醤油の低分子黄色色素 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-チオフェノンについて

醤油の色は主にメイラード反応で形成されるメラノイジンであるが、メラノイジンは高分子の不均一なポリマーであるためその化学構造は解明しにくい。そこで、著者は醤油から低分子色素の単離を試み、色素の寄与率は低いものの、グルコースとシステインから形成され、香ばしい香りを呈する 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-チオフェンを黄色物質として同定し、本物質は各種醤油や味噌中に存在しており、醤油の発酵熟成中に徐々に形成され、ビール、パンのクラスト、炒めたタマネギやニンニクなどの加熱食品中にも存在することを明らかにしたので、解説いただいた。

村 田 容 常

1 はじめに

醤油は、大豆、小麦を加熱処理した後、麹菌を増殖させ、その後、食塩水中で発酵、熟成させた調味料である。大豆や小麦中の高分子成分であるデンプンやタンパク質が、発酵中に麹菌の酵素により低分子化し、アミノ酸、ペプチドや糖類などが生じる。醤油は、食塩、グルタミン酸を主体とするアミノ酸やペプチドなどに富む、貯蔵性の高い伝統的調味料である。

醤油は、独特の赤褐色の色調を持っており、醤油の品質を特徴づけている。醤油の色は、原料の大豆や小麦の色由来ではなく、原料の加熱や発酵・熟成、火入れなどの過程でメイラード反応により形成される。醤油の色については、90 年ほど前から研究されていて、主な研究は日本人の研究者によりなされている。初めて醤油の色素を科学的に研究したのは黒野と勝目(1927)で、醤油より沈殿法を用い、アルカリに溶解する色素としてソヤメラニン酸とソヤメラニンを報告している¹⁾。これらの色素の組成式を $C_{27}H_{17}N_3O_{13}$ 、 $C_{27}H_{15}N_3O_{12}$ としており、醤油色素は含窒素化合物であり、チロシンから形成されるメラニン類似の色素で

あると考察している。現在、アミノ酸と糖からメイラード反応により形成される不定形の高分子褐色色素をメラノイジンと呼ぶ。醤油は製造過程でアミノ酸と糖が高濃度に生じるため、加熱工程や発酵・熟成過程、火入れ時などにアミノ酸と糖がメイラード反応(アミノカルボニル反応とも言う)をおこしメラノイジンが形成されるので、ソヤメラニン酸とソヤメラニンはメラノイジンの一種であると考えられる。メイラード反応と醤油の色との関係では、加藤ら(1961)が醤油中に 3-デオキシグルコソン(第1図)を見出し、またその 3-デオキシグルコソンがメイラード反応の重要な中間体であることを証明したため、醤油の色がメイラード反応により生成することが明らかとなった^{2,3)}。橋場は、醤油色素をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、醤油色素が Sephadex G-25 により 3 つに大別できること、それらの画分が醸造過程に伴い増加すること、最も高分子の画分がソヤメラニンに類似していること、火入れにより最も低分子の画分が増加すること、また、醤油は酸化すると色調が濃くなるが、それに伴い最も高分子側の画分が増加することなどを示した⁴⁾。近年、様々なメイラード反応生成物が生体中の

2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-thiophenone as a Low Molecular Weight Yellow Pigment in Soy Sauce
Masatsune MURATA (Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University)

メイラード反応の研究から同定されているが、それらの化合物の中には、醤油やその加水分解物中に確認されたものがある。早瀬ら（2002）は、醤油中にピラリンを、醤油の酸加水分解物中にペントシジンとリジル-ピロピリジン（第1図）を見出している⁵⁾。これらの低分子化合物は色素ではないが、それらの存在はメイラード反応が醤油の製造工程中に起こっていることを示すものである。このように醤油の色素すなわち色は主にメイラード反応によって形成されるメラノイジンであると考えられる。メラノイジンは、可視領域に吸収を示すが、特定の極大吸収を示さない高分子色素であり、

アミノ酸に由来する窒素を含む酸性物質で、エンジオール構造を分子内に含み還元性を示す。化学構造については、特定のユニット構造が存在しない、ヘテロ高分子であるため不定である。

一方、低分子の色素としては、木原らのグループによりβ-カルボリン誘導体であるフラジン（第1図）やその関連化合物が報告されているが^{6,7)}、それ以外は見当たらない。ここでは醤油色素のクロマトグラフィックな挙動を概観した後、我々が同定した黄色色素2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3-(2*H*)-チオフェノン（第2図、S1）について概説する⁸⁾。

第1図 色素や関連化合物の化学構造

第2図 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3-(2*H*)-チオフェノン(S1)の構造

2 醤油色素の分析⁸⁾

醤油色素をSephadex G-25で分画し、400 nmで分けると3つの画分に分かれる(第3図-A)。可視光の波長である400 nmに吸収があれば色があること分かる。400 nmに極大吸収があれば黄色色素ということになるが、いずれのフラクションも可視領域に極大吸収はなく、500 nmにかけて徐々に吸収が減少するメラノイジン様のスペクトルを示す。280 nmの値とNaCl濃度も同時に示してある。各画分を順次希釈していき、どこまで色が検知できるかを測り、そこから色素強度(ユニット)⁹⁾を求めプロットしたのが、第3図-Bである。色素強度は官能評価による色の強さを示すものであるが、400 nmの吸光度をプロットしたものとよく類似していて、官能評価で色調の強さを評価しても、400 nmの吸光度で見てもあまり変わらないことが分かる。それぞれの色に対する寄与率は、P1が58%、P2が23%、P3が17%であり、一番高分子側のP1が主要な色素画分であった。マーカーと比較するとP1の溶出領域は分子量5000程度に相当した。低分子領域のP3は、食塩より遅く溶出され、低分子であるかもしくは樹脂との相互作用のために遅く溶出される化合物群であると考えられる。

確定したユニット構造を持たないヘテロ高分子色素であるメラノイジンは、原理的に化学的な解析が困難

なため、近年あまり研究されていない。分子構造の中に疎水的に部分構造を有する低分子化合物は、ODS樹脂に吸着され、分析が可能となる。そこで醤油を、DAD検出器を装着したODS-HPLCで分析してみた。DAD検出器では、紫外可視吸収スペクトルが測れるため、極大吸収を示す化合物の存在が分かる。しかし、可視部付近に極大吸収を示すピークは検出できなかった。次に、ODS樹脂への醤油色素の吸着性を調べた。色素量は官能評価による色素強度で表した。その結果、第4図に示すように、70%の醤油色素はODSに吸着せず、20-30%の色素がODSに吸着しメタノールで溶出された。ODS非吸着画分と吸着画分をODS-HPLCで分析したが、醤油同様、極大吸収を示すピークは検出されなかった。これらの結果は、醤油の色素の大部分は、水溶性高分子であるメラノイジンであることを支持するものであった。

3 醤油中の低分子色素⁸⁾

このように醤油の色素は主にメラノイジンであることが確認できたが、ヘテロ高分子色素であるメラノイジンは原理的に化学的な解析が困難である。しかし、長年構造不明であった、キシロースとグリシン系のメイラード反応溶液中の青色色素(Blue-M1)の構造が早瀬らにより明らかになったこと¹⁰⁾、近年当研究室でフルフラールやキシロースを含む弱酸性系における

第3図 醤油の Sephadex G-25 クロマトグラム

濃口醤油(1.0 ml)を Sephadex G-25(i.d. 2.4×41 cm)にかけ(流速 1.0 ml/min; 分画用量 2.75 ml), 280nm と 400 nm でモニターした(A)。分子量マーカー: A, タンニン酸(M.W. 1701); B, シアノコバラミン(M.W. 1355); C, リボフラビン(M.W. 376)。色強度(ユニット)は官能評価で検知閾値から求めた(B)。

第4図 醤油色素の ODS カラムによる分画
濃口醤油を ODS カラムに供し、非吸着画分と吸着画分に分け、色強度と吸光度(400 nm)を測定(A)し、またそれぞれを ODS-HPLC 分析(B)した。

メイラード反応のモデル系からフルピペート類^{11,12)}やジリジルジピロロン類^{13,14)}などいくつかの新規な低分子メイラード色素(第1図)が見出されたことなどを考え、醤油の低分子色素をさらに調べてみることにした。醤油を直接 HPLC 分析した場合は、色素ピークは検出されなかったが、微量の色素成分がメラノイジンにより妨害されるもしくは隠れて検出されない可能性を考えた。そこで、醤油色素を酢酸エチルで抽出し、メラノイジンと分離することで分析できるかどうかを調べた。まず酢酸エチル抽出して残った画分を Sephadex G-25 クロマトグラフィーで調べてみた。その結果、P1 及び P2 画分は酢酸エチルで全く抽出されず。P3 画分のみ一部減少することが分かった。そこで酢酸エチル抽出画分を ODS-HPLC で分析した。その結果、第5図に示したように、400 nm でモニターしたクロマトグラム上いくつかのピークが検出された。そしてその中の主要なピークである 17 分付近のピーク(S1)が 365 nm 付近に明瞭な極大吸収を示し、380 nm 以上の可視領域にも吸収を示した。よって S1 は低分子の黄色色素であると考えられるため、本ピークを単離同定することとした。

30 l の醸造醤油を酢酸エチルで抽出後、減圧下濃縮

第5図 醤油の酢酸エチル抽出画分の DAD-HPLC パターン
HPLC 条件；カラム, TSKgel ODS-100V；溶離液, 水/MeOH(98:2)から水/MeOH(30:70)へ直線勾配(30分)

し、粗ペースト約 39g を得た。このものを ODS のオープンカラムクロマトグラフィーに供した。カラムを水、水：メタノール（85:15, 40:60, 60:40）、メタノールで順次展開後、溶出した画分を HPLC 分析し、S1 を含む画分を集めた。S1 は水溶出画分で認められたので、それらを集めた後、S1 を酢酸エチルで抽出し濃縮した。このものを分取 HPLC（カラム、YMC-pack R&D ODS (i.d. 20×250 mm, YMC)；溶出液、水/MeOH = 60:40；流速、9.9 ml/min；検出、370 nm）で精製した。S1 を含む 12 分付近のピークを分取後、2 回目の分取 HPLC（カラム、COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (i.d. 20×250 mm, ナカライ)；溶出液 0.5% AcOH/MeOH = 60:40；流速、9.9 ml/min；検出、370 nm）にかけた。S1 を含む約 15 分のピークを集め、さらに 3 回目の分取 HPLC（カラム、COSMOSIL 5C₁₈-PAQ (i.d. 20×250 mm, ナカライ)；溶出液、0.5% AcOH/MeOH = 60:40；流速、9.9 ml/min；検出 detection, 370 nm）にかけた。S1 を含む約 14 分付近のピークを集め、酢酸エチルで抽出後濃縮し、メタノールに溶解した。このものを濃縮結晶化させ、黄色の板状晶（約 40 mg）を得た。

本物質は結晶化したため、X-結晶解析により構造を解析した。分子式は C₆H₈O₃S であり、構造を 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2*H*)-チオフェノン（第 2 図）と同定した。NMR データ (¹H-NMR δ (ppm) : 1.68 (s, 3H), 2.19 (s, 3H) および ¹³C-HMR δ (ppm) : 14.0 (CH₃), 25.5 (CH₃), 83.9 (C), 136.7 (C), 147.8 (C), 196.9 (C)) 及び MS データ (EI-MS (*m/z*) : 160 (M⁺)) は本構造を支持するものであった。例えば、¹H-NMR は二つのシングレットメチル基 (δ_H 1.68 及び 2.19 ppm) を示しており、¹³C-NMR は、一つのカルボニル基 (δ_C 196.9 ppm)、二つのオレフィニック炭素 (δ_C 136.7 及び 147.8 ppm)、一つの O に隣接したアリファティック炭素 c (δ_C 83.9 ppm) を示していた。

4 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2*H*)-チオフェノン (S1) の性質と分布

本物質の紫外可視吸収スペクトルを第 6 図に示す。水や酸性溶液中では 360 nm に極大吸収を示し、アルカリ性の水溶液中では 390 nm に極大吸収を示した。弱酸性溶液の目視での検知閾値は、25 µg/ml であっ

第 6 図 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2*H*)-チオフェノン (S1) の紫外可視吸収スペクトル

S1 は 10 µg/ml の濃度で、水、0.01 M HCl, 0.01 M NaOH に溶解させた。

た。醤油中の存在量は、約 6 µg/ml だったことから醤油自体の色調にはほとんど影響しない。

本物質は、システインとフラノンもしくはグルコースからメイラード反応により形成されるよりフレーバ化合物として報告されているが^{15,16)}、黄色色素として報告されたのは初めてである。フレーバー成分が色素成分でもあり、食嗜好の観点から興味深い。想定反応経路を第 7 図に示した。本化合物は、醤油の製造中にシステインおよび他のアミン酸とグルコースからメイラード反応により形成される。システインから生成した硫化水素がグルコースなどの 6 単糖由来のメイラード反応中間体と反応、環化し、形成されると考えられる。近年、韓国のグループが本物質をニンニク中の抗酸化作用や高炎症作用を示す機能性成分として報告している^{17,18)}。

市販の醤油や味噌を分析した結果、S1 は各種醤油 (1.6 ~ 18.1 mg/l, 第 8 図) や味噌 (0.9 ~ 7.6 mg/kg) 中に幅広く存在していることが分かった¹⁹⁾。また、研究室で醤油を試醸してその生成を見たところ、本物質は諸味の発酵・熟成中に徐々に形成された (第 9 図)。さらに様々な食品や飲料中の S1 を調べたところ、S1 は非加熱食品には検出されず、ビール (0.3~0.8 mg/l) や炒めたタマネギやニンニク、パンのクラストなどに存在した。以上の結果から、本物質は醤油や味噌ばかりでなく様々な食品に含まれ、高温加熱や長期の

第7図 システイン存在下のメイラード反応による、グルコースや2,5-ジメチル-4-ヒドロキシ-3(2H)-フラノン(DMHF)からの2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-チオフェノン(S1)の予想生成経路
1-DG, 1-デオキシグルコソン；3-DG, 3-デオキシグルコソン

第8図 各種醤油における2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-チオフェノン(S1)濃度

第9図 醤油試験醸造の発酵経過と 2,4-ジヒドロキシ-2,5-ジメチル-3(2H)-チオフェノン(S1)の生成

熟成中にメイラード反応により形成されると考えられた。

〈お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科〉

参考文献

- 1) 黒野勘六, 勝目 英: 農化, **3**, 594-613 (1927)
- 2) 加藤博通, 山田靖宙, 井坂健一, 桜井芳人: 農化誌, **35**, 412-415 (1961)
- 3) H. Kato: *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **24**, 1-12 (1960)
- 4) 橋場弘長: 農化, **45**, 29-35 (1971)
- 5) F. Hayase, Y. Takahashi, S. Sasaki, S. Shizuuchi, and H. Watanabe: *International Congress Series*, **1245**, 217-221 (2002)
- 6) 木原 清, 醬研, **11**, 53-59 (1985)
- 7) S. Nakatsuka, B. Feng, T. Goto, and K. Kihara: *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3399-3402 (1986)
- 8) M. Satoh, Y. Nomi, S. Yamada, M. Takenaka, H. Ono, and M. Murata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1240-1244 (2011)
- 9) T. Hofmann: *Carbohydr. Res.*, **313**, 203-213 (1998)
- 10) F. Hayase, Y. Takahashi, S. Tominaga, M. Miura, T. Gomyo, and H. Kato: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1512 - 1514 (1999)
- 11) M. Murata, H. Totsuka, and H. Ono: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1717-1723 (2007)
- 12) H. Totsuka, K. Tokuzen, H. Ono, and M. Murata: *Food Sci. Technol. Res.*, **15**, 45-50 (2009)
- 13) J. Sakamoto, M. Takenaka, H. Ono, and M. Murata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2065-2069 (2009)
- 14) Y. Nomi, J. Sakamoto, M. Takenaka, H. Ono, and M. Murata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 221-226 (2011)
- 15) C.-K. Shu, M. L. Hagedorn, B. D. Mookherjee, and C.-T. Ho: *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 638-641 (1985)
- 16) R. Tressel, E. Kersten, C. Nittka, and D. Rewicki: *ACS Symposium series*, **564**, 2638-2644 (1994)
- 17) I. G. Hwang, K. S. Woo, D. J. Kim, J. T. Hong, B. Y. Hwang, and Y. R. Lee: *Food Sci. Biotechnol.*, **16**, 963-966 (2007)
- 18) J. O. Ban, J. H. Oh, T. M. Kim, D. J. Kim, H.-S. Jeong, S. B. Han, and J. T. Hong: *Arthritis Res. Therapy*, **11**, R145 (2009)
- 19) 古澤梨奈, 後藤千明, 佐藤美紀, 村田容常: 第59回日本食品科学工学会講演要旨, 2Ha4, 札幌 (2012)