

アズキ品種間における抗酸化活性の簡易評価法について

齋藤優介^{1, 2)}, 森田武志¹⁾, 西 繁典^{1, 2)}, 小疇 浩³⁾, 弘中和憲³⁾, 小嶋道之^{1, 2)}

(受付 : 2008年 4 月 30 日, 受理 : 2008年 5 月 15 日)

The simple evaluation method of antioxidant activity between Adzuki bean varieties

Yusuke Saito, Takeshi Morita, Shigenori Nishi, Hiroshi Koaze, Kazunori Hironaka, Michiyuki Kojima

摘要

種皮色の異なるアズキ13品種のポリフェノール含量および抗酸化活性の相関関係から、アズキ品種の抗酸化活性を評価する二つの作業仮説を提案する。(1) 複色種子を除く単色のアズキ品種においては暗い種皮色、すなわちL値が小さい品種ほどポリフェノール含量が高い。(2) 50℃、5時間の種子の温水抽出液およびそれに続けて分別した種皮の100℃、1時間の熱水抽出液の両者を合計した全ポリフェノール含量が高いほど、抗酸化活性が高い品種であると評価できる。(2) に関しては、単色及び斑紋色の種子全てに利用できる評価法である。

キーワード : アズキ, ポリフェノール, 抗酸化活性, 種皮色, 品種

I 緒言

貯蔵性・保存性の良い食材である豆類は、裏を返せば調理に手間がかかり、デンプンやタンパク質などの栄養素と共に収斂味や渋味などの不快味成分を含んでいる。そのため、ある種類の豆類では、調理前のかき抜き処理や調理加工の方法を工夫することで不快味成分を除き利用されてきた。また、味覚や消化性の向上を考慮して、食品微生物を利用した豆類の難消化成分の分解や、旨味成分への変換、ビタミン・色素類豊富な発酵食品の製造、

発芽実生や未熟豆の利用による完熟豆にはない味覚および食感を楽しむ野菜としての利用が進んでいる。日本でもよく利用される豆類はアズキ、インゲンマメ、エンドウ、ソラマメ、リョクトウ、ダイズ、ラッカセイなどがあり、これらの豆類に含まれる栄養成分や色素成分、毒性成分および苦味・渋味成分に関する多くの報告がある(Aykroyd et al 1993; 小嶋ら 1997; 香川 2002)。また、色素成分に含まれる豆類ポリフェノールの成分や機能性に関する研究がいくつかあるが、主成分はフラボノイド(フラボン類とアントシアニン類)と縮合タンニン(プロシアニジ

(¹帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座食品栄養科学研究室, ²岩手大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻生物機能開発学講座, ³帯広畜産大学畜産科学科食料生産科学講座食品工学研究室)

(¹Laboratory of Food Nutritional Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ²The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, ³Laboratory of Food Engineering, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

ン類等)である(Martin-Tanguy et al. 1977; Martin et al. 1980; Ariga et al. 1981; Yoshida et al. 1996; Takahata et al. 2001; 齋藤ら 2007)。しかし, 豆類は多くの種類が存在し, 多様な種皮色をもつ品種が存在しているが, 豆類品種間に含まれるポリフェノールや抗酸化活性は, これまでに調べられていない。本研究では, アズキ品種の抗酸化活性を簡便に比較・評価する方法について明らかにすることを目的とした。

II 実験方法

1. 抽出液の調製

アズキ(品種: エリモシヨウズ)種子5gに蒸留水15mlを加えて, 3つの条件; (1)20°Cで24時間, (2)50°Cで5時間, (3)100°Cで15分, により抽出液を得た(それぞれ抽出液A, 抽出液C, 抽出液Eとする)。続いて(1)~(3)の種子より種皮のみを分別後, それぞれの種皮に再度15mlの蒸留水を加えて, 100°Cで1時間加熱抽出した(それぞれ抽出液B, 抽出液D, 抽出液Fとする)。各々の抽出液は, 凍結乾燥後, 使用時に蒸留水で一定濃度に溶解して用いた。

系譜及び来歴(佐藤ら 1975; 足立ら 1980; 村田ら 1985; 白井ら 1990)の明らかなアズキ13品種は, 十勝農業試験場より分譲していただき, 以下の方法に従い抽出した。すなわち, アズキ13品種の種子5gに蒸留水15mlを加え, 50°Cで5時間抽出して抽出液Cを得た。続いて, 種子から分別した種皮のみに蒸留水15mlを加え, 100°Cで1時間加熱して抽出液Dを調製した。それぞれは, 凍結乾燥後に蒸留水を用いて10mg/mlに溶解して用いた。

2. 種皮色, ポリフェノール含量および組成分析

各種子の種皮色L* a* b*値は, 色彩色差計(日本電色ND-100IDP)を用いて, 種子50粒以上を単粒法で測定し, 計算によりC*値(彩度)を求めた。また, 抽出液に含まれるポリフェノール量は, Folin-Ciocalteu法により求め, (+)-カテキンを用いた検量線からカテキン相当量に換算して表した(小嶋ら 2006)。また, ポリフェノール組成は, 逆相HPLCを用いて分析した(小嶋ら 2006)。

HPLC条件は, Phenomenex C18(4.6mm×250mm)カラムにSPD-10ADvp検出器(島津製作所)を接続したシステムで, 溶媒A; 0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸と溶媒B; 0.1%(v/v)トリフルオロ酢酸-アセトニトリルを用いた30分間で溶媒Bが8%から30%まで増加するグラジエント条件を用いた。また, カラム恒温槽の温度は40°C, 流速は1ml/min, 検出波長は280nmを用いた。

3. 抗酸化活性の測定

凍結乾燥した各試料および市販標準品の抗酸化物質は, 蒸留水で10mg/mlの濃度に溶解して抗酸化活性を測定した。抗酸化活性の測定は, 1, 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジルラジカル消去活性法(DPPH法)とニトロブルーテトラゾリウム法(NBT法)の2つの方法を用いた(小嶋ら2006)。すなわち, DPPH法は, 試料50 μ l(コントロールは蒸留水を使用)に2mlの0.5mM DPPHエタノール溶液と2mlの100mM Tris-HClバッファー(pH7.4)を加えて混和して15分後の520nmの吸光度を求めた。抗酸化活性はコントロールの吸光度に対する試料添加の吸光度の割合(%)として示した。また, NBT法は, キサンチンオキシダーゼ懸濁液(和光純薬)を用いたスーパーオキシド生成系で生じたスーパーオキシドとNBTとの反応により生じたホルマザンを測定(560nm)して, 試料を加えない場合の差(%)として抗酸化活性を表した。

III 結果および考察

1. 抽出条件の検討

アズキ(エリモシヨウズ)種子からの抽出物量が最も多かったのは条件(2)の抽出液Aおよび条件(3)の抽出液Fであり, ポリフェノール含量の最も高かったのは, 条件(2)の抽出液Aと条件(3)の抽出液Fであった(Table 1)。3つの条件における抽出液A~Fの抽出物量およびポリフェノール含量はそれぞれで異なる値を示したが, 両者の合計の抽出物量およびポリフェノール含量は, 前者が106mg~119mgおよび後者が12.8mg~13.1mgであった。すなわち, 3条件共に抽出できる全抽出物量や全ポリフ

エノール量はほぼ同様であるが、抽出液A、CおよびEの値が顕著に異なり、最初の抽出で効率良くポリフェノールが抽出されたとき、続く種皮のみとした抽出では抽出量が少ないことが示された。

抗酸化活性を比較すると、DPPH ラジカル消去活性は、条件(2)の抽出液Cと条件(1)の抽出液Bが高く、NBTスーパーオキシド消去活性は、条件(1)の抽出液Bが高かった。種子を50℃で5時間吸水する条件(2)の抽出液Cは、抽出物量およびポリフェノール含量および抗酸化活性が高く、その後に種皮のみとして100℃で1時間加熱抽出して得られた抽出液Dも、他の条件の抽出液と遜色の無い抗酸化活性を示したことから、この条件(2)が今回調査した中では総合的には最も良い抽出条件であると評価した。

2. 13品種のアズキ種子抽出液に含まれるポリフェノール量およびその組成

種皮色(野村ら 1991)が赤色の4品種、黒色の2品種、白色の1品種、灰白色の1品種、緑色の1品種、他に斑紋色および部分色の4品種を合計して13のアズキ品種を実験に用いたが、それらの種子サイズや重量は顕著に異なっていた。各種子5gからの抽出液Cと抽出液Dの凍結乾燥物の重量には、有意な品種間差は認められなかった(データ省略)。L* a* b* 表色法により、各々のアズキ品種の種皮色を数値化したところ、各々の品種で固有の数値を示したが、同系種皮色同士では近似した値を示した(Table 2)。

単色(赤, 黒, 白, 灰白および緑)の種皮色を有するアズキ品種に含まれるポリフェノール含量は、100g 当た

Table 1 Extract's weight, polyphenol contents and relative antioxidant- and radical scavenging activities of Adzuki beans extracts.

	Condition(1) ³		Condition(2) ³		Condition(3) ³	
	Ex A	Ex B	Ex C	Ex D	Ex E	Ex F
Extract (mg) ¹	62.2	43.4	101.0	18.0	59.2	49.2
Polyphenol (mg)	7.7	5.2	10.8	2.0	7.2	5.9
(a) DPPH (%) ²	62.6	76.9	81.9	73.5	57.1	71.0
(b) NBT (%) ²	38.1	47.9	33.5	38.5	31.8	39.3

¹Extract show extract's weight of 5g seeds.

²Relative antioxidant and radical scavenging activities measured with (a)250 μg and (b)50 μg of each extract.

³Ex A is extracts at 20℃ condition during 24hours from 5g seeds.

Ex B is extracts at 100℃ condition during 1hour from seed coat of treated seeds.

Ex C is extracts at 50℃ condition during 5hours from 5g seeds.

Ex D is extracts at 100℃ condition during 1hour from seed coat of treated seeds.

Ex E is extracts at 100℃ condition during 15minutes from 5g seeds.

Ex F is extracts at 100℃ condition during 1hour from seed coat of treated seeds.

Table 2 Seed characterizations and polyphenol contents of 13 varieties of Adzuki bean seeds.

No.	Varieties	Skin color	L*a*b* value ¹				Polyphenol (mg/100g seeds)	Polyphenol (mg/100 grains)
			L*	a*	b*	C*		
1	Erimosyouzu	Garnet Brown	34.04	23.14	13.43	26.75	227.2 ± 10.6	38.6 ± 1.8
2	Akanedainagon	Garnet Brown	32.42	21.83	12.7	25.25	175.2 ± 4.0	35.0 ± 0.8
3	Kamuidainagon	dark Garnet Brown	32.23	21.64	11.13	24.34	236.0 ± 4.6	31.5 ± 1.2
4	Token 38gou	light Garnet Brown	45.5	16.66	22.27	27.8	161.8 ± 3.2	32.4 ± 0.6
5	Kurosyozu	Black	20.18	1.75	-1.07	2.05	290.6 ± 9.0	43.6 ± 1.4
6	391-PI157633	Black	21.93	1.14	-1.44	1.84	337.4 ± 8.4	37.1 ± 0.9
7	Hokkaishirosyouzu	Ivory Yellow	68.63	0.29	25.08	25.08	85.6 ± 9.2	12.9 ± 1.4
8	Kaihakukei-4	pale Olive Buff	59.96	4.5	23.72	23.72	159.2 ± 5.2	30.3 ± 1.0
9	Midorisyozu	bull Green Yellow	53.16	-3.23	27.23	27.42	132.6 ± 2.4	22.5 ± 0.4
10	Buchisyoryukei-1	Garnet Brown, mottled	-	-	-	-	265.6 ± 5.8	23.9 ± 0.5
11	Kumamoto zai63	bull Green Yellow, mottled	-	-	-	-	225.2 ± 12.2	21.3 ± 0.6
12	Anekokei-1	Ivory Yellow, partly Garnet Brown	-	-	-	-	128.8 ± 8.8	24.5 ± 1.6
13	382-PI157633	Ivory Yellow, partly Black	-	-	-	-	211.2 ± 8.2	33.7 ± 1.3

¹ Values show average for more than 50seeds. C* = (a*² + b*²)^{1/2}

り86 gから337mgと幅広い値であった。また、今回分析した同色系統、例えば赤色系統のアズキポリフェノール含量は、100 g当たり162mgから236mgの幅広い値を示し、黒色系統におけるポリフェノール含量にもそれぞれ顕著な違いが見られた(Table 2)。ホッカイシロシヨウズのポリフェノール含量は低いが、灰白色の灰白系-4のポリフェノール含量はアカネダイナゴンや十系38号に含まれるそれとほぼ同程度であった。今後、これらのアズキ品種を用いたポリフェノール組成、酵素、遺伝子などの比較解析により、アズキ種皮色及びポリフェノールに関する合成経路の解明が期待される。

単色種皮色を有するアズキ品種のL* a* b* 値とポリフェノール含量との関連を検討したところ、 $Y = -4.252X + 374.5$ ($R^2 = 0.8189$)の相関関係を示し、L値とポリフェノール含量との間には高い負の相関関係のあることが示された。この結果は、単色種皮色のアズキ種子においては、種皮色のL値の大きな値を示す明るい種皮色のアズキに含まれるポリフェノール含量は低いと推定することが可能であるかもしれない。今後は、多くの赤色系統のL* a* b* 値とポリフェノール含量との関連を検討して、同色系統のアズキ品種においてこの関係が成立するのかどうかを詳細に検討する必要がある。

アズキ品種のポリフェノール組成を逆相HPLC分析により比較したところ、カテキングルコシド、カテキン、

プロシアニジン、ケルセチングリコシドなどが認められ、ホッカイシロシヨウズ以外の12品種のHPLCプロファイルに顕著な違いは認められなかった(Table 3)。また、ホッカイシロシヨウズのポリフェノールはカテキンが大部分であったことから、他品種に見られる糖転移酵素の欠損もしくは不活性化が推察された。

3. 13品種のアズキ種子抽出液に含まれる抗酸化活性の比較

13品種のアズキ抽出液Cおよび抽出液DのDPPHラジカル消去活性は、品種間で顕著に異なっていた。しかし、全てのプロットを用いて両抽出液のポリフェノール濃度とDPPHラジカル消去活性との相関関係を検討したところ、 $Y = 0.0213X$ の直線関係が認められた。この結果は、調べた13品種の2種類の抽出液に含まれるポリフェノール濃度と抗酸化活性の間には顕著な正の相関関係($R^2 = 0.9261$)のあることを示唆している(Fig. 1A)。Fig. 1のプロットに示した番号は、Table 2に示した品種を表している。表示方法は、例えば図上に示した数字の1はエリモシヨウズの抽出液Cのポリフェノール濃度とDPPHラジカル消去活性を示す値を、1'は抽出液Dのポリフェノール濃度とDPPHラジカル消去活性を示す値をそれぞれプロットした(以下同様に、グラフ上に示した数字がTable 2の品種No.に対応している)。また、ポリフ

Table 3 RP-HPLC profile of 13 varieties of Adzuki bean seed polyphenols.

No.	Varieties	(%)						
		CG	C	PC	QMG	QDG	QTG	Unknown
1	Erimosyouzu	27.2	19.2	24.9	3.4	6.4	10.4	8.5
2	Akanedainagon	19.8	46.5	12.9	1.7	-	9.9	9.1
3	Kamuidainagon	36.0	31.8	15.5	-	-	4.7	11.9
4	Tokei 38gou	19.3	31.6	11.4	0.5	1.5	7.7	27.8
5	Kurosoyouzu	22.3	40.7	9.8	1.2	3.3	11.1	11.7
6	391-PI157633	24.7	44.4	14.8	-	2.1	10.2	3.8
7	Hokkaishirosoyouzu	-	40.0	6.1	2.8	1.3	11.5	38.3
8	Kaihakukei-4	61.1	19.9	11.4	-	-	-	7.6
9	Midorisoyouzu	39.9	25.7	15.7	-	1.1	4.5	13.1
10	Buchisouryukei-1	18.9	35.6	15.0	2.0	3.6	13.9	11.1
11	Kumamoto zai63	37.2	39.0	6.5	-	1.0	6.0	10.1
12	Anekoeki-1	18.6	53.3	10.4	-	1.5	7.0	9.3
13	382-PI157633	17.2	46.4	10.1	1.0	1.5	13.2	10.6

Abbreviation; CG: Catechin 7-glucoside, C: Catechin, PC: Procyanidins, QMG: Quercetin monoglycosides,

QDG: Quercetin diglycosides,

-:Not detected

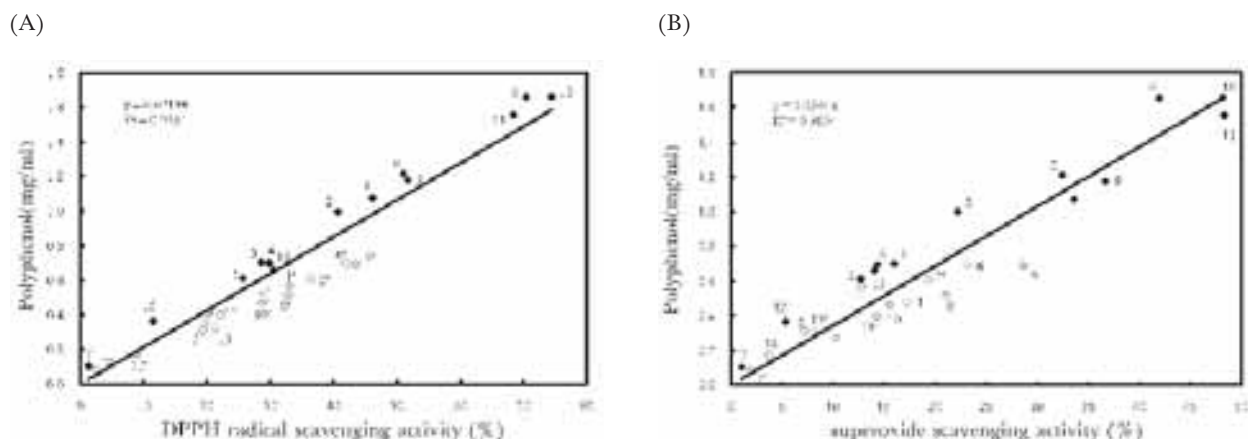


Fig.1 Correlation between (A)DPPH radical scavenging activity, (B)superoxide scavenging activity and polyphenol of Adzuki bean extracts.

(◆) show Ex C and (◇) show Ex D from No.1-13 samples at Table 2, respectively.

フェノール濃度とスーパーオキシド消去活性値との間においても、 $Y = 0.0344X$ の直線関係が認められ、正の相関関係($R^2 = 0.9034$)が示された(Fig. 1B)。すなわち、今回用いたアズキ13品種の抽出液C及び抽出液Dのポリフェノール濃度とラジカル消去活性およびスーパーオキシド消去活性との間にはそれぞれ正の相関関係のあることが示唆された。

これらの結果より、アズキ品種の抗酸化・ラジカル消去活性の評価法として、種皮色(赤, 黒, 白, 灰白, 緑および複色)との関連は、単色の種子色のアズキに関しては、種皮色が暗いアズキ種子ほどポリフェノール含量が高いこと、また、抽出液C及び抽出液Dの合計ポリフェノール含量が高い品種は抗酸化活性が高いことが示唆された。今回の結果を利用すれば、単色種皮色のアズキ品種は視覚的に簡単に評価できること、および種子抽出液のポリフェノール含量を求めることにより、アズキ品種の抗酸化活性の高低を評価できることを明らかにした。

アズキ13品種に含まれるポリフェノール組成の割合には、多少の相違が認められるので、今後HPLC分析による詳細な成分比較を行い、アズキポリフェノール成分の合成および代謝制御の解明を行い、ポリフェノール含量と種皮色との関連性について明確にしたいと考えている。また、今回調べた複色のアズキ品種に含まれるポリフェノール含量は、種子100g当たり129mgから266mgの範囲にあった。

しかし、これらの斑紋や部分色のある種皮色は色彩色差計を用いての数値化をすることは不可能である。ポリフェノールが種皮色の濃い部分に局在して分布しているのかもしれないが、これらの遺伝資源を用いた遺伝学的な検討が今後必要であろう。現在、どのような遺伝子が複色に関係しているのかは不明であるが、これらを親として得られた子及び孫の種皮色が単色になるのかどうかなどの遺伝育種学的な検討から、種皮色とポリフェノールとの関連について研究の発展が今後期待される。

本実験は13品種数からの結果であるが、今回の作業仮説を明確にするには、さらに多くの遺伝子資源を用いた検討が必要であろう。さらに、アズキの品質評価法として、非破壊測定法によるアズキの抗酸化・ラジカル消去活性の評価方法が期待される。

謝辞

本研究は日本豆類基金協会の資金援助を受け行い、13品種のアズキ種子は北海道立農業試験場の小豆菜豆科より分譲していただきました。両機関に感謝いたします。

参考文献

足立大山, 千葉一美, 村田吉平, 佐藤久泰, 成河智明.

1980. 小豆新品種「ホッカイシロシヨウズ」の育成について. 北海道立農業試験場集報 43: 80-87
- Ariga T, Asano Y. 1981. Isolation, identification and organoleptic astringency of dimeric proanthocyanidins occurring in Adzuki beans. *Agricultural and Biological Chemistry* 45: 2709-2712
- Aykroyd WR, Doughty J, Walker Ann. 1993. 渡辺篤二, 大久保一良監修, 豆類の栄養と加工, pp42-126, 建帛社, 東京
- 香川芳子. 2002. 五訂食品成分表2002, pp50-51, 女子栄養大学出版部, 東京
- 小嶋道之, 鈴木信幸, 大西正男, 伊藤精亮. 1997. アズキ発芽過程におけるトコフェロール量および抗酸化活性の変動, *日本食品科学工学会誌* 44: 144-148
- 小嶋道之, 山下慎司, 西繁典, 齋藤優介, 前田龍一郎. 2006. 小豆ポリフェノールの生体抗酸化活性と肝臓保護作用. *日本食品科学工学会誌* 53: 386-392
- 村田吉平, 成河智明, 千葉一美, 佐藤久泰, 足立大山, 松川勲. 1985. 小豆新品種「エリモシヨウズ」の育成について. 北海道立農業試験場集報 53: 103-113
- Martin LP, Hagerman AE, Butler LG. 1980. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and mung beans. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 28: 459-461
- Martin-Tanguy J, Guillaume J, Kossa A. 1977. Condensed tannins in horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28: 757-765
- 野村信史, 中村茂樹, 土屋武彦, 千葉一美, 南忠, 飯田修三, 佐々木絢一. 1991. 北海道における豆類の品種編集委員会編, 北海道における豆類の品種(増補版), pp159-206, 日本豆類基金協会, 東京
- 齋藤優介, 西繁典, 小疇浩, 弘中和憲, 小嶋道之. 2007. 豆類ポリフェノールの抗酸化活性ならびに α -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性. *日本食品科学工学会誌* 54: 563-567
- 佐藤久泰, 松川勲, 成河智明, 後木利三. 1975. 小豆新品種「アカネダイナゴン」の育成について. 北海道立農業試験場集報 33: 47-57
- 白井滋久, 村田吉平, 島田尚典, 足立大山, 原正紀, 千葉一美, 成河智明. 1990. 小豆新品種「カムイダイナゴン」の育成について. 北海道立農業試験場集報 60: 73-85
- Takahata Y, Ohnishi-Kameyama M, Furuta S, Takahashi M, Suda I. 2001. Highly polymerized procyanidins in brown soybean seed coat with a high radical-scavenging activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49: 5843-5847
- Tsuda T, Ohshima K, Kawakishi S, Osawa T. 1994. Antioxidative Pigments Isolated from the Seed of *Phaseolus vulgaris* L.. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42: 248-251
- Yoshida K, Sato Y, Okuno R, Kameda K, Isobe M, Kondo T. 1996. Structural analysis and measurement of anthocyanins from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseolus*, and *Glycine* legumes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60: 589-593

Abstract

We examined the correlation between polyphenol content and antioxidant activity of about seed coat-colored different 13 varieties Adzuki beans. Two hypothetical methods are proposed as the method of appraising the antioxidant activity of Adzuki beans. (1) Except bicolor Adzuki beans, polyphenol is included much so that the seed coat color is dark, in other words, the L value is small. (2) As polyphenol content is large, antioxidant activity are high. Polyphenol is two successive extracts were prepared from Adzuki beans as follows: the total that extracts with 50°C water for 5 hours from seed, and subsequent extracts with 100°C water for 1 hour from seed coat of treated seeds. This evaluation method can apply to both mono-color and bicolor Adzuki beans.

[Key words]

Adzuki beans, polyphenol, antioxidant activity, seed coat
color, varieties