

<平成19年度>

ニンニク健康増進作用を強化させるための加工・保存技術の開発

赤川 貢

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

1. 緒言

ユリ科ネギ属の植物であるニンニク (*Allium sativum*) は古来より万病に効くといわれ、香辛料として食用にするほか、広く薬用に用いられてきた¹⁾。ニンニクには、ビタミンやミネラルの他に含硫化合物が豊富に含まれており^{2, 3)}、様々な保健機能を有することが知られており、現在では健康食品の原料として用いられている⁴⁾。多様な健康増進作用を持つニンニクの成分は、様々な調理加工過程において一部は分解するとともに新たな有効成分が生じることが知られている。アホエ

ン (ajoene) は、ニンニクを油脂中で加熱することで生成する新規含硫化合物として1984年に発見された⁵⁾。名称と発音はスペイン語でニンニクを意味する“ajo”に由来する。その構造は、分子内に不飽和結合を持つジスルフィドの一種である4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene-9-oxideのEおよびZ異性体の混合物として報告されている(図1)。ニンニクを刻んだり傷つけることによって細胞が壊れて空気に触れるとニンニク自身を持っている酵素アリイナーゼの作用を受けてアリイン (alliin, S-allyl-L-cysteine sulfoxide) からアリシン (allicin, diallyl thiosulfinate) が生成し⁶⁾、さらに

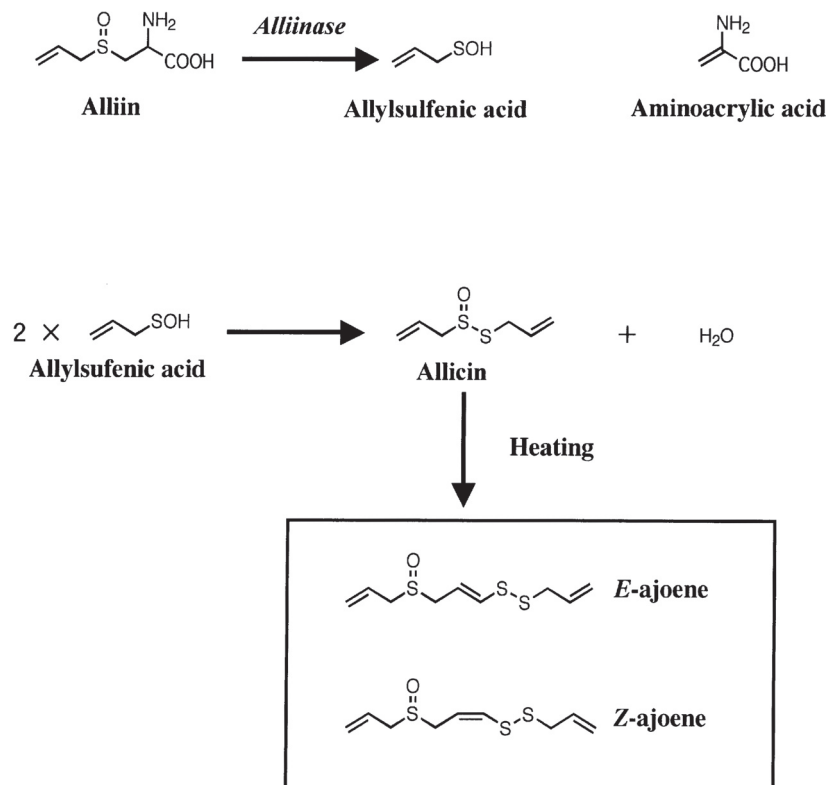


図1 アホエンの生成機構

加熱することによってアリシン三分子が縮合しアホエンが生成する⁷⁾。アホエンは、抗血栓作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、コレステロール低下作用、血小板凝集抑制作用、抗腫瘍作用を持つことが報告されており^{8~13)}、ニンニク由来の含硫化合物の中でも特に強い健康増進作用を持つことが知られている。しかしながら、アホエンは生ニンニクには含まれておらず、実際のニンニクの調理加工過程においてどの程度生成するのか、またどの程度の安定性を持つのかなどに関する情報は少ない。さらに、アホエンには*E*体および*Z*体の幾何異性体が存在するがその含有量については未知の部分が多い。ニンニクの有効成分をより効率的かつ高い安定性で日常的に摂取することは、われわれの健康の増進および疾病の予防につながるものと期待される。このような背景をもとに本研究では、アホエンの含有量を指標としてニンニクの健康増進作用を増強させるための加工・保存技術の開発を試みることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 試薬と材料

n-hexane と 2-propanol は、HPLC グレードを使用し、その他の全ての試薬は特級グレードを用いた。ニンニクは、堺市内のスーパーマーケットで購入した青森県産を使用した。

2.2 アホエン標品の合成

E-および*Z*-アホエンは、Block らの方法を改良し合成した¹⁴⁾。クロロホルムに溶解した 0.1 M diallyldisulfide 溶液に 0.1 M *m*-perchlorobenzoic acid を含むクロロホルム溶液を窒素気流下において攪拌しつつゆっくりと滴下し、30 分間放置することでアリシンを合成した。さらにこの反応溶液に等量の 5% の炭酸水素ナトリウム水溶液を加え分液し、下層のクロロホルム層を分離し、室温で一晩放置することでアホエンを合成した。減

圧下においてロータリーエバポレーターを使用して濃縮乾固した後に *n*-hexane に溶解し、シリカゲルクロマトグラフィー (Silica gel 60, Nacalai Tesque) によって *E*-および*Z*-アホエンを分離精製した。酢酸エチルと *n*-hexane の混合溶媒を溶出溶媒として用い、酢酸エチル/*n*-hexane (2:3, *v/v*)、酢酸エチル/*n*-hexane (1:1, *v/v*)、酢酸エチル/*n*-hexane (13:7, *v/v*) によって段階的に溶出させた。それぞれの構造および精製度は、NMR (Nuclear Magnetic Resonance) による解析および薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析によって確認した。

2.3 TLC

順相 TLC は、Merck 社製のシリカゲル薄層アルミニウム板 (Kieselgel 60) を用い、酢酸エチルを展開溶媒として使用した。展開後に乾燥し、発色試薬である molybdo phosphoric acid/85% リン酸/硫酸/水 (2.4:1.5:5, *v/v/v*) を噴霧し、70°C で 20 分加熱しアホエンを検出した。アホエンは青色のスポットとして検出され、*R_f* 値は、それぞれ *Z*-アホエンが 0.52、*E*-アホエンが 0.45 であった。

2.4 構造解析

NMR による解析によって合成した *E*-および*Z*-アホエンの構造および精製度を確認した。NMR 測定は、JEOL 社の 400MHz JNX-270FT-NMR を用いた。テトラメチルシラン (TMS) を化学シフトの内部標準として用い、溶媒は重クロロホルム (CDCl₃) を使用した。以下にスペクトルデータを示す。

E-アホエン: ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.38 (dt, *J* = 14.8, 1H, 1.0Hz), 5.98 (m, 3H), 5.4 (m, 2H), 5.2 (m, 2H), 3.5 (m, 4H), 3.36 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz)。

Z-アホエン: ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.55 (dt, *J* = 9, 1H, 1.0 Hz), 5.8 (m, 3H), 5.4 (m, 2H), 5.2 (m, 2H), 3.5 (m, 4H), 3.38 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz)。

2.5 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるアホエンの分析

E-アホエンおよび*Z*-アホエンのそれぞれの含量は、順相 HPLC によって定量した。HPLC は L-2130 pump, L-4200 UV/vis detector, D-2500 chromat-integrator からなる日立製のシステムを使用した。シリカゲルカラムは、LiChrospher Si 60 column (5 μ m, 250 mm \times 4.0 mm, 関東化学), ガードカラムは、LiChrospher Si 60 LiChroCART (5 μ m, 4.0 mm \times 4.0 mm, 関東化学), 溶出溶媒は、*n*-hexane/2-propanol (85:15, *v/v*) を使用し、流量を 1.0 ml/min としてアホエンの持つ 240 nm の UV 吸収を検出した。それぞれのサンプルを 20 μ l インジェクトして分析を行った。

2.6 ニンニクの処理

3 - 4 mm 程度の厚さにスライスしたニンニク球を大豆油, こめ油, オリーブオイルなどの食用油脂に混合 (250 mg/ml) し, アイスバス中で冷却しながら SMT 社製の High-Flex Homogenai

zer を用いてホモジナイズした。調製した混合物を栓付き試験管に移しドライサーモバス中で加熱処理した。加熱後に酢酸エチルによる分液抽出を行い, 減圧下においてロータリーエバポレーターを使用して濃縮乾固した後に 1.0 ml の酢酸エチルに再溶解し, 不溶性の固形物を遠心分離し除去したものを HPLC 分析に使用した。

2.7 アホエンの安定性の検証

生ニンニクを大豆油中において 80°C で 4 時間加熱処理したアホエンを含有するオイルと合成した 0.1 mM の *E*-および*Z*-アホエンを含む酢酸エチル溶液を調製し, 保蔵条件に関する熱や UV に対する安定性試験を行った。UV ランプは東芝社製の GL15 を使用した。

3. 結果と考察

本研究は, ニンニクの健康増進作用を増強させるための加工・保存技術を開発することを目的とし, ニンニク由来の含硫化合物の中でも非常に強い生理活性を持つとされるアホエンの含有量を指

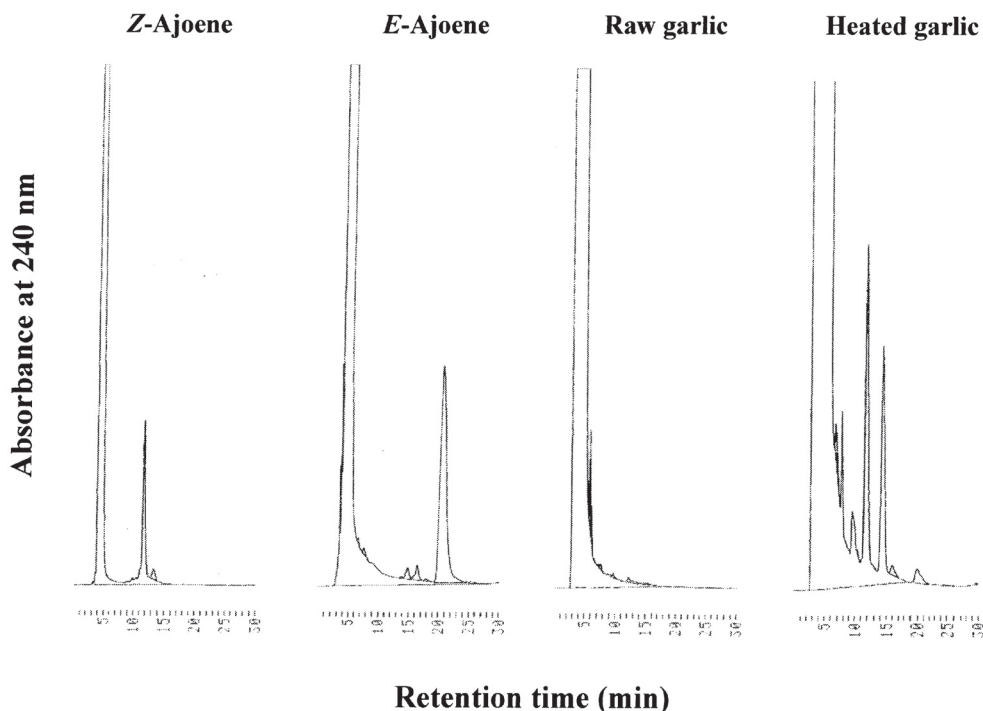


図2 順相 HPLC によるアホエンの分析

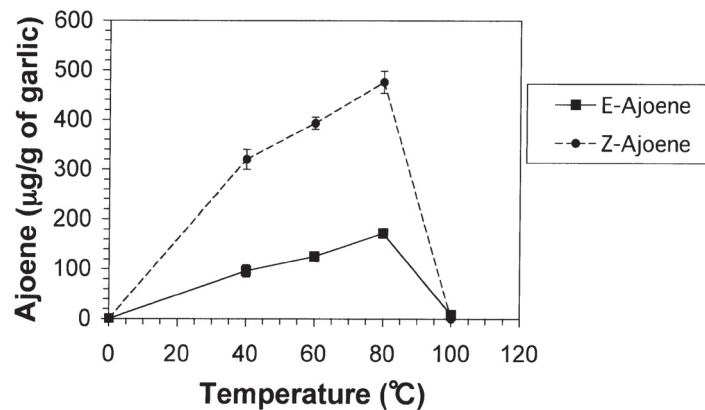


図3 アホエン生成へ与える加熱温度の影響
ニンニクホモジェネートを米油中において4時間加熱処理した。抽出後にE-およびZ-アホエンをHPLCによって定量した。

標としてその生成と安定性の基礎的なデータの収集を行った。

3.1 HPLCによるアホエンの分析

順相HPLCによってアホエンを分析したクロマトグラムを図2に示した。合成し構造を決定したZ-アホエンおよびE-アホエン標準品は、それぞれのリテンションタイムが11 minと20 minのピークとして検出された。生のニンニクからはアホエンを検出することができなかったが、大豆油中において加熱処理したニンニクからZ-アホエンおよびE-アホエンの両異性体のピークを高い分離度で検出することができた。

3.2 加熱処理によるアホエンの生成

図3は、アホエンの生成へ与える加熱温度の影響を調べた結果である。生ニンニクのホモジェネートをこめ油中において4時間加熱処理し、抽出後にE-およびZ-アホエンをHPLCによって定量した。その結果、E-およびZ-アホエンともに80

°Cの加熱処理によって最も多く生成した。最大生成量は、E-アホエンが172.0 µg/g of garlic、およびZ-アホエンが476.0 µg/g of garlicであった。しかしながら、0°Cと100°Cの処理によってはアホエンの生成は全く認められなかった。40 - 80°Cの加熱においてE-アホエンの約2.5倍のZ-アホエンが生成することが明らかになった。また、アホエンの生成は、油脂中での加熱が必須であり水分含量の増加に伴いその生成が阻害され、以前の報告と一致していた。本研究では、油脂として大豆油、こめ油、およびオリーブオイルを使用した。アホエンの生成に与えるそれぞれの油脂間の差は小さいものであった。

表1は、加工と保存方法の異なるニンニクの加熱処理によって生成するアホエン量を分析した結果である。-20°Cにおいて凍結保存したニンニク、ペースト状にした後に凍結保存したニンニク、およびニンニクを油で揚げたフライドガーリックを

表1 加工ニンニクの過熱処理によって生成するアホエン量

Processing	E-Ajoene (µg/g of garlic)	Z-Ajoene (µg/g of garlic)
Raw	158.3	466
Frozen	88.0	40.3
Frozen paste	48.0	N.D.
Fried	40.0	N.D.

それぞれの加工ニンニクの加熱処理は、大豆油中において80°Cで4時間行った。

N.D.: not detected.

大豆油中においてホモジェナイズした後に 80℃で4時間加熱処理し、*E*-および*Z*-アホエンを定量した。その結果、冷凍ニンニク由来のオイルからは、*E*-および*Z*-アホエンがともに検出されたがその生成量は、それぞれ約50%および10%程度まで減少していた。さらに冷凍保存されたガーリックペーストおよびフライドガーリック由来の油脂では、*E*-アホエンの生成量が約25%にまで減少し、*Z*-アホエンは検出されなかった。低温および高温の処理によってアリイナーゼが失活し、アホエンの前駆物質であるアリシンの生成量が減少すること、また、フライ処理によるアリシン自身の分解がアホエンの生成を減少させる原因であると考察された。以上の結果から、アホエンを効率的に含む食品を調理するためには、新鮮な生ニンニクを材料として用い、アリシンの生成を促進するために細かく破碎し、油脂中において80℃で加熱する方法が最も効果的であると考えられた。

3.3 アホエンの安定性試験

低温貯蔵におけるアホエンの安定性を調べた結果を図4に示した。ニンニクホモジェネートを大豆油中において80℃で4時間加熱処理したアホエン含有オイルを-20℃において最長で9ヶ月間保蔵した。9ヶ月間の低温保存後の*E*-および

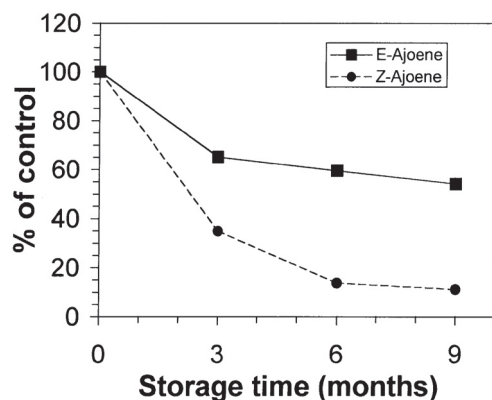


図4 低温保蔵におけるアホエンの安定性
ニンニクホモジェネートを大豆油中において80℃で4時間加熱処理したオイルを-20℃において保蔵した。

Z-アホエンの残存量は、それぞれ54および11%であり、*E*-アホエンの安定性がより高かった。また、室温保存においては*Z*-アホエンの減少とともに*E*-アホエンが増加する傾向が認められた。すなわち*Z*-アホエンが*E*-アホエンへと異性化することが明らかとなった。この現象が低温保蔵における*E*-アホエンの高い安定性に関与していることが考えられた。図5は、同様に加熱処理に対するアホエンの安定性を調べた結果である。合成した*E*-および*Z*-アホエンを酢酸エチル中において24時間加熱した後にHPLCによって定量した。80℃以上の高温では、*E*-および*Z*-アホエンともに顕著な分解が認められた。図6は、UV照射に

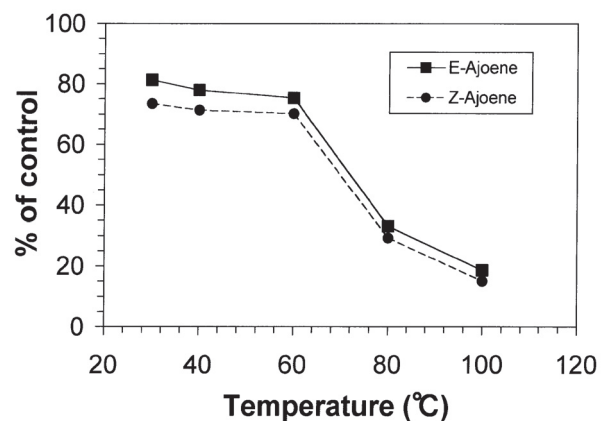


図5 加熱処理に対するアホエンの安定性
合成した*E*-および*Z*-アホエンを酢酸エチル中において24時間加熱した後にHPLCによって定量した。

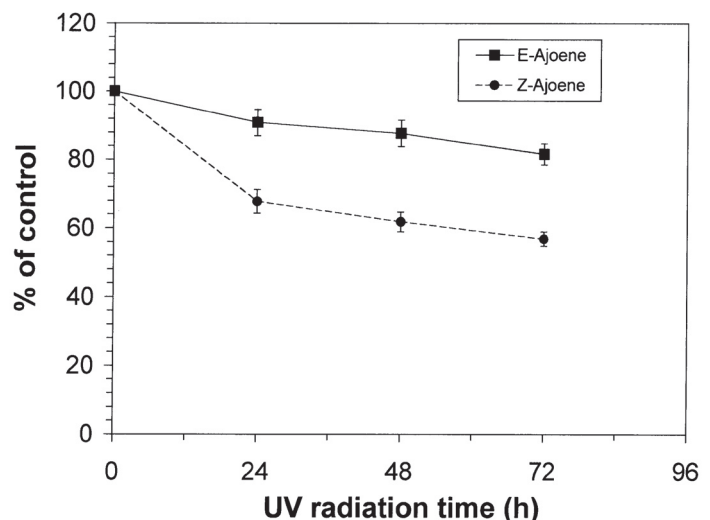


図6 UV照射に対するアホエンの安定性
酢酸エチルに溶解した*E*-および*Z*-アホエンに室温でUVを照射した後にHPLCによって定量した。

対するアホエンの安定性を調べた結果である。室温において酢酸エチルに溶解した *E*- および *Z*-アホエンに UV を照射した後に HPLC によって分析した。その結果、*Z*-アホエンは、72 時間後には 60% 以下にまで減少し、顕著な分解が認められた。一方、*E*-アホエンは、72 時間後には 80% が残存しており比較的安定であった。以上の結果から、アホエンを含有する加工食品は、遮光下において冷凍保存することによって数ヶ月間は、その機能性が有効であると考えられた。

4. ま と め

本研究は、ニンニクの健康増進作用を増強させるための加工・保存技術を開発することを目的として行った。ニンニクの調理加工によって生成し、多様な健康増進作用を持つ含硫化合物であるアホエンの含有量を指標としてその生成と安定性に関する基礎的なデータを収集した。本研究によってアホエンを効率的に含有する食品を調理するためには、新鮮な生ニンニクを材料として用い、アリシンの生成を促進するために細かく破碎し、油脂中において 80℃ で加熱する方法が最も効果的であることが明らかになった。また、アホエンを含有する加工食品は、遮光下において冷凍保存することによって数ヶ月間は、その機能性が有効であると考えられた。このような情報をもとにニンニクを効果的に調理加工および保存することによって、より私達の食生活の向上および健康の増進につながるものと期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者各位に心より感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Rivlin, R. S. Historical perspective on the use of garlic. (2001). *Journal of Nutrition*, **31** (3S), 951S-954S.
- 2) Rybak, M. E., Calvey, E. M., and Harnly, J. M. (2004). Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 682-687.
- 3) Lawson, L. D., Wang, Z.-Y. J., and Hughes, B. G. (1991). Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialkyl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta Medica*, **57**, 363-370.
- 4) Itakura, Y., Ichikawa, M., Mori, Y., Okino, R., Udayama, M., and Morita, T. (2001). Recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supplement: how to distinguish garlic from the other *Allium* vegetables. *Journal of Nutrition*, **131**, 963S-967S.
- 5) Block, E., and Ahmad, S. (1984). (*E*, *Z*)-Ajoene a potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*, **106**, 8295-8296.
- 6) Lawson, L. D.L., and Wang, Z. J. (2001). Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 2592-2599.
- 7) Srivastava, K. C., and Tyagi, O. D. (1993). Effects of a garlic-derived principle (ajoene) on aggregation and arachidonic acid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, **49**, 587-595.
- 8) Scharfenberg, K., Wagner, R., and Wagner, K. G. (1990). The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines. *Cancer Letters*, **53**, 103-108.
- 9) Rendu, F., Daveloose, D., Debouzy, J. C., Bourdeau, N., Levy-Toledano, S., Jain, M. K., and Apitz-Castro, R. (1989). Ajoene, the antiplatelet compound derived from garlic, specifically inhibits platelet release reaction by affecting the plasma membrane internal microviscosity. *Biochemical Pharmacology*, **38**, 1321-1328.
- 10) Ferri, N., Yokoyama, K., Sadilek, M., Paoletti, R., and Apitz-Castro, R. (2003). Ajoene, a garlic compound, inhibits protein prenylation and arterial smooth muscle cell proliferation. *British Journal of Pharmacology*, **138**, 811-818.
- 11) Li, M., Ciu, J. R., Ye, Y., Min, J. M., Zhang, L. H., Wang, K., Gares, M., Cros, J., Wright, M., and Leung-Tack,

- J. (2002). Antitumor activity of Z-ajoene, a natural compound purified from garlic: antimitotic and microtubule-interaction properties. *Carcinogenesis*, **23**, 573-579.
- 12) Scharfenberg, K., Ryll, T., Wagner, R., and Wagner, K.G. (1994). Injuries to cultivated BJA-B cells by ajoene, a garlic-derived natural compound: cell viability, glutathione metabolism and pools of acidic amino acids. *Journal of Cellular Physiology*, **158**, 55-60.
- 13) Apitz-Castro, R., Ledezma, E., Escalante, J., Jorquera, A., Pinate, F. M., Moreno-Rea, J., Carrillo, G., Leal, O., and Jain, M. K. (1988). Reversible prevention of platelet activation by (E, Z)-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene 9-oxide (ajoene) in dogs under extracorporeal circulation. *Arzneimittel-Forschung*, **38**, 901-904.
- 14) Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J. L., Jain, M. K., and Apitz-Castro, R. (1986). Antithrombotic organosulfur compounds from garlic: structural, mechanistic and synthetic studies. *Journal of the American Chemical Society*, **108**, 7045-7055.

Development of method for processing and preservation of garlic to enhance its health-promoting benefits

Mitsugu Akagawa

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

Garlic (*Allium sativum* L.) has been used worldwide as a food and medicinal plant since ancient times, and its beneficial properties against cardiovascular diseases, cancer, and infections are well known. When the clove of garlic is cut or crushed, the enzyme alliinase is released from its compartment and transforms alliin, a organosulfur compound, to allicin. Ajoene [(*E, Z*)-4,5,9-trithiadodeca-1,6,11-triene-9-oxide], one of the derivatives of allicin, is a major compound containing sulfur in processed garlic products, and has antithrombic, antitumor, antimicrobial, and antibiotic effects. The aim of this study is to develop the method for processing and preservation of garlic to enhance its health-promoting benefits. We verified the formation and stability of ajoene as an indicator of health-promoting functionality during processing and storage. A simple and rapid HPLC method suitable for routine analysis of *E*- and *Z*-ajoene was developed using a silica gel column. Maximum recovery of both ajoene was obtained from incubating raw garlic at 80°C in edible oils. After 9-month storage at - 20°C, the remaining amounts of *E*- and *Z*-ajoene were 54.2% and 11.2 %, respectively. Ajoene was more stable against UV-light than temperature, while *E*-ajoene was more stable than *Z*-ajoene against temperature, UV-light and storage conditions. These information might further enhance the health promotion and disease prevention effects of garlic dishes.