[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 56, No. 6, pp. 417~425, 1982]

D-キシロース-グリシン系の褐変初期段階 における青色色素の生成

三浦理代, 五明紀春
(女子栄養大学)

昭和56年8月27日受理

Formation of Blue Pigment in the Earlier Stage of Browning in the System Composed of D-Xylose and Glycine

Masayo MIURA and Toshiharu GOMYO
*Kagawa Nutrition College (Joshi Eiyo Daigaku),
Chiyoda 3-9-21, Sakato-shi, Saitama 350-02*

A marked blue color developed before the initiation of browning when glycine reacted with excess D-xylose in slightly alkaline medium containing sodium bicarbonate as catalyst. The blue color of the reaction solution intensified under an atmosphere of nitrogen and on addition of hydrophilic organic solvents, such as methanol, ethanol, isopropanol and acetone. Higher temperature accelerated the formation of blue pigment, reducing the duration of the color; no blue pigment was produced at cooking temperature.

Three kinds of blue pigments (Blue 1, Blue 2 and Blue 3) were chromatographically separated. Although the structural details of these pigments are under investigation, some chemical and spectroscopic properties were examined. The molecular weight of the pigments was estimated on the basis of behavior in gel permeation chromatography. Blue 1, Blue 2 and Blue 3 were approximately 800, 1200 and 1600, respectively.

The formation pathway of these pigments was discussed, and it was suggested that these substances corresponded to consecutive oligomers produced in the earlier stage of polymerization in browning caused by the amino-carbonyl reaction of D-xylose with glycine.

(Received August, 27, 1981)

緒 言

アミノ・カルボニル反応における着色機構には不明の点が多い。Song ら⁽¹⁾は着色過程の動力学的研究に基づいて褐変初期生成物である α, β -不飽和アルデヒド類とアミノ化合物の反応によるアルドイミン類が重合反応のモノマーとしている。Suyama ら⁽²⁾も、クロトンアルデヒド-グリシン系を用いて、*N*-クロトニリデングリシンとクロトンアルデヒドの縮合物が重合開始種であろうと指摘している。しかし、褐色色素メラノイジン形成の初期段階に位置する低分子の重合体に関して、単離・同定されておらず、重合開始時の反応機構については結論が得られていない。

Kurata ら^(3,4)は、デヒドロアスコルビン酸 (DHA) と α -アミノ酸の系による一連の研究の結果、主要な重合開始種と予想されて赤色色素の構造を解明している。Hayashi ら⁽⁵⁾は、DHA-アミノ酸、-アミンの系で、着色過程に関与しているものと考えられる特異的な色調を有するラジカル生成物を得ている。DHA-アミノ化合物系で得られた色素類は、褐変初期の二量体ないし三量体として位置づけることも可能であり、重合機構の点からきわめて興味深い物質である。

種々のアミノ酸と糖の混合水溶液を加熱すると、一般吸収を有する褐色物質の生成に至る過程で、反応溶液が特異的な色調を経過することは、しばしば観察されることである。着色初期にみられるこれらの特異的な色調を有す

する生成物は、メラノイジン形成機構の解明に重要な手がかりを提供するものと推定される。

著者らは、D-キシロース-グリシン系において、褐変速度に及ぼす反応条件の検討を行っている際に、褐変前段階において顕著な青変を惹起する条件を見出した⁽⁶⁾。すなわち、グリシンに対しD-キシロースを大過剰にし微アルカリ性、窒素置換を行い、室温以下で反応させたところ鮮明な青色色素を生成した。本研究は、この青色色素の生成条件の詳細を調べ、色素の単離を行い、その化学的性質を明らかにする目的で行った。また、この色素の重合過程における意義について検討した。

実験方法

1. 試薬 D-キシロース、グリシンおよびその他の試薬は市販特級試薬を使用した。ただし、D-キシロースは着色している場合、活性炭処理によって脱色してから用いた。また、反応溶媒のための水は、イオン交換水をさらにガラス製蒸留器で蒸留したものを用いた。

2. 標準的反応条件 D-キシロース 1M, グリシン 0.1M または 0.2M, NaHCO_3 0.1M となるよう 60% エタノール (v/v) に溶解、希塩酸で pH 7.5 に調節、ガラス製細口試薬ビン (あらかじめ希塩酸で洗浄) に入れ、 N_2 ガス置換して密封、20°C、暗所に 2~3 日間静置した。

3. イオン交換濾紙クロマトグラフィー 陰イオン交換濾紙 (DE 81, Whatmann Ltd.) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) で空展開後直ちに、試料溶液をバンドスポットし、同溶媒を用い、室温、下降法で 2~3 時間展開した。スポットの抽出には 0.5M NaCl を用いた。

4. 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー DEAE-Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals) を 0.1M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁、時々攪拌しながら 1 時間沸とう水浴中で加温、ガラスカラムに充填した (2×20cm)。同緩衝液で平衡化した後、試料溶液を適当に希釈、pH 6.8 に調節してから、カラムに注入、色素帯を吸着させた。0.1M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 500 ml → 同緩衝液 + 0.2M NaCl 500 ml を用い、食塩濃度に関し直線勾配を与えるようグラディエント展開した。10 ml ずつ分画した。以上の操作は、すべて低温 (4°C) にて行った。

DEAE-cellulose (Serva) を 0.2N NaOH, 0.2N HCl で交互に洗い、遊離型とし、ブフナーロート上で 0.1M

Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で十分洗い、同緩衝液に懸濁、脱気し、ガラスカラムに充填した (2×20cm)。展開条件は DEAE-Sephadex と同様であった。

5. ゲル濾過クロマトグラフィー Bio-Gel P2 (200~400 mesh, Bio-Rad Laboratories) を 1M NaCl に懸濁し、減圧下で十分脱気した後、ガラスカラムに充填した (1×150cm)。1M NaCl を用い、20°C において展開、2 ml ずつ分画した。

6. 濾紙電気泳動 東洋濾紙 No. 51 A (16×40cm) を媒体とし、次の緩衝液を用いて泳動を行った。いずれもイオン強度を 0.2 に調節した。

1/5M HCl-1/5M KCl (pH 2.2 および 2.5)

1/5M HCl-1/5M KH phthalate (pH 3.5 および 3.8)

1/5M NaOH-1/5M KH phthalate (pH 5.8)

また、電極液 (飽和 KCl) にはフェノールを 1% 濃度に溶解し、発生する塩素を吸収させた。室温下、5mA (160~220 V) で、1 時間通電した。

実験結果

1. D-キシロース-グリシン系の青変に及ぼす反応条件の影響

青変時には反応液の吸収スペクトルは 627nm に吸収極大を示した。反応の進行とともに、 A_{627} は増大したが、しだいに 580nm の肩が増大、 A_{580}/A_{627} 比は増加した (Fig. 1)。この間、反応液の色調は、淡黄色から淡青色を経て濃青色になり、さらに暗青紫色から黒褐色に変った (反応条件は実験の項参照)。以下、青変の指標として A_{627} および A_{580}/A_{627} 比 (この比が小さいほど反応液は鮮明に青色を呈する) を用いて、青変に及ぼす各種反応条件の影響を検討した。

1) D-キシロース-グリシン組成比の影響 (Fig. 2) D-キシロースとグリシンの濃度の和が 2M となるように組成比を変えて反応させた。なお、他の条件は実験方法の項 2 に従った。モル組成比 1:1 の場合に A_{627} の増加速度は最大となったが、D-キシロースの割合を多くすると A_{580}/A_{627} は減少、溶液の色調はより鮮明な青色を呈した。逆に、グリシンの割合を多くすると青変せずに速やかに褐変した。本研究では青変を効果的に起させる条件として D-キシロース/グリシン 1:0.1~0.2 (モル比) を採用した。青色の反応液にグリシンを D-キシロースに対し過剰となるよう添加すると速やかに褐変し、青色物質はグリシンにより不安定化される性質を有する

Fig. 1. Changes in Absorption Spectra during the Reaction of D-Xylose with Glycine. An aqueous solution containing 2 M D-xylose, 0.4 M glycine and 0.1 M NaHCO_3 was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 30°C under an atmosphere of N_2 in a dark place. An aliquot of the reaction solution was taken at intervals and subjected to spectrometry after adequate dilution.

Fig. 2. Effect of the Molar Ratio between D-Xylose and Glycine on Bluing. An aqueous solution containing 0~2 M D-xylose, 0~2 M glycine and 0.1 M NaHCO_3 was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N_2 in a dark place. The total molarity of D-xylose and glycine was fixed to 2 M. O, A_{627} ; ●, A_{580}/A_{627} .

Fig. 3a. Effect of pH on Bluing Due to the Reaction of D-Xylose with Glycine. An aqueous solution containing 2 M D-xylose, 0.4 M glycine and 0.1 M NaHCO_3 was adjusted to varied values of pH and allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N_2 in a dark place for five days. The segments of lines drawn in the graph indicate the ranges of pH fluctuation during the reaction. —, A_{627} ; ----, A_{580}/A_{627} .

Fig. 3b. Effect of Temperature on Bluing Due to the Reaction of D-Xylose with Glycine. An aqueous solution containing 2 M D-xylose, 0.4 M glycine and 0.1 M NaHCO_3 was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at varied temperatures under an atmosphere of N_2 in a dark place. —, A_{627} ; ----, A_{580}/A_{627} .

ものと推定された。

2) pH の影響 (Fig. 3a) D-キシロース 2M, グリシン 0.4M の組成で pH を変えて反応させた。他の条件は 1) と同様にした。青変最適 pH は 7~8 で, pH 6 以下では緩慢に黄変後, 褐変した。他方, pH 9 以上では青変を経ずに速やかに褐変した。pH 7.5 で青変させた反応液を pH 5~6 に調節して放置しても青色に変化はなかったが, pH 9 にすると速やかに褐変した。

3) 温度の影響 (Fig. 3b) pH 7.5 で他の条件は 2) と同様にして温度を変えて反応させた。反応温度が高くなるにつれ青変開始は早くなるが, 青色持続時間は短縮し速やかに褐変した。90°C 以上では全く青変せずに褐変した。逆に, 比較的低温では青変開始は遅れるものの青色は安定に保たれ, 時間とともに強く青変した。なお 20°C で反応させた場合, 反応液を経時的にサンプリングし DE 81 によるイオン交換濾紙クロマトグラフィーによって青色スポットを分離・抽出・定量した結果を Fig. 4 に示す。この場合, 青色物質は一定量蓄積した後, 減少することが判明した。青色物質は本反応系にお

Fig. 4. Formation of Blue Pigment in the Reaction of D-Xylose with Glycine. An aqueous solution containing 0.5M D-xylose, 0.1M glycine and 0.1M NaHCO₃ was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N₂ in a dark place. An aliquot of the reaction solution was taken at intervals and applied to an ion-exchange paperchromatography which was performed on DE 81 by the method of descending with 0.1M acetate buffer (pH 5.0) as a developing solvent. The blue spot developed was extracted by 0.5M NaCl and subjected to colorimetry at 627 nm. The absorbance was calibrated with the amount of the blue substance which was chromatographically separated by the method as described in Fig. 6.

Table I. Effect of Light and Oxygen on Colorization in the Reaction of D-Xylose with Glycine

Conditions	Reaction period (days)			
	2	3	4	5
Light +O ₂	—	G(w)	G~B(m)	G~B(s)
	—O ₂	—	B(w)	B(s)
Dark +O ₂	—	G(w)	B~G(m)	B~G(s)
	—O ₂	B(w)	B(m)	B(s)

An aqueous solution containing 0.5M D-xylose, 0.1M glycine and 0.1M NaHCO₃ was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 20°C under varied conditions as shown in the above table.

G, green; B, blue. (s), strong; (m), medium; (w), weak.

ける褐変過程の中間体であると推定された。

4) 光および酸素の影響 (Table I) 20°C で光および酸素の有無の青変に対する影響を比較した。他の条件は 3) と同様にした。酸素存在下では明暗の別なく反応液は緑変し, 鮮明な青変は起らなかった。このことから酸素は青色物質を不安定化し褐変を促進する因子であることが予想された。無酸素条件下では明暗によらず鮮明な青色を呈したが, 暗所のほうが青変開始の早いことが認められた。しかし, 青変した反応液を明所に放置すると暗所に比較して速やかに褐変した。

5) 陰イオン種 (Na 塩) の影響 (Fig. 5a) 上記の反応系にはすべて触媒として NaHCO₃ 0.1M 添加しているが, NaHCO₃ の代りに NaH₂PO₄, CH₃COONa, NaCl をそれぞれ添加した場合の青変に及ぼす影響を比較した。ただしいずれも反応溶液を pH 7.5 に調節し, 他の条件は 4) と同様にした。その結果 NaHCO₃ に比べ, NaH₂PO₄ では鮮明な青変を経ずに速やかに緑変し, 次いで褐変した。また, CH₃COONa, NaCl では着色は著しく遅延し, かつ, 全く青変せずに褐変した。D-キシロース-グリシン系における青色物質の生成および蓄積に対し, HCO₃⁻ の存在が必要であることが確認された。

6) 溶媒の影響 (Fig. 5b) 親水性有機溶媒 (メタノール, エタノール, アセトン, イソプロパノール) の 50% 水溶液を反応溶媒として用い, 純水を溶媒とした場合と比較した。他の条件は実験方法の項 2 に従った。これらの有機溶媒の添加により, 純水と比べいずれも青変開始が早くなり, かつ, 青色も強くなった。また, アルコールについてはイソプロパノール > エタノール > メタノールの順で, 極性の低いものほど青変を促進した。

Fig. 5 a. Effect of Several Sodium Salts on Bluing due to the Reaction of D-Xylose with Glycine. An aqueous solution containing 2M D-xylose, 0.4M glycine and 0.1M sodium salt such as phosphate, bicarbonate, acetate and chloride was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N_2 in a dark place. —, A_{627} ; ----, A_{580}/A_{627} ; ●, phosphate; ○, bicarbonate; ▲, acetate; △, chloride.

Fig. 5 b. Effect of Several Hydrophilic Organic Solvents on Bluing Due to the Reaction of D-Xylose with Glycine. To an aqueous solution containing 2M D-xylose, 0.4M glycine and 0.1M $NaHCO_3$, hydrophilic organic solvent such as methanol, ethanol, isopropanol and acetone was added at 50%(v/v). The mixture was allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N_2 in a dark place after being adjusted to pH 7.5. —, A_{627} ; ----, A_{580}/A_{627} ; △, isopropanol; ▲, acetone; ○, ethanol; ●, methanol; □, H_2O .

さらにエタノールについてその濃度を変えると 70% まではエタノール濃度の増加とともに青変速度は増大した。しかし、80% 以上では着色開始は早くなるものの全く青変せず直ちに褐変した。反応溶媒の極性は青変速度に対して顕著に影響を及ぼすことがわかった。なお、各溶媒とも青変時の色調は肉眼的にはほとんど同じであった。以後の実験ではとくにことわらぬ限り 60% エタノールを反応溶媒として用いた。

2. 各種アミノ酸と糖による褐変初期における色調の比較

D-キシロース-グリシン系における青変の条件をその他のアミノ酸-糖の系に適用した場合の褐変反応初期における色調変化を調べた。

Table II に 20 種のアミノ酸のほかモノメチルアミン、グリシルグリシン、グリシンメチルエステルのおの

Table II. Effect of Various Amino Compounds on Colorization in the Reaction with D-Xylose

Amino compounds	Reaction period (days)		
	4	7	11
Trp	Y(m)	Y(s)	Y(s)
Lys	O(s)	Br(s)	Br(s)
His	Y~G(m)	Y~G(m)	Y(m)
Arg	P(s)	R~P(s)	R~Br(s)
Citrulline	Y(w)	Y(w)	O(w)
Ornithine	Y(s)	Br(s)	Br(s)
Asp	—	—	—
Glu	—	—	—
Thr	—	—	Y(w)
Ser	—	Y(w)	Y(w)
Pro	—	Y(w)	Y~G(w)
Gly	B(s)	B~G(s)	G~Bl(s)
Ala	—	Y(m)	Y(s)
Cys	—	—	—
Val	Y(w)	Y(s)	Y(s)
Met	Y(w)	O(s)	Br(s)
Ileu	Y(w)	Y(s)	Y(s)
Leu	Y(w)	Y(s)	O(s)
Tyr	—	—	Y~G(w)
Phe	Y~G(w)	Y(w)	Y~Br(m)
Monomethylamine	B(w)	B~Bl(s)	Br~Bl(s)
Glycylglycine	—	—	—
Gly-methylester	—	—	Y(w)

An aqueous solution containing 0.2M amino compound, 1M D-xylose and 0.1M $NaHCO_3$ was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N_2 in a dark place.

Y, yellow; O, orange; G, green; P, pink; Br, brown; B, blue; Bl, black; R, red. (s), strong; (m), medium; (w), weak.

おのに対して D-キシロースを反応させた場合の色調を定性的に示した。グリシン以外のアミノ酸では青変するものはなかった。ヒスチジン、プロリン、チロシン、フェニルアラニンでは緑変を経て褐変した。これらのアミノ酸では青色物質の生成と褐変が重なって起っていたものと考えられるが今後の検討を要する。その他のアミノ酸では鮮明な赤(アルギニン)、オレンジ(リジン、メチオニン)、黄(トリプトファン、シトルリン、オルニチン、バリン、イソロイシン、ロイシン)に変るものがあった。ここで採用した比較的穏和な反応条件では、反応初期において各種のアミノ酸で一般吸収とは異なる特異的な吸収スペクトルを有する色素が中間体として生成・蓄積するものと考えられる。アミノ酸以外ではモノメチルアミンの場合には鮮明な青変が観察された。

Table III はグリシンに対して五炭糖を反応させた場合の結果を示す。D-リボースでは濃く青緑変したが、D-アラビノースでは黄変した。なお、六炭糖 (D-グルコース, D-ガラクトース, D-マンノース, D-フルクトース) では五炭糖に比べ着色開始はきわめて遅く、全く青変せずに黄褐変した。

3. 青色物質の分離

D-キシロース 1M, グリシン 0.1M, NaHCO_3 0.1M の 60% エタノール溶液 1l を調製、塩酸で pH 7.5 に調節した。N₂ ガス通気後密封し、30°C, 24 時間、暗所に静置した。青変した反応液を 4°C, 暗所に 3 日間放置した。冷所に放置する間、青色はさらに濃くなるが、1 週間以上経過すると黒褐変するので、本実験では冷所 3 日放置のものを試料とした。エタノールを減圧留去後、蒸留水で適当に希釈し pH 6.8 に調節、DEAE-Sephadex による陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで分離した (Fig. 6)。主要な色素帯として青色画分が得られた。しかし、青色以外に黄色、赤色帯も分離した。青色画分を乾固しないように減圧濃縮し Sephadex G-10 (2×40

Fig. 6. Chromatogram for Some Pigments Formed in Bluing Due to the Reaction of D-Xylose with Glycine. The blued solution resulted from the reaction of D-xylose with glycine in the presence of NaHCO_3 was appropriately diluted and adjusted to pH 6.8. Then an aliquot of this solution was applied to a DEAE Sephadex A-25 column (2×20 cm) equilibrated with 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0). Elution was carried out with a linear gradient system consisting of 500 ml of 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 500 ml of the same buffer containing 0.2M NaCl at 4°C. Each fraction was 20 ml. The color intensity was measured in terms of absorbance at 627nm to the blue fraction, at 550nm to the red one and at 420nm to the yellow one, respectively. -----, conc. of NaCl.

cm) で脱塩し DEAE-cellulose で再び分画し、同様に脱塩し濃縮後、Bio-Gel P2 を用い 1M NaCl を展開溶媒

Table III. Effect of Various Pentoses on Colorization in the Reaction with Glycine

Pentoses	Reaction period (days)		
	2	6	11
D-Xylose	—	B(m)	G~Bl(s)
D-Arabinose	Y(w)	Y(w)	Y(m)
D-Ribose	G(w)	G~B(m)	Br~Bl(s)

An aqueous solution containing 1M pentose, 0.2M glycine and 0.1M NaHCO_3 was adjusted to pH 7.5 and allowed to stand at 20°C under an atmosphere of N₂ in a dark place.

Y, yellow; G, green; B, blue; Br, brown; Bl, black. (s), strong; (m), medium; (w), weak.

Fig. 7a. Gel Permeation of Blue Pigments Separated from the Blued Solution Resulted from the Reaction of D-Xylose with Glycine. The blue fraction obtained by chromatography on DEAE Sephadex A-25 (See Fig. 6) was desalted by gel filtration on Sephadex G-15 (2×40 cm) and concentrated to a small volume under reduced pressure. This solution was applied to Bio-Gel P2 (200~400 mesh) column (1×150 cm) equilibrated with 1M NaCl. Elution was carried out with 1M NaCl at a flow rate of ca. 1 ml/min at 20°C, and each fraction was 2 ml. The blue pigments were monitored by absorbance at 627 nm. The retention volume for the red pigment and the yellow one was also indicated in the graph.

Fig. 7b. Estimation of Molecular Weight of Blue Pigments Separated from the Blued Solution Resulted from the Reaction of D-Xylose with Glycine. The calibration plots for estimation of molecular weight were made by chromatography as described in Fig. 7a, using oligosaccharides including sucrose, raffinose and stachyose as markers.

Fig. 8 a. Absorption Spectra of Blue Pigments Isolated from the Blued Solution Resulted from the Reaction of D-Xylose with Glycine. The samples were the blue fractions (Blue 1, Blue 2 and Blue 3) obtained by chromatography on Bio-Gel P 2 as described in Fig. 7 a.

Fig. 8 b. Fluorescence Spectra of Blue Pigments Isolated from the Blued Solution Resulted from the Reaction of D-Xylose with Glycine. The samples were the same with those in Fig. 8 a. Excitation wave length ; 385 nm.

としてゲル濾過クロマトグラフィーを行った (Fig. 7 a). その結果 3つの青色帯に分離した。低分子域から Blue 1, Blue 2, Blue 3 とした。なお、さきに DEAE-Sephadex で分離溶出した黄色物質は Blue 1 より低分子域に、赤色物質は Blue 2 と 3 の中間に溶出することがわかった。Blue 1, 2, 3 を合せた収量は約 3mg であった。

4. 青色物質の性質

1) 分子量の推定 Blue 1, 2, 3 の Bio-Gel P 2 カラムによる溶出パターンに基づき、オリゴ糖 (ショ糖, ラフィノース, スタキオース) をマーカーとして分子量の推定を試みた (Fig. 7 b). その結果 Blue 1 約 800, Blue 2 約 1200, Blue 3 約 1600 と推定された。また黄色物質は約 400, 赤色物質は約 1300 となった。

2) 吸収スペクトルおよび蛍光スペクトル Blue 1, 2, 3 のおのおのの吸収スペクトルを Fig. 8 a に、蛍光スペクトルを Fig. 8 b に示す。青色物質のスペクトルは相互に若干異なっているが、きわめて近似しており、構造の類似性を示唆している。

3) 電気泳動 濾紙電気泳動の結果を Fig. 9 に示す。Blue 1, 2, 3 は相互に分離せず pH 2 より高い pH 域でマイナスに荷電するところから酸性解離基を有することが判明した。なお、DE 81 によるイオン交換濾紙クロマトグラフィーによっても Blue 1, 2, 3 は相互に分離

Fig. 9. Paper Electrophoresis of Blue Pigments Separated from the Blued Solution Resulted from the Reaction of D-Xylose with Glycine. The blue fraction obtained by chromatography on DEAE Sephadex A-25 as described in Fig. 6 was desalted by gel filtration on Sephadex G-15 as described in Fig. 7 a, and concentrated under reduced pressure. This solution was loaded on a paper, and electrophoresis was performed at 1 mA/cm (160~220 V) for 1 hr at room temperature. The buffers used were as follows ; 1/5M HCl-1/5M KCl (pH 2.2 and pH 2.5), 1/5M HCl-1/5M KH phthalate (pH 3.5 and pH 3.8) and 1/5M NaOH-1/5M KH phthalate (pH 5.8). All the buffers were adjusted to 0.2 of ionic strength.

しなかった。

4) 安定性 Blue 1, 2, 3 それぞれの中・酸性水溶液を 100°C, 10 分加熱しても吸収スペクトルは変わらず、青

色物質の単独水溶液は熱に安定であった。しかし、アルカリ性 (NaOH) ではいずれも加熱により速やかに脱色した。脱色した水溶液を酸性にするとわずかに青色が復元した。また、D-キシロース、グリシンをそれぞれ添加しても Blue 1, 2, 3 の色調は変らなかった。なお、Blue 1, 2, 3 はエタノール、メタノール、アセトンに不溶であったが、それぞれの 50% 水溶液中では室温で速やかに黒褐変した。

5) 赤色物質の生成 Blue 1 を硝酸銀または第二塩化鉄で処理すると赤色に変った。このときの反応液をイオン交換濾紙 (DE 81) クロマトグラフィーにかけたところ赤色のスポットが分離された (Fig. 10 a)。この赤色物質の吸収スペクトル (Fig. 10 b) はさきに分離した赤色物質と同一であった。Blue 2, 3 をそれぞれ同様に処理した場合は褐変し明確な赤色スポットは分離されなかった。青変した反応溶液中から分離された赤色物質は Blue 1 の酸化生成物に相当するものと推定された。

6) 黄色物質の青変 さきに分離した黄色物質は不安定で 30°C, 5 時間放置により青変した (pH 6~7 の水溶液)。このときの反応液をイオン交換濾紙 (DE 81) クロマトグラフィーにかけたところ R_f が Blue 1 と一致する青色物質の生成が確認された (Fig. 11)。D-キシロ

Fig. 10 a. Formation of Red Pigment from Blue 1 on Oxidation. The conditions for chromatography are described in Fig. 4. (A) red pigment; prepared in the same manner as described in Fig. 6, (B) Blue 1, (C) Blue 1 oxidized; treated with AgNO_3 aq. Fig. 10 b. Spectral Change of Blue 1 on Oxidation. (A) Blue 1, (B) Blue 1 was exhaustively oxidized by AgNO_3 .

Fig. 11. Formation of Blue 1 from Yellow Pigment. The conditions for chromatography are described in Fig. 4. (a) yellow pigment; separated in the same manner as described in Fig. 6 and concentrated under reduced pressure after desalting. (b) yellow pigment of (a) was heated at 50°C for 1 hr in an aqueous medium of pH 7.5. (c) Blue 1.

ース-グリシン溶液が青変する直前に黄色に着色することと併せてこの黄色物質は Blue 1 の前駆体と推定した。

7) Blue 1 と Blue 2, 3 の関係 D-キシロース-グリシン反応溶液がわずかに青変し始めた段階で、別に分離した Blue 1 水溶液を添加し反応を続行させた後、反応液を直接 Bio-Gel P2 カラムにかけて Blue 1 無添加の場合と比較したところ、Blue 1 の添加により Blue 2, 3 のバンドは Blue 1 無添加よりも著しく濃く出現した。この事実は何らかの反応生成物が Blue 1 に作用して Blue 2 および 3 の生成を促進したことを示す。なお、Blue 1 に D-キシロースまたはグリシンを作用させても Blue 2, 3 は全く生成しなかった。

考 察

本実験条件下で D-キシロース-グリシン系の褐変過程の初期において顕著な青変の起ることが明らかとなったが、生成した青色物質 Blue 1, 2, 3 の収量はきわめてわずかであった。現段階においてはこれらの色素の構造解析には至っていない。Blue 1, 2, 3 の混合物について予備的に元素分析したところ C/N 比は約 7 であった。この値は該色素が D-キシロースとグリシンの骨格を 1:1 で含むと仮定した場合の値とほぼ一致する。Blue 1, 2, 3 は吸収スペクトル、蛍光スペクトルが類似しており、何らかの共通単位構造を含むものではないかと考えられる。Blue 1 と Blue 2, 3 の関係およびそれらの分子量

の推定値より、これらの青色物質は D-キシロース-グリシン系の褐変過程における重合初期の一連のオリゴマーに相当する可能性が考えられる。

黄色物質については著者らは現在、重合初期における主たる活性モノマー種であろうと考えている。その理由として、①反応液の青変直前に黄色物質が出現すること、②黄色物質単独の水溶液を放置ないし加温すると容易に青変し Blue 1 が出現し、その際わずかながら Blue 2, 3 も生成すること、③Blue 1, 2, 3 それ自体は単独水溶液において比較的安定であること、④反応初期黄変段階（青変がわずかに始まっている段階）の反応液に Blue 1 を添加すると、無添加の場合に比べて Blue 2, 3 の生成が多くなること、⑤分子量の推定値から Blue 1, 2, 3 はそれぞれ黄色物質の約 2 倍、3 倍、4 倍に相当すること、などがあげられる。なお、黄色物質の推定分子量は約 400 であったが、D-キシロースおよびグリシンの骨格を 1:1 に含むものの二量体化したものであろうと推定しているが、今後の検討が必要である。

著者らは現在、青色物質の生成は褐色色素メラノイジン形成の主要な経路に位置していると考えている。その理由として、①DEAE-Sephadex によって得られた青色画分と黄色画分を混合することにより速やかに褐変し青色物質が消失すること、②D-キシロース 0.25 M, グリシン 0.5 M の水溶液を 100°C, 60 分加熱すると、青変せずに速やかに褐変するが、この時の褐変速度が極大となる pH は 7.5 付近⁽⁷⁾で青変の至適 pH とよく一致すること、などがあげられる。D-キシロースとアミノ化合物の反応により 3-デオキシペントソンが顕著に生成してくる⁽⁸⁾。オゾン類が青色物質の直接的な前駆体であるかどうかに関しては、さらに検討が必要である。

要 約

(1) グリシンと過剰の D-キシロースを微アルカリ

性条件で NaHCO_3 の共存下反応させると褐変開始前に顕著な青変の起ることを見出した。

(2) 青変は無酸素、親水性有機溶媒（メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン）の添加で強化された。高温では青変開始は促進されるが、青色持続時間は短縮され、調理条件（90°C 以上）では青変せず褐変した。

(3) 3 種の分子量の異なる青色色素（Blue 1, 2, 3）をクロマトグラフィーによって分離し、化学的性質および吸収・蛍光スペクトルを調べた。

(4) ゲル濾過クロマトグラフィーにより Blue 1, 2, 3 の分子量をそれぞれ約 800, 約 1200, 約 1600 と推定した。

(5) Blue 1, 2, 3 の生成経路について検討し、これらが重合反応初期における一連のオリゴマーである可能性について考察した。

本研究にご助言を賜いました東京大学教授加藤博通博士に厚くお礼を申し上げます。

- (1) P. S. Song and C. O. Chichester: *J. Food Sci.*, **31**, 914 (1966).
- (2) K. Suyama, A. Tachibana and S. Adachi: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 9 (1979).
- (3) T. Kurata and M. Fujimaki: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1471 (1973).
- (4) T. Kurata and M. Fujimaki: *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 676 (1973).
- (5) T. Hayashi, F. Manou, M. Namiki and K. Tsuji: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 711 (1981).
- (6) 堀越理代, 五明紀春: 日本農芸化学会昭和53年度大会講演要旨集, 1978, p. 376.
- (7) H. Kato: *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **20**, 273 (1956).
- (8) H. Kato: *Agric. Biol. Chem.*, **26**, 187 (1962).