

夏蜜柑果汁製造に関する基礎的研究 (第20報) 果汁の褐変機構について

(其の8) 褐変果汁中の Hydroxymethylfurfural

野村 男 次 (山口大学農学部)

果汁を常温で貯蔵すると容易に褐変を起し、芳香を悪変すると共に、その栄養価を減ずる。この変化の中間生成物として hydroxymethylfurfural の生成がみられる。而してこの HMF (hydroxymethylfurfural を以後 HMF と略記する) が褐変現象に重要な関係を示していることについては既にたびたびのべた¹⁾。

一般に果汁の貯蔵の如き非常に温和な状態においてこの種 HMF が出来る機構としては廣くアミノカルボニール反応が考えられている²⁾。

本報ではアミノカルボニール反応の中間生成物である N-配糖體及びそのアマドリ轉位生成物のモデルとして *p*-toluidine-N-glucoside 及び N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine を合成、これを用いて HMF の生成の機構を追究したのでこの機構を紹介すると共に、褐変夏蜜柑果汁中の HMF の量と褐変度との関係について報告する。

1. 窒素配糖體

ブドウ糖や果糖等、還元糖よりの HMF の生成はアミノ酸の存在によつて著るしく促進される³⁾。夏蜜柑果汁の褐変を起したものの中には HMF の存在がみられる。今數字的にその生成量を測定した結果を参考に示すと table 1 に見る如くである。測定には BECKMAN spectrophotometer を用いた。果汁をエーテルで抽出、このエーテル抽出部を水蒸氣蒸溜して溜出物を集め BECKMAN Spectrophotometer でその紫外線吸収スペクトルを求めると共に、 $\lambda_{\max}$ 285m μ の optical density からその濃度を算出した。

Table 1. Hydroxymethylfurfural contents of stored Natsudaidai juice at 55°C

Time of storage (days)	Optical density at 285m μ	Contents of HMF (mg%)
0	0	0
1	350	2.04*
3	615	4.79
5	988	7.53
7	1280	9.16
8	1410	11.50

* Furfural. $\lambda_{\max}$ 277m μ

この場合、この HMF の生成の機構としてはアミノカルボニール反応を考えている。即ち果汁中の糖はブドウ糖、果糖、及び蔗糖であること⁴⁾、蔗糖は存在する枸橼酸によつて容易に加水分解されること⁴⁾、20種に及ぶアミノ酸が果汁中には存在すること^{5) 6)}、等によつてみても兩者間の此の種反應は必ずみられるものと思う。この反應では先づ還元糖はアミノ酸と反應して(以下ブドウ糖を用いて實驗を行つたのでブドウ糖について説明する) N-substituted-glucosylamineを作る。この関係は濾紙クロマトグラフを用いると容易に認めることが出来る⁷⁾。著

者は前報においてこの種 N-配糖體の代表に aniline-N-glucoside を選び、これを 2 N 醋酸液中で加熱分解させ、HMF の生成量を求めると共に、褐変の度合いを吟味した⁸⁾。これによつて HMF の生成が N-配糖體を仲介にして容易に行われることがわかつた。

2. アマドリ轉位と HMF 生成との関係

アマドリ轉位生成物(アマドリ轉位とはアルデヒド基の糖の N-配糖體が對應する ケトースのアミノ誘導體に轉位するのを言うのであつて、この轉位生成物をアマドリ轉位生成物と呼ぶ)は元のアミノ糖縮合物即ち N-配糖體より加水分解され難いが、HMF を生じ易い性質をもっている。

この関係を明確にするために、證明原料に aniline-N-glucoside を用いて實驗を試みたが、明確な數値を得る上に必ずしも満足なものではなかつた⁹⁾。特に aniline-N-glucoside のアマドリ轉位生成物は分離し難い上に、精製が困難であつたので、京都大学農学部井上研究室の教示により、*p*-toluidine-N-glucoside とそのアマドリ轉位生成物である N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine を使用、これを合成、實驗を行つた。

合成法には井上氏¹⁰⁾等の方法を採用した。即ちブドウ糖と *p*-toluidine とをアルコールを溶媒として反應させ融點 116°C の結晶を得た。

これは *p*-toluidine-N-glucoside の融點に一致、これを *p*-toluidine-N-glucoside として使用した。一方ブドウ糖

と *p*-toluidine とを無溶媒で加熱反應させると融點152°Cの結晶が得られる。N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine の融點に一致すると共にメチレンブラウ、KMnO₄ を脱色及びフェリング液の脱色をさせる力をもつて居り、*p*-toluidine-N-glucoside のアマドリ轉位生成物と考えられる。

この兩者の紫外線吸収スペクトルを求めた結果は fig. 1 に見る通りであつた。兩者は全く同様な吸収をみせているが、アマドリ轉位生成物 (N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine) の方が N-配糖體 (*p*-toluidine-N-glucoside) に比較して239m μ 、及び291m μ に見られる最大吸収が240m μ 及び292m μ と1m μ だけ長波長側へ移動しているのがみられた。

次いでこの *p*-toluidine-N-glucoside 及び N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine 269mgを100ccの2N醋酸に溶解して100°Cの湯浴上で加熱分解、各時期に於ける分解物の紫外線吸収スペクトル (1/50に稀めて) を求めた。その結果は Fig. 2の(1) (2)に見る如くで、共に285m μ に最大吸収をみせる新しい物質が生成されることが認められた。然してFig. 1と比較してみると、醋酸水溶液中では *p*-toluidine-N-glucoside と N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine は可成り異なる吸収スペクトルを示すことがわかる。*p*-toluidine-N-glucoside はその水溶液中での吸収と非常に異り、水溶液に於いて現れた240m μ 附近の吸収はみられず、新しく262m μ に吸収がみられた。

Fig. 1. Ultraviolet absorption spectra of *p*-toluidine-N-glucoside and its Amadori rearrangement product (aq. sol.)

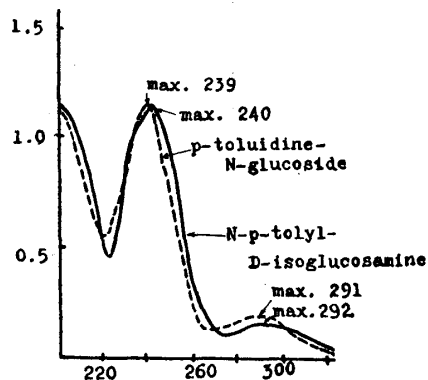
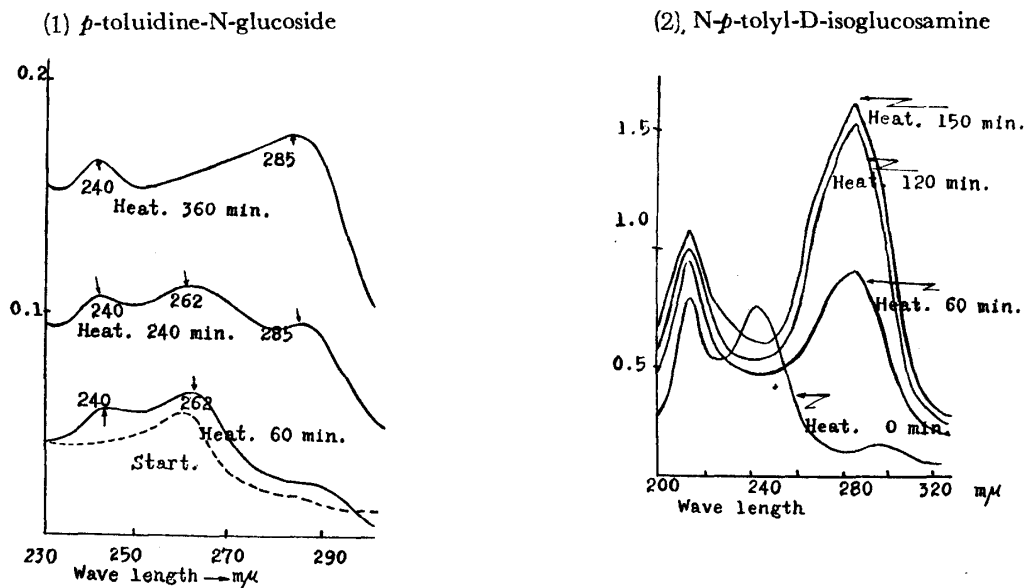


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectra of hydrolyzed products of *p*-toluidine-N-glucoside and N-*p*-tolyl-D-isoglucosamine in 2N. acetic acid solution.



285m μ に現れる最大吸収は HMF の生成によるものと考えられ、著者は濾紙クロマトグラフ (ブタノール-醋酸-水系で Rf: 0.83) 及びポーログラフ ($\pi/2$: -1.36V. v.s. N. C. E, 0.1N NH₄Cl 液中) を用いてそれを確認した。特に反應の終了後、反應液を水蒸気蒸溜に付して溜出液をポーログラフにかけると典型的な HMF のポーログラムが得られる。

この紫外線吸収スペクトルの λ_{max} . 285 の optical density より $C=E/16.500$ を用いて HMF の濃度を算出、着色と HMF 生成量との關係を求めた。Table 2 がその結果である。

この結果よりアマドリ轉位生成物の方が N-配糖體より遙かに HMF を生じ易く、又褐變を起し易いことがわかる。此の關係より所謂、還元糖とアミノ化合物との褐變化即ち "MAILLARD" 反應では N-配糖體を中心に、そのアマドリ轉位生成物を經由しての HMF 形成が、その褐變化に重要な役割を演じていることがわかつて來た。

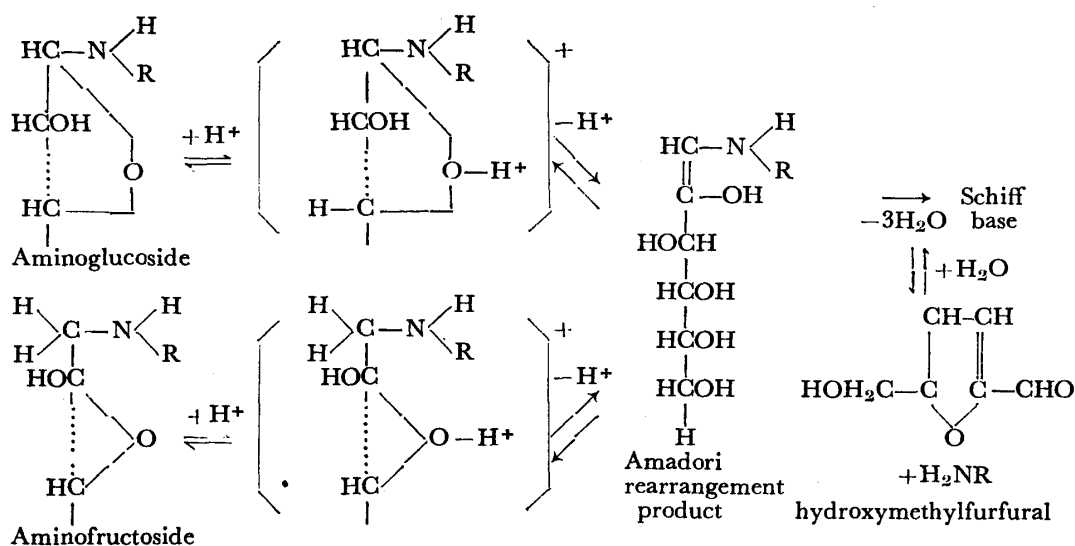
(496)

(野村) 夏蜜柑果汁製造に関する基礎的研究 (第20報)

Table 2. Production of color and HMF from toluidine-N-glucoside and its Amadori rearrangement product in 2N acetic acid solution.

Heating at 100°C (min.)	Toluidine-N-glucoside		N- <i>p</i> -tolyl-D-isoglucosamine	
	Transmission T% at 500m μ	HMF (mg%)	Transmission T% at 500m μ	HMF (mg%)
0	100	0	100	0
15	—	—	85	—
30	98	—	11	16.35
45	—	—	1	—
60	97	—	0	33.35
75	—	—	—	—
90	96	—	—	42.21
120	95	—	—	57.33
135	94	—	—	56.07
240	93	8.07	—	56.03
360	86	14.79	—	57.88

この機構は既に濾紙クロマトグラフ法による結果より PARTRIDGE, GOTTSCHALK¹⁰⁾ 両氏等が推定提案している。氏等の提案によると其の機構は次の如くであると言う。



3. Hydroxymethylfurfural のポーラログラム

以上のような機構によつて生成される HMF は典型的なポーラログラムを示し、著者はこれの測定に BECKMAN Spectrophotometer と共にポーラログラフを使用している。よつて次にこれらポーラログラム測定の基準になる諸元をあげる。波型はアルカリ側に於いて求めるとよく、電解液には緩衝液として McIlvain buffer を、非緩衝液として 0.1N. NH_4Cl を使用している。波型は特に pH. 7~8 において美しく、この範囲では濃度は波高に正確に比例し、この範囲では波高を求めて濃度を算定することが出来、定量が可能である。LiCl, TeCl の添加が波型を整るに効果があると言う報告もみられるが¹¹⁾、別にこれらを添加しなくとも充分測定は可能である。Table 3 に pH と $\pi^{1/2}$ との関係を示すと共に、Fig. 3 に pH. 8 において求めた濃度と波高との関係をあげた。

なおアルカリ側 (pH 7.2, 8.0, 9.0, 12.0,) において得られる HMF のポーラログラムの若干を Fig. 4 に例示して置いた、

Table 3. Half-wave potentials of HMF

pH	$\pi^{1/2}$ v. s. N. C. E.	Buffer
2.1	-1.05V	BRITON ROBINSON
3.0	-1.06	"
3.8	-1.15	"
4.9	-1.20	"
5.7	-1.28	"
7.2	-1.36	MCILVAIN
8.0	-1.38	"
9.0	-1.41	"
10.0	-1.44	"
11.2	-1.47	"
12.1	-1.50	"
13.0	-1.51	"
0.1N. NH_4Cl	-1.36	Non-buffer.

Fig. 3. Relationship between the wave height and the concentration of HMF, at pH. 8.00.

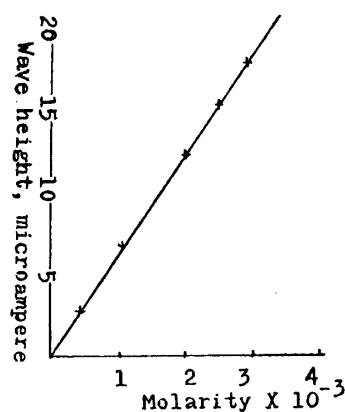
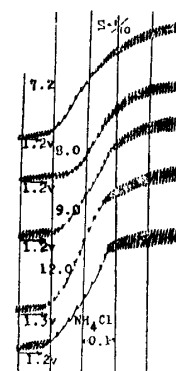


Fig. 4. Polarograms of HMF at several pH values. (Alkali side)



4. 夏蜜柑褐変果汁中の HMF

以上のべたような機構によつて果汁中に HMF が出来ると想像しているが、この HMF の生成量は

- (1) 貯蔵時間の増加に伴つて HMF の生成量は増加する。(Table 1 参照)
- (2) 不良果汁程 HMF の生成量(含有量)が大きい。
- (3) 濃縮果汁は一般に含有量が多く、又生成が容易である。
- (4) 殺菌果汁は生果汁よりも HMF 生成が容易である。(Table 4 参照)
- (5) 加熱果汁の HMF は加熱時間が長くなる程、生成量が大きくなる。(Table 5 参照)

これらの関係は果汁の品質検査にも充分應用出来る。一般に HMF の含有量が多いもの程果汁としての品質は不良である。測定にはポーラログラフ法や紫外線吸収スペクトル法を用いるとよい。測定は一定量の果汁を秤取すると共に、エーテル、或は石油エーテルで10時間連続抽出する。抽出を終ると抽出物を水蒸気蒸溜して一定量の蒸溜液(500~1000cc)を得て、ポーラログラフや BECKMAN Spectrophotometer にかける。エーテル抽出物をその儘、これらの測定の原料にすると他の成分が共存するため測定結果が不正確になる。又果汁をその儘水蒸気蒸溜すると、水蒸気蒸溜中に HMF の生成反応が起り、結果が過大になる欠点をもつ。

Table 4. Production of HMF in pasteurized Natsudaidai juice. Storage temp., 55°C

Stored time (days)	Produced HMF fresh juice (mg%)	Produced HMF pasteurized juice* (mg%)
0	0	0
3	4.79	6.21
6	7.53	11.13
8	11.50	13.51

* Condition of pasteurization: 85°C for 5 min.

Table 5. Production of HMF in Natsudaidai juice by heating at 100°C

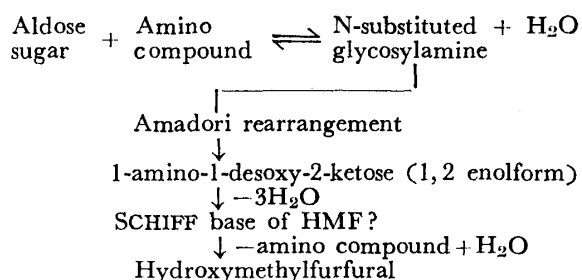
Heating time (minutes)	Produced HMF (mg%)	Produced HMF after storage* (mg%)
5	0.62	0.99
10	0.69	1.03
15	1.07	1.61
20	1.75	2.40

* The juice was stored for 25 days at 25°C after heating.

おわりに: 著者は既に夏蜜柑果汁を原料に果汁の褐変機構を研究して数報を世に送つている。その褐変機構の中心に HMF があることを発見すると共に、その生成の機構は次のようなアミノカルボニル反応にあることを指摘している。

(498)

(野村) 夏蜜柑果汁製造に関する基礎的研究 (第20報)



よつてこの結果の應用として著者は果汁の HMF 含量を定量し、果汁の變質度を求め、これを用いて果汁の良否の判定を行つてゐるが、良好な結果を得ている。なお本研究の研究費の一部は文部省科學研究助成補助金(昭和29年, 30年度)によつたこと、及び本報は農藝化學會西日本支部會で口演済であることをも附記して置く。

(夏蜜柑の化學的研究 第25報)

第16報(本誌, 33, 212 (1955)) 第18報(本誌, 33, 247 (1955)) の誤植訂正

第16報, 頁	誤	正
214	Table 1 中最下列	
	Glucose (1.8)	
	Ammonia (0.05)	
	Acetaldehyde (3.0)	1.00 100
第18報, 249	Table 3 中7列目	
	Furfural (1%)	Furfural (1%)
	Ammonia (0.01%)	Ammonia (0.01%)
	Formaldehyde (3%)	Acetaldehyde (3%)

文 献

- 1) 野村: 本誌, 32, 442 (1954), 33, 212, 247 (1955), 農化, 28, 923 (1954).
- 2) HODEG, J. E.,: *J. Agr. and Food Chem.*, 1, 928 (1953).
- 3) 野村: 本誌, 32, 442 (1954).
- 4) 野村, 松原: 本誌, 30, 417 (1952).
- 5) 野村, 宗近: 本誌, 30, 449 (1952).
- 6) 鹽入, 片山: 農産加工技術, 1, 134 (1954).
- 7) 野村: 本誌, 31, 429 (1953).
- 8) 野村: 本誌, 33, 279 (1955), 夏蜜柑の化學的研究 (1955).
- 9) 井上, 小野寺, 唐澤: 農化, 25, 75 (1951).
- 10) GOTTSCALK, A., and PARTRIDGE, S. J.,: *Nature*, 165, 684 (1950).
- 11) CANTOR, S. M., and PENISTON, Q. P.,: *J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2113 (1940).

(昭和 30, 8, 12 受理)

Nonesterifying agent による有機酸のクロマトグラフィー SCOTT R.W.: *Anal. Chem.* 27, 367 (1955)

一般にシリカゲルを用いる有機酸のクロマトには、*eluent* としてアルコール類を用いるが、このアルコールは長い *column* の通過中とか、試料の調製中にエステル化せられる欠点がある。この欠点をなくする爲、著者等は *eluent* としてケトン(主として *methyl isobutyl ketone*) と炭化水素のハロゲル化物(主として *methylene chloride*) との混合物を用いている。

反應は3~4時間にて終了し、少く共 0.1m. eq の酸を測定し得る。クエン酸とイソクエン酸の分離はアルコ

ールを用いた場合と同様、分離出来なかつた。フマル酸は *tailing* し、又蔞酸とグリコール酸の分離も不完全であるが、多量のシリカゲルを用うれば分離を完全にし得るであろう。乳酸とコハク酸の分離は、ケトンと炭化水素の組成を變化する事により解決し得る。

この各區分の有機酸を確認するために、圓形濾紙クロマトを行つてゐる。この方法によれば展開は2~4時間にて終了し、0.5~1r の酸を検出し得る。又展開した濾紙を170~180°Cにて乾燥すれば(蟻酸を除く爲)從來數時間を必要としたのが20分にて完全であると云つてゐる。(上田)