

ドーナツ褐色色素の精製に関する研究 (2)

—消化酵素によるデンプンの除去と褐色色素の分離—

板倉厚一, 近藤夏美*, 鈴木泉帆*, 中村朱里*, 河上恵利**

1. 緒言

食品を加熱すると表面が褐色に変色(褐変)してくる。褐変の起こる原因は、加熱中に褐色色素(メラノイジン)が形成されるためである¹⁾。近年、褐色色素には、抗酸化作用や抗菌作用、食物繊維類似作用、金属キレート能などの様々な機能が報告されている²⁾。筆者らはこれまで、褐変食品のドーナツからデンプンを取り除き、そのうえで褐色色素を分離する方法を検討してきた。その結果、デンプンの除去はデンプン分解酵素(α -アミラーゼとプルラーゼ)を用いることで可能であり、褐色色素はタンパク質分解酵素(プロナーゼ E)によって分離できることを報告した³⁾。そこで本研究では、実際にドーナツを摂取した場合を考え、デンプンに対しては α -アミラーゼのみを、一方、褐色色素にはペプシン、トリプシン、 α -キモトリプシンを併用し、デンプンの除去と褐色色素の分離が可能であるかについて検討した。

2. 実験方法

2.1 ドーナツ表面(褐色部分)の分取および脱脂

市販のドーナツ(247 g)を凍結乾燥させ、その表面部分(24.1 g)を分取した。次に、その一部(3.0 g x 2)をヘキササン(20 mL x 2)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、褐色試料(2.84 g)を得た。

2.2 α -アミラーゼによるデンプンの加水分解

褐色試料(250 mg)を0.1M 酢酸緩衝液(0.02% NaN_3) (pH 6.0) (4.95 mL)に懸濁させ、2,000 units/mL α -アミラーゼ(from *Bacillus sp.*, 839 units/mg solid, ナカライテスク) (50 μL)を加えて37°Cで一晩攪拌した。その後、遠心分離(5,000 rpm, 4°C, 15 min)を行い、上澄み液(1日目)を得た。一方、沈殿物は0.1M 酢酸緩衝液(0.02% NaN_3) (pH 6.0) (4.95 mL)に懸濁し、2,000 units/mL α -アミラーゼ(50 μL)を加えてもう一晩37°Cで攪拌した。そして、遠心分離(5,000 rpm, 4°C, 15 min)により上澄み液(2日目)を得た。さらにこの懸濁・酵素処理・遠心分離を二回繰り返して、それぞれ上澄み液(3日目)と上澄み液(4日目)を得た。

2.3 上澄み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

上澄み液(1~4日目)(20 μL)をそれぞれ0.1M 酢酸緩衝液(pH 6.0) (180 μL)で10倍に希

積し、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 μ L）を加えて 37°C で反応させた。そして、48 時間後に 0.6N NaOH（50 μ L）を加えて反応を停止した。生成したブドウ糖は、反応液（13 μ L）に対してグルコース CII-テストワコー（和光純薬工業株式会社）（2.0 mL）を加えて室温で 15 分間発色させ、505 nm における吸光度を測定した。

2.4 タンパク質消化酵素による褐色色素の分離

上澄み液（4 日目）に対する沈殿物を 20mM 塩酸（2.0 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 20mM 塩酸で十分に置換した。次に、この沈殿物を 20mM 塩酸（0.98 mL）に再度懸濁させ、5.0 mg/mL ペプシン（from porcine stomach mucosa, 3,100 units/mg solid, SIGMA）（20 μ L）を加えて 37°C で攪拌した。24 時間後にいったん遠心分離（5,000 rpm, 4°C, 15 min）を行い、上澄みと沈澱を観察した。観察後はそのまま懸濁し、0.1N NaOH（310 μ L）で pH を 7-8 に調整した。そして、20mM トリス塩酸緩衝液（0.02% NaN₃）（pH 8.0）（550 μ L）と 0.4% NaN₃（100 μ L）を加えて全量を 1.96 mL とした。最後に、10 mg/mL トリプシン（Type II-S, from porcine pancreas, 1 BTEE units/mg solid, 1,310 BAEE units/mg solid, SIGMA-ALDRICH）（20 μ L）と 10 mg/mL α -キモトリプシン（from bovine pancreas, Type II, 83.9 units/mg solid, SIGMA）（20 μ L）を加え、37°C で攪拌した。24 時間後、遠心分離（5,000 rpm, 4°C, 15 min）を行い、上澄みを濾過（マイレクス-LG, 0.20 μ m, 13 mm, メルクミリポア）して褐色色素溶出液を得た。

3. 結果および考察

3.1 ドーナツ試料の作成

市販のドーナツを用い、凍結乾燥後に表面（褐色部分）をかきとって細かく粉砕し、これをヘキサソで脱脂して褐色試料とした。

3.2 α -アミラーゼによるデンプンの除去

本研究では、 α -アミラーゼのみを用いてドーナツからデンプンを取り除くことができるかについて検討した。褐色試料を酢酸緩衝液（pH 6.0）中 α -アミラーゼで処理し、37°C で一晚反応させた。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。さらに、残存したデンプンの酵素分解を徹底させるために、沈殿物に対してこの懸濁・ α -アミラーゼ処理・遠心分離を三回繰り返し、それぞれで上澄み液（2 日目、3 日目、および 4 日目）を得た。各上澄み液中の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により生成したブドウ糖として定量した。図 1 に示したように、上澄み液（1 日目）で 1.26 mg/mL で

あったものが二日目以降急激に減少し、上澄み液（4日目）ではほとんど検出されなくなった。このことから、 α -アミラーゼのみでも、四日間でデンプンを取り除くことが十分可能であることがわかった。

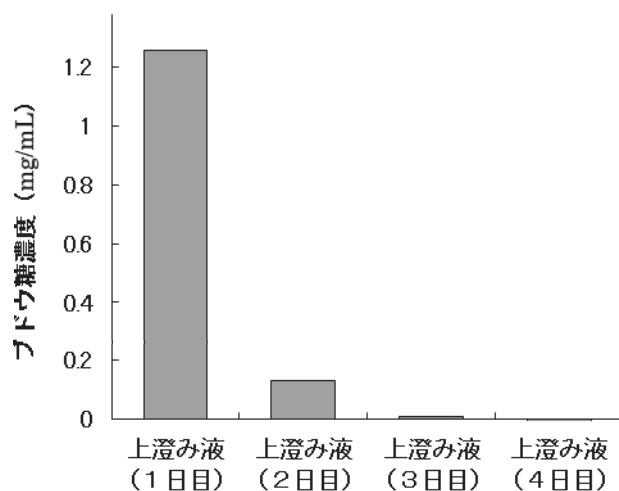


図1. 上澄み液（1～4日目）のブドウ糖濃度

3.3 タンパク質消化酵素による褐色色素の分離

Borrelli, R. C.らは、プロナーゼ E を用いてパン菓子から褐色色素を溶出している⁴⁾。また筆者らも、これをドーナツ（デンプンを含まない。）で確認している³⁾。本研究では、タンパク質消化酵素（ペプシン、トリプシン、 α -キモトリプシン）により褐色色素の分離が可能であるかについて検討した。まず、上澄み液（4日目）に対する沈殿物（図2）に、塩酸酸性下 37℃でペプシンを作用させた。図3は、24 時間後に遠心分離を行い、上澄みと沈殿の色を観察したものである。褐色色素の溶出は認められるものの、まだ沈殿にも残存しているのがわかる。そこで引き続き、

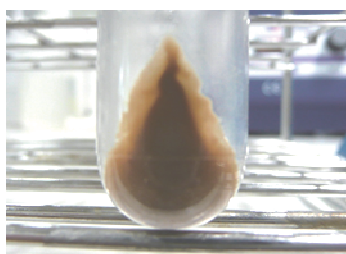


図2. ペプシン処理前の沈殿物

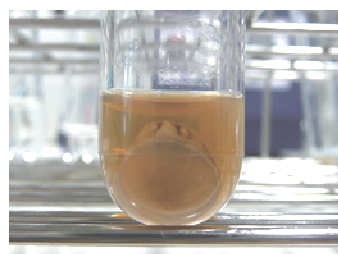


図3. ペプシン処理後

トリプシンと α -キモトリプシンを作用させることとした。観察後、NaOHにより pH を 7・8 とし、

トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で全量を調整した後、トリプシンと α -キモトリプシンを加えて 37°C で反応させた。そして、24 時間後に遠心分離を行い、上澄みとして褐色色素溶出液を得た。図 4 は遠心分離後の上澄みと沈殿の様子である。沈殿 (右) は白色であり、褐色色素がほとんど残っていないのがわかる。

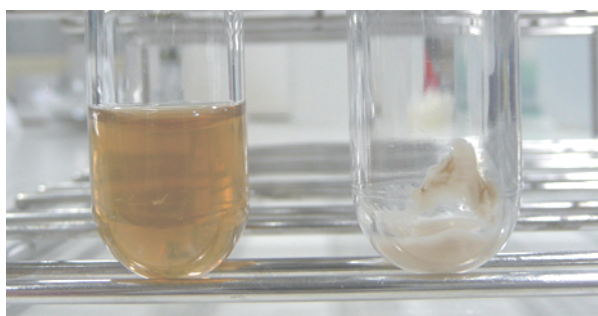


図 4. トリプシン/ α -キモトリプシン処理後
左) 上澄み 右) 沈殿

これまで筆者らは、ドーナツに α -アミラーゼとプルラーゼを繰り返し作用させることで、褐色色素の大部分を溶出させることなくデンプンを取り除くことができることを報告した³⁾。また、褐色色素は、プロナーゼ E を用いることで分離可能であることを示した。本研究では、これが消化酵素で可能であるかについて検討を行った。その結果、デンプンの除去は α -アミラーゼのみで、褐色色素の分離はペプシン、トリプシン、および α -キモトリプシンの併用で十分可能であることを示すことができた。今後は、それぞれの方法で得られた褐色色素の化学特性の違いについても明らかにする必要があると考えている。

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) -デンプンの除去- 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.