- (1) 足立 達 : 本誌, 30, 378, 383, 454, 459 (1956).
- (2) S. Adachi : *Nature*, 177, 936 (1956).
- (3) 足立 達 : 科学, 27, 209 (1957).
- (4) H. Kiliani : *Ann.*, 218, 361 (1883).
- (5) H. Kiliani : *Ber.*, 42, 2603 (1909).
- (6) L. de Bruyn, A. van Ekenstein : *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 2101 (1930).
- (7) W. M. Corbett, J. Kenner : *J. Chem. Soc.*, 1953, 2245.
- (8) S. Patton : *J. Dairy Sci.*, 33, 102, 324 (1950).
- (9) S. Patton, R. J. Flipse : *J. Dairy Sci.*, 36, 766 (1953).
- (10) 麻生 清 : 真空技術, 3, 1 (1955).
- (11) R. Beeby, J. Mantle : *Australian J. Dairy Tech.*, 10, 110 (1955).
- (12) E. Fischer : *Ber.*, 21, 2631 (1888) ; 22, 87 (1889).
- (13) S. Bayne, J. A. Fewster : *Adv. Carbohydrate Chem.*, 11, 43 (1956).
- (14) M. Ishidate : *Mikrochim. Acta*, 3, 283 (1938), (F. Feigl : *Spot Tests*, 2, 142 (1954)).
- (15) C. S. Hudson, H. S. Isbell : *J. Am. Chem. Soc.*, 51, 2225 (1929).
- (16) E. M. Montgomery, C. S. Hudson : *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 2101 (1930).
- (17) O. Samuelson, E. Sjöström : "Ion Exchangers in Analytical Chemistry", 198 (1953).
- (18) R. Kuhn, H. H. Baer : *Chem. Ber.*, 87, 1560 (1954).
- (19) E. E. Snell : *Biochemical Preparations.*, 3, 74 (1953).
- (20) F. Weinman : *Ber.*, 62, 1637 (1929), (東大農化: 実験農芸化学, 407 (1952)).
- (21) R. L. Whistler, D. F. Dursco : *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 677 (1950).
- (22) G. Holz, R. V. McAllister, C. Niemann : *J. Biol. Chem.*, 171, 27 (1947).
- (23) 三宅 捷, 林 金雄 : 炭水化物概論, 267 (1949).
- (24) H. R. Roberts, E. F. McFarren : *J. Dairy Sci.*, 36, 620 (1953).
- (25) 佐々木林治郎, 谷口宏吉 : 本誌, 30, 809 (1956).
- (26) C. P. Anantakrishnan, B. L. Herrington : *Arch. Biochem.*, 18, 327 (1948).
- (27) S. Adachi : *Tohoku J. Agri. Res.*, 8, 79 (1957).

ミルク・キャラメルの褐色化について (その3)*

ミルク・キャラメルのアミノ・カルボニル反応性変質の一測定法**

足 立 達 (東北大学農学部畜産利用学研究室)

昭和 32 年 8 月 27 日 受 理

ミルク・キャラメル (主原料の一として乳製品を使用したキャラメルをかように呼称することにする) は貯蔵中に、特に高温多湿の条件下では変質して、特異的な非脂質由来のステール・フレーバーの発生を初めとする風味の変化、外観が白色の場合にはその褐変化がおこり、又 pH の低下、還元能の増加等の諸現象が現われて来る^(1,2)。

一般にミルク・キャラメルに現われる諸変化の中で、上記のような変化はアミノ・カルボニル反応の進行に伴って生ずるものと考えられているが、製品の品質に及ぼす影響の大きさからも、この検討の為にはまず本反応の進行度の定量的把握が必要である。

さて、このミルク・キャラメルのアミノ・カルボニル反応進行の測定に当って、その指標となるものは以上の具体的な諸変化の中に求められねばならないが、色調の変化は著しくキャラメル化した製品の場合にその定量的表現が困難で、pH の低下は反応の進行に伴って明瞭な変動を示さず、共に測定法の指標として適当とは認められない。又風味の変化も数値表現が困難であるので考慮しなかったが、変化中に生ずる揮発性還元物質が本反応に

* On Browning of Milk Caramels. (3) A Colorimetric Determination of Deterioration derived from Amino-carbonyl Reaction in Milk Caramels. (Studies on Amino-carbonyl Reaction of Milk Products. Part XVII.)

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

** 本報告を「乳製品のアミノ・カルボニル反応に関する研究 (第 17 報)」とする。

起源を持つならば、Farber⁽³⁾、内藤⁽⁴⁾等の提案した方法が使用出来るかもしれない。しかしいずれにせよ、検討を要する点が少ないので、還元能の測定を反応進行の尺度として取り上げることにした。

従来から、この還元能の増加は種々の方法、例えば 2,6-dichlorophenol-indophenol⁽⁵⁾、沃度等で測定されて来たが、特に ferricyanide 法には多くの検討が加えられている。Mirsky, Anson 等⁽⁶⁾が蛋白質の SH 基の定量に使用したことに基づき置くこの方法は、McFarlane 等⁽⁷⁾によって初めて粉乳の還元能の測定に使用され、ついで Lea⁽⁸⁾ Crowe, Jennes 及び Coulter⁽⁹⁾ によって改良が加えられ、この還元値は糖・蛋白質結合体の生成、分解をも表わしていることが示唆されるに至った。しかし Crowe 等が示したように、この還元値には糖区分だけから由来する値も含まれてくるので、糖含量の多い試料ではその影響を考慮することなしに、俄かにその還元値をアミノ・カルボニル反応性のものと速断することは出来ぬであろう。

そこでミルク・キャラメルに対する、本質的には Crowe 等の方法に準拠した ferricyanide 法の適用性の検討を行い、その結果、本 ferricyanide 法はそのアミノ・カルボニル反応性変質の測定法として充分使用出来ることが判明したので、以下にその成績の概要を報告する。

実 験

〔I〕 測定法

(1) 試薬： 磷酸緩衝液 (M/5 磷酸一加里と M/5 苛性ソーダとから調整, pH 6.6), 10% 三塩化醋酸溶液, 1% 赤血塩溶液 (遮光で再結を繰返えし、夾雑鉄イオンを除去したもの), 0.1% 塩化第二鉄溶液 (使用前に新に調製する)。

(2) 実施法： 試料 1g を精秤して溶解し稀釈して 100 ml とする。この 5 ml を太目の試験管にとり、磷酸緩衝液 5 ml, 1% 赤血塩溶液 5 ml を順次加え混合した後、50° の水浴中に正確に 20 分間保持し、ついで氷水中で 25° 以下に急冷し、三塩化醋酸溶液 5 ml を加えて混合濾過する。この透明濾液 5 ml をとり、蒸溜水 5 ml を加えて稀釈した後、塩化鉄溶液 1 ml を加えて充分に混合して Prussian blue の呈色を生じさせ、正確に

10 分経過後、10 mm のセル中で Beckman 分光光度計で盲験を対照として 700 mμ (止むを得ぬときは 660 mμ) の波長の吸収度を読む。別に作製した検量曲線から生じた ferrocyanide のモル数 (10^{-7}) を求め、その濃度を以て還元値とするか、或いは便宜上、簡単に吸収度の読みで表わしても良い。尚第 1 図に筆者の求めた検量曲線を示しておいた。

〔II〕 実験成績

(1) 呈色の吸収特性： 本法によって呈色の吸収特性を求めするには、Prussian blue が濃度の大である時には沈澱しやすく不安定であるので、比較的濃度の薄い条件で行う必要がある。そこでこの目的に適うものとして製造後 15 日を経過しないミルク・

キャラメルを試料として用い、450~900 mμ の範囲に亘ってその吸収スペクトルを測定すると第 2 図のようになる。極大吸収は 710 mμ 附近に存在するので、従来行われていた 660 mμ での比色は最良の結果を与えるとは限らず、

第 1 図 $K_4Fe(CN)_6$ の検量曲線

第 2 図 呈色の吸収スペクトル

第 3 図 呈色の吸光度測定値の合法則性
* 稀釈試料の量 (mμ) を示す。

第 1 表 呈色の安定性

放置時間 (分)	キャラメル			黄血塩溶液	
	A	B	C	D	E
0	0.275	0.502	0.742	0.185	0.623
3	0.280	0.508	0.742	0.192	0.625
6	0.282	0.510	0.745	0.194	0.629
10	0.285	0.511	0.746	0.197	0.632
15	0.287	0.511	0.745	0.199	0.635
25	0.287	0.511	0.745	0.202	0.633
40	0.287	0.511	0.744	0.205	0.633
60	0.288	0.510	0.744	0.209	0.630

第 2 表 本法の信頼性

試料	A	B
平均値	0.105	0.365
標準偏差	0.003	0.012
信頼限界 (5%水準)	0.002	0.008
変動係数 (%)	2.86	3.29

第 3 表 キャラメル原料の組合せによる還元値の増加

原料	放置日数	
	対照(0)	25
1. 水 飴	0.030	0.037
2. 加糖煉乳	0.074	0.266
3. 水飴+加糖煉乳	0.070	0.480
4. 水飴+蔗糖	0.033	0.040
5. 水飴+加糖煉乳+蔗糖	0.053	0.355
6. 加糖煉乳+蔗糖	0.053	0.246

原料の配合は次の重量割合で行った。
加糖煉乳：水飴：蔗糖 (35:40:15)

第 4 表 市販キャラメルの測定値

新しい製品			古い製品		
試料番号	還元値	ステールフレバー強度	試料番号	還元値	ステールフレバー強度
1	0.037	—	1	0.366	冊
2	0.113	—	2	0.327	冊
3	0.074	—	3	0.187	+
4	0.085	—	4	0.152	冊
5	0.132	士	5	0.386	冊
6	0.058	—	6	0.437	冊
7	0.079	—	7	0.278	冊
8	0.085	—	8	0.146	冊
9	0.027	—	9	0.289	冊
10	0.105	士	10	0.371	冊

実からも、本実験での還元値の増加が、機構的には練乳中の乳蛋白質・糖系のアミノ・カルボニル反応の進行に主として基づくことは確実である。

(5) 幾つかの測定例：新古のミルク・キャラメルに就て得られた測定値を第 4 表に掲げる。製品のアミノカルボニル反応性変質によって新旧を分つ境界数値の決定は、測定データが不充分であるので完全を期すことは出来ないが、現在では一応 0.100~0.150 の範囲に設定している。この統計数値の集積をまての結論は今後に残された課題である。

総 括

ミルク・キャラメルのアミノカルボニル反応性変質を測定する為に ferricyanide 法を検討改良し、一比色測定法を確立し、更にこの還元値の増加は本質的にはミルク・キャラメルの主原料の一をなしている乳製品中のアミノ・カルボニル反応の進行に基づくことを明らかにした。

660~770 m μ で行わねばならないことは明らかである。しかも 700 m μ の吸収度が Lambert-Beer の法則に従うことは第 3 図の結果によって理解される。本測定法に 700 m μ での吸収度を採用した所以である。

(2) 呈色の安定性：塩化第二鉄溶液添加の後 Prussian blue の呈色は時間の経過と共に比較的速かに変化する。第 1 表にその結果を示した。実験は 3 種の市販ミルク・キャラメルと任意に稀釈した黄血塩水溶液を試料として行われたが、塩化鉄添加後生じた Prussian blue は次第に濃化してゆき 10 分経過の後約 5 分間は殆ど一定値を示し、以後一般に漸増する。ただ呈色濃度が大きい場合には吸収度の減少が起るが、これは Prussian blue 沈澱生成の前駆現象としての凝集に基づく為と考えられる。又両試料区の間に明確な差異を認めることは出来なかった。したがって比色に際しては呈色が一定値を示す段階に於て測定を行わねばならないことは明瞭である。

(3) 本測定法の精度：2 種類のキャラメル試料の各々 6 回の測定値から得られた統計成績を第 2 表に示す。この結果は測定値の再現性が充分であることを表わし、又 Crowe 等が粉乳について得た成績⁽⁹⁾と一致する。

(4) 還元値増加の機構の大略：貯蔵中にミルク・キャラメルの還元値が増加し、現象的には褐色化と相伴うことは既に前報に示したが、その相互の内的連関性については検討を行わなかった。そこでこの還元値の増加に対するミルク・キャラメルの成分の寄与を明らかにしようとして実験を行った。ミルク・キャラメ

ルの主原料である加糖煉乳、水飴 (澱粉の糖化法による水分 30% の半製品)、蔗糖を適宜組合わせて混合し、各 120 g を 100 ml 容の広口瓶に満し密閉して 37° の恒温器に 25 日間放置し、放置前後の測定値の変化をしらべ、第 3 表の結果を得た。還元能の増加は練乳を混入した試料に限って著しく、糖質原料区では微少で、しかも褐色化度と相伴うことが特徴的な事実であり、このことから還元値の増加に練乳が主体的役割を演じていることを結論することが出来る。更に既に明らかにされているように、粉乳の還元値の増加が lactose-caseinate 系の反応に起因することが多い事

終りに臨み、終始御懇篤な御指導を賜る佐々木林治郎教授、中西武雄教授に深甚の謝意を表します。又一部の試料の御恵与を頂いた不二家食品株式会社沼津工場にも謝意を表します。

(1) 足立 達, 中西武雄: 本誌, 31, 189(1957).	<i>Physiol.</i> , 19, 451 (1936).
(2) 中西武雄, 足立 達: 本誌, 31, 193(1957).	(7) R. A. Chapman, W. D. McFarlane: <i>Can. J. Res.</i> , 23 B, 91 (1945).
(3) L. Farber: <i>Food Tech.</i> , 6, 319 (1952).	(8) C. H. Lea: <i>Analyst</i> , 72, 336 (1947).
(4) 内藤正一: 農産加工技研誌, 3, 92(1956).	(9) L. K. Crowe, R. Jenness. S. T. Coulter: <i>J. Dairy Sci.</i> , 31, 595 (1948).
(5) 中西武雄: 畜産物の科学, 4, 129 (1954).	
(6) A. E. Mirsky, M. L. Anson: <i>J. Gen.</i>	

各種糸状菌のアミラーゼに関する研究 (第 14 報)*

タカアミラーゼ B の各種基質に対する分解作用

岡 崎 浩 (三共株式会社高峯研究所)

昭和 32 年 8 月 31 日 受 理

ま え が き

(1) 一般に β -アミラーゼと呼ばれる高等植物源の糖化酵素はマルトース生成型であり、かつマルターゼ力を有しない。ところがかびの糖化酵素はグルコース生成型であるという点で β -アミラーゼと明らかに異なる。このことは種々の菌株に対する多くの人々の研究の累積によって今まで取扱われたかびの糖化酵素のすべてに共通な性質とみなされるようになった。このほか、 β -アミラーゼではもはや分解しえない β -リミットデキストリンや α 、 β -リミットデキストリンなどをさらに分解しうること、またマルターゼ力を兼ね備えていることの 2 点も共通性質とみなして差し支えない。ただし最後の性質には例外が 1 つあって、北原等⁽¹⁾によって黒麹から分離され、 γ -アミラーゼと命名されたグルコース生成型アミラーゼにはマルターゼ力が全くない。ともかく、この例外を頭に入れた上で、上記の点をかび糖化酵素のもつ共通な性質と考えてよからう。

(2) そこでこのような共通性をもったかび糖化酵素同志をさらに何等かのメルクマールによっていくつか分類できないものであろうか。もちろんかびはかびでも菌株がちがえば、いわゆる生物の多様性という概念から

第 1 図 グルコース生成型アミラーゼの糖化曲線の 2 型

1. *Rhizopus delemar* (福本, 社販) 2.

タカアミラーゼ B (岡崎)

2% 可溶性澱粉液 50 ml, M/20 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 20 ml, 蒸留水 25 ml, 酵素液 5 ml, 40°, 還元力は Fehling-Lehmann-Schoorl 法による。
← 無 色 ← 紫 青 色

いって当然蛋白質化学的な諸性質にちがいがあっても不思議ではない。しかしそういったちがいをこまかくしらべるよりまえに、もっと簡単な現象だけで、まず少くとも 3 つに分けてもよさそうな気がするのである。というのは、今、福本等⁽²⁾の報告から *Rhizopus delemar* の糖化酵素の糖化曲線をそのまま借用してかいてみると第 1 図曲線 1 のようになる。つまり 100% 近くまでスムーズに分解がすすみ、90% 以上で沃度澱粉反応が無色になっている。ところが筆者がタカジアスターゼから精製した *Aspergillus oryzae* の糖化酵素 (タカアミラーゼ B)⁽³⁾ を全く同一条件で作図してみると曲線 2 のようになる。つまり途中から明らかに曲ってしまい、容易に伸びず、沃度澱粉反応もいつまでも残る。このように糖化曲線の比較という極めて簡単なメルクマールだけで明らかに両酵素がちがうことが知れる。もっともタカアミラーゼ B に極めてわずかの α -アミラーゼを混ぜて作用させると、あたかも曲線 1 と同じようなスムーズな伸びを示す事実があることから、もしかすると福本氏等の標品にはわずかの α -アミラーゼが混在しているので

* Studies on Amylases of Various Species of Molds. Part XIV. Hydrolysis of Taka-amylase B upon Various Substrates.

By Hiroshi OKAZAKI (Takamine Research Laboratory, Sankyo Co. Ltd.)

[第 13 報は *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, 322 (1956)]