

# ドーナツ褐色色素の精製に関する研究 (1)

## —デンプンの除去—

板倉 厚一

### 1. 諸言

食品の加工・調理などの加熱時に、その表面が褐色に変色してくる現象（褐変）が知られている。褐変は、食品中の還元糖とアミノ化合物（アミノ酸やタンパク質）との間で起こるメイラード反応が、褐色色素（メラノイジン）を生成するためである<sup>1)</sup>。また、メイラード反応は、褐色色素以外にも独特な香气成分の生成を伴うため、古くから着色とともに着香の目的でも積極的に利用されてきた<sup>2)</sup>。色や香りは、食品に欠かすことのできない重要な二次機能である。しかしながらその一方で、褐変が品質の劣化や栄養価の低下をもたらす場合も多い。

メイラード反応は多段階からなる非常に複雑な反応であるため、その最終産物である褐色色素の分子構造や化学的性質については不明な点が多い。しかしながら、こうした中でも、様々な食品から褐色色素の分離が試みられ、抗酸化作用<sup>3),4),5)</sup>や抗変異原作用<sup>6)</sup>、整腸作用<sup>7)</sup>、血圧安定化作用<sup>8)</sup>などの三次機能（生体調節機能）が報告されている。褐色色素は分子サイズの大きい高分子化合物と考えられている。このため、食品から褐色色素を分離する場合には、透析や限外ろ過、分子篩クロマトグラフィーなどを駆使し、褐色（可視領域の吸光度）を指標にしながら高分子画分を得る手法が多く用いられてきた。しかしながら、実際の褐変食品には、褐色を呈さない高分子成分（炭水化物やタンパク質など）も多量に存在することから、分子の大きさに基づく分画のみでは、必ずしも精製として十分とはいえない。褐色色素の構造や性質を明らかにし、また、三次機能を証明していくためには、より高い精製度が求められるであろう。そこで本研究では、パン菓子などの褐変食品に多く含まれるデンプンに着目し、これを褐色色素の精製過程において除去する方法を検討した。褐変食品としては、デンプンを主成分とした褐色強度の強い食品ということで、ドーナツを使用した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 ドーナツの作成

サラダ油 (19 g)、牛乳 (84 g)、および卵 (L サイズ一個 62 g) を混合して泡立たせ、さらに砂糖 (113 g) と塩 (1.5 g) を加えてかき混ぜた。そこに、小麦粉（薄力粉）(500 g) とベーキングパウダー (15 g) を篩にかけたものを少しずつ混ぜ込んだ。これを手でこねて生地を作り、その一部をとってドーナツ状にした。そして、160~170℃ のサラダ油で表面が十分に褐色になるまで揚げ、ドーナツ (62.18 g) を得た。さらにこれを凍結乾燥させることにより、乾燥ドーナツ (57.25

g) を得た。

## 2.2 ドーナツ表面褐色部分の分離および脱脂

乾燥ドーナツ表面を注意深くかきとり、細かく粉碎した (18.22 g)。そして、その一部 (3.00 g) をとってヘキサン (20 mL) 中でよく振り混ぜた。その後、遠心分離 (5,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、脂溶性成分の溶出した上澄みを取り除いた。以上の操作をさらに二回繰り返して脂溶性成分を十分に除去し、褐色粉末試料 (2.07 g) を得た。

## 2.3 酵素によるデンプンの加水分解

褐色粉末試料 (500 mg) を 0.1M 酢酸緩衝液 (0.02% NaN<sub>3</sub>) (pH 6.0) (5.98 mL) 中に懸濁させ、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 プルラナーゼ (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①を得た。沈殿に対しては以上の操作をさらに三回繰り返し、それぞれにおいて、上澄み②, 上澄み③, および上澄み④を得た。

## 2.4 褐色色素の溶出

上澄み④の段階で得られた沈殿を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (0.02% NaN<sub>3</sub>) (pH 8.0) (3.0 mL) 中に懸濁させ、その後、遠心分離 (5,000 rpm, 4°C, 15 min) を行って、上澄みを取り除いた。この操作をさらに二回繰り返し、沈殿をトリス塩酸緩衝液で十分に置換した。次に、沈殿を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (0.02% NaN<sub>3</sub>) (pH 8.0) (2.97 mL) 中に再度懸濁させ、10 mg/mL プロナーゼ E (30  $\mu$ L) (from *Streptomyces griseus*, 5.82 units/mg, Fluka) を加えて 37°C で三日間攪拌した<sup>9)</sup>。ただし、三日目については、さらに 10 mg/mL プロナーゼ E (30  $\mu$ L) を追加した。そして、遠心分離 (5,000 rpm, 4°C, 15 min) を行い、上澄み⑤を得た。

## 2.5 上澄みのろ過

上澄み①～⑤はすべて、グルコース、褐色強度、およびタンパク質の測定前に、マイレクス LG 13 (0.2  $\mu$ m, MILLIPORE) で必要量をろ過した。

## 2.6 グルコアミラーゼによる加水分解条件の検討

上澄み① (10  $\mu$ L) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) (90  $\mu$ L) で 10 倍に希釈し、これに 0.1 mg/mL または 1.0 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) を 25  $\mu$ L 加えた後、37°C で反応させた。そして、24, 48, 72, および 96 時間後に 0.6N NaOH (25  $\mu$ L) を加えた。遊離したグルコースは、グルコース CII-テストワコー

(和光純薬工業株式会社)を用いて定量した。なお、発色は反応液 (13  $\mu\text{L}$ ) に対して発色試液 (2.0 mL) を加えて行った。

## 2.7 上澄みのグルコアミラーゼ処理より遊離したグルコースの定量

上澄み①～⑤(20  $\mu\text{L}$ ) を 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) (180  $\mu\text{L}$ ) で 10 倍に希釈し、0.1 mg/mL グルコアミラーゼ (50  $\mu\text{L}$ ) を加えた後、37°Cで反応させた。そして、二日後に 0.6N NaOH (50  $\mu\text{L}$ ) を加えた。遊離したグルコースは、2.6と同じ方法で定量した。

## 2.8 褐色強度の測定

上澄み①～⑤ (200  $\mu\text{L}$ ) の吸光度 (405 nm) をマイクロプレートリーダー(マルチスキャン JX, Thermo Labsystems) で測定することにより、褐色色素の相対的濃度とした<sup>10)</sup>。

## 2.9 ペプチドの定量

上澄み①～⑤ (10  $\mu\text{L}$ ) をリン酸緩衝-生理食塩水 (PBS) (90  $\mu\text{L}$ ) で 10 倍に希釈し、BCA Protein Assay Kit (Pierce 社) を用いて定量を行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 ドーナツ褐色粉末試料の調製

本実験では実際の食品から褐色色素を分離するという目的から、ドーナツは一般的な調理方法により作成した。そして、凍結乾燥後に表面褐色部位のみを注意深くかきとり、これを有機溶媒ヘキサンにより脱脂して褐色粉末試料とした。

### 3.2 デンプンの加水分解・可溶化と褐色色素の溶出

ドーナツ作成に使用した材料の成分組成から、褐色粉末試料には多量のデンプンが含まれていると考えられる。そこでまず、デンプンを加水分解酵素 ( $\alpha$ -アミラーゼとプルラナーゼ) で可溶化して除去し、そのあとでタンパク質加水分解酵素 (プロナーゼ E) によって褐色色素を溶出させることとした。Borrelli らは、プロナーゼ E を用いることでパン菓子から効率よく褐色色素を溶出できると報告している<sup>9)</sup>。

褐色粉末試料を $\alpha$ -アミラーゼ/プルラナーゼの存在下、0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中 37°Cで一晩攪拌した。そして遠心分離により上澄み①を得た。沈殿は再び同じ緩衝液に懸濁し、 $\alpha$ -アミラーゼ/プルラナーゼを加えて一晩攪拌した後、遠心分離により上澄み②を得た。そして、同じ操作をさらに二回繰り返して、上澄み③と④を得た。最後の遠心分離で得られた沈殿は、次に 20 mM 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°Cで三日間攪拌した。その

後、遠心分離によって上澄み⑤を得た。

### 3.3 グルコアミラーゼによる加水分解条件の検討

各上澄み中に溶出したデンプン（およびその酵素分解物）量は、グルコアミラーゼで加水分解した際に遊離してくるグルコース量として定量することとした。そこでまず最初に、加水分解条件（反応時間とグルコアミラーゼ濃度）の検討を上澄み①を用いて行った。反応は四日間（96時間）行い、グルコアミラーゼ濃度は0.1 mg/mLと1.0 mg/mLの2段階で設定した。その結果、グルコース濃度は二日後以降ほぼ一定となり、グルコアミラーゼ濃度については0.1 mg/mLと1.0 mg/mLとの間でほとんど差は認められなかった（図1）。以上のことから、グルコアミラーゼによる加水分解は、反応時間は二日間、グルコアミラーゼ濃度は0.1 mg/mLで行うこととした。

### 3.4 上澄み中のデンプンの定量

各上澄み中のデンプン（およびその酵素分解物）の定量結果を図2に示した。対照実験（ $\alpha$ -アミラーゼ/プルラーゼ非添加）では、上澄み①～④において0.07・0.19 mg/mLのグルコースが検出され、目的とする褐色色素溶出液（上澄み⑤）においても0.26 mg/mLが確認された。これは、多量のデンプンが存在する限り、上澄みへのデンプンの溶出が避けられないことを示している。一方、 $\alpha$ -アミラーゼ/プルラーゼ添加の場合を見てみると、上澄み①で2.68 mg/mLのグルコースが検出されたものの、その後は急激に減少し、上澄み⑤ではついに検出限界以下にまで達した。こうして、デンプンを $\alpha$ -アミラーゼ/プルラーゼで加水分解・可溶化することにより、最終的に上澄みからデンプン（およびその酵素分解物）を除去することができた。

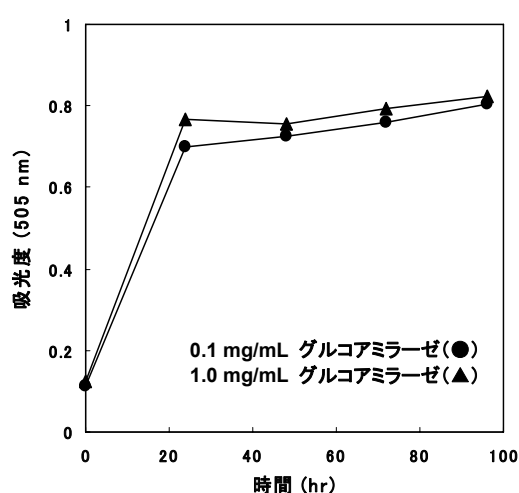


図1. グルコアミラーゼによる加水分解条件の検討

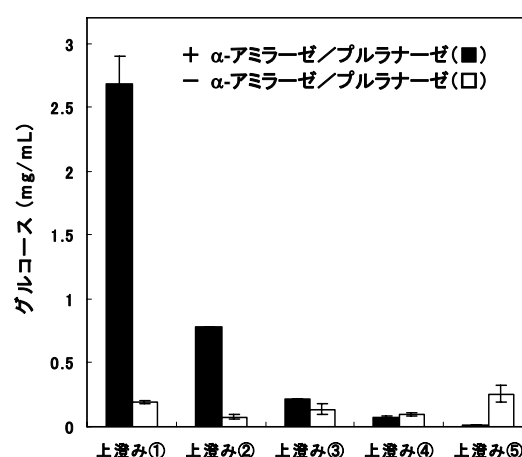


図2. 各上澄みのグルコース濃度

数値は二回の平均値±(最大値－平均値)

### 3.5 上澄みの褐色強度

褐色色素の構造や性質は不明な点が多く、その正確な定量は困難と言われている。このため、褐色の強度（400 nm 付近の吸光度）を用いることで褐色色素の相対的濃度とするのが一般的である<sup>10)</sup>。そこで本実験では、各上澄みにおける 405 nm の吸光度を測定した（図 3）。 $\alpha$ -アミラーゼ／プルラナーゼ添加の場合、上澄み①において吸収が見られたものの、上澄み②以降は急激に弱まり、上澄み④ではほとんど吸収は見られなくなった。しかしながら、まだ沈殿は濃い褐色を呈していた。そこで、沈殿から褐色色素を溶出させるため、Borrelli らの方法に従ってプロナーゼ E の添加を行った。その結果、上澄み⑤において強い吸収を認めた。図 4 には、上澄み④と⑤の段階における沈殿の様子を示した。一方、 $\alpha$ -アミラーゼ／プルラナーゼ非添加の場合を見てみると、添加した場合と比較して吸光度に大きな差は認められなかった。このことは、デンプンの加水分解・可溶化の目的で添加した $\alpha$ -アミラーゼ／プルラナーゼが、褐色色素の溶出に対してはほとんど影響しなかったことを示している。

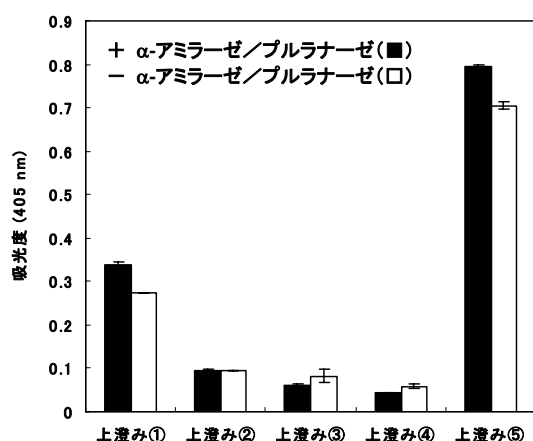


図3. 各上澄みの褐色強度

数値は二回の平均値 $\pm$ (最大値－平均値)

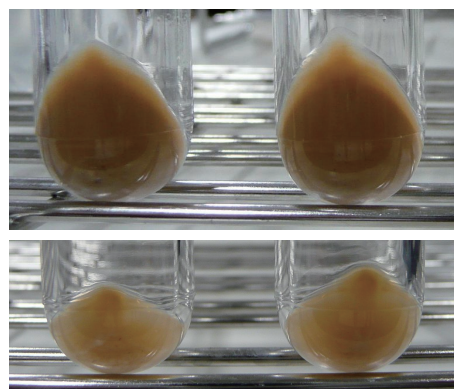


図4. 上澄み④(上)と⑤(下)の段階における沈殿

それぞれ二回行ったものを示した。

### 3.6 上澄み中のペプチドの定量

上澄み⑤中の褐色色素はタンパク質加水分解酵素の作用によって溶出されたものであることから、タンパク質が断片化されたペプチドと考えられる。そこで、上澄み⑤についてペプチドの定量を行ったところ、 $\alpha$ -アミラーゼ／プルラナーゼを添加した場合は  $2.41 \pm 0.01$  mg/mL、添加しない場合は  $2.02 \pm 0.04$  mg/mL であった。ここでも褐色色素の溶出の場合と同様、 $\alpha$ -アミラーゼ／プルラナーゼ添加の影響は顕著には認められなかった。なお、ここで定量されたペプチドのすべてが褐色を呈するのでは必ずしもない。

本研究では、ドーナツ褐色色素の溶出過程においてデンプンを除去する方法を検討した。褐色色素は酢酸緩衝液中で数日間攪拌してもごく一部が溶出されるのみであり、大部分はプロナーゼ E を添加することではじめて溶出が可能となる。そこでこのことを逆に利用し、プロナーゼ E を添加する前の段階でデンプンを除去しておくことを試みた。その結果、あらかじめデンプンを $\alpha$ -アミラーゼとプルラナーゼで加水分解・可溶化することで、褐色色素を溶出させる前にデンプンを除去することができた。褐変食品には、パン菓子をはじめとして多量のデンプンを含むものが多い。今回の方法は、こうした食品から褐色色素を精製する場合に広く応用が可能なものと期待される。

## 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) Adams, A., Borrelli, R. C., Fogliano, V., Kimpe, N. D., 2005. Thermal degradation studies of food melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4136-4142.
- 3) Borrelli, R. C., Visconti, A., Mennella, C., Anese, M., Fogliano, V., 2002. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6527-6533
- 4) Wang, H., Jenner, A. M., Lee, C.-Y. J., Shui, G., Tang, S. Y., Whiteman, M., Wenk, M. R., Halliwell, B., 2007. The identification of antioxidants in dark soy sauce. *Free Radic. Res.* 41, 479-488
- 5) Lindenmeier, M., Faist, V., Hofmann, T., 2002. Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6997-7006
- 6) Chuyen, N. V., 1998. Maillard reaction and food processing. Application aspects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 434, 21-235
- 7) Borrelli, R. C., Fogliano, V., 2005. Bread crust melanoidins as potential prebiotic ingredients. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 673-678
- 8) Rufián-Henares, J. A., Morales, F. J., 2007. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of coffee Melanoidins. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1480-1485
- 9) 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 Chem. Tox.* 41, 1367-1374.
- 10) 受田浩之, 石井利直：食品のメイラード反応生成物の分析法 *Foods Food Ingredients J. Jpn.* No.171, 84-91(1997)