ブドウ種子抽出物のラジカル捕捉能に及ぼす熱 および pH の影響と蒟蒻の製造

北尾 悟*・寺本円佳*・的場輝佳**

Effect of Heat and pH on the Radical-scavenging Activity of Proanthocyanidin-rich Extract from Grape Seeds and Production of Konjac Enriched with Proanthocyanidin

Satoshi KITAO*, Madoka TERAMOTO* and Teruyoshi MATOBA**

* *Department of Food Science, Osaka Shoin Women's University, 4-2-26 Hishiyanishi,
Higashi-Osaka 577-8550*

** *Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University,
Kitauoya-nishimachi, Nara 630-8506*

The effects of heat and pH on the radical-scavenging activity of proanthocyanidins, oligomeric and polymeric polyhydroxyflavan-3-ol units, and ascorbic acid were compared. The radical-scavenging activity was evaluated by measuring the decrease of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) detected at 517 nm. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds (GSE) had stronger radical-scavenging activity than ascorbic acid and (+)-catechin, which is the monomeric compound of proanthocyanidin. This result suggested that more phenolic OH groups in a molecule caused stronger DPPH radical-scavenging activity. GSE was more stable against heat and pH than ascorbic acid. In acidic region, pH 4.0, the DPPH radical-scavenging activity of GSE almost possessed at 100°C for 5 hours, while that of ascorbic acid decreased less than 10%. In neutral region, pH 7.0, the activity of GSE was stable less than 50°C for 5 hours. In alkaline region, pH 10.0, 60% of activity of GSE remained at 100°C for 30 min, although the activity of ascorbic acid were completely lost. As it was clear that GSE was suitable for food ingredient of food processing and cooking, GSE was adapted to Konjac production, which is necessary for alkaline treatment. Konjac enriched with GSE significantly showed the DPPH radical-scavenging activity.

(Received Apr. 11, 2001 ; Accepted May 28, 2001)

近年、生体内の活性酸素、フリーラジカルが、悪性新生物（ガン）、脳血管疾患（脳卒中）、心疾患を代表とする生活習慣病などの疾病を引き起こす要因であることが明らかとなり、また、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であるとも言われている¹⁾。そこで、これら活性酸素、フリーラジカルを捕捉、消去する物質が多く含まれる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に期待が集まっている。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、緑黄色野菜には活性酸素、フリーラジカルを捕捉、消去する化合物が多く含まれていることが証明されている²⁾

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50%~70%は種子に分布している。ブドウ種子抽出物（grape seeds extract, GSE）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、既に商品化され食品素材や健康食品および化粧品素材として市販されている³⁾。その構造

* 大阪樟蔭女子大学食物学科（〒577-8550 東大阪市菱屋西4-2-26）

** 奈良女子大学生活環境学部（〒630-8506 奈良市北魚屋西町）

Fig. 1 Representative structure of procyanidin oligomers with C₄-C₈ linkage

は、(+)-カテキンが C4-C8 結合したプロアントシアニジンが主成分である水溶性化合物の混合物である (Fig. 1)。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⁴⁾⁵⁾、ヒトに対する生理機能なども調べられている^{6)~8)}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 に対する安定性に関する知見が見あたらない。

本研究では、GSE の熱ならびに pH に対するラジカル捕捉活性の安定性について、総合的に検討することにした。また、同じ水溶性抗酸化剤で現在広く用いられているアスコルビン酸 (AsA) についても併せて比較検討した。その結果、GSE が AsA では不安定なアルカリ領域において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を施す蒟蒻製造⁹⁾に GSE を応用することを試み、GSE 配合蒟蒻のラジカル捕捉能を評価することを行った。

実験方法

1. 材料

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 GSE は、キッコーマンより供与を受けた。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

YAMAGUCHI *et al.*¹⁰⁾ の方法を一部改良して測定した。すなわち、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 μM 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。抗酸化剤を溶解していない緩衝液に同様にして Tris 緩衝液と DPPH エタノール溶液を混合し暗所室温 20 分間反応させたときの 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同族体である Trolox の吸光度減少度を指標とし、Trolox 濃度換算の DPPH ラジカル捕捉活性 (μmol Trolox eq.) として求めた。

3. 濃度依存性試験

各濃度の GSE、GSE の主成分であるプロアントシアニジンの構成最小単位である (+)-カテキン、および AsA 水溶液 ((+)-カテキンの場合はエタノール溶液) を DPPH ラジカル捕捉活性測定系に適応し、517 nm の吸光減少度より Trolox 濃度換算の DPPH ラジカル捕捉活性 (μmol Trolox eq.) として求めた。

4. 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。各 pH 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)。

5. 抗酸化剤配合蒟蒻の試作

予め、200 mg の GSE あるいは AsA 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。なお、無添加の蒟蒻を作る場合は蒸留水に同様にグルコマンナンを加えた。グルコマンナンを全量混合後、いったん 1 分間加熱攪拌し溶解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 を水道水 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。

この時の蒟蒻ゲルの体積は 1000 cm^3 となった。これをステンレス製型 ($15 \times 13.5 \times 5.0 \text{ cm}$) 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。

6. 抗酸化剤配合蒟蒻の DPPH ラジカル捕捉活性

各々の蒟蒻 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) を用いて水中、120 回転/分、2 分間処理を行った。このホモゲナイザーサンプルを 100°C 3 分間加熱融解させた後、15000 回転 15 分間の遠心分離処理した上清の pH を 7.4 に調整した。蒸留水で液量を 100 ml に補い、サンプル液として DPPH ラジカル捕捉活性を測定した。

実験結果

1. GSE, AsA, (+)-カテキンの DPPH ラジカル捕捉活性

Fig. 2 に示したように、3 種類の抗酸化剤とも濃度に依って捕捉活性が上昇した。これらの直線の傾きから、同じ濃度では、GSE, AsA, (+)-カテキンの順に活性が強いことが判る。Trolox 濃度で $110 \mu\text{M}$ まで直線性があり、この値から、 $250 \mu\text{M}$ の DPPH ラジカルの 50% を捕捉する濃度をまとめたものが Table 1 である。GSE は異なる重合度のプロアントシアニジンの混合物であるため、重量濃度 (ppm) でまとめた。この表からもこれらの抗酸化剤の中で GSE のラジカル捕捉活性が最も高いことが示された。また、GSE は重合度分布より概算した平均分子量⁽¹⁾ から、AsA, (+)-カテキンとともにモル数でも表した。その結果からも、GSE のラジカル捕捉活性が、AsA や (+)-カテキンより高いことが判明した。

2. 熱および pH による DPPH ラジカル捕捉活性の経時変化

各温度処理を行った時の DPPH ラジカル捕捉活性の経時変化を示したものが Fig. 3 である。測定は pH 4.0 から 10.0 まで行ったが、ここでは酸性、中性、アルカリ性領域として pH 4.0, 7.0, 10.0 の結果を温度処理開始時の捕捉活性を 100% とする相対活性として表した。GSE, AsA とともに温度、pH の上昇とともに DPPH ラジカル捕捉活性は減少する傾向を示したが減少度合は大きく異なり、GSE は AsA に比べて熱および pH に対して安定性に優れていることが判明した。pH 4.0 において、GSE は 100°C 5 時間処理でも捕捉活性がほとんど損なわれなかったが、酸性領域で比較的安定とされている AsA は、

Fig. 2 Relationship between the radical-scavenging activity of antioxidants and their concentration by the DPPH colorimetric analysis

GSE, proanthocyanidin-rich extract from grape seeds; AsA, ascorbic acid.

—●—, GSE; —▲—, (+)-Catechin; —■—, AsA

Table 1 Fifty % radical-scavenging activity concentration of antioxidants by the colorimetry method

Antioxidant	Concentration ^a	
	(ppm)	(μM)
GSE	7.14 ± 0.14	3.57 ± 0.07
(+)-Catechin	9.54 ± 0.46	32.9 ± 1.6
Ascorbic acid	8.57 ± 0.32	48.7 ± 1.8

^a Each value is the mean $\pm$ standard deviation of five independent experiments.

同じ条件では約 10% 程度しか活性が残らなかった。GSE も中性域になるにつれて若干活性が低下したが、pH 7.0 においても 100°C 5 時間の処理でも 40% 以上活性が残存していた。一方、AsA は pH 7.0 の中性域では 100°C 2 時間で完全に活性が消失した。アルカリ性領域である pH 10.0 においては、 100°C 処理では 30 分以内に AsA の捕捉活性が完全に消失したが、GSE は約 60% 活性を残存した。

pH 4.0, 7.0, 10.0 における各温度 30 分処理後の DPPH 捕捉活性を pH 4.0, 0°C , 30 分時の活性値を 100% とする相対値で表した (Fig. 4)。pH 4.0 では GSE, AsA とともに 30 分処理では温度上昇に伴う顕著な活性の低

Fig. 3 Relative change of the radical-scavenging activity of GSE and AsA at various temperatures and pHs

(a), pH 4.0-GSE ; (b), pH 4.0-AsA ; (c), pH 7.0-GSE ; (d), pH 7.0-AsA ; (e), pH 10.0-GSE ; (f), pH 10.0-AsA.

Antioxidants solution (100 ppm) dissolved in each GTA buffer (pH 4.0 or 7.0 or 10.0) was incubated for the indicated time at each temperature. Each value is the mean $\pm$ standard deviation of five independent experiments. The radical-scavenging activity without incubation is expressed as 100%.

---□---, 0°C ; ---△---, 25°C ; ---○---, 37°C ; —■—, 50°C ; —▲—, 75°C ; —●—, 100°C

下は見られなかったが、中性領域の pH 7.0 になると AsA は温度上昇とともに活性を消失した。100°C 30 分処理で AsA の活性は pH 4.0, 0°C, 30 分処理時の約 20% となったが、GSE は同様の処理ではほとんど活性の消失が見られなかった。pH 10.0 のアルカリ領域では GSE

も温度上昇とともに活性は減少するが、100°C 30 分処理でも pH 4.0, 0°C, 30 分処理時の約 70% の活性が残存していた。一方、AsA は完全に活性を消失した。次に、pH 4.0 から 10.0 の範囲で、100°C, 30 分処理後の DPPH ラジカル捕捉活性を各々の pH 4.0 の時の値を 100% とす

Fig. 4 Effects of heat on the radical-scavenging activity of GSE and AsA

(a), pH 4.0; (b), pH 7.0; (c), pH 10.0.

Antioxidants solution (100 ppm) dissolved in each GTA buffer (pH 4.0 or 7.0 or 10.0) was incubated for 30 minutes at each temperature. Each value is the mean $\pm$ standard deviation of five independent experiments. The radical-scavenging activity of each antioxidant at pH 4.0, at 0°C for 30 minutes incubation is expressed as 100%. ●, GSE; ▲, AsA

Fig. 5 Effects of pH on the radical-scavenging activity of GSE and AsA

Antioxidants solution (100 ppm) dissolved in each GTA buffer (pH 4.0 to 10.0) was incubated for 30 minutes at 100°C. Each value is the mean $\pm$ standard deviation of five independent experiments. The radical-scavenging activity of each antioxidant at pH 4.0, at 100°C for 30 minutes incubation is expressed as 100%. ■, GSE; ▨, AsA

る相対値で表した (Fig. 5). GSE, AsA とともに pH がアルカリ側へシフトしていくにつれて活性は減少するが, 減少度は AsA の方がはるかに大きかった. AsA は中性領域である pH 7.0 でも約 4 割程度活性が減少し, アルカリ領域である pH 10.0 ではこの条件で完全に活性が消失した. 同じ pH 10.0 の条件では GSE は約 60% 活性を残存していた.

3. 抗酸化剤配合蒟蒻の試作と DPPH ラジカル捕捉活性

Fig. 3 から 5 の結果より, GSE の DPPH ラジカル捕捉活性は, AsA のそれよりはるかに熱および pH に対して安定であることが判明した. 特に, アルカリ pH 領域での安定性に優れていることに着目し, 加工工程でアルカリ処理を行う蒟蒻製造に GSE を使用することを試みた.

蒟蒻は, 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潤性のある物性が生じる⁹⁾. 今回, 加水時に最終濃度 200 ppm となるよう, GSE 配合, AsA 配合, あるいは, 無配合の蒟蒻を試作した (Fig. 6). 無配合の蒟蒻は白色であるのに対

Fig. 6 Photograph of Konjac enriched with antioxidant

(a), without antioxidant; (b), enriched with GSE; (c), enriched with AsA.

して、GSE 自体赤褐色化していることから、GSE 配合蒟蒻は着色している。また AsA 配合蒟蒻は若干黄色味を帯びている。これらの蒟蒻の DPPH ラジカル捕捉活性をまとめたものが、Table 2 である。10% (v/v) 酢酸加熱処理により、無配合蒟蒻は捕捉活性を示さず、また AsA 配合蒟蒻もわずかな活性が認められる程度だった。一方、GSE 配合蒟蒻は、DPPH ラジカル捕捉活性が有意に認められた。

考 察

プロアントシアニジンを中心とする GSE の熱ならびに pH に対する DPPH ラジカル捕捉活性の安定性について、同じ水溶性抗酸化剤で現在広く用いられている AsA と詳細に比較検討した。その結果、Fig. 2 および Table 1 に示したように、アスコルビン酸やプロアントシアニジンの単量体であり構成最小単位である (+)-カテキンよりラジカル捕捉活性に優れていることが判明した。GSE のプロアントシアニジンの成分組成分布は現在解析中であるが、単量体よりオリゴマーが主体で平均重合度が約 7 である¹¹⁾ことが判っており、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という報告¹²⁾を支持する結果となった。

また、GSE は、DPPH ラジカル捕捉活性に及ぼす熱および pH の影響を比較的受けにくいことも明らかとなった。AsA は酸性 pH 領域では比較的安定であるが、そこに加熱工程が加わると安定性が乏しくなる。ましてや pH が中性からアルカリ領域となると急激に不安定となる。一方、GSE は、このような影響を受けにくい。これは、熱あるいはアルカリ処理に伴い試料液は重合に伴う

Table 2 Radical-scavenging activity of various Konjacs

Konjac	DPPH radical-scavenging activity (μM Trolox eq.) ^a
No addition	0.00 $\pm$ 0.00
GSE-Konjac	16.9 $\pm$ 0.61*
AsA-Konjac	1.70 $\pm$ 0.33

^a Each value is the mean $\pm$ standard deviation of five independent experiments.

* means significance at 0.5% level between GSE-Konjac and AsA-Konjac.

と考えられる着色が進んでいくことより、重合度が増してラジカル捕捉活性を維持していると推察する。アルカリ、加熱条件下でのプロアントシアニジンの構造変化ならびにラジカル捕捉活性との相関関係について、今後解析を行う必要がある。また素材の色を生かした食品加工、調理には着色の問題を解決しなければならないと思われた。

今回、GSE がアルカリ領域での安定性に比較的優れている点、および、食品自体の着色による影響も受けにくい観点から GSE を配合した蒟蒻を試作した。Table 2 に示したように、無配合および AsA 配合の蒟蒻ではほとんど DPPH ラジカル捕捉活性を示さなかったのに対して、GSE 配合の蒟蒻では有意にその活性が示された。蒟蒻は伝統的な食品であるにもかかわらず、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。蒟蒻の主成分であるグルコマンナンには、コレステロール上昇抑制効果、抗高脂血効果、血糖値抑制およびインスリン節約効果など多くの健康機能が見出されており¹³⁾、今回、さらに GSE を配合しラジカル捕捉活性を付与した高機能性食品として提示をした。ただ、配合した含量と熱およびアルカリ処理によるラジカル捕捉活性の低下度から計算すると、活性の回収率は約 50% 程度であった。抽出後の蒟蒻の着色度から GSE が残存していることが明らかであり、GSE 配合蒟蒻の正確なラジカル捕捉活性を評価するためには、抽出条件の検討が必要であると思われた。また、試作した蒟蒻の色、テクスチャー、および、官能検査は現在検討中である。

GSE 以外にもプロアントシアニジンを多く含む「ワインエキス」などブドウ、ワイン関連の素材が開発されている¹⁴⁾。これらの素材を調理、加工に用いる場合、熱及び pH に対する影響を受けずに素材の機能性を生かし

た食品を作り出す可能性を今後検討していきたいと考える。また、蛋白質、糖、塩などの食品中の共存物質の影響を調べた上で、ブドウ種子ポリフェノールを中心としてラジカル捕捉能を有する機能性を持たせた食品を作り、その評価をしていく予定である。

要 約

プロアントシアニジンが主成分であるブドウ種子抽出物(GSE)のDPPHラジカル捕捉活性の熱およびpHに対する安定性について、アスコルビン酸(AsA)と比較検討した。また、アルカリpH領域でゲル粘濁化を行う蒟蒻にGSEを配合し、そのラジカル捕捉活性の評価を行った。

(1) GSEは、AsA、(+)-カテキン同様、濃度依存的にDPPHラジカル捕捉活性を示した。GSEは1分子あたりのフェノール性水酸基の数が多いため、これらの抗酸化剤中、最もラジカル捕捉活性が強かった。

(2) 酸性域から中性域のpH領域で、GSEは熱に対して非常に安定だった。特に、pH 4.0、100℃5時間処理でも捕捉活性をほぼ100%保持していた。

(3) アルカリ域のpH領域ではGSEも若干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だった。例えば、AsAが完全に活性を失ったpH 10.0、100℃、30分処理では、GSEは捕捉活性を約60%保持していた。以上のことから、GSEは熱、pH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証明された。

(4) GSE配合の蒟蒻を試作し、本蒟蒻がDPPHラジカル捕捉活性を有意に示すことを確認した。同濃度配合のAsA蒟蒻では弱い活性値しか示さず、無配合蒟蒻は活性を確認できなかった。

文 献

- 1) 吉川敏一：フリーラジカルの科学（講談社、東京），p. 125（1997）。
- 2) 寺尾純二・五十嵐脩：フリーラジカルと疾病予防，吉川敏一・五十嵐脩・糸川嘉則編（健帛社、東京），p. 25（1997）。
- 3) 有賀敏明・細山 浩・徳武昌一・山越 純：農化，**74**，1（2000）。
- 4) RICARDO DA SILVA, J.M., DARMON, N., FERNANDEZ, Y. and MITJAVILA, S.: *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1549（1991）。
- 5) YAMAGUCHI, F., YOSHIMURA, Y., NAKAZAWA, H. and ARIGA, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2544（1999）。
- 6) SAITO, M., HOSOYAMA, H., ARIGA, T., KATAOKA, S. and YAMAJI, N.: *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1460（1998）。
- 7) KOGA, T., MORO, K., NAKAMORI, K., YAMAKOSHI, J., HOSOYAMA, H., KATAOKA, S. and ARIGA, T.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1892（1999）。
- 8) YAMAKOSHI, J., KATAOKA, S., KOGA, T. and ARIGA, T.: *Atherosclerosis*, **142**, 139（1999）。
- 9) 亀和田光男：食の科学，**260**，20（1999）。
- 10) YAMAGUCHI, T., TAKAMURA, H., MATOBA, T. and TERAOKA, J.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1201（1998）。
- 11) 近藤一成：日本食品衛生学会第80回学術講演会要旨集，p. 68，郡山（2000）。
- 12) BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C. and SARAN, M.: *Methods Enzymol.*, **186**, 343（1990）。
- 13) 辻 啓介：食の科学，**259**，58（1999）。
- 14) 佐藤充克：ニューフードインダストリー，**40**，39（1998）。

（平成13年4月11日受付，平成13年5月28日受理）