

9 8 5 8 食塩水によるカット野菜の褐変抑制機構の解析

助成研究者：村田 容常 (お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科)
 共同研究者：本間 清一 (お茶の水女子大学 生活科学部)

近年、カット野菜や果物がわれわれの食生活に浸透してきた。デパートやスーパーの食品売場だけでなく、ファーストフード、ファミリーレストランなど業務用にもかなりのカット野菜が使用されている。カット野菜や果物の品質保持で問題となるものの一つに褐変がある。野菜や果物は、切断されるとポリフェノールとポリフェノールオキシダーゼ(PPO)が接触し、酵素的褐変反応を引き起こす。この酵素的褐変の身近な例にリンゴがあり、食卓でリンゴを切っておくと褐変し、その褐変が食塩水で阻害されることが知られている。ここでは、カット野菜としてレタスを用い、その冷蔵中の褐変機構を明らかにした。次いで食塩によりカットレタスの褐変抑制がおこるかどうかを検討した。

カットレタスでは、まずポリフェノールの生合成系が誘導され、ポリフェノールが合成され、次いでこれが基質となり、PPOにより酵素的褐変が引き起こされると想定される。そこでこの想定を確かめるため、市販のレタスを切り、小片を作り(カットレタス)、1週間程度4℃で冷蔵した。冷蔵中の褐変度(目視及び色差計)、ポリフェノール量(HPLC法)、PPO活性、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL、ポリフェノール生合成の律速酵素)活性を測定し、レタスの褐変要因を調べた。その結果、カットレタスは冷蔵中に徐々に褐変し、3ないし4日目には目視で褐変が観察され、1週間でかなり褐変した。目視での褐変度の増加とa値の増加がよく対応していた。10個以上のレタスについて試験を行った結果、PPO活性は貯蔵中あまり変化せず、リンゴと同程度の活性を示した。一方、カット直後にはほとんど検出されなかったPAL活性は貯蔵3日目に顕著に増加した。褐変度とPPO活性や褐変度とポリフェノール量の間は相関が認められなかったが、褐変度とPAL活性には有意な相関が認められた。このことは、カットという刺激に対しレタスが傷害応答し、PAL活性が誘導され、その結果ポリフェノール類が合成され、できたポリフェノール類が順次PPOにより酸化されレタスが褐変したことを示している。

次いで、食塩溶液のレタスの褐変に対する効果を調べた。NaCl溶液はPAL活性に影響を与えなかったが、NaClや他の塩化物はレタスのPPOを阻害した。しかし、この阻害はかなり弱いもので($K_i=0.11M$)、食塩処理によりカットレタスの褐変は阻害されなかった。今後PAL阻害剤など他の薬剤との組み合わせによる褐変阻害効果を調べる必要がある。

9858 食塩水によるカット野菜の褐変抑制機構の解析

助成研究者：村田 容常 (お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科)

共同研究者：本間 清一 (お茶の水女子大学 生活科学部)

1. 研究目的

近年、カット野菜や果物がわれわれの食生活に浸透してきた。デパートやスーパーの食品売場だけでなく、ファーストフーズ、ファミリーレストランなど業務用にもかなりのカット野菜が使用されている。カット野菜や果物の品質保持で問題となるものの一つに褐変がある(1)。野菜や果物は、切断されるとポリフェノールとポリフェノールオキシダーゼ(PPO)が接触し、酵素的褐変反応を引き起こす(2)。この褐変を防止するためには様々な化学的処理(亜硫酸処理、アスコルビン酸の添加など)が考えられるが、消費者サイドからは好まれない。ここでは、昔より広く知られている食塩による褐変制御について検討する。リンゴを切ると褐変することはよく知られた現象で酵素的褐変の典型例である。切ったリンゴを食塩水につけておけば褐変が防がれることは昔より知られていた。この詳細な機構は不明であるが、塩素イオンによるポリフェノールオキシダーゼの阻害によるものである。

ここでは、カットレタスを用い、その貯蔵における褐変機構を明らかにした後、食塩により実際褐変抑制がおこるかどうかを検討した。カットレタスでは、まずポリフェノールの生合成系(Fig. 1のシキミ酸経路)が誘導され(3)、ポリフェノールが生産される。次いでこれが、基質となりPPOにより酵素的褐変反応が起こると想定される。そこでこの想定を確かめるため、褐変度、ポリフェノール量、PPO活性、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL、ポリフェノール生合成の律速酵素)活性を測定し、レタスの褐変要因を明らかにした。次いで、食塩溶液の効果を調べた。食塩処理が基質の生合成系に影響するか否かを調べ、次いでレタスのPPO阻害について検討した。また、食塩水による洗浄効果(基質及び酵素を洗い流す効果)も検討した。

2. 研究方法

2.1 材料及び貯蔵法

市販レタスの外側及び内側を除き、その間を用いた。葉は下1cmを除いた後、約2×4cmの大きさに切り、ラップをかけ低温室(約4℃)で貯蔵した。カットした日を貯蔵0日とした。経時的に褐変度、ポリフェノール量、PPO活性、PAL

活性を測定した。レタスは1997年12月から1998年1月にかけて購入し、以下の分析項目は11個のレタスの平均値を示した。

2.2 褐変度の評価

目で見て褐変の程度を0 (褐変していない) から9 (極めて褐変している) で評価した。また、切ったレタスを束ね、断面のL値、a値、b値を色差計で測定した。

2.3 酵素の抽出

Siriphanich and Kaderの方法(4)に従った。レタスに3倍量の0.1 Mクエン酸・0.2 Mリン酸水素2ナトリウム (pH6.5) を加えホモジナイザーで30秒破碎した。遠心分離により上清を得、PPOの粗酵素とした。レタスに3倍量の5 mMメルカプトエタノールを含む0.2 Mほう酸バッファー (pH8.8) を加えホモジナイザーで30秒破碎した。遠心分離により上清を得、PALの粗酵素とした。

2.4 フェノール類の抽出

レタスに3倍量のメタノールを加え、30秒ホモジナイズし10分攪拌してフェノール類を抽出した。3回抽出後抽出液をあわせ減圧濃縮し、塩酸でpH2~3に調整後、酢酸エチルで抽出した。乾固後少量のメタノールに溶解しフェノール類の分析に供した。

2.5 粗ポリフェノール量

Folin-Denis法でクロロゲン酸換算で算出した。

2.6 HPLCによる各ポリフェノールの分別定量

ダイオードアレイ検出器を持ったHPLCで逆相系カラムによりフェノール類を分離し、クロロゲン酸を標準として定量した。ポンプ、L-6320; カラム、YMC-pak R-ODS (i.d. 4.6x250mm); 検出器、L-4500 Diode array detector; 検出波長、250-380nm (定量、320nm); 流速、1ml/min; 溶離液、CH₃CN:5%AcOH =2:98 を10分流した後50分かけCH₃CN:5%AcOH=30:70にグラジエント。

2.7 PPO活性

0.1 Mクエン酸/0.2 Mリン酸水素2ナトリウムバッファー (pH6.5) 1.6 mLに基質クロロゲン酸 (0.5 mM) を0.2 mL添加し30°Cで1分プレインキュベート後酵素液0.2 mLを加えし、クロロゲン酸の減少を325 nmで測定した。吸光度が1分間に0.1減少する活性を1 Uとした。

2.8 PAL活性

0.5 M ほう酸バッファー (pH 8.8) 1.4 mL に基質フェニルアラニン (0.01 M) 0.2 mL を加え、30°C で1分ブレインキュベート後、酵素液0.4 mL を加え 290 nm の増加 (シンナム酸の生成) を測定した。1時間でシンナム酸が1 μmol できる活性を1 U とした。

2.9 食塩水による酵素阻害

PPO 活性測定の際クロロゲン酸の濃度を0.02~0.1 mM に変化させ、NaCl を0、0.1 および0.5 M 添加した。PAL 活性に対してもNaCl を同様に添加して活性を測定した。

2.10 食塩水のカットレタスに対する影響

カットレタスを5倍量の0.1 M ないし0.5 M 食塩水に30秒浸した後、ペーパータオルで水分を拭き取り、約4°C で冷蔵保存した。同様に水で処理したコントロールと比較した。

2.11 食塩水の洗浄効果について

カットレタスを5倍量の処理液 (水もしくは0.1 M ないし0.5 M 食塩水) に30秒浸し、その処理液 (洗液) 中のポリフェノール量 (Folin-Denis法)、タンパク質量 (Lowry法) を測定した。洗液は蒸留水に対し透析後、PPO 活性も測定した。

3. 研究結果及び考察

3.1 レタス中のポリフェノール類の同定と定量

レタス中の主要フェノール類 (Fig. 2) は、caffeoyltartaric acid (CTA), dicaffeoyltartaric acid (diCTA), 5-caffeoylquinic acid (CQA) の3種で、それぞれ HPLC で定量した。レタス中のフェノール量は各成分をを足しあわせて約1 mg / 100 g (生重量) 程度であった。その内diCTAが約半量をしめ、主要ポリフェノールであった。このポリフェノール量を酵素的褐変の顕著なリンゴと比べると10分の1以下であった。成熟したリンゴでは5-CQAが主要ポリフェノールで20 mg / 100 g 程度存在している (5)。

3.2 貯蔵によるポリフェノール量と褐変度の変化

Figure 3 に貯蔵に伴うカットレタスの褐変 (色差と目視) を示した。色差と目視は同様の傾向を示し、貯蔵につれて褐変していくのがわかる。L値とb値は余り変化せず、a値が増加していった。これは褐変が赤みをおびていることと対応していた。個体差がかなりあったが、目視で1週間程度で断面がはっきり褐変してきた。Tomas-Barberanら (1997) は、レタスの切断した軸部分の褐変ではa*値が

主に増加することを報告している（6）。

Figure 4-1 に貯蔵に伴うポリフェノール量の変化を示した。ポリフェノール量は、貯蔵3日で貯蔵0日の2倍程度に増加したが、7日目にはやや減少した。最大値の3日目でも2mg/100g以下しか存在しなかった。この量はリンゴが20mg/100g以上のクロロゲン酸を有している（5）のに比べ、極めて少量である。Tomas-Barberanら（7）は、diCTAがレタスの主要フェノールであり、レタスを切り5ないし10℃で貯蔵すると、diCTAなどのコーヒー酸誘導体が3ないし6倍増加したと報告している。PAL活性は0日はわずかに検出されるものであったが、3日に急増し7日目にやや減少した（Fig. 4-2）。PPO活性は0日から7日まで変化せず、褐変を引き起こす十分な活性（成熟リンゴと同程度）が認められた（Fig. 4-3）。

また、褐変度とPPO活性、褐変度とポリフェノール量とは全く相関が認められなかったが、褐変度とPAL活性の間には正の相関が認められた（Fig. 5）。

以上の結果よりカットレタスでは、PALが誘導されることでdiCTAを主成分とするポリフェノールが生合成され、それが次々とPPOにより酸化されることで褐変すると考えられる。

3.3 食塩水処理の褐変に及ぼす影響

リンゴを切った後食塩水につけると褐変が抑制されることが知られている。これはリンゴのPPOを食塩が阻害するためと考えられる。そこで、カットレタスを食塩水で処理し、貯蔵し、褐変に対する影響を調べた。その結果、予想に反して食塩処理では褐変を抑制しなかった（Table I）。NaClの濃度を0.5M以上の濃度にするとしおれてしまった。

3.4 NaClのPAL及びPPOに対する作用

NaClがポリフェノール生合成系に作用するか否かを調べるため、ポリフェノール生合成系のキー酵素であるPALに対する作用を調べたが、粗酵素に対し全く阻害活性は示さなかった。Table II には、0.5MのKCl, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄の効果を調べた結果を示した。いずれも顕著な阻害を示さなかった。Tomas-Barberanらは、レタスの軸をCaCl₂溶液で処理すると褐変とPAL活性が半分程度抑制されたと報告している（6）。PAL阻害作用はCaイオンによるものと考えられる。

次いで、一般にNaClは植物PPOを阻害することが知られているので、レタスPPOに対する阻害効果を調べた。Table III に各種塩（KCl, NaCl, NaBr, NaI, Na₂SO₄, NaNO₃）の阻害効果を示した。0.5Mという高濃度でNaCl, NaBr, KCl, NaIが明らかな阻害を示した。Na₂SO₄とNaNO₃は全く阻害しなかったことより

NaClの阻害はCl⁻イオンによるものと考えられた。Cl⁻イオンによるPPO阻害は、リンゴの精製酵素でも報告されているが、1mMで40%程度阻害された

(8)。基質の濃度を変えて逆数プロットをとった結果、基質クロロゲン酸に対するKm値が0.10mMであるのに対し、NaClのKi値は0.11Mとなり、NaClの阻害効果はかなり弱いものであった。阻害型は非拮抗型であった。PPOはその活性中心に2分子の銅を持っている。ここに酸素分子やポリフェノールが配位し酸化反応を触媒すると考えられている。Cl⁻イオンがPPOの銅と配位することで阻害作用を示すと考えられる。

3.5 食塩の洗浄効果

食塩水で洗浄したときに水洗に比べ洗い流されるポリフェノールやタンパク質量に差がないかを調べた。Table IV に示すように水洗と0.1M NaCl溶液で溶出されるタンパク質量、ポリフェノール量に差は認められなかった。0.5M NaCl溶液(カットレタスがしおれてしまう濃度)では、より多くのタンパク質やフェノール成分が溶出された。また、洗液を透析してNaClの影響を除いた後PPO活性を調べたが、水洗と0.1M NaCl溶液間には、有意な差は認められなかった。NaClの洗浄効果が特に褐変防止に対して有効とは思われなかった。

4. 結論及び今後の課題

レタスはカットした直後には褐変せず、貯蔵中に褐変した。これは、以下のように説明できた。カットされた時のレタスには褐変するほどのポリフェノール類は存在していないが、カットという物理的的刺激がレタスにとり傷害となり、傷害応答としてPAL活性が誘導される。PALはポリフェノール生合成経路のキー酵素であり、ポリフェノールが生合成されることになる。生成したポリフェノールは十分量存在するPPOにより酸化されキノン体となり褐変する。生成したポリフェノール類はPPOにより変換されるため、見かけ上ポリフェノール量はあまり蓄積されない。

NaClは、レタスのPPOを非拮抗的に阻害したが、阻害活性は弱く、低濃度のNaClでは褐変を阻害しなかった。そのため低濃度のNaClはカットレタスを顕著に阻害することはなかった。高濃度ではかえって褐変を促進した。

今後、PAL阻害剤や他のPPO阻害剤などを用い、褐変抑制に対する食塩と他の薬剤との相乗効果などを検討する必要があると思われる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり助成下さったソルトサイエンス財団に深く感謝いたします。

6. 文献

- 1) 河野澄夫、椎名武夫、カット野菜の加工・流通過程における品質保持技術、日本食品工業学会誌、**36**、159-167 (1989)
- 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、日本食品科学工学会誌、**45**、177-185 (1998)
- 3) Dixon, R. A. and Paiva, N. L.; Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1085-1097 (1995).
- 4) Siriphanich, J. and Kader, A.A.; Effect of CO₂ on total phenolics, phenylalanine ammonia lyase, and polyphenol oxidase in lettuce tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **110**, 249-253 (1985).
- 5) Masatsune Murata, Ikuko Noda, and Seiichi Homma; Enzymatic browning of apples on the market: relationship between browning, polyphenol content, and polyphenol oxidase. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**, 820-826 (1995).
- 6) Tomas-Barberan, F. A., Gill, M. I., Castaner, M., Artes, F., and Saltveit M. E.; Effect of selected browning inhibitors on phenolic metabolism in stem tissue of harvested lettuce. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 583-589 (1997).
- 7) Tomas-Barberan, F. A., Loaiza-Velarde, J., Bonfanti, A., and Saltveit M. E.; Early wound- and ethylene-induced changes in phenylpropanoid metabolism in harvested lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **122**, 399-404 (1997).
- 8) Masatsune Murata, Chiyo Kurokami, and Seiichi Homma; Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1705-1710 (1992).

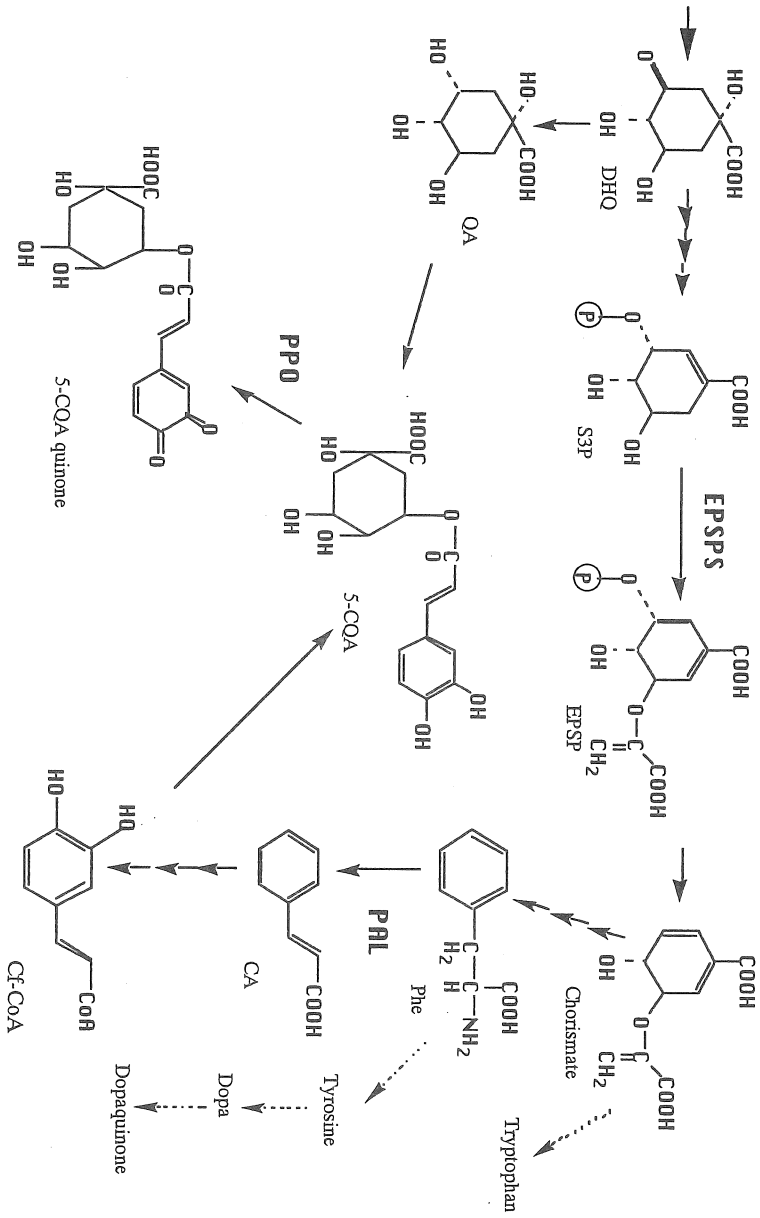


Fig. 1 Biosynthesis pathway of chlorogenic acid (5-CQA).

Dihydroquinic acid, DHQ; shikimic acid 3-phosphate, S3P; 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate; 5-caffeoylquinic acid, 5-CQA; cinamic acid, CA; caffeoyl-CoA, Cf-CoA; EPSPS synthase, EPSPS; polyphenol oxidase, PPO; phenylalanine ammonia lyase, PAL; quinic acid, QA.

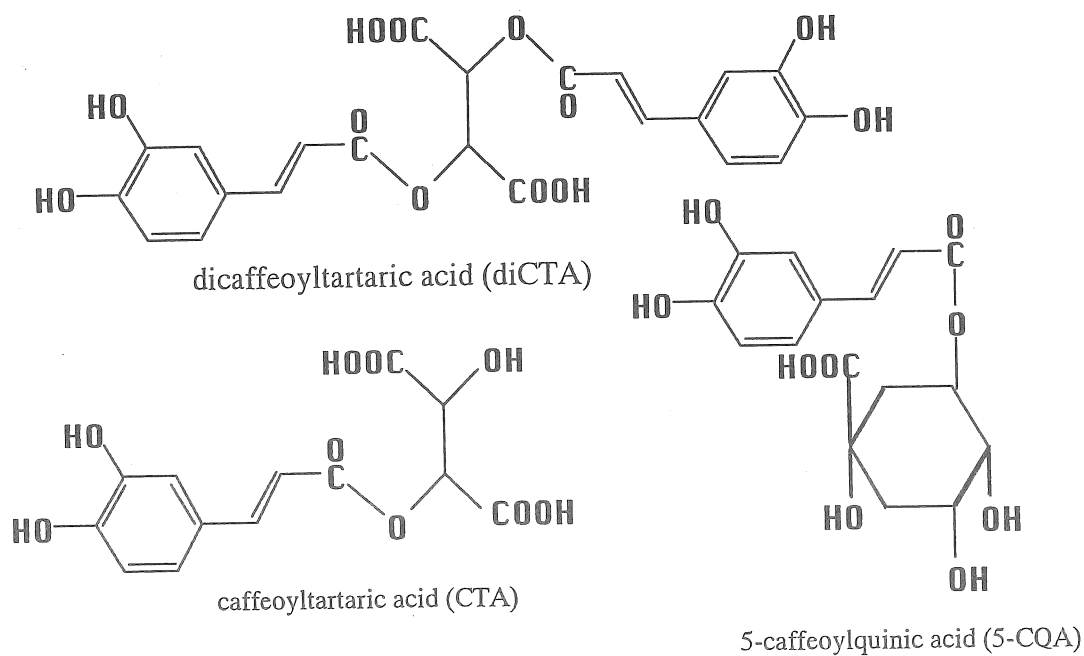


Fig. 2 Phenolics in lettuce

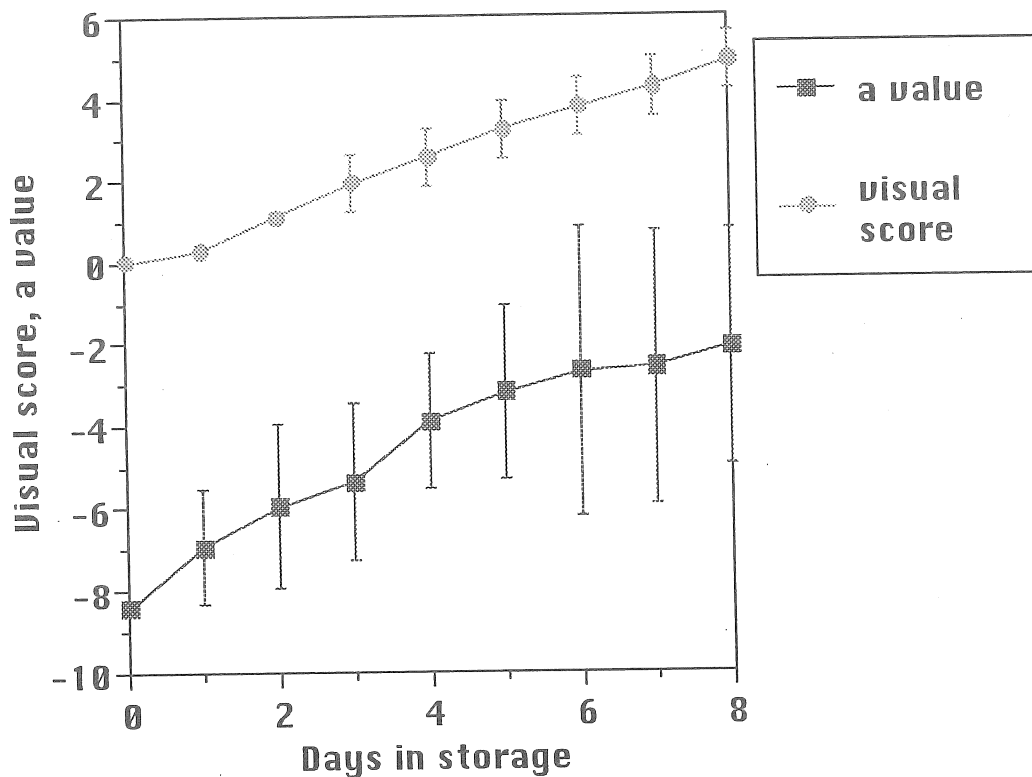


Fig. 3 Browning of shredded lettuce

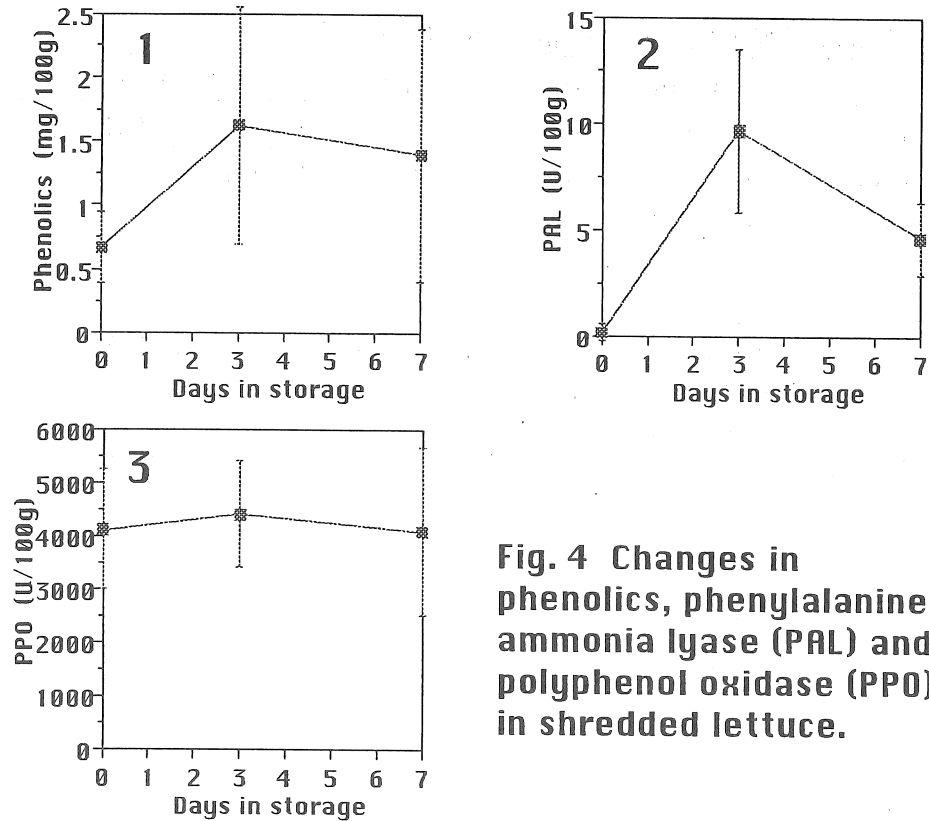


Fig. 4 Changes in phenolics, phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO) in shredded lettuce.

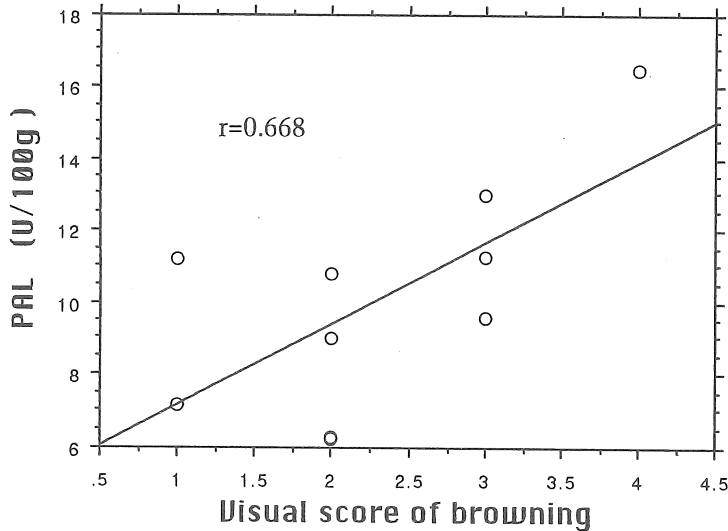


Fig. 5 Correlation between browning and PAL activity of shredded lettuce.

PAL activity was measured after 3 days of storage and browning was visually estimated after 4 days of storage.

Table I. Effect of NaCl on browning of shredded lettuce.

| | Control | 0.1M NaCl | 0.5M NaCl |
|----------|---------|-----------|---------------|
| Browning | ++ | ++ | +++ (wilting) |

Shredded lettuce was treated by NaCl solution and stored at 4°C. Browning was estimated visually after 7 days storage. Degree of browning, - (no browning) < +<++<+++.

Table II. Effect of various salts on phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity of shredded lettuce.

| | KCl | NaCl | NaBr | NaI | Na ₂ SO ₄ | NaNO ₃ |
|------------------|-----|------|------|-----|---------------------------------|-------------------|
| PAL activity (%) | 126 | 110 | 105 | 92 | 150 | 0 |

PAL activity (%) was expressed by % of control (no addition of salt). Salt (0.5M) was added to reaction mixture containing lettuce PAL.

Table III. Effect of various salts on polyphenol oxidase (PPO) activity of shredded lettuce

| | | LiCl | KCl | NaCl | NaBr | NaI | Na ₂ SO ₄ | NaNO ₃ |
|------------------|------|------|-----|------|------|-----|---------------------------------|-------------------|
| PPO activity (%) | 0.1M | 100 | 79 | 76 | 74 | 48 | 97 | 120 |
| | 0.5M | n.d. | 27 | 17 | 23 | 0 | 108 | 115 |

PPO activity was expressed by % of control (no addition of salt). Salt was added to reaction mixture containing lettuce PPO. n.d., not determined.

Table IV. Comparison of washing with NaCl solution and with water on eluted proteins, phenolics and polyphenol oxidase (PPO).

| | Washing with | | |
|------------------------|--------------|-----------|-----------|
| | water | 0.1M NaCl | 0.5M NaCl |
| Proteins (mg/100 g) | 2.0 | 1.8 | 2.8 |
| Phenolics (mg/100 g) | 0.24 | 0.22 | 0.59 |
| PPO activity (U/100 g) | 117 | 128 | 163 |

Shredded lettuce was washed with NaCl solution. Eluted proteins, phenolics and PPO activity were determined. PPO activity was measured after removing NaCl by dialysis.

Enzymatic browning of shredded vegetable and the effect of NaCl on the browning

Masatsune Murata and Seiichi Homma

Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University

Summary

When shredded vegetable is stored at refrigerator, it gradually turns brown. We examined the factors of this enzymatic browning such as amount of phenolics, phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and polyphenol oxidase (PPO) activity during storage of shredded lettuce. We next examined the inhibitory effect of NaCl, an inhibitor of PPO, on the browning.

Lettuce was shredded and stored at 4°C during about 1 week. The degree of browning was estimated visually or by color difference meter. The two values gradually raised and showed good correlation. Shredded lettuce turned brown after 3 or 4 days of storage. The amount of phenolics was measured by HPLC method. DicaFFEoyltartaric acid, caffeoyltartaric acid and 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) were the major phenolics. PPO and PAL activities of crude extract of shredded lettuce were spectrophotometrically measured using 5-CQA and Phe as the substrates, respectively. PPO catalyzes the oxidation of *o*-diphenols to corresponding quinones. *o*-Quinones are yellowish compounds and are easily polymerized to form brown pigments. PAL is a key enzyme of biosynthesis of phenolic compounds. PPO activity was almost constant during storage, while PAL activity intensively raised at 3 days after cutting. There was no relation between browning and phenolics and between browning and PPO activity, while there was significant correlation between browning and PAL activity. This result showed that PAL activity was induced in shredded lettuce as the response against injury, newly synthesized phenolics were successively oxidized by PPO and that shredded lettuce turned brown.

Next the effect of NaCl on browning of shredded lettuce was examined. NaCl did not show any effect on PAL activity and phenolics biosynthesis. NaCl and other chlorides inhibited PPO activity of shredded lettuce, however, Na salts such as Na₂SO₄ and NaNO₃ did not inhibit PPO. This showed Cl⁻ inhibited PPO. However the inhibitory activity of NaCl against lettuce PPO was weak (K_i=0.11 M) and NaCl did not inhibit the browning of shredded lettuce. Further synergistic effect of NaCl and other inhibitors such as PAL inhibitors should be examined to regulate enzymatic browning of shredded lettuce.