

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K00838

研究課題名(和文) 古代エンドウ「ツタンカーメン豆」の調理により生じる着色機構の解明と抗酸化性の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of coloration induced by cooking of the ancient pea "Tutankhamun pea" and evaluation of its antioxidant properties

研究代表者

近藤 美樹 (Kondo, Miki)

徳島文理大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：80326412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エンドウの古代品種であるツタンカーメンエンドウのユニークな特徴を科学的に説明するために、加熱中に生じる着色機構の解明ならびに抗酸化成分の同定およびその評価を行った。着色成分の前駆体は(-)-エピガロカテキンの二量体であり、着色成分はその脱水素反応による酸化化合物であることを明らかにした。また、主要な抗酸化成分として、着色成分の前駆体と同一成分である(-)-エピガロカテキンの二量体を同定した。これらの結果から、当該エンドウの独特な特徴に(-)-エピガロカテキンの二量体が関与することが示された。また、莢の抗酸化成分として4種類のアントシアニンを同定し、酸化モデル動物において生体抗酸化性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで現象のみが捉えられていたツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色反応のメカニズムを提示した。着色や抗酸化活性には共通して(-)-エピガロカテキンの二量体が関与しており、当該成分が当該エンドウのユニークな特徴を与えていることが明らかになった。また、食生活において抗酸化活性を効果的に活用するためには水溶性の抗酸化成分の損失を避ける調理方法が重要であり、加工食品の製造にも応用可能な情報を提供した。さらに、約5割の廃棄部に相当する莢に含まれる抗酸化成分の同定とその生体抗酸化性の立証は、未利用資源である莢を機能性食品素材等として活用する上で科学的基盤として役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The immature Tutankhamun pea (*Pisum sativum* L.) have the unique characteristic of changing from green to reddish brown upon heating and are known to have higher antioxidant activity than normal varieties. In this study, the coloring mechanism was elucidated and antioxidant components in the pea were identified. It was suggested that the precursor of the coloring component produced by heating is a dimer of (-)-epigallocatechin, and the coloring component is a dehydrogenated product of this dimer. Furthermore, the dimer of (-)-epigallocatechin, the precursor of the colored component, was identified as the major antioxidant compound. These results demonstrated that (-)-epigallocatechin dimers are responsible for the unique characteristics of Tutankhamun peas. In addition, four anthocyanins were identified as antioxidant components of the capsules, and their antioxidant properties of the capsules were demonstrated in a mouse model of oxidative stress.

研究分野：調理科学、食品化学

キーワード：ツタンカーメンエンドウ 着色反応 抗酸化活性 エピガロカテキンの二量体 調理 莢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紫黒米などの古代米に代表されるように、古代品種は一般品種と比べて、低温や害虫への耐性のためにポリフェノール類を高濃度に蓄積しており、ヒトに対しても様々な生理作用を示す。従って、医療費が増大する現代において、古代品種の利用は、健康の維持・増進のために利点が大きいと考えられる。

エンドウ(*Pisum sativum* L.)の古代品種として知られている、通称、ツタンカーメンエンドウは、未熟な豆(実)を食する実エンドウであり、莢は濃紫色を呈し、未熟豆は黄緑色であるが、米と一緒に加熱して保温することで豆が暗赤色に着色するユニークな特徴を有する。色の変化に対する関心は高く、栽培も容易であるため、一部の農家や家庭菜園で栽培され、また、全国的に幼稚園や小学校における食育活動の学習教材として、栽培、収穫、調理の一連の体験に利用されている。古代エンドウの栄養成分は一般品種と差異はなく、いんげん豆に近い(伊藤ら、日本食品科学工学会誌, 2007)。しかし、調理中の着色機構は不明である(KAKEN 研究課題番号 14780070, 2002~2003, 実績報告書)。そのため、着色源や着色成分を同定し、科学的根拠に基づいた着色機構に関する情報を提供する必要がある。

また、当該エンドウの機能として、*in vitro* において抗酸化活性が報告されているが抗酸化成分は未同定であり(磯部由香, 伊藤 知子. 家政学研究, 2008)、調理による抗酸化活性の変化に関する情報も乏しい。

一方、収穫されたエンドウは、実と廃棄される莢がほぼ同割合であるが、莢は生理活性物質として知られているアントシアニンを含み、デルフィニジン 3-キシロシルガラクトシド-5 アセチルグルコシドおよびその脱アセチル化誘導体として同定され、*in vitro* の抗酸化性が報告されている(Terahara N. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000)。そのため、一般品種であるウスイエンドウの莢よりも優れた機能が期待される。しかし、当該エンドウの莢の機能性に関する報告は少なく、生体に及ぼす影響は不明である。

以上のように、ツタンカーメンエンドウは一般品種と比較してユニークかつ生理機能の面でも優れた食品であると考えられる。しかし、利活用のためには不明点が多いため、その解明が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、ツタンカーメンエンドウの抗酸化性に着目した生体調節機能ならびに加熱中に生じる着色反応を明らかにすることを目的とした。まず、ツタンカーメンエンドウの実に含まれる抗酸化成分を同定する。次いで、食生活における食形態を想定し、各種調理による抗酸化活性ならびに抗酸化成分の変化を解析する。また、加熱中に生じる着色反応を理解するために着色源および着色成分を同定し、着色機構を解明する。さらに、莢の生体抗酸化性の解析を通して、一般品種に対する優位性を明確にすることで付加価値化を図り、廃棄物の未利用資源としての活用の可能性を探ることとした。

3. 研究の方法

(1) ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の同定および加熱調理による抗酸化性の挙動解析

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)ラジカル消去活性を指標にツタンカーメンエンドウを部位別にアセトン/蒸留水/エタノール(70 : 29.5 : 0.5 by vol.)混合溶媒(AWA 溶液)を用いて抽出物を調製し、活性を測定した。次いで、高い活性を示した部位の抽出物に含まれる微量の活性成分を前処理カラムによって濃縮後、DPPH ラジカル消去活性を指標に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)において単離した。最終的に、タンデム四重極型質量分析計に供し、抗酸化成分を同定した。

(2) ツタンカーメンエンドウの加熱調理による抗酸化性の挙動解析

エンドウの実を各種方法(煮る、煮含める、茹でる、蒸す、電子レンジ加熱、オープン加熱)で調理し、凍結乾燥・粉碎後にAWA 溶液を用いて抽出物を調製し、それらのDPPH ラジカル消去活性およびポリフェノール量を測定した。さらに、HPLC により抗酸化成分の調理による挙動解析を行った。

(3) ツタンカーメンエンドウの加熱調理による着色機構の解明

着色源を検索・同定するために、抽出物のHPLCにおける分画と得られた画分の加熱を繰り返して着色源を追跡・単離し、質量分析に供した。さらに、各種フラバン間の開裂反応を利用してエピマー構造を決定した。次いで、単離した着色源を水溶液中で加熱して着色を確認後、着色物質を質量分析に供した。また、着色機構を解明するために、先行研究(Hayashi, S. *et al.*, *Food Chemistry*, 2018)を参考に基質を変更して着色源を合成し、酸化モデル実験を行った。

(4) ツタンカーメンエンドウの莢抽出物の抗酸化性の評価および抗酸化成分の同定

凍結乾燥したツタンカーメンエンドウおよびウスイエンドウの莢を粉碎し、AWA 溶液を用いて成分を抽出した。次いで、DPPH ラジカル消去活性を測定し、抗酸化性を評価した。さらに、HPLC による分画物のDPPH ラジカル消去活性を指標に抗酸化成分を単離後、質量分析により同定した。

- (5) ツタンカーメンエンドウの莢抽出物の *in vivo* における生体抗酸化性の評価
 6週齢の雄性ICRマウスに体重1kgあたり4および8gの莢粉末相当量の莢抽出物を1週間連続経口投与し、最終投与の15分後に鉄ニトリロ酢酸を体重1kgあたり鉄5mg相当量になるように腹腔内投与して酸化を誘導した。1時間後に解剖し、血漿のチオバルビツール酸反応物質(TBARS)を測定した。なお、本実験は徳島文理大学動物実験委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の単離・同定

実に含まれる抗酸化成分は皮に存在することを確認した。HPLCによって単離した主要な抗酸化成分は、質量610の成分であることが明らかになった。さらに、そのフラグメントイオンのプロファイルは、ポリフェノールの一種である既報のエピガロカテキンの二量体のプロファイルと一致したことから、当該成分を(エピ)ガロカテキンの二量体と同定した。さらに、三量体を含む合計6種類の抗酸化成分を同定した(表1)。

表1 ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の質量解析

成分	[M-H] ⁻			[M+H] ⁺			推定質量	同定された化合物 【推定】	分子質量
	MS	MS/MS	MS	MS/MS	MS	MS/MS			
1	304.9	219.0, 179.0, 164.9, 136.9, 124.9	306.8	163.0, 139.0	306		306	(-)エピガロカテキン	306.2
2	608.9	483.1, 441.1, 423.1, 305.1, 303.1, 125.0	610.8	443.0, 425.0, 307.0, 305.0, 126.9	610		610	(エピ)ガロカテキンの二量体	610.5
3	912.9	744.8, 727.0, 609.0, 423.2, 305.0, 302.9	914.9	747.1, 610.8, 443.1, 307.1, 305.0	914		914	(エピ)ガロカテキンの三量体	914.7
4	912.8	745.0, 727.0, 608.9, 423.0, 305.1, 302.9, 124.6	914.7	611.1, 442.9, 307.0, 304.8, 126.9	914		914	(エピ)ガロカテキンの三量体	914.7
5	608.1	441.9, 428.9, 422.9, 305.0, 303.0, 124.9	609.6	443.0, 424.5	609		609	【(エピ)ガロカテキンの二量体-H】	609.5
6	760.1	609.0, 423.8, 305.0, 303.0, 125.0	762.0	608.7, 442.1, 305.0, 127.1	761		761	【(エピ)ガロカテキン-ガロイル(エピ)ガロカテキン-H】	762.6

(2) ツタンカーメンエンドウの加熱調理による抗酸化性の挙動解析

ツタンカーメンエンドウの調理後の抗酸化活性は、電子レンジ加熱、煮る(煮含めあり)、オープン加熱、蒸す、煮る(煮含めなし)、茹でるの順に低下し、茹でるではエンドウよりも茹で汁の方が高い活性を示した(図1)。また、ポリフェノール量もDPPHラジカル消去活性と正の相関を示した。抗酸化活性は加熱によって一部低下するが、主な低下の要因は、水溶性である活性成分の水媒体への流出によることが明らかになった。したがって、ツタンカーメンエンドウの抗酸化活性の低下を防いで機能を効果的に利用するためには、電子レンジ加熱、あるいは煮汁などを一緒に摂取できる煮豆(煮含め)やスープ料理が推奨される。

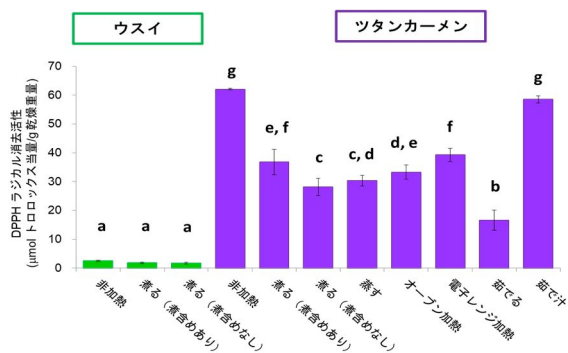


図1 エンドウの調理における抗酸化活性の変化

平均値 ± SD (n=3)

異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05, ANOVA)

(3) ツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色反応の着色源および着色成分の同定とその反応機構

着色源をエピガロカテキンの二量体と同定した。これは、先に同定した主要な抗酸化成分と同じ成分であった。単一の着色源を加熱した着色成分は、着色源よりも長波長側に吸収を示す複数のピークとして検出され、質量分析において着色源であるエピガロカテキンの二量体の質量-2に相当するイオンを与えた。つまり、2分子の脱水素反応生成物、すなわち、酸化物に相当する同一のシグナルを与えたことから、異性体であることが示唆された。また、化学的に合成して得られたエピガロカテキンの二量体を用いた加熱モデル実験においても、その生成物はエンドウ由来の着色成分と同じパターンを示し、質量分析のプロファイルもエンドウ由来の着色成分のものと完全に一致した。これらの結果から、着色反応は脱水素反応によるものであり、着色は複数のエピガロカテキンの二量体の酸化物に起因することが明らかになった。

- (4) ツタンカーメンエンドウの莢抽出物の *in vitro* における抗酸化性の評価および抗酸化成分の同定

ツタンカーメンエンドウの莢の AWA 抽出物はウスイエンドウの莢抽出物に比べて約 7.4 倍高い DPPH ラジカル消去活性を示し、高い抗酸化活性を有することが示された (図 2)。さらに、ツタンカーメンエンドウの莢抽出物から単離した 4 つの抗酸化成分をデルフィニジンおよびシアニジンをアグリコンとするアントシアニンとして同定・定量した。そのうち、主要成分は cyanidin 3-sambubioside-5-acetylglucoside であり、莢における新規成分として cyanidin 3-sambubioside-5-acetylglucoside を検出した。

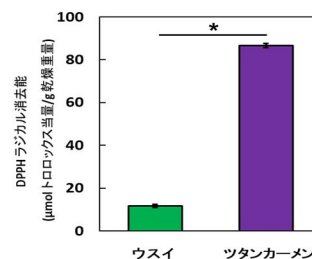


図 2 2種類のエンドウの莢抽出物における抗酸化活性の比較

平均値 ± SD (n=3)

2種類の莢抽出物の抗酸化活性に有意差あり (* $p < 0.001$, Student's t-test)

- (5) ツタンカーメンエンドウの莢抽出物の *in vivo* における抗酸化性の評価

鉄を投与したマウスの血漿 TBARS 値は未投与に対して有意に上昇した。一方、鉄を投与する前にツタンカーメンエンドウの莢抽出物を体重 1 kg あたり莢乾燥重量として 8 g 相当量を経口投与した群では、血漿 TBARS 値の上昇が有意に抑制された (図 3)。その効果は、ウスイエンドウの莢抽出物では認められなかった。これらの結果は、ツタンカーメンエンドウの莢は生体で抗酸化性を発揮すること、さらに、ウスイエンドウの莢よりも生体抗酸化性の点で優位性が高いことを示している。

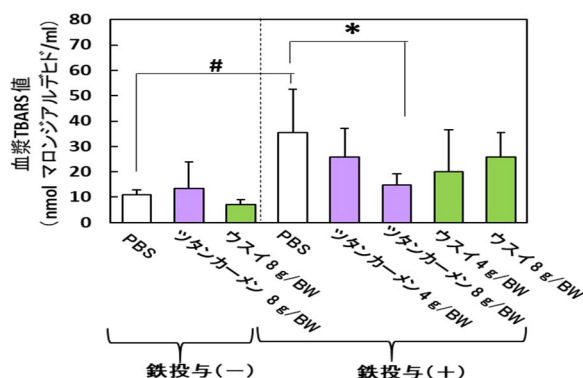


図 3 酸化誘導マウスの血漿 TBARS 値に及ぼす影響

平均値 ± SD (n=6)

鉄投与 (-) 群と、鉄投与 (+) 群間に有意差あり (# $p < 0.05$, Student's t-test)

PBS 投与の対照群とツタンカーメンエンドウ 8 g/BW 投与群間に有意差あり

(* $p < 0.05$, Student's t-test)

- (6) ツタンカーメンエンドウの特徴の発現に関する成分

ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分

分と加熱中に生じる着色反応の原因物質である着色源は同一成分のエピガロカテキンの 2 量体であった。従って、当該成分はツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色や一般品種よりも高い抗酸化活性を有する特徴の発現に関するキー成分であることが明らかになった。さらに、廃棄部である莢の機能性にはアントシアニンが関与しており、機能性食品素材として未利用資源の有効活用につながる情報を提供した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miki Hiemori-Kondo, Yuuki Maekawa, and Honoka Uehara	4. 巻 1
2. 論文標題 Identification of the antioxidant compounds in Pisum sativum L. with purple pods and the effect of various cooking methods on their activities.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Food Science & Technology	6. 最初と最後の頁 2041-2052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsfoodscitech.1c00221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiemori-Kondo Miki, Morikawa Etsuko, Fujikura Michiko, Nagayasu Ayuko, Maekawa Yuuki	4. 巻 94
2. 論文標題 Inhibitory effects of cyanidin-3-O-glucoside in black soybean hull extract on RBL-2H3 cells degranulation and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 107394 - 107394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2021.107394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Hiemori-Kondo and Mika Nii	4. 巻 84
2. 論文標題 In vitro and in vivo evaluation of antioxidant activity of Petasites japonicus Maxim. flower buds extracts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience Biotechnology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 621-632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1691913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 近藤 美樹	4. 巻 91
2. 論文標題 古代えんどう豆の調理による抗酸化性の変化と加工食品への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 豆類時報	6. 最初と最後の頁 11 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 前川優樹、稲井千紘、稲木舞、近藤（比江森）美樹
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの莢抽出物における生体抗酸化性
3. 学会等名 第77 回大会日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuuki Maekawa, Miki Hiemori-Kondo
2. 発表標題 Color reaction of Tutankhamen 's pea upon heating
3. 学会等名 22nd IUNS-International Congress of Nutrition (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川優樹、稲井千紘、稲木舞、近藤(比江森)美樹
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの紫色の莢に含まれるアントシアニンの抗酸化性
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川優樹、近藤（比江森）美樹
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウに含まれる抗酸化成分の探索および同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前川優樹, 近藤(比江森)美樹
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの加熱による着色反応機構の解析：着色源の単離および同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度中四国支部大会 (第57回講演会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川優樹, 近藤(比江森)美樹
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの加熱中に生じる着色反応に関与する成分の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Hiemori-Kondo, Hohoka Uehara, Yuuki Maekawa
2. 発表標題 Investigation of a component involved in color reaction by heating Tutankhamen's pea
3. 学会等名 The 9th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Hiemori-Kondo, Mika Nii, Daisuke Shinya
2. 発表標題 Evaluation of the antioxidant activity of Petasites japonicus Maxim. flower bud extracts
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤(比江森)美樹, 上原穂野香
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの加熱による着色反応に關与する成分の探索
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤(比江森)美樹, 上原穂香, 新家大輔
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの抗酸化成分の同定および調理による抗酸化性の変化
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤(比江森)美樹, 上原穂野香
2. 発表標題 ツタンカーメンエンドウの抗酸化性に及ぼす調理の影響
3. 学会等名 日本調理科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miki Hiemori-Kondo
2. 発表標題 Effect of cooking on antioxidant activity of the pea (<i>Pisum sativum</i> L.) cultivar with purple pods
3. 学会等名 256th American Chemical Society National Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Hiemori-Kondo and H. Uehara
2. 発表標題 Antioxidant activity of the pea (<i>Pisum sativum</i> L.) cultivar with purple pods and effect of cooking on its antioxidant activity
3. 学会等名 The 8th International Conference on Polyphenols and Health 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

豆類時報のWebページ：古代えんどう豆の調理による抗酸化性の変化と加工食品への応用 https://www.mame.or.jp/Portals/0/resources/pdf_z/091/MJ091-03A-TK.pdf
--

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------