

助成番号 9956

## 食塩水と他薬剤との併用によるカット野菜の褐変抑制

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）

レタスやキャベツなどをあらかじめ切って売るカット野菜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。ここでは、PPO阻害剤である食塩とポリフェノール生合成系の阻害剤との併用効果について検討する。

昨年度、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。カットレタスの貯蔵中の褐変度、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）活性を測定した結果、カットレタスでは、まずPALが誘導され、つまりポリフェノールの生合成系が誘導され、ポリフェノールが生産された。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考えられた。食塩は、レタスPPOを阻害したが、その阻害はあまり強くない、食塩処理のみでは、カットレタスの褐変を制御するには至らなかった。本年は、これらの知見に基づき、PALの阻害剤2-アミノインダン-2-リン酸（AIP）やシキミ酸生合成系の阻害剤グリフォセートの褐変阻害効果、またそれらと食塩との併用による褐変制御を検討した。

カットレタスの褐変制御には、ポリフェノール合成系の制御が重要であった。カットレタスをPALの特異的阻害剤AIPやEPSPSの特異的阻害剤グリフォセートで処理すると、貯蔵中の褐変は有意に抑制された。AIP処理ではポリフェノールの供給が、グリフォセート処理ではPALの基質フェニルアラニンの供給が、それぞれ抑えられたため、褐変が抑制されたと考えられる。AIP処理後、PPO活性、PAL活性、ポリフェノール量を測定すると、貯蔵初期（貯蔵3日目）にPAL活性が抑えられ、貯蔵後期（貯蔵8日目）のポリフェノール量が顕著に減少していた。また、PPO活性に変化はなかった。AIPやグリフォセートの処理時に、同時にNaClを加えると褐変は抑制されたが、相乗的効果は認められなかった。今後、天然由来の安全性の確認されたPAL阻害剤やEPSPS阻害剤の開発が望まれる。



助成番号 9956

## 食塩水と他薬剤との併用によるカット野菜の褐変抑制

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

レタスやキャベツなどをあらかじめ切って売るカット野菜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（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。ここでは、PPO阻害剤である食塩と他薬剤との併用効果について検討する。

昨年度、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。カットレタスの貯蔵中の褐変度、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）活性を測定した結果、カットレタスでは、まずPALが誘導され、つまりポリフェノールの生合成系（Fig. 1）が誘導され（3）、ポリフェノールが生産された。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考えられた。食塩は、レタスPPOを阻害したが、その阻害はあまり強くなく、食塩処理のみでは、カットレタスの褐変を制御するには至らなかった。本年は、これらの知見に基づき、PALの阻害剤2-アミノインダン-2-リン酸（AIP）やシキミ酸生合成系の阻害剤グリフォセートの褐変阻害効果、またそれらと食塩との併用による褐変制御を検討した。

## 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1999年から2000年にかけて購入し、以下の分析項目は最低5切片、5個体の平均値を示した。

## 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3 (極めて褐変している) で評価した。

## 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、5mMの2-メルカプトエタノールと3.3%のポリビニルポリピロリドンを含む0.1Mクエン酸・0.2Mリン酸水素2ナトリウム緩衝液 (pH6.5) を加え、ホモジナイザーで30秒破碎した。4重のガーゼで濾過した後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、5mMメルカプトエタノールと3.3%のポリビニルポリピロリドンを含む0.2Mほう酸緩衝液 (pH8.8) を加えホモジナイザーで30秒破碎した。4重のガーゼで濾過した後遠心分離により上清を得た後、80%飽和硫酸で沈殿させ、透析したものを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。

## 2.6 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、CH<sub>3</sub>CN:5%AcOH=2:98を10分流した後50分かけCH<sub>3</sub>CN:5%AcOH=30:70にグラジエント。コーヒー酸のようなUVスペクトルを示した5成分 (5-caffeoyltartaric acid, 5-caffeoylquinic acid, dicaffeoyltartaric acid, peak 4 (unknown), 3,5-deicaffeoylquinic acid) の面積和からクロロゲン酸換算で求めた。

## 2.7 PPO活性

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

## 2.8 PAL活性

0.5Mほう酸バッファー (pH8.8) 1.4mLに基質フェニルアラニン (0.01M) 0.2mLを加え、30℃で1分ブレインキュベート後、酵素液0.4mLを加え290nmの増加(シナム酸の生成)を測定した。1時間でシナム酸が1μmolできる活性を1Uとした。

## 2.9 AIPの酵素阻害

PAL活性測定の際、フェニルアラニンの濃度を0.25~2.5mMに変化させ、AIPを0、0.1および1.0μM添加した。

## 2.10 薬剤のカットレタスに対する影響

カットレタスを各種薬剤溶液に30秒浸した後、ペーパータオルで水分を拭き取り、約4℃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。

# 3. 研究結果及び考察

## 3.1 2-アミノインダン-2-リン酸 (AIP) のレタスPALに対する効果

AIPは、PALの特異的阻害剤 (Fig. 2)である(5)。レタスより調製したPALに対する阻害効果を調べたところ、AIPは、極めて強いレタスPALの阻害剤であった。Ki値は115nM、フェニルアラニンに対するKm値は125μMであった。AIPは、基質フェニルアラニンに対して拮抗的に阻害した。

## 3.2 各種薬剤の褐変阻害効果

カットした直後に薬剤処理をし、その後低温貯蔵してその褐変度を評価した。Figure 3にAIPの褐変に対する効果を示す。コントロールの薬剤処理していないときの褐変度に比べ、1μM以上の濃度のAIP処理により褐変が抑制された。10μMの溶液で処理したレタスでは褐変度が有意に低くなった。

次にグリフォセートの褐変に対する効果を調べた。グリフォセートは、シキミ酸経路の律速酵素エノールピリビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素を特異的に阻害 (Fig. 2)し、PALの基質フェニルアラニンの供給を阻害すると考えられる。

Figure 4に示すように、1mMのグリフォセートはAIP同様有意な褐変抑制効果を示した。濃度的には、AIPより高濃度が必要であった。

これらの結果は、ポリフェノールの合成系が、カットレタスの貯蔵褐変に必須であり、褐変を抑えるためにはポリフェノールの合成系の制御が重要であることを示している。

## 3.3 NaClとAIPやグリフォセートとの併用効果

AIPやグリフォセートとNaClの併用効果を調べた。Figure 5に示すように、0.1MのNaClを添加してもAIPやグリフォセートの阻害効果は強まらなかった。

た。PPOのより強い阻害剤であるhexylresorcinolとAIPやグリフォセートの相乗効果を調べたが、同様に顕著な相乗効果認められなかった。これらの結果は、カットレタスのようにポリフェノール類が貯蔵中に徐々に増加するためにおこる酵素的褐変に対してPPOの阻害剤の1回処理は有効でないことを示している。

### 3.4 AIP処理のPAL活性、PPO活性、ポリフェノール量に対する影響

AIP処理により貯蔵中の褐変が抑えられることが明らかになったので、AIP処理した後、PPO活性やPAL活性がどのように変化するかを調べた。また、同時に存在しているポリフェノール量の変動も調べた。Figure 6に示すように薬剤処していない対照区では、PPO活性は変化しなかったが、PAL活性が3日目に最大となり、8日目にポリフェノール量も増加した。これらの結果は、傷つけたレタスのPAL活性が、5℃3日で最大値となり、レタスの品質や褐変とよく関連したというLopez-Galvezらの報告(6)や、レタスを切断し5℃で3日貯蔵するとクロロゲン酸が5倍増加するというTomas-Barberanらの報告(7)とよく一致した。一方、AIP処理区では、PPO活性は変化しなかったが、PAL活性は、貯蔵初期に抑制されていた。3日目の処理区とコントロールを比べると活性は約半分に落ちていた。ポリフェノール量は8日目でFigure 5に示すように処理区のほうが少なかった。これらの結果から、AIP処理により貯蔵初期のPAL活性が抑えられ、その結果貯蔵後期のポリフェノール量が増えず、褐変が抑制されたと考えられる。

## 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。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。

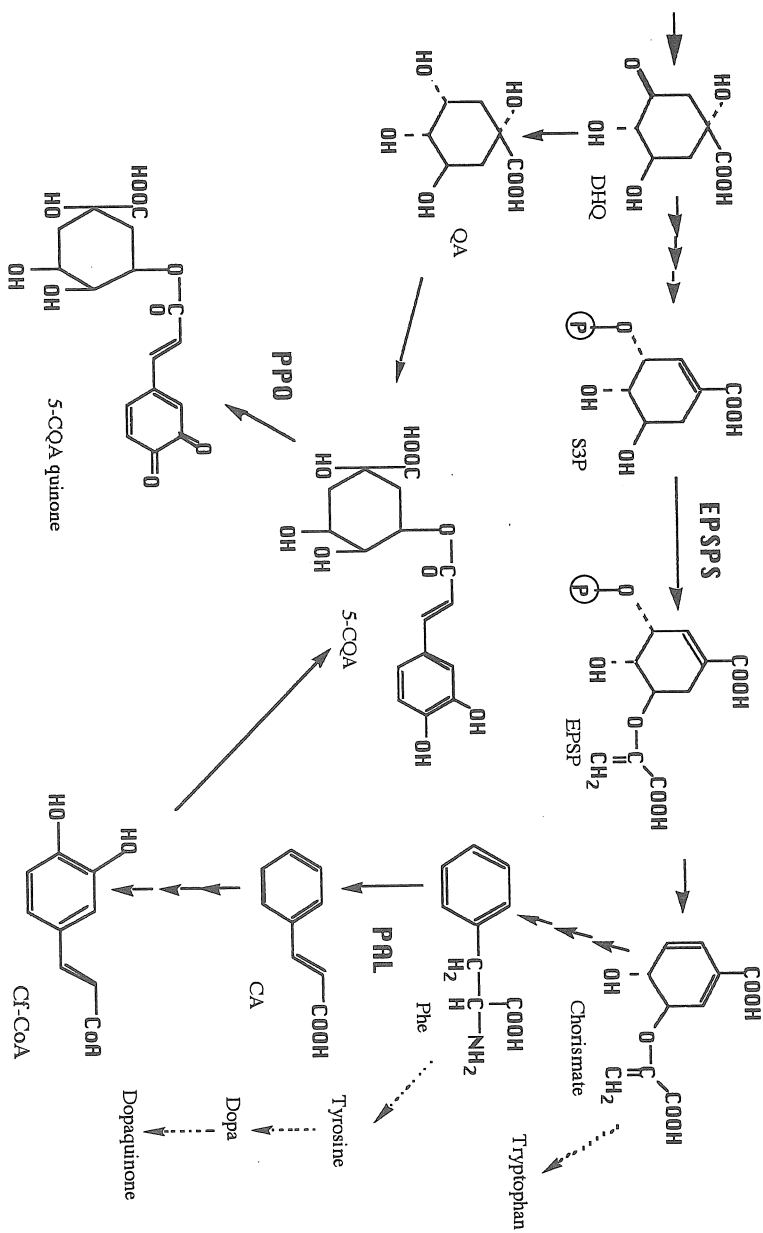
よって、カットレタスの褐変制御には、PAL活性の制御が重要である。実際PALの特異的阻害剤AIPで処理すると褐変は有意に抑制された。その時PAL活性が抑えられており、ポリフェノール量も減少していた。同時にNaClを加えると褐変は抑制されたが、相乗の効果は認められなかった。また、EPSPSの阻害剤グリフォセートを用い、PALの基質フェニルアラニンの供給をたつことでも、褐変を抑制できた。今後、天然由来の安全性の確認されたPAL阻害剤やEPSPS阻害剤の開発が望まれる。

## 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

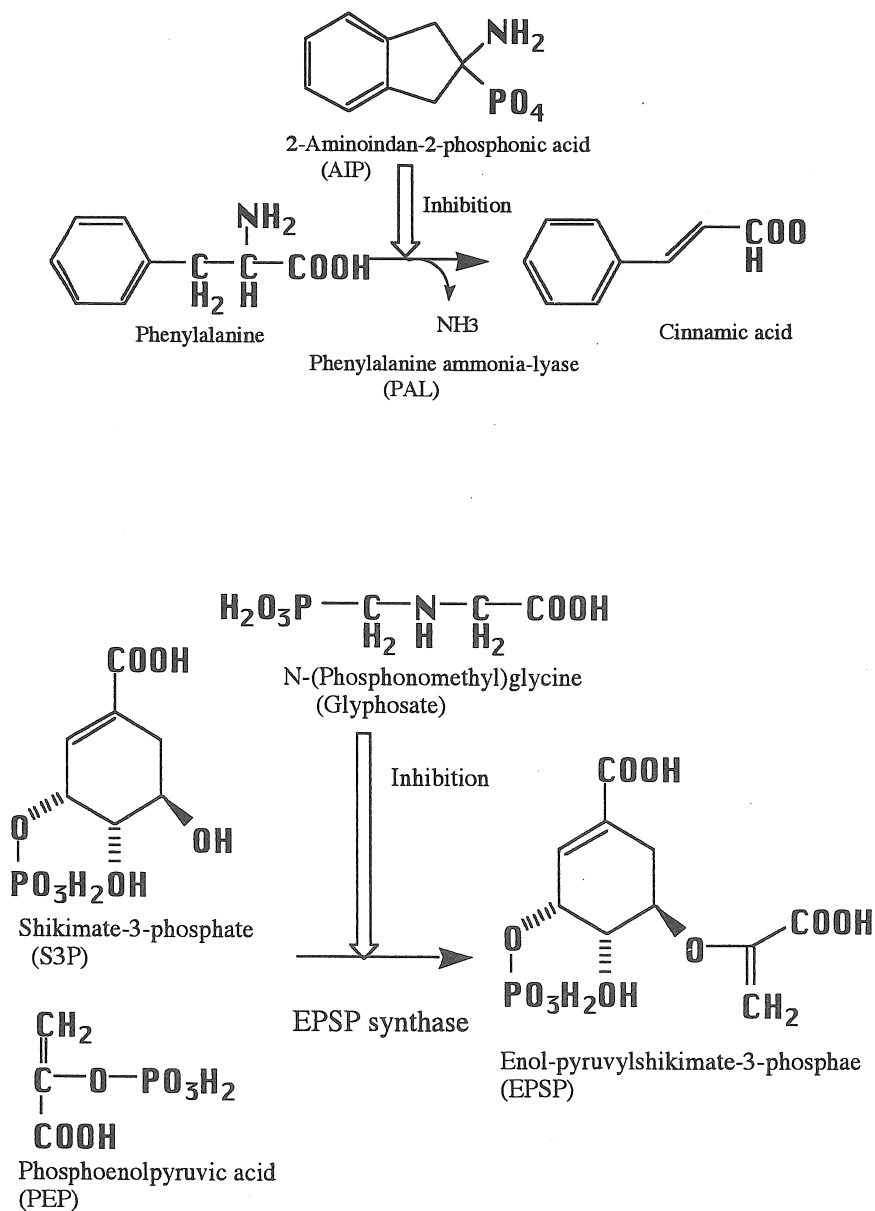
- 1) 河野澄夫、椎名武夫、カット野菜の加工・流通過程における品質保持技術、日本食品工業学会誌、36、159-167 (1989)
- 2) 村田 容常、本間 清一、ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御、日本食品科学工学会誌、45、177-185 (1998)
- 3) Dixon, R. A. and Paiva, N. L.; Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097 (1995).
- 4) Siriphanich, J. and Kader, A.A.; Effect of CO<sub>2</sub> on total phenolics, phenylalanine ammonia lyase, and polyphenol oxidase in lettuce tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110, 249-253 (1985).
- 5) Jerzy Zon and Nikolaus Amrhein; Inhibitors of phenylalanine ammonia-lyase: 2-aminoindan-2-phosphonic acid and related compounds. *Liebigs Ann. Chem.*, 625-628 (1992).
- 6) Lopez-Galvez, G., Salveit, M., and Cantwell, M.; Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuces. *Postharv. Biol. Technol.*, 9, 223-233 (1996).
- 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).



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

Dihydroquinate, DHQ; shikimate acid-3-phosphate, S3P; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; 5-caffeoylquinic acid, 5-CQA; cinnamic acid, CA; caffeoyl-CoA, Cf-CoA; EPSP synthase, EPSPS; polyphenol oxidase, PPO; phenylalanine ammonia-lyase, PAL; quinic acid, QA.





**Fig. 2 2-Aminoindane-2-phosphonic acid (AIP) and glyphosate.**

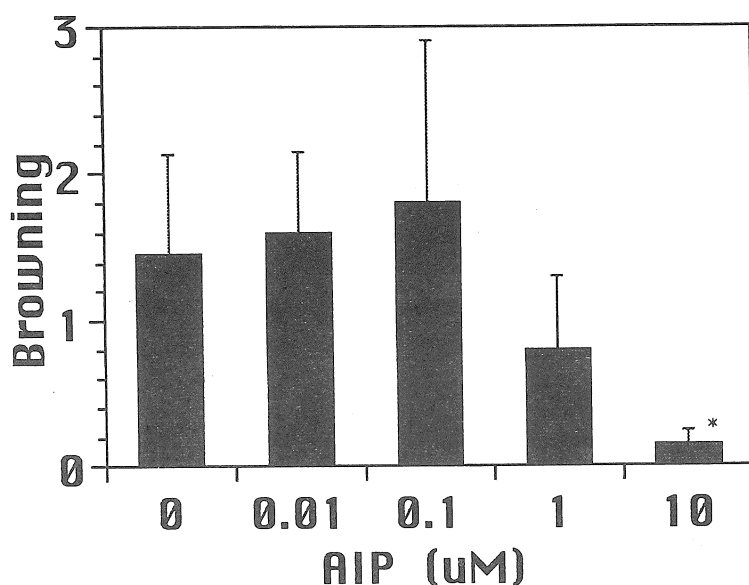


Fig. 3 Effect of AIP on the browning of shredded lettuce during cold storage. Browning was visually estimated (0, no browning; 3 extremely brown). \* shows significant difference from the control (no treatment).

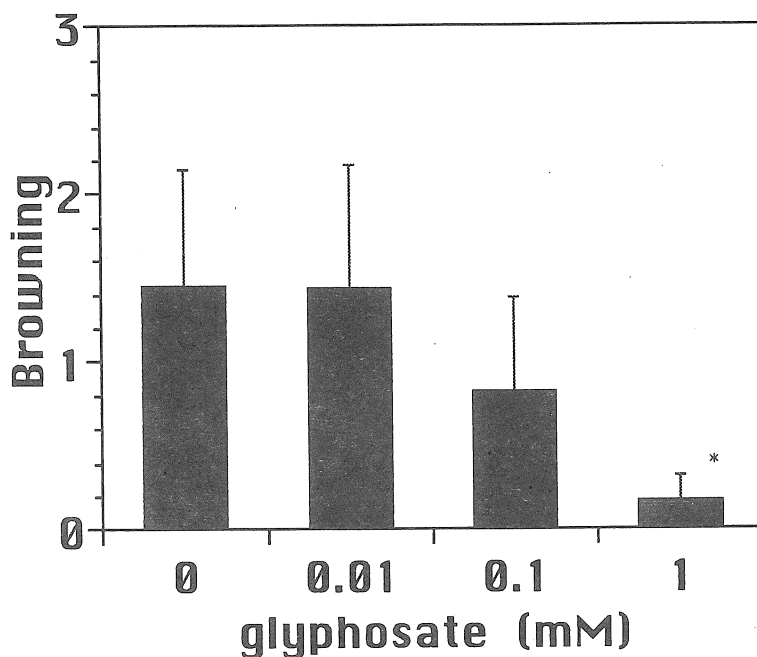


Fig. 4 Effect of glyphosate on the browning of shredded lettuce during cold storage. Browning was visually estimated (0, no browning; 3 extremely brown). \* shows significant difference from the control (no treatment).

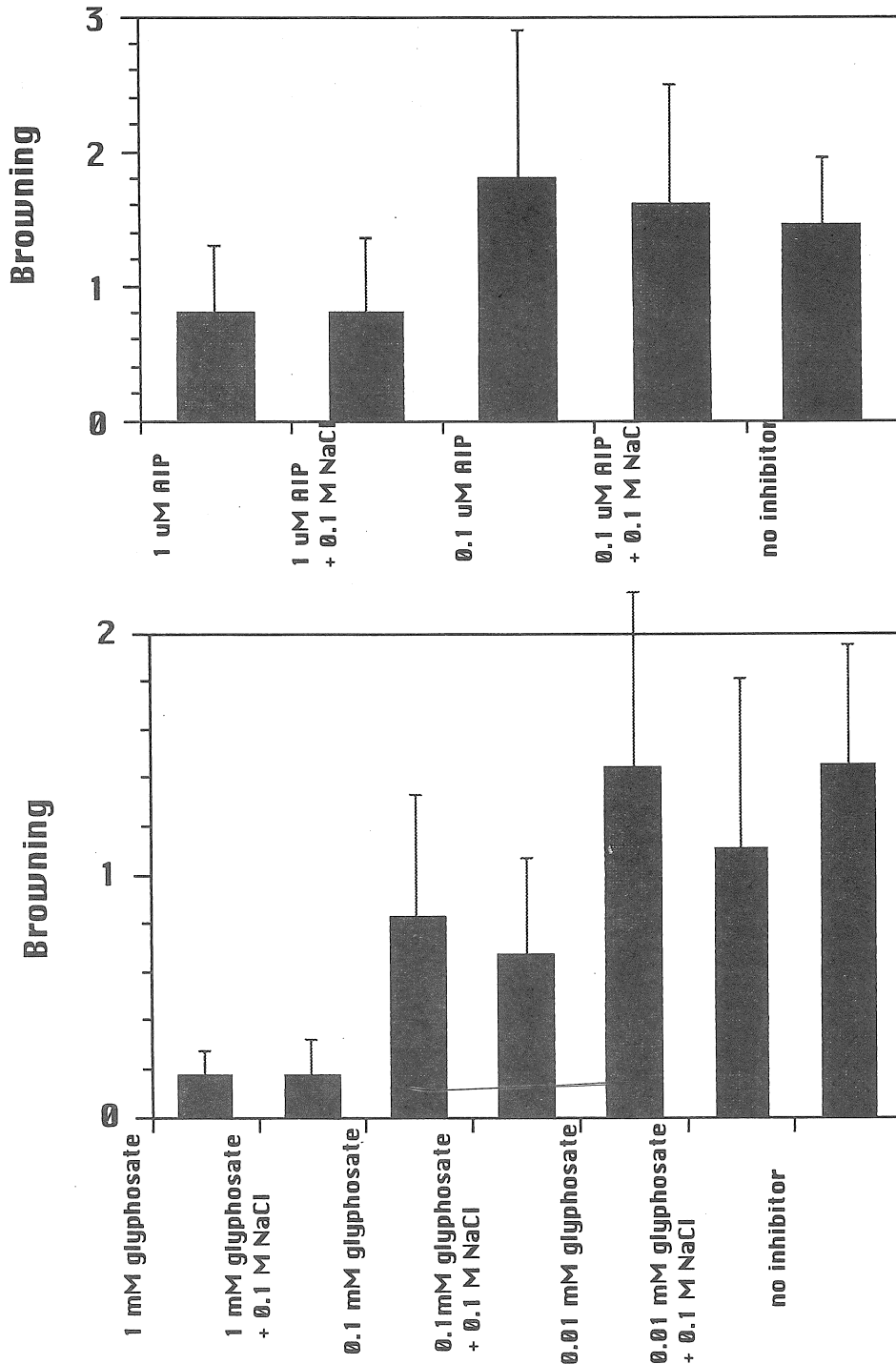


Fig. 5. Effect of NaCl on the browning of shredded lettuce during cold storage. Browning was visually estimated. (0, no browning; 3 extremely brown).

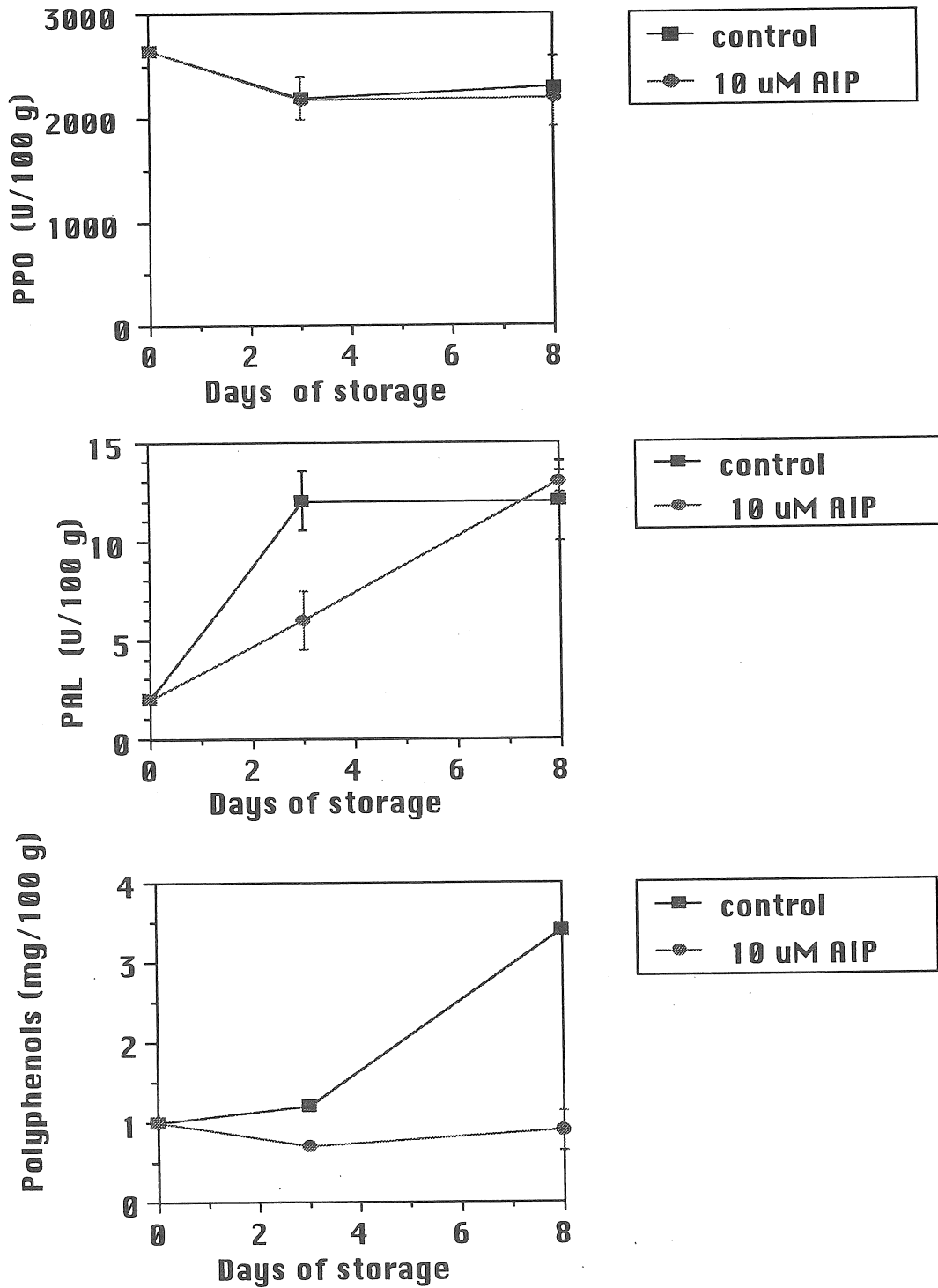


Fig. 6 Effect of AIP on PPO activity, PAL activity and polyphenol content of shredded lettuce during cold storage.

## Repression of enzymatic browning of shredded vegetables by using enzyme inhibitors and NaCl

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. Last year we used shredded lettuce and examined such factors of this enzymatic browning during cold storage as amount of phenolics, phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity and polyphenol oxidase (PPO) activity. 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 the biosynthesis of phenolic compounds.

Shredded lettuce turned brown after 3 or 4 days of cold storage. 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 a significant correlation between browning and PAL activity. This result shows that PAL activity is induced in shredded lettuce as the response against injury, newly synthesized phenolics are successively oxidized by PPO and that shredded lettuce turns brown.

Next the effect of NaCl on browning of shredded lettuce was examined. NaCl and other chlorides inhibited PPO activity of shredded lettuce. 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.

This year we examined the effect of the inhibitors of polyphenol biosynthesis on the browning of shredded lettuce during cold storage. We further examined the synergistic effect of NaCl and the inhibitors on the browning. We here used 2-aminoindan-2-phosphonic acid, a PAL inhibitor, and glyphosate, an enolpyruvylshikimate 3-phosphatase synthase inhibitor. AIP competitively inhibited lettuce PAL ( $K_i=115$  nM) against phenylalanine ( $K_m=125$   $\mu$  M). When shredded lettuce was treated with 10  $\mu$  M AIP or 1 mM glyphosate solutions, the browning was significantly inhibited. The PAL activity of lettuce treated by AIP was about a half of the activity of untreated lettuce at 3 days of storage. The amount of polyphenols at 8 days of storage in the treated lettuce was 30% of that of non-treated lettuce. NaCl did not show the synergistic effect on the inhibition of browning by AIP and glyphosate.

We here showed the usefulness of the inhibitors of polyphenol biosynthesis to prevent the browning of shredded lettuce. We hope the development of safe PAL or EPSPS inhibitors derived of natural products.