琉球大学学術リポジトリ

アミノカルボニル反応の梢頭部蔗汁の褐変に及ぼす影響(農芸化学科)

メタデータ	言語:
	出版者: 琉球大学農学部
	公開日: 2008-02-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 外間, 宏一, 仲宗根, 洋子, 親川, 雅浩, Hokama, Koichi, Nakasone, Yoko, Oyakawa, Masahiro
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4200

アミノカルボニル反応の梢頭部蔗汁の褐変に及ぼす影響

外間宏一*・仲宗根洋子*・親川雅浩*

Koichi HOKAMA, Yoko NAKASONE and Masahiro OYAKAWA: Effect of amino-carbonyl reactions on the browning of sugarcane-top juice

I 緒言

原料蔗汁中にはカロチノイド，フラボン，サッカチレン，タンニン等サイトウキビそのものに由来する色素と，カラメル，メラノイジン等のように製造工程中に生成する色素が存在することはすでに知られている。

フランスの化学者Maillardは，グルコースとグリシン溶液を加熱すると褐色メラノイジンを生ずることを観察した。この反応をMallard反応と呼び，アミン，アミノ酸，タンパク質と糖類，アルデヒド及びケトンとの間にも同様な褐変反応が起こることが明らかになった。この反応は食品の加熱または長時間の貯蔵期間中に起る褐変の主な原因であるといわれている。

褐変機構の最初の段階に於いて起こる反応は，アミノ酸またはタンパク質の遊離アミノ基と還元糖のカルボニル基との間に起こる縮合反応で，アミノカルボニル反応と呼ばれている。サトウキビにも数種類のアミノ酸，糖を含んでおり，この組み合わせによって，数種の褐変反応が起こることが予想される。

サトウキビ中のアミノ酸及び糖をペーパークロマトグラフィーで同定し，それらのアミノ酸と糖を組み合わせた場合に起こる褐変反応に及ぼすpH及び温度の影響を調べた。また，サトウサビ切片を一週間放置して褐変させ，その蔗汁中に標品アミノ酸と糖を反応させてできた生成物と一致する色素が存在するか否やを検討した。

II 実験方法

1 試料の調製

玉城村より採取した1976～1977年期のサトウキビ（NCO 310）を細かく刻み，之に水を加えてミキサーで粉砕した。その蔗汁に活性炭を加えろ過し，そのろ液をアミノ酸と糖の分離のための試料に供した[6]。分離工程図を図1に示した。

* 琉球大学農学部農芸化学科

琉球大学農学部学術報告 25：235～246（1978）

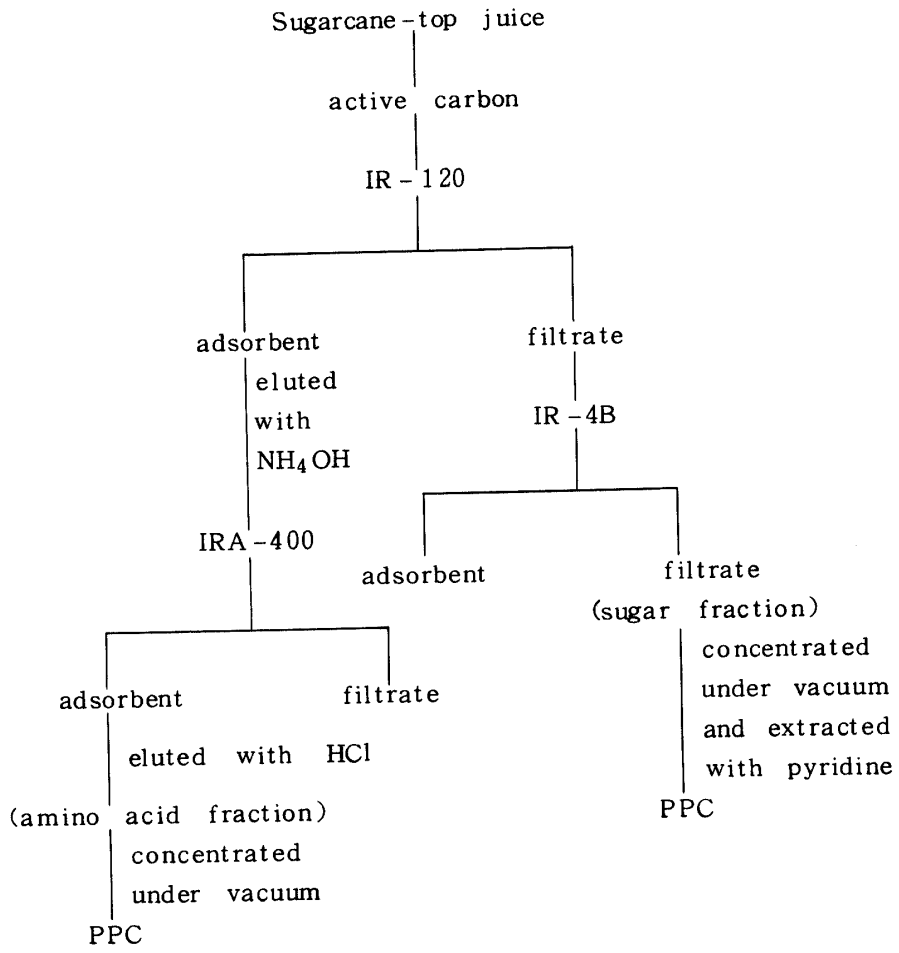

Fig. 1. Separation diagram of amino acids and sugars from sugarcane-top juice

2 糖の分離

強酸性イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 を2N-塩酸でH型にしたのち，十分水洗し，カラム（1×30cm）へ充填し，上記のろ液を，毎分1～2mlの速度で通過させると，ほとんどすべてのアミノ酸及び陽イオンが吸着され，微酸性液が流下した。更に蒸留水20mlを通過させて樹脂柱を洗った。

次に流下液及び洗液を合したものを，弱塩基性イオン交換樹脂 Amberlite IR4Bを2N-水酸化ナトリウムでOH型にしたのち，十分水洗し，カラム（1×30cm）へ充填したものに毎分1～2mlの速度で通過させた。ほとんどの陰イオンが吸着され中性液が流下した。前同様蒸留水20mlで洗った。全洗液を合し減圧下で乾固し，ピリジンで糖を抽出し，ペパークロマトグラフィーの試料とした。

3 アミノ酸の分離

強酸性イオン交換樹脂Amberlite IR-120を2N-塩酸でH型にしたのち，十分水洗し，カラム（1×30cm）に充填し，1項において得られた試料を，毎分1～2mlの速度で通過させた。ほとんどすべてのアミノ酸，陽イオンが吸着される。次に蒸留水20mlで樹脂を洗った。その際ろ過洗液には有機酸イオン，無機イオン，糖及び尿

素などが含まれる。この樹脂に，2N－アンモニア水100mlを毎分2～3mlの速度で通過させるとアミノ酸はほとんどすべて溶出した。溶出液を減圧下に30ml位まで濃縮し，過剰のアンモニア水を除去した。

次に，この濃縮溶液を強塩基性イオン交換樹脂Amberlite IRA－400を2N－水酸化ナトリウムでOH型にしたのち，十分水洗し，カラム（1×30cm）へ充填した吸着柱に毎分0.5～1 ml の速度で通過させた。このようにして樹脂に吸着された全アミノ酸は，10 ml の蒸留水で洗浄後，2N－塩酸50 ml を用いて溶出された。溶出液を減圧濃縮してえた少量のペプチドを含むアミノ酸区分をペーパークロマトグラフィーの試料とした。

4 糖とアミノ酸による褐変

2.5％グルコース及び2.5％フルクトースをそれぞれ，Sorensen緩衝液[1]で2.5％溶液にしたグルタミン酸，バリン及びアラニンと組み合わして次の実験を行なった[7]。

(1) pHと褐変度との関係　上記の糖とアミノ酸（pH 3,5,7）をそれぞれ組み合わせ，この混合液を試験管にとり，90℃のウォーターバス中で2時間反応させた後，冷却し，日立139分光度計により，波長500nm において，褐変度を測定した。また，褐変前の中間生成物様物質は，原液を10倍に希釈して波長295nm の柴外部で測定した。

(2) 温度と褐変度との関係　糖とアミノ酸の混合液を緩衝液でpH 9 に調整し，30℃，45℃，60℃，75℃及び90℃ の温度で，それぞれ，2時間反応させ，褐変度を測定した。

5 水溶性色素の単離[2]

除皮したサトウキビを1週間放置し，褐変させ，細かく刻み，水を加えミキサーで粉砕した。次にろ過し，ろ液に酢酸エチルを加え，分液ロートでふり，一昼夜放置後，水層と酢酸エチル層に分離し，水層200 mlにエタノール200 mlを加え，沈澱物を遠沈除去し，10mlに減圧濃縮した。以後，之を水溶性色素とし，ペーパークロマトグラフィーの試料とした。分離工程図を図2に示した。

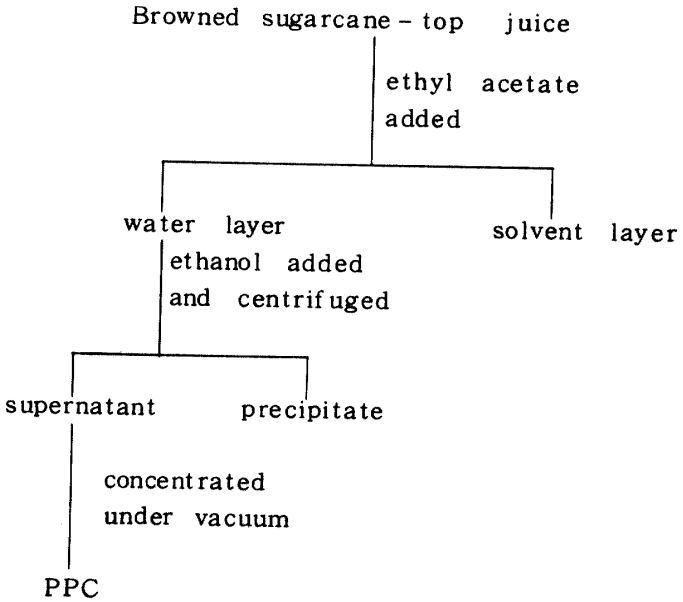

Fig. 2. Separation of water-soluble pigments fraction from browned sugarcane-top juice

6　糖，アミノ酸混合液と水溶性色素の吸収スペクトル

自記分光光度計（東芝ベックマン ABGT）で測定した。

Ⅲ　実験結果及び考察

1　アミノ酸の同定[3,8]

甘蔗汁から分離したアミノ酸の一次元ペーパークロマトグラムを図3に示した。東洋ろ紙 No.50を用い，フェノール：水（4：1）を展開剤として，約20時間展開を行ない，ニンヒドリン試薬で発色させた。

バリン（Rf 0.76），アラニン（Rf 0.59）及びグルタミン酸（Rf 0.32）に相当するスポットがそれぞれ検出された。最も Rf 値の低いスポットは一致するものがなく，同定できなかった。おそらく，ペプチドではないかと考えられた。

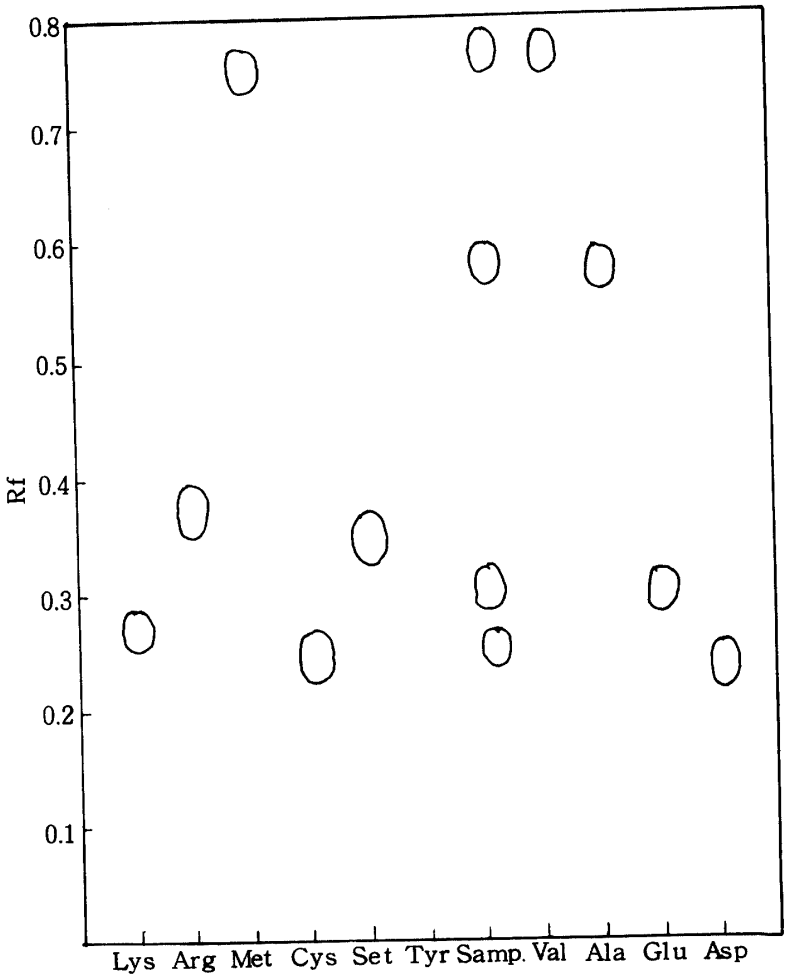

Fig. 3.　Paper chromatograms of amino acids from sugarcane-top juice
Solvent system : phenol : water (4 : 1, v/v)
Coloring reagent : ninhidrin

2 糖の同定[8)]

甘蔗汁から分離した糖の一次元ペーパークロマトグラフィーを図4に示した。発色剤は，アニリン，フタル酸試薬で，ろ紙は東洋ろ紙No.50を用いた。展開溶媒は，*n*－ブタノール：酢酸：水（4：1：5）を用いた。その結果，甘蔗汁から，グルコース，フラクトース及び蔗糖の3スポットが検出された。

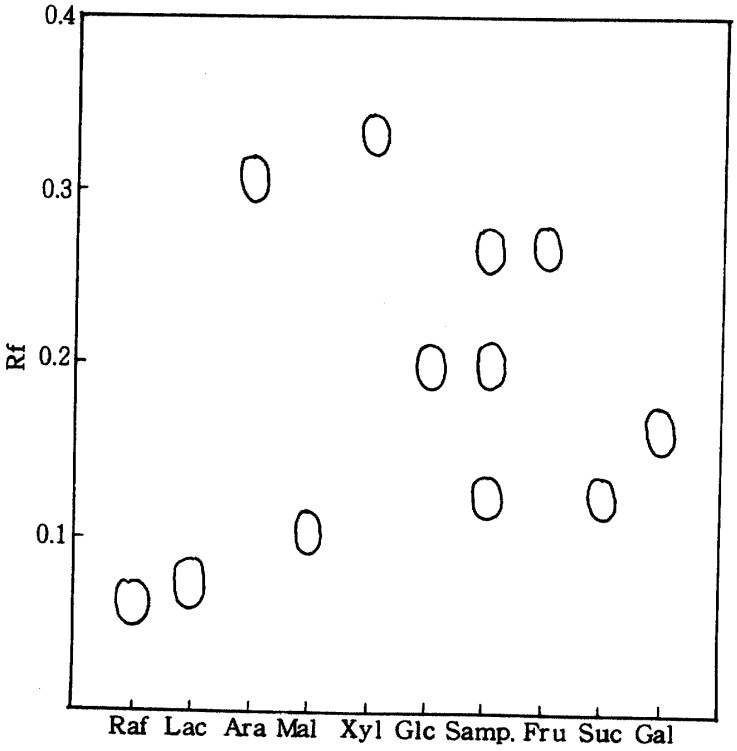

Fig. 4. Paper chromatograms of sugar fraction from sugarcane-top juice
Solvent system : n-BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 5, v/v)
Coloring reagent : Aniline-phthalic acid

3 pHの褐変度に及ぼす影響

図3，図4で同定したアミノ酸と糖をそれぞれ組み合わせて褐変させ，その結果を第1表に示した。この表からも明らかのように，pHが高くなるにつれて褐変度も増加した。また，アラニンは，グルタミン酸，バリンに比べて褐変度が高かった。糖はアルカリ性において褐変する性質を持っているが，pH 7で反応は止めているので，その影響はないものと思われる。

Table 1. Effect of pH values on color density in amino carbonyl reactions

	Fructose (Glucose)		
pH	Glutamic acid	Valine	Alanine
3	0.002 (0.002)	0.002 (0.002)	0.012 (0.005)
5	0.005 (0.003)	0.002 (0.006)	0.045 (0.010)
7	0.010 (0.005)	0.105 (0.060)	0.230 (0.100)

The color density was measured according to the absorbance at 500 nm

4 糖とアミノ酸混合液の紫外部吸収スペクトルを図5に示した。

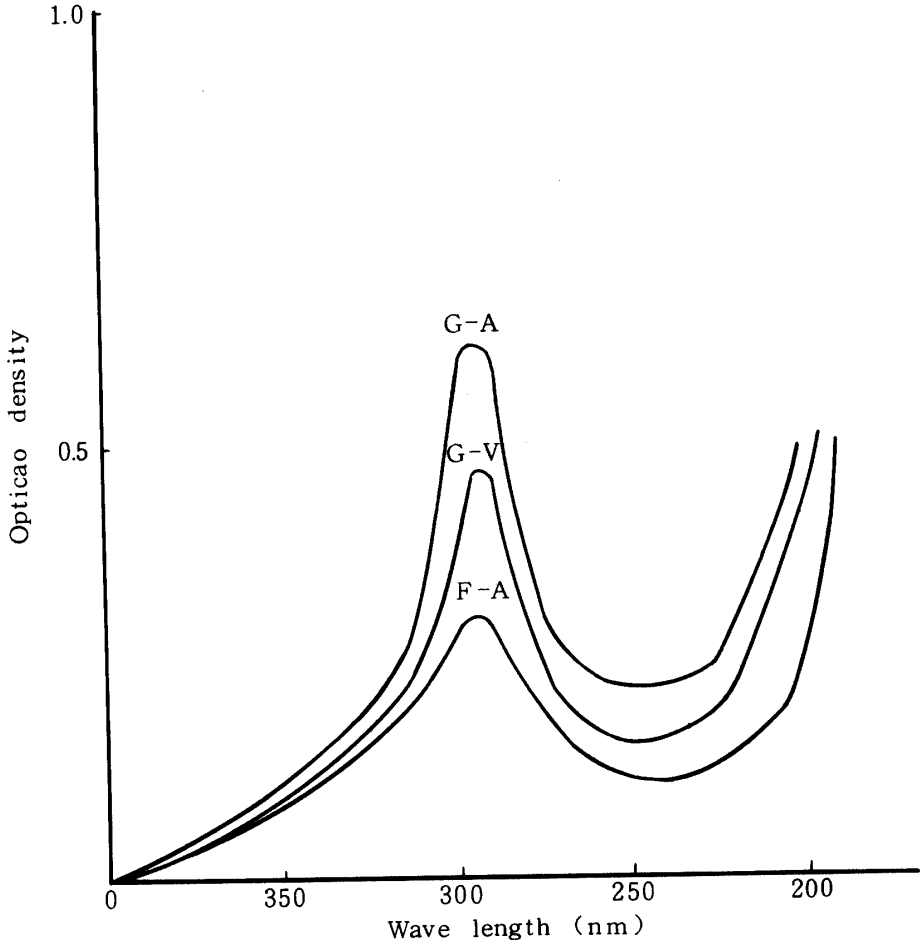

Fig. 5. Absorption spectra of amino acid-sugar reaction mixtures at pH value 7
G-A : Glucose - Alanine
G-V : Glucose - Valine
F-A : Fructose - Alanine

5 pHと中間生成物との関係

図5に示されるように，それぞれの糖とアミノ酸混合液の最大吸収スペクトルは，295 nm にあったので，同波長で測定した。その結果を表2に示した。

Table 2. Effect of pH values on intermediate-like products before browning in amino carbonyl reaction mixtures

	Fructose (Glucose)		
pH	Glutamic acid	Valine	Alanine
3	0.060 (0)	0.045 (0)	0.030 (0)
5	0.060 (0)	0.065 (0.005)	0.120 (0.010)
7	0.070 (0)	0.380 (0.370)	0.450 (0.380)

These concentrations were indicated with absorbances at 295 nm

表からも明らかのように，pH の上昇とともに，吸光度が増加しているが，之は褐変する前の中間生成物の影響によると思われる。即ちこの 295 nm に最大吸収を持つ生成物が発色現象に関与していると推察された[7]。こゝにのべている中間生成物とは，アルドースとアミノ酸によるアミノカルボニル反応によって生じたN－置換1－アミノ－1－デオキシ－2－ケトースのことである。この中間生成物よりの色素形成の機構を図6に示した[5]。

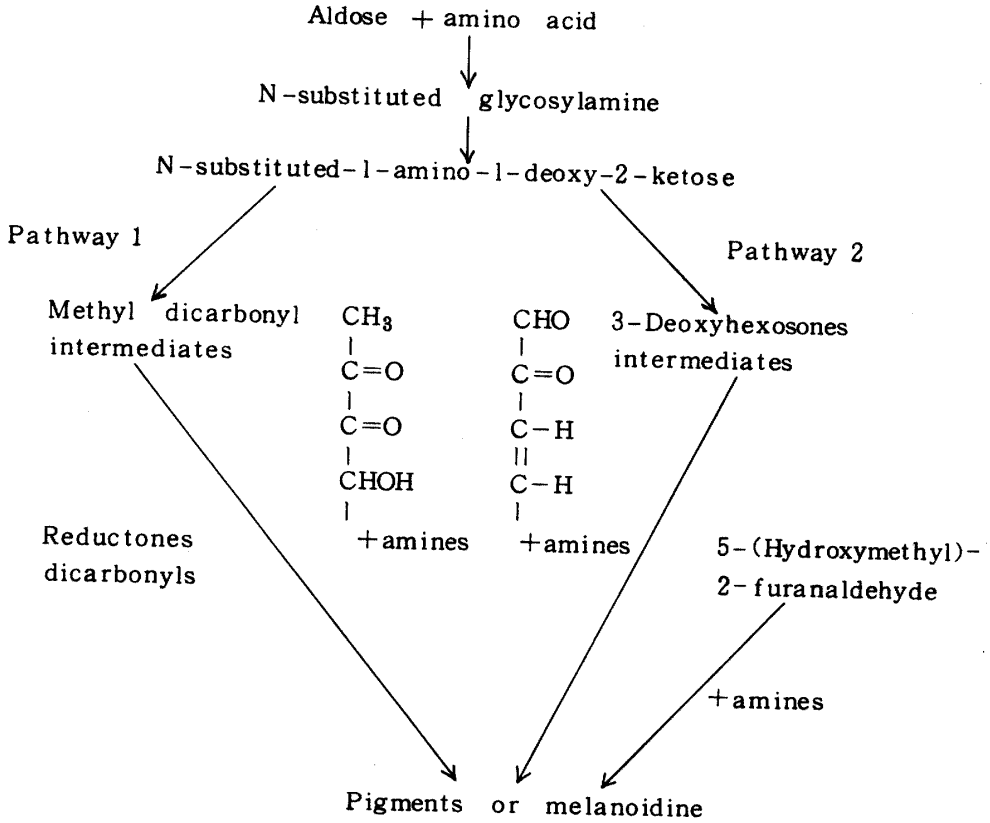

Fig. 6. Two pathways of color formation in amino carbonyl reaction

6　温度の褐変度に及ぼす影響

結果を図7に示した。温度の上昇とともに，褐変度も増加した。特に，90℃で急激な増加を示した。又，グルコースとの反応よりフルクトースとの反応の方が褐変度が高かった。

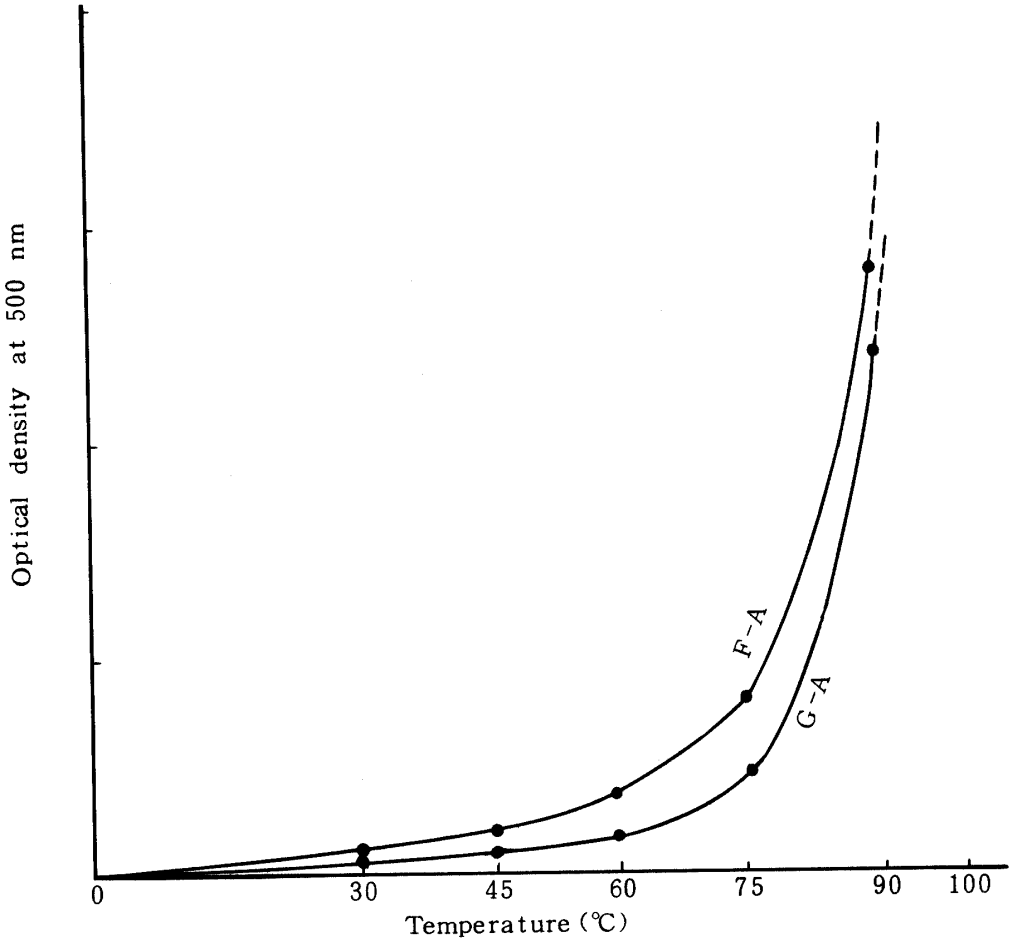

Fig. 7. Effect of temperatures on browning in amino carbonyl reaction at pH value 7
F-A: Fructose-Aniline
G-A: Glucose-Alanine

7　水溶性色素の同定

ウオーターバス中で，pH 7，90℃ において，検出された糖とアミノ酸を2時間反応させ，減圧濃縮した褐変溶液及び水溶性色素をペーパークロマトグラフィーの試料に供した。結果を図8に示した。即ち，水溶性色素中に，Rf 0.32とRf 0.14の二つの色素，また，アラニンーフルクトス，アラニンーグルコースにも，それぞれ，Rf 0.34 とRf 0.38 の二つの色素が検出されたが，バリンーフルクトース，バリンーグルコースの場合は，色素形成は確認できなかった。

これらのうち，Rf 0.32 とRf 0.34の二色素は，それぞれ，アニリンーフタール酸試薬，ニンヒドリン試薬陽性であるので，グリコシリアミン類縁物で，かつ，同一色素と思われた。反応混合液中に，バリンが検出され，アラニンが検出されなかったことは，後者の場合は，色素を形成し，前者の場合は，

それを形成しないことをよく証明している。即ち，アラニンは色素生成のための反応に関与するが，バリンは関与しないということである。

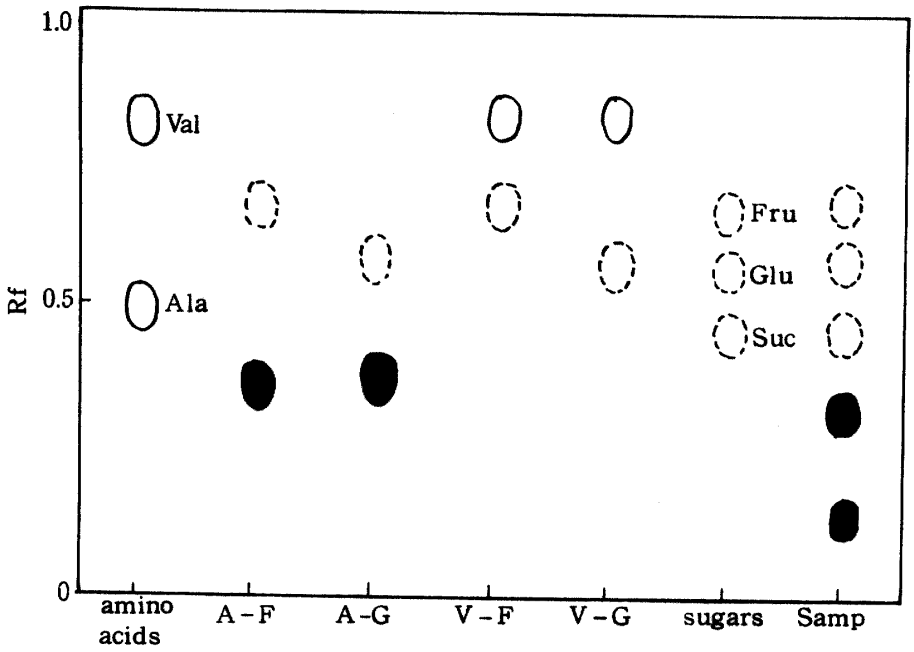

Fig. 8 Paper chromatograms of sugar-amino acid reaction mixtures and water-soluble pigments fraction from browned sugarcane-top juice

○…… Visiualized by ninhidrin reagent

◯…… Visiualized by aniline-phthalic acid reagent

●…… Visiualized by ninhidrin and aniline-phthalic acid reagent

Solvent system phenol : water (4 : 1, v/v)

8 水溶性色素の吸収スペクトル

275～325 nm の吸収曲線を図 9 に示した。この結果得た 295nm の最大吸収スペクトルは図 5 に示された糖，アミノ酸混合液のそれと一致したので，水溶性色素中にも 295nm にピークを持つ物質が含まれているものと考えられた。

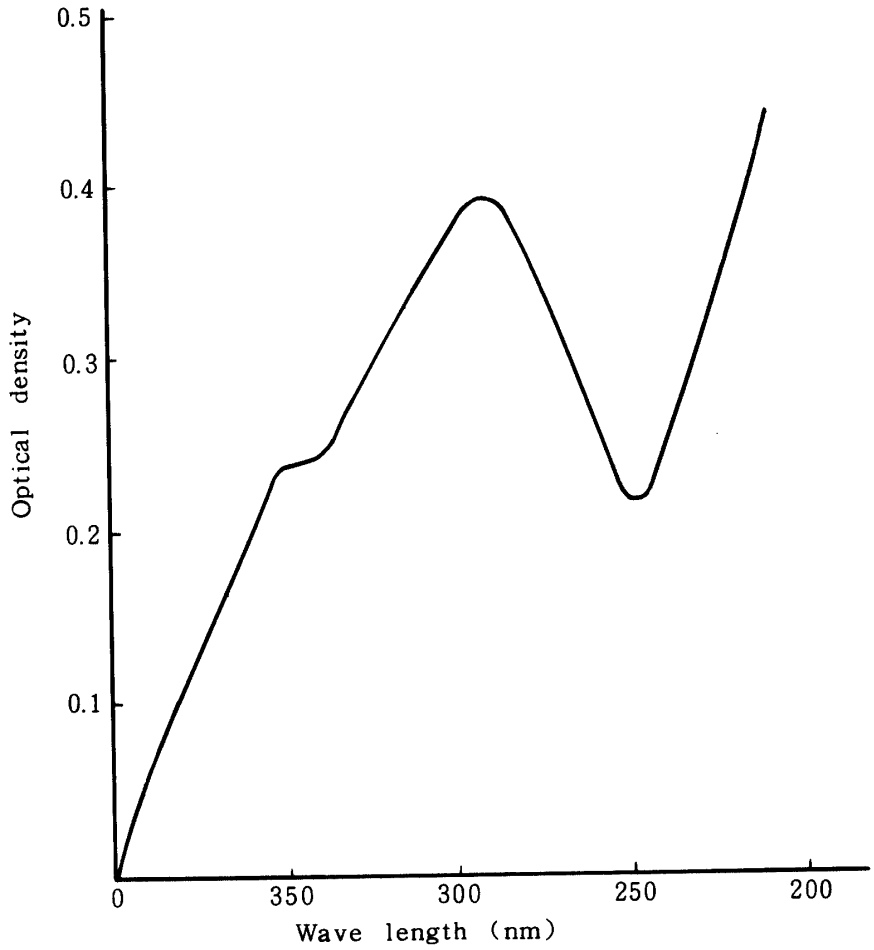

Fig. 9. Absorption spectra of water-soluble pigment fraction from browned sugarcane-top juice

9　イミダゾール化合物の検出[4)]

試料（水溶性色素）を東洋ろ紙No.50にスポットし，展開溶媒として*n*－ブタノール：エタノール：1％アンモニア水（2：1：1）を用いて，9時間，一次元展開ペーパークロマトグラフィーを行なった。

検出は，Pauly のジアゾ試薬噴霧後，アンモニアガスにさらして呈色させる方法で行なった。結果を図10に示した。クロマトグラム中に Pauly の試薬陽性のスポットが検出されたので，アミノカルボニル反応溶液中に存在すると言われているイミダゾール化合物が試料中にも含まれていると思われた。

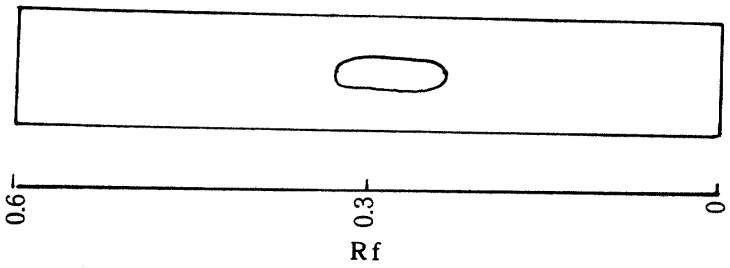

Fig. 10. Paper chromatogram of imidazole compounds of water-soluble pigment fraction from browned sugarcane-top juice
Solvent system : n-BuOH : EtOH : 1% NH_4OH (2 : 1 : 1, v/v)
Coloring reagent : diazotigation reagent

Ⅳ 要 約

1. 甘蔗汁にアミノ酸としてバリン，アラニン及びグルタミン酸，糖としてグルコース，フルクトース及びスークロースが検出された。
2. アミノカルボニル反応は，温度及びpHが高い程起こり易かった。
3. 糖とアミノ酸の反応において，295 nmに最大吸収スペクトルを持つ褐変前の中間生成物（N－置換1－アミノ－1－デオキシ－2－ケトース）と思われる物質が蔗汁の褐変現象に関与しているものと推察された。
4. Rf 0.32のサトウキビ水溶性色素は，アラニン－グルコース反応によって生じたRf 0.34の色素と同一で，グリコシルアミン類縁物であると思われた。
5. アミノカルボニル反応溶液中に存在するといわれているイミダゾール化合物がサトウキビ水溶性色素中にも存在するらしいことが確認された。

参 考 文 献

1. 編集委員会 1963 化学大辞典，**5**：429～430，東京，共立出版社
2. 外間宏一 1973 甘蔗の赤変に関する生化学的研究，琉大農学報，**20**：55
3. 外間宏一，仲宗根洋子，大城清勝，渡久地政武 1975 沖縄産廃糖蜜のアルコール発酵に伴なうアミノ酸よりフーゼル油の生成，琉大農学報，**22**：227～228
4. 河本正彦 1961 グルコースとアンモニアの反応生成物に関する化学的研究（第1報）農化 **36**：306
5. 川村信一 1973 食品の生化学，139～145，東京，医歯薬出版社
6. 佐竹一夫 1960 クロマトグラフィー，53～56，東京，共立出版社
7. 清水俊秀，酒井重男 1957 砂糖の精製に関する研究（XVⅢ），農化，**32**：506～510
8. 東大農化 1972 実験農芸化学，下巻，411～435，東京，朝倉書店

Summary

1. Valine and alanine as amino acids and glucose, fructose and sucrose as sugars were identified to exist in sugarcane-top juice, respectively.

2. At higher temperatures and pH values, the amino-carbonyl reaction took place in a greater extent.

3. From the viewpoint of a sugar-amino acid reaction, it was suggested that the intermediate-like products with the maximum absorbance peak of 295 nm (N-substituted 1-amino-1-deoxy-2-ketose) took a part in browning of sugarcane-top juice.

4. It was supposed that the water-soluble pigment of Rf value 0.32 was identical with that of Rf value 0.34, formed as the result of an alanine-glucose reaction, and was analogous to a glycosylamine compound.

5. It was recognized that the imidazol compound supposed to exist in aminocarbonyl reaction mixtures was also contained as a water-soluble pigment in browned sugarcane-top juice.