

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500932

研究課題名(和文) 含蜜糖の食品機能成分の分析とそれらのストレス緩和効果

研究課題名(英文) Analysis of functional components and stress repression in non-centrifugal brown cane sugar

研究代表者

和田 浩二 (WADA, KOJI)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：50201257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な含蜜糖である沖縄の黒糖はサトウキビの搾汁液をライミング後、糖蜜を除去することなく、そのまま加熱・濃縮して製造する。したがって、黒糖には多くの有用な成分が含まれることになる。本研究では、サトウキビ、糖蜜、黒糖を実験材料として用い、それらの物理化学的特性、フレーバー特性、機能性成分および酸化活性、ストレス緩和効果といった機能性について検討した。

研究成果の概要(英文)：A cane brown sugar, called kokuto, has been traditionally produced in Okinawa by non-centrifugal method, without molasses removing process. Therefore, kokuto contains a lot of various useful components. In this study, sugarcane, kokuto and molasses are used as materials, and their physicochemical properties, flavor characteristics, functional components and biological functions such as antioxidant activity and stress repression are examined.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：サトウキビ 黒糖 甘味資源 ワックス 抗酸化 香気成分 ストレス

1. 研究開始当初の背景

黒糖は南西諸島で生産されているわが国独自の含蜜糖で、古くから加熱食品特有の好ましい香りを持ち、豊富なミネラルを有する食品または素材として親しまれてきた。黒糖の主要成分は甘味成分であるショ糖であるが、微量成分としてミネラル以外にもサトウキビ由来の様々な有用成分が含まれると考えられる。さらに、沖縄と長寿とのかわりにおいて黒糖には多くの生体調節機能が期待されることから、黒糖に含まれるフェノール化合物をはじめとする様々な有用成分とともに、独特の香りやその新たな機能性の検索ならびに評価を行うことを計画した。

2. 研究の目的

黒糖に代表される含蜜糖はグラニュー糖や上白糖などの分蜜糖と異なり、その製法上からサトウキビ由来のミネラルやフェノール化合物などショ糖以外の有用な成分ならびに加熱加工で生成する新たな物質を含んでいる。特にサトウキビ由来の機能性物質としては、ラジカル捕捉作用などを有するフェノール化合物が多く存在し、黒糖の有機溶媒抽出物が高い抗酸化力や生体調節機能を有すること、また関係するいくつかの化合物の構造について報告されている。さらに、サトウキビ表皮に存在するワックス成分も機能性物質と考えられるが、未だ詳細な報告は見当たらない。

一方、黒糖の製造工程のメイラード反応によって形成される揮発性成分は加熱食品特有の好ましい香りを有し、黒糖の品質因子として重要な部分を占めている。しかしながら、この香りや味についての食品科学的な評価はほとんどなされておらず、さらに、近年注目される香りのストレス緩和効果に寄与する揮発性成分も含まれる可能性がある。

以上のことから、本研究では黒糖の品質関連因子としての風味成分の分析、機能性物質の解析およびその評価を行うことにより、最終的には含蜜糖の機能性甘味資源素材としての利用拡大を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) サトウキビのワックス、ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドの分析

黒糖には抗酸化活性をもつフェノール化合物が含まれることが知られているが、サトウキビ表皮に存在するワックスやその構成成分も有用成分と考えられる。そこで、サトウキビのワックス、ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドの分析を行った。サトウキビ試料として沖縄県農業研究センターで2007年10月(未熟期)および2008年1月(適熟期)に収穫したNCo310、F161、F177、NiF8、Ni13、Ni15、Ni17を用いた。ワックス、ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドの分析用試料は、手作業にて外皮と内実部を分割後、粉碎し、それぞれ凍結乾燥して調製した。次に凍結乾

燥品を円筒ろ紙に採取し、ヘキサン、メタノールの20:1の混合溶媒を用いて、ソックスレー抽出器によりワックス、ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドの抽出を行った。抽出物は濃縮、乾固後、溶媒で定容し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)およびGC-質量分析(MS)に供した。

(2) 糖蜜由来の抗酸化物質の検索と評価

黒糖はグラニュー糖や上白糖などの分蜜糖と異なり、搾汁液から糖蜜を除去することなく製造される。したがって、黒糖の有用成分の大部分は糖蜜に存在する成分と考えられることから、糖蜜由来の抗酸化物質の検索と活性評価を行った。実験材料には2011年に湘南製糖株式会社で製造されたサトウキビ糖蜜を用いた。糖蜜を異なる濃度のメタノール水溶液で順次溶出し、得られた5つの画分においてフェノール化合物含量および活性酸素吸収能力(ORAC活性)を測定した。次に高いフェノール化合物含量と強いORAC活性を示した画分をToyopearl HW-40Cを用いて、F1からF7の7つに分画した(図1)。これらの画分の中でフェノール化合物含量の高かった画分については、ORAC活性、細胞内抗酸化活性(CAA)ならびにDNA酸化障害抑制能(DNA-DPC)を測定するとともに、抗酸化物質の単離と構造解析を行った。

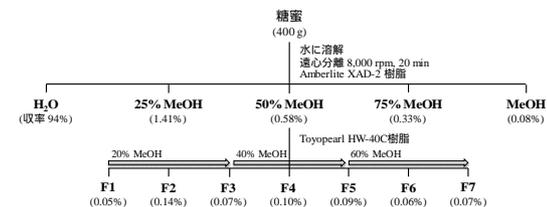


図1 糖蜜からの抗酸化物質の分画

(3) 黒糖貯蔵における食品成分およびフレーバー成分の変化

黒糖はグラニュー糖や上白糖などの分蜜糖とは異なり、サトウキビ由来のショ糖以外の有用成分を多く含むことに加えて、もうひとつの大きな特徴として嗜好性因子である独特のフレーバーがあげられる。このフレーバーは黒糖の製造工程の中の加熱工程、特にシラップから黒糖の製造過程でのメイラード反応により急速に形成されるが、黒糖製品の貯蔵中にもメイラード反応はゆるやかに進行し、フレーバーや色調に影響をおよぼすことが考えられる。そこで、黒糖の貯蔵中における食品成分や嗜好性成分などの成分変化を分析した。実験材料には西表産のブロック黒糖を用い、ブロック黒糖を解砕し、クラフト袋で沖縄県内の倉庫に貯蔵した。製造直後の黒糖をコントロールとし、室温にて3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月および12ヶ月貯蔵した黒糖を分析用サンプルとした。なお、貯蔵中の倉庫の平均気温は26.8℃、平均湿度は52.1%であった。分析項目は105℃乾燥法による水分含量、水分活性、HPLC分析による糖含量お

よび有機酸含量、分光光度法による色調の測定、GC および GC-MS 分析による香気成分の分析および HPLC 分析による 3-Deoxyglucosone (3-DG) 含量とした。

(4) 黒糖のストレス低減効果に及ぼす影響

黒糖には様々な有用成分や嗜好性成分が確認されており、日常的に食品として摂取することからストレス低減効果をもつ成分が含まれることが期待される。そこで、黒糖のストレス低減効果についてヒトにおけるストレス負荷試験を行い、心理学的および生化学的観点からその効果を検証した。ストレス負荷試験には市販の黒糖を用いた。被験者(13名)へのストレス負荷は15分間のクレペリンテストにより実施し、ストレス負荷のみを与えた場合をコントロールとし、ストレス負荷前後に10%濃度の黒糖水を摂取した場合のストレス低減の有無およびその効果を評価した。心理学的観点からのストレス負荷の影響については、ストレス負荷前後に気分プロフィール(POMS)試験および視覚的評価スケール(VAS)評価を実施した。また、試験中に被験者から唾液を計6回採取し、唾液中のストレスマーカー(コルチゾール、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)、テストステロン、アミラーゼ、クロモグラニンA(CgA)およびイムノグロブリンA(IgA))を市販の測定キットを用いて定量し、生化学的な評価を行った。なお、ヒト試験は琉球大学疫学研究倫理審査委員会の審議を経て、学長の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) サトウキビのワックス、ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドの分析

サトウキビのワックスの組成を HPLC 分析した結果、主要な構成成分はすべての品種でアルデヒド類とステロール類(55-60%)、次いでアルコール類(31-39%)であった。一方、サトウキビ外皮からのポリコサノールの抽出は、ヘキサン、メタノールの混合溶媒を用いることにより高い抽出効率を得られ、また抽出物中の夾雑物も少なく、さらに誘導体化することなく GC 分析によりポリコサノールの定性と定量を行うことが可能であった。GC 分析および GC-MS 分析の結果、サトウキビには C22 から C30 の 5 種類のポリコサノールとともに、同じ炭素鎖をもつ C26 から C30 の 3 種類の長鎖アルデヒドが含まれることが明らかとなった(図2)。また、ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドはほとんどが外皮に含まれていた。サトウキビ外皮のポリコサノールおよび長鎖アルデヒドの組成を分析した結果、すべての品種でポリコサノールは C28 のアルコール(C28-OH)の含量が最も高く、次いで C26-OH、C28-OH、長鎖アルデヒドは C28 のアルデヒド(C28-CHO)の含量が最も高く、次いで C28-CHO、C26-CHO の順であった(表1、表2)。一方、品種では Ni17 がポリコサノールおよび長鎖アルデヒドとも

高い含量を示したが、品種間でそれらの組成や含量は異なっていた。さらに、未熟期からべて適熟期のサトウキビにおいてポリコサノールおよび長鎖アルデヒド含量が高いことが明らかとなった。

以上の結果は、基礎知見としてサトウキビの新たな機能性成分としてのワックスの特性と存在部位を明らかにするとともに、廃棄される外皮の新たな有効利用を提案するものである。

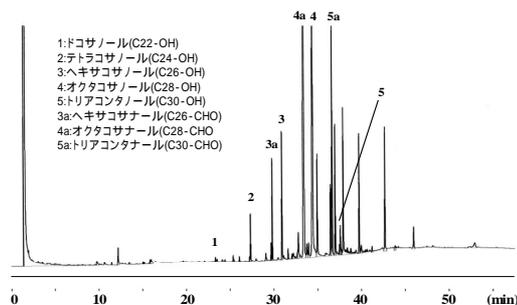


図2 ポリコサノールおよび長鎖アルデヒドのガスクロマトグラム

表1 サトウキビ品種のポリコサノール組成と含量 ($p < 0.05$)

品種	ポリコサノール含量 (mg/100g サンプル, 新鮮重)				合計
	C ₂₂ -OH	C ₂₄ -OH	C ₂₆ -OH	C ₂₈ -OH	
NCc310	0.10 ± 0.03 b [*]	0.20 ± 0.02 cd	4.36 ± 0.27 c	52.40 ± 4.36 d	2.61 ± 0.14 e
F161	0.11 ± 0.02 b	0.16 ± 0.06 d	6.42 ± 0.36 d	56.96 ± 5.36 cd	5.04 ± 0.56 bc
F177	0.13 ± 0.01 b	0.26 ± 0.04 cd	7.53 ± 0.53 cd	73.47 ± 5.48 b	3.70 ± 0.45 dc
NiF8	0.12 ± 0.02 b	0.40 ± 0.06 bc	12.10 ± 1.37 b	71.67 ± 6.44 b	4.14 ± 0.40 cd
Ni13	0.12 ± 0.01 b	0.22 ± 0.08 cd	6.66 ± 0.12 d	58.56 ± 4.21 cd	5.61 ± 0.66 ab
Ni15	0.13 ± 0.03 b	0.28 ± 0.06 c	8.81 ± 1.29 c	66.45 ± 5.02 bc	3.73 ± 0.79 dc
Ni17	0.20 ± 0.01 a	0.78 ± 0.05 a	16.04 ± 0.72 a	100.46 ± 7.06 a	6.18 ± 0.95 a

表2 サトウキビ品種の長鎖アルデヒド組成と含量 ($p < 0.05$)

品種	長鎖アルデヒド含量 (mg/100g サンプル, 新鮮重)			合計
	C ₂₆ -CHO	C ₂₈ -CHO	C ₃₀ -CHO	
NCc310	3.36 ± 0.09 cd [*]	61.71 ± 1.30 c	11.68 ± 1.23 d	76.75 ± 0.65 c
F161	3.04 ± 0.42 d	53.87 ± 3.93 c	15.99 ± 0.63 c	72.89 ± 4.87 c
F177	2.62 ± 0.10 d	56.23 ± 4.76 c	10.92 ± 1.03 dc	69.78 ± 5.85 c
NiF8	4.22 ± 0.55 c	70.57 ± 9.99 b	14.06 ± 0.99 c	88.84 ± 11.37 b
Ni13	5.16 ± 0.24 b	84.69 ± 0.99 a	25.58 ± 1.71 a	115.43 ± 23.74 a
Ni15	6.42 ± 1.14 a	60.72 ± 2.82 c	9.52 ± 0.75 c	76.66 ± 4.37 c
Ni17	5.19 ± 0.27 b	85.81 ± 0.78 a	20.37 ± 1.02 b	111.38 ± 0.92 a

(2) 糖蜜由来の抗酸化物質の検索と評価

糖蜜を Amberlite XAD-2 を用いて異なる濃度のメタノール水溶液で順次溶出した結果、50%メタノール画分が最も高いポリフェノール含量と強い ORAC 活性を示した(図3)。また、フェノール化合物含量と ORAC 活性には高い正の相関(0.82)が認められたことから、糖蜜の抗酸化活性にはフェノール化合物含量が大きく寄与していることが明らかとなった。次に、50%メタノール画分を Toyopearl HW-40C を用いて7つに分画しフェノール化合物含量を測定した結果、分画物1gあたり没食子酸相当量(GAE)は54.8-121.8mgであり、特にF5、F6およびF7の3つの画分で高い値を示した(表3)。そこで、F5、F6およびF7の ORAC 活性、CAA ならびに DNA-DPC を測定した結果、ORAC 活性はF7が最も高く、次いでF6、F5であり、CAA もF7が最も高かったが、CAA ではF5の活性がF6よりも高かった(表4)。したがって、糖蜜の抗酸化活性にはフェノール化合物含量だけでなく、個々

のフェノール化合物の物理化学的な特性も大きく影響することが示唆された。また、F6 および F7 の DNA-DPC はポジティブコントロールである没食子酸と同等の強い活性があることが明らかになった。さらに、F5、F6 および F7 からは ferulic acid、schaftoside、p-hydroxybenzaldehyde、p-coumaric acid をはじめとする 10 個のフェノール化合物を単離・同定できたことから、糖蜜には抗酸化活性を持つ様々なフェノール化合物が存在することが確認された。

以上の結果は、含蜜糖である黒糖に強い抗酸化活性を持つ様々なフェノール化合物が存在することを支持するものであり、機能性甘味資源素材としての利用につながる基礎知見が得られたと考える。

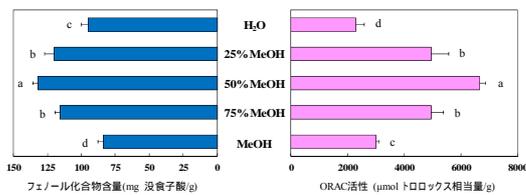


図3 糖蜜の分画物のフェノール化合物含量と活性酸素吸収能力(ORAC 活性)

表2 F1-F7 のフェノール化合物含量

フラクション	ORAC 活性 (μmol トロロックス含量/g)	CAA (EC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)	DNA-DPC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
F5	4399 \pm 331.0	3.9	250
F6	5329 \pm 417.1	5.9	100
F7	6266 \pm 242.3	3.7	100
没食子酸	-	0.3	100

表3 F5、F6 および F7 の活性酸素吸収能力(ORAC 活性)、細胞内抗酸化活性(CAA) および DNA 酸化障害抑制能(DNA-DPC)

フラクション	フェノール化合物含量 (mg 没食子酸/g)
F1	54.8 \pm 2.8 e
F2	69.4 \pm 6.3 d
F3	68.3 \pm 5.3 d
F4	90.0 \pm 7.9 c
F5	105.3 \pm 6.7 b
F6	121.8 \pm 2.1 a
F7	114.6 \pm 6.5 ab

(3) 黒糖貯蔵における食品成分および香り成分の変化

黒糖貯蔵中の水分含量と水分活性は若干の増減があったが、水分活性は一般に微生物の増殖を抑制する値であった。また、黒糖の主要成分であるスクロースは、貯蔵に伴う変化は見られなかったが、還元糖であるフルクトースとグルコースは最初の3ヶ月とその後の3ヶ月で有意に減少したことから、メイラード反応への関与が示唆された。有機酸は貯蔵黒糖サンプルから6化合物が検出され、最も多く含まれたのは乳酸で、次いでアコニッ

ト酸、酢酸であった。各有機酸とも貯蔵中に若干の増減があったが、全体的には貯蔵に伴う変化はあまりないと考えられた。一方、貯蔵中の色調の変化は顕著で、コントロールの ICUMSA 色価 18000 は貯蔵中に平均 12.5% の割合で増加し、12 ヶ月後には色価 29000 に達した(図4)。このことから、貯蔵に伴い色調が濃くなったことが確認されるとともに、色価の上昇にはメイラード反応が関与していることが示唆された。

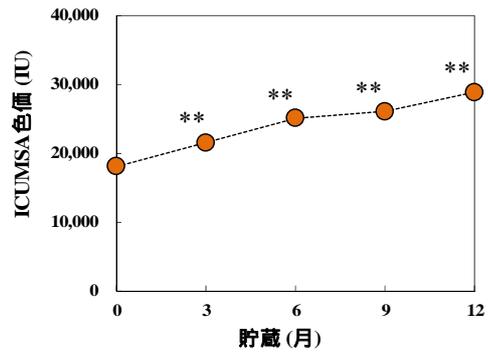


図4 黒糖貯蔵中の ICUMSA 色価の変化

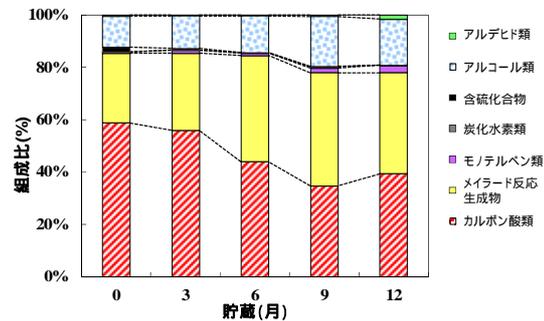


図5 黒糖貯蔵中の香り成分組成の変化

次に貯蔵中の香りの変化を GC 分析により解析した結果、アルデヒド類3成分、アルコール類8成分、含硫化合物1成分、炭化水素類3成分、メイラード反応生成物(MRP)12成分、カルボン酸類10成分の計37成分が同定・定量された。コントロールではカルボン酸類が59%と最も多く、次いでMRP27%、アルコール類12%で、特徴的なグリーンガラス臭をもつ含硫化合物の dimethyl sulfide も2%程度含まれていた(図5)。貯蔵に伴いカルボン酸類は9ヶ月後には35%に減少し、含硫化合物は9ヶ月以降は検出されなかった。これらの成分の減少は貯蔵中の揮発によると推定された。一方、アルコール類は9ヶ月以降その組成比は大きくなったが、これはカルボン酸類と含硫化合物の組成比の減少によるものと考えられた。一方、MRPも貯蔵に伴いその組成比は大きくなり、組成比の変化と ICUMSA 色価の変化の間には正の高い相関が認められた。さらに、黒糖貯蔵中の色や香りの変化へのメイラード反応の関与を確認するために、メイラード反応中間生成物である3-DGの含量を測定した結果、貯蔵3ヶ月

で著しく増加し、その後はゆるやかに減少したことから、貯蔵中にメイラード反応が進行していることが確認された(図6)。

以上の結果は、黒糖貯蔵における成分変化を推測する情報となるだけでなく、貯蔵により色調が濃く、製造直後の香気を抑えた黒糖原料としての新たな利用価値を提案するものである。

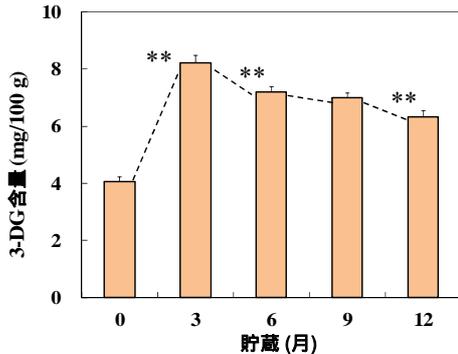


図6 黒糖貯蔵中の3-Deoxyglucosone (3-DG)含量の変化

(4) 黒糖のストレス低減効果に及ぼす影響
 ストレス付加前の黒糖摂取では、安静期のVAS値はコントロールと比べて違いを示さなかったが、ストレス負荷直後のVAS値では有意な低下を示し、その後の回復期におけるVAS値でも有意な低下を示した(図7)。また、POMS試験では、ストレス負荷直後のすべての情動(緊張、抑うつ、怒り、活気、疲労および混乱)に低下効果を示し、特に抑うつおよび混乱では有意な低下を示した($p < 0.01$ および $p < 0.05$)。したがって、ストレス負荷前の黒糖摂取は、主観的感覚としてストレス低減効果を示し、抑うつや混乱の情動について強い影響を与える可能性が示唆された。また、ストレス負荷前に黒糖を摂取した場合の被験者の唾液中のストレスマーカーを評価した(図8)。コントロール群では、ストレス負荷によって、試験開始時の値と比較してすべてのストレスマーカーで値の増加を示し、特に -アミラーゼ活性ではストレス負荷直後の値で有意差を示した。黒糖摂取群では -アミラーゼ活性および Ig-A はストレス負荷で増加を示さず、回復期の間も低値を維持していた。唾液中コルチゾール、DHEA、テストステロンおよび Cg-A は試験開始時の値と比較して増加を示したが、コルチゾール以外のストレスマーカーでは、コントロールと比較して低い値を維持した。したがって、ストレス負荷前の黒糖摂取は HPA 系および SAM 系によるホルモン分泌や -アミラーゼ生産を抑制している可能性があり、ストレス低減効果を示すことが示唆された。

一方、ストレス負荷後に黒糖を摂取した場合、被験者の主観的感覚および情動に変化はなく、被験者唾液中のストレスマーカーについても、Ig-Aを除くすべてのストレスマカ

ーはコントロールと比較して変化を示さなかった。以上の結果より、心理学的および生化学的観点からストレス負荷前の黒糖摂取はヒトに対してストレス低減効果を示すことが明らかとなった。

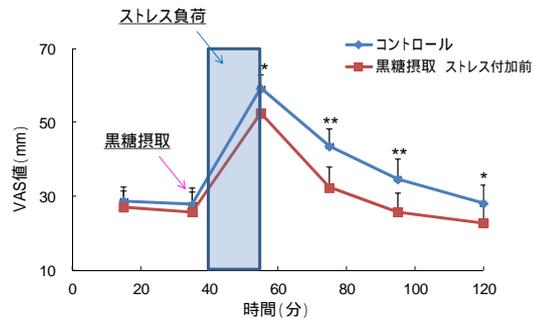


図7 ストレス付加前の黒糖摂取における視覚的評価スケール(VAS)値の推移

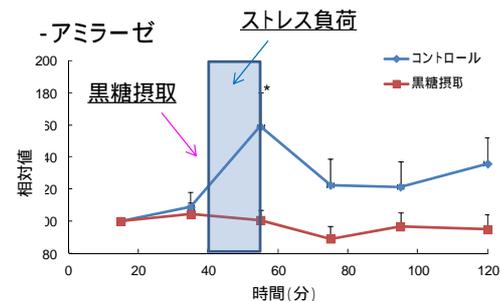
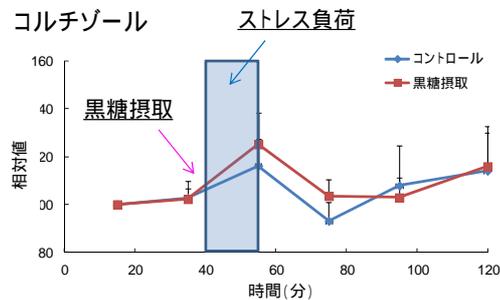


図8 ストレス付加前の黒糖摂取における唾液中のコルチゾールと -アミラーゼの推移

以上の成果は、沖縄特産物の黒糖に含まれるフレーバー成分や機能性成分についての基礎知見にとどまらず、それらの成分に関する遺伝資源情報や加工利用特性にまで言及したものである。したがって、本研究で確立した分析手法や得られた解析データは、黒糖だけでなく、国内外の地域特産資源の研究やその加工利用などにも広く応用できると考える。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文](計5件)

1. Asikin, Y., Kamiya, A., Mizu M., Takara, K., Tamaki, H., Wada, K., Changes in the physicochemical characteristics, including flavour components and Maillard reaction products, of non-centrifugal

cane brown sugar during storage, Food Chemistry, 149, 170-177 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.10.089
2.Asikin, Y., Takahashi, M., Mishima, T., Mizu, M., Takara, K., Wada, K., Antioxidant activity of sugarcane molasses against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced peroxy radicals, Food Chemistry, 141, 466-472 (2013) 査読有
DOI:10.1016/j.foodchem.2013.03.045
3.氏原 邦博、吉元 誠、和田 浩二、高橋 誠、須田 郁夫、サトウキビ糖蜜の抗酸化活性に及ぼす加熱加工の影響、日本食品科学工学会誌、60 巻、159-164 (2013) 査読有
<https://www.jsfst.or.jp/>
4.和田浩二、黒糖バンザイ、体調を整え、疲労も回復、現代農業、9月号、104~107(2012) 査読無 <http://www.ruralnet.or.jp/gn/>
5.Asikin, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Hou, D-X, Takara, K., Wada, K., Wax, policosanol, and long-chain aldehydes of different sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivars, European Journal of Lipid Science and Technology, 114, 583-591 (2012) 査読有
DOI: 10.1002/ejlt.201100300

〔学会発表〕(計6件)

1.和田浩二、Yonathan Asikin、新垣江利子、玉城一、高良健作、神谷朝博、中島寿典、水雅美、黒糖貯蔵における食品成分および香気成分の変化、日本食品科学工学会第60回大会、2013年8月29日-31日、実践女子大学(東京)
2.Asikin, Y., Takahashi M., Mishima, T., Watai, M., Mizu, M., Kawai, T., Takara, K., Wada, K., Antioxidant activity of sugarcane molasses against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) generated peroxy radicals, EuroFoodChem XVII, May 07-10, 2013, Istanbul, TURKEY
3.Asikin, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Hou, D-X, Takara, K., Wada, K., Compositional analysis of policosanol, long-chain aliphatic alcohols, in sugar-cane (*Saccharum officinarum* L.) and Okinawan brown sugar products, World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress 2012, September 30- October 4, 2012, Nagasaki, Japan
4.和田浩二、サトウキビおよび黒糖のワックス成分 - ポリコサノールと長鎖アルデヒド - 、第22回西日本食品産業創造展'12西日本機能性食品開発研究会セミナー、2012年5月16日~18日、マリンメッセ福岡(福岡)
5.Asikin, Y., Takahashi, M., Hirose, N., Takara, K., Wada, K., Wax, policosanol and long-chain aldehyde of sugarcane

(*Saccharum officinarum* L.) of different cultivars、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22 日~26 日、京都女子大学(京都)

6.玉城一、大城里奈、水雅美、河合俊和、佐々木重夫、高良健作、和田浩二、黒糖中の 3-DG (3-Deoxyglucosone) の定量、日本食品科学工学会第58回大会、2011年9月9日~11日、東北大学(宮城)

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 浩二 (WADA Koji)
琉球大学・農学部・教授
研究者番号：50201257