

# グルタミン酸およびアスパラギン酸の ガンマ放射線分解に関する研究\*

鮫 島 宗 雄\*\*

## Studies on the $\gamma$ -Radiolysis of Glutamic and Aspartic Acids

Muneo SAMESHIMA

### Abstract

Recent studies on the utilization of radiation as one of the effective methods of food preservation has been conducted. By these investigations, it has been clarified that the budding of potatoes has been controlled, and this method has been applied to practical use. The method of preserving food by irradiation of  $\gamma$ -rays on food has many advantages: There is no need to heat food and no need to add antibiotics to food, but there are a few disadvantages, for example, decomposition of the constituents of food, and the formation of "off-flavor" or discoloration. This investigation was undertaken to clarify the mechanism of radiolysis of the constituents of the food in order to improve the preservation method of food by applying it to practical use.

This thesis is mainly concerned with the mechanism of radiolysis of glutamic and aspartic acids, when the crystalline samples and the aqueous solutions of these compounds were irradiated by  $\gamma$ -rays under vacuum. Glutamic and aspartic acids are the major components of fisheries food and they are monoamino-dicarboxylic acids, therefore, interesting to note that they have quite a different mechanism of radiolysis from other simple amino acids.

The radiation sources of  $\gamma$ -rays used was Co-60, 3,000 ci, and the dosage was 20-180 Mrads for crystal samples, and 1.8-40 Mrads for aqueous solutions.

The components of the decomposed compounds by radiolysis were separated by ion exchange column chromatography, thus purified, each amino acids was assayed by the ninhydrine coloration method. Fatty acids were submitted to silica gel column chromatography, and thus purified, each fatty acids was derived to p-bromophenacyl-esters and measured their melting points or paper partition chromatography or gas liquid chromatography. Ammonia was assayed by the micro diffusion method and indophenol coloring method. The amounts of carbon dioxide were measured by micro diffusion method. In order to detect the changes of the configurations of the amino acids, the irradiated samples were submitted to infra-red spectrophotometer and X-rays diffraction analysis.

1.1. It was confirmed that there are two kinds of reactions, when the crystalline samples of glutamic acid were irradiated by  $\gamma$ -rays: Ammonia and glutaric acid were obtained by deamination, and carbon dioxide and  $\alpha$ -amino-n-butyric acid were isolated by decarboxylation. The amounts of the products are  $G(\text{ammonia})=3.8$ ,  $G(\text{glutaric acid})=2.8$ ,  $G(\text{CO}_2)=1.0$ , and  $G(\alpha\text{-ABA})=0.8$ .

\* 北海道大学審査学位論文 (Thesis submitted for the degree of Doctor of Fishery Science at the University of Hokkaido, June, 1972.)

\*\* 鹿児島大学水産学部生物化学研究室 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

The form of decarboxylation reaction is  $\omega$ -decarboxylation. The existence of small amounts of n-butyric acid, which seemed to be generated by the complex reaction of decarboxylation and deamination, were confirmed.

Besides small amounts of succinic and malonic acids, it was clarified that  $\alpha$ -amino-n-butyric acid was isomerized to  $\gamma$ -aminobutyric acid. And also that the infra-red absorption spectra of carboxyl and amino radicals were considerably effected, when the same crystalline samples were irradiated by more than 100 Mrads dosage.

1.2. When  $\gamma$ -rays was irradiated on the aqueous solution of glutamic acid, the amounts and the kinds of the decomposed constituents were greatly affected by pH of its solution: In weak alkaline solution,  $\gamma$ -aminobutyric acid was obtained by  $\alpha$ -decarboxylation, and its highest yield was  $G(\gamma\text{-ABA})=2.2$  at pH 7.9. On the other hand, in the weak acidic solution, aspartic acid was identified and its amounts became highest at pH 3.9 ( $G(\text{Asp})=3.9$ ).

The mechanism of formation of aspartic acid from glutamic acid seems to be a complex reaction which needs a scission of the chain between 3rd and 4th carbons and recombination with other carboxyl radicals. Decarboxylation reaction is a peculiar reaction which has two maximum values in weak acidic and in weak alkaline conditions. Each  $G(\text{ammonia})$  was 2.6, 1.7 and 4.2 at pH 2.2, 6.8 and 9.2 respectively. The formation of glutaric acid which was generated at the same time has an identical tendency.

In a weak acidic solution, very small amounts of n-butyric acid were identified.

1.3. When  $\gamma$ -rays was irradiated on the crystalline samples of  $\gamma$ -monosodium glutamate, the amounts of  $\alpha$ -amino-n-butyric acid were detected by decarboxylation reaction, and were one of those found in the case of the crystalline samples of glutamic acid. The differences between the bounding energies based on the existence of Na atom have clearly been manifested.

2.1. The main reaction and its major products were ammonia and succinic acid by deamination reaction, and alanine and  $\beta$ -alanine by the decarboxylation one, when the crystalline samples of aspartic acid were irradiated. Its G values were as follows:  $G(\text{ammonia})=6.0$ ,  $G(\text{succinic acid})=5.2$ , and  $G(\text{Ala})=1.0$ . It was confirmed that decarboxylation of the crystalline samples of aspartic acids were slightly manifested at  $\alpha$ -site, in addition to the main reaction of  $\omega$ -decarboxylation.

2.2. Decarboxylation reaction was mainly a  $\alpha$ -decarboxylation one, and its reaction became highest at pH 9.4:  $G(\beta\text{-Ala})=1.8$ , when the aqueous solution of aspartic acid was irradiated. In the weak acidic solution, small amounts of alanine were identified by the reaction of  $\omega$ -decarboxylation. This phenomenon was completely different from the reaction of aspartic acid formation occurred in a glutamic acid sample.

On the other hand, the effect of pH was almost same in the case of the sample of glutamic acid, its products were ammonia and succinic acid. In the case of weak acidic solution, very small amounts of propionic acid were identified.

When the decomposition of the crystalline samples of glutamic acid were compared with that of aspartic acid, the decomposition of aspartic acid was stronger than of glutamic acid: The deamination reaction of aspartic acid was two times greater than in the case of glutamic acid, and its decarboxylation reaction was four times greater than that one.

The author proposed that the reason came from the difference in the length of their carbon chains. When the decomposition of the aqueous solution of glutamic acid was compared with that of aspartic acid, the most conspicuous difference of these compounds was that aspartic acid was formed from glutamic acid, and  $\beta$ -alanine and alanine were formed from aspartic acid in the weak acidic solutions. It was clarified that the differences between those reaction mechanisms came from the structure of the carbon chains. In the aqueous solution, besides the changes of ionization according to pH, glutamic acid had a tendency of making a ring structure by dehydration and condensation reaction in the molecules. This specific characteristic of the glutamic acid makes a conspicuous differences depending on the amounts and the kinds of the decomposed products of aspartic acid. Deamination reaction has the same tendency of decomposition in both glutamic and aspar-

tic acids, but in the case of decarboxylation, glutamic acid proceeds 1.3 times faster than that of aspartic acid.

When the crystalline samples of both glutamic and aspartic acids were compared with those of the aqueous solution, the samples of aqueous solution were decomposed more strongly than that of the crystalline samples by the reaction of the free radicals and hydrated electrons formed by decomposition of water. The most remarkable difference among the reaction forms were decarboxylation reactions, and in the case of crystalline samples, the major one was  $\omega$ -decarboxylation. In the case of the aqueous solution, it was  $\alpha$ -decarboxylation.

Among the degradation components generated from glutamic and aspartic acids by the irradiation of  $\gamma$ -rays, the most odorous components are ammonia and lower grades of fatty acids. In order to prevent these degradation reactions, to keep the medium strong acid or alkali is one of the most effective ways, but from the point of view of food, it is one of the best ways to keep the medium neutral and to irradiate the food at a moderate dosage.

## 目 次

序 論	4
1. 水産食品に対する放射線照射	4
2. アミノ酸に対する放射線照射	6
3. この研究の目的	9
実験方法	10
1. 試料ならびに標準試薬	10
2. 照射用試料の調製	10
3. ガンマ線照射	11
4. 反応生成物の検出と測定	11
実験結果	14
1. L-glutamic acid のガンマ線分解	14
1.1. 固体試料に対するガンマ線照射とその分解生成物	14
1.1.1. glutamic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構	14
1.1.2. ガンマ線照射による glutamic acid のカルボン酸への転移機構	18
1.2. 水溶液試料に対するガンマ線照射とその分解生成物	23
1.2.1. glutamic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構	23
1.2.2. ガンマ線照射による glutamic acid のカルボン酸への転移機構	27
1.3. $\gamma$ -Na-glutamate に対するガンマ線照射とその分解生成物	34
2. L-aspartic acid のガンマ線分解	38
2.1. 固体試料に対するガンマ線照射とその分解生成物	38
2.1.1. aspartic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構	38
2.1.2. ガンマ線照射による aspartic acid のカルボン酸への転移機構	40
2.2. 水溶液試料に対するガンマ線照射とその分解生成物	44
2.2.1. aspartic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構	44
2.2.2. ガンマ線照射による aspartic acid のカルボン酸への転移機構	46
討 論	52
1. glutamic acid および aspartic acid 結晶のガンマ線分解	52
2. glutamic acid および aspartic acid 水溶液のガンマ線分解	54
3. 生化学的アミノ酸分解との比較	57
4. タンパク質食品に対する放射線照射の問題点	59
要 約	62

謝 辞	64
文 献	64

## 序 論

### 1. 水産食品に対する放射線照射

#### 1.1. 食品照射の現状

従来食品の保存法としては、缶詰、冷凍冷蔵等が代表的なものとされて来た。しかし、ここ20数年来食品に対する放射線照射が保蔵を目的として試みられ、一部には、すでに実用価値を認められた部門もある。放射線による食糧保蔵は、諸外国においても、世界的な食糧事情の困難に対処する有効な手段として実用化を予想し、これに必要な関連問題を広汎にとり上げながら総合的見地に立った開発計画の推進が、国連食糧農業機構、国際原子力機関等を

Table 1. Approbation on the foods irradiation (1965)<sup>1)</sup>

Foods	Radiation source	Energy (MeV)	Dose (Mrad)	Purpose	Approbation
Potato	<sup>60</sup> Co $\gamma$ rays	1.17		inhibition of budding	USSR (1959)
		1.33	0.015	"	Canada (1960)
	"		0.005~0.010	"	USA (1964)
Bacon	<sup>137</sup> Cs $\gamma$ rays	0.06	"	"	" (1964)
	<sup>60</sup> Co $\gamma$ rays		4.5~5.6	sterilization	USA (1963)
		$\beta$ rays	5	"	"
		10	"	"	" (1965)
	X rays	5		pasteurization	" (1964)
Wheat	<sup>137</sup> Cs $\gamma$ rays		4.5~5.6	sterilization	" (1963)
	<sup>60</sup> Co $\gamma$ rays		0.02~0.05	extermination of vermins	USA (1963)
		$\beta$ rays	5	"	"
Onion	$\gamma$ rays		0.015	inhibition of budding	Canada (1964)
				Sterilization of surface	USA (pending)
Orange	<sup>60</sup> Co $\gamma$ rays		0.075~0.20		
	<sup>137</sup> Cs $\gamma$ rays				

Table 2. Favorable foods for radiation-preservation<sup>2)</sup>

Purpose	Foods	Dose (Mrad)	Cost (¥/Kg.)
sterilization	bacon	4 -6	40 -80
pasteurization	fruits	0.05 -1.0	5 -15
	fishes		
disinfection	eggs	0.3 -1.0	5 -15
	meats	0.01 -0.05	
extermination of vermins	cereals	0.01 -0.05	- 0.5
inhibition of budding	potato	0.003-0.015	0.2- 0.5
	onion		
quality improvement	dried vegetables	0.3 -0.4	
	wines	0.05 -0.2	5 -10

中心に行なわれている<sup>1)</sup>。

Table 1<sup>1)</sup> および Table 2<sup>2)</sup> は1965年における食品照射の法的許可と経済面から見た有望度である。放射線の殺菌作用が食品工業に本格的に応用されたのは第二次大戦後であるが、ジャガイモの発芽抑制に、ソ連、カナダ、アメリカで利用されている程度で、完全殺菌を目的としたものは、アメリカにおけるベーコンだけである。しかし、今後の開発によっては、魚介類、卵、肉類の pasteurization, 消毒への応用も有望と言える<sup>2)</sup>。

食品照射の安全性については、危害の可能性を生物学、化学、物理学の面から検討した報告<sup>3)</sup> がある。

問題点として挙げられるものは、

- (1) 照射によって有害物質が食品中に生成しないか。
- (2) 糖質、脂質、蛋白質、ビタミン等の食品成分が破壊しないか。色、味、臭い、物性変化はないか。
- (3) 照射食品中に、生物の遺伝に変異を起こさせる物質が生成する可能性がないか。
- (4) ベーコンなどステロール含有食品を照射した場合、たとえば 6- $\beta$ -hydroperoxy-4-cholesten-3-one のような発がん性物質を生じないか。
- (5) 食品中の成分の一部が放射化しないか。
- (6) 照射後も残存する細胞および変異した菌によって病害が起る可能性はないか。

の諸点である。このうち(2)を除く諸点については現在までの研究では問題はないとされている。照射による食品栄養素の破壊、変色、異臭発生については十分に検討を加えなければならぬ。

## 1.2. 水産食品に対する照射

水産食品を対象とした放射線照射の研究は、殺菌を目的として早くから着手されている<sup>4)</sup>。1949年以來サバ、タラなどに電子線照射を行なったものを始めとし<sup>5,6)</sup>、魚介類はもとよりねり製品<sup>7)</sup>、塩干品<sup>8)</sup> 等多くの報告がなされている。もとより食品の品質を低下させずに完全殺菌することは困難であるが、研究の進展とともに食品照射の主要方向が radiation pasteurization に位置づけられるとともに、照射の対象、線量の程度などに焦点が絞られるようになった。

今日一般に行なわれる動物性食品の低線量照射殺菌は、多くの水産物も対象として挙げられている<sup>9,10)</sup>。

1965年、アメリカ原子力委員会から食品薬品管理局に対して水産物照射許可の申請が出されたが、実用化までには、まだ多くの問題点があり、その解決には基礎的研究が不足している<sup>11,12)</sup>。

水産食品に対する照射の線源としては、Co-60のガンマ線が多く採用されている。照射による食品の品質低下が起こらずに保存期間を効果的に延長する線量、いわゆる適正線量は一般に0.15~0.3Mradと言われている。適正線量の定義は極めて莫然としているが、

- (1) 食用可能な範囲での最大線量。
- (2) その製品に必要なとされる保存期間中、一定の品質を保証できる最低の線量の範囲内とするのが普通のようなものである<sup>13)</sup>。

例えば、魚肉フィーレについて適宜の線量と低温保持を併用することによって照射品が非

照射品の2~3倍の保存期間延長ができる程度が一応の目安とされている<sup>14,15)</sup>。

食品に対する照射線量は明確には分類されていないが、次のような提唱がなされ<sup>16)</sup>、1965年には国際的に採択されている<sup>17)</sup>。

- (1) 完全殺菌 (radappatization), 4~6Mrad.
- (2) 病原菌殺菌 (radicization), 0.3~1.0Mrad.
- (3) 普通腐敗菌の減少 (radurization), 0.05~1.0Mrad.

魚介類を完全殺菌するには4~6Mradの高線量を必要とするため、必然的に食品成分の分解変質を伴い、臭、味、色沢等の悪変による商品価値の低下を避けることは困難である。

前述のベーコンに対する4~6Mradの法的許可は例外的なものである。食品成分の分解のうち主要なものは、含硫化合物の分解による硫化水素、メルカプタンの発生、含窒素化合物の分解による ammonia、アミン類の発生、この外に低級脂肪酸、カルボニル化合物の生成、脂肪の酸化、ビタミン類の破壊等である。特に水分および酸素の存在下における照射によって著しい変化が起こされる<sup>3)</sup>。

## 2. アミノ酸に対する放射線照射

### 2.1. 水産食品に含まれる glutamic acid と aspartic acid

著者は、食品照射の実用化に関して残されている諸問題点のうち、含窒素化合物の分解によって生ずる ammonia、低級脂肪酸等の悪影響を除く目的をもって、魚介類の成分のうち食品学的に見て最も価値あるタンパク質をとりあげ、タンパク質の構成成分であるアミノ酸のガンマ線分解を基礎的研究の対象とした。

各種アミノ酸のうち、glycine<sup>18)</sup>、alanine<sup>19,20)</sup>のような比較的低分子の化合物や、照射によって不快な硫化水素またはメルカプタンを生ずる含硫アミノ酸<sup>21)</sup>については比較的研究がなされている。

しかしタンパク質構成アミノ酸のうち極めて存在量の多い glutamic acid、aspartic acid については、総合的な研究がお不十分である。

Table 3 は水産動物の筋肉タンパク質を構成するアミノ酸のモル比である。表中の魚類は<sup>22,23)</sup>サバ、ブリ、メバチ、カツオ、ホシザメ、マイワシ、ベニマス、コイ、ハモ、マアジ、マダイ、イシガレイ、およびスケソウダラ、を個々に分析した結果であり、甲殻類<sup>24)</sup>はクルマエビ、イセエビ、およびガザミを、貝類<sup>25)</sup>はハマグリ、およびアワビを分析対象としたものである。いずれの分析例も glutamic acid は第1位の含量を示し、aspartic acid も第2位または極めて上位にあることがわかる。水産動物のタンパク質<sup>26,27,28,29)</sup> またはエキス分の<sup>28,30,31)</sup>アミノ酸構成比に関する報告は多いが、筋肉タンパク質の主成分ミオシンを対象<sup>27)</sup>としたものでは glutamic acid と aspartic acid の存在比がそれぞれ1位と2位を占めるのが普通である。また海藻類のエキス成分中のアミノ酸についても、例えばコンブ成分を分析し、glutamic acid はアミノ酸全体の50~60%を、aspartic acid は20~40%に相当し、それぞれ1位と2位の存在比であるとの報告<sup>32)</sup>もある。

このように glutamic acid と aspartic acid は水産動植物中に多く存在するので、水産食品の照射を考えると、当然、無視し得ないアミノ酸といえることができる。

Table 3. Amino acids composition of fishes, shell-fishes, and Crustacean muscle proteins  
(nitrogen % in total amino-nitrogen)

Amino acids	Fishes <sup>22,23)</sup>	Shell-fishes <sup>25)</sup>	Crustacean <sup>24)</sup>
glycine	3.0- 5.5	4.3- 6.2	4.6- 4.7
alanine	5.1- 7.3	6.2- 6.6	5.7- 6.0
valine	5.6- 9.3	4.2- 4.4	4.4- 5.0
leucine	7.4- 9.4	8.2- 9.6	8.6- 9.0
isoleucine	5.0- 7.9	4.0- 4.5	3.8- 4.7
proline	2.9- 4.2	3.4- 4.6	3.4- 4.5
phenylalanine	3.4- 5.2	3.7- 3.7	4.4- 4.8
tyrosine	3.5- 4.6	3.7- 4.6	4.1- 4.7
tryptophn	1.1- 1.4	0.7- 1.5	1.0- 1.6
serine	4.6- 5.5	4.9- 5.2	4.2- 4.9
threonine	5.2- 6.0	4.7- 5.0	4.1- 5.2
cystine	-	1.3- 1.3	1.1- 1.7
methionine	3.1- 3.7	2.5- 2.7	2.8- 3.2
arginine	5.6- 6.9	7.8- 8.6	6.3- 9.0
histidine	2.2- 3.9	1.5- 1.5	1.9- 2.4
lysine	9.9-11.8	6.8- 8.1	8.9- 9.5
aspartic acid	6.2-11.5	11.1-11.2	11.7-12.3
glutamic acid	13.4-16.9	15.8-17.1	16.2-17.5

Fishes (13 species): *Mustelus manazo* (hoshizame), *Sardina malanosticta* (maiwashi), *Oncorhynchus nerka* (benimasu), *Cyprinus carpio* (koi), *Muraenesox cinereus* (hamo), *Trachurus Japonicus* (maaji), *Pagrosomus major* (madai), *Kareius bicoloratus* (ishigarei), *Theragra chalcogramma* (suketodara), *Scomber japonicus* (saba), *Seriola quinqueradiata* (buri), *Parathunnus sibi* (mebachi), *Katsuwonus vagons* (katsuo).

Shell-fishes (2 species): *Meretrix meretrix* (hamaguri), *Haliotis gigantea* (awabi).

Crustacean (3 species): *Penaeus japonicus* (kurumaebi), *Panulirus japonicus* (iseebi), *Neptunus trituberculatus* (gazami).

## 2.2. アミノ酸の放射線分解に関する従来の研究

一般にアミノ酸に対する放射線照射の研究は、古くから数多くあり、近年の食品工業界での利用は、放射線に対して感受性の強い物質の化学変化についての研究を一層発展させている。最近に至り、微量分析法の改善、分析機器の著しい発展によって、極めて微量の分解生成物までが検討の対象になり、反応機構の解明も活発である。

アミノ酸に対する放射線の影響は、結晶を対象とした直接効果と、試料を溶液として照射を行なう間接効果の両面から研究されている。水溶液での実験では放射線の効果が水にも及ぶため、水に由来する遊離基の活性が大きく作用し、直接効果では得られない多くの相異点を見出すことができる。

### 2.2.1. 直接効果に関する研究

ガンマ線、X線のアミノ酸に対する直接効果を研究した報告の多くは生成する遊離基の測定に electron spin resonance (ESR) を用いている。SHIELD と GORDY<sup>33)</sup> は X線照射を受けた多種類のアミノ酸の ESR パターンを検討し、遊離基の同定を試み、PRYDZ<sup>34)</sup> らも

同様に遊離基の収量を報告している。SCHIRMERら<sup>35)</sup>は $\alpha$ 線によって作られる paramagnetic center を X 線の影響による場合と比較し、X 線の場合の40~80%であると報告している。その他にも ESR を利用してアミノ酸から生ずる遊離基を同定した研究は多い<sup>36,37,38,39,40,41,42,43)</sup>。

アミノ酸分解物についての一般的研究としては、10種類のアミノ酸について分解生成物の G 値を求めた Box らの報告<sup>44)</sup>を始め、アミノ酸の脱炭酸、脱水酸基反応によって生ずるアミン類、イミノ化合物、ケト酸の追求と炭素鎖の分裂と再合成を研究した例がある<sup>45)</sup>。

MESHITSUKAら<sup>46)</sup>は GHOSHら<sup>47)</sup>、WEINERら<sup>48)</sup>が glycine 結晶につて ESR を用いて得た遊離基変化を参考とし、ガンマ線照射後の glycine 分解物を分析して、その反応の収支、機構に検討を加えている。特殊な例としては芳香族アミノ酸結晶を 77°K でガンマ線照射した後に加熱し、3000~6500Å の thermoluminescence を検出した研究<sup>49)</sup>がある。

### 2.2.2. 間接効果に関する研究

KHENOKH<sup>50)</sup>らは glycine, alanine, leucine, phenylalanine, tyrosine の水溶液にガンマ線を照射し、炭素鎖の切断または環状構造の hydroxylation によって 230~300m $\mu$  の紫外部吸収が増加することを報告している。紫外部吸光度の変化については芳香族アミノ酸溶液に X 線を照射した場合の実験例<sup>51)</sup>もある。アミノ酸水溶液にガンマ線照射を行なうと、種類によっては光学活性に変化が現われるが L-glutamic acid, L-aspartic acid の比旋光度変化は少ない<sup>52)</sup>。

照射を受けたアミノ酸水溶液に生ずる分解生成物については多くの報告があり、分解反応機構の解明が試みられている。

STEINら<sup>53)</sup>は X 線照射を受けた溶液中のアミノ酸から生ずる ammonia, アルデヒド類は、酸化的脱アミノの結果であり *in vitro* で化学的に OH<sup>-</sup> の作用を受ける場合と同じ変化であると報告している。酸化的脱アミノは酸素の存在下で反応初期に強く起こるとされている<sup>54)</sup>。この外分解生成物としては炭素鎖の切断による H<sub>2</sub>CO の生成<sup>55,56,57)</sup>、含硫アミノ酸からは硫化水素、メルカプタン類<sup>55)</sup>、アルデヒド類<sup>58)</sup>、その他<sup>59,60)</sup>がある。

アミノ酸の脱アミノで生ずる ammonia<sup>54)</sup> や水素、アルデヒド類の生成量<sup>56)</sup> は、必ずしも放射線量に直線的な比例関係にはないと報告がある。しかし、これらの報告はいずれも断片的な研究であり、照射によってアミノ酸から生ずる全ての物質を測定し、G 値の算出と反応機構の解明を試みたのは glycine<sup>18)</sup> および alanine<sup>19)</sup> について研究した MAXWELL らが最初である。彼等は、また alanine 分解に及ぼす pH の影響についても詳細に研究し、<sup>14</sup>C で標識した glycine を照射し CH<sub>3</sub>•NH<sub>2</sub>, HCHO, HCOOH の炭素はメチル基の C に、CO<sub>2</sub> はカルボキシル C に由来することを確認している<sup>20)</sup>。

間接効果においては水に由来する遊離基が大きな影響力を持っている。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成はアミノ酸の種類<sup>61)</sup> および濃度<sup>62)</sup> によって差があり、glutamic acid は、多量にこれを生成する部類に属する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成は溶液の pH により影響が大きく pH 8 において最大の生成量を示し<sup>63)</sup>、またアミノ酸の分子量によって G(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 生成量に何らかに傾向が見られるとの報告<sup>64)</sup>もある。第一鉄イオンの共存下では H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は OH, HO<sub>2</sub> に変化しアミノ酸から  $\alpha$ -oxo acid が生成する<sup>65)</sup>。一般に照射するアミノ酸水溶液を十分に脱気すれば H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等の生成は微量に止まるものである<sup>68)</sup>。



KOPOLDOVÁら<sup>66)</sup>は  $\alpha$ -amino-n-butyric acid 水溶液を照射し、20種類以上の分解生成物を検出した。分解生成物のうち76%は炭素4個の化合物であり、炭素3個の化合物は5%に過ぎず、また明らかに dimerization の行なわれた形跡があったという。重合は酸素の存在下では dimerization の段階で止まるが、脱気条件下では長時間照射によって polymerization が起こる<sup>67)</sup>。

水溶試料についても ESR によって遊離基を追求した報告例<sup>68)</sup>がある。

### 2.2.3. glutamic acid および aspartic acid の放射線分解

glutamic acid の放射線分解に関する報告としては、X 線照射により水溶液中に  $\alpha$ -および  $\gamma$ -amino butyric acid<sup>69)</sup>, ammonia<sup>70)</sup> の発生、ガンマ線照射によってポリマーの生成する例<sup>71)</sup>がある。

紫外線照射による光化学的变化によれば glutamid acid, から aspartic acid, serine, glycine,  $\alpha$ -および  $\beta$ -alanine,  $\alpha$ -および  $\gamma$ -amino-butyrlic acid, ammonia, propionic acid, n-butyric acid 等が生成する<sup>72,73,74,75,76)</sup>。

aspartic acid の場合には、X 線照射を受けた水溶液中に  $\alpha$ -および  $\beta$ -alanine が生成する<sup>45)</sup>。紫外線照射の場合には  $\alpha$ -および  $\beta$ -alanine の外 serine, glycine,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid, glutamic acid, ammonia, propionic acid, n-butyric acid, malonic acid, oxaloacetic acid, oxalic acid と多様な物質が生成する<sup>77)</sup>。

このうち glutamic acid の生成は、aspartic acid から生じた alanine と acetic acid が再び結合する反応によると推論されている<sup>74,75,78)</sup>。

SHIMAZUら<sup>79)</sup>は多くのアミノ酸の放射線に対する安定度を測定し、glutamic acid と aspartic acid は放射線に対して glycine, alanine と同様に分解を受け難く、含硫アミノ酸の cystine, methionine, 芳香族アミノ酸の phenylalanine は分解し易いことを報告している。

## 3. この研究の目的

食品に対する放射線照射の影響を研究するには、分解し易いアミノ酸や、分解によって食品価値を損なう物質を生成するアミノ酸を先ず対象にすべきであり、含硫アミノ酸はこの意味でかなり進められている<sup>47,59,108,109,110,111,112)</sup>。また一面においては、タンパク質アミノ酸のうちでも含有量の多いアミノ酸を対象とした放射線分解の研究も大切である。

先述したように glutamic acid と aspartic acid は、水産食品のタンパク質を構成するアミノ酸のうちで含量は1位、2位と高位を占める場合が多く、食品に対して放射線照射を行なう場合に、量的に無視できない成分である。しかし、これらの放射線分解に関する基礎的研究報告は少ない。

著者は glutamic acid と aspartic acid の結晶および水溶液を脱気条件下でガンマ線照射し、主要分解生成物の測定と分解機構に対する考察を行なった。両者は、ともに mono-amino-dicarboxylic acid に属し、炭素鎖の長さがわずか1個異なるだけの物質で、その分解の類似点、相違点も反応機構を論ずる上で重要なものと考えられる。

本報告は食品照射の実用化と改良に対する基礎的資料となるものと考えられる。

## 実験方法

### 1. 試料ならびに標準試薬

1.1. アミノ酸 ガンマ線照射用の L-glutamic acid, L-aspartic acid,  $\gamma$ -Na-glutamate および分解生成物確認のための L-alanine,  $\beta$ -alanine は和光純薬製 (特級), DL- $\alpha$ -amino-n-butyric acid, DL- $\gamma$ -amino-butyric acid は関東化学製 (特級) を使用した. 以上のアミノ酸はいずれもクロマトグラフィ的に純品で, L-glutamic acid と L-aspartic acid の融点は, それぞれ224°~225°C (245°~249°Cで分解) と268°~270°Cで, 文献値<sup>80)</sup>にある224°~225°C (245°~249°Cで分解) と270°~271°Cによく一致した.

本文または図表中において各アミノ酸は必要に応じて次のように略称した.

L-glutamic acid	; Glu
L-aspartic acid	; Asp
$\gamma$ -Na-glutamate	; $\gamma$ -Na-Glu
DL- $\alpha$ -amino-n-butyric acid	; $\alpha$ -ABA
DL- $\gamma$ -amino-butyric acid	; $\gamma$ -ABA
L-alanine	; Ala
$\beta$ -alanine	; $\beta$ -Ala

1.2. カルボン酸 分解生成するカルボン酸確認のために, 標準試薬として adipic acid (半井化学薬品製特級品), glutaric acid, malonic acid, oxalic acid, n-valeric acid, n-butyric acid, propionic acid, および acetic acid (以上和光純薬製特級品) を使用した.

### 2. 照射用試料の調製

2.1. 結晶試料 結晶アミノ酸はメノー乳鉢で磨砕し, 100メッシュ以下の粒度にしたものを硫酸デシケート内で一夜乾燥した. この試料アミノ酸を内径 6.5~7.0mm の硬質ガラス管 (柴田ガラス製ハリオ) に入れ, 水銀拡散ポンプまたは油拡散ポンプ (日本真空技術製 YB-100 型) にて  $10^{-5}$  Torr 程度の減圧で2時間以上脱気後密封した. なお, 操作中の30分間は, 脱気中の試料入りガラス管を80°C前後に湯浴を施して加温し, 脱気を促進した. 各試料管中のアミノ酸は約500mgで脱気前に精秤した.

2.2. 水溶液試料 供試アミノ酸は500mg/dl または800mg/dl (glutamic acidは33.98mM または54.37mM, aspartic acidは37.57mM または60.11mM,  $\gamma$ -Na-glutamate $\cdot$ H<sub>2</sub>Oは500mg/dlすなわち26.71mMのみ) の濃度とし, 内径13~14mmの硬質ガラス管に5mlずつ分注し, いわゆる freeze and thaw method によって脱気した. すなわち, 液体窒素または dry ice-acetone の寒剤で試料溶液を凍結しつつ脱気し, 続いて融解により溶存ガスを追い出し, 再び凍結, 脱気, 融解を反覆し, 試料溶液中の溶存ガスを認めなくなった後密封した. 脱気操作中の水分減少は微量であった. 排気装置は結晶試料の脱気に用いたものと同じで  $10^{-6}$  Torr の減圧能力を持つものである.

試料液の調製に当り, pH緩衝液として, CLARK-LUBS系の緩衝液<sup>81)</sup>を使用した. ただし, 成分中に窒素化合物, カルボキシル基, 炭酸基を加えぬように注意した. 一部にアミノ酸を純水に溶解したものを試料としたが, 純水は, 次のようにして精製した. 脱イオン水に苛性

ソーダおよび過マンガン酸カリを加えて蒸溜し，続いて硫酸と過マンガン酸カリを加えて蒸溜し，さらに一回蒸溜を重ねた三溜水である．各アミノ酸試料液の pH は実験結果の該当部にそれぞれ記載した．

### 3. ガンマ線照射

照射は，北海道大学理工系放射性同位元素研究室の3,000キュリー Co-60 を線源とする装置で行った．照射線量は Radocon レントゲンメーター (Victoreen 社製) で測定し，吸収線量は  $G(\text{Fe}^{3+})=15.6$  とする FRICKE法<sup>82)</sup> によって算出した．

### 4. 反応生成物の検出と測定

#### 4.1. アミノ酸 結晶試料は分析直前に開封し，蒸溜水に溶解後 pH 2.2 citric acid

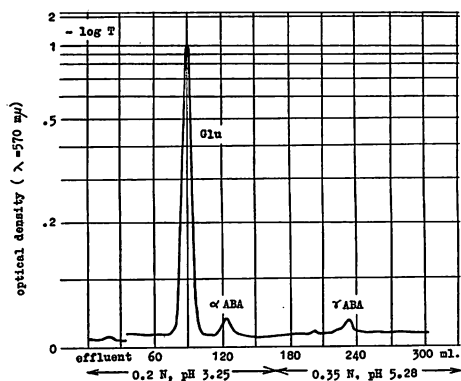


Fig. 1. Results of amino acids separation by method of auto-analysis  
 sample:  $\gamma$ -irradiated L-glutamic acid crystal (total dosage: 134 Mrad)  
 sample concentration for analysis: 200  $\mu\text{g./ml.}$  or 1.36  $\mu$  mole  
 column length: 15 cm.  
 resin: Amberlite CG-120 Type III  
 buffer solution: citrate buffer solution  
 column temperature: 50°C.  
 apparatus: Hitachi KLM-3

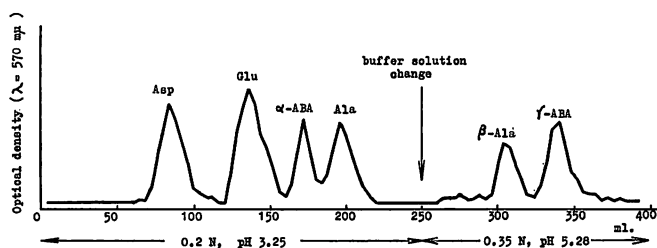


Fig. 2. Standard amino acids separation by column chromatography  
 Column: 60 cm.  $\times$  9 mm.  $\phi$   
 Resin : Amberlite CG-120  
 Buffer solution : citrate buffer solution

緩衝液にて適宜稀釈して供試した。アミノ酸の測定は日立製作所製 KLA-3 型アミノ酸分析計, または Amberlite CG-120 の  $9\text{mm}\phi \times 600\text{mm}$  カラムとフラクションコレクター, ニンヒドリン発色法, 光電光度計を組合せ, 自動分析に準じた方法<sup>83)</sup>によって分析した。

両方とも glutamic acid, aspartic acid,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid および  $\beta$ -alanine の分離は良好であった。この結果を示せば Fig. 1 および Fig. 2 である。

この外アミノ酸同定のため一部にペーパークロマトグラフィ, シリカゲル薄層クロマトグラフィを併用した。

**4.2. カルボン酸** カルボン酸の測定はシリカゲルカラムクロマトグラフィによって分別溶離し, 中和滴定する方法<sup>84,85)</sup>に従った。シリカゲルは Mallinckrodt 社製 A.R. 100 メッシュで, カラムは  $13\text{mm}\phi \times 240\text{mm}$  である。この方法は固定相として chloroform, 移動相として n-butanol を併用するもので, 溶離速度は  $60\text{ml/hr}$  とし, 必要に応じて水銀柱  $100\text{mm}$  前後の圧力をかけた。溶離液は  $5\text{ml}$  ずつ分取し, phenolphthalein を指示薬として  $0.01\text{N}$  または  $0.02\text{N}$  KOH で滴定した。Fig. 3 はカルボン酸分析に使用したカラム装置であり, Fig. 4 は標準品を使用した場合の溶離曲線である。分離は充分とは言えないが, 本実験では試料中に存在するカルボン酸の種類が少なかったため, これ以上の分析法改良は行なわなかった。

この方法で溶離され KOH 標準液で中和された各有機酸成分は, 減圧乾固の後 P-ブロムフェナシルエステルとし, 融点の測定とに供した<sup>86,87)</sup> 同時に標準酸から製した同エステルと

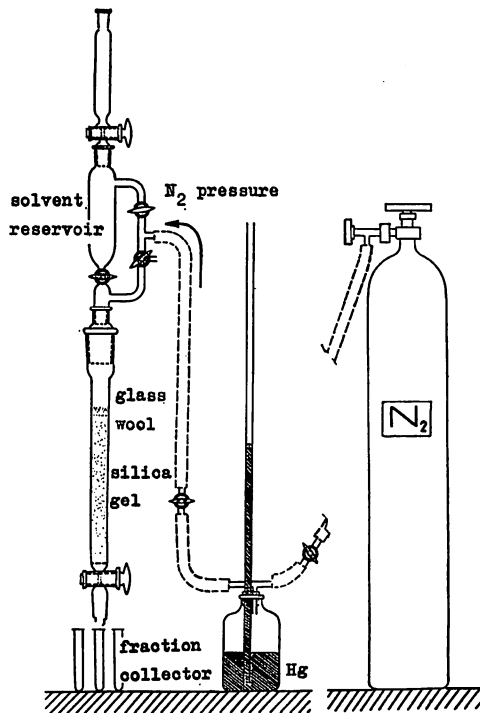


Fig. 3. Column chromatograph for carboxylic acids separation

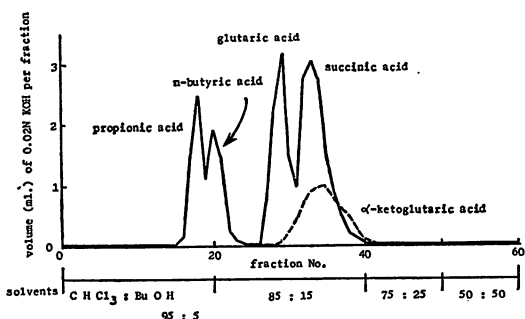


Fig. 4. Separation of organic acids

の混融試験も行った。

これとは別にペーパークロマトグラフィによる同定も併せて試みた<sup>88)</sup>。すなわち照射試料に ethyl ether と、水溶液試料の場合はさらに少量の  $H_2SO_4$  を加えてカルボン酸を ether 層に転溶し、低温で注意深く濃縮し、クロマトグラフィ用の試料とした。なお一塩基酸はアンモニウム塩の形として、二塩基酸は遊離型のままで、下記の展開剤と発色剤を使用した。

- 一塩基酸用展開剤 A. n-butanol saturated with 1.5N  $NH_4OH$   
 B. ethanol: 1.5N  $NH_4OH$  = 4:1 (v/v)  
 発色剤 bromophenol blue  
 二塩基酸用展開剤 A. n-butanol: formic acid: water = 4:1:1 (v/v/v)  
 B. phenol: 85% formic acid = 3:1 (w/v)  
 C. ethanol: 28% ammonia: water = 20:1:4 (v/v/v)  
 発色剤 bromocresol green

**4.3. 揮発性塩基** 揮発性塩基の測定は CONWAY の微量拡散法<sup>89)</sup> によった。結晶試料は break off seal 管に密封したものを照射し、測定直前に脱気管内で水に溶解し定容後供試した。溶液試料はそのままの状態での測定に用いた。

ammonia 態窒素は微量拡散法により硫酸標準液に吸収させたものを indophenol 発色法<sup>90, 91)</sup> によって比色定量した。

**4.4. 二酸化炭素** 一部の結晶試料について実験を行なったが、揮発性塩基の測定に用いたと同一の試料水溶液について微量拡散法<sup>92)</sup> によって測定した。

**4.5. 赤外分光分析** ガンマ線照射後の glutamic acid 結晶試料を KBr 錠剤として分析した。装置は日立製作所製赤外分光スペクトロメーター EPI-2 型である。スペクトラムの検討は IRDC カード<sup>93)</sup> を参照した。分析図は次の X 線回析図と同様に 1.1.1. の中に掲げた。

**4.6. X 線回析** ガラス板上にアミノ酸結晶試料の少量を水を用いて塗抹乾固したもの、または結晶をそのまま平板上に固めたものを試料とし X 線回析を行なった。装置は理学電機製ガイガーフレックス (high power unit Model D-3F) で、結果の検討は ASTM カード<sup>94)</sup> を参照した。

## 実験結果

### 1. L-glutamic acid のガンマ線分解

L-glutamic acid を脱気条件下でガンマ線照射した場合に各種の反応が起きるが、他のアミノ酸の分解と同様に脱アミノおよび脱炭酸反応を主要反応として挙げなければならない<sup>95)</sup>。脱アミノ反応によっては ammonia と該当するカルボン酸が、脱炭酸によっては二酸化炭素と  $\alpha$  または  $\gamma$ -amino butyric acid の生成が予想される。ここでは、試料が固相および液相と異なった二つの状態にある場合について、上記二つの反応によって生ずる反応生成物質がどのように変化するかを追及した。

#### 1.1. 固体試料に対するガンマ線照射とその分解生成物

##### 1.1.1. glutamic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構

###### 1.1.1.1. 他種アミノ酸の生成

アミノ酸を脱炭酸した場合、単純アミノ酸ではそれに相当するアミンを生ずる。放射線による反応でも同様であるが、直接作用により結晶アミノ酸から別種アミノ酸が生成した例は少ない<sup>96)</sup>。glutamic acid は2個のカルボキシル基を持つため、そのうち1個が分解するとき生成を予想される物質として、2種類のアミノ酸が挙げられる。一つは  $\alpha$ -脱炭酸による  $\gamma$ -amino-butyrlic acid、もう一つは  $\gamma$ -脱炭酸による  $\alpha$ -amino-n-butyrlic acid である。45~134 Mrad のガンマ線照射を受けた glutamic acid から生ずる他種アミノ酸の生成状況は、Table 4 の如くである。表中の数値は、照射前の glutamic acid 100  $\mu$ mole について生成する各アミノ酸量を  $\mu$ mole で表示したものであり、参考値として同時に生成する ammonia の  $\mu$ mole 数を併記した。残存する glutamic acid と生成した3成分の合計量を、吸収線量別に比較すれば、アミノ基を基準として glutamic acid 結晶のガンマ線分解経過を考察することができる。

脱炭酸反応は脱アミノ反応に較べてかなり弱いですが、線量が 50Mrad 以上になると明らかに  $\alpha$ -amino-n-butyrlic acid の存在を認めることができた。glutamic acid より  $\alpha$ -amino-n-butyrlic acid が生成する際の G 値は0.6~1.0と計算される。また 100Mrad 以上になると  $\gamma$ -amino-butyrlic acid の少量が測定された。

Table 4. Changes from crystalline L-glutamic acid to other amino acids by  $\gamma$ -radiolysis in vacuo

dosage (Mrad)	amino acids and ammonia ( $\mu$ mole)				
	before irradiation	after irradiation			
	Glu	Glu	$\alpha$ -ABA	$\gamma$ -ABA	ammonia
44.8	100.0	90.98	0.40	0.00	2.56
89.8	100.0	84.80	0.77	0.00	5.48
134	100.0	77.90	2.11	0.17	9.83

Glutamic acid から  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の生成は  $\gamma$ -脱炭酸によるもので、これは水の存在下で行なわれる  $\alpha$ -脱炭酸とは全く機構を異にした反応である。一方  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成については、先ず  $\alpha$ -脱炭酸反応が考えられるが、実験的証明としては次に述べる異性化による方が容易である。

1.1.1.2.  $\alpha$ -amino-n-butyric acid および  $\gamma$ -amino-butyric acid 結晶のガンマ線分解  $\alpha$  または  $\gamma$ -amino-butyric acid を glutamic acid と同様にガラス管に脱気密封し、134 Mrad の照射を行なったところ Table 5 の結果を得た。

Table 5. Changes from crystalline  $\alpha$ - or  $\gamma$ -amino butyric acid to other amino acids by  $\gamma$ -radiolysis in vacuo

original samples	dosage (Mrad)	amino acids and ammonia ( $\mu$ mole)				
		before irradiation	after irradiation			
			Glu	$\alpha$ -ABA	$\gamma$ -ABA	ammonia
$\alpha$ -ABA	134	100.0	0.00	81.81	3.40	13.82
$\gamma$ -ABA	134	100.0	2.19	0.00	87.26	9.53

$\alpha$ -amino-n-butyric acid からは3.40% 相当の  $\gamma$  異性体を生じているが、逆に  $\gamma$ -amino-butyric acid からは  $\alpha$  異性体を全く検出できなかった。もちろん glutamic acid から直接  $\gamma$ -amino-butyric acid ができることも考えられるが、glutamic acid 結晶から生成した  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の一部が二次的に  $\gamma$ -amino butyric acid に異性化することは明らかであろう。しかしこの異性化にはカルボキシル基またはアミノ基の離脱と、それに続く再結合が必要であり、単純な反応経過ではない。

1.1.1.3. 二酸化炭素の測定結果

glutamic acid の結晶のガンマ線分解によって生ずる二酸化炭素を、照射線量別に示すと Table 6 のようである。

Table 6 の二酸化炭素生成量と、Table 4 の  $\alpha$ -amino-n-butyric acid 生成量の一つの図にまとめたものが Fig. 5 である。これによって G( $\alpha$ -ABA) が大略 G(CO<sub>2</sub>) に等しいことがわかる。

1.1.1.4. 赤外分光分析

脱気条件下でガンマ線照射を受けた glutamic acid 結晶の赤外分光分析結果は、10Mrad

Table 6. The yields of carbon dioxide formed from crystalline glutamic acid by  $\gamma$ -radiolysis in vacuo

dosage (Mrad)	glutamic acid and CO <sub>2</sub> ( $\mu$ mole)		
	before irradiation	after irradiation	
		Glu	Glu
78.6	100.0	83.9	0.87
118	100.0	78.1	1.61
157	100.0	71.9	2.90

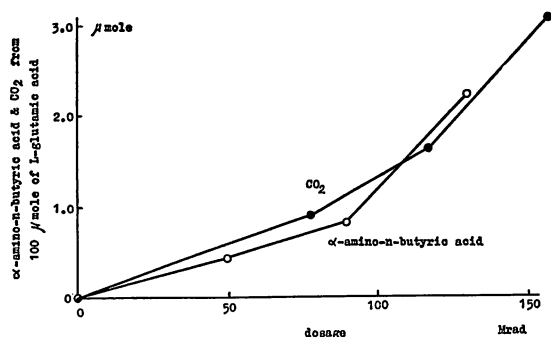


Fig. 5. The yields of  $\alpha$ -amino-n-butyric acid and carbon dioxide formed from crystalline L-glutamic acid irradiated with  $\gamma$ -rays in vacuo

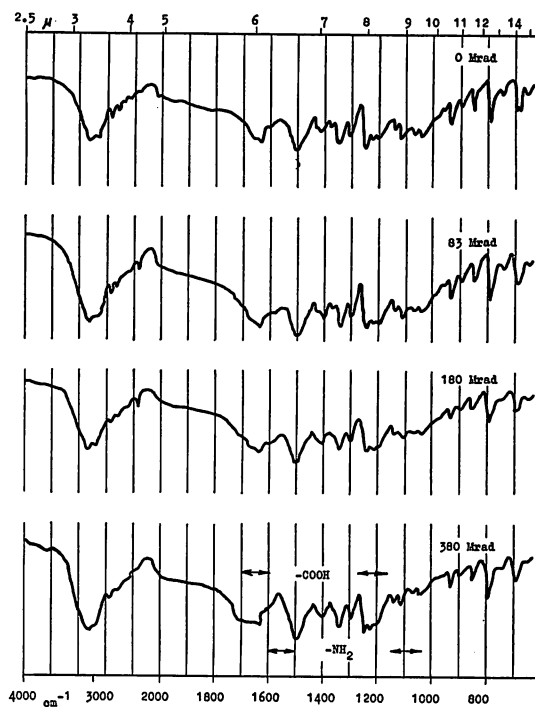


Fig. 6. IR spectra of  $\gamma$ -irradiated L-glutamic acid crystal in vacuo  
 sample : KBr tablet (1 mg./600 mg. KBr)  
 prism : NaCl  
 response : 70  
 gain : 40  
 suppression : 30

以下の線量では照射前と殆んど変わらないスペクトラムしか得られなかった。しかし、それ以上の大線量を照射したものは、カルボキシル基とアミノ基の吸収部に見るべき変化が現われた。すなわち、 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  および  $1200\text{ cm}^{-1}$  附近のカルボキシル基吸収と、 $1600\sim$



1500 cm<sup>-1</sup> および 1100 cm<sup>-1</sup> 附近のアミノ基吸収の変化<sup>97)</sup> は、吸収線量に比例している。この結果は Fig. 6 に示す通りである。一般に食品に対するガンマ線照射は Mrad または、それ以下の線量であるから、通常はこのような大きな変化は起らないであろう。

#### 1.1.1.5. X 線回折分析

赤外分光分析に供したと同じ条件の試料について X 線回折を行った。ガンマ線照射前後における glutamic acid 結晶構造の変化を記録紙上に求めると、Fig. 7 のように入射角 27° ~ 28° と 31° ~ 32° 附近のピークに変化が見られる。330 Mrad の照射を受けた glutamic acid

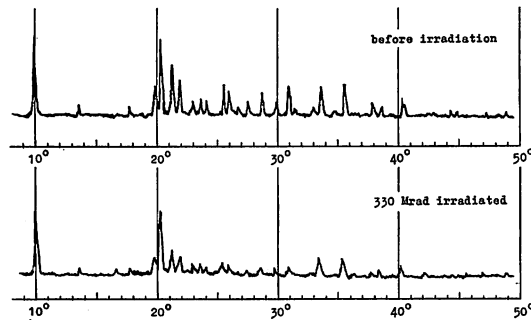


Fig. 7. X-rays diffraction charts of  $\gamma$ -irradiated L-glutamic acid crystal in vacuo

結晶は、約20%が他の物質に変化し、脱アミノ反応による glutaric acid 生成は 1.1.2. で述べる如く特に顕著である。しかし、このような分解反応の結果と X 線回折図のピークの消失、結晶構造の変化との間の関係を充分説明するには至らなかった。

#### 1.1.1.6. 考 察

放射線のアミノ酸に対する直接の影響に関する研究としては、SHIELD<sup>33)</sup>、GORDY<sup>40)</sup> らが多くの照射アミノ酸の ESR パターンを検討し、遊離基の同定を試みている。この外にも遊離基に関する報告は多い<sup>37)</sup>。

MESHITSUKA<sup>46)</sup> は GHOSH<sup>47)</sup>、WEINER<sup>48)</sup> が照射 glycine 結晶について ESR で得た基の変化を参考として、ガンマ線照射後の glycine 結晶を水溶液として分析し、反応収支、機構を検討している。これによると H<sub>2</sub>N·CH<sub>2</sub>·COOH から脱アミノ反応によって、CHO·COOH, CH<sub>3</sub>COOH が、脱炭酸反応によって CH<sub>3</sub>·NH<sub>2</sub> と微量の H·CHO の生成を説明している。glycine の場合と同様の反応機構が glutamic acid にも適用されると仮定すれば、脱炭酸反応によって  $\alpha$ -amino-n-butyrac acid,  $\gamma$ -amino-butyrac acid のいずれかを生ずるはずであるが、本実験の結果から  $\alpha$ -amino-n-butyrac acid の出現を知ることができた。

後述の如く glutamic acid 水溶液を対象とする時は、照射による分解生成物は  $\alpha$ -異性体ではなく  $\gamma$ -amino-butyrac acid である。このように結晶試料に対する放射線の直接作用と、水を介しての間接作用が、脱炭酸の位置を全く逆にした理由は、glutamic acid 各基の結合エネルギー、水溶液における電離の状態、水に生ずる遊離基の作用を総合的に解明しなければ説明できない。

#### 1.1.1.7. 要 約

1. 結晶 glutamic acid を脱気条件下でガンマ線照射し、脱炭酸反応の結果他種のアミノ

酸に変化する過程を研究した。

2. 10~100Mrad の照射を加えると, glutamic acid の一部は  $\gamma$ -脱炭酸によって  $\alpha$ -amino-n-butyric acid に変化した。その生成状況は線量に比例的であり, G 値は0.6~1.0であった。

3. 脱炭酸反応によって生ずる二酸化炭素量は,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の生成モル数にほぼ等しい。

4. 100Mrad 以上の照射では,  $\gamma$ -amino-butyric acid の微量を検出することができる。これは  $\alpha$ -amino-n-butyric acid からの二次的生成物であることを確認した。

5. 100Mrad 以上の照射によって glutamic acid 結晶に現われる変化を赤外分光分析によって求めたところ, アミノ基およびカルボキシル基の吸収部分に明らかな変化が認められた。同じ試料を X 線回折して結晶構造の変化を検索したところ, 入射角 $27^{\circ}$ ~ $28^{\circ}$ と $31^{\circ}$ ~ $32^{\circ}$ 附近のピークが照射によって消失することを知った。

### 1.1.2. ガンマ線照射による glutamic acid のカルボン酸への転移機構

ガンマ線照射を受けた glutamic acid の分解反応のうち最も顕著にあらわれるものは脱アミノ反応である。したがって, 単純アミノ酸では相当する脂肪酸を生ずることになるが, glutamic acid は monoamino-dicarboxylic acid であるから, 二塩基酸を生ずるはずである。本章では glutamic acid を脱気条件下でガンマ線照射し, その結果生ずるカルボン酸と ammonia 量を測定し, 反応機構を検討した。

#### 1.1.2.1. シリカゲルカラムクロマトグラフィによるカルボン酸の溶離

支持相, 固定相, 移動相として, それぞれシリカゲル, chloroform, n-butanol を使用するカラムクロマトグラフィ<sup>84,85)</sup>により, 一塩基酸と二塩基酸を溶離した。本実験で出現する生成カルボン酸の種類は少数であったため, 分別操作に特別の改良を加える必要はなかった。

すなわち照射を受けた glutamic acid 結晶 500mg を水に溶解して 100ml とし, そのうち 25ml をとり, 2N NaOH 2ml を加えて減圧濃縮後, シリカゲル 1g とよく混合し, さらに 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.1ml を添加してよくすり混ぜ, これをシリカゲルカラムの上部につめて溶離を行なった。Fig. 8 はその溶離曲線である。カルボン酸の生成量は Fig. 9 にも示す如く線量に比例し, その種類は標準酸との照合により, 第一ピークは n-butyric acid, 第二ピークは glutaric acid であることを知った。

#### 1.1.2.2. p-ブロムフェナシルエステルの融点

ガンマ線照射により glutamic acid 結晶より生じたカルボン酸は n-butyric acid と glutaric acid であるが, 構造の類似した同系統の他のカルボン酸とシリカゲルカラムクロマトグラフィの溶離位置が接近しているため, 溶離フラクションのうち, カルボン酸ピークの主要部に相当するものを選び出し, p-ブロムフェナシルエステルを作りそれらの融点を測定した。この結果は Table 7 である。照射試料より製したエステルとともに, 標準酸から製したエステルの融点を測定し参照したが, Table 7 に示すように, Fig. 8 における第一ピークは n-butyric acid または propionic acid に, 第二ピークは glutaric acid に相当することを知った。また混融試験でもこれを裏づける結果を得た。

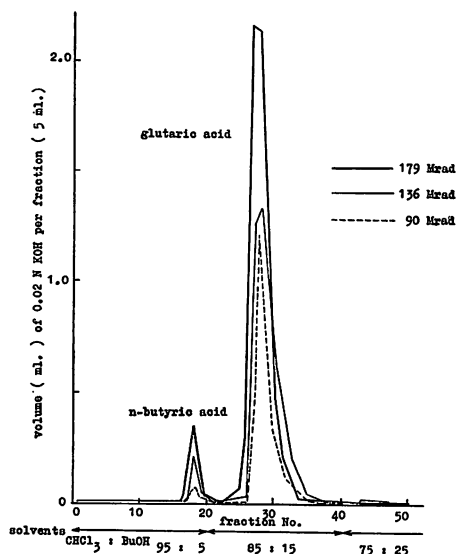


Fig. 8. Column chromatographic separation of carboxylic acids formed from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid crystal

Table 7. M. P. of p-bromophenacyl esters

absorbed dosage	fraction No.	melting point
90 Mrad	18	60.5- 62.0°C
	29	132.0-135.0
136	18	59.5- 62.5
	29	135.0-137.0
179	18	61.5- 62.5
	28	134.0-137.5
reference acids		melting point
propionic		59.0- 61.0°C
n-butyric		61.5- 63.0
n-valeric		71.5- 73.0
glutaric		136.0-137.5
succinic		209.0-212.0

### 1.1.2.3. ペーパークロマトグラフィの Rf

照射試料を ethyl ether で抽出して得た区分についてカルボン酸のペーパークロマトグラフィを行ない、前述のシリカゲルカラムによる溶離分析、p-ブロムフェナシルエステルの融点測定の結果と併せて、glutamic acid から生じたカルボン酸の同定資料とした。

Table 8 は一塩基酸区分の試料と標準酸による Rf 値である。照射を受けた glutamic acid 試料中に生成する一塩基酸は、比較的少量のため、かなり高線量の照射によらなければこれを明確にし得なかったが、n-butyric acid を確認することができた。

二塩基酸区分のペーパークロマトグラフィは、Table 9 の如く 136Mrad 以上の照射を受けた全ての試料中に glutaric acid に相当するスポットを認めた。

Table 8. Rf value of monobasic acids\*

absorbed dosage	Rf value
90 Mrad	?
136	?
179	?
390	0.31
.....	
reference acids	
formic	0.08
acetic	0.08
propionic	0.14
n-butyric	0.32
n-valeric	0.50

\*: in form of ammonium salts  
 solvent system: butanol saturated with  
 1.5 N ammonium water  
 developer: bromo-phenol blue

Table 9. Rf value of dibasic acids

absorbed dosage	solvent A	solvent B	solvent C
90 Mrad	?	?	?
136	0.79	0.33	0.84
179	0.81	0.34	0.86
390	0.82	0.33	0.84
	0.74	0.25	0.73
	(trace)	(trace)	(trace)
.....			
reference acids			
glutaric	0.81	0.34	0.85
succinic	0.73	0.27	0.75
malonic	0.54		0.60
tartaric	0.35	0.14	0.34
citric	0.76	0.08	0.43
oxalic	0.51	0.07	0.40

solvent system  
 solvent A=butanol : formic acid :  
 water=4: 1: 1  
 solvent B=ethanol : 28% ammonia:  
 water=20: 1: 4  
 solvent C=phenol : formic acid  
 =3 g.: 1 ml.  
 developer: bromo-cresol green

390Mrad 照射試料には、この外に微量ではあるが、succinic acid と malonic acid と推定されるスポットを検出した。このことは glutaric acid がさらに二次分解を受けて分子量の小さな化合物に変化した事実を表わしていると思われる。

以上のようにガンマ線照射を受けた glutamic acid 結晶から生じたカルボン酸は、glutaric acid および n-butyric acid を主成分とし、高線量を受けた場合は、微量の succinic acid, malonic acid の生成をみる事が判明した。

glutaric acid と n-butyric acid の生成状況を、ガンマ線吸収線量と対応して示したものが Fig. 9 および Table 10 である。これによると約 150Mrad 以上の照射を加えると glutaric acid 増加率が純ってくるが、n-butyric acid は、なお線量に比例的に増加している。

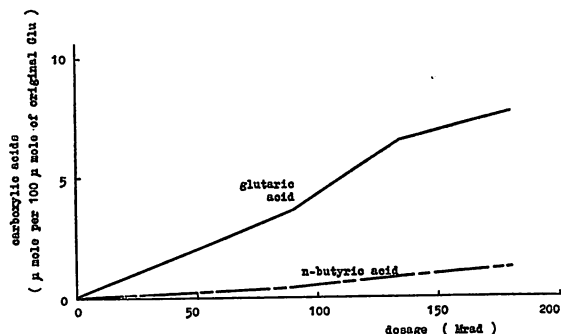


Fig. 9. Liberation of carboxylic acids from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid crystal

Table 10. Carboxylic acids formed from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid crystal

Absorbed dosage	$\mu$ mole per 100 $\mu$ mole of original glutamic acid		
	n-butyric acid	glutaric acid	total
90 Mrad	0.42	3.57	3.99
136	0.77	6.21	6.98
179	1.20	7.81	9.01

1.1.2.4. カルボン酸生成量と ammonia 生成量との関係

glutamic acid の脱アミノ反応機構から考えると, glutamic acid と n-butyric acid 生成量の合計は, 当然同時に生成する ammonia 量と等モル関係でなければならぬ. シリカゲルカラムクロマトグラフィによる溶離操作で得た生成カルボン酸量を, 吸収線量別にまとめたものが Table 10 であり, この結果に ammonia 生成量を併記したものが Fig. 10 である.

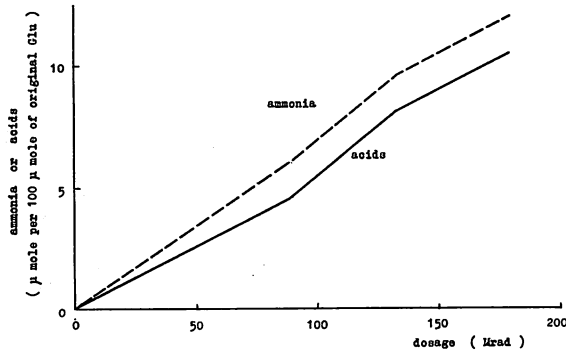


Fig. 10. Liberation of ammonia or carboxylic acids from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid crystal

これによるとカルボン酸生成量と ammonia 生成量は互いに並行していることが明確である. ammonia とカルボン酸の生成量にわずかな差が存在するが, これは一度生成したカルボン酸の二次的分解に起因するものと考えられる. なお  $G(\text{glutaric acid}) = 2.6 \sim 3.0$ ,  $G(\text{n-butyric acid}) = 0.3 \sim 0.4$ ,  $G(\text{glutaric acid} + \text{n-butyric acid}) = 2.9 \sim 3.4$ ,  $G(\text{ammonia}) = 3.5 \sim 4.0$  と計算された.

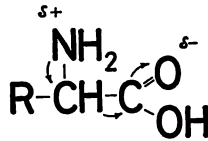
1.1.2.5. 考 察

以上の実験によって得た結果から, 結晶 glutamic acid を脱気条件下で 100Mrad 前後のガンマ線照射した場合の脱アミノ反応を考察してみよう.

glutaric acid と n-butyric の生成過程を考えると, 先ず脱アミノ反応の結果 glutamic acid から glutaric acid を生じ, 次いで脱炭酸反応によって glutaric acid から n-butyric acid を生ずる過程が挙げられる. 1.1.1. に記したように, 結晶 glutamic acid は脱炭酸して  $\alpha$ -amino-n-butyric acid となるので, この amino butyric acid が脱アミノすることによって n-butyric acid が生成する経路も挙げなければならない.

glutamic acid 結晶のガンマ線照射による脱アミノ反応と脱炭酸反応は, 前者が強行なわれており,  $G(\text{ammonia}) = 3.5 \sim 4.0$  に対し  $G(\text{CO}_2) = 0.7 \sim 1.2$  であることは 1.1.1. で述

べた通りである。α-アミノ酸全般について言えることであるが、α炭素に結合するカルボキシル基とアミノ基の結合力の差は、C=Oの酸素と-NH<sub>2</sub>の窒素の電子吸引の差によりアミノ基の結合力が弱く、従って脱アミノ反応の方が脱炭酸反応より強く起きる結果となっている<sup>98)</sup>。glutamic acid 生成量が n-butyric acid 生成量より大である原因は、この理由の外に、n-butyric acid が脱アミノ、脱炭酸の二反応を経由しなければならないことにも依っている。



結晶 glutamic acid から生成する glutaric acid と n-butyric acid, 微量ではあるが検出される succinic acid の生成過程を略示すると Fig. 11 のようになる。

Fig. 11 のうち aspartic acid と γ-amino butyric acid は 1.2.1. に述べるように、水溶液

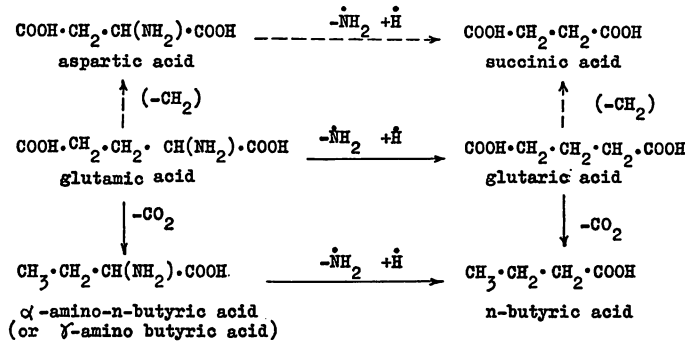


Fig. 11. Chemical changes from glutamic acid to carboxylic acids

中の glutamic acid の照射実験に出現するものであるから、生成過程から外してもよい。succinic acid とさらに分子の小さい malonic acid の生成に関しては、生成過程に glutamic acid 炭素鎖の切断とカルボキシル基の再結合を考えなければならない。炭素鎖の切断については、酸素存在下で紫外線照射を受けた glutamic acid が炭素鎖のさまざまな位置で切断する例が報告<sup>78)</sup>されている。α-amino-n-butyric acid のガンマ線照射実験でも多く炭素鎖切断が報告<sup>80)</sup>されている。

酸素を除去した条件下でも、glutamic acid 水溶液のガンマ線分解において、炭素鎖のβ-γ位間が切断して alanine と acetic acid が一時的に生成する可能性があるとも推測<sup>99)</sup>されている。

これらの報告例は、いずれも水溶液での実験であるが、本報の場合もこれに類した反応が極く微弱に起こったものと考えられる。

#### 1.1.2.6. 要 約

1. 脱気条件下で glutamic acid 結晶に 90~180Mrad のガンマ線を照射し、脱アミノ反

応によって生成するカルボン酸の検索を行なった。

2. 生成するカルボン酸のうち主要なものは glutaric acid と n-butyric acid であり、この外に微量の succinic acid と malonic acid を検出した。

3. glutaric acid 生成量は、140Mrad 以下では線量に比例的であるが、一方 n-butyric acid の生成は、180Mrad までの範囲では線量に比例的であった。

4. glutamic acid 結晶の脱アミノによって生ずる ammonia 量を測定し、その生成量は glutaric acid と n-butyric acid 生成量の合計に比例していることを確認した。それぞれの生成物質の G 値を実験値より求めたところ、G (glutaric acid)=2.6~3.0, G (n-butyric acid)=0.3~0.4, G(ammonia)=3.5~4.0 であった。

5. 以上のカルボン酸生成の諸過程に関し、主として脱アミノ反応と脱炭酸反応の過程を中心にして考察を加えた。

## 1.2. 水溶液試料に対するガンマ線照射とその分解生成物

### 1.2.1. glutamic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構

水溶液中での glutamic acid のガンマ線分解は、結晶試料の場合とは大いにその様相を異にする。放射線を受けた水からは各種の遊離基を生じ、これらは強力かつ複雑な反応を溶質と行なう。本章は各種 pH の緩衝液ならびに純水を溶媒として用い、これに glutamic acid を 500mg/dl の濃度に溶解したものを試料とし、脱気条件下でガンマ線照射を行ない、glutamic acid が脱炭酸反応を経て他種アミノ酸に変化する状況を pH 別に研究した結果である。

#### 1.2.1.1. Aspartic acid の生成

glutamic acid 溶液中に生ずる aspartic acid 量と水溶液 pH との関係は、Fig. 12 の中に記載した。この図の縦軸は、試料溶液中に存在する glutamic acid の他種アミノ酸への変化

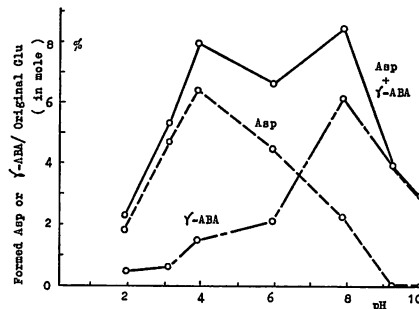


Fig. 12. Asp or  $\gamma$ -ABA formation from Glu in solution by  $\gamma$ -radiolysis (Dose rate:  $5.8 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 1.8 Mrad)

の割合を%で示したものである。aspartic acid の生成は pH 値 4 附近が最大であり、強酸性、強塩基性条件下では少なく、特に pH 値 9 以上では全く見られなかった。常温での glutamic acid は、 $pK_1=2.19$ ,  $pK_2=4.25$ ,  $pK_3=9.67$ ,  $pI=3.22$  (25°C) である<sup>100)</sup>。これによ

ってみても, aspartic acid の生成は glutamic acid の電離状況に大きく影響されていることが明らかである. G(Asp) は次のように計算された.

pH	1.90	3.14	3.91	6.00	7.89	9.15	10.00
G	0.63	1.72	2.34	1.63	0.82	0.00	0.00

#### 1.2.1.2. $\gamma$ -amino-butyric acid の生成

pH=6~10 の中性から弱塩基性条件にかけて,  $\gamma$ -amino-butyric acid が生成する. 特に pH 8.0 前後においては生成量が多い. その生成状況は Fig. 12 の通りである. G( $\gamma$ ABA) は次のように計算された.

pH	1.90	3.14	3.91	6.00	7.89	9.15	10.00
G	0.16	0.22	0.55	0.79	2.25	1.43	1.07

Fig. 12 には, aspartic acid と  $\gamma$ -amino-butyric acid 生成量の和も併記した.

#### 1.2.1.3. $\alpha$ -amino-n-butyric acid の生成

上記の実験とは別途に行なった例では, pH 1.98 の glutamic acid 溶液を 0.71Mrad 以上の線量で照射した場合に, 微量ではあるが  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の生成が認められた. この結果は Table 12 に記載し, 1.2.1.5. にて説明する.

#### 1.2.1.4. 純水溶液中での glutamic acid のガンマ線分解

これまでの実験は, いずれも緩衝溶液中の glutamic acid のガンマ線分解を行った結果であった. 共存する塩類が分解結果に影響を与えているか否かは, 純水中に glutamic acid を溶解した試料の結果と相互に比較すればよい.

十分に精製した蒸留水に glutamic acid を 500mg/dl の濃度に溶解し, 緩衝液を用いた場合と同様にガンマ線照射し, 分解によって生ずる他種アミノ酸の量を定量した. 生成するアミノ酸は純水を溶媒とした場合も aspartic acid と  $\gamma$ -amino-butyric acid であった. 純水に溶解した glutamic acid 液の pH は照射前 3.18 であり, 照射後も殆んど変わらず pH 3.19 であったので, 生成したアミノ酸の G 値と, さきに pH 3.14 緩衝液中の glutamic acid の分解に際して得た G 値を併記して比較してみた. その結果は Table 11 の通りである.

Table 11. Asp and  $\gamma$ -ABA formation from 0.5% Glu pure water solution by  $\gamma$ -radiolysis.  
(Dose rate:  $3.8 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 0.41 Mrad)

Formed amino acids	Formation rate*		
	in pure water (pH=3.18)	in pure water (pH=3.18)	in buffer solution (pH=3.14)
Asp	1.27	1.00	1.72
$\gamma$ -ABA	0.29	0.23	0.22

\*: Compared with mole of original Glu in %.

G( $\gamma$ ABA) は, 純水溶液については 0.23, 緩衝溶液については 0.22 と類似し, 共存塩類の影響は少ない. 一方 G(Asp) は, 純水溶液については 1.00, 緩衝溶液については 1.72 と若干の差異がみられる. これは共存塩類の有無に原因するのではなく, 吸収線量の差によるものとも考えられる. G=1.72 は 1.8Mrad で得た数値であり, G=1.00 は 0.41Mrad における値である. 1.2.1.5. に示すように, aspartic acid 生成は glutamic acid の二次的分解に



よるものであり、その収量は比較的線量の高い場合に多いようである。

1.2.1.5. 吸収線量と生成アミノ酸との関係

pH 値をそれぞれ 1.98, 5.30, および 10.60 とした glutamic acid 水溶液を試料とし、0.12, 0.71, および 4.00Mrad のガンマ線を照射し、分解して生ずるアミノ酸を測定した結果を Table 12 に示した。

Table 12. Relations between the dosage and Asp,  $\alpha$ -ABA or  $\gamma$ -ABA formation from 0.5% Glu solution by  $\gamma$ -radiolysis.

(Dose rate:  $1.0 \times 10^6$  r./hr.)

pH	Dosage (Mrad)	Formation rate (compared with mole of original in %)		
		Asp	$\alpha$ -ABA	$\gamma$ -ABA
		0	0	0
1.98	0.12	0	0	0
	0.71	0.7	0.1	0
	4.00	4.2	0.6	0
5.30	0.12	0	0	1.7
	0.71	0.9	0	—
	4.00	4.9	trace	2.1
10.60	0.12	0	0	1.1
	0.71	0	0	1.8
	4.00	1.0	0	5.0

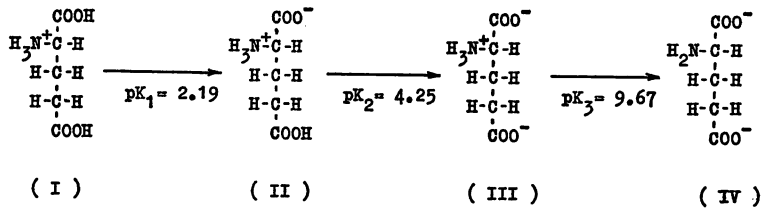
生成したアミノ酸の種類と pH の影響は 1.2.1.1.~1.2.1.3. に記載したものと殆んど同一傾向にあるが、吸収線量別に見ると、アミノ酸の種類によって出現するに至る線量に差異のあることがわかった。すなわち、pH 5.30 以下は aspartic acid の生成好適条件であるが、0.12Mrad では生成されず、比較的高線量に至ってから検出されている。これに対して  $\gamma$ -amino-butyric acid は塩基性を好適生成 pH とするが、比較的低線量から検出されていることがわかる。

glutamic acid 水溶液のガンマ線分解において、 $\gamma$ -amino-butyric acid は glutamic acid の脱炭酸によって生ずるものであり、生成機構は単純である。しかし aspartic acid は、glutamic acid の分解生成物の中では二次的生成物に属するものと考えられる。その機構については考察の項において述べるが、生成機構が複雑なために aspartic acid の生成は遅れ、比較的高線量の照射を受けるに及んで出現するものと考えられる。また酸性溶液で微量ながら  $\alpha$ -amino-n-butric acid 生成を見ているが、これは glutamic acid に対するガンマ線の直接効果によるものと推察される。

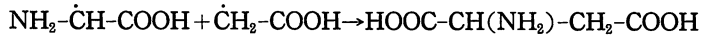
1.2.1.6. 考 察

pH によって変化する glutamic acid の電離状況が、ガンマ線照射による aspartic acid の生成に大きな影響を与えていることについては、これまでも述べたが、Fig. 13 に glutamic acid の電離状況を掲げて<sup>100,101)</sup> 考察を行う。

aspartic acid の生成は、等電点 pH 3.22 から  $pK_2$  に相当する pH 値において最大である。glutamic acid 分子の炭素鎖と  $\alpha$ -および  $\gamma$ -カルボキシル基が結合している力を、電離の状況と比較して考察すると、分子構成原子の電気陰性度の変化により、(II) の状態にある場合が  $\alpha$ -カルボキシル基に比較して  $\gamma$ -カルボキシル基の結合が最も弱く、(III) がこれ

Fig. 13. Ionization of glutamic acid<sup>100, 101)</sup>

に次いで弱い状態にあることがわかる。従って、これらの状況下で  $\gamma$ -脱炭酸または、 $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  の間の secession<sup>99)</sup> が活発に行なわれるものと推察される。この結果生じた  $\alpha$ -amino-n-butyric acid は、二次的な carboxylation または水の放射線分解に由来する遊離基による酸化を受けて、aspartic acid に変化するであろう。FRIEDBERG ら<sup>99)</sup> は pH 8 の glutamyl glutamic acid 水溶液のガンマ線分解で  $\text{C}_3$ - $\text{C}_4$  間に、secession が起り、生じた alanine が試料溶液中にて別の反応で生じた formic acid と再結合し、aspartic acid を生ずることを報告している。pH 8 は、本報告における glutamic acid から aspartic acid の生成条件、すなわち弱酸性条件とは一致しないが、生成機構についての考え方としては興味がある。これに類した報告例としては、glycine と acetic acid のラジカルが結合して aspartic acid を生ずるといふ研究<sup>102)</sup>がある。



酸化的条件下の UV 照射実験では、glutamic acid から aspartic acid 生成に関する多くの報告がなされている<sup>72, 73, 74, 75, 76)</sup>。

$\gamma$ -amino-butyric acid の生成過程は、glutamic acid の  $\alpha$ -脱炭酸によるが、pH 7 以上の水溶液中で glutamic acid の電離が (IV) の状態になるに及び、その反応が強くなるものと考えられる。また、強塩基性水溶液中では、 $\gamma$ -amino-butyric acid の生成量が急激に減少するのは、ガンマ線によって水から生ずる遊離基のうち、反応に関係のある  $e^-_{aq}$  の作用が弱くなるため<sup>103)</sup>と推察される。 $\alpha$ -および  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成に関しては、RAJEWSKY ら<sup>69)</sup> も glutamic acid を X 線照射し、脱炭酸反応を経由して行なわれることを報告している。

#### 1.2.1.7. 要 約

1. 各種 pH における 0.5% glutamic acid 水溶液を、脱気条件下で 0.12~4.0Mrad のガンマ線照射し、脱炭酸反応等によって溶液中に aspartic acid,  $\gamma$ -amino-butyric acid および微量の  $\alpha$ -amino-n-butyric acid を生ずることを確認した。

2. aspartic acid の生成は pH 4 付近を中心とした弱酸性から中性にかけて盛んであり、G(Asp) の最高は pH 3.91 の溶液における 2.34 であった。

3.  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成は、pH 8 付近を中心とした中性から弱塩基性にかけて多く起こり、G( $\gamma$ ABA) の最高は、pH 7.89 における 2.25 であった。

4. aspartic acid,  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成状況と吸収線量との関連を検討したところ、 $\gamma$ -amino-butyric acid は照射の初期、すなわち比較的低線量照射によって出現するものに対し、aspartic acid は照射がある程度進行してから生成し始めることを知った。この現

象は, aspartic acid は  $\gamma$ -amino-butyric acid とは異なり, glutamic acid からの二次的反應生成物であることに起因する。

5. 純水に溶解した glutamic acid のガンマ線照射実験を行ない, これとほぼ同 pH を有する緩衝溶液を溶媒とする glutamic acid の分解との比較を行なった。共存する塩類の有無は glutamic acid の分解に特に大きな影響を与えとは考えられなかった。

6. aspartic acid と  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成は, glutamic acid の電離状態が溶液 pH の変化によって推移する際の, アミノ基または, カルボキシル基の結合力の変化と関係が深いことを論じた。

### 1.2.2. ガンマ線照射による glutamic acid のカルボン酸への転移機構

glutamic acid のアミノ基がガンマ線照射によって離脱し, glutamic acid 等のカルボン酸へ変化する反応機構は, 結晶試料については 1.1.2. において述べた。反応系が水溶液である場合は, 媒質である水自体の複雑な分解が行なわれるので<sup>104)</sup>, 反応機構は, 結晶の場合とは著しく異なった過程をたどることが予期される。

本章は glutamic acid を各種の pH 値を有する緩衝液に溶解したものと, 別途によく精製した純水に溶解したものを試料とし, 脱気条件下で 2.7Mrad のガンマ線照射を行ない, 脱アミノ反応によって生じた分解生成物, 例えばカルボン酸, ammonia 等を測定し, 反応機構を推論したものである。

本章の実験に使用した glutamic acid 水溶液は, 濃度 800 mg/dl であり, これを内径 13 mm の硬質ガラス管に 5 ml ずつ脱気封管して照射に供した。照射前後における, 緩衝液を使用した試料液の pH は Table 13 の通りである。

Table 13. pH value of glutamic acid solution before and after  $\gamma$ -radiolysis  
(Dose rate:  $9.0 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 2.7 Mrad)

sample No.	pH value						
	1	2	3	4	5	6	7
before irradiation	1.35	2.22	3.28	4.31	6.83	9.53	11.08
after irradiation	1.65	2.23	3.31	4.10	6.80	9.31	10.10

#### 1.2.2.1. シリカゲルカラムクロマトグラフィによるカルボン酸の溶離

シリカゲルカラムクロマトグラフィの操作法<sup>84,85)</sup> は, 1.1.2. の場合と同じであるが, ここでは, 水溶液を対象としているため, 前処理として次の濃縮操作を附加した。すなわち, 試料液 10ml をとり, 酸性または中性試料には NaOH を加えて塩基性とした後濃縮し, 続いて濃縮物をシリカゲル 1g に吸着させたものを H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液で酸性に変え, これをシリカゲルカラムの上端に移し, 有機溶剤による展開操作を行なった。

glutamic acid より分解生成したカルボン酸の溶離滴定曲線を, 試料液 pH 別に求めた結果は Fig. 14 に示す通りである。図においてみられる小さな第一ピークは一塩基酸, 大きな第二ピークは二塩基酸である。pH 別のカルボン酸生成量を比較するには, 各試料別に反応生成物の生成率または G 値を算出し, 相互に比較すればよい。Table 14 はその結果である。

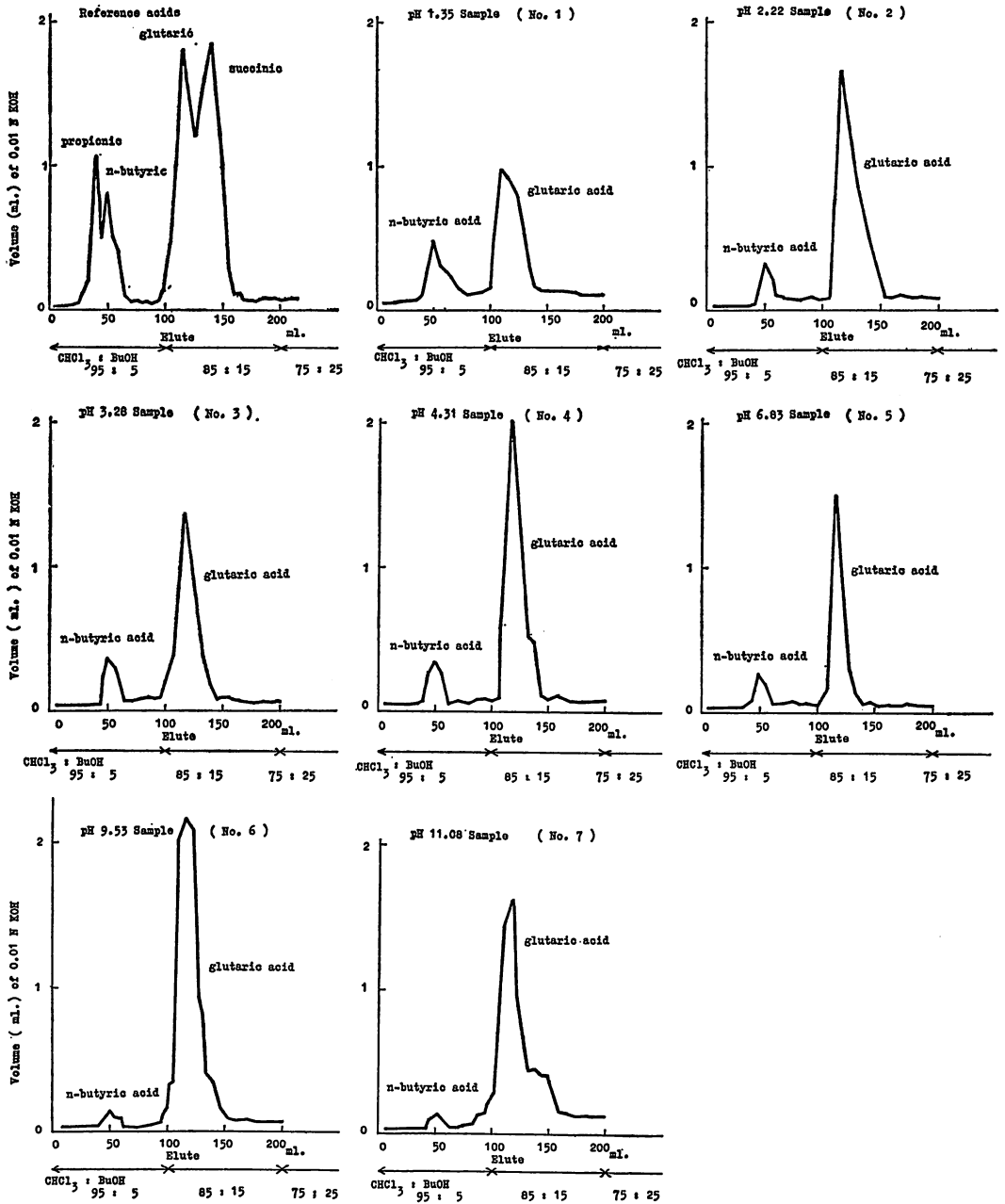


Fig. 14. Silica gel column chromatography of carboxylic acids formed from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid solution

Table 14. Carboxylic acids formation from glutamic acid solution by  $\gamma$ -radiolysis  
(Dose rate:  $9.0 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 2.7 Mrad)

pH value of solution	G value							
	1.35	2.22	3.28	4.31	6.83	9.53	11.08	
mono-carboxylic acid	0.43	0.31	0.41	0.32	0.22	0.12	0.12	
di-carboxylic acid	1.09	1.67	1.43	1.70	1.35	4.00	2.93	

これによると、二塩基酸の生成は pH 9.35 を頂点とし、酸性側についてみると一般に生成量が少ない傾向が見られるが、pH 4.31 において極大値が認められる。この測定結果に見られる二塩基酸の生成傾向は、後述の ammonia 生成傾向と一致する。

一方、一塩基酸の生成は酸性側が塩基性側に比しやや強いが、全般的にみればその生成量は二塩基酸よりかなり低い。一塩基酸の生成は、脱アミノ反応による二塩基酸生成に続いて脱炭酸反応が必要である。従って一塩基酸生成に及ぼす pH の影響が少ないことは、脱炭酸反応に及ぼす pH の影響が少ないことを示しているであろう。

1.2.2.2. ペーパークロマトグラフィによるカルボン酸の確認

シリカゲルカラムクロマトグラフィによって得た一塩基酸と二塩基酸に相当する区分を可能な限り多量に集め、ethyl ether で酸成分を抽出し、カルボン酸のペーパークロマトグラフィを試みた。実験は集めた試料の量が充分でなかったため、7種類の pH を有する試料個々について行なうことができず、試料を酸性側 (pH 1.35, 2.22, 3.28, 4.25) と中性および塩基性側 (pH 6.83, 9.53, 11.08) の2種に分類して行った。

Table 15. Paper partition chromatography of mono-carboxylic acids\*

	Samples	Rf value	
		Solvent A	Solvent B
Reference acids	1	0.29	0.79
	2	0.29	0.78
	acetic	0.10	0.67
	propionic	0.18	0.71
	n-butyric	0.30	0.77
	n-Valeric	0.45	0.82

\* = in form of ammonium salts  
Solvent A = n-BuOH saturated with 1.5N NH<sub>4</sub>OH  
Solvent B = EtOH: 1.5N NH<sub>4</sub>OH = 4:1 (V/V)  
Indicator = bromo-phenol blue

Table 16. Paper partition chromatography of di-carboxylic acids

	Samples	Rf value	
		Solvent A	Solvent B
Reference acids	1	0.84	0.78
	2	0.86	0.81
	malonic	0.69	0.65
	succinic	0.77	0.72
	glutaric	0.85	0.81
	adipic	0.90	0.89

Solvent A = n-BuOH: 85% formic acid: Water = 4:1:1 (V/V/V)  
Solvent B = phenol: 85% formic acid = 3:1 (W/V)  
Indicator = bromo-cresol green

Sample 1 is acidic, and sample 2 is neutral or basic.

ガンマ線照射により水溶液中の glutamic acid から生じたモノカルボン酸を分析した結果は Table 15 である。酸性試料、中性および塩基性試料とも n-butyric acid の Rf に相当するスポットを得た。すなわち展開溶媒 A では 0.29, 展開溶媒 B では 0.79 または 0.78 の Rf 値を持ち、対照として用いた n-butyric acid に一致していた。二塩基酸を対象としたペー

パークロマトグラフィの結果は、Table 16 である。酸性試料、中性および塩基性試料とも glutamic acid 標準品の Rf 値に一致するスポットを得た。すなわち展開溶媒 A では 0.84 または 0.86、展開溶媒 B では 0.78 または 0.81 であった。

#### 1.2.2.3. p-ブロムフェナシルエステルの融点

ガンマ線照射によって glutamic acid 水溶液中に生じたカルボン酸は主として n-butyric acid と glutaric acid であることが判明したが、さらにこの2種の物質を確認するために、

Table 17. Melting point of p-bromo-phenacyl esters

		Melting point (°C)
Samples	mono-carboxylic acid fraction	—
	di-carboxylic acid fraction	128~134
Reference acids	propionic	59.0~61.0
	n-butyric	61.5~63.0
	n-valeric	71.5~73.0
	glutaric	134
	succinic	209~212

それぞれのカルボン酸の p-ブロムフェナシルエステルを作り融点を測定した<sup>86,87)</sup>。この結果は Table 17 である。照射試料より製したエステルとともに、標準試薬より製したエステルの融点を測定した結果、Fig. 14 に示した第二ピークは glutaric acid に相当することが確認された。しかし第一ピークの成分は収量が少なく、測定に充分な量を得ることができなかった。

#### 1.2.2.4. ガスクロマトグラフィによるカルボン酸の確認

シリカゲルクロマトグラフィによって得た一塩基酸区分並びに二塩基酸区分のそれぞれを、ペーパークロマトグラフィの場合と同様に ethyl ether で抽出し、ガスクロマトグラフィに供した。カルボン酸の種類を確認するため、対象標準品として次のものを使用した。一塩基酸としては acetic acid, propionic acid, n-butyric acid, n-valeric acid を、二塩基酸用としては oxalic acid, malonic acid, succinic acid, glutaric acid, adipic acid を用いた。なお、二塩基酸試料は、ブチルエステルの形に変え<sup>105)</sup>、chloroform 溶液として分析した。

照射試料並びに対象カルボン酸の分析結果については、一塩基酸成分は Fig. 15 に、二塩基酸成分については Fig. 16 に示した。

一塩基酸区分の主要成分は n-butyric acid であったが、同時に少量の propionic acid が混在していることを見出した。

二塩基酸区分は glutaric acid を主成分としていたが、succinic acid の少量も同時に検出された。

一塩基酸区分の propionic acid と二塩基酸の succinic acid がペーパークロマトグラフィにおいて検出されず、p-ブロムフェナシルエステルの融点測定でも見落されたのは、その生成量がわずかであったためと考えられる。

#### 1.2.2.5. 純水溶液中の glutamic acid のガンマ線分解

十分に精製した蒸留水に glutamic acid を 800 mg/dl の濃度に溶解した試料液を、内径

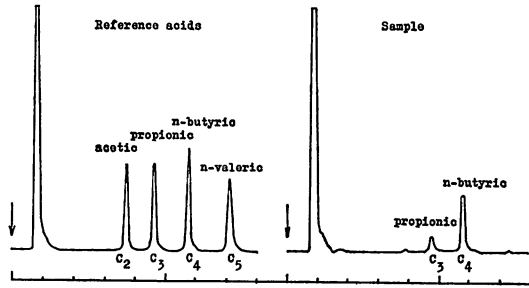


Fig. 15. GLC analysis of mono-carboxylic acids fraction

Sample : mono-carboxylic acids fraction  
 Carrier gas : N<sub>2</sub>, 60 ml./min.  
 Column packing : diethleneglycol succinate + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5%  
 Column : Stainless steel, 2 mm.φ × 2m.  
 Oven temperature : 100°C.~, programed rate 6°C./min  
 Detector : FID

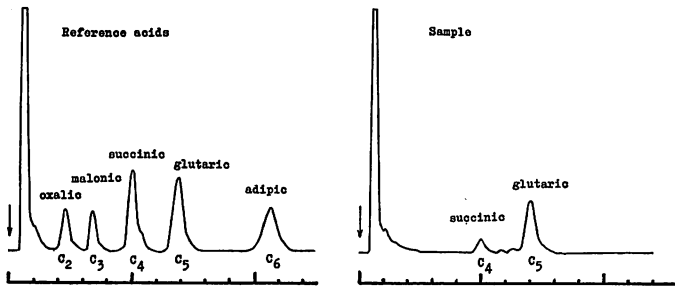


Fig. 16. GLC analysis of di-carboxylic acids fraction

Sample : dicarboxylic acids fraction  
 Carrier gas : N<sub>2</sub>, 70 ml./min.  
 Column packing : neopentylglycol sebacate  
 Column : Stainless steel, 2 mm.φ × 2 m.  
 Oven temperature : 210°C.  
 Detector : FID

13mm のガラス管に脱気封管してガンマ線照射し, glutamic acid の脱アミノ反応によって生成するカルボン酸と ammonia を測定した. 同時に揮発性塩基量を測定したが, その主要成分は ammonia であり, 他にアミンが含まれているものと推定される.

純水溶液中の glutamic acid を照射した目的は, 既述の緩衝溶液中の塩類が glutamic acid のガンマ線分解に影響力を持つか否かを知ることにあつた.

吸収線量は, 0, 0.9, 1.79, 2.68, 3.58Mrad の5段階とした. このうち 2.68Mrad 照射の結果が緩衝溶液使用時の吸収線量と同一である. 純水溶液の pH 値は照射前 pH 3.18 であり, 照射後は線量とともに高くなったが, その変化の程度は 3.19~3.25 の範囲であつた.

従つて glutamic acid 分解に及ぼす塩類の影響を見るには, pH 3.2 附近の試料について, 吸収線量 2.68 Mrad の実験結果を純水溶液, 緩衝溶液試料相互に比較すればよい. Fig. 17 は純水溶液中で照射を受けた glutamic acid の, 脱アミノ反応の結果生じた諸物質の測定結

果である。

分解生成物の種類と量に及ぼす共存塩類の影響は、後述の Fig. 18 および Fig. 19 に掲げた、緩衝溶液並びに純水溶液中での glutamic acid 照射によって生ずる生成物を比較すれば明らかのように、殆んど認められなかった。

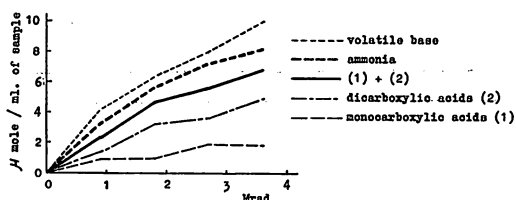


Fig. 17. Carboxylic acids and volatile bases formation from  $\gamma$ -irradiated Glu pure water solution

#### 1.2.2.6. 考 察

以上の実験結果によって、glutamic acid 水溶液を脱気条件下で Mrad 単位の照射を行なった時に生ずるカルボン酸は、主として glutaric acid と n-butyric acid であり、他に微量の succinic acid と propionic acid も同時に生ずることを知った。glutaric acid と n-butyric acid の生成量を glutamic acid 水溶液の pH 別に測定し G 値で示したものは Fig. 18 である。

Fig. 18 には glutamic acid から脱アミノ反応を経て生ずる ammonia とともに揮発性塩

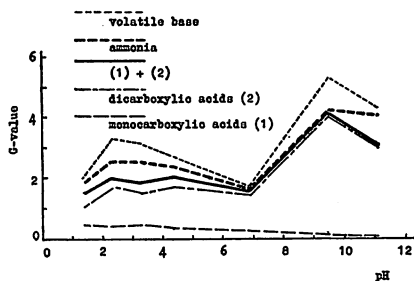


Fig. 18. G-value of carboxylic acids and volatile bases formed from  $\gamma$ -irradiated Glu solution

基の G 値を併記した。図は酸性および塩基性において二つの極大値を持つ、いわゆる bimodal curve を描いているが、これは両性イオンであるアミノ酸の脱アミノ反応全般について、しばしば見られる型である<sup>20,103)</sup>。酸性側の glutaric acid 測定結果に多少不安定な個所があるが、概して言えば glutamic acid の脱アミノ反応は、 $pK_1$  に相当する pH 2.19 附近及び  $pK_3$  である pH 0.67 附近に極大値を持ち、 $pK_2$  と  $pK_3$  の中間である pH 7.0 附近に極小値を持つと言える。

有機電子論の立場からアミノ酸の脱アミノ反応をみると、 $\alpha$  炭素に付く  $-COOH$  の  $=O$  は電気陰性度が高く、従って  $-NH_2$  の結合力はそれに関連して弱くなり、脱アミノ反応が脱



炭酸反応より起り易い状態にあるわけである<sup>98)</sup>。さらに  $-NH_2$  が  $-NH_3^+$  と、 $-COOH$  が  $-COO^-$  と荷電すると、上記の電気陰性度の傾向はさらに強まりアミノ基は離脱し易くなる。この考え方に拠れば  $pK_3$  の pH 値に達するまでの状態では、pH 値が高くなるほど脱アミノ反応は強くなり、 $pK_3$  以上では  $-NH_2$  が電離状態をとらないので、脱アミノ反応量は下降の傾向をとると言える。また強塩基性条件で脱アミノ反応が衰えるのは、ガンマ線照射によって水から生じた  $e_{aq}^-$ ,  $H^+$ ,  $H_3O^+$  の力が急に弱まるためと言われる<sup>103)</sup>。中性の附近の脱アミノ反応がやや減少する傾向は、アミノ酸に広く見られる現象であるが、それに対する説明は未だ明確にはされていない。

Fig. 19 は、Fig. 17 の結果を基礎に算出した、純水溶液中の glutamic acid が glutaric

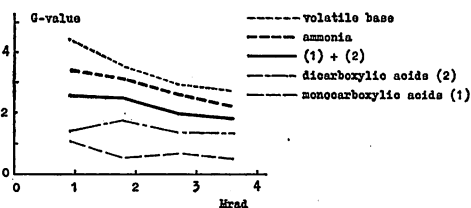


Fig. 19. G-value of carboxylic acids and volatile bases formed from  $\gamma$ -irradiated Glu pure water solution

acid その他に変化した時の G 値を示したものである。

Fig. 18 の pH 3.2 および Fig. 19 の 2.68Mrad に相当する値は、glutamic acid の緩衝溶液および純水溶液について行なった照射実験のうち、相互に同一 pH 値と吸収線量の部分である。条件として異なる点は緩衝剤としての塩類が存在するか否かのみであるが、両図におけるその部分の G 値は、ammonia, glutaric acid 等ともほぼ同じであると言える。

水溶液中の glutamic acid が glutaric acid または n-butyric acid に変化する経路は、アミノ酸の脱アミノおよび脱炭酸反応で容易に説明することができる。その機構は Fig. 20 に示す通りである。 $\gamma$ -amino-butyric acid 経路で n-butyric acid を生ずる経路は、1.2.1. にて説明した glutamic acid から他種アミノ酸への変化を参照すれば理解できる。

glutamic acid 水溶液の pH と各生成物質の G 値を Fig. 18 によって見ると、脱アミノ反応の結果である ammonia と glutaric acid 量が強く pH の影響を受けているのに対し、脱炭酸反応を経由した n-butyric acid は、pH の影響をそれほど受けていない。

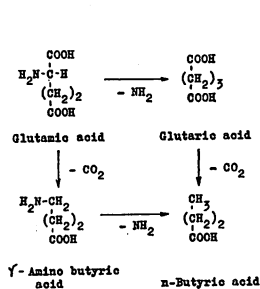


Fig. 20. Chemical changes from glutamic acid to glutaric acid or n-butyric acid

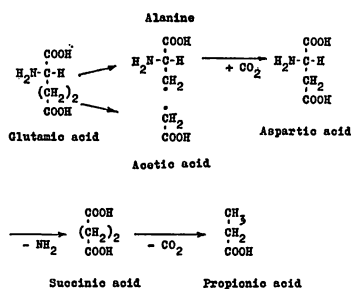


Fig. 21. Chemical changes from glutamic acid to succinic acid or propionic acid

また succinic acid と malonic acid の微量が検出されたことは、Fig. 21 に示すように、1.2.1.でも述べたことではあるが、水溶液中の glutamic acid から aspartic acid を生ずる事実を基礎にして考えると、aspartic acid からさらに分解して succinic acid, propionic acid を生ずる経路が考えられる。

#### 1.2.2.7. 要 約

1. 水溶液中の glutamic acid が脱気条件下でガンマ線照射を受け、脱アミノ反応によってカルボン酸および ammonia に変化した量を測定し、その変化機構を考察した。

2. 生成したカルボン酸の主要成分は、glutamic acid の脱アミノ反応の結果生ずる glutaric acid と、脱アミノ、脱炭酸両反応を経て生ずる n-butyric acid である。また微量ではあるが succinic acid と propionic acid が検出された。

3. glutaric acid の生成量は溶液の pH と密接な関係があり、glutamic acid の  $pK_1$  に相当する pH 2~3 にて  $G=1.4\sim 1.7$ ,  $pK_3$  に相当する pH 9~10 にて  $G=4.0$  と2個所に極大値を持ち、pH 7 付近では極小値を持ち、いわゆる bimodal curve を描くことを知った。

4. glutamic acid のイオン化状況は溶液の pH によって変化するが、これとともに、極性を有する基の電気陰性度も変化する。電気陰性度の変化は、 $-NH_2$  等の結合エネルギーも微妙な変化を与える。glutamic acid のガンマ線分解による glutaric acid の生成量が pH によって変化する理由の一つはここにあるものと考えられる。また強塩基性条件下で glutaric acid 生成量が減少するのは、 $e_{aq}^-$  などの水中に生ずる活性遊離基が減少するからであるが、pH 7 付近で極小値を示す理由は不明である。

5. n-butyric acid の生成と溶液 pH との関連には特徴がない。しかし酸性条件下で  $G=0.31\sim 0.43$ 、塩基性条件下で  $G=0.12\sim 0.22$  と酸性側で生成量が多い。

6. 純水に溶解した glutamic acid のガンマ線分解は、これと同一 pH を有する緩衝液中での分解と比較して、分解生成物の種類、生成量とも大差なく、試料溶液中に共存する塩類の影響は認められなかった。

### 1.3. $\gamma$ -Na-glutamate に対するガンマ線照射とその分解生成物

これまでに glutamic acid に対するガンマ線の直接ならびに間接効果を述べたが、glutamic acid の塩に対するガンマ線照射の影響はどのようなものであろうか。塩類中最も一般的な化合物である  $\gamma$ -monosodium-L-glutamate を対象として、その結晶および水溶液に対するガンマ線照射を行い、glutamic acid 以外のアミノ酸への変化状況を検討した。

#### 1.3.1. 結晶および水溶液中の $\gamma$ -Na-glutamate より生ずる他種アミノ酸とその生成機構

$\gamma$ -monosodium-L-glutamate (和光純薬製特級) の試料調製は、結晶を100メッシュ以下の粒度とし、硫酸デシケーター内で十分に乾燥した後、内径 6.5~7.0 mm のガラス管内に入れ、充分脱気した後密封した。ガンマ線照射は  $3.8 \times 10^5$  r/hr の線量率で、全吸収線量 19~78Mrad の範囲で行った。

水溶液試料の調製法は  $\gamma$ -monosodium-L-glutamate を、500 mg/dl の濃度となるように各種 pH 緩衝液に溶解し、内径 14 mm のガラス管にそれぞれ 5 ml ずつ入れ脱気密封した。

これらの試料アンプルを照射したが、吸収線量は 2.2Mrad であった。

1.3.1.1. 結晶試料より生ずる  $\alpha$ -amino-n-butyric acid および  $\gamma$ -amino-butyric acid  $\gamma$ -Na-glutamate を脱気条件下でガンマ線照射し、その結果生ずる他種アミノ酸の種類は  $\alpha$ -amino-n-butyric acid および  $\gamma$ -amino butyric acid であった。吸収線量と分解生成アミノ酸量との関係は Table 18 に示す通りである。すなわち約 40Mrad 以上の照射を受けると

Table 18. G-value of  $\alpha$ -ABA and  $\gamma$ -ABA formed from gamma-irradiated  $\gamma$ -monosodium-glutamate crystal.

Dosage	G( $\alpha$ -ABA)	G( $\gamma$ -ABA)
19 Mrad	0	0
39	trace	0
58	0.33	trace
78	0.40	trace

$\alpha$ -amino-n-butyric acid が生成し、100Mrad 近くの大線量になると微量ではあるが  $\gamma$ -amino-butyric acid も検出された。

$\alpha$ -および  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成機構については、glutamic acid について実験した 1.1.1. の中で機構に対する考察として記載したところである。脱気条件下で行なった glutamic acid 結晶と  $\gamma$ -Na-glutamate 結晶のガンマ線分解の程度は、 $\alpha$ -amino-n-butyric acid 生成に関する G 値を比較すれば明白なように、かなりの差異がある。glutamic acid 結晶の場合 G( $\alpha$ ABA)は 1.1.1. に記載の如く 0.6~1.0 であるが、 $\gamma$ -Na-glutamate 結晶では 0.33~0.40 である。 $\gamma$ -amino-butyric acid 生成量は微量であるため、G 値の比較は困難であった。この G 値に示された差異の原因は、Na- 塩の場合、 $\gamma$ -カルボキシル基に結合した Na- 原子のため、 $\alpha$ -amino-n-butyric acid 生成に必要な  $\gamma$ -脱炭酸が遊離の glutamic acid の場合に比較して阻害されるためと考察される。

1.3.1.2. 水溶液試料中に生ずる aspartic acid および  $\gamma$ -amino-butyric acid

$\gamma$ -Na-glutamate 水溶液のガンマ線分解に当り、検出されるアミノ酸は aspartic acid と  $\gamma$ -amino-butyric acid であった。水溶液の pH と前記アミノ酸生成量との関係は次のようであった。

先ず aspartic acid 生成は、Fig. 22 のように pH 4.3 で G(Asp)=2.28 と最高を示し、pH 9.5 では 0.3 と低い生成率であった。これを 1.2.1. で述べた遊離 glutamic acid 水溶液で

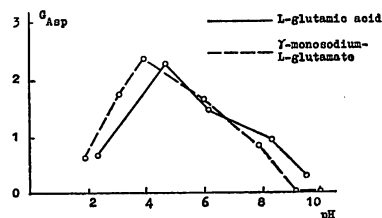


Fig. 22. Aspartic acid formation from  $\gamma$ -irradiated L-glutamic acid and  $\gamma$ -monosodium-glutamate solutions

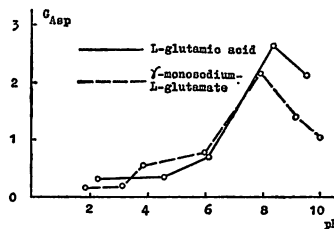


Fig. 23.  $\gamma$ -Amino-butyric acid formation from  $\gamma$ -irradiated L-glutamic acid and  $\gamma$ -monosodium-glutamate solutions

のガンマ線分解実験結果と比較すると、ほぼ同様の生成率と言える。参考として Fig. 22 に遊離 glutamic acid から aspartic acid 生成に関する結果を併記した。

一方  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成は Fig. 23 に示す通りで、pH 8.3 で  $G(\gamma\text{ABA})=2.67$  と最高を示し、酸性側では低い結果を示した。1.2.1. で得た遊離 glutamic acid 水溶液分解時の  $G(\gamma\text{ABA})$  を参考のため Fig. 23 に併記したが、Na-塩、遊離 glutamic acid 試料ともに同傾向の生成を示していることがわかった。

水溶液試料についての照射実験は、溶媒として緩衝液を使用しているため、 $\gamma$ -Na-glutamate は溶液中では解離し、結果的には遊離 glutamic acid を緩衝液中に溶解して照射した実験結果と同様になったものと考えられる。従って、 $G(\text{Asp})$ ,  $G(\gamma\text{ABA})$  とともに、glutamic acid の遊離型、Na-塩の両者について行った値が同じ結果となったのであろう。

### 1.3.2. 結晶および水溶液中の $\gamma$ -Na-glutamate より生ずる ammonia

#### 1.3.2.1. 結晶試料より生ずる ammonia

ガンマ線照射による結晶試料の脱アミノ反応は、Fig. 24 のように 40Mrad 以下では高い

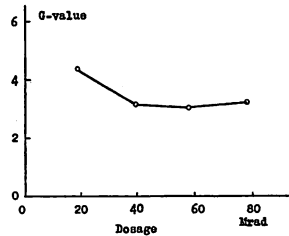


Fig. 24. G-value of ammonia formed from  $\gamma$ -irradiated  $\gamma$ -monosodium L-glutamate crystal

$G(\text{ammonia})$  を示したが、40~80Mrad では 3.0~3.1 の G 値で線量にほぼ比例的であった。また 1.1.2. に述べた遊離 glutamic acid 結晶の脱アミノ値は  $G(\text{ammonia})=3.7\sim 3.9$  であり、Na 塩での結果はやや低い値であった。しかし脱アミノ反応による  $\gamma$ -amino-butyric acid 生成の如く、Na-塩からの生成量が遊離型 glutamic acid からの 1/2 と言った大きな差ではなく、分子中の Na-原子の存在はそれ程大きな影響を与えていない。

#### 1.3.2.2. 水溶液試料中に生ずる ammonia

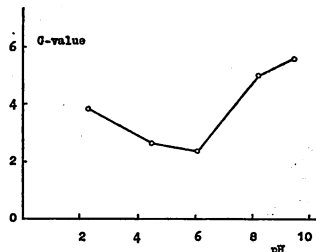


Fig. 25. G-value of ammonia formed from  $\gamma$ -irradiated  $\gamma$ -monosodium L-glutamate solution

$\gamma$ -Na-glutamate 水溶液の pH と、ガンマ線照射によって生ずる ammonia 量との関係は Fig. 25 の通りである。吸収線量は 2.2Mrad である。ammonia の生成量は pH 6.1 付近で極小を示しており、それより酸性側および塩基性側とともに増加している。遊離 glutamic acid に対する照射実験では、pH 2 以下の酸性条件下と、pH 11 以上の塩基性条件下では、ammonia 生成量が減少している。本実験では、いわゆる bimodal curve を得ることができなかったが、これは試料が Na- 塩であるため両性イオンであるアミノ酸特有の脱アミノ傾向<sup>20,103)</sup>が行なわれなかったためではなく、試料液 pH の条件選定が不相当であったためと考えるべきであろう。

### 1.3.3. 考 察

ガンマ線照射による結晶  $\gamma$ -Na-glutamate から他種アミノ酸への変化は、遊離の glutamic acid におけると同様に、 $\gamma$ -位脱炭酸による  $\alpha$ -amino-n-butyric acid である。高線量照射時に出現する微量の  $\gamma$ -amino-butryic acid は、 $\alpha$ -位脱炭酸反応も考えられるが、1.1.1. で述べたように  $\alpha$ -amino-n-butyric acid からの二次的生産物と考えるのが妥当であろう。

ただ遊離 glutamic acid と  $\gamma$ -Na-glutamate のガンマ線分解における相違は、 $\alpha$ -amino-n-butyric acid 生成に関する G 値である。すなわち、Na- 塩では  $G=0.33\sim 0.40$  であるのに対し、遊離 glutamic acid では  $G=0.6\sim 1.0$  である。これは両者の分子構造上の Na- 原子と H 原子の違いに原因するものと推測される。H と Na の原子電気陰性度は PAULING の定義<sup>107)</sup>によると  $H=2.1$  に対し  $Na=0.9$  である<sup>108)</sup>。このため基全体として見たとき、 $-\text{COOH}$  に比して、 $-\text{COONa}$  の電気陰性度は低い。従って  $-\text{COONa}$  の方が結合は比較的強く、脱炭酸反応を受けることが少なかったのであろう<sup>98,107)</sup>。

水溶液中における  $\gamma$ -Na-glutamate のガンマ線分解は、分子が電離状態にあるため、遊離 glutamic acid が水溶液中にある場合と同じ状態となり、Na- 塩と遊離酸の分解生成物の差異は認められなかった。

また脱アミノ反応による ammonia 生成についても、結晶試料、水溶液試料の双方について、Na- 塩と遊離酸の間の相違は明らかでなかった。

### 1.3.4. 要 約

1. 結晶  $\gamma$ -Na-glutamate を脱気条件下でガンマ線照射し、脱炭酸反応による他種アミノ酸への変化を測定した。生成する他種アミノ酸は主として  $\alpha$ -amino-n-butyric acid であり、20~80Mrad 範囲での G 値は 0.33~0.40 であった。

2. 遊離 glutamic acid 結晶からガンマ線照射によって生ずる  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の G 値は 1.1.1. に述べたように 0.6~1.0 であり、Na-塩とは若干の差がある。これは遊離酸分子の H 原子と、Na- 塩分子の Na 原子の原子電気陰性度の差異に起因する結合エネルギーの相違によるものであろう。

3.  $\gamma$ -Na-glutamate 水溶液のガンマ線照射によって生ずる aspartic acid と  $\gamma$ -amino-butyric acid は、生成に及ぼす pH 条件の影響、生成量ともに遊離 glutamic acid に関する実験結果と大差は無かった。これは、 $\gamma$ -Na-glutamate が水溶液中で電離状態にあるため、遊離 glutamic acid 水溶液と結果的には同一条件となり、同様のガンマ線分解を受けるためであろう。

4.  $\gamma$ -Na-glutamete の脱アミノによる ammoniac 生成は、結晶試料、水溶液試料の双方

について、遊離型 glutamic acid についての実験結果との差異は明らかではなかった。

## 2. L-aspartic acid のガンマ線分解

L-aspartic acid は 1. に述べた如く, L-glutamic acid のガンマ線分解生成物として重要な物質である。また, L-aspartic acid は L-glutamic acid とともに, 自然界に存在の多い mono-amino-dicarboxylic acid であるが, 炭素鎖の長さが1個だけ異なっている。このことが L-aspartic acid と L-glutamic acid のガンマ線分解生成物の種類と量にどの程度の影響を与えるかは興味ある問題である。

本編では各種照射条件下における L-aspartic acid のガンマ線分解生成物を測定し, その生成機構に考察を加える。

### 2.1. 固体試料のガンマ線照射とその分解生成物

#### 2.1.1. L-aspartic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸の生成とその機構

1.1.1. において結晶 glutamic acid を脱気条件下でガンマ線照射し,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の生成状況を測定した。ガンマ線照射を受けた L-aspartic acid の脱炭酸反応が glutamic acid の場合と同様の過程で進行するならば aspartic acid からは  $\beta$ -脱炭酸によって alanine が生成することになる。

本章におけるガンマ線照射条件は, 線量率  $5.0 \times 10^5$  r/hr, 吸収線量は 33.1~157 Mrad である。

##### 2.1.1.1. alanine および $\beta$ -alanine の生成

脱気条件下で 33.1~157 Mrad のガンマ線照射を受けた L-aspartic acid の結晶を水に溶解し, アミノ酸組成を測定したところ Fig. 26 の結果を得た。alanine と  $\beta$ -alanine 量は, 生成%, aspartic acid は残存%を表わしている。Table 19 は G(Ala) および G( $\beta$ -Ala) を算出した結果である。

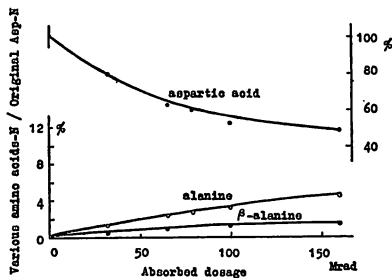


Fig. 26. Formation of alanine and  $\beta$ -alanine from aspartic acid crystal by  $\gamma$ -rays irradiation (Dose rate:  $5.0 \times 10^5$  r./hr.)

Table 19. G-value of Ala and  $\beta$ -Ala formation from  $\gamma$ -irradiated Asp crystal

Absorbed dosage	G(Ala)	G( $\beta$ -Ala)
0.00 Mrad	0.0	0.0
33.1	3.3	1.1
66.2	2.4	1.1
78.6	2.9	—
99.3	2.6	0.9
157	2.3	0.8

照射初期における G(Ala) は 3.3 であるが, 線量の増加とともに生成率は減少し, 特に 100 Mrad 以上では 2.3~2.6 であった。また G( $\beta$ -Ala) は照射初期では 1.1 であり, alanine 生成と同様に線量とともに生成率は低下するが 100 Mrad 以上でも 0.8~0.9 を保っていた。

以上の結果によると脱気条件下の L-aspartic acid の照射によって生ずる脱炭酸反応生成物は alanine であり，反応初期での G(Ala) は 3 を越えることがうかがえる。alanine に次いで  $\beta$ -alanine の生成量も多く，反応初期での G( $\beta$ -Ala) は 1.0 以上であった。揮発性塩基の大部分は ammonia で，脱アミノ反応の結果生じたものである。このことは L-aspartic acid の脱アミノ反応を説明した後章で詳述する。

2.1.1.2. 考 察

aspartic acid 結晶から alanine と  $\beta$ -alanine の生成は Fig. 27 のように  $\beta$ -脱炭酸によ

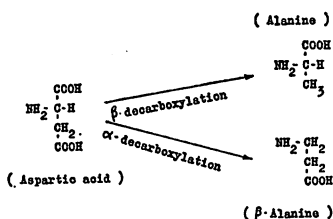


Fig. 27. Radiation-chemical decarboxylation of aspartic acid

て alanine を生じ， $\alpha$ -脱炭酸によって  $\beta$ -alanine を生成するものと考えてよい。

本章の実験結果を glutamic acid 結晶のガンマ線分解反応の場合と比較すると次のようなことが言える。すなわち aspartic acid では  $\beta$ -脱炭酸による alanine，glutamic acid では  $\gamma$ -脱炭酸による  $\alpha$ -amino-n-butyric acid と，いずれも末端のカルボキシル基の離脱によって生ずる化合物を主要生成物にしている点は共通している。しかし，明確な差異は，それらの分解生成物の量である。10~100 Mrad 程度のガンマ線照射実験では，glutamic acid からは  $\alpha$ -amino-n-butyric acid と  $\gamma$ -amino-butyric acid を生ずるが，その量は G( $\alpha$ ABA) = 0.6~1.0，G( $\gamma$ ABA) は極めて微量であった。これに対して aspartic acid からの生成物量は，G(Ala) = 2.3~3.3，G( $\beta$ -Ala) = 0.8~1.1 である。

G(Ala) が G( $\alpha$ ABA) の 3 倍であることは，aspartic acid の脱炭酸が glutamic acid に比較して大であることを示している。それに増して aspartic acid と glutamic acid の脱炭酸の大きな違いは G( $\gamma$ -ABA) が微量であるのに対して G( $\beta$ -Ala) は約 1 であることである。これらの相異は aspartic acid と glutamic acid の分子の大きさによるカルボキシル基の結合の強さで説明するほかはない。炭素鎖が短いほど  $\alpha$ -脱炭酸が起り易く，長いほど起り難い傾向にあることを明確にするには，炭素数が 6 と glutamic acid よりさらに大きな mono-amino-dicarboxylic acid の  $\alpha$ -amino adipic acid で本章と同様の実験を行なえばよい。

2.1.1.3. 要 約

1. aspartic acid 結晶に対して脱気条件下で 33.1~157 Mrad のガンマ線を照射し，脱炭酸反応によって生成する他種アミノ酸の検索を行なった。
2. aspartic acid 結晶より生成する他種アミノ酸のうち主要なものは alanine であり，他に  $\beta$ -alanine が測定された。
3. 照射初期における G(Ala) は 3.3 であるが，吸収線量の増加とともに生成率は減少傾向を示し，特に 100Mrad 以上では，G(Ala) は 2.3~2.6 であった。
4.  $\beta$ -alanine の生成は照射初期では G( $\beta$ -Ala) = 1.1 であり，alanine 生成と同様に線

量とともに生成率は低下するが、100Mrad以上の線量でも0.8~0.9を保っていた。

5. aspartic acidと同じmono amino-dicarboxylic acidであるglutamic acid結晶のガンマ線分解結果と比較すると、末端カルボキシル基の離脱を脱炭酸の主反応としている点は共通している。しかしaspartic acidの分解によるalanine生成は、glutamic acid分解による $\alpha$ -amino-n-butyric acid生成の約3倍の量に達した。

また $\alpha$ 位脱炭酸によってglutamic acidから生ずる $\gamma$ -amino-butyric acid量は微量であったのに対し、aspartic acidから生ずる $\beta$ -alanineは主反応であるalanine生成量の1/3にも達した。

このようなaspartic acidとglutamic acidの脱炭酸反応の相異は、両者の炭素鎖の長さ起因する結合エネルギーの差で説明するのが妥当と考える。

### 2.1.2. ガンマ線照射による aspartic acid のカルボン酸への転移機構

ガンマ線照射を受けたL-aspartic acidの分解反応のうち、最も顕著にあらわれるものは脱アミノ反応である。従ってaspartic acidからはsuccinic acidが生成する可能性が極めて高い。本章はL-aspartic acid結晶を脱気条件下でガンマ線照射し、その結果生ずるカルボン酸と揮発性塩基量を測定するとともに、その結果をglutamic acid結晶のガンマ線分解反応の場合と比較検討したものである。

#### 2.1.2.1. シリカゲル・カラムクロマトグラフィによるカルボン酸の溶離

支持相、固定相、移動相として、それぞれシリカゲル、chloroform、n-butanolを使用するカラムクロマトグラフィにより、一塩基酸と二塩基酸の溶離を行なった<sup>85)</sup>。この分析操作は1.1.2および1.2.2.での記載と同様の方法である。

Fig. 28はこのシリカゲルカラムクロマトグラフィの溶離曲線である。各図はそれぞれ照

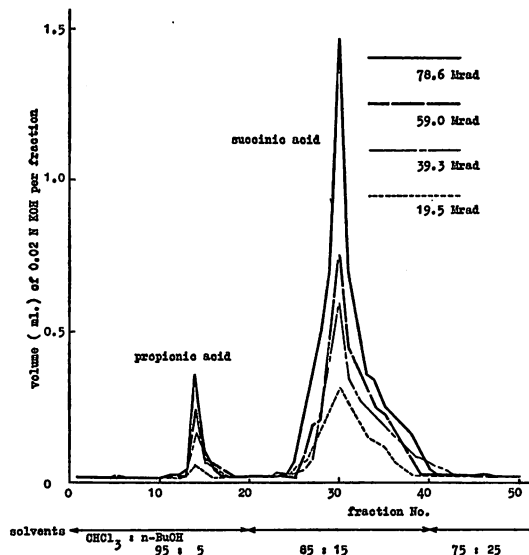


Fig. 28. Liberation of carboxylic acids from  $\gamma$ -irradiated aspartic acid crystal



射前の試料 aspartic acid にして 125 mg より生じた一塩基酸と二塩基酸量を示している。横軸はフラクション番号で（各フラクションは溶離液 5 ml）、縦軸は中和滴定に使用した 0.02 N KOH 標準液の ml 数である。図中の小さな第一ピークは一塩基酸であり、大きな第二ピークは二塩基酸である。このことは標準品による比較実験および後述の実験によって明らかで、酸の種類は propionic acid と succinic acid であった。吸収線量と生成する propionic acid と succinic acid 量が比例的であることを後述の Fig. 29 で説明する。

2.1.2.2. ペーパークロマトグラフィによるカルボン酸の確認

照射試料を ethyl ether 抽出して得た区分についてカルボン酸のペーパークロマトグラフィを行ない、前述のカラムクロマトグラフィによる溶離分析結果と併せてカルボン酸同定の資料とした。

Table 20 は試料抽出物と標準カルボン酸について行なった一塩基酸用のペーパークロマトグラフィ Rf である。この結果より aspartic acid 結晶にガンマ線照射して得られる一塩基酸は propionic acid であることが明らかである。

二塩基酸区分のペーパークロマトグラフィ結果は Table 21 の如くカルボン酸標準品との比較によって succinic acid であることがわかった。

Table 20. Rf value of monobasic acids\*

absorbed dosage	Rf value
19.5 Mrad	0.23
39.3	0.24
59.0	0.24
78.6	0.24
.....	
reference acids	
formic	0.18
acetic	0.20
propionic	0.24
n-butyric	0.39
n-valeric	0.50

\*: developed as form of ammonium salts  
solvent system: n-butanol saturated with  
1.5 N ammonium water  
indicator: bromo-phenol blue

Table 21. Rf value of dibasic acids

absorbed dosage	solvent A	solvent B
19.5 Mrad	0.68	0.83
39.3	0.68	0.82
59.0	0.67	0.82
78.6	0.68	0.82
.....		
reference acids		
oxalic	0.55	0.51
malonic	0.59	0.74
succinic	0.68	0.82
glutaric	0.75	0.88
adipic	0.82	—

solvent system  
A: n-butanol: formic acid: water  
=4: 1: 1  
B: phenol: formic acid=3 g.: 1 ml.  
indicator: bromo-cresol green

propionic acid と succinic acid 以外のカルボン酸は本実験の線量範囲では見出すことはできなかった。

2.1.2.3. p-ブロムフェナシルエステルの融点

これまでのクロマトグラフィ実験の結果、aspartic acid 結晶のガンマ線照射によって生ずるカルボン酸は、succinic acid と propionic acid であることを知った。これをさらに確実に知るために、カラムクロマトグラフィの溶離曲線のうち、主要ピークに相当するフラクションより、含有するカルボン酸および標準カルボン酸の p-ブロムフェナシルエステルを作り、それらの融点を測定した。この結果は Table 22 である。エステルの融点測定の結果、Fig. 28 における第一ピークは propionic acid であり、第二ピークは succinic acid に相当

Table 22. M. P. of p-bromophenacyl esters

absorbed dosage	fraction No.	melting point
19.5 Mrad	30	210-213°C
39.3	30	208-211
59.0	29	210-212
78.6	14	58- 61
	30	209-211
.....		
reference acids		
acetic		83-85 °C
propionic		59- 61
n-butyric		61- 63
n-valeric		71- 73
succinic		209-212
glutaric		136-137

することが確実となった。propionic acid 相当の試料は少なく、78.6 Mrad 照射の試料からのみしか製し得なかったが、混融試験でもこれを裏付ける結果を得た。

#### 2.1.2.4. カルボン酸生成量と ammonia 生成量との関係

シリカゲルカラムクロマトグラフィによる溶離操作で得たカルボン酸生成量および別に測定した ammonia 生成量を線量別に記録し、まとめたものが Fig. 29 である。これによると

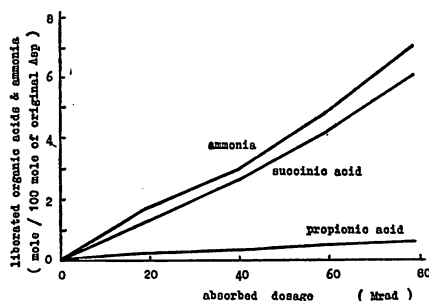


Fig. 29. Liberation of carboxylic acids and ammonia from  $\gamma$ -irradiated Asp crystal

カルボン酸は propionic acid, succinic acid とともに線量に比例して生成量が増している。しかし、succinic acid の生成率に較べて propionic acid 生成率はそれ程高くないと言える。

succinic acid と propionic acid 生成量の合計は、当然 aspartic acid の脱アミノ反応の結果であり、ammonia 生成量と等モルの関係にある。二次的な分解反応を考えればこの等ル関係は厳密には一致しないが、ほぼ近似した数値を示している。

#### 2.1.2.5. 考 察

以上の実験結果から、結晶 aspartic acid を脱気条件下で 10Mrad 単位のガンマ線照射をした場合の脱アミノ反応を考察する。

シリカゲルカラムクロマトグラフィによる溶離実験、ペーパークロマトグラフィによる Rf 検定、および p-ブロムフェナシルエステルの融点測定結果によって、結晶 aspartic acid

から生ずるカルボン酸は succinic acid および propionic acid であることを確認した. succinic acid は aspartic acid の脱アミノによって生じたものであり, propionic acid は succinic acid がさらに脱炭酸した結果生成したものである. 生成カルボン酸量と脱アミノによる ammonia 生成量との関係は前に述べたが, それらの G 値は Fig. 30 の通りである.

この結果を結晶 glutamic acid の脱アミノ反応の場合と比較すると次のことが言える. ammonia の G 値は aspartic acid から生成するときは 5.5~6.3, glutamic acid より生ずるときは 3.5~4.0 である. これによって脱アミノ反応の規模は aspartic acid の方が glutamic acid の約 1.5 倍であることがわかる. 生成するカルボン酸の G 値を比較すると aspartic acid から succinic acid 生成が G=4.8~5.5, propionic acid 生成が G=0.6~0.7 であり, glutamic acid から glutaric acid 生成の G=2.5, n-butyric acid 生成の G=0.3 である. 生成するカルボン酸の G 値から見ても aspartic acid と glutamic acid の脱アミノ反応に 1.5 : 1 の差があることが明白である.

aspartic acid から succinic acid および propionic acid が生成する機構は Fig. 31 のように考えられる. すなわち aspartic acid の脱アミノによって succinic acid を生じ, 生じた succinic acid の脱炭酸によって propionic acid が生成する経路である. この経路外に 2.1.1. で述べた「aspartic acid の脱炭酸によって生じた alanine または,  $\beta$ -alanine」が脱アミノして propionic acid を生ずる経路も挙げられる. succinic acid および propionic acid の生成量は aspartic acid の脱アミノおよび脱炭酸の程度を表わしている. 脱アミノの量は Fig. 30 の如く G(ammonia)=5.5~6.3 であり, 脱炭酸の量は直接求められないが alanine

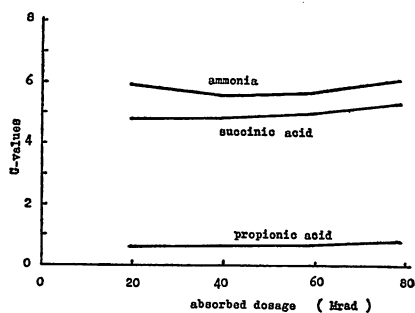


Fig. 30. G-values of carboxylic acids and ammonia

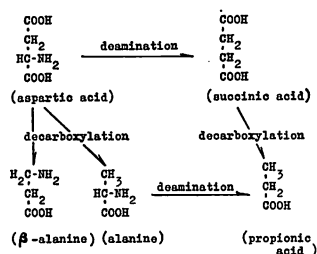


Fig. 31. Chemical changes from L-aspartic acid to other organic acids by  $\gamma$ -rays irradiation

と  $\beta$ -alanine 生成量から推定して  $G(\text{CO}_2)=3.1\sim 4.4$  と考えられる. 従って脱アミノによって生ずる succinic acid の量は多く, 脱アミノおよび脱炭酸の両反応を経なければならぬ propionic acid は, それだけ生成量が少ないわけである.

#### 2.1.2.6. 要 約

1. 脱気条件下で aspartic acid 結晶に対し 19~79Mrad のガンマ線を照射し, 脱アミノ反応を経て生成するカルボン酸の検索を行なった.

2. 生成するカルボン酸のうちで主なものは succinic acid で G 値は 4.8~5.5 であった. 次いで propionic acid は G 値=0.6~0.7 であった. succinic acid と propionic acid の生成量は本実験の線量範囲では吸収線量にほぼ比例的であった.

3. aspartic acid の脱アミノによって生ずる ammonia 量も吸収線量と比例的に増加し、G 値は 5.5~6.3 であった。この数値は succinic acid と propionic acid 生成に関する G 値の合計とほぼ一致する。

4. ガンマ線照射を受けた aspartic acid 結晶と glutamic acid 結晶の脱アミノ反応を比較すると、反応生成物より見て aspartic acid が glutamic acid の場合の 1.5 倍に達する。

## 2.2. 水溶液試料に対するガンマ線照射とその分解生成物

### 2.2.1. aspartic acid の分解によって生ずる他種アミノ酸とその生成機構

水溶液 aspartic acid のガンマ線分解には glutamic acid と同様 pH が大きな影響を与える。

ガンマ線照射を受けた水溶液中の aspartic acid から生ずる主要な物質のうち、脱炭酸反応によるものは、 $\beta$ -alanine である。これは結晶 aspartic acid について alanine を得た結果とは反対に  $\alpha$ -脱炭酸が主に行なわれるためである。本章は照射前の aspartic acid 濃度 500 mg/dl の各種 pH 水溶液に 1.9 Mrad のガンマ線を照射し、脱炭酸反応によって生ずる  $\beta$ -alanine と alanine 量を測定し、反応機構を検討した結果である。

#### 2.2.1.1. $\beta$ -alanine および alanine の生成

aspartic acid 水溶液より生ずる  $\beta$ -alanine および alanine 量と水溶液 pH との関係は、Fig. 32 である。照射試料溶液が微酸性であるときは微量の alanine が生成しているが、中

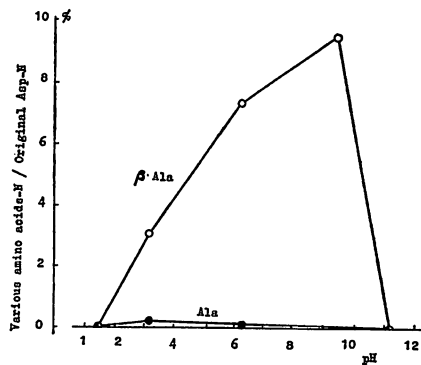


Fig. 32. Chemical changes of Asp (solution) to various amino acids by  $\gamma$ -rays irradiation (Absorbed dosage: 1.9 Mrad)

性~微塩性では殆んど検出されず、多量の  $\beta$ -alanine が生成する。pH 1.5 以下の強酸性および pH 11 以上の強塩基性条件では  $\beta$ -alanine, alanine とも生成を見なかった。aspartic acid の水溶液中における解離状況を見ると、 $pK_1=1.94$ ,  $pK_2=3.70$ ,  $pK_3=9.62$  である (25°C)。 $\beta$ -alanine の最大生成 pH はほぼ  $pK_3$  であり、alanine の最大生成 pH は、生成量は微量であるが  $pK_2$  に近い数値であると言える。

なお Fig. 32 は水溶液中の aspartic acid, alanine,  $\beta$ -alanine を比率で表わし、照射前に

存在した aspartic acid のモル数を100とし、照射後に測定された各アミノ酸量を比較したものである。

2.2.1.2. 考 察

水溶液中の aspartic acid が、ガンマ線照射を受けて脱炭酸し、alanine または  $\beta$ -alanine に変化する量を G 値によって示すと、Table 23 の通りである。

水溶液における aspartic acid の電離状態は、Fig. 33<sup>101)</sup> によって示される。aspartic acid

Table 23. Ala and  $\beta$ -Ala formation from aspartic acid solution by  $\gamma$ -radiolysis  
(Dose rate:  $5.0 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 1.9 Mrad)

pH value of solution before irradiation	G value				
	1.5	3.2	6.3	9.4	11.2
Ala	0.00	0.04	0.02	0.00	0.00
$\beta$ -Ala	0.00	0.59	1.41	1.83	0.00

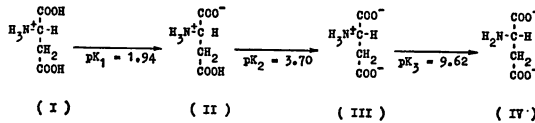


Fig. 33. Ionization of aspartic acid<sup>101)</sup>

の脱炭酸は水の遊離基作用が不活発な強酸性または強塩基性条件を除けば (II) および (III) の条件下で行なわれている<sup>108)</sup>。主要反応は  $\alpha$  脱炭酸で、殊に (III) の条件で活発である。これに対して  $\gamma$  脱炭酸は (II) において極くわずかに行なわれている。

aspartic acid の脱炭酸を glutamic acid の場合と比較すると、主反応が  $\alpha$ -脱炭酸であることは一致している。aspartic acid から生成する  $\beta$ -alanine, glutamic acid から生成する  $\gamma$ -amino-butyrac acid の G 値はほぼ同じであり、生成量と pH との関係も類似している。しかし、微酸性条件における反応は根本的に異なる。aspartic acid から生ずる alanine は  $\beta$ -脱炭酸によるものであり原理的には単純であるが生成量は少ない。一方 glutamic acid から生ずる aspartic acid は複雑な生成機構を経るもので<sup>99)</sup> 同一系統の mono amino-dicarboxylic acid に属する aspartic acid と glutamic acid でも炭素鎖の長さが一個異なるためこのような大きな差が現れるわけである。この点が aspartic acid と glutamic acid のガンマ線分解における最大の差であり、glutamic acid 分解は複雑な二次反応を伴っている。aspartic acid から生ずる alanine 量が少ないことも、さらに深く追求すれば二次的な分解または  $\beta$ -alanine への異性化が明らかになるかもしれない。

aspartic acid 水溶液のガンマ線分解と結晶試料の場合を比較すると、脱炭酸反応によって生ずる主要生成物が全く異なる。水溶液試料から生ずる  $\beta$ -alanine と結晶試料から生ずる alanine の生成機構の差異は、イオン化に伴う元素の電気陰性度の変化に伴う結合エネルギーの強弱によって説明しなければならない。

ガンマ線以外の線源によって aspartic acid 水溶液を照射した実験例としては次の報告がある。

RAJEWSKY ら<sup>45)</sup> は X 線照射によってガンマ線照射の場合と同様の  $\beta$ -alanine と alanine を検出している。紫外線の照射を受けた場合は非常に複雑な変化を示す。PFORDTE ら<sup>73)</sup> と PAVOLINI ら<sup>75)</sup> は alanine,  $\beta$ -alanine の外に serine, glycine, glutamic acid,  $\alpha$ -amino-n-butyric acid と多様なアミノ酸の生成を報告している。この中で glutamic acid の生成については FERRARI ら<sup>76)</sup> によって aspartic acid から生じた alanine と酢酸が二次的に結合するいわゆる scission and recombination の結果と推察されている。

### 2.2.1.3. 要 約

1. 各種 pH における 0.5% aspartic acid 水溶液を脱気条件下で 1.9 Mrad のガンマ線照射し、脱炭酸反応によって溶液中に  $\beta$ -alanine と alanine を生ずることを確認した。
2.  $\beta$ -alanine の生成は中～弱塩基性で大きく、G( $\beta$ -Ala) の最高は、pH 9.4 における 1.8 であった。
3. alanine の生成は弱酸性条件で少量見られ、G(Ala) の最高は、pH 3.2 における 0.04 であった。
4.  $\beta$ -alanine と alanine 生成は aspartic acid の  $\alpha$  脱炭酸または  $\beta$  脱炭酸によるものであり、aspartic acid の水溶液 pH による電離状態の転移に伴う、アミノ基またはカルボキシル基の結合力の変化と関係が深いことを論じた。

### 2.2.2. ガンマ線照射による水溶液中の aspartic acid のカルボン酸への転移機構

L-aspartic acid のアミノ基がガンマ線照射によって離脱し、succinic acid, propionic acid に変化する反応機構は、結晶試料については 2.1.2. に述べた。反応系が水溶液である場合は媒質である水自体の複雑な分解が行なわれるので<sup>113)</sup>、反応は結晶の場合とは著しく異った過程をたどることが予想される。

本章は aspartic acid を各種の pH 緩衝液に溶解したものに、脱気条件下で 2.69 Mrad のガンマ線を照射し、脱アミノ反応によって生じた分解生成物、例えばカルボン酸、ammonia を測定し、反応機構を推論したものである。

試料 aspartic acid の濃度は 800 mg/dl の濃度であり、これを内径 13 mm の硬質ガラス管に 5 ml ずつ脱気封管し、照射に供した。

照射前後における試料溶液の pH 変化は Table 24 の通りである。

#### 2.2.2.1. シリカゲルクロマトグラフィによるカルボン酸の溶離

シリカゲルカラムクロマトグラフィの操作法は 1.2.2. に記載した方法<sup>85)</sup> と同一である。aspartic acid 水溶液より分解生成したカルボン酸の溶離滴定曲線を試料液 pH 別に求め結果は Fig. 34 に示す通りである。

Table 24. pH value of L-aspartic acid solution before and after  $\gamma$ -radiolysis  
(Dose rate:  $9.0 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 2.7 Mrad)

Sample No.	pH value						
	1	2	3	4	5	6	7
Before irradiation	1.25	1.92	2.80	3.61	6.65	9.39	11.35
After irradiation	1.50	2.12	3.03	3.52	6.64	9.24	10.31

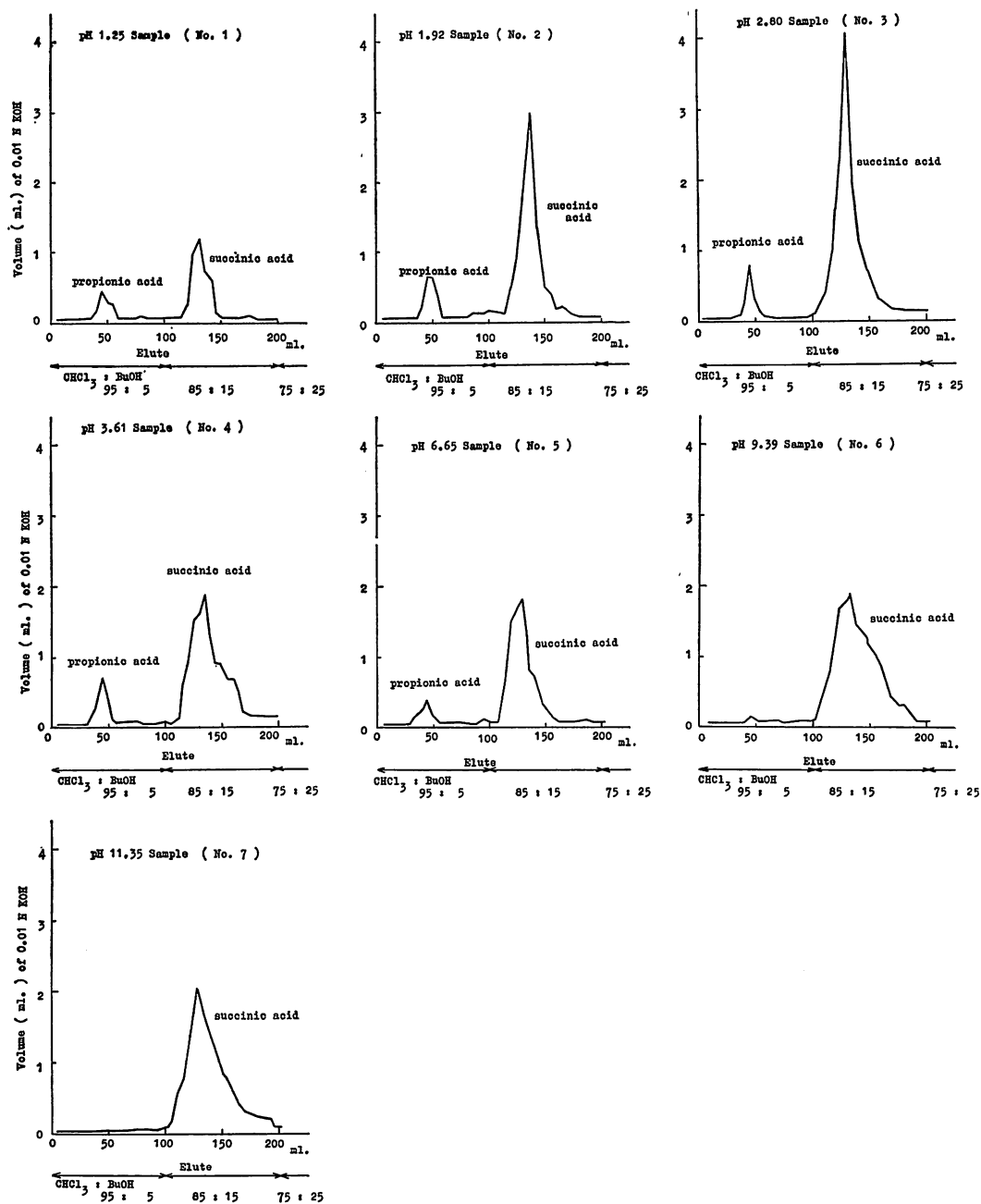


Fig. 34. Silica gel column chromatography of carboxylic acids formed from  $\gamma$ -irradiated aspartic acid solution

No. 7 試料を除き各図とも大小二つのピークが現われた。これらを標準酸の溶出位置を比較すると、小ピークは propionic acid の、大ピークは succinic acid の溶出位置に合致する。しかし両ピークは、それぞれ n-butyric acid, glutaric acid の溶出位置に近いので、この結果のみではカルボン酸の種類を断定し得ないので、以下に述べる定性試験を併用し同定を行った。

#### 2.2.2.2. ペーパークロマトグラフィによるカルボン酸の確認

シリカゲルカラムクロマトグラフィによって得た二つのピークは、初めに小ピークが一塩基酸区分、次の大ピークが二塩基酸区分に相当する。そこでこれら二つの区分を可能な限り多量に集め、ethyl ether で酸成分を抽出し、カルボン酸のペーパークロマトグラフィを試みた。原試料の aspartic acid 水溶液は pH 別に7種類あるが、試料の絶対量が少なかつたため、酸性側試料 (pH 1.25, 1.92, 2.80, および 3.61) と中性および塩基性試料 pH 6.65, 9.39, および 11.35) をそれぞれ合一して実験を行なった。

ガンマ線照射により、水溶液中の aspartic acid から生じた一塩基酸をペーパークロマトグラフィによって分析した結果は Table 25 である。対照標準酸について得た Rf と比較した結果、酸性側試料、中性および塩基性試料ともに propionic acid に相当する Rf 値を持つスポットを得た。二塩基酸を対象としたペーパークロマトグラフィでは、対照標準酸の Rf 値と比較した結果、酸性側試料、中性および塩基性試料とも succinic acid を成分としていることが判明した。結果は Table 26 に示す通りである。

Table 25. Paper partition chromatography of mono-carboxylic acids\*

	Samples	Rf value	
		Solvent A	Solvent B
Reference acids	1	0.22	0.71
	2	0.22	0.70
	acetic	0.10	0.60
	propionic	0.22	0.70
	n-butyric	0.38	0.73
n-valeric	0.50	0.77	

\*: in form of ammonium salts

Solvent A: n-BuOH saturated with 1.5 N NH<sub>4</sub>OH

Solvent B: EtOH: 1.5 N NH<sub>4</sub>OH=4: 1 (V/V)

Indicator: bromo-phenol blue

Table 26. Paper partition chromatography of di-carboxylic acids

	Samples	Rf value	
		Solvent A	Solvent B
Reference acids	1	0.71	0.72
	2	0.71	0.73
	malonic	0.63	0.63
	succinic	0.71	0.71
	glutaric	0.78	0.80
adipic	0.83	0.87	

Solvent A: n-BuOH: 85% formic acid: water =4: 1: 1 (V/V/V)

Solvent B: phenol: 85% formic acid =3: 1 (W/V)

Indicator: bromo-cresol green

Sample 1 is acidic, and sample 2 is neutral or basic.

#### 2.2.2.3. p-ブROMフェナシルエステルの融点

シリカゲルカラムおよびペーパークロマトグラフィの結果から、aspartic acid 水溶液を脱気条件下でガンマ線照射して得られるカルボン酸は、propionic acid および succinic acid であることを知った。さらにこの二つの物質を確認するために、それぞれのカルボン酸のp-ブROMフェナシルエステルを作り<sup>86,87)</sup> 融点の測定を行なった。

照射試料のカルボン酸区分とカルボン酸標準品より製したエステルの融点の比較を行なっ



Table 27. Melting point of p-bromophenacyl esters

		Melting point (°C)
Samples	mono-carboxylic acid fraction	—
	di-carboxylic acid fraction	205~209
Reference acids	propionic	59.0~61.0
	n-butyric	61.5~63.0
	n-valeric	71.5~73.0
	glutaric	136~137
	succinic	209~212

た結果は Table 27 である。

一塩基酸区分より製したエステルは収量が少なく測定を行なうことが不可能であったが、二塩基酸区分からは 205°~209°C の融点を有するエステルを得ることができた。この値は succinic acid 標準品の 209°~212°C よりやや低いが、その原因は、収量が少ないため、過剰の試薬 p-ブロムフェナシルブロマイドを完全に除去できなかったためと考えられる。

p-ブロムフェナシルエステルの融点測定は、完全に満足すべき結果ではないが、二塩基酸区分の成分は大抵 succinic acid であることを示している。

2.2.2.4. ガスクロマトグラフィによるカルボン酸の確認

シリカゲルカラムクロマトグラフィによって得た一塩基酸区分ならびに二塩基酸区分のそれぞれを、ペーパークロマトグラフィ用試料の場合と同様に処理し、カルボン酸の ethyl ether 溶液を調製して、ガスクロマトグラフィに供した。一塩基酸区分の試料には対照カルボン酸として acetic acid, propionic acid, n-butyric acid と n-valeric acid を用い、二塩基酸区分には同じく、oxalic acid, malonic acid, succinic acid, glutaric acid, adipic acid を用いた。なお二塩基酸区分試料はブチルエステルの形に変え chloroform 溶液として分析した。

照射試料並びに対照の標準カルボン酸の分析結果については、一塩基酸成分は Fig. 35 に、

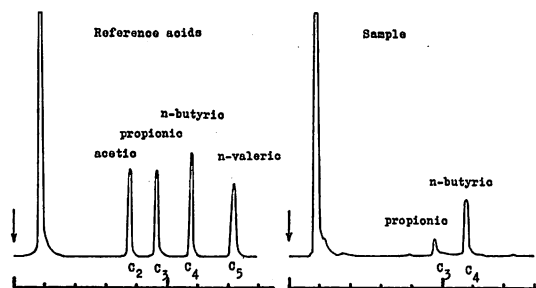


Fig. 35. GLC analysis of monocarboxylic acids fraction

- Sample : monocarboxylic acids fraction
- Carrier gas : N<sub>2</sub>, 60ml./min.
- Column packing : diethleneglycol succinate + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 5%
- Column : stainless steel, 2 mm.φ, 2 m.
- Oven temperature : 100°C~, programed rate 6°C./min.
- Detector : FID

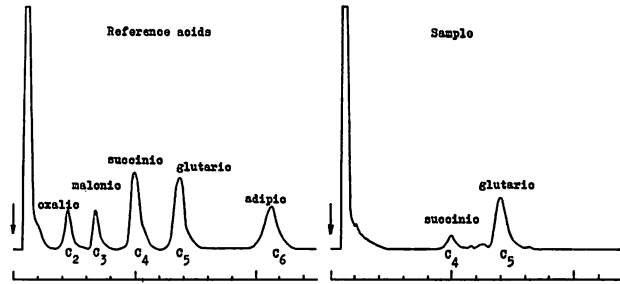


Fig. 36. GLC analysis of dicarboxylic acids fraction

Sample : butyl ester of dicarboxylic acids fraction  
 Carrier gas : N<sub>2</sub>, 70 ml./min.  
 Column packing : Neopentylglycol sebacate  
 Column : stainless steel, 2 mm.φ, 2 m.  
 Oven temperature : 210°C.  
 Detector : FID

二塩基酸成分は Fig. 36 に示した。

図示の如く照射試料中のカルボン酸は一塩基酸区分は propionic acid. 二塩基酸区分は succinic acid であることが明らかである。

#### 2.2.2.5. 考 察

以上記載した、シリカゲルカラムクロマトグラフィ、ペーパークロマトグラフィ、p-ブロムフェナシルエステルの融点測定およびガスクロマトグラフィの結果、aspartic acid 水溶液を脱気条件下で照射して得られるカルボン酸は succinic acid 並びに propionic acid であることが判明した。

この反応は脱アミノ反応を主体とした経路である。当然カルボン酸の生成に伴って ammonia が生産されているはずである。生成した propionic acid, succinic acid, と ammonia の収量を試料液の pH 別に掲げたものが Table 28 である。なおこの表には参考までに揮発性塩基の収量を併記した。

Table 28 の結果により各生成物質の G 値を算出し、pH別に示したものが Fig. 37 である。

Table 28. Carboxylic acids, volatile bases, and ammonia formed from  $\gamma$ -irradiated aspartic acid solution

(Dose rate:  $9.0 \times 10^5$  r./hr., Total dosage: 2.7 Mrad)

pH value of sample solution	Yields ( $\mu$ mole per 100 $\mu$ mole of original aspartic acid)			
	propionic acid	succinic acid	volatile bases	ammonia
1.25	1.51	4.00	10.55	6.42
1.92	2.62	8.25	16.19	14.14
2.80	1.87	9.13	13.50	13.64
3.61	1.71	8.81	14.04	12.78
6.65	1.30	6.74	10.02	8.70
9.39	0.28	11.69	21.10	15.80
11.35	0.00	11.29	20.57	14.45

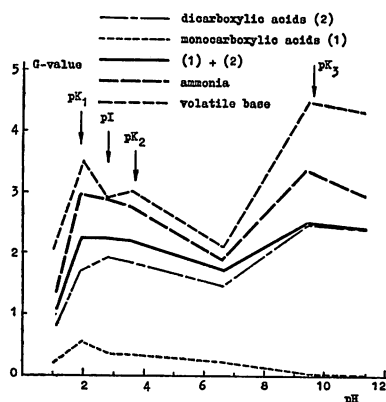


Fig. 37. G-values of carboxylic acids, volatile base, and ammonia formed from  $\gamma$ -irradiated aspartic acid solution

ガンマ線照射を受けた aspartic acid 水溶液中に生ずるカルボン酸と ammonia の G 値を比較すると次のことが言える。

propionic acid は生成量が少なく G 値の最高は pH 1.92 試料において測定した 0.57 で、pH 値が高いほど propionic acid 生成は少ない。

succinic acid は酸性側試料液では pH 2.80 での G 値 1.92 が極大であり、pH 2~4 においては比較的生成量が多い。中性付近では G 値は低く pH 6.65 では 1.45 に止まった。塩基性側試料液では pH 9.39 のものが最高の生成量を示し、G 値は 2.52 に達しているが、それより高い pH 値では、succinic acid 生成は徐々に減少する傾向がうかがわれる。

ammonia 生成量は propionic acid と succinic acid 生成量の和と比例関係にあり、aspartic acid の脱アミノの状態を表わしている。すなわち pH 1.92 で  $G=3.5$ 、pH 6.65 で  $G=2.2$ 、pH 9.39 で  $G=4.5$  と、いわゆる bimodal curve を描いていることは、溶液の pH 値とアミノ酸の脱アミノ反応に通常見られる現象であり<sup>19,103)</sup> 1.2.2. における水溶液中の glutamic acid のカルボン酸への転移に関する章においても記載したところである。

aspartic acid の電離状態を見ると<sup>100)</sup>、 $pK_1=1.94$ 、 $pI=2.80$ 、 $pK_2=3.70$ 、 $pK_3=9.62$  であり、カルボン酸および ammonia 生成量が aspartic acid の電離による基の結合エネルギーの変化と深い関係にあることを物語っている。この関係も 1.2.2. で述べた glutamic acid 水溶液の場合と同じ原理に基づくものと考えられる。

また本章の結果を glutamic acid 水溶液における脱アミノと比較する場合、各 pH にわたりほぼ同程度の G 値を与える。

水溶液中の aspartic acid が succinic acid または propionic acid に変化する経路は、アミノ酸の脱アミノ反応および脱炭酸反応によって説明することができる。

aspartic acid は脱アミノ反応を受けて succinic acid に変化し、その一部が脱炭酸反応により propionic acid となるのである。またこの経路以外に aspartic acid が  $\alpha$ -脱炭酸して  $\beta$ -alanine に変化し、さらに脱アミノ反応を経て propionic acid を生ずる場合も考えられる。酸性試料液では微量ではあるが aspartic acid の  $\beta$ -脱炭酸による alanine を経由する反応も可能である。

これらの生成過程は 2.1.2. の Fig. 31 に示した経路と同様である。

#### 2.2.2.6. 要 約

1. 水溶液中の aspartic acid を脱気条件下で 2.7 Mrad のガンマ線を照射し、脱アミノおよび脱炭酸反応によって生成するカルボン酸と ammonia 量を測定し、その変化機構を考察した。

2. aspartic acid から生成したカルボン酸の主要成分は succinic acid であり、脱アミノ反応を経て生じたものである。少量検出された propionic acid は脱アミノおよび脱炭酸反応を経て生成したものである。

3. succinic acid の生成量は溶液の pH と密接な関係があり、aspartic acid の  $pK_1$ ,  $pI$ ,  $pK_2$  に相当する pH で生成量が多く、pH 2.80 で極大を示し、G 値は 1.92 であった。また  $pK_3$  に相当する pH 9.62 付近で生成量は最大に達し、pH 9.39 での測定は  $G=2.52$  であった。しかし  $pK_2$  と  $pK_3$  の中間では succinic acid 生成は少なく pH 6.65 では  $G=1.45$  に止まった。

4. propionic acid の生成は pH 1.92 における  $G=0.57$  が最高で高い pH 値の試料ほど生成量は少ない傾向にあった。

5. ammonia 生成量は pH 1.92 で  $G=3.5$ , pH 6.65 で  $G=2.2$ , pH 9.39 で  $G=4.5$  であり、この pH 域外の強酸性および強塩基性条件では生成量は低い。この値は succinic acid, propionic acid 生成量の和と広い pH 域にわたって比例関係にあり、aspartic acid の脱アミノ反応を明らかに示していた。

6. succinic acid または ammonia 生成量と、試料溶液の pH 値に見られる。いわゆる bimodal curve は両性電解質であるアミノ酸に広く見られる現象であり、aspartic acid もその例外ではなかった。

## 討 論

glutamic acid と aspartic acid はともに monoamino-dicarboxylic acid に属し、炭素鎖の長さがわずか 1 個異なるのみの化合物で、構造と化学的性質は極めて類似している。

この討論は試料の状態別、すなわち結晶状および水溶液中の glutamic acid と aspartic acid のガンマ線分解生成物を測定した結果を基に、glutamic acid と aspartic acid の共通点、相違点を挙げ、分解機構を論ずるものである。

### 1. glutamic acid および aspartic acid 結晶のガンマ線分解

Fig. 38 は glutamic acid および aspartic acid 結晶が、ガンマ線照射を受けて、他の物質に変化する過程をまとめたものである。glutamic acid, aspartic acid とともに、脱アミノ反応に続いて脱炭酸反応を受け、低級脂肪酸に至る経路はよく類似している。

しかし、直接脱炭酸することによって他種のアミノ酸となる変化は両アミノ酸の間にはかなりの差が見られる。glutamic acid の場合は、主として  $\omega$ -脱炭酸によって  $\alpha$ -amino-n-butyric acid を生じ、10Mrad 以上の高線量照射によってのみ  $\alpha$ -amino-n-butyric acid の一部が  $\gamma$ -amino-butyric acid に異性化する。aspartic acid の場合も  $\omega$ -脱炭酸による alanine 生成が主反応であるが、 $\alpha$ -脱炭酸による  $\beta$ -alanine 生成量も無視することはできない。これらの相違は、glutamic acid と aspartic acid の分子の大きさに原因するカルボキシル基、

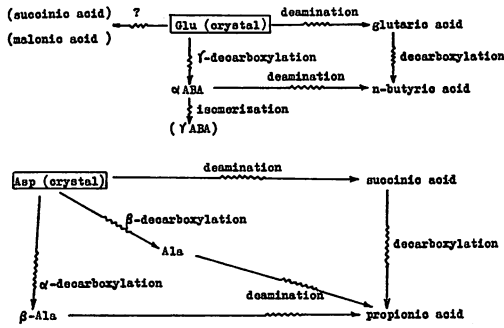


Fig. 38. Radiation-chemical changes from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid and aspartic acid crystals to other substances  
(substance): trace substances.

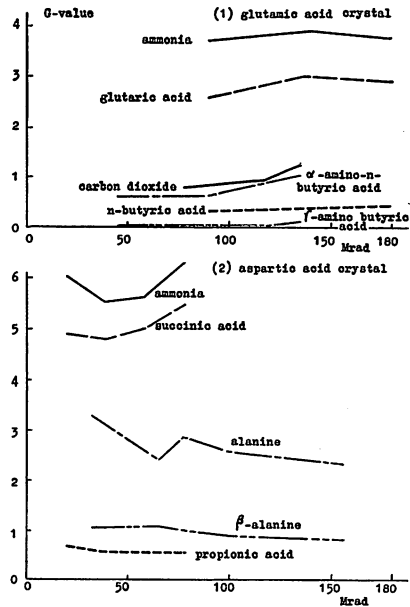


Fig. 39. G-values of various compounds formed from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid (1), and aspartic acid (2) crystals

アミノ基の結合の強さの差で説明することができる。炭素数が glutamic acid よりさらに1個多い  $\alpha$ -amino-adipic acid について実験を行えば炭素鎖の相違による  $\alpha$ -脱炭酸と  $\omega$ -脱炭酸の傾向，すなわち炭素鎖が長いほど  $\alpha$ -脱炭酸が起こり難いことが明確になると考える。

以上は主として分解生成過程を定性的にとり上げたに過ぎないので，生成物の量的関係を G 値によって説明する。Fig. 39 は照射線量と生成物の G 値との関連を示したものである。

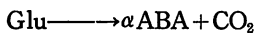
### 1.1. 主として脱炭酸反応による他種アミノ酸の生成

glutamic acid および aspartic acid 結晶からガンマ線分解によって生ずる他種アミノ酸生成物の G 値と照射線量との関係は Fig. 39 に示されている。

glutamic acid からの主要分解生成物は， $\alpha$ -amino-n-butyrlic acid であり， $G(\alpha\text{-ABA})$  は0.6~1.0である。 $\gamma$ -amino-butyrlic acid の生成も見られるがそれは大線量照射においてだけ検出され， $G(\gamma\text{-ABA})$  も 0.1 以下である。

一方 aspartic acid からの主要分解生成物は alanine で， $G(\text{Ala})=2.3\sim 3.3$ ，次いで多い  $\beta$ -alanine は  $G(\beta\text{-Ala})=0.8\sim 1.1$  である。

脱炭酸反応に伴う二酸化炭素生成は glutamic acid のみについて測定を行なったが  $G(\text{CO}_2)=0.7\sim 1.2$  で  $G(\alpha\text{-ABA})$  と並行しており，



に示すように glutamic acid の  $\omega$ -脱炭酸の結果を示している。

glutamic acid と aspartic acid のガンマ線分解を比較してみると，主要生成物である  $\alpha$ -

amino-n-butyric acid と alanine はいずれも被照射試料の  $\omega$ -脱炭酸の結果であり共通している。しかし反応量は aspartic acid 分解の方が強く、glutamic acid 分解の3~4倍行なわれている。

$\alpha$ -脱炭酸量がさらに大きいことは  $\gamma$ -amino-butyric acid と  $\beta$ -alanine 生成量を比較すれば明白である。

### 1.2. 主として脱アミノ反応による他種カルボン酸の生成

Fig. 39 のように glutamic acid からの主要生成物 glutaric acid の生成は  $G(\text{glutaric acid}) = 2.6 \sim 3.0$  である。

glutaric acid に次いで n-butyric acid の生成があり、 $G(\text{n-butyric acid}) = 0.3 \sim 0.4$  である。これらのカルボン酸は glutamic acid の脱アミノの結果生じたものであり、その際生成した ammonia 量は  $G(\text{ammonia}) = 3.7 \sim 3.9$  であった。

$G(\text{glutaric acid}) + G(\text{n-butyric acid})$  が  $G(\text{ammonia})$  の79~89%に過ぎないのは、ガンマ線照射によってカルボン酸がさらに分解を受ける二次的变化に原因するのであろう。

aspartic acid においては主要生成物として succinic acid を挙げることができる。その  $G(\text{succinic acid})$  は4.8~5.5である。これに次ぐ生成量の propionic acid は  $G(\text{propionic acid})$  0.6~0.7である。aspartic acid 試料の場合脱アミノ反応による  $G(\text{ammonia})$  は5.5~6.5であり、 $G(\text{succinic acid}) + G(\text{propionic acid})$  はその95~98%で大差なく glutamic acid 試料の場合に比較して aspartic acid から生ずるカルボン酸の二次的分解は極めて少ないと言える。

Fig. 39の結果は、脱炭酸反応、脱アミノ反応ともに glutamic acid より aspartic acid 試料の方が強く起こることを示している。

## 2. glutamic acid および aspartic acid 水溶液のガンマ線分解

Fig. 40 は glutamic acid と aspartic acid が脱気条件下の水溶液中でガンマ線分解する過程を示すものである。

glutamic acid と aspartic acid の分解経路で共通しているところは、結晶試料の場合と同様に、脱アミノ反応に続いて脱炭酸反応が起こり低級脂肪酸を生ずる経路である。glutamic acid と aspartic acid が脱炭酸されて他種アミノ酸に変化する場合、主として  $\alpha$ -脱炭酸が行なわれる点は共通しているが、aspartic acid では  $\omega$ -脱炭酸もかなりなされている。さらに最も特徴ある変化は glutamic acid から aspartic acid を生ずることである。この現象については glutamic acid 水溶液について1.2.1. で詳述したが、aspartic acid 試料の分解においてはこのような現象は見られない。glutamic acid から aspartic acid に変化する経路は FRIEDBERG ら<sup>99)</sup>の仮説に依っているが、彼等の実験は最適生成条件の pH 4 ではなく pH 8 で行なわれている点で本研究と異なるが、機構としては肯定できる。ただし、alanine,  $\beta$ -alanine, formic acid は中間産物として未だ検出されず、今後の研究にまたなければならぬ。

このように glutamic acid と aspartic acid の分解経路に相違のある理由は、例えば glutamic acid は水溶液中で分子内脱水縮合によって環状化合物ピロリドン酸を作り得るが<sup>114)</sup>、aspartic acid ではそのような化合物を作らないこと等、炭素鎖の長さの差による性質の相

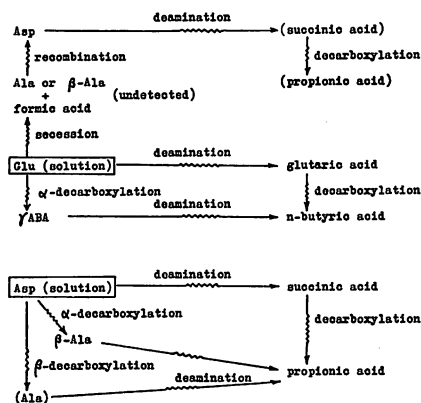


Fig. 40. Radiation-chemical changes from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid and aspartic acid solution to other substances (substance): trace substances

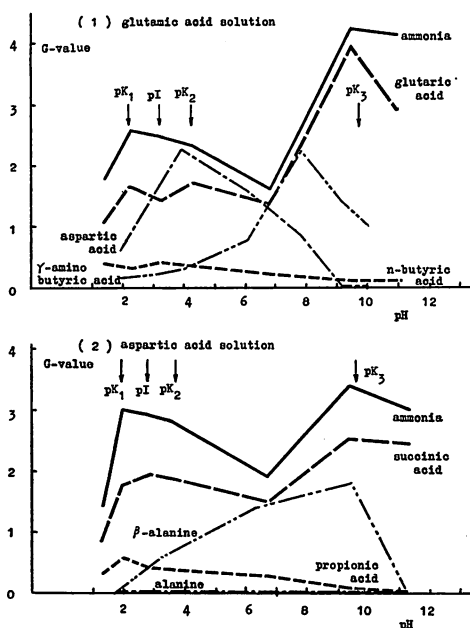


Fig. 41. G-values of various compounds formed from  $\gamma$ -irradiated glutamic acid (1), and aspartic acid (2) solutions.

違を考慮しなければならない。

### 2.1. 主として脱炭酸反応による他種アミノ酸の生成

水溶液中の glutamic acid は脱炭酸反応によって他種アミノ酸に変化するが、水溶液の pH によって生成するアミノ酸の種類が異っている。酸性溶液では aspartic acid の生成が多く、塩基性溶液では  $\alpha$ -脱炭酸による  $\gamma$ -amino-butyric acid の生成が多い。aspartic acid 生成の最高は pH 3.9 附近であり、G(Asp) は 2.3 である。 $\gamma$ -amino-butyric acid の生成至適

pH は pH 7.9 附近で  $G(\gamma\text{ABA})$  は 2.2 であった. pH 7 附近では  $G(\text{Asp})$  と  $G(\gamma\text{ABA})$  は、ほぼ等しく約 1.3 である.

Fig. 41 は glutamic acid と aspartic acid 水溶液を脱気条件下でガンマ線照射した時に生成する各種物質の G 値と水溶液 pH との関係である. 図中に電離定数  $pK_1$ ,  $pK_2$ ,  $pK_3$  と等電点の位置  $pI$  を示したが、それらの pH の位置が、各分解生成物の G 値曲線と大きな関係にあることがわかり、試料アミノ酸の電離状況が、ガンマ線分解による生成物質の種類と量に重大な影響を与えていることを示している. それらの詳細は実験結果の各章に述べた通りである.

aspartic acid 水溶液においては pH 3~10 の広い pH 域にわたり、 $\alpha$ -脱炭酸による  $\beta$ -alanine 生成が見られる. 至適生成条件は pH 9.4 附近で  $G(\beta\text{Ala})$  は 1.8 である.  $\omega$ -脱炭酸も行なわれるが極めて少なく酸性溶液中でわずかな alanine が検出されるだけである.

glutamic acid と aspartic acid 水溶液のガンマ線分解を比較すると、共通点としては pH 6~10 の中性~弱塩基性条件において  $\alpha$ -脱炭酸が行なわれることが挙げられる. しかし酸性溶液中での変化には相違点があり、aspartic acid 試料では alanine が微量検出されるに止まったが glutamic acid 試料では複雑な機構を経て多量の aspartic acid を生成している.

## 2.2. 主として脱アミノ反応による他種カルボン酸の生成

水溶液中の glutamic acid はガンマ線照射によって脱アミノし、glutaric acid を生じ、さらに脱炭酸して n-butyric acid を生ずるが、反応に及ぼす pH の影響は大きい. 特に主要生成物 glutaric acid, ammonia の生成と pH との関係は、いわゆる bimodal curve を示す. Fig. 41(1) では弱酸性条件の glutaric acid 収量曲線が乱れているが、pH 2~5 で  $G(\text{glutaric acid})=1.4\sim 1.7$ ,  $G(\text{ammonia})=2.2\sim 2.6$ , pH 9.5 附近で  $G(\text{glutaric acid})=4.0$ ,  $G(\text{ammonia})=4.2$  と二つの極大値を持ち pH 6.8 附近で  $G(\text{glutaric acid})=1.3$ ,  $G(\text{ammonia})=1.7$  と極小値を持っている. n-butyric acid は生成量が少なく、酸性溶液では  $G(\text{n-butyric acid})=0.4$  を示すが、中性~塩基性では極めて微量である.

aspartic acid の場合も glutamic acid 試料におけると同傾向の変化が起った. ammonia と succinic acid 生成量も glutamic acid における ammonia と glutaric acid 生成と同様の pH 条件で極大、極少を示す. すなわち pH 2~4 で  $G(\text{succinic acid})=1.8\sim 2.0$ ,  $G(\text{ammonia})=2.8\sim 3.0$ , pH 9.4 附近で  $G(\text{succinic acid})=2.5$ ,  $G(\text{ammonia})=3.4$  と二個所に極大値を持ち pH 6.7 附近では  $G(\text{succinic acid})=1.5$ ,  $G(\text{ammonia})=1.9$  の極小値を示している. propionic acid の生成傾向も glutamic acid 試料における n-butyric acid と同であり、酸性溶液では  $G(\text{propionic acid})=0.6$  を示したが中性~塩基性では微弱であった. 水溶液試料における各種分解生成物の生成傾向を見ると、glutamic acid 試料から生ずるものが aspartic acid 試料から生ずる物質の G 値より高い. 結晶試料においては、glutamic acid の分解に比較して、aspartic acid の分解が強く行なわれていたことは全く反対の現象である.

水溶液中のアミノ酸がガンマ線照射を受けて脱アミノする場合、pH の影響を強く受け中性附近に極小点を持つ bimodal curve を描く原因は、アミノ酸の電離状況による結合エネルギーの変化と、水中に生ずる  $e_{aq}^-$  等の活動にあること<sup>103)</sup> は、実験結果の 1.2.2. および 2.2.2. に述べたところであるが、HART<sup>104)</sup> らは、Table 29 のように、ガンマ線照射を受



Table 29. Radiolytic yields for  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays or electrons of energy  $< 1 \text{ MeV}^{104)}$

pH	G( $e_{aq}^-$ )	G(H)	G(OH)	G( $\text{H}_2\text{O}_2$ )	G( $\text{H}_2$ )	References
0 to 2	3.50	0.6	2.95	0.8	0.45	a)
1.3	2.94	0.55	2.85	0.76	0.43	b)
3 to 13	2.63	0.55	2.72	0.68	0.45	b)
4 to 9	2.8	0.6	2.8	0.75	0.45	a)
12	3.05	0.55	2.9	0.75	0.40	a)

a): AMBER, M.: "Fundamental processes in radiation chemistry", P. AUSLOCS ed., p. 651 (1968) Interscience, N. Y..

b): DRAGANIĆ, I. G., M. T. NENADOVIĆ, and Z. D. DRAGANIĆ: J. Phys. Chem., **73**, 2564 (1969).

けた水中に生ずる  $e_{aq}^-$  の収量は、強酸性、弱塩基性の中間で低くなることを報告している。また、これより強塩基性の条件下では  $e_{aq}^-$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$  は急激に力を失い脱アミノ作用も弱まるとされている<sup>103)</sup>。

### 3. 生化学的アミノ酸分解との比較

glutamic acid, aspartic acid は生化学的にも重要な化合物であり、生体内の代謝過程においても分解作用が絶えず営まれている。そこで本研究における放射線化学的分解、特に生体の条件に通ずる水溶液試料での分解と、生化学的分解とを比較し、過程の類似点、相異点を挙げてみよう。

放射線化学的にも、生化学的にも、最も重要と思われる反応として、glutamic acid, aspartic acid の脱炭酸および脱アミノ反応と、glutamic acid から aspartic acid への変化について述べることにする。glutamic acid, aspartic acid に作用する酵素として Carboxyl-lyase, ammonia-lyase および amino-transferase の3種をとり上げ、酵素の種別に自然界における存在、glutamic acid, aspartic acid への作用、類似する放射線化学的分解条件との比較を記載する。酵素の名称および分類は、国際生化学連合酵素委員会報告<sup>115)</sup> によった。

水溶液中の glutamic acid または aspartic acid に作用して脱炭酸反応を進める Carboxyl-lyase としては次のものがある。

#### (1) L-glutamate 1-Carboxy-lyase (glutamate decarboxylase)

この酵素は glutamic acid に作用し、4-amino butyrate ( $\gamma$ -amino-butyric acid) と二酸化炭素に分解する力を有している pyridoxal-phosphate protein である<sup>115)</sup>。細菌に存在する酵素が著名であり、*Cl. welchii* SR-12 の有する酵素は酢酸緩衝液中において Cell free では pH 4.5<sup>116)</sup>、intact では pH 3.5~4.5<sup>117,118)</sup> を作用至適条件としている。この酵素は、glutamic acid の定量手段としても利用されている<sup>119,120)</sup>。*E. Coli* sp. の有する酵素についても intact で至適 pH 4.0~4.5 とする報告<sup>117,118)</sup> がある。

高等植物についてもユリ花粉<sup>121)</sup>、蔬菜<sup>122)</sup>、カボチャの果汁または果皮<sup>123,124,125)</sup> に存在が認められ、カボチャの酵素は硼酸または磷酸緩衝液中にて 35°C, pH 5.5~5.8 を至適作用条件とする pyridoxal phosphate protein である<sup>126)</sup>。

#### (2) L-aspartate 1-Carboxy-lyase (aspartic acid 1-decarboxylase)

aspartic acid に作用し、 $\beta$ -alanine と二酸化炭素を生ずる酵素である。

根瘤バクテリア *Rhizobium lequinosarium*<sup>127,128),129)</sup>, *Rh. trifolii*<sup>130)</sup> に存在するものは 40°C, pH 6.0 を至適作用条件としている。

(3) L-aspartate 4-carboxy-lyase (aspartate 4-decarboxylase)

aspartic acid に作用し, alanine と二酸化炭素に分解する酵素で, L-aspartate 1-carboxy-lyase 同様 pyriboxal phosphate protein である<sup>115)</sup>. *Pseudomycobacterium* sp.<sup>131,132,133)</sup> *Cl. welchii* は至適 pH 5.5 で働く酵素を有しているが<sup>134)</sup>, 至適 pH を 4.9 とする報告もある<sup>135)</sup>.

以上3種類の Carboxy-lyase の作用至適 pH を見ると L-glutamate 1-carboxy-lyase は pH 3.5~5.8, L-aspartate 1-carboxy-lyase は pH 6.0, L-aspartate 4-carboxy-lyase は pH 4.9~5.5 といずれも弱酸性側にある。ガンマ線分解によって glutamic acid から  $\gamma$ -amino-butyric acid を生ずる場合は pH 8附近を至適条件とし, aspartic acid から  $\beta$ -alanine を生ずる至適条件は pH 9~10 で弱塩基性である。aspartic acid から alanine を生ずる反応では弱酸性でわざわざ行なわれ, これは生化学的反應の至適条件と一致するが, 他は全く相違した pH 条件である。

酵素化学反応は補酵素を必要とするように, 放射線化学反応とは非常に異った反応条件を必要とする。

ammonia-lyase としては, glutamic acid に作用する酵素の記載は見られないが, aspartic acid については次の酵素がある。

(4) L-aspartate ammonia-lyase (aspartase)

この酵素は aspartic acid に作用して嫌氣的条件下で fumaric acid と ammonia に分解する能力を持っており, *B. fluorescens*<sup>136,137)</sup>, *E. coli*<sup>138)</sup> に存在が知られている。本研究の aspartic acid のガンマ線分解では生成カルボン酸は fumaric acid ではなく, succinic acid である。aspartic acid から還元的脱アミノ基によって succinic acid を生ずる酵素としては嫌氣菌として *B. sporogenes*, *B. histolyticus*, *B. tertius* 中に, 好氣菌として *B. subtilis*, *B. phlei*, *B. alkaligenes*, *B. megatherium* 中に存在が知られ, この酵素の作用至適 pH は 7.1 とされている<sup>139)</sup>。

放射線分解によって aspartic acid から succinic acid を生ずる反應の至適 pH は, Fig. 41(2)に見られるように, pH 9 および pH 2.5 附近であり, pH 7.1 はこの二つの至適条件には含まれた不適の条件と言える。

carboxy-lyase の場合と同じように, 生化学的反應と放射線化学的反應の至適 pH は全く異なる結果となった。

aminotranferase はハトの筋肉中にその作用が認められて<sup>140)</sup>以来, SZENT-GYÖRGYI<sup>141, 142)</sup>によって積極的に研究が進められた。glutamic acid が aspartic acid に変化する過程は Fig. 42 の如く KRITZMANN<sup>143)</sup>によって, アミノ基供与体と  $\alpha$ -ケト酸との間で行なわれることが指摘された。

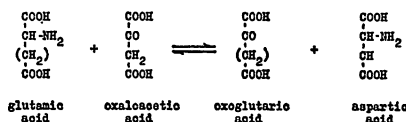


Fig. 42. Reaction of L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase<sup>115)</sup>

この酵素反応は  $\alpha$ -ケト酸の存在を必要とする点で放射線化学的分解とは根本的に過程を異にしているが、ここでは単に glutamic acid から aspartic acid を生ずる現象に焦点を合せて比較することにする。

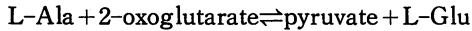
(5) L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase (glutamate-oxaloacetic transaminase)

この酵素は Fig. 42 の反応式によるもので補酵素として pyridoxal phosphate, pyridoxamine phosphate を必要とする<sup>144,145,146</sup>。ウマ心筋に存在する酵素は磷酸緩衝液中 25°C で pH 7.4<sup>47)</sup>, 38°~40°C で pH 7.2~8.0<sup>148)</sup> を至適作用条件としている。

ガンマ線照射を受けた glutamic acid が aspartic acid に変化する反応は pH 4.0 附近を至適条件としており、全く相違した反応条件にあることがわかる。

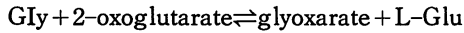
(6) L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase (glutamic-pyruvic transaminase)

この酵素は、次の反応を触媒する。



(7) glycine: 2-oxoglutarate aminotransferase

この酵素は、次の反応を触媒する。



(6) と (7) の酵素は glutamic acid を aspartic acid に変化させる反応には直接の関係はないが、FRIEDBERG らの仮説<sup>99)</sup>、すなわち glutamic acid が一度 alanine 等に分解し、さらに他のカルボン酸と再結合して aspartic acid を形成する過程の一部の経路と同一変化を成している点で興味がある。

酵素化学反応は酵素蛋白質、補酵素、賦活剤等を必要とし、放射線化学反応の場合は、ガンマ線による直接反応と、水に由来する活性遊離基の作用に影響される。

このように原理的に反応過程を異にする両者の間では、pH 等の反応条件に相違があっても当然であろうが、上記の如く、同一の基質から同じ反応生成物を生ずる変化において、酵素化学反応と放射線化学反応では全く異なる至適 pH 条件を有している。

#### 4. タンパク質食品に対する放射線照射の問題点

##### 4.1. 水産食品照射法の改良

序論で述べたように、保蔵を目的として食品を放射線照射によって完全殺菌することは、食品の品質を低下させるため困難であり、普通腐敗菌の減少 (radurization) と呼ばれる 0.15~0.3Mrad の線量が適正線量とされている。

照射による食品の品質低下を解決するために多くの試みがなされているが、水産食品についても、放射線のみで殺菌効果を期待せず、従来から使用されている保蔵法との併用で、一層の保蔵効果向上を企てた研究が行なわれている。戸沢<sup>12)</sup> は、これらの改良研究を綜説し水産食品照射法の改良として下記の3点を挙げている。

##### (1) 冷蔵法の併用

一般に照射品は、非照射品より低温保蔵による期間延長が効果的になされる。例えばタラ切身に 0.15Mrad 照射した場合、非照射品に比較した保存期間の延長は、28°C では 4~5 日であり、0.5°C では 20 日間になるという。

## (2) 包装の改良と脱気

照射食品は細菌による二次汚染を防ぐため包装が必要である。しかし、プラスチック材には通気性の面で問題になるものがあるので、例えばナイロン11の様に通気性の少ないものが望ましい。

各種水産物の照射試料の貯蔵に当り、脱気条件下におくことは保蔵期間延長に好結果を与えることが知られている。保蔵のみならず照射も脱気条件下で行なえばカルボニル化合物の生成、脂質の酸化が阻止され品質の悪化を防止できる。

## (3) 防腐剤の併用

魚介類を照射した際に、残存する細菌の生育防止に CTC(5~20ppm) 浸漬、フリルフラマイド (5ppm)、タイロシン (10ppm) などを併用すると、照射のみの試料より1~2週間の貯蔵期間延長が可能であるという。

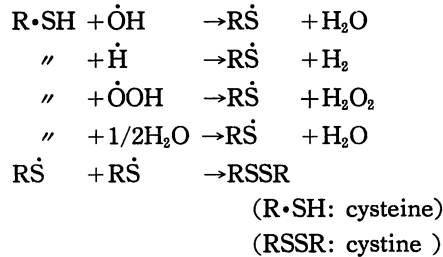
その他照射法の改良や、さらに進んで照射によって品質改善を試みようとする積極的な利用もなされているが、現段階では、まだ、基礎的研究資料が不足であり、多くの課題が残されている。

## 4.2. 含硫アミノ酸の放射線分解

本研究はタンパク質食品として重要な水産食品を照射する場合に起こる問題点を解決するため、食品を構成する個々のアミノ酸の放射線分解についての研究を試み、先ず glutamic acid と aspartic acid について検討したが、照射による食品の品質低下を問題とするならば、揮発性硫黄化合物を発生する含硫アミノ酸の分解にも重要である。

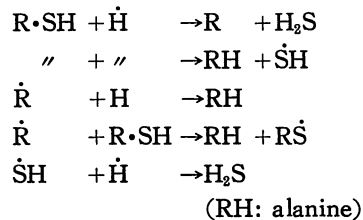
## (1) cysteine の分解

MARKAKIS ら<sup>109)</sup>は 0.1M cysteine 溶液をガンマ線照射し、その分解状況を次ぎのように推察した。



また脱気条件下で 1Mrad の照射をした場合  $G(\text{cystine})=1.3$ ,  $G(\text{H}_2\text{S})=0.8$ ,  $G(\text{NH}_3)=0.1$ ,  $G(\text{Ala})=0.8$  と計算し、脱アミノに比して硫化水素発生量の多いことを指摘している。

DALE ら<sup>149)</sup>は cysteine の分解について次ぎの式を与えている。



これらの研究における cysteine 溶液は pH 1.5 前後であるが、KOPOLDOVÁ によると cys-

teine からの硫化水素生成の至適 pH は6.5であるという<sup>95)</sup>。

(2) cystine の分解

cystine から硫化水素生成は、共存酸素の存否の影響は少ないといわれる<sup>109)</sup>。

(3) methionine の分解

methionine の放射線分解については多くの研究<sup>111,150,151,152)</sup>があるが、特徴は methyl mercaptan を生ずることである。

SHIMAZU ら<sup>21)</sup> は含硫アミノ酸の脱気条件下、1Mrad の放射線分解生成物を比較して Table 30 のようにまとめている。

Table 30.  $\gamma$ -Radiolysis of sulfur containing amino acids in oxygen free solution<sup>21)</sup>  
(Dose: 1 Mrad)

Sample	before irradiation		after irradiation	
	initial amino acid	ammonia	hydrogen sulfide	methyl mercaptan
0.01 M Met	100		0.42	6.8
0.01 M Cys	100	21	1.0	
0.1 M Cys-SH	100	0.52	3.18	

揮発性硫黄化合物は不快な臭気を放つため食品の品質低下防止にとって重大な問題であり、生成条件、生成機構、防止法について多くの基礎的実験を必要としている。

4.3. 食品照射の問題点から見た glutamic acid, aspartic acid の分解

アミノ酸の種類によって放射線分解物の種類、量も異なり、したがってタンパク質食品を照射するためには、実際の食品に対する照射実験によって改良を進める必要のあることは言うまでもない。しかし食品を構成する主要成分の個々について十分に分解機構解明の研究をつくすことは、基本的に重要なことと思われる。本研究では、タンパク質構成アミノ酸のうち、量的にも、またそのタンパク質の質的な面でも、極めて重要な素因をもつとみなされる glutamic acid および aspartic acid について、ガンマ線照射による分解機構の解明を行なったが、この結果より、食品照射の立場からみた問題点について述べてみる。

食品の品質低下、特に放射線照射の関連で問題にされることは、遊離基の生成に伴う諸変化をも含めて、異臭および異味の発生ならびに変色（褐変、褪色）の問題である。

glutamic acid および aspartic acid のガンマ線照射により生成する  $\gamma$ -amino-butyric acid, aspartic acid,  $\beta$ -alanine などの他種アミノ酸、あるいは glutaric acid および succinic acid などのカルボン酸は、それ自体、呈味および臭気上ではさほど問題とされず、むしろ好ましい素因を与える場合もあるものとも考えられるが、一方において生成する n-butyric acid, propionic acid などの低級脂肪酸、あるいは ammonia などの塩基物質は悪臭の強い成分で、これらの生成を抑止しなければ、悪臭はもとより、各成分相互間のアミノ・カルボニル反応などによる褐変が副次的に起こる可能性が大きい。

問題を glutamic acid と aspartic acid に限定して考える場合、Fig. 41 の結果からも明らかのように、食品の pH を強酸性か、強塩基性にすれば、上記諸成分の生成を最少限に抑えることも可能と考えられるが、食品加工上このような pH 条件で処理することは一般には好

ましくないので、各成分の生成量が平均的にみて少ない中性附近の照射が、この場合最も適当した照射条件と云える。しかし、前記したように、食品タンパク質中に普遍的に含まれる含硫アミノ酸の分解は、一般に中性附近で旺盛とされているので<sup>95)</sup>、実際の食品照射時には、この点をも十分に考慮しなければならない。この意味において、たとえば凍結条件下での照射は、自由水の減少によりラジカルの易動性が減殺され、物質の分解が少なくなること<sup>39)</sup>、シタビラメに 1Mrad のガンマ線照射した例では、水分20~30%附近を極大点として、その前後の水分域では SH 分解が極度に抑制されていること<sup>158)</sup>など、低線量、低温照射はもとより、同時に被照射体の水分特性とも関連して研究を進めることも必要とされる。また、このようにしても防ぎ得ない不都合な分解生成物は、さらに包装技術の研究開発とも関連し、たとえば臭気成分であれば、活性炭その他の吸着脱臭剤の併用など、食品の品質保全を改善するよう研究を続けなければならないと考える。

## 要 約

水産食品を対象にした、放射線照射保蔵は、種々の長所を持つにかかわらず、附随する問題点のため実用化が遅れている。これらの問題点をとりあげ、欠点を一つずつ解決する目的をもつて次の基礎的研究を行った。

水産食品は、栄養学的見地から見ると良質なタンパク質源として価値あるものが多い。保蔵を目的とした食品照射を発展させるためには、そのタンパク質を構成する主要アミノ酸の放射線分解機構を探究し、基礎的データを十分に分析して総合的な考察を加える必要がある。

本研究は、水産食品のタンパク質構成アミノ酸のうち、最も存在量の多い glutamic acid と aspartic acid を結晶状または水溶液試料として、脱気条件下でガンマ線照射し、分解生成物を定量するとともに分解反応の機構を解明したものである。線量は結晶試料に対しては 20~180Mrad、水溶液試料に対しては 1.8~4.0Mrad であり、glutamic acid 溶液濃度は 33.98 または 37.57mM、aspartic acid 溶液濃度は 54.37 または 60.11mM であった。

1. glutamic acid 結晶の主要分解反応は脱アミノ反応で、生成する化合物とその G 値は  $G(\text{ammonia})=3.7\sim 3.9$ 、 $G(\text{glutaric acid})=2.6\sim 3.0$  である。脱アミノ反応に次いで脱炭酸反応があり生成する化合物と G 値は  $G(\text{CO}_2)=0.7\sim 1.2$ 、 $G(\alpha\text{ABA})=0.6\sim 1.0$  である。脱アミノ反応、脱炭酸反応の複合した結果 n-butyrac acid を生ずるが  $G(\text{n-butyrac acid})=0.3\sim 0.4$  である。その他 100Mrad 以上の照射によって succinic acid、malonic acid および  $\gamma$ -amino-butyrac acid を生ずるが、 $\gamma$ -amino-butyrac acid は  $\alpha$ -amino-n-butyrac acid が異性化したものである。

2. ガンマ線照射を受けた glutamic acid 結晶を赤外分光分析し、その構造変化を追及したところ、100 Mrad 以上の照射により、アミノ基およびカルボキシル基の吸収部分に見るべき変化が現われた。また同試料を X 線回折分析し、ガンマ線照射による結晶構造変化を検索した。回折記録の上には入射角  $27^\circ\sim 28^\circ$  および  $31^\circ\sim 32^\circ$  のピークに若干の変化を認めしたが、有意の変化として挙げるには資料として充分ではなかった。

3. aspartic acid 結晶の主要分解反応は、脱アミノ反応であり、生成する化合物とその G 値は  $G(\text{ammonia})=5.5\sim 6.5$ 、 $G(\text{succinic acid})=4.8\sim 5.5$  である。脱炭酸反応の結果生ずる化合物と G 値は  $G(\text{Ala})=2.3\sim 3.3$ 、 $G(\beta\text{-Ala})=0.8\sim 1.1$  が測定された。脱アミノ、脱

炭酸両反応によって生ずる propionic acid の量は  $G(\text{propionic acid})=0.6\sim 0.7$  である。

4. 討論の部 Fig 41-(1) に表わされたように、水溶液中での glutamic acid の分解は二つの特徴をもっている。まず脱炭酸反応は弱酸性条件において  $\alpha$ -amino-n-butyric acid を全く生成せず、その代りに aspartic acid を生成すること (pH 3.9 附近で最高  $G(\text{Asp})=2.3$ )、弱塩基性条件において  $\gamma$ -amino-butyric acid を生成すること (pH 7.9 で最高、 $G(\gamma\text{ABA})=2.2$ ) である。

次に脱アミノ反応は弱酸性と弱塩基性条件で二つの極大値を、また、中性附近で極小値を与えるいわゆる bimodal curve を示す。すなわち pH 2.2, 6.8 および 9.5 における  $G(\text{ammonia})$  は 2.6, 1.7, 4.2 であり、 $G(\text{glutaric acid})$  は 1.7, 1.3, 4.0 である。

脱炭酸、脱アミノ両反応の結果による n-butyric acid 生成は量的に少なく、pH 3.2 における  $G(\text{n-butyric acid})=0.4$  を最高にし、塩基性条件下では微量に過ぎなかった。

ここに述べた aspartic acid の生成は glutamic acid の第三および第四炭素間の切断とカルボキシル基の再結合を必要とする複雑な反応機構の結果である。また脱アミノ反応による ammonia と glutaric acid 生成量が pH 別に見てほぼ並行していることがわかる。

5. 水溶液中での aspartic acid の分解は討論の部 Fig. 41-(2) に示したように脱炭酸反応に特徴がある。すなわち弱塩基性条件において  $\alpha$ -脱炭酸による  $\beta$ -alanine 生成が行なわれ、pH 9.4 の  $G(\beta\text{-Ala})=1.8$  を最高とする。酸性側条件では glutamic acid 水溶液での aspartic acid 生成に相当する現象は無く、極く微量の alanine が  $\beta$ -脱炭酸の結果生じた。

一方脱アミノ反応は glutamic acid 水溶液と同様の反応傾向を示し ammonia と succinic acid の pH 別生成は bimodal curve を示した。pH 2.8, 6.7, および 9.4 における  $G(\text{ammonia})$  は 2.9, 1.9 および 3.4 であり  $G(\text{succinic acid})$  は 2.0, 1.5, 2.5 であった。

脱炭酸、脱アミノ両反応の結果による propionic acid の生成は pH 2 における  $G(\text{propionic acid}) 0.6$  を最高としており、量的にはわずかであった。

6.  $\gamma$ -monosodium glutamate の分解と glutamic acid の分解の相違を脱炭酸反応によって比較した。結晶試料からの  $\alpha$ -amino-n-butyric acid は glutamic acid からは  $G(\alpha\text{-ABA})=0.6\sim 1.0$  であったのに対し、 $\gamma$ -monosodium glutamate からは  $G(\alpha\text{-ABA})=0.33\sim 0.40$  と約1/2に過ぎない。すなわち Na の存在による結合エネルギーの差が明確に現われていた。

水溶液試料においては試料成分は解離しているため、glutamic acid と  $\gamma$ -monosodium glutamate からの分解生成物は種類、量ともに同一の結果を得た。

7. glutamic acid と aspartic acid 結晶のガンマ線分解状況を比較すると、全般的に見て aspartic acid の分解が強く、脱アミノ反応は glutamic acid の約1.5倍、脱炭酸反応は同じく約4倍に達する。しかも、glutamic acid の脱炭酸は殆んどが  $\omega$ -脱炭酸に限られていたが、aspartic acid では  $\alpha$ -脱炭酸も  $\omega$ -脱炭酸の1/3程度行なわれている。

8. 水溶液中の glutamic acid と aspartic acid のガンマ線分解は glutamic acid の方が強く行なわれ、aspartic acid の約1.3倍である。試料液 pH 別の分解物生成状況は、脱アミノ反応は glutamic acid, aspartic acid の間に異なった傾向は見られないが、脱炭酸反応は要約 4., 5. に記した如く大きな差が存在する。中性～塩基性における  $\alpha$ -脱炭酸は同傾向であるが、微酸性においては aspartic acid からは  $\omega$ -脱炭酸による微量の alanine 生成が見られるのに対し、glutamic acid は  $C_3$ - $C_4$  間の secession と分解生成物間の recombination に

より aspartic acid の生成が見られた。

9. glutamic acid, aspartic acid を通じて結晶試料と水溶試料のガンマ線分解を比較して言えることは、水溶液試料ではアミノ酸のイオン化の外に水に由来する遊離基、水和電子の作用により分解反応が強力に行なわれること、脱炭酸反応の形式が結晶試料では  $\omega$ -脱炭酸であるのに対し、水溶液では  $\alpha$ -脱炭酸を主体としていることである。また脱アミノ反応は結晶、水溶液試料とも脱炭酸反応の約3倍の強さで行なわれた。

10. このような glutamic acid と aspartic acid は類似した同系統の物質であるが、それらのガンマ線分解の差は、炭素鎖1個の長短の影響によるものである。水溶液においては、これに加えて pH によるイオン化の状態変化と、glutamic acid は分子内で脱水縮合して環状構造をとり得る性質があり、これらが分解生成物の種類と量に大きな差を与えている。

脱アミノと脱炭酸反応の差は分子内における基の結合エネルギーの差に起因するものであり、この結果が反応生成物の量に現われている。

11. glutamic acid, aspartic acid の分解生成物の中で最も悪臭の原因となるものは ammonia と低級脂肪酸である。強酸性または強塩基性が、それらの発生を防止する条件であるが、この条件は食品としての価値を保ち難い条件である。従って悪臭を最少限に止める実施可能な照射条件は、蛋白質アミノ酸を照射する場合、含硫アミノ酸に対する条件としては最適とは言えないが、弱酸性、弱塩基性を避けた中性附近の条件で、酸素を出来るだけ絶ち、適正線量を加えることと言える。

## 謝 辞

この研究を行なうに当って、終始御懇切な御指導を賜った元北海道大学水産学部、川原鳳策教授をはじめ、多大な御配慮と、有益な助言を賜った同学部、石原義雄教授、山田実教授、秋場稔教授、斉藤恒行教授、鹿児島大学水産学部、片山輝久教授、柿本大啓教授、並びに東京大学海洋研究所、黒木敏郎教授、実験に御助力を賜った北海道大学水産学部海洋化学講座、同学理工系放射性同位元素総合研究室の教職員、鹿児島大学水産学部生物化学講座の職員学生各位に厚く感謝する。

また、研究費の一部は鹿児島大学援助会の援助金、および文部省科学研究費によった。記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) 松山 晃：食品工業，**9** (8), 35-37 (1966).
- 2) 飯塚義助：食品工業，**9** (8), 38-41 (1966).
- 3) 三浦利之：食品工業，**9** (8), 42-47 (1966).
- 4) NICKERSON, J. T. R., E. E. ROCKHART, B. E. PROCTOR, and J. J. LICCIARDELLO: Food Technol., **8**, 32-34 (1954).
- 5) NICKERSON, J. T. R., S. A. GOLDBLITH, and B. E. PROCTOR: *ibid.*, **4**, 84-88 (1950).
- 6) PROCTOR, B. E., J. T. R. NICKERSON, and S. E. GOLDBLITH: Refrigerating Engineering, **58**, 375-379 (1950).
- 7) 岡田郁之助・小坂部勇・菊池武昭・福島 清・山下久雄・佐々木正五・橋本一男・赤塚 盛・渡辺 渉：日水誌., **20**, 989-993 (1955).



- 8) 外山健三・平野敏行・山鹿 宏：日水誌., **25**, 565-568 (1959).
- 9) SLAVIN, J. W., J. T. R. NICKERSON, S. A. GOLDBLITH, L. J. RONSIVALLI, J. D. KAYLOR, and J. J. LICCIARDELLO: *Isotope Rad. Technol.*, **3**, 365-381 (1966).
- 10) SCHULTZ, H. W., and J. S. LEE: *Food Technol.*, **20**, 136-141 (1966).
- 11) SLAVIN, J. W., L. J. RONSIVALLI, and J. D. KAYLOR: *Activities Rpt. published by US Army Natick Laboratories, Natick, Mass.*, **17** (2), 120-132 (1965).
- 12) 戸沢晴巳：日水誌., **34**, 740-755 (1968).
- 13) 天野慶之：食品工業会誌., **13**, 195-203 (1966).
- 14) SLAVIN, J. W., L. J. RONSIVALLI, and T. J. CONNORS: *Proc. Intern. Symp. on Food Irrad.*, IAEA/FAO, Karlsruhe, 509-533 (1966).
- 15) SHEWAN, J. M.: *ibid.*, 489-509 (1966).
- 16) GORESLINE, H. E., M. INGRAM, P. MACÚCH, G. MOCQUOT, D. A. A. MOSSEL, C. F. NIVEN Jr., and F. S. THATCHER: *Nature*, **204**, 237-238 (1964).
- 17) 河端俊治：缶詰技術, **7**, 562-574 (1966).
- 18) MAXWELL, C. R., D. C. PETERSON, and N. E. SHARPLESS: *Radiation Res.*, **1**, 530-545 (1954).
- 19) SHARPLESS, N. E., A. E. BLAIR, and C. R. MAXWELL: *Radiation Res.*, **2**, 135-144 (1955).
- 20) SHARPLESS, N. E., A. E. BLAIR, and C. R. MAXWELL: *Radiation Res.*, **3**, 417-422 (1955).
- 21) SHIMAZU, F., U. S. KUMTA, and A. L. TAPPEL: *Radiation Res.*, **22**, 276-287 (1964).
- 22) 松浦文雄・鴻巣章二・太田良三・香取進一・田中清枝：日水誌., **20**, 941-945 (1955).
- 23) 鴻巣章二・香取進一・太田良三・江口貞也・森高次郎：日水誌., **21**, 1163-1166 (1956).
- 24) 鴻巣章二・香取進一・秋山明子・森高次郎：日水誌., **24**, 300-304 (1958).
- 25) 鴻巣章二・森高次郎：日水誌., **25**, 153-155 (1959).
- 26) 赤堀四郎・水島三一郎編：“蛋白質化学”, **2**, p. 147 (1954), 共立出版, 東京.
- 27) 土屋靖彦：“水産化学”, pp. 37-38 (1962), 恒星社厚生閣, 東京.
- 28) 土屋靖彦：“水産化学”, p. 121 (1962) 恒星社厚生閣, 東京.
- 29) SUGIMURA, K., H. TAIRA, N. HOSHINO, H. EBISAWA, and T. NAGAHARA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 520-524 (1955).
- 30) 鴻巣章二・秋山明子・森高次郎：日水誌., **23**, 561-564 (1958).
- 31) 鴻巣章二・秋山明子・森高次郎：日水誌., **23**, 565-567 (1958).
- 32) 大石圭一・田村祐子・金井英治・奥村彩子・村田喜一：日水誌., **27**, 601-605 (1961).
- 33) SHIELD, H., and W. GORDY: *J. Phys. Chem.*, **62**, 789-798 (1958).
- 34) PRYDZ, S., and H. HENRICKSEN: *Acta Chem. Scand.*, **15**, 791-802 (1962).
- 35) SCHIRMER, O., and K. SOMMER-MEYER: *Atomproxis*, **8**, 288-294 (1962).
- 36) HORSFIELD, A., J. R. MORTON, and D. H. WIFFEN: *Trans Faraday Soc.*, **57**, 1657-1661 (1961).
- 37) YOSHI, G.: *Radioisotopes*, **12**, 286-292 (1963).
- 38) BLYUMONFEL'D, L. A., and E. A. KALMANSON: *Biofizika*, **3**, 87-91 (1958).
- 39) VAN ROGGEN, A., L. VAN ROGGEN, and W. GORDY: *Bull. Am. Phys. Soc.* (2), **1**, 266-267 (1956).
- 40) GORDY, W., and H. SHIELD: *ibid.*, **1**, 267 (1956).
- 41) BLYUMONFEL'D, L. A., and A. KALMANSON: *Doklady Akad. Nauk SSSR.*, **117**, 72-74 (1958).
- 42) MACDOWELL, C. A., and W. C. LIN: *Proc. Intern. Symp. Mol. Struc. Spectry.*, Tokyo 1962 (D 201), 4p.
- 43) MORTON, J. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2325-2329 (1964).
- 44) BOX, H. C., and H. G. FREUND: *Nucleonics*, **17**, 66-76 (1959).
- 45) RAJEWSKY, B., and K. DOSE: *Z. Naturforsch.*, **12b**, 384-393 (1957).

- 46) MESHITSUKA, G., K. SHINDO, A. MINEGISHI, H. SUGURO, and Y. SHINOZAKI: *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **37**, 928-930 (1964).
- 47) GHOSH, D. K., and D. H. WIFFEN: *J. Chem. Soc.*, 1869 (1960).
- 48) WEINER, R. F., and W. S. HOSHI: *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 873 (1963).
- 49) WEINBERG, C. J., D. R. NELSON, and J. G. CARTER: *J. Chem. Phys.*, **36**, 2869-2879 (1962).
- 50) KHENOKH, M. A., and E. M. LAPINSKAYA: *Doklady Akad. Nauk. SSSR.*, **110**, 125-128 (1956).
- 51) GUZMAN-BARRON, E. S., J. AMBROSE, and P. JOHNSON: *Radiation Res.*, **2**, 145-158 (1955).
- 52) RADELL, J., and S. M. DEC: *Israel J. Chem.*, **1**, 21-24 (1963).
- 53) STEIN, G., and J. WEIS: *Nature*, **162**, 184 (1948).
- 54) KOPOLDOVÁ, J., J. KOLOUSEK, A. BABICKÝ, and J. LIEBSTER: *Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses At. Energy*, 2nd., Geneva (1958), **22**, 492-498.
- 55) DURAN, L., and A. L. TAPPEL: *Radiation Res.*, **9**, 498-501 (1958).
- 56) STEIN, G., and J. WEIS: *J. Chem. Soc.*, 3256-3263 (1949).
- 57) NOSWORTHY, J., and C. B. ALLSOPP: *J. Colloid Sci.*, **11**, 565-574 (1956).
- 58) TAEUFEL, K., and R. ZIMMERMAN: *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, **118**, 105-111 (1962).
- 59) KOPOLDOVÁ, J., J. LIEBSTER, and A. BABICKÝ: *Intern. J. Appl. Radiation Isotopes*, **13**, 617-622 (1962).
- 60) ROTBLAT, J., and J. A. SIMMONDS: *Phys. Med. Biol.*, 489-497 (1963).
- 61) AMBE, K. S., and A. L. TAPPEL: *J. Food Sci.*, **26**, 448-451 (1961).
- 62) PIFFAULT, C., P. BLANGUET, and J. DUHAMEL: *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, **89**, 155-157 (1951).
- 63) ROTHERAM, M., N. TODD, and S. L. WHITCHER: *Naturwissenschaften*, **39**, 450-451 (1952).
- 64) OKADA, S.: *Actios Chim. et Biol. Radiations*, No. 4, 46-49 (1958).
- 65) JOHNSON, G. R. A., G. SCHOLLES, and J. WEIS: *Science*, **114**, 412-413 (1951).
- 66) KOPOLDOVÁ, J., J. LIEBSTER, and A. BABICKÝ: *Jaderná Energie*, **6**, 348-349 (1960).
- 67) BARKER, S. A., P. M. GRANT, M. STACEY, and R. B. WARD: *Nature*, **183**, 376-377 (1959).
- 68) PIHL, A., T. SANNER, and T. HENRIKSEN: *Acta. Chem. Scand.*, **17**, 2124-2125 (1963).
- 69) RAJEWSKY, B., and K. DOSE: *Strahlentherapie*, **106**, 300-303 (1958).
- 70) HATANO, H.: *J. Radiation Res.*, **1**, 28-37 (1960).
- 71) BARKER, S. A., B. M. GRANT, M. STACEY, and R. B. WARD: *J. Chem. Soc.*, p. 1648 (1959).
- 72) KALYANKAR, G. D., K. V. GIRI, and C. S. VAIDYANATHAN: *Naturwissenschaften*, **40**, 440-441 (1953).
- 73) PFORDTE, K., and G. LEUSCHNER: *Strahlentherapie*, **113**, 140 (1960).
- 74) FERRARI, G., and R. CULTRERA: *Gazz. Chim. Ital.*, **90**, 1712-1720 (1960).
- 75) PAVOLINI, T., R. CULTRERA, and P. G. PIFFERI: *ibid.*, **91**, 706 (1961).
- 76) FERRARI, G., and C. PASSERA: *Photochem. Photobiol.*, **1**, 155-158 (1962).
- 77) PFORDTE, K., and G. LEUSCHNER: *Strahlentherapie*, **119**, 278 (1962).
- 78) FERRARI, G., and R. CULTRERA: *Gazz. Chim. Ital.*, **90**, 1637-1644 (1960).
- 79) SHIMAZU, F., and A. L. TAPPEL: *Radiation Res.*, **23**, 203-209 (1964).
- 80) HEILBRON ed.: "Dictionary of Organic Compounds" 4th ed., (1965), p. 1530, Eyre & Spottiswoode.
- 81) 生物化学ハンドブック編集委員会編: "生物化学ハンドブック", p. 902 (1962), 技報堂, 東京.
- 82) 日本放射性同位元素協会編: "アイソトープ便覧", pp. 567-568 (1962), 丸善, 東京.
- 83) MOORE, S., D. H. SPACKMAN, and J. A. PATTERSON: *Anal. Chem.*, **18**, 1185 (1958).
- 84) ISHERWOOD, F. A.: *Biochem J.*, **40**, 688 (1946).

- 85) BULEN, W. A., J. E. VANER, and C. BURELL: *Anal. Chem.*, **24**, 187-190 (1952).
- 86) REID, E. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, 124 (1916).
- 87) 船久保英一：“有機化合物確認法”，中巻，p. 50 (1954)，養覧堂，東京。
- 88) 生物化学ハンドブック編集委員会編：“生物化学ハンドブック”，pp. 926-927 (1962)，技報堂，東京。
- 89) 日本分析化学会：“分析化学便覧”，pp. 595-598 (1961)，丸善，東京。
- 90) AKAMATSU, S.: *J. Biochem.*, **39**, 203 (1952).
- 91) 波田野博行，桐田智子，関根隆光：“生化学領域における光電比色法”，各論2，pp. 46-51 (1958)，南光堂，東京。
- 92) 三宅泰雄・北野 康：“水質化学分析法”，pp. 59-61 (1960)，地文書館，東京。
- 93) The Infrared Data Committee of Japan: IRDC Cards (1963).
- 94) American Society for Testing Materials: Index to X-ray Power Data File (1961).
- 95) LIEBSTER, J., and J. KOPOLDOVÁ: “Advances in Radiation Biology”, **1**, 177-226 (1964), Academic Press, N. Y.
- 96) 鮫島宗雄：鹿児島大学水産学部紀要，**15**, 39-44 (1966)。
- 97) 日本分析化学会：“分析化学便覧”，p. 1349 (1961)。丸善，東京。
- 98) CRAM, D. J., and G. A. HAMMOND: “Organic Chemistry”, pp. 199-333 (1959), McGraw-Hill, N. Y.
- 99) FRIEDBERG, F., and G. A. HAYDEN: *Science*, **140** (3568), 825-826 (1963).
- 100) 赤堀四郎ら編：“タンパク質化学”，**1**, p. 271 (1969)，共立出版，東京。
- 101) CONN, E. E., and P. K. STUMPF: “Outlines of Biochemistry” 2nd ed., pp. 74-80 (1967), John Wiley & Sons, N. Y.
- 102) WEEK, B. M., and W. M. GARRISON: *Radiation Res.*, **9**, 291-304 (1958).
- 103) GARRISON, M. W.: *Radiation Res.*, Supplement **4**, 158-174 (1964).
- 104) HART, J., and M. ANBER: “The Hydrated Electron”, p. 18 (1970).
- 105) LAMKIN, M. M., and C. W. GEHRKE: *Anal. Chem.*, **37**, 383-389 (1965).
- 106) 馬場宏明：大木道則ら編“化学の理論”，p. 41 (1963) 共立出版，東京。
- 107) PAULING, L. 著・小泉正夫訳：“化学結合論”，pp. 201-239 (1961)，共立出版，東京。
- 108) LITTMAN, F. E., E. M. CARR, and A. P. BRADY: *Radiation Res.*, **7**, 107 (1957).
- 109) MARKAKIS, P., and A. L. TAPPEL: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1613 (1960).
- 110) GRANT, D. W., S. N. MANSON, and M. A. LINK: *Nature*, **192**, 352-353 (1961).
- 111) KOPOLDOVÁ, J., J. KOLOUŠEK, J. LIEBSTER, and A. BABICKÝ: *Nature*, **182**, 1074-1076 (1958).
- 112) KOPOLDOVÁ, J., J. LIEBSTER, and A. BABICKÝ: *Intern. J. Appl. Radiation Isotopes*, **11**, 139-144 (1961).
- 113) BUXTON, G. V.: “Radiation Research 1966” pp. 235-250 (1967).
- 114) WILSON, H., and R. K. CANNAN: *J. Biol. Chem.*, **119**, 309-331 (1937).
- 115) 田宮信雄訳：国際生化学連合酵素委員会報告“酵素名酵素反応記号一覧”，pp. 96-97, 125-126, 132-133 (1963)，共立出版，東京。
- 116) GALE, E. F.: *Biochem. J.*, **39**, 46 (1945).
- 117) GALE, E. F.: *ibid.*, **34**, 392 (1940).
- 118) GALE, E. F.: *ibid.*, **35**, 64 (1941).
- 119) GALE, E. F.: *Adv. Enzymol.*, **6**, 1 (1946).
- 120) KREBS, H. A.: *Biochem. J.*, **43**, 51 (1948).
- 121) OKUNUKI, K.: *Botanical Mag.*, **51**, 70 (1937).
- 122) SCHALES, O., and S. SCHALES: *Arch. Biochem.*, **10**, 455 (1946).

- 123) SCHALES, O., and S. SCHALES: *ibid.*, **11**, 155, 445 (1946).
- 124) SCHALES, O., and S. SCHALES: *ibid.*, **11**, 455 (1946).
- 125) OKUNUKI, K., and M. INAGAKI: Proc. Japan Acad., **27**, 658, (1951).
- 126) 赤堀四郎編: “酵素研究法”, **2**, 714-721 (1956), 朝倉, 東京.
- 127) VIRTANEN, A. I., and T. LAINE: Suomen Kemistilehti, **10B**, 2 (1937); Chem. Abstr., **31**, 2631 (1937).
- 128) VIRTANEN, A. I., and T. LAINE: Enzymologia, **3**, 266 (1937).
- 129) VIRTANEN, A. I., P. RINTA, and T. LAINE: Nature, **142**, 674 (1938).
- 130) DAVID, W. E., and H. C. LICHSTEIN: Proc. Sci. Extl. Biol. Med., **73**, 216 (1950).
- 131) MARDASHEV, S. R.: Mikrobiologiya, **16**, 469 (1947).
- 132) MARDASHEV, S. R., and V. N. GLADKOVA: Biokhimiya, **13**, 315 (1948); Chem. Abstr., **42**, 8859 (1948).
- 133) MARDASHEV, S. R., and R. N. ETINGOF: Biokhimiya, **13**, 402 (1948); Chem. Abstr., **43**, 1073 (1949).
- 134) MEISTER, A., H. A. SOBER, and S. V. TICE: J. Biol. Chem., **189**, 577 (1951).
- 135) MEISTER, A., H. A. SOBER, and S. V. TICE: J. Biol. Chem., **189**, 591 (1951).
- 136) COOK, R. P., and B. WOOLF: Biochem. J., **22**, 474 (1928).
- 137) WOOLF, B.: Biochem. J., **23**, 472 (1929).
- 138) QUASTEL, J. H., and B. WOOLF: Biochem. J., **20**, 545 (1926).
- 139) VIRTANEN, A. I., and J. TARNANEN: Biochem. Z., **250**, 193 (1932).
- 140) NEEDHAM, D. M.: Biochem., J., **24**, 208 (1930).
- 141) ANNAU, E., I. BANGA, A. BLUZSO, V. BRUCKNER, L. LAKI, F. B. STRAUB, and A. SZENT-GYÖRGYI: Z. Physiol. Chem., **244**, 105 (1936).
- 142) BANGA, I., and A. SZENT-GYÖRGYI: *ibid.*, **245**, 118 (1937).
- 143) KRITZMANN, M. G.: Nature, **143**, 603 (1939).
- 144) UMBREIT, W. W., D. J. O'KANE, and I. C. GUNSALUS: J. Bact., **51**, 576 (1948).
- 145) AMES, S. R., P. S. SARMA, and C. A. ELVEHJEM: J. Biol. Chem., **167**, 135 (1947).
- 146) MEISTER, A., H. A. SOBER, and E. A. PETERSON: J. Am. Chem. Soc., **74**, 2385 (1952).
- 147) KREBS, H. A.: Biochem. J., **54**, 82 (1953).
- 148) COHEN, P. P.: Biochem. J., **33**, 1478 (1939).
- 149) DALE, W. M., and J. V. DAVIS: Biochem. J., **48**, 129 (1951).
- 150) KOLUŠEK, J., J. LIEBSTER, and A. BABICKÝ: Nature, **179**, 521 (1957).
- 151) KUMTA, U. S., S. U. GURNANI, and B. M. SAHASRABUDHE: J. Sci. Ind. Res., **15C**, 45-47 (1956).
- 152) KUMTA, U. S., S. U. GURNANI, and B. M. SAHAARABUDHE: *ibid.*, **16C**, 25-29 (1957).
- 153) WEDEMEYER, G., and A. M. DOLLER: J. Food Sci., **29**, 525 (1964).