

琉球大学学術リポジトリ

甘蔗赤腐病に関与する色素群の研究(第1報): 赤変現象について(農芸化学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 外間, 宏一, Hokama, Koichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4485

甘蔗赤腐病に關与する色素群の研究 (第1報)

赤変現象について

外 間 宏 一*

Koichi HOKAMA : Studies on pigments related to sugarcane red rot
Part I The reddening

I 緒 言

甘蔗は沖縄、ハワイ、キューバ、台湾などで広く栽培され、沖縄においては、糖業はいくつかの基幹産業のうち、最も重要な地位を占めている。したがって、その原料である甘蔗中に起る諸現象について、関心を抱くのは当然である。

甘蔗の切断面を空气中に放置すれば、2~3日間で赤変することはよく知られた現象である。ペーパークロマトグラフィーによって、この赤色物質を分離してみると、赤色、褐色、黄色等いろいろの色素の混合物であることが確認されたので、甘蔗切断面に起る呈色現象は、広義の意味では、褐変現象と称し、また、肉眼的には赤色を呈しているので、狭義の意味では、赤変現象と呼ぶのが妥当であろう。以下本研究では、後者の用語を用いて表現することにする。

従来、リンゴの褐変現象(10, 11)、ジャガイモの褐変現象(8)のような酵素的褐変、柑橘果汁の褐変現象(5, 6)のような非酵素的褐変など、植物食品の褐変に関する研究は数多く報告されている。また、甘蔗汁の酵素作用による褐変(7)については報告があるが、甘蔗の赤腐病の赤変機構については、ほとんど化学的解明がなされていない。Edgerton (2)によれば、赤腐病は、茎部の昆虫による喰傷、成長期のひびわれなどから、赤腐病菌 (*Phycolodpora tucumanensis*) が汚染することによって、発生し、昆虫の代表的なものは甘蔗の表面から内部へ深く穴をあける *Diatraea saccharalis* であるとのことである。筆者は甘蔗切断面の赤変現象(人為的赤腐病)に関心を持ち、主として、微生物による赤変、化学反応による赤変および赤変物質の単離と化学構造の決定を研究目標にしているが、微生物による赤変現象について、ある程度の知見をえたので、報告したい。

II 実験方法および実験結果

1 温度による発現状況

1) 低温保存における甘蔗切断面の変化 冷蔵庫の上段(フリーザー)、中段、下段に試料をあらかじめ乾熱滅菌した綿栓試験管に入れて保存し、24時間後に、取りだして室温に放置して、赤変の発現を

* 琉球大学農学部農芸化学科

観察した。その結果、上段は -10°C で発現しなかったが、中段は 4°C 、下段は 7°C で発現した。

2) 加熱処理による赤色発現の変化 試料甘蔗を 45°C 、 50°C 、 55°C 、 60°C 、 65°C の温水中にそれぞれ5分間浸漬した後、とりだしてシャーレーに入れ、室内に放置し、赤変がおこなうかどうかを観察した。その結果、3日目に 45°C 処理のものに赤変が僅かに認められた。5日目には 45°C 処理の試料は完全に赤変し、 50°C 、 55°C 処理のものにも、僅かに、赤変が認められた。 60°C 処理の試料は赤変現象が最後まで認められなかった。

2 水分との関係

試料を乾燥剤 (CaCl_2) を入れたデシケーター中に入れたもの、水分をふくませたガーゼに包みこんだもの、無処理のもの、それぞれのについて、赤変の発現を観察した。その結果、デシケーター中に入れたものは発現しなかった。ガーゼに包みこんだものは対照に比して、赤変の発現が促進された。試料を環切りにしたもの (高さ約 3cm) を半分位水を入れたシャーレーに直立させ、室内に5日間放置した。その結果、水に浸漬した部分は赤変しなかったが、大気中に露出した部分は対照程度ではなかったが、発現した。

3 無酸素状態における赤変現象

1) 水蒸気飽和デシケーター中における赤変、下図のように、試料を入れたシャーレーを底に水を入れたデシケーター中に放置し、数回減圧 (10mm-Hg) し、デシケーター内の空気を水蒸気で置換し、水蒸気で飽和した。5日間放置して、赤変現象が発現するかどうかを観察した。その結果、赤変現象は対照よりも促進された。(Fig. 1)

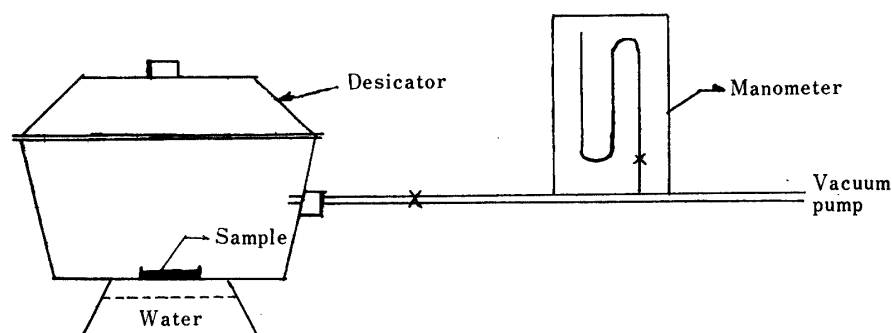


Fig. 1. Apparatus for saturating steam vapor

2) Nガス飽和デシケーター中における赤変 (1)の方法に準じて行い、Nガス飽和はNガスボンベより導入することによってなされた。その結果、赤変現象は対照と同程度に発現した。(Fig. 2)

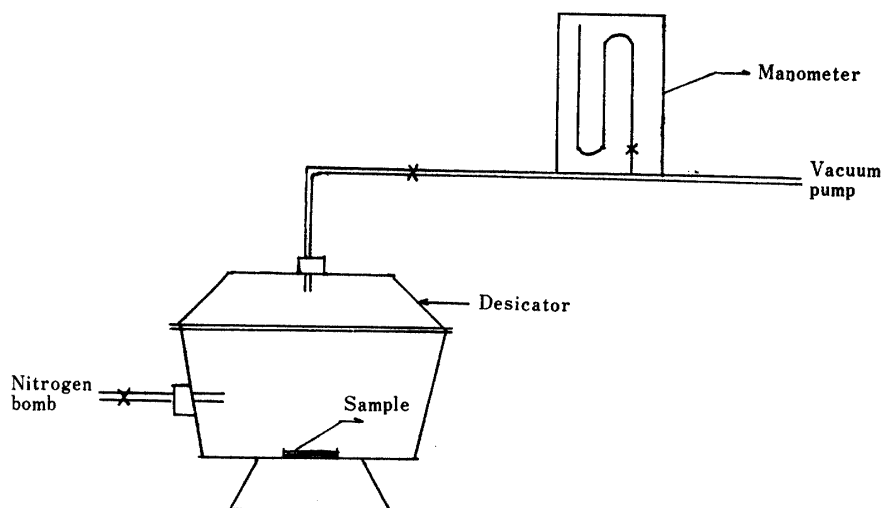


Fig. 2. Apparatus for saturating nitrogen gas

4 菌株の分離

赤変甘蔗を殺菌蒸留水 2 ml に入れよく振とうし、それを種用試料溶液として、甘蔗汁を培地として用いて扁平培養を行った結果、白い菌糸をもった糸状菌(B)と細菌様菌(A)それぞれ1種をえた。B菌は培地に浸透し、その部分を赤変させた。おそらく、*Phyalospora* 属の一種であろう。A菌はそれ自体のピンク色の美しいコロニーを形成した。またC菌として、琉球農業試験場所有の赤腐病菌 (*Phyalospora tucumanensis* Speg.) から分離した。A, B, C, それぞれの菌の呈色を調べるために、修正坂口、王培地(12)蔗糖 30 g を 150 g に修正) で扁平培養を行った結果B菌がC菌より呈色能がすぐれていた。A菌はコロニー形成がみられなかった。

5 自然発現とその他発現のペパークロマトグラフィーによる比較

A) 自然発現した甘蔗を 80°C で乾燥後、アルコールで抽出濃縮し、蒸留水を加えて懸濁し、除糖の目的で酢酸エチルでふって、一昼夜放置後、水層をすて、上層は塩化カルシウムで乾燥、濾過、減圧濃縮して、石油ベンジンを添加して沈澱せしめ、沈澱物は減圧乾燥後、メタノールに溶解して試料とした。

B) 黒糖色素をメタノールで浸漬抽出後、濃縮したもの。

C) 8節に準じて調製した水洗搾汁バガスを5%蔗糖で発現したものについて、(A)に準じて、試料液を調製した。

D) 鉍酸酸性によって赤変した甘蔗切片を充分水洗して除酸、除糖を行い、メタノールで抽出濾過して、濾液を 50°C で減圧蒸発乾固し、メタノールに溶解、遠沈して、上清を同条件下で蒸発乾固したものを更にメタノールに溶解したものを試料とした。

E) 鉍酸酸性によって赤変した甘蔗汁を除酸除糖の目的でブタノールとふり下層をすて、更に蒸留水と数回ふって一昼夜放置して上層をとり、硫酸ナトリウムで乾燥して、50°Cにて蒸発乾固したものをメタノールに溶解濾過して試料とした。

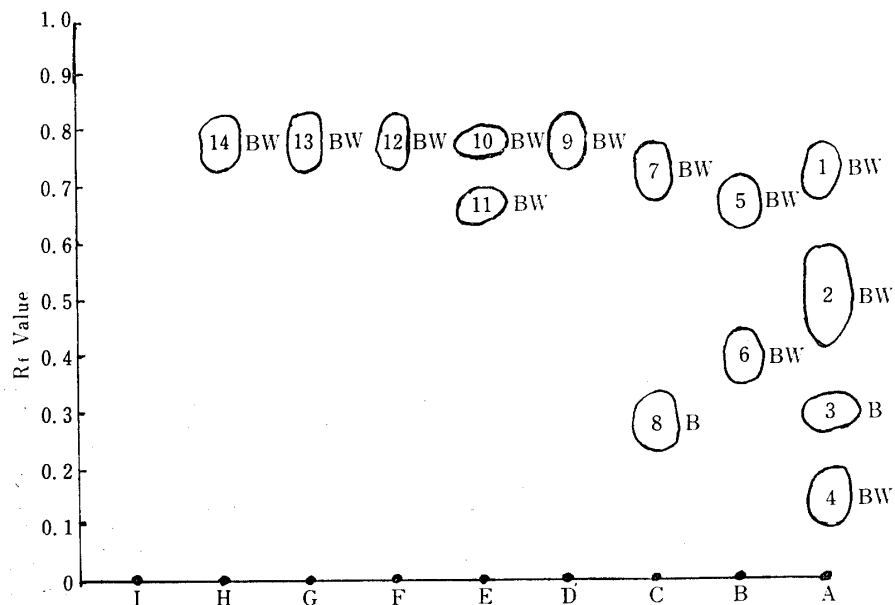
F) A菌を斜面培養したものをメタノールで抽出濃縮したもの。

G) B菌を修正坂口王培地を用いて、シャーレー内で8日間培養呈色させ、減圧濃縮後、メタノールで抽出したもので紫褐色を呈した。

H) B菌を Mayer (12)培地を用いて、シャーレー内で5日間培養呈色させ、減圧乾燥して、メタノールで抽出濃縮したもので、オレンジ色を呈した。

I) 除皮、除節した生甘蔗を減圧乾燥後、メタノールで抽出濃縮したもの。

濾紙は東洋濾紙 No. 50を用いて、(A)―(I)までの試料をスポットして、3種の溶媒 (AcOH・H₂O (1:1) (Fig. 3), AcOH・H₂O (1:3) (Fig. 4), BuOH・AcOH・H₂O (4:1:2) (Fig. 5) で展開し、紫外線下の螢光色によって、スポットの位置を判断した。



Various factors of red change

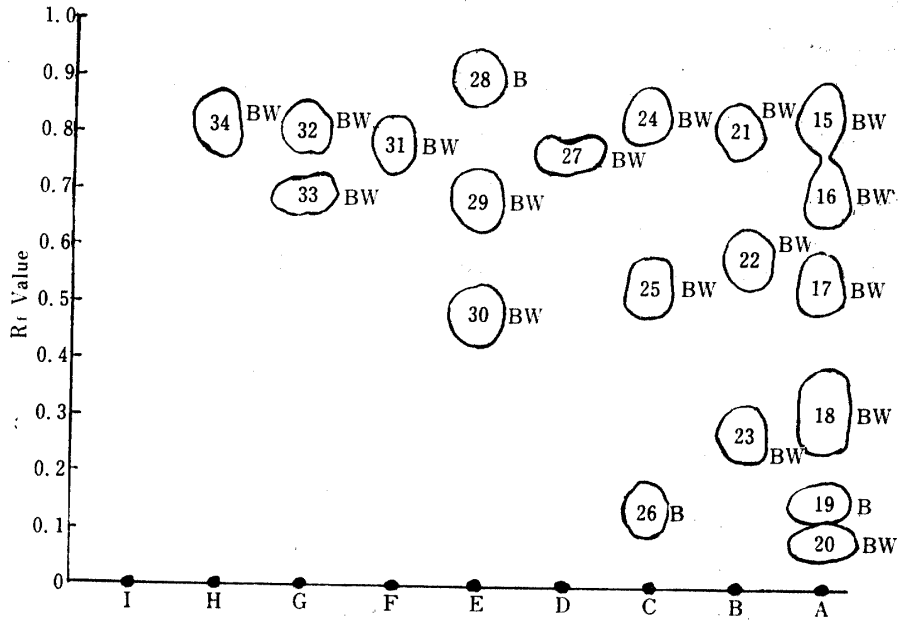
Fig. 3. Paperchromatographic relationships between natural red change and others in a solvent system AcOH · H₂O (1 : 1)

6 自然発現における諸現象

1) 吸収スペクトル測定 (Hitachi Perkin Elmer 器使用, 以下同じ) 下記検量線測定用 10倍液を使用した。λ_{max}は 280mμにあった (Fig. 6)。

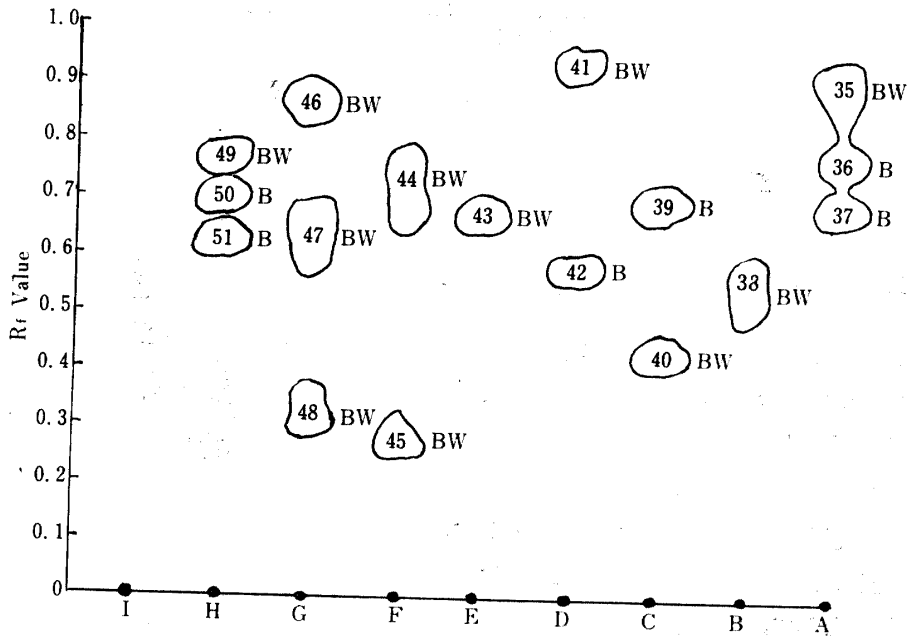
2) 検量線作成 上節(A)項に準じて調製した試料 0.0477gをメタノールに溶解して100ccとし, 280mμで測定した (Fig. 7)。

3) 糖濃度, 色素濃度および pHの相対的關係 直径15cmシャーレーの中央に, 蒸発水分を補充するために, 直径7cmのシャーレーに水を入れたものを置き, その周囲に除皮, 除節した細断甘蔗35gを



Various factors of red change

Fig. 4. Paperchromatographic relationships between natural red change and others in a solvent system $\text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1 : 3)



Various factors of red change

Fig. 5. Paperchromatographic relationships between natural red change and others in a solvent system $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 2)
 note : Fluorescence under U.V. — BW (Blue white) , B (Brown)

一様に広げて、30°Cで孵卵器中に保存発現させ（水分80%）、糖濃度、色素濃度およびpHの経時的変化を調べた（Fig. 8）。

糖定量 Fehling Soxhlet 液 (13) による。以下同じ。試料5gを乳針で粉碎し、蒸留水で抽出して60ccとなし、還元糖および総糖分の定量に供した。

吸光度 80°Cで2時間乾燥した試料1gをメタノール10ccで24時間浸漬抽出した後、遠沈したものを試料とし、280m μ で測定した。

4) pH 試験紙によった（以下同じ）。最高は5.8、最低は2.8であった。

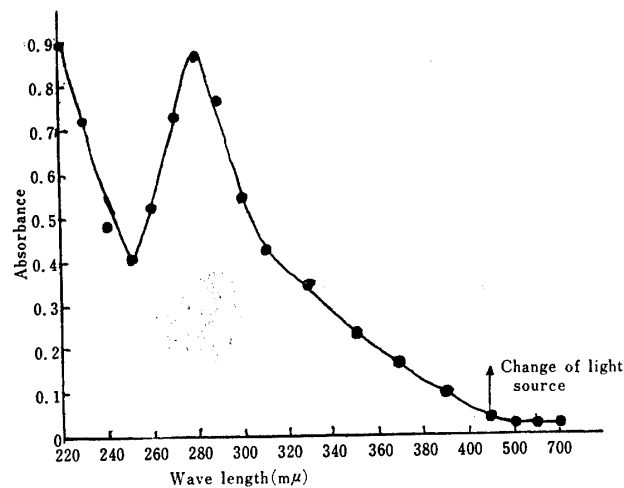


Fig. 6. Absorption spectrum of pigment involved in natural red change

7 人為発現における諸現象

1) 吸収スペクトル測定 上節(c)項に準じて調製した試料0.0043gをメタノールに溶解して、50ccにしたものを用いた。 λ_{max} は290m μ にあった（Fig. 9）。

2) 検量線作成 上記試料をそのまま用いて、290m μ で測定した（Fig. 10）。

3) 糖濃度、色素濃度およびpHの相対的關係 5%濃度の蔗糖溶液500ccに、上節(c)項に準じて調製したバカス50gを30分間浸漬し、充分水切りして、蒸発水分を補充するために、中央に水を入れた小シヤーレーをおいた径15cmシヤーレー中に均一に広げて、30°Cで孵卵器中に放置発現したもの（水分88.5%）を試料として、糖濃度色素濃度およびpHの経時的変化を調べた（Fig. 11）。

糖定量 試料5gを蒸留水で抽出して50ccとなし、還元糖および総糖分の定量に供した。

吸光度 試料1gを減圧乾燥して、メタノールで抽出して10ccにしたものを試料とし、290m μ で測定した。

4) pH 最高は6.0、最低は2.6であった。

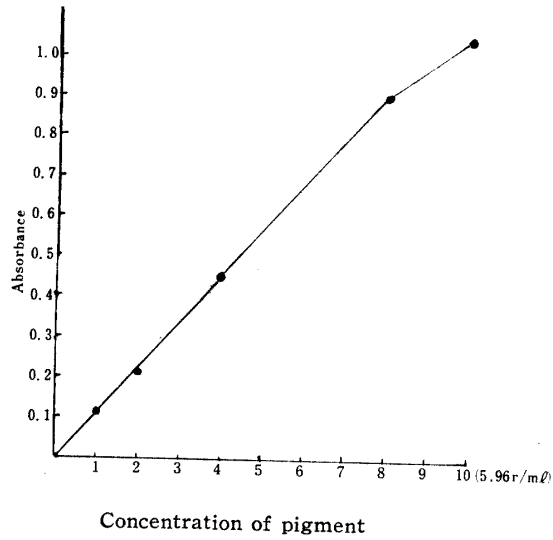


Fig. 7. Calibration curve of pigment involved in natural red change ($280m\mu$)

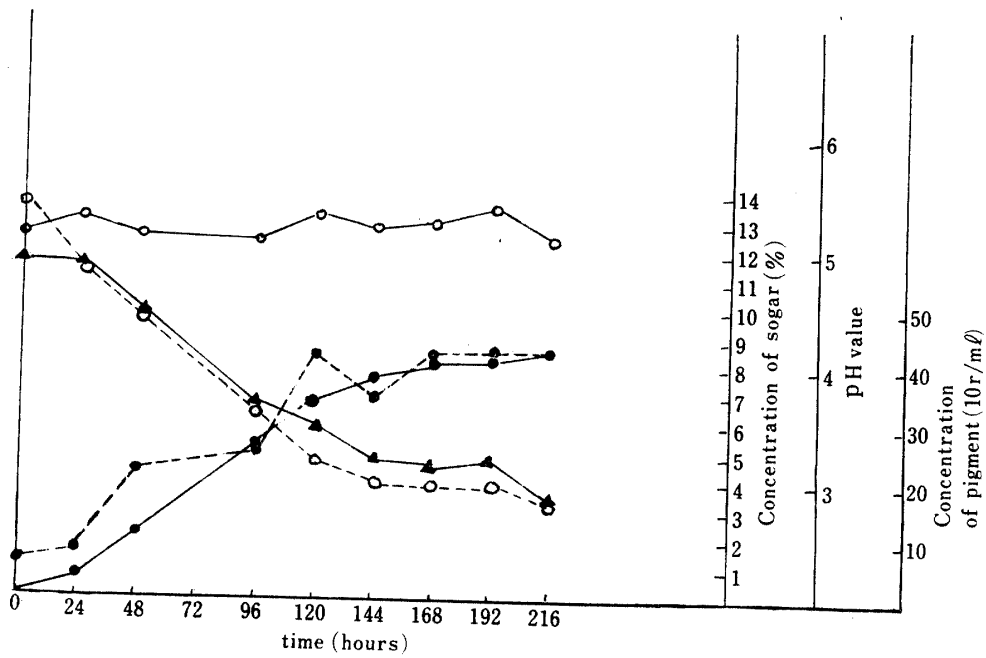


Fig. 8. changes of pigment and sugar concentration and pH value with time in natural red change

○—○: total sugar; ●—●: reducing sugar;
 ▲—▲: sucrose; ○····○: pH; ●····●: pigments

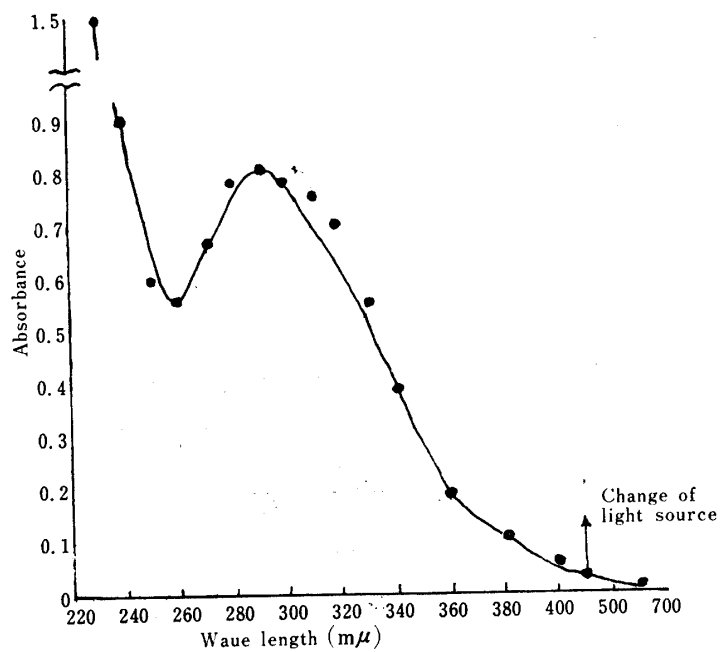


Fig. 9. Absorption spectrum of pigment involved in artificial red change

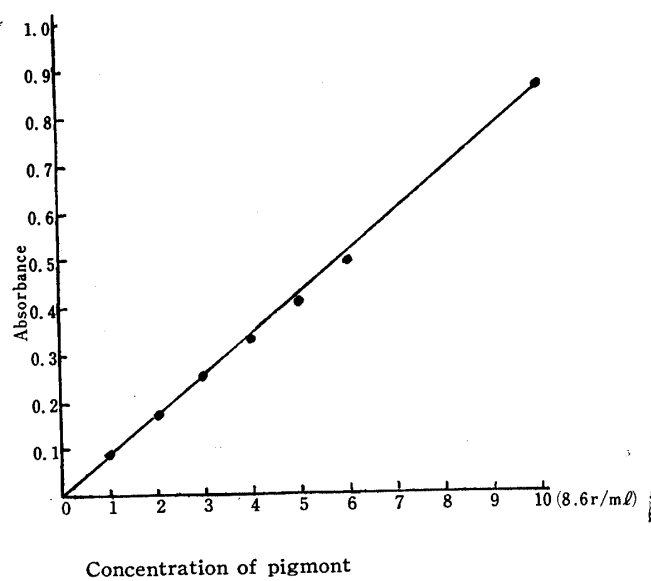


Fig. 10. Calibration curve of pigment involved in artificial red Change (290mμ)

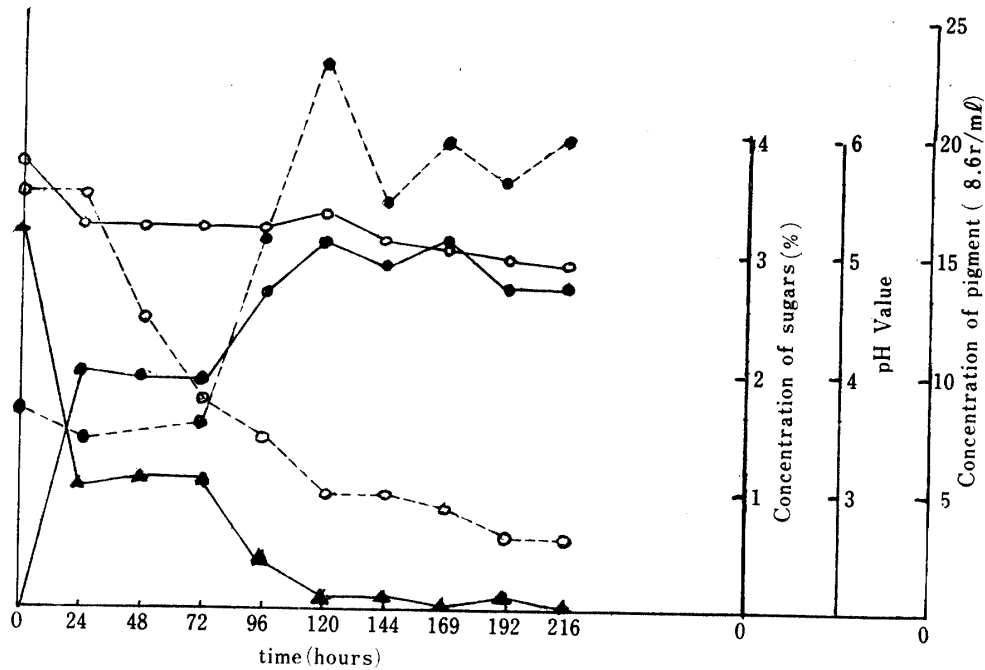


Fig. 11. Changes of pigment and sugar concentration and pH value with time in artificial red change

○—○: total sugar; ●—●: reducing sugar;
 ▲—▲: sucrose; ○··○: pH; ●··●: pigment

8 各糖濃度による人為發現

除皮，除節した甘蔗をミキサーでホモジナイズして，除糖の目的で充分水洗した後，搾汁したバガス（水分83.5%）を下図のように，各濃度の糖液15ccに30分間浸漬し，水切りして 30°Cで孵卵器中に6日間放置發現したものについて，蔗糖，葡萄糖および果糖の3種の糖について糖濃度と色素濃度との關係を検量線から求めた（Fig. 12）。

III 考 察

甘蔗赤腐病にともなう赤変現象は，下記の事実からは，大氣中あるいは甘蔗自体に生息する赤腐病菌による以外に，甘蔗組織中に存在する高温は勿論低温でも失活する酵素作用の影響にも起因し，かつ表面水分の組成と密接な關係があるように推察される。

1) 一般的に糸状菌，酵母および細菌等の微生物は冷蔵庫等による低温保存によって，その生殖機能および酵素活性を低下させることなく維持できるが，赤腐病とともに起こる赤変は低温においてはその活性が低く，-10°Cに保存したものは再び大氣中に出出して放置しても，發現しなかった。

2) 60°C以上に加温処理したものは發現しなかった。

3) 減圧乾燥した試料は勿論，吸水して元の状態に戻しても發現しなかった。

4) 物理的処理，たとえば圧搾，乳鉄処理したものは褐変はしたが，赤変しなかった。

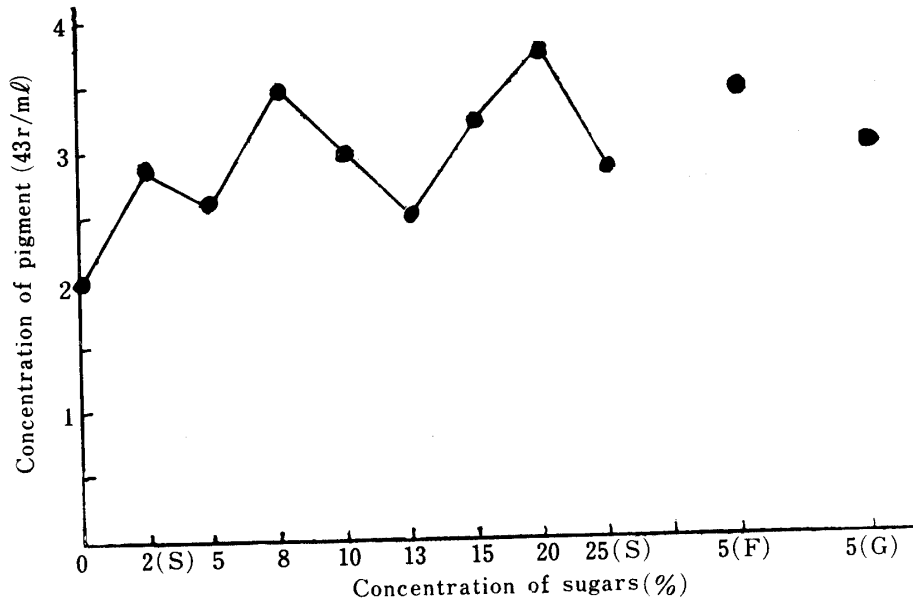


Fig. 12. Changes of Concentration of pigment accompanied with that of sugars in artificial red change

2 (s) —25 (s) ...Sucrose; F...Fructose; G...Glucose

- Notes (1) Natural red change (A in Fig. 4, 5, 6) is a phenomenon in which red change occurs in sugarcane cut.
 (2) Artificial red change (C in Fig. 4, 5, 6) is a phenomenon in which red change occurs when sugar solution is added to the bagasses washed to remove natural sugar.

窒素気流中でも発現することから、赤腐病菌は酸素の有無に関係なく生息し、すなわち通性嫌気性菌に属しているように思われ、赤腐病が甘蔗組織の内部深くまで浸透しているのをよく見受けると矛盾しない。当研究室で分離した2つの菌(A, B)が赤腐病に関与する菌であるとするならば、第3, 4, 5図に示されたペパークロマトグラム上ではこれ等の菌に起因すると断定できる色素が確認されるべきなのに、発見することができなかった。それらのことをあわせて、自然発現によって生産された色素群中に占める既述の8項目の要因によって生産される色素の位置づけを分離能の最もよい第4図を基準にして、ペパークロマトグラム上で検討してみなさい。

(B)を要因の中に加えた理由は、蔗糖は200°C付近でカラメル化、すなわち暗着色の物質(9)を生成するので、カラメル成分色素が甘蔗の赤変に関与しているのではないかと思われたからである。甘蔗汁は約0.2%の塩素を含み(1)かつpH 5.6位の微酸性を呈しているの、なんらかの形でH⁺とCl⁻が反応して、塩酸が生成される可能性があること、および糖類は鉍酸が存在すると、フェノール類やアミン類と反応して赤~黄に呈色することが知られていること(9)から考察して、塩酸が甘蔗の赤変に関与していることが考えられる。(D), (E)を要因の中に加えた理由は以上の理由によるものである。

順位1の No. 26 スポットは第3図、第4図および第5図において、クロマトグラム上の色調およびRf値ともに一致し、自然発現における No. 19 スポットは要因Cに起因するものであると断定してよい。順位2の No. 27 スポットはRf値はほとんど一致しているが、色調が他より強烈であること、

順位3の No. 32 スポットと順位4の No. 34, 31の両スポットは、Rf 値にかなりの相違があることおよび上記4スポットとも No. 15~16 スポットの位置に集中していること、それらのことをまとめて考察すると、いずれのスポットも対応成分であることは同定し難い。

Table 1. Identification of the pigments shown in Fig. 3, 4 and 5

Order of identification	Spot No. in A in Fig. 4	Identified spot No. in Fig. 4	Identification in others
1	19 (0.15)	26 (0.14)	Fig. 3 : 8 (0.38) → 3 (0.40) Fig. 5 : 39 (0.70) → 37 (0.70)
2	15~16 (0.84~0.71)	27 (0.77)	Fig. 3 : 9 (0.87) → 1 (0.83) Fig. 5 : 41 (0.95) → 35 (0.93)
3	15~16 (0.84~0.71)	32 (0.81)	Fig. 3 : 13 (0.80) → 1 (0.83) Fig. 5 : 45 (0.87) → 35 (0.93)
4	15~16 (0.84~0.71)	34 (0.81)	Fig. 3 : 14 (0.8) → 1 (0.83) Fig. 5 : 49 (0.78) → 35 (0.93)
		31 (0.78)	Fig. 3 : 12 (0.89) → 1 (0.83) Fig. 5 : 44 (0.73) → 35 (0.93)

note : numers in parenthesis indicate Rf values.

自然発現と人為発現における諸実験においては、類似性を予想したのであるが、結果は下記のように、かなりの相違があった。すなわち、(1) 第4図のペーパークロマトグラムにおいて、前者は6個のスポットであるのに対し、後者は2個のスポットである。(2) 紫外吸収スペクトルにおいて、前者は230m μ にシャープな極大吸収を有しているのに対し、後者は290付近に幅広い吸収を有している。(3) 前者は酸分解液を中和した場合、pH4~5で褐色、pH5~7で紫色、強アルカリ性で褐色に呈色したが、後者は全く変色しなかった。

転化速度は第8図と第11図の比較から判断すると、後者が前者よりはるかに急激であった。たとえば後者は24時間で約35%も転化しているが、後者は殆んど転化していない。しかも前者が最終的に約35%転化しているのに対し、後者はほとんど100%転化している。以上のことから、人為的発現においては、分解力強力なインペルターゼを有する微生物が生育することが予想されるが、このことについては、更に検討を加える必要がある。もし、赤腐病が微生物によるものとすれば、アルコール発酵(3)や酵母の増殖(4)などのように、糖分が炭素源として、消費されることが予想されるのであるが、自然発現および人為発現のいずれの場合においても、総糖分は殆んど変化していないということは、今後の研究課題として、興味ある問題である。赤腐病における色素濃度と糖濃度との相対関係を人為発現の場合を例にとって考察したが、糖濃度の影響はほとんど認められなかった。

IV 要 約

1) 甘蔗赤腐病の発現には適当な水分と少量の水分が必要であったが、酸素の有無にはほとんど無関係であった。

- 2) 発病甘蔗から赤色の色素を分泌する糸状菌とそれ自体ピンク色を呈している細菌様菌それぞれ1種を分離した。
- 3) 欠糖バカスを蔗糖液で処理して赤変させた人為発現においては、強力な蔗糖分解酵素を生産する微生物が生育するように思われた。
- 4) 赤腐病に関与している色素は、*Physalopora* 菌だけでなく、その他いろいろの要因によって生じた色素の集合体であるように思われた。
- 5) 赤腐病進行中、色素濃度の上昇、pHの低下にかかわらず、糖分低下の現象はほとんどみられなかった。

参 考 文 献

- 1) Binkley, Wendell W., and Wolfrom, Melville 1953 Composition of cane juice and cane final molasses p. 11
- 2) Edgerton, Claude W, 1958 Sugarcane and its diseases p. 80
- 3) 外間宏一 1962 泡盛醗酵期間中における還元性糖類消費に関する研究
琉大農学報 9 : 214 ~ 218
- 4) 外間宏一, 宮城好弘 1967 糖蜜培地における酵母の増殖と糖消費について
琉大農学報 14 : 156 ~ 159
- 5) 今井 寛, 酒井宏美, 藤谷 健, 大西隆三 1957 柑橘果汁の褐変に関する研究 (第1報) 夏橙濃縮果汁の褐変について
農化 31 : 161 ~ 165
- 6) —, —, —, — 1957 — (第2報) 褐変に関与する物質について
農化 31 : 165 ~ 168
- 7) 井上憲正 1952 総合酵素化学 p. 181
- 8) 小幡弥太郎, 坂村貞雄 1953 馬鈴薯の変色成分の分離確認 (食品の褐変に関する研究 第5報) 農化 27 : 766
- 9) 三日会輪講会訳編 Honig 製糖化学汎論 第二卷, pp. 399
- 10) 中林敏郎 1953 林橘果肉の褐変現象 (其の1) 農化 27 : 813 ~ 818
- 11) — 1954 — (其の2) 農化 28 : 212
- 12) 東大農化 1970 実験農芸化学 (上)
- 13) 友田宜孝, 工藤憲資, 玉置弥栄 1958 炭水化物実験法 p. 42

Summary

- (1) Sufficient moisture and a small amount of sugar were essential for the occurrence of the red rot disease but little oxygen.
- (2) One strain of fungus which secreted red pigments and one pinkish bacteriallike germ were separated from the infected sugarcane respectively.
- (3) Germs which secreted strongly active invertase seemed to occur in the red pigments which were artificially caused by the addition of sugar solution to the washed bagasses.

-
- (4) It seemed that the red pigments involved in the red rot disease were caused by not only fungus *physalospora tucummanensis* but also such various other factors as shown in Fig. 3,4 and 5.
 - (5) When the red rot disease advanced, the concentration of the red pigments increaed but pH value decreased, meantime sugar was little consumed.