

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500754

研究課題名（和文） 加賀能登の伝統食品の機能性と抗酸化素材としての有用性

研究課題名（英文） Function and usability as antioxidants of traditional foods in the Kaga and Noto areas of Ishikawa prefecture.

研究代表者

寺沢 なお子（TERASAWA NAOKO）

金沢大学・人間科学系・教授

研究者番号：00227513

研究成果の概要（和文）：石川県加賀・能登地方の伝統的な食材の機能性について調べた。その結果、加賀レンコンにおいてチロシナーゼ阻害活性やアルドースレダクターゼ阻害活性が高かった。また、赤ズイキ粗色素は 120℃までの加熱には抗酸化性・色調ともに安定であり、クッキーへの添加により脂質の酸化を抑制した。また、SOD 様活性および糖化タンパク質生成阻害活性はズイキアントシアニンであるケラシアニンよりズイキ粗色素の方が高く、色素以外の成分の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The function of traditional foods in the Kaga and Noto areas of Ishikawa prefecture was investigated. Kaga Renkon showed a strong inhibitory effect on tyrosinase and aldose reductase. The radical scavenging activity and color intensity of the red Zuiki pigment remained at almost the same level during a heat treatment at 120℃ for 60min. The effect of this pigment on lipid peroxidation in cookies was also investigated, the cookies in which 0.05% of dough had been substituted by the pigment showing inhibition of the peroxide value. Inhibition of the SOD activity and glycosylation process was higher with the Zuiki pigment than with keracyanin which is a Zuiki anthocyanin. The results indicate that a component of Zuiki other than anthocyanin was involved in this activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：食品機能学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：加賀野菜，能登野菜，機能性，抗酸化性，アントシアニン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな食品において抗酸化作用、  
血圧低下作用などの機能性が報告されている

が、中でもアントシアニン色素については高い抗酸化性が認められており、各種の果実・野菜・豆などから色素の分離同定が行われている。一方、申請者はハーブ、アボカド果皮、有色米、富山黒茶などの食品の抗酸化性について研究を行ってきたが、近年はイシル(魚醬)のラジカル消去活性ペプチドの分離同定を行う(寺沢なお子他, 日本家政学会誌, 61, 493-499, 2010)など、加賀能登地方の食材の機能性研究に力を入れている。その過程において、加賀能登地方の郷土料理として食される「赤ズイキ」のアントシアニン色素に着目した。ズイキとはサトイモの葉柄であり、緑色のものは食用に適さないが、赤紫色のものは酢の物、煮物、味噌汁などの具材として用いられる。この赤ズイキからアントシアニン色素を分離したところ、ほぼ単一の色素から成ることが明らかとなり、構造決定の結果シアニジン-3-ルチノシド(keracyanin)と同定された(N. Terasawa, et al., *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4154-4159, 2007)。

シアニジン-3-ルチノシドは、イチゴ、ブラックベリー、ラズベリー、桃、ブラックプラム(X. Wu and R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 2589-2599, 2005)などに含まれていることがわかっているが、主要色素として存在する場合は少ない。比較的高率で含有される黒カシス(blackcurrant)においても、シアニジン-3-ルチノシドの含有量は約35%であり、デルフィニジン-3-ルチノシド(約50%)に及ばない(松本均, *バイオサイエンスとインダストリー*, 64, 558-561, 2006)。また、このシアニジン-3-ルチノシドが他のシアニジン配糖体と比較しどの程度の抗酸化性を有するのかについては、詳細な検討がなされていない。

そこで本研究では、加賀能登野菜について抗酸化性をはじめとする各種機能性を検討するとともに、赤ズイキ粗色素およびシアニジン-3-ルチノシドの機能性についても明らかにする。一方、アントシアニンは多くの成分の混合物の方が安定であるともいわれるため(大庭理一郎ら, 「アントシアニン」, 建帛社, 58-59, 2000), 赤ズイキ粗色素の安定性に関して検討する必要があると考えられる。すなわち、赤ズイキ色素の抗酸化素材としての有用性、および油脂を使用した加工食品に添加した場合の抗酸化効果についてもあわせて検討を行う。さらに、能登地方の特産である「能登赤ネギ」の機能性についても検討する。

上記のように、赤ズイキ色素についての研究報告は申請者以外になく、また、能登赤ネギ色素に関する研究報告は現在までのところない。本研究により、赤ズイキ色素および能登赤ネギ色素の機能性や抗酸化素材としての有用性が明らかになれば、食品科学的に

興味深いばかりでなく、食品加工的観点からも極めて重要であると考えられる。さらには、なじみの薄い食材である赤ズイキおよび能登赤ネギの消費拡大、新たな商品開発などへの道も開けるものと思われる。

## 2. 研究の目的

まず、赤ズイキ色素であるシアニジン-3-ルチノシドの抗酸化性の強さについて、他のシアニジン配糖体と比較し検討する。

さらに、赤ズイキおよび赤ネギ色素の抗酸化素材としての可能性を探るため、色素の耐紫外線性や耐熱性について調べ、さらに赤ズイキ色素を添加した加工食品(クッキー)を作製し、ズイキ色素の抗酸化性について過酸化物質を指標として評価する。

一方、加賀能登野菜など加賀能登地方の特産食材について、抗酸化性(ラジカル消去活性, SOD 様活性)をはじめとした各種機能性(チロシナーゼ阻害活性, ヒアルロニダーゼ阻害活性, アルドースレダクターゼ阻害活性, 糖化タンパク質生成抑制能など)の検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 赤ズイキ・赤ネギ粗色素の特性

#### ①粗色素の抽出

市販の乾燥赤ズイキおよび生の赤ネギ皮から80%エタノールで色素を抽出後、Diaion HP-20 オープンカラムに負荷し吸着させた。カラムを水洗後80%エタノールで色素を溶出し、濃縮、減圧乾固した後、エーテルで洗浄、凍結乾燥して粗色素を得た。

#### ②粗色素の DPPH ラジカル消去活性

赤ズイキおよび赤ネギ粗色素を0.1M酢酸緩衝液(pH 5.5)で溶解し、50 ng/mlとした。この試料液とエタノールを2mlずつ混合し、さらに500  $\mu$ M DPPH/エタノール溶液1mlを加えた。上記混合液の調製直後(0分後)と30分後に517 nmで吸光度測定を行い、DPPHラジカルの減少に伴う吸光度の減少量と、コントロール(0.1M酢酸緩衝液とエタノールを2mlずつ混合)の値から、ラジカル消去活性を算出した。また、試料液の色が測定結果に与える影響を考慮し、500  $\mu$ M DPPH/エタノール溶液の代わりにエタノールを加えて混合したものを色ブランクとした。ラジカル消去活性は以下の式に従い算出した。

$$\text{ラジカル消去活性(\%)} = \{A - (B - C)\} / D \times 100$$

A=コントロール0分後の吸光度, B=試料

液 30 分後の吸光度, C=試料液色ブランクの吸光度, D=コントロール 30 分後の吸光度

また、6-ヒドロキシ-2,5,7,8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (Trolox) と L-アスコルビン酸 (ビタミン C) について濃度とラジカル消去活性の関係を検量線に表し、試料のラジカル消去活性を Trolox 相当量 (mg Trolox eq./g) およびビタミン C 相当量 (mg ascorbic acid eq./g) に換算して示した。測定は各試料 3 回ずつ行い、平均値±標準偏差で表した。

### ③粗色素の DPPH ラジカル消去活性の加熱安定性

②と同様に調製した粗色素溶液 10ml をねじ栓付試験管 (φ14×130mm) に入れ、90℃, 120℃, 180℃のブロックヒーターでそれぞれ 15, 30, 60 分間加熱した。加熱前後の DPPH ラジカル消去活性と色調変化を測定した。

### ④粗色素の DPPH ラジカル消去活性の紫外線安定性

②と同様に調製した粗色素溶液 25ml を透明なポリプロピレン容器 (100ml) に入れ、紫外線灯 (15W) から 5cm の距離に置き室温に 3, 6, 12, 24 時間放置した。紫外線照射による DPPH ラジカル消去活性と色調の変化を経時的に測定した。

### ⑤粗色素の脂質酸化抑制効果

薄力粉 200g, バター100g, 砂糖 80g, 卵 1 個を用いてクッキーを作成した。赤ズイキ粗色素はクッキー生地に対して 0.05%および 0.2%になるように加えた。クッキーの焼き時間は 160℃, 15分間とした。クッキーを 50℃の恒温槽内に保存し、経時的に過酸化価 (POV) を測定した。測定方法は衛生試験法・注解 (日本薬学会編, 金原出版, 東京, 187-188, 1980) に従った。

### ⑥粗色素の SOD 様活性測定

赤ズイキ粗色素および各種アントシアニン色素を蒸留水に溶解し、0.2mg/ml とした。また、乾燥赤ズイキ 1g に蒸留水 11.5ml を加えてすりつぶし、遠心 (3,500rpm, 5min, 10℃) して上澄液を採取した。上澄液に濁りがあった場合は濾過した。これを蒸留水で適宜希釈して用いた。

SOD Assay Kit-WST (同仁化学, 熊本) を用い、プロトコールに従って実験を行った。マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、以下の式に従って阻害活性を求めた。

$$\text{阻害活性 (\%)} = \frac{[(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank 2}})]}{(A_{\text{blank 1}} - A_{\text{blank 3}})} \times 100$$

テトラゾリウム塩 (WST-1) 還元 of 50%阻害 (IC<sub>50</sub>) を示すサンプル溶液 20 μl に含まれる SOD 量が 1 U (ユニット) であることから、試料の阻害曲線より IC<sub>50</sub> を示す試料の希釈率を求め、これより試料 1mg 当たりが SOD 様活性として IC<sub>50</sub> を示すユニット数を算出した。測定は各試料 3 回ずつ行い、平均値±標準偏差で表した。

### (2)加賀能登野菜の総フェノール量測定

加賀能登野菜および特産食材 19 種類 (加賀野菜: 赤ズイキ, 打木赤川甘栗カボチャ, 加賀ツルマメ, 加賀太キュウリ, 加賀レンコン, 金沢一本ネギ, 金沢春菊, 金時草, 源助ダイコン, 五郎島金時, セリ, ヘタ紫ナス, 能登野菜: 中島菜, 神子原クワイ, 能登ミニトマト, その他特産食材: サマツ (キノコ), カジメ, ギンバサ, ツルモ (海藻)) について、以下の要領で熱水および冷水抽出を行った。まず凍結乾燥を行った野菜類 1g に蒸留水を加えてすりつぶし、最終的に 50ml とした。これを濾過して濾液を得た (冷水抽出)。同様に凍結乾燥野菜 1g に蒸留水を加え、95℃以上の沸騰水浴中で 5 分間加熱した後すりつぶし、最終的に 50ml とした。これを濾過して濾液を得た (熱水抽出)。これらを適宜希釈して試料液とした。総フェノール量は Folin-Ciocalteu 法により測定し、結果は没食子酸換算で表した。

### (3)加賀能登野菜のチロシナーゼ阻害活性測定

凍結乾燥野菜に蒸留水を加え、95℃以上の沸騰水浴中で 5 分間加熱した後すりつぶし、定容化して (最終濃度 20mg/ml) 濾液を得た。赤ズイキ粗色素および各種アントシアニン色素は 1mg/ml になるように水で溶解した。これらを Mcilvaine 緩衝液 (pH 6.8) で適宜希釈し試料液とした。

各試料液 0.5ml, 1.66mM チロシン/Mcilvaine 緩衝液 0.9ml を試験管中で混合した。対照として、試料液の代わりに水を 0.5ml 加えたものを同様に作成した (C)。これらを 37℃の恒温水槽につけ、5分後、1,500 unit/ml チロシナーゼ 0.1ml を添加・混合し、37℃の恒温水槽中に 1 分間つけた。その後 0.5M 炭酸ナトリウム水溶液 0.5ml を加えて混合した (A0, C0)。一方、同様に調製し 37℃の恒温水槽に 5 分間つけた試験管に、1,500 unit/ml チロシナーゼ 0.1ml を添加・混合し、37℃の恒温水槽中に 11 分間つけた後、0.5M 炭酸ナトリウム水溶液 0.5ml を加えて混合した (A1, C1)。各試験官の 475nm における吸光度を測定し、反応前後の吸光度の差からチロシンの減少量を求め、下記の式に従い活性阻害率を算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{\{(C1-C0) - (A1-A0)\}}{(C1-C0)} \times 100$$

#### (4)加賀能登野菜のヒアルロニダーゼ阻害活性測定

(3)と同様に調製した試料を用い、以下のように行った。

試料液0.1mlと酵素溶液 (0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) にヒアルロニダーゼ (TypeIV-S from bovine tests, SIGMA) を4.0mg/mlとなるように溶解) 0.05mlを試験管中で混合し、37°Cの恒温水槽に20分間つけた(S)。別の試験官に、試料液0.1mlと酢酸緩衝液0.05mlを加えて混合し、37°Cの恒温水槽に20分間つけた(ブランク, B)。さらに別の試験官に、試料液の代わりに蒸留水を0.1mlと酵素溶液0.05mlを加えて混合し、37°Cの恒温水槽に20分間つけた(対照, C)。

各試験官に酵素活性化液(酢酸緩衝液にCompound 48/80 (SIGMA) を0.5mg/ml, 塩化カルシウムを3.8mg/mlとなるように溶解) 0.1mlを添加し、37°Cの恒温水槽に20分間つけた。これに基質溶液 (0.8mg/ml Hyaluronic acid sodium salt from rooster comb (SIGMA) ) 0.25mlを添加して37°Cの恒温水槽に40分間つけた。さらに0.4N NaOH 0.1mlとホウ酸カリウム溶液 (0.8M ホウ酸水溶液に水酸化カリウムを22.4mg/mlとなるように溶解) 0.1mlを添加し、沸騰水中で3分間加熱後、急冷した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 (p-Dimethylaminobenzaldehyde 5gを氷酢酸44ml, 10N HCl 6mlに溶解。使用時に氷酢酸で10倍希釈) 3mlを加え、37°Cの恒温水槽に20分間つけた。各試験官の585nmの吸光度を測定し、下記の式に従い活性阻害率を算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = \{1 - (S-B)/C\} \times 100$$

#### (5)加賀能登野菜のアルドースレダクターゼ (AR) 阻害活性の測定

総フェノール量が高かった食材5種類(中島菜, カジメ, ヘタ紫ナス, 加賀レンコン, セリ)について測定を行った。凍結乾燥品1gに酢酸エチル, メタノール, またはエタノールを50ml加え、75°Cの湯浴中で2時間加熱還流した。これを濾別した後、残渣を再度同様に抽出した。2回の濾液を集めて濃縮乾固し、ジメチルスルホキシドを10mg/mlになるように加えて溶解した。これを0.2M リン酸緩衝液 (pH 6.2) で適宜希釈し試料液とした。

試験管4本に0.2M リン酸緩衝液 500  $\mu$ l, 1.5mM NADPH 100  $\mu$ l, 0.1M DL-グリセルアルデヒド 100  $\mu$ lを加えた。このうち2本に試料抽出液 100  $\mu$ l, 2本に蒸留水 100  $\mu$ lを加え、混合した。これを25°Cの恒温水槽で5分間保温後、試料液を入れた試験官と蒸留水を

入れた試験官各1本を取り出し、0.5M 炭酸ナトリウム水溶液 600  $\mu$ l と 0.03 unit/ml AR 100  $\mu$ lを加えて混合した。残りの試験官に0.03 unit/ml AR 100  $\mu$ lを添加・混合し、25°Cの恒温水槽中で15分間保温した。これに0.5M 炭酸ナトリウム水溶液 600  $\mu$ lを加えた後、340nmにおける吸光度を測定し、以下の式に従い阻害率を算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = \{1 - (A0-A1)/(C0-C1)\} \times 100$$

A0 : 試料抽出液の反応開始前の吸光度,  
A1 : 試料抽出液の反応後の吸光度,  
C0 : 対照の反応開始前の吸光度,  
C1 : 対照の反応後の吸光度

#### (6)加賀能登野菜の糖化タンパク質生成抑制能の測定

(2)および(5)と同様に調製した試料液を用い、これを0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し試料液とした。

BSA-Fructose 溶液 (0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に、BSA が2%, Fructose が0.5M, proClin-200 が15mg/Lになるよう溶解) 990  $\mu$ lに、蒸留水 10  $\mu$ l (C) または $\alpha$ -G-ルチン溶液 (東洋製糖, 検量線用 0.01~10mM) 10  $\mu$ l (Sr), または各試料液 10  $\mu$ l (Ss)を加えた。対象として、0.2M リン酸緩衝液 990  $\mu$ lに各ルチン溶液 10  $\mu$ l (Br), または各試料液 10  $\mu$ l (Bs)を加えた。これを37°Cで3日間インキュベートし、その後直ちに-20°Cで保存した (AGE 試料)。

IMMUNO-TEK ELISA construction system (Zeptomatrix) を用い、固定用AGE抗原 (C) をマイクロプレートに固定した。その後各ウェルに0.1  $\mu$ g/ml 抗AGEモノクローナル抗体 (トランスジェニック) 50  $\mu$ lと各AGE液 (C, Sr, Br, Ss, Bs) の100倍希釈液50  $\mu$ lを加えた。ウェルは各試料3連とした。これを室温で3時間放置した後、ウェルを0.05% Tween20を含むPBSで3回洗浄した。発色基質 (TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL) ) 100  $\mu$ lを加え、3分間静置した後、各ウェルに1M リン酸 100  $\mu$ lを加えて反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで450nmにおける吸光度を測定した。

以下の式に従い阻害活性を算出し、ルチンの検量線を作成した後、検量線から各試料の阻害率を求めた。

$$\text{阻害率(\%)} = \{1 - (B-S)/C\} \times 100$$

## 4. 研究成果

### (1)赤ズイキ・赤ネギ粗色素の特性

#### ①粗色素の抽出

赤ズイキおよび赤ネギ粗色素の収率は、それぞれ 1.14%、0.54%であった。

#### ②粗色素の DPPH ラジカル消去活性

赤ズイキおよび赤ネギ粗色素の DPPH ラジカル消去活性は、Trolox 換算でそれぞれ 658 mg/g, 299 mg/g, ビタミンC換算でそれぞれ 478 mg/g, 228 mg/g であった。

#### ③粗色素の DPPH ラジカル消去活性の熱安定性

赤ズイキおよび赤ネギ粗色素のラジカル消去活性は、いずれも 90℃, 120℃の加熱では 60 分までほとんど変化せず、180℃では経時的に活性が低下した。また、両色素とも 90℃, 120℃の加熱では吸光度もほとんど変化しなかった。180℃では色調が黄褐色に変化し吸光度が上昇した。以上の結果より、ズイキ粗色素は 120℃までの加熱に対しては抗酸化性・色調ともに安定であることが示され、抗酸化素材としての有用性が示唆された。

#### ④粗色素の DPPH ラジカル消去活性の紫外線安定性

赤ズイキ粗色素のラジカル消去活性は経時的に低下し、最終的に 1/2 以下の活性となった。色調は黄褐色に変化し吸光度が上昇した。

#### ⑤粗色素の脂質酸化抑制効果

保存 72 日目で、ズイキ色素を添加したクッキーの POV は色素無添加クッキーの約 60% となり、脂質酸化を抑制した。色素添加量 0.05% と 0.2% では差が認められなかった。

#### ⑥粗色素の SOD 様活性測定

SOD 様活性 ( $IC_{50}$ ) は、赤ズイキ熱水抽出液では 20.0 mg/ml と低かったが、赤ズイキ粗色素は 0.13 mg/ml を示し、赤ズイキ色素の主要アントシアニンであるケラシアニン (シアニジン-3-ルチノシド) の活性 0.64 mg/ml より高かった。この結果より、赤ズイキの SOD 様活性には、アントシアニン色素以外のズイキ成分が関与している可能性が示唆された。

#### (2) 加賀能登野菜の総フェノール量測定

加賀能登野菜および特産食材について総フェノール量を測定した結果、熱水抽出において中島菜、カジメ、加賀レンコンで含有量が高く、それぞれ 14.3, 13.9, 10.6 mg/g であった。

フェノール含有量の高かった試料について以下の機能性測定を行った。

#### (3) 加賀能登野菜のチロシナーゼ阻害活性測定

チロシナーゼ阻害活性 (チロシンを基質と

する) はセリ、ヘタ紫ナス、加賀レンコンで高かった (いずれも  $IC_{50}$  = 約 50~60 ng/ml)。赤ズイキおよび赤ネギ粗色素の活性は低かったが ( $IC_{50}$  = 約 250~350 ng/ml), ケラシアニンの活性 ( $IC_{50}$ ) は 34ng/ml と高かったことから、色素の精製度による違いと考えられた。

#### (4) 加賀能登野菜のヒアルロニダーゼ阻害活性測定

いずれの試料もほとんど活性を示さなかった。

#### (5) 加賀能登野菜のアルドースレダクターゼ (AR) 阻害活性の測定

アルドースレダクターゼ阻害活性は中島菜のメタノール抽出物、カジメおよび加賀レンコンの酢酸エチル抽出液で高かった (いずれも  $IC_{50}$  = 約 0.2 mg/ml)。

#### (6) 加賀能登野菜の糖化タンパク質生成抑制能の測定

試料 1mg あたりの活性 (ルチン相当量) は加賀レンコンで約 0.9 ng/mg と他の試料に比べて比較的高かったが、赤ズイキ粗色素が約 28 ng/mg と圧倒的に高い結果となった。しかしケラシアニンの活性は 4 ng/mg と低く、赤ズイキの糖化タンパク質生成阻害活性はアントシアニン以外のズイキ成分によるものと推察された。アントシアニン色素の活性は全体的に小さかった。

今後は、赤ズイキの SOD 様活性成分、糖化タンパク質生成抑制成分、加賀レンコンのチロシナーゼ阻害活性成分および AR 阻害活性成分など、各機能性において高い活性が得られた試料につき、活性成分の分離同定を行いたい。

#### 5. 主な発表論文等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

寺沢 なお子 (TERASAWA NAOKO)  
金沢大学・人間科学系・教授  
研究者番号: 00227513

##### (2) 研究分担者

村田 容常 (MURATA MASATSUNE)  
お茶の水女子大学・人間文化創成科学研究科・教授  
研究者番号: 60210051