各種果実のアセトン可溶性画分が果実の 酵素的褐変に及ぼす影響

小宮山美弘*・辻 政雄*・岩田 隆**

Effect of Acetone Soluble Fraction from Various Fruits on Enzymatic Browning

Yoshihiro KOMIYAMA*, Masao TSUJI* and Takashi IWATA**

* Department of Wine and Food Technology, Yamanashi Industrial
Technology Center, 312-4, Isawa-cho, Yamanashi 406

** College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, 4
Mozuume-machi, Sakai-shi, Osaka 591

Polyphenol oxidase (PPO) of each fruit was added to each of acetone soluble fractions (AFs) prepared from various fruits, and the extent of browning of the reaction mixtures was determined. When the AFs from three fruits ('Delaware' grape, 'Sordum' plum, 'Hakuho' peach), containing the same amount of polyphenol, were added to PPO of each fruit, the AF of grape markedly inhibited PPO activity of all three kinds of fruit. The oxidation of the AF of peach was the strongest of the three and that of plum was intermediate. The PPO and AFs of 'Kosui' pear and 'Tsugaru' apple were also prepared by the same method as the other three fruits. Since the PPO of all five fruits had high substrate specificity for chlorogenic acid, the oxidation of chlorogenic acid was used as an index of the browning. The AF of grape inhibited PPO activity of peach, apple and grape, whereas the AF of plum inhibited PPO activity of peach and apple, but accelerated the PPO activity of pear, plum and grape. The AF of peach and apple was appeared to have a stimulative effect on PPO activity.

(Received Jul. 11, 1990)

果実破碎時に起こる酵素的褐変は、果汁の外観的品質を損なうばかりでなく、褐変物質の重合による Off-flavor など香味の劣化を招くことが知られており¹⁾²⁾、これを防止するためには果実に存在するポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性を抑制する必要がある。PPO 不活性化の最も効果的な方法は加熱操作であるが、果実破碎時の工程や果汁の品質を考慮すると、できるだけ温和な条件が好ましいことは言うまでもない。特に最近天然果汁やフローズンあるいはチルド果汁の需要が高まり、例えば米国ではフレッシュスクイズオレンジジュースが搾りたてのジュースとして人気を博しており³⁾、

生果実の特性をできるだけ活かす加工法が要求されている。未加熱状態での PPO 活性の抑制には、アスコルビン酸やエリソルビン酸²⁾⁴⁾⁵⁾、亜硫酸⁴⁾⁶⁾⁷⁾、アスコルビン酸の各種誘導体や脂肪酸エステル^{8)~10)}の添加による効果が検討されているが、果汁中でのこれらの酸化物の品質への影響や食品添加物としての表示などの問題が残る。

著者らはスモモの一品種「サントローザ」が破碎時にほとんど褐変しないことを報告¹¹⁾し、この原因が、この品種自身のアセトン可溶性画分に存在する PPO 阻害物質によることを明らかにして¹²⁾天然阻害剤としての利用を試みた。一方、中林¹³⁾、CHUNG¹⁴⁾、SCIANCALE-

* 山梨県工業技術センター食品・醸造部 (〒406 山梨県東八代郡石和町窪中島 312-4)

** 大阪府立大学農学部 (〒591 大阪府堺市百舌鳥梅町 4 丁 804)

PORE ら¹⁵⁾が桃とオリーブを用いた報告では、酵素的褐変の程度はポリフェノール含量に支配されるとしている。しかし、著者の報告によって、果実あるいは品種によって酵素的褐変の支配因子の異なることが示唆された。

本報では数種の果実のアセトン可溶性画分と PPO を調製して酵素的褐変を起こし、果実間の褐変の差異や阻害効果を検討し、果実成分の天然阻害剤としての利用や異種果実を同時に破碎した場合の褐変予測の基礎資料を得るために実施した研究結果について報告する。

実験方法

1. 供試材料

ブドウは山梨県石和町産の‘デラウェア’、スモモは同若草町産の‘ソルダム’、モモ‘白鳳’、リンゴ‘つがる’及びナシ‘幸水’は石和町内の市販品を購入し、合計 5 属 5 品種の果実を供試した。

2. アセトンパウダーの調製

果肉部約 100 g を -40℃ に冷却した 10 倍量のアセトンとともにホモジナイズし、プフナー濾過器により素早く濾過した。残渣は少量のアセトンで洗って一夜減圧乾燥し、得られたパウダーはデシケーターに入れて使用時まで -20℃ の冷凍庫に保存した。

3. アセトン可溶性画分の調製

供試果実約 50 g (ブドウは全粒、その他の果実は中心部と外側のほぼ中間部を輪切りにし、果肉と果皮を含めたが種子や果芯は含まない) をそのままあるいは細断後、中林の方法¹⁶⁾に準じて 150 ml のアセトンとともにホモジナイズした後加熱還流抽出した。濾過後残渣を 70% のアセトンで 2 回還流抽出し、全抽出液は合せて炭酸ガスで置換後 40℃ 以下で減圧濃縮した。濃縮液は 12 000×g、10 分間の遠心分離後 100 ml に定容した。なお、以後この画分をポリフェノール抽出液または抽出液とした。

4. 粗酵素液の調製

アセトンパウダーを一定量採取し、これに 70 倍量の 1/20 M クエン酸-1/10 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) を加えて、4℃ 下で 1 時間時々攪拌しながら抽出した後 12 000×g で遠心分離した。得られた上澄液を粗酵素液とした。

5. 抽出液の褐変度の測定

ポリフェノール含量が 0.275 mg になるように抽出液 (0.1~0.6 ml) を採取し、1/20 M クエン酸-1/10 M リン酸緩衝液 (pH 5.0) を 0.4~0.9 ml、0.5 g のパウダーから同じ緩衝液で抽出した粗酵素液 2 ml の合計

3 ml をガラスセルに入れ、30℃ で反応させた。経時的に 2 倍量の 99.5% のメタノールを加えて反応を停止させ、12 000×g、10 分間遠心分離後 400 nm の吸光度を測定し¹⁷⁾、反応開始前の吸光度との差を褐変度とした。

6. PPO の活性測定

ワールブルク検圧計を用い、アセトンパウダー 0.5 g から抽出した粗酵素液 1 ml と pH 5.0 のクエン酸-リン酸緩衝液 1 ml を主室に、基質 (カテコール、カテキン、クロロゲン酸、ピロガロール、いずれも 4×10^{-6} mol) 1 ml を側室に、副室には 0.1 ml の 20% KOH 溶液をとり 10 分間空振りした後側室の基質を酵素液に添加し、30℃ で経時的に酸素吸収量を測定した。

7. 抽出液と PPO 反応系におけるクロロゲン酸の酸化度の測定

適量のアセトンパウダーから抽出した粗酵素液の各果実 0.1 g 相当量を採取 (0.15~0.49 ml) し、これに果実 0.1 g 相当のポリフェノール抽出液 (0.1~0.2 ml) とクロロゲン酸 (0.1 mg/ml) 0.5 ml 及び上記 pH 5.0 の緩衝液を加えて計 3 ml とし、ガラスセル内、30℃ で反応させた。反応の停止は 4 項と同様な方法で行って遠心分離後 400 nm の吸光度を測定し、対照としてクロロゲン酸を含まない反応系の吸光度との差を酸化度の指標とした。

8. ポリフェノール成分の定量

既報¹¹⁾に準じ、抽出液中の全ポリフェノールは FOLIN-DENIS 法、フラバノール型タンニンにはバニリン-硫酸法、クロロゲン酸はジアゾ法を用いて定量した。ロイコアントシアンは、抽出液を 5 倍に希釈し、その 1 ml を塩酸-ブタノール法により発色し、550 nm の吸光度を求め、この値を果実 100 g に換算して示した。

実験結果

1. 種類の異なる果実のポリフェノール抽出液と PPO の褐変反応

ブドウ、スモモ及びモモから抽出した抽出液と同時に各果実から調製した PPO の褐変反応の結果を Fig. 1 に示した。いずれの PPO を用いてもブドウの抽出液の褐変が顕著に抑制され、モモの抽出液の褐変が最も大きかった。スモモの抽出液は両者の中間程度の褐変であったが、PPO によって若干差異がみられ、ブドウでは褐変は促進された。褐変反応の基質である含有ポリフェノールは同一であることからこの差は抽出液成分あるいはポリフェノール成分組成に起因しているのではないかと考えられた。

なお、各反応液の実際の pH は 4.85~5.0 の範囲であった。

2. ポリフェノール抽出液の成分組成

果実間の褐変の差の一つの理由としてポリフェノール成分組成が考えられたので、上記 3 種類の果実以外にリンゴとナシを加え、Table 1 にその結果を示したが、全ポリフェノール含量には大差が見られた。組成的に見ると、ブドウ、スモモ、及びモモの 3 種類ではブドウのフラバノール型タンニンとスモモのクロロゲン酸の組成が低く、また、モモの褐変基質の一つとして知られている¹⁶⁾ロイコアントシアンは少なく、褐変の程度とポリフェノール含量及び組成の間に相関関係が見られず、ポリフェノール含量や組成が 3 種類の果実間の褐変度の差異を生ずる主要因ではないと思われた。リンゴとナシでは、ナシの含量が顕著に少なく、フラバノール型タンニ

ンとクロロゲン酸の組成比が他の果実の 1/2 と低かった。リンゴの組成比は他の果実と大差はなかった。

3. PPO の基質特異性

各果実抽出液の PPO による酵素的褐変に与える影響を調べるため、PPO が最もよく酸化する基質を選択した。モモとブドウの例を Fig. 2 に示したが、クロロゲン酸を最もよく酸化し、次いで果実によって異なるが、カテコールと D-カテキンで、o-diphenol 類をよく酸化した。ピロガロールは酸化しにくかった。他の果実も程度の差はあったが、同様な傾向であり、この結果からクロロゲン酸の酸化を褐変の指標とした。

4. ポリフェノール抽出液が PPO のクロロゲン酸の酸化・褐変に与える影響

(1) 'ソルダム' スモモの PPO

結果を Fig. 3 に示した。ソルダムの PPO はナシ以

Fig. 1 Changes of ΔOD_{400} in the reaction mixture of each acetone powder and polyphenol extracts (○—○ grape, ●—● plum, △—△ peach) from three kinds of fruit

$\Delta OD_{400} = OD_{400}$ after reaction - OD_{400} before reaction

Acetone soluble fraction of fruit was designated as polyphenol extract.

A, B and C show the acetone powder from grape, plum and peach, respectively.

All reaction mixtures contained 0.275 mg of total polyphenol.

Composition of reaction mixture; 1/20 M citrate-1/10 M phosphate buffer (pH 5.0) 0.4-0.9 ml, polyphenol extract 0.1-0.6 ml, crude enzyme sol. 2 ml (0.5 g of each acetone powder was extracted with above buffer 35 ml) Total 3 ml. Reaction temperature was 30°C.

Table 1 Polyphenol contents in various fruits

Fruits	Total polyphenol*	Flavanol tannin*	Chlorogenic acid**	Leuco anthocyan Absorb. at 550 nm***
Plum (Sordum)	454	246(54.1)	158(34.8)	0.740
Peach (Hakuho)	92	46(50.0)	72(78.3)	0.130
Grape (Delaware)	290	100(34.5)	236(81.4)	0.456
Apple (Tsugaru)	68	38(55.9)	44(64.7)	0.098
Pear (Kosui)	18	4(22.2)	8(44.4)	0.003

*as catechin (mg/100 g flesh), **mg/100 g flesh, ***absorbance/100 g flesh

The values in parentheses show the percentage to the total polyphenol.

Fig. 2 Oxygen uptake of the reaction mixture of the acetone powder from 'Delaware' grape and 'Hakuho' peach and several substrates

●—● Chlorogenic acid, ■—■ Catechol,
▲—▲ D-Catechin ×—× Pyrogallol

Composition of reaction mixture;
1/20 M citrate-1/10 M phosphate buffer 1 ml
Substrate (4×10^{-6} mol) 1 ml
Crude enzyme sol. (0.5 g of each acetone powder was extracted with above buffer 35 ml) 1 ml
Total 3 ml

Reaction temperature was 30°C.

外の果実の抽出液の存在下でクロロゲン酸をよく酸化し、抽出液の存在が褐変を促進する傾向のあることがわかった。特にソルダム自身の抽出液も促進し、最もその効果の大きかったのはリンゴの抽出液であった。

(2) '白鳳' モモの PPO

結果を Fig. 4 に示した。白鳳の PPO はソルダムと異なり、ナシ以外の果実の抽出液はいずれもクロロゲン酸の酸化を抑制した。特にブドウとスモモの褐変抑制効果は大きく、対照の 1/2~1/3 程度に抑制した。モモ自身の抽出液も若干抑制傾向を示した。リンゴは対照と大差はなかった。

(3) '幸水' ナシの PPO

結果は Fig. 5 に示した。幸水の PPO は、ソルダムと同様にナシ自身以外の抽出液の存在下でクロロゲン酸の酸化・褐変が促進された。しかし、ブドウの抽出液ではその様相が異なり、反応当初は、その速度が抑制される傾向にあり、時間の経過とともに促進された。最も促進したのはスモモの抽出液であり、40 分後にはブドウの抽出液もこれに次いだ。ナシ自身の抽出液は対照と大

差はなかった。

(4) 'つがる' リンゴの PPO

結果は Fig. 6 に示した。つがるは抽出液の種類により促進される場合と抑制される場合があった。スモモとブドウの抽出液は顕著にクロロゲン酸の酸化・褐変を抑制したが、リンゴとモモは促進した。ナシは対照と大きな差はなかった。

(5) 'デラウェア' ブドウの PPO

結果は Fig. 7 に示した。デラウェアの PPO はそれ自身の抽出液で顕著にクロロゲン酸の酸化・褐変を抑制し、対照の 1/3 程度の褐変抑制効果が認められた。他の果実の抽出液は一時的に促進効果があったが対照との差はわずかであった。

考 察

ポリフェノール含量を一定にした 3 種類の果実からのアセトン可溶性画分に、それぞれの果実からの PPO を作用させると、抽出液の褐変には大きな差がみられ、見掛けの上ではポリフェノール含量以外の可溶性成分が

Fig. 3 Effect of addition of polyphenol extracts from various fruits on the enzymatic browning of chlorogenic acid containing PPO of 'Sordum' plum

Δ Absorbance was shown as differences of absorbance at 400 nm with and without chlorogenic acid

Composition of reaction mixture;
crude enzyme corresponding to 0.1 g of fruit

polyphenol extract corresponding to 0.1 g of fruit

chlorogenic acid (50 mg/50 ml) 0.5 ml

1/20 M citrate-1/10 M phosphate buffer (pH 5.0) 1.8 ~ 2.4 ml

total 3.0 ml

Reaction temperature; 30°C

PPO の活性を阻害しているものと推察された (Fig. 1). これは、著者らが既に報告¹¹⁾¹²⁾したのと同様に、果実の種類間にも褐変の程度がポリフェノール含量に支配されない反応系の存在が推察された。従来の報告^{13)~15)}では同種類の果実間ではポリフェノール含量が褐変を支配しているとの報告が多かったが、今回のポリフェノール成分の組成調査からも、例えば、褐変の最も激しいモモがロイコアントシアンが少なかったことや全ポリフェノール含量が最も多いにもかかわらず、モモより褐変程度が小さかったことなど、ポリフェノール含量以外の要因の可能性のあるものと思われた。

そこで、さらにこの現象を明確にするため、各果実の抽出液と PPO との反応系におけるクロロゲン酸の酸化を褐変の指標として調べた (Fig. 3~7) 結果を一覧表

Fig. 4 Effect of addition of polyphenol extracts from various fruits on the enzymatic browning of chlorogenic acid containing PPO of 'Hakuho' peach

Reaction conditions and measuring methods are the same as given in Fig. 2.

Fig. 5 Effect of addition of polyphenol extracts from various fruits on the enzymatic browning of chlorogenic acid containing PPO of 'Kosui' pear

Reaction conditions and measuring methods are the same as given in Fig. 2.

にして Table 2 に示した。対照はクロロゲン酸を添加しない反応系を用いたが、モモ、リンゴ及びナシの PPO に対してブドウの抽出液は顕著に阻害効果を示した。また、スモモの抽出液はモモとリンゴの PPO に対して阻害効果を示したが、ナシ、スモモ、ブドウの PPO には、促進効果を示し、PPO の種類による効果に差のあることがわかった。さらにモモとリンゴの抽出

液は褐変促進効果を示す因子を保有しているものと考えられ、ナシはあまり影響を及ぼさないように思われた。一方この反応を PPO の性質から見ると、スモモは各抽出液によって活性化され易いと考えられ、リンゴやブドウは抽出液によって阻害される場合と活性化される場合のあることがわかった。果実抽出液の添加比率は果実重量に換算して全て同量にしてあるので、これらの差は果実間の差異と考えられる。実際の果実の破碎が混合系で行われることは少ないと考えられるが、'デラウェア'ブドウ抽出液の場合には少なくともここで示した他の果実の PPO 阻害剤としては利用できるものと考えられる。ブドウ破碎時の PPO の酸素消費速度⁷⁾や褐変度¹⁷⁾、RADLER ら¹⁸⁾の報告などから、ブドウの PPO 活性は高いことが指摘されており、本報で用いたデラウェア種とは異なった。これは、品種の違いもあるが、これまでの報告では PPO の性質のみの測定で、抽出液との反

Fig. 6 Effect of addition of polyphenol extracts from various fruits on the enzymatic browning of chlorogenic acid containing PPO of 'Tsugaru' apple

Reaction conditions and measuring methods are the same as given in Fig. 2.

応は行われていないことに起因しているものと思われる。破碎液の褐変の程度と PPO 活性との間には大きな差も予想されるが、今後各種のブドウの PPO とそれぞれの抽出液との関係についても詳細に検討する必要があるものと思われた。

なお、PPO 活性の促進効果の原因についてはさらに検討を続ける予定である。

要 約

ブドウ 'デラウェア'、スモモ 'ソルダム'、モモ '白鳳' 果実から PPO とアセトン可溶性画分 (抽出液) を

Fig. 7 Effect of addition of polyphenol extracts from various fruits on the enzymatic browning of chlorogenic acid containing PPO of 'Delaware' grape

Reaction conditions and measuring methods are the same as given in Fig. 2.

Table 2 Influence of polyphenol extracts on the enzymatic browning

Acetone soluble fractions	Degree of influence				
	Peach*	Apple*	Pear*	Plum*	Grape*
Peach (Hakuho)	—	—	—	—	—(—)
Apple (Tsugaru)	—	—	—	—	—(—)
Pear (Kosui)	—	—	—	—	+
Plum (Sordum)	++	++	—	—	—
Grape (Delaware)	+++	++	—(+)	—	+++

* Acetone powder from various fruits

+ (25~50%), ++ (50~100%), +++ (100%~); Degree of inhibition —; Non inhibition, — (25%~); Acceleration of the browning Symbols in parentheses show the degree of the inhibition and acceleration at the end of the reaction.

調製し、各 PPO に抽出液を反応させた。その結果、ブドウの抽出液は各 PPO の活性を顕著に抑制し、モモの抽出液はよく酸化された。スモモはその中間であった。

これらの果実にナシ‘幸水’、リンゴ‘つがる’を加えて PPO と抽出液を調製し、基質特異性の高いクロロゲン酸を添加して抽出液のクロロゲン酸の酸化に与える影響を調べた。ブドウの抽出液はモモ、リンゴ及びブドウの PPO を顕著に阻害した。スモモの抽出液はモモとリンゴの PPO を阻害したが、ナシ、スモモ及びブドウの PPO には促進効果を示した。モモとリンゴの抽出液には PPO の促進効果が大きかった。

文 献

- 1) VAMOS-VIGYAZO, L., MIHALYI, K., GAJZAGO I., and NADVARI-MARKUS N.: *Acta Alimentaria*, **6** (4), 379 (1977).
- 2) 中林敏郎：日食工誌, **10**, 530 (1977).
- 3) 伊福 靖：食品と科学, **31** (2), 81 (1989).
- 4) SAPERS G.M. and DOUGLAS JR. F.M.: *J. Food Sci.*, **52**, 1258 (1987).
- 5) SAPERS G.M. and ZIOLKOWSKI, M.A.: *J. Food Sci.*, **52**, 1732 (1987).
- 6) SAYAVEDRA-SOTO L.A. and MONTGOMERY: *J. Food Sci.*, **51**, 1531 (1986).
- 7) 天野義文・久保田正俊・加賀美元男：醗酵工学, **57**, 92 (1979).
- 8) SAPERS G.M., HICKS K.B., PHILIPS J.G., GARZARELLA L., PONDISH D.L., MATULAITIS R.M., MCCORMACK, J., SONDEY S.M., SEIB P.A. and EI-ATWY Y.S.: *J. Food Sci.*, **54**, 997 (1989).
- 9) SAPERS G.M., EI-ATWY Y.S., HICKS K.B. and GARZARELLA L.: *J. Food Sci.*, **54**, 1096 (1989).
- 10) HSU A.F., SHIEH J.J., BILLS D.D. and WHITE K.: *J. Food Sci.*, **53**, 755 (1988).
- 11) 小宮山美弘・原川 守・辻 政雄：日食工誌, **26**, 325 (1979).
- 12) KOMIYAMA, Y., HAKAWA M. and TSUJI M.: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 937 (1980).
- 13) 中林敏郎・鶴飼暢雄：日食工誌, **10**, 211 (1963).
- 14) CHUNG J.I. and LUH B.S.: *Confructa*, **17**, 8 (1972).
- 15) SCIANCALEPORE V.: *J. Food Sci.*, **50**, 1194 (1985).
- 16) 中林敏郎：日食工誌, **15**, 73 (1968).
- 17) VALERO E., VARON R. and GARCIA-CARMONA: *J. Food Sci.*, **53**, 1482 (1988).
- 18) RADLER F. and TOROKFALVY E.: *Z. Lebensmittel U.*, **152**, 38 (1973).

(平成2年7月11日受理)