メラノイジンに関する化学的研究 (第2報)

メラノイジンのゲル濾過画分の性質について

加藤博通, 五明紀春*, 宇高 潔, 藤巻正生

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 46 年 5 月 22 日 受 理

Chemical Studies on Melanoidins

Part II. Some Properties of Melanoidins Fractionated through Gel Filtration

By Hiromichi KATO, Toshiharu GOMYO,* Kiyoshi UDAKA and Masao FUJIMAKI

Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, Tokyo

The melanoidin prepared by the browning reaction between D-xylose and glycine or *n*-butylamine was fractionated by gel-permeation chromatography with Sephadex G-25, G-75, G-100, or LH-20, and the resulted fractions were investigated in relation to elution volume (*i. e.* molecular size or degree of polymerization).

Permanganate consumption per weight was almost constant without regard to molecular size. $E_{300m\mu}$ per weight was also roughly constant but color intensity ($E_{470m\mu}$) per weight increased with degree of polymerization; the ratio of the increase was larger at longer wave length. Reductone content also increased with degree of polymerization. Both color intensity and reductone content, however, seem to approach to a constant value, respectively, in the region of larger molecular size. Nitrogen content was almost constant but C/N ratio increased with the increase of molecular size.

Association-dissociation of melanoidin molecules was examined by gel filtration in 8 M urea and in buffer solution at pH 10.4 but the phenomenon was not observed.

(Received May 22, 1971)

* Present address: Kagawa Nutrition College, Tokyo

著者らは従来より、アミノカルボニル反応における中間生成物の分離、同定、反応機構の検討などを行ない⁽¹⁻⁴⁾、それらの結果に基づいてメラノイジンの生成機構を推定したが、しかし、このような視点からのメラノイジン化学の解明には、一定の限界があるといわねばならないであろう。そこで著者らは、メラノイジンそのものの、とくに非透析性メラノイジンを取り扱った研究を企画し、なんらかのアプローチを得ようとしている。前報⁽⁵⁾においては、各種のモデル反応系から非透析性メラノイジンを調製し、インドフェノール比色法によりメラノイジン分子中のレダクトン含量を測定し、レダクトン構造が該分子中に存在することを示した。

モデル系から調製されたメラノイジンの化学構造に関

* 現在、女子栄養大学。

しては、Maillard⁽⁶⁾、Enders および Theis⁽⁷⁾ の報告以来、多くの研究⁽⁸⁾があるが、元素組成と官能基、その他の一般的性質の記述の程度に止まっている。この場合、調製条件の相違により、得られる色素の組成や性質は異なってくる。一方、褐変した乾燥果実⁽⁹⁾およびカエデ糖シラップ⁽¹⁰⁾から褐色色素を分離した例もあり、わが国では醤油の色素について研究が行なわれてきた⁽¹¹⁻¹³⁾。とくに Binkley⁽¹⁴⁾ は、糖蜜から褐色色素を分離し、接触還元その他の手段を適用して該色素の構造を解明しようとしているが、このような天然物から分離された色素には、多糖類のような非色素成分が結合していることが多く、構造解明の障害となっている。したがって、メラノイジンの基本構造の解明には、試料としてモデル系から調製したものをを用いる方が有利であると思われる。

本報告においては、重合生成物の分画に有効なゲル濾過法によりメラノイジンを分画し、得られた画分の二、三の性質を、とくに重合度との関連において検討した結果を述べる。メラノイジン試料の調製には、糖としてD-キシロース、アミノ化合物としてはグリシンおよびn-ブチルアミンを用いた。ブチルアミンを用いた理由は、アミノ酸に比較して反応性強く、100°C 以下の温度条件で多量のメラノイジンを生成するので、副反応が起こりにくい、ストレッカー分解を起こさないなどのために、生成するメラノイジンの構造が、より単純であることが期待されるからである。また、水に難溶であるがアルコール類に可溶性のメラノイジンが得られる点にも特徴がある。

実験方法

1. メラノイジン試料

1) キシロース-グリシン系メラノイジン: D-キシロース 2M, グリシン 2M, NaHCO_3 0.05 M の混合水溶液 (pH 6.5) を 100°C に 10 時間加熱し、褐変反応液を得た。これをセロファンチューブ (Visking Co.) に入れ、流水中で 48 時間、蒸留水中で 24 時間、さらに脱イオン水中で 24 時間透析した。内液を 40°C で減圧濃縮したのち、凍結乾燥した。キシロース 30g より非透析性メラノイジン 13.9g が得られた。

2) キシロース-ブチルアミン系メラノイジン: D-キシロース 30g, n-ブチルアミン 20ml, メタノール 20 ml の混合物を攪拌しつつ、65°C に 30 分間加熱する。この間にキシロースは、窒素配糖体を形成して溶解する。流水で冷却したのち、ブチルアミンに対して等モルの酢酸 (12ml) を加えると、急激に褐変が起こる。この混合液を 65°C に 70 分間加熱して、褐変反応液を得た。これにブタノール 300ml を加え、分液ロートに移して同量の水と振とうする。ブタノール層を水で洗浄することを 10 回以上繰り返す。この間、適宜ブタノールを補充し、乳化した場合は NaCl を加える。この操作により水溶性物質はほぼ完全に除去され、メラノイジンの主要部分はブタノール層に残る。ブタノール層を減圧濃縮し、酢酸エチルを加えて沈殿させた。沈殿を真空乾燥し、酢酸エチルで洗浄すると粉末化した。収量 4.8g。

2. ゲル濾過 水溶性のグリシン系メラノイジンに対しては、セファデックス G-25 (Fine), G-75, G-100 を用い、水に難溶性のブチルアミン系メラノイジンに対

しては、セファデックス LH-20 を用いてエタノール中でゲル濾過を行なった。条件は、各図に記したとおりである。

3. レダクトンの定量 メラノイジン画分中のレダクトン含量の測定は、前報⁽⁹⁾に従って、インドフェノールブタノール比色法⁽¹⁵⁾により行ない、アスコルビン酸当量として表わした。

4. 過マンガン酸カリ消費量の測定 飲料水検査に用いる公定法に従い、酸性法で行なった⁽¹⁶⁾。

実験結果および考察

1. メラノイジン分子の会合についての検討

メラノイジンは共有結合による重合高分子物質であると考えられるが、たとえば長時間透析を行なっても、透析膜外に出る成分が容易に変わらないというような現象がみられ、その原因の一つとして分子の会合の可能性が考えられるであろう。そこで、分子の会合について検討しておく必要があると思われた。

Fig. 1. Gel Filtration Pattern of Nondialyzable Xylose-Glycine Melanoidin with Sephadex G-25 in Water, 8M Urea, or Buffer Solution at pH 10.4.

●—● in water, ○—○ in 8M urea, ×—× in $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ (0.05 M each, pH 10.4).

Column: Sephadex G-25, 1.1×142 cm; sample: dialyzed xylose-glycine melanoidin, 20 mg, dissolved in aqueous NaHCO_3 (2ml).

Fig. 2. Gel Filtration Pattern of Nondialyzable Xylose-Glycine Melanoidin with Sephadex G-75 in Water or 8M Urea.

—●— in water, —○— in 8M urea.

Conditions for gel filtration were similar as in Fig. 1.

非透析性キシロース-グリシン系メラノイジンを水中および 8M 尿素中でゲル濾過を行ない、パターンを比較した。Fig. 1 に、セファデックス G-25 のカラムによるパターンを示した。非透析性区分であるために、ほとんど V_0 で溶出するが、8M 尿素中でのパターンも全く同様で、分子が解離している徴候は認められない。8M 尿素中で V_0 が小さくなっているが、これはゲルに対する尿素有の吸着によるものと考えられる。Fig. 2 は G-75 のカラムによるパターンであるが、この場合、水中 V_0 で溶出しない比較的低分子の区分も 8M 尿素中では、ゲルの網目が尿素有の吸着により小さくなるために、 V_0 に近い位置で溶出するようになり、ピークの高さが高くなっている。以上のことから、尿素中で解離する可能性は考えにくく、したがってメラノイジン分子はほとんど会合していないと考えられる。

なお、メラノイジンはエノール性の酸性物質であり、アルカリ性では一部のエノールがイオン化すると考えられる。そこで、イオン化が会合-解離に影響をおよぼす可能性をも考慮して、pH 10.4 の緩衝液中でのゲル濾過を試みた。結果は Fig. 1 に示されるとおり、パターンは水中とほとんど同様であり、会合-解離の現象は認められなかった。この場合、わずかにテーリングがみられたが、これはアルカリ性下での分解によるものと考えられる。

2. キシロース-グリシン系メラノイジンの分画とその画分の性質

透析前のキシロース-グリシン系の褐変反応液を直接セファデックス G-25 のカラムにかけ、Fig. 3 に示されるように、7つの画分に分画し、各画分の着色度 (E_{470})、

過マンガン酸カリ消費量、乾物重量、元素分析値、レダクトン含量を測定した (Fig. 4, 5)。また、非透析性メラノイジンを G-100 のカラムにかけ、各画分の紫外部および可視部吸光度を測定した (Fig. 6)。以上の各測定値と、ゲル濾過の溶出位置 (分子量または重合度) との関係について検討した。

1) 過マンガン酸カリ消費量、重量および着色度 : Fig. 4 にみられるように、各画分の乾物重量と過マンガン酸カリ消費量とは、ほぼ平行していることがわかる。これは重合度が高くな

っても、過マンガン酸カリによってよく酸化分解されることを示すものと考えられる。過マンガン酸カリ消費量

Fig. 3. Gel Filtration of Browning Reaction Solution between D-Xylose and Glycine.

Sample : 5ml of browning reaction solution (glycine 2M, xylose 2M, NaHCO_3 0.05 M, heated at 100°C for 10hr); gel filtration : Sephadex G-25, 2.4×65 cm, in water, 20ml/hr.

Fig. 4. Characterization of Each Fraction Obtained in Fig. 3.

Fig. 5. Elemental Composition of Each Fraction Obtained in Fig. 3.

* Starting material (glycine+xylose, 1:1).

当りの着色度 (E_{470}) は, 重合度が大になるにつれて大きくなっている。したがって, 重量当りの着色度も, 分子量大なるほど大きくなる。通常, メラノイジンのゲル濾過パターンは着色度により表わされるが, これは物質量を示すパターンとは異なることに, 注意する必要があると思われる。

2) レダクトン含量: Fig. 4 に明らかなように, 重量当りのレダクトン量は, 分子量が大きくなるにつれて増加するが, 次第に一定値に近づく傾向がみられる。なお, 分子量が大きくなると, レダクトンの測定条件で試料が不溶性のため測定できなかった。

3) 元素組成と C/N 比: Fig. 5 に示されるように, C, H, N% はほぼ一定であるが, C/N 比を計算すると, 重合度の高い領域において, 重合度大なるほど, わずかながら C/N 比が上昇している傾向が認められる。

4) 紫外部および可視部吸光度比率: 非透析性メラノイジンについて, G-100 のカラムにより分画された各画分の吸光度比率 E_{800}/E_{470} , E_{470}/E_{600} を求めた結果は, Fig. 6 にみられるように, 低分子領域では分子量が小さいほど比率が大となる傾向を示し, 高分子領域では分子量が大きくなるほど, わずかながら小さくなるが, ほぼ一定となる傾向がみられる。

3. キシロース-ブチルアミン系メラノイジンの分画とその画分の性質

キシロース-ブチルアミン系の褐変反応液から, ブタノール抽出によって得られたメラノイジンは透析していないので, 低分子区分も含ん

でいる。これをセファデックス LH-20 のカラムで分画し, 各画分の乾燥重量, 紫外部および可視部の吸光度 (Fig. 7), レダクトン含量 (Fig. 8) を測定した。また, 各画分の元素分析も行なったが, 爆発性が著しいために信頼できるデータが得られなかった。そこで透析を行ない, 透析時間の順に透析膜外に出る画分をとり, 元素組成を測定した (Table II)。この場合は, 爆発による損失はわずかであった。以上の各測定値とゲル濾過の溶出位置 (分子量または重合度) との関係について検討した。

Fig. 6. Gel Filtration of Nondialyzable Xylose-Glycine Melanoidin with Sephadex G-100 and Characterization of Each Fraction.

Sample: dialyzed xylose-glycine melanoidin, 0.5g, dissolved in aqueous NaHCO_3 (15ml); gel filtration: Sephadex G-100, 3.0×100 cm, in water, 23ml/hr.

Fig. 7. Gel Filtration of Xylose-Butylamine Melanoidin and Characterization of Each Fraction.

Sample: xylose-*n*-butylamine melanoidin, 0.5g, dissolved in ethanol (8ml); gel filtration: Sephadex LH-20, 3.0×100 cm, in ethanol; fraction: 10ml.

Table I. Color and Lambda Maximum of Melanoidin Fraction Obtained in Fig. 7

Fraction number	Color of dried powder	$\lambda_{\max}$ *
25	Brownish black	330(b)
31	"	330(b)
37	"	310(b, s)
46	Brown	295(b)
52	Pale brown	295
58	"	285
65	"	285

* Ethanol solution; b: broad, s: shoulder.

1) 重量, 着色度, 紫外部吸光度および吸光度比率: Fig. 7 の結果から明らかなように, 各画分の重量当りの着色度 (E_{470}) は分子量が大きくなるほど大きくなっている. この結果は, 前述のグリシン系メラノイジンについて得られた結果 (Fig. 4) と同様である. 一方, 紫外部吸光度 (E_{285}) は, E_{470} に比較すると重量とはほぼ平行する傾向が認められる. また, 吸光度比率, E_{285}/E_{470} , E_{470}/E_{600} は, ともに分子量が大きくなるにつれて小さくなっている. 以上の結果から考察すると, 重合度が增大するにつれて, 重量当りの紫外部吸光度はほぼ一定であるが, 着色度は増加し, しかもその増加は長波長 (低振動数) にいくほど大きくなる. 言い換えると, 吸収曲線の勾配が小さくなり, 色調が黒ずんでくると考えられる.

Fig. 7 で得られた画分のいくつかをとり, 蒸発乾固したときの残渣の色調をみると, Table I に示したように, 溶出位置が後から前にいくにつれて (分子量が大きくなるにつれて) 淡褐色から褐色, さらに黒褐色へと濃色化していく. これらの各画分の $\lambda_{\max}$ は, いずれもブロードなものであるが, 285 m μ から 330 m μ 前後まで次第に長波長側に移行していくことが観察された.

以上のことから, メラノイジンの重合が進むにつれて, わずかながら深色移動が起こり, 同時になんらかの共厄系が伸びていき, 低振動数の吸収が増加していくことが示された. この場合, 通常の深色移動と異なり, 高振動数の吸収が減少しない点に特徴がある.

2) レダクトン含量: Fig. 8 にみられるように, 着色度 (E_{470}) 当りのレ

Fig. 8. Color Intensity and Reductone Content of Xylose-Butylamine Melanoidin Fractionated through Gel Filtration.

Sample: xylose-*n*-butylamine melanoidin, 20 mg, dissolved in ethanol (2 ml); gel filtration: Sephadex LH-20, 1.1×140 cm, in ethanol, 12 ml/hr.

* Ascorbic acid $\mu\text{g/ml}$.

ダクトン含量は, 分子量の増大とともに大きくなっている. 前述のごとく, 重量当りの着色度は分子量大なるほど増大するから, 重量当りのレダクトン含量もより一層分子量大なるほど増大する. この結果も, グリシン系メラノイジンについて得られた結果 (Fig. 4) と一致する.

3) 元素組成と C/N 比: ブチルアミン系メラノイジンをエタノールに溶解し, セロファンチューブに入れエタノール中で 24 時間, 50% エタノール中で 48 時間, さらに水中で 4 日間透析し, 各段階で透析膜外に出てくる画分と, なお透析されない画分とについて元素分析を行なった. この場合, 早く透析膜外に出る画分ほど平均分子量は小さいと考えられる. 結果は Table II にみられるように, H および N 含量は各画分ともほぼ一定であ

Table II. Elemental Composition of Xylose-Butylamine Melanoidin Fractionated through Dialysis for Various Periods

Fraction	Dialysis condition*	Yield (mg)	C	H	N	O** (%)	C/N***
1	EtOH, 24 hr	295	57.65	7.93	7.32	27.10	9.20
2	50% EtOH, 48 hr	591	59.30	8.08	7.43	25.19	9.31
3	H ₂ O, 4 days	561	60.04	8.01	7.46	24.49	9.39
4	nondialyzable	404	63.45	7.96	7.33	21.26	10.11

* 2.0 g of xylose-*n*-butylamine melanoidin were dialyzed for 24 hr in EtOH, 48 hr in 50% EtOH, and 4 days in water, subsequently, and each fraction was evaporated under reduced pressure at 45°C and dried.

** Calculated from C, H, and N%.

*** Atomicity ratio.

るが, C 含量は分子量大なるにつれて大きくなっている。これに応じて, C/N 比も大きくなる。C, H, N の分析値から計算される O 含量は, 重合するほど減少するが, これは脱水または脱炭酸によることが考えられる⁽⁸⁾。この場合, C/N は不変(脱水の場合)ないし低下(脱炭酸の場合)するはずであるが, 実際には C/N 比は増大している。このことは, 重合するにつれて, (1) N を含まない成分との結合比率が高くなる, (2) N を含む成分が脱離していく, のいずれか(または両方)が起こることを推測させる。前述のごとく, グリシン系メラノイジンの場合は, C 含量はほぼ一定であったが, C/N 比はこの場合と同様に大きくなった (Fig. 5)。

以上述べたごとく, グリシンとブチルアミンという異質のアミノ化合物から調製された 2 種のメラノイジンについて観察された諸結果には, とくに相反する点は認められず, これ以外のメラノイジンについても同様であることが推察される。

要 約

D-キシロースとグリシンまたは α -ブチルアミンよりメラノイジンを調製し, これを各種のセファデックスのカラムで分画し, 各画分の性質を溶出位置(分子量または重合度)との関連において検討し, 以下の結果を得た。

(1) 重量当りの過マンガン酸カリ消費量は, 分子量に関係なくほぼ一定である。

(2) 重量当りの紫外吸光度はほぼ一定であるが, 着色度は重合度が大きくなるにつれて増加し, この増加は長波長にいくほど著しい(黒色味を増す)。ただし高分子量域では, 一定値に近づく。

(3) レダクトン含量(インドフェノール還元力)も重合度が大きくなるにつれて増加するが, 高分子量域では一定値に近づく。

(4) メラノイジンの N% はほぼ一定であるが, C/N

比は, 重合度が増すにつれて大きくなる。

なお, メラノイジン分子の会合の可能性について, 8 M 尿素中および pH 10.4 の緩衝液中でのゲル濾過を行なって検討したが, 会合-解離の現象は認められなかった。

本報告の一部は昭和 45 年 4 月, 日本農芸化学会大会(福岡)において発表した。

- (1) 加藤博通: 農化, **42**, R 9 (1968).
- (2) H. Kato and M. Fujimaki: *J. Food Sci.*, **33**, 445 (1968).
- (3) H. Kato, M. Yamamoto and M. Fujimaki: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 939 (1969).
- (4) H. Kato and M. Fujimaki: *ibid.*, **34**, 1071 (1970).
- (5) H. Kato, G. Noguchi and M. Fujimaki: *ibid.*, **32**, 916 (1968).
- (6) L. C. Maillard: *Ann. chim. Sér.* **9**, **5**, 258 (1916).
- (7) C. Enders and K. Theis: *Brennstoff-Chem.*, **19**, 360, 402, 439 (1938).
- (8) T. M. Reynolds: *Adv. in Food Res.*, **12**, 1 (1963); **14**, 167 (1965).
- (9) C. A. Weast and G. Mackinney: *Ind. Eng. Chem.*, **33**, 1408 (1941).
- (10) J. C. Underwood, C. O. Willits and H. G. Lento: *J. Food Sci.*, **26**, 397 (1961).
- (11) 黒野勘六, 勝目 英: 農化, **3**, 594 (1927).
- (12) 大亦正次郎, 上野照雄, 中川 泰: 農化, **29**, 256 (1955).
- (13) 橋場弘長: 昭和 46 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 171 (1971).
- (14) W. W. Binkley: *Intern. Sugar J.*, **59**, 64, 178 (1957); **60**, 62, 322 (1958); *Zuckerindustrie*, **20**, 291 (1970).
- (15) H. Mitsuda and T. Shikanai: *Vitamins (Japan)*, **13**, 394 (1957).
- (16) 東京大学農学部農芸化学教室編: 実験農芸化学, 別巻, 朝倉書店, 1961, p. 80.

(注) 文献 (5) を第 1 報とする。