

助成番号 0648

異なる食塩濃度におけるアミノ酸・ペプチド・タンパク質と糖との反応の進行 および生成物の生成について

グエン・ヴァン・チュエン, 山口 敬子, 能見 祐理

日本女子大学家政学部食物学科

概要 食品の加工・貯蔵・調理の過程において、代表的な成分間反応のひとつであるアミノ・カルボニル反応は、食品の品質を変化させ、栄養生理的にも影響をもたらす。反応の後期段階においては、褐色色素や AGEs (Advanced Glycation End products) が形成される。AGEs は食品中および生体内で形成され、特に生体内 AGEs は、老化や糖尿病合併症を引き起こすことが知られている。そのため、近年、食品中の AGEs も生体内 AGEs と同様に、疾病の進展因子となる可能性があるとして問題となっている。また、日本において日常的に摂られている味噌や醤油は、加工・貯蔵の過程においてアミノ・カルボニル反応が起き、褐変した食品である。さらに、味噌・醤油は食塩の含有量が高い食品である。この反応は重金属イオンの存在により影響されることから、食塩濃度の高い食品の加工・調理において、食品中の食塩から生じるイオンがアミノ・カルボニル反応に何らかの影響を及ぼしている可能性がある。そこで、本研究では数種のアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質を用いて、糖によるアミノ・カルボニル反応における食塩の濃度変化が及ぼす影響について検討を行った。

数種類のアミノ酸を用いて、NaCl 濃度および加熱時間による褐変反応の影響を検討した。その結果、すべてのアミノ酸において NaCl 濃度が高くなるほど褐変度が低くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。次に、リジンモデルとして無機塩類の種類、塩類のイオン強度および pH による褐変反応の影響を検討した。その結果、褐変反応の反応性が高い pH 6.0 および pH 7.5 の条件下では、いずれの塩類においてもイオン強度に依存して反応の抑制効果を示した。したがって、褐変反応の抑制に塩類のイオン強度が影響している可能性が示唆された。また、数種類のペプチドを用いて、NaCl 濃度および加熱時間による褐変反応の影響を検討した。その結果、すべてのペプチドにおいて、いずれの加熱時間においても NaCl 濃度と褐変度との間に関連性がみられなかった。ペプチドはアミノ酸と比べて水溶液中における pK_2 値が低く、グルコースとの反応性が早いために、NaCl 添加による褐変反応の抑制がみられなかったと考えられる。次に、 β -ラクトグロブリンを用いて、タンパク質のアミノ・カルボニル反応における NaCl 濃度および加熱時間の影響を検討した。その結果、NaCl 濃度が高くなるほどアミノ・カルボニル反応の進行が抑制され、また、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。アミノ酸における研究と同様の結果となったことから、褐変の反応抑制に NaCl のイオン強度が影響している可能性が示唆された。以上の結果より、塩類のイオン強度の増加にともない、アミノ・カルボニル反応の進行が抑制されることが示唆された。

アミノ・カルボニル反応の後期段階に生成される食品中 AGEs は、生体内 AGEs と同様に疾病を促進させる可能性があるため、アミノ・カルボニル反応を制御し、AGEs の生成を抑制することが重要である。また、食品の加工・貯蔵・調理の過程において、アミノ・カルボニル反応を制御することにより、褐色色素の生成を促進または抑制することが可能となる。したがって、塩類の種類を選択し、イオン強度や pH、加熱時間などを調節することにより、アミノ・カルボニル反応を制御することは食品加工および栄養学上において極めて重要である。

1. 研究目的

食品成分は、加工・貯蔵・調理の過程において相互に反応し、食品の品質を変化させて、さらには栄養生理的影響をもたらす。食品成分間の反応として代表的なものに

アミノ・カルボニル反応がある。この反応は、アミノ基とカルボニル基が共存する場合に起こる非酵素的反応であり、メイラード反応とも呼ばれている。アミノ基は遊離アミノ酸、アミン、ペプチド、タンパク質などの構造中に存在し、また

カルボニル基は糖、脂質あるいはそれらの分解生成物であるアルデヒド、ケトンなどの構造中に存在するため、食品中において起こりやすい反応といえる。また、この反応は酸素や重金属イオンの存在により影響を受けることが知られている¹⁾。アミノ・カルボニル反応は、初期段階では Schiff 塩基が形成され、酸の触媒下においてアマドリ転位が起きる。アマドリ転位生成物は反応の中期段階において分解され、反応性の高い種々のカルボニル化合物が生成される。後期段階ではカルボニル化合物がアミノ化合物と再び反応することにより、メラノイジンや AGEs (Advanced Glycation End products) が形成される。AGEs は食品中および生体内で形成され、特に生体内 AGEs は、老化や糖尿病合併症を引き起こすことが知られている²⁾。そのため、近年、食品中の AGEs も生体内 AGEs と同様に、疾病の進展因子となる可能性があるとして問題となっている³⁾。したがって、加工・貯蔵・調理の過程において、食品中で起こるアミノ・カルボニル反応の進行を制御することは、極めて重要である。また、日本において日常的な調味料である味噌や醤油は、加工における発酵・熟成の工程において、アミノ・カルボニル反応が深く関与している。さらに、味噌は一般的に食塩濃度が 12%前後(減塩の場合は 6%程度)、醤油は 15%前後(減塩の場合 7%程度)である。アミノ・カルボニル反応が起こる際に、アミノ化合物はアニオンの形でカルボニル化合物と反応することが知られている⁶⁾。したがって、食塩から生じるイオンがアミノ・カルボニル反応に何らかの影響を及ぼしている可能性があり、食品加工および栄養学上の観点より、その影響を解明することは重要である。本研究ではこのような背景をもとに、アミノ・カルボニル反応において食塩の濃度変化が及ぼす影響について検討を行った。なお、アミノ化合物は数種のアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質を用い、カルボニル化合物は代表的な還元糖であるグルコースを用いた。

2. 研究方法

2.1 NaCl 添加アミノ酸の糖化

アミノ酸は L-アラニン、グリシン、L(+)-リジン塩酸塩を用いた。アミノ酸、グルコースおよび NaCl は、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) により溶解した。0.2 M アミノ酸に 0.2 M グルコースを加え、NaCl は 0, 5, 10% の 3 種類の濃度に調製した。ヒートブロックを用いて 100°C で 0, 30, 60, 90, 120 分間加熱した。

2.2 数種の無機塩類添加によるリジンの糖化

リジンは L(+)-リジン塩酸塩を用い、無機塩類は NaCl, KCl, Na₂SO₄ を用いた。pH による影響を検討するため、リジン、グルコースおよび無機塩類は、数種の緩衝液に溶解した。なお、緩衝液は 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5)、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0)、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) の 3 種類を用いた。0.2 M リジンに 0.2 M グルコースを加え、無機塩類は 0, 0.8, 1.6 M の 3 種類の濃度に調製した。ヒートブロックを用いて 100°C で 0, 120 分間加熱した。

2.3 NaCl 添加ペプチドの糖化

ペプチドは DL-アラニン-DL-アラニン、グリシルグリシン、グリシルグリシルグリシンを用いた。ペプチド、グルコースおよび NaCl は、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) により溶解した。0.2 M ペプチドに 0.2 M グルコースを加え、NaCl は 0, 5, 10% の 3 種類の濃度に調製した。ヒートブロックを用いて 100°C で 0, 30, 60, 90, 120 分間加熱した。

2.4 NaCl 添加タンパク質の糖化

タンパク質試料は β-ラクトグロブリンを用いた。タンパク質、グルコースおよび NaCl は、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) により溶解した。0.1 mM β-ラクトグロブリンに 0.1 M グルコースを加え、NaCl は 0, 5, 10% の 3 種類の濃度に調製した。ヒートブロックを用いて、70°C で 0, 6, 12, 18, 24 時間加熱し、0.2 μm 膜フィルターを用いて濾過した。

2.5 吸光度計による褐変度の測定

UV-VIS 分光光度計を用い、λ = 470 nm における吸光度を測定することにより、糖化反応後のアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質の褐変度を測定した。

2.6 SDS-PAGE 電気泳動によるタンパク質重合度の確認

糖化タンパク質を SDS-PAGE 試料緩衝液と混合し (1 : 1)、2 分間煮沸したものを電気泳動用試料とした。なお、緩衝液には 0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 1.25 ml、グリセリン 1.0 g、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.2 g、2-メルカプトエタノール 1.0 ml、ブロムフェノールブルー (BPB) 10 mg を溶解した。泳動ゲル (12.5% SDS) は、純水 1.5 ml、30% アクリルアミド保存液 3.75 ml、1.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8) 3.75 ml、10% 過硫酸アンモニウム 80 μl、N',N',N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 10 μl を混合して作成した。電気泳動装置により 50 分間泳動した後、Gel Code Blue Stain Reagent により染色し、純水により洗浄した。染色ゲルはデンストグラフを用いて解析を行い、各バンドの比率を測定した^{4,5)}。

3. 結果および考察

3.1 糖化反応後 NaCl 添加アミノ酸の褐変度

アミノ酸の種類および NaCl 濃度による褐変反応の影響を検討するため、リジン、グリシンおよびアラニンの3種類のアミノ酸を用いて、NaCl 濃度 0, 5, 10% の条件において比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 100°C で 0, 30, 60, 90, 120 分間加熱した試料を比較した。NaCl 添加アミノ酸の糖化反応後の褐変度を Fig. 1 に示した。3 種類のアミノ酸は、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間とともに褐変度が増加した。なかでも、リジンは特に褐変反応が速く、次いでグリシン、アラニンの順に反応性がみられた。アミノ酸の構造を比較すると、グリシンとアラニンはアミノ基が一つであるのに対し、リジンは二つのアミノ基をもっている。そのため、グルコースとの反応性が高い結果となったことが考えられる。また、アラニンの反応性がグリシンよりも低値を示した理由としては、アラニンの構造中にはメチル基がありグリシンよりも複雑な立体配座を形成しているため、グルコースとの反応性が低かったことが考えられる。NaCl 濃度における比較を行った結果、すべてのアミノ酸において濃度が高くなるほど褐変度が低くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。アミノ・カルボニル反応において、アミノ化合物はアニオンの形でカルボニル化合物と反応することから、食塩から生じるイオンがその反応の抑制に関与しているのではないかと推察された⁶⁾。

3.2 糖化反応後の無機塩類添加リジンの褐変度

褐変反応における反応性が高いリジンをモデルとし、無機塩類の種類および塩類のイオン強度による褐変反応の影響を検討するため、NaCl, KCl および Na₂SO₄ の3種類の塩類を用いて、イオン強度 0, 0.8, 1.6 の条件において比較した。さらに、pH による影響も検討するために pH 4.5, 6.0, 7.5 の三つの条件で比較した。試料はすべて 2 時間加熱した後に褐変度を測定した。無機塩類添加リジンの糖化反応後の褐変度を Fig. 2 に示した。いずれの塩類においても pH 4.5 の条件下における加熱の場合、塩類濃度とは関係なく褐変度がほとんどみられなかった。また、すべての塩類において pH 7.5 の条件下による褐変反応のほうが pH 4.5 よりも反応性が高い結果となった。アミノ・カルボニル反応の中期段階から後期段階においては、pH が中性～塩基性の条件下でラジカル生成が促進され、さらには褐色色素の形成が促進される¹⁾。このため、三つの pH 条件のなかでもより塩基性に近い pH 7.5 における褐変

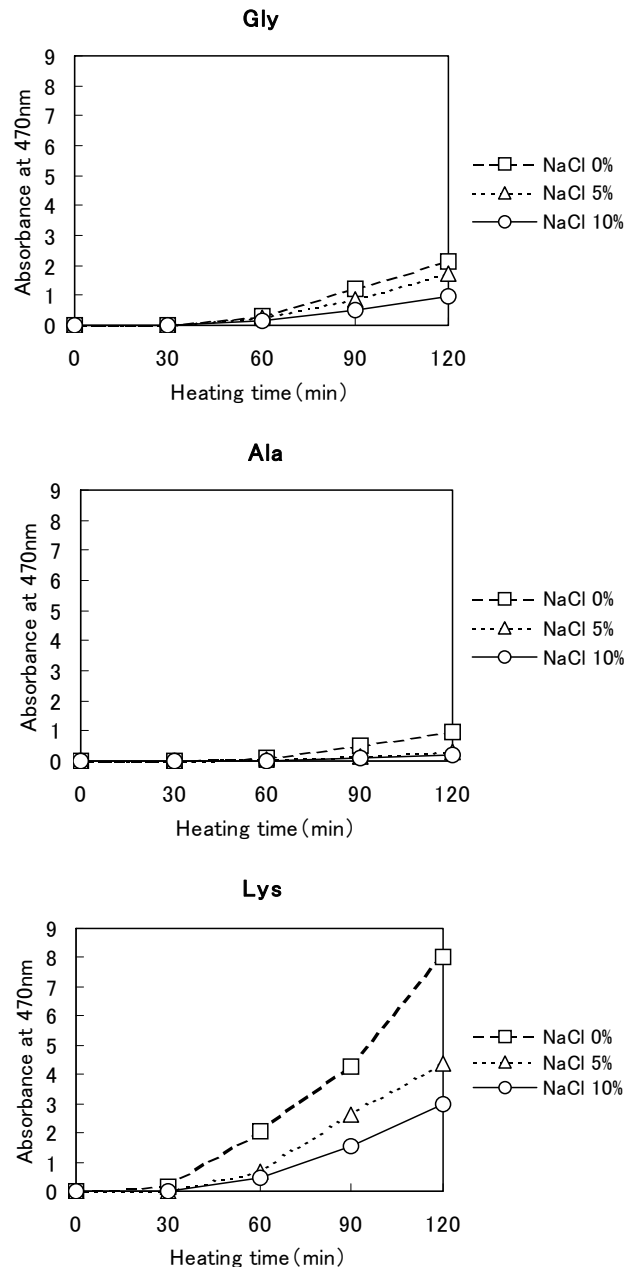


Fig. 1 NaCl concentration in relation to degree of browning on browning reaction between glucose and amino acids. Samples were heated at 100°C.

度が顕著に高値を示したことが考えられる。イオン強度による褐変反応の影響を比較した結果、もともと反応性が高い pH 6.0 および pH 7.5 の条件下では、いずれの塩類においてもイオン強度に依存して反応を抑制した。したがって、褐変反応の抑制に塩類のイオン強度が影響している可能性が示唆された。また、NaCl と KCl の抑制傾向は類似していたが、Na₂SO₄ は他の塩類と比べて若干抑制傾向が緩やかな結果となった。したがって、反応の抑制にはイ

オン強度のみが関与しているのではなく、塩類の種類によっても変化することが推測される。

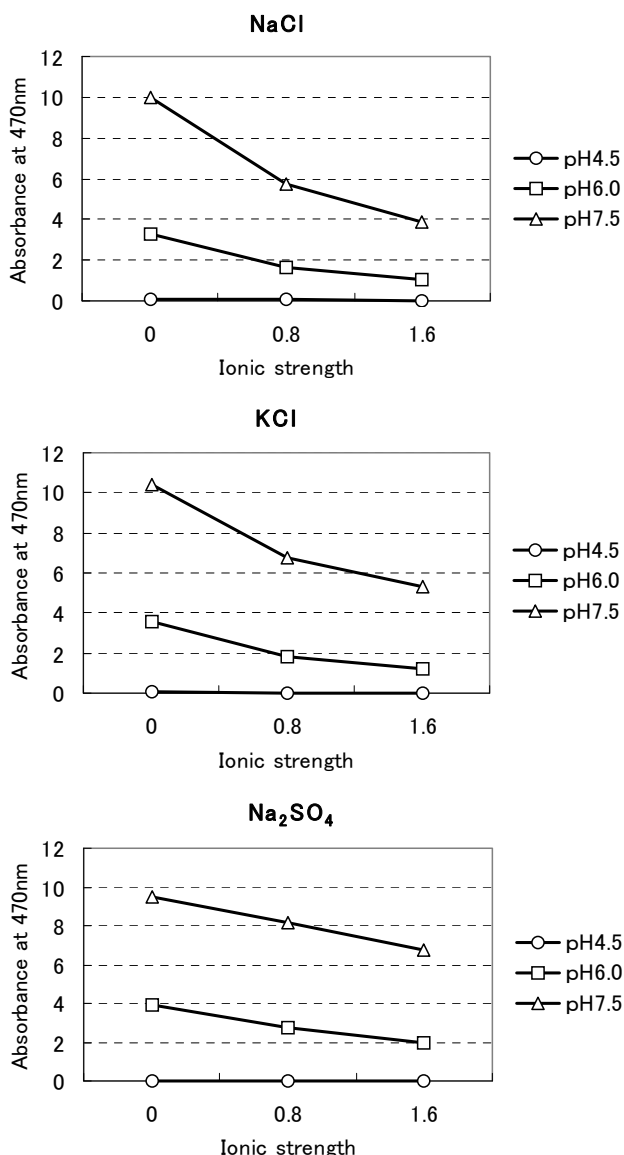


Fig. 2 Ionic strengths and pH in relation to degree of browning on browning reaction between glucose and lysine by the addition of either NaCl, KCl or Na₂SO₄. Samples were heated at 100°C for 120 min.

3.3 糖化反応後の NaCl 添加ペプチドの褐変度

ペプチドの種類および NaCl 濃度による褐変反応の影響を検討するため、アラニルアラニン、グリシルグリシン、グリシルグリシルグリシンの 3 種類のペプチドを用いて、NaCl 濃度 0、5、10% の条件において比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 100°C で 0、30、60、90、120 分間加熱した試料を比較した。NaCl 添加ペプチドの糖化反応後の褐変度を Fig. 3 に示した。3 種類のペプ

チドは、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間にもない褐変度が増加した。グリシルグリシンとグリシルグリシルグリシンにおける褐変度の増加は、ほぼ同様の傾向を示した。一方、アラニルアラニンの褐変度は他の 2 種類のペプチドと比較して著しく褐変反応の反応性が低く、120 分間の加熱後においては他のペプチドの約 1/2 の褐変度しか示さなかった。これは、ペプチドの解離定数 pK₂ 値が関与している可能性が示唆された。アミノ・カルボニル反応において、アミノ化合物はアニオンの形で反応するため、pK₂ 値と褐変度との関係は反比例にあることがわかってい

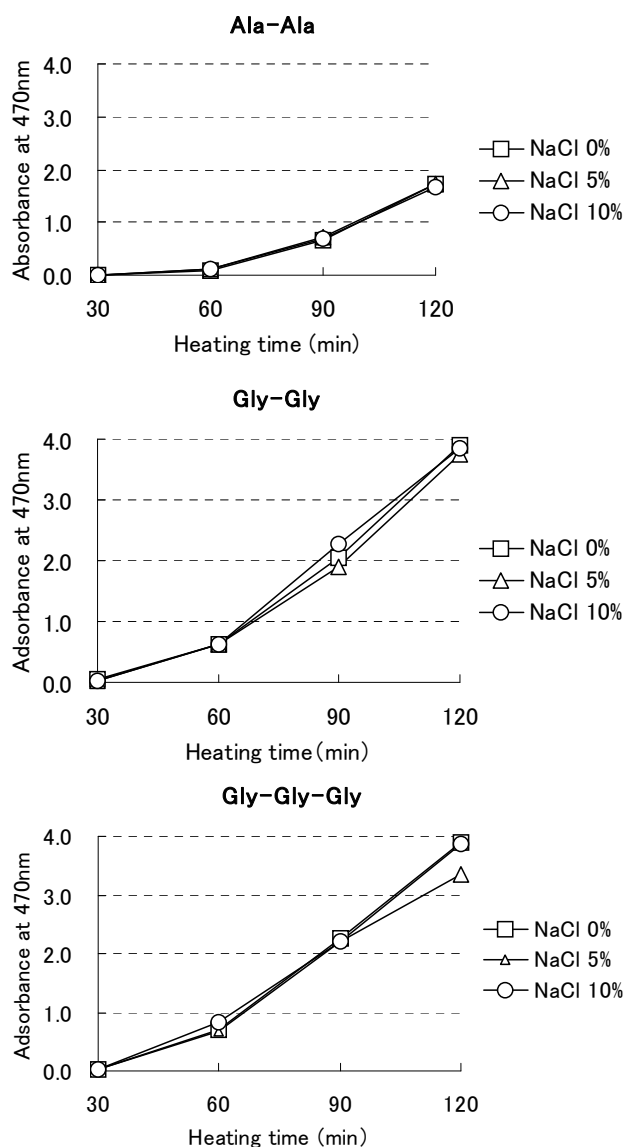


Fig. 3 NaCl concentration in relation to degree of browning on the reaction between peptides and glucose. Samples were heated at 100°C.

る⁶⁾。アラニルアラニンの解離定数は $pK_2 = 8.42$ であり、グリシルグリシンは $pK_2 = 8.25$ 、グリシルグリシルグリシンは $pK_2 = 7.91$ である。したがって、解離定数 pK_2 値が一番大きいアラニルアラニンの褐変度が顕著に低くなったと考えられる。また、NaCl 濃度における比較を行った結果、いずれのペプチドにおいても、添加濃度と褐変度との間に関連性がみられなかった。ペプチドはアミノ酸と比較して水溶液中における pK_2 値が低く、グルコースとの反応性が著しく早いために、アミノ酸における実験結果とは異なり、NaCl 添加による褐変反応の抑制がみられなかったと考えられる。

3.4 糖化反応後 NaCl 添加 β -ラクトグロブリンの褐変度および重合度

タンパク質の褐変反応における NaCl 濃度による影響を検討するため、乳清タンパク質の主要な成分である β -ラクトグロブリンをモデルとして用い、NaCl 濃度 0, 5, 10% の条件における褐変度および重合度を比較した。さらに、加熱時間による影響も検討するために 70°C で 0, 6, 12, 18, 24 時間加熱した試料を比較した。NaCl 添加 β -ラクトグロブリンの糖化反応後の褐変度を Fig. 4 に示した。

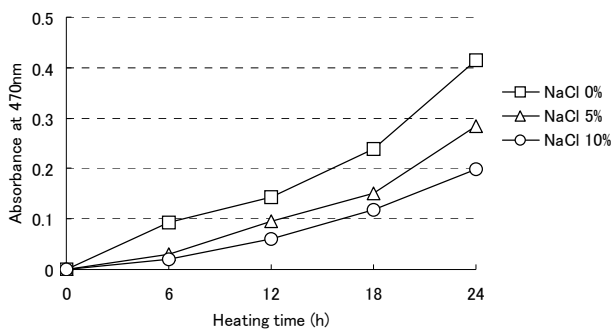


Fig. 4 NaCl concentration in relation to degree of browning on the reaction between β -lactoglobulin and glucose. Samples were heated at 70°C.

糖化 β -ラクトグロブリンは、いずれの NaCl 濃度においても加熱時間にもない褐変度が増加した。また、NaCl 濃度 5%, 10% においては、加熱時間が長くなるほど褐変反応の抑制傾向がみられ、NaCl 濃度が高くなるほどその抑制効果が顕著であった。NaCl 添加 β -ラクトグロブリンの糖化反応後の重合度を Fig. 5 に示した。いずれの NaCl 濃度においても加熱時間にもない重合度が増加した。さらに、NaCl 濃度が高くなるほど重合度が低下し、アミノ・カルボニル反応における重合化の抑制傾向がみられた。以

上の結果より、 β -ラクトグロブリンをモデルとした場合は、NaCl の添加がアミノ・カルボニル反応の進行を抑制することが示唆された。無機塩類添加リジンの褐変反応における結果から推察すると、褐変および重合化の抑制に NaCl のイオン強度が影響している可能性が示唆された。

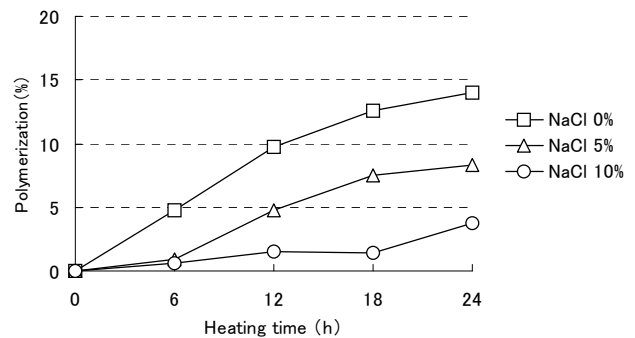


Fig. 5 NaCl concentration in relation to polymerization on the reaction between β -lactoglobulin and glucose. Samples were heated at 70°C.

4. 結論

数種類のアミノ酸を用いて、NaCl 濃度および加熱時間による褐変反応の影響を検討した。その結果、すべてのアミノ酸において NaCl 濃度が高くなるほど褐変度が低くなり、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。次に、リジンモデルとして無機塩類の種類、塩類のイオン強度および pH による褐変反応の影響を検討した。その結果、褐変反応の反応性が高い pH 6.0 および pH 7.5 の条件下では、いずれの塩類においてもイオン強度に依存して反応の抑制効果を示した。したがって、褐変反応の抑制に塩類のイオン強度が影響している可能性が示唆された。また、数種類のペプチドを用いて、NaCl 濃度および加熱時間による褐変反応の影響を検討した。その結果、すべてのペプチドにおいて、いずれの加熱時間においても NaCl 濃度と褐変度との間に関連性がみられなかった。ペプチドはアミノ酸と比べて水溶液中における pK_2 値が低く、グルコースとの反応性が早いために、アミノ酸における実験結果とは異なり、NaCl 添加による褐変反応の抑制がみられなかったと考えられる。次に、 β -ラクトグロブリンを用いて、タンパク質のアミノ・カルボニル反応における NaCl 濃度および加熱時間の影響を検討した。その結果、NaCl 濃度が高くなるほどアミノ・カルボニル反応の進行が抑制され、また、加熱時間が長くなるほどその傾向が顕著にみられた。アミノ酸における研究と

同様の結果となったことから、褐変の反応抑制に NaCl のイオン強度が影響している可能性が示唆された。以上の結果より、塩類のイオン強度の増加にともない、アミノ・カルボニル反応の進行が抑制されることが示唆された。

アミノ・カルボニル反応の後期段階に生成される AGEs は、食品中および生体内において形成される。生体内 AGEs が糖尿病合併症や老化を進行させることから、食品中 AGEs も同様に疾病の進展因子となる可能性がある^{2,3)}。そのため、アミノ・カルボニル反応を制御し、AGEs の生成を抑制することが重要であると思われる。また、食品の加工・貯蔵・調理の過程において、アミノ・カルボニル反応を制御することにより、褐色色素の生成を促進または抑制することが可能となる。したがって、塩類の種類を選択し、イオン強度やpH、加熱時間などを調節することにより、アミノ・カルボニル反応を制御することは食品加工および栄養学上の観点より極めて重要である。今後は、実際の加工・調理において、アミノ・カルボニル反応の中期段階に生成されるアマドリ転位生成物や後期段階に生成される AGEs といった反応生成物を定量することにより、塩類添加による影響を検討したいと考えている⁷⁻¹⁰⁾。

参考文献

- 1) 加藤博通, 倉田忠男: *食品の科学6 食品保蔵学*, 文永堂出版, 108-133, 1999
- 2) 八木橋操六: *臨床医のための糖尿病病理, 診断と治療社*, 2004
- 3) Jaime Uribarri, Weijing Cai, Oana Sandu, Melpomeni Peppas, Teresia Goldberg, Helen Vlassara, Diet-driven Advanced Glycation End products are major Contribution to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects, *Ann N Y Acad Sci*, Vol.1043, 461-466, 2005
- 4) Marion A. M. Hoffmann and Peter J. J. M. van Mil, Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds, *J. Agric. Food Chem.*, Vol.45, 2942-2948, 1997
- 5) Douglas G. Dalgleish, Vinitha Senaratne, and Sophie Francois, Interactions between α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in the Early Stages of Heat Denaturation, *J. Agric. Food Chem.*, Vol.45, 3459-3464, 1997
- 6) N. V. Chuyen, T. Kurata and M. Fujimaki, Studies on the Strecker Degradation of Alanine with Glyoxal, *Agric. Biol. Chem.*, 36 (7), 1199-1207, 1972
- 7) Molna' R-peal I, Pinte'R-Szaka'CS M, Wittmann R, Reutter M, Eichin ER K, Optimum yield of pyridosine and furosine originating from maillard reactions monitored by ion-exchange chromatography, *J chromatogr*, Vol.361, 311-320, 1986
- 8) Tokusoglu OEzlem, Akalin A. Sibel, Unal Kemal, Rapid high performance liquid chromatographic detection of furosine(ϵ -N-2-furoylmethyl-L-lysine) in yogurt and cheese marketed in Turkey, *J Food Qual*, Vol.29, No.1, 38-46, 2006
- 9) Weijing Cai, Qiao-di Gao, Li Zhu, Melpomeni Peppas, Gijiang He and Helen Vlassara, Oxidative Stress-Inducing Carbonyl Compounds From Common Foods: Novel Mediators of Cellular Dysfunction, *Molecular Medicine*, Vol8 (7), 337-346, 2002
- 10) GOLDBERG T, CAI W, PEPPA M, DARDAINE V, BALIGA B S, URIBARRI J, VLASSARA H, Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods, *J Am Diet Assoc*, Vol.104 (8), 1287-1291, 2004

No. 0648

Effect of Sodium Chloride Concentration on the Reaction Rate of Amino Acid, Peptide and Protein with Glucose

Nguyen Van Chuyen, Keiko Yamaguchi and Yuri Nomi

Department of Food and Nutrition, Japan Women's University

Summary

Maillard reaction is a chemical reaction involving the amino group and carbonyl group, the reaction occur readily in food processing, storage and cooking process. The mechanism of Maillard reaction is generally divided into three stages, namely early, advance and late stage. In the early stage, a condensation occurs between an amino acid and a carbonyl group leading to the formation of a Schiff base and Amadori rearrangement product. In this early stage, amino compound reacts with carbonyl compound in the form of an anion. Therefore, it is considered that the ions generated from sodium chloride affect the rate of Maillard reaction. In this research, the amino acids such as alanine, glycine, lysine, the peptides such as alanylalanine, glycylglycine, glycylglycylglycine, and protein such as beta-galactobulin were used. The concentration of sodium chloride was set up at 0, 5 and 10%. Equimolar (0.2 M) of amino acid or peptide and glucose (in 0.2 M phosphate buffer, pH 6.0) was heated at 100°C for 30, 60, 90 and 120 min. Then, the browning degree was measured at 470 nm. The results showed that for the case of amino acids, the rate of browning was inhibited by high concentration of sodium chloride. However, in the case of peptides, the browning rate was not inhibited by sodium chloride concentration. In the case of beta-Galactobulin, 0.1mM beta-Galactobulin and 0.1 M glucose was heated at 70°C for 6, 12, 18, 24 h, then the browning was measured at 470 nm, while the polymerization of the protein was measured by SDS-PAGE. The results showed that the rate of browning of protein was also inhibited by the concentration of sodium chloride. Since the reaction rate of amino acid or protein was much lower than that of peptide with glucose, then it is estimated that the ionic strength affect the reaction rate of amino acids and protein, but not peptides in the reaction with glucose. In order to investigate that whether sodium ion or chloride ion affect the reaction rate, the same ionic strength at 0, 0.8 and 1.6 of sodium chloride, potassium chloride and sodium phosphate was used for the reaction of lysine with glucose. The result showed that the same tendency was observed for all three salts, thus it is estimated that the effect of ionic strength is more important than the kind of ion on the reaction rate of lysine with glucose. Besides, the same tendency was observed for the reaction at pH 4.5, 6.0 and 7.5. Consequently, sodium chloride can be used to control the rate of Maillard reaction in food industry.