終りに、終始御鞭撻下された川上行蔵博士に対し、心から、感謝の意を表す。なお房州より試料を送り下されたコミヤ味工株式会社々長古官軍一郎氏並に、実験に協力され高木兵治氏に厚く謝意を表する。

(1) 第 34 次農林省統計表 (昭和 32 年度)	<i>Plantarum</i> , 8, 358 (1955).
(2) T. Torquati: <i>Arch. Farm. Sper.</i> , 15, 308 (1913); <i>C. A.</i> , 7, 2774 (1913).	(6) O. Folin, W. Denis: <i>J. Biol. Chem.</i> , 12, 239 (1912).
(3) G. O. Rudkin, J. M. Nelson: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 69, 1470 (1947).	(7) W. Hoepfner: <i>Chem. Z.</i> , 56, 911 (1932).
(4) R. C. Cheng, F. Hanning: <i>Food Research</i> , 20, 506 (1955).	(8) H. M. Barnes, J. R. Feldman, W. V. White: <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 72, 4178 (1950).
(5) M. Shiroya, S. Hattori: <i>Physiologia</i>	(9) 小幡弥太郎, 坂村貞雄: 本誌, 27, 766 (1953).

そらまめの褐変成分に関する研究 (第 2 報)*

子実内ポリフェノール物質の分布とチロシン及び Dopa の確認

長 沢 俊 三 (農林省農業技術研究所 農村生活科)

昭和 34 年 10 月 17 日 受 理

子実組織内におけるポリフェノール物質の分布 褐変化したそらまめの子実を些細に観察すると、褐変現象は、子葉部には全く見られずに種皮部だけに見られる。これは褐変を起す成分が子葉部に存在していないと見るのが妥当なのか、或は又、褐変を起す成分が存在していても、褐変を発現させる酵素系を阻害するものがあるためにその発現を見ないのか。この点を予め知っておくことは、そらまめ子実の褐変成分を抽出する上に必要と考えたので、これらの組織内分布状態を組織化学的に検討することにした。

実 験

供試そらまめの子実切片の調製は次の通りである。すなわち、莢より取出した新鮮まめを約 5mm の厚さに輪切りにし、10% ホルマリンに一夜浸漬し組織の固定を行ったのち、これを取り出し、よく水洗し、最後に 2% ゼラチン液に浸漬した。浸漬時間はゼラチンが充分組織内に浸透するまで、つまり、浮上していたまめの組織が沈降する時を限度とした。ゼラチン処理を終った組織は凍結切片にした。

この切片は常法通り予め卵白グリセリンを塗付したスライドガラス上にはりつけ、それぞれ、次の処理を行って、組織中における褐変成分の分布を観察した。

(i) ジアゾ試薬による組織内ポリフェノール物質の分布検出: 組織切片をジアゾ試薬⁽¹⁾、すなわち、ジアゾベンゼンスルホン酸の炭酸ソーダ溶液に処理したのち、直ちに、流水で過剰未反応試薬を洗い去り、常法に従いバルサムで封じた。

ジアゾニウム塩と結合した組織中の着色ポリフェノール成分の分布を観察すると、第 1 図の如く、皮部の柵状組織の下部、すなわち子葉組織に接している細胞層に分布していることが認められた。

(ii) アムモニア性硝酸銀液処理による組織内還元性物質の分布検出: 組織切片を、アムモニア性硝酸銀液に、瞬時作用させ、直ちに流水で過剰未反応液を洗い流したのち、常法にしたがいヘマトキシリン・エオジンの複染色を行い、バルサムで封じた。

ここに用いたアムモニア性硝酸銀液⁽²⁾は、次の如く調製した。

すなわち 10% 硝酸銀液 5ml に対し、濃厚アムモニア水を徐々に滴下。この滴下量は、一度生じた褐色沈澱が再び溶解するまでの量で、大体 0.5 ~ 0.6ml 程度である。ここに得たアムモニア性硝酸銀液に、3% の苛性ソ

第 1 図 そらまめ子実組織がジアゾ試薬により反応を示した部位 (360 倍)

* Studies on the Browning Compounds of Broad Bean. Part II. On the Distribution of Browning Compounds in Tissue of Green Seed and the Identification of Tyrosine and Dopa.

By Toshizo NAGASAWA (Section of Rural Home Economics, National Institute of Agricultural Sciences)

第 2 図 そらまめ子実組織がア
ムモニア性硝酸銀を置元
した部位 (360 倍)

第 3 図 褐変化したそらまめ子
実組織 (360 倍)

ーダ液 5ml を加える。この際、着色沈澱の生成をみるが、この沈澱は更に 2~3 滴のアムモニア水の滴下によって溶解させることが出来る。

このアムモニア性硝酸銀液処理による組織切片を検鏡すると、還元された銀塩が黒褐色となって存在している部分はジアゾ試薬によって検出される部分と同一である。すなわち第 2 図の写真の如く皮部柵状組織の下部細胞層であることが認められた。

(iii) 褐変したそらまめ子実の組織について： 莢よりとり出したそらまめ子実を数日室温に放置しておく、次第にその表面は褐変化してゆく。

この褐変化した子実組織の褐変部位を明かにする目的で、既述の方法にしたがって組織切片を調製した。この結果は第 3 図に示してある如く、褐変部位は前記二実験の結果と同じく、皮部柵状組織下部の細胞層にあることが認められた。

以上示した組織化学的な観察から、そらまめ子実の褐変に直接関与すると考えられるポリフェノール物質は、皮部の組織に分布しているものであって、はじめ危惧した子葉部組織には分布していないことが明かにされた。

皮部組織抽出液中チロシン及び dopa の確認 そらまめ子実中におけるポリフェノール物質は、皮部の細胞層に集中的に分布していることを既に組織化学的に明かにした。したがって、子実の褐変成分を検索するためには子実全粒を用いるより皮部のみを用いる方がその成分抽出には便利である。

そこで子実褐変成分を系統的に検索する意図で、皮部組織の抽出液を調製した。この抽出液中に、チロシン、dopa の存在を確認したので、ここに報告する。

実 験

市販のそらまめ (一寸そらまめ) 10 kg (莢共重量) より子実 3.9 kg を得た (莢と豆の重量比は 6 : 4)。

この子実量から、供試料の皮部収量は約 1.1 kg (子葉部と皮部の重量比は 7 : 3) であった。莢と子実、子葉と皮の比率は品種によって異なるが、一般に早生種は皮及び子実共に小さく、したがって、皮部の取得量は著しく少い。

この供試皮部約 1.1 kg を第 4 図に示す順序に従い褐変成分の抽出をすすめた。すなわち供試皮部をワーリングブレンダーで約 3 分間処理し、組織を充分に破碎し、これを 91 の 0.1% 醋酸水で浸出した。なおこの抽出過程において成分の酸化を防ぐため、亜硫酸水を適宜添加した。

浸出液は木綿袋で濾し分け、これに 20% 中性醋酸鉛を沈澱の生成しなくなるまで、やや過剰に添加した。生成した沈澱は遠心分離し上澄液を集め、これにアムモニア水を滴下し、液の pH を 7.5~8.0 に調整。この時に生成する黄色沈澱を再び遠心分離して分け、沈澱部分を水に懸濁せしめ硫化水素を通じて脱鉛を行った。

硫化鉛を除いた透明な濾液は、減圧で約 50 ml に濃縮した。

(i) ペーパークロマトグラフィによる dopa の存在の確認：

第 4 図 子実褐変成分の分離抽出

前記抽出液を、*n*-ブタノール・醋酸・水=4:1:1 の溶剤で、東洋濾紙 No. 51 (2×40 cm) 上に、一次展開を行い、そして、Folin-Denis のフェノール試薬⁽³⁾、アムモニア性硝酸銀液及び、0.1% ブタノール性ニンヒドリン溶液によって、スポットの現象を行った。

ここに、現象された R_F 0.22~0.23 を示すスポットは、比較的顕著に現われる。この R_F 値から見て dopa の存在が考えられるが、これを確認するために、抽出液を 40×40 cm の濾紙の一边に一直線に塗付し、同時に展開後、この R_F 値に相当する部分を切り取り、この部分を水で浸出した。この浸出液について、紫外外部吸収スペクトルの測定を行ったが、この吸収特性は、前報において、莢より分離した L-dopa のそれと (280 mμ に最大の吸収を示した) 全く一致し、更にペーパークロマトグラフィによる R_F 値も同一であった。よってこれを dopa の存在と認めた。

(ii) チロシンの分離確認: Dopa の存在を定性的に確認した前記抽出濃縮液を、冷蔵庫に一夜放置しておく、少量の沈澱が生成する。これを遠心分離し、この上澄液にアルコールを 80% になるように添加し、再び冷蔵庫におく。ここに生成した樹脂状沈澱を分離し、この上澄液に、約 30% になるようエーテルを添加、更に、冷蔵庫に放置した。この間に生成した樹脂状沈澱を分け、上澄液中のアルコール・エーテルを溜去すると同時に減圧濃縮し、冷蔵庫に数日間放置した。

ここに生成した沈澱を集め、冷却水でよく洗い、ついでこれを稍多量の熱水に溶解した。

この液は多少着色しているので少量の活性炭で処理したのちに減圧濃縮し、冷蔵庫に放置、数日後に、無色針状結晶が生成された。これを二三回水より再結を繰り返えし、約 30 mg の結晶を得た (第 5 図)。

このものは、ニンヒドリン反応及びミロン反応陽性であることと、水溶液の紫外外部吸収特性 (第 6 図) 及び、ペーパークロマトグラフィの R_F 値などから、これをチロシンと同定した。

要 約

(1) 未成熟そらまめ子実の褐変は易い。この褐変化に関係する成分を検索するためには、子実の如何なる部分がこの現象を示すか、検討しておく必要がある。そのために、褐変化に関係のあるポリフェノール物質の組織内分布状態を、組織化学的に観察した。すなわち、子実組織の凍結切片を作製し、これをジアゾ試薬、アムモニア性硝酸銀液で、それぞれ処理し、反応部分を検鏡した。このほか既に、褐変化した子実組織を無処理のまま検鏡し褐変部位を観察した。これらの結果、褐変成分は皮部の柵状組織の細胞層に分布していることが明かとなった。

(2) 子実中存在するポリフェノール物質は、皮部に分布していることを認めたので、子実のこれらの物質の検索は皮部組織抽出液について行うことが効果的である。

そこで、この抽出液について褐変成分の検索中、dopa とチロシンの存在を確認した。すなわち前者は、ペーパークロマトグラフィで定性的に、後者は結晶として分離確認した。

稿を終るに当り、御鞭撻賜った川上行蔵博士並に協力された高木・伊東両氏に謝意を表す。

(1) K. H. Saunderson: The Aromatic Diazo-compounds and their Technical Application. p. 10 (1949).

(3) O. Folin, W. Denis: J. Biol. Chem., 12, 239 (1912).

(2) R. D. Lillie: Histopathologic Technic and

第 5 図 そらまめ子実皮部組織より得た L-チロシンの結晶 (15×40)

第 6 図 そらまめ子実皮部組織より分離した物質の紫外外部吸収スペクトル