

沖縄産純黒糖の抗酸化能と糖類分解酵素阻害活性

前田剛希*、荻貴之

沖縄の伝統食品である黒糖は、疲労回復や血圧上昇抑制作用等様々な効果が謳われている健康イメージの強い食品である。黒糖の機能性については、含有するポリフェノールや抗酸化能に関して幾つかの報告がある。ポリフェノールは植物中に広く分布する抗酸化成分であり、動脈硬化や糖尿病、高血圧などの生活習慣病に対する予防作用が報告されている。ポリフェノールが豊富な黒糖も、動脈硬化や糖尿病等に対する予防作用が期待される。しかしながら、黒糖に含まれるポリフェノールは種類が多く、機能性については未解明な部分が多い。そこで本研究では、黒糖の機能性の一端を明らかにするために、沖縄産純黒糖から非ショ糖画分を調製し、ポリフェノール含量を測定、複数の評価系を用いて抗酸化能を調べた。また、糖尿病に対する影響を明らかにするために、腸内における糖類の吸収阻害作用の指標である各種糖類分解酵素阻害活性についても併せて分析した。その結果、黒糖の非ショ糖画分はポリフェノールを多く含み、抗酸化能や LDL 酸化抑制作用、糖類分解酵素阻害作用を有する事が確認された。以上の結果は、ポリフェノールを豊富に含む黒糖が機能性食品としても有望な素材になる可能性を示唆した。

1 はじめに

黒糖は、沖縄で約 380 年前から作り続けられている伝統食品である。特に 7 離島の工場でサトウキビ搾汁液だけを煮詰めて作られている純黒糖は、平成 18 年に地域食品ブランドの表示基準「本場の本物」の認定を受け、本物志向の食品として人気が高い。昨今の沖縄ブームも追い風となって黒糖の需要は増加しており、沖縄県の黒糖生産量は純黒糖だけで年間約 6 千～1 万トン、販売実績は約 15～23 億円に達し、黒糖産業は県の重要な産業の一つになっている。

黒糖は単なる伝統食品、県の重要な経済品目の一つというだけでなく、疲労回復や血圧上昇抑制等様々な効果が謳われている健康イメージの強い食品でもあり、生活習慣病に対する予防効果等様々な機能性が期待されている。黒糖の機能性については、抗酸化能¹⁾、抗動脈硬化作用²⁾、グルコース吸収阻害作用³⁾⁴⁾、等の報告があり、特にポリフェノールに関する報文⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾が多数報告されている。ポリフェノールは植物中に広く分布する抗酸化成分であり、動脈硬化や糖尿病、高血圧などの生活習慣病に対する予防作用が明らかにされている。ポリフェノールを含む黒糖も、動脈硬化や糖尿病等に対する予防作用が期待される。しかしながら、黒糖に含まれるポリフェノールは種類が多く、機能性については未解明な部分が多い。また工場によって製造ラインに相違点が多々あり、原料品種も異なることから、黒糖のポリフェノール含量や機能性については工場間で違いが生じていると予想される。

そこで本研究では、県内の代表的な 3 工場で生産された黒糖から非ショ糖画分を調製し、ポリフェノール含量を調べると同時に、DPPH ラジカル消去能や LDL 抗酸化能等複

数の評価系を用いて抗酸化能を比較した。さらに糖代謝改善効果に焦点を当て、血糖値上昇抑制に関与する糖類分解酵素阻害活性を調べた。その結果、幾つかの重要な知見を得たので報告する。

2 実験方法

2-1 試薬

Trolox、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)、MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate)、2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)は和光純薬工業から購入した。フェノール試薬は MERCK Co.で購入した。ヒト LDL は、Funakoshi Co. inc.から購入した。ラット腸管アセトンパウダーは Sigma -Aldrich Chemical co.から購入した。その他の試薬は、市販の特級試薬をそのまま使用した。

2-2 試料

沖縄県内の含蜜糖工場 3 社 (工場 A、B、C) で製造された 2005 年度産の純黒糖を用いた。

2-3 試料溶液の調製

黒糖は乳鉢で細砕後、蒸留水に溶かした。黒糖水溶液を合成吸着樹脂 HP20 充填カラムに通液し、黒糖の 10 倍量の水で洗浄、糖分を除去した後、5 倍量の 20%、40%、60%、80%、100%メタノール (MeOH) で順次溶出した。MeOH 溶出画分は濃縮乾固後、50%MeOH に再溶解し実験に供した。動物実験は、20%～100%MeOH 溶出画分をまとめて (Pool) 濃縮乾固後、水に懸濁させて黒糖エキスとして用いた。

* 現沖縄県農業研究センター

2-4 試料の成分分析

試料の黒糖は凍結乾燥して水分含量を求めた。糖組成は、黒糖を蒸留水に溶解後、0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、既報⁹⁾と同様に HPLC で分析した。HPLC 分析は次の条件で行った。カラム; Shodex NH₂ (4.6 mm i.d × 250 mm)、カラム温度; 40°C、流速; 1.0 mL/min、移動相; アセトニトリル: 水 = 75: 25(V/V)、検出; 示差屈折計。検量線はシュクロース、フラクトース、マルトースを用いて作成し、糖含量は黒糖 100 g あたりの各成分の相当量として算出した。又、2-3 で調製した MeOH 溶出画分を濃縮乾固して非シヨ糖画分の重量を求めた。

2-5 総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量は Folin-ciocalteu 法¹⁰⁾で測定した。すなわち適宜希釈した試料溶液に 10 倍希釈したフェノール試薬、10%炭酸ナトリウムを同量加え、1 時間室温放置後、マイクロプレートリーダー(BioRad Model 550 Microplate reader)で 660 nm の吸光度を測定した。検量線は没食子酸を用いて作成し、ポリフェノール含量は溶液 1mL あたりの没食子酸相当量 (mmol gallic acid eq./ mL) として算出した。

2-6 DPPH ラジカル消去能

DPPH ラジカル消去活性は沖ら¹¹⁾の方法に準じて測定した。すなわち 96 穴マイクロプレートに段階的に希釈した試料溶液、0.2 M MES 緩衝液(pH 6.0)、20%エタノールをそれぞれ 50 μL 入れ、0.8 M DPPH 溶液 50 μL を加えて攪拌し、室温で 20 分間放置後、マイクロプレートリーダーで 540 nm の吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去能は Trolox を指標に用い、黒糖 1 g あたりの Trolox 相当量(μmol Trolox eq./ g) として算出した。

2-7 リノール酸 β - カロテン法による脂質過酸化抑制能

脂質過酸化抑制能は、リノール酸 β - カロテン法¹²⁾で測定した。リノール酸、β-カロテン、Tween40 を含む混合液 2500 μL と試料溶液 (黒糖 20 g/mL) 50 μL を混合して、50°C で反応させ、470 nm の吸光度を経時的に測定した。Control には蒸留水、比較対照には合成抗酸化剤ブチルヒドロキシアニソール (BHA) を用い、比較検討した。

2-8 LDL 抗酸化能

LDL 抗酸化能は既報¹³⁾の方法で測定した。酸素飽和した PBS (pH 7.4) で調製したヒト LDL 2225 μL (112 μg protein/mL)に 2.5 mM EDTA 100 μL と適宜希釈した試料溶液 125 μL を加えてよく混合した。反応は 20 mM 2,2'- azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile)エタノール溶液 50 μL を加えて 37°C 保温下で開始させ、6 分毎に 234 nm の吸光度を測定した。LDL 抗酸化能は、測定開始後から O.D.が 0.1 増加するまでにかかった時間 (Lag time と表示) を比較して評価した。

2-9 糖類分解酵素阻害活性

糖類分解酵素阻害活性は鎌田らの方法¹⁴⁾に準じて、次の手順で測定した。ラット腸管アセトンパウダー 1 g にクエン酸緩衝液(pH 6.0) 10 mL を加え、氷中で 4 時間攪拌後、遠心分離 (10000 rpm、45 分、4°C) した上清を粗酵素液とした。PCR チューブに粗酵素液 20 μL と試料溶液 10 μL (control は蒸留水 10 μL) を入れて、PCR を用いて 37°C、5 分間保温した。基質溶液 20 μL (2%可溶性デンプン、2%シュクロース、2%マルトース) をそれぞれ添加し、37°C で 20 分間反応後、99°C、15 分間の熱失活で反応を停止した。反応液を遠心分離(4800rpm、20 分間)し、上清のグルコース量をグルコース CII テストワコー (和光純薬、東京) で測定した。粗酵素液は、基質がマルトース、可溶性デンプンの時はクエン酸緩衝液で 3 倍希釈した。阻害活性は Control のグルコース生成量を 100%とした時の比率として算出した。

2-10 Wistar 系ラットによる糖負荷試験

1 週間予備飼育した Wistar 系雄性ラット (7 週齢) を control 群と黒糖エキス投与群に分け (各群 3 匹)、可溶性デンプンあるいはグルコース (1 g/kg 体重) と黒糖エキス (黒糖 5 g 相当/kg 体重) を投与した。Control 群には黒糖エキスの代わりに蒸留水を投与した。投与後 0、30、60、90、120、150 分に尾静脈より採血し、血糖値をグルコース CII テストワコーで、インシュリン含量をインシュリン EIA キット (株式会社シバヤギ、群馬) で測定した。

2-11 統計処理

各データは平均値±標準偏差で示し、データ間の比較は一元配置分散分析で行った。有意差は Scheffe の多重比較検定にて有意水準 5% (P<0.05) で検定した。統計解析にはエクセル統計 2002 (株) 社会情報サービス) を使用した。

3 実験結果および考察

3-1 黒糖の成分組成

試料の黒糖は、シュクロース、フラクトース、グルコースの糖分が 90%近くを占める組成であった。分析に用いた非シヨ糖画分は黒糖の約 1%であった (表 1)。

表 1 黒糖の成分組成

生産工場	(%)					
	シュクロース	フラクトース	グルコース	水分	非シヨ糖画分	その他(ミネラル他)
工場A	85.4	1.0	1.6	3.3	0.9	7.8
工場B	84.4	1.0	1.2	4.3	1.0	8.1
工場C	81.8	0.5	0.2	4.7	1.6	11.2
平均	83.9	0.8	1.0	4.1	1.1	9.0

3-2 総ポリフェノール含量

3 工場の黒糖 MeOH 溶出画分の総ポリフェノール含量を図 1 に示した。工場間で含量に差が認められたが、いずれ

も 20~60%MeOH 溶出画分にポリフェノールが多かった。黒糖は工場によって製造ラインに相違点があり、原料サトウキビの品種も地域で異なる。工場間の差は、原料や製造法の違い等によるものと予想された。

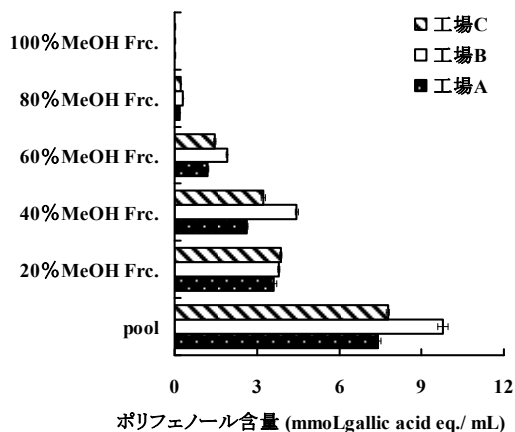


図1 黒糖の総ポリフェノール含量

3-3 DPPH ラジカル消去能

3 工場の MeOH 溶出画分の DPPH ラジカル消去能を図 2 に示した。ポリフェノールと DPPH ラジカル消去能は相関する事が明らかにされているが、黒糖においてもポリフェノールが豊富な 20~60%MeOH 溶出画分の活性が強かった。

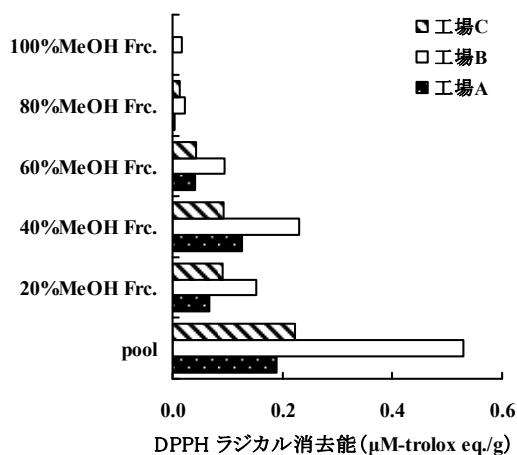


図2 黒糖の DPPH ラジカル消去能

3-4 LDL 抗酸化能

黒糖を摂取させた日本ウズラでは動脈硬化の進行が遅れることが明らかにされている²⁾。動脈硬化の初期段階では、血管内皮でマクロファージが酸化 LDL を取り込み泡沫細胞化し、血管を肥厚させる。LDL の酸化を抑制する事は動脈硬化の予防に繋がると考えられている。そこで 3 工場の黒糖のヒト LDL に対する抗酸化能を調べた結果、いずれも用量依存的に LDL の酸化にかかる時間が長くなり、LDL 抗

酸化能を有する事が明らかになった。特に工場 B の黒糖の活性が強かった (図 3)。

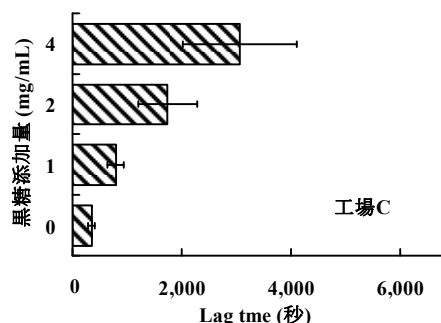
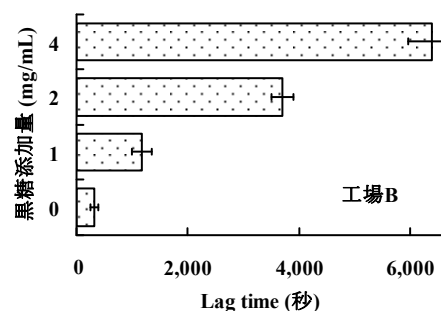
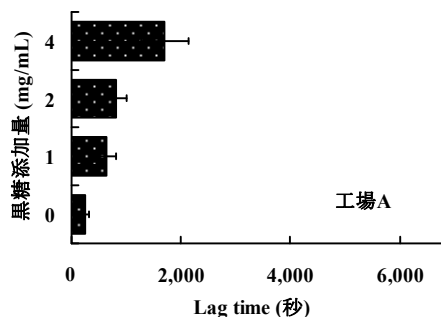


図3 黒糖の LDL 抗酸化能

工場 B の黒糖について、更に詳細に LDL 抗酸化能を調べた結果、ポリフェノールを多く含む 40%、60%MeOH 溶出画分の LDL 抗酸化能が強かった (図 4)。この結果から、黒糖の LDL 抗酸化能にはポリフェノールの寄与が推察された。

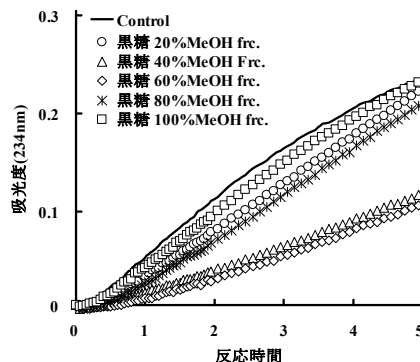


図4 黒糖 MeOH 溶出画分の LDL 抗酸化能

3-5 脂質過酸化抑制能

前項の3-4ではLDLの酸化に対する黒糖の影響を調べた。LDLの酸化はLDL粒子上のリン脂質が酸化されて生成する過酸化脂質によって連鎖的に脂質過酸化反応が進行し、最終的にLDLのタンパクまで酸化変成すると考えられている。そこで、3工場の黒糖非シヨ糖画分について脂質過酸化反応に対する影響をリノール酸β-カロテン法で分析した。リノール酸β-カロテン法は、リノール酸の自動酸化によりβ-カロテンが退色することを利用した抗酸化能の評価法である。いずれの黒糖も強い活性を示す事が明らかになり、黒糖非シヨ糖画分は、連鎖的脂質過酸化反応を抑えることでLDLの酸化を抑制していることが推察された(図5)。

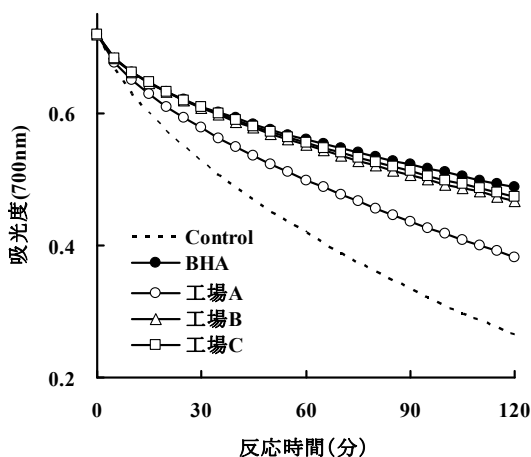


図5 黒糖の脂質過酸化抑制作用

3-6 糖類分解酵素阻害活性

食事中のデンプンや糖類等の炭水化物は、腸内で糖類分解酵素によってグルコースまで分解されて体内に吸収される。糖類分解酵素を阻害する事で糖類の吸収が抑制され、食後の過血糖を予防できる。そこで、3社の黒糖の各種糖類分解酵素に対する阻害活性を調べた。いずれの工場の黒糖も濃度依存的に糖類分解酵素の活性を阻害した(図6)。

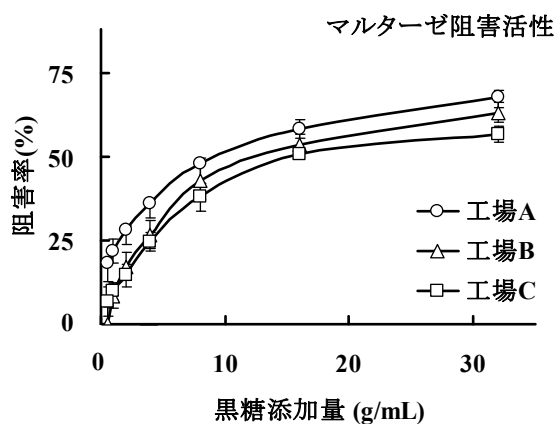
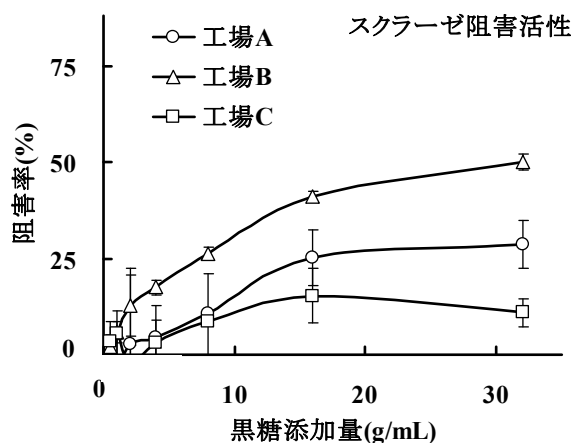
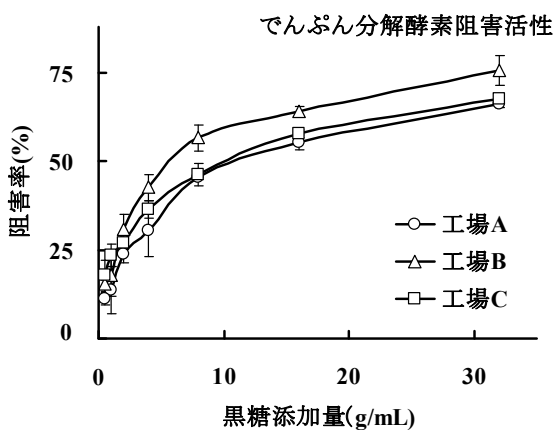


図6 黒糖の糖類分解酵素阻害活性

特に20~60%MeOHで溶出される画分には強い糖類分解酵素阻害活性が認められ、抗酸化能と同様にポリフェノール含量が多い画分ほど、活性が強い傾向を示した事から、ポリフェノールが糖類分解酵素に対し阻害作用を示している事が推察された(図7)。

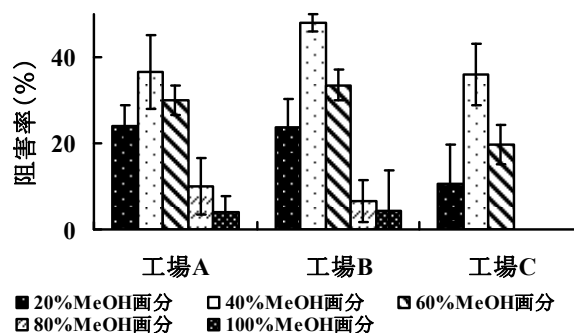


図7 黒糖 MeOH 溶出画分のデンプン分解酵素阻害活性

3-7 動物実験

糖類分解酵素に対する黒糖抽出物の阻害活性が認められたことから、Wister系ラットでデンプンとグルコースを用いた糖負荷試験を行った結果、血糖値上昇抑制作用は確認

できなかった（データ省略）。この結果は、*in vitro* の実験で効果を示した成分が、実際の消化系では分解等何らかの理由で活性を失った可能性を示唆させる。しかしながら木村ら³⁾は黒糖の黒色物質が腸内におけるグルコースの吸収を阻害すると報告しており、黒糖の血糖値上昇抑制作用については、今後も検討していく必要があるだろう。

本研究で黒糖の20～60%MeOH 溶出画分にはポリフェノールが多く含まれていることが明らかになった。ポリフェノール含量には工場間で差があり、DPPH ラジカル消去能やLDL 抗酸化能等の活性はポリフェノール含量と比例して増加する傾向を示した。黒糖 MeOH 溶出画分を HPLC 分析した結果、工場間でポリフェノール組成に大差は認められなかった（データ省略）ことから、工場間の各種活性の差はポリフェノールの組成ではなく、含量の差に起因しているものと推察された。沖縄県の含蜜糖工場 7 社は離島にあり、黒糖原料であるサトウキビの栽培品種、栽培土壌は工場によって異なる。又、製造ラインも工場によって相違点があり、原料サトウキビの搾汁率や濃縮法は様々である。これらの様々な要因によって、黒糖中のポリフェノール含量に違いが生じていると予想される。黒糖に含まれるポリフェノールの詳細を明らかにし、含量に差が生じる原因を解明することで、ポリフェノールに特徴をもたせた新規黒糖製造への展開等も期待される。

4 まとめ

黒糖から20～40%メタノールで溶出される非ショ糖画分はポリフェノールを多く含んでおり、抗酸化能やLDL 酸化抑制作用、糖類分解酵素阻害作用を有する事が確認された。

以上の結果は、ポリフェノールを豊富に含む黒糖が機能性食品としても有望な素材になる可能性を示唆した。

謝辞

本研究は平成 17～19 年度 沖縄県産黒糖機能性等科学的分析評価事業の一環として、沖縄 TLO の委託を受けて実施した。試料提供にご協力頂いた沖縄県黒砂糖工業会に感謝致します。

参考文献

- 1) 仲宗根洋子, 和田浩二, 玉城典子, 桜井達生, 又吉悟, 高良健作, 沖縄産黒糖の抗酸化性について, 琉球大学農学部学術報告, 41, 305-308 (1994).
- 2) Inafuku, M., Toda, T., Okabe, T., Wada, K., Takara, K., Effect of *kokuto*, a non-centrifugal cane sugar, on the development of experimental atherosclerosis in Japanese quail and apolipoprotein E deficient mice, *Food Sci. Technol. Res.*, 13,

- 61-66 (2007).
- 3) 木村善行, 大南宏治, 有地英子, 奥田拓道, 有地滋, 林輝明, 黒砂糖中の黒色物質の糖および脂質代謝に及ぼす影響, 薬学雑誌, 102 (7), 666-669 (1982).
- 4) Matsuura, Y., Kimura, Y. and Okuda, H., Effect of aromatic glucosides isolated from black sugar on intestinal absorption of glucose., 和漢医薬学会誌, 7, 168-172 (1990).
- 5) 高良健作, 金城聡子, 松井大吾, 和田浩二, 仲宗根洋子, 与儀誠一, 黒糖の非ショ糖画分におけるフェノール性抗酸化物, 日本農芸化学誌, 74, 885-890 (2000).
- 6) Takara, K., Matsui, D., Wada, K., Ichiba, T. and Nakasone, Y., New antioxidative phenolic glycosides isolated from *Kokuto* non-centrifuged cane sugar, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 29-35 (2002).
- 7) Takara, K., Ushijima, K., Wada, K., Iwasaki, H. and Yamashita, M., Phenolic compounds from sugarcane molasses possessing antibacterial activity against cariogenic bacteria, *J. Oleo Sci.*, 56, 611-614 (2007).
- 8) Smith, P., and Paton, H. N., Sugarcane flavonoids, *Sugar Technology Reviews*, 12, 117-142 (1985).
- 9) 前田剛希, 沖縄産紅イモ「沖夢紫」の成分特性および色調について, 沖縄県工業技術センター研究報告, 第 8 号, 71-77 (2007).
- 10) Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Terahara, N. and Suda, I., Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars, *J. Food. Sci.*, 67, 1752-1756 (2002).
- 11) 沖智之, 増田真美, 古田收, 西場洋一, 須田郁夫, 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性, 食科工, 48, 926-932 (2001)
- 12) Maeda, G., Takara, K., Wada, K., Oki, T., Masuda, M., Ichiba, T., Chuda, Y., Ono, H. and Suda, I., Evaluation of antioxidant activity of vegetables from Okinawa prefecture and determination of some antioxidative compounds, *J. Food Sci. Technol. Res.*, 12, 8-14 (2006).
- 13) 前田剛希, 沖縄伝統野菜の低密度リポタンパク質(LDL)の酸化抑制能, 沖縄県工業技術センター研究報告, 第 8 号, 65-70 (2007).
- 14) 鎌田靖弘, 豊川哲也, 県産資源を活用した機能性素材の開発, 沖縄県工業技術センター研究報告, 第 3 号, 77-89 (2001).

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。