

シャクヤクの褐変化反応について

松永 孝之, 田村 隆幸

Studies on the browning in *Paeonia lactiflora*

Takayuki MATSUNAGA and Takayuki TAMURA

要 約

シャクヤク根における褐変化反応の一因としてポリフェノールオキシダーゼによる酵素反応の関与が指摘されている。そこで、シャクヤク葉を用いてポリフェノールオキシダーゼ活性を測定した。その結果、4-メチルピロカテコール、ドパミン及び没食子酸を基質とした酵素反応が進行することを認めた。この酵素反応は、至適 pH は8.0付近、至適温度は30°C付近であることが示唆された。さらに、シャクヤク根に含まれる没食子酸及びカテキンは、アルカリ条件に置かれると変色することが明らかになった。

以上の結果から、シャクヤク根における褐変化反応には、内因物質である没食子酸などを基質としたポリフェノールオキシダーゼによる酵素反応が一因であることが示唆された。さらに、内因性物質である没食子酸及びカテキンは、液性変化によっても着色することから、この変化も関与していることが考えられる。

Summary

Browning in the root of *Paeonia lactiflora* is thought to result from the reaction of polyphenol oxidase as one of causes. Firstly, the activity of polyphenol oxidase was assayed using the extract from the leaves of *Paeonia lactiflora*. The activity of this enzyme was detected with 4-methylpyrocatechol, dopamine and gallic acid as substrate. It was shown that the optimal pH is around 8.0 and the optimal temperature is around 30 degree in this reaction. Furthermore, the alkaline solution of gallic acid and catechin, both the endogenous components in *Paeonia lactiflora*, was shown to discolor.

These results suggest that the browning in the root of *Paeonia lactiflora* is partly due to the reactant of gallic acid, catechin and so on, by polyphenol oxidase and alkalinity.

キーワード：シャクヤク、褐変化、ポリフェノールオキシダーゼ、没食子酸、カテキン、液性
Key words : *Paeonia lactiflora*, Browning, Polyphenol oxidase, Gallic acid, Catechin, Alkalinity

シャクヤクは、鎮痛薬や鎮痙薬などとして多くの漢方処方に使用されている¹⁾。また、消化管に対する作用(胃運動亢進、腸管運動抑制、ストレス潰瘍の抑制)、鎮痛作用、抗炎症作用、鎮静作用、抗ケイレン作用、内分泌系刺激作用及び血液凝固・線溶系に対する作用などが多くの薬理作用が報告されている¹⁾。シャクヤクは、ボタン科の多年草で根を用い、活性成分としてはペオニフロリンやガロタンニン類が知られている²⁾。シャクヤクの品質に関しては、理化学的及び薬理的な評価が実施され、成分的な評価及びインビトロ及びインビボにおける薬効評価により品質評価が行われている³⁾。一方、生薬鑑別の観点からは、昔から匂い及び色調による評価が行われてきた。これらは、シャクヤクの調製法と密接に関係があるものと推察され、特に、乾燥工程による影響が大きいものと思われる⁴⁾。色調変化については、本来、白く仕上がったものが上品とされ、暗

褐色に変色したものは劣品とされており、この際、成分変化を来すことが報告されており、また、薬効にも変化があるものと推察される⁴⁾。シャクヤク根における色調変化は、酵素的褐変化によるものと考えられているが、詳細に検討した例はなく、唯一、林らがポリフェノールオキシダーゼ(PPO)によるフェノール性化合物の変色反応の可能性を指摘している⁵⁾。

我々は、富山シャクヤクとしてブランド化出来る品種の理化学的・薬理的選抜と共に栽培品の有効な乾燥調製法の検証も行っている。この際、問題となる色調変化について、酵素的及び非酵素的褐変化の観点からシャクヤク葉を用いて検討した。

実験方法

1. 試薬

本試験で用いた主な試薬は、没食子酸、4-メチルピロカテコール、塩酸ドパミン、海砂(30~50メッシュ、以上和光純薬)、カテキン(ケイマンケミカル)及び CelLytic TM P Cell Lysis Reagent (植物組織用抽出試薬、シグマ)である。

2. シャクヤク葉の採取

シャクヤクの葉は、平成28年5月に富山県薬用植物指導センターの圃場にて採取した。梵天種(4年栽培品)の1株より6~10枚の葉を採取し、4株から同様に採取し直ちに氷冷して持ち帰った。これを水洗した後水分を十分拭き取り計量してから使用するまで-80℃で保存した。

3. リンゴ由来 PPO の粗酵素液の調製⁶⁾

市販リンゴの皮を剥いて芯を取り、得られた果肉約244gを細切した後水中で冷やしながらか乳鉢で粉碎した。これに0.4Mショ糖、0.01Mアスコルビン酸含む0.1M Na/Kリン酸緩衝液(pH7.2)100mlを加えて水中で冷やしながらかホモジナイザーで破碎した。この破碎液を4枚重ねのガーゼでろ過後、得られたろ液をさらに遠心分離(500 x g, 20分間)し、得られた沈殿を抽出緩衝液で洗浄して粗プラスチック画分とした。その後0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)に懸濁して粗酵素液とし、少量ずつ分注して-80℃で保存した。

4. シャクヤク葉由来 PPO の粗酵素液の調製

シャクヤク葉由来の PPO 活性の測定に用いる粗酵素液は以下のように調製した。すなわち、凍結状態のシャクヤク葉をナイロン袋中でなるべく細かく細切し、破碎した後秤量した。これを予め氷上で冷やした乳鉢に入れ、10倍量の植物組織用抽出試薬及び2倍量の海砂を加えて冷やしながらか磨り潰した。これを遠心チューブに入れ、12,000 x g, 4℃, 10分間遠心して得られる上清を粗酵素液とし、少量ずつ分注して-80℃で保存した。

5. PPO活性の測定

シャクヤク由来の PPO 活性は、次のように測定した。

すなわち、0.1Mリン酸緩衝液または0.1Mトリス塩酸緩衝液(各々示した pH)に粗酵素液と各基質溶液(終濃度10 mM)を添加し、同緩衝液で全量1mlにした。これを各温度に設定した恒温槽に10~60分間反応させ、経時的に各基質に対応した吸光度を測定した。

また、リンゴ由来の PPO 活性は、次のように測定した⁷⁾。すなわち、McIlvaine 緩衝液(0.1Mクエン酸と0.2 Mリン酸1水素ナトリウムを混和、pH4.0)に粗酵素液とクロロゲン酸(終濃度0.05mM)を添加し、同緩衝液で全量1mlにした。これを30℃の恒温槽にて反応させ、波長325nmにおける吸光度を測定した。

6. 3種 pH 緩衝液中における没食子酸及びカテキンの吸光度変化の測定

5 mM カテキンまたは没食子酸の溶液を0.1Mリン酸緩衝液(各 pH 6,7,8)に溶解し、30℃に保温して経時的にカテキンは波長380nmの、また、没食子酸は波長400nmの吸光度を各々測定した。

7. タンパク量の定量

タンパク定量は、Lowry 法に従って行った⁸⁾。すなわち、タンパク溶液0.2 mlに反応混液(2%炭酸ナトリウムの0.1 N水酸化ナトリウム溶液:0.5%硫酸銅の1%クエン酸ナトリウム溶液=50:1)1 ml添加して37℃, 10分間加温した。その後、Folin-Ciocalteu 試薬0.1ml添加して良く攪拌した後、さらに30分間反応させ、波長750nmの吸光度を測定した。なお、牛血清アルブミンフラクションVを用いて同様の反応を行い、作成した検量線からタンパク量を求めた。

実験結果

1. リンゴ果実の PPO 活性

リンゴ果実を切った後に褐変化するのには PPO に起因することはよく知られている⁹⁾。そこで、初めにリンゴ由来の PPO を用いて酵素活性を測定した。その結果、Table 1 に示すように調べた3種の基質に対して吸光度の変化が認められ、酵素活性を確認できた。その中で、4-メチルピロカテコールを基質として用いた時の活性が最も高かった。

Table 1 Activity of polyphenol oxidase in apple

Substrate	Concentration(mM)	Wave length(nm)	Δ OD/1min/mg protein
Chlorogenic acid	0.05	325	1.238
Dopamine	10	400	0.416
4-Methylpyrocatechol	10	400	8.790

Each OD value shows the mean of 4-7 experiments.

2. シャクヤク葉のPPO活性

次に、シャクヤク葉のPPO活性をリンゴ由来のPPOと同一条件で測定してみた。しかし、pH4.0の緩衝液中では活性は認められなかった。そこで、反応液のpHを変えて酵素活性の測定を行ったが、pHの上昇に伴いクロロゲン酸溶液の吸光度が上昇し、中性以上の測定条件では基質としては不適であった。そこで、ドパミンを基質としてPPO活性を測定した結果、酸性pHではやはり活性は認められないが、中性付近では活性が認められることが分かった。そこで、至適pHの検討を行った結果、Fig. 1に示すように、pH8.0付近で最も高い活性を示した。また、データには示さないが、4-メチルピロカテコールでも同様に検討したところ、pH7.5付近で最も高い活性を認めた。

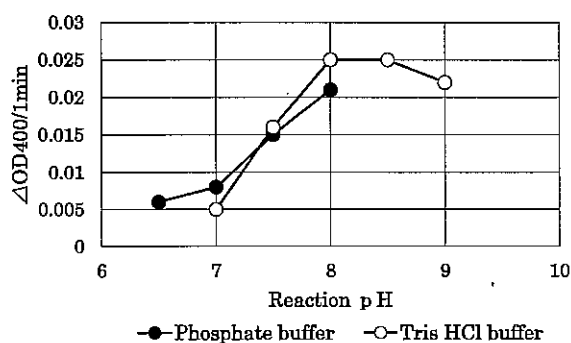


Fig. 1 Effect of reaction pH on the activity of polyphenol oxidase from the leaf of *Paeonia lactiflora* with dopamine as a substrate

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. The pH range of reaction mixture is pH6.5 to pH8.0 in 100mM phosphate buffer and pH7.0 to pH9.0 in 100mM tris HCl buffer.

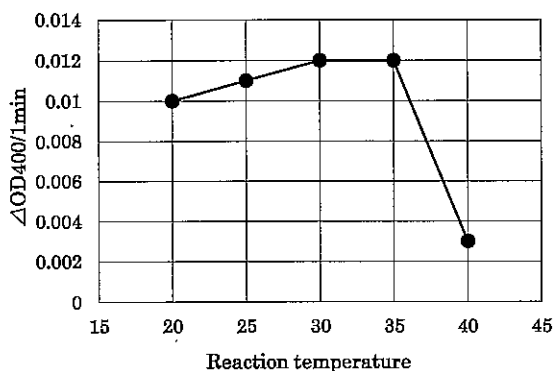


Fig. 2 Effect of reaction temperature on the activity of polyphenol oxidase from the leaf of *Paeonia lactiflora* with dopamine as a substrate

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. The reaction was assayed in the indicated temperature.

次に、反応温度を変えてPPO活性を測定した。その結果、Fig. 2に示すように、30°C付近で最も高い活性が見られた。

さらに、反応条件としてpH7.5、30°Cにおいて、各基質を用いた反応を検討した。その結果、Table 2に示すように、リンゴPPOと同様にドパミン及び4-メチルピロカテコールに対して、基質として酵素反応が進行した。また、シャクヤク根にも含まれる没食子酸も基質となり、吸光度の変化が認められた。しかし、クロロゲン酸は中性領域では吸光度の上昇が見られ、本酵素反応の基質としては不適であるため、酵素反応の検討はしなかった。

3. 塩基性下における没食子酸及びカテキンの変色反応

今回、酵素反応の至適pHを検討する過程でクロロゲン酸が中性以上のpHで着色することを観察した。また、ドパミン及び没食子酸においても中性以上のpHで着色してくることを確認している。そこで、シャクヤク根にも含まれる没食子酸及びカテキンの異なるpHにおける色調変化を調べた。その結果、Fig. 3に示すように、5mM没食子酸溶液においてpH6.0では8時間後でもほとんど吸光度の変化は見られないが、pH7.0では、吸光度の上昇が見られ、8時間後の吸光度は約1.6となった。また、pH8.0では、吸光度の変化はさらに大きく、8時間後の吸光度は約2.58となり、データには示さないが、8時間後では濃紺色を呈し、100時間以上静置すると黄色を呈すようになった。また、カテキンについても同様に各pHにおける吸光度変化を調

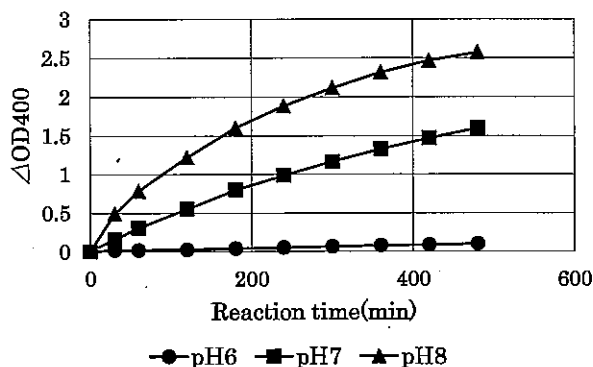


Fig. 3 Changes of absorbance in catechin solution at various pH

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. Catechin solution at various pH was incubated at 37°C in the dark. Each absorbance was assayed at the indicated intervals.

Table 2 Activity of polyphenol oxidase in leaf of *Paeonia lactiflora*

Substrate	Concentration (mM)	Wave length (nm)	ΔOD/1min/mg protein
Gallic acid	10	400	0.388
Dopamine	10	400	0.108
4-Methylpyrocatechol	10	400	0.096

Each OD value shows the mean of 5-10 experiments.

べた。その結果、Fig. 4 に示すように、pH6.0では吸光度の変化はほとんどなく、また、pH7.0においても若干の吸光度上昇を認めるのみであった。しかし、pH8.0では、急激な吸光度の上昇が見られ、8時間後では約0.54となり、黄色を呈した。

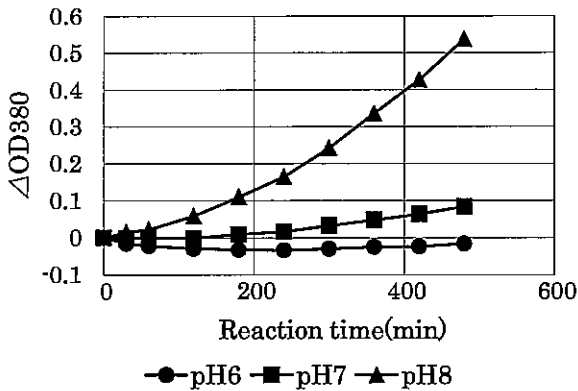


Fig. 4 Changes of absorbance in gallic acid solution at various pH

Each absorbance shows the mean of 2 experiments. Gallic acid solution at various pH was incubated at 37°C in the dark. Each absorbance was assayed at the indicated intervals.

考 察

野菜や果物において、酵素的褐変化は色調の劣化とオフフレーバーを引き起こすため商品価値を下げるものと認識されている¹⁰⁾。ジャクヤクにおいても、乾燥など調製加工の過程で褐変化を来し、品質の低下をもたらすとされている⁴⁾。この現象は、ジャクヤク根に含まれるPPOによるフェノール性化合物の酸化反応によるものと推察されている⁴⁾。そこで、ジャクヤク葉を用いて褐変化反応におけるPPOの関与について検討を行った。

ジャクヤク葉の抽出エキスにPPO活性が認められるか検討した結果、リングエキスで活性の認められたpH4の反応条件では活性は検出出来なかった。そこで、基質としてドパミンを用いて反応pHを変えて酵素反応の検出を行ったところ、中性から弱アルカリの反応条件で活性が認められた。至適pHは、ドパミンを基質とした場合、pH8前後、4-メチルピロカテコールを基質とした場合は、pH7.5前後であり、弱アルカリ条件で最も高い活性を示すことが明らかとなった。植物を含む種々生物由来のPPOの至適pHは、3.5から9まで幅広く報告されており¹¹⁾、ジャクヤク葉由来のPPOの場合は、弱アルカリ側に至適条件を有することが示唆された。林らは⁵⁾、ジャクヤク根由来のPPO活性に関して、ピロガロールを基質として至適pHを検討し、pH7.2付近で最も高い活性を認めたと報告している。また、今回至適温度を調べたところ、約30°Cで最も高い

活性を認めた。

次に、各種基質を用いてPPO活性を比較検討した結果、先に述べたように、ドパミン及び4-メチルピロカテコールでは酵素反応が進行した。さらに、ジャクヤク根に含まれる没食子酸を用いて酵素活性を調べたところ、基質となりうることを確認した。この結果は、ジャクヤク根のPPOが葉と同様の特性を有する場合は、没食子酸を基質として酵素的褐変化が生じる可能性を示唆している。一方、2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸及び2,6-ジメソキシフェノール)ではほとんど酵素反応は進行せず、これらの合成基質は基質となりにくいことがわかった。

今回、ジャクヤク葉由来のPPOの至適pHの測定に際し、基質として用いたドパミン及び4-メチルピロカテコールの吸光度がpHの上昇に伴い増加した。各種フェノール性化合物において、アルカリ条件下では構造変化が進み、吸収スペクトルが変化することが報告されている¹²⁾。そこで、ジャクヤクに含まれるフェノール性化合物のカテキン及び没食子酸についてアルカリ条件下における吸光度変化を調べた。その結果、カテキンに関しては、pH6では8時間まで吸光度の変化はほとんど見られないが、pH7では徐々に吸光度が上昇する傾向が見られ、pH8になると急激に吸光度が上昇し、8時間後では明らかに黄変した。また、没食子酸においても同様の傾向が認められ、特にpH7ではカテキンより吸光度の上昇が顕著であった。カテキン及び没食子酸は、液性がアルカリに向かうに従い濃度が減少し、重合体あるいは分解物を生じることが報告されている^{13,14)}。この際、光照射により促進されるとされているが、今回の実験では遮光条件で反応させており、徐々にではあるが反応が進行した。カテキンでは、pHの上昇に伴い自動酸化が亢進し、キノン生成が促進されるため溶液が黄色を呈するものと推察されている¹⁵⁾。植物葉の細胞内器官のpHに関しては、細胞質内ではpH7.2~7.4の弱アルカリであるとされている¹⁶⁾。また、また、カテキンや没食子酸などが含まれる液胞内のpHは、5.0~5.5と酸性であり、自動酸化を受けにくい条件で存在しているものと推察される。一方、PPOが存在するプラスチドや葉緑体のpHは8.0~9.0とされており¹⁶⁾、今回示されたジャクヤク葉の至適pHに近い条件に維持されている。正常な状態では、液胞中の没食子酸などと葉緑体などに存在するPPOが接触することはないが、植物組織が破壊された場合、局在性が失われ、両者が接触し酵素反応が進む⁹⁾と共に、カテキンや没食子酸などのフェノール性化合物が中性あるいは弱アルカリ条件にさらされることになり、非酵素的褐変化がさらに進むものと推察される。

今回、ジャクヤク葉を用いて褐変化反応にPPOが関与

する酵素的褐変化とシャクヤク根に含まれるカテキンや没食子酸の存在する環境が弱アルカリ化することによる非酵素的褐変化が生じる可能性が示唆された。今後、シャクヤク根においても同様の機序で酵素的褐変化が発生するの否か明らかにすると共に、これらの成分の自動酸化による構造変換により薬効が変化するかどうかについても検討する予定である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、酵素の取り扱い及び諸性質の検討に関して貴重なご助言を戴きました富山県立大学工学部生物工学科伊藤伸哉教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) 第十七改正日本薬局方解説書, 広川書店 (2016)
- 2) S. Parker, et al: A pharmacological review of bioactive constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch, *Phytother. Res.*, **1445** (2016)
- 3) J.-Y.Bae, C.Y.Kim, H.J.Kim, J.H.Park and M.-J.Ahn: Differences in the chemical profiles and biological activities of *Paeonia lactiflora* and *Paeonia obovate*, *J. Med. Food*, **18**, 224-232 (2015)
- 4) 林茂樹, 姉帯正樹, 佐藤正幸, 柴田敏郎: 北海道北部地域におけるシャクヤク収穫後の調製方法が生薬の品質に及ぼす影響, *生薬学雑誌*, **64**, 68-75 (2010)
- 5) 林隆章, 桂英二, 金島弘恭, 山岸喬: 芍薬の化学的変化 (第5報), 芍薬の変色について, *道衛研究報*, **33**, 35-38 (1983)
- 6) M. Murata, M. Tsurutani, S. Hagiwara and S. Homma: Subcellular location of polyphenol oxidase in apples, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1495-1499 (1997)
- 7) M. Murata, M. Tsurutani, M. Tomita, S. Homma and K. Kaneko: Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1115-1121 (1995)
- 8) O.H.Lowry, N.J.Rosenbrough, A.L.Farr and R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
- 9) 村田容常: 酵素的褐変化とその制御, *化学と生物*, **45**, 403-410 (2007)
- 10) 木原智子: ポリフェノールオキシダーゼと食品の酵素的褐変化, *中部大学応用生物学部紀要*, **4**, 29-34 (2005)
- 11) <http://www.brenda-enzymes.org>
- 12) M.Friedman and H.S.Jurgens: Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2101-2110 (2000)
- 13) J.-Y.Liang, J.-Y.Wu, M.-Y.Yang, A.Hu and L.-Y.Chen: Photocatalytic polymerization of catechin molecules in alkaline aqueous, *J. Photochem. Photobiol.*, **165**, 115-120 (2016)
- 14) Y.Du, H.Chen, Y.Zhang and Y.Chang: Photodegradation of gallic acid under UV irradiation: Insight regarding the pH effect on direct photolysis and the ROS oxidation-sensitized process of DOM, *Chemosphere*, **99**, 254-260 (2014)
- 15) M.Mochizuki, S.Yamazaki, K.Kano and T.Ikeda: Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1569**, 35-44 (2002)
- 16) <http://jspp.org/hiroba/q>