食品の変色とスペクトルとの関係 (Ⅲ)

Relationship between Change of Color of Foods and Spectra (III)

リンゴ酵素による褐変液の吸収スペクトル

Absorption Spectrum of Brown Solution by Apple Enzyme

(昭和 45 年 2 月 24 日 受 理)

大 村 浩 久* 尊 田 民 喜*
(Hirohisa Omura) (Tamiyoshi Sonda)

In order to get a clue explaining the change of the absorption spectrum of apple juice due to browning, spectra were determined on a model system of apple enzyme and pyrogallol, catechol or chlorogenic acid. In the case of pyrogallol, 2 shoulders at 275 m μ and 370 m μ and smaller one at 420 m μ were observed at the first stage and then flattened except that at 275 m μ . However, the maximum increase of the optical density was observed at 300 m μ throughout the reaction. With catechol, distinct peak was formed between 380 m μ and 390 m μ in a short time, probably dependent to quinone forming, and then diminished. However, the peak of catechol at 275 m μ was changed into shoulder. Thus, the change of the optical density having the maxima at 290 m μ and 250 m μ and the minimum at 275 m μ was observed, although the peak at 380 m μ had been seen in the beginning of the browning. In the case of chlorogenic acid, the peak was first formed at 400 m μ and then flattened. The maximum increase of the optical density was determined at 400 m μ which was then moved to 380 m μ . Incidentally, in the UV range, 2 peaks of chlorogenic acid at 325 m μ and 293 m μ were disappeared and the new one was formed at 250 m μ which was decreased again. Thus, the highest increase of the optical density was observed at 260 m μ and the maximum decrease at 300 m μ . By comparing the changes of these spectra, it was suggested that the browning of apple juice, at least, could not be attributed only to chlorogenic acid.

前報¹⁾において生のリンゴ果汁では褐色に着色しても特徴ある吸収スペクトルは観察されないが、その吸光度は褐変にともなって変化し、とくに 380 m μ 付近および 260 m μ 付近において最も著しく上昇することを報告した。これは果汁中の褐変基質および生成物の反応にともなう消長と関係があると推定される。しかし果汁の成分は複雑であり、また種々の反応が同時に起こっていると考えられるので、その吸収スペクトルの変化が単に褐変現象とのみ直接関係があるか否か、またさらにどのような成分がこの変化に関与しているかなどを明らかにすることはむずかしい。一般にリンゴの褐変ではこれに含まれているポリフェノール化合物²⁾とくにクロロゲン酸やカテコールなどがポリフェノールオキシダーゼによって酸化されたのち重合して色素を生ずるといわれている。しかしリンゴの酵素は種々のポリフェノール類に作用するので、反応性に差があるとしても酵素の作用を受ける

ものはすべて褐変に関与していると単純に断定することはできない。さらにクロロゲン酸やエピカテキンのように果実中に含まれていることが確かめられなければならない²⁾。一方酵素標品を用いた反応液で観察される何らかの特性が生果汁のものに似ているならば、これから果汁中で起こっている反応を類推することもできると思われる。この観点から酵素反応液をモデルとして前報で明らかにした吸収スペクトルの変動を比較検討した。もちろん反応モデルには種々のポリフェノールを用いなければならないが、まずリンゴ褐変の本体であるといわれているクロロゲン酸のほか最も簡単な *o*-ジフェノールおよびトリフェノールであるカテコールならびにピロガロールを我々の研究室で明らかにしているポリフェノール類の制癌作用³⁾と関連して用いた。これらにリンゴの果肉酵素を作用させて褐変反応系を作り、吸収スペクトルおよびその変化を求めて生果汁のものと比較した。

* 九州大学食糧化学教室

実験方法

酵素標品：市販リンゴ（紅玉または国光）の果肉を手早く小片として氷冷したアセトンに投入，Waring ブレンダーで磨砕したのち吸引濾過する。残渣を再びアセトンで同様に反復処理して脱水する。これを5回前後くり返すが，この間にアセトン溶液は初めの黄色から無色になる。こうして得た白色の粉末をデシケーター中で減圧乾燥したのち保存する。

このアセトン粉末 0.5 g を pH 6 の 0.2 M クエン酸・リン酸ソーダ緩衝液 40 ml で乳鉢中で磨砕抽出し吸引濾過後さらに溶液を10,000 r.p.m.で30分間遠心分離し上澄液を酵素液として用いた。これは多少乳濁しているがほとんど無色であって，基質を加えなければ放置しても褐変しない。

吸収スペクトル：酵素液 4 ml に 10^{-3} M ポリフェノール溶液 1 ml および水 5 ml を加え 25°C の恒温室に放置し一定時間毎にその吸収スペクトルを測定した。紫外部の場合クロゲン酸だけは濃度を半減して 5×10^{-4} M 溶液を用いた。また対照として沸騰水中に10分間浸漬して失活させた酵素液を用いたがこの場合にはもちろん反応液はほとんど着色しなかった。吸収スペクトルは前報¹⁾ 通り島津マルチパーパス自記分光光度計 MPS-50 型を用い可視部 (340 m μ ~800 m μ) および紫外部 (220 m μ ~350 m μ) それぞれ3分間で自動的に測定した。

結果および考察

可視吸収スペクトル：ピロガロールに酵素を作用させた場合30分で黄褐色，60分では褐色を呈した。これとともに第1-a 図に示すように 30 分後には 370 m μ 付近に明瞭な肩および 420 m μ から 440 m μ にかけて小さい肩をもつ吸収スペクトルが観察された。時間の経過に従い波長全域にわたって吸収レベルは上昇したが，さらにこれとともに前者は消失し，24時間後には後者だけが多少長波長側にずれて 460 m μ 付近を中心に認められた。これに対して加熱酵素液を用いた対照区では特異的なピークの生成はもちろん吸収レベルの上昇もほとんど認められなかった。従ってこの対照区のスペクトルは反応直後のものを示すと考えられるので，これを基準として反応時間ともなう吸光度の変化を求め第1-b 図を得た。これによると吸光度の上昇に特徴はあるが波長の短いほど大きく，生果汁のように 380 m μ という特定の波長に上昇のピークは認められなかった。

一方カテコールも30分で淡褐色，60分以降では褐色となったが，その吸収スペクトルは30分ないし60分では380 m μ から 390 m μ にかけて吸収極大をもつことが観察

Fig. 1-a. Absorption spectrum of the system, "Enzyme-Pyrogallol", in visible range

a': boiled enzyme (not browned); b: 5 min. (yellow); e: 30 min. (yellow brown); f: 60 min. (brown); g: 120 min. (brown); j: 24 hrs. (brown); s: pyrogallol only.

Enzyme solution was prepared by extracting 0.5 g acetone powder of rinded apple with 40 ml 0.2M citric acid-sodium phosphate buffer, pH 6. A reaction mixture of 4 ml enzyme solution, 1 ml 10^{-3} M pyrogallol and 5 ml H₂O was incubated at 25°C and the absorption spectrum was estimated at the time indicated, using a Shimadzu Multipurpose Recording Spectrophotometer, MPS-50.

Fig. 1-b. Increase of the optical density of the system, "Enzyme-Pyrogallol", in visible range

The same as Fig.1-a.

され *o*-キノンのような初期の反応生成物によるものと推定された。しかしその後は平滑となり数時間後のスベ

Fig. 2-a. Absorption spectrum of the system, "Enzyme-Catechol", in visible range

a': boiled enzyme (not browned); a: 0 min. (not browned); b: 5 min. (yellow); e: 30 min. (light brown); f: 60 min. (brown); g: 120 min. (brown); h: 3.5 hrs. (brown); i: 5.5 hrs. (brown); j: 24 hrs. (brown).

The estimation was carried out by the same procedure as that in Fig. 1-a, using 10^{-3} M catechol in stead of pyrogallol.

Fig. 2-b. Increase of the optical density of the system, "Enzyme-Catechol", in visible range

The same as Fig. 2-a.

クトルにはこのピークは見られなかった。もちろん褐変は進みそれとともにピロガロールの場合と同様に吸収レベルは波長の全域にわたって上昇した(第2-a図)。従って最終的に生成した色素はある特定の波長にピークを示すスペクトルを持たないことが示唆された。これとともにスペクトルの変動は第2-b図に示すように、とくに反応の初期において生果汁の場合と同様に 380 $m\mu$ ないし 400 $m\mu$ での吸光度の増加が最も大きく、その後は短波長域での増加がこれをしのぐようになった。

これに対してリンゴの代表的な褐変基質といわれているクロロゲン酸に酵素が作用した場合はその吸収スペクトルの変動もかなり特異的であった。すなわち第3-a図にみられるように反応開始後まず 400 $m\mu$ 付近に吸収を生じ20分ないし120分にわたって観察されたが、その後は反応の進行にともなって全く認められなくなりカテコールの場合と同様にスペクトルは平滑となった。従ってこの場合にも最初の反応生成物のスペクトルにはピークが明らかに認められるがこれから生じた色素のスペクトルにはピークは観察されない。さらにその吸光度は反応のはじめに大きく上昇しその後はかえって減少する傾向があり24時間後も初期のものと大差はなかった。従って吸光度の変動は第3-b図に示すようになり、吸光度の増加は 400 $m\mu$ 付近で最高であるが時間とともに 390 $m\mu$ 付近、ついで24時間後には 380 $m\mu$ 付近にピークは移動した。しかもその増加度は時間によって著しい差は認められない。

Fig. 3-a. Absorption spectrum of the system, "Enzyme-Chlorogenic acid", in visible range

a: 0 min. (not browned); d: 20 min. (yellow); f: 60 min. (light brown); g: 120 min. (brown); h: 3.5 hrs. (brown); j: 24 hrs. (brown).

The estimation was carried out by the same procedure as that in Fig. 1-a, using 10^{-3} M chlorogenic acid in stead of pyrogallol.

Fig. 3-b. Increase of the optical density of the system, "Enzyme-Chlorogenic acid", in visible range

The same as Fig. 3-a.

このように酵素標品を用いた褐変モデル溶液の吸収スペクトルには基質および反応時間によってそれぞれ異なった特徴が観察された。前報¹⁾において生果汁の吸収スペクトルは調製後2時間程度までに限定して測定したので、改めて24時間後のものを30分後のものとともに求めた。第4-a図に示すように長時間経過すれば初めに認められた425mμ、450mμおよび490mμ付近の小ピークは消失しスペクトルは平滑となった。しかしこの場合においてもクロロゲン酸の場合とは異なって第4-b図のように吸光度の上昇ピークは短時間の場合と同じく380mμにあり、しかも24時間後の上昇度が大きかった褐変の進行にともなってスペクトルの小ピークが失われることは果汁だけでなく果実切片について求めた吸収ならびに反射スペクトルでも指摘されたが⁴⁾、さらに酵素標品を用

Fig. 4-a. Absorption spectrum of the fresh apple juice in visible range

a: 0 min. (not browned); e: 30 min. (light brown); j: 24 hrs. (brown).

The estimation was carried out by the procedure described in the preceding paper 1.

Fig. 4-b. Increase of the optical density of the fresh apple juice in visible range

The same as Fig. 4-a.

いたこのモデル反応系では初めから観察されないこともあわせて考えると、この小ピークを示すものはリンゴの褐変に重要な意義があるとは思われない。

紫外吸収スペクトル：紫外部における吸収スペクトルは色と直接関係はないにしても反応組成に由来し、またその変化は酵素によって起こる化学反応とかなり密接に関係することが予想される。リンゴの生果汁では280mμおよび245mμ付近に極大、260mμ付近に極小をもつ吸収スペクトルが褐変とともに平滑化し、その変動は260mμ付近で最も大きかった。

酵素-ピロガロール系の吸収スペクトルを第5-a図に示す。加熱酵素を用いた対照区ではとくに300mμ以下の

Fig. 5-a. UV absorption spectrum of the system, "Enzyme-Pyrogallol"

a: 0 min.; b: 5 min.; e: 30 min.; g: 120 min.; h: 3.5 hrs.

The same as Fig. 1-a.

Fig. 5-b. Increase of the optical density of the system, "Enzyme-Pyrogallol", in UV range

The same as Fig. 5-a.

Fig. 6-a. UV absorption spectrum of the system, "Enzyme-Catechol"

a: 0 min.; c: 10 min.; e: 30 min.; f: 60 min.; g: 120 min.

The same as Fig. 2-a.

吸収は大きい明瞭なピークは認められない。しかし活性酵素液の場合反応開始後5分ですでに全域にわたってある程度の吸光度の上昇が起こるとともにとくに275mμ付近に肩があらわれた。これは30分ないし120分にかけて明瞭なピークとなったが反応時間がさらに長くなると吸光度は再び低下した。しかし3.5時間以後も依然肩として残った。この反応経過にもなるスペクトルの変動は第5-b図に示される。すなわち全体として吸収レベルは上昇するがとくに300mμで最も大きくさらに275mμにも小さいピークをともなった。

次にカテコール系の吸収スペクトルを第6-a図に示すカテコール自身275mμに吸収極大があるので対照区でももちろんピークが観察された。しかし反応が進むにともなうとくに短波長域での吸収が増大してこのピークは不明瞭となり60分ないし120分では肩に変化した。これとともに吸光度の変化は第6-b図のようになり275mμ付近のピークの吸収ははじめ低下したのち全体のレベルの上昇にともなう増加した。従って吸光度の変動はカテコール自身の吸収ピーク275mμ付近で最も少なく、一方250mμ付近および290mμ付近に上昇度のピークが観察された。

Fig. 6-b. Increase of the optical density of the system, "Enzyme-Catechol", in UV range

The same as Fig. 6-a.

クロロゲン酸では紫外部でもかなり興味あるスペクトルおよびその変動が観察された。反応直後はクロロゲン酸自体にもとづき325mμおよび293mμ付近に極大、263mμならびに305mμ付近に極小をもつスペクトルが認められ、果汁そのもののスペクトルと異なることは第7-a図に示す通りである。10分後にはスペクトルは著しく変化し両ピークの吸収はかなり低下するとともに後者は285mμ付近に移行した。これとともに250mμ付近は強い吸収極大があらわれた。反応が進むとともに最初の吸収極大はついに消失し、また250mμ付近の新しいピークも減少をはじめた。一方さきに低下した280mμ付近のピークを中心に270mμ付近より長波長側の吸収レベルは再び上昇するようであった。このように各反応時間での吸収スペクトルはそれぞれ異なり、一見してそ

Fig. 7-a. UV absorption spectrum of the system, "Enzyme-Chlorogenic acid"

a': boiled enzyme (not browned); c: 10 min. (yellow); g: 120 min. (yellow); h: 3.5 hrs. (light brown).

The same as Fig. 3-a, using 5×10^{-4} M chlorogenic acid.

Fig. 7-b. Increase of the optical density of the system, "Enzyme-Chlorogenic acid", in UV range

The same as Fig. 7-b.

の関連性はないようである。しかしこのスペクトルの変動を検討すると第7-b図のようになり、少なくとも反応の初期においては $260 \text{ m}\mu$ 付近を中心に吸光度は著しく増大し、一方 $280 \text{ m}\mu$ 付近より長波長側においてはむしろ減少しその低下度は $325 \text{ m}\mu$ ないし $330 \text{ m}\mu$ 付近において最も大きかった。

このような反応系のスペクトルの測定において、とくに酵素をカテコール (第2-a図) やクロロゲン酸 (第3-a図, 第7-a図) に作用させた場合、反応のごく初めに特定の波長にピークをもつスペクトルが求められるが、これは酵素の作用による生成物、恐らくキノン類のものであろうと推定される。この生成物が色素を形成するわけでこれにともなって反応液のスペクトルは引続き変化するものと思われる。事実、第7-a図においてまず生成した $250 \text{ m}\mu$ のピークが再び低下するとともに $280 \text{ m}\mu$ ないし $290 \text{ m}\mu$ 付近にかけて吸光度の増加が起きている。

Henze⁹⁾ は酵素をクロロゲン酸に作用させて生ずる黄色蛍光物質が $270 \text{ m}\mu$ に吸収極大を示すこと、ならびに反応系にシステインまたはグルタチオンを加えて褐変を防止した場合にも同様の蛍光物質を生じ、しかも $275 \text{ m}\mu$ または $270 \text{ m}\mu$ にピークがあることを明らかにした。さらにこれらの物質をペーパークロマトグラフィーによって分離し、2, 3の定性試験の結果、SH化合物と反応によって生じたキノンとの複合体であると推定している。このような中間体の生成は少なくとも果汁のものでは確認することは困難であった。

生果汁の吸収スペクトルは酵素液を用いたモデル反応系のものとは異なり、しかもそれらは褐変の進行に応じて変動するもので両者を直接関連づけることはむずかしい。しかしスペクトルの変化を比較検討すればかなりの類似性があることを示唆する根拠が得られるようにも思われる。たとえば可視部における生果汁の吸光度は $380 \text{ m}\mu$ ないし $400 \text{ m}\mu$ 付近で最も大きく上昇するが、カテコールまたはクロロゲン酸を用いたモデル系の反応初期のものがこれに近くピロガロールでは全く合致しない。しかし生果汁では24時間後も反応初期のものと同じ波長に上昇のピークがあるが、モデル系ではカテコールやクロロゲン酸でも観察されない。他方紫外部の場合も生果汁のスペクトルとモデル反応系のスペクトルはほとんど似ていないが、吸光度の変化は生果汁では $260 \text{ m}\mu$ 付近で顕著であってクロロゲン酸のものがこれに近い。しかしクロロゲン酸のみであれば $280 \text{ m}\mu$ 付近よりも長波長側において吸光度はかえって減少し $325 \text{ m}\mu$ 付近で最も著しくなければならないが生果汁ではこのような低下は認められない。これに対してカテコールの場合は $250 \text{ m}\mu$ および $290 \text{ m}\mu$ 付近に吸光度増加のピークがあり、褐変

にともなうクロロゲン酸の吸光度の減少を補なっていると考えられると思われる。同様な 280 m μ 付近における補正効果の可能性はピロガロールについても考えられるがこの場合には 260 m μ 付近にかなり大きい上昇の谷があるので問題があろう。もちろんこれらのことはいずれも酵素活性、反応時間、基質濃度など反応組成や条件その他によって影響されることは当然である。こうしてモデル系についての吸収スペクトルの変動を検討することによりリンゴの褐変が単にクロロゲン酸のみに対する酵素の作用によるということは少なくとも無理であって、たとえばカテコールのような他のポリフェノール化合物も関与していることは推定される。これはさらに反応系におけるポリフェノール化合物の量的な問題、各基質に対する活性の問題、あるいはスペクトルに変化をもたらす褐変とは無関係の反応なども影響するし、またポリフェノール化合物にしても単に試験した3種のものに限らないので、他のものについても検討のうえ考慮しなければならないことは当然である。

要 約

リンゴ酵素液をピロガロール、カテコールないしクロロゲン酸に作用させ反応液の吸収スペクトルおよびその変動を測定し生果汁の場合と比較検討した。

1. ピロガロールの場合可視部では反応の初期に 370 m μ に明瞭な肩および 420 m μ ないし 440 m μ にかけて小さい肩をもつ吸収スペクトルがまず観察されたが、以後波長全域にわたって吸光度は上昇しスペクトルは平滑となり24時間後のものでは 460 m μ 付近にのみ肩が残った。この間上昇度は短波長側で大きく生果汁の場合のような上昇度に極大は認められなかった。一方紫外部でも反応にともなって吸光度は上昇し、275 m μ に肩をもつスペクトルが求められたが増加度は 300 m μ 付近において最も大きかった。

2. カテコールに酵素を作用させると可視スペクトルはまず 380 m μ から 390 m μ にかけて吸収極大をもつもの

のが求められたが、以後吸収レベルの上昇にともなって平滑化した。従って吸光度の増加は反応の初めにおいては 390 m μ 付近で顕著であったが作用時間が長くなるにつれて短波長側での増加が大きくなった。これに対して紫外部においては 275 m μ に肩をもつスペクトルを生じたが、吸光度の変化は 250 m μ 付近および 290 m μ 付近に極大、275 m μ 付近に極小を示した。

3. 酵素-クロロゲン酸反応系においては反応開始後まず 400 m μ 付近に明白なピークをもつスペクトルが観察されたが、反応の進行にともなって平滑となりピークは消失した。これに関連して吸光度の増加のピークは反応初期では 400 m μ 付近にあったが時間とともに390 m μ 付近、ついで 380 m μ 付近に移動した。しかもその増加度の時間による差はほとんど認められなかった。また紫外部スペクトルは反応時間で互に関連性が認められないほどそれぞれ異なった。すなわちクロロゲン酸自体による 325 m μ および 293 m μ の吸収はすみやかに低下消失し、一方 250 m μ 付近に強い吸収極大があらわれた。これはさらに減少をはじめ、ついで 270 m μ 付近より長波長域において再び吸光度は増加をはじめた。しかし吸光度の変動は比較的単純であって 260 m μ 付近を中心に著しく増大するが 280 m μ 付近より長波長側ではかえって減少し、その低下度は 325 m μ ないし 330 m μ において最も著しかった。

本論文の要旨は昭和44年度日本栄養・食糧学会西日本支部大会、日本栄養改善学会西日本大会（昭和44年11月15日、宮崎）で発表した。

文 献

- 1) 大村浩久、尊田民喜：栄養と食糧，22, 497 (1969)
- 2) 中村敏郎：農化，28, 212 (1954)
- 3) 村上浩紀、山藤一雄：九大農学芸誌，24, 19 (1969)
- 4) 大村浩久、内田 泰、尊田民喜：九大農学芸誌，23, 33 (1967)
- 5) Henze, R.: *Science*, 123, 1174 (1956)