オレンジミートに関する研究—II

糖—アミノ酸系の加熱によつて生成する螢光性物質の存在*

清水泰幸・尾藤方通

(1972 年 12 月 15 日受理)

Orange Coloration of Canned Skipjack Meat—II
Occurrence of Fluorescent Substances in Sugar—Amino Acid Systems

Yasuyuki SHIMIZU and Masamichi BITO**

It has been reported in the preceeding paper, that there is a close relation between the orange coloration and the formation of fluorescent substances in canned skipjack meat.

In order to elucidate the cause of orange coloration, fluorophotanalytical investigations were carried out.

Two dominant kinds of fluorescence were observed on the orange colored meat of canned skipjack; one had an excitation maximum at λ 290 nm and an emission maximum at λ 350 nm (I), the other at λ 333 nm and λ 400 nm respectively (II). From their excitation and emission spectra and their intensities of fluorescence in different pH, (I) was ascribed to tryptophan, and (II) was ascribed to sugar—amino acid reaction products. On high alkalinity, however, an unidentified fluorescence presumably caused by pterine was observed. Nineteen amino acids were treated individually with D-ribose in phosphate buffer at pH 6.4 and 121°C in an autoclave for 60 min, and the fluorescence characteristics of the resulting solutions were examined. Though many of them were more or less similar to (II) fluorophotometrically, those of the histidine—ribose and proline—ribose systems were almost identical with (II). All showed most intense fluorescence at pH 4.3. The deeper the brown-yellow of the sample, the more intense was the fluorescence.

The above data suggest that the orange coloration is caused by sugar—amino acid reactions in the can, and that histidine especially plays an important role in the coloration.

カツオ黄褐変缶詰（オレンジミート）から著るしく強い青色の螢光を検出し、その螢光強度が内容物の黄褐変度に対応して増大していることを前報¹⁾で報告した。この螢光を分光分析したところ、糖—アミノ酸系の加熱生成物と認められる螢光を検出したので報告する。

試 料

前報¹⁾と同様に正常缶および黄褐変缶を含む多数（54 缶）のカツオ水煮缶詰の液汁を、各缶別に 3,000 rpm, 10 分間遠心分離し上澄を試料液とした。これらの缶詰の原料はブライン凍結品であつて、1969 年 5 月静岡県清水市大金缶詰株式会社で同一条件の工程で同時に製造された。これらの供試缶詰には前報¹⁾のそれに比べて著しく黄褐変したものが多かつた。

* 東海区水産研究所業績B第 564 号, 昭和 47 年 4 月 2 日 日本水産学会春季大会（東京）で発表。

** 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki, Chuo-ku, Tokyo, Japan)

実験方法および結果

蛍光物質 (I), (II) の検出 黄褐変の著しい試料液を水で約 25 倍に希釈し、その蛍光を分光測定した結果、(I) 極大励起波長 290 nm, 極大蛍光波長 350 nm, (II) 極大励起波長 333 nm, 極大蛍光波長 400 nm の 2 種の優勢な蛍光を検出した (Fig. 1)。

(I), (II) 以外にも広い波長域にわたって蛍光が検出されたがその強度は比較的弱く、著明な極大を示さなかつた。

Fig. 1. Spectra of excitation (EX) and emission (EM) rays of juice of the orange discolored canned skipjack.

— Fluorescent substance (I)

— Fluorescent substance (II)

Measured on diluted juice (1 : 25) with distilled water.

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

黄褐変度と蛍光物質 (I), (II) の蛍光強度との関係 前記の供試缶詰の試料液を 1 缶ごとに黄褐変の程度と、蛍光物質 (I), (II) の蛍光強度とを測定した。すなわち黄褐変の程度は前報¹⁾と同様に、三塩素酢酸で除蛋白した試料液の $-\log T_{\lambda 450 \text{ nm}}$ の値で表わし、蛍光強度は試料液を水で 50 倍に希釈したときの値で表わした。その結果、黄褐変の著しいほど蛍光物質 (I) の蛍光強度が弱く、(II) の蛍光が強い現象が認めれた (Fig. 2)。

蛍光物質 (I) の検討 本蛍光物質は蛍光スペクトルの特徴から、トリプトファンらしく思われたので、次の 2 項目について標品と比較した。

1. 蛍光物質 (I) とトリプトファンとの励起、蛍光スペクトル 蛍光物質 (I) の励起スペクトルおよび蛍光スペクトルをトリプトファンの希薄水溶液のそれと比較したところ、ほとんど完全に一致した (Fig. 3)。

2. 蛍光物質 (I) とトリプトファンとの pH-蛍光強度曲線 オレンジミートの試料液とトリプトファンの希薄水溶液とを BRITTON-ROBINSON の広域緩衝液 (第 II 液) を用いて種々の pH に調製し、蛍光物質 (I) の蛍光の最適波長で蛍光強度を測定した。その結果、両者の pH-蛍光強度曲線は類似の形状を呈し、どちらも pH 11 で極大を示した (Fig. 4)。

蛍光物質 (II) の検討 前記 1, 2 の検討により蛍光物質 (I) はトリプトファンと思われるが、その蛍光強度が黄褐変の著しいほど弱い事実から、黄褐変の進行は本物質の減耗を伴うものと考えられる。よつ

Fig. 2. Relations between degree of orange coloration and relative intensity of fluorescence of canned skipjack measured on diluted juice (1 : 50).

White spot: Fluorescence showed by the Fluorescent substance determined on the fluorescent substance (I).

Black spot: Fluorescence showed by the fluorescent substance determined on the fluorescent substance (II).

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

てオレンジミートの発現にアミノ酸が関与している疑いを深くした。そこで、アミノ酸が関与する褐変反応として広く知られている MAILLARD²⁾ 反応による生成物との比較検討を行なつた。

1. 糖-アミノ反応生成物を含む溶液の調製

本反応系に用いる糖としてD-リボースを用いた。すなわち D-リボース-各アミノ酸 (1 : 1 モル比) 溶液を試験管に入れ口部をかるく覆つて、121°C, 60 分加圧加熱し、褐色の反応液を得た。この際、リボース、アミノ酸のみでは褐変が弱く、第3の物質が必要なことは永山^{3,4)} によつて検討されている。これらの物質のうち磷酸は普遍的な生体成分であるのでこれを用いた。すなわち、反応系にこれと等量

Fig. 3. Spectra of excitation (EX) and emission (EM) rays of tryptophan and juice of the orange discolored canned skipjack (Measured on diluted juice (1 : 20)).

— Juice of the orange discolored canned skipjack.

----- Tryptophan in distilled water.

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

Fig. 4. Relations between pH and the fluorescent intensity of juice of the orange discolored canned skipjack and tryptophan.

— Juice of the orange discolored canned skipjack.

----- Tryptophan in distilled water.

Fluorescence was measured at λ 290 nm for the excitation and at λ 350 nm for the emission rays.

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

の磷酸緩衝液を加え、pH 6.4 で実験した。

2. 蛍光物質 (II) と糖-アミノ反応液との励起、蛍光スペクトル 前項で作製した反応液を水で 10-20 倍に希釈し、励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定した。その結果、両スペクトルの極大の位置はアミノ酸によって異なつたが、それらの多くは蛍光物質 (II) の励起光および蛍光の極大波長に近く、特にリボース-ヒスチジン、リボース-プロリン系は蛍光物質 (II) のそれときわめて近似していると認められた (Table 1)。

カツオ肉のヒスチジン含量は他のアミノ酸に比べて著しく多量^{5,6)}であるので、このアミノ酸がオレンジミートの発色に強く影響していると考えられる。そこで黄褐色の著しい試料液と前記リボース-ヒスチジン

反応液との励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを比較した結果、両者は同様と認められるスペクトルを示した (Fig. 5)。測定液は前者では水で 20 倍に希釈し、後者はその黄褐色が認められなくなるまで水で希釈したものである。

3. 蛍光物質 (II) とリボース-ヒスチジン反応液との pH-蛍光強度曲線 オレンジミートの試料液と、リボース-ヒスチジン反応液とについて、蛍光物質 (I) の場合と同じ方法で測定液を調製し、蛍光物質 (II) の蛍光の最適波長で蛍光強度を測定した。その結果、オレンジミートの試料液の pH-蛍光強度曲線は、酸性側では pH 4.3 で極大を示してリボース-ヒスチジン反応液と同じ特徴を現わしたが、アルカリ側で前記の反応液には認められない大きい極大を示した (Fig. 6)。この不一致はオレンジミートの試料液中の蛍光物質 (II) 以外の夾雑物質によるものと思われる。

Table 1. Maxima of excitation rays (EX) and of fluorescence emitted (EM) on a heated ribose-amino acid systems.

Amino acid	(EX)	(EM)
Alanine	335 nm	414 nm
Arginine	347	422
Aspartic acid	345	435
Cystine	339	420
Glutamic acid	342	425
Glycine	344	427
Histidine	333	398
Hydroxyproline	356	442
Isoleucine	342	426
Leucine	354	426
Lysine	356	428
Methionine	344	422
Phenylalanine	349	430
Proline	335	398
Serine	342	420
Threonine	344	423
Tryptophan	355	455
Tyrosine	347	428
Valine	349	431
Juice of the orange colored meat of canned skipjack	333	400

Equivalent moles of D-ribose and L-amino acid were mixed and heated at 121°C for 60 min under pressure in phosphate buffer at pH 6.4, then diluted with distilled water untill the quenting effect becomes invisible.

Instinctive fluorescence of phenylalanine, tryptophan and tyrosine is subtracted from figures in the table.

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

Fig. 5. Spectra of excitation (EX) and emission (EM) rays of juice of the orange discolored canned skipjack and heated ribose-histidine system.

— Juice of the orange colored meat of canned skipjack.

----- Heated ribose-histidine system.

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

Fig. 6. Relations between pH and the fluorescence intensity of juice of the orange discolored canned skipjack and heated ribose-histidine system.

— Juice of the orange colored meat of canned skipjack.
 ----- Heated ribose-histidine system.

Fluorescence was measured at λ 333 nm for the excitation and at λ 400 nm for the emission rays.

Instrument: HITACHI MPF-2 A Fluorescence Spectromicrometer.

なるが、希薄な等モル溶液で比較するとトリプトファンの蛍光が最も強い。この3者を混合するとトリプトファンの蛍光のみを現わし、チロシン、フェニールアラニンの蛍光は認められなくなる。したがってオレンジミートの試料液がトリプトファンの蛍光のみを示し、他の2種の発蛍光性アミノ酸の蛍光が認められないことがうなずかれる。

Fig. 7 のアルカリ側における試料液の蛍光 この不明の蛍光は pH 11 付近でその強度が最大となつていたので、トリプトファンではないかと思われたが、トリプトファンの励起スペクトルは Fig. 3 に示すごとく波長範囲が狭く、Fig. 6 を画いた励起波長 (333 nm) ではトリプトファンは全く蛍光を発現しない。

つぎに pH 11 付近のこの試料液の蛍光を改めて調べた結果、極大励起波長 380 nm、極大蛍光波長 460 nm であつて、これは葉酸を希薄なアルカリで処理して得られるプテリンのそれに全く一致する。しかし試料液中のプテリンあるいはその生成源としての葉酸の存在量についての検討は未だ不十分であるので、プテリンと断定するに至っていない。

オレンジミートの発生と糖アミノ反応との関係 本報ではオレンジミートの発生に伴うリボースの変化、およびトリプトファンを除くアミノ酸の減少についての実験を欠いているが、試料液中にリボース-ヒスチジン系の加熱生成物の示す蛍光が検出され、その蛍光強度が缶詰内容物の黄褐変度に随伴して増大している事実 (Fig. 2) から、オレンジミートの発現に糖アミノ反応が大きく関与していることは疑いないと思われる。

本蛍光性物質は前報¹⁾で述べたごとく、単一物ではなく数個に分離して検出される。永山⁸⁾は加熱した糖-アミノ酸系の蛍光は不飽和環式化合物の示す蛍光に類すると述べ、BURTON ら⁹⁾は Hydroxylic なものであると記載している。著者らもこれらの蛍光性物質についてさらに検討の予定である。

考 察

リボース-ヒスチジン系の褐変度 糖-アミノ反応による褐変には関与するアミノ酸によつて強弱があると知られている。FRIEDMAN⁷⁾ らはグルコース-12 種アミノ酸系の加熱による褐変度について、ヒスチジンはリジン、トリプトファンにならぶ強い褐変を起すことを示し、永山⁸⁾はリボース-12 種アミノ酸につき、ヒスチジンがリジンについて強く褐変することを明らかにしている。著者らの実験でもリボース-ヒスチジン系の加熱液はリボース-リジン、リボース-トリプトファン、リボース-フェニールアラニン系について強く褐変した。

プロリンによる褐変は特に著しくはなく^{3,9)}、カツオ肉中の含量^{5,6)}も少量ゆえ、オレンジミートの発現への影響は少ないと考えられる。しかしこの種の普遍性のないアミノ酸もまた見過すべきでない。

試料液中の発蛍光性アミノ酸 トリプトファン、フェニールアラニン、チロシンはそれ自身単独で蛍光を現わす。これらの蛍光の波長位置はそれぞれ異

要 約

オレンジミート (カツオ黄褐変缶詰) の示す蛍光を分光分析した結果、糖-アミノ酸系の加熱生成物が示す蛍光と同一と認められる蛍光を検出した。この蛍光性物質は缶詰内容物の黄褐変の進行に伴つて増加すると推定される事実からオレンジミートは糖アミノ反応によつて発現するものであり、その際、アミノ酸では

ヒスチジンが大きく影響していることを推察した。

研究の機会を与えられた当研究所所長天野慶之博士，御理解と御指導をいただいた生物化学部長平尾秀一博士，保蔵部長横関源延博士，試料入手についてお世話いただいた日本缶詰検査協会井上勘吾氏に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 清水泰幸・尾藤方通： 本誌，**39**，543-549 (1973).
- 2) L. C. MAILLARD: *Compt. rend.*, **154**, 66-68 (1912).
- 3) 永山文男： 本誌，**26**，1107-1113 (1960).
- 4) 永山文男： 同誌，**27**，34-37，158-161 (1961)，**28**，49-54 (1962).
- 5) 鴻巣章二・橋本芳郎： 同誌，**25**，307-311 (1959).
- 6) 鴻巣章二： 同誌，**37**，763-770 (1971).
- 7) L. FRIEDMAN and O. L. KLINE: *J. Biol. Chem.*, **84**，599-606 (1950).
- 8) 永山文男： 本誌，**28**，45-48 (1962).
- 9) H. S. BURTON, D. J. MCWEENY, P. N. PANDHI and D. O. BILTCLIFFE: *Nature*, **196**，948-950 (1962).