

ニンニク加工食品緑変色の
原因と対策設定に関する研究

山 崎 賀 久

謝 辞

本論文完成に至るまで、大学学部学生時代より終始御指導、御高配を賜りました弘前大学農学生命科学部元教授、現在弘前大学名誉教授 奥野 智旦博士に深く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、終始御指導を頂きました弘前大学農学生命科学部教授 橋本 勝博士に心より感謝します。

本研究を行うにあたり、化合物の機器分析を行い構造解析の御指導を頂きました弘前大学農学生命科学部准教授 高田 晃博士に心より感謝します。

また、本論文の御高閲と御教示を頂きました弘前大学農学生命科学部准教授 前田 智雄博士、同助教 前多 隼人博士、帯広畜産大学食品科学研究部門教授 福島 道広博士、山形大学農学部准教授 及川 彰博士に心より感謝します。

最後に、本研究に御理解と御協力を頂きました山本 忠志氏を始めとする青森県農産物加工指導センター（現 地方独立行政法人青森県産業技術センター農産物加工研究所）歴代所長及び職員の皆様に心より感謝します。

目 次

| | |
|-----------------------------------|----|
| 序 論 | 1 |
| 第 1 部 ニンニクピューレ中の緑変前駆物質と緑変色素 | 5 |
| 第 1 章 実験結果 | 8 |
| 1 緑変の再現と研究方法の設定 | 8 |
| 2 緑変前駆物質の単離 | 14 |
| 3 緑変前駆物質の化学構造 | 19 |
| 4 緑変色素の組成と化学構造 | 25 |
| 第 2 章 考 察 | 33 |
| 第 3 章 実験の部 | 37 |
| 1 実験材料と実験装置 | 37 |
| 2 緑変前駆物質の単離と同定 | 38 |
| 3 緑変色素の組成と化学構造 | 41 |
| 第 2 部 原料ニンニクの貯蔵条件とピューレの緑変 | 49 |
| 第 1 章 実験結果 | 53 |
| 1 ニンニク鱗茎の緑変関連成分評価法の構築 | 53 |
| 2 ニンニク鱗茎に与える低温貯蔵効果 | 58 |
| 3 ピューレが緑変するニンニク鱗茎に与える加温処理効果 | 64 |
| 第 2 章 考 察 | 73 |
| 第 3 章 実験の部 | 77 |
| 1 実験材料と実験装置 | 77 |
| 2 ニンニク鱗茎の貯蔵実験 | 78 |
| 第 3 部 総 括 | 81 |
| 文 献 | 87 |
| 付 図 | 95 |

序 論

ニンニク (*Allium sativum* L.) は、旧来より多くの国で香辛料や滋養強壮食物等として活用されている重要な園芸作物の一つである。いわゆる「にんにく」として市場に流通しているのは主に鱗茎部である。ニンニク鱗茎は、ピューレやピクルスなどにも加工・利用されている。そして加工時に、しばしば緑色の変色（以下、緑変という。写真 1）が観察される¹⁻⁷⁾。この緑変現象は、ニンニク加工食品の商品価値を著しく落とすことから、ニンニク生産・流通・加工等関係者の間では、かねてより問題となっている⁸⁻¹¹⁾。



写真 1 通常のニンニクピューレと緑変したピューレ

ニンニク鱗片を同重量の 2 %クエン酸水溶液とともにピューレ化し、袋詰め後、加熱殺菌(80℃・30 分間)したもの。原料ニンニクは、同一ほ場で同時に収穫された同一品種。

筆者が本研究を開始する以前は、ニンニク鱗茎の緑変について、いくつかの知見はあるものの、その詳細は不明であった。たとえば鱗茎のままでは緑変することはないが、細断加工することにより緑変し、商品価値を失う事故が時折発生する。加工時の緑変についても品種、栽培年次・ほ場が同一のニンニク鱗茎を同一条件で加工した場合でも、予想しないところで緑変するなど、再現性が見られず問題をより複雑にしていた^{3, 12)}。また、単独でピューレなどに加工して緑変しない場合であっても、調味料等を製造するためにタマネギ (*Allium cepa* L.) から調製したピューレと混合することにより、混合物が緑変するといった現象も報告されている¹³⁻¹⁶⁾(写真 2)。緑変色素は、その吸収スペクトルからクロロフィルでないことは明らかである¹⁾。以上の背景から、この呈色メカニズムについて、複数の研究者が注目しその成果が報告されてきた¹⁵⁻¹⁷⁾。著者が研究を開始した 1999 年当時、緑変メカニズムは結論に至っておらず、実用的な対策のためにも、その解明が待たれていた。

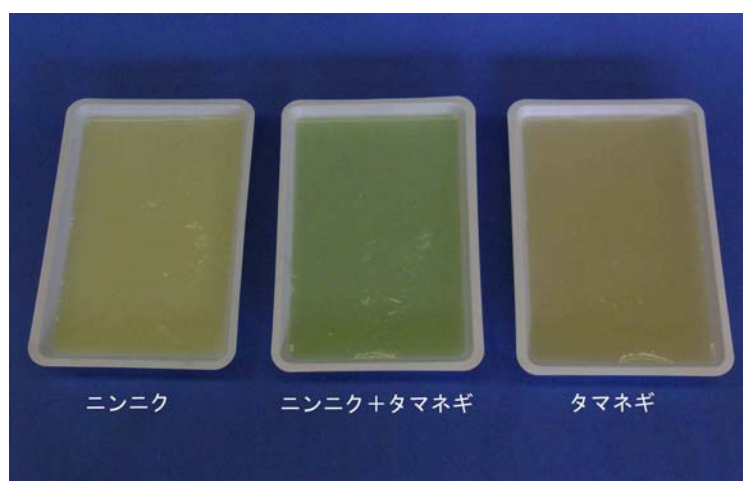


写真 2 ニンニクとタマネギを材料としたピューレ

ニンニク(鱗片)、タマネギ(鱗茎)、同重量のニンニクとタマネギの混合物それぞれを同重量の 2%クエン酸水溶液とともにピューレ化して、加熱殺菌(80℃・30 分間)したもの。

一方、緑変した加工食品を食しても健康を害したという記録はない。本緑変現象は、通常の調理の過程で観察されることはまれであり、一般に認知されているものではなく、本発色現象に違和感を覚える消費者も少なくない。したがって加工食品で発現した場合、クレームになりがちである。青森県は、ニンニク生産量国内第1位（収穫量 13,600 トン、全国シェア 67.7 %：農林水産省生産出荷統計(平成 24 年度)）である。このため、青森県内の関係機関に対する県内外の一般消費者、流通業者、加工業者からの緑変についての苦情・照会も多い。筆者は青森県職員として、農産加工の研究開発業務に従事してきたが、地域産業支援の立場からも、本現象の機構解明及び対策法開発は重要な課題といえる。

以上の背景のもと、著者はピューレ及び原料鱗茎中の緑変関与成分を中心にニンニク加工に係る緑変機構解明研究を行い、その結果、以下の成果を得た。

- 1 ニンニクピューレから緑変前駆物質を単離・同定した。これら緑変前駆物質から緑変を再現することに成功し、さらに、緑変が 3 種類の色素で構成されることを明らかにした。うち一つの新規色素を単離してその構造を明らかにした(第 1 部)。
- 2 原料鱗茎の貯蔵条件とピューレの緑変の関係について明らかにした。これにより、加工しても緑変しない原料鱗茎の貯蔵条件を設定できた。また、鱗茎中の関連成分の動態も併せて検討し、緑変が鱗茎の萌芽開始に伴う代謝と密接に関連していることを明らかにした(写真 3)。さらに、ピューレの緑変程度を軽減する原料鱗茎の処理条件について明らかにした(第 2 部)。

本学位論文では、以上の成果を中心に述べる。上記成果は、ニンニク加工食品が緑変する原因及び実用的な対策について科学的に説明するものである。また、本成果を応用することで、ニンニクの健康増進効果を高めることも明らかにできたので、この点についても記述する。

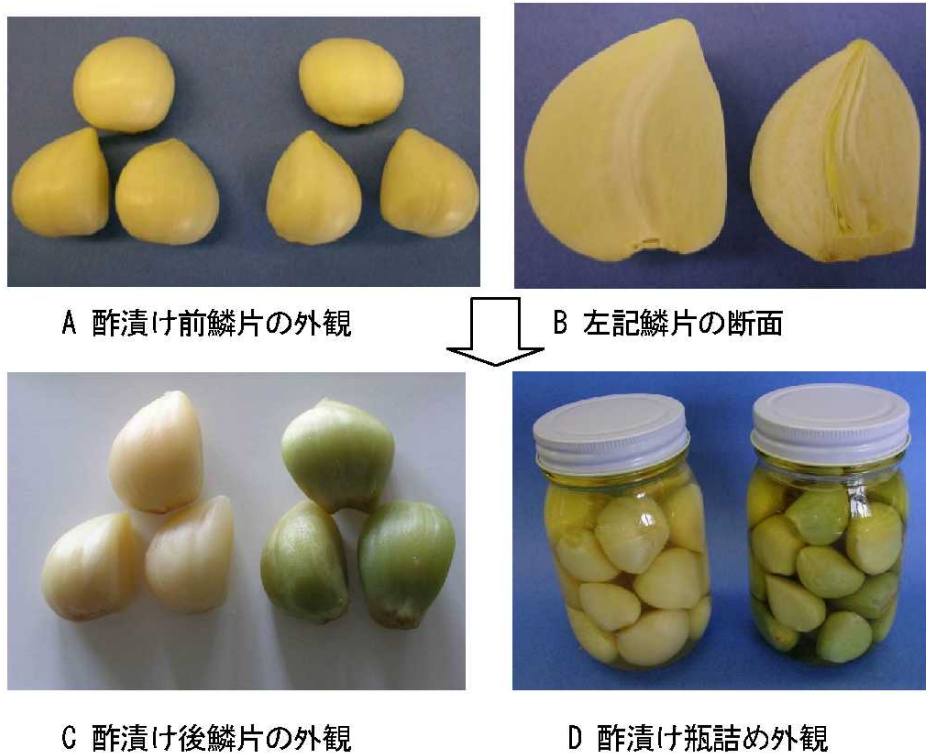


写真 3 ニンニクの萌芽の有無と酢漬けの緑変

各写真とも、左側が萌芽開始前、右側が萌芽開始後のニンニク鱗片。
写真 B の右側の鱗片断面で芽の分化が確認できる。

第1部 ニンニクピューレ中の緑変前駆物質と緑変色素

ピューレをはじめとするニンニク加工食品緑変の機構解明を行うにあたり、まず著者は、緑変現象に関与する物質の特定を行った。過去に緑変したピューレから直接緑変色素を単離・構造決定する試みも報告されているが、色素の構造解明には至っていない¹⁸⁾。後述するように、緑変したピューレには、同色を呈する色素が多数存在し、構造解析に十分な純粋物質を得ることができなかったことが原因と考えている。

食品加工の視点から、本現象に注目した研究は、複数のグループによって、著者らの研究とは独立して展開されている。たとえば、2004年に Kubec らは、色素の前駆体を特定する試みを報告している¹⁷⁾。その中で、*S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (*S*-allyl-L-cysteine *S*-oxide, alliin¹⁹⁾)、*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (isoalliin²⁰⁾)がその前駆物質であり、alliinase (EC 4.4.1.4)及びグリシンと混合させることにより、緑変化を誘導すると述べている。同時に彼らは、前述した alliin と isoalliin から alliinase によって誘導される 2-propenyl *E*-1-propenethiosulfinate (2P1PTS)や *E/Z*-1-propenyl 2-propenethiosulfinate (1P2PTS)とグリシンを反応させることにより青色素が生成することを示している(図 1-1)。

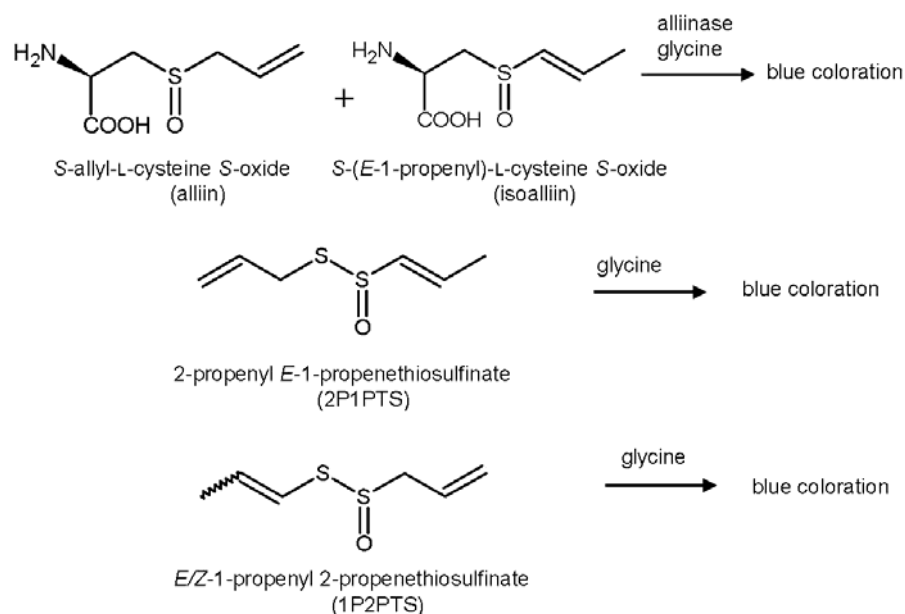


図 1-1 Kubec らが提案する呈色反応 ¹⁸⁾

2006 年には、Imai らも類似の実験を行い、1-propenyl 1-propenethiosulfinate (1P1PTS)及び 2-propenyl 2-propenethiosulfinate (2P2PTS, allicin)が色素前駆物質であり、バリンと反応させることにより、緑変の再現に成功し、さらにその色素の構造は図 1-2 で示した PUR-1 であると報告している ^{15, 16)}。

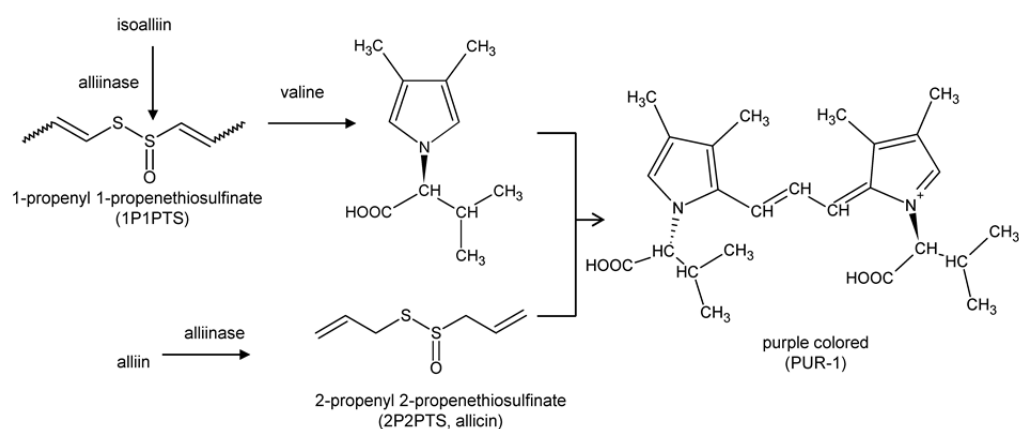


図 1-2 Imai らが提案する呈色反応、及び色素構造 ^{15, 16)}

著者も同時期に、ニンニクの緑変機構を解明して青森県産業支援に応用することを目的に緑変前駆物質及び色素構造の解明研究を行い、独立してその成果を得たが²¹⁾、その報告は彼らの後塵を拝することとなってしまった。しかし、本学位論文における成果は、彼らと同様なものも少なくないが、筆者独自の研究展開の結果である。

第 1 章 実験結果

1 緑変の再現と研究方法の設定

(1) 緑変の再現

ニンニク加工食品の緑変現象再現の検討から実験を開始した。実際の加工では、鱗茎をピューレ状にすりつぶしたのち、80℃で加熱殺菌する。この時の pH は 4.0 程度である。実験室でニンニク鱗茎とクエン酸水から調製したピューレは pH 3.8 で乳白色であった。本ピューレを 80℃で 1 時間加熱したところ、時間の経過とともに青緑色に変色した。また、加熱前のピューレを遠心分離し、上清をサンプリングして同様に加熱したところ、同じ色調の緑変を再現良く確認した(図 1-3)。上清液の場合、比色定量も容易であり、以後はピューレの遠心上清を実験材料とした。

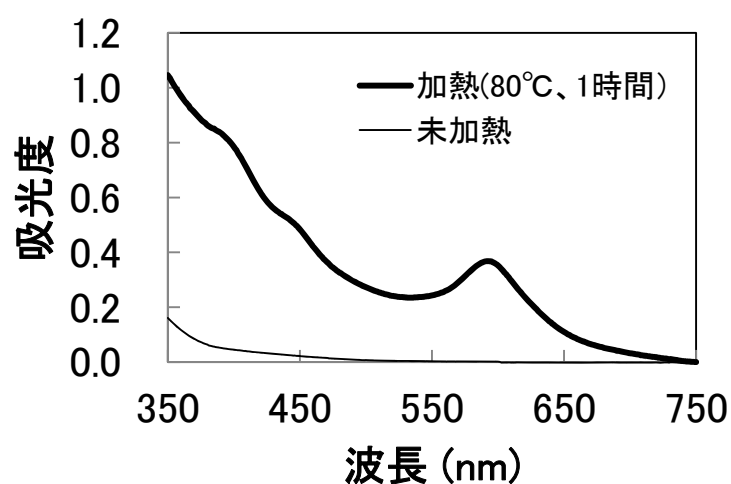


図 1-3 ニンニクピューレ遠心上清の可視紫外吸収スペクトル

未加熱：ニンニク鱗片と同重量の 2 %クエン酸水溶液を 5 分間ホモジナイズし、遠心分離により得た上清。

加熱(80℃、1 時間)：上記遠心上清を 80℃・1 時間加熱・冷却した溶液。

※吸収スペクトルは、溶液の濁度の影響を消去するために 800 nm の吸収からの差で示した。

(2) 緑変原因物質の極性

前実験では、ニンニクピューレ中の色素前駆物質の存在を明らかにした。次にそれらを分画し、成分の特定を検討した。ピューレ遠心上清をオクタドデシルシリルシリカ(ODS)カートリッジ(Waters社、SepPak C18)を使用し、吸着されることなく素通りする ODS 非吸着成分液と吸着後メタノールで溶出される ODS 吸着成分液とに分画した。それぞれの画分は単独で加熱しても変色しなかった。興味深いことに、両画分を再び混合して加熱すると緑変が観察された。その可視紫外吸収スペクトルを測定したところ、ピューレ上清の加熱により生成した色素成分と同一であることが判明した(図 1-4)。即ち緑変には、ピューレ遠心上清成分の中で、ODS に吸着される極性の低い成分と ODS に吸着されない極性の高い成分の 2 種類の成分が関与することが明らかとなった。

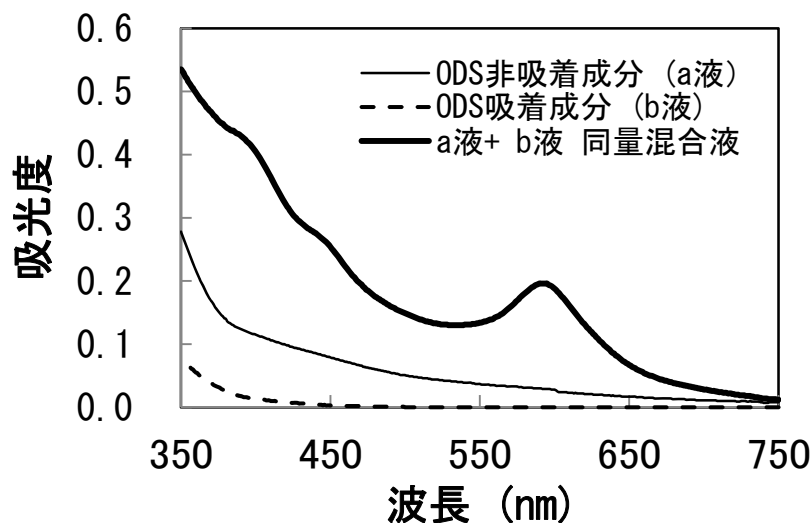


図 1-4 ピューレ遠心上清の ODS 非吸着成分、吸着成分、及びその混合溶液を加熱したときの可視紫外吸収スペクトル

ODS 非吸着成分(a 液)：図 1-3 記載のピューレ遠心上清 5.0 mL を ODS カートリッジ通過させた際の素通り液。

ODS 吸着成分(b 液)：上記カートリッジにメタノール 5.0 mL を通過させて得た液。

a 液+b 液同量混合液：a 液、b 液各 2.5 mL の混合液。

※各溶液は、80℃・1 時間加熱、冷却後スペクトルを測定した。

(3) 高極性の緑変関与成分の特定

ODS 非吸着画分には多くのアミノ酸が含まれる。中でも、ニンニクピューレにはアルギニンが多量に含まれていることが明らかにされている²²⁾。そこで、ODS 非吸着画分の緑変誘導物質をアルギニンと仮定し、ODS 吸着画分と反応させることとした。ODS 吸着画分にリン酸で pH 4.0 に調整した 0.10 mol/L アルギニン水溶液を添加した後、先と同条件で加熱したところ、予想通り同じ色調で緑変を確認した(図 1-5)。可視紫外吸収スペクトルでは、紫外部分では若干の違いは見られるものの、可視領域でスペクトルプロファイルが

ピューレの加熱によって生じた緑変溶液とほぼ一致した。ピューレの場合、紫外領域では特徴的な吸収極大がみられなかったが、これは、ピューレ上清液には色素以外の成分が多数含まれているためであると考えた。従って、新たに観測した λ_{max} 390、440 nm の吸収は今回調製した色素由来の可能性が高いといえる。

アミノ酸側鎖の影響を調べる目的で、同反応についてアルギニンをグリシンに置き換えて同様な実験を行ったところ、ほぼ同様な緑変を観察した。この溶液の可視紫外吸収スペクトルは、アルギニンを用いて得た緑変色素のスペクトルとほぼ一致することが判明した(図 1-5)。以上の結果から、緑変色素は ODS 吸着画分の成分とアミノ酸が反応したもので、アミノ酸の側鎖に依存しないものであらうと考えた。また、グリシンを用いた実験では同化学量を用いたにもかかわらず、アルギニンより大きな吸光度を示した。このことから、グリシンの方がアルギニンより緑変色素への変換効率が高いとも予想した。以上を踏まえ、以降の ODS 吸着画分に含まれる緑変前駆物質の探索では高感度が期待できるグリシンを用いてアッセイを行うこととした。

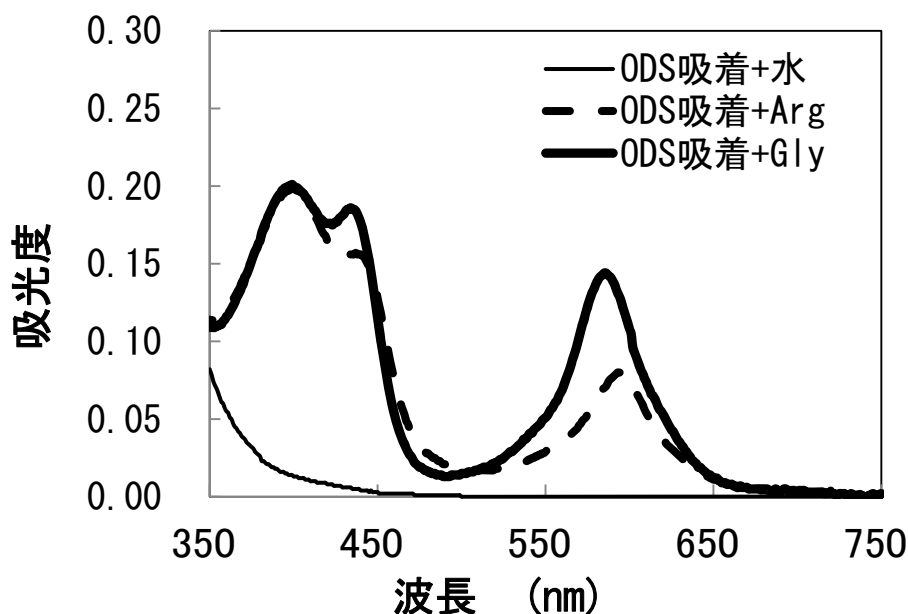


図 1-5 ニンニクピューレ ODS 吸着成分とアルギニンあるいはグリシン混合溶液を加熱したときの可視紫外吸収スペクトル

ODS 吸着+水: 図 1-4 記載の ODS 吸着成分液 (2.5 mL) と水 (2.5 mL) の混合液。

ODS 吸着+Arg: 同 ODS 吸着成分液 (2.5 mL) と 0.10 mol/L アルギニン水溶液 (2.5 mL, pH 4.0) の混合液。

ODS 吸着+Gly: 同 ODS 吸着成分液 (2.5 mL) と 0.10 mol/L グリシン水溶液 (2.5 mL, pH 4.0) の混合液。

※各溶液は、80℃・1 時間加熱、冷却後スペクトルを測定した。

(4) 緑変前駆物質精製のためのアッセイ系の構築

以上の実験を基に、ODS 吸着画分に含まれるニンニク緑変前駆物質を探索するアッセイ系を以下のように構築した。

即ち、ODS 吸着画分を展開溶媒の極性を徐々に変化させて展開し、それぞれの画分から一定量をサンプリングして、0.10 mol/L グリシン水溶液 (5.0 mL) を添加、これまでと同様な方法で緑変化を誘導、585 nm の吸収を指標とし、活性画分を探索することとした。サンプリングは 0.1 mL と 1.0 mL の二通りで行った。

また、これまでの実験では、緑変活性画分は減圧濃縮により活性が低下する現象に直面した。種々検討を行ったところ、湯浴温度を30℃以下に保ちながらメタノール成分のみ減圧除去した後、残った水溶液をジクロロメタンで分配することにより、効率よく抽出されることが判明した。以上の結果から、直接減圧濃縮を行った場合の活性低下は、目的の緑変前駆物質を水蒸気蒸留により失っていたと考えることができる。このことから目的の前駆物質は、比較的小さな分子量の揮発性物質であろうと推定した。

2 緑変前駆物質の単離

前述したアッセイを指標にニンニク鱗片 250 g から緑変前駆物質の単離を行った。単離の概要を図 1-6 にまとめた。

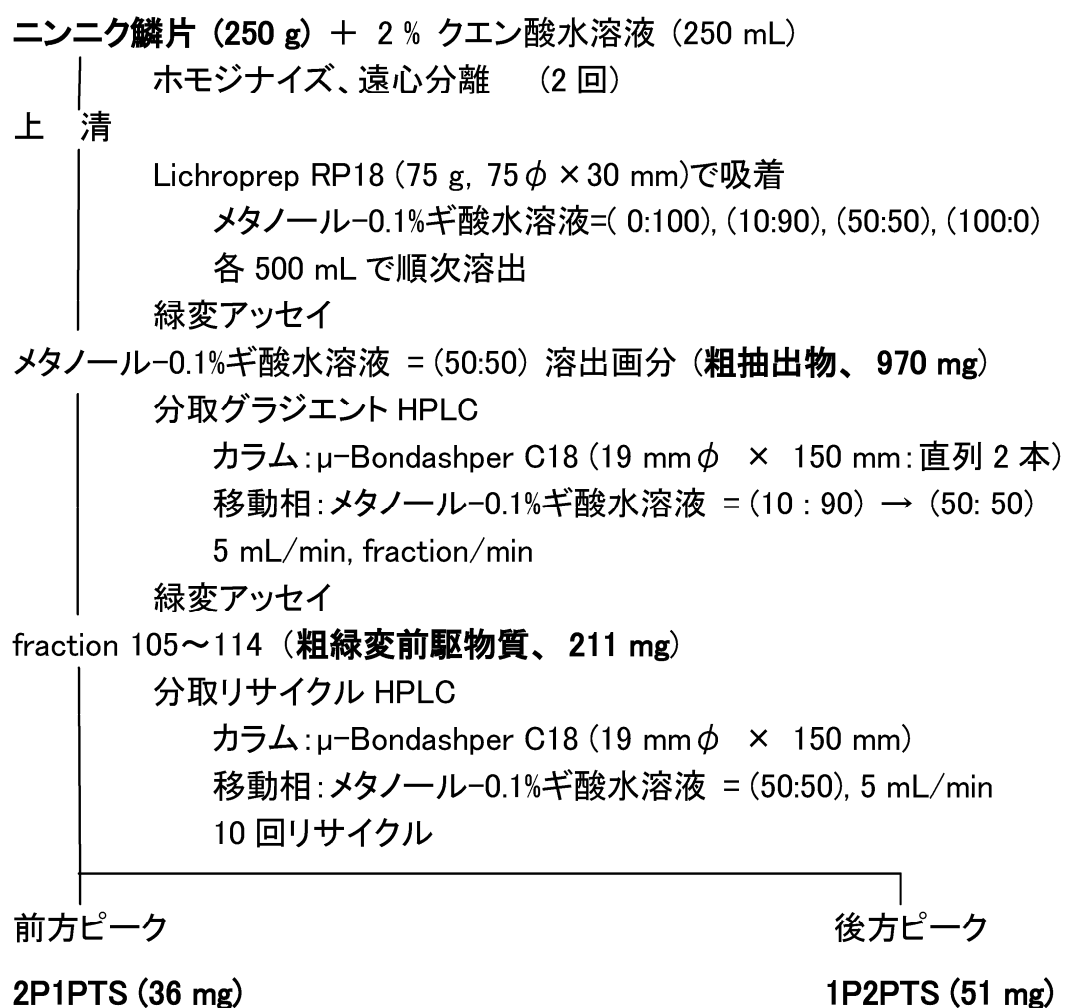


図 1-6 緑変前駆物質の単離フロー

実際の単離操作では、濃縮による目的物質の蒸発損失を最小化するため、遠心上清をそのまま ODS 樹脂(Merck 社、Lichroprep RP-18)に吸着させた。その後徐々にメタノールの比率を上げながら展開したところ、メタノール：0.1%ギ酸水溶液 = (50:50)で展開した溶出液に活性を確認した(図 1-7)。前述したようにジクロロメタンで活性成分を抽出、その後の濃縮により活性画分残渣(970 mg)を得た。

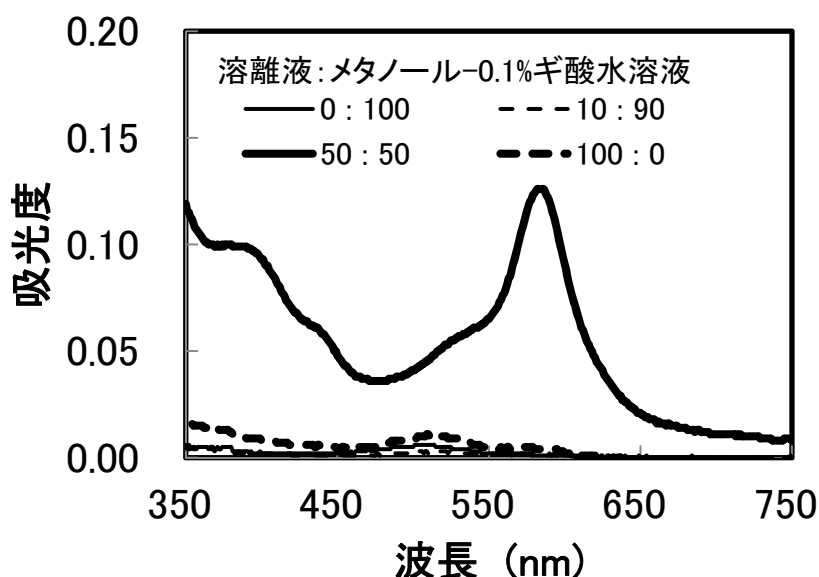


図 1-7 ODS 樹脂からの各溶出画分の呈色活性

ニンニクピュール遠心上清を通過させた ODS 樹脂(Lichroprep RP-18)からのメタノール-0.1%ギ酸水溶液のステップワイズ展開による溶出液(1.0 mL)を 0.10 mol/L グリシン水溶液(5.0 mL)と混合し、80℃・1 時間加熱・冷却した後スペクトルを測定した。

次に HPLC によりさらに分画を進めた。分取 ODS カラム(Waters 社 μ -Bondasher C18, 19 ϕ \times 150 mm(直列 2 本), メタノール-0.1%ギ酸水溶液 = (10:90) \rightarrow (50:50), 5.0 mL/min)で展開、5.0 mL ず

つ分画したところ、活性は 105-114 フラクションに回収された(図 1-8)。この時、アッセイによる呈色は予想した緑ではなく青であったが、可視紫外吸収スペクトルの可視部はこれまでと類似の吸収を示したことから目的物と判断し、回収して 211 mg の残渣を得た。なお、82-84 フラクションもグリシンとの反応により 585 nm に吸収をもたらすピンクの呈色活性を示した。

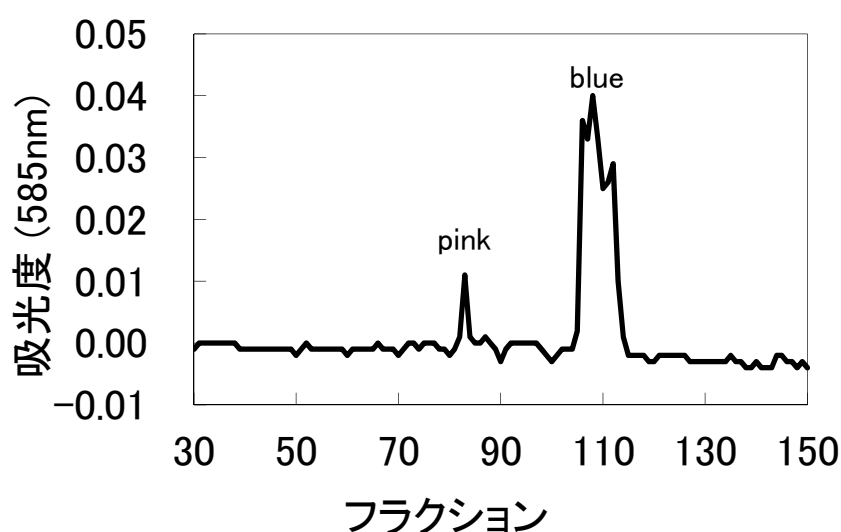


図 1-8 グラジエント HPLC で得られた各フラクシオンの呈色活性

分取グラジエント ODS-HPLC により得られた各フラクシオン (0.1 mL) を 0.10 mol/L グリシン水溶液 (5.0 mL) と混合して 70 °C ・ 1.5 時間加熱・冷却した後の吸光度で示した。
HPLC 条件：図 1-6 に記載。

105-114 フラクシオン画分をまとめて濃縮後 ODS-HPLC を用いて、詳細に分析したところ保持時間 8.5 分及び 9.5 分の 2 つの成分で構成されていることが判明した(図 1-9)。分取時、通常の展開では分離が不十分であったが、リサイクル法(μ -Bondasher C18, 19 ϕ × 150 mm, メタノール・0.1%ギ酸水溶液 = (50 : 50), 5.0 mL/min、リ

サイクル 10 回)により精製することができた(図 1-10)。それらをこれまでと同様に濃縮して二つの成分 36 mg、51 mg を単離した。便宜上、それぞれを**活性成分 A**、**活性成分 B**と呼ぶことにする。次節で述べる実験により、それらは緑変前駆物質であり、スペクトル解析の結果、図 1-1 に記載の 2P1PTS、1P2PTS であることが判明した。

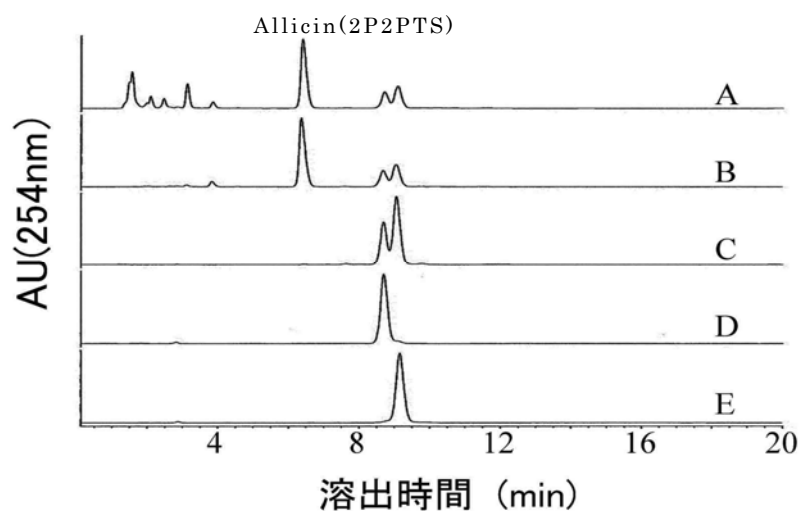


図 1-9 緑変前駆物質精製経過の HPLC クロマトグラム

A：分離前試料溶液，**B**：ODS 粗分離後，**C**：グラジエント HPLC 分離後，**D** (成分 A) 及び **E** (成分 B)：リサイクル HPLC 分離後

HPLC 条件：カラム： μ -Bondashper C18 (3.9 ϕ × 150 mm, 35℃), 移動相：メタノール-0.1%ギ水溶液 = (40:60), 1.0 mL/min, UV 254 nm 検出。

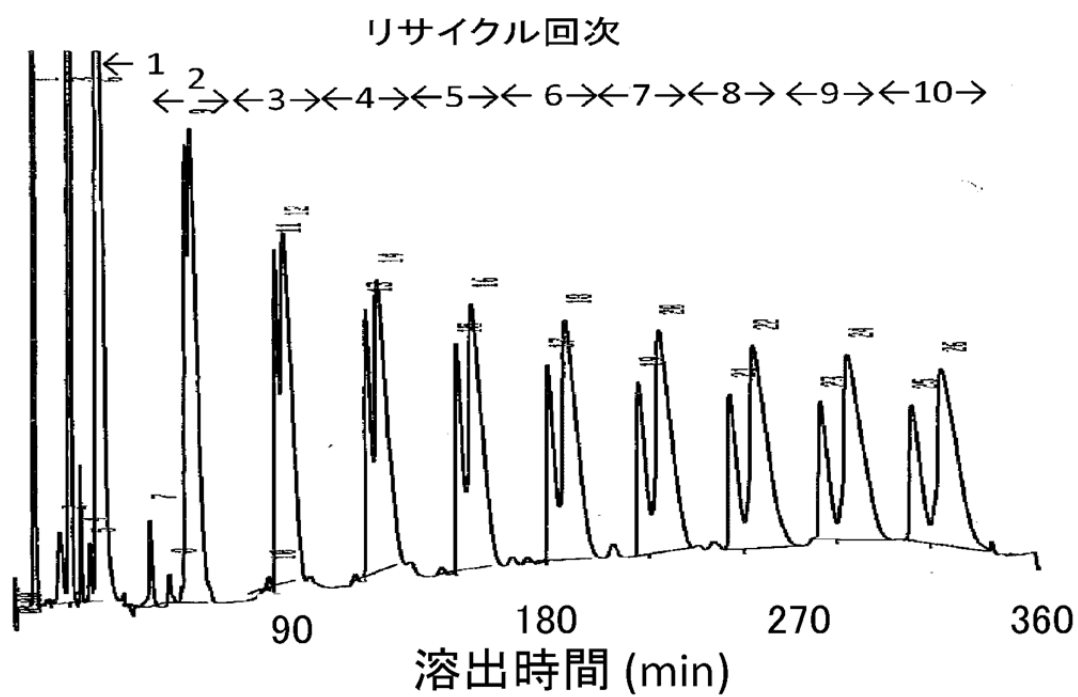


図 1-10 粗緑変前駆物質の分取りサイクル HPLC クロマトグラム

HPLC 条件：図 1-6 に記載（RI 検出）。

3 緑変前駆物質の化学構造

(1) 活性成分 A の構造

単離した活性成分 A 及び活性成分 B の構造を解析した。

活性成分 A は ESIMS により、 $m/z = 163.0279$ に強いイオンシグナルを与え、これをプロトン化した疑似分子イオン $[M+H]^+$ とみなし、分子式 $C_6H_{10}OS_2$ ($[M+H]^+$, 163.0251) と推定した(図 1-11)。 m/z 145 のシグナルは、その差から脱水したフラグメントイオンと帰属した。

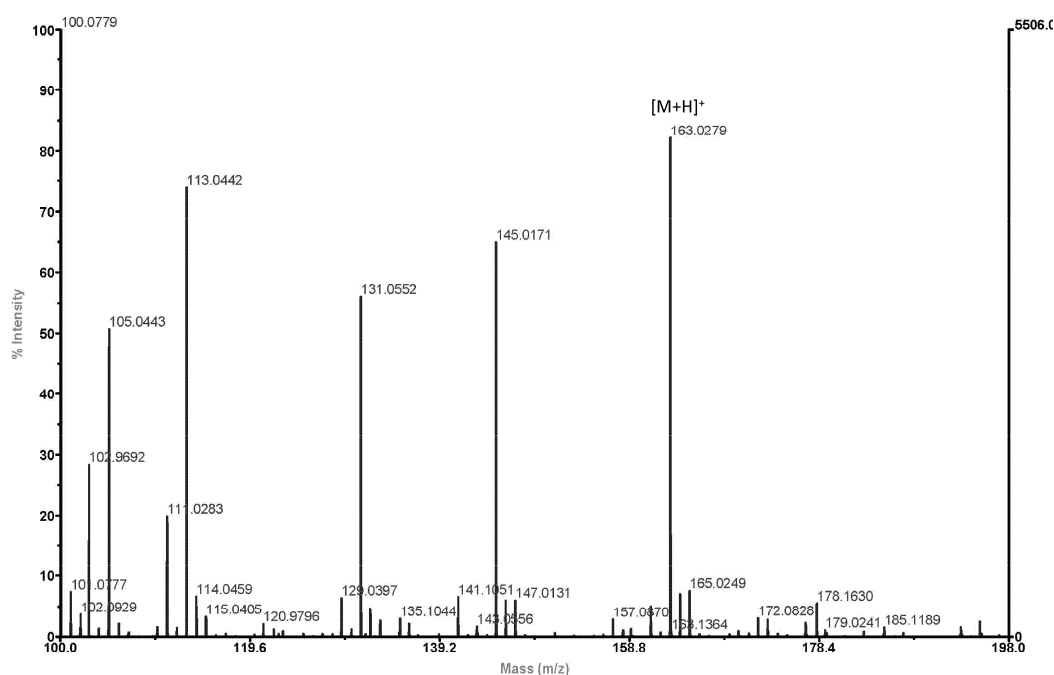


図 1-11 2P1PTS の ESIMS スペクトル

次に NMR スペクトルを解析した。 1H NMR スペクトルでは、5.23, 5.33, 5.96 ppm の二重結合性プロトンは典型的 1 置換オレフィンを

示し、5.96 ppm のシグナルは 3.75 ppm のメチレンプロトンとスピ
ン結合していることからアリル基の存在を確認した。また、1.99
ppm のダブルットに現れるメチル基シグナルは、6.60 ppm のアル
ケンプロトンと 6.8 Hz でスピン結合していた。この 6.60 ppm の
プロトンシグナルは、6.47 ppm のシグナルとスピン結合しており、
その結合定数は 14.8 Hz であった。以上のことから、本化合物はト
ランス-1-プロペニル基も有していることが判明した。分子式から残
りは 2 個の硫黄原子と 1 個の酸素原子である。

ニンニクの特徴的成分である *S*-propenyl-L-cysteine *S*-oxide がそ
の由来であると仮定して文献を調査したところ、
S-allyl(1*E*)-prop-1-ene-1-sulfinothioate (2-propenyl *E*-1-propene-
thiosulfinate, **2P1PTS**) のスペクトルデータが一致した²³⁻²⁵。

¹H NMR 解析した結果を図 1-12 に示した。

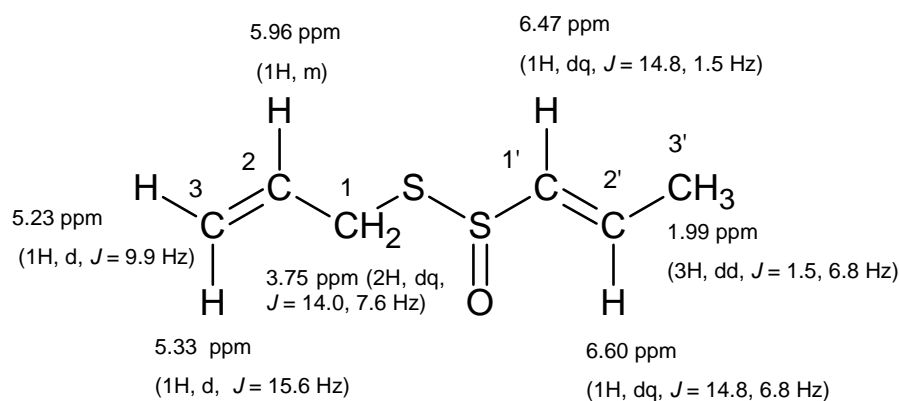


図 1-12 2P1PTS の化学構造と ¹H NMR スペクトル帰属

(2) 活性成分 B の構造

同様な方法で**活性成分 B** の構造も解析した。本成分は、ESIMS により、 $m/z = 163.0279$ と**活性成分 A** と同一分子式 $C_6H_{10}OS_2$ を示唆した(図 1-13)。精密質量も矛盾しない ($[M+H]^+$, 163.0251)。 $m/z = 121$ のフラグメントイオンは、アリル基が脱離した $[M+H-C_3H_6]^+$ と帰属した。

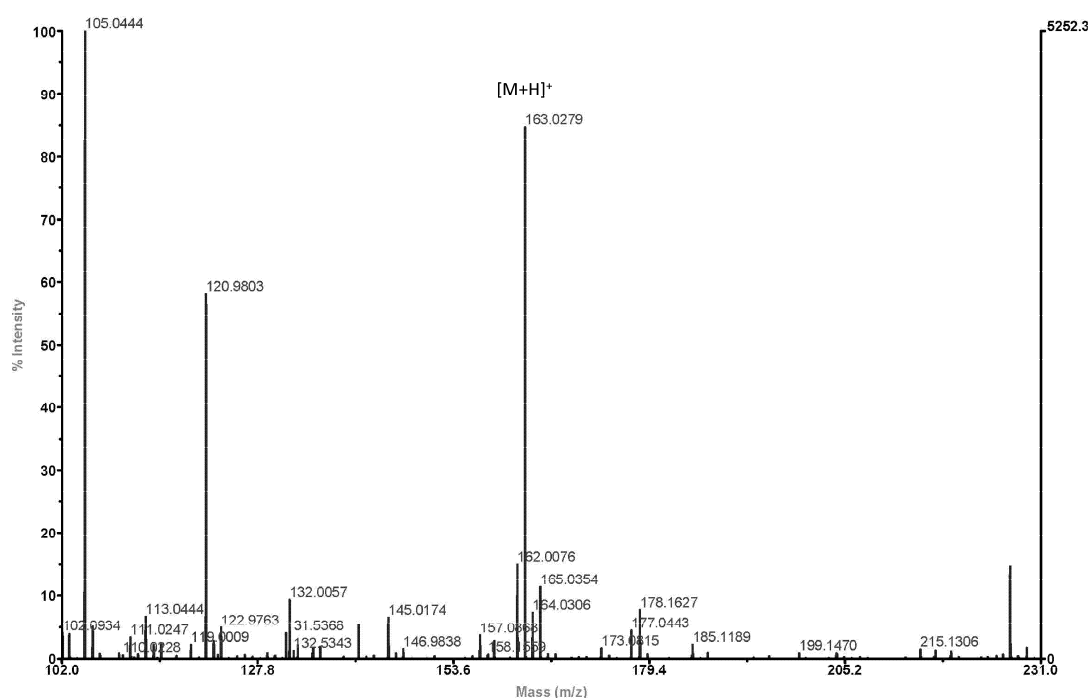


図 1-13 1P2PTS の ESIMS スペクトル

次に NMR スペクトルを解析した。 1H NMR スペクトルは**活性成分 A** のそれと比較的似ていたが、シグナルは複雑でそれらの積分比から**活性成分 B** は約 7 : 3 の混合物であることが明らかになった。質量分析では単純なイオンパターンを与えたことから、これらは同一分子式且つ原子の配列様式も似ていると推定した。 1H NMR スペ

クトルにおいて、2 成分の化学シフトが微妙に異なるため細かな分裂パターンを解析することはできなかったが、両成分とも 5.43, 5.47, 5.93 ppm 付近にメチンシグナル、3.83 ppm のメチレンシグナルを与えたことから、両成分ともアリル基を有すると考えた。一方、メチル基に相当するシグナルは 1.84 及び 1.89 ppm にともにダブルット(J 値はともに 6.8 Hz)として観測した。またこれらは、6.4-6.3 ppm(2H 相当分)のアルケニル水素と COSY 相関を示したことから、イソプロペニル基に由来すると推定した。幸い、0.3H 分に相当する 6.30 ppm に現れたシグナルについてはそのパターンを dd, $J = 6.8, 8.9$ Hz と解析することができ、このシグナルはメチル基と 6.8Hz でスピン結合していたことから、アルケニルビシナルプロトンで結合定数は 8.9Hz と帰属、即ち、マイナー成分は *Z*-異性体であると決定した。もう一方の成分についても化学シフトがよく似ていることから、その *E*-異性体であると推定した。この帰属は、マスペクトルにおいてイオンパターンが比較的単純であったことに矛盾しない。

分子式から残りは 2 個の硫黄原子と 1 個の酸素原子であるが、スルホキシド基の位置の異なる異性体と考えることができる。文献既知を調査したところ、*S*-[(1*E*,2*Z*)-prop-1-enyl] prop-2-ene-1-sulfinothioate (*E/Z*-1-propenyl 2-propenethiosulfinate, **1P2PTS**、図 1-14)と ^1H NMR スペクトルデータが完全に一致した²⁶⁾。 ^1H NMR 解析した結果を図 1-14 に示した。成分間に互変異性化が存在するかは確認できていないが、文献上でもほぼ同一の成分比の混合物と報告されていることからこれらは分離できない互変異性体混合物であると考えている。

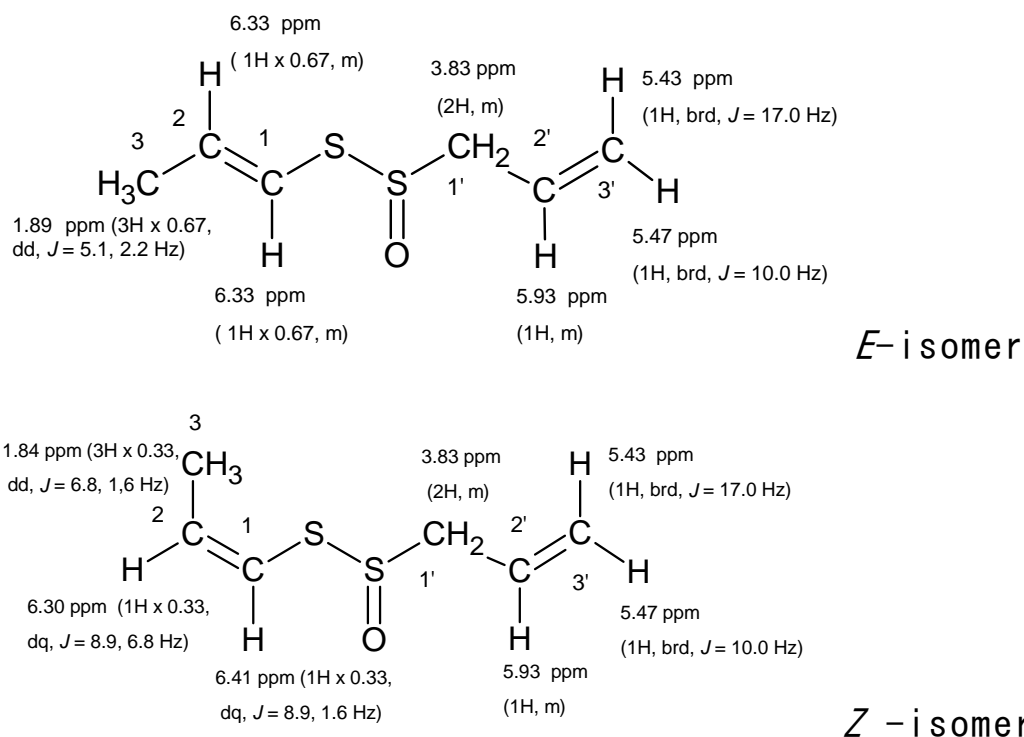


図 1-14 1P2PTS の化学構造と ^1H NMR スペクトル帰属

(3) 緑変前駆物質の緑変活性

得られた 2P1PTS と 1P2PTS の緑変活性を検定した。2P1PTS と 1P2PTS は、ともに目的の緑変前駆物質であることを以下の方法で確認した。2P1PTS と 1P2PTS の 10 mmol/L 溶液をそれぞれ同容量の 0.20 mol/L グリシン水溶液と混合後、常法により加熱したところ緑変化を観察した。下の表 1-1 に示したように、吸収極大の吸光度を基準とした緑変活性度では、2P1PTS の方が 1P2PTS より高いといえる。

ニンクピューレ中には、2P1PTS と 1P2PTS とはほぼ同量含まれていることが分かっている^{23,24)}。そこで、2P1PTS と 1P2PTS とを半量ずつ混合して、常法によりグリシンと混合、加熱操作を行っ

たところ、その吸光度は両者の平均に比べて明らかに大きかった。
また検討した 3 呈色液の色調ともピューレ遠心上清の緑変現象に非
常に似ているものであった。

表 1-1 緑変前駆物質の緑変活性

| 化合物 | 吸収極大 | 吸光度 |
|--------------------------|--------|-------|
| 2P1PTS | 586 nm | 0.148 |
| 1P2PTS | 579 nm | 0.108 |
| 2P1PTS+1P2PTS (ともに半量) | 584 nm | 0.193 |

2P1PTS, 1P2PTS : 各 10 mmol/L 溶液 (1.0 mL)を別々に 0.20 mol/L
グリシン溶液 (1.0 mL)と混合し、80℃・1.5 時間
加熱・冷却した。

2P1PTS+1P2PTS : 両 10 mmol/L 溶液 (各 0.5 mL)を合せ 0.20 mol/L
グリシン溶液 (1.0 mL)と混合し、80℃・1.5 時間
加熱・冷却した。

4 緑変色素の組成と化学構造

(1) 緑変色素の組成

前述したが、ニンニクピューレ中には 2P1PTS と 1P2PTS が同程度含有されている^{23,24)}。実際のピューレの緑変を再現する目的で 2P1PTS、1P2PTS 同量とアミノ酸としてグリシンを混合・加熱して青緑色液を調製、その色素組成を検討した。青緑色液は、図 1-15 に示すように HPLC により 390 nm、440 nm 及び 580 nm 周辺に極大吸収を示す 3 種類の色素として分離された。このうち、390nm 周辺に極大吸収波長を示す色素は、これまで報告のない新規の色素である。また、HPLC クロマトグラムから、各吸収波長を示す色素は複数あることも明らかとなった。

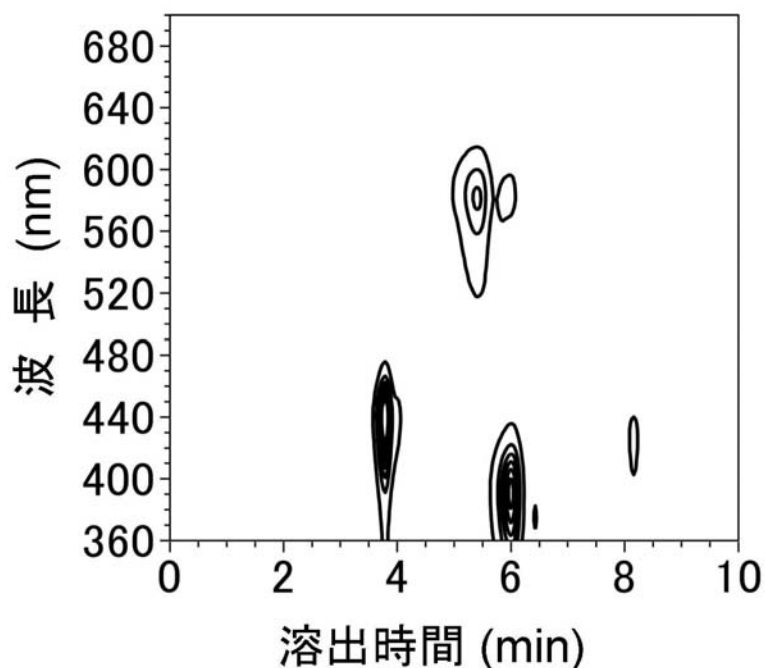


図 1-15 青緑呈色液の 2 次元 HPLC クロマトグラム

HPLC 条件;カラム : Capcell pak Ph (4.6 φ × 250 mm, 35℃), 移動相 : メタノール・0.1%ギ酸水溶液 = (60:40), 1.0 mL/min。

(2) 緑変色素の単離

前述色素の構造解析を目的に、スケールアップを行った。10 mmol/L 2P1PTS (10 mL)、10 mmol/L 1P2PTS (10 mL)及び 0.20 mol/L グリシン水溶液(20 mL)の 3 溶液を混合・加熱して粗色素を調製した。なお、以降の実験では、ニンニクピュールからこれまでと同一条件で再度調製した 2P1PTS と 1P2PTS を用いた。加熱は 80℃で呈色程度が最大となった 4 時間で終了した。得られた粗色素から分取 HPLC により、388 nm (黄)、442 nm (黄) 及び 584 nm (青紫)に極大吸収をもつ 3 色素をそれぞれ、0.3 mg、0.4 mg 及び 0.1 mg 単離した(写真 4、図 1-16)。これらの単離した色素に対して、それぞれ Pig390G、Pig440G 及び Pig580G と命名した。

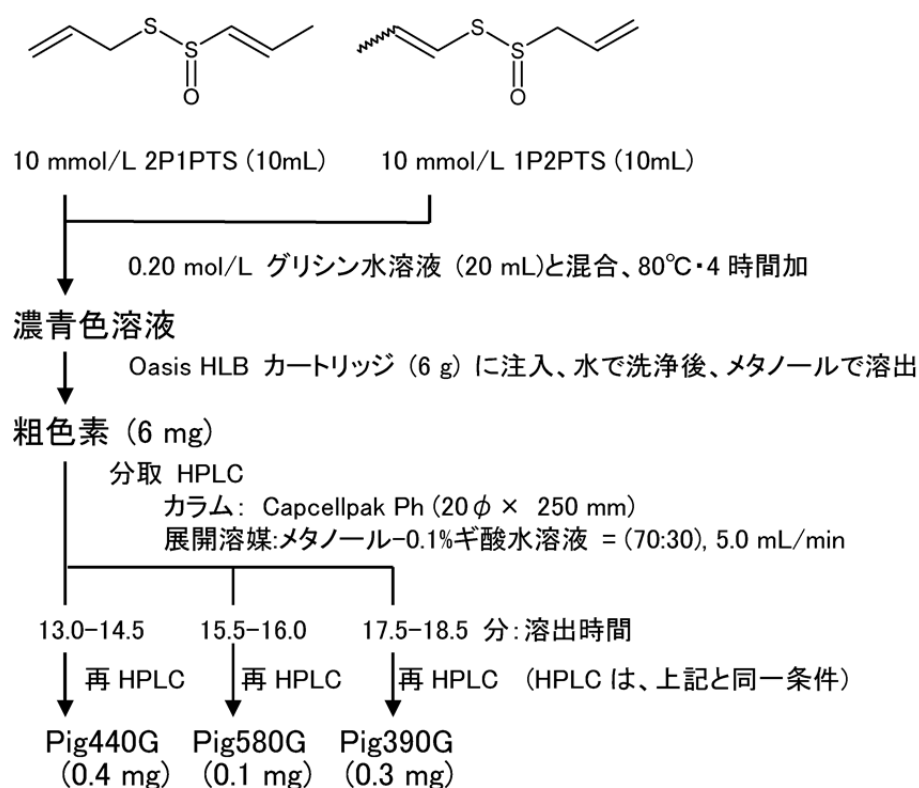


図 1-16 緑変色素の調製・単離フロー

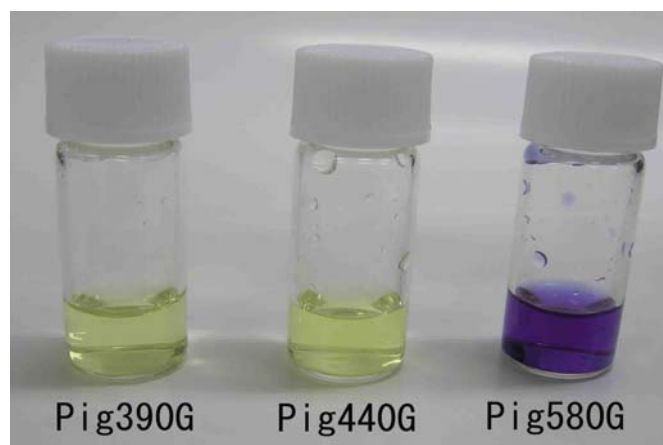


写真 4 単離した 3 色素 Pig390G, Pig440G, Pig580G の溶液

これら 3 色素のうち、Pig390G は単離後も比較的安定であったが、Pig440G と Pig580G は単離後、特に濃縮過程において退色するなど不安定であった。そこで、Pig390G の解析から行うこととした。

Pig390G の紫外・可視吸収スペクトルは図 1-17 に示すとおりで、極大吸収は UV/vis (MeOH, c 3.7 mmol/L) $\lambda_{\max}(\epsilon)$: 388 nm (5900) であった。

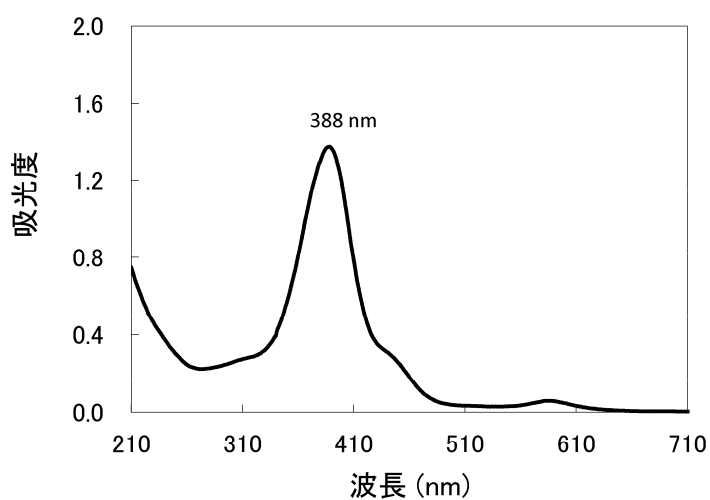


図 1-17 Pig390G の可視紫外吸収スペクトル

(3) Pig390G の構造決定

Pig390G は、ESIMS により、 $m/z = 282.1368$ の強い偽分子イオンシグナルを与えたことから分子式 $C_{14}H_{19}NO_5([M+H]^+, 282.1336)$ と推定した(図 1-18)。硫黄原子の精密質量(31.97)を考慮すると、観測した精密質量から本物質には硫黄原子が含まれないことが予想できる。また $m/z = 264$ のシグナルは、脱水したイオンと帰属することができ、本化合物は、容易に脱水する部分構造を有していると推定した。推定分子式に窒素原子が含まれていることから、用いたグリシンは色素に取り込まれていると予想した。分子式からその不飽和数は 6 である。

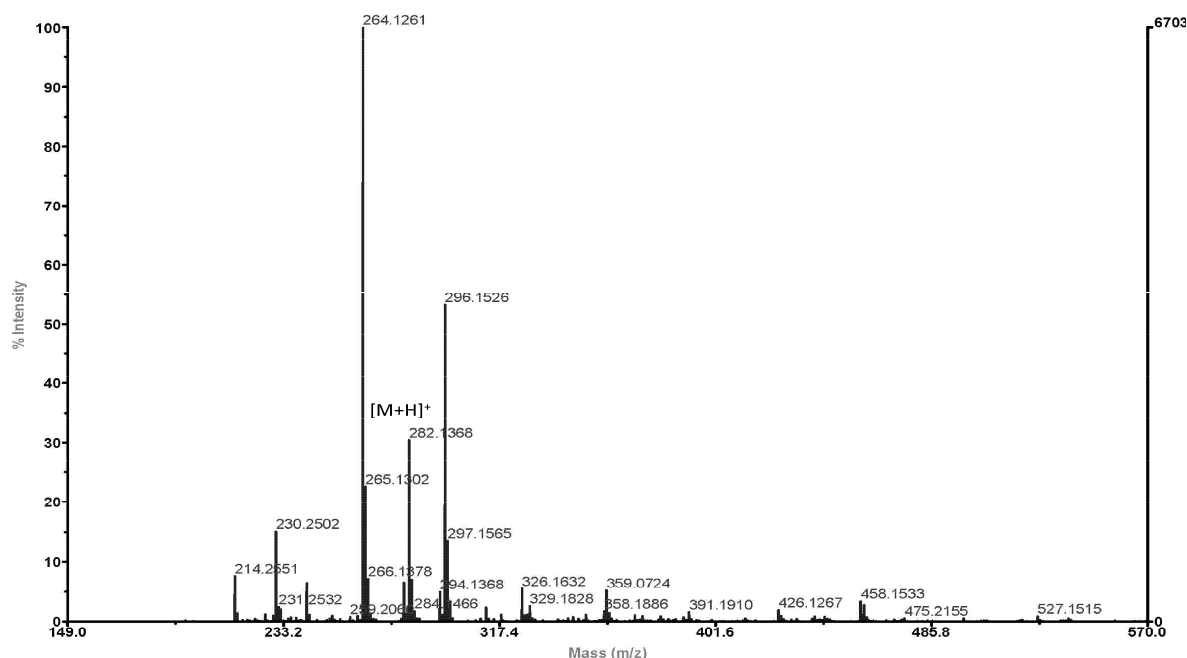
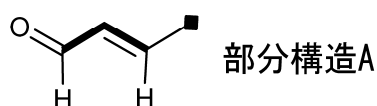
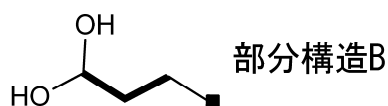


図 1-18 Pig390G の ESIMS スペクトル

次に ^1H NMR スペクトルを解析した(図 1-19)。解析の結果を表 1-2 に示した。9.28 ppm に観測されたシグナルはその化学シフト及び HMQC により 195.6 ppm のシグナルに相関を与えたこと等からアルデヒド水素に由来すると決定した。7.49, 6.33 ppm に現れたシグナルは、その化学シフトからオレフィンプロトンであると考えることができる。両者は 15.4 Hz でスピン結合していることから、トランス配置と帰属することができる。また、6.33 ppm のシグナルはアルデヒド水素と COSY 相関を示すことから、 α,β -不飽和アルデヒド部分構造(部分構造 A)を帰属した。



同様に、4.46 ppm のメチン、2.69 及び 1.75 ppm のメチレンは、COSY スペクトルにより連続していることが明らかになった。4.46 ppm のシグナルは、98.0 ppm の炭素シグナルと HMQC 相関を与えることからアセタール構造、即ち、含水型 3-オキソプロピル基(部分構造 B)を示唆した。



4.55 ppm に現れたメチレンシグナルはシングレットであり、グリシン由来であると推定できる。本色素の合成ではグリシンを用いている。グリシンが取り込まれていることは分子式からも明らかである。またこのメチレンプロトンは HMBC スペクトルで 175.3 ppm に相関を与えたが、このシグナルがグリシンのカルボン酸由来と考

えることができる。Phenyl カラムを用いた逆相 HPLC では溶出時間が早いことから本色素は極性が高いと考えることができ、著者はグリシン由来のカルボン酸は遊離していると考えた。

本化合物には二つのメチル基の存在が示唆されるが、それらの化学シフト(1.98、2.19 ppm)から、これらメチル基はアルケンに結合しているはずである。HMBC スペクトルを解析するとこれらメチル基はそれぞれ二つの 4 置換アルケンと共に相関を与えることが判明した。以上の解析から分子式のすべての炭素及び水素シグナルを帰属することができた。

これらの知見を考慮し、さらに部分構造 A、B とアルケンとの HMBC 相関から、本色素は 4 置換ピロールを有する {2-(3,3-dihydroxypropyl)-3,4-dimethyl-5-[(1*E*)-3-oxoprop-1-enyl]-1*H*-pyrrol-1-yl}acetic acid であると決定した(図 1-20)。HMQC 及び HMBC の相関を表 1-2 にまとめた。文献調査の結果、本化合物は新規物質であることが明らかになった。

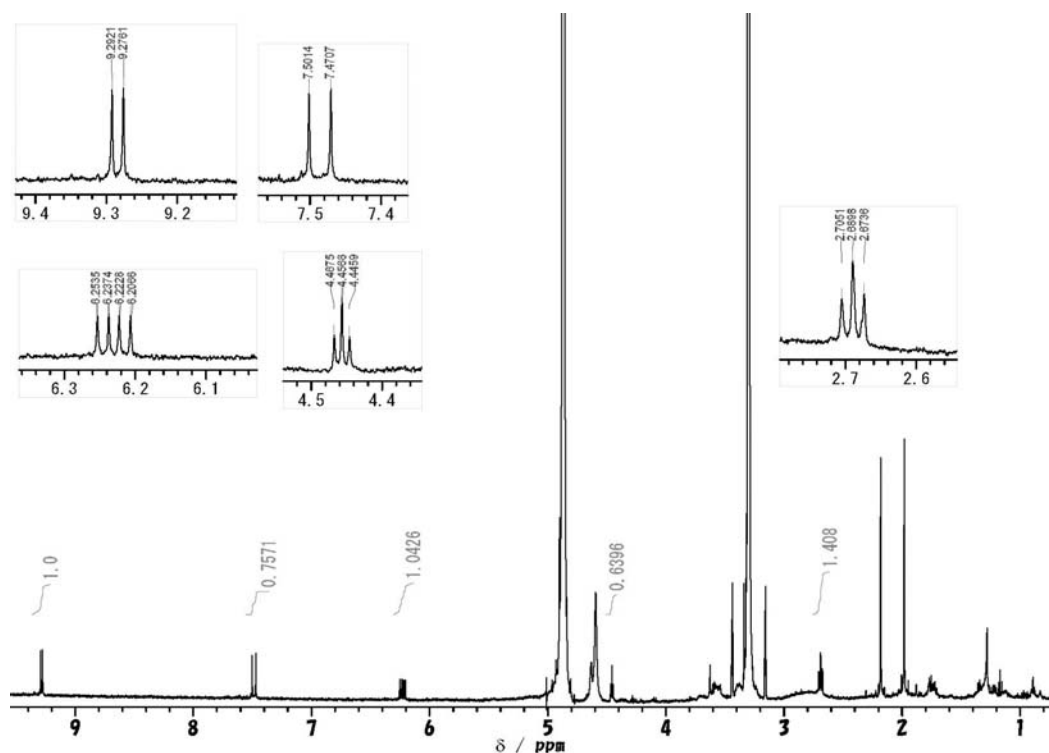


図 1-19 Pig390G の ^1H NMR (500MHz) スペクトル

表 1-2 Pig390G の ^1H NMR (500MHz), ^{13}C NMR (125MHz) スペクトルデータ

| Position ^a | δ_{H} (integral, mult, J) | δ_{C} | | HMBC 相関 |
|-----------------------|--|---------------------|-------|---|
| | | HMQC | HMBC | |
| 2 | | | 141.5 | 6-H, 8-H, 3-CH ₃ |
| 3 | | | 120.2 | 3-CH ₃ , 4-CH ₃ |
| 3-CH ₃ | 1.98 (3H, s) | 9.0 | | |
| 4 | | | 129.0 | 11-H, 3-CH ₃ , 4-CH ₃ |
| 4-CH ₃ | 2.19 (3H, s) | 12.0 | | |
| 5 | | | 127.2 | 6-H, 4-CH ₃ |
| 6 | 4.55 (2H, s) | 48.8 | | |
| 7 | | | 175.3 | 6-H |
| 8 | 2.69 (2H, t, $J = 7.7$ Hz) | 21.0 | | |
| 9 | 1.75 (2H, m) | -- b | | |
| 10 | 4.46 (1H, t, $J = 5.4$ Hz) | 98.0 | | |
| 11 | 7.49 (1H, d, $J = 15.4$ Hz) | 143.9 | | |
| 12 | 6.23 (1H, dd, $J = 8.0, 15.4$ Hz) | 121.0 | | 13-H |
| 13 | 9.28 (1H, d, $J = 8.0$ Hz) | 195.6 | | 11-H, 12-H |

a : 炭素原子の番号は図 1-20 に示した。

b : 信号が検出されない。

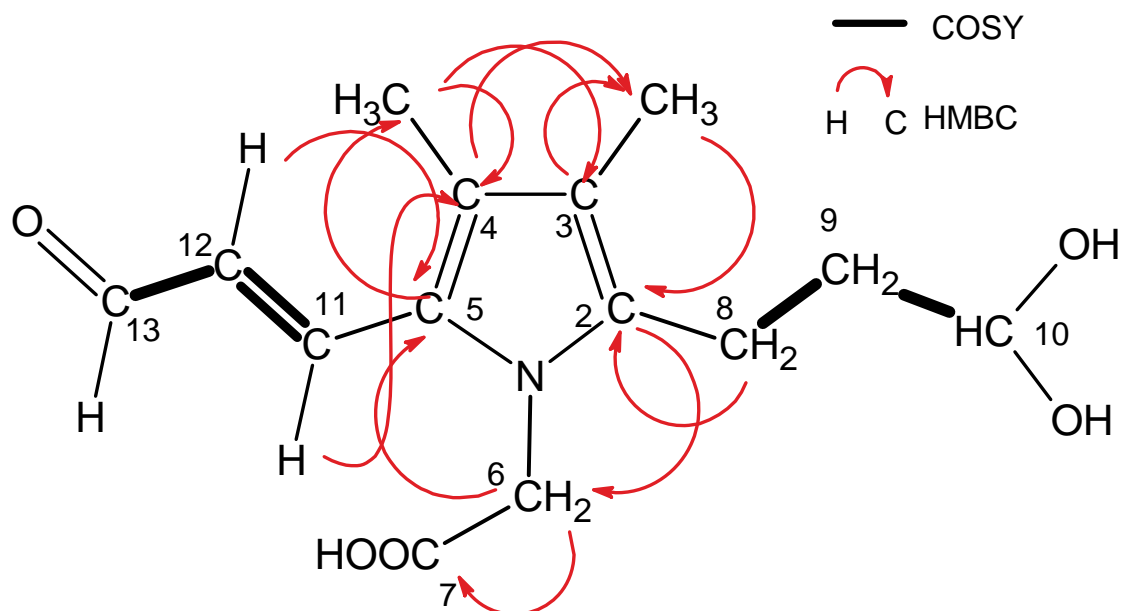


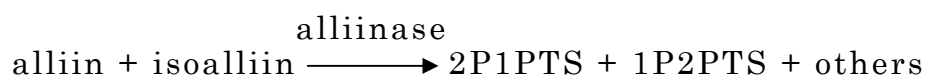
図 1-20 Pig390G の化学構造

第 2 章 考 察

第 1 部ではまず、ニンニクピューレの緑変を再現し、緑変の原因を明らかにする実験方法について検討を加えた。これにより、ニンニクピューレから緑変に関与する成分(緑変前駆物質)を特定することができた。さらに、緑変前駆物質とグリシンを用いて緑変を再現し、緑変色素は 3 種の物質から構成されること、そのうち主成分となる新規色素の構造を明らかにした。

次に、本色素の生成について考察を行った。今回の実験結果から、ニンニクの緑変には、ニンニク中に含まれるアミノ酸類と、ジアリルジスルフィド誘導体(2P1PTS 及び 1P2PTS)が関与していることが明らかになった。色素前駆物質を検討する段階で、濃縮により活性が著しく低下することを経験したが、これは 2P1PTS、1P2PTS が比較的揮発性であり、特に逆相 HPLC 後の含水溶液を濃縮する際には、水蒸気蒸留によりこの 2 成分を消失してしまったことが原因である。実際、著者は成分をジクロロメタンに抽出してから濃縮することによりこの問題を解決した。

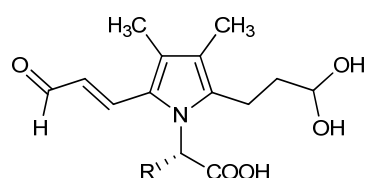
2P1PTS あるいは 1P2PTS などのジアリルジスルフィド誘導体の生合成について、次のように、ニンニクの特徴的成分である alliin と isoalliin から酵素 alliinase によって生成することが明らかにされている²⁷⁾。



鱗片を破碎してニンニクピューレを調製する時に、alliinase が刺激されそれらジアリルジスルフィド誘導体が大量に生成したと考えられる。このことは、破碎前のニンニクを一度 80℃で 30 分間加熱し

た後、ピューレを調製しても緑変化を起こさなかったことから支持される。

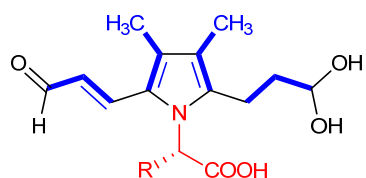
実験では、アルギニンやグリシンを用いて緑変化に成功し、いずれの場合も緑変溶液の可視領域の吸収スペクトルは、ピューレ緑変のスペクトルをほぼ再現した。また **Pig390G** の構造から、グリシンのアミノ基のみがクロモフォア形成に関与していたことを考え合わせるとアルギニンを用いた実験における緑変成分の一つは構造 **X** と推定できる。



Pig390G:(R = H)
X: R = CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂

実際のピューレ緑変成分は、複数のアミノ酸が同様な反応によりクロモフォア化に関与した混合物であろうと結論した^{28,29)}。

次に、緑変前駆物質 **2P1PTS**、**1P2PTS** について考察する。**Pig390G** の構造から、この化合物は緑変前駆物質由来の 4 個の **C3** ユニットと一つのアミノ酸から合成されることが考えることができる。

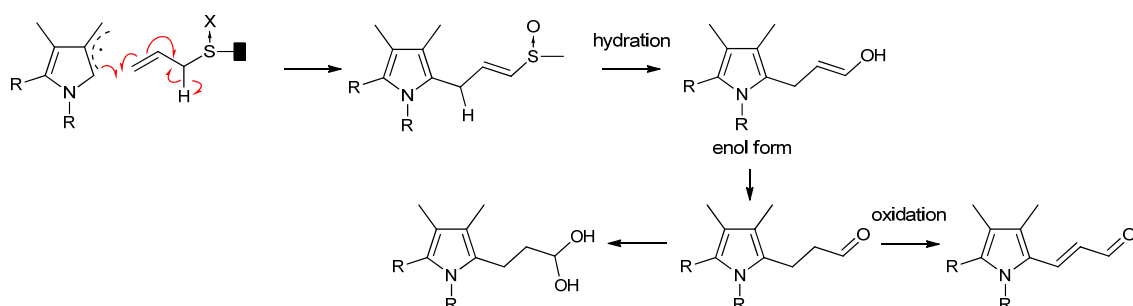


この緑色化はその収率から考えても、有機合成反応のような効率的なものではなく、**2P1PTS**、**1P2PTS** から加熱によりアリルラジカルが発生し、それがアミノ酸を巻き込んで重合したものと考えられる。

ことができる。

実験では 2P1PTS、1P2PTS をそれぞれ単独でグリシンと反応させても得られる色素成分の可視紫外吸収スペクトルには違いがみられなかった。両者を混合した場合、緑変化が促進されたが、これはジアリルジスルフィド誘導体の構造によりラジカルが発生効率、あるいはラジカル連鎖の効率が変わったと考えることができる。

その機構として、以下に示したように 2 分子のアリルラジカルとアミノ酸が縮合して 3,4-dimethyl-1H-pyrrole radical が生成し、さらに 2 位と 5 位で再びアリルラジカルが付加した後ビニルスルフィド構造が加水分解してアルデヒドに、それが水和したり、酸素ラジカルにより酸化されるなどして両側鎖部分が形成したと考えることができる。



ニンニクの鱗片は白色であり、緑変することは非常にまれであるが、これは、ニンニク健全細胞中では 2P1PTS と 1P2PTS は、alliin と isoalliin の *S*-propenyl-L-cysteine *S*-oxide の状態で存在してその濃度は低いためと考えることができる。alliinase は維管束鞘液胞中に、酵素反応の基質となる alliin と isoalliin は細胞質ゾル中にと別々の組織に局在していることは既に明らかにされている²⁷⁾。

Pig390G は、予想される色素の一つであり、この構造決定がニ

ニンニクピューレの緑変の色調を忠実に再現したとは言い難い。今回の実験では微量成分 442 nm (黄、Pig440G) と 584 nm (青紫、Pig580G) 色素の構造を決定するに至らなかったが、これら色素も緑変色調に関与している。これについては、上記未解明色素の構造を決定し、更なる検討を行っていく必要があると考えている。

著者らと独立して Imai らは、PUR-1 と命名した紫色素($\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$)を明らかにしているが¹⁶⁾、これも、2 分子の 3,4-dimethyl-1H-pyrrole radical と 1 分子のアリルラジカルが、著者らの Pig390G とほぼ同様な反応機構で生成したと考えることができる。この Imai らの PUR-1 は、著者らが単離に成功した Pig580G(青紫、 $\lambda_{\max} = 584 \text{ nm}$)と類似の色素と考えることができる。実際のニンニクピューレの緑変は、著者らが見出した Pig390G や Pig440G などの黄色素と Pig580G などの青(紫)色素が共存することにより緑色を呈するものと考えている。

以上、緑変の再現、色素構造の検討を通じて、ニンニクピューレ中から得られた 2P1PTS と 1P2PTS が主たる緑変前駆物質であることを明らかにした。同時に、原料ニンニク鱗茎中の緑変の原因成分が alliin と isoalliin の 2 種の *S*-propenyl-L-cysteine *S*-oxide であること、及び原因酵素が alliinase であることも明確となった。原料ニンニク鱗茎中の alliin、isoalliin 含有量とピューレの緑変程度の関係については、第 2 部で詳細に検討する。

第 3 章 実験の部

1 実験材料と分析装置

ニンニク鱗茎（青森県産，品種：福地ホワイト）は、2002 年 9 月に市販品を購入し、3℃の恒温庫で 12 週間貯蔵したものを使用した。ニンニクピューレは、皮を剥いたニンニク（鱗片）に同重量の 2% クエン酸水溶液を加え、ブレンダーで室温下 5 分間ホモジナイズして調製した。

水は、ミリ Q 装置（Millipore 社）で製造した純水を使用した。また、酸性水として、同純水にギ酸を容量比で 0.1% 添加した水溶液を使用した（0.1% ギ酸水溶液）。

HPLC 装置は、Waters 社 600S 送液システム、リサイクルバルブ付き 510 ポンプ、996PDA 及び 410RI 検出器を組合せて使用した。可視紫外吸収スペクトルは日立社 U-2010 分光光度計を用い、水またはメタノール中、室温下で測定した。質量分析は HPLC システムを組み合わせた日立社 NanoFrontier LD を用い、イオンスプレー（ESI）法でイオン化した。アセトニトリル-0.1% ギ酸水溶液の系で装置に導入して測定した。 ^1H ， ^{13}C 核磁気共鳴スペクトルは、日本電子社 JEOL JNM-ECA 500 (500 MHz) を用い、重クロロホルム、あるいは重メタノール中で測定した。重クロロホルムを用いた場合、クロロホルムの残留プロトンシグナル (7.24 ppm) を内部標準に、重メタノールを用いた場合、メチル基の残留プロトンシグナル (3.35 ppm) を内部標準とした。

2 緑変前駆物質の単離と同定

(1) 緑変の再現実験

上記により調製したニンニクピューレを遠心分離し (15,000 × *g*, 30 分間)、遠心上清を得た。遠心上清の加熱前とブロックヒーターで 80℃・1 時間加熱後の吸光度を測定した。

遠心上清 5.0 mL を ODS カートリッジ(Waters 社、SepPak C18 plus)に吸着させた。このときの素通り液を非吸着画分として回収したのち、水(5.0 mL)でカートリッジを洗浄後、メタノール(5.0 mL)で溶出して吸着画分を回収した。この操作を 2 回実施して得た吸着画分を 2.5 mL ずつ、3 本の試験管に入れ、水(2.5 mL)、0.10 mol/L アルギニン水溶液(2.5 mL, リン酸添加により pH 4.0 に調製)、0.10 mol/L グリシン水溶液 (2.5 mL, リン酸添加により pH 4.0 に調製)をそれぞれ加え、ブロックヒーターで 80 °C・1 時間加熱し、室温まで放冷後、吸光度を測定した。

(2) 緑変前駆物質の粗抽出

ニンニク鱗片 250 g から調製したピューレを遠心分離 (15,000 × *g*, 30 分間)した。沈澱に再度 2.0%クエン酸水溶液(250 mL)を加え、ホモジナイズ(5 分間)・遠心分離操作(15,000 × *g*, 30 分間)をした。得られた上清を合わせたのち、ブフナロート (75 φ × 30 mm) に詰めた 75 g の Lichroprep RP-18 (40~63 mesh, Merck 社)に吸着させた。吸着成分をそののち、各々 500 mL のメタノール-0.1%ギ酸水溶液 = (0:100), (10:90), (50:50), (100:0) の溶媒で順次溶出した。各画分 1.0 mL に 0.10 mol/L グリシン水溶液(5.0 mL)をそれぞれ加

え、ブロックヒーターで 80℃・1 時間加熱し、室温まで放冷後、吸光度を測定し緑変程度をアッセイした。アッセイ結果をもとに、メタノール-0.1%ギ酸水溶液(50:50)で溶出した画分をロータリーエバポレータで湯浴温が 30℃を超えないようにして体積が約 200 mL になるまで減圧濃縮した。濃縮液をジクロロメタンで分配し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウム乾燥した。無水硫酸ナトリウムをろ過後、減圧濃縮 (<20℃) して、970 mg の粗抽出物を得た。

(3) 緑変前駆物質の単離

上述の粗抽出物 (970 mg) を HPLC により分画・精製した。条件は以下のとおりである。μ-Bondasphere C18 カラム(Waters 社、5 μm, 100 Å, 19 φ × 150 mm、2 本を直列に連結)、移動相：メタノール-0.1%ギ酸水溶液 [10:90 (20 分間), 10:90 → 50:50 (80 分間のリニアグラジエント), 50:50 (50 分間保持), 流速 5.0 mL/min]。溶出液を 1 分毎に分画し、各画分 0.1 mL に 0.10 mol/L グリシン水溶液(5.0 mL)をそれぞれ加え、ウォーターバスで 70℃・1.5 時間加熱し、室温まで放冷後、吸光度を測定し緑変程度をアッセイした。検液の 585 nm の吸光度から、溶出時間 105～114 分に溶出した画分を活性画分とした。この活性画分を併合したのち、水で 250 mL に希釈し、ODS カートリッジ(SepPak C18, 10 g)を通過させた。水(100 mL)で高極性成分を溶出させたのち、ジクロロメタンで吸着した成分を溶出、分液ロートで有機層を回収した。有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で濃縮して、緑変前駆物質を含む残渣(211 mg)を得た。

上記残渣(211 mg) からリサイクル HPLC により 2 つの画分を得

た(カラム: μ -Bondasphere C18 (5 μ m, 100 Å, 19 ϕ × 150 mm)、移動相: メタノール-0.1%ギ酸水溶液 = (50:50)、流速 5.0 mL/min、リサイクル 10 回)。得られた 2 画分は、それぞれ上述の ODS カートリッジを用いた溶媒置換法でジクロロメタン溶液とした。このジクロロメタン溶液を減圧濃縮 (<18°C) し、前方、後方ピーク成分としてそれぞれ 36 mg (2P1PTS)、51 mg (1P2PTS)を得た。両化合物とも形状は、無色油状であった。両化合物の ^1H NMR スペクトルは後記の図 1-21~23 に示した。

(4) 緑変前駆物質の呈色程度の評価

上記の操作で得られた 2P1PTS、1P2PTS それぞれを 10 mmol/L になるようにメタノール-0.1%ギ酸水溶液(10:90)溶液に溶解し、用時まで-75°Cで保存した²⁷⁾。単離した 2 化合物の呈色検定は、2P1PTS 溶液(A 溶液, 1.0 mL)、1P2PTS 溶液(B 溶液, 1.0 mL)、及び 2P1PTS 溶液(0.5 mL)と 1P2PTS 溶液(0.5 mL)の混合液(0.5A+0.5B 溶液)それぞれを 0.20 mol/L グリシン水溶液(1.0 mL)と試験管中で混合し、ブロックヒーターで 80°C・1.5 時間加熱した。加熱した溶液を室温放冷後、Oasis HLB (Waters 社、plus) カートリッジに注入した。カートリッジを水(5.0 mL)で洗浄後、メタノール(5.0 mL)で溶出し色素成分を回収した。得られたメタノール溶出液の 350~750 nm の吸収スペクトルを測定し、Oasis HLB 処理前の濃度に換算して示した。

0.5A+0.5B 溶液とグリシンで調製した吸光度測定用溶液は、後述する色素組成検討用 HPLC にも供した。

3 緑変色素の組成と化学構造

(1) 緑変色素の組成

前述の呈色程度検定で吸光度測定用に使用した 2P1PTS、1P2PTS 及びグリシンの組合せで得られた緑変したメタノール溶液について、HPLC (カラム: Shiseido 社 Capcell Pak Ph (5 μ m, 80 \AA , 4.6 ϕ \times 250 mm)、移動相: メタノール-0.1%ギ酸水溶液 = (60:40), 1.0 mL/min)でその色素組成を検討した。

(2) 緑変色素の調製と単離

10 mmol/L 2P1PTS 溶液(10 mL)、10 mmol/L 1P2PTS 溶液(10 mL)及び 0.20 mol/L グリシン水溶液(20 mL)を混合し、ブロックヒーターで 80 $^{\circ}$ C \cdot 4 時間加熱した。加熱により濃青色となった溶液を室温下放冷後、Oasis HLB (6 g) カートリッジに注入した。カートリッジから水(80 mL)で未反応のグリシンを除去後、メタノール(80 mL)で吸着成分を溶出し、減圧濃縮により粗色素 6 mg を得た。粗色素を HPLC (カラム: Capcellpak Ph (5 μ m 80 \AA , 20 ϕ \times 250 mm)、移動相: メタノール-0.1%ギ酸水溶液 = (70:30), 5.0 mL/min)で展開し、30 秒毎に分画した。13.0~14.5 分、15.5~16.0 分及び 17.5~18.5 分の溶出液をそれぞれ 440 nm、580 nm 及び 390 nm 周辺に極大吸収を持つ個別の色素画分として得た。各々の色素画分について再度同一条件で分取 HPLC を実施し、極大吸収波長 442 nm (Pig440G)、584 nm (Pig580G)及び 388 nm (Pig390G)の色素としてそれぞれ 0.4 mg、0.1 mg 及び 0.3 mg を得た。

Pig390G の ^1H - ^1H COSY、HMQC、HMBC の各 NMR スペクトル

は後記の図 1-24～26 に示した。なお、HMQC、HMBC の各 NMR スペクトルは、再度同様に調製した Pig390G 0.3 mg を合わせた計 0.6 mg で測定した。

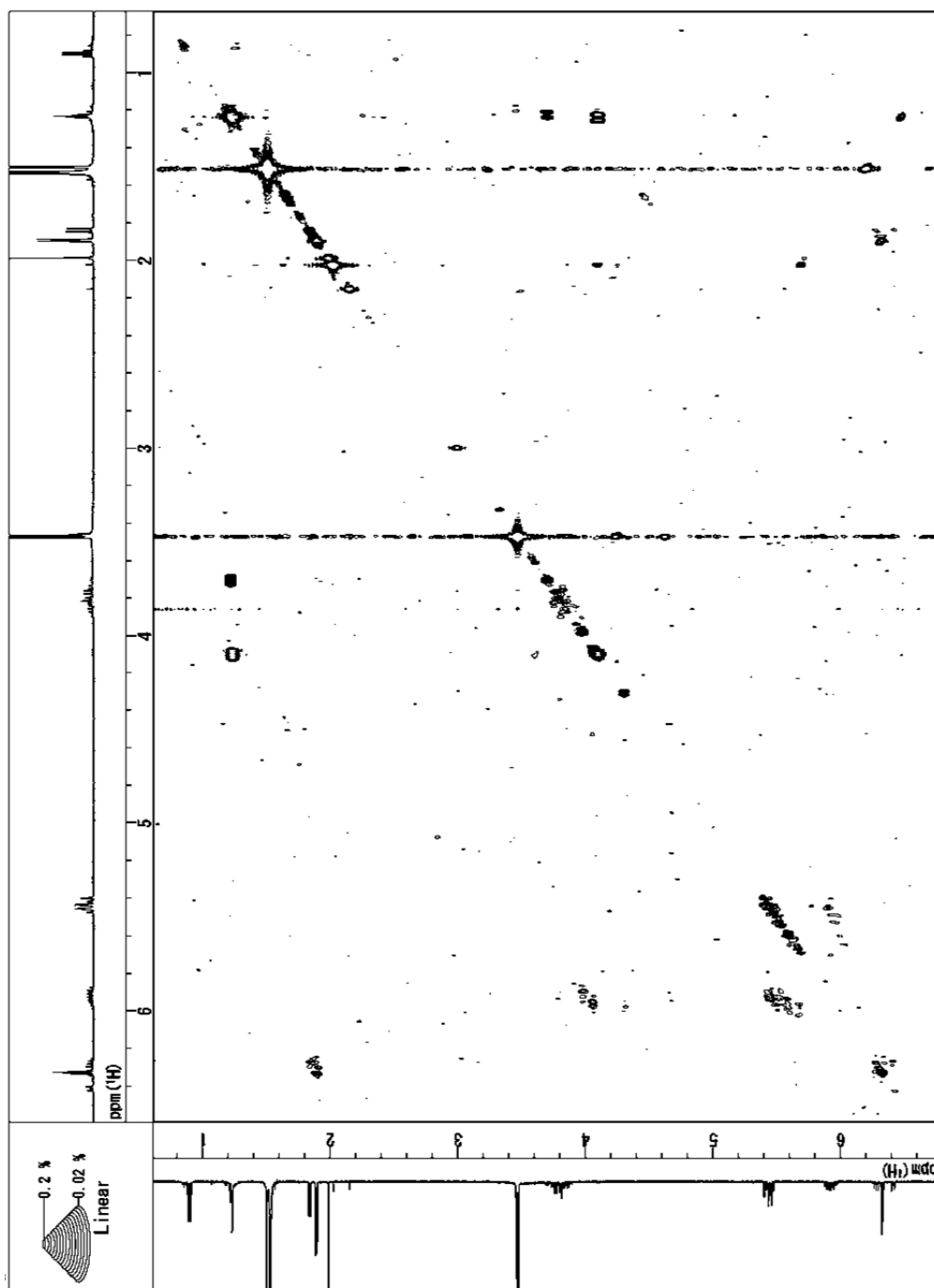


図 1-23 1P2PTS の ^1H - ^1H COSY スペクトル

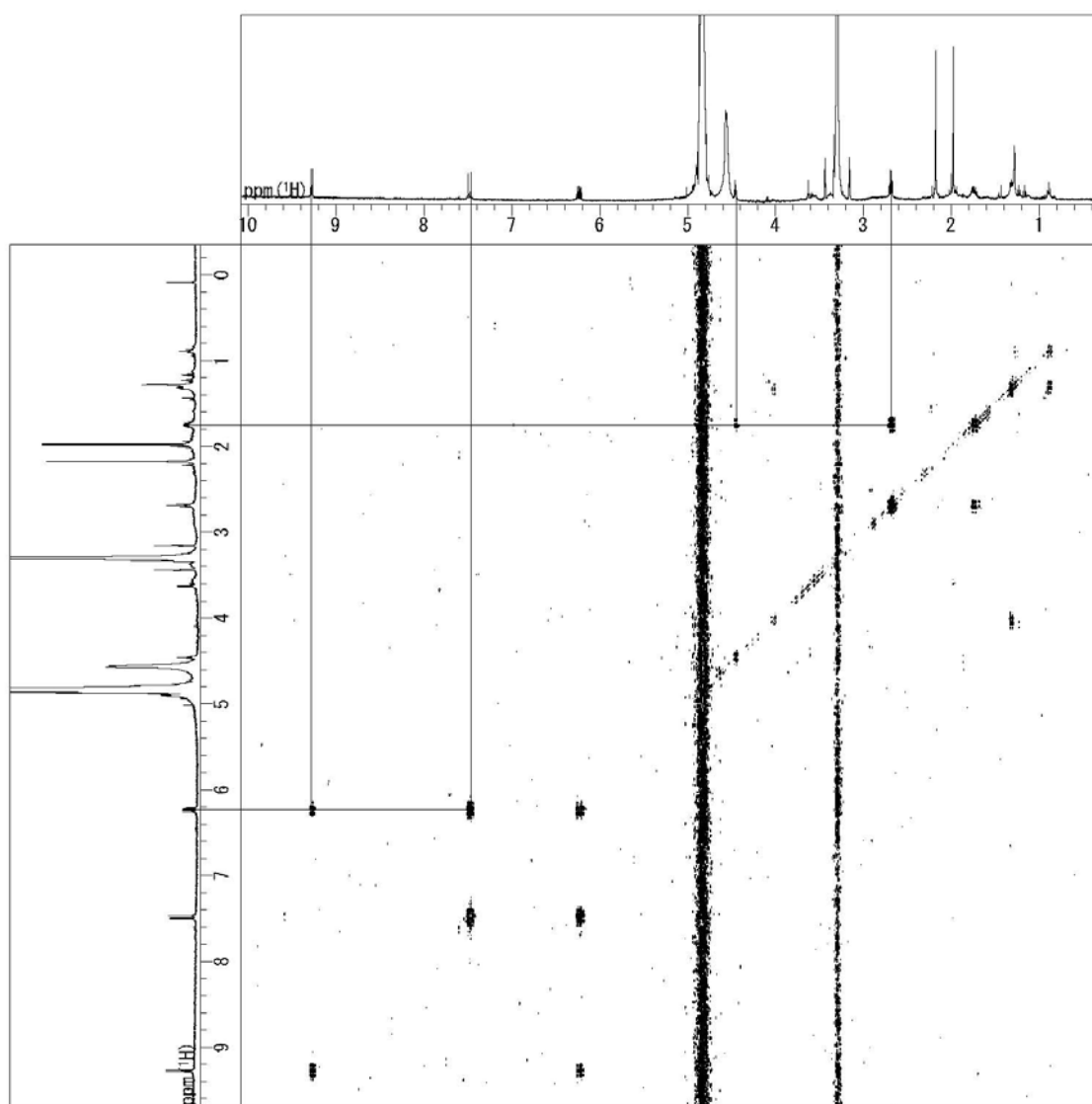


図 1-24 Pig390G の ^1H - ^1H COSY スペクトル

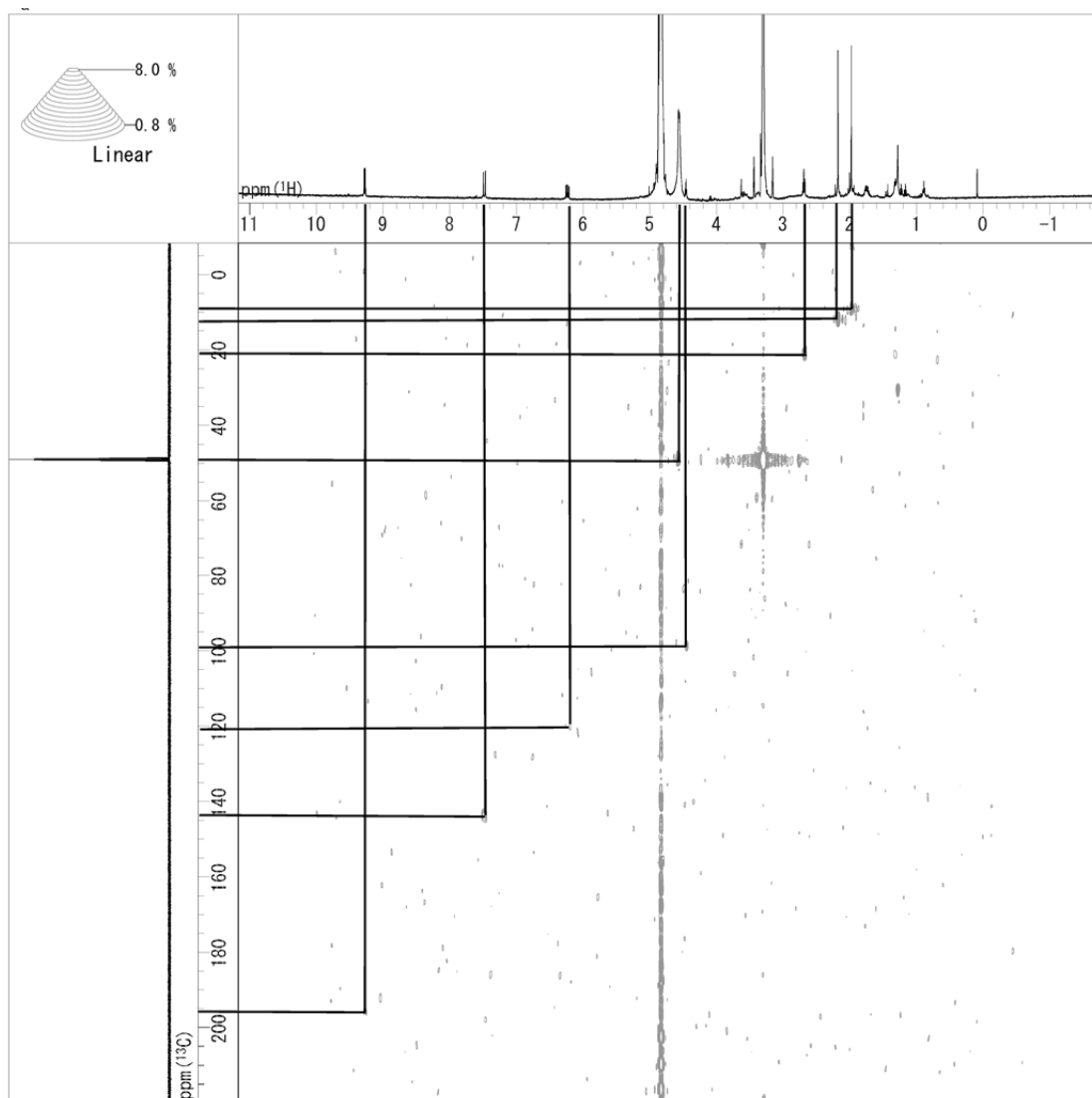


図 1-25 Pig390G の HMQC スペクトル

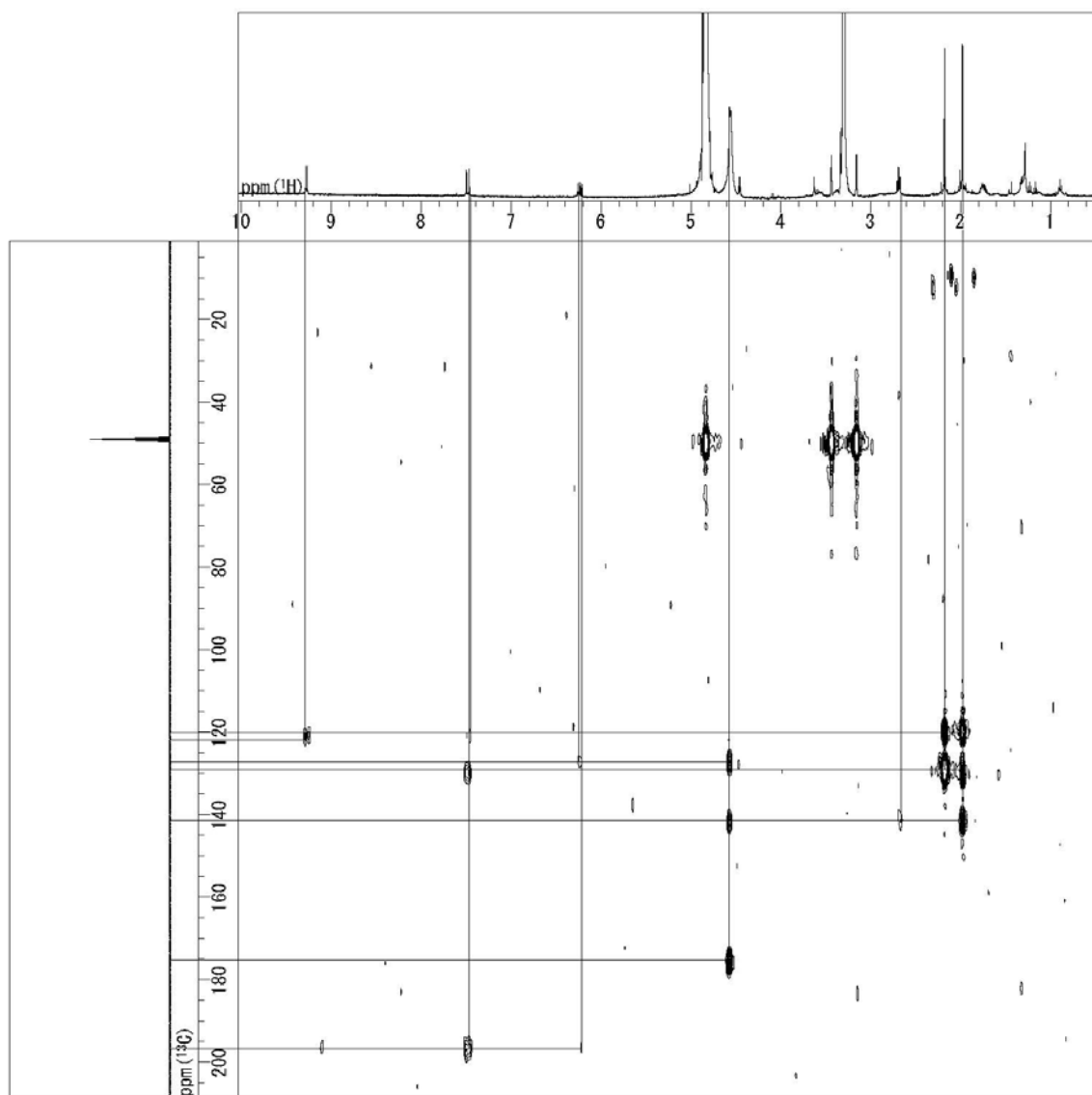
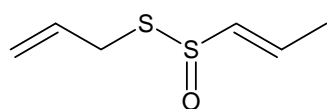


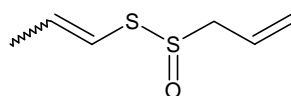
図 1-26 Pig390G の HMBC スペクトル

第 2 部 原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件とピューレの緑変

第 1 部では、ニンニクピューレ中の *in vitro* 条件における緑変前駆物質 2P1PTS 及び 1P2PTS の同定に成功した。第 2 部では、ニンニクピューレ製造における原料鱗茎の原因成分と緑変現象との関係について言及する。本検討は、実際のピューレ製造過程における問題を特定し、解決に向けた情報を提供すると期待した。



2P1PTS



1P2PTS

ニンニクピューレ製造過程における緑変について、1986 年に Lukes は、原料となるニンニク鱗茎の貯蔵(保管)温度が要因であると報告している (表 2-1)³⁾。

表 2-1 Lukes が報告したニンニク鱗茎の貯蔵条件とピューレ色 ³⁾

| 品 種 | 貯蔵温度 (℃) | 貯蔵日数 | | |
|---------------|-------------|------|-----|------|
| | | 0 | 18 | 32 |
| カリフォルニア 早生 | 3 | 乳白色 | 淡緑色 | 濃青緑色 |
| | 12 | 乳白色 | 淡緑色 | 青緑色 |
| | 23 | 乳白色 | 乳白色 | 乳白色 |
| | 28 | 乳白色 | 乳白色 | 乳白色 |
| カリフォルニア 晩生 | 3 | 淡緑色 | 淡緑色 | 濃青緑色 |
| | 12 | 淡緑色 | 淡緑色 | 青緑色 |
| | 23 | 淡緑色 | 乳白色 | 乳白色 |
| | 28 | 淡緑色 | 乳白色 | 乳白色 |

また、2005 年に Bai らは、中国の伝統食品である緑色ニンニク酢漬け(“Laba garlic”)を作る際の原料鱗茎の低温貯蔵の必要性を報告した⁶⁾。さらに 2008 年 Li らは、緑変に γ -glutamyl transpeptidase (GGTase, EC 2.3.2.2)が関与しており、ニンニク鱗茎を 4℃付近で保存した場合、酵素反応によりピューレの緑変が観測されるが、35℃貯蔵では酵素活性の低下が原因で緑変が軽減されると報告している³⁰⁾。これらは有用な知見であるが、ニンニクピューレの緑変問題を解決するには情報が不十分であった。筆者は以上の背景を踏まえ、筆者自身のこれまでの情報に基づき、本検討を開始した。

一方、著者の研究と並行して、ニンニク成分の生理活性を検討した以下の 2 つの報告がなされた。ニンニクの貯蔵温度と成分の動態に関して、1991 年に Lawson らは、4℃貯蔵によって鱗茎中の *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-alkyl-L-cysteine (Glu-SAC)が減少し、調製したピューレ中の 2P1PTS や 1P2PTS 等が増加することを報告した (図 2-1)³¹⁾。また 2006 年に Ichikawa ら³²⁾は、鱗片の 4℃貯蔵で鱗片内の Glu-SAC が減少し *S*-alkyl-L-cysteine *S*-oxide(SACSO)が増加すること、及び 25℃と 35℃貯蔵の鱗片中で isoalliin が 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid *S*-oxide (cycloalliin)³³⁾に変化することを報告した (図 2-2)。筆者も独立して、青森県内の関連産業の優位性確保の観点からニンニク成分の健康機能³⁴⁻³⁹⁾に注目して研究を行い、cycloalliin 含有量増加などの成果を得て 2002 年に特許出願している⁴⁰⁾。

Lawson らや Ichikawa らの報告では緑変現象に関する言及はなされていないが、第 1 部で述べた筆者のこれまでの研究成果から、緑変現象に大いに関係すると考えられる。すなわち、4℃で貯蔵した原料鱗茎のピューレの緑変は進行し、25 及び 35℃で貯蔵した原

料鱗茎のピューレは緑変が軽減されるはずである。

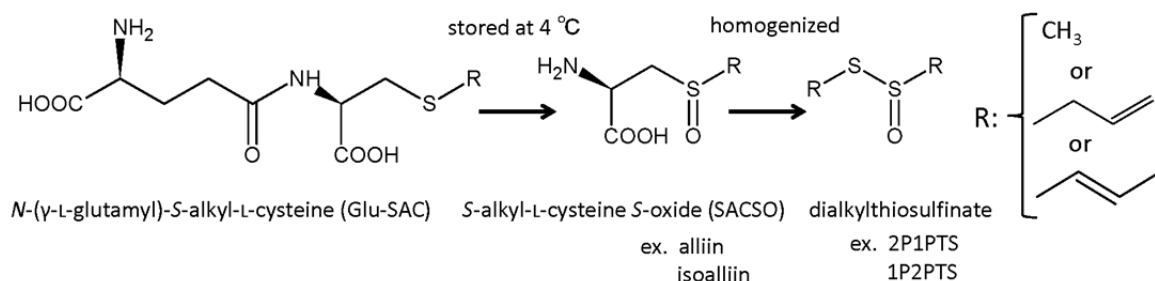


図 2-1 Lawson らが報告したニンニク鱗茎の低温貯蔵に伴う代謝とホモジナイズによる酵素反応³¹⁾

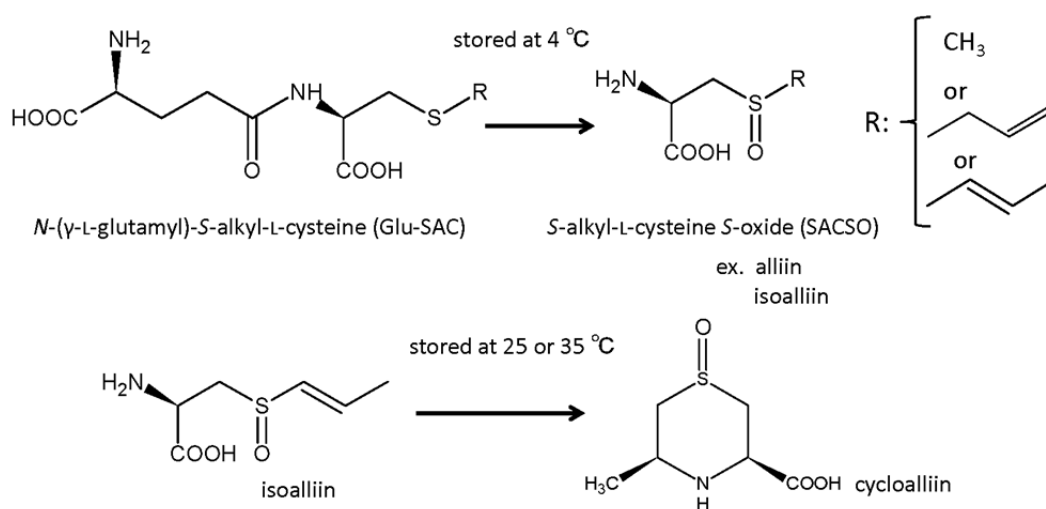


図 2-2 Ichikawa らが報告したニンニク鱗茎の低温貯蔵に伴う代謝(上)と加温による反応促進(下)³²⁾

以下に、筆者が行った検討について述べる。著者は前述した緑変前駆物質の同定と並行して、緑変に関するクレームが毎年晩秋頃に出始めることなどから原料鱗茎の保管温度と緑変の関係に着目し、

原料鱗茎の貯蔵条件と加工食品の緑変に関する研究を開始した。

本貯蔵実験では、原料鱗茎の貯蔵条件と鱗茎中の成分変化、ピューレにした場合の緑変程度の関係について詳細な検討を行った。

第 1 章 実験結果

1 ニンニク鱗茎の緑変関連成分評価法の構築

(1) 緑変関連成分評価法の開発

貯蔵実験を開始するにあたって、緑変に関連する成分とその評価方法について検討した。

ピューレ中の緑変前駆物質 2P1PTS 及び 1P2PTS は、揮発性で且つ非常に不安定であることが知られており²³⁾、正確な定量分析はできない。そこで、第 1 部で明らかにしたこれら揮発性物質の前駆物質 alliin と isoalliin に着目した。これら前駆物質は不揮発性であり、比較的安定であることはこれまでの研究から明らかである。また、迅速な測定を目的に、alliin や isoalliin をはじめとする *S*-alkyl-L-cysteine 誘導体(図 2-3)を分析する HPLC 法を確立した^{41, 42)}。

HPLC 条件を種々検討した結果、陽イオン交換カラムに Capcell Pak SCX UG (Shiseido 社、4.6 φ × 250 mm)を用い、移動相を 10 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液 (pH = 2.50)とし、UV210nm の吸収を用いることで、一度の分析でほぼすべての関連物質を分離分析可能であることを確認した(図 2-4)。本分析法は、既存の *S*-alkyl-L-cysteine 関連物質分析法^{43, 44)}と比較して、再現性が低いとされる isoalliin も効率的に分析可能である。

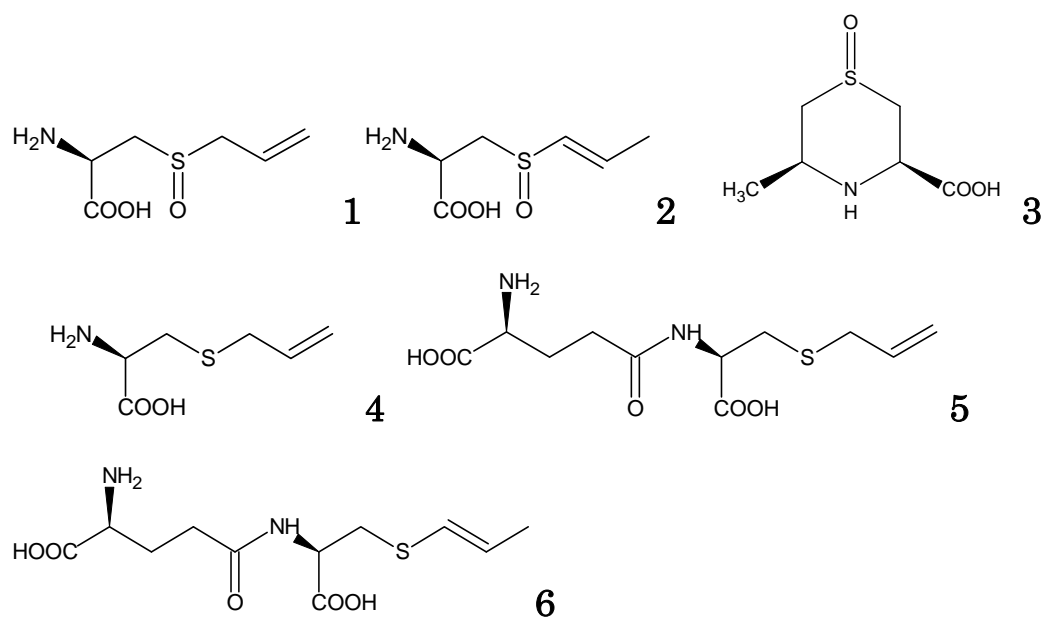


図 2-3 *S*-alkyl-L-cysteine 誘導体の化学構造及び略号

- 1: *S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (alliin),
- 2: *S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (isoalliin),
- 3: 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid *S*-oxide (cycloalliin),
- 4: *S*-(2-propenyl)-L-cysteine (*S*-allyl-L-cysteine, deoxyalliin),
- 5: *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(2-propenyl)-L-cysteine (Glu-ALC),
- 6: *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC).

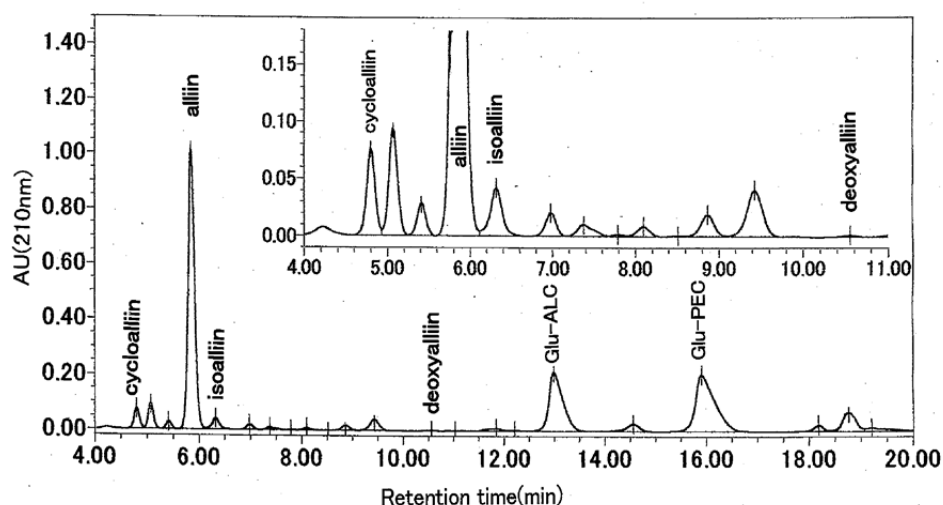


図 2-4 ニンニク試料の HPLC クロマトグラム

各ピークの化合物名及び構造式は図 2-3 に記載。

HPLC 条件：カラム：Capcell Pak SCX UG (4.6 φ × 250 mm)、移動相：10 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液 (pH = 2.50) 流速 1.0 mL/min、検出 UV210nm。

(2) ニンニク 鱗茎中の緑変関連成分含有量

次に、開発した HPLC 分析法で休眠期にあるニンニク鱗片中の alliin と isoalliin の含有量を評価した(表 2-2)⁴¹⁾。実験に用いたニンニク 11 品種の isoalliin の平均含有量は乾燥鱗片 100 g あたり 0.13 g と、alliin の平均含有量 2.62 g に比較して約 1/20 で、両成分の含有量に大きな差が認められた。予備実験から alliin の場合、品種ごとの含有量の変化は小さく、また緑変化の頻度から、その量が重要な要因とは考えにくい。一方 isoalliin の場合、その品種ごとに含有量が大きく変化することから、ピューレの緑変程度に影響を与えている可能性が高いと考え、主に isoalliin の動態に注目し以後の実験を進めた。

表 2-2 ニンニクの品種別 alliin と isoalliin の含有量

| 品種名 | 鱗片中含有量 (g /100g 乾重量) | |
|----------|-------------------------|-----------|
| | alliin | isoalliin |
| 福地ホワイト | 2.77 | 0.14 |
| 岩木在来 | 2.48 | 0.14 |
| 壱州早生 | 2.41 | 0.09 |
| 佐賀在来 | 3.41 | 0.23 |
| (中国 山東省) | 2.16 | 0.08 |
| (中国 貴州省) | 2.43 | 0.07 |
| (中国 広州) | 3.71 | 0.15 |
| (中国 上海) | 3.71 | 0.09 |
| アメリカ | 1.84 | 0.20 |
| 加州晩生 | 2.05 | 0.11 |
| 加州早生 | 1.85 | 0.12 |
| 平均値 | 2.62 | 0.13 |

実験材料は、青森県グリーンバイオセンターで 1999 年に収穫された休眠期にある鱗茎。品種名不明の中国由来の材料は、()内に種子採取地を記載した。分析は、本文記載の分析法で実施した。

(3) タマネギ鱗茎中の緑変関連成分の含有量

ニンニクピューレとタマネギピューレを混合すると緑変することを序論で述べた。次に、本現象について先に確立した分析法により検討した。市販のニンニク鱗茎とタマネギ鱗茎を分析した結果、ニンニクに関しては、前述の分析結果と同様 isoalliin が alliin に対して極少量しか含まれていなかった。一方、タマネギには isoalliin は豊富に含まれていたが、alliin は検出できなかった(表 2-3)⁴²⁾。緑変の起こりやすさと、isoalliin 量には正の相関があることが明らかになり、ニンニクとタマネギの混合によるピューレの緑変現象は、タマネギに含有される isoalliin が要因となっている可能性が高い。

表 2-3 市販ニンニクとタマネギ中の alliin と isoalliin の含有量

| 試料名 | 可食部中含有量 (g /100g 乾重量) | |
|---------|--------------------------|-----------|
| | alliin | isoalliin |
| ニンニク 鱗片 | 2.17 | 0.13 |
| タマネギ 鱗茎 | 0 | 2.11 |

実験材料は、2005年から2006年にかけて青森県内小売店で購入した。ニンニクは時期を変えて購入した3材料の平均値、タマネギは同4材料の平均値で示した。

2 ニンニク鱗茎に与える低温貯蔵効果

(1) ピューレの緑変程度

ニンニク鱗茎保存時の温度と緑変との関係を次に検討した。実験は 3℃と 25℃の 2 温度条件を設定し、休眠期のニンニク鱗茎を上記温度で貯蔵し、2 週ごとに鱗茎 10 個分の鱗片の半分をピューレ化し、残り半分は凍結乾燥粉末化し酸性条件で抽出して先の方法で HPLC 分析した。また、25℃で貯蔵開始後 2 週目と 4 週目に貯蔵温度を 3℃に変更する条件も検討した。

貯蔵条件による変色程度評価用のピューレは、第 1 部と同様に調製した。ピューレの変色程度は、ピューレ遠心上清の 590 nm における吸光度で評価した。検液の濁度の影響を補正するため、590 nm の吸光度から濁度のみの影響を受けている 800 nm の吸光度を差し引いた数値(ΔABS_{590})を緑変の指標とした。

各貯蔵条件に置かれたニンニク鱗茎から経時的に調製したピューレの緑変程度の推移を図 2-5 に示した。25℃で貯蔵した原料鱗茎のピューレは、貯蔵開始から 10 週目までは貯蔵開始時のピューレ($\Delta\text{ABS}_{590} = 0.01$)とほぼ同等の乳白色を示した ($\Delta\text{ABS}_{590} \leq 0.01$)。しかし、14 週目から緑変はしないものの、徐々に褐変が認められるようになった(18 週目、 $\Delta\text{ABS}_{590} = 0.20$)。

一方、3℃貯蔵の原料鱗茎のピューレは、貯蔵開始後 4 週目の鱗茎を材料としたものから緑変が観察されるようになった。以後、3℃での貯蔵期間が長くなるほど、緑変の程度は大きくなった(18 週目、 $\Delta\text{ABS}_{590} = 0.83$)。

また、貯蔵実験途中で貯蔵温度を 25℃から 3℃に変更した原料鱗茎のピューレは、貯蔵温度変更後 4 週目の鱗茎を材料としたものか

ら緑変が観察されるようになった。以後、3℃での貯蔵期間が長くなるほど、緑変の程度は大きくなった。この貯蔵温度を 25℃から 3℃に変更する処理は、貯蔵実験開始後 2、4 週目の 2 回実施し、2 回とも貯蔵温度変更後の傾向は同一で、再現性が認められた。

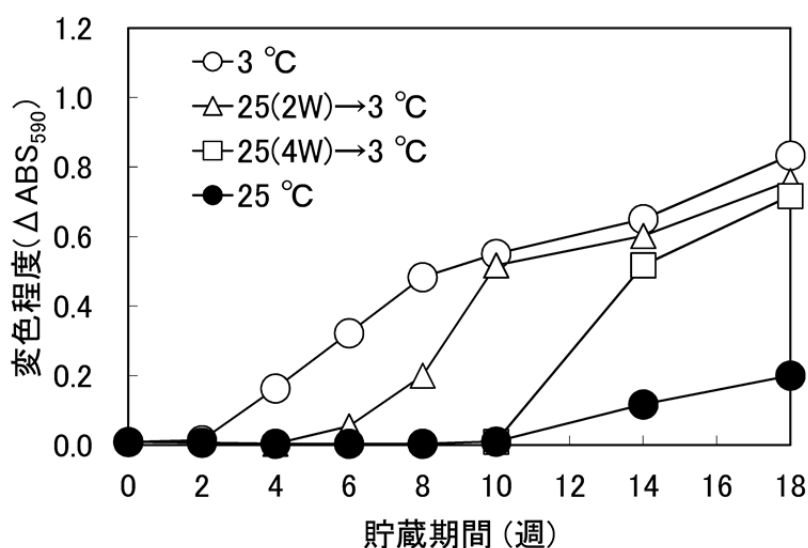


図 2-5 原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件とピューレの変色程度

貯蔵条件：

3℃ : 終始 3℃ 貯蔵

25(2W)→3℃ : 2 週間 25℃ 貯蔵後 3℃ で貯蔵

25(4W)→3℃ : 4 週間 25℃ 貯蔵後 3℃ で貯蔵

25℃ : 終始 25℃ 貯蔵

ΔABS₅₉₀：ピューレ遠心上清の 590 nm と 800 nm での吸光度差。

同一材料を使用し同時に実験を開始した 10℃と 20℃で貯蔵した原料鱗茎について、4 週目と 8 週目にピューレ緑変を検討した結果を表 2-4 に示した。予想通り、10℃貯蔵では 4 週目で 590 nm の吸収が増大し、緑変を確認した。一方、20℃で貯蔵した場合、貯蔵 4 週目では 590 nm の吸収は実験開始時とほぼ同程度であり、貯蔵 8 週目でわずかながら吸収の増大が確認できた。このことから、ピュ

ーレ緑変の有無に係る原料鱗茎の貯蔵温度の閾値が 20℃程度と推定した。

表 2-4 原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件とピューレの変色

| 貯蔵温度 (℃) | 貯蔵期間 (週) | 上清吸光度 (ΔABS_{590}) |
|-------------|-------------|---------------------------------------|
| 貯蔵開始時 | | 0.01 |
| 10℃ | 4 | 0.34 |
| | 8 | 0.35 |
| 20℃ | 4 | 0.03 |
| | 8 | 0.07 |

ΔABS_{590} : ピューレ遠心上清の 590 nm と 800 nm での吸光度差。

さらに、25℃で貯蔵を開始し、しばらくして貯蔵温度を 3℃に下げた場合、低温貯蔵に移行した時期に相応して 590 nm の吸光度が増加している。以上の結果は、鱗茎を低温貯蔵すると緑変の度合いが大きくなることを示している。本結果は Lukes の報告と類似しているが、鱗茎の貯蔵温度と緑変の関係を定量的に議論した初めての例である。

また本実験から、ピューレ原料となるニンニク鱗茎は 20℃以上で貯蔵することで緑変を防ぐことができることを明らかにした。

(2) 鱗茎内成分変化

次に、貯蔵条件と鱗茎中の isoalliin の関係について検討した。結果を図 2-6 に示した。25℃貯蔵した鱗茎では、18 週間の貯蔵期間中、isoalliin 含有量に変化は認められなかった(0.07 → 0.08 g/100g 鱗片乾重量、以下単位を g/100gDW と略記)。一方、3℃貯蔵した鱗茎では、isoalliin 含有量が貯蔵開始時の 0.07 g/100gDW か

ら 18 週目で、10 倍以上の 0.94 g/100gDW と顕著に増加した。また、貯蔵温度を 25℃ から 3℃ へ変更する処理によって、2 回とも isoalliin 含有量が増加した。

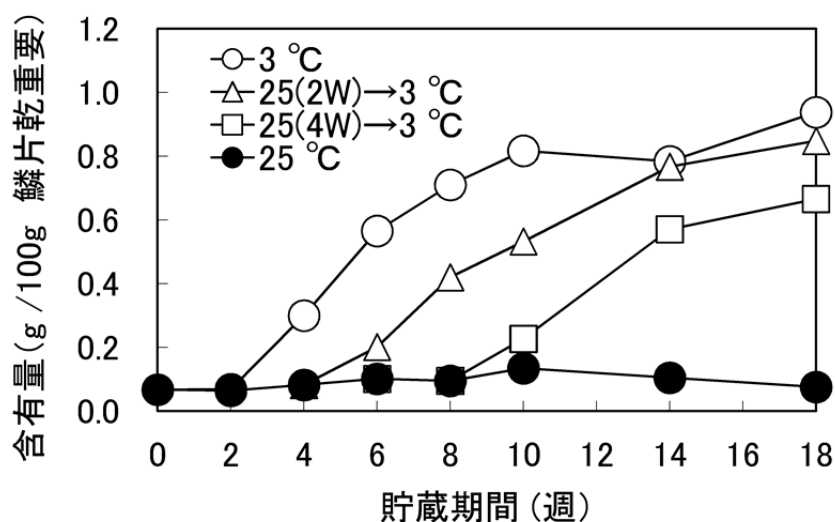


図 2-6 原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件と鱗茎中の isoalliin 含有量

貯蔵条件の凡例の内訳は、図 2-5 と同様。

原料鱗茎中の isoalliin 含有量と調製したピューレの緑変程度 (ΔABS_{590}) の間には、高い相関 ($r = 0.977$, $n = 8$ (処理開始時含む), $p < 0.01$, 図 2-7) が認められた。

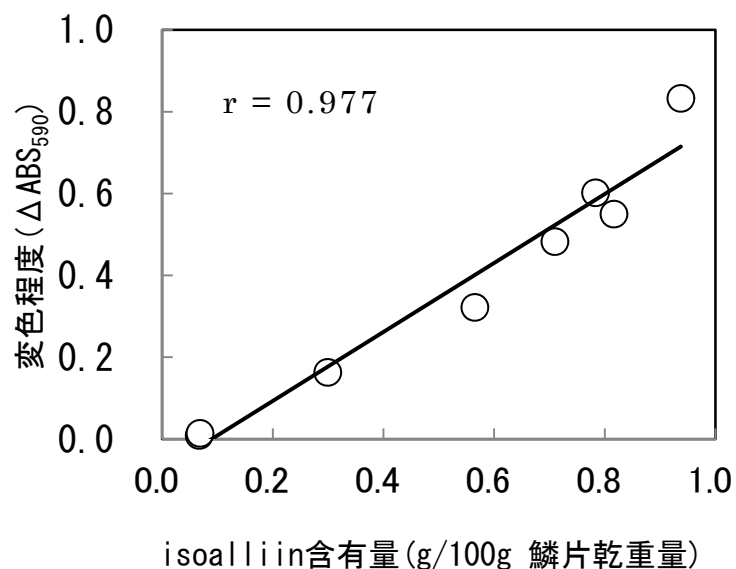


図 2-7 原料ニンニク鱗茎 isoalliin 含有量とピューレ変色との相関

ΔABS_{590} : ピューレ遠心上清の 590 nm と 800 nm での吸光度差。

以上、実験を行った温度の範囲では、ニンニク鱗茎の貯蔵温度と isoalliin 含有量、及び貯蔵温度と緑変には負の相関があり、また isoalliin 含有量とその鱗茎から調製したピューレの緑変程度には正の相関がみられることが判明した。したがって、鱗茎を低温で貯蔵すると、緑変の原因となる isoalliin が蓄積されたと結論した。

isoalliin は、休眠期には *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC)^{45, 46)}として存在することが知られている。鱗茎の貯蔵期間と Glu-PEC との関係を分析した結果を図 2-8 に示した。25℃貯蔵した鱗茎で Glu-PEC は、処理開始時から 18 週目で 20%ほど減少した。一方、3℃貯蔵した場合、同一の期間で 80%ほどと著しく減少した。また、貯蔵温度を 25℃から 3℃に変更する処理を行った場合も、低温条件に移行後に、Glu-PEC の減少が開始した。

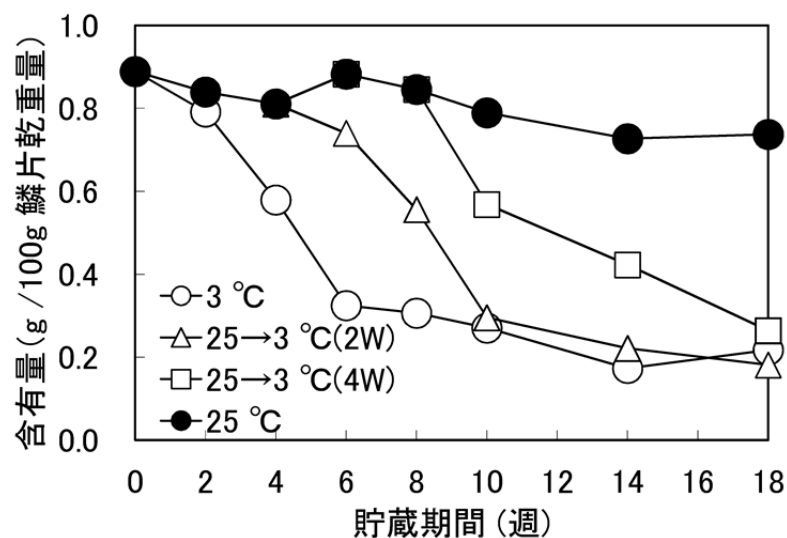


図 2-8 原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件と鱗茎中の Glu-PEC 含有量

貯蔵条件の凡例の内訳は、図 2-5 と同様。

以上の実験結果、特に貯蔵温度を途中で 25℃ から 3℃ の条件に変更する実験により、原料鱗茎が低温を感受して Glu-PEC → isoalliin 代謝が促進され isoalliin が蓄積することが明らかとなった。また、原料鱗茎中の isoalliin 含有量は、ピューレの緑変程度と高い相関を示すことが確認され、isoalliin を成分指標とする妥当性を確認した。

3 ピューレが緑変するニンニク鱗茎に与える加温処理効果

(1) ピューレの緑変程度

前節では、鱗茎を低温で貯蔵した場合の緑変について議論した。次に、加工後ピューレの緑変の低減について、加工前鱗茎への加温が与える効果をさらに詳細に検討した。

ピューレの変色程度は、色彩色差計を用いて、ピューレ表面色の色差値(CIE-1976 スケール)で評価した⁴⁷⁾。

色差値(ΔE^*ab)は、以下のように定義されている。

- ・ 比較ピューレの表面色測定値 (L^*_0, a^*_0, b^*_0)
- ・ 測定対象ピューレの表面色測定値 (L^*, a^*, b^*) の場合

$$\Delta E^*ab = ((L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2)^{1/2}.$$

なお、アメリカ国家標準局 (NBS) 指標によれば、色差値(ΔE^*ab)と視覚との関係は次のとおり⁴⁷⁾：

$\Delta E^*ab = 0-0.5$ (trace, 微かに異なる),
0.5-1.5 (slight, 僅かに異なる),
1.5-3.0 (noticeable, 感知し得るほど異なる),
3.0-6.0 (appreciable, 目立つほど異なる),
6.0-12.0 (much, 大きく異なる),
12.0- (very much, 別の色調).

実験は、あらかじめ 3℃で 12 週間貯蔵(前貯蔵)してピューレが緑変するニンニク鱗茎を複数の温度でさらに 2 週間貯蔵(後貯蔵)し、1

週目と2週目にピューレに調製した。得られたピューレは、透明なラミネート袋に入れ80℃で30分間加熱して、呈色を安定させるため25℃で24時間放置した後に、色素色差計を用い袋の外側からピューレの色度を測定、所定の式に従って ΔE^*ab を算出した(表2-5)。

まず、前貯蔵を25℃で12週間行い直ちにピューレ加工した場合、 $(L^*, a^*, b^*) = (71.4, -4.3, +4.4)$ とほとんど着色がみられなかった。このピューレを、基準色のピューレとした。

一方、3℃で12週間貯蔵したニンニク鱗茎をピューレ加工した場合、写真5(右上)のように濃緑色に変色する。この時のピューレ色は、 $(L^*, a^*, b^*) = (46.5, -14.8, -4.6)$ で ΔE^*ab 値は28.5と明らかな緑色を示した。



写真5 原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件(温度・期間)とピューレの変色

各ピューレのラベルは、原料ニンニク鱗茎について、**0 Week**：貯蔵開始時；**3°C(12W)**：3℃で12週間貯蔵；**25°C(12W)**：25℃で12週間貯蔵したものであることを示す。

次に前貯蔵を 3℃で 12 週間行った後、後貯蔵を 1 週間とした場合、3℃では後貯蔵をしなかった場合と同程度に緑変した($\Delta E^*ab = 28.4$)。後貯蔵を 25℃、30℃、35℃、40℃とした場合、温度と緑変には明らかな負の相関がみられ(それぞれ $\Delta E^*ab = 27.4$ 、21.4、10.8、5.9)、これまでの実験と矛盾しない結果が得られた(写真 6)。後貯蔵を 45℃とした場合、緑変はほとんど起こらないことが明らかになった($\Delta E^*ab = 4.8$)。



写真 6 12 週間低温貯蔵後に加温処理（後貯蔵 1 週間）した原料ニンニク鱗茎で調製したピューレ色

各ピューレのラベルは、原料ニンニク鱗茎について、**3℃(12W)**: 3℃で 12 週間貯蔵（加温処理開始時）；**3→○○℃(1W)**: 3℃で 12 週間貯蔵後に○○℃で 1 週間加温処理（後貯蔵）したものであることを示す。



写真 7 12 週間低温貯蔵後に加温処理（後貯蔵 2 週間）した原料ニンニク鱗茎で調製したピューレ色

各ピューレのラベルの記号は写真 6 と同様、ただし 2W は加温処理期間が 2 週間であることを示す。

同様に後貯蔵期間を 2 週間として実験を行った。その結果、45℃・後貯蔵 1 週間と比べ 5℃低温で緑変がほぼ抑えられた（写真 7、 $\Delta E^*ab = 3.7$ ）。しかし後貯蔵を 45℃とした場合、いわゆる褐変が観測された。

以上の実験結果から、調製したピューレが緑変する原料鱗茎であっても、後貯蔵を 35℃以上で 2 週間ほど行うことにより、緑変がほぼ抑えることが明らかになった。また、40℃を超える後貯蔵ではピューレが褐変することも同時に判明した。

表 2-5 原料ニンニク鱗茎の後貯蔵条件と加工したピューレ色

| 後貯蔵条件 | | ピューレ色 | | | |
|-------------------------|-----------|--------------------|-------|-------|-------------------|
| 温度 (°C) | 期間 (週) | 表面色 (CIE-1976 表色系) | | | |
| | | L^* | a^* | b^* | ΔE^*_{ab} |
| 後貯蔵開始時 | | 46.5 | -14.8 | -4.6 | 28.5 |
| 3 | 1 | 46.0 | -14.9 | -3.5 | 28.4 |
| | 2 | 44.2 | -14.0 | -5.2 | 30.1 |
| 25 | 1 | 47.2 | -15.4 | -1.9 | 27.4 |
| | 2 | 52.7 | -15.5 | +1.2 | 22.0 |
| 30 | 1 | 53.4 | -15.0 | +0.0 | 21.4 |
| | 2 | 61.3 | -12.8 | +5.1 | 13.3 |
| 35 | 1 | 62.9 | -11.0 | +5.3 | 10.8 |
| | 2 | 69.6 | -5.7 | +7.4 | 3.7 |
| 40 | 1 | 67.3 | -7.5 | +7.2 | 5.9 |
| | 2 | 70.3 | -4.6 | +6.6 | 2.4 |
| 45 | 1 | 67.8 | -4.2 | +7.6 | 4.8 |
| | 2 | 60.5 | -2.7 | +15.5 | 15.6 |
| 比 較 (25 °C, 12 週間貯蔵) | | 71.4 | -4.3 | +4.4 | reference |

後貯蔵は、前貯蔵として 3°C で 12 週間貯蔵した鱗茎を実験材料とした。
 $\Delta E^*_{ab} = ((L^* - L^*_{\text{ref}})^2 + (a^* - a^*_{\text{ref}})^2 + (b^* - b^*_{\text{ref}})^2)^{1/2}$; ref = reference.

(2) 鱗茎内成分変化

原料鱗茎を 3℃で前貯蔵した後、35℃で後貯蔵した場合の成分変化を図 2-9 に示した。前貯蔵期間は、鱗茎中の isoalliin 含有量が貯蔵開始時から 12 週で 6 倍に増加 [0.14 → 0.82 (g/100gDW)] し、Glu-PEC は反対に 40%に減少 [0.77 → 0.33 (g/100gDW)] した。また、この前貯蔵期間では cycloalliin 含有量に顕著な変化は認められなかった。これらの低温に対する成分変化の傾向は、前節の実験結果とほぼ同じである。

35℃で行った後貯蔵では、成分の著しい変化が観測された。isoalliin は減少し 4 週後には 1/14 にまで減少した[0.82 → 0.06 (g/100gDW)]。一方、cycloalliin は増大し、4 週後に約 4 倍となった [0.21 → 0.83 (g/100gDW)]。

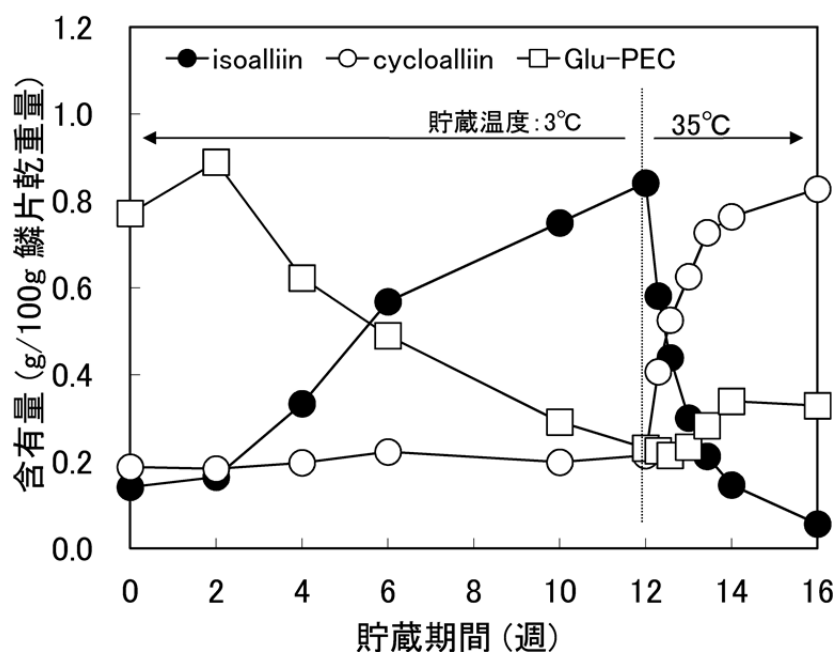


図 2-9 原料ニンニク鱗茎の貯蔵（処理）条件と成分変化

化合物名及び構造式は、図 2-3 に記載。

さらに、後貯蔵温度、期間を変えて実験を行った。結果を表 2-6 にまとめた。後貯蔵温度が高いほど、また期間は長いほど isoalliin 含有量は減少し、cycloalliin 含有量は増加することが判明した。

表 2-6 原料ニンニク鱗茎の後貯蔵条件と成分含有量

| 後貯蔵条件 | | 成分含有量 (g/100g 鱗片乾重量) | | | | | |
|-----------|-----------|----------------------|----------------|------------------|------------------|-------------|-------------|
| 温度 (℃) | 期間 (週) | alliin | iso- alliin | cyclo- alliin | deoxy- alliin | Glu- ALC | Glu- PEC |
| 後貯蔵開始時 | | 3.00 | 0.82 | 0.26 | 0.03 | 0.40 | 0.33 |
| 3 | 1 | 2.49 | 0.79 | 0.20 | 0.02 | 0.18 | 0.22 |
| | 2 | 2.71 | 0.81 | 0.21 | 0.03 | 0.22 | 0.24 |
| 25 | 1 | 2.62 | 0.69 | 0.36 | 0.00 | 0.18 | 0.21 |
| | 2 | 2.60 | 0.51 | 0.49 | 0.01 | 0.17 | 0.20 |
| 30 | 1 | 2.49 | 0.48 | 0.45 | 0.01 | 0.18 | 0.23 |
| | 2 | 2.38 | 0.33 | 0.59 | 0.02 | 0.21 | 0.22 |
| 35 | 1 | 2.78 | 0.30 | 0.63 | 0.02 | 0.23 | 0.23 |
| | 2 | 2.80 | 0.15 | 0.76 | 0.02 | 0.34 | 0.34 |
| 40 | 1 | 2.93 | 0.20 | 0.69 | 0.02 | 0.34 | 0.30 |
| | 2 | 2.81 | 0.10 | 0.85 | 0.03 | 0.36 | 0.36 |
| 45 | 1 | 2.66 | 0.07 | 0.86 | 0.26 | 0.23 | 0.27 |
| | 2 | 1.24 | 0.02 | 0.96 | 0.72 | 0.30 | 0.33 |

後貯蔵は、前貯蔵として 3℃で 12 週間貯蔵した鱗茎を処理した。
化合物名及び構造式は、図 2-3 に記載。

後貯蔵による isoalliin と cycloalliin 以外の成分変化については、45℃加温処理において deoxyalliin⁴⁸⁾の増加が認められ、後貯蔵 1 週間より 2 週間で蓄積がより顕著となった。また alliin に関しては、40℃以下の処理では加温の影響は小さかったが、45℃・2 週間後貯蔵において顕著な減少が認められた。

以上のように、後貯蔵を室温以上の温度で行うと、原料鱗茎中で isoalliin から cycloalliin への反応が促進されることを実験的に証明した。

(3) 鱗茎の加温処理と鱗茎品質

後貯蔵による鱗茎の品質変化を、鱗片表面の変色程度及び鱗茎重量の減少程度で検討した(表 2-7、写真 8)。



写真 8 12 週間低温貯蔵後に後貯蔵 (2 週間) した原料ニンニク鱗茎の鱗片色

各鱗片のラベルは、**0W** : 3℃で 12 週間貯蔵 (後貯蔵開始時) ;
3→○○℃(2W) : 3℃・12 週間貯蔵後に○○℃で 2 週間後貯蔵した鱗茎のものであることを示す。

後貯蔵を実施した鱗片の表面色は、25～40℃後貯蔵の鱗片では、後貯蔵開始時(基準)に対し、2 週間でも軽微な変色 ($\Delta E^*_{ab} < 1.8$) しか認められなかった。一方、45℃後貯蔵では、1 週間で僅かな褐変が認められ、2 週間では極端に変色 (褐変) が進行した ($\Delta E^*_{ab} = 16.7$)。

また、後貯蔵による鱗茎の重量は、25～40℃後貯蔵では 2 週間で 4～7%の重量減であった。一方、45℃後貯蔵では 1 週間で 16%、2 週間で 22%の重量減と、45℃後貯蔵では 25～40℃後貯蔵に対し処理 1 週間でも減量程度が大きかった。

表 2-7 原料ニンニク鱗茎の後貯蔵条件と鱗茎品質

| 後貯蔵条件 | | 貯蔵後の鱗茎品質 | | | | 鱗茎重量 (%) |
|-----------|-----------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|-------------|
| 温度 (℃) | 期間 (週) | りん片表面色 (CIE-1976 表色系) | | | | |
| | | <i>L</i> [*] | <i>a</i> [*] | <i>b</i> [*] | ΔE^*ab | |
| 後貯蔵開始時 | | 85.2 | -3.1 | +18.1 | reference | 100 |
| 25 | 1 | 85.4 | -3.6 | +19.3 | 1.4 | 97 |
| | 2 | 85.9 | -3.2 | +18.2 | 0.7 | 96 |
| 30 | 1 | 85.0 | -3.6 | +19.2 | 1.2 | 97 |
| | 2 | 86.4 | -3.3 | +18.1 | 1.2 | 96 |
| 35 | 1 | 85.7 | -3.5 | +19.0 | 1.1 | 96 |
| | 2 | 85.4 | -3.5 | +19.9 | 1.8 | 94 |
| 40 | 1 | 85.2 | -3.3 | +19.4 | 1.3 | 95 |
| | 2 | 85.6 | -3.3 | +19.6 | 1.5 | 93 |
| 45 | 1 | 85.0 | -2.1 | +20.0 | 2.1 | 84 |
| | 2 | 76.6 | +1.3 | +31.7 | 16.7 | 78 |

後貯蔵は、前貯蔵として 3℃で 12 週間貯蔵した鱗茎を処理した。
 $\Delta E^*_{ab} = ((L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2)^{1/2}$;
 鱗茎重量(%)は、後貯蔵前の重量に対する後貯蔵後の重量比。

以上の実験結果から、鱗片表面色及び鱗茎の重量減でみた後貯蔵後鱗茎の外部品質は、40℃・2 週間以下の条件であればほぼ後貯蔵前の状態を保持するが、45℃後貯蔵での上限期間は 1 週間で、2 週間では外部品質が極不良になることが判明した。

第 2 章 考 察

第 2 部では、原料鱗茎の貯蔵条件とピューレの緑変程度の関係について鱗茎中の関連成分を含めて検討した。これにより、原料鱗茎に起因する緑変の原因と予防方法、及びピューレの緑変程度を軽減する原料鱗茎の処理方法を明らかにした。

ニンニクピューレの緑変程度は、原料鱗茎の貯蔵条件に影響を受けていた。貯蔵条件を 25℃ から 3℃ へ変更する処理により再現性良くピューレが緑変することを確認し、原料鱗茎の低温貯蔵がピューレ緑変の原因と結論した。また、緑変に係る原料鱗茎の貯蔵温度の閾値については、20℃ 程度と推定している。このことから同時に、ニンニク加工食品の緑変対策としては、20℃ 以上で原料鱗茎を貯蔵(保存)することが予防法になると言える。25℃ 貯蔵の場合、緑変を予防できる期間は 10 週間程度である。

ピューレが緑変する低温貯蔵中の原料鱗茎内の成分変化は、Glu-PEC の減少と isoalliin の増加が顕著であった。この成分変化については、ニンニク鱗茎が低温により萌芽を開始することにより⁴⁹⁾、Glu-PEC → isoalliin 代謝が開始され、以後、isoalliin が蓄積したと考えている(図 2-10)。これは、Glu-PEC → isoalliin 代謝に関与する GGTase の酵素活性が 4℃ で高いとする報告³⁰⁾と矛盾しない。また、今回の実験では室温以上で 1 週間ほど後貯蔵した場合に緑変が低減したが、室温以上での後貯蔵により、不安定な isoallin は非酵素的に反応して cycloallin に変化したと考えると合理的である。

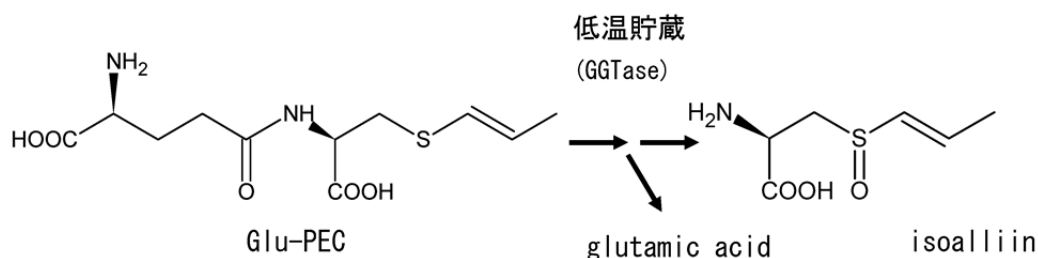


図 2-10 原料ニンニクの低温貯蔵による成分変化

第 1 部で記述したように、緑変にはピュール中の緑変前駆物質 2P1PTS と 1P2PTS の鱗茎中の前駆体である alliin と isoalliin の 2 成分が関与する。著者は研究の初期に休眠期の鱗茎中の isoalliin 含有量は、alliin に比較して約 1/20 と極少量であることを明らかにしている⁴¹⁾。また、Imai ら¹⁵⁾、Cho ら²⁹⁾も筆者の研究とは独立して isoalliin 量が alliin に比べ少ないことを報告している。

以上のことから、緑変には alliin と isoalliin が関与するが、存在量の少ない isoalliin が緑変化速度に寄与し、低温貯蔵で GGTase 活性が高まり isoalliin 生成は促進され、また低温下では不安定な isoalliin も分解せず、緑変が顕著になったと考えることができる。室温以上で後貯蔵をした場合、isoalliin は緑変化に不活性な cycloalliin に変化するため、ピュールの緑変が抑えられたと考えることができる。

序論でニンニクピュールとタマネギピュールを混合すると緑変化する現象について言及したが、今回の実験から、主にタマネギに含まれる isoalliin が原因で、ニンニク中に多く存在する alliin と反応して緑変が起きたと考えることができ、合理的であるといえる。

次に、加工食品が緑変する原料ニンニク鱗茎の緑変対策について

検討した。緑変対策としては、製造時にシステインなどの添加物で緑変を軽減する方法も報告されている^{5, 50)}。しかし、食品添加物には使用制限があるため無添加で緑変を抑えられれば理想的である。今回の研究により、ピューレに加工する前に室温以上で鱗茎を一定期間貯蔵することにより--緑変に必須な成分である isoalliin が緑変に関与しない cycloalliin に変化するため--緑変を低減させることができる^{と結論した(図 2-11)}。この isoalliin → cycloalliin 反応は通常の化学反応であることから⁵¹⁾、より高温での反応促進によって効率的な緑変軽減処理が可能であった。しかし 40℃を超える温度での貯蔵は褐変が生じるため好ましくないことも今回の実験で明らかにした。緑変を軽減させる鱗茎の好適貯蔵条件は、40℃で 2 週間であった。

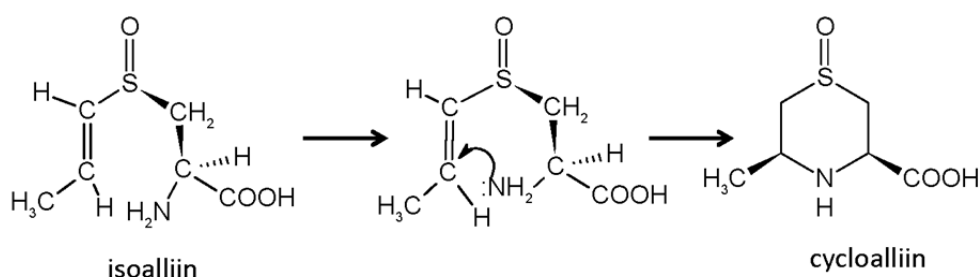


図 2-11 原料ニンニクの加温処理による成分変化

鱗茎の加温処理による緑変軽減法の二次的効果として、isoalliin から変換された cycloalliin の蓄積があげられる。この cycloalliin には、健康上好ましくない報告はなく、むしろ血栓防止効果や中性脂肪低下効果があると報告されている^{34, 35)}。このことから、緑変対策としての鱗茎の加温処理は、同時にニンニク及びその加工食品の付加価値を高めると考えることができる³⁶⁾。

さらに、鱗茎を 45℃で処理した場合、ピューレは褐変化し商品価

値は低下する。しかし、このような条件では肝細胞保護効果、大腸ガンの予防効果、抗酸化作用等の報告³⁸⁾がある deoxyalliin (*S*-allyl-L-cysteine)が鱗茎内で顕著に増加する新規の現象を見出した。従来の deoxyalliin 製法はニンニク鱗茎の *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(2-propenyl)-L-cysteine (Glu-ALC)の加水分解によるものだが⁵²⁾、今回の加温処理による deoxyalliin 蓄積については、Glu-ALC とは起源が異なるもので、更なる検討が必要と考えている。この 45℃での後貯蔵は、緑変防止の視点からは過度の条件である。しかし、有用性が期待される deoxyalliin の含有量が増大することは、今後のニンニクの産業利用上の一つの選択肢と考えることができる。

以上のとおり、主に緑変関連成分 isoalliin の消長とその反応機構から、ニンニク加工食品緑変の原因の解明と対策の設定ができた。加えて、加工食品の緑変程度を低減する原料鱗茎の処理は、処理後のニンニク鱗茎及びその加工食品の付加価値を高めることを明らかにした。本研究成果は、第 1 部に記述したものも含め、ニンニクの生産、流通、加工等の産業に非常に有益であるとともに食品化学や作物生理学等の分野で学術的にも貢献するものと考えている。

第 3 章 実験の部

1 実験材料と実験装置

(1) 実験材料

実験材料のニンニク（福地ホワイト）鱗茎は、休眠期の材料を 2 回に分けて入手した（A: 1999 年、B: 2001 年に同一栽培農家より購入）。材料 A 及び B を主に、ピューレの緑変解析、鱗茎中成分評価に使用した。これら材料は、同一品種であり大きさなどにも大きな違いはなく、材料の違いが実験結果を左右することはないと考えている。

また、品種別成分などの解析には、青森県グリーンバイオセンター 1999 年産の休眠期にある 11 種類のニンニクを使用した。alliin と isoalliin 含有量の検討に使用したニンニク及びタマネギは、2005 年、2006 年の異なる時期に青森県内小売店から購入した。

分析用の *S*-alkyl-L-cysteine 誘導体(図 2-3)は、文献を参考に^{31, 53-55)}ニンニク鱗茎、タマネギ鱗茎、ニラ(*Allium tuberosum* Rotter)種子より単離し、標品として用いた(付図)。

(2) 実験装置

吸光度は、日立社 U-2001 分光光度計で測定した。色相分析は、ミノルタ社 CR300 色彩色差計で測定した。HPLC 装置は、第 1 部で使用したのと同じ装置を使用した。

2 ニンニク 鱗茎の貯蔵実験

(1) ニンニク 鱗茎の低温貯蔵

材料 A を 3℃ 及び 25℃ で貯蔵を開始した。25℃ で貯蔵を開始した鱗茎の一部を貯蔵実験開始から 2 週目と 4 週目の 2 回、3℃ の恒温室へ移動した。各温度下に置いた鱗茎を、経時的に約 10 個抜き取り鱗片とし、十分混合して、半量をピューレの変色程度評価実験、残りを成分分析に供した。

参考実験として、本実験と同時に 10℃ の恒温庫と 20℃ の空調室でも同一材料の一部を貯蔵し、時々経過を調査した。

(2) ニンニク 鱗茎の加温処理

材料 B を 3℃ の恒温室及び 25℃ の恒温器で貯蔵し、3℃ で貯蔵中の鱗茎の一部を貯蔵開始から 12 週目に 25, 30, 35, 40, 45℃ の恒温器に移動した。3℃ 貯蔵と同時に 25℃ で貯蔵を開始した鱗茎を比較試料とした。貯蔵実験当初から各温度条件に静置した鱗茎は、経時的に約 8 個を抜き取り鱗片とし、上記低温貯蔵実験と同様に、半量をピューレ変色評価、残りを成分分析に供した。加えて、加温処理した鱗茎については、鱗茎重量及び鱗片表面色の測定も実施した。

(3) ピューレ及び鱗片の変色評価

緑変程度評価用ピューレは、鱗片に同重量の 2%クエン酸水溶液を加え、ブレンダーで 5 分間ホモジナイズして調製した。200 g を透明なラミネート袋に入れ封をし、80℃・30 分加熱後、冷却した。

25℃の恒温室に1日放置した後、ピューレの変色程度を、遠心上清(5,000 rpm、30 分間)の 590 nm での吸光度で評価した。検液の濁りの影響を 800 nm での吸光度で補正した。また、袋に色彩色差計の検出部を密着させて反射光を 5 か所測定し、平均値を CIE-1976 表色系(L^*, a^*, b^*)で表した。

鱗片の表面色は、鱗片10個に色彩色差計の検出部を密着させて反射光を測定し、平均値を上記ピューレと同様に表した。

(4) ニンニク鱗茎中の *S*-alkyl-L-cysteine 誘導体含有量評価

① HPLC 用標準液の調製

各種 *S*-alkyl-L-cysteine 誘導体のメタノール水溶液を調製し(20.0 mg/10.0 mL)それぞれ 1.00 mL ずつを混合し、陽イオン交換樹脂カートリッジ (Varian 社、Bond Elute SCX Jr) に吸着させ、その後、100 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液(9.5 mL, pH 4.0)で溶出した。水を加えて 10.0 mL として HPLC 用標準液とした。本標準液は-75℃で保存し、用時室温に戻して使用した。

② HPLC 用試料液の調製

ニンニク鱗片を-20℃に凍結後、凍結状態のままスライスし、その後凍結乾燥した。凍結乾燥後ただちにフードブレンダーで試料粉末とし、分析時まで-35℃で保存した。試料粉末 500 mg を 25.0 mL のメタノール・水・ギ酸 混合液(50:50:1)に懸濁させ、超音波照射の下 60 分間抽出後、ろ過により粗抽出液を得た。粗抽出液から 5.0 mL を採取し、上記と同じ陽イオン交換樹脂カートリッジに注入し、前述の方法で HPLC 用試料液を調製、直ちに使用した。

③ HPLC 分析

標準液（5.00～100 μL ）を用い 210 nm の吸収を用いて検量線を作成した。次に、各試料液 50.0 μL を HPLC により分析した。分析は、標準液、試料液とも 3 回分析しその平均値を使用した。また、試料中の水分含量は、別途、粉末試料を 105℃で 15 時間乾燥させてその減少重量から算出した。本実験での精度は相対標準誤差 3%以内であることを確認した。

第 3 部 総 括

本論文では、ニンニク (*Allium sativum* L.) 加工時にしばしば問題となる、加工した食品が緑色に変色する緑変現象についてその機構解明と対策設定に関する研究結果を記述した。

第 1 部では、ニンニクピューレから緑変に関与する成分(緑変前駆物質)を単離・同定した。次に、緑変前駆物質を用いて緑変を再現し、緑変色素の構成、及びうち 1 つの新規色素の構造を明らかにした。

まず、ニンニクピューレ遠心上清中にアミノ酸と反応し呈色する物質の存在を確認し、グリシンとの呈色アッセイにより緑変前駆物質を探索した。その結果、緑変前駆物質として、ピューレ中に存在既知の含硫化合物である

**2-propenyl *E*-1-propenethiosulfinate (2P1PTS) 及び
E/Z-1-propenyl 2-propenethiosulfinate (1P2PTS)**

の 2 種のアリルジスルフィド類縁体を単離した。このことから同時に、原料ニンニク鱗茎中の緑変原因成分が

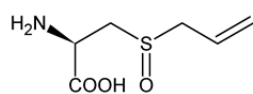
**S-(2-propenyl)-L-cysteine S-oxide (alliin) 及び
S-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine S-oxide (isoalliin)**

の 2 種の *S*-propenyl-L-cysteine *S*-oxide であること、ピューレ化時に作用する緑変原因酵素が

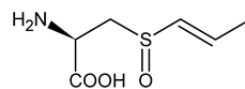
alliinase (EC 4.4.1.4)

であることも明確となった。

原料ニンニク中



alliin



isoalliin

ニンニクピューレ中

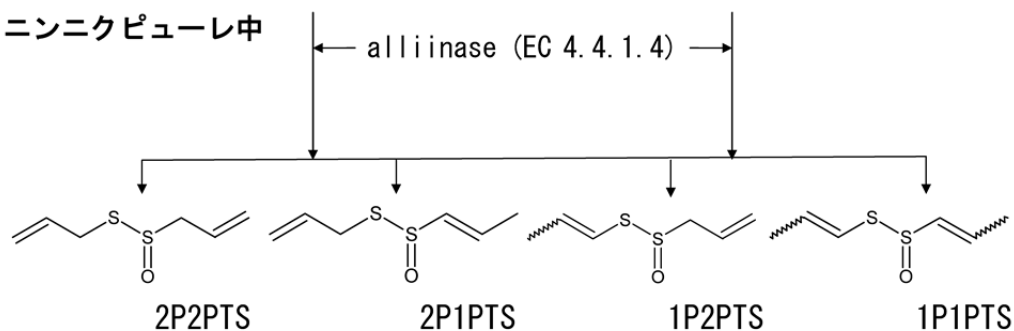
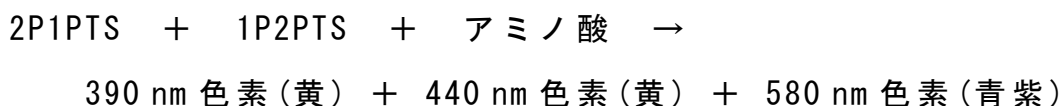


図 3-1 ニンニク加工処理による緑変前駆物質の生成反応

すなわち、ニンニクピューレ緑変の発現機構は、鱗茎をピューレに加工する際の組織破碎により、図 3-1 に示す反応で、4 種のアリルジスルフィド類縁体が生成し、この反応で生じた 2P1PTS と 1P2PTS がさらにピューレ中のアミノ酸と反応し、ニンニクピューレが緑変するものと判明した。

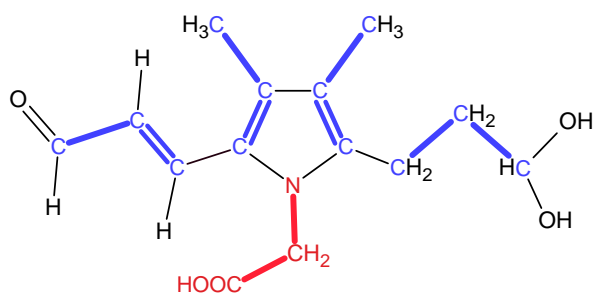
緑変前駆物質 2P1PTS、1P2PTS のグリシンと反応した際の緑変程度については、(2P1PTS 半量 + 1P2PTS 半量) > 2P1PTS > 1P2PTS と 2P1PTS、1P2PTS に相乗効果が認められた。

次に、ピューレ中の含有比に基づく 2P1PTS、1P2PTS 同量とグリシンの 3 化合物で緑変を再現した。得られた粗色素から 388 nm (黄、Pig390G)、442 nm (黄) 及び 584 nm (青紫) に極大吸収を示す個別の 3 色素を単離することに成功した。すなわち、ピューレ中の緑変反応は：



であることが示された。

このうち新規の黄色素 Pig390G の化学構造が、次の



{2-(3,3-dihydroxypropyl)-3,4-dimethyl-5-[(1*E*)-3-oxoprop-1-enyl]-1*H*-pyrrol-1-yl}acetic acid

であることを明らかにした。この構造は、2P1PTS 及び 1P2PTS 由来の 4 個の C3 ユニットとグリシンを骨格としていた。

第2部では、原料ニンニク鱗茎の貯蔵条件と調製したピューレの緑変程度、及び鱗茎中の成分動態について詳細に検討し、原料鱗茎に起因する緑変原因の解明と対策の設定を行った。

まず、新規の HPLC 分析法を確立し、休眠ニンニク鱗茎中の緑変原因成分の存在比が $\text{alliin} : \text{isolliin} \approx 20 : 1$ と isoalliin が極少量で、第1部の結果も踏まえ、 isoalliin が鱗茎中の緑変の支配成分であることを確認した。

次に、鱗茎の貯蔵実験で常温域の 25°C から 3°C への温度変更によってピューレの緑変と鱗茎中の isoalliin 蓄積が同時に開始することから、

低温下に置かれた鱗茎を原料としたピューレが緑変する

ことを明確にした。同時に実施した実験で、緑変の有無に係る鱗茎の貯蔵温度の閾値は 20°C 程度と推定した。ピューレの緑変対策としては、

原料鱗茎を 25°C 程度の条件で貯蔵(保存)することが予防法

であることも示した。この原料鱗茎の 25°C 貯蔵によるピューレの緑変を予防できる期間については、10 週間程度であった。

また、鱗茎の低温貯蔵による isoalliin の蓄積には、 N -(γ -L-glutamyl)- S -(E -1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC)の減少を伴っていることを確認した。このことから、原料鱗茎の低温貯蔵によるピューレの緑変は、低温条件に置かれた鱗茎が萌芽を開始し、 $\text{Glu-PEC} \rightarrow \text{isoalliin}$ の代謝が進行したためであることを明確にした(図 3-3)。

さらに、加工すればピューレが緑変する原料鱗茎であっても、

鱈茎の加温貯蔵によりピューレの緑変程度が軽減する

ことを確認した。このピューレの緑変軽減は、緑変原因成分 isoalliin から緑変に関与しない成分 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid *S*-oxide (cycloalliin) への化学反応の促進によるものであった (図 3-2)。

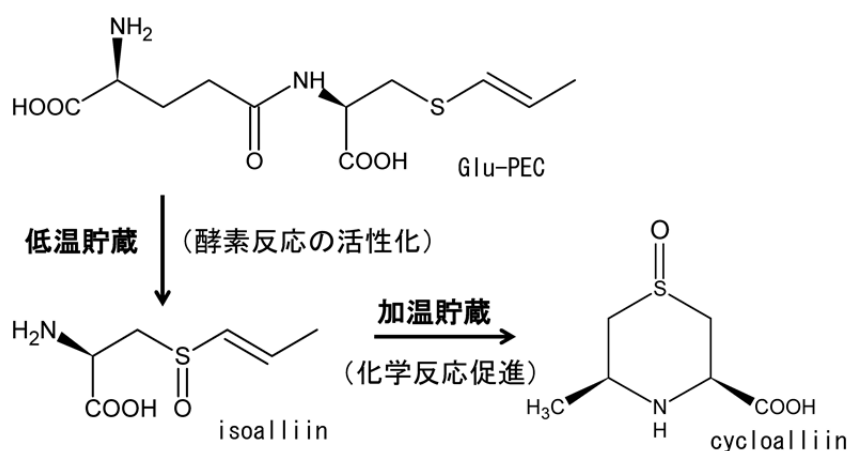


図 3-2 ニンニク鱈茎の貯蔵条件と成分変化

ピューレの緑変程度が軽減する原料鱈茎の加温条件については、より高温の方が効果は高かったが、ピューレの変色程度(褐変程度)及び鱈茎の外部品質から、40℃・2週間が好適条件と判断した。

以上、ニンニクピューレを材料として実験を実施したが、実験結果はピクルスなどの他のニンニク加工食品にも適合することは明らかである。従って、ニンニク加工食品の緑変対策として、

○原料鱈茎に対する加工食品の緑変予防法：

暖かい条件での鱈茎の貯蔵 (25℃で 10 週間の効果確認済み)

○加工食品の緑変程度を軽減する原料鱈茎の回復処理：

鱈茎の加温貯蔵 (好適条件：40℃で 2 週間)

と設定した。

鱗茎の加温貯蔵による緑変軽減法の二次的効果として、isoalliin から変換された cycloalliin の蓄積があげられる。この cycloalliin には、血栓防止効果や中性脂肪低下効果があると報告されている。このことから、

緑変対策の加温貯蔵は、同時にニンニクの付加価値を高める

ことが判明した。さらに 45℃ 処理で deoxyalliin (*S*-2-propenyl-L-cysteine) の顕著な蓄積を新規に見出した。deoxyalliin は、肝細胞保護効果、大腸ガンの予防効果等の報告がある医薬品の有効成分である。処理後の鱗茎及び加工食品に品質低下が認められるが、cycloalliin に加え deoxyalliin の生理活性も付与されるため、鱗茎の 45℃ 加温貯蔵は、産業利用上の一つの選択肢といえる。

文 献

- 1) Joslyn, M. A. and Sano, T. (1956). The formation and decomposition of green pigment in crushed garlic tissue. *Food Res.*, **21**, 170-183.
- 2) Yamaguchi, M., Shannon, S., Haward, F. D. and Joslyn, M. A. (1965). Factors affecting the formation of a pink pigment in purees of onion. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, **86**, 475-483.
- 3) Lukes, T. M. (1986). Factors governing the greening of garlic puree. *J. Food Sci.*, **51**, 1577&1582.
- 4) Rejano, L., Sanchez, A. H., Castro, A. D. and Montano, A. (1997). Chemical characteristics and storage stability of pickled garlic prepared using different processes. *J. Food Sci.*, **8**, 1120-1123.
- 5) Bae, R. N. and Lee, S. K. (1990). Factors affecting greening and its control methods in chopped garlic. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.*, **31**, 358-362.
- 6) Bai, B., Chen, F., Wang, Z., Liao, X., Zhao, G. and Hu, X. (2005). Mechanism of the greening color formatin of “Laba” garlic, a traditional homemade Chinese food product. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 7103-7107.
- 7) Block, E. (2010). Garlic and other alliums: The lore and the science; The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp. 100-223.
- 8) Kim, W. J., Cho, J. S. and Kim, K. H. (1999). Stabilization of ground garlic color by cysteine, ascorbic acid, trisodium

- phosphate and sodium metabisulfite. *J. Food Quality*, **22**, 681-691.
- 9) Hong .S.-I.,and Kim D.-M.(2001). Storage quality of chopped garlic as influenced by organic acids and high-pressure treatment. *J. Sci. Food Agric.*, **81**, 397-403.
 - 10) Schwimmer, S. (1981). Color change induced by enzyme action on nonphenolic substances in plant food, part V. in “*Source Book of Food Enzymology*.”AVI Publishing, Westport, CT, 1981, pp.298-314.
 - 11) Fenwick, G. R. and Hanlyen, A. B. (1985). The genus *Allium*. Part 2. In “Critical Reviews in *Food Science and Nutrition*”, ed. By Furia, T. E., vol. **22**, CRC Press, Bca Raton, FL., pp. 273-377. (Part 1. pp 227-233)
 - 12) Yamazaki, Y., Yamamoto, T., and Okuno T. (2012). Causes and remedies for green discoloration of processed garlic puree: Effects of storage conditions on ingredient bulbs. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 187-193.
 - 13) Shannon, S., Yamaguchi, M. and Howard, F. D. (1967). Reactions involved in formation of a pink pigment in onion purees. *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 417-422.
 - 14) Shannon, S., Yamaguchi, M. and Howard, F. D. (1967). Precursors involved in the formation of a pink pigment in onion purees. *J. Agric. Food Chem.*, **15**, 423-426.
 - 15) Imai, S., Akita, K., Tomotake, M., and Sawada, H. (2006). Model studies on precursor system generating blue pigment in onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 848-852.

- 16) Imai, S., Akita, K., Tomotake, M. and Sawada, H. (2006), Identification of two novel pigment precursors and a reddish-purple pigment involved in blue-green discoloration of onion and garlic. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 843-847.
- 17) Kubec, R., Hrbáčová, M., Musha, R. A. and Velíšek, J. (2004). *Allium* discoloration: precursors involved in onion pinking and garlic greening. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5089-5094.
- 18) Lee, E.-J., Cho, J. -E., Kim, J.-H and Lee, S. -K. (2007). Green pigment in crushed garlic (*Allium sativum* L.) cloves: Purification and partial characterization. *Food Chem.*, **101**, 1677-1686.
- 19) Stoll, A. and Seebeck, E. (1951). Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic. *Advan. Enzymol.*, **11**, 377-400.
- 20) Carson, J. F., Lundin, R. E. and Lukes, T. M. (1966). The configuration of (+)-*S*-(1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide from *Allium cepa*. *J. Org. Chem.*, **31**, 1634-1635.
- 21) Yamazaki, Y., Takada, T. and Okuno T. (2012). Isolation and identification of causal constituents of green discoloration from garlic puree. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 673-678.
- 22) Ueda, Y., Kawajiri, H., Miyamura, N. and Miyajima, R. (1991). Content of some sulfur-containing components and free amino acids in various strains of garlic. 日食工誌, **38**, 429-434.
- 23) Lawson, L. D., Wood, S. G. and Hughes, B. G. (1991). HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove

- homogenates. *Planta Med.*, **57**, 263-270.
- 24) Block, E., Naganathan, S., Putman, D. and Zhao, S. -H. (1992). *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsons), leek, scallion, shallot, elephant (great-headed) garlic, chive and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 2418-2430.
 - 25) Calvey, E. M., Matusik, J. E., White, K. D., DeOrazio, R., Sha, D. and Block, E. (1997). *Allium* chemistry: Supercritical fluid extraction and LC-APCI-MS of thiosulfinates and related compounds from homogenates of garlic, onion, and ramp. Identification in garlic and ramp and synthesis of 1-propanesulfinothioic acid *S*-allyl ester. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4406-4413.
 - 26) Yoshida, H., Katsuzaki, H., Ohta, R., Ishikawa, K., Fukuda, H., Fujino, T. and Suzuki, A. (1999), Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 591-594.
 - 27) Lawson, L. D. (1996). In: Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. ed. By Koch, H. P. and Lawson, L. D. Williams & Silkins: Baltimore. pp 37-108.
 - 28) Kubec, R. and Velíšek, J. (2007). *Allium* discoloration: the color-forming potential of individual thiosulfinates and amino Acids: structural requirements for the color-developing precursors. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 3491-3497.

- 29) Cho, J., Lee, J. E., Yoo, K. S., Lee, S. K. and Patil, S. B.
(2009). Identification of candidate amino acids involved in the formation of blue pigments in crushed garlic cloves (*Allium sativum* L.). *J. Food Sci.*, **75**, C11-C16.
- 30) Li, L., Hu, D., Jiang, Y., Chen, F., Hu, X. and Zhao, G. (2008). Relationship between γ -glutamyl transpeptidase activity and garlic greening, as controlled by temperature. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 941-945.
- 31) Lawson, L. D., Wang, Z. J. and Hughes, B. G. (1991). γ -Glutamyl-*S*-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp.: Precursors of age-dependent *trans*-1-propenyl thiosulfinates. *J. Nat. Prod.*, **54**, 436-444.
- 32) Ichikawa, M., Ide, N. and Ono, K. (2006). Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4849-4854.
- 33) Virtanen, A. I. and Spare, C. -G. (1961). Isolation of the precursor of the lachrymatory factor in onion (*Allium cepa*). *Soum. Kemistilehti*, **34**, 72.
- 34) Agarwal, R. K., Dewar, H. A., Newell, D. J. and Das, B. (1977). Controlled trial of the effect of cycloalliin on the fibrinolytic activity of venous blood. *Atherosclerosis*, **27**, 347-351.
- 35) Yanagita, T., Han, S. Y., Wang, Y. M., Tsuruta, Y. (2003). Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triglycerol in rats. *Nutrition*, **19**, 140-143.
- 36) Lawson, L. D., Garlic: A review of its medicinal effects and indicated active compounds. *ACS. Symp. Ser.*, **691**, 176-209

- (1998).
- 37) Agarwal, K. C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Med. Res. Rev.* **16**, 111-124.
 - 38) Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J. Nutr.*, **136**, 716S-725S.
 - 39) 山崎賀久, 奥野智旦(2008), ニンニク鱗茎の加温処理によるS-アリル-L-システイン蓄積量の増加, 食科工, **55**, 410-415.
 - 40) 山崎賀久, 加工ニンニク, およびその処理方法, 特開 2005-278635 (2005.10.13); 特許4070138号
 - 41) 山崎賀久, 徳永隆司, 奥野智旦(2005), ニンニク中のフレーバ前駆体; S-アルケニルシステイン誘導体, のHPLC分析, 食科工, **52**, 160-166
 - 42) Yamazaki, Y., Iwasaki, K., Mikami, M. and Yagihashi, A. (2011). Distribution of eleven flavor precursors, *S*-alk(en)yl-L-cysteine derivatives, in seven *Allium* vegetables. *Food Sci. Technol. Res.*, **17**, 55-62.
 - 43) Ziegler, S. J., and Sticher, O. (1989). HPLC of *S*-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in garlic including quantitative determination of (+)-*S*-allyl-L-cysteine sulfoxide (alliin). *Planta. Medica*, **55**, 372-378.
 - 44) Mütch-Eckner, M., Sticher, O. and Meier, B. (1992). Reversed-phase high-performance liquid chromatography of *S*-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in *Allium sativum* including the determination of (+)-*S*-allyl-L-cysteine sulphoxide, γ -L-glutamyl-*S*-allyl-L-cysteine and γ -L-glutamyl-*S*-(*trans*-1-propenyl)-L-cysteine. *J. Chromatography*, **625**, 183-190.

- 45) Lancaster, J. E. and Shaw, M. L. (1989). γ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of *S*-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavour precursors) in *Allium*. *Phytochemistry*, **28**, 455-460.
- 46) Matsuura, H., Inagaki, M., Maeshige, K., Ide, N., Kajimura, Y. and Itakura, Y. (1996). Changes in contents of γ -glutamyl peptides and fructan during growth of *Allium sativum*. *Planta Medica.*, **62**, 70-71.
- 47) ミノルタ株式会社, 色彩色差計 CR-300シリーズ 取扱説明書, 74-45.
- 48) Suzuki, T., Sugii, M., Kamimoto, T. and Tuboi, N. (1961). Isolation of (-)-*S*-allyl-L-cysteine from garlic. *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 251-252.
- 49) Volk, G. M., Rotindo, K. E. and Lyons, W. (2004). Low-temperature storage of garlic for spring planting. *HortScience*, **39**, 571-573.
- 50) Kim, W. J., Cho, J. S. and Kim, K. H. (1999). Stabilization of ground garlic color by cysteine, ascorbic acid, trisodium phosphate and sodium metabisulfite. *J. Food Quality*, **22**, 681-691.
- 51) Ueda, Y., Tsubuku, T. and Miyajima, R. (1994). Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 108-110.
- 52) Lawson, L. D. and Wang, Z. J. (1995). Changes in the organosulfur compounds released from garlic during aging in water, dilute ethanol, or dilute acetic acid. *J. Toxicology*, **14**, 214.

- 53) Ueda, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R. and Kimizuka, A. (1990). Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 163-169.
- 54) Mütch-Eckner, M., Meier, B., Wright, A. D., and Sticher, O. (1992). γ -Glutamyl peptides from *Allium sativum* bulbs. *Phytochemistry*, **31**, 2389-2391.
- 55) Mütch-Eckner, M., Erdelmeier, C. A. J., Sticher, O. and Reuter, H. D. (1993). A novel amino acid glycoside and three amino acids from *Allium sativum*. *J. of Nat. Prod.*, **56**, 864-869.

(全体を通じて参考とした邦文成書)

- i) 林孝三編, 「増訂 植物色素」, 養賢堂(東京), (1988)
- ii) 木村進, 中林敏郎, 加藤博通 編・著, 「食品の変色の化学」, 光琳(東京), (1995)
- iii) 齋藤洋監修, 「ニンニクの科学」, 第1版, 朝倉書店(東京), (2000).
- iv) 藤井正美監修, 「新版・食品天然色素」, 光琳(東京), (2001)

付 図

S-alkyl-L-cysteine 誘導体標品の ESIMS 及び ¹H NMR スペクトル

収録化合物一覧

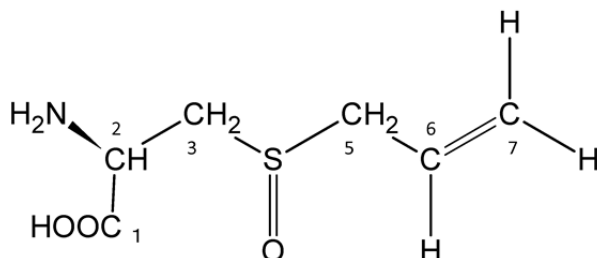
| No. | 略号 | 化合物名称 |
|-----|-------------|---|
| 1 | alliin | <i>S</i> -(2-propenyl)-L-cysteine <i>S</i> -oxide |
| 2 | isoalliin | <i>S</i> -(<i>E</i> -1-propenyl)-L-cysteine <i>S</i> -oxide |
| 3 | cycloalliin | 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid <i>S</i> -oxide |
| 4 | deoxyalliin | <i>S</i> -(2-propenyl)-L-cysteine |
| 5 | Glu-ALC | <i>N</i> -(γ -L-glutamyl)- <i>S</i> -(2-propenyl)-L-cysteine |
| 6 | Glu-PEC | <i>N</i> -(γ -L-glutamyl)- <i>S</i> -(<i>E</i> -1-propenyl)-L-cysteine |

測定装置：

質量分析スペクトル(MS)： API 300 (Applied Biosystems)

¹H 核磁気共鳴(NMR)スペクトル： JEOL α 400 (日本電子, 400 MHz, D₂O)
(重水の残留プロトンシグナルを 4.63 ppm の内部標準とした。)

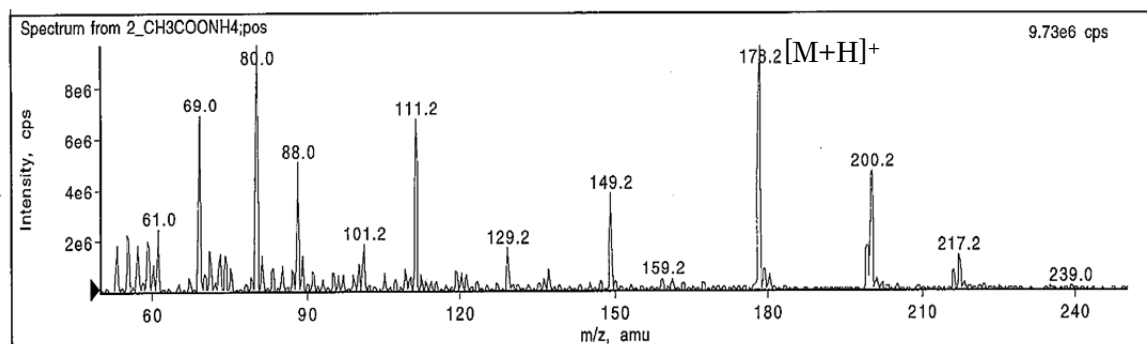
付図 1 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (alliin)



付図 1-1 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (alliin)の化学構造

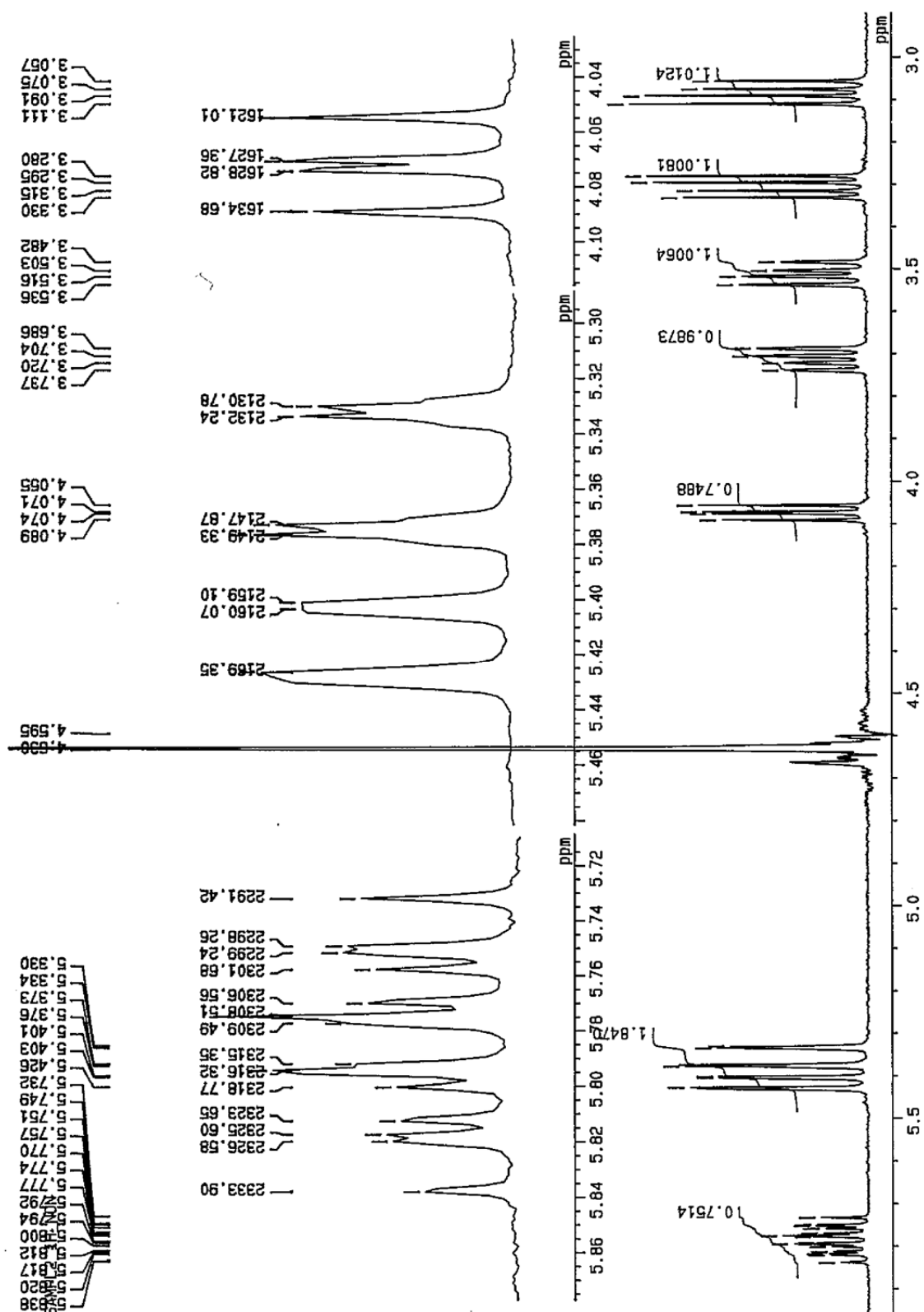
付図 1-2 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (alliin)の ESIMS 及び ^1H NMR
スペクトル帰属

| MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ | ^1H NMR | |
|---|------------------|--|
| 分子式 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) | 位置 | (400 MHz, D_2O , δ ppm) |
| 178.2 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{S}$ | 2 | 4.07 (dd, 1H, $J = 6.1, 7.6$ Hz) |
| | 3 | 3.08 (dd, 1H, $J = 7.6, 14.3$ Hz) |
| | | 3.30 (dd, 1H, $J = 6.1, 14.3$ Hz) |
| | 5 | 3.51 (dd, 1H, $J = 7.0, 13.4$ Hz) |
| | | 3.71 (dd, 1H, $J = 8.2, 13.4$ Hz) |
| | 6 | 5.78 (m, 1H) |
| | 7 | 5.35 (br d, 1H, $J = 17.1$ Hz, <i>trans</i>) |
| | | 5.41 (br d, 1H, $J = 9.8$ Hz, <i>cis</i>) |

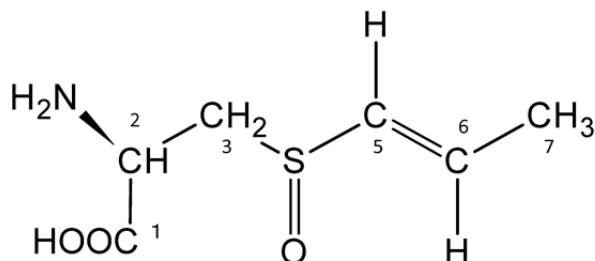


付図 1-3 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (alliin)の ESIMS スペクトル

付図 1-4 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (allin)の ^1H NMR スペクトル



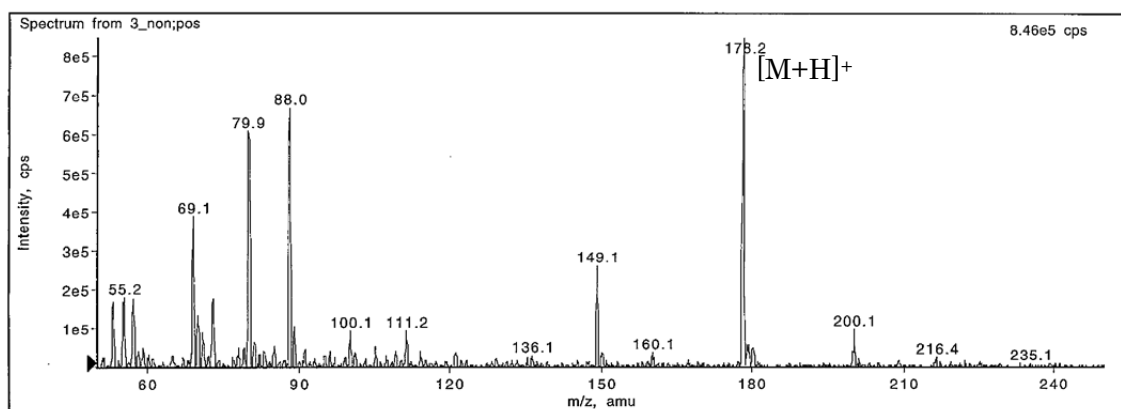
付図 2 *S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (isoalliin)



付図 2-1 *S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (isoalliin)の化学構造

付図 2-2 *S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (isoalliin)の ESIMS 及び ^1H NMR スペクトル帰属

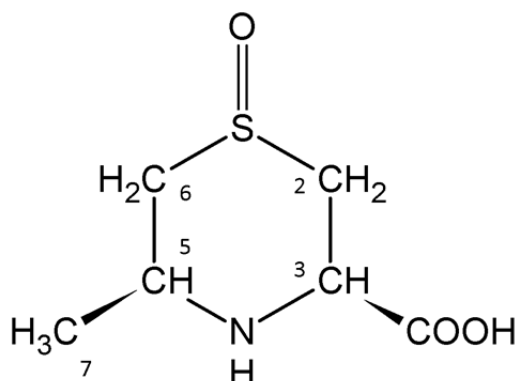
| MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ | ^1H NMR | |
|---|------------------|--|
| 分子式 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) | 位置 | (400 MHz, D_2O , δ ppm) |
| 178.2 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{S}$ | 2 | 4.22 (dd, 1H, $J = 5.9, 7.3$ Hz) |
| | 3 | 3.20 (dd, 1H, $J = 7.3, 14.6$ Hz) |
| | | 3.38 (dd, 1H, $J = 5.9, 14.6$ Hz) |
| | 5 | 6.40 (br d, 1H, $J = 15.1$ Hz) |
| | 6 | 6.59 (dq, 1H, $J = 6.8, 15.1$ Hz) |
| | 7 | 1.81 (br d, 1H, $J = 6.8$ Hz) |



付図 2-3 *S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine *S*-oxide (isoalliin)の ESIMS スペクトル

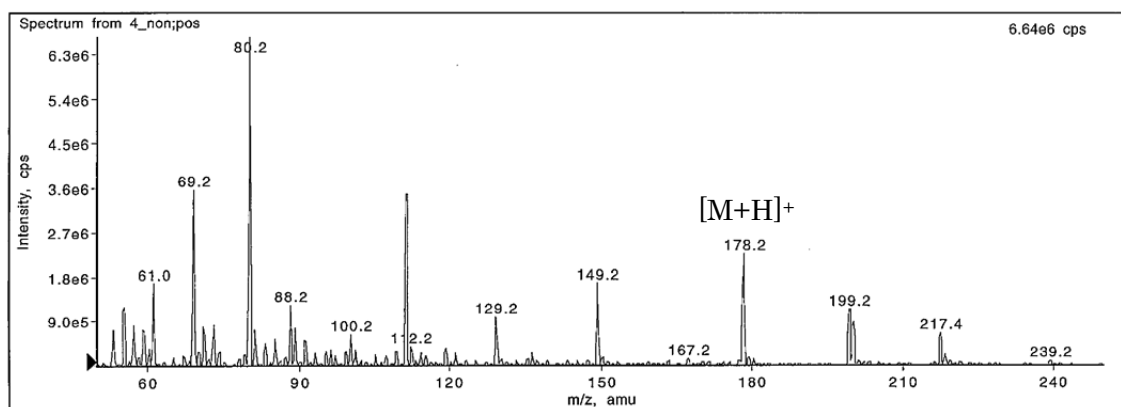


付図 3 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid *S*-oxide (cycloalliin)



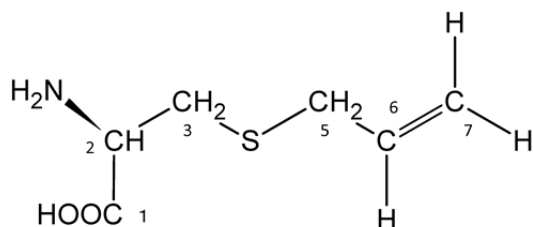
付図 3-2 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid *S*-oxide (cycloalliin) の ESIMS 及び ^1H NMR スペクトル帰属

| MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ | ^1H NMR | |
|---|------------------|--|
| 分子式 $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 位置 | (400 MHz, D_2O , δ ppm) |
| 178.2 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_3\text{S}$ | 2 | 2.74 (dd, 1H, $J = 12.7, 15.1$ Hz) 2.88 (dd, 1H, $J = 13.2, 15.1$ Hz) |
| | 3 | 4.19 (dd, 1H, $J = 12.7, 13.2$ Hz) |
| | 5 | 3.90 (m, 1H) |
| | 6 | 3.19 (dt, 1H, $J = 2.9, 15.6$ Hz) 3.44 (dt, 1H, $J = 2.9, 15.6$ Hz) |
| | 7 | 1.35 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz) |



付図 3-3 5-methylthiomorpholine-3-carboxylic acid *S*-oxide (cycloalliin) の ESIMS スペクトル

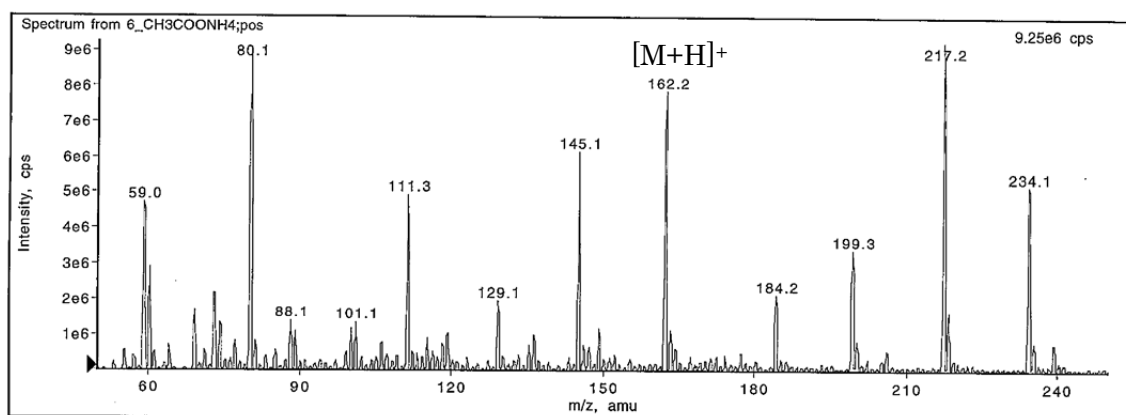
付図 4 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine (deoxyalliin)



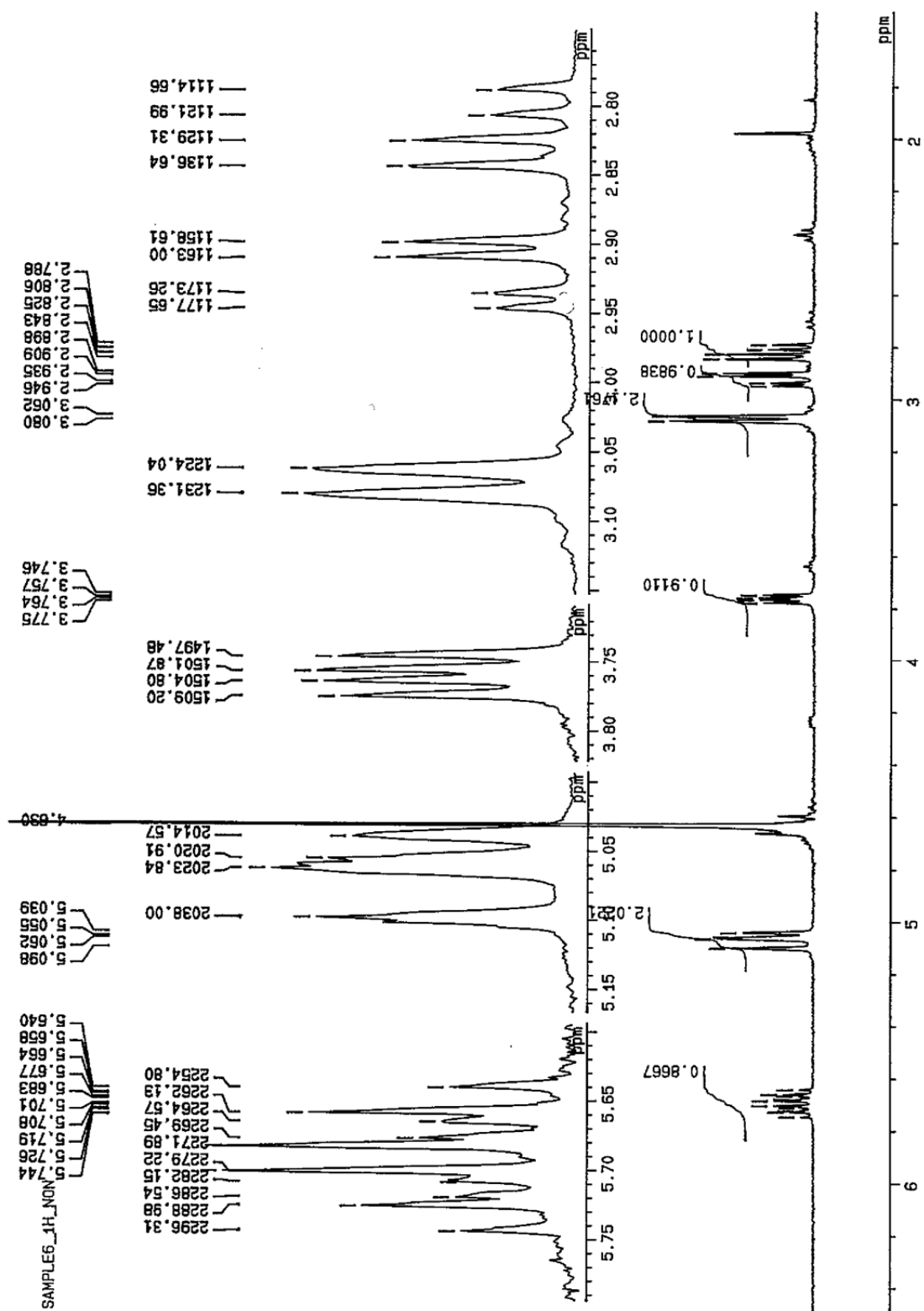
付図 4-1 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine (deoxyalliin)の化学構造

付図 4-2 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine (deoxyalliin)の ESIMS 及び ^1H NMR スペクトル
 帰属

| MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ | ^1H NMR | |
|---|------------------|---|
| 分子式 $([\text{M}+\text{H}]^+)$ | 位置 | (400 MHz, D_2O , δ ppm) |
| 162.2 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2\text{S}$ | 2 | 3.76 (dd, 1H, $J = 4.4, 7.3$ Hz) |
| | 3 | 2.82 (dd, 1H, $J = 7.3, 14.7$ Hz) |
| | | 2.92 (dd, 1H, $J = 4.4, 14.7$ Hz) |
| | 5 | 3.07 (br d, 2H, $J = 7.3$ Hz) |
| | 6 | 5.69 (ddt, 1H, $J = 7.3, 9.3, 17.1$ Hz) |
| | 7 | 5.05 (br d, 1H, $J = 9.3$ Hz, <i>cis</i>) 5.08 (br d, 1H, $J = 17.1$ Hz, <i>trans</i>) |

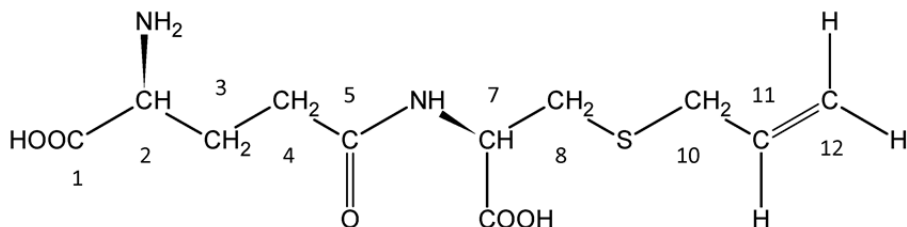


付図 4-3 *S*-(2-propenyl)-L-cysteine (deoxyalliin)の ESIMS スペクトル



付図 4-4 S-(2-propenyl)-L-cysteine (deoxyallin) の ^1H NMR スペクトル

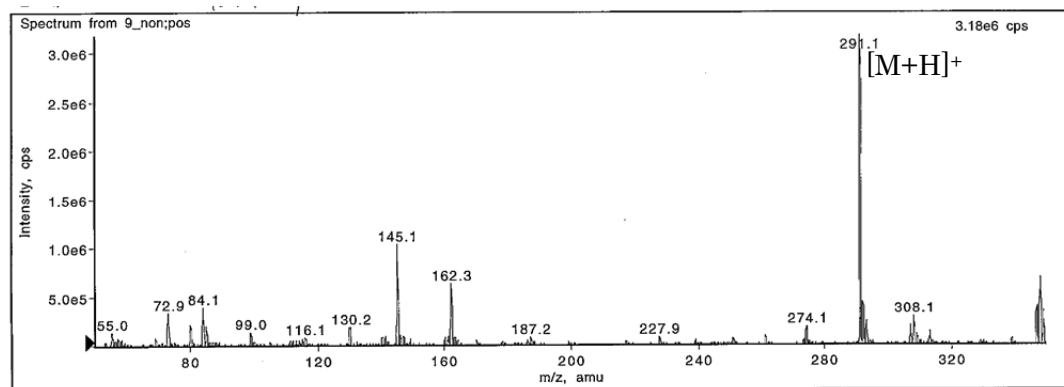
付図 5 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(2-propenyl)-L-cysteine (Glu-ALC)



付図 5-1 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(2-propenyl)-L-cysteine (Glu-ALC)の化学構造

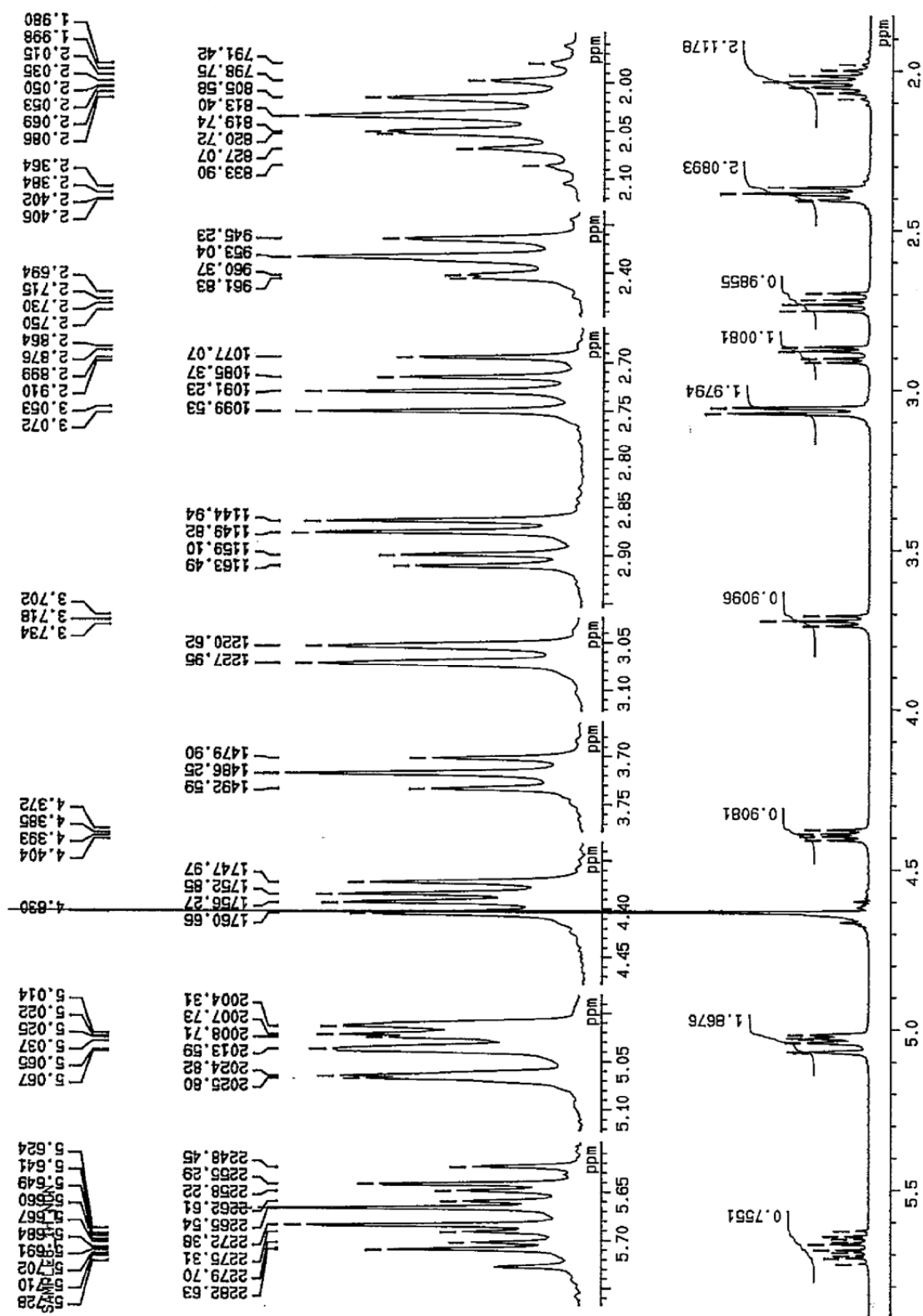
付図 5-2 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(2-propenyl)-L-cysteine (Glu-ALC)の ESIMS 及び ^1H NMR スペクトル帰属

| MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ | ^1H NMR | |
|---|------------------|---|
| 分子式 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) | 位置 | (400 MHz, D_2O , δ ppm) |
| 291.1 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ | 2 | 3.72 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz) |
| | 3 | 2.04 (dt, 2H, $J = 6.4, 7.9$ Hz) |
| | 4 | 2.39 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz) |
| | 7 | 4.39 (dd, 1H, $J = 4.4, 8.3$ Hz) |
| | 8 | 2.72 (dd, 1H, $J = 8.3, 14.2$ Hz) |
| | | 2.89 (dd, 1H, $J = 4.4, 14.2$ Hz) |
| | 10 | 3.06 (br d, 2H, $J = 7.3$ Hz) |
| | 11 | 5.68 (ddt, 1H, $J = 7.3, 9.3, 17.1$ Hz) |
| | 12 | 5.03 (br d, 1H, $J = 9.3$ Hz, <i>cis</i>) 5.04 (br d, 1H, $J = 17.1$ Hz, <i>trans</i>) |

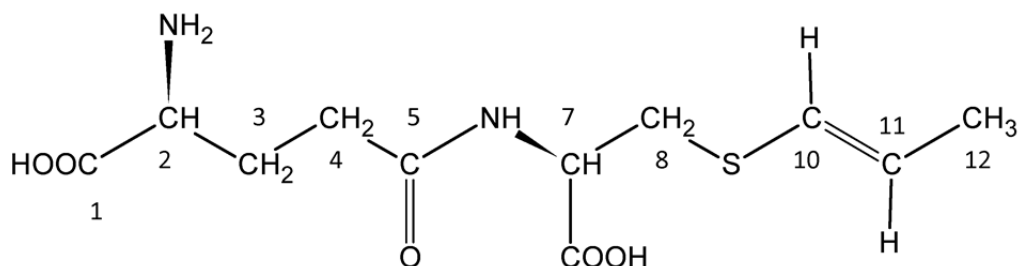


付図 5-3 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(2-propenyl)-L-cysteine (Glu-ALC)の ESIMS スペクトル

付図 5-4 $N^2(\gamma\text{-L-glutamyl})\text{-}S\text{-(2-propenyl)}\text{-L-cysteine (Glu-ALC)}$ の ^1H NMR スペクトル



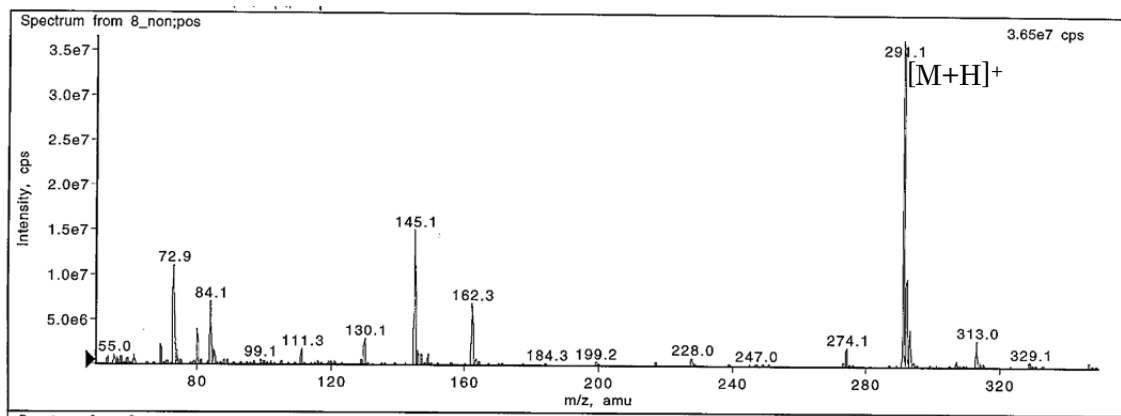
付図 6 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC)



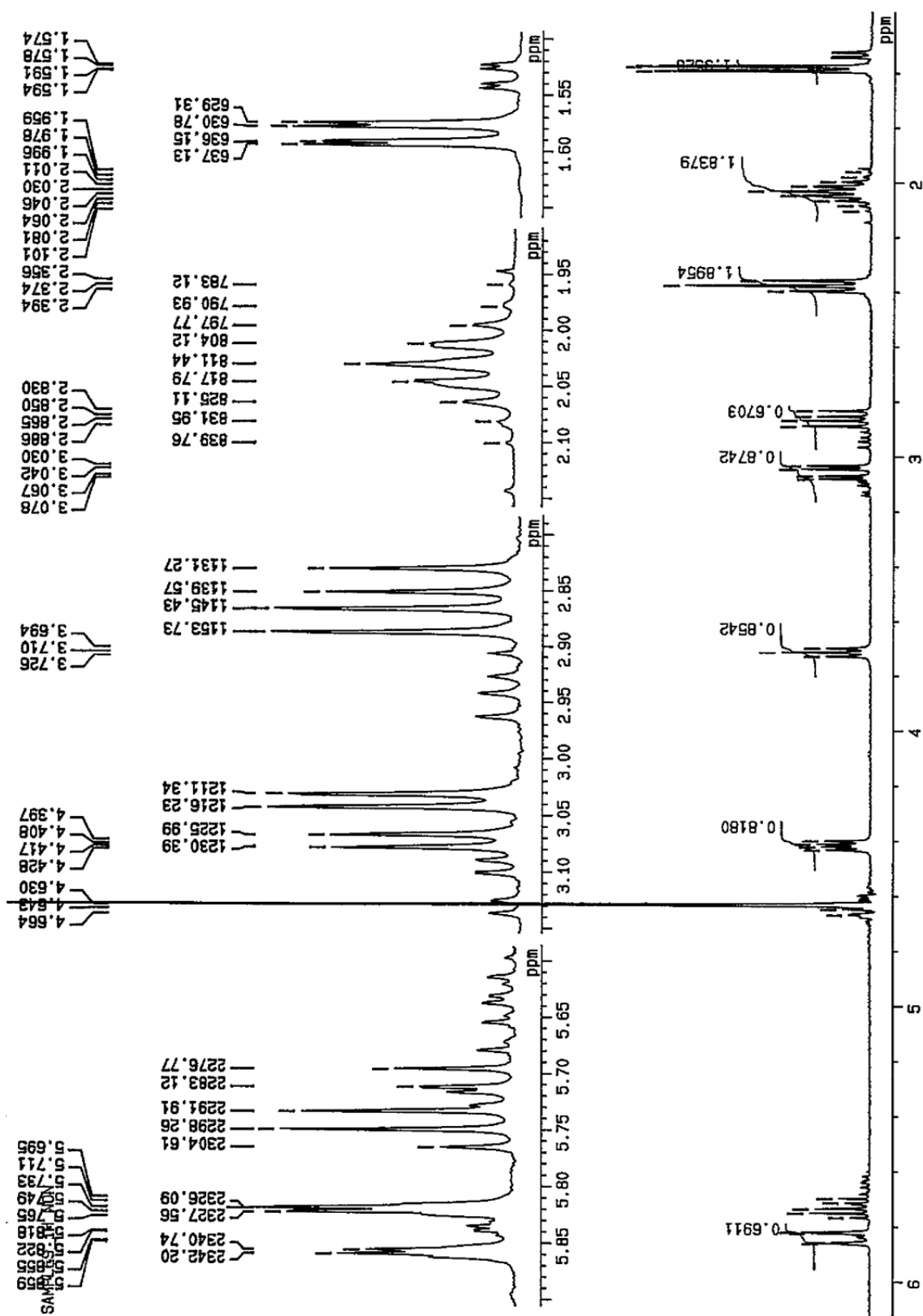
付図 6-1 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC)の化学構造

付図 6-2 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC)の ESIMS 及び ^1H NMR スペクトル帰属

| MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ | ^1H NMR | |
|---|------------------|--|
| 分子式 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) | 位置 | (400 MHz, D_2O , δ ppm) |
| 291.1 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ | 2 | 3.71 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz) |
| | 3 | 2.03 (dt, 2H, $J = 6.4, 7.6$ Hz) |
| | 4 | 2.37 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz) |
| | 7 | 4.41 (dd, 1H, $J = 4.4, 8.3$ Hz) |
| | 8 | 2.86 (dd, 1H, $J = 8.3, 14.3$ Hz) |
| | | 3.05 (dd, 1H, $J = 4.4, 14.3$ Hz) |
| | 10 | 5.84 (dd, 1H, $J = 1.4, 14.7$ Hz) |
| | 11 | 5.73 (dq, 1H, $J = 6.6, 14.7$ Hz) |
| | 12 | 1.58 (dd, 1H, $J = 1.4, 6.6$ Hz) |



付図 6-3 *N*-(γ -L-glutamyl)-*S*-(*E*-1-propenyl)-L-cysteine (Glu-PEC)の ESIMS スペクトル



付図 6-4 $N\text{-(}\gamma\text{-L-glutamyl)-S-(E-1-propenyl)-L-cysteine}$ (Glu-PEC) の ^1H NMR スペクトル