魚肉の褐変に関する研究—Ⅷ

リン酸またはホー酸が介在する
グルコース—リジン系の褐変反応

永 山 文 男

(1961 年 11 月 2 日受理)

STUDIES ON THE BROWNING OF FISH FLESH—VIII.
BROWNING REACTION OF GLUCOSE-LYSINE SYSTEM IN THE
PRESENCE OF PHOSPHATE OR BORATE

Fumio NAGAYAMA*

The browning reaction of glucose-lysine system was studied to explain the accelerating mechanism of the reacting by phosphate or borate.

Intensities of color, fluorescence and ultraviolet absorption of the system increased in parallel with each other. Decrease of fluorescence did not occur even though the browning reaction was extended. The fluorescence of the system was supposed to be due to not only precursor of brown pigment but final products of the reaction.

Ultraviolet absorption spectrum of the system containing phosphate differed from the one containing borate. Borate induced the loss of the reducing power of glucose in the absence of lysine.

It was considered that phosphate may accelerate the browning reaction by its simple catalytic action. On the contrary, borate may possibly accelerate the reaction through the formation of its complex with sugar. One of the possible way of the reaction induced by borate is aldehyde formation by opening of pyranose ring, and another way is ketose (sorbitose) formation.

第 V 報¹⁾において、糖-アミノ酸系の褐変が、リン酸およびホー酸によつて著しく促進されることを報告した。

通常魚肉中には 20~70mM 程度の無機リン酸が含まれるものであるから、魚肉の糖-アミノ反応に基づく褐変反応にもリン酸が関与するものと推察される。しかしリン酸がどのような作用機構によつて糖-アミノ系の褐変を促進するかは未だ明らかでない。

本実験においては、リン酸による褐変促進の機構と、あわせてホー酸の褐変促進の作用機構を明らかにするために、グルコース-リジンのモデル系を用いて、光学および化学的観察を行なつた。

実 験

試料および方法 pH 6.5 にした 0.1M リン酸塩またはホー酸塩溶液に、グルコースおよびリジンを 0.01 M になるように溶解し、還流冷却器を付して沸騰浴中で加熱した。

一定時間ごとに反応液をとつて、必要に応じ適宜に希釈したのち、Beckman 分光光度計を用いて吸光度および蛍光度を測定した。また同じ試料についてニンヒドリン反応度と還元力を測定した。なお還元力の測定は NELSON²⁾ の方法によつた。

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

結果および考察

着色体の生成 液の着色度を $430\text{m}\mu$ の吸光度によつて時間的に追跡し Fig. 1 の結果を得た。

リジンを含まないグルコース溶液の褐変は、ホー酸の共存により比較的急速に開始され、かつ直線的に反応が進むが、リン酸の場合には、着色体生成の開始がおそく、反応速度は時間とともにやや大きくなるような傾向がみられる。

リジンが共存する場合の着色体生成反応は、リジンがない場合より数倍急速に進むが、このときも反応の初期に、着色体が明瞭にみとめられない段階がある。その時間は、リン酸で1.5時間、ホー酸で1時間、リン酸とホー酸の両者を含むものでは0.5時間であつた。各時間における褐変度を比較すると、リン酸とホー酸の両者を含むものの褐変度は、リン酸あるいはホー酸を単独に含むものの褐変度の和にほぼ等しい。したがつて、リン酸あるいはホー酸がそれぞれリジンと synergistically に作用してグルコースの褐変を促進するとしても、ホー酸とリン酸は互いに相乗作用をもたないことが明らかで、両者はそれぞれに特有の褐変促進作用を個々に行なうものと思われる。

Fig. 1. Development of color in glucose-lysine system.

Systems dissolved in 0.1M phosphate or borate buffer, pH 6.5, were heated in boiling water bath. B, glucose-lysine system with borate; P, the system with phosphate; BP, the system with borate and phosphate; CB, glucose with borate; DP, glucose with phosphate.

Fig. 2. Development of fluorescence in glucose-lysine system.

Method and abbreviations are the same as in Fig. 1.

Fluorescence was measured by the use of Beckman DU spectrophotometer.

蛍光体の生成 蛍光生成反応をみると Fig. 2 のように、着色体の生成についてみられたとほとんど同様の傾向が認められた。

既往の研究の多くは、蛍光体は着色体の前駆体と考えている。PATRON³⁾はグルコース-グリシン溶液から無色に近い蛍光物質を単離したと報告しているが、本実験の着色体生成と蛍光体生成に関する観察結果からは、蛍光生成反応が明らかに着色反応に先行するとは考えられない。蛍光物質が着色物質の前駆体であると

推論した一つの研究例に、OVERBY ら⁴⁾ のデキストロース-フィブリンの褐変に関する報告がある。すなわち、加熱時間の経過に伴い着色度は増加するが蛍光度は減少すること、および重亜硫酸塩の添加は着色を抑えるが蛍光生成を抑えないことなどから、蛍光体は着色体の前駆体であると推論した。しかし、その実験では褐変した溶液を希釈せず直接蛍光を測定しているために、第 III 報⁵⁾ にも述べたような自己消光あるいは着色物質による干渉がきわめて大きく、蛍光の値を正しく示していないことは疑う余地がない。また、FRIEDMAN ら⁶⁾ もグルコース-アミノ酸系の褐変液の蛍光を測定し、長時間加熱して褐変度が増するにつれて、最初のうちは増加した蛍光がかえって減少すると報告しているが、これも上述のような理由によると思われる。

本実験では特にその点に留意して、試料を必要に応じ充分に希釈 (10~150 倍) したのちに蛍光度を測定した。その値に希釈率を乗じて原液の蛍光度を算出すると、100° で 36 時間加熱後も蛍光度は減少することなく、着色度と同様な増加がみとめられた。一方、OLCOTT ら⁷⁾ もグルコース-グリシンの褐変反応について、着色度と蛍光度の増加曲線が類似の傾向を示すと報告している。したがって、蛍光体の生成と着色体の生成は並行的に進行するものと思われる。また第 IV 報⁸⁾ および次報にも明かなように蛍光体自体単一の物質ではなく、必ずしも着色物質の前駆体とのみは考えられず、反応後期の生成物である着色性の含窒環式化合物を含むものであろう。

紫外吸収スペクトルの変化 糖-アミノ反応の中期に紫外線を吸収する物質の生成が起こるといわれている。260 m μ と 295 m μ の吸光度の変化を時間的に追跡して Fig. 3 および Fig. 4 のような結果を得た。すなわち、紫外吸収度の増加曲線には、着色体および蛍光体の生成においてみられたような反応初期の誘導期に類する段階はみとめられなかつた。

ここで 295 m μ の吸光度はリン酸を含むもののほうが大きいが 260 m μ の吸光度はホー酸を含むものが大

Fig. 3. Development of ultraviolet absorption in glucose-lysine system.

Methods and abbreviations are the same as in Fig. 1.

Absorption at 260 m μ was measured.

Fig. 4. Development of ultraviolet absorption in glucose-lysine system.

Methods and abbreviations are the same as in Fig. 1.

Absorption at 295 m μ was measured.

Fig. 5. Ultraviolet absorption spectra of glucose-lysine system.
Fig. P, with phosphate; Fig. B, with borate. Numerals in figure represent reaction time in hour.

きい。そこで紫外領域のスペクトルを求めると Fig. 5 のように、ホー酸とリン酸では全く異なっている。

紫外吸収の増加から判断すれば、従来考えられている褐変反応の中期の段階までにおいて、リン酸およびホー酸が触媒作用をもつと想定することが可能であるが、スペクトルからみて、これら両者の作用機構は異なるものと思われる。

リン酸は第 IV 報⁸⁾で述べたように、直接糖あるいは反応物質と結合しないようであつて、単純な液相均一触媒として作用するものであろう。なお、スペクトルの時間的な変化をみると、褐変が進み褐色の沈澱物が生ずるころ(約 16.5 時間)から 270 mμ に肩が現われはじめ、36 時間に至ると 295 mμ の肩が消えて 270 mμ の吸収が著明になつた。これは反応の進行とともに、初期の反応生成物とは異種の短波長に吸収極大をもつ物質が蓄積することを示すものである。

ホー酸は 2 個の隣接する水酸基がシス位にある多価アルコールと結合して錯化合物を作る。また還元糖とアミノ酸の縮合は糖のアルデヒド型の量に比例するといわれている⁸⁾。この 2 点から、ホー酸がグルコースの 4, 5 位に結合して不可逆的にピラノースの開環をもたらし、そこに生じたアルデヒド型の糖がアミノ酸と付加する経路が考えられる。しかしこの場合、アミノ付加物となつたのち、さらに 1, 2 位にホー酸が結合する可能性も想定しなければならない。一方、ピラノース型のまま 1, 2 位にホー酸が結合したとすれば糖はいつたんソルボース型となつて、その後はケトースの褐変機構を辿ると考えなければならない。いずれの場合でも、ホー酸は容易に離れるとは思われないので、その後も結合状態で介在するであろう。しかし食品、特に魚肉の場合、ホー酸が関与する褐変反応はほとんど無いと思われる。したがつて、この問題は本研究とは別個に考究したい。

グルコースとリジンの変化 グルコースおよびリジンの減少は加熱開始と同時に起こり、反応の初期(4, 5時間)までは、グルコースの減少度はリジンの減少度の2倍の値を示し、MICHEEL ら⁹⁾の報告しているように、見掛け上グルコース 2: リジン 1 のモル比の反応であつた (Figs. 6 と 7)。

Fig. 6. Loss of reducing power in glucose-lysine system.

Methods and abbreviations are the same as in Fig. 1.

Fig. 7. Loss of amino group in glucose-lysine system.

Methods and abbreviations are the same as in Fig. 1.

アミノ酸を含まない糖液の還元力も、リン酸あるいはホー酸の共存により減少する。リン酸の場合にはアミノ酸がないと還元力の減少速度はアミノ酸がある場合の1/3であつたが、一方、ホー酸の場合にはアミノ酸の有無に関係なく還元力が減少した。このようにホー酸が共存する場合、アミノ酸あるいは着色度と関係なく還元力が減少することは、先に述べたように、ホー酸がグルコースと直接結合する特異な反応経路を迎ることによるものと考えなければならない。

アミノ酸を含む場合のグルコースの減少度は、リン酸とホー酸とで着色反応にみられたほどの差はなく、リン酸では見掛け上 76.3% を反応極限とする一次式、ホー酸では 48.0% を極限とする 3/2 次式に近い曲線であつた。

ニンヒドリン反応度、すなわちリジンの減少度はリン酸では 17.5% を極限、ホー酸では 26.8% を極限とする 3/2 次式に近い曲線を示し、各時間における減少度を比較するとリン酸 2: ホー酸 3 の比であつた。

しかし褐変反応液中には各種の中間生成物が混在するものであつて、ここに得られた結果から正しい反応論的考察を行なうことはできない。

要 約

リン酸またはホー酸の共存するグルコース-リジン系の褐変反応を観察した。

1. 着色体、蛍光体、および紫外吸収物質は加熱時間の経過に伴ないいずれも増加することがみとめられた。紫外吸収スペクトルはリン酸共存の場合とホー酸共存の場合とで全く異なるものであつた。

2. リン酸の褐変促進作用は液相均一触媒としての作用に基づくものと思われるが、ホー酸の場合はグルコースと直接結合する特異な反応経路が推定される。

3. 反応の初期においてはグルコースの減少とリジンの減少の比は 2:1 であつた。ホー酸はアミノ酸の有無にかかわらず還元力の減少をもたらした。

本実験にご指導賜わ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一杉秀成氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) 永山文男: 本誌, 27, 34 (1961).
- 2) N. NELSON: *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944).
- 3) J. A. HODGE: *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928 (1953).
- 4) L. R. OVERBY and D. V. FROST: *J. Nutrition*, 46, 539 (1952).
- 5) 永山文男: 本誌, 26, 1107 (1960).
- 6) L. FRIEDMAN and O. L. KLINE: *J. Biol. Chem.*, 84, 599 (1950).
- 7) H. S. OLCOTT and H. J. DUTTON: *Ind. Eng. Chem.*, 37, 1119 (1945).
- 8) 永山文男: 本誌, 27, 28 (1961).
- 9) F. MICHEEL and A. KLEMER: *Chem. Ber.*, 1083 (1952).