

## メラノイジンの研究について

友田 宜孝・中村 亦夫・吉 弘 芳 郎

## 1 ま え が き

われわれはすでに食品の色の中で褐色より黒色にわたる系統の色の本体が、次の三つに大体分けることができると述べた<sup>1)</sup>。すなわちカラメル、メラノイジン、メラニンであって、カラメルは炭水化物を母体とし、メラニンはアミノ酸および蛋白質より、メラノイジンは炭水化物とアミノ酸、および蛋白質の両者より生成する。

カラメルとメラニンはそれぞれ生成の源が成分的に簡単なため、古くから研究が行われたが一方メラノイジンは炭水化物とアミノ酸、および蛋白質の両者の化学反応により生ずるため、また生じてできた色というもので全く他の二者に似ているため、これらに比べると研究の歴史は浅い。一般的に研究されはじめたのは、1912年にフランスの Maillard<sup>2)</sup> がグルコースとアミノ酸の混合物を水溶液にして、加熱して生ずる褐色の色素をメラノイジンと命名した。以来、糖類とアミノ酸および蛋白質の混合物よりこの色素を生成する反応を Maillard reaction と呼ぶことが多い。

また反応の特徴である褐色色素の生成からして褐色化反応、browning reaction or browning と呼ばれる。

メラノイジンに関する研究は戦前には食品化学の一角で極めて地味に行われたにすぎなかったが、メラノイジン生成反応が実に広範囲に食品の貯蔵中に起るいろいろの反応に関係があることに注目されてから漸く盛んに行われるようになった。特に食糧の変敗(deterioration)に関連してアメリカ、イギリス等において研究が盛んに行われるようになり、本邦でも食品の品質の改良という面から次第に注目されてきたようである。ここではこれらの研究について歴史的に若干述べてメラノイジンに関する研究の概要やわれわれの行った研究の一端を報告したいと思う。

## 2 食糧工業の問題としてのメラノイジン

メラノイジンの研究を歴史的にたどる前に、もう少しメラノイジンが食糧工業上の問題として、どんなものか具体的に述べてみたい。

メラノイジンの特性は、その色(color)と匂い(aroma)にある。色を問題にしたときの食糧工業上の問題の具体

的例としてはビール、醤油の色、パンの外皮(crust部)の色などがあり、水飴の色などはわれわれの研究によればこのメラノイジンによるものと考えられる。

Enders<sup>3)</sup>氏等によると焙燥麦芽の色の原因はメラノイジンであり、緑素芽(green malt)を焙燥して香気と色素を生成させることはメラノイジン反応を起させ、メラノイジンの特性をプラスに利用したものとといえるであろう。ビールの色の強さは麦芽汁のメラノイジンの濃度によると Hennrich Lüers<sup>4)</sup>氏は報告している。

醤油の色は黒野、深井<sup>5)</sup>氏等により研究されて、その本体はメラニンの一種であって醤油のメラニンという意味でソヤメラニン酸と名づけられたが、これなどは明かにメラノイジンの一種であろうと考えられる。黒野氏はこの時すでにこのソヤメラニン酸を合成し、合成醤油(化学醤油)の色の主体として用い得ることを主張されていたが、最近の合成醤油の着色に一部用いられるカラメルにはその製造に当って含窒素化合物を用いることが多いから、事実上メラノイジンがすでに利用されていることにもなるであろう。

パンの皮の色の問題は他の焼き菓子などの場合と同様適度のメラノイジンの生成により、われわれの嗜好が満足され、その香りと色を有効に利用している一例であろう。しかし逆に小麦粉等の穀類を利用した食糧工業では着色を極度に嫌う製品、例えばパン粉製造などにはメラノイジンの生成はむしろマイナスの効果を持つことになる。

水飴の色の問題はさきにわれわれが報告<sup>6)</sup>したように水飴の色の濃さや貯蔵中における着色性の難易は、多分にその中に含まれている窒素化合物の量によることが判った。窒素化合物の多いもの程、メラノイジン生成反応が起り易く、また水飴の水分含有量がメラノイジンの生成に最適の条件の近くにあることも判った。それでこの場合には、むしろわれわれにマイナスの効果を持つこれらの生成を避けるには、原料たる精製澱粉に含まれる蛋白質の量をできるだけ少なくする必要があり、またその蛋白質の加水分解生成物にいくらかのものがあるか知る必要がある。われわれはこの研究<sup>7)</sup>を行い、精製澱粉中に含まれる微量の蛋白質を加水分解しペーパークロマトグラフを用いて 15 種以上のアミノ酸類を検出した。これ

らの中には糖類と反応して容易にメラノイジンを生成するアミノ酸もある。

澱粉中の蛋白質は普通の水飴製造の糖化条件では加水分解を受けることが少なく、大部分は糖化糖液中に絮状沈澱となって残り、活性炭脱色処理の際ほとんどが取除かれて水飴中に移行する量は極めて少量であるがこれがメラノイジン生成の原因となるものと考えられる。水飴を常温で長期間貯蔵した場合に起る着色現象がメラノイジンによるという考え方を裏づける実験に赤堀氏<sup>9)</sup>の実験がある。すなわち1ロイシンとグルコースを水溶液にし、炭酸ガスを除いた空気を通じ溶液中の炭酸ガスを完全に除いた後密閉し約2ヶ月間放置した所、溶液は完全に黄褐色に着色し、且つ空気を通じて炭酸ガスを追い出し加里球に吸収せしめた所、加里球は重量増加し炭酸ガスの発生を立証した。

その他果汁工業、干果工業における加熱処理の時に起る望ましからぬ着色現象や乾燥卵、ミルク工業等々色の問題は食糧工業上の多方面にわたっている。

一方匂いの問題は色のそれと共に食糧工業上の大きな問題であるが、メラノイジン自身に匂いがあるのかどうかはまだはっきりしない。メラノイジンを生成する際には必ず匂いを副生することは古くから知られているので、ここではやはり Maillard reaction で発生する匂いはメラノイジンによるものとしておこう。

Lintener<sup>9)</sup>は糖類とアミノ酸とで Maillard 反応の際生ずる色、匂い、味は用いられるアミノ酸により異なることを述べ、さらに W. Ruckdeschel はこれについて1941年に焙燥麦芽の色と匂いについての研究を行い、焙燥の条件でいかなるアミノ酸より、いかなる程度に匂いと色が出るかしらべるため、個々のアミノ酸とグルコースを反応させ、その反応性、呈色性、芳香性等についてくわしく研究したがその結果を要約すると第1表の如くなる。非常に概略的な結果ではあるがかなり意義のあるものと思われる。その他これに似た報告とし

第1表 各種アミノ酸の Maillard reaction

アミノ酸	反応性および呈色性	芳香性	その他
グリシン	早し	ビールよう芳香	味は少ない
アラニン	早し	強烈なビールよう香	—
フェニルアラニン	ゆるやか	—	不快味
ヴァリン	ゆるやか	カラメルよう匂い	—
ロイシン	着色性は少し	強烈なパンの匂い	蜂蜜のような味
アスパラギン酸	反応はゆるやか	—	—
グルタミン酸	反応はゆるやか	—	—

ては、Barnes<sup>10)</sup>等はアミノ酸として、 $\alpha$ アミノ酪酸を用いたときには楓よりの香を得ることができると報告して

いる。

これらの匂いの原因はその後の研究によれば、メラノイジン自体にあるというよりはむしろ Maillard 反応の際にアミノ酸が酸化されてアルデヒド類となり、これらが匂いの原因となるのであろうとされている。しかしアミノ酸からできるアルデヒド類だけでは Maillard 反応の際の匂いは出ずやはりメラノイジンを含むいろいろの匂いが合成されて芳香となるものと考えられる。メラノイジンの匂いに関する研究は本邦では少ないが、さきに述べた醤油の色に関連して、香りの問題も黒野 深井両氏等が研究を行い、その香気物質をジメドン誘導体として分離しその構造は次の如きもの、

$\text{CH}_3-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$  すなわち $\gamma$ -アセトブチルアルデヒドであろうとしこれをソヤナル(soyanal)と名付けたがこれなどもメラノイジンに関連した匂いの研究の一つと思われる。赤堀氏はこの研究をさらに進め各種の単糖類と各種のアミノ酸をグリセリン液に熱し、生成する香気成分を研究しロイシンを用いたときにはイソヴァレルアルデヒド、フェニルアラニンの場合にはフェニルアセトアルデヒドを生ずることを認め、アラニン、ヴァリン、 $\alpha$ -アミノイソ酪酸よりはイソブチルアルデヒドのできることを報告している。また反応にあずかる単糖類よりはグルコースを用いたときにはヒドロキシメチルフルフロールを、アラビノース等のペントースを用いたときにはフルフロールを、またラムノースを用いたときにはメチルフルフロールのできることを報告している。

このようにメラノイジン生成反応において色や匂いやさらにまた味の問題が次第に明らかになるにつれて、貯蔵・調理加工に起る炭水化物と蛋白質の相互作用に起るいろいろの問題も次第に解決されてゆくものと考えられる。

### 3 メラノイジン研究の概況

一般的应用技術上の面より、また純粋な学問的興味の対象としてメラノイジン生成の反応についていろいろな研究がなされてきたが依然としてメラノイジンの本体については明かでない。その大きな理由の一つに Maillard 反応の起る条件が極めて広い範囲にあるということを挙げることができる。すなわち糖と蛋白質アミノ酸類の共有の状態には各種の場合があり水素イオン濃度、水分などがいろいろ違ってくる。例えば水飴の問題では pH は酸性であろうし、乾燥卵製造の場合のように蛋白質が多い場合には pH はアルカリ側にあると考えられる。前者の如き場合には酸性反応といい後者の場合はアルカリ性反応と Maillard 反応を区別する人もある。

両反応では反応条件が異なることは明らかであり同じ糖アミノ酸が両反応にそれぞれ起っても同一の反応と断言することが難しい。殊に酸性反応の如く炭水化物の

多い場合には Maillard 反応とカラメル化反応の区別がつけにくく、更にその上少量のアミノ化合物の存在がカラメル化反応の触媒的作用をなすこともあって、生成される色素が同じ黒褐色でもメラノイジンとカラメルの区別がはっきりしなくなる。

メラノイジンの研究方法を大別して二つのグループに分けることができる、一つは実際の面よりの研究で総合的な方法で研究を進めることであり、研究の対象を多糖類、蛋白質等の間に行われる反応におくが他の一つは例えばグルコースとグリシンを反応させるように、モデル的な反応を基にして基礎的に研究を進める方法である。これは主に反応機構に研究の主体をおくものといえよう。

前者の研究には Patton<sup>11)</sup>、Lea<sup>12)</sup>氏等の研究があり、後者のそれには Wolfstrom氏<sup>13)</sup> 等の研究がある。

Patton氏等はカゼイン、大豆グロブリン等の蛋白質の生物学的の価値が Maillard 反応でどのような影響を受けるかということの研究した。グルコースとそれらの蛋白質を反応させた後、蛋白質を加水分解した所、リジン、アルギニン、トリプトファン等のアミノ酸の減少を認めた。

同様の実験を Evans<sup>14)</sup>氏等はオートクレーブを用いて行い大豆蛋白質にグルコースまたは蔗糖を反応させたとき消化酸素で分解して出てこなくなるアミノ酸をあげている。

Lea 氏は乾燥状態におけるグルコースとカゼインの反応を調べ、アミノ基の減少を Van slyke 法でしらべた。

37°C で 70% 相対湿度で各種の糖類がカゼインに作用して起るアミノ態窒素の減少もしらべられたがそれは第 2 表のようになる。さらに注目すべき事柄として反応速

第 2 表 カゼインと種類の反応

種 類	アミノ態窒素の減少mg/g(全窒素)		
	4 日 後	8 日 後	16 日 後
キシロース	23.2	27.7	30.5
アラビノース	15.9	22.6	24.3
グルコース	8.2	12.0	16.9
ガラクトウロン酸	8.5	13.0	19.1
ラクトース	6.8	9.2	10.6
マルトース	5.7	8.4	10.7
フラクトース	0.9	1.5	2.7

度は固体が濡れた状態、相対湿度 65~70% のときが最も早く、非常に乾燥しているとか、または非常に水分の多い時には極めて遅くなることを述べているが、この報告は Wolfstrom, Rooney 氏等の結果と比較すると面白い。これは糖類とアミノ化合物間の反応の中、キシロースとグリシンのモル比 1:5 の混合物の反応という最も普通のモデル系で水分の量を変化して反応せしめたときの反応

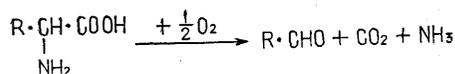
速度を比色計で呈色度を測定する方法でしらべた結果、着色量は水分 0 より 30% 位までは急激に増し、それからしだいに減少し水分 90% ではほとんど 0 となる。不均一系反応ではなかなか正確な結果が得られないが Wolfstrom 氏等のこの方法によれば Maillard 反応では最適水分量というものがあることを示し Lea 氏の不均一系反応の結果と一致した傾向を示している。

Lea 氏はこの外 pH の影響や反応速度式などについても報告しているがこれらの実際の面よりの研究に対し、基礎的な研究も多い。これらの研究はいずれもメラノイジン生成の反応機構を解明しようとしたもので、簡単なモデル的な反応条件で Maillard 反応の反応性やまた生成物の物理化学性などを比色法、氷点法、施光度測定法、吸収スペクトル法などで研究したものである。これらの手段の外にクロマトグラフ法もよく用いられる。もちろん従来の Van slyke 法等の化学的測定法による研究も盛んに用いられる。われわれは窒素の測定にはアゾトメトリーを応用した。これらの研究により反応機構の一部が明らかにはなっているが依然としてメラノイジンの本体は不明である。

#### 4 メラノイジン生成の機構

糖類とアミノ化合物の反応で第一に考えられることは、単糖類中の CHO 基とアミノ化合物中の NH<sub>2</sub> 基の反応であろう。しかし糖とアミノ化合物のこのような脱水化合物を取り出したという報告はない。しかし糖とアミノ酸の水溶液を混じた場合は肉眼的にみて無反応のようでもこれに紫外線を照射すると蛍光を発することよりこれらの化合物も瞬間的には存在しているのかも知れない。

次にこれを加熱し反応を促進するとはじめて炭酸ガスが盛んに出て反応液が着色し、同時に特有の匂いが出てくる。この反応では反応に使用されるアミノ酸の一定量に対し、糖の量を順次に増加していても常に発生する炭酸ガスは使用されるアミノ酸に相当する量を超えず、また同時に生成するアルデヒドは使用されるアミノ酸より炭素数が 1 個すくないもの、および糖の脱水生成物たるフルフラール類であることを赤堀氏は報告し、結局メラノイジン生成反応におけるアミノ酸の変化は次のようなものであるとした。



この場合に発生する NH<sub>3</sub> はメラノイジン色素の一部となるため NH<sub>3</sub> として定量することはできない。

ところが上記の反応式の如く、αアミノ酸に作用して酸化分解を起させる有機化合物は外にも多い。これらの中には—CO—CO—なる原子団を持つものが多く Neu-

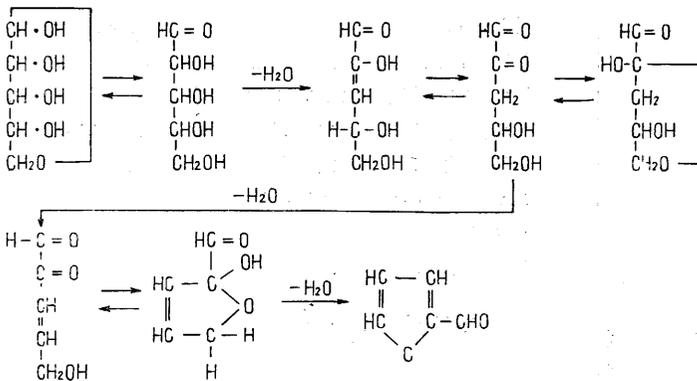
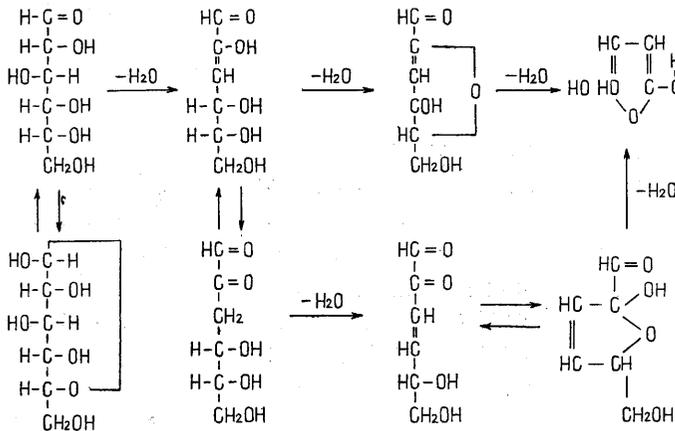
berg<sup>15)</sup> Kobel 氏等はメチルグリオキザール、ジアセチルなども上記の作用を持っていると報告している。

また一方 Dowell<sup>16)</sup> 氏等はフルフラールとアミノ酸が反応して窒素を含むフミン質を作ることより赤堀氏は研究を進め糖類とアミノ酸の反応はフルラールとアミノ酸との反応に帰着し且つまたフルフラールとアミノ酸は反応するが、ワニリン、ピペロナルなどはアミノ酸と反応しないことより、アミノ酸に対する酸化作用はアルデヒド基の作用でなく、フルフラール特有の性質であろうとした。

これによっても Maillard 反応には糖の分解生成物が大きな役割を演じていることが判明する、OH の高いもの程反応が行われやすいのはアルカリ溶液中においては糖がいろいろのものに変化しやすいためと考えられる。

Wolfrom 氏等は紫外線吸収スペクトル法を用い、ヘキソースから 5-ヒドロキシメチルフルフラールのできる模様をしらべ第 1 図の如き仮定の転化過程を報告した。

ペントースの場合には第 2 図の如くなる。更に D キ



シロースとフルフラールとの Maillard 反応における比較を行い、両者の反応生成物について元素分析や吸収曲線その他で比較した結果、これらの性質が良く似ていることを報告し、ペントースよりフルフラールにいたる中

間体でグリシンの如きアミノ化合物との反応でメラノイジンができて、フルフラールフルフロールができて、色素ができて、述べている (第 3 図)。

5 単糖類と無機アンモニウム塩の作用

グルコースまたはキシロースと無機アンモニウム塩とを水溶液で熱して得る褐色の色素は、それぞれの糖からヒドロキシメチルフルフラール、フルフラールができてこれがアンモニウム塩の触媒作用で色素ができると考えると、できた色の部分には窒素分が極めて少ないであろうということが想像されるが、実際色だけを取り出し窒素を測定すると後述するようになかなりの量が出てくる。また、その他の研究により無機アンモニウム塩が単糖類のフルフラール類にいたる中間体とかなり反応するものと考えられる。

この実験のための褐色色素は次のような方法で得た。すなわち 50% 濃度の糖液に硫酸等含窒素有機物を加えこれをオートクレーブ中で 2atm 30~60min 加熱して着色せしめ、これに活性炭を加えて色素を吸着させ、活性炭をよく洗い、洗液に糖反応がなくなつてから活性炭を水に懸濁液をアルカリにすると色素が溶出する。濾過して濾液を濃縮し色素を得る。または着色反応液をマグネソール層を通し、マグネソールに吸着された色素を含水メタノールで抽出し、メタノールを蒸溜して色素を得る。

いずれの場合も黒いシラップ状に得られるがデシケーターで乾燥すると固い固体となる。

性質は非常に吸水性で水に溶けやすく、有機溶媒には溶け難い。

この色素を常法通りキエールダール分解しアゾトメーターで N 分を測定した結果第 3 表の如き値が得られた。この N% は試劑の作成法によってかなり変動するが大體 7

第 3 表

試料	N <sub>2</sub> (mg)	N <sub>2</sub> %
31mg	2.5	8.0

~3%前後のものが多かった。

他の人々の報告を第 3 表に示す。

糖類とアンモニウム塩の濃度の割合を変化したときの着色の様子を光電光度計でしらべ次の如き結果を得

第 4 表

実 験 者	N%	摘 要
Wolfrom, Langer <sup>17)</sup> Tzi Lieh Tan	7.05~5.80	キシロース グリシン反応
"	4.65~3.09	フルフラール グリシン反応
黒 野 <sup>18)</sup>	7.48	醬油の色
Wolfrom, Schlicht <sup>19)</sup>	8.87	D グルコース-1— C <sup>14</sup> グリシン
Ruckderchel <sup>20)</sup>	5.28	グルコースグリシン
"	5.01	グルコースアラニン
"	2.45	グルコースロイシン
Enders <sup>21)</sup>	3.5~5.3	—

第 5 表

N量 $\gamma$	グルコース g	pH		吸光度
		反応前	反応後	
100	5	5.0	4.8	0.030
200	5	5.0	4.8	0.058
300	5	5.0	4.8	0.072
400	5	5.0	4.8	1.11
500	5	5.0	4.8	1.40

第 6 表

N量 $\gamma$	グルコース g	pH		吸光度
		反応前	反応後	
500	1	5.0	5.0	0.030
500	2	5.0	5.0	0.041
500	3	5.0	5.0	0.050
500	4	5.0	4.8	0.056
500	5	5.0	4.8	0.061

た。その方法は 5g のグルコースに硫酸 (窒素量 100~500r) を加え水を加えて 5cc とし 2atm 30 分間加熱後、反応着色液を日立 EPO—型光電光度計を用い BG フィルター (主波長 500m $\mu$ ) で吸光度を測定した。

第 5 表はその結果を示したものである。

これによると N 量と吸光度すなわち生成色素濃度とはほぼ比例している。逆に N 量を一定にしてグルコース濃度をかいてゆくと次のようになる (第 6 表)。グルコース濃度がますます吸光度もますますグルコース濃度が 2 倍になっても吸光度は 2 倍にはならない。これによってもメラノイジン生成における糖類の複雑な変化が推定される。

前記実験と同様にして糖溶液に塩化アンモン、硼酸アンモン、硫酸アンモン、アスパラギン酸等で着色した色素の吸収曲線を波長 400m $\mu$  → 740m $\mu$  の間で求めたが単調で特別の特徴は見出せなかった。しかしフルフラール類の吸収曲線の特異性は紫外部にあるから色のそれも紫外部に興味ある結果が出るかも知れない。

### 6 クロマトグラフによるメラノイジンの研究

Maillard 反応の際に生ずるいくつかの生成物をクロマトグラフィーで研究しようとする試みはすでに多くの人々によってなされている。Patton<sup>22)</sup> 氏等はグリシンとグルコースの混合物を熱して得られた反応液を、展開剤として 77% エタノールを用いて Whatman No. 1 の沷紙上で降下法によりパーティションクロマトグラフを行い、沷紙を乾燥後 3650A の紫外線をあてて R<sub>f</sub> 値 0.07~0.91 の間で約 10 ケ以上の螢光帯を見出し、これらはいずれもグルコースでもグリシンでもないと報告してい

るがこれが如何なるものであるか不明である。この実験は Maillard 反応において各種の中間生成物の存在を研究する面白いものと考えられる。この報告では色素は原点に止るとされているがわれわれが同様の実験をグルコース、アスパラギン酸で行い展開剤として 75% エタノールを使用した時には色素が約三つのクロマトグラムを作った、これより考えるとわれわれの得た色は Patton 氏等の得たものとは化学的組成が異なるものと考えられる。Gottschalk, Partridge<sup>23)</sup> 氏等はグルコースとアミノ酸をアルカリの存在で加熱反応せしめ、これをクロマトグラフィーして二つの反応生成物をあげ、これらが N グリコシドであると述べている。Chichester, Stadtman, Machinney<sup>24)</sup> 氏等はグリシンとグルコースの反応で得られたものを含水フェノール系、ブタノール・醋酸・水系の二つの展開剤で二次元クロマトグラフィーを行い 24 以上のスポットを報告し各スポットのエンヒドリン試験や m・フェニレンジアミン反応などを行いそれらの中に Partridge 等の報告したものや、またヒドロオキシメチルフルフラールを確認している。

このようにしてクロマトグラフによる研究も着々進められているが、反応物が極めて微量にしか得られないことや操作中にもその性質がしだいに変わってゆくことなどで一定したものが得難いため充分な成果がなかなか得られないが、Maillard 反応の中間生成物の研究には有力な手段であることには違いなく興味ある結果が得られることを期待される。

### 7 あとがき

以上不十分であるがメラノイジン研究の概要をのべた最近研究上に新しい技術が続々紹介されているがこれらを応用してメラノイジンの化学が一日も早く進歩することを望むものである。この研究は食糧化学の立場より見ると実に大きな問題であり、食糧化学のみならず炭水化物 蛋白質を扱う化学の分野においては必ず存在する問題と考えられ、われわれも今後とも一層努力したいと思う。(1955. 1. 24)

### 文 献

- 1) 友田等 本誌 4 366.
- 2) Maillard Compt. rend. 154 66—8 C.A. 6 1130. 1912.
- 3) Enders Wochschr. Brau 53 306—9(1936) C.A. 31 5100<sup>4</sup>.
- 4) Hernrich Brewers digest 24 41—4(1949).
- 5) 黒野, 深井 日農化 1 1016.
- 6) 吉弘 工化誌 51 61.
- 7) 友田等 本誌 5 91.
- 8) 赤堀 日農化 52 608.
- 9) Lintener 2 Gerch Bran 95 545—8(1911).
- 10) Barnes Ind Eng Chem 39 1167(1947).
- 11) Patton Science 107 623(1948).
- 12) Lea Chem & Ind March 4(1950).
- 13) Wolfrom 等 Jour. Amer. Chem. Soc. 68 2022  
" 69 2411  
" 70 514  
" 71 3518  
" 72 5090 など
- 14) Evans J. Biol. Chem. 178 543(1949).
- 15) Neuberg Biochem Z. 185 477(1927).
- 16) Dowell Ber. 61 942(1928).
- 17) Wolfrom Langcr Tzi.lich Tan. Jour. Amer. Chem. Soc. 72 5090.
- 18) 黒野 5) と同じ
- 19) Wolfrom Schlicht Jour. Amer. Chem. Soc. 72 1013
- 20) Ruckdeschel Z ges Brau. 37(1914) C.A. 9 118.
- 21) Enders Kolloid Z. 85 74—87(1938).
- 22) Patton Nature 167 406(1951).
- 23) Gottschalk Partridge Nature 165 684(1950).
- 24) Chichester Stadtman Jour. Amer. Chem. Soc. 74 3148-20(1950)