

原著論文

## 片平あかねのアントシアニンと緑茶のクロロフィルを含む 分離液状ドレッシングの保存性

北條雅也・石川亜希

### Preservability of a Separate Type Salad Dressing Containing Anthocyanins of Traditional Vegetable 'Katahiraakane' in Nara Prefecture and Chlorophyll of Green Tea

Masaya HOJO and Aki ISHIKAWA

#### Summary

The preservability of a separate type salad dressing using anthocyanin (AN) contained in Katahiraakane (*Brassica rapa* L.) in the aqueous phase and chlorophyll (Chl) contained in tea in the oil phase was evaluated. In 5°C dark conditions, the AN color tone was maintained, the decomposition of Chl was suppressed, and the oxidation of oil was also suppressed for up to 3 months. Catechins were added to maintain the AN color tone. However, despite effects observed under UV treatment, no effect was observed under fluorescent light. Furthermore, anthocyanin aglycone of Katahiraakane was revealed qualitatively to be pelargonidin.

**Key Words:** Anthocyanin, Catechin, Chlorophyll, Peroxide value, Preservability, Salad dressing

#### 緒言

食品の色は、食欲や食の楽しさを増進させる要因として重要である(津田ら, 2009). 加工食品の場合、色を付与させるために、食品添加物である合成着色料が使用されることがあるが、近年、消費者の天然物志向の高まりにより、天然の着色料が求められている(津田ら, 2009; 牧ら, 1981). 野菜や果物に含まれる色素として、アントシアニン、クロロフィル等があるが、これらは、合成着色料に比べて不安定で、長期間の保存が困難である場合が多い(津田ら, 2009; 牧ら, 1981; 尾崎ら, 2006).

奈良県北部に位置する山添村には、在来品種でアブラナ科のカブの一種である‘片平あかね’(*Brassica rapa* L.)があり、根部がアントシアニンの赤色を呈する。地元では、主に酢漬けにして食されており、酸性にすることにより鮮やかな色調を示す。同じく山添村には緑茶(*Camellia sinensis* L.)の生産が盛んで、緑茶では緑色を呈するクロロフィルが含まれる。

我々は、これまで県内農産物を利用した加工品を開発してきたが、今回、片平あかねに含まれるアントシアニンを水相に、緑茶に含まれるクロロフィルを油相に溶かした分離液状ドレッシングを試作した(第1図)。試作品は現地での評価も高く、今後普及



第1図 水相に片平あかねを油相に緑茶を使用したドレッシングの試作品

Fig. 1. Salad dressing sample

する見込みがある。

アントシアニンは光と温度により分解されやすく(津田ら, 2009), 試作したドレッシング中のアントシアニンの保存性は不明である。また、アントシアニンのアグリコンは主に6種類あり、色の特性が異なるが(津田ら, 2009; 津久井, 1998), 片平あかねの同定はされていない。

クロロフィルも光と熱により退色し(守ら, 1964;

佐伯ら, 1987; 倉田ら, 1990), さらに油の中にクロロフィルを添加すると油の酸化を促進することが知られている(千葉, 1999; 千葉, 2005; 遠藤, 1998). しかしながら緑茶を含む油の保存性についての報告はない.

このように, 試作した分離液状ドレッシングは, 光と温度により分解されやすい未同定のアントシアニンを含み, 油の中には酸化しやすく分解されやすいクロロフィルを含む. これらの性質は, 店頭陳列中や保存期間中に, 見た目や食味に悪影響を及ぼすと考えられる.

アントシアニンについては, その退色抑制方法に関して, グリチルリチン, ルチン,  $\alpha$ -シクロデキストリンの添加(林・津久井, 1998), ポリフェノールの添加が有効であるとの報告がある(尾崎ら, 2006; Brenesら, 2005; 桜庭・一瀬, 1982). しかしながら, その実用例は少ない(越島・竹村, 2016).

そこで本研究では, 試作した分離液状ドレッシングの保存特性を知ることに加え, 緑茶に含まれるポリフェノール的一种であるカテキンに注目し, これを添加することによりアントシアニンの色調変化が抑えられないか検討した. また片平あかねのアントシアニンの色調特性について知るため同定を試みた.

そのため, 片平あかねのアントシアニンのアグリコンを明らかにし, 片平あかねのアントシアニンに対して, 緑茶由来のカテキンに退色抑制効果があるか促進試験により調査した. さらに, 店頭陳列棚を想定した環境下で, 模擬ドレッシング作成し, 水相部のアントシアニンの色調変化と, 油相部のクロロフィルを溶解させた油の色調変化と油の酸化について調査した.

## 材料および方法

### 材料

片平あかねは山添村片平地区の生産者より11月に入手し, 入手後は直ちに5°Cで保存し数日までに裁断した後, -30°Cに保存して予備凍結し, 凍結乾燥を行った. 凍結乾燥物を家庭用電動ミルミキサー(IFM800DG イワタニ製)により粉碎した後, 乾燥剤をいれたアルミ袋に入れて-30°Cで保存し, 実験に供試した. カテキン混合物(和光純薬製 生化学用: 緑茶由来のカテキン粗抽出物で, エピカテキン, エピガロカテキン, 没食子酸エピカテキン, 没食子酸エピ

ガロカテキンの混合物), 酸化防止剤として市販されている緑茶抽出物の食品添加物(以下食品添加物と称する), 緑茶は大和茶研究センターで製茶した‘やぶきた’の2番茶をミルで粉末化したものを使用した. 95°Cの超純水1ℓに緑茶30gを加え10分間湯煎して抽出したものを水冷し室温になった後, 遠心分離し, No.2のろ紙により濾過し, 緑茶の抽出液を得た. 模擬ドレッシングの酢は10%酸度醸造酢(清泉-10ミツカン製)を使用した.

カテキン混合物, 食品添加物, 緑茶の抽出液はHPLCによりgallic catechin(GC), epigallocatechin(EGC), catechin(C), epicatechin(EC), epigallocatechin gallate(EGCg), gallocatechin gallate(GCg), epicatechin gallate(ECg), catechin gallate(Cg)の定量を行った. HPLC分析はAgilent1260(Agilent製)を用い, 以下の条件で行った. カラム: 5C18-AR-II 4.6ID×150mm(ナカライテスク製), カラム温度: 40°C, 移動相A液(水:アセトニトリル:85%リン酸=95.45:4.5:0.05), B液(水:アセトニトリル:85%リン酸=49.95:50:0.05), 濃度勾配: A液 100%-90%(0-5min), 90-70%(5-8min), 70%(8-10min), 20%(15-20min), 流速: 1ml/min, 検出波長: 231nm(フォトダイオードアレイ検出器, Agilent製)

### 実験1 アントシアニンの同定

片平あかねのアントシアニンのアグリコンの同定を立澤らの方法を一部改変して行った(立澤・篠田, 2005). 片平あかねの凍結乾燥粉末100mgに500 $\mu$ ℓの1%塩酸メタノールを加えて混合し, さらに2mol/ℓのHClを500 $\mu$ ℓ加え, 沸騰浴中で1時間加水分解した. 遠心分離後, 上清をSepPackPlusC18(Waters製)に色素を吸着させ, 30%メタノールを加えた後, 50%メタノールを加えて色素を溶出した. これをTLC, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析と分光光度計による吸収スペクトル分析に供試した. TLC分析: セルロース薄層板(20×20cm, Merck製)に試料を点着し, 展開溶媒としてForestal(酢酸:塩酸:水=30:3:10)を用いて, 1時間展開した. HPLC分析は, Waters2695(Waters製)を用い, 以下の条件で行った. カラム: 5C18-PAQ 4.6 $\phi$ ×250mm(ナカライテスク製), カラム温度: 40°C, 移動相A液(1.5%リン酸), B液(1.5%リン酸, 20%酢酸, 25%アセトニトリル), 濃度勾配: A液 80%-15%(40min), 流速: 1.0ml/min, 検出波長: 200-700nm(フォトダイオードアレイ検出器; Waters2996, Waters製)を用いた.

分光光度計による分析はサンプルを分光光度計 (V-630, 日本分光製) で 200-700nm の吸収スペクトルを測定し, 吸収極大 ( $\lambda_{max}$ ) を測定した. 測定後, 塩化アルミニウム ( $AlCl_3$ ) を加え, 可視部吸収極大の移動の有無を調べた. 各分析に標準品として, ペラルゴニン, シアニジン, デルフィニンを用いた.

## 実験 2 UV 照射下のアントシアニンの色調

片平あかね粉末試料 10mg を 2ml のエッペンドルフチューブに入れ, 各種添加物と酢酸 5  $\mu$ l を加え, 計 500  $\mu$ l となるように超純水を加えて調整し, 遠心分離した後, 上清をサンプル溶液とした. 添加物はカテキン区と食品添加物区はカテキン混合物と食品添加物を超純水で溶解し, カテキン区は最終濃度 0.5% に, 食品添加物区は 0.3%, 0.03% となるよう調整した. 緑茶区は 1g の緑茶粉末に 10ml の超純水を加え熱水浴中に 15 分間湯煎し室温に冷却後, 超純水の代わりに使用した. 総カテキン類濃度は, カテキン区で 0.3%, 食品添加物区は最終濃度 0.3% は 0.08%, 最終濃度 0.03% は 0.008%, 緑茶区で 0.1% となった.

色調調査のため, サンプル溶液を 96 穴マイクロプレートに入れ, 揮発防止に透明粘着シート (Optical adhesive Cover Applied Biosystems 製) を貼り, 殺菌灯 (GL-15 TOSHIBA 製) 照射下 (UV-C: 0.1mw/cm<sup>2</sup>, 24 時間照射/日), 室温で静置した. UV 処理前, UV 処理 2 日, 3 日, 4 日, 5 日, 7 日後のサンプルについて, 写真で外観を撮影し, マイクロプレートリーダー (Synergy HTX BioTek 製) により OD510nm を測定し色調を評価した. UV 処理 3 日後以降は沈殿物が観察されたので, 遠心分離し上清を測定に使用した.

## 実験 3 蛍光灯下でのアントシアニンの色調

第 1 表の組成で模擬ドレッシングを作成した. 総カテキン類濃度が 0.01%, 0.05%, 0.1% となるように, カテキン混合物と食品添加物を超純水に溶解して添加し, 緑茶については適宜希釈して用いた. 無添加区では超純水を用いた. 蓋つきガラス管にそれぞれ 9ml 加えて蓋をし, 80°C, 20 分間湯煎し殺菌した.

JIS 照度基準のスーパーマーケットの陳列部の照度 2000lx (蛍光灯 24 時間/日) に設定した人工気象器 (NC350 日本医化器械製作所製) に試験管立てにセットした試料を静置した. 暗所の区は試験管立てをアルミ箔で覆い遮光した. 温度は 5°C, 25°C とし, 5°C 暗所, 5°C 明所, 25°C 暗所, 25°C 明所を設定した. 各試験区 3 反復とし, 保存期間中は光, 温度環境に偏り

第1表 模擬ドレッシングの組成

Table 1. Salad dressing formulation

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| 10%acidity Brewing vinegar | 15 g  |
| Suger                      | 10 g  |
| Salt                       | 5 g   |
| Katahiraakane              | 1 g   |
| Catechin solution          | 69 g  |
| Total                      | 100 g |

が生じないように, 1 週間に一度の頻度で, 場所の入れ替えを行った. 保存後 1 か月, 3 か月, 6 か月に, 赤色の色調の a\* 値を色差計 (SE7700 日本電色工業製) により測定した.

## 実験 4 緑茶入り油の保存性

緑茶 12g をキャノーラ油 (日清オイリオ製) 600ml に加え攪拌した後, 1 晩室温で静置した. 10ml ずつねじ口試験管に分注し蓋をした後, 80°C で 20 分間湯煎し殺菌した. 人工気象器により, 5°C で明所 (5°C 明所区), 25°C で明所 (25°C 明所区), 5°C で暗所 (5°C 暗所区), 25°C で暗所 (25°C 暗所区) を設定し, 試料を試験管立てに置き静置した. 官能評価ではこれらに加えて, 5°C 暗所, 25°C 明所にキャノーラ油を静置し添加なしの試料とした. 保存期間は 1 か月, 3 か月, 6 か月間とし, 各区 3 反復とした. 保存期間中は実験 3 同様に 1 週間に一度の頻度で, 場所の入れ替えを行った.

処理前と各保存期間のサンプルについて, 色差計 (SE7700 日本電色工業製) により a\* 値を測定し, 基準油脂分析試験法に基づきクロロフィル含量 (日本油化学会, 1996) と過酸化値 (Peroxide Value: PV) (日本油化学会, 2013) を測定した. 食用油の劣化指標について一般には, 自動酸化や光増感酸化では酸価による評価が行われないので過酸化値のみを測定した (市川, 2009). また, センター職員 6 名をパネルとして, 蓋をした各保存期間の試料を供し, パネルが各自蓋を開けて臭いをかぎ, 油の異臭 (酸化臭) の有無を評価した. 統計ソフト R を用いて Steel-Dwass の方法による多重比較検定を行い, 有意水準は  $P < 0.05$  とした.

## 結果

### 実験1 片平あかねのアントシアニンの同定

TLC 分析の結果、片平あかねのスポットは赤色で Rf 値は 65 となり、標準のペラルゴニジンと同様であった (第2図, 第2表)。分光光度計によるスペクトル分析では、片平あかねの  $\lambda_{max}$  は 522nm, 272nm で、 $AlCl_3$  による変化はなかった。HPLC によるスペクトル

$\lambda_{max}$  が 523nm, 274nm, デルフィニジンの tR は 16.6 分,  $\lambda_{max}$  が 534nm, 272nm, 348nm であった。

### 実験2 UV照射下のアントシアニンの色調

UV 処理 0 日目において、対照区と比較し、すべての処理区において色が濃くなり、吸光度も高くなった。(第3図, 第3表)。UV 処理期間が長くなるにつれて、すべての区で赤色の退色、吸光度の低下が進む

第2表 スペクトルとクロマト特性

Table 2. Spectrum and chromatographic characteristics

| Samples       | HPLC                         |                             | Spectrophotometer            |                       | Rf value of TLC <sup>v</sup> |
|---------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|
|               | $\lambda_{max}$ <sup>z</sup> | t <sub>R</sub> <sup>y</sup> | $\lambda_{max}$ <sup>x</sup> | $AlCl_3$ <sup>w</sup> | Forestal                     |
| Katahiraakane | 513nm,422nm,267nm            | 23                          | 522nm,272nm                  | -                     | 65                           |
| Pelargonidin  | 511nm,421nm,265nm            | 23                          | 520nm                        | -                     | 65                           |
| Cyanidin      | 523nm,274nm                  | 19.7                        | 538nm,272nm                  | +                     | 53                           |
| Delphinidin   | 534nm,272nm,348nm            | 16.6                        | 546nm                        | +                     | 23                           |

<sup>z</sup> Mesurament of  $\lambda_{max}$  at wavelength from 200nm to 700nm by photodiode array

<sup>y</sup> Retention time

<sup>x</sup> Mesurament of  $\lambda_{max}$  at wavelength from 200nm to 700nm by spectrophotometer

<sup>w</sup> Drops of 5%  $AlCl_3$  in MeOH were added:(+)=shift,(-)=absence shift

<sup>v</sup> Solvent system Forestal acetic acid:HCl:water=30:3:10(v/v)

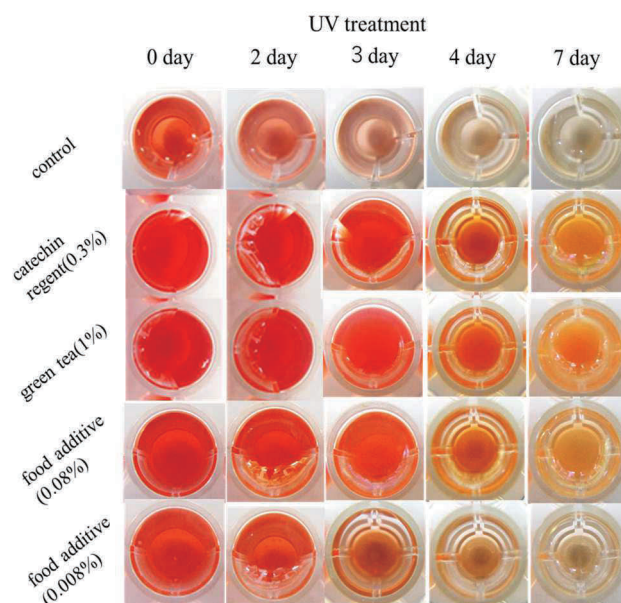


katahira-akane Pelargonidin

第2図 片平あかねから抽出したアントシアニン色素の TLC分析

Fig. 2. Thin-layer chromatogram analysis of anthocyanin pigment extracted from Katahiraakane  
Solvent system Forestal acetic acid:HCl:water=30:3:10(v/v)

ル解析では、片平あかねは、リテンションタイム (tR) が 23 分で、 $\lambda_{max}$  が 513nm, 422nm, 267nm であった。標準のペラルゴニジンの tR は 23 分,  $\lambda_{max}$  が 511nm, 421nm, 265nm, シアニジンの tR は 19.7 分,



第3図 カテキンの添加がUV照射処理の片平あかねの1%酢酸溶液の色調保持に及ぼす影響

Fig. 3. Effects of catechin on color stability of anthocyanin extract from Katahiraakane in 1% acetic acid solution under UV-C

<sup>z</sup> Sample name (total catechin contents %)

第3表 カテキンの添加がUV照射処理の‘片平あかね’の1%酢酸溶液の吸光度に及ぼす影響

Table 3. Effect of catechin on change of absorbance of anthocyanin extract from 'katahiraakane' in 1% acetic acid solution under UV-C treatment

|                          | UV treatment (days) |     |     |     |     |
|--------------------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|
|                          | 0                   | 2   | 3   | 4   | 7   |
| Control(0%) <sup>z</sup> | 1.6 <sup>y</sup>    | 0.8 | 0.4 | 0.2 | 0.1 |
| Green tea(1%)            | 3.5                 | 3.4 | 2.5 | 1.4 | 0.7 |
| Catechin reagent(0.3%)   | 4.1                 | 3.9 | 2.2 | 1.0 | 0.4 |
| Food additive(0.08%)     | 2.4                 | 2.4 | 1.5 | 0.8 | 0.3 |
| Food additive(0.008%)    | 1.9                 | 1.4 | 0.7 | 0.3 | 0.2 |

<sup>z</sup> Sample name (total catechin contents %)<sup>y</sup> Absorbance at OD510nm

傾向を示した。対照区は UV 処理 2 日で明らかに退色が進む一方、カテキン区、緑茶区、食品添加物 0.08% 区では、UV 処理 0 日とほぼ変化なく、食品添加物 0.008% 区でも退色はしていたが、コントロールに比べ抑制効果が認められた。さらにカテキン区、緑茶区、食品添加物 0.08% 区は UV 処理 3 日まで赤色の色調を保っていた。

### 実験 3 蛍光灯下でのアントシアニンの色調

a\* 値 (+ で赤味が強く、- で緑味が強くなる) は、対照区においては、5°C 暗所では 3 か月まで処理前の値と変わらなかった。それ以外の温度・光条件では 1 か月で値が低下していた (第 4 表)。

緑茶区においては、5°C 暗所で、1 か月では 0.01% と 0.05% で対照区の 0 か月と変わらなかったが 0.1% でやや低い値となった。3 か月以降は濃度依存的に低い値となった。それ以外の温度・光条件では 1 か月で値が低下していた。

第4表 カテキンが添加されたアントシアニン含有ドレッシングの保存中のa\*値

Table 4. CIE a\* color values of salad dressing containing anthocyanin with catechin during storage

| Samples <sup>z</sup>    | 5°C dark           |              |              | 5°C light <sup>x</sup> |              |              | 25°C dark    |              |             | 25°C light  |              |              |              |
|-------------------------|--------------------|--------------|--------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|                         | 0 month            | 1 month      | 3 month      | 6 month                | 1 month      | 3 month      | 6 month      | 1 month      | 3 month     | 6 month     | 1 month      | 3 month      | 6 month      |
| Control(0%)             | 20.10 <sup>y</sup> | 20.93 ± 0.12 | 20.57 ± 0.05 | 18.89 ± 0.12           | 15.85 ± 0.53 | 2.94 ± 0.86  | 0.42 ± 0.07  | 16.46 ± 0.04 | 9.72 ± 0.07 | 4.59 ± 0.23 | 10.85 ± 1.38 | 0.79 ± 0.21  | 0.07 ± 0.08  |
| Tea(0.01%)              | 20.53              | 20.21 ± 0.04 | 19.62 ± 0.08 | 16.47 ± 0.68           | 10.88 ± 1.06 | 0.37 ± 1.23  | 0.00 ± 0.05  | 15.37 ± 0.07 | 7.13 ± 0.17 | 2.13 ± 0.12 | 6.86 ± 0.04  | 0.17 ± 0.34  | -0.41 ± 1.46 |
| Tea(0.05%)              | 21.15              | 19.89 ± 0.01 | 16.83 ± 0.06 | 11.20 ± 0.31           | 1.44 ± 0.55  | -0.78 ± 0.03 | -0.88 ± 0.02 | 12.19 ± 0.02 | 3.07 ± 0.10 | 0.15 ± 0.01 | 0.30 ± 0.36  | -0.02 ± 0.02 | 0.21 ± 0.26  |
| Tea(0.1%)               | 20.56              | 18.13 ± 0.41 | 14.34 ± 0.08 | 8.58 ± 0.10            | 0.55 ± 0.25  | -0.22 ± 0.02 | 1.80 ± 0.01  | 7.80 ± 0.13  | 1.43 ± 0.03 | 0.69 ± 0.12 | 0.27 ± 0.59  | 5.41 ± 0.13  | 2.71 ± 0.03  |
| Catechin reagent(0.01%) | 20.58              | 20.83 ± 0.13 | 19.65 ± 0.02 | 16.70 ± 0.20           | 13.91 ± 0.64 | 4.86 ± 0.49  | 1.21 ± 0.12  | 15.47 ± 0.16 | 7.37 ± 0.03 | 2.49 ± 0.11 | 10.54 ± 0.45 | 1.01 ± 0.24  | -0.12 ± 0.02 |
| Catechin reagent(0.05%) | 23.09              | 22.39 ± 0.17 | 20.76 ± 0.09 | 16.37 ± 0.16           | 9.79 ± 1.18  | 0.58 ± 0.64  | -0.62 ± 0.04 | 16.60 ± 0.15 | 6.66 ± 0.18 | 2.01 ± 0.10 | 5.96 ± 0.59  | 0.42 ± 0.13  | 0.02 ± 0.06  |
| Catechin reagent(0.1%)  | 24.99              | 23.36 ± 0.07 | 20.96 ± 0.07 | 16.29 ± 0.29           | 6.36 ± 0.72  | -0.78 ± 0.10 | -1.24 ± 0.01 | 15.96 ± 0.12 | 5.49 ± 0.28 | 0.46 ± 0.23 | 1.95 ± 0.21  | -0.17 ± 0.14 | -0.52 ± 0.11 |
| Food additive(0.01%)    | 25.84              | 21.27 ± 0.02 | 19.81 ± 0.03 | 16.94 ± 0.02           | 17.81 ± 0.40 | 7.39 ± 1.19  | 1.20 ± 0.27  | 16.02 ± 0.08 | 7.60 ± 0.04 | 2.54 ± 0.16 | 12.23 ± 0.35 | 0.76 ± 0.10  | -0.27 ± 0.03 |
| Food additive(0.05%)    | 20.68              | 22.99 ± 0.10 | 20.65 ± 0.15 | 15.89 ± 0.16           | 11.23 ± 1.00 | 1.61 ± 0.72  | -0.20 ± 0.07 | 16.63 ± 0.07 | 7.02 ± 0.20 | 1.96 ± 0.32 | 5.85 ± 0.12  | 2.12 ± 0.25  | 0.08 ± 0.09  |
| Food additive(0.1%)     | 23.72              | 21.43 ± 0.09 | 19.49 ± 0.08 | 15.51 ± 0.04           | 12.71 ± 0.40 | 1.92 ± 0.17  | -0.20 ± 0.03 | 15.55 ± 0.08 | 6.66 ± 0.12 | 1.76 ± 0.06 | 7.00 ± 0.22  | 0.07 ± 0.10  | -0.51 ± 0.02 |

<sup>z</sup> Sample name(catechin contents %) control:water,tea:solution of 1g green tea leaf extracted with 10ml of boiled water,catechin reagent:catechin mixture from green tea (Wako Pure Chemical Corporation) ,food additive:food additive as natural antioxidants from green tea

<sup>y</sup> Means±S.E. of a\*value of salad dressing<sup>x</sup> Fluorescent light(2000lx)

カテキン区、食品添加物区では 5°C 暗所で、3 か月まで対照区の 0 か月とかわらない値となっていたが、6 か月目で低い値となった。5°C 明所、25°C 暗所、25°C 明所においては、1 か月で対照区の 0 か月より低い値となった。

5°C 明所、25°C 暗所、25°C 明所の同じ保存期間において、同じ総カテキン濃度では、緑茶区と比べ、カテキン区、食品添加物区の方が高い傾向を示した。

使用したカテキン混合物、食品添加物、緑茶中の各種カテキンの組成を第 5 表に記す。食品添加物とカテキン混合物は同様の傾向で、緑茶はそれらに比べ、EGCg は約 1/3 倍、ECg は約 1/4~1/5 倍、EGC は約 2 倍であった。

模擬ドレッシング 100ml 当りに含まれる原材料のアスコルビン酸含量を第 6 表に記す。片平あかねは 1.4mg/100ml、緑茶は 0.18mg/100ml、食品添加物とカテキン混合物は 0mg/100ml であった。

### 実験 4 緑茶入り油の保存性

a\* 値は 1 か月以降で、明所が高く推移した (第 4 図)。また、クロロフィルは明所において温度に関係なく、1 か月以降でほぼ存在していなかった (第 5 図)。一方暗所においては温度に関係なく 6 か月でも、処理前に比べ約 8 割残存していた。

油の酸化程度については、明所において、1 か月で PV10 以上となり、25°C 明所区において 3 か月以降、5°C 明所区においては 6 か月で、PV30 以上あった (第 6 図)。25°C 暗所は 3 か月で PV10 以上となり、6 か月で、PV30 以下であった。25°C 暗所区では、3 か月まで PV10 以下で、6 か月で PV30 以下であった。

官能評価ではすべての期間において、緑茶入りの

第5表 試料の各種カテキン組成

Table 5. Catechin composition rate of samples

| Samples          | GC <sup>z</sup>  | EGC  | C   | EC   | EGCg | GCg | ECg  | Cg  |
|------------------|------------------|------|-----|------|------|-----|------|-----|
| Green tea        | 9.4 <sup>y</sup> | 58.1 | 2.4 | 11.7 | 13.3 | 1.6 | 3.6  | 0.0 |
| Catechin reagent | 5.1              | 29.5 | 1.4 | 7.4  | 40.4 | 1.9 | 14.2 | 0.0 |
| Food additive    | 3.9              | 28.3 | 1.5 | 8.5  | 37.6 | 1.0 | 19.0 | 0.1 |

<sup>z</sup> GC=gallocatechin,EGC=epigallocatechin,C=catechin,EC=epicatechin,EGCg=epigallocatechin gallate,

GCg=gallocatechin gallate,ECg=epicatechin gallate,Cg=catechin gallate

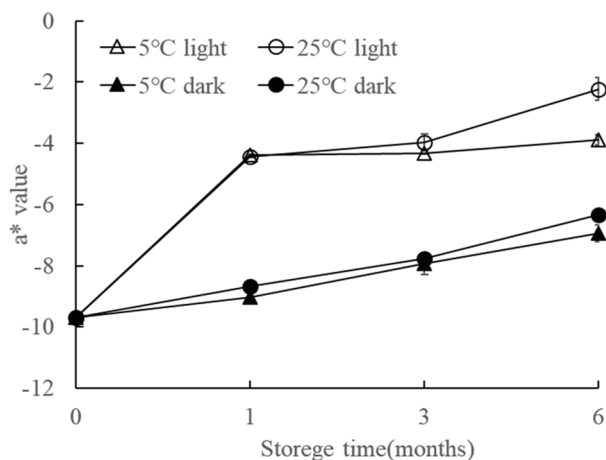
<sup>y</sup> Percentage of catechin composition

第6表 模擬ドレッシングに含まれる原材料のアスコルビン酸含量

Table 6. Ascorbic acid concentration of salad dressing ingredients

| Samples          | mg/100ml <sup>z</sup> |
|------------------|-----------------------|
| Katahiraakane    | 1.4                   |
| Green tea        | 0.18                  |
| Catechin reagent | 0                     |
| Food additive    | 0                     |

<sup>z</sup> Ascorbic acid concentration in ingredient per 100 ml of simulated salad dressing

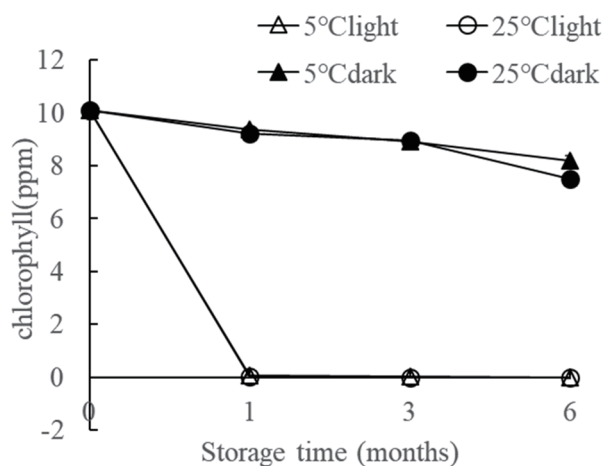


第4図 保存中の緑茶入りキャノーラ油の色調

Fig. 4. CIE a\* value of canola oil with green tea during storage

Error bar represents standard error (n=3)

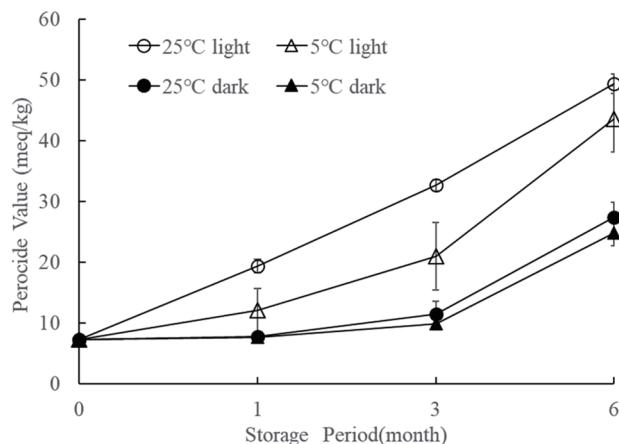
25°C明所区ですべてのパネルが異臭を感じたが、5°C暗所区ですべてのパネルが異臭を感じなかった(第7表)。5°C明所区、25°C暗所区は1か月ではすべてのパネルが異臭を感じなかった。3か月、6か月では25°C暗所区に比べ5°C明所区の方が異臭を感じるパネルの割合は多かった。添加無しでは、5°C暗所区ではすべてのパネルが異臭を感じない一方、25°C明所区では1か月から異臭を感じるパネルがいた。



第5図 保存中の緑茶入りキャノーラ油のクロロフィル含量

Fig. 5. Chlorophyll contents of canola oil with green tea during storage

<sup>z</sup> Chlorophyll (ppm) = (A670-1/2(A630+A710)) / 0.0964  
Error bar represents standard error (n=3)



第6図 保存中の緑茶入りキャノーラ油の過酸化値

Error bar represents standard error (n=3)

第7表 保存中の緑茶入りキャノーラ油の官能評価

Table 7. Sensory evaluation of canola oil with green tea during storage

| Samples     | Treatment        | Storage Period(month)            |       |       |        |
|-------------|------------------|----------------------------------|-------|-------|--------|
|             |                  | 0                                | 1     | 3     | 6      |
| Green tea   | Before treatment | 0 <sup>z</sup> n.s. <sup>y</sup> | -     | -     | -      |
|             | 25°C light       | -                                | 100 a | 100 a | 100 a  |
|             | 5°C light        | -                                | 0 b   | 50 ab | 83 ab  |
|             | 25°C dark        | -                                | 0 b   | 17 ab | 33 abc |
|             | 5°C dark         | -                                | 0 b   | 0 b   | 0 c    |
| No additive | Before treatment | 0 n.s.                           | -     | -     | -      |
|             | 25°C light       | -                                | 17 ab | 67 ab | 100 a  |
|             | 5°C dark         | -                                | 0 b   | 0 b   | 0 c    |

<sup>z</sup>Percentage of panelists who felt oxidative odor (n=6)

<sup>y</sup>Different letters in the same row are significantly different at P<0.05 by steel-dwass test. n.s. is no significant differences between row at P<0.05

## 考察

### 1. 片平あかねのアントシアニンの同定

高等植物のアントシアニンは、基本骨格であるアグリコンの B 環に結合する水酸基やメトキシル基の数や位置によりペラルゴニジン、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、マルビジンの 6 種に大別される (津田ら, 2009; 武田ら, 2013)。また、アグリコンに糖や有機酸が結合し様々な組み合わせにより現在のところ 400 種類程度のアントシアニンが報告されている (津田ら, 2009)。これまで片平あかねの特徴である鮮やかな赤色を呈するアントシアニンのアグリコンについて未同定であった。そこで、今回は片平あかねの根部について TLC, HPLC と分光光度計による分析によりアグリコンの同定を試みた。片平あかねのアントシアニンは標準との比較で TLC ではペラルゴニジンと同様の Rf 値となり、HPLC でも標準のペラルゴニジンと tR と  $\lambda$  max が一致した。シアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン等のアントシアニンのアグリコンの B 環に 2 個以上の水酸基をオルト位にもつものは、分光光度計の測定で塩化アルミニウムを添加すると添加前に比べて  $\lambda$  max が長波長側へ移動する現象が認められるが (武田ら, 2013)、標準のペラルゴニジンと同様に認められなかった。 $\lambda$  max は片平あかねでは 522nm, 272nm で、標準のペラルゴニジンは 520nm であった。今回のアントシアニンの同定に参考にした立澤らの報告 (立澤・篠田, 2005) での、ペラルゴニジンの値は TLC の Rf 値は

65, HPLC 分析の  $\lambda$  max は 513nm, 422nm, 267nm で、分光光度計の  $\lambda$  max は 525nm, 276nm である。立澤らは同条件での HPLC 分析条件であれば、HPLC の  $\lambda$  max は固有の値として考えられると報告している。今回の分光光度計の  $\lambda$  max について標準では 272nm 付近にピークが見られなかったが、立澤らの HPLC 分析の結果との一致や、そのほかの分析の結果を踏まえ、片平あかねのアントシアニンのアグリコンはペラルゴニジンと同定した。

桑原らは、信州の伝統野菜の赤カブのアントシアニンのアグリコンについて同定を行っており、配糖体とアシル基の有無についても LC/MS/MS 分析により推定し、それらの安定性について検討している (桑原ら, 2000, 2004)。アシル基を有するアシル化アントシアニンは、アシル基の芳香環とアグリコン骨格のピリリウム環が重なり水和反応を抑制するため、色素が安定化する (武田ら, 2013)。今回、片平あかねについてはアグリコンにどのような糖や有機酸が結合しているかは分析しておらず、今後の検討課題となる。

野菜、果実、穀物等に含まれるアグリコンの内、最も多いのはシアニジンである。今回調査した片平あかねはアブラナ科の *Brassica rapa* L. であるが、アブラナ科の植物の中には、片平あかね同様に、ハツカダイコンやダイコン (*Raphanus sativus* L.) やカブ類 (*Brassica rapa* L.) でペラルゴニジンを含む品目もあるが、多くはシアニジンである (Hoshi・Hosoda, 1967; 浅子ら, 2011)。アントシアニンは水酸基の数が多い

ほど青味を増す傾向にあり、水酸基が1個のペラルゴニジンは橙赤色、2個のシアニジンは赤紫色、3個のデルフィニジンは青紫色を示し、ペラルゴニジンより青色味を呈する(武田ら, 2013)。

食品の色彩は食欲に関係し、極めて重要な要素である。橙赤色は食欲増進に、紫色は食欲減退に影響するとされる(奥田ら, 2002)。今回、片平あかねのアントシアニンが橙赤色のペラルゴニジンと同定され、片平あかねの長所として色が重要であることが確認された。

アントシアニンは酸性で安定でより赤色を呈する(津田ら, 2009; 武田ら, 2013)。実験2での溶液のpHは約3.0で、実験3での各区の溶液のpHは約3.5であり、各区間の退色との関係は認められなかった(データ未掲載)。今回試作したドレッシングは酢を含有するため酸性で、色の安定と鮮やかな色となり、食品として好ましい色を呈した。今後、新たな加工品を開発する場合、酸性にすることが重要であると考えられた。

## 2. アントシアニンの退色

緑茶由来のカテキンにアントシアニンの退色抑制効果があるか促進実験である実験2により確認を試みた。実験2において対照区に比べ、カテキン区、緑茶区、食品添加物区で色が濃くなり、また吸光度が高くなり、退色抑制効果が認められた。これはアントシアニンの芳香環とカテキンの芳香環の相互作用でおきるコピグメント効果によりアントシアニンが安定している可能性が考えられた(武田ら, 2013)。これらの結果からカテキン類によりアントシアニンを含むドレッシングの退色抑制が期待できるのではないかと考え、実用的な実験系として実験3では、蛍光灯下で実際のドレッシングの組成に近い模擬ドレッシングを作成し保存試験を行った。実験3においても、0か月では、対照区に比べ、カテキン区、食品添加物区では吸光度が高くなり、コピグメント効果と考えられる濃色効果が認められた。しかし退色抑制効果については、5℃暗所の1か月保存で、0か月の対照区よりもカテキン区、食品添加物区でやや吸光度が高かったが、これは0か月の濃色効果で高くなった影響もあり明らかな退色抑制効果かどうかは判然とせず、他の温度、光条件でも、退色抑制効果は認められなかった。実験2の結果と異なる原因として、各処理区のカテキン濃度の違いと光質が異なる点が考えられた。実験2では、各種カテキンがアントシアニン

に対して退色抑制効果があるかどうか確認するための促進実験を意図したが、実験3は、実用性を意図した。そのため蛍光灯下の実験ではカテキンの濃度が濃すぎると渋みの影響が大きくなることを考慮し、総カテキン類濃度は0.1%以下に設定した。実験2において、食品添加物区は0.08%、0.008%でも抑制効果があったため濃度が主要因とは考えにくい。また、明所の処理区では一般の陳列棚の照明を考慮し蛍光灯で2000lxに設定し実験を行った。アントシアニンの光安定性を調べる方法としてUV-Cを用いる報告があり(津久井, 1998; 桑原ら, 2004)、今回促進実験として用いた。しかし、UV-Cは大気で吸収されるため、地上にはほぼ届かない波長である(下永田ら, 2017)。紫外線を用いる場合、UV-A、UV-Bについても検討が必要と考えられた。また、後藤らは促進実験として用いたキセノンランプと蛍光灯ではアントシアニンの退色の反応に違いがあるのではないかと述べている(後藤ら, 2004)。今後、促進実験により検討する場合は、促進実験で使用する光源と蛍光灯下の退色の関連を確認する必要があると考えられた。

実験3では、対照区に対し、カテキンを添加したすべての区で退色抑制効果はなかったが、これらを比較すると、総カテキン類を同程度添加しているのにもかかわらず、カテキン区、食品添加物区に比べ、緑茶区では退色が促進されていた。また、緑茶区において、5℃暗所で3か月以降において濃度依存的に低い値となっていたことから、この原因として、カテキン区、食品添加物区は緑茶を精製して得られたカテキンを用いるのに対し、緑茶区ではカテキン以外の成分を含むことと、また、前2者と緑茶区とでカテキンの組成が異なることが考えられた。カテキン以外の成分で緑茶中に含まれるアントシアニンの退色に関わる成分としてアスコルビン酸が考えられた(中林, 1964)。そこで、それぞれのアスコルビン酸濃度を測定した結果、カテキン混合物、食品添加物はアスコルビン酸を含まれていないのに対し、緑茶にはアスコルビン酸が含まれていた。さらに片平あかねにもアスコルビン酸が含まれていた。すべての区に共通して含有する片平あかねに含まれるアスコルビン酸含量は緑茶に含まれるアスコルビン酸含量の7.7倍であり、緑茶とカテキン混合物、食品添加物のアスコルビン酸含量の差が退色の差に大きく影響を及ぼしたとは考えにくいと推察された。

アントシアニンの退色防止のため、抗酸化剤を用いることがあるが(越島・竹村, 2016)、カテキンに



は抗酸化活性がある (Kumamoto and Sonda,1998). カテキンの種類によって活性の強さが異なり, 熊本らによると  $EC < ECg \approx EGC < EGCg$  の順で  $EGCg$  が最も活性が高いとされる (Kumamoto and Sonda,1998). 今回の結果では, 緑茶がカテキン混合物, 食品添加物に比べて割合が低いのは  $EGCg$  と  $ECg$  であった. 一方で,  $EGC$  は緑茶の方が高く, これらの組成の違いが影響を及ぼしたかは明らかにできなかった. 緑茶に含まれるアントシアニンの退色に影響を及ぼす何らかの要因については, アスコルビン酸, カテキンの組成以外の要因も踏まえて今後の検討課題と考えられた.

### 3. 緑茶入り油の保存性

試作したドレッシングの油相には緑茶由来のクロロフィルが見た目の美しさのために含有している. しかし, クロロフィルは光と熱により分解が促進される (守ら, 1964; 佐伯ら, 1987; 倉田ら, 1990). 今回の実験においても, 明所では 1 か月でクロロフィルはほぼすべてが分解したが, 暗所では 6 か月においても残存しており, 温度については大きな違いは認められなかった. 守らはクロロフィルを水に溶解した溶液を 10 分間加熱したところ,  $25^{\circ}\text{C}$  と  $40^{\circ}\text{C}$  ではクロロフィル量に大きな違いがないが, それ以上の温度では分解することを示している (守ら, 1964). 今回の実験での温度は冷蔵保存と室温保存を想定して行ったが, これらの温度ではクロロフィルの安定性に大きな違いがなく, 緑茶入り油の保存において色を保持するためには光が最も重要であることが明らかとなった.

油脂の劣化の主要因は酸化であり, クロロフィルは光照射下で油脂の酸化を促進する因子である (倉田ら, 1990). 今回の実験では, 過酸化価と官能評価を行い, 緑茶入り油の保存中の酸化程度を評価した. その結果, 緑茶入り油は保存温度よりも光の影響が大きく, 暗所で保存すれば  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  でも, 保存前に比べ 1 か月は過酸化価に違いはなかった. 食品の油の酸化に関する規定は厚生労働省の「食品, 添加物等の規格基準」(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)において, 即席めん類は酸価が 3 以下又は, 過酸化価 30 以下とされ, 「弁当及びそうざいの衛生規範」(昭和 54 年 6 月 29 日環食第 161 号)において, 弁当およびそうざいの原材料としては, 酸価 1 以下および過酸化価 10 以下と定められている. ドレッシングの適用は特にないが,  $5^{\circ}\text{C}$  暗所であれば 3 か月ま

では過酸化価 10 以下となった. また, 官能検査でも緑茶入り油において  $5^{\circ}\text{C}$  暗所であれば, 6 か月まですべてのパネルが異臭を感じなかった.

クロロフィルを含む油としてエクストラバージンオリーブオイルがある. 千葉らはオリーブオイルを用いてクロロフィル含量と油の酸化安定性について調査し, ピュアオリーブオイルに比べてクロロフィル類の含量の多いエクストラバージンオリーブオイルの方が明所での酸化安定が低いことを報告している (千葉, 2005). 今回の実験においても,  $25^{\circ}\text{C}$  明所において, 添加無し油でも保存期間が長くなるにつれて異臭を感じるパネルの割合は増えたが, 緑茶入り油に比べ低い割合となり, 緑茶のクロロフィルが酸化に影響を及ぼしていることが推察された. 遠藤らは, エクストラバージンオリーブオイル, ひまわり油, サフラワーオイルのクロロフィル含量を今回と同条件で測定しており, それぞれ 2.14ppm, 2.42ppm, 0.63ppm と報告している (立澤・篠田, 2005). 今回の緑茶入り油に含まれるクロロフィル含量は 10ppm 程度あり, 既存の油よりも多いクロロフィル類が含まれていると考えられる. 緑茶入り油は, 緑茶のクロロフィルを市販のキャノーラ油に移したものでクロロフィルを含み, 既存の油に比べて, 光による酸化が早いことが示唆されるが, 遮光することにより, 保存性を高めることができると考えられた.

### 4. 試作ドレッシングの保存性

実験 2 では UV 処理 3 日後以降で沈殿物が確認されたが, これは遠心分離で除けなかった片平あかねの残渣か, UV により内容成分が変化したものか判然としなかった. 実験 3 の模擬ドレッシングでは, 片平あかねの粉末を除去しておらず, 実験 2 で認められた沈殿があったかどうかはわからなかった. 実用上, 片平あかねの粉末を取り除いた商品とする場合は外観上沈殿物があれば問題となる可能性はあるが, 粉末を残した商品であれば問題ないと考えられた.

今回, 試作したドレッシングの水相に含まれるアントシアニンの保存条件と油相の緑茶入り油の保存条件を検討した. アントシアニンについては, カテキンが UV 照射下で退色抑制効果が認められたものの, 実用的な条件では期待された退色抑止効果は認められなかった. 一方で今回の実験でカテキン類を含まない対照区では  $5^{\circ}\text{C}$  暗所であれば, 3 か月色調が保持できることが明らかとなった. 緑茶入り油の保存条件については, 3 か月では  $5^{\circ}\text{C}$  暗所であれば, 酸化が

抑えられ、異臭もしないことが明らかとなった。

## 摘要

片平あかねに含まれるアントシアニン(AN)を水相に、大和茶に含まれるクロロフィル(Chl)を油相に使用した分離液状ドレッシングの保存性を評価した。5°C暗所の条件下では3か月までANの色調保持と、Chlの分解が抑えられ、油の酸化も抑えられた。ANの色調保持のため、カテキン類を加えたが、UV処理下では効果が認められたものの、蛍光灯下では効果は認められなかった。加えて片平あかねのアントシアニンのアグリコンの定性も行い、ペラルゴニジンであることを明らかにした。

## 謝辞

本研究の実施に当たり、片平あかねのサンプルをご提供いただいた片平あかねクラブの福山若仁様、奥中孝俊様、現地との調整をしていただいた東部農林振興事務所農業普及課、アントシアニンの定性方法についてご指導いただいた東京農工大学の小関良宏教授、百瀬忠征先生、千葉大学の宮原平博士に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

浅子洋一・大脇祐介・小関良宏・佐々木伸大・阿部裕・百瀬忠征・下村講一郎. 地下部内部全体にペラルゴニジンをもつアントシアニンとして蓄積するダイコン (*Raphanus sativus* L.) の中間母本「乾谷」とその遺伝様式 育種学研究 13:65-73 2011.

Carmen H.Brenes, David del Pozo-Insfran, and Stephen T. Talcott. Stability of Copigmented Anthocyanins and Ascorbic Acid in a Grape Juice Model System Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:49-56 2005.

千葉俊之. 食用オリーブ油に存在するクロロフィル類について 岩手県立大学盛岡短期大学部研究論集. 自然科学編 創刊:29-33 1999.

千葉俊之. クロロフィル分解物の植物油酸化に与える影響について 岩手県立大学盛岡短期大学部

研究論集 第7号:21-25 2005.

遠藤泰志・洪水宏之・渋谷直樹・鈴木清次・高橋重幸・土田進一・中村和弘. 植物油中のクロロフィル類の高速液体クロマトグラフィーによる定量方法の確立と合同実験結果 日本油化学会誌 第47巻 第11号:1225-1232 1998.

後藤隆子・奥正和・高橋徹・森大蔵. 光がPET容器詰飲料の品質に及ぼす影響 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書 25:55-63 2004.

林一也・津久井亜紀夫. グリチルリチンのアントシアニン色素に及ぼす影響 日本家政学会誌 Vol.48 No.5:437-441 1997.

林一也・津久井亜紀夫. アントシアニン色素に及ぼすグリチルリチンのコピグメント効果 日本食品科学工学会誌 Vol.45 No.1:16-20 1998.

市川和昭. 総説 油脂劣化とその分析評価 名古屋文理大学紀要 第9号 2009.

五十嵐喜治. 食品素材によるアントシアニンの成分特性と機能・利用 日本調理科学会誌 Vol.41 No.3:167-175 2008.

越島貴司・竹村優子. FFI JOURNAL Vol.221 No.3:P268-273 2016.

倉田元子・奥村江理子・石井智恵美・表美守. 食物クロロフィルの熱安定性 調理科学 Vol.23 No.1:94-98 1990.

桑原秀明・大澤克己・栗林剛・中島富衛・小原忠彦. 木曾赤かぶに関する研究 長野県食工試研報 28:24-27 2000.

桑原秀明・栗林剛・金子昌二・唐沢秀行・高波修一. 木曾赤かぶに関する研究 (第2報) 長野県食工試研報 32:24-29 2004.

牧善輔・田代操・稲本英子. 桑の実アントシアニン色素の安定性 京都府立大学学術報告 (理学・生活科学) 第32号 B系列:P1-6 1981.

守康則・北久美子・宮崎節子. クロロフィルの安定性に関する研究 家政学雑誌 Vol.15 No.1:1-5 1964.

Midori Kumamoto and Tamiyoshi Sonda. Evaluation of Antioxidative Activity of Tea by an Oxygen Electrode Method Biosci Biotechnol Biochem 62(1), 175-177 1998.

中林敏郎. アスコルビン酸によるイチゴアントシアニンの分解 日本食品工業学会誌 第11巻 第11号:469-478 1964.

日本油化学会編. 基準油脂分析試験方法 クロロフィル 参 2.9-1996 1996.

- 日本油化学会編. 基準油脂分析試験方法 過酸化物質 2.5.2.1-2013 2013.
- 奥田弘枝・田坂美央・由井明子・川染節江. 食品の色彩と味覚の関係 日本調理科学会誌 Vol.35 No.1:2-9 2002.
- 尾崎加奈・安田みどり・水流美智子・太田英明. (一)-エピガロカテキンガレートによるクロロフィル a の光退色抑制作用 日本食品保蔵科学会誌 Vol.32 No.6:263-268 2006.
- 佐伯俊子・丸山悦子・中西洋子・梶田武俊. 緑葉クロロフィルの熱安定性に関する研究 調理科学 Vol.20 No.2:125-129 1987.
- 桜庭英剛・一瀬肇. タンニン酸による酸化酵素の不活性化とアントシアニン色素の安定化 日本農芸化学雑誌 Vol.56 No.7:pp.517-524 1982.
- 清水孝重・川原章弘・中村幹雄・加藤喜昭・合田幸広・米谷民雄. 食品からのアントシアニン系色素の分析方法 日本食品科学会誌. Vol.3 (1): 10-20 1996.
- 下永田修二・飯塚正明・杉田克生. グランドにおける紫外線反射強度の調査 千葉大学教育部研究紀要 第 65 巻:395-398 2017.
- 立澤文見・篠田浩一. フォトダイオードアレイ検出器を用いた高速液体クロマトグラフィーによるアントシアニンの同定と薄層クロマトグラフィーおよび分光光度計での吸収スペクトル特性を併用したアントシアニンの同定の比較 園芸学研究 4(2): 225-228 2005.
- 武田幸作・齋藤規夫・岩科司編. 植物色素フラボノイド 文一総合出版 2013.
- 津田孝範・須田郁夫・津志田藤二郎. アントシアニンの科学 建帛社 2009.
- 津久井亜紀夫. 食品中のアントシアニン色素について 日本食生活学会誌 Vol 9 No.1:9-14 1998.
- Toshimi Hoshi and Tomowo Hosada. GENETICAL STUDIES ON ANTHOCYANINS IN BRASSICAE CROPS.1 育種学雑誌 第 17 巻 第 1 号:47-51 1967.