

# アミノ・カルボニル反応生成物の抗酸化性に関する研究 (第2報)

トリプトファン・グルコース反応系の抗酸化性発現に  
およぼす反応条件の影響

富 田 裕 一 郎

## Studies on Antioxidant Activity of Amino-Carbonyl Reaction Products

### Part II. Influence of Reaction-Condition of Tryptophan and Glucose on Antioxidant Activity of the Resulting Browning-Solution

Yuichiro TOMITA

(Laboratory of Animal Nutrition)

#### 緒 言

前報<sup>1)</sup>において、トリプトファン・グルコース褐変反応系の抗酸化能は他のアミノ酸・グルコース褐変反応系のそれに比べて強いことを明らかにした。一般に、アミノ・カルボニル反応における褐変現象は環境条件に大きく支配されることが知られており、これらの条件因子として *pH*、濃度、温度、酸素あるいは空気、光や放射線などが認められている。桜井<sup>2)</sup>や加藤<sup>3)</sup>はこれらの因子の中で *pH*、濃度および温度の3因子の影響が大きいことを述べている。しかるに、アミノ・カルボニル反応における抗酸化能の発現に関するこれら諸因子の影響については殆んど知られてなく、山口<sup>4)</sup>や桐ヶ谷<sup>5)</sup>の報告が見られる程度で、詳細は不明である。

そこで、本報では抗酸化能の発現と反応条件との関係を明らかにするため、先に強い抗酸化能を示すことが認められたトリプトファン・グルコース系を用いて検討を加えた。同時に抗酸化能の発現と反応生成物との関係を推察するため着色度を測定し、さらに還元能や DPPH 法による電子供与能も測定し検討した。

#### 実 験 方 法

基質、自動酸化法、POV および着色度測定法は前報<sup>1)</sup>記載の通りである。

##### 1. 褐変反応液の調製

特記しない限り  $10^{-2}M$  のトリプトファンと  $10^{-2}M$  のグルコースの混合液を緩衝液に溶解して調製し、 $120^{\circ}C$  で1時間加熱して褐変反応液を調製した。

##### 2. レダクトン量の測定

満田<sup>6)</sup>のインドフェノール・ブタノール溶液を用いるアスコルビン酸の比色定量法を適用して測定し、検量線からアスコルビン酸量として、褐変反応液 1 ml 中の mg 数で示した。

##### 3. 電子供与能

前報<sup>1)</sup>で適用した DPPH 法を用いて測定し、アスコルビン酸を標準物質として得た検量線から、アスコルビン酸量として、褐変反応液 1 ml 中の mg 数で示した。

##### 4. 酸化誘導期間

POV の経時的変化図を見ると、POV は酸化の初期段階では徐々に増加するが、その後急激に増加しほぼ直線的に上昇するので、この直線をそのまま下方に延ばし(第4図参照、点線で示した)、POV の OD<sub>500</sub> 値が 0.1 の線(第4図参照、破線で示した。これは沃度滴定法による POV 83 mEq/kg に相当する)と交差する点の示す時間をもって酸化誘導期間とし、時間で示した。

特記しない限り添加濃度は  $5 \times 10^{-5}M$  である。

#### 結果および考察

##### 1. 緩衝液の種類および濃度の影響

###### 1) 緩衝液の種類の影響

HODGE<sup>7)</sup>、永山<sup>8)</sup>、稲神<sup>9)</sup>はアミノ・カルボニル反応の進行度を示す着色度が緩衝液の種類や濃度によって変化することを認め、リン酸塩の存在によって着色度が増すことを明らかにしている。そこで先ず、トリプトファンとグルコースを *pH* 7.0, 0.05 M のヴ

Table 1. The Influence of Buffer Variety of Reaction-Solution of Amino Acids with Glucose on Antioxidant Activity of Resulting Browning-Solutions.

Buffer solutions ( <i>pH</i> 7.0, 0.05 M)	Tryptophan-glucose browning-solution <sup>a)</sup>		Lysine-glucose browning-solution <sup>a)</sup>	
	Color intensity <sup>b)</sup>	POV% <sup>c)</sup>	Color intensity <sup>b)</sup>	POV% <sup>c)</sup>
Veronal	0.052	82	0.065	92
Borate	0.531	30	0.615	33
Phosphate	0.570	18	0.635	24

Linoleic acid was dissolved in ethyl alcohol and diluted with 0.05 M phosphate buffer of *pH* 7.5. This solution, containing 20% ethyl alcohol, was used as the substrate.

Five ml. of incubation mixture consisting of 2.5 ml. of linoleic acid solution and 2.5 ml. of the adequately diluted browning-solution was shaken at 40°C for 24 hr..

Final concentration of linoleic acid was  $10^{-2}$  M. The concentration in incubation mixture, shown on the basis of initially given amino acid, was  $5 \times 10^{-4}$  M.

a) : A mixture of  $10^{-2}$  M amino acid and  $10^{-2}$  M glucose in buffer solution was heated at 120°C for 1 hr..

b) :  $OD_{430}$  of browning-solution.

c) : Peroxide value (POV) was determined as  $OD_{500}$  by the method of the previous paper (1) The values are shown as the percentage to POV of the control experiment without browning-solution.

フェロナール、硼酸およびリン酸緩衝液の3種にそれぞれ溶解し、120°Cで1時間加熱反応を行なわせ抗酸化能および着色度を比較した。同時にリジンについても同様の試験を行なった。この結果を第1表に示した。

ヴェロナール緩衝液中でアミノ酸と糖を反応させた場合は、POV%が高く抗酸化能が弱いことが明らかである。この場合は恐らく含まれるアミノ酸自体の抗酸化能が発現されているものと考えられる。また着色度も極めて低く、リジンとグルコースをヴェロナール緩衝液にかして加熱したときに着色度の低いことは稲神ら<sup>9)</sup>によっても明らかにされており、トリプトファン・グルコース系でも同様に反応は殆んど進行していないことを示している。他方、硼酸およびリン酸緩衝液を用いた場合には、トリプトファンおよびリジン何れの反応液でも抗酸化能は大となり着色度も増加することが認められた。この両緩衝液ではリン酸緩衝液の場合が抗酸化能、着色度共やや大であった。永山<sup>8)</sup>によるとリン酸は褐変反応液中でアミノ酸、糖あるいは着色物質の何れとも直接結合していないといわれ、またPIGMANら<sup>10)</sup>は褐変活性のあるヒドロキシメチルフルフルールの生成が酸触媒によって促進されることを認めている。これらのことから、リン酸は反応の触媒として作用し、反応の進行を促進しているのではないかと考えられる。また抗酸化能は反応の進行によって増加することが明らかである。

## 2) 緩衝液の濃度の影響

*pH* 8.9 のリン酸緩衝液の濃度を 0.025, 0.05,

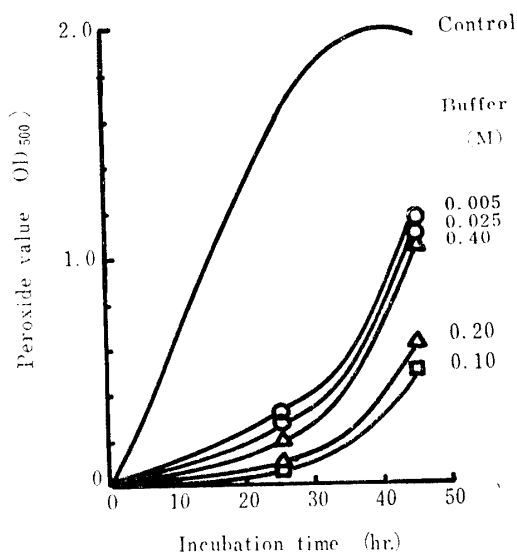


Fig. 1. The Influence of Phosphate Buffer Concentration in Reaction Solution of Tryptophan with Glucose upon Antioxidant Activity of Resulting Browning-Solution.

A mixture of  $10^{-2}$  M tryptophan and  $10^{-2}$  M glucose in phosphate buffer of *pH* 8.9, was heated at 135°C for 1 hr., where the buffer concentration was varied as indicated.

Incubation was the same as shown in the legend of Table 1, except that the concentration in incubation mixture was  $5 \times 10^{-5}$  M.

0.10, 0.20 および 0.40 M とかえて、135°C で 1 時間加熱し調製した褐変反応液をリノール酸に加え、経時

Table 2. The Influence of Phosphate-Buffer-Concentration in Reaction-Solution of Tryptophan with Glucose upon Color Intensity of Resulting Browning-Solution.

Phosphate buffer concentration (M)	0.025	0.05	0.10	0.20	0.40
Color intensity (OD <sub>430</sub> )	1.14	1.19	1.95	1.87	1.74

Preparation of browning solution was the same as shown in Fig. 1.

的に POV を測定した結果を第 1 図に示した。

この結果から、0.10 M の緩衝液を用いた反応液の POV が最も低く、抗酸化能が強いことを示しているが、0.20 M の場合と余り差はない。しかし、濃度を高くして 0.40 M の緩衝液を用いた場合はかえって抗酸化能は弱くなることが明らかとなった。

リン酸緩衝液の濃度を変えて調製した褐変反応液の着色度を第 2 表に示した。着色度は緩衝液の濃度を増すにしたがい増加するが、0.10 M 濃度の緩衝液を用いた褐変反応液の場合が最も高く、これ以上濃度の大

なるものを用いても着色度は低下した。これと同じ現象を永山<sup>8)</sup> はリジンとグルコースを硼酸溶液に溶かし加熱したときに認めている。これらの現象はアミノ酸や糖の濃度あるいはその他の条件によって反応の進行が制約されていることを示唆し、反応を行なわせる時の条件によって適した緩衝液濃度があると考えられる。また抗酸化能と着色度との間に関連のあることが予想される。

2. pH の影響

前項で、アミノ・カルボニル反応生成物の抗酸化能

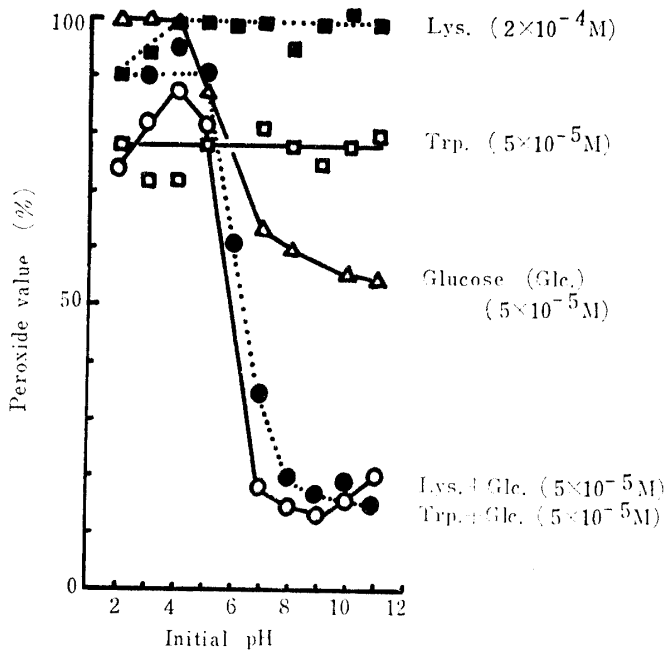


Fig. 2. The Influence of Initial pH of Reaction Solution of Tryptophan with Glucose upon Antioxidant Activity of Resulting Browning-Solution.

A mixture of  $10^{-2}$ M tryptophan and  $10^{-2}$ M glucose in the Britton-Robinson's buffer solution was heated at  $120^{\circ}\text{C}$  for 1 hr..

Incubation was the same as shown in Table 1, except that the concentration in incubation mixture was varied as indicated.

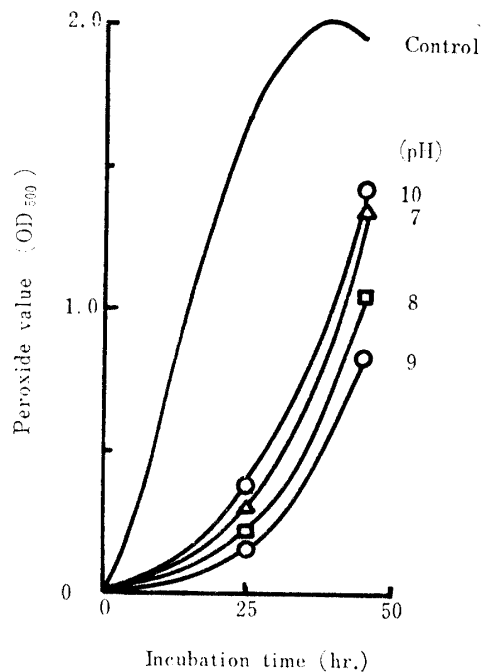


Fig. 3. The Influence of Initial pH of Reaction Solution of Tryptophan with Glucose upon Antioxidant Activity of Resulting Browning-Solution.

Preparation of browning solution and incubation mixture was the same as shown in Fig. 2, except that the concentration in incubation mixture was  $5 \times 10^{-5}$ M.

Table 3. The Influence of Initial *pH* of Reaction Solution of Amino Acid with Glucose upon Color-Intensity of Resulting Browning-Solutions.

<i>pH</i>	Glucose alone	Tryptophan-Glucose	Lysine-Glucose
2.0	—	0.017	0
3.0	—	0.012	0
4.0	—	0.017	0.010
5.0	0.010	0.086	0.071
6.0	0.116	0.218	0.385
7.0	0.430	0.592	0.883
8.0	0.650	1.210	1.167
9.0	0.820	1.450	1.361
10.0	0.880	1.160	1.384
11.0	0.890	0.960	1.322

Preparation of browning-solution was the same as shown in Fig. 2. The values are shown as OD<sub>430</sub> of browning solution.

は溶媒として用いた緩衝液の種類によって変動することを明らかにした。そこで褐変反応を行なわせる際の *pH* の影響を調べるにあたって、緩衝液の組成が余り変わらないものが望ましいので、緩衝液は Britton-Robinson 広域緩衝液—I を用いた。この緩衝液は M/25 リン酸、酢酸および硼酸の酸混合液と N/5 水酸化ナトリウム液とで *pH* を調製するものである。試験した *pH* の範囲は 2~11 の間である。比較のためリジンについてもトリプトファン同様試験した。またグルコースについても検討した。添加濃度はリジン系の場合に  $2 \times 10^{-4} \text{M}$  であったが他は  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  とした。

自動酸化開始後 24 時間後の POV % を測定し図示したのが第 2 図である。

この結果から、アミノ酸の抗酸化能は *pH* をかえて加熱しても殆んど変化しないものと考えられる。しかるにグルコースのみ、トリプトファン・グルコース系およびリジン・グルコース系では *pH* 5 以上になると抗酸化能の急激な増大が認められ、全般的に見てアルカリ性が大となるほど褐変反応液の抗酸化能も強くなる傾向が認められる。しかし、トリプトファン・グルコース系では *pH* 9 附近が最も低い POV %, すなわち最も強い抗酸化能の発現が認められる。

そこで、*pH* 7~10 の範囲におけるトリプトファン・グルコース系反応液をリノール酸液に加え、リノール酸を自動酸化させた時に見られる POV の経時的変化を測定し図示したのが第 3 図である。

この図で明らかのように *pH* 9 で加熱した反応液の抗酸化能が強いことが認められる。

桐ヶ谷ら<sup>5)</sup> はグルコースとグリシン、アルギニンおよびグアニジンとをそれぞれ *pH* をかえて調製した反応液を透析して得たメラノイジンの抗酸化能はアルカリ側で調製したものが強いことを認めているが、*pH*

の全域について検討したのではなく、また他の条件が異なり、用いたアミノ酸も異なるので完全な比較は出来ないが、一般的にはアルカリ側の反応生成物が強い抗酸化能を示すことは一致している。

次に、溶媒として用いた緩衝液の *pH* によるグルコース加熱液、トリプトファン・グルコース系およびリジン・グルコース系反応液の着色度の変化を第 3 表に示した。

着色度は *pH* 5 以下では極めて低いが、*pH* が 5 以上になると増大が認められ、グルコースのみの加熱液でも着色度の増加が明らかである。トリプトファン・グルコース反応系では *pH* 9 の時に、リジン・グルコース反応系では *pH* 10 の時に着色度の極大点が認められた。

アミノ酸と糖類間の反応において *pH* が着色度におよぼす影響を検討した報告も多く、上述した着色度の極大点は KATO<sup>11)</sup> もグリシンあるいは  $\beta$ -アラニンとキシロースとの反応で認めている。HODGE<sup>7)</sup> によるとアミノ酸と糖の反応は両者が相互に反応してあるいは分解して窒素配糖体、アマドリ転移生成物、更にアミノ酸のストレッカー分解生成物またレダクトン類などが生成し、これらがさらに反応しあって複雑な機構をもつことが知られている。また、KATO<sup>12)</sup> はアミノ・カルボニル反応は *pH* が大となるほど強く起り、アルカリ性では還元糖が単独で分解したのち、分解生成物がアミノ化合物と反応することを報告し、アミノ・カルボニル反応による抗酸化能の発現も極めて複雑な要素をもつことが推察される。

糖単独でもアルカリ側ほど抗酸化能が増し、また着色度も増すことが認められた。EULER ら<sup>13)</sup> はグルコースをアルカリ性で加熱することによって典型的なレダクトンであるトリオースレダクトンを分離している

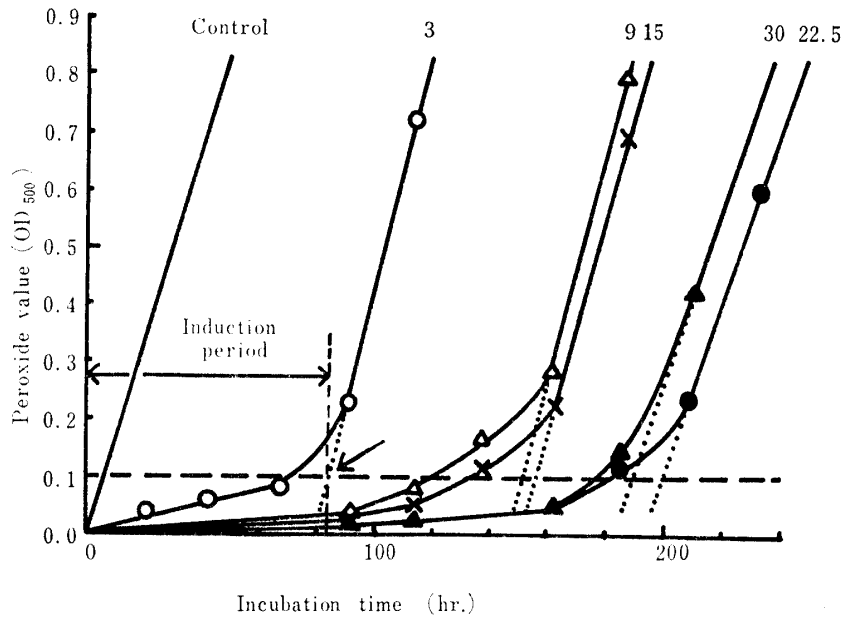


Fig. 4. Antioxidant Activity of Browning-Solutions obtained by a Reaction between Tryptophan and Glucose under Various Concentration Ratios and Determination of Induction Period.

A mixture of tryptophan and glucose in 0.1M phosphate buffer of *pH* 9.0 was heated at 120°C for 1 hr..

The concentration in incubation mixture, which was shown on the basis of initially given tryptophan, was  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ .

Figures on curves indicated the concentration of glucose ( $\times 10^{-2} \text{M}$ ) reacted with  $10^{-2} \text{M}$  tryptophan.

Induction period was determined graphically from the intersection, shown by the arrow, of the dotted and broken lines.

が、このレダクトンは強い還元性を有し、また褐変中間体として知られており、グルコース加熱液の抗酸化能はこのレダクトン類にも影響されることが推察される。

反応液の着色度はリジン・グルコース系がトリプトファン・グルコース系より大であったが、抗酸化能は後者が強く、これは生成された反応中間物質や着色物質が異なり抗酸化能に影響していることが考えられる。しかし各々のアミノ酸についてみれば、糖との反応液の着色度と抗酸化能の増加および低下の傾向がほぼ一致し、両者間に何らかの関連が存在することが考えられる。

### 3. グルコース濃度の影響

アミノ・カルボニル反応はアミノ化合物とカルボニル化合物両者の相互反応であるから、これらの濃度に影響されることが考えられる。そこで、トリプトファンと反応を行なわせるグルコースの濃度による抗酸化能の変動について検討した。また、このグルコース濃度と酸化誘導期間、電子供与能および還元性物質をレダクトン量として、これらの間の関係について検討

した。

1) 反応液の抗酸化能におよぼすグルコース濃度の影響

褐変反応液は  $10^{-2} \text{M}$  のトリプトファンとグルコースを 3×, 9×, 15×, 22.5× および 30×  $10^{-2} \text{M}$  それぞれ含むように *pH* 9.0, 0.1 M のリン酸緩衝液にかした液を 120°C で 1 時間加熱し調製した。添加濃度はトリプトファンとして  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  となるようにリノール酸液に加えて、酸化を行なわせ、POV の経時の変化を見たのが第 4 図であり、これから酸化誘導期間を求めた。

トリプトファンに加えるグルコース量が増すにしたがい、その褐変反応液の抗酸化能も増大する。本実験では、 $10^{-2} \text{M}$  のトリプトファンにグルコースを 22.5×  $10^{-2} \text{M}$  含む褐変反応液の抗酸化能が最も強く、30×  $10^{-2} \text{M}$  含む褐変反応液のそれはわずかに弱くなっている。これから抗酸化能の発現に対してアミノ酸とグルコースに至適濃度が存在することが明らかである。

2) 反応液中のグルコース濃度、酸化誘導期間、電子供与能、レダクトン量および着色度の関係

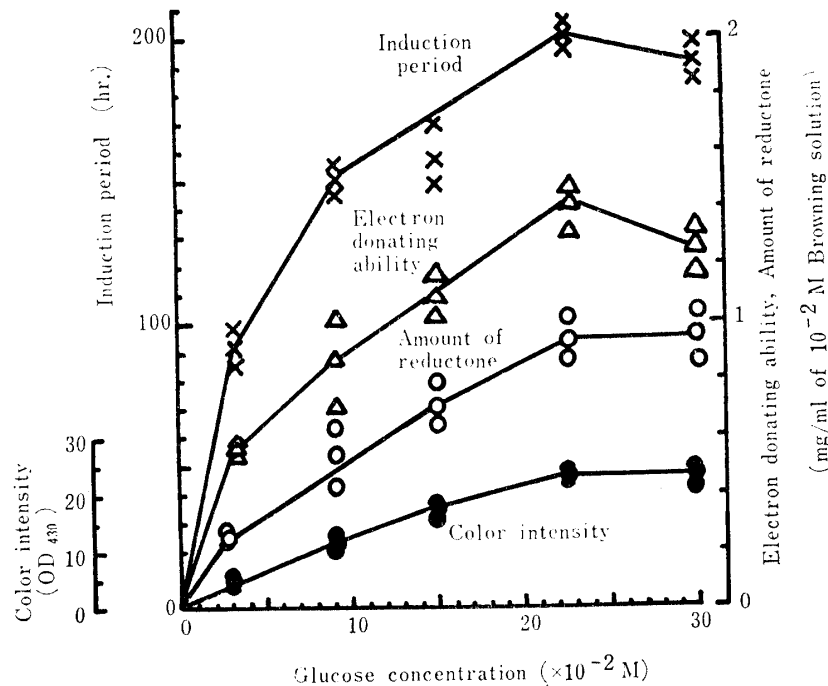


Fig. 5. Changes of Antioxidant Activity, Electron Donating Ability, Amount of Reductone and Color-Intensity of Browning-Solutions obtained by a Reaction between Tryptophan and Glucose under Various Concentration Ratios.

Preparation of browning solution and the incubation mixture was the same as shown in Fig. 4.

Antioxidant activity was shown as the induction period obtained from Fig. 4.

Electron donating ability and amount of reductone was shown as ascorbic acid equivalent determined by colorimetry of the previous paper<sup>1)</sup>.

この関係を第5図に示した。

グルコース濃度を増すにしたがって、何れの項目も増加し、グルコース濃度を  $22.5 \times 10^{-2}$  M にした褐変反応液で何れも極大点に達していることが認められ、これらの相互間に密接な関連のあることが予想される。

このレダクトン量として示した還元能の増加は、アミノ・カルボニル反応の中期段階における著しい特徴の一つであるが、EULER ら<sup>13)</sup> によると、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの還元性からエンジオール化合物、すなわちレダクトン類生成の有力な根拠となっている。したがって、この系の還元能と抗酸化性との間に密接な関連のあることが推察されたので、抗酸化性発現の一因子として、レダクトン類の存在も考慮せねばならないと考えられる。

DPPH 法による電子供与能について、本実験ではレダクトン量と同じくアスコルビン酸量として算出したが、この両者の差について比較すると明らかに両者

間に差があり、電子供与能が大きいことが認められる。

MITSUDA ら<sup>14)</sup> はグリシンとグルコースより生成した着色高分子物質であるメラノイジン中に遊離基の存在することを明らかにし、また COMMONER ら<sup>15)</sup> はチロシンの酵素的褐変により生ずるメラニン中に、O' MEARA ら<sup>16)</sup> はコーヒー中に安定な遊離基の存在を認めている。抗酸化剤の抗酸化性は遊離基によって発揮されると考えられるので、これらの遊離基も抗酸化能と関係があるものと推察される。また FUENO ら<sup>17)</sup> は各種フェノール化合物の抗酸化能は最高被占準位分子軌道エネルギーと関連することを報告しており、PULLMAN ら<sup>18)</sup> によるとインドール化合物は一般に低い最高被占準位軌道エネルギーをもつので、良好な電子供与性を示すものと考えられる。本実験で認められた電子供与能とレダクトン量との差はメラノイジンによるものか、あるいはこれとその他の物質例えばトリプトファンに由来するインドール化合物などの存在による

Table 4. Color-Intensity and Antioxidant Activity of Browning-Solution obtained by a Reaction between Tryptophan and Glucose under Various Concentration Ratios.

Tryptophan concentration (M)		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	Control
Glucose concentration (M)		3×10 <sup>-1</sup>	3×10 <sup>-2</sup>	3×10 <sup>-3</sup>	3×10 <sup>-4</sup>	
Color intensity (OD <sub>430</sub> )	Dilution fold of browning-solution	100	0.510	—	—	—
		10	—	0.465	—	—
		1	—	—	0.378	0.032
Antioxidant activity <sup>a)</sup> (Induction period, hr.)		52	97	78	19	6

A mixture of tryptophan and glucose in 0.1 M phosphate buffer of pH 9.0 was heated at 120°C for 1 hr..

The concentration in incubation mixture was 5×10<sup>-3</sup> M.

a) : Determined in the same way as shown in Fig. 4.

ものか不明であるが、レダクトン類以外にも電子供与性を示す物質の存在を示唆するものと考えられる。

#### 4. 反応系中のトリプトファンおよびグルコース濃度の影響

前項でトリプトファンと反応させるグルコースの濃度を増すと抗酸化能も極大点に達することが認められた。

そこで本項では、トリプトファンを 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> および 10<sup>-4</sup> M 含むように pH 9.0, 0.1 M リン酸緩衝液にとかし、これらにモル比でトリプトファン 1 に対し 3 のグルコースを含むように加え、120°C で 1 時間加熱し褐変反応液を調製し、添加濃度が 5×10<sup>-5</sup> M となるように基質に加え、酸化誘導期間および着色度を比較した。

この結果を第 4 表に示したが、トリプトファンを 10<sup>-2</sup> M 含む褐変反応液が最も強い抗酸化能を示し、次いで 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-1</sup> M そして 10<sup>-4</sup> M の反応液の順である。

着色度はトリプトファンを 10<sup>-1</sup> M 含む、および 10<sup>-2</sup> M 含む褐変反応液を稀釈して 10<sup>-3</sup> M の反応液に相当する濃度として測定したが、10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> および 10<sup>-3</sup> M の褐変反応液 3 者を比較した時、明らかに濃度が稀薄になるほど着色度が低くなることが認められる。

THOMPSON ら<sup>19)</sup> によると 0.5 M のキシロースと 1 M のグリシンの褐変反応液の着色度は、これらの濃度をそれぞれ 1/2 にした時の約 6 倍であると報告しており、本実験ではトリプトファンとグルコースの濃度が 10 倍になると着色度は約 11 倍増加している。

10<sup>-1</sup> M のトリプトファンを含む褐変反応液では着色度は高いにもかかわらず抗酸化能は 10<sup>-2</sup> M および

10<sup>-3</sup> M のトリプトファンを含む褐変反応液に比べ弱い。これは強い抗酸化能を発現するのに反応条件によってアミノ酸や糖に至適濃度が存在することを示し、トリプトファンとグルコースとの褐変反応液の抗酸化能が着色物質によっても反応条件によってその構造に差のあること、あるいは抗酸化性発現に関与する反応生成物が着色物質以外にも存在する可能性のあることを示すものと考えられる。

この結果から、トリプトファン濃度を 10<sup>-2</sup> M として褐変反応液を調製することにした。

#### 5. 反応時間の影響

アミノ・カルボニル反応の進行は反応時間によっても影響されるので、加熱反応時間を 120°C で 1, 2.5 および 5 時間と変えて検討した。

着色度と抗酸化能すなわち酸化誘導期間との関係を第 6 図に示した。

着色度および酸化誘導期間とも加熱反応時間が長くなるに従い増加、増大することが認められ、着色度と酸化誘導期間との間に直線関係のあることが明らかとなった。また、酸化誘導期間の長さは 5×10<sup>-5</sup> M 添加した時は 2×10<sup>-5</sup> M 添加した時に比べて約 2 倍の長さを示した。

この結果から、着色物質が抗酸化性に関与することを示していることは明らかであり、桐ヶ谷ら<sup>5)</sup> が報告しているように非誘析性の着色高分子物質メラノイジンが抗酸化性発現の一因子であることを示しているものと考えられる。

#### 6. 反応温度の影響

アミノ・カルボニル反応は化学反応であるから、温度の影響を著しく受ける。そこで、加熱反応温度を

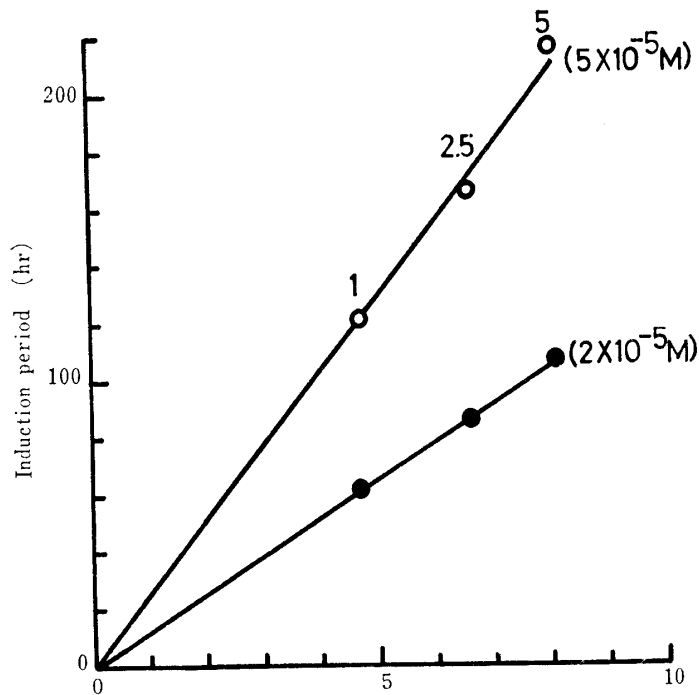


Fig. 6. Relationship between Color-Intensity and Antioxidant Activity of the Browning-Solution.

A mixture of  $10^{-2}$ M tryptophan and  $3 \times 10^{-2}$ M glucose in 0.1 M phosphate buffer of pH 9.0 was heated at  $120^{\circ}\text{C}$  for 1.0, 2.5, and 5 hr.. Figures on curves indicate the reaction time (hr.).

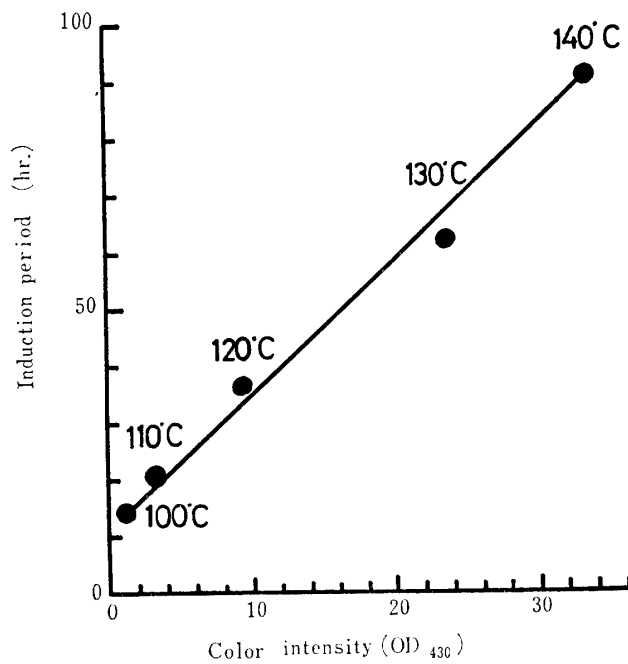


Fig. 7. Relationship between Color-Intensity and Antioxidant Activity of Browning Solution.

A mixture of  $10^{-2}$ M tryptophan and  $10^{-2}$ M glucose in 0.05M phosphate buffer of pH 7.5 was heated at  $100^{\circ}$ ,  $110^{\circ}$ ,  $120^{\circ}$ ,  $130^{\circ}$  or  $140^{\circ}\text{C}$  for 1 hr.. The concentration in incubation mixture was  $2 \times 10^{-5}$ M.



100°, 110°, 120°, 130° および 140°C とかえて1時間加熱して, その抗酸化能および着色度について検討した。

その結果を第7図に示した。

加熱反応温度が高くなるに従い, 抗酸化能も着色度も増加する。抗酸化能, すなわち酸化誘導期間と着色度との間には直線関係が認められ, 前項の加熱時間の影響を検討した時と同様に着色物質が抗酸化能に関与する一因子であることを示すものと考えられる。

加藤ら<sup>3)</sup>はアミノ・カルボニル反応の着色度は, 100°C 以下の温度では, 10°C の温度差で褐変速度は3~5倍程度差があると述べている。本実験では10°C の温度差で褐変速度は1~3倍程度の差がある。また抗酸化能の増加速度も10°C の温度差で1~3倍程度の差が認められたが, 高温になるほどその倍率は小さくなり, アミノ酸や糖の濃度と関連があり, 極大点に近づくものと考えられる。

以上全体を通じて考察するならば, 一般にリン酸塩の存在, pHが高いほど, 温度が高く加熱反応時間が長いほど強い抗酸化能が発現するといえる。しかし, これらの至適条件は緩衝液, トリプトファンあるいはグルコース濃度によって変動し, またこれらの至適濃度は他の条件によって変化する。従って, 条件を変えた時には最も強い抗酸化性の発現は上述の各項目を考慮して, 着色度の強い条件を適用すれば得られる。これは, アミノ酸や糖の種類が一定すれば抗酸化性と着色度とは相互に関係があるからである。

さらに, 抗酸化性の発現は, この着色度の他にインドフェノール法による還元能およびDPPH法による電子供与能との間にも密接な関連性のあることを見出した。従って, 抗酸化性の発現には着色物質の他にレダクトンやその他の低分子物質も関与している可能性があり, これらの低分子物質も考慮せねばならないことが推察される。

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

## 要 約

トリプトファン・グルコース反応系の抗酸化能発現に影響する諸条件について検討した。

1. 抗酸化能は反応条件によって大きく支配されることが明らかとなった。しかも, 抗酸化能は検討した全ての因子によって変化することが認められ, 反応の進行度を示す着色度と平行することが明らかとなった。

2. 一般にアミノ・カルボニル反応による抗酸化性の発現は, アルカリ性側で, 加熱反応温度が高い程, 加熱時間の長い程大きい。しかし, 反応するアミノ酸や糖の濃度によって極限のあることが明らかとなった。

## 参 考 文 献

- 1) 富田裕一郎: 鹿大農学術報告. **21**: 153 (1970).
- 2) 桜井芳人・溝田久輝・柴崎一雄編: 食品保蔵. p. 285, 朝倉書店 (1966).
- 3) 加藤博通・中林敏郎・木村進: 食品の変色とその化学. p. 223, 光琳書院 (1967).
- 4) 山口直彦・横尾良夫・小山吉人: 食工誌. **11**: 184 (1964).
- 5) 桐ヶ谷紀昌・加藤博通・藤巻正生: 農化. **43**: 484 (1969).
- 6) 溝田久輝・鹿内健彦: ビタミン. **13**: 394 (1957).
- 7) J. E. HODGE: *J. Agr. Food Chem.* **1**: 928 (1953).
- 8) 永山文男: 日水産誌. **24**: 833 (1959). **26**: 1062, 1107 (1960). **27**: 28, 34 (1961). **28**: 45 (1962).
- 9) 稲神馨・古賀民穂: 九州大学農学部学芸雑誌. **22**: 225 (1966).
- 10) W. PIGMAN and R. M. GOEPP, JR.: "Chemistry of the Carbohydrates," p. 69, Academic Press, New York. (1947).
- 11) H. KATO: *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan.* **20**: 273 (1956).
- 12) H. KATO: *Bull. Agr. Chem. Soc., Japan.* **20**: 279 (1956).
- 13) H. VON EULER・野村男次・足立達・山藤一雄: レダクトン化学の基礎とビタミン C の生化学的成果. 内田老鶴圃 (1960).
- 14) H. MITSUDA, K. YASUMOTO and K. YOKOYAMA: *Agr. Biol. Chem.* **29**: 751 (1965).
- 15) B. COMMONER, J. TOWNSEND and G. E. PAKE: *Nature.* **174**: 689 (1954).
- 16) J. P. O'MEARA, E. K. TRUBY and T. M. SHAW: *Food Res.* **22**: 96 (1957).
- 17) T. FUENO, T. REE and H. EYRING: *J. Phys. Chem.* **63**: 1940 (1959).
- 18) B. PULLMAN and A. PULLMAN: "Quantum Biochemistry," p. 130, 495, Interscience Pub., New York (1963).
- 19) A. THOMPSON, M. L. WOLFROM: *J. Am. Chem. Soc.* **80**: 6618 (1958).

### Summary

The influences of various factors upon the antioxidant activity exhibited by a browning-solution of tryptophan with glucose were investigated. The activity of the resulting browning-solution was effected by all the factors examined here. The antioxidant activity and the color-intensity were observed to be strong at the time when the reaction-conditions were kept as follows: — high initial *pH*, high temperature long period of the browning-reaction, and also high concentration ratio of glucose to tryptophan. Thus, a close correlation between the activity and the color-intensity was indicated. It should, however, not be ignored that the colorless, low molecule substances may play a role, to some extent, in the antioxidant activity.