

リンゴ果汁の褐変およびDPPHラジカル消去活性に対する 柑橘系果実果汁添加の影響

Effect of Citrus Juice Addition for Enzymatic Browning and DPPH Radical Scavenging Activity of Apple Juice

藪田 邦博 玉田 葉月 浅野 (白崎) 友美 橋本 沙幸

Kunihiro SONODA Hazuki TAMADA Tomomi ASANO (SHIRASAKI) Sayuki HASHIMOTO

1. はじめに

過食, 喫煙, 運動, 虚血再灌流, 放射線などによる生体内での活性酸素の増加は, がん, 心・脳血管疾患, 糖尿病, 喘息, 腎疾患, 肝疾患などの発症や病態の進展に関わることが知られている¹⁾。この活性酸素を消去する食品成分にポリフェノールがある。ポリフェノールは, ベンゼン環に2個以上の水酸基(-OH)を含む有機化合物の総称であり, 多くのポリフェノール化合物は抗酸化作用を有することが知られている²⁾。疫学調査においてもポリフェノールの摂取が, がん, 高血圧, 脳血管疾患, 心疾患, 糖尿病, 感染症, 老化, 喘息に効果があることが示されている³⁻⁵⁾。

ポリフェノールは, 調理や加工段階で野菜や果物の組織内に含まれているポリフェノール酸化酵素(PPO)と反応することにより褐色の物質に変化し, 食品を褐変させる。この食品の褐変は見た目を損なうだけでなくポリフェノールの減少, それに伴う抗酸化作用の低下が起こる⁶⁾。PPOにより褐変を生じる代表的な果実にはリンゴがあり, ポリフェノール

のクロロゲン酸やカテキンが関与している^{7,8)}。これらのポリフェノールは細胞の液胞に存在し, PPOは細胞のプラスチドに局在しているため通常は反応せず褐変しない⁹⁾。しかし, 調理や加工した際に細胞が破壊されるとプラスチドに存在するPPOとポリフェノールが反応することで褐変を生じる。従って, リンゴもカットしたものより細胞が壊れるジュースで褐変の影響が現れやすい。

最近では, スロージューサーなど様々なタイプのジューサーが販売されており, 一般家庭においても果実ジュースや野菜ジュースを飲む機会が増えている。リンゴは, ジュースを作る際に広く汎用されていることからリンゴジュースの褐変や抗酸化作用の低下を抑制することは栄養学的にも重要である。この褐変を防止する方法には, 食品の加熱, 還元剤の添加(アスコルビン酸, 亜硫酸塩など), 食塩の添加, pHの調節などがある²⁾。一般家庭でもカットした果実や野菜の褐変防止として食塩水への浸漬が行われているが, ジュースへの食塩添加は塩分摂取の増加となり好ましくない。また, リンゴの切断面の褐変防止に関して乳清たんぱく質¹⁰⁾やタマネギ搾汁の添加¹¹⁾の有効性については報告されてい

金城学院大学生活環境学部食環境栄養学科
Department of Food and Nutritional Environment, College
of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University

るが他の食材の効果について詳細を検討した学術的な報告は少ない。

そこで、本実験では一般家庭でも入手が容易である柑橘系果実のレモンとグレープフルーツ (GF) 果汁添加によるリンゴ果汁の褐変とDPPHラジカル消去活性に対する影響を検討したので報告する。

2. 方法

1) 試料溶液の調製

リンゴ (青森県産・ジョナゴールド) と柑橘系果実としてレモン (アメリカ産) とGF (アメリカ産) をスーパーマーケットにて購入した。リンゴを試験前に水道水で洗浄し、水分を拭き取って切断した後、おろし器で擦りおろした。このとき試料はピューレ状であったので、リンゴ重量と等倍容の蒸留水を加えて混和し、残渣を除去するために水切りネットで濾し、50%リンゴ果汁溶液を作成した。レモンとGFは、压榨により柑橘系果実果汁を採取した後、50%リンゴ果汁20 mLに対して5 mL添加し、試料溶液 (各果汁濃度: リンゴ果汁40%, 柑橘系果実果汁20%) とし、20%レモン果汁および20% GF果汁となるよう蒸留水で希釈したものをリンゴ果汁の影響を除いた比較対照として用いた。以降はリンゴ果汁試料: AP, リンゴ果汁+レモン果汁試料: LM/AP, リンゴ果汁+GF果汁試料: GF/AP, 20%レモン果汁試料: 20% LM, 20% GF果汁試料: 20% GFと表記する。

試料作成直後に以下の6) と7) の測定を行った。さらに以下に示す2) - 5) および8) については0, 10, 30, 60分経過ごとに試料溶液を採取し測定を行った。

2) 色調変化の記録

デジタルカメラDMC-FH10 (パナソニック) を用いて色調の変化を記録した。

3) 分光色差計による色調の測定

分光色差計X-Rite RM200QC (エックスライト株式会社) を用いて各試料溶液の経時的な色の変化を測定し、 ΔE 値 (色差) として示した。また、基準色は試料溶液に充分量のアスコルビン酸を添加することで酸化反応による褐変を阻害したものをを用いた。各試料の0分時点の ΔE 値を0として10, 30, 60分の ΔE 値を算出した。

4) ポリフェノール量の測定

各試験溶液に50%メタノール溶液を等倍容添加し、不溶物を除去するために遠心分離 (10,000 rpm, 室温, 1分間) を行った。フォーリン・チオカルト法¹²⁾ に準じ、前述の溶液500 μ Lにフェノール試薬200 μ L, 飽和炭酸ナトリウム溶液500 μ Lおよび蒸留水4.3 mLを加えて混和し、室温で1時間放置後、765 nmにおける吸光度を測定した。フェノール試薬を加えないものをblankとし、吸光度を測定してデータの補正を行った。これとは別に、没食子酸を標準物質として検量線を作成し、これに基づいてポリフェノール量 (没食子酸相当量) を算出した。さらに、初期の値を100%としてポリフェノール量の変化率 (%) を算出した。

5) DPPHラジカル消去活性の測定

各試験溶液に50%メタノール溶液を等倍容添加し、不溶物を除去するために遠心分離 (10,000 rpm, 室温, 1分間) を行った。Kimらの方法¹³⁾ に準じ、前述の溶液200 μ Lに80%エタノールで溶解した0.1 mM DPPH溶液800 μ Lを加えて混和し、暗所で10分間放置後、517 nmにおける吸光度 (S) を測定した。0.1 mM DPPH溶液を蒸留水に置き換えたものをblank (B) とし、吸光度を測定してデータの補正を行った。また、蒸留水を対照とし

て用いた (C)。以下に示す式を用いてDPPHラジカル消去活性 (%) を算出した。さらに、初期の値を100%としてDPPHラジカル消去活性の変化率 (%) を算出した。

$$DPPHラジカル消去活性 (\%) = \frac{\{Cの吸光度 - (Sの吸光度 - Bの吸光度)\}}{Cの吸光度} \times 100$$

6) 物理化学的特性

試料溶液のBrix値 (%) をデジタル屈折計PR-100 (アタゴ株式会社) を用いて測定した。ナトリウム量 (%) をデジタル塩分計PAL-ES (アタゴ株式会社) を用いて測定した。pHは、pHメーター F-21 (HORIBA) を用いて測定した。

7) 有機酸量 (酸度) の測定

各試料を作成後、測定のためにAPは蒸留水で5倍希釈し、その他の試料は10倍希釈した。それぞれの試料10 mLにフェノールフタレインを加え0.1 Mの水酸化ナトリウムで中和滴定した¹⁴⁻¹⁶⁾。有機酸量 (酸度) は、リンゴ酸、またはクエン酸として算出し、希釈倍率を補正した。

8) 還元型ビタミンC (アスコルビン酸) の測定

還元型ビタミンC (以下、アスコルビン酸) は、抗酸化作用に影響を与えるが酸化型のビタミンCはラジカル消去活性に影響しないことから本実験では、アスコルビン酸のみをインドフェノール法 (中和滴定) で測定した^{15, 16)}。各試料溶液を調製した後、試料溶液を採取して5%メタリン酸で2倍に希釈し、5 mLのインドフェノール溶液を中和するのに必要な試料溶液の量からアスコルビン酸量を算出した。なお、本実験では滴定における試料溶液の量が10 mLを超えたものは測定

限界 (0.765 mg/100 mL) 未満とした。なお、統計処理を行う際は0.765 mg/100 mLの半分 (0.383 mg/100 mL) を用いた。さらに、初期の値を100%としてアスコルビン酸の変化率 (%) を算出した。

9) 統計処理

数値データはすべて平均±標準偏差で示し、有意差の検定はTukey-Kramer testを用いた。相関関係はPearsonの相関係数検定を用いた。これらの解析にはStatMate Vソフトウェアを用いた。 $p < 0.05$ を統計学的に有意と評価した。

3. 結果

1) 柑橘系果実果汁添加による褐変に対する影響

AP, LM/AP, およびGF/APの経時的な褐変の様子を図1および図2に示した。APでは測定開始10分後から、GF/APでは開始30分から視覚的な褐変の進行が確認された。一方、LM/APでは開始から60分後まで視覚的な変化は確認されなかった。

この褐変を客観的に評価するため色差計を用いて ΔE 値を測定した。APの ΔE 値は、測定開始10分後から上昇し始め、LM/APとGF/APに比べ有意な上昇が認められた。LM/APでは0分時点から60分後まで ΔE 値の変化は認められなかった。

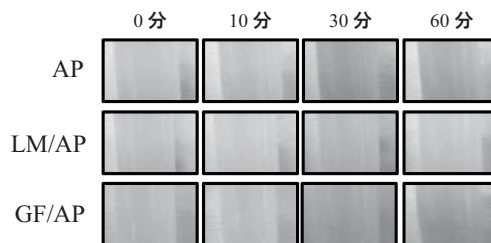


図1) 各試料溶液の褐変の経時変化

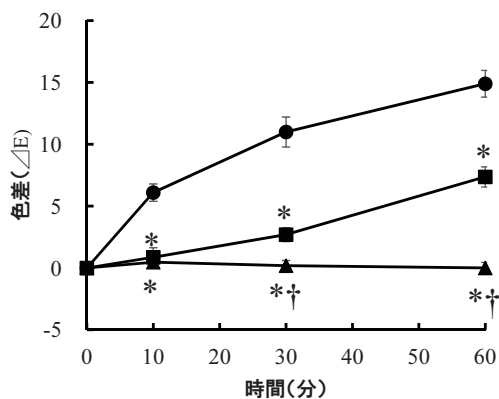


図2) リンゴ果汁への柑橘系果実果汁添加による褐変抑制効果
 (●) AP, (▲) LM/AP, (■) GF/AP
 (各群 n=3), * $p < 0.05$ vs. AP, † $p < 0.05$ vs. GF/AP

2) 柑橘系果実果汁添加によるポリフェノール量に対する影響

AP, LM/AP, およびGF/APの経時的なポリフェノール量の変化率(%)を図3に示した。0分時点の値を100%とすると, APおよびGF/APのポリフェノール量は測定開始60分後にそれぞれ67.5%と76.4%となった。一方, LM/APのポリフェノール量は60分経過後も0分時点と同等(3.5%の増加)の値を示し, APやGF/APと比較してポリフェノールの減

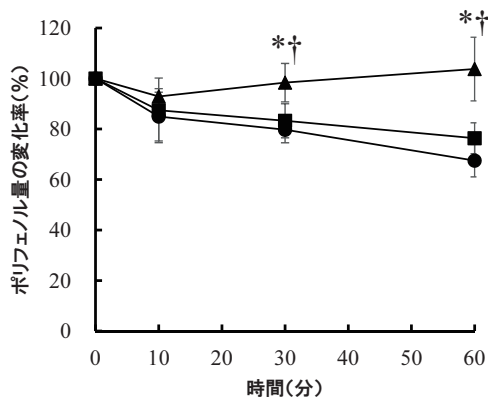


図3) リンゴ果汁への柑橘系果実果汁添加によるポリフェノール量に対する影響
 (●) AP, (▲) LM/AP, (■) GF/AP
 (各群 n=3), * $p < 0.05$ vs. AP, † $p < 0.05$ vs. GF/AP

少量が有意に少なかった。

3) 柑橘系果実果汁添加によるDPPHラジカル消去活性に対する影響

AP, LM/AP, およびGF/APの経時的なDPPHラジカル消去活性の変化率(%)を図4に示した。0分時点の値を100%とすると, APとGF/APのDPPHラジカル消去活性は, 測定開始60分経過後にそれぞれ56.2%, 60.4%の活性となり0分時点から約40%の活性低下が認められた。一方, LM/APでは60分経過後においても88.1%の活性を示し, APやGF/APの様なDPPHラジカル消去活性の大幅な低下は認められなかった。

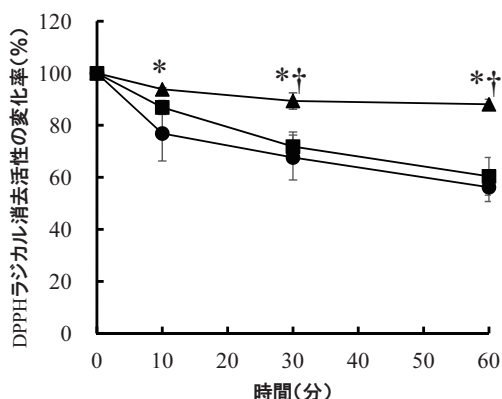


図4) リンゴ果汁への柑橘系果実果汁添加によるDPPHラジカル消去活性に対する影響
 (●) AP, (▲) LM/AP, (■) GF/AP
 (各群 n=3), * $p < 0.05$ vs. AP, † $p < 0.05$ vs. GF/AP

4) ポリフェノール量, DPPHラジカル消去活性, 色差(ΔE値)の相関

APのポリフェノール量, DPPHラジカル消去活性, ΔE値の値を用い, それぞれの関係を図5に示した。ΔE値とポリフェノール量の相関係数は-0.8114(図5A), ポリフェノール量とDPPHラジカル消去活性の相関係数は0.9359(図5B), ΔE値とDPPHラジカル消去活性の相関係数は-0.7683(図5C)であり,

それぞれに相関関係が認められた。

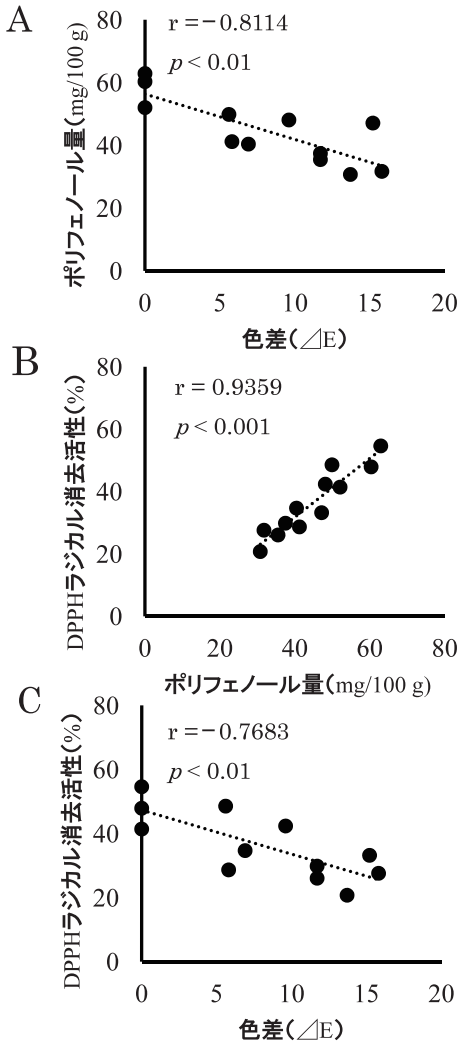


図5) リンゴ果汁の褐変 (色差), ポリフェノール量, DPPHラジカル消去活性との関係

5) 柑橘系果実果汁添加によるBrix値, ナトリウム量, pH, 有機酸量に対する影響

各試料溶液のBrix値 (%), ナトリウム量 (%), pH, 有機酸量 (%) を表1に示した。LM/APおよびGF/APのBrix値とナトリウム量は, APに比べ有意に高かった。pHに関してはAPとGF/APの間に有意な差は認められなかったが, LM/APでは, APとGF/APの両者より有意に低値を示した。GF/APの有機酸量は, APに比べ有意に高かった。さらに, LM/APの有機酸量はAPとGF/APより有意に高かった。また, APを加えていない20% LMと20% GFを比較すると20% LMでBrix値以外のナトリウム量, 有機酸量, pHで有意な差が認められた。

6) 柑橘系果実果汁添加によるアスコルビン酸量に対する影響

LM/AP, GF/AP, および20% LM, 20% GFの経時的なアスコルビン酸量の変化率 (%) を図6に示した。GF/APのアスコルビン酸量は時間の経過とともに急激に低下し, 測定開始30分時点で変化率0% (測定限界の0.765 mg/mL未満) まで減少したのに対し, LM/APのアスコルビン酸量は, 60分間ほとんど変化しなかった。20% LMと20% GFにおいてもアスコルビン酸量は60分間変動しなかった。

表1) 各試料溶液の物理化学的特性

	Brix (%)	ナトリウム (%)	pH	有機酸量 (%)
AP	4.30 ± 0.26	0.06 ± 0.01	3.94 ± 0.14	0.15 ± 0.03
LM/AP	5.47 ± 0.55 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	2.84 ± 0.08 ^{ab}	1.36 ± 0.06 ^{ab}
GF/AP	5.73 ± 0.55 ^a	0.08 ± 0.01 ^a	3.73 ± 0.05 ^c	0.32 ± 0.02 ^{ac}
	Brix (%)	ナトリウム (%)	pH	有機酸量 (%)
20% LM	1.53 ± 0.06	0.11 ± 0.01 ^d	2.38 ± 0.05 ^d	1.29 ± 0.26 ^d
20% GF	1.63 ± 0.12	0.06 ± 0.01	3.25 ± 0.12	0.24 ± 0.03

(各群 n = 3), ^ap < 0.05 v.s. AP, ^bp < 0.05 v.s. GF/AP, ^cp < 0.05 v.s. LM/AP, ^dp < 0.05 v.s. 20% GF

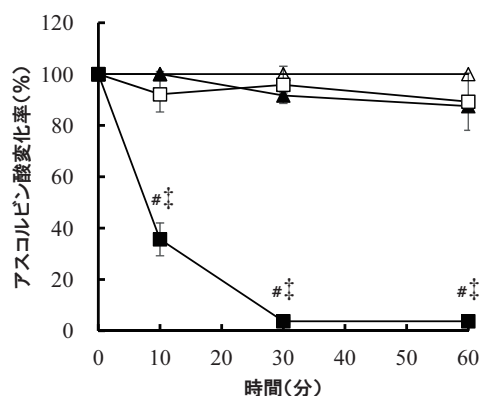


図6) リンゴ果汁への柑橘系果実果汁添加によるアスコルビン酸量に対する影響
 (△) 20% LM, (▲) LM/AP,
 (□) 20% GF, (■) GF/AP
 (各群 n = 3), # $p < 0.05$ v.s. LM/AP,
 ‡ $p < 0.05$ v.s. 20% GF

考察

リンゴは、一般家庭においても様々な調理形態で利用されている食材の一つであるが調理・加工段階で褐変を生じやすく、褐変の進行は抗酸化作用を低下させるため好ましくない。リンゴの褐変の差は、PPO活性の強弱、および基質量の差異に加えて、酸度、pHおよびアスコルビン酸含量の差異によって定まることが推察されている¹⁷⁾。本研究では、これらの項目に着目し、リンゴ果汁へのレモンおよびGF果汁の添加による褐変、および抗酸化作用に対する影響を検討した。

リンゴの褐変は、細胞破壊により活性化されたPPOとポリフェノールが反応し、ポリフェノール類が重合することにより引き起こされる。そのため、褐変の進行によりポリフェノールの減少が起こる。本研究においてもAPは、測定開始直後から急速に褐変が進行し、ポリフェノール量の減少と抗酸化作用の低下が認められた。Murataら¹⁸⁾は、ポリフェノール量と褐変度に相関があること、濱渦ら¹⁹⁾はポリフェノール量と抗酸化活性に

関係があることを報告しており、我々の結果と一致していた。一般的にリンゴの褐変抑制方法として、カットした物に対しては食塩水やレモン果汁に浸漬する方法が用いられ、ジュースでは抗酸化物質であるアスコルビン酸の添加などが行われている。本実験においてもリンゴ果汁にレモン果汁を添加したLM/APでは測定60分後においても褐変を認めず、さらに経時的なポリフェノール量の減少や抗酸化作用の低下を認めなかった。また、レモンと同じ柑橘系果実のGF果汁の添加は、褐変の進展に一定の抑制効果を示したが、その効果はレモンに比べて弱いものであった。さらに、ポリフェノール量の減少や抗酸化作用の低下に対して抑制効果を示さないという結果から、同じ柑橘系の果実であってもリンゴ果汁の褐変や抗酸化作用に対する効果に違いがあることが明らかになった。

前述のように、褐変や抗酸化作用の低下には酸化酵素の一種であるPPOが関わる。このPPOの活性は有機酸の存在およびpHの低下により抑制されることが報告されている^{17,20)}。本実験においても、LM/APはGF/APに比べ約5倍の有機酸量を含むという結果が得られた。また、APはpH 3.94、GF/APはpH 3.73であったのに対し、LM/APはpH 2.84であった。Murataら²¹⁾は、リンゴの品種である“ふじ”のPPOの至適pHが4付近であり、pH 3ではPPOの活性が約60%に低下することを報告している。本実験の結果は、これと一致しており、レモン果汁添加によるリンゴ果汁の褐変、および抗酸化作用低下に対する抑制作用は、有機酸含量やpH低下によるPPO活性の抑制が関与していると考えられた。

さらに、レモンやGFには、褐変防止剤としても広く用いられているアスコルビン酸がそれぞれ50 mg/100 gと36 mg/100 g含まれている²³⁾ためアスコルビン酸の影響について

検討した。20% GFのアスコルビン酸量は経時的な減少を認めなかったのに対し、GF/APでは急速にアスコルビン酸量が減少した。このことから、リンゴ果汁にGF果汁を加えることは、GF由来のアスコルビン酸の酸化も促進することが明らかとなった。村上ら²²⁾は、リンゴにはアスコルビン酸を酸化するアスコルビナーゼがほとんど含まれないにも関わらず、褐変と共にアスコルビン酸が急激に低下することを報告している。従って、GF/APのアスコルビン酸の減少はAPに含まれるアスコルビナーゼ以外の酸化酵素 (PPOなど) が関わると考えられた。一方、興味深いことにLM/APではアスコルビン酸量の減少がほとんど見られなかった。これは、レモン果汁の添加によるpHの低下がアスコルビン酸自体を安定化したこと、又は (及び) PPOを含む酸化酵素類の活性を抑制したことに起因すると推察されるが、詳細は不明であり今後の研究課題としたい。

以上のことから、リンゴ果汁へのGF果汁の添加は褐変を一部抑制するが、抗酸化作用の低下に対する効果は示さないことが明らかとなった。一方、レモン果汁の添加は褐変防止に対する効果だけでなくアスコルビン酸の減少や抗酸化作用の低下を抑制することが明らかとなった。その作用は、レモン果汁の添加に伴う有機酸量の増加やpH低下によるPPOをはじめとする酸化酵素類の活性抑制が関わることが示唆された。

今後は、ジョナゴールドがリンゴの中でも褐変が起りにくく褐変速度が比較的遅い品種とされていることから、異なる品種を用いて検討を行うことが課題である。また、今回の実験で用いた最終濃度20%となるリンゴ果汁へのレモン果汁添加は酸味が強く現れる。このため20%以下のレモン果汁添加の効果を検討し、その嗜好性についても評価を行う必

要があると考えている。

結論

リンゴジュースへのレモン果汁またはGF果汁の添加は、両者ともに褐変の進行抑制に有効であるが、抗酸化作用や還元型ビタミンCの維持の面からはレモンがグレープフルーツに比べ優れた効果を発揮することが明らかになった。また、その作用には有機酸量やpHの変化が関与することが示唆された。

参考文献

- 1) 吉川敏一. 酸化ストレスVer.2 フリーラジカル医学生物学の最前線. 医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, 2006
- 2) 長澤治子. 食べ物と健康 食品学・食品機能学・食品加工学 第2版. 医歯薬出版株式会社, 2013, P122-123
- 3) Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2015, 3, 16(2), 3350-76
- 4) Graf BA, Milbury PE, Blumberg JB. Flavonols, flavanones, flavanones and human health: Epidemiological evidence. *J Med Food.* 2005, 8, 281-290
- 5) Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005, 81, 317-325
- 6) 濱渦康範, 上田裕子, 伴野潔. リンゴ 'つがる' 果実の抗酸化能と含有ポリフェノール成分の関係. *園学雑.* 1999, 68(3), 675-682
- 7) 中林敏郎. 食品加工におけるポリフェノール成分の制御. *日本食品工業学会誌.* 1977, 24, 10, 530-538
- 8) 村田容常. 酵素的褐変とその制御. *化学と生物.* 2007, 45(6), 403-410
- 9) 村田容常, 本間清一. ポリフェノールオキシダーゼと酵素的褐変制御 最近の研究の進歩と動向 (総説). *日本食品科学工学会誌.* 1998, 45(3), 177-185
- 10) Le Tien C, Vachon C, Mateescu MA, Lacroix M.

- Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. *J Food Sci.* 2001, 66(4), 512-516
- 11) 藤井裕士, 細田浩. 野菜・果物の褐変に対するタマネギ搾汁液の抑制効果. *日本食品保蔵科学会誌*, 2002, 28(3), 135-138
- 12) 倉田忠男. 新・食品分析法[Ⅱ]. 光琳, 2006
- 13) Kim MJ, Kim JI, Kang MJ, Kwon B, Jun JG, Choi JH, Kim MJ. Quality evaluation of fresh tomato juices prepared using high-speed centrifugal and low-speed masticating household juicers. *Food Sci. Biotechnol.* 2015, 24(1), 61-66
- 14) 日本農林規格 (JAS規格)
- 15) 菅原龍幸, 前川昭男. 新食品分析ハンドブック. 建帛社, 2000, 240
- 16) 青柳康夫, 有田政信. Nブックス実験シリーズ 食品学実験. 建帛社, 2014, 82-83
- 17) 宇野和明. 国内産及び北米産リンゴ果肉の酵素的褐変における速度論的研究. *愛知江南短期大学紀要*, 2006, 35, 1-12
- 18) Murata M, Noda I, Homma S. Enzymatic Browning of Apples on the Market: Relationship between Browning, Polyphenol Content, and Polyphenol Oxidase. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 1995, 42(10), 820-826.
- 19) 濱渦康範, 飯島悦子. リンゴの果肉抽出物のポリフェノール組成と抗酸化活性. *日本食品科学工学会誌*, 1999, 46(10), 645-651
- 20) Chaisakdanugull C, Theerakulkait C, Wrolstad R. E, Pineapple Juice and Its Fractions in Enzymatic Browning Inhibition of Banana [*Musa* (AAA Group) Gros Michel]. *J. Agric. Food Chem*, 2007, 55(10), 4252-4257
- 21) Murata M, Kurokami C, Homma S. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992, 56, 1705-1710
- 22) 村上美代子, 佐野洋子, 永江春江, ジュースと栄養(その1), 園田女子大論文集, 1975, 10, 9-15
- 23) 香川芳子, 日本標準食品成分表2015, 女子栄養大学出版部, 2015, 94-95, 106-107