

## 令和 3 年度終了 豆類振興事業助成金（試験研究）の成果概要

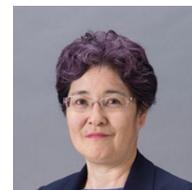
1 課題名 小豆紫色色素の定量法確立による、品種間差と餡色発色の機構解明を目指す  
開発試験事業

2 研究実施者

研究代表者 吉田久美 名古屋大学大学院情報学研究科 教授

分担 堀内優貴 北海道立総合研究機構 十勝農業試験  
場研究部 主査

分担 川原美香 とかち財団 ものづくり支援部・課長



3 実施期間 令和元年度～令和 3 年度（年間）

4 試験研究の成果概要

(1) 試験研究の目的

赤小豆の種皮にはアントシアニンはほとんど含まれず、化学的性質や発色がアントシアニンとは全く異なる紫色色素のカテキノピラノシアニジン A, B (cpcA, cpcB) が含まれる。これらの色素は水に溶けず、熱水にはわずかに溶けさらし餡の紫色を担う。餡色を担う色素と発色の仕組みの解明は長年待たれてきた課題であり、紫色色素の分析法が確立されれば、紫色色素の含有量を指標にした育種、餡の発色の解明研究が格段に進展する。紫色色素分析法を用いて、品種や生育環境による色素組成の違いを分析し、育種や選抜の際の指標としての利用可能性を探り、高品位な餡の製造技術を確立することを目的とした。

(2) 実施計画、手法

1) 種皮に含まれる紫色色素の発色機構の研究

単離した純粋な色素を用いて色素溶液の pH の違いによる発色、安定性、金属イオン共存下での発色、安定性を調査した。

2) 小豆種皮に含まれる紫色色素の単離方法の確立、小豆（乾豆、餡）に含まれる紫色色素の分析方法の確立

色素の単離方法については、色素抽出法および精製法を精査した。色素の分析方法については、溶媒や抽出法について検討を行った。

3) 製餡加工条件と餡色と紫色色素含有量の相関の分析

十勝農業試験場産のしゅまりを用いて製餡条件を変えて製餡を実施し、種皮色素、餡色、餡色素の分析を実施し、製餡加工工程がどのように餡色に影響するのかを解析した。また、栽培条件の異なる同一品種（しゅまり、エリモショウズ、きたろまん）を用いて製餡を実施し、製餡加工工程がどのように餡色に影響するのかを解析した。

4) 品種改良途中の世代、在来種、外国産小豆、栽培条件の異なる小豆の種皮色素含有量の分析

確立した紫色色素分析方法において様々な小豆の分析を実施した。

### (3) 成果の概要

#### 1) 種皮に含まれる紫色色素の発色機構の研究

紫色の発色機構解明のため、**cpcA** の酸解離定数 ( $pK_a$ ) を測定した。赤色のフラビリウムカチオン型と紫色のアンヒドロ塩基型との間の  $pK_a$  は  $-0.46$  であった (図 1)。通常、アントシアニンの  $pK_a$  は  $2\sim 4$  の値を取る。これと比較すると、**cpcA** の  $pK_a$  は極めて小さく、強酸性でもプロトン化せずに紫色のアンヒドロ塩基型を取るという特異な化学的性質を持つことがわかった。

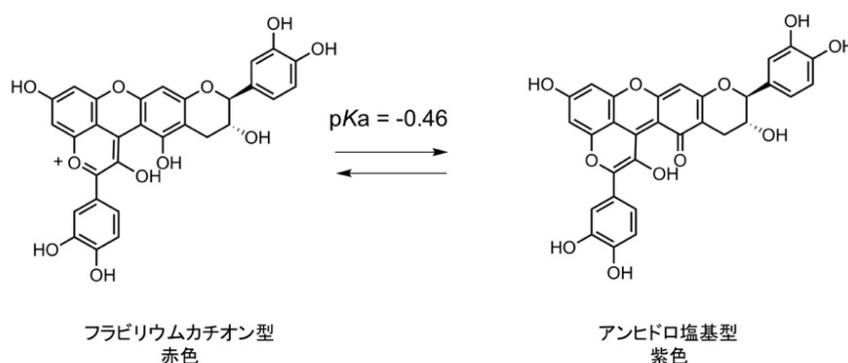


図1. 赤小豆種皮紫色色素、カテキノピラノシアニジン A の酸解離定数.

さらに、**cpcA** および **B** を 50% MeOH-緩衝溶液に溶解して  $50\ \mu\text{M}$  の溶液とし、色と安定性を測定した (図 2, 3)。pH 1, 3, 5 の溶液中で、**cpcA** は紫色を呈した。pH 5 と pH 7 との間に次のアンヒドロ塩基型とアンヒドロ塩基アニオン型との間の平行があるため、pH を経時的に測定した。それぞれの pH における安定性を 0 日の吸収極大波長との吸光度の変化を示した (図 3)。pH3、および 5 の弱酸性溶液中が最も安定であることが分かった。同様に **cpcB** についても実験を行ったところ、発色と安定性の両方においてほぼ **cpcA** と同様の結果を得た。以上から不斉炭素の違いは発色や安定性にはほとんど影響しないことが分かった。さらに、餡の紫色発色には弱酸性の液性が適していることがわかった。製餡加工において紫色色素を安定に保って餡色を制御するのに重要な知見が得られた。

続いて金属イオン共存下での発色について調査した。**cpcA** と **cpcB** をそれぞれ 50% MeOH-緩衝液 (pH5) に溶解して  $50\ \mu\text{M}$  の溶液とし、そこへ、製餡の際に水や鍋の素材の違いによって混入が予測される  $\text{Mg}^{2+}$  (酢酸マグネシウム・4 水和物)、 $\text{Al}^{3+}$  (硫酸アルミニウムアンモニウム・12 水和物)、 $\text{Fe}^{3+}$  (硫酸鉄 (III) アンモニウム・12 水

和物)、 $\text{Cu}^{2+}$  (酢酸銅) を色素に対して 1 当量加えてその色変化を観察し (図 4)、紫外可視吸収スペクトル (UV/Vis) を測定した (図 5)。

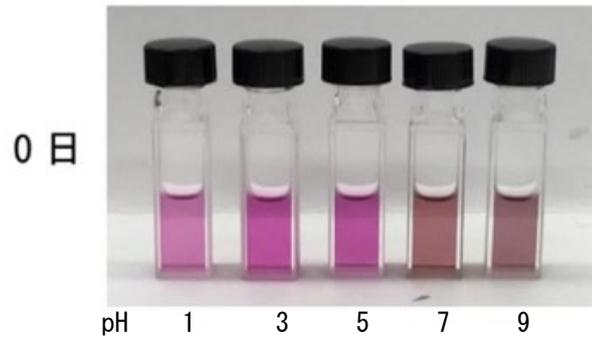


図 2. カテキノピラノシアニジン A(cpcA) を 50%メタノール含有緩衝液に溶解した際の溶液の色変化. 室温暗所で保存して経時的に観察した濃度:  $50 \mu\text{M}$ .

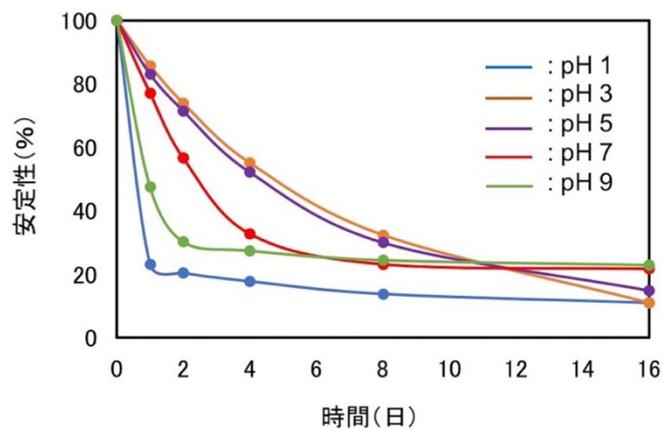


図 3. カテキノピラノシアニジン A(cpcA) を各種の pH の 50%メタノール含有緩衝液に溶解した際の溶液の色の安定性. 室温暗所で保存し、吸収極大波長における吸光度の変化で示した。

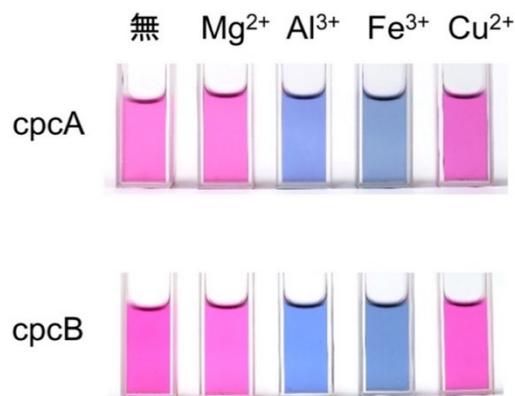


図 4. カテキノピラノシアニジン類に 1 当量の金属イオンを添加した際の色変化. カテキノピラノシアニジン A (上) とカテキノピラノシアニジン B (下). 色素濃度:  $50 \mu\text{M}$ , 50%メタノール-酢酸緩衝液 (pH 5.0), 金属イオン:  $50 \mu\text{M}$ .



## 抽出条件

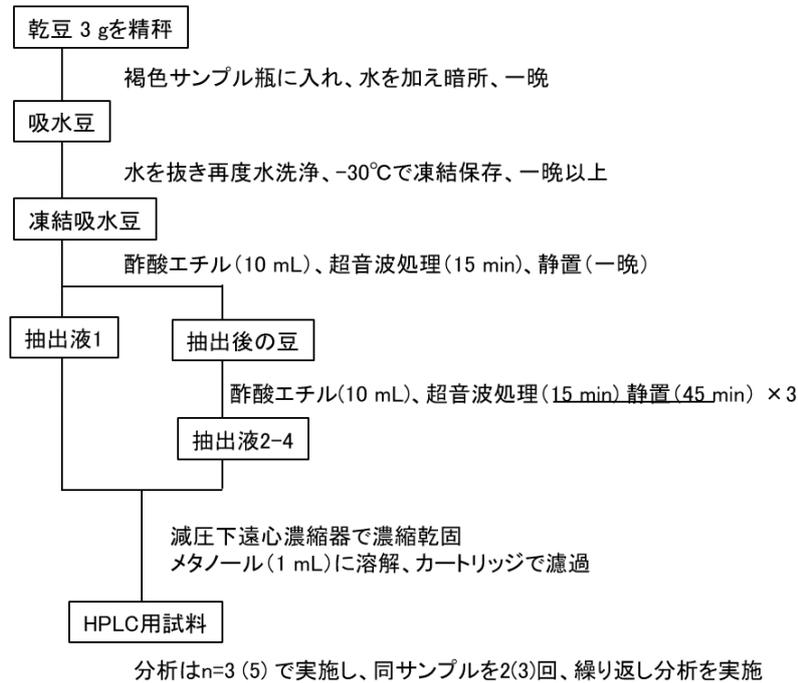


図 6. 確立した乾豆からの紫色色素抽出方法

## HPLC分析条件

ポンプ:	日本分光社製PU-1585
デガッサー:	日本分光社製DG-2080-53
検出器:	日本分光社製MD-2018Plus (570 nm)
カラムオーブン:	日本分光社製866-CO
カラム:	野村化学社製PRAQUEOUS-AR-3(φ 2.0mm × 150mm)
オートサンプラー:	日本分光社製AS-4550
移動相:	A液0.5%TFA 10%Acetonitril水溶液 B液0.5%TFA 90%Acetonitril水溶液

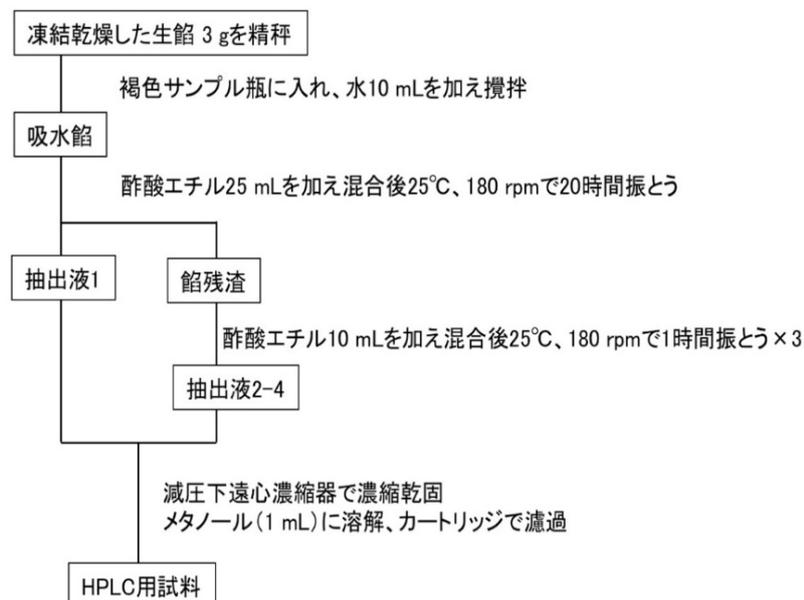
## グラジエント条件

Time	組成比(%)	
	A液	B液
0	70	30
7	70	30
22	15	85
22.1	0	100
25	0	100

分析はn=3で実施し、同サンプルを2回、繰り返し分析を実施

図 7. HPLC 分析条件.

抽出条件



分析はn=3 (5) で実施し、同サンプルを2(3)回、繰り返し分析を実施

図 8. 確立した生餡からの紫色色素の抽出法.

表 1. 種々の品種の小豆に含まれる紫色色素の含有量.

試料 産地	生産 年	品種	色素合計量			cpcA 割合 (%)	百粒重 g
			$\mu\text{g/g}$	cpcA	cpcB		
十勝 農試	2020	しゅまり	13.81 ± 1.10	11.11 ± 0.88	2.70 ± 0.22	80	14.9
	2020	きたろまん	8.75 ± 0.79	7.10 ± 0.62	1.64 ± 0.17	81	18.4
	2017	とよみ 大納言	5.69 ± 1.26	4.93 ± 1.07	0.76 ± 0.20	87	29.0
	2017	ほまれ 大納言	5.40 ± 0.48	4.54 ± 0.45	0.71 ± 0.09	84	22.9
黒龍 江省	2016	赤小豆	5.58 ± 1.03	4.35 ± 0.81	1.22 ± 0.22	78	13.0
山西	2016	赤小豆	3.55 ± 0.33	2.76 ± 0.27	0.79 ± 0.06	77	12.1

定量値 : n=3, 百粒重 : n=3.

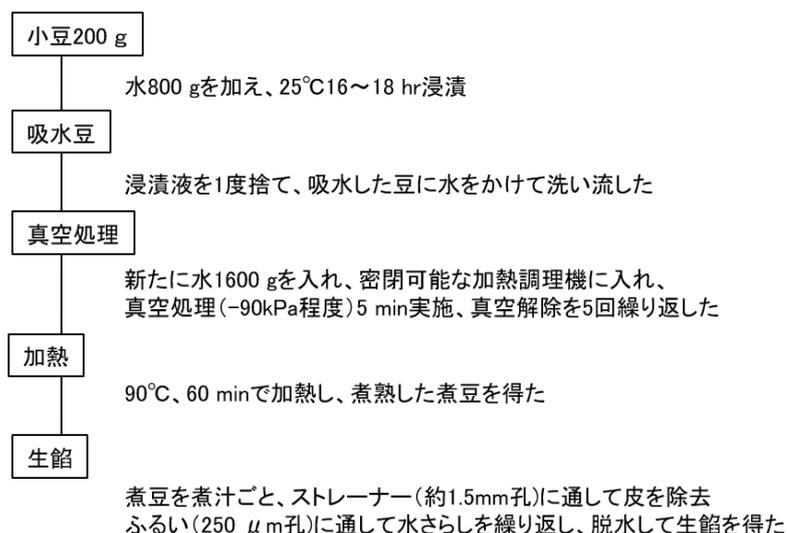
紫色色素の含有量は品種によって異なり、しゅまりの含有量が高く、きたろまんは低い結果となった。大納言はさらに低値を示した。粒大が大きいことから重量あたりの表面積が小さくなることが影響したと考えている。紫色色素全体に占める **cpcA** の割合は北海道産普通小豆では 80-81%と一定の値を示し、品種間での有意差は認められなかった。大納言小豆では **cpcA** の割合が高い傾向が認められた。

外国産小豆の分析も実施した。粒大から普通小豆であるが、北海道産と比較して **cpcA,B** の含有量が低い傾向にあった。**cpcA** の割合は、日本産の品種と比較して 77-78%と若干低い値を示すことがわかった。これが、品種の違いであるのか、生産地の違いによるのかについては、今後さらに検討する必要があると考えるが、産地(品種)の判定において、利用可能な指標になるのではないかと考える。

#### 4) 製餡加工条件と餡と紫色色素含有量の相関の分析

製餡条件を種々検討した結果、美しい紫色餡を得るには、褐色化しやすい化合物を除去し、紫色色素が種皮から溶出された後、酸化されないように速やかに餡に吸着させる必要があることがわかった。これらの知見をもとに新製法の真空炊き製餡方法を開発した(図9)。

##### 新規製餡法



##### 色差計

日本電色工業株式会社製 水懸濁時の沈殿した餡の色を測定した  
SA-4000  
マンセル表色計 D65/2°  
Φ30mm丸形セル使用

図9. 新規製餡法

この製餡方法は、従来法に比べて餡の紫色が濃く、色素含有量も高いことがわかった。そこで、本製餡法を用いて種々の品種の小豆を製餡し、色素含有量を比較した。

調製した生餡の色差計による色測定値を表2に、紫色色素の分析結果を表3に示した。一般的にしゅまりは紫色がかった餡になりやすいと言われている。生餡の外観色と色測定データを比較すると、紫色の傾向が強い生餡ほどb\*の数値が低い傾向にあり、b\*値を色の指標として用いることにした。十勝農試産のしゅまりは最もb\*値が低く、紫色系の生餡が得られた。

紫色色素の定量分析では、外観色が濃い小豆の方が色素量が多い傾向が認められた。これは、小豆の成熟に伴い、赤褐色に変化しやすい色素とともに紫色色素も蓄積されているためと考えられる。美しい紫色の生餡の調製をするためには、十分に成熟した小豆を原料とし、褐色化しやすい色素が少ない品種、栽培条件が必要な要素となると推測された。

表2. 2017-2018年十勝農試産、品種別小豆の生餡色測定結果.

産地	生産年	品種	色彩色差		
			L*	a*	b*
十勝農試	2017	しゅまり	42.9	8.8	-0.09
	2018	しゅまり	46.7	9.0	-0.89
	2018	きたろまん	39.9	8.7	-0.67
	2018	エリモショウズ	42.5	8.3	0.18

表3. 凍結乾燥した餡に含まれる紫色色素量.

生産年	品種	色素合計量	cpcA	cpcB	cpcA割合
		$\mu\text{g/g Freez dry (平均値}\pm\text{SD)}$			(%)
2017	しゅまり	17.5 $\pm$ 1.8	12.7 $\pm$ 1.4	4.8 $\pm$ 0.5	72
2018	しゅまり	19.4 $\pm$ 1.0	14.0 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 0.3	72
2018	きたろまん	20.9 $\pm$ 0.3	15.2 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.1	73
2018	エリモショウズ	21.6 $\pm$ 0.5	15.7 $\pm$ 0.4	5.9 $\pm$ 0.2	73

## 5 今後の課題

赤小豆ならびに生餡に含まれる紫色色素 **cpcA,B** の定量法が確立できたので、外国産を含め、多数の小豆の色素含有量の比較調査が可能となった。この方法を用いて、多くの品種、産地の違いによる小豆および生餡の色素量を定量することで、多くのデータを得ること、さらに、紫色色素の生合成経路の解明による遺伝子の特定と育種の迅速化が今後の課題である。

## 6 成果の波及効果

今回の試験研究で確立できた小豆ならびに餡の紫色色素の分析法を応用展開することにより、科学的根拠に基づく育種の指標ならびに栽培方法の提供ができるようになる。さらに、製餡加工の条件検討に資する技術の開拓に役立つ技術の確立につながる。これにより、高品位な小豆の生産と小豆加工品創成のための基盤技術の確立ができるものと考えられる。

## 7 論文、特許等

### 論文

1. Oyama, K., Kondo, T. Shimizu, T., Yoshida, K.: Determination of Absolute Configuration of Photo-Degraded Catechinopyranocyanidin A by Modified Mosher's Method. *Chirality*, 32, 556-563, (2020). DOI: 10.1002/chir.23202, April 16, 2020.
2. 吉田久美「小豆の赤色はアントシアニンではない！？-種皮から餡の紫色を担う新規の色素を発見」、*化学*、**74**, 24-28 (2019).
3. 吉田久美「フラボノイド系植物色素の化学-最近の話題を中心に-」、*色材誌*、**94**, 263-269 (2021).

### 特許

1. 吉田久美、川原美香：小豆餡の製造方法、特願 2020-146610、特開 2022-41424 学会発表

1. 高山 陽子、数馬 恒平、吉田 久美：赤小豆中のカテキノピラノシアニジン A,B の定量分析. 日本農芸化学会 2021 年度大会 (仙台) 2021.3.18-21.
2. 吉田久美、高山 陽子、浅野友世、萩原星児、佐藤綾人：様々な品種のアズキ種皮に含まれる色素の分析. 日本農芸化学会 2022 年度大会 (京都) 2022.3.15-18.