ゲル濾過クロマトグラフィーを用いた加熱玉葱 褐変物質の解析

玉木雅子*・鶴飼光子*・本間清一**

Gel Filtration Chromatography of Browened Compounds in Heated Onion

Masako TAMAKI*, Mitsuko UKAI* and Seiichi HOMMA**

* Musashigaoka College, Yoshimimachi, Hiki-gun,
Saitama, 355-01

** Faculty of Life Science, Ochanomizu University,
Bunkyo-ku, Tokyo 112

Onion juice browened by heating was chromatographed on a Sephadex G-50 column. Browened compounds in the onion juice were fractionated into five peaks designated as A, B, C, D and E according to the elution order. Optical density at 400 nm of peak B increased by browning. Elution volume of peak B was a little larger than that of sugar or amino acid. The yield of non-dialyzable melanoidin of browened onion juice was 1/5 of total melanoidin. These results suggested that the main browened compounds of heated onion juice are low in molecular weight compared with model melanoidin.

(Received Jun. 6, 1996)

玉葱を加熱したときの変化は独特で、長時間炒めることにより香ばしい香りや甘味を生じるとともに好ましい飴色に変化するので、オニオングラタンスープをはじめ、スープやソースの材料としての利用度も高い。筆者らは、玉葱を加熱したときの色調の変化について、加熱時の条件が与える影響や褐変に伴ういくつかの成分変化について明らかにし、この反応が糖の分解および糖とアミノ酸の反応を中心とした非酵素的なものであり、反応の進行とともに還元性物質を増加させ、3-デオキシグルコソンを中心とした種々の中間生成物を経て、着色重合物を生成していることを推察した¹⁾。今回はこの褐変色素の由来と性質を知ることが目的とし、ゲル濾過クロマトグラフィーを試みたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

1994年1月に埼玉県比企郡吉見町農業協同組合で購入した泉州中高黄玉葱を使用した。

2. 試料液の調製

前報¹⁾と同様にして玉葱の可食部をジューサーミキサーを用いてジュースにし、ナイロンメッシュ(200 μm)で濾過後、遠心分離(15 $\times$ 10³ rpm, 10 min)で得られた上澄み液をグラスフィルター(G 25)で吸引濾過し、試験液とした。

3. 試料の加熱方法

試料液を試験管に3 mlずつ分注し、アルミ箔で蓋をして沸騰水中で加熱した。

4. モデルメラノイジンの調製法

0.2 M グリシン, 0.2 M グルコース, 0.2 M 炭酸水素ナトリウムを沸騰水中で2時間加熱した。

5. 各成分の検出および定量方法

(1) 還元糖

* 武蔵丘短期大学 (〒355-01 埼玉県比企郡吉見町大字南吉見 111-1)

** お茶の水女子大学 (〒112 東京都文京区大塚 2-1-1)

フェーリング反応で検出し、ソモギーネルソン法で定量した。

(2) 全糖

モーリッシュ反応で検出し、フェノール硫酸法で定量した。

(3) アミノ酸

ニンヒドリン反応により、検出および定量を行った。

6. ゲル濾過条件

Sephadex G-50 (Fine, Pharmacia LKB) を充填したオープンカラム (1.7φ×85 cm) を用い、0.1 M NaCl を含む 10 mM リン酸バッファー (pH 6.0 および pH 9.0) で室温にて溶出した。採取量は、フラクションあたり 3.5 ml あるいは 7.0 ml とした。分子量マーカーには分子量 1 000, 6 000, 20 000 (ただし、水酸化から求めた理論上の平均分子量) のポリエチレングリコール (和光純薬) を用いた。示差屈折計 (Shimadzu, RID-6 A) で検出した。検量線を Fig. 1 に示す。

7. 色素の検出方法

400 nm における吸光度を分光光度計で測定した。

8. 各フラクションの加熱

生試料のゲル濾過により分取された各フラクションにアルミホイルで蓋をし、沸騰浴中で 8 時間加熱した。

Fig. 1 Calibration curve of molecular weight determined by using Polyethylene-glycol on Sephadex G-50 chromatography

Column : Sephadex G 50, 1.7 φ×85 cm

Eluent : 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.1 M NaCl

Detector : RI, Fraction : 3.5 ml

9. 透析

加熱により褐変した玉葱ジュースを、透析膜 (三光純薬発売, VISKASA SALES CORP 製, 透析膜 UC 24-32-100, 分画分子量 12 000~14 000) に封入し、外液の蒸留水に着色がなくなるまで約 1 週間、冷蔵庫中で透析を行った。

10. スペクトル測定

分光光度計 (Shimadzu, UV 2 200) を用い、190~600 nm の範囲のスペクトルを測定した。

実験結果および考察

1. 玉葱の吸収スペクトル

生試料および加熱試料の吸収スペクトルを Fig. 2 に示した。加熱していない生試料は 220~230 nm 付近にピークをもち、250 nm および 300~360 nm あたりには 2 つの肩が見られるが、加熱して褐変した玉葱では 250 nm の肩は小さなピークに変化し、このピークから 450 nm 付近までのなだらかな吸収は、加熱時間に従い高くなった。

2. ゲル濾過による色素の分離

Fig. 3 および Fig. 4 は、それぞれ pH 9.0 と pH 6.0 における、玉葱の生試料および加熱試料 (100°C 3 時間, 5 時間, 8 時間) のクロマトグラムである。Fig. 4 のクロマトグラムでは、溶出液量を増やしたため、フラクション

Fig. 2 Absorption spectra of onion juice

Onion juice (—) was heated at 100°C for 3 hr (---), 5 hr (— · —), and 8 hr (— · —)

*: All the samples were diluted to 1/100 with water

Fig. 3 Effect of heating on the chromatographic behavior of onion juice at pH 9.0

Column : Sephadex G 50, 1.7 ϕ $\times$ 85 cm
 Eluent : 10 mM phosphate buffer (pH 9.0) containing 0.1 M NaCl
 Elution : flow rate ; about 60 ml/hr, 3.5 ml/fraction
 Sample volume : 2 ml
 Sample : Onion juice (—) was heated at 100°C for 3 hr (- - -), 5 hr (—), and 8 hr (- . -)

D, E にも若干のピークを検出することができた。Fig. 3 の a, b, c はそれぞれ Fig. 4 の A, B, C に相当しており、溶出液の pH が変化してもほぼ同じクロマトグラムを示した。このうち 2 番目のピーク (b および B) は、試料の加熱時間に従い増大し、他のピークでは顕著な変化は見られなかったため、褐変色素の大部分がこの近辺のフラクションに溶出していると考えられた。

ピーク C, D, E については、溶出体積がベッド容量よりも大きく、色素のゲルへの吸着が示唆された。Sephadex の非特異的吸着の原因としては、イオンの作用、芳香族の影響、疎水的作用が考えられる。溶出液の NaCl 濃度を 0.5 M にまで上げてみたが、得られたクロマトグラムに変化はなかったため、イオンの作用による吸着ではないと判断する。ゲルの粒子直径が異なるが、Sephadex G 50 と同様の性質を有するとされる Sephadex G 15 を充填した小カラムを作成し、生の玉葱ジュースの吸着色素の溶出を試みたところ、溶出液のリン酸バッファー (pH 4.4~pH 9.0) にアルコールを添加 (10~40%) しても溶出せず、フェノール/酢酸/水 (1/1/1) の溶液で溶出した。また、Fig. 3 と Fig. 4 の比較からわかるように、ピーク C に相当する色素は、アルカリ性下では 400 nm における吸光度が高く、濃い色調を示す

Fig. 4 Effect of heating on the chromatographic behavior of onion juice at pH 6.0

Column : Sephadex G 50, 1.7 ϕ $\times$ 85 cm
 Eluent : 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 0.1 M NaCl
 Elution : flow rate ; about 60 ml/hr, 7.1 ml/fraction
 Sample volume : 2 ml
 Sample : Onion juice (—) was heated at 100°C for 3 hr (- - -), 5 hr (—), and 8 hr (- . -)
 - - - ; model melanoidin

ことが肉眼でも認められた。以上のことから、ピーク C, D, E は芳香族化合物である可能性が高いと思われる。玉葱中には、外皮のみならず可食部にもケンフェロールをはじめとするフラボノイドが含有される^{2)~4)}ので、ピーク C, D, E がこれらフラボノイドおよびその配糖体であると推察した。

3. 各フラクションの吸収スペクトル

各試料について、Fig. 4 のピーク A~E に相当するフラクションの吸収スペクトルを Fig. 5 に示した。

フラクション A では、生試料だけが 280 nm 付近に若干の吸収ピークをもち、加熱試料には認められなかった。しかし、400 nm 付近における吸収には変化がみられず、褐変による着色への影響はほとんどないと考えられる。

フラクション B の 275 nm のピークは、加熱試料にあり、生試料には認められない。この吸収は、420 nm 付近

Fig. 5 Absorption spectra of the fractions of heated onion juice

A, B, C and D: Colored fractions separated by gel filtration chromatography (conditions, see Fig. 4)

Sample: Onion juice (—) was heated at 100°C for 3 hr (---), 5 hr (—), and 8 hr (---)

までならかに続き、試料の加熱時間に従い高くなっている。これは、Fig. 2 の加熱玉葱のもつ吸収スペクトルに類似しており、玉葱を加熱した時に生じる褐変色素のほとんどがフラクション B に溶出していると考えられる。

フラクション C, D, E では、いずれの試料にもその吸収スペクトルには変化がみられなかった。

4. 各フラクションを加熱したときの変化

生試料をカラムにかけて pH 9.0 の溶出液で得られた各フラクションを、100°C で 8 時間の加熱処理を行った時の褐変の度合い (400 nm における吸光度) の変化を Fig. 6 に示した。加熱により、ピーク b に相当するフラクションだけが褐変した。加熱前に糖・アミノ酸の検出を行ったところ、この付近のフラクションはフェーリング反応、モーリッシュ反応、ニンヒドリン反応のいずれの定性反応に対しても陽性を示していた。従って、これら糖・アミノ酸が玉葱の加熱褐変の原因物質である可能性が高いと思われる。ただし、pH 9.0 の溶出液で得られたフラクションを加熱しているの、玉葱ジュースとは加熱時の pH がかなり異なっていたといえる。

そこで、加熱条件を玉葱ジュースの場合とそろえるために、pH 6.0 の溶出液で得られた生試料の各フラクション (A~E) を加熱した。各フラクションの吸収スペクトルの変化を Fig. 7 に示した。フラクション A および E は、加熱により、波形に若干の変化があったが、400 nm 付近の吸収がいずれも低いことから、褐変による着色への寄与はあまりないと考えられる。フラクション C, D

Fig. 6 Color formation of fractionated onion juice by heating

—: Chromatogram of non-treated onion juice (conditions, see Fig. 3)

---: Each fraction separated by gel filtration of non-treated onion juice was heated for 8 hr at 100°C in a test tube, and measured for browning intensity

---: Fractions with total sugar, reducing sugar, and amino acid separated from non-treated onion juice

Fig. 7 Effect of heating to raw onion juice fractions on absorption spectra

—: Fractions of raw onion juice

---: Each fraction was heated at 100°C for 8 hr in a test tube

では変化が認められなかった。フラクション B だけが加熱により褐変した。これは溶出液を pH 9.0 として得られた結果に等しい。

B (あるいは b) は褐変物質が溶出するフラクションであり、b ではアミノ酸や糖類が検出されている (Fig. 6)。本クロマトグラフィー条件では、褐変の原因物質と褐変物質とが同程度の分子量画分に溶出するようである。

pH 6.0 の溶出液により得られる B 付近のフラクションにも、糖・アミノ酸の溶出が予想されるので、これらについて定量を行い、次の項に示した。

5. 糖とアミノ酸の定量結果

ゲル濾過 (pH 6.0) で得られた各フラクションのうち、還元糖、アミノ酸、全糖が検出されたフラクション 22～25 (溶出液 77 ml～88 ml に相当するフラクション、以後フラクションナンバーで示す) について、各成分の定量を行った。結果を Fig. 8 に示す。

還元糖および全糖はフラクション 23、アミノ酸はフラクション 24 に最も多く含まれ、加熱試料のフラクションではその含量はわずかに減少した。

Fig. 8 Contents of amino acid, total sugar, and reducing sugar in color fractions of onion juice

Sample: Onion juice (—) was heated at 100°C for 3 hr (---), 5 hr (—), and 8 hr (---). **: Contents of amino acid, and total and reducing sugars were expressed as those of leucine (*), and maltose (**).

還元糖の定量値が全糖の定量値とほぼ同じ、もしくは高い結果が得られた。この傾向は試料の加熱時間が長いほど顕著であるため、加熱により増加したレダクトン類の還元力が、還元糖の定量に影響したのではないかとと思われる。本実験のクロマトグラフィー条件では、褐変により生じたレダクトン類が糖やアミノ酸と同じ分子量画分に溶出する可能性が示唆された。

6. 褐変色素の分子量

褐変色素の溶出ピークはフラクション 24～25 で、これは、分子量 1 270～1 550 (ポリエチレングリコール) に相当する (Fig. 4)。一方、糖・アミノ酸の溶出ピークはフラクション 23～24 (MW 1 550～1 893) であり (Fig. 8)、玉葱の褐変色素の方がやや低分子量画分に溶出した結果となった。同条件におけるモデルメラノイジンのクロマトグラム (Fig. 4) と比較すると、モデルメラノイジンの溶出ピークはフラクション 22 (MW 2 311) であり、やはり玉葱の褐変色素の方が低分子量画分に溶出していることが確認できた。

加熱により褐変した玉葱ジュースを透析したところ、400 nm における吸光度は約 1/15 に減少した (Table 1)。このことから、玉葱の褐変色素に低分子の物質が占める割合が高いことが確認できた。通常、食品から分離された褐色色素は、 $C_{17}H_{19}O_9N$ (乾燥アンズ)、 $C_{18}H_{27}O_{12}N$ (カエデ糖蜜)、 $C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$ (甘藷糖蜜)、 $C_{27}H_{15}O_{12}N_3$ (醤油) 等の実験式で表されるように⁵⁾、褐変物質が高分子重合体であると考えられている。茂田井ら^{6,7)}は、醤油の褐変色素を P1～P8 の 8 つに分離し、モデル実験から、それらの分子量を 290～14 200 と推察し、P8 は P1 が重合することにより生じると報告している。前報¹⁾において、玉葱の褐変反応では、反応に伴い 3-DG 含量が増加することを報告したが、玉葱の褐変反応では、褐変物質の重合反応が進みにくく、比較的低分子物質のままで存在するのではないかと考えられる。

Table 1 Dialysis of heated onion juice
Absorption × Dilution rate

Total* Melanoidin	Non-Dialyzable** Melanoidin
3.1	0.2

*: Heated onion juice (100°C-8 hr) was measured for browning by absorbance at 400 nm

**: Heated onion juice (100°C-8 hr) was dialyzed for 1 week at 4°C, and measured for browning at 400 nm

要 約

加熱により褐変した玉葱は、セファデックス G-50 により 5 つの色素 (A, B, C, D, E) に分画され、2 番目に溶出する色素 (B) が玉葱の主たる褐変色素と考えられた。色素 B は、糖やアミノ酸よりもやや低分子の画分に溶出し、モデルメラノイジンとは異なる挙動を示した。透析による非透析性メラノイジンの回収率も 1/15 と低く、玉葱の褐変物質のほとんどが低分子である可能性が高いと考えられた。

文 献

- 1) 溝井雅子・川端晶子・本間清一：栄食誌, **45**, 441 (1992).
- 2) BRANDWEIN, B.J. : *J. Food Sci.*, **30**, 680 (1965).
- 3) PANISSET, B. and TISSUIT, M. : *Physiol. Veg.*, **21**, 49 (1983).
- 4) 津志田藤二郎・鈴木雅博：日食工誌, **42**, 100 (1995).
- 5) 加藤博道・中林敏郎・木村 進：食品の変色とその化学, (光琳書院, 東京), p. 246 (1967).
- 6) 茂田井宏・井上 進・西沢嘉彦：農化 **46**, 631 (1972).
- 7) H. MOTAI and S. INOUE : *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 233, (1974).

(平成 8 年 6 月 6 日受理)