水産食品の変色—V.

アミノ酸—還元糖—脂質系での油焼機構

豊水正道・鍾忠勇

(43年4月30日受理)

Studies on Discoloration of Fishery Products—V.
Mechanism of Rusting in Amino Acid-Reducing Sugar-Lipid System.

Masamichi TOYOMIZU and Chung-Young CHUNG*

It has been known that nonenzymatic browning in fish muscle is caused by Maillard reaction or lipid oxidation, however no report has been presented about the correlation between them. In an attempt to elucidate it, browning in lysine-ribose-fatty acids (*R*), lysine-ribose (*M*) and lysine fatty acids (*L*) systems was studied in model dehydrated systems (Table 1).

The colored products were extracted from these systems and fractionated into dialyzed water soluble fraction formed by Maillard reaction and CHCl_3 -MeOH soluble fraction by lipid oxidation (Fig. 1). These colored fractions from *R* system were compared with those from *M* system, *i.e.* Maillard system or from *L* system, *i.e.* lipid oxidation system respectively, in color intensity (Table 2) and by spectro analyses and thin layer chromatography (Figs. 2~6). In *R* system, Maillard reaction was accelerated by lipid oxidation, while lipid oxidation was inhibited by Maillard reaction (Table 3). Consequently, browning in *R* system was due mainly to Maillard reaction, suggesting that browning by Maillard reaction might play an important role in rusting of fish muscle containing nitrogenous compound, reducing sugar and unsaturated lipid. Further, the reason why sodium bisulfite did not inhibit browning in the presence of lipid was that it could not inhibit Maillard reaction (Table 4).

食品の非酵素的褐変反応として、還元糖と含窒素物との反応および酸化脂質と含窒素物との反応が重視されているが、これらは別々の問題として研究され、これら相互の関連に関する研究は見当たらない。水産動物は高度不飽和酸を含有しているので、加工中あるいは貯蔵中の脂質酸化による変色が注目され、油焼と呼ばれている。水産動物中には脂質、含窒素物のほかに還元糖も含有されているので、これら3成分が変色に関与している可能性があり、著者の一人¹⁾はモデル乾燥系で脂質と含窒素物による油焼が還元糖の存在で促進されることを見いだした。著者らは脂質、含窒素物および還元糖の3成分による変色機構を解明するためにモデル乾燥系を用いて研究した。

実験方法

モデル乾燥系の調製 アミノ酸として L-リジン、還元糖として D-リボース、脂質として混合脂肪酸、担体としてセライトを用い、前報²⁾の方法に準じて Table 1 に示したリジン-リボース-脂肪酸系 (*R*)、リジン-リボース系 (*M*)、およびリジン-脂肪酸系 (*L*) を調製した。各系をペトリ皿に入れ、30°C (RH 48%) でとくに記載したほかは7日間貯蔵した。なお混合脂肪酸の組成をガスクロマト法で分析し、その結果も Table 1 に記した。

* 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Tech., Kyushu Univ., Fukuoka, Japan)

Table 1. Model dehydrated system.

<i>R</i> :	Lysine + ribose + fatty acids
<i>M</i> :	Lysine + ribose
<i>L</i> :	Lysine + fatty acids

0.2 m mole of lysine and ribose and 10 ml of M/10 phosphate (pH 6.90) were added to 1 g of Celite (No. 535) which was used as a support medium. After lyophilization, 0.25 g of fatty acids were added to the systems.

Fatty acids composition (%): C_{16:0} 2.7, C_{18:0} 1.4, C_{18:1} 4.9, C_{18:2} 50.9, C_{18:3}, C_{20:0} 15.5, C_{20:1} 26.1

Model dehydrated system

Fig. 1. Extraction scheme of colored products from model dehydrated system.

変色物質の分画 各系からの変色物質の分画を Fig. 1 に示したように行なつた。すなわち未変色脂質をヘキサンで抽出後、脂質酸化による変色物質である CHCl₃-MeOH 可溶性分画と MAILLARD 反応による変色物質である透析水溶性分画とに分けた。

変色度の測定 前記 2 画分をそれぞれ 20 ml とし、変色度を 460 mμ の吸光度で表わした。

脂肪酸の酸化度の測定 脂肪酸を BF₃-MeOH 法³⁾ でメチル化し、ガスクロマトグラムからミリスチン酸メチルとリノール酸メチルのピーク高を測定した。未酸化原混合脂肪酸および 8 日間貯蔵した *R* 系あるいは *L* 系からのヘキサン可溶性分画のそれらをそれぞれ H_{14} , h_{14} ; $H_{18:2}$, $h_{18:2}$ とし、 $\left(1 - \frac{h_{18:2}/h_{14}}{H_{18:2}/H_{14}}\right) \times 100$ で酸化度を算出した⁴⁾。なお標準脂肪酸として一定量のミリスチン酸をあらかじめ添加した混合脂肪酸を供試した。

結 果

R 系の変色物質を CHCl₃-MeOH 可溶性分画と透析水溶性分画とに分け、これらの変色度をそれぞれ *L*, *M* 系の変色度と比べたのが Table 2 である。すなわち透析水溶性分画の変色度は $R > M$ で、CHCl₃-MeOH 可溶性分画では $L > R$ であり、*R* 系での変色の大部分は MAILLARD 反応によるもので、脂質酸化によるものは僅少であつた。また変色度を反射率から算出した前報での結果¹⁾と同様に *R* 系の全変色度は *M*, *L* 系の変色度の和よりも大であつた。他方 8 日後のリノール酸の酸化度は Table 3 に示したように、1 g のセライトに 0.25 g の混合脂肪酸のみを添加した対照に比べて *L* 系では僅かに、*R* 系では著しく小であつた。

R, *L* 系の CHCl₃-MeOH 可溶性分画の紫外吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。さらにこれら画分をそれぞれ CHCl₃ 溶液としてシリカゲルカラム (1.2×27 cm, Mallinckrodt 製, 100 メッシュ) に通し、100 ml のエーテル/ヘキサン (20/80) で展開して未

Table 2. Color intensity of each fraction in model dehydrated system.

System			
Fraction	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>L</i>
CHCl ₃ -MeOH	0.054	0.012	0.060
Dialyzed water	1.707	1.451	0

Optical density at 460 mμ was measured with 20 ml soln.

Table 3. Difference in linoleic acid oxidation between *R*- and *L*-system.

Deterioration rate		
System stored for 8 days	$\left(1 - \frac{h_{18:2}/h_{14}}{H_{18:2}/H_{14}}\right) \times 100$	
<i>R</i>	2.5	
<i>L</i>	63.8	
Control (fatty acids on Celite)	88.4	

H and *h* represented peak heights of methyl ester in original and deteriorated sample on gas chromatograms.

変色脂質を流出後、45 ml の $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{水}$ (65/25/2) で変色脂質を溶出して精製した。これら 精製画分のヘキサン/クロロホルム/メタノール/水/酢酸 (15/65/25/2/1) を展開剤とするシリカゲル薄層クロマトグラム (Wakogel B-0) を Fig. 3 に示した。またこれら 精製画分の赤外スペクトルを Fig. 4 に示した。これらの結果から、脂質酸化によって生成される *R*, *L* 系の変色物質には差異が見いだせなかつた。

他方、*R*, *M* 系の透析水溶性画分のカラムクロマト法あるいはペーパークロマト法による精製は成功しなかつた。これらの画分は透析による精製がすでに行なわれているので、紫外および赤外スペクトルを測定し、それぞれ Figs. 5, 6 に示した。これらの結果から、*R*, *M* 系の MAILLARD 反応によって生成される変色物質にも差異が見いだせなかつた。

Fig. 2. Absorption spectra of CHCl_3 -MeOH fractions from *R*- and *L*-system.

Fig. 3. Thin layer chromatogram of CHCl_3 -MeOH fractions from *R*- and *L*-system purified by column chromatography on silicic acid.

Thin layer: Wakogel B-O (270 μ), Developing solvent: hexane/ CHCl_3 /MeOH/ H_2O /AcOH (15/65/25/2/1), Control: obtained from fatty acids on Celite stored at 30°C for 45 days.

Fig. 4. Infrared absorption spectra of CHCl_3 -MeOH fractions from *R*- and *L*-system purified by column chromatography on silicic acid. Spectra were obtained as a film.

Fig. 5. Absorption spectra of dialyzed water fractions from *R*- and *M*- system.

Fig. 6. Infrared absorption spectra of dialyzed water fractions from *R*- and *M*-system.

Spectra were obtained in a KBr disk.

考 察

水産動物の褐変は微生物あるいは酵素によらない悪変として大きな問題であり、これは脂質酸化による油焼あるいは MAILLARD 反応のいずれか一方に帰せられてきた。本研究では、*R*系すなわちリジン-リボース-脂肪酸系での変色は MAILLARD 反応に主として原因し、MAILLARD 反応による変色物質である透析水溶性画分の変色度は脂質酸化による変色物質である CHCl_3 -MeOH 可溶性画分の約 30 倍であつた (Table 2)。その上 *R* 系の CHCl_3 -MeOH 可溶性画分の変色物質は *L* 系のそれと、また *R* 系の透析水溶性画分の変色物質は *M* 系のそれと、それぞれ同一物質であつた (Figs. 2~6)。このことから、リジン、リボースおよび脂肪酸の 3 成分が存在している *R* 系では MAILLARD 反応による変色と酸化脂質とリジンとの反応による変色との 2 変色のみが関与し、これら以外の変色反応は関与していないと結論される。

各系での変色度の相違を示した Table 2 から、透析水溶性画分の変色度は $R > M$ であつた。このことは *R* 系での MAILLARD 反応が脂質の存在すなわち脂質酸化によつて促進されることを示している。これは脂質酸化によつて生じる遊離基の促進作用に基づくものであろう。また *L* 系の透析水溶性画分の変色度が 0 であつたことは脂質酸化によつては水溶性変色物質の生成が無かつたことを示し、注目に値する。他方著者らは脂質として脂肪酸を用いたので、未変色油の大部分をヘキサンで除去することに成功した。このよう

にして得た脂溶性変色物質である CHCl_3 -MeOH 可溶性画分の変色度は $L > R$ で (Table 2), またリノール酸の酸化度も $L > R$ であった (Table 3)。これらは R 系で進行する MAILLARD 反応が脂質酸化とこれによる変色とを阻害していることを示している。これは脂質酸化によつて生じる遊離基が MAILLARD 反応に関与するために、脂質酸化の反応連鎖が切断されるためで、結果的には MAILLARD 反応生成物は抗酸化的に作用している。すなわちアミノ酸、還元糖および脂質の3成分を含む R 系では、MAILLARD 反応は脂質酸化によつて促進され、脂質酸化による変色は MAILLARD 反応によつて阻害されると結論される。このため脂質が存在しているにもかかわらず、 R 系での変色には MAILLARD 反応が主役を演じ、従来から魚の油焼といわれている褐変は酸化脂質の変色よりも MAILLARD 反応に基づく変色が主役を演じていると推論される。

著者らが考案したモデル乾燥系での MAILLARD 反応は、リジンで最も強く変色するが、バリンあるいはメチオニンでは変色し難い²⁾。前述のような脂質酸化による MAILLARD 反応促進がリジンのみでなく、バリン、メチオニンでも認められることを Table 4 に示した。また混合脂肪酸の存在する R 系では、 NaHSO_3 によつて MAILLARD 反応が阻害されなかつたことが Table 4 から分る。すなわち脂質酸化は NaHSO_3 の MAILLARD 反応阻害作用を無効にした。これは NaHSO_3 が MAILLARD 反応を阻害するが、油焼を阻害しないと指摘した前報の結果²⁾ と考え合わせて興味あることである。

MAILLARD 反応はアミノカルボニル反応で、含窒素物は反応にとり込まれるが、脂質酸化による変色に含窒素物がとり込まれるかどうかには問題がある。TAPPEL⁵⁾ は酸化脂質と蛋白との反応はアミノカルボニル縮合反応であると述べた。しかしこの反応の活性化エネルギーがアミノカルボニル反応よりも低いこと、アミノカルボニル反応を阻害する NaHSO_3 の添加および蛋白のアセチル化が無効であることから、同氏は⁶⁾ アミノカルボニル反応説を自ら後に否定した。野中⁷⁾ は酸化油が揮発性塩基窒素物の存在下で変色し、この変色油を分画すると変色物質は酸化酸と行動を共にすると述べ、酸化酸を精製すると変色度は変化しないが、窒素量が減少するから、含窒素物は変色反応にはとり込まれないと結論した。著者らの結果では、 R, L 系の CHCl_3 -MeOH 可溶性画分をシリカゲルカラムクロマト法で精製したものは元素分析の結果それぞれ 0.5%, 0.48% の窒素を含んでいた。これらの赤外スペクトルは含窒素基の吸収を示さないこと (Fig. 4), および混合脂肪酸のみをセライトに混和し 45 日間貯蔵して生成した変色物質のシリカゲルカラムクロマト法による精製物 (窒素含量 0) とほぼ同一の挙動を薄層クロマトグラムで示したこと (Fig. 3) から、少量の窒素は不純物と考えられるが、結論は今後の研究にまたねばならない。

要 約

1. 油焼と MAILLARD 反応との関係を明らかにするために、モデル乾燥系であるリジン-リボース-脂肪酸系の変色物質を脂質酸化による変色物質である CHCl_3 -MeOH 可溶性画分と MAILLARD 反応による変色物質である透析水溶性画分とに分画して検討した。
2. 脂質酸化は MAILLARD 反応を促進し、この系での変色の大部分は MAILLARD 反応によるものであった。
3. MAILLARD 反応生成物は抗酸化的に作用し、脂質酸化による変色は弱かつた。
4. これらの結果から、含窒素物、還元糖および脂質を含有している魚肉の油焼では MAILLARD 反応による変色が主役を演じていると推論された。

Table 4. Acceleration of Maillard reaction in R -system by fatty acid oxidation.

System stored for 10 days Amino acid used	Color intensity of dialyzed water fraction	
	R	M
Valine	0.261	0.189
Methionine	0.471	0.121
Lysine+ NaHSO_3	1.910	0.225

Optical density at 460 $m\mu$ was measured with 20 ml of dialyzed water soln.

5. NaHSO_3 が油焼を阻害しないのは、脂質存在下では NaHSO_3 が MAILLARD 反応を阻害しないことに原因している。

文 献

- 1) 豊水正道・山崎統道・古森善裕: 本誌, **34**, 143~145 (1968).
- 2) 豊水正道・山崎統道・古森善裕: 本誌, 第IV報 **34**, 853~856 (1968).
- 3) W. R. MORRISON and L. M. SMITH: *J. Lipid Res.*, **5**, 600~608 (1964).
- 4) K. IMAICHI, J. FUKUDA and A. NOTOMI: *J. Biochem.*, **59**, 189~191 (1966).
- 5) A. L. TAPPEL: *Arch. Biochem. Biophys.*, **54**, 266~280 (1955).
- 6) A. W. VENOLIA and A. L. TAPPEL: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 135~138 (1958).
- 7) J. NONAKA: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **43**, 127~165 (1957).