食用アマランサスの抗酸化能と肉団子調製・保存における抗酸化効果

A Study of the Food Functional Characteristics and Utilization of Amaranthus

三宅 妙子*・菅原 龍幸**

(*川崎医療福祉大学・**聖徳大学)

Taeko Miyake*, Tatsuyuki Sugahara**

*Kawasaki University of Medical Welfare, 288, Matsushima, Kurashiki-shi, Okayama, 701-0193

**Seitoku University, 550, Iwase, Matsudo-shi, Chiba, 271-8555

*〒701-0193 岡山県倉敷市松島 288

**〒271-8555 千葉県松戸市岩瀬 550

Amaranthus L. are edible plants that are rich in protein, dietary fiber, minerals and vitamins. There are 12 varieties which are cultivated and used in food preparations in Japan: Rarushaku, BAYAM.M, BAYAM.P, ABIEBIE, Maruba, Yanagiba, and Baiamu which belong to A. vegetables and Mexico, Nairobi, Nouken c. 91-3, K4, and Akou which belong to A. grains. Since the young stems and leaves of A. grains are used as vegetables. The objective of this study was to determine if edible amaranthus contains any natural antioxidant materials. 17 samples, 12 leaves and five grains, were screened using ethanol extracts in a methyl linoleate oil system. Fifteen of the samples contained rather strong antioxidant activity.

The results were as follows: 1) Seven samples had strong antioxidant activities: water extracts of the leaves of ABIEBIE, Yanagiba, and Nairobi, ethanol extracts of the leaves of BAYAM.M and ABIEBIE, and ether extracts of the leaves of Baiamu and Nairobi.

2) Water extracts of ABIEBIE and Yanagiba leaves showed a synergistic antioxidant effect with citric acid, and water extracts of ABIEBIE and Yanagiba leaves and ethanol extract of ABIEBIE leaves showed a synergistic antioxidant effect with α -tocopherol.

3) Water extracts of ABIEBIE and Yanagiba leaves were stable against heat treatment at 100°C for 2h. 4) Water extracts of ABIEBIE, Yanagiba, and Nairobi leaves were stable at pH's 3.0, 5.0, 7.0, and 9.0. 5) Water extracts of ABIEBIE and Yanagiba leaves showed activity with a minced pork model system. The synergistic antioxidant effect with the addition of citric acid or α -tocopherol showed a stronger antioxidant activity. 6) The HPLC (High Performance Liquid Chromatography) method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods, using 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, was used in 13 samples. Eight samples showed free radical-scavenging activity. Three of these, water extracts of ABIEBIE, Yanagiba and Nairobi leaves, showed the particularly strong free radical-scavenging activity. In conclusion, water extracts of edible amaranthus have natural antioxidants.

はじめに

アマランサス (*Amaranthus* L.) は、食品栄養学的にも優れた食用作物として期待されるアカザ目、ヒユ科ヒユ属の草本植物である^{1)~5)}。しかし、食用アマランサスの抗酸化性など三次機能についての研究はほとんどみられないようである。そこで今回著者は、食用アマランサスが抗酸化能を有するか否かのスクリーニングを行い^{6)~8)}、津田らの実験方法^{9),10)}を参考に、13種の食用アマランサス抽出物に対して抗酸化性を重ねて確認すると共に、天然抗酸化剤であるクエン酸、 α -トコフェロールとの相乗効果、食用アマランサス抽出物の熱や pH に対する安定性について試験し、さらに DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) を用いたラジカル捕捉活性試験¹¹⁾も試みた。そして著明な抗酸化効果が認められた試料については、肉団子調製時に抽出物を添加し、保存中の抗酸化性を油脂の変敗度を指標として検討した。

実験方法

1. 試料

試料は勸農産業振興奨励会から入手した種子を用いて栽培したものである。種類については、野菜用のラルシャーク、バヤム・エム、バヤム・ピイ、アビエビエ、丸葉、柳葉、パイアムの7種と、子実用では、*A. hypochondriacus* に属するメキシコ、ナイロビ、農研セ91-3と、*A. caudatus* に属するK4と赤穂の5種、計12種である。これらは、1996年から1997年に岡山県のアマランサス生産地の賀陽町の農家にて栽培し、適期に収穫した^{12),13)}。子実用5種については子実を8月下旬に、茎葉を6月下旬に収穫したものをを用いた。

野菜等の茎葉は凍結乾燥し、子実、穂を収穫後10日前後温室にて自然乾燥させた後、唐箕を用いて子実を分別収集し、夾雑物を除去するために水洗し、35~40℃で一晩乾燥したものを粉碎して試料とした。

2. 抽出物等の調製法

①抗酸化能のスクリーニング用抽出物の調製 試料粉末1gに20mlのエタノールを加え、一晩室温にて放置後、5,000rpmで15分遠心分離し、その上澄液を抽出液とした。

②抗酸化力の測定用抽出物の調製 水抽出：試料(アビエビエ、柳葉、ナイロビとK4の茎葉)15gに水400mlを加えてホモジナイズし、100℃の湯浴上で30分間加熱還流後、ろ過し、ろ液を得た。抽出残渣は更に水

200mlを加え同様の方法で1回抽出し、ろ液を合わせて濃縮後、全量を100mlとした。

エタノール抽出¹⁰⁾：試料(バヤム・エム、アビエビエ、柳葉、パイアム、メキシコの茎葉)15gに99.5%エタノール250mlを加えてホモジナイズし、一晩冷蔵にて放置後、ろ過し、ろ液を得た。抽出残渣は更に99.5%エタノール125mlを加え同様の方法で1回抽出し、ろ液を合わせて濃縮後、全量を100mlとした。

エーテル抽出：試料(パイアムとナイロビ、農研セ91-3、K4それぞれの茎葉)15gにジエチルエーテル250mlを加えてホモジナイズし、一晩冷蔵にて放置後、ろ過し、ろ液を得た。抽出残渣は更にジエチルエーテル125mlを加え同様の方法で1回抽出し、ろ液を合わせた。ろ液中のジエチルエーテルは、ソックスレー抽出器にて回収し、抽出物は濃縮乾固後、99.5%エタノールに溶解して全量を100mlとした。

③肉団子の調製 肉団子の配合割合は、内藤らの方法¹⁴⁾を参考に豚ロースのミンチ150g、馬鈴薯デンプン25g、鶏卵20g、蒸留水5gを基本配合とし1個20gの肉団子を調製した。材料はいずれも市販品を用い、アマランサス抽出液を添加する場合は、蒸留水と代替えた。保存条件は2℃とし、加熱条件はガス高速レンジコンベック(リンナイ株式会社RCK-10E-10、消費電力90W)で200℃2分間、次いで180℃5分間加熱した。

3. 試薬

抗酸化能測定のためのリノール酸メチルは東京化成工業㈱の一級品、リノール酸は和光純薬㈱製を使用し、抗酸化剤としてAldrich Chem.㈱Troloxを使用した。

4. 抗酸化力の測定

①抗酸化能のスクリーニングⅠ 能勢⁶⁾、春日ら^{7,8)}の方法に従い、小試験管に採ったリノール酸メチル100 μ lに、抽出液50 μ lを加え、50℃で25時間反応後、Lea法の改良法^{6),15)}により過酸化価(POV)を測定した。抗酸化の判定は、抽出液添加区のPOV(POV_s)と、抽出液に代えてエタノールを添加したコントロール区のPOV(POV_c)の比を求めることにより行った。

②抗酸化能のスクリーニングⅡ¹⁰⁾ リノール酸を基質としたモデル系(以後リノール酸モデル系とする)を用いて検討した。標準反応液は、リノール酸0.13ml、pH7.0、50mMリン酸緩衝液10ml、99.5%エタノール10mlを混合した溶液に、蒸留水を加えて25mlとした。アマランサス抽出液添加の反応液は、抽出液の添加量が乾燥試料として反応液のそれぞれ0.1、0.2、0.4、0.6、0.8%混合されるように、蒸留水または99.5%エタノール

ルと代替えて添加した。これらの反応液は、共栓付100ml容褐色広口瓶に移し、40℃のインキュベーターに遮光保存した。保存期間中、1日おきに酸化の度合いをロダン鉄法¹⁶⁾によりPOVを、Griewhan法¹⁷⁾によりTBA価を測定した。

③クエン酸、 α -トコフェロールの相乗効果¹⁰⁾ ②の抗酸化能のスクリーニングの結果、特に強い抗酸化効果を示したアマランサス抽出液7種について、リノール酸モデル系において、アマランサス抽出液とクエン酸または α -トコフェロールを混合し、これらの相乗効果を測定した。リノール酸モデル系への食用アマランサス抽出液の添加量は、乾燥試料として反応液のそれぞれ0.1, 0.2, 0.4%とし、クエン酸は40 μ g/mlを0.5ml (0.08%に相当)、 α -トコフェロールは20 μ g/mlを0.5ml (0.04%に相当)、いずれも蒸留水または99.5%エタノールと代替えて添加した。

④アマランサス抽出物の熱安定性¹⁰⁾ リノール酸モデル系に、③と同様のアマランサス抽出液を加熱処理して添加し、反応液を調製した。アマランサス抽出液は、沸騰水浴中に0, 30, 90, 120分間保持し、各保持時間後直ちに氷冷したもので、抽出液の添加量は、乾燥試料として反応液のそれぞれ0.1, 0.2, 0.4%とし、いずれも蒸留水または99.5%エタノールと代替えて添加した。結果は、未加熱試料の抗酸化性を100%とした時の各熱処理試料の抗酸化性で表した。

⑤アマランサス抽出物のpH安定性¹⁰⁾ リノール酸モデル系に、③と同様のアマランサス抽出液を各pH緩衝液10mlに溶解して加熱処理したものを添加し、反応液を調製した。pH緩衝液は、pH 3.0とpH 5.0の50 mM酢酸緩衝液、pH 7.0の50 mMリン酸緩衝液、pH 9.0の50 mMグリシン緩衝液を用い、沸騰水浴中に120分間保持し、直ちに氷冷したもので、抽出液の添加量は、乾燥試料として反応液のそれぞれ0.1, 0.2, 0.4%とし、いずれも蒸留水または99.5%エタノールと代替えて添加した。結果はpH 7.0の未加熱試料の抗酸化性を100%とした時の各熱処理試料の抗酸化性で表した。

なお、③④⑤の抗酸化力の測定方法は、②と同様にした。

⑥ラジカル捕捉活性試験¹⁸⁾ 0.5 mM DPPH (1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル) エタノール溶液1 mlに、pH 7.4, 100 mM Tris-HCl 緩衝液800 μ lと500 μ l MTrolox エタノール溶液または試料溶液200 μ lを加えて混和後、室温で暗所にて20分間反応させた。分析は、高速液体クロマトグラフを使用し、送液ポンプに日立L

-6,300, 検出器に日立L-4,250を用いた。測定条件は、カラムに日立L-5,025 (C8 4.6mm ϕ $\times$ 150mm)を用い、カラム温度20℃, 流速1.0ml/min, 移動相は、70%メタノール溶液で分析した。検出は517nm, DPPHの保持時間は8.5分であり、データ処理はクロマトデータ処理(日立D-2,500)で行った。

⑦肉団子の油脂の酸化抑制度の測定

1) 脂質の抽出および測定: 各肉団子の脂質の抽出はクロロホルム・メタノール混液(CM混液)改良抽出法¹⁹⁾に従った。

2) 油脂の変敗度測定: 油脂の酸化安定性の指標として、Lea法の改良法^{6,15)}により、過酸化物価(POV)を測定した。

結 果

1. 食用アマランサスの抗酸化能のスクリーニング I

リノール酸メチル1 mlあたり、乾燥試料0.025g相当量のエタノール抽出物を加えて行った抗酸化能スクリーニングの結果をTable 1に示した。試料抽出液添加区の過酸化物価(POV_s)とコントロール区の過酸化物価(POV_c)の比POV_s/POV_cによって抗酸化効果を4段階に区分けした。すなわち、抗酸化性の著明なものを++ : 0 $\leq$ POV_s/POV_c < 0.2, 抗酸化活性の強いものを+ :

Table 1 Screening for antioxidant activity of edible amaranthus

Variety	Activity
Rarushaku (A)	++
BAYAM.M (A)	++
BAYAM.P (A)	++
ABIEBIE (A)	++
Maruba (A)	++
Yanagiba (A)	++
Baiaimu (A)	++
Mexico (A)	++
Nairobi (A)	++
Nouken c.91-3 (A)	++
K4 (A)	++
Akou (A)	++
Mexico (B)	++
Nairobi (B)	++
Nouken c.91-3 (B)	-
K4 (B)	++
Akou (B)	-

(1) Tissues of plant body used for extraction are indicate as follows: A; Stems & Leaves B; Seeds

(2) ++ : 0 $\leq$ POV_s/POV_c < 0.2 + : 0.2 $\leq$ POV_s/POV_c < 0.4
 ± : 0.4 $\leq$ POV_s/POV_c < 0.7 - : 0.7 $\leq$ POV_s/POV_c

POV_s : Peroxide value with sample

POV_c : Peroxide value of control

Fig.1 Antioxidant activity of crude extract prepared from edible amaranthus as measured by thiocyanate method after incubation for 7 days

* : Stems & Leaves A: water extract B: ethanol extract C: ether extract

0.2 ≤ POV_s/POV_c < 0.4, 抗酸化活性の弱いものを± :
 0.4 ≤ POV_s/POV_c < 0.7, 抗酸化活性のないものを- :
 0.7 ≤ POV_s/POV_c とした。

このスクリーニングの結果, 試験した食用アマランサスのエタノール抽出液は, リノール酸メチルの POV の上昇を抑制する効果を15部位が有していることを示した。そして, その効果はすべて POV_s/POV_c が++ であ

り, かなり強い抗酸化能の存在が示唆された。

2. 食用アマランサスの抗酸化能のスクリーニング II

アマランサス抽出物のリノール酸モデル系における, ロダン鉄法を用いた抗酸化試験で, 特に強い抗酸化効果を示した7種だけを Fig.1 に示した。結果は, 測定期間中7日目にコントロールの吸光度がほぼ最大になったので, この時のコントロールの吸光度を100とし, アマラ

Fig.2 Synergetic antioxidant activity of edible amaranthus extract with citric acid or α-tocopherol as measured by thiocyanate method after incubation for 7 days

* : Stems & Leaves A: water extract B: ethanol extract C: ether extract

Fig.3 Effect of heat treatment on antioxidant activity of edible amaranthus extract as measured by thiocyanate method
 * : Stems & Leaves A: water extract B: ethanol extract C: ether extract

Fig.4 Effect of pH on antioxidant activity of edible amaranthus extract as measured by thiocyanate method
 * : Stems & Leaves A: water extract B: ethanol extract C: ether extract

ンサス抽出物添加時の脂質の過酸化度を示した。水抽出物では、アビエビエ0.2%添加が16、柳葉0.2%添加が18、ナイロビ茎葉0.4%添加が1、エタノール抽出物では、バヤム・エム0.2%添加が28、アビエビエ0.1%添加が40、

エーテル抽出物ではバヤム0.2%添加が18、ナイロビ茎葉0.1%添加が19を示した。

3. クエン酸、 α -トコフェロールとの相乗効果

リノール酸モデル系における、アマランサス抽出物と

Fig.5 Radical-scavenging activity of crude extract prepared from edible amaranthus as measured by the DPPH-HPLC method
 *: Stems & Leaves A: water extract C: ether extract

Fig.6 Antioxidant activity of edible amaranthus extract with a minced pork model system
 POV: Peroxide value *: Stems & Leaves A: water extract B: ethanol extract T: α -tocopherol

クエン酸、 α -トコフェロールとの相乗効果についてのロダン鉄法による測定結果を Fig.2 に示した。クエン酸とは、アビエビエと柳葉の水抽出物が相乗効果を示し、 α -トコフェロールとは、アビエビエと柳葉の水抽出物、アビエビエのエタノール抽出物が相乗効果を示した。

4. アマランサス抽出物の熱安定性

アマランサス抽出物の各温度における抗酸化力の安定

性について、ロダン鉄法による測定結果を Fig.3 に示した。なおグラフの数値は、未加熱試料を100とした場合の加熱試料の熱安定性を示している。アビエビエと柳葉の水抽出物は、加熱時間に関係なくほぼ同様の抗酸化性を示した。バイラム・エム、アビエビエのエタノール抽出物と、バイラム、ナイロビ茎葉のエーテル抽出物は、加熱時間の延長に伴い、抗酸化性が上昇する傾向を示した。

しかし、ナイロビ茎葉の水抽出物の抗酸化性は、急激に低下した。

5. アマランサス抽出物の pH 安定性

アマランサス抽出物の各 pH における抗酸化力の安定性について、ロダン鉄法による測定結果を Fig.4 に示した。なおグラフの数値は、未加熱試料を100とした場合の加熱試料の pH 安定性を示している。アビエビエと柳葉の水抽出物は、塩基性では抗酸化性がやや低下したが、その他の条件下では抗酸化性を示した。ナイロビ茎葉の水抽出物は、いずれの条件下でも特に強い抗酸化性を示した。

6. ラジカル捕捉活性試験

Fig.5 に、コントロールを100とした場合のラジカル捕捉活性を示した。アマランサス抽出物は、エタノール抽出物を除く8種にラジカル捕捉活性を認め、Trolox が51に対して、水抽出物ではアビエビエが7、柳葉が18、ナイロビとK4の各茎葉が29と16、エーテル抽出物ではバイアムが39、農研セ91-3、K4、ナイロビの各茎葉がそれぞれ29、41、49と強い抗酸化力を示した。

7. 肉団子の油脂の酸化抑制度

肉団子調製時にアビエビエ、柳葉、ナイロビ茎葉の水抽出物、アビエビエ、柳葉の水抽出物にクエン酸を、アビエビエ、柳葉の水抽出物と、アビエビエのエタノール抽出物に α -トコフェロールを混合したものを添加し、加熱処理した肉団子計8種をコントロールと比較検討した。クエン酸、 α -トコフェロールの使用濃度は、4. の③と同様とした。これらの保存期間中の POV の変化を Fig.6 に示した。保存開始から2週間が経過すると、肉団子の変敗度にわずかな差が生じ始め、コントロールとナイロビ茎葉の水抽出物を添加した肉団子は、27日以降急激に POV が上昇した。しかし、アビエビエや柳葉の水抽出物を添加した肉団子の POV は緩やかな上昇にとどまり、アビエビエや柳葉の水抽出物にクエン酸、 α -トコフェロールを混合して添加した肉団子では、更に POV の変化は少なかった。なかでも柳葉の水抽出物にクエン酸、 α -トコフェロールを添加した肉団子は、40日経過後で20 mgeq/kg 以下を示し、強い抗酸化力を示した。

考 察

アマランサス抽出物の抗酸化性を、最終的に食品加工へ利用するための基礎的知見を得ることを目的として実験を行った。そこで、最初にアマランサス抽出物が他の抗酸化性物質と相乗効果を示すかどうかについて検討し

た。その結果、アビエビエと柳葉の水抽出物は、リノール酸モデル系において、クエン酸、 α -トコフェロールとの相乗効果を示し、肉団子への添加試験においても抗酸化効果を認めた。クエン酸は、一般に脂質過酸化を促進する金属イオンを封鎖することにより抗酸化性を発現するが、特にフェノール性の抗酸化性物質との間に著しい抗酸化的相乗効果を示すことが知られている²⁰⁾。従って、アビエビエと柳葉の水抽出物中には、フェノール性物質が含まれている可能性は高いと推察される。アビエビエと柳葉の水抽出物は、その他の条件下においても比較的安定な抗酸化性を示したことから、天然抗酸化性物質として食品加工への応用が十分可能と考えられる。

またラジカル反応は連鎖反応であり、これを防止するには連鎖を切断するための抗酸化性物質、いわゆるラジカル捕捉活性を有する物質の共存が望ましい。ラジカル捕捉活性は、グロブ、オールスパイス等15種類のスパイスや加熱処理された野菜類に見られる¹¹⁾。アマランサス抽出物の加熱処理、pH の調整、調理過程での影響については今後の検討課題と考える。またアマランサスの抗酸化活性成分の本態については、現在検討中である。

要 約

食用アマランサス12種、17部位のエタノール抽出物をリノール酸メチルを基質とした油系において抗酸化能スクリーニングを行ったところ、15部位（ラルシャーク、バヤム・エム、バヤム・ビイ、アビエビエ、丸葉、柳葉、バイアムと、メキシコ、ナイロビ、農研セ91-3、K4、赤穂の各茎葉とメキシコ、ナイロビ、K4の各子実）に非常に強い抗酸化効果が認められた。

- (1) 抗酸化力試験において、強い抗酸化性を示したものは、アビエビエ、柳葉、ナイロビ茎葉の水抽出物、バヤム・エムとアビエビエのエタノール抽出物、バイアムとナイロビ茎葉のエーテル抽出物の7種であった。
- (2) クエン酸と相乗効果を示したものは、アビエビエと柳葉の水抽出物であり、 α -トコフェロールと相乗効果を示したものは、アビエビエと柳葉の水抽出物とアビエビエのエタノール抽出物であった。
- (3) 100℃120分までの加熱に対して安定性を示したものは、ナイロビ茎葉の水抽出物を除く6種であった。
- (4) pH に対する安定性では、アビエビエ、柳葉、ナイロビ茎葉の水抽出物が安定性を示し、なかでもナイロビ茎葉の水抽出物は、いずれの pH においても非常に強い安定性を示した。

- (5) アマランサス抽出物のラジカル捕捉活性は、非常に強く、水抽出物のアビエビエ、柳葉、ナイロビとK4の茎葉の4種と、エーテル抽出物のパイラムとナイロビ、農研せ91-3、K4の各茎葉の4種、計8種に認められた。
- (6) 肉団子の酸化安定性には、アビエビエと柳葉の水抽出物が効果を示し、クエン酸や α -トコフェロールとの混合では、基礎実験の結果と同様な相乗効果を示し、保存期間の延長をもたらした。

参考文献

- 1) ナショナル・アカデミー・サイエンス編：21世紀の熱帯植物資源，楽書房，p.16，(1983)
- 2) 三宅妙子，松本義信，根岸由紀子，奥崎政美，菅原龍幸：日本食生活学会誌，**9**(4)，45 (1999)
- 3) 三宅妙子，奥崎政美，山口文芳，菅原龍幸：日本食生活学会誌，**8**(2)，52 (1997)
- 4) 三宅妙子，根岸由紀子，奥崎政美，佐々木弘子，菅原龍幸：日本食生活学会誌，**10**(1)，57 (1999)
- 5) 三宅妙子：川崎医療福祉学会誌，**4**，121 (1994)
- 6) 能勢征子，藤野直子：日食工誌，**29**，507 (1982)
- 7) 春日敦子，青柳康夫，菅原龍幸：日食工誌，**35**，828 (1988)
- 8) 春日敦子，青柳康夫，菅原龍幸：日食工誌，**40**，56 (1993)
- 9) 津田孝範，藤井正人，渡邊美栄，中荏秀夫，大島克己，大澤俊彦，川岸舜明：日食工誌，**41**，475 (1994)
- 10) 津田孝範，深谷吉則，大島克己，山本 明，川岸舜明，大澤俊彦：日食工誌，**42**，430 (1995)
- 11) 山口智子，林恵里奈，藤本さつき，高村仁知，的場輝佳：日本食品科学工学会第45回大会講演集，**①**日本食品科学工学会，p.67 (1998)
- 12) 中村泰郎：今月の農業，**33**，34 (1989)
- 13) 佐柄一男，阿部 弘：東北農業研究，**44**，239 (1991)
- 14) 内藤茂三，山口直彦，横尾良夫：日食工誌，**28**，291 (1981)
- 15) 日本油化学協会編：基準油脂分析試験法，**2**，4，12-86 (1972)
- 16) 満田久輝，安本教傳，岩見公和：栄養と食糧，**19**，210 (1966)
- 17) 市川朝子，藤井 聡，河本正彦：日食工誌，**22**，159 (1975)
- 18) Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. and Terao, J.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201 (1998)
- 19) 菅原龍幸編：食品学実験書，建帛社，p.58-59, p.117-123 (1995)
- 20) 太田静行：油脂食品の劣化とその防止，幸書房，p.135 (1977)