魚肉の褐変に関する研究—III.

磷酸塩緩衝液中の糖とアミノ酸の褐変

永 山 文 男

(1960 年 6 月 16 日受理)

STUDIES ON THE BROWNING OF FISH FLESH—III.
BROWNING CAUSED BY SUGAR WITH AMINO ACID IN
PHOSPHATE BUFFER SOLUTION

Fumio NAGAYAMA*

In this series, browning of fish flesh have been studied in relation to the role of sugar component in the reaction, but some contradictory results with the behavior of sugar were obtained in the experiment on the browning of fish flesh by heat^{1,2)}.

Although the literature on the browning of sugar-amino acid or protein in model system is already voluminous, most of these reports do not deal with the reaction under the same condition as in raw or processed fish flesh.

Present author investigated the browning in sugar-amino acid system by heat in 0.1M phosphate buffer, pH 6.5, which is considered to be comparatively close to the natural condition.

Phosphate buffer seemed to accelerate browning of sugar even in the absence of amino acid (Table 1). Color production was stronger in ribose than in glucose (Table 2), but fluorescence was stronger in the latter (Table 6). Among amino acids, in general, basic acids produced color strongly, and acidic acids caused no browning (Table 2). There was no distinct correlation among browning, loss of sugar, and loss of amino acid (Tables 3, 4 and 5).

Details of the effect of phosphate on the browning and the properties of reaction products will be reported in the following paper.

畜肉、牛乳、鶏卵および魚貝肉等を含めたいわゆる肉製品の褐変は、主として Maillard 反応に基くものであることは既往の数多い研究から明らかである。著者は先に魚肉の加熱に伴う褐変と糖含量との関連性について検討し、遊離還元糖は褐変の主要な因子ではあるが、必ずしも糖含量と褐変度とは比例しないことを報告した^{1,2)}。

加熱による褐変が Maillard 反応に基くものであれば、当然、糖とならんで反応の主要なもう一つの因子であるアミノ化合物との関係について考慮せねばならない。また肉類などの天然物中には糖、アミノ化合物の他に各種の成分が含まれているのであるから、反応条件もかなり複雑なものと考えられる。したがって、純粋な糖とアミノ酸によるモデル実験の結果がそのまま実際に天然物を加熱した際に起る反応の全てを表わすものではないであろうが、著者は比較的自然状態に近い条件として pH 6.5 の磷酸塩緩衝液をえらんで、その緩衝液中での糖とアミノ酸の加熱に伴う褐変について観察し、褐変における糖とアミノ酸の関係を明らかにしようとした。

実 験

試 薬 アミノ酸、糖、磷酸塩等は全て市販の特級試薬をそのまま用いた。

方 法 予じめ pH 6.5 の 0.1M 磷酸塩緩衝液に糖を約 0.4~0.5mM/10ml になるようにとくして

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. Fish., Minato-ku, Tokyo, Japan).

おく。各アミノ酸を約 0.4mM とり、個々のアミノ酸毎に糖の溶液 10ml を加えアンプルに封入して 113° 90 分または 120° 60 分オートクレーブで加熱する。

分 析 アミノ酸はニンヒドリン法、グルコースはアンスロン法、リボースはオルシノール法で、それぞれ、加熱前と加熱後定量した。

吸光度は色調がきわめて濃いので 0.5cm のセルを使用して測定した。

螢光度は Beckman の螢光測定装置により、0.1N H₂SO₄ にとかした 100 万分の 1 の硫酸キニーネを 100% として測定した。

なお Table 1 にあげた実験の条件は表の説明に示したごとく、上記の実験条件とやや異なる点がある。

結果および考察

磷酸塩の影響 グリシン、リジンおよびヒスチジンの 3 種のアミノ酸に、それぞれグルコースまたはリボースを混じ水に溶解して加熱してもほとんど褐変を起さないが、磷酸塩緩衝液を加えて加熱すると著しい褐変が起る (Table 1)。普通 pH 7 以下では褐変が起らないとされているが³⁾、この結果から、pH 値の影響とは全く別に、磷酸塩の存在そのものによつて糖-アミノ酸系の褐変反応が促進されることは明らかである。しかも Table 1 にみられるように、アミノ酸を加えない場合でも磷酸塩を加えた糖液が褐変する点から、磷酸塩は糖-アミノ反応によらない糖の褐変をも促進するものと考えられる。磷酸塩が褐変反応を促進する作用を有することはすでにいくつかの報告にみられることであるが⁷⁾、天然物、殊に魚肉の褐変においてかなり重要な意味をもつ。すなわち魚肉中には通常多量の磷酸が存在し、さらに pH 値も本実験の条件に近似のものであるので、魚肉を加熱する際、磷酸が褐変を助長することが考えられるからである。磷酸塩のこのような影響が焦性ブドウ酸ソーダ⁴⁾あるいは醋酸塩⁵⁾等の褐変促進作用と同じ性質のものか否か、またその詳細な作用機作については更に検討を加え別に報告する。

Table 1. Effect of phosphate buffer on browning in sugar-amino acid system.

To the mixture of 1ml (40 micromoles) each of sugar and amino acid aqueous solution in water, was added 5ml of water or 0.1M phosphate buffer, pH 6.8. The solution was sealed in ampule, and autoclaved for 1 hour at 113°. Absorbance of the autoclaved solution was measured with 1cm cuvette.

Wave Length	Sugar	Solvent	Amino acid			
			Gly.	Lys.	His.	None
430 mμ	Glucose	Water	neg.	neg.	neg.	neg.
	Ribose	"	"	"	0.140	"
	Glucose	P.-Buffer	0.138	0.240	0.230	0.114
	Ribose	"	0.353	0.458	0.404	0.285
490	Glucose	Water	neg.	neg.	neg.	neg.
	Ribose	"	"	"	0.067	"
	Glucose	P.-Buffer	0.075	0.120	0.105	0.060
	Ribose	"	0.171	0.217	0.177	0.131

磷酸塩緩衝液中の糖-アミノ酸の着色 個々のアミノ酸をそれぞれ糖と混合し pH 6.5 の 0.1M 磷酸塩緩衝液に溶解して 113°C または 120°C に加熱すると、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸を除き、いずれのアミノ酸を混じたものも明らかに褐変する (Table 2)。糖のみの溶液についても Table 1 の場合と同様に褐変がみられるが、上記の 3 種を除いたアミノ酸を加えたものでは褐変が促進され、恐らく糖-アミノ反応が起つたものと考えられる。本実験で供試したアミノ酸中で最も褐変度の大きなものはリジンであり、ヒスチジン、グリシンがこれに次ぐ。これらのアミノ酸はいずれも褐変度の高いアミノ酸としてしば

しば既往のモデル実験^{6,7)}に用いられており、また馬場⁹⁾も魚介肉の加熱時の褐変にリジンが密接な関係を有することを認めている。一方本実験においてはアスパラギン酸、シスチン、グルタミン酸等は褐変を起さぬのみならず、むしろ糖の褐変を抑える傾向が認められ、チロシンも褐変度が小さかった。またリジンなどと同様に褐変のモデル実験にしばしば用いられているアルギニンも本実験では特別褐変度が大きいものではなかった。一般に魚肉は多量のリジンを含むことが知られているが、本実験の結果からも加熱による褐変にリジンが主要な因子となることが推定される。しかし LENTO⁹⁾ のようにアミノ酸の炭素数、UNDERWOOD¹⁰⁾ のようにアミノ基の位置についての規則性は認められなかった。当然のことであるが温度の高いほど褐変度は大きい。反応生成物については別に報告する。

Table 2. Absorbance of the phosphate buffer solution containing amino acid and glucose or ribose after autoclaving.

About 0.4 millimole of each amino acid and sugar were dissolved in 10 ml of 0.1M phosphate buffer, pH 6.5. Absorbance of the solution autoclaved was measured with 0.5 cm-cuvette at 490 m μ .

Amino acid	113°, 90 min.		120°, 60 min.	
	Glucose	Ribose	Glucose	Ribose
Ala.	0.208	0.322	0.577	0.825
Arg.	0.350	0.323	0.511	0.693
Asp.	—	—	0.043	0.206
Cys.	—	—	0.180	0.161
Glu.	0.015	0.062	0.025	0.132
Gly.	0.380	0.631	0.861	1.257
His.	0.398	0.770	0.870	1.385
Hyd.	0.193	0.428	0.552	0.818
Leu.	0.248	0.323	0.601	—
Lys.	0.999	0.850	1.583	1.732
Met.	0.258	0.410	0.631	0.980
Phe.	0.490	—	0.770	0.901
Pro.	0.131	—	0.410	0.613
Ser.	0.188	0.400	0.645	1.030
Thr.	0.170	0.394	0.656	0.894
Try.	—	—	0.600	0.816
Tyr.	0.111	0.273	0.303	0.550
Val.	0.241	0.374	0.722	0.900
None	0.060	0.176	0.219	0.374

Table 3. Loss of glucose during autoclaving with amino acid in phosphate buffer, pH 6.5.

Amino acid added*	Loss of glucose			
	113°, 90 min.**		120°, 60 min.***	
	micromoles per ml.	%	micromoles per ml.	%
Ala.	5.7	14.5	21.2	42.3
Arg.	12.6	31.7	23.4	46.7
Asp.	—	—	8.4	16.7
Cys.	—	—	20.5	40.1
Glu.	1.4	3.4	9.5	19.0
Gly.	5.2	13.1	22.3	44.5
His.	4.9	12.4	21.7	43.4
Hyd.	3.6	9.0	17.8	33.4
Leu.	6.8	17.2	13.4	26.7
Lys.	17.7	44.8	31.2	62.3
Met.	7.4	18.6	21.7	43.4
Phe.	10.5	25.5	25.6	51.2
Pro.	2.2	5.5	18.9	37.8
Ser.	7.6	19.3	22.8	45.6
Thr.	7.6	19.3	22.8	45.6
Try.	2.7	6.9	15.5	30.1
Tyr.	4.1	10.3	13.4	26.7
Val.	2.7	6.9	22.3	44.5
None	3.0	7.6	13.4	26.7

* Amounts of amino acids added are shown in Table 5.

** Original solution contained 39.6 micromoles of glucose per ml.

*** Original solution contained 50 micromoles of glucose per ml.

アミノ酸と加熱した糖の量的変化 (1) グルコース。本実験ではグルコース定量は還元法によらずアンスロン法だけによつたが、Table 3 に示したようにリジンと加熱したものが最も減少し、着色度と同じようにみえるが、次いでアルギニン、フェニルアラニンと加熱したものの減少度が大きく、着色度とは並行しない。アスパラギン酸、グルタミン酸は褐変を抑えたと同様にグルコースの減少をも抑制するように思われる。アミノ酸を加えない糖液の減少度を差引いて温度による差を比較すると、温度の高低による糖の減少度の差は着色度の場合ほど顕著でない。この結果から加熱による褐色物質の生成とアンスロン反応に陽性な

Table 4. Loss of ribose during autoclaving with amino acid in phosphate buffer, pH 6.5.

Amino acid added*	Loss of ribose			
	113°, 90 min.**		120°, 60 min.***	
	micromoles per ml.	%	micromoles per ml.	%
Ala.	20.4	59.8	29.5	59.0
Arg.	28.6	83.8	39.5	79.0
Cys.	—	—	27.3	54.5
Glu.	5.2	15.1	0	0
Gly.	26.0	76.1	34.4	68.7
His.	19.9	58.4	26.1	52.2
Hyd.	17.5	51.3	22.5	45.0
Leu.	19.7	57.9	—	—
Lys.	31.5	92.5	43.3	86.5
Met.	25.4	74.4	38.9	77.7
Phe.	23.1	67.8	35.2	70.4
Pro.	—	—	23.6	47.2
Ser.	23.8	69.7	35.5	70.9
Thr.	24.0	70.5	35.9	71.7
Try.	20.1	59.0	23.2	46.3
Tyr.	14.3	42.2	21.3	42.6
Val.	23.5	68.8	36.6	73.2
None	14.2	41.6	21.3	42.6

* Amounts of amino acids added are shown in Table 6.

** Original solution contained 34.1 micromoles of ribose per ml.

*** Original solution contained 50 micromoles of ribose per ml.

大きく、リジンとヒスチジンがこれにつぐと報告し、LEA¹⁴⁾はリジンが最も減少度が大きく、アルギニンがこれにつぐと述べている。HODSON¹⁵⁾もまた牛乳の褐変において上記3種のアミノ酸が著しい減少を起すことを観察した。しかし、本実験ではアルギニンの減少はさして顕著なものではなく、グルタミン酸およびグリシンが著しく減少した。リジンとヒスチジンの減少量は多いが、他のアミノ酸に比して、着色度についてみられたような特異性は示していない。馬場⁸⁾は魚貝肉の加熱に伴う有効性リジンの変化について観察し、リジンはグルコースの褐変を著しく促進するが、着色度とリジンの量的変化とはさして密接な関係を有するものでないことを報告しているが、本実験の結果と類似するものであろう。また糖の減少量 (Table 3 と 4) とアミノ酸の減少量 (Table 5) のモル数はアミノ基の数を考慮しても一致しない。

このように、着色度、糖およびアミノ酸の量的変化が相互に直線的相関を示さないことは、一つに本実験で用いた分析法によるものかも知れない。すなわち、褐変反応の生成物のある段階のものはアンスロン反応に陽性であり、また、あるものはニンヒドリン反応に陽性であることが知られており、このような生成物の混在が、真の糖あるいはアミノ酸の減少量を与えない危険性がある。しかし、褐変の初期の段階では糖-アミノ反応が 1:1 モル反応であることが知られているが、褐変反応が進むと、その間に更に別のアミノ化合物が反応に関与することが推定されているので、各種の段階の反応生成物が混在していると思われる本実験の分析結果は必ずしも反応の細部を示すものではない。

物質 (ヘキソース) の減少度とは必ずしも一致しないと考えられる。

(2) リボース。オルシノール反応によつてリボースを定量すると Table 4 のごとき結果を得た。すなわち、グルコースの場合と同様にリジンと加熱したものが最も減少度が大きく、アルギニンがそれに次いでいる。グルタミン酸、アスパラギン酸およびチロシンはリボースの減少を全く抑えるが、褐変を起さないシステインの試験区はリボースが明らかに減少している。このように、褐変度と糖の減少度が必ずしも併行しないことはアミノ酸の種類によつて、加熱時の糖との反応に差異があることを示すものである。Table 4 で 120°の方が113°よりもリボースの減少度 (%) が低い値になっているが、減少量 (μM) は 120°の方が多い。減少量、減少度ともグルコースに比べリボースは極めて大きな値を示し、また 113°で反応は急激に起るように思われ、着色度についての観察結果とあわせて、TARR¹¹⁾、HABIB¹²⁾等が述べているごとくりボースあるいはペントースがグルコースに比較し強い褐変作用を有することが認められる。

糖と加熱したアミノ酸の量的変化 糖とともに加熱した溶液中のアミノ酸の量をニンヒドリン反応で定量して Table 5 の結果を得た。最初に溶解したアミノ酸の量が各アミノ酸について同じでないで減少度 (%) を比較するよりは減少量 (μM) を直接比較するのが適当と思われる。すでに褐変におけるアミノ酸の減少について観察した多くの研究があり、蛋白と糖の褐変について GIRI¹³⁾はアルギニンが最も減少度が大きく、

Table 5. Loss of amino acid during autoclaving with sugar in phosphate buffer, pH 6.5 (113°, 90 min.).

Amino acid	With Glucose*				With Ribose**			
	Original	Autoclaved	Loss		Original	Autoclaved	Loss	
	micromoles per ml.	micromoles per ml.	micromoles per ml.	%	micromoles per ml.	micromoles per ml.	micromoles per ml.	%
Ala.	39.4	28.8	10.6	26.9	35.8	26.4	9.4	26.1
Arg.	40.7	34.4	6.3	15.6	36.2	29.1	7.1	19.6
Glu.	44.7	27.6	17.1	38.4	39.1	23.9	15.2	38.9
Gly.	42.5	28.5	14.0	33.0	43.8	30.5	13.3	30.3
His.	38.5	22.7	15.8	40.9	30.8	20.4	10.4	33.8
Hyd.	13.7	3.2	10.5	76.7	33.8	30.6	3.2	9.5
Leu.	28.6	23.6	5.0	17.6	19.3	15.0	4.3	22.3
Lys.	38.9	27.5	11.4	29.4	39.7	29.3	10.4	26.2
Met.	29.4	24.8	4.6	15.6	33.9	26.3	7.6	22.5
Phe.	31.8	24.3	7.5	23.6	—	—	—	—
Pro.	48.2	27.0	21.2	43.9	—	—	—	—
Ser.	32.4	27.2	5.2	16.1	35.7	28.8	6.9	19.1
Thr.	—	—	—	—	36.9	21.1	15.8	15.7
Try.	11.4	5.1	6.3	55.0	6.0	5.8	0.2	3.3
Tyr.	2.7	2.6	0.1	18.9	2.6	2.1	0.5	19.7
Val.	31.3	25.4	5.9	4.5	27.3	24.6	2.7	9.9

* 39.6 micromoles of glucose per ml.

** 34.1 micromoles of ribose per ml.

褐変液の蛍光 褐色物質の前駆体として蛍光物質が生ずることが知られている^{16,17)}が、本実験の褐変液でも数種のアミノ酸を除くほとんどの糖-アミノ酸液は蛍光を示した (Table 6)。液の濃度が高いと蛍光度

Table 6. Fluorescence of the phosphate buffer solution containing amino acid and glucose or ribose after autoclaving for one hour at 120°, pH 6.5.

Filter paper (Toyo No. 51) on which 0.05 ml of the autoclaved solution was spotted was extracted with 10 ml of 0.1N H₂SO₄ for 30 min. at room temperature. Relative fluorescence was measured against 10⁻⁶ quinine sulphate solution in 0.1N H₂SO₄ as 100% control.

Color of fluorescence was observed by the ultraviolet irradiation on the air dried filter paper on which the sample was spotted.

Amino acid	Relative Fluorescence		Color of Fluorescence*	Amino acid	Relative Fluorescence		Color of Fluorescence*
	Glucose	Ribose			Glucose	Ribose	
Ala.	4.0%	5.6%	white blue (m)	Met.	5.0%	0%	Light violet (m)
Arg.	10.8	10.8	"	Phe.	20.9	13.8	yellowish green (s)
Asp.	—	—	blue (vw)	Pro.	3.1	0	blue (w)
Cys.	—	—	Light blue (s)	Ser.	4.5	0.3	white blue (m)
Glu.	1.9	0	blue (vw)	Thr.	5.0	1.7	"
Gly.	6.9	10.6	pale pink (m)	Try.	29.2	18.6	{yellow ring, violet spot (s)
His.	14.9	15.7	bluish green (s)	Tyr.	2.5	0	neg.
Hyd.	2.2	0.8	blue (w)	Val.	5.2	5.9	blue (w)
Leu.	4.9	2.7	white blue (m)	None	0.8	0.7	neg.
Lys.	21.0	15.5	yellowish pink (s)				

* No difference of color is found between glucose and ribose. s, strong; m, median; w, weak; vw, very weak.

Fig. 1. Effect of dilution on the relative fluorescence of the autoclaved solution of sugar with amino acid.

Glucose-his. and ribose-lys. were diluted with 0.1N H_2SO_4 , and ribose-his. was diluted with 0.1M phosphate buffer, pH 6.5.

Fig. 2. Effect of pH on the relative fluorescence of the autoclaved solution of sugar with amino acid. Left ordinate, glucose-lys. and ribose-arg. diluted to 6×10^{-3} . Right ordinate, ribose-his. and ribose-gly. diluted to 1.2×10^{-2} .

がかえって小さくなるような場合もみられた (Fig. 1) ので 0.1N H_2SO_4 で 200 倍に希釈して測定した。グルタミン酸、アスパラギン酸は褐変も起さなかつたが蛍光もみられない。またメチオニン、チロシンも蛍光は弱い。それに反し、全く褐変のみられなかつたシスチン (蛍光度は測定しなかつた) が極めて強い蛍光を示した。褐変度の強いリジン、アルギニン、グリシンおよびヒスチジンは蛍光度も強い。トリプトファンとフェニルアラニンは褐変度も比較的大きいが蛍光度は特に高い値を示した。蛍光は pH 4.0~4.5 附近で最も強いもののようである (Fig. 2)。汚紙上にスポットして紫外線を照射して蛍光の色調をみると、アミノ酸の種類により多少異っている (Table 6)。グルコースとリボースを比較すると、前者の方が全般に蛍光度が強く、褐変度とは逆である。これは褐変の進行により蛍光体が更に褐色物質となつて蛍光を失うためと考えられる。

蛍光物質および褐色物質の分離とその性質については別に報告する。

要 約

- 1) pH 6.5 の磷酸塩緩衝液中のアミノ酸と糖の加熱による褐変について観察した。
- 2) 磷酸塩緩衝液は糖-アミノ酸の褐変を促進する。
- 3) リボースはグルコースよりも褐変度は大であるが、蛍光体はグルコースの方に多くみられた。
- 4) 最も褐変を起し易いアミノ酸はリジン、グリシンおよびヒスチジンであり、アスパラギン酸、グルタミン酸およびシスチンは褐変を起さない。
- 5) 糖およびアミノ酸の減少度はリジンを除いて褐変度とは併行せず、また糖とアミノ酸の減少量も一致しない。

本研究を行なうに当り御指導賜つた小野豊樹教授ならびに分析に協力された杉浦聰彦氏に深く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 小野・永山: 本誌, **24**, 833~836 (1959).
- 2) 永山: 本誌, **26**, 1026~1031 (1960).
- 3) C. O. WILLITS, J. C. UNDERWOOD, H. G. LENTO, Jr. and C. RICCITI: *Food Research*, **23**, 61~67 (1958).
- 4) R. G. RICE, Z. I. KERTESZ and E. H. STOTZ: *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1798~1800 (1947).
- 5) A. PATRON: *Ph. D. Thesis, University of Massachusetts*, 1949; Ref. No. 137 in 6).
- 6) J. P. DANEHY and W. W. PIGMAN: *Advances in Food Research*, **3**, 241~290 (1951), (Review).
- 7) J. E. HODGE: *J. Agr. Food Chem.*, **1**, 928~943 (1953), (Review).
- 8) 馬場: 本誌, **26**, 330~333 (1960).
- 9) H. G. LENTO, Jr., J. C. UNDERWOOD and C. O. WILLITS: *Food Research*, **23**, 68~71 (1958).
- 10) J. C. UNDERWOOD, H. G. LENTO, Jr. and C. O. WILLITS: *ibid.*, **24**, 181~184 (1959).
- 11) H. L. A. TARR: *Nature*, **171**, 344 (1953); *Food Technol.*, **8**, 15~19 (1954).
- 12) A. T. HABIB and H. D. BROWN: *ibid.*, **11**, 85~89 (1957).
- 13) K. V. GIRI, P. B. RAMA RAO and R. RAJAGOPALAN: *Food Research*, **18**, 217~222 (1952).
- 14) C. H. LEA and R. S. HANNAN: *Biochem. Biophys. Acta*, **5**, 433~456 (1950).
- 15) A. Z. HODSON: *Food Research*, **17**, 467~471 (1952).
- 16) L. FRIEDMAN and O. L. KLINE: *J. Biol. Chem.*, **184**, 599~606 (1950).
- 17) L. R. OVERBY and D. V. FROST: *J. Nutrition*, **46**, 539~550 (1952).