

平成21年6月15日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700581

研究課題名（和文）水菜の褐変とポリフェノール関連酵素との関連の解明

研究課題名（英文）Study on correlation between browning of mizuna and phenolic-related enzymes.

研究代表者

木原 智子 (KIHARA TOMOKO)

中部大学・応用生物学部・助教

研究者番号：10399016

研究成果の概要：近年カット野菜としての消費が増えている水菜について、品質劣化要因である褐変に関わると予想される3つの酵素（ポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、フェニルアラニンアンモニリアーゼ）がどのように褐変に寄与しているかを調べた。活性化処理をしたポリフェノールオキシダーゼの活性が褐変度と高い相関を示し、ポリフェノールオキシダーゼの活性化抑制や活性阻害が褐変の抑制に効果的である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	90,000	1,390,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：水菜、褐変、ポリフェノール、ポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、フェニルアラニンアンモニリアーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 水菜は近年まで京都の伝統野菜として栽培され、鯨肉と一緒にハリハリ鍋として調理されるか、塩漬けにされるなど、産地も調理法も限られた物だった。しかし近年、サラダや様々な料理のトッピングとして生で食されることが多くなるにつれ、産地も広がり、生産量も大きく伸びている。

(2) サラダやカット野菜の品質で劣化因子となるのが、酵素的褐変である。その主な原因は植物に内在するポリフェノールがポリフェノールオキシダーゼ (PPO) により酸化されて褐色の高分子複合体が生成されるこ

とである。また、ペルオキシダーゼ (POD) もポリフェノールの酸化酵素として知られている。カット野菜では、切断により細胞構造が壊され、酸化酵素とポリフェノールが接触し、反応が進行する条件の下で、商品が流通・陳列されることになる。一方、ポリフェノールの生合成経路の鍵酵素となるのは L-フェニルアラニンアンモニリアーゼ (PAL) である。カット野菜の加工処理によって PAL が誘導され、ポリフェノールが商品の流通・陳列中に随時生合成されると予想される。このようにカット野菜は褐変が進行しやすい状態にある。

(3) 水菜がカット野菜として利用されることが増加しているにもかかわらず、水菜のこれらの酵素やポリフェノールについてはほとんど知られておらず、褐変を制御するための基礎的知見を得ることが必要と考えた。

2. 研究の目的

ポリフェノールが生合成され、酸化されて褐色高分子色素を形成する過程(図1)で関与が予想される PPO, POD, PAL について、水菜においてこれらが褐変にどの程度寄与しているのかを明らかにし、褐変抑制を効果的に行うための基礎的知見を得ることを目的とした。

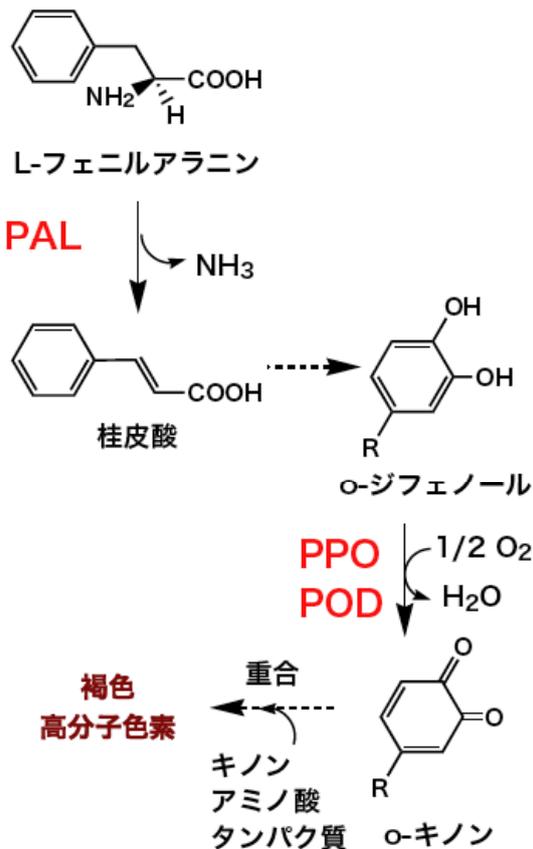


図1 ポリフェノール由来の褐色高分子色素の生成過程

3. 研究の方法

- (1) 水菜試料は市販品または当大学内のガラス温室にて水耕栽培した9品種を使用した。
- (2) 水菜の根本から1cmと4cm部位を切断し、4cm部位の切断面のa*値を色差計により測定し、切断直後のa*値と切断4日後のa*値の差を褐変度とした。
- (3) 水菜の根本9cmを3cmごとに切断し4℃暗所で保存した。切断直後から4日後まで1日ごとに各酵素活性を測定した。
- (4) 酵素の抽出にはPPO, POD; 0.1 M リン酸

バッファー (pH 6.5), PAL; 0.1 M ホウ酸バッファー (pH 8.0) をそれぞれ2倍容用い、ミキサーでホモジナイズ後遠心分離した上清を粗酵素抽出液とした。酵素活性はマイクロプレートリーダーを用いて測定した。各酵素反応液の組成はPPO; 4mM ピロガロール / 0.1 M リン酸バッファー (pH6.5), POD; 4mM ABTS・0.012% H₂O₂ / 0.1 M 酢酸バッファー (pH4.2), PAL; 5mM L-フェニルアラニン / 0.1 M ホウ酸バッファー (pH9.0) とした。酵素溶液の終濃度は全て10% (v/v) とした。反応温度と測定波長はPPO: 30℃・420nm, POD: 25℃・414nm, PAL: 40℃・290nm とした。PPOは抽出直後と粗酵素抽出液を30℃で3時間インキュベートしたものについて活性測定を行った。粗酵素抽出液のタンパク質濃度はBradford法で測定した。

4. 研究成果

(1) 切断面のL*, a*, b*値のうち、a*値は切断1日後から一定の割合で上昇し続け、目視による褐変度とよく対応していたのはa*値であることが判明した(図2)。

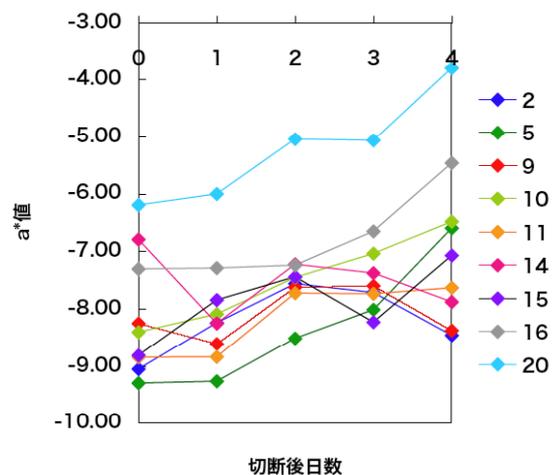


図2 a*値の切断後の経時変化

(2) PPOは植物によって異なる基質特異性を示すが、水菜の場合はピロガロール、L-DOPA, (+)-カテキンの順に基質特異性が高いことが認められた。

(3) 抽出直後はほとんどPPO活性が見られないが、抽出液を30℃で40分以上インキュベートすると活性の上昇がみられ、2時間後から4時間後まで一定の値を保った。PPOは植物によっては不活性な状態で存在していることがあり、水菜の場合は不活性な状態で存在していることが認められた。他の植物由来のPPOはSDSやグアニジンの添加により活性化する場合があるが、水菜PPOはこれらを添加しても活性化しなかった。

(4) 各酵素活性と褐変度の相関

① 【PPO】 活性化処理 (30℃, 3時間イ

ンキュベート)をしなかった場合、測定期間中を通してPPO活性は見られなかった。活性化処理した場合、生重量あたりのPPO活性は切断直後から切断2日後まで一定の値を示し、その後減少した(図3)。褐変度の大きい5品種(No. 5, 10, 15, 16, 20)はPPO活性も他の4品種に比べて測定期間中を通して高かった(図2, 3)。また、測定期間中の生重量あたりのPPO活性の和は褐変度と高い相関を示した(図4)。

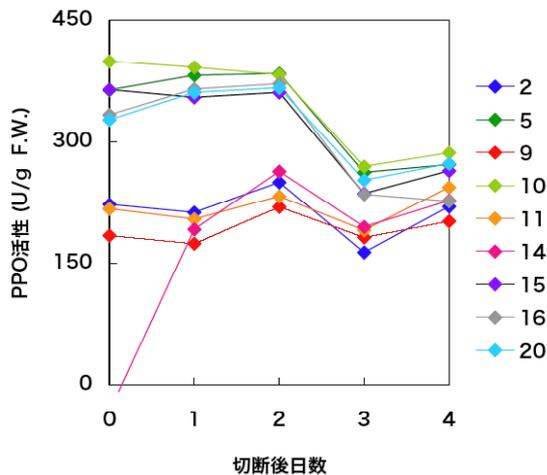


図3 PPO活性(活性化処理有り)の切断後の経時変化

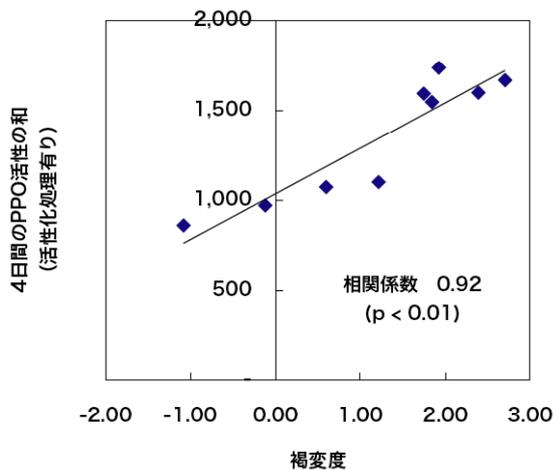


図4 水菜のPPO活性と褐変度の相関

② 【POD】 生重量あたりのPOD活性は測定期間中を通して緩やかに上昇した。比活性は3日後までは一定の値を示したが、3日後から4日後にかけて全ての品種で大きく上昇した(図5)。POD活性と褐変度には相関はみられなかった。

③ 【PAL】 生重量あたりのPAL活性と比活性は同じ挙動を示し、測定期間中を通して上昇傾向が見られた。2日後から3日後に

かけて大きく上昇し、その後減少する品種が3つあった(図6)。PAL活性と褐変度には相関はみられなかった。

以上のことから、水菜のPPOは不活性な状態で存在するが、活性化した場合には褐変に大きく寄与すると考えられる。水菜の褐変を抑制するためにはPPOの活性化の抑制や、PPO活性の阻害が効果的である可能性が示唆され、今後は活性化機構の解明や阻害剤の検討が必要である。

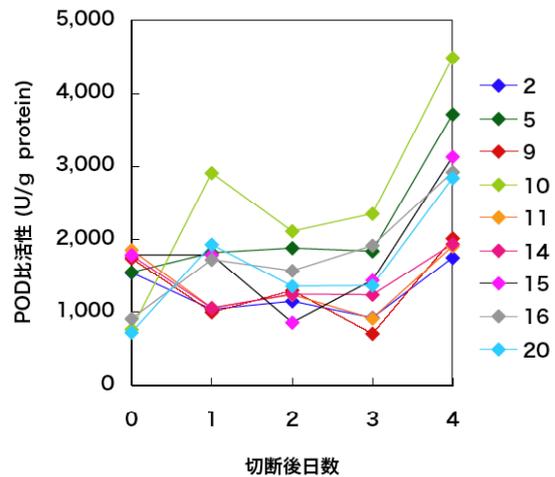


図5 POD比活性の切断後の経時変化

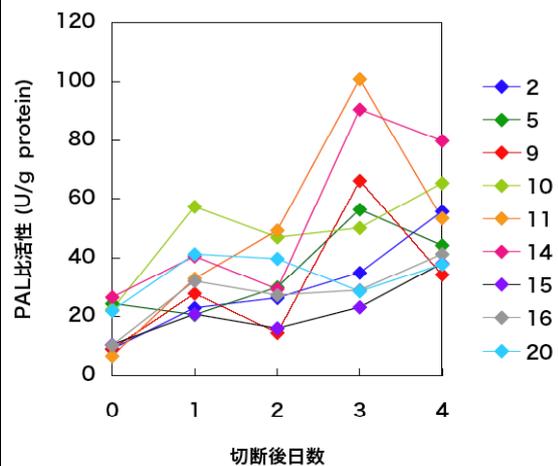


図6 PAL比活性の切断後の経時変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

木原 智子, 水菜の褐変におけるポリフェノール関連酵素の影響, 第54回日本食品科

学工学会，2007年9月8日，中村学園大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 智子 (KIHARA TOMOKO)

中部大学・応用生物学部・助教

研究者番号：10399016：