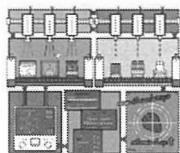


健康・機能性食品素材の開発Ⅱ

ヤマブドウ機能性成分の新規抽出法による
食品素材の開発



長澤孝志／小浜恵子／山下和彦

FEATURES

1. ヤマブドウ果実の特性

ヤマブドウ (*Vitis coignetiae* Pulliat) は、欧米で栽培され、品種改良が重ねられてきたヴィニフェラ種、ラブルスカ種などのブドウとは異なり、日本に自生する日本固有の種である(図1)。その生育地域は北海道から本州にかけてであり、現在のような欧米種が広く栽培される前から食用と

されてきた。ヤマブドウ果実の種子は大きく、皮との分離が困難で生食には向かず、加工食品として利用される。岩手県では以前から果汁やワインなどの特産品が製造されており、生産安定性向上のため、県林業技術センターが収量性に優れた系統を選抜し、「涼実紫(すずみむらさき)」(写真1)として品種登録を行っている。平成16年より苗木の頒布を始め、平成18年度の栽培面積は全国194.7haのうち岩手県が114.7haをしめ、収

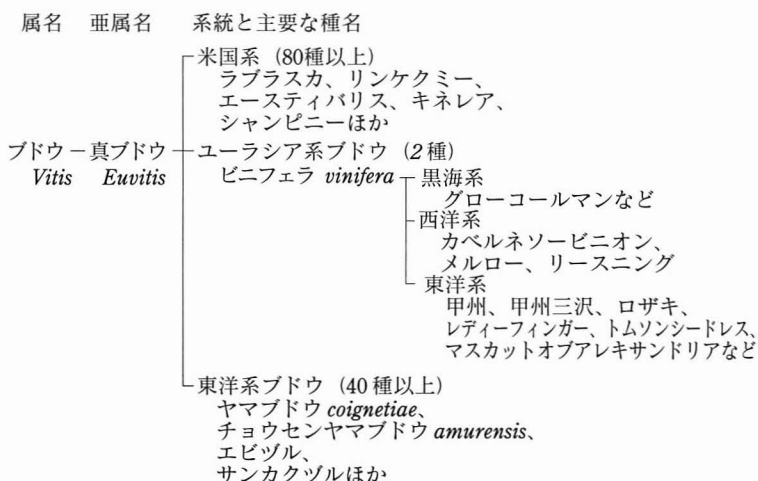
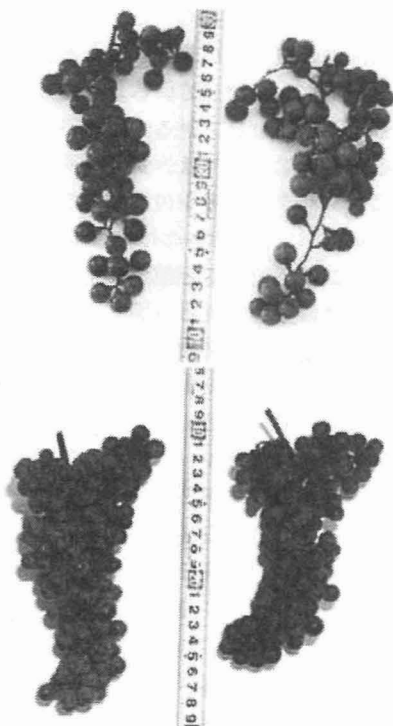


図1 ヤマブドウの分類上の位置

永田、新特産シリーズ「ヤマブドウ」 農文協 より引用

ながさわ たかし 岩手大学農学部応用生物化学課程
こはま けいこ 地方独立行政法人 岩手県工業技術センター食品醸造技術部
やました かずひこ ヤエガキ醸酵技研(株)機能性食品研究開発部



上段：対照品種 下段：涼実紫2号

写真1 新たに選抜されたヤマブドウの品種

穫量は約300tで、最も生産量が多い。

ヤマブドウ果汁中にはキャンベルなどの黒色系ブドウと同様にポリフェノールが豊富(2,071±534mg/l Folin-Denis法による没食子酸換算。平成16年岩手県内産の11品種系統産地別63個体)に含まれている。また、酒石酸1.0g/100ml、リンゴ酸1.4g/100mlで有機酸含有量も高く、キャンベル果汁のそれぞれ3倍および2倍である。主要アントシアニン色素はマルビジン-3,5ジグルコシドで比較的安定性があるといわれている。岩手県内の消費者は、ヤマブドウ果汁は酸っぱいが滋養豊富で、健康志向の特別な飲み物として、贈答用に購入することが多い。主力商品である果汁やワインは物産展などで全国的にも展開してきたが、国内の認知度は未だ低い。岩手県では生産量の増大とともに、新商品として菓子類、地ビール、リキュールなども登場し、地元のパン製造会社がヤマブドウジャムと岩手県産の小麦を使用したパンを大手コンビニエンスストアに展開するなど特

産地としての知名度アップに取り組んでいる。しかしながら全国の消費者に認知していただくには、果実の利用率を上げ、加工品のバリエーションを増やし、健康に良い情報を具体的に発信していくことが不可欠である。

2. ヤマブドウ搾りかすの利用

私たちは、ヤマブドウ果汁の搾汁率が50～60%と低く、生じる搾りかすは廃棄されていることから、かすをポリフェノール素材として活用することを検討している。果汁搾汁後、ヤマブドウ果実全体のうち8割のポリフェノールが粕に残るので、これを抽出、利用する方法を検討した。ヤマブドウ搾りかすは50%の水分を含んでおり、熱水やエタノールでどの程度抽出できるか検討した。80gの搾りかすから70～120℃の熱水およびエタノールで1時間抽出を行い、抽出液を乾燥して得られる重量、Folin-Denis法による総ポリフェノール量、Vanilin-HCl法による総フラバノール量を測定した(表1)。100℃の熱水あるいはエタノールであれば、ポリフェノールとして約5～6%の粉末を得ることが可能であった。100℃抽出液の乾燥粉末5gを溶解し、セファデックスLH20カラムに吸着させた後、70%エタノールおよび60%アセトンで溶出させるとそれぞれ、240mg(ポリフェノール73%)、40mg(ポリフェノール50%)のポリフェノール濃縮粉末が得られ、その構成成分を分析した。プロシアニジンB1、(+)-カテキン、プロシアニジンB2、(-)-エピカテキンが確認され、これらで3割を

表1 搾りかすからのポリフェノール抽出

	取得量 (g)	総ポリフェノール (%)	総フラバノール (%)
(水)			
室温	6.6	4.0	0.8
45℃	6.9	5.1	1.3
70℃	7.0	6.2	1.7
100℃	8.2	6.3	2.8
120℃	10.3	7.7	2.8
(エタノール)			
室温	6.3	5.5	1.9
70℃	6.9	6.3	2.7

占めており、カテキン類モノマーや重合度の低いプロシアニジンが比較的多いという特徴がある。

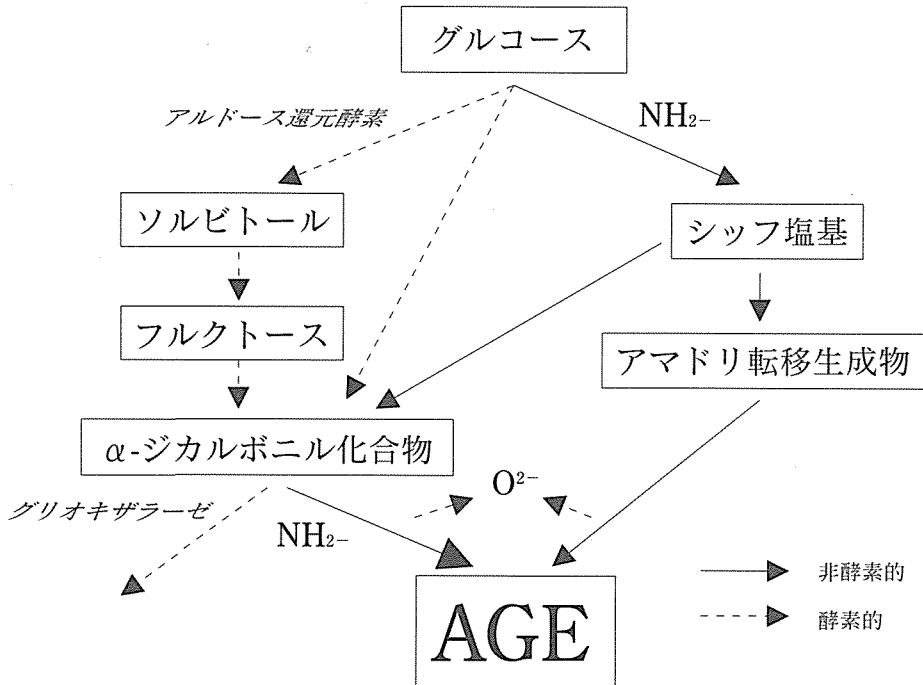
3. グリケーション抑制素材としてのヤマブドウ搾りかす抽出物

ヤマブドウ搾りかすの熱水抽出物はポリフェノールを豊富に含み、強い抗酸化性がDPPHラジカル補足活性やORACから認められたことから、抗酸化食品素材としての可能性が考えられた。生活習慣病には酸化ストレスが関与するものが少なくない。特に糖尿病では高血糖に伴う酸化ストレスが疾病の進展に強く関係すると考えられている。そこで、私たちはヤマブドウ搾りかす抽出物の糖尿病、特にその合併症の抑制に対する効果を検討した。

糖尿病は、糖尿病性網膜症、白内障、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症などの重篤な合併症を惹起し、糖尿病患者の生活の質をさらに低下させる国民的な健康問題となっている。糖尿病により引き起こされる合併症の一因として、糖尿病患者の高

血糖状態下において脂質、核酸、タンパク質がグルコース等の還元糖と非酵素的な縮合反応を起こすことが明らかになっている。この反応は食品化学分野でよく知られているメイラード反応と同じである。医化学分野では、メイラード反応は、酵素的にタンパク質に糖を付加するグリコシルーションと区別してグリケーションと呼ばれる。グリケーションは大概すると前期反応、中期反応および後期反応に分けられる(図2)。

前期段階ではアミノ酸のN末端アミノ基やリジン残基のε-アミノ基の窒素が還元糖のカルボニル基の炭素に求核的に反応してシッフ塩基を形成する。中期段階ではシッフ塩基が不安定な構造であるためグルコシルアミノ化合物からアマドリ転移を起こし、比較的安定した1-デオキシ-2-ケト型の構造を持つアマドリ転位化合物を形成する。アマドリ転位化合物は、酸化・脱水・縮合・開裂などの複雑な反応を経て褐色・蛍光・架橋形成などの物理化学的特徴を有するグリケーション後期段階生成物(advanced glycation endproduct: AGE)へと変化する。後期段階では活性酸素の関与が知



られていることからAGEの生成に伴い生体に酸化ストレスが加わることになり、これが糖尿病の悪化に関係するとも考えられている。また、ポリオール経路による細胞内の糖代謝などからグリオキザール、メチルグリオキザール、3-デオキシグルコソンのグルコースに比較して非常に高い反応性を示す α -ジカルボニル化合物が生成し、グリケーションの惹起物質としてタンパク質のAGE化に深く関与することが近年強い注目を浴びている¹⁾。生体に存在するAGE構造として蛍光性・架橋性を有するペントシジン、クロスリン、グリオキザールリジンダイマー(GOLD)、メチルグリオキザールリジンダイマー(MOLD)、非蛍光性・非架橋性として N^{ϵ} -カルボキシルリジン(CML)、ピラリンなどが知られている。最近、架橋性のAGEは細胞毒性が強いとの報告もある²⁾。

私たちは、これまでポリフェノールを多く含む食品素材の*in vitro*、*in vivo*における抗酸化活性、抗グリケーション作用について明らかにしてきた。ソバに多く含まれるフラボノイドの一種であるルチン(ケルセチン3-O-ルチノシド)の水溶性グルコース誘導体である α -G-ルチンについて、*in vitro*における抗グリケーション作用が従来の代表的な抗グリケーション剤であるアミノグアニジ

ンに匹敵することを示し³⁾、さらにストレプトゾトシン投与によって糖尿病態を誘導したラットに α -G-ルチン添加飼料を与えることで、組織タンパク質のグリケーションおよび酸化修飾が有意に抑制されることを示した⁴⁾。このようにフラボノイドには抗酸化作用だけでなく、抗グリケーション作用を持つことが期待される。ヤマブドウ搾りかす抽出物には他の素材より高濃度のポリフェノールが含まれていることに着目し、グリケーション抑制活性の有無を、糖尿病モデルラットを使って検討した。

5週齢のWistar系雄ラットをストレプトゾトシンの投与により1型糖尿病を誘発させた。この糖尿病ラットにポリフェノールとして0.2%となるようにヤマブドウ搾りかす抽出物を含む20%カゼイン食を1カ月間給与した。対照としては健常ラット、および20%カゼイン食を給与した糖尿病ラットを設けた。糖尿病ラットでは多飲、多尿、体重減少という典型的な糖尿病症状とともに顕著な血糖値の上昇が認められた。ヤマブドウ抽出物の投与は血糖値の上昇を抑制することはできなかったため、本抽出物には糖の吸収阻害やインスリン作用がないことが示唆された。糖尿病ラットでは組織にAGEが蓄積する。そこで、AGEを認識

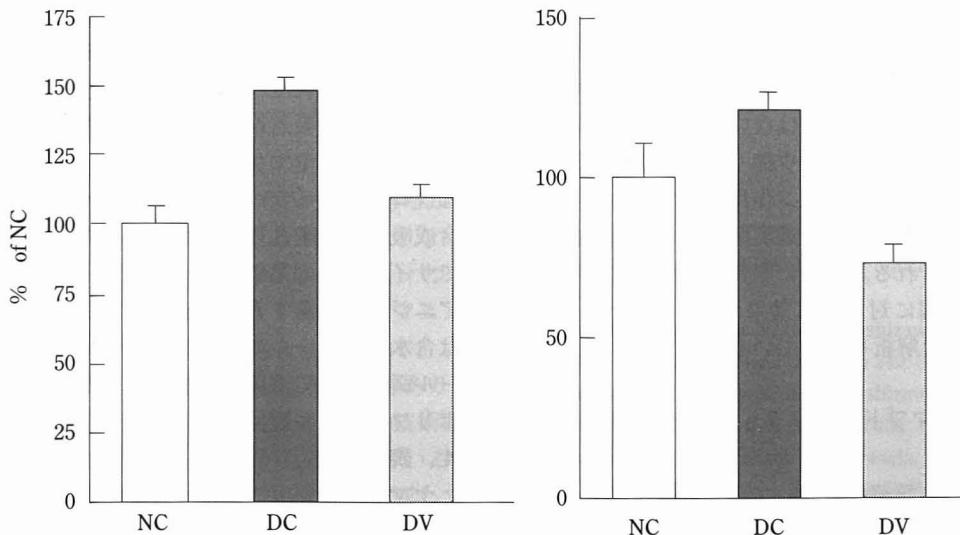


図3 ヤマブドウ搾りかす抽出物添加飼料を摂取した糖尿病ラットの肝臓のAGE
 NC: 健常ラット (20%カゼイン食)、DC: 糖尿病ラット (20%カゼイン食)、
 DV: 糖尿病ラット (ヤマブドウ搾りかす添加食)

する抗AGE抗体を用いたウエスタンブロット法でAGEを検出したところ、糖尿病では腎臓や肝臓のAGEが増加していた。ヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取でこの増加したAGEは健常ラットのレベルまで減少した(図3)。以上の結果は、ヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取が糖尿病の合併症の大きな原因となるAGEの組織への蓄積を抑制することができることを示したものである。

AGEは還元糖からだけではなく非常に反応性の高い α -ジカルボニル化合物からも生成する。 α -ジカルボニル化合物はグルコースからフルクトースを生成するポリオール経路によっても生成する。ポリオール経路は糖尿病において活性化することが知られているのでこの経路によるAGEの生成に対するヤマブドウ搾りかす抽出物の影響を調べた。ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいて、ヤマブドウ搾りかす抽出物の摂取により α -ジカルボニル化合物の一つである3-デオキシグルコソンの血液中の濃度が減少した。さらに、ポリオール経路の律速段階であるアルドース還元酵素の活性も低下する傾向を示した。近年、いくつかのフラボノイドがアルドース還元酵素の活性を阻害することが示されている⁵⁾。ヤマブドウ搾りかす抽出物にもアルドース還元酵素の阻害活性があることが示唆され、この抽出物は単に抗酸化的にグリケーション後期段階を阻害するだけではなく、ポリオール経路などグリケーションの複数の経路を抑制するのではないかと考えられる。

以上より、ヤマブドウ搾りかす抽出物は、抗酸化性、抗グリケーション作用を示すことから糖尿病合併症の発症予防、進展阻止に効果的であることが考えられる。さらに脂質異常症などその他の生活習慣病に対しても効果がある可能性が高く、現在詳細な解析を行っている。

4. ヤマブドウポリフェノールの新規抽出法

ヤエガキ醸酵技研(株)では400種類以上の天然色素の製造販売を行っており、天然素材からポリフェノール類などの有効成分を抽出精製技術に実績をもっている。

ヤマブドウに含まれる特徴的なポリフェノール

はアントシアニン、フラバノールと縮合型タンニンである。分子量も200前後の小さな単分子から数十個が結合して数万の分子量までさまざまなものが存在し、物理的な特性も異なるため抽出条件が重要になってくる。ヤマブドウ果実に含まれるプロアントシアニン類は他の果実類に比べても豊富で特に果皮部分に多く含まれている。色素成分であるアントシアニン類は水への溶解性が持つのに比べ、フラバノールが重合したプロアントシアニンは水への溶解性も低いいため抽出効率を高めるために加熱したアルコールによる抽出が好ましい。一方で加熱温度や抽出時間など抽出効率に寄与する要因は逆にアントシアニンを始めとするポリフェノール類が酸化や重合反応などにより本来の機能が失われる危険性がある。そこでヤマブドウからの抽出は30~60℃の低温で行うことでポリフェノール類へのダメージの少ない条件で行っている。

植物素材からの抽出ではポリフェノール類の他にもタンパク質、糖質などの可溶性成分のほかには脂質、食物繊維などの不溶性成分も一緒に抽出されるため、ポリフェノール類を精製工程が必要となってくる。天然物からの抽出物を精製する場合、通常複数の化合物が混在するため分子量や吸着特性を考慮しながら精製条件を絞り込んでいく。合成吸着剤を用いた精製方法では目的成分を吸着させることで高純度精製に適しており、ポリフェノール類が合成吸着剤に吸着する特性を利用した精製を行った。ヤマブドウポリフェノール類の特徴はプロアントシアニンの重合度の低いことで、合成吸着剤も細孔径の小さいものを使用することでサイズ排除効果により一定品質のプロアントシアニンが吸着する。吸着したポリフェノール類は含水アルコールで溶離させ、高純度ポリフェノール画分として濃縮、乾燥することでヤマブドウポリフェノール製品として製造を確立させた(図4、表2)。

ヤマブドウポリフェノールは加速試験(40℃、湿度75%、4カ月)においても安定な品質を保ち、また120℃、30分間の加熱試験においてもポリフェノール量の変化は見られなかった。

ヤマブドウポリフェノールは健康食品として打

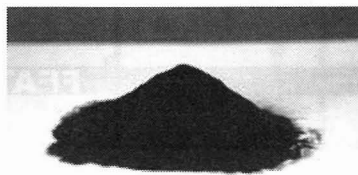


図4 ヤマブドウポリフェノールの製法

表2 ヤマブドウポリフェノール「エヴィノール」の製品規格

試験項目	規格値	分析方法
性状	赤紫～紫色粉末	目視
ポリフェノール	40～42%	Folin - ciocalteu法
乾燥減量	5.0 %以下	食品添加物公定書
強熱残分	1.0 %以下	食品添加物公定書
重金属 (Pbとして)	20ppm以下	食品添加物公定書
ヒ素 (As ₂ O ₃ として)	2ppm以下	食品衛生検査指針 理化学編
一般生菌数	1.0_10 ³ 個以下	食品衛生検査指針 微生物編
カビ、酵母	1.0_10 ² 個以下	食品衛生検査指針 微生物編
大腸菌群	陰性	食品衛生検査指針 微生物編

錠品やカプセルなどの加工はもちろんであるが、チョコレート等の菓子類の風味を損なうことなく添加することができる。このほかにも飲料、パン、乳製品などの用途に応じたヤマブドウポリフェノールの利用についても現在検討を重ねている。

ヤマブドウは日本固有のぶどう科植物であり、最大の生産量をほこる岩手県では先端栽培技術により今後さらに生産量の拡大が見込まれている。岩手県では栽培農家における栽培管理も徹底しており、以降の流通過程の管理および自社工場での加工など国産食品ならではの安心を提供していきたい。

引用文献

- 1) Sima AA, Sugimoto K (1999) Diabetroglia 42: 773-788.
- 2) Van Nguyen C (2006) Mol Nutr Food Res 50: 1140-1149.
- 3) Nagasawa T, Tabata N, Ito Y, Nishizawa N, Aiba Y, Kitts DD (2003) Mol Cell Biochem 249: 3-10.
- 4) Nagasawa T, Tabata N, Ito Y, Nishizawa N, Aiba Y, Kitts DD (2003) Mol Cell Biochem 252: 141-147.
- 5) Yoshikawa M, Murakami T, Ishiwada T, Morikawa T, Kagawa M, Higashi Y, Matsuda H (2002) J Nat Prod. 65: 1151-1155.