

学内研究助成金研究課題

殺線虫剤によるジャガイモ塊茎の褐変に関する研究(第3報)

DBCP剤の処理により形成される褐変色素について

駒井功一郎^{*}, 佐藤庄太郎^{*}

Studies on the Browning Phenomenon of Potato Tubers by Nematocide (Ⅲ)

Browning Pigments Formed in Potato Tubers by Nematocide DBCP Treatment

Koichiro KOMAI and Shotaro SATO

Synopsis

This experiment was initiated in order to separate the induced browning pigments of potato tubers treated with nematocide DBCP. Two browning pigments of dark brown and black were separated from browning tubers. The pigments were essentially identical with the properties of pigments prepared from chlorogenic acid or L-DOPA in vitro. But solubility in water showed the difference between two pigments and also pigments prepared from chlorogenic acid and L-DOPA. Structure unit of these pigments is presumed to be form of resemblance by infrared, ultraviolet and qualitative test. In browning pigments was recognized the existence of protein by Sephadex G-25 column chromatography and disc electrophoresis. From these results, it was inferred that the browning pigment in tissues was largely composed of mixture of dark brown pigments, black pigment and protein.

I 結 言

ジャガイモ塊茎組織の傷害に伴う褐変は、チロシン、ドーパ(dihydroxyphenyl alanine)^{1,2,3,4)} およびクロロゲン酸類⁵⁾ が酵素的または非酵素的な酸化をうけ、重合、縮合あるいは窒素化合物の関与⁶⁾ により、無定形のメラニン成分が形成されるために起るとされている。

一方、著者らは殺線虫剤の処理によって発現するジャガイモ塊茎の褐変も殺線虫剤により塊茎組織が破壊され、チロシンやクロロゲン酸がポリフェノールオキシダーゼと接触することにより酸化され、褐変色素に変わること起因すると報告した^{7,8)}。メラニン様物質は動植物組織に広く存在し、生体内においては蛋白質などと結合した⁹⁾ 高分子量の難溶性物質であるため、組織からの単離、精製が困難な物質とされている。ジャガイモ塊茎組織中で生成したメラニン成分

も組織中の細胞膜などに沈着¹⁰⁾して複雑な形態で存在しているため、その単離が困難とされている。そのため、塊茎褐変の主な基質であるチロシンおよびクロロゲン酸の両物質から酸化、重合して生成するそれぞれの褐変色素の性状、構造、生成機構あるいは存在形態などについて不明な点が多い。

本報では、殺線虫剤DBCP(1,2-dibromo-3-chloropropane)の処理で発現するジャガイモ塊茎褐変の要因である褐変色素の分離を試み、分離した褐変色素の性状などについて検討した。ここに得られた2, 3の知見について報告する。

実験方法

1. ジャガイモ塊茎からチロシンおよびクロロゲン酸の分離

供試ジャガイモ塊茎(品種:ダンシャク)中のチロシンおよびクロロゲン酸の存在確認とこれらの物

質の単離操作過程での褐変化への程度を観察する目的で実施した。

a) チロシン：小幡らの方法⁵⁾に従って実施した。ジャガイモ塊茎5kgを1%トリクロル酢酸5ℓとともに破碎し、ろ過して残渣を除く。ろ液は減圧濃縮し、ろ液中のトリクロル酢酸をエーテルで抽出除去する。抽出残部を放冷し、生じた結晶性沈殿物をろ集して温水より再結晶を行ない、細針状結晶1.3gを得た。この結晶のIRスペクトルはチロシン標品と一致した。(Fig. 1)操作過程での褐変現象は全く観察されなかった。

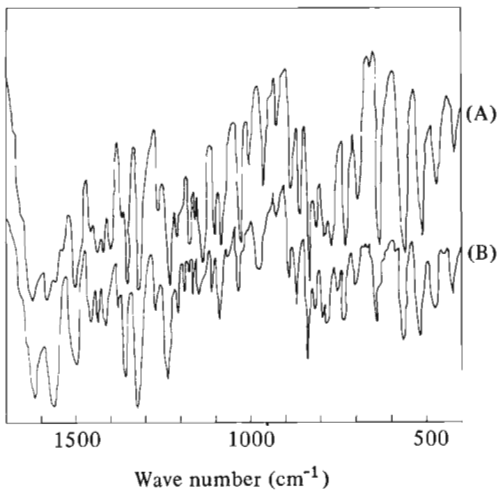


Fig. 1. IR Spectra of L-Tyrosine in KBr Disc.
A: authentic, B: isolated from potato tubers

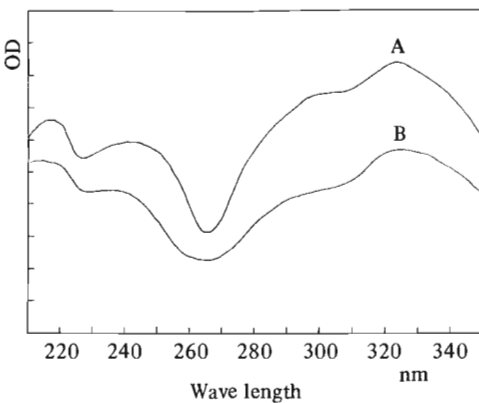


Fig. 2. UV Spectra of Chlorogenic Acid
A: Authentic, B: Prepared from Potato Tubers

b) クロロゲン酸：堀川らの方法¹¹⁾に従って実施した。ジャガイモ塊茎5kgを無水アセトンとともに

破碎し、ろ過する。ろ液は炭酸ガス気流中で減圧濃縮し、20%塩基性酢酸鉛水溶液を加えて生じた黄色沈殿を遠心分離で集め、80%メチルアルコールに懸濁する。懸濁液中の鉛を除去し、ろ液を再び減圧濃縮する。濃縮液に5倍量のアセトンを加えて析出する淡黄色の沈殿をろ別し、ろ液を減圧濃縮して酢酸エチルで繰返し抽出する。酢酸エチルを減圧留去し、放冷して析出する淡黄色沈殿をろ集し、温水に溶解後放冷して再沈殿させる。0.2gの淡黄色沈殿物を得た。この沈殿物のUVスペクトルはクロロゲン酸標品のものと近似であった。(Fig. 2)

2. ジャガイモ塊茎から褐変色素の分離

ジャガイモ塊茎組織の褐変色素は、Fig. 3に示す方法に従って分離した。外皮を除去したジャガイモ塊茎2kgをハンドスライサーで厚さ約2mmの輪切り切片とし、布で水分をふき取った後、D B C P原体を均一にスプレーし、25℃で24時間放置して褐変を発生させた。黒褐色化した塊茎切片は、メチルアルコールで洗浄してD B C Pを除き、再び2ℓのメチルアルコールと共にワーリングブレンダーで破碎し、吸引ろ過で黒色残渣と褐色ろ液に分別した。残渣は水に懸濁後、数枚重ねたガーゼでろ過し、ろ液について10,000r.p.mで15分間遠心分離した。沈殿物は白色の下層（主に澱粉）と黒色の上層に分離した。黒色上層を集め、水に懸濁して再び遠心分離し、微量混入する澱粉を分別した。遠心分離を数回繰返すことで澱粉をほとんど除くことができた。ここで得た黒色色素を検鏡したところ、多量の繊維成分や細胞膜の存在が認められたので6N塩酸で5時間煮沸分解した。煮沸に伴って黒色が増加したが、色調には変化は認められなかった。煮沸後黒色沈殿物を集め、水、エチルアルコールで十分洗浄後、減圧乾燥して粉末黒色色素2.5gを得た。一方、先に得たメチルアルコールろ液は減圧濃縮後、2倍量のアセトンを添加して濃褐色下層を分取し、水20mlに溶解した。水溶液は塩酸酸性とし、5倍量のアセトンを加え、生成する沈殿物ろ別し、ろ液を減圧濃縮後、5%炭酸ナトリウムで中和した。濃縮液に再び5倍量のアセトンを加え、沈殿物をろ別し、ろ液を減圧濃縮、乾固して、粘稠性暗褐色色素5gを得た。

3. チロシン、ドーパおよびクロロゲン酸から褐変色素の調製

ジャガイモ塊茎から分離したL-チロシン、クロロゲン酸および市販L-ドーパをpH5.5のリン酸緩衝液に溶解し、それにジャガイモ塊茎のアセトンパウダーから常法¹³⁾により調製したポリフェノールオキシ

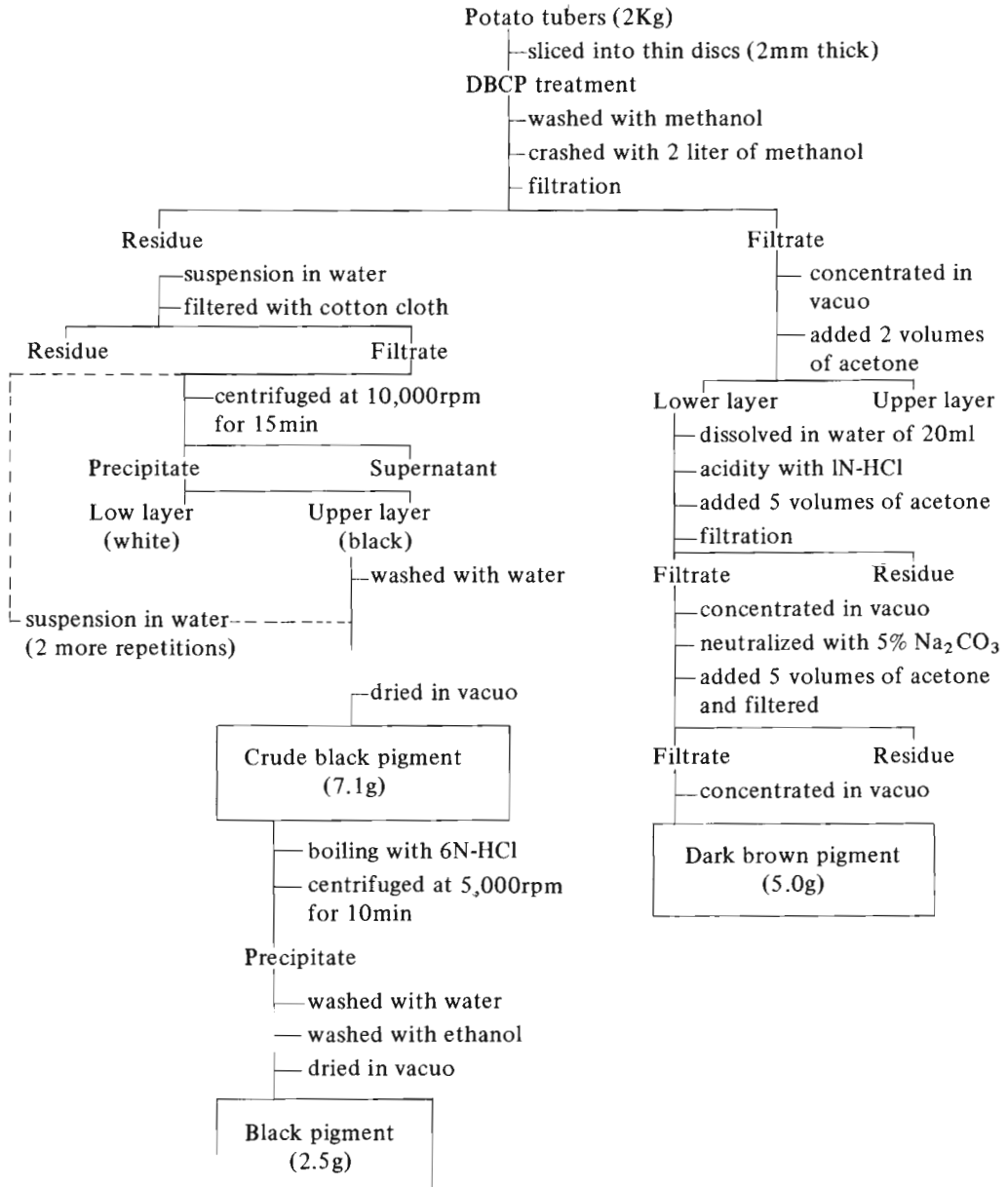


Fig. 3. Preparation of Browning Pigments from Potato Tubers

ダーゼ酵素液を100mlあたり20ml量添加し、30°C、24時間反応させることでL-チロシン、L-ドーパは黒色、クロロゲン酸からは褐色の色素がそれぞれ生成した。反応液にはペクチン様物質が析出するので除去し、L-チロシン、L-ドーパからの黒色色素については遠心分離により黒色沈殿物を集め、再び水に懸濁して遠心分離を行ない、得られた黒色沈殿物をエチルアルコール、熱水で洗浄後減圧乾燥して粉末状の黒色色素を得た。クロロゲン酸からの場合は、反応液を減圧濃縮によりシラップ状とし、それに2倍量のアセトンを加えて暗褐色下層を分取し、これに酢酸エチルを加えて未反応のクロロゲン酸を除去した。残部の褐色部分を減圧乾固し粘稠性褐色色素を得た。

4. セファデックスG-25カラムクロマトグラフィー

セファデックスG-25のカラム(2×70cm)を0.05M トリシュー塩酸緩衝液pH6.5で平衡後、褐変色素水溶液を加え、同じ緩衝液で流速0.5ml/minで展開、溶出させた。溶出液は4mlごとに分取し、それぞれにつき405nmの吸光度を測定した。

5. ディスク電気泳動

セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーで得られた各フラクションの褐変色素のポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動をトリシュー塩酸緩衝液、pH8.3を用いる永井らの方法¹²⁾で行なった。泳動は2.5mA/cmで100分間行ない、0.5%アミドブラック10Bで30分間染色後、水洗脱色し、泳動バンドを得た。

6. IRスペクトル、UVスペクトル

IRは日立EPI-G₃を用い、KBr錠剤法によって測定し、UVは日立EPS-3T自記分光光度計によって測定した。

7. 炭素、窒素の分析

褐変色素の乾燥粉末試料について柳本製MT-500型CNコーダーで測定した。

III 実験結果

ジャガイモ塊茎から分離した黒色および暗褐色の褐変色素とチロシンおよびクロロゲン酸を*in vitro*で褐変させることで得た褐変色素の諸性質について検討した。

Table 1. Properties of Browning Pigments

	Prepared from chlorogenic acid	Prepared from L-tyrosine	Prepared from potato tubers		
			1	2	
A	Form	viscid	powder	viscid	powder
	Color	dark brown	black	dark brown	black
	0.5N-NaOH	soluble	soluble	soluble	soluble
	conc. H ₂ SO ₄	soluble	soluble	soluble	soluble
	Distilled water	soluble	insoluble	soluble	insoluble
	Ethyl ether	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
	ethyl alcohol	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
	Acetone	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
B	Chloroform	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
	Benzene	insoluble	insoluble	insoluble	insoluble
C	H ₂ O ₂	light coloration	light coloration	light coloration	light coloration
	AgNO ₃	liberation of silver	liberation of silver	liberation of silver	liberation of silver
C	Diazo reagent	±	-	-	-
	Ehrlich reagent	+	+	+	+
	Folin reagent	+	+	+	+

A: Solubility, B: Effect of oxidizing agent, C: Color reaction of dissolved pigments with alkaline solution
+: Positive, -: Negative

1. 定性試験

溶解性および酸化剤，ジアゾ試薬(0.5% P-ニトロアニリン 2*N*-塩酸液 5 ml に 5% 亜硝酸ナトリウム液数滴を加えてジアゾ化したのち，使用直前に 20% 酢酸ナトリウム 20 ml を混合する。)，エーリッヒ試薬(P-ジメチルアミノベンズアルデヒドの10%濃塩酸溶液)，Folin 試薬¹⁴⁾の各試薬に対する定性試験を行ない，その結果は Table 1 に示した。

ジャガイモ塊茎より分離した粉末黒色色素は水酸化ナトリウム，硫酸には徐々に溶解するが，水およびその他有機溶剤に対して不溶であった。粘稠性暗褐色色素も有機溶剤には不溶であるが，水酸化ナトリウム水溶液，硫酸および水に易溶であった。また，粉末黒色色素はチロシンから生成した色素に，粘稠性暗褐色色素はクロロゲン酸からの色素にそれぞれ類似の溶解性を示した。酸化剤に対しては過酸化水素水ではいずれも淡色化し，アルカリ性硝酸銀溶液ではいずれも白濁し，銀の遊離が観察された。また各色素のアルカリ溶液は，エーリッヒ試薬¹⁵⁾および Folin 試薬に対して陽性であるが，ジアゾ試薬に対しては陰性であった。

2. 炭素量と窒素量

各色素の炭素および窒素含有量は Table 2 に示したように，クロロゲン酸およびL-ドーパより調製した褐変色素に比較してジャガイモ塊茎より調製した色素はいずれも窒素含有量が大きであった。しかし炭素量では大差なかった。

3. IRスペクトル，UVスペクトル

各色素のIRスペクトルはFig. 4, Fig. 5にそれぞれ示した。L-ドーパ，L-チロシンより調製した黒色色素は，クロロゲン酸から得た褐色色素と類似の吸収スペクトルを示し，またジャガイモ塊茎から分

離した色素のうち，暗褐色色素はこれらの吸収スペクトルと類似であった。しかし，黒色色素の吸収スペクトルは異なった。

各色素のUVスペクトルはFig. 6に示したように，いずれの色素も273nm付近に吸収極大をもつスペクトルを示した。

4. セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーとディスク電気泳動

調製，分離した色素のうち，塊茎から分離した水溶性暗褐色色素とクロロゲン酸から調製した色素についてカラムクロマトグラフィーを行なった。塊茎からの暗褐色色素は3つの色素帯に，クロロゲン酸からの色素は4つの色素帯にそれぞれ分離した。

(Fig. 7)

次に得られた色素帯についてディスク電気泳動を行なった。泳動開始とともに褐色色素は陰極から陽極へ泳動し，泳動終了時には一部の褐色色素は分離用ゲル層を泳動しきっていた。その後，アミドブラック10Bの染色で強く染色する泳動帯が得られた。(Fig. 8)大部分の染色帯には褐色色素は観察されず，大半の褐色色素は染色帯よりも移動度が大きであった。

IV 考 察

殺線虫剤DBCPでジャガイモ塊茎を処理して褐変を発生させ，その褐変組織から褐変色素の分離を試みた。その結果，性状の異なった2種類の褐変物質を分離した。破碎処理後の残渣から得た粉末黒色色素は水不溶性であるため以後の精製が困難であった。この色素中に含有している繊維成分の除去を本実験では塩酸加熱処理という強制的条件下で行なった。そのため塩酸による色素の影響は無視できないが，処理後の定性試験，色調に著しい変化が見られない

Table 2. Contents of Carbon and Nitrogen in Browning Pigments

	C (%)	N (%)
Prepared from chlorogenic acid	55.42	3.06
Prepared from L-DOPA	51.30	5.54
Dark brown pigment prepared from potato tubers	54.26	9.56
Crude black pigment prepared from potato tubers	57.17	13.45
Black pigment after HCl treatment	54.55	9.69
Chlorogenic acid	53.58	-
	(54.2)	-
L-DOPA	53.41	6.7
	(54.0)	(7.0)

(): calcd.

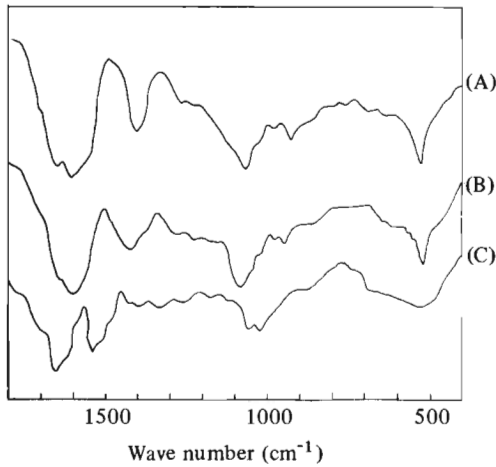


Fig. 4. IR Spectra of Black Pigments in KBr Disc.
 A: prepared from L-tyrosine
 B: prepared from L-DOPA
 C: prepared from potato tubers

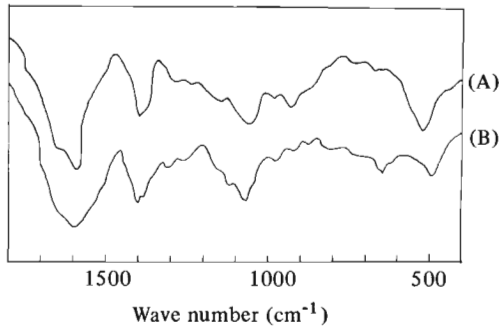


Fig. 5. IR Spectra of Dark Brown Pigments in KBr Disc.
 A: prepared from chlorogenic acid
 B: prepared from potato tubers

ところから本色素は相当安定な形態を成していると考えられる。一方、ろ液から得た粘稠性暗褐色色素は水溶性で、それぞれの性状の差異が観察された。また *in vitro* で調製したチロシン、ドーバからの黒色色素は前者の溶解性に、クロロゲン酸からの褐色色素は後者の溶解性に類似した。ジャガイモ塊茎の褐変はチロシンおよびクロロゲン酸が褐変基質であるとされているが、両基質から生成した褐変色素の存在形態の差異については不明な点が多い。本実験操作で得た2種類の色素がそれぞれ異なった基質から生ずるものであればおそらくチロシンあるいはクロロゲン酸類であろうし、褐変組織中では異なった

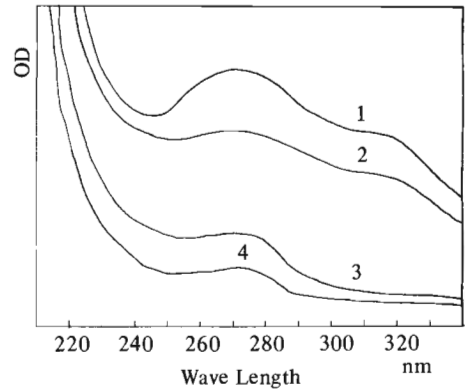


Fig. 6. UV Spectra of Browning Pigments
 1: Dark brown pigment prepared from potato tubers
 2: Dark brown pigment prepared from chlorogenic acid
 3: Black pigment prepared from potato tubers
 4: Black pigment prepared from L-DOPA
 1,2: aqueous solution, 3,4: 6N-HCl solution

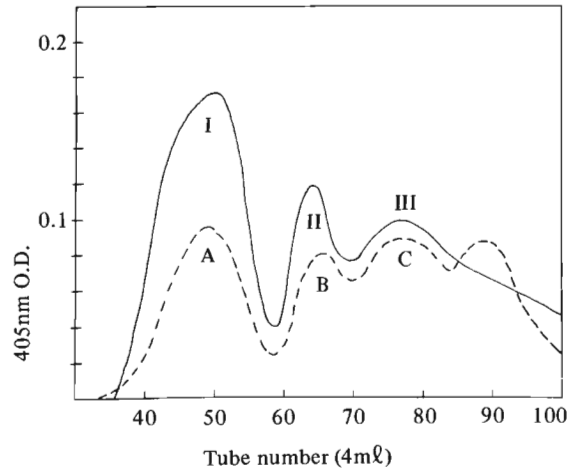


Fig. 7. Sephadex G-25 Column Chromatogram of Water-Soluble Browning Pigments.
 ---- prepared from chlorogenic acid
 — prepared from potato tubers

形態で存在することが推察される。また各色素とも I R スペクトル, UV スペクトルが類似で、その定性試験はキノノイドとしての一般的性質を示し、そのアルカリ溶液はエーリッヒ反応が陽性であることより、インドールキノン、フランあるいはそれらの類縁化合物が主な構成因子となった重合体であると推察する。しかしながらチロシン由来の褐変色素の構成因子はインドールキノン類であることが知られ

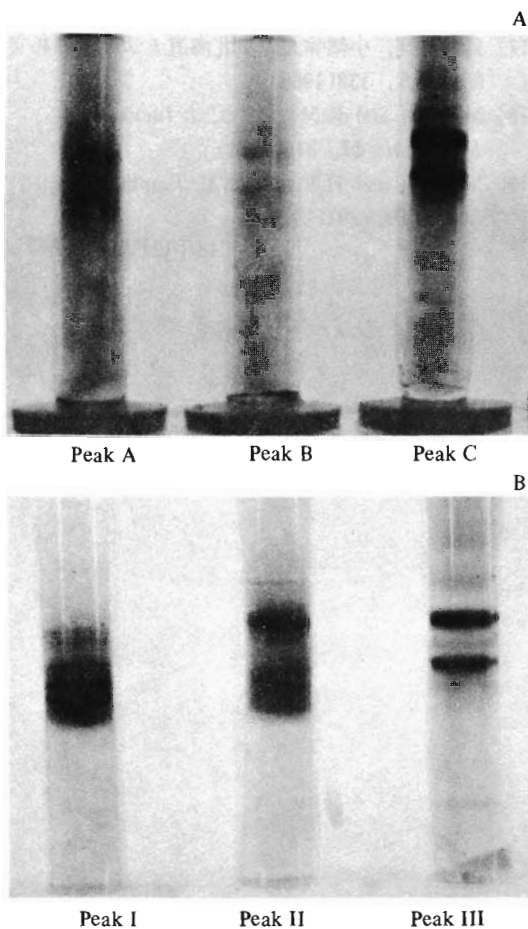


Fig. 8. Polyacrylamide Gel Electrophoretic Patterns of Each Peak in Fig. 7.

Electrophoresis was carried out at 2.5mA per tube and pH 8.3, for 2 hrs.

A: prepared from chlorogenic acid

B: prepared from potato tubers

ているが、クロロゲン酸からの褐変色素の構造については本実験結果だけでは考察できない。褐変基質の問題点とも合せて現在検討中である。

窒素含有量は、*in vitro*で生成した色素に比してジャガイモ塊茎から分離した色素が多量であった。すなわち、ジャガイモ塊茎組織中にはアミド態窒素^{16,17)}など遊離窒素が多いことからしてこれら窒素化合物の褐変色素形成への関与あるいは生成した色素の蛋白質など高分子量窒素化合物との結合が含有窒素成分多量の原因と考える。また、褐変色素中の高分子量窒素化合物の存在は、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーおよびディスク電気泳

動の結果からも推察された。水溶性暗褐色色素はカラムクロマトグラフィーで3~4の色素帯に分離した。また各色素帯には数種の泳動帯(アミドブラック10Bで染色する)が認められることより、これらの色素は分子量の異なった数種の色素複合体で、各色素には数種類の蛋白質成分が存在していることが考えられるが、電気泳動により褐色色素の多くは染色泳動帯よりも移動度が大きいことからして、色素と蛋白質との結合は強くないと考えられる。清寺ら^{18,19)}によれば、哺乳類チロシナーゼの失活は、メラニンがチロシナーゼと結合体を形成することにより起り、またチロシナーゼとL-ドーパの反応系にアルブミンを加えた場合、反応に関係のないアルブミンもまたメラニンとともに沈殿するとの報告を考えると、塊茎組織から得た褐変色素もポリフェノールオキシダーゼおよび組織蛋白質との結合体として存在していることも考えられる。

V 要 約

殺線虫剤DBCPの処理で褐変させたジャガイモ塊茎から粉末黒色色素と粘稠性暗褐色色素の2種類の色素を分離した。前者はチロシン、ドーパ系から、後者はクロロゲン酸から生成した褐変色素にそれぞれ類似した性質であった。粘稠性暗褐色色素はセファデックスG-25カラムクロマトグラフィーで4つの色素帯に分離した。またこれらの色素帯には電気泳動により泳動、分離する数種の蛋白質が認められた。しかし、褐変色素中に存在する蛋白質は電気泳動の結果からして褐色色素とさほど強い結合をもっているとは考えられない。

文 献

- 1) A.B.LERNER: *Physiol. Revs.*, **30**, 91(1950).
- 2) H.S.MASON: *J.Biol. Chem.*, **172**, 83(1948).
- 3) E.S.ROBINSON and J.M.NELSON: *Arch. Biochem.*, **4**, 111(1944).
- 4) H.SCHMALFUSS and H.BUMBACHER: *Biochem. Z.*, **315**, 97(1943).
- 5) 小幡弥太郎, 坂村貞雄: *農化*, **27**, 766(1953).
- 6) M.GRAUBARD and J.M.NELSON: *J.Biol. Chem.*, **111**, 757(1935).
- 7) 駒井功一郎, 佐藤庄太郎: *農化*, **45**, 483(1971)
- 8) 駒井功一郎, 佐藤庄太郎: *農化*, **46**, 607(1972)
- 9) 船津 勝, 船津軍喜: *農化*, **31**, 221(1958)
- 10) 緒方邦安, 辰巳保夫, 茶珍和雄: *食工誌*, **17**, 298(1970)
- 11) 堀川博朗, 岡安美恵子, 和田篤子, 草間正夫:

食工誌, **18**, 115(1971)

- 12) 永井 裕: 蛋白質, 核酸, 酵素, **11**, 818(1966)
- 13) M. OGAWA and I. URITANI: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 870(1970)
- 14) O. FOLIN and W. DENIS: *J. Biol. Chem.*, **22**, 305(1915)
- 15) 池本 始: 応動昆, **14**, 216(1970)
- 16) A. NEUBERGER and F. SANGER: *Biochem. J.*, **36**, 662(1942)
- 17) 葛西隆則, 小幡弥太郎: 北海道大学農学部邦文紀要, **5**, 139(1965)
- 18) M. SEIJI and K. MIYAZAKI: *J. Invest. Dermatol.*, **57**, 316(1971)
- 19) M. SEIJI and H. FUKUZAWA: *Tohoku J. exp. Med.*, **108**, 291(1972)

(昭和48年12月10日受理)