

硫化黒変に関する研究—I

アスパラガス中の腐食因子について

竹内伊公子・長田博光・大塚 滋

Studies on Sulfur Stain of Internal Wall of Cans—1 Corrosion Factors in Asparagus

Ikuko Takeuchi, Hiromitsu Osada and Shigeru Otsuka

Although severe sulfur stain and internal corrosion in canned asparagus have been widely observed, very little has been known about the cause or causes of these. In this study, the existence of the unknown substance(s) is suggested which is entirely different from so-called "corrosion factors" such as nitrates, anthocyan pigments, cystine and cysteine and presumably plays the main role in the corrosion reaction in canned asparagus.

White asparagus was extracted with 75% ethanol and fractions with ion exchange resins and ethereal extraction were examined as to the corrosion activities.

Both the sulfur-staining and corroding activities were found in the effluent from Dowex 50W × 8 (H⁺ form). Further fractions with Amberlite IR-45 (OH⁻ form) treatment showed considerable activities of sulfur stain and corrosion.

By paper chromatograms of the hydrolyzates of the fractions, citric and tartaric acids were detected, which were not detected on paper even after extraction of the unhydrolyzed fraction with ether for 120 hours. The hydrolyzates and one of the ethereal extracts contained significant amount of glutamic acid.

It is assumed that at least one of the sulfur-staining and corroding factors in the fresh plants is the loose conjugate of glutamic acid and the organic acids. Results obtained from the fractionation studies also strongly indicates that sulfur containing carbonhydrates and organic acids are involved in the sulfur-staining reaction of the internal wall of canned asparagus.

1. 緒 言

缶内面の腐食因子としては、従来、酸性度、アントシアン色素、硝酸塩、糖のカラメル化および液汁中の溶存酸素やヘッドスペース中の残存酸素などがあげられるが、これらについては古くから数多く研究、報告されている^{1)~9)}。また、硫化黒変は一般に食品中の蛋白質や含硫化合物が熱分解で生じた硫化水素と缶面のスズと反応しておこるが、魚体中の未知有機成分やタンニン様物質と鉄イオンが反応して黒変を形成するなどの報告がある¹⁰⁾¹¹⁾。

アスパラガスの缶内面腐食は、農産缶詰の中でも特に著しい。この腐食因子として、アスパラガ

ス莖部中の硝酸イオン⁹⁾、アントシアン色素¹²⁾、種々の有機酸¹³⁾¹⁴⁾などが報告されている。また、森ら¹⁵⁾はアスパラガスの腐食因子として、含硫化合物を示唆し、堀尾ら¹⁶⁾は添加したシスチンやシステインが缶内面腐食および黒変を促進することから、これらを腐食因子として報告している。黒変に関しては、小幡らが¹⁷⁾アスパラガスの成分である2,2'-ジチオison酪酸と金属との反応によると報告している。

アスパラガス缶詰の腐食因子の検討は上述のいくつかの報告にとどまり、アスパラガス中の成分自体が腐食におよぼす影響や黒変因子の分布や性状については未だ究明されていないのが現状である。著者らは、アスパラガス缶詰について、従来の腐食因子とされているアントシアン色素、硝酸イオンや遊離のシスチンやシステインとは異なった腐食因子が存在すると考えて、ホワイトアスパラガスのエキスの検索を行なった。その結果、アスパラガス中の腐食および黒変因子は、硝酸イオンや遊離のシスチンやシステインとは異なり、少くとも2種類以上の酸性物質であることを見出し、かつこれらの腐食要因物質は化学的に分解をうけやすい結合体であると考えられるので、これらについて報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

東洋食品研究所付属農場で栽培したホワイトアスパラガス（メリーワシントン種）を使用した。

2.2 アルコール抽出

ホワイトアスパラガスに75%エタノールを加えて沸騰水浴中で20分間浸出し、浸出液を50°Cで減圧濃縮した。濃縮液に新しく75%エタノールを加え、不溶部をとり除いた。アルコールを十分に留去し、1%ピクリン酸溶液を加えて、遠心分離による除蛋白を行ない、過剰のピクリン酸はDowex 2×8 (Cl⁻型)を用いて除去した。溶出液を50°Cで減圧濃縮し、エキスとした。

2.3 陽イオンおよび陰イオン交換樹脂による分画

アスパラガスのエキスをDowex 50W×8 (H⁺型)を用いて、非吸着部Aおよび吸着部Bに分画を行なった。Bは2Nアンモニア水で溶出した。さらにAをAmberlite IR-45 (OH⁻型)で処理し、非吸着部A-Iおよび吸着部A-IIに分画した。A-IIは2Nアンモニア水で溶出した。

2.4 エーテル抽出

A-IとA-IIの画分について、ソックスレー装置を用いてエーテル中で120時間還流し、それぞれのエーテル可溶部A-I-1とA-II-1およびエーテル不溶部A-I-2とA-II-2に分別した。

2.5 「A-II」の部分加水分解および部分加水分解物の分画

A-IIについて、2.4N塩酸で100°C、2時間還流し、部分加水分解を行なった。不溶部を濾別し、減圧下で塩酸を除去後、Dowex 50W×8 (H⁺型)で処理して、非吸着部A-IIIと吸着部A-IVに分画した。A-IVは2Nアンモニア水で溶出した。

2.6 「A-II」、「A-II-1」および「A-II-2」の加水分解

A-II、A-II-1およびA-II-2の各画分について、6N塩酸、110°C、封管中1夜放置の

条件で加水分解を行なった。

2・7 各画分の液体クロマトグラフィー

各画分の液体クロマトグラフィーおよびエキスのアミノ酸分析は日立液体クロマトグラフィー装置034型によった。

2・8 各画分のペーパークロマトグラフィー

各画分およびこれらの加水分解物のペーパークロマトグラムでは、アミノ酸および有機酸はn-ブタノール：酢酸：水（4：1：1 v/v/v）の同一の展開溶媒を用い、ニンヒドリンおよびブロムクレゾール・グリーン試薬（BCG）による発色、糖類はn-ブタノール：ピリジン：水（6：4：3 v/v/v）を用い2重展開後、アニリン・水素・フタル酸塩の発色による検索を行なった。「A-II」の部分加水分解物についても同様の検索を行なった。

2・9 各画分の缶内面腐食性

各画分および「A-II」の部分加水分解物について、それぞれをpH7.0に調整し、McIlvaine buffer (pH 6.2) を加えて試料溶液として、内面無塗装のベビー・フード缶に充填し、真空（50 cmHg）で巻締め、120°C、20分間の加熱殺菌後、37°Cに貯蔵した。1週間後、開缶しそれぞれの缶内面腐食性（スズ溶出量および黒変の度合）を調べた。

2・10 黒変度の判定およびスズ溶出量の測定

黒変度は缶内面の硫化黒変の度合を視覚的に判別して、十・一で表示した。溶出スズ量はポーラログラフィー法により測定した。

Table 1 Composition of free amino acids in fresh white asparagus.
(μ mole per 100 grams of fresh plant)

Amino Acid	(μ mole)	Amino Acid	(μ mole)
Lysine	16	Alanine	236
Histidine	16	Cystine	0
Arginine	44	Valine	40
Aspartic acid	48	Methionine	28
Threonine	524	iso-Leucine	4
Serine	692	Leucine	12
Glutamic acid	192	Tyrosine	trace
Proline	74	Phenylalanine	4
Glycine	112		

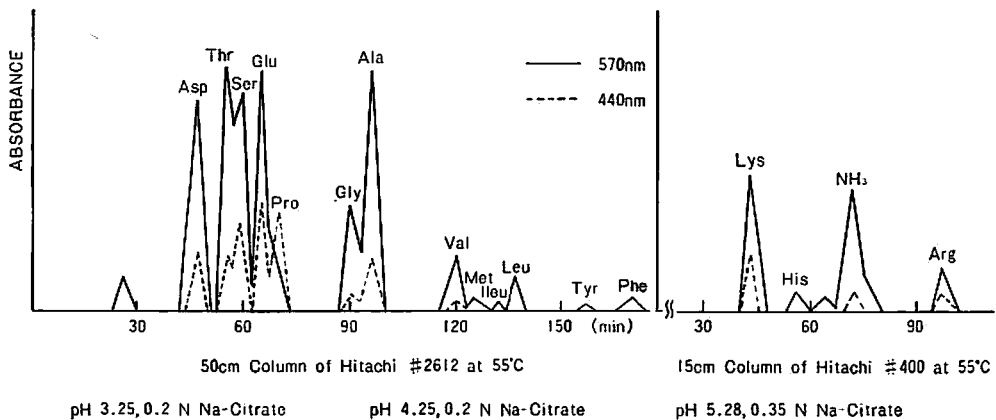


Fig. 1 Analysis of free amino acids in fresh white asparagus.

3. 実験結果

3.1 ホワイトアスパラガスのアミノ酸分析

ホワイトアスパラガス中の遊離アミノ酸の組成および含有量は第1図および第1表に示した通りである。なお、アミノ酸分析用の試料調整は常法¹⁸⁾に従ったが、シスチンは遊離のアミノ酸として検出できなかった。

3.2 各画分の缶内面腐食性

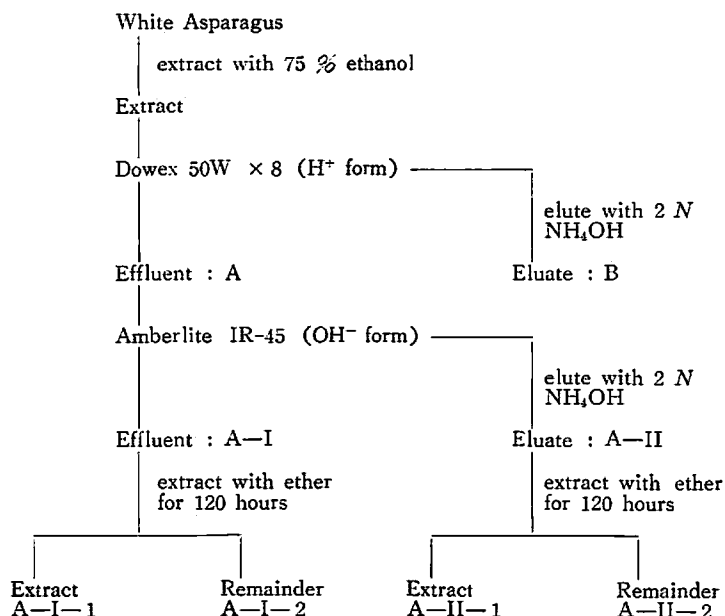


Fig. 2 Fractionation of the extract of fresh white asparagus.

第2図に従ってホワイトアスパラガスのエキスを分画して、得られた各画分のスズ溶出量と黒変度を第2表に示した。スズ溶出型の腐食（以下腐食と略す）および黒変は、酸性物質からなる画分Aに著しく生じ、中・酸性および塩基性アミノ酸などを含むBには殆んどみられなかった。A-IとA-IIを比較すると、腐食は2つの画分と同程度に現れたが、黒変はA-IIの方に著しく現れた。また、A-Iの腐食因子および黒変因子はエーテルには殆んど溶けないが、A-IIでは1部の溶

Table 2 Effect of fractions of white asparagus extract on internal wall corrosion.

Fraction	Tin dissolved (ppm)	Sulfur Stain
A	198	+++
B	45	+
A-I	246	+
A-II	135	+++
A-I-1	74	-
A-I-2	239	++
A-II-1	154	++
A-II-2	112	++
Control	59	-

Compare only between two fractions in each couple.

Control : McIlvaine buffer (pH 6.2)

Each sample was packed in baby-food can, sterilized at 120°C for 20 minutes and stored at 37°C for a week.

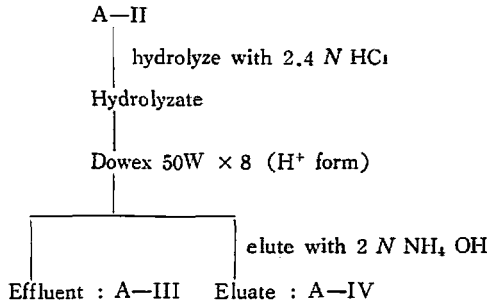


Fig. 3 Fractionation of the hydrolyzate of "A-II" by cation exchange resin.

Table 3 Effect of fractions of partial hydrolyzate of "A-II" on internal wall corrosion.

Fraction	Tin dissolved (ppm)	Sulfur Stain
A-III	260	+++
A-IV	91	+
Control	41	-

Control : McIlvaine buffer (pH 6.2)

Each sample was packed in baby-food can, sterilized at 120°C for 20 minutes and stored at 37°C for a week.

出が認められた。

3・3 部分加水分解物の缶内面腐食性

第3図に従って、分画して得られたA-IIIおよびA-IVの缶内面におよぼす影響を第3表に示した。腐食および黒変はともにA-IIIに著しく現れ、A-IVでは殆んど認められなかった。

3・4 各画分の液体

クロマトグラフ イー

各画分の液体クロマトグラフィーのパターンを第4図に示した。B以外は、それぞれ酸性物質からなるA群であるため、ニンヒドリンによる発色では殆んど特徴的な吸収はみられなかったが、相対的に570nmよりも440nmの波長が高く、A、A-II、A-II-1およびA-II-2では、標品のグルタミンあるいはグルタミン酸の位置に一致する鋭い吸収が認められた。この吸収の吸光度は一定しないで、陽イオン交換樹脂

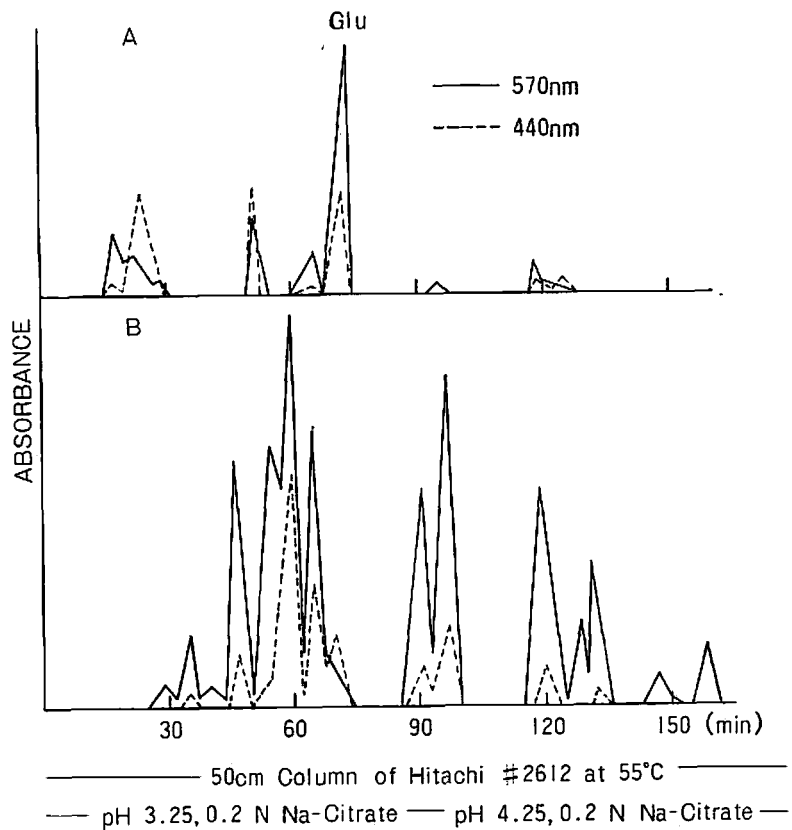


Fig. 4 a Chromatograms of chromatographic fractions of white asparagus extract by cation exchange resin.

A : Effluent from Dowex 50W × 8 (H⁺ form).

B : Eluate from above.

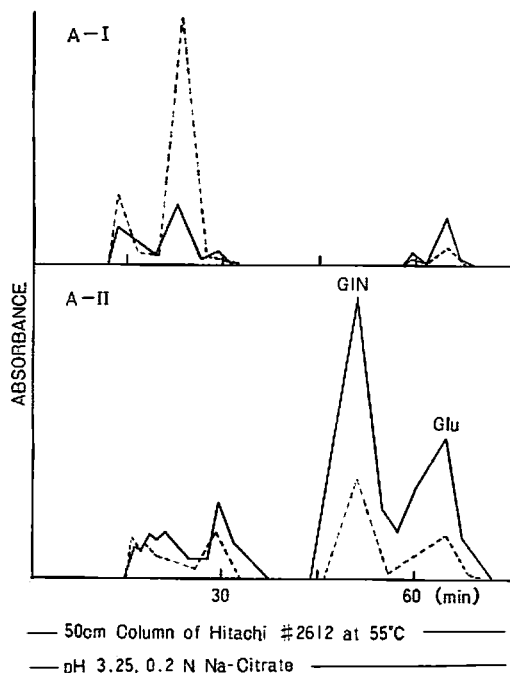


Fig. 4 b Chromatograms of chromatographic fractions of white asparagus extract by ion exchange resins. For marks A-I and A-II, see Fig. 2 and "Experimental".

脂クロマトグラフィーをくりかえしてもこの吸収を除くことはできなかった。また、A-IおよびA-I-2にはほぼシステイン酸の位置に440nmの波長の高い鋭い吸収が認められた。また、A-IIIはグルタミンあるいはグルタミン酸を主ピークとして、440nmの波長の高い吸収が2,3とグリシンの位置に小さい吸収。A-IVでは主ピークのグルタミン酸の他に、グリシンおよびアラニンの位置に小さな吸収が認められた他は、殆んど特徴的な差異がなかった(第5図)。

3・5 各画分のペーパークロマトグラフィー
A-II, A-II-1, A-II-2のおよびこれらの加水分解物のペーパークロマトグラムを第6図に示した。A-IIおよびA-II-2は標品のグルタミン酸と一致するRf値0.25のスポットおよびRf値0.1, 0.2にニンヒドリン陽性

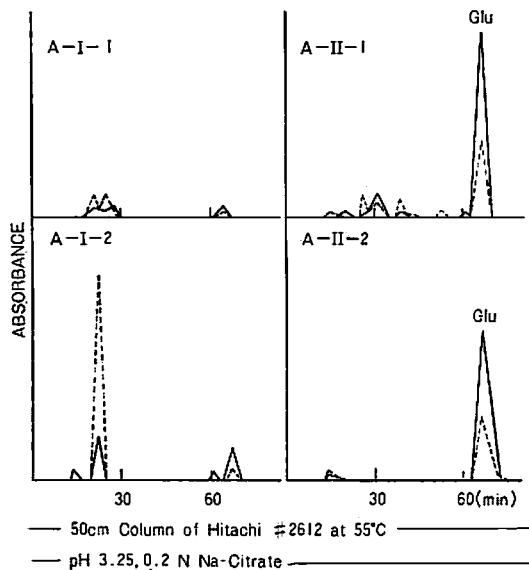


Fig. 4 c Chromatograms of chromatographic fractions of white asparagus extract by ion exchange resins. For marks A-I-1, A-I-2, A-II-1 and A-II-2, see Fig. 2 and "Experimental".

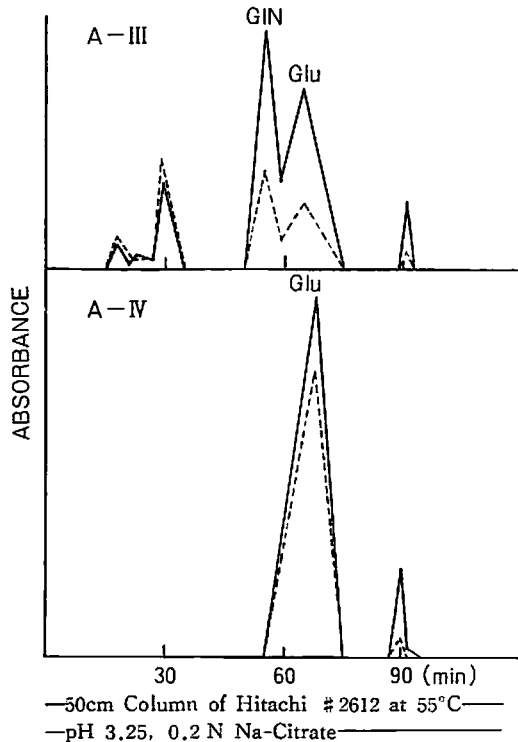


Fig. 5 Chromatograms of partial hydrolyzate of "A-II" For marks A-III and A-IV, see Fig. 3 and "Experimental".

のスポットを与えたが、A-II-1は殆んど陰性であった。A-II, A-II-1およびA-II-2の加水分解物ではいずれも新しくグルタミン酸に一致するスポットを発現した。BCG発色による有機酸の検出では、A-II, A-II-2およびこれらの加水分解物はグルタミン酸の位置とほぼ重なるRf値0.24のスポットを与えた。A-IIおよびA-II-2のRf値0.65の

スポットは、加水分解で消失し、新しくA-IIの加水分解物はRf値0.55と0.45のスポットを、A-II-2の加水分解物はRf値0.55のスポットを生じた。なおRf値0.45は標品のクエン酸に一致した。また、A-II-1はBCG陰性であったが、この加水分解物ではRf値0.24のスポットを新しく生じた。

A-IIの部分加水分解物のペーパークロマトグラムでは、A-IIIは標品の酒石酸およびクエン酸に一致するスポットとRf値0.60, 0.43のスポットを、A-IVは酒石酸にほぼ一致するRf値0.39のスポットを与えた。アニリン・水素・フタル酸塩による糖の検出では、A-IのみがRf値0.47のガラクトースよりやや低いRf値0.43のスポ

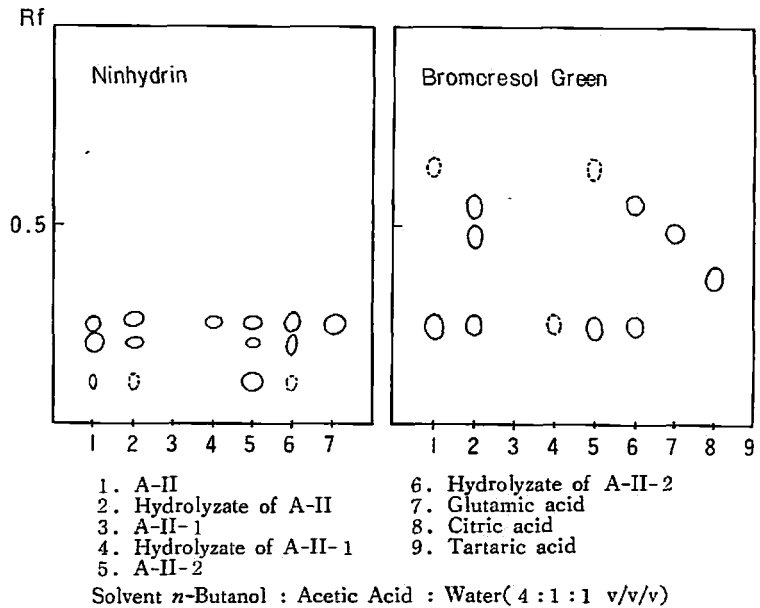


Fig. 6 Paper chromatograms of fractions of white asparagus extract with ion exchange separation and those hydrolyzates. For marks A-II, A-II-1 and A-II-2, see Fig. 2 and "Experimental".

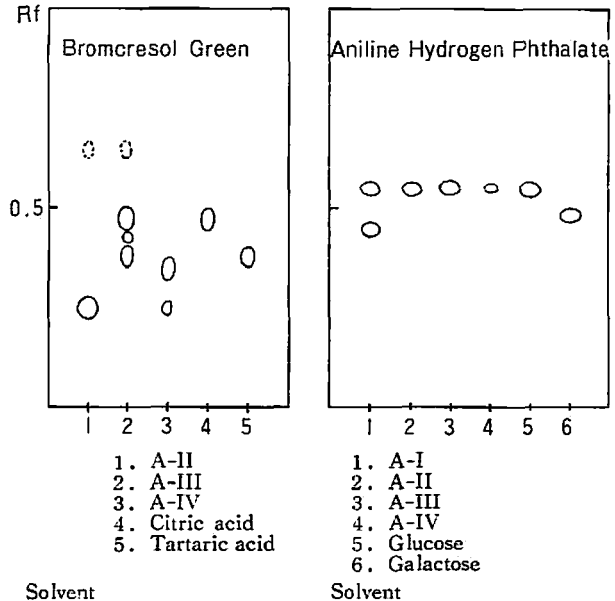


Fig. 7 Paper chromatograms of partial hydrolyzate of fraction "A-II" with ion exchange separation. For marks A-I, A-II, A-III and A-IV, see Fig. 2, Fig. 3 and "Experimental".

ットを示した他は、各画分ともにグルコースに一致する Rf 値0.55のスポットが認められた（第7図）。

4. 考 察

従来、シスチンやシステインは缶内面の腐食因子および黒変因子として格好のモデル物質とされているが、日立液体クロマトグラフィー装置 034 型を用いた遊離アミノ酸の分析の上からは、これらの関与は考えられない。

ホワイトアスパラガスのエキスについてイオン交換樹脂を用いて分画を行ない、各画分の缶内面腐食性をみたところ、腐食および黒変は Dowex 50W×8 (H⁺ 型) に吸着しない画分 A に著しく、さらに Amberlite I R-45 (OH⁻ 型) に吸着した酸性区分 A-II の方により一層顕著であるが、A は元来、遊離のシスチンやシステインなどの中・酸性アミノ酸を含まない画分であるから、アスパラガスの腐食および黒変については遊離のシスチンやシステイン以外の含硫化合物が関与していると考えられる。

A-I に存在する腐食因子は、エーテルに溶出されにくく、A-I-2 に残存する。一方、A-II の腐食因子は容易にエーテルに溶出されるが、このエーテル可溶部 A-II-1 は長時間のエーテル抽出にもかかわらず、ペーパークロマトグラム上では有機酸は検出されなかった。このことは A-II-1 に存在する腐食因子は、遊離の有機酸とは異なった酸性物質からなることを示唆している。また、これらの酸性区分では、無機酸特に硝酸イオンの存在が懸念されたが、ジフェニルベンジジン法¹⁰⁾による硝酸イオンの定性反応の結果は、ほぼ陰性であって、アスパラガスの腐食に関しては硝酸イオンは主因子とは考えられない。

各画分の液体クロマトグラム上にグルタミンあるいはグルタミン酸に一致する吸収や加水分解あるいは部分加水分解した際のペーパークロマトグラム上にグルタミン酸、酒石酸およびクエン酸などのスポットを与えたが、これらのグルタミン酸、クエン酸および酒石酸は原料中に遊離した形で存在しているのではなく、グルタミン酸および有機酸が何らかの化学的結合をした有機化合物が存在して、ゆるやかな部分加水分解の条件で切断され、ペーパークロマトグラムあるいは液体クロマトグラム上で検出されたと考えられる。

5. 要 約

1. ホワイトアスパラガスのエキス中の腐食因子および黒変因子は、陽イオン交換樹脂に吸着されないで、陰イオン交換樹脂に吸着する区分に大部分が存在する。陰イオン交換樹脂に吸着しない1部の腐食因子はエーテルには溶けない。陰イオン交換樹脂に吸着する腐食因子および1部の黒変因子はエーテルにかなり溶け出す。

2. 陰イオン交換樹脂に吸着したこの酸性区分は、ゆるやかな条件の部分加水分解で、容易にグルタミン酸、酒石酸およびクエン酸などを遊離する。

3. アスパラガスの缶内面腐食因子（スズ溶出型の腐食因子および黒変因子）は既知のいわゆる

“腐食因子”，遊離のシスチンやシステイン，有機酸，硝酸塩あるいはアントシアニン色素などではなく，また，単一な物質でもないと考えられる。腐食因子のうち，少なくとも1つはグルタミン酸，有機酸あるいは炭水化物がゆるやかに結合した化合物であると考えられる。

終わりにのぞみ，試料を提供下さいました新海アスパラガス株式会社および東洋食品研究所農場の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) Bryan, J. M. : D. S. I. R. Food Invest. Board, Ann. Report p. 185 (1936).
- 2) Dickinson, D. : Bristol Univ. Fruits & Vegetable Preservation Research Station, Ann. Report, Campden (1946).
- 3) Morris, T. N. and Bryan, J. M. : D. S. I. R. Food Invest. Board, Spec. Report, No 40, London (1931)
- 4) Kohman, E. F. : Canning Age, 6, 19 (1925)
- 5) Culpepper, C. W. and Caldwell, J. J. : J. Agr. Res., 35, (2), 107 (1927).
- 6) Cheftel, H., Monvoisin, J. and Swirski, M. : J. Sci. Food Agr., 6, 652 (1955).
- 7) Culpepper, C. W. and Moon, H. H. : Canning Age, 9, 619 (1928).
- 8) 堀尾嘉友, 岩本喜伴, 小田久三 : 食衛誌, 6, 353 (1965).
- 9) 岩本喜伴, 宮崎正則, 国里進三, 前田秀子, 堀尾嘉友, 本誌, 8, 30 (1968).
- 10) 山田紀作, 田中瑞穂 : 缶詰時報, 37, (10), 72 (1958).
- 11) Hernandez, H. H. and Vosti, D. C. : Food Technol., 17, (1), 95 (1963).
- 12) 坂村貞雄, 小幡弥太郎 : 缶詰時報, 45, (3), 129 (1966).
- 13) Dame, C. Jr. : Food Res., 24, 28 (1959).
- 14) 大塚滋, 岩本喜伴, 下田吉夫, 毛利威徳, 青山延子 : 缶詰時報, 41, (9), 18 (1962).
- 15) 森光国, 鈴木健, 河原伸江 : 缶詰時報, 48, 760 (1969).
- 16) 堀尾嘉友, 吉田千恵子 : 食衛誌, 13, 376 (1972).
- 17) 坂村貞雄, 小幡弥太郎 : 日農化会誌 31, 585 (1957).
- 18) 波多野博行 : アミノ酸自動分析法, (化学同人), p. 59 (1964).
- 19) 岩本喜伴, 宮崎正則, 国里進三, 前田秀子 : 日食品工会誌, 15, 265 (1968).