

9256 塩を利用した天然色素の食品着色とその機構解明

助成研究者:吉田 久美(椋山女学園大学 生活科学部)

共同研究者:亀田 清(椋山女学園大学)

:近藤 忠雄(名古屋大学)

植物性食品のうち、赤から紫色を呈するものは、ほとんどがアントシアニンによる。さらに、この色素は梅干し、紅生姜、赤飯など様々な食品の着色にも用いられる。食品の色は嗜好性に大きな影響を与えるため、調理や加工の過程における退色を抑え美しい色に仕上げることは大切である。

今回我々は、赤飯の着色に用いられるアズキをはじめとする様々なマメ類に含まれる色素について研究を行なった。マメの種皮の色素については報告も多くなく、特にアズキ色素については、抽出が極めて困難であるため構造にも疑問がもたれた。そこで、まず、アズキ、ササゲ、キントキマメ、ハナマメなどの種皮に含まれる色素をこれまでに報告した方法で単離して、構造を明かにした。さらに、表に示した様々なマメ種皮の色素を抽出し、構造とその含有量を明かにした。

次に、赤飯の着色に及ぼす各種塩類の効果について、アズキとササゲを用いて検討した。赤飯の着色は、あらかじめマメを茹でて得られた赤茶色の煮汁を加えて炊飯することによる。そこで、マメとその茹で汁、さらに飯の色に及ぼす塩類の効果について調べた。有機溶媒で抽出する際と同様に、アズキよりもササゲの方が飯の赤色は濃いことが確かめられた。塩を用いると茹で汁の着色が抑えられ、マメの色は濃くなるが、飯の色は薄くなった。

Table. Major anthocyanin and its content of various pulses.

	scientific name	pigment	content mg/g dry pulse
<i>Glycine</i>			
kuromame (Hokkaido)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	0.8
kuromame (Tanba)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	0.7
kuromame (kamiiso)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	1.0
<i>Vigna</i>			
azuki (Tohoku, China)	<i>Vigna angularis</i>	cyanin	<0.01
akatake azuki	<i>Vigna umbellata</i>	delphinidin-3-glc	<0.01
sasage (Thailand)	<i>Vigna sinensis</i>	cyanidin-3-glc	<0.01
<i>Phaseoleae</i>			
hanamame	<i>Phaseolus coccineus</i>	delphinidin-3-glc	0.2
kintoki	<i>Phaseolus vulgaris</i>	pelargonidin-3-glc	0.2
uzura	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	0.03
black turtle	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	1.7
small red	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	<0.05

9256 塩を利用した天然色素の食品着色とその機構解明

助成研究者: 吉田 久美(椋山女学園大学 生活科学部)

共同研究者: 亀田 清(椋山女学園大学)

: 近藤 忠雄(名古屋大学)

1. はじめに

シソ、ナス、赤キャベツ、赤タマネギ、イチゴ、リンゴ、ブドウなどの果実、野菜の赤から紫にいたる色は、ほとんどがアントシアニンである¹⁾。この天然色素は、色調が極めて美しく、取り得る色の幅が広いという利点を持つ。さらに、人類が長年にわたり食してきた食用植物に多く含まれることから、安全性にも何ら問題がない。これらの理由からアントシアニンは、発癌性、肝毒性などが懸念される合成タール系着色料に替わる食用着色料として大きな期待が寄せられている。しかし、色素の安定性が、強酸性条件以外の弱酸性～中性～塩基性条件下では極めて悪く、また、食品加工や調理の過程の加熱や金属塩の存在により、容易に変色するため、その使用は現在のところ極めて限られている。

我々は、一昨年度の当財団の助成による研究によって、梅干し漬けの赤色が、シソに含まれるアントシアニンによるものであるにもかかわらず長期間安定に色を保つ理由について化学的に研究し、梅を漬けるときに用いる多量の食塩と、梅から滲出する有機酸による強酸性の両作用によって色素が安定化されていることを明らかにした²⁾。さらに昨年度の当財団の助成による研究によって、食塩以外の他の1価、2価、3価の無機塩の安定化作用について、シソから単離した色素を始め構造の異なる種々の色素を用いて調べた³⁾。そして、2価塩の塩化マグネシウムおよび塩化カルシウムに高いアントシアニン安定化効果を認めることができた。この安定化効果が、塩の添加による系内の自由水の減少と深く関わっていることを、¹⁷O核磁気共鳴スペクトルを測定することにより明らかにした^{3, 4)}。

今回は、これらの成果を踏まえ、重要な雑穀として多様な用途が知られるマメ科植物の乾燥子実種皮の色素に着目し、まず含まれる色素の構造と含有量を明かにし

た。次に、マメの色素を着色に用いた食品として赤飯を選び、その着色に及ぼす各種塩類の効果について、アズキとササゲを用いて検討した。

2. ダイズ類およびインゲン類に含まれる色素の構造

これまで、マメ種皮の色素に関する研究はさほど多くなく、1935年に黒田らがクロマメ色素を単離して cyanidin 3-glucoside と構造決定したのが最初である⁵⁾。その後吉倉らは、丹波産のクロマメが、cyanidin 3-glucoside のほかに、微量色素として delphinidin -3-glucoside を含むと報告している⁶⁾。また、キントキマメ⁷⁾、クロダネキヌガサインゲン⁸⁾、ササゲ⁹⁾ についても報告があり、いずれも色素はモノグルコシド、あるいはジグルコシドで単純な構造とされていた。これらの報告は、抽出に塩酸-メタノールを用いており、マロニル基などの脱離し易い基が精製中に加水分解された可能性も否定できない。さらに、色素の同定方法も分解反応やペーパークロマトグラフィーなどの方法でなされたに過ぎない。そこでまず我々は、色素を温和な条件で抽出し¹⁰⁾、最近の機器分析手段を用いて構造の再検討を行なった。

2. 1 ダイズ類およびインゲン類に含まれる色素の分析

乾燥したマメを水浸後種皮を取り、3%のトリフルオロ酢酸を含む50%アセトニトリル水溶液で抽出した。この抽出液を3次元検出器をつないだ高速液体クロマトグラフィーで分析した。

まず、市販されている一般的なマメである、クロマメ (*Glycine soja*)、ハナマメ (*Phaseolus coccineus*)、キントキマメ (*Phaseolus vulgaris*) について分析した結果を図1に示した。クロマメ、ハナマメには色素は1種類しか含まれず、色素以外の成分はほとんど検出されなかった。キントキマメには2種類の色素が含まれ、微量色素はクロマメに含まれる色素と一致した。これらの色素は3次元検出器による分析でいずれも芳香族酸を含まないことも分かり、構造の単純なアントシアニンであると推定した。

2. 2 ダイズ類およびインゲン類に含まれる色素の単離と構造

次に、マメより色素を大量に単離し、構造解析を行なった。まず、クロマメ色素を我々の常法¹⁰⁾に従って単離した。

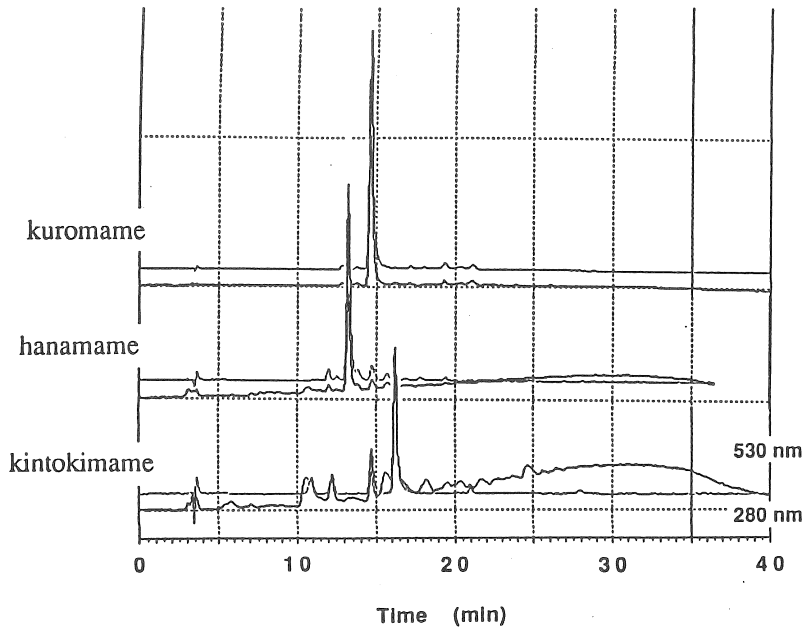


Fig. 1. HPLC chromatogram of various pulse extracts.

クロマメ 300 g を水浸し、得られた種皮を先ほどと同様に抽出した。抽出液を減圧下濃縮し、アンバーライト XAD-7 カラムに吸着させ、0.1% のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル水溶液の、アセトニトリルの含量を段階的に上昇させて溶出した。20% アセトニトリル画分から粗色素を 450 mg 得た。粗色素を分取 ODS カラムクロマトグラフィーにより精製し、不揮発性のりん酸塩を揮発性の TFA 塩に置換したのち、減圧下濃縮乾固して、主色素の TFA 塩を 185 mg 得た。

得られた色素の構造は、主として $^1\text{H NMR}$ 、及び FABMS を用いて明らかにした。

クロマメ色素の分子量は、FABMS から 449 であることがわかり、10% の重トリフルオロ酢酸を含む重メタノール中での $^1\text{H NMR}$ より、アントシアニン母核はシアニジンで β -グルコシドが 1 個存在することがわかった。糖のアノメリック位を照射した NOE 実験より糖は 3 位に結合していると決定できた。以上よりクロマメ種皮の主色素は以前の黒田らの報告と同じ、cyanidin-3-O- β -glucoside であると同定できた。

同様にハナマメ、キントキマメについても種皮より色素を単離し、構造解析を行った。

その結果、今回単離した色素は、いずれも母核の 3 位のみ糖が結合したモノグ

ルコシドで、クロマメは cyanidin-3-O- β -glucoside、ハナマメは delphinidin-3-O- β -glucoside、キントキマメ主色素は pelargonidin-3-O- β -glucoside、微量色素はクロマメと同じ cyanidin-3-O- β -glucoside であると同定した (図2)。

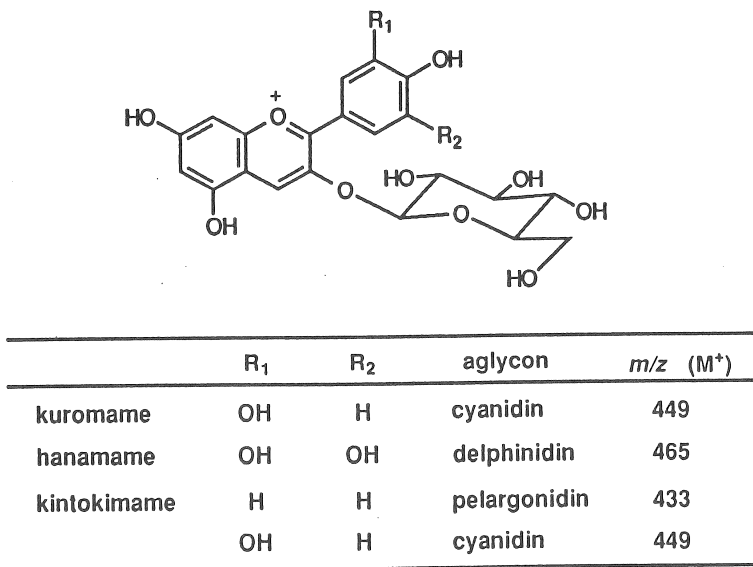


Fig. 2. Structures of anthocyanins from kuromame, hanamame and kintokimame.

3. アズキに含まれる色素の構造

アズキは赤飯やあんの材料として日本では多く用いられるマメの一つである。アズキの色素については、1934年、黒田らによって報告されたが¹¹⁾、アントシアニン系の赤色素と、タンニン系の褐色色素からなるであろうという推定に留まっていた。その後林らによって、赤黒色のアズキより微量ながらも色素が単離され、delphinidin-3-glucoside であると報告されている¹²⁾。しかし、いずれも極く微量の色素しか得られておらず、その構造にも疑問が持たれたので、今回、色素の抽出法を検討し、日本産の赤色のアズキより色素の単離を行なった。

一般にも簡単に入手できる北海道産の普通小豆を用い、色素を先に示した方法に従って抽出し、まず HPLC で分析した。アズキは抽出される色素の量が極めて少なかったため、抽出液を濃縮してから、分析を行なった。図3に、アズキ抽出液のクロマトグラムを示した。色素のピークは検出できたが、他の成分が極めて多いことがわかった。

次に大量のアズキより色素の単離を試みた。5 kg のアズキを水に漬け、得られた 1.3 kg の皮を液体窒素で凍結後、ミキサーで粉碎した。3% トリフルオロ酢酸を含む 50% アセトニトリル水溶液を加え、室温で一晩抽出した。得られた抽出液を減圧下濃縮乾固し、0.5% トリフルオロ酢酸水溶液を 0.2 L 加えて 1 時間の超音波処理の後遠心分離し、色素を含む上清を得た。これを、常法に従いアンバーライト XAD-7 カラムクロマトグラフィー、次いで分取 ODS カラムクロマトグラフィー、ODS-HPLC を用いて精製し、主色素を 0.5 mg 得た。

色素の構造は HPLC 分析、 $^1\text{H NMR}$ 、FABMS により分析した結果、cyanin と同定できた (図4)。これは、以前林らが報告した delphinidin-3-glucoside とは異なっていた。これについては、種の違いなども考えられ、今後の検討を要する。

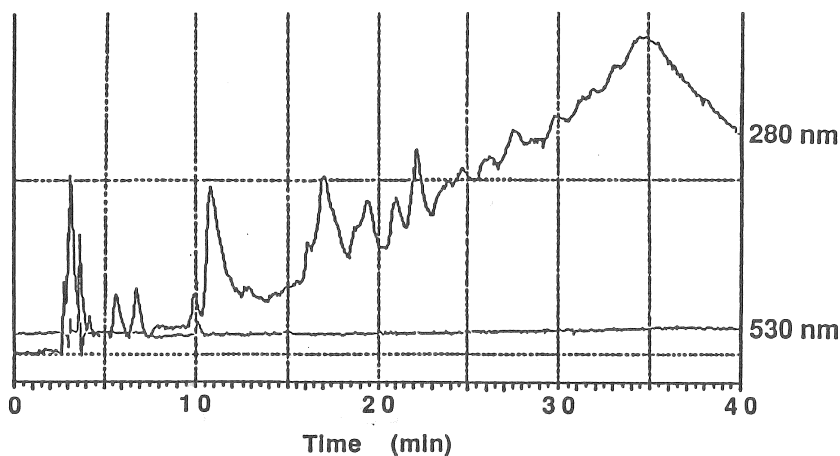


Fig. 3. HPLC chromatogram of extract from red skin of *Vigna angularis* (azuki).

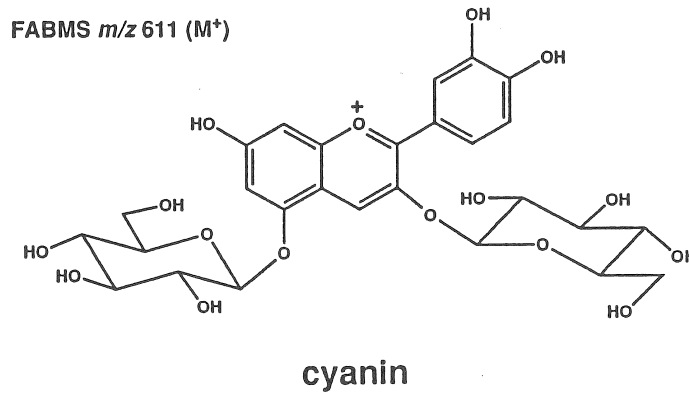


Fig. 4. Structure of anthocyanin from red skin of *Vigna angularis* (azuki).

4. 種々のマメ種皮に含まれる色素の構造とその含有量

以上のように我々は、食用マメの種皮色素を単離して、構造を明らかにすることができた。そこで次に、この結果をもとに、多数のマメ種皮に含まれる色素の構造とその含有量を HPLC で分析した (表 1)。

ダイズ属のクロマメの主色素は産地にかかわらずいずれも、cyanidin-3-glucoside で、その含有量は乾燥マメ 1 g あたり 1 mg 前後であった。

ササゲ属マメ類のアズキでは、日本産のマメの色素は cyanin であったが、極く微量で定量できなかつた。しかし、中国東北産のアズキは、日本産のものよりも色素が抽出され易く、cyanin が約 0.01 mg 含まれてた。また、赤竹アズキの色素は delphinidin-3-glucoside、ササゲは cyanidin-3-glucoside であった。一般的に国産のササゲは、アズキよりも色素が抽出され易いことが明かになった。

インゲン属のマメ類の種皮色素は、ほとんどが delphinidin-3-glucoside で、キントキマメだけが pelargonidin-3-glucoside であった。ブラックタートルの色素含有量は、1.7 mg/g とかなり色素の含有量が高いことが分かった。

マメ種皮の色素含有量は、種皮の色の濃さと関係あり、黒色のマメ類は一般的に

Table 2. Major anthocyanin and its content of various pulses.

	scientific name	pigment	content mg/g dry pulse
<i>Glycine</i>			
kuromame (Hokkaido)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	0.8
kuromame (Tanba)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	0.7
kuromame (kamiiso)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	1.0
<i>Vigna</i>			
azuki (Tohoku, China)	<i>Vigna angularis</i>	cyanin	<0.01
akatake azuki	<i>Vigna umbellata</i>	delphinidin-3-glc	<0.01
sasage (Thailand)	<i>Vigna sinensis</i>	cyanidin-3-glc	<0.01
<i>Phaseoleae</i>			
hanamame	<i>Phaseolus coccineus</i>	delphinidin-3-glc	0.2
kintoki	<i>Phaseolus vulgaris</i>	pelargonidin-3-glc	0.2
uzura	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	0.03
black turtle	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	1.7
small red	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	<0.05

色素含量が高く、薄い色のものは含量が低かった。また、アズキについては、種皮の色の割に、アントシアニンの抽出量が低く、他のアントシアニン重合体やタンニンなどの存在も含め、今後検討する必要がある。

5. 赤飯の着色に関する塩類の効果

赤飯の着色は、あらかじめマメを茹でて得られた赤茶色の煮汁を加えて炊飯することによる。そこで、アズキとササゲを用いて、その茹で汁、さらに飯の色に及ぼす塩類の効果について調べた。

5. 1 様々な塩溶液で煮熟したマメの種皮および煮汁の色

アズキおよびササゲを一般的に赤飯を炊く時の条件である5倍量の水あるいは塩水溶液を加え、吸水させることなくただちに加熱した。沸騰するまでは強火で加熱し、一旦煮汁を捨ててから再度5倍量の水または塩溶液を加えた。沸騰後は火力は弱くし、マメが踊らない程度に20分間加熱を続けた。煮熟後はただちにマメと汁を別し、それぞれの色を、マメの種皮については積分球装置で、茹で汁については、そのまま吸光分析を行なった。条件を表2に示した。最初にアク抜きのために捨てる茹で汁を吸光分析したところ、400 nm以下の吸収が極めて高く、黄色～褐色の成分がまず抽出除去されることを示した。

Table 2. Various salt solutions used for boiling pulses.

pulse (10 g)	salt solution (50 mL)
azuki (<i>Vigna angularis</i>)	water, 0.1 M NaCl, 1 M NaCl, 0.1 M MgCl ₂ , 1M MgCl ₂ , 0.1 M AlCl ₃ 0.01% AcOH, 1% AcOH
sasage (<i>Vigna sinensis</i>)	water, 0.1 M NaCl, 1 M NaCl, 0.1 M MgCl ₂ , 1M MgCl ₂ , 0.1 M AlCl ₃ 0.01% AcOH, 1% AcOH

茹で汁のスペクトルを図5に示した。水や0.1 M程度の塩を加えてマメを煮熟すると、茹で汁は濁り、肉眼では若干赤色がかった黄色を示したがスペクトルの測定はできなかった。これに対し、塩を加えると茹で汁の濁りが抑えられ、アズキの場合食塩や塩化マグネシウムを添加すると460-500 nm付近にショルダーピークが認められた。ササゲでも同様のショルダーがスペクトル上に見られた。しかし、いずれの茹で汁も肉眼的には黄色ないし褐色味が強くさほど赤くは見えなかった。

この条件で煮熟したマメの皮の色について、積分球装置を用いて測定した。食塩を加えることにより、種皮の色は濃くなる傾向が認められた。塩化マグネシウムの添加では、600 nm付近の吸収が増加しマメの色は紫色ないし青みがかった黒色となった。塩化アルミニウムを加えると、600 nm付近に吸収極大を持つようになり、マメは緑色を帯びた。酢酸を添加した場合は、汁については500 nm付近の吸収が増大し、マメも赤みを帯びることが分かった(図6)。

5. 2 赤飯の飯の色に対する塩の効果

実際の赤飯の色に及ぼす塩の効果について調べた。マメ10 gに50 mLの水または塩溶液を加え、5. 1と同様にマメを煮熟した。マメと茹で汁をろ別後、茹で汁は水を加えて150 mLとし洗米して水を切った米100 gに加え沸騰するまで強火で加熱した。そこへ先の煮熟したマメを加え、弱火で汁がなくなるまで煮た。得られた赤飯の飯粒の着色を積分球装置で測定した(図7)。赤飯の色は、塩を加えないササゲが最も赤く、これは500 nm付近に吸収極大を示すことから明かであった。塩化ナトリウムの添加では、飯は赤くなるものの若干色が薄く、塩化マグネシウムではほとんど着色が認められなかった。

5. まとめと今後の展望

以上の研究から、食用の赤から黒色のマメ種皮に含まれる色素の構造および含有量が明らかにできた。いずれのマメ種皮も、構造の単純なアントシアニンをほぼ1種類だけ含むことがわかった。他の植物と異なり、フラボン、タンニンなどの含量が低いこともわかり、マメ種皮が食用着色料資源として有用であることが示唆された。

さらに、マメの色素を用いて着色する食品である赤飯について、塩を加えて炊飯

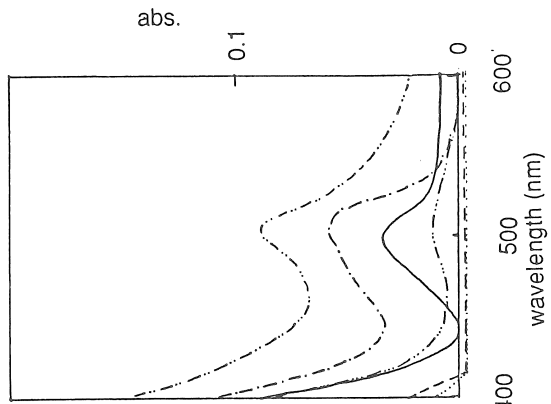


Fig.7. Electronic spectra of baked rice, "sekihan" with salts.

—, H₂O (Azuki) ; ---, 1M NaCl (Azuki) ;
 1M MgCl₂ (Azuki) ; - - - , H₂O (Sasage) ;
 - - - , 1M NaCl (Sasage) ; - · - · , 1M MgCl₂ (Sasage).

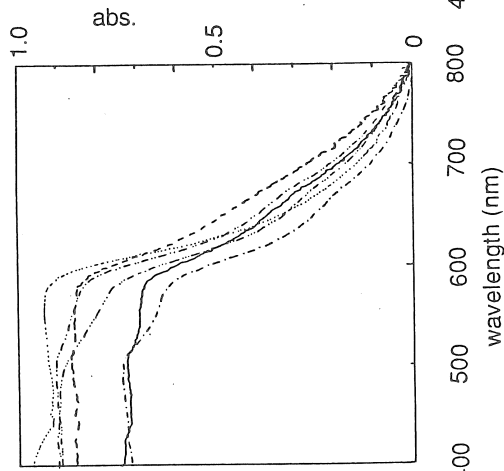


Fig.6. Electronic spectra of the skins of boiled pulses with salts.

—, H₂O (Azuki) ; ---, 1M NaCl (Azuki) ;
 1M MgCl₂ (Azuki) ; - - - , H₂O (Sasage) ;
 - - - , 1M NaCl (Sasage) ; - · - · , 1M MgCl₂ (Sasage).

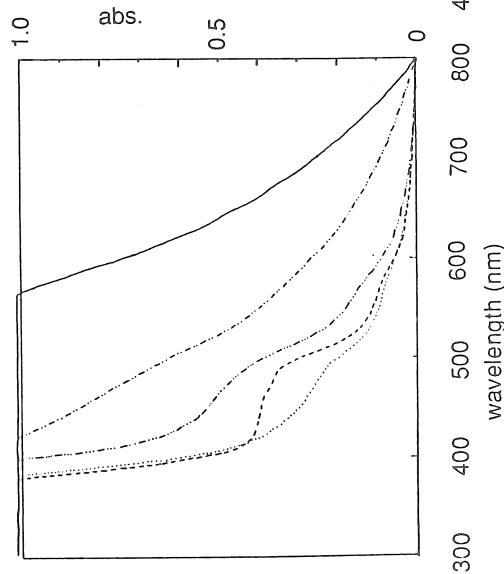


Fig. 5. Electronic spectra of sup. of boiled pulses with salts.

—, H₂O (Azuki) ; ---, 1M NaCl (Azuki) ;
 1M MgCl₂ (Azuki) ; - - - , 1M NaCl (Sasage) ;
 - · - · , 1M MgCl₂ (Sasage).

した際のマメの色および飯の色の違いを検討した。アズキよりもササゲの方が飯の赤色は濃くなることがわかった。これは、色素を抽出する際にも確かめられたとおり、ササゲ色素の方が溶出しやすいことを示す。塩を用いると茹で汁の着色が抑えられ、マメの色は濃くなるが、飯の色は薄くなることもわかった。ただし、米に加える茹で汁の色が黄色～褐色味が強いにも関わらず、飯に着色すると赤色を示すことについては、今後抽出や吸着に際しての色素の変化についても化学的に検討して明かにする必要がある。

今後は、アズキなどのように色素が極めて抽出されにくいマメ類の、種皮への色素の吸着状態や、真の色素の構造を明かにすると共に、抽出された色素がどのように食品に吸着し発色するのかを化学的に明かにする必要がある。それにより、基礎化学的な見地からばかりでなく、食用着色料への応用分野においても極めて有用な知見が得られると考えられる。

参考文献

- 1) Goto, T. and Kondo, T., 1991 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30: 17-33.
- 2) 吉田久美、亀田清、近藤忠雄、ソルトサイエンス研究財団助成研究報告集、平成2年度。
- 3) 吉田久美、亀田清、近藤忠雄、ソルトサイエンス研究財団助成研究報告集、平成3年度。
- 4) K. Yoshida, K. Kameda, T. Kondo and T. Goto, 1993 *Seventh Symposium on Salt, II* 623-630.
- 5) C. Kuroda and M. Wada, 1933 *Proc. Imp. Acad. Japan*, 9, 17-18.
C. Kuroda and M. Wada, 1933 *Proc. Imp. Acad. Japan*, 9, 517-520.
C. Kuroda and M. Wada, 1935 *Proc. Imp. Acad. Japan*, 11, 189-191.
C. Kuroda and M. Wada, 1936 *Bull. Chem. Soc. Japan*, 11, 272-287.
- 6) 吉倉和子、浜口洋一、1969 *栄養と食糧* 22, 367-370.
- 7) 吉倉和子、浜口洋一、1971 *栄養と食糧* 24, 275-278.
- 8) 沖田千衣子、諏訪紀子、吉倉和子、浜口洋一、1972 *栄養と食糧* 25, 367-370.
- 9) N. Ishikura, M. Iwata and S. Miyazaki, 1981 *Bot. Mag. Tokyo*, 94, 187-205.
- 10) Kondo, T., Tamura, H., Yoshida, K. and Goto, T., 1989. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 797-800.
Yoshida, K., Kondo, T., Kameda, K and Goto, T., 1990. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1745-1751.
- 11) C. Kuroda and M. Wada, 1934 *Proc. Imp. Acad. Japan*, 10, 472-474.
- 12) S. Sasanuma, K. Takeda and K. Hayashi, 1966 *Bot. Mag. Tokyo*, 79, 807-810.

Mechanism of coloring food with natural pigments by using salts

Kumi Yoshida, Kiyoshi Kameda and Tadao Kondo*
 School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen University
 *Chemical Instrument Center, Nagoya University

The red, purple and blue colors of fruits and vegetables are mostly anthocyanins. Anthocyanins exhibit various vivid colors. So, those pigments are expected for a safe food colorant. Therefore, in weakly acidic and neutral solutions most anthocyanins are very unstable and rapidly decolorized. By cooking or food processing decomposition of the color also occurs. In Japan the pigments from red bean, azuki, are used for coloring baked rice, "sekihan". In this study we investigated the pigments of various pulses and the mechanism of coloring "sekihan" by red bean.

Using our procedure pigments were extracted and isolated from edible pulses. The structures were determined by ^1H NMR and FABMS. (Table)

"Sekihan" was baked with salt solution. The color of the baked rice with aq. NaCl or MgCl_2 solution was lighter than that with water.

Table. Major anthocyanin and its content of various pulses.

	scientific name	pigment	content mg/g dry pulse
<i>Glycine</i>			
kuromame (Hokkaido)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	0.8
kuromame (Tanba)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	0.7
kuromame (kamiiso)	<i>Glycine soja</i>	cyanidin-3-glc	1.0
<i>Vigna</i>			
azuki (Tohoku, China)	<i>Vigna angularis</i>	cyanin	<0.01
akatake azuki	<i>Vigna umbellata</i>	delphinidin-3-glc	<0.01
sasage (Thailand)	<i>Vigna sinensis</i>	cyanidin-3-glc	<0.01
<i>Phaseoleae</i>			
hanamame	<i>Phaseolus coccineus</i>	delphinidin-3-glc	0.2
kintoki	<i>Phaseolus vulgaris</i>	pelargonidin-3-glc	0.2
uzura	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	0.03
black turtle	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	1.7
small red	<i>Phaseolus vulgaris</i>	delphinidin-3-glc	<0.05