

# リンゴの褐変化とビタミンCとの関係

杉田 倭子\*

## 緒 言

リンゴ(学名 *Malus, Pumila Mill var* イバラ科)はアジア北西部に原産のものが自生し、我が国では明治以降北米より多くの品種が輸入され栽培が始められた。リンゴの主成分は含水炭素特に糖分でその含量は通常10%内外である。ペクチンは1%内外で有機酸は0.5%内外である。タンニン酸或は類似物は未熟果には多いが熟したものでは0.02~0.12%である。ビタミンCは文献によると藤田氏は約3mg%、高橋氏は4mg%、中山氏は3~8mg%、神前氏は3~5mg%であると報じている。著者はIndophenol法で定量した結果4~6mg%であった。リンゴは生食(剥皮しそのままジュース)する他缶詰、ジャム、酒、砂糖漬等加工して長期間保存する場合も多い。しかしリンゴ果実を剥皮したものや、その压榨汁を空気中に放置しておくると速やかに褐変しこれに伴い風味も害され、成分中のビタミンCもほとんど破壊されてしまうので、リンゴを加工処理する場合に於ける最大の問題点がここにある。この現象は一般食品に関しても従来多数の報告があり、その原因としては酸化によらぬ変色と酸化による変色とに大別されている。前者には加熱、焙焦によるMaillard Reactionがあり、後者には酵素作用即ちアスコルビン酸酸化酵素、ポリフェノール酸化酵素、過酸化酵素による酸化と、非酵素作用即ち空気、温度、光線(紫外線)等による自然酸化と銅、鉄等重金属イオンによる触媒的酸化とがある。

故に剥皮したリンゴの表面或は果汁の褐変現象についても当然これら種々の因子が考えられるがJOSLY、PONTINGの総合的論述によればPolyphenol酸化酵素による果肉中のPolyphenol系物質の酸化が主因であり、空気、温度、光線(紫外線)、銅イオン等は反応を促進するにすぎないと云っている。即ちSH基をもった還元性物質がすべて酸化されると酸化型Cは還元されなくなり、それに伴いキノン型Polyphenol類はPolyphenol類に戻ることが出来ず褐色化してくる。

換言すれば褐変したリンゴ果肉、果汁中にはもはや還元型Cは存在しないことになる。そこで著者は先

ず褐変の基質であるPolyphenol系物質の種類及び含有量を調べ、それらと褐変の強弱との関係を検討してから普通のリンゴ品種を用いて特に近年食品の強化剤、抗酸化剤として盛んに利用されているアスコルビン酸を中心に最も有効と思われる酸化防止法を考じながら褐変とビタミンCとの関係を明らかにするため本実験を開始した。

## 実 験 の 部

### [1] Polyphenol 成分の検討

#### (1) 検 出<Paperchromatography>

##### ① 試 料

市販の国光を用いた。

##### ② 試料の調製

リンゴを剥皮及除芯後、果肉を直ちに氷冷した2倍量のメタノールと共にミキサーで磨砕し、濾過して得た黄色透明の濾液を燃料ガス気流中で減圧下にメタノールを溜去して得たシロップをSampleとした。

##### ③ 操 作

- a) 方法: Paperchromatography 一次元上昇法
- b) 濾紙: Toyo filter paper No 50 (2×40cm)
- c) 溶媒: n-Bu OH・AcOH・H<sub>2</sub>O (4:1:2)
- d) 展開温度及時間: 28°C 恒温器中で18時間
- e) 発色剤: FeCl<sub>3</sub> 及びジアゾベンゼンスルホン酸

##### ④ 結果及考察

発色処理により3個のSpot及びRf 0.5以下に尾をひいたタンニンのSpotを得た。第1表にRf値を示した。

第1表 Polyphenol の Paper chromatography による Spot の Rf 値及び Color

Spot No	Sample R.f 値	Color	Standard Rf 値(1)	Substance
I	0.61	Yellow Brown	0.62	L-epi-Catechin
II	0.67	Parple	0.67	Chlorogenicacid
III	0.79	Yellow Brown		不明

\*昭和38年度卒業生

Spot No. I は文献の Rf 値との比較により L-epi-Catechin と推定, No. II は純粋物の同時展開により Chlorogenic acid であることを認めた。No. III はこれに相当する Polyphenol が見当らなかった。

<Thinlayer Chromatography>

① 試料

市販を国光を用いた。

② 試料の調製

リンゴを剥皮及除芯後, 果肉を直ちに氷冷した2倍量のアセトンと共にミキサーで磨砕し濾過, 残渣を更に2回70%アセトンで処理後濾液を合わせ燃料ガス気流中で, 減圧下にアセトンを溜去して得たシロップを Sample とした。

③ 操作

- a) 方法: Thinlayer Chromatography 一次元上昇法
- b) プレート: TLC プレート
- c) 溶媒: n-BuOH・AcOH・H<sub>2</sub>O (4:1:2)
- d) 展開: 28°C 恒温器中で 10cm
- e) 発色剤: FeCl<sub>3</sub> 及デアゾベンゼン スルホン酸。

④ 結果と考察

発色処理により3個の Spot を得た。第2表に Rf 値を示した。

第2表 Polyphenol の Thinlar Chromatography による Spot の Rf 値と Color

Spot No	Sample Rf 値	Color	Standard	Substance
I	0.39	Yellow Brown		不明
II	0.68	Parple	0.68	Chlorogenic acid
III	0.94	Yellow Brown		不明

Spot No. II は純粋物と同時展開を行ない, Chlorogenic acid<sub>2)</sub> であることを確認した。No. I, No. III については純粋物がなく未確認であるが, No. I はタンニンで No. III は分解物ではないかと思われる。尚リンゴ抽出液に HCl-For 試薬を加えると桃赤色を呈した。純 Catechin 及 Chlorogenic acid のみではかかる呈色を示さないから, これはリンゴ果肉中に Leucoanthocyan のごときもが存在するものと思われる。

<Paper Chromatography>

① 試料

市販の国光を行いた。

② 試料の調製

前述の果肉のアセトン抽出液 5cc に 4N-HCl 5cc とイソアミルアルコール 10cc を加え沸騰湯浴中で20分加熱し赤変したイソアミルアルコールを分離濃縮したものを Sample とした。

③ 操作

- a) 方法: Paper Chromatography 一次元上昇法
- b) 濾紙: Toyo Filter Paper No50 (2×40cm)
- c) 溶媒: AcOH・HCl・H<sub>2</sub>O (5:1:5)  
同 (30:3:10)
- d) 展開温度及時間: 28°C 恒温器中で 15時間。

④ 結果及考察

二種の溶媒を用いて展開した結果いずれの場合も第3表に示すごとく1個の Spot を得た。

第3表 Leucoantocyan の Paperchromatography による Spot の Rf 値と Color

溶媒	Sample の Rf 値	Color	standard Rf 値	Substance
5:1:5	0.35	Pink	0.39 <sup>3)</sup>	Cyanidin
30:3:10	0.49	Pink	0.94 <sup>4)</sup>	Cyanidin

Rf 値の比較より Cyanidin の存在を認めた。

(2) 定量

Chromatography による検出の結果4個の Spot を得たが不明のものもあり, これらの分別定量は困難であるので“ポリフェノール系物質”として総合定量した。

① 試料

市販の紅玉, スターキング, ゴールデンデリシャス, 国光を用いた。

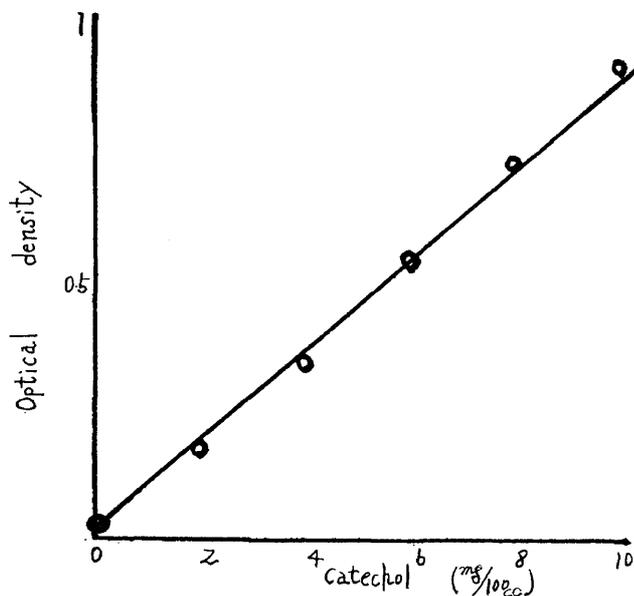
② 試料の調製

リンゴ果肉 250mg に 70% (v/v) 氷冷アルコール 8cc を加え, 乳鉢で磨砕し 15分間遠心分離し濾過し濾液に水を 10cc 加えよく混ぜ合わせたものを Sample とした。

③ 操作

Sample 1cc に Folin Deuis<sup>6)</sup> 試薬 2cc を加え 5分後に 0.4N-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> の溶液 8cc を加え, 1時間後に液槽の厚さ 1cm の Cell に入れ A.K.A 光電比色計の白色光にて蒸溜水を対照として吸光度を測定した。尚カテコール溶液を同様に処理したものにつき検量曲線を求めた。

第5図 カテコールの検量曲線



次に Leucoanthocyan の定量を行った。

① 試料

市販の紅玉, スターキング, ゴールデンデリシャス, 国光を用いた。

② 試料の調製

各品種につき前述同様アセトンで処理して得られた抽出液を Sample とした。

③ 操作

Sample 1.5cc に 4N-HCl 1.5cc, イソアミルアルコール 2cc を加えて沸湯浴中で 20分加熱, 冷後 1.5cc ずつのイソアミルアルコールで 3回抽出, 全抽出液を合わせて 50cc とし 1cm の Cell に入れ光電比色計の Filter #53 にて吸光度を測定した。

④ 結果及考察

測定値は第4表に示した。

第4表 品種別による Polyphenol 及 Leucoanthocyan の含量

品 種	Poly-phenol 吸光度	同平均	mg%	Leucoanthocyan 吸光度
紅 玉	0.045	0.048	57.6	0.085
	0.048			
	0.050			
ス タ ー キ ン グ	0.058	0.059	70.8	0.094
	0.060			
	0.060			

ゴールドデン デリシャス	0.045	0.045	54.0	0.081
	0.045			
	0.046			
国 光	0.067	0.070	84.0	0.110
	0.070			
	0.072			

Polyphenol 系物質の含量は品種によって差があった。この多少によって褐変程度に強弱があるものと推察された。

〔Ⅱ〕 品種による褐変程度の差異

① 試料

市販の祝, 旭, 紅玉, スターキング, ゴールデンデリシャス, 国光を用いた。

② 試料の調製

リンゴの果肉 (600g) を手早くアルマイト製卸し金で磨砕し, 直ちに袋に入れビーカーに搾り込んだものを Sample とした。

③ 方法

Sample を室温 (20~25°C) に放置しておき, 5分, 10分, 20分後にこれを採り, H. J. LOEFFLER の方法に従って呈色度を測定した。即ち Sample 5cc に対しアセトン 5cc を加えよく振盪してから5分間遠心分離を行ない, 上澄液を 1cm の Cell に入れて光電比色計の青色 Filter (中心波長 450m $\mu$ ) にて蒸溜水を対照として透光度を測定した。

④ 結果及考察

測定値は第5表に示した。

第5表 果汁褐変作用の品種による比較

品 種 Variety	PH	Color index (T%)		
		5 mts	10mts	20mts
祝	3.5	57	54	53
旭	3.4	64.5	61.5	61.5
紅 玉	3.3	73	72	68.5
ス タ ー キ ン グ	3.9	65.5	60.2	58
ゴールドデン デリシャス	3.6	87.5	85.5	82
国 光	3.6	4.05	39	39

各品種共褐変作用は極めて迅速で, 磨砕と殆んど同時に刻々変色するのが認められた。搾汁液後最初の5分までに各品種固有の色調にまで着色が進行し, その後の変化は緩慢であった。これらの色調の差から褐変の強弱は酸化酵素の活性度, 酸化を受けるべき Poly-

phenol 系物質の多少によるという推察が明らかになった。以上のような関係が成立つとすれば、アスコルビン酸を抗酸化剤として用いた場合、品種によって当然異なった効果を示すであろうと思われる。

〔Ⅲ〕 アスコルビン酸による褐変防止効果

① 試料

市販の旭，紅玉，国光を用いた。

② 試料の調製

リンゴの果肉重量に対し8%の蒸溜水に所定のアスコルビン酸（果肉重量当り0.~50mg%の範囲とした）を溶かし，その中に全果肉を前実験同様に処理したものを Sample とした。

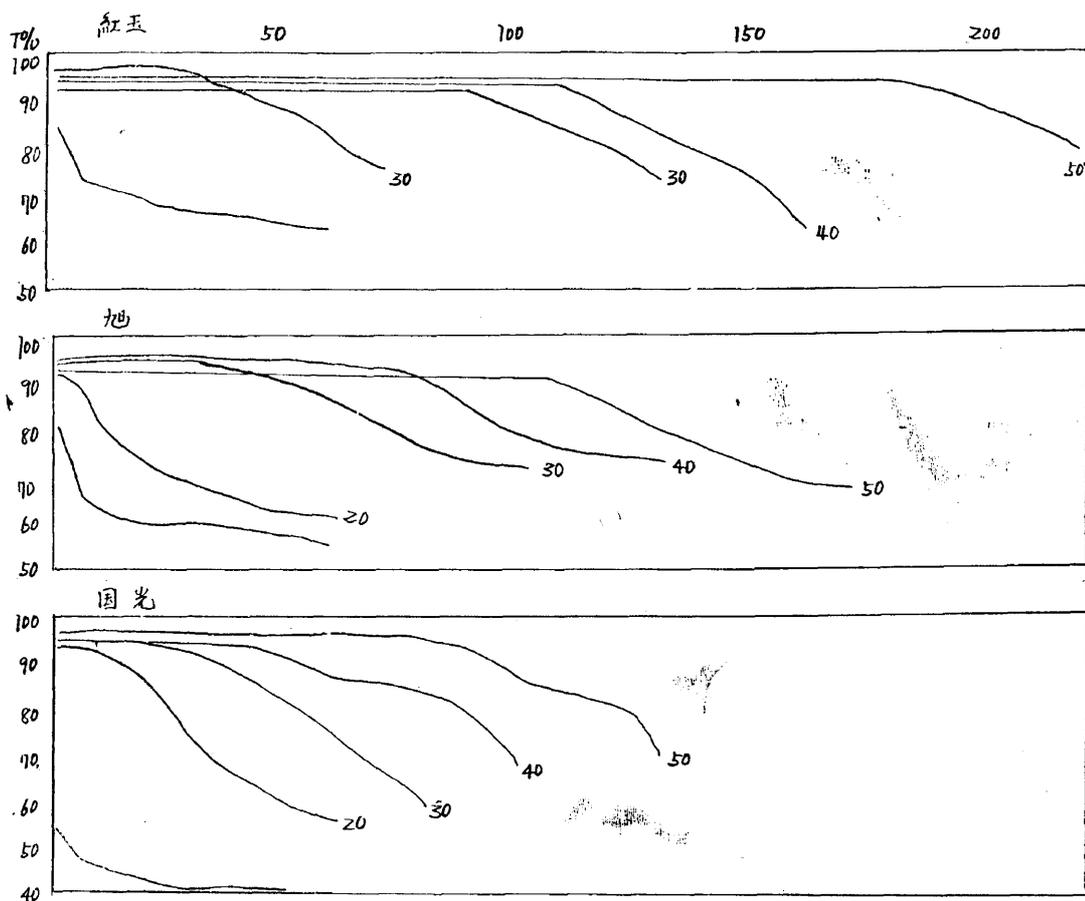
③ 方法

Sample を室温に放置し，一定時間毎に H. J. LOEFFLER の方法に準じて呈色度を測定した。

④ 結果及考察

一定時間における呈色度を第6図に示した。いずれの品種においてもアスコルビン酸添加区の Index はある時間変わることなく維持された。それがある時期に到達すると急に着色が起り，紅玉は最も淡く，旭がこれに次ぎ国光は最も濃かった。次に時間的影響を見ると，30mg% 添加区で全品種において褐変防止効果時間は長くなった。又同量のアスコルビン酸に対しては紅玉，旭，国光の順に有効時間は長かった。ここに於てある種の物質添加により酸化酵素の活性を制御すれば，アスコルビン酸による効果時間を更に延長出来るものと思われた。

第6図 アスコルビン酸添加量



〔Ⅳ〕 各種物質添加によるビタミンC酸化防止効果

① 試料

市販の紅玉を用いた。

② 試料の調製

リンゴ果肉に2倍量の各種物質水溶液を加え，乳鉢ですりつぶしたものを Sample とした。

各種物質

- イ) 食塩：酸化酵素を阻害する為。
- ロ) 有機酸（クエン酸）：pH を低下する為。

ハ) コロイド性物(砂糖) : ビタミンC保護の為。

ニ) SH 化合物(チオ尿素) : 酸化型Cを還元する為。

ホ) その他(セミカルバチド, ヒドロキシルアミン)

③ 方法

Sample を 10 分間遠心分離し, その上澄液につき Indophenol 法<sup>8)</sup>によってビタミンC量を測定した。

④ 結果及考察

ビタミンC測定値を第6表に示した。

第6表 リンゴ果汁のビタミンCに及ぼす各種物質の影響

添加物	濃度 (%)	ビタミンC (mg%)
食塩	2	2.80
	1.5	2.51
	1	2.21
	1.5	0.49
クエン酸	1	0.26
砂糖	15	0.18
	10	1.18
チオ尿素	1	1.81
	0.5	1.74
セミカルバチド	1	3.29
	0.5	1.59
ヒドロキシルアミン	1.5	1.57
	1	1.30
対照メタリン酸	5	5.04

クエン酸及砂糖には殆んど有効性は認められなかった。チオ尿素, セミカルバチド, ヒドロキシルアミンには効果が認められたが, 味及毒性の点で実用に乏しい。これに対し食塩は味を感じない程の低濃度に於て著しいビタミンCの酸化防止が認められ, 品質的にも害がなく食品衛生上に於ても問題がなく最も目的に適している。

〔V〕 アスコルビン酸と食塩の共用による褐変防止効果

① 試料

市販の旭, 紅玉, 国光を用いた。

② 試料の調製

リンゴ果肉重量に対し8%の蒸溜水に所定アスコルビン酸及50mg%の食塩を溶かし, その中に全果肉を前実験同様に処理したものを Sample とした。

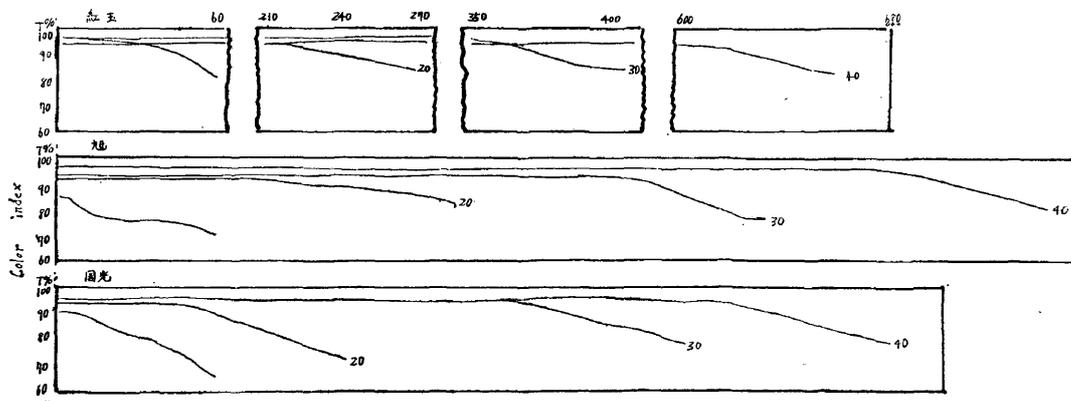
③ 方法

Sample を室温に放置し一定時間毎に H. J. LOEFLER の方法によって呈色度を測定した。

④ 結果及考察

一定時間における呈色度を第7図に示した。アスコルビン酸に食塩を共用した場合は個々に用いた効果の単なる相和ではなく, それよりもはるかに有効であった。即ちアスコルビン酸 30mg% 添加区では旭は 50 分の効果が 220 分まで, 紅玉は 80 分が 350 分まで, 国光は 30 分の効果が 170 分までとそれぞれ 4~5 倍にまで延長した。

第7図 アスコルビン酸及食塩の共用が Color index に及ぼす影響



〔Ⅶ〕 果汁中のアスコルビン酸量の時間的変化と褐変との関係

① 試料

市販の旭，紅玉，国光を用いた。

② 試料の調製

調製方法は前実験と同様に行なった。但し添加量は次の様にした。

紅玉：アスコルビン酸 30mg%

アスコルビン酸 30mg% + 食塩 50mg%

旭，国光：アスコルビン酸 40mg%

アスコルビン酸 40mg% + 食塩 50mg%

③ 方法

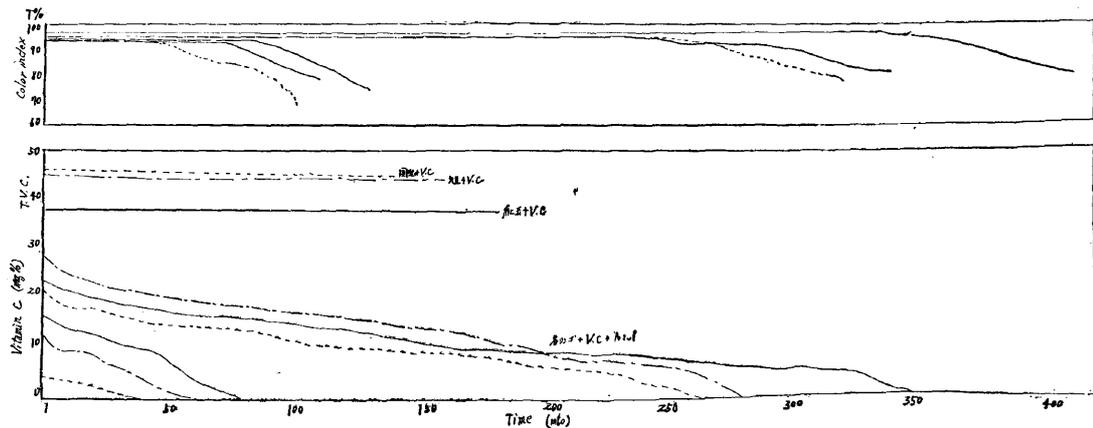
Sample を室温に放置し一定時間毎に H.J. LOEF-FLER の方法による呈色度の測定と同時に Indophenol 法による総ビタミンC 及還元型C量を測定した。

④ 結果及考察

以上の結果を第8図に示した。還元型ビタミンCの推移を見ると、いずれの品種も最初の4分間、即ち搾汁後1分までに急激な減少を示しその後はやや緩慢となった。これは最初の磨砕で最も空気との接触の多いパルプ状態を得た後、粕と液とが分離され空気との接触面が急に減少したためと思われる。その後の状態を見るとアスコルビン酸単用区に比べ食塩共用区ははるかに減少が緩慢であった。この実験で注目すべき点は、いずれの品種においても還元型CがOとなった時をもって着色が始まったことと総ビタミンC量が、添加後終始変わらなかったことであり、この場合ビタミンCの変化は還元型→酸化型であることがわかった。故に還元型Cが酸化型Cに移行してしまうと褐変が起るという関係が明らかになった。

〔附〕 酵素作用によるリンゴの褐変を促進する数種の因子について若干の実験を行なったので参考までに記した。

第8図 Color index の変化と Vitamin C 量との関係



(1) 試料

市販の紅玉を用いた。

(2) 実験

イ) 空気 (O<sub>2</sub>)

① 方法

リンゴ果肉を細切し (a) 室内に放置した場合及 (b) 真空デシケーター中に保存した場合について色調の変化を観察した。

② 結果

第7表 空気による影響

試料 \ 空気	放 置	真 空
リンゴ	+	-

ロ) 温度

恒温状態のもとで比較出来なかつたので実験を省略した。

ハ) 紫外線

① 方法

リンゴ果肉の重量に対し 40mg% のアスコルビン酸を添加し、果汁としたもの、(a)室内の可視光線による場合及 (b) 殺菌灯の紫外線照射による場合の呈色度及び還元型ビタミンC量を測定した。

② 結果

測定値を第9図に示した。

ニ) 銅イオン

① 方法

リンゴ果肉の重量に対し 40mg% のアスコルビン

酸を添加し、果汁にした場合と、これらに1/50000量の銅イオンを添加した場合の呈色度及還元型ビタミンC量を測定した。

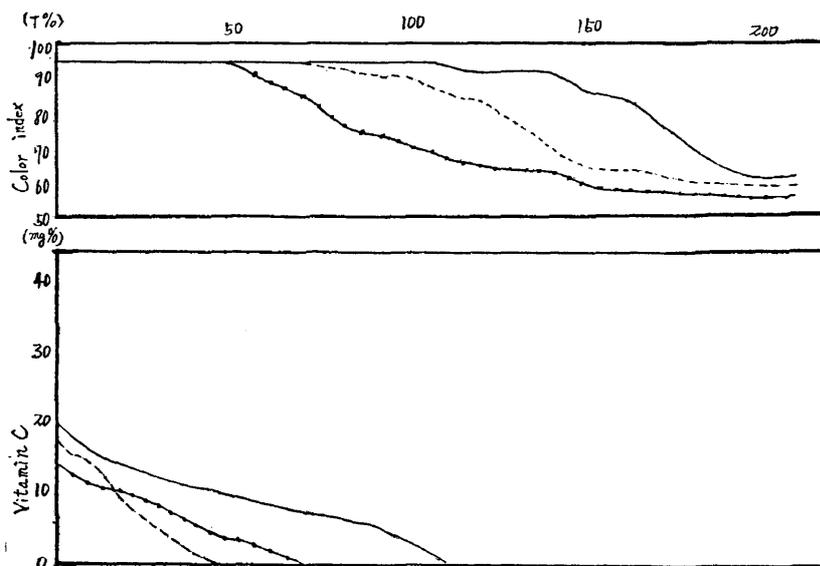
## ② 結果

測定値を第9図に示した。

## ③ 考察

いずれの実験においても褐変速度は短縮した。故に空気(O<sub>2</sub>)、温度、紫外線、銅イオン等は褐変現象の主因である酸化酵素の作用を促進するものであるということが明らかになった。

第9図 紫外線及銅イオンによる Color index と Vitamin C量



## 総 括

### A リンゴ果肉の褐変基質である Polyphenol を検出及定量した結果

(1) Polyphenol 成分として Chlorogenic acid, Lepi-Cate Chin 及 Leucoanthocyanidin の存在を認めた。

(2) Polyphenol の含量は品種によって異なり国光に特に多かった。

(3) Polyphenol の多い品種ほど強く褐変することを認めた。

### B 我国の主要品種を用いて、特にアスコルビン酸による褐変防止を試みた結果

(4) 果肉重量当り 30mg% 以上のアスコルビン酸を加えると、どの品種にも褐変防止効果が見られ、添加量の多い程効果時間が長くなることを認めた。

(5) ビタミンC酸化防止には食塩が最も实际的に有効であった。

(6) 味に影響しない程度、即ち50mg%の食塩をアスコルビン酸と共用するとアスコルビン酸単独の場合よりもはるかに効果が著しく、褐変防止時間を数倍に延長することが出来た。

(7) アスコルビン酸添加後の量的、質的变化を見ると最初の磨碎、搾汁操作による減少が最も著しく、その後緩慢となるが時間と共に引続き減少し遂に0となるまで褐変防止効果があった。食塩をアスコルビン酸と共用した場合はアスコルビン酸単独の場合に比し減少がはるかに緩慢となった。この際のビタミンCは還元型→酸化型であることを認めた。

本実験に際し、終始御指導激励を賜った平友恒教授はじめ、高橋、井口両先生に心から感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1), 2) 中村敏郎: 日本農芸化学会誌 **27**, 817 (1953)
- 3) 佐竹一夫: ペーパー クロマトグラフィー **138**
- 4) : *Journal of Chorma to graphy* **1**, 481 (1958)
- 5) Weurmann, Swain: *J. sri, Foodagr* **6**, 186 (1955)
- 6) : *A. O. A. C.* 111 (1960)
- 7) LOEOFLEH, H. J.: *Processing of oorange juice. ind Eug chem.* **33**, 1308