スライスアーモンドとゴマ種子の焙煎温度が 抗酸化性に及ぼす影響

福田靖子*・中田徳美*

Effects of Roasting Temperature in Sliced Almonds and Sesame Seeds on the Antioxidative Activities

Yasuko FUKUDA* and Satomi NAKATA*

* Faculty of Education, Shizuoka University, Ohya 836, Shizuoka 422-8529

Effects of roasting temperature on antioxidative activities in sliced almonds and sesame seeds were investigated. The antioxidative activities in the ethyl acetate-methanol (E-M, 7 : 3), methanol (M) soluble browning fractions extracted from roasted sliced almonds and sesame seeds were determined by using two radical scavenging methods, DPPH radical and superoxide radical (NBT), and two lipid peroxidation methods, peroxide (thiocyanate) and cytotoxic 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) formation by a specific ELISA procedure. The browning levels (O.D. at 420 nm) in each fraction were increased with increasing roasting temperature. The highest level of DPPH radical and superoxide radical scavenging effects, and the strongest inhibition of peroxide and HNE formation from linoleic acid, were obtained at the highest roasting temperatures in the E-M fractions rather than in M fractions from sliced almonds and sesame seeds, especially sesame. These results indicated that the browning ethyl acetate-methanol soluble components formed during roasting seeds possessed antioxidative effects.

(Received, Apr. 12, 1999 ; Accepted, Aug. 6, 1999)

種実類には、脂質やタンパク質が多く、糖質の少ないものと糖質やタンパク質が多く、脂質の少ないものがあるが、成分組成の違いによって、その食品としての利用法は異なってくる。前者には、アーモンドナッツやカシューナッツ、ゴマ種子などがあり、乾熱、つまり炒って利用することが多い。これらナッツや種子は水分が6%前後と少なく、脂質が30~60%と多いので、炒る過程での食品成分間反応も、糖やアミノ酸のみならず、脂質も関与する比較的高温での反応が起こり、ナッツ香の生成や褐変化などが生じるものと考えられる。還元糖とアミノ酸の加熱時におけるメイラード反応に関してはその生成メカニズムや生体内および食品系での抗酸化作用、変異原性、抗変異原性など既に多くの研究がある^{1)~3)}。早瀬らはモデル的なグルコース-グリシン系メラノイジンに生体内での強い活性酸素消去作用を認め、その作用には特異性はなく、スーパーオキシド、ヒドロ

キシラジカル、過酸化水素に対して有効であると報告している^{4)~5)}。モデルメラノイジンに限らず、多脂の種実類の炒り操作により生ずる褐変成分にも生体内での活性酸素消去能を有するものと考えられる。これまでに我々は、焙煎ゴマ油の極めて高い抗酸化性について研究し、ゴマ種子の焙煎温度の高いほど、褐変度が高く、抗酸化性も高まることを明らかにした^{6)~7)}。ゴマ以外では、NIENABERらのヘーゼルナッツに関するもので、焙煎温度が高いほど水やメタノール抽出区分の褐変度、還元力、抗酸化性が高まるとの報告がある⁸⁾。本研究では、ゴマ種子に近い成分組成のアーモンドナッツとゴマ種子を用いて、炒り条件による褐変度と抗酸化性、特に生体内での活性酸素消去能について比較検討した。

* 静岡大学教育学部 (〒422-8529 静岡市大谷 836)

実験方法

1. 実験材料・試薬

白洗いゴマ(かどや製油株式会社製), スライスアーモンド(米国産市販品)を直径15 cmのアルミホイル皿に各試料を重ねないように並べ, 同一のホイル皿でふたをし, 乾熱器(Yamato, MODEL DX-38)中段で加熱した。加熱温度はゴマ種子, 170°C, 185°C, 200°C, アーモンド155°C, 170°C, 185°C(各加熱温度 $\pm 1^\circ\text{C}$)とし, 時間は30分とした。抽出は加熱試料を小型粉碎器で粉碎し, ふるい(18メッシュ)に通したものを15 g計量し, ヘキサン, ヘキサン:酢酸エチル(7:3), 酢酸エチル, 酢酸エチル:メタノール(7:3), メタノール, メタノール:蒸留水(1:1), 蒸留水の各溶媒200 mlで順次抽出した。抽出は一昼夜行い, 抽出後吸引濾過し, ロータリーエバポレーターで40°C以下の湯浴中で溶媒を留去し, 乾固して試料とした。試薬:リノール酸, チオシアン酸アンモニウム, 塩化第一鉄, α, α -ジフェニル- β -ピクリルヒドラジル(DPPH $\cdot$), 2-デオキシリボース, 硫化鉄, α -フェニレンジアミン, トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン, ツウイン20, 過酸化水素は和光純薬工業製の特級試薬, ワサビペルオキシダーゼ標識抗IgG免疫グロブリンはオルガノテクニカ製, ブロックエースは大日本製薬製, 抗修飾たんぱく質モノクローナル抗体は京都大学医学部病理教室豊国伸哉先生よりの供与品, 4-ヒドロキシノネナールは名古屋大学農学研究科食品機能化学研究室内田浩二先生よりの供与品, グリセロアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GADPH)はベーリンガーマンハイム社製, キサンチン, キサンチンオキシダーゼ, ートロブルー-テトラゾリウム(NBT), 牛血清アルブミンはシグマ社特級試薬, EDTA, 無水塩化銅, その他一般試薬, 抽出溶媒は和光純薬工業製の一般試薬を用いた。

2. 実験方法

褐変度は各抽出溶媒と同一の吸収スペクトル用溶媒で各抽出物を0.2% (w/v)濃度に希釈し, 420 nmの吸光度を測定した。

抗酸化試験は①ロダン鉄法⁹⁾, 即ち, 0.2 Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 10 ml, 1.3%リノール酸-エタノール溶液10 ml, 試料2 mg/ml(ブチルヒドロキシアニソール, トコフェロール(γ -Toc.)は1 mg/ml)を0.2 ml, 蒸留水4.8 ml(コントロールは蒸留水5.0 ml)の全量25 mlの溶液を50 mlの共栓付三角フラスコに入れ, パラフィルムで密栓し, 37°Cの通風恒温器中段に放置し, 劣化を促進させ, 経日的にロダン鉄法⁹⁾で測定した。②DPPH

ラジカル法¹⁰⁾, 0.1 M酢酸緩衝液(pH 5.5) 2 ml, 試料を0.1%添加したエタノール溶液2 ml, 0.5 mM DPPHラジカル-エタノール溶液1 mlを加えて全量を5 mlとし, 30分間, 室温に放置した。反応により減少したDPPHラジカル量を517 nm吸光度値で測定して, Δ 517 nmとしてラジカル消去能を表示した。③スーパーオキシドラジカルの消去能にはNBT法¹¹⁾を用いた。即ち, 各区分0.2% (w/v)溶液0.1 mlを反応液(0.05 M炭酸水素ナトリウム緩衝液pH 10.2, 2.4 ml, 0.75 M NBT, 3.0 mM キサンチン, 3.0 mM EDTA, 0.15% (w/v), 牛血清アルブミン各0.1 ml)に加えて全量を3 mlとし, 25°C, 10分予熱後, キサンチンオキシダーゼ(1 mg/5 ml溶液)0.1 mlを加えて反応を開始し, 20分後, 6 mM塩化銅0.1 ml加えて反応を停止し, O.D. 560 nmの吸光度を測定し, 対照(褐変成分無添加)のO.D.値の50%以上の抑制を活性基準とした。④リノール酸の酸化により生じる細胞毒性の高い4-ヒドロキシ2-ノネナール(HNE)の生成抑制作用は内田らの開発したELISA法¹²⁾を用いた。各区分をリノール酸に0.5%添加し(コントロールはエタノールを添加), 60°C, 8日酸化促進後のHNE生成量を測定した。ヌンク製マイクロプレートウエルにHNE結合タンパク質(1.0 mg/mlグリセロアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GADPH))を100 μ lずつ分注し, 4°Cで1昼夜放置後, 0.5% Tween 20を含む1 M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸溶液(pH 7.5)で3回洗浄し, 試料を100 μ lずつ分注し, 37°C, 2時間反応させた。その後HNE結合タンパク質を認識する一次抗体を結合し, 一次抗体を認識するペルオキシダーゼ標識二次抗体を加え, 過酸化水素と基質 α -フェニレンジアミンを添加し, 15分反応させた後, 2 N硫酸で反応を停止させた。東ソーMPR-A 4 iマイクロプレートリーダーを用いて, 492 nmの吸光度を測定した。定量には5段階濃度のHNEの検量線を測定日毎に作成し, 算出した。ロダン鉄法, DPPH法, NBT法は3回測定したものの平均値であり, HNEのELISA法は各試料5回の平均値である。

実験結果および考察

1. 炒りアーモンド, ゴマの各溶媒抽出区分量および褐変度

アーモンド, ゴマ試料15 gを各溶媒で非極性溶媒から順次抽出した。各抽出物量の割合をTable 1に示した。最も多かったのはヘキサン可溶成分, 即ち, 脂質がアーモンドで約57%, ゴマで約53%あり, 残渣を除い

Table 1 Content of extracts from roasted sliced almond and sesame seed (%)

(A) Sliced almond

Solvent*	Unroasted seed	Roasting temp. (°C)		
		155	170	185
Hexane	56.33	56.80	56.47	57.00
H : EtOAc	2.70	3.25	1.07	2.65
EtOAc	0.42	0.53	0.40	0.59
EtOAc : MeOH	0.85	0.61	0.42	0.63
MeOH	3.47	3.13	1.98	1.21
MeOH : H ₂ O	3.59	3.40	3.25	3.45
H ₂ O	3.51	4.14	1.92	1.37
Residue	28.33	23.32	28.60	25.33

(B) Sesame seed

Solvent*	Unroasted seed	Roasting temp. (°C)		
		170	185	200
Hexane	52.67	53.11	53.29	53.39
H : EtOAc	4.23	3.54	3.11	3.26
EtOAc	0.56	0.52	0.58	0.66
EtOAc : MeOH	0.74	0.74	1.29	1.27
MeOH	2.34	2.02	1.13	2.21
MeOH : H ₂ O	1.31	2.01	2.36	3.40
H ₂ O	1.12	0.81	1.51	1.41
Residue	35.62	32.91	31.20	25.59

* H : EtOAc, EtOAc : MeOH, 7 : 3, MeOH : H₂O 1 : 1, H : hexane, EtOAc : ethyl acetate, MeOH : methanol

て、わずかに極性のあるヘキサン・酢酸エチル区分と極性の高いメタノールや水で抽出される成分がアーモンド、ゴマとも比較的多かったが、加熱温度による抽出成分の顕著な変化は認められなかった。一方、加熱温度が高くなるほど、特に、酢酸エチル-メタノール区分、およびメタノール区分は肉眼的に著しく着色していたので、褐変度を 420 nm の吸光度として測定した。その結果、Fig. 1 に示すように、酢酸エチル-メタノール、メタノール区分とも加熱温度が高くなるほど、褐変度が高くなっているが、アーモンドもゴマ種子も酢酸エチル-メタノール区分の方が顕著であった。つまり、種子の炒り過程での成分間反応により生成する褐変成分は酢酸エチル-メタノール (7 : 3) やメタノールに可溶性成分であることが示唆された。これまで研究されたモデルメラノイジンは比較的水溶性の高い、非透析性高分子区分を対象

としている報告が多い、今回の種実類加熱により生成した褐変成分の分子量は不明であるが、極性から推測するとその化学的構造はモデルメラノイジンとはかなり異なるものと考えられる。

2. 酢酸エチル : メタノール、メタノール褐変区分の活性酸素消去作用

種実類の加熱時に生じる酢酸エチル-メタノール、メタノール可溶の褐変区分について、抗酸化作用および生体内ラジカル消去作用について検討した。

水-エタノール系でのリノール酸に対する過酸化脂質生成抑制作用をロダン鉄法で測定し、その結果を Fig. 2 に示した。アーモンドもゴマも加熱温度が高くなるほど過酸化脂質生成を抑制していたが、アーモンドの 155, 185°C, ゴマの 170, 185, 200°C 焙煎ではメタノール、酢酸エチル-メタノール区分とも同程度の抗酸化活性を示した。加熱温度が高いほど褐変度と抗酸化性が高くなっていて、加熱により生じた褐変成分が抗酸化性に深く関わっているものと推定されるが、酢酸エチル-メタノール、メタノール区分における褐変度の差はロダン鉄法の抗酸化性にはみられなかった。抗酸化活性の特に高かったのは高温焙煎ゴマの酢酸エチル-メタノール、メタノール区分であり、 α -トコフェロールや BHA の約 1/2 程度に匹敵するほどの活性を示した。高温焙煎時 (アーモンド 185°C, ゴマ 200°C) の酢酸エチル-メタノール区分、メタノール区分の抗酸化性にトコフェロールが関与しているか否かについて、HPLC (カラム ; Nomura Chemicals Develosil ODS, 溶離液メタノール, 検出 ; 295 nm) で調べた。しかし、トコフェロールはアーモンド、ゴマの両区分とも検出されなかった。従って、酢酸エチル-メタノール、メタノール区分の高い抗酸化性は焙煎時に生成する成分である可能性が高い。アーモンド未加熱種子メタノール区分の強い活性は、加熱により抗酸化活性が低下していることから、種子そのものに含まれていた熱に弱い抗酸化成分が関与していたと思われる。

生体内での脂質過酸化により生じるラジカルのモデルである DPPH ラジカルを用いて、抗酸化活性の高かった酢酸エチル-メタノール区分、メタノール区分のラジカル消去作用を調べた。エタノールで可溶化した褐変区分に DPPH ラジカル-エタノール溶液を添加し、30 分後の吸光度を測定し、最初の吸光度との差を $\Delta 517$ nm として、y 軸に示した。その結果、Fig. 3 に示すように、アーモンドもゴマも加熱温度が高くなるほど、吸光度差、即ち、ラジカル消去作用が高くなり、特に酢酸エチ

Fig. 1 Browning level in ethyl acetate-methanol (E-M) and methanol (M) extracts from roasted sliced almonds and sesame seeds

▨, E-M ; ■, M

Each extract was prepared to 0.2% (w/v) solution.

Fig. 2 Antioxidative activity in ethyl acetate-methanol (E-M) and methanol (M) extracts from roasted sliced almonds and sesame seeds measured by thiocyanate method

▨, E-M ; ■, M

The incubation time of reaction medium is for 10 days at 37°C.

The extracts : 0.4 mg/25 ml reaction medium

γ-Tocopherol and BHA : 0.2 mg/25 ml reaction medium

The test was run in triplicate and averaged.

ル-メタノール区分が顕著にラジカルを消去しており、Fig. 1 の褐変度や Fig. 2 の過酸化脂質生成量の結果と類似の傾向を示した。

Table 2 にはキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によりスーパーオキシドを発生させ、その抑制作用をNBT法で調べた結果をまとめた。コントロールに比べて50%以上のラジカル消去能を有するのは、アーモンド185°Cのメタノール区分、ゴマ185°C、200°Cの酢酸エ

チル-メタノール区分であり、特にゴマ200°Cの酢酸エチル-メタノール区分で、著しくスーパーオキシドラジカルを消去していた。

Fig. 4 は生体内において脂質の酸化により2次的に生ずる細胞毒性の高い4-ヒドロキシノネナール(HNE)の生成抑制作用について、HNEを特異的に定量するELISA法を用いて、調べた結果である。リノール酸のみのコントロールに比べて、アーモンド、ゴマともHNE

Fig. 3 DPPH radical scavenging effect of ethyl acetate-methanol (E-M) and methanol (M) extracts from roasted sliced almonds and sesame seeds

▨, E-M; ■, M

The test was run in triplicate and averaged.

Table 2 Superoxide radical scavenging effect of ethyl acetate-methanol (E-M) and methanol (M) extracts from roasted sliced almond and sesame seed by NBT (% of inhibition)

	Almond		Sesame seed	
	E-M	M	E-M	M
Unroast	37.50	44.45	39.58	15.28
155°C	33.33	38.89	—	—
170°C	34.72	47.22	40.28	35.47
185°C	38.88	58.33	50.00	51.39
200°C	—	—	75.00	62.50

E-M : ethyl acetate-methanol (7 : 3), M : methanol

の生成量が少なく、加熱温度が高いほど HNE の生成が抑制されていたが、特に、ゴマ 185°C、200°C 加熱の酢酸エチル-メタノール区分の HNE 生成抑制作用が顕著であった。著者らは既に、焙煎ゴマ油に高い HNE 生成抑制作用を認め、その要因として既知抗酸化物質であるγ-トコフェロールやセサモール、シネルギスト的作用を持つセサミンや抗酸化前駆体であるセサモリンを含まず、褐変度の高い酢酸エチルやメタノール抽出区分であることを報告した¹³⁾が、本実験の焙煎時に生じる酢酸エチル-メタノール区分の成分と同一の成分ではないかと推定し、現在、検討を進めている。

以上、アーモンド、ゴマとも焙煎により生じる、特に着色している酢酸エチル-メタノール抽出区分、メタ

ノール抽出区分に、抗酸化試験やラジカル消去試験において、強い活性が認められた。なかでも、DPPH ラジカル消去能と HNE 生成抑制作用は加熱温度が高いほど、また、メタノール区分より酢酸エチル-メタノール区分の方が特に高い活性を示した。これらの活性の傾向は褐変度の強さ、すなわち、着色度と同様の傾向を示していることから、アーモンド、ゴマに共通する焙煎により生成する褐変成分ではないかと推定される。しかし、今回の実験で用いたどの活性測定法でもアーモンドに比べてゴマの方が高い活性を示した。アーモンドとゴマの酢酸エチル-メタノール区分にはトコフェロールが検出されなかったことから、ゴマの高い抗酸化活性はゴマ特有のリグナン系抗酸化成分等の影響も考えられるが、これに関しては今後の課題である。

要 約

スライスアーモンドとゴマ種子の焙煎条件（温度と時間）が抗酸化性に及ぼす影響について 4 種の抗酸化試験を用いて評価し、以下の結果をえた。

(1) 白洗いゴマ、スライスアーモンドの加熱温度はゴマは 170°C、185°C、200°C、アーモンドは 155°C、170°C、185°C（各加熱温度±1°C）で、時間は 30 分とした。これら 2 種の試料を 6 種の溶媒条件（ヘキサン、ヘキサン-酢酸エチル 7 : 3、酢酸エチル、酢酸エチル-メタノール 7 : 3、メタノール、水）で非極性溶媒から順次抽出した。アーモンド、ゴマ種子とも焙煎温度による 6 種の溶媒抽出量に大きな差は認められなかった。

(2) 酢酸エチル-メタノール、メタノール抽出区分は

Fig. 4 HNE inhibitory effect of ethyl acetate-methanol (E-M) and methanol (M) extracts from roasted sliced almonds and sesame seeds by ELISA after incubation of 8 days at 60°C

■, E-M ; ■, M

The test was run in triplicate and averaged.

The details are shown in the method.

両試料とも、著しく着色していた。この着色度を 420 nm の吸光度で測定した結果、どちらの試料も加熱温度が高くなるほど、着色度も高くなった。

(3) 着色度の高かった酢酸エチル-メタノール、メタノール区分について抗酸化性を調べた結果、ロダン鉄法では両試料とも、焙煎温度が高くなるほど、リノール酸からの過酸化脂質生成を抑制していた。特に、200°C 焙煎ゴマ種子の抽出物の活性は約 1/2 量の BHA に相当する活性を示した。DPPH ラジカル消去能では、同様に両試料とも焙煎温度が高くなるほど消去能が高く、酢酸エチル-メタノール区分が顕著に消去していた。スーパーオキシドラジカルの消去能でも両試料とも高温焙煎で高く、ゴマの酢酸エチル-メタノール区分の消去率は 200°C 焙煎で、75.00% であった。リノール酸から生じる細胞毒性の高い HNE の生成抑制作用ではリノール酸のみが 1450 nmol/ml に比べ、ゴマの 185°C、200°C 焙煎の酢酸エチル-メタノール区分はそれぞれ 300 nmol/ml、250 nmol/ml であり、著しく HNE 生成を抑制していた。

文 献

- 1) BAYNES, J.W. and MONNIER, V.M. : The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition. (Alan R. Liss. New York) p 1 (1989).
- 2) 早瀬文孝 : 化学と生物, **31**, 592 (1993).

- 3) RAVANDI, A., KUKASIS, A., MARAI, L., MYHER, J., STEINER, G. G., LEWISA, G. and KAMIDO, H. : *FEBS Letters*, **381**, 77 (1996).
- 4) 早瀬文孝 : 農化, **61**, 970 (1987).
- 5) HAYASE, F. and KATO, H. : *Comm. Agric. Food Chem.*, **3** 111 (1994).
- 6) 小泉幸道・福田靖子・並木満夫 : 食科工, **43**, 689 (1996).
- 7) 福田靖子・小泉幸道・井藤龍平・並木満夫 : 食科工, **43**, 1271 (1996).
- 8) NIENABER, U. and EICHNER, K. : *Fat Sci. Technol.*, **97**, 435 (1995).
- 9) 満田久輝・安本教伝・岩見公和 : 栄養と食糧, **19**, 210 (1966).
- 10) BERSUDER, P., HOLE, M. and SMITH, G. : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 2 (1998).
- 11) HARAGUCHI, H. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 945 (1996).
- 12) TOYOKUNI, S., UCHIDA, K., OKAMOTO, K., HATTORI-NAKAKUKI, Y., HIAI, H. and STADTMAN, E.R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 2616 (1994).
- 13) FUKUDA, T., TOYOKUNI, S. and UCHIDA, K. : Abstracts of 90th AOCS Annual Meeting & Expo, *INFORM 10* S 109 (1999).

(平成 11 年 4 月 12 日受付, 平成 11 年 8 月 6 日受理)