(1)

日本食品保蔵科学会誌

vol. 40 No. 3

会 編集委員	長長	高井 太田	陸雄 英明	副	会	長	太田	英明	小宮山	山美弘	早坂	薫		
編集委		石田津久井	裕	稲熊 東尾		≦博 、雄	井上 古庄	茂孝 律	今堀 松田	義洋 茂樹	竹永	章生		
	文> イン製	是造工程	星における	フェ	ノレ	⁄ 生成酉	孝母の分	か離とそ	の性状					(103) 卜松正和
沖縄県産	ネギ類	É (Allii	um spp.)	の生	育特	性およ	くび香気	〔成分に	/新均	亘美香・	能性分析 ・高橋 ↓ ↓アムザ↓	成・城間	清・萠	泰田修二
ウメ由来		エノー	-ルはラッ ⁻ る								/岸田邦博		雅也・音	『屋雄一
	然発症	ミラット	、における -酸化窒素								 ・樫村修 <i>生</i>			
	説> 燥品の)生産性	上 向上と高	5品質	化技	で術の閉	昇発 …							(135) 山﨑雅夫
	座> 菜・果	と物~そ	一の起源か	ゝら生	産・	消費者	まで(2)	5) 黒:	ダイス「	丹波黒	J	•••••		(143) 賽田智子
<文献抄 <会	録> · 告> ·													(151) (152)

102 (2)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 40 NO. 3 (2014)

<article> (Japanese)</article>
Isolation and Characterization of <i>Phénolé</i> Producing Yeast Strains from Red Wine Production Process in Japan ONDA Takumi and KOMASTU Masakazu
Classification of Okinawan Welsh Onions (<i>Allium</i> spp.) on the Basis of Morphological Characteristics and Volatile Aroma Compounds, and Analysis of Their Functionalities ARAKAKI Mika, TAKAHASHI Makoto, SHIROMA Kiyoshi, FUJITA Shuji, HOSAIN Md. Amzad, TAKARA Kensaku and WADA Koji
<article> (English)</article>
Phenolic Extract from Japanese Apricot Fruit (<i>Prunus Mume</i> Sieb et Zucc.) Inhibits Disaccharidase Activity in the Small Intestine and Suppresses the Postprandial Elevation of Glucose Levels in Ra KISHIDA Kunihiro, SUZUKI Masaya, HEYA Yuichi, YAMAZAKI Yudai, HORINISHI Asako and OZAKI Yoshihiko
<research note=""> (Japanese)</research>
Endothelial Nitric Oxide Synthase Suppresses Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats by Oral Administration of CamuCamu (<i>Myrciaria dubia</i>) Fruit Juice TANAKA Hiroyuki, KASHIMURA Osamu, SUZUKI Kenta and TOYOHARA Hidekazu ··· (127)
<review> (Japanese)</review>
Technical Development of Processing of Boiled-dried Adductor Muscle of Scallop to Improve the Productivity and Quality of Manufacturing YAMAZAKI Masao
<serialization lecture=""> (Japanese)</serialization>
Black Soybean 'Tanbaguro'

HIROTA Tomoko ····· (143)

国産赤ワイン製造工程における フェノレ生成酵母の分離とその性状

恩田 匠*§·小松正和*

* 山梨県工業技術センター支所ワインセンター

Isolation and Characterization of *Phénolé* Producing Yeast Strains from Red Wine Production Process in Japan

ONDA Takumi*§ and KOMASTU Masakazu*

* Yamanashi Wine Center, Yamanashi Industrial Technology Center, 2517, Katsunuma, Katsunuma-cho, Kousyu-shi, Yamanashi 409–1316

Recently, preventing the development of phenolic off-flavors ('phénolé') has become a focus area in red wine production. Therefore, in this study, phénolé producing yeast strains were isolated during the red wine production process in Japan and were characterized. Eight yeast isolates were obtained from red wine samples collected from barrels. Using standard morphological and biochemical tests, these isolates were identified as strains belonging to the genus Brettanomyces. The isolates were inhibited by $0.6 \, \text{mg}/\ell$ molecular sulfur dioxide, and pasteurization was also found to be useful for sterilization. This is the first study to report the presence of Brettanomyces in the red wine making production process in Japan.

(Received Sep. 2, 2013; Accepted Mar. 3, 2014)

Key words: Brettanomyces, off-flavor, phénolé, 4-ethylphenol, wine ブレタノミセス, オフフレーバー, フェノレ, 4-エチルフェノール, ワイン

赤ワインの品質劣化原因の一つとして、「フェノレ」と通称されるフェノール系オフフレーバーリーでの発生がある。欧米ではすでに深刻な問題としてとらえられてきたが、近年国産赤ワインにおいても注視されるようになっている。この赤ワインのフェノレの本体は、エチルフェノール類の2種の物質(4-エチルフェノールおよび4-エチルグアイアコール)であり、赤ワイン製造工程において、Brettanomyces属酵母が汚染することによって発生するものである³٫٫٫٫゚。赤ワインに、フェノレが低濃度で含まれる場合には良好な香りがマスキングされ、高濃度になると「馬小屋臭」とも表現される強い異臭として発現する。国産赤ワインにおけるフェノレの発生については、これまでに十分な研究が行われず、その実態は不明であった。

我々®はすでに、現状の国産赤ワイン製品におけるフェノレの発生頻度について明らかにした。国産赤ワインのほとんどの試料は、フェノレ汚染においては健全であることがわかったが、一部の製品において高濃度でフェ

ノレが検出された。また、フェノレ濃度が高かったワイン試料から、同酵母の検出キットを用いることで、その細胞を検出した。したがって、本邦のワイン製造工程においても、同酵母の汚染が発生していることがはじめて確認された。

そこで、赤ワイン製造、特に貯蔵熟成工程からの、 Brettanomyces属酵母の検索と分離を行い、その性状を調 べ、発生防止法の検討を行った。

実験方法

1. 供試ワイン試料

山梨県内の一ワイン製造企業において、熟成工程にある数十個の樽中の赤ワインについて、フェノレの臭気を官能的に調べた。官能的にフェノレの臭気が検知された赤ワイン11点およびフェノレが検知されなかったワイン3点、計14点を採取して、分析用の試料(Table 1)とした。これらはいずれも、赤ワイン生成後に、樽貯蔵され、2~3年が経過したものである。

^{* 〒409-1316} 山梨県甲州市勝沼町勝沼2517

^{\$} Corresponding author, E-mail:onda-wkk@pref.yamanashi.lg.jp

2. ワインの化学成分分析

供試ワイン試料について、フェノレ濃度、遊離亜硫酸濃度、pHを計測した。赤ワインのフェノレ、すなわち4-エチルフェノールと4-エチルグアイアコール(および白ワインのフェノレ;4-ビニルフェノール、4-ビニルグアイアコール)の定量は既報⁸⁸に従った。遊離亜硫酸は、ランキン法により測定した。分子状亜硫酸は、OENODEV社のインターネットサイト(http://www.oenodev.com/outils_SO2L1.asp)を利用して、pHと遊離亜硫酸濃度およびアルコール濃度、品温の値から算出した。

3. Brettanomyces属酵母細胞の検出

供試ワインにおける, Brettanomyces属酵母細胞の検出は, 既報®の市販の簡易分析キットを用いて実施した。

4. 培地と培養方法

Brettanomyces属酵母の分離用培地として、RODRIGUES ら®が開発したDekkera/Brettanomyces Differential培地 (DBDM培地と略称;イーストナイトロジェンベース [Difco社製] $6.7\,\mathrm{g}/\ell$, エタノール 6% (v/v), シクロヘキシミド $10\,\mathrm{mg}/\ell$, p-クマル酸 $100\,\mathrm{mg}/\ell$, ブロモクレゾール・グリーン $22\,\mathrm{mg}/\ell$, 寒天2.0%) を用いた。培地のpHは5.4に調整した。寒天を除き、すべての試薬は、メンブランフィルター除菌を行った。オートクレーブ滅菌した寒天溶液と、フィルター除菌後の試薬溶液を混合して、平板培地を作製した。

分離酵母の培養には、YM液体培地(Difco社製)を用いた。YM平板培地として用いる場合には、寒天2%を添加した。培養温度は25℃として、静置培養を行った。培地のpHは5.5とした。

一部の試験には、YP液体培地(酵母エキス [Difco社 製] 0.5%、ペプトン [Difco社製] 0.5%)を用いた。

5. 酵母の分離と同定

平板培地において、得られたコロニーは、YM平板培地を用いて、ストリークカルチャーによる純粋分離を繰り返した。得られた純粋分離株は、グリセロールストックとして、-80℃下で凍結保存した。

酵母の同定試験 $^{9/-12)}$ として、栄養細胞の形態、胞子 (子嚢胞子) 形成、偽菌糸の形成、皮膜形成、ジアゾニウムブルーB (DBB) 染色反応、ウレアーゼ活性、硝酸塩 (硝酸カリウム) 資化性、シクロヘキシミド耐性 (0.01%, 0.1%)、37^{\circ}における生育、炭素源の資化性について調べた。また、UBEDAとBRIONESの方法 13 によりパントテン酸要求性と食塩耐性を調べた。

分離酵母のフェノレ生成能の確認は、4-エチルフェノールの前駆体であるp-クマル酸を $300 \,\mathrm{mg}/\ell$ 添加した、YM培地に植菌し、培養後の臭気を官能的に調べることにより確認した。

6. 分離酵母の増殖阻止条件の検討

分離酵母の増殖阻止条件は、まず亜硫酸の効果について、YP培地および赤ワインを用いて、次のように調べ

た。YP培地は、エタノールを12%になるように調製し、酒石酸を用いてpHを調整後、亜硫酸塩(ピロ亜硫酸カリウム)を各種の濃度で添加した試験培地を調製した。この試験培地に、分離酵母の前培養液を、生菌数10°CFU/mℓになるように添加し、20℃で培養した後の酵母の増殖性およびフェノレ生成を調べた。また、赤ワイン(山梨県工業技術センター支所ワインセンターで製造した「山梨ワイン2008」;カベルネ・ソーヴィニヨン100%原料、エタノール12.5%)を用いて、酒石酸でpH調整した後に、各種の濃度で亜硫酸塩を添加した試験培地でも同様に、分離酵母株の18℃における増殖性を調べた。

また,低温加熱殺菌処理の効果を調べるため,赤ワイン(上述した「山梨ワイン2008」)に分離酵母の前培養液を,生菌数 10° CFU/ $m\ell$ になるように添加し, 50° C 2分間, 60° C 2分間処理(各温度に達して 2分間の保持)後の生残菌数を調べた。

実験結果および考察

1. 樽熟成工程のワインのフェノレと汚染酵母

供試赤ワイン14点の、フェノレ濃度、Brettanomyces属酵母細胞の濃度、DBDM平板培地でのコロニーの有無、遊離亜硫酸濃度、分子状亜硫酸濃度およびpHを、Table 1に示した。国産赤ワインの平均的なpHは3.55付近である 8 が、サンプリングした赤ワイン試料のpHはほとんどが高い値を示した。遊離亜硫酸 14 は、重亜硫酸イオン(HSO_3^-)と分子状亜硫酸(SO_2)から構成される。このうち、汚染微生物抑止に有効なのは、分子状亜硫酸であるが、その濃度はpHに依存する。ワインの汚染微生物抑止のためには、分子状亜硫酸が $0.5\sim0.8\,\mathrm{mg}/\ell$ 付近にあることが推奨 40 されている。今回の赤ワイン試料に含まれる分子状亜硫酸は、すべてが $0.3\,\mathrm{mg}/\ell$ 以下であった。したがって、Brettanomyces属酵母が増殖し得る環境になっていることが確認された。

4-エチルフェノールと4-エチルグアイアコールの閾 値²は、赤ワイン中において単体では、それぞれ0.605 mg/ℓ および $0.110mg/\ell$ とされている。供試赤ワイン試 料14点のうち、官能的にフェノレの臭気が検知された11 点(B1~B11)は、ほとんどが高いエチルフェノール 類含量を示した。これら11点の試料のうち,1点(赤ワ イン試料B4)を除き、すべてからBrettanomyces属酵母 の細胞が検出された。また、8点の試料からDBDM培 地上で、周囲の黄変をともなって増殖したコロニーが得 られた。これらの増殖の認められたDBDM培地からは, フェノレの臭気が官能的に検知できた。DBDM培地は, シクロヘキシミドが添加され、唯一の炭素源としてエタ ノールのみが含まれる, きわめて低栄養の培地であり, この培地に増殖できるのは、ほとんどBrettanomyces属酵 母のみであることがいくつかの研究(),15)で明らかになっ ている。したがって、DBDM平板培地上で生育したコ ロニーは、Brettanomyces属酵母である可能性が高いもの

Table 1	Data pertaini	ng to <i>phén</i>	<i>olé</i> , free s	sulfide	dioxide,	molecular	sulfur	dioxide	concentrations,	pH va	alues,	cell
counts	and detection	of Brettano	nyces of re	ed wine	samples	s collected	from t	the barre	ls at a wine pro	oductio	n site	

Sample No.1)	Concentrations	of phénolé (mg/l)	Actual free sulfur dioxide4)	Calculated molecular	рН	Cell counts	Detection of
Sample No.	$4-EP^{2)}$	4-EG ³⁾	(mg/ℓ)	sulfur dioxide $^{5)}$ (mg/ ℓ)	pm	by Z-BRETT ⁶⁾	Brettanomyces using DBDM ⁷⁾
В1	0.300	0.067	5	0.1	3.76	10^{4}	_
B 2	0.571	0.078	18	0.3	3.65	10^5	+ 9)
В3	0.229	0.000	16	0.3	3.70	10^4	-
B 4	0.343	0.078	11	0.2	3.55	$\mathrm{ND}^{\mathrm{8})}$	_
В 5	0.371	0.078	8	0.1	3.70	10^{6}	+
B 6	1.229	0.133	2	0.0	3.68	10^{5}	+
В7	0.843	0.133	5	0.1	3.65	10^{5}	+
B 8	1.271	0.156	2	0.0	3.94	10^{6}	+
B 9	0.871	0.156	1	0.0	3.84	10^4	+
B10	0.757	0.178	10	0.1	3.85	10^{5}	+
B11	1.229	0.233	21	0.2	3.85	10^{5}	+
B12	0.029	0.007	16	0.2	3.88	$\mathrm{ND}^{\mathrm{s})}$	_
B13	0.029	0.000	14	0.2	3.65	ND	_
B14	0.058	0.004	11	0.1	3.77	10^4	_

- 1) Phénolé odor was detected for samples B1-B11 but not for 3 samples B12-B14.
- 2) 4-EP: 4-ethylphenol.
- 3) 4-EG: 4-ethylguaiacol.

(4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol were not detected among most samples.)

- 4) Values measured by the Rankine method.
- 5) Values calculated using web site of OENODEV Corporation (http://www.oenodev.com/outils_SO2L1.asp).
- 6) Z-BRETT: immunoassay (antibody-based) system for rapid detection of Brettanomyces.
- 7) DBDM: Dekkera/Brettanomyces Differential Medium.
- 8) ND: not detected.
- 9) +: Detection of colonies with yellow zones.

と推察された。赤ワイン試料B4には、フェノレが検知されたものの、Brettanomyces属酵母の細胞が検出されなかった。これは、Brettanomyces属酵母が増殖し、フェノレが生成後に細胞が澱とともに沈降するなどしたため、細胞が採取できなかった可能性が考えられた。

一方で、フェノレの臭気が認められなかった赤ワイン 試料(B12~B14)からは、ほとんどエチルフェノール 類が検出されなかった。また、赤ワイン試料B14を除き、 Brettanomyces属酵母の細胞が認められなかった。赤ワイン試料B14にはBrettanomyces属酵母が生育したものの、フェノレ生成に至る前に、死滅した可能性が考えられた。以上のような赤ワイン試料においてBrettanomyces属酵母が増殖し得る条件となっていたのは、従来の国産赤ワイン製造現場では、当該酵母汚染について十分な知識がなく、その発生防止対策としての亜硫酸とpH管理が行われてこなかった結果であることが考えられた。樽熟成

2. 分離酵母の同定

8点の試料から得られた、DBDM培地で培地の黄変をともなって増殖したコロニーをそれぞれ純粋分離し、8株の酵母菌株を得た。

工程は、Brettanomyces 属酵母が検出されること^{16),17)}が多

く報告されていることから、徹底した対策が必要である。

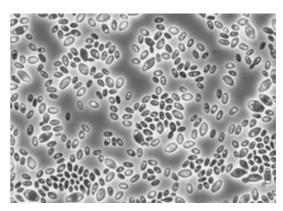


Fig. 1 Optical micrograph of the isolated yeast strain SK-01 (magnification, ×1,000)

これらすべての純粋分離株は、いびつな卵型あるいは伸長した楕円の、出芽型の栄養細胞形態(Fig. 1)を示した。伸張した細胞は、しばしばいくつかのクラスターを形成した。YM平板培地上では、クリーム色の滑らかな外観のコロニーを形成し、偽菌糸を形成した。YM液体培地では産膜性が認められ、グルコースを発酵してガスを生産した。強いシクロヘキシミド耐性をもち0.1%濃度でも良好な増殖が認められた。37℃での増殖も良好

であった。硝酸塩資化性,ウレアーゼ活性,DBB反応 はともに陰性であり、5%食塩を含んだ培地には生育せ ず,パントテン酸を要求した。なお,胞子形成は認めら れなかった。以上のことから、DBDM培地上で得られ た微生物は、Brettanomyces 属酵母 (Dekkera van der Waltの不完全型)18)であると同定した。純粋分離した酵 母のうち、3株について、その他の生理生化学的性状を 調べたところ、乳糖、ガラクトース、ソルビトール、コ ハク酸を資化しなかった。また、形成した偽菌糸は、無 隔壁型ではなかった。これらの生理生化学的性状を, The yeast; A Taxonomic Study記載のSmithの同定スキー ムに照合すると,赤ワインの汚染菌として典型的な, Brettanomyces bruxellensis Kufferath & van Laer¹⁸⁾であ ると推定された。この同定結果は、遺伝子レベル(26S rDNA D1/D2領域の配列解析) での検証が必要であ る。

3. 分離酵母の増殖阻止条件の検討

Brettanomyces属酵母の増殖抑止法については、各種化学物質(二炭酸ジメチル、ソルビン酸、安息香酸等)の利用^{4),19),20)}、フィルター除菌²¹⁾、高圧処理²²⁾などが主に実験室レベルで検討されている。以上の方法は、我が国の酒税法の範囲内で用いることができなかったり、実用的でないものも含まれる。そこで、日本における一般的な赤ワイン製造工程において、Brettanomyces属酵母の増殖抑止するための条件として、亜硫酸の利用と低温加熱殺菌処理の効果を調べた。

まず、分離Brettanomyces sp. SK-01株を用いて、YP

培地と赤ワインを用いて、亜硫酸濃度に対する増殖性を調べた結果を、それぞれTable 2とTable 3に示す。いずれの培地を用いて検討した場合でも、分子状亜硫酸濃度が $0.6 \, \mathrm{mg/\ell}$ 付近以上で、その生育が阻害される結果が得られた。なお、その他 2 株(Brettanomyces sp. SK-02 株とSK-03株)を用いた試験でもほぼ同様な傾向が認められた。以上のことから、赤ワイン製造工程において、亜硫酸管理と同時に、pHの管理を実施することが重要であることが確認された。国産赤ワインの平均pH3.55において、分子状亜硫酸 $0.6 \, \mathrm{mg/\ell}$ とするためには、約27 $\mathrm{mg/\ell}$ の遊離亜硫酸が必要となる。Brettanomyces 属酵母は、菌株により亜硫酸耐性が異なること 23 が報告されていることから、今後もより多くの分離株の亜硫酸耐性を調べることが必要である。

また、一般的な酵母類は、湿熱下で60°C10~15分間の処理、またはエタノールを含んだ試料の場合51°C数分で死滅すること 241,250 が知られている。また、ワイン(エタノール12%)の場合、比較的簡便に実施できる熱酒瓶詰 260 では55~60°C約2分間の処理で殺菌が行われることがある。そこで、Brettanomyces sp. 分離株に対する低温加熱処理の影響を調べた。その結果、Brettanomyces sp. 3株(SK-01,SK-02株とSK-03株)は、低温加熱処理(50°C2分間、60°C2分間)で滅菌された。このことから、現在でも一部のワインで実施されている低温加熱殺菌は、瓶詰後のBrettanomyces</sup>属酵母の増殖抑止においては、有効であることを確認した。

今後は、ワイン製造現場におけるBrettanomyces属酵母

Table 2 Growth of *Brettanomyces* isolates obtained from red wine in YP media with differing free sulfur dioxide concentraions and pH values

pН			3.6				3	.3	
(actual values)	(3.53)	(3.51)	(3.50)	(3.50)	(3.50)	(3.29)	(3.30)	(3.31)	(3.30)
Free sulfur dioxide (mg/ ℓ) 1)	0	10	21	23	28	0	10	17	24
Molecular sulfur dioxide $(mg/\ell)^2$	0	0.27	0.59	0.64	0.78	0	0.43	0.76	0.98
Growth of Brettanomyces ³⁾	++	+	±	_	_	++	+	_	_
Detection of phénolé ⁴⁾	++	+	_	_	_	++	_	_	_

¹⁾ Actual values by the Rankine method. 2) Calculated values. 3) Turbidity of cultured medium after 1 month of inoculation (+++: very strong; ++: strong; +: good; ±: week; -: no growth). 4) Sensory detection of *phénolé* odor (+++: very strong; ++: strong; +: good; ±: weak; -: not detected).

Table 3 Growth of *Brettanomyces* isolates obtained from red wine in red wine media with differing free sulfur dioxide concentrations and pH values

рН			3.6				3	.3	
(actual values)	(3.53)	(3.60)	(3.63)	(3.61)	(3.62)	(3.29)	(3.30)	(3.31)	(3.30)
Free sulfur dioxide(mg/ ℓ) ¹⁾	0	11	20	32	41	0	7	15	24
Molecular sulfur dioxide $(mg/\ell)^2$	0	0.22	0.37	0.62	0.78	0	0.27	0.57	0.94
Growth of Brettanomyces ³⁾	++	+	±	_	_	++	+	_	_
Detection of <i>phénolé</i> ⁴⁾	++	+	_	_	_	++	_	-	_

Refer to the footnotes to Table 2.

の起源の解明,赤ワイン製造工程におけるBrettanomyces 属酵母のモニタリング方法や汚染抑止方法などを詳細に 検討していく必要がある。

要 約

山梨県内のワイン製造現場において、樽熟成工程から、フェノレ生成酵母を分離した。同定試験の結果、フェノレ生成原因酵母は、Brettanomyces属の酵母であることがわかった。Brettanomyces属酵母は、分子状亜硫酸濃度 $0.6\,\mathrm{mg}/\ell$ 以上で増殖防止が可能であることを確認した。低温加熱処理は、Brettanomyces属酵母の殺菌には有効であった。以上のことから、本邦においても、フェノレ原因微生物がワイン製造現場に存在することがはじめて明らかになった。

本研究は、独立行政法人科学技術振興機構 研究成果 展開事業研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP; Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through target-driven R&D)フィージビリ ティスタディ【FS】探索タイプ(Exploratory Research) における成果を含みます。

マ 献

- 1) RIBÉREAU-GAYON, P., GLORIES, Y., MAUJEAN, A. and DUBOURDIEU, D.: 8.4.1 Les phenols volatils responsables des certaines deviations olfactives de type (phénolé) des vins, Traite d'oenologie Tome 2-Chimie du vin, Stabilisation et tritements 5 e edition (Dunod, Paris), pp.307~324 (2004)
- 2) Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.-N. and Pons, M.: The origin of ethylphenols in wines, *J. Sci. Food Agric.*, **60**, 165~178 (1992)
- 3) Licker, J. L., Acree, T. E. and Henick-Kling, T.: What is "Brett" (*Brettanomyces*) Flavor?: A preliminary investigation, *ACS Symposium Series* (*American Chemical Society*), **714**, 96~115 (1999)
- 4) Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A. and Calderón, F.: The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review, *Food Chemistry*, 102, 10~21 (2007)
- 5) 篠原 隆:ワインのフェノール性異臭の成因について、日醸協誌、**96**、182~188 (2001)
- 6) Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V.: Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*, *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 588~599 (2001)
- 7) POLLNITZ, A. P., PARDON, K. H. and SEFTON, M. A.: Q uantitative analysis of 4-ethylphenol and 4-

- ethylguaiacol in red wine, *J. Chromatogr. A.*, **31**, 101 \sim 109 (2000)
- 8) 恩田 匠・小松正和:国産赤ワインにおけるフェノール系オフフレーバーの発生頻度,日食保蔵誌,**39**,343~346 (2013)
- 9) Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. and Robert, V: Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. 1 (5th ed.) (Elsevier Science, Amsterdam). pp.87~110 (2011)
- 10) 飯塚 広・後藤昭二:酵母の分類同定法(第3版) (東京大学出版会,東京)(1984)
- 11) 長谷川武治編集: 微生物の分類と同定(上)(学会出版センター,東京)(1984)
- 12) 恩田 匠・乙黒親雄・飯野修一・後藤昭二:梅加工 品から分離した産膜酵母の同定とその症状,日食科工 誌,44,407~417 (1997)
- 13) UBEDA, J. F. and BRIONES, A. I.: Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines, Food Control, 10, 41~45 (1999)
- 14) 横塚弘毅:ワイン製造(その4),日本ブドウ・ワイン学会誌,95,91~101(2000)
- 15) Dias, L., Dias, S., S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M. and Loureiro, V.: Identification of yeasts isolated from winerelated environments and capable of producing 4ethylphenol, *Food Microbiol.*, 20, 567~574 (2003)
- 16) Boidron, J. N., Chatonnet, P. and Pons, M.: Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins, *Connaiss. Vigne. Vin.*, **22**, 275~294 (1988)
- 17) Boidron, J. N. and Pons, M.: Elevage des vins rouges en f\u00fcts de ch\u00e9ne: Evolution de certains composes volatils et de leur impact aromatique, Sci. Alim., 10, 565~587 (1990)
- 18) SMITH, M. T.: Capter 25; *Dekkera* van der Walt; The Yeasts, a Taxonomic Study, Vol. 1 (5 th ed.) (Elsevier Science, Amsterdam). pp. 373~377 (2011)
- 19) Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A. and Ambro, S.: Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC), *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5605~5611 (2002)
- 20) Renouf, V., Strehaianob, P. and Lonvaud-Funel, A.: Effectiveness of dimethly dicarbonate to prevent Brettanomyces bruxellensis growth in wine, 19, 208~216 (2008)
- 21) CALDERON, F., MORATA, A., UTHURRY, C. and SUÁREZ, J. A.: Aplicacion de la ultrafiltracion en

- enologia, Tecnología del vino, 16, 22~28 (2004)
- 22) Puig, A., Vilavella, M., Daoudi, L., Guamis, B. and Minguez, S.: Microbiological and biochemical stabilization of wines using the high pressure technique, *Bulletin de l' OIV* **76**, 596~617 (2003)
- 23) Conterno, L., Joseph, C. M. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T. and Bisson, L. F.: Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines, *Am. J. Enol.*
- *Vitic.*, **57**, 139~147 (2006)
- 24) 高野光明・横山理雄:食品の殺菌;その科学と技術 (幸書房, 東京), pp.5~9 (1998)
- 25) 好井久雄・金子安之・山口和夫: 食品微生物学ハンドブック (技報堂, 東京), pp.473~484 (1995)
- 26) 山梨県工業技術センター編集: 葡萄酒醸造マニュアル (2000年版) p.69 (2000)

(平成25年9月2日受付,平成26年3月3日受理)

沖縄県産ネギ類 (Allium spp.) の生育特性 および香気成分による分類と機能性分析

新 垣 美 香*1*2・高 橋 誠*2§・城 間 清*3・藤 田 修 二*4 ホサイン Md. アムザド*2・高 良 健 作*2・和 田 浩 二*2

- *1 鹿児島大学大学院連合農学研究科 *2 琉球大学農学部 *3 沖縄県農林水産部園芸振興課 *4 中村学園大学短期大学部
- Classification of Okinawan Welsh Onions (*Allium* spp.) on the Basis of Morphological Characteristics and Volatile Aroma Compounds, and Analysis of Their Functionalities

ARAKAKI Mika*1*2, TAKAHASHI Makoto*28, SHIROMA Kiyoshi*3, FUJITA Shuji*4, HOSAIN Md. Amzad*2, TAKARA Kensaku*2 and WADA Koji*2

- * 1 United Graduate School of Agricultural Science, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima 890-8580
- * 2 Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara-cho, Okinawa 903–0213 * 3 Horticulture Promotion Division, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries of Okinawa Prefecture, 1–2–2 Izumisaki, Naha-shi, Okinawa 900–8570
 - * 4 Nakamura Gakuen University Junior College, 5-7-1 Befu, Jounan-ku, Fukuoka 814-0189

We investigated the morphological characteristics and food functionalities of seven cultivar of Okinawan Welsh onions (Allium spp. 'Tsuken', 'Ginowan', 'Nakagusuku', 'Taketomi', 'Haneji', 'Bise', and 'Makabe') and cultivars of two other Welsh onions (Kujyo and Nagasaki of Kyoto and Nagasaki Prefectures, respectively) as controls. Further, their volatile aroma compounds were examined using gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry. Among the tested Welsh onions, only Tsuken, Ginowan, and Kujyo showed flower-bud formation with wide leaf sheath diameter (Type I). Among the Welsh onions, excluding the Type I cultivars, Nakagusuku, Taketomi, and Nagasaki were confirmed to have a dormant season (Type II), while the remaining three cultivars (Haneji, Bise, and Makabe) had no such dormant season (Type III). The volatile aroma compounds of all the tested cultivar samples consisted of four functional groups: primary thiols, sulfides, alcohols, and aldehydes. Two-dimensional principal component analysis was used to assess the relative concentrations of the four functional groups to classify the aroma characteristics; the classified compounds were found to be closely related to the morphological characteristics, except for those of Makabe. Further, to evaluate the food functionalities, the total polyphenol contents and antioxidant activities of the Welsh onions were determined. All the samples contained a polyphenol and showed antioxidant activities,; however, the activities had little association with each morphological characteristic of the seven cultivars.

(Received Dec. 19, 2013; Accepted Mar. 13, 2014)

^{*1 〒890-8580} 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-24

^{* 2 〒903-0213} 沖縄県中頭郡西原町千原1

[§] Corresponding author, E-mail: h119314@agr.u-ryukyu.ac.jp

^{*3 〒900-8570} 沖縄県那覇市泉崎1-2-2

^{* 4 〒814-0189} 福岡県福岡市城南区別府 5-7-1

Key words: Okinawan Welsh onion, morphological characteristic, aroma compound, principal component analysis, antioxidant activity

沖縄県産ネギ類、生育特性、香気成分、主成分分析、抗酸化活性

ネギ類はネギ (Allium fistulosum L.) やワケギ (A. wakegi Araki) など、ネギ属の球根性多年草植物を指し、東アジアを中心に食用として栽培されており、日本でも古くから香味野菜として親しまれてきた $^{1)\sim3}$ 。ネギ類は独特のフレーバーをもち、その香気成分は酵素アリイナーゼの作用により原料中に存在するS-アルキルシステインスルフォキシドから二次的に派生するスルフィド、チオール、アルコール、アルデヒドなどにより特徴づけられている $^{4)\sim6}$ 。また主なポリフェノールとしてケンフェロールやケルセチンを含有しており $^{7).8}$ 、血圧降下作用 $^{8).9}$ や抗血栓作用 9 、血管拡張作用 10 などの食品機能性を有することが報告されている。

国産のネギは、生態型と用途により九条群、千住群、加賀群の基本的な3つの品種群に大別され定着している^{1),2)}が、その栽培史の長さを反映して地域ごとに異なる気候や土壌に適応した特色のある地方品種も多く存在する。最近これら地方品種では、味、香りおよび形態特徴などを明確化させ、ネギの付加価値を高めることで他産地との差別化を図ることが望まれている。

一方、沖縄県においても古くからネギ類の栽培が行われているが、その特徴について情報が乏しく、同じネギ属でもネギとワケギが混同して認知されており、両者ともビラもしくはジービラなどといった呼称が用いられている³³。また、ネギやワケギ以外にも異なる外見や形態をもつネギ類の存在が確認されており、その特徴からネギの変種であるワケネギと推測されている^{110,120}が、各地域のネギ類について客観的な分析データに基づいた分類の検証はなされていない。

そこで本研究では、まず沖縄県内の7地域のネギ類を対象に、形質特性として鱗茎の形、生態的特性として花房形成および休眠性の有無を比較し、沖縄県産ネギ類の分類を試みた。さらに、分類したネギ類は一般的な7形質についても測定を行った。また、これまでに野菜の品種および産地判別の手段として、ブドウ中の揮発性化合物分析¹³⁾やカボチャ種子中の無機元素分析¹⁴⁾など、対象となる作物の化学特性を判別技術に活用する試みが報告されている。そこで、7地域のネギ類の香気成分を分析し、その成分組成や含量がネギ類および産地の分類の指標と成り得る可能性について検討した。さらに、各ネギ類の総ポリフェノールおよび抗酸化活性といった食品機能性においても、若干の知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 材 料

ネギ苗は沖縄県の7地域(津堅, 宜野湾, 中城, 竹富,

羽地, 備瀬および真壁) から収集した7種類のネギ類を 用いた (Fig. 1)。また対照として京都府産 (九条太ネギ, 以下九条ネギ)および長崎県産(長崎大玉ワケギ、以下 長崎ワケギ)のネギ苗をそれぞれ用いた。これら9種類 のネギ苗は、2011年3月に琉球大学農学部附属亜熱帯フ ィールド科学教育研究センタービニールハウス内にて植 え付けおよび栽培を行った。すなわち、各ネギ苗は形の 揃った鱗茎を約5cmの長さに調整し、根の長さを $2\sim3$ cmで切り揃えた後、市販の用土(株式会社秋元天産物、 花咲物語)および粉砕した軽石を体積比1:2で混合, 充填したポリポット(直径8cm, 容量約200ml)に鱗茎 の先端が隠れる程度の深さで植え付けた。使用した用土 の化学特性は、N:P:K=0.40:0.40:0.38 (g/ℓ) であった。また葉身伸長開始後は、NO₃-N:PO₄-P: K: Ca: Mg = 18.6:5.1:8.6:8.2:3.0 (me/ℓ) Ø 液肥を施用した。ネギ苗の植え付け後、約60日が経過し た6月に各ネギ類を収穫し、分析に用いた。

2. 形質および生態的特性の測定

収穫した各ネギ類から偏りがないように葉身長が同程 度の5個体(ただし,津堅産,宜野湾産ネギおよび九条 ネギは3個体)を選び,形質特性として,地上部丈,葉 身長,葉鞘長,葉鞘径,分げつ数,生葉数,全生重およ

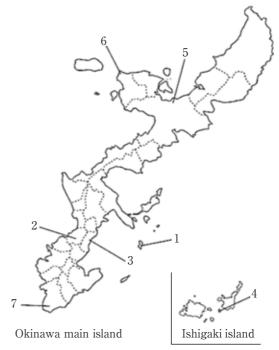


Fig.1 Map showing the location of the cultivation areas of Japanese Welsh onions in Okinawa Prefecture

- 1, Tsuken ; $\ 2$, Ginowan ; $\ 3$, Nakagusuku ; $\ 4$, Taketomi ;
- 5, Haneji; 6, Bise; 7, Makabe.

び鱗茎の形を測定した。鱗茎の形については藤枝ら¹⁵の 方法に従い、丸とっくり型(以下R型)および長とっくり型(以下B型)に分類した。また生態的特性については、ネギ苗の植え付け後から収穫までの期間中における各ネギ類の花房形成および夏季における休眠期の有無を調べた。

3. 試 薬

香気成分の同定に用いた標準試薬は東京化成工業(株)より購入した。総ポリフェノールの測定に用いた没食子酸一水和物は和光純薬で購入し、抗酸化活性の測定に用いたTroloxはCalbiochem、フルオレセインはSigma-Aldrich、2、2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(AAPH)は和光純薬で購入したものを用いた。その他の試薬はすべて市販の特級試薬を使用した。

4. 香気成分の分析

各ネギ類の香気成分の分析には, 主な可食部である葉 身部を用いた。すなわち、葉身部を試験直前に約2~3 mm幅で細断し、その1gを20mℓバイアルに採取した後、 密閉してヘッドスペースサンプラー(アジレント社, G 1888) で40℃, 30分間の平衡化を行った。バイアル内部 のヘッドスペースガスは、検出器として水素炎イオン化 検出器 (FID) を装備したガスクロマトグラフ (アジレ ント社, 7890A, 以下GC) を用いて分析を行った。カ ラムはDB-WAX (アジレント社,内径0.25mm,長さ60 m, 膜厚0.25 μm), キャリヤーガスとしてヘリウムを使 用し、カラム温度は40°Cで5分間保持した後、5°C/分 の割合で200℃まで昇温した。なお、各ネギ類の香気成 分量は検出ピークの面積値とし、検体1点に対して3回 の分析を行い, 面積値の平均および標準偏差を算出した。 また、同一のカラムを質量分析計(アジレント社、5975 C,以下MS)に接続し、GCと同一の分析条件でEIモー ド(70eV)により、香気成分を同定した。香気成分の 同定は、ライブラリー (NIST database) および標準品 のマススペクトルとリテンションインデックス (RI) の一致を確認して行った。

5. 総ポリフェノールおよび抗酸化活性の測定

各ネギ類の食品機能性を比較するため、総ポリフェノールおよび抗酸化活性の測定を行った。分析用試料は $2_{\text{ITNANOVÅ}}$ ら $^{\text{16}}$ の方法を一部改変して調製した。すなわち、各ネギ類(水分率89.0%~91.5%)の葉身部 $2\,g$ に 90 \mathbb{C} の蒸留水10 \mathbb{M} \mathbb{C} $\mathbb{C$

(1) **総ポリフェノールの定量** 総ポリフェノールの 定量は佐藤ら¹⁷⁾の方法に従ってフォーリンチオカルト法 にて測定した。検量線は没食子酸を用いて作成し、総ポリフェノールを生鮮物重量100gあたりの没食子酸相当量 (mg-GAE/100g-FW) として算出した。

(2) 抗酸化活性の測定 抗酸化活性の測定はPRIOR ら¹⁸の方法を一部改変し、oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法にて測定した。すなわち、96穴マイクロプレート (Nunc社、#237105) の各ウェルに、試料溶液25μℓ、90nMフルオレセイン溶液150μℓを加えて37℃で7分間静置した。その後、153mM AAPH溶液25μℓを加えて撹拌後、37℃に保った蛍光プレートリーダー(BioTek社、Synergy HT)を用い、フルオレセインの蛍光強度(Ex:490nm、Em:535nm)の経時変化を、AAPH添加1分後から1分間隔で30分間測定した。蛍光強度を経時的に記録したグラフの曲線下面積を算出し、生鮮物重量100gあたりのTrolox相当量(μmol-TE/100g-FW)としてORAC活性値を算出した。

6. 統計学的処理

試験結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。結果の統計処理はTukeyの方法に基づいた多重比較により行い,P < 0.01 またはP < 0.05 の場合を有意差ありと判定した。また,ネギ類の香気特性の分析は主成分分析法(Microsoft Office Excel2007,以下PCA)を用いて行った。

実験結果および考察

1. 沖縄県産ネギ類の形質および生態的特性

沖縄県内7地域(7種類),京都府産(九条ネギ)お よび長崎県産(長崎ワケギ)のネギ類における花房形成 および夏季休眠の有無および鱗茎の形をTable 1 に示し た。 9 種類のネギ類のうち、花房を形成したのは九条ネ ギ,津堅産および宜野湾産ネギのみであった。花房形成 について、九条ネギを含む大多数のネギおよびワケネギ の抽台系品種は、緑植物低温感応型に属するために低温 短日条件で花房分化を起こすとされており20,190, 津堅産 および宜野湾産ネギがこのタイプであると考えられた。 一方、ネギ、ワケネギの一部の不抽台系品種およびワケ ギは、ほとんど花房を形成せず、分げつによる繁殖を行 うことが報告2,19)されているため、九条ネギ、津堅産お よび宜野湾産ネギ以外のネギ類がこれに相当すると考え られた。また、花房の形成を示さなかった6種類のネギ 類では, 長崎ワケギ, 中城産および竹富産ネギのみが夏 季休眠を示した。長崎ワケギを含むワケギ種は夏季に休 眠を行い^{2),11),19)}, さらに鱗茎の形がR型のシャロットを 起源にもつと考えられているい。本研究においても、長 崎ワケギ、中城産および竹富産ネギの鱗茎の形はR型を 示したことから、中城産および竹富産ネギは、長崎ワケ ギと同様のワケギである可能性が示唆された。一方で, ネギおよび分げつネギの変種と推定されているワケネギ は、夏季に完全な休眠を示さず、鱗茎の形もB型あるい は鱗茎を形成しないことが報告20,110されている。したが って, 羽地産, 備瀬産および真壁産ネギは, 不抽台系品

Table 1	Comparison	of	the	characteristics	for	the	classification	of	nine	Welsh
onion	cultivars									

Area	Cultivars	Inflorescence development	Dormancy	Shape of bulbs ^a
Okinawa	Tsuken	+	-	В
	Ginowan	+	_	В
	Nakagusuku	_	+	R
	Taketomi	-	+	R
	Haneji	_	_	В
	Bise	_	_	В
	Makabe	-	-	В
Kyoto	Kujyo	+	-	В
Nagasaki	Nagasaki	-	+	R

^aB, bobbin shape; R, round shape

種のネギもしくはワケネギである可能性が示唆された。 以上の結果より、沖縄県産のネギ類について、津堅産お よび宜野湾産ネギは九条ネギと同様の花房形成型ネギ類 (以下Ⅰ型)、中城産および竹富産ネギは長崎ワケギと同 様の夏季休眠性R型ネギ類(以下Ⅱ型)、羽地産、備瀬 産および真壁産ネギは非休眠性B型ネギ類(以下Ⅲ型) の3つのグループに分類された。

次に、同一グループ内において地域別にネギ類の一般的な 7 形質(地上部丈、葉身長、葉鞘長、葉鞘径、分げつ数、生葉数および全生重)を比較した(Table 2)。 I 型のネギ類について、津堅産および宜野湾産ネギはすべての形質特性について差が認められなかった。しかしながら、対照の九条ネギは、地上部丈、葉身長、葉鞘長および分げつ数について津堅産および宜野湾産ネギと比較して明らかな違いを認めた (P < 0.01)。このことから、津堅産および宜野湾産ネギは九条ネギとは異なる品種である可能性が示唆された。 II 型のネギ類について、

中城産ネギは竹富産ネギと比較して、生棄数が約1.6倍多く、また有意差は認めなかったものの、地上部丈、葉身長、葉鞘径および全生重で高い値を示した。一方、竹富産ネギの各形質特性は、対照の長崎ワケギと比較して有意な違いを認めなかったことから、両ネギ類は近い品種関係にある可能性が示唆された。 \square 型のネギ類について、真壁産ネギは羽地産ネギと比較して、地上部丈、葉身長および葉鞘長で有意に高い値を示し(P<0.01)、葉鞘径では約1.5倍、全生重では約2.3倍高い値を示した。一方で、羽地産および備瀬産ネギの分げつ数は、真壁産ネギと比較して約1.4~1.6倍高く、また他のグループのネギ類と比較しても明らかに高い値を示すことから、羽地産および備瀬産ネギは、特に分げつが旺盛といった特徴 \square を有するワケネギの可能性が示唆された。

さらに、異グループ間におけるネギ類の特徴的な形質 の違いを挙げると、Ⅰ型ネギ類の葉鞘径が6.0~9.0mmの 範囲に分布しているのに対し、Ⅱ型およびⅢ型の葉鞘径

Table 2 Comparison of the growth parameters among nine Welsh onion cultivars

Type	Cultivars	Plan	t height (cm)		f blade gth(cm)		f sheath gth(cm)	-	of sheath meter(mm)		ımber of tillers		mber of eaves	Tota	l weight (g)
I	Tsuken Ginowan	36.8 34.5	$\pm 2.4^{\rm bc} \ \pm 4.2^{\rm bc}$	29.3 28.3	$\pm 2.1^{\rm bc} \ \pm 3.8^{\rm bc}$	11.0 10.8	± 1.5 ^b ± 1.3 ^b	6.0 7.0	$\pm 0.0^{bc} \pm 2.6^{ab}$	5.7 3.7	± 2.1 ^{ab} ± 0.6 ^{bc}	13.7 9.3	$\pm 5.0^{ m abc} \ \pm 0.6^{ m bc}$	29.2 17.7	$\pm 7.4^{a} \\ \pm 6.0^{abcd}$
II	Nakagusuku Taketomi	40.1 34.3	± 3.7 ^b ± 3.1 ^{bc}	31.8 28.1	± 3.3 ^{bc} ± 2.7 ^{bc}	10.4 10.4	± 0.8 ^{bc} ± 1.1 ^{bc}	4.8 3.2	± 0.6 ^{bcd} ± 0.4 ^d	4.6 4.6	± 0.5 ^{ab} ± 0.5 ^{ab}	21.0 13.4	± 3.3 ^a ± 2.4 ^{abc}	20.0 12.1	± 2.9 ^{abc} ± 2.3 ^{cd}
Ш	Haneji Bise Makabe	25.8 34.3 42.6	± 2.1° ± 6.6 ^{bc} ± 3.3 ^b	24.3 30.2 36.1	$\pm 1.9^{c}$ $\pm 5.3^{bc}$ $\pm 2.8^{b}$	7.6 8.1 10.9	$\pm 0.2^{d}$ $\pm 0.4^{cd}$ $\pm 0.9^{b}$	2.8 2.8 4.2	$\pm 0.4^{d}$ $\pm 0.8^{d}$ $\pm 0.6^{cd}$	7.2	$\pm 0.4^{ab}$ $\pm 1.3^{a}$ $\pm 1.3^{ab}$	16.8 21.6 17.6	± 1.6 ^{ab} ± 4.4 ^a ± 4.3 ^{ab}	11.2	$\pm 0.8^{d}$ $\pm 6.0^{cd}$ $\pm 1.9^{cd}$
Control	Kujyo Nagasaki	65.2 38.4	± 5.7 ^a ± 5.2 ^b	51.5 31.6	± 5.4° ± 3.7°	17.2 11.8	± 0.8 ^a ± 1.1 ^b	9.0 4.0	± 1.0 ^a ± 0.4 ^{cd}	1.0 4.0	± 0.0° ± 1.2 ^{bc}	5.0 12.6	± 0.0° ± 3.0°	27.8 17.1	± 5.5 ^{ab} ± 3.3 ^{bcd}

The values are shown as means \pm standard deviation (SD).

 $^{^{}a\sim d}$ Means with different letters are significantly different at P < 0.01 by Tukey's test.

は I 型に比べて小さい値(Ⅱ型,3.2~4.8mm;Ⅲ型,2.8~4.2mm)を示すことから,I 型ネギ類は太ネギ型,Ⅲ型およびⅢ型は細ネギ型に分類されると考えられた。以上のように,沖縄県内の各地域のネギ類の形質および生態特性により客観的な分類が可能であり,また分類されたネギ類の特徴も明らかにすることができた。しかしながら,本研究は2011年のみのデータであり,季節変動の可能性が示唆されることから,今後も季節変動を考慮したサンプルの収集やデータ解析が必要であると考えられる。

2. 沖縄県産ネギ類中に含まれる香気成分の分析

ネギ類の香りは嗜好特性として最も重要な因子の1つ と考えられる。沖縄県産ネギ類および比較対照である九 条ネギと長崎ワケギの香気成分として17成分を同定し、 FIDで定量した面積値を, Table 2の形質および生態的 特性により分類した結果に基づいて示した(Table 3)。 同定された17成分のなかで12成分は含硫化合物であるス ルフィド類またはチオール類であり、沖縄県産ネギ類の 香気総量の85~97%を占めた。Allium属の主要な香気成 分は含硫化合物であることは多数報告^{4),6),20)}されており, 対照である九条ネギ (90%) と長崎ワケギ (96%) とと もに、沖縄県産ネギ類でも同様の傾向がみられた。各ネ ギ類で共通して最も高い定量値を示した 1-Propanethiol は玉ネギ様やキャベツ様のにおい210を呈し、ネギやアサ ツキ20,22, リーキ23等に含まれている成分である。ま た、1-Propanethiolに次いで高い定量値を示したDipropyl disulfideは、ニンニク様や玉ネギ様のにおい^{21),23)}を呈し、 ネギ^{6),20),22)}やリーキ²³⁾の他、シャロット²⁴⁾やワケギ^{6),25)}に も存在し、ネギ属に幅広く含まれる成分である。これら のチオール類およびスルフィド類は、Ⅲ型に分類した真 壁産ネギを除き、Ⅱ型の細ネギ型で顕著に高い傾向を示 した。一方、含硫化合物12成分の中で各ネギ類に共通し て検出された成分は5成分のみであった。主要香気成分 である1-PropanethiolとDipropyl disulfideの閾値はそれ ぞれ 0.13×10^{-2} ppm, 7.1×10^{-2} ppm, また, Methanethiol, Allyl mercaptan, Dimethyl disulfide, Dimethyl trisulfideといった他のチオール類およびスルフィド類の 閾値はそれぞれ 0.11×10^{-2} ppm, 0.04×10^{-2} ppm, 1.23×10⁻²ppm, 0.17×10⁻²ppmという報告²⁶⁾があり, 今回 検出されたアルコール類やアルデヒド類の閾値と比べて 10~105オーダーも低い260ことから、含硫化合物の組成や 含量の違いは各ネギ類の香気特性に大きく影響している と考えられた。また、各ネギ類には含硫化合物以外にア ルデヒド類2成分とアルコール類3成分が共通して検出 されたが、その定量値も各ネギ類間では異なっていた。

そこで、各ネギ類の香気成分であるスルフィド類、チオール類、アルデヒド類およびアルコール類の定量値を変数としてPCAを用いて解析し、各ネギ類の香気特性に基づく分類を行った(Fig. 2)。第1主成分に54.7%、第2主成分に38.4%の情報が要約され、Fig. 2(A)の

因子負荷量の散布図から、第1主成分はネギ属独特の香 りを呈するスルフィド類およびチオール類と高い正の相 関を示す軸, 第2主成分はアルデヒド類およびアルコー ル類と高い正の相関を示す軸と意味づけられた。特に, 第1主成分は主要な12成分の含硫化合物の情報であるこ とから、香気総量の情報も反映していると推定された。 各ネギ類の第1主成分および第2主成分のスコア散布図 をFig.2(B)に示した。この散布図において真壁産ネ ギを除き, 形質および生態的特性によって分類された I 型, Ⅱ型およびⅢ型のネギ類は、それぞれ類似した香気 特性に基づき分類できた。すなわち、Ⅰ型に分類された 津堅産および宜野湾産ネギは九条ネギとともに、他のネ ギ類に比べ、含硫化合物、アルデヒドおよびアルコール 含量が少なく, 香気総量的にもネギ特有の香りが弱いこ とが示唆された。一方、Ⅱ型の中城産および竹富産ネギ は長崎ワケギとともに、含硫化合物含量が高く、ネギ特 有の強い香りをもつことが示された。ニンニクやジャン ボリーキのような休眠性をもつAllium属の植物は、休眠 中に含硫化合物の前駆物質であるグルタミル-S-アルキ ルシステインを貯蔵する27,28)ことから、Ⅱ型に分類され るワケギタイプのネギ類についても休眠中に同前駆物質 を多量に蓄積していると考えられた。また、Ⅲ型である 羽地産および備瀬産ネギの含硫化合物含量はI型とほぼ 同じであるが、アルデヒド類およびアルコール類がⅠ型 やⅡ型のネギ類に比べて高いという香気特性を示した。 Allium属のリーキの香気成分として、不飽和脂肪酸の酵 素反応による分解物である揮発性アルデヒドやアルコー ルが報告23)されていることから、脂肪酸の関与とともに、 アルデヒド類やアルコール類の香気形成への寄与につい ても詳細に分析する必要があると考えられた。さらに、 形質および生態的特性からⅢ型に分類された真壁産ネギ は、アルデヒド類およびアルコール類の含量が他のⅢ型 よりも低く, 休眠を行わないにもかかわらず, 含硫化合 物含量はⅡ型のネギ類に比べて著しく高かった。今後は, 形質および生態的特性の詳細な解析や香気形成に関与す る前駆物質も含めた成分分析を行い、新たな型に分類さ れるかを検討する必要がある。

3. 沖縄県産ネギ類の総ポリフェノールおよび抗酸化活性の測定

近年、心疾患や糖尿病などの各種疾患の予防を目的とした、野菜などの食品に含まれる抗酸化物質の機能性が注目されている。Allium属の野菜においても、玉ネギやニンニクなどが有する多くの抗酸化物質およびそれらの食品機能性が確認されている 71,291 が、沖縄県産ネギ類についての知見はない。Fig. 3に各ネギ類の総ポリフェノールおよび抗酸化活性としてORAC活性値を示した。沖縄県産ネギ類の総ポリフェノールは $20.1 \sim 38.1 \, \text{mg}$ -FWの範囲にあり、竹富産ネギが最も多く($38.1 \, \text{mg}$)、次いで中城産ネギ($34.2 \, \text{mg}$)、真壁産ネギ($34.0 \, \text{mg}$)であった。対照のネギ類では長崎ワケギが最も高く

Table 3 Gas chromatography analysis of the volatile compounds in fresh Welsh onions

					Peak areaª	areaª					
Compound	RIb	Ty	Type I	Ty	Type II		TypeⅢ		J J	Control	Identification ^c
		Tsuken	Ginowan	Nakagusuku	Taketomi	Haneji	Bise	Makabe	Kujyo	Nagasaki	
Sulfides	760	411 + 575	1 00 +	201 + 200	000 + 640	010 + 22 6	100 + 00 1	10 O + 11 P P	;	200 C + 110 F	DI MC
z-ivietnyitniirane	176	4.11 ± 5.72	1.89 ± 1.09	3.07 ± 1.25	5.57 ± 0.55	3.00 ± 0.40	4.93 ± 0.21	5.75 ± 0.24	H.	4.35 エリ.33	MS,
Dimethyl disulfide	1,072	tr.	ND	tr.	tr.	1.58 ± 0.14	2.20 ± 0.15	0.94 ± 0.11	tr.	QN N	RI, MS, PC
S-propyl thioacetate	1,180	2.72 ± 0.60	2.33 ± 0.19	3.13 ± 0.47	2.47 ± 0.20	tr.	tr.	3.59 ± 0.40	2.15 ± 0.24	ij.	RI, MS, PC
Methyl propyl disulfide	1,236	4.43 ± 1.45	2.03 ± 0.39	9.62 ± 2.24	7.02 ± 1.89	5.58 ± 0.43	4.77 ± 0.60	14.55 ± 1.49	2.75 ± 0.37	4.70 ± 0.76	RI, MS, PC
Allyl methyl disulfide	1,293	tr.	tr.	tr.	tr.	1.00 ± 0.08	1.40 ± 0.12	0.97 ± 0.14	tr.	tr.	RI, MS, PC
Dipropyl disulfide	1,386	49.36 ± 14.41	42.42 ± 5.97	73.31 ± 21.58	59.68 ± 8.17	11.20 ± 1.47	4.63 ± 0.27	144.42 ± 21.86	30.55 ± 2.56	51.93 ± 8.45	RI, MS,
Dimethyl trisulfide	1,408	ND	ND	1.10 ± 0.16	tr.	ND	ND	tr.	ND	tr.	RI, MS, PC
Allyl propyl disulfide	1,445	1.64 ± 0.41	ij.	2.95 ± 0.97	7.47 ± 1.86	3.04 ± 0.25	3.78 ± 0.19	12.54 ± 1.17	tr.	9.62 ± 1.55	RI, MS, PC
Dipropyl trisulfide	1,681	ND	ND	tr.	tr.	ND	ND	2.36 ± 0.38	ND	2.25 ± 0.42	RI, MS,
Total sulfides		62.27	48.66	93.78	80.21	26.06	21.71	185.13	35.45	72.85	
Thiols											
Methanethiol	691	37.56 ± 8.35	14.78 ± 3.55	61.62 ± 6.11	31.46 ± 5.07	84.58 ± 6.89	121.36 ± 3.85	60.56 ± 6.83	27.11 ± 4.60	18.75 ± 0.61	RI, MS, PC
1-Propanethiol	834	884.14 ± 283.55	770.47 ± 66.50	$1,\!806.26\pm309.67$	$1,778.29 \pm 113.09$	913.48 ± 75.03	631.15 ± 25.21	$2,379.91 \pm 182.22$	546.36 ± 129.16	$1,833.76 \pm 188.58$	RI, MS, PC
Allyl mercaptan	931	4.01 ± 0.88	3.41 ± 0.22	5.58 ± 0.93	5.95 ± 0.55	8.54 ± 0.03	8.91 ± 0.97	8.96 ± 0.60	2.47 ± 0.50	6.98 ± 0.91	RI, MS, PC
Total thiols		925.71	99.882	1,873.47	1,815.71	1,006.61	761.42	2,449.43	575.94	1,859.49	
Aldehydes											
Acetaldehyde	710	17.60 ± 3.78	8.94 ± 1.36	10.27 ± 1.94	15.21 ± 2.29	30.42 ± 4.55	26.83 ± 6.43	33.63 ± 6.29	6.85 ± 1.08	13.91 ± 2.11	RI, MS,
Propanal	797	6.44 ± 0.51	3.53 ± 0.82	8.69 ± 1.52	16.31 ± 2.58	14.43 ± 1.58	13.01 ± 1.82	14.41 ± 2.95	2.42 ± 0.36	21.61 ± 3.41	RI, MS, PC
Total aldehydes		24.04	12.48	18.96	31.52	44.85	39.84	48.04	9.27	35.53	
Alcohols											
Methanol	903	35.83 ± 5.25	28.05 ± 3.70	19.33 ± 1.46	39.35 ± 1.07	35.73 ± 1.26	44.43 ± 5.17	32.56 ± 1.67	25.07 ± 2.47	34.97 ± 2.71	RI, MS, PC
Ethanol	939	26.14 ± 5.77	14.95 ± 1.93	9.63 ± 1.89	8.81 ± 0.40	27.57 ± 3.04	23.17 ± 3.96	19.56 ± 0.67	16.38 ± 3.71	5.01 ± 0.85	RI, MS, PC
1-Propanol	1,042	27.57 ± 1.83	20.59 ± 3.86	19.05 ± 2.73	20.91 ± 1.49	35.48 ± 1.68	32.66 ± 1.18	21.20 ± 1.73	15.36 ± 1.00	15.56 ± 1.46	RI, MS, PC
Total alcohols		89.55	63.58	48.01	20.69	98.78	100.26	73.32	56.81	55.54	
Total identified		1,101.57	913.39	2,034.21	1,996.50	1,176.30	923.24	2,755.92	677.48	2,023.41	

"The values are shown as means ± standard deviation (SD) (n=3); ND, not detected; tr, trace amount (less than 0.2).

^bRetention index.

^cRI, identification based on RI; MS, identification based on mass spectrum and NIST MS library; and PC, identification based on authentic standards.

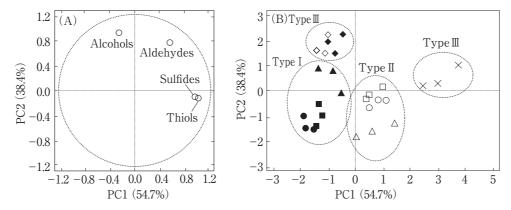


Fig. 2 Principal component analysis (PCA) plots of volatile compounds defined by first (PC1) and second (PC2) principal components of Welsh onions:

(A) distribution of four groups of volatile compounds and (B) discrimination of cultivars on the basis of the relative concentrations of four functional groups of volatilec ompounds

Type I; (\bullet) , Kujyo: (\blacktriangle) , Tsuken: (\blacksquare) , Ginowan

Type II ; (\bigcirc) , Nagasaki : (\triangle) , Nakagusuku : (\Box) , Taketomi

Type \mathbb{II} ; (\spadesuit) , Haneji: (\diamondsuit) , Bise: (\times) , Makabe

(39.2mg),次いで九条ネギ (33.2mg) であり、いずれも高い値を示した。また、3つのグループ間の比較では、II型のネギ類が他のグループと比べて高い値の範囲 (34.2-39.2mg-GAE/100g-FW) に分布していた。一方、沖縄県産ネギ類のORAC活性値は855~1,638 μ mol-TE/100g-FWの範囲にあり、真壁産ネギが1,638 μ molと最も高く、対照の九条ネギ(1,250 μ mol)および長崎ワケギ(1,271 μ mol)と比較しても最も高い活性値を示した。また、沖縄県産ネギ類で最も高い総ポリフェノールを示した竹富産ネギについても比較的高い値(1,435 μ mol)を示した。

これらの結果をもとに、すべてのネギ類における総ポリフェノールおよびORAC活性値の相関を算出したところ、相関係数はr=0.395とほとんど相関を示さなかった(データ非掲載)。そこで各ネギ類についてポリフェノール単位量あたりのORAC活性値(μ mol-TE/mg-GAE)を算出したところ(データ非掲載)、 I 型および II 型に分

類されたすべてのネギ類が40 µmol以上の値(I型:津堅 産, 42.1 µmol; 宜野湾産, 60.6 µmol; Ⅲ型:羽地産, 62.4 μmol; 備瀬産, 42.6 μmol; 真壁産, 48.2 μmol), Ⅱ型 のネギ類では40 µmol以下の値(中城産, 33.6 µmol; 竹富 産, 37.7 µmol) を示した。したがって, 各産地のネギ類 が示す抗酸化活性に対する総ポリフェノールの寄与はそ れぞれ異なり、また異グループ間の比較では、 I 型およ びⅢ型のネギ類はⅡ型と比較して抗酸化活性の高いポリ フェノールを含有する傾向があるものの, 本研究で分類 したネギ類の生育特性を抗酸化活性および総ポリフェノ ール含量のみで厳密に関連づけることは困難であると考 えられた。青山ら⁷は、ネギの種類に伴ってケンフェロ ールおよびケルセチンの含量が大きく異なり, 抗酸化活 性の違いに大きく関与すると報告している。またWU ら30)は、ポリフェノール以外の抗酸化物質としてチオー ル類などの揮発性含硫化合物をあげている。したがって、 今後は各ネギ類に含有するポリフェノールや含硫化合物

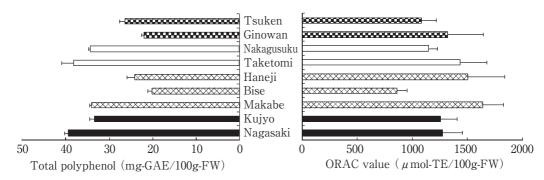


Fig. 3 Total phenolic content and antioxidant values (oxygen radical absorbance capacity [ORAC]) of nine Welsh onion cultivars

のような抗酸化活性に寄与する化合物の定性や定量およびその抗酸化活性を測定し、各グループの生育特性との 関連づけを検討する必要があると考えられた。

要 約

本研究では、沖縄県内7地域のネギ類について、花房 形成, 夏季休眠の有無および鱗茎の形を検討し, 沖縄県 産ネギ類の分類を試みた。その結果、津堅産および宜野 湾産ネギは九条ネギと同様の花房形成型ネギ類 (Ⅰ型), 中城産および竹富産ネギは長崎ワケギと同様の夏季休眠 性R型ネギ類 (Ⅱ型), 羽地産, 備瀬産および真壁産ネ ギは非休眠性B型ネギ類(Ⅲ型)の3つのグループに分 類された。さらに、Ⅰ型ネギは太ネギ型、Ⅱ型およびⅢ 型ネギは細ネギ型であることを見い出した。さらに沖縄 県産の地域別ネギ類における香気成分を分析するととも に、各ネギ類の香気成分であるスルフィド類、チオール 類、アルデヒド類およびアルコール類の定量値を変数と してPCAを用いて解析した結果、真壁産ネギを除き各 グループごとに類似した香気特性を示した。また沖縄県 産ネギ類の総ポリフェノールおよび抗酸化活性(ORAC 値) を測定した結果, 総ポリフェノールは20.1~38.1mg -GAE/100 g -FW, ORAC値は855~1,638 μmol-TE/100 g -FWの範囲にあり、対照の九条ネギおよび長崎ワケギよ りも高い含量あるいは活性を示す沖縄県産ネギ類が存在 した。しかし、すべてのネギ類における総ポリフェノー ルおよびORAC活性値は相関を示さず、各産地のネギ類 が示す抗酸化活性に対する総ポリフェノールの寄与はそ れぞれ異なるため、分類したグループ内のネギ類におい ても, 抗酸化活性に関与するポリフェノールの量や抗酸 化物質の種類が異なることが示唆された。

謝 辞 本研究遂行にあたり、材料となるネギ苗をご 提供して下さいました農家の方々、沖縄県農業研究セン ターの皆様、測定および分析にご協力いただいた前當正 範様、古澤梨奈様、神田沙也加様に厚く御礼申し上げま す。

文 献

- 1) 若生忠幸・塚崎 光・小原隆由・吉田昌美・島崎 聡・安藤利夫・山下謙一郎・小島昭夫:形態および成 長特性の主成分分析によるネギの品種分類の検証,野 菜茶業研究所研究報告,**8**,121~130(2009)
- 2) 農文協編:野菜園芸大百科 ネギ/ニラ/ワケギ/リーキ/やぐら性ネギ18 (農山漁村文化協会,東京),pp. 17~370 (2004)
- 3) 青葉 高:日本の野菜 (八坂書房, 東京), pp.120 ~132 (2000)
- 4) 水谷純也・田原哲士・西村弘行: ネギ属植物のフレーバー, 化学と生物, **17**, 814~820 (1979)
- 5) Boscher, J., Auger, J., Mandon, N. and Ferary,

- S.: Qualitative and quantitative comparison of volatile sulphides and flavour precursors in different organs of some wild and cultivated garlics, *Biochem. Syst. Ecol.*, **23**, 787~791 (1995)
- 6) Kameoka, H., Iida, H., Hashimoto, S. and Miyazawa, M.: Sulphides and furanones from steam volatile oils of *Allium fistulosum* and *Allium chinense*, *Phytochemistry*, **23**, 155~158 (1984)
- 7) AOYAMA, S. and YAMAMOTO, Y.: Antioxidant activity and flavonoid content of Welsh onion (*Allium fistulosum*) and the effect of thermal treatment, *Food Sci. Technol. Res.*, 13, 67~72 (2007)
- 8) AOYAMA, S., HIRAIKE, T. and YAMAMOTO, Y.: Antioxidant, lipid-lowering and antihypertensive effects of red Welsh onion (*Allium fistulosum*) in spontaneously hypertensive rats, *Food Sci. Technol. Res.*, 14, 99~103 (2008)
- CHEN, J. H., CHEN, H. I., TSAI, S. J. and JEN, C. J.: Chronic consumption of raw but not boiled Welsh onion juice inhibits rat platelet function, *J. Nutr.*, 130, 34~37 (2000)
- 10) Chen, J. H., Tsai, S. J. and Chen, H. I.: Welsh Onion (*Allium fistulosum* L.) extracts alter vascular responses in rat aortae, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **33**, 515∼520 (1999)
- 11) 小林五郎・農耕と園芸編集部共編:ネギ類 生理と 栽培技術(誠文堂新光社,東京), pp.18~71 (1989)
- 12) 沖縄県農林水産部・沖縄県中央卸売市場:沖縄の伝統野菜等と食材~見直そう昔からの長寿食材~(沖縄県農林水産部・沖縄県中央卸売市場,沖縄),p.8 (2006)
- 13) ALEIXANDRE, J. L., LIZAMA, V., ALVAREZ, I. and GARCĪA, M. J.: Varietal differentiation of red wines in the Valencian region (Spain), *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 751~755 (2002)
- 14) 今井晶子・大高亜生子・中村 哲・門倉雅史・鈴木 忠直・中井 泉:蛍光X線分析を用いたカボチャ種子 の微量分析および産地判別への応用,日食科工誌, 59,338~347 (2012)
- 15) 藤枝國光・安谷屋信一・大久保敬・高橋基一・松尾 英輔:ワケギ (*Allium wakegi* Araki) の種内分化に 関する研究, 園学雑, **49**, 180~188 (1980)
- 16) ŽITŇANOVĂ, I., RANOSTAJOVĂ, S., SOBOTOVĀ, H., DEMELOVĀ, D., PECHĀŇ, I. and ĎURAČKOVĀ, Z.: Antioxidative activity of selected fruits and vegetables, *Biologia. Bratislava.*, **61**, 279~284 (2006)
- 17) 佐藤明子・渡辺 純・後藤真生・石川 (高野) 祐子: Oxygen radical absorbance capacity法によるスモモの抗酸化活性評価, 日食科工誌, **57**, 44~48 (2010)

- 18) Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B. and Jacob, R.: Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3273~3279 (2003)
- 19) 斎藤 隆:蔬菜園芸の事典 (朝倉書店, 東京), pp. 233~236 (1991)
- 20) Kuo, M.C. and Ho, C.T.: Volatile constituents of the distilled oils of Welsh onions (*Allium fistulosum* L. variety maichuon) and Scallions (*Allium fistulosum* L. variety caespitosum), *J. Agric. Food Chem.*, 40, 111~117 (1992)
- 21) Chin, S. T., Nazimah, S. A. H., Quek, S. Y., Che Man, Y. B., Abdul Rahman, R. and Mat Hashim, D.: Analysis of volatile compounds from Malaysian durians (*Durio zibethinus*) using headspace SPME coupled to fast GC-MS, *J. Food. Compos. Anal.*, 20, 31~44 (2007)
- 22) 梅原三貴久・末吉孝行・下村克己・平島敬太・下田 満哉・中原隆夫:ネギとアサツキの種間雑種作出とそ の特性について、福岡農総試研報、**26**,25~30 (2007)
- 23) Nielsen, G. S. and Poll, L.: Determination of odor active aroma compounds in freshly cut leek (*Allium ampeloprasum* var. *bulga*) and in long-term stored frozen unblanched and blanched leek slices by gas chromatography olfactometry analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1642~1646 (2004)
- 24) D'ANTUONO, L. F., MORETTI, A. and NERI, R.:

- Evaluation of 'di Romagna' and 'French grey' shallots for quality characters connected to bulb colour and volatile oil content and composition, *Genet. Resour. Crop. Evol.*, **49**, 175~182 (2002)
- 25) 亀岡 弘・出水義之・岩瀬保彦・上村康夫: ワケギ の水蒸気揮発性油の中性成分について, 日農化会 誌, 55, 315~318 (1981)
- 26) Schiffman, S., Bennett, J. and Raymer, J.: Quantification of odors and odorants from swine operations in North Carolina, *Agr. Forest Meteorol.*, **108**, 213~240 (2001)
- 27) 山崎賀久・徳永隆司・奥野智旦:ニンニク中のフレーバー前駆体S-アルケニルシステイン誘導体のHPLC 分析,日食科工誌,**52**,160~166 (2005)
- 28) 内田あゆみ・萩原 淳・熊谷日登美・赤尾 真・松 藤 寛・櫻井英敏・関口一郎:ジャンボリーキのスルフィド生成に関わる成分の検索と同定,日食科工誌, 56,280~285(2009)
- 29) Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H. M., Ross, C. F., Powers, J. R., Tang, J. and Rasco, B. A.: Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of Onion (*Allium cepa*) and Shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy, *Food. Chem.*, **129**, 637~644 (2011)
- 30) Wu, J., Lin, L., Luan, T., Gilbert, Y. S. C. and Lan, C.: Effects of organophosphorus pesticides and their ozonation byproducts on gap junctional intercellular communication in rat liver cell line, Food Chem. Toxicol., 45, 2057~2063 (2007)

(平成25年12月19日受付,平成26年3月13日受理)

Phenolic Extract from Japanese Apricot Fruit (*Prunus Mume* Sieb et Zucc.) Inhibits Disaccharidase Activity in the Small Intestine and Suppresses the Postprandial Elevation of Glucose Levels in Rats

KISHIDA Kunihiro*[§], SUZUKI Masaya*, HEYA Yuichi*, YAMAZAKI Yudai*, HORINISHI Asako* and OZAKI Yoshihiko*

* Department of Science and Technology on Food Safety, Kinki University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493

We investigated the inhibitory effects of Japanese apricot phenolic extract (JAPE) on d isaccharidase activity in samples obtained from the small intestine of rats and its suppressive effects on postprandial elevation of blood glucose levels in rats. JAPE inhibited maltase, glucoamylase, lactase but not sucrase, isomaltase, trehalase that were present in the samples from the small intestine. Kinetic analyses indicated that the inhibitory modes of JAPE were mixed/ non-competitive for maltase, uncompetitive for glucoamylase, and competitive for lactase. In the sugar load tests, postprandial blood glucose levels were significantly suppressed when maltose, sucrose, starch, but not glucose, was administered in combination with the JAPE to rats. The results indicated that the JAPE had no effect on glucose absorption and that the suppressive effects on blood glucose levels were caused by the inhibition of disaccharidase. The JAPE did not affect the amount of glucose absorption because AUC_{0-120min} was not altered by the JAPE. Hydroxycinnamic acid derivatives in JAPE may partly contribute to disaccharidase inhibition. These results suggest that JAPE could be useful as a food ingredient to reduce the risks of lifestyle diseases such as type 2 diabetes and obesity.

(Received Jan. 9, 2014; Accepted Apr. 7, 2014)

Key words: Japanese apricot, phenolics, disaccharidase inhibition, postprandial blood glucose ウメ, フェノール性化合物, 二糖類水解酵素阻害, 食後血糖

Hyperglycemia accelerates lipogenesis and fat accumulation, and is a major risk factor for cardiovascular and neurological complications in patients with type 2 diabetes1). Glycemic control is crucial for reducing the risk of chronic metabolic diseases. Alpha-glucosidase is the key enzyme that catalyzes the final step in the digestion carbohydrates. Alpha-glucosidase associated with two protein complexes anchored in the brush border membrane of the small intestine, i. e., maltase-glucoamylase (MGAM) and sucraseisomaltase (SI). MGAM and SI, which are composed of duplicated catalytic domains and glucosidases, are involved in the final step of digestion²⁾. Hence, α-glucosidase inhibitors believed to be good candidates for antidiabetic drugs because they delay carbohydrate digestion and absorption and thus lower postprandial blood glucose and insulin levels. α-Glucosidase inhibitors

such as acarbose, miglitol, and voglibose are widely used to treat patients with type 2 diabetes. However, it is often reported that they cause diarrhea and other intestinal disturbances³⁾. Much effort has been made to find effective α-glucosidase inhibitors from natural sources. These inhibitors have a low incidence of serious gastrointestinal side effects4),5) and can be included in a functional diet that can possibly alleviate or prevent hyperglycemiainduced disorders. Many phenolic compounds have been shown to inhibit α -glucosidase activity^{6),7)}. Among them, acylated anthocyanins and caffeoyl derivatives have shown strong inhibition. An increase in the number of caffeoyl groups in acylated anthocyanins and caffeoyl derivatives were reported to increase the effectiveness of inhibition 8)~10). This suggests the importance of acylation or esterification in α-glucosidase inhibition. Recently, we reported the phenolic profile of the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb et Zucc.)¹¹⁾, and established a protocol for extracting phenolic compounds from the Japanese apricot "umezu", which is the juice that exudes from the salted fruits. The Japanese apricot phenolic extract (JAPE) contains 11.5% (w/w) phenolics, expressed as gallic acid equivalents, and mainly consist of hydroxycinnamic acid (caffeic acid, *p*-coumaric acid, and ferulic acid) derivatives (unpublished data). Thus, the JAPE may show an inhibitory effect on α-glucosidase.

In an inhibitory assay, it should be noted to the effects under more physiological conditions. Significant differences in inhibitory effects were observed between mammalian- and yeastderived α-glucosidases. (+)-Catechin was found to inhibit yeast α-glucosidase, but not rat α-glucosidase, when p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (PNPG) was used as the substrate. In addition, inhibitory effects have also varied across substrates used. D-xylose, which uncompetitively inhibits sucrase activity, showed no inhibition in the PNPG assay. Therefore, PNPG would not be appropriate for screening uncompetitive inhibitors12). OKU et al. reported that the hydrolyzing activity of disaccharidase in humans was similar to that in rats and that the digestibility of saccharides measured using enzymes found in the rat's small intestine could be extrapolated to humans¹³⁾. In this study, we investigated if the JAPE inhibited disaccharidase activity in samples obtained from the small intestine of rats and suppressed the elevation of blood glucose levels in rats.

Materials and Methods

1. Phenolic extracts

JAPE was obtained from umezu, which is the juice that exudes from salted Japanese apricot fruits. The details of the preparation method for the JAPE will be described elsewhere. JAPEs contain derivatives of hydroxycinnamic acid (caffeic acid, *p*-coumaric acid, and ferulic acid) as free forms, quinic acid esters, and sugar esters. The proportion of the phenolic moiety was as follows: 1.2% for caffeic acid, 2.6% for *p*-coumaric acid, 1.1% for ferulic acid (w/w for each). The total phenol content measured by means of the Folin-Ciocalteu method was 11.5% (w/w) in terms of gallic acid equivalents (unpublished data).

2. Disaccharidase assay

Ten male Wistar rats (Kiwa Laboratory Animals

Co. Ltd., Wakayama, Japan), which were fed a standard solid diet (MF diets; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan), were included in the study. Brush border membrane vesicles (BBMVs) were obtained from the small intestinal mucosa of these rats. After a 16-h fasting period, the rats were sacrificed and the small intestinal BBMVs were prepared according to the method of Kessler et al. 14) The BBMVs were suspended in 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and stored at -30° C until use for analysis. The disaccharidase (maltase, sucrase, isomaltase, glucoamylase, lactase, trehalase) activity was determined by Dahlqvist's assay with a slight modification¹⁵⁾. Briefly, 0.1 ml of enzymatic solution containing BBMVs, 0.1 ml of substrate (maltose, sucrose, palatinose, soluble starch, lactose, and trehalose) for each disaccharidase, and 0.1 mℓ of the JAPE were added to the respective test tube and mixed. Each solution was preliminarily diluted in 0.05 M sodium maleate buffer (pH 6.0) to an adequate concentration to determine the activity. After incubation for $10\sim30$ min at 37° C, $2 \text{ m}\ell$ of 1M Tris-HCl buffer (pH 7.0) was added to stop the disaccharidase reaction. and the glucose concentration was determined by an enzymatic colorimetric assay with Glucose CII test Wako (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan), which is based on the glucose oxidase method. The standard addition method was used to measure glucose because the JAPE inhibited the glucose oxidase reaction. Palatinose, which has an α -1, 6 glycosidic linkage and is hydrolyzed by isomaltase, was used instead of isomaltose. All substrates used in this assay were of analytical grade and obtained from Wako Pure Chemical Industries Ltd. Protein concentration was measured by the DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, California, USA) with bovine serum albumin as a standard. To study the kinetics of inhibition, varying concentrations of substrates (2 \sim 32 mM for maltose, 2 \sim 128 mM for sucrose, 0.5~16 mM for palatinose, 4~32 mM for lactose, $1 \sim 32$ mM for trehalose, $2 \sim 12$ mg/m ℓ for soluble starch) were mixed with their respective disaccharidase in the absence and presence of the JAPE $(1 \text{ mg/m}\ell \text{ and } 2 \text{ mg/m}\ell)$. Enzyme activity was calculated as micromoles of substrate hydrolyzed · min⁻¹ · mg⁻¹ protein (maltase, sucrase, isomaltase, lactase, and trehalase) or micromoles of glucose released $\cdot \min^{-1} \cdot mg^{-1}$ protein (glucoamylase). The mode of inhibition was determined by LineweaverBurk plot analysis.

3. Sugar load test

Male Wistar rats (18~33 weeks old) were used to evaluate the effect of the JAPE on postprandial elevation of glucose levels. After an overnight fasting period of 16 h, a single oral administration of each sugar (maltose, sucrose, starch, and glucose) was carried out at a dose of $2g/6m\ell/kg$ body weight (BW) in the absence and presence of the JAPE (250~1,000 mg/kg BW). The same rats were used throughout the experiment. JAPE and sugar were dissolved together in distilled water and administered to the rats. Blood glucose levels were measured from the tail vein using a handheld blood glucose meter (Glutest Neo Super; Sanwa Chemical, Nagoya, Japan) before and 10, 20, 30, 60, 90, and 120 min after administration. This study was approved by the Animal Care Committee of Kinki University, and the animals were maintained in accordance with the guidelines.

4. Statistical analyses

The blood glucose levels have been expressed as mean ± SE for each group. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison test performed using IBMSPSS statistics software, version 19.0 (IBM Co., New York, USA). P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results and Discussion

Inhibitory effects of the JAPE on disaccharidase activity

The JAPE inhibited the activity of maltase, glucoamylase, and lactase but not of sucrase, isomaltase, and trehalase present in the small intestine samples. Lineweaver-Burk plots and kinetic data (apparent K_m and V_{max}) of each disaccharidase, with and without the addition of the JAPE, are displayed in Fig. 1 and Table 1, respectively. The K_m values for the disaccharidases under control similar conditions were to those previously reported16~18). The JAPE increased K_m and decreased V_{max} . However, the K_m and V_{max} values glucoamylase decreased in the presence of the JAPE. The JAPE increased the K_m value of lactase, but did not affect its V_{max} . Kinetic analyses indicated that the inhibition mode of the JAPE was mixed/ non-competitive for maltase, uncompetitive for glucoamylase, and competitive for lactase. In mammals, the four catalytic domains, the N- and Cterminal subunits of MGAM and SI, are involved in maltase activity. MGAM and SI account for 20% and 80%, respectively, of maltase activity. Additionally, MGAM accounts for the total glucoamylase activity and 1% of isomaltase activity. SI accounts for the total sucrase activity and almost all of the isomaltase activity 19,20. This study did not identify the domains of MGAM and SI that were inhibited by the JAPE during maltase inhibition. Moreover, sucrase and isomaltase were not inhibited by the JAPE. JAPE possibly inhibits maltase activity in the SI complex by binding to the sucrase -maltose and/or isomaltase-maltose complex. Because maltase inhibition is not competitive, JAPE can bind to the enzyme-substrate complex. The JAPE uncompetitively inhibited glucoamylase; suggests that it binds to the starch-glucoamylase complex. Fogarty et al. reported the uncompetitive inhibition of thermophilic amyloglucosidase, purified from Aspergillus niger, with gentiobiose used at 20 mM and with starch as a substrate²¹⁾. Gentiobiose is a disaccharide and sugar moiety of amygdalin, which is present in the Japanese apricot as a cyanogen compound. JAPE may contain gentiobiose or its analogs, which may attribute to glucoamylase inhibition. JAPE contains hydroxycinnamic acid (caffeic acid, p-coumaric acid, and ferulic acid) derivatives as free forms, quinic acid esters, and sugar esters. We have previously isolated chlorogenic acids (3-O-caffeoylquinic acid, 4-Ocaffeoylquinic acid and 5-O-caffeoylquinic acid) and some p-coumaricacid esters of acetylated sucrose in JAPE (unpublished data). Kamitani et al. reported that chlorogenic acids (3-O-caffeoylquinic acid, 4-Ocaffeoylquinic acid and 5-O-caffeoylquinic acid) had similar half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) $(mg/m\ell)$ values for maltase $(0.799 \sim 0.816)$, sucrase $(0.980 \sim 1.01)$, and α -amylase $(0.145 \sim 0.168)$. Feruloylquinic acids also showed inhibitory effects, although their effects were weaker than those of acids²²⁾ . Hydroxycinnamic caffeovlquinic derivatives in JAPE are possibly responsible for d isaccharidase inhibition. Further research will help elucidate the contribution of each hydroxycinnamic acid derivative to the inhibition of JAPE.

2. Suppressive effects on the elevation of blood glucose levels in rats

Sugar load tests were performed to evaluate the suppressive effects of the JAPE on the elevation in

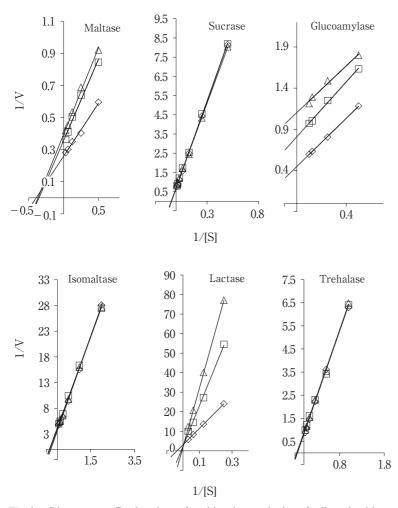


Fig.1 Lineweaver-Burk plots for kinetic analysis of disaccharidase inhibition by JAPE

[S], concentration of substrate, mM or $mg/m\ell$; V, micromoles of substrate hydrolyzed \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹ protein or micromoles of glucose released \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹ protein; \diamondsuit , absence of JAPE; \square , $1mg/m\ell$ of JAPE added; \triangle , $2mg/m\ell$ of JAPE added

postprandial blood glucose levels in rats. The JAPE alone did not cause significant blood glucose elevation (data not shown). Fig. 2 shows the variation in blood glucose levels before and after the administration of each sugar (maltose, sucrose, starch, and glucose) in the absence and presence of the JAPE. In all tests, the elevation in blood glucose levels was observed 10 min after administering sugar. Significant suppressive effects of the JAPE were observed except in the glucose load test, which indicated that the JAPE had no effect on glucose absorption and that the suppressive effects glucose levels were caused blood The isaccharidase inhibition. administration maltose and starch containing JAPE significantly suppressed blood glucose levels after 30 min in comparison to each control group (maltose: 174.8

Table 1 Kinetic parameters of disaccharidase inhibition with the JAPE

JAPE concentration	$K_{\scriptscriptstyle m}$	$V_{\rm max}$
Maltase		
control	2.5	3.9
$1 \mathrm{mg/m} \ell$	2.8	2.8
$2 \text{mg/m} \ell$	2.7	2.5
Sucrase		
control	23	1.6
$1 \text{mg/m} \ell$	21	1.4
$2 \text{mg/m} \ell$	20	1.4
Glucoamylase		
control	3.3	2.2
$1 \text{mg/m} \ell$	2.1	1.2
$2 \text{mg/m} \ell$	1.3	0.91
Isomaltase		
control	3.4	0.28
$1 \text{mg/m} \ell$	2.7	0.24
$2 \text{mg/m} \ell$	2.9	0.25
Lactase		
control	26	0.32
$1 \text{mg/m} \ell$	90	0.43
$2 \text{mg/m} \ell$	110	0.38
Trehalase		
control	7.3	1.3
$1 \text{mg/m} \ell$	6.4	1.2
$2 \text{mg/m} \ell$	7.0	1.2

 V_{max} , expressed as micromoles of substrate hydrolyzed·min $^{-1}$ ·mg $^{-1}$ protein or micromoles of glucose released ·min $^{-1}$ ·mg $^{-1}$ protein; K_m expressed as mM or ·mg/m ℓ ; V_{max} and K_m were calculated with Lineweaver-Burk plot.

 $\pm 4.9 \text{ mg/d}\ell$ vs $204.4 \pm 12 \text{ mg/d}\ell$ for control; starch: $170.8 \pm 12 \text{ mg/d} \ell \text{ vs } 185.7 \pm 9.4 \text{ mg/d} \ell \text{ for }$ control). The JAPE also showed the suppression in sucrose load test although it did not inhibit sucrase activity. JAPE used at a dose of 1,000 mg/kg BW resulted in a significant reduction of blood glucose levels up to 30 min (10 min: $142.6 \pm 9.4 \text{ mg/d} \ell$ vs $172.3 \pm 14 \text{ mg/d}\ell$ for control; 20 min: $144.8 \pm 8.0 \text{ mg}$ $/d\ell$ vs 168.7 \pm 8.9 mg/d ℓ for control; 30 min: 139.8 $\pm 8.5 \text{ mg/d}\ell$ vs $166.3 \pm 10 \text{ mg/d}\ell$ for control). The reason for this discrepancy between in vitro and in vivo results is unclear. However, the total sugar content in JAPE (phenol-sulfuric acid method) is approximately 60% (unpublished data), indicating that hydrolysates of JAPE from gastric digestion may inhibit sucrase activity. The area under the curve (AUC_{0-120min}) is shown in Table 2. There was

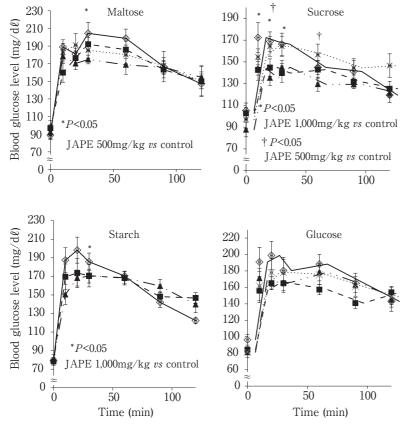


Fig.2 Suppressive effects of the JAPE on postprandial blood glucose levels in rats

Data are expressed as mean values with SE (n=6). —— \diamondsuit ——, Control; --- JAPE 1,000 mg/kg BW; --- JAPE 500 mg/kg BW; --- JAPE 250 mg/kg BW; --- JAPE 250 mg/kg BW

Table 2 Area under the curve (AUC_{0-120min}) of postprandial glucose levels in the absence and presence of the JAPE

JAPE concentration	$\mathrm{AUC}_{ ext{0-120min}}$ (mg \cdot min/d ℓ)
Maltose	
control	$21,400 \pm 1,274$
$250 \mathrm{mg/m}\ell$	$20,600 \pm 1,132$
$500 \mathrm{mg/m}\ell$	$19,792 \pm 830$
$1{,}000 { m mg/m}\ell$	$20,408 \pm 948$
Sucrose	
control	$17,635 \pm 984$
$250 \mathrm{mg/m}\ell$	$18,191 \pm 958$
$500 \mathrm{mg/m}\ell$	$15,714 \pm 545$
$1{,}000 \mathrm{mg/m}\ell$	$16,295 \pm 697$
Starch	
control	$19,174 \pm 506$
$500 \mathrm{mg/m}\ell$	$18,933 \pm 630$
$1{,}000 { m mg/m}\ell$	$18,926 \pm 898$
Glucose	
control	$20,745 \pm 1,312$
$250 \mathrm{mg/m} \ell$	$19,677 \pm 668$
$500 \mathrm{mg/m}\ell$	$19,523 \pm 777$
1,000mg/mℓ	$18,186 \pm 562$

Data are expressed as mean values with SE (n = 6).

no significant difference in the AUC calculated from each sugar load test, which suggests that the JAPE did not affect the amount of glucose absorption, but delayed digestion.

Conclusion

The JAPE inhibited maltase, glucoamylase, lactase but not sucrase, isomaltase, trehalase that were present in the samples from the small intestine. The inhibition modes for maltase, glucoamylase, and lactase were found to be mixed/non-competitive, competitive. uncompetitive. and respectively. Postprandial blood glucose levels were significantly suppressed when maltose, sucrose, and starch were administered with JAPE to rats. However, the JAPE had no effect on glucose absorption. The AUC_{0-120min} was not altered by the JAPE. These results indicate that the JAPE delayed carbohydrate digestion and subsequent absorption, but did not affect the amount of glucose absorbed. Hydroxycinnamic acid derivatives such as chlorogenic acids in JAPE may

partly contribute to disaccharidase inhibition. Thus, JAPE could be useful as a food ingredient to reduce the risk of developing hyperglycemia-induced disorder.

References

- 1) Blonde, L.: Benefits and risks for intensive glycemic control in patients with diabetes mellitus, Am. J. Med. Sci., 343, 17~20 (2012)
- 2) Van Beers, E. H., Büller, H. A., Grand, R. J., Einerhand, A. W. and Dekker, J.: Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 197 ~262 (1995)
- 3) Lebovitz, H. E.: α-Glucosidase inhibitors, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, **26**, 539~551 (1997)
- 4) Bhat, M., Zinjarde, S. S., Bhargava, S. Y., Kumar, A. R., and Joshi, B. N.: Antidiabetic Indian plants: a good source of potent amylase inhibitors, *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2011, 810207 (2011)

- 5) Benalla, W., Bellahcen, S. and Bnouham, M.: Antidiabetic medicinal plants as a source of α -glucosidase inhibitors, *Curr. Diabetes Rev.*, **6**, 247 \sim 254 (2010)
- 6) YILMAZER-MUSA, M., GRIFFITH, A. M., MICHELS, A. J., SCHNEIDER, E. and FREI, B.: Grape seed and tea extracts and catechin 3-gallates are potent inhibitors of α-amylase and α-glucosidase activity, J. Agric. Food Chem., 60, 8924~8929 (2012)
- Kumar S., Narwal, S., Kumar, V. and Prakash,
 α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes, *Pharmacogn Rev.*, 5, 19~29 (2011)
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N. and Matsumoto, K.: α-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins.
 α-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1952~1956 (2001)
- 9) Matsui, T., Ebuchi, S., Fukui, K., Matsugano, K., Terahara, N. and Matsumoto, K.: Caffeoylsophorose, a new natural α-glucosidase inhibitor, from red inegar by fermented purple-fleshed sweet potato, *Biosci.*, *Biotechnol.*, *Biochem.*, **68**, 332~339 (2004)
- 10) Matsui, T., Ebuchi, S., Fujise, T., Abesundara, K. J. M., Doi, S., Yamada, H. and Matsumoto, K.: Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1797~1803 (2004)
- 11) MITANI, T., HORINISHI, A., KISHIDA, K., KAWABATA, T., YANO, F., MIMURA, H., INABA, N., YAMANISHI, H., OE T., NEGORO, K., MORI, H., MIYAKE, Y., HOSODA, A., TANAKA, Y., MORI, M. and OZAKI, Y.: Phenolics profile of mume, Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruit, *Biosci.*, *Biotechnol.*, *Biochem.*, 77, 1623~1627 (2013)
- 12) OKI, T., MATSUI, T. and OSAJIMA, Y.: Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 550~553 (1999)
- 13) OKU, T., TANABE, K., OGAWA, S., SADAMORI, N. and NAKAMURA, S.: Similarity of hydrolyzing activity of human and rat small intestinal disaccharidases, *Clin. Exp. Gastroenterol.*, **4**, 155 ~ 161 (2011)
- 14) Kessler, M., Acuto, O., Strelli, C., Murer, H., Muller, M. N. and Semenza, G.: A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush

- border membranes, *Biochem. Biophys. Acta.*, **506**, 136~154 (1978)
- 15) Dahlqvist, A.: Method of assay of intestinal disaccharidases, *Anal. Biochem.*, **7**, 18~25 (1964)
- 16) Oku, T., Yamada, M., Nakamura, M., Sadamori, N. and Nakamura, S.: Inhibitory effects of extractives from leaves of *Morus alba*on human and rat small intestinal disaccharidase activity, *Br. J. Nutr.*, **95**, 933~938 (2006)
- 17) Nakamura, S., Aki, M., Hashiguchi-ishiguro, M., Ueda, S. and Oku, T.: Inhibitory effect of depolymerized sodium alginate by *Vibrio alginolyticus* SUN 53 on intestinal brush border membrane disaccharidase in rat, *J. Jpn. Assoc. Dietary Fiber Res.*, 12, 9~15 (2008)
- 18) Goda, T., Yamada, K., Hosoya, N. and Moriuchi, Y.: Effects of α-glucosidase inhibitor BAY g 5421 on rat intestinal disaccharidases, *Eiyo To Shokuryo*, 34, 139~143 (1981)
- 19) NICHOLS, B. L., ELDERING, J., AVERY, S., HAHN, D., QUARONI, A. and STERCHI, E.: Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. Homology to sucrase-isomaltase, *J. Biol. Chem.*, **273**, 3076~3081 (1998)
- 20) Dahlqvist, A. and Semenza, G.: Disaccharidases of small intestinal Mucosa, *J. Pediatr. Gastroenterol*, *Nutr.*, **4**, 857~867 (1985)
- 21) Fogarty, W. M. and Benson, C. P.: Purification and properties of a thermophilic amyloglucosidase from *Aspergillus niger, Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 271~278 (1983)
- 22) Kamitani, Y., Iwai, K., Fukunaga, T., Kimura, R. and Nakagiri, O.: In vitro analysis on inhibitory activity of amylolytic enzymes in decaffeinated green coffee bean extracts and contributions of chlorogenic acids, *J. Jpn. Soc. Food. Sci.*, **56**, 336~342 (2009)

ウメ由来ポリフェノールは ラット小腸二糖類水解酵素を阻害し, 食後血糖値を改善する

岸田邦博*・鈴木雅也*・部屋雄一* 山崎祐大*・堀西朝子*・尾崎嘉彦* * 近畿大学生物理工学部食品安全工学科 (〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷930)

ウメ由来ポリフェノール抽出物 (JAPE) を用いて, ラット小腸二糖類水解酵素への阻害活性ならびに食後血 糖値上昇抑制作用を検討した。JAPEは、マルターゼ、 グルコアミラーゼ, ラクターゼに対して阻害作用を示し, 阻害様式はそれぞれ混合型非拮抗阻害, 不拮抗阻害, 拮 抗阻害であった。スクラーゼ、イソマルターゼ、トレハ ラーゼに対しては阻害作用を示さなかった。ラットへの 経口糖負荷試験では、マルトース、スクロース、デンプ ン投与時にJAPEによる有意な血糖値上昇抑制作用が認 められ、グルコース投与時には、有意な影響は認められ なかったことから、JAPEはグルコース吸収には影響せ ず、血糖値上昇抑制作用は二糖類水解酵素阻害によるこ とが示唆された。AUC_{0-120min}は変化がなかったことから, JAPEはグルコース吸収量には影響しなかった。JAPE に含まれるヒドロキシ桂皮酸誘導体が二糖類水解酵素阻 害にある程度関与していると考えられる。これらの知見 より、JAPEは2型糖尿病や肥満などの生活習慣病のリ スクを減らす食品素材として有用である可能性が示され た。

(平成26年1月9日受付,平成26年4月7日受理)

高血圧自然発症ラットにおけるカムカム果汁投与による 血圧抑制に内皮型一酸化窒素合成酵素が与える影響

田中弘之*18·樫村修生*2·鈴木健太*2·豊原秀和*2

*1 東京家政学院大学現代生活学部健康栄養学科 *2 東京農業大学国際食料情報学部

Endothelial Nitric Oxide Synthase Suppresses Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats by Oral Administration of CamuCamu (*Myrciaria dubia*) Fruit Juice

TANAKA Hiroyuki*1\$, KASHIMURA Osamu*2, SUZUKI Kenta*2 and TOYOHARA Hidekazu*2

- * 1 Department of Health and Nutrition Faculty of Contemporary Human Life Science, Tokyo Kasei Gakuin University, 22 Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102–8341
- * 2 Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

Involvement of active vasoconstriction substances of sympathetic nervous system, endothelial cell dependent vasorelaxation substances and constriction substances of renin-angiotensin system in blood pressure suppression by oral administration of Camu-Camu (Myrciaria dubia) fruit juice was investigated. Wister-Kyoto rats (WKY) and SHR were used and divided into WKYW and SHRW groups given by water, and WKYC and SHRC groups given by Camu-Camu fruit juice 0.25ml (total polyphenol content 337µg, Vitamin C content 2.25mg). When measuring blood pressure by insertion method of carotid artery catheter, norepinephrine (NE) losartan and L-NAMA were orally administered and involvement of angiotensin II and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in blood pressure suppression was evaluated. In administration of orally Losartan, blood pressure in SHRC was less increased than in SHRW, suggesting that those except for angiotensin ATII involved blood pressure suppression. Blood pressure of SHRC was significantly increased as compared with that of SHRW. Response of removed thoracic aorta to NE, acethylcoline, phenylphrine (PHE) in Kerbs ringer liquid was examined. Vasoconstrictive response elicited from active substances of sympathetic nervous systems showed more desensitization in SHRC than SHRW and vasorelaxation response elicited from endothelial dependent relaxation substances was accelerated. Blood pressure measurement by insertion method of catheter and tension measurement of removed thoracic aorta revealed the enhancement of eNOS in SHR by oral administration of Camu-Camu fruit juice.

(Received Jun. 17, 2013; Accepted Jan. 22, 2014)

Key words: L-NMMA, Losartan, NO, acethylcholine, norepinephrine, phenylephrine ロサルタン,一酸化窒素,アセチルコリン,ノルエピネフリン,フェニルレフリン

高血圧,動脈硬化,糖尿病,脂質異常症などは,血管内皮機能障害など様々な要因から引き起こされる¹⁾。なかでも,高血圧は脳卒中の最も危険な因子とされ,臓器障害や心血管病の合併が深く関与すると指摘されている²⁾。

一酸化窒素(Nitric oxide, NO)はL-アルギニンを基質として、NO合成酵素(NO synthase, NOS)により生成される。内皮型一酸化窒素合成酵素(endothelial NOS, eNOS)から産生されたNOは、内皮機能障害などの心血管性の恒常性維持に重要な役割を果たしている³¹。

^{* 1 〒102-8341} 東京都千代田区三番町22

[§] Corresponding author, E-mail:tnkhiro@kasei-gakuin.ac.jp

^{* 2 〒156-8502} 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

また,血管平滑筋におけるサイクリックGMP(Guanosine monophosphate, cGMP) 増大を通じて,弛緩反応を誘発し,NO産生が増加することも知られている 40 。さらに,血管内皮細胞におけるNOS活性の低下により,血管弛緩に関与するNO量の減少が,高血圧に関与することも報告されている 10 。

一方,血圧の調節に関与するレニン-アンギオテンシ ン (Angiotensin, AT) 系において、ATIをATIIに変 換する酵素であるAT変換酵素(AT converting enzyme, ACE) は、血圧の調節に関与する因子であり、ATIIは、 強力な血管収縮作用のあることが知られておりり、その AT II には、AT-1とAT-2の2種類の受容体が存在する⁶⁾。 特にAT-1受容体は、血管平滑筋などに分布し、血管収 縮作用,血管壁肥厚作用,動脈硬化作用,心筋肥大作用 を介している。このAT系の障害は、病態生理学的にみ ても高血圧, 腎臓病および心不全などに関与することが 知られているで、なかでも、高血圧の発症および悪化に 関与する要因として、ACE活性の増大8,血管平滑筋に 関与する血管収縮物質であるATⅡの増大®などが関与 するとされている。このことから、 高血圧の改善メカニ ズムとして、間接的にeNOS活性の増大、あるいはACE 活性の抑制が部分的に関与する可能性が推察される。

カムカム(フトモモ科,学名 Myrciaria dubia)は,南米ペルーに自生する植物である。果実中にビタミン B_1 ,ビタミン B_2 ,ビタミンC,ナイアシン,クエン酸,カルシウムなどが豊富に含まれているが 10 ,近年,それらの成分以外に,果皮中に高血圧を抑制するとされるポリフェノール類を多く含むことが報告されている 11 。また,アマゾン熱帯雨林地域に自生するカムカム果実には,ポリフェノールの一種であるアントシアニンを豊富に含むことが報告されている 12 。

一般的に、ポリフェノールを多く含む赤ワイン®、緑茶および紅茶¹³、ココア¹⁴、チョコレート¹⁵、ブルーベリー¹⁶などには、高血圧を抑制する働きやフラボノール、カテキン、アントシアニンなどに分類されるフラボノイド類は、脳卒中や心臓病など動脈硬化性疾患のリスクを低下させる可能性があることが報告されている¹७。また、野菜や果物などに含まれるビタミンCは、本態性高血圧疾患者の血圧上昇を抑制する働きのあることが報告されている¹®。さらに、VASDEVら¹٩の研究では、12週齢の高血圧自然発症モデルラット(spontaneously hypertensive rat、SHR)に対してビタミンCを9週間に渡り与えた結果、収縮期血圧の低下、アルデヒド結合および有害な腎血管性変化が改善することを報告している。

樫村らは、若齢のSHRにカムカム果皮抽出液を 5 週間経口投与した結果、体重や心拍数に影響は認められないが、収縮期および拡張期血圧の上昇が顕著に抑制されることを報告し、カムカム果皮中に含有する高濃度のポリフェノール類が血圧上昇抑制に関与することを推察している¹¹¹。また、彼らは、SHRの摘出胸部大動脈において、

カムカム果皮抽出液投与により、ノルエピネフリン (Norepinephrine, NE) およびフェニレフリン (Phenylephrine, PHE) に対する収縮反応は有意に低下し、アセチルコリン (Acetylcholine, Ach) に対する弛緩反応は有意に増大することを見い出し、カムカム果皮に豊富に含まれるポリフェノール類が、SHR血管内皮細胞の損傷を修復し、血管弛緩物質であるNOの放出を促進させる可能性があることを示唆している 20 。

INOUEら²¹⁾は、男性喫煙者にカムカム果汁100%を7日間継続的に与えた結果、ビタミンCを与えた群と比較して、カムカム果汁投与群で抗酸化作用および抗炎症作用をより強力にしたことから、カムカム果汁には、強力な抗酸化作用および抗炎症作用があることを報告している。

しかしながら、カムカム果汁投与が生理作用に及ぼす研究データは少ないのが現状である。そこで本研究では、カムカム果汁投与による血圧上昇抑制作用に対する血管内皮細胞および血管平滑筋への関与について明らかにするため、市販されているカムカム果汁100%をSHRに5週間経口投与し、血圧の上昇抑制に対する交感神経系活性収縮物質、内皮細胞由来弛緩物質、レニン・アンジオテンシン系収縮物質および平滑筋由来弛緩物質の各関与について、カテーテル挿入による覚醒状態での体血圧測定および摘出大動脈による張力測定により、その血管反応の変化を検討した。

実験方法

1. 動 物

- (1)実験動物および飼育条件 実験には、本態性高血圧疾患モデルとして開発されたSHR(SHR/NCri、日本チャールズ・リバー社 5 週齢の雄性)、対照として正常血圧モデルラット(Wistar Kyoto Rat, WKY)である(WKY/NCri、日本チャールズ・リバー社)をそれぞれ20匹ずつ用いた。ラットは1週間安静飼育した後、下記の4群に分け、5週間、ラット専用の動物飼育制御装置(クリーンラック、日本医化器機製作所(株))内で飼育した。飼育環境は、室温約23 $^{\circ}$ になるようにエアコンにより調整した。餌はラット用固形飼料(オリエンタル酵母、MF)、水は水道水を自由摂取させた。
- 1) SHRカムカム投与群(以下, SHRC群): 10匹の 雄性SHRには、1日1回5週間毎日カムカム果汁液をテ フロン製経口ゾンデ(イナリサーチ)に用いて食道内に 慎重に投与した。
- 2) SHR水投与群(以下, SHRW群): 10匹の雄性SHR には, 1日1回5週間毎日水道水を上記と同様の方法で投与した。
- 3) WKYカムカム投与群(以下, WKYC群):10匹の 雄性WKYには,1日1回5週間毎日カムカム果汁液を 同様の方法で投与した。
- 4) WKY水投与群(以下, WKYW群):10匹の雄性 WKYには, 1日1回5週間毎日水道水を同様の方法で

投与した。

- 5) 体血圧測定と血管張力測定:各群を2分し、カテーテル挿入による体血圧の測定とリング標本の作製と血管張力の測定実験を行った。
- (2) カムカム果汁液ならびに水投与条件 カムカム 果汁100%(総ポリフェノール量 $337\mu g$,メルカード農大(株))をHPLC法によりビタミンC量を分析した結果から,カムカム果汁液の1日1回の投与量は, $0.25m \ell$ (総ポリフェノール含量 $337\mu g$,ビタミンC量2.25m g)とした。対照投与として水道水を同量投与した。

(3) 測定項目

- 1)体重,血圧および心拍数の測定:飼育開始から1週目は、体重測定および血圧測定に慣らすため、毎日のハンドリングと2回の体重測定を実施した。2週目からは、毎週、体重および血圧の測定を行った。血圧は、非観血式自動血圧測定装置(ソフトロン、BP-98A)により測定した。血圧は、あらかじめ20分間ラットを固定器(保温装置38℃)に留置し、尾動脈に血流がある状態を確認後、収縮期血圧、拡張期血圧および心拍数の測定を5回実施し、最高ならびに最低値を除いた3回の値からそれぞれの平均値を算出した。測定時刻は、明期の午前中8:00から12:00の間に測定した。
- 2) カテーテル挿入による体血圧の測定:5週間飼育 期間終了後、各群ペントバルビタール麻酔下(30mg/kg 体重i.p.) において、ヘパリンを添加し生理食塩水で 満たしたポリエチレン製カテーテル (SP-45, 夏目製作 所)を右総頸動脈へ3cm挿入し、大動脈弓付近に留置し た。また、別のヘパリン添加し生理食塩水で満たした特 製ビニール製カテーテル (SV-10, 夏目製作所)を右頚 静脈から5cm挿入し、右心室に留置した。各カテーテル 挿入時は、カテーテルを血圧測定システム(TP-300T, 日本光電) および記録計 (RTA-1100, 日本光電) に接 続し, 圧波形を確認しながら挿入を行った。各カテーテ ルは、皮下を通し頭頂部に導出し、カプセル内に保管し た。カテーテル手術24時間後、完全覚醒状態において、 再び体血圧用カテーテルを血圧測定システムおよび記録 計に接続した。体血圧は、記録計の脈波から平均血圧を 算出した。心拍数は、記録計の脈波から算出した。安静 にて30分間測定後, 頚静脈に挿入したカテーテルから順 に (NE, Losartan, Losartan + NE), (NE, L-NMMA, L-NMMA+NE) 薬品を注入し、血圧および心拍数を測定 した。
- 3) **リング標本の作製と血管張力の測定**: 各群 5 匹ずつ, 5 週間の飼育期間終了後,ペントバルビタール麻酔下 (50mg/kg 体重i.p.) で脱血し,胸部大動脈 (長さ 5 mm)を 2 本摘出した。摘出血管は,10mℓのKrebs ringer (Sigma社)液の入ったティシュオーガンバス内に留置し,ステンレス製の 2 本の針により 5 g の張力伸展をした。張力の測定は,圧力トランスデューサー (LVS,

Kyowa) にデジタルインジケーター (F430, Unipulse) を接続して行った。その後、10分間隔で3度リングを Krebs ringer液でwash outし,再び5g張力に調整し た。その後、摘出血管は、40mMKClによる収縮反応を 30分間確認した後、再びKrebs ringer液で10分間隔3回 wash outを 行い, 再 び 5 g の 張 力 に 調 整 し た。 Norepinephrine (NE, (Sigma社)) は10-8Mから10-4M 濃度の5段階でオーガンバス内に10分間隔で添加し、濃 度依存性張力変化を測定した。NEの最大張力(10⁻⁴ M) 状態から、Acetylcholine (Ach, (Sigma社)) は10⁻⁹ から10⁻⁵M濃度5段階でオーガンバス内に10分間隔で添 加し、濃度依存性張力変化を測定した。その後、Krebs ringer液でwash outを10分間隔で3回行い,再び張力 を 5 g に調整した。その後、Phenylephrine (PHE、(Sigma 社)) を10⁻⁸Mから10⁻⁴M濃度の4段階でオーガンバス内 に10分間隔で添加し、濃度依存性張力変化を測定した。 その後,再びKrebs ringer液でwash outを3回10分間 隔で行った。引き続いて100μgのN^G-Monomethyl-Larginine, acetate (L-NMMA, (Sigma社)) をオーガン バス内に添加し30分間経過後,再びPHEを10⁻⁸Mから10⁻⁴ M) まで添加して濃度依存性張力変化を測定した。

別の摘出血管は、10分間隔で3度リングをKrebs ringer液でwash outし、5g張力に調整した。その後、摘出血管は、40mMKClによる収縮反応を30分間確認した後、再びKrebs ringer液で10分間隔3回wash outを行い、再び5gの張力に調整した。その後、Sodium nitropurussid(SNP)を 10^{-10} Mから 10^{-6} M濃度の5段階でオーガンバス内に10分間隔で添加し、濃度依存性張力変化を測定した。その後、Krebs ringer液でwash out を10分間隔で3回行い、再び張力を5gに調整した。その後、AT II を 10^{-12} Mから 10^{-8} Mの4段階でオーガンバス内に添加し、濃度依存性張力変化を測定した。

得られた各濃度依存性収縮反応は、40mM KCIによる収縮反応で得られた最大収縮反応に対する割合(%)で示した。さらに、X軸を濃度(-log M 対数表示)とY軸を収縮割合による曲線回帰を算出するとともに、50%収縮反応に対するNE,PHEおよびSNP平均濃度を求め、各薬品に対する収縮感受性を示す値(IC50)とした。また、Ach濃度依存性弛緩反応は、NE最大収縮反応(10⁻⁴M濃度)に対する割合(%)で示した。さらに、X軸を濃度として、Y軸を弛緩割合で曲線回帰を算出し、50%弛緩反応に対するAch平均濃度を求め、Achに対する弛緩感受性反応(ED50)とした。

4)統計処理:図や本文に示したすべての値は、平均値および標準偏差で表示した。各群間における有意差検定は、二元配置分散分析で解析し、Schéffeの多重比較検定を用いて行った。また、各群間の有意差の検定は、すべて危険率5%水準で示した。なお、この実験は東京農業大学実験動物委員会の承認を得て実施した。

結 果

1. 体 重

体重は、WKYW(投与前113±3.1g,投与後327±11.3g)とWKYC(投与前121±3.5g,投与後330±13.0g)およびSHRW(投与前109±2.5g,投与後278±9.9g)とSHRC(投与前114±5.0g,投与後279±12.1g)との群間と各系統で非投与群,投与群の体重増加にそれぞれ有意差は認められなかった。

2. 収縮期血圧および拡張期血圧の変化

Fig. 1およびFig. 2は、4群における投与前から投与後5週間における収縮期血圧および、拡張期血圧の変化をそれぞれ示した。投与前から投与後における収縮期血圧と拡張期血圧は、WKYCおよびWKYW群と比較して、SHRCおよびSHRW群で有意に高い値を示した(p<0.05)。また、投与8週から10週間目の収縮期血圧と拡張期血圧は、SHRC群はSHRW群に比較して、有意に低い値を示した(p<0.05)。しかし、投与8週間および10週間後の収縮期血圧および拡張期血圧は、WKYCとWKYWの群間に有意な差は認められなかった。

カムカム果汁投与による体血圧におよぼすNEおよびLosartanの影響

Fig. 3は、各群におけるα交感神経受容体を介する平 滑筋収縮反応に関与するNE、AT-I受容体を遮断する

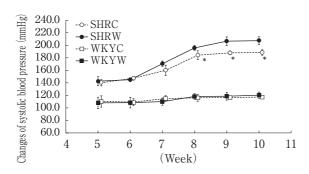


Fig. 1 Changes of systolic blood pressure in SHRC, SHRW, WKYC and WKYW rats.

p < 0.05 vs SHRW

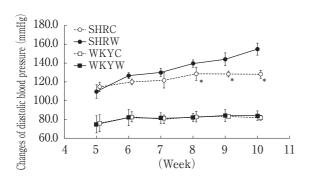


Fig. 2 Changes of diastolic blood pressure in SHRC, SHRW, WKYC and WKYW rats.

*p < 0.05 vs SHRW

LosartanおよびNE+Losartan投与時の体血圧の変化を示した。Controlにおける体血圧は、WKY群に比較してSHR群が高値を示したが、SHRC群はSHRW群に比較して有意な低値(p<0.05)を示した。

NE投与時における体血圧はControlと比べて、各群とも上昇した。Losartan投与²²⁾時(79µmol/kg)における体血圧は、NE投与群に比べて各群とも下降した。NEとLosartanの同時投与における体血圧は、Losartan投与群に比べて各群とも上昇した。NEまたはLosartan単独投与時の体血圧は、SHRW群に比較してSHRC群で有意に低くかった(p<0.05)。

LosartanとNE同時投与はLosartan単独投与よりも体血圧は上昇しているが、SHRC群は、SHRW群に比較すると体血圧は有意に低かった(p<0.05)。

4. カムカム果汁投与による体血圧に与えるNEおよび NOSを阻害するL-NMMAの影響

Fig. 4は,各群におけるNE,L-NMMAおよびNEとL-NMMA同時投与の体血圧の変化を示した。

Control, NEは、Fig. 3と同様であったが、L-NMMA 単独投与およびNEとL-NMMA同時投与における体血圧 は、SHRC群とSHRW群との間に差はなかった。L-NMMA単独投与によるControlからの体血圧上昇の変化 量において、SHRC群(平均値48±6 mmHg)は、SHRW

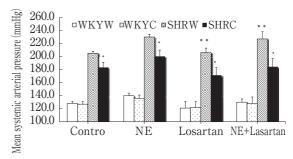


Fig. 3 Mean systemic arterial pressure after NE, Losartan and combined treatment of NE and Losartan in WKYW, WKYC, SHRW and SHRC rats.

Values are means \pm SD. *p<0.05 vs. same treatment in SHRW rats. **p<0.05 vs. same treatment in SHRW rats.

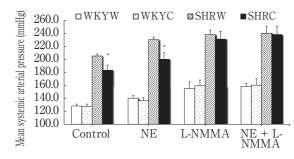


Fig. 4 Mean systemic arterial pressure after NE, L-NMMA and combined treatment of NE and L-NMMA in WKYW, WKYC, SHRW and SHRC rats.

Values are means \pm SD. *p<0.05 vs. same treatment in SHRW.

群(平均値33±9 mmHg)に比較して有意に高かった(p <0.05)。また、NEとLosartan同時投与によるNE単独投与からの体血圧上昇の変化量も、SHRC群(平均値38 \pm 5 mmHg)は、SHRW群(平均値10 \pm 3 mmHg)に比較して、有意に高かった(p<0.05)。

Controlにおける体血圧は、WKY群に比較してSHR群が高値を示したが、SHRC群はSHRW群に比較して有意な低値(p<0.05)を示した。L-NMMA単独投与時の体血圧上昇の変化量は、Controlと比較して、各群で(WKYW: 27 ± 6 ,WKYC: 32 ± 5 ,SHRW: 33 ± 9 ,SHRWC: 48 ± 6 mmHg)上昇した(p<0.05)。NE投与時の体血圧上昇は、SHRW群に比較してSHRC群で有意に小さく(p<0.05),L-NMMA単独投与もしくはNEとL-NMMA同時投与による体血圧上昇量は、NE単独投与より有意に増大した(p<0.05)。

5. NE, Ach, PHEによる摘出大動脈濃度依存性反応

各群における40mMKCl投与における摘出大動脈収縮 張力は、WKYW群1.23±0.15g,WKYC群1.31±0.18, SHRW群1.43±0.21, SHRC群1.44±0.2であり、各群 間の収縮張力に差はみられなかった。

Fig. 5は、各群におけるNEによる摘出大動脈濃度依存性収縮反応を示した。NE添加による摘出大動脈収縮反応は、WKYW群とWKYC群の間には差はみられなかったが、SHRW群に比較してSHRC群でNE濃度 10^{-6} から 10^{-4} Mまで有意に低値を示した(p<0.05)。また、NEに対する収縮感受性濃度(IC_{50} 、 $-\log$ M)は、SHRW群7.69±0.22に比較してSHRC群で7.19±0.23と有意に高濃度を示した(p<0.05)。

Fig. 6は、各群における副交感神経伝達物質Achの濃度依存性弛緩反応を示した。Achの濃度依存性弛緩反応

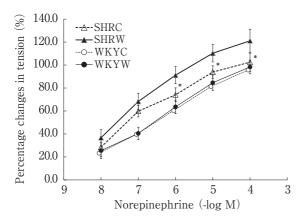


Fig. 5 Concentration effect of the contaction response to NE in isolated thracic aortae in SHRC, SHRW, WKYC and WKYW rats. Results are expressed as a percentage of response to 40 mM KCl and are presented as means ± SD.

は、WKYW群とWKYC群の間には差はみられなかったが、SHRCは、SHRWに比べて濃度が 10^{-7} から 10^{-5} Mで有意に割合が低かった (p<0.05)。また、Achに対する弛緩感受性濃度 (ED $_{50}$, $-\log$ M) は、SHRW群7.05±0.17に比較してSHRC群で7.71±0.31と有意 (p<0.05)に低濃度を示した。

Fig. 7は、各群における交感神経伝達物質PHEの濃度 依存性収縮反応を示した。PHEの濃度依存性収縮反応 は、WKYW群とWKYC群の間に差はみられなかったが、

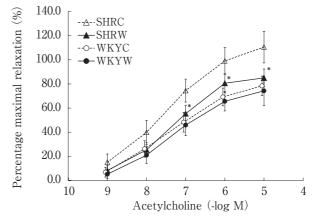


Fig. 6 Concentration effect of the relaxation response to ACh) in isolated thracic aortae in SHRC, SHRW, WKYC and WKYW rats.

Results are expressed as a percentage of response to NE $(10^{-4}$ M, maximal contraction) and are presented as means \pm SD.

* indicated ACh concentrations at which aortae of SHRC had more constrictive responses than SHRW at concentarions of 10^{-7} to 10^{-5} M (p<0.05).

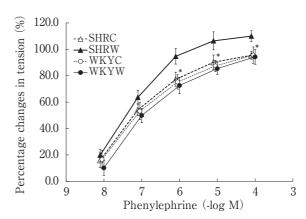


Fig.7 Concentration effect of the contaction response to phenylephrine (PHE) in isolated thracic aortae in SHRC, SHRW, WKYC and WKYW rats.

Results are expressed as a percentage of response to $40\,\mathrm{mM}$ KCl and are presented as means \pm SD.

* indicated PHE concentrations at which aortae of SHRC had less constrictive responses than SHRW at concentarions of 10^{-7} to 10^{-4} M ($p\!<\!0.05$).

^{*} indicated NE concentrations at which aortae of SHRC had less constrictive responses than SHRW at concentarions of 10^{-6} to 10^{-4} M (p<0.05).

SHRCは、SHRWに比べて濃度が 10^{-6} から 10^{-4} Mで有意に収縮割合が低かった(p<0.05)。また、PHEに対する収縮感受性濃度(IC_{50} 、 $-\log$ M)は、SHRW群7.30 ± 0.29 に比較してSHRC群で 6.84 ± 0.14 と有意(p<0.05)に高濃度を示した。

Fig. 8は、平滑筋由来弛緩物質であるSNPの濃度依存性弛緩反応を示した。Fig. 9は、L-NMMAでベースライン後によるPHEの濃度依存性収縮反応を示した。SNPの濃度依存性弛緩反応およびPHEの濃度依存性収縮反応において、それぞれSHRCは、SHRWに比べて有意差は無かった。

考 察

本研究において、カムカム果汁の投与は、体重や心拍数に影響を与えないが、SHRに対して血圧上昇を顕著に抑制させる効果があることが明らかになった。

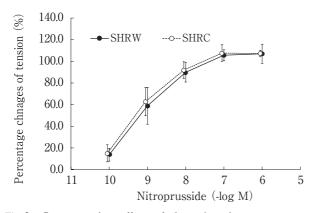


Fig.8 Concentration effect of the relaxation response to SNP in isolated thracic aortae in SHRW and SHRC rats.

Results are expressed as a percentage of response to $40\,\mathrm{mM}$ KCl and are presented as means $\pm\,\mathrm{SD}$.

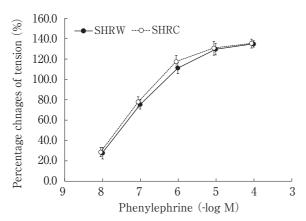


Fig.9 Concentration effect of the contaction response to PHE after treatment of L-NMMA in isolated thracic aortae in SHRW and SHRC rats.

Results are expressed as a percentage of response to $40\,\mathrm{mM}$ KCl and are presented as means \pm SD.

NOは、血流や血圧の調節に関与することが明らかになり、NO依存性の血管拡張性は、脈圧伸張、血流、ずり応力(Shear stress)などにより血管内皮細胞が活性化させることで維持されている 23 。また、NOは、L-アルギニンを基質として、NOSにより合成されることが知られている。一方で、血流調節には、eNOS由来NOが内皮由来血管弛緩因子(EDRF)として重要な役割を果たしており、血流によりもたらされるずり応力によってeNOSが活性化されることにより、血管径が拡張し、血流が調節される 24 。

本研究で用いたSHRは、大動脈において内皮依存性の 弛緩が L-アルギニンのニトロ化合物により阻害されており、この結果、血管内皮細胞からのNO遊離が極端に減少している可能性が強いと報告されている²⁵⁾。このよう な特徴を持つSHRにカムカム果汁を投与したことによって、内皮細胞の修復が行われた可能性が示唆された。

本研究において, 交感神経伝達物質であるNEによる 大動脈収縮反応は、WKY群に比較してSHR群で大きか った。これは、SHRにおける大動脈血管平滑筋細胞は、 交感神経伝達物質の刺激によりCa²⁺貯蔵部位からの流出 およびCa²⁺チャネルの活性化にともない、細胞内Ca²⁺を 増加させ収縮が増強されたことが考えられる²⁶⁾。SHRで は、カムカム果汁投与により交感神経伝達物質NEに対 する大動脈血管収縮反応が顕著な抑制を示したが、WKY においては、カムカム果汁を投与してもその収縮抑制は 認められなかった。この一連の反応は、NEだけでなく PHEに対する収縮反応においてもみられ, SHRの高血 圧は, α交感神経受容体を介する平滑筋収縮反応に関与 するもの200であることがわかっている。カムカム果汁を 投与したSHRでは, α交感神経伝達物質に対する受容体 の反応性変化が生じ、血管平滑筋細胞内Ca²⁺の減少によ り収縮反応が減弱していることが推察された。

NEは血管平滑筋を収縮させるが、同時にNOを遊離さ せて収縮を抑制する。この抑制は内皮α交感神経受容体 を介する弛緩反応であることも報告されている
っ。この ことからSHRの大動脈では、内皮α交感神経受容体を介 するNOによる弛緩反応に明らかな障害が生じているこ とが考えられ、血管に対して交感神経伝達物質に対する 受容体と内皮依存性弛緩因子が相互に関連し血管の張力 状態が維持されていることが推察された。一方、NOは 活性酸素により不活性化されるため、SHRでは酸化スト レスによりNOの不活性化が亢進している可能性がある。 このため、ビタミンC存在下でNE収縮を観察すると、 SHRにおける血管内細胞機能障害改善が回復した報告が なされている²⁸⁾。また、AT-1受容体の遮断剤である LosartanによりATIIの関与を検討した結果, SHRW群 では、Losartan投与とNE+Losartan投与間の血圧の上 昇は有意に大きいが、SHRC群では、Losartan投与とNE +Losartan投与間の血圧の上昇に有意差はなかった。す なわちSHRW群に比較すると血圧の上昇は小さかった。

このことにより、SHRにカムカム果汁を投与した際の血圧上昇の抑制には、ATIIの関与がないことが考えられた。また、eNOS阻害剤であり、血管からのNOの放出を完全に遮断するL-NMMAをカテーテルから投与したことにより、各群で血圧は上昇した。特徴的なのは、SHRC群はNEによる血圧上昇がSHRW群に比較して有意に小さいが、L-NMMA単独投与もしくはNEとL-NMMA同時投与によって血圧上昇量は、有意に増大することが明らかとなった。このことから、カムカム果汁投与により、血圧上昇が抑制されることに大動脈血管内皮細胞で合成されるeNOSが関与している可能性が考えられる。

交感神経系活性物質であるNE,PHEによる摘出大動脈 における濃度依存性収縮反応は、SHRW群に比較して SHRC群で収縮の割合が有意に低値を示し、収縮感受性 濃度 (IC50) は、SHRW群に比較してSHRC群で高濃度 を示した。さらに平滑筋由来弛緩物質のSNPの濃度依存 性弛緩反応とNOS阻害薬のL-NMMAでベースライン後 のPHEの濃度依存性収縮反応は、SHRW群とSHRC群の 有意差がなかった。一方、内皮細胞由来弛緩物質のAch の濃度依存性弛緩割合は、SHRCは、SHRWに比べて収 縮の割合が有意に低値を示し、弛緩感受性濃度(ED50) は,有意に低濃度を示した。このことから,カムカム果 汁投与によりAchに対する血管弛緩反応は顕著に増大し た。つまり、SHRにおいてAchに対する弛緩反応に障害 がないにもかかわらず、カムカム果汁の投与により、弛 緩反応が増大したことは、内皮由来弛緩因子であるNO の遊離が増大した可能性が考えられる。内皮由来弛緩因 子であるNOは、Achにより血管内皮細胞から放出し、 平滑筋に作用し細胞内でcGMPを産生し、筋弛緩がもた らされる^{11),20)}。また、Achに対する血管弛緩反応の増大 はWKYWおよびWKYCでは観察されなかったことから、 高血圧症血管における特異的に弛緩反応であることがわ かった。

SHRにおいて、Achにより遊離されるNOは減少することが報告されている²⁰⁾。このことから、SHRの動脈において、カムカム果汁の投与によりAchに対する感受性が亢進し、NOの産生が増加した可能性が考えられる。

ビタミンCは、本態性高血圧疾患者において、動脈血管で一酸化窒素合成生成障害を修復し一酸化窒素経路を活性化し血管内皮依存性弛緩反応を一部改善すると報告されている¹⁸。また、ポリフェノールも血小板凝集抑制、血管内皮細胞の障害抑制^{90,200}、活性酸素種産生の減少により血管内皮細胞機能障害を修復すると報告²⁰⁰されており、いずれも、高血圧を改善する要因となっている。本研究で用いたカムカム果汁の成分には、ポリフェノール類およびビタミンCが豊富に含まれていることから、SHRC群の血圧上昇抑制の原因として、これらの成分単独、あるいはその組み合わせが関与している可能性が考えられる。

要 約

本研究では、ビタミンCおよびポリフェノール類を豊 富に含むカムカム果汁を用いて、SHRおよびWKYに5 週間投与すると血圧が抑制されることが明らかとなった。 その血圧上昇抑制のメカニズムについて, カテーテル挿 入による覚醒状態の体血圧変化および摘出大動脈による 張力変化を測定し, 交感神経系活性収縮物質, 内皮細胞 由来弛緩物質、レニン・アンギオテンシン系収縮物質な どの関与の面から検討した。その結果, 摘出大動脈によ る張力測定結果からNE収縮感受性の減弱、さらにカテ ーテル挿入の覚醒状態において、ATI受容体遮断剤であ るLosartan投与により血圧が増大したことから、カムカ ムはこの受容体の関与しない血圧抑制作用の可能性が推 察された。この高血圧抑制には、カムカムに多く含有す るポリフェノール類がアンギオテンシン系に関与したこ とが推察される。また、NE,PHE投与下において平滑筋 へのα受容体に作用するCa濃度以外の作用が示唆された。 さらに、カムカムはAchの感受性を高め、PHEの感受性 を鈍らせたことから, 血管内皮細胞の修復にともない eNOSタンパク発現の増大, L-NMMAの投与による収縮 および血圧の増大から、eNOS活性促進に関与した可能 性が考えられた。この血圧上昇抑制には、カムカム果汁 に含まれるポリフェノール類に加えビタミンCの血管内 皮細胞機能障害の改善によるNOの関与している可能性 が考えられた。

文 献

- 1) Huang, P. L.: eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease, *Trends Endocrinol Metab.*, **20**, 295~302 (2009)
- 2) 日本高血圧学会: 高血圧治療ガイドライン2009 ライフサイエンス出版, pp. 46~53 (2009)
- 3) Xu, J. W., IKEDA, K. and YAMORI, Y.: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by cyanidin 3 glucoside, a typical anthocyanin pigment, *Hypertension.*, **44**, 217~222 (2004)
- 4) Murad, F.: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation, *J. Clin. Invest.*, **78**, 1~5 (1986)
- 5) Padmanabhan, N., Padmanabhan, S and Connell, J. M.: Genetic basis of cardiovascular disease the renin-angiotensin-aldosterone system as a paradigm, J. Renin. Angiotensin Aldosterone Syst., 1, 316~324 (2000)
- 6) Heeneman, S., Sluimer, J.C. and Daemen, M.J.: Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling, *Circ. Res.*, **31**, 441~454 (2007)
- 7) Dzau, V.J., : Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a

- unifying hypothesis, *Hypertension.*, **37**, $1047 \sim 1052$ (2001)
- 8) Kang, D.G., Kim, Y.C., Sohn, E.J., Lee, Y.M., Lee, A.S., Yin, M.H. and Lee, H.S.: Hypotensive Effects of Butein via the Inhibition of Angiotensin Converting Enzyme, *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1345~1347 (2003)
- 9) SARR, M., CHATAIGNEAU, M., MARTINS, S., SCHOTT, C. E.I., BEDOUI. J., OAK, M.H., MULLER, B., CHATAIGNEAU, T. and Schini-Kerth, V. B.: Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase, *Cardiovasc Res.*, 71, 794~802 (2006)
- 10) 豊原秀和・松本信二・鈴木孝幸・神山松夫: ビタミンCの王様カムカムに生きる(東京農大出版会, 東京) (2005)
- 11) 樫村修生・豊原秀和・岩本もりえ・重田公子・石田 裕: 高血圧自然発症ラットにおいてカムカム果皮ポ リフェノールは高血圧を抑制する,食農と環境, 4, 119~124 (2007)
- 12) Zanatta, C. F., Cuevas, E., Bobbio, F. O., Winterhalter, P. and Mercadante, A. Z.: Determination of anthocyanins from camu-camu (Myrciaria dubia) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR, J. Agric. Food Chem., 30, 9531~9535 (2005)
- 13) Negishi, H., Xu, J.W., Ikeda, K., Njelelela, M., Nara, Y. and Yamori, Y.: Black and Green Tea Polyphenols Attenuate Blood Pressure Increases in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, *J. Nutr.*, **134**, 38~42 (2004)
- 14) Cienfuegos-Jovellanos, E., Quinones, M. M., Muguerza, B., Moulay, L., Miguel, M. and Aleixandere, A.: Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6156~6162 (2009)
- 15) Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casalle, R., Properzi, G., Blumberg, J. B. and Ferri, C. : Blood Pressure Is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in Glucose-Intolerant, Hypertensive Subjects afyer 15 Day of Consuming High-Polyphenol Dark Chocolate, *J. Nutr.*, **138**, 1671 ∼1676 (2008)
- 16) Erlund, I., Koli, R., Alfthan, G., Marniemi, J., Puukka, P., Mustonen, P., Mattila, P and Jula, A. : Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol, *Am. J. Clin. Nutr.*, **87**, 323~321 (2008)

- 17) Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Tuomainen, T. P., Kurl, S. and Salonen, J. T.: Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *Br. J. Nutr.*, 100, 890~895 (2008)
- 18) Taddei, S., Virdis, A., Ghiadoni, L., Magagna, A and Salvetti, A.: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension, *Circulation*, **97**, 2222~2229 (1998)
- 19) Vasdev, S., Ford, C. A., Parai, S., Longerich, L. and Gadag, V.: Dietary vitamin C supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats, *Mol. Cell. Biochem.*, **218**, 97~103 (2001)
- 20) 樫村修生・豊原秀和・鈴木孝幸・岩本もりえ・笹田 陽子・市原幸文・石田 裕:カムカム果皮抽出液によ る高血圧改善硬化における血管内皮細胞の影響,食農 と環境,83~89 (2008)
- 21) INOUE, T., KOMODA, H., UCHIDA, T. and NODE, K.
 : Tropical fruit camu-camu (Myrciaria dubia) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties, *J. Cardiol.*, 52, 127~32 (2008)
- 22) Alexander, J. : Angiotensin AT₁ α 2 C-adrenoceptor interaction disturbs α 2 A-auto-inhibition of catecholamine release in hypertensive rats, *Neurology.*, **4** (70), 1 \sim 10 (2013)
- 23) Chang, H.R., Lee, R.P., Wu, C.Y. and Chen, H.I.: Nitric oxide in mesenteric vascular reactivity: a comparison between rats with normotension and hypertension, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **29**, 275 ~80 (2002)
- 24) 谷口直之・ 鈴木敬一郎: NOの生理作用と疾患 (羊土社, 東京) (1999)
- 25) Sunano, S., Li-Bo, Z., Matsuda, K., Sekiguchi, F., Watanabe, H. and Shimamura, K.: Endothelium-Dependent Relaxation by Alpha 2-Adrenoceptor Agonists in Spontaneously Hypertensive Rat Aorta, J. Cardiovasc. Pharmacol., 27, 733~739 (1989)
- 26) 児玉龍彦・高橋 潔・渋谷正史:血管生物学(講談 社サイエンティフィック,東京),pp.39~41(1997)
- 27) 砂野 哲・関口冨美子:血管内皮依存性因子. 特に一酸化窒素と高血圧, *Yakugaku zassi.*, **123**, 495~515 (2003)
- 28) 土肥靖明:高血圧症と酸化ストレス, *Nagoya Med. J.*, **51**, 153~158 (2010)
 - (平成25年6月17日受付,平成26年1月22日受理)

ホタテ乾燥品の生産性向上と高品質化技術の開発

平成25年度日本食品保蔵科学会技術賞

山崎雅夫*§

* 東京農業大学生物産業学部食品香粧学科

Technical Development of Processing of Boiled-dried Adductor Muscle of Scallop to Improve the Productivity and Quality of Manufacturing

YAMAZAKI Masao*§

* Department of Food and Cosmetic Science, Tokyo University of Agriculture, 196 Yasaka Abashiri-shi, Hokkaido, 099–2493

Key words: Seafood processing, scallop, dried adductor muscle, innovation, productivity 水産加工, ホタテ, 乾貝柱, イノベーション, 生産性向上

ホタテガイの貝柱を乾燥させた製品(乾貝柱)は、主に東アジアへ輸出される重点品目であり国際商品となっている。主要産地である北海道ではオホーツク海産地播き天然貝を原料とし、その加工は過疎化が進行する地域の重要な産業の一つである。

乾貝柱は工場の原料受入庫で一晩氷冷などして貯蔵された貝を、蒸煮、水煮などの煮熱(一番煮)によって開設し、軟体部と貝殻を分離する。貝柱は手作業により軟体部から摘出され、選別によって大きさを揃え洗浄・冷却後サイズ毎に塩濃度および加熱時間を調製する塩水煮(二番煮)によって調味される。80~90℃で焙乾(40~60分間)後機械乾燥または天日乾燥を組み合わせるなどして約1か月をかけて製品がつくられる。

製品の等級は主に、色調・身締りの外観評価と製品水分(水分16%以下)によって主観評価されている。乾貝柱の等級を下げる黒変要因が貝柱の内因成分であるとする推察から、煮熱工程における原因物質(呈味成分)の排除が徹底されている。最終製品の水分が規定されていることから、生産性向上を実現するには製造プロセスにおける貝柱からの固形分損失を抑制することが肝要となる。しかしながら、生産設備が装置化されているものの熟練者による経験則に準拠したプロセス管理は、生産性と等級(外観品質)の両立を困難なものにしている。

本研究は製造期間の短縮を図り,色調品質形成のメカニズムに基づく生産性と高品質化を高度に向上させる新しい製造方法を提案するものである。

1. 温度および湿度調整による 乾燥・あん蒸技術の開発

乾貝柱の製造が長期にわたる原因は、望ましい色調品質を形成させるために、乾燥とあん蒸を繰り返す結果、製造に時間がかかる点にある。機械乾燥や天日乾燥によって生じる貝柱内部と外周との水分差を平衡化するために、定温での放置、すなわちあん蒸が行われる。この繰り返しによって貝柱の水分は徐々に低下し、内在成分による褐変反応により黄金色あるいは飴色へと貝柱の色調は変化し、特有の風味を形成する。このプロセスは職人の腕の見せ所でもあるものの、生産者が組合を構成し共販体制"に基づく輸出流通の際に、工場間での外観品質のバラツキの要因にもなっている。

塩水煮の際,グルコースを添加するなどした貝柱について,環境試験器を用いた温度および湿度の調整による乾燥・あん蒸や室温放置後環境試験器にて乾燥・あん蒸すると,環境試験器への投入のタイミングによって,褐変原因物質である糖類存在下でも最終製品の色調を調節することができた(図1)²⁾。現在の乾貝柱製法は製品の白色化を目指す方向で開発が重ねられてきたが,製品の名変度(a*値)は1を下回ると白すぎる評価になる傾向にある。概ね高い評価を得る製品のa*値は,1から3の間を示す。環境試験器で内での貝柱の褐変は,貝柱の水分活性が0.85から0.75に低下し乾燥する過程で大幅に上昇した(図2)。この水分活性域で,装置内温度を60℃程度の高めにすれば飴色に,40℃程度の低めにすれば黄

^{* 〒099-2493} 北海道網走市八坂196

[§] E-mail: m-yamaza@bioindustry.nodai.ac.jp

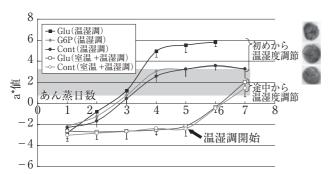


図1 二番煮液添加物と温度と湿度を調節した乾燥・あん蒸 の開始時期が乾貝柱色調に及ぼす影響

温湿調:50℃,60%RH

室温:室温条件 (17℃±0.9, 40%RH±2.9) で5日間実施後温湿

調条件開始 二番煮条件:70℃, 30min

Glu: 7% NaCl+0.4mM Glu G6P: 7% NaCl+0.4mM G6P

Cont:7% NaCl (網掛けは一等級品領域)

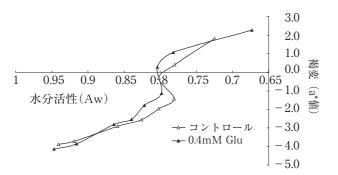


図2 温度と湿度を調節した乾燥・あん蒸中の 貝柱水分活性と褐変

(設定:40℃, 80%RH)

金色の色調の製品が2週間程度で得られることがわかった。貝柱表面の過乾燥は、内部水分の蒸発を抑制し乾燥効率を低下させるが、温度と湿度を調整した乾燥方法では、湿度調整によって過乾燥を防ぎ固く身締まりの良い製品となった。庫内雰囲気の湿度と貝柱の乾燥効率、身締まりの向上の関係については今後精緻な測定により明らかにする必要がある。

2. 低温塩水浸漬による 新しい調味方法の開発

貝柱からの脱水と塩味付与を目的とする塩水煮(二番煮)の工程は、貝柱の大きさに応じて塩水の塩濃度(9~14%)と加熱時間(11~16分間)を変えて行われている。製品における塩分含量は6~7%が目安とされ、呈味は等級評価に含まれない。製品の過度な褐変を防ぐため煮熟による褐変原因物質の排除が徹底されている。このため、煮液中に失われた固形分の代替として塩分を過大に付与する傾向がある。塩水煮液のゲル濾過クロマトグラフィーでは、全糖および還元糖の検出で大きく3つ

のフラクションに分けられた(図3)。これらフラクションの真空凍結乾燥粉末と主要な貝柱遊離アミノ酸であるグリシンとのデシケータを用いた水分活性調節下の褐変反応³⁰では、主に低分子画分に褐変がみられる一方、グリコーゲンに溶出位置が一致する高分子画分は褐変しなかった(図4)。低分子画分はグリシン添加の有無にかかわらず褐変することから、低分子画分に溶出する成分間で褐変することが考えられた⁴⁰。

低温塩水浸漬により得られる乾貝柱表面に二番煮処理ではみられない照りが認められた(図5)。低温塩水浸漬工程を経た貝柱からは、環境試験器での乾燥中にガラス化した固形物が滲出した。このガラス化滲出物のゲル濾過クロマトグラフィーはグリコーゲンの溶出ピークに一致し、低分子化合物は含まれなかった(図6上)。一方、光沢を有する製品および光沢のない製品の貝柱表面を水洗いした液のゲル濾過クロマトグラフィーでは、光沢のある製品の溶出全糖量の高分子画分と低分子画分の面積比は7:1とグリコーゲンが高い割合を占めるのに対し(図6中)、光沢のない製品の面積比は1:1とグリコーゲンの割合が低い傾向がみられた(図6下)。高分子糖は製品の光沢形成に寄与していることが推察され

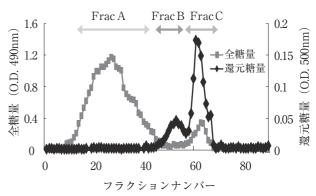


図3 塩水煮液 (二番煮液) のゲル濾過クロマトグラフィー

カラム:セファデックスセファロース CL-2B (2×100cm) 溶離液:0.01N水酸化ナトリウム溶液 (含0.2M塩化ナトリウム) 流 速:1 mℓ/min フラクションサイズ:5.5mℓ

ウエイト:99min

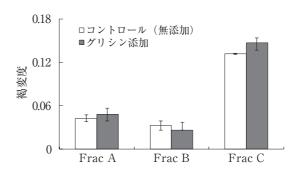


図4 二番煮液ゲル濾過クロマトグラフィー分画の褐変反応 におけるグリシン添加の有無

褐変反応:Aw0.75 40℃,5日間

た。

一般に光沢計を用いて食品の照りを客観的に評価することは、透過する光があるために工業製品に比べて難しい。乾貝柱の光沢は官能的な外観評価に頼っているが、 貝柱表面糖の分子量分布を迅速に判断できれば、機器測定による評価ができる可能性がある。

このように低温塩水浸漬は、過剰な煮熱を行わない調味法のために、グリコーゲンなどの固形分の保持に効果的であり、また、水産物の呈味に大きな影響を及ぼす塩味は、浸透圧により製品に付与されることから、大きさが異なる貝柱でも最終製品の塩分を安定化させることが



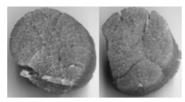


図5 調味法が異なる乾貝柱の外観

上:低温塩水浸漬 下:塩水煮(二番煮)

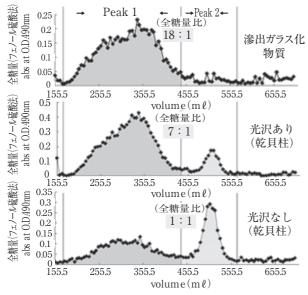


図6 乾貝柱表面抽出液のゲル濾過クロマトグラフィー

カラム:セファデックスセファロース CL-2B (2×100cm) 溶離液: 0.01N水酸化ナトリウム溶液 (含0.2M塩化ナトリウム)

流 速:1 ml/min

上 : 温度と湿度を調整しながら乾燥・あん蒸したときに

貝柱から滲出したガラス化物質中 : 光沢のある乾貝柱の表面抽出液下 : 光沢のない乾貝柱の表面抽出液

できた50。

後述する開殼液や水煮液、焙乾液のエキスを浸漬液に添加することにより、製品の歩留まりを約60%改善した。しかしながら、固形分付与された製品は、吸湿により褐変が進行しやすいことから保管条件に配慮する必要があり品質の安定化が課題となった。また、静置による浸漬では20時間程度調味に時間が掛かることから時間短縮を実現する装置化が課題である。

3. 褐変要因の解明

水産加工における褐変反応による品質劣化には、カツオ缶詰におけるオレンジミートが知られている⁶。鮮度の高い筋肉の死後変化によって、解糖系を通じて産生されるグルコース 6 リン酸(G6P)が、褐変にかかわり肉色を変化させる。ホタテ貝柱の加工中に褐変した貝柱で、G6P含量との相関⁷⁷が見い出されたり、タウリン、アラニン含量が低下すること⁸³から、これら低分子化合物の褐変への関与が示唆されている。

乾貝柱は貝柱の成分間反応が形成する色調が、製品品質の重要な要素となる一方、過度な褐変は等級を大幅に落とすことから、この褐変反応を適切に調節する必要がある。

試薬を使った褐変のモデル実験では、グリコーゲン代謝糖であるG6Pやフルクトース 6-リン酸(F6P)は、 貝柱が褐変しやすい水分活性域で、貝柱遊離アミノ酸の 約8割を占めるグリシン、タウリンと褐変した。褐変す る糖の種類については、リン酸化されている場所によっ て褐変に差異がみられ、6位の炭素がリン酸化されてい るものが褐変し易い傾向がみられた⁴⁰(図7)。

低温塩水浸漬工程に, グリコーゲン代謝糖を添加し,

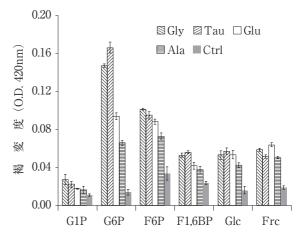


図7 リン酸化糖およびアミノ酸の試薬を使った褐変反応 (40℃5日間,Aw0.75)

Gly : グリシン Tau: タウリン Glu : グルタミン酸 Ala: アラニン

Ctrl:蒸留水

G1P: グルコース 1-リン酸 G6P: グルコース 6-リン酸 F6P: フルクトース 6-リン酸 F1,6BP: フルクトース1,6ビスリン酸

Glc : グルコース Frc : フルクトース

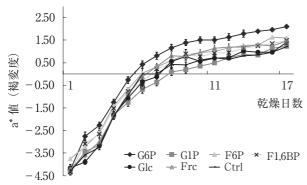


図8 低温塩水浸漬工程における糖およびリン酸化糖添加が 温度および湿度を調整した乾燥・あん蒸中の貝柱色調に与 える影響

浸漬: 4℃, 20時間

浸漬液:G6P (4mMグルコース 6-リン酸を含む 6%NaCl)

G1P (4mMグルコース 1-リン酸を含む 6%NaCl)

F6P (4mMフルクトース 6-リン酸を含む 6%NaCl)

F1,6P (4mMフルクトース1,6-ビスリン酸を含む6%NaCl)

Glc (4mMグルコースを含む6%NaCl)

Frc (4mMフルクトースを含む6%NaCl)

Ctrl (6%NaCl)

環境試験器にて温度と湿度をプログラム運転で調整する 乾燥・あん蒸法では、17日間の全乾燥期間でG6Pが褐 変し易い傾向(図8)を示し、貝柱の死後変化によって 増減するリン酸化糖が製品の褐変に関係することが推察 された。

4. 伝統製法における生産性のボトルネックと 新しい貝柱摘出技術

伝統製法では、機械および天日乾燥の組み合わせでの 色調形成は高い熟練度を必要とするために、一番煮およ び二番煮の煮熱工程で褐変原因物質を過度に煮液へ排出 させていると考えられる。このため、製品の水分品質が 16%以下と規定されている中で、貝柱の固形分を増やす ことは、生産性(歩留まり)の向上が期待されるが、外 観品質に影響する。二つの煮熱工程のうち、塩味付与と 予備脱水を目的とする二番煮を低温塩水浸漬工程に改善 したので、もう一方の貝柱摘出の役割をもつ一番煮の改 良を試みた。加熱加工向けの開設法はもっぱら貝全体を加熱する蒸煮や煮熟によって行われ、夏季には施氷などして原貝温度を15℃以下に保ち、開設作業の効率向上のため一晩原料受入庫で放置して弱らせた貝を使用している。貝柱と貝殻の接合部の温度が概ね60℃前後になると貝は開設がする。そこで、貝柱付着部分に貝殻の外側から蒸気をあてる局所加熱を試みた。貝の片方を開設し貝柱以外の外套膜や内臓を除去した後、片貝に付着した貝柱を貝殻の外側から加熱し、脱殻するものである(図9)。

貝の加熱変性を嫌う冷凍貝柱加工では治具を用いた手作業による貝柱の摘出が行われているが、貝柱と貝殻の間に治具(スクレーパー)を挿入し、人力でこじ開ける操作を、貝殻の外側からの加熱に置き換えた方法といえる。

加熱媒体に飽和水蒸気を用いる場合,概ね10秒程度の加熱で開設し、摘出される貝柱表面の白色度(タンパク質変性)は低く(表1)、冷凍貝柱の摘出法と差はなかった(データ未掲載)。一方伝統的な一番煮では白色度が高くタンパク質の変性を示し、摘出される貝柱の歩留まりも11.8%と局所加熱の13.2%より低い値を示した。

一番煮の全体加熱で得られるエキス歩留まりは9.5% と高い。しかし、貝全体を加熱するために、貝殻に付着 した海藻や他の貝類などからの成分溶出が考えられ、夾 雑物が多いことから現状では一番煮で生じる煮液は廃棄

表1 貝柱の摘出方法が貝柱の生産性および 表面変性に及ぼす影響

	歩留まり*3		貝柱表面の白色度*4		
	溶出固形分	貝柱	(タンパク質変性)		
全体加熱*1	9.5%	11.8%	70.8 ± 1.7		
局所加熱*2	0.4%	13.2%	56.7 ± 1.3		

*1:伝統製法(一番煮):煮熟(90℃,5分間)

*2:新製法:飽和水蒸気(片面 10秒毎)

*3:歩留まり:原料貝100g当たりの生産割合(溶出固形分は屈 折糖度計のBrixより算出)

4:白色度:W=100-{(100-L)^2+a*^2+b*^2}^1/2 L*, a*, b*値:色彩色差計測定値(KonicaMinolta CR-400)

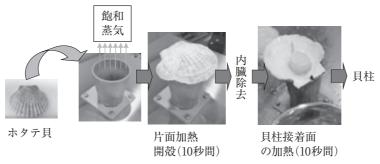


図9 局所加熱による新しい貝柱の摘出方法

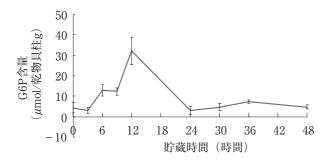
装置デバイス:(株)ニッコー社製ホタテラボシェラー(試作品)

され利用されていない。

一方,局所加熱では貝殻の内側に夾雑物を含まないホタテガイの風味豊かなエキスが回収可能な状態で貯留する。このエキスの歩留まりは0.4%と低くない。

閉殼筋である貝柱中のグリコーゲンは死後変化をすることが知られている 10 。活貝からスクレーパーで開殼,貝柱を摘出し洗浄後トンネルフリーザーで急速凍結してつくられる冷凍貝柱(玉冷)を冷蔵解凍すると,G6P含量は12時間後を最大に増減する。G6Pの増加は貝柱の中心温度が0 \mathbb{C} を超えると始まり4 \mathbb{C} の冷蔵中に増減することから低温でも解糖系が働く(図10)。しかしながら,冷凍貝柱の中心温度を50 \mathbb{C} 以上に加熱するとG6Pの増減はみられない(図11)。50 \mathbb{C} の達温程度の加熱でホタテガイ貝柱の解糖系関連酵素は失活すると考えられる 11 。

現在の製法では、開設脱殼効率の向上から高鮮度の活 貝を使用せずに一晩弱らせた貝が使用されることから、 原料は衰弱貝と死後変化が始まった貝が混在していると 考えられ、褐変原因物質 (G6P) の蓄積が原料全体で



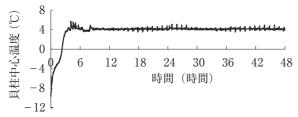


図10 冷凍貝柱の冷蔵解凍中のグルコース 6-リン酸 (G 6 P) 量変化(上)と貝柱中心温度(下)

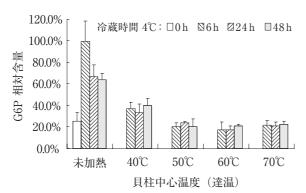


図11 貝柱の加熱処理が冷蔵(4°)中のG6P含量変化に 及ぼす影響

一様でない可能性が高い。G6Pの増減に配慮すれば、 採捕直後の高鮮度な状態で加熱により死後変化を停止さ せるほうが、製品の褐変を調節するのに好適であると考 えられた。

局所加熱によって得られる貝柱は、生鮮に近い状態であるので解凍した玉冷と同様に、死後変化を生じ褐変原因物質であるG6Pを蓄積する可能性があるため、速やかに貝柱を加熱しG6Pの産生を抑制する必要がある。そこで、局所加熱によって開殼、摘出した貝柱を水煮し速やかに加熱変性させた後、低温塩水浸漬による調味を行い、既報²²の過熱水蒸気焙乾を施し、ワンストップで温度と湿度を調整して乾燥あん蒸を行う新しい製法を考案した(図12)。

この工程は、伝統製法の開設・脱設工程を全体加熱から局所加熱に改変し、予備脱水と調味を担う塩水煮工程を、変性失活を担う水煮および調味を担う低温塩水浸漬にそれぞれ改変したものである。塩水煮工程を二つの工程に分けることで工程数が多くなるものの、水煮液という新しい副産物を創出する。水煮液と浸漬液のエキス合計歩留まりは2%前後を示す。伝統製法の生産現場における塩水煮液のエキス歩留まりは、塩分を含み0.2~0.4%であることを考えると、一番煮による開設加熱工程で過剰な加熱により固形分が溶出し、貝柱の歩留まりが11.8%と低くなる一方、局所加熱で得られる貝柱の歩留まりが13.2%と高歩留まりであるために、水煮液や浸漬液に回収されるエキス成分が多くなると考えられる。

従来の塩水煮液を利用するには脱塩などの高度な設備 が必要とされ、財務体力が低い加工現場での高次加工利

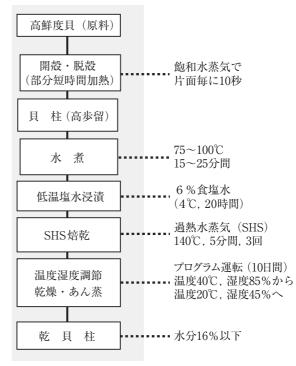


図12 新しい乾貝柱加工法のスキーム

表 2	水煮液の遊離ア	3	1 i	酸組成
3 C 4	71 C.R. 11X v 7 192 ME 7	`	- 1	

	mg/原貝(kg)	(%)
	8/ /4// (1.8/	(70)
Gly	453.5	41.7
Tau	404.9	37.2
Arg	150.5	13.8
Ala	29.6	2.7
Glu	25.4	2.3
その他のアミノ酸	23.3	2.1

水煮:70℃,25分(水道水)

用を困難にしてきたが、水煮液は脱塩が不要でありその 粉末は、ボイル貝柱の風味に富んだ既存マーケットにな いエキス粉末である。塩がないことで様々な用途での利 用が考えられる。

水煮液には表2に示したように遊離アミノ酸を含んでおり、グリシン、タウリンに富む。食薬区分がなされている天然タウリンの供給源としても重要な資源として煮液をとらえることができる。低温塩水浸漬および過熱水蒸気焙乾の各工程で派生するエキスのアミノ酸組成も水煮液のアミノ酸の割合と大きな違いはみられず、組成比は安定しており、グリシン、タウリンに富むエキスが得られることがわかった(データ未掲載)。

5. 新製法と副産煮液の高度利用による新ビジネスモデル

新製法の有効性について,湧別漁業協同組合登栄床自営工場の協力を得て検証を行った。湧別産活貝を新製法にて水煮あるいは低温塩水浸漬までラボスケールで処理後,塩水煮あるいは焙乾以降の工程を完成まで自営工場で実施する試験区,焙乾まで自営工場で処理した仕掛品を温度と湿度を調節した乾燥あん蒸方法で完成させた試験区についてそれぞれ完成品を北海道漁業連合共販部に評価してもらった。

すべての工程を新製法で実施した試験区および調味まで新製法で実施し、焙乾、乾燥あん蒸以降を自営工場で 実施した試験区の歩留まりは3.5%であった。また、副 産物のエキス合計もそれぞれ1.9%、2.2%であった。水 煮まで新製法で行い、塩水煮以降の工程を生産現場で実施した試験区では、歩留まりが3.1%であり生産現場での塩水煮工程は貝柱の歩留まりを下げることが示唆された。伝統製法の焙乾までを加工現場で行い、乾燥・あん蒸以降を新製法で実施した試験区の歩留まりは2.8%を示し、新製法の歩留まり3.5%に比べて0.7ポイント低い結果であった。前処理にかかわらず新製法の温度と湿度を調整する乾燥・あん蒸方法でつくられた貝柱の外観は良評価を得た。製造期間は15日であった。焙乾まで伝統製法で行い乾燥・あん蒸以降を新製法で実施した試験区で良評価を得たことは、この乾燥方法の実用性の高さを示していると考えられる。一方、天日乾燥を用いた伝統製法では、試験を実施した11月の天候では十分な色調形成がなされず低い評価となり製造期間は30日であった。

新製法は製造期間を半減し、生産性を約1.3倍に高め た。また副産エキス量を5~10倍に増大させた。伝統製 法では副産されるエキスは廃棄あるいは他社へ安価に提 供されているために、主に主産物のみで収入を支えるビ ジネスモデルである。製品の高品質化と生産性の向上の 両立は製造原理を考えると難しい。一方, 新製法では主 産物の生産性を向上させると共に、新しい副産物を創出 する。この新副産物を自社で加工し製品化すれば、主産 物に加え副産物も収入源となる。主産物の品質低下要因 を煮液に排除しても, それを自社で高付加価値利用でき れば、生産性を副産物と合算させてとらえることができ る新しいビジネスモデルとなる(図13)。副産物には、 グリコーゲン、タウリン、グリシンといった機能性素材 となり得る成分やホタテの香気成分に富む。新ビジネス モデル構築には、これら成分の特性に着目した新素材と なる副産物の用途開発が今後求められる。

貝柱の加熱加工には、乾貝柱の他に主に養殖貝を原料とするボイル貝柱があり、北海道南部や東北地方の主力加工品となっている。新製法の開設・水煮工程をボイル貝柱加工に適用できれば、乾貝柱だけでなく現在エキスを産出しないボイル貝柱加工でも新副産物を創出することが可能となり、乾貝柱だけでなくボイル加工の生産性を向上させる可能性がある。貝柱の加工仕向けのうち、約4割を占める乾貝柱とボイル貝柱で製法の標準化と新

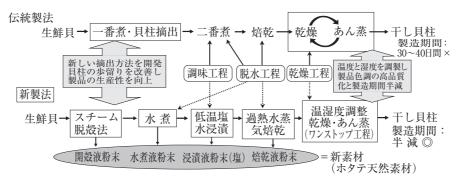


図13 ホタテ乾貝柱新製法の概要と伝統製法との比較

副産物の創出が可能である。

現在の貝柱加工法は,近隣国に真似され競合品が市場流入してきた。従来の製法を見直した新製法は日本のホタテ加工を次のステージへと導く可能性を秘めている。

本研究は、元富山県農林水産総合技術センター食品研 究所所長西岡不二男先生との過熱水蒸気を用いた乾貝柱 の高品質化への取り組みを緒としている。また, 東京水 産大名誉教授小嶋秩夫先生には,多くの加工会社,装置 会社を紹介して頂いた。公私ともに支えて頂いた両先生 には、この場を借りて深く御礼申し上げます。生産現場 での検証にご協力頂いた湧別漁業協同組合営漁指導部課 長三浦健一氏および同組合登栄床水産加工所副工場長八 木清二氏、製品評価にご協力頂いた北海道漁業協同組合 連合会共販部木谷幸治氏,局所加熱装置を試作頂いた (株)ニッコー常務取締役及川寿恵男氏, アミノ酸分析を して頂いたコーケン香料株式会社生産統括本部長遠田尚 毅氏に深謝いたします。実験に協力してくれた本学院生 村﨑圭太さん、学部生の中村翔さん、小穴俊さん、長谷 保代さん, 佐々木一志さん, 今井典子さん, 武田あゆみ さん, 小南久斗さん, 菊池恵介さんに感謝致します。

また本研究は、一般財団法人東和食品研究振興会平成 18年度および24年度学術奨励金、ノーステック財団研究 開発助成事業イノベーション創出研究支援事業平成22年 度および23年度の研究助成をそれぞれ受けて遂行されま した。関係機関に感謝いたします。

文 献

- 1) 長谷川健二:北海道漁連のホタテ貝共同出荷と系統 販売―漁連系統組織とマーケティングに関する考察―, 三重大生物資源紀要11,97~104 (1993)
- 2) 山崎雅夫:高品質ホタテ白干しの製造方法,特許第 4899006号2012年01月13日
- 3) ROCKLAND, L. B.: Saturated Salt Solutions for

- Static Control of Relative Humidity between 5° and 40°C, Anal. Chem., **32** (10), 1375~1376 (1960)
- 4) Yamazaki, M.: Browning reaction in the production of the boil-dried adductor muscle of scallop (*shiraboshi*), *Food Preserv. Sci.*, **39**, 3, 137~142 (2013)
- 5) 山崎雅夫・村崎圭太:ホタテガイ乾燥貝柱の生産方法,特許第5398002号,2013年11月1日
- 6) 山中英明ら:カツオ缶詰のオレンジミートに関する 研究IIオレンジミートの主要原因物質について,日本 水産学会誌,**39** (12),1299~1308 (1973)
- 7) KAWASHIMA, K. and YAMANAKA, H.: Effects of cold storage, freezing and thawing on browning of cooked scallop adductor muscle, *Fisher. Sci.*, **61**, 1031~1034 (1995)
- 8) KAWASHIMA, K. and YAMANAKA, H.: Free amino acids responsible for the browning of cooked scallop adductor muscle, *Fisher. Sci.*, **62**, 293~296 (1996)
- 9) 山﨑雅夫,岩崎義彦:加圧過熱水蒸気を使った生鮮 および冷凍ホタテガイの開殼,脱殼技術,日本食品保 蔵科学会誌,33(3),131~134(2007)
- 10) DE MATTIO, N. V., *et al.*: Postmortem changes in the adductor muscle of scallop (Chlamys tehuelchus) in chilled and frozen., *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, **10**, 49∼59 (2001)
- 11) Yamazaki, M. and Oikawa, S.: New procedures to improve productivity and quality in the manufacture of boiled-dried adductor muscles of scallop (*shiraboshi*), *Food Preservation Science*, **39** (2), 75~81 (2013)
- 12) 西岡不二男ら:過熱水蒸気を用いたホタテ白干し製品の高品質化,食科工誌,**51**,167~171 (2004)