

メイラード反応におけるアミノ酸置換基の影響

富田 季里呼[†], 松田 樹生也[†], 山口 悟^{*†}[†]茨城県立水戸第一高等学校 化学部 〒310-0011 茨城県水戸市三の丸 3-10-1

(2019年8月10日 受付; 2019年8月19日 受理)

Abstract

メイラード反応とは、糖とアミノ酸を加熱することにより褐色物質のメラノイジンと風味成分が生成される反応である。本研究から、その第一段階として、複合反応であるメイラード反応に対し、擬一次反応を仮定したメイラード反応速度定数の算出方法を確立することができた。その際、反応の初期段階においてアミノ酸のアミノ基中の窒素原子が糖に結合する反応が律速段階であり、アミノ酸の α 炭素上のプロトン化されていないアミノ基の存在が反応速度に大きな影響を与えることが示唆された。

アミノ酸分子中のアルキル基の評価から、それは α 炭素上にあるアミノ基の窒素原子の電子密度に影響を及ぼすことがわかった。その結果として、アミノ基の求核剤としての働きが強まり、シッフ塩基形成過程が促進される。さらに、アルキル基は立体障害と材料性の面でもメイラード反応に深く関与していることがわかった。

Introduction

メイラード反応とは食品中のアミノ酸、ペプチドやタンパク質と還元糖が反応してメラノイジンと呼ばれる褐色物質と風味成分が生成する反応である^{1), 2)}。その反応の一例として、焼肉の焦げ目やホットケーキの焼き色、味噌や醤油の褐色成分の生成などが挙げられ、料理の色や風味に大きく影響する。

また、終末糖化産物(AGEs)は生体内に存在する糖質と組織タンパク質、脂質、アスコルビン酸などが起こすメイラード反応によって生成する^{3, 5)}。AGEsの一つである ϵ -carboxymethyl-lysine (CML)は真皮浅層に蓄積しシワの原因となる物質である³⁾。

さらにAGEsの蓄積は糖尿病、動脈硬化症、アルツハイマー病、透析アミロイドーシス、腎臓病のような加齢に伴う疾患の発症にも関与している^{4), 5)}。結果として生体内でのメイラード反応の阻害は、加齢に伴う疾患の改善に貢献すると考えられる。

したがって最適な調理方法を確立し、一般的に美味しいといわれるような料理を簡単に作るためにもメイラード反応の反応速度定数を求めることは重要である。さらに、非常に複雑なメイラード反応を理解し、疾患を予防するにはアミノ酸の持つ置換基がメイラード反応に及ぼす影響を明らかにすることが必要である。

そこで、本研究では高校の化学実験室でもできるメイラード反応の反応速度定数算出方法を確立し、アミノ酸の持つ置換基がメイラード反応に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

Experimental

試薬

グリシン (試薬特級, 米山薬品), L-リシン (試薬特級, 和光純薬), L-アルギニン (試薬特級, 和光純薬), L-ヒスチジン (試薬特級, 和光純薬), L-アラニン (試薬特級, 和光純薬), L-バリン (試薬特級, 和光純薬), L-ロイシン (試薬特級, 和光純薬), L-イソロイシン (試薬特級, 和光純薬), D(+)-グルコース (鹿一級, 関東化学)

器具

スクリーキャップ付き石英セル, UV-Vis 分光光度計 (SIMADZU UV mini1240), ホットプレート

操作

実験は参考文献6)を参照し行った。

グルコース濃度を 1.50 mol/L, アミノ酸濃度を 0.15 mol/L に調整した混合水溶液を調製した。そのグルコース/アミノ酸混合水溶液 3.0 mL をスクリーキャップ付き石英セルに入れ, 100°Cのオイルバスで加熱した。UV-Vis 分光光度計を用い, メラノイジンの吸収極大波長である 470 nm⁶⁾における吸光度を 10 分おきに測定した。グルコース+アミノ酸→メラノイジンを A→B の擬一次反応と仮定し, 下式からメイラード反応速度定数を算出した。

$$\ln \frac{[B_x]}{[B_0]} = k(t_x - t_0) \quad (1)$$

ここで, $[B]$ はメラノイジンの濃度(吸光度), t は加熱時間[min], k は反応速度定数[$1/\text{min}$]である。

本実験ではアミノ酸におけるアミノ基の影響を評価するために, 最も簡単なアミノ酸であるグリシン, 窒素“N”原子を2つ持つリシン, N原子を3つ持つアルギニン, N原子を4つ持つヒスチジンを用いた。ア

* Corresponding author. e-mail address: ymgtstr@***

*** =outlook.jp

Present address : 茨城県立日立第一高等学校

〒317-0063 茨城県日立市若葉町 3-15-1

ミノ酸のアルキル基の影響を評価するために、グリシン、メチル基を持つアラニン、*sec*-プロピル基を持つバリン、*iso*-ブチル基を持つロイシン、*sec*-ブチル基を持つイソロイシンを用いた。

Results and Discussion

I. メイラード反応の反応速度定数算出実験の確立

図1に、メイラード反応の素反応を示した。メイラード反応は求核付加反応であるシッフ塩基形成からはじまる複雑な複合反応である。しかし、参考文献6)に示されていたグルコース/グリシン系のメイラード

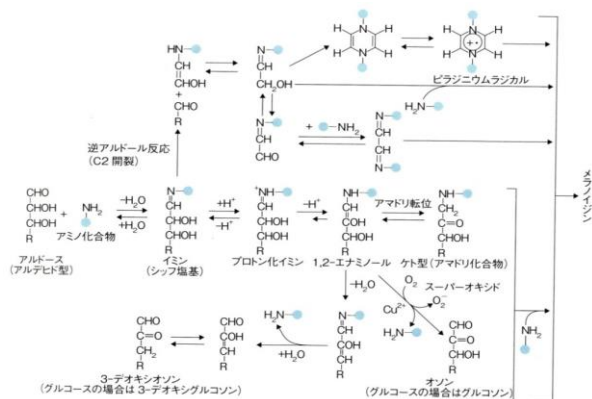


図1 グルコースとアミノ酸によるメラノイジン生成までの反応の略図

反応速度定数から、図のシッフ塩基形成過程からアムドリ転移を起こすまでの反応が律速段階であることが示唆された。そこで、アミノ酸より糖の量を過剰にすることで、メイラード反応は擬一次反応として扱うことができると考えた。本研究では、メイラード反応を擬一次反応と近似し、高校の実験室で可能な反応速度定数の算出方法を確立した。

図2に、実験で得られたグルコース/グリシン混合水溶液の吸光度の加熱時間変化を示した。図から、加熱

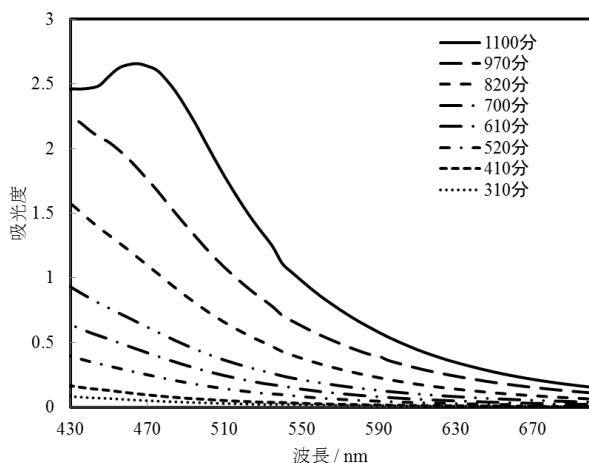


図2 グルコース/グリシン系における吸収スペクトルの加熱時間変化

とともに 470 nm 付近の長波長域の吸光度が増加することがわかった。

メイラード反応初期段階では短波長の光を吸収する低分子化合物が形成され、反応の後半でそれらが縮合・重合し長波長域の光を吸収する重合体や高分子化合物が生成すると考えられる。さらに、参考文献6)に示されていたメラノイジンの極大吸収波長は 470 nm であり、本実験で確認された吸収スペクトルのピークと一致したので、本実験でもメラノイジンの生成が確認できた。

図3にグルコース/グリシン系における加熱時間に対する吸光度変化を示した。図4は擬一次反応を仮定したときの $\ln([B_x]/[B_0])$ と $(t_x - t_0)$ の関係を表している。グルコース/グリシン系におけるメイラード反応の反応速度定数を算出したところ $1.32 \times 10^{-2} [\text{min}^{-1}]$ と、参考文献6)の値 $1.42 \times 10^{-2} [\text{min}^{-1}]$ と極めて近い値であった。

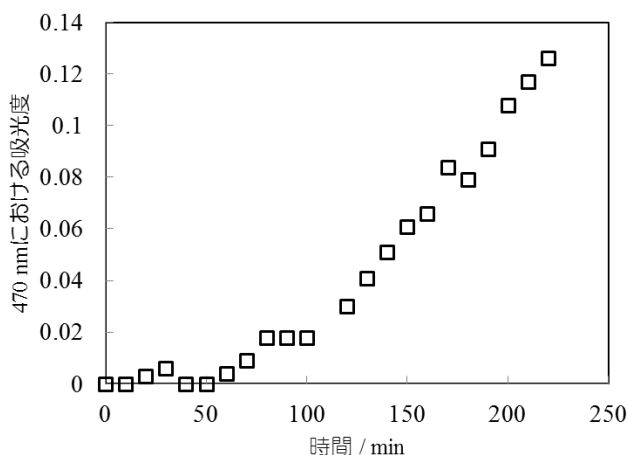


図3 グルコース/グリシン系における吸光度の加熱時間変化

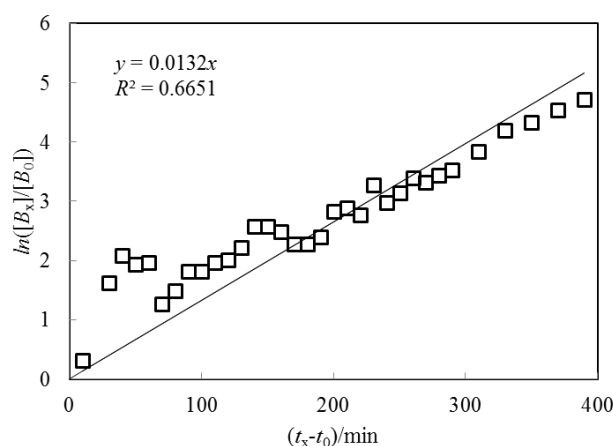


図4 グルコース/グリシン系における擬一次反応を仮定したときの $\ln([B_x]/[B_0])$ と $(t_x - t_0)$ の関係

II.メイラード反応におけるアミノ基の影響

窒素“N”原子を複数持つアミノ酸, N原子を1つ持つ“グリシン”, N原子を2つ持つ“リシン”, N原子を3つ持つ“ヒスチジン”, N原子を4つ持つ“アルギニン”, とグルコースとの反応速度定数を算出し, アミノ基がメイラード反応速度に与える影響について評価した。

図5に, グルコース/リシン, アルギニン, ヒスチジンおよびグリシンの系におけるメラノイジン生成の吸光度の時間変化を示した。

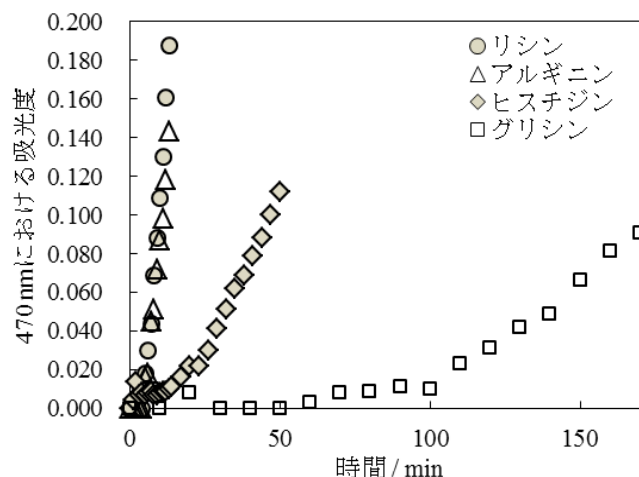


図5 グルコース/リシン, アルギニン, ヒスチジン, グリシン系における時間に対する吸光度変化

図5において, グルコース/リシンとアルギニンの系では, グラフの傾きが急であることから, 傾きがなだらかなヒスチジンとグリシンに比べ, 高いメイラード反応速度を示すことが示唆された。

図6に, 擬一次反応近似により得られた $\ln([B_x]/[B_0])$ と $(t_x - t_0)$ の関係を示した。

表1に, 図6の近似直線の傾きから求めた速度定数と決定係数 R^2 値を示した。その結果, リシン>アルギニン>ヒスチジン>グリシンの順となることがわかった。また表1に示したように, リシンとアルギニンのメイラード反応速度定数の値が $2.02 \times 10^{-1} [\text{min}^{-1}]$ と $1.97 \times 10^{-1} [\text{min}^{-1}]$ ほとんど変わらなかった。ヒスチジンの持つイミダゾール基 (2つの窒素を含む不飽和五員環) やアルギニンの持つグアニジノ基 ($\text{H}_2\text{N}-\text{C}=\text{NH}-\text{NH}_2$ で表される1価の基) は, 共役による安定化のためシッフ塩基形成過程に大きく影響を及ぼしにくいと考えられる。したがって, 反応速度定数はアミノ酸の窒素原子の数のみで決まらないことが示唆された。

アミノ酸は水溶液中において双性イオンで存在している。図7に(a)リシン, (b)アルギニン, (c)ヒスチジン, (d)グリシンの双性イオンの分子構造を示した。

図7より, 反応速度定数が大きかったリシンとアルギニンはその双性イオンの構造中の α 炭素のアミノ基はプロトン化されていないことがわかる。一方, 反応

速度定数が小さかったヒスチジン, グリシンの双性イオンはそのアミノ基がプロトン化されている。したがって, リシンやアルギニンのように, 炭素のアミノ基

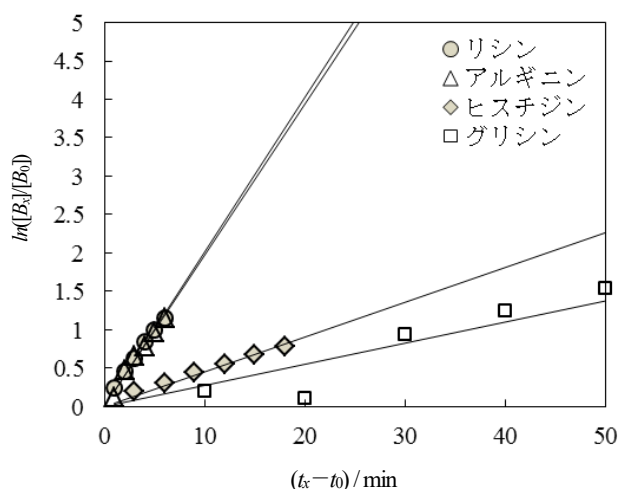


図6 グルコース/リシン, アルギニン, ヒスチジンおよびグリシン系における一次反応を仮定したときの $\ln([B_x]/[B_0])$ と $(t_x - t_0)$ の関係

表1 リシン, アルギニン, ヒスチジンおよびグリシンの反応速度定数 $[\text{min}^{-1}]$ と決定係数 R^2 値

アミノ酸	反応速度定数 / min^{-1}	R^2 値
リシン	2.02×10^{-1}	0.981
アルギニン	1.97×10^{-1}	0.975
ヒスチジン	4.54×10^{-2}	0.975
グリシン	2.75×10^{-2}	0.944

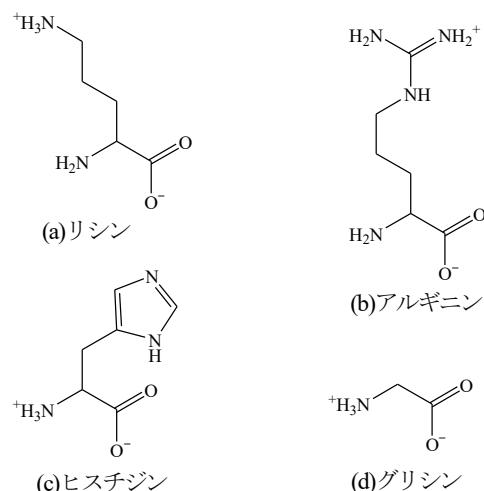


図7 (a)リシン, (b)アルギニン, (c)ヒスチジン, (d)グリシンの双性イオンの分子構造

がプロトン化されていないアミノ酸を用いたとき, メイラード反応は速くなると考えられる。メイラード反応において律速段階であると考えられるシッフ塩基形成過程では, 非共有電子対を持ち求核剤であるアミノ基の窒素原子が求核付加反応により, 糖のカルボニル

基に結合する。

図8はアミノ酸における(a)プロトン化されていないアミノ基と(b)プロトン化されているアミノ基を表している。

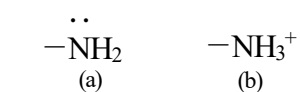


図8 (a)プロトン化されていないアミノ基と(b)プロトン化されているアミノ基

図8の(a)に示したように、アミノ基は求核剤として非共有電子対を持っている。これがプロトン化されることにより、図8(b)に示したように、非共有電子対は失われ、求核剤としての働きを失う。つまり、アミノ基がプロトン化されていると求核付加反応が起こりにくくシッフ塩基は生成されにくい。アミノ基がプロトン化されていないと反応が起こりやすくなりシッフ塩基が生成されやすい。したがって、プロトン化されていない α 炭素のアミノ基の存在が、メイラード反応に大きく関与していることが示唆された。

III.メイラード反応におけるアルキル基の影響

本研究で利用してきたアミノ酸は α -アミノ酸であり、その α 炭素にはアミノ基以外にアルキル基が存在する。そこで、アミノ基の窒素原子と同じように、アミノ酸の構造において大きな構成要素であるアルキル基がメイラード反応においてどのような影響を及ぼすのかを評価した。

本実験で使用したアミノ酸を図9に示した。実験ではアルキル基が反応に及ぼす影響を調べるために側鎖にアルキル基では無く水素原子を持つ(a)グリシン、側鎖にアルキル基であるメチル基を持つ(b)アラニン、

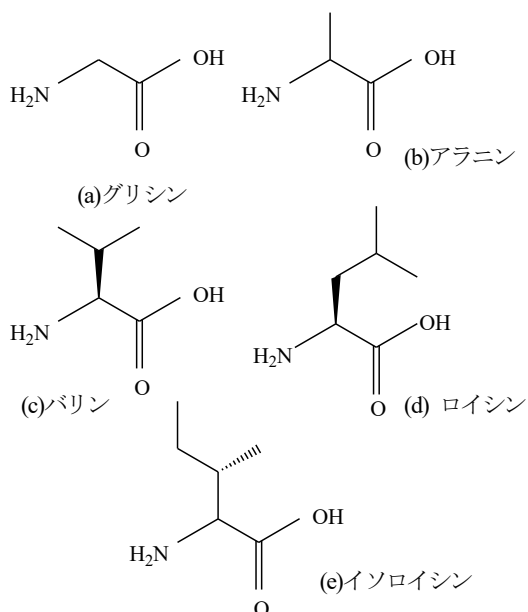


図9 (a)グリシン, (b)アラニン, (c)バリン, (d)ロイシン, (e)イソロイシンの分子構造

sec-プロピル基を持つ(c)バリン, *iso*-ブチル基を持つ(d)ロイシン, *sec*-ブチル基を持つ(e)イソロイシンを用いた。

図10に5つのアミノ酸において、測定した吸光度の時間変化を示した。図から、おおまかではあるが、アラニンの反応速度が遅いことがわかった。図11に、擬

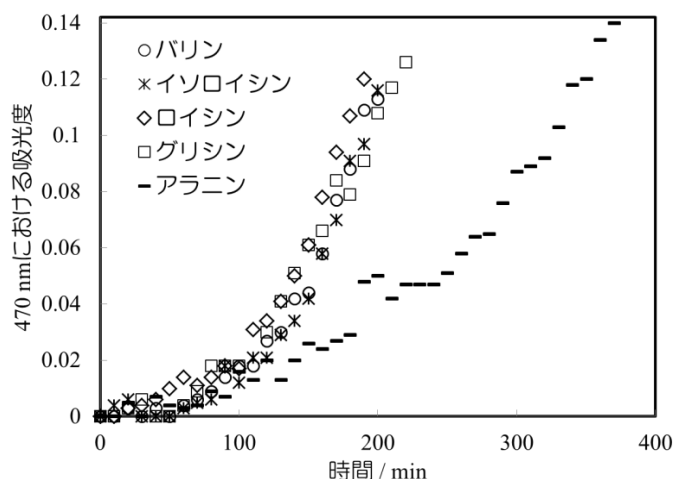


図10 470 nm における吸光度の反応時間変化

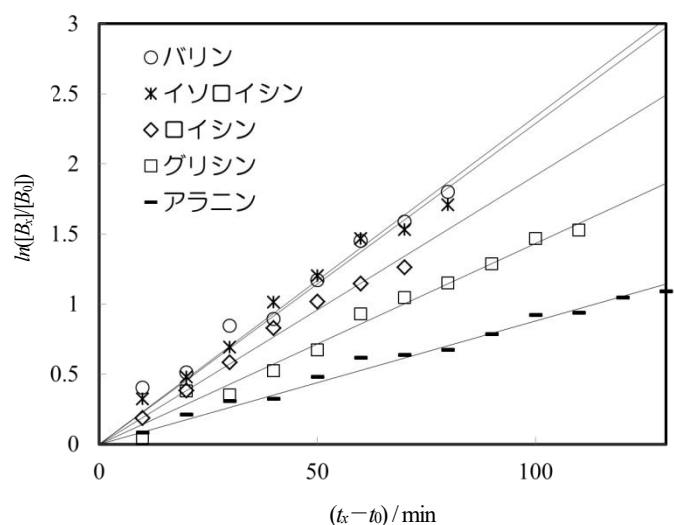


図11 グルコース/バリン, イソロイシン, ロイシン, グリシンおよびアラニン系における擬一次反応を仮定したときの $\ln([B_x]/[B_0])$ と $(t-t_0)$ の関係

表2 バリン, イソロイシン, ロイシン, グリシン, アラニンの反応速度定数 $[\text{min}^{-1}]$ と決定係数 R^2 値

アミノ酸	反応速度定数 / min^{-1}	R^2 値
バリン	0.0233	0.9642
イソロイシン	0.0229	0.9719
ロイシン	0.0192	0.9854
グリシン	0.0136	0.9074
アラニン	0.0088	0.9842

一次反応を仮定したときの $\ln([B_x]/[B_0])$ と $(t_x - t_0)$ の関係を示した。表 2 に図 11 から得られた各系の反応速度定数と決定係数 R^2 値を示した。その結果、反応速度定数は大きい順に、バリン > イソロイシン > ロイシン > グリシン > アラニンとなることがわかった。

III.1 アミノ基の窒素原子の電子密度

半経験的分子軌道法計算ソフト Winmostar⁸⁾を用いて、アミノ酸の持つ窒素原子の電子密度を計算した。図 12 に、メイラード反応速度定数と計算から得られた窒素原子の電子密度との関係を示した。グラフは大体

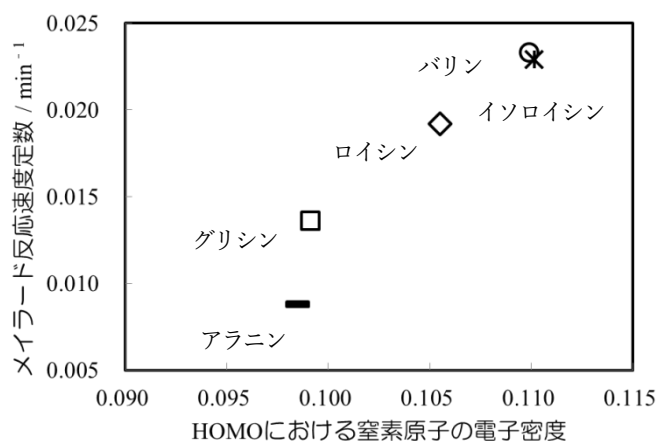


図 12 HOMO における窒素原子の電子密度とメイラード反応速度定数との関係

かに比例関係があり、電子密度が大きくなるほど求核剤としての働きが強くなり、反応速度定数も大きくなることが示唆された。しかし、グリシンとアラニンの値の間においてグリシンはアラニンよりも電子密度がわずかしき増加していないのに対し反応速度定数は急激に増加しており、比例直線に一致しない。したがって窒素原子の電子密度以外にも反応速度定数に影響を与えるものがあることが示唆された。

III.2 シッフ塩基形成におけるアルキル基の影響

分子内に存在する原子または原子団の反発力のために、結合の周りの自由回転や反応が妨げられたりすることを立体障害という。図 13 に、本研究で用いたアミノ酸の空間充填モデルを示した。シッフ塩基形成において、アミノ酸のアミノ基にある窒素原子が糖のアルデヒド基の炭素を攻撃する。その際に、アミノ基に近い位置にかさ高いアルキル基があった場合、立体障害のためにシッフ塩基形成が抑制されると考えられる。

III.3 シッフ塩基形成以降におけるアルキル基の影響

図 14 は、参考文献 9) から得られたメイラード反応の大まかな反応機構を示している。メイラード反応では、シッフ塩基が形成された後、アマドリ化合物が生

成される。それ以降は生成したカルボニル化合物とア

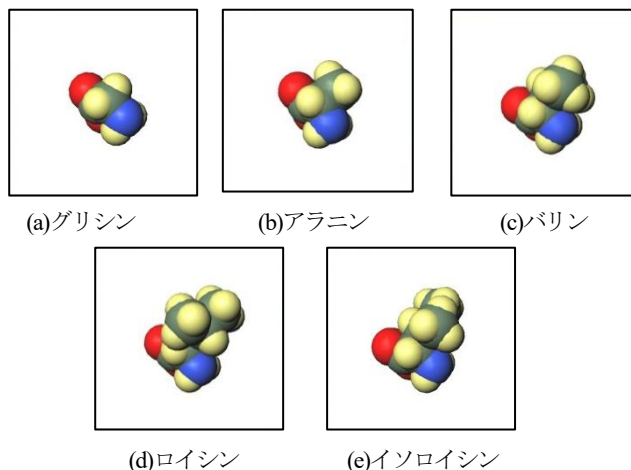


図 13 (a)グリシン, (b)アラニン, (c)バリン, (d)ロイシン, (e)イソロイシンの空間充填モデル

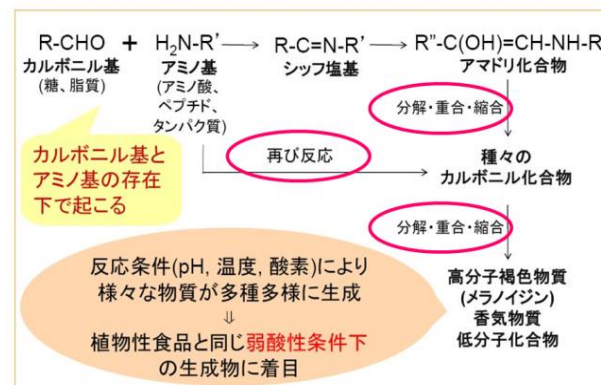


図 14 メイラード反応の大まかな反応機構

ミノ酸が再び反応したり、分解・重合・縮合などが繰り返り起こったりなど、多種多様な素反応により複雑な化合物が生成する。したがって、アルキル基を持たないグリシンは立体障害の影響も無くスムーズに再び反応できるので、メラノイジン形成に深く関与できると考えられる。そのため、グリシンのメイラード反応速度定数は大きくなったと考えた。さらに、大きなアルキル基を持つバリン、ロイシン、イソロイシンは、立体障害のためにシッフ塩基形成は抑制されるが、大きなアルキル基自体が重合・縮合反応に貢献し、メラノイジンを構成する材料としても使えるために、シッフ塩基形成以降のメラノイジン生成反応が進みやすくなる。その結果として、それらのメイラード反応速度定数は大きくなると考えた。

Conclusions

複合反応であるメイラード反応に対し、擬一次反応を仮定したメイラード反応速度定数の算出方法を確認することができた。さらに、メイラード反応において、アミノ酸の α 炭素上のプロトン化されていないアミノ

基の存在が反応速度に大きな影響を与えることが示唆された。

アミノ酸分子中のアルキル基は、 α 炭素上にあるアミノ基の窒素原子の電子密度に影響を及ぼすことがわかった。その結果として、アミノ基の求核剤としての働きが強まり、シッフ塩基形成過程が促進される。さらに、アルキル基は立体障害と材料性の面でもメイラード反応に深く関与していることがわかった。

References

- 1) 吉田 勉, “わかりやすい食品化学” 三共出版 (2008).
- 2) 豊田 正武, 田島 眞, “食物・栄養系のための基礎化学” 丸善出版 (2003).
- 3) 船板 子, “美容皮膚科におけるレーザー治療” *日本レーザー医学会誌* (2006), **4**, 309-314.
- 4) Thorpe S. R., Baynes J. W., “Role of the Maillard Reaction in Diabetes Mellitus and Diseases of Aging” *Drugs & Aging* (1996), **2**, 69-77.
- 5) Chuyen N. V., “Toxicity of the AGEs generated from the Maillard reaction: On the relationship of food-AGEs and biological-AGEs” *Mol. Nutr. Food Res.* (2006), **50**, 1140-1149.
- 6) Martins S. I. F. S., Van Boekel M. A. J. S., “Kinetics of the glucose / glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations” *Food Chem.* (2005), **92**, 437-448.
- 7) 山口 悟, “茨城県立水戸第一高等学校 メイラード反応における窒素原子の影響” *化学と教育* (2015), **63**, 396-397.
- 8) Winmostar, winmostar.com (2017 年 12 月現在)
- 9) お茶の水女子大学,
www.hles.ocha.ac.jp/food/chozo/yellowpigments.pdf (2017 年 12 月現在)

Acknowledgement

本研究を行うにあたり、財団法人 げんでん ふれあい茨城財団 第17回【平成26年度】げんでん科学技術振興事業よりご支援を頂きました。心より感謝申し上げます。