

食品の変色とスペクトルとの関係：(V) 種々のpHにおける”リンゴ酵素-クロロゲン酸”系の褐変

尊田, 民喜
九州大学農学部食糧化学教室

井上, 浩輔
味の素ゼネラルフーズ株式会社

荒巻, 輝代
福岡県消費生活センター

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/23152>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 28 (2), pp.73-78, 1974-02. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

食品の変色とスペクトルとの関係

(V) 種々の pH における“リンゴ酵素— クロロゲン酸”系の褐変

尊田 民喜・井上 浩輔¹⁾

荒巻 輝代²⁾・大村 浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1973年11月22日受理)

Relationship between Change of Color of Foods and Spectra

Browning of “Apple Enzyme—Chlorogenic Acid” System at Various pH

TAMIYOSHI SONDA, KOSUKE INOUE, TERUYO ARAMAKI
and HIROHISA OMURA

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

我々は食品の変色について、吸収スペクトルの解析を手掛りとし、その反応機構の解明を企図してきた。そのため、まず主としてリンゴの抽出果汁(大村・尊田, 1969)のほか、果肉アセトン粉末から調製した酵素液を代表的な基質であるカテコールおよびクロロゲン酸に作用させた反応系(大村・尊田, 1970)についてその吸収スペクトルの変動を中心に検討を加えた。

食品の酵素的褐変は食品中に含まれているポリフェノール類の酵素的変化と、これに引続いて起る色素への重合との二段階に大きく分けられると思われるが、前報(大村ら, 1971)においてこの両過程に対する pH の影響が異なることを“酵素—カテコール”系について確めこれを実証した。食品の酵素的褐変は種々の果実や蔬菜類について広く研究されてきたが、ほとんど酵素ポリフェノールオキシダーゼ(*o*-Diphenol: oxygen oxidoreductase, E. C. 1.10.3.1)の特性を中心とする最初の段階を解明するにとどまり色素形成の過程については検討されていない。

リンゴの場合、酵素はクロロゲン酸に対し特に高い基質特異性を示すことから(中林, 1954)これが褐変

色素の主体であると考えられてきたが、一般に酵素は褐変を起すに十分な活性を持っているので、着色度の面からは基質含量の高いものが主体であつて酵素への親和性はむしろ着色速度に影響するものであると考えられるべきであろう。大村・尊田(1970)は果汁ならびに酵素的褐変モデル系の着色に伴う吸収スペクトルの変動を比較検討し、クロロゲン酸が特に速やかに酵素の作用を受けるにしても褐変の主体はむしろカテコール類であろうと推定した。このことは、リンゴのポリフェノール類のうちクロロゲン酸類は主成分ではなくカテキン類の含量が高い事実(中林, 1968)とも合致する。この推定に基いて、リンゴの褐変に対する pH の影響も“リンゴ酵素—カテコール”系をモデルとして検討したが、クロロゲン酸系についても無視するわけにはいかない。そこで変色とスペクトルとの関係に基礎資料を追加するため“リンゴ酵素—クロロゲン酸”系についても若干の補足実験を行なつた。

実験方法

酵素の調製および褐変、吸収スペクトルないしポリ

1) 味の素ゼネラルフーズ株式会社

2) 福岡県消費生活センター

フェノールオキシダーゼ活性の測定などはいずれも原則的には前報(大村ら, 1970, 1971)記載の方法で行なつた。

結果および考察

1. 種々の pH における吸収スペクトル

まず初めに 0.5 mM クロロゲン酸に種々の pH においてリンゴ酵素を 30°C, 2 時間反応させた場合の褐変液の可視部における吸収スペクトルを測定し Fig. 1 に示した。

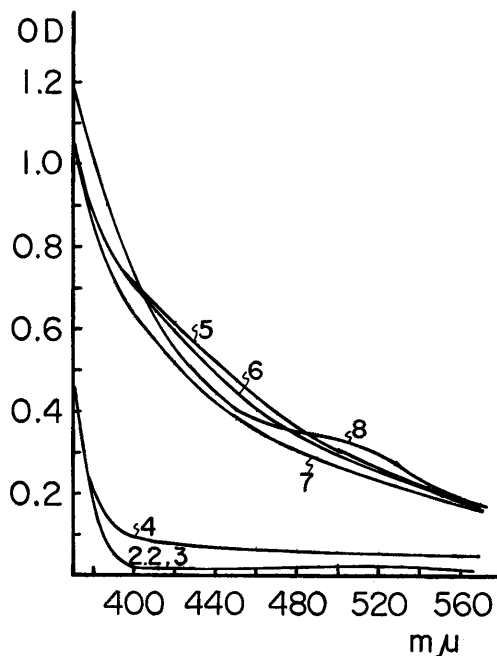


Fig. 1. Absorption spectra of "apple enzyme—chlorogenic acid" system of various pH in visible range. Enzyme solution was prepared by extraction of 0.5 g acetone powder of rinded apple with 40 ml H₂O. A reaction mixture of 3 ml enzyme solution, 0.5 ml 5 mM chlorogenic acid, 1 ml 0.2 M citric acid-sodium phosphate buffer of various pH and 0.5 ml H₂O was incubated at 30°C for 2 hours. The absorption spectrum was estimated using a Shimadzu Multipurpose Recording Spectrophotometer, MPS-50. Numerical values of 2, 2, 3, ……7 and 8 indicate the pH value.

カテコールの場合 pH 2, 2, 3 ないし 4 では反応液の褐変はもちろん吸光度の変化も起らなかつた。クロロゲン酸でも同様に着色は認められず, また吸光度も pH 2.2 および 3 では変化しなかつたが, pH 4 ではごく僅か上昇した。いずれにおいても pH 5 以上では反

応液は褐変し, 吸光度の上昇も認められ, 一般に短波長側で高く長波長側に移るに従つて低下した。しかしカテコール系では pH 5~7 で 420 mμ 付近に明白なピーク, pH 8 で肩が認められたが, クロロゲン酸系の吸収スペクトルには顕著な吸収ピークは全くなく, pH 5 および 6 で 420 mμ 付近に微弱な肩のほか, 特に pH 8 で 500 mμ 付近に明瞭な肩が見られるに過ぎなかつた。他方, カテコールの場合 pH によつて吸光度自体は異なり, pH 6 で最も大きくついで pH 8, 7, 5 の順であつたが, クロロゲン酸系では各 pH においてカテコール系における程明瞭な差は認められなかつた。

果汁の場合, 可視部の吸収スペクトルには特徴ある吸収は全く認められなかつたが(大村・尊田, 1969), 吸光度の変化を求めると 380 mμ 付近で最も上昇度が高かつた。クロロゲン酸系においても pH 2.2~3 での吸収が変化しないのでこれを基準とし, この pH 域でのスペクトルと各 pH でのスペクトルを比較し Fig. 2 に示した。この場合にも pH 8 での 500 mμ 付近の

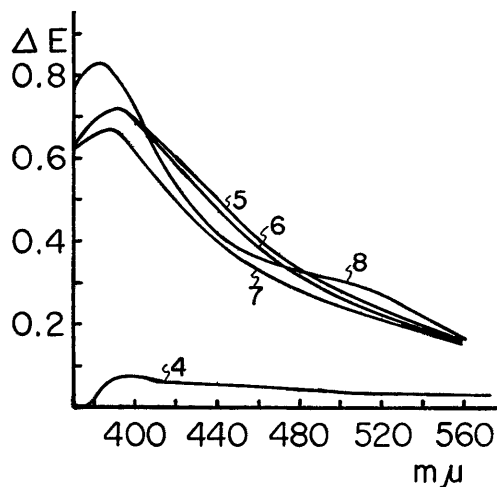


Fig. 2. Variation of the optical density of "apple enzyme—chlorogenic acid" system of various pH in visible range. Explanation is the same as in Fig. 1.

肩はもちろん認められるが, さらに果汁の場合と同じように 380 mμ~390 mμ 付近に最大の吸光度上昇が認められた。このピークの波長は pH で多少異なり, pH 5~6 で 390 mμ, pH 7 で 386 mμ, pH 8 で 382 mμ とアルカリ側に移るに従いピークは多少短波長側に移行する傾向があつた。

次に紫外線吸収スペクトルを求めた。同じく 0.5 mM クロロゲン酸に酵素を作用させたが, この場合 10 倍

稀釈して測定しなければならないので、各 pH における相異を十分に解析するため 24 時間作用させて吸収スペクトルならびにその変動を求め Fig. 3 および Fig. 4 に示した。

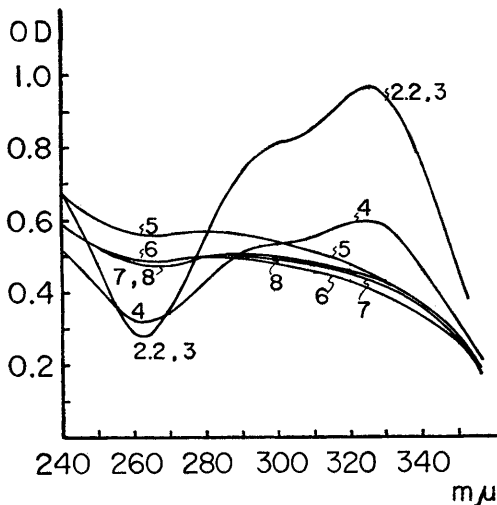


Fig. 3. Absorption spectra of "apple enzyme—chlorogenic acid" system of various pH in UV range. Explanation is the same as in Fig. 1, but the reaction mixture was incubated for 24 hours and the spectrum was estimated after 10 times dilution.

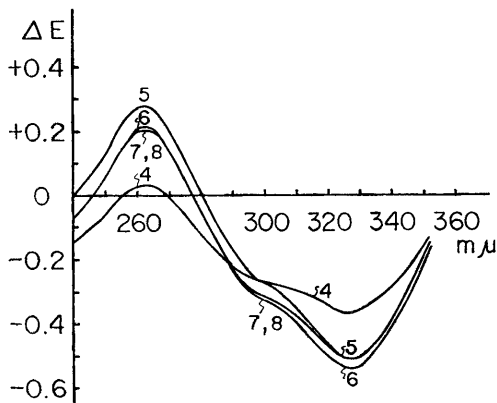


Fig. 4. Variation of the optical density of "apple enzyme—chlorogenic acid" system of various pH in UV range. Explanation is the same as in Fig. 3.

可視部において pH 4 までは褐変は起らず吸光度の変動もそれ程認められなかつたが、紫外部においても同様であつて、pH 2.2~3 および 4 では 325 mμ 付近に極大、295 mμ 付近に明瞭な肩、263 mμ 付近に極小をもつクロロゲン酸のスペクトルが観察された。も

つとも pH 4 でもクロロゲン酸の酵素的酸化は行なわれるので、吸収スペクトルの極大部の低下および極小部の上昇が認められた。pH 5 以上ではこのような吸収は消失し、280 mμ ないし 290 mμ 付近に弱いピークが残つた。この波長での吸光度は pH 5 において他よりも若干大きかつた。このように pH が異なると反応液の吸収スペクトルは異なることが見られたが、その変動はどの pH においても同様の傾向を示し、吸光度はスペクトルの極大部 325 mμ 付近を中心に減少し、極小部 263 mμ 付近で上昇した。しかしこの変動は pH により特徴があり、吸光度の減少は pH 6、上昇は pH 5 で最も大きかつた。

2. 種々の pH における褐変の時間的経過

リンゴのポリフェノールオキシダーゼの活性はクロロゲン酸、カテキン、カテコール等 *o*-ジフェノール類に対して強く、特にクロロゲン酸に対し顕著であり、その至適 pH はいずれも 4.8、また 3.5~4.0 の間でも相当の酸素吸収が認められ、他方 pH 4 と 6 とではほぼ同一の活性が観察された。さらに pH 5 と 6 とにおける活性比は、30°C 20 分間反応させた場合、クロロゲン酸に対しては 150:35、カテコールに対しては 55:20 程度であつた(中林, 1954)。これに対して大村ら(1971)はカテコールを基質とした場合 pH 6 に最高活性を示し、pH 5 あるいは 7 ではその約 1/7 に過ぎないことを認めた。いずれにしてもポリフェノールオキシダーゼにより着色が起るならば褐変度に対する pH の影響も pH—活性曲線に類似のものでなければならない。他方初めに述べたようにポリフェノールの酸化と色素重合とが異つた反応によるものであれば、褐変に対する pH の影響は酵素活性に対するものと必ずしも一致するとは考えられない。事実“酵素—カテコール”系においては pH と酵素活性あるいは褐変度との関係は一致せず、しかも反応時間によりさらに異なることが認められた。そこで 0.5 mM クロロゲン酸に対しても種々の pH においてリンゴ酵素を 30°C で作用させ、30分、1時間、4時間および 24 時間後の褐変度を測定した (Fig. 5)。作用時間の如何にかかわらず pH 3 以下ではほとんど OD_{blue} は認められず、pH 4 で極めて微弱であつた。pH 5 以上において褐変が観察された。褐変の程度は反応時間 30 分では pH 5 において最高であり、pH 6 でも 30 分ないし 4 時間の反応時間で pH 5 におけるものと同程度の着色を起したが、24 時間後では pH 5 におけるよりも若干高い値を示した。反応初期においてはアルカリ側での着色は低いが時間とともに増大し、24 時間後で

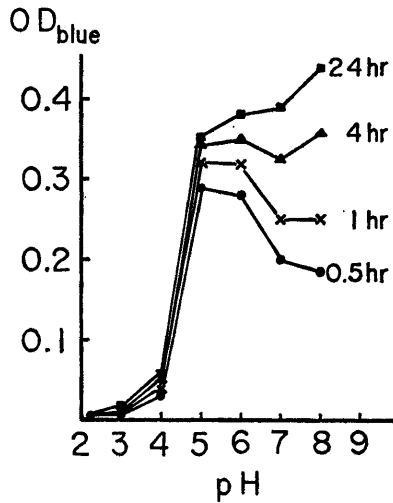


Fig. 5. Effect of pH on browning of "apple enzyme—chlorogenic acid" system for different time. Explanation is the same as in Fig. 1. Browning was estimated using an electric colorimeter, Erma N-5, with blue filter.

はアルカリ側ほど大きかった。この時間的経過はカテコール系とはかなり異つた (Fig. 6)。すなわちカテコール系では pH 5 および 6 では 1 時間ですでに着色は最高に達し、以後徐々に低下し、また褐変度は pH 6 で非常に高かつた。これに反して pH 7 および 8 ではさらに長時間にわたつて OD_{blue} は上昇した (大村ら, 1971)。Fig. 5 に示すようにクロロゲン酸では反応時間が短いと OD_{blue} は pH 5 で最も大きい、その上昇はカテコールの場合ほど急激でなく、約 2 時間

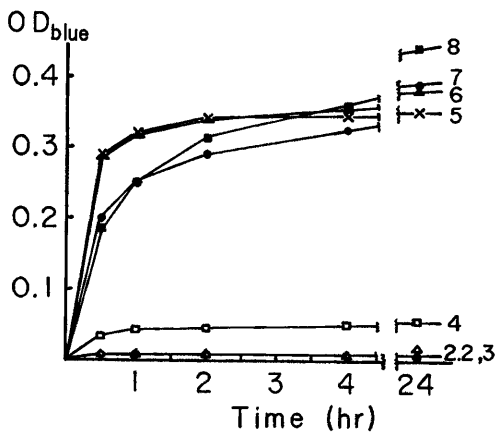


Fig. 6. Time course of browning of "apple enzyme—chlorogenic acid" system of various pH. Explanation is the same as in Fig. 5.

まで徐々に上昇し以後一定となつた。pH 6 ないし 8 ではさらに上昇するがその変化は著しくない。しかしこの場合にも上昇度はアルカリ側で大きかつた。

リンゴの褐変を防ぐために食塩水に浸漬することはしばしば利用されているが、これは食塩がポリフェノールオキシダーゼを阻害するためであると考えられる (中林, 1954)。しかし大村ら (1966) は食塩濃度が 5 mM 程度の稀薄な場合には褐変防止効果はほとんどないことを認め、しかもカテコール系では微酸性においてむしろ褐変を促進し、pH 4 でも吸光度の上昇が起ることを示した (大村ら, 1971)。このような食塩の特異的機能についてクロロゲン酸系でも試験するため、同じく 0.5 mM クロロゲン酸に対し 5 mM 食塩とともに無添加の場合と同一条件で酵素を作用させた。Fig. 7 に示すように微酸性における褐変の促進は認められ

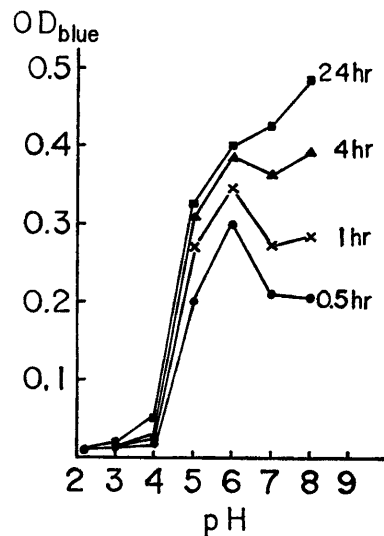


Fig. 7. Effect of pH on browning of "apple enzyme—chlorogenic acid" system in the presence of NaCl. Explanation is the same as in Fig. 1, but 5 mM NaCl was added in the reaction mixture.

ず、pH 4 でも OD_{blue} はほとんど求められなかつた。pH 5 における褐変は食塩によりむしろ抑制されるが pH 6 では影響されない傾向にあり、従つて最高の褐変は pH 6 に認められた。この場合にも長時間での褐変はアルカリ側において大きく、24 時間後には食塩無添加区と同じようにアルカリ側ほど OD_{blue} は大きかつた。この条件における褐変の時間的経過を Fig. 8 に示すが、食塩無添加区とほぼ同一の傾向が観察された。いずれにしても“酵素—クロロゲン酸”系においてもカテコール系と同様の着色現象が推定される。

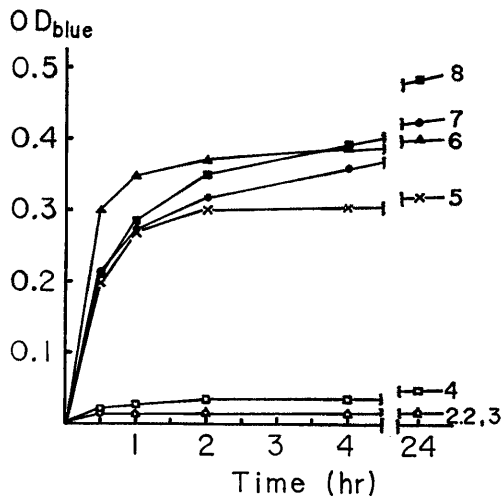


Fig. 8. Time course of browning of "apple enzyme—chlorogenic acid" system of various pH in the presence of NaCl. Explanation is the same as in Fig. 7.

3. 阻害剤の影響

基質の酸化と褐変とが異つた過程によることは阻害剤の酵素活性ならびに褐変に対する影響からも推定される。0.5mM クロロゲン酸と5mM 亜硫酸ナトリウム、システインまたは食塩との混液に酵素を pH 6,

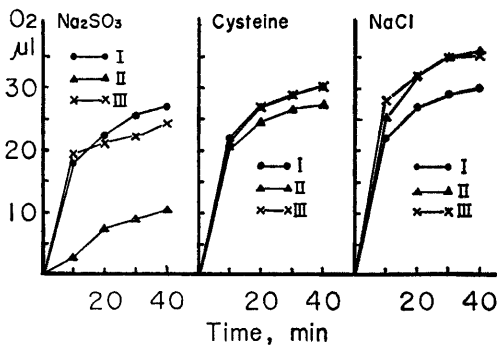


Fig. 9. Effect of some inhibitors on O_2 uptake by "apple enzyme—chlorogenic acid" system. O_2 uptake was estimated in a Warburg manometer at $30^\circ C$ for 40 minutes. Reaction mixture is the same as in Fig. 1, but with 1/2 scale and 5mM inhibitor, at pH 6.

I: Control without inhibitor; II: Inhibitor was preliminarily incubated with apple enzyme at $30^\circ C$ for 10 minutes before reaction and chlorogenic acid was then added to start the reaction; III: Inhibitor was preliminarily incubated with chlorogenic acid as II and the apple enzyme was then added to start the reaction.

Table 1. Coloration of "apple enzyme—chlorogenic acid" system in the presence of some inhibitors.

Inhibitor added	I	II	III
Na_2SO_3	0.200	0.035	0.048
Cysteine	0.204	0.068	0.076
NaCl	0.202	0.213	0.232

The same as in Fig. 9, but the coloration of the reaction mixture was estimated after 60 minutes at $30^\circ C$.

$30^\circ C$ で作用させて酸素吸収を測定するとともに、反応液の吸光度を求めた (Fig. 9 および Table 1). 亜硫酸ナトリウムをあらかじめ酵素に 10 分間作用させたのちクロロゲン酸を加えて反応させた場合、酵素活性は抑制され酸素吸収は著しく低下した。これに対して、まず亜硫酸ナトリウムをクロロゲン酸と混合したのち酵素を加えた場合は酸素吸収に対する影響は僅かに過ぎなかつた。しかし褐変度の低下は亜硫酸ナトリウムの処理順序の如何に拘らず顕著であつた。他方、システインの場合には酸素吸収に対する効果はほとんど認められないが、褐変防止は明らかに観察された。食塩ではむしろ両者に対する促進傾向が示された。

総括

リンゴ褐変のモデル系として "リンゴ酵素—クロロゲン酸" 系についてその褐変に対する pH の影響を試験した。

pH 5 以上では反応系の褐変とともに可視部における吸光度の上昇が認められた。しかし pH 8 で $500 m\mu$ 付近に明瞭な肩を持つ吸収スペクトルを生じたほかは、どの pH においても特徴ある吸収スペクトルは認められなかつた。この場合いずれも $380 m\mu \sim 390 m\mu$ を中心に吸光度は上昇したがそのピークは、pH 5~6 では $390 m\mu$, pH 7 では $386 m\mu$, pH 8 では $382 m\mu$ 付近にあつた。

一方、紫外線吸収スペクトルはクロロゲン酸の減少などもあわせて、pH によりそれぞれ異なる吸収スペクトルが観察された。しかしこの場合も、その吸光度はどの pH においても $325 m\mu$ 付近で減少、 $263 m\mu$ 付近で増加した。

また褐変度は最初 pH 5~6 で最も大きかつたが、長く放置するとアルカリ側ほど著しくなつた。食塩を添加した場合、"リンゴ酵素—カテコール" 系では pH 4 でも褐変が起つたが、"リンゴ酵素—クロロゲン酸" 系では認められず、また短時間での褐変は pH 6

で最高となった。しかしこの場合も長時間ではアルカリ側ほど大きかった。

これに関連して“リンゴ酵素—クロロゲン酸”系による酸素吸収ならびに褐変に対する亜硫酸ナトリウム、システインおよび食塩の影響を試験した。亜硫酸ナトリウムは酵素活性を阻害し、一方システインはほとんど阻害しなかつたが、いずれも褐変を抑制した。

こうしてこの系における褐変も、クロロゲン酸の酵素的酸化と色素への重合の二段階に大きく分けられることが認められた。

文 献

中林敏郎 1954 林檎果肉の褐変現象(その2) 林檎果肉呼吸の terminal oxidase に就て. 農化, 28:

212—217

中林敏郎 1968 果実および野菜類タンニン成分(第1報)バラ科果樹果実のタンニン成分. 食工誌, 15: 73—78

大村浩久・副枝紘一郎・山藤一雄 1966 亜硫酸塩によるリンゴの褐変防止. 九大農芸誌, 22: 109—120

大村浩久・尊田民喜 1969 食品の変色とスペクトルとの関係(II)リンゴ果汁の吸収スペクトル. 栄養と食糧, 22: 497—505

大村浩久・尊田民喜 1970 食品の変色とスペクトルとの関係(III)リンゴ酵素による褐変液の吸収スペクトル. 栄養と食糧, 23: 367—373

大村浩久・尊田民喜・井上浩輔 1971 食品の変色とスペクトルとの関係(IV)リンゴ酵素—カテコール系による褐変に対するpHの影響. 栄養と食糧, 24: 242—248

Summary

Effect of pH on the browning of the model system, “apple enzyme-chlorogenic acid”, was investigated by estimating the absorption spectrum or the variation of the optical density of the reaction mixture at various pH. Above pH 5, the browning of the system was brought about and the optical density in the visible range of the wavelength was increased. However, the spectra without absorption peak were determined, except that the spectrum at pH 8 has a shoulder at 500 m μ . The maximum increase of the optical density was observed at 390 m μ , 386 m μ and 382 m μ at pH 5~6, 7 and 8 respectively. On the other hand, in the ultraviolet range of the wavelength, the peculiar spectra were observed according to pH of the reaction mixture. However, the uniform variation of the optical density was established, which indicates the maximum increase at 263 m μ and the maximum decrease at 325 m μ .

Then, the time course of the browning of the system at various pH was also estimated. The browning was the highest at pH 5~6 for 4 hours, while it was higher at alkaline range after 24 hours; the highest browning being at pH 8. When sodium chloride was added to the system, browning was the highest at pH 6 for a short time, although no browning was observed at pH 4 differing from the system of “apple enzyme-catechol.” In this case too, the higher browning was observed at alkaline range after 24 hours.

In connection with the browning of apple, O₂ uptake by polyphenol oxidase as well as the browning was comparatively estimated in the presence of anti-browning substance such as sodium sulfite, cysteine or sodium chloride. Although the browning was retarded by sodium sulfite or cysteine, the enzyme was inhibited by the former, but not by the latter. Notable effect was not shown by sodium chloride on the browning and the enzymatic activity.

Thus, as suggested by the preceding study, it was demonstrated that the course of the enzymatic browning of chlorogenic acid was divided into two steps, the enzymatic oxidation of chlorogenic acid and the non-enzymatic polymerization of the oxidized product to melanin.