リンゴ酵素褐変系の ESR スペクトル†

尊田民喜, 村中誠*, 大村浩久

九州大学農学部食糧化学教室

ESR Spectrum of the Browning System with Apple Enzyme

Tamiyoshi SONDA, Makoto MURANAKA*, Hirohisa OMURA

Food Chem. Inst., Fac. Agricult., Kyushu Univ., Hakozaki, Fukuoka

Free radical signals were detected on the freeze-dried powder of the nondialysable and dialysable fractions of the melanoidins produced in the enzymatic browning systems of "apple enzyme • catechol" and "apple enzyme • catechol • methionine." Notwithstanding the dialysis of the browning systems, the coexistence of methionine in the systems and the reaction time of the enzyme, the g values were 2.004 in all specimens determined when the signal of DPPH had been comparatively determined as the standard of the value, or 2.007 in the case of Mn^{2+} as the standard.

The relative concentration of the radicals in the nondialysable fractions was dependent on the concentration of catechol and the enzymatic activity in the browning systems. The maximum of the relative concentration was observed at early stage of the reaction when the enzymatic activity was much higher.

The relationship between the antioxidative activity of the nondialysable fractions against linoleic acid and the relative concentration of the free radicals in them was suggested.

(Received April 26, 1975)

アミノカルボニル反応における色素生成機構の詳細は明らかでないが、少なくとも中間体として生じるレダクトンやオゾンなどカルボニル化合物とアミノ化合物との共重合が主要な反応過程であることは、推定される¹⁾。酵素の褐変反応においても、たとえばリンゴ酵素・カテコール系に種々のアミノ酸を加えると褐変が促進される²⁾。またレダクトン類が褐変反応の重要な中間体であり、その構造はメラノイジン中にも含まれていることは知られているが³⁾、酵素の褐変系においても同様に還元力を生じ、しかもアミノ酸の添加により増強される⁴⁾。他方アミノカルボニル反応により抗酸化能も形成されるが⁵⁾、酵素の褐変系においても生成され⁶⁾、メチオニンにより強化される⁴⁾。これらの研究は、酵素の褐変系における色素の生成過程がアミノカルボニル反応など非酵素の褐変反応に類似することを示唆する。満田ら⁷⁾はアミノカルボニル反応により、グルコースとグリシンとかから生成したメラノイジン中に比較的安定なフリーラジカルが存在することを確かめ、このフリーラジカルの生成

が、アミノカルボニル反応に含まれることを推定した。

なおこのようなフリーラジカルは、メラニン⁸⁾、腐植酸⁹⁾、タバコ煙の濃縮物¹⁰⁾、焙焼したコーヒー豆¹¹⁾などにも検出されている。したがって酵素の褐変系においても同様のことが推定されるので、リンゴ酵素・カテコール系について ESR スペクトルを求め、フリーラジカルの存在を検討した。

実験方法

1. 酵素液

常法^{12)~15)}によりリンゴ果肉アセトン粉末から抽出調製した粗酵素液に、飽和硫酸溶液を加えて 0.8 飽和とし、生じた沈殿を 0.02M リン酸緩衝液 (pH 7) に溶かす。これを同じ緩衝液に対し、5°C、2 日間透析したのち 10,000 rpm、30 分間遠心分離し、その上澄液を酵素液とした。

2. メラノイジン

酵素・カテコール系 (5 mM カテコール溶液 150 ml, 水 150 ml, 酵素液 50 ml) または酵素・カテコール・メチオニン系 (5 mM カテコール溶液 150 ml, 10 mM メチオニン溶液 150 ml, 酵素液 50 ml) を 37°C に一定時間反応させたのちただちに冷却、2 l の蒸留水に対し 5°C で 2 日間透析し、内液 (非透析性成分) および外液 (透析性成分) を凍結乾燥した。

† 食品の変色とスペクトルとの関係 (第11報)
Relationship between Change of Color of Foods
and Spectra (Part XI)

* 現在: 朝日麦酒株式会社柏工場

〒 812 福岡市東区箱崎

3. ESR スペクトル

内径 1 mm の石英毛細管に凍結乾燥試料 130 mg を詰める。この毛細管をさらに内径 3 mm の石英試料管に入れ、23°C の恒温室内に設置した電子スピン共鳴装置日本電子 JES-ME-IX 型 (磁場変調周波数: 100 kc; マイクロ波周波数帯: Xバンド; マイクロ波検波: クリスタル; 円筒型空洞共振器: TE₀₁₁ モード (JES-UCX-2 型) で ESR スペクトルを測定した。測定条件は、通常、応答 (response) I, 磁場変調幅 (modulation width) 6.3 ガウス, マイクロ波出力 (power) 8.0 mW, 磁場掃引幅 (sweep width) ± 50 ガウス, 磁場掃引時間 (sweep time) 5 分間とし、試料に応じて利得 (gain) を変えて測定した。

g 値を求めるために、 Mn^{2+} は磁場校正装置を使用し試料と同時に測定できるので、照合物質としておもにこれを用いた。また一般に用いられている diphenyl picryl hydrazyl (DPPH, g 値 2.0036) も用いたが、この場合には 2 mM 溶液 (ベンゼン) とし、磁場変調幅 20 ガウス, 出力 10 mW, 磁場掃引幅 ± 250 ガウス, 磁場掃引時間 1 分間とした。一方、ESR の強度あるいはフリーラジカルの濃度は、測定が困難煩雑であるので Commoner ら¹⁶⁾ に従い、最大傾斜幅 ΔH_{msl} の平方とピークの極大値と極小値との差 Δh との積により、相対的に比較した。各反応時間について、それぞれ試料粉末を調製し、シグナルを 20 回あて測定しその平均値を求めた。もちろん、この場合適用した条件ではシグナル強度は飽和していなかった。

4. 抗酸化能

凍結乾燥した各試料粉末 15 mg を水 10 ml によく懸濁し、常法¹⁷⁾によりそのリノール酸に対する抗酸化力を測定し、O.D.₅₀₀ で表わした。

結果および考察

1. メラノイジンの ESR スペクトル

メラノイジンの水溶液ないし水懸濁液では、ESR シグナルは検出されなかった。これは測定に用いた試料の濃度が低いことにもよるが、水の誘電率が大きいためであるとも考えられる。そのため凍結乾燥粉末を測定に用いた。Fig. 1 に酵素・カテコール・メチオニン系の 24 時間反応、非透析性成分の ESR シグナルを示す。DPPH を照合物質とした場合には g 値は 2.004 であったが、 Mn^{2+} の場合にはその 3 番目と 4 番目のシグナルの中間に現われ、 g 値は 2.007 であった。

測定に用いた試料が固体粉末であるので、酸素の影響も考えられる。そのため、つぎにメラノイジン粉末のほか、カテコール結晶粉末、メチオニン結晶粉末、両者の等量混合物、および凍結乾燥した酵素粉末について ESR

Fig. 1. ESR spectrum of the nondialysable melanoidin produced in the browning system of apple enzyme, catechol and methionine.

A mixture of 150 ml 5 mM catechol solution, 150 ml 10 mM methionine solution and 50 ml apple enzyme solution was incubated at 37°C for 24 hr. After rapid cooling, it was dialysed against 2 l water at 5°C for 2 days, followed by freeze-drying. The ESR spectrum was estimated on 130 mg freeze-dried powder filled in a quartz capillary tube of 1 mm diameter with the spectrometer, JES-ME-IX, maintained in a room of 23°C. A: standard Mn^{2+} ; estimating conditions: response I, modulation width 6.3 gauss, power 8.0 mW, sweep width ± 50 gauss, sweep time 5 min, gain 7.1×100 .

B: standard DPPH (2 mM solution in benzene); estimating conditions: response I, modulation width 20 gauss, power 10.0 mW, sweep width ± 250 gauss, sweep time 1 min, gain 6.3×10 (DPPH) or 2.5×1000 (sample).

Fig. 2. ESR signals of the each component in the browning system.

ESR spectra were determined as in Fig. 1, but with gain 5.6×100 , for crystalline powders of catechol, methionine and catechol-methionine (1:1) mixture or freeze-dried powders of apple enzyme and nondialysable melanoidin produced in the browning system.

Fig. 3. ESR spectra of the nondialysable melanoidin and dialysed fraction produced under the different conditions.

The browning systems of "apple enzyme • catechol" and "apple enzyme • catechol • methionine" were incubated at 37°C for 0.5, 6 or 24 hr and dialysed as in Fig. 1. Both the nondialysable and dialysable fractions were freeze-dried and ESR spectra were estimated as in Fig. 1, but with gain indicated.

Specimen:

- A: nondialysable melanoidin; "enzyme • catechol" system; incubation time 0.5, 6, 24 hr; gain 4.0×100 .
- B: nondialysable melanoidin; "enzyme • catechol • methionine" system; incubation time 0.5, 6, 24 hr; gain 2.0×100 .
- C: dialysed fraction; "enzyme • catechol" system; incubation time 24 hr; gain 1.4×100 .
- D: dialysed fraction; "enzyme • catechol • methionine" system; incubation time 24 hr; gain 2.0×100 .

スペクトルを測定し Fig. 2 に示す。その結果、メラノイジンにのみ安定なシグナルが確認された。

この ESR シグナルはメチオニンを加えない酵素・カテコール系においても、またさらに両褐変系ともに反応 24 時間のものだけでなく、30 分や 6 時間などのものにも検出され、しかも同じ g 値を示した。Fig. 3, A および B にこれを示す。他方、同一のシグナルは透析性成分にも認められた。Fig. 3, C および D は 24 時間褐変系透

析成分の ESR スペクトルであるが、透析外液の凍結乾燥粉末は吸湿性であるので定量的測定は困難であった。

いずれにしても、このように ESR シグナルが求められたが、これは酵素の褐変にともない、しかも比較的短時間でも、還元力ならびに抗酸化能が透析性ならびに非透析性の両成分に生成される事実⁴⁾と深い関連性が示唆される。芳香族遊離基には、安定なものが知られているが、それらの固体は一般に鋭い 1 本の ESR シグナルを示し、その g 値は、例外なく 2 に近いことが知られている¹⁹⁾。たとえば、照合物質に DPPH を用い、アミノカルボニル反応により生成したメラノイジン 2.0037⁹⁾、メラニン 2.003²⁰⁾、腐植酸 2.0036²¹⁾などの g 値が求められている。また皮膚、毛髪などにも 2.003~2.004 のシグナルが検出されているが¹⁹⁾、さらに蚕卵、白ネズミ肝臓、鶏胚の肝臓および脳、ウニ卵、蛙卵、原生動物 *Tetrahymena pyriformis*、腹水ガン細胞 AH7974、培養動物細胞 C3H2K など多くの生物材料の凍結乾燥粉末に g 値が 2.00 である ESR シグナルが認められている²⁰⁾。したがって、 Mn^{2+} のシグナルに照合した場合にはわずかに高い値が得られたが、酵素的褐変系で検出されたシグナルの g 値もほとんどこれらと一致し、有機化合物のフリーラジカルに基づくことが推定される。

2. 反応時間の影響

褐変反応系においても還元力ないし抗酸化力は反応初期から形成し、反応時間にともない多少変動した。フリーラジカルも Fig. 3 に示すように比較的短時間ですでに検出されたが、その安定性や生成速度などに関連し反応時間とともに変動することが推定される。そこで、酵素・カテコール系および酵素・カテコール・メチオニン系について、30 分、6 時間、12 時間および 24 時間反応させて生成した非透析性メラノイジンの ESR スペクトルを測定し、フリーラジカルの相対量を比較し、反応時間にともなう変動を追求した。

同一酵素液を用いたが反応系が異なり、また ESR スペクトルはほぼ同一条件ではあるが、利得は酵素・カテコール系 2.0×100 、酵素・カテコール・メチオニン系 7.9×100 で測定したので両褐変系の比較はむずかしく、Fig. 4 はそれぞれの反応系について相対量を比較するに過ぎない。

酵素・カテコール系では反応初期にフリーラジカルの量は多く 30 分で最高であって、それ以後時間とともに減少した。これに対して、共重合物を加えて強く褐変させた酵素・カテコール・メチオニン系では褐変が進行するにつれてフリーラジカルの量が多くなり、6 時間で最高に達したのち減少した。これらのことから、非透析性メラノイジンのフリーラジカルは少なくとも褐変反応の比較的早い時期に多くなり、それ以後は褐変が進んでも

Fig. 4. Change of relative concentration of free radical in the nondialysable melanoidin with reaction time.

As in Fig. 1, the nondialysable melanoidins were prepared by incubating the browning systems of "enzyme • catechol" and "enzyme • catechol • methionine" at 37°C for 0.5, 6, 12 or 24 hr and freeze-dried after dialysis. ESR spectra were estimated and relative concentration of free radicals was expressed as $(H_{msl})^2 \Delta h$ of the signal, where H_{msl} is maximum slope line-width and Δh is peak-height.

減少していくことが示唆される。

3. 酵素活性の影響

酵素の褐変反応は酵素の活性に著しく影響される。フリーラジカルの量が最高に達する時間も異なることをしばしば経験したが、この原因の一つに、用いた酵素の活性が異なることが推定される。そこで、フリーラジカルの生成におよぶ酵素活性の影響を試験した。

リンゴ酵素液 (酵素液 I) およびこれを 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7) で 10 倍に希釈した液 (酵素液 II) を常法どおりカテコールあるいはカテコール・メチオニンに反応させ、30 分、6 時間、12 時間、24 時間および 48 時間後非透析性メラノイジン粉末を調製し、フリーラジカルの測定に用いた。

Fig. 5 に酵素・カテコール系におけるフリーラジカルの相対量を示す。この場合酵素活性の強い酵素液 I では利得 1.0×100 、希釈酵素液 (酵素液 II) を用いたものでは 1.8×100 で ESR スペクトルを測定した。フリーラジカルの相対量は酵素液 I の場合 12 時間で最高となり、酵素液 II の場合はこれよりも遅く 24 時間で最高に達した。

一方、酵素・カテコール・メチオニン系の変動を Fig. 6 に示す。この場合、酵素液 I 褐変系では利得 2.1×100 、酵素液 II 系では 7.1×100 で ESR スペクトルを求めた。この場合も、酵素活性が強い場合にフリーラジカル量は早く最高に達し 6 時間であったが、弱い場合には 24 時間を要した。

これらの結果から、生成したメラノイジンのフリーラジカルの相対量は褐変過程のある時点で最高に達し、以

Fig. 5. Effect of the enzymatic activity on the amount of free radical in nondialysable melanoidin of "enzyme • catechol" system.

ESR measurements were carried out as in Fig. 4 using the enzyme solutions of different activity. Enzyme I: the same as in Fig. 4; enzyme II: enzyme I was diluted 10 times with 0.01M phosphate buffer (pH 7).

Fig. 6. Effect of the enzymatic activity on the amount of free radical in the non-dialysable melanoidin of "enzyme • catechol • methionine" system.

ESR measurements were carried out as in Fig. 5, but for the browning system of "enzyme • catechol • methionine."

後減少すると考えられる。したがって酵素活性が同一の場合、カテコール系よりもカテコール・メチオニン系のほうが多量のメラノイジンを生ずるため、最高点の過程に達するまでには長い時間を要すると思われる。一方同一の反応系においては、最高点の過程までには酵素活性の強いほうが当然速やかに到達することは容易に考えられる。

4. 基質濃度の影響

酵素的褐変系において褐変度のほか還元力や抗酸化能も基質濃度によって異なる。そこで酵素・カテコール系における反応液中のカテコールの濃度を $10^{-2}M$ ないし $10^{-6}M$ とし、24時間反応させて生成した非透析性メラノイジンについて ESR スペクトルを測定して Fig. 7 に示し、さらにこれから求めたフリーラジカルの相対濃度を Fig. 8 に示す。この場合、測定条件のうち利得を $7.1 \times$

Fig. 7. ESR spectra of the nondialysable melanoidins produced in the browning system of enzyme and catechol of different concentrations.

ESR measurements were carried out as in Fig. 1, but for the browning system of enzyme and catechol of different concentrations.

Fig. 8. Effect of the concentration of catechol on the amount of free radical in nondialysable melanoidin.

Relative concentration of free radical was calculated from ESR spectra of Fig. 7.

100 とした。

カテコールの濃度が 10^{-2}M および 10^{-3}M の場合は、そのメラノイジンはほとんど同じ強度の ESR スペクトルを示したが、 10^{-4}M 、 10^{-5}M および 10^{-6}M ではその吸収強度は急激に弱くなり、濃度の低下とともにフリーラジカルの相対量は減少した。

中村ら¹⁹⁾はカイコのチロシナーゼでは ESR シグナルは検出できず、この酵素中の銅は1個であるとしている。こにに対して Bouchilloux ら²⁰⁾ はマッシュルームのチロシナーゼに $g=2.00$ の ESR シグナルがあること

を認め、これが酵素中の2個の銅に基づくと考えた。リンゴ酵素により、とくに微量の 10^{-5}M ないし 10^{-6}M カテコールから得られたメラノイジンでも、高濃度のカテコールから生成されたものの ESR スペクトルと類似のシグナルが観察されているが、酵素中の Cu^{2+} のシグナルが加算されている可能性も考えられる。Fig. 2 に示すように、使用したリンゴ酵素標品には ESR シグナルは認められなかったが、さらに念のため利得を 3.2×1000 にあげて酵素ならびにメラノイジンについて ESR スペクトルを測定した。結果を Fig. 9 に示す。この場合にも酵素標品にはシグナルは観察されず、したがって微量のカテコールから生成したメラノイジンのシグナルも、それ自身の安定なフリーラジカルであることが確認された。

こうして少なくとも酵素的褐変により、カテコールから生成する非透析性メラノイジンのフリーラジカルの量は、基質カテコールの濃度に依存していることが示される。

また酵素的褐変系によって生成されたメラノイジンも、抗酸化能を示すことをすでに認めたが^{4,6)}、メラノイジン中のフリーラジカルがこれに関与することも考えられる。そこで、同じ非透析性メラノイジンについてリノール酸に対する抗酸化能を測定し Fig. 10 に示す。

これから明らかなように、カテコール濃度 10^{-2}M ないし 10^{-3}M の場合には生成した非透析性メラノイジンのフリーラジカルの相対濃度は高く、しかも比較的強い抗酸化能を示した。しかし 10^{-4}M 以下ではフリーラジカルの相対濃度も低く、抗酸化能もほとんど認められ

Fig. 9. ESR spectra of the nondialysable melanoidins produced from catechol of very low concentration.

ESR measurements were carried out as in Fig. 7, but with gain 3.2×1000 .

Fig. 10. Antioxidative activity of the nondialysable melanoidin on linoleic acid.

For the same melanoidins (1.5 mg/ml H₂O) as in Fig. 7, the antioxidative activity was determined by estimating peroxide content (O.D.₅₀₀) with the ferric-thiocyanate method.¹⁶⁾

ない。したがって褐色色素は種々の性質を有する可能性がある多数のポリマーから成る複合系であり、抗酸化能はそれらの総合的機能と考えられるが、フリーラジカルの濃度も抗酸化能に関係しているように思われる。

総 括

1) リンゴ酵素・カテコールおよびリンゴ酵素・カテコール・メチオニン両褐色系において生成した透析性ならびに非透析性成分の ESR スペクトルを測定し、フリーラジカルの存在を確認した。これらすべての成分のシグナルは反応時間に関係なくいずれも同一の g 値を示し、照合物質が DPPH の場合 2.004, Mn^{2+} の場合 2.007 であった。

2) 非透析性メラノイジンのフリーラジカルの量は時間とともに変化し、比較的早い時期に最高に達したのち

減少した。この変動は酵素活性にも影響され、活性が高い場合に早く最高に達した。

3) 酵素活性が一定のときはフリーラジカルの量は基質濃度に依存し、カテコール濃度が高いほど多かった。さらにメラノイジンのフリーラジカル量は、抗酸化能に関係しているように思われた。

文 献

- 1) 野村男次, 大村浩久: レダクトンの化学, 307 (1969), 内田老鶴園新社 (東京)
- 2) 尊田民喜, 荒巻輝代, 大村浩久: 栄養と食糧, 28, 151 (1975)
- 3) Kato, H., Noguchi, G. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 916 (1968)
- 4) 大村浩久, 尊田民喜, 浅田要一郎, 村中 誠, 橋英文: 食工誌, 22, 395 (1975)
- 5) Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agr. Biol. Chem.*, 32, 287 (1968)
- 6) 大村浩久, 尊田民喜, 浅田要一郎, 稲富良文, 橋英文: 食工誌, 22, 387 (1975)
- 7) Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Yokoyama, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 751 (1965)
- 8) Mason, H.S., Ingram, D.J.E. and Allen, B.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 86, 225 (1960)
- 9) Steelink, C. and Tollen, G.: *Biochem. Biophys. Acta*, 59, 25 (1962)
- 10) Lyons, M.T., Gibson, J.F. and Ingram, D.J.E.: *Nature*, 182, 1003 (1958)
- 11) O'Meara, J.P., Truby, E.K. and Shaw, J.M.: *Food Res.*, 22, 96 (1957)
- 12) 大村浩久, 尊田民喜: 栄養と食糧, 22, 497 (1969)
- 13) 大村浩久, 尊田民喜: 栄養と食糧, 23, 367 (1970)
- 14) 大村浩久, 尊田民喜, 井上浩輔: 栄養と食糧, 24, 242 (1971)
- 15) 尊田民喜, 大村浩久: 栄養と食糧, 26, 531 (1973)
- 16) Commoner, R., Townsend, J. and Pake, G.E.: *Nature*, 174, 689 (1954)
- 17) 畑中千秋, 大村浩久: 栄養と食糧, 26, 457 (1973)
- 18) 渡辺 格, 島内武彦: 生物物理化学実験法, 292 (1962), 培風館 (東京)
- 19) Nakamura, T. and Sho, S.: *J. Biochem.*, 55, 510 (1964)
- 20) Bouchilloux, S., McMahon, P. and Mason, H.S.: *J. Biol. Chem.*, 238, 1699 (1963)

(昭和50年4月26日受理)