黒斑病甘藷の病理化学的研究 (第 10 報)

被害部隣接健全層の重曹水浸漬による緑変現象の機構 (その 1)

瓜 谷 郁 三 (名古屋大学農学部生物化学教室)

昭和 28 年 6 月 22 日 受 理

Phytopathological Chemistry of Black-Rotten Sweet Potato. Part 10.

The Mechanism for Greening occurred on the Sound Part next to
the Injured, when dipped in Sodium Bicarbonate Solution. (1)

By Ikuzô URITANI (Lab. of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University)

黒斑病甘藷の被害部隣接健全層を空気に曝すと緑変し、やがて褐色に変わつてゆく。又同一部分を予め重曹水に浸漬し加熱すると更に鮮明に緑変し、その緑色は長い間維持されている。この両者の変色は恐らく類似の機構の下に進むものと推定し、先ず色調濃く安定である後者に就て明らかにすることにした。次に前者の機構を考察し、これらの知見を基にして被害部隣接健全層の異状代謝の際の化学成分の消長を解明したいと思う。この現象は健全層の皮層及び導管部に於て顕著であることは周知の事実であり、既にこの機構に就て二、三の報告⁽¹⁾⁽²⁾が見られるが未だ明らかにされていない。一方著者は昭和 23 年夏、罹病甘藷中の polyphenol 成分の抽出を試み、この成分が重曹水アルカリ性の下に polyphenol oxidase により緑変することを知り⁽³⁾、この発色は polyphenol 成分の酸化に起因するものと推定し、以下の実験を試みた。

実 験 と 結 果

I. Polyphenol 成分の性状 罹病甘藷健全部には多量の polyphenol 成分が集積しており、その生理的意義を明らかにするためにも、又緑変現象の発色母体であることを証するためにもそれを単離する必要があつた。それで RUDKIN⁽⁴⁾ の、健全甘藷からの chlorogenic acid 分離法に準じ罹病甘藷より抽出分離を試み、その結果 chlorogenic acid⁽⁵⁾、caffeic acid⁽⁶⁾ 及び methyl caffeate を分離証明し、更に粉末状の 2 成分 (A₁, A₂-III) を分離した。今回は後 2 者の性状に就て実験を試みた。

A₁, A₂-III 成分は共に chlorogenic acid, methyl caffeate と同様に caffeic acid と同一の吸収スペクトル (最大吸収, 324~5 mμ (溶媒水) を示し⁽⁷⁾、恐らく chlorogenic acid と同様に caffeic acid の誘導体であると推定された故、十分に精製された両成分をアルカリ分解し caffeic acid の分離を試みた。即ち両成分の各を 1 N アルカリに溶解し、真空にして 1 夜放置し、分解液を正確に中和しエーテル抽出を実施した。抽出物を稀アルコールから再結することにより、融点 190° (同時に分解) の黄色の結晶を得、元素分析の結果並に合成した caffeic acid との混融に於て降下を見ず、caffeic acid であることを確認した。C₉H₈O₄, 計算値, C 60.0, H 4.4; 実験値, A₁ 成分からのもの, C 59.95, H 4.56; A₂-III 成分からのもの, C 60.43, H 4.47; chlorogenic acid からのもの, C 59.97, H 4.49。

なお A₂-III 成分からの caffeic acid を硫酸触媒の下にメタノールと煮沸してメチルエステルを合成し、その元素分析の結果並に合成品との混融 (156°) に於て降下を見ず、原サンプルは caffeic acid であることを確認した。C₁₀H₁₀O₄, 計算値, C 61.8, H 5.1; 実験値, C 62.09, H 5.52。

以上より黒斑病甘藷から分離した 5 種類の polyphenol 成分は共に caffeic acid 並にそのエステルであることを証明し得た。これらの成分を Na₂CO₃-NaHCO₃ 溶液 (pH 9.1) に溶し、粗 polyphenol oxidase 液を添加すると、caffeic acid を除き他の caffeic acid 誘導体は青緑変し、これらが緑変現象の母体であることがわかつた。但し caffeic acid は赤褐変した。

なおその後の実験に於て caffeic acid 抽出後のアルカリ分解液より A₁, A₂-III 成分各よりキナ酸を分離し得、更に両成分の種種の性状より、後者は先に BARNES⁽⁸⁾ がコーヒー豆から分離した isochlorogenic acid が主成分であり、前者は彼がその存在を推定した isochlorogenic acid のラクトン型であると推定したが、その詳細は次報⁽⁹⁾に発表する。

II. 緑変現象における polyphenol oxidase の役割

(i.) 無酸素状態における反応:— 0.1% Chlorogenic acid 1 cc, Na₂CO₃-NaHCO₃ 溶液 (pH 9.1) 0.4

cc 及び 酵素溶液 (アセトン沈澱法により調製⁽⁵⁾) 0.2 cc の混液を 50° に加温しつつ振盪すると直に緑変した。一方 THUNBERG 管の主室に chlorogenic acid を、側室に $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶液並に酵素溶液を加え、2 mm. Hg に真空にし、両者を合し 50° に 5 分間、室温に 25 分間置いたが変化は見られなかつた。これに空気を入れると直に緑変した。これよりこの変色は空気酸化が関係していると推定された。

(ii) Polyphenol oxidase の阻害剤添加の影響 :— 0.33% Chlorogenic acid 及び 0.175% methyl caffeate それぞれ 2 cc, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶液 (pH 9.1) 2 cc, 酵素溶液 (Na_2SO_4 塩析により得たもの, 16.41 units/cc⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾) 0.2 cc 及び 0.01 M diethyldithiocarbamate 溶液 0.5 cc を採り、全量を蒸留水で 7 cc とし 50° に 30 分間加熱した。同時に対照として阻害剤無添加の区を設けた。対照は直に緑変して来たのに対し、試験区は最初の間殆ど変色せず、やがて緑変して来た。その溶液を 2 倍に稀め PULFRICH 比色計 (フィルター No. 4) により吸光度を測定したところ、chlorogenic acid において対照 0.412 に対し 試験区 0.183, methyl caffeate において対照 0.627 に対し 0.269 であり、本阻害剤の作用は明らかであり、従つてこの変色は polyphenol oxidase に依るものと推定された。

(iii) プルプレオ塩添加の影響 :— プルプレオ塩 ($[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$) は polyphenol oxidase 的作用を有するものとされている故⁽¹²⁾⁽¹³⁾、その 0.4% 溶液を酵素溶液の代りに使用したところ、顕著に青緑変を示し、又 (i) の場合と同様に無酸素状態においては変色せず、空気を入れると直に青緑変を示した。

(iv) 酵素溶液の煮沸の影響 :— 0.175% Methyl caffeate 2 cc, $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶液 (pH 9.1) 2 cc 及び酵素溶液 0.2 cc を採り全容を 7 cc とし、50° に 20 分間加熱した。同時に 3 分間煮沸水に浸し破壊した酵素溶液の区を設けた。その結果、前者が後者よりも緑色の色調大であり、PULFRICH の比色計 (5 mm-のキューベット, No. 4 のフィルター) による吸光度はそれぞれ 0.390, 0.161 であつた。後者に於ても幾分緑変を示したのは自己酸化に依るものと考えられた。

III. 本反応における窒素成分の関与 Chlorogenic acid の名称はこの成分がアンモニアアルカリ性に於て緑変する事実から、PAYEN⁽¹⁴⁾ が名付けたものであり、更に GORTER⁽¹⁵⁾ がこの緑変現象の研究を進め、POL-ITIR⁽¹⁶⁾ は植物組織をアンモニア蒸気に当て、生ずる緑変により chlorogenic acid の分布を調査した。これは自己酸化の結果に依るとされているが、これにアンモニアが必要であるか或は他のアルカリ成分でも同様の現象を起すかは不明である。著者はこの点を明らかにすると共にアルカリ性の下に種種の窒素成分を添加した場合の

影響を検討することにした。

Table 1. Autoxidation of Na-chlorogenate, Methyl caffeate and Na-caffeate in the Various Alkaline Solutions.

Two cc of the 10 kinds of alkaline solutions (pH 9.1) were added respectively to each tube containing 2 cc of 0.01 M Na-chlorogenate (10 tubes.). After incubating them for 30 min. in a water bath of 50°, the color occurred as the result of autoxidation was observed. The same experiments were carried out also for Me-caffeate and Na-caffeate.

Basic substance	Na-chlorogenate	Methyl caffeate	Na-caffeate
Na_2CO_3	yellowish brown	yellowish brown	slight pink
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	" "	" "	colorless
$\text{Ba}(\text{OH})_2$	yellow	brown	"
Na_2HPO_4	" "	yellow	slight pink
NH_3	green	green	" "
CH_3NH_2	light green	"	slight green (exceedingly)
Piperidine	yellowish brown	yellowish brown	slight brownish pink
Lysine	bluish green	bluish green	slight yellowish brown
Histidine	" "	" "	slight brownish pink
Arginine	green	" "	slight yellowish brown

合に於ては酸化酵素の場合と同様にすべて褐変に導いた。

(ii) 中性及び酸性アミノ酸添加の影響 :— (i) の結果より窒素成分が有効であることを知つたが、その窒素成分が塩基性であることが必要か否かを明らかにするため、上記 polyphenol 溶液 2 cc, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶液 (pH 9.1) 0.4 cc 及びアミノ酸溶液 0.5 cc を混じ、(i) と同様に色調の変化を調査した。結果は Table 2

(i) 各種アルカリ性成分による自己酸化 :— 0.01 M Chlorogenic acid-Na, methyl caffeate 及び caffeic acid-Na それぞれ 2 cc に Table 1 記載の塩基性成分水溶液 (pH 9.1) 2 cc を添加し、50° に 30 分間保ち色調の変化を調べた。結果は Table 1 の如くで、前二者の場合に於てメチルアミン及び塩基性のアミノ酸はアンモニア同様に緑変させることを知つたが、窒素を含有しない成分及びピペリジンは緑変させず黄褐変に導いた。Caffeic acid の場

の如くで、使用したアミノ酸はすべて本反応を示し、又同様実施した醋酸アンモンにもこの反応を認めた。なお caffeic acid の場合には (i) と同様多くは褐変し、中に緑変する区もあったがその程度は極めて微弱であった。

(iii) ポリペプチド及び蛋白質添加の影響：— 上記の結果よりアミノ酸であれば、中性、酸性、塩基性を問わず緑変することを知った故、ポリペプチド及び蛋白質に就て (ii) と同様

に試験した。この中 ipomeine は西宏氏が甘藷から分離したもので、分離後数年を経過したため一部変性したものの如く 5% 食塩水に完全には溶けなかつた。然し不溶のまま試験液として使用した。結果は Table 3 の如くであり、ポリペプトン、ゼラチンは緑変現象を示したが ipomeine は methyl caffeate に於て示したが、chlorogenic acid に於ては示さなかつた。前 2 者が反応陽性であることはその中に少量の遊離アミノ酸を含むためかも知れない。又 ipomeine に於て chlorogenic acid の場合に陰性であるのは食塩の影響に依るのかもしれない。

(iv) Polyphenol oxidase に依る緑変現象と窒素成分との

関係：— 既に記した如く重曹アルカリ性の下に chlorogenic acid 及び methyl caffeate は polyphenol oxidase に依り酸化をうけ緑変することを知り、且つこの緑変には第 1 級アミン乃至アミノ酸恐らくはポリペプチド乃至蛋白質が関係していることを知った。従つて本酵素による緑変には、酵素に共存する窒素成分も関係していると考えられ、その際酵素そのものも窒素成分として反応に与る可能性もあるものと推定された。従つて本反応に窒素成分が不可欠であることを更に明らかにするため窒素成分添加の影響を調査した。試験区の各種溶液の割合は $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ 溶液 (pH 9.1) 2 cc, 0.175% methyl caffeate 2 cc, polyphenol oxidase 溶液 (Na_2SO_4 塩析の沈澱物を水に溶解し透析したもの；乾量 31.5 mg/cc) 0.2 cc 及び窒素成分溶液 (8.5% アスパラギン酸, 10% ゼラチン及び 5% 醋酸アンモンの各) 0.5 cc で、蒸留水で全容を 7 cc とした。対照区として酵素溶液無添加及び窒素成分無添加の両区を設けた。各区ともに 50° に 20 分間作用させ、後急冷して蒸留水で倍に稀め、PULFRICH 比色計 (5 mm のキューベット, No. 4 のフィルター) により吸光度 (E) を求めた。結果は Table 4

Table 2. The Effect of the Addition of Neutral and Acidic Amino Acids on Coloring occurred as the Result of the Oxidation of the Polyphenols.

0.5 cc of amino acids, neutral and acidic, and $\text{NH}_4\text{-acetate}$ were added respectively to each tube containing 2 cc of 0.01 M Na-chlorogenate and 0.4 cc of $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ solution (pH 9.1). In the same method as shown in the Table 1 notes, the test was carried out. The experiments for Me-caffeate and Na-caffeate were carried out too.

Amino acid	Na-chlorogenate	Methyl caffeate	Na-caffeate
Glycine	light green	green	colorless, slight green after 1 hour
Alanine	bluish green	bluish green	slight black green
Leucine	green	deep green	light yellowish brown
Na-aspartate	"	"	light brown
Na-glutamate	light bluish green	bluish green	slight black green
Asparagine	green	deep green	light yellowish brown
$\text{NH}_4\text{-acetate}$	light bluish green	light bluish green	light pink

Table 3. The Effect of the Addition of Polypeptide and Proteins on Coloring occurred as the Result of the Oxidation of the Polyphenols.

In the same way as shown in Table 2 notes, except that polypeptide and proteins were in a place of amino acids, the color was observed.

Polypeptide or protein	Na-chlorogenate	Methyl caffeate	Na-caffeate
Polypeptone	light green	bluish green	light reddish brown
Gelatine	bluish green	" "	slight green
Ipomeine	light yellow brown	green	reddish brown

Table 4. The Effect of the Addition of N-Substances on Coloring occurred as the Result of the Oxidation of the Polyphenols by Polyphenol oxidase.

Polyphenol oxidase solution 0.2 cc, 0.175% methyl caffeate 2 cc, $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ solution (pH 9.1) 2 cc, and N-substance solution (containing each of 8.5% Na-aspartate, 10% gelatine and 5% $\text{NH}_4\text{-acetate}$) 0.5 cc and distilled water 2.3 cc were mixed and incubated for 30 min. in a bath of 50°. The optical density (E) of the occurring green color was measured by PULFRICH photometer. The two controls, without the enzyme solution and without N-substance, were respectively tested in the same way.

	(A) Enzyme + N-substance	(B) Enzyme	(C) N-substance	(D) A - (B + C)
Na-aspartate	0.687	0.390	0.089	0.201
Gelatine	0.739	"	0.207	0.142
$\text{NH}_4\text{-acetate}$	0.578	"	0.043	0.145

の如くであり、試験区は両対照区の加算値より更に大であり、polyphenol oxidase に依る緑変現象は窒素成分添加により更に促進されることを知った。

む す び

(1) 黒斑病甘藷の被害部隣接健全層を重曹水に浸漬すると健全甘藷の皮層及び導管部と同様に緑変することを知った。その発色母体は chlorogenic acid の如き数種の caffeic acid のエステルであることが明らかとなった。

(2) この変色は polyphenol oxidase による甘藷中の polyphenol 成分の酸化、一部自己酸化にも依っており、特に (1) に記した部分にこの変色が顕著であるのは、その部における polyphenol 成分の集積及び本酵素の活性の増大に依るものと考えられた。

(3) 酵素作用による緑変現象はアンモニア、アミノ酸、ポリペプチド及び蛋白質の如き窒素成分の存在に依り更に促進され、自己酸化による本現象には上記の如き窒素化合物が必要であることを知った。

(4) 緑変現象は次の経過を経て起るものと考えられた。

(i) Polyphenol oxidase に依り caffeic acid エステルが酸化される。

(ii) 生成したキノン或はオキシキノン成分がアルカリ性に於てアミノ酸、ペプチド及び蛋白質を酸化してアンモニアを放出させる。

(iii) その結果生じた還元性成分（必ずしも元の caffeic acid エステルとは限らぬ）がキノン成分と縮合し、或は更にアムモニアも縮合に加わり、緑色色素を形成する。従つて丁度ニンヒドリン反応⁽¹⁸⁻²⁰⁾と同様の機作によるものと推定され、一種の STRECKER 反応⁽²¹⁾と見做した。

(5) 本反応を利用しアミノ酸及び第1級アミン（恐らく蛋白質、ペプチドも）の検出をなし得た。即ち methyl caffeate を $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{--NaHCO}_3$ 溶液 (pH 9.1) に溶し、それに試験液を添加して 50° に加温し、緑変の有無を調査する。

終りにのぞみ本研究に対し終始御懇篤に御指導御鞭撻下さいました恩師住木諭介教授に厚く感謝の意を表します。又本研究に協力された星谷磐夫、滝田智久両兄、貴重なサンプル、ipomeine を下さった西宏氏並にマイクロ分析を担当して下さいました山本節子、村瀬良子、中山通子さん達に深謝いたします。本研究費の一部は文部省科学研究費によつた。

(本研究は昭和 27 年 4 月 6 日、日本農芸化学会大会に於て発表した)。

(1) 和井田統一郎、馬木俊子：特許 177097 (1948)。	(12) 渡辺 篤： <i>Japanese J. Bot.</i> , 4, 37(1929)。
(2) 鈴木郷司、榊原賢明、荒木栄子：日本化学会第4年会 (1951)。	(13) 刈米達夫、橋本庸平：薬学雑誌, 70, 716 (1951)。
(3) 瓜谷郁三、村松敬一郎：農化, 26, 289 (1952)。	(14) PAYEN： <i>Ann.</i> , 26, 108 (1849)。
(4) G. RUDKIN and J. NELSON： <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 69, 1470 (1947)。	(15) K. GORTER： <i>Ann.</i> , 358, 329 (1908)； <i>ibid.</i> , 359, 217 (1908)； <i>ibid.</i> , 379, 110 (1911)。
(5) 瓜谷郁三、村松敬一郎：農化, 27, 29(1935)。	(16) J. POLITIR： <i>Praktika</i> , 7, 249 (1932)； <i>Compt. rend.</i> , 226, 692 (1948)； <i>ibid.</i> , 225, 954 (1947)。
(6) 瓜谷郁三：農化, 27, 165 (1953)。	(17) 西 宏：農化, 23, 52 (1949)。
(7) 瓜谷郁三：農化, 27, 57 (1953)。	(18) D. A. MACFADYEN： <i>J. Biol. Chem.</i> , 186, 1 (1950)； <i>ibid.</i> , 186, 13 (1950)。
(8) H. M. BARNES, J. R. FELDMAN and W. V. WHITE： <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 72, 4178 (1950)。	(19) S. MOORE： <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 367 (1948)。
(9) 瓜谷郁三：農化 (第14報として発表予定)。	(20) A. SCHÖNBERG and R. MAUBACHER： <i>Chem. Rev.</i> , 50, 261 (1952)。
(10) W. H. MILLER and C. R. DAWSON： <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 63, 3375 (1941)；
W. H. MILLER, M. F. MALLETT and C. R. DAWSON： <i>ibid.</i> , 66, 514 (1944)。	(21) A. SCHÖNBERG, R. MAUBACHER and A. MOSTAFA： <i>J. Chem. Soc.</i> , 176(1948)。
(11) 瓜谷郁三、家近恵子：農化, 27, 688(1953)。	

Summary

1. It was seen that the sound part adjacent to the injured part of black-rotten sweet

potato turned green in the presence of air, when it was dipped in NaHCO_3 solution, as well as the *cortex* and the *vessel* of sound sweet potato. This chromogens were proved to be several caffeic acid esters such as chlorogenic acid.

2. This coloration is based on the oxidation of polyphenols in sweet potato by polyphenol oxidase and partially on the autoxidation of polyphenols; the noticeable coloration in the parts described in 1 may be explained by the accumulation of polyphenols and increase of polyphenol oxidase activity in them.

3. The presence of any one of NH_3 , amino acids and peptides was found to be indispensable for the coloration.

4. The coloration was considered to occur through the following process; the quinone substances, produced as the result of the oxidation of caffeic acid esters by polyphenol oxidase, oxidized the amino acids, peptides or proteins in the alkaline solution, to liberate NH_3 . The reduced substances from quinones were condensed with the quinone substances or further with NH_3 to give the green pigment in the similar process to ninhydrin reaction. Thus the reaction was assumed as one of STRECKER reaction.

5. Amino acids and primary amines (perhaps, also, peptides and proteins) are able to be detected by this reaction. The sample to be tested is heated at 50° with methyl caffeate in the Na_2CO_3 — NaCO_3 solution (pH 9.1), if the solution turns green, one or more of the compound are present in the sample.

黒斑病甘藷の病理化学的研究 (第 11 報)

被害部隣接健全層の重曹水浸漬による緑変現象の機構 (その 2)

瓜谷郁三, 星谷磐夫, 滝田智久 (名古屋大学農学部生物化学教室)

昭和 28 年 6 月 22 日 受理

Phytopathological Chemistry of Black-Rotten Sweet Potato. Part 11.

The Mechanism for Greening occurred on the Sound Part next to the Injured, when dipped in Sodium Bicarbonate Solution. (2)

By Ikuzō URITANI, Iwao HOSHIYA and Satohisa TAKITA

(Lab. of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Nagoya University)

前報⁽¹⁾に記した如く、黒斑病甘藷の被害部隣接健全層を重曹水に浸漬し加熱すると鮮明な緑色を呈する。この変色の機構として、罹病甘藷健全部に多量に集積している caffeic acid のエステル類が polyphenol oxidase により酸化を受け、生成したキノン或はハイドロキノン成分がアルカリ性に於てアミノ酸、ペプチド及び蛋白質を酸化してアムモニアを放出させ、その結果生じた還元性成分(必ずしも元の caffeic acid エステルとは限らぬ)がキノン成分と縮合し、或いは更にアムモニアも縮合に加わり緑色色素を形成すると見做し、丁度ニンヒドリン反応⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾と同様の機作によるものと推定した。今回は polyphenol 成分の構造とこの緑変現象との関係を明らかにするため、合成及び天然の polyphenol 成分を基質とし、弱アルカリ性 (pH 9.1) の下に polyphenol oxidase 並にブルプレオ塩を作用させ、酸化により生ずる変色の模様を調査した。その結果 caffeic acid のエステル類並にアמידのみ緑変し他の成分の多くは褐変することを知つた (Table 1)。即ち caffeic acid, dihydrocaffeic acid 及び protocatechuic acid の如き遊離の酸はすべて褐変し、それぞれの酸のエステルは caffeic acid の場合を除き褐変した。Caffeic acid の種の誘導体の中エステル類 (chlorogenic acid 等も含めて) 及びアמידは緑変したが、3,4-dioxycinnamoyl ketone, caffeyl chloride 等は褐変した。更に他の polyphenol 成分に就ても試験したが殆ど褐変乃至赤褐変した。

次に caffeic acid の誘導体の構造と緑変現象との関係を考察してみるのに、フェノール基の *para* の位置にある側鎖の末端基の +E 効果の順序は $-\text{COCH}_3 > -\text{COCl} > -\text{COOMe} > -\text{COOEt} > -\text{COOPr} > -\text{COquinic acid (chlorogenic acid)} > -\text{CONH}_2 > -\text{COO-}$ (遊離酸) と推定され得。緑変する化合物が持つ基即ち $-\text{COOR}$ 及び $-\text{CONH}_2$ はこれらの中にあることを知つた。従つて緑変し得る polyphenol 成分の構造上の条件として、caffeic acid のエステルの如く、phenol 基の *para* の位置に炭素原子数 3 個 (或いはそ