

# 地域特産物の抗酸化力向上に関する研究（第2報）

木村 英生・樋口 かよ・小嶋 匡人・橋本 卓也

## Improvement of Antioxidant Activity of Local Agricultural Products (2nd Report)

Hideo KIMURA, Kayo HIGUCHI, Masahito KOJIMA and Takuya HASHIMOTO

### 要 約

県産野菜類を中心にORAC法による抗酸化能の評価を実施し、茹でる、油炒めなどの調理による変化、あるいは加熱乾燥、醗酵、焙煎といった加工における抗酸化能の変化を検討した。葉物野菜を対象に茹でた場合では抗酸化活性は減少し、油炒めの場合でも減少するがその割合は軽減される傾向を示した。一方、加工による変化では、大豆から味噌を試作した場合、及び野菜を粉末化して焙煎した場合も抗酸化能は向上した。特に焙煎による効果が大きく、県内の伝統野菜である大塚にんじんを素材とした場合、乾燥粉末の数値の約5倍となった。

### 1. 緒 言

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。当センターでは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いる<sup>1,2)</sup>が、最近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、広く用いられるようになってきた。

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。

一方、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。

米国では果実・野菜のORAC法による抗酸化能のデータ(ORAC値)が公表され、飲料など一部の商品でORAC値が表示され始めており、日本においてもゼリーや清酒などでORAC値を表示した商品が発売されている。

日本国内においては平成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、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)法を選定し検証を行っている<sup>3)</sup>。

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。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値を明らかにし、抗酸化能(ORAC値)を向上させる加工法を検討することを目的とした。

今年度は、県産野菜類を中心に抗酸化能評価と調理加工時の変化について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 供試試料

山梨県産野菜類(一部果実)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22~23年度に収穫期のものを入手し、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℃のディープフリーザー(エスペック㈱, BFH-110)にて保存した。凍結乾燥(東京理化工機㈱, FDU-220)後、フォースミル(大阪ケミカル㈱)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 0.1~1.0g 正確に量り, ヘキサン: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 0.1~1.0g 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

AOU-P(H-ORAC)分析手順<sup>3)</sup>に準じ, 96 穴マイクロプレートに測定用試料 35  $\mu$ l, Fluorescein 溶液 (sigma 社製, 110.7 nM) 115  $\mu$ l を加え, 37°C に保ったプレートリーダー (コロナ電気㈱, 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-amidinoopropane) dihydrochloride) 溶液 (L-ORAC では 63.4nM, H-ORAC では 31.7nM, pH 7.4) を 50  $\mu$ 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( $\mu$  mol of TE/100gfw)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 (コロナ電気㈱, 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 ( $\mu$  mol of TE/100g-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 (㈱日立ハイテック, 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.

### 2-6 葉菜類の調理操作

「茹でる」作業は以下のとおり実施した. 2 リットルの沸騰水中に可食部 (生) を 50 g 入れ, 40 秒間強火で加熱し, 冷水で冷やした. キッチンペーパーで水気を除去し, 重量を測定して試料とした.

一方, 「油炒め」作業は以下のとおり実施した. フライパンを強火であたためた後, 油 (食用なたね油) を 3g 入れ, 可食部 (生) 50g を中火で 1 分間加熱した後, 重量を測定し, 試料とした.

## 2-7 加工品の試作

### 2-7-1 ジャム

原料（モモ）に対し、0.5~0.6%の白双糖を加え、あくを除去しながら約 10 分加熱した。この際、果皮や種は調理用の不織布にいれ、一緒に加熱した。ブリックスが 50~60 度になったら火をとめ、瓶詰した。

### 2-7-2 ドライフルーツ

原料（モモ）をよく洗い、果皮のまま 5mm前後に薄く切り、網にのせ、65℃前後の乾燥器で 7 時間程度乾燥させた。外側がべたつかず、乾いた時点で出来上がりとした。

### 2-7-3 味噌（調合味噌）

味噌は株式会社富士井屋糀店で配布された資料に準じて試作した。すなわち、大豆一斗を一昼夜水づけし、十分な水で 2~3 時間煮た後、煮汁を切り、熱いうちに薄く広げて冷ました。麴 15~20 枚（米麴：麦麴=3：2、富士井屋糀店）をもみほぐし、原料の 7%の塩混ぜたものを冷ました大豆に加えてよく混ぜた。

混合したら、水を適量入れ、味噌玉をつくり、容器につめた。その後、重石を置き、蔵で約一年熟成させた。供試試料として、味噌玉と熟成後味噌の一部を使用した。

### 2-7-4 塩麴

食塩 20g、乾燥麴 60g をよく混ぜた後、水 120g を加えた。保存容器に入れ、25℃で 14 日醗酵させた。

### 2-7-5 焙煎粉末

フライパンに試料粉末を適量入れ、弱火で約 5 分間加熱した。加熱時は焦がさないように、適度にかき混ぜ、むらなく火が通り、茶褐色になった時点を出来上がりとした。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 県産野菜類の ORAC 値

表 1 に県産野菜類の ORAC 値、DPPH ラジカル消去活性値及び総ポリフェノール量を示した。

最も ORAC 値が高いものは 5000 ( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ ) を超えていた。県の伝統野菜として取り上げられる水かけ菜、クレソン、大塚にんじん、八幡芋などは、それぞれ 3124, 1674, 887, 434 ( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ ) の ORAC 値を示した。

続いて、この野菜類の ORAC 値と DPPH ラジカル消去活性値との相関を図 1 に示した。ややばらつきもあるが、野菜試料 33 種類において、相関係数は  $r = 0.83$  と概ね高い相関を示した。さらに対象を葉菜類 11 種類としてみると、相関係数  $r = 0.93$  と相関性は向上した (図 2)。ORAC 値とポリフェノール量との相関も  $r = 0.98$  と高く (図 3)、野菜類、特に葉菜類では ORAC

値はポリフェノール量に比例し、DPPH ラジカル消去活性値と相関の関係にあることがわかった。また、これらの結果から DPPH ラジカル消去活性値ないしポリフェノール量から ORAC 値を推測できる可能性が示唆された。

表 1 野菜類の ORAC 値、DPPH ラジカル消去活性値及び総ポリフェノール量

No.	試料名	ORAC値	DPPHラジカル 消去活性値	ポリフェノール
		( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )	( $\mu\text{mol of TE}/100\text{g-fw}$ )	(mg of GAE/100g-fw)
1	菜花	5139	499	248
2	春菊	4777	578	259
3	ふきのとう	4701	397	356
4	たらの芽	3960	306	196
5	カキ菜	3800	400	210
6	オカヒジキ	3619	456	242
7	小松菜	3469	392	187
8	こごみ	3243	265	190
9	水かけ菜	3124	387	130
10	プチヴェール	3056	412	151
11	ヤマブキ	3046	325	202
12	ほうれん草	2787	287	145
13	にんにく	2676	300	47
14	うぐいす菜	2329	264	103
15	たらの芽(産地別)	2170	350	99
16	二十日大根	2055	275	65
17	クレソン	1674	322	100
18	アスパラガス	1565	300	88
19	口紅大根	1317	226	51
20	とうもろこし(甘々娘)	1238	346	34
21	ネギ(葉鞘部)	1210	182	49
22	サトイモ	1185	436	53
23	カンゾウ	987	212	61
24	大塚にんじん	887	88	97
25	かぼちゃ	885	53	40
26	菊芋	788	189	38
27	とうもろこし (ゴールドラッシュ)	732	160	28
28	紫大根	669	136	40
29	栗かぼちゃ	668	105	28
30	アイスプラント	652	150	29
31	トマト(桃太郎)	527	110	31
32	八幡芋	434	134	19
33	ネギ(本葉部)	217	61	15

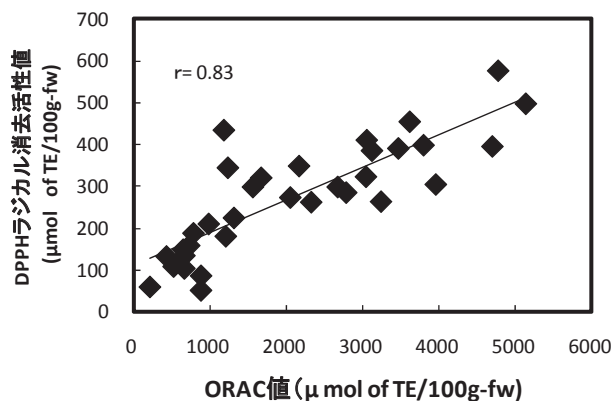


図 1 県産野菜類の ORAC 値-DPPH ラジカル消去活性値間の相関

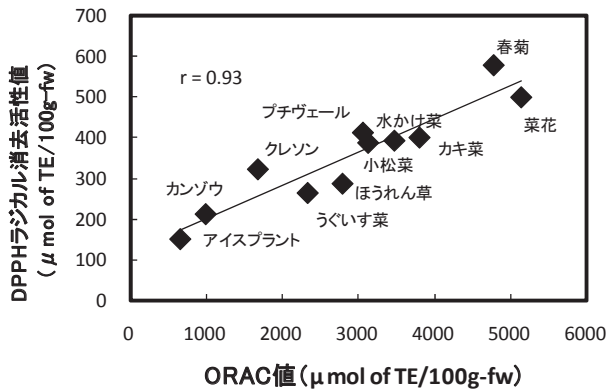


図2 葉菜類のORAC値-DPPHラジカル消去活性値間の相関

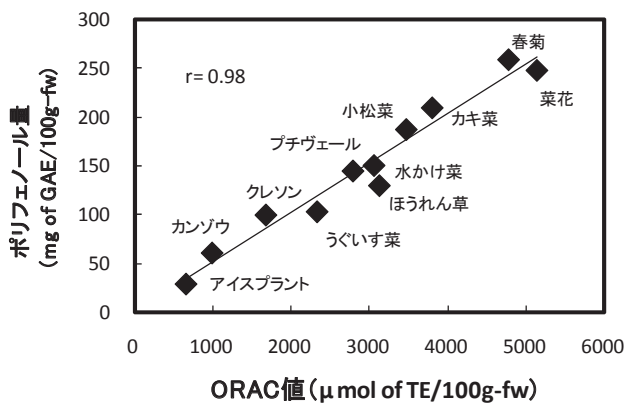


図3 葉菜類のORAC値-ポリフェノール量間の相関

### 3-2 調理時の抗酸化能の変化

「茹でる」、「炒める」の調理を行なった際の抗酸化能の変化について検討した。図4にORAC値を、図5にポリフェノール量の変化を示した。

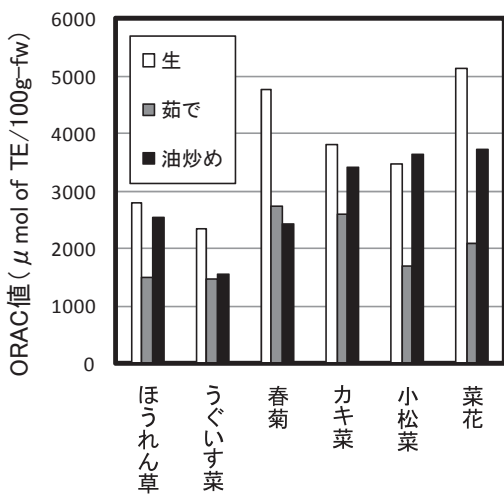


図4 葉菜類における調理時の抗酸化能 (ORAC 値) の変化

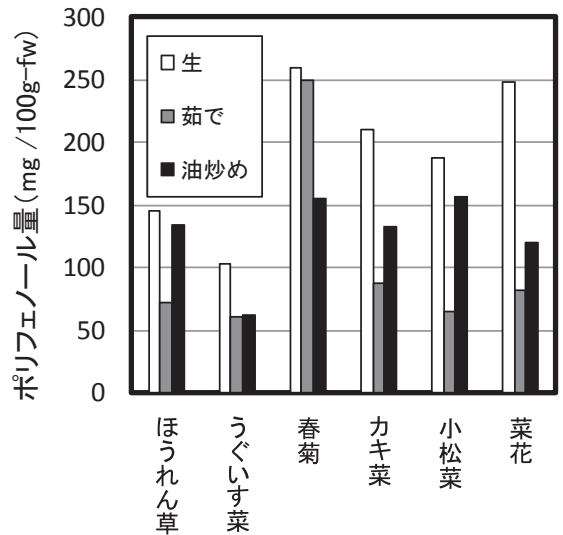


図5 葉菜類における調理時のポリフェノール量の変化

薬物野菜を中心に調理による変化を検討したところ、茹でた場合ではORAC値はすべての試料で減少した。油炒めの場合でも概ね減少する傾向を示したが、その割合は茹でた場合に比較して軽減される傾向を示した。ポリフェノール量についてもORAC値と同様な傾向を示していた。

### 3-3 加工時の抗酸化能の変化

図6に試作加工品のORAC値を示した。モモを原料としてジャム及びドライフルーツを試作した。これらについて加工前の原料(モモ果実)と加工後の抗酸化能についてORAC値を測定し、比較したところ、加工後にORAC値が上昇した。特にドライフルーツで大きく向上しているが、乾燥粉末での数値で比較するとORAC値はほぼ等しく、水分の減少による「濃縮」の効果が大きいと考えられる。

味噌、塩麴、黒ニンニク(黒ニンニクについては、試作を実施していない。ニンニクと加工品の測定値の比較である)についてみるとこれらも加工前(醗酵、熟成前)の原料に比較して加工後(醗酵、熟成後)ではORAC値は上昇していた。味噌については加工前の約2.7倍となっており、乾燥粉末での比較でも明らかに向上していることから、抗酸化物質が生成したと考えられた。味噌の抗酸化物質としては大豆サポニン、イソフラボン、 $\alpha$ -トコフェロールなどがあるが、これ以外にも褐色色素であるメラノイジンにも抗酸化作用があると言われている。メラノイジンは糖とアミノ化合物との反応(メイラード反応)により生成する物質であることから、この物質の生成も寄与していると考えられた。

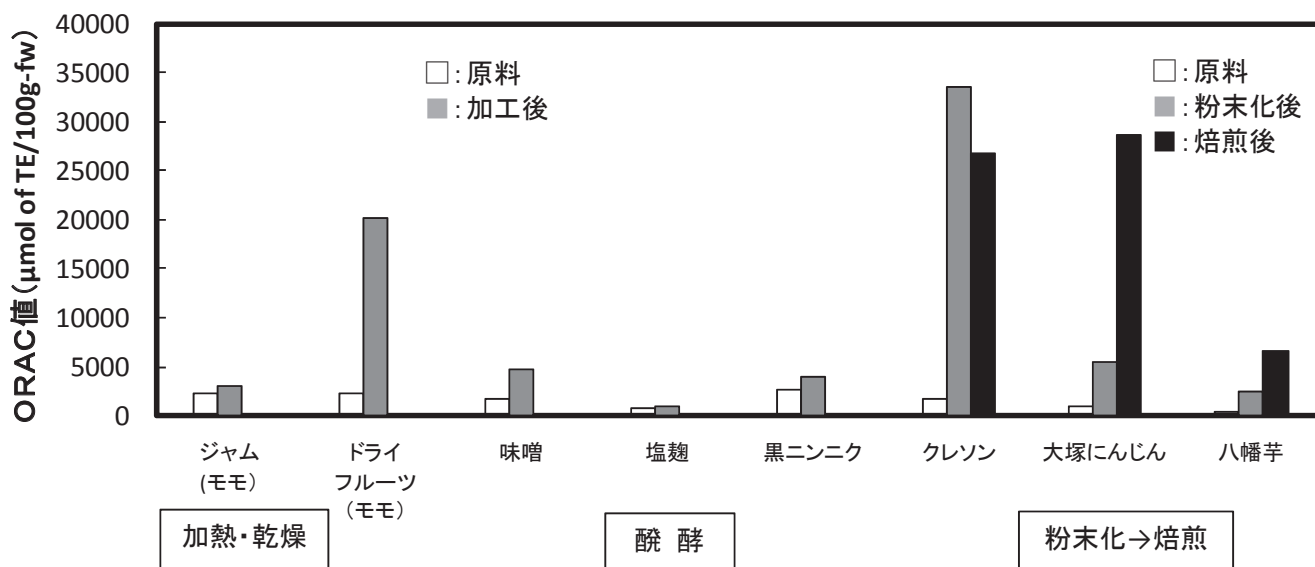


図6 加工試作品のORAC値

そこでこのメイラード反応を利用して抗酸化能の向上が図れないか、次に検討した。すなわち焙煎加工による効果を検討するため、野菜類を粉末化し、これを焙煎して抗酸化能の変化を評価した。クレソンでは粉末化後の数値と比較して焙煎することでORAC値は減少していた。しかし、大塚にんじん、八幡芋では焙煎によって大きくORAC値が向上していた。

大塚にんじん及び八幡芋の粉末は焙煎によって適度に褐変しており、メイラード反応が進行したことがうかがわれた。反応生成物の定量などは実施していないが、遊離アミノ酸を測定すると焙煎前後で大きく減少しており、メイラード反応が進行したことが示唆された。

クレソンにおいてもアミノ酸は焙煎前後で減少している。しかし、クレソンにはアミノ酸も糖も少なく、メイラード反応による効果は少ないと考えられた。クレソンの加工適性については既報<sup>4)</sup>で検討しており、加熱によって抗酸化能が減少することを報告している。クレソンにおいては、焙煎による加熱でポリフェノールなどが損なわれ、抗酸化能が減少する効果の方が大きいと思われる。

一方、大塚にんじんと八幡芋は、クレソンより糖やアミノ酸含有量が多く、メイラード反応の寄与が大きいものと推察された。大塚にんじんにおいては焙煎前後で約5倍に向上している。にんじんの抗酸化物質としてはβ-カロテンなどが挙げられるが、このようなカロテノイドの抗酸化作用はORAC法では評価できないとされていることから、今後別の方法でも評価することが望ましいと思われる。

#### 4. 結 言

県産野菜類を対象に、茹でる、油炒めなどの調理による変化、あるいは加熱乾燥、醗酵、焙煎といった加工における抗酸化活性の変化をORAC法などで評価した。

薬物野菜を中心に調理による変化を検討したところ、茹でた場合では抗酸化活性は減少し、油炒めの場合でも減少するがその割合は軽減される傾向を示した。

一方、加工による変化を見た場合、モモなど果実を素材として、乾燥してドライフルーツを試作した場合、抗酸化活性は向上した。しかし、これは水分が除去されたことによる「濃縮」の影響が主であると推察された。

大豆から味噌を試作した場合、及び野菜を粉末化して焙煎した場合も抗酸化活性は向上した。特に焙煎による効果が大きく、県内の伝統野菜である大塚にんじんを素材とした場合、乾燥粉末の数値の約5倍となった。この焙煎粉末を熱湯で抽出した抽出液（コーヒー風飲料）を試飲したところ、風味もよく好評価であった。

#### 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) AOU-P(H-ORAC)分析手順書 (2009)
- 4) 恩田 匠, 小嶋 匡人, 長沼 孝多, 斎藤 美貴, 橋本 卓也: 山梨県工業技術センター研究報告, No.22, p.140-143 (2008)