

黒緑豆 (*Vigna mungo*) 実生中の Antioxidant 成分の検索

竹内若子・杉浦由有子・高橋平八郎

The Antioxidative Component of Ethanol Extracts in Mung Bean (*Vigna mungo*) Seedlings

Wakako TAKEUCHI, Yuko SUGIURA and Heihachiro TAKAHASHI

緒 言

著者らはこれまで黒緑豆もやしを試料として植物内ポリフェノール生合成の初期段階であるモノフェノール (*p*-coumaric acid) よりジフェノール (caffeic acid) への水酸化反応について調べてきた。近年、食品成分としての種々のポリフェノール類のもつ抗酸化性が注目されてそれらに関する報告も多くみられるようになってきたが、これらポリフェノール類の antioxidant としての機能に関しては、相反する内容の報告もあり必ずしも明確ではない。そこで著者らは、黒緑豆実生中に存在するポリフェノール成分としてのカフェイン酸 (caffeic acid) をはじめ、カフェイン酸から誘導合成される主要なポリフェノール類の一種であるルチン (rutin) などの antioxidant としての有効性の検討を目的に実験を行った。

実験材料および方法

1) 実験材料および試薬

前報¹⁾に準じ処理した黒緑豆 (*Vigna mungo*) を3日間暗所で発芽生育させたのち、さらに2日間暗所に放置したもの (以下 dark と記す) と、3日間の発芽生育後、2日間光照射下で生育もの (以下 light と記す) および発芽後、直ちに濃度16ppm エチレンガスを充填したデシケーター内に移し、光照射下で生育させたもの (以下 ethylen-treated と記す) を用いた。

リノール酸は片山化学工業製を、チオバルビツール酸 (以下 TBA と記す) は Merck 社製を用い、その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

2) 黒緑豆実生 (dark, light および ethylen-treated) からのエタノールおよび水可溶成分の調製

上記各試料の5倍量の熱エタノール (95%) または蒸留水を加えて磨砕・抽出後、生じた沈澱を濾過して (濾紙 No.2, TOYO) 除去し、その濾液をそれぞれの試料原液とした。

3) 抗酸化性の測定

a. 酸化処理

上記2) で示した熱エタノール抽出および水抽出可溶成分の試料原液をもとに、各々エ

タノールまたは水でさらに5倍希釈し、各試料溶液とした。

各試料溶液4.0mlを0.2M、リン酸緩衝液 (pH7.0) 2.0ml, 蒸留水10.0ml, 2.6% (w/v) リノール酸エタノール溶液4.0mlと共にネジ口試料ビン ($\phi 4.0 \times 7.5$ cm) に入れ、混合したのちアルミ箔で覆って遮光し、40°Cのインキュベーター内に静置した。また、 Fe^{2+} (硫酸第一鉄) を終濃度0.025%加えた系でも同様に処理して酸化を行った。ただし、水抽出試料についてはリノール酸の不溶性化を防止するために蒸留水10.0mlの代わりに、蒸留水6.0mlとエタノール4.0mlとで10.0mlとした。

b. T B A 法

a. で処理した試料混合液より経時的に1.0mlをとり、Buegeらの方法²⁾に準じ、T B A 試薬 (0.375% TBA, 15% TCA, 0.25N-HCl) 2.0mlを加えて混合し、沸騰浴中で15分間加熱した。加熱後、室温まで氷冷水槽中で冷却し、3,000rpmで10分間遠心後の上清の535nmにおける吸光度を測定した。コントロールを対照に酸化に伴って増大する吸光度を追跡し、吸光度の増加抑制をもって抗酸化性とした。抗酸化性の測定法として、一般的にロダン鉄法およびT B A法が用いられているが、森口³⁾の報告よりこれら2法における結果はすべて一致をみていることから、今回はT B A法だけを試みた。

c. 総アスコルビン酸量の定量

各条件下で生育させた黒緑豆実生中のアスコルビン酸量は、既報⁴⁾に準じ、還元型と酸化型における差スペクトル法で定量した。

d. 総ポリフェノール含量の定量

既報⁵⁾に準じ、Zuker法により測定した。

結果および考察

1) エタノール抽出および水抽出可溶部の抗酸化性

黒緑豆実生のエタノール抽出可溶部の抗酸化性と水抽出可溶部の抗酸化性を比較した (Fig. 1-a and b)。いずれも抽出原液の5倍希釈液の添加により、コントロールに比べて dark, light 共に T B A 値の上昇が抑えられた。

2) Fe^{2+} 共存下でのリノール酸酸化に対する抗酸化性

酸化に対する影響をより明確にするために、 Fe^{2+} を加えた系で、同様にリノール酸酸化に対する抗酸化性をみた (Fig. 2, (a) (b) および Fig. 3, (a) (b))。 Fe^{2+} 無添加の系に比較して酸化の連鎖反応がより促進されることから T B A 値はいずれも試料添加直後より高く、その上昇は顕著であり、各試料における抗酸化性を短時間で追跡できた。また、エタノール抽出、水抽出いずれの試料においても light の方が dark に比べて抗酸化性の高いことが示された。このことは光照射に伴って黒緑豆実生中のポリフェノールオキシダーゼ等の酵素活性が増大し、それとともにアントシアニンなどのポリフェノール成分量が増大・蓄積することに起因するものとみなされた (Fig. 4)。

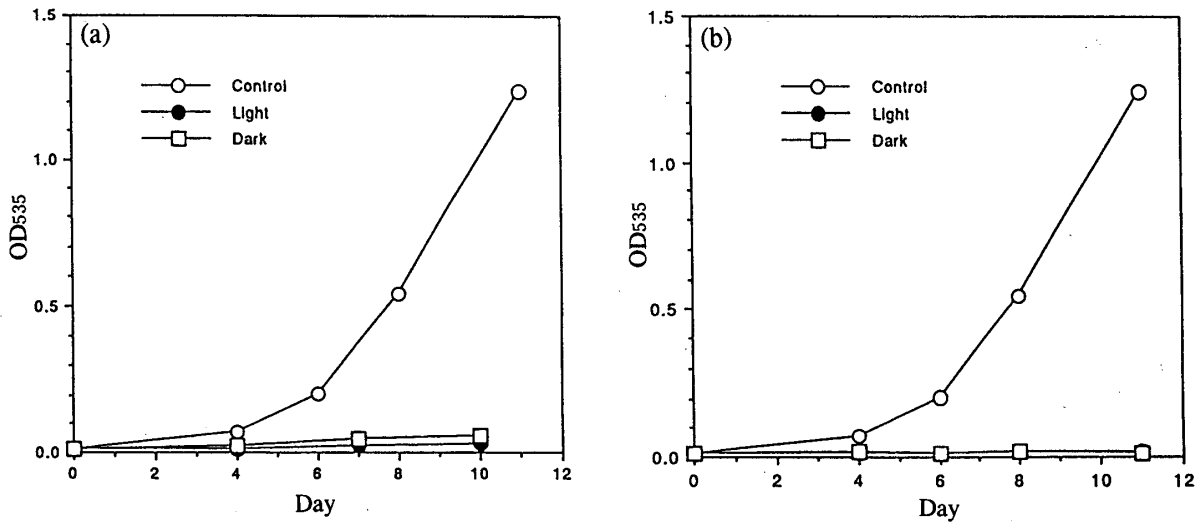


Fig. 1 Antioxidative activity of ethanol-soluble extracts and water-soluble extracts from mung bean seedlings
 a : ethanol-soluble extracts, b : water-soluble extracts
 ○, Control ; ●, Exposed to Light for 2 Days ; □, Kept in the Dark

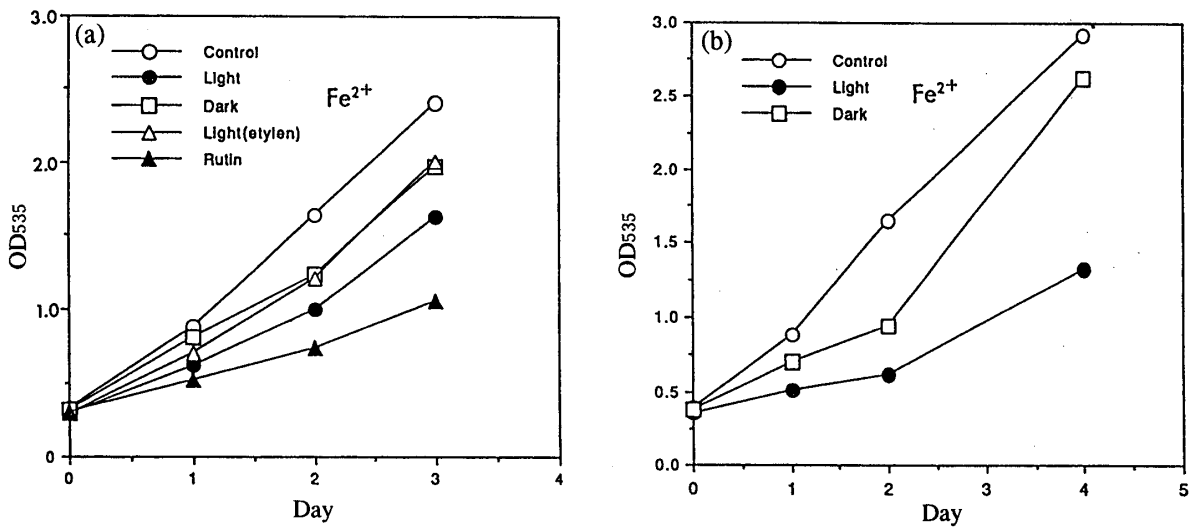


Fig. 2 Antioxidative activity of ethanol-soluble extracts and water-soluble extracts from mung bean seedlings in the presence of FeSO₄.
 (a) : ethanol-extracts, (b) : water-extracts

3) ポリフェノールモデルとしてのルチン (rutin) の抗酸化性

黒緑豆実生中の主なポリフェノール成分の一つとしてすで報告されているルチン⁶⁾は、そのアグリコンであるケルセチンの抗酸化性に関する報告例⁷⁾もあることから、ルチン標品 (和光純薬工業 K.K.) をエタノールに溶解し、最終濃度20 μM になるように添加し、酸化処理したものと試料溶液との抗酸化性も比較した (Fig.2 (a,b)) 結果, light 下で生育させたもやしとほぼ同じ挙動を示し, 高い抗酸化性を有することが確認された。

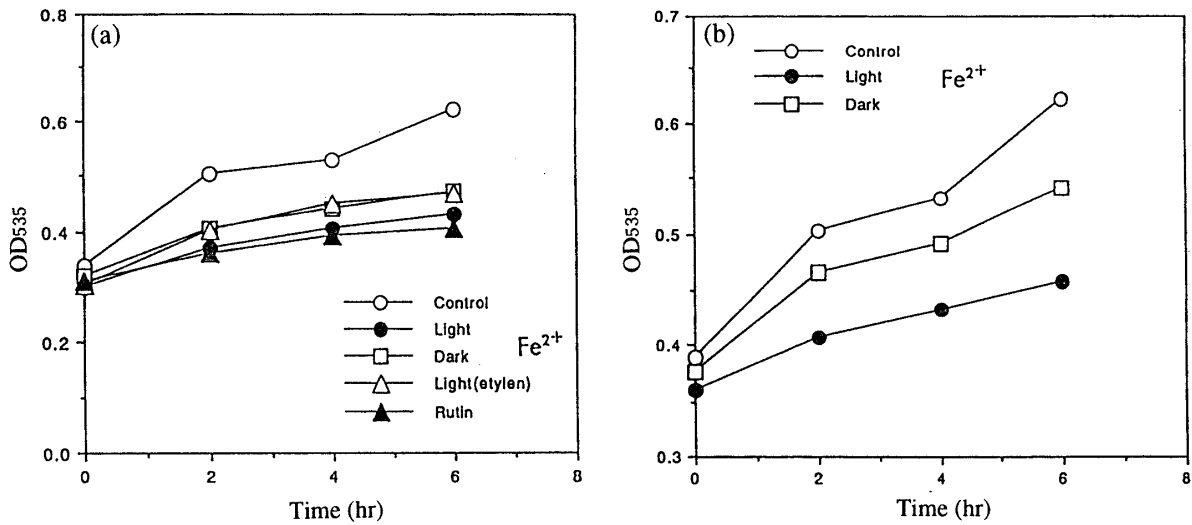


Fig. 3 Antioxidative activity of ethanol-soluble and water-soluble extracts from mung bean seedlings in the presence of FeSO₄.

(a) : ethanol-extracts, (b) : water-extracts

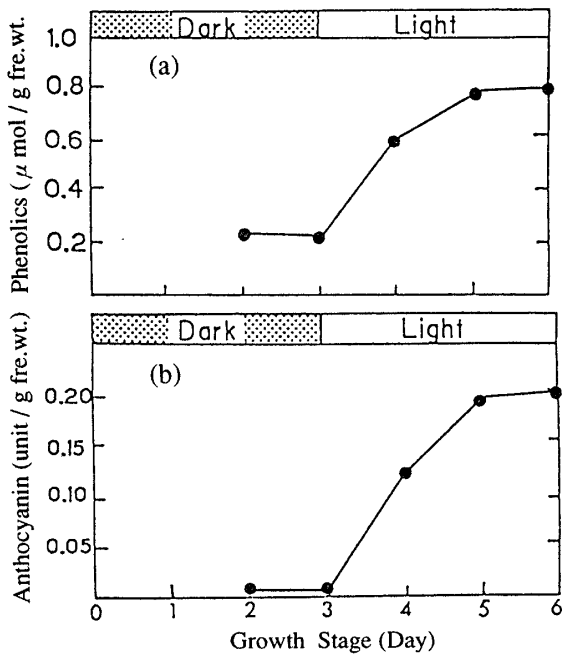


Fig. 4 Effect of treatment by light on total phenolics and anthocyanin accumulation in mung bean seedlings

(a) : Total Phenolics, (b) : Anthocyanin

4) エチレン処理もやしの抗酸化性

暗所で発芽生育させたあと直ちに透明デシケーター内にいれて、16ppm濃度のエチレンを充填し照射下で生育させた実生についてもその抗酸化性を比較したが (Fig. 2 (a) (b)), エチレン処理しない dark とほとんど差がみられず, light よりも T B A 値が高く antioxidant としての効果は低かった.

5) 黒緑豆実生中のアスコルビン酸の影響

食品中に存在する抗酸化剤として、脂溶性ビタミンのα-トコフェロールとともに水溶性ビタミンの一種であるアスコルビン酸もよく知られており、水抽出可溶部における抗酸化作用は、このアスコルビン酸に依存するのではないかと考えられた。このためアスコルビン酸オキシダーゼ (Sigma) を作用させて、抽出した試料溶液中のアスコルビン酸を分解させたものを用いてその効果をみた (Fig. 5) が、アスコルビン酸オキシダーゼを作用させないものと変わら

ない強い抗酸化性が認められた。また、新鮮重量あたりのアスコルビン酸含量 (Fig. 6) の高い dark の方が抗酸化性が弱いことから黒緑豆実生中のアスコルビン酸以外の水溶性の抗酸化性物質の存在が示唆された。

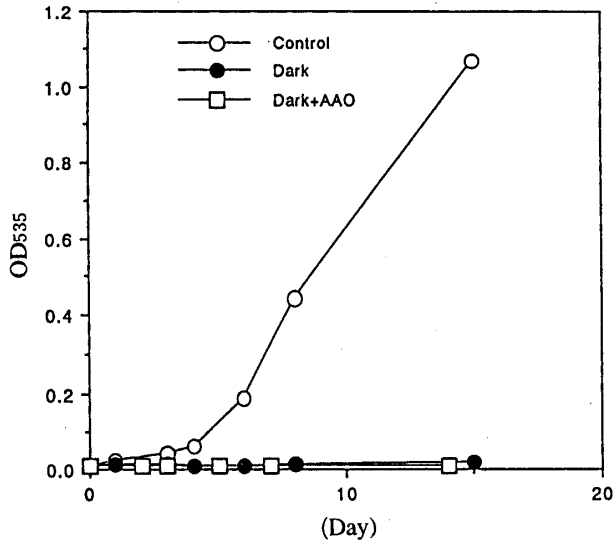


Fig. 5 Effect of treatment by AsA-oxidase on antioxidative activity

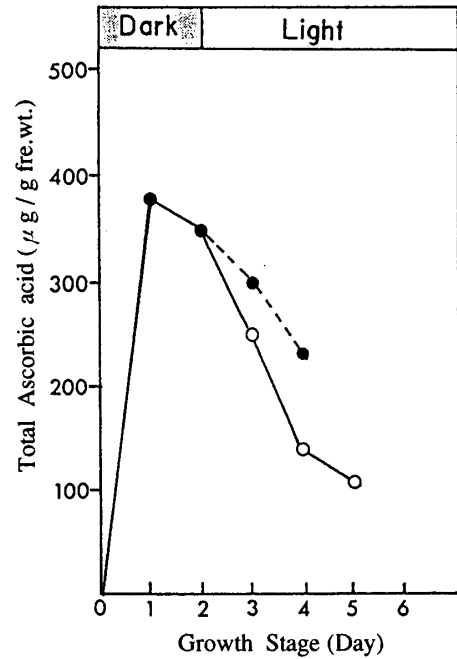


Fig. 6 Changes of total ascorbic acid contents in mung bean seedlings. ○, under the light ; ●, kept in the dark

6) TLC法による抗酸化性ポリフェノール成分の検索

エタノール抽出液および水抽出液中の抗酸化性ポリフェノール成分の検出を各種溶媒系を用いた TLC 法で試みた。Fig.7に示した展開溶媒では、いずれの試料液からも UV-lamp (302nm) 照射下では2つのスポットが確認できたが、このうちフェノール試薬陽性を示したのは上のスポットのみであった。現在のところ、このスポットがなにであるかを同定するには至っていない。3) に記したように黒緑豆実生中存在するルチンは、ケルセチン (quercetin) の配糖体であり水溶性でもあることからルチンの標品とともにその検出を試みたが、Rf 値からはルチン以外の他のポリフェノール成分の存在の可能性が考えられた。このような結果、黒緑豆実生中の抗酸化性物質がポリフェノールであるとの確証は得られていないが、今後 HPLC 等の手法によってこの物質を検索し、同定したいと考えている。また、植物性ポリフェノール成分のもつ抗酸化性に関しては、o-diphenol 構造の有効性を強調する報告が多いが、一方において同じ o-diphenol 構造をもつカフェイン酸などでは抗酸化性が認められないという報告例⁸⁾

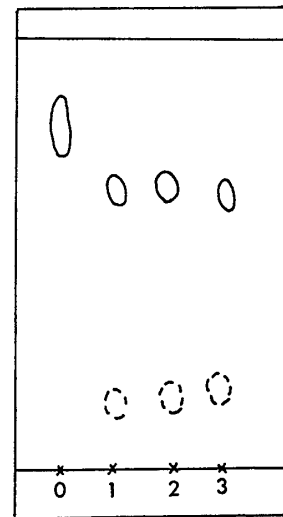


Fig. 7 Profile of thin layer chromatography (TLC)
TLC was developed using n-BuOH : Acetic acid : Water (20 : 5 : 11)
0 : authentic rutin
1 : Dark
2 : Light
3 : Ethylen-treated

もある。

天然の食品成分としての植物性ポリフェノール類は、大半が配糖体の形で存在しており、ヒトにとってはその消化・吸収性が問題となるが、ビタミン類とともに天然の antioxidant 成分としての機能が期待されるものの一つではないかと考えられた。

要 約

各種条件下で生育させた黒緑豆実生から熱エタノール抽出したポリフェノール成分についてリノール酸酸化に対する antioxidant としての効果を調べた結果、下記のようなことが認められた。

- 1) エタノール可溶部とともに水可溶部にも強い抗酸化性が認められた。
- 2) Fe^{2+} 共存下でのリノール酸酸化に対する抗酸化性は、エタノール抽出、水抽出ともに光照射実生の方が暗所生育実生に比べ TBA 値の上昇を抑制し、高い効果を示した。
- 3) 黒緑豆実生の主要ポリフェノール成分の一つであるルチンでも高い抗酸化性が確認された。
- 4) 水抽出した黒緑豆実生中にもアスコルビン酸以外の水溶性の抗酸化成分の存在が示唆され、各種溶媒系による TLC 法でエタノール抽出した試料中に antioxidant としてルチン以外の他のポリフェノール成分の存在の可能性が考えられた。

参 考 文 献

- 1) 竹内若子, 高橋平八郎: 名古屋女子大紀要, **38**, 51-57(1992)
- 2) Buege, J. A. and Aust, S. T. D.: Meth. Enzymol., **52**, 302-310(1978)
- 3) 森口貴代: 日本食品工業学会誌, **40**, 64-68(1993)
- 4) 竹内若子, 高橋平八郎: 名古屋女子大紀要, **40**, 33-37(1994)
- 5) 竹内若子, 小島峯雄, 高橋平八郎: 名古屋女子大紀要, **34**, 85-92(1988)
- 6) Duke, S. O. and Vaughn, K. C.: Physiol. Plant, **54**, 381-385(1982)
- 7) Takahama, Umeo: Plant Cell Physiol., **30**, 295-301(1989)
- 8) 中山 勉: 日本栄養・食糧学会誌, **47**, 1-9(1994)

Summary

Mung bean (*Vigna mungo*) seedlings contains the polyphenolic compounds such as rutin and anthocyanin, both of which are flavonoids. The effect of hot-ethanol extracts or water-extracts from mung bean seedlings which were grown several conditions on the linoleic acid oxidation was investigated. Mung bean seedlings were grown kept in the dark, exposed to light or ethylene-treated (16ppm). Both the ethanol-soluble and water-soluble fractions from seedlings showed strong antioxidative activity. However, we found that extract from seedlings exposed to light were more effective than from seedlings kept in the dark. We found some unidentified phenolic components except rutin in these fractions by TLC.