[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 54, No. 1, pp. 13~19, 1980]

リジノアラニン生成におよぼすグルコースの影響

村 瀬 誠

(愛知県食品工業試験所)

昭和 54 年 7 月 6 日 受 理

Effect of Glucose on Lysinoalanine Formation

Makoto MURASE

*Food Research Institute, Aichi Prefectural Government,
2-1, Shimpukuji-cho, Nishi-ku, Nagoya 451*

Lysinoalanine (LAL) formation was partially inhibited by D-glucose, and the extent of inhibition of LAL formation was directly dependent on the ratio between glucose and protein. Among some glucose derivatives examined, the compounds with free carbonyl group showed the partial inhibition of LAL formation which was also dependent on the ratio between glucose derivatives and protein. The inhibition of LAL formation by glucose and its derivatives was always accompanied with brown color development probably due to amino-carbonyl reaction. Positive correlations between the extents of inhibition of LAL formation and those of brown color development were observed. The pH and temperature during the alkaline treatments were the direct factors for the inhibition of LAL formation. With increase in temperature, LAL formation also increased. The highest inhibition of LAL formation was attained between pH range of 11.0 to 12.0.

Lysine contents of alkaline-treated proteins also decreased with increase of glucose to protein ratio. On the other hand, decomposition of cystine and/or cysteine estimated from cysteic acid was not affected by glucose.

D-Glucose-L-cysteine, thiazolidine compound, inhibited LAL formation.

These results suggest that inhibition of LAL formation by glucose is due to the decrease in the concentration of ϵ -amino group of lysine residues participated in amino-carbonyl reaction.

(Received July 6, 1979)

食品の加工処理中に生成されるリジノアラニン⁽¹⁻⁶⁾ (以下 LAL と略す) は栄養および生理上⁽⁷⁻⁹⁾からみて種々の問題を投げかけている。例えば、それらは必須アミノ酸であるリジンおよび含硫アミノ酸であるシスチンとシステインが LAL に転換される⁽¹⁰⁾ことによる栄養価の低下とか、LAL を含む飼料で給餌したラットの腎臓細管の核や細胞質が肥大する⁽¹¹⁾という現象などにみられる。

ヒトに対する LAL の生理作用はまだ十分に研究されていないが、上記のようなことから食品を加工する際、LAL の生成をできるだけ抑制した方が好ましいという考えが一般的となっている。Sternberg ら⁽¹²⁾や Finley ら⁽¹³⁾もこのような観点から研究し、SH 化合物が LAL の生成を効果的に抑制することを明らかにした。これ

は、例えばシステインは SH-SS 交換反応を触媒しシスチン残基の β -エリミネーションを抑制し、またデヒドロアラニンとシステインとの反応速度がリジンの ϵ -アミノ基との反応速度に比べ大きいために、ランチオニンが優先的に生成される結果であると考えられている。

一方、食品は複合体であり、タンパク質は糖類との共存状態で加工処理されることが多い。タンパク質と還元糖との間のアミノ-カルボニル反応⁽¹⁴⁾は、アルカリ性下高温処理で進行しやすく、リジンを含む塩基性アミノ酸残基が関与すると広く知られている。LAL の生成は pH と温度に依存した、リジンの ϵ -アミノ基が関与する反応⁽¹⁰⁾である。したがって、反応系における還元糖の存在は LAL の生成に影響を与えたと考えられる。

そこで、本研究においては鶏卵卵白をモデル的に使用

し、グルコースが LAL の生成におよぼす影響を明らかにし、これからの飼料、食品素材の高温、アルカリ処理時における LAL 生成の制御方法について参考的知見を得ることを目的として行った。

実験方法

1. 試薬 チアゾリジン化合物として、D-グルコース-L-システイン(日本理化学薬品株式会社製)を使用した。試料中の LAL のアミノ酸分析における同定および定量に際して、マイルズ社製の *N*-ε(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine を標準品として用いた。アミノ酸分析にはアミノ酸分析用試薬(半井化学製)を用いた。その他の試薬はすべて特級品を使用した。

2. 実験材料の調製 市販の殻付鶏卵から実験の都度卵白を分離し、5~10 倍量の水で希釈して遠心分離(5000rpm, 10min)して得た上澄液を使用した。この溶液のタンパク質含量は 10~23mg/ml であり、pH は 9.0~9.5 であった。糖類は使用時に所定濃度(w/v)の水溶液とし、室温で攪拌しながら等量の希釈卵白溶液と混合した。タンパク質(P)に対する糖(G)の添加率は重量比で示した。

3. アルカリ処理およびその停止 基本的には前報⁽⁵⁾に示したとおりであり、pH 12.5 に調整した試料溶液を沸騰水中で 20min 加熱することによりアルカリ処理を行った。なお pH 7~13 の範囲で pH の影響を、40~120°C の範囲の所定温度で加熱することにより温度の影響を検討した。ただし 120°C における加熱処理はオートクレーブを用いて行った。いずれの場合にも糖類を添加しないで同様の加熱処理を行ったものを対照とした。所定の加熱処理を行った後直ちに水冷し、濃塩酸を 6N となるように加えて反応を停止し、塩酸加水分解に供した。なお図に示した pH はすべて加熱処理前の値である。

4. タンパク質の定量 セミマイクロケルダール法により測定した窒素量に係数 6.25 を乗じてタンパク質含量を求めた。

5. 褐変度の測定 所定の加熱処理後水冷した試料溶液を蒸留水で 10 倍希釈し、420nm における吸光度を測定しその値を褐変度として表示した。

6. アミノ酸分析 前報⁽⁵⁾のとおり加水分解して得た試料を自動アミノ酸分析装置(日立 KLA 5 型)により分析した。LAL の分析は短カラムを 2 本並列に装着

し、次のような条件で行った。すなわち、カラムに日立球状樹脂 #2618 を充填(11.5cm×0.9cm)し、2 カラム法による分析で塩基性アミノ酸用の 0.35N クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 5.28)の pH を 4.75 に下げて溶出に用いた。酸・中性アミノ酸およびアルギニン区分はドレインに流し、LAL 区分のみを分析するようにプログラムを設定した。カラム温度は 55°C、流速は 60 ml/hr とした。シスチン、システインは Moore⁽¹⁵⁾の方法に従って過ギ酸酸化後塩酸加水分解し、アミノ酸分析装置によりシステイン酸として分析した。得られたアミノ酸量はすべてタンパク質 100g あたりの mmol として表示した。

実験結果

1. LAL の分析

Fig. 1 に標準塩基性アミノ酸類、未処理鶏卵卵白タンパク質およびグルコース、システイン共存下でアルカリ処理した鶏卵卵白タンパク質の塩酸加水分解物を分析した例を示した。LAL はアミノ糖、オルニチンと、またリジンはオルニチンと分離して溶出され(A)、アルカリ処理をしたタンパク質においても LAL およびリジンは未同定の成分、オルニチンとも重なることなく溶出された(B)。一方、未処理タンパク質の加水分解物中には LAL の位置に溶出される妨害物質は認められなかった(C)。

2. LAL 生成におよぼすグルコース添加量の影響

反応液のタンパク質含量が 4.70mg/ml の場合、タンパク質に対するグルコース添加量の相違が LAL 生成におよぼす影響を検討した結果を Fig. 2 に示した。G/P 比が増加するに伴い LAL 生成量は減少し、比 1.07 のとき対照の約 50% になった。G/P 比がさらに増加しても LAL 生成量の減少は少なく、比 3.30 の場合でもなお 30% 程度生成された。一方、褐変度は G/P 比に対しほぼ直線的に増加した。

アルカリ処理によりシスチン、システインから生成されるデヒドロアラニンはリジンの ε-アミノ基と共有結合することにより LAL を生成する⁽¹⁰⁾。リジンおよびシステイン酸とアルギニンのアルカリ処理後の変化を Fig. 3 に示した。G/P 比が増加してもシステイン酸含量の変化は小さかったが、リジン、アルギニン含量は著しく減少した。ヒスチジンはあまり減少しなかった。

3. グルコース共存下における LAL 生成量の経時変化

反応液のタンパク質含量が 11.50mg/ml の場合、グルコース共存下 (G/P=0.79) における LAL 生成量、システイン酸含量および褐変度の経時変化を対照のものとともに Fig. 4 に示した。LAL 生成量は対照区においては加熱時間とともに増加したが、グルコース添加区においては加熱 3 分後から対照より少なくなり、5 分で極大値を示したあと減少する傾向がみられた。一方、システイン酸含量はグルコース添加区において若干多かったが、その経時変化は対照区と類似していた。褐変度はグルコース添加区では時間とともに増加したが、対照区ではほとんど増加はみられなかった。

Fig. 1. Typical Chromatograms of Some Authentic Compounds and Hydrolyzates of Egg White Proteins. Chromatographic conditions on the amino acid analyser (Hitachi KLA 5) were as follows. Column size, 0.9×11.5cm; buffer, sodium citrate (0.35N in sodium ion, pH 4.75); temperature, 55°C; flow rate, 60ml per hour. A, authentic compounds; B, hydrolyzate of egg white protein alkaline-treated in the presence of glucose and cysteine; C, hydrolyzate of egg white protein before alkaline-treatment. The proteins were hydrolyzed with 6N HCl at 110°C for 22hr. 1, glucosamine; 2, galactosamine; 3, LAL; 4, ornithine; 5, lysine; 6, histidine; 7, ammonia. Compounds corresponding to peak No. 8, 9 and 10 are unknown. Arginine is eluted near at the effluent volume of 110ml but is drained off.

Fig. 2. Effect of Glucose on LAL Formation and Brown Color Development. Equal volumes of glucose solution and diluted egg white solutions were mixed to give G/P ratio (glucose to protein ratio in weight) 0 to 3.30. The mixtures were adjusted to pH 12.50 with dropwise addition of N NaOH. An aliquot of each mixture was taken into test tubes (1.8×18.0cm) and heated in boiling water bath for 20min. Protein content of the mixtures was 4.70mg/ml. After heating, mixtures were cooled in tap water and diluted 10 times with water. These solutions were subjected to determine brown color development by measuring absorbances at 420 nm. ○—○, LAL; □—□, brown color development.

Fig. 3. Effect of Glucose on the Degradation of Amino Acids in Egg White Protein. The conditions of alkaline-treatments were the same as described in Fig. 2. ◇—◇, lysine; ◆—◆, arginine; △—△, cysteine acid.

Fig. 4. Time Dependence of LAL Formation, Degradation of Cystine (cysteine) and Brown Color Development. The mixtures (pH 12.51) prepared as described in Fig. 2 were heated in a boiling water bath for indicated periods. Protein content of the mixtures was 11.50 mg/ml. G/P ratio were 0 (control) and 0.70. Amounts of cystine and cysteine were counted as cysteic acid. ○—○, LAL; △—△, cysteic acid; □—□, brown color development. Open and solid symbols show the results obtained in the absence and presence of glucose, respectively.

4. アルカリ処理の温度の影響

反応液のタンパク質含量が 5.65 mg/ml, G/P=0.89 および 2.68 の場合, アルカリ処理の温度が LAL 生成におよぼす影響を検討した結果を対照区とともに Fig. 5 に示した. 対照区では, 100°C まで加熱温度が上昇するに伴い LAL 生成量は増加し, 120°C で急減した. グルコース添加区では, 温度上昇に伴い G/P 比に依存して LAL 生成量は減少し, 比 0.89 のとき 70°C, 比 2.68 のとき 60°C 以上の加熱で対照区より減少した. また LAL 生成量は 80°C 付近で極大値を示したあと温度が上昇するとともに G/P 比に準じて減少した. 一方, 褐変の発現は対照以外の系でみられ, 60°C より温度上昇に伴い増加した.

5. pH の影響

反応液のタンパク質含量が 5.65 mg/ml, G/P=0.89 の場合, 加熱時の pH が LAL 生成におよぼす影響を検討した結果を対照のものとともに Fig. 6 に示した. グルコース添加の有無に関係なく試験した pH 範囲内で LAL の生成が認められ, ことに pH 10 以上で生成量は多かった. グルコースによる LAL 生成の抑制は pH 10 以

Fig. 5. Temperature Dependence of LAL Formation and Brown Color Development. The mixtures (pH 12.50) prepared as described in Fig. 2 were heated in a water bath adjusted to indicated temperatures for 30 min. Heat treatment at 120°C was performed with autoclaving. Protein content of the mixtures was 5.65 mg/ml. G/P ratios were as follows: ●—●, ■—■, 0 (control); ○—○, □—□, 0.89; ◎—◎, ◻—◻, 2.68. Circular and square symbols show the amounts of LAL and brown color development, respectively.

上で認められ, pH 11~12 付近で最高の効果が認められた. 褐変度は pH 12.5 付近までは pH 上昇に伴い増加したが, pH 13 で若干低下した.

6. グルコース関連化合物およびシステインが LAL 生成におよぼす影響の比較

グルコース関連化合物として, D-グルコース-6-リン酸 (G-6-P), D-グルコース-1-リン酸 (G-1-P) のそれぞれ 2 ナトリウム塩, スクローズおよび D-グルコース-1-システイン (G-L-C) を用い, これらが LAL 生成におよぼす影響を検討した結果を Fig. 7 に示した. 反応液のタンパク質含量は 4.69~5.00 mg/ml, タンパク質に対するグルコース関連化合物の添加率は 0~3.7 の範囲であった. 6 位をリン酸化しカルボニル基が遊離している G-6-P の場合には LAL 生成の抑制, 褐変の発現ともにみられた. しかし, 1 位をリン酸化した G-1-P の場合には LAL 生成の抑制, 褐変の発現ともにみられなかった. また非還元糖であるスクローズも LAL 生成の

Fig. 6. pH Dependence of LAL Formation and Brown Color Development. The mixtures were adjusted to indicated pH with dropwise addition of $N H_2SO_4$ or $N NaOH$ and heated as described in Fig. 2. Protein content of the mixtures was 5.65 mg/ml. G/P ratios were as follows: $\bullet$ — $\bullet$, $\blacksquare$ — $\blacksquare$, 0 (control); $\circ$ — $\circ$, $\square$ — $\square$, 0.89. Circular and square symbols show the amounts of LAL and brown color development, respectively.

抑制、褐変の発現を示さなかった。一方、チアゾリジン化合物である G-L-C の場合 LAL 生成の抑制、褐変の発現ともみられた。

前述したようにシステインは LAL の生成を抑制することが報告^(12,13)されているが、添加、加熱処理方法が本報で採用した方法とは異なる。そこで反応液のタンパク質含量 10mg/ml、タンパク質に対するシステインの添加率 0~0.4 の範囲でシステイン添加量が LAL 生成におよぼす影響を検討した結果を Fig. 8 に示した。L-システインはグルコースやその関連化合物のいずれよりも効果的に LAL の生成を抑制し、そのとき褐変の発現はみられなかった。

考 察

本実験の範囲内では、リジン、シスチン、アルギニンおよび LAL を除いてアルカリ処理前後でその含量に大きな変化を示すものはなく、また塩酸加水分解時にグルコースが共存してもアミノ酸分析値はほとんど影響を受

Fig. 7. Effect of Glucose Derivatives on LAL Formation and Brown Color Development. Details for the preparation of the mixtures and the conditions of the alkaline-treatments were the same as described in Fig. 2. Protein contents and pH of the mixtures were 4.69 to 5.00 mg/ml and 12.52, respectively. $\circ$ — $\circ$, $\square$ — $\square$, D-glucose-6-phosphate; $\bullet$ — $\bullet$, $\blacksquare$ — $\blacksquare$, D-glucose-1-phosphate; $\triangle$ — $\triangle$, $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$, sucrose; $\blacksquare$ — $\blacksquare$, D-glucose-L-cysteine. Circular and triangle symbols show the amounts of LAL and squares show brown color development, respectively.

Fig. 8. Effect of Cysteine on LAL Formation. Details were the same as described in Fig. 2 except that L-cysteine was substituted for glucose. Protein of the mixtures was 10.00 mg/ml, and pH was 12.58.

けなかった。また卵白には固形物換算で約3%の還元糖が含まれる⁽¹⁶⁾が、これは G/P 比にして約 0.03 にすぎず、対照区の褐変度はグルコース添加区に比べ無視しうるものであった。従って本報では卵白に含まれる還元糖については考慮しなかった。

本報で示したグルコースによる LAL 生成抑制作用の原因として次の2つが考えられる：(a)グルコースがシスチン、システイン残基の β -エリミネーションを抑制する。(b)アミノ-カルボニル反応等によりリジンの ϵ -アミノ基が消費される。

(a)に関しては、グルコースがシステイン残基とチアゾリジン環を形成⁽¹⁷⁾し、システイン残基のデヒドロアラニンへの変化を抑制する反応が挙げられる。例えば Kato ら⁽¹⁸⁾はシステインを添加して卵白を乾燥すると褐変の発現が抑制されることを示し、これはシステインが卵白に含まれる還元糖とチアゾリジン環を形成した糖のアルデヒド基を不活性化するためであると結論している。また山澤ら⁽¹⁹⁾は還元糖を添加した試作かまぼこをレトルト処理すると硫化水素の生成が抑制されるのは、システイン残基がチアゾリジン環を形成した結果であろうと推測している。しかし本報で採用したアルカリ処理の場合、システイン酸の変化はグルコース添加の有無にかかわらず類似しており (Fig. 3, 4)、シスチン、システイン残基が保護されたとは言えない。また D-グルコース-L-システインは無水系でチアゾリジン環を形成しており SH 基、アルデヒド基ともに不活性化されているが、高 pH、高温の水溶液中では速やかに加水分解し SH 基、アルデヒド基ともに遊離する⁽¹⁹⁾。Fig. 7 においてもグルコース誘導体による LAL 生成の抑制、褐変の発現がみられるので、チアゾリジン環の形成があったとしても、LAL 生成の抑制に対する寄与は大きくないと考えられる。

(b)についてみると、グルコースによる LAL 生成の抑制は常に褐変の発現を伴い、Fig. 3 に示したようにリジン、アルギニンが顕著に減少していることからアミノ-カルボニル反応等の同時進行が推測される。生成機構⁽¹⁰⁾からみて、LAL の増加とリジンの減少は同時に進行するものであり、グルコースを添加したとき G/P 比の増加に伴い LAL 生成量が減少すれば、リジン量は対照より多くなるはずである。ところが G/P 比の増加に伴いリジン量が顕著に減少していることは褐変反応等による消費が原因と考えられる。褐変度は G/P 比、溶液中における濃度および pH の影響を受けるので、同一試験区

Fig. 9. Relationships between Inhibition of LAL Formation and Brown Color Development. Inhibition of LAL formation was calculated according to the following equation. Inhibition of LAL formation (%) = $\frac{\text{LAL}_{\text{control}} - \text{LAL}_{\text{glucose}}}{\text{LAL}_{\text{control}}} \times 100$ where $\text{LAL}_{\text{control}}$ and $\text{LAL}_{\text{glucose}}$ were the amounts of LAL formed under the same conditions of alkaline-treatment in the absence and presence of glucose, respectively. Lines 1, 2, 3, 4 and 5 were data quoted from those in Fig. 2, 4, 5, 6 and 7, respectively.

ごとに褐変度と次式によって算出した LAL 生成抑制率との関係を示すと Fig. 9 のようになる。

$$\text{LAL 生成抑制率 (\%)} = \frac{\text{LAL}_{\text{control}} - \text{LAL}_{\text{glucose}}}{\text{LAL}_{\text{control}}} \times 100$$

ただし、 $\text{LAL}_{\text{control}}$ と $\text{LAL}_{\text{glucose}}$ はグルコース添加の有無を除いて同一の条件で加熱処理したときの LAL 生成量である。

G/P 比、温度および時間を変えたときの LAL 生成抑制率は褐変度と正の相関を示し、褐変度が大きいほど LAL の生成が抑制されることを示している。pH を変えたときは負の相関を示し、グルコースによる LAL 生成抑制の最適 pH が本報で主として採用した 12.5 という値よりも低い領域に存在することを示すと考えられる。

さらに糖が LAL 生成を抑制するためにはそのアルデヒド基が遊離していなければならない (Fig. 7) ことから、グルコースが LAL の生成を抑制する原因は加熱処理中にアミノ-カルボニル反応等が進行し、リジンの ϵ -アミノ基の濃度が減少することであると推察される。

多量のグルコースを加えても LAL が一部生成されるのは、Fig. 4 から推測されるように、リジンの ϵ -アミノ基の消費よりも β -エリミネーションが早く進行すること、リジン残基、シスチン残基のタンパク質立体構造上

における位置によってはアルデヒド基あるいはデヒドロアラニン残基との接触に難易が生ずることなどによるものであろう。

なお、本報で採用したアルカリ処理条件ではグルコース自身も顕著に褐変し、タンパク質共存の影響を明示することは困難であったが、この点については今後詳細に検討したい。グルコースがシスチン、システイン残基の分解系路やデヒドロアラニン残基の消長に関与する可能性も今後の課題である。

要 約

LAL 生成におよぼす還元糖の影響を検討し次の結果を得た。

(1) G/P 比 0~3.30 の間でグルコース添加量が増加するに伴い LAL 生成量は減少した。pH 10 以上および 60°C 以上の処理で LAL の生成は抑制されたが、完全に抑制するには至らなかった。

(2) グルコースによる LAL 生成の抑制は常に褐変反応を伴い、抑制率は褐変度とほぼ比例していたことから、アミノ-カルボニル反応によりリジンの ε-アミノ基の濃度が減少する結果であると考えられた。

(3) システイン酸の変化はグルコースの有無にかかわらず類似しており、チアゾリジン化合物である D-グルコース-L-システインも LAL 生成の抑制作用を示したので、チアゾリジン環の形成によるシステインの保護は考えられなかった。

(4) 糖が LAL の生成を抑制するためにはカルボニル基が遊離の状態で存在することが必要であった。

終りに本研究を遂行するにあたり終始ご指導ご鞭撻を賜った愛知県食品工業試験所、後藤富士雄前所長、小山吉人所長に感謝いたします。なお本報の一部は昭和 52

年 12 月、日本農芸化学会中部支部例会（静岡）で発表した。

- (1) M. Sternberg, C. Y. Kim and F. J. Schwende: *Science*, **190**, 992 (1975).
- (2) 斎尾恭子, 村瀬 誠: 日食工誌, **22**, 30 (1975).
- (3) M. Sternberg, C. Y. Kim and R. A. Plunkett: *J. Food Sci.*, **40**, 1168 (1975).
- (4) N. T. Chu, P. L. Pellett and W. W. Nawar: *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1084 (1976).
- (5) 村瀬 誠, 後藤富士雄: 日食工誌, **24**, 547 (1977).
- (6) 竹内久直, 加藤博通, 藤巻正生: 食衛誌, **19**, 44 (1978).
- (7) A. P. deGroot and P. Slump: *J. Nutr.*, **98**, 45 (1968).
- (8) J. C. Woodard and D. D. Short: *ibid.*, **103**, 569 (1973).
- (9) M. M. Provansal, J. L. A. Cuq and J. C. Cheftel: *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 928 (1975).
- (10) Z. Bohak: *J. Biol. Chem.*, **239**, 3878 (1964).
- (11) J. C. Woodard and M. R. Alvarez: *Arch. Pathol.*, **84**, 153 (1967).
- (12) M. Sternberg and C. Y. Kim: *Adv. Exp. Med. Biol.*, **86 B**, 73 (1977).
- (13) J. W. Finley, J. T. Snow, P. H. Johnston and M. Friedman: *ibid.*, **86 B**, 85 (1977); *J. Food Sci.*, **43**, 619 (1978).
- (14) J. P. Danely and W. W. Pigman: *Adv. Food Res.*, **3**, 241 (1959).
- (15) S. Moore: *J. Biol. Chem.*, **238**, 235 (1963).
- (16) S. Kato, N. Yano, I. Suzuki, T. Ishii, T. Kurata and M. Fujimaki: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 2425 (1974).
- (17) M. Friedman: "The Chemistry and Biochemistry of the Sulfhydryl Group in Amino Acids, Peptides and Proteins," Pergamon Press, N. Y., 1973, p. 88.
- (18) 山澤正勝, 村瀬 誠, 志賀一三: 日水誌, 投稿中.
- (19) 宮坂春生: 私信 (1978).