

兵庫県産黒大豆のミネラル及びポリフェノール類に着目した成分分析と機能性

吉村 美紀*, 加藤 陽二*, 和田 裕子*, 島田 良子*, 小林 美幸**,
赤松 成基**, 鯛 かおる***, 高山 裕貴****

*兵庫県立大学 環境人間学部 人間環境部門, 先端食科学研究センター

兵庫県立健康科学研究所, *(株)アトラステクノサービス, ****兵庫県立大学理学研究科

Compositional Analysis and Functional Properties of Hyogo Black Soybeans Focusing on Minerals and Polyphenols

Miki YOSHIMURA*, Yoji KATO*, Yuko WADA*, Ryoko Shimada*, Miyuki KOBAYASHI**,
Shigeki AKAMATSU**, Kaoru Tai***, Yuki TAKAYAMA****

*School of Human Science and Environment, University of Hyogo,
Research Institute for Food and Nutritional Science, University of Hyogo
1-1-12 Shinzaike-honcho, Himeji, 670-0092 Japan

**Hyogo Prefectural Institute of Public Health Science

***Atlas Techno Service, Co. Ltd.

****Graduate School of Science, University of Hyogo

Abstract: Focusing on the mineral elements and polyphenols of Hyogo black soybean edamame (*Phaseolus vulgaris L.*), we analyzed mineral elements and investigated the functionality of polyphenols. We also compared the mineral elements of black soybean edamame and yellow soybean edamame from different production areas.

- (1) Although there was no significant localization of mineral components in the cotyledonary portion of the black soybean edamame, it was inferred that mineral components remained in the leaf vein portion of the capsule.
- (2) Black soybean edamame with seed coat contained slightly more Ca and Fe.
- (3) In a comparison of black and yellow soybean edamame, yellow soybean edamame tended to contain more K and Mg than black soybean edamame, but this may be due to differences in the maturity of the edamame.
- (4) In terms of viral enzyme main protease inhibitory activity, black soybean edamame showed about 14% inhibition and yellow soybean edamame showed about 10%. It means that the inhibitory effect was higher in black soybean edamame than yellow soybean edamame. The reason for this is expected to be the contribution of polyphenols, including anthocyanins, which are abundant in black soybean edamame.

Keywords: black soybean, mineral element, polyphenol

1. はじめに

大豆は、タンパク質が豊富で、栄養価の高い食品である。

兵庫県産黒大豆および黒大豆エダマメは、兵庫県の特産物であり、食感、食味の良さに加え、最近では健康食材とし

て機能性が注目されている。黒大豆エダマメは黒大豆の完熟前に収穫したものであり、収穫時期は 10 月頃である。廣田らによる兵庫県産大豆の品質比較では、黒大豆は黄大豆に比べてショ糖、オリゴ糖、トコフェロール含量が高いことが報告されている¹⁾。

オリゴ糖は腸の調子を整え、ビタミンの合成を促進し、免疫機能を向上させるとされている²⁾。トコフェロールはホルモンバランスを整え、体内の過酸化脂質の減少をもたらす働きがあり、老化防止に役立つとされている²⁾。李らは、丹波黒大豆の中でもエダマメ用に品種改良された「紫ずきん」は、黄大豆エダマメに含まれていない水溶性オリゴ糖であるスタキオースを含むことを報告している³⁾。スタキオースは、エダマメの種皮色がまだ緑色である時期は含まれていないことが示されている。また、黒大豆エダマメは黄大豆エダマメと比較して、ミネラル成分であるマグネシウムとカリウムは約 4 倍、リンは約 1.5 倍多く含むことを報告している⁴⁾。マグネシウムは神経伝達やタンパク質の合成を助けるなどの生理機能を持ち、不足すると食欲不振や高血圧症などを誘引することが知られている。また、成人の高血圧と心血管疾患、脳血管疾患、冠動脈系疾患のリスクを減らすために、食物からのカリウム摂取を増やすことが推奨されている。

黒大豆の種皮には、色素成分にアントシアニン類とフラバン-3-オール類のポリフェノールが多く含まれている。山下らは、黒大豆種皮ポリフェノールは、高い抗酸化能を有し、活性酸素によって引き起こされる疾病予防と改善に寄与することを明らかとしている⁵⁾。さらに、黒大豆のポリフェノールの薬物代謝調節、遺伝毒性抑制、エネルギー代謝促進などヒトの健康維持増進機能を報告している⁵⁾。

また、アントシアニン(シアニジン-3-グルコシド)に新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の酵素メインプロテアーゼ阻害活性が *in vitro* の研究ながら示唆されている⁶⁾。酵素メインプロテアーゼはウイルス複製に必須であり、その阻害はウイルス感染防御につながるため、メルクや塩野義製薬が開発した市販薬の標的にもなっている分子でもある。すなわちアントシアニンなどポリフェノールを豊富に含むエダマメそのものにも新型コロナウイルス感染症(COVID-19)から身体を守る機能が期待される。

このように、黒大豆、黒大豆エダマメでは、食感、食味の良さに加え、オリゴ糖、ミネラル成分、ポリフェノール類などを多く含むことの報告が多くあり、その機能性の点で注目されている。これまでの報告から、これらの微量成分の存在箇所として黒大豆、黒大豆エダマメの種皮の部分にも存在することが予想された。

本研究では、兵庫県産黒大豆エダマメのミネラル成分の

存在箇所に着目するため、放射光 X 線マイクロ CT 観察及び蛍光 X 線分析により部位によるミネラル量の存在を確認し、さらに誘電結合プラズマ発光分光分析によりミネラル成分分析を行った。また、産地の異なる黒大豆エダマメと黄大豆エダマメのミネラル成分の比較を行った。

エダマメの機能性としてこれまで報告されていない新型コロナウイルス酵素に対する阻害作用の検討を行った。

本研究で検討した新型コロナウイルス酵素メインプロテアーゼ阻害については、抽出液による検討であり、実際の生体で効果があるかについては未解明である。しかしながらエダマメの吸収代謝を考慮した本格的な機能性研究に進めるためにも、エダマメ成分に期待される機能性(本研究ではウイルス酵素阻害活性)があるのかを調べるための重要な研究となる。

2. 実験方法

(1) 試料

兵庫県産の黒大豆エダマメ(2021 年度産)を用いた。莢つき黒大豆エダマメを真空フライヤー(10 kg バッチタイプ、(株)アトラステクノサービス製)を用いて、 -0.09 MPa から -0.097 MPa の真空下で試料の入ったカゴをパーム油内にくぐらせながら $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 270 分間加熱、乾燥させた。真空フライ後の黒大豆エダマメの水分は、赤外線水分計(FD-600, Kett 製) $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、60 分間測定により 1.5%であった。黒大豆エダマメ中央部分 1 と端部分 2 および莢部分 3(図 1)について、放射光 X 線マイクロ CT 観察及び蛍光 X 線分析を行った。

(2) 試料の灰化

真空フライした黒大豆エダマメの種皮あり部分と黒大豆エダマメの種皮なし部分とに分けて、精密秤で計量したるつばに試料を入れ精量し、電気炉を用いて $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 3 時間、 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 3 時間、 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 24 時間灰化した。灰化後、1% HCl を加え、ホットプレート上で熱し溶解し、フィルター濾過し 25 ml メスフラスコにフィルアップしたものを誘電結合プラズマ発光分光分析に用いた。また、産地の異なる黒大豆エダマメと黄大豆エダマメを購入後直ぐに、莢ごと 5 分間熱湯で茹でて冷凍したものを同様の方法で灰化し、誘電結合プラズマ発光分光分析に用いた。

(3) 放射光 X 線マイクロ CT 観察及び蛍光 X 線分析

黒大豆エダマメのミネラル局在可視化及び高含有ミネラルの同定を目的として、大型放射光施設 SPring-8 の高輝度 X 線を用いた放射光 X 線マイクロ CT 及び蛍光 X 線分析を行った。試料には真空フライ品(図 1)を用いた。実験は、兵庫県 BM ビームライン BL08B2 の投影型マイクロ CT システムを用いて行った⁷⁾。イメージング用検出器

には CMOS 検出器(浜松ホトニクス(株)製 C11440-22CU)を備えた間接型 X 線カメラを、蛍光 X 線検出器にはシリコンドリフト検出器(AMPTEK, Inc.製 XR-100SDD)を用いた。X 線波長を 0.103 nm(光子エネルギー 12 keV)とし、直径 10 mm のポリイミドチューブに入れた試料を大気環境中の CT ステージに設置して、0~180° 方向の投影像を 0.075° ステップ(2400 投影)、0.1 秒露光投影、画素サイズ 6.5 μm の条件で取得した。投影データセットにフィルター補正逆投影法を適用して三次元再構成を行い、線吸収係数 0~9 cm⁻¹ を 256 階調化して解析を行った。また、マイクロ CT 測定と同時に、露光時間を 240 秒として蛍光 X 線スペクトルを計測し、バックグラウンド減算及び弾性散乱で規格化を行うことで、周期表上の Ar から Zn までの元素の K_α 及び K_β 線の相対強度を評価した。

(4) 誘電結合プラズマ発光分光分析(ICP)

誘電結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)(Perkin Elmer 製 Optima 7300DV)を用いた。測定は、プラズマ RF 出力: 1300W, アルゴンプラズマガス: 15L/min, アルゴンキャリアガス: 0.7L/min, アルゴン補助ガス: 0.2L/min, 測定時間: 5sec, 繰り返し 3 回とした。ブランクとして 1% HCl を使用し、それぞれ検量線から濃度を算出した。試料中にミネラル成分(K, Mg, Ca, Zn, Fe)の定性、定量分析を行った。測定波長は 766.490nm(K), 279.553nm(Mg), 396.847nm(Ca), 202.548nm(Zn), 238.204nm(Fe), 371.029nm(Y, 内標準元素)とした。結果は繰り返し 3 回の平均値を示した。

(5) ウイルス酵素メインプロテアーゼ阻害活性

酵素阻害評価は既報に従い行った⁸⁾。黒大豆エダマメと黄大豆エダマメを、莢ごと 5 分間熱湯で茹でた後、冷却し、マメを取り出し細断、一部を取り、重量を測定し、粉碎用ビーズ入りのチューブ(Lysing Matrix A)に移した。エダマメ重量の 5 倍量の溶媒(methanol)を添加した後、細胞組織粉碎器(Fast Prep 24 5G)によりホモジネートした。ホモジネートを回収後、室温にてシェイカーで 2 日間抽出した。その後遠心により上清を取り、フィルターろ過したものをサンプルとした。組み換え酵素 0.5 μM をサンプル(持ち込み量 0.4%)と緩衝液中で混合して 37°C で 30 分置き、更に合成ペプチド基質 Dabcyl-KTSAVLQ SGFRKME-Edans を添加し 1 時間反応させた。うち 10 μl を HPLC 蛍光検出器により蛍光性ペプチド切断物(SGFRKME-Edans)を分離した。分離カラムは Kinetex XB-C18(4.6×50 mm, 2.6 μm, Core shell), 溶出溶媒 A は 0.1% Trifluoroacetic acid in H₂O, B は CH₃CN, 流速は 1 ml/min とした。グラジエント溶出プログラムは 0 min (B10%), 3 min (B100%), 4 min (B10%), 10 min (B10%)とした。蛍光

検出波長は ex. 336 nm, em. 490 nm に設定した。抑制作用は、阻害物質を入れていない溶媒コントロール(methanol)の酵素活性と比較することで算出した。実験は n=3 で行い、結果は、阻害率(平均値±標準偏差)として示した。

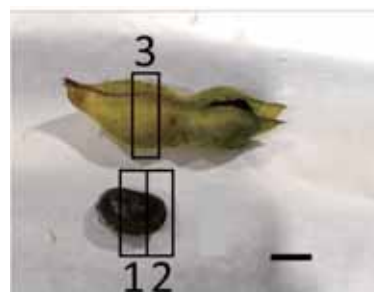


図1 黒大豆エダマメ(真空フライ)外観および試料切断部位(1-3)。スケールバーは 10 mm。

3. 結果および考察

(1) 放射光 X 線マイクロ CT 観察及び蛍光 X 線分析

図1に示すように黒大豆エダマメ(真空フライ)の「中央部分1」、「端部分2」と「莢部分3」の各部位に X 線を照射し、評価した。黒大豆エダマメ(真空フライ)の蛍光 X 線スペクトルを図2に、断層像とボリュームレンダリング像を図3及び図4に示した。真空フライ品は細胞組織の保存性が高いため、生鮮試料の成分の局在性を概ね維持したまま濃縮してシグナルを高めることができると期待される⁹⁾。

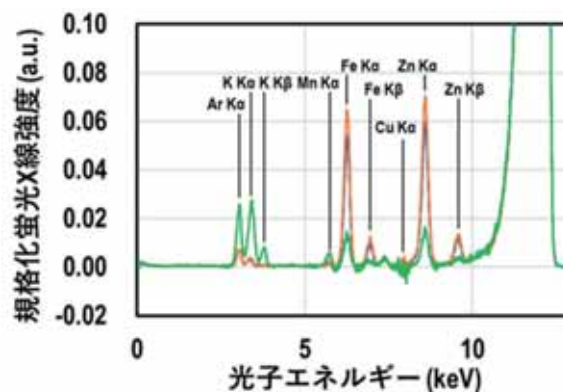


図2 黒大豆エダマメ(真空フライ)中央部分1(青), 端部分2(橙)と莢部分3(緑)の蛍光 X 線スペクトル

蛍光 X 線分析では、蛍光 X 線の光子エネルギーが元素ごとに固有であることから、含有元素の同定が可能である。蛍光 X 線エネルギーごとに透過率が異なることと、試料自体による異方的な X 線吸収の効果により、元素間の定量的な含量比較は困難であるが、本研究では、試料の 0~

180° 方向の蛍光 X 線を積算しており、試料体積におおよそ比例する弾性散乱強度でスペクトル強度を規格化していることから、試料間での元素ごとの含有量の大小は評価可能と考えられる。以上を踏まえると、図 2 より、黒大豆エダマメは K, Mn, Fe, Zn を含むが、Fe と Zn は中央部分 1 と端部分 2 の方が莢部分 3 より多く含まれることが示唆された。一方、莢部分 3 は、中央部分 1 と端部分 2 より相対的に K を多く含むことが示唆された。

続いて、マイクロ CT 像図 3 及び 4 からミネラルの局在性を評価した。各画素の線吸収係数値は含有元素の原子番号が大きい程、あるいは濃度が高い程、高値を示す傾向がある。したがって、線吸収係数値が水 (2.0 cm^{-1}) やタンパク質 (2.8 cm^{-1}) の値より顕著に高値な領域は、ミネラル成分が顕著に局在した領域であると推察できる。黒大豆エダマメ中央部分 1 および端部分 2 の線吸収係数値は、全体的に水やタンパク質と同程度であったことから、ミネラル成分の顕著な局在は生じていないと考えられた。黒大豆エダマメの子葉中の Mg, P, K, Ca の分布は、李らによって走査電子顕微鏡 X 線マイクロアナライザを用いて測定されており³⁾、子葉部に一様に分布していたことから本研究と矛盾しない。一方で、莢部分 3 については、線吸収係数値は水やタンパク質の 2 倍以上の領域が漸層像上で見られた。三次元構造をボリュームレンダリング像で可視化すると、線吸収係数値が顕著に高い領域は葉脈組織と一致することから、葉脈部分にミネラルが残留していることが示唆された。

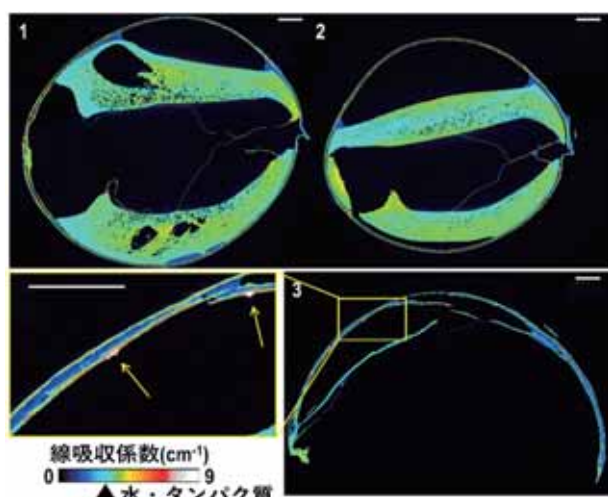


図 3 黒エダマメ(真空フライ)中央部分 1, 端部分 2 と莢部分 3 の断層像。スケールバーは 1 mm。

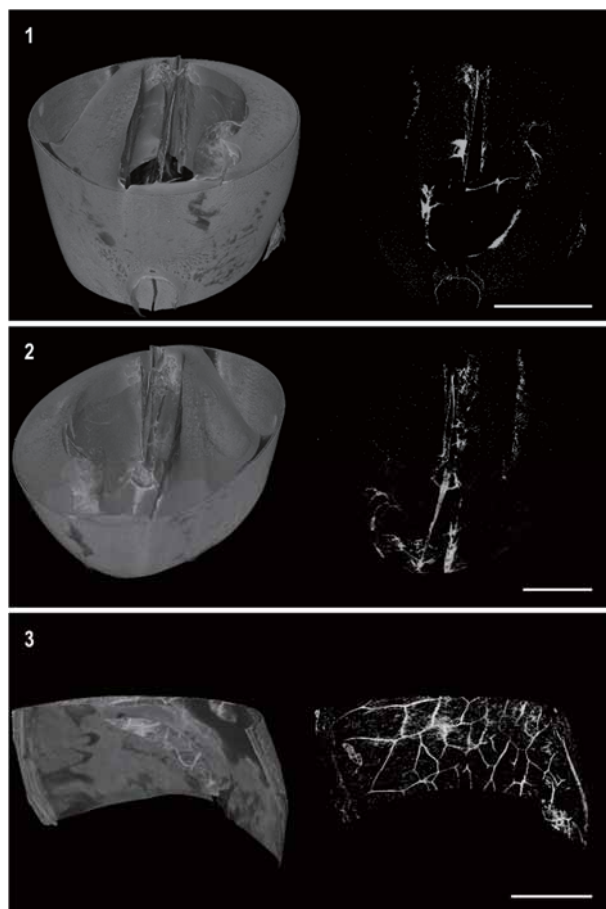


図 4 黒エダマメ(真空フライ)中央部分 1, 端部分 2 と莢部分 3 のボリュームレンダリング像 左は 0 cm^{-1} , 右は 6 cm^{-1} に閾値を設定。スケールバーは約 5 mm

(2) 誘電結合プラズマ発光分光分析(ICP)

表 1 に、種皮ありと種皮なし黒大豆エダマメ(真空フライ)の誘電結合プラズマ発光分光分析によるミネラル成分結果を示す。黒大豆エダマメの種皮あり、種皮なしとともに、K を多く含んでいた。黒大豆エダマメは、種皮がある方が、Ca, Fe がやや多く含まれていた。種皮の部分に、Ca, Fe を多く含むことが推察された。

表 1 黒大豆エダマメ(真空フライ)のミネラル量

	Mg	K	Ca	Fe	Zn
試料	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
黒大豆エダマメ(種皮あり)	247	1319	190	8.5	3.2
黒大豆エダマメ(種皮なし)	253	1310	169	6.1	3.1

(繰り返し 3 回の平均値)

産地の異なる黒大豆エダマメと黄大豆エダマメ(茹で)のミネラル量の比較を表 2 に示した。黒大豆エダマメと黄大

豆エダマメは、いずれも **K** を多く含んでいた。黒大豆エダマメより黄大豆エダマメの方が、**K** と **Mg** を多く含む傾向であった。李らの報告³⁾では、黒大豆エダマメは、黄大豆エダマメに比較して **Mg** を 4 倍多く含むことが示され、**Mg** は黒大豆エダマメの熟成につれ著しく増加することが示されている。本研究では、黒大豆エダマメの方が、ミネラル成分が少ない傾向を示し、これまでとは異なる結果となった。エダマメに含まれるミネラルおよび細胞壁構成多糖類は、エダマメの熟成につれ増加し、豆の硬さに影響することが報告されている¹⁰⁾。本研究では、同時期に購入したエダマメのミネラル成分比較を行ったが、エダマメの熟成度の検討は行っていない。そのため、黒大豆エダマメの方が黄大豆エダマメより熟成度が低いものであり、ミネラル量が少なくなる可能性も考えられた。

表2 産地の異なる黒大豆エダマメと黄大豆エダマメ(茹での)のミネラル量

試料	Mg (mg)	K (mg)	Ca (mg)	Fe (mg)	Zn (mg)
黒大豆エダマメ (兵庫県産①)	62	318	76	2.5	1.2
黒大豆エダマメ (兵庫県産②)	52	264	62	2.0	1.2
黒大豆エダマメ (京都産①)	63	331	65	2.4	1.2
黒大豆エダマメ (京都産②)	49	282	50	1.8	0.8
黄大豆エダマメ (群馬県産①)	91	452	71	2.4	1.7
黄大豆エダマメ (群馬県産②)	79	396	61	2.2	2.0
黄大豆エダマメ (兵庫県産①)	88	488	88	3.6	1.5

(繰り返し3回の平均値)

(3) ウイルス酵素メインプロテアーゼ阻害活性

機能性の検討として、黒大豆エダマメおよび黄大豆エダマメ抽出物によるウイルス酵素メインプロテアーゼ阻害活性を調べた。その結果、黒大豆エダマメに約 14%、黄大豆エダマメに約 10%の阻害効果が認められた(表3)。

表3 黒大豆エダマメと黄大豆エダマメ(茹での)によるウイルス酵素メインプロテアーゼ阻害活性

試料(抽出物)	阻害率 (%)
黒大豆エダマメ (兵庫県産①)	13.9 ± 6.3
黄大豆エダマメ (兵庫県産①)	9.9 ± 2.8

(n=2) (平均値±標準偏差)

阻害効果は黄大豆エダマメよりも黒大豆エダマメの方が高い傾向であった。精製標品を用いた先行研究⁹⁾では、カテコールあるいはピロガロール型構造を有するポリフェノールに強い酵素メインプロテアーゼ阻害活性を見出している。このため、本研究の阻害機構には黒大豆エダマメに豊富に含まれるアントシアニンを含めたポリフェノール類の寄与が予想される。

4. 今後の展望

本研究では、黒大豆エダマメ部位によるミネラル量に着目し、放射光 X 線マイクロ CT 観察及び蛍光 X 線分析により、エダマメ全体のミネラル存在箇所を確認し、誘電結合プラズマ発光分光分析によるミネラル成分分析により微量ミネラル量の定量分析を行った。莢部分は、豆部分より相対的に **K** を多く含むことが示唆された。また、種皮の部分に、**Ca**, **Fe** を多く含むことが推察された。エダマメの摂食時に莢を除去し、場合によっては種皮も外すことがある。しかし、ミネラルの効果的な摂取の面では、摂取時に除去する部分を少なくする方法などの検討も今後必要と考えられた。

エダマメの吸収代謝までを考慮した機能性研究を遂行するためには、動物やヒト試験による機能性試験が望まれるところであるが、本研究では、その前段階としてエダマメ抽出成分に機能性があるのかを *in vitro* 研究により調べた。本研究で着目した機能性は、新型コロナウイルス酵素メインプロテアーゼの阻害である。実際に、抽出成分に酵素阻害活性を見出すことができたが、黄大豆エダマメに比べて黒大豆エダマメ抽出液の方が新型コロナウイルス酵素の阻害作用が高かった理由については、より詳細に調べる必要がある。また、本研究は組換え酵素と抽出液を試験管内で混合した実験であり、吸収や代謝の影響を加味しておらず、今後、生体レベル、細胞レベルでも阻害作用があるか、ウイルス感染防御に役立つかについては、更なる検討が必要である。

エダマメに含まれるポリフェノール類などの部位別の成分分析についても検討し、特定の部位に成分の偏りがある等、興味深いデータ(未発表)が得られているため、その意義についても検討を進める必要がある。

5. まとめ

兵庫県産黒大豆エダマメのミネラル成分とポリフェノール類に着目し、ミネラル成分分析を行い、ポリフェノールの機能性の検討を行った。また、産地の異なる黒大豆エダマメと黄大豆エダマメのミネラル成分の比較を行った。

1) 黒大豆エダマメの子葉部分におけるミネラル成分の

顕著な局在はみられないが、莢部分は葉脈部分にミネラル成分が残留していることが推察された。

2) 黒大豆エダマメは種皮がある方が、Ca, Fe がやや多く含まれていた。

3) 黒大豆エダマメと黄大豆エダマメの比較では、黒大豆エダマメより黄大豆エダマメの方が、K と Mg を多く含む傾向であったが、エダマメの熟成度が異なっていることも考えられた。

4) ウイルス酵素メインプロテアーゼ阻害活性では、阻害効果は黄大豆エダマメよりも黒大豆エダマメの方が高い傾向であった。その理由として黒大豆エダマメに豊富に含まれるアントシアニン類を含めたポリフェノールの寄与が予想された。

本研究は、JSPS 科研費(20H01619)および兵庫県立大学令和 3 年度次世代研究プロジェクト推進事業の一部として実施しました。助成賜りましたこと深謝いたします。放射光実験は、大型放射施設 SPring-8 の兵庫県 ID ビームライン BL24XU において、専用ビームライン課題 2021B3427 として実施しました。ウイルス酵素阻害実験にご助力頂きました富山県立大学工学部 生城真一教授に感謝致します。

引用文献

- 1) 廣田智子, 田畑広之進, 小河拓也, 岩井正志, 井上喜正, 兵庫県産大豆の品質特性, 兵庫県立農林水産技術総合センター研究報告, 農業編, **53**, 6-12 (2005)
- 2) 大久保一良, 大豆の科学(朝倉書店)57-75(1992)
- 3) 李温九, 南出隆久, 大谷貴美子, 熟度の異なる「紫ずきん」, 黒大豆エダマメの水溶性オリゴ糖含量とゆで操作に伴うオリゴ糖含量の変化, 日本農芸化学学会誌, **74**, 501-504 (2000)
- 4) 李温九, 河合哉, 坪井秀樹, 和田正夫, 佐藤健司, 南出隆久, 大谷貴美子, 黒大豆エダマメ, 「紫ずきん」の熟成と遊離アミノ酸及びミネラル含有量の変化, 微量栄養素研究, **19**, 71-75 (2002)
- 5) 山下陽子, 黒大豆ポリフェノールの機能性に関する研究, 化学と生物, **57**, 146-152(2019)
- 6) Eleni Pitsillou, Julia Liang, Chris Karagiannis, Katherine Ververis, Kevion K. Darmawan, Ken Ng, Andrew Hung, Tom C. Karagiannis, Interaction of small molecules with the SARS-CoV-2 main protease in silico and in vitro validation of potential lead compounds using an enzyme-linked immunosorbent assay, Computational Biology and Chemistry **89**, 107408

(2020)

7) Yoshimasa Urushihara, Hiroshi Hasegawa, Nozomu Iwasaki, “X-ray micro-CT observation of the apical skeleton of Japanese white coral *Corallium konjoji*” *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **475**, 124-128 (2016)

8) Yoji Kato, Akari Higashiyama, Emi Takaoka, Miyu Nishikawa, Shinichi Ikushiro, Food phytochemicals, epigallocatechin gallate and myricetin, covalently bind to the active site of the coronavirus main protease in vitro. *Advances in Redox Research* **3**, 100021 (2021).

9) 吉村美紀, 原弥伽, 澤村弘美, 湯浅正洋, 加藤陽二, 江口智美, 鯛かおる, 真空フライ法による真空チップスの物性・嗜好性および抗酸化について, 日本調理科学会誌, **50**, 6-12, 2017

10) 李温九, 南出隆久, 大谷貴美子, 微量栄養素研究, **18**, 123-127(2001)

※ 本論文掲載の図が白黒で判別しにくい場合は、兵庫県立大学・機関リポジトリ(<https://onl.sc/vpc5tk6>)からカラー版が入手できる。

(令和 5 年 1 月 23 日 受付)