モデル系でのフラボノールによるたんぱく質の非酵素的褐変

五十嵐喜治, 実戸則子, 保井忠彦

(山形大学農学部農芸化学科)

昭和 53 年 5 月 15 日 受 理

Nonenzymic Browning Reaction of Protein with Flavonols by Model Systems

Kiharu IGARASHI, Noriko SHISHIDO and Tadahiko YASUI

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka-shi, Japan*

Nonenzymic browning reactions of casein (C) or N-acetyl casein with various phenolics including flavonols were studied by model systems kept in pH 6.8.

The degrees of the browning at 470 nm of each reaction product were as follows: C+myricetin > C+quercetin > C+catechin > C+phloroglucinol $\geq$ C+azaleatin > C+caffeic acid > C+dihydroquercetin > C+chlorogenic acid > C+protocatechuic acid. In C+rutin, C+quercitrin, C+rhamnetin and C+luteolin, the browning was weak. These results suggested that the browning of casein was strengthened by both hydroxyl groups at 3- and 7-positions on flavone ring possessing hydroxyl groups at 3'- and 4'-positions.

Available lysine decreased by 18% for reaction product (C_1) prepared by heating casein with quercetin and 10% for reaction product prepared by mixing casein with browned solution from quercetin which was heated previously. N-acetyl casein heated with quercetin browned, too. These results suggested that a part of the browning of casein might be given without the interaction of ϵ -amino groups of casein with quercetin, its oxidation products or brown pigment produced from these compounds.

In elution patterns of C_1 and the mixture composed of casein and browned solution from quercetin on Sephadex G-150 column, the peaks of nitrogen and brown color overlapped. From this result, it was considered that casein molecule combined strongly with quercetin, its oxidation products or brown pigment produced from these compounds. (Received May 15, 1978)

緑葉などから抽出・分離したたんぱく質は概して着色しているものが多く, その着色の多くは緑葉などに存在するコーヒー酸, クロロゲン酸などによると推定されている^(1,2). 一方, 著者らは先に, 赤クローバー天日乾燥葉から抽出・分離したたんぱく質にみられる着色の一部は, ケルセチンなどのフラボノールによる可能性を推定し⁽³⁾, さらにはモデル系で, カゼインはケルセチンにより微酸性, 加熱下で褐変し, またその配糖体ルチン, ヒペリン, イリケルシトリンではほとんど褐変しないことを報告した⁽⁴⁾. このことはフラボノールの 3 位が遊離の方が反応性に富むことを予想させた.

本報告では植物界に広く存在するフラボノイドを用い

て, 微酸性, 加熱下でのフラボノイドによるカゼインの褐変についてモデル系で比較検討し, その化学構造と褐変との関連について明らかにしようとした. さらにはカゼインの褐変機構を知るための一助として, ケルセチン, その酸化分解物や酸化褐変物質と, カゼインや N-アセチルカゼインとの反応性を比較検討した.

なお, フラボノールの中性, アルカリ性での自動酸化については一部, Nordström ら⁽⁵⁾によって, また, フラボノールの化学構造と褐変との関連については Roux ら⁽⁶⁾によって報告されているが, 微酸性での加熱で, フラボノールによるたんぱく質の褐変と化学構造との関連, およびその機構についてはほとんど報告をみない.

I : Catechin

II : Dihydroquercetin

III :

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Quercetin	OH	H	H	OH	H
Kaempferol	OH	H	H	H	H
Myricetin	OH	H	H	OH	OH
Azaleatin	OH	CH ₃	H	OH	H
Rhamnetin	OH	H	CH ₃	OH	H
Quercitrin	O-Rhamnose	H	H	OH	H
Rutin	O-Rutinose	H	H	OH	H
Luteolin	H	H	H	OH	H

実験材料および方法

1. 試薬 カゼイン (Hammersten), フロログルシノールはメルク製, ケルセチン, コーヒー酸, ケルシトリン, ルチン, D(+)-カテキンは東京化成工業製, クロロゲン酸は Sondheimer ら⁽⁷⁾の方法によって生コーヒー豆より分離したもの, ケンペロールはワラビより単離したアストラガリンを加水分解して得たもの, ラムネチンは Jurd⁽⁸⁾の方法により合成したもの, ルテオリンは山口大学農学部柳下一愛教授のご好意により提供されたもの, ジヒドロケルセチンは Geisman ら⁽⁹⁾の方法により合成したもの, ミリセチンは本学部安江保民教授のご好意により提供されたものを用いた. アザレアチンは次のようにして合成したものを用いた. まずケルセチンをビリジン中無水酢酸でアセチル化し, 得られた反応混合物から, ケルセチン-3,7,3',4'-テトラアセテートを単離した. 次にこれをジアゾメタンでメチル化し, 5-メトキシ-3,7,3',4'-テトラアセチルケルセチンを得た. 以後は Jurd⁽⁸⁾のラムネチンテトラアセテートからのラムネチン合成法に準じた. 得られた標品の mp, 元素分析値, UV スペクトルは文献値⁽¹⁰⁾とよく一致した. N-アセチルカゼインの調製は堀米の方法⁽¹¹⁾に準じて行なった.

2. 反応生成物の調製 カゼインの褐変に対する種類のフェノール化合物の影響を調べるため, 反応生成物

a :

Erlenmeyer flask (500 ml)

Added 2g of casein (or N-acetyl casein*)
Dissolved with 30 ml of 1/20N NaOH
Added 150 ml of phosphate buffer (pH 6.8)
Added 0.1mM of quercetin preliminarily
dissolved with 40 ml of MeOH

Incubated at 80°C for 24hr in an oven

Added 100ml of EtOH

Precipitated at the isoelectric point by addition of 5% HCl

Centrifuged

Precipitate

Washed successively with EtOH and Et₂O
(Filtrate was free from reddish-brown color)

Reaction Product (C₁ or N₁**)

b :

Erlenmeyer flask (500 ml)

Added 0.1mM of quercetin preliminarily
dissolved with 40ml of MeOH
Added 150 ml of phosphate buffer (pH 6.8)
Added 30 ml of 1/20N NaOH

Incubated at 80°C for 24hr in an oven

Cooled to room temperature

Brown Solution

Added 2g of casein (or N-acetyl casein*)
preliminarily dissolved with 30 ml of
phosphate buffer (pH 6.8)

Stirred for 2hr at room temperature

Added 100ml of EtOH

Treated according to the procedure described above

Reaction Product (C₂ or N₂)

Fig. 1. Preparation Scheme for Reaction Products from Quercetin and Casein or N-Acetyl Casein. *The amount of N-acetyl casein equal to 2g of casein in nitrogen content was added. **In the case of the preparation of N₁, N-acetyl casein was first dissolved with phosphate buffer (pH 6.8), and after then, 1/20N NaOH was added.

は次のようにして調製した. まず, カゼイン 1g を 1/20 N NaOH 15 ml に溶解し, これに 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8) 75 ml を加えてよく混合し, 続いて 300 ml の二口丸底フラスコに移した. この際の pH は 6.8 であった. 次にメタノール 20 ml で溶解した各種フェノール化合物 0.1mM を加え, 湯せん中, 80°C で空気を吹き込みながら還流下で 10 時間加熱した. 反応終了後, メタノール 50 ml を加えてよく混合し, 未反応のフェノール化合物が沈澱として析出する場合はこれを溶解し,

その後、5% 塩酸を加えて等電点で反応生成物を沈澱させた。これを遠心分離し、沈澱部をガラスフィルター上に移し、濾液に着色が認められなくなるまでエタノールで、ついでジエチルエーテルで洗浄し、真空デシケター中で乾燥して標品とした。一方、ケルセチンとカゼインまたは N-アセチルカゼインから調製した反応生成物の 2 者について褐変度などを比較する場合は Fig. 1a に従い、ケルセチンのみを加熱したとき、その溶液に遊離のケルセチンが認められなくなるような加熱時間、すなわち 24 時間（ガスクロマトグラフィーにより確認）、乾燥器中で反応させて調製した反応生成物、それぞれ C_1, N_1 を用いた。なお、N-アセチルカゼインを使用する場合は Fig. 1a で、まず N-アセチルカゼイン（使用量は窒素含量において、カゼインの場合と等しくした）を緩衝液に溶解し、次に 1/20N NaOH を加えて同様に操作した。また、ケルセチンの酸化褐変物質とカゼインまたは N-アセチルカゼインとの反応性について検討する場合は Fig. 1b に示すように、あらかじめケルセチンを酸化褐変させ、放冷後、これにカゼインまたは N-アセチルカゼインを添加し、さらに攪拌してから Fig. 1a と同様に操作して得た反応生成物それぞれ C_2, N_2 を用いた。

3. 褐変度、有効性リジンの測定 褐変度は反応生成物を pH 8.4 のリン酸緩衝液に溶解し、これを No. 2 の濾紙で濾過し、得られた濾液の 470 または 520 nm における吸光度を液層 1 cm のセルで求め、窒素 156.7 mg が 100 ml に溶解しているときの読み値として表わした。なお、反応生成物は緩衝液に完全に溶解し、溶液はほぼ透明で、濾過前後における吸光度には差がなかった。また、有効性リジンの定量は Carpenter の方法⁽¹²⁾ によった。

4. 反応生成物のゲル濾過 C_1, C_2 は約 80 mg を、 N_1, N_2 は約 50 mg を pH 8.0 硼酸緩衝液 10 ml に溶解し、その 8 ml を同緩衝液で調製したセファデックス G-150 のカラムでゲル濾過した。溶出には同緩衝液を用い、カラムの大きさは 2.7 cm × 80 cm とした。また分取量は 10 g とした。得られた各フラクションの褐変度は 470 nm で測定し、窒素含量はケールダール法で測定した。

5. 酸化褐変物質とたんぱく質との相互作用 ケルセチンとの加熱によるカゼインおよび N-アセチルカゼインの着色の一部は、あらかじめケルセチンやその酸化分解物が酸化褐変し、これにカゼイン、N-アセチルカゼ

インが反応して付与される場合が考慮されるので、次のような実験を行ない、その可能性について検討した。すなわち、Fig. 1b に従い、褐変溶液を調製した。また別に、Fig. 1a においてケルセチン含有メタノールを添加するかわりにメタノールを添加して同様に操作し、等電点沈澱物（カゼインより得たものを加熱カゼイン、N-アセチルカゼインより得たものを加熱 N-アセチルカゼインとする）を分離した。次に 5 倍に濃縮した褐変溶液 5 ml と加熱カゼインまたは加熱 N-アセチルカゼイン溶液 5 ml を室温下で 10 分間攪拌した。その溶液はほぼ透明であったが、No. 2 の濾紙で濾過後、その 8 ml を前実験 4 と同条件下でゲル濾過し、それぞれの場合についてたんぱく質と褐変物質のカラム上での挙動を検討した。なお、攪拌にさいし、用いたたんぱく質溶液の調製は次のようにして行なった。すなわち、加熱カゼインの場合はその 70 mg を、加熱 N-アセチルカゼインの場合はその 50 mg を pH 6.8 リン酸緩衝液 5 ml に溶解した。また、対照として、それぞれについて濾過した溶液や濃縮した褐変溶液も同様にゲル濾過した。

実験結果および考察

1. 褐変度と化学構造

カゼイン (C) と各種フェノール化合物を空気下で 10

Table I. Comparison of the Browning in Reaction Products

	(O. D. at 470 nm) × 10 ⁻³	(O. D. at 520 nm) × 10 ⁻³
Casein + chlorogenic acid	521	396
Casein + caffeic acid	751	413
Casein + catechin	850	510
Casein + quercetin	941	724
Casein + kaempferol	206	174
Casein + myricetin	1505	1007
Casein + dihydroquercetin	590	—
Casein + protocatechuic acid	314	260
Casein + phloroglucinol	780	331
Casein + azaleatin	778	510
Casein + rhamnetin	206	174
Casein + quercitrin	78	55
Casein + rutin	47	33
Casein + luteolin	196	174

Reaction product containing 156.7 mg of nitrogen (g casein = N 156.7 mg) was dissolved in 100 ml of phosphate buffer (pH 8.4) and the optical density of the solution was read in a cuvette having light path of 1 cm against a buffer blank.

時間加熱して得た反応生成物の褐変度は Table I に示した。ケルセチン(Q)による場合は、フェノール化合物として、広く酵素的褐変に関与することが知られているコーヒー酸、クロロゲン酸(Ch), カテキンなどによる場合よりも高かった。なお、C+Ch では若干緑色を呈していたが、緑色に基づく 680 nm 付近の吸光度は 470, 520 nm におけるいずれの吸光度よりも低かったため、この場合も褐変度はこれらの波長で比較した。一方、ケルセチンはカゼインとの反応条件と同条件下で 4~5 時間加熱するとその一部がプロトカテキュ酸とフロログルシノールに分解することを確認しているため、これらの化合物とカゼインから調製した反応生成物の褐変度をそれぞれ、C+Q と比較した。いずれの場合も C+Q より低かったが、それぞれの和は C+Q より多少大きく、カゼインの着色はすべてこれらの酸化分解物によってのみ付与されるようにも思われた。しかし、ケルセチンとカゼインを空気下で 10 時間反応させた溶液には未反応のケルセチンが多少残っており (TLC で確認)、また別に、等モルのケルセチン、プロトカテキュ酸、フロログルシノールをそれぞれ、pH 6.8 リン酸緩衝液中、80°C の乾燥器中で 48 時間加熱したところ、それぞれの場合の 470 nm での吸光度の比が 5.3:1.0:2.9 で、ケルセチンの場合は後 2 者の和よりかなり大きかった。したがって、カゼインの着色はすべてプロトカテキュ酸とフロログルシノールによってのみ付与されるとは考えがたい。よって、着色はこれらの酸化分解物他に、ケルセチンまたは別の酸化分解物によっても付与される可能性が考えられた。なお、ケルセチンを加熱した場合、プロトカテキュ酸とフロログルシノールの量はほぼ 24 時間でピークに達し、ケルセチンは消失したので (ガスクロマトグラフィーにより確認)、おおよそ 24 時間後に生成されるこれらの酸化分解物もすべて加熱を受け、褐変しうる場合のあることを考慮して 48 時間加熱し、3 者の褐変度を比較した。

ケルセチンの 3 位の配糖体ルチン、ケルシトリンでは最も褐変度が低く、また 3 位の水酸基が水素で置換されたルテオリン、7 位の水酸基がメトキシル基で置換されたラムネチンでも褐変度は他に比し、概して低かった。5 位の水酸基がメトキシル基で置換されたアザレアチンでは褐変度がかなり高かった。これらの結果より、フラボン骨格で 3', 4' 位が水酸基の場合、褐変は 3 位と 7 位の水酸基によって増強されることが明らかにされた。

Table II. Properties in Each Reaction Product

	(O. D. at 470 nm) $\times 10^{-3}$	Available lysine (% as dry weight)
Heated casein	—	7.3
Casein+quercetin (C ₁)	3342	6.0
Casein+oxidized quercetin(C ₂)	1021	6.6
N-Acetyl casein+quercetin(N ₁)	1270	—
N-Acetyl casein+oxidized quercetin (N ₂)	941	—

Fig. 2. Gel Filtration of Heated Casein, Brown Solution and Reaction Products Obtained from Casein-Quercetin or Casein-Brown Solution (C₁ or C₂) with Sephadex G-150. a: ○, nitrogen of heated casein; ●, O. D. of brown solution. b: ○, nitrogen of C₁; ●, O. D. of C₁. c: ○, nitrogen of C₂; ●, O. D. of C₂.

さらに、フラボン骨格で 3, 5, 7 位に水酸基があった場合、B 環の水酸基の数と褐変度との関係を検討した。褐変度はミリセチンで最も高く、次いでケルセチン、ケンペロールの順であった。また、ケルセチンの 2 位と 3 位の 2 重結合を還元したジヒドロケルセチンではケルセチンより褐変度が低かった。

2. 反応条件と反応生成物の褐変度、有効性リジンとの関係

結果は Table II に示した。カゼインとケルセチンを最初から加熱した場合の反応生成物 (C₁) の褐変度は、あらかじめケルセチンのみを加熱して得られた褐変溶液とカゼインより調製した反応生成物 (C₂) のそれより高

Fig. 3. Gel Filtration of Heated N-Acetyl Casein, Brown Solution and Reaction Products Obtained from N-Acetyl Casein-Quercetin or N-Acetyl Casein-Brown Solution (N_1 or N_2) with Sephadex G-150. a : $\circ$, nitrogen of heated N-acetyl casein; $\bullet$, O.D. of brown solution. b : $\circ$, nitrogen of N_1 ; $\bullet$, O.D. of N_1 . c : $\circ$, nitrogen of N_2 ; $\bullet$, O.D. of N_2 .

かった。有効性リジンは C_1 が C_2 より若干少なく、またいずれの場合も加熱カゼインより若干少なかった。したがって、カゼインの褐変時にはわずかな ϵ -アミノ基の減少を伴い、またその傾向は褐変度が高くなるにつれて大きくなることが予想された。また、カゼインはケルセチンの酸化褐変物質と共存すると、室温下でも容易にこれらと反応して褐変することが示唆された。一方、 ϵ -アミノ基をアセチル基で保護した N-アセチルカゼインは最初からケルセチンを添加し、反応させても、また褐変溶液にこれを添加して反応させても、分離した反応生成物にはいずれの場合も褐変が認められた。この結果は褐変には必ずしも ϵ -アミノ基の関与を必要としないことを示唆している。

3. ゲル濾過による反応性の検討

前述の加熱カゼインと褐変溶液、 C_1 , C_2 のゲル濾過における挙動はそれぞれ、Fig. 2a, Fig. 2b, Fig. 2c に示した。 C_1 , C_2 のいずれにおいてもフラクション 15 で窒素のピークと着色ピークが一致した。また C_1 , C_2 のフ

Fig. 4. Gel Filtration of the Mixtures Composed of Brown Solution and Heated Casein or Heated N-Acetyl Casein (M_1 or M_2) with Sephadex G-150. a : $\circ$, nitrogen of M_1 ; $\bullet$, O.D. of M_1 . b : $\circ$, nitrogen of M_2 ; $\bullet$, O.D. of M_2 . $\circ$: Open circle overlapped over closed circle.

ラクション 15 における吸光度 (O.D.) の窒素 (mg) に対する比率 (O.D./mg) はそれぞれ 0.50, 0.14 であった。なお、加熱カゼインの窒素のピークはフラクション 16 に認められた。これらの結果は、酸化褐変物質がカゼインと強固に結合していること、またケルセチンまたはその酸化分解物はあらかじめカゼインに結合し、後に酸化重合して着色を付与する以外、あらかじめ酸化重合してから着色を付与する場合のあることを示唆した。加熱 N-アセチルカゼインと褐変溶液、 N_1 , N_2 のゲル濾過の結果はそれぞれ Fig. 3a, Fig. 3b, Fig. 3c に示した。 N_1 , N_2 のいずれにおいても窒素と着色のピークは一致せず、N-アセチルカゼインはケルセチンやその酸化分解物と結合したり、あるいは酸化褐変物質と結合したりする機会がカゼインに比し、少ないように思われた。

褐変溶液と加熱カゼインまたは加熱 N-アセチルカゼインを攪拌して得た溶液 M_1 , M_2 のゲル濾過の結果はそれぞれ、Fig. 4a, Fig. 4b に示した。 M_1 ではフラクション 15 で窒素と着色のピークが一致し、カゼインは室温下での攪拌時に酸化褐変物質と結合しうる場合のあることが示唆された。 M_2 ではピークが一致せず、酸化褐変物質と結合している N-アセチルカゼインは少ないように思われた。

要 約

微酸性, 加熱下でのフラボノールによるたんぱく質の非酵素的褐変について検討した.

1. ケルセチンによるカゼインの非酵素的褐変はコヒー酸, クロロゲン酸, カテキンによる場合よりも大きかった. また, 褐変度はフラボン骨格で 3', 4' 位に水酸基がある場合, 3 位と 7 位の水酸基によって増強された. また 3, 5, 7, 4' 位に水酸基がある場合, 4' 位に隣接する水酸基の数によって影響された. 2 位と 3 位の 2 重結合を還元した場合, 褐変度は減少した.

2. N-アセチルカゼインも, ケルセチン, その酸化分解物または酸化褐変物質による褐変が認められ, 褐変には必ずしも ε-アミノ基の関与を必要としないように思われた. また, ケルセチンの酸化褐変物質は室温下でもカゼインや N-アセチルカゼインに着色を付与した.

3. カゼインとケルセチンとの反応生成物や, 褐変溶液との混合溶液はゲル濾過で窒素と着色のピークが一致し, カゼインはケルセチン, その酸化分解物または酸化褐変物質と強固に結合するように思われた. N-アセチルカゼインではピークが一致せず, カゼインに比べて反応性に乏しいものと思われた.

終りにのぞみ, ルテオリンを提供くださった山口大学

農学部, 柳下一愛教授, ケンペロール, ミリセチンを提供くださった本学農学部, 安江保民教授, 貴重なご助言をくださった本学農学部, 佐々武史教授, 元素分析をお願いした東京大学分析センター, ならびにご便宜をはかってくださった東京大学農学部, 内藤 博教授に深謝いたします.

本報告の一部は第 78 回日本農芸化学会東北支部会で発表した.

- (1) 堀米隆男, 神立 誠: 農化, **38**, 121 (1964).
- (2) 堀米隆男, 神立 誠: 農化, **40**, 246 (1966).
- (3) 五十嵐喜治, 阪本康夫, 保井忠彦: 農化, **50**, 67 (1976).
- (4) 五十嵐喜治, 鈴木正子, 真島朋子, 保井忠彦: 農化, **52**, 209 (1978).
- (5) C. G. Nordström and C. Majani: *Suomen Kemistilehti*, **B 38**, 239 (1965).
- (6) D. G. Roux and S. E. Drewes: *Chem. Ind. (London)*, **1965**, 1442.
- (7) E. Sondheimer, C. D. Szymanski and J. W. Corse: *J. Agric. Food Chem.*, **9**, 146 (1961).
- (8) L. Jurd: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5531 (1958).
- (9) T. A. Geisman and H. Lishner: *ibid.*, **74**, 3001 (1952).
- (10) E. Wada: *ibid.*, **78**, 4725 (1956).
- (11) 堀米隆男: 栄養と食糧, **26**, 257 (1973).
- (12) K. J. Carpenter: *Biochem. J.*, **77**, 604 (1960).