

玄米粉の塩化ナトリウム洗浄が、 フィチン酸の抗酸化作用に与える影響

Effect of the Antioxidant Activity of Phytic Acid on Cleaning with
Sodium Chloride of Brown Rice Powder.

渡辺陽菜*, 井上節子**

Haruna Watanabe

Setsuko Inoue

【要旨】

玄米には抗酸化作用を示すフィチン酸 (IP6) が多く含まれているため、健康志向の一つとして、“玄米食” が注目されている。一方で、フィチン酸のリン酸基とミネラル元素が結合し、体外に排出されるため、玄米摂取によるミネラル阻害という問題が報告されている。そこで、玄米のミネラル阻害を抑制するために、フィチン酸に含まれるリン酸基の一部を脱リン酸し、摂取する方法の検討を行った。玄米を調味料として用いられる食塩水 (塩化ナトリウム) で洗浄し、結合しているリン酸基の変化を調べた。さらに、フィチン酸含量が少ない精白米と、玄米の抗酸化力の違いを調べた。

米粉、玄米粉、発芽玄米粉のフィチン酸 (IP6) とイノシトール5リン酸 (IP5) 量を、液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。IP6は玄米粉、発芽玄米粉に多く、IP5は玄米粉に多く含まれていたが、米粉では両成分が低値を示した。

また、玄米粉を塩化ナトリウム溶液 (0.5、1.0、3.0、5.0%濃度) で洗浄し、HPLCによって、水溶性抽出分と脂溶性抽出分に分け、各抽出分のIP6、IP5、イノシトール4リン酸 (IP4) の定量を行った。IP6は脂溶性抽出分に多く含まれ、IP5とIP4は水溶性抽出分に多く含まれていた。また、洗浄に使用した塩化ナトリウム濃度が大きくなると、IP6、IP5、IP4濃度が高くなった。

米粉と玄米粉を同様に塩化ナトリウム溶液で洗浄し、その後、抗酸化力の指標である過酸化脂質生成量の変化をTBARS (八木) 法で調べた。塩化ナトリウム濃度が高くなると、米粉では過酸化脂質量の増加がみられたが、玄米ではその増加が見られなかった。このことから、玄米粉は白米粉と比べ、過酸化脂質生成が抑制される事が明らかになった。

キーワード：玄米、フィチン酸、抗酸化作用、塩化ナトリウム

【はじめに】

日本型食生活において、米は日常的に摂取している最も重要なエネルギー源である。江戸時代には「玄米」が一般的な主食であったが、現代では、「白米」に変わっている。白米は炊きやすさ、食べやすさ、おいしさ、消化のしやすさといった付加価値を高め、消費者の需要が高まった。しかし、米の豊富な栄養成分は外部の糠層に多く含まれている^{1) 2)} ため、表1に示したように、玄米は白米と比較すると、脂質、無機質 (カリウム、マグネシウム、リン、鉄、マンガン)、ビタミン (E、B1)、食

* 文教大学健康栄養学部管理栄養学科4年

** 文教大学健康栄養学部教授

表1. 『五訂日本食品標準成分表』³⁾ による米の成分比較

食品名	可食部100g当たり																				
	エネルギー	水分	たんばく質	脂質	炭水化物	灰分	無機質							ビタミン					食物繊維総量		
							ナトリウム	カリウム	カルシウム	マグネシウム	リン	鉄	亜鉛	銅	マンガン	レチノール当量	E	B1		B2	C
	kcal	g					mg							g	μg	mg				g	
精白米	356	15.5	6.1	0.9	77.1	0.4	1	88	5	23	94	0.8	1.4	0.22	0.8	0	0.2	0.08	0.02	0	0.5
玄米	350	15.5	6.8	2.7	73.8	1.2	1	230	9	110	290	2.1	1.8	0.27	2.05	0	1.3	0.41	0.04	0	3

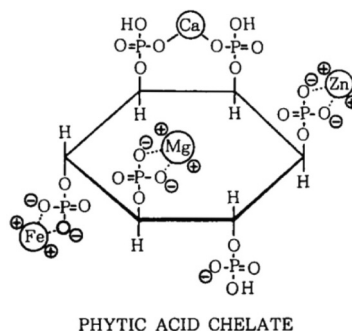
物繊維の栄養成分量が高い。

生体内酸化のメカニズムの研究が進み、その酸化を抑制する抗酸化食品の開発が進められている^{4) 5)}。玄米には抗酸化成分として、フィチン酸 (phytic acid、イノシトール6リン酸、IP-6)⁶⁾ が多く含まれている。このため、玄米の中に含まれる抗酸化物質を利用した食品の開発が報告されている。

フィチン酸の構造式を図1に示した。フィチン酸は、myo-イノシトールの6個の水酸基がすべてリン酸エステル化した物質であり、これにマグネシウム、カリウム、カルシウムなどのミネラルが結合することで、フィチン (phytin) となる⁷⁾。

フィチン酸を形成するイノシトールには、6カ所のリン酸基があり、イノシトールのリン酸化合物は、これに結合したリン酸基によって、呼び名が異なる。イノシトール1リン酸 (IP1) からイノシトール5リン酸 (IP5) まであり、IP6がフィチン酸と呼ばれている。フィチンはリンの主要な貯蔵形態となっており、穀類や種子などの植物体に多く含まれている^{10) 11) 12)}。また、強い金属キレート作用から、酸化防止剤、pH調整剤、変退色防止剤などの食品添加物としても利用される^{13) 14)}。最近では、フィチン酸が細胞のシグナル伝達作用に関与している事がわかり、がん抑制遺伝子に関するシグナル伝達の研究も行われている^{15) 16)}。

一方でフィチン酸を多く含む、玄米摂取にはいくつかの問題がある。その一つに、ミネラルの摂取量が低い開発途上国の幼少期において、大量に玄米を摂取することで、ミネラル吸収を阻害することも挙げられている^{17) - 20)}。それとは対照的に、生理的濃度ではミネラル吸収阻害はないという報告もある²¹⁾。さらに、日本型食生活では多くの食品が同時に摂取されるので、食べ合わせによってこの阻害効果が抑制される事も述べられている。また、玄米に対して発芽玄米は、玄米に含まれるフィチン酸がフィターゼによって分解されるため、ミネラルの吸収阻害が抑制される事が報告されている²²⁾。しかしフィチン酸が実際にミネラルを阻害する機構についての報告はまだ少ない。Lonnerdalらは、フィチン酸であるイノシトール6リン酸 (IP6) のイノシトールに結合するリン酸を少なくすると、ミネラルの溶解性を高める事を報告している²³⁾。さらに、フィチン酸塩を加水分解し、得られたIP3~IP6を調整してイノシトールリン酸塩の亜鉛、カルシウムの吸収阻害について調べた報告もある。その結果フィチン酸の吸収阻害作用に比べてIP3~IP5では阻害作用が弱くなっている事が報告されている。



PHYTIC ACID CHELATE

図1. 中性環境下におけるフィチン酸と各種金属とのキレート^{8) 9)}

本研究では、フィチン酸のミネラル吸収阻害に注目して、白米と玄米でフィチン酸の定量を行った。さらに、食事の中で調味料として使われている食塩（塩化ナトリウム、NaCl）で洗浄し、フィチン酸のリン酸基に変化が見られるか調べ、またフィチン酸のリン酸基と抗酸化作用の関係についても調べた。その結果から、玄米をどのように処理すれば、ミネラル等の栄養素を排出することなく、さらに抗酸化作用を示すIP3~IP6を摂取できるか検討を行った。今後、健康食の一つとして注目されるであろう、玄米食の有用性や日本型食生活の見直しについて考察を加えた。

【実験方法】

1. 材料

新潟県魚沼産コシヒカリを100%原料としたうるち米粉、玄米粉、発芽玄米粉（有限会社 大幸）を使用した。発芽玄米は、玄米を温度（28~30℃）で15時間位専用のタンクに浸漬させ、0.5~1.0 mmほど発芽させたもの。各うるち米粉（以後、米粉と省略）、玄米粉、発芽玄米粉は、自然乾燥後（水分28%）、湿式気流粉碎（スーパーパウダーミル）において、微細粉（35ミクロン）にしたものを使用した。

2. 試薬

トリクロル酢酸（特級）、ピリジン（一級）は関東化学社製のものを使用した。塩化ナトリウム（特級）、リノール酸（一級）、エタノール（特級）、塩化鉄（Ⅲ）六水和物（特級）、SDS溶液（一級）、酢酸（特級）、TBA試薬（特級）、n-ブタノール（特級）、超純水（LC/MS用）、50%フィチン酸（化学用）、リン酸緩衝液（D'PBS）、いずれも和光純薬社製を使用した。

3. 方法

（1）米粉、玄米粉、発芽玄米粉中のIP5とIP6の定量

①試料の作成

IP5とIP6定量のためのサンプル試料作成では、米粉、玄米粉、発芽玄米粉を7.0 gを採取して100 ml容三角フラスコにとり、3%TCA溶液50 mlを加え、45分間攪拌した。その後、懸濁液を50 mlチューブに移し、4℃で13000 rpm/分で20分遠心分離を行い、上清を濾紙（東洋No.5B）で濾過したのち、濾液を採取して、試料として使用した。

②HPLCを用いたIP5、IP6の定量

米粉、玄米粉、発芽玄米粉中のIP5、IP6の定量をHPLCで行った。ポンプはSSC-8200（センシユー科学）、カラムはShodex Asahipak GS-220 HQ、温度は室温、検出器RI（ERC-7525）で行った。溶媒は10mM-HClO₄を用いて、流速0.6 ml/min、注入量100 μlで行った。

（2）玄米粉中の塩化ナトリウム洗浄による水溶性、脂溶性溶液中のIP4、IP5、IP6の定量

①試料の作成

玄米粉1 gを15 mlチューブに採取、水又は各塩化ナトリウム水溶液（0.5、1.0、3.0、5.0%）²⁴⁾を加え、室温で10分間混和反応させた。この懸濁液を4℃で6000 rpm/分、5分、遠心分離を行った。上清をデカンテーションによって取り除き、水で沈殿物を洗浄した。さらに、懸濁液を4℃で6000 rpm/分、5分遠心分離し、上清をデカンテーションによって取り除き、再度水で沈殿物を洗浄した。この時

の上清を、水溶性の試料として採取した。

沈澱物を各1.0 g、15 mlチューブに採取し、そこに80%エタノール溶液を3 ml加え混合し²⁶⁾、4℃で6000 rpm/分、5分遠心分離を行った。この時の上清を、脂溶性の試料として採取した。

採取した水溶性、脂溶性の試料から、各1 ml取り、3%TCA溶液7 mlを加え、45分間攪拌した。その後、懸濁液を4℃で13000 rpm/分、20分遠心分離を行い、上清を試料として使用した。

②HPLCを用いたIP4、IP5、IP6の定量法

上記のHPLC法と同様な方法で分析を行った。

(3) 米粉、玄米粉の塩化ナトリウム洗浄による過酸化脂質生成量の測定

①米粉、玄米粉の塩化ナトリウム、水洗浄の方法

米粉、玄米粉の試料1.2 gを15 mlチューブに採取、水又は各塩化ナトリウム水溶液 (0.5、1.0、3.0、5.0%)²⁴⁾を加え、室温で10分間混和反応させた。この懸濁液を4℃で6000 rpm/分、5分、遠心分離を行った。上清をデカンテーションによって除き、水で沈澱物を洗浄した。さらに、懸濁液を4℃で6000 rpm/分、5分遠心分離し、上清をデカンテーションによって除き、再度水で沈澱物を洗浄した。

②米粉、玄米粉のリノール酸との酸化反応²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾

沈澱物を各1.0 gずつ、15 mlチューブに採取し、そこに蒸留水4 mlを加えよく攪拌した。さらに、リン酸緩衝液2 ml、2.6%リノール酸エタノール溶液2 ml、塩化鉄(Ⅲ) (50 µg/ml) 溶液を1 mlを加え、37℃で10分混和反応させた。懸濁液は4℃で6000 rpm/分、5分遠心分離し、上清をデカンテーションによって除いた。沈澱物には、80%エタノール溶液を2 ml加え混合し、4℃で6000 rpm/分、5分遠心分離を行った²⁸⁾。

③酸化反応により生成した過酸化脂質の測定²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾

上清から、各1 mlを遠沈管に採取し、8.1%SDS溶液0.2 ml、20%酢酸1.5 ml、0.8%TBA試薬1.5 mlを加え混和した。さらに、蒸留水1 mlを加え、沸騰水中で45分間加熱した。冷却した後、蒸留水1 ml、n-ブタノール：ピリジン(15：1)5 mlを加えて、激しく3分間混和させた。4℃で4000 rpm/分、10分遠心分離にかけた後、上清を532 nmで吸光度測定を行った。

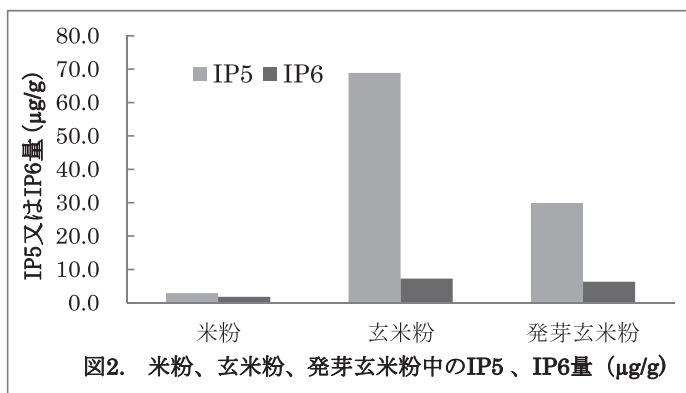
【結果】

(1) 米粉、玄米粉、発芽玄米粉中のIP5とIP6の量

フィチン酸のTCA溶液によって、除タンパクした後のIP5とIP6の量を図2に示した。各試料1 g中に含まれるフィチン酸は、米粉にはIP5が2.9 µg/g、IP6が1.8 µg/gであり、IP5+IP6では4.7 µg/gであった。玄米粉には、IP5が68.9 µg/g、IP6が7.3 µg/gであり、IP5+IP6では76.2 µg/g、発芽玄米粉には、IP5が29.9 µg/g、IP6が6.3 µg/gであり、IP5+IP6では36.2 µg/gであった。

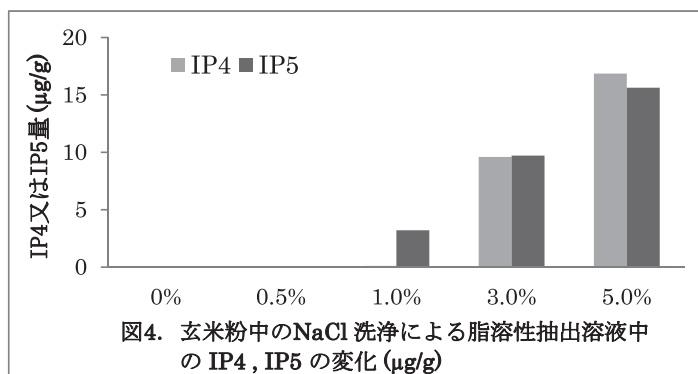
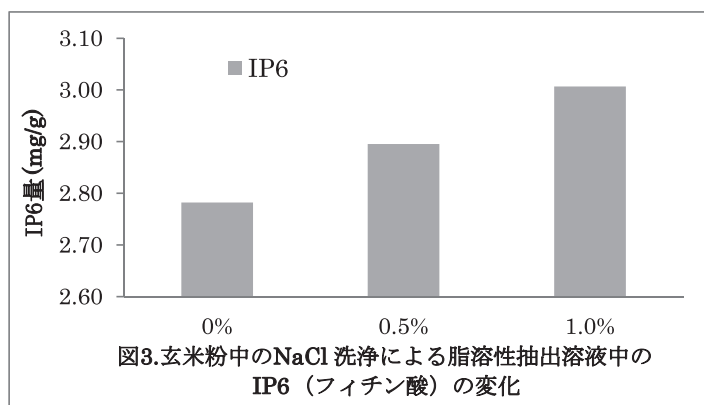
(2) 玄米粉中の塩化ナトリウム洗浄による水溶性、脂溶性溶液別のIP4、IP5、IP6の量

玄米粉の塩化ナトリウム洗浄後の脂溶性溶液抽出中のIP6量の結果を図3に示した。塩化ナトリウム濃度0%で2.73 mg/g、0.5%で2.90 mg/g、1.0%で3.01 mg/gであった。洗浄の塩化ナトリウム濃度が高くなるほど、脂溶性溶液に抽出されるIP6量は増加することが示された。玄米粉の塩化ナトリウム

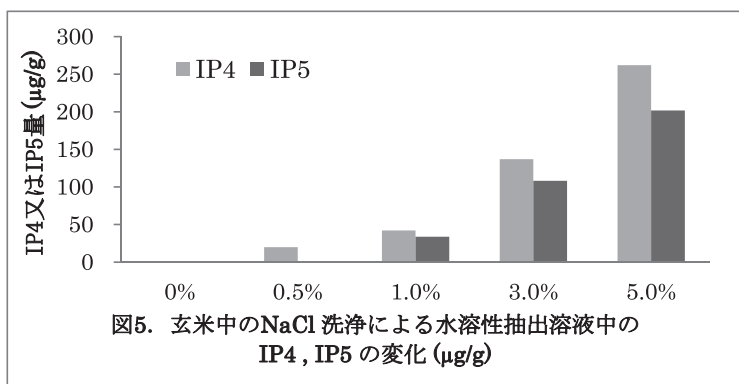


洗浄後の水溶性溶液抽出のIP6量も測定したが、ピークが見られなかった。

玄米粉中の塩化ナトリウム洗浄による、脂溶性溶液抽出のIP4、IP5量の結果を図4に示した。塩化ナトリウム濃度0%および0.5%では、IP4は0 $\mu\text{g/g}$ 、IP5も0 $\mu\text{g/g}$ であった。塩化ナトリウム濃度1.0%では、IP4は0.11 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は3.21 $\mu\text{g/g}$ 、塩化ナトリウム濃度3.0%では、IP4は9.59 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は9.72 $\mu\text{g/g}$ 、塩化ナトリウム濃度5.0%では、IP4は16.86 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は15.63 $\mu\text{g/g}$ であった。

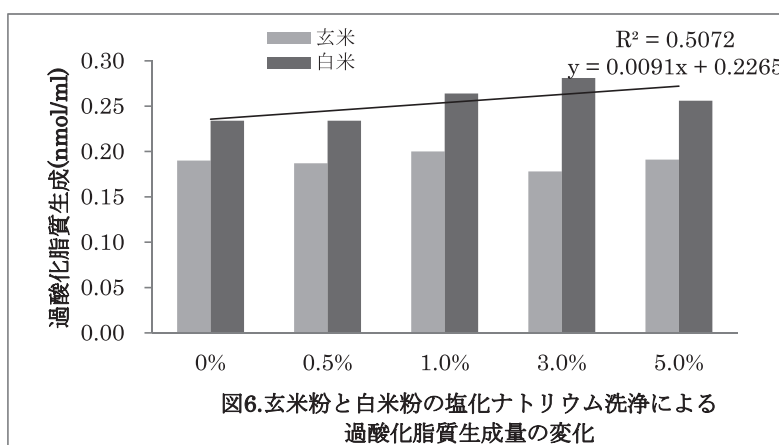


玄米粉中の塩化ナトリウム洗浄による、水溶性溶液抽出のIP4、IP5量の結果を図5に示した。洗浄塩化ナトリウム濃度0%では、IP4は0 $\mu\text{g/g}$ 、IP5も0 $\mu\text{g/g}$ であった。塩化ナトリウム濃度0.5%では、IP4は20 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は0 $\mu\text{g/g}$ 、塩化ナトリウム濃度1.0%では、IP4は42 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は34 $\mu\text{g/g}$ 、塩化ナトリウム濃度3.0%では、IP4は137 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は108 $\mu\text{g/g}$ 、塩化ナトリウム濃度5.0%では、IP4は262 $\mu\text{g/g}$ 、IP5は202 $\mu\text{g/g}$ であった。



(3) 米粉、玄米粉の塩化ナトリウム洗浄による過酸化脂質生成量の変化

洗浄の塩化ナトリウム濃度が大きくなると、米粉ではリノール酸による過酸化脂質量が増加したが、玄米粉では増加が見られなかった。塩化ナトリウム濃度を増加させると、過酸化脂質量は有意に増加するが、玄米粉では過酸化脂質の生成が抑制された。



【考察】

米粉、玄米粉、発芽玄米粉中のフィチン酸量をTCA溶液によって、除タンパクした後、IP5とIP6の量について測定を行った。米粉では低濃度だが、玄米ではIP5が有意に高濃度で、IP6は発芽玄米とほぼ同濃度であった。このことから、発芽玄米で働くと考えられているフィチン酸分解酵素フィターゼは、IP6には作用しにくく、IP5やIP4以下のリン酸基の分解に働いた事が考えられる。IP6は脂溶性の

ため、フィターゼは働きにくく、1つ脱リン酸されたIP5に、作用する事が考えられた。

塩化ナトリウムの添加量は、1%程度の食塩量が美味しいと感じることから²⁴⁾、米の洗浄に塩化ナトリウム濃度が1%前後の異なる溶液を使い脂溶性と水溶性溶液中に含まれるIP6、IP5、IP4の量を調べた。その結果、塩化ナトリウムによる洗浄によって、IP6はリン酸基がはずれてIP5、IP4へ変化することが示された。塩化ナトリウム溶液の濃度が高くなるにつれて、脂溶性及び水溶性のIP4、IP5は増加傾向にあった。また、IP6は脂溶性抽出溶液に高濃度であるに対し、リン酸基がはずれたIP5、IP4では水溶性抽出溶液に増加する事が観察された。これは、リン酸基がはずれたことにより、Naや他の水酸基におきかわり、水に溶けやすくなった事が考えられた。

米粉、玄米粉の塩化ナトリウム洗浄により、過酸化脂質量の変化を求めたところ、米粉では、玄米と比べ過酸化脂質量の生成量が有意に高い値を示した。この事から、玄米には白米と比べ、抗酸化作用を示すフィチン酸が多く含まれ、過酸化脂質の生成量を抑制した事が考えられた。また、IP6の抗酸化力に加え、塩化ナトリウム洗浄によってリン酸基がはずれたIP5、IP4もまた抗酸化作用を示す事が考えられた。

また、米粉では洗浄した塩化ナトリウムの濃度が高くなると、過酸化脂質量も高くなる事が示された。この事は、米粉に含まれる親水性の官能基と結合していた金属イオンが過剰のナトリウムイオンと置換し、遊離された金属イオンが、酸化の触媒になり過酸化脂質の生成を促進した事が考えられた。

玄米に多く存在するフィチン酸(IP6)のミネラル吸収阻害作用については、様々な報告がされている。阻害作用はIP6のみではなく、イノシトールからリン酸基がはずれたIP5、IP4の状態でも考えられる。本実験では定量を行わなかったが、フィチン酸はIP3、IP2への変化も報告されている²⁵⁾。リン酸基の数が少なくなると、ミネラルの結合は低くなるので、排出量も少なくなると同時にミネラル阻害作用も低くなる事が考えられる。一方で過酸化脂質生成の触媒となる金属を結合するキレート作用も低下し、従って抗酸化作用も低下する事が予測される。どちらの作用も兼ねる事は難しい。

これらの事から、今後、健康食として玄米が摂取される時、フィチン酸のミネラル吸収阻害作用を、調理に使用する食塩(塩化ナトリウム)を始め、食べ合わせによる他の食材を摂取し、摂取したミネラル分によって、ある程度のリン酸基を取り除く事ができるのではないかと考えられる。発芽玄米も、フィチン酸を分解するフィターゼの働きによって、このミネラル吸収阻害が軽減されている事で注目されている。

私たちが主食として、日常的に摂取している米において、最も豊富な栄養素や、フィチン酸を代表する機能性成分は、玄米の糠層に含まれている。近年、消費者のニーズが「健康志向」へ移行してきており、玄米食を中心としていた伝統的な日本型食生活が、見直される。今後は、米自身が持つ栄養や機能性のみならず、焦点を当てていくことに加え、“人が食べる”という点から、食べやすさ、おいしさといった点の改善も必要になってくると考えられる。栄養機能性と嗜好性の両面から、食生活に取り入れやすいように工夫し、正しい知識のもとで時代のニーズに合わせた「食」を提供していくことが課題であると考えられた。

【文献】

- 1) 大坪研一,米の化学成分-米の化学,大谷孝佑,大坪研一編,朝倉書店,東京,18-48,1995
- 2) 猪谷富雄,建本秀樹,岡本実剛,藤井一範,武藤徳男,有色米の抗酸化活性とポリフェノール成分の品種間差,日本食品科学工学会誌,49,8,540-543,2002
- 3) 文部科学省,五訂日本食品標準成分表,科学技術・学術審議会・資源調査分科会,2005

- 4) 石川祐子,食品素材・成分の抗酸化性,独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構,食品総合研究所,19-58,2009
- 5) 二木鋭雄,成人病予防食品の開発,シーエムシー出版,1998
- 6) Graf,E.andEaton,J.W.,Antioxidant Functions of Phytic Acid, *Freeradic Bio Med* 8(1)60,1990
- 7) 谷口久次,橋本博之,細田朝夫,米谷俊,築野卓夫,安達修二,米糠含有成分の機能性とその向上.日本食品科学工学会誌,58,7,301-318, 2012
- 8) 早川利郎,伊賀上郁夫,フィチン酸の構造と機能,日本食品科学工学会誌39(7)647,1992
- 9) Erdeman J.W Jr, *J Am.Oil.Chem.*56,736,1979
- 10) 日本食品科学工学会,新・食品分析法,光琳,1996
- 11) フィチン酸について,*Japan Food Research Laboratories*,78,2008
- 12) 木村午朗,フィチン酸について,有機合成化学,25(2)167-179,1967
- 13) 重松康彦,田辺聖子,長谷川峯夫,HILICを用いた米糠中のフィチン酸分法,第20回日本香辛料研究会要旨集 2005
- 14) Richard Hurrell, Influence of Vegetable Protein Sources on Trace Element and Mineral Bioavailability, *American Society for Nutritional Sciences*,133(9)2873-7, 2003
- 15) A.M.Shamsuddin,I.Vucenik,K.E.Cole, IP6 A Novel Anticancer Agent, *Life Science*,61(4)343- 353,1997
- 16) 大坪研一,穀類が持つ生理機能,農業および園芸,72,89-94,1997
- 17) 相川律子,神馬征峰,開発途上国における鉄欠乏性貧血症対策,国際協力研究 191,37,39-45,2003
- 18) Schlemmer, U., Frolich, W., Prieto, R.M. and Grases, F., Phytate in foods and significance for humans:food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol Nutr. Food Res.* 53, 330-375, 2009
- 19) Ivana Vucenik,Abul Kalam M.Shamsuddin,Cancer Inhibition by Inositol Hexaphosphate(IP6) and Inositol, *From Laboratory to Clinic, American Society for Nutritional Sciences*, 2003
- 20) Ernst graf, John W.raton, Effects of Phytate on Mineral Bioavailability in Mice, *JN the journal of nutrition*,133,1192-1198,1984
- 21) Shamsuddin,A.M.,天然抗がん物質IP6の驚異,講談社46-48,60-61,144-145,2000
- 22) Wang, Y., Cheng, Y., Ou, K., Lin, L., and Liang, J. In vitro solubility of calcium, iron and zinc in rice brain treated with phytase, cellulose and protease. *J Agric Food Chem.* 56, 11868-74, 2008
- 23) 桑田五郎,岩附聡,遠山純子,今井正武,イノシトールリン酸のカルシウム沈殿阻害活性,日本栄養・食糧学会誌, 46(1)83- 88,1993
- 24) 白井展也,鈴木啓太郎,大坪研一,NaClを添加した発芽玄米の高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) の血圧上昇抑制効果と血糖調整に関連するホルモンへの影響,日本食品科学工学会誌,58(7)324-329,2011
- 25) Mi Ra Yoon,Seok Hyun Nam,Mi Young Kang,Antioxidative and Antimutagenic Activities of 70% Ethanolic Extracts from Four Fungal Mycelia-Fermented Specialty Rices,*J.Clin.Biochem.Nutr.*,43, 118-125,2008
- 26) 小澤美奈子,基礎生化学実験法5脂質・糖質・複合脂質,社団法人日本生化学学会,54-57,2002
- 27) 菊川清見,過酸化脂質・フリーラジカル実験法(生化学実験法34),学会出版センター,144,1994
- 28) 菊川清見,脂質栄養と脂質過酸化(脂質栄養学シリーズ2),学会出版センター,55,1998