魚肉の褐変に関する研究—VI.

数種の解糖中間体の加熱による変化

永 山 文 男

(1960 年 9 月 26 日受理)

STUDIES ON THE BROWNING OF FISH FLESH—VI.
CHANGES OF SOME GLYCOLYTIC INTERMEDIATES BY HEAT

Fumio NAGAYAMA*

Glucose and ribose cause browning in the presence of amino acid, and the browning reaction seems to be accelerated by inorganic phosphate. In this experiment, some glycolytic intermediates, hexose-phosphates and adenosine phosphates, were autoclaved in the presence of amino acid.

G6P, F6P and FDP produced brown color, but G1P, AMP and ATP did not produce any visible color. In general, sugar phosphates and adenosine phosphates liberated inorganic phosphate and lost sugar during autoclaving. However, the degrees of phosphate-liberation and loss of sugar were greater in G6P, F6P and FDP which produced brown color than in others. Adenosine phosphates which contain ribose caused no browning, although it liberated inorganic phosphate and lost ribose by autoclaving.

It is considered that the browning of hexose phosphates except G1P is introduced by the liberation of inorganic phosphate from sugar, being followed by the sugar-amino reaction accelerated by the catalytic action of inorganic phosphate. Thus, the possibility that hexose phosphates may be involved in some extent in the browning of fish flesh by heat must be considered, although their contents are lower than these of free sugars in fish flesh.

加熱による魚肉の褐変は主として糖-アミノ反応に基くものと考えられるが、魚肉中にみられる遊離糖は解糖系によると思われるヘキソースと、核酸系によると思われるペントースが主なものである¹⁾。遊離リボースの生成機構はすでに TARR によつて明かにされており²⁾、また魚肉の解糖については著者が一連の研究を行なつて³⁾いる。

加熱による糖-アミノ反応は無機正リン酸により促進されるが⁴⁾、通常魚肉中には無機正リン酸がかなりの量存在するものであり、さらに鮮度の低下あるいは加工処理等に伴つてその量が増加することは、衆知の事実である。

一般に解糖中間体は糖のリン酸エステルの型を示すものであり、褐変反応の1つの因子である糖と、反応促進作用を持つリン酸とを共有する点から、解糖中間体と褐変との関連性を詳かにする必要がある。しかし、解糖中間体の加熱に伴う変化、あるいは褐変との関係についての報告例は TARR⁵⁾の一報にみるのみである。今回著者はヘキソースリン酸およびアデノシンリン酸をアミノ酸とともに加熱した場合の変化について観察を行なつたのでここにその結果を報告する。

実 験

試薬 市販特級のグルコース (G), リボース (R), フラクトース (F), グルコース-1-リン酸・K₂ (G1P), グルコース-6-リン酸・Ba (G6P), フラクトース-6-リン酸・Ba (F6P), フラクトース-1,6-リン酸・Ba (FDP), アデノシン-5-リン酸 (AMP), アデノシン-三リン酸 (ATP), およびリジン, グリシンを用いた。Ba 塩は 0.1N-HCl

* 東京水産大学 (Tokyo Univ. Fish., Shiba Kaigandori 6, Minato-ku, Tokyo).

に溶解し Na_2SO_4 を加えて Ba を除き中和して使用した。

方法 上記の種々の糖化合物とリジンまたはグリシンをそれぞれ終濃度約 5mM になるように蒸留水に溶解し (pH 6.8 に修正), アンプルに封入して 115° で 1 時間加圧蒸煮した。

測定法 III 報⁶⁾と同様に, 吸光, 螢光は Beckman DU 型光電光度計で測定し, ヘキソースはアンスロン法, ペントースはオルシノール法, 磷は FISKE-SUBBAROW 法で定量した。

ペーパークロマトグラフについては結果の項で述べる。

結果および考察

液の褐変度 アミノ酸を加えたあるいは加えないグルコース, リボース, フラクトース, G1P, AMP, および ATP は加圧蒸煮によつても全く褐変を起さず, G6P, F6P, FDP の三者は明かに褐変が認められた (Table 1)。しかもアミノ酸を添加することによつてその褐変度が大きくなっている点から, G6P, F6P, FDP による褐変もまたアミノ-糖反応に属するものであらうと推定される。通常魚肉中には上記種のヘキソース磷酸の含量はさして多くないが, 遊離糖とともに, ある程度褐変に関与する可能性があると考えなければならない。TARR⁹⁾ は G1P を魚肉に添加して加熱すると, グルコースあるいは G6P を添加した場合と同程度の褐変を齎すと報告しているが, 最も単純な二成分系によつた本実験では G1P は全く褐変を起さなかつた。

無機磷酸および糖の変化 加熱前後の無機磷酸および糖の定量を行ない Table 2 のごとき結果を得た。

Table 2. Changes of inorganic phosphate and sugar contents by autoclaving for one hour at 115° .

Sugar phosphate	Amino acid	Inorganic phosphate				Sugar			
		Before Autoclav.	After Autoclav.	Diff.	Liberated phosphate	Before Autoclav.	After Autoclav.	Diff.	Decreased sugar
		mM	mM	mM	%	mM	mM	mM	%
G1P	Lys.	0.145	0.700	0.555	10.0	5.54	5.54	0	0
	Gly.		0.638	0.493	9.0		5.54	0	0
	None		0.450	0.305	5.5		5.54	0	0
G6P	Lys.	0.105	2.36	2.26	35.1	6.44	3.27	3.17	49.2
	Gly.		2.36	2.26	35.1		3.19	3.25	50.4
	None		1.90	1.80	28.0		3.75	2.79	43.3
F6P	Lys.	0.188	2.43	2.24	54.6	4.10	1.70	2.40	58.5
	Gly.		2.43	2.24	54.6		1.70	2.40	58.5
	None		2.28	2.09	51.0		1.31	2.79	68.0
FDP	Lys.	2.61	7.43	4.82	70.3	3.43	0.278	3.15	91.8
	Gly.		7.78	5.17	75.3		0.194	3.24	94.4
	None		7.29	4.68	68.2		1.18	2.25	65.6
AMP	Lys.	0.109	0.958	0.849	21.0	4.03	1.96	2.07	51.3
	Gly.		0.700	0.581	14.4		2.35	1.68	41.7
	None		0.629	0.520	12.9		2.50	1.53	38.0
ATP	Lys.	0.825	6.67	5.85	43.1	4.52	2.85	1.67	37.0
	Gly.		6.24	5.42	40.0		—	—	—
	None		5.61	4.79	35.3		2.72	1.80	40.0

Table 1. Absorbance of sugar phosphates after autoclaving for one hour at 115°C in the presence of amino acid. Before autoclaving, solutions of ca. 5mM concentration for each component were adjusted to pH 6.8 with HCl or NaOH.

Sugar compd.	Amino acid	Absorbance	
		430 m μ	490 m μ
G6P	Lys.	0.222	0.114
	Gly.	0.184	0.108
	None	0.070	0.034
F6P	Lys.	0.326	0.170
	Gly.	0.266	0.134
	None	0.076	0.044
FDP	Lys.	0.244	0.110
	Gly.	0.250	0.116
	None	0.094	0.045
Glucose, ribose, fructose, G1P, AMP, ATP		below 0.050	

FDP および ATP は加熱前にすでかなりの無機燐が認められたが、他は糖の定量値から推定されるモル数の 2~3% の無機燐が混在する程度であり、後述のペーパークロマトグラフによる観察でも、純度は充分満足すべきものと考えた。加熱によつて遊離する無機燐の量は ATP, FDP に多く、ついで G6P, F6P が多いが、AMP および G1P は加熱によつて分解遊離する燐はきわめて少ない。遊離した燐の量を、糖の定量値を基にして計算して、Table 2 に示したような燐の遊離度が求められた。すなわち、FDP, F6P, ATP, G6P が加熱によつて分解されやすいと考えられる。

つぎに糖の量的変化 (Table 2) をみると、褐変した G6P, FDP, F6P の糖の減少が著しく、G1P は全く変化がみられなかつた。一方、全く褐変しない AMP, ATP においても糖の減少が明かに認められた。減少度を比較すると FDP が最も大きく、F6P, G6P, AMP, ATP の順になつた。

褐変度の大きい FDP, F6P, G6P はいずれも燐の遊離度および糖の減少度が大きい、燐の遊離度に比し糖の減少度がやや大きな値を示しており、その両者の差はどのような理由によるかは明かでない。しかし一般的に考える場合、まず加熱により燐が遊離し、生じたヘキソースがアミノ酸と反応するものであろう。アミノ酸がない場合の糖の減少および全く褐変を認めない AMP, ATP で糖の減少については詳かでないが、III 報⁶⁾ の場合にもみられたように、必ずしも糖の定量値と褐変度とは一致せず、加熱によつて、定量のための呈色反応に陰性な他の物質の生成があるということも一応想定せねばならない。

蛍光 糖-アミノ酸を加熱した場合に生ずる蛍光は、褐変物質の前駆体と考えられているが、本実験の場合でも、それぞれの加熱した溶液の蛍光を 1 p.p.m. の硫酸キニーネを標準として測定すると、Table 3 に示したように、特に褐変の顕著である FDP, F6P, G6P をアミノ酸と加熱した試験液にきわめて高い値が得られた。したがって上

Table 3. Relative fluorescence of the mixtures of sugar phosphate and amino acid after autoclaving for one hour at 115°C, when compared to 1 p.p.m. solution (0.1N H₂SO₄) of quinine sulfate.

Amino acid Comp.	Lys.	Gly.	None
G1P	12.0	8.0	6.0
G6P	36.0	32.0	6.0
F6P	41.0	40.0	0
FDP	46.6	26.8	0
AMP	15.6	7.8	5.4
ATP	12.8	5.0	0

Fig. 1. Paperchromatograms of sugar phosphates before and after autoclaving for one hour at 115°C. Paper strips (Toyo filter paper No. 51) were developed at room temperature by descending method. Spots were detected by molybdate reagent (M) and aniline phthalate reagent (A) for hexose phosphates, and by ultraviolet absorption for adenosine phosphates. *P_i* represents inorganic phosphate.

記3種のヘキソース磷酸はアミノ酸の共存下に加熱した場合、糖-アミノ酸系の場合と同様に、螢光物質を前駆体とする褐変物質を生成するとき反応を起すものと考えられる。

ペーパークロマトグラフ 加熱処理をした溶液中の成分の性質をペーパークロマトグラフによつて検討した (Fig. 1)。

すなわち、メタノール-ギ酸-水 (80:15:5)⁷⁾ によつて、東洋汙紙 No. 51 にスポットしたヘキソース磷酸を下降法で展開せしめ、加熱前後のものを比較した。まずモリブデン試薬⁸⁾ で検出を行なうと、加熱しないものは無機磷酸が認められない (FDP を除き) が、加熱したものでは多量の無機磷酸が検出される。また G6P, F6P, FDP それ自体が著しく減少し、同時に、さして明瞭ではないがアニリン蔭酸試薬⁹⁾ によるグルコースあるいはフラクトースと同定されるスポットを与えた。G1P は Table 2 の分析結果から推定されるのと同様に、ペーパークロマトグラフによつても、加熱による著しい分解が起らないことが確認された。G6P, F6P, FDP の褐色物質は糖-アミノ酸の場合⁸⁾ と同様に原点に残留するようにみえた。

つぎに iso-アミルアルコール飽和の 5% Na₂HPO₄ 水溶液⁹⁾ でアデノシン磷酸を下降展開して、紫外線吸収のスポットを検出すると、ATP は加熱によつて少量の ADP と多量の AMP を生じ ATP は全く消失していた。AMP の場合 R_f 0.48 附近にきわめて稀薄ではあるがアデニンあるいはアデノシンらしい1つのスポットがみられたが本実験からはそれ以上のことは明かでない。

Table 2 の結果と併せて考えると、ATP (およびおそらく ADP も) は加熱により高エネルギー磷酸を遊離して AMP になり、さらにその一部はオルシノール反応に対して陰性な物質に変化するものと思われるが褐変とは直接の関係が認められない。

要 約

1. ヘキソース磷酸およびアデノシン磷酸をアミノ酸とともに加熱してその変化を観察した。
2. G1P, AMP, ATP は全く褐変しないが、G6P, F6P, FDP は明かに褐変した。
3. 一般にヘキソース磷酸およびアデノシン磷酸は加熱により無機磷を遊離し、糖は減少した。
4. G6P, F6P, FDP の褐変液は強い螢光を示した。
5. アミノ酸が共存しないと磷の遊離度、糖の減少度、褐変度、螢光度等がいずれもアミノ酸共存の場合よりも小さかつた。
6. アデノシン磷酸の加熱による糖の減少の原因は明かでないが、G6P, F6P, FDP の場合には、加熱によりまず磷が遊離し、残つた糖部分がアミノ酸と反応し、螢光物質を経て褐変物質を生ずるものと考えられた。

本研究にご指導賜つた九州大学富山哲夫教授、東京水産大学小野豊樹教授ならびに実験に協力された佐野公博君に感謝の意を表する。

文 献

- 1) F. NAGAYAMA, T. ONO, F. SAKAI and T. KINOSHITA: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **45** (2), 163 (1959).
- 2) H. L. A. TARR: *Biochem. J.*, **59**, 386 (1955).
- 3) 小野・永山: 本誌, **23**, 260 (1957).
- 4) 永山: 本誌, **27**, 34 (1961).
- 5) H. L. A. TARR: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **8**, 74 (1950).
- 6) 永山: 本誌, **26**, 1107 (1960).
- 7) R. S. BANDURSKI and B. AXELROD: *J. Biol. Chem.*, **193**, 405 (1951).
- 8) 永山: 本誌, **27**, 28 (1961).
- 9) C. E. CARTER: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1466 (1950).