

9036 梅干し漬けの色の安定化に及ぼす食塩の効果

吉田 久美(椋山女学園大学)

梅干しの赤色は紫蘇 (*Perilla ocimoides*) に含まれるアントシアニンによる。アントシアニンは高等植物の花、果実、葉などに広く分布する色素で、橙から赤、紫、青と幅広い鮮やかな色調を持つことが特徴である。安全な食用色素として期待されているが、一般的に不安定で、抽出した色素は中性から弱酸性では速やかに水和され、無色になる。しかし、梅干し中では、長期間その赤い色を保つことから、何らかの安定化機構の存在が示唆された。そこで、紫蘇の色素成分を明らかにして、主に pH と食塩濃度がアントシアニンの安定化に及ぼす影響を調べ、梅干し漬けにおける色素の安定化機構の解明を行った。

1) 紫蘇に含まれる色素の構造

新鮮な紫蘇葉を液体窒素で凍結後粉碎し、3%トリフルオロ酢酸水溶液で抽出した。抽出液から各種クロマトグラフィーを繰り返すことにより6種のアントシアニン単離し、機器分析により構造決定を行った。

2) 色素安定化に及ぼす食塩と pH の効果

紫蘇葉主色素を種々の pH (pH 2~6)、食塩濃度 (0~20%) の水溶液に溶解し、吸光度の変化、残存色素量およびその構造変化について分析した(図1)。マロニルシソニンに結合した有機酸および糖は順々に加水分解されていくことが分かった。

実際に塩濃度を変えて梅干しを漬けたところ、やはり食塩濃度が高いほど色が鮮やかであった。

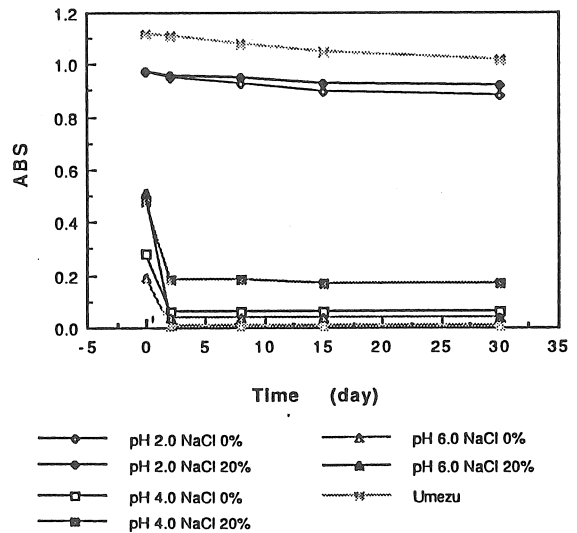
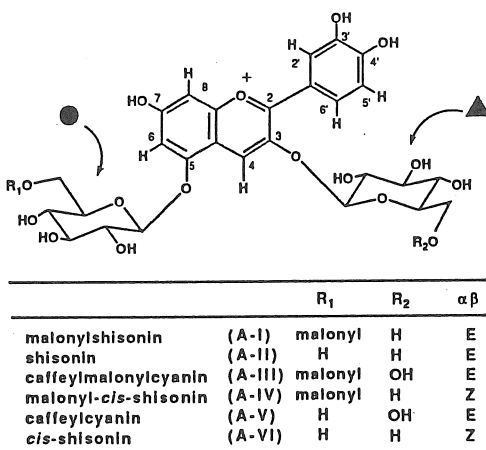


Fig. 1. Stability of color of malonylshisonin solutions. (5×10^{-4} M, at 23°C)

9036 梅干し漬けの色の安定化に及ぼす食塩の効果

吉田 久美 (椋山女学園大学)

赤～紫～青色の花や果実、葉の色は大部分がアントシアニンである。アントシアニンは配糖体として存在し、そのアグリコンのアントシアニンが色のもと(発色団)である。天然に見いだされるアントシアニンの種類は数種にすぎないにも関わらず、アントシアニンは様々な色を呈し、また、一般には色素を中性の水溶液に溶かすと速やかに退色してしまうのに (Fig. 1)、植物中やある種の食品(梅干し、赤ワイン等)においては色が長期間保たれる。この2つの大きな問題点(色の变化と安定性)が解決すれば、安全な食用着色料としてのアントシアニンの利用は飛躍的に広がるのが期待される。

本研究では、紫蘇のアントシアニンで着色する食品の梅干しが、長期間安定に鮮やかな赤色を保つことにヒントを得て、その安定化機構の化学的解明を目指して行った。

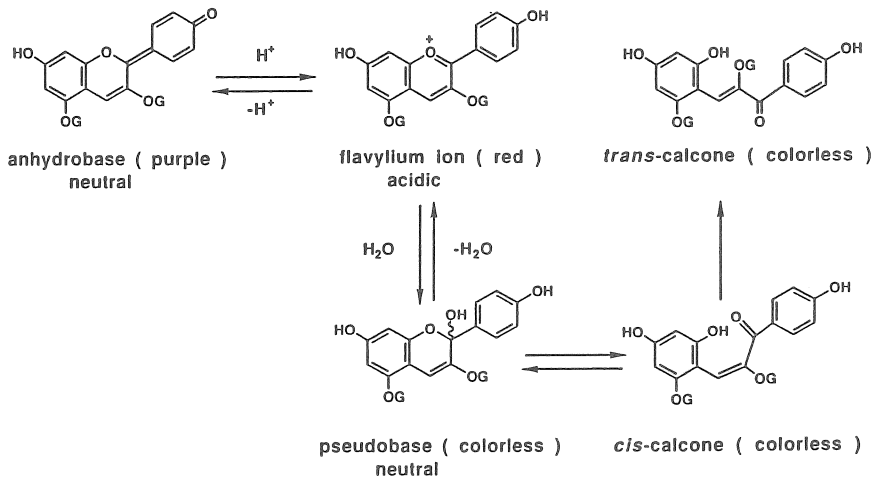


Fig. 1. Structure change of anthocyanin with pH in aqueous solution.

食品は多成分系であり、様々な要素が絡み合って色を安定化していると考えられる。各因子ごとの効果を明確にするために、まず紫蘇に含まれる成分の構造解明を行った。つぎに、単離した紫蘇の主色素を用いて、pHと食塩濃度を変化させた場合の色の安定性を調べ、同時に色素の化学変化も追求した。さらに、食塩濃度を変えて実際に梅干しを漬け、梅酢中の色素含量の変化と出来上がった梅干しの色についても考察した。

1. 紫色の紫蘇に含まれる色素成分の構造

紫蘇葉の色素の化学的研究の歴史は古く、1935年に初めて黒田により色素が取られ、シソニンと命名された。¹⁾ 構造については黒田、¹⁾ 渡辺ら、²⁾ 武田ら³⁾ の報告があり、cyanidin-3-(6-O-p-coumarylglucoside)-5-glucosideと報告されていたが、立体等は明らかにはなっていなかった。その後、1989年になって、我々は、主色素の真の構造がシソニンではなく、マロン酸の結合したマロニルシソニンであることを明らかにした。⁴⁾ しかし、Fig. 2に示すように、紫蘇葉には、主色素の他にも多数の微量色素が含まれていることが明らかになったので、まずこれらの色素の構造解明を行った。⁵⁾

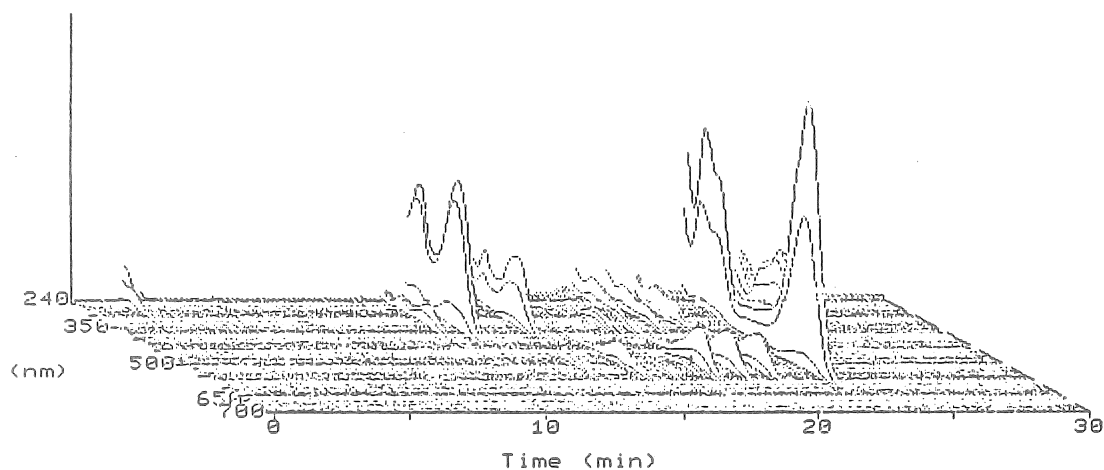


Fig. 2. Chromatogram of the extracts from *Perilla ocimoides*.

1. 1 色素の単離精製

新鮮な紫色の紫蘇葉 (*Perilla ocimoides*) を液体窒素で凍結後、ミキサーで粉砕した。得られた粉末に3%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を加え、室温で数回抽出した。抽出液は、アンバーライトXAD-7カラムに吸着させ、TFAを含むアセトニトリル水溶液で段階的に溶出した。色素を多く含む30%アセトニトリル画分はさらに分取逆相クロマトで精製し、純粋な色素としてA-I (マロニルシソニン)、A-II (シソニン) の他にA-III、A-IV、A-V、A-VIをそれぞれ得た。またフラボン成分として、F-I、F-II、F-III、も単離した (Fig. 3)。

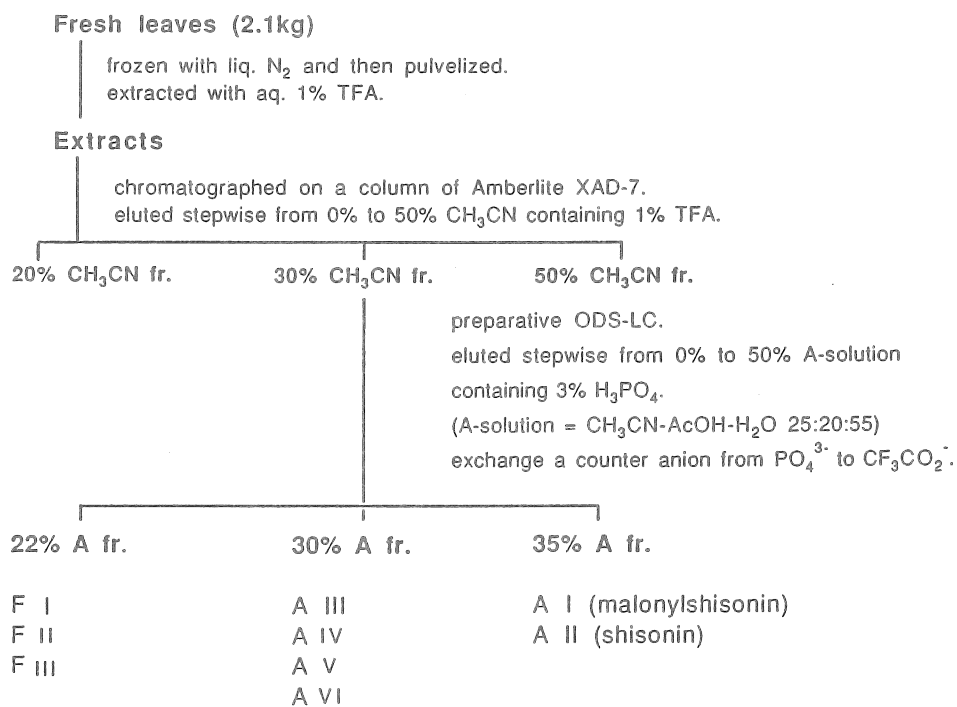


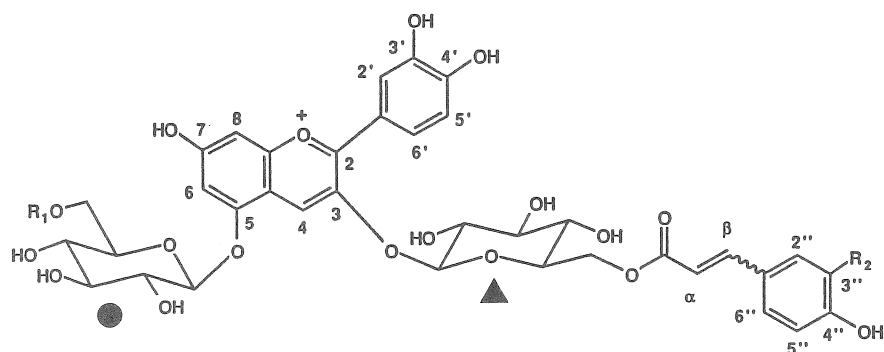
Fig. 3. Isolation procedure of anthocyanins and flavones from *Perilla ocimoides*.

1. 2 色素の構造決定

得られたアントシアニン及びフラボンの構造は、主として機器分析手段 (質量

分析、核磁気共鳴スペクトル)により明らかにした。また必要に応じて分解反応も行った。糖や有機酸の立体、結合位置は、核磁気共鳴スペクトルの結合定数とNOE実験で完全に決定することができた (Fig. 4)。

その結果、アントシアニンの母核は全てシアニンで、それぞれの色素の構造の違いは、▲の糖の6位に結合した有機酸の違いと●の糖の6位にマロン酸が結合しているか否かによるものであることを明らかにできた。これまで、アントシアニンに含まれるケイヒ酸誘導体は全てトランス配置のものしか知られておらず、今回初めてシス配置のp-クマル酸、カフェ酸を含むアントシアニンの存在が明らかになった。このシス体の生合成経路、植物や食品中でのシーストランス異性化の機構などは今後非常に興味もたれる。

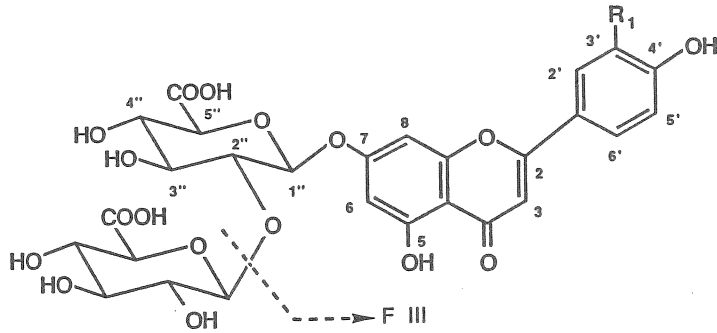


		R ₁	R ₂	α β
malonylshisonin	(A-I)	malonyl	H	E
shisonin	(A-II)	H	H	E
caffeylmalonylcyanin	(A-III)	malonyl	OH	E
malonyl- <i>cis</i> -shisonin	(A-IV)	malonyl	H	Z
caffeylcyanin	(A-V)	H	OH	E
<i>cis</i> -shisonin	(A-VI)	H	H	Z

Fig. 4. Structures of *Perilla* anthocyanins.

フラボンの構造についてもアントシアニンと同様の手法を用いて完全に決定した。紫蘇に含まれるフラボンはアピゲニン、またはルテオリンにグルクロン酸が1ないし2個結合したものであることが分かった (Fig. 5)。また、フェノール

成分として、かなりの量のロズマリン酸 (Fig. 6) が含まれることも H P L C から明らかになった。



		R ₁
7-O-glucuronylapigenin	(F-I)	H
7-O-glucuronylluteolin	(F-II)	OH
7-O-diglucuronylluteolin	(F-III)	OH

Fig. 5. Structures of *Perilla* flavones.

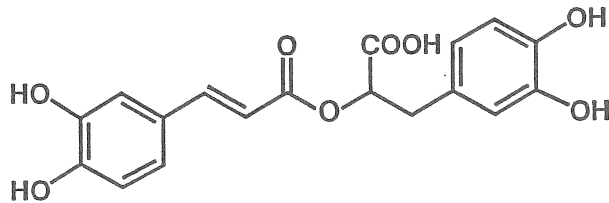


Fig. 6. Structure of rosmarinic acid.

2. 梅干し漬けモデル系における pH と食塩の影響

梅干し漬けにおいてアントシアニンの色が長期間安定であるのは、梅から滲出する有機酸によって、梅酢が強い酸性になっているためと、漬けるときに用いる

食塩（通常20%程度）によると言われている。そこで、単離した紫蘇主色素のマロニルシソニンを用いて、pHと食塩が色素に及ぼす影響をモデル系で調べた。

2. 1 モデル系におけるマロニルシソニンの安定性

梅に対して20%の食塩を使用して、ごく一般的に漬けたときの梅酢のpHは約1.8、食塩濃度は約15%であった。また果肉の食塩濃度は約20%となった。そこで梅酢のモデルとして、pH2.0、食塩濃度20%の緩衝液を作り、マロニルシソニンを 5×10^{-4} Mの濃度に溶解した。このほか、pHの影響を調べるため、4.0、6.0の塩溶液も調製し、それぞれ塩濃度は0%、20%とした。この溶液を暗所23度で保存し、経時的に溶液の吸光度を測定した

(Fig. 7)。pH2では溶液は鮮やかな赤色を示し30日の保存でも殆ど退色が認められなかった。しかし、pH4、6では溶解直後はそれぞれ紫色から淡い藤色を示したものの、退色が速やかであった。いずれのpHにおいても食塩20%の方が色は安定であることが明らかになった。Fig. 1で示したように、アントシアニンの構造はpHにより変化し、それと同時に色も変わる。そこで、モデル溶液におけるマロニルシソニンの退色が、不可逆的なものか、あるいは単にプロイド塩基に変化しただけで酸性にすれば戻るかどうかを、HPLCで分析した。(Fig. 8)。その結果、pH4、6といった、溶液が殆ど退色してしまう条件においても、マロニルシソニンはかなりの量残存していることが明らかになった。酸性のpH2では、塩濃度に依存してマロニルシソニンの残存量も多かったが、弱酸性、中性域ではむしろ色素の分解は速やかであることが明らかになった。

2. 2 モデル系におけるマロニルシソニンの変化

マロニルシソニンは、梅干し漬けに近い条件では室温でかなり長期間安定であることが明らかになった。そこで、長期保存を想定した色素の分解実験を、1M塩酸溶液中で色素溶液を80度に加熱することにより反応を加速して行った(Fig. 9)。それぞれのピークを分取して、構造決定したところ、マロニルシソ

ニンから、有機酸、糖が順次脱離し、シソニン、シアニン、シアニジングルコシドへと分解していくことが明らかになった (Fig. 10)。

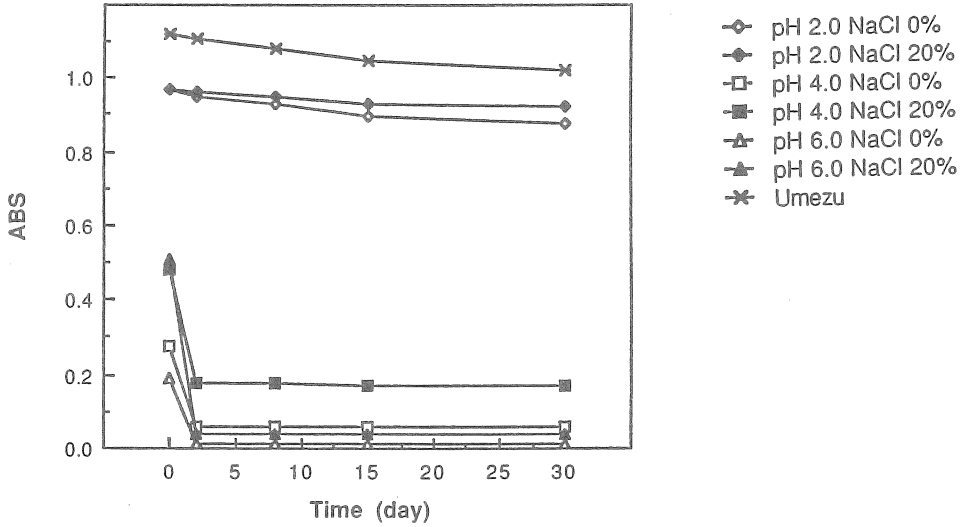


Fig. 7. Stability of color of malonylshisonin solutions.
($5 \times 10^{-4} \text{M}$, at 23°C)

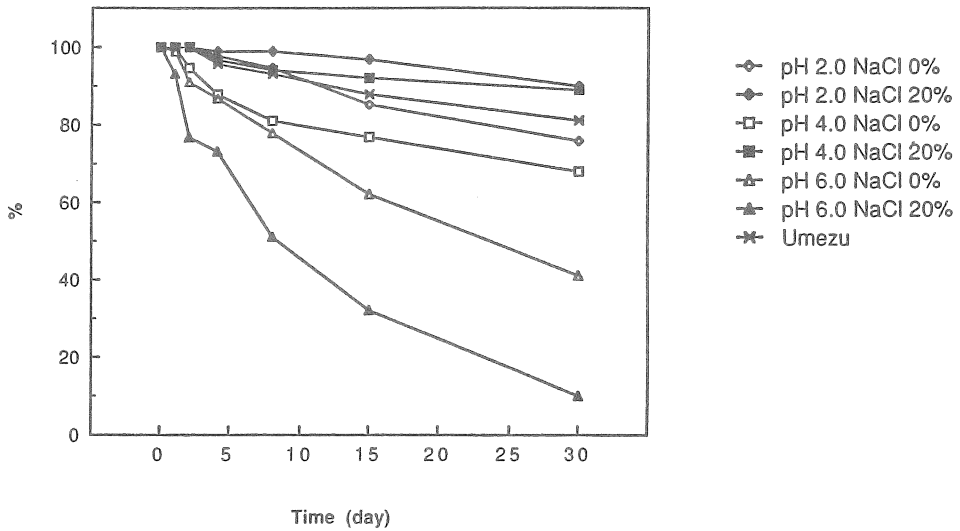


Fig. 8. Stability of malonylshisonin in various pH aq. solutions.
($5 \times 10^{-4} \text{M}$, at 23°C)

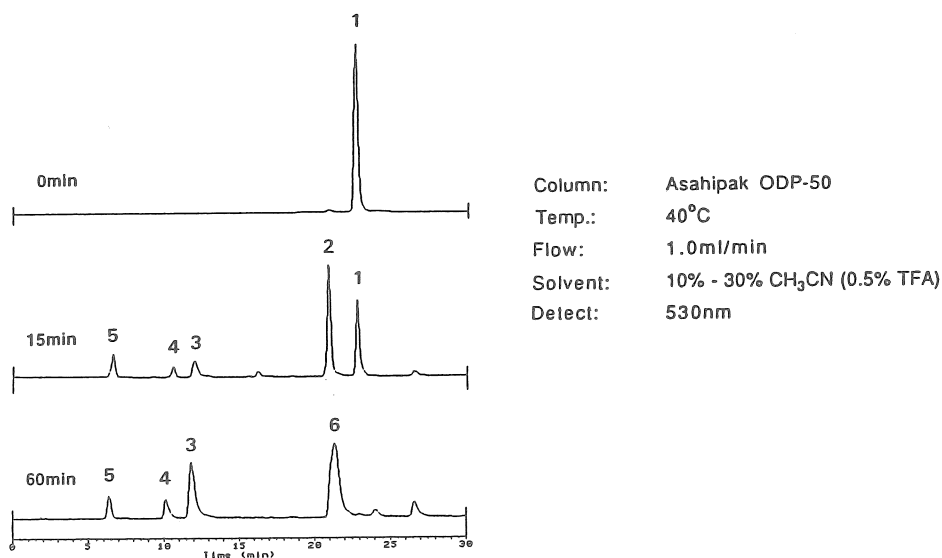


Fig. 9. Chromatograms of degradation reaction of malonylshisonin in 1M HCl at 80°C.

The number of each peak is corresponded to that of each compound in Fig. 10.

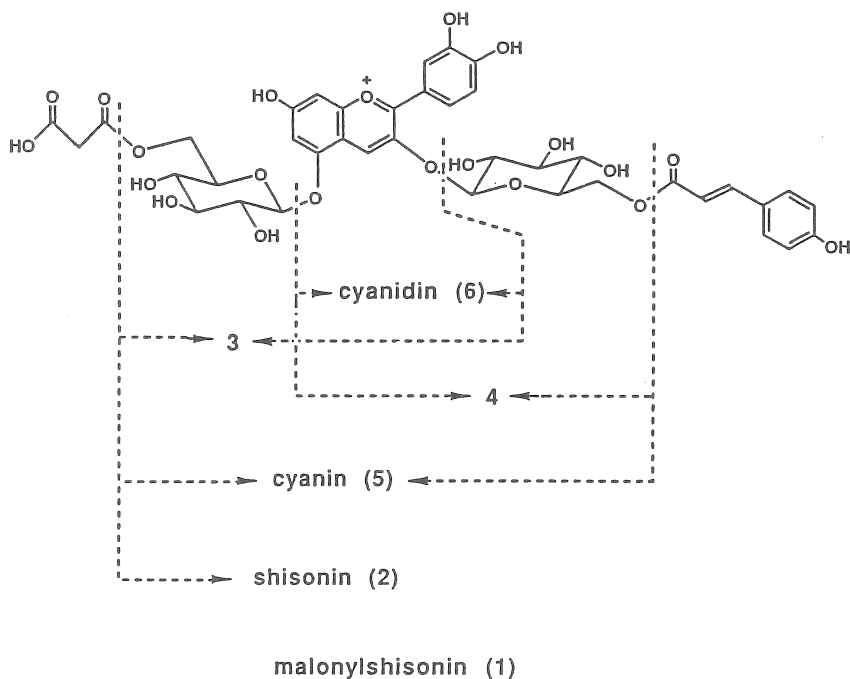


Fig. 10. Structures of degradation products of malonylshisoisin in 1M HCl at 80°C.

The number of each compound is corresponded to that of each peak number in Fig. 9.

3. 梅干し漬けにおける食塩濃度と着色の関係

実際に梅干しを漬けたときに、食塩濃度が梅の着色にどのような影響を及ぼすか、また、梅酢中の色素はどう変化するかを調べた。表1に示した条件で梅干しを漬けたところ、梅酢、梅の性状は表2のようであった。紫蘇入れ後の梅酢中の全色素量は Fig. 11に示したように、塩濃度が高いほど多く、エタノールを添加すると減少することが明らかになった。また30日から50日にかけては、マロン酸の加水分解によって生じたと考えられるシソニンの生成量が増加した。従って、2. 2で示されたような色素の化学変化が、実際の梅干し漬けにおいても起きていることが確かめられた。

Table 1. The condition of pickling ume

entry	salt	50% ethanol
A	20%	0%
B	30%	0%
C	15%	10%
D	10%	10%

Table 2. The pH, concentration of salt and color of "umeboshi"

entry	pH	conc. of salt	color of umeboshi
A	1.6	15%	dark red
B	1.6	21%	dark red
C	1.7	11%	red
D	1.8	7%	pinkish red

4. 今後の課題

本研究によって初めて、紫蘇に含まれるアントシアニンが微量色素も含めて明らかにでき、色素の単離精製法も確立した。純粋な色素を用いてpHと食塩濃度の影響を調べたところ、pHが低く塩濃度は高いほど色素は安定化されることが

明らかになった。また、梅酢中の色素の変化についても有機酸と糖の脱離が起きることが明らかになった。今後は、フラボンなどと共存した場合の安定性や、様々な構造のアントシアニンに対する食塩の効果をもより定量的に調べ、酸性のみならず中性域での安定化機構の解明へも発展させていく必要がある。

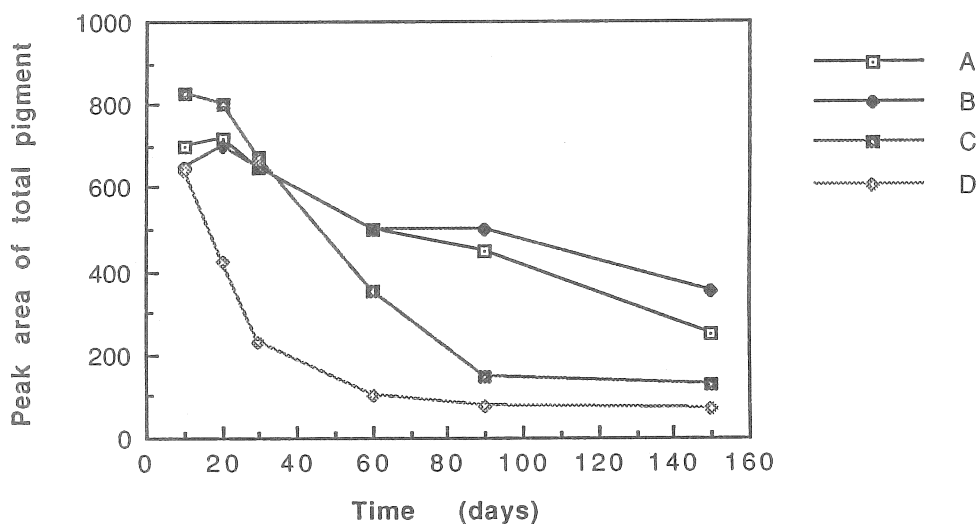


Fig. 11. Total amount of pigment in "umezu" of pickled ume A to D analyzed by HPLC.

参考文献

- 1) C. Kuroda and M. Wada, *Proc. Imp. Acad. (Tokyo)*, **11**, 28 (1935).
- 2) K. Takeda and K. Hayashi, *Proc. Jpn. Acad.*, **40**, 510 (1964).
- 3) S. Watanabe, S. Sakamura and Y. Obata, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 420 (1966).
- 4) T. Kondo, H. Tamura, K. Yoshida and T. Goto, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 797 (1989).
- 5) K. Yoshida, T. Kondo, K. Kameda and T. Goto, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1745 (1990).

Effect of Salt on the Stability of Color of Umeboshi
(Jpanease Pickled Plum)

Kumi Yoshida, Kiyoshi Kameda and *Tadao Kondo

Faculty of Food and Nutrition, School of Home Economics,
Sugiyama Jogakuen University, Chikusa, Nagoya 464, Japan

*Chemical Instrument Center, Nagoya University,
Chikusa, Nagoya 464-01, Japan.

Jpanease traditional food "umeboshi" is colored by anthocyanin pigment of purple leaves of Perilla ocimoides. Anthocyanins are widely distribute in flower petals, fruits and leaves of higher plants and have vivid orange, red, violet or blue color. These pigments are expected to a safe food colorant but the extracted pigments are ordinary unstable and decolorized quickly under neutral or weakly acidic condition. It have been a question why umeboshi keeps such a beautiful red color for several years. Umeboshi is strongly acidic and contains about 20% salt. So salts must be concerned with color stability.

We isolated the pure pigments from Perilla leaves by our procedure. The structures were determined completely by FABMS and ¹H NMR to be malonylshisonin as major pigment, but not shisonin. The complete structures of the other pigments were also determined.

Malonylshisoïn was dissolved in various pH's (pH 2.0 to 6.0) and concentration's (0 to 20%) salt(NaCl) solutions. The stabilities were analyzed by UV-VIS and HPLC. The color stability depended on concentration of salts at every pHs. In acidic solution the decrease of malonylshisonin was also prevented by salt. But in neutral or weakly acidic solution the decomposition of malonylshisonin was accelerated by addition of salt. In strong acidic solution malonylshisoïn changed to shisonin cyanin and cyanidin-mono-glucoside.

When "ume" was pickled with various concentrated salt, the umeboshi pickled with the largest amount of salt had the reddest color.