

[J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. 28, 37~43 1993]

甲州種ブドウのポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼす 塩化ナトリウム濃度とpHの影響

中村和夫、黒沢 尋、天野義文
(山梨大学工学部化学生物工学科)

Effect of Sodium Chloride Concentration and pH on the Activity of Polyphenol Oxidase from Koshu Grapes

KAZUO NAKAMURA, HIROSHI KUROSAWA and YOSHIFUMI AMANO

*Department of Applied Chemistry and Biotechnology,
Faculty of Engineering, Yamanashi University, Kofu 400, Japan*

Abstract

The effect of sodium chloride and pH on the oxygen uptake rate of Koshu grape juice was investigated. The oxygen uptake rate decreased with the addition of sodium chloride. This inhibiting effect of sodium chloride depended on the juice pH, namely, the lower the pH of the grape juice, the greater the inhibition by sodium chloride. Those inhibiting effects were common to Muscat Bailey A grape juice.

The inhibiting effect of sodium chloride and pH on the enzyme activity of a purified polyphenol oxidase (PPO) from Koshu grapes was also investigated. Although sodium chloride did not inhibit the activity of PPO at pH 6.0, 15% and 50 % inhibition of the PPO activity was observed with 100 mM sodium chloride at pH 5.0 and 10 mM sodium chloride at pH 3.5, respectively. These results showed that the inhibition by chloride ion depended on pH. Halogen ions including fluoride, chloride, iodine and bromide inhibited the PPO activity at pH 3.5. At pH 6.0 fluoride and iodine ions strongly inhibited the activity.

緒 言

甲州種ブドウはわが国において白ワインの原料として最も代表的なものである。ブドウを圧搾するとき、何の処理も行わない場合は得られるブドウ果汁は速やかに褐変する。果汁の褐変は、果汁中に含まれている酸化酵素であるポリフェノールオキシダーゼが、果汁中のポリフェノールと溶存酸素との反応を触媒しキノンを生じさせ、更に生成したキノンがメラニンに変わって褐色となるときに現象である。

我々は甲州種ブドウの酸化褐変について検討して

きた。甲州種ブドウの果汁が高い酸素吸収速度を有し、その主な原因がポリフェノールオキシダーゼであることを既に明らかにした¹⁾。更に、ポリフェノールオキシダーゼをブドウから分離精製し、最適pH、温度、安定性、基質特異性について明らかにした²⁾。本研究では、甲州種ブドウのポリフェノールオキシダーゼに及ぼす塩化ナトリウムの影響について検討することとした。

ポリフェノールオキシダーゼに及ぼす塩化ナトリウムの影響についてはリンゴ³⁾、オリーブ⁴⁾で検

討され、塩素化合物の阻害がpHに依存していることが報告されている。しかし、甲州種ブドウのポリフェノールオキシダーゼの活性に及ぼす塩素イオンやpHの影響については研究されていない。

本実験では甲州種ブドウ果汁において塩化物濃度及びpHがどのように影響するかを検討した。また品種間の比較を行うためにマスカットベリーA種果汁についても検討した。さらに、果汁における上記の結果はポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼす阻害であることを、精製酵素を用いて明らかにしたのでここに報告する。

実験方法

供試材料

山梨県内で収穫した甲州種及びマスカットベリーA種のブドウを用いた。

果汁の調製方法

手で除梗したブドウ顆粒200gをホモジナイザーに入れ、15,000rpm、2分間ホモジナイズした。処理液をナイロン布(100meshes、2層)を用いて手で搾汁した。直ちに搾汁液を三角フラスコに入れ、窒素ガスを通気した。フラスコを密栓し使用するまで水冷した。

果汁の酸素吸収速度の測定法

酸素電極法によって行った。果汁2.0mlと果汁と同じpHの0.1M酒石酸緩衝液18.5mlの混合物に0.1Mカテコール溶液2.0mlを加えて反応を開始した。25°Cで溶存酸素濃度の減少を記録し、酸素吸収速度を求めた。

ポリフェノールオキシダーゼの調製方法

甲州種ブドウから中村ら²⁾の方法に従って酵素を分離精製した。

ブドウ果汁に冷アセトンを加えて生じた沈澱物からアセトン粉末を作製した。アセトン粉末にKClを含む0.1Mリン酸緩衝液を加えて酵素を抽出した。可溶性酵素液を透析した後、硫酸塩析を行った。硫酸飽和度60-95%で沈澱する蛋白を遠心分離で集めた。0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)で透析した酵素を、0.01Mリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したCM-セルロースカラムに加えクロマトグラフィーを行った。活性画分を回収した後、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー、更にハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーを行って精製した。この精製標品を酵素活性測定のための酵素とした。

酵素活性測定法

0.1M酢酸緩衝液(pH3.5, 5.0, または6.0) 3.5mlと0.13Mカテコール溶液0.3mlの混合液に、酵素溶液0.2mlを加えて反応を開始した。25°Cで420nmにおける吸光度の増加量を測定した。

実験結果及び考察

1. pHの異なるブドウ果汁の酸素吸収速度に及ぼす塩化ナトリウム濃度の影響

2. 84のpHを示すブドウ果汁(未熟ブドウ果汁に補糖して成熟ブドウの糖濃度にしたもの)、および3. 84のpHを示すブドウ果汁(成熟ブドウの果汁)の酸素吸収速度を測定した。測定混合物に各濃度の塩化ナトリウムを加え酸素吸収速度に及ぼす影響を調べた。阻害度は塩化ナトリウムを含まないときの酸素吸収速度(コントロール)を100%として相対活性値で表した。

Fig. 1に示すようにpH3.84の果汁では塩化ナトリウム濃度12mMで酸素吸収速度はコントロールの半分に低下し50%の活性が阻害されることがわかった。塩化ナトリウム濃度が増加すると阻害度が増加し、100mMでは90%阻害された。一方、pH2.84の果汁では5mMの塩化ナトリウム濃度で50%の活性が阻害され、100mMでは殆ど酸素吸収活性が認められなかった。このようにpHの低い果汁ほど低濃度の塩化ナトリウムで阻害がおきることが明らかとなった。すなわち、果汁の酸素吸収における塩化ナトリウムによる阻害の程度は果汁のpHによって異なることがわかった。塩化ナトリウムによる阻害において果汁pHが阻害度に影響を及ぼすことが、他の果実と同様に甲州種ブドウにおいても存在することが明らかとなった。未熟ブドウすなわち酸度の高いブドウ果汁のほうが少量の塩化ナトリウムの添加によって褐変が防止されることがわかった。

甲州種ブドウにおいて酸素吸収活性が塩化ナトリウムによって阻害され、さらにpH依存性であるという現象が他の品種のブドウにおいてもみられるか否かを検討するために、赤ワイン用品種のMuscat Bailey A種ブドウについて実験した。甲州種ブドウ果汁(pH3.30、総酸度0.74g/100ml)とMuscat Bailey A種ブドウ果汁(pH3.70、総酸度0.75g/100ml)を酒石酸または水酸化ナトリウムを用いてpHを3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0にそれぞれ調製した。これらのpHの異なる果汁の酸素吸収速度に対する10mMの塩化ナトリウムの影響をFig. 2に示した。両方の品種ともpHが高いほど酸素吸収活性の阻害度が小さく、pHが低いほど阻害されやすいこ

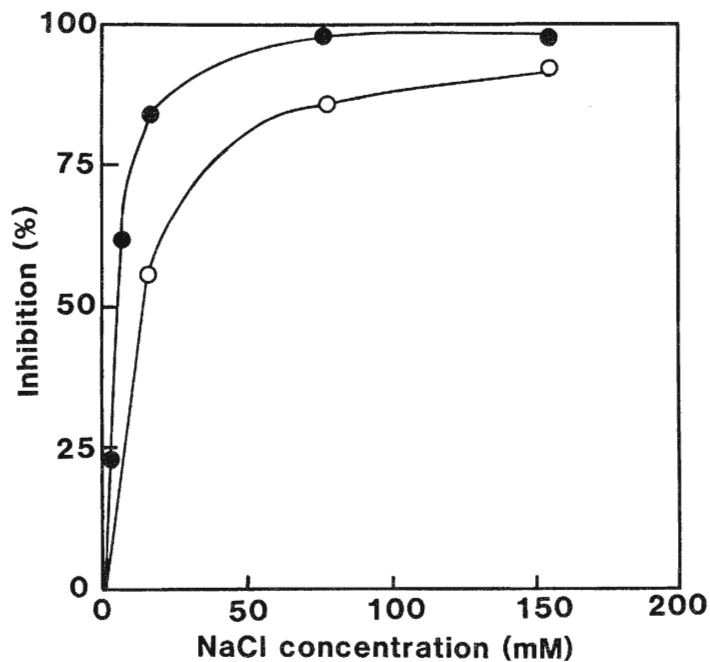


Fig. 1. Effect of NaCl concentration and pH on the oxygen uptake rate of Koshu grape juices.
The pHs of grape juice were 2.84(●) and 3.84(○).

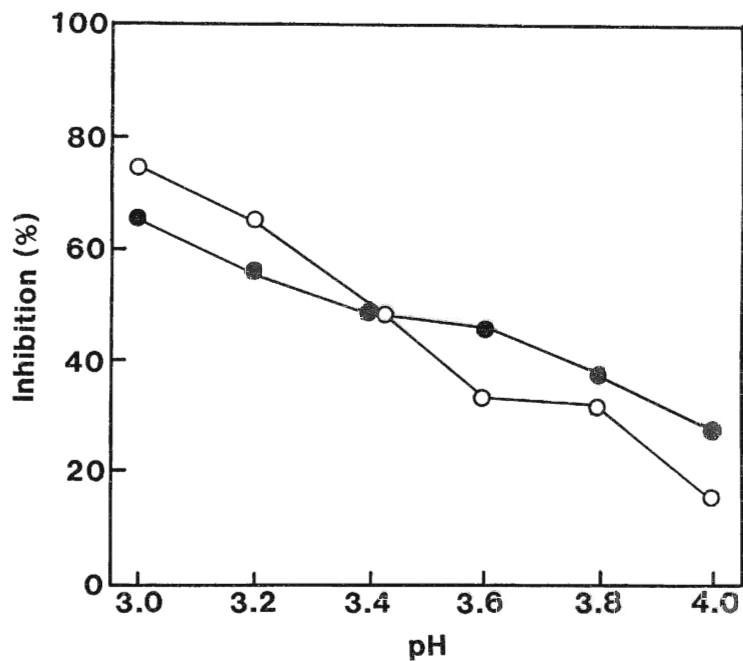


Fig. 2. Effect of pH on the oxygen uptake rate of Koshu(●) and Muscat Bailey A(○).
The grape juices contained 10mM NaCl. The pHs of grape juices were adjusted by adding tartaric acid or sodium hydroxide solution.

とが明らかとなった。このように塩化ナトリウムによる阻害はブドウの品種に関係なく、かつ阻害度はpHに依存していることがわかった。

ブドウ果汁の酸素吸収及び褐変はブドウ果汁中に含まれる酸化酵素であるポリフェノールオキシダーゼによる酵素反応に基づいていると考えられる。しかし、果汁の酸化褐変反応における塩化物とpHの影響を明らかにするには、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、分離精製して得られた精製酵素を用いて褐変反応の活性に及ぼす塩化物及びpHの影響を検討することが必要である。

よって、次の項では甲州種ブドウから精製したポリフェノールオキシダーゼを用いて検討を行った。すなわち、ブドウ果汁における酸素吸収活性の阻害現象はポリフェノールオキシダーゼによる酵素反応が影響を受けた結果であることを確かめることにした。

2. 甲州種ブドウから精製したポリフェノールオキシダーゼの活性に対する塩化物とpHの影響
 - 1) 塩化ナトリウムによるポリフェノールオキシ

ダーゼ活性の阻害におけるpHと有機酸の影響
 精製酵素を用いカテコールを酸化基質として反応を行わせ、この酸化反応に及ぼす塩化ナトリウム濃度と緩衝液の種類の影響について検討した。酒石酸、乳酸、酢酸、クエン酸、リン酸を構成成分とする各緩衝液を用いpHを3.5, 5.0, 6.0に調整して活性を測定した。Fig. 3に示すように塩化ナトリウム濃度が同じであってもpHにより阻害度が異なることが認められた。すなわち、pH5.0では100mMの塩化ナトリウム濃度で15%、pH3.5では10mMの塩化ナトリウム濃度で50%阻害された。一方、pH6.0では殆ど阻害されなかった。この結果を他のポリフェノールオキシダーゼの阻害剤と比較してみたのがTable Iである。pH6.0で試験した阻害剤のうち、塩化ナトリウム以外の4種は1mM以下の低濃度で活性を100%阻害したが、塩化ナトリウムでは高濃度にもかかわらず、阻害がみられなかった。

このように塩化ナトリウムの酵素活性に及ぼす阻害はpHに強く依存することが明らかとなった。同様の現象はオリーブ⁴⁾やリンゴ³⁾のフェ

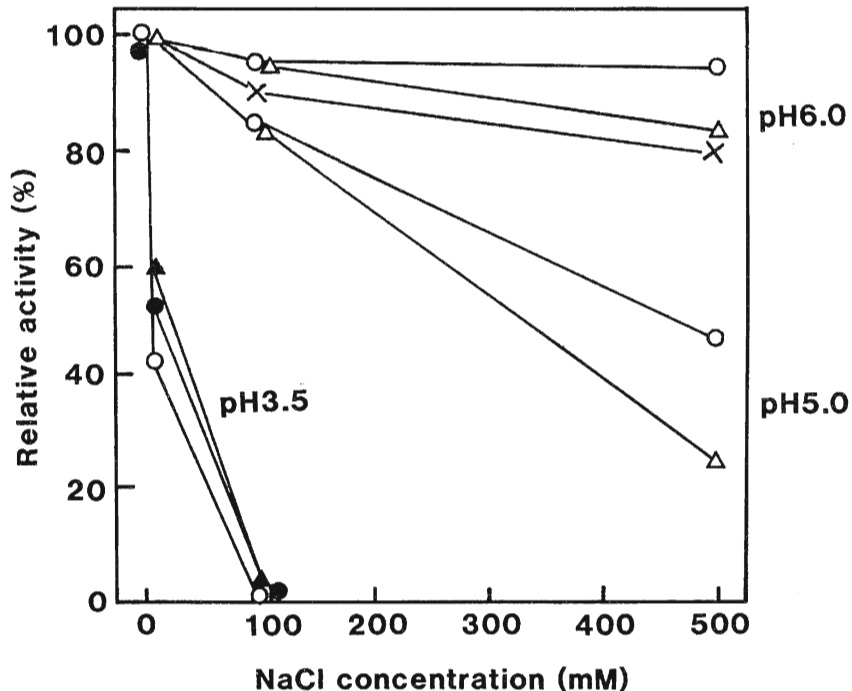


Fig. 3. Effect of NaCl concentration and pH on the activity of polyphenol oxidase from Koshu grapes.

The type of buffers used were tartrate(●), lactate(▲), acetate(○), citrate(△) and phosphate(×).

ノール酸化酵素について報告されている。

緩衝液の構成成分である有機酸の種類の影響を調べたところ、Fig. 3に示すように酵素活性および塩化ナトリウムの阻害度にはほとんど影響しないことが明らかとなり、塩化ナトリウムの阻害は共存イオンによらずpH依存性であることが示された。

2) ポリフェノールオキシダーゼ活性の阻害におよぼす塩素化合物の種類の影響

塩化ナトリウム以外の塩素化合物においても塩化ナトリウムと同様の効果が見られるかどうか検討した。塩素化合物として、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウムを用いた。

pH6.0とpH3.5の酢酸緩衝液におけるポリフェノールオキシダーゼ活性への塩素化合物の濃度の影響をFig. 4.に示した。pH6.0においては0から500mMの塩化物濃度においても阻害度は小さく、塩化ナトリウム以外の塩素化合物でも同様の阻害効果を示すことがわかった。このことは阻害が陽イオンの影響によるものでなく塩素イオンによって引き起こされることを示している。また、

ブドウ果汁のpHに近いpHの3.5においてはどの塩も同じ阻害度を示す結果となり、pH6.0における結果よりもさらに明瞭に、陽イオンの影響よりも塩素イオンによって阻害が生ずることが示された。

天野ら¹⁾は甲州種ブドウ果汁の酸素吸収速度に及ぼす塩素化合物の影響を調べたところ、塩化ナトリウム濃度10mMで76%、20mMで85%活性が阻害されたことを報告している。また、他の塩素化合物を用いたときも塩素イオンが活性を阻害していることを述べている。

以上のようにブドウ果汁での結果を精製酵素の反応から説明することができた。

3) ハロゲンイオンのポリフェノールオキシダーゼ活性への影響

塩素イオンの場合pH6.0では高濃度の塩素化合物でも活性が阻害されにくいこと、pH3.5では低濃度でも阻害されやすいことが明らかとなった。塩素イオン以外のハロゲンイオンではポリフェノールオキシダーゼ活性はどのように阻害されるのか検討した。

Table I Effect of inhibitors on the activity of polyphenol oxidase from Koshu grapes at pH6.0

Inhibitor	Concentration	Inhibition(%)
Na-DEDTC	50 μ M	14
	100	42
	500	98
KCN	50 μ M	34
	100	51
	1000	95
L-Cysteine	50 μ M	59
	100	92
	1000	100
Potassium metabisulfite	50 μ M	37
	100	54
	1000	100
NaCl	10mM	0
	100	0
	500	0

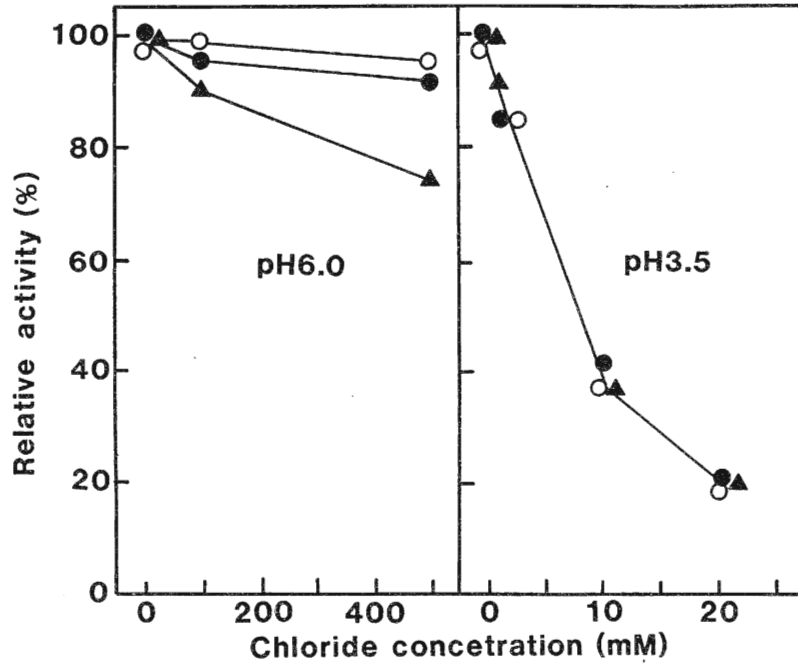


Fig. 4. Effect of chloride concentration on the activity of polyphenol oxidase from Koshu grapes at pH6.0 and pH3.5.

The chloride compounds used were NaCl(●), KCl(○) and NH₄Cl(▲).

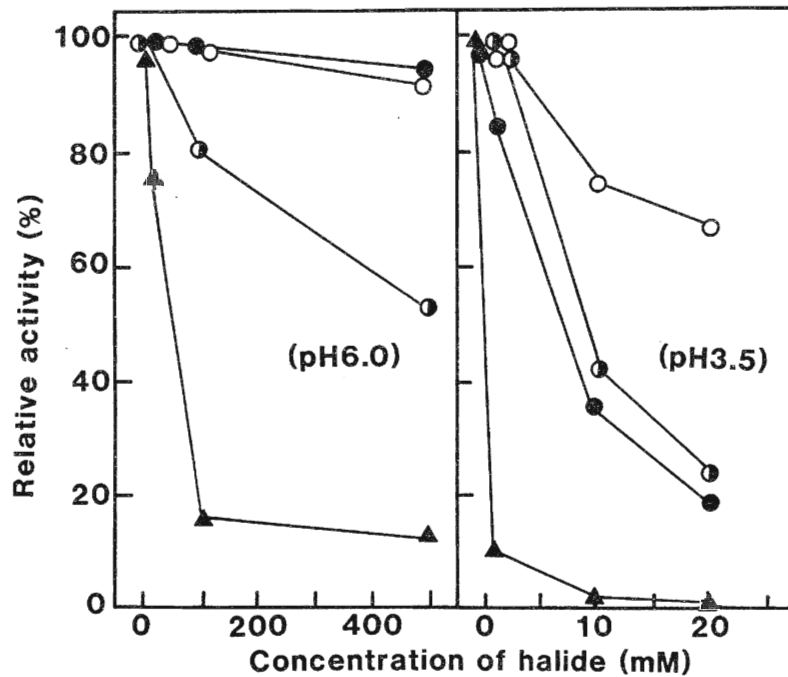


Fig. 5. Effect of halide concentration on the activity of polyphenol oxidase from Koshu grapes at pH6.0 and pH3.5.

The halide ions used were chloride(●), bromide(○), iodide(◐) and fluoride(▲).

その結果、塩素以外のハロゲンイオンにおいてもpH6.0よりもpH3.5のほうが低濃度で阻害することがわかった (Fig. 5)。pH6.0では臭素イオンは塩素イオンと同様に高濃度でも阻害度が小さかった。ヨウ素イオンとフッ素イオンは、pH6.0において臭素や塩素イオンの結果と異なり、ヨウ素イオン濃度100mMで20%阻害し500mMで50%阻害した。フッ素イオンは100mMの濃度で80%以上阻害することがわかった。すなわち、ハロゲンイオンの種類がポリフェノールオキシダーゼ活性に大きく影響することが示された。

pH3.5ではpH6.0の時の阻害のパターンとは異なり、臭素イオンは塩素イオンよりも阻害効果が小さく、ヨウ素イオンと塩素イオンが同じパターンを示した。フッ素イオンは低濃度で非常に強く阻害することが示された。

以上のように、pHの違いによって阻害度に相違が生ずること、またハロゲンイオンの種類によって効果が異なることが明らかとなった。Robbら⁵⁾は、フッ素イオンはチロシナーゼの活性部位に存在する銅をキレート化して阻害することを述べている。本実験においてもフッ素イオンが強く阻害するのはこのような効果によるものと考えられる。Shalomら⁴⁾はオリーブのカテコールオキシダーゼにおいて、ハロゲン化物の影響はpH5においてフッ素の阻害が強く、ついで塩素、臭素であることと、pHに依存することを報告している。pHの依存性については、銅とハロゲンイオンとの間の複合体の形成にpHが影響し、低いpHではその複合体が安定であるためであるといっている。本実験の結果もこのような理由によって、pHが低下すると阻害効果が大きくなるものと考えられる。

要 約

甲州種ブドウ果汁の酸素吸収速度に及ぼす塩化ナトリウム濃度とpHの影響を検討した。ブドウ果汁

の酸素吸収活性は塩化ナトリウムによって阻害されたが、pHの低い果汁の方がpHの高い果汁よりもより低濃度の塩化ナトリウムによって阻害された。この結果はマスカットベリーA種ブドウにおいても同様であった。

甲州種ブドウから精製したポリフェノールオキシダーゼ活性に及ぼす塩化ナトリウム濃度とpHの影響を検討した。pH6では殆ど阻害されなかった。pH5では100mMのNaClで15%、pH3.5では10mMのNaClで50%阻害された。酵素活性に及ぼす塩化ナトリウムの阻害はpH依存性であることが示された。塩素化合物中の塩素イオンが酵素活性を阻害した。ハロゲンイオンの影響を調べたところ、pH6ではフッ素イオンとヨウ素イオンは活性を阻害したが、塩素イオン、臭素イオンの影響は小さかった。一方、pH3.5ではすべてのハロゲンイオンにより阻害が生じたが特にフッ素イオンが低濃度で非常に強く活性を阻害した。

文 献

- (1) 天野義文, 久保田正俊, 加賀美元男: 発酵工学, 57, 92-101 (1979).
- (2) Nakamura, K., Amano, Y., and Kagami, M.: *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 122-127 (1983).
- (3) Mayer, M.A.R., and Philippon, J.: *Phytochemistry*, 25, 2717-2719 (1986).
- (4) Shalom, N. B., Kahn, V., Harel, E., and Mayer, A.M.: *Phytochemistry*, 16, 1153-1158 (1977).
- (5) Robb, D. A., Swain, T., and Mapson, L. W.: *Phytochemistry*, 5, 665-675 (1966).