金属-タンパク質複合体に関する研究 (第 5 報)

還元糖-アミノ酸とのかっ変物と金属との反応について

梶本五郎・吉田弘美・高森由紀子

神戸学院大学栄養学部 (神戸市垂水区伊川谷町有瀬)

Studies on the Metal-Protein Complex. V. Reactions between the Browning Reaction Products from Glycine and Reducing Sugars and Metals

Gorō KAJIMOTO, Hiromi YOSHIDA and Yukiko TAKAMORI
Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University (Arise, Ikawadani, Tarumi-ku, Kobe)

Among the browning reaction of various foods, the Maillard reaction has been studied extensively and it is known that the reaction products show antioxidative activity. In the previous papers, the authors observed that the easy formation of metal-protein complex and iron-fatty acid complex, and those complex thus formed did not promote the rancidity of oil.

In this paper the relation between the binding ability of melanoidin(M) and metal and characteristics of M-metal complex was investigated. M prepared from a mixture of glycine and D-xylose by heating at 100°C for 5 hr, was fractionated by Sephadex G 25 or thin-layer chromatography (TLC).

M and fractionation components with Sephadex G 25 and TLC were reacted at 50°C with some inorganic metals (copper sulfate, ferrous chloride, zinc nitrate and magnesium chloride). The precipitated complex was separated by centrifugation, and the amount of adduct formed with those materials, and metal content in those complex, and IR spectrum and TLC of those complex were measured.

The results obtained were as follows:

- 1) It was found that the easy formation of M-metal complex and the amount of M-metal complex increased with the reaction time of M with metal. And also the longer reaction time of glycine with xylose rendered greater the formation of M-metal complex. For M, the amount of adduct with iron was the most, and these with copper, zinc and magnesium came in the followed order.
- 2) As for gel-filtration on Sephadex G 25, this fraction gave same pattern as the M and metal in M-metal complex.
- 3) TLC chromatographic method of M-metal complex gave one spot, and from the above results, it was concluded that the M-metal complex forms.

1 緒 言

還元糖-アミノ酸のかっ変反応物であるメラノイジン(M)は酸化防止性を有し、丸山¹⁾らはMのアセトン溶出物が最も酸化防止性が大であると報告している。山口²⁾らはセファディクス G15 で糖-アミノ酸のかっ変物の分別と分別物の酸化防止性を検討し、着色物質区には著しい酸化防止性を有するも、低分子還元性物質にはほとんど認められないと述べており、また、Mとトコフェロールとの混合では相乗性を示し、MとCuとの混合は著し

く油脂の酸化を促進し、クエン酸を添加することによりクエン酸の金属封鎖作用が認められ酸化防止性を発揮したと報告している。Mの酸化防止機構については還元性にもとづくラジカル・インヒビターの作用のみでなく、金属封鎖作用も関係しているのではないかと報告している³⁾。ところで、Mの酸化防止性は金属封鎖作用によるものと推察されているにもかかわらず、MとCuとの混合系では油脂の酸化を著しく促進している。著者らも前報⁴⁾で、脂肪酸とCuの混合系または銅セッケンでは著しく油脂の酸化が促進されることを報告し、逆に脂肪酸

と Fe との混合または鉄セッケンでは酸化が抑えられることを知った。しかし、油脂の酸化に対する両金属セッケンの相反する機構については不明であった。

鉄および銅セッケン同様、Mの酸化防止機構も不明な点が多い。そこで、金属との反応面よりMの酸化防止機構を究明すべく、今回、還元糖とアミノ酸のかっ変反応物であるMと金属との反応およびM-金属反応物の性質などについて検討した。

2 実 験

2.1 試料および試料の調製

2.1.1 糖-アミノ酸かっ変反応物の調製

文献^{1)~3)}にしたがい 2 M のグリシンと D-キシロースの 30% エタノール混合溶液 100 ml を 300 ml 容量のなす型フラスコに入れ、還流冷却管をつけて沸騰水中時々振とうしながら 5 hr 加熱してかっ変物を得た。かっ変物はエバポレーターでエタノールを留去したものと (M と表す)、さらにアセトン 100 ml を加えてその可溶物を試料 (M アセトン抽出物) とした。M と金属との反応を調べるため、下記の 2 方法でさらに分別した。

2.1.2 かっ変反応物のゲルろ過による分別

2.1.1 の方法で得た M の 2 ml を 50×1.8 cm のガラス管にセファディクス G 25 Medium (生化学工業株式会社) を 28 cm の高さに充てんしたカラムにとおし、展開液は再蒸留水を用い、1 フラクシオン 4 ml として、フラクシオンコレクターにて採集し、流速は 4 ml/10 min で行った。各フラクシオンの着色度は 450 nm の吸光度

Fig.-1 Gel filtration diagram of fractionation with Sephadex G 25 using color components melanoidin from glycine-xylose system.

Fig.-2 Ultraviolet spectrum of fractionation components of melanoidin from glycine-xylose system.

で表した。そのクロマトグラムは Fig.-1 に示すように、フラクシオンナンバー 8 が最も着色度が高かった。各フラクシオン部と金属の反応性を調べるため便宜上、8~10 (M ゲルろ過 F1), 13~15 (M ゲルろ過 F2), 17~20 (M ゲルろ過 F3) の 3 分画に大別した。それぞれの 3 分画物の紫外スペクトルは Fig.-2 のとおりである。なお、測定は、日立自記分光光度計 124 型を使用した。3 分画部の窒素量は M ゲルろ過 F1 で 1.78%, M ゲルろ過 F2 および F3 で 1.15% および 0.49% であった。窒素量は Slone-Stanley の方法⁵⁾によった。

各フラクシオン部についてニンヒドリン反応も同時に行った。すなわち各フラクシオン部より 0.5 ml ずつをひょう取し、 SnCl_2 0.1 ml, ニンヒドリン溶液⁶⁾ 2 ml を加え、100°C で 20 min 間反応後、5 ml の再蒸留水を加え、570 nm の吸光度を測定した。結果は Fig.-1 に併記した。

ゲルろ過分別の F1 部に着色部の大部分が溶出され、紫外部の吸収スペクトルにみられるように、M 特有のパターンを示す。すなわち 260~330 nm にいたるブロードなピークを示し、F2, F3 は着色度は低く、未反応のグリシン、糖なども含有するため F1 に比べ異なったパターンを示している。

2.1.3 かっ変反応物の薄層クロマトグラフィーによる分画

薄層クロマトグラフィー (TLC) の方法は、メルクシリカゲル G に再蒸留水を倍量加え泥状とし、東洋科学産業の TLC アプリケーターに流し込み、0.25 mm のプレートを作り一夜放置後、150°C で 2 hr 乾燥させた。上

記プレートにMおよびMアセトン抽出物をスポットし、アセトンで展開した。そのクロマトグラムは Fig.-3 に示すように、数種のスポットが認められた。 R_f の小さい順に A, B, C と表し大別、各部をかきとりアセトンで抽出したものについて金属との反応性を調べた。各 A, B, C 区の窒素量は 0.8%, 0.6%, 0.5% で、文献⁷⁾によれば A 区は M の複数成分と考えられる。B 区はキシロースの R_f と一致したが、吸収スペクトルでは一致しなかったで M およびキシロースなどの混合物であろう。

Fig.-3 Thin-layer chromatograms of melanoidin and acetone eluate from melanoidin.

2.2 金 属

銅：特級硫酸銅（純度 99%）

鉄：特級塩化第一鉄（純度 98%）

亜鉛：特級硝酸亜鉛（純度 98%）

マグネシウム：特級塩化マグネシウム（純度 98%）

いずれも米山薬品工業株式会社製で、それぞれの金属塩を再蒸留水で再結晶させたものを Cu, Fe, Zn, Mg とし 10~100 ppm/ml になるよう再蒸留水に溶解し調製した。

2.3 実験方法

2.3.1 グリシン-キシロースの かつ 変反応物と金属との反応

M と M アセトン抽出物では Fig.-3 に示すように同スポット数を示したので、金属との反応にはかなり多量の M を必要とするので M を用いることにした。

M と 2.1.2 の方法で得た M のゲル過分画 F1, F2, F3 および 2.1.3 の方法で得た TLC 分画 A, B, C のそれぞれ 5 ml 溶液（固形物として 50 mg/5 ml, 各分画区ともできるだけ同重量にした）に Fe, Cu, Zn, Mg とし 100 ppm 濃度の各金属塩を 1 ml ずつ添加混合し、50°C 水そう中で 5~20 hr 反応させた。M および金属濃度を異にしたものについても同様反応させ、低濃度の M

調製は蒸留水で希釈し、反応時は常に 5 ml とした。なお、M は多価電解質としての性質を有することがわかり、pH 2.5 で沈殿するので水溶液（pH 6.9）中で反応させた。

2.3.2 かつ変反応物と金属との反応沈殿物の分別および反応沈殿物の定量

M と金属を混合することにより短時間にて沈殿がみられ、かつ沈殿物中に添加した金属が多量含有されていたので、M-金属の反応物とみなし、遠心分離（4,000 rpm, 10min）で沈殿物を分別、さらに蒸留水を加え遠心分離による洗浄操作を繰り返し、上澄み液部に着色が認められなくなるまで洗浄した。なお、水洗処理しても沈殿物は水に溶解しなかった。沈殿量の求め方は、沈殿物を減圧乾燥させた重量と反応に用いた M およびゲル過、TLC 分画部の固形重量に対する割合で表した。M と金属との沈殿物を M-金属反応物と表す。

2.3.3 M-金属反応物の着色度と金属量について

2.3.2 の方法で得た M-金属反応物は水、アセトン、エーテルなどに不溶、3 N-HCl, 10% CCl_3COOH に少量溶解、0.1 N-NaOH に完全に溶解した。そこで、M-金属反応物を 5 ml の 0.1 N-NaOH に溶解（以後、M-金属反応物の溶解液と表す）し、450 nm の吸光度から着色度を表し、金属量は前報⁴⁾同様、日立 208 型原子吸光度計で測定、M-金属反応物の乾燥重量に対する mg% で表した。

2.3.4 M-金属反応物のゲル過と各フラクションの着色度および金属量

M-金属反応物の溶解液および M-金属反応物を除いた上澄み液（未反応の M と金属が存在）を 2.1.2 の方法でゲル過、各フラクション部の着色度（450 nm 吸光度測定）と原子吸光度計で各フラクション（4 ml）中の Fe および Cu の金属量を求めた。

2.3.5 M-金属反応物の TLC

2.3.2 で得られた M-Fe および M-Cu 反応物の溶解液とその反応物を除いた上澄み液について、2.1.3 の方法で TLC を行った。

2.3.6 M-金属反応物の赤外スペクトル

M-金属反応物を 50°C で減圧乾燥後、細粉、KBr（1 : 100）との混合板を作成、島津自記赤外線分光光度計 IR-27 C 型で IR スペクトルを測定した。

3 結 果

3.1 かつ変反応物と金属の反応物量および金属量

グリシン-キシロースの かつ 変物と各金属塩を混合することにより沈殿がみられたので、その沈殿量を求めた。すなわち、M 5 ml と Fe および Cu とし 100 ppm 濃度の FeCl_2 , CuSO_4 を 1 ml ずつ添加混合し、50°C で反応、経時的に取り出し沈殿量を測定した結果

Table-1 Relationship between reaction products of melanoidin and metal.

Metals	M**-Fe mixture			M**-Cu mixture		
	5	10	20	5	10	20
Reaction period (hr)	5	10	20	5	10	20
Precipitate complex* (%)	11.1	12.0	12.2	9.5	10.6	10.8

* Precipitate complex : Precipitate complex weight (mg)/
Used melanoidin weight (mg)

** M : Melanoidin

は、**Table-1** のとおりである。

M-Fe, M-Cu のいずれの混合系においても 10~13% 程度の沈殿がみられ、かつ 5 hr 程度の早い反応時間で大部分の沈殿物がみられ、その後はわずかに増加する程度であった。おそらく反応時間が長くなるほど変反応がさらに進み金属と反応しやすくなったものと考えられる。このことは後述するが、グリシン-キシロースの混合物でMを調製する際、反応時間の短いものでは金属とあまり反応せず、反応時間の長い変度の高いMは容易に金属と反応し、多くの沈殿を生成することと同じ現象だと思われる。

金属の添加量および M 濃度の異なる混合系について、20 hr 反応後、M-金属反応物量およびその着色度、Fe, Cu 量を求めた結果は **Table-2** のとおりである。

M濃度を一定にし金属添加量が異なる場合、沈殿量は、金属添加量が多くなるほど増加し、ことにその傾向は Fe ほど大であった。M-金属反応物の溶解液の着色度および Fe, Cu 量も金属添加量が多くなるほど高くなった。金属量を一定にし、M濃度をかえて反応させた場合、M濃度が低いほど見掛け上の沈殿量は少ないが、M重量に対する割合で表すと多くなった。M-金属反応物の着色度は M が少量の場合、M の割合に対する沈殿量が多くても絶対量の M 量が少ないため、M-金属反応物

量も少なく、当然着色度は低い。しかし M-金属反応物中の金属量は多くなった。その傾向は M-Fe 混合系ほど大で、M-Cu 混合系ではほぼ一定であった。

Mと金属との混合で沈殿がみられ、かつ沈殿物中に多量の金属が含有されることから、Mと金属とが反応したものといえる。ただし、その沈殿物がイオン結合に基づく M-金属の複合体なのか、M のキレート結合物であるかは逐次検討していく。

以後のMと金属との反応には、M 5 ml (50 mg), Fe, Cu として 100 ppm 濃度のものを 1 ml 使用する。

M-金属反応物を除いた上澄み液には未反応の M と金属が残存しており、金属の添加量が多くても沈殿量が著しく増加しないこと、あるいは添加量が少ない場合にはほとんど沈殿物を生じないことから、Mと金属との反応間には一定の濃度比率がある。また、金属と反応するMの形、例えば重合度などが関係しているように思われる。

そこで、ゲルろ過分画物および TLC 分画物と Cu との反応を試みた。結果は **Table-3~4** のとおりである。

ゲルろ過分画では、F1 すなわち着色度の高い部との

Table-3 Relationship between percentage of adduct formation of frationated materials with Sephadex G 25 using color component of melanoidin from glycine-xylose system and copper.

Sections	Fraction numbers		
	8-10	13-15	17-20
	F 1	F 2	F 3
Volume of precipitate complex (%)*	13.0	2.6	Tr.

* For abbreviations see **Table-1**

Table-2 Relationship between percentage of reaction products and metal content in reaction products and different stages of melanoidin or metal quantity.

Metals	M**-Fe mixture				M**-Cu mixture			
Melanoidin volume (ml)	5	5	5	5	5	5	5	5
Added metal (ml)	0.1	0.5	1.0	2.0	0.1	0.5	1.0	2.0
Volume of precipitate complex (%)*	5.0	8.2	11.0	12.0	7.1	7.4	8.8	10.6
Browning ratios of precipitate complex (450 nm)	0.02	0.07	0.47	0.73	0.01	0.06	0.40	0.60
Metal contents*** (mg%)	3.5	13.5	23.5	49.4	3.2	8.7	18.2	25.6

Metals	M**-Fe mixture				M**-Cu mixture			
Metal volume (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1
Added melanoidin (ml)	5.0	3.0	1.0	0.5	5.0	3.0	1.0	0.5
Volume of precipitate complex (%)*	11.2	12.4	17.5	30.3	9.0	9.1	9.0	12.1
Browning ratios of precipitate complex (450 nm)	0.50	0.33	0.26	0.24	0.53	0.32	0.14	0.03
Metal contents*** (mg%)	24.9	27.8	24.3	30.8	19.0	28.0	78.2	118.0

*, **: For abbreviations see **Table-1**

***: Metal content in precipitate complex (mg)/precipitate complex weight (mg)

Melanoidin volume : 50 mg/5 ml, 30 mg/3 ml, 10 mg/1 ml, Fe and Cu : 100 ppm/1 ml

Table-4 Relationship between percentage of adduct formation of fractionated materials with TLC using color component of melanoidin from glycine-xylose system and copper.

Section	TLC fractionation		
	A	B	C
Volume of precipitate complex (%) [*]	12.2	1.0	2.4

* For abbreviations see Table-1

反応が最も多く沈殿物を生じ、他の分画物ではわずかに沈殿物を生じた程度であった。TLC 分画では、 R_f 値の小さい A 区、すなわち複数成分との間に多くの沈殿がみられた。M の着色度と重合度との関係については、茂田井^{8),9)}らは M は酸化されることにより重合が起こり、重合することにより色の増加が起こると報告していることから、本実験でも M の着色度の高いものは重合度も高いといえる。ただし、今回は M の重合度は測定しなかった。

M の着色度と金属との反応については、先に述べたようにグリシン-キシロースの反応初期の着色度の薄い溶液と金属との反応では M-金属反応物がわずかにしか生成されないが、さらに加熱反応させ着色度の高くなったものとは明らかに沈殿物が多く認められた。

そこで、グリシン-キシロース混合物の反応時間と Cu との反応生成量について検討した。結果は Table-5 のとおりである。なお、M の着色度は、反応時間の異なる M をそれぞれ 0.2 ml ずつとり 4 ml に希釈したものについて 450 nm の吸光度を求め、ニンヒドリン反応の呈色は、それぞれ 0.2 ml ずつとり発色後、40 倍に希釈したものについて 570 nm の吸光度を求めた。

Table-5 Relationship between percentage of adduct formation and different stages of reaction hours of glycine-xylose system.

Reaction period (hr)	1	2	3	5	10
Density of M** (450 nm)	0.13	0.28	0.65	0.86	1.40
Density of ninhydrin reaction (570 nm)	1.40	1.30	1.25	1.21	1.10
Volume of precipitate complex (%) [*]	3.5	4.2	10.6	12.0	13.5

*, ** For abbreviations see Table-1

グリシン-キシロース混合物の反応時間が 1 hr 程度のもものでは M-金属反応物がわずかにしか生成されないが、3 hr 以上の加熱反応 M では、多くの M-金属反応物が生成した。したがって着色度の高い M ほど金属と容易に反応することがわかった。

金属の種類と M との反応について検討し、Table-6 の結果を得た。なお、金属との反応時間は 10 hr で

Table-6 Reaction between various inorganic metal and melanoidin.

Kinds of metal salt	FeCl ₂	CuSO ₄	MgSO ₄	Zn(NO ₃) ₂
Volume of precipitate complex (%) [*]	12.2	10.8	5.6	7.7
Metal contents (mg%) ^{***}	30.6	19.7	8.1	16.3

*, *** For abbreviations see Table-1 and 2

ある。

Fe が最も多く M と反応し、ついで Cu, Zn, Mg の順であった。

3.2 M-金属反応物のゲルろ過

M と金属との反応物がイオン結合、金属錯体形成、あるいは単なる金属の吸着現象に伴う沈殿物であるかを検討する必要があった。

そこで、まず 2.3.2 の方法で得た M-Fe, M-Cu 反応物の溶解液と M-金属反応物を除去した上澄み液についてセファディクス G 25 によるゲルろ過を試み、Fig.-4 ~5 の結果を得た。

M-Fe および M-Cu 反応物では、M の着色部と Fe および Cu ゲルろ過による検出パターンが一致しており、上澄み部では、M の着色部と Fe および Cu の検出パターンは一致するところもあるが、大部分の金属は

Fig.-4 Gel filtration diagram of melanoidin-iron complex and supernatant liquid. **Fig.-5** Gel filtration diagram of melanoidin-copper complex and supernatant liquid.

パーゼ, トリプシン) を使用し, 金属との複合体を調製, アルコール洗浄により遊離の金属を除去, Sephadex G 75 を用いゲルろ過, 280 nm 吸光度測定による酵素溶出のパターンと原子吸光光度計による金属の検出パターンを求めた場合, 全く一致し, 酵素および金属のそれぞれ単一のゲルろ過では酵素溶出後に金属の溶出がありパターンは一致しない。この結果から, M-金属反応物であるかは, ゲルろ過法で一応の目安になると考えたからである。

グリシン-キシロース 混合物の反応初期ではMの生成も少なく, 反応時間が長くなるにしたがい着色度は高まり, 金属との反応性も増加した。ただし今回は, Mの重合度については求めなかった。Mの重合度と金属との反応およびM-金属反応物の油脂の酸化に対する挙動については次回に報告したい。

M-金属反応物の反応機構がイオン結合なのか, 金属錯体形成物であるかは, IR スペクトル, TLC 分析などからでは充分証明できなかった。しかし, Mと金属との混合により沈殿物を生ずることから, Mが多価電解質としての性質を有することは事実のように考えられる。

Mと金属との反応はM重量に対し高々30%で, M-金属反応物を除いた上澄み液にはMと金属とがかなり残留しており, このものは長く放置しても沈殿物を生じてこない。その上澄み液に再度金属塩を添加すると再び沈殿が生じ, 同操作を繰り返すことによりその都度沈殿物が認められるが, 次第にMの着色度も薄くなり, M-金属反応物量も次第に減少する。したがって, Mと金属と

の反応には, M濃度と金属との間に一定の比率があるものと考えられ, Mに比べ金属量が少ない場合には沈殿物を生じてこない。Table-2 に示すように金属量を一定にし, M濃度を高くしてもM-金属反応物は増加しない。本実験の結果から, M:Feの比はおおよそ50mg:5ppm程度が沈殿物を生成する限界比率であると推察される。

Fig.-4~5のM-金属反応物を除いた上澄み部のゲルろ過では, 大部分は遊離のMと金属であるが, 一部Mの着色部のパターンと金属のパターンが一致しており, このものはゲルろ過操作中カラム内でMと金属との反応が行われたのか, あるいは本実験で用いた程度の遠心分離速度では沈殿しない微細なM-金属反応物も生成されているのかもしれない。これらについては, 考察の中で問題点となったものを含め今後の課題にしたい。

(昭和49年8月6日受理)

文 献

- 1) 丸山, 藤本, 金田, 食品工誌, **17**, 281 (1970)
- 2) 山口, 藤巻, 食品工誌, **17**, 136 (1970)
- 3) 山口, 藤巻, 食品工誌, **21**, 13 (1974)
- 4) 梶本, 吉田, 油化学, **23**, 83 (1974)
- 5) G.H. Sloane-Stanley, *J. Biochem.*, **104**, 293 (1967)
- 6) 梶本, 吉田, 農化, **47**, 515 (1973)
- 7) 山口, 藤巻, 食品工誌, **20**, 508 (1973)
- 8) H. Motai, S. Inoue, *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 233 (1974)
- 9) 茂田井, 井上, 農化, **48**, 329 (1974)
- 10) T. Baba, H. Yoneda, M. Muto, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **41**, 1965 (1968)