

# ドーナツ褐色色素の抗酸化性

板倉厚一, 磯部さをり\*, 山下祐希奈\*, 山田実咲\*, 吉川優衣\*, 渡邊千加\*

## 1. 緒言

褐変は食品の加熱時にみられる褐色に変色する現象であり、還元糖とアミノ化合物(アミノ酸, ペプチドおよびタンパク質)が相互作用して褐色色素(メラノイジン)が生成される<sup>1)</sup>。この反応はメイラード反応として知られている。メイラード反応は褐色色素の生成のみならず香気物質の生成も伴うため、着色・着香の目的で加工や調理において利用されている。さて、褐色色素には、抗酸化能、抗菌性、金属キレート能、食物繊維様作用等の様々な機能が報告されている<sup>2)</sup>。その中でも抗酸化能は、酸化ストレスと生活習慣病との関連が指摘されていることから、注目の機能となっている。筆者らはこれまで、抗酸化能の評価には褐色色素の純度が重要であると考え、褐変食品(ドーナツ)からの分離方法を模索してきた。そして、デンプン加水分解酵素によりデンプンの除去が可能であり、また、タンパク質分解酵素を作用させることで褐色色素をドーナツから分離できることを報告した<sup>3)</sup>。そこで本研究では、この方法でドーナツ表面(褐色部分)から分離した褐色色素を用い、透析による精製ののち、これを試料として抗酸化能を評価した。また、ドーナツ内部(白色部分)に対しても同様の分離・精製を行い、これを対照試料(褐色色素を含まない。)とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 褐色部分と白色部分の分画および脱脂

市販のドーナツ(4個分, 247 g)を凍結乾燥させ、表面(褐色部分)と内部(白色部分)に分画した。次に、褐色部分(6.0 g)と白色部分(6.0 g)をそれぞれへキサソ(40 mL)中でよく振り混ぜ、遠心分離(5,000 rpm, 4°C, 15 min)を行って脂溶性成分の溶出した上澄みを取り除いた。この抽出をさらに二回繰り返して脂溶性成分を十分に取り除き、褐色試料(2.84g)と白色試料(4.53g)を得た。白色試料については、以後、対照試料として使用した。

### 2.2 $\alpha$ -アミラーゼとプルラーゼによるデンプンの加水分解

褐色試料(500 mg)を0.1M 酢酸緩衝液(pH 6.0)(5.98 mL)に懸濁させ、10,000 units/mL  $\alpha$ -アミラーゼ(10  $\mu$ L)(from *Bacillus sp.*, 1,333 units/mg solid, ナカライテスク)と550 units/mL プルラーゼ(10  $\mu$ L)(懸濁液, 肺炎桿菌由来, 生化学用, 和光純薬工業株式会社)を加えて37°Cで一晩攪拌した。そして遠心分離(5,000 rpm, 4°C, 15 min)を行い、上澄み液(1日目)を得た。沈殿物に対しては、同様の懸濁・酵素処理・遠心分離をさらに三回繰り返した。

## 2.3 褐色色素の分離

2.2 で得られた最終沈殿物を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) (3.0 mL) に懸濁させ、遠心分離 (5,000 rpm, 4°C, 15 min) を行って上澄みを取り除いた。この懸濁と遠心分離をさらに二回繰り返し、沈殿物をトリス塩酸緩衝液で十分に置換した。次に、沈殿物を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) (2.97 mL) に懸濁し、10 mg/mL プロナーゼ E (from *Streptomyces griseus*, 5.82 units/mg, Fluka) (30 µL) を加えて 37°C で三日間攪拌した。そして遠心分離 (5,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、褐色色素溶出液を得た。

## 2.4 褐色色素溶出液のグルコアミラーゼ処理より生成したブドウ糖の定量

褐色色素溶出液 (20 µL) を 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) (180 µL) で 10 倍に希釈し、これに 0.1 mg/mL グルコアミラーゼ (サッカロマイコプシス属由来, 11 units/mg, 生化学用, 和光純薬工業株式会社) (50 µL) 加えた後、37°C で反応させた。そして二日後、0.6N NaOH (50 µL) を加えて反応を停止させた。また、比較のために上澄み液 (1 日目) (20 µL) でも同様の処理を行った。生成したブドウ糖は、反応液 (13 µL) にグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社) (2.0 mL) を加えて 37°C で 5 分間発色させ、505 nm における吸光度を測定した。

## 2.5 褐色色素溶出液の透析

褐色色素溶出液 (150 µL) を微量透析器 EasySep (分画分子量: 14,000, トミー精工) に入れ、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (200 mL) を外液として室温で透析を行った。そして、24 時間後に内液を回収し、一部 (80 µL) をとって 405 nm における吸光度を測定した。

## 2.6 ゲル濾過高速液体クロマトグラフィー (ゲル濾過 HPLC) による褐色色素溶出液の分析

透析前後の褐色色素溶出液を以下の条件で分析した。

カラム: TSKgel SuperSW3000 (4.6 mm I.D. x 300 mm) (東ソー)

溶離液: 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4), 0.05% アジ化ナトリウム

流速: 0.35 mL/min

検出: 280 nm, 405 nm

試料量: 5 µL

## 2.7 褐色色素溶出液の抗酸化試験

7.0mM 2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) ニアンモニウム塩 (ABTS) 水溶液 (5.0 mL) に 2.45mM ペルオキシ二硫酸カリウム水溶液 (150 µL) を加えて室温暗所で一晚酸化させ、これを PBS で 100 倍に希釈した。この希釈液 (2.0 mL) に褐色色素溶出液 (透析後) (20 µL) を加え、室温で 10 分後に 734 nm の吸光度を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 ドーナツ試料の作成

市販のドーナツを凍結乾燥した後、表面（褐色部分）と内部（白色部分）に分画した（図1）。そして、それぞれをヘキサンで脱脂し、褐色試料および白色試料（対照試料）とした。



図1. ドーナツの表面（左）と内部（右）

#### 3.2 酵素によるデンプンの加水分解および除去

筆者らはすでに、ドーナツにデンプン加水分解酵素（ $\alpha$ -アミラーゼとプルラーゼを併用）を作用させることで、デンプンの除去が可能であることを報告している<sup>3)</sup>。本研究でもこの方法でデンプンを取り除くこととした。まず、褐色試料を酢酸緩衝液（pH 6.0）に懸濁し、 $\alpha$ -アミラーゼとプルラーゼを加えて37℃で一晩反応させた。褐色試料より溶出したデンプンおよびその酵素分解物は、遠心分離することで上澄み液（1日目）として回収した。そして、この懸濁・酵素処理・遠心分離をさらに三回繰り返す、褐色試料からデンプンを徹底的に溶出させた。

#### 3.3 褐色色素の分離

Borrelli, R. C.らは、タンパク質分解酵素（プロナーゼ E）を用いることでパン菓子から褐色色素を溶出している<sup>4)</sup>。また、筆者らもこの方法に従い、ドーナツから褐色色素を分離している<sup>3)</sup>。本研究でも、プロナーゼ E を利用して褐色色素を分離することとした。デンプンが取り除かれた沈殿物をトリス塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁し、プロナーゼ E を加えて37℃で三日間反応させた。そして遠心分離を行い、上澄みとして褐色色素溶出液を得た。溶出液中の褐色色素の量は、405 nm における吸光度を目安とした（図2）<sup>5)</sup>。

#### 3.4 褐色色素溶出液のデンプンおよびその酵素分解物の定量

ここで、褐色色素溶出液中にデンプンおよびその酵素分解物が残存していないかについて、念のため確認した。デンプンおよびその酵素分解物は、グルコアミラーゼ処理で生成するブドウ糖の量として定量した。また比較のために、デンプン除去の過程で得られた上澄み液（1日目）に

についても同じ処理を行った。図3に示したように、上澄み液（1日目）では2.30 mg/mLのブドウ糖が検出されたが、褐色色素溶出液では0.02 mg/mLとなり、デンプンおよびその酵素分解物はほぼ残存していないことが確認された。この結果は、白色試料についても同様であった。

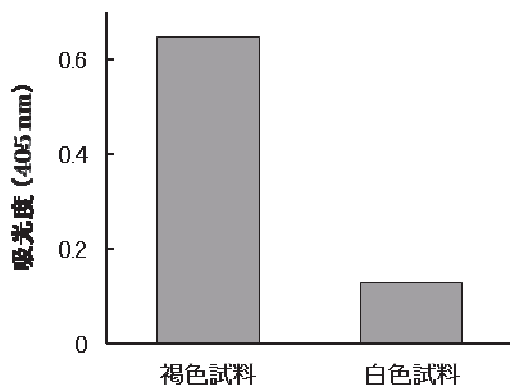


図2. 褐色色素溶出液の褐色強度

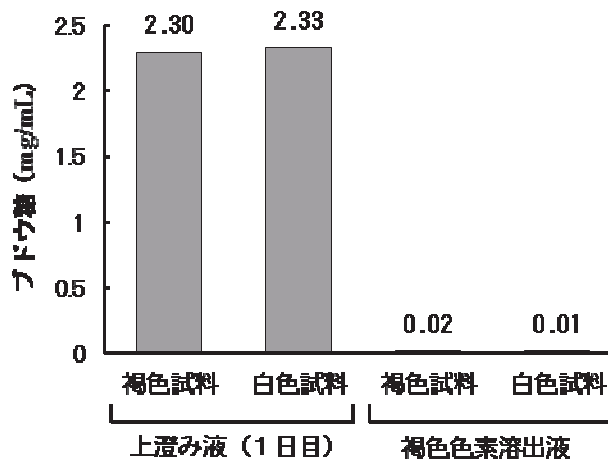


図3. 褐色色素溶出液のブドウ糖濃度

### 3.5 透析による褐色色素の精製

次に、褐色色素溶出液に含まれる低分子物質を取り除くために透析（分画分子量：14,000）による精製を行い、それをゲル濾過 HPLC により確認した。図4-a はタンパク質の検出波長である 280 nm で分析したものである。透析前では三本のピーク（A, B, C）が検出されたが、透析後はピーク B と C が消失し、ピーク A のみが検出された。そこで、三本のピークのどれが褐色色素によるものであるかを調べるために、波長を 405 nm に変えて検出を行った。その結果、透析前後ともに A のみが検出された（図4-b）。これら二波長による分析は、A, B, C のうち A のみが褐色色素によるものであり、A より低分子である B と C は透析によって取り除かれたことを示している。対照の白色試料の場合も、ピーク A の強度が弱い以外は同様であった（図5-a, b）。なお、この透析で A の一部損失も認められた。

### 3.6 ドーナツ褐色色素の抗酸化能

ここまでの段階で、ドーナツからデンプンと低分子物質を含まない褐色色素を得ることができた。そこで、透析により精製された褐色色素溶出液を用いて、ABTS 法による抗酸化試験を行った<sup>6)</sup>。白色試料から精製されたものについては、褐色色素を含まない対照試料とした。ABTS はペルオキシ二硫酸カリウムで処理すると、734 nm に極大吸収をもつ酸化 ABTS を生成する。ここに抗酸化能をもつ物質が添加されると酸化 ABTS が還元され、734 nm における吸光度が減少する。この吸光度変化をもって抗酸化能を評価した（図6）。その結果、褐色色素溶出液（褐色試料）において抗酸化能が認められた。一方、白色試料の場合の抗酸化能は、褐色試料と比較して

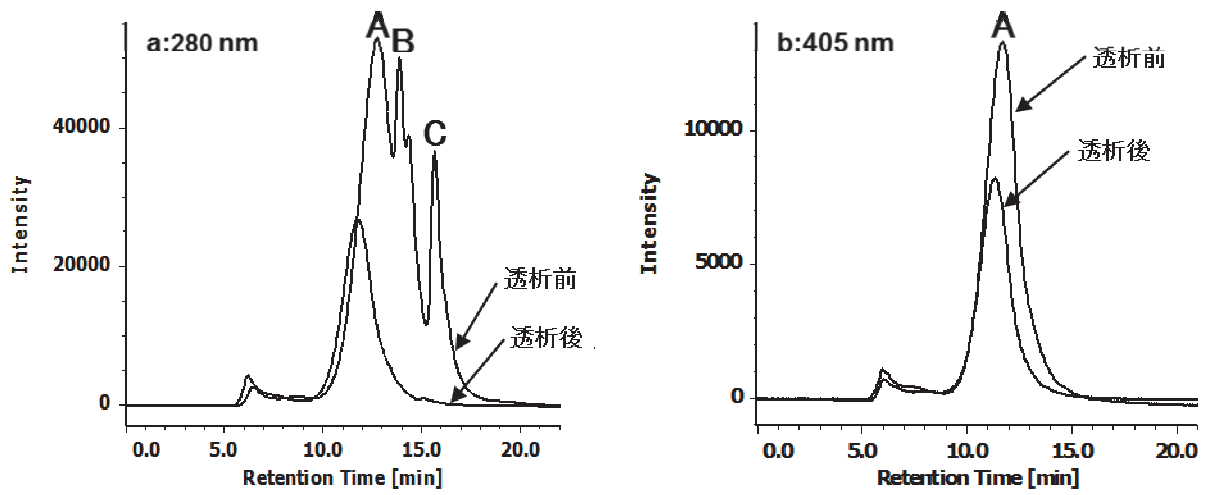


図 4. ゲル濾過 HPLC による透析前後の比較 (褐色試料)

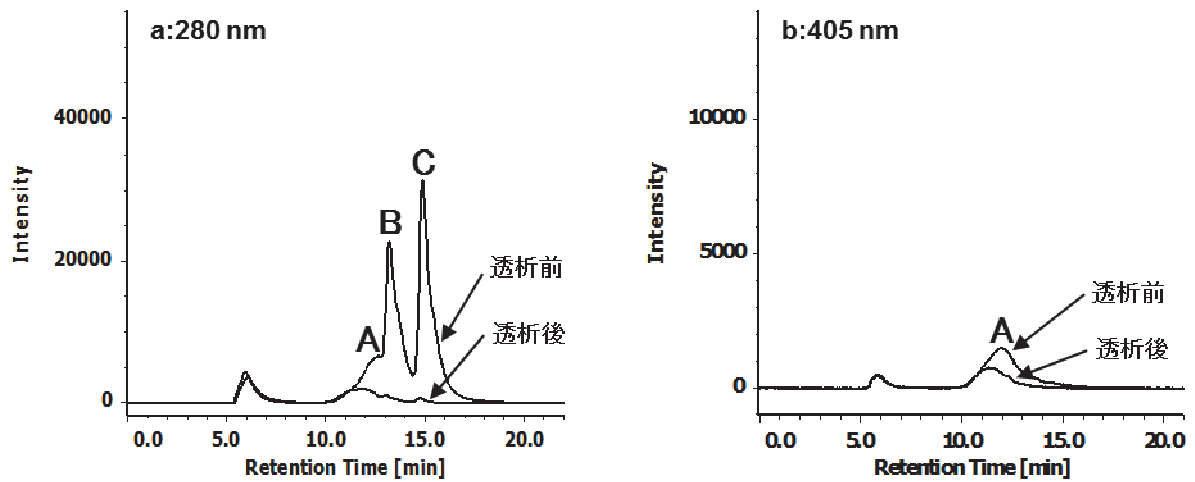


図 5. ゲル濾過 HPLC による透析前後の比較 (白色試料)

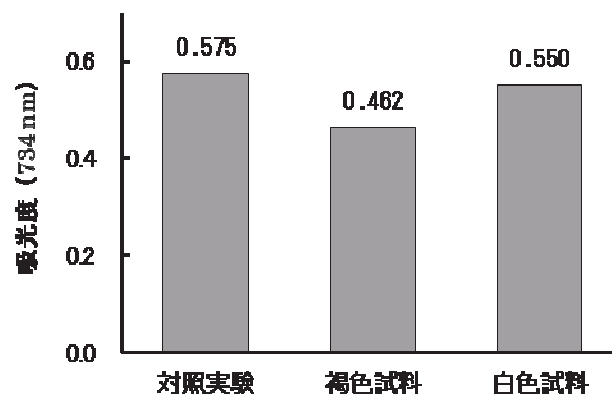


図 6. 褐色色素溶出液 (透析後) の抗酸化能

非常に弱いものであった。

本研究では、ドーナツ表面からデンプンを除去したうえで褐色色素を分離し、さらに透析を行うことで褐色を呈さない低分子物質を取り除いた。そして、こうして精製された褐色色素溶出液には、ドーナツ内部（白色部分）と比較して高い抗酸化能が認められた。現精製段階においては、この表面と内部における抗酸化能の差がすべて褐色色素によるものであるとは結論できない。しかしながら今回の結果は、褐色色素の関与を強く示唆するものと考えている。

## 参考文献

- 1) 本間清一：メラノイジンに関する食品化学的研究 日本栄養・食糧学会誌 第58巻 第2号 85-98 (2005)
- 2) Morales, F. J., Somoza, V., Fogliano, V. (2012) Physiological relevance of dietary melanoidins. *Amino Acids* 42, 1097-1109.
- 3) 板倉厚一：ドーナツ褐色色素の精製に関する研究（1）ーデンプンの除去ー 愛知教育大学家政教育講座研究紀要 第39号 73-78 (2009)
- 4) Borrelli, R. C., Mennella, C., Barba, F., Russo, M., Russo, G. L., Krome, K., Erbersdobler, H. F., Faist, V., Fogliano, V. (2003) Characterization of coloured compounds obtained by enzymatic extraction of bakery products. *Food and Chemical Toxicology* 41, 1367-1374.
- 5) 受田浩之, 石井利直：食品中のメイラード反応生成物の分析法 *Foods & food ingredients journal of Japan : FFI ジャーナル* 171, 84-91 (1997)
- 6) Long, L. H., Kwee, D. C. T., Halliwell, B. (2000) The antioxidant activities of seasonings used in Asian cooking. Powerful antioxidant activity of dark soy sauce revealed using the ABTS assay. *Free Radical Research* 32, 181-186.