

9038 魚醬および穀醬の電気透析脱塩に伴い損失する色素および呈味成分の特定

本間 清一(お茶の水女子大学)

アジア8カ国から魚醬4種と穀醬16種を収集し、醬油の色素メラノイジンによる鉄(II)キレート能を測定するための前処理として、醬油を電気透析にかけた。Mohr法で測定した透析前の醬油の塩化ナトリウム含量は、中国産の魚醬が29%の最高値を示し、全ての魚醬が25%以上であった。穀醬は中国、韓国、フィリピンとタイ産の各1種が22.3-25.5%の範囲内にあるが、その他の穀醬では20%以下であった。

電気透析にはマイクロアシライザー(旭化成G-1100)に両性イオン交換膜(AC-220-10)を用い、3時間脱塩した。透析した醬油の食塩含量は0.045%以下であった。非透析性メラノイジンの量は、タイと中国の魚醬2種がそれぞれ67%と73%、台湾の穀醬が63%を示したが、その他の17種の醬油は81%以上であった。電気透析法は醬油の非透析性メラノイジンを短時間で、濃縮操作の必要もなく調製でき、以下の方法で醬油のキレート能を測定するための前処理として有用であることをみとめた。

これらの醬油試料に鉄(II)イオンを加えると可視部の吸光度が増し、EDTAを加えると可視部の吸光度は減少し、その吸光度の差は全色素の3-10%に相当した。このことは醬油メラノイジンがキレート能のあることを示唆する。

醬油のメラノイジンが高分子であることを利用して鉄(II)-メラノイジン錯体をゲル濾過HPLCで分離し、鉄(II)キレート能を測定した。その結果、魚醬は0.13-0.50mgFe/ml、穀醬は0.11-1.95mgFe/mlであり、穀醬は一般に魚醬より鉄(II)キレート能がおおきい。

本研究の呈味成分の変化については時間の関係で着手できなかったが、電気透析した醬油のうま味が減少することをみとめた。

9038 魚醬および穀醬の電気透析脱塩に伴い損失する色素および呈味成分の特定
本間 清一(お茶の水女子大学)

1. 研究目的

醤油には魚類を材料とする魚醬と穀物や豆類を材料とする穀醬があり、醤油はアジア地域で広く生産されている調味料である。タンパク質栄養のアミノ酸バランスの観点からみると醤油に含まれるタンパク質、ペプチド、アミノ酸は一部の地域では単なる調味料としての呈味性のみならず食餌の必須アミノ酸の重要な給源にもなっている。これらの醤油の保存性は醸造に先立ち加えられる多量の食塩の存在により達成されている。

醤油の醸造中に醤油の色素が形成される。この色素は従来の研究によりアミノ・カルボニル反応により形成されるメラノイジン⁽¹⁾といわれる。メラノイジンは一般に分子量分布が多分散な重合高分子である。近年、メラノイジンの性質が明らかにされつつあるが、その中で金属キレート性に着目した。これはメラノイジンの一性質として知られている事ではあるが、現在 微量元素、骨粗しょう症あるいは鉄欠乏性貧血など金属の生体内利用率にかかわる現象が注目されるにおよび、醤油のように日常摂取頻度の高い食品に含まれるキレート性成分の性質をしらべることが必要になった。醤油の鉄が色調の劣化を促進し品質保持の上では好ましくなく、また醤油の鉄キレート能は食餌性の鉄利用率を下げる可能性もあるので本研究のキレートの対象として鉄(II)を選んだ。

申請者はアジア地域の8カ国から魚醬と穀醬合計20種類を収集し、醤油のキレート能を測定した。その方法として、メラノイジンが高分子であることに着目し、鉄(II)を含む緩衝液で平衡化したゲル濾過カラムクロマトグラフィー^(2,3)を用いた。この測定法においては、予め試料中の食塩を除去することが必要であり、その脱塩方法として電気透析法を用いた。その際除去される食塩とメラノイジンの割合がどの程度の範囲にあるかをしらべた。

2. 研究方法

2. 1. 試料 穀醬16種および魚醬4種を次の8カ国から収集した：中国、日本、韓国、フィリピン、シンガポール、タイ、台湾、ベトナム。

2. 2. 鉄の定量 醤油の鉄は灰化せずに直接に原子吸光分析機(島津 AA670)にかけて測定した。

2. 3. 電気透析 電気透析はマイクロアシライザーG-1100 (旭化成) を用いた。透析膜は陽イオンと陰イオン交換膜を組み合わせた aciplex cartridge AC-220-10 である。5mlの醤油を透析機にかけた。電極液には50mlの5%硫酸ナトリウムを用い約2.5時間透析した後25mlの同溶液に交換し透析を続した。多くの場合、全透析操作は3時間で終了し、試料の代わりに水をセットして流路と交換膜を洗浄し、試料と洗浄液を合わせた。

2. 4. 食塩の定量 醤油は色調が濃いので 滴定の終点を見やすくするため水で10分の1に希釈した10mlの試料液に0.5gの活性炭を加え脱色した。透析前後の醤油および電極液の塩化ナトリウムはMohr法により定量した塩素イオンの量から換算した。

2. 5. 醤油メラノイジンの測定 1mlの醤油または脱塩した醤油に2mlの0.3mM硫酸鉄(II)と3mlの水を加え、Fe(II)-メラノイジン錯体試料とした。鉄を結合しないメラノイジンとして1mlの醤油に2mlのEDTA(0.6mM), 2mlの0.3mM硫酸鉄(II)と水1mlを加えた。対照として1mlの醤油に5mlの水を加えた。色調の濃い醤油においては水で希釈してから上記の操作を行った。このように処理した醤油の450nmと550nmの吸光度を測定した。色素量は吸光度に希釈率を乗じたものである。

2. 6. キレート能の測定 脱塩した醤油および種々の濃度の塩化ナトリウム溶液(100 μ l)をHPLCにかけた。カラムはゲル濾過タイプのTSK G-3000PW (7.5 x 600mm、排除限界50,000)を用い、プレカラムとして TSK PWH (7.5 x 75mm)を接続した。溶出液は0.1mM硫酸鉄(II)を含むpH4酢酸緩衝液(0.01M)であり、流速は1ml/min, 検出は275nmの吸光度である。溶離液を5mlに分画し、灰化せずに原子吸光度計にかけて鉄濃度を測定した。

3. 研究結果

3. 1. 電気透析した醤油の塩化ナトリウム濃度

透析前後の食塩濃度をTable 1に示した。最高濃度はChina-fish-1の29%であった。全ての魚醬が25%以上を示し、本実験でしらべた醤油試料の中で高濃度のグループに位置づけられる。穀醬ではChina-soy-1, Korea-soy-2, Philippines-soy-2とThailand-soy-3が高濃度で22.3-25.5%の範囲にあるが、その他の穀醬の塩化ナトリウムの濃度は20%以下であった。魚醬の塩化ナトリウムの濃度が穀醬より高いのは魚体の自己消化の制御と微生物的な変敗を抑制するために食塩を多量に加えるからである。

電気透析後の醤油の塩化ナトリウムの濃度は0.045%以下になり、多くの試料では0.012%であった。終末濃度が僅かに異なる原因は、試料瓶の固定が悪いと透析中に試料を循環するとき瓶の内部に飛沫が飛ぶことがある。その内壁にくっついた飛沫が未透析のまま残ると結果として塩化ナトリウム濃度が僅かに高くな

ったと考えられる。

Table 1に示したように、電極液に回収された塩化ナトリウムの割合は90-96%である。透析中に塩素ガスの匂いがしたのは電極液から一部の塩素がガスとして逃げたことを示し、本実験ではMohr法で塩素イオンを定量するために100%にならないと考えられる。

3. 2. 電気透析した醤油のメラノイジン量

醤油の非透析性メラノイジンの割合をTable 2に示した。非透析性メラノイジンの最も少ない醤油はTaiwan-soy-2の63%であり、次いでThailand-fish-1の67%、China-fishの74%であった。以上の魚醬2種と穀醬1種を除くと、測定した20種類の醤油試料の中で非透析性メラノイジンが85%以上のものは17種類あった。他の脱塩法、例えばゲル濾過カラムクロマトグラフィーや透析などと比べると、ここに用いた電気透析法は約3時間という短時間で醤油の塩化ナトリウムを殆ど除きながらもメラノイジンの大部分を残し、かつ濃縮の必要もない。したがって、醤油を電気透析してから直ちにゲル濾過タイプのカラムにかけることにより醤油メラノイジンの大部分を反映したキレート能を測定できる。

既にゲル濾過カラムを用いたHPLCでメラノイジンのピークトップに相当する保持容量から醤油メラノイジンの分子量を測定したが、その分子量の数値とここで測定した非透析性のメラノイジンの割合が必ずしも相関しない。その原因はHPLC上のピークは一点を示し、メラノイジン全体の分子量分布の広がりを示すものではないからであり、クロマトグラフィーパターンにもとづく判断がより適切であろう。

3. 3. 醤油中の塩化ナトリウムの鉄(II)キレート測定に及ぼす影響

本実験に用いる鉄(II)キレート測定法は高分子化合物と低分子の金属イオンとの相互作用で形成する鉄(II)-メラノイジンcomplex(錯体)をゲル濾過カラムで分離するものである。すなわち、移動相の鉄(II)をメラノイジンが結合すると周辺の遊離型の鉄(II)濃度が下がる。カラムの分離作用で鉄(II)-メラノイジンcomplexは先に進み、鉄濃度は平衡濃度より高くなりピークを形成する。一方、平衡濃度より低い鉄(II)の部分は遅れて溶出され、鉄濃度は平衡濃度より低い谷を形成する。このように形成されたピークと谷の面積は原理的には等しいことになる。

Fig. 1(F)に国産の醤油のクロマトグラムを示したが、メラノイジンのピークと鉄のピークが重なっており、醤油メラノイジンが鉄(II)をキレートしていることが示唆される。予備実験において他の醤油試料を同じようにHPLCにかけて分析したところ、鉄濃度のピークと谷がそれぞれ1ずつ現れ、その保持容量も試料によらず殆ど同じであることに疑問を感じた。

そこで、塩化ナトリウム溶液をHPLCにかけたところ、濃度が0.1%より高くなると醤油と同じように鉄濃度のピークと谷が出現した。したがって、本測定法

では食塩の量を0.1%以下に減らすことが必要であり、電気透析により醤油を0.045%以下に脱塩でき、本法で鉄(II)キレート量を測定することが可能である。

3.4. 醤油試料の色調と鉄含量

Table 2に試料の鉄濃度と色素濃度を示した。鉄含量は11-77 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、多くの醤油は18-25 $\mu\text{g/ml}$ であった。中国の穀醤と魚醤各1種、と台湾の穀醤1種が52-77 $\mu\text{g/ml}$ の高い鉄含量を示した。中国圏の醤油の鉄含量が高いのは原料と製造工程に共通の特徴があるのであろう。

魚醤の色素は穀醤より薄い傾向を示した。

3.5. キレートによる醤油の色調の変化

醤油に硫酸鉄(II)を加えるとキレートにより450nmの吸光度が増え、EDTAを加えて内因性の鉄とメラノイジンとの結合を離すと吸光度が減少した。その吸光度の差がキレートに基づく色調の増加であり、もとの色の3-10%に相当し、いずれの醤油のメラノイジンも鉄(II)をキレートし得ることを示している。

450nmの吸光度(OD450)と550nmの吸光度(OD550)の比OD450/550は色調を示し、この値が低いと醤油は黒味を帯る^(4,5)。一般に、醤油が酸化したり、キレートするとこの比率が低くなるが、醤油を長い間空気にさらすと黒味を帯びることはよく見かけるところである。

本研究でしらべた醤油のOD450/550は、透析前では2.50-4.14であり、透析後は2.42-4.32であった。透析の有無に関係なく全ての醤油のOD450/550は鉄(II)をキレートすると下がり、キレートをなくすると上昇した。透析前後でOD450/550の値を比較すると、穀醤の7種類と魚醤の1種類が透析後に増加した。

3.6. 醤油の鉄(II)キレート能

HPLCの鉄の濃度曲線のピークあるいは谷の面積に相当する鉄の量がキレート量であり、Table 3に醤油試料1ml当りの鉄mgで示した。本実験でしらべた穀醤の鉄(II)キレート能は0.11-1.95mg/ml、魚醤は0.13-0.50mg/mlであり、穀醤は魚醤より一般にキレート能が高い。Table 3においてピークによる計算値と谷による計算値が一致しないのは鉄(II)-メラノイジン錯体が高分子を形成して溶解性が著しく低下したり、あるいはカラムに吸着するとピーク面積が減少することが考えられる。

醤油のキレート能が450nmで測定した色素量と必ずしも相関しなかったのは、鉄のピークがメラノイジン画分のみならず非着色画分にも形成されたことに示されるように、メラノイジン以外のキレート性成分が存在するためであろう。

4. 考察および今後の課題

本研究のもう一つの目的である呈味成分に関する研究に着手する時間がなかったしかし、透析によりうま味がやや少なくなり、味の満足度がおとることが試料全体

としてみとめられた。一つには食塩が除かれることによりうま味と塩味とのバランスがくずれたことが官能的評価を下げる原因にもなっている。呈味という見地からの脱塩であればこのように極めて低い食塩濃度まで透析する必要もなく、透析時間を調節することにより呈味性のアミノ酸、ペプチドなどの成分を多く残すことも可能であろう。

5. 引用文献

- 1) Lee, Y.S., Homma, S. and Aida, K.: 日本食品工業学会誌、34, 313 (1987).
- 2) Hummel, J.P. and Dreyer, W.J.: Biochim. Biophys. Acta, 63, 530 (1962).
- 3) Sebillie, B., Thuaud, N. and Tillement, J.P.: J.Chromaogr., 167, 159 (1978).
- 4) 橋場弘長: 日本醤油研究所雑誌、11, 144, 189 (1985).
- 5) Hashiba, H.: Amino-carbonyl Reaction in Food and Biological System, ed. by Fujimaki, M., Namiki, M. and Kato, H. (Kodansha-Elsevier, Tokyo) p.158 (1986).

Table 1. Sodium Chloride Concentration in Soy Sauce and Fish Sauce

Sample	Before dialysis mg/ml	After dialysis mg/ml	Recovered sodium chloride in electrode solution %
China			
soy-1	255	0.30	90.59
soy-2	238	0.12	93.28
fish-1	290	0.12	90.69
Japan			
soy-1	178	0.12	93.82
soy-2	145	0.18	94.48
Korea			
soy-1	173	0.12	96.53
soy-2	223	0.18	93.57
soy-3	174	0.12	93.10
Philippines			
soy-1	181	0.45	95.03
soy-2	254	0.45	96.06
Singapore			
soy-1	197	0.45	90.86
soy-2	180	0.45	90.56
Thailand			
soy-1	205	0.12	95.12
soy-2	207	0.18	92.27
soy-3	232	0.12	90.95
fish-1(shrimp)	281	0.12	-
fish-3(pomfret)	258	0.12	90.70
Taiwan			
soy-1	155	0.12	96.13
soy-2	133	0.12	93.98
Vietnam			
fish	282	0.12	90.43

Table2. Iron Content and Color Intensity of Soy Sauce and Fish Sauce

Sample	Iron ug/ml	Before dialysis						After dialysis						Nondialyzable melanoidin by 450nm %	
		Color intensity 450 nm.			OD 450nm OD 550nm			Color intensity 450 nm			OD 450nm OD 550nm				
		+Fe	C	-Fe	+Fe	C	-Fe	+Fe	C	-Fe	+Fe	C	-Fe	C	-Fe
China															
soy-1	69.50	90.00	88.56	86.76	3.01	3.11	3.26	82.50	78.00	76.50	2.89	3.47	3.19	38.1	
soy-2	25.40	26.28	25.56	24.84	2.70	2.96	3.00	24.84	23.04	23.04	2.76	2.91	3.05	90.1	
fish	76.90	5.39	4.87	4.34	1.95	2.50	2.12	3.66	3.59	3.49	2.41	2.42	2.55	73.7	
Japan															
soy-1	25.30	23.76	23.40	22.32	3.47	3.61	3.88	21.60	20.52	19.80	3.16	3.52	3.44	87.7	
soy-2	25.70	33.84	31.68	30.60	3.03	3.26	3.27	30.96	30.60	28.80	3.12	3.25	3.50	96.6	
Korea															
soy-1	24.30	34.56	34.20	32.40	3.10	3.28	3.33	29.88	29.16	29.16	2.96	3.12	3.24	85.3	
soy-2	26.30	19.44	19.44	19.08	2.70	2.84	2.94	18.30	16.68	16.56	3.18	3.10	3.29	85.8	
soy-3	15.50	19.08	19.08	18.36	2.52	2.65	2.68	19.80	19.08	18.00	2.62	2.79	2.94	100.0	
Philippines															
soy-1	18.90	73.50	67.50	66.00	3.27	3.21	3.38	64.50	63.00	61.50	3.58	3.82	4.10	93.3	
soy-2	20.80	73.44	70.20	69.48	3.24	3.48	3.57	70.56	68.48	65.52	3.11	3.45	3.64	97.6	
Singapore															
soy-1	17.00	180.00	174.00	174.00	3.87	4.14	4.14	168.00	162.00	160.50	4.00	4.32	4.28	93.1	
soy-2	19.60	9.00	8.94	8.64	3.13	3.24	3.35	9.30	8.88	8.82	2.92	3.15	3.34	99.3	
Thailand															
soy-1	26.00	4.56	4.44	4.32	2.62	2.74	2.67	4.20	3.84	3.60	2.69	2.91	3.05	86.5	
soy-2	19.80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
soy-3	10.60	4.08	3.84	3.66	2.83	2.91	3.21	3.18	3.12	2.94	2.65	2.74	2.72	81.3	
fish-1(shrimp)	19.20	1.20	1.18	1.12	3.33	3.37	4.00	0.96	0.79	0.76	4.17	3.80	4.47	66.9	
fish-3(pomfret)	12.70	3.18	3.00	2.88	3.12	3.33	3.69	3.12	2.94	2.76	2.89	3.06	3.83	98.0	
Taiwan															
soy-1	52.60	34.56	34.20	29.16	3.43	4.13	3.86	32.40	30.60	29.52	3.33	3.70	4.10	89.5	
soy-2	25.30	20.88	20.88	19.80	2.76	2.76	2.89.	14.87	13.24	9.24	2.59	2.87	2.81	63.4	
Vietnam															
fish	18.30	2.76	2.64	2.58	3.54	3.67	3.91	2.76	2.64	2.58	3.54	3.67	3.58	100.0	

+Fe : sample 1 ml + water 3 ml + 0.3 ml FcSO 2ml
 -Fe : sample 1 ml + water 1 ml + 0.3 ml FcSO 2 ml + 0.6ml EDTA 2 ml
 C : sample 1 ml + water 5ml
 Color intensity is shown by the value of optical density multiplied by dilution rate.

Table 3. Iron Chelating Activity of Electrodialyzed Soy Sauce and Fish Sauce

Sample	Color intensity at 450 nm	Iron chelating activity(mg/ml)	
		peak	trough
China			
soy-1	78.00	1.95	1.62
soy-2	23.04	0.86	1.18
fish	3.59	0.29	0.07
Japan			
soy-1	20.52	0.72	0.23
soy-2	30.60	0.85	0.30
Korea			
soy-1	29.16	0.36	0.37
soy-2	16.68	0.07	0.35
soy-3	19.08	0.52	0.33
Philippines			
soy-1	63.00	1.11	0.71
soy-2	68.48	0.17	0.34
Singapore			
soy-1	162.00	1.82	0.97
soy-2	8.88	0.07	0.38
Taiwan			
soy-1	30.60	0.96	1.80
soy-2	13.24	0.12	0.83
Thailand			
soy-1	3.84	0.11	0.08
soy-2	-	0.11	0.12
soy-3	3.12	0.09	0.26
fish-1 (shrimp)	0.79	0.50	0.45
fish-3 (pomfret)	2.94	0.37	0.32
Vietnam			
fish	2.64	0.13	0.04

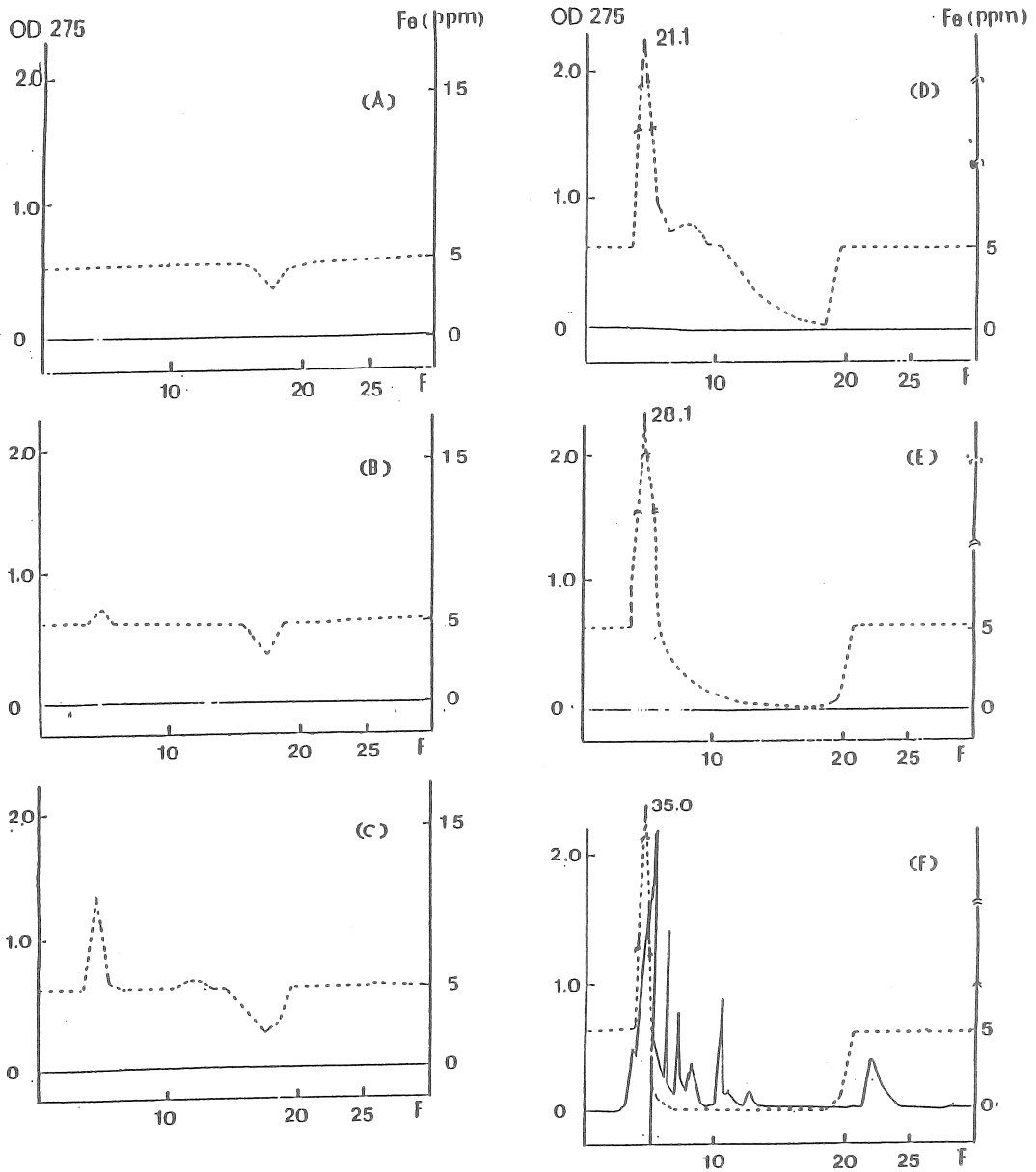


Fig.1. Effect of Sodium Chloride Concentration in the Sample on the Iron Concentration Level in the Eluate of HPLC.

Sodium chloride solution(%):(A) 0.1, (B) 0.2, (C) 0.5, (D) 1.0, (E) 2.0, (F) soy sauce(Japan) with 17.8% salt.

HPLC conditions:

Column; TSK G-3000PW (7.5 x 600 mm) connected with a precolumn TSK PWH (7.5 x 75 mm).

Eluent; 0.01 M Acetate buffer (pH 4.0) containing 0.1 mM FeSO_4 .

Flow rate ; 1 ml/min.

Fraction ; 5 ml.

Detection ; Optical density at 275 nm ———, Fe conc.-----.

Estimation of dialyzed melanoidin and tasty substances in fish sauce and soy sauce with the treatment of electro dialysis.

Seiichi Homma and Young Soon Lee

Department of Nutrition and Food Science,
Ochanomizu University

Summary

A HPLC technique was used to evaluate iron(II) chelating activity of melanoidin in fish sauce and soy sauce. Dialysis of soy sauce samples was found to be essential to the HPLC technique. Twenty samples of fish sauce and soy sauce produced in Asian countries were subjected to electro dialysis and measured for the amounts of melanoidin and sodium chloride retained in the dialyzed sauces. The dialyzed sauces retained less than 0.045% of sodium chloride and more than 81% of melanoidin except for two fish sauces and one soy sauce. The color intensity of melanoidin in sauce measured by optical density at 450 nm was raised by addition of iron(II) sulfate. It suggests that melanoidin in the soy sauce and fish sauce has a potent ability to chelate iron.

The dialyzed sauces were determined for iron(II) chelating activity by HPLC using a gel permeation column equilibrated with pH 4 acetate buffer (0.01M) containing 0.1 mM iron(II) sulfate. The Fe-complex of each sample was detected on melanoidin fractions and in uncolored fractions, and the characteristics of the sample was represented by the elution profiles of Fe-complex. The results show that the amount of iron chelated per ml of electro dialyzed soy sauce ranged from 0.11 to 1.95 mg, and that of the fish sauce ranged from 0.13 to 0.50 mg. The chelating activity of soy sauce was larger than that of fish sauce. The chelating activity of the sauces was not always correlated with the color intensity at 450 nm of the samples.