

## 亜硫酸塩によるリンゴの褐変防止

大村, 浩久  
九州大学農学部食糧化学教室

副枝, 紘一郎  
明治乳業株式会社

山藤, 一雄  
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/22959>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 22 (2), pp.109-120, 1966-04. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

## 亜硫酸塩によるリンゴの褐変防止

大村浩久・副枝紘一郎\*・山藤一雄

## Prevention of browning of apple with sulfite

H. Omura, K. Soeda and K. Yamafuji

剥皮したリンゴの果実を空气中に放置すると果肉は間もなく褐色を呈するようになることはよく知られているが、これはリンゴの phenol 性物質が共存する酸化酵素の作用によつて酸化重合し褐色色素を生ずるためであると考えられている。リンゴの phenol 性物質としては古く Sando<sup>1)</sup>によつて quercetin, hyperin および idein が分離され、その後 Bradfield 等<sup>2)</sup>により L-epi-catechin, Hulme<sup>3)</sup>により chlorogenic acid が存在すると報告された。さらに中林<sup>4,5)</sup>もリンゴ果肉の polyphenol 類の主成分は chlorogenic acid および L-epi-catechin であることを確かめるとともにその酸化酵素について詳細に検討し、この両物質とくに chlorogenic acid が酵素の基質としてよく酸化され、それとともに反応系は顕著に褐変することを確かめた。また terminal oxidase との関係や若干の阻害剤や無機塩類の影響も試験し、リンゴ果肉の褐変はその呼吸とは無関係に polyphenol oxidase によつて chlorogenic acid や catechin 類が酸化されるためにおこるものであり、一般に云われている食塩による褐変防止はこれが polyphenol oxidase を阻害するためであると結論した。

このような褐変はその他種々の食品についても認められている。たとえば馬鈴薯の褐変は tyrosinase の作用に基づくものといわれており、楠木等<sup>6)</sup>もエビの tyrosinase の分布と黒変との関係を追及した。また藤井等<sup>7)</sup>も同様にエビの黒変現象は tyrosinase によつて tyrosine が酸化されるためであるとし、これに関連してリンゴも類似した機構によつて褐変するものと推定した。

リンゴの褐変が藤井等の主張する tyrosinase も関与するものか中林が証明したように polyphenol oxidase の作用によつて chlorogenic acid や catechin の酸化にのみとづくものであるかは別とし、

いずれにしても phenol 性物質が酵素的に酸化されて色素を形成するという共通の機構にもとづくものである。従つてその防止策としては一般に酵素の作用を抑制する手段が採られる。そのため酵素を直接失活させるか、または何等かの阻害剤を加え、あるいは酸素との接触を遮断して反応の進行を妨げればよいわけであつて、中林によつて報告された食塩の酵素阻害効果やリンゴは剥皮しなければ褐変しないことはこれを示している。

最近藤井等<sup>8)</sup>は亜硫酸ソーダとオルソ磷酸とを混合して調製した試薬 (SP) を用いてフグ毒 tetrodotoxin の解毒に成功した。これは tetrodotoxin 分子内の OH 基が SP により還元されまたラクトン環にスルホン基が付加して構造が変化するためにその毒性が失われると推定した。さらに上述のエビの褐変も亜硫酸ソーダによつて防止されることが認められていたが藤井等<sup>9)</sup>はその機構を探究し亜硫酸は tyrosinase 活性を直接阻害するのではなくてフグ毒の場合と同様に tyrosine の phenol 性 OH を還元する結果 tyrosinase の基質として利用されえなくなるためであると主張した。その上この原理にもとづいてリンゴおよび馬鈴薯の褐変も SP によつて防止出来ることを示した。

このように果実中に含まれている phenol 性物質を化学的に変化させて酵素の作用する余地をなくし色素の生成を防止しようとする試みは従来の研究方向とは異なつた褐変防止策として原理的にも興味深く有効な手段である。さらに食品中には種々の phenol 性物質が含まれていて色や味など食品の品質に密接な関係をもつているので藤井等によつて開発された SP 剤はこれらの食品にも適用されて種々の効果を発揮するものと期待される。そこで先ず代表的なものとしてリンゴの褐変について試験した。

\* 勤務先：明治乳業株式会社

## 実験および結果

### SP 剤

藤井等<sup>2)</sup>の処方に従つて調製した。即ち亜硫酸ソーダを水にとかしこれにオルソ磷酸を加えてその pH を 5.5 に調節したものであつてその濃度は亜硫酸ソーダの濃度で示した。安定性にかんがみ通常使用前に調製することが望ましく  $10^{-1}$  ないし  $10^{-2}M$  溶液を作り必要に応じて適当に希釈することが便利である。

### Tyrosine の測定

tyrosine の測定法としては Millon の反応を利用する比色法があるが、これは tryptophan および一般に phenol 基をもつ化合物に陽性であるのでその特異性は低い。これに対して  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol と硝酸とによる呈色反応は tyrosine と tyramine にのみ特有なものであつて、組織などには tyramine は殆んど含まれていないので tyrosine に特異的なもの

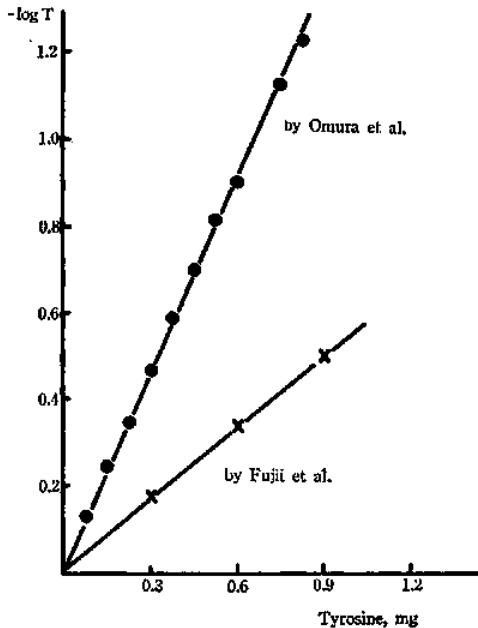


Fig. 1. Coloration of tyrosine by  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol.

Omura et al.: 3 ml sample, 5 ml  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol, 2 ml 2.5 N  $HNO_3$ , 3 ml 20% HCl, 2 ml  $H_2O$ .

Heating at 90°C for 2 min., fill up to 20 ml., estimation at 517 m $\mu$ .

Fujii et al.: 15 ml sample, 8 ml  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol, 4 ml 2.5 N  $HNO_3$ , 6 ml 20% HCl.

Heating at 90°C for 2 min., fill up to 50 ml., estimation at 500 m $\mu$ .

だと云つてよく生物組織のような複雑な物質の混合物中の tyrosine の測定に適している。藤井等<sup>2)</sup>はこの方法について検討を行ない測定法として次の条件を設定した。即ち 15 ml の試料に 8 ml の  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol 飽和水溶液、ついで 4 ml 2.5 N  $HNO_3$  ならびに 6 ml 20% HCl を加え、これを加熱する。内部液温が 90°C に達してから正確に 2 分間加熱発色させた後流水で冷却し、さらに全量を水で 50 ml にしたのち 500 m $\mu$  でその透過率を測定し、これを片対数で調製した検量線から tyrosine 含量を求める。この方法によると試料中の tyrosine が 0.9 mg まではその濃度と透過率とが比例関係にあることが認められ、リンゴ、馬鈴薯、エビ等の tyrosine 含量の測定に利用された。

しかし我々は測定に必要な呈色液は少量で足りるので次の条件に改めて操作を行なつた。

試料 3 ml に 5 ml  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol, 2 ml 2.5 N  $HNO_3$ , 3 ml 20% HCl, 2 ml  $H_2O$  を加えて全量を 15 ml とし 90°C で正確に 2 分間加熱して発色させた後冷却し、さらに  $H_2O$  を加えて正確に 20 ml とした。この呈色液について日立分光光度計 EPU-2 型、光路 10 mm のセルを用い 517 m $\mu$  でその吸光度 (-log T) を測定した。

この両法による標準曲線を第 1 図に示すが吸光度は原法同様に約 0.9 mg までは直線関係を示すが操作は簡便であつてしかもその精度は上昇した。

藤井等は一定の tyrosine 及び tyrosinase 溶液に種々の量の SP を加え 40°C に 1 時間反応させた後、残存する tyrosine の量を本法で測定したが SP の添加量が多くなるにつれてその発色度は逆に減少し、同一量の tyrosinase を添加しているにもかかわらず SP の添加量が多くなるにつれてあたかも tyrosinase 活性が促進されるような現象を認めた。藤井等はこれに対して基質である tyrosine と SP とが化学的に反応するために反応液中の tyrosine の量が減少するためであると解釈した。さらにこれを裏付ける為に tyrosinase を加えることなく tyrosine 溶液に SP を添加し  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol を加えて発色させ、同様に SP の添加量が多くなるにともない発色度が低下することを認めた。

この解釈もある程度の可能性が考えられるがもし SP が tyrosine に対してそれだけの反応性を示すならば発色試薬である  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol に対しても作用しこれにともなつて tyrosine の呈色を阻害することも考えられ、SP 添加量の増加とともに発色度が

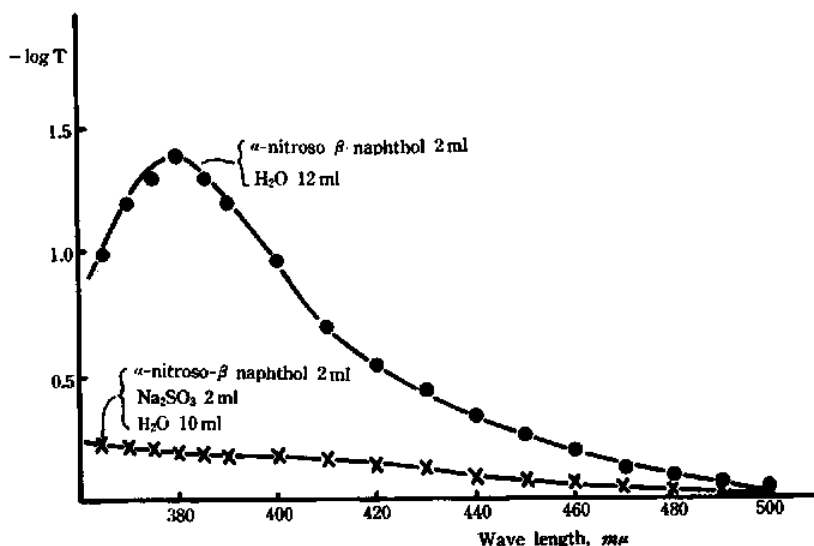


Fig. 2. Effect of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  on an absorption spectrum of  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol.

低下するという藤井等の観察も合理的に理解出来る。一方我々は tyrosine と SP との混液を常法に従つて  $90^\circ\text{C}$  2 分間加熱した場合には殆んど呈色しなかつたが、加熱をさらに続けると弱く呈色するようになることを認めた。しかし藤井等が述べているように tyrosine と SP との化学反応が瞬間的に迅速に行なわれるならば発色試験によつてこのどちらかを確かめることはむづかしい。そこで呈色試薬  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol に対する SP の作用を試験した。第 2 図に示すように  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol は  $380 \text{ m}\mu$  に顕著な吸収の極大を示す。しかしこれに亜硫酸ソーダを添加するとこの吸収は完全に消失した。このことは少なくとも亜硫酸が  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol と反応するために tyrosine の呈色を著しく阻害することを示唆している。従つて亜硫酸を含む溶液中の tyrosine をこの  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol 法で比色定量するには発色に先立って予かじめ亜硫酸を除かなければならない。この事実は藤井等によつても承認され、さらに formaldehyde によつて亜硫酸を除けば適切であることが確かめられた。

#### SP のリンゴ褐変防止効果

市販リンゴ (国光) を剥皮し  $2 \times 10^{-2} \text{M}$  SP に室温で 10 分間浸漬し、水洗して空气中に放置したが第 3-a 図に示すように数時間ないし翌日になるまでも褐変しなかつた。これに対して  $\text{H}_2\text{O}$  および  $2 \times 10^{-2} \text{M}$  NaCl でも比較のために同様に処理したが短時間で強く褐変した。

このリンゴの褐変あるいは SP による褐変防止は空気と接触するリンゴ果肉の表面でだけ起るものであつて室温に 1 晩放置した後に果肉の表面を数 mm の厚さになすく除くと第 3-b 図に示すように褐色を示していた対照の  $\text{H}_2\text{O}$  および NaCl 区のものも SP 区のものと同様に着色しない果肉を現わした。しかしこれをさらに放置すると第 3-c 図のように再び褐変したがこの場合は SP 処理区のものも同様に着色した。こうしてリンゴの褐変は果肉のごく表面で起るとは明らかであつて SP 剤は顕著な褐変防止能を持つているが、その効力も褐変が起る果肉の表面にとどまる。これに対して一般に云われている NaCl の防止効果は試験した  $2 \times 10^{-2} \text{M}$  程度では殆んど認められなかつた。

#### リンゴ果汁の褐変

リンゴの褐変あるいは SP の褐変防止効果について外観的にその色の変化を観察して表現することは出来るが、その程度をはつきり示すことはむづかしい。従つてこのような着色の程度を数値で示すことが出来れば研究上にも好ましい。そのためには比色計などの利用が考えられ、それとともに果実そのものよりは果汁についての取扱いが容易である。しかし果汁そのものの濁りなどにもとづく固有の吸収があるのでこの値を控除しなければならない。しかもリンゴは剥皮するとともに褐変を始めるので褐変しない対照果汁を調製することが困難であつて、控除しなければならない固有の吸収値は調製操作などによつてもかなり変動する。しかし上述のように SP がリンゴの褐変を防止するの

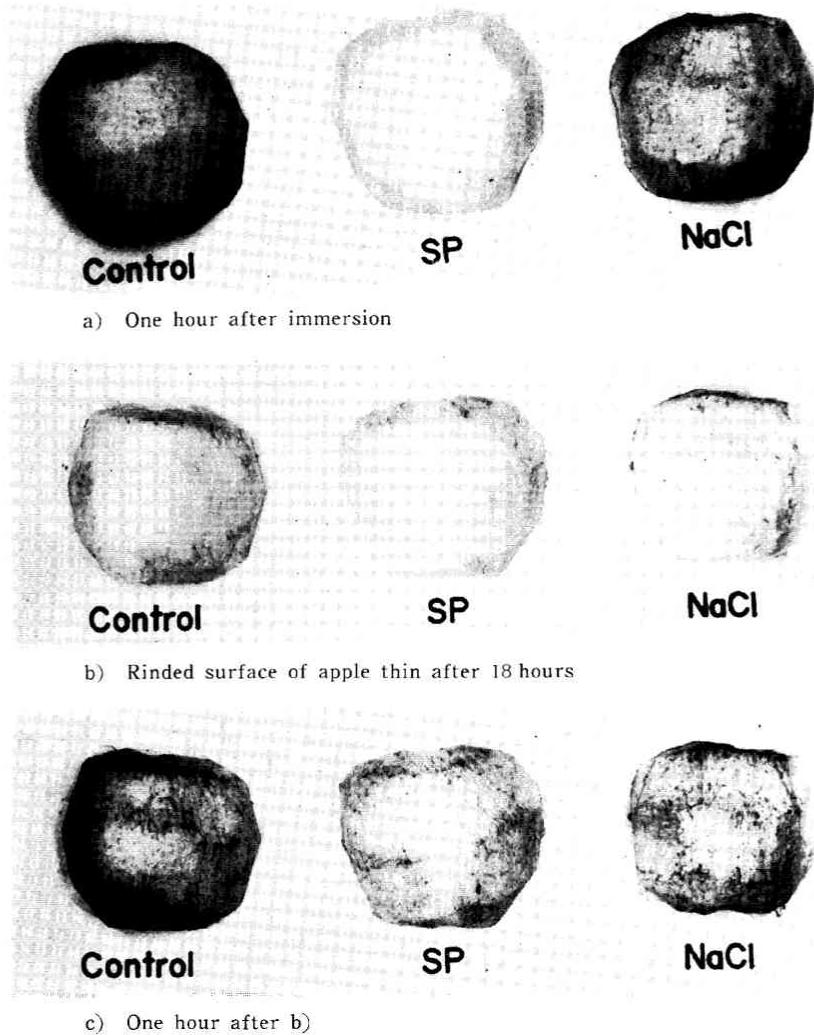


Fig. 3. Browning of rinded apple.

でこれを用いて果汁を調製すれば着色しないものが得られ、これを比色の対照に用いることによつて果汁の褐変度を比色計で測定することが出来ると思われる。

約200gのリンゴ(両光)を素早く剥皮し果肉25gを採る。これを50mlのH<sub>2</sub>OでWaring blenderを用いて30秒磨砕懸濁した後吸引濾過して果汁を調製した。一方同じリンゴから類似の部分の果肉25gを採りH<sub>2</sub>Oのかわりに10<sup>-2</sup>M SPを用いて対照果汁を調製した。これを対照として着色果汁の吸収スペクトルを測定したが褐変しているにも拘らず特有の吸収極大を認めることは出来なかつた。そこで一般的に吸光値を測定することとし日立光電比色計EPO-A型を用い種々のフィルターで果汁の吸光値を求めた。

Table 1. Effect of filter on extinction value of discolored apple juice.

Filter	blue	blue-green	green	cobalt
OD	0.680	0.521	0.420	0.420

Electric colorimeter: Hitachi EPO-A.  
Cell: 10 mm light path.

こうして果汁の吸光値を青色フィルターを用い光電比色計で測定すれば果汁の褐変度を示すことが出来る筈である。そこで先ずその褐変の進行度を測定した。

剥皮したリンゴの果肉25gから75mlのH<sub>2</sub>Oで常法通りすみやかに果汁を調製した。また同一果実から10<sup>-2</sup>M SPで同様に対照液を調製し比色計のセルに入

れ室温に放置して一定時間毎にその吸収の値を測定した。

第4図に示すようにこの条件でリンゴ果汁は約30分間にわたりほぼ直線的に吸収の値を増加し褐変が直線的に進行することを示すがそれ以後は徐々にその増加度を減じ約60分で概ね一定の値に達した。勿論この速度は果汁の質や濃度即ちリンゴに含まれている固有基質の量や酸化酵素の活性などに依存するものであつて供試したリンゴの種類や状態にも支配される。さらに果汁の調製は出来るだけ迅速に行い、また対照果汁は同一個体のしかも類似の部分から調製することが望ましい。

**SPの褐変果汁に対する漂白効果**

亜硫酸はしばしば食品の漂白にも使われる。リンゴについても褐変した果肉を比較的初期にSPに浸漬あるいは褐色になった果汁にSPを添加するとその色の強さは低下することが外観的に観察されたが完全に漂白することは認められなかつた。このことは次の実験からも示される。

褐変した果汁それぞれ10mlに種々の量にSPを添加すると着色の程度は低下しその吸光値を減少したが褐色であることには変りはなかつた。

Table 2. Decrease of color intensity of brown apple juice by SP.

Brown apple juice, (ml)	10 <sup>-3</sup> M SP added, (ml)	H <sub>2</sub> O added, (ml)	OD <sub>410mμ</sub>	color of juice
10	0	1.0	0.580	brown
10	0.1	0.9	0.360	brown
10	0.4	0.6	0.315	brown
10	0.8	0.2	0.290	brown
10	1.0	0	0.290	brown

第2表に示すように褐変したリンゴの果汁にSPを加えるとその添加量を増加するとともに果汁の吸光値は減少したがある一定の値(この場合10<sup>-3</sup>M SP 0.8 ml, OD<sub>410mμ</sub> 0.290)に達しそれ以上SPの添加量を増しても吸光値は減少せず果汁の色も多少薄くは

なるが褐色に着色したままであつた。このことはリンゴの褐変化反応は多くの段階を経て行なわれ、初期の物はSPにより褪色するがある時期を越えればもはや褪色は不可能となるためであると推定される。

**SPによるリンゴ果汁の褐変防止**

リンゴの果汁を調製する場合あらかじめSPを添加すればその褐変を防ぐことができる事は褐変度の測定に使用する対照液から明らかである。

それぞれ10gの剥皮したリンゴ果肉を種々の濃度のSP 40 mlで磨砕抽出し濾過果汁を室温に放置し15分及び30分後のその色の外観を第3表に示す。

このSPの褐変防止効果を数的に表現し防止効果をもつSPの量の限界についての1例を第4表に示す。予備試験と同様に剥皮したリンゴ果肉10gから40ml SPで果汁を調製し約1時間室温に放置後その

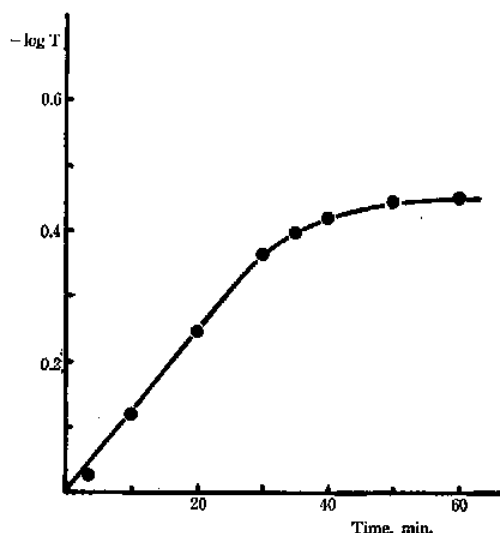


Fig. 4. Increase of optical density of apple juice.

Optical density (-log T) of apple juice was estimated using a Hitachi electric colorimeter, EPO-A, with blue filter. Apple juice containing SP was employed as control for estimation.

Table 3. Browning of apple juice prepared with SP.

Conc. of SP used, M		10 <sup>-5</sup>	5×10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	2×10 <sup>-4</sup>	4×10 <sup>-4</sup>	5×10 <sup>-4</sup>	6×10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>
Browning	15 min.	+	+	-	-	-	-	-	-
	30 min.	+	+	+	+	-	-	-	-

From 10 g rindless apple, juice was prepared with 40 ml of SP by homogenizing in a Waring blender and filtering. Browning of juice prepared was checked after standing at room temperature for 15 minutes and 30 minutes.

+ : juice became brown.

- : appreciable browning of juice was not observed.

Table 4. Extinction value of apple juice prepared with SP (1).

Conc. of SP used, M	0	$2 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-4}$	$3 \times 10^{-4}$	$3.5 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$4.5 \times 10^{-4}$
OD <sub>580</sub> Browning of juice	0.350 +	0.189 +	0.180 +	0.130 +	0.077 -	0.019 -	0.005 -

Apple juice was prepared from 10 g of rinded apple with 40 ml of SP as above. Extinction value (OD<sub>580</sub>) was estimated after standing at room temperature for 60 minutes. At the same time, browning of juice was checked.

吸光値を測定した。比色の対照は  $10^{-3}$ M SP で調製した果汁を用いた。尚同時に果汁の外観的褐変の有無を識別した。

第4表の条件では外観的に褐変していないリンゴの果汁を得るためには  $3 \sim 4 \times 10^{-4}$ M 付近に SP の限界があることを示す。しかしこのように外観的には褐変していない果汁でもその吸光値は対照のものに比べて高く吸光値 0.1 付近になつて果汁の着色が識別されるようになる。

この果汁の褐変を防止する SP の限界量はリンゴの種類、使用量その他の諸条件によつて異なる筈である。例えば 20 g 即ち 2 倍量のリンゴ果肉を用い 40 ml の SP で果汁を調製すると磨砕もやや困難であつて時間も要する。しかし着色限界の吸光値には顕著な相違は認められないが吸光値はかなり高い。

Table 5. Extinction value of apple juice prepared with SP (2).

Conc. of SP used, M	$3 \times 10^{-4}$	$4 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$
OD <sub>580</sub> Browning of juice	0.180 +	0.107 -	0.045 -

Apple juice was prepared from 20 g of rinded apple with 40 ml of SP as above.

#### SP の残存量

亜硫酸塩は主に漂白剤あるいは酸味をもつ果実や野菜の防腐剤などとして食品にも添加利用されているが、その使用量は法律によつて制限されている。その用量は食品の種類によつてかなり変動するが最も厳しいもので kg 当り 30 mg 以下でなければならない。従つて SP がリンゴの褐変防止に顕著な効力をもつて

いても使用に際してはその残存量が許容範囲を越えてはならないことは当然である。

素早く剥皮した 200 g のリンゴ果肉を 200 ml H<sub>2</sub>O で常法通り磨砕抽出した。この果汁 50 ml に直ちに  $10^{-4}$ M SP 50 ml を混合し室温に放置。一定時間毎に 10 ml 宛採り出し、後述する方法<sup>10)</sup>に従つて rosanilin-HCl 溶液および formaldehyde 溶液それぞれ 1 ml 宛を加えて発色させ 580 m $\mu$  の吸光値を測定して亜硫酸の残存量を求めた (第6表)。

SP を果汁と混合すれば後述<sup>10)</sup>するように果汁中の phenol 性物質その他のものと反応して SP の量はかなり減少するがさらに時間の経過とともに漸減した。

一方剥皮したリンゴ果実を SP に浸漬して褐変を防止する場合どの程度の SP が付着し残留するかを測定する事は褐変防止効果の検討と関連して望ましい。

200 g の剥皮したリンゴを等分し各々 25 g の果実片を  $10^{-3}$ M SP に 1 時間浸漬した後室温空气中に放置した。一定時間後に各果実をそれぞれ 25 ml H<sub>2</sub>O で常法通り磨砕抽出しその 1 ml を 10 倍に稀釈して発色させ SP の量を比色定量した (第7表)。

SP 処理をしたリンゴを空气中に放置するとそれだけでかなり迅速に SP は減少するがどの果肉も、またそれから調製したどの果汁も褐変しなかつた。

次に同じく  $10^{-3}$ M SP に種々の時間浸漬した後 100 ml H<sub>2</sub>O で磨砕抽出しその 1 ml について残存する SP を測定した。

第8表の結果は常識どおり浸漬時間が長いほど残存する SP の量は多いことを示す。

またリンゴを SP で処理しついで H<sub>2</sub>O で洗滌すれ

Table 6. Decrease of SP in apple juice.

Time, hr	0	0.5	1	2	5
OD <sub>580</sub> Total amounts of SO <sub>2</sub> , $\mu$ g	0.147 41.2	0.134 37.4	0.132 35.7	0.127 33.2	0.121 31.5

Juice was prepared quickly from 200 g rinded apple with 200 ml H<sub>2</sub>O. Then, 50 ml of juice were mixed 50 ml of  $10^{-4}$ M SP. An aliquot of 10 ml of the mixture was taken out at definite interval and mixed with 1 ml of rosanilin-HCl and 1 ml formaldehyde for estimating remaining sulfite. Color intensity was determined at 580 m $\mu$ .

Table 7. Decrease of SP on piece of rinded apple.

Time, min.	0	15	30	60	120
Browning	—	—	—	—	—
OD <sub>560</sub>	0.820	0.620	0.450	0.330	0.250
Total amounts of SO <sub>2</sub> , $\mu$ g	601.8	446.1	352.8	232.4	207.5
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	24.07	17.84	14.11	9.30	8.30

Pieces of rinded apple of 25 g each were immersed in 10<sup>-3</sup>M SP for 60 minutes. After standing at room temperature, sulfite in piece of apple was estimated colorimetrically using 1 ml of extract.

Table 8. Effect of immersion time on amounts of remaining sulfite.

Immersion time, hr.	0.5	1.0	1.5	2.0
Browning	+	—	—	—
OD <sub>560</sub>	0.145	0.160	0.176	0.200
Total amounts of SO <sub>2</sub> , $\mu$ g	415.0	456.5	498.0	564.4
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	16.60	18.26	19.92	22.58

Pieces of rinded apple of 25 g each were immersed in 10<sup>-3</sup>M SP for different time and remaining sulfite in piece of apple was estimated using 1 ml of extract.

Table 9. Effect of washing with water on amounts of remaining sulfite.

Washing, min.	0	30	60	90
Browning	—	—	+	+
OD <sub>560</sub>	0.125	0.093	0.080	0.018
Total amounts of SO <sub>2</sub> , $\mu$ g	352.8	278.9	236.6	49.8
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	14.11	11.16	9.46	1.99

The same as Table 8, except that pieces of apple were immersed for 90 minutes and washed them by immersing into H<sub>2</sub>O for different time.

Table 10. Effect of concentration of SP on amounts of remaining sulfite.

Conc. of SP, M	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
Browning	+	—	—
OD <sub>560</sub>	0.120	0.246	0.585
Total amounts of SO <sub>2</sub> , $\mu$ g	83.0	172.2	419.2
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	3.32	6.89	16.77

The same as Table 9, except that pieces of apple were immersed for 30 minutes in SP of different concentration.

ば SP の量が減少する事は当然考えられることであつて第9表はこれを示す。各25gのリンゴ片を10<sup>-3</sup>M SP に90分間浸漬した後大量のH<sub>2</sub>Oにそれぞれの時間浸漬洗滌しこれを100 ml H<sub>2</sub>Oで磨砕抽出しその1 mlについて呈色しSPの量を求めた。

浸漬するSPの濃度が変われば残存するSPの量も異なる事はこれらの実験からも推定されるが、同一リンゴについて試験した。25g宛浸漬SPの濃度をかえてそれぞれ200 mlに30分間浸漬し水洗後50 ml H<sub>2</sub>Oで磨砕抽出、その2 mlについてSPを比色定量した(第10表)。

このようなリンゴのSP処理は短時間で行なうことが望ましい。しかし褐変を防止するためにはそれに応じて比較的高い濃度のSPを用いなければなら

い。従つてそのような条件でのSPの残存量も検討されなければならない。

25gの剥皮した果実を2×10<sup>-2</sup>M SPに一定時間浸漬したのち5分間水洗、50 ml H<sub>2</sub>Oで磨砕抽出し3倍稀釈液10 mlについて発色させた(第11表)。

さらに短時間処理するため10<sup>-4</sup>M SPに25gリンゴ果肉を1分間浸漬し直ちに水洗または濾紙で付着水分を除き50 ml H<sub>2</sub>Oで磨砕抽出し残存SPを測定した。他方同一条件で処理したリンゴを固形のまま1日放置後同じく50 ml H<sub>2</sub>Oで抽出しSPの量を求めた(第12表)。

高濃度のSPに浸漬すれば1分間でも褐変防止に有効である。この場合濾紙で附着する水分を除く程度ではSPの残存量は著しく多くて充分ではなく水洗しな



Table 11. Effect of immersion in higher concentration of SP on amounts of remaining sulfite.

Immersion time, min.	5	10	15	20	30
Browning	—	—	—	—	—
OD <sub>580</sub>	0.234	0.323	0.420	0.479	0.820
Total amounts of SO <sub>2</sub> , μg	99.6	138.0	178.3	211.7	361.1
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	3.98	5.52	7.13	8.47	14.44

The same as Table 8, except that pieces of apple were immersed in  $2 \times 10^{-2}$  M SP.

Table 12. Immersion of pieces of rinded apple into  $10^{-1}$  M SP for 1 minute.

Exp. No.	1		2	
	H <sub>2</sub> O	filter paper	H <sub>2</sub> O	filter paper
Browning	—	—	—	—
OD <sub>580</sub>	0.445	∞	leaving at room temperature for 20 hrs.	
Total amounts of SO <sub>2</sub> , μg	622.5	∞		
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	24.9	∞		
	leaving the juice at room temperature for 18 hrs.			
Browning	—	—	—	—
	(on apple juice)		(on piece of rinded apple)	
OD <sub>580</sub>	0.168	∞	0.150	0.218
Total amounts of SO <sub>2</sub> , μg	234.5	∞	207.5	311.3
Amounts of SO <sub>2</sub> per kg, mg	9.38	∞	8.30	12.45
Browning of juice	—	—	+	+

Pieces of rinded apple of 25 g were immersed into  $10^{-1}$  M SP for 1 minute and pieces were washed with H<sub>2</sub>O or adsorbed by filter paper. Two pieces in Exp. 1 were homogenized with 50 ml H<sub>2</sub>O and filtered. Sulfite remaining in the apple juice prepared was estimated. Another 2 pieces in Exp. 2 and apple juice in Exp. 1 were left at room temperature over night and browning of juice and fruit was checked. Sulfite in apple juice in Exp. 1 was again estimated. Pieces in Exp. 2 were also homogenized with 50 ml H<sub>2</sub>O, filtered and sulfite in the juice was estimated.

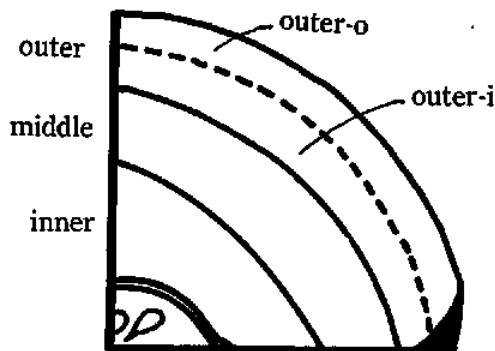


Fig. 5. Illustration of part of apple fruit.

なければならない。こうして調製した果汁を放置し翌日再びその SP 含量を測定したところかなり減少している事が認められたが褐変は起らなかった。之に対して SP 処理果実を同様に洗滌し固形のまま放置すれば翌日には相当量の SP が消失していた。しかしこのような状態のリンゴを H<sub>2</sub>O で磨砕抽出すれば果実の外観上褐変していないにも拘らず得られた果汁は多少着色

した。

これまでは果汁あるいは通常 8 切りした果実片について SP の褐変防止効果を検討してきたが最後に果実そのままについて試験した。直径約 8 cm, 重量約 200 g のリンゴ (国光) を剥皮し直ちに  $2 \times 10^{-3}$  M SP に 2 時間浸漬した。これによつてたびたび示したように褐変は勿論起らなかった。さらにこのリンゴを濾紙で拭つたのち切断し第 5 図に示すように果実の表面側の外部、芯を中心とする内部およびその間の中間部に 3 分し、それぞれ約 25 g を 100 ml H<sub>2</sub>O で迅速に磨砕抽出しその 2 ml について発色し SP 含量を測定した。

初めに SP によるリンゴの褐変防止が果実の表面で起る事を第 3 図に示すように観察した。第 13 表の結果はこのことをよく支持しており、SP 含量は表面に近い外部で最も高かつた。しかし SP は内部にも滲透することを示したが、その量は充分ではなく調製した果汁は間もなく褐変した。このことも SP で褐変防止した果実の表面を除くと、新しく現われる表面は褐変

Table 13. Penetration of SP into whole apple fruit.

Part	inner	middle	outer
Browning of juice	+	+	-
OD <sub>550</sub>	0.246	0.145	0.600
Total amounts of SO <sub>2</sub> , μg	352.8	205.4	867.4

A ringed apple was immersed into  $2 \times 10^{-3}M$  SP for 2 hrs. and wiped with filter paper. Each 25 g of inner, middle and outer part of the apple were homogenized with 100 ml H<sub>2</sub>O and filtered. Browning of the juices were checked and their SP content was determined.

Table 14. Effect of washing on amounts of SP in whole apple.

Part	inner	middle	outer-i	outer-o
Browning of juice	+	+	+	-
OD <sub>550</sub>	0.171	0.161	0.154	0.317
Total amounts of SO <sub>2</sub> , μg	236.6	228.3	213.7	448.2

The same as Table 13 except that the apple was washed with water after SP treatment and that outer part was further divided into outer-i and outer-o.

する上述の観察とも一致する。内部と中部との SP 含量は前者が却て多少高い値を示した。之はリンゴの中央部の凹みからの滲入が果肉を通しての滲入よりも能率的なためと推定される。

これらの数値は勿論概略を示すにすぎないが SP 量はこの場合リンゴ 1 ケについて約 4 mg に達する。従つて 1 kg 当り 20 mg に達し、法的許容量以下ではあるが、この値は平均値であつて表面部はかなり高い値となる。従つて洗滌によつて SP の附着量を出来るだけ低下させなければならない。そこで SP 処理を行つた果実そのものに対する水洗の効果を試験した。前回同様 2 × 10<sup>-3</sup>M SP に 2 時間浸漬、充分に水洗したのち SP の残存量を測定した。SP の残存がとくに表面で顕著であるので第 13 表における外部をさらに 2 分し、各区それぞれ 25 g 宛採り 100 ml H<sub>2</sub>O で磨砕抽出し同様に 2 ml について SP の含量を比色測定した。

SP がリンゴの表面で多い事は第 14 表でも明白であり洗滌によつて外部および内部の SP 量は減少した。然し中間部の SP 量には大差なく洗滌効果は認められない。こうして洗滌によつてとくに外部の SP 量は減少し残存量は殆んど半減した。

## 考 察

リンゴの果汁あるいは剥皮した果実を SP で処理すればその褐変を完全に防止することができる。この効果は亜硫酸塩の作用によるものであつて必ずしも磷酸を加える必要はない。リンゴの褐変は polyphenol 類あるいは tyrosine のいずれにせよこれらの phenol 性物質が酵素的に酸化を受けて重合し色素を形成するこ

とによることはよく知られており、SP の褐変防止効果が藤井等の主張するように基質の phenol 性 OH が SP によつて還元されるためであるとういには実験的根拠が充分であると必ずしも思われぬ。しかし NaCl がリンゴの褐変を防ぐことは経験されており、さらにリンゴの polyphenol 酸化酵素を阻害することは中林によつても確められているにも向らず、剥皮したリンゴを処理した場合 SP は完全に褐変を防止するのに対し NaCl は同一濃度で殆んど効果がなかつた。このことは果肉内に自然の状態である酵素に対する阻害作用は試験管内でのモデル実験ほど充分でないことも推定させる。

Tyrosine と SP との化学反応によつて α-nitroso-β-naphthol により測定される tyrosine の量が減少するという事実は藤井等の主張の根拠の 1 つとなつているが、我々が明らかにしたように発色試薬である α-nitroso-β-naphthol が SP と反応するために tyrosine の呈色が妨害されるためであると考えられるのでこの点についてはさらに検討しなければならない。しかし藤井等はペーパーおよび薄層クロマトグラフィーによつて tyrosine を SP で処理した場合その R<sub>f</sub> が若干変動することを認めている。しかしこれも phenylalanine のものとは全く異つており、我々も tyrosine の紫外吸収スペクトルの変動を試験することによつてほぼ類似の傾向を認め、少くも初めに考えられたような単なる phenol 性 OH の還元だけでは思われぬ。

いずれにしても酵素の基質を化学的に変化させて酵素の作用する余地をなくして褐変を防止しようとする

研究方向は従来あまりおこなわれておらず新しい解決の道への手段を提供するものと思われる。この考え方は褐変防止だけではなく種々の食品加工において多くの道を開くものと期待される。

原理的には尚多少の解決すべき問題をのこしているが SP がリンゴの褐変を防止することは明白なことであつて一般に云われている NaCl に比べてその効果は著しく大きい。この SP を利用することによつて褐変を防いだリンゴの果汁を作ることが出来る。従つてこれを比色計の対照液として用いることによつてリンゴ果汁の褐変を定量的に追及することが可能となつた。SP はリンゴの褐変を防止するだけでなく一部漂白させ得ることも明らかになつたが完全に脱色することはできない。このような微妙な変化は外観的視覚によつて表現することはむづかしく光学的手段によつて初めて数値的に示されるものであつて、実験に使用した条件では吸光度 0.1 付近に視覚の限界があり、これ以上ではじめて褐変を認めることが出来た。SP 処理果汁はさらに褐変による妨害を防ぎまたリンゴ抽出液固有の吸収を求めて測定値の補正に供する等種々の比色定置にも有効である。

中林によると NaCl は 1M で 73%,  $5 \times 10^{-4}M$  で 44%,  $2.5 \times 10^{-4}M$  で 44%,  $2.5 \times 10^{-5}M$  で 33% 程度に polyphenol 酸化酵素を阻害しさらに  $MgCl_2$ , KCl,  $Na_2SO_4$ ,  $K_2SO_4$ , KBr,  $MgSO_4$  等の無機塩類も程度の差はあるが酵素の作用を抑制する。従つてリンゴの褐変を完全に阻止するためには相当高い濃度の NaCl ないし他の塩類を用いなければならない。試験管内でのモデル酵素実験と果実についての褐変試験との相違はあるが  $2 \times 10^{-2}M$  NaCl に剥皮したリンゴを浸漬した場合褐変を防ぐことができなかったことは上記酵素の阻害度からも首肯される。

それに対して SP の褐変防止能が著しく高いことは明白である。リンゴ果汁の場合我々が試験した条件では  $2 \sim 4 \times 10^{-4}M$  程度で有効であり而形果実の場合 1M SP に数分、 $1 \sim 2 \times 10^{-2}M$  SP に 5 分間程度浸漬すればその後水洗しても褐変防止には差支えないようである。浸漬時間をさらに長くすれば  $10^{-2}M$  程度に SP の濃度を低下させても有効である。勿論これがリンゴの種類、状態あるいは果汁の濃度等によつて多少の変動があることは当然である。

リンゴの褐変あるいは SP によるその防止が果実の表面でおこなわれることは褐変したリンゴの表面をうすく除けば着色しない果肉があらわれ、また SP で褐変を防止した無色の果肉表面を同様に除くとそのリン

ゴは間もなく褐変を起すことから明白であり、この事実は SP に浸漬したリンゴ果実内 SP 含量が果実表面部でとくに高いことから確かめられた。これとともに SP はリンゴの内部にも滲透することが認められた。しかしその量は少く果汁を調製しても褐変を防ぐことは出来ない。

さらに SP は比較的分解されやすく、とくに果実の表面で顕著である。しかも SP 処理をした果実を水洗すれば褐変を防止したまま残存する SP をかなりの程度除くことが出来る。食品に亜硫酸を使用することは法律的に制限されているので、使用に際してはとくに慎重でなければならず残存量が許容限界以下であることを常に確かめなければならない。亜硫酸の限界量は食品の種類によつて異なるが最も厳格なもので 1kg あたり 30mg である。我々が試験した範囲内ではいずれも SP の残存量はこの限界内であつてこの点に関する限り差支えない。しかし SP 処理が色調だけでなくビタミン等他の有効成分や味覚等食品の品質に対する影響を検討する必要があることは当然である。

## 総 括

1)  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol による tyrosine の定置法について検討し藤井の方法をさらに改良した。これとともに SP が  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol と反応し tyrosine の測定を妨害することを認めた。

2) 剥皮したリンゴを  $2 \times 10^{-2}M$  SP に浸漬しその褐変を防止出来たが同じ濃度の NaCl では効果はなかつた。このリンゴの褐変および SP の褐変防止は果実の表面でおこるものであつて褐変リンゴの表面をうすく除くと着色しない果肉があらわれ、また SP で褐変防止した果実の表面を同様に除くと果肉は間もなく褐変した。

3) リンゴを SP で抽出することによつて褐変しない果汁を調製することが出来た。さらにこれを対照液として用いることによつてリンゴ果汁の褐変度を比色計により定量的に測定することができた。こうしてリンゴ果汁の褐変が初期には直線的に進行することを認めた。

4) 褐変した果汁は SP の添加によつて多少漂白されたが、完全に脱色することはできなかった。

5) 果汁の褐変を防止する SP の量は我々が試験した条件では  $2 \sim 4 \times 10^{-4}M$  であつて比色計による吸光度 0.1 付近以下では外観上褐変は認められない。一方固形果実の場合 1M SP に数分、 $1 \sim 2 \times 10^{-2}M$  SP に 5 分間程度浸漬すれば充分であり浸漬時間を長くすれ

ば SP の濃度は更に低くすることができる。

6) 果汁あるいは果実表面に残存する SP は比較的分解され易いことが認められた。また種々の SP 処理条件の SP 残存量に対する影響を試験した。

7) SP 浸漬による SP のリンゴ内部への滲入を測定し主として果実の表面部に多いことを認めた。

本研究は昭和 39 年度文部省試験研究費（代表者山藤一雄）で行なつたものであり、研究に際し種々御助言を賜つた水産大学校藤井実教授に感謝する。

（食糧化学教室）

## 文 献

1) Bradfield, A. E., Flood, A. E., Hulme, A. C.

- and Williams, A. H. (1952) *Nature* **170** 168.  
 2) 藤井 実, 片岡一治, 坂田 修 (1963) 水産大学校研報 **12**, 1.  
 3) 藤井 実, 原田勝彦, 大島寿夫 (1964) 真空化学 **12**, 221.  
 4) 藤井 実, 坂田 修 (1964) 水産大学校研報 **13**, 75.  
 5) 藤井 実 (1965) 私信.  
 6) Hulme, A. C. (1953) *Biochem. J.* **53**, 337.  
 7) 柿本大彦, 金沢昭夫 (1956) 日水誌 **22**, 471, 476.  
 8) 中林敏郎 (1953) 農化 **27**, 813.  
 9) 中林敏郎 (1954) 農化 **28**, 212.  
 10) 大村浩久, 副田絨一郎, 山藤一雄 (1966) 九大農学芸誌 **22**, 131.  
 11) Sando, C. E. (1924) *J. Agr. Research* **28**, 1243.

## Summary

It is well known that browning of rinded apple is brought about by the action of phenol oxidase upon some phenolic substances, precursors of colored substances, in fruit. Some procedures of prevention for browning of apple were so far studied through inhibiting the activity of enzymes with several inhibitors or by losing touch with air. However, another procedure will be possible. If natural substrates of phenol oxidase are chemically modified, they can not be oxidized, preventing the formation of brown color. SP (a mixture of sodium sulfite and ortho phosphoric acid adjusted to pH 5.5) was examined to prevent browning of rinded apple, since it was established to counteract with tetrodotoxin by reducing OH group in a molecule.

Fujii's method for estimation of tyrosine with  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol was modified. The procedure was as follows. Into 3 to 5 ml of sample solution, 5 ml of saturated  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol solution, 2 ml of 2.5 N HNO<sub>3</sub>, 3 ml of 20% HCl and H<sub>2</sub>O were added to a total volume of 15 ml. The mixture was heated at 90°C for exact 2 minutes and rapidly cooled with running tap water. A colored solution was filled up to 20 ml with H<sub>2</sub>O. The optical density was estimated at 517 m $\mu$  using a Hitachi spectrophotometer EPU-2 with cells of 10 mm light pass. As shown in Fig. 1, optical density is proportional to the amounts of tyrosine until 0.9 mg with higher accuracy compared with Fujii's method. However, it was found that the estimation of tyrosine with  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol was disturbed by SP. This interference was attributed to the action of SP upon the reagent, as presumed from an observation that the maximum peak of spectrum of  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol at 380 m $\mu$  was diminished by addition of SP.

An apple was rinded and cut into a several pieces. They were immersed in  $2 \times 10^{-2}$  M SP for 10 minutes at room temperature and washed with water. Two pieces of apple which had been immersed into H<sub>2</sub>O or  $2 \times 10^{-2}$  M NaCl became brown within a hour, while SP-treated piece of apple did not discolor, as shown in Fig. 3. However, non-discolored pieces were obtained, if surface of pieces was rinded thin. Finally new surface of all three pieces became again brown on standing for a while. These observations indicate that browning of rinded apple and its prevention by SP take place on surface of apple.

A piece of rinded apple was quickly homogenized with H<sub>2</sub>O in a Waring blender for 30 seconds and filtered by suction. Apple juice obtained became brown soon. However, non-discolored juice was obtained if apple was extracted with SP. Using this colorless juice with SP as control for colorimetry, a rate of browning of apple juice could be quantitatively estimated by Hitachi electric colorimeter with blue filter. Thus, it was found that the intensity of color of apple juice increased proportionally to time for 30 minutes and reached to approximately constant value after 60 minutes.

By means of the procedure established, some bleaching of brown juice of apple with SP was

estimated. When brown apple juice was mixed with SP, its optical density was decreased, although extinctive alteration of color could not be established by viewing the juice. Furthermore, bleaching of juice by SP was not complete.

Browning of apple juice was prevented by SP in a final concentration of  $2\sim 4 \times 10^{-4}M$  under the condition examined. On the other hand, prevention of discoloration of rinded apple fruit was attained by immersing it into 1 M SP for a few minutes or into  $1\sim 2 \times 10^{-2}M$  SP for 5 minutes, even it was washed with water after immersion. Prolonged immersion of apple rendered to reduce the concentration of SP employed.

Using our colorimetric method for estimating sulfite, remaining amounts of SP in juice or fruit was examined. SP was decreased within apple juice or more quickly on surface of apple. Amounts of SP remained was reduced by decreasing immersion time or concentration of SP and by washing fruit. Whole apple was immersed into SP and amounts of SP within a fruit was also estimated. It was found that most of SP were estimated in outer part of apple and the minimal amounts were detected in middle part. At any rate, amounts of SP remained in juice or fruit was established to be less than limited amounts permitted of addition into food by the Law in Japan, 30 mg per kg, after treatment with SP for prevention of browning of apple.

Laboratory of Food Chemistry,  
Department of Food Science and Technology,  
Kyushu University