

# 地域特産物の抗酸化力向上に関する研究

木村 英生・樋口 かよ・小嶋 匡人・橋本 卓也

## Improvement of Antioxidant Activity of Local Agricultural Products

Hideo KIMURA, Kayo HIGUCHI, Masahito KOJIMA and Takuya HASHIMOTO

### 要 約

ORAC 法による評価体制を整え、県産果実について抗酸化能の評価を実施した。果実中ではブルーベリーが最も高い ORAC 値を示し、次いでブドウ（甲州，全果）が高い ORAC 値を示した。果実類の H-ORAC 値は総 ORAC 値に対して高い割合を占め、抗酸化能の主体が水溶性画分にあることが示唆された。ORAC 値と総ポリフェノール量との相関性を検討すると有意に正の相関が見られたことから、ポリフェノール類が抗酸化成分の主体を占めると考えられた。ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との間にも正の相関が見られたが、ポリフェノール量との相関よりは低かった。

### 1. 緒 言

ブドウ、モモ、スモモ等の果実やクレソン、やはたいも、鳴沢菜等の野菜は、山梨県の重要な地域特産物であり、当センターにおいても、これまでに県産果実や野菜の機能性評価に関する研究（平成16～18年度<sup>1)</sup>、平成17～19年度<sup>2)</sup>）を実施しているが、技術の進歩や社会的な要請などによって機能性の評価項目や測定方法は年々変わってきている。

機能性の中の一つである抗酸化能は、活性酸素種による生体の酸化を防止する効果の指標として特に重要視され、様々な測定方法が用いられてきているが、最近米国ではORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity；活性酸素吸収力)法が標準の方法として認知されるようになった。米国農務省のホームページでは果実・野菜のORAC法による抗酸化能のデータ（ORAC値）が表示され、飲料など一部の商品でもORAC値が表示され始めている。

日本国内においても平成19年に設立されたAntioxidant unit研究会を中心に抗酸化指標の統一化が検討されてきており、抗酸化指標「AOU」が提案されている。ここでは、抗酸化成分をポリフェノール系とカロテノイド系に大別して、ポリフェノール系抗酸化指標を「AOU-P」、カロテノイド系抗酸化指標「AOU-C」としてそれぞれの数値を併記するとしている。各々の測定法について検討を重ね、ポリフェノール系についてはORAC法を選定し、カロテノイド系についてはSOAC(Singlet oxygen absorption capacity；一重項酸素吸収力)法を選定すべく検証を行っているとのことである<sup>3)</sup>。

これまでは多様な測定法が存在し、各々の測定法で得

られた数値間の互換性が低く、簡単に数値の比較ができない状況であったが、測定法の標準化がなされ、広く用いられるようになることで今後抗酸化能指標の統一化が加速すると思われる。

しかし、当センターで過去に実施した抗酸化能測定には主にDPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)ラジカル消去活性測定法を用いており、上記のような国内外の傾向をふまえると、ORAC法など新たな測定法への対応が必要となってきた。

DPPHラジカル消去活性測定法は、安定なDPPHラジカルを用いる簡便な方法として広く用いられてきたが、生体内に存在しないラジカルを用いていることから生体内の反応系を必ずしも的確に表していないことが短所として指摘されている。

一方、ORAC法は、生体成分の過酸化反応に関与する脂質ペルオキシラジカルを模したラジカル種を用いた反応系であり、生理的pHでの反応であることから生体での酸化反応に近い系であると言われている。さらにORAC法は水溶性、脂溶性のどちらのサンプルでも測定でき、一回測定で抗酸化作用の持続時間とその力価を併せて評価できるなどの長所があげられる。ただし、Antioxidant unit研究会でSOAC法を検討しているように、β-カロテンや不飽和脂肪酸など一部の抗酸化成分については評価ができない<sup>4)</sup>。

先述したように欧米では食品へのORAC値の表示が進み、数値の比較的高い果実や野菜の消費を押し上げたとも言われている。日本においても、Antioxidant unit研究会の会員企業を中心にラベルへORAC値が表示された食

品が出回り始めている。

今後、日本においても米国と同様に農産物や加工食品についてORAC値（あるいはAntioxidant unit研究会が検討している抗酸化指標AOU単位の数値）が求められるようになり、食品の機能だけでなく品質を表す指標の一つとしても定着することが想定される。

そこで、本研究では、県産果実・野菜類及びその加工品について、ORAC法による抗酸化能評価を実施し、地域特産物のORAC値を明らかにする。また、ORAC値を指標として、抗酸化能（ORAC値）の高い加工食品（野菜ジュース等）を試作開発する。

今年度は、県産果実類を中心に抗酸化能評価について報告する。

## 2. 実験方法

### 2-1 供試試料

山梨県産果実類（モモ、ブドウ、スモモ、サクランボ、ウメ、カキ、リンゴ、キウイ、ブルーベリー、イチゴ）については、県内の農園、農産物直売所、スーパーなどで平成 22 年度に適熟期のものを入手し、供試した。供試試料は粉碎もしくはホモジナイズ後液体窒素で冷却し、 $-60^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザー（ESPEC(株)、BFH-110）にて保存した。凍結乾燥（東京理化工機(株)、FDU-220）後、フォースミル（大阪ケミカル(株)）で粉碎し、測定試料とした。ORAC法（Oxygen Radical Absorbance Capacity）、DPPHラジカル消去活性評価法、ポリフェノールの定量法にてそれぞれの試料を評価した。

### 2-2 試料抽出液の調製

#### 2-2-1 ORAC法

凍結乾燥後の粉末試料を 0.3~1.0g 正確に量り、ヘキササン：ジクロロメタン（1：1）で抽出した。30秒懸濁し、遠心分離後上清を回収した（2回）。回収した上清に窒素ガスを吹き付けながら湯浴中で溶媒を除去し、アセトン 2ml 加えたものを L-ORAC（親油性抗酸化能）測定試料とした。

続いて、抽出後の固体残渣に MWA 溶液（メタノール 90：水 9.5：酢酸 0.5）を加え、超音波洗浄器で 10 分間抽出した（2回）。遠心分離後、上清を回収し MWA 溶液で 25ml に定容したものを H-ORAC（親水性抗酸化能）測定試料とした。

なお、ORAC法では、L-ORAC、H-ORAC を各々測定し、合計値を ORAC 値として算出した。

#### 2-2-2 DPPHラジカル消去活性評価法・ポリフェノール定量法

試料粉末を 0.3~1.0g 正確に量り、80%エタノールを

添加して超音波洗浄器で抽出した（3回）。上清を回収し、80%エタノールで 50ml に定容したものを測定試料とした。

#### 2-3 ORAC法による測定

食品機能性評価マニュアル集<sup>5)</sup>に準じ、96穴マイクロプレートに測定用試料 35 $\mu\text{l}$ 、Fluorescein 溶液（sigma 社、110.7nM）115 $\mu\text{l}$ を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ に保ったプレートリーダー（CORONA SH-9000Lab）を用い、Fluorescein 溶液の蛍光強度を測定した（Em:490nm, Ex:535nm）。AAPH(2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride)溶液（L-ORAC では 63.4nM, H-ORAC では 31.7nM, pH 7.4）を 50 $\mu\text{l}$ 添加して振とう攪拌後、添加 2 分後から 2 分間隔で蛍光強度の経時変化を測定した（L-ORAC 180 分間、H-ORAC 90 分間）。

ORAC法では、標準物質である Fluorescein が、ラジカル発生剤である AAPH 溶液から発生したペルオキシラジカルによって、分解される蛍光強度を経時的に測定し、蛍光強度の軸と時間軸とのグラフの軌跡に囲まれた面積 AUC（Area Under Curve）を算出する。ここでは、Trolox(6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid)を標準物質とし、測定結果を Trolox 相当量で示し、100g 新鮮重あたりの ORAC 値( $\mu\text{mol of TE}/100\text{gfw}$ )などで算出した。

#### 2-4 DPPHラジカル活性評価法による測定

DPPHラジカル活性評価法は、食品機能性評価マニュアル集に準じ、96穴プレート法で測定した。2-2(2)の抽出試料に等量の 20%エタノールを添加し、適宜 50%エタノールで希釈した。

96穴プレートに Trolox、測定試料を分注後、MES 緩衝液（2-Morpholinoethanesulfonic acid, 200mM, pH6.0）をブランクウェル以外に分注した。ウェルブランクには 50%エタノールのみ、色補正列には試料と 50%エタノールのみ分注した。

プレートリーダー（CORONA SH-9000Lab, 520nm）で吸光度を測定し Trolox で作成した回帰曲線の傾きを用いて分析試料の添加量に相当する Trolox 量を算出し、さらに 100g 新鮮重あたりの DPPHラジカル消去活性値 ( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )を算出した。

#### 2-5 ポリフェノールの定量

フォーリン・チオカルト法を一部改変した方法で総ポリフェノールを定量した。すなわち、フェノール試薬（関東化学）と蒸留水を 1：1（v/v）で調製したフェノール試薬希釈液を用いて分析した。

没食子酸溶液を標準液として、検量線作成のため、没食子酸溶液濃度が 0, 60, 180, 300nmol/assay になるよう 80%エタノール及び蒸留水で調製した。また、測定試料は

80%エタノールで抽出液と蒸留水を1:1で混和した。それぞれの試料液を試験管に分注後、フェノール試薬希釈液1mlを分注しボルテックスで混和させた。3分後に10%炭酸ナトリウム溶液1mlを分注し60分放置した。遠心分離機で溶液の白濁を分離し、上澄みだけを分光光度計用石英セルを用いて分光光度計（HITACHI U-2000,750nm）で測定した。測定後、検量線から試料のポリフェノール量を計算し、100g新鮮重あたり(mg/100gfw)で算出した。

### 3. 結果及び考察

#### 3-1 県産果実類のORAC値

表1にH-ORAC, L-ORAC及び総ORAC値を示した。H-ORACとL-ORACの合計値である総ORAC値に対して、H-ORAC値が大部分を占めているが、これは既報と同様の傾向であり、水溶性の画分に果実類の抗酸化成分の主体が含まれることが示唆される。

L-ORAC値は総ORAC値に対して、概ね1%前後であったが、ウメ（甲州小梅）については7.1%と今回の検体の中では比較的高い数値を示した。L-ORAC値は多くの果実で5%以下であるという報告<sup>6)</sup>もあり、それと比較すると親油性の画分に抗酸化成分が多い傾向にあることがうかがえる。

抗酸化能が高いとされるブルーベリーやイチゴを対照とすると、ブドウ（甲州、全果）、スモモ（大石早生、全果）、ウメ（甲州小梅）及びサクランボ（高砂）がそれぞれ3194, 2220, 2094,及び2088( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )と比較的高い抗酸化能を示した。ブドウ（甲州）においては、果肉のみの場合は670( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )であり、果皮に含まれる抗酸化成分の影響が大きいと推察された。

表1 県産果実類のORAC値

果実・品種	H-ORAC	L-ORAC	総ORAC
	( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )		
モモ・山根白桃(全果)	1189	10	1199
モモ・山根白桃(果肉)	963	4	967
モモ・夢しずく(全果)	962	10	972
モモ・夢しずく(果肉)	726	6	732
モモ・なつっこ(全果)	777	15	792
モモ・なつっこ(果肉)	651	6	657
モモ・白鳳(全果)	768	14	782
モモ・白鳳(果肉)	513	4	517
モモ・はなよめ(全果)	582	10	592
ブドウ・デラウェア(全果)	1451	6	1457
ブドウ・キングデラウェア(全果)	1230	8	1238
ブドウ・ロザリオ(全果)	2060	5	2065
ブドウ・甲斐路(全果)	944	3	947
ブドウ・甲斐路(果肉)	547	3	550
ブドウ・甲州(全果)	3182	12	3194
ブドウ・甲州(果肉)	667	3	670
スモモ・大石早生(全果)	2212	8	2220
サクランボ・高砂	2068	20	2088
サクランボ・佐藤錦	972	9	981
ウメ・甲州小梅	1945	149	2094
カキ・富有柿	464	4	468
リンゴ・ふじ	1875	28	1903
キウイ	403	7	410
ブルーベリー	4059	17	4076
イチゴ(5品種、平均値)	1954	10	1964

#### 3-2 ORAC値, DPPHラジカル消去活性値及び総ポリフェノール量の相関性

表2に果実ごとのORAC値, DPPHラジカル消去活性値及び総ポリフェノール量の平均値を示した。

モモ（全果）とモモ（果肉）のORAC値はそれぞれ平均867及び718( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )でその差149( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )であったが、ブドウにおいては全果及び果肉で平均1780及び610( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )とその差1170( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )とモモと比較すると果皮の影響が大きいことが明らかとなった。

果実類のORAC値は410~4076( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )、DPPHラジカル消去活性値は170~1189( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )、そして総ポリフェノール量は26~162(mg of GAE / 100g-fw)であった。

表2 果実類のORAC値, DPPHラジカル消去活性値及び総ポリフェノール量

果実名	品種数	ORAC値	DPPHラジカル消去	ポリフェノール
		( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )	活性値 ( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )	(mg of GAE / 100g-fw)
モモ(全果)	5	867	206	29
モモ(果肉)	4	718	172	26
ブドウ(全果)	5	1780	556	81
ブドウ(果肉)	2	610	396	38
スモモ(全果)	1	2220	366	77
サクランボ(全果)	2	1534	464	88
ウメ(全果)	1	2088	378	59
カキ(全果)	1	468	170	39
リンゴ(全果)	1	1903	242	68
キウイ(果肉)	1	410	267	29
ブルーベリー	1	4076	1189	162
イチゴ	5	1964	302	58

DPPH ラジカル消去活性値は Trolox 相当量で算出しているが、総じて ORAC 値よりも低い値となっている。これは DPPH ラジカル消去活性測定法が電子供与反応に基づく測定法であり、ORAC 法が水素原子供与反応に基づく測定法であって反応機構が異なるためであり、カテキン、ケルセチン、クロロゲン酸などの抗酸化物質では ORAC 値の方が高い値を示すことが報告されている<sup>4)</sup>。

次に ORAC 値と総ポリフェノール量との相関性を検討した(図1)。

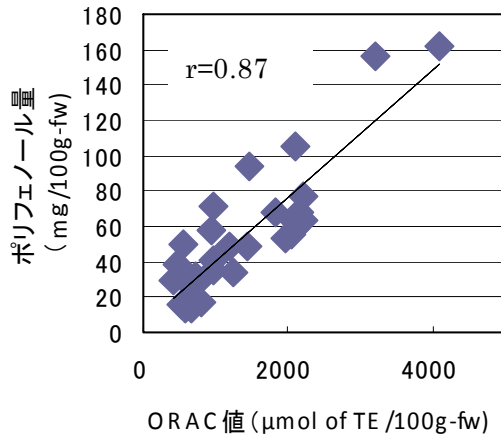


図1 果実類の ORAC 値とポリフェノール量との相関性

有意水準 1%で相関が認められ、相関係数は 0.87 であった。果実類の ORAC 値はポリフェノール量に依存し、ポリフェノール量が高くなるに従い ORAC 値も高くなる傾向を持つことが示唆された。

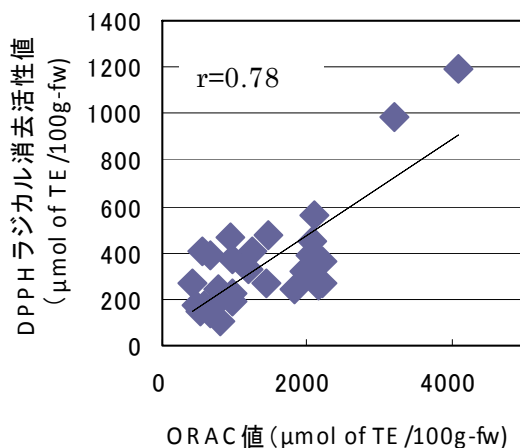


図2 果実類の ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との相関性

ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との相関についてみると相関係数 0.78 と比較的高い相関を示した。

ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との間には相関は

見られないとする報告もあるが、佐藤ら<sup>7)</sup>は山梨県産スモモを対象とした報告で、相関係数 0.717 と報告している。またニホンスモモとドメスチカスモモに分類した際の相関係数はそれぞれ 0.763 及び 0.735 としている。

今回の検体のうち、モモ及びブドウについて ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との相関をみると、相関係数はそれぞれ 0.75, 0.87 であった。モモ及びブドウのみに限定することによって相関性も高まると予想したがモモでは同程度であった。検体数も少ないことから今後検体数をさらに増やして引き続き検討していきたい。

#### 4. 結 言

ORAC 法による評価体制を整え、目的とした県産果実の 29 種類について抗酸化能の評価を実施することができた。果実中ではブルーベリーが最も高い ORAC 値を示し、次いでブドウ(甲州, 全果)が高い ORAC 値を示した。果実類の H-ORAC 値は総 ORAC 値に対して高い割合を占め、抗酸化能の主体が水溶性画分にあることが示唆された。ORAC 値と総ポリフェノール量との相関性を検討すると有意に正の相関が見られたことから、ポリフェノール類が抗酸化成分の主体を占めると考えられた。また、ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との間にも正の相関が見られたが、ポリフェノール量との相関より低かった。本研究で得られた ORAC 値のデータは抗酸化能に着目した県産果実類の加工品開発に利用できるものとする。次年度は、抗酸化能の高い加工食品の試作開発に取り組んでいく。

#### 参考文献

- 1) 木村 英生, 長沼 孝多, 恩田 匠, 辻 政雄: 山梨県工業技術センター研究報告, No.20, P.5-8 (2006)
- 2) 木村 英生, 長沼 孝多, 小松 正和, 恩田 匠: 山梨県工業技術センター研究報告, No.20, P.101-104 (2006)
- 3) 津志田藤二郎: 食品と開発, Vol.45, No.6, P.4-6 (2009)
- 4) 渡辺 純, 沖 智之, 竹林 純, 山崎 光司, 津志田藤二郎: 化学と生物, Vol.47, No.4, P.237-243 (2009)
- 5) 食品機能性評価支援センター編: 食品機能性評価マニュアル集第II集, P.71 (2008)
- 6) Wu, X. et al.: J. Food Compos. Anal., Vol.17, P.407-422 (2009)
- 7) 佐藤 明子, 渡辺 純, 後藤 真生, 石川(高野) 祐子: 日本食品科学工学会誌, Vol.57, No.1, P.44-48 (2010)