リンゴ果実のポリフェノール含有量と色調の 経時的变化

山王丸靖子*・片山 脩*・金子勝芳**・増田哲男***

Changes in Polyphenol Content and Coloration of Apple Fruits over Time

SANNOMARU Yasuko*, KATAYAMA Osamu*,
KANEKO Katsuyoshi** and MASUDA Tetsuo***

** The Skylark Food Science Institute*

1-3-CB-5, Nakase, Mihama-ku, Chiba-shi, Chiba 261-0023

*** National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
2-1-2, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0856*

**** Apple Research Center, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries
92, Nabeyashiki, Shimokuriyagawa, Morioka-shi, Iwate 020-0123*

The object of this study was to clarify the effect of experimental hydroponics (water culture: WC) on browning reaction of apple fruits. The changes in total polyphenol (TPP) content and coloration over time after crushing of apple fruits were investigated. The polyphenoloxidase (PPO) activity and property were analysed also. In this study, ripe conventional soil cultured fruits (SCF) and water cultured fruits (WCF) of two cultivars (Fuji and Hokuto) were used. The results were as follows. 1) Regardless of the cultivar, the absorbance of 450nm (OD₄₅₀) in SCF increased rapidly as time elapsed, but that in WCF increased to half degree of SCF until 60 minutes elapsed gradually. Especially, the OD₄₅₀ in WCF of Hokuto was inhibited significantly. 2) The reflectance in SCF and WCF (Fuji and Hokuto) showed a similar tendency at OD₄₅₀, which was measured with a spectro color meter. 3) Before browning reaction, there was no difference in the TPP content between WCF and SCF in Fuji. But in Hokuto, the TPP content in WCF was larger than that in SCF. Regardless of the cultivar, the TPP content in SCF decreased over time, especially quickly in the early stage. However the TPP content in WCF decreased slightly. 4) The decrease in the content of TPP due to browning showed a good negative correlation with the degree of enzymatic browning. After all, the TPP content was closely related to the browning degree. 5) The PPO activity was significantly lower in WCF than that in SCF. Isozyme patterns of PPO showed no difference between WCF and SCF. In conclusion, the low browning degree of WCF resulted from the revelation of PPO activity that was inhibited by WC. The browning degree was not affected by the PPO property.

(Received Jul. 30, 1997)

* (財) すかいらーく フードサイエンス研究所 (〒261-0023 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3-CB-5)

** 農林水産省食品総合研究所 (〒305-0856 茨城県つくば市観音台2-1-2)

*** 農林水産省果樹試験場リンゴ支場 (〒020-0123 岩手県盛岡市下厨川字鍋屋敷92)

食品の貯蔵および加工・調理過程における変色や着色は、酵素的褐変と非酵素的褐変に大別される。このうち非酵素的褐変では、食品に好ましい色や香りを与える場合もあるが、酵素的褐変により生じる果実、野菜の着色は、ほとんどの場合品質低下の原因となる事が多い。中でもリンゴの切断・破碎時における褐変現象はよく知られており¹⁾、加工・流通上大きな問題となっている。そのため、褐変防止策についての研究が広く行われているが^{2)~5)}、今だにより効果的な解決策が得られていないのが現状である。

ところが近年、農林水産省果樹試験場盛岡支場（果樹試・盛岡、現在リンゴ支場）において、水耕栽培⁶⁾により収穫されたリンゴ果実の褐変度が著しく低い事、および普通栽培樹にカルシウム (Ca) 溶液を樹上散布⁷⁾した果実、あるいは水耕および普通栽培樹に窒素肥料を多く施用⁸⁾したリンゴ果実の褐変度が抑制される事が報告されている。我々は、これらの特殊な栽培管理下で収穫されたリンゴ果実のうち、前2者について検討を行い、水耕栽培により褐変度が著しく抑制される事および、Ca溶液の樹上散布により褐変度がやや抑制される事を確認し報告している⁹⁾。

リンゴの褐変現象は、酸化酵素（主として、ポリフェノールオキシダーゼ：PPO）が、反応基質（ポリフェノール：PP）に作用するものとされているが、我々の水耕栽培果に関する研究では、PP含有量は普通栽培果と差がみられないが、PPO活性は褐変度の低い水耕栽培果が普通栽培果よりも、著しく低い値を示すという結果を得ている^{10), 11)}。

そこで本研究では、水耕栽培により収穫されたリンゴ果実の褐変機構の特異性について、果実の磨砕時から褐変およびPP含有量の経時変化を測定し、これらの色調の面から検討した。さらにPPO活性とその性質を調べ、以下の結果が得られたので報告する。

実験方法

1. リンゴ果実の栽培方法

1) 対照区 通常の普通栽培を対照区とし、これを土耕そして収穫果実を土耕果と呼ぶ。

2) 水耕栽培 水耕栽培は果実試・盛岡において既報¹⁰⁾と同様の方法で行った。この方法により収穫された果実を水耕果と呼ぶ。

2. 供試リンゴ

実験には果樹試・盛岡において、1995年に収穫された土耕栽培および水耕栽培された‘ふじ’ならびに‘北斗’を使用した。果実は当地での一般的な収穫適期とされる

時期に収穫した。それぞれの果実の収穫はリンゴの花満開後から数えて、‘ふじ’の土耕果185日、水耕果184日、‘北斗’の土耕果181日、水耕果170日目に行った。

3. 試料の調製

褐変度および総PP含有量を測定するための試料調製は、MURATA ら¹²⁾の方法に従って行った。すなわち、リンゴ果肉100gに冷純水100mlを加え、家庭用ジュースミキサーで30秒間磨砕した。この磨砕汁を30℃で30秒、1分、5分、10分、30分、60分放置した後、4%メタリン酸溶液200mlを加える事によって反応を停止させた。この磨砕汁について、それぞれの時間ごとに褐変度と総PP含有量の測定を行った。

4. 褐変度

褐変度は、分光光度計（日立製作所（株）製U-3210）による450nmの吸光度を10mmのガラスセルを用いて測定した。また、色調を検討するために測色色差計（日本電色工業（株）製SZ-Σ90）による反射色を測定した。

なお、吸光度測定用の試料は、前記の方法により調製した磨砕汁をさらにガラス繊維濾紙、セルロースアセテート膜（DISMIC-25cs）で濾過した清澄な液を用いた。色差計による反射色は、前記の方法により調製した磨砕汁をそのまま測定に供し、標準色板としてY：95.42、X：93.59、Z：113.41、および標準液として純水を用いた。測定値はCIE（国際照明委員会）Lab表色系（JIS, Z8729）の $L^*a^*b^*$ として表した。なお、標準液との色差は $\Delta E^* = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ 、彩度は $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ によって計算した。

5. 総ポリフェノール含有量の測定

総PP含有量はFolin-Denis法¹³⁾に従って、既報¹⁰⁾と同様に測定した。PPの標準物質としては、（-）-エピカテキン（SIGMA社製）を用い、総PP量をエピカテキン量として表した。

6. ポリフェノールオキシダーゼ活性の測定

PPO活性はKLAPP ら¹⁴⁾の方法に準じて既報¹⁰⁾と同様に測定した。すなわち、リンゴ果肉凍結乾燥物から粗酵素を抽出し、これをPPOとした。このPPOを用いてクロロゲン酸を基質とし、溶存酵素の消費量から活性を算出した。活性単位は、1秒間に1nmolの酸素の消費を1nkatとして1分間の平均を取り、凍結乾燥物1gあたりのPPO活性として表した。

7. ポリフェノールオキシダーゼの電気泳動

上記6で調製した、リンゴPPOのアイソザイムを測定するため、スラブ電気泳動をLAEMMLI¹⁵⁾らの方法に準じて、既報¹⁰⁾と同様に行った。なお、アイソザイム

確認のための活性染色は既報¹⁰⁾と同様に東野ら¹⁶⁾の方法に従って行った。

8. 実験結果の有意差検定

実験結果の平均値の評価の検定は、スミルノフの棄却検定を行った後、 t 検定法によった。

結果および考察

1. 褐変度の経時的変化

1) 吸光度の経時的変化 分光光度計により測定した吸光度の経時的変化をFig. 1に示した。土耕果では、リンゴの磨砕直後から2品種とも急激に褐変が起り、吸光度の値は大きく上昇した。30分後には最大の値を示し、その後は大きな変化はなかった。なお褐変の傾向には、品種による差はみられず、‘ふじ’、‘北斗’とも吸光度の最大値はほぼ同程度であった。これらと比較して水耕果では2品種とも、10分経過後まで吸光度はほとんど増加しなかったが、30分、60分経過後には土耕果の半分程度まで緩やかに増加した。特に‘北斗’の水耕果は土耕果と比較して吸光度は著しく抑制され、その差は‘ふじ’の水耕果と土耕果の差よりも顕著であった。

2) 色調の経時的変化

① a^* 値、 b^* 値の経時的変化： a^* 値、 b^* 値の経時的変化をFig. 2に示した。 a^* 値は0から+方向で赤の着色を、-方向で緑の着色を示し、 b^* 値は0から+方向で黄の着色を、-方向で青の着色を示す数値である。土耕果では、リンゴ磨砕直後から時間の経過に伴って‘ふじ’、‘北斗’ともに a^* 値、 b^* 値は増加し、赤方向およ

Fig. 1 Changes in absorbance at 450nm of apple juices by browning

●FUJI Soil ○FUJI Water ■HOKUTO Soil □HOKUTO Water
Soil: Cultivated by soil culture. Water: Cultivated by water culture.

Fig. 2 Changes in a^* and b^* values of apple juices by browning

●FUJI Soil ○FUJI Water ■HOKUTO Soil □HOKUTO Water
Soil and Water are the same as in Fig. 1.

び黄方向に着色が進む傾向を示した。この土耕果における a^* 値、 b^* 値の経時的変化は、MURATA¹⁷⁾らの報告と類似するものであった。なお、着色の傾向に品種による差はみられなかった。しかし、水耕果では土耕果と比較して2品種とも a^* 値、 b^* 値はほとんど増加せず、その傾向は特に‘北斗’において‘ふじ’よりも顕著に認められた。

② L^* 値の経時的変化： L^* 値(明度)の経時的変化をFig. 3に示した。品種、栽培条件に関係なく、す

Fig. 3 Changes in L^* value of apple juices by browning

●FUJI Soil ○FUJI Water ■HOKUTO Soil □HOKUTO Water
Soil and Water are the same as in Fig. 1.

すべてのリンゴにおいて磨砕直後から5分経過までL*値は急激に減少し、明度は暗い方向に変化した。その後土耕果では、'ふじ'は60分経過までほとんどL*値は変動しなかった。しかし'北斗'におけるL*値は一旦減少するが、その10分経過後にはスタート時の約半分程度まで上昇し、明度は明るい方向へ回復した。その後60分経過に至るまで変化はみられなかった。また水耕果におけるL*値は、'ふじ'では5分経過から30分経過後まで、ほとんど変化しなかったが、その後60分経過に掛けて緩やかに減少した。'北斗'では、5分経過からその後の変化はみられなかった。なお、水耕果のL*値は2品種とも土耕果と比較して高い数値を示し、明度は高い結果となった。

③ 色差の経時的変化：色差(ΔE)の経時的変化をFig. 4に示した。色差はL*値, a*値, b*値による計算式から算出される。そのため、土耕果では'ふじ', '北斗'ともa*値, b*値が上昇したため、それぞれの経過時間において、水耕果よりも高値を示した。経時的には5分経過まで急激に増加したが、それ以降大きな変化はみられなかった。水耕果は2品種とも土耕果よりも低値を示し、着色が抑制された事は明らかである。なお、これらの変化の傾向は吸光度とはほぼ類似するものであった。竹内ら¹⁸⁾は、数種類のリンゴ破砕物の色差の経時の変化について検討した結果、各品種特有の褐変曲線の存在を報告している。その中には'ふじ'についても報告されており、本実験における'ふじ'の土耕果の結果は、それらとほぼ一致するものであった。

Fig. 4 Changes in color difference of apple juices by browning

●FUJI Soil ○FUJI Water ■HOKUTO Soil □HOKUTO Water
Soil and Water are the same as in Fig. 1.

$$\Delta E^* = (\Delta L^* + \Delta a^* + \Delta b^*)$$

Fig. 5 Changes in saturation of apple juices by browning
●FUJI Soil ○FUJI Water ■HOKUTO Soil □HOKUTO Water
Soil and Water are the same as in Fig. 1.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

④ 彩度の経時的変化：彩度(C)の経時的変化をFig. 5に示した。彩度は土耕果では、2品種とも10分経過までに増加し、その後はほとんど変化しなかった。水耕果における彩度は、スタート時から、変化はほとんどみられなかった。

2. 総ポリフェノール含有量の経時の変化

総PP含有量の経時の変化をFig. 6に示した。土耕果の総PP含有量は'ふじ', '北斗'とも、磨砕直後から時間の経過に伴い急激に減少した。特に'ふじ'では30分経過後に、含有量が0 mg付近まで減少した。'北斗'は'ふじ'

Fig. 6 Changes in total polyphenol content of apple juices
●FUJI Soil ○FUJI Water ■HOKUTO Soil □HOKUTO Water
Soil and Water are the same as in Fig. 1.

ほど急激ではないが、緩やかに減少を続けた。これらの土耕果の現象と比較して水耕果では、2品種とも30分経過後まで総PP含有量はほとんど減少せず、その後60分経過に至るまでの間に緩やかに減少した。その程度は土耕果の約半分であった。

褐変前の総PP含有量は、‘ふじ’では水耕果と土耕果に差が認められなかったが、‘北斗’では水耕果のほうが土耕果よりも高い値となった。‘ふじ’のこの結果は既報^{9)~11)}における水耕果の総PP含有量は土耕果よりも高値であるという結果とは異なっている。この要因は不明であるが、収穫年の違いによるPP含有量の差異については、LEEら¹⁸⁾がモモについて検討し、同様の結果を報告している。本実験でも、収穫年の違いによる水耕栽培樹の根部の生育状態の違いが考えられ、これが果実の品質に影響を及ぼした事が考えられる。また、品種による比較では水耕果、土耕果ともに‘ふじ’よりも‘北斗’のほうが含有量が高く、これは品種に由来する差と考えられる。

これらの褐変度増加の経時的変化と、総PP含有量減少の経時的変化について相関係数を求め、相関検定を行った結果、両者には明らかに負の相関 ($r < -0.89$, $P < 0.01$) が認められた。AMIOTら¹⁹⁾も、11品種のリンゴの褐変度と分解したフェノール量について検討し、両者の相関性は高いと報告している。更に、竹内ら^{18), 20)}も同様に、リンゴ搾汁液中のクロロゲン酸含有量の減少とともに、褐変度が高くなる事を報告している。これらの結果から、PP類は明らかに酵素褐変の基質であり、褐変度の強弱に大きく関与している事が示唆された。

3. ポリフェノールオキシダーゼ

PPO活性の測定結果をFig. 7に示した。2品種とも水耕果が土耕果と比較して、PPO活性は顕著に低い値を示した。これらの結果は、既報^{10), 11)}と一致するもので、水耕栽培によりPPO活性が明らかに抑制された結果、褐変度が低くなった事が考えられた。

竹内ら²⁰⁾は、褐変速度、PPO活性、PP組成の関係について検討を行い、PPO活性の高い品種では褐変速度も高い傾向にある事、および褐変度にはクロロゲン酸含有量が多く影響していると報告している。本研究ではクロロゲン酸含有量の測定は行っていない。しかし、我々は既報^{10), 11)}において、‘ふじ’の水耕果と土耕果のクロロゲン酸含有量を測定し、両者には差がないか、あるいは水耕果が高値である事を報告している。これらの結果から、水耕果の褐変度が低い事は、PP含有量の大小ではなく、PPO活性の低値に由来するものである事が大きく示唆された。

Fig. 7 Polyphenoloxidase activity of apple flesh FS, Fuji soil culture; FW, Fuji water culture; HS, Hokuto soil culture; HW, Hokuto water culture. Values are same mean $\pm$ SD. Means with same letter (a, b) are not significantly different ($P < 0.05$).

Fig. 8 Isozyme Patterns of PPO from the Apples Electrophoresis was carried out with running of 20mA per plate for 1.5h at PH8.0 with cooling to approximately 4°C. The Enzyme was stained with Coomassie Brilliant blue (CBB) and Epicatechin. FS, FW, HS and HW are the same as in Fig. 7.

4. ポリフェノールオキシダーゼの性質

PPOの性質を測定するために、Native-電気泳動による活性染色を行った。結果はFig. 8に示した。2品種とも栽培条件によるアイソザイムの差異は認められず、活性バンドも一致した。これらの結果は、既報¹⁰⁾と同様であり、水耕果の褐変程度の低い事はPPOの特質ではなく、その発現量の低い値に由来するものである事が改めて示唆された。しかし、そのアイソザイムパターンは、既報¹⁰⁾とは異なっている。これは、リンゴの収穫年が異

なるため、その環境条件の違いがPPO内の生理機構に影響を与え、異なったアイソザイムパターンが発現した事が予想される。

要 約

水耕栽培による褐変度の低いリンゴの機構解明を目的とし、水耕および土耕栽培による2品種(‘ふじ’、‘北斗’)のリンゴ果実の総PP含有量および色調の経時的変化を測定した。結果は以下のとおりである。

1. ‘ふじ’、‘北斗’ともに、土耕果のリンゴ磨砕汁の吸光度は、時間の経過に伴って急激な増加を示すが、水耕果ではその程度は緩やかで、磨砕後60分経過でも土耕果の半分程度であった。

2. 測色色差計による測色値も、吸光度と同様の傾向を示し、水耕果では土耕果と比較して、測定値の変化は少なかった。

3. 総PP含有量は、磨砕後の時間の経過とともに減少する傾向を示した。‘ふじ’、‘北斗’ともに土耕果の減少率は顕著であったが、水耕果では緩やかに減少した。この総PP含有量の減少は褐変度の増加と反比例するもので、両者には負の相関が認められた。

4. PPO活性は、‘ふじ’、‘北斗’ともに水耕果が土耕果と比較して明らかに低値を示した。このことから水耕果の弱褐変は、PPO活性の低値に由来すると示唆された。

5. PPOのアイソザイムパターンには、栽培条件による差異は認められなかった。この結果から、PPO活性の低値は酵素の質ではなく、水耕栽培によりPPO活性が抑制される事に由来すると推察された。

文 献

- 1) NICOLAS, J. J. : *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri.*, **34**, 109 (1994)
- 2) 石川(高野)裕子・大宮あけみ・垣内典夫: 果樹試験報告, **29**, 27 (1997)
- 3) 小林英治・金谷清身・小田切一広: 果汁協会報, **429**, 33 (1993)
- 4) 榎村芳記・吉岡博人・青葉幸二・金子勝芳: 特願平4-266829 (1992)
- 5) 関村照吉・遠山 良・関澤憲夫: 岩手県醸造食品試験場報告, **24**, 7 (1990)
- 6) 金子勝芳: 特定農産物緊急技術開発事業研究成果—果実編(第二分冊), p.585, 農林水産技術会議事務局振興課編 (1995)
- 7) 青葉幸二・金子勝芳・吉岡博人・榎村芳記・田鎖壽: 園学雑, **61別1**, 514 (1992)
- 8) 青葉幸二・吉岡博人・藤本國夫: 園学雑, **59別1**, 628 (1990)
- 9) 山王丸靖子・鎮西夕子・金子勝芳・片山 脩: すかいらくフードサイエンス研究所研究報告, **3**, 63 (1994)
- 10) 山王丸靖子・片山 脩・榎村芳記・金子勝芳: 食科工, 投稿中
- 11) 山王丸靖子・片山 脩・榎村芳記・金子勝芳: 食科工, 投稿中
- 12) MURATA, M., TURUTANI, M., TOMITA, M., HOMMA, S. and KANEKO, K. : *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1115 (1995)
- 13) FOLIN, O. and CIOCALTEU, V. : *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927)
- 14) JANOVITS-KLAPP, A., RICHARD, F. and NICOLAS, J. : *Phytochemistry*, **28**, 2903 (1989)
- 15) LAEMMLI, U. K. : *Nature*, **227**, 680 (1970)
- 16) 東野哲三・藤田修二・川崎宏隆・李 忠富: 農化, **60**, 705 (1986)
- 17) LEE, C. Y., KAGAN, V., JAWORSKI, A. W. and BROWN, S. K. : *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 99 (1990)
- 18) 竹内正彦・石澤弘明・松澤恒友: 果汁協会報, **418**, 13 (1992)
- 19) AMIOT, M. J., TACCHINI, M. AUBERT, S. and NICOLAS, J. : *J. Food Sci.*, **57**, 958 (1992)
- 20) 竹内正彦・石澤弘明・柳原政利: 果汁協会報, **441**, 39 (1994)

(平成9年7月30日受理)