有色米の抗酸化活性とポリフェノール成分の 品種間差異

猪谷富雄, 建本秀樹*, 岡本実剛,
藤井一範, 武藤徳男

A Comparative Study on Antioxidative Activity and Polyphenol Content of Colored Kernel Rice

Tomio Itani, Hideki Tatemoto*, Mitsuyoshi Okamoto,
Kazunori Fujii and Norio Muto

*School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University,
562 Nanatsuka, Shobara, Hiroshima 727-0023*

Six rice cultivars (two red rice, two purple-black rice and two white rice) were compared for their antioxidative activities and differential distribution of active substances. Ethanol extracts prepared from red and purple-black hulled rice exhibited remarkably high superoxide anion- and radical-scavenging activities compared with those from white hulled rice. In addition, these activities were localized mostly in pericarp and testa, namely, rice bran. Colored rice contained polyphenols much more abundantly than white rice and their contents were mutually related to their antioxidative potencies. Spectrophotometric analyses showed that the major active substances in red rice and purple-black rice were tannin pigments and anthocyanin pigments, respectively.

(Received Oct. 5, 2001 ; Accepted Apr. 24, 2002)

動脈硬化, 糖尿病, 脳卒中, 癌などの各種疾患や老化に活性酸素やフリーラジカルが関与することが明らかになり, これらを消去する抗酸化物質に疾患予防・老化抑制作用が期待されている¹⁾。食品には栄養面, 嗜好面以外に生理的リズムの変調を調整し, 病気の発症を予防する機能面での働きがあることが認識されており²⁾, この抗酸化活性を有する多様な食品が注目されている³⁾⁴⁾。赤ワインのポリフェノール, 緑茶のカテキン, トマトのリコペンなどとともに, 米についてもフィチン酸, トコ-

ル類, フェルラ酸類が疾患予防・治療効果を有することが報告されている^{5)~9)}。

有色米とは玄米の果・種皮に色素を含有する米であり, タンニン系赤色色素を有する赤米, アントシアニン系色素を有する紫黒米, クロロフィルを有する緑米などがある¹⁰⁾¹¹⁾。これら有色米は普通米(白米)より長期の貯蔵における発芽力劣化に対して抵抗性を示すことが報告されており¹²⁾, この作用本体の一つとして色素成分シアニジン-3-O- β -D-グルコシドが同定されている。さらに, この色素成分を始めとする有色米のフェノール成分の抗酸化活性は疾患の予防において極めて有望であることも示唆されている¹³⁾¹⁴⁾。このことから有色米の有する抗酸化活性を系統的に, かつ生化学的に解析することは, これら有色米の有用性の評価ならびに新たな利用法の開発において有意義なことと考えられる。本実験では, 異なる有色米の抗酸化活性の品種間差異を解析し, その玄米内分布特性や含量からポリフェノール色素との関連を明らかにする。

1. 実験方法

(1) 水稻試料

本実験では, 赤米品種として「ベニロマン」と「総社赤米」, 紫黒米品種として「朝紫」と「中国黒米」, 白米品種として「コシヒカリ」と「中生新千本」の計6品種を使用した¹⁰⁾。いずれの水稻とも広島県立大学緑農地管理センター水田で1997年, 1999年に栽培, 収穫した後, 粃のまま冷蔵(4℃)貯蔵し, 2000年12月から2001年2月に粃摺りを行い, その玄米を供試した。それぞれの品種について玄米と精白米部(精白歩留り90%)はミルで1分間粉碎し, 糠層を含めた3種の粉末をさらにふるい(500 μ m)にかけて微粉末標品とした。それぞれの標品1.0gをバイアル瓶に秤量し, 80%エタノール3.0mlを加えて, 振盪機を用いて150rpmで1時間抽出した後, その懸濁液を遠心分離(10000 $\times$ g, 10分)し, 得られた上澄みを測定試料とした。なお, 試料調製および分析にはすべて市販の特級品試薬を用いた。

(2) 抗酸化活性の測定

抗酸化活性は, いずれの試料についても分子状酸素から最初に発生する活性酸素であるスーパーオキシドアニオンを消去する活性酸素消去活性とエタノール溶液中で安定なフリーラジカルを消去するラジカル消去活性を測定した。前者では亜硝酸法¹⁵⁾に従い, 反応液(0.5ml)中に添加した試料0.8 μ l~0.05ml(80%エタノールを加え

広島県立大学生物資源学部(〒727-0023 広島県庄原市七塚町562番地)

* (現)琉球大学農学部(〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1番地)

Table 1 Antioxidative activities of the ethanol extracts from hulled rice of six cultivars cultivated in 1999

Rice	EC ₅₀ value (μ l/assay tube)	
	Superoxide-scavenging activity	Radical-scavenging activity
Koshihikari	50.50 $\pm$ 4.11 ^a	22.00 $\pm$ 0.78 ^a
Nakateshinsenbon	46.17 $\pm$ 5.01 ^a	22.50 $\pm$ 0.50 ^a
Soja-Akamai	0.73 $\pm$ 0.11 ^b	1.08 $\pm$ 0.04 ^b
Beniroman	2.41 $\pm$ 0.06 ^{bc}	1.90 $\pm$ 0.07 ^c
Asamurasaki	2.29 $\pm$ 0.25 ^{bc}	2.21 $\pm$ 0.02 ^c
Chugoku-Kuromai	6.22 $\pm$ 0.19 ^c	6.51 $\pm$ 0.10 ^d

EC₅₀ values that exhibit 50% scavenging activity were calculated as the added volumes of individual rice extracts in each assay tube. All data are expressed as mean $\pm$ S.D. for three separate experiments and values without a common superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$ evaluated by LSD method.

て 0.05 ml に調整) による吸光度 (550 nm) の変化を測定した。なお、スーパーオキシドアニオン産生にはヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (バターミルク製, 和光純薬) 系を使用した。一方、後者では 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法¹⁶⁾ に準じて, DPPH 溶液 (3.94 mg/100 ml エタノール) 0.98 ml に試料 0.8 μ l $\sim$ 0.02 ml (80% エタノールを加えて 0.02 ml に調整) を添加し, その吸光度 (516 nm) の変化を測定した。いずれの場合とも, 得られた吸光度の減少から消去率 (%) を求め, 50% 消去する試料添加量を EC₅₀ 値 (μ l/assay) として表した。

(3) ポリフェノールの定量と定性分析

総ポリフェノール量は上記の方法で調製した玄米抽出物を用いて, Folin 法 (Folin-Ciocalteu 試薬)¹⁷⁾ に従って定量し, 没食子酸相当量として求めた。また, アントシアニンは糠部 0.2 g を 0.1% 塩酸-メタノール 15 ml で 24 時間浸漬して得られる遠心上清を 0.2 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) で希釈後, 可視部スペクトルを測定し, アントシアニン特有の 520 nm における吸光度から評価した¹⁸⁾。タンニンは玄米抽出物に 2% 塩化第二鉄溶液を添加し, そのスペクトル変化から解析した。

(4) 統計処理

有意差検定は, 最小有意差 (LSD) 法により行い, 危険率 5% 以下を有意とした。

2. 実験結果および考察

(1) 抗酸化活性の品種間差異

1999 年産の 6 品種の玄米抽出物を用いて活性酸素消去率およびラジカル消去率を測定し, それぞれの EC₅₀

値を求めた (Table 1)。いずれの測定法においても赤米および紫黒米は白米より顕著に, かつ有意に高い活性を示し, また有色米 4 品種間では「総社赤米」>「ベニロマン」 $\approx$ 「朝紫」>「中国黒米」の順であった。これら有色米 4 品種の玄米抽出物について得られた 2 つの測定法による消去率をプロットした結果, 活性酸素消去率とラジカル消去率の間には正の相関性 ($r=0.908$) が確認された (Fig. 1)。このことより玄米の有する抗酸化活性の総量はいずれの方法においても正しく評価できることが示唆された。さらにこの品種間差異は 1997 年度産の玄米についても同様のパターンで確認されたことから, それぞれの活性本体は生合成レベルで制御されている比較的稳定な物質であると考えられる。

次に, 1999 年産の 6 品種の玄米, 糠, 精白米抽出物を用いて両評価法での抗酸化活性を測定した。全品種とも糠抽出物の活性は玄米抽出物の活性より高く, 一方精白米抽出物の活性はそれらより著しく低かった。このことから玄米の有する抗酸化活性の大部分は糠部, つまり果・種皮中に局在することが明らかになった。これらの活性成分は外界からの酸化ストレスに対する化学的抗酸化バリアーとして機能すると考えられ, 有色米種子が長期貯蔵における発芽力劣化に抵抗性¹²⁾を示すことを支持する結果である。

(2) ポリフェノール成分の品種間特性

植物ポリフェノール色素は強い抗酸化活性を有することが知られている。有色米品種に強い抗酸化活性が検出されたため, 次に玄米抽出物に含まれる総ポリフェノール含量を定量した (Table 2)。有色米 4 品種はいずれも

Fig. 1 Relationship between the superoxide-scavenging activity and radical-scavenging activity of colored hulled rice cultivated in 1999

Table 2 Determination of polyphenol contents in the ethanol extracts from hulled rice of six cultivars cultivated in 1999

Rice	Polyphenol content (mg gallic acid/g powder)
Koshihikari	0.935±0.116 ^a
Nakateshinsenbon	1.003±0.151 ^a
Soja-Akamai	7.540±0.643 ^b
Beniroman	6.044±0.577 ^c
Asamurasaki	6.501±0.974 ^b
Chugoku-Kuromai	2.401±0.242 ^d

Polyphenol content was determined using Folin-Ciocalteu reagent and expressed as gallic acid equivalent (mg) per g of hulled rice powder. All data represent mean±S.D. for three separate determinations and values without a common superscript in the same column are significantly different at $p < 0.05$ evaluated by LSD method.

白米に比べて有意に高いポリフェノール含量を示し、特に「総社赤米」、「朝紫」、「ベニロマン」は白米2品種の6倍以上の高値を示した。この総ポリフェノール含量の差はそれぞれの抗酸化活性をよく反映しており、玄米においてもポリフェノールが主要な活性本体であることが推察された。

そこで、有色米の含有するポリフェノール成分についてその分光学的特性を調べた。糠抽出物を酸性下に希釈し、可視部吸収スペクトルを測定すると、「朝紫」および「中国黒米」においてのみそれぞれ 517, 520 nm に吸収極

大を呈し、アントシアニン特有のスペクトル¹¹⁾を呈した。さらに、それぞれの波長における吸光度からアントシアニン含量は「朝紫」が「中国黒米」の2倍以上高く、この結果は総ポリフェノール含量 (Table 2) のみならず抗酸化活性 (Table 1) とほぼ一致した。一方、赤米および白米抽出物には 520 nm 付近の吸収ピークは検出されず、アントシアニンの存在は分光学的には検出されなかった。

次に、玄米抽出物を用いて第二鉄塩反応を行い、色調変化を調べた。その結果、赤米2品種は顕著なスペクトル変化を示し、新たに 460 nm 付近のブロードな吸収ピークを生じ、タンニンの存在が確認された。一方、紫黒米および白米抽出物ではスペクトル変化は生じなかった。

これらの結果から、紫黒米品種である「朝紫」と「中国黒米」のみがアントシアニン系色素を含有し、タンニン系ポリフェノールを殆ど含有しないこと、逆に赤米品種である「ベニロマン」と「総社赤米」はタンニン系ポリフェノールを豊富に含むがアントシアニン系色素を殆ど含有しないことが明らかになった。このことはこれまでに報告されていること¹¹⁾¹⁹⁾を支持する結果であり、抗酸化活性成分の特定にむけての新たな知見である。有色米のアントシアニン系色素については一部 HPLC 分析の報告²⁰⁾があるため、これら有色米4品種の含有するポリフェノールの化学的組成についても早急に分析する必要がある。今後は有色米に含まれる新たな活性成分を分離同定するとともに、これら活性成分を多様に含有する有色米の特質を生かした利用法の開発、さらには廃棄される糠の利用や加工法の開発などを検討する予定である。

要 約

有色米および白米6品種の抗酸化活性を、スーパーオキシドアニオン消去およびDPPHラジカル消去の評価系を用いて測定し、それらに含まれるポリフェノール色素の局在性や化学的性状を解析した。

(1) 赤米(「ベニコマン」,「総社赤米」), 紫黒米(「朝紫」,「中国黒米」)および白米(「コシヒカリ」,「中生新千本」)の計6品種のうち、玄米の有する抗酸化活性はいずれの方法においても赤米、紫黒米が白米に比べて著しく高かった。

(2) 全品種とも果・種皮,つまり糠層からの抽出物が最も高い抗酸化活性を示し、精白米部からの抽出物には殆ど活性は検出されなかった。このことより活性成分は果・種皮に局在することが示唆された。

(3) 両評価法で求めた抗酸化活性の間には高い相関性($r=0.908$)が確認された。この活性は総ポリフェノール含量をよく反映しており、活性本体はポリフェノールであると考えられた。分光学的解析から、赤米はタンニン系色素を、また紫黒米はアントシアニン系色素を主要なポリフェノールとして含有することが明らかになった。

文 献

- 1) Sies, H., *Oxidative stress*, (Academic Press, London) (1987).
- 2) 荒井総一, 食料科学バイオテクノロジー, 木村光編(培風館, 東京) p. 28 (1989).
- 3) 中谷延二, 蛋白質核酸酵素, **38**, 1766 (1993).
- 4) Minamiyama, Y., Yoshikawa, T., Tanigawa, T., Takahashi, S., Naito, Y., Ichikawa, H. and Kondo, M., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 467 (1994).
- 5) Graf, E., *J. Biol. Chem.*, **262**, 11647 (1987).
- 6) Jariwalla, R.J., *Drugs Exp. Clin. Res.*, **27**, 17 (2001).
- 7) Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, M. and Arai, K., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2313 (2000).
- 8) Qureshi, A.A., Mo, H., Packer, L. and Peterson, D.M., *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3130 (2000).
- 9) Xu, Z., Hua, N. and Godber, J.S., *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2077 (2001).
- 10) 猪谷富雄, 赤米・紫黒米・香り米―「古代米」の品種・栽培・加工・利用―, 農文協(2000).
- 11) 前川雅彦, 喜多富美治, 北海道大学農学部農場研究報告, **23**, 11 (1983).
- 12) Ramaratnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Tashiro, T., *J. Sci. Food Agric.*, **37**, 719 (1986).
- 13) Osawa, T., *Anticancer Res.*, **19**, 3645 (1999).
- 14) Ling, W.H., Cheng, Q.X., Ma, J. and Wang, T., *J. Nutr.*, **131**, 1421 (2001).
- 15) Oyanagui, Y., *Anal. Biochem.*, **42**, 290 (1984).
- 16) Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C., *Lebensm. Wiss. Technol.*, **28**, 25 (1995).
- 17) Singleton, V.L. and Rossi, J.A., *Amer. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144 (1965).
- 18) Harborne, B.J., *Biochem. J.*, **70**, 22 (1958).
- 19) 名和義彦, 大谷敏郎, 食品工業, **35** (11), 28 (1991).
- 20) Terahara, N., Saigusa, N., Ohba, R. and Ueda, S., *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **41**, 519 (1994).

(平成13年10月5日受付, 平成14年4月24日受理)