

琉球大学学術リポジトリ

茶に関する研究 第6報 茶葉のポリフェノールオキシダーゼ

メタデータ	言語: 出版者: 沖縄農業研究会 公開日: 2009-01-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 仲村, 実久, 島袋, 永伸, 金城, 一成, 田幸, 正邦, Nakamura, Sanehisa, Shimabukuro, Eishin, Kinjo, Issei, Tako, Masakuni メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002015361

茶に関する研究

第6報 茶葉のポリフェノールオキシダーゼ

仲村実久・島袋永伸・金城一成・田幸正邦

(琉球大学農学部農芸化学科)

Sanehisa NAKAMURA, Eishin SHIMABUKURO, Issei KINJYO and Masakuni TAKO: Studies on tea IV. Polyphenol Oxidase in tea leaves.

1. 緒言

植物のポリフェノールオキシダーゼに関する研究は、植物体の傷害および病理生理、それに植物を利用する食品加工の際の褐変および香味との関連について多くの研究がなされている。¹⁻⁴⁾

一方、茶葉ポリフェノールオキシダーゼは活性の大部分が水不溶性区分に存在することが知られている。本報では竹尾らの方法¹⁾に従って茶葉ポリフェノールオキシダーゼの可溶化を行い、その性質を調べたので報告する。

2. 実験材料および方法

(1) 試料

茶葉はユタカミドリを沖縄県農業試験場名護支場において一心三葉摘みを行い供試した。

(2) 粗酵素液の調製¹⁾

茶生葉に2倍量のイソアスコルビン酸ナトリウム(1.0%)および塩化ナトリウム(0.35M)を含む0.05Mリン酸緩衝液(PH7.0)を添加、氷冷下ワーリングブレンダーで30分間摩砕を行い、15,000×g、15分間冷却遠心分離後沈澱について再び同緩衝液で洗浄、遠心分離を行い、この沈澱に3倍量のリン酸緩衝液を加え、さらに5%容量の表面活性剤、Tween-80を加えた後すり鉢中で30分間摩砕、0℃、2時間マグネチックスターラーで攪拌を行い、その後25,000×g、60分間冷却遠心分離、暗緑色の上澄液を得た。さらに上清に硫酸を加え30%飽和沈澱させ一夜放置後10,000×g、15分間遠心分離、再び上清に硫酸を加え90%飽和沈澱させ一夜放置後再び遠心分離を行い、沈澱を0.01Mリン酸緩衝液に溶解、同液中で透析を行い粗酵素液とした。

(3) 酵素活性の測定法

酵素活性の測定はワールブルグ検圧計を用いて次の反応組成で行った。¹⁾

粗酵素液 (0.26mg/ml) 1.0ml
D-カテキン (5 mg/ml) 1.0ml
0.05Mクエン酸を含む0.05M
リン酸緩衝液 (pH5.6) 1.0ml
反応条件と活性単位
温度 27℃
O₂ μl/mg · 10min

(4) 蛋白質の定量

粗酵素液中の蛋白質の定量はLowry⁵⁾らの方法に従って行った。

3. 結果

1). 酵素濃度の影響

先に調製した粗酵素溶液を0.052~0.52mg/mlに調製し、それぞれの液1.0mlにD-カテキン(5 mg/ml)1.0ml, McIlvaine氏緩衝液(pH5.6)1.0mlを加え27℃、10分間反応を行い、その間に生成する酸素量を測定してFig.1に示した。酵素濃度0.26mg/mlまでは酸素量は直線的に増大したが、その後はゆるやかに増大した。

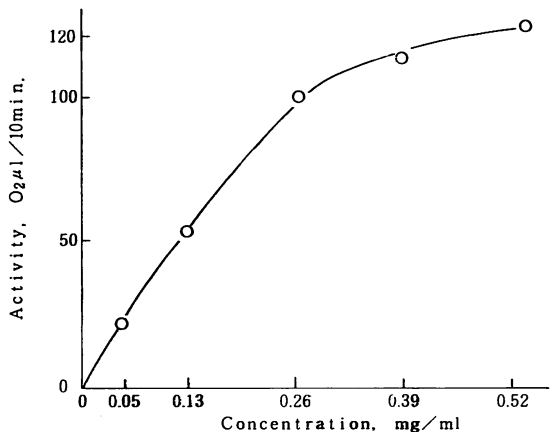


Fig.1. Effect of enzyme concentration on the enzyme activity.

2). ポリフェノールオキシダーゼ反応に及ぼすpHの影響

Fig.2はポリフェノールオキシダーゼ反応をD-カテキンを基質として種々のpHで行い、酵素活性とpHとの関係を示したものである。pH5.6で最も高い酵素活性(85

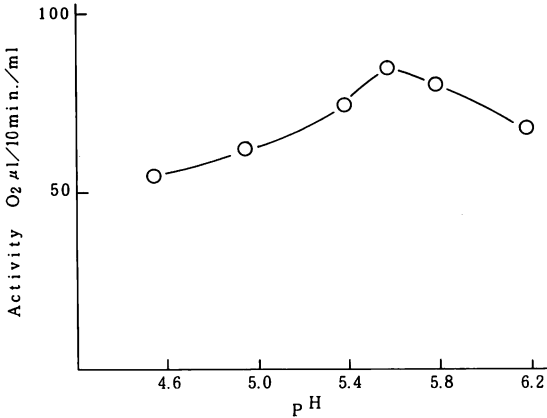


Fig.2. Effect of pH on the enzyme activity (μl) が得られ、pH4.6 (53μl) およびpH6.2 (70μl) においても比較的高い活性を示した。

3). ポリフェノールオキシダーゼ反応に及ぼす温度の影響

前項同様D-カテキンを基質としてポリフェノールオキシダーゼ反応を種々の温度で行い、酵素活性と温度との関係を Fig.3 に示した。本酵素は36℃で最も高い活性を示した。

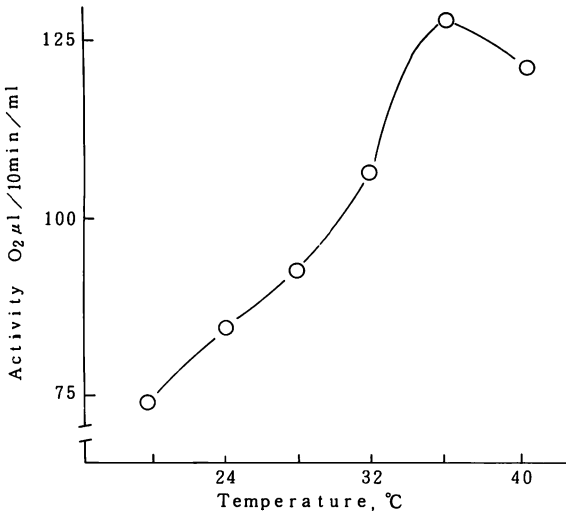


Fig.3. Effect of temperature on the enzyme activity

4). ポリフェノールオキシダーゼ反応に及ぼす基質濃度の影響

D-カテキンを基質としてポリフェノールオキシダーゼ反応を種々の基質濃度で行い、酵素活性と基質濃度と

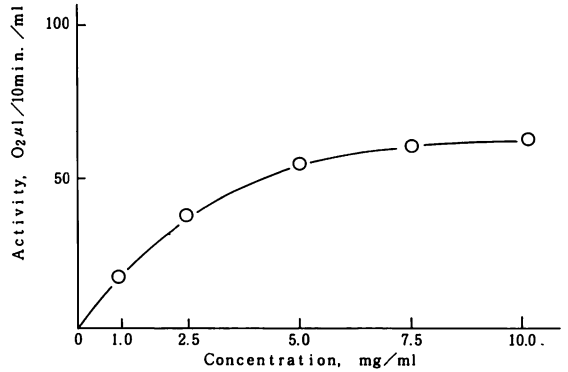


Fig.4. Effect of substrate concentration on the enzyme activity.

の関係を Fig.4 に示した。基質濃度5.0mg/mlまでは基質濃度増大に伴って酸素生成量も増大したが、その後はほぼ一定値を示した。また、Lineweaver-Burk の逆数をプロットしてkm値を求めたところ、 $9.2 \times 10^{-3} M$ であった。

5). ポリフェノールオキシダーゼの基質特異性

D-カテキン、L-エピガロカテキンおよびL-エピガロカテキンガレートを基質として常法に従い27℃、10分間反応を行い結果を Table 1 に示した。結果はD-カ

Table 1. Effect of substrate on the enzyme activity

Substrate	O ₂ -absorption μl/10 min.	Relative activity %
D-Catechin	87.2	100
L-Epigallocatechin	92.3	105.8
L-Epigallocatechin-gallate	67.8	77.8

テキンの活性を100%としてその相対値で表わした。L-エピガロカテキンおよびL-エピガロカテキンガレートの活性はそれぞれ105.8および77.8%であった。

6). ポリフェノールオキシダーゼ反応に及ぼす阻害剤の影響

Table . Effect of inhibitors on the enzyme activity

Inhibitor	Control	Concentration	
		$2.5 \times 10^{-3} M$	$2.5 \times 10^{-2} M$
KCN	Activity	92.6	12.4
	Inhibition ratio(%)	0	86.6
DIECA	Activity	90.9	59.5
	Inhibition ratio(%)	0	34.5

Activity; O₂ μl/10 min./ml, 27 °C

茶葉のポリフェノールオキシダーゼ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 (DIECA) によって活性が阻害されていることが明らかにされている。¹⁾ 本実験においても、Table 2 に示すようにポリフェノールオキシダーゼは著しくこれら阻害剤の阻害を受けた。

4. 考 察

茶葉のポリフェノールオキシダーゼは紅茶発酵の過程で香味物質および色素等の生成に密接な関係を持つことから、古くから研究されている¹⁾。特に竹尾らによって詳しく研究されているので本報では彼らの酵素調製法に準じてポリフェノールオキシダーゼの調製を行い、その性質を調べた。

ポリフェノールオキシダーゼは活性の大部分が水不溶性区分に存在することから本実験では、表面活性剤 Tween-80 を用いて酵素の可溶化を行い、さらに硫酸分画により粗酵素を調製して実験に供した。

本酵素は pH 5.6 で最も高い活性が認められ、竹尾らの結果とほぼ一致した。また、本酵素の k_m は $9.2 \times 10^{-3} M$ で高い値を示した。これは硫酸分画により調製した酵素を供試したことによるものと考えられ、さらに精製を行えば低い k_m 値を得ることが出来るものと考えられる。

本酵素の基質特異性を調べたところ、ジフェノールの D-カテキンおよび L-エピガロカテキンに対しては高い活性が認められたが、トリフェノールの L-エピガロカテキンガレートに対しては D-カテキンの 77.8% の活性が認められた。これらの結果は竹尾らのそれとほぼ一致した。さらに、シアン化カリウムや DIECA 等の阻害剤の影響を調べたところ、特に後者によって著しく阻害を受けた。

5. 要 約

茶葉から表面活性剤 Tween-81 を用いてポリフェ

ノールオキシダーゼを水可溶性とし、硫酸分画を行い、その性質を調べた。

ポリフェノールオキシダーゼの反応最適 pH は 5.6、最適温度は 36°C、 k_m は $9.2 \times 10^{-3} M$ であった。また本酵素はジフェノールの D-カテキンおよび L-エピガロカテキンに特異的に反応した。

さらに本酵素は DIECA によって著しく阻害された。

終りに茶葉を提供していただいた沖縄県農業試験場名護支場に厚く感謝の意を表す。

6. 参考文献

- 1) Takeo, T. 1965. Tea Leaf Polyphenol Oxidase. Agric. Biol. Chem. 29: 558~563
- 2) 竹尾忠一 1965 茶葉の貯蔵に関する研究茶業技術研究 31: 68~74
- 3) 松山晋 1961 タバコ葉の褐変に関する研究, 農化 35: 405~408
- 4) 滝野慶則・今川弘 1963 茶葉カテキンの酸化機構に関する研究, 農化 37: 417~422
- 5) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the Phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265~275

Summary

The polyphenol oxidase was solubilized from tea leaves homogenate by addition of Tween-80 and fractionated with ammonium sulfate.

Optimum pH of the enzyme was 5.6 and Michaelis constant for D-catechin was $9.2 \times 10^{-3} M$.

D-catechin and L-epigallocatechin showed higher activity than that of L-epigallocatechin gallate.

The enzyme activity was inhibited by potassium cyanide and sodium diethyldithiocarbamate.