

## 桑の実アントシアニン色素の安定性

牧 善輔・田代 操・稲本 英子

### Stability of Anthocyanin Pigments of Mulberry

ZENSUKE MAKI, MISAO TASHIRO and HIDEKO INAMOTO

Three crude anthocyanin pigments, MP-1, MP-2 and MP-3, were prepared from mulberry juice, and their stability was examined.

MP-1, MP-2 and MP-3 showed a deep red color below pH 3.0, but they lost their color with a rise in pH value. MP-1, MP-2 and MP-3 were slowly discolored by heat treatment at 100°C and pH 2.2, but the rate of decolorization was lower than that of a natural pigment, betacyanin CBR. MP-1 and MP-2 were also unstable to UV irradiation under a strongly acidic condition, but the degree was similar to that of a synthetic pigment, Red 102. On the other hand, MP-3 was considerably stable to UV irradiation. Furthermore, storage tests of pigments in carbonated-water indicated that these mulberry pigments had a great practical value.

(Received July 13, 1981)

#### 緒 言

食品の色は人間の嗜好に深い関係があり、その品質判定の一つの重要な要素である。そのため加工食品において着色料は欠くことのできないものとなっている。しかし、近年タール系色素に代表される合成着色料の安全性が問題になっており、食品業界においても、その使用は逐次減少の一途をたどっている<sup>1)</sup>。このような情勢のもとで、合成着色料に代る物として、天然系の着色料が注目を集め、その使用量は徐々に増加しつつあり、また、新しい天然色素を開発利用しようとする動きも活発である<sup>2)~5)</sup>。

しかしながら、天然色素は一般に合成色素に比べて不安定であり、また、その安全性についても明白な根拠に乏しいのが現状である<sup>3)</sup>。したがって、合成物に替り天然物が使用されるのが望ましいとしても、今後は、これら天然色素の利用に当っては、それぞれの色素の性質をよく理解し、着色料としての適用範囲を明確に定めるとともに、それらの安全性を立証することが必要である。

植物由来の天然色素であるアントシアニン系色素は

赤、青、紫などの鮮やかな色を示す色素であり、その中には、シソの葉の色素であるシソニンのように古くから実用に供されているものもある<sup>1)</sup>。一方、桑の実にはアントシアニン色素に富む資源で、成熟すると紫黒色となり、すでに食用或いは醸造用に供されており、その安全性には、問題はないと思われるが、着色料の素材としての利用は未だ行なわれていない。この桑の実アントシアニン色素に関しては、Harbone がシアニジン-3-グルコシドであると報告しており<sup>6)</sup>、我々もまた、シアニジン-3-グルコシド以外に、ペラルゴニジン-3-グルコシドやペチュニジン-3-ルチノシドの存在することを明らかにしている<sup>7)</sup>。

本報告では、桑の実アントシアニン色素の利用という観点から、桑の実より抽出した粗色素に関して行なった若干の安定性検討の実験結果について述べる。

#### 実験材料および方法

##### 1. 色素濃縮液の調製

1000 g の桑の実(京都工芸繊維大学嵯峨野農場で採集した魯桑の実)をミキサーで破碎、0.1%塩酸を含むメタノール約 1000 ml を加えて色素を抽出し、濾過

して深紅色の抽出液を得た。これを約40℃で減圧濃縮し、粗色素濃縮液（以下 MP-1 と称する）を調製した。本品は桑の実の糖成分を多量に（1160 mg/ml）含んでいる。

## 2. イオン交換樹脂による糖の除去

先と同様にして得た色素抽出液に Dowex 50W-X4 (H型)陽イオン交換樹脂を加え、前報の方法<sup>7)</sup>に従って糖成分を除去した粗色素濃縮液（以下MP-2と称する）を調製した。

## 3. 醗酵による糖の除去

糖成分を除去する方法として、Adams<sup>8)</sup>らの方法に準じて、色素抽出液に *Candida utilis* を培養した。桑の実 1000 g をミキサーで破碎、水 1000 ml を加えて色素を抽出、濾過して得た抽出液 200 ml を 500 ml 容の培養フラスコにとり、塩酸で pH を調整し、予め 20 ml のイーストスープに培養しておいた *Candida utilis* を加え、30℃ で振盪培養した後、遠心分離（10,000 g, 15分）により菌体を除き、40℃で減圧濃縮して、粗色素濃縮液（以下 MP-3 と称する）を調製した。

## 4. 吸収スペクトルの測定

MP-1, MP-2, MP-3 をそれぞれ、3 ml, 20 ml, 3 ml とり、水で希釈して 100 ml とした。対照として、市販合成着色料（「食用赤色」株式会社小林作商店、赤色 102号15%含有。以下 Red 102と称す）0.35 g, 市販天然着色料（「タナカラー-A」田辺製薬株式会社、ビートレッド。以下 CBR と称す）5 g も同様に水に溶かして100 ml とした。これら色素をさらに McIlvaine 氏緩衝液（pH 2.2, 3.0, 5.0）のそれぞれを用いて15倍に希釈し、450 nm~600 nm における吸収スペクトルを日立ダブルビーム分光光度計 124 型で測定した。

## 5. 熱安定性

先と同様にして調製した、各 pH の色素液を100℃で0~180分間熱処理し、急冷後 520 nm での吸光度を測定した。なお、CBR は熱に対して非常に不安定なため加熱時間を0~15分間とした。

## 6. 紫外線に対する安定性

各色素溶液（pH 2.2, 3.0, 4.0, 5.0）を石英の試験管に入れ、リコー社低圧水銀蒸気放電装置 UVL 型 30 W（主波長2537 Å）を用いて、光源から1 cm の距離において紫外線を30分間照射した。各色素液の照射前後における 520 nm の吸光度を測定し、結果は照射前に対する相対的吸光度で表示した。

## 7. 炭酸水への着色安定性

MP-1, 3 ml, MP-2, 20 ml, MP-3, 3 ml および

Red 102, 0.35 g をとり1%クエン酸溶液でそれぞれ 100 ml にして、1 N水酸化ナトリウムと飽和クエン酸溶液を用いて pH 2.0に調整後、遠心分離（10,000 g 15分間）し、上澄液を着色試料とした。つづいて市販の無着色炭酸水（キリンレモン）200 ml 容瓶を開栓し、すばやく炭酸水 10 ml を抜き取り、各試料 10 ml を注入して、新しい王冠で再び打栓し、着色炭酸水を調製した。これらを30℃と5℃で暗所に貯蔵し（約80日間）、その間7~9日ごとに各試料瓶を開栓し、十分に炭酸ガスを放出した後、着色炭酸水の 520 nm での吸光度を測定した。

## 実験結果および考察

### 1. 醗酵による糖の除去

桑の実抽出液の pH を 4.0, 5.0, 6.0 に調整して24時間振盪培養した後、遠心分離して菌体を除いた上澄液に残っている糖の量を、Somogy Nelson 法により、窒素量を Kjeldahl 法により定量した結果を Table 1 に示す。pH 4 のときが最も残存する糖が少く、窒素の量も少ない。

Table 1 Effect of pH on Fermentation by *Candida utilis*

	Sugar mg/ml	Nitrogen mg/ml
Initial juice	42.0	0.95
After fermentation		
pH 4.0	0.96	0.30
pH 5.0	1.04	0.42
pH 6.0	0.99	0.40

Table 2 Residual Sugar and Absorbance (520 nm) during Fermentation by *Candida utilis* (30°C pH 4.0)

Fermentation time (hr)	Sugar mg/ml	Absorbance
non heat treatment		
0	43.0	0.59
24	0.48	0.49
48	0.49	0.45
72	0.40	0.42
heat treatment		
24	0.60	0.48
48	0.54	0.46
72	0.48	0.48

次に、pH 4 で時間を変えて培養した結果が Table 2 である。吸光度は醗酵終了後、遠心分離して得た上

澄液を、0.1 M acetate buffer pH 4.0 で10倍に希釈して、520 nm で測定したものである。24時間以上醗酵をつづけても、糖は余り減少しないが、吸光度は少しずつ減少する。醗酵前に比し、いずれも吸光度が減少しているのは、遠心分離により菌体を除去する際に、色素の一部が失われたものと思われる。熱処理とは、菌を加える前に100℃の water bath 中で10分間加熱したもので、無処理のものと同様に殆んど変化はなかった。以上の結果より、*Candida utilis* による糖の除去には、pH 4.0 で予め熱処理を行わず、24時間の振盪培養を行うことにした。

2. pH による吸収スペクトルの変化

桑の実より調製した粗色素 MP-1, MP-2, MP-3 および合成着色料 Red 102, 天然着色料 CBR の pH 2.2, 3.0, 5.0 における吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。桑の実色素は Red 102 や CBR と異り、pH が低い方が発色率が高く、また、吸収極大の位置は、pH が高くなると、MP-1, MP-2 では長波長へ移動した。すなわち、MP-1 では極大吸収値を与える波長は pH 2.2 で 516 nm, pH 3.0 で 517 nm, pH 5.0 で 528 nm であり、MP-2 では 510, 513, 534 nm となる。しかしながら、MP-3 では pH 5.0 で 498 nm と短波長へ移動した。視覚的にも、これらの色素は低い pH では紫紅色を示したのに対し、pH の上昇と共に減色し、かつ色調に変化がみられた。このような pH の変化による色調の変動は、Red 102 ではほとんど見られず、また、ベタンシアニン系色素である CBR でも僅かであった。

pH の上昇による淡色化はアントシアニン系色素に共通に見られるものであり<sup>9)</sup>、桑の実の色素もその主構成成分が、シアニジン-3-グルコシドのアントシアニンであることから当然ではあるが、このことは着色料として見た場合、その適用範囲が限られてくるものと思われる。しかしながら、Fig. 1 に示されたように pH 3 以下では極大吸収波長がさほど変わらないことから、pH の低い食品には十分利用可能であると考えられる。

3. 熱安定性

100℃で熱処理した時の MP-1 の 520 nm での吸光度変化を Fig. 2 に示す。MP-1 は熱処理により、その吸光度を減少し、その速度は pH 2.2, 3.0, 5.0 の順であった。同様の結果が MP-2, MP-3 でも得られ、したがって桑の実色素は pH 2.2 より pH 5.0 の方が安定であるという結果になった。しかしながら色調の面では pH 2.2, 3.0 では単に淡色化が生じただけであったのに対し、pH 5.0では褐色への変色が見られた。このことは吸収スペクトルの測定からも確認され、pH 5.0では加熱時間120分で著しいスペクトルの変化が生じた。したがって色調の点では、pH 2.2 のような低い pH の方が熱安定性が高いといえる。なお、pH 5.0 で熱処理した色素液を再び pH 2.2 に調整しても、やはり色調の変化が認められた。

対照として用いた Red 102, CBR の熱安定性は桑の実色素と著しく異っていた。すなわち、Red 102 は非常に安定で、pH に無関係にその色調を保っていた。一方、CBR は非常に不安定で急速に退色し、特に pH

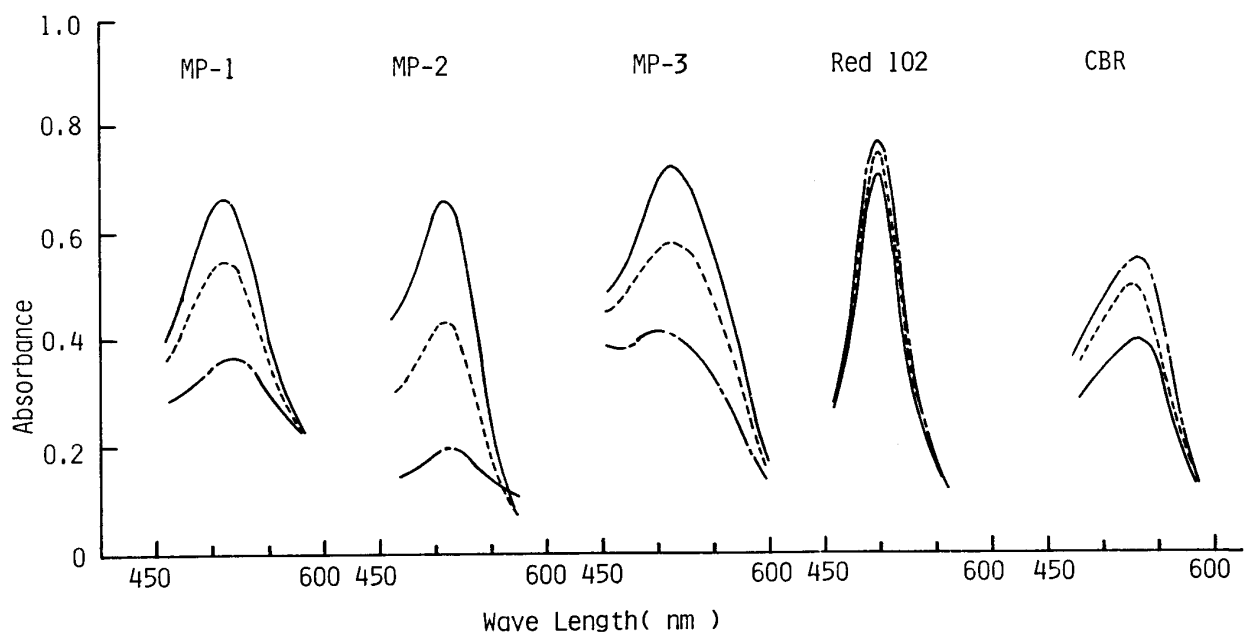


Fig. 1. Absorption Spectrum of Pigments.  
 —, pH 2.2; ----, pH 3.0; - · - ·, pH 5.0.

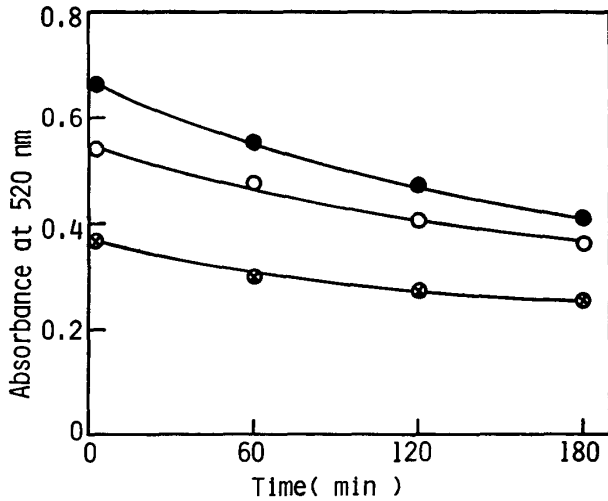


Fig. 2. Effect of pH on Thermo-stability of MP-1.  
 ●-●, pH 2.2; ○-○, pH 3.0;  
 ⊗-⊗, pH 5.0.

の低い場合 (pH 2.2) は数分で, pH 5.0 でも約15分間でほとんどその色を失った。Fig. 3 に pH 2.2 での各色素の熱安定性の違いを示してある。桑の実の色素は Red 102 と CBR の中間の安定性を有しており, また, MP-1, MP-2, MP-3 の間にも若干の相違のあることがわかる。糖の存在により耐熱性の増加することは, 同じアントシアニン系の色素であるソニンで観察されているが<sup>10</sup>, 殆んど糖を酵酵により除いた MP-3 が MP-1 より安定であったことは興味深い。

4. 紫外線の影響

Fig. 4 に MP-1, MP-2, MP-3 および Red 102 の

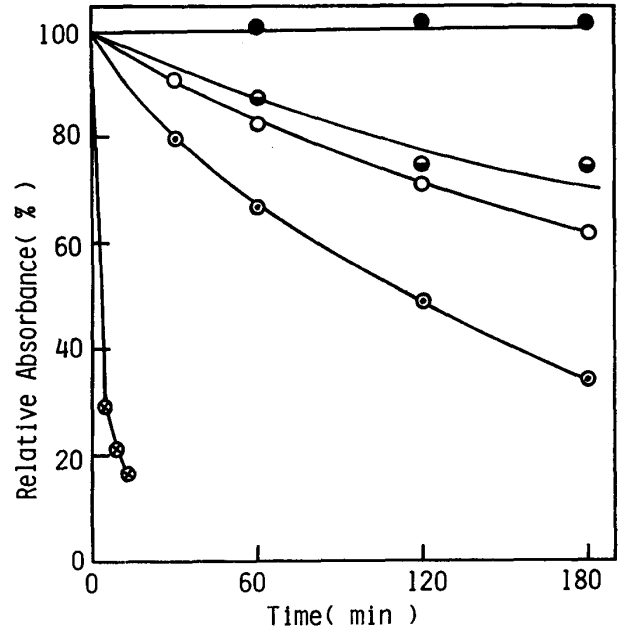


Fig. 3. Thermo-stability of Pigments at pH 2.2.  
 ○-○, MP-1; ⊙-⊙, MP-2;  
 ●-●, MP-3; ●-●, Red 102;  
 ⊗-⊗, CBR.

紫外線照射に対する安定性を示す。CBR は本条件下では完全に退色したため, 図には示さなかった。桑の実色素と Red 102 の安定性はほぼ同程度で, いずれも pH の低い方が不安定であった。紫外線により, pH 5.0 の溶液の方が pH 2.2 よりも変化をうけないという結果は, いちごより得たペラルゴニン-3-グルコシドにおいても観察され<sup>11</sup>, これはアントシアニン色素が pH の違いによりその構造を異にする<sup>12</sup>こ

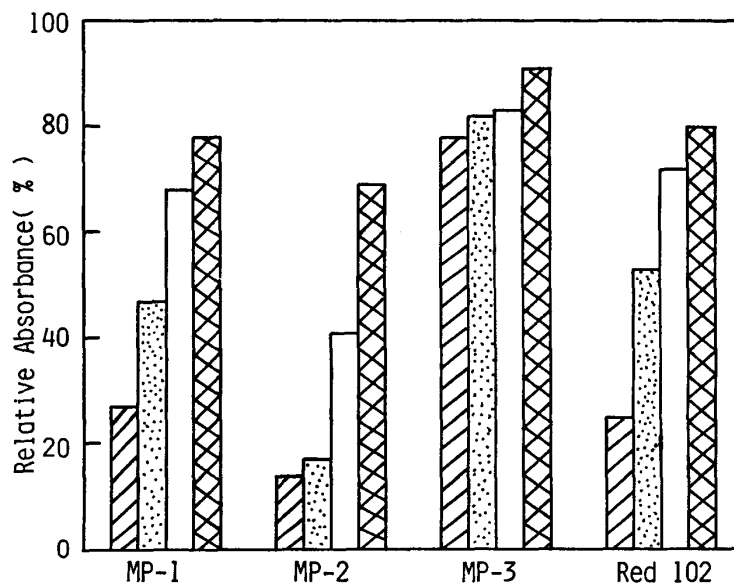


Fig. 4. Effect of UV Irradiation on Pigments.  
 ▨, pH 2.2; ▤, pH 3.0;  
 □, pH 4.0; ⊗, pH 5.0.

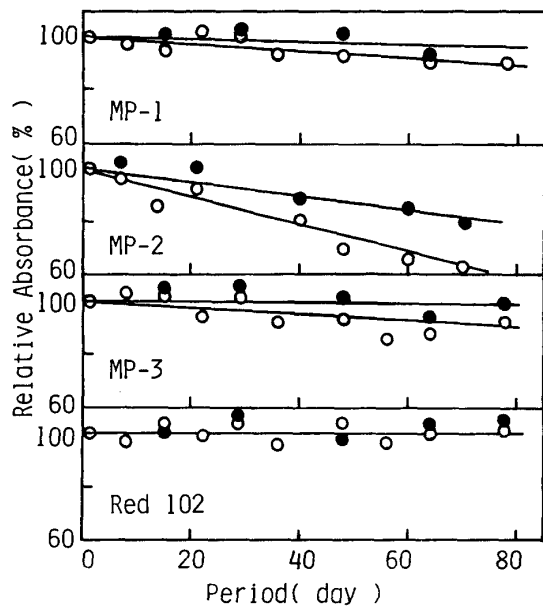


Fig. 5. Color Changes of Pigments in Carbonated-water.  
●—●, 5°C; ○—○, 30°C.

とによるものと考えられる。醸酵した桑の実色素 MP-3 が最も安定であり、特に酸性における退色が他の色素に比し少なかった。

5. 炭酸水中における安定性

桑の実色素が実際の食品中で、どのような安定性を示すかを検討する必要がある。先に述べたように、桑の実色素は pH 3.0 以下の酸性条件での色調が望ましく、また、強い加熱 (100°C, 30分間以上) や長時間の日光への曝露は不相当である。このような条件を満足する食品として、炭酸飲料が考えられる。Fig. 5 は市販炭酸水 (pH 2.9) へ Red 102, MP-1, MP-2, MP-3 をそれぞれ添加した後、約80日間にわたって、520 nm の吸光度を追跡した結果であるが、桑の実色素はいずれも、Red 102 には劣るものの比較的高い安定性を有していることがわかる。さらに、MP-1, MP-2, MP-3 とも貯蔵期間を通じて、沈澱や変色は認められなかった。したがって、これら色素は十分利用可能であるといえる。

一般に天然色素を使用して、加工食品製造を行う場合に考慮しなければならない点は、pH と色調、金属イオン、酸素、光、水分、温度の影響、さらに、食品成分との関係がある<sup>23)</sup>。また製造工程のみならず、貯蔵、流通過程での条件も加味しなければならない等、数多くの問題点がある。

本報では、まず、桑の実の抽出液には多量の糖が含まれており、そのため濃縮液にしたとき、粘度が大きく、吸湿性が強く、粉末製品とするのが困難である。

また、多量の糖のため、濃縮液の貯蔵性はあるが、使用範囲に限られる等の欠点もあるので、糖成分を除く方法について検討し、つづいて桑の実色素の pH と色調、温度や紫外線に対する安定性を調べたが、その実用化のためには、さらに、残された問題点を解明していく必要がある。

要 約

桑の実より3種類の粗色素液、MP-1 (糖成分を多量に含有する濃縮色素)、MP-2 (イオン交換樹脂 Dowex 50W-X4, H型、処理により糖を主体とする非吸着成分を除去した濃縮色素)、MP-3 (*Candida utilis* を培養して糖成分と少量の窒素成分を除去した濃縮色素) を調製し、その安定性を検討した。これらの色素は pH 3.0 以下の酸性のもとで、鮮明な紫紅色を呈したが、pH の上昇とともに著しい淡色化と色調の変化が見られた。pH 2.2, 100°C の加熱処理により、いずれも徐々に退色したが、その速度は市販のベタシアニン系天然色素に比べると著しく遅く、天然色素としては安定な部類に属することが明らかとなった。

紫外線に対しては、MP-1, MP-2 は強酸性下で不安定であったが、その程度は合成色素 (赤色 102 号) と同等であり、一方、醸酵した桑の実色素 MP-3 は強酸性下においてもきわめて安定であった。さらに市販炭酸飲料に、桑の実色素を添加し着色安定性を調べたところ、十分実用化に耐える結果を示した。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金の援助による。

(1981年7月13日受理)

文 献

- 1) 片山 脩: 食の科学, No 11, 98 (1973)
- 2) 井川房欣: ジャパンフードサイエンス, 9 (2), 34 (1970)
- 3) 吉積智司: 食品工業, 15 (14), 20 (1972)
- 4) R. E. Buckmire and F. J. Francis: *J. Food Sci.*, 43, 908 (1978)
- 5) F. M. Clydesdale, J. H. Main, F. J. Francis and R. A. Damon, Jr: *J. Food Sci.*, 43, 1687 (1978)
- 6) J. B. Harbone: *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, p. 127 (1967) Academic Press, London and New York
- 7) 牧 善輔・稲本英子: 京都府立大学学術報告 (理学・生活科学), 23号, 17 (1972)
- 8) J. P. Adams, J. H. von Elbe and C. H. Amun-

- dson: *J. Food Sci.*, 41, 78 (1976)
- 9) 中林敏郎・木村 進・加藤博通: 食品の変色とその化学, p. 38 (1967), 光琳書院 (東京)
- 10) 谷村顕雄・片山 脩・遠藤英美・黒川知男・吉積智司: 天然着色料ハンドブック, p. 273 (1979), 光琳 (東京)
- 11) 牧 善輔・稲本英子: 家政学雑誌, 22, 92(1971)
- 12) E. Sondheimer: *J. Am. Chem. Soc.*, 20, 1507 (1953)