパターンを示した。しかし, $R_f=0.79$ のバンドはカテコールの場合と同様に呈色が弱くなった。コーヒー酸, D-カテキン, p-クレゾールの場合はカテコールと同様の結果であったが, $R_f=0.8$ のバンドは消失した。L-チロシンは, Fig. 3の場合は全くバンドが認められなかったが, acid shock により発色の弱いバンドが現れた。また, ピロガロールの活性バンドは Fig. 3の場合よりも更に明瞭になった。このように成熟甲州種では多くの基質に対し酢酸処理によって電気泳動パターンの変化することが明らかとなった。

未成熟甲州種では, 酢酸処理による活性バンド数の増加は認められなかった。バンドの位置も酸処理以前と同じで呈色度が増しただけであった。L-チロシンとピロガロールの場合, 酸処理前にはバンドが存在しなかったが新たに1本現れた。

成熟 Muscat Bailey A 種ブドウの場合 (Fig. 6), 成熟甲州種ブドウのように酢酸処理によって活性バンド数の増加は認められず, 同じ R_f 値のバンドの呈色が強くなった。この結果は, 未成熟甲州種における酢酸処理後の泳動パターンにおいて, バンド数の増加はないが処理前に活性バンドが存在しなかった L-チロシンとピロガロールの場合にのみ新たにバンドが現れた, という結果と同様であった。また, 未成熟 Muscat Bailey A 種における結果も成熟 Muscat Bailey A 種ブドウの結果と同様であった。

以上のように全ての基質の泳動パターンが酢酸処理により影響をうけ活性バンドが変化した。桃¹⁵⁾のポリフェノールオキシダーゼの電気泳動パターンでは2本のバンドが, 酢酸処理により5本に増加したと報告されており, この現象は酢酸処理によって緩やかな酸刺激が施され酵素蛋白に変化が生じたためであろうと述べられている。また, Lerner ら¹⁶⁾は酵素を酸性 pH や尿素中に短時間置くと, 数分後に4~10倍活性が増加すると報告しており, 酸性 pH や尿素が酵素蛋白の活性部位付近を刺激し構造を変化させて, 酵素の活性

化を導くと考察している。また、活性化は酵素と阻害物質の複合体から阻害物質の除去に帰因しているともいわれ¹⁷⁾、酵素の dissociation や aggregation よりもむしろ limited conformational change によるものと考えられている¹⁸⁾。

本研究でも上に述べたような理由に原因すると考えられる活性バンドの変化が検出された。このような実験により、甲州種と Muscat Bailey A 種ブドウの電気泳動パターンの違いが更に明確になり、この2種のブドウを容易に区別することが可能となった。

要 約

甲州種ブドウからポリフェノールオキシダーゼを抽出し、電気泳動を行い、甲州種ブドウの特徴を Muscat Bailey A 種と比較検討し次の結果を得た。

粗酵素の比活性は甲州種、Muscat Bailey A 種ともに未成熟ブドウ果実の方が高かった。成熟度の違いによる電気泳動パターンでは、甲州種ブドウは成熟ブドウと未成熟ブドウとで違いが認められた。品種の違いによる電気泳動パターンでは、甲州種ブドウと Muscat Bailey A 種ブドウとでは、未成熟期では差は認められず、成熟期では差が認められた。o-ジフェノール類に対する反応では共通的に活性を有するバンドと基質特有のバンドが現れた。モノフェノール類に対する反応では、p-クレゾールには反応があったがL-チロシンにはなかった。ピロガロールに対しては成熟甲州種のみ活性が認められた。

酢酸を用いた acid shock により、処理以前に比べて活性が増加し全ての基質に対し反応した。特に甲州種成熟ブドウにはバンド数の増加が認められ、Muscat Bailey A 種との差が更に明確になった。

本研究の経費の一部は實吉奨学会研究助成金（昭和55年度）によった。

文 献

- 1) Mayer, A. M., Harel, E.: *Phytochemistry*, **18**, 193 (1979)
- 2) Traverso-Rweda, S., Singleton, V. L.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**, 103 (1973)
- 3) Kidron, M., Harel, E., Mayer, A. M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 30 (1978)
- 4) Kimberly, W. W., Lee, C. Y.: *J. Food Sci.*, **46**, 506 (1981)
- 5) Wolfe, W. H.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**, 68 (1976)
- 6) Cash, J. N., Sistrunk, W. A., Stutte, C. A.: *J. Food Sci.*, **41**, 1398 (1976)
- 7) Paulson, A. T., Vanderstoep, J., Paritt, S. W.: *J. Food Sci.*, **45**, 34 (1980)
- 8) 天野, 久保田, 加賀美: *醸酵工学*, **57**, 92(1979)
- 9) 永井: *蛋白質・核酸・酵素*, **11**, 744 (1966)
- 10) 鈴木: *遺伝*, **31**, 43 (1973)
- 11) Benjamin, N. D., Montgomery, M. W.: *J. Food Sci.*, **38**, 799 (1973)
- 12) 東京大学農芸化学教室: *実験農芸化学* (下), 54 (1972) 朝倉書店
- 13) Zenin, C. T.: *J. Food Sci.*, **43**, 646 (1978)
- 14) Harel, E., Mayer, A. M.: *Phytochemistry*, **10**, 17 (1971)
- 15) Flurkey, W. H., Jen, J. J.: *J. Food Sci.*, **43**, 1826 (1978)
- 16) Lerner, H. R., Mayer, A. M., Harel, E.: *Phytochemistry*, **11**, 2415 (1972)
- 17) Kenten, R. H.: *Biochem. J.*, **68**, 224 (1958)
- 18) Swain, T., Mapson, L. W., Robb, D. A.: *Phytochemistry*, **5**, 469 (1966)