

チロシナーゼの安定性ならびに活性に及ぼす添加物の影響

石井智恵美 村尾枝里子* 表 美守**

The Stability of Tyrosinase and The Effect of Additives on its Activity

Chiemi Ishii, Eriko Murao, Yoshimori Omote

食物の酵素褐変には、酵素、基質の他に酸素が必要であり、酸素のない条件下では酵素と基質が存在しても褐変反応が進行することはない。この反応に関与する酵素は、1895年にチロシンを酸化して褐変させる反応を触媒するものとして発見されたためチロシナーゼ後にモノフェノールモノオキシゲナーゼと命名され、銅を含む酸化酵素として酵素番号 [1.14.18.1] を与えられている。褐変に関与する酵素は古くからきのこ類に含まれていることが知られており、市販のチロシナーゼもマッシュルームを原料としているが、モノフェノール類を酸化するチロシナーゼとジフェノール類を酸化するラッカーゼとに分けて論じられることが多かった。しかしながら、両酵素がモノフェノールもジフェノールも酸化する能力を持つなど曖昧な点が多いため、現在ではフェノール類の褐変に関与する酵素を総称してポリフェノールオキシダーゼあるいはフェノールオキシダーゼと呼ばれることが多い。近年ではシイタケ¹⁾、カットキャベツ²⁾、桃³⁾、南極オキアミ⁴⁾、*Alternaria tenuis* (菌類)⁵⁾のポリフェノールオキシダーゼの報告があり、酵素活性測定法についてはフロログルシン⁶⁾やクロロゲン酸⁷⁾を基

質とする方法の報告がある。チロシナーゼの均一性についてはハムスターメラノーマ⁸⁾とマッシュルームのチロシナーゼ⁹⁾¹⁰⁾にアイソザイムの存在のあることがすでに報告されている。ポリフェノールオキシダーゼの阻害については、シアンイオンやプロトカテク酸によるものの他、カルボン酸、ハロゲン化合物¹¹⁾、脂肪族アルコール¹²⁾、亜硫酸塩¹³⁾、食塩¹⁴⁾など報告は多く見られる。安定性については、バナナ¹⁵⁾、ナス¹⁶⁾に含まれる酵素について若干の報告がある。最近ではチロシナーゼの阻害のモデル実験¹⁷⁾が行われ、また、メラニンモデルとしてインドキノンの4位と7位の結合¹⁸⁾が提案されている。

著者らは、マッシュルームとシイタケを生で保存した場合、マッシュルームに含まれる褐変酵素の活性低下が著しいこと、マッシュルームとシイタケより得た粗酵素の基質特異性と阻害の様式が異なることを既に報告¹⁹⁾した。そこで反応系をより単純化するために市販のチロシナーゼを用い、酵素としての安定性を検討するとともに添加物の酵素活性に及ぼす影響を観察したので報告する。

* 実践女子大学 ** 筑波大学名誉教授

実験方法

1. 試薬

本実験では試薬はすべて特級 (SIGMA) を用いた。

2. 活性試験

ねじ口試験管に0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 6.8) 3.6 ml, 蒸留水0.2 ml, 基質水溶液 2 ml を入れ恒温槽 (30℃) で温める。これにチロシナーゼ水溶液 (1 mg/ml) 0.2 ml を加え, 反応を開始させる。タッチミキサーで正確に10秒反応液を攪拌後, 庫内の温度を一定 (30℃) に設定した分光光度計 (島津 UV-2200) にて吸光度を測定した。

本実験は基質が光によって酸化され呈色する可能性があるため遮光して行った。

3. チロシナーゼの安定性

(1) 水溶液状態における安定性

チロシナーゼ水溶液 (1 mg/ml) をねじ口試験管に分注し, 6℃と-38℃に保存した。活性試験はL-DOPAを基質としたため, 吸光度測定はL-DOPAの酸化生産物の吸収極大である475 nmで行った。

(2) 粉末状態における安定性

チロシナーゼを粉末のまま25℃と35℃に保存し, L-DOPAを基質として1ヶ月ごとに活性を測定した (475 nm)。

4. 基質と呈色

基質としてチロシン, カテキン, カテコール, L-DOPAを用いてチロシナーゼと反応させ, 呈色物質の吸収スペクトルを観察した。

5. 添加物の影響

添加物としてアスコルビン酸, リボフラビン, ハイドロキノン, グルコース, ニコチンアミド, シスチン, システインを用いた。基質はL-DOPAとして以下活性試験に準じて活性を測定した。

結果と考察

1. チロシナーゼ水溶液の安定性

チロシナーゼ水溶液を6℃と-38℃に保存し, 一定日数後にL-DOPAを基質として反応させた。酵素反応速度はその反応の初期において最大であるため, 475 nmにおける反応開始2分後の吸光度を求め, 保存0日の吸光度を100%として比較した (図1)。その結果, -38℃で保存したものは45, 75, 100日後においても吸光度の低下は見られなかった。

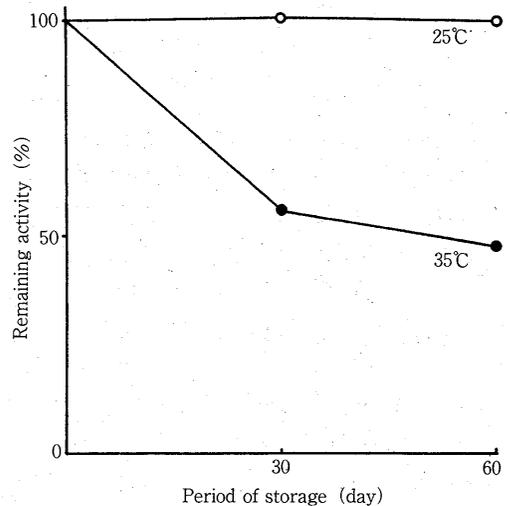


Fig.1 Stability of tyrosinase stored as aqueous solution.

一方, 6℃で保存したものは7日後82%, 14日後で77%, 45日後で60%, 70日後で45%, 100日後で39%となり, 反応初速度にかなりの低下が生ずることが分かる。そこで両者の反応低下のおおよその速度を求めるために, みかけ上反応生産物量が最大になる反応20分後の吸光度を用いて活性の残存率を求めたこととした。まず保存0日の酵素によって得られる反応生産物の量は0.462であった。これを45日間6℃と-38℃で保存した場合, 得られる生産物量はそれぞれ0.280と0.448であり, 従って45日後の活性の残存率は6℃で60.6%,

-38℃で96.8%となる。これを一次反応とみなして反応速度定数 k で表すと、6℃は $k = 1.29 \times 10^{-7}$ 、-38℃は $k = 8.37 \times 10^{-9}$ となり酵素の不活性化の速度が大きく異なることが分かる。最初の45日という単位でみる限り、酵素を水溶液で6℃に保存すると、-38℃に保存した場合と比較して約15倍の速度で不活性化が進行することが分かる。速度低下の比較に2分後の吸光度を用いなかったのは、-38℃保存に活性低下が見られなかったため、計算上比較することが難しかったからである。

2. チロシナーゼ粉末の安定性

市販のチロシナーゼ（凍結真空乾燥粉末）をそのままの状態ですべて密封し25℃と35℃に保存した。市販の酵素は凍結真空乾燥粉末である場合が多く、これを冷凍すれば長期間安定に保存できることは、既に広く受け入れられている事実である。しかしながら、図2に示すように25℃というかなり高温での保存において60日まで酵素の活性が低下しなかったのは予想外であった。一方、35℃では30日後にすでに活性が60%にまで低下した。

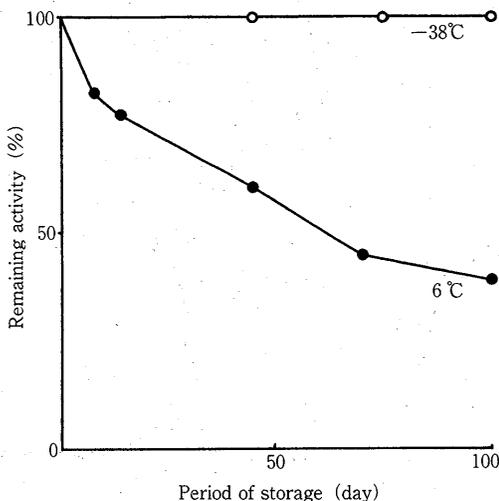


Fig.2 Stability of tyrosinase stored as lyophilized powder.

3. 基質による呈色の違いの比較

基質のカテコール部分が共通でも、チロシナーゼ存在下で酸化重合してできる色素の構造はそれぞれに異なると考えられる。そこで、モノフェノールとしてL-チロシン、ジフェノールとしてL-DOPAとカテコール、ポリフェノールとしてカテキンを用い、反応生産物の吸収スペクトルを経時的に60分まで測定し、30分までを図に示した（図3, 4, 5, 6）。L-チロシンの場合可視部における吸収極大は480 nm 付近にあるが、これは時間の経過とともに変化し、測定60分間に473 nm から490 nm にまで移動する。吸光度は60分まで上昇し続けるが、反応速度は10分以降徐々に低下する。またベースラインの上昇も見られる。L-DOPAの場合吸収極大は480 nm 付近であり、吸光度は反応開始20分後に最大となる。その後吸光度は減少する。一方では紫外部の吸光度が上昇しはじめ、ベースラインの極端な上昇も見られる。カテコールの場合吸収極大は410 nm 付近であるが、吸光度は反応開始5分後に最大となり後は減少し続けた。ベースラインの上昇は認められなかった。カテキンの場合可視部にピークが2つあり、両者とも時間の経過とともに増大し続けた。吸光曲線は60分まで測定したが、恐らく測定限界をこえていると思われるため、10分までの曲線を示した（図6）。吸光度は60分まで上昇し続け、ベースラインの上昇も見られなかった。以上の結果より、基質が異なれば生産物もそれぞれ特有の呈色をしていることが分かる。一度上昇した吸光度がその後低下し、それに伴って紫外部の吸光度が上昇することは、基質の酸化生産物がさらに別のものに変化していくことを示唆しており、ベースラインの上昇は酸化生産物が重合して分子量が大きくなり不溶性になった結果とも考えられる。

4. チロシナーゼ活性に及ぼす添加物の影響

L-アスコルビン酸はポリフェノールオキ

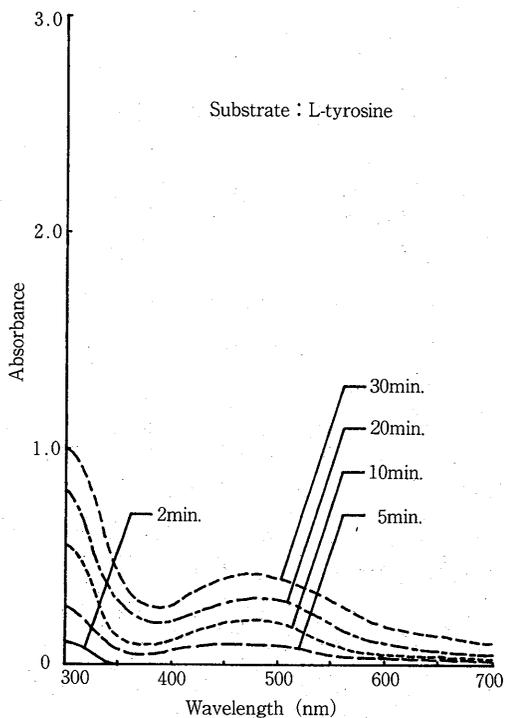


Fig.3 Absorption spectrum of colored product at given time.

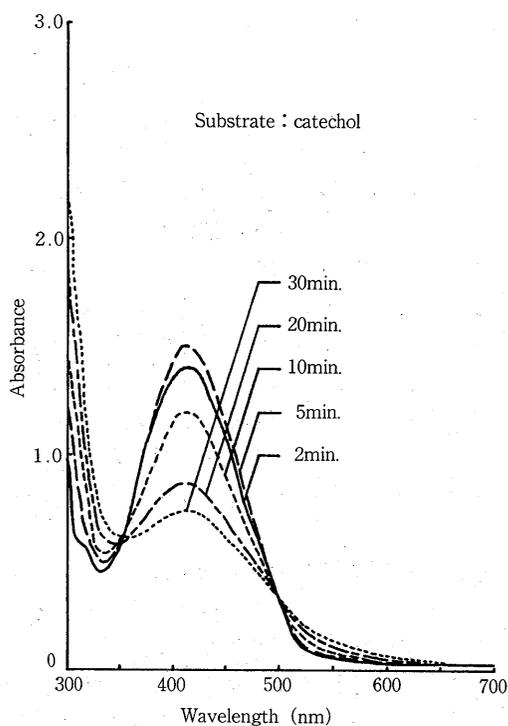


Fig.5 Absorption spectrum of colored product at given time.

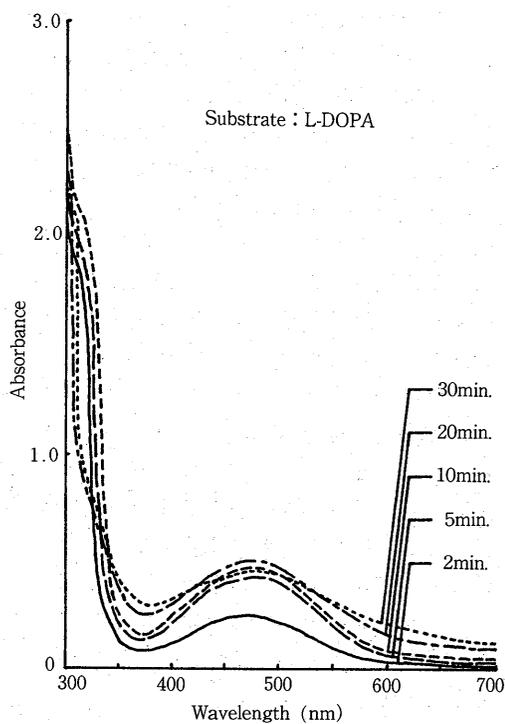


Fig.4 Absorption spectrum of colored product at given time.

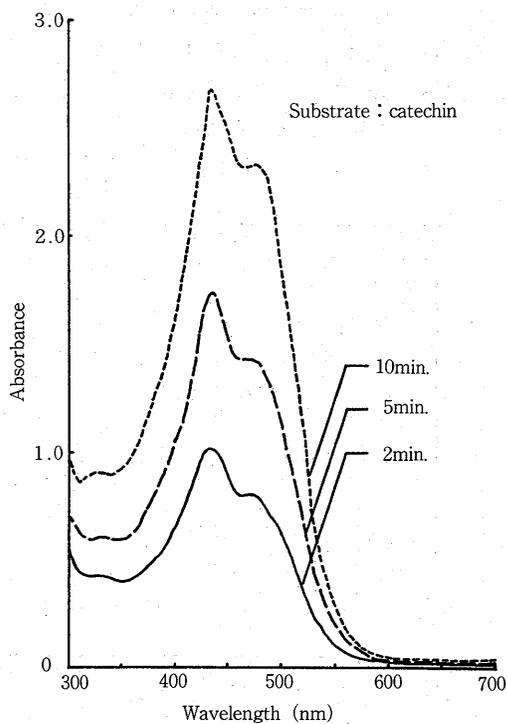


Fig.6 Absorption spectrum of colored product at given time.

シダーゼによって酸化され褐変した物質を還元してもとの無色の物質にもどす働き¹¹⁾²¹⁾のあることは既によく知られていることである。そこでL-アスコルビン酸を標準添加物としてリボフラビン、ニコチンアミド、D-グルコース、ハイドロキノン、シスチン、システインの及ぼす影響を比較した。リボフラビンは生体内ではリン酸エステル (FMN, FAD) として存在し、生体内の酸化還元に関与しているため、何らかの影響を及ぼすと考えた。その結果褐変抑制作用を示したが、リボフラビンの溶解度が低いいため反応液中のリボフラビン濃度50 μM までの検討とした (図7)。ニコチンアミドは脱水素酵素の補酵素 NAD^+ に含まれ、リボフラビンが補酵素 FAD に含まれていることと対応する。なお酸化還元の見地から還元糖としてD-グルコース、還元性化合物としてハイドロキノンを比較検討した (図8)。ハイドロキノンは酵素反応の活性化に働くのは、このものの自体が基質として呈色反応に加わるためと考えられる。グルコースはほとんど影響が見られない。ニコチンアミドは阻害作用を示したが、L-アスコルビン酸と比べるとその作用は弱

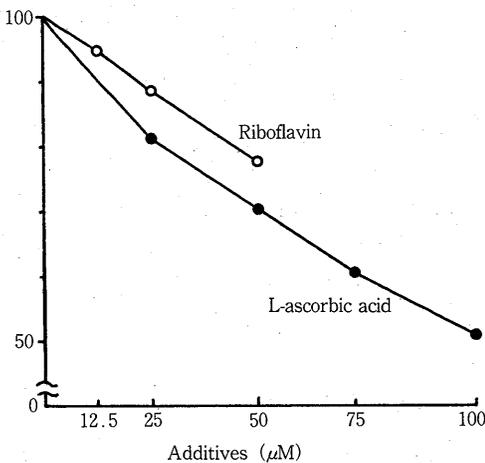


Fig.7 Effect of L-ascorbic acid and riboflavin on tyrosinase activity.

い。また $-\text{SH}$ の酸化還元立場からシステインとシスチンの影響をみたのが図9であり、システインは阻害作用を示すがシステインが

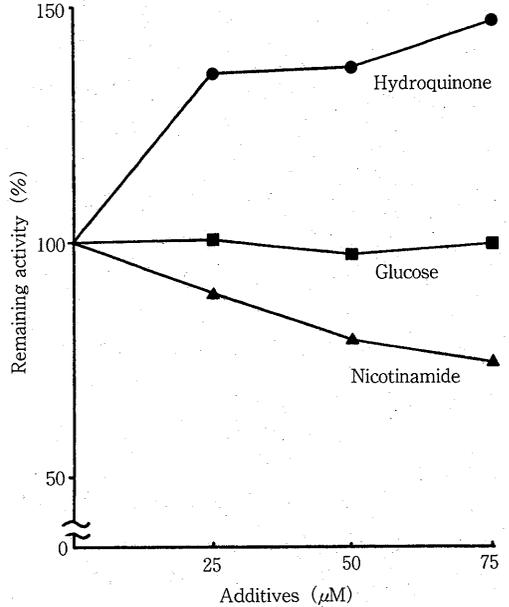


Fig.8 Effect of hydroquinone, glucose, and nicotinamide on tyrosinase activity.

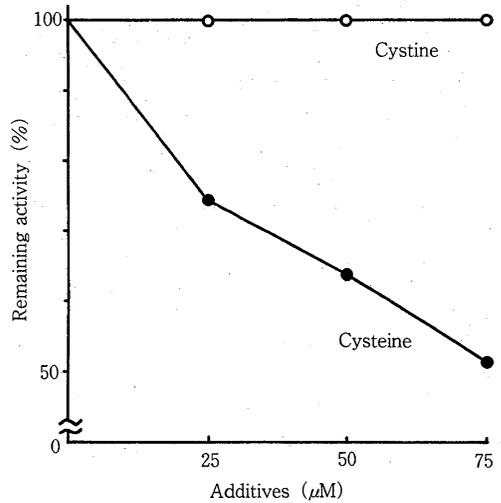


Fig.9 Effect of cysteine and cystine on tyrosinase activity.

示さないことは当然であると考えられる。

要約

(1) 市販のチロシナーゼの安定性を水溶液状態で6℃と-38℃で保存した場合と、さらに粉末状態で25℃と35℃で保存した場合について検討した。粉末状態で保存した場合、25℃では保存60日まで活性は低下しなかった。

(2) L-DOPA, カテキン, カテコール, チロシンを基質としたときの呈色物質の吸収スペクトルを経時的に測定した。

(3) L-アスコルビン酸, リボフラビン, ニコチンアミドはいずれもチロシナーゼ作用を抑制した。グルコースの影響は認められなかった。

文 献

- 1) 山口優一・山下市二・青木章平：日本食品低温保蔵学会誌, **14**, 59 (1988).
- 2) 名和義彦・細田浩・椎名武夫・伊藤裕朗・黒木柁吉：食総研報, **50**, 65 (1987).
- 3) Lee, C. Y., Kagan, V., Jaworski, A. W. and Brown, S. K.: J. Agric. Food Chem., **38**,99 (1990).
- 4) Oshima, T. and Nagayama, F.: Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., **46**,1035 (1980).
- 5) Motoda, S.: J. Ferment. Technol., **57**,71 (1979).
- 6) 塩田芳之・黒田柁吉：日食工誌, **16**,135 (1969).
- 7) 東野哲三・藤田修二・李忠富：日食工誌, **36**,920 (1989).

- 8) Pomerantz, S. h.: J. Biol. Chem., **238**,2351 (1963).
- 9) Moore, B. M. and Flurkey, W. H.: J. Food Sci., **54**,1377 (1989).
- 10) Flurkey, W. H.: J. Food Sci., **56**,93 (1991).
- 11) Janovitz- Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M. and Nicolas, J. J.: J. Agric. Food Chem., **38**,926 (1990).
- 12) Valero, E., Varón, R. and F. García- Carmona: J. Agric. Food Chem., **38**,1097 (1990).
- 13) Sayavedra- Soto, L. A. and Montgomery, M. W.: J. Food Sci., **51**,1531 (1986).
- 14) 黒澤祝子：調理科学, **17**,242 (1984).
- 15) Cano, P., Marin, M. A. and Fúster, C.: J. Sci. Food Agric., **51**,223 (1990).
- 16) Fujita, S. and Tono, T.: J. Sci. Food Agric., **46**,115 (1988).
- 17) Maddaluno, J. F. and Faull, K. F.: Experientia, **44**,885 (1988).
- 18) Raghavan, P. R., Zane, P. A. and Tripp, S. L.: Experientia, **46**,77 (1990).
- 19) 石井智恵美, 児玉枝里子, 横山裕樹子, 津久井朝野, 倉田元子, 表 美守：実践女子大学家政学部紀要, **29**,87 (1992).
- 20) 児玉枝里子, 横山裕樹子, 倉田元子, 石井智恵美, 表 美守：実践女子大学家政学部紀要, **30**,31 (1993).
- 21) Hsu, A. F., Shieh, J. J., Bills, D. D. and White, K.: J. Food Sci., **53**,765 (1988).