

リンゴ果肉の酵素的褐変現象に関する研究

第1報 リンゴ果肉中のポリフェノール物質の分離

平田 政雄 堀川 博朗

by Masao Hirata Hiroaki Horikawa

Study on the Enzymatic Browning Phenomenon of Apple Fruit

Part I. Isolation of Polyphenol Substances in Apple Fruit

In general, when a peeled apple is exposed in air, its surface turns into a brown color gradually. This phenomenon is caused by the oxidative reaction of phenol substances by the polyphenol oxidase in apple. Many people have studied on this enzymatic browning reaction for a long time, but the reaction mechanism and the chemical structure of this brown compound have not been yet cleared. So, authors tried to elucidate these problems.

In this report, isolation method and identification of polyphenol compounds in apple fruit, are presented.

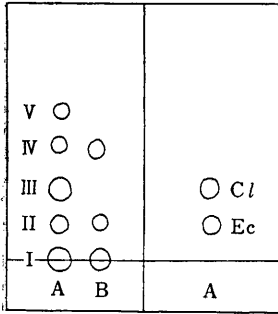
剥皮したリンゴ果肉を空气中に放置すると、次第に褐変してくる。これは剥皮の際に、リンゴ細胞が破壊され、その結果、酸化酵素ポリフェノールオキシダーゼが活性化されて、果肉中のポリフェノール物質を酸化するためである。他の果実類、野菜類に現われる褐変もこれに類似する反応と考えられている。リンゴの褐変現象に関する研究は古く、研究報文も多い。本邦においては、中林⁽¹⁾によって詳細な研究がなされ、褐変現象に関与するポリフェノール物質として、クロロゲン酸、L-エピカテキンが明らかにされている。しかしながら、褐変反応の機構および生成する褐色物質の化学的性質に関しては、多くの研究にもかかわらず、いまだ明らかにされていない。そこで著者等は、褐色物質の化学的性質を明らかにすることを目的として、研究を始めた。本報告では、主として、リンゴ果肉中のポリフェノール物質の検索および分離法について述べる。

実験および結果

1. ポリフェノール成分の検索

市販リンゴ(国光)を剥皮および除芯後、直ちに冷アセトン中で充分に磨砕し、その濾液について薄層クロマトグラフィーを行なった。結果は第1図の通りである。

薄層クロマトグラフィー(1次元上昇法 2.5×10 cm):塗布剤(第一化学薬品製シリカライダー)、展開剤(トルエン:蟻酸エチル:蟻酸=4:4:1)、発色剤:赤血塩試薬(0.5% フェリシアン化カリウム水溶液と0.5% 鉄ミョウバン水溶液の等量混合液——噴霧後ポリフェノール物質は直ちに青



第1図 リンゴ果肉抽出液の薄層クロマトグラム

A: 赤血塩試薬で発色
B: 塩酸—バニリン試薬
Cl: クロロゲン酸
Ec: L-エピカテキン

色を呈する), 塩酸—バニリン試薬(10%バニリンエタノール溶液 5 ml と濃塩酸 3 ml を使用直前に混合して噴霧するとフラバノール型カテキンは赤橙色を呈する)。

スポットⅢおよびⅡは、発色剤、紫外線下での蛍光、標準物質との比較などから中林等の明らかにしたクロロゲン酸およびL-エピカテキンに該当するが、他のスポットについては明らかでない。一方、上記濾液について塩酸—イソamilアルコールを使用して常法により⁽²⁾処理した結果、イソamilアルコール層は鮮紅色となり、ロイコアントシアンの存在を示した。この物質は塩酸—バニリン試薬で赤橙色を呈するので、スポットⅠまたはⅣのいずれかがロイコアントシアンに該当するものと思われる。

2. 褐変反応後におけるポリフェノール物質の検索

リンゴ果肉を磨碎し、十分に褐変させた後、上記と同様にアセトンを加え、その濾液について薄層クロマトグラフィーを行なった結果、ポリフェノール物質はすべて消失し、検出することはできなかった。

3. ポリフェノール物質の分離および同定

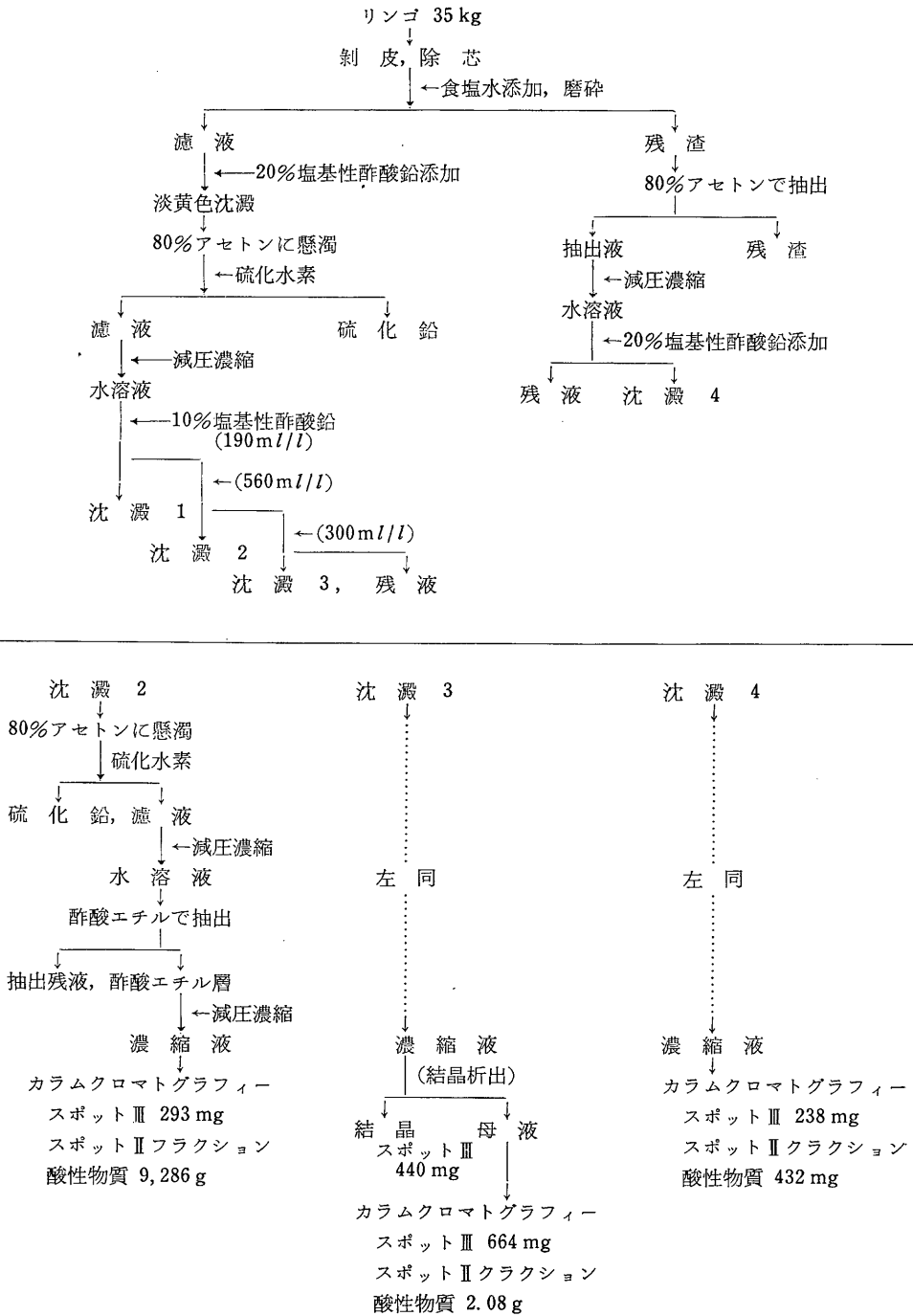
上記1および2の実験によって、リンゴ果肉中には少くとも5種類のポリフェノール物質が存在し、それらがすべて褐変反応後は消失することが確認できたので、これらポリフェノール物質の分離および同定を試みた。

(1) ポリフェノール物質の分離

市販リンゴ(国光)を第2図に示す手順で処理し、ポリフェノール物質の分離を行なった。

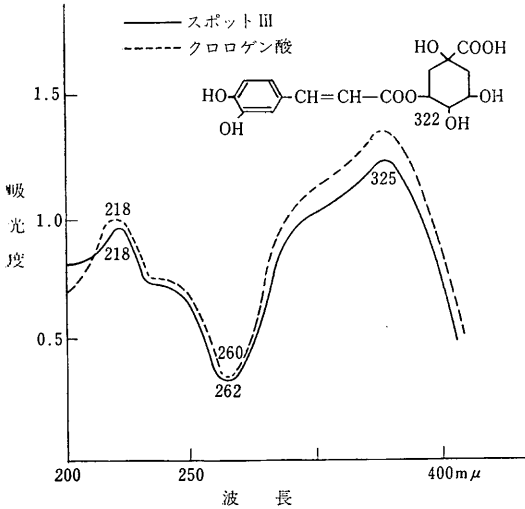
リンゴ 35 kg を剥皮および除芯し、飽和食塩水を 20 ml/kg の割合で添加した後、ジュースで磨碎した。これをガーゼで濾過し、濾液に20%塩基性酢酸鉛を沈澱が完結するまで加える。この沈澱を濾別し、80%アセトンに懸濁させ、これに硫化水素を通すと、鉛とポリフェノール物質のキレート結合が切れ、ポリフェノール物質はアセトン溶液に溶解するので、濾過して濾液を得る。この濾液を減圧濃縮してアセトンを除去して水溶液となし、第2図の如く、10%塩基性酢酸鉛の添加量によって、生じる沈澱を3つに分画した。リンゴパルプを主成分とする残渣は、80%熱アセトン溶液で1時間抽出した後、抽出液中のアセトンを減圧濃縮することによって除去し、得られた水溶液に20%塩基性酢酸鉛を添加して沈澱を完結し、濾別して沈澱4とした。かくして得た沈澱1~4の中、沈澱1には、殆んどポリフェノール物質が含まれていなかったため、沈澱2~4の各々について、次のように処理した。沈澱を80%アセトンに懸濁し、上記と同様に処理して得た水溶液を酢酸エチルで繰返し抽出する。抽出液を合して減圧濃縮すると、沈澱3の濃縮液からは直ちにスポットⅢに該当する結晶が析出したので濾別した(440 mg)。この母液および沈澱2, 4の濃縮液は、シリカゲルカラムクロマトグラム法(150~200メッシュ、展開剤: 酢酸エチル)により、スポットⅢ, Ⅱおよび酸性物質の部分に分画した。スポットⅢに該当するフラクションを集め、濃縮すると、直ちに結晶を析出したがスポットⅡに該当するフラクションは、結晶せず、液状のままである(2~3 ml)。ポリフェノール物質ではないが、酸性を示すフラクションを集め濃縮すると、容易に結晶として得ることができた。結局、35 kg のリンゴから、スポットⅢに該当する物質 1,635 g, スポットⅡに該当する濃縮液(2~3 ml), 酸性物質 11,798 g を得た。

(2) ポリフェノール物質の同定

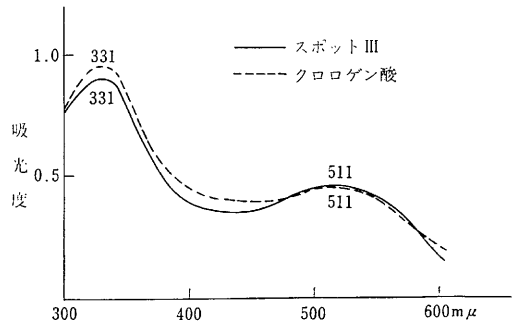


第2図 リンゴ果肉中のポリフェノール物質分別法

スポットⅢに該当する粗結晶をメタノールから再結晶させると、白色針状結晶として得ることができる。この結晶は、第1図のスポットⅢと同じ位置を示し、紫外線下で青色螢光を発する。また、赤血塩試薬で青色を呈し、塩酸—バニリン反応は陰性である。第3図には、スポットⅢとクロロゲン酸の紫外外部吸収スペクトル、および、スポットⅢとクロロゲン酸をジアゾ法で発色させて⁽³⁾測定した可視部吸収スペクトル図を示す。



第3図(a) スポットⅢ及びクロロゲン酸の紫外外部吸収スペクトル



第3図(b) ジアゾ法で発色させたスポットⅢ及びクロロゲン酸の可視部吸収スペクトル

以上の結果より、スポットⅢは、クロロゲン酸である。スポットⅡに該当する濃縮液中には薄層クロマトグラムおよびペーパークロマトグラム上で L-エピカテキンと同一の位置を占め、発色剤で同色を呈する物質が存在する。この物質が中林⁽¹⁾の分離した L-エピカテキンと思われるが、現在単離中である。

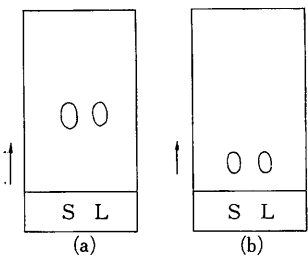
なお、ポリフェノール物質以外で、結晶として多量に得た酸性物質は、ペーパークロマトグラム法（1次元上昇法、濾紙、東洋 No.50, 8×12 cm, 発色剤, BPB 指示薬）により、リンゴ酸と同定した（第4図参照）

(3) ロイコアントシアンの同定

実験1で塩酸—イソamilアルコール法により、リンゴ果肉中にロイコアントシアンが存在することを確認したので、更にその種類の同定を試みた。ところでロイコアントシアンは極めて不安定であり、純粋に単離することは困難である。それで、塩酸—イソamilアルコール法により比較的安定なアントシアニンに変化させて検討した。

アントシアニンは第1表に示す如く C 環につく水酸基の数により3種に大別することができる。

そこで、これら3種のアントシアニンを調製し、リンゴ果肉のロイコアントシアンから誘導したアントシアニンと化学的に比較した。

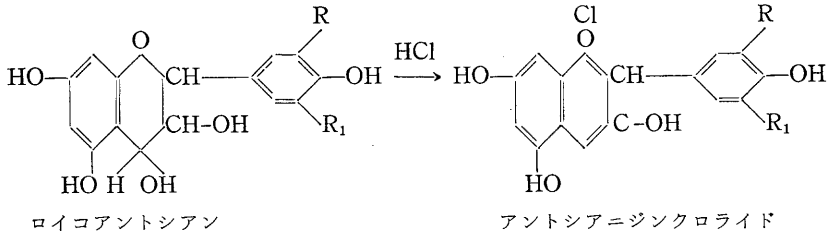


S : 酸性物質 L : リンゴ酸
展開剤

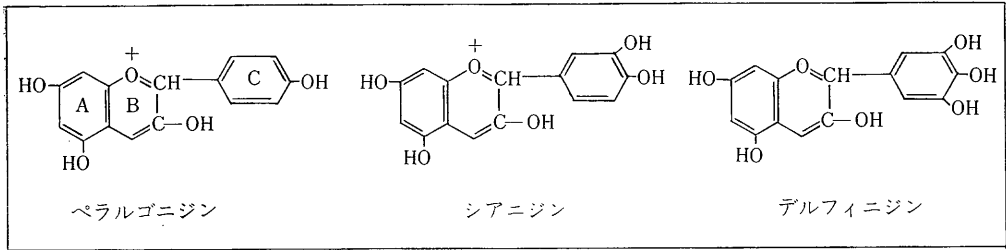
(a) n-ブタノール-酢酸-水 (4 : 1 : 5)

(b) エタノール-アンモニア水-水 (80 : 4 : 16)

第4図 リンゴより得た酸性物質のペーパークロマトグラム

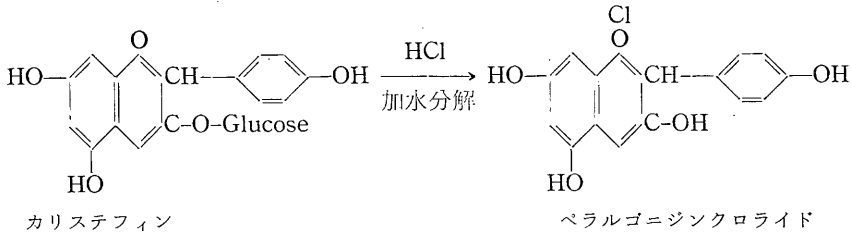


第1表 アントシアニジンの基本型



(i) ペラルゴニジン溶液の調製

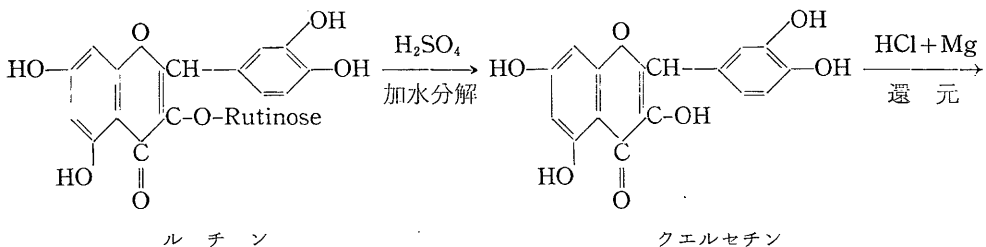
イチゴの中にはペラルゴニジン系アントシアニンであるカリステフィンが存在するので、イチゴより次の如くしてペラルゴニジン溶液を調製した。

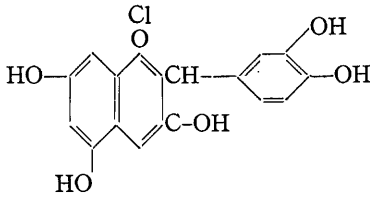


市販イチゴを磨碎し、これに約倍量のn-ブタノールを加え抽出すると、カリステフンはブタノール層に移り鮮かな赤橙色を呈した。ブタノール層を分取し、塩酸で十分に酸性にした後、沸騰浴中で30分加熱すると、ペラルゴニジンのクロライドとなる。この加水分解液をカラムクロマトグラム法(100~200メッシュセルロースパウダー、展開剤：2規定塩酸アセトン1：1混合液、1.2×23 cm)により精製した。

(ii) シアニジン溶液の調製

ルチンから次の如くして調製した。



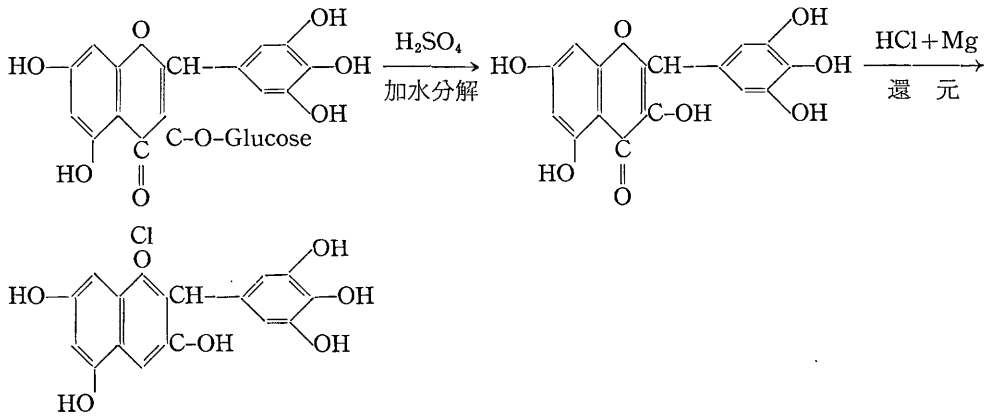


シアニジンクロライド

ルチン 200 mg を 2% 硫酸 20 ml に懸濁し、沸騰浴中で 30 分間加熱後、冷却するとアグリコンのケルセチンが析出する。これを濾別し、乾燥後、少量のメタノールに溶解する。次にメタノール溶液にマグネシウム粉末を加え、これに 4 規定塩酸を滴下すると、発生する水素によってケルセチンは還元され、シアニジンを生じる。反応液に未反応のケルセチンが析出するまで水を加え、ケルセチンを濾別した後、濾液を減圧濃縮する。濃縮液をイソアミルアルコールで抽出し、(i)と同様にカラムクロマトグラム法で精製した。

(iii) デルフィニジン溶液の調製

ミリチリンより(ii)と全く同様にして調製した。



デルフィニジンクロライド

(iv) リンゴ果肉からアントシアニン溶液の調製

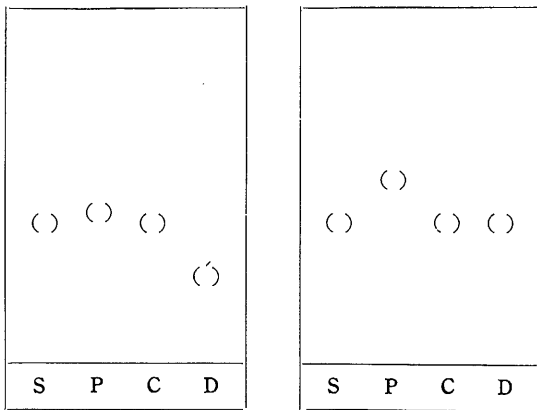
実験 1 の方法で得たリンゴ果肉のアセトン抽出液 50 ml に 4 規定塩酸 50 ml とイソアミルアルコール 25 ml を加え、沸騰浴中で 20 分間加熱すると、イソアミルアルコール層は赤色となった。このイソアミルアルコール層を分取し、上記と同様にしてカラムクロマトグラム法で精製した。

かくして得られた各アントシアニン溶液について、ペーパークロマトグラム法 (濾紙, 東洋, No. 50, 8×14 cm, 展開剤, 氷酢酸—36% 塩酸—水, 5:1:5, イソプロピルアルコール—2 規定塩酸 1:1, 1 次元上昇法), および可視部吸収スペクトルを測定することによってリンゴ果肉より得たアントシアニンを決定した。その結果を第 5 図, 第 6 図に示す。

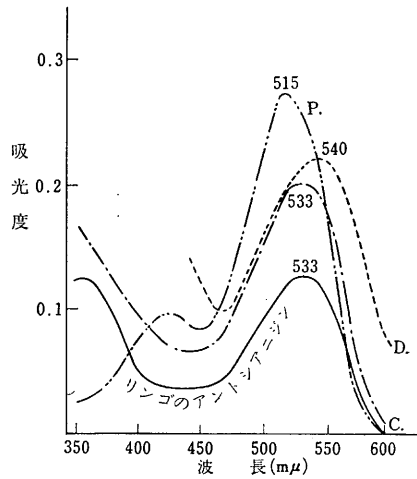
第 5, 6 図より, リンゴ果肉から得たアントシアニンはシアニジンと推定される。従って果肉中には, ロイコシアニジンが存在すると考えられる。

要約

リンゴ果肉の褐変現象を解明するために, 果肉中のポリフェノール成分を検索し, 更に分離を行った。その結果, クロロゲン酸, L-エピカテキン, ロイコアントシアニンおよび未知フェノー



イソプロピルアルコール：氷酢酸：濃塩酸：水
 2 規定—塩酸 (1:1) (5:1:5)
 S：リンゴのアントシアニン， P：ペラルゴニン
 C：シアニン D：デルフィニン
第5図 リンゴ果肉ロイコアントシアンから生ずる
 アントシアニン



吸光度
 波長(mμ)
 P: ペラルゴニン C: シアニン
 D: デルフィニン
第6図 リンゴ果肉より得たアントシアニンの可視部吸収スペクトル図

ル成分2つを検出した(第1図参照)。この中、クロロゲン酸を結晶として分離することができた。更に、ロイコアントシアニンの種類はペーパークロマトグラム法および可視部吸収スペクトル図よりロイコシアニンと推定した(第5, 6図参照)。

謝 辞

協同研究者、沢田智子、佐藤満里子両氏に感謝します。

文 献

- (1) 中村敏郎 農化 **27** 813~818 (1952), **28** 218~217 (1953)
- (2) BATE-SMITH, E. C.: Biochem. J., **58** 122 (1954)
- (3) PEACH, K. and RUCKENBROD, M: Ber., **66** 76 (1953)