

ブドウ種子ポリフェノールのフリーラジカル捕捉活性

—アルカリ域における熱安定性とコンニャクの試作—

北 尾 悟
寺 本 円 佳

I. 緒 言

近年、生体内の活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスが、悪性新生物・脳血管疾患・心疾患を代表とする生活習慣病を引き起こす要因であることが明らかとなっている。また、これら活性酸素・フリーラジカルは、老化の 1 要因ともされ、アルツハイマー病・パーキンソン病などの疾病の引き金とも言われている¹⁾。そこで、細胞膜を含む生体膜を酸化反応から守るため、活性酸素・フリーラジカルを捕捉・消去する物質を多く含有し、かつその活性が強い食品を摂取することにより、これらの疾病を予防することが予想される。事実、緑黄色野菜の摂取が生活習慣病の予防に有効な手段であるといわれ、緑黄色野菜の活性酸素・フリーラジカル捕捉・消去活性と生活習慣病との相関性が証明されている²⁾。

ポリフェノール化合物は、ベンゼン環やナフタレン環に水酸基が 2 個以上結合した芳香族炭化水素の総称である。フラボノイド類・イソフラボン類・カテキン類・アントシアニン類・桂皮酸類・リグニン類・クルクミン類などが含まれる。主として植物を中心に自然界に多く分布しており、果実や野菜の色素や渋味、苦味成分を形成している。すなわち、果実や野菜の色素であるアントシアニンやフラボノイド化合物、渋味の原因となるタンニン、お茶の苦味成分であるカテキン類などのほか、植物の二次代謝によってつくられる多くの化合物が存在する³⁾。ひところは摂取したポリフェノール類が腸管から吸収されているのかという疑問と化学的な方法で調べた抗酸化性が体内でも有効なのかという疑問があったが、どちらもヒトや動物を対象とした研究で証明されつつある。

ポリフェノールを多く含む食品としては、緑茶・紅茶・赤ワインなどがよく知られている。中でもワインの原料であるブドウ中には多くのポリフェノール化合物が存在しており、その 65%～70%は種子に分布している⁴⁾。特に「フレンチパラドックス」⁵⁾という言葉が一般に良く知られるように、赤ワインが心疾患の予防に良いとのことから赤ワインブームとなった。その赤い色素がアントシアニンと呼ばれる物質である。ちなみにアントシアニンはアグリコンの総称であり、アントシアニンはその配糖体の総称である。その 2 つを併せてアントシアニン類と呼ぶ。

ブドウ種子ポリフェノールは、ブドウ・ワイン工業の未利用副産物であるブドウ種子から熱水抽出により調製したものである。ブドウ種子ポリフェノールは、スーパーオキシドラジカル消去活性をはじめとする抗酸化活性を有することは既に知られており、抗酸化作用に基づいて、機能性・生理機能・ヒトに対する効果なども調べられている⁶⁾。現在、酸化防止剤や健康食品分野へ

の利用が広がりつつあるが、食品素材として利用する場合、調理・加工に大きな影響を及ぼす熱ならびに pH 処理に関する知見が見あたらなかった。そこで、我々は同じ水溶性の酸化安定剤として現在広く用いられているアスコルビン酸と比較する形式で、ブドウ種子ポリフェノールの熱ならびに pH に対する安定性について調べた⁷⁾。その結果、ブドウ種子ポリフェノールは熱および各種 pH 域に対して非常に安定であることを見いだした⁸⁾。前報⁹⁾では、ミネラルウォーターの pH 域である pH 7.0 におけるブドウ種子ポリフェノールの DPPH ラジカル捕捉活性に関しての熱安定性について報告した。そこで今回、特にアスコルビン酸が非常に不安定となるアルカリ pH 域においてブドウ種子ポリフェノールが比較的安定なラジカル捕捉能を有することを見いだしたため、加工工程でアルカリ処理と加熱処理を施すコンニャク製造にブドウ種子ポリフェノールを応用し、ブドウ種子ポリフェノール配合コンニャクを試作しその評価を行ったので報告する。

II. 実験方法

1. 材 料

ブドウ種子ポリフェノールは、ブドウ (*Vitis vinifera* L.) 由来の全フラバノール含量が 96.0 %、プロアントシアニジン含量が 88.9% の商品名グラヴィノールスーパー (GR-S) をキッコーマン株式会社より供試を受けた。アスコルビン酸 (AsA)、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジド (DPPH)、および、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール (Tris) はナカライテスク製特級試薬、6-ヒドロキシ-2, 5, 7, 8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸 (Trolox) は、アルドリッチ社製を使用した。また、グルコマンナンは商品名「マンナン 100」を伊那食品より、酸化カルシウム (生石灰, 一級) は和光純薬より購入した。その他、試薬は特級グレードを用いた。

2. DPPH ラジカル捕捉活性の測定

ラジカル捕捉活性は、Yamaguchi et al.¹⁰⁾ の方法を一部改良し DPPH を用いて測定した。DPPH は比較的安定なラジカルで、不対電子を保持しているときには青紫の色調を帯びているが、不対電子をポリフェノールなどの捕捉物質により引き抜かれると無色化する。517 nm の吸光度を測定することにより、その減少度から捕捉活性の割合を知ることが可能である。

実際には、アルミホイルを巻いて遮光した試験管に 0.4 ml の各種濃度の抗酸化剤水溶液と 1.6 ml の 100 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、エタノールに溶解した 2.0 ml の 500 μ M DPPH 溶液を充分混合攪拌し、室温で捕捉反応を開始した。20 分経過後、517 nm の吸光度を測定し、ラジカル捕捉活性算出の数値とした。同様にして、抗酸化剤を溶解していない緩衝液に Tris 緩衝液と DPPH エタノール溶液を混合し、反応させたときの 517 nm の吸光度をコントロールとした。コントロールと各種抗酸化水溶液を用いた場合の 517 nm の吸光度の差を、同時に測定した各種濃度の水溶性トコフェロールの誘導体である Trolox の吸光減少度を指標とし、Trolox 濃度換算の DPPH ラジカル捕捉活性 (μ mol Trolox eq.) として求めた。

3. 安定性試験

抗酸化剤を溶解する緩衝液は、pH 緩衝能範囲が広い 50 mM 3,3-ジメチルグルタル酸、Tris、2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール (GTA) を用いた。pH 10.0 の GTA 緩衝液に 100 ppm となるよう溶解した抗酸化剤溶液 3 ml を 20 ml 容ガラス製バイアルビンに入れ、各温度に指示された時間まで保持したサンプリング液の DPPH ラジカル捕捉活性を測定した (活性測定時の抗酸化剤試料濃度は 10 ppm)。

4. 抗酸化剤配合コンニャクの製造

予め、200 mg の GR-S を蒸留水 800 ml に溶解し、温度が上昇しないよう氷上で 20 g のグルコマンナンを少しずつ攪拌しながら加えた。グルコマンナンを全量混合後、加熱し沸騰後 2 分間、攪拌溶解し膨潤の均一化を行った。40℃以下まで冷却したのち、酸化カルシウム 1 g を蒸留水 100 ml に懸濁した液 (石灰乳) を手早く混合攪拌し全体を滑らかにした。この時のコンニャクゲルの体積は 1,000 cm³ となった。これをステンレス製型 (15 X 13.5 X 5.0 cm) に入れ、30 分間ゆで加熱して固化させた。その後、流水にさらしあく抜きをして試料とした。GR-S の代わりに AsA を 200 mg 溶解して同様に製造したものを AsA 配合コンニャク、GR-S や AsA を配合しないコンニャクを無配合コンニャクとし、3 種類のコンニャクを試作した。

5. 抗酸化剤配合コンニャクの色調測定

色の指標である L, a, b 値について 3 種類のコンニャクを比較した。日本電色工業の測色色差計 ZE-2000 を用い、明度を表す L 値、プラスの方向なら赤味を (マイナスの方向なら緑味を) 示す a 値、プラスの方向なら黄味を (マイナスの方向なら青味を) 示す b 値を求めた。

6. 抗酸化剤配合コンニャクの DPPH ラジカル捕捉活性

各々のコンニャク 50 g を包丁で細かく刻み、これに 10% (v/v) 酢酸溶液 100 ml を混合し、ホモゲナイザー (三井電気精機製, HF-91 型) を用いて氷中、120 回転/分、2 分間処理を行った。得られた懸濁液を 100℃ 3 分間加熱融解した後、15,000 回転 15 分の遠心分離処理を行い、得られた上清を希苛性ソーダにて pH を 7.4 に調整した。それぞれの調整液に蒸留水を加えて液量を 100 ml に補正した液を活性測定液とし、上述のように DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。

7. 抗酸化剤配合コンニャクの硬度測定

タケトモ電気製のテンシプレッサー (TTP-50BX, My Boy System) を用いて 3 種類のコンニャクの硬さを測定した。測定条件を表 1 に示したが、咀嚼を念頭において連続 16 回、元のコンニャクが 50% 歪むときの荷重とそのプランジャーの移動距離との積算によるみかけの硬さを求めた。

表1 テンシプレッサーの測定条件

条件	値
Distance (mm)	40
Clearance (mm)	0.1
Thickness 1 (mm)	25
Thickness 2 (mm)	25
Repeat time	16
Magnificant	2
Plunger area (cm ²)	4
Deformation (%)	50

8. 抗酸化剤配合コンニャクの官能検査

無配合・GR-S 配合・AsA 配合の3種類のコンニャクを生のまま、あるいは、市販のおでんの素（キッコーマン製・だししょうゆうす色）で味付けしたおでん風味という2種類の調理方法で、本学・食物学科3回生ならびに4回生90人をパネラーとして官能検査を行った。評価項目は、各々、外観・食感・味、それらをまとめて全体の評価とし、普通を3とした5段階評価とした。測定項目について平均値と標準偏差を算出し、2群間のt検定を実施し有意差を求めた。

III. 結果と考察

1. アルカリ pH 域における熱安定性

図1に pH 10.0 における熱安定性の結果を示した。0℃から100℃の各温度に保持したときの捕捉活性の経時変化を示した。各々の試料液のスタート時、つまり、0分時の DPPH ラジカル捕捉活性を100%として相対活性で表した。GR-S および AsA とともに温度上昇に伴い DPPH ラジカル捕捉活性は減少する傾向にあるが減少度合は大きく異なり、GR-S は AsA と比較してアルカリ pH 域である pH 10.0 において熱に対して安定であることが判明した。GR-S は、75℃、

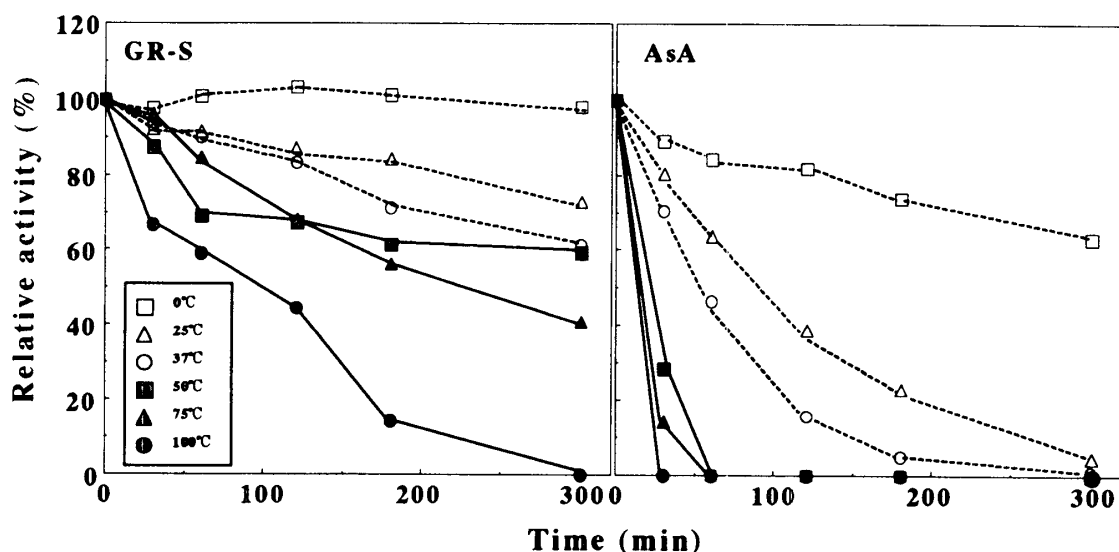


図1 各温度における DPPH ラジカル捕捉活性の経時変化

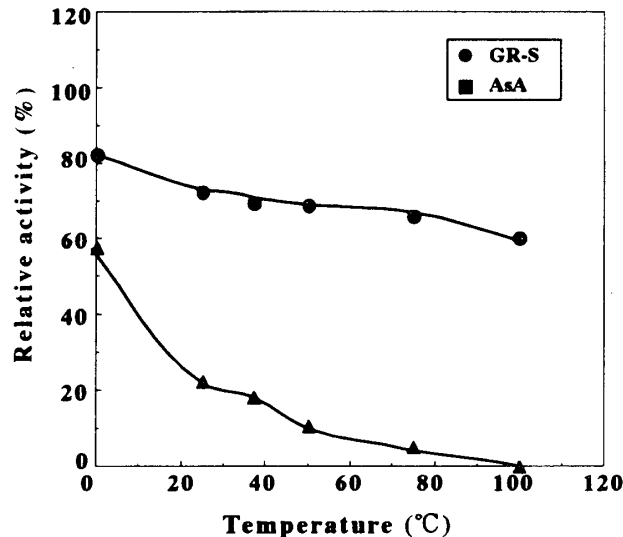


図2 各温度 30 分保持後 DPPH ラジカル捕捉活性の安定性

5 時間経過後も約 50%活性を保持していたが、AsA は 0 °C (水中) に保持しても 5 時間経過後で約 75%に活性が低下していた。ラジカル捕捉活性は温度上昇とともに低下していき、50°C以上においては 1 時間経過後の AsA は完全に捕捉活性を失っていた。

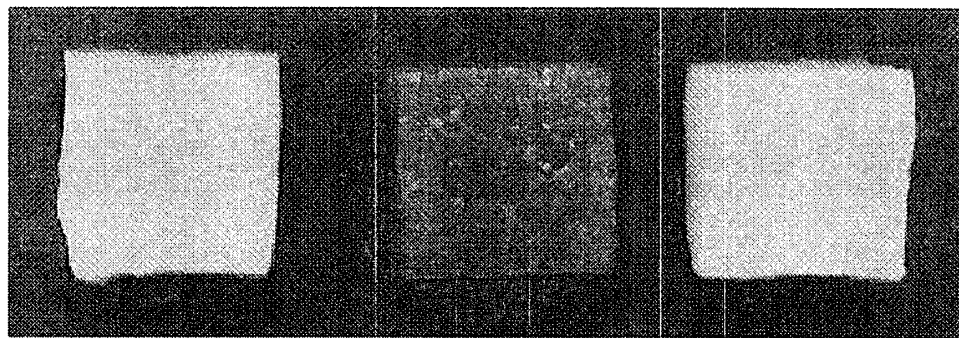
図 2 は、pH 10.0 における各温度 30 分処理後の DPPH ラジカル捕捉活性を、pH 4.0、0 °C、30 分処理時の GR-S の活性を 100%として相対値で表したものである。その結果、アルカリ環境下にさらされることにより 0 °C 30 分処理においても GR-S は約 80%、AsA は約 60%に活性が低下した。また、温度上昇とともに両抗酸化剤ともその捕捉活性が低下していく傾向となったが、GR-S は 100°Cにおいても約 60%活性を保持していた。一方、AsA は 100°C 30 分処理ではほとんど失活し捕捉活性を検出できなかった。

カテキン類はアルカリ・加熱処理により重合を促進することが知られており、着色現象も観察された。重合による分子構造の変化から、分子数は減少するがフェノール性水酸基の数はあまり変化しないことが予想され、ラジカル捕捉活性を比較的保持していると考察する。構造上、1 分子あたり多くのフェノール性水酸基を有することから、複数のフェノール性水酸基の共同作用によりラジカル捕捉活性が高まる¹¹⁾ ことも予想される。また、アスコルビン酸は中性からアルカリ pH 域においては、容易に酸化され、デヒドロアスコルビン酸やジケトグルン酸へと変化する。これらの化合物はラジカル捕捉活性を示さないことは既に知られている¹²⁾。

以上の結果より、アルカリ pH 域において、GR-S は AsA より熱に対して非常に安定な DPPH ラジカル捕捉活性を有する食品素材であることが判明した。

2. 抗酸化剤配合コンニャクの試作と色調測定

GR-S がアルカリ pH 域で安定性に優れていることに着眼し、加工工程にアルカリおよび加熱工程を行うコンニャク製造に GR-S を配合することを試みた。コンニャクは、グルコースやマンノースを主体とする多糖類であるグルコマンナンが熱処理によりゲル化し、水酸化カルシウムなどのアルカリ処理により独特な粘濁性のある物性が生じる食品である。



(a) 無配合

(b) GR-S配合

(c) AsA配合

図3 各種コンニャクの写真

表2 各種コンニャクの色調

コンニャク	L	a	b
無配合	44.51±0.55	-2.13±0.11	-10.14±1.29
GR-S 配合	30.53±1.30*	5.68±0.23*	8.01±1.52*
AsA 配合	45.19±1.27	-2.33±0.11	-10.43±0.60
赤こん	28.56±1.26	27.53±3.41	12.03±1.65

Each value is the mean±standard deviation of six independent experiments.

*means significance at 0.5% level between GR-S-Konjac and no addition Konjac.

図3に3種類のコンニャクの写真を示す。無配合コンニャクは白色であるのに対して、GR-S粉末自体が赤褐色化していることから、GR-S配合コンニャクは着色している。一方、AsA配合コンニャクは無配合コンニャクとあまり差がないように見られる。色調の指標であるL、a、b値について比較し、表2にまとめた。無配合コンニャクとAsA配合コンニャクでは3つの値とも有意差が生じなかったが、GR-S配合コンニャクは全ての値において、無配合コンニャクとAsA配合コンニャクとの間に有意に差があることが明らかとなった。すなわち、GR-S配合コンニャクは、明度が低く、赤味と黄色味がかっていることが判明した。タンニン化合物を代表とするプロアントシアニジンは3価の鉄イオンと容易に反応して着色する。着色を防ぐためにはキレート剤や還元物質による手段を考える必要がある。表2にも記載したように、近江八幡名産に400年以上の伝統がある通称「赤こん」とされる酸化鉄配合のコンニャクがある。この「赤こん」よりもGR-S配合コンニャクの赤味度は低く落ち着いた色調であった。

3. 抗酸化剤配合コンニャクのDPPHラジカル捕捉活性

試作した3種類のコンニャクの1gあたりのDPPHラジカル捕捉活性を図4に示した。生コンニャクの場合、無配合コンニャクの活性は見いだされなかったが、GR-S配合コンニャクでは約85トロロックス換算値、AsA配合コンニャクでも約8トロロックス換算値の活性を示した。また、この生コンニャクを市販のおでんの素とともに90°C15分間煮込んで、おでん風味としたときのコンニャクのラジカル捕捉活性も調べた。この場合、GR-S配合コンニャクは約75トロロックス換算値を示したが、生のときに活性を有していたAsA配合コンニャクでは活性を見いだせなかった。

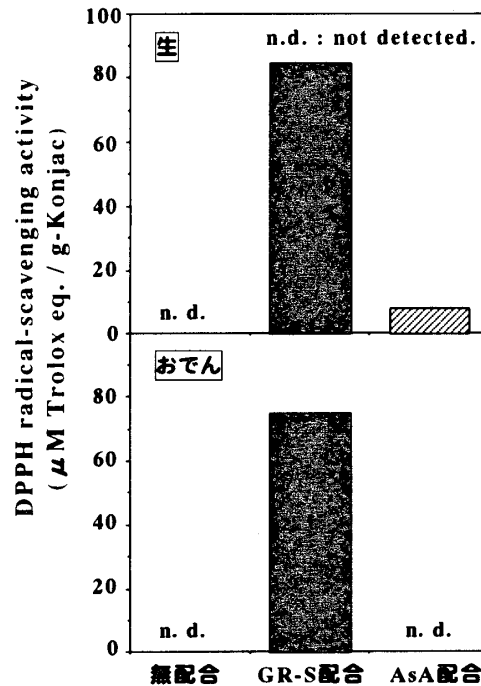


図4 各種コンニャク DPPH ラジカル捕捉活性

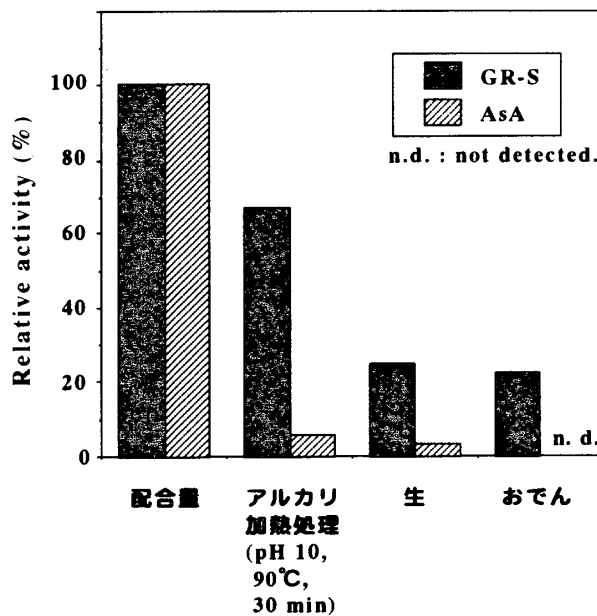


図5 各工程における DPPH ラジカル捕捉活性の推移

今回、容積 1,000 ml のコンニャクを試作する際に各々 200 mg の GR-S あるいは AsA を配合したが、この配合量の活性をコンニャク 1g あたりに換算し、このときの活性を 100% として、各工程処理毎の相対活性値を示したものが図 5 である。アルカリ・加熱処理は、グルコマンナンを共存させないで、コンニャクの製造工程条件と同じ pH 10.0、90°C、30 分処理を行ったときの相対ラジカル捕捉活性である。このアルカリ・加熱処理と比較して生コンニャクのラジカル捕捉活性が大きく減少している。今回の抽出方法である 10% (v/v) 酢酸水溶液では、コンニャクからプロアントシアニジンが充分量抽出できなかつたと判断している。何故ならば、コンニャク

抽出残渣の着色度からプロアントシアニジンが残存していることが明らかであり、実際の生コンニャクのラジカル捕捉活性は、アルカリ・加熱処理時と変わらないと推察する。GR-S 配合コンニャクの正確なラジカル捕捉活性を評価するためには、抽出条件の再検討が必要であると思われる。また、GR-S 配合コンニャクにおいて生コンニャクとおでん風味コンニャクとのあいだに大きなラジカル活性の違いが見られないことより、醤油ベースの調味料存在下における 90°C15 分間処理では、ラジカル捕捉活性はほとんど影響を受けないことが明らかとなった。同条件では AsA 配合コンニャクでは完全に失活していた。

以上のことから、GR-S を配合しラジカル捕捉活性を有したコンニャクの試作に成功した。

4. 抗酸化剤配合コンニャクのテクスチャー

試作した 3 種類のコンニャクの硬さをテンシプレッサーにより測定した結果を表 3 に示した。その結果、3 種類のコンニャクに硬度の差は見られなかった。つまりどのコンニャクでも食感に差がないことが示された。AsA が自動酸化される過程で発生するラジカルの作用によりゲルを形成している多糖類、例えば、寒天・カラギーナン・キサンタンガムなどが分解され、ゲル強度が低下するという報告¹³⁾があるが、グルコマンナンの場合は強度低下という現象は見られなかった。

表 3 各種コンニャクの硬さ

コンニャク	硬さ (Kgf/cm ² ・cm)
無配合	331.23±66.59
GR-S 配合	312.55±34.56
AsA 配合	323.43±36.87

Each value is the mean±standard deviation of ten independent experiments.

5. 抗酸化剤配合コンニャクの官能評価

表 4 に官能検査の結果を示す。生コンニャク、つまりさしみ風の評価においては、GR-S 配合コンニャクは他の 2 つのコンニャクと大きく色調が異なるため、外観の評価が著しく悪く、この外観の評価の低さから全体の評価も低い結果となった。一方、おでん風味となると醤油ベースの着色も手伝い外観にあまり評価の差がなく、全体の評価にも違いが見られなかった。ただ、味に関してはコンニャクが暖められ舌の感覚が鋭敏になったためか、GR-S 配合コンニャクにプロアントシアニジン由来と予想される収斂味を感じたパネラーがおり、若干、評価が落ちた。また、食感に関しては、生ならびにおでん風味とも、テンシプレッサーによる結果 (表 3) 同様、3 種類のコンニャクとも大きな違いは見られなかった。

表4 各種コンニャクの官能検査

コンニャク		無配合	GR-S 配合	AsA 配合
(生)	全体	3.22±0.83	2.94±0.77***	3.27±0.81
	外観	3.44±0.89	2.58±1.03*	3.51±0.86
	食感	3.50±0.85	3.40±0.91	3.24±1.04
	味	3.22±0.93	3.18±0.93	3.22±0.99
(おでん)	全体	3.54±0.86	3.42±0.80	3.54±0.75
	外観	3.11±0.92	3.01±1.03	3.33±0.86
	食感	3.16±0.87	3.04±0.90	3.09±0.96
	味	3.66±0.94	3.36±0.96*	3.73±0.96

Each value is the mean±standard deviation of ninety independent examinations.

* and ** means significance at 5 % and 1 % level between GR-S Konjac and no addition Konjac, respectively.

IV. 要 約

アルカリ pH 域におけるプロアントシアニジンが主成分であるブドウ種子ポリフェノール (GR-S) の DPPH ラジカル捕捉活性の熱安定性をアスコルビン酸 (AsA) と比較検討した。また、アルカリ pH 域でゲル粘稠化を行うコンニャク製造に GR-S を配合し、そのラジカル捕捉活性をはじめとする種々の検討も行った。

アルカリ pH 域では、中性域よりも GR-S も若干ラジカル捕捉活性の減少が見られたが、AsA と比べればはるかに熱に対して安定であった。例えば、AsA が完全に活性を失った pH 10.0、100℃、30 分処理において、GR-S は捕捉活性を約 60% 保持していた。このことより、GR-S はアルカリ・熱に対して非常に安定な DPPH ラジカル捕捉化合物であることが明らかとなった。また、アルカリ・加熱工程を有するコンニャク製造に GR-S を応用し、GR-S 配合コンニャクを試作した。GR-S 配合コンニャクは DPPH ラジカル捕捉活性を有意に示すことが明らかとなり、醤油ベースのおでん風味とした場合でも活性を確認できた。一方、同濃度の AsA 配合コンニャクでは弱い活性値しか示さず、おでん風味となると活性が検出できなかった。GR-S 配合コンニャクは、無配合および AsA 配合コンニャクと同等なテクスチャーを有し、官能検査でも同様の結果が得られた。GR-S 配合コンニャクは特に赤色に着色しており、官能検査でも生の場合、外観そして全体の評価が悪かった。しかし、おでん風味となると今回試作した 3 種類のコンニャクに大きな評価の違いはなかった。

コンニャクは伝統的な食品であるにも関わらず、低カロリーかつ食物繊維様作用を有することから、健康機能食品として見直されてきている。コンニャクの主成分であるグルコマンナンの整腸作用、コレステロール吸収阻害作用、抗高脂血効果、血糖値抑制ならびにインスリン節約効果¹⁴⁾などにプラスして新たにラジカル捕捉能を有したコンニャク製造の可能性を示し、広く生活習慣病を予防することにマルチパーパスな健康志向食品を提示した。

官能検査にパネラーとして参加していただいた本学・食物学科 3 回生ならびに 4 回生に厚く感謝申し上げます。

V. 参考文献

- 1) 永田親義：“活性酸素の話”、講談社ブルーバックス（1997）。
- 2) 寺尾純二、五十嵐脩：“フリーラジカルと疾病予防”、建帛社（1997）。
- 3) 早川幸男：*Food Style* 21、4 (8)、117-122（2000）。
- 4) 佐藤充克：*New Food Industry*、40 (10)、39-45（1998）。
- 5) S. Renaud, M. De Lorgeril：*Lancet*, 339, 1523-1526（1992）。
- 6) 有賀敏明、細山浩、徳武昌一、山越純：日本農芸化学会誌、74 (1)、1-8（2000）。
- 7) 北尾悟、寺本円佳、的場輝佳：日本調理科学会平成12年度大会研究発表要旨集、p. 24（2000）。
- 8) 北尾悟、寺本円佳、的場輝佳：日本食品工学会誌、48 (8)、591-597（2001）。
- 9) 北尾悟、寺本円佳：大阪樟蔭女子大学論集、38、93-100（2001）。
- 10) T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba and J. Terao：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (6), 1201-1204（1998）。
- 11) W. Bors, W. Heller, C. Michel, and M. Saran：*Methods Enzymol.*, 186, 343-355（1990）。
- 12) 山口智子、梶川理恵、溝渕妙子、寺尾純二、高村仁知、的場輝佳：日本農芸化学会平成11年度大会講演要旨集、p. 125（1999）。
- 13) 佐々木淳、池内義弘、塩谷敏明：公開特許、2000-93096。
- 14) 辻啓介：食の科学、256、58-62（1998）。