

セサムフラワの微生物処理が抗酸化機能性に及ぼす影響

石山 絹子・森下 真希*・小泉 幸道**・福田 靖子

Radical Scavenging Activity of Sesame Flour treated with *Aspergillus niger*

Kinuko ISHIYAMA, Maki MORISHITA, Yukimichi KOIZUMI and Yasuko FUKUDA

緒 言

セサムフラワはゴマサラダ油の製造時に生じる脱脂粕で、これまで飼料等にしか利用されなかったが、生理活性成分であるリグナン類やその配糖体が含まれていること、また、世界的な人口の増加による食糧需要の増加と工業化・都市化・環境破壊による供給の減少に伴う食糧不足の問題の観点からも未利用資源であるセサムフラワは食品としての利用開発が期待されている。

リグナン類はゴマ種子中に0.8%ほど含まれ、血中コレステロール降下、アレルギー抑制¹⁾、がん細胞増殖抑制²⁾、肝機能の増強³⁾など様々な作用があることが明らかにされている。特にリグナン配糖体については親水性であるためゴマ油中にはほとんど移行せず、大部分が脱脂粕中に存在することから^{4), 5)}、その機能性を活かした利用開発が期待されている。リグナン配糖体のひとつ、セサミノール配糖体は、糖の存在により抗酸化性を示す官能基であるフェノール性水酸基は食品中では保護されているためにそれ自身では抗酸化性を示さないが、食品成分として摂取した後、とくに腸内細菌のもつ β -グルコシダーゼの作用によって加水分解を受け、アグリコンが腸管から吸収され、生体膜などの酸化的傷害を防御するというメカニズムが明らかにされている^{6), 7)}。一方大豆は、良質なたんぱく質を含む栄養価の高い食品として古くから我々の食生活に浸透してきた。大豆の特徴的な成分のひとつが大豆イソフラボンである。大豆中には概ね0.2%~0.4%のイソフラボンが含まれ、代表的なものにダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインなどがある。これらは化学構造が女性ホルモンのエストロゲンに類似しており、骨粗鬆症や更年期障害を予防する働きがあることが報告されている。さらに血中コレステロール低下作用、脂肪低下作用があることも報告されている⁸⁾。イソフラボンは配糖体としても大豆中に含まれ、ゴマのリグナン配糖体と同様 β -グルコシダーゼにより分解され抗酸化性を発揮する。江崎らの研究では豆味噌製造時に大豆中のイソフラボン配糖体が微生物の作用で分解され、生成したイソフラボンがさらに水酸化されオルトジヒドロキシイソフラボンに変換した結果、豆味噌の抗酸化力が増大したことを報告している⁹⁾。これまでに β -グルコシダーゼを利用したゴマ脱脂粕からのリグナン類の抽出法は確立されているが、より自然にリグナン類、イソフラボン類を得るために、微生物を用いて配糖体を分解することを考えた⁷⁾。そこで、本研究では、特にゴマ脱脂粕の有用成分である抗酸化物質に着目し、高機能食材である大豆とセサ

*医療法人社団正徳会浜名クリニック、**東京農業大学応用生物科学醸造科学科

ムフラワの複合食品に微生物処理することにより抗酸化能が増加するか否かを調べた。微生物には日本の発酵食品に利用される代表的な麹菌3種を用い、抗酸化性を高めるのに有用な菌のスクリーニングを行い、また、抗酸化機能性に関わる成分の同定を行った。

実験方法

試薬;1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH) (和光純薬), 96%セサミノール (本研究室で精製したもの), セサミン (本研究室で精製したもの), セサモリン (本研究室で精製したもの), ダイゼイン (フナコシ (株)), ゲニステイン (フナコシ (株)) を用い、特に記述しないものについては和光純薬試薬特級を用いた。

試料;菌種を検討するためにセサミムラワ (かどや製油 (株) 製の食用セサムフラワ), 大豆 (タカノフーズ (株) の極小粒大豆) +セサムフラワ (大豆:ゴマ粕=5:2) の2試料を使用した。しかし食品の2次機能の観点より馴染みの深い大豆を混合した発酵食品である大豆+セサムフラワ試料を主に測定に用いた。また、微生物処理には *Aspergillus niger* NRIC 1222, *Asp. awamori* NRIC 1200, *Asp. oryzae* NRIC 1224の3種を使用した。

試料の調製

麴の作成法; (セサムフラワ試料) セサムフラワ20g (水分9%) を水分含量が50%になるに調製し、よく混合した。オートクレーブで10分殺菌後、放冷し、供試カビを3~5白金耳を接種して、30°Cの恒温器で1週間培養した。(大豆+セサムフラワ試料) 極小粒大豆を一晩浸漬後、小切りしてオートクレーブで1.5気圧、128°Cで25分殺菌した。これとは別に、セサムフラワ20g を水分含量が50%になるように調製したものを10分殺菌し、混合したものに各種カビを接種し、30°Cの恒温器で1週間培養した。

抽出方法; 試料約10gを、乳鉢でよくすりつぶし、200ml 容三角フラスコに移し n-ヘキサン 50ml を入れ、スターラーで1時間攪拌し、吸引濾過を行い、これを3回繰り返した。抽出残渣を酢酸エチル、メタノール、蒸留水で順次同様の方法で抽出を行った。抽出液をそれぞれナス型フラスコに入れ、ロータリーエバポレーター (東京理化工業 (株) EYELA N-1000型) で溶媒を留去、濃縮し、凍結乾燥機 (東京理化工業 (株) EYELA FREEZE DRYER FD-5N) で乾固したものを抽出試料とし、10mg/ml の濃度に各溶媒で調製したものを各抗酸化能測定に供した。

抗酸化性の測定

ラジカル捕捉活性の測定; 96穴プレートに99.5%エタノール150 μ l を入れ、そこに試料液を50 μ l 加え、プレートミキサーにて混和後0.5mM の1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH ラジカル) エタノール溶液を加えて混和し、20分間室温に放置し517nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (MODEL-550, BIO-RAD 製) で測定し、ラジカル捕捉活性を求めた。酢酸エチル抽出物、n-ヘキサン抽出物にはごりを生じ測定できなかった。そのため n-ヘキサンについては測定を行わず、酢酸エチル抽出物については試料を乾固した後メタノールに溶解して測定を行った。

リグナン、イソフラボンの定量

HPLC 分析により定量を行った。分析機器、分析条件については以下に示すとおりである。
 分析機器；高速液体クロマトグラフィー解析部 (Shimadzu LC 6A 型), 送液部：Shimadzu LIQUID CHROMATOGRAPH LC 6AD, 検出部：Shimadzu UV SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR SPD 6A, データ処理部：Shimadzu CHROMATOPAC C R6A
 分析条件①イソフラボン類の検出；カラム：DEVELO SIL ODS-7 (野村化学製) 4.6φ × 250mm, カラム温度：室温, 移動相：メタノール：蒸留水=6：4, 流速：0.8ml/min, 検出波長：UV 262nm, 注入量：10μl, ②リグナン類の検出；カラム：DEVELO SIL ODS-UG-5 (野村化学製) 4.6φ × 250mm, カラム温度：室温, 移動相：メタノール：蒸留水=7：3, 流速：0.8ml/min, 検出波長：UV 290nm, 注入量：10μl

実験結果

抗酸化性の測定

Fig.1は麹菌の種類別および抽出溶媒別の DPPH ラジカル捕捉能の測定結果を表している。セサムフラワ試料では酢酸エチル抽出物 > メタノール抽出物 > 水抽出物の順に高く、菌種間の差はほとんどみられなかった。大豆+セサムフラワ試料においてはメタノール抽出物, 酢酸エチル抽出物において微生物処理前後で消去能に大きな差がみられ, 特にこの両抽出物における *Asp. niger* で処理した試料の捕捉能はどちらも高かった。

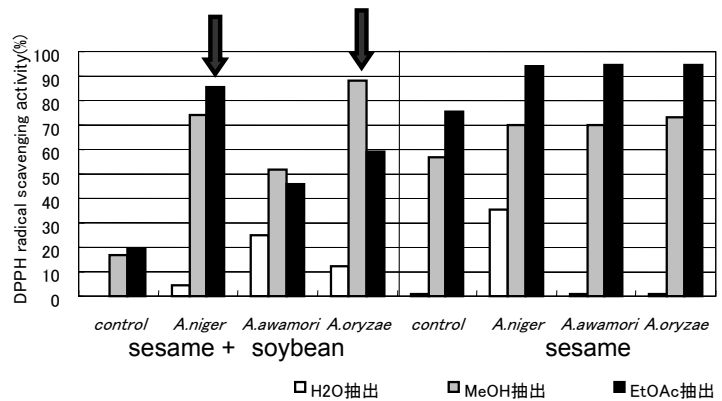
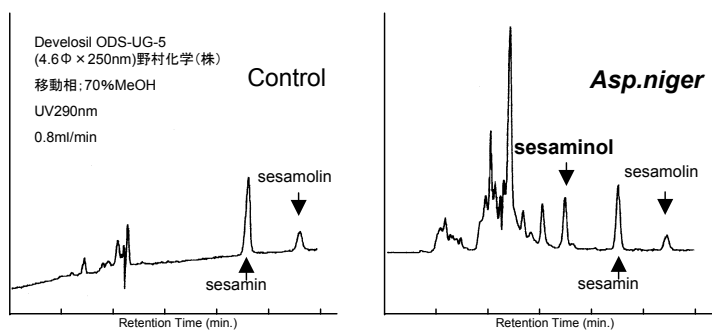


Fig.1 DPPH radical scavenging activity

HPLC によるリグナン・イソフラボン類の分析

Fig.2はセサムフラワ試料で高い DPPH ラジカル捕捉能を示した *Asp. niger* で微生物処理を行ったもので行わなかったものの酢酸エチル抽出物の HPLC 分析のクロマトグラムである。セサミン, セサモリンは微生物処理の前後ピークの大さにほぼ変化はないが, 微生物処理を行ったもの

Fig.2 HPLC chromatograms of EtOAc. ext. from sesame flour treated by *Asp. niger*

はセサミノールのピークが検出されていることがわかる。Fig.3は大豆+ゴマ試料に *Asp. niger* で微生物処理を行ったもので行わなかったものの酢酸エチル抽出物の HPLC パターンを比較したものである。クロマトグラムが示すように微生物処理後イソフラボン類 (ダイゼイン, ゲニステイン)

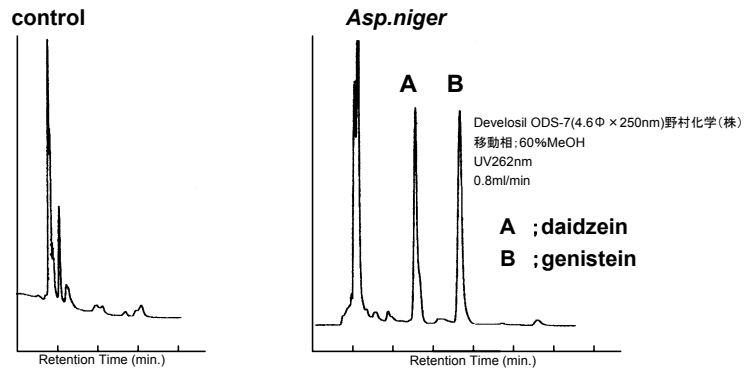


Fig.3 HPLC Chromatograms of EtOAc extract of soybean plus sesame flour

のピークが著しく増大していることがわかる。最も抗酸化能が高かった大豆+セサムフラワを *A. niger* で処理した試料の酢酸エチル抽出物に含有する抗酸化性物質であるリグナンおよびイソフラボン類の定量を予備的に行ったところ、セサムフラワ由来のセサミノールは0.56%、大豆由来のイソフラボン類であるダイゼインは0.21%、ゲニステインは0.18%であった。

考 察

DPPH ラジカル捕捉能はセサムフラワ試料および大豆+セサムフラワ試料ともに酢酸エチル抽出物、メタノール抽出物>水抽出物であり、低極性溶媒の抽出物で抗酸化性が高い傾向が見られた。これらは麹菌由来の β -グルコシダーゼなどによりリグナン・イソフラボン配糖体が分解され親水性の糖との結合が切れ、低極性溶媒に可溶で、抗酸化作用を持つリグナンやイソフラボンなどのアグリコンが生成されたためだと考えられる。特に *Asp. niger* で処理した大豆+セサムフラワ試料の酢酸エチル抽出物、メタノール抽出物がどちらも共に捕捉能が高い結果であった。この試料中のセサムフラワの割合が29%にもかかわらずセサムフラワと同等の抗酸化力を示したものもあり、それを補うだけの抗酸化物質が大豆中に含まれていることが示唆された。

ゴマに含まれるリグナン類のうち最も多く含まれているのはセサミン、セサモリンであるが、水酸基を持ったリグナンであるセサミノールは強い抗酸化性を持っている。Fig.2に示すように、セサムフラワ試料を *Asp. niger* で微生物処理を行ったものでは、セサミノールのピークが検出されたことから、搾油時に抽出されずセサムフラワ中に残存した極性成分であったセサミノール配糖体が Fig.4に示すように微生物由来の β -グルコシダーゼによりアグリコンに分解され、抗酸化能が増大したと考えられる。Fig.3の大豆+

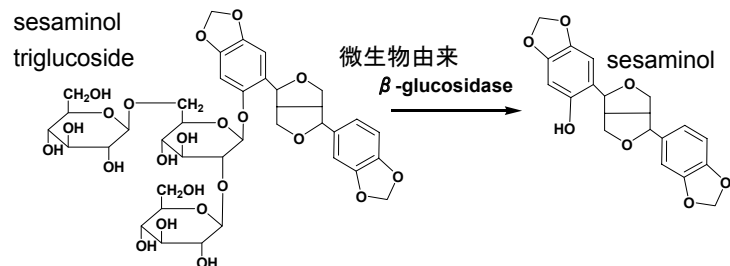


Fig.4 Production of sesaminol from sesaminol triglucoside by microbial β -glucosidase

ゴマ試料に *Asp. niger* で微生物処理を行ったもの
と行わなかったものの酢酸エチル抽出物の HPLC
クロマトグラムが示すように微生物処理後イソフ
ラボン類のピークが著
しく増大した。この結果

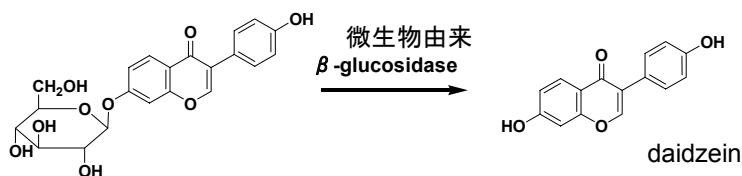


Fig.5 Production of daidzein from isoflavone glycoside by microbial β -glucosidase

は Fig.5が示すように微生物由来の β -グルコシダーゼの作用によって配糖体から分解されたと考えられるイソフラボン類はエストロゲン様作用により骨粗鬆症などに対する予防効果などが知られており、抗酸化作用に加え、生理活性作用も期待できる。このように *A.niger* によって微生物処理を行ったものは、その β -グルコシダーゼの作用によりイソフラボン類およびセサミノールが遊離することにより抗酸化機能性において優れた結果を示したため、セサムフラワの微生物処理に適していると考えられたが、しかしながら試料自体の色が黒く嗜好的に好まれないと思われた。よって今後は嗜好的機能を含め、より機能性を高めるための条件の検討が必要である。

要 約

- ・大豆+セサムフラワ試料では微生物処理を行うことによって DPPH ラジカル捕捉能が増大した。特に低極性溶媒抽出画分での抗酸化能の増大が著しかった。
- ・*Asp. niger* で処理した大豆+セサムフラワ試料は、特に酢酸エチル抽出画分で DPPH ラジカル捕捉能が増大し、セサムフラワ試料の HPLC 分析の結果、セサミノールが検出された。このことよりセサムフラワ中のセサミノール配糖体が微生物由来の β -グルコシダーゼの作用によって分解しセサミノールとして遊離し、抗酸化能が増大したことが考えられた。
- ・HPLC 分析の結果 *Asp. niger* で処理を行った大豆+セサムフラワ酢酸エチル抽出物はダイゼイン、ゲニステインのイソフラボン類が検出された。これについてもそれぞれの配糖体が分解し遊離したと考えられた。

なお、本研究内容は、(社)日本家政学会中部支部第50回記念大会(2004年9月17日於;岐阜女子大学)で発表した。

文 献

- 1) 並木満夫, 福田靖子:健康食・からだになぜいいのゴマ, p46,NHK 出版 (2000)
- 2) Hirose N.,Sugano M.,Doi F., Ueki T., Akazawa K., Chijima K., Akimoto K.,Shimizu S.,Yamada H.:Suppressive Effect of sesamin against 7,12-dimethylbenz (a) -anthracene induced rat mammary carcinogenesis, Anticancer Res. ,12 (4) ,1259-1265 (1992)
- 3) 秋元健吾, 清水昌:ゴマの微量成分とアルコール代謝セサミンの生理活性を中心として, 日本醸造協会誌, 89 (10), 787-792 (1994)
- 4) Katsuzaki H.,Kawakishi S.,Osawa T.:Sesaminol glucosides in sesame seeds,Phytochemistry ,35

- (3) ,773-776 (1994)
- 5) Katsuzaki H.,Kawasumi M.,Kawakishi S.,Osawa T.:Structure of novel antioxidation lignan glucosides isolated from sesame seed,Biosci. Biotechnol. Biochem. ,56 (12) ,2087-2088 (1992)
 - 6) 大澤俊彦：ゴマ研究の新展開 ゴマ種子に含まれる配糖体の研究リグナンタイプ抗酸化成分の生体防御効果，食の科学，218,26-32 (1996)
 - 7) Fukuda Y.,Osawa T.,Namiki M.:Studies on antioxidative substances in sesame seed, Agric. Biol. Chem. ,49,301-306 (1985)
 - 8) 福井健介：大豆と健康 骨粗しょう症や更年期障害の予防・改善に役立つ大豆たん白質・イソフラボン，食の科学，289,8-15，(2002)
 - 9) 江崎秀男，渡部綾子，増田 均，大澤俊彦，川岸舜朗：豆味噌醸造中のオルトジヒドロキシイソフラボンの生成と変動，日食工誌，48，(3)，189-195 (2001)

Abstract

The aim of this research is to investigate the antioxidant activity of sesame flour and soybean treated with microorganisms.

The sterilized sesame flour and soybean mixture were cultivated with *Aspergillus niger* NRIC 1222, *Asp. awamori* NRIC 1200 and *Asp. oryzae* NRIC 1224 for one week at 30°C . After the cultivation, the mixtures were successively extracted with n-hexane, ethyl acetate, methanol and distilled water. The antioxidant activity was determined by DPPH radical scavenging method. The activities of EtOAc and MeOH extracts from the sesame and soybean mixture cultivated by *Asp. niger* were higher than those of the extracts by *Asp. Oryzae*. Sesaminol and isoflavones were detected in the cultivated sesame flour and soybean mixture. This result suggests that increased antioxidant activity of the cultivated mixture may result from their aglycons hydrolyzed by β -glucosidase in *Asp. niger*.

日本語訳

セサムフラワと大豆を複合化し，微生物処理による，新たな機能性の検討を行うことを目的とした。殺菌したセサミムラフおよび大豆試料に *Aspergillus niger* NRIC 1222, *Asp. awamori* NRIC 1200, *Asp. oryzae* NRIC 1224を接種し，30°C，1週間培養した。培養後，n-ヘキサン，酢酸エチル，メタノール，蒸留水で順次抽出し，濃縮したもののラジカル捕捉能をDPPHラジカル捕捉能により測定し，リグナン類，イソフラボン類を検出するためHPLC分析を行った。

DPPHラジカル捕捉能は *Asp. niger* および *Asp. oryzae* を接種した試料の酢酸エチルおよびメタノール抽出物で高かった。微生物処理した試料ではセサミノールおよびイソフラボン類が検出された。これらは麴菌由来の β -グルコシダーゼによりゴマ脱脂粕および大豆に含まれる配糖体が分解されアグリコンが生成され，それによりラジカル捕捉能が強まったと考えられた。