

カボチャエキスの調製と抗酸化性

清水 健志, 青木 央, 大坪 雅史, 宮崎 俊一

Preparation and Antioxidative Activity of Pumpkin Extract

Takeshi Shimizu, Hiroshi Aoki,
Masashi Ootsubo and Syun-ichi Miyazaki

要 旨

道南森町で収穫されたカボチャ「みやこ」の新規加工用途の開発を目的に、酵素を利用したエキスの調製と抗酸化性について検討した。使用した酵素中、カボチャの可溶化とエキスのBrixを高めたものは、セルラーゼオノズカRSであった。さらに、セルラーゼオノズカRSで調製したエキスは、リノール酸モデル系による抗酸化活性とDPPHラジカル消去活性について測定し、それぞれの活性の増加が認められた。また、エキスに含まれる β -カロテン量をHPLCで分析した結果、未処理エキスよりセルラーゼオノズカRS処理エキスに多く含まれていることが確認された。さらに、セルラーゼオノズカRS処理エキスには、 β -カロテン含有量以上の抗酸化活性およびラジカル消去活性が認められたことから、 β -カロテン以外に両活性を有する物質が存在していることが示唆された。

1. はじめに

活性酸素やフリーラジカルは、種々のストレスなどにより誘発され、生体構成分子に酸化的障害を引き起こすため、ガン、脳卒中、心疾患などの生活習慣病や老化と深く関わっていることが指摘されている^{1), 2)}。近年では、活性酸素やフリーラジカルの発生抑制や消去する物質を多く含んでいる食品を摂取することにより、これら疾病を予防することに期待が集まっている。特に、緑黄色野菜の摂取が生活習慣病予防に効果的であるといわれ、緑黄色野菜には活性酸素、フリーラジカルを補足、消去する物質が多く含まれていることが証明されており、カロテンまたはカロテノイドの抗酸化性が注目されている²⁾⁻⁴⁾。

緑黄色野菜であるカボチャは、北海道を代表する農産物のひとつであり、全国収穫量の約45%を占めている。道南地域では森町が主要産地であり、全国市町村中で第2位の収穫量を誇っている。

我々は、前報⁵⁾で地域農産資源である森町産のカボチャを用い、新たな加工用途の開発を目的に

カボチャジュースの開発を行なったが、可溶化率の低さが課題として残っていた。本研究では、さらなる可溶化率の向上を目的に、様々な市販酵素を用いたエキス化の検討を行なった。また、エキス化により β -カロテンなどの機能性物質が溶出されることも予想されるため、抗酸化作用について抗酸化活性とラジカル消去活性を測定するとともに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による β -カロテンの分析を行った。

2. 実験方法

2.1 試料

供試試料は、1999年に北海道南茅部郡森町で収穫された品種「みやこ」を用いた。カボチャは、洗浄、カット、ワタおよび種を除去、剥皮した後、加圧加熱機 (平山製作所製, LM-36A) を用い110°Cで15分間加熱後、-20°Cで凍結保存した。試験には、凍結乾燥したものを粉碎して使用した。

2.2 成分分析

凍結乾燥試料を使用し、水分は常圧加熱乾燥法(105°C)、脂質はエーテル抽出法、灰分は加熱灰化法(550°C)、タンパク質はケルダール自動分析装置(Tecator社製, Kjeltac 2300 Analyzer)で分析を行なった。炭水化物は差し引き法により求めた。

食物繊維の分析は、サウスゲートの変法⁶⁾に従い、水溶性非セルロース多糖(SDF)、水不溶性非セルロース多糖(IDF)、セルロース(CEL)、リグニン(LIG)に分別定量した。また、それぞれの多糖画分の構成単糖は、Chaplinら⁷⁾の方法に準じ、試料をトリメチルシリル化した後、ガスクロマトグラフ(GC)により以下の条件で分析を行なった。装置(Hewlett Packard社製, 5890A)、使用カラム:DB-1(J&W社製, 内径:0.25mm, 長さ:30m, 膜厚:0.25 μ m)、注入温度:140°C、検出器温度:260°C、カラム温度:140°C(2min)から240°C(3min)、昇温速度:4°C/min、検出器:FID。ピークの同定は、標準品を用いて溶出時間より行った。

2.3 カボチャエキスの調製

凍結乾燥試料に対し、8.5倍量蒸留水を加え、105°Cで10分間加圧加熱し、放冷後、試料の0.05%の酵素を含む0.5倍量の水溶液を添加し、50°Cで24時間反応させた。反応終了後、90°Cで30分間加熱して酵素を失活させた後、遠心分離(10000rpm, 10min)を行い、上清をエキスとした。

2.4 エキス調製用酵素の検討

α -アミラーゼ(SIGMA社)、グルコアミラーゼ(生化学工業(株))、ヘミセルラーゼ(SIGMA社)、セルラーゼ(和光純薬工業(株))、セルラーゼオノズカRS(以下、オノズカRS、ヤクルト薬品工業(株))を用いて試料の可溶性について検討を行なった。また、酵素の代わりに蒸留水のみ添加したもの(未処理区)を対照として調製した。各酵素で調製したエキスのBrixは、示差屈折計(株)アタゴ製, DBX-55)で測定した。エキスを調製する際に行なった遠心分離での沈殿は、凍結乾燥後、重量を測定した。可溶化率は、以下の式により算出した。

$$\text{可溶化率}(\%) = \{1 - (\text{酵素処理区の乾燥重量} / \text{未処理区の乾燥重量})\} \times 100$$

2.5 リノール酸モデル系による抗酸化活性の測定

2.5.1 過酸化反応溶液の調製

白坂ら⁸⁾の方法に準じて行った。即ち、1.3%リノール酸を含むエタノール(99.5%)溶液1mlと0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)0.5mlと蒸留水250 μ lに試料を250 μ l添加し、最後に0.5M 2,2-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride(AAPH)水溶液10 μ lを10ml容ねじ口試験管に取り、よく攪拌した後、40°Cの恒温器内に遮光状態で静置した。20時間経過したものを過酸化反応溶液とし、抗酸化活性を測定した。また、対照区として蒸留水のみ添加したのも同時に調製した。

2.5.2 抗酸化活性の測定

過酸化反応により生成した過酸化物をロタン鉄法⁹⁾により500nmの吸光度で測定した。即ち、反応溶液40 μ lに75%エタノール1.88ml, 30%チオシアン酸アンモニウム水溶液40 μ l, 20mM塩化第一鉄3.5%塩酸溶液40 μ lを加え、よく攪拌した後、正確に3分後の500nmにおける吸光度を測定した。抗酸化率を以下の式によって算出し、これを抗酸化活性とした。

$$\text{抗酸化率}(\%) = \{1 - (\text{試料添加区の吸光度} / \text{対照区の吸光度})\} \times 100$$

2.6 DPPHラジカル消去活性の測定

長島ら¹⁰⁾の方法に準じ、次のように行った。0.2M酢酸緩衝液(pH5.5)1mlと0.5mM 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)を含むエタノール溶液1mlとエタノールmlと蒸留水750 μ lに、試料を250 μ l加え反応液とした。反応液調整後、室温で静置し、遠心分離(5000rpm, 1min)後、正確に30分後の517nmにおける吸光度を測定した。対照区として、試料の代わりに蒸留水のみ添加したものを測定した。DPPHラジカル消去率を以下の式によって算出し、これをDPPHラジカル消去活性とした。

$$\text{DPPHラジカル消去率}(\%) = \{1 - (\text{試料添加区の吸光度} / \text{対照区の吸光度})\} \times 100$$

2.7 HPLCによるエキス中の β -カロテンの分析

β -カロテンの分析は、東尾¹¹⁾の方法に準じてHPLCで行った。試料10mlに炭酸マグネシウムを1g、テトラヒドロフラン80mlを加えてホモジェナイズし、ガラス濾過器で濾過後、抽出液を得た。100mlに定溶した後、分液漏斗に採取、等量の石油エーテルを添加してエーテル層へ転溶させ、濃縮乾固を行い、HPLC溶離液のB液に溶解させたものを調製液とした。カラムは関東化学(株)製 PurospherRP18 (内径:4.6mm, 長さ:250mm, 粒子径5 μ m)を用い、直線グラジエントで分析した。溶離液はA液(アセトニトリル:メタノール:ジクロロメタン:ヘキサン=85:10:2.5:2.5)とB液(アセトニトリル:メタノール:ジクロロメタン:ヘキサン=45:10:22.5:22.5)を用いた。グラジエント条件は、開始時から10分までA液100%とし、直線グラジエントで40分後にB液を100%とした。その後、10分間B液100%で流した。カラム温度は室温、流速は0.7ml/min, 測定波長470nmで検出した。ピークの同定は、標準品の β -カロテン(SIGMA社)を用いて溶出時間より行った。

2.8 RSエキスの各画分の抗酸化試験

HPLC分析の試料調製において、2層分配されたRSエキスの有機溶媒層と水層について、抗酸化活性およびDPPHラジカル消去活性の測定をそれぞれ行った。また、対照としてRSエキスに含まれる β -カロテンと同濃度の溶液を調整して測定を行った。

3. 結 果

3.1 成分分析

成分分析を行った結果、水分は7.3%、タンパク質は6.9%、脂質は4.6%、灰分は5.5%、炭水化物は75.5%であった。炭水化物中の食物繊維について分析を行った結果、SDF, IDF, CEL, LIGの割合は、それぞれ3.7%、2.0%、6.6%、6.6%であった。凍結乾燥による水分減少量から生試料に換算すると、それぞれの組成は87.2%、1.0%、0.6%、0.8%、10.4%、0.5%、0.3%、0.9%、0.9%であった(表1)。GC分析による食物繊維の各多糖画分の構成単糖は、表2に示した。

表1 「みやこ」の成分分析

成分	凍結乾燥(%)	換算値(%)
水分	7.3	87.2
タンパク質	6.9	1.0
脂質	4.6	0.6
灰分	5.5	0.8
炭水化物	75.7	10.4
SDF	3.7	0.5
IDF	2.0	0.3
CEL	6.6	0.9
LIG	6.6	0.9

表2 多糖画分の構成単糖

多糖画分	中性糖(wt %)							酸性糖(wt %)
	Ara	Xyl	Rha	Fuc	Man	Gal	Glc	
SDF	8.1	3.6	3.9	ND	1.3	10.2	1.7	71.1
IDF	11.5	12.5	6.5	1.0	1.8	29.3	3.9	33.5
CEL	4.4	16.8	ND	ND	6.7	8.3	42.9	20.9

3.2 酵素の検討

試料を酵素処理し、24時間後のエキスのBrixと試料の可溶化率を表3に示した。未処理区と比較し、各酵素処理区はいずれもBrixおよび可溶化率において高い値を示した。

表3 酵素処理による可溶化試

処理条件	Brix	可溶化率(%)
未処理	8.2	0
α -アミラーゼ	8.8	29.2
グルコアミラーゼ	8.4	8.4
セルラーゼ	8.4	19.4
ヘミセルラーゼ	8.6	19.3
オノズカRS	9.2	41.5

3.3 RSエキスのHPLC分析と抗酸化性

リノール酸を基質とした抗酸化活性を測定した結果、未処理エキスの抗酸化率は33.8%、RSエキスでは40.7%であった。また、DPPHラジカル消去活性を測定した結果は、それぞれ25.1%、30.8%であり、酵素処理によりいずれの活性も高くなっていることが確認された(図1)。

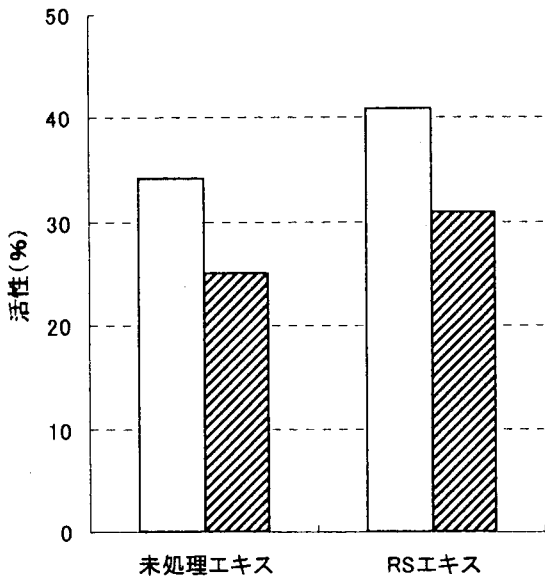


図1 エキスの抗酸化活性試験

□, リノール酸モデル系による抗酸化活性
 ▨, DPPH ラジカル消去活性

活性を示した (図3)。また、溶媒層の抗酸化活性およびDPPH ラジカル消去活性は、図4に示すように濃度に依存していることが示された。

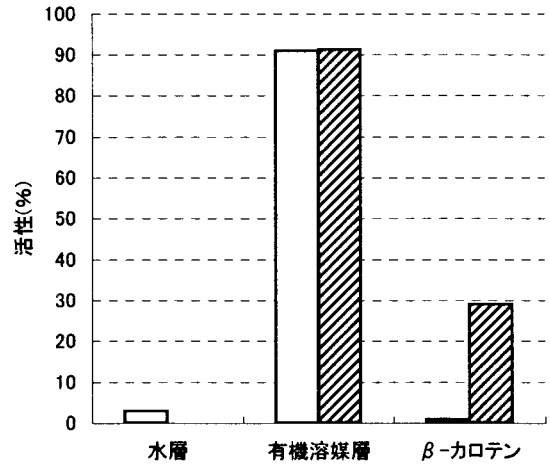


図3 RSエキスの水層と有機溶媒層の抗酸化活性試験

□, リノール酸モデル系による抗酸化活性
 ▨, DPPH ラジカル消去活性

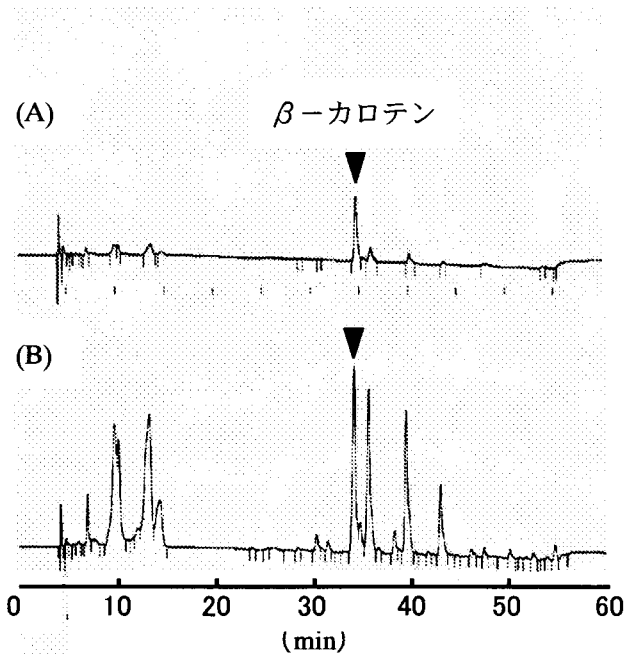


図2 HPLCによるエキスのクロマトグラム
 (A), 未処理エキス : (B), RSエキス
 測定波長, 470nm

HPLC分析の結果、未処理エキスで230ng/ml に対し、RSエキスでは730ng/mlであった (図2)。

RSエキスを有機溶媒層と水層の抗酸化活性およびラジカル消去活性を測定した結果、水層では活性がほとんど見られなかったのに対し、溶媒層で非常に強い活性が認められた。また、溶媒層とβ-カロテン溶液の比較では、溶媒層の方が高い

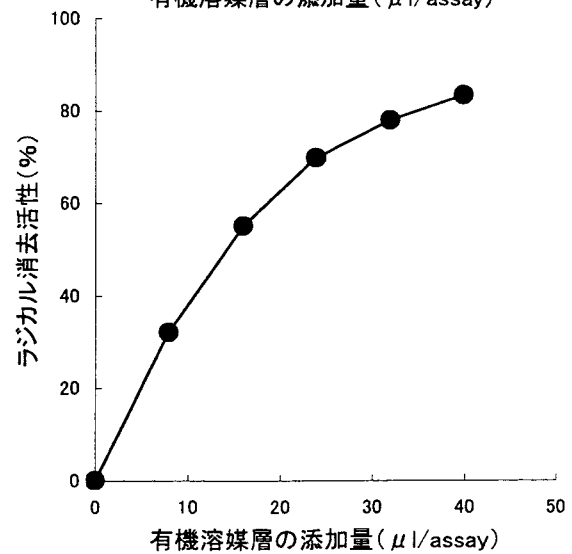
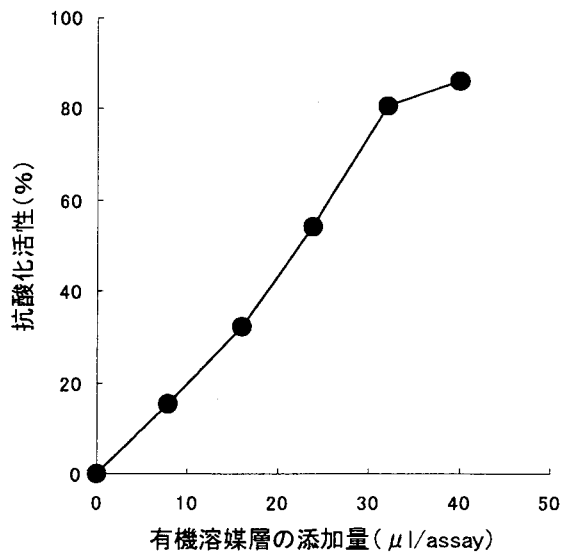


図4 有機溶媒層のリノール酸モデルによる抗酸化活性およびDPPH ラジカル消去活性

4. 考 察

4.1 カボチャ「みやこ」の成分

各成分は、一般的な西洋カボチャの組成と同様に、炭水化物の割合が最も高かった。炭水化物を分解することが、カボチャエキス調製に重要である可溶化率の向上に貢献すると考えられた。そこで、エキス調製に有効な酵素を選択するため、食物繊維やそれらの構成単糖についても詳細な分析を行なった。その結果、食物繊維中には水溶性多糖 (SDF) に比べ、不溶性多糖 (IDF, CEL) の割合が高いことが確認された。GCによる構成単糖の分析から、これらはヘミセルロースやセルロースが主成分と考えられ、エキス調整では不溶な残渣成分であるため、分解する酵素を選択することがカボチャの可溶化に有効と考えられる。

4.2 酵素による可溶化

各酵素処理による可溶化率および Brix を比較し、最も高い値を示したものは、オノヅカ RS 処理区であった。オノヅカ RS は、セルラーゼ活性の他にヘミセルラーゼ活性やペクチナーゼ活性なども有しているため、植物細胞壁を分解しプロトプラストなどの調製に用いられており、カボチャの場合も、細胞壁が分解されて可溶化が進んだものと思われた。また、 α -アミラーゼによるデンプン分解に比べ、高い可溶化率と Brix 値を示したことは、カボチャエキスの調製には細胞壁成分の分解が有効であると考えられた。

4.3 RS エキスの HPLC 分析と抗酸化性

抗酸化性を測定する方法にはいくつかの系が知られているが、それぞれ原理が異なっている。リノール酸モデル系は、抗酸化物質の添加によりリノール酸の酸化を抑制する系であり、簡便であることから抗酸化活性の測定に多く用いられている。また、DPPH を用いた比色法によるラジカル消去活性の評価も、簡易な手法として汎用されており本試験でも用いた。

リノール酸モデル系による測定の結果、RS エキスに活性増加が認められた。また、ラジカル消去活性でも増加が認められたことから、酵素処理による可溶化に伴いカボチャ組織から抗酸化性を有する物質の溶出量が増加されることが示唆され、また、抗酸化活性よりラジカル消去活性の強い物

質であることが考えられる。

HPLC 分析の結果から、オノヅカ RS 処理することでエキス中の β -カロテン量が約 3.2 倍に増加していることが認められ、他のピークの増加も確認されることから、酵素処理による可溶化に伴う細胞内物質の遊離が考えられた。さらに、有機層の抗酸化性試験において、含有されている β -カロテン量を上回る活性が濃度依存的に示されたことから、 β -カロテン以外にも抗酸化性を有する物質の存在が示唆される。

ま と め

カボチャエキスの調製に重要となる可溶化には、オノヅカ RS が最も有効であり、可溶化に伴い β -カロテンが抽出されていることが確認された。また、リノール酸モデル系による抗酸化活性および DPPH ラジカル消去活性を測定した結果、各活性の増加が認められた。さらに、エキス中には抗酸化性に寄与する β -カロテン以外の物質の存在も示唆されたため、これらの詳細な分析が今後の課題である。

参 考 文 献

- 1) 越智宏倫：光琳テクノブックス17老化制御食品の開発 (光琳), (1995), P25-84
- 2) 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真：抗酸化物質フリーラジカルと生態防御 (学会出版センター), (1996), P3-69
- 3) 津志田藤二郎, 安井明美, 東尾久雄, 関谷敬三, 須田郁夫：地域農産物の品質・機能性成分総覧 (サイエンスフォーラム), (2000), P186-188
- 4) 荒井綜一：機能性食品の研究 (学会出版センター), (1996), P159-168
- 5) 青木央, 大坪雅史, 宮崎俊一：北海道立工業技術センター研究報告, 2号, (1992), P15-21
- 6) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000 (金原出版), (2000), P151-238
- 7) M. F. Chaplin and J. F. Kennedy: Carbohydrate Analysis (IRL press), (1986), P1-36
- 8) 白坂憲章, 暮松亜紀, 金銅信之, 金銅俊二, 飯田雅弘, 長谷川豪宏, 村上哲男, 吉栖肇:

- 日食工誌, 46巻, 12号 (1999), P792-798
- 9) 川岸舜朗: 生物化学実験法38食品中の生体機能調節物質研究法 (学会出版センター), (1996), P14
- 10) 長島万弓, 福田靖子, 井藤龍平: 日食工誌, 46巻, 6号(1999), P382-388
- 11) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一: 食品機能研究 (光琳), (2000), P323-327