

二価銅イオン共存下におけるトリオースレダクトンとアミノ酸との反応による褐変および吸収スペクトルの変動

篠原, 和毅
九州大学農学部食糧化学教室

曾, 耀崑
中国化学学院家政学研究所 : 嘉義農業専科学校農産加工科 : 訪問研究員

大村, 浩久
九州大学農学部食糧化学教室

<https://doi.org/10.15017/23174>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 29 (1/2), pp.23-30, 1974-09. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

二価銅イオン共存下におけるトリオースレダクトン とアミノ酸との反応による褐変および 吸収スペクトルの変動*

篠原 和毅・曾 耀崑†・大村 浩久

九州大学農学部食糧化学教室

(1974年6月6日受理)

Browning and Variation of Absorption Spectra by the Reaction of Triose Reductone with Amino Acids under the Co-existence of Cu^{2+}

KAZUKI SHINOHARA, YAW-KUN TSENG
and HIROHISA OMURA

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka

篠原ら(1974a)は食品の褐変に関連して、代表的レダクトンの1つであるトリオースレダクトン(TR)と種々のアミノ酸との反応による褐変を試験し、数種のアミノ酸との反応系において著しい褐変の進行を観察した。また同時に、還元力を有する縮合物(アミノレダクトン)が新たに生成されることも確認した。さらにこれら反応系における吸収スペクトル、およびその吸光度の変動を求めた結果、褐変が進行すると、TRに特徴的な吸収の減少と、縮合物のものと思われる225 nm、および310 nm付近の吸光度の増加が認められた(篠原ら, 1974b)。

一方、二価銅イオンは糖とアミノ化合物との反応による褐変や、アスコルビン酸等の褐変を促進することが知られている(加藤ら, 1964; 鎌田 1961)。また山藤ら(1970)はレダクトン類の抗腫瘍作用、ならびに核酸切断作用を二価銅イオンが促進することを報告しており、二価銅イオンがレダクトン類の生理作用と何らかの関係をもつことが推定される。そこで本実験においてはTRとアミノ酸との反応による褐変、およびその吸収スペクトルの変動に及ぼす二価銅イオンの影響について検討した。

実験方法

トリオースレダクトン (TR)

常法(大村ら, 1974)に従って調製した。

二価銅イオン(Cu^{2+})共存下におけるTRとアミノ酸との反応

篠原ら(1974a)と同様に、25 mM TRと同モルアミノ酸(1:1反応)、および50 mMのアミノ酸(1:2反応)をおのおの0.1 M HCl-KCl緩衝液(pH 2.0)に溶かしたのち、それぞれの反応系に1 mMになるように Cu^{2+} を加え、90°Cで4時間加熱した。

紫外吸収スペクトル

常用の島津マルチパーパス自記分光光度計MPS-50型により自動的に記録して求めた。測定は反応液を600倍に希釈して行なった。

ペーパークロマトグラフィー

東洋濾紙 No. 51, 展開溶媒としてn-ブタノール:酢酸:水(4:1:2)を用いた。検出には紫外線照射、インドフェノール試薬、およびニンヒドリン試薬を用いた。

* レダクトン類の生理的機能に関する研究(第9報)

† 中国文化学院家政学研究所および嘉義農業専科学校農産加工科, 現在訪問研究員

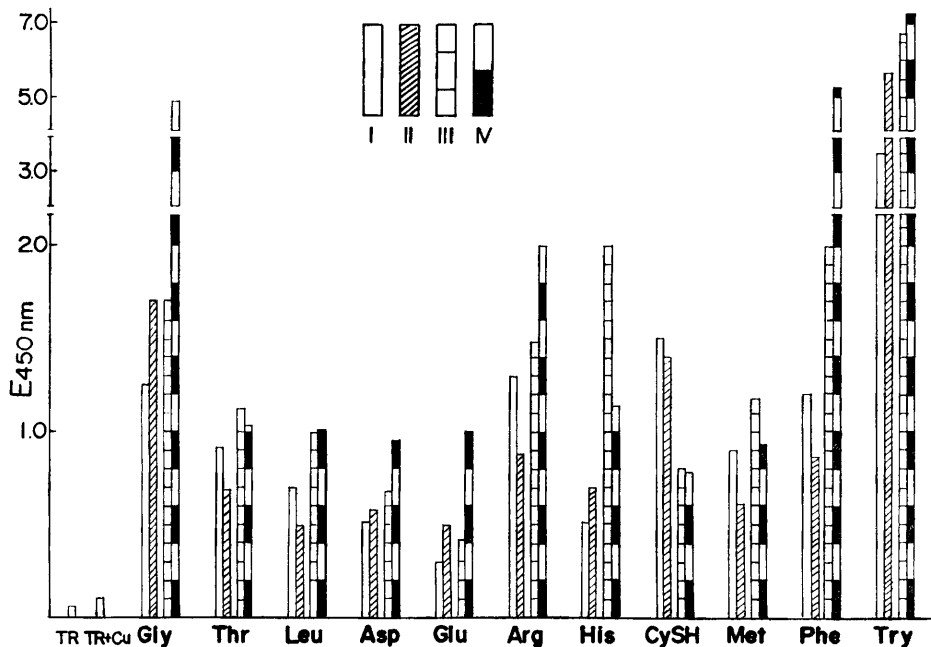


Fig. 1. Browning by the reaction of TR with amino acids under the co-existence of Cu^{2+} . I—, TR: amino acids=25 mM: 25 mM. II—, TR: amino acids=25 mM: 50 mM. III—, TR: amino acids: Cu^{2+} =25 mM: 25 mM: 1 mM. IV, TR: amino acids: Cu^{2+} =25 mM: 50 mM: 1 mM. The reaction mixture was heated at 90°C for 4 hrs and optical density was estimated at 450 nm.

実験結果および考察

1. Cu^{2+} 共存下における TR とアミノ酸との反応による褐変

Fig. 1 に 90°C で 4 時間加熱した後の各反応における 450 nm の吸光度を示す。また Cu^{2+} を加えない場合の褐変度もあわせて示した。

試験したアミノ酸のなかでは、特に Gly, Asp, Glu, Try, Arg, Phe 等の 1: 2 反応系において、 Cu^{2+} 無添加の場合よりも褐変が進行したが、他のアミノ酸との反応系では Cu^{2+} を加えない時とほぼ同程度か、あるいは逆に褐変が低下する傾向がみられた。また Cu^{2+} 無添加の場合と同様に、褐変は CySH 系を除いて 1: 2 反応において顕著であった。このように Cu^{2+} 共存下においても褐変度はアミノ酸の種類によつて異なつた。また一般に TR とアミノ酸との反応による褐変は、 Cu^{2+} 無添加の場合も考えあわせると、特に Gly, Arg, His, Phe, Try 等のアミノ酸系において著しいことが明らかである。これはアスコルビン酸—アミノ酸系の褐変(鎌田, 1961)と同様な傾向である。一方、TR とアミノ酸の濃度は

比較的高く、また 1 mM という高濃度の Cu^{2+} を添加し、しかも 90°C で加熱するという条件からは、無添加の場合に比し、褐変度の数倍の増加が期待されたが、実際はそうではなかつた。

なお、TR—アミノ酸— Cu^{2+} 系による褐変の経時的変化は前報(篠原ら, 1974a)と同様であつた。また TR に Cu^{2+} を加えた時の褐変度は TR 単独の場合と大差はみられなかつた。

2. Cu^{2+} 共存下における吸収スペクトルの変動

TR とアミノ酸との反応に対する Cu^{2+} の影響を TR に特徴的な吸収スペクトルを経時的に測定することによつて検討した。

Fig. 2 は TR—Met— Cu^{2+} 系の吸収スペクトル、およびその吸光度の変動を示すが、反応時間とともに TR に特徴的な吸収の減少がみられる。特に 1: 2 反応においてその低下が大きい。TR は pH 2.0 では比較的安定である(大村ら, 1974)が、 Cu^{2+} が共存すると加熱 4 時間後で TR の吸収は反応前に比べて約 80% 近く減少した(Fig. 3)。このように TR は Cu^{2+} によつて著しい分解(酸化)をうけるが、Figs. 2, 3 から明らかのように TR—Met— Cu^{2+} 系における

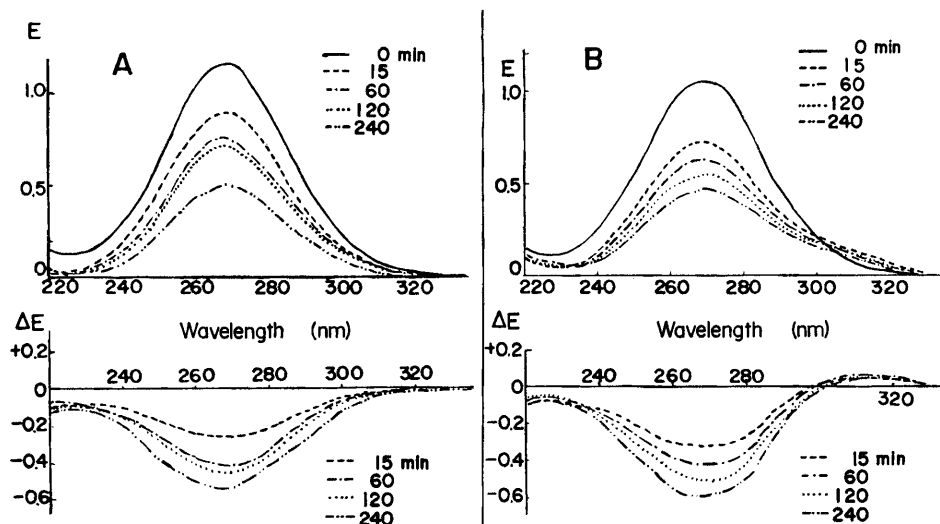


Fig. 2. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, methionine (Met) and Cu²⁺. A—, TR: Met: Cu²⁺=25 mM: 25 mM: 1 mM. B—, TR: Met: Cu²⁺=25 mM: 50 mM: 1 mM. The reaction mixture was heated at 90°C for 4 hrs and the absorption spectra were estimated.

TR の減少度は TR-Cu²⁺ 系に比べてわずかながら低かった。この傾向は His系, Arg 系においてもみられた。これらのことはアミノ酸が TR の Cu²⁺ による分解を防止している, すなわち, アミノ酸が Cu²⁺ と複合体を作り, その結果, Cu²⁺ の TR に及ぼす作用が弱められたとも考えられる。あるいは逆に複合体の形成により, アミノ酸と TR との反応性が弱められたと考えられなくもない。それはこの Cu²⁺ とアミノ酸との複合体の形成について先に報告があるからである (Hemmerich, 1966; Maley, 1950)。

一方, 生成物の証拠となる 310 nm 付近の吸光度の増加は 1: 2 反応においてのみ観察され, 1: 1 反応では全く認められなかった。しかしながら, 1: 2 反応における 310 nm 付近の増加は Cu²⁺ を加えない場合よりも低かった。篠原ら (1974b) がみたような 225 nm 付近の増大も認められなかった。

同様に TR の減少の傾向が TR-Thr-Cu²⁺ 系においてもみられる (Fig. 4)。しかし, この場合には加熱 4 時間後の TR の減少度は 1: 1 反応において高かった。また 1: 1 反応でも極くわずかながら 310 nm 付近に吸光度の上昇が観察された。これら 2 つの反応系においては反応開始 15 分後での 270 nm を中心とした吸光度の減少が他のアミノ酸系に比して大きいようであった。

TR-Glu-Cu²⁺ 系 (Fig. 5) においては反応時間とともに TR の示す 270 nm を中心とした吸光度が

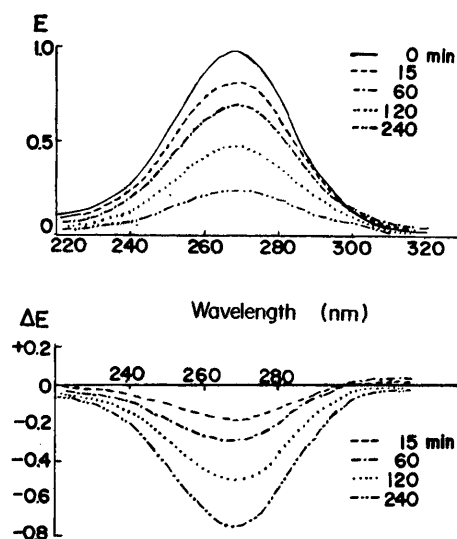


Fig. 3. Absorption spectra and its variation of TR and Cu²⁺. The reaction mixture of 25 mM TR and 1 mM Cu²⁺ was heated at 90°C for 4 hrs and the absorption spectra were estimated.

減少した。その低下の割合は 1: 1, 1: 2 反応とも, Cu²⁺ 無添加の場合と同程度であった。またこの反応系でも 1: 2 反応に 310 nm 近辺の吸収の増加が認められた。

Fig. 6 に His 系の, また Fig. 7 に Arg 系の吸

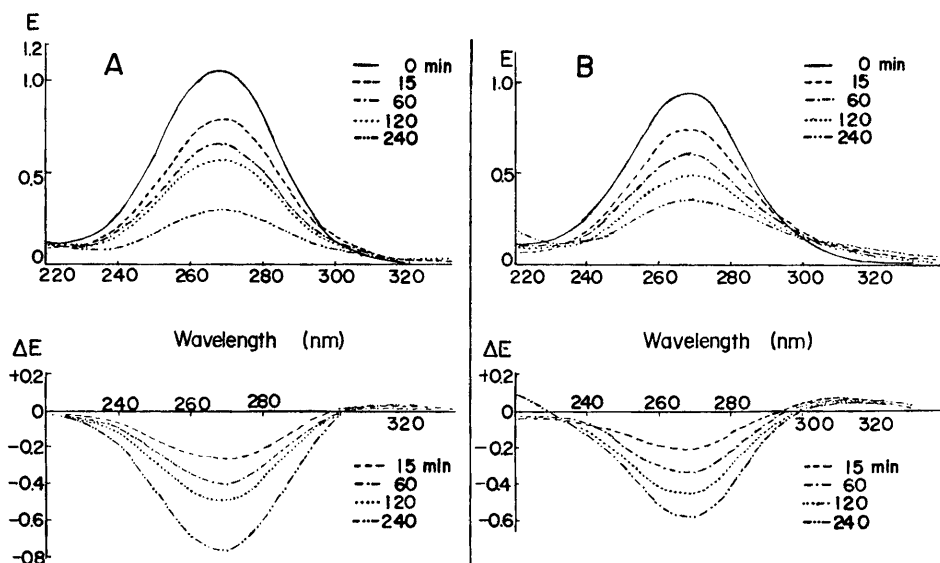


Fig. 4. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, threonine and Cu^{2+} . The experimental conditions were the same as in Fig. 2.

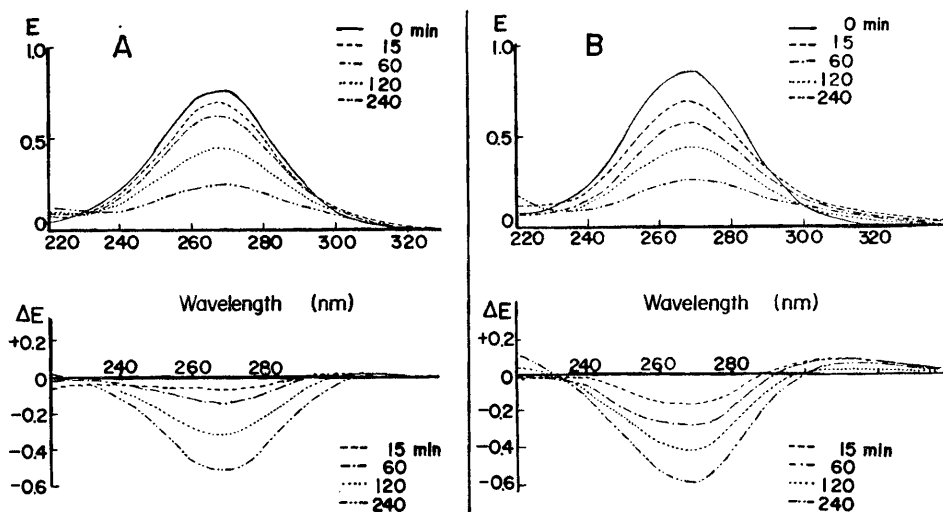


Fig. 5. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, glutamic acid and Cu^{2+} . The experimental conditions were the same as in Fig. 2.

収スペクトルの変動を示すが、上記の反応系と同様に加熱時間とともに TR の吸収が減少した。それは 1:1, 1:2 反応とも同程度であったが、 Cu^{2+} を加えない場合よりも TR の減少度は高く、また TR- Cu^{2+} 系よりも低かった。一方縮合物の生成を示す 225 nm, および 310 nm 付近を中心とした吸光度の増加が 1:1, 1:2 反応系ともみられた。この増加は Cu^{2+} 無添加の時と同程度であった。また Fig. 5 お

よび 6 で示すように縮合物は反応 15 分後頃から生成しはじめ、反応 1 時間で最高の吸光度に達した。しかしその後は減少する傾向にあった。我々は先に TR とアミノ酸との反応から縮合物を得、それが Cu^{2+} によつて酸化をうけ、TR の酸化型のメソキサルアルデヒドとアミノ酸に分解することを確認しているのので、この場合の減少は生成した縮合物が Cu^{2+} によつて、再び分解したことによると考えられる。このよう

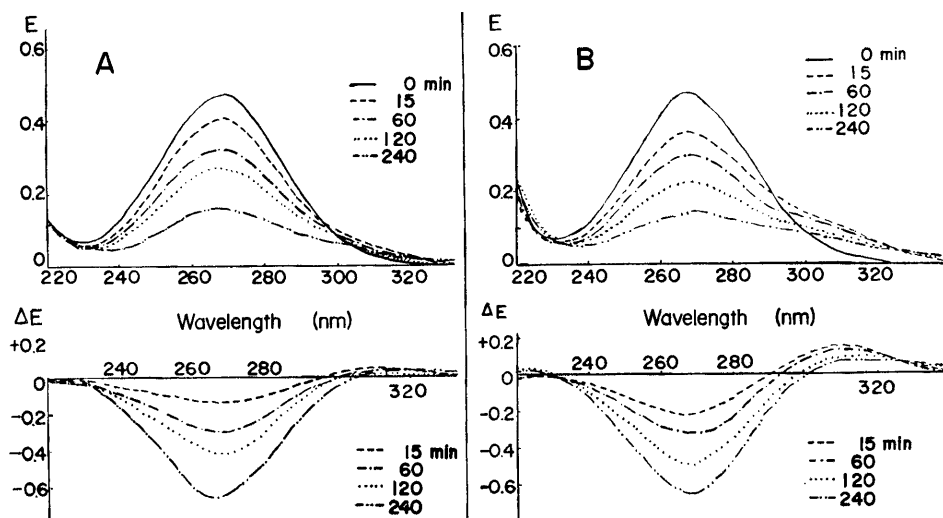


Fig. 6. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, histidine and Cu²⁺. The experimental conditions were the same as in Figure 2.

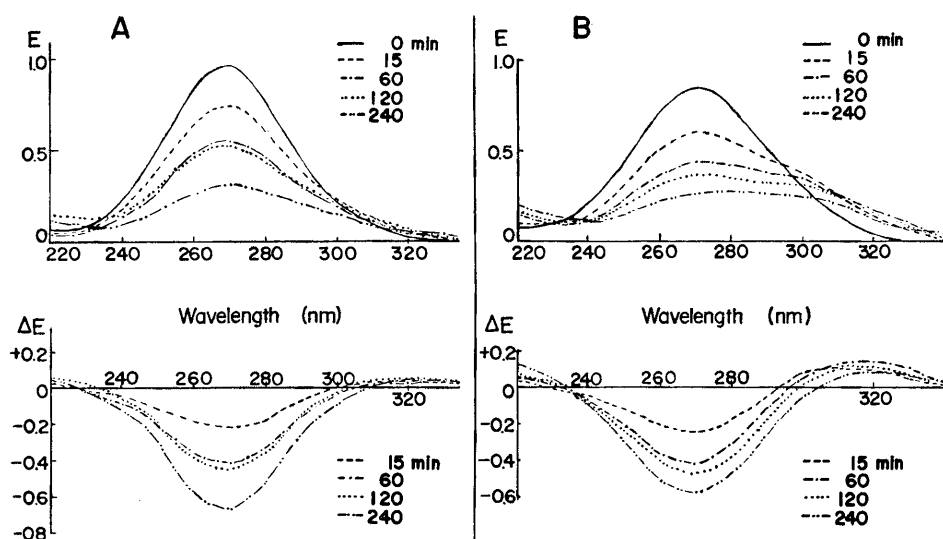


Fig. 7. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, arginine and Cu²⁺. The experimental conditions were the same as in Figure 2.

な傾向は他のアミノ酸系でも認められた。

Phe 系における TR の減少度は上記の反応系よりもわずかながら低いようであった (Fig. 8)。この反応系でも特に 1:2 反応において 310 nm 付近の吸光度が上昇した。その増加の割合は TR-Phe 系とほぼ同程度であった。なお TR-Asp-Cu²⁺ 系, TR-Leu-Cu²⁺ 系, TR-Gly-Cu²⁺ 系の反応においても Phe 系と同様な傾向がみられた。

CySH 系の反応では篠原ら (1974b) と同様に 270

nm を中心とした著しい吸光度の減少がみられた (Fig. 9)。特に 1:2 反応では加熱 60 分でほとんど TR の吸収は消失した。また生成物の証拠となる 225 nm, および 310 nm 付近の吸光度の増加も認められなかった。

Fig. 10 に TR と Try との反応に及ぼす Cu²⁺ の影響を示すが、篠原ら (1974b) と異なっており、Cu²⁺ 共存下では 270 nm を中心とした吸光度の著しい減少が観察された。それは特に 1:2 反応において顕著で

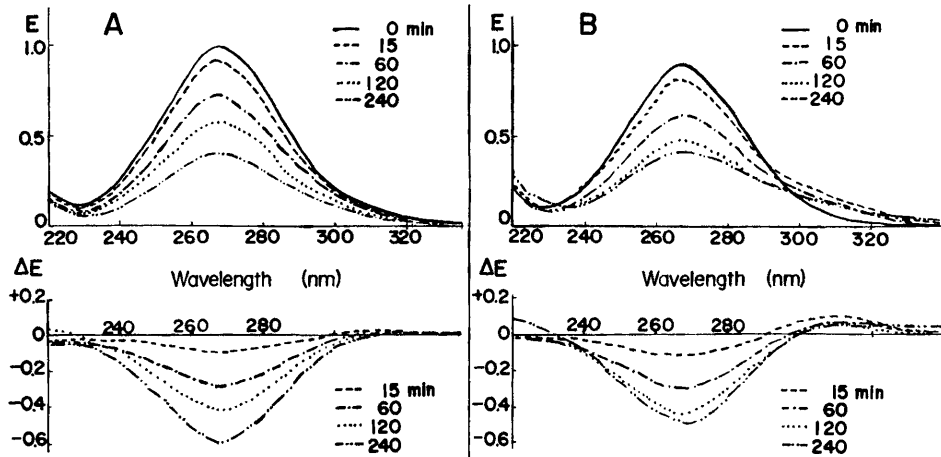


Fig. 8. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, phenylalanine and Cu^{2+} . The experimental conditions were the same as in Fig. 2.

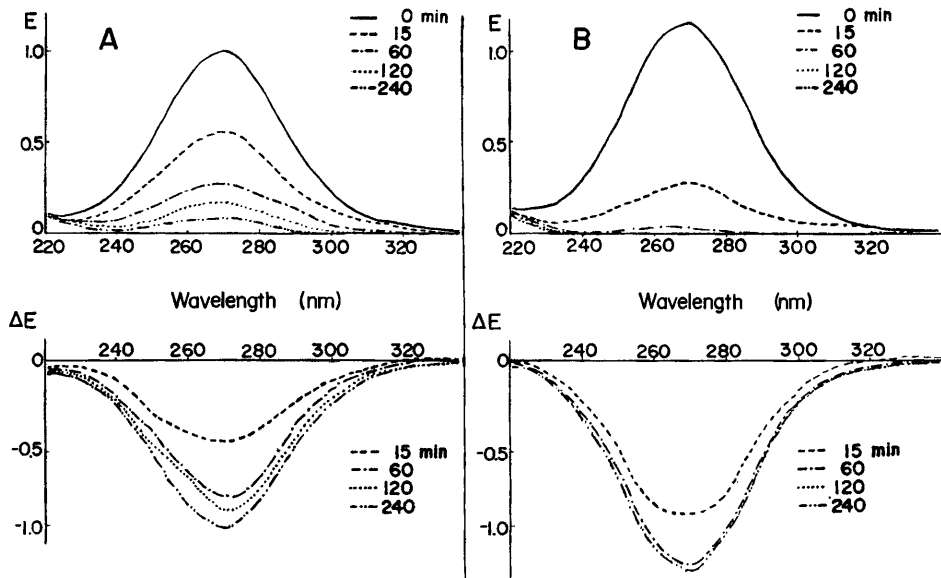


Fig. 9. Absorption spectra and its variation mixture of TR, cysteine and Cu^{2+} . The experimental conditions were the same as in Fig. 2.

あつた。さらに 240 nm 以下の短波長側と 300 nm 以上の長波長側に明瞭な吸光度の増加がみられたが、前述したように加熱後では減少する傾向にあつた。これは 1:1, 1:2 反応とも同様であつた。またその増加の程度は Cu^{2+} を含まない TR-Try 系よりも低かつた。

以上、TR に特徴的な吸収の変動から、TR とアミノ酸との反応に及ぼす Cu^{2+} の影響について検討した結果、一般に反応時間とともに TR の吸収の低下が

みられた。その低下の程度は Cu^{2+} を含まない系よりもわずかながら大きかつた。またほとんどの反応系でほぼ同程度の減少度を示した。さらに縮合物の形成を示す吸光度の増加が、特に 1:2 反応においてみられたが、上記の TR の減少の場合とは逆に Cu^{2+} 無添加の場合よりもその上昇の割合は低いようであつた。また 225, および 310 nm 付近の吸光度の増加は反応時間とともに減少する傾向がみられた。 Cu^{2+} を加えない系においては経時的な測定は行なつていない

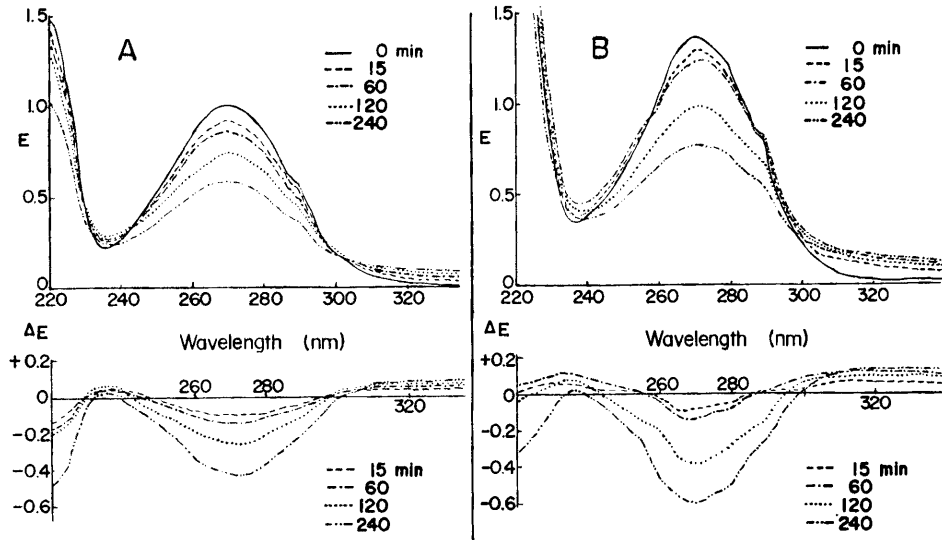


Fig. 10. Absorption spectra and its variation of the reaction mixture of TR, tryptophan and Cu²⁺. The experimental conditions were the same as Fig. 2.

が, このような傾向は Cu²⁺ 無添加の系についてもみられるかもしれない。

3. 反応液のペーパークロマトグラフィー

Cu²⁺ 共存下での TR とアミノ酸との反応において反応後 225 nm, および 310 nm 付近の吸光度の増加が認められるが, これは縮合物の生成を示すものである。そこで加熱 4 時間後の反応液のペーパークロマトグラフィーを行なった (Fig. 11)。その結果, 試験したすべてのアミノ酸系に縮合物と思われるインドフェノール, およびニンヒドリン弱陽性のスポットが検出された。また Cu²⁺ を加えない反応では観察されなかった CySH 系でもスポットが検出された。一方, Gly, His, Try 等の反応系においては 1:1, 1:2 反応とも 2~3 個のスポットが認められた。この 1 つは TR とアミノ酸との 1:1 縮合物と想定されるが, 他のスポットは 1:2 縮合物である可能性がある。あるいはまた Cu²⁺ とこれらアミノ酸との複合体とも考えられる。

要 約

TR とアミノ酸との反応における褐変におよぼす Cu²⁺ の影響について検討した結果, Cu²⁺ 共存下においては, 特に Gly, Asp, Try, Arg, Phe との 1:2 反応で, Cu²⁺ 無添加の場合よりも著しい褐変が観察された。他のアミノ酸との反応系では Cu²⁺ を加えない時とほぼ同程度か, あるいはそれ以下であった。他方, Cu²⁺ 共存下でも褐変は 1:1 反応よりも 1:2

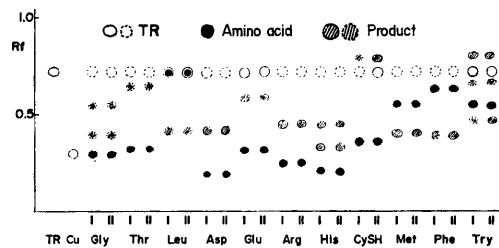


Fig. 11. Paperchromatogram of the mixture of TR, amino acids and Cu²⁺ after heating. I—, TR: amino acids: Cu²⁺=25 mM: 25 mM: 1 mM. II—, TR: amino acids: Cu²⁺=25 mM: 50 mM: 1 mM. The reaction mixture of TR, amino acids and Cu²⁺ was heated at 90°C for 4 hrs and applied to paperchromatography.

反応において顕著であった。

続いて, Cu²⁺ 存在下での TR とアミノ酸との反応における吸収スペクトル, およびその吸光度の変動を求めた。その結果, 反応時間とともに TR に特徴的な吸収の減少がみられた。その低下の度合は各反応系ともほぼ同程度であった。さらに, 特に 1:2 反応において縮合物の生成を示す 225 nm, および 310 nm 付近を中心とした吸光度の増加が認められた。また各反応液についてペーパークロマトグラフィーを行なった結果, すべての反応系に縮合物と思われるスポットが検出された。

文 献

- Hemmerich, P. 1966 Model Studies on the Binding of Univalent and Redox-Active Copper in Proteins. In "The Biochemistry of Copper," ed. by J. Peisach, P. Aisen and W. E. Blumberg, Academic Press, New York, pp. 15-47
- 鎌田栄基 1961 オレンジジュースのかつ変. 農化, **35**: 285-292
- 加藤博通・桜井芳人 1964 果汁製品の褐変機構に関する研究(第3報) クエン酸-蔗糖系における褐変機構. 農化, **38**: 536-541.
- Maley, L. E. and D. P. Mellor 1950 Stability of Some Metal Complexes of Histidine, *Nature*, **165**: 453
- 大村浩久・藤田明男・佐藤雅子・大槻 実・飯尾雅嘉 1974 トリオースレダクトンと数種含窒素化合物との反応. 九大農学芸誌, **28**: 79-92
- 篠原和毅・曾 耀崑・井上 譲・佐藤雅子・大村浩久 1974 a トリオースレダクトンとアミノ酸との反応による褐変, 九大農学芸誌, **28**: 139-144
- 篠原和毅・曾 耀崑・大村浩久 1974 b トリオースレダクトンとアミノ酸との反応による吸収スペクトルの変動. 九大農学芸誌, **29**: 15-21

Summary

Effect of Cu^{2+} on the browning reaction of triose reductone (TR) with amino acids was investigated. Browning was remarkably promoted with Cu^{2+} , especially in the 1:2 reaction system of TR with some amino acids such as glycine, aspartic acid, glutamic acid, tryptophan, arginine and phenylalanine. But in other reaction system, the browning was about the same or less than that without Cu^{2+} . On the other hand, the browning by the 1:2 reaction system was always more predominant than the 1:1 reaction with or without Cu^{2+} .

Then, the variation of absorption spectra of the reaction mixture of TR, amino acids and Cu^{2+} was also estimated. The characteristic absorption of TR decreased with the reaction time. Especially in the 1:2 reaction system, the increase of the absorption at near 225 and 310 nm, suggesting the formation of condensation products, was also observed. Furthermore, the spots supposed to be condensation products were detected paperchromatographically in all reaction mixtures.