

セレン強化スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化活性の評価

大津浩平, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘

(関西大学化学生命工学部生命・生物工学科*)

(受付 2017年9月1日, 受理 2017年9月21日)

Evaluation of the Antioxidant Content and Antioxidant Activity in Selenium-enriched Sprouts of Broccoli and Mung Bean

Kohei OOTSU, Ryota HOSOMI, Kenji FUKUNAGA and Munehiro YOSHIDA

Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University

Summary

We evaluated the effect of selenite exposure on the antioxidant content and antioxidant activity in the sprouts of broccoli (*Brassica oleracea*) and mung bean (*Vigna radiata*). After cultivation at 25 °C for 7 days with 0, 10, or 20 ppm selenite, we measured the antioxidant content (total ascorbic acid and total polyphenol) and the antioxidant activities (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical absorbing activity and superoxide dismutase-like ability) in the sprouts. The fresh weight and hypocotyl lengths were found to have significantly decreased in the sprouts exposed to 10 and 20 ppm of selenite. However, the selenium content of the sprouts increased with selenite exposure levels. Total ascorbic acid and total polyphenol contents were significantly enhanced in accordance with the exposure to selenite. DPPH radical absorbing activity was also increased at higher levels of selenite exposure. These results indicate that the total ascorbic acid and total polyphenol contents were increased in the sprouts by selenite exposure, and consequently, the DPPH radical absorbing activity also strengthened. These findings suggest that selenite exposure could be useful for producing sprouts with higher antioxidant activities.

生体内で発生する活性酸素やフリーラジカルと生活習慣病や老化との関連が注目されている。野菜には、ビタミンCやポリフェノールといった抗酸化物質が含まれており、活性酸素やフリーラジカルを消去する機能が多数報告されているため、生活習慣病の予防という観点から、野菜に含まれる抗酸化物質の含有量を増大させる試みが行われている¹⁻³⁾。たとえば、栽培中に照射する光の強度、補光時間の長さ、光質を変化させることでブロッコリーの総ポリフェノール含量が増大することが報告されている¹⁻²⁾。また、養液の電気伝導度の違いによって、イソチオシアネート含量が変化することが報告されている³⁾。これらの研究から、生育環境を制御することにより、抗酸化物質の含有量を植物個体レベルで調節しうることを示している。

水耕環境下で発芽・生育させたスプラウトは抗酸化物質を効率的に摂取できる利点を持ち注目されている。スプラウトに含まれるポリフェノールの一種であるアントシアニンやフラボノイド類には高い抗酸化活性や抗炎症作用^{4,5)}、イソチオシアネートの一種であるスルフォラファ

ンは抗がん作用が報告されている⁶⁾。ブロッコリースプラウトにおいては、スルフォラファンが、成熟ブロッコリーの30倍以上含まれていることが報告されている⁷⁾。さらに、スプラウトは、水耕に用いる養液に添加された低分子化合物を容易に取り込むため、意図的に特定の栄養素含量を高めることが可能である。我々は、鉄、亜鉛、セレンといった必須微量元素を強化したスプラウトの調製を試みており⁸⁾、その中で、高濃度セレン環境下で栽培したカイワレダイコンスプラウトには、大腸前癌病変の進行を抑制する効果を有することを報告した⁹⁾。しかし、高濃度セレン環境下で栽培したスプラウトの抗酸化物質含量や抗酸化活性について評価した報告はない。そこで本研究では、高濃度セレン環境下で栽培したブロッコリー (*Brassica oleracea*) および緑豆モヤシ (*Vigna radiata*) スプラウトについて、抗酸化成分として総ビタミンCと総ポリフェノール含量、抗酸化活性として1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル捕捉活性、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 様活性を評価した。

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

†連絡先 (Corresponding Author), Tel: 06-6368-1765, E-mail: hryotan@kansai-u.ac.jp

実験方法

1. セレン強化スプラウトの調製

プラスチック容器にセレンとして0 ppm (対照), 10 ppm, 20 ppm の亜セレン酸ナトリウムを含む蒸留水を含ませた脱脂綿を広げ、ブロッコリー (*B. oleracea*), または緑豆モヤシ (*V. radiata*) の種子 20 粒を播種した。容器を密閉し、モヤシは5日間、ブロッコリーは7日間暗所で放置した。その後、長日条件の光周期のもと、25℃で2日間栽培した (CLE-305, 株式会社トミー精工, 東京)。採取したスプラウトから根を取り除き、胚軸長および新鮮重量を測定した。総ポリフェノール量と抗酸化活性の分析には、各スプラウトを3倍量の蒸留水でホモジナイズし、10,000 rpm で5分間遠心分離を行った後の上清をスプラウト抽出液として用いた。

2. 誘導結合プラズマ質量分析によるセレン含量の測定

各スプラウトを0.5 g 秤量後、ケルダールフラスコに移し、濃硝酸 2 mL を加え、不溶物がなくなるまで加熱した。冷却後、過塩素酸 1 mL を加え、過塩素酸の白煙が生じるまで加熱灰化した。超純水を加えて 10 mL にメスアップし、0.45 μm フィルターでろ過したものをセレン測定試料とした。試料溶液中のセレンの定量は、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により行った。使用機種は ICPMS-2030 (株式会社島津製作所, 京都), 分析質量数は 82, 内部標準はロジウムとした。

3. 総ビタミンCの定量

各スプラウトを5%メタリン酸溶液にてホモジナイズ後、10 mL に定容した。次に 3,000 rpm で5分間遠心分離を行い、その上清を試料溶液とした。総ビタミンC量は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNP) 法で測定した¹⁰⁾。酸化型ビタミンCはインドフェノールを用いて還元し、総ビタミンC量として求めた。

4. 総ポリフェノールの定量

Folin-Denis 法による波長 760 nm の吸光度を測定し、スプラウト新鮮重 100 g 当たりの没食子酸量に換算して表示した¹¹⁾。

5. DPPH ラジカル消去活性の測定

各スプラウト抽出液 200 μL を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) 800 μL と混合し、0.5 mM DPPH-エタノール溶液 1 mL を加えた。コントロールはスプラウト抽出液の代わり蒸留水とした。室温、暗所で 20 分間反応させ、波長 517 nm における吸光度を測定した¹²⁾。試料の DPPH ラジカル消去活性は、次式により算出した。

$$\text{DPPH ラジカル消去活性 (\%)} = \{(Ac - As) / Ac\} \times 100$$

Ac はコントロールの吸光度, As は試料の吸光度とした。

6. SOD 様活性の測定

SOD を失活させため、各スプラウト抽出液を沸騰水中で5分間加熱した。SOD 様活性の測定は SOD テストワーク (和光純薬工業製) の用法に従って測定した。コントロールはスプラウト抽出液の代わり蒸留水とした。試料の SOD 様活性は、次式により算出した。

$$\text{SOD 様活性 (\%)} = \{(Ab - Abb) - (As - Asb) / (Ab - Abb)\} \times 100$$

Ab はコントロールの吸光度, Abb は酵素液の代わりにブランク液を加えたコントロールの吸光度, As は試料の吸光度, Asb 酵素液の代わりにブランク液を加えた試料の吸光度とした。

7. 統計解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した。一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差について Tukey の多重比較検定を用いた。統計処理は GraphPad Prism for Mac, ver 6.0 (GraphPad Software, Inc., California, USA) を用いて解析した。

結果と考察

種々の水準 (0, 10, 20 ppm) の亜セレン酸曝露を行った後、20 本のスプラウトを 1 本ずつの胚軸長および新鮮重量、セレン含量を測定した結果を Table 1 に示した。亜セレン酸無添加と比較し、ブロッコリーおよびモヤシスプラウトともに、10 ppm および 20 ppm 曝露で有意な胚軸長および新鮮重量の低下が確認された。ブロッコリースプラウトの 10 ppm と 20 ppm 曝露を比較すると、胚軸長において有意な差が認められたが、新鮮重量では有意な差はみられなかった ($p = 0.12$)。モヤシスプラウトの 10 ppm と 20 ppm 曝露間では、大きな変化はみられなかった。一方、セレン含量について、亜セレン酸無添加と比較し、ブロッコリーおよびモヤシスプラウトともに、10 ppm および 20 ppm 曝露で濃度依存的な上昇が確認された。これまでにブロッコリーは、Se-メチルセレノシステインの形態でセレンを蓄積する能力を有していることから、セレン耐性が高いことが知られている¹³⁾。ブロッコリースプラウトはモヤシスプラウトと比較して、約 4 倍セレン含量が高かったことは、両種のセレン耐性の違いが影響していると考えられる。

種々の水準の亜セレン酸曝露を行ったブロッコリースプラウトの総ビタミンC濃度、総ポリフェノール濃度、DPPH ラジカル消去活性と SOD 様活性を Fig. 1 に示した。総ビタミンC濃度および総ポリフェノール濃度は、亜セ

Table 1 The influence of 0, 10, and 20 ppm selenite on the hypocotyl length, fresh weight, and selenium content of the sprouts of broccoli and mung bean.

	Selenite exposure level		
	0 ppm	10 ppm	20 ppm
Broccoli sprout			
Hypocotyl length (cm)	4.6 ± 0.2 ^c	3.1 ± 0.3 ^b	2.8 ± 0.2 ^a
Fresh weight (mg)	64.8 ± 3.2 ^b	38.0 ± 2.0 ^a	31.0 ± 2.0 ^a
Se content (ppb)	5.27 ± 0.03 ^a	264.27 ± 1.67 ^b	392.33 ± 2.24 ^c
Mung bean sprout			
Hypocotyl length (cm)	9.4 ± 1.0 ^b	5.3 ± 0.3 ^a	5.5 ± 0.2 ^a
Fresh weight (mg)	324 ± 22 ^b	171 ± 4 ^a	194 ± 6 ^a
Se content (ppb)	5.28 ± 0.05 ^a	63.13 ± 2.07 ^b	97.43 ± 2.16 ^c

Data represent means ± standard error of the means (SEM).

Values in the same row, not sharing a common superscript letter, were significantly different at $p < 0.05$ according to the Tukey's multiple comparisons test.

Se, selenium.

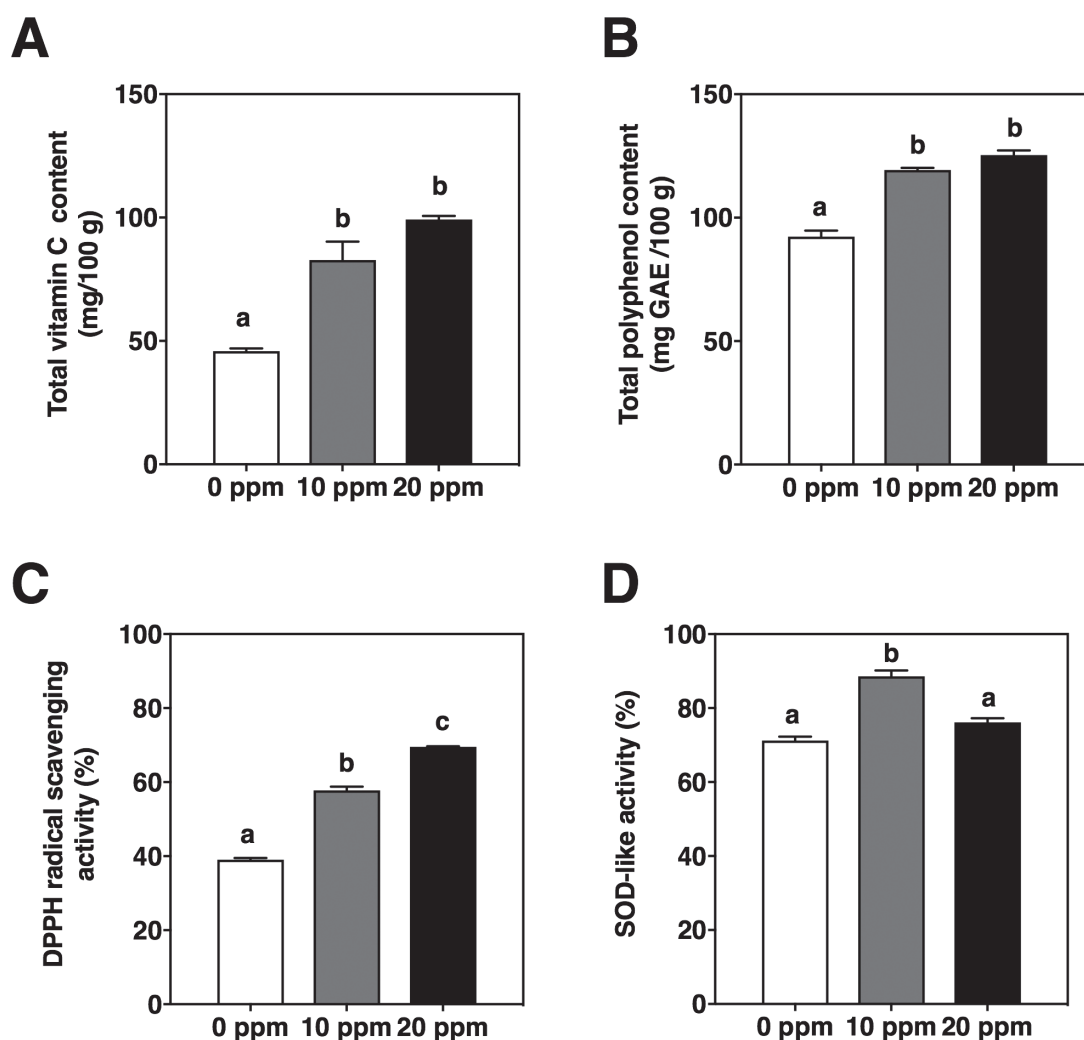


Fig. 1 The influence of 0, 10, and 20 ppm selenite on the total vitamin C content (A), total polyphenol content (B), DPPH radical scavenging activity (C), SOD-like activity (D) in sprout of broccoli.

Data represent means ± standard error of the means (SEM) (n = 4).

Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ according to the Tukey's multiple comparisons test. DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; GAE, gallic acid; SOD, superoxide dismutase.

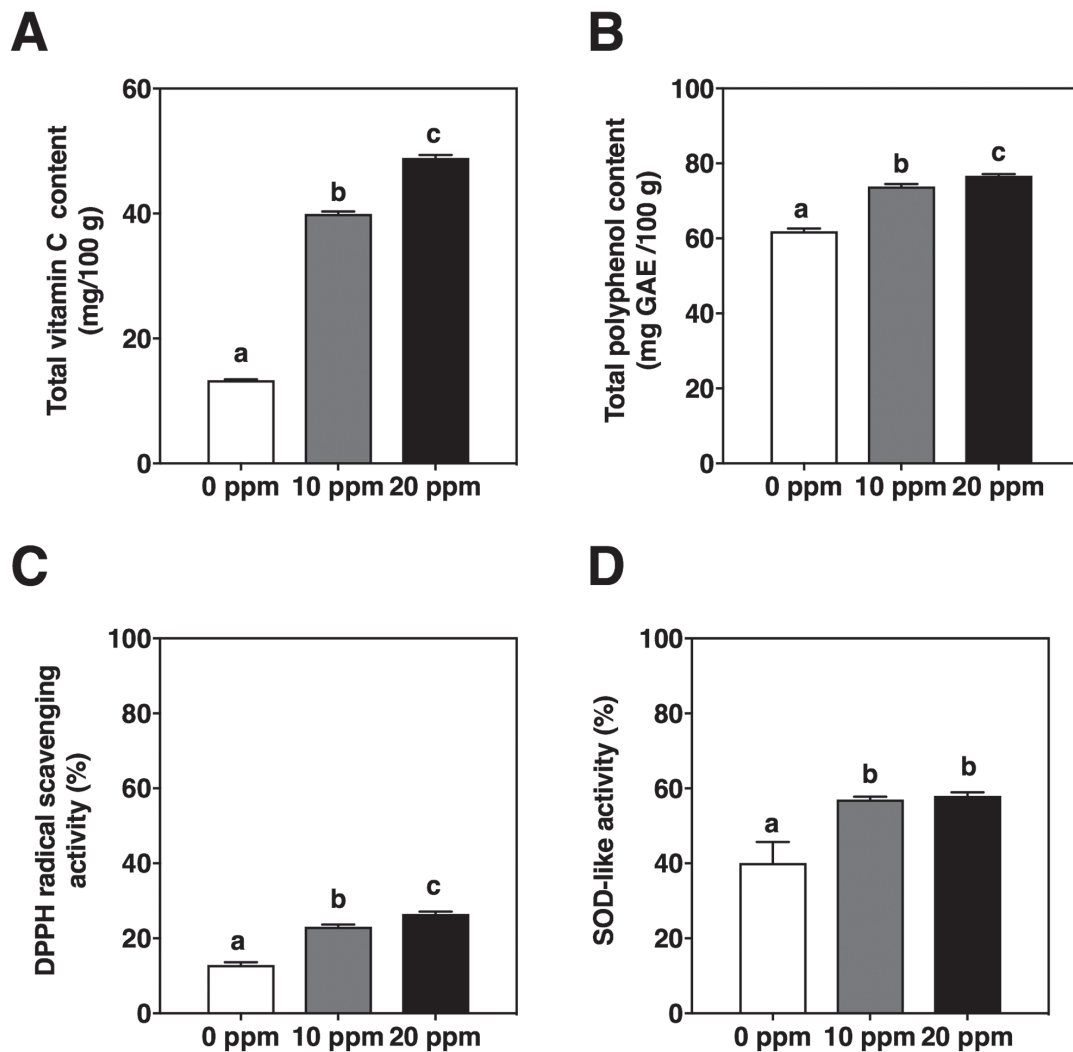


Fig. 2 The influence of 0, 10, and 20 ppm selenite on the total vitamin C content (A), total polyphenol content (B), DPPH radical scavenging activity (C), SOD-like activity (D) in sprout of mung bean. Data represent means \pm standard error of the means (SEM) ($n = 4$). Values not sharing a common letter are significantly different at $p < 0.05$ according to the Tukey's multiple comparisons test. DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl; GAE, gallic acid; SOD, superoxide dismutase.

レン酸無添加と比較し、10 ppm および 20 ppm 曝露で有意な上昇が確認された。DPPH ラジカル消去活性は、亜セレン酸無添加と比較し、10 ppm および 20 ppm 曝露で濃度依存的な活性上昇が確認された。一方、SOD 様活性は、亜セレン酸無添加と比較し、10 ppm 曝露で活性上昇が確認されたが、20 ppm 曝露では有意な差はみられなかった。

一方、亜セレン酸曝露を行ったモヤシプラウトの総ビタミンC濃度、総ポリフェノール濃度、DPPH ラジカル消去活性と SOD 様活性を Fig. 2 に示した。亜セレン酸無添加と比較し、総ビタミンC濃度は、10 ppm および 20 ppm 曝露で濃度依存的な上昇が確認され、20 ppm 曝露では約 3 倍の上昇がみられた。総ポリフェノール濃度は、10 ppm および 20 ppm 曝露で有意な上昇が確認された。DPPH ラジカル消去活性は、亜セレン酸無添加と比較し、10 ppm および 20 ppm 曝露で濃度依存的な活性上昇が確認された。SOD 様活性は、亜セレン酸無添加と比較し、

10 ppm および 20 ppm 曝露で有意な活性上昇が確認された。ブロッコリーおよびモヤシプラウトの抗酸化活性を比較すると、ブロッコリースプラウトは総ビタミンC濃度、総ポリフェノール濃度がともに高く、DPPH ラジカル消去活性および SOD 様活性においても高い活性を示した。

これまでに、DPPH ラジカル消去活性はポリフェノール含量やビタミンC含量と強い相関があることが知られている¹⁴⁻¹⁶。各スプラウトの DPPH ラジカル消去活性と総ビタミンC量および総ポリフェノール量の間には、ともに強い相関（それぞれ $r > 0.95$ ）が認められた。また DPPH ラジカル消去活性はセレン濃度とも強い相関（ブロッコリー $r = 0.99$ 、モヤシ $r = 0.97$ ）が認められた。セレン化合物の化学形態によって DPPH ラジカル消去活性が異なることが報告されており、無機セレンであるセレン酸と亜セレン酸は活性が低く、有機セレンであるセレンメチオニンやセレンシスタミンは活性が高い¹⁷。これまで

の我々の研究から、ブロッコリーおよびモヤシスプラウトに含まれるセレン化合物の化学形態は、ともにSe-メチルセレンシステインであると考えられる⁸⁾。Se-メチルセレンシステインのDPPHラジカル消去活性に関する報告は見当たらないため、どの程度関与しているかは不明である。一方、各スプラウトのSOD様活性と総ビタミンC量、総ポリフェノール量およびセレン含量の間には、DPPHラジカル消去活性のような強い相関はみられなかった。これらのことから、亜セレン酸を曝露したスプラウトは、新鮮重量あたりの総ビタミンC量と総ポリフェノール量が増大することで、DPPHラジカル消去活性が高まることが示唆された。

これまでに、カイワレダイコンスプラウトの培養時に水分量を少なくすると、新鮮重量の減少がみられるが、ポリフェノール量とDPPHラジカル消去活性が高くなることが報告されている¹⁸⁾。本研究において、両スプラウトともに、亜セレン酸を曝露することで胚軸長および新鮮重量の低下が見られた。亜セレン酸曝露によってスプラウト中の抗酸化物質の合成が高まったのではなく、元々種子に含まれていた抗酸化物質がスプラウトの生育が抑制されたために高濃度になっているだけとも考えられる。今後、亜セレン酸を曝露することでスプラウト中のビタミンCや総ポリフェノールなどの抗酸化物質の合成が高まっているのか検討する必要があると考える。

本研究から、高濃度セレン環境下で栽培したブロッコリーおよびモヤシスプラウトは、新鮮重量あたりの総ビタミンC量と総ポリフェノール量が増大することで、DPPHラジカル消去活性が高まることが示唆された。

謝 辞

本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（次世代ベンチトップ型シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究）の援助により実施したものである。

参考文献

- 1) 前川健二郎, 前田智雄, 大島千周, 鈴木卓, 大澤勝次 (2006) 数種アブラナ科スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化能に及ぼす照射光強度の影響. 園芸学研究 5: 315-320.
- 2) 前田智雄, 角田英男, 大島千周, 前川健二郎, 鈴木卓, 大澤勝次 (2006) 補光装置によるアブラナ科スプラウトのポリフェノール含量および抗酸化能の増大. 植物環境工学 18: 35-41.
- 3) 林三徳, 山本幸彦, 金丸隆 (1989) カイワレダイコンの栽培条件と形状・品質-1-培養液濃度, 栽培日数並びに日照時間の影響. 福岡県農業総合試験場研究報告 B (園芸) 9: 29-32.

- 4) Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD (2003) Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. Cancer Letters 194: 13-19.
- 5) Le Marchand L (2002) Cancer preventive effects of flavonoids-a review. Biomed Pharmacother 56: 296-301.
- 6) Sestili P, Fimognari C (2015) Cytotoxic and Antitumor Activity of Sulforaphane: The Role of Reactive Oxygen Species. Biomed Res Int. 2015: 402386.
- 7) 真部真里子, 中村薫 (2006) 生育光条件の異なるブロッコリースプラウトが腸管上皮細胞からのIL-7・TGF- β 分泌に及ぼす影響. 日本食品科学工学会誌 53: 437-442.
- 8) Sugihara S, Kondo M, Chihara Y, Yuji M, Hattori H, Yoshida M (2004) Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. Biosci Biotechnol Biochem 68: 193-199.
- 9) Yoshida M, Okada T, Namikawa Y, Matsuzaki Y, Nishiyama T, Fukunaga K (2007) Evaluation of nutritional availability and anti-tumor activity of selenium contained in selenium-enriched Kaiware radish sprouts. Biosci Biotechnol Biochem 71: 2198-2205.
- 10) 福永健治, 細見亮太 (2013) 基礎食品分析実験, 文教出版, 大阪: pp.157-174.
- 11) 藤山修二, 山田和彦 (2002) 五訂日本食品標準成分表に基づく定量実験「食品学実験書」第2版, 医歯薬出版, 東京: pp.115-116.
- 12) 渡辺達夫, 森光康次郎 (2008) 健康を考えた食品学実験, アイ・ケイコーポレーション, 東京, pp.112-114.
- 13) Lyi SM, Heller LI, Rutzke M, Welch RM, Kochian LV, Li L (2005) Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli. Plant Physiol 138: 409-420.
- 14) 立山千草, 五十嵐喜治 (2006) ナス野菜の栽培品種・部位別のアントシアニン量, クロロゲン酸量およびラジカル消去活性. 日本食品工業学会誌. 53: 218-224.
- 15) 菅原哲也, 野内義之, 五十嵐喜治 (2006) ジェネバ(クラブアップル)果汁のポリフェノール成分とラジカル消去活性. 日本食品工業学会誌. 53: 232-235.
- 16) 的場輝佳 (2007) 抗酸化作用を中心とした食の機能性. 日本食生活学会誌. 18: 205-210.
- 17) Saito Y, Umemoto D, Kidera Y, Sato T, Chikuma M (2005) DPPH radical scavenging activity of sele-

nocompounds: importance of selenium, Biomed Res Trace Elements 16: 332-335.

18) 松本恵子, 多田雄一, 清水浩, 澁澤栄 (2009) カイワ

レダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwardaikon (Japanese radish sprout)') の生育および抗酸化活性に与える給水量の影響. 植物環境工学. 21 : 79-85.