乳製品のアミノ カルボニル反応に関する研究 (第 8 報)*

尿素-ラクトース系の褐色化機構 (その 2)

緩和条件における Urea-lactoside の生成条件とその理化学的性質

足 立 達 (東北大学農学部畜産利用学研究室)

昭和 31 年 6 月 12 日 受理

前報では、加熱牛乳のアミノ カルボニル反応の一モデル系として採用した尿素-ラクトース系反応において、緩和条件下に urea-lactoside が生成することを認めたが⁽¹⁾、この尿素-ラクトース系のアミノ・カルボニル反応は、加熱牛乳のアミノ カルボニル反応の主反応要因の 1 つを占めるので、この urea-lactoside の生成は加熱牛乳の本反応の初期反応解釈の上に有力な手懸りを提供するものと考えられた。しかし、更にこの urea-lactoside の生成条件、物理化学的諸性質を明かにすることは、窒素配糖体の生成から melanoidin の形成に至る一連のアミノ・カルボニル反応において、特に HODGE が主唱するよう⁽²⁾に、初期反応における窒素置換配糖体生成とその AMADORI 転位生成物の 1-amino-1-deoxy-2-ketose 生成反応検討の基礎を与えるものとして重要な意義を持つであろう。

一般に還元糖とアミノ化合物との間のアミノ カルボニル反応には、初期反応として窒素配糖体の生成がほぼ確実視されているが、この生成条件はそれぞれ相異っていて、取扱った窒素配糖体の未知物質に起因する為か、1, 2 の報告を除き物質の確認に不明瞭な点を残しているので、なお検討すべき問題が提起されているといわねばならない。既に井上、小野寺、北岡、獅山は、緩和条件下の窒素配糖体の生成を *p*-sulfanilamide とアルドヘキソース、アルドペントースとを用いて、生成条件の詳細な検討を行い、*p*-sulfanilamide-*N*-glycoside は pH 5 以下の酸性側において特に著しいことを認め⁽³⁾、又、野村はグリシン-グルコース系の褐色化機構の一連の研究の中で、加熱と共に窒素配糖体と推定される物質が経時的に増加することを明かにしているが^(4,5)、この場合も主として稀クエン酸溶液中で実験が行われた。しかるに、最近 SCHROEDER, IACOBELLIS, SMITH 等は、アルカリ性緩衝液中におけるアミノ酸-グルコース溶液の高温加熱試料をペーパークロマトグラフ的に検討し、新たなニンヒドリン陽性のスポットを検出したが⁽⁶⁾、前記の諸成績と併せ考えて興味を惹く事実である。

一方、urea-glycoside の合成は SCHOORL⁽⁷⁾、HELFRICH と KOSCHE⁽⁸⁾、又 ERICKSON と KEPS⁽⁹⁾ 等によつて試みられて来たが、いずれも酸性触媒存在下の室温近くの比較的緩和な温度で容易に合成されている。最近この urea-glycoside を含めて一般にアミンと還元糖との反応によって生ずる amine-glycoside は、アミノカルボニル反応検討への新な道を拓くものとして注目検討されているが⁽¹⁰⁾、この反応においては一連の経過反応として AMADORI 転位、更にこのカルボニル基とアミンとの複雑な反応等が期待されている。

本論文は、以上の知見に基づき urea-lactoside の生成条件とその構造検討を中心として取扱ったものである。

実 験

試 薬 Urea-lactoside は前報において示したように⁽¹⁾、褐色化した緩和条件下の尿素-ラクトース系に生成したものを分離精製して使用した。氷酢酸から再結し、m. p. 235°. 酢酸：ブタノール：水 (1:4:2) によって 3 重展開して得たペーパークロマトグラム上で単一のスポットを与えた。又尿素、グルコース、ガラクトース等も前報と同様であった。

実験方法 個個の実験方法に関してそれぞれの箇所で詳述するが、これらを通じて主として次のようなペーパークロマトグラフを採用した。Urea-glycoside の呈色試薬としては *p*-dimethylamino benzaldehyde、糖の呈色指示薬として aniline hydrogen phthalate とレゾルシン試薬を使用し、展開溶媒にはブタノール：酢酸：水 (4:1:2) を urea-glycoside の検索に、ブタノール：ピリジン：水 (3:2:1.5) を糖の検索に用いた。なお使用濾紙は東洋濾紙 No. 50、展開距離は 35 cm。糖検討の場合には 1 次元室温上昇 1 回展開を、urea-glycoside

* Studies on Amino-Carbonyl Reaction of Milk Products. Part VIII. The Mechanisms of Browning in Urea-lactose System (2) On the Condition for the Formation and the Some Properties of Urea-lactoside.

By Susumu ADACHI (Laboratory of Animal Products Technology, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

の際には特記しない限り 1 次元上昇 3 重展開を行った。

I. 緩和条件下の Urea-glycoside の生成条件

前報では尿素・還元糖系の自然放置の儘の状態における urea-glycoside の生成を示したが⁽¹⁾, 唯, 溶液中の方が半乾燥状態においてよりも, その生成が速かであることを指摘したのみであったので, 更にその生成条件を pH, 触媒等に亘って検討した。

1. Urea-glycoside の生成と pH : M/2 糖類溶液 50 cc に尿素 750 mg を加えて溶解し, pH を N/10 HCl, N/10 NaOH の少量添加によって調整し, トルエン少量を添加して 37° の恒温器に放置し, 随時取り出しておのおののペーパークロマトグラムを求めた。その結果は第 1 表に示す通りである。即ちラクトース, グルコース, ガラクトース共に pH 3.6 以下の酸性溶液中で urea-glycoside を生成するが, pH の低下と共にその生成速度が大なることを認めることが出来る。

第 1 表 Urea-glycoside の生成と pH

混 合 系	pH	経 過 日 数				
		5	10	16	23	30
尿素-ラクトース	9.0	—	—	—	—	—
	6.0	—	—	—	—	—
	3.6	—	—	—	±	+
	1.5	+	++	+++	+++	+++
	9.0	—	—	—	—	—
尿素-グルコース	9.0	—	—	—	—	—
	6.0	—	—	—	—	—
	3.6	—	—	—	±	+
	1.5	+	++	+++	+++	+++
	9.0	—	—	—	—	—
尿素-ガラクトース	9.0	—	—	—	—	—
	6.0	—	—	—	—	—
	3.6	—	—	—	±	+
	1.5	+	++	+++	+++	+++
	9.0	—	—	—	—	—

第 2 表 Urea-glycoside の生成と酸

混 合 系	酸	経 過 時 間 (時 間)		
		4	10	20
尿素-ラクトース	塩酸	±	±	+
	磷酸	+	++	+++
	酢酸	—	—	±
	乳酸	—	—	±
	クエン酸	±	+	++
尿素-グルコース	塩酸	±	±	+
	磷酸	+	++	+++
	酢酸	—	—	±
	乳酸	—	+	+
	クエン酸	—	+	++

第 1 図 Urea-lactoside に対するエムルシンの作用のペーパークロマトグラフィ

展開溶媒……ブタノール: 酢酸: 水 (4: 1: 2) 室温上昇 1 回展開

A, B, C, E……aniline hydrogen phthalate } 発色剤

D, F……*p*-dimethylamino benzaldehyde }

R_F { 1. urea-lactoside, 2. ラクトース, 3. urea-glucoside

4. グルコース, 5. ガラクトース

2. Urea-lactoside の生成と酸: 井上等は窒素配糖体の合成にしばしば使用される触媒酸として, 塩酸, 酢酸を選び, これらの *p*-sulfanilamide-*N*-glycoside の生成に対する影響を検討しているが⁽³⁾, ここでは生化学的に関係の深い酸を使用し, 糖類としてグルコース, ラクトースを選び, それぞれの urea-glycoside の生成度を比較した。即ち, M/20 の上記の糖類溶液 10 cc に, 7 N の酸を 0.2 cc 添加して 37° の恒温器に入れ, 経時的に取り出してペーパークロマトグラフ展開を行った。この結果は第 2 表に示す通りで, 磷酸, クエン酸が最も生成度が大であり, 塩酸, 乳酸, 酢酸の順に小となる。糖類間における生成度の差異はここでもなお明瞭には認められないが, グルコースがラクトースに比較して速かなように推定され, 前報の結果と一致する。

II. Urea-lactoside の構造と理化学的性質

既に SCHOORL は urea-lactoside の 2, 3 の性質について言及しているものの⁽⁷⁾, 化学構造を含めてその詳細な諸性質については以後未検討の儘放置されて, 褐色化した尿素・ラクトース系中の urea-lactoside の示す諸反応を十分に解釈することが不可能であった。

しかも一般のアミノ化合物と糖とのアミノカルボニル反応において窒素配糖体の形成とその AMADORI 転位が初期反応として期待されているので, この意味からも, 分離した上記 urea-lactoside の諸性質の検討を通じて urea-lactoside の構造を明かにしようとした。

1. β -Glucosidase (エムルシン) の作用

用: 扁桃から TAUBER⁽¹¹⁾ 法に従って調整したエムルシンを pH 4.4 の M/10 酢酸緩衝液に 0.2% になるように溶解し, 不溶分を遠心分離によって除去した後使用した。このエムルシンを松田, 麻生が kojibiose, sakebiose の検討に使用した方法⁽¹²⁾

に準じてラクトースを対照として urea-lactoside に作用させた。その結果は第 1 図に示す通りで *p*-dimethyl-amino benzaldehyde 発色剤によって urea-lactoside はエムルシンの水解作用を受けて分解し、分解生成物は R_L の点から urea-glucoside のそれに一致するのが示され、更に又、aniline hydrogen phthalate によってエムルシン分解を蒙ったラクトースの生成物と同様のスポットを示した。したがって、この成績から尿素-ラクトースから生じた糖はガラクトースであると考えられるので、ラクトース部分は β 型構造を有し、又 urea-glucoside が水解されない点から尿素-ラクトース結合は α 型であるとの推定も可能である。

2. 赤外線スペクトルの測定：糖類及び配糖体の化学構造決定に赤外線吸収スペクトルが使用されるようになったのは最近の事に属するが、 α , β 構造判定にも極めて有効な手段であることが判明して来ているので^(13,14), 本 urea-lactoside の構造決定の一助に赤外線スペクトル測定を採用した。ただ現在迄に解析された配糖体はメチル誘導体が大部分で、その他の例は非常に少く、僅かに R. KUHN らが人乳から分離した配糖体様物質の解析例⁽¹⁵⁾を見るのみであった。ここに使用した装置は Perkin-Elmer 21. 型で L. P. KUHN の方法⁽¹⁶⁾に準じて測定した。即ち試料 40 mg, 又対照として α -ラクトース 10 mg を磨砕して Nujol paste として試料を調整しスペクトルを得た。この測定条件は結果と共に第 2 図に示す。即ち、糖類の構造解析に使用される特異吸収範囲 730~960 cm^{-1} において、urea-lactoside は約 775, 875, 890 cm^{-1} 附近に特異吸収を示すが、これは α -ラクトースの特異吸収と酷似する。なお L. P. KUHN はラクトースのスペクトルを示しているが 775 cm^{-1} 附近の吸収を除いては本成績と一致しているので α , β の区別は記載しなかったもののこの物質は α -ラクトースと推定される。又、ラクトースについての赤外線解析が不十分の現在、決定的ではないがこの両吸収の中 890 cm^{-1} 附近のものは β -ガラクトースにより、875 cm^{-1} 附近のものは α -グルコースによるものと考えられるので、以上の事実から本 urea-lactoside は α -ラクトースのグリコサイドと推定することが出来、エムルシン分解の結論とも一致する。更にこのスペクトルはフラノース誘導体、又デオキシ糖誘導体のスペクトルを与えているとは認められないので⁽¹⁴⁾, 本 urea-lactoside が AMADORI 転位生成物であるとは認め難く、1545, 1660 cm^{-1} の吸収は、それぞれ尿素の $\delta_{\text{N-H}}$, $\nu_{\text{C=O}}$ によるものと判断される。

3. 物理的・化学的性質：本物質は白色の稜晶で、水に易溶、メタノール、エタノールに難溶、石油エーテ

第 2 図 Urea-lactoside の赤外線吸収スペクトル

1. Nujol 2. ラクトース 3. Urea-lactoside

測定条件：プリズム, NaCl., resolution 927, response 1:1, gain 5, speed 5, suppression 2, scale cm^{-1}

ル、エーテル、クロロホルム、氷酢等には不溶である。水に対する溶解性は α -ラクトースよりも大である。フェーリング液を還元するが冷却時には殆ど還元しない。

(i) *o*-ジニトロベンゼン反応： 試料約 10 mg を 5 cc の水に溶解し、*o*-ジニトロベンゼン結晶約 5 mg を加えた後 10% NaCO_3 溶液 0.5 cc を添加して沸水中に加熱する。経時的に取り出して着色の変化を検したが、20 分間加熱しても黄橙色が僅かに濃化するのみで盲験物と比較して殆ど差異を認めなかった。この反応は diketopiperazine 反応としての他に、AMADORI 転位生成物の特有反応として著名で、紅紫色に呈色すれば本転位物の存在を指示するものである⁽¹⁷⁾。なおここに使用した *o*-ジニトロベンゼンは *o*-ニトロアニリンをカロー酸化によって *o*-nitro nitrosobenzene に導き、これを硝酸置換して合成した。m. p. 118.5°, 文献値 118°。

(ii) SELIWANOFF 反応： 常法に従って行ったが、呈色せず長時間の加熱によって僅かに黄変するのみである。

(iii) ジフェニルアミン反応： 常法通り行ったがラクトースと同様に紫青色に呈色して特別な変異は認められない。

(iv) Dische-Borenfreund 反応 常法⁽¹⁸⁾にしたがって発色させたもののスペクトルをベックマンの分光光度計によって測定したが、ケトース特有の 640 m μ の極大吸収は認められなかった。

以上の諸呈色反応の結果は、本物質が所謂 *N*-urea-fructosylamine でもなく、又 urea-lactoside の AMADORI 転位物でもないことを示すもので、赤外スペクトルからの推定を支持している。

考 察

以上の諸結果から緩和状態における尿素-ラクトース系に生成した urea-lactoside は、*N*-urea- α -lactoside であると判断される。

この urea-lactoside の形成が酸性溶液中で促進されることは、井上等の成績⁽³⁾と一致するが、特に、磷酸、クエン酸の存在下で傾向が著しい事実は、牛乳中における相当量の磷酸塩、クエン酸塩の存在と考え併せて興味深い現象である。しかし一方、褐色化度をはじめ、旋光度の変化、アミノ態窒素の減少等のアミノ・カルボニル反応の進行を示す現象は、アルカリ性において著しい事実が一般に認められている⁽¹⁹⁾ので、上記の結果はこれと矛盾するが、この相反する事実は、IACOBELLIS が指摘するよう⁽²⁰⁾に、褐色化はアルカリ性側において行われ、アミノ・カルボニル反応（彼は MAILLARD 反応と称しているが）とは独立して進行し、直接的な関連はないとの解釈をとることによって、止揚することも可能である。彼は極く最近、アルカリ性のグリシン-グルコース系において gluconylglycine の生成を確認しているが⁽²⁰⁾、本 urea-lactoside の生成がアルカリ側で認められなかったのは、実験条件の差に基因するとも考えられる。

既に KUHN, WEYGAND は *N*-*p*-tolylglucosamine の合成において、その生成に無水条件が必要であることを示したが、続報に記載するように、一般的に *N*-*p*-tolylglycosamine の合成には無水条件が必須で、含水条件ではその AMADORI 転位体の *N*-*p*-tolylisoglycosamine しか得られない事実は、上記の実験成績と比較して必ずしも一致した結果を与えていないので注目値する。即ち、含水条件下に生成した urea-lactoside が AMADORI 転位物とは認められないことは、このものの安定性を示唆するもので、本試料調製後 1 年を経過しても室温で *N*-*p*-tolylglycosamine に認められるような褐色化が進行せず、urea-lactoside が如何にして褐色化するか、或は、更にさかのぼって、尿素-ラクトース系の褐色化現象の初期反応生成物が果してこの urea-lactoside の形であるか否かに関して、なお若干の検討の余地を残しているものと考えられる。したがって、この点は後日の検討によって明確にしたい。ただ、ここでは、褐色化現象における urea-lactoside 形成の意義を考察する上での問題点を提起するに留めておく。

要 約

緩和条件下の尿素-ラクトース系中に形成される urea-lactoside 生成の 2, 3 の条件を検討して次の結果を得た。

(1) pH 3.6 以下の酸性溶液中では速かに urea-lactoside が形成されるが、グルコース、ガラクトースでも同様である。

(2) 酸の存在は urea-lactoside の生成を促進するが、この程度は磷酸、クエン酸が最も大で、塩酸、乳酸、酢酸の順に小となり、urea-glucoside の場合も同様である。

更に、この形成された urea-lactoside の構造及び理化学的諸性質の検討を行った。即ち、 β -グルコシダーゼ

による被分解能, 赤外線吸収スペクトル等の結果から, 本物質は *N*-urea- α -lactoside の構造を有し, 又, *o*-ジニトロベンゼン, cysteine-carbazol, SELIWANOFF 反応陰性等の成績から, 本物質は AMADORI 転位生成物とは認められないことを推定した。

最後に, 本物質の尿素-ラクトース系のアミノ カルボニル反応における褐色化に対する意義について考察を加えた。

終りに臨み終始御懇篤な御指導を賜わる佐々木林治郎教授, 中西武雄助教授に深く感謝致しますと共に, 貴重な文献を御恵与頂いた山口大学農学部野村男次助教授, 赤外線吸収スペクトル撮影に御教示と便宜を与えられた本学非水溶液研究所会田高陽助教授にも御礼申し上げます。

(1) 足立 達 : 本誌, 30, 372 (1956).	(1932).
(2) J. F. HODGE : <i>J. Agr. Food Chem.</i> , 1, 928 (1953).	(12) 松田和雄, 麻生 清 醸工, 31, 211(1953).
(3) 井上吉之, 小野寺幸之進, 北岡正三郎, 獅山慈孝 : 本誌, 26, 360 (1952).	(13) 高橋正雄 薬学雑誌, 74, 320(1954); 75, 237 (1955).
(4) 野村男次 : 醸工, 33, 212 (1955).	(14) S. A. BAKER et al. : <i>J. Chem. Soc.</i> , 1954, 171, 3468, 4211, 4550.
(5) 野村男次, 河野正夫 : 醸工, 32, 442(1954).	(15) R. KUHN, H. H. BAER, A. GAUHE : <i>Chem. Ber.</i> , 87, 1553 (1954).
(6) L. J. SCHROEDER, M. IACOBELLIS, A. H. SMITH : <i>J. Biol. Chem.</i> , 212, 973(1955).	(16) L. P. KUHN : <i>Anal. Chem.</i> , 22, 276 (1950).
(7) M. N. SCHOORL : <i>Rec. trav. chim.</i> , 22, 31 (1903).	(17) R. KUHN, F. WEYGAND : <i>Ber. deut. chem. Ges.</i> , 70, 769 (1937).
(8) S. B. HELFERICH, W. KOSCHE <i>Ber.</i> , 59, 69 (1926).	(18) Z. DISCHE, E. BORENFREUND : <i>J. Biol. Chem.</i> , 192, 583 (1951).
(9) J. G. ERICKSON, J. S. KEPS : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 75, 4339 (1952).	(19) J. P. DANELY, W. W. PIGMAN : <i>Adv. Food. Res.</i> , 3, 241 (1951).
(10) 例えば J. F. CARSON <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 1881, 5957 (1955); J. G. ERICKSON : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 77, 2839(1955).	(20) M. IACOBELLIS <i>Arch. Biochem. Biophys.</i> , 59, 199 (1955).
(11) H. TAUBER : <i>J. Biol. Chem.</i> , 99, 257	

乳製品のアミノ カルボニル反応に関する研究 (第 9 報)*

尿素-ラクトース系及び加熱牛乳からの Oxymethylene Glycolaldehyde** の分離証明

足 立 達 (東北大学農学部畜産利用学研究室)

昭和 31 年 6 月 14 日 受 理

一般に褐色化を伴うアミノ・カルボニル反応において, その反応誘起物質としてのアミノ化合物とカルボニル化合物との相互作用から褐色化物質形成への過程は, 幾多の物質の生成, 分解を伴う非常に複雑な反応から成る。したがって, これらの反応中間生成物中には易褐色化性物質の生成存在が当然推定されるが, この分離証明はアミノ カルボニル反応機構解明に有力な鍵を提供するものであろう。加熱牛乳の褐色化に際しても, かような物質の生成関与が予想されたので, この反応機構を明かにする目的で本物質群の確認を企図した。

既に S. PATTON 一派によって褐色化した加熱牛乳から furfuryl alcohol⁽¹⁾, フルフラール⁽²⁾, 5-hydroxymethyl furfural⁽³⁾, maltol⁽⁴⁾, acetol⁽⁵⁾ 等が分離されて, 特にこれらの中フルフラール類と maltol とはアミノ カルボニル反応の中間生成物として, 褐色化に積極的に関与するものと考えられて来た。しかしながら, これらの物質を牛乳に添加した実験の結果は, 必ずしもこの見解を裏書きしないので, 褐色化を促進する活性反応

* Studies on Amino-Carbonyl Reaction of Milk Products. Part IX. Isolation and Identification of Oxymethylene Glycolaldehyde from Heated Skim Milk and Urea-lactose Systems.
By Susumu ADACHI (Laboratory of Animal Products Technology, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai)

** 本物質は初め H. EULER によつて reductone と称されたが, その後 reductone の意味する内容が広義なものとなつたので, 混同を避ける為, より合理的なこの命名に従つた。