

# パンダン葉中における2-アセチル-1-ピロリンの生合成

村橋鮎美・田中直義

## Biosynthesis of 2-Acetyl-1-pyrroline in Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) Leaf

Ayumi MURAHASHI and Tadayoshi TANAKA

The leaf of Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) was cultivated to the culture solution including sugar and amino acid. 2-Acetyl-1-pyrroline (2-AP) was analyzed in Pandan leaf extract by gas-chromatograph with FTD (NPD). Much 2-AP was synthesized from sucrose, when glucose was used. In using proline as an amino acid, the most abounding 2-AP was synthesized. 2-AP contents in each part was compared by the division of the Pandan leaf in four. 2-AP contents in top of leaf rose most, and concentration rose to about 30ppm. From these results, following fact was clarified : (a) proline is a precursor of 2-AP in Pandan leaf, (b) Pandan is a suitable plant to examine 2-AP biosynthetic pathway.

キーワード : 2-acetyl-1-pyrroline, biosynthesis, Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) leaf, proline

### I 緒 言

パンダン *Pandanus amaryllifolius* は東南アジアの各地で栽培され、ポップコーン様の臭いを食品に添加する目的で使用されている植物である。例えば、タイ、カンボジア、ベトナムではバイトーイと称され、その搾り汁が菓子類、飴類、またいくつかの調理品を作る際に着香料として使用されている。この植物葉に含まれるポップコーン様の臭い物質は2-アセチル-1-ピロリン (以下、2-AP) であることが同定されている<sup>1)</sup>。2-APは強いポップコーン様の香りを持つ物質であり、パンダン以外にも、バン<sup>2)</sup>、醃酵ココア<sup>3)</sup>、トウジンビエ<sup>4)</sup>、香り米<sup>5, 6)</sup>、茶豆 (大豆)<sup>7)</sup>、ポップコーン<sup>8)</sup> などの食物や植物体中から検出されている。この物質は臭い閾値が非常に小さく<sup>6)</sup> 1 ppb 以下であるためにその含有量は非常に少なく、ほとんどの食品において 1 ppm 以下のレベルである。

2-APは存在量が少ないためその生合成の過程は完全に明らかにされておらず、ピロリン環がプロリン由来であることが、安定同位体の窒素を含むプロリンを作用させた香り米<sup>9)</sup>、ココア<sup>3)</sup>の分析から明らかにされている。本報告においては、パンダンにおいてもプロリンが2-APの前駆物質であることを明らかにするとともに、パンダンが高濃度の2-APを含むことから生合成経路を検討するために適した植物であることを示す。

### II 方 法

#### 1. 試料および試薬

パンダン葉は東京都内のタイ食材専門店で購入した。この店は毎週月曜日にタイから冷蔵状態で新鮮なパンダン葉を空輸しているため、火曜日に購入することとした。購入した葉は長さ30~40cm、幅約3cmであった。購入後は4℃の冷蔵庫中に保存した。

2-AP 標品は、Buttery の方法<sup>5)</sup> により、2-アセチルピロールから合成し、分取ガスクロマトグラフィー (GC) により精製した。合成直後にメタノールで希釈後、ガラスアンプル中に封入し、冷凍庫に保存して標準溶液とした。合成の確認はマススペクトルにより行った。

他の試薬は、シグマアルドリッチジャパン(株)、和光純薬工業(株)、東京化成工業(株)の製品を使用した。なお、アミノ酸は全てL-型を使用した。

## 2. パンダンの生育方法

蒸留水に防腐剤として、ストレプトマイシン、ペニシリン、シクロヘキサミドを濃度が200ppm、ナイスタチンの濃度が20ppm になるように溶かした溶液100ml (以下、培養液) を入れた200ml コニカルピーカーへパンダン葉を挿し、日中太陽光の当たる室内に放置した。パンダンは、根元方向が下になるように溶液へ挿し、5日間放置した。

糖およびアミノ酸は培養液中に、糖添加の場合はグルコースまたはスクロースを濃度が10mM となるように、アミノ酸添加の場合は濃度が100mM となるように添加した。なお、アミノ酸はプロリン、グルタミン酸、アルギニン、ヒスチジン、セリン、バリンを使用した。

## 3. 分析用試料溶液の作製方法

パンダン葉にパンダン葉重量の4倍量の蒸留水を加えてワーリングブレンダーにかけ均一にした後、ガーゼで濾過することにより繊維を除去し、パンダン抽出液を得た。

4ml バイアルに、パンダン抽出液3.0ml、無水炭酸ナトリウム150~155mg、内部標準として2-アセチルピロールの1,000ppm アセトン溶液を3.0 $\mu$ l、ジエチルエーテル0.5mlを入れてセプタムをかぶせ、キャップをして2分間振った。これを遠心分離機により3,000~3,500rpm、10分間処理し、得られた上層のエーテル抽出液をガスクロマトグラフ用の分析溶液とした。

## 4. ガスクロマトグラフ (GC) の測定条件

島津製作所株式会社製ガスクロマトグラフ GC-14A を用い、検出器は FID と窒素化合物

に特異的に高感度である FTD (別名 NPD) を使用した。カラムは、DB-1 (内径0.53mm、長さ30m、膜厚5 $\mu$ m、J&W 社製) を使用し、カラム出口を分岐して1つを FID に、もう1つを FTD へ導いた。カラム温度を50℃から毎分4℃の割合で昇温させた。エーテル抽出液をマイクロシリンジで3.0 $\mu$ l 採取し、注入口温度250℃の GC へ注入した。ガスクロマトグラフは、805データステーション (ウォーターズ製) に保存し、解析した。ピークの同定は標品とのリテンション・インデックス (以下、RI) を比較することにより、同一のカラムを用いる同一の条件によるガスクロマトグラフ・マススペクトロメーター (以下、GCMS) (日本電子製) により行った。

## III 結 果

### 1. GC による2-AP の検出

本方法によりカラムとして DB-1 を使用した場合、2-AP の RI は892、2-アセチルピロールの RI は1028であった。Fig. 1 にエーテル抽出液のガスクロマトグラムを示したが、検出器として FTD を用いると溶媒ピークの影響もほとんど現れず、良好な結果が得られたので、FTD を検出器として用いることとした。パンダン抽出液に2-AP および2-アセチルピロールを添加した場合の回収率はいずれも92~95%であったので、2-AP の定量値は2-アセチルピロールのピーク面積値と比較することにより求めた。それぞれの測定は3回行った。同一の条件により GC および GCMS で詳細にピークの解析を行ったが、2-AP と同様のポップコーン様の臭いを有するとされている2-プロピオニル-1-ピロリン<sup>6)</sup> を検出することはできなかった。

### 2. 糖の種類による影響

培養液にグルコースまたはスクロースをそれぞれ単独で添加した場合と、それぞれの糖とともにプロリンを添加した場合、2-AP の定量値は培養液のみで生育させたパンダン葉に比べて、グルコースのみの場合はやや少なくなったが、

パンダン葉中における2-アセチル-1-ピロリンの生成

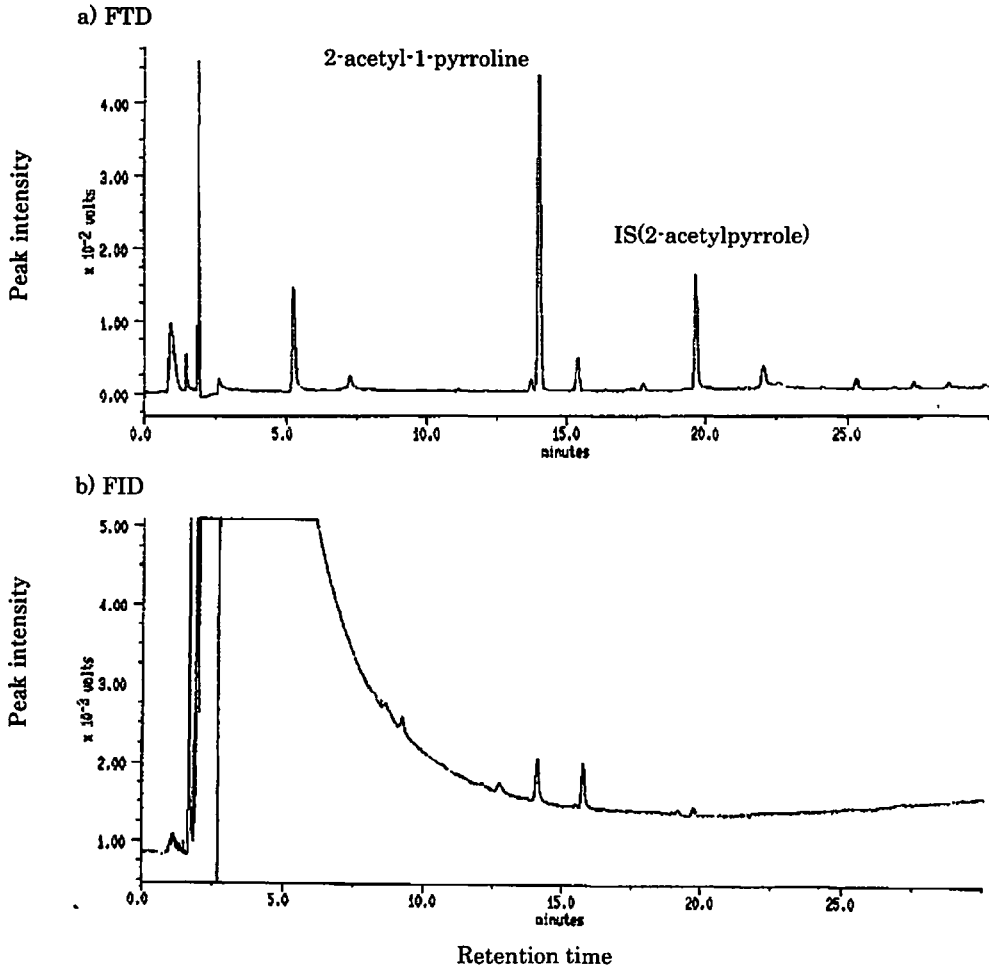


Fig. 1 Gas chromatogram of ether extract from Pandan leaf.

Column : DB-1 (0.53mm ID, 30m long, 5  $\mu$  m film thickness)  
Oven temperature : initial 50°C, program rate 4°C/min.  
Injection temperature : 250°C  
Detector temperature : 250°C  
Detector : a-FTD, b-FID

スクロースのみの場合はほぼ同じであった。糖とプロリンを同時に添加した培養液に挿した場合はいずれの糖においても大きくなったが、スクロースの方が少し大きくなった (Fig.2)。

なお、培養液にストレプトマイシン、ペニシリン、シクロヘキサミド、および、ナイスタチンを添加したが、これらの抗生物質を添加しないと培養液中に多量の細菌やカビが発生し、5

日間の培養は不可能であった。

### 3. アミノ酸の種類による影響

糖としてスクロースを培養液に添加し、これにそれぞれのアミノ酸を添加して培養させたパンダン葉中の2-APを定量した。その結果、スクロースとプロリンの共存する場合が最も値が大きくなった。グルタミン酸が共存する場合はやや大きくなったが、アルギニンが共存する場

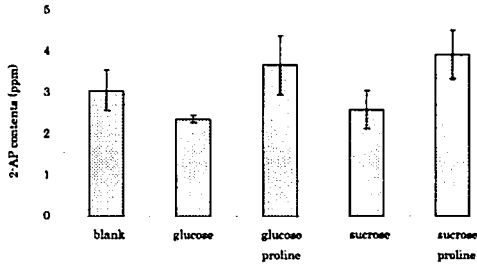


Fig. 2 Additional effect of sucrose and amino acid to culture solution

sugar : 10mM, L-proline : 100mM

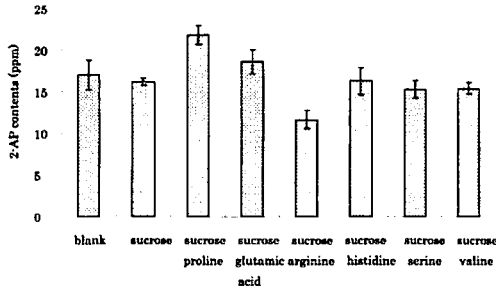


Fig. 3 Additional effect of sugar and proline to culture solution

sugar : 10mM, L-proline : 100mM

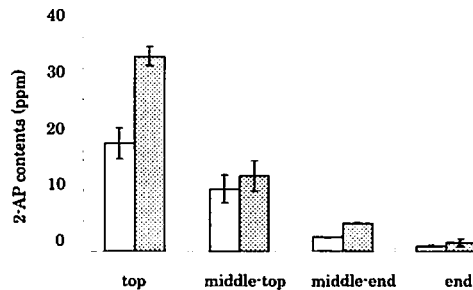


Fig. 4 Comparison between four part of Pandan leaf on 2-acetyl-1-pyrroline contents

□ : sucrose (10mM) only  
 ▨ : sucrose (10mM) and proline (100mM)

合は逆に小さくなった (Fig.3)。

#### 4. パندان葉の部位による比較

糖としてスクロースを、アミノ酸としてプロリンを添加した培養液で培養したパندانの葉を、葉先から根元の順に4等分した。それぞれの部位の葉に含まれる2-APを定量したところ、葉の先端がわの2-AP濃度が最も多くなり、最も少なかった根元がわの約10倍になった。また、それぞれの部位の値を比較すると、プロリンを培養液に添加した場合は、添加しなかった場合に比べていずれも約2倍の濃度になった (Fig.4)。

### IV 考 察

2-APはいくつかの食品において、その臭いの特徴付ける物質として知られている。しかし、臭い閾値が非常に小さい物質であるために官能的に存在することは明らかであっても、存在量が非常に少ないことからその分析は簡単ではなく、一般的には、試料から水蒸気蒸留と溶媒抽出の後に抽出溶液を濃縮し、その後にGCまたはGCMSにより分離定量する方法が行われている。この方法は、抽出操作が複雑であるために2-APの回収率にバラツキが生じ易くなり、定量値の信頼性が低くなる。それに対して、近年は安定同位元素を含む2-AP標品を内部標準として添加し、GCMSにより分離定量する方法も行われている<sup>10, 11)</sup>が、安定同位体を含む標品を合成しなければならない。著者らは固相微量抽出法により抽出・濃縮し、FTDをもちいるGCにより定量する方法を検討したが、定量限界がやや高かった<sup>12)</sup>。存在量が微量であることが2-APの生合成経路を推定する上で困難な原因となっていることから、本報告においては実験系に使用する植物としてパندانを選び、定量方法として簡単な溶媒抽出法と、窒素化合物に対して特異的に感度の高いFTDを用いるGCを試みた。その結果、パندان葉から得られる溶液に炭酸ナトリウムを添加し、ジエチルエーテルで抽出した後、FTDを検出

器とする GC を用いる方法が、2-AP 含有量を比較する目的のために適した方法であることをまず明らかにした。

2-AP の生合成経路は、窒素を含むピロリン環部分はプロリンが前駆物質であることが、香り米とカカオ醗酵槽中の微生物において明らかにされている<sup>3,9)</sup>。本報告においても数種のアミノ酸をパンダン葉の培養液に添加することにより比較した。その結果、これまでの報告と同様にプロリンを培養液に添加した場合が最も 2-AP 濃度が高くなったことから、パンダンの葉においても吸収されたプロリンが 2-AP に変化したと考えられた。しかし、葉全体を試料として 2-AP 濃度を測定すると 2-AP の増加率は 10~15パーセント程度であり、推測の確実性が小さいと考えられた。そこで、プロリンとスクロース溶液で培養した細長いパンダンの葉を 4 つの部位に分割して、それぞれの部位による差を比較した。その結果、先端部分の 2-AP 濃度が 30ppm を越える程度まで高くなり、プロリンがこの植物においても 2-AP の前駆物質であることが明らかとなった。また、湿重量において 10ppm 以上の 2-AP を含む植物体はこれまでに報告されていないことから、パンダンが 2-AP の生合成経路を検討するために適した実験系であることが明らかになった。パンダンにおいてプロリンが 2-AP に合成される場所が葉のどの部位であるかは不明であるが、培養液にプロリンを添加した値と添加しなかった値とを比較すると、4 つの部位ともにほぼ同等の割合になっていることから、根元がわで合成されており、先端がわへ移動し、先端がわに蓄積される可能性が考えられる。先端がわに移動・蓄積される原因は不明である。以上の結果から、安定同位体を含むプロリンおよびスクロースを用いることにより、ピロリン環のみでなくアセチル基の前駆物質も明らかにできるようになるものと推測できる。

## 引用文献

- 1) V. Laksanalamai and S. Ilangantileke : Comparison of Aroma Compound (2-Acetyl-1-Pyrroline) in Leaves from Pandan (*Pandanus amaryllifolius*) and Thai Fragrant Rice (Khao Dawj Naku-105), *Cereal Chem.*, **70**, 381-384, 1993.
- 2) W. Grosch and P. Schieberle : "Bread" in *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, H. Maarse ed., Marcel Dekker, 1991, pp. 41-77.
- 3) L. J. Romanczyk, Jr., C. A. McLlceland, L. S. Post and W. M. Aitken : Formation of 2-Acetyl-1-pyrroline by Several *Bacillus cereus* Strains Isolated from Cocoa Fermentation Boxes, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 469-475, 1995.
- 4) L. M. Seitz, R. L. Wright, R. D. Waniska and L. W. Rooney : Contribution of 2-Acetyl-1-pyrroline to Odors from Wetted Ground Pearl Millet, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 955-958, 1993.
- 5) R. G. Buttery, J. G. Turnbaugh and L. C. Ling : Contribution of Volatiles to Rice Aroma, *J. Agric. Food. Chem.*, **36**, 1006-1009, 1988.
- 6) H. Maarse: "Rice" in *Volatile Compounds in Foods and Beverages*, H. Maarse ed., Marcel Dekker, 1991, pp. 79-89.
- 7) 山上敦, 馬野克己: 枝豆(茶豆)の香気成分, 食品科学工学会第52会大会講演要旨 p.71, 2005.
- 8) P. Schieberle : Primary Odorants in Popcorn, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1141-1144, 1991.
- 9) 吉橋忠, グエン・ティ・トゥ・ホン, ビバ・スロジャナメタクン・, パチャリ・タクトラクン, ワルニー・バラニヤノン, 野口明徳: 香り米の香り成分—タイの香り米品種カオドマリ105を中心として, 食科工誌, **54**, 105-112, 2007.
- 10) P. Schieberle and W. Grosch : Quantitative Analysis of Aroma Compounds in Wheat and

Rye Bread Crusts Using a Stable Isotope dilution Assay, *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 252-257, 1987.

- 11) T. Yoshihashi : Quantitative Analysis on 2-Acetyl-1-pyrroline of an Aromatic Rice by Stable Isotope Dilution Method and Model Studies on its Formation during Cooking, *J. Food Sci.*, **67**, 619-622, 2002.
- 12) 田中直義, 山内智子, 高橋節子, 松永直子 : 固相微量抽出法とFTDを用いるガスクロマトグラフによる2-アセチル-1-ピロリンの定量法について, 共立女子短期大学生生活科学科紀要第43号, p.9-12, 2000.