

乳液の褐変現象について

足 立 晃 太 郎*
井 窪 茂 子**
亀 井 光 子***
霊 山 満 佐 子***

I. 緒 論

従来食品の褐変現象については多数の報告があり、⁽¹⁾褐変に関係すると考えられる種々の因子として、**tannin**, **Maillard reaction**, **Reducton (ascorbic acid 等の還元物質)**, 日光及び空気による酸化, 酵素等が認められている。特に **Reducton** については、最近食品の非酵素的褐変に **Reducton** が重要な働きをもつことが **H. V. Euler** 等によって明らかにされて来ている様である。^(註) 著者等は褐変現象を起す食品中特に乳液を含むイチヂク・甘藷を、乳液の褐変を研究する為タンポポを試料として、これら三試料につき乳液の褐変現象を明らかにする目的で上記の諸褐変因子を中心に研究した。三試料の乳液の主成分について各々イチヂクはゴム質及び蛋白質,⁽²⁾ 甘藷は **Jalapin**,⁽³⁾ タンポポは **taraxacin** 及び **taraxacerin** 等であると報告されているが、各乳液の褐変については未だ明かにされていないようである。故に三種の乳液の褐変現象を明らかにするため、**tannin**, 糖, アミノ酸, **ascorbic acid**, **peroxidase** 等を呈色反応, **paper chromatography**, 純粋物分離等各種の実験を行って検索し、その結果を総合的に考察して乳液の褐変因子を究明しようと試みた。

II. 実験の部

[1] 実験試料

a. イチヂク

産地：奈良市法蓮佐保川西町（昭和35年9月採取）。品種：ホワイト、ゼノア。

b. 甘藷

産地：奈良県山辺郡山添村室津（昭和35年9月～12月産）
品種：農林一号

c. タンポポ

産地：奈良県山辺郡山添村室津（昭和35年12月採取）

[2] 実験及び結果

§ 1. tannin

1) tannin の検出法

上記三試料について **tannin** の存在を明らかにするため試料の **tannin** 水抽出液及び乳液について試薬による沈澱及び呈色反応を試みた。⁽⁵⁾

(a) **gelatin** 液による沈澱：0.5% **gelatin** と10%の食塩を含む試薬を供試液に等量加えると白色沈澱を生ずる。

(b) 金属塩類による沈澱：炭酸加里, 石灰鉛, 銅塩に依って沈澱を生ずる。石灰水又は10%醋酸鉛を供試液に等量加えると白色沈澱を生ずる。

(c) 重クロム酸塩による呈色：重クロム酸加里飽和液を加えると黒褐色の沈澱を生ずる。

(d) 鉄塩による呈色：鉄塩溶液を加えると暗緑～暗青色の沈澱を生ずる。

(e) 臭素水による呈色：臭素水を滴加すると黄褐～赤褐色となる。

(f) 硫酸による呈色：濃硫酸を加えると黄褐～紫紅色となる。稀硫酸を加えると黄褐～赤褐沈澱を生ずる。

[実験結果]

上記の沈澱及び呈色反応を行った結果第1表に示す如く、三試料中に **tannin** が含まれていることを認めた。

第1表 沈澱及び呈色反応

試 薬	イチヂク	甘 藷	タンポポ
1. ゼラチン+食塩	+	+	+
2. 醋酸鉛 (10%)	+++	+++	+
3. 石 灰 水	+++	+++	+
4. 重クロム酸加里	++	+	+
5. 塩化第二鉄(1%)	++	+	+
6. 臭素水 (1%)	+	+++	+
7. 濃 硫 酸	+	+	+
稀 硬 酸	+	+	+

+は沈澱の量を示す。

2) [paper chromatography (P.C.)]

甘藷・イチヂクの **methanol** 抽出液（試料を洗滌

*本学教授 **昭和35年度食物科卒業 ***本学副手
野村男次, 山藤一雄：レダクトン化学の基礎とビタミンCの生化学的成果

(註) H. v. Euler, 足立達, 一食品学の基礎— 1960年

乾燥後、氷冷した3倍量の methanol を加えて mixer で 3~5 分間細砕後抽出する。これを直に吸引濾過すると透明な液を得る。この時イチヂクは深緑色、甘藷は赤褐色である。この濾液を 50°C にて炭酸ガス気流を通じ減圧濃縮を行ったもの⁽⁶⁾及びタンポポ乳液(乳液をトリクロール醋酸にて沈澱後濃縮したもの)について東洋濾紙 No. 50, 40×2 cm を用いて一次元展開を行った。展開剤としては n-BuOH : AcOH : H₂O = 5 : 2 : 6 の混液を用いた。風乾後 1% 塩化第二鉄

液及び 1% KCN 液を噴霧して tannin の spot を発色させると第 1 図に示すような chromatogram が得られた。即、イチヂクより 2 ケ、甘藷 3 ケ、タンポポ 2 ケである。

〔実験結果〕

chromatogram による tannin の分別結果は第 2 表に示す如くである。分別決定は tannin extract との対称試験及び R_f 値の比較による⁽⁷⁾。

第 2 表 paper chromatography

spot No.	イチヂク		甘藷			タンポポ	
	1	2	1	2	3	1	2
標準 R _f 値	0.75	0.82	0.65	0.75	0.80	0.65	0.75
試料 R _f 値	0.75	0.83	0.65	0.75	0.81	0.66	0.76
FeCl ₃ の呈色反応	blue	brownish blue	blue	blue	green-blue	—	—
KCN の呈色反応	brown	brown	dark orange	orange	pink orange	orange	pink orange
tannin の種類	gallic acid	l-epi-catechin gallate	l-epi-catechin	gallic acid	l-epi-catechin gallate	l-epi-catechin	gallic acid

3) gallic acid の確認

第 2 表に示す実験の結果より三試料中に gallic acid の存在を認めたので確認するため更に次の実験を行った。

a) P.C. による検討

甘藷・タンポポの menthanol 抽出液及びタンポポ乳液の一次元 P.C. を行い、この際 gallic acid の純粋物を同時に展開した結果両者は同一 R_f 値を示した。

b) 呈色反応

イチヂク・甘藷の水抽出液及びタンポポ乳液の稀釈液に等量の HCl-formalin 試薬 (35% の HCl 100cc, 30% formalin 2 cc, 水 500cc) を加え 2 時間放置後濾過し、炭酸ナトリウムで中和して微アルカリ性となし、これに燐モリブデン酸溶液を加えると鮮明な青色を呈した。

以上 P.C. による純粋物との対称試験及び塩酸ホルモル法による呈色反応の結果等により三試料中に gallic acid が存在するものと考えられる。

4) 結晶 tannin の分離

〔操作〕

甘藷、イチヂクの茎、タンポポ根の tannin の methanol 抽出液に醋酸鉛を加えて沈澱させる。この時不純物の多い沈澱を生ずる故、之を濾別し、その濾液に完全に沈澱を生じさせ吸引濾過し、沈澱を水洗後水に浮遊

させ稀硫酸にて振盪浸出し、炭酸ガス気流中にて減圧濃縮し冷却しつつ chloroform を注加すれば沈澱を生ずる。これを真空乾燥すると無定形の tannin 物質を得る。之を温水に溶解し、冷所に放置すれば tannin が析出する。数回水より再結する。

〔実験結果〕

イチヂク・タンポポより無色針状結晶の tannin を分離した。甘藷より結晶を分離したが淡黄色岩状で純粋の tannin 結晶とは認め難い。

〔結晶 tannin の性質〕

- (1) 無色針状結晶である。
- (2) 水, alcohol, acetone, に易溶; ether に溶けるが難溶; chloroform, benzene に不溶である。
- (3) 結晶 tannin の水溶液は、塩化第二鉄液によって緑色、濃硫酸によって紫紅色を呈する。
- (4) 酸化して褐色を帯びる。

以上三試料の呈色反応、P.C., 塩酸ホルモル法による呈色反応、純粋物分離及び結晶 tannin の性質、顕微鏡観察等を行った結果、三試料の tannin は各々イチヂクは, gallic acid, l-epi-catechin gallate; 甘藷は, gallic acid, l-epi-catechin, l-epi-catechin gallate; タンポポは gallic acid, l-epi-catechin と考えられる。

§ 2. Maillard reaction

Maillard reaction の因子となる糖及びアミノ酸の

存在を明らかにする為呈色反応, P.C.を行った。

1) 糖の検出

(a) 糖の検出を行うためイチヂク, 甘藷の水抽出液及びタンポポ乳液について炭水化物に共通の呈色反応である molish 反応及び thymol 反応を行った結果いずれも陽性を示したので糖が存在するものと認められた。

(b) P.C.

上記呈色反応で糖の存在を認めたので糖の種類を分別するため, tannin水抽出液及び乳液について P.C. 一次元上昇法を行った。東洋沓紙 No. 50 40×2 cm, 展開剤は n-BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 5 の混液, 発色剤は anilin hydrogen phthalate である。分別決定は糖の extract との対称試験及び Rf 値の比較によった。実験の結果は第3表及び第2図に示す如く, イチヂクより1ヶ, 甘藷より3ヶの spot を検出したが, タンポポについてはテーリングの為明確な spot を得られなかった。

第3表 paper chromatography

	イチヂク	甘 藷		
	spot	spot 1	spot 2	spot 3
標準 Rf 値	0.18	0.14	0.18	0.23
試料 Rf 値	0.18	0.13	0.18	0.22
呈色反応	黄褐色	黄褐色	黄褐色	黄褐色
糖の種類	d-glucose	d-sucrose	d-glucose	d-fructose

(c) 呈色反応

P.C. の結果 d-glucose, d-sucrose, d-fructose 等を認めたが更に糖の種類を明らかにするため, 個々の呈色反応を行い, P.C. による結果と一致するか否かについて検討した。実験の結果を第4表に示した。以上の諸実験の結果について, 先づ Molish 反応, thymol 反応に各々陽性を示したことより糖の存在を認めたので P.C. による種類分別を行った結果, タンポポはテーリングにより明確な spot を検出出来なかったが, イチヂク中に d-glucose ; 甘藷中に, d-glucose, d-sucrose, d-fructose を検出しこれらの Rf 値, 発色剤による呈色, 純粋物との同時展開による対称試験及び上記第4表の呈色反応等の結果, 糖の種類として次のものが考えられる。イチヂク, 甘藷は還元糖の検出反応に陽性を示したことより P.C. の d-glucose という結果と一致する。甘藷は更に Selwanoff 反応にも陽性を示したことより ketose 即 d-fructose の存在が考えられこれは P.C. の結果と

も一致している。タンポポについては Seliwanoff 反応, anilin 試薬による反応に陽性を示したことより d-fructose を, orcinol 反応に陽性を示したことより l-rhamnose ではないかと考えられる。

第4表 糖の呈色反応

呈 色 反 応	甘藷	イチヂク	タンポポ乳液	
還元糖検出反応	Trommer 反応	+	+	-
	Fehling	+	+	-
	Picric acid	+	+	-
	Tollens	+	+	-
ketose検出反応	Seliwanoff反応	+	-	+
pentose検出反応	Aniline 反応	-	-	-
	Orcinol 反応	-	-	+
methyl pentose 検出反応		-	-	+

2) アミノ酸

(a) ninhydrine reaction

イチヂク, 甘藷の水による抽出液及びタンポポ乳液について ninhydrine reaction を行った結果, 各々陽性を示しアミノ酸の存在を認めた。

(b) P.C.

ninhydrine reaction によりアミノ酸の存在を認めたので P.C. によってアミノ酸の種類を検討した。

[方法]

沓紙 : 東洋沓紙 No. 50 40×2 cm

展開剤 : n-BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 2 : 1 の混液

液

発色剤 : ninhydrine 試薬

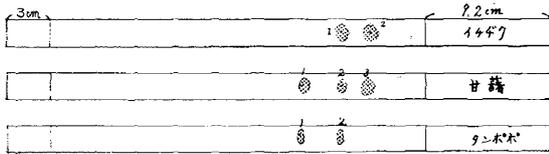
[結果]

実験の結果は第5表及び第3図に示した。分別決定はアミノ酸の extract との対称試験及び Rf 値の比較によった。タンポポより2ヶの spot を検出したが, イチヂク, 甘藷については Rf 値, P.C. による spot の対称試験の不一致によりアミノ酸の種類を明らかに出来なかった。

第5表 paper chromatography (タンポポ)

	スポット 1	スポット 2
標準 Rf 値	0.35	0.49
試料 Rf 値	0.34	0.48
呈色反応	赤紫	赤紫
アミノ酸の種類	threonine	tyrosine

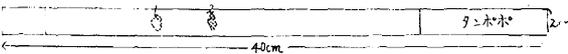
第1図 タンニン



第2図 糖



第3図 アミノ酸



(c) 呈色反応

P. C. によって甘藷・イチヂクのアミノ酸の種類を明らかに出来なかったので、呈色反応を試みた。しかし甘藷・イチヂクに於ては、検液が速かに褐変するため、明確な結果が得られなかった。タンポポの乳液は xanthoproteic reaction に陽性を示した。この反応結果及び P. C. による分別結果から、タンポポの乳液中には tyrosine, threonine が存在するものと考えられる。

§ 3. Reducton (特に ascorbic acid)

甘藷及びイチヂクの ascorbic acid についてはすでに研究されているので省略し、タンポポの乳液の sacorbic acid を indophenol 滴定法で測定した結果 45.3mg% の ascorbic acid を含むことを認めた。

§ 4. 日光及び空気による酸化

1) 日光

新鮮試料の乳液について暗室遮光せるもの、室内放置、紫外線を照射したものの三条件下で褐変の度を比較した。結果を第6表に示した。

2) 空気

新鮮試料の乳液について真空デシケーター中で空気を遮断したもの及び室内放置の二条件下で褐変度を比較した。結果を第6表に示した。

第6表 各種の条件下に於ける褐変状態

試料	暗室(遮光)	室内放置	紫外線照射	真空デシケーター(無酸素状態)	室内放置
イチヂク	-	+	+	-	+
甘藷	-	+	+	-	+
タンポポ	-	+	+	-	+

(+は褐変, -は変化なし)

(註) 岩田久敏: 食品化学 (1960年P. 373, 415) によれば ascorbic acid 量は各々イチヂク 5 mg %, 甘藷 38mg% である。

第6表に示す結果によって日光及び空気による酸化が褐変を促進する因子となっていることが認められる。

§ 5. 酵素

褐変に関係すると考えられている酸化酵素について次の実験を行った。

[酵素液の調製]

イチヂク, 甘藷は水抽出液, タンポポは乳液を 40°C で 2 時間恒温器中で抽出した液を各々酵素液とした。

1) peroxidase

[呈色反応]

(a) pyrogallol 0.5g を 20°C, 200cc の水に溶解し 0.5% の過酸化水素水 1cc を酵素液に加えると液は黄色を呈し沈澱を生ずる。

(b) guaiac reaction (H₂O₂ の試験)

3cc のグアヤック丁幾 (0.3g を 10cc の ethanol に溶解したもの) に 3% の過酸化水素 2cc を加え、之に酵素液を加えると両者の接触面に藍色を現出する。

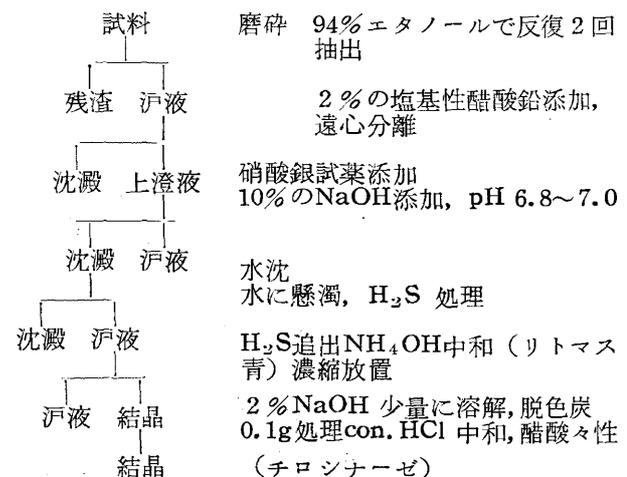
[実験結果]

上記の呈色反応を行った結果両反応に各々陽性を示したので、3 試料中に peroxidase が存在するものと考えられる。

2) tyrosinase

(a) 呈色反応: 酵素液を取り、ナトリウム液で中性とし、少量の tyrosine を加えると酵素の存在する時は 24 時間で橙黄色~暗褐色~黒色に着色する。

(b) tyrosinase の純分分離



[実験結果]

三試料は全て上記呈色反応に陰性を示し、純粋物分離も出来なかった。故に tyrosinase の存在を認め得なかった。

3) catalase の試験法 (KMnO₄ 法)

5~10cc の酵素液を 150~200cc の容器に入れ、20cc

の1%過酸化水素液を混合する(この際注加する過酸化水素は常に過量であることを要する)。2時間室温に放置後10ccの10%硫酸液にて酸性となし、後30~40ccの蒸溜水で稀釈し、 $\frac{N}{10}$ -KMnO₄溶液で微紅色を呈する迄滴定する。

〔実験結果〕

上記実験の結果、イチヂク・甘藷に catalase の存在を認めたが、タンポポ乳液には認められなかった。

Ⅲ. 考 察

褐変に関係すると考えられている polyphenol 物質⁽¹¹⁾である tannin について検索した結果、第1表、第2表に示す如く三試料中より2種又は三種の tannin を検出した。次に Maillard reaction の因子となる糖及びアミノ酸の存在について種々の実験を行った結果第3、4、5表に示すように糖及びアミノ酸は三試料中にいずれも存在することが認められた。Maillard 反応はアミノ基と還元糖のカルボニル基とが縮合し、褐色の色素 melanoidine を生ずる反応でこの際褐変の速度、程度はアミノ酸と糖の種類、pH、温度等に影響され温度は高いほど早く、pH は 6.5~8.5 で、糖は pentose が最も速かに着色することが知られている。これらの点と実験の結果^(註)を考察した結果甘藷・イチヂクは d-glucose, d-fructose を検出したが pentose は認められず、又アミノ酸も存在は認めたが種類の確認は出来なかったこと等より明確な結論は出し難いが、Maillard 反応は乳液褐変に関係はあるが主因子とは考え難い。タンポポは pentose の反応に陽性を示し l-rhamnose を予想したこと及び tyrosine を認めたことより Maillard reaction による褐変の可能性が前者より大ではないかと考えられる。次に食品の非酵素的褐変現象には Reducton 類が重要な役割を示しているが Reducton の代表である ascorbic acid を褐変因子として考え、乳液の ascorbic acid を測定した結果タンポポは45.3mg%であった。これはイチヂクの5mg%、甘藷の38%mgに比して多量であり前二者よりもタンポポの場合 ascorbic acid が褐変に関与する可能性が大ではないかと考えられる。日光及び空気による酸化については第6表に示す如く、遮光、真空状態では殆んど変化しないのに対して紫外線照射、室温放置は速かに褐変したことにより、日光、空気による酸化が褐変促進因子として認められる。酵素については三試料全て peroxidase の存在を認めたことより、

(註)：乳液の褐変は温度に影響され高温に於ては低温より速に変化した。又乳液のpHは4.8であった。

tannin の酸化を促進する因子として褐変に関与していると考えられる。以上の諸実験の結果を総合的に考察すると乳液の褐変因子として tannin, Maillard 反応, Reducton, 日光及び空気による酸化、酵素等種々の因子が総合的に作用しているものと考えられる。更に褐変の主因子として甘藷、イチヂクは tannin, peroxidase: タポポの乳液は tannin, peroxidase, ascorbic acid が考えられる。従って甘藷・イチヂクの褐変は、主として tannin 類が peroxidase の作用により空気中の酸素で酸化されて起り、タンポポの乳液は tannin peroxidase 以外に ascorbic acid も褐変の主要因子として作用しているものと考えられる。

Ⅳ. 総 括

甘藷・イチヂク・タンポポの乳液の褐変因子を究明するため一般に褐変因子と認められている tannin, Maillard reaction, Reducton, 日光及び空気による酸化、酵素等について各々種々の実験を行った。即ち tannin については抽出液の沈澱、呈色反応を行い tannin の存在を認め、次に P.C. 一次元展開によって tannin の種類を分別し、最後に結晶 tannin の分離を行った。Maillard reaction については糖及びアミノ酸を呈色反応、P.C. によって各々糖及びアミノ酸の種類を推定し、更に pH、温度等の影響を考察した。乳液中の ascorbic acid を indophenol 法により測定し存在を認めた。日光及び空気による酸化については、遮光及び真空状態と室温放置、紫外線照射を行った場合等の諸条件下で乳液の褐変状態を比較検討した。最後に酵素について、呈色反応、 $\frac{N}{10}$ -KMnO₄ 滴定、純粋物分離等の実験を行い酵素の存在を究明した。以上の結果：

(1) tannin

- ・イチヂク……gallic acid, l-epi-catechin gallate を無色針状結晶として分離した。
- ・甘 藷…… gallic acid, l-epi-catechin, l-epi-catechin gallate.
- ・タンポポ……gallic acid, l-epi-catechin を無色針状結晶として分離した。

(2) Maillard reaction

Maillard reaction の因子となる糖及びアミノ酸の存在を三試料中に認めた。

〔糖の種類〕

- ・イチヂク……d-glucose,
- ・甘 藷……d-glucose, d-sucrose, d-fructose.

〔アミノ酸〕

- ・タンポポ……tyrosine, threonine.

(3) Reducton (特に ascorbic acid) タンポポ乳液の ascorbic acid は45.3mg%であった。

(4) 日光及び空気による酸化

乳液の褐変は日光及び空気による酸化に影響される。

(5) 酵素

イチヂク・甘藷より peroxidase, catalase を；タンポポの乳液より peroxidase を検出した。

(6) 以上の結果を総合的に考えると、乳液の褐変は、tannin (gallic acid, catechin 類) が peroxidase や ascorbic acid 等の酸化酵素及び日光、空気等の協働作用によって酸化され、褐色の酸化物を生ずるのであろうと考えられる。

〔参考文献〕

- (1) E. M. Mrak, G. F. Stewart : *Advances in Food Research*, **1**, 355 (1948).
- (2) 市川 : *植誌*, **46**, 803 (1932).
- (3) 小瀬 : *各務研究報告*, **46**, 1 (1938).
- (4) 井上 : *工化*, **40**, 52 (1937).
- (5) G. Klein : *Handbuch der Pflanzen Analyse*, **II**, 344 (1932).
- (6) 大島, 中林, 石橋 : *日農化*, **28**, 264 (1954).
- (7) 大島, 中林, 西田 : *日農化*, **26**, 377 (1952).
- (8) 大島, 中林 : *日農化*, **26**, 378 (1952).
- (9) 石井, 大島 : *日農化*, **16**, 476 (1939).
- (10) 小幡, 坂村 : *日農化*, **27**, 766~769 (1953).
- (11) 中林 : *日農化*, **27**, 813 (1953).