

## 機能性に優れた県産食品素材の検索(Ⅲ)\*

小浜 恵子\*\*、山口 佑子\*\*\*、前田 穰\*\*、米倉 裕一\*\*\*、長澤 孝志\*\*\*\*

糖尿病合併症予防に有効な岩手県産食材として前報で選抜されたカシス、アロニア、カリン、ヤマブドウについて検討を行った。糖化タンパク質(AGE)生成抑制能は、総ポリフェノール量およびDPPHラジカル消去活性を反映していた。ポリフェノール類はカリンではポリマーのプロアントシアニジンが主であり、アロニアやヤマブドウしぼり粕ではオリゴマーのプロアントシアニジンやモノマーのポリフェノール類と推察された。ヤマブドウしぼり粕からAGE生成抑制能を有するポリフェノール類を抽出するには70℃以上が望ましく、機能性を利用した食品として酢や錠剤の試作を行ない、十分なものが得られた。ヤマブドウやカリンでは糖尿病モデルラットでの試験でもAGE生成抑制能など糖尿病態改善効果が認められており、機能性食品としての展開が期待される。

キーワード：糖化変性、ポリフェノール、糖尿病

## Relative Estimation of Food Functionality of Agricultural Products Harvested in Iwate Prefecture (Ⅲ)

KOHAMA Keiko, YAMAGUCHI Yuko, MAEDA Yutaka, YONEKURA Yuichi and NAGASAWA Takashi

We selected some agricultural products (black currant, chokeberry, Chinese quince and wild grape) which inhibit AGEs generation in previous report. In this work, we separated polyphenol of these products by using Sephadex LH-20 column. The inhibitory activity of these products was related to the amount of total polyphenol and the DPPH radical scavenging activities. Polymeric procyanidins were the main in Chinese quince, and oligomer procyanidins and monomer phenol compounds were the main in chokeberry and wild grape pomace. In wild grape pomace, extraction at 70°C or more was preferable to obtain polyphenol that had inhibitory activity of AGEs generation. Vinegar and tablet were made as food using the functionality of the extract, and the enough one was obtained. In addition, the diabetic rats feeding wild grape or Chinese quince showed beneficial effects with improvement in the disease.

key words : glycation, polyphenol, diabetes

### 1 緒 言

消費者の健康食品に関する興味や関心は年々高まっており、それに伴って健康食品市場も年々増大している。そのため、食品の高付加価値化のためには何らかの機能性を見いだすことが必要であり、食品の機能性解明に重点を置く企業は増加の傾向にある。そこで我々は、県産食品素材の機能性面での高付加価値化を目的として、生活習慣病の中でも国民病といわれるほど発症率の高い糖尿病に着目した機能性評価に取り組んでいる。糖尿病を発病し高血糖状態が続くと、生体内におけるタンパク質の非酵素的糖付加反応が促進され糖化タンパク質が生成される(グリケーション)。これらはその後の反応過程を経て、非酵素的糖付加反応—後期反応生成物(AGE:Advanced Glycation End Products)となり、生体

内で種々の糖尿病の病態(腎臓障害、視力障害、etc)を引き起こす原因となる<sup>1),2)</sup>。これら一連の反応では、ラジカルの発生によりAGEの生成が促進されるともいわれており、抗酸化活性もAGE生成の抑制に重要と考えられている。

前報では<sup>3),4)</sup>AGE生成抑制という点に着目したスクリーニングとして、約250種類の県産農産物の糖化タンパク質生成抑制能および抗酸化活性を*in vitro*で評価し、活性の高いものについてさらにアルドースレダクターゼ阻害活性についても分析した結果、カシス、アロニア、カリン、ヤマブドウなどではすべての活性が高いことが明らかになった。我々はこれらを糖尿病合併症予防効果に有用と考え、これらの活性の本体について検討を行った。特に岩手県内で栽培面積の増大しているヤマブドウ

\* いわて新ブランド食品創生事業

\*\*\*\* 岩手大学農学部

\*\* 食品技術部

\*\*\* 醸造技術部

に関しては、廃棄物として有効利用が期待されるしぼり粕に着目した。

2 実験方法

2-1 分析試料

カリン、カシス、アロニアは、岩手県農業研究センター、盛岡農業普及センター、独立行政法人果樹試験場などを通じて県内より収集した。また、ヤマブドウは岩手県林業技術センターで栽培された「涼実紫2号」を70℃加熱した後、圧搾した粕を用いた。

2-2 試料抽出液の調製とポリフェノールの濃縮

カリン、カシス、アロニアは前報<sup>4)</sup>同様に可食部を凍結乾燥後、粉碎し、10倍量(w/v)の水で熱水抽出した。ヤマブドウ粕については、乾燥せずに、そのまま温度条件を変えて(室温、45、70、100、120℃)抽出を実施した。これらの抽出液を濾過し、試料抽出液とした。水で膨潤させたSephadex LH-20カラム(9×44mm)に抽出液8mlをアプライしてポリフェノール類を吸着させた。カラムに吸着せずに通過した非吸着画分(N)を分取した後、水で洗浄し、70%エタノール溶出(E)、60%アセトン溶出(A)を行い、それぞれの画分を分取し分析に用いた。

2-3 総ポリフェノール・フラバノール含量の測定

各試料の総ポリフェノール量は既報<sup>5)</sup>に従って測定し、没食子酸相当あるいは(+)-カテキン相当量として算出した。また、ポリフェノールの中でもフラバノール類に特異性の高いVanillin-HCl法<sup>6)</sup>で、(+)-カテキン相当量として算出した。

2-4 ラジカル消去活性の測定

有色ラジカルであるDPPHの消去活性は、既報<sup>5)</sup>に従って測定し、没食子酸相当量として算出した。

2-5 糖化タンパク質生成抑制能の測定

糖化タンパク質生成抑制能は、前報<sup>3)</sup>に従って測定した。

2-6 ヤマブドウしぼり粕を用いた酢の試作

2-1のしぼり粕に2倍量(V/V)の水を加えて再度70℃で加熱した抽出液を用い、既報<sup>7)</sup>に従って酢を試作した。

3 結果および考察

3-1 カリン、カシス、アロニアの分取画分の分析

図1に、各試料の各画分中の総ポリフェノール量、DPPHラジカル消去活性、糖化タンパク質(AGE)生成抑制能を示した。いずれの果実の抽出原液(元)ポリフェノール含量も高い値を示した。カラムによる吸着、分画によりカリン2種類では、ポリフェノール類はいずれも主にアセトン溶出(A)によって回収できた。アロニアは、エタノール溶出画分(E)に多く含まれアセトン画分(A)には少なかった。カシスはエタノール、アセトン画分からはほぼ同量回収した。

DPPHラジカル消去活性は、それぞれの画分の総ポリフェノール量をほぼ反映した。前報<sup>3),4)</sup>において、250種

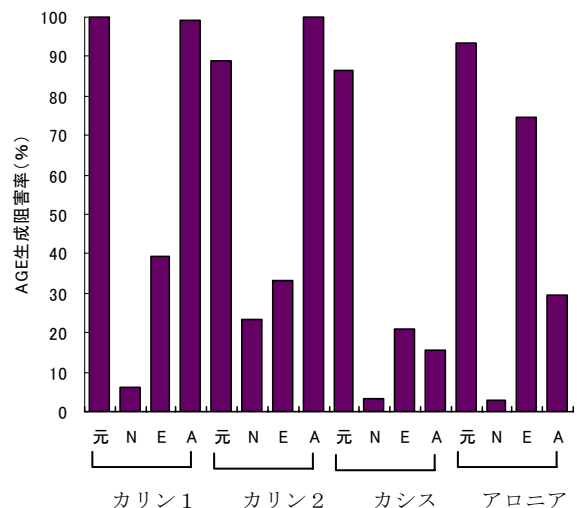
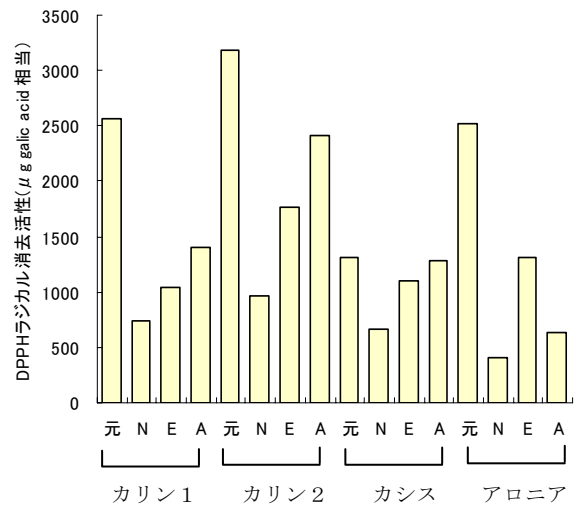
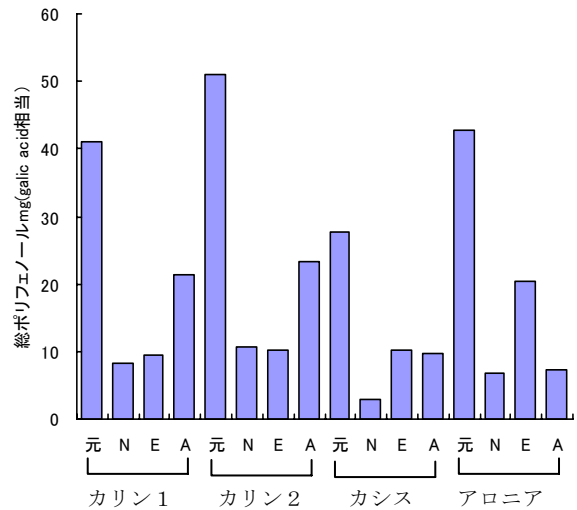


図1 分取した画分の分析  
 上段から総ポリフェノール量、DPPHラジカル消去活性、AGE生成抑制能、元：抽出原液、N：非吸着画分、E：70%エタノール溶出画分、A：60%アセトン溶出画分

類のスクリーニングを実施した結果、総ポリフェノール量とラジカル消去活性が相関関係にあることが認められており、今回も同様の結果を得た。カシスではポリフェノール含量に比べて高い値を示したが、DPPH ラジカル消去活性の測定波長付近の妨害の影響と推測され、他の測定方法での確認が必要である。

糖化タンパク質(AGE)生成抑制能は、非吸着画分(N)では、いずれの試料でも認められなかった。カリンはアセトン溶出画分の抑制能が高く、カシスはエタノール溶出画分、アセトン溶出画分で同程度、アロニアではエタノール溶出画分の抑制能が高かった。これは、ポリフェノール含量およびラジカル消去活性の大小とほぼ一致する。LH-20 ゲルでポリフェノールを吸着性で分画した例<sup>8)</sup>から、70%エタノールで溶出されるポリフェノール類はモノマーから比較的重合度の低い(オリゴマー)プロアントシアニジン類等と思われ、60%アセトンで溶出される画分は重合度の高いポリマープロアントシアニジンと予測される。

以上のことから、糖化タンパク質(AGE)生成抑制能を示す主な成分はポリフェノール類であり、カリンでは重合度の高いものが、アロニアではモノマーからオリゴマーが、カシスでは両方が活性の主体と推察している。

### 3-2 ヤマブドウしぼり粕の分取画分の分析

ヤマブドウ搾り粕には非常に高い糖化タンパク質(AGE)生成抑制能があり、経口投与による動物実験での抑制効果についても既に報告している<sup>9)</sup>。実際の製品とする場合は工業的に可能な抽出条件を定める必要があり、抽出効率について検討した結果を表1に示した。室温、45℃抽出物のAGE生成抑制能は非常に低く、70℃以上での抽出が望ましい。70℃、100℃におけるFolin-Denis法により測定した総ポリフェノール量は差がないが、Vanillin-HCl法による総フラバノール含量に差があり、100℃、120℃では逆にフラバノール含量に差がない。AGE生成抑制能は、フラバノール含量を反映していると思われる、抽出には70℃以上、100℃以下が適している。

表2には、熱水抽出物をLH-20カラムで分画した抽出液を乾固させて得られる粉末のポリフェノール含量とポリフェノール10mg/mlとしてAGE阻害率を測定した結果を示した。熱水抽出物は総ポリフェノール含量として約6.8%に対して、エタノール溶出画分、アセトン画分でそれぞれ66.5%、50%に濃縮された粉末を得た。ポリフェノール含量が同量となる条件でAGE生成抑制能を測定した結果、濃縮粉末の方が高い値を示した。前項3-1で示した他の果実と同様に、非吸着画分ではAGE生成抑制能はみられず(データは省略)、活性の主体はポリフェノール類と思われる。また、100℃抽出物に含まれるポリフェノールはエタノール画分とアセトン画分で約8:2の割合で回収され、アロニアと同様に比較的重合度の低いオリゴマーで構成されると考えられる。

このエタノール画分粉末についてLC/MS/MS、NMR、

表1 ヤマブドウ搾り粕からの抽出条件

	総ポリフェノール (%)	総フラバノール (%)	AGE生成 阻害率 (%)
室温	4.0	0.8	5.0
45℃	5.1	1.3	15.3
70℃	6.2	1.7	23.2
100℃	6.3	2.8	45.4
120℃	7.7	2.8	42.7

(+)-カテキン相当量

表2 ヤマブドウ搾り粕の分画粉末

画分 (重量%)	総ポリフェノール* (%)	AGE生成阻害率** (%)
100℃抽出物	6.8	71.5
70%エタノール溶出	66.5	84.1
60%アセトン溶出	50.0	92.1

\*galic acid相当量

\*\*ポリフェノール10mg/mlでの阻害率

TOF-MSによる成分解析を行った結果、総フラバノール中にモノマーでは(+)-カテキン:10.4%、(-)-エピカテキン:8.6%、ダイマーのプロアントシアニジンとしてプロシアニジンB1:3.4%、プロシアニジンB2:5.1%、であり、約7割がオリゴマーのプロアントシアニジンと推定された<sup>9)</sup>。また、岩手大学での糖尿病ラットへの経口投与試験の結果、100℃抽出物と同様にAGE生成抑制能を認めている<sup>9)</sup>。

### 3-3 糖尿病合併症抑制効果を有する食品開発

現在までの結果を元にヤマブドウの機能性食品としての用途を検討している。製品形態としては、一般食品あるいは錠剤・ドリンク剤としての展開が考えられる。一般食品として、ヤマブドウしぼり粕から酢を試作した結果を表3および図2に示した。果汁から試作した酢と比較して色調にも問題が無く、ポリフェノール含量、ラジカル消去活性についても高い値であった。これら試作酢について糖尿病ラットでの摂取試験を行っている。飲料水として摂取させていることから、ポリフェノール摂取量は前記100℃抽出物、エタノール画分に比べ少ない量であったが、穀物酢を用いた場合と比較してAGE生成抑制能を示し、糖尿病態の特徴である血漿中の中性脂肪濃度の上昇を抑制した<sup>10)</sup>。また、(株)夢実耕望の協力を得て、100℃抽出の粉末を用いた錠剤化を検討したところ、96%粉末での錠剤化が可能であった(図3)。

表3 ヤマブドウ果汁およびしぼり粕の試作酢

	総酸 Brix%		色 調		総ポリ* フェノール	DPPHラジカル** 消去活性
			420nm	530nm		
果汁	4.3	5.4	0.89	0.92	1.58	0.14
粕	5.9	8.4	0.77	1.01	1.95	0.36

\*,\*\* galic acid相当量(mg/ml)

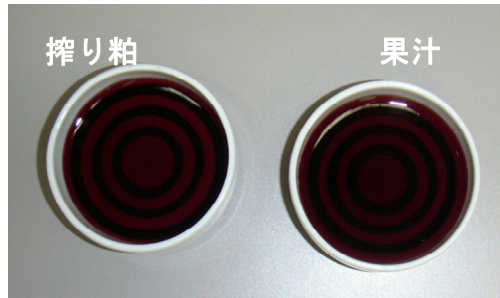


図2 ヤマブドウ果汁およびしぼり粕の試作酢

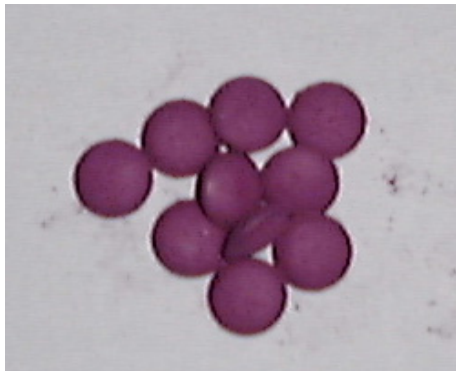


図3 ヤマブドウタブレット

他の素材、カリン、アロニア、カシス等についても検討を進めている。特にカリンは高分子のポリフェノール類が主と考えられ、体内への吸収性が悪いと予測されたが、糖尿病ラット経口投与試験を行った結果では、血漿中の糖濃度に減少傾向がみられ、糖尿病に特徴的な体重の減少が抑えられた<sup>11)</sup>。また、カシスは、岩手県で生産量の多いブルーベリーに次ぐ小果樹として盛岡近郊で栽培に取り組む農家もあり、ワインなど地元企業との製品が生まれ、さらに用途の拡大が望まれている。アロニアは、盛岡市で平成16年から栽培導入し(580本)、数年後には数tの収穫が見込まれている。盛岡市では菓子、果汁としての特産品のほか、健康効果を意識した活用を期待している。糖尿病態を改善する効果について更に検討を進め、食品としての開発も検討する予定である。

#### 4 結 言

糖尿病合併症予防効果に有望な岩手県産食材として選抜されたカシス、アロニア、カリン、ヤマブドウの活性の本体について検討を行った。糖化タンパク質(AGE)生成

抑制能は、総ポリフェノール量およびDPPHラジカル消去活性を反映していた。活性の主体であるポリフェノール類はカリンではポリマーのプロアントシアニジンが主であり、アロニアやヤマブドウではオリゴマーのプロアントシアニジンやモノマーのポリフェノール類と推察された。また、岩手で栽培面積が拡大しているヤマブドウのしぼり粕から糖化タンパク質(AGE)生成抑制能を有するポリフェノール(フラバノールが主)を抽出するには70℃以上が望ましいことがわかった。機能性を利用した食品形態として酢や錠剤の試作を行なった。

ヤマブドウ、ヤマブドウ酢やカリンでは糖尿病モデルラットでの試験でも糖化タンパク質(AGE)生成抑制能など糖尿病態改善効果が、認められた。

本研究を行うにあたり、試料を提供して頂いた、岩手県農業研究センター、岩手県林業技術センター、盛岡農業普及センター、独立行政法人果樹試験場、試作にご協力いただきました(株)夢実耕望に心より感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Takeda, M., Ku, Y., Suzuki, Y. and Kuroda, Y.: Hepato-Gastroenterology, **49**, 928-931 (2002)
- 2) McLennan, S. V., Martell, S. K. Y. and Yue, D. K.: DIABETES, **51**, 2612-2618 (2002)
- 3) 山口 佑子、岸 敦、小浜 恵子: 岩手県工業技術センター研究報告, **11**, 15-18 (2004)
- 4) 山口 佑子、岸 敦、小浜 恵子: 岩手県工業技術センター研究報告, **12**, 13-15 (2005)
- 5) 小浜 恵子、岸 敦、米倉 裕一、大澤 純也、澤井 秀幸、長澤 孝志: 岩手県工業技術センター研究報告, **10**, 77-80 (2003)
- 6) Butler, G. L., Price L. M. and Bronthern E. J.: J. Agric. Food Chem., **30**, 1087-1089 (1982)
- 7) 米倉 裕一、山口 佑子、小浜 恵子、櫻井 廣: 岩手県工業技術センター研究報告, **11**, 70-73 (2004)
- 8) Peng, Z., Hayasaka, Y., Iland, G. P., Sefton, M., Hoj, P., and Waters, J. E.: J. Agric. Food Chem., **49**, 26-31 (2001)
- 9) 特願 2005-328561
- 10) 佐々木和子 岩手大学農学部卒業論文(2006)
- 11) 武藤美由紀 岩手大学農学部卒業論文(2006)