

氷冷操作がリンゴ果汁の褐変およびラジカル消去活性に及ぼす影響

Effect of Ice-cold Processing for Enzymatic Browning and DPPH Radical Scavenging Activity of Apple Juice

玉田 葉月 浅野（白崎）友美 橋本 沙幸 藪田 邦博

Hazuki TAMADA Tomomi ASANO (SHIRASAKI) Sayuki HASHIMOTO Kunihiro SONODA

1. はじめに

これまでに、野菜や果物の摂取が癌¹⁾や循環器疾患^{2,3)}のリスクを下げる事が多く報告されている。これらの疾病の発症に関与する要因のひとつとして、活性酸素やフリーラジカルによる生体の酸化障害が挙げられるが、野菜や果物をはじめとする様々な食品にはその障害を抑制する抗酸化作用をもつ成分が含まれている⁴⁾。本邦においても、厚生労働省は国民に対し、野菜と果物の摂取量の増加を推奨しており、健康日本21⁵⁾では1日の野菜摂取量の平均値350g、および果物摂取量100g未満の者の割合を30%にすることを目標として掲げている。しかし、国民健康・栄養調査結果⁶⁾によると、野菜類摂取量の平均値はどの年齢階級においても350gに達しておらず、また、20-40歳代では100g以上の果物類を摂取していない。

本邦において、リンゴは一般的に広く流通している食品であり、プロシアニジン为主要成分としたポリフェノールを含む^{7,8)}。リンゴに含まれるポリフェノールに関しては、食後の脂質吸収抑制作用⁷⁾、抗酸化作用⁸⁾、血中LDL-コレステロール値低下作用^{9,10)}、内臓脂肪量低下作用¹¹⁾などの様々な生理機能を示

すことが明らかにされている。また、リンゴに含まれるポリフェノールの投与による副作用はなく、長期にわたって多量に摂取しても毒性を示さないことが報告されており、ヒトにとって有益な物質であると考えられる^{11,12)}。しかし、リンゴに限らず多くの食品にはポリフェノールオキシダーゼが存在し、ポリフェノール類を酸化してキノン様物質を生成し、それが重合することで褐色色素を生ずる¹³⁾。この酵素的褐変反応により生じる色調の変化は食品の外観を悪化させるだけでなく、栄養価値の低下も伴うため一般に好ましくないものとされており、食品の加工・流通の面でも問題視される¹⁴⁾。現在では、食塩等の阻害剤の添加によりポリフェノールオキシダーゼ活性が抑制されることが明らかにされており¹³⁾、また、一般に酵素にはそれぞれ至適pHおよび至適温度が存在しているため¹⁵⁾、それ以外の範囲では酵素活性が抑制されることが予想される。

本研究では、家庭においても提供できるすりおろしリンゴ果汁に含まれるポリフェノールとその抗酸化機能に関して、食塩の添加および低温条件における経時変化を明らかにすることを目的として分析を行った。

2. 方法

1) 試験溶液の調製

リング（青森県産・ジョナゴールド）をスーパーマーケットで購入した。購入したリング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、リング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、試験溶液（無処理群）とした。蒸留水を0.2 M塩化ナトリウム溶液に置き換えたものを試験溶液（塩化ナトリウム群;最終濃度0.1 M）とし、氷冷蒸留水に置き換えたものを試験溶液（氷冷群）とした。この時点をお0分とし、10, 30, 60分経過後の各試験溶液について以下に示す測定を行った。なお、氷冷群サンプルの放置は水中で行った。

2) 物理化学的特性

試験溶液の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（%）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。

3) 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¹⁶⁾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、ポリフェノール量（没食子酸相当量）を算出した。

4) 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¹⁷⁾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ラジカル消去活性（%）を算出した。

5) 色の变化の記録

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。

6) 450nmにおける吸光度（褐変度）の測定

山王丸らの報告¹⁴⁾に準じ、450 nmの波長における吸光度を褐変度とした。各試験溶液を遠心分離（10,000 rpm, 室温, 1分間）して不溶物を除去し、得られた清澄な溶液を試料として用いた。

7) 分光色差計による色調の変化の測定

分光色差計X-Rite RM200QC（エックスライト株式会社）を用いて各試験溶液の色の経時的な変化を測定し、L値（明度）、a値（赤

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

み), b値 (黄み), ΔE値 (色差)として示した。また, 試験溶液に充分量のアスコルビン酸を添加し, 酸化反応による褐変を阻害したものを基準溶液として測定に用いた。得られたΔE値を, 表1に準じて評価した^{18,19)}。

表1 ΔE値 (色差) の評価

ΔE 値	Critical remarks of color difference
0.0 - 0.5	Trace
0.5 - 1.5	Slight
1.5 - 3.0	Noticeable
3.0 - 6.0	Appreciable
6.0 - 12.0	Much
> 12.0	Very much

^{18,19)}より引用改変

8) 統計処理

数値データはすべて平均±標準偏差で示した。無処理群と塩化ナトリウム群および氷冷群との比較にはDunnnett法を用いた。同様に, 各群において0分と各経過時間との比較にもDunnnett法を用いた。相関関係はPearsonの相関係数検定を用いて評価した。これらの解析にはstatcel 3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) 物理化学的特性

Brix値 (%), ナトリウム (%), pHの測定結果を表2に示した。無処理群, 塩化ナトリウム群, 氷冷群のBrix値はそれぞれ, 4.3 ± 0.3 , 5.7 ± 0.4 , 4.8 ± 0.2 であり, 塩化ナトリウム群は無処理と比較して有意に高値を示した。無処理群, 塩化ナトリウム群, 氷冷群のナトリウムはそれぞれ, 0.06 ± 0.01 , 0.56 ± 0.03 , 0.05 ± 0.01 であり, 塩化ナトリウム群は無処理群と比較して有意に高値を示した。無処理群, 塩化ナトリウム群, 氷冷群のpHはそれぞれ 3.94 ± 0.14 , 3.74 ± 0.14 , 4.03 ± 0.11 であり塩化ナトリウム群および氷冷群とも無処理群と

の間に有意な差は検出されなかった。

表2 各試験溶液の物理化学的特性

	無処理群	塩化ナトリウム群	氷冷群
Brix (%)	4.3 ± 0.3	$5.7 \pm 0.4^*$	4.8 ± 0.2
ナトリウム (%)	0.06 ± 0.01	$0.56 \pm 0.03^*$	0.05 ± 0.01
pH	3.94 ± 0.14	3.74 ± 0.14	4.03 ± 0.11

* 無処理群と比較した際に有意差あり ($p < 0.05$)

2) ポリフェノール量の経時変化

それぞれの試験溶液に含まれるポリフェノール量の経時的な変化の割合を図1に示した。試験溶液調製後0分時点のポリフェノール量を100%としたとき, 無処理群では時間の経過に伴ってポリフェノール量が減少し, 30および60分後にはそれぞれ $68.8 \pm 11.0\%$, $55.4 \pm 12.2\%$ となり, 0分と比較して有意な差が検出された。それとは対照的に, 塩化ナトリウム群および氷冷群ではどの時点においてもポリフェノール量は減少せず, 0分との差は検出されなかった。また, どちらの試験

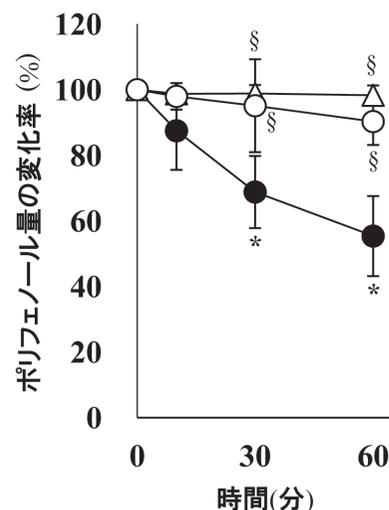


図1 ポリフェノール量の変化率の経時変化

(●) 無処理群, (△) 塩化ナトリウム群, (○) 氷冷群

* 各群において, 0分と比較して有意差あり ($p < 0.05$), § 無処理群の同じ経過時間のものと比較して有意差あり ($p < 0.05$)

溶液においても、30および60分後の値が無処理群よりも有意に高かった。

3) DPPHラジカル消去活性の経時変化

それぞれの試験溶液におけるラジカル消去活性の経時的な変化の割合を図2に示した。ポリフェノール量の変化と同様に、無処理群では時間の経過に伴ってラジカル消去活性が低下し、10、30、60分後における値は0分と比較して有意に低かった。一方、塩化ナトリウム群および氷冷群では、どの時点においてもラジカル消去活性は低下せず、0分との差は検出されなかった。また、塩化ナトリウム群では30および60分後、氷冷群では10、30、60分後の値が無処理群よりも有意に高かった。

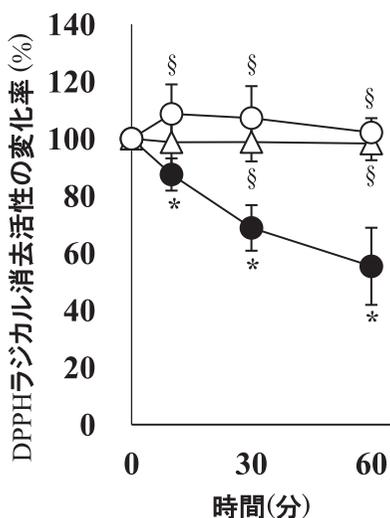


図2 DPPHラジカル消去活性の変化率の経時変化

(●) 無処理群, (△) 塩化ナトリウム群, (○) 氷冷群

* 各群において、0分と比較して有意差あり ($p < 0.05$), § 無処理群の同じ経過時間のものと比較して有意差あり ($p < 0.05$)

4) ポリフェノール量とラジカル消去活性との相関

時間の経過に伴い、ポリフェノール量およ

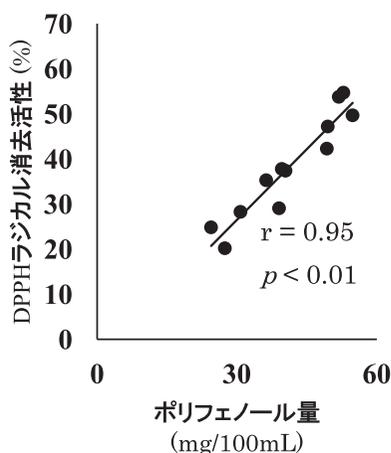


図3 ポリフェノール量とDPPHラジカル消去活性との関係

びラジカル消去活性の値に変化が観察された無処理群に関して、両者の値の相関を図3に示した。ポリフェノール量とラジカル消去活性の間には正の相関関係があることが確認され、その相関係数は0.95 ($p < 0.01$)であった。

5) 色調の変化と450 nmにおける吸光度 (褐変度)

肉眼的な色調の変化を図4に示した。無処理群では時間の経過に伴って褐変したが、塩化ナトリウム群および氷冷群では褐変が抑制された。450 nmにおける吸光度の経時的な変化の割合を図5に示した。無処理群では時間の経過に伴って吸光度が上昇し、30および60分の値は0分と比較して有意に高かった。塩化ナトリウム群ではどの時点においても吸光度の変化はなかった。氷冷群では無処理群と同様の傾向を示し、30および60分の値が0分と比較して有意に高かった。

6) 分光色差計による測定値

分光色差計による測定値の経時的な変化を図6に示した。無処理群ではどの時点においても、L値は変化せず、塩化ナトリウム群の

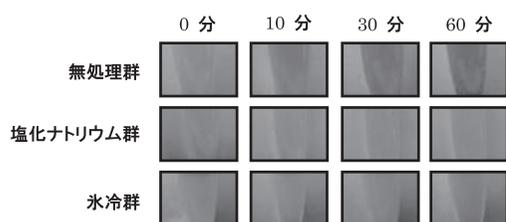


図4 各試験溶液の褐変の経時的変化

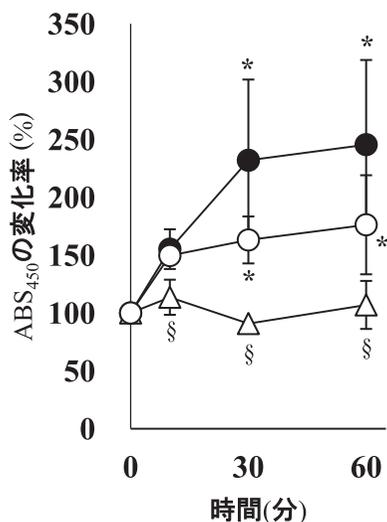


図5 450 nmにおける吸光度の変化率の経時変化

(●) 無処理群, (△) 塩化ナトリウム群, (○) 氷冷群

* 各群において, 0分と比較して有意差あり ($p < 0.05$), § 無処理群の同じ経過時間のものと比較して有意差あり ($p < 0.05$)

10, 30, 60分後における測定値との間に有意な差が検出された。無処理群において, a値およびb値が経時的に著しく上昇し, 赤みおよび黄みが時間の経過とともに強くなることが示された。塩化ナトリウム群では, どちらの値も0分から有意な上昇は認められず, どの時点においても無処理よりも有意に低かった。氷冷群では, aおよびb値の両者とも時間の経過とともに0分時点の値よりも上昇したが, 30および60分後において無処理群よりも有意に低かった。無処理群の ΔE 値は時間ともに上昇し, 60分時点における値は $14.7 \pm$

2.4となった。表1で示すように, 基準溶液からの変化はVery muchと評価された。塩化ナトリウム群および氷冷群では, 30および60分時点における ΔE 値が無処理群の値よりも有意に低く, どちらも基準溶液からの変化はMuchと評価された。

7) 450 nmにおける吸光度 (褐変度) および分光色差計による測定値とラジカル消去活性との相関

450 nmにおける吸光度とラジカル消去活性との相関を図7Aに示した。相関係数は -0.79 ($p < 0.01$)であった。また, 分光色差計による測定値とラジカル消去活性との相関を図7Bに示した。 ΔE 値との相関係数は -0.96 ($p < 0.01$)であった。

4. 考察

本研究では, 家庭で比較的手軽に提供できるすりおろしリンゴ果汁に含まれるポリフェノール量とその抗酸化活性の関連, また, 時間の経過に伴って生じる様々な変化とその抑制効果に関して分析を行った。それにより, 塩化ナトリウムの添加および氷冷操作が, すりおろしリンゴ果汁調製後に生じる望ましくない変化を抑制することが示された。

一般に, リンゴの切断面の褐変抑制のためには, 食塩水に浸漬させることが効果的であることはよく知られているが, これは食塩がポリフェノールオキシダーゼの活性を阻害するためであり, 0.1 M食塩水への浸漬は酵素活性を80%程度阻害するとされている¹³⁾。今回の研究において, リンゴと同量の0.2 M塩化ナトリウム溶液の添加 (最終濃度0.1 M) はすりおろしリンゴ果汁調製後に生じる経時的なポリフェノールの酸化とそれに伴うDPPHラジカル消去活性の低下をとともに抑制し, 肉眼的な色調の変化も軽微なものに留め

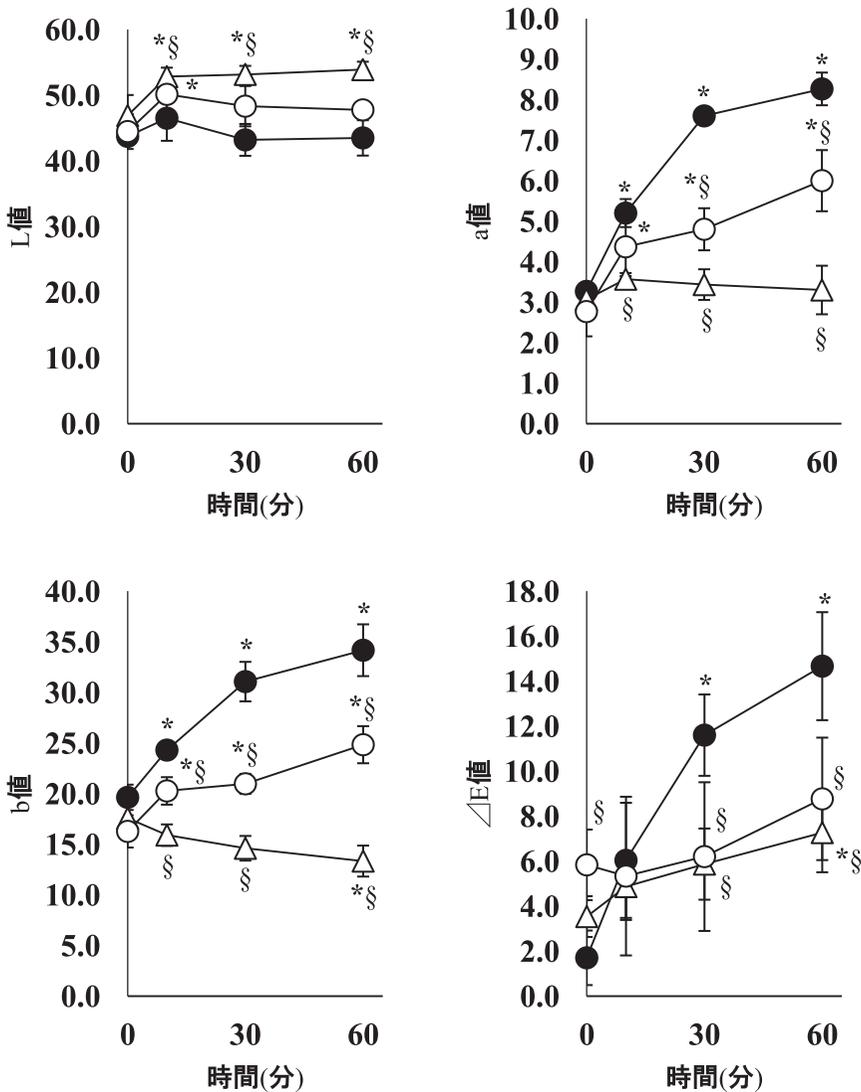


図6 ΔE , L, a, b値の経時変化

(●) 無処理群, (△) 塩化ナトリウム群, (○) 氷冷群

* 各群において, 0分と比較して有意差あり ($p < 0.05$), § 無処理群の同じ経過時間のものと比較して有意差あり ($p < 0.05$)

た。従来から調理過程において行われている食塩水への浸漬が, リンゴ切断面の褐変やそれに伴う生理活性物質の酸化に対して有効であることは予想されているが, すりおろし操作によって得られたリンゴ果汁にも有効であることが示された。しかし, 0.1Mという塩化ナトリウム濃度はおよそ0.6%程度に相当

し, 生理食塩水が0.9%であることを考慮しても, 飲料として用いるには現実的ではない。今回はリンゴの切断面ではなくすりおろし操作による破碎処理を行ったリンゴ果汁に対する塩化ナトリウム溶液添加の効果に関する分析であるので, 効果的な塩化ナトリウム溶液の濃度に関しては, 今後さらに検討の余地が

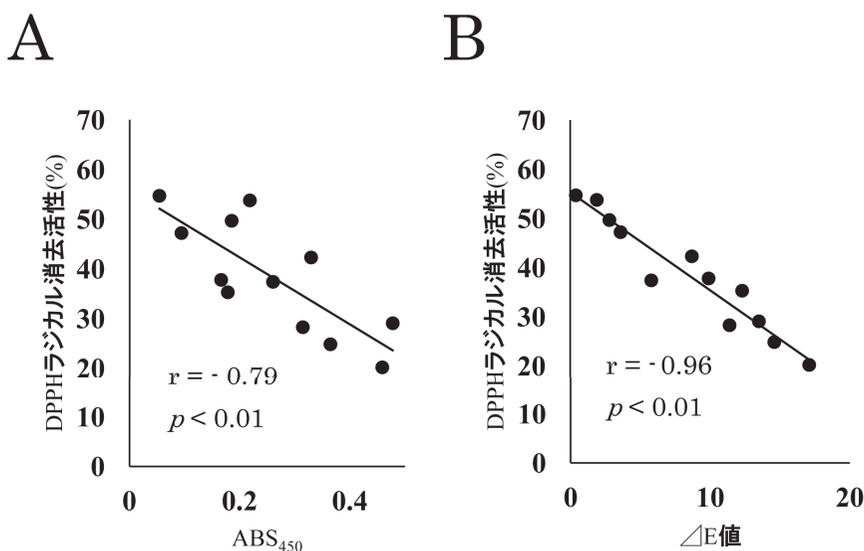


図7 色調の変化とラジカル消去活性との関係

あるかもしれない。

食塩の添加と同様に、ポリフェノールオキシダーゼの活性を抑制する条件として低温(氷冷)処理が挙げられる。ポリフェノールオキシダーゼの至適温度は、種類により異なるがおよそ25-40℃と報告されており²⁰⁾、今回行った氷冷処理は酵素活性を抑制すると予想できる。実際に、ポリフェノール含量およびDPPHラジカル消去活性の低下が抑制され、肉眼的な色調の変化も無処理群と比較して少なく、氷冷処理が有効であることが示された。一般的なチルド室は-5~5℃に制御されていることが多いが¹³⁾、今回の氷冷処理を行ったすりおろしリンゴ果汁の温度はおよそ0℃付近まで低下しており、チルド室内の環境に相当すると考えられる。すなわち、すりおろしリンゴ果汁を速やかにチルド室内で保存すれば、食塩等の阻害剤を添加しなくてもすりおろし操作後に生じる望ましくない変化を抑制することが期待できる。

食品のポリフェノール含有量とDPPHラジカル消去活性の間に相関関係があることはす

で報告されているが²¹⁾、今回の研究においても同様の結果が得られた。ポリフェノールと同様に生体内において抗酸化作用が期待される果物中の物質としてビタミンCが挙げられるが、今回用いたリンゴ果汁には100gあたり3mg程度しか含まれておらず²²⁾、一般的にビタミンCを多く含む果物とされるレモン果汁(50mg/100g)と比較して非常に少ないため、その効果はあまり期待できないと推測される。ゆえに、リンゴ果汁摂取後の生体内における抗酸化作用を保持するためには、ポリフェノールの酸化を抑制し、ポリフェノール量を保持することが不可欠であり、そのためには調理操作後速やかにその温度を下げる効果が効果的であると考えられる。また、DPPHラジカル消去活性により表される抗酸化作用は、色調の変化と負の相関関係にあるため、すりおろしリンゴ果汁調製後の抗酸化作用の変化の目安となることが示された。

5. まとめ

すりおろしリンゴ果汁への食塩の添加およ

び氷冷操作はポリフェノールオキシダーゼによるポリフェノールの酸化とそれに伴う褐変および抗酸化活性の低下を抑えることが明らかとなった。また、この氷冷操作がもたらす効果は、各家庭においてはすりおろしリング調製後速やかにチルド室内へ保管することで発揮されるということが示された。

参考資料・文献

- 1) Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*. 1991;2(5):325-357.
- 2) Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(1):93-99.
- 3) Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr*. 2010;104(3):S28-39.
- 4) Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):7915-7922.
- 5) 健康日本21（第2次），厚生労働省，http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/kenkou/kenkouinippon21.html
- 6) 平成25年「国民健康・栄養調査」の結果，厚生労働省，<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000067890.html>
- 7) 赤染陽子，神田智正，杉山洋，大竹康之，島崎弘幸. リンゴポリフェノール含有飲料の高脂肪食負荷における中性脂肪抑制作用の検討. *日本食品化学学会誌* 14(2)，82-86, 2007
- 8) 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* 46(10)，645-651, 1999
- 9) Akazome Y, Kanda T, Ikeda M, Shimasaki H. Serum Cholesterol-Lowering Effect of Apple Polyphenols in Healthy Subjects *Journal of Oleo Science*. 2005; 54(3): 143-151.
- 10) Ravn-Haren G, Dragsted LO, Buch-Andersen T, Jensen EN, Jensen RI, Németh-Balogh M, Paulovicsová B, Bergström A, Wilcks A, Licht TR, Markowski J, Bügel S. Intake of whole apples or clear apple juice has contrasting effects on plasma lipids in healthy volunteers. *Eur J Nutr*. 2013;52(8):1875-1889.
- 11) Akazome Y, Kametani N, Kanda T, Shimasaki H, Kobayashi S. Evaluation of safety of excessive intake and efficacy of long-term intake of beverages containing apple polyphenols. *J Oleo Sci*. 2010;59(6):321-338.
- 12) Shoji T, Akazome Y, Kanda T, Ikeda M. The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(6):959-967.
- 13) 長澤治子，川端康之，中野隆之，市川和昭，和田律子，白土英樹，竜口和恵，吉田博，阿部一博，山本愛二郎，高松伸枝，中河原俊治，木村万里子. 食べ物と健康 食品学・食品機能学・食品加工学. 医歯薬出版株式会社，2012
- 14) 山王丸靖子，片山脩，金子勝芳，増田哲男. リンゴ果実のポリフェノール含有量と色調の経時的変化. *日本食品保蔵科学会誌* 24(2)，103-108, 1998
- 15) 石崎泰樹，丸山敬. リッピンコットシリーズ イラストレイテッド生化学，丸善株式会社
- 16) 倉田忠男. 新・食品分析法〔Ⅱ〕. 光琳，2006
- 17) 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*.

氷冷操作がリンゴ果汁の褐変およびラジカル消去活性に及ぼす影響 (玉田 葉月, 浅野 (白崎) 友美, 橋本 沙幸, 藪田 邦博)

Biotechnol. 2015; 24(1):61-66

- 18) Shotwell JL, Razzoog ME, Koran A. Color stability of long-term soft denture liners. *J Prosthet Dent.* 1992;68(5):836-838.
- 19) Al Qahtani MJ, Binsufayyan SS. Color change of direct resin-based composites after bleaching: An in vitro study. *Saudi J Dent Res.* 2011;2(1-2): 23-27.
- 20) 中多啓子, 尊田民善, 安田みどり, 熊川景子, 高智穂弥香, 森永訓子. 結球レタス (Head lettuce) の緑色部位および白色部位のポリフェノールオキシダーゼの性質. *西九州大学健康福祉学部紀要* 38, 1-8, 2008
- 21) 須田郁夫, 沖智之, 西場洋一, 増田真美, 小林美緒, 永井沙樹, 比屋根理恵, 宮重俊一. 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性. *日本食品科学工学会誌* 52(10), 462-471, 2005
- 22) 新しい「日本食品標準成分表2010」による食品成分表. 女子栄養大学出版社, 2011