

食品に含まれる褐色色素成分の生理活性と 構造解析に関する研究

Biological Activities and Structural Analysis of Brown Coloring Matter in Foods

堂ヶ崎知格, 角野洋一, 川上 泰, 山本裕介

麻布大学

Chikaku Dogasaki, Yhoichi Kakuno, Yasushi Kawakami, Yusuke Yamamoto

Azabu University

Abstract. The presence of the poly-phenol compounds and some enzymes are concerned in the cause of brown coloring resulted from the polymerization in foods. These polymers of characteristic brown color in foods are designated as Vesiculogen, and are expected to have a important role of increasing immunological activities for our health. However, very little is known about the productive mechanisms and the biological activities of Vesiculogen. It is often caused some troubles that the value of articles was spoiled by enzymes on a process of circulation and storage in commodities of Yacon. Therefore, the studies on Vesiculogen were performed on following under the procedures using Yacon as the materials for these experiments. 1) Yacon was extracted with 50 % methanol including HCl adjusted to 2N of a concentration. Small quantities of components in extract were separated by HPLC using ODS-C18 column ($\phi 1.0 \text{ cm} \times 25.0 \text{ cm}$) and methanol (prepared on acidity with addition of TFA) as a eluting solvent. Several peaks of compounds were detected and collected respectively. Structural analysis of each compound was performed using some instruments such as FT-IR, LC-MS and NMR. 1) Two peaks (A and C) of compounds were identified as Fumaric acid (using NMR) and Chlorogenic acid (using LC/MS), and other three were found to be the diene compounds using NMR. Still the chemical structure of the diene compounds could not be completely identified in these experiments, but it was suggested that the diene compounds had the possibility of new chemicals. The content of Fumaric acid was 537.2 mg per 100 g of Yacon from the result of a quantitative analysis. Because it is well-known that some organic acids such as Fumaric acid show the effect of a fatigue recovery, it is equally expected that the effect of a fatigue recovery was occurred with the ingestion of Yacon. On the other side, the presence of Chlorogenic acid as a kind of polyphenols in Yacon was reconfirmed certainly from these analysis. 2) The composition of Vesiculogen using the chlorogenic acid of a commercialized reagent was performed on following the procedure. When the enzymes (HRP) of several quantities were added to the mix of Chlorogenic acid prepared in several quantities and hydrogen peroxidase, the several Vesiculogen colored brown were constituted. In such a case that 50mg of chlorogenic acid and 5ml of hydrogen peroxidase were mixed with 20 mg of HRP, the brown coloring of Vesiculogen turned to be deepest. The Vesiculogen was dialyzed with distilled water using spectro pour tube (pore size of MW. 50,000) and was separated two fractions of above 50kDa (V-N fraction) and less than 50KDa (V-D fraction) of molecular weight. The mitogenic assay for each fraction was examined using spleen cells of male mice of C3H/HeN. The mitogenic activity was found remarkably in a V-N fraction, but not in a V-D fraction. It was suggested that the active substance of Vesiculogen was dependent on the fraction of high molecular above 50kDa. However it is a big problem to decrease in those article value by brown coloring occurred among the processes of circulation and storage, the elucidation of general mechanisms for production of Vesiculogen is expected in future by our studies connected with the relationship between the activities

1. 目的

食品中で起こる褐変の多くは、その商品価値の低下を招くことからしばしば問題となる。これは食品中に含まれるポリフェノール化合物が酵素によってキノン体となり、さらには重合して褐変現象を引き起こしたり、食品中に含まれるアミノ酸と還元糖の存在下で反応し、褐変することなどが考えられている。しかしながら、この褐変は食品特有の色と深く関係するのみならず、食品の香り、さらには免疫賦活とも関連することが報告されている。^{1,2)} 食品中で生成するこのような重合体の褐色色素は Vesiculogen と称されるが、その生成機序には不明な点が多い。又、その生成過程で様々な要因（成分、温度、反応時間など）の影響を受けるため、食品中で既に生成した Vesiculogen の構造解析や機能性の検討は大変複雑で困難を極める。又、Vesiculogen の生理活性に関する研究報告は少ない。そこで、本研究では上述を踏まえて、近年、健康食品として食されるようになってきているヤーコン^{3,4)} について、この塊根部が流通や貯蔵の過程で褐変し、その商品価値低下でしばしば問題となることがあることから、実験材料として用い、褐変色素の生成機序および生理活性の検討を行った。

ヤーコン (*Samallathus sonchifolius*) は南米アンデス地域（ペルー、ボリビア）が原産のキク科の植物で、その地域では古来より、イモ（塊根）は果物として利用され、葉は主にお茶として用いられ、糖尿病や高血圧に効果があるとされてきた。日本へは1985年に導入された後、1990年にヤーコンのイモにフラクトオリゴ糖が大量に含まれていることが発見され、健康野菜として栽培および消費が次第に拡大している。葉や茎にはカリウム・カルシウム等のミネラルなど生命維持に欠かすことができない物質も豊富に含まれていて、塊根部には整腸作用を有するフラクトオリゴ糖の他に、抗酸化作用・抗菌作用を有するポリフェノール化合物が含まれることが知られている。

2. 方法

1) ヤーコン成分の抽出 (Fig. 1) と分析：乾燥・粉末としたヤーコンに塩酸濃度が2Nとなるように

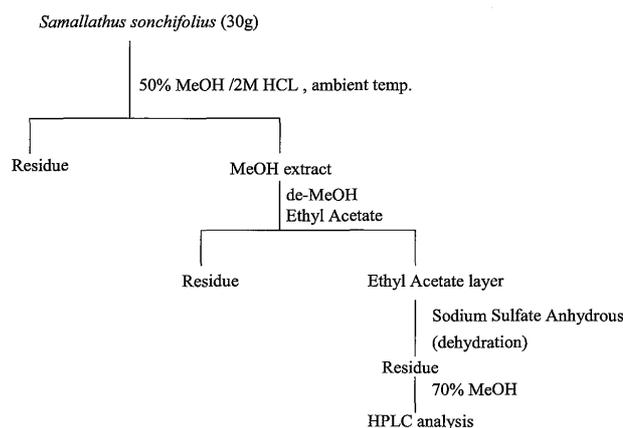


Fig. 1 Diagram of Extraction Procedure Applied on *Samallathus sonchifolius*

調製した50%メタノール溶液を加えて抽出した。⁵⁾ 次いで、減圧濃縮によってメタノールを留去した後、酢酸エチルを等量加えて分配抽出をした。酢酸エチル層は硫酸ナトリウム（無水）で脱水し、減圧濃縮によって乾固した。残渣に70%メタノール20mlを加えて溶解し、0.45 μ m メンブレンフィルターを用いてろ過した後、HPLC分析用の試料とした。HPLCによって分離された各ピークをそれぞれ集め、FT-IR, LC-MS, NMR等の分析機器を用いて構造解析を行った。なお、分離・精製に用いたHPLCカラムにはODS-C18 ($\phi 10 \times 250$ mm)、溶離液として0.05% TFA加メタノール溶液を用いた。

2) 褐色色素群の合成と生理活性：上述の分析により検出されたポリフェノールについては、市販の標準試薬を用い、同じく市販の西洋ワサビ由来酵素 (HRP) に少量の H_2O_2 を添加し、室温で反応させて Vesiculogen を合成した。また、この Vesiculogen に関して、生理活性の一つとしてミトジェン活性（マウスリンパ球幼若化能）の有無を検討した。

3. 結果と考察

1) ヤーコン抽出物をHPLCによって分離し、FT-IR, LC-MSおよびNMRの分析機器を用いて構造解析を行った結果、主なピークの一つにポリフェノールであるクロロゲン酸が検出された (Fig. 2)。しかしながら、他にはポリフェノールの検出は認められなかった。また、その他の成分として、フマル酸 (Fig. 3) 及び3種類のジエン系化合物 (Fig. 4) が検出された。フマル酸には疲労回復効果のあることが

知られていることから、フマル酸量を定量したところ、可食部 100 g あたり 537.2 mg の含有が認められた。ヤーコンにフマル酸が含まれることはこれまで報告されておらず、ヤーコンの摂取は新たに疲労回復の効果も期待されることが分かった。また、ジエン系化合物については文献等に未記載であり、新規化合物の可能性が強く示唆された。

2) 褐色色素の合成と生理活性

始めに、最も濃度の高い Vesiculogen 合成のための条件を検討した。反応時間、クロロゲン酸量および酵素量を変え、褐色色素濃度を吸光度計でモニターしながら、褐色の進行具合を検討した結果、クロロゲン酸 50 mg, HRP 20 mg および H₂O₂ (市販品 100 倍希釈液) 5 ml を添加した場合に、最も褐色濃度の

高い Vesiculogen が得られることが分かった。さらに、Vesiculogen はポアサイズ MW .50,000 の透析膜を用いて透析し、透析性画分 (分子量 50kDa 未満; V-D 画分) と非透析性画分 (分子量 50 kDa 以上; V-N 画分) に分画し、それぞれの画分についてマイトジェン活性 (マウスリンパ球幼若化能) の有無を検討した。その結果、V-N 画分において顕著な活性が認められた (Fig. 5)。一方、V-D 画分では活性はほとんど認められなかったことより、Vesiculogen の活性本体は分子量 50 kDa 以上の高分子化合物であることが明らかになった。従って、酵素的褐色によって得られた色素は、ヤーコンをはじめとするポリフェノール含有食品において容易に生成可能であり、リン

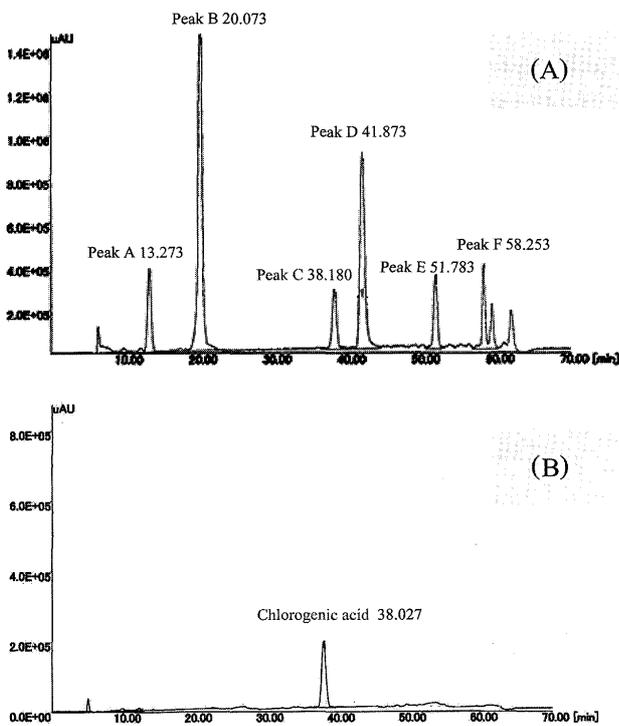


Fig. 2 HPLC Chromatogram of Yacon Extract (A) and Chlorogenic acid (B)

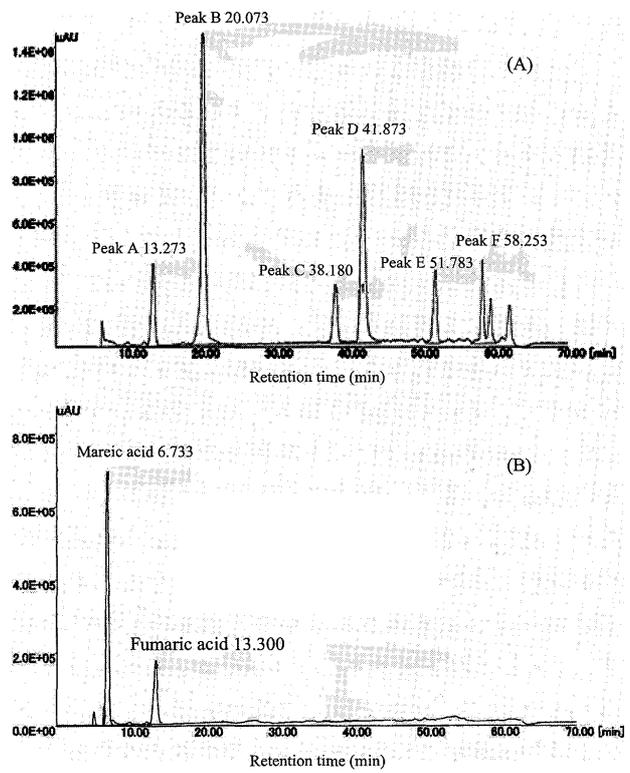


Fig. 3 HPLC Chromatogram of Yacon Extract (A), Fumaric acid and Mareic acid (B)

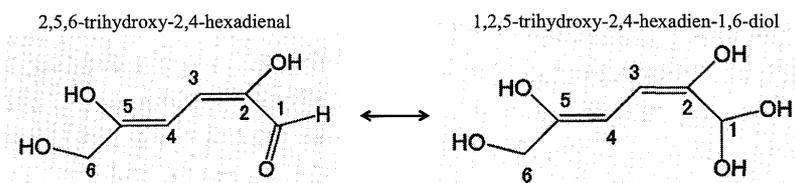


Fig. 4 Structure of Diene Compounds

The structure shown on the upper figure means the compound of peak B. Peak B, D and E were identified as diene compounds

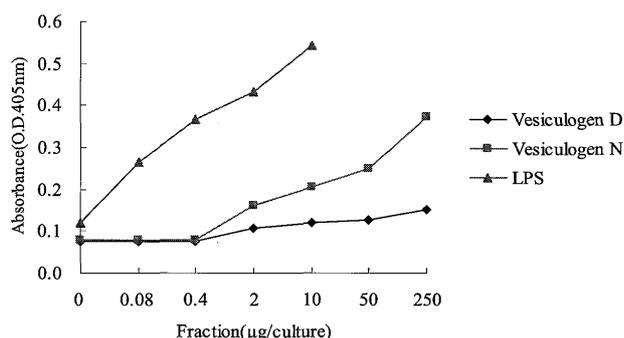


Fig. 5 Mitogenic activities of vesiculogen using spleen cells of C3H/HeN mice

バ球幼若化能を有することから免疫賦活に深く関与することが強く示唆された。

4. 要約

ヤーコンの塊根部は流通や貯蔵の過程で褐変化することによって商品価値が低下することがしばしば問題となる。これはヤーコンに含まれているポリフェノール化合物が酵素的反応によって重合体となり、褐変現象を引き起こすためである。しかしながら、この重合体は Vesiculogen と呼ばれ、食品の色、香りと強く関係するのみならず、免疫賦活効果と関連することが指摘されるが、生理活性に関する研究報告は少なく、その生成機序などにも不明な点が多い。また、Vesiculogen はその生成過程で様々な要因（食品中の成分、温度、反応時間など）の影響を受けるため、食品中で既に生成した Vesiculogen の構造解析や機能性の直接的な検討は困難であるため、本研究ではヤーコンに含まれるものと同等の市販のポリフェノール標準試薬を用いて Vesiculogen の合成を試みるとともに、マウスリンパ細胞を用いたマイトジェン活性試験により Vesiculogen の生理活性を検討した結果、以下のとおりであった。

1) ヤーコンに含まれる各種成分の分析

ヤーコンを塩酸濃度が2Nになるように加えて調製された50%メタノールで抽出し、抽出物をさらに酢酸エチルで分配抽出した。抽出物はHPLC (ODS-C18 カラム 10.0 mm × 250 mm, 溶離液 0.05% TFA/メタノールを用いた) で分離し、それぞれの分離ピークをFT-IR, LC-MS, NMR等の分析機器を用いて構造解析を行った。その結果、ヤーコン抽出液中か

ら、フマル酸、クロロゲン酸及び3種類のジエン系化合物が検出された。フマル酸の定量値は可食部100gあたり537.2mgであった。また、ヤーコンにフマル酸が含有されることは未報告であり、ヤーコンには新たに疲労回復の効果が期待されることがわかった。ジエン系化合物については、いずれも文献等に未記載であり、新規化合物の可能性が強く示唆された。

2) 褐色色素群の合成と生理活性

ヤーコンに含まれる主なポリフェノールはクロロゲン酸のみであったことから、市販のクロロゲン酸標準品を用い、同じく西洋ワサビ由来の市販の酵素 (HRP) 並びに少量の H_2O_2 を添加して室温で反応させ、Vesiculogenを合成した結果、クロロゲン酸50mg, HRP 20mg および H_2O_2 (市販品100倍希釈液) 5mlを添加した場合に最も褐変濃度の高いVesiculogenを得た。次いで、生理活性の一つとして免疫賦活効果を検討するために、マウスリンパ細胞を用いたマイトジェン活性試験を行い、リンパ球幼若化能を検討した。その結果、分子量が50kDa以上の高分子なVesiculogen画分にのみ顕著な活性が認められた。

以上より、酵素的褐変色素はヤーコンをはじめとするポリフェノール含有食品において容易に生成されることが推測され、免疫賦活効果に深く関与することが示唆された。

文献

- 1) Naohito OHNO et al., Requirement of Anionic Groups for the Mitogenicity of a Fungal Mitogen, Vesiculogen. *Microbiol. Immunol.* 28, 821-830, (1984).
- 2) 大野尚仁, アガリクス茸ポリフェノール酸化酵素による免疫賦活物質の生成, 日本薬学会第119年会 講演要旨集 10-032, 1999.
- 3) 月橋輝男, 奇跡の健康野菜ヤーコン, 20-23, 廣済堂, 東京, 1999.
- 4) 伊藤洋行, ヤーコン (芋及び葉) の化学成分と健康効果, ヤーコン研究会報, 3, 41-58, 2000.
- 5) 鈴木誠, Folin-Denis法による総ポリフェノール量測定のための抽出溶媒の検討, 日本食品科学工学会, 49, 507-511, 2002.