

# リンゴ果肉の酵素的褐変現象に関する研究

(第2報) クロロゲン酸の酵素酸化生成物に関する検討

堀川博朗 村井幸代 平田政雄

Studies on the Enzymatic Browning Phenomenon of Apple Fruit

Part 2. Enzymatic oxidation of chlorogenic acid and its related compounds

Hiroaki HORIKAWA, Sachiyo MURAI and Masao HIRATA

A browning phenomenon of apple fruit is mainly due to chlorogenic acid. Therefore, enzymatic oxidation of chlorogenic acid and its related compounds was carried out and the chemical properties of oxidation products were examined.

リンゴ果肉(国光)の褐変現象に関与するポリフェノール物質の抽出・分離を行ない、クロロゲン酸と得た<sup>(1)</sup>。この物質が酵素ポリフェノールオキシダーゼによって酸化され、褐色物質を生じることが、すでに中林によって明らかにされているが<sup>(2),(3)</sup>、褐色物質の生成機構、化学構造はまだ明らかでない、しかしながら、リンゴ果肉の褐変現象におよぼすクロロゲン酸の役割は大きい。従って、この褐色物質の生成機構および化学構造を知ることが、リンゴ果肉の褐変現象を解明するうえで重要である。

本報ではクロロゲン酸およびその構成成分とL-エピカテキンの立体異性体である(+)-カテキンについて酵素酸化反応を行ない、クロロゲン酸から生じる褐色物質との比較検討を行なったので報告する。

## 実験方法

### 1. 実験材料

(1) ポリフェノールオキシダーゼ標品

中林の方法<sup>(2)</sup>に従い、新鮮リンゴ(国光)を剥皮・除芯後、ブレンダーを用いて、直ちに冷アセトン中で処理し、真空乾燥してえた白色粉末を酵素標品とした。

(2) クロロゲン酸

前報で報告した方法<sup>(1)</sup>によってえたクロロゲン酸を再結晶して用いた。

(3) カフェイン酸、キナ酸

市販品(東京化成)を用いた。

(4) カフェイン酸エチルエステル

瓜谷の方法<sup>(4)</sup>に準じて調製した。すなわち、カフェイン酸 100 mg をエタノール (99.5%) 5 ml に溶解し濃硫酸 5 ml を加えて 70~80°C で3時間エステル化を行なう。反応終了後、エタノールを留去し、水溶液を炭酸ナトリウムで中性~微アルカリ性になし、ソックスレー抽出器を用いエチルエーテルで10時間抽出する。エーテル抽出液を芒硝で脱水後、エーテルを留去するとカフェイン

酸エチルエステルの粗結晶がえられる。これをアルコールから再結晶して用いた。

### (5) (+)-カテキン

阿仙葉(市販品)から抽出・分離して用いた。すなわち、阿仙葉を70~80°Cで十分に乾燥後無水酢酸エチルを軽く沸騰させながら抽出する。抽出液を減圧濃縮して酢酸エチルを留去し、残留液に少量の蒸留水を加え、酢酸エチルを完全に留去すると(+)-カテキンの粗結晶が析出する。これを熱水から再結晶して用いた。

## 2. 反応条件

基質 $10^{-4}$ モルを McIlvaine 緩衝液 (pH 4.0) 10 ml に溶解し(基質が難溶または不溶の場合には、ごく少量のメタノールに溶解した後、緩衝液を加える)、酵素標品 40 mg を添加後、直ちに空気を送入しながら30°Cで30分間反応させる。

なお、至適 pH および温度はつぎのようにして決定した。

### (1) 至適 pH

クロロゲン酸 $10^{-4}$ モルを各 pH (3.5, 4.0, 4.5, 5.0) の McIlvaine 緩衝液 10 ml に溶解し、酵素標品 40 mg を添加後、空気を送入しながら30°Cで反応を行なう。30分後、反応液を濾過し、濾液について420 $m\mu$ の吸収を測定した(日立139型分光光度計を使用)、その結果を第1図に示した。

### (2) 至適温度

クロロゲン酸 $10^{-4}$ モルを pH の緩衝液に溶解し、酵素標品を添加後、5°C 間隔で15~45°Cの温度で反応を行ない、濾液について420 $m\mu$ の吸収を測定した。その結果を第2図に示した。

### (3) ペーパークロマトグラフィー

一次元上昇法、東洋濾紙 No. 51、展開剤:n-ブタノール・氷酢酸・水(4:1:5)、2%酢酸、発色剤:0.5%鉄ミョウバンと0.5%赤血塩の等量混合液

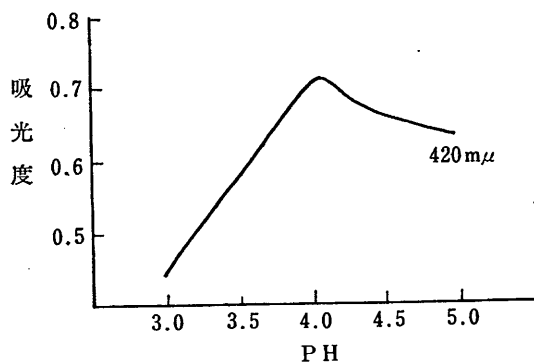


図1 ポリフェノールオキシダーゼの pH 曲線

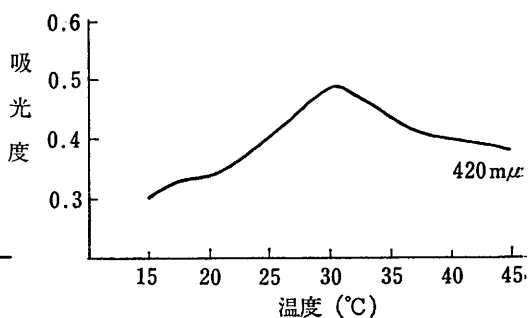


図2 ポリフェノールオキシダーゼの温度曲線

## 実験結果および考察

### 1. クロロゲン酸の酸化反応

酵素標品添加と同時に、反応液は酵素標品とともに淡黄色となり、30分後には淡黄褐色を経て赤褐色を呈した。この色はリンゴ果肉が褐変して呈する色調ときわめて似ている。溶液中の褐色色素および酵素標品表面上の褐色色素の有機溶媒に対する溶解性はほとんどなく、n-ブタノールにわずかに溶解する程度である。図3には反応中におけるクロロゲン酸と生成する褐色色素の消長を

示すペーパークロマトグラムを示した。

## 2. カテキンの酸化反応果

肉中にクロロゲン酸と同様多く存在するL-エピカテキンを抽出・分離することができなかったもので、その立体異性体である(+)-カテキンを使用して酸化反応を行ない、リンゴ果肉の褐変現象におよぼすL-エピカテキンの影響を推測した。その結果は、溶液が薄い橙色を呈するにとどまり、褐変することはなかった。

## 3. クロロゲン酸と(+)-カテキン混合液の酸化反応

リンゴ果肉(国光)中には、クロロゲン酸とL-エピカテキンがほぼ同じ割合で存在しており<sup>(2)</sup>、この両物質がポリフェノール物質の大部分を占めているものと思われる。そこで、(+)-カテキンとクロロゲン酸の等モル混合液を酸化し、着色状態を調べた。

酵素添加と同時に反応液は酸い赤橙色を呈し、次第にその濃さを増しながら、30分後には赤橙色となった。この色調はクロロゲン酸単独の場合とは明らかに異っている。従って、種々のポリフェノール物質の共存する果肉中の褐変反応はきわめて複雑なことを示している。図4、図5には反応過程のペーパークロマトグラムを示した。

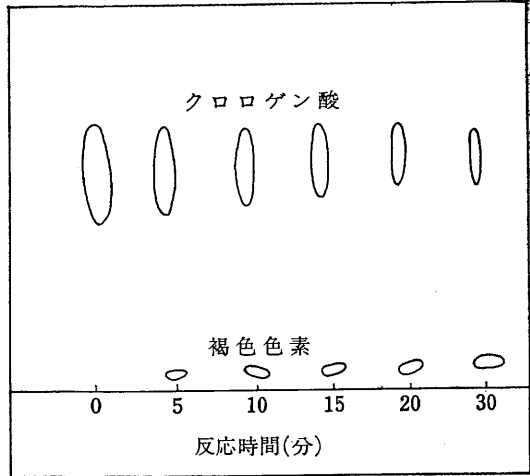


図3 クロロゲン酸の酵素酸化反応液ペーパークロマトグラム  
展開剤, n-ブタノール: 氷酢酸: 水 (4: 1: 5)

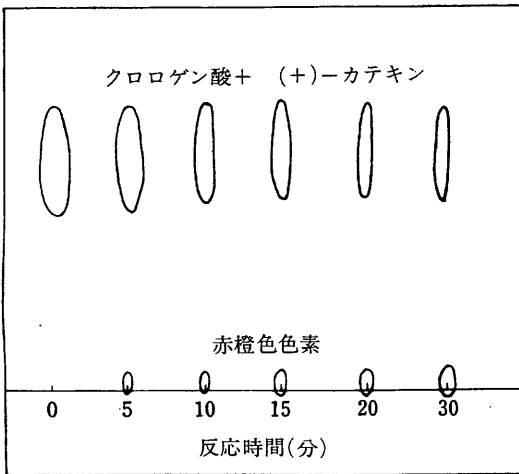


図4 クロロゲン酸と(+)-カテキン混合液酵素酸化反応液ペーパークロマトグラム  
展開剤, n-ブタノール: 氷酢酸: 水(4: 1: 5)

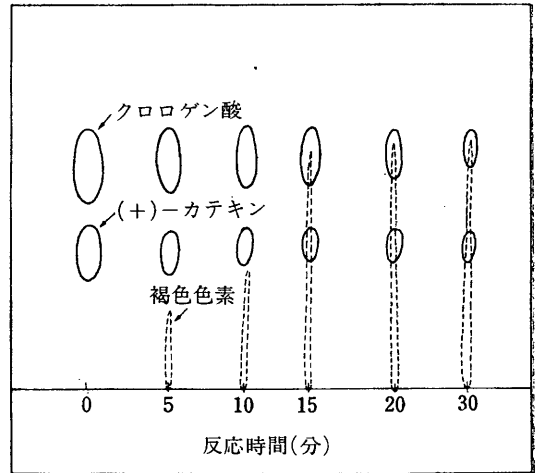
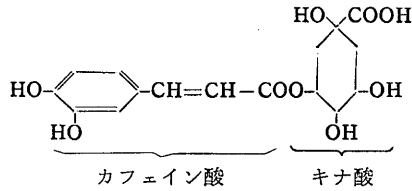


図5 クロロゲン酸と(+)-カテキン混合液の酵素酸化反応液ペーパークロマトグラム  
展開剤, 2%酢酸

以上の結果から、リンゴ果肉の褐変現象においては、クロロゲン酸が大きな役割をしていると考えることができる。そこでさらにつぎのことを検討した。クロロゲン酸はカフェイン酸とキナ酸がエステル結合した化合物であるので、クロロゲン酸が酵素によって褐色物質を生成する場合、クロ

クロゲン酸がエステル結合の形で褐色物質に変化するのか、カフェイン酸とキナ酸に加水分解されて後、両成分またはいずれか一つが褐色物質に変化するのかを検討した。



4. カフェイン酸の酸化反応

反応液は全く変化せず、酵素標品の表面だけが変化した。すなわち、酵素標品表面は少しずつ褐色を呈し30分後にはかなり濃い褐色を呈した。この褐色物質は、アセトンおよびエーテルで溶出することができ、水に不溶であって、クロゲン酸の生成物とは異なる。

5. カフェイン酸エチルエステル酸反応

酵素の作用を受ける場合、エステル結合を有する基質が酸化されやすいことも考えられるので、カフェイン酸のエチルエステルを酸化し、生成物を調べた。その結果はカフェイン酸の場合とは若干異なり、反応液は淡褐色、酵素標品表面は黒褐色を呈した。反応液中の褐色はブタノールで完全に抽出され、一方、酵素表面上の黒褐色色素はアセトンおよびエーテルで完全に溶出される。(カフェイン酸の生成物より易溶)

6. キナ酸の酸化反応

反応液、酵素標品表面ともに全く変化しない。

表1 クロゲン酸、カフェイン酸、カフェイン酸エチルエステルおよびキナ酸の酵素酸化生成物の比較

性質 基質		褐色度	褐色色素溶解性			
			水	n-ブタノール	アセトン	エーテル
クロゲン酸	反応液	卅		難溶		
	酵素標品	+		不溶	不溶	不溶
カフェイン酸	反応液	-				
	酵素標品	卅	不溶	可溶	可溶	可溶
カフェイン酸 エチルエステル	反応液	+		可溶	可溶	可溶
	酵素標品	卅	不溶	可溶	可溶	可溶
キナ酸	反応液	-				
	酵素標品	-				
キナ酸 + カフェイン酸	反応液	} カフェイン酸と同じ				
	酵素標品					
リンゴ果肉	ジュース	卅		難溶		
	残渣	卅	不溶	不溶	不溶	不溶

卅 強 + 弱

### 7. キナ酸とカフェイン酸混合液の酸化反応

カフェイン酸の酸化反応の場合と全く同じであった。

### 8. リンゴ国光果肉の褐変

リンゴ果肉をジューサーで磨碎し空気中に放置すると次第に褐色を呈してくる。この褐色色素の有機溶媒に対する溶解性は、ブタノールにわずかに溶けるだけである。

以上の実験（1～8）の結果を表1に示した。

表から明らかなように、クロロゲン酸から生じる褐色物質だけが反応液中に容易にとけるが（水易溶性）、カフェイン酸およびカフェイン酸エチルエステルから生じる褐色物質は、水不溶性で、アセトン・エーテルに可溶である。カフェイン酸およびそのエチルエステルは、分子中に占める親水性原子団の割合が小さいために水に難溶性であり、したがってその酸化生成物である褐色物質も難溶性または不溶性の性質をもつとも考えられる。一方、クロロゲン酸は、水易溶のキナ酸を分子中にもつために水に対する溶解性は大きい。このクロロゲン酸の酸化生成物が水易溶であることは、酵素酸化反応によって、クロロゲン酸は加水分解されずに褐色物質に変化しているためとも考えられる。クロロゲン酸、カフェイン酸エチルエステルから生じる褐色物質はそれぞれ BPB 指示薬に対して酸性を示さないがカフェイン酸から生じる褐色物質は酸性を示すことは上記の推定に合致している。

## 要 約

クロロゲン酸およびその構成成分、L-エピカテキンの立体異性体の(+)-カテキンについて酵素酸化反応を行ない、クロロゲン酸から生じる褐色がリンゴ果肉の褐色色調に似ていること、溶媒に対する溶解性が似ていること、さらに、クロロゲン酸の構成成分の酸化生成物の溶媒に対する溶解性などから、クロロゲン酸はカフェイン酸とキナ酸に加水分解されずに褐色物質に変化すると推定した。

## 文 献

- (1) 平田政雄, 堀川博朗 東京家政大学研究紀要 9, 43~49 (1969)
- (2) 中林敏郎 農化, 27 813~818 (1953)
- (3) 中林敏郎 農化, 28 212~219 (1954)
- (4) 瓜谷郁三, 星谷磐夫, 滝田智久 農化, 27 785~789 (1953)