報 文

食用色素光分解物のペプシン活性に及ぼす影響について

三 谷 璋 子

福山市立女子短期大学家政科

Effect of Photolysis Products of Food Coloring Matters on Pepsin Activity

Akiko Mitani

Fukuyama City Junior College for Women

Artificial digestion experiment by employing pepsin was made by using Blue-2 of tar coloring matters for food and its photolysis product, and the following results were obtained:

- 1) As for the effects of the photolysis products of tar coloring matters for food, the relation of Blue-2 and pH showed that light resistance of Blue-2 was decreased completely at the initial UV light irradiation except pH-7 and the absorption spectrum showed a little change. That is, the absorption value decreased in the visible region of the spectrum and the shoulder of spectrum disappeared in the ultra-violet region, showing a gentle form.
- 2) Concerning the effects on pepsin activity of Blue-2, enzyme activity was little hindered under non-UV light. But in regard to the effects of the photolysis product, the longer the days of UV light irradiation were, the nearer pH got to the neutral medium, the more enzyme activity was inhibited.
- 3) Regarding the dye-bound mechanism of pepsin and Blue-2, or that of pepsin and the photolysis product from gelfiltration chromatography by Sephadex G-75, pepsin structure changed in the low molecular range and as a result, enzyme activity was inhibited.

Jap. J. Nutr., 36 (3) 107~111 (1978)

緒 言

近年、経済水準の上昇と共に食品工業界も著しい進展をとげ、加工食品、保存食品の生産は急激に上昇し、それに伴って食品添加物の果たす役割も大きい。現在、使用が許可されている食用タール色素（以下、色素と略す）は11種あり、色素の毒性、発癌性に関しては各種の検討がなされており¹⁾²⁾、また、消化酵素に対する色素の影響についても、多くの報告がなされている^{3)~6)}。色素は、嗜好性を増しあるいは購買意欲を起こせるなど多目的に利用されている。しかし、使用許可されている色素も周囲の環境の影響を受け多様な変化を受けることもあり、その中で特に食品の製造、流通過程においては、日光や人工照明等、光の介入が無視できない状態にある。本報は、色素の光分解物は安全であるかどうか、また、色素が光分解され、その結果どういふものができるか、色素光分解物のたん白質に対する結合機構はどのようであるか等を知ることを目的として、プロテアーゼ特にペプシンについて基礎実験を行なった結果、興味ある知見を得たのでここに報告する。

実 験 方 法

1) 基質：カゼイン（メルク製，Hammarsten）を用い，M/5 HCl-KCl 緩衝液（pH 1.5）に溶解し，1%濃度にて実験に供した。

2) 酵素：ペプシン（メルク製，E/g 35,000）は 1 mg/ml HCl-KCl 緩衝液（pH 1.5）に溶解して実験に供した。

3) 食用タール色素として，インジゴイド系色素である青色 2 号（B-2 と略記，東京化学工業製）を用い，McIlvaine 緩衝液（pH 3, 5, 7）に溶解して，0.01% にて実験に供した。

4) 食用タール色素の光分解：色素溶液を 0～9 日間紫外線照射（東洋電子工業製，365 nm）し，退色を島津製ダブルビーム分光光度計を用いて，最大吸光波長（B-2 は 613 nm）の吸光値の測定および吸収スペクトルも測定した。

5) プロテアーゼ活性の測定：榎本ら⁷⁾の方法に従って，基質に pH 別色素溶液（終濃度 0.001%）および色素光分解物を加えて，ペプシンにより 30 分間人工消化し酵素活性を測定した。さらに，ペプシンに対する色素の結合実験として，ペプシン 5 ml に直接色素溶液 2 ml（または，光分解物 2 ml）および M/5 HCl-KCl 緩衝液（pH 1.5）3 ml を加え，37°C に 20 分間放置して前処理した後，基質 10 ml を加え 30 分間人工消化した。これらの消化分解液についてフォリン呈色法に従ってペプシン活性度を測定した。

6) ゲルろ過：セファデックス G-75 を用い，カラムベット 2.5×45 cm，1 フラクションは 10 ml，流速 10 ml/20 min. で行ない，各溶出液について 280 nm における吸光値を測定した。

結果および考察

1. 光分解と pH との関係

色素 B-2 が pH 別に紫外線照射により，どのような影響をうけたかを調べた結果，Fig. 1 に示すような色素の変化がみられた。

B-2 は食用タール色素の中では光分解の起こりやすい色素であり，紫外線照射 1～2 日で完全に退色した。そこで，pH 7 における色素の光分解を吸収スペクトルより検討した（Fig. 2）。B-2 は 613 nm にピークを，350 nm 付近に肩をもつ色素であるが，紫外線照射を行なうと，照射 2 日目で，可視部のピークは消失して退色が認められ，紫外部の肩も紫外線照射が長くなると消失し，全体的になだらかなスペクトルを示した。この傾向は，

Fig. 1 Change of residual color in photolysis of Blue-2 by pH.

Fig. 2 Absorption spectrum of Blue-2 photolysis by pH.

pH 3, 5 においては, さらに顕著に認められた。

2. ペプシン活性に及ぼす影響

色素 B-2 のペプシン活性に及ぼす影響を, カゼインに色素溶液のかわりに, 各 pH 別の緩衝液を加えたものの分解生成アミノ酸量を100%として, それに対して pH 別色素添加時の分解生成アミノ酸量を百分率で表わした結果を Table 1 に示す。

Table 1 Effect of binding Blue-2 and its photolysis product with casein on pepsin activity

Experimental condition of coloring matter	Enzyme activity %*		
	pH 3	pH 5	pH 7
non-UV light	91	83	99
2 days under UV light	79	67	61
9 days under UV light	74	50	20

[The reaction of pepsin 5 ml to the mixture of casein 10 ml, coloring matter 2 ml and buffer (pH 1.5) 3 ml]

$$* \frac{\text{Pepsin activity in the presence of coloring matter}}{\text{Pepsin activity in the absence of coloring matter}} \times 100$$

紫外線無照射色素溶液添加の場合, B-2 は, pH 7 を除いてわずかな酵素活性阻害作用がみられた。しかし, B-2 の光分解物は, 紫外線照射日数が長くなるほど, また色素溶液の pH が中性域にいくほど, ペプシンによるカゼインの分解を阻害し, 光分解物の酵素活性への影響が認められた。この阻害作用は, 色素が基質と結合する以外にペプシン酵素に直接結合することが考えられるため, ペプシンに直接色素を加え, 前処理した後, カゼインを加えて酵素活性を測定した結果は Table 2 に示す。

Table 2 Effect of Blue-2 and its photolysis product on enzyme activity

Experimental condition of coloring matter	Enzyme activity %*		
	pH 3	pH 5	pH 7
non-UV light	99	96	61
2 days under UV light	96	89	90
9 days under UV light	94	67	71

[The reaction of casein 10 ml to the mixture of pepsin 5 ml, coloring matter 2 ml and buffer (pH 1.5) 3 ml]

$$* \frac{\text{Pepsin activity in the presence of coloring matter}}{\text{Pepsin activity in the absence of coloring matter}} \times 100$$

無照射色素溶液が pH 3 では, ほとんど酵素活性阻害は認められず, pH 5 では, わずかな阻害が認められ, pH 7 においては, ペプシンとよく結合し, 阻害作用を示し, カゼインへの結合とは異なっていた。古武⁸⁾は, キサンテン系色素・フロキシンは酸性溶液中 (pH 2~4) でよくたん白質に染着されると報告しているが, B-2 の場合は, 中性域でよく解離し, たん白質と結合して酵素阻害作用を示すものと思われる。また, 色素とたん白質等の高分子化合物が結合して色調の変化を示すメタクロマジー現象の発現についても, 各色素系で pH による差異があると報告されている⁹⁾。光分解物の影響は, 照射2日間では, 酵素に対する阻害作用はあまり認められず, 照射が長くなると, 酵素活性は低下し, 光分解物がペプシンたん白質に染着され, 阻害作用を示

すものと思われる。

3. ゲルろ過

食用色素(酸性染料)と酵素たん白質との結合は、まず解離したアミノ基との間には起こると考えられ⁹⁾、中性域において色素イオンと酵素との結合物をセファデックスG-75を用いてゲルろ過を行ない、その溶出パターンより検討した。Fig. 3に示したように、ペプシン自体は、280 nm の吸収では2つのピーク(1: P₁, 2: P₂) が認められ、P₁ が主要ピークであった。紫外線無照射 B-2 溶液は、フラクシオン No. 21 付近に1つのピーク(3: B-2, non-UV light) が認められ、これとペプシンを37°C, 20分間作用させた分画物は、2つのピークおよび肩が得られた。高分子域のピーク(4: pepsin+B-2, non-UV light)はペプシン(P₁)と同位置にみられ、ペプシンの低分子域のP₂は、2つのピーク(5, 6: pepsin+B-2, non-UV light)にわかれ、色素の影響が特に低分子域において認められた。光分解物(7: B-2, 7 days under UV light)のピークは、無照射色素3よりかなり低分子域にずれて小さなピークとなり、これとペプシンを作用させた色素光分解物・ペプシンの分画物(8, 9: pepsin+B-2, 7 days under UV light)の位置は、ペプシンP₁, P₂のピークより全体的に低分子域にずれた溶出パターンを示した。

以上、インジゴイド系色素(光無照射)のプロティアーゼに対する阻害は、キサントゲン系色素に比べて *in vitro* 実験^{8)~7)10)11)} では、あまり顕著ではないと報告されている。本実験においても、ペプシンに対して同様な結果を得たが、色素光分解物のペプシン活性阻害は強く、その機構については、さらに検討しなければならない。食用タール色素は実際にはいろいろな条件で、各種の食品に使われているが、本実験で得られたように、紫外線により光分解が起こり、単に退色にとどまらず、色素の光分解物も容易にたん白質と結合して、酵素活性阻害を増大させるという点から、食品の加工、流通、陳列、保存等で無造作に食品が取り扱われないよう十分気をつけねばならないと考える。

要 約

食用タール色素の青色2号(B-2)およびその光分解物を用いて、ペプシンによる人工消化実験を行なった結果、次のような結論を得た。

Fig. 3 Gel-filtration chromatography of dye-bound pepsin by Sephadex G-75

1: Pepsin P₁ 2: Pepsin P₂ 3: B-2, non-UV light
4, 5, 6: Pepsin+B-2, non-UV light 7: B-2, 7 days under UV light
8, 9: Pepsin+B-2, 7 days under UV light

1) 色素 B-2 の光分解はpHによって異なり、紫外線照射初期において、pH 7 を除いて、完全に退色し、吸収スペクトルにも変化がみられた。

2) 色素 B-2 のペプシン活性に及ぼす影響は、紫外線無照射色素溶液添加の場合では低いが、光分解物の場合では、紫外線照射日数が長くなるほど、また pH が中性域にいくほど、強く表われた。

3) セファデックス G-75 によるゲルろ過により、ペプシンと色素 B-2 および光分解物の結合をみると、いずれも低分子域で、ペプシンの構造上に変化が起こり、酵素活性が低下したものと思われる。

終りに、本研究をすすめるにあたり、御助言・御校閲をいただいた広島大学・守康則教授に対し、深く謝意を表する次第である。

文 献

- 1) 池田良雄：日薬理, **61**, 77 (1965)
- 2) 相磯和嘉：ファルマシア, **1**, 336 (1965)
- 3) 古武弥三他：食衛誌, **7**, 230 (1966)
- 4) 榎本則行他：栄養と食糧, **25**, 115 (1972)
- 5) 後藤たへ他：栄養と食糧, **25**, 480 (1972)
- 6) 吉田 勉：栄養と食糧, **26**, 487 (1973)
- 7) 榎本則行他：佐賀大農学集報, **29**, 9 (1970)
- 8) 相沢秀俊：食衛誌, **8**, 387 (1967)
- 9) 志村憲助他：蛋白質生化学 (朝倉書店), 96 (1960)
- 10) 村上浩紀他：食衛誌, **13**, 12 (1972)
- 11) 田中慶一他：食衛誌, **14**, 234 (1973)

(受付：昭和53年2月18日)