報 文

褐変物質に関する研究

——グルコサミン褐変物質の抗酸化性について——

小 柳 津 周

武蔵野栄養専門学校

Studies on Products of Browning Reaction

——Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine——

Makoto Oyaizu

Musashino Nutrition College

Products of browning reaction of glucosamine were prepared from glucosamine-HCl by incubating it at 37°C for 0~30 days, and the antioxidative activity, reducing power, degree of browning, aminosugar contents, pH, moisture and total nitrogen contents of the products were measured. In addition, the brown products prepared from glucosamine by incubation at 37°C for 0, 15 and 30 days were fractionated by gel filtration using Sephadex G-15, and the antioxidative activity, reducing power, degree of browning and pH of each fraction were also measured.

The results obtained were as follows:

- 1) When white powder of free glucosamine was allowed to stand for 3 days at 37°C, it transformed to a brown paste.
- 2) The strongest antioxidative activity was observed in the product obtained after incubation between 20 and 30 days.
- 3) The increase in antioxidative activity of the products of browning reaction was accompanied by the increase in the degree of browning.
- 4) The brown products prepared from glucosamine by long incubation were fractionated into fractions according to their molecular weights.

Antioxidative activity was detected in the fractions corresponding to intermediate molecular weight.

Jpn. J. Nutr., 44 (6) 307~315 (1986)

結 言

褐変物質に関する研究は、古くから多くの報告がなされている^{1)~3)}。その多くは化学的性状や油脂に対する抗酸化作用であり、特に抗酸化作用については桐ヶ谷、加藤ら^{4)~7)}が還元力と抗酸化作用、褐変度と抗酸化作用の関係を報告している。

褐変物質の多くは糖とアミノ酸を用いたもので、この反応は複雑な反応経過をたどるため、反応生成物の性状や作用についてはまだ十分に解明されていない。本報では、1分子中にアミノ基とカルボニル基をもったグルコサミンを用い、これを遊離形にすることにより容易に褐変をする性質を利用し、その生成物である褐変物

Key words : glucosamine, products of browning reaction, antioxidative activity

グルコサミン、褐変物質、抗酸化性

質をリノール酸に添加してワールブルグ検圧装置により抗酸化性を測定した。

実験方法

1. 遊離グルコサミンの調製

グルコサミン塩酸塩（シグマ社製）25 g を 300 ml 三角フラスコに入れ、メチルアルコール（無水）100 ml を加えた。この溶液中に金属ナトリウムを加え、冷却しながら激しく振盪反応させ、生成した食塩を濾過し、その濾液にエチルアルコール（無水）10 ml を加えて、白色沈澱物として遊離グルコサミンを得た。さらにこれを減圧下で乾燥し、白色の粉末状とした。調製の操作を Fig. 1 に示す。

2. 遊離グルコサミンからの褐変物質の調製

遊離グルコサミンは褐色ガラス容器に入れ、37℃ でインキュベーター中に放置し、褐変グルコサミン（Browning products of glucosamine：以下、BGA と略す）を得た。BGA は測定の都度同一容器から計りとり、放置 0 日から 5 日間は毎日、以後は 5 日の間隔で 30 日間経時的に性状の変化を測定した。

3. 褐変物質の物理的、化学的性質の測定

(1) 還元力の測定

還元力の測定は、足立⁹⁾の方法により行った。すなわち、BGA 0.03 g を蒸留水に溶解し、100 ml とした。この溶液 5 ml に 1/15 M リン酸緩衝液（pH 6.6）5 ml を加え、50℃ で 20 分間反応後冷却し、10% トリクロ酢酸溶液 5 ml を加えた。この溶液 5 ml に蒸留水 5 ml と 0.1% 塩化第二鉄溶液 1 ml を加えて発色させ、日立分光光度計を用い 700 nm で吸光度を測定した。

(2) アミノ糖の測定

グルコサミン残存量の測定は、Elson-Morgan 法の変法である Blix 法⁹⁾により行った。すなわち、BGA 0.01 g を蒸留水で 100 ml とし、この溶液 0.5 ml にアセチルアセトン 1 ml を加え、90℃ で 1 時間反応後冷却し、さらに 96% エチルアルコール 10 ml とエールリッヒ試液 1 ml を加えて発色させ、530 nm で吸光度を測定した。

(3) 全窒素量、および水分量の測定

全窒素量の測定はマイクロケルダール法¹⁰⁾によった。また、水分量の測定はケット水分計を用い、乾燥温度 105℃ で測定した。

(4) 褐変度、および pH の測定

褐変度および pH の測定は、BGA 0.03 g を蒸留水に溶解し、100 ml として用いた。すなわち、褐変度は 450 nm⁹⁾ で吸光度を測定することにより、pH は pH メーター（堀場社製）を用いて測定した。

Fig. 1 Flow sheet illustrating preparation of free-glucosamine

4. 抗酸化性の測定

(1) 基質リノール酸の調製

基質リノール酸はリノール酸メチルエステル(東京化成工業社製)を用い, Dugan ら¹¹⁾の方法によりカラムクロマトグラフィーを行い, 過酸化物を除いた。カラムはガラスカラム (2.4cm×40cm), 充填剤はワコーゲル(シリカゲル) C・200, 展開溶媒としては n-ヘキサン:メチルアルコール (3:1)を用い溶出した。溶出したリノール酸メチルエステルを, 常法¹²⁾によりケン化, 加水分解後, 溶媒を窒素ガス気流下で濃縮し, 過酸化物を除去したリノール酸 (POV=0)を得た。リノール酸はリノール酸メチルエステルと比較して酸化反応性¹³⁾が速いので基質として用いた。カラムクロマトグラフィーの操作を Fig. 2 に示す。

(2) ワールブルグ検圧装置による抗酸化性の測定

抗酸化性の測定はワールブルグ検圧装置¹⁴⁾¹⁵⁾により行い, 酸素吸

収量 (μl) で求めた。すなわち, BGA を基質リノール酸に対し, 10% (w/w) 量添加し, 乳化剤 (ツウィーン20を 2g 計り, 1/15M リン酸緩衝液, pH 7.3 に溶解し, 100 ml としたもの) 10 ml を加え, ホモジナイザーで 3,000 回/分で 3 分間乳化した。この乳化液 1.5 ml を Fig. 3 に示す反応フラスコの主室に入れた。また, 酸化促進剤として 0.05% ヘモグロビン溶液 (市販の粉末ヘモグロビン 0.05 g を, 1/15 M リン酸緩衝液, pH 7.3 に溶解し, 100 ml にしたもの) 0.5 ml と, 炭酸ガス吸収溶液として 10% KOH 溶液 0.2 ml を, それぞれ, Fig. 3 に示した側室と副室に入れた。一方, 対照区には BGA 無添加のものを用いた。

酸素吸収量の補正として副室に 10% KOH 溶液 0.2 ml と主室に蒸留水 2 ml を入れ, 補正係数を測定した。測定は 37°C 恒温水槽中に測定用マンオメーターを接続した Fig. 3 の反応フラスコを入れ, 10 分間の予備振盪を行い, その後, 側室のヘモグロビン溶液を主室に混合し, 42 回/分の振盪回数により, 開始 10 分間は毎分, それ以後 5 分間隔で酸素吸収量を測定し, 抗酸化性を求めた。なお, 基質濃度は予備実験により決定した。

Fig. 2 Procedure for linoleic acid purification

Fig. 3 Warburg flask

5. Sephadex G-15 による褐変物質の分画および化学的性質の測定

(1) Sephadex G-15 によるカラムクロマトグラフィー

Sephadex G-15 (ガラスカラム：2.5 cm×45 cm；以下、セファデックス G-15 と略す) を用い、カラムクロマトグラフィーを行った。フラクションの分取はフラクションコレクター (東洋科学産業社製・SF-160 K) により、1 フラクション 7 ml/10 分で分取した。すなわち、BGA 0.2 g を計りとり、これを 2 ml の蒸留水で溶解してカラムクロマトグラフィーに供した。展開液は蒸留水を用いて溶出した。試料は褐変前の遊離グルコサミン (0 日間放置と略す)、15 日間 37℃ に放置調製した BGA (15 日間放置と略す)、および 30 日間 37℃ に放置調製した BGA (30 日間放置と略す) を用いた。分取したフラクションは凍結乾燥 (ヤマト科学[®]製、MODEL・DC-35 を用いた) した。

(2) 分画したフラクションの抗酸化性の測定

分画したフラクションの抗酸化性はワールブルグ検圧装置を用い、前述の方法により測定した。なお、凍結乾燥した各フラクションの BGA は、基質油脂に対して 10% (w/w) の割合で添加して測定を行った。

(3) 分画したフラクションの化学的性質の測定

分画したフラクションの化学的性質は、

Fig. 4 Changes in reducing power, aminosugar, browning and moisture content in products of browning reaction
a : Reducing power (at 700 nm), b : Aminosugar (at 530 nm), c : Browning (at 450 nm), d : Moisture content (%)

Table 1 Changes in reducing power, browning, aminosugar, pH, moisture and total nitrogen content of products of browning reaction

Day	Reducing power*1	Browning*2	Aminosugar	pH	Moisture (%)	Total N (%)
0	0.036	0.000	0.265	9.60	17.0	1.22
1	0.257	0.022	0.152	11.30	18.5	1.24
2	0.340	0.035	0.133	11.43	20.0	1.25
3	0.420	0.051	0.081	11.65	30.3	1.30
4	0.496	0.053	0.022	11.36	31.4	1.26
5	0.576	0.067	0.005	11.08	31.0	1.22
10	0.459	0.072	0.002	10.94	31.0	1.20
15	0.444	0.086	0.002	10.86	30.0	1.18
20	0.410	0.104	0.001	10.80	30.0	1.18
25	0.385	0.125	0.001	10.65	30.0	1.18
30	0.378	0.144	0.001	10.43	30.0	1.18

*1 Optical density at 700nm
*2 Optical density at 450 nm

褐変度, 還元力, pH について測定を行った。測定方法は前述の方法により行った。

実験結果

1. グルコサミン褐変物質の物理的, 化学的性質の経時変化について

放置褐変したグルコサミン褐変物質の物理的, 化学的性質の測定結果を, Table 1 に示し, そのうちの代表的なものを Fig. 4 に示す。

還元力は測定開始 0 日から 5 日間まで増加し, 10 日目以降は減少した。還元力の最高値は 5 日目で認められた。褐変度は長く放置するほど増大した。放置期間中色調は白色から黄色, さらに褐色に変化した。アミノ糖の残存量は測定開始から減少を続け, 5 日目ではほとんど消失した。pH は測定開始から 3 日間上昇し, 4 日目以降, 下降した。水分量は測定開始から 4 日まで増加し, 以降大きな変動は示さなかった。全窒素量は測定開始から 3 日間わずかながら増加し,

Fig. 5 Changes of antioxidative activities in products of browning reaction
a : Control, b : 0 day, c : 1 day,
d : 3 days, e : 10 days, f : 20 days,
g : 30 days

Table 2 Antioxidative activities in products of browning reaction

Time*1	Control	Incubation period (days)										
		0	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0.29	0.15	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0.23*2	0.39	1.02	0.58	0	0	0	0	0	0	0	0
20	2.52	3.32	3.92	2.90	1.31	1.16	1.10	0	0	0	0	0
30	5.10	5.07	5.22	4.21	1.89	1.74	1.50	1.30	1.00	0.29	0	0
40	6.96	6.59	6.41	5.10	2.30	2.21	2.00	1.81	1.40	0.65	0	0
50	8.70	7.80	7.54	6.09	3.05	2.90	2.40	1.96	1.65	0.87	0	0
60	10.1	8.97	8.44	6.96	3.63	3.34	3.00	2.18	1.80	0.89	0	0
70	11.1	10.1	9.74	7.98	4.35	4.06	3.45	2.19	1.90	0.89	0	0
80	12.4	11.1	10.5	8.56	4.64	4.28	3.60	2.19	2.00	0.90	0	0
90	14.2	12.1	11.3	9.57	5.22	4.86	3.80	2.47	2.15	1.00	0	0
100	15.1	13.2	12.3	10.5	5.88	5.22	4.10	2.54	2.30	1.10	0	0
110	16.1	14.2	13.2	11.1	6.09	5.66	4.40	2.61	2.45	1.20	0	0
120	16.9	15.1	14.5	12.1	6.53	6.09	4.60	2.71	2.55	1.32	0	0
130	17.7	16.0	15.3	13.0	6.82	6.16	5.00	3.34	2.70	1.50	0.29	0.22
140	18.1	16.4	15.7	13.2	7.11	6.53	5.25	3.48	2.85	1.60	0.50	0.43
150	19.0	16.4	16.0	13.5	7.51	6.91	5.50	3.60	2.99	1.71	1.00	0.84

*1 Reaction time (minute)

*2 Oxygen uptake (μ l)

以降わずかに減少した。また、物理的性状は粉末状からペースト状に変化した。

2. グルコサミン褐変物質の抗酸化性について

結果を Table 2 に示し、そのうちの代表的なものを Fig. 5 に示す。

抗酸化性は長く放置し、強く褐変したもののほど強かった。特に25日間および30日間放置したものに強い抗酸化性が認められた。また、測定開始0日、1日および2日間放置したものではわずかに酸素吸収が促進したが、3日間以降はこの現象はみられなかった。

3. セファデックス G-15 による分画と分画液の褐変度、および pH について

結果を Table 3 に示し、そのうちの代表的なものを Fig. 6 に示す。

セファデックス G-15 で分画して得たフ

Fig. 6 Changes in antioxidative activities, browning and pH in fractions

Table 3 Changes in browning and pH of fraction by Sephadex G-15

Fraction No.	Incubation period (days)					
	0		15		30	
	Browning*	pH	Browning	pH	Browning	pH
8					0.003	7.41
9			0.006	6.50	0.023	7.38
10			0.014	6.40	0.082	7.40
11			0.194	6.75	0.108	7.21
12			0.101	6.75	0.100	7.20
13			0.076	6.73	0.103	6.90
14			0.067	6.70	0.117	6.90
15	0.001	7.90	0.067	6.70	0.127	6.90
16	0.003	7.94	0.065	6.90	0.134	6.88
17	0.003	8.11	0.064	7.26	0.130	6.85
18	0.003	8.30	0.059	7.73	0.124	7.51
19	0.005	8.69	0.048	7.87	0.121	8.14
20	0.008	8.97	0.054	7.68	0.133	8.20
21	0.009	9.22	0.069	7.55	0.073	8.60
22	0.006	9.23	0.038	7.54	0.034	9.15
23	0.004	9.21	0.014	7.46	0.020	9.30
24	0.001	9.35	0.006	7.40	0.016	9.30
25	0.001	9.29	0.005	7.40	0.014	9.17
26	0.001	9.34	0.002	7.41	0.005	9.00
27			0.002	7.43	0.002	9.00
28			0.001	7.44	0.001	9.00

* Optical density at 450 nm

フラクションの数は、0日間放置で12フラクション、15日間放置で20フラクション、30日間放置で21フラクションである。

0日間放置のフラクションではほとんど着色を示さなかったが、15日間放置のフラクションではフラクション No. 11 と No. 21 に褐変のピークを示し、30日間放置のフラクションではフラクション No. 11, No. 16, No. 20 にピークを示した。放置日数が長くなると分子量分布が広範囲になり、分子量の比較的高い画分に褐変度の増加がみられた。pH は、0日間放置のフラクション No. 15 から No. 21 まで上昇し、以降ほぼ一定の値を示した。15日間放置ではフラクション No. 15 から No. 19 まで上昇した後、フラクション No. 21 以降ほぼ一定の値を示した。30日間放置のフラクションでは No. 17 から No. 24 まで pH が上昇し、以降徐々に下降した。

4. 分画液の抗酸化性、および還元力について

結果を Table 4 に示し、そのうちの代表的なものを Fig. 6 に示す。

抗酸化性は、0日間放置についてはほとんどのフラクションに認められなかったが、フラクション No. 22 にわずかながら認められた。15日間放置のフラクションでは、No. 17 に抗酸化性が認められ、さらに No. 16, No. 18 にも弱い抗酸化性を示した。また、30日間放置のフラクションでは、No. 17, No. 18 に強い抗酸化性

Table 4 Changes in reducing power and antioxidative activities of fractions by Sephadex G-15

Fraction No.	Incubation period (days)					
	0		15		30	
	Reducing* ¹	Antioxi.* ²	Reducing	Antioxi.	Reducing	Antioxi.
Control* ³		14.2		14.2		14.2
8					0.092	10.74
9			0.104	10.94	0.156	10.80
10			0.182	10.94	0.192	10.85
11			0.448	10.93	0.488	10.97
12			0.340	10.94	0.280	10.71
13			0.320	10.98	0.240	10.78
14			0.304	10.84	0.200	10.70
15	0.018	10.92	0.307	10.51	0.216	10.24
16	0.020	10.92	0.334	10.14	0.208	10.00
17	0.024	10.89	0.380	9.50	0.252	9.22
18	0.048	11.20	0.408	10.00	0.272	9.82
19	0.050	10.95	0.348	10.92	0.276	10.20
20	0.065	10.61	0.307	10.75	0.240	10.65
21	0.070	10.65	0.294	10.99	0.192	10.90
22	0.074	10.54	0.242	11.00	0.096	11.30
23	0.065	11.01	0.202	11.24	0.080	11.56
24	0.020	11.52	0.162	11.61	0.072	11.72
25	0.010	11.65	0.100	11.90	0.060	12.04
26	0.003	11.89	0.072	12.11	0.048	12.06
27			0.042	12.31	0.040	12.35
28			0.022	12.40	0.022	12.55

*¹ Reducing power (Optical density at 700 nm)

*² Antioxidative activities [Oxygen uptake (μ l)]

*³ See Table 2

が、No. 15, No. 16, No. 19, No. 20には弱い抗酸化性が認められた。長く放置し、強く褐変したBGAのフラクションほど抗酸化性を示すものが多く、抗酸化性も強かった。一方、還元力は、0日間放置のフラクションNo. 22で最高値を示した。15日間放置のフラクションではNo. 11, No. 18で高い値を示し、30日間放置のフラクションではNo. 11, No. 19で高い値を示した。

考 察

37°Cに放置した遊離グルコサミンは、白色の粉末状から次第に着色、褐変した。

水分量は、放置褐変中に17%から30%へ増加し、特に3日間放置ごろより粉末状からペースト状へ急激に変化した。この水分量の変化が、アミノ・カルボニル基の分子内、分子間反応か、遊離グルコサミンがもつ強い吸湿性によるものか、あるいは両者によるものかは明らかでない。その後、水分量は31%を最高に安定した。

アミノ糖の残存量は5日間の放置でほとんど消失し、その時、還元力は最高値を示した。褐変度も放置後5日間まで徐々に増大し、その後も次第に着色、褐変が進行した。初期の酸素吸収量は、放置2日目までわずかながら対照区よりも増加したが、3日間放置以降、この現象はみられなかった。その原因については不明である。

抗酸化性は放置期間が長くなるほど強くなり、特に25日間と30日間放置で顕著であった。この期間、還元力は増加し、遊離のグルコサミンは消失し、褐変も進行した。

Table 1, 2に示したように、褐変度が増加すると抗酸化性も増強したことから、両者には深い関係があると思われ、この結果は着色度と抗酸化性に相関関係を示すとしたKirigayaら⁷⁾の報告と一致した。また、桐ヶ谷ら⁴⁾はpHが高いほど抗酸化性も強く、アルカリ性において生成する褐変物質の中間生成物は酸性側で生成するものよりもより強い抗酸化性を示すと報告している。本実験では強いアルカリ性で生成したBGAよりも、弱いアルカリ性で生成したBGAが強い抗酸化性を示した。

一方、セファデックス G-15を用い、0, 15, 30日間放置褐変したBGAを分画した結果、長期間放置褐変したBGAほど多くのフラクションを得た。すなわち、15日間と30日間放置のBGAでは、低分子量の褐変生成物と高分子量の褐変生成物とのピーク³⁾が認められ、長く放置褐変したBGAには分子量が比較的高い物質から低い物質までが広範囲に存在することが示された。このことから褐変中に重合、縮合反応¹⁶⁾が進行し、褐変化するものと考えられる。抗酸化性については、0日間放置では分子量の低い領域に弱い効果を、15日間および30日間放置では分子量の低い領域の褐変生成物と、分子量が比較的高い領域の褐変生成物の中間フラクションに強い抗酸化性を認めた。山口ら³⁾は、着色物質の抗酸化性は、酸化促進物質と抗酸化性物質のバランスの上より成り立つと報告している。遊離グルコサミンが重合、縮合し、褐変する過程で、抗酸化性を示すフラクションと酸化促進を示すフラクションを分画したことは山口ら³⁾の報告を支持する結果であるが、量的なバランスについては明らかにすることができなかった。

pHの影響について岡田ら¹⁷⁾は、高分子化はpHが低い場合に起きやすいと報告しているが、本実験ではpHは0日間、15日間および30日間放置褐変したフラクションの前半で低い値を示し、フラクションの半ばから後半にかけて高い値を示した。15日間と30日間放置で、pHが上昇する付近のフラクションが抗酸化性を示したことは、桐ヶ谷ら⁴⁾の報告を支持する結果である。

重合、縮合することにより、生成する褐変物質では抗酸化性、褐変度、還元力、水分量が増強、増加し、一方、遊離のグルコサミンではこれらが低い。このことが遊離グルコサミンのもつ激しい吸湿性による反応か、

分子内、分子間による反応か、あるいは両者が複雑にかかわって褐変を促進した効果を示すものかは本実験においては不明である。

要 約

グルコサミン塩酸塩を遊離形にし、37°C インキュベーターで0日から30日間放置褐変した褐変グルコサミン (BGA) の抗酸化性、還元力、褐変度、アミノ糖の残存量、pH、水分量、全窒素量を、放置0日から5日間は毎日、以後5日間の間隔で30日間測定した。一方、0、15、30日間放置褐変したBGAをセファデックス G-15 で分画し、抗酸化性、還元力、褐変度、pHについて測定して、次のような結果を得た。

- 1) 遊離グルコサミンは、3日間放置後より白色粉末状から褐色ペースト状に急激な変化を示した。
- 2) 最も強い抗酸化性は、25日間と30日間放置褐変したBGAで認められた。
- 3) BGAのリノール酸に対する抗酸化性は、褐変度と深い関係を示した。
- 4) 長く放置褐変したBGAは、分子量が比較的高い領域の褐変生成物質と、比較的低い領域の褐変生成物質に分画された。
- 5) 長く放置褐変したBGAでは、高分子の褐変生成物質のフラクションと、低分子の褐変生成物質のフラクションの中間フラクションに抗酸化性を認めた。

文 献

- 1) 山口直彦, 横尾良夫, 小山吉人: 日食工誌, **11**, 184 (1964)
- 2) 湯木悦二, 石川行弘, 吉和哲朗: 油化, **23**, 714 (1974)
- 3) 山口直彦, 藤巻正生: 日食工誌, **17**, 136 (1970)
- 4) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博通, 藤巻正生: 農化, **43**, 484 (1969)
- 5) 加藤博通, 石川久隆, 桎尾 一, 土田広信, 藤巻正生: 農化, **49**, 179 (1975)
- 6) 桐ヶ谷紀昌, 加藤博通, 藤巻正生: 農化, **45**, 292 (1971)
- 7) Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **32**, 287 (1968)
- 8) 足立 達: 農化, **32**, 313 (1957)
- 9) 福井作蔵: 生物化学実験法, 還元力の定量法, p. 116 (1969) 東京大学出版会
- 10) 東京大学農芸化学編: 実験農芸化学上, p. 286 (1978) 朝倉書店
- 11) Dugan, Jr., L. R., Beadle, B. W. and Heich, A. S.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **25**, 153 (1948)
- 12) 日本油学会編: 基準油脂分析試験法, 2.4.20.2—77 (1977)
- 13) Olcott, H. S.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 597 (1958)
- 14) 笹川泰治: 生物化学Ⅱ, 実験化学講座24, p. 85 (1959) 丸善
- 15) 湯木悦二, 石川行弘, 山岡 至, 吉和哲朗: 日食工誌, **20**, 411 (1973)
- 16) 山口直彦, 藤巻正生: 日食工誌, **17**, 142 (1970)
- 17) 岡田憲幸, 太田輝夫, 海老根英雄: 農化, **55**, 407 (1981)

(受付: 昭和61年3月22日)