キウイフルーツのパーオキシダーゼについて

小倉長雄*・熊川京子*・福島真樹子*・曾田 功*
佐藤隆英*・中川弘毅*

Studies on Peroxidase of Kiwifruit

Nagao OGURA*, Kyoko KUMAKAWA*, Makiko FUKUSHIMA*
Isao SODA*, Takahide SATO* and Hiroki NAKAGAWA*

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture,
Chiba University, 648 Matsudo Matsudo-shi, Chiba 271

The greater part of peroxidase was distributed in core of Kiwifruit and was extracted by Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 5% NaCl. The amount of extractable peroxidase activity was decreased during fruit ripening. Polyacrylamide gel electrophoretic analysis showed that the three peroxidase isozymes were contained in core of Kiwifruit and the zymogram pattern of isozyme was not changed during fruit ripening. Peroxidase was partially purified about 22 folds from core of fruits by means of ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography on CM-52 cellulose column and gel filtration on Toyopearl HW-55 F. Zymogram of partially purified peroxidase on polyacrylamide gel showed one active band. This enzyme preparation had a pH optimum of 7.5, K_m value for pyrogallol of 10 mM, and was strongly inhibited by KCN. (Received Dec. 23, 1986)

キウイフルーツ (*Actinidia chinensis* Planch. 以下キウイ) は 1940 年代にニュージーランドで企業的に生産されて以来、果肉の美しい色や風味が好まれ、栽培の容易さもあり世界中に広がった。日本に苗が導入されて約 16 年、国産のキウイも年間約 1.6 万 t を収穫し更に増産が見込まれている (日園連調査)。これに伴い栽培技術と生理、収穫後の貯蔵性やその条件及び追熟についての研究、果実の利用法などの研究が行われてきており近年総説としてまとめられている¹⁾。しかし追熟機構や貯蔵生理については未だ不詳な部分が多く残されている。キウイは強力なたん白質分解酵素 (アクチニジン) をもっており、本酵素は分離精製され、その諸性質が明らかにされている^{2)~5)}。その他、ポリフェノールオキシダーゼ⁶⁾、ペクチンエステラーゼ⁷⁾ についての報文はみられるが酵素面からの研究は少ない。

パーオキシダーゼ (E.C. 1.11.1.7, 以下 PO) は広

く動植物中に分布し過酸化水素の存在下で種々のフェノール類を酸化する酵素である。生体内では呼吸系への関与⁸⁾、インドール酢酸の生成と分解⁹⁾、クロロフィルの分解¹⁰⁾、リグニンの生成^{11)~12)} などに関与していると考えられているが不明の点も多い。また、多くのアイソザイムが存在し、温度や傷害などの環境因子によりアイソザイムのパターンが変動する^{13)~17)} ことから考えても重要な生理作用をもつものと考えられる。今回はキウイの追熟に伴う PO の活性変動と部分精製した酵素の性質について検討した結果を報告する。

実験材料及び方法

1. 試料

静岡産の果実 (10 月下旬収穫のヘイワード) を追熟の実験に用いた。酵素の精製にはニュージーランド産の輸入果実を用いた。

* 千葉大学園芸学部 (〒 271 松戸市松戸 648)

2. 追熟方法

果肉の硬い果実をエチレン処理区と無処理区に分け、プラスチック製の箱 (12.5 l) に入れ密封し、20℃ の恒温器中に貯蔵した。エチレン処理はエチレン濃度約 100 ppm になるようにエチレンガスを貯蔵初日に注入した。貯蔵した箱は約 24 時間ごとに呼吸量を測定した後、蓋をあけ空気の入れ換えを行った。

3. 呼吸量及び硬度の測定法

密封容器から注射器を用いて中の空気を採取し、これを東レジコニア式酸素計 (東レ株式会社) に注入し、酸素濃度を測定し、呼吸量を新鮮果実 1 kg が 1 時間に消費する酸素量 (mg) で表した。

果実の硬度は硬度計 (5 mm の直径の円柱状の針を持つ、木屋製作所) を用いて測定した。キウイの皮を剥き約 2 cm の厚さに輪切にして、果肉部・中心部 (芯) につき硬度をそれぞれ 10 点ずつ測定し平均し、kg 単位で表した。

4. 酵素活性測定法

(1) 粗酵素液の調製法

果実の皮を剥き芯 (中心部) と種子を除いた果肉部に分け、各々 25 g に純水 25 ml を加えてホモジネートし、これを 10 000 × g、10 分間遠心分離し、上澄液と沈澱部に分け、上澄液を水溶性画分とした。沈澱部に 5% 食塩、10 mM EDTA、50 mM ロイペプチンを含む 0.2 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え 4℃ で 12 時間以上放置後、遠心分離して得られた上澄液を塩可溶画分とした。水溶性画分と塩可溶画分を粗酵素液として用いた。

(2) 活性の測定法

ピロガロールを基質として生成するプルプロガリンの量を 430 nm の吸光度の増加量として測定した。反応液組成は 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) 0.5 ml、10 mM ピロガロール 0.5 ml、0.15% 過酸化水素 0.1 ml、酵素液 0.1~0.5 ml、これに純水を 1.4~1.8 ml 加えて 3 ml とした。反応は過酸化水素を加えて開始させ、生成する着色度を分光光度計 (日立 150-2) で連続的に 2 分間測定し、初速度を求めて活性を測定した。基質 1 μmole を 1 分間に変化させる酵素量を 1 単位とした¹⁸⁾。

5. ディスク電気泳動法と染色法

REISFELD らの方法¹⁹⁾ によりポリアクリルアミドゲル (7.5%, pH 4.3) を分離用ゲルとして電気泳動を行った。

たん白質染色は 0.25% コマシーブリリアントブルー R-250 を含むエタノール・水・酢酸 (9:9:2) 混液で

30 分染色後、7% 酢酸中で脱色した。

活性染色は KU らの方法²⁰⁾ に従い、0.3% 過酸化水素及び 0.05% ベンチジンを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.2) 中にゲルを浸漬させた。活性の強い部分から発色が生じる。約 1 時間後にゲルをエタノールに浸して酵素反応を停止させた後に水中に戻して発色したバンドを観察した。

6. たん白質の定量法

BRADFORD の方法²¹⁾ により牛血清アルブミンを標準たん白質として測定した。

実験結果

1. 果実の部位別パーオキシダーゼ活性

追熟の果実を果肉部と芯部に分けそれぞれの水溶性と塩可溶性画分の酵素活性を測定した結果を表 1 に示す。果肉部・芯部とも水溶性画分の酵素活性は極めて弱い。塩可溶性画分にはかなりの活性が測定されたが、芯部により強い活性が含まれていた。

2. 追熟過程における果実の状態変化及びパーオキシダーゼの活性変動

貯蔵前果肉部の硬度 1.2 kg の果実はエチレン処理に

表 1 キウイフルーツの部位別パーオキシダーゼ活性 (単位/g新鮮重)

	芯 部	果肉部
水溶性酵素	0.17	0
塩可溶性酵素	2.48	0.87

図 1 追熟に伴うパーオキシダーゼの活性変動 (無処理区, 貯蔵温度 22℃)

- 芯部の塩可溶性酵素
- 芯部の水溶性酵素
- △—△ 果肉部の塩可溶性酵素
- ▲—▲ 果肉部の水溶性酵素

より急激に軟化が進み貯蔵後3日で果肉硬度は0.2 kgに低下, 6日後には過熟状態となり, 硬度測定は不可能であった。無処理の果実は徐々に軟化がみられ3日目で0.75 kg, 6日目では0.5 kgと低下した。

芯部は果肉部よりも硬く貯蔵前の果実は3 kgの硬度があったが, エチレン処理区のは3日後0.5 kg, 6日後0.1 kgに低下した。無処理区のは3日後2 kg, 6日後1.2 kg, 12日後0.2 kgと軟化は遅かった。

追熟過程における呼吸量は, 無処理区で貯蔵1日後に15.5 mg O₂/h・fwtを示し, この値は多少上下はあったが10日後までは一定を保った。10日以降に呼吸量が増加する傾向がみられた。エチレン処理区では1日後に37 mg O₂/h・fwtと無処理区より高い値を示し, 4日後まではこの値を保ったが貯蔵5日後より低下し, 6日後には20 mg O₂/h・fwtを示した。以後再び上昇し10日後には37 mg O₂/h・fwtを示した。果実の軟化状態と考え合わせると, 両区とも明らかなクライマクテリックな呼吸型は見られなかった。

無処理区の果実の追熟に伴う酵素活性変動を測定した結果を図1に示す。果肉部には水溶性酵素活性はほとんどみられず, 塩可溶性酵素が83単位含有されていたが追熟中に変動はみられなかった。芯部には水溶性酵素が20単位認められ追熟に伴わずに活性が上昇し(30単位になり)以後貯蔵期間中大きな変動はみられなかった。塩可溶性酵素の活性は高く245単位認められたが追

熟に伴って急速に活性が低下し, 4日目で100単位, 13日目に75単位となった。エチレン処理した果実の酵素活性変動の結果はデータには示さないが, 芯部の塩可溶性酵素の活性の低下が早く2日で100単位に低下した以外は無処理区と同様な傾向を示した。

3. パeroxidaseのチモグラム

芯部の塩可溶性酵素をディスク電気泳動後に活性染色をした結果を図2(A)に示す。濃度のほぼ等しい3本

図2 キウイフルーツパeroxidaseアイソザイムのチモグラムパターン

A 芯部よりの塩可溶性酵素
B 部分精製酵素

図3 キウイフルーツパeroxidaseのCM-セルロースカラムクロマトグラフィー

表 2 キウイフルーツパーオキシダーゼの精製

	総たん白質 (mg)	総活性量 (単位)	比 活 性 単位/mg たん白質	精 製 度	回 収 率
粗抽出液	97.2	205	2.11	1	100
硫酸画分 (40-90%飽和)	43.9	153	3.48	1.6	75
CM-52 セルロースカラム	6.8	84	12.38	5.6	41
トヨパール HW-55 F	0.42	20	48.86	22.7	10

(キウイフルーツ果芯部 80 g より)

の活性バンドが見られ、少なくとも3つのアイソザイムが存在することを認めた。追熱に伴ってこれらアイソザイムのパターンに大きな変化はみられなかった。

4. 部分精製

比較的硬いキウイの芯を用いて塩可溶性酵素の精製を試みた。芯 80 g から得られた塩可溶画分の硫酸濃度 40~90% 飽和で沈澱する画分を集め、これを少量の 10 mM リン酸緩衝液 pH 6.5 にとかし、同じ緩衝液に透析した。これを 10 mM リン酸緩衝液 pH 5.5 で平衡化した CM-52 セルロースカラム (20×300 mm) に展着し、同じ緩衝液で吸着しない部分を洗滌後、0~0.8 M の食塩の濃度勾配をつけた同じ緩衝液で酵素を溶出させた。溶出パターンを図 3 のごとく非吸着部分にもわずかの活性が認められ、吸着部分からはイオン強度をあげるにつれて2つの活性ピークを持つフラクションが溶出した。精製には後に溶出された部分を用いた。後の活性部分を集めミリポアのイマシーブル CX-10 を用いて濃縮後、50 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.5 で平衡化したトヨパール HW-55 F カラム (18×1 000 mm) にのせゲル濾過を行った。溶出された活性ピーク部分を部分精製標品とした。

図 4 キウイフルーツパーオキシダーゼ活性に対する pH の影響

○—○ マッキルベイン緩衝液
●—● トリス-塩酸緩衝液

精製過程の結果を表 2 に示す。

比活性 48.86 単位/mg たん白質で 22.7 倍に精製された部分精製酵素を得た。この標品をディスク電気泳動後活性染色を行った結果は図 2 (B) に示すように、粗酵素の活性バンド 3 本のうち真中のバンドのもの 1 本であった。図示はしないがたん白質染色の結果は活性バンドに一致するたん白質の他にわずかに染色バンドがみられ、たん白質的には均一な酵素ではなかったが部分精製標品とした。

5. パーオキシダーゼの性質

1) 活性に及ぼす pH の影響

作用最適 pH を pH 3~8 は MACILVAIN 緩衝液, pH 7.5~9 はトリス塩酸緩衝液を用いて測定した結果を図 4 に示す。最適 pH は 7.5 にあった。pH に対する酵素の安定性を知るために、pH 3~8 の緩衝液と共に 1 時間と 18 時間保った後活性を測定した結果、pH 6.0 以下では不安定になり pH 5.5 で約 20%, pH 5 で 40%, pH 3.5 では 90% の活性が失われた。

2) 酵素の熱安定性

30~70℃ の各温度に酵素液を 5 分間保った後活性を測定した結果を図 5 に示す。50℃ までは安定であったが、55℃ では 5%, 60℃ で 55%, 70℃ で 95% の活性

図 5 キウイフルーツパーオキシダーゼ活性に対する加熱温度の影響

表 3 キウイフルーツパロキシダーゼの基質特異性

基 質	λ (nm)	4OD/min	活性比(%)
ピロガロール	430	0.55	100
グアヤコール	470	0.81	147
ベンチジン	430	0.57	105
O-フェニレンジアミン	492	1.18	215
カ テ キ ン	420	1.00	182

 λ : 測定波長

表 4 キウイフルーツパロキシダーゼの試薬による影響

添加試薬	活性比(%)
	100.0
1 mM P-CMB	97.3
10 mM KCN	4.8
10 mM クエン酸	91.1
10 mM EDTA	89.0
10 mM FeSO ₄	100.0
10 mM CuSO ₄	65.8
10 mM MnSO ₄	106.8

P-CMB パラクロロマーキュリベンゾエイト

が消失した。

3) 基質特異性

ピロガロール、グアヤコール、ベンチジン、O-フェニレンジアミン、カテキンを基質として活性を1分間当たりのOD値の増加量で求め比較した結果を表3に示す。各基質は10 mMに調製し各基質の示す最大吸光度の波長を用いて測定した。ピロガロールを基準とした相対値で比較すると、O-フェニレンジアミンとカテコールに対し高い活性を示した。

4) 基質濃度の影響

ピロガロールを基質とした場合の K_m 値をラインウェバーバークのプロットより求めると10 mMとなった。

5) 阻害剤及び塩類の影響

阻害剤及び金属塩の影響については表4に示すごとくシアン化カリによる阻害が著しく10 mM濃度で約95%、次いで硫酸銅で約30%の活性低下が認められたがp-CMB(1 mM)、Feイオン、Mnイオンの影響はほとんどなかった。

考 察

キウイは追熟中にエチレン生成を伴い呼吸増大を示すクライマクテリック型の果実といわれている。しかし同時期に収穫した果実でもエチレン発生時期には個体差が

大きく²²⁾、典型的なクライマクテリックな呼吸パターンは得られにくい報告も見られる。今回の実験では明らかな呼吸のクライマクテリックピークは見られなかったが、エチレン処理が果実の呼吸量を高め、軟化を促進させることを認めた。

果実内のPOの分布については芯部に高い活性がみられ、果肉部には少なかった。また水で抽出される酵素よりも塩で可溶化抽出される酵素が多く存在した。芯部では塩可溶性酵素が水溶性酵素の3倍以上の活性があった。

追熟貯蔵中のPO活性を果肉と芯に分けそれぞれ水溶性と塩可溶性酵素について調べた。果肉部には水溶性酵素はほとんどみられない。塩可溶性酵素活性は認められたが追熟中に活性の変動はなくほぼ一定であった。芯部には高い活性をもつ塩可溶性酵素が存在し、追熟に伴って著しく活性が減少した。水溶性酵素の活性は低いが追熟中変化はみられなかった。POがエチレン発生や呼吸の上昇に関与するとの報告²⁰⁾もあるが今回の結果からは特に相関はないと思われた。

POはアイソザイムが多いことが報告されており、ワサビ¹³⁾、カリフラワー^{14),15)}、アスパラガス¹⁵⁾、バナナ¹⁷⁾などのアイソザイムは追熟や貯蔵温度などの環境変化によって変動することが報告されている。キウイのPOは3つのアイソザイムが認められ、追熟中にこれらの電気泳動パターンは変動せず、追熟に伴う活性バンドの生成や失活するアイソザイムは認められなかった。

芯部の塩可溶性酵素の精製を試み、硫酸分画、DEAEセルロースカラムクロマト、ゲル濾過により比活性が22倍になった部分精製酵素を得た。この酵素のチモグラムは1本の活性バンドを示した。

この酵素は7.5に最適pHをもち、pH6以下では不安定であった。活性測定のpHを6.5で行ってきたのはピロガロールがアルカリ性で不安定になり測定が不正確になりやすいためである。POは酸性下では不安定でありpH3.5では活性が消失した。キウイのホモジネートのpHが約3.5であり、酵素の抽出時に活性に影響を及ぼすことが考えられる。またデーターには示さないがアスコルビン酸がPO活性出現をおくらせる性質があり、キウイのアスコルビン酸が活性阻害に働くことが考えられた。果肉中に水溶性酵素がみられないのはPO酵素たん白質が存在しないのか、また活性が阻害されてしまったのかは今後検討を要することである。

キウイのPOは他の材料からのPO^{14),15)}と同様に比較的熱安定性があり、50℃では活性の失活はなく、75

℃でも活性は完全には消失せずわずかに存在した。またフェノール類、ジアミノベンゼンなど幅広い物質を基質とすることができ、シアン化カリで活性は強く阻害された。

要 約

(1) PO は果実の芯部に多く含まれ、水溶性画分よりも塩可溶画分に多く溶出された。

(2) 活性量の多い芯部の塩可溶性酵素は果実の追熟に伴って減少した。

(3) チモグラムからキウイフルーツには3つのアイソザイムが存在し、果実の追熟中にアイソザイムが変動することはなかった。

(4) 硫安分画, CM-52 セルロースカラムクロマト, トヨパール HW-55 F のゲル透過により酵素の精製を試み、比活性が約 22 倍になった部分精製酵素を得た。この酵素は 1 本の活性染色バンドを示した。

(5) 酵素は pH 7.5 に最適 pH を持ち、50℃までは安定であり、ピロガロールに対する K_m 値は 10 mM を示し、シアン化カリで強く活性が阻害された。

文 献

- 1) LUH, B.S. and ZHANG WANG: *Advance in Food Research.*, **29**, 279 (1984).
- 2) McDOWALL, M.A.: *Eur. J. Biochem.*, **14**, 214 (1970).
- 3) BAKER, E.N.: *J. Mol. Biol.*, **115**, 263 (1971).
- 4) CARNE, A. and MOORE, C.H.: *Biochem. J.*, **173**, 73 (1978).
- 5) 橋永文男・福留哲朗・伊藤三郎: 鹿大農学術報告,

36, 65 (1986).

- 6) PARK, E.Y. and LUH, B.S.: *J. Food Sci.*, **50**, 678 (1985).
- 7) 福家洋子・松岡博厚: 日食工誌, **31**, 31 (1984).
- 8) KU, H.S.: *Plant Physiol.*, **21**, 253 (1970).
- 9) KAWASHIMA, N. and URITANI, I.: *Plant Cell Physiol.*, **6**, 247 (1970).
- 10) YAMAUCHI, N. and MIMAMIDA, T.: *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **54**, 265 (1985).
- 11) HARKIN, J.M. and OBST, J.R.: *Science*, **180**, 296 (1973).
- 12) JOHNSON-FLANGAN, A.M. and OWENS, J.N.: *Plant Physiol.*, **79**, 103 (1985).
- 13) SHANNON, L.M. and KAY, E.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 2166 (1966).
- 14) LEE, C.Y. and PENNESI, A.P.: *J. Food Sci.*, **49**, 1616 (1984).
- 15) WANG, Z. and LUH, B.S.: *J. Food Sci.*, **48**, 1412 (1983).
- 16) LEE, C.Y. and PENNESI, A.P.: *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 18 (1984).
- 17) TORASKAR, M.V. and MODI, V.V.: *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1352 (1984).
- 18) COLOWICK, S.P. and KAPLAN, N.O.: *Method in Enzymology* II. p.773 (Academic Press) (1955).
- 19) REISFELD, R.A. and LEWIS, U.J.: *Nature*, **195**, 281 (1962).
- 20) KU, H.S. YANG, S.F. and PRATT, H.K.: *Plant Cell Physiol.*, **11**, 241 (1970).
- 21) BRADFORD, M.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 22) HYODO, H. and FUKASAWA, R.: *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **54**, 202 (1985).

(昭和 61 年 12 月 23 日受理)