

フェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性および ポリフェノールオキシダーゼ活性の抑制による レタス切り口の褐変防止法

茨木俊行・鶴 暁子¹⁾・中村 駿・松本明芳

レタスの商品性低下に影響を及ぼす切り口褐変を防止するため、茎部より抽出したフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 及びポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性の抑制条件を検討した。さらに、茎部を細断した試料をインキュベートし、*in vivo* における酵素活性を明らかにするとともに、効果的な切り口褐変防止方法について検討した。PAL 活性は反応温度が低いほど低下した。特に 10℃以下で酵素活性は著しく低かった。PAL ではレタス茎部の切断傷害数時間後に活性が増加し、そのうち低下するという一時増加型の活性パターンを示した。このパターンは低温下またはアリルイソチオシアネート (AITC) 処理下で発現が遅れた。これに対し、PPO 活性は PAL 活性の増加より数時間遅れて徐々に増加するという漸増型の活性パターンを示した。このパターンは低温下で発現が遅れ、AITC 処理下では活性の増加は認められなかった。褐変現象は PAL 活性が増加し、さらに PPO 活性もわずかに増加しはじめた頃より始まり、PPO 活性の増加とともに進行した。AITC 処理すると PPO 活性は増加せず、褐変は認められなかった。レタス切り口に AITC 処理後、20℃に保存した試料で褐変抑制効果が認められたのは貯蔵開始後 1 日間のみで、それ以降はむしろ無処理試料より褐変は進行した。5℃の場合には AITC 無処理においても褐変の進行をある程度抑制できたが、長く商品性を保持することはできなかった。しかし、AITC 処理後、5℃に保存した試料では、褐変が抑制され、収穫後 4 日経過した後も商品性は良好に維持された。

[キーワード：レタス切り口、褐変、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ]

Prevention of the Browning Symptom on Lettuce Stem Cut Surface by Suppressing the Activities of Phenyl-alanine Ammonia Lyase and Polyphenol Oxidase. IBARAKI Toshiyuki, Akiko TSURU, Hiroshi NAKAMURA and Akiyoshi MATSUMOTO (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 14: 95-98 (1995)

To prevent the browning of lettuce stem cut, the activities of Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and Polyphenol oxidase (PPO) involved in the tissue browning were examined with regard to the temperature and chemical treatments. The lower the incubation temperature, the less the activities of PAL were. The PAL activity increased steeply for 12 hours after the incubation and then decreased when newly chopped lettuce stem was incubated at 20℃. On the other hand, the PPO activity increased slowly. Similar activity patterns for PAL and PPO were also found at 5℃, although the response was delayed. With AITC treatment, the PPO activity remained constant even at 20℃ although the PAL activity increased for several hours and then decreased at 36 hours after the treatment. Taking into account of the enzymic activity, the effective treatments were investigated to prevent the cut lettuce stem cut from browning. The lower the incubation temperature, the lower the brown index of the symptom was. However, the tissue browning could not be avoided either under a lower temperature or with AITC treatment. The tissue could be prevented from browning only when it was kept at 5℃ (low temperature) and treated with AITC solution. From these results, it is concluded that lettuce should be stored under a lower temperature after the cut surface was soaked with AITC solution.

[Key words : Lettuce stem cut, Browning, Phenylalanine ammonia lyase, Polyphenol oxidase]

結 言

レタスは結球野菜の中では最も鮮度の低下が早い作目の一つである。そのため、流通段階における商品性の維持に効果的な鮮度保持条件及び技術が要求される。

レタスの収穫から出荷までの日数は近郊産地で 1～2 日、遠隔地では 3 日間を要する。さらに、平成元年度青果物卸売市場調査報告 (農林水産省統計情報局) によると東京都中央卸売市場におけるレタス入荷量のうち 14.2% が転送に振り向けられ、東京近隣の市場をはじめ遠く札幌市場まで輸送されている。このような状況を考慮すると、少

なくとも収穫後 4 日間はレタスの商品性を保持する必要がある。

レタスの商品性低下の主な要因は切り口の褐変、葉部の褐色小斑点、腐敗、萎凋、黄化等である。このうち、切り口の褐変は収穫後のごく初期から発生するが、これがレタスの価格に与える影響は大きい。特に、市場へのレタスの入荷量が多いときは、結球部分が健全であるにもかかわらず、切り口が褐変したレタスの市場価格は著しく低下する。レタス茎部の褐変については Brecht らの報告^{2,3)}がある。これは、茎全体に対する雰囲気ガス濃度及び貯蔵温度等の影響を検討したものであり、茎切り口のみ褐変について検討した報告はない。

1) 前福岡県農業総合試験場

植物体では障害、病気、刺激等によりフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) が誘導されると、一連の代謝系を経て、遊離アミノ酸のフェニルアラニンがクロロゲン酸等のポリフェノール類に変化する。PAL は障害等により誘導される酵素であるとともに、ポリフェノールを生成する際の律速酵素でもある。一般に褐変現象は、ポリフェノール類のポリフェノールオキシダーゼ (PPO) による酸化により発生する現象と考えられている。従って、レタスの褐変防止対策には褐変に関与している酵素の性質を明らかにし、その抑制条件を検討することが不可欠である。

褐変を防止するため、含硫アミノ酸⁴⁾、還元型アスコルビン酸¹⁰⁾とその誘導体⁶⁾、pH²⁾等を用いてリンゴやマッシュルーム等の PPO 活性の抑制条件を検討した例が報告されている。本報ではこれらを参考に、レタスの茎部より抽出した褐変酵素の活性抑制条件を明らかにするとともに、切り口褐変防止法を検討し、2, 3 の知見を得たので報告する。

材料及び方法

本研究で供試したレタス品種は「菊川 102 号」であり、1989 年から 1992 年にかけて、福岡県山門郡三橋町で栽培されたものを用いた。朝 8 時までに収穫したレタスを、直ちに福岡県農業総合試験場に搬入し、以下の試験に供した。

1 酵素活性の測定

PAL 活性及び PPO 活性を調査するため、レタスの茎部を pH7.5 のマックルベン緩衝液とともに磨砕・抽出し、遠心分離した。上澄み液中の低分子部分を透析により除去し、これを粗酵素液とした。PAL 活性を測定するため、試験管に pH8.5 のトリス-塩酸緩衝液 3 ml を入れ、基質として 10mM のフェニルアラニン 1 ml を加えた。これを恒温水槽に移し、試験管内の温度が 35℃ になった後に、粗酵素液 1 ml を加え、60 分後に 268nm の吸光度を測定した。1 分間に 268nm の波長を 1 吸光度 (OD) 変化させるのに必要な酵素量を 1 unit とした。PPO 活性を測定するため、試験管に pH7.5 のマックルベン緩衝液 3 ml を入れ、基質として 1% のオルトフェニレンジアミン 0.1ml を加えた。これを恒温水槽に移し、試験管内の温度が 35℃ になってから粗酵素液 1 ml を加え、60 分後に 430nm の吸光度を測定した。1 分間に 430nm の波長を 1 吸光度 (OD) 変化させるのに必要な酵素量を 1 unit とした。

2 酵素活性に及ぼす反応温度の影響

反応温度が酵素活性に及ぼす影響を調査するため、0, 5, 10, 15, 20, 30℃ の各温度で酵素活性を測定した。

3 切断障害後の酵素活性の経時的変化

フードプロセッサ (松下電気産業社製 MK-K41) を用いてレタス茎部を細断した後、シャーレに 6g 計り取り蒸留水 1 ml を加え、5℃ 及び 20℃ の恒温室に保存した。アリルイソチオシアネート (AITC) の酵素活性抑制効果を調査するため、蒸留水の代わりに 500ppm の AITC 水溶液 1 ml を添加し、20℃ の恒温室に保存した。以後経時的に褐変程度を調査するとともに、抽出した酵素について、PAL 及び PPO 活性を測定した。

4 切り口褐変防止効果

レタスの外葉を除去し、茎を切断した後、ポリスチレン製フィルムでハンカチ包装し、以下の調査に用いた。貯蔵

温度及び AITC 処理が切り口褐変に及ぼす影響を調査するため、切り口切断直後に 500ppm の AITC 水溶液を塗布した後、5℃ 及び 20℃ の恒温庫に貯蔵した。以後、これらの試料について経時的に日本電色工業社製の測色色差計 (1001DP) を用いて切り口の L 値、a 値及び b 値を測定した。さらに、達観により褐変程度を調査した。評価方法は、切り口処理直後を 0、やや褐変しているものの商品性に影響を及ぼさないものを 1、商品性に若干影響を及ぼす褐変を 2、商品性に影響を及ぼす褐変を 3、商品性に多大な影響を及ぼす褐変を 4、もはや商品価値がないまでに褐変している状態を 5 とする評点法で調査した。

結果及び考察

1 酵素活性に及ぼす反応温度の影響

PAL 及び PPO 活性に及ぼす反応温度の影響を第 1 図に示した。反応温度が低いほど酵素活性は低下した。PAL では、30℃ における活性を 100 とした場合、20℃ における活性は約 40 にまで低下した。さらに、0~5℃ では酵素の活性は著しく抑制され、特に 0℃ では PAL の活性はほとんど認められなかった。著者らは前報⁸⁾において、PPO 活性に及ぼす反応温度の影響について調査し、0~10℃ の温度域における低下割合が、10~30℃ のそれよりも小さく、0℃ においても、30℃ における活性の 10% が維持されたことを明らかにした。このように、PAL と PPO では 0~10℃ の低温域における活性に差があるものの、10℃ 以下における活性はいずれも著しく低かった。

2 切断障害後の酵素活性の経時変化

レタス茎部の細断物を 20℃ でインキュベートした場合、8 時間後から褐変が始まり、以降徐々に進行した。48 時間後には褐変が最も進み、72 時間後に茎部の腐敗が始まった (第 2-A 図)。PAL 活性は 2 時間後から増加しはじめ、12 時間後にピークに達した。その後活性は低下し、24 時間後にはインキュベート開始直後と同程度にまで低下するという一時増加型の活性パターンを示した。これに対し PPO 活性では、5~8 時間後から増加が始まり、48 時間

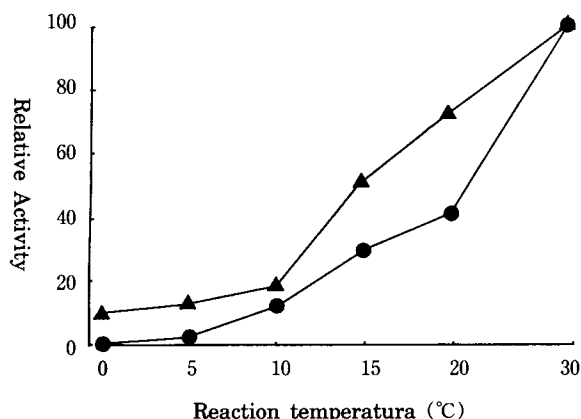


Fig.1. Effects of reaction temperature on phenylalanine ammonialyase and polyphenol oxidase activities of lettuce stem.

Relative Activity = (enzyme activities performed over temperature ranging from 0℃ to 30℃) / (enzyme activity performed at 30℃) × 100. (●) PAL activity, (▲) PPO activity.

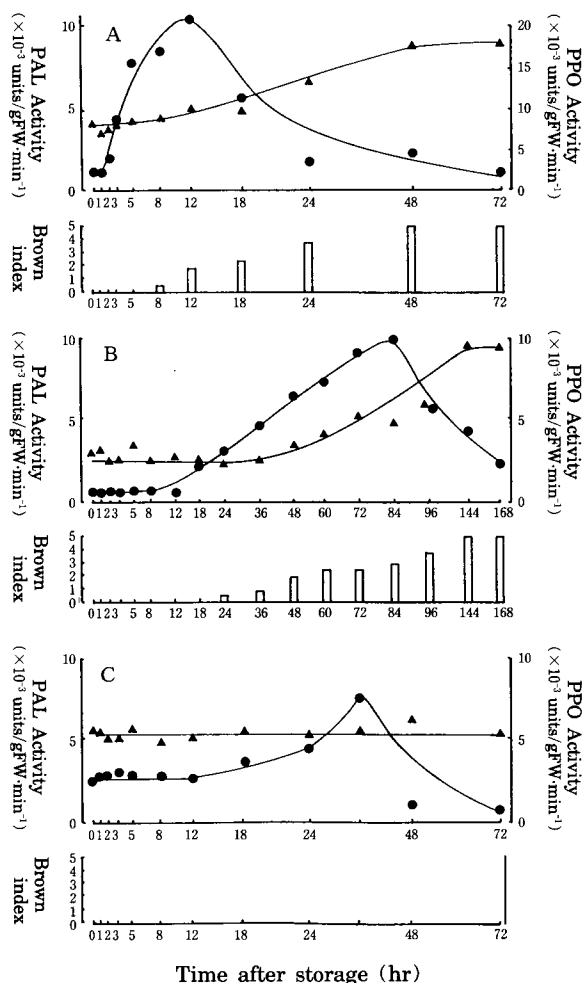


Fig. 2. Changes in enzyme activities and browning of chopped lettuce.

A: Chopped lettuce stem stored at 20 °C, B: that stored at 5 °C, C: Chopped lettuce stem with AITC stored at 20 °C. Brown index is based on the discoloration; 0, no browning; 5, severe browning. Symbols are same in Fig. 1.

後まで徐々に増加する漸増型の活性パターンを示した。

5 °Cでインキュベートした場合の褐変は、20 °Cの場合と比べ、発生開始時間、進行程度ともに遅く、24時間後から徐々に始まり、144時間後には、もはやこれ以上進行しないまでに褐変した(第2-B図)。このときのPAL活性は20 °Cの場合と同様に一時増加型のパターンを示したが、増加開始時間は18時間後、ピークは84時間後であり、5 °Cの場合は20 °Cのときに比べ増加開始時間、ピーク時間ともに遅かった。また、PPO活性も20 °Cの場合と同様に漸増型の活性パターンを示すが、増加開始時間は遅く48時間後から増加を開始した。

著者らは前報⁸⁾においてPAL活性とPPO活性を抑制する化合物について検討し、AITCはPPO活性抑制効果が高く、PAL活性抑制効果もわずかながら認められることを報告した。そこで、AITC処理し、20 °Cでインキュベートした場合の褐変程度と酵素活性について同様に調査した。この場合、茎切断物の褐変はまったく認められず、72時間後に茎部の腐敗が始まった。PAL活性は36時間後に活性ピークを示したものの、PPO活性の増加は認められなかった(第2-C図)。これらのことから、PAL活性が褐変の律速因子となり、PPOが作用して発生するものと

考えられる。Hyodoら⁷⁾も、レタスのRusset Spot(褐色小斑点)の形成の前にPAL活性が増大することを観察し、PALがRusset Spot形成の律速因子の一つであることを示唆している。また、阿部ら¹⁾は、貯蔵中のナス果実のPPO活性が褐変に先立ち急増し、褐変が起こった後は低下することを報告している。レタスにおける今回の試験では、PPO活性が褐変に先だって増加し始めたが、その後の活性低下は認められなかった。一方、AITC処理した場合はPAL活性は増加するものの、PPO活性が増加せず、褐変を始める前にレタス切断物自体が腐敗した。

前報⁸⁾および実験1(in vitro)では、低温及びAITC処理によりPAL活性及びPPO活性を抑制することができた。これを受けた実験2(in vivo)では、褐変に先立って細胞内でのPAL活性が増加し、その後低下するという一時増加型の活性パターンが認められた。これに対して、PPO活性はPAL活性の増加より数時間遅れ、褐変が始まる直前から徐々に増加するという漸増型の活性パターンを示した。この二つの酵素活性の発現は低温条件で遅れ、さらにAITC処理下ではPPO活性は発現しなかった。このことから、低温によって細胞内においても酵素活性が抑制されたものと考えられる。in vivoにおいてAITCが褐変を抑制することはカットキャベツでも報告^{9,11)}がなされているが、この褐変抑制機構はAITCがキャベツのPPOを直接抑制するのではなく、褐変系に基質を供給するPAL活性を抑制することによる。しかし、レタスにおいては、AITCによるPAL活性の抑制は認められず、AITCがPPO活性の増加を抑制したために褐変が抑制されたことが明らかになった。

3 切り口褐変防止効果

レタスの褐変現象は、基部全体が変色する場合と、基部中央が変色する場合とがある。そこでこの変色を数値化するために、切断後のレタス基部を色差計を用いて測定した(第1表)。褐変が進行するにつれL値は低下し、a値は上昇した。b値の変動は小さかった。つまり、褐変が進むに

Table 1. Effects of storage temperature and AITC treatment on colorimetry of cut surface of lettuce stem.

	Storage temperature (°C)	AITC treatment	Days after harvest				
			0	1	2	3	4
L	20	—	61.9	55.3	54.1	49.3	
	20	+	70.7	68.7	50.2	46.1	45.3
	5	—		72.9	70.6	65.5	61.1
	5	+		74.1	73.5	72.7	70.5
a	20	—		8.2	9.6	7.2	8.8
	20	+		-1.5	7.8	8.2	6.8
	5	—	-5.2	-4.1	-2.0	2.8	6.3
	5	+		-5.5	-5.0	-4.8	-3.8
b	20	—		20.4	19.0	19.3	19.3
	20	+		20.2	21.5	19.4	19.6
	5	—	18.6	20.3	19.6	19.3	19.2
	5	+		19.8	19.3	19.5	19.6

In AITC treatment, lettuce stem cut surface was soaked with 500ppm AITC solution.

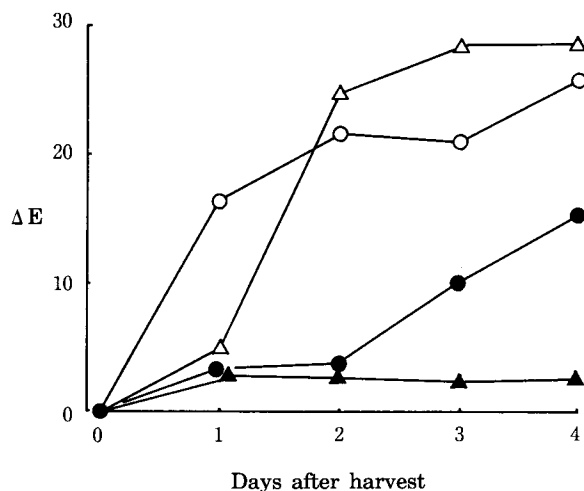


Fig.3. Effect of storage temperature and AITC treatment on ΔE of cut surface of lettuce stem.

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2}$$

L_0 , a_0 , b_0 are values of colorimetry immediately after cutting the stem. (○) 20 °C, (△) 20 °C -AITC treatment, (●) 5 °C, (▲) 5 °C -AITC treatment.

つれ、基部は赤色が増し、つやが低下することがうかがえる。Gerald ら⁵⁾は、色差計を用いてリング切り口を測定したところ、褐変が進行するにつれ L 値が減少し、 a 値が増加するという結果を得、 L 値と a 値は褐変のよい指標になると報告している。茎切断直後の色差値を L_0 , a_0 , b_0 とし、ある時点での色差値 L , a , b との差を、

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2}$$

としたとき、 ΔE 値の経時変化 (第3図) は褐変の経時変化 (第4図) と良く一致した。切り口に何も処理せず、20 °C でレタスを貯蔵した場合は収穫1日後より褐変が認められた。この場合、褐変程度は達観評価の3を上回り、商品性は著しく低下した。また、2日後以降の褐変は緩やかに進行した。これに対して、切り口に AITC 水溶液の処理を施した後に 20 °C で貯蔵した場合、処理1日後までは褐変が抑制されたが、2日後より急激に進行した。一方、切り口に何も処理しない状態で 5 °C で貯蔵した場合、収穫後1日後までは褐変は抑制されたが、2日後以降徐々に進行し、3日後には褐変程度が2を上回った。しかしながら、切り口に AITC 水溶液を浸透させ、5 °C で貯蔵すると、褐変の抑制効果は高く、収穫4日後においてもほとんど商品性は損なわれなかった。

以上から、レタス切り口に AITC を塗布し、5 °C の低温下で流通させると切り口の褐変を抑制でき、収穫後4日間は商品性を保持できる。

引用文献

- 1) 阿部一博・茶珍和雄・緒方邦安 (1976) ナス果実の低温障害に関する研究Ⅱ. 低温障害発生に対する熟度ならびに収穫時季の影響. 園学雑 45 : 307-312.
- 2) BRECHT, P.E., A.A.KADER and L.L.MORRIS (1973) Influence of postharvest temperature on brown stain of lettuce. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98 : 399

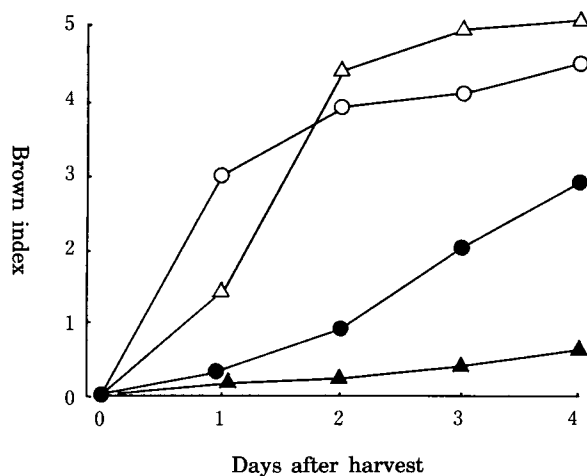


Fig.4. Effects of storage temperature and AITC treatment on browning of cut surface of lettuce stem.

Brown index is the same in Fig.2. Symbols are the same in Fig.3.

-402.

- 3) BRECHT, P.E., A.A.KADER and L.L.MORRIS (1973) The effect of composition of atmosphere and duration of exposure on brown stain of lettuce. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98 : 536-538.
- 4) FRIENDMAN, M. and I. Molnar-PERL (1990) Inhibition of browning by sulfur amino acid. I. Heated amino acid-glucose system. J. Agric. Food Chem. 38 : 1642-1647.
- 5) GERALD M.Sapers and Frederic W. DOUGLAS Jr. (1987) Measurement of enzymatic browning at cut surfaces and in juice of raw apple and pear fruits. J. Food Sci. 52 : 1258-1262.
- 6) HSU, A.F., J.J.SHIEH, D.D.BIKKS and K. WHITE (1988) Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic acid derivatives. J. Food Sci. 53 : 765-769.
- 7) HYODO, H., H.KURODA and S.F.YANG (1978) Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of resset spotting caused by ethylene. Plant Physiol. 62 : 31-35.
- 8) 茨木俊行・平野稔彦・鶴 暁子・松本明芳 (1990) レタス切口褐変防止に関する研究Ⅰ. レタスの褐変酵素について. 福岡農総試研報 B-10 : 19-22.
- 9) 永田雅靖・石井現相・西条了康 (1989) アリルイソチオシアネートによるカットキャベツの褐変防止とエチレン生成の阻害機構. 園学要旨. 平 1 : 642-643.
- 10) SAPERS, G.M. and M.A.ZIOLOKOWSKI (1987) Comparison of erythorbic and ascorbic acids as inhibitors of enzymatic browning in apple. J. Food Sci. 52 : 1732-1735.
- 11) 矢野昌充・西条了康・太田保夫 (1986) イソチオシアネート類によるカットキャベツの褐変防止とエチレン生成阻害. 園学雑 52 : 194-198.