カンキツ果実の発育中における抗酸化機能の推移

近藤 悟^{1*}・津田和彦¹・武藤徳男¹・中谷宗一²¹広島県立大学生物資源学部 727-0023 庄原市七塚町 562²広島県農業技術センター果樹研究所 729-2402 豊田郡安芸津町三津 2835Changes in Antioxidant Activity during Fruit Development in *Citrus* FruitSatoru Kondo^{1*}, Kazuhiko Tsuda¹, Norio Muto¹ and Soichi Nakatani²¹ School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University, Shobara, Hiroshima 727-0023² Fruit Tree Research Institute, Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center 729-2402

Summary

The antioxidant activity, phenolic concentration, and ascorbic acid concentration during fruit development were investigated in four types of *Citrus* fruit (*Citrus spp.*); Satsuma mandarin (*Citrus unshuu* Marc. cvs. 'Ishiji' and 'Nankan 20'), 'Shiranuhi' [(*Citrus unshuu* Marc. × *Citrus unshuu* Osbeck) × *Citrus reticulata* Blanco], and 'Lisbon' lemon (*Citrus limon* Burm. f.). In general, the superoxide (O_2^-) radical scavenging activity remained high throughout the development in the skin of all four types. The activities in the pulp decreased with maturation except for 'Shiranuhi' and 'Lisbon' lemon. The changes in scavenging activity for the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical differed from those for O_2^- DPPH radical scavenging activity in the skin decreased with days after full bloom (DAFB) in the four types of fruit, but increased again at harvest. The activity in pulp decreased with DAFB except in 'Shiranuhi' and 'Lisbon' lemon. The total phenolic and total ascorbic acid concentrations were higher in the skin than pulp. The ascorbic acid concentrations in the pulp were high at the beginning of fruit development, but decreased toward maturation except in 'Shiranuhi' and 'Lisbon' lemon. These results suggest that ascorbic acid concentrations influence free radical scavenging activity in the pulp of *Citrus* fruit.

キーワード DPPH ラジカル, 活性酸素, カンキツ, 抗酸化機能, スーパーオキシドアニオンラジカル

緒 言

われわれの生活における健康志向の高まりに伴い食生活の見直しが進められるとともに、植物の持つ抗酸化機能が注目されている。たとえば植物由来の抗酸化物質は、人体における癌や心臓病の誘発に関連する活性酸素を消去する (Ames ら, 1993)。茶 (*Aspalathus linearis*) (人見ら, 1999) やインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) (津田ら, 1994) は強い抗酸化機能を持つが、これらはいずれもポリフェノールの一種であるカテキンを多く含有し、抗酸化作用に加え抗菌作用など人体に有益に作用する (岩井ら, 2000)。果実もまた抗酸化作用を持つため、その機能性について研究されている。ブルーベリー (*Vaccinium spp.*) はポリフェノールの一種であるアントシアニンを高含有し、強い活性酸素消去能力を持つ (Ehlenfeldt・Prior, 2001)。

抗酸化作用を持つ物質としてポリフェノール以外にカ

ロチノイド類、フラボノイド類、ビタミン C・E などが上げられ、カンキツ類はこれらを多く含む果実として知られている (小川, 1997)。これらの濃度は品種および果実の部位で異なり (Mozafar, 1994)、それゆえ抗酸化機能も相違すると考えられる。さらに、これらは果実の発育時期によっても異なると考えられ、それにともない抗酸化機能も変化すると推定される。しかし、カンキツ類 (*Citrus spp.*) に関して果実の発育段階と抗酸化機能の関連についての知見は乏しい。

本研究では、西南暖地で糖濃度が高くその食味の良さから広く栽培されているウンシュウミカン (*Citrus unshuu* Marc.) '南柑 20 号' および '杉山ウンシュウ' の変異樹で浮皮の発生が少なく糖度が高く今後の栽植の増大が予想される '石地ウンシュウ'、特異な外観と糖度の高さで急速に人気が高まっている '不知火' [(*Citrus unshuu* Marc. × *Citrus unshuu* Osbeck) × *Citrus reticulata* Blanco]、ならびに高濃度のビタミン C (アスコルビン酸) を含有することから強い抗酸化機能が期待されるレモン 'リスボン' (*Citrus limon* Burm.f.) の 4 種のカンキツ果実を採取し、

2001 年 7 月 31 日 受付, 2001 年 10 月 1 日 受理.

* Corresponding author.

発育時期や果実部位と抗酸化機能との関連性を検討した。さらに総フェノール濃度およびアスコルビン酸濃度と抗酸化機能との関係も検討した。

材料および方法

広島県農業技術センター果樹研究所の圃場に植栽された15年生のウンシュウミカン、‘石地ウンシュウ’および‘南柑20号’（カラタチ台木）、8年生の‘不知火’（カラタチ台木）ならびに20年生のレモン‘リスボン’（カラタチ台木）をそれぞれ3樹ずつ無作為に採取し供試した。‘石地ウンシュウ’および‘南柑20号’については満開後14日から187日（収穫日）まで、‘不知火’は満開後14日から220日（収穫日）まで、そして‘リスボン’については満開後14日から191日（収穫日）までそれぞれ定期的に採取した。果皮と果肉をナイフで分離後直ちに液体窒素で凍結し、分析まで -30°C のフリーザーに貯蔵した。

スーパーオキシドアニオンラジカル活性の測定

果皮および果肉（1–10 g 新鮮重、無作為に採取した5–15果の3反復）を、それぞれ13.7 M エタノール中でホモジナイズした。濾過後エタノールを蒸発させ、蒸留水で10 ml に定容した。

スーパーオキシドアニオンラジカル消去活性は、Ooyanagi (1984) の報告に従って亜硝酸法により測定した。すなわち上記の試料溶液（0.05 ml）、0.5 mM ヒポキサンチン（0.1 ml）、 $1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ヒドロキシルアミン-O-スルホン酸を含む10 mM ヒドロキシルアミン溶液（0.05 ml）、蒸留水（0.1 ml）、65 mM リン酸二水素カリウム–35 mM 四ほう酸ナトリウム–0.5 mM EDTA 溶液（pH 8.2, 0.1 ml）および $14.5\text{ mU}\cdot\text{ml}^{-1}$ のキサンチンオキシダーゼ液（0.1 ml）を混合し、反応液（総量0.5 ml）とした。37 $^{\circ}\text{C}$ 下に30分静置後、30 μM N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩–3 mM スルファニル酸–4.2 M 氷酢酸溶液1 mlを加え、室温に30分静置後、550 nmの吸光度を分光光度計（U-2001, 日立）で測定した。各試料の IC_{50} 値を、加えた試料量を基に回帰式を求め計算した。なおコントロールとして試料溶液の代わりに蒸留水を用いた。

DPPH ラジカル活性の測定

O_2^- 活性測定に供試したものと同一の試料溶液を、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカル測定に供試した。試料溶液20 μl に、エタノールに溶解させた0.1 M DPPH 980 μl を加え、十分に攪拌後、暗黒下で室温に20分間静置した後に516 nmの吸光度を分光光度計で測定した。 O_2^- 活性測定と同様に、各試料の IC_{50} 値を、加えた試料量を基に回帰式を求め計算した。コントロールとして試料溶液の代わりに蒸留水を用いた。

総フェノールおよびアスコルビン酸の測定

フェノール抽出は、試料（5 g 新鮮重、無作為に採取した5–15果）をアセトンおよび酢酸エチルで抽出する濱渦・

飯島 (1999) の方法、測定はFolin-Ciocalteu法（Singleton・Rossi, 1965）で行った。総フェノール濃度は、(-)-エピカテキン当量として表示した。アスコルビン酸の抽出は試料（5 g 新鮮重、無作為に採取した5–15果）を5%メタリン酸20 ml中でホモジナイズし、濾過後蒸留水で50 mlに定容した。アスコルビン酸濃度はヒドラジン法（南出, 1983）により測定した。それぞれ、抽出および測定は3反復した。

結果および考察

第1図および第2図において、 IC_{50} 値を示す果皮および果肉試料値の上昇は、試料におけるラジカル消去活性の低下を示す。各カンキツ果実において O_2^- ラジカル消去活性は、全般に果皮が果肉に比べて高かった（第1図）。果皮の活性は満開後191日の‘リスボン’を除き、発育初期から収穫まで大きく低下せず、特に‘不知火’の果皮の活性は高く保持された。一方、果肉の O_2^- ラジカル消去活性の推移は各カンキツ果実間で異なった。‘石地ウンシュウ’および‘南柑20号’では、満開後60日には果皮と同程度にその活性は高かったが、以降急激に低下した。‘不知火’でも活性は収穫に向け徐々に低下したか、ウンシュウミカン2品種に比べその減少率は小さかった。‘リスボン’では満開後60日から191日まで大きな変化は観察されなかった。

果皮および果肉のDPPHラジカル消去活性の推移は、 O_2^- ラジカル消去活性の推移とやや異なった。‘石地ウンシュウ’および‘南柑20号’では果皮の活性が果肉に比べて高かったが、‘不知火’および‘リスボン’では果皮と果肉でその活性は同程度であった（第2図）。果皮中のDPPHラジカル消去活性は果実発育初期に高かったが、満開後日数の経過とともに徐々に低下した。しかし、いずれの品種も収穫時に、その活性は再び上昇した。果肉中のDPPHラジカル消去活性について、‘石地ウンシュウ’および‘南柑20号’は果実発育初期に高く、以降急激に低下した。しかしながら‘石地ウンシュウ’ではその活性は収穫期に再び上昇した。‘不知火’および‘リスボン’の果肉では、満開後60日以降収穫まで満開後日数の経過とともない大きな活性の低下は観察されず、特に‘リスボン’では満開後60日以降、その活性はほぼ同程度であった。

各カンキツ果実で、総フェノール濃度は果皮が果肉に比べ高かったが、果皮および果肉とも、その濃度は発育初期ほど高かった（第1表）。各果実の果肉におけるアスコルビン酸濃度は、発育初期に高く収穫期に向けて低下した。果皮のアスコルビン酸濃度の推移は各果実間で異なった。‘リスボン’およびウンシュウミカンの2品種では、その濃度は発育初期に高く、一方‘不知火’ではむしろ収穫時に高くなった。果実の持つ高い抗酸化機能は人体の健康維持に有益であり、本研究の O_2^- ラジカル消去活性の測定結果より、果皮は有望な供給源として期待で

第1図 各カンキツ果実の果皮および果肉におけるスーパーオキシドアニオンラジカル消去活性の推移
値は平均±標準誤差 (n=3)

第2図 各カンキツ果実の果皮および果肉における1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性の推移
値は平均±標準誤差 (n=3)

第1表 各カンキツ果実の果皮および果肉中の総フェノールおよび総アスコルビン酸濃度

品種	満開後日数	総フェノール ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{FW}$)		総アスコルビン酸 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{FW}$)	
		果皮	果肉	果皮	果肉
石地ウンシュウ	60	0.53 ± 0.10	0.25 ± 0.07	1.7 ± 0.21	1.31 ± 0.13
	104	0.58 ± 0.04	0.02 ± 0.01	0.63 ± 0.05	0.18 ± 0.02
	187	0.46 ± 0.07	0.09 ± 0.07	1.62 ± 0.03	0.16 ± 0.01
南柑 20号	60	0.88 ± 0.14	0.46 ± 0.23	1.15 ± 0.03	0.99 ± 0.01
	104	0.43 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.61 ± 0.05	0.23 ± 0.04
	187	0.44 ± 0.08	0.24 ± 0.05	0.7 ± 0.04	0.37 ± 0.07
不知火	60	0.30 ± 0.06	0.18 ± 0.02	0.89 ± 0.11	1.86 ± 0.53
	104	0.47 ± 0.08	0.07 ± 0.01	1.58 ± 0.09	0.41 ± 0.07
	220	0.06 ± 0.04	0.05 ± 0.01	2.83 ± 0.21	0.68 ± 0.12
リスボン	60	1.03 ± 0.13	0.45 ± 0.17	3.03 ± 0.12	1.85 ± 0.31
	108	0.29 ± 0.02	0.04 ± 0.03	1.81 ± 0.24	0.5 ± 0.13
	191	0.37 ± 0.03	0.29 ± 0.05	1.44 ± 0.27	0.43 ± 0.09

値は平均±標準誤差 (n=3)

きる。これまで果皮中に含有される抗酸化物質として、特にポリフェノール類が注目され研究が行われてきているが (Ehlenfeldt・Prior, 2001, Wang・Lin, 2000), 各カンキツ果実の総フェノール濃度はこれらの報告に比較して低く、総フェノール濃度の推移も O_2^- 消去活性とは一致しなかった。果皮における総フェノール濃度と DPPH ラ

ジカル消去活性との関連もまた同様であった。アスコルビン酸もまた有力な抗酸化物質であるか (平井, 1999), 果皮における O_2^- および DPPH 両ラジカル消去活性とアスコルビン酸の推移は必ずしも一致しなかった。

カンキツ類の果皮は精油成分を含むが、その中でクマリン類のオーラプテンは発癌抑制作用を持つ (小川,

1997). さらにカンキツ果実は β -カロチン, クリプトキサンチンなどカロチノイド色素を含有し, これらは発癌抑制作用や活性酵素を消去する作用を持つ(矢野, 1999). カロチノイド色素は成熟期に蓄積してくる(門屋, 1995). 各カンキツ果実で果皮の DPPH ラジカル消去活性は発育期に一旦減少した後, 収穫期に再び増加した(第2図). これらの結果はカロチノイド色素が DPPH ラジカル消去に影響を及ぼしている可能性を示唆するものである. また果皮中の両ラジカル消去活性の推移は異なったことから, それぞれ異なる成分が影響しているものと考えられた. 今後, 各カンキツ果実の果皮に含有される精油成分や色素成分と抗酸化機能との関連を検討していく必要があるであろう.

一方, 各カンキツ果実で果肉の O_2^- および DPPH ラジカル消去活性の推移はアスコルビン酸濃度の推移と類似した. さらに果肉の O_2^- および DPPH ラジカル消去活性は, 発育期を通して比較的高く維持された‘不知火’や‘リスボン’では, ウンシュウミカンに比べアスコルビン酸濃度が高かった. したがってアスコルビン酸が果肉の活性酸素消去機能に影響を及ぼしている可能性が推定される. ただし‘石地ウンシュウ’の果肉では, 収穫期に DPPH ラジカル消去活性が再び上昇したことから, 果皮と同様カロチノイド色素など, アスコルビン酸以外の成分も影響しているものと考えられた.

摘 要

ウンシュウミカンの‘石地ウンシュウ’および‘南柑 20 号’, ‘不知火’ならびにレモン‘リスボン’の果実発育中における抗酸化機能と総フェノール濃度およびアスコルビン酸濃度との関連を検討した. 一般にスーパーオキシドアニオン(O_2^-)ラジカル消去活性は, 各カンキツ果実の果皮で発育を通じて高かった. 果肉での活性は‘不知火’および‘リスボン’を除き, 成熟に向け減少した. 果実中の 1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)ラジカル消去活性の変化は, O_2^- のそれらと異なった. 果皮中の DPPH ラジカル消去活性は各果実で満開後日数とともに減少したか, その活性は収穫時に再び増加した. 果肉中のそれらの活性は‘不知火’および‘リスボン’を除いて満開後の日数とともに減少した. 果皮中の総フェノール濃度とアスコルビン酸濃度は, 果肉に比べ高かった. 果肉中のアスコルビン酸濃度は果実の発育初期に高かったが, ‘不知火’および‘リスボン’を除き, 一般に成熟に向けて減少した. これらの結果は, カンキツ果肉においてアスコルビン酸が活性酸素消去活性に影響している可能性を示唆する.

引用文献

- Ames, B., M. K. Shigena and T. M. Hagen. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 7915-7922.
- Ehlenfeldt, M. K. and R. L. Prior. 2001. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and Phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of high-bush blueberry. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2222-2227.
- 濱渦康範・飯島悦子 1999 リンゴ果実抽出物のポリフェノール組織と抗酸化活性. *食科工.* 46: 645-651.
- 平井俊次. 1999 健康からみた果物消費効果. *果実日本.* 54: 26-30.
- 人見英理・田村聡美・鶴本祐子・津田孝範・中野昌俊. 1999 ルイボスティー(*Aspalathus linearis*)の抗酸化性. *食科工.* 46: 779-785.
- 岩井邦久・佐藤麻里母・松江 一 2000. xyz-dish法により評価した市販茶飲料の抗酸化活性とカテキン濃度との関連. *食科工.* 47: 120-129.
- 門屋一臣. 1995. 形態・生理・機能. p.13-66. 農業技術大系編集委員会編著, 農業技術大系, 果樹編 1, カンキツ 農文協. 東京.
- 南出隆久 1983 生理に関する実験, アスコルビン酸 p.181-183. 中川昌一編著 園芸学実験・実習. 養賢堂. 東京.
- Mozafar, A. 1994. Genetic variability p. 43-87 Mozafar, A. 編著 Plant vitamins. Agronomic, physiological, and nutritional aspects. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 小川一紀. 1997 柑橘類の機能性成分のかん予防効果. *果実日本.* 52: 30-33.
- Ooyanagui, Y 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 142: 290-296.
- Singleton, V. L. and J. A. Ross. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.
- 津田孝範・藤井正人・渡邊美栄・中茎秀夫・大島克己・大澤俊彦・川岸舜朗. 1994. インゲンマメ抽出物の抗酸化性と食品加工への応用. *食科工.* 41: 475-480.
- Wang, S. Y. and H. S. Lin. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agr. Food Chem.* 48: 140-146.
- 矢野昌充. 1999 果実の機能性成分の研究課題と展望. *果実日本.* 54: 22-25.