

吉備国際大学研究紀要

(医療・自然科学系)

第32号, 9-19, 2022

## (+)-カテキンを基質としたコムギ種子中の酸化酵素活性

香川 弘征\*・桑川 翔哉\*・横山 由紀子\*・喜田 衣久美・氷見 英子

### Characterization of (+)-catechin oxidase of wheat grain

Kosei KAGAWA, Shoya KUMEKAWA, Yukiko YOKOYAMA, Ikumi KIDA, Eiko HIMI

#### Abstract

Discoloration of dough strongly affects wheat products such as Udon noodles. The discoloration has occurred by oxidation of phenolic substances in flour. Polyphenol Oxidase (PPO) is the key enzyme that plays a role in the oxidation and discoloration of dough. Since the PPO activity is crucial for quality products, many studies have been conducted using non-existing phenolic substances in flour e.g. L-DOPA as substrates. Here we demonstrated PPO activity with (+)-catechin, which has been confirmed that it is synthesized in wheat grain coat. The PPO activity is mainly derived from the outer layer of grain and strongly inhibited by sodium chloride, ascorbic acid, and citric acid.

**Key words :** (+)-catechin, discoloration of dough, grain, oxidase, wheat

**キーワード :** (+)-カテキン, 生地のかすみ, 種子, 酸化酵素, コムギ

#### 緒言

コムギは世界の三大穀類の一つとされる主要作物である。コムギの播種時に異なる品種の種が混じると生育や種子成熟の時期がずれて栽培や収穫に支障が生じる。そのため種子の品種鑑別方法は多数開発され、その一つとしてフェノールによる品種鑑別法が1938年に発表されている<sup>1)</sup>。コムギ種子をフェノールに浸漬すると種子が着色し、その着色度合いが品種によって異なることを利用したものである。

このコムギ種子の着色現象は、バナナやリンゴの切断面の褐変化と同様、ポリフェノールオキシダーゼ (polyphenol oxidase; PPO) と呼ばれる酸化酵素がフェノール類をキノン体に酸化することで起こる<sup>2)</sup> (図1)。



図1 PPOによる酸化反応

吉備国際大学農学部地域創成農学科  
〒656-0484 兵庫県南あわじ市志知佐礼尾370-1  
School of Agriculture, Kibi International University  
370-1, Shichi Sareo Minamiawaji, Hyogo, Japan (656-0484)

\* These authors contributed equally to this work.

小麦粉を練った生地色の低下、いわゆる「生地のくすみ」もまたPPOが原因である<sup>3,4)</sup>。小麦粉の加工品としては主にパン、菓子、麺類があるが、このうちパンや菓子については小麦粉以外の原料が多く小麦粉本来の色が隠れる上、パンやケーキでは空隙が多く生地のくすみは重要視されない。一方、うどんなどの麺類は生地の色が直接最終加工品に反映するため、生地のくすみが重要視されてきた。

植物には多くの種類のフェノール化合物が存在し、その種類は植物種や部位によっても大きく異なる。それぞれのフェノール化合物類を酸化する酵素もまた多様であり、「PPO」という酵素もまた多様な酵素を含む総称である。PPOは①モノフェノールを基質とするチロシナーゼ、②*o*-ジフェノールを基質とするカテコールオキシダーゼ、③*p*-ジフェノールを基質とするラッカーゼの3種類に大きく分類され、これらはいずれも銅と結合して活性化する<sup>5,6)</sup>。植物中で基質として多く存在するのはクロロゲン酸類やカテキン類の*o*-ジフェノールであるため、②のカテコールオキシダーゼのみをPPOと考える研究者が多かったが、近年ではチロシナーゼ、カテコールオキシダーゼ、ラッカーゼすべてがモノフェノールもジフェノールも酸化する能力があることが明らかにされ、区別が曖昧になっている。

褐変現象は基質の量と種類によっても大きく異なる。ニホンナシはリンゴと同程度のPPO活性を示すが、リンゴよりはるかに褐変の程度が弱い<sup>5)</sup>。これは基質量がリンゴに比べ著しく少ないためで、ナシのジュースにクロロゲン酸やカテキンをリンゴと同じレベルまで添加するとリンゴジュースのように褐変する<sup>5)</sup>。

コムギ種子のフェノール化合物は種皮や糊粉層を含む外皮に多く含まれ、フェノール化合物の83%は製粉時に除去される「ふすま」に含まれており、その大部分はフェルラ酸とその二量体や三量体などの重合体である<sup>7)</sup>。細菌*Bacillus licheniformis*を用いた実験により、フェルラ酸は酸化により重合され、その酸化重合

化にはラッカーゼの関与が明らかにされている<sup>8)</sup>。しかしフェルラ酸はむしろPPO活性を阻害し、米糠由来のフェルラ酸はジャガイモやリンゴの褐変を防ぐ効果があること、またコムギふすまから精製されたPPOはフェルラ酸により活性が減少することが報告されている<sup>9,10)</sup>。つまりコムギ種子のフェルラ酸は生地のくすみに関わるPPOの基質としては考えにくい。リンゴでも、PPOの基質としてはクロロゲン酸が最も多いが、褐変化には量の少ないカテキン類が大きく影響し、また食品褐変に関わるフェノール化合物としてはカテキンやカテキンの重合体であるプロシアニジンの関与が大きいと言われている<sup>5,11)</sup>。

PPOは植物に広く存在し、かつ食品の褐変化を引き起こすため商業的に重要な酵素であるが、植物体内での機能は不明な点が多い。しかしPPO活性が病原菌感染などの生物学的ストレスと強い相関があることがジャガイモやトマトで明らかになっている<sup>11)</sup>。またコムギの赤カビ病抵抗性品種では赤カビ病菌*Fusarium graminearum*の接種によりPPO活性が3倍に増加することが報告されている<sup>11)</sup>。細胞内での局在で見るとPPOはプラスチドに存在し、基質となるポリフェノールは液胞に存在する。つまり通常はこれらの酵素・基質は出会うことはなく褐変反応も起こらないが、細胞が破碎されると両者が出会い酵素反応が開始する。小麦粉の場合は製粉時に細胞が破碎されるが水分含量が低いためにPPO活性が抑制されており、生地を作製時の加水により酵素反応が開始する。

酵素活性は多くの要因に依存している。酵素活性には酵素濃度、酵素に特異的な基質の量、反応液のpH、温度、活性化因子や阻害剤の有無が影響を及ぼしている。PPOの至適pHは植物種によって異なり、リンゴではpH4.5-5.0、パイナップルでは中性に近く、キウイフルーツはpH8.0で高い活性が見られる<sup>11)</sup>。また至適温度についても植物種によって異なり、レタスでは25-35℃、ブドウでは25-45℃、オリーブでは30-50℃と報告されている<sup>11)</sup>。PPO阻害剤の身近な例としては、

皮をむいたリンゴを塩水あるいはレモン汁に漬ける褐変抑制が挙げられる。これはPPO活性が塩水に含まれる塩化ナトリウム (NaCl) やレモン汁に含まれるアスコルビン酸あるいはクエン酸によって阻害されるためである。このような酵素的褐変の阻害剤は既に複数の報告があり、アスコルビン酸などの還元剤タイプ、L-システインなどのキノンカップラータイプ、NaCl やエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの銅キレート剤タイプに分類されている<sup>2)</sup>。銅キレート剤がPPO活性を阻害するのは、PPOが銅結合タンパク質であり、さらに銅が活性化因子の役割を果たしているためである。またPPO活性は低いpHでは活性が低下するため、クエン酸をはじめ、マレイン酸やリン酸の添加はpHを低下させ、活性阻害を引き起こしているという報告もある<sup>12)</sup>。

酸化酵素の活性測定には酸素電極を用いた方法が一般的であるが、この方法は多数の検体を扱うことが困難である。PPO活性の低いコムギ品種の育成のためには多数の系統を同時に比較可能で、精度が高く簡便なPPO活性測定法が必須である。そこでAnderson and Morris (2001) は基質としてコーヒー酸、L-DOPA, 4-メチルカテコール, フェノール, L-チロシンを用い、それぞれの水溶液にコムギ種子を加えた場合のPPO活性を調査した。その結果、基質の種類によって基質溶液の色の変化に差があり、L-DOPAでの変化量が最も顕著であることを報告した<sup>13)</sup>。さらに小麦粉を用いた場合でも同様の結果が見られたことから、これらの知見を統合し、従来の酸素電極を用いたPPO活性測定法に代わり、L-DOPAを基質として基質溶液の呈色を測定する簡易的な比色法が開発された<sup>14)</sup>。

コムギPPOの正体はタンパク質側と遺伝子側から並行してアプローチがされた。2003年に、高いPPO活性を示す品種のコムギふすまを材料にしてL-DOPA酸化活性のあるタンパク質が抽出され、その部分的なアミノ酸配列はリンゴやブドウから単離された既知のPPOと高い相同性を示した<sup>15)</sup>。またKiharaら (2005)

は4-メチルカテコールを基質として酸化活性のあるタンパク質を精製し、このタンパク質のアミノ酸配列が上述した配列と一致することから、同じタンパク質が基質を問わず機能していると報告した<sup>10)</sup>。一方遺伝子レベルでの解析はPPO活性に差がある4倍体コムギ同士の交雑後代を用いた解析から端を発し、PPO遺伝子はAゲノムの第2染色体に座乗していることが2002年に示された<sup>16)</sup>。続いて2005年には6倍体コムギでもPPO活性が2A染色体上に由来することが報告された<sup>17)</sup>。アミノ酸配列情報をもとに遺伝子の単離が進み、同年にはSunらが2A染色体上のPPO遺伝子を特定し、またPPO活性の異なる系統間での配列情報をもとにSTSマーカーを作成した<sup>18)</sup>。しかし2A染色体上のPPO (PPO-A1) のみでは種子のPPO活性は説明できず、その後2D染色体上のPPO配列 (PPO-D1) が単離された。活性の異なる系統間のPPO-D1配列からDNAマーカーが開発され、PPO-A1およびD1の遺伝子型でほぼPPO活性を推定することが可能になった<sup>19)</sup>。その後の解析により、コムギのPPO遺伝子は各ゲノムに複数コピー存在するが、種子のPPO活性に関与するものはこのうちPPO-A1およびD1であり、特にPPO-A1の影響が強いことが明らかにされた<sup>20, 21)</sup>。

L-DOPAは哺乳類ではL-チロシンから体内や脳内で合成される物質で、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンなどの神経伝達物質の前駆体である。工業的に合成が可能のため比較的安価に手に入ることからPPO活性測定時の基質として広く用いられている。しかしL-DOPAを合成する植物はハッシュウマメなど一部のマメ科植物に限られ、またその用途も根部より土壤中に放出して周囲の植物の成長を妨げるアレロケミカルとして機能している<sup>22)</sup>。つまりコムギ種子中にはL-DOPAは存在しないため、生地のくすみの直接的な原因物質としては考えにくい。そこで本研究ではコムギ種子中に存在し、PPOの基質となり、かつ生地のくすみの原因として考えられる (+)-カテキンを基質とした場合のコムギPPOの酵素活性について調

査することで、より実態に近い特性を明らかにした。

## 材料と方法

### 1. 供試材料

吉備国際大学農学部のフィールド圃場(34° 29' 85" N, 134° 74' 88" E) で育成し、2019年に収穫したコムギ (*Triticum aestivum* L.) Chinese Spring (以後CS) の種子を全ての実験に用いた。施肥は全量基肥(窒素: 0.83kg/a, リン酸: 0.56kg/a, カリウム0.44kg/a)で行った。

### 2. 酸化酵素活性測定

酵素活性の基質には (+)-カテキン水和物 (Sigma-aldrich社) を用いた。(+) -カテキン水和物はメタノールで200mMに溶解し、最終濃度が10mMになるように1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4) で希釈した。この希釈液を以後「基質溶液」とする。基本とした酵素反応は以下のとおりである。計量したコムギ種子 (3~5粒) を入れた2 mLチューブに基質溶液を1 mL加え、25°Cで1時間反応させたのちに反応液の432nmの吸光度を測定した。酵素活性はFuerstr<sup>23)</sup>の方法を参考に、 $\Delta A_{432} \cdot \text{種子重 (g)}^{-1} \cdot \text{反応時間 (min)}^{-1}$  で表した。 $\Delta A_{432}$ は酸化反応の前後における基質溶液の432nmの吸光度の差(吸光度変化量)である。全ての実験は三反復し、平均および標準誤差を算出した。

### 3. 反応時間と至適温度およびpHの調査

反応時間および反応温度の違いによる酵素活性を調査するため、反応時間を5, 10, 15, 30分および1, 2, 3, 4, 5時間、さらに反応温度を10, 20, 30, 40, 50°Cにしたときの酵素活性を測定した。またpHによる酵素活性調査のため、50mM 酢酸/酢酸ナトリウム (pH 4 および pH 5), 50mM MOPS/水酸化ナトリウム (pH 6, pH 7, pH 8), 50mM HEPES/水酸化ナトリウム (pH 9) それぞれに200mM (+)-カテキン

メタノール溶液が最終濃度10mMになるように基質溶液を作成した。

### 4. 粉碎種子の酵素活性

コムギ種子そのまま (whole grain), ラジオペンチで圧潰した種子 (pressed grain), および組織破砕機 (SHAKE Master NEO, BMS社) で1500rpm, 1分間破砕した種子 (smashed grain) を用い、基質溶液を加えて反応させた。反応液は遠心 (15000rpm, 1分) したのちに上清を取り、酵素活性を測定した。

### 5. コムギ種子中の酸化酵素の局在調査

試験搗精用のテストミル (TM05C, サタケ社) を用いた。金剛ロールは#36, 回転数は1000rpmに設定した。コムギCSの種子150gを30秒ずつ7分まで研削し、それぞれの研削粉を酵素活性測定に用いた。

### 6. 酵素活性阻害物質の添加による酵素活性の変化

アスコルビン酸, クエン酸, および塩化ナトリウム (以上富士フィルム和光純薬社) および0.5Mエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 水溶液 (pH8.0, ナカライテスク社) を用いた。それぞれの物質は1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4) で溶解あるいは希釈した。

## 結果

### 1. 酵素活性測定条件の検討

本実験では (+)-カテキンを基質としたときのコムギ種子のPPO活性を測定するため、pH7.4での反応後のカテキン溶液の最大吸収波長を調査した。その結果、図2に示す通りコムギPPOによるカテキン酸化物は432nmと482nmにピークを示した。

Anderson and Morris (2001) はコムギ種子のPPO活性調査の基質としてカフェイン酸, L-DOPA, 4-メチルカテコール, フェノールおよびL-チロシンを用い、フェノールおよび4-メチルカテコールは410 nm,



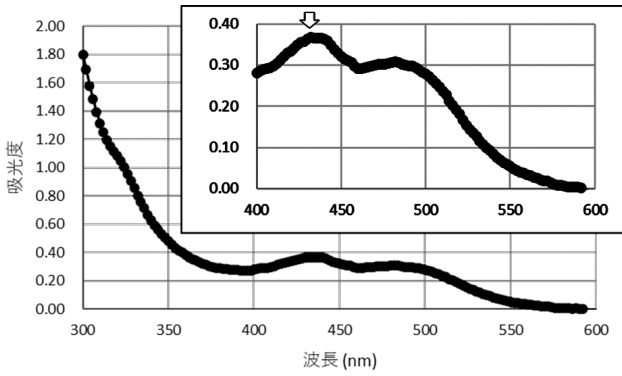


図2 コムギ種子を1時間浸漬後の(+)-カテキン溶液の連続スペクトル。  
矢印は最大値を示した432nmの位置を示す。

それ以外の基質は475nmで吸光度を測定している<sup>13)</sup>。またJiménez-Atiénzarらはモモ果肉のPPOによるカテキン酸化物の最大吸収波長がpHによって変動し、pH5.0での酵素反応後のカテキン酸化物は最大吸収波長が390nmなのに対し、pH7.5では430nmであることを報告している<sup>24)</sup>。以上から432nmでの測定が妥当と考えられたため、このあとの実験結果は全て432nmの吸光度の結果を示す。

次に反応時間を調査した。図3 Aは反応開始から5, 10, 15, 30分および1, 2, 3, 4, 5時間後の反応液の吸光度変化量を示したグラフである。反応開始15分までは変化がないが、30分後からはほぼ直線的に増加している。また反応時間あたりの吸光度変化量を図3 Bに示した。反応開始30分後を最大として、60分後からは一定である。この結果からこの後の実験では反応時間を60分とした。

反応温度を調査した結果、10℃以下の低温ではほとんど吸光度に変化がなく、低温では(+)-カテキン酸化が起こりにくいことが明らかになった(図4)。一方50℃では吸光度の変化量が最大となり、それ以上高温になると吸光度の変化量が少ない。コムギ全粒粉のPPO活性は60℃で5分間加熱すると半減すること<sup>3)</sup>や、コムギふすまから抽出された精製PPOは70℃で10分間加熱すると活性が30%に低下すること<sup>10)</sup>が報告されているため、PPOタンパク質は60℃以上で失活する

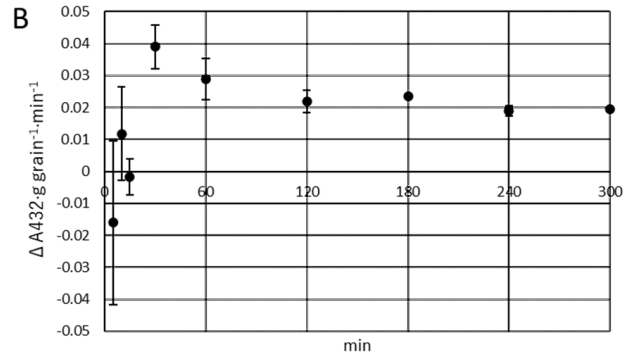
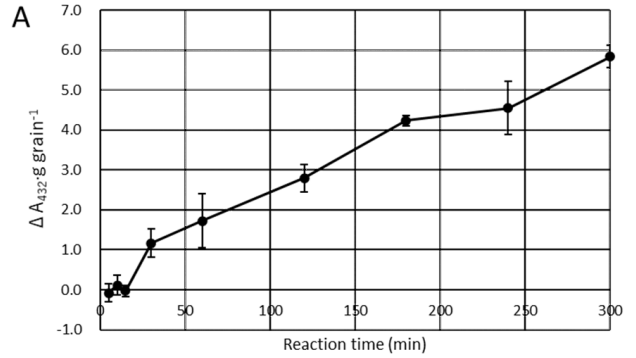


図3 コムギPPO活性の時間的变化。  
A. 種子重(g)当たりの吸光度変化量。  
B. 種子重(g)および時間(分)あたりの吸光度変化量。

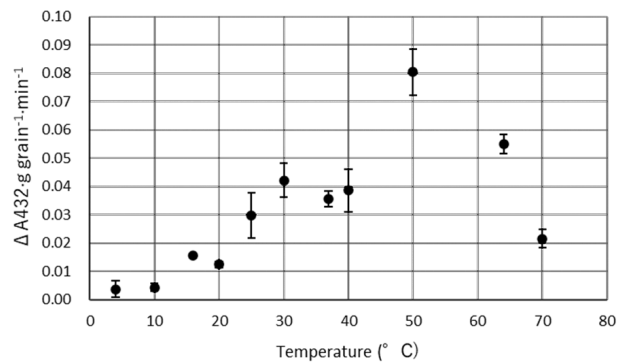


図4 温度によるコムギPPO活性の効果。

と考えられる。コムギの生育環境や小麦粉の加工時の温度を考慮し、この後の実験は25℃で行った。

pHの違いによる活性を調査した結果、pHが高いほどカテキン酸化が起きやすい結果が示された(図5 A)。また432nmおよび482nmの吸光度の比はpHによって異なり、pH6で最も低く、それより低くあるいは高くなるにつれて比が大きくなる結果が見られた(図5 B)。カテキン類の自動酸化はpHにより変動し、pHが高い

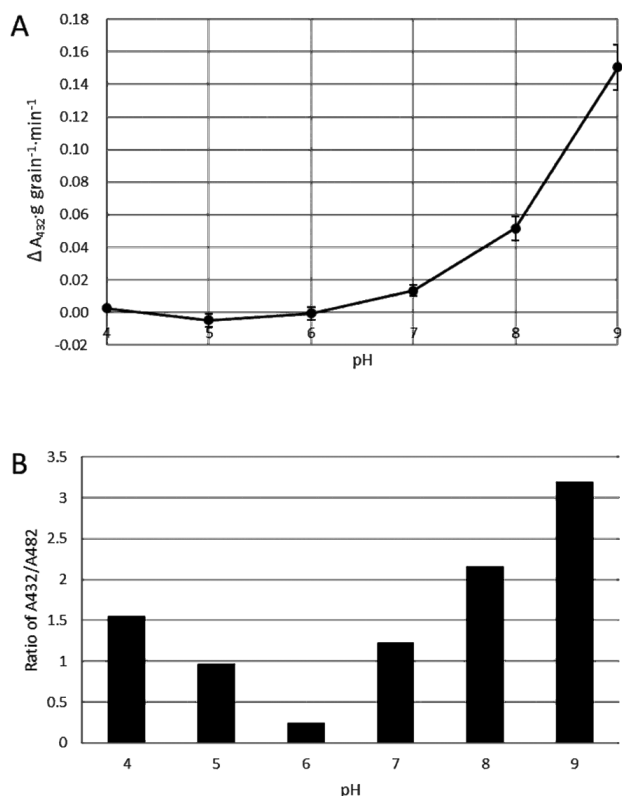


図5 A. pHによるコムギPPO活性の効果。  
B. pHによる432nmおよび482nmのPPO活性比。

ほど自動酸化が起きやすいことが知られており<sup>25)</sup>、図5Aに示す高いpHでのカテキン酸化は酵素活性に依存しない自動酸化と考えられる。PPOの至適pHは植物種によって違いがあるが、カテコールを基質とした小麦粉あるいはコムギふすまのPPO活性はpH7で最大となることが明らかにされている<sup>3, 10)</sup>。このことから、自動酸化に影響を受けずに (+)-カテキン酸化を調査するためにはpH7付近が最適であると考えられたため、以後の実験はpH7.4とした。

## 2. コムギ (+)-カテキン酸化酵素の種子分布

通常、PPOタンパク質は細胞内ではプラスチドに局在し、一方で基質となるポリフェノール類は液胞に局在している。そのため細胞が破壊されて初めてPPOは基質と出会い酵素反応が開始する<sup>5)</sup>。そこでコムギ種子の破碎によるPPO活性を調査するため、圧潰種子 (pressed grain) および粉碎種子 (smashed grain) のPPO活性を全粒種子 (whole grain) と比較した。その

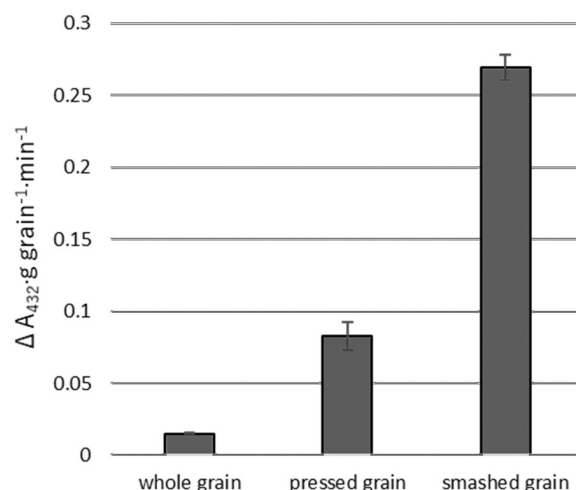


図6 全粒 (whole), 圧潰 (pressed), 粉碎 (smashed) コムギ種子のPPO活性の比較。

結果、全粒種子 (0.015 ΔA<sub>432</sub>·g grain<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) と比較して、圧潰種子は5.6倍 (0.083 ΔA<sub>432</sub>·g grain<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>)、粉碎種子は18倍 (0.27 ΔA<sub>432</sub>·g grain<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) の活性を示した (図6)。このことから、コムギ種子のPPOもまた細胞の破碎による活性化が起こると考えられる。しかし、種子の圧潰および粉碎は胚乳の澱粉を露出させ、溶液を吸収してしまうことや、反応液を遠心分離しても反応液が濁ることから、吸光度の上昇はこの濁りにも影響を受けていると考えられる。

次にPPOの種子での局在を調査するため、種子を搗精して得られた研削粉のPPO活性を調査した。搗精とは種子に連続的に摩擦をかけて種子粒の表層部を擦り減らすものである。30秒ずつ7分まで搗精し、それぞれの研削粉を計量して表面からの理論上の割合を算出した結果を表1に示す。表面からの研削率とそれぞれのPPO活性とを図7に示した。搗精最初の30秒で表面から4.4%が研削されており、この部分のPPO活性が1.61 ΔA<sub>432</sub>·g grain<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>と最も高い。表面から16.2%が研削された搗精2分後のPPO活性は0.26 ΔA<sub>432</sub>·g grain<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>で、そのあとの研削粉は同程度の活性を示した。したがってPPOは種子表面に局在しており、胚乳のPPO活性は低いと考えられる。

表1 搗精時間と表面からの研削率

搗精時間(分)	表面からの研削率(%)
0.5	4.4
1.0	8.4
1.5	12.9
2.0	16.2
2.5	19.5
3.0	21.0
3.5	23.0
4.0	25.1
4.5	27.6
5.0	28.9
5.5	30.6
6.0	32.2
6.5	33.1
7.0	34.8

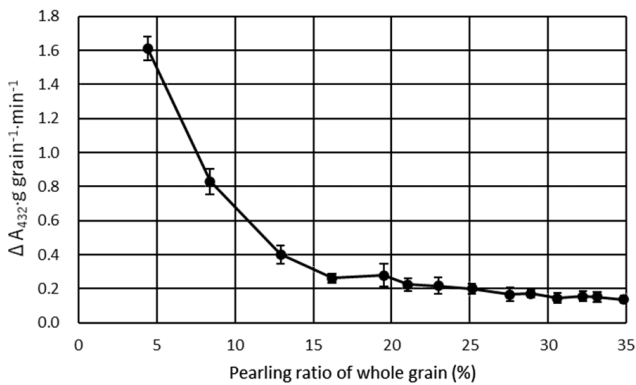


図7 搗精により得られたコムギ種子研削粉のPPO活性。横軸は種子表面からの研削率を表す。

### 3. 阻害剤によるコムギ (+)-カテキン酸化酵素の活性阻害効果

コムギ (+)-カテキン酸化酵素の活性阻害効果についてNaCl, EDTA, クエン酸およびアスコルビン酸を用いて調査した。

うどんなどの麺は小麦粉に食塩水を加水して加工する。その際に使われる食塩水の濃度は約10%とされている。10%の食塩水はおよそ1.83Mであるため、この濃度を挟むように2.5Mから0.003Mまで段階的に希釈しそれぞれの濃度での酵素活性を調査した。その結果、PPO活性はNaClを添加しなかった場合に比べて低濃度の0.003M NaClはやや高くまた0.01Mでは同程

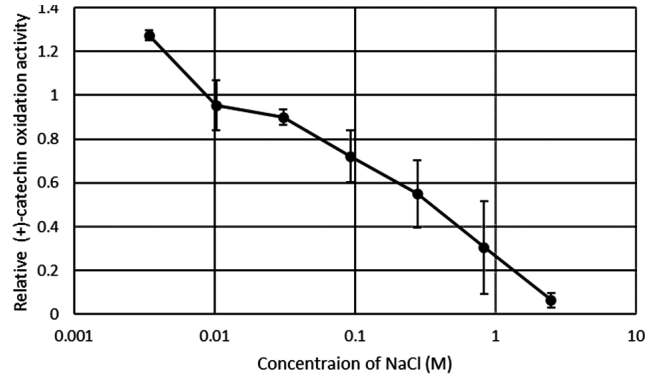


図8 塩化ナトリウム(NaCl)添加によるコムギPPO活性阻害効果。無処理区のPPO活性を1とする。

度であったが、それ以上の高濃度では濃度依存的に低くなる傾向が示された(図8)。

リンゴ果肉のPPO活性はNaCl濃度依存的に阻害され、無処理区の活性を100としたとき、0.5M NaClで41と半減すること、またこの傾向はジャガイモ塊茎や黒緑豆もやし胚軸でも同様であることが明らかになっている<sup>26)</sup>。コムギPPOもまた0.28MのNaCl濃度では比活性がほぼ半減していることからPPOは植物種に関わらず、NaClにより活性阻害が見られること、またNaCl濃度によるPPO活性阻害効果は同程度であると示唆された。

PPOは高度に保存された銅結合部位があり、この領域が活性中心と考えられている<sup>5,6)</sup>。そこで銅キレート剤であるEDTAを添加し、PPO活性の阻害効果について調査した。Kiharaらは5mM EDTAは精製コムギPPOの活性阻害効果はほとんどないと報告しているのに対し<sup>10)</sup>、本研究では60mM EDTAの比活性が47.6と有意に低下した(図9)。しかしそれ以上の濃度でも比活性は大きくは低下しないことから、EDTAによるPPO活性の阻害は部分的であると考えられる。

図10ではクエン酸によるPPO活性の阻害効果を示している。クエン酸濃度に依存してPPO活性は低下し、100mMではほぼ活性が失われることが明らかになった。この傾向はアスコルビン酸でも同様であった(図11)。

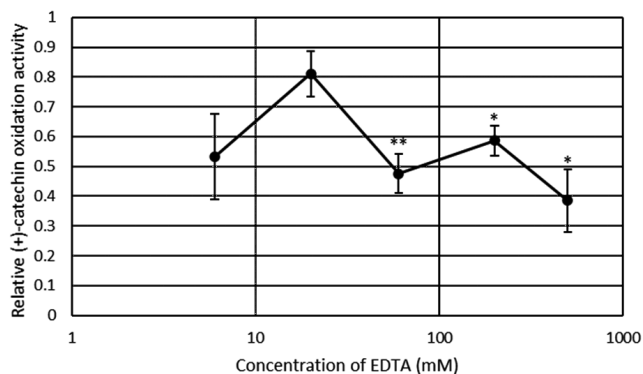


図9 エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 添加によるコムギPPO活性阻害効果。無処理区のPPO活性を1とする。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

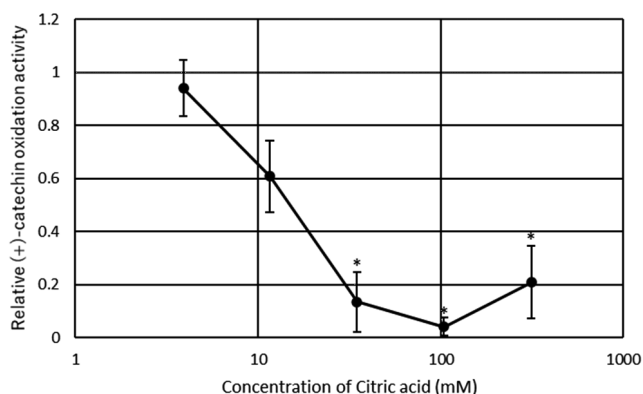


図10 クエン酸添加によるコムギPPO活性阻害効果。無処理区のPPO活性を1とする。\* $p < 0.05$

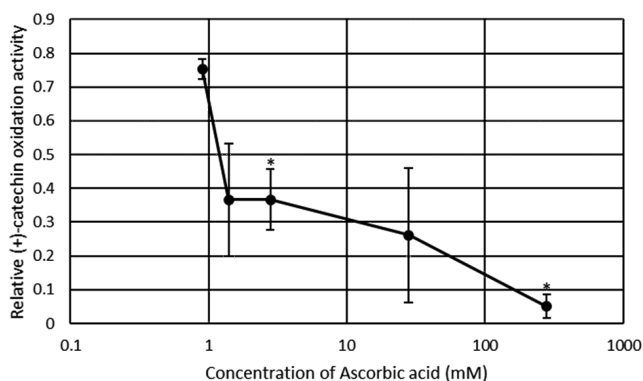


図11 アスコルビン酸添加によるコムギPPO活性阻害効果。無処理区のPPO活性を1とする。\* $p < 0.05$

## 考察

コムギ種子によるカテキン酸化物の最大吸収波長は432nmであり、モモ果肉PPOによるカテキン酸化物の最大吸収波長430nmとほぼ同じ結果を示したことから、それぞれのPPOによるカテキン酸化物の構造は同一と予想される。また図1では432nmのピーク以外に、482nmのピークが見られるが、この傾向はモモ果肉PPOを用いた実験でも観察されている<sup>24)</sup>。また、(+)-カテキンは90℃で加熱すると10分後には330nmと400nmに吸収極大を持つことが明らかにされている<sup>27)</sup>。高熱により酵素活性は失活していることから、加熱によるカテキン酸化は酵素反応ではなく自動酸化と考えられており、酵素的酸化と自動酸化とで生成される酸化物の構造に違いがあるのかは今後検討すべき課題である。同様に図5Bで示したようなpHの変化による432nm, 482nmでの吸光度の比が変化する現象はモモ果肉PPOを用いた実験でも明らかにされている<sup>24)</sup>。この原因としてpH依存的にフリーラジカルの形成が異なるために反応後の酸化物の構造が異なる可能性が提唱されている<sup>24)</sup>。

イネの種子(玄米)を白米にするには精米により糠を除去する。この糠とは果皮や種皮などの種子の外皮と胚芽を含んでいる。コムギの糠に相当する部分は「ふすま」と呼ぶが、コムギの種子はイネの種子と異なり表皮が種子の内部に入り込んだ構造をしているため、いわゆる精米のように外側を削るだけではふすまは除去しきれない。さらにイネは種子を粒のまま食するが、コムギは種子を製粉、加工して食用にする。そのため種子を砕いて篩い、ふすまを除去して小麦粉を得ている。得られた小麦粉が製粉前の種子に対してどの程度かを製粉歩留まりといい、一般的な製品の製粉歩留まりは60%程度と言われているが、上述したように種子を一度砕くことから、細かい外皮は除去できず小麦粉に混入する。本研究では研削率16%以上ではPPO活性の低下を示しており(図8)、一般的な小麦粉はPPO



のほとんどが除去され生地のくすみに関与するPPOはわずかに混入した表皮に由来すると考えられる。さらに本研究で用いた (+)-カテキンなどのPPOの基質となるフェノール化合物は表皮に多く含まれている。つまり完全に表皮を除去すれば「生地をくすませるもの(酵素)」と「くすむ原因となるもの(基質)」のいずれも排除することが理論的には可能であるが、現実的ではない。

コムギ種子のフェノール浸漬による品種鑑別法が開発されたように、PPO活性には品種間差がある。コムギPPO遺伝子は2群染色体上に座乗し、A, B, Dゲノムそれぞれに複数コピーが存在する<sup>20)</sup>。しかし種子のPPO活性にかかわる遺伝子は限られており、2A, 2Bゲノムにそれぞれ座乗するPPO-A1遺伝子とPPO-D1遺伝子がコードするPPOが活性を担っていること、またPPO-A1のほうがPPO-D1よりも強いPPO活性を示すことが明らかになっている<sup>21)</sup>。このことから生地のくすみの改善のため、PPO-A1活性を欠失させた品種の育成が試みられている。

一方でPPOの基質となるフェノール化合物は限定できていない。リンゴなど他の植物でも報告されているようにPPOは基質特異性が広く、多種のフェノール化合物が基質になっていると考えられるためである。しかしこれまでの知見からカテキン類は少量であっても褐変化には大きく貢献しているため、カテキン蓄積の少ないコムギはPPO活性が低くても結果的に生地のくすみへの影響が小さいと予想される。

## 参考文献

- 1) 近藤萬太郎, 高橋隆平. フェノール着色法による小麦の品種鑑識(第一報). *農學研究* **30**, 39-68 (1938).
- 2) 村田容常, 本間清一. ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御 最新の研究動向. *日本食品科学工学会誌* **45**, 177-185, doi:10.3136/nskkk.45.177 (1998).
- 3) Marsh, D. R. & Galliard, T. Measurement of polyphenol oxidase activity in wheat-milling fractions. *Journal of Cereal Science* **4**, 241-248, doi:10.1016/s0733-5210 (86) 80026-1 (1986).
- 4) Kruger, J. E., Hatcher, D. W. & DePauw, R. A whole seed assay for polyphenol oxidase in canadian prairie spring wheats and its usefulness as a measure of noodle darkening. *Cereal Chemistry* **71**, 324-326 (1994).

本研究ではコムギPPOの活性は、クエン酸、アスコルビン酸、NaCl, EDTAによって阻害されることを明らかにした。一般的にうどんを作る際には約10%の塩水を小麦粉の半量(重量比)加えているため、小麦粉中のPPO活性はNaClにより抑制されていると考えられる。しかし実際には生地の色がくすむことから、①生地を長い時間寝かせることでわずかに残ったPPOが色の低下を引き起こしている、②生地に含まれるカテキン類などのフェノール化合物が自動酸化することで褐変化を引き起こしていることが考えられる。

コムギの種子色は種皮に蓄積されたプロアントシアニジンによるもので、このプロアントシアニジンはカテキンが重合したものである。プロアントシアニジンを蓄積しないコムギ種子は肉眼で白く見えることから「白粒」といわれているが、穂発芽しやすく降雨の多い日本ではほとんど栽培されていない。PPO活性はPPO遺伝子型に由来し、PPO活性が高い系統では生地のくすみが起こりやすいが、種子の色(カテキン量)と生地のくすみとの関係は未だ明らかになっていない。酵素側を抑えるだけでなく、基質を抑える育種もまた今後必要になると期待される。

## 謝辞

本研究の一部は(公財)飯島藤十郎記念食品科学振興財団2019年度学術研究助成および令和元年度吉備国際大学共同研究の助成を受けたものである。

- 5) 村田容常. 酵素的褐変ならびにメイラード反応に関する食品化学的研究 (令和元年度日本食品科学工学会学会賞). *日本食品科学工学会誌* **67**, 1-12, doi:10.3136/nskkk.67.1 (2020).
- 6) 桑原朋彦. 植物ポリフェノールオキシダーゼ研究の新展開. *生化学* **69**, 1384-1389 (1997).
- 7) Laddomada, B., Caretto, S. & Mita, G. Wheat bran phenolic acids: bioavailability and stability in whole wheat-based foods. *Molecules* **20**, 15666-15685 (2015).
- 8) Koschorreck, K. *et al.* Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**, 217-224, doi:10.1007/s00253-008-1417-2 (2008).
- 9) Sukhonthara, S., Kaewka, K. & Theerakulkait, C. Inhibitory effect of rice bran extracts and its phenolic compounds on polyphenol oxidase activity and browning in potato and apple puree. *Food Chemistry* **190**, 922-927, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.016 (2016).
- 10) Kihara, T., Murata, M., Homma, S., Kaneko, S. & Komae, K. Purification and characterization of wheat (*Triticum aestivum*) polyphenol oxidase. *Food Sci. Technol. Res.* **11**, 87-94 (2005).
- 11) Taranto, F. *et al.* Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. *International journal of molecular sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18020377 (2017).
- 12) Mishra, B. & Gautam, S. Polyphenol oxidases: Biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control. *Enzyme Engineering* **5** (2016).
- 13) Anderson, J. V. & Morris, C. F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. *Crop Science* **41**, doi:10.2135/cropsci2001.1697 (2001).
- 14) 伊藤美環子, 西尾善太, 谷尾昌彦, 船附稚子, 田引正, 山内宏昭. 小麦粉のポリフェノールオキシダーゼ活性の簡易評価法の開発. *日本作物学会紀事* **77**, 159-166, doi:10.1626/jcs.77.159 (2008).
- 15) Anderson, J. V. & Morris, C. F. Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein. *Cereal Chemistry* **80**, 135-143 (2003).
- 16) Simeone, R., Pasqualone, A., Clodoveo, M. L. & Blanco, A. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. *Cellular and Molecular Biology Letters* **7**, 763-769 (2002).
- 17) Raman, R. *et al.* Genetic and in silico comparative mapping of the polyphenol oxidase gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics* **5**, 185-200 (2005).
- 18) Sun, D. J. *et al.* A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Molecular Breeding* **16**, 209-218 (2005).
- 19) He, X. Y. *et al.* Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theor Appl Genet* **115**, 47-58 (2007).
- 20) Beecher, B. S., Carter, A. H. & See, D. R. Genetic mapping of new seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* **124**, 1463-1473, doi:10.1007/s00122-012-1801-2 (2012).
- 21) Nilthong, S., Graybosch, R. A. & Baenziger, P. S. Inheritance of grain polyphenol oxidase (PPO) activity in multiple wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic backgrounds. *Theor Appl Genet* **125**, 1705-1715, doi:10.1007/s00122-012-1947-y (2012).
- 22) Soares, A. R. *et al.* The role of L-DOPA in plants. *Plant signaling & behavior* **9**, e28275-e28275, doi:10.4161/psb.28275 (2014).
- 23) Fuerst, E. P., Anderson, J. V. & Morris, C. F. Polyphenol oxidase in wheat grain: whole kernel and bran assays for total and soluble activity. *Cereal Chemistry* **83**, 10-16 (2006).
- 24) Jimenez-Atienzar, M., Cabanes, J., Gandia-Herrero, F. & Garcia-Carmona, F. Kinetic analysis of catechin oxidation by polyphenol oxidase at neutral pH. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 902-910, doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.077

(2004).

- 25) Mochizuki, M., Yamazaki, S.-i., Kano, K. & Ikeda, T. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1569**, 35-44, doi:[https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00230-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00230-6) (2002).
- 26) 大羽和子, 山本淳子, 伊藤幸子, 藤江歩巳, 竹内若子. 食塩によるポリフェノールオキシダーゼ活性の阻害メカニズム. *日本海水学会誌* **56**, 234-240, doi:10.11457/swsj1965.56.234 (2002).
- 27) 神山紀子. 食用大麦の加熱後褐変とポリフェノール成分に関する研究. *作物研究所研究報告* **12**, 15-67 (2011).