

アミノ・カルボニル反応生成物の抗酸化性に関する研究 (第5報)

トリプトファン・グルコース系反応生成物の
抗酸化剤としての利用試験

富 田 裕 一 郎

Studies on Antioxidant Activity of Amino-Carbonyl Reaction Products

Part V. Applying Tests of Reaction Products of Tryptophan with Glucose

Yûichirô TOMITA

(Laboratory of Animal Nutrition)

前報¹⁾²⁾では、アミノ酸と糖との反応生成物の抗酸化能についてリノール酸を基質として検討を加え、その結果トリプトファンとグルコースとの反応生成物が強い抗酸化能を示すことを明らかにした。そこで抗酸化能発現の強い反応条件を適用してトリプトファン・グルコース系反応液を調製し、これと現在広く食品などの酸化防止に使用されている化合物と抗酸化能を比較した。次に、実用的な面を考慮して、トリプトファンとグルコースの反応液から調製したメラノイジンの油脂類に対する抗酸化能を知るため、基質としてナタネ油および脂溶性プロビタミンAであるβ-カロチンを用い、その安定性がメラノイジンを添加した場合にどの程度増すかについて試験した。

さらに、上の2例のようにメラノイジンでなくトリプトファンとグルコースを材料中に加え、この反応系が加工処理中に発現する抗酸化性を利用し、BHAおよびBHTの効力と比較する試験を行なった。

実 験 方 法

A. 基質としてリノール酸を用いたとき

供試した抗酸化剤は次の3種である。

合成α-トコフェロール(エーザイ株式会社製品)、**BHT**, **BHA**(和光純薬工業株式会社製品)

(1) モル比1:1反応液とα-トコフェロールおよび**BHT**との抗酸化能比較試験法

反応液は 10^{-2}M のL-トリプトファンと 10^{-2}M のD-グルコースを含むpH 7.5および9.0の0.05Mリン酸緩衝液の溶液を 120°C および 130°C で1時間加熱して調製した。抗酸化能の比較はリノール酸液に

反応液をもとのトリプトファンとして添加濃度が $2 \times 10^{-5}\text{M}$ となるように加え、 40°C で振盪して、リノール酸の自動酸化を行なわせ、経時的にPOVを測定して行なった。また、α-トコフェロールおよび**BHT**をエチルアルコールに溶解し、上記の緩衝液で稀釈して、リノール酸液に反応液と同濃度になるように添加して比較した。

(2) モル比1:20反応液と**BHA**および**BHT**との抗酸化能比較試験法

10^{-2}M のL-トリプトファンと $2 \times 10^{-1}\text{M}$ のD-グルコースを含むpH 9.0, 0.1Mリン酸緩衝液の溶液を 120°C で1時間加熱した反応液と**BHA**, **BHT**との抗酸化能を比較した。

反応液の添加濃度はもとのトリプトファンとして $5 \times 10^{-5}\text{M}$, **BHA**および**BHT**は許容限界量が0.02%であるので、リノール酸量に対して0.02%になるように添加した。なお自動酸化は 40°C で静置して行なった。

B. 基質として、リノール酸以外のものを用いたとき

1. ナタネ油の安定試験

1) 材料

試験に用いたナタネ油は鹿児島市内の製油工場より購入したものであり、製造後2週間経過し、過酸化物質は2 meq/kgであった。

合成抗酸化剤の**BHT**および**BHA**は和光純薬製のものを用いた。

トリプトファン・グルコース反応系メラノイジンは次のようにして調製した。すなわち、2gのL-トリ

プトファンと 6 g の D-グルコースを 100 ml の pH 9.0, 0.1 M リン酸緩衝液にとかし, 190°C で 1 時間加熱し反応液を調製した. この反応液をセロファン膜に入れ流水中で 5 日間透析を行ない, 非透析性の着色高分子物質を凍結乾燥し, この乾燥粉末をメラノイジンとして供試した.

2) 方法

試料油は次のようにして調製した.

ナタネ油に抗酸化剤のエチルアルコール溶液を加え, 抗酸化剤が 0.02% 含まれるように調整し, 減圧下でエチルアルコールを除いたものである. なお対照油としては, エチルアルコールをナタネ油に抗酸化剤を加えた時に要した量と同量加え, のち減圧下で処理したものをを用いた.

各試料油の安定性は熊沢の装置³⁾を用いて活性酸素法による酸化試験を行ない, 比較検討した. すなわち, 約 20 ml 容の試験管に試料油を 10 ml ずつとり, 沸騰浴中につけ除湿空気を 1 分間当たり 50 ml の割合で通し, 経時的に過酸化価を測定して, 各試料油の酸化度を比較するものである. なお, 過酸化価の測定には沃素滴定法⁴⁾を適用した.

2. β -カロチンの安定試験

カロチンとしては合成 β -カロチン (E. Merck 製) をを用いた.

BHT, BHA およびメラノイジンは前項と同じものをを用いた.

1) 試料カロチン油の調製

合成 β -カロチンをエチルエーテルに溶解し, 新調ラードに加え十分混合して減圧下でエチルエーテルを除いた. このカロチンを含むラードを約 10 g づつあらかじめ精秤したペトリ皿に分取し, 精秤後ラード 1 g 当たり抗酸化剤が 25 μ と 100 μ 含有するように抗酸化剤のエチルアルコール溶液を加えて十分混合し減圧デシケーター中でアルコールを除く. また対照としてエチルアルコールをカロチン油に抗酸化剤を加えたときに要したエチルアルコールと同量加えて上と同様に処理した.

各試料カロチン油の安定性の比較は各ペトリ皿を 40°C で暗所に静置し, 経時的にカロチン残存量を測定して行なった.

2) カロチンの測定法

試料カロチン油の少量を 25 ml 容のメスフラスコに秤取し, 石油エーテル (bp. 40~60°C) を加え溶解し定容とする. この液の 450 $m\mu$ の吸光度を測定し, 下に記した PETERSON ら⁵⁾の 450 $m\mu$ における

β -カロチンの特殊吸光係数を用いて算出した.

$$E_{450}^{1\%1cm}(450 m\mu \text{ in P. ether}) = 2,730$$

3. 揚物の安定試験

1) 揚物作製法

アミノ酸と糖や抗酸化剤を含むモチの揚物を次のようにして製造した.

市販のモチ米を清洗, 風乾して粉碎機にかけ,モチ米粉をつくら. そしてこれを材料として次のような試験区をつくり, 試験した.

a) 対照区:モチ米粉 200 g を秤取し水 100 ml を加え, よく混合する. 120°C で 30 分オートクレーブにかけ, 取出したものを十分こね合わせ, 5 g ずつ秤取し, 径約 4 cm 位に押しひろげる. これを 180°C にあらかじめ加熱したナタネ油 (白絞油) 中に入れ正確に 3 分間後にあげて油を切る.

b) グリシン区:モチ米粉 200 g にグルコース 5 g とグリシン 1 g を水 100 ml にとかしたものを加える. 後の方法は対照区と同じように行なった.

c) トリプトファン A 区:モチ米粉 200 g にグルコース 5 g とトリプトファン 1 g を水 100 ml にとかしたものを加える. 後の方法は対照区と同じように行なう.

d) トリプトファン B 区:対照区と同じようにしてオートクレーブしたあと, グルコース 5 g とトリプトファン 1 g を加えよくこねる. これを前と同じように揚げる.

e) BHA 区:トリプトファン B 区で加えたグルコースとトリプトファンの代わりにブチルヒドロキシアニソール 40 mg をエチルアルコールにとかして加え, よくこねた以外は同じように行なう.

f) BHT 区:トリプトファン B 区で用いたグルコースとトリプトファンの代わりにジブチルヒドロキシトルエン 40 mg をエチルアルコールに溶かして加えて, よくこねた以外は同じように行なう.

2) 揚物の安定度試験法

上述のようにアミノ酸やグルコースあるいは抗酸化剤を加えて作製した 6 試験区の揚物を 60°C で保存し, 経時的に過酸化価を測定した.

揚物中の油の過酸化価測定は次のようにして行なった. すなわち, 各試験区から揚物各 2 枚づつを 1 組としてとり, 精製エチルエーテルを用いて含まれる油を抽出し, 減圧濃縮してエーテルを除き, 沃素滴定法⁴⁾によって過酸化価を測定した. なお, これらの値は各試験区 2 組づつ測定し, その平均値で示した.

結果および考察

(1) モル比 1:1 反応液と α -トコフェロールおよび BHT との抗酸化能比較

この結果を第1図に示した。

反応液の抗酸化能は、加熱反応時の pH が高い程、そして加熱温度が高い程強くなることを先に報告した²⁾が、これを再確認する結果を得た。

これらの中で BHT が最も強い抗酸化能を示した。130°C で1時間加熱した反応液は α -トコフェロールの有する抗酸化能より強いことが認められた。

トコフェロールの抗酸化性は、クロマン核の6位の

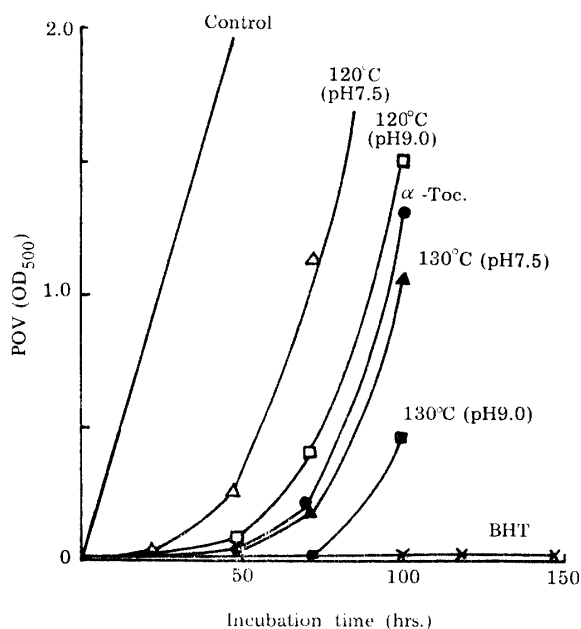


Fig. 1. Antioxidant Activity of Browning Solution, α -Tocopherol and Butylhydroxy toluene.

The browning solution was prepared as in the following; a mixture of 10^{-2} M L-tryptophan and 10^{-2} M D-glucose in 0.05 M phosphate buffer of pH 7.5 or 9.0 was heated at 120°C or 130°C for 1 hr..

The α -tocopherol and butylhydroxy toluene (BHT) dissolved ethyl alcohol, and then diluted with phosphate buffer.

Five ml. of incubation mixture consisting of 2.5 ml. of 2×10^{-2} M linoleic acid solution and 2.5 ml. of the adequately diluted browning solution, the α -tocopherol or BHT was shaken at 40°C.

The concentration of additive in incubation mixture was 2×10^{-5} M, but in the case of browning solution it was shown on the basis of initially given amino acid.

Peroxide value (POV) was determined as OD₅₀₀ by the method of the previous paper¹⁾.

水酸基に由来する。したがって抗酸化性を有するのは、天然ビタミンE同族体の α -, β -, γ -, δ -, ζ -, ϵ -, η -トコフェロールの7種と合成ビタミンE (dl - α -トコフェロール)である。構造上から見るとクロマン核の5位に遊離の水素をもつ γ -, δ -, η -トコフェロールの抗酸化性が大であるといわれている。LEA ら⁶⁾によるとトコフェロール同族体のメチルリノレートに対する抗酸化力は δ -> γ -> β -> α -の順であり、 α -トコフェロールはこれら同族体の中では抗酸化性は弱い。しかし、加熱温度を変えるだけで反応液の効力がこれを凌ぐという事実は意義あるものと考えられる。

(2) モル比 1:20 反応液と BHA および BHT との抗酸化能比較

この結果を第2図に示した。

この図で明らかなように、糖の濃度を増し pH 9.0, 120°C 1時間加熱するだけで、反応液の抗酸化能は増し、BHA よりも強い抗酸化能が認められた。BHT の効力は反応液のそれより優れていたが、BHA と反応液の差に比較すると小さい。これを前報²⁾に示したように酸化誘導期間を求めると、BHA は約 160 時

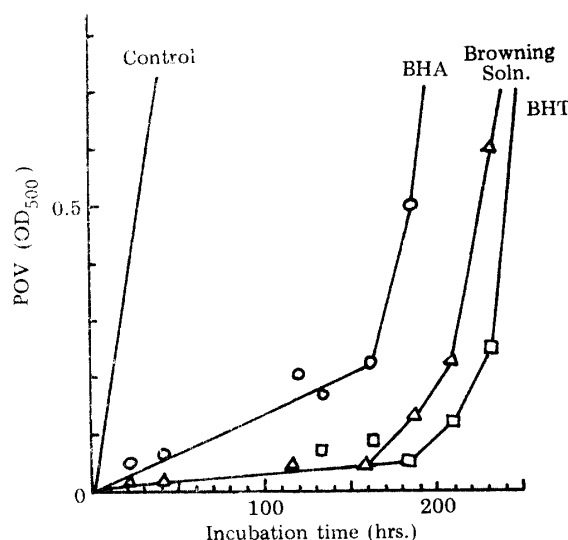


Fig. 2. Antioxidant Activity of Browning Solution, Butylhydroxy anisol and Butylhydroxy toluene.

The browning solution was prepared as in the following; a mixture of 10^{-2} M L-tryptophan and 2×10^{-1} M D-glucose in 0.1 M phosphate buffer of pH 9.0 was heated at 120°C for 1 hr..

The concentration in incubation mixture of browning-product was 5×10^{-5} M as initially given amino acid, and BHA or BHT was 0.02% for the linoleic acid in incubation mixture.

Incubation was the same as shown in the legend of Fig. 1.

間、反応液は約 200 時間、BHT が約 225 時間であった。

以上のように、トリプトファン・グルコース系反応液が現在食品業界に最も広く利用されているこれらの両合成抗酸化剤に匹敵する効力を示すことは極めて意義のあることと考えられる。

(3) ナタネ油の安定試験

食用油脂は酸化に伴い、風味の劣化、し好性、栄養価を低下させ、さらに毒性を呈するに至ることが知られている。そこで油脂酸化に対する抗酸化性を知るため、メラノイジンをなたね油に加え、その安定性を試験した。

この結果は、第 3 図に示した。これは過酸化価の経時的变化量として示したものである。この結果、なたね油の酸化に対するメラノイジンの抗酸化能は BHA よりも優れていたが BHT よりも弱く、両者の中間程度の効力を示した。

抗酸化剤の効力は基質によって異なることが知られている。たとえば、Higgins⁷⁾ によると没食子酸プロピルエステルはラードに加えたときの方が植物油に加えたときより効果を示し、MOORE ら⁸⁾ によれば、BHA は植物油で効力が劣り、Duggn⁹⁾ は、BHT と

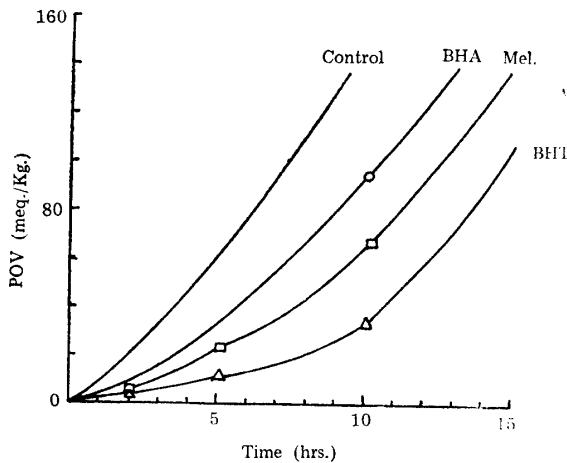


Fig. 3. Stability test of Rape Seed Oil.

The browning reaction product 'melanoidine' was prepared as in the following; A mixture of 2 g. L-tryptophan and 6 g. D-glucose in 100 ml. of 0.1 M phosphate buffer of pH 9.0 was heated at 120°C for 1 hr., and browning solution was dialysed against running water for 5 days, then resulting inner solution was lyophilized, and the obtained dried powder was used as melanoidine.

The added concentration of antioxidant was 0.02% for oil.

The active oxygen method³⁾ was used for the autoxidation of rape seed oil.

BHA の効力が試験の条件によって変動し優劣はつけ難いと報告している。メラノイジンの効力も基質によって変動する可能性はあるが、リノール酸に対する試験の結果を勘案すると、BHA や BHT に匹敵する効力を示すものと考えられる。

また、なたね油にメラノイジンを添加したとき、着色が認められた。しかしこの着色は添加当初に他よりやや濃い色が見られたが、酸化時間が経過するに従って次第に他と区別がつかなくなり、実用性があるものと考えた。

(4) カロチンの安定試験

動植物体の組織中に広く分布し、食品や飼料に豊かな色彩を与えているカロチノイドは貯蔵あるいは加工中に酸化され易く、栄養はもとより、品質管理、経済上から見て重要な色素であるので、この代表的な β -カロチンの安定性をなたね油と同様に試験した。

β -カロチンの初濃度は試料カロチン油 1 g 当り 95 r であった。

各試料カロチン油中の β -カロチンの安定度を β -カロチンの初濃度に対する減少率で示したのが、第 4 図である。

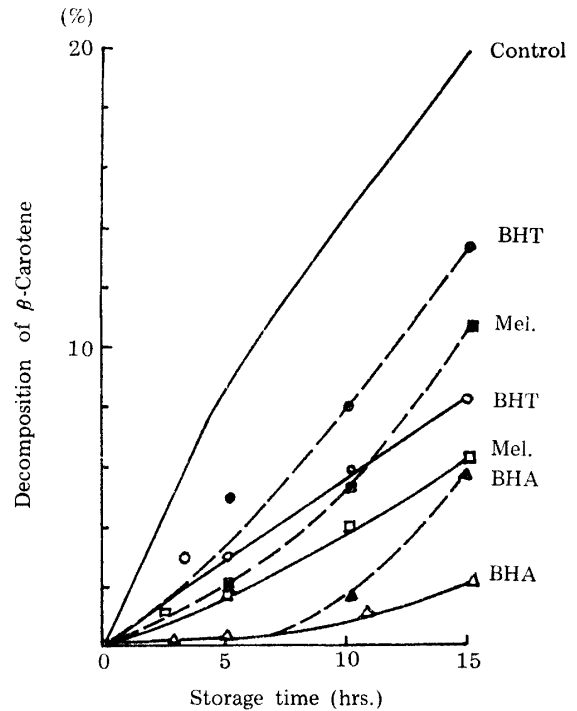


Fig. 4. Stability Test of Carotene.

For the determination of the percentage of the decomposition of β -carotene, it was dissolved in lard as corresponding to 95 mg.% and was stored at 40°C in air oven.

The added concentration of antioxidant was 100 r per 1 g. of lard (—) or 25 r (---).

β -カロチンは不飽和度が高く酸化されやすく次第に退色してくるので容易に比較できる。

BHT, BHA およびメラノイジン3者共, β -カロチンの酸化防止に効果があることが認められた。この中では, BHA の効果が大きく, メラノイジンの効果がこれに次ぎ, BHT は最も効果が弱かった。

カロチノイドの酸化防止に関する研究は多くの研究者によってなされており, カロチノイドの酸化は開放下, 缶詰, 瓶詰, ガス交換など貯蔵条件によって異なること, また直接あるいは間接添加法など抗酸化剤の添加方法によっても異なることが知られている。殊に乾燥食品では水分含量が5%以下で貯蔵することが望ましいといわれているが, このような低水分の場合, 木村ら¹⁰⁾はカロチノイドの酸化がすみやかに進行すること明らかにしている。

BHA, BHT を添加した例として, Debold¹¹⁾はサツマイモフレークのカロチノイドを酸化防止する目的で, サツマイモを加熱破碎し, ドラム乾燥する前に各種の抗酸化剤を加えた製品は, 空気の下で貯蔵しても対照より30日以上良好な状態を保ったことを報告している。また Bickoff ら^{12)~14)}は鮫油, ラードおよびヤシ油にカロチンを溶解し各種の抗酸化剤のカロチン酸化防止効果を調べ BHA, BHT が優れた効果をもつことを認めている。

このようにメラノイジンが BHA, BHT に匹敵する抗酸化性を示すことから最近, 高エネルギー飼料として, 動物脂を15%内外飼料に加えて家畜に給与すると生育の良好なことが知られているが, このような飼料にメラノイジンを添加することは脂肪のみならず飼料中のプロビタミンAであるカロチンの安定化も可能であり, 今後この方面への利用も一考すべきであると考えられる。

(5) 揚物の安定試験

最近油揚処理を行なったいわゆる揚げめんなどの需要が増すにつれてこの油脂の酸化防止が問題となってきたが, 現在まだ完全な解決策はない。

そこで前項まではメラノイジンを直接加えて油脂やカロチンの安定試験を行なったが, 本項では原料にトリプトファンとグルコースを加え簡単な加工すなわち揚物をつくり, 揚物中の油脂の安定性を比較した。

BHA 区および BHT 区に添加した抗酸化剤の添加量はあらかじめ全く同じようにして揚物を作製し, 2枚づつ5組をソックスレー抽出器を用いて油脂の定量を行ない, この平均値より揚物中に含まれる油脂量を求め, この油脂に対し合成抗酸化剤の添加許容量の

0.02%となるように加えたものである。1枚の揚物に平均3.3gの油脂が含まれていた。

なお揚物作製に用いたなたね油の過酸化値は1以下であった。

モチ揚物の安定性の試験結果を第5図に示した。

BHT 区は試験した中では最も酸化が早く, グリシン区がこれに次いで過酸化物の生成が大である。トリプトファン区は BHA 区よりも安定でトリプトファンとグルコースが加熱処理中に反応し強い抗酸化性を

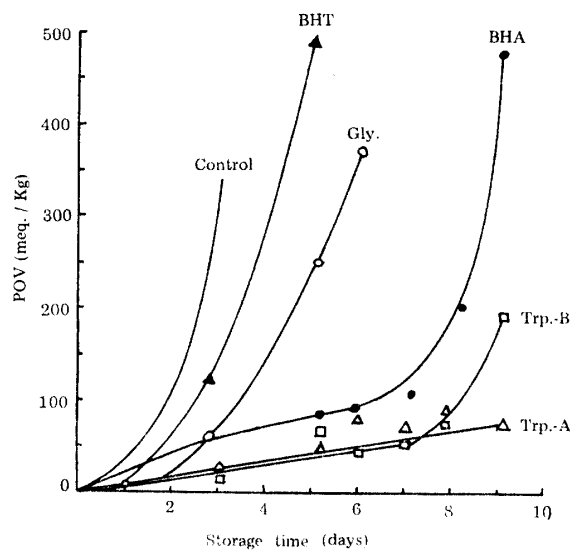


Fig. 5. Stability Test of Fried Rice Cake Chip.

Fried rice cake chip was prepared as in the following;

Control: Glutinous rice flour(200 g.)+Water (100 ml.)→Mixed→Autoclave (120°C, 30 min.)→Knead→5 g. weighed→Expand (diameter ca. 4 cm.)→Fried (rape seed oil, 180°C, 3 min.).

Gly.: Flour(200 g.)+D-glucose 5 g.+Glycine 1 g.+Water 100 ml.)→Mixed→Later treatment was the same way in the control.

Trp.-A: Flour (200 g.)+D-glucose 5 g.+L-tryptophan 1 g.+Water (100 ml.)→Mixed→Later treatment was the same way in the control.

Trp.-B: Flour (200 g.)+Water (100 ml.)→Mixed→Autoclave→+D-glucose, 5 g.+L-tryptophan, 1 g.→Knead→Fried.

BHA.: Flour (200 g.)+Water (100 ml.)→Mixed→Autoclave→+BHA, 40 mg. (corresponding to 0.02% for oil contained av. 3.3 g. in a chip)→Knead→Fried.

BHT: It was the same as shown in the BHA, except the one using BHT insted of BHA.

These fried chips were stored up to the time of determination of POV at 60°C in air-oven.

発現したことを示している。トリプトファンA区はあらかじめモチ米粉にトリプトファンとグルコースを混合し、オートクレーブにかけ 120°C で 30 分加熱しさらに 180°C の油で 3 分間加熱しており、オートクレーブの際にトリプトファンとグルコースを加えて油で揚げる時に加えたトリプトファンB区よりも強い抗酸化力を示している。対照区、BHT 区および BHA 区は油で揚げた時わずかに着色したに過ぎないが、グリシン区、トリプトファンA区およびB区はかなり着色が認められた。

これに類する実験として、山口ら¹⁵⁾ はリジンおよびグルコースを加えて焼菓子を製造すると油脂の酸敗臭の発現が遅れることを明らかにし、油脂の安定性は還元力の大きなものほど安定であることを報告している。また、Griffith¹⁶⁾ はクッキー中の糖類、とくにグルコースが蛋白質などと共存して褐変反応を起こすときに生成するレダクトンは、クッキーに添加された油の安定性を増加させることを明らかにしている。このように実験例は少ないが、焼菓子等の製造の際に、アミノ・カルボニル反応が進行して強い抗酸化性を発揮することは還元性物質の増加と関連のあることが明らかで、本研究の結果とよく一致することである。

しかも、本実験で明らかにしたように、トリプトファンとグルコースを加えて揚物を製造すると、この製品は BHA, BHT を添加したものよりも油脂の酸化防止に効果のあること、また、猿渡¹⁷⁾ の指摘しているようにこれらの合成抗酸化剤の熱安定性が低く、200°C 以上では気散あるいは分解することなどを考慮すると、製品の着色を問題にしない食品あるいは飼料等に本実験の方法の原理を利用することによって強い抗酸化性の発現が期待できるので、きわめて意義のあることであると考えられる。

要 約

トリプトファン・グルコース反応液と現在常用されている抗酸化剤との酸化防止効果の比較を行なったところ、ここで明らかにされた最適条件で得られた反応液の抗酸化能は α -トコフェロールよりも強く、合成抗酸化剤の BHA, BHT に匹敵するものであることが明らかになった。

以上のように強い抗酸化性を示したトリプトファン

・グルコース反応生成物ナタネ油の抗酸化剤、カロチンの安定剤および餅の揚げ物の抗酸化剤として用いた試験を行なった。そして、この反応生成物は BHA, BHT などに匹敵する効果を示すことを明らかにした。

本研究遂行上、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜わった 稲神馨博士 (元九大教授、現カルピス研究所長)、山藤一雄名誉教授 (九州大学)、九州大学豊水正道教授、大村浩久教授、阿久根了元教授、鹿児島大学山田晃教授に感謝の意を表す。更に、御便宜を賜わった九州大学農学部食糧化学工学科の諸氏に対し謝意を表す。

文 献

- 1) 富田裕一郎：鹿大農学術報告. **21**, 153(1970).
- 2) 富田裕一郎：同上誌. **21**, 161 (1970).
- 3) 熊沢 恒：油化学. **8**, 405 (1959).
- 4) 八木一文・秋谷年見：食品の酸化とその防止。光琳書院 (1967).
- 5) W. J. PETERSON, J. S. HUGHES and H. F. FREEMAN: *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed*, **9**, 71 (1937).
- 6) C. H. LEA and R. J. WARD: *J. Sci. Food Agr.* **10**, 537 (1959).
- 7) J. W. HIGGINS and H. S. BLACK: *Oil & Soap*. **21**, 277 (1944).
- 8) R. N. MOORE and W. G. BICKFORD: *J. Am. Oil chem. Soc.* **29**, 1 (1952).
- 9) L. R. DUGAN: *Am. Meat Inst. Foundation Bull.* No. 18 (1954).
- 10) 木村進・塩田和子：食工誌. **10**, 276 (1963).
- 11) H. J. DEBALD, T. A. MCLEMORE, N. R. BERTONIEKE and J. A. MALTINE: *Food Tech.* **18**(5) 145, (12) 146 (1964).
- 12) E. M. BICKOFF: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **28**, 65 (1951).
- 13) E. M. BICKOFF, G. M. COPPINGER, A. L. LIVINGSTON and T. W. CAMPBELL: *ibid.* **29**, 51 (1952).
- 14) E. M. BICKOFF, A. L. LIVINGSTON, J. GUGGOLZ and C. R. THOMPSON: *ibid.* **29**, 445 (1952).
- 15) 山口直彦・横尾良天・小山吉人：食工誌. **11**, 184 (1964).
- 16) T. GRIFFITH: *Cereal Chem.* **34**, 159 (1957).
- 17) 猿渡健市：有機合成化学協会誌. **23**, 734 (1965).

Summary

A comparative research was made between the antioxidant ability of the browning solution of tryptophan with glucose and the commercial antioxidants.

When the linoleic acid was used as the substrate, the antioxidant activity of the browning solution prepared under the suitable condition was stronger than that of α -tocopherol, and also was shown to have the same effects as the commercial agents such as BHA and BHT. In the cases of the rape seed oil, the β -carotene and the fried-rice-cake chip was used as substrate, it was found that the effect of the browning-reaction-product 'melanoidine' was almost equal to those of BHA and BHT.