
 新 研 究

食品の褐変に関する研究

丸 山 悦 子*

緒 言

野菜や果実類は調理や貯蔵の際に褐変現象がおこり、外観を損うばかりでなく、栄養価の低下をもたらすことが知られている。ことにつくねいもを生のまますりおろしたり、春菊などを繊切りにして調理する場合や、りんご・バナナなどを剥皮すると、その部分が次第に褐変し、食味も劣ることは日常経験するところである。

このような生鮮食品の褐変現象については、古くから多くの観察・研究が行われており、とくに、甘藷、ばれいしょ、茶葉など農産加工の分野での研究には見るべきものが多く、褐変成分も分離され、変色を防止する方法が実用化されているものも多い。

しかし、褐変変色の原因となるポリフェノール類は一般に不安定で、容易に酸化重合しやすく、個々に単離することが困難であるため、未だこの現象については全貌が明らかになったとはいいがたく、褐変防止剤の作用機作についても不明の点が多い。

著者らは褐変反応を酵素の面から究明するために、変色の速やかな数種の野菜・果実について、ポリフェノール成分を検索した¹⁾上で、各種褐変防止剤の作用機作について推論した²⁾。さらに、褐変過程の吸収・反射スペクトル、褐変反応の中間生成物の検索を通じて各フェノール成分がどの程度褐変に関与しているかを推論し³⁾、褐変反応において酵素作用が果たす役割について考察を加えた。これらを中心に著者らの実験、検討したものをまとめて報告する。

試料および実験方法

1. 試 料

* 奈良女子大学

市販のつくねいも(京都大山産)、中葉春菊(奈良県産)、りんご(長野県産、スターキング)のいずれも可食部を用いた。

2. フェノール成分の検索

東野⁴⁾の方法により温アルコール抽出後減圧濃縮し、そのままおよびイオン交換樹脂を用いて分画後、東洋ろ紙No.50を用い、ペーパークロマトグラフィーを行った。展開溶媒はn-ブタノール：酢酸：水=4:1:2を用い、検出には紫外線照射、パラニトロアニリン試薬、フェリシアンカリ-鉄ミョウバン試薬を使用した。

3. 酵素液の調製

つくねいも、りんごについては剥皮後、常法によりアセトンパウダーを調整し、このアセトンパウダーを各至適pHの0.2M McIlvaine 緩衝液に懸濁、60分室温にて攪拌抽出後、10,000×g、10分間遠心分離した上清を粗酵素液とした。春菊については粗酵素液を熱処理(60°C、1分間)後、65%飽和になるように硫酸を加え、遠心分離した沈渣をpH6.0のMcIlvaine 緩衝液にて溶解し、セファデックスG-200によるゲル濾過法により得られた活性のある画分を集め、これをDEAEセルロースカラム(2.5×40cm)にかけ、0.005M McIlvaine 緩衝液(pH6.0)を用い、0~0.5M食塩でグラジエント法により溶出した。活性ピークⅡ、ⅢについてはDEAEセルロースカラムを用い、同様の条件にて再クロマトグラフィーを行った。

4. 酵素活性の測定

1) ワールブルグ検圧法：容器の主室には0.2M McIlvaine 緩衝液(pH6.5)1ml、基質(終濃度 5×10^{-3} M)1ml、副室には2% KOH、側室には酵素液0.5mlを入れ、30°C、1分間振盪した後、反応を開始させ、一定時間毎の酸素吸収量を測定した。

食品の褐変に関する研究

2) 比色法: Fox と Burnett⁵⁾ の方法に準じ 400nm における反応初速度を測定した。

3) **Chronometric 法**: M. A. EL-Bayoumi の方法⁶⁾ に準じ, 0.2M McIlvaine 緩衝液 (pH6.5), EDTA (10^{-5} M), アスコルビン酸 (4.2×10^{-5} M), ドーパミン (5×10^{-4} M), 酵素を加えて全量を 3.0ml とし, 25°C における反応液の 265nm における吸光度の減少を日立自記記録計により記録した。吸光度の変化が 0.02~0.20/分の範囲で酵素濃度に比例した。

5. 反射ならびに吸収スペクトルの測定

反射スペクトルの測定には, つくねいもを 3×3cm, 厚さ 0.8cm に切った切片をサララップで表面を覆い試料とした。吸収スペクトルの測定には, つくねいも水抽出液, すなわち, つくねいも 10g をすりおろしたのち, 20ml の水を加えて攪拌, 遠心分離した上清を用いた。モデル実験反応系としては, 酵素液に各基質 (つくねいもの酵素には 3×10^{-4} M, 春菊の酵素には 1.25×10^{-5} M) を 1ml, 0.2M McIlvaine 緩衝液 (pH6.5) 1.5ml を加え, 全量を 3.0ml とし, 30°C で反応させ, 経時的にスペクトルを測定した。スペクトルの測定は, 日立自記分光光度計 EPS-3T 型を用い, 液層 1cm のセルで透明試料はそのまま, 半透明試料については透過光を積分球で集め, 可視部および紫外部において自記させた。走査時間は通常の透過光の場合は 1分, 積分球を用いた場合は 3分とした。

6. 中間物質の検索

Forsyth の方法⁷⁾ に準じ, 上記水抽出液またはモデル反応系をインキュベートし, 適宜塩酸で反応を止めたのち, 酢酸エチルを加えた上層を用いてペーパークロマトグラフィーし, 二次展開を行った。

展開には, (1)中林らの方法, (2) Forsyth らの方法⁷⁾ を多少変更して, 一次元には 2% 酢酸, 二次元にはベンゼン: 酢酸: 水 = 2: 4: 1 の上層を用いた。

実験結果および考察

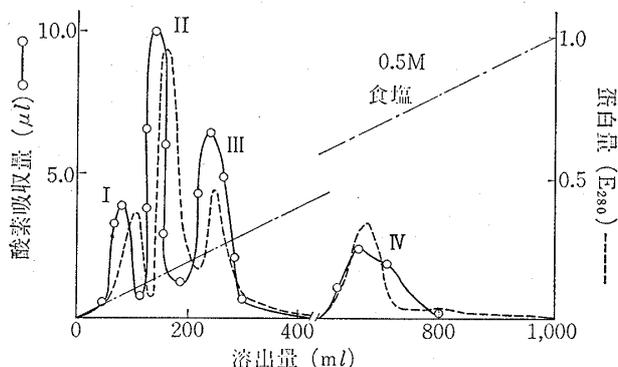
1. フェノール成分の検索

食品の褐変に関与するポリフェノール類は, 植物の種類が異なればその性質も異なり, また, 同一植物の同一部位においても種々の異なったポリフェノールが多数混在することが明らかにされている。本実験に用いたつくねいも, 春菊, りんごの褐変に関与する物質がどのようなものであるかを知るため, 各々の試料についてフェノール成分をペーパークロマトグラフィーにより検索した結果, つくねいもには, D-カテキン, ピロカテコールなどのカテキン類, ドーパミン, ドーパ, チロシンおよびフラ

バノール型タンニンが検出された。また, 春菊にはクロロゲン酸, カテキン類, カフェイン酸, りんごにはカテキン類およびクロロゲン酸の存在が認められた。量的にみると, つくねいもにはピロカテコールを主体とするカテキン類が, 春菊にはクロロゲン酸が多いことが明らかであった。

2. ポリフェノール酸化酵素の一般的性質

ポリフェノール酸化酵素は植物界に広く分布しており, 植物の呼吸に重要な役割を果していると考えられているが, ‘切る’ ‘する’ ‘おろす’, などの調理操作により細胞破壊を生じると, ポリフェノールとその酸化酵素が容易に接触して, ポリフェノールが酸化され着色物質を生成する。本酵素について, つくねいも, りんごの粗酵素および春菊から分離した精製酵素を用いて酵素的性質を調べた。とくに断らないかぎり, つくねいも, りんごの酵素にはカテコールを, 春菊の酵素にはクロロゲン酸を基質として, ワールブルグ検圧法により測定した。第1図, 第1表に春菊から本酵素の精製過程を示した。春菊は野菜類の中では, ポリフェノール酸化酵素活性が著しく高いため, 580~830倍に精製され, 収量は約21%であった。また本酵素はクロマトグラフィー的に4つの酵素に分離され, 溶出されやすい順に I, II, III, IV とすると, 各々電気泳動パターンに差が認められ, かつ単一なバンドを示した²⁾。

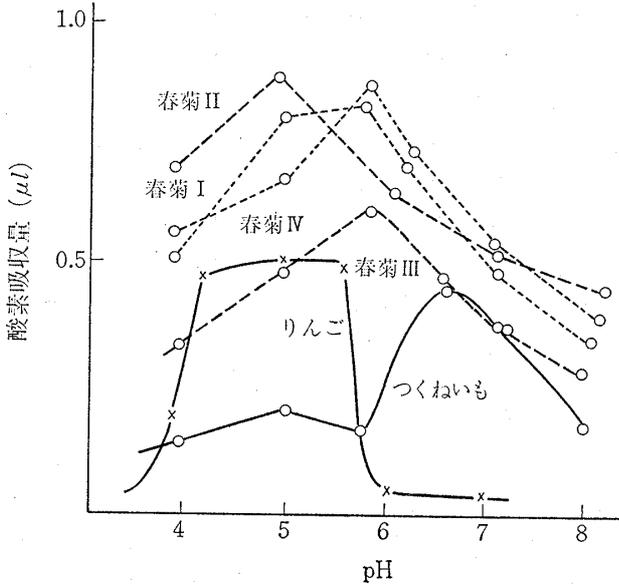


第1図 ポリフェノール酸化酵素のDEAEセルロースカラムクロマトグラム

第1表 春菊ポリフェノール酸化酵素の精製

精製過程	容量 (ml)	酵素活性 $\mu\text{l}/\text{ml}/\text{min.}$	蛋白質 E_{280}/ml	比活性	収量
上清	382	2.92	265	0.011	100
熱処理 (60°C, 1min.)	310	3.06	159	0.019	85
0.65飽和硫酸沈澱画分	26	12.08	305	0.040	28
セファデックス	200	1.60	3.4	0.470	28
DEAEセルロース II	30	4.50	0.49	9.180	13
III	40	2.51	0.39	6.410	8

1) pH による活性の比較: 第2図にpH活性曲線を示した。つくねいもではpH6.6付近に主たるピークとpH5.0に低いピークがみられたことから、至適pHの異なる2種以上のポリフェノール酸化酵素の存在が推定される。りんごの酵素の至適pHは4.2~5.8であった。春菊の酵素IはpH5.0~6.0, IIはpH5.0付近に高い活性を示したが、IIIとIVはpH6.0付近に至適pHをもつよく似た曲線を示し、いずれもその食品自体のpHとほぼ一致していた。



第2図 ポリフェノール酸化酵素活性におよぼすpHの影響

2) 基質特異性: 第2表にみられるように、つくねいものポリフェノール酸化酵素はドーパミンの活性が著しく高いが、チロシンなどのモノフェノールには活性を示さない。春菊の酵素はIとII, IIIとIVの特異性が各々類似しているのので、IIとIIIについてみると、IIはピロカテコール、D-カテキン、IIIはクロロゲン酸に高い活性を示し、前者はつくねいも、りんごなどの酵素と同様にモノフェノールおよびドーパミンに活性を示さないが、後者はカタコラーゼ、クレゾラーゼ活性をあわせもつ酵素であるといえよう。

3) 耐熱性: つくねいもはpH6.5, 春菊はpH6.0, リン

第2表 ワールブルグ法による基質特異性

基 質 ($5 \times 10^{-3} M$)	酸 素 吸 取 量 ($\mu l / 分$)			
	つくねいも	りんご	春 菊	
			II	III
クロロゲン酸	2.4	12.0	0.5	1.5
ドーパミン	22.2	2.0	0	0.5
ピロカテコール	12.0	7.0	1.2	0.8
D-カテキン	7.2	7.0	0.8	0.6
カフェイン酸	2.4	3.0	0.1	0.2
チロシン	0	0	0	0.6
クレゾール	0	0	0	0.8

ゴはpH5.0のMcIlvaine緩衝液中に各々粗酵素を50~90°Cの各温度で1分間加熱後、直ちに氷冷して残存活性を測定し、その結果を第3表に示した。つくねいも、りんごの酵素は熱に比較的安定であるが、春菊の酵素は70°Cで急速に失活した。また、つくねいもと春菊では耐熱性におよぼすpHの影響にも違いがみられ、春菊の酵素はpH5以下の酸性域では急速に失活したのに対し、つくねいもの酵素はpH間における有意の差はみられなかった。

第3表 酵素の耐熱性

(加熱時間) 1分	残 存 活 性		
	つくねいも	りんご	春 菊
対 照	100	100	100
50°C	85	100	82
60°C	73	100	78
70°C	58	78	17
80°C	22	20	6
90°C	0	0	0

4) 阻害剤の影響: 次にポリフェノール酸化酵素活性に対する各種化合物の影響について調べた結果を第4表に示した。いずれも、ジチオカルバミン酸、チオ尿素による阻害が大きく、一種の銅酵素であると考えられる。また、つくねいも、春菊の酵素は食塩に対する抵抗性が強いが、りんごの酵素は食塩の濃度に依存して活性が阻害され、褐変も防止されることから、りんごの褐変に対する食塩の効果は食塩によるポリフェノールオキシダーゼの阻害に基くものと思われる。グルタチオン、システインおよびアスコルビン酸によっては褐変が著しく抑制されるにもかかわらず、酵素活性の阻害は比較的少ない。

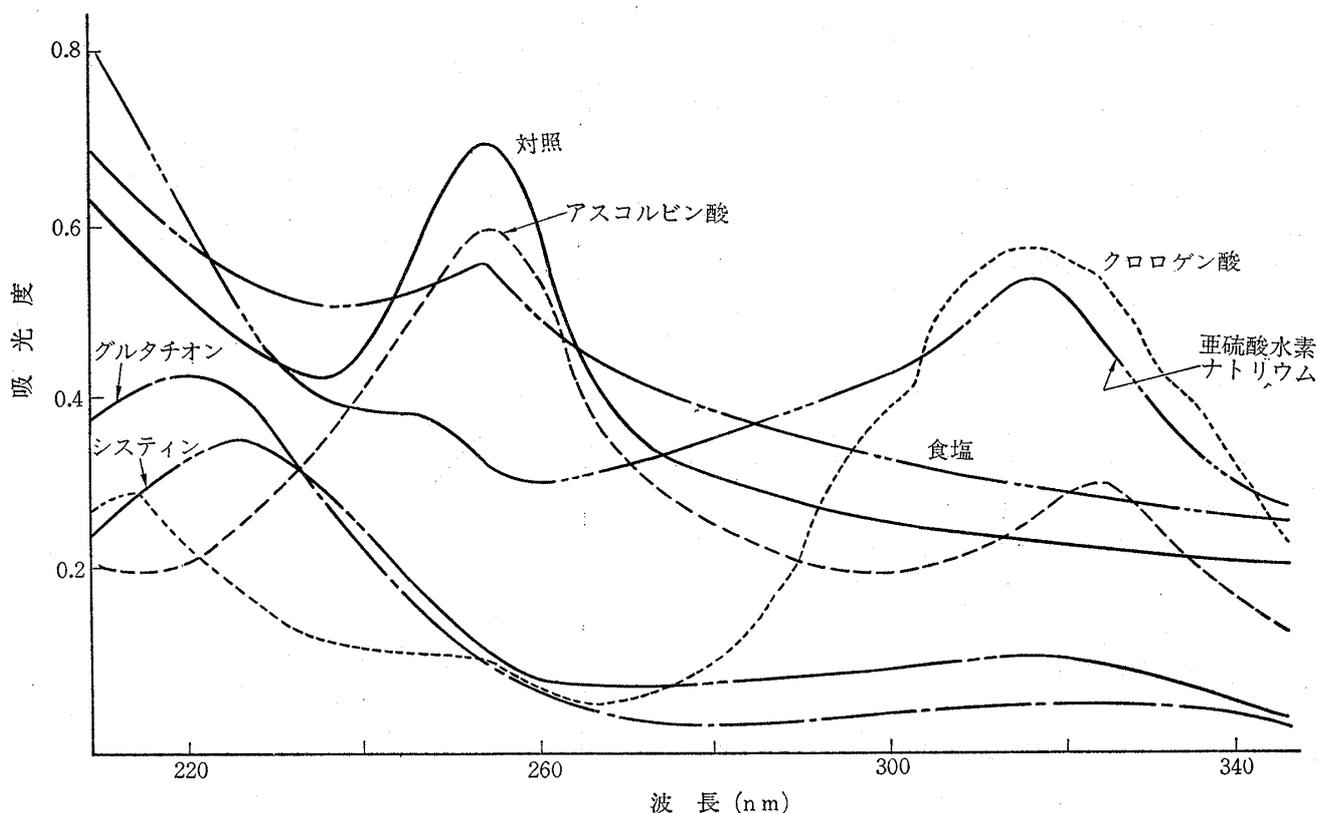
第4表 各種阻害剤の影響

阻 害 剤 (終濃度 $5 \times 10^{-3} M$)	相 対 活 性			
	つくねいも	りんご	春 菊	
			II	III
対 照	100	100	100	100
食 塩	100	72	84	93
" (1N)	100	20	78	86
グルタチオン	70	82	74	77
システイン	61	78	76	85
アスコルビン酸	100	80	80	78
チオ尿素	65	48	41	45
亜硫酸水素ナトリウム	28	6	37	35
ジチオカルバミン酸	9	22	28	17

3. 各種褐変阻害剤の作用機構について²⁾

春菊の精製酵素(II)を用いて、クロロゲン酸を基質とし、これらの阻害剤がどのような作用機構で酸化酵素を阻害し、褐変を防止するのかをペーパークロマトグラフ

食品の褐変に関する研究



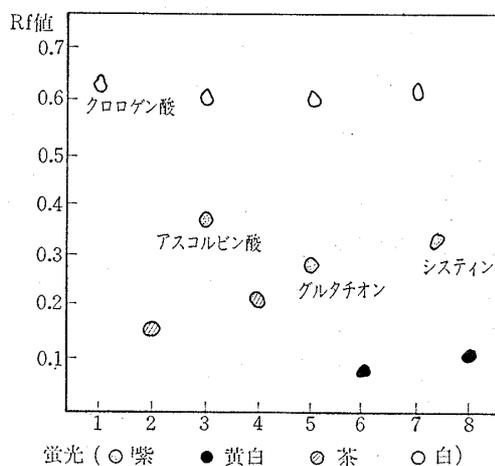
第3図 クロロゲン酸の酵素的酸化生成物の紫外外部吸収スペクトルにおよぼす各種阻害剤の影響

ィーおよび紫外吸収スペクトルにより検索した。

1) 紫外外部吸収スペクトルによる褐変反応中間生成物の検索:

酵素活性測定の場合と同じ反応系を用いて、そのまま褐変させた場合および阻害剤を加えて褐変を防止した場合のおのおのについて、経時的に紫外外部吸収スペクトルを測定した。第3図は反応20分経過後の吸収スペクトルをおのおの0分との差スペクトルで示したものである。アスコルビン酸を加えた系では褐変とともに、クロロゲン酸の減少がみられたが、システインやグルタチオンの場合はクロロゲン酸のピークが消失してシステインでは226nm, グルタチオンでは223nmに新しいピークの出現がみられた。これらのSH化合物は酵素により生成したキノンを単に還元するのではなく、これを何らかの形で除去することにより褐変を阻止するものと推定される。SH基をもたないアミノ酸であるグリシン, アラニンによっては褐変の阻害はみられなかった。食塩では253nm付近にピークを有する対照系に近い曲線を示した。亜硫酸水素ナトリウムではかなりのクロロゲン酸の残存がみられ、酵素作用を阻害したものと思われる。

2) システイン・グルタチオンによる反応中間生成物について: さらに上記阻害剤の作用機構を明らかにするため、ペーパークロマトグラフィにより反応生成物を検索した結果を第4図に示した。グルタチオン・シス



1. クロロゲン酸+熱失活酵素
2. " + 酵素
3. " + 熱失活酵素+L-アスコルビン酸
4. " + 酵素+L-アスコルビン酸
5. " + 熱失活酵素+グルタチオン
6. " + 酵素+グルタチオン
7. " + 熱失活酵素+システイン
8. " + 酵素+システイン

第4図 各種阻害剤の反応生成物のペーパークロマトグラム

テインを加えた系では、この条件下でクロロゲン酸は消失し、新しい黄白色の蛍光をもつスポットを生じた。これらの蛍光をもつ物質は塩化第二鉄反応、ニンヒドリン

反応陽性でSH 検出試薬にも反応し、かつこの時クロロゲン酸のスポットがみられないことより、システインあるいはグルタチオンとクロロゲン酸の複合体あるいはその中間体であろうと考えられる。これらのことはSH化合物が *in vitro* では酵素により生じたキノン以降の段階で褐変を防止していることを示唆している。アスコルビン酸では黄白色の蛍光をもつスポットはみられない。そこで、SH複合体と考えられる物質が第3図の吸収スペクトルにおいて出現した新しいピークを示す物質であるかどうかを確認するため、蛍光をもつスポットの部分をエチルアルコールで抽出し、紫外部における吸収スペクトルを測定した結果、グルタチオン系の Rf 0.09の部分は 223nm、システイン系の Rf 0.12 の部分は 226nm にピークを有することが観察され、これらの物質はSH-クロロゲン酸複合体を形成することによって、褐変防止作用を示すものと推定された。

4. 酵素的褐変機構

先に検出されたフェノール成分が各々の褐変の原因物質となりうるかどうかを推定するために、ペーパークロマトグラフィーにより展開後、各酵素液を噴霧し、30°Cにおいて呈色状態をみた結果、チロシンに着色がみられなかった以外はいずれのフェノール成分も着色し、酵素的褐変に関与しうることがわかったが、これらのうちのどのフェノール成分が個々の褐変において最も重要な役割を果たしているかを明らかにするには至らなかった。そこで、つくねいもを試料として褐変現象に伴うポリフェノール類の変化の過程を推定することにより、褐変に主として関与するフェノール成分について検討を加えた。

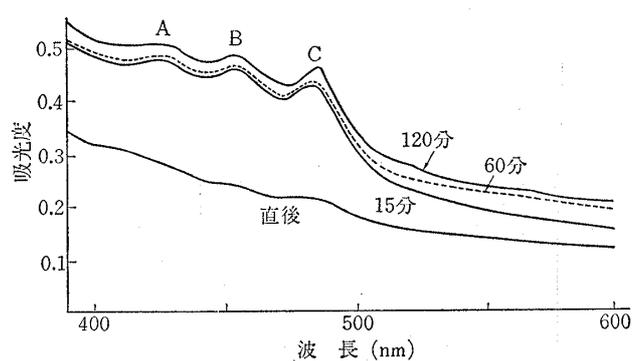
1) 褐変反応中間生成物³⁾ :

(i) つくねいもの反射ならびに吸収スペクトル

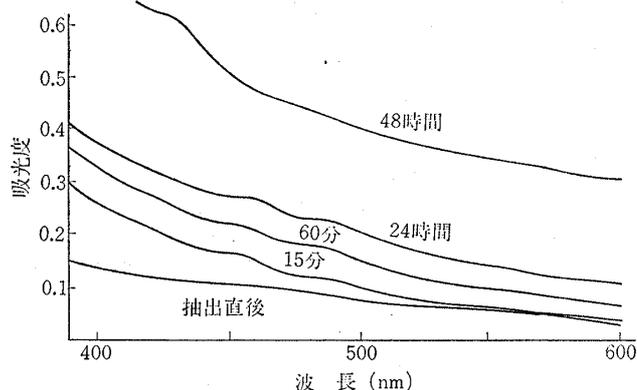
剥皮後ただちに調製したつくねいも切片的の反射スペクトルの経時変化を第5図に示した。15分後には3つの吸収極大(A, B, C)が観察され、その後120分までは大きな変化は認められないことから短時間で褐変の初期反応が完了することが推定される。また、つくねいもの水抽出液を調製し、吸収スペクトルを経時的に測定したところ、第6図にみられるように、濃度の差はあっても質的には切片におけるのと同様の変化を生じていると考えられる。抽出液をさらに長時間放置すると黄変し、可視部全域にわたって吸収レベルは上昇した。

(ii) モデル反応系における吸収スペクトル

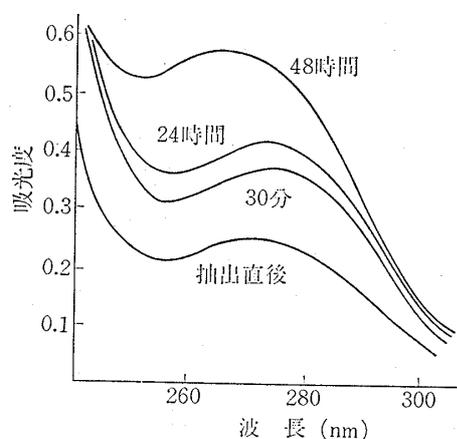
つくねいも中に存在することが確認されたドーパミン、ドーパ、ピロカテコールおよびカテキンにつくねいもの粗酵素液を作用させて褐変反応系をつくり、反応過程での吸収スペクトルの経時変化を測定し、つくねいも本来



第5図 つくねいも切片的の反射スペクトル



第6-1図 つくねいも抽出液の可視部吸収スペクトルの経時変化



第6-2図 つくねいも抽出液の紫外部吸収スペクトルの経時変化

のものと比較した。ドーパミンに酵素を作用させた場合は反応開始から5分にかけて、470nmに吸収極大をもつピークがみられ、このピークは漸次減少して最終的に黒味がかかった灰色の沈澱を生じた。紫外部では300nm付近に肩が現われ、時間とともに平滑化したスペクトルが観察された。ドーパを基質とした場合も可視部においてはドーパミンとよく似た傾向がみられた。ピロカテコールを基質とした場合は10分で黄色、30分で淡褐色、60分以降では褐色となったが、その吸収スペクトルは60分までは410nm付近にゆるい吸収極大が観察された。D-カ

第5表 ポリフェノール酸化酵素の V_{max}

測定法	酵素吸収量 $\mu\text{l}/\text{分}$	生成物 $\mu\text{mol.}/\text{分}$
ワールブルグ法 比色法 (470nm)	22.2	23.9
Chronometric法 (265nm)	186.0	16.6

酸化させた場合の吸収スペクトルの変化は Palmer の報告⁸⁾ とほぼ一致するので、本酵素によるドーパミンの酸化は Palmer の提案する反応式 (第10図) に従うと考えられる。したがって、実験方法の項に記載した3つの活性測定法により本酵素活性を測定することは妥当であると考えられるが、各測定値を直接比較できないので、各々 V_{max} を求め、単位酵素量あたりの V_{max} を算出した結果をまとめたものを第5表に示した。Chronometric法では第10図中Aの反応の初速度を、比色法ではA+Bの反応の初速度を、ワールブルグ法はそれ以後の段階を含んだ反応の速度を測定していることになる。第5表のように、chronometric法と比色法とで生成速度がほぼ近似することから、Bの反応は瞬間的に進行するものであり、少なくとも褐変の初期反応の律速段階はAの酵素反応であると考えられる。また、chronometric法により算出した酵素吸収速度とワールブルグ法による酵素吸収速度の実測値とがこのように大きく異なるのは、ワールブルグ法の場合にはBの反応以降の中間生成物が蓄積し、それによってAの反応が阻害されたために酵素吸収量が低下したことによると推論することができる。

以上、酵素的褐変について、その性質・機構を検討するとともに、褐変防止剤の作用機構についても検索したが、褐変物質が不安定で酸化重合しやすいため、褐変の初期の変化ならびに中間生成物を正確に測定することが困難であり、これを解決する技術的な進歩がまたれる。また、褐変防止法についても、栄養素の損失をもたらすことなく、個々の食品・調理に適した有効な方法を実用化していくことが今後の課題であろう。

要 約

1. つくねいも・春菊・りんごを用い、褐変成分、褐

変酵素の性質について検討した結果、ポリフェノール酸化酵素の至適pHは試料により差異がみられ、つくねいもはpH6.6、りんごはpH4.0~5.8であった。春菊には本酵素が少なくとも4種類存在し、このうち2種はpH5.0付近で *o*-ジフェノールに特異的であり、他は至適pH6.0でチロシンにも活性を示した。つくねいも、春菊の酵素は食塩に対し抵抗性がみられたが、りんごの酵素は食塩により阻害された。いずれもジチオカルバミン酸、チオ尿素により阻害され一種の銅酵素と考えられる。

2. 春菊の精製酵素を用いて、各種阻害剤の作用機構について検索した結果、グルタチオン、システインによる褐変の阻害はアスコルビン酸と異なり、基質であるクロロゲン酸と黄白色の蛍光をもつ複合体を形成することによると推定された。

3. 褐変機構について検討し、キノンまでの反応に酵素が関与すること、2,3-デハイドロインドール-5,6キノンからメラニンへ至る反応生成物によって、酵素が阻害されることが示唆された。

おわりに、本稿の御校閲を賜りました、元本学長谷川千鶴教授、ならびに本実験に御協力下さいました方々に心から感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 山本喜男・丸山悦子・西口香里・藤田美栄子・遠藤金次：家政誌 24, 16 (1973)
- 2) 丸山悦子・藤田美栄子・梶田武俊：家政誌 26, 346 (1975)
- 3) 丸山悦子・西口香里・藤田美栄子・遠藤金次・山本喜男：家政誌 24, 9 (1973)
- 4) 東野哲三：砂丘研究所報告 6, 181 (1967)
- 5) Fox, A. S.・Burnett, J. B. : Exptl. Biol. Med. 98, 110 (1958)
- 6) EL-Bayoumi, M. A.・E, Frieden : J. Am. Chem. Soc. 79, 4854 (1957)
- 7) Forsyth, W. G. C.・Harley-Mason, V. C. ; Biochim. Biophys. Acta 25, 155 (1957)
- 8) Palmer, J. K. ; Plant Physiol. 38, 508 (1963)