

日本食品保蔵科学会誌

VOL. 41 NO. 3

会 長	高井 陸雄	副 会 長	太田 英明	小宮山美弘	早坂 薫
編集委員長	太田 英明				
編 集 委 員	石田 裕	稲熊 隆博	井上 茂孝	今堀 義洋	竹永 章生
	津久井亜紀夫	東尾 久雄	古庄 律	松田 茂樹	

<報 文>

- ラット神経膠腫細胞に対する山菜抽出物のアポトーシス誘導効果…………… (91)
 /名取貴光・中川裕子・桜林ひかる・福井 智
 野田聖子・窪島愛華・戸澤一宏・仲尾玲子

<報 文> (英文)

- カンキツ果実における細胞間隙体積の推定モデル …………… (103)
 /ディルパン アンディ・疋田慶夫・千葉浩徳・小川幸春

<技術報告>

- 生姜汁を用いた牛乳ゲルの形成について …………… (111)
 /山田徳広・永島伸浩・志垣 瞳・稲熊隆博

<技術報告> (英文)

- 白色反射シートのカーテン処理によるワイン用ブドウ‘カベルネ・ソービニオン’の
 着色促進効果およびワイン品質 …………… (117)
 /松本敏一・石原 藍・安部紀夫
 桜井尚史・三島晶太・秋廣高志

<講 座>

- HACCP教育講座 (9) HACCP普及の取組みについて …………… (123)
 /梅田浩史

- <文献抄録> …………… (129)

- <会 告> …………… (130)

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 41 NO. 3 (2015)

<Article> (Japanese)

- Induction of Apoptosis by Extracts of Edible Wild Plants in C6 Glioma Cells
 NATORI Takamitsu, NAKAGAWA Yuko, SAKURABAYASHI Hikaru, FUKUI Satoru,
 NODA Seiko, KUBOJIMA Aika, TOZAWA Kazuhiro and NAKAO Reiko (91)

<Article> (English)

- Mathematical Modeling of Intercellular Space Volume of Citrus Fruits
 DIRPAN Andi, HIKIDA Yoshio, CHIBA Hironori and OGAWA Yukiharu (103)

<Technical Report> (Japanese)

- Preparation of Milk Gels by Incubating a Mixture of Milk and Ginger Juice
 YAMADA Norihiro, NAGASHIMA Nobuhiro, SHIGAKI Hitomi and INAKUMA Takahiro (111)

<Technical Report> (English)

- Effects of Curtain Treatment with White Reflection Sheets
 in Improving Berry Coloration and Wine Quality in 'Cabernet Sauvignon' Grapes
 MATSUMOTO Toshikazu, ISHIHARA Ai, ABE Norio, SAKURAI Takafumi,
 MISHIMA Shota and AKIHIRO Takashi (117)

<Serialization Lecture> (Japanese)

- Approach to the Promotion of HACCP
 UMEDA Hiroshi (123)

ラット神経膠腫細胞に対する 山菜抽出物のアポトーシス誘導効果

名取 貴光^{*1§}・中川 裕子^{*2}・桜林ひかる^{*1}・福井 智^{*1}
野田 聖子^{*1}・窪島 愛華^{*1}・戸澤 一宏^{*3}・仲尾 玲子^{*1}

* 1 山梨学院大学健康栄養学部管理栄養学科

* 2 山梨学院短期大学食物栄養科

* 3 山梨県森林総合研究所

Induction of Apoptosis by Extracts of Edible Wild Plants in C6 Glioma Cells

NATORI Takamitsu^{*1§}, NAKAGAWA Yuko^{*2}, SAKURABAYASHI Hikaru^{*1}, FUKUI Satoru^{*1},
NODA Seiko^{*1}, KUBOJIMA Aika^{*1}, TOZAWA Kazuhiro^{*3} and NAKAO Reiko^{*1}

* 1 *Department of health and nutrition, Yamanashi Gakuin University,
2-4-5 Sakaori Kofu, Yamanashi 400-8575*

* 2 *Department of food and nutrition, Yamanashi Gakuin junior college,
2-4-5 Sakaori Kofu, Yamanashi 400-8575*

* 3 *Yamanashi Forestry and Forest Products Research Institute,
Saisyoji Fujikawa-cho, Minamikoma-gun, Yamanashi 400-0502*

Many edible wild plants have been consumed as food. It has been reported that these plants have antioxidants, antitumor and antibacterial activities. First, we examined the DPPH radical scavenging activity and total polyphenol contents in 14 species of edible wild plants, which were collected from the Yamanashi prefecture. A significant correlation between antioxidant activity and polyphenol content was observed. Moreover, *Akebia quinata*, *Pteridium aquilinum*, *Adenophora triphylla*, *Cacalia delphiniifolia*, *Allium victorialis*, *Hosta sieboldiana*, *Vinca minor* and *Acer maximowiczianum* were found to have significant antitumor effects against C6 glioma cells. The decrease of cell viability raises two possibilities-induction of cell death or growth retardation. We then subjected the extracts to propidium iodide (PI) and calcein-AM staining to distinguish between dead and live cells, respectively. The extracts from *A. maximowiczianum* induced an increase in the number of PI-positive cells. Moreover, activation of caspase 3 and translocation of phosphatidylserine were observed in the extract-treated cells suggesting that apoptosis might be the reason for decreased cell viability. On the other hand, extracts of *A. victorialis*, *H. sieboldiana*, and *V. minor* induced abnormalities in the cell cycle in the G₂/M phase of cell cycle. Our data suggest that the antitumor effect of the edible wild plants might be through the induction of apoptosis and cell cycle abnormalities.

(Received Oct. 15, 2014 ; Accepted Feb. 12, 2015)

Key words : *polyphenol, apoptosis, edible wild plant, antitumor effect, cell cycle abnormality*

ポリフェノール, アポトーシス, 山菜, 抗腫瘍効果, 細胞周期異常

山菜とは、野山に自生する食用植物の総称である。日本のみならず、アジア、ヨーロッパ、北米・南米など、世界のいたるところに生育している。生育する環境も々で、山間部や平地を中心に、河川域や海岸などにも自生

している。各地域には、多種多様な山菜が存在し、古くより食用として好まれている¹⁾。

山菜は、毎年新しく芽が出て茎が伸長する多年草に分類される。食用に供される部分は、これらの若芽や茎先

* 1 〒400-8475 山梨県甲府市酒折 2-4-5

§ Corresponding author, E-mail: t-natori@ygu.ac.jp

* 2 〒400-8575 山梨県甲府市酒折 2-4-5

* 3 〒400-0502 山梨県南巨摩郡富士川町最勝寺2290-1

端部、若葉、根茎などが中心で、採取や収穫できる時期が限定される。一般に山菜は野菜類と同様に、タンパク質や脂質が少なく、食物繊維が多いのが特徴であるが、加えてミネラルやビタミンが多く独特の風味をもつ。また、アクの強いものが多く、生食では苦味や渋味、酸味、えぐ味を強く感じるため、食用の際は、茹でる、煮る、揚げるなどの処理を必要とする。これによりアクのもとになる成分はほとんどが分解あるいは除去されるため、加熱調理によって美味なものとして食することができる。また、各地域の農山村には伝統的に、お浸しや煮物、和え物など、多種多様な山菜料理が存在している^{2),3)}。近年、山野に自生している山菜を人工的に畑で栽培する技術が確立され、店頭でも販売されるようになってきた。最近では、ワサビやミツバ、フキ、ウド、セリなどの品種に加え、タラノメやワラビ、ゼンマイ、ギョウジャニンニクなども栽培が可能となり、都会でも貴重な山菜を入手することができるようになってきている。また、山菜は食用としての利用に加え、薬用としても古くより用いられており、身近な民間療法の薬用食品として食されている^{2),3)}。

また、消費者の健康志向が高まり、食品成分のもつ様々な機能性に対する関心が高まってきている。自身の健康や身体の機能に関係するため、大変興味も高く、食によって糖尿病や高血圧症などの生活習慣病を予防したいと願う人も多い。これら機能性成分の中で最も関心の集まっているものとして、ポリフェノール類が挙げられる⁴⁾。近年では、ブドウに多く含まれるポリフェノール類に脳神経機能の改善効果^{5),6)}や抗ガン作用⁷⁾、心疾患に対する予防効果⁸⁾も報告されている。また、大豆イソフラボンによる骨粗鬆症予防効果⁹⁾、緑茶カテキンによる心疾患予防効果および抗がん効果^{10),11)}など、食品由来成分の機能性について数多く報告がなされている。

山菜にもポリフェノールなど、身体の機能を調節しうる成分が豊富に含まれていることが知られている¹²⁾。このような背景から、山菜における薬効やその機能性にも注目が集まり、抗酸化活性や抗菌作用、抗腫瘍作用、抗変異原性作用、解毒作用、糖尿病予防効果など様々な研究が進められている^{13)~17)}。山菜のもつ効能・機能性成分としては、フラボノイド類、アントシアニン類、カロテノイド類、アルカロイド類、サポニン、有機酸、ミネラルなどが挙げられる。先に挙げた山菜特有のアクは、ポリフェノール類の一種であるホモゲンチジン酸や有機酸の一種であるシュウ酸に由来している¹⁸⁾。

これまでに、キク科に属するフキやフキノトウに抗酸化作用や抗アレルギー作用、神経保護効果^{19),20)}、アブラナ科に属するワサビに抗菌作用や解毒作用、抗腫瘍作用^{21)~23)}、ウコギ科に属するウドやタラノメに抗酸化作用や抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗アレルギー効果^{24)~27)}、ユリ科のギョウジャニンニクに抗腫瘍作用や抗血栓作用、解毒作用^{28)~30)}、ゼンマイ科に属するゼンマイやオシダ科

に属するクサソテツに抗酸化作用や抗ウイルス作用のあることが報告されている^{31),32)}。この他にも、アルカロイド類やサポニンなども含め様々な作用が報告されており、山菜には多種多様な生理活性物質が含まれていることが推察される^{33),34)}。一方で、山菜各品種の生理作用についての検証はなされているものの、総合的に機能性を比較した研究は乏しく、その報告が期待される。

今回試料採取を行った山梨県は、豊かな自然と風土に囲まれ、特色ある農林産業が発展している。降水量が少なく日照時間が長いという特徴を生かし、甲府盆地から富士山、八ヶ岳山麓に至るまで、様々な野菜・果樹類が栽培されている。山間部では清流を利用してクレソンやタラノメなどが栽培されており、野山に自生する山菜やキノコ類は貴重な植物資源となっている。本研究では、山梨県内で採取しうる山菜を対象に、その生理機能について検討を行った。山梨県内で採取した14種類の山菜について検討を行ったところ、ポリフェノール含有量と抗酸化活性に高い相関がみとめられた。また、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果の検討を行ったところ、多数の山菜に顕著な増殖抑制効果が確認された。特に、ワラビにおいては顕著なアポトーシスが誘導されていた。さらに、細胞周期に対する影響を検討したところいくつかの山菜において細胞周期の異常がみとめられ、腫瘍細胞の増殖が抑制されていることが明らかとなった。以上、今回得られた知見について報告する。

実験方法

1. 材料

山梨県総合農業技術センターおよび八ヶ岳薬用植物園で採取した山菜（14種類；アケビ、ミツバアケビ、ワラビ、ツリガネニンジン、モミジガサ、セイヨウノコギリソウ、ワレモコウ、ヤブカンゾウ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウ、イカリソウ、メグスリノキ、センキュウ）を試料として用いた。なお、アケビ、ミツバアケビ、ワレモコウ、メグスリノキについては、葉のみを使用し、それ以外の山菜については葉および茎を使用した。

2. 試料の調製および抽出

試料を凍結乾燥した後、ミルサー（IWATANI IFM-720G-W）を用いて微粉碎した。試料1gを精秤後、80%メタノール40mlを加えてキュートミキサー（EYELA CM-1000 10分間）にかけ、遠心分離（4,000rpm, 10分間）して上清を回収した。残渣に再び80%メタノール40mlを加えて同様の抽出操作を繰り返し、ろ紙（KIRIYAMA40φm/m）にて吸引ろ過を行った。得られた上清を合わせて200mlに定容しポリフェノール分析試料とした。なお、生物学的な分析においては、ポリフェノール分析試料を濃縮・乾固させた後に、100mg/mlとなるようにジメチルスルホキシド（DMSO）に再溶解させ試料とした。

3. 総ポリフェノール含量の測定

ポリフェノール含量は、Folin-Denis法に準じ、タンニン酸の検量線から相当量として算出した。各分析試料0.4mlに、10%炭酸ナトリウム溶液0.4ml、フォーリン・チオカルト試薬0.2ml、蒸留水3mlを加え攪拌した。室温にて30分間静置した後、反応液を96wellプレートに移し、分光マイクロプレートリーダーを用いて750nmにおける吸光度を測定した。同様に、タンニン酸を標準物質として用いて検量線を作成し、得られた検量線から各分析試料中の総ポリフェノール量を算出した。

4. DPPHラジカル消去活性の測定

分析試料0.1mlと500 μ MのDPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) -エタノール溶液0.4mlを混合し、室温、暗所で30分間反応させた。反応液を96wellプレートに移し、各抽出液の代わりにエタノール用いたものを対照として、分光マイクロプレートリーダーを用いて517nmにおける吸光度を測定した。同様に、標準物質としてTroloxを用いて検量線を作成し、得られたTroloxの検量線から各分析試料のDPPHラジカル消去活性(Trolox相当量)を算出した。なお、DPPH溶液は使用直前に調製したものを用いた。

5. 腫瘍細胞に対する増殖抑制効果の評価(MTTアッセイ法)

腫瘍細胞モデルとしてラット由来の神経膠腫細胞株(C6 glioma)を用いた。細胞培養には、10%新生児牛血清(GIBCO, USA)およびpenicillin G (50unit/ml), streptomycin (50 μ g/ml)を含むpH7.4に調整したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM) (Sigma)を使用した。96wellプレートにC6 gliomaを播種し(1万cells/well), 一晚培養した。翌日、培養液100 μ lを各濃度に調製した試料入り無血清培地と入れ換えて培養した。24時間後、MTT法にて生細胞数を測定した(MTT法とは、ミトコンドリアの還元能を利用した方法でミトコンドリアの脱水素酵素が3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromideを還元することを利用している)。MTT溶液による反応を2時間行い、反応停止液を加え一晚反応させた。570nmにおける吸光度を測定し、試料無添加系をコントロール(100%)として細胞生存率を算出した。

6. 蛍光顕微鏡法による細胞死判定

24ウェルプレートにC6 gliomaを播種し(6万cells/well), 一晚培養した。翌日、培養液500 μ lを各濃度に調製した試料入り無血清培地と入れ換えて培養した。24時間後、培養液500 μ lを染色液(染色液500 μ l/well (5mlの無血清培地にカルセインAM 4 μ l, Propidium iodide (PI) 6 μ l, Hoechst 33342 5 μ lを混合したもの)に入れ換え20分間CO₂インキュベーター内で反応させた。染色液を無血清培地に交換した後、蛍光顕微鏡観察を行い、写真を撮影した。解析は、撮影画像から細胞数を計測し、死細胞率を算出した(死細胞率=PI陽性細胞数/

細胞数/(カルセインAM陽性細胞数+PI陽性細胞数)×100)。カルセインAMでは生細胞が緑、PIでは死細胞が赤色、Hoechst33342ではアポトーシス細胞が青白、細胞核が濃青色にそれぞれ観察される。

7. アポトーシス細胞の検出(Annexin V-およびCaspase-3の検出)

96ウェルプレートにC6 gliomaを播種し(1万cells/well), 一晚培養した。培養液100 μ lを各濃度に調製したサンプル添加培地に入れ換えて培養した。24時間培養した後、培養液を各種染色液(Annexin V-EnzoGoldを無血清培地に100倍希釈で添加した溶液(GFP-Certified™ Apoptosis/Necrosis Detection Kit)または、NucView™ 488 Caspase-3 substrateを無血清培地に100倍希釈で添加した溶液(NucView™ 488 Caspase-3 Assay Kit)に入れ換え15分間CO₂インキュベーター内で培養した。染色液を無血清培地に交換した後、蛍光マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を測定し(Ex/Em: 550/570nmまたはEx/Em: 488/520nm), その蛍光強度よりアポトーシス細胞の割合およびCaspase-3産生量を算出した。

8. 細胞周期の解析

6cmシャーレにC6 gliomaを播種し(60万cells/dish), 一晚培養した。培養液1mlを各濃度に調製したサンプル添加無血清培地に入れ換えて24時間培養した。培養液を除去した後、0.25%トリプシン/EDTA溶液を添加して細胞をシャーレからはがし、ピペッティングを行い、2mlチューブに細胞懸濁液を回収した。1,500rpm, 3min遠心分離して上清を捨てた後、PBS溶液を加え再び細胞を懸濁させた。1,500rpm, 3min遠心分離して上清を捨てた後、70%エタノール溶液を加えてよく懸濁し細胞を30分間固定した。1,500rpm, 3min遠心分離して上清を捨てた後、PBS溶液を加え再び細胞を懸濁させた。同様の洗浄操作を2回繰り返した。1,500rpm, 3min遠心分離して上清を捨てた後に得られた細胞のペレットを100 μ lのPBS溶液に懸濁した後、RNaseを0.1mg/mlとなるように添加し、37℃で30分間反応させた。PI染色溶液を添加し、30分間、室温、暗所で反応させた後、Tali® Image-Based Cytometerを用いて細胞周期の解析を行った。

実験結果および考察

1. 総ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性

抗酸化活性を示す代表的な成分としてポリフェノール類が挙げられる。生体内ラジカルや活性酸素が病気発症の要因であることが解明されて以来、抗酸化作用は大変注目を浴びている^{35)~38)}。

そこで、山菜抽出物における総ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性の検討を行った。山菜抽出物の総ポリフェノール含量をTable 1に示した。アケビ、ミツバアケビ、ワラビ、ツリガネニンジン、モミジガサ、セイヨウノコギリソウ、ワレモコウ、ヤブカンゾウ、ギ

Table 1 Polyphenol content and radical scavenging activity of extracts of edible wild plants

Samples		Total polyphenols (mg TA eq/100g-fresh weight)	Radical scavenging activity against DPPH (μ g Trolox eq/100g fresh-weight)
アケビ	<i>Akebia quinata</i>	1,113 \pm 34.8	0.31 \pm 0.12
ミツバアケビ	<i>Akebia trifoliata</i>	1,677 \pm 18.4	0.68 \pm 0.02
ワラビ	<i>Pteridium aquilinum</i>	600 \pm 7.9	0.33 \pm 0.08
ツリガネニンジン	<i>Adenophora triphylla</i>	684 \pm 2.9	0.23 \pm 0.01
モミジガサ	<i>Cacalia delphiniifolia</i>	345 \pm 17.2	0.13 \pm 0.00
セイヨウノコギリ	<i>Achillea millefolium</i>	1,073 \pm 7.3	0.42 \pm 0.04
ワレモコウ	<i>Sanguisorba officinalis</i>	2,007 \pm 20.7	0.66 \pm 0.07
ヤブカンゾウ	<i>Hemerocallis fulva</i>	208 \pm 3.6	0.10 \pm 0.01
ギョウジャニンニク	<i>Allium victorialis</i>	50 \pm 1.2	0.05 \pm 0.00
オオバギボウシ	<i>Hosta sieboldiana</i>	106 \pm 6.6	0.01 \pm 0.00
ヒメツルニチニチソウ	<i>Vinca minor</i>	810 \pm 7.6	0.28 \pm 0.00
イカリソウ	<i>Epimedium grandiflorum</i>	418 \pm 13.3	0.08 \pm 0.01
メグスリノキ	<i>Acer maximowiczianum</i>	1,845 \pm 7.7	1.99 \pm 0.32
センキュウ	<i>Cnidium officinale</i>	527 \pm 18.1	0.24 \pm 0.00

ョウジャニンニク, オオバギボウシ, ヒメツルニチニチソウ, イカリソウ, メグスリノキ, センキュウの抽出物に含まれるポリフェノール含量は, それぞれ, 1,113 \pm 34.8, 1,677 \pm 18.4, 600 \pm 7.9, 684 \pm 2.9, 345 \pm 17.2, 1,073 \pm 7.3, 2,007 \pm 20.7, 208 \pm 3.6, 50 \pm 1.2, 106 \pm 6.6, 810 \pm 7.6, 418 \pm 13.3, 1,845 \pm 7.7, 527 \pm 18.1mg (タンニン酸相当量)/100g (生鮮物)であった。今回供試した山菜の中ではミツバアケビ, ワレモコウ, メグスリノキにおけるポリフェノール含量が高いこと, 一方, ヤブカンゾウ, ギョウジャニンニク, オオバギボウシのポリフェノール含量が低いことが明らかとなった。一般に市販されている野菜に含まれるポリフェノール量は生鮮物100g当たり, 1~400mg (没食子酸相当量)であることが知られている。抽出方法や定量方法, 換算の方法にもよると思われるが, 今回の結果より山菜の一部にはポリフェノールが豊富に含まれているといえ

る。

また, 各山菜抽出物のDPPHラジカル消去活性について検討したところ, アケビ, ミツバアケビ, ワラビ, ツリガネニンジン, モミジガサ, セイヨウノコギリソウ, ワレモコウ, ヤブカンゾウ, ギョウジャニンニク, オオバギボウシ, ヒメツルニチニチソウ, イカリソウ, メグスリノキ, センキュウの抽出物のDPPHラジカル消去活性は, それぞれ, 0.31 \pm 0.12, 0.68 \pm 0.02, 0.33 \pm 0.08, 0.23 \pm 0.01, 0.13 \pm 0.00, 0.42 \pm 0.04, 0.66 \pm 0.07, 0.10 \pm 0.01, 0.05 \pm 0.00, 0.01 \pm 0.00, 0.28 \pm 0.00, 0.08 \pm 0.01, 1.99 \pm 0.32, 0.24 \pm 0.00 μ g (Trolox換算)/100g (生鮮物)であった。ミツバアケビ, ワレモコウ, メグスリノキの抗酸化活性が高いこと, 一方, ギョウジャニンニク, オオバギボウシ, イカリソウの抗酸化活性が低いことが確認された。

次に, 山菜抽出物の総ポリフェノール含量とDPPHラ

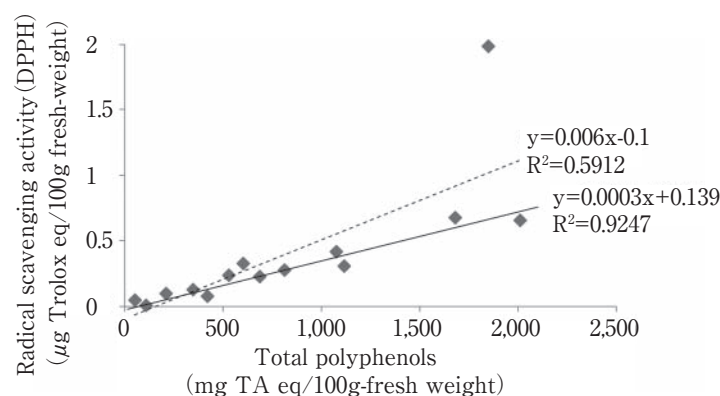


Fig. 1 Correlation between total polyphenols and radical scavenging activity of extracts of edible wild plants

The solid line indicates the approximate curve inclusive of all samples whereas the dotted line shows the approximate curve excluding *Acer maximowiczianum*.

ジカル消去活性の関係をFig. 1に示した。ミツバアケビ、ワレモコウなど、総ポリフェノール含量の高かった山菜抽出物ほどDPPHラジカル消去活性が高く、ポリフェノール含量とDPPHラジカル消去活性の間に強い相関関係のあることが確認された（実線： $R^2=0.9247$ ）。しかし、メグスリノキを含めた場合には低い相関関係となることが明らかとなった（点線： $R^2=0.5912$ ）。一般に、ポリフェノール含量と抗酸化活性には高い相関のあることが知られている^{39), 40)}。本検討においても、その傾向がみとめられたが、メグスリノキのみが際立って抗酸化活性が高い結果となった。一般にポリフェノール以外の抗酸化物質として、カロテノイド、ビタミンC、ビタミンE、アミノ酸の一部などが知られている。AKAZAWAらは、メグスリノキにカテキンとともに α -トコフェロールが含まれていること、また、AcerosideやAcerogeninというジアリルヘプタイドが含まれ、これらの物質が抗酸化性を示すことを報告している⁴¹⁾。メグスリノキが示した高い抗酸化活性はこれらの物質によるものと考えられる。

2. 腫瘍細胞の細胞生存率に対する影響

悪性腫瘍（ガン）は、日本人の3大死因の一つであり、脳卒中および心疾患とならび治療が期待される疾病の一つである。このガンの発症には活性酸素種が深くかかわっていることが知られている。生体内に活性酸素種が過剰に蓄積すると細胞内レドックスのバランスが変化し、細胞内脂質やタンパク質の構造変化と機能不全がおこる。また、これらの影響がDNAの損傷に及ぶと細胞のガン化がおこる。ポリフェノールは活性酸素種を除去する物

質の代表として知られ、抗ガン効果について広く研究されている。さらに、ポリフェノール類は生活習慣病の予防にも効果のあることが知られており、これらを豊富に含む食品の摂取による病気発症予防への期待は高い。

そこで本研究では、脳で発症するガン細胞の一種であるC6グリオーマ細胞を用いて山菜ポリフェノールの脳腫瘍に対する増殖抑制作用の検討を行った。本研究でモデル細胞としたC6グリオーマは脳腫瘍の一種で、主な治療方法は手術による摘出である。すべてのグリオーマを脳内から取り除くことは難しいこと、また、放射線治療に対して抵抗性をもつこと、特効薬（抗がん剤）がないことが問題となっており、その治療方法の開発が望まれている。

はじめに、C6 gliomaの細胞培養系に山菜抽出物を0.1, 0.2, 0.4mg/mlとなるように添加し24時間培養した際のコントロールに対する細胞生存率および50%細胞生存率濃度（ CC_{50} ；50% cytotoxicity concentrations）をFig. 2に示した。各山菜抽出物を0.4mg/mlとなるように添加した際の細胞生存率は、コントロール、アケビ、ミツバアケビ、ワラビ、モミジガサ、セイヨウノコギリソウ、ワレモコウ、ヤブカンゾウ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウ、イカリソウ、メグスリノキ、センキュウ、それぞれ、 100.0 ± 9.1 , 12.5 ± 10.0 , 80.6 ± 7.9 , 58.7 ± 12.8 , 68.4 ± 12.8 , 61.1 ± 12.0 , 107.9 ± 19.1 , 76.0 ± 21.4 , 92.3 ± 14.5 , 42.6 ± 10.5 , 4.9 ± 21.1 , 24.1 ± 11.8 , 77.6 ± 8.3 , 55.2 ± 18.3 , $85.1 \pm 10.3\%$ であった。また、各山

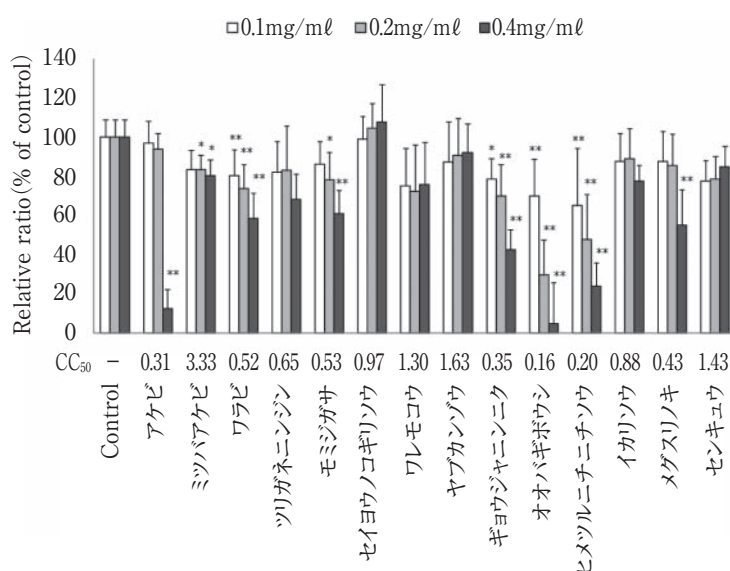


Fig.2 Effects of extract of edible wild plants on the viability of C6 glioma cells

The cells were treated with extracts from edible wild plants at the indicated concentrations for 24 h, and the cell viability was quantified with an MTT assay. The values are represented as mean \pm SD in comparison to the untreated cells (control). CC_{50} showed 50% cytotoxicity concentrations. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, ANOVA).

葉抽出物添加時のCC₅₀は、それぞれ、0.31, 3.33, 0.52, 0.65, 0.53, 0.97, 1.30, 1.63, 0.35, 0.16, 0.20, 0.88, 0.43, 1.43であった。アケビ、ワラビ、ツリガネニンジン、モミジガサ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウ、メグスリノキの山菜抽出物に顕著な細胞生存率の低下がみとめられた。オオバギボウシのCC₅₀が最も低く、0.16mg/ml、続いて、ヒメツルニチニチソウ、アケビ、ギョウジャニンニク、メグスリノキ、ワラビ、モミジガサの順であった。また、初代培養グリア細胞系（正常細胞）に山菜抽出物を添加して24時間後の細胞生存率を測定したところ顕著な低下は認められなかった。従って、正常細胞に対する毒性は低いと考えられる（データ記載なし）。

Table 1 に示したように、アケビ、ワラビ、ツリガネニンジン、ヒメツルニチニチソウ、メグスリノキは、ポリフェノール含量も高く、顕著な細胞生存率の低下がみとめられた。久保田らは、重量の約7割がエピカテキン、エピガロカテキンといったカテキン類で占められる緑茶熱水抽出物をヒト肝ガン細胞（HepG2）の培養系に添加（0.1mg/mlの濃度）すると細胞の生存率が顕著に低下することを報告している⁴²⁾。本実験に供試した山菜抽出物は久保田らの用いた緑茶熱水抽出物ほど高ポリフェノール含有ではないものの顕著に細胞生存率を低下させていた（培養系における終濃度は0.1~0.4mg/ml）。したがって、アケビ、ワラビ、ツリガネニンジン、ヒメツルニチニチソウ、メグスリノキは緑茶熱水抽出物のようにポリフェノール含有量が多く抗ガン作用が発揮されたと考えられる。

一方、モミジガサ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシは、ポリフェノール含量、抗酸化活性とも低い値であったものの、腫瘍細胞に対して強い生存率低下作用を示した。OKABEらは、メグスリノキの葉に含まれるgeraniinが内因性発癌プロモーターを阻害することで発ガン効果を発揮することを報告しており⁴³⁾、オオバギボウシ、ギョウジャニンニク、モミジガサには、ポリフェノール類やその他の抗酸化性物質に類似しない阻害・影響因子、すなわちgeraniinのような物質が含まれており生存率低下が示された可能性が考えられる。

また、ポリフェノール含量および抗酸化活性の高かったミツバアケビ、ワレモコウにおいては細胞生存率の低下はみとめられるものの、CC₅₀は他の山菜と比較して高い値となった。これまでにフキやタラノメに細胞保護効果のあることが報告されており^{17), 19)}、ミツバアケビやワレモコウには他の山菜とは異なり、細胞保護効果を発揮するポリフェノールまたはその他の物質が含まれているか、または抗ガン作用が発揮されないポリフェノールが含まれている可能性が考えられる。

さらに、ポリフェノール含量の高かったセイヨウノコギリソウは、細胞生存率の低下にほとんど効果を示さなかった。したがって、セイヨウノコギリソウには細胞保

護効果を発揮するポリフェノールまたはその他の物質が含まれているか、または抗ガン作用が発揮されないポリフェノールが含まれているのかもしれない。

本検討の結果から、山菜に含まれるポリフェノール類のすべてが抗腫瘍活性を示すわけではないことが推察される。ポリフェノールは、高分子として存在しているものも多く、また配糖体として存在するものも多い。そのため成分によって、細胞に取り込まれていない可能性も考えられる⁴⁴⁾。細胞への影響については物質の存在形態を考慮しなければならないと考えられる。

3. 蛍光顕微鏡を用いた生死細胞判定

山菜抽出物を添加して培養した際の生細胞および死細胞を蛍光顕微鏡にて撮影し、得られた画像より死細胞の割合を算出した。結果をFig. 3に示した。なお、代表的な蛍光撮影画像としてコントロール、アケビ、ワラビ、オオバギボウシ、メグスリノキをあわせて示した。コントロール、アケビ、ミツバアケビ、ワラビ、モミジガサ、セイヨウノコギリソウ、ワレモコウ、ヤブカンゾウ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウ、イカリソウ、メグスリノキ、センキュウ、それぞれの死細胞の割合は、0.52±1.32, 6.18±4.35, 0.96±1.36, 18.39±4.45, 2.62±2.76, 4.35±4.29, 3.84±2.86, 3.46±3.34, 0.22±0.53, 0.20±0.32, 3.61±4.28, 0.98±1.52, 0.13±0.31, 6.90±3.61, 3.34±3.74%であった。各山菜抽出物のうち、細胞生存率の検討で顕著な低下のみられたアケビ、ワラビ、メグスリノキにおいて有意な死細胞割合の増加がみとめられた。しかし、細胞生存率の低下がみとめられたツリガネニンジン、モミジガサ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウでは有意な差はみとめられなかった。一般に、抗腫瘍効果は、細胞の増殖を抑える効果と細胞死を誘導する効果に大別される。本検討結果から、アケビ、ワラビ、メグスリノキには、死細胞を誘導する作用のあること、また、ツリガネニンジン、モミジガサ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウには細胞増殖を抑制する作用のあることが考えられる。これまでに、緑茶カテキンに細胞増殖を抑える効果や細胞死を誘導する効果が報告されているが^{45), 46)}、アケビのブタノール抽出画分やワラビの水溶性画分に細胞毒性およびアポトーシス誘導効果のあることが報告されている^{47), 48)}。今回、アケビやワラビにみとめられた死細胞の増加はポリフェノール類に限定されないものの、これら成分を含め細胞毒性またはアポトーシスを誘導する成分が含まれていることを示唆している。

4. アポトーシス誘導効果

次に、山菜抽出物による細胞死誘導がアポトーシスであるか否かを確認するため、Annexin-VおよびCaspase-3による検討を行った。結果をFig. 4に示した。コントロール、アケビ、ミツバアケビ、ワラビ、モミジガサ、セイヨウノコギリソウ、ワレモコウ、ヤブカンゾウ、ギ

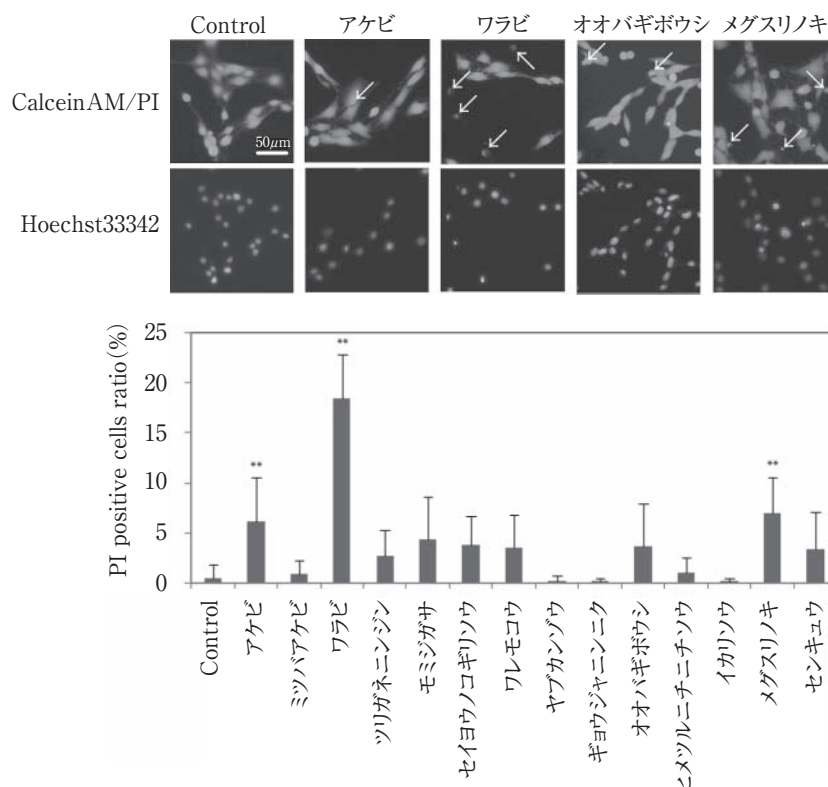


Fig.3 Induction of C6 glioma cell death by the extracts from edible wild plants

The cells were treated with extracts from edible wild plants for 24 h (final concentrations of each sample were 0.2 mg/ml). Photograph shows the typical live-dead staining pattern of extracts-treated C6 glioma cells. The cells were subjected to live/death cell staining with calcein-AM, PI and Hoechst 33342. The live cells were stained with calcein-AM and the dead cells were stained with PI (arrows) as seen as the upper panels. The lower panel represents Hoechst 33342 staining. The values were represented as the mean percentage of PI-positive cells \pm SD. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA).

ョウジャニンニク, オオバギボウシ, ヒメツルニチニチソウ, イカリソウ, メグスリノキ, センキュウのAnnexin-Vの蛍光強度は, それぞれ, 100.0 ± 2.4 , 98.3 ± 11.4 , 79.6 ± 6.5 , 169.6 ± 9.4 , 72.5 ± 2.7 , 59.9 ± 6.0 , 59.0 ± 2.4 , 102.2 ± 5.7 , 96.2 ± 5.8 , 64.1 ± 6.5 , 98.7 ± 25.6 , 97.3 ± 10.4 , 59.3 ± 3.5 , 125.3 ± 3.3 , $64.4 \pm 9.3\%$ であり, Caspase-3活性は, それぞれ, 100.0 ± 5.1 , 156.3 ± 13.2 , 139.7 ± 8.9 , 228.9 ± 21.2 , 124.8 ± 13.4 , 68.9 ± 9.3 , 65.6 ± 1.1 , 155.5 ± 8.6 , 132.4 ± 13.3 , 77.0 ± 4.3 , 88.2 ± 33.2 , 162.2 ± 9.4 , 78.2 ± 6.2 , 138.8 ± 5.0 , 71.8 ± 13.5 あった。

Annexin-Vの検討では, ワラビ, メグスリノキにおいて有意な蛍光強度の増加がみとめられた。また, Caspase-3活性の検討では, アケビ, ミツバアケビ, ワラビ, ワレモコウ, ヒメツルニチニチソウ, メグスリノキにおいて, Caspase-3活性が有意に上昇していた。これまでに, 緑茶に含まれるカテキン類, ブドウに含まれるレスベラトロール, タマネギに含まれるケルセチンや柑橘類のナリンギンなどのフラボノイド類によるアポトーシス誘導

効果が報告されている^{45), 46), 49) ~ 53)}。また, クロロゲン酸やカフェ酸などのポリフェノール類にもアポトーシス誘導効果のあることが報告されている^{54), 55)}。山菜にはフラボノイド類やアントシアニン類に加えて, これらクロロゲン酸やカフェ酸が含まれていることも知られており^{56), 57)}, ワラビおよびメグスリノキにおいてみとめられた死細胞割合の増加は, アポトーシス誘導によるものではないかと考えられる。また, それら以外の山菜抽出物においてもCaspase-3活性の上昇がみられたことから初期のアポトーシス誘導が引き起こされている可能性が考えられる。今回, ポリフェノール以外の成分について定量は行っていないものの, その他細胞死誘導に関与する物質の存在が示唆される^{47), 48)}。

一方, モミジガサ, セイヨウノコギリソウ, ギョウジャニンニク, イカリソウ, センキュウにおいてはコントロールに比較してアポトーシス誘導が抑えられている傾向がみとめられた (Fig. 4)。これまでにポリフェノール類を中心として, 植物には酸化ストレスによる細胞死を抑制する効果を有する物質が含まれていることが数多く

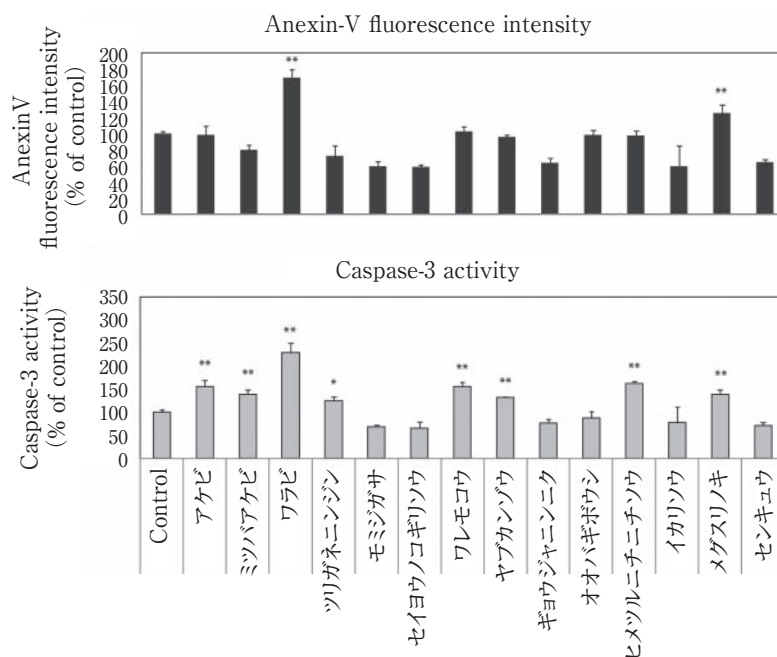


Fig.4 The apoptosis-inducing effect of extracts from edible wild plants on C6 glioma cells

The cells were treated with extracts from edible wild plants for 24 h (final concentrations of each samples were 0.2 mg/ml), and then treated with respective assay reagents. The values are represented as mean \pm SD in comparison to control. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA)

報告されている^{58)~60)}。今回供試した山菜抽出物にも細胞死抑制効果を有する物質が含まれている可能性が考えられる。おそらく、抗酸化作用に起因する細胞死保護効果が発揮され、アポトーシスが一部抑制されるという複合的な結果が現れているのではないかと考えられる。

5. 細胞周期に対する影響

次に、山菜抽出物の細胞周期への影響について検討した結果をFig. 5に示した。ミツバアケビ、ワラビ、ワレ

モコウ、メグスリノキにおけるsubG₁期細胞割合が増加しており、これら山菜抽出物によってアポトーシスが誘導されていたことが示唆される。

また、ミツバアケビおよびセイヨウノコギリソウにおいては、S期細胞割合の減少とG₂/M期細胞割合の増加、アケビ、ヤブカンゾウ、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウ、メグスリノキ、センキユウにおいてはG₂/M期細胞割合の増加がそれぞれみと

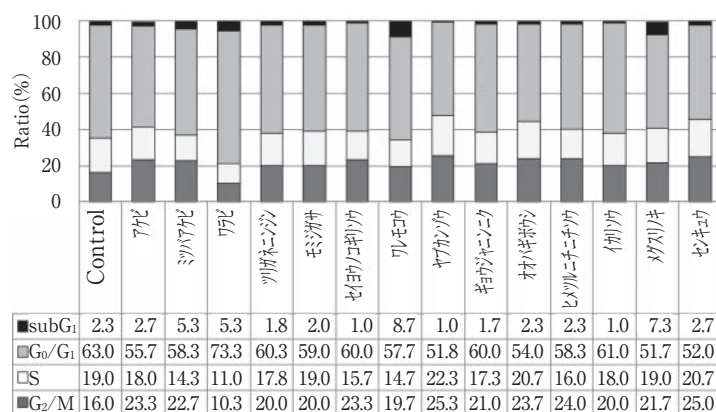


Fig.5 The effect of extracts from edible wild plants on the cell cycle of C6 glioma cells

The cell cycles were analyzed using image-based cytometry of the PI stained cells. The C6 glioma cells were treated with each extracts for 24 h, and then harvested, fixed, and stained with PI. The values were represented as the mean ratio of the number of cells in each phase to the total number of cells \pm SD.

められており、これら山菜抽出物がG₂/M期における細胞周期阻害を引き起こしていると考えられる。さらに、ワラビにおいては、S期とG₂/M期細胞割合の減少による顕著なG₀/G₁期細胞割合の増加がみとめられており、G₀/G₁期における細胞周期阻害が引き起こされていると考えられる。

一方、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウにおいては、細胞生存率の低下がみとめられたものの (Fig. 2), 死細胞の割合増加 (Fig. 3) およびAnnexin-Vの蛍光強度の上昇 (Fig. 4) はみとめられなかったが、G₂/M期における細胞周期に異常がみとめられたことから、細部生存率の低下は細胞周期異常による増殖阻害と考えられる。また、ツリガネニンジンおよびモミジガサにおいてはいずれの影響もみとめられなかったため、ネクローシスによる細胞死である可能性が高いと考えられる。

これまでに、クロロゲン酸やクルクミン誘導体によるG₂/M期阻害やレスベラトロールやケルセチンによるG₁期阻害が報告されている^{50)~53), 55), 56), 61)}。シソやハウレン草といった葉菜類と同様山菜類にはクロロゲン酸が豊富に含まれていることが知られている^{56), 57)}。また、山菜のイタドリ (タデ科の多年草) の根にはレスベラトロールが含まれているという報告がある⁶²⁾。今回供試した山菜のレスベラトロール定量は行っていないが、クロロゲン酸の定量を行ったところほとんどの山菜にクロロゲン酸が含まれていた (データ記載なし)。したがって、G₂/MおよびG₀/G₁期における細胞周期の異常にはクロロゲン酸が関与している可能性が考えられる。また、今後ケルセチンやレスベラトロールの定量を行い細胞周期異常への関与を確認するとともにその作用機序を明らかにする必要があると考えられる。

要 約

野山に自生する山菜の多くは古くより食用として好まれてきた。また、これら山菜は様々な効果をもつことから民間療法として薬用にも用いられている。山菜由来成分には、抗腫瘍効果や抗酸化作用、抗菌活性、抗肥満作用などが報告されており、多種多様な生理活性物質が含まれている。本研究では、山梨県内で採取される山菜の機能性成分と生理活性について検討を行った。試料は、山梨県総合農業技術センター、八ヶ岳薬用植物園で採取した山菜を使用した。

14種類の山菜の総ポリフェノール量およびDPPHラジカル消去活性を測定したところ、ミツバアケビ、ワレモコウ、メグスリノキにポリフェノールが多く含まれており、抗酸化活性が高いことが確認され、ポリフェノール含量と抗酸化活性に高い相関がみとめられた。次に、これらサンプルのC6 glioma株に対する抗腫瘍効果について検討を行ったところ、アケビ、ワラビ、ツリガネニンジン、モミジガサ、ギョウジャニンニク、オオバギボウ

シ、ヒメツルニチニチソウ、メグスリノキに濃度依存的な抗腫瘍効果が認められた。特に、オオバギボウシとヒメツルニチニチソウにおいては低濃度で顕著な抗腫瘍効果が確認された。また、カルセイン-AMおよびプロピディウムイオダイドを用いた生死細胞の判定を行ったところ、アケビおよびワラビ、メグスリノキにおいて顕著な細胞死が誘導されており、アポトーシスの指標であるCaspase-3の活性の上昇や細胞膜成分の転移が確認されたことから、これら山菜による抗腫瘍効果はアポトーシスであると考えられる。一方、ギョウジャニンニク、オオバギボウシ、ヒメツルニチニチソウにはG₂/M期における細胞周期に異常がみとめられた。今回供試した山菜による抗腫瘍効果はアポトーシスおよび細胞周期の異常であると考えられる。

謝 辞 本研究の成果は、山梨県総合農業技術センターおよび八ヶ岳薬用植物園、公益財団法人やまなし産業支援機構との共同研究の一部であり、山梨学院大学学術研究助成金を受け実施いたしました。本研究に対し多大なる支援を頂いたことに深く感謝いたします。

文 献

- 1) 高野昭人：おいしく食べる山菜・野草：採り方・食べ方・効能がわかる，世界文化社 (2006)
- 2) 今井國勝・今井万岐子：よくわかる山菜図鑑，永岡書店 (2013)
- 3) 橋本郁三：食べられる野生植物大辞典，柏書房 (2003)
- 4) LIU, R.H.: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action, *J. Nutr.*, **134**, 3479S~3485S (2004)
- 5) LI, F., GONG, Q., DONG, H. and SHI, J.: Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease, *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 27~33 (2012)
- 6) CHANG, H.C., TAI, Y.T., CHERNG, Y.G., LIN, J.W., LIU, S.H., CHEN, T.L. and CHEN, R.M.: Resveratrol attenuates high-fat diet-induced disruption of the blood-brain barrier and protects brain neurons from apoptotic insults, *J. Agric. Food. Chem.*, **62**, 3466~3475 (2014)
- 7) FULDA, S.: Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer, *Drug Discov. Today*, **15**, 757~765 (2010)
- 8) BERTELLI, A.A. and DAS, D.K.: Grapes, wines, resveratrol, and heart health., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **54**, 468~476 (2009)
- 9) ISHIMI, Y.: Prevention of osteoporosis by foods and dietary supplements. Soybean isoflavone and bone metabolism, *Clin. Calcium*, **16**, 1661~1667 (2006)

- 10) BHARDWAJ, P. and KHANNA, D. : Green tea catechins : defensive role in cardiovascular disorders, *Chin. J. Nat. Med.*, **11**, 345~353 (2013)
- 11) LECUMBERRI, E., DUPERTUIS, Y.M., MIRALBELL, R. and PICHARD, C. : Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy, *Clin. Nutr.*, **32**, 894~903 (2013)
- 12) 木村俊之・山岸賢治・鈴木雅博・新本洋士 : 農産物のラジカル消去能の検索, 日本食品科学工学会誌, **49**, 257~266
- 13) 吉田 潤・伊藤芳明・木村賢一 : わさびとウド・セリ科野菜に含まれるGSK-3 β 阻害物質の2型糖尿病に関わる機能性, *NewFoodIndustry*, **54**, 9~18 (2012)
- 14) 新本洋士・木村俊之・鈴木雅博・山岸賢治 : 東北地域農産物のマウス白血病細胞増殖に対する作用, 日本食品科学工学会誌, **48**, 787~790 (2001)
- 15) 新本洋士・木村俊之・山岸賢治・鈴木雅博 : 東北地域で生産される野菜および山菜類の抗変異原性試験, 日本食品科学工学会誌, **49**, 736~739 (2002)
- 16) 畠 恵司・石川匡子・堀 一之 : 秋田県産食用山菜に含まれるヒト白血病細胞株 (HL60) に対する分化誘導活性, *生薬学雑誌*, **52**, 269~272 (1998)
- 17) 開元多恵・渋谷まゆみ・前田英雄 : タラの芽がラットの生体に及ぼす影響, *栄養学雑誌*, **68**, 309~314 (2010)
- 18) GOLUBKINA, N.A., MALANKINA, E.L., KOSHELEVA, O. V. and SOLOV'YEV, A.I. : Content of biologically active substances--selenium, flavonoids, ascorbic acid and chlorophyllin of *Allium ursinum* L and *Allium victorialis* L, *Vopr. Pitan.*, **79**, 78~81 (2010)
- 19) SOK, D.E., OH, S.H., KIM, Y.B., KANG, H.G. and KIM, M.R. : Neuroprotection by extract of *Petasites japonicus* leaves, a traditional vegetable, against oxidative stress in brain of mice challenged with kainic acid, *Eur. J. Nutr.*, **45**, 61~69 (2006)
- 20) LEE, K.P., KANG, S., PARK, S.J., CHOI, Y.W., LEE, Y. G. and IM, D.S. : Anti-allergic and anti-inflammatory effects of bakkenolide B isolated from *Petasites japonicus* leaves, *J. Ethnopharmacol.*, **148**, 890~894 (2013)
- 21) SHIN, I. S., MASUDA, H. and NAOHIDE, K. : Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*, *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 255~261 (2004)
- 22) MORIMITSU, Y., NAKAGAWA, Y., HAYASHI, K., FUJII, H., KUMAGAI, T., NAKAMURA, Y., OSAWA, T., HORIO, F., ITOH, K., IIDA, K., YAMAMOTO, M. and UCHIDA, K. : A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf 2 - dependent detoxification pathway, *J. Biol. Chem.*, **277**, 3456~3463 (2002)
- 23) FUKU, Y., HAGA, Y., ONO, H., NOMURA, T. and RYOYAMA, K. : Anti-carcinogenic activity of 6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate-, an active anti-proliferative principal of wasabi (*Eutrema wasabi* Maxim.), *Cytotechnology*, **25**, 197~203 (1997)
- 24) LIU, X.H., HOU, D.B., ZHAO, N. and WANG, B. : Extraction and antioxidant activity of flavonoids from *Aralia cordata*, *Zhong. Yao. Cai.*, **33**, 1484~1487 (2010)
- 25) CHENG, W.L., LIN, T.Y., TSENG, Y.H., CHU, F.H., CHUEH, P.J., KUO, Y.H. and WANG, S.Y. : Inhibitory effect of human breast cancer cell proliferation via p21-mediated G1 cell cycle arrest by araliadiol isolated from *Aralia cordata* Thunb, *Planta. Med.*, **77**, 164~168 (2011)
- 26) KIM, T.D., LEE, J.Y., CHO, B.J., PARK, T.W. and KIM, C.J. : The analgesic and anti-inflammatory effects of 7-oxosandaracopimaric acid isolated from the roots of *Aralia cordata*, *Arch. Pharm. Res.*, **33**, 509~514 (2010)
- 27) TOMATSU, M., OHNISHI - KAMEYAMA, M. and SHIBAMOTO, N. : Aralin, a new cytotoxic protein from *Aralia elata*, inducing apoptosis in human cancer cells, *Cancer Lett.*, **199**, 19~25 (2003)
- 28) SHIRATAKI, Y., MOTOHASHI, N., TANI, S., SUNAGA, K., SAKAGAMI, H., SATOH, K., NAKASHIMA, H., KANAMOTO, T., WOLFARD, K. and MOLNAR, J. : Antioxidative activity of *Allium victorialis* L. extracts, *Anticancer Res.*, **21**, 3331~3339 (2001)
- 29) WOO, K.W., MOON, E., PARK, S.Y., KIM, S.Y. and LEE, K.R. : Flavonoid glycosides from the leaves of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* and their anti-neuroinflammatory effects, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22**, 7465~7470 (2012)
- 30) NISHIMURA, H. : Chemistry of Plant Flavor Components and the Ultra-microanalysis, *J. Japan Oil Chem. Society*, **38**, 856~864 (1989)
- 31) SUZUKI, M., TAKENAKA, M., YAMAGISHI, K. and SHINMOTO, H. : L - O - Caffeoylhomoserine from *Matteuccia struthiopteris*. Kimura, T. , *Phytochemistry*, **65**, 423~426 (2004)
- 32) WOO, E.R., KIM, H.J., KWAK, J.H., LIM, Y.K., PARK, S.K., KIM, H.S., LEE, C.K. and PARK, H. : Anti-herpetic activity of various medicinal plant extracts. *Arch. Pharm. Res.*, **20**, 58~67 (1997)
- 33) OKABE, S., SUGANUMA, M., IMAYOSHI, Y., TANIGUCHI, S., YOSHIDA, T. and FUJIKI, H. : New TNF- α releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, *Megusurino - ki*, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1145~1148 (2001).

- 34) FUJIKI, H., SUGANUMA, M., KURUSU, M., OKABE, S., IMAYOSHI, Y., TANIGUCHI, S. and YOSHIDA, T.: New TNF - alpha releasing inhibitors as cancer preventive agents from traditional herbal medicine and combination cancer prevention study with EGCG and sulindac or tamoxifen, *Mutat. Res.*, **523** ~**524**, 119~125 (2003)
- 35) CHU, Y.F., SUN, J., WU, X. and LIU, R.H.: Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6910 ~6916 (2002)
- 36) VINSON, J.A., SU, X., ZUBIK, L. and BOSE, P.: Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5315~5321 (2001)
- 37) 石見佳子: 植物ポリフェノールの機能性と安全性, 食品と開発, **35**, 5 ~ 7 (2000)
- 38) ROY, M.K., KOIDE, M., RAO, T.P., OKUBO, T., OGASAWARA, Y. and JUNEJA, L.R.: ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: relationship between total polyphenol and individual catechin content., *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **61**, 109~124 (2010)
- 39) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木 吉: 日本食品工業学会誌, **41**, 611~618 (1994)
- 40) 須田郁夫・沖 智之・西場洋一・増田真美・小林美緒・永井沙樹・比屋根理恵・宮重俊一: 沖縄県産果実類・野菜類のポリフェノール含量とラジカル消去活性, 日本食品科学工学会誌, **52**, 462~471 (2005)
- 41) AKAZAWA, H., AKIHISA, T., TAGUCHI, Y., BANNO, N., YONEIMA, R. and YASUKAWA, K.: Melanogenesis Inhibitory and Free Radical Scavenging Activities of Diarylheptanoids and Other Phenolic Compounds from the Bark of *Acer nikoense*, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1970~1972 (2006)
- 42) 久保田芳美・湯浅 (小島) 明子・湯浅 勲: 緑茶抽出物におけるヒト肝ガン細胞の増殖抑制効果におよぼすROS産生の役割, 生活科学研究誌, **2**, 39~47, (2003)
- 43) OKABE, S., SUGANUMA, M., IMAYOSHI, Y., TANIGUCHI, S., YOSHIDA, T. and FUJIKI, H.: New TNF-alpha releasing inhibitors, geraniin and corilagin, in leaves of *Acer nikoense*, *Megusurino - ki*, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1145~1148 (2001)
- 44) 金沢和樹: 植物性食品の非栄養性機能成分ポリフェノール, オレオサイエンス, **7**, 317~325 (2007)
- 45) SHEN, X., ZHANG, Y., FENG, Y., ZHANG, L., Li, J., Xie, Y.A. and Luo, X.: Epigallocatechin-3-gallate inhibits cell growth, induces apoptosis and causes S phase arrest in hepatocellular carcinoma by suppressing the AKT pathway, *Int. J. Oncol.*, **44**, 791~796 (2014)
- 46) YOON, J.W., LEE, J.S., KIM, B.M., AHN, J. and YANG, K.M.: Catechin-7-O-xyloside induces apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human non - small cell lung carcinoma H1299 cells, *Oncol. Rep.*, **31**, 314~320 (2014)
- 47) PEREIRA, L.O., BICALHO, L.S., CAMPOS-DA-PAZ LOPES, M., DE SOUSA, T.M., BÃO, S.N., DE FÁTIMA MENEZES ALMEIDA SANTOS, M. and FONSECA, M.J.: DNA damage and apoptosis induced by Pteridium aquilinum aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3, *J. Oral. Pathol. Med.*, **38**, 441~447 (2009)
- 48) JUNG, H.J., LEE, C.O., LEE, K.T., CHOI, J. and PARK, H.J.: Structure-activity relationship of oleanane disaccharides isolated from *Akebia quinata* versus cytotoxicity against cancer cells and NO inhibition, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 744~747 (2004)
- 49) LI, J., WANG, S., YIN, J. and PAN, L.: Geraniin induces apoptotic cell death in human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **91**, 1016~1024 (2013)
- 50) QUOC TRUNG, L., ESPINOZA, J.L., TAKAMI, A. and NAKAO, S.: Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis in malignant NK cells via JAK2/STAT3 pathway inhibition, *PLoS One.*, **8**, e55183 (2013)
- 51) KANG, N., WANG, M.M., WANG, Y.H., ZHANG, Z.N., CAO, H.R., Lv, Y.H., YANG, Y., FAN, P.H., QIU, F. and GAO, X.M.: Tetrahydrocurcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis involving p38 MAPK activation in human breast cancer cells, *Food Chem. Toxicol.*, **67**, 193~200 (2014)
- 52) MERTENS-TALCOTT, S. U. and PERCIVAL, S. S.: Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells, *Cancer. Lett.*, **218**, 141~151 (2005)
- 53) NAOWARATWATTANA, W., DE-EKNAMKUL, W. and De MEJIA EG.: Phenolic-containing organic extracts of mulberry (*Morus alba* L.) leaves inhibit HepG 2 hepatoma cells through G2/M phase arrest, induction of apoptosis, and inhibition of topoisomerase IIa activity, *J. Med. Food.*, **13**, 1045~1056 (2010)
- 54) LIU, Y.J., ZHOU, C.Y., QIU, C.H., LU, X.M. and WANG, Y.T.: Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells, *Mol. Med. Rep.*, **8**, 1106~1110 (2013)

- 55) TSENG, T.H., SHEN, C.H., HUANG, W.S., CHEN, C.N., LIANG, W.H., LIN, T.H. and KUO, H.C.: Activation of neutral-sphingomyelinase, MAPKs, and p75 NTR-mediated caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis in C6 glioma cells, *J. Biomed. Sci.*, **21**, 61 (2014)
- 56) 村山 徹・箭田浩士・宮沢佳恵: コシアブラ抗酸化成分の促成栽培条件による変動, 園芸学研究, **6**, 241~245 (2007)
- 57) 徳田正樹・沖 智之・永井沙樹・須田郁夫: 大分県産山菜類の抗酸化活性とその関与成分, 九州農業研究, **67**, 42 (2005)
- 58) ZHAO, J., FANG, S., YUAN, Y., GUO, Z., ZENG, J., GUO, Y., TANG, P. and MEI, X.: Green tea polyphenols protect spinal cord neurons against hydrogen peroxide-induced oxidative stress, *Neural Regen Res.*, **9**, 1379~1385 (2014)
- 59) PATIL, S.P., JAIN, P.D., SANCHETI, J.S., GHUMATKAR, P.J., TAMBE, R. and Sathaye, S.: Neuroprotective and neurotrophic effects of Apigenin and Luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice, *Neuropharmacology*, **86**, 192~202 (2014)
- 60) VENUPRASAD, M.P., HEMANTH KUMAR, K. and KHANUM, F.: Neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of *Ocimum sanctum* against H₂O₂ induced neuronal cell damage in SH-SY5Y cells via its antioxidative defence mechanism, *Neurochem. Res.*, **38**, 2190~200 (2013)
- 61) HSU, C.L., HUANG, S.L. and YEN, G.C.: Inhibitory effect of phenolic acids on the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes in relation to their antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 4191~4197 (2006)
- 62) CHEN, H., TUCK, T., Ji, X., ZHOU, X., KELLY, G., CUERRIER, A. and ZHANG, J.: Quality assessment of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) grown on Prince Edward Island as a source of resveratrol, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 6383~6392 (2013)
- (平成26年10月15日受付, 平成27年2月12日受理)
-

Mathematical Modeling of Intercellular Space Volume of Citrus Fruits

DIRPAN Andi^{*1, *2}, HIKIDA Yoshio^{*1§},
CHIBA Hironori^{*1} and OGAWA Yukiharu^{*3}

* 1 Faculty of Agriculture, Ehime University, 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566

* 2 Department of Food Science and Technology, Hasanuddin University, Makassar 90245, Indonesia

* 3 Graduate School of Horticulture, Chiba University, 648 Matsudo, Matsudo-shi, Chiba 271-8510

The aim of the present study is to determine the intercellular space volume (V_{in}) of citrus fruits and to develop a simple prediction method for V_{in} . In determining V_{in} , the mass (m), vertical and horizontal diameters (vd , hd), total volume (V_t), and real density (P_t) of eight species of citrus fruits of different sizes were measured. The results showed that each species had various V_{in} , which depended on fruit size; in other words, the larger the size of the fruit, the larger the V_{in} . However, the levels of porosity (ϕ) in each species were not fully proportional to fruit size. The model used to develop the simple prediction method for V_{in} ($V_{in} = V_t - \frac{m}{1.0647}$, where V_{in} and V_t are in cubic centimeters and m is in grams), exhibited a high determination coefficient ($R^2 = 0.999$), modeling efficiency ($EF = 0.999$), index of agreement ($d = 0.999$), and paired t -test value (0.365). It was concluded that the model is suitable for predicting V_{in} of citrus fruits.

(Received Sep. 22, 2014 ; Accepted Feb. 12, 2015)

Key words : *intercellular space volume, citrus, mathematical modeling, modified atmosphere packaging, controlled atmosphere storage*

細胞間隙体積,カンキツ, 推定モデル, MA包装, CA貯蔵

Japan is a major citrus fruit-producing country¹⁾, and Ehime Prefecture is one of the main citrus fruit producing regions in Japan. As many as 20 major citrus varieties are cultivated in Ehime annually.

The quality of fresh produce is greatly affected by internal concentrations of CO_2 and O_2 ²⁾, which are influenced by intercellular space volume (V_{in}). V_{in} acts as a diffusion pathway through plant organs to supply adequate O_2 for respiration³⁾ and allows evolution of CO_2 . Moreover, the network of V_{in} has been described as a system for the gaseous transport of O_2 , CO_2 , C_2H_4 , and other physiologically important gases^{4), 5)}.

According to a number of gas exchange studies, V_{in} of fruit is an important factor^{2), 6)~9)}. Some studies have shown that gas exchange¹⁰⁾ and respiration¹¹⁾ in fruit are directly influenced by V_{in} , and fruit tissue with a small V_{in} results in low respiration¹¹⁾. Other studies focusing on V_{in} in apples and pears have shown that fruit with greater V_{in} or porosity, that is, the ratio of V_{in} and total volume of a fruit, had higher internal gas diffusion¹²⁾ and became softer¹³⁾

or more mealy¹⁴⁾. Furthermore, a study on tolerance to controlled atmosphere (CA) conditions has suggested that this tolerance depends on V_{in} or porosity. For instance, although the apple cultivar Cox's Orange is characterized by low porosity and has a low tolerance to CA, fruit with high porosity tends to have a high tolerance to CA¹⁰⁾.

From the above studies, it can be concluded that V_{in} is an important factor in estimating sensitivity of fruit to low levels of O_2 , high levels of CO_2 , or both in the surrounding atmosphere and in determining appropriate concentrations for CA storage or modified atmosphere packaging (MAP). To further develop MAP or CA storage techniques focusing on citrus fruit, we are studying gas diffusion characteristics in plant organs¹⁵⁾ and respiration function in the intercellular space, and we plan to establish a prediction and control method of O_2 and CO_2 concentrations in the intercellular space. In this research, the V_{in} value of citrus fruit is required.

To the best of our knowledge, this is the first study to determine V_{in} of various citrus species.

The objective of this study is to determine V_{in} using the pycnometric method and to develop a simple prediction method for V_{in} . The pycnometric method is time consuming because ground samples are required. Accordingly, a prediction method can be simply applied to determine the V_{in} of citrus fruits.

Materials and methods

1. Materials

The experiment used eight species of freshly harvested citrus fruit at Ehime University farm: Iyokan (*Citrus iyo* hort. ex Tanaka), Navel (*Citrus sinensis* L. Osbeck var. *brasiliensis* Tanaka), Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), Siranui (*Citrus unshiu* Marcov x *Citrus sinensis* Osbeck x *Citrus reticulata* Blanco), Amanatsu (*Citrus natsudaidai* Hayata), 'Kiyomi' tangor (*Citrus unshiu* Marcov. forma *miyagawa-wase* x *C. sinensis* Osbeck), Lime (*Citrus aurantifolia*), and Unshu (*Citrus unshiu* Marc. cv. Kuno). Each species consisted of five sizes (S, M, L, 2L, and 3L), except Lime, for which only two sizes were used (small and large) because of the absence of size standards. The citrus fruits were measured just after harvest (Table 1).

2. Physical measurements

The mass, diameter, volume, and apparent density were measured for five whole fruits for each size: 25 fruits were measured for each species except Lime, for which 10 fruits were measured. For real density, citrus tissue was measured in five fruits each of the two middle sizes (L and 2L) per species, except for Lime with small and large sizes, giving a total of 10 fruits measured for each species.

The real density of peel and flesh and the apparent density of a segment of fruit were measured only for Unshu, which was considered to have a typical morphology of citrus, with five fruits each of the two middle sizes (L and 2L), giving a total of 10 fruits measured. The apparent density of a segment was measured in three segments for each fruit.

(1) **Mass and diameter** Fruit mass (m) was measured using an electric balance accurate to 0.1 g. Vertical dimension (vd), and horizontal dimension 1 (hd1) and 2 (hd2), which perpendicularly intersect, were measured using slide calipers accurate to 1 mm. Vertical dimension represents the measurement from one apex to the next. Horizontal dimension represents the measurement of the equatorial axis.

Table 1 Vertical dimension (vd) and horizontal dimension (hd) of eight citrus species

Harvest date	Species	Size	Diameters (cm)	
			vd	hd
22 January	Navel	S	6.1	6.6
		M	6.6	6.9
		L	7.6	7.7
		2 L	8.0	8.2
		3 L	8.4	8.9
23 January	Iyo	S	5.8	7.0
		M	6.7	7.9
		L	7.5	8.5
		2 L	7.8	9.2
		3 L	8.4	9.7
8 February	Ponkan	S	5.3	5.9
		M	5.9	6.3
		L	6.2	6.7
		2 L	6.5	7.5
		3 L	7.5	7.8
4 March	Siranui	S	6.2	6.4
		M	6.6	7.0
		L	7.2	7.7
		2 L	7.6	8.3
		3 L	8.4	8.9
13 April	Amanatsu	S	7.3	8.6
		M	7.4	9.2
		L	7.6	9.7
		2 L	8.1	10.2
		3 L	8.5	10.9
3 March	'Kiyomi' tangor	S	5.3	6.0
		M	5.8	6.7
		L	6.1	6.8
		2 L	6.7	7.8
		3 L	7.4	8.3
5 November	Lime	Small	5.0	4.8
		Large	6.2	5.6
4 December	Unshu	S	4.7	5.9
		M	4.9	6.5
		L	5.1	7.1
		2 L	5.4	7.7
		3 L	6.0	8.4

All measurements were performed in quintuplicate ($n = 5$) in 2013. hd was obtained from mean values of hd1 and hd2, which perpendicularly intersect.

(2) **Volume** A technique based on Archimedes' principle was used to determine the total volume (V_t) of fruit. Buoyancy was measured using an electric balance accurate to 0.1 g when a sample was submerged in water. Sphere equivalent volume (V_s) was also calculated by assuming that the fruit

is a sphere with a diameter the average of vd , $hd1$, and $hd2$.

(3) Real density and apparent density Real density (P_t) of citrus tissue was measured using the pycnometric technique¹⁶⁾. First, a 25 mL pycnometer filled with distilled water was weighed (W_1) using an electric balance accurate to 0.001 g. The density of distilled water was 0.9982 g/cm³ while the temperature of the distilled water was kept at 20 °C. Next, after the water in the pycnometer was removed, the pycnometer was weighed (W_2). Approximately 10 g of ground sample by mortar and pestle that is one-eighth of a whole sample (stem end, consisting of peel and flesh) was placed in the pycnometer and weighed (W_3). The sample weight in the pycnometer can be obtained by subtracting W_2 from W_3 . Next, the sample in the pycnometer was submerged in water; subsequently, the pycnometer was placed in a vacuum (0.01 MPa) for up to 30 min to eliminate the air bubbles in the sample. Next, the pycnometer containing the sample was filled fully with distilled water and weighed (W_4). Finally, real density was calculated using the following equation.

$$P_t = 0.9982 \frac{W_3 - W_2}{W_1 + W_3 - W_2 - W_4} \dots\dots\dots (1)$$

P_t : Real density of citrus tissue (g/cm³)

The pycnometric technique was also applied to the peel and flesh of Unshu fruit to determine their real density.

The apparent density of whole fruit (P_a) was calculated as the ratio of fruit mass (m) to total volume (V_t).

The apparent density of a segment of Unshu fruit was also calculated as the ratio of the mass to the volume, which was measured using Archimedes' principle.

3. Determination of intercellular space volume and porosity

Intercellular space volume (V_{in}) was calculated after measuring mass, total volume, and real density. V_{in} is the difference between total volume and the volume of fruit tissue¹⁶⁾ (Equation (2)). Therefore, V_{in} was calculated using Equation (3).

$$V_{in} = V_t - V_{tissue} \dots\dots\dots (2)$$

$$V_{in} = V_t - \frac{m}{P_t} \dots\dots\dots (3)$$

V_{in} : Intercellular space volume (cm³)

V_t : Total volume of whole fruit (cm³)

V_{tissue} : Volume of fruit tissue (cm³)

m : Mass of fruit (g)

P_t : Real density of fruit tissue (g/cm³)

Porosity (ϕ) was determined using the following equation.

$$\phi = \frac{V_{in}}{V_t} 100 \dots\dots\dots (4)$$

ϕ : Porosity (%)

4. Measurement of moisture content

Moisture content was measured using the oven drying method (100 °C for 24 h). We measured samples of about one-eighth of a whole fruit. All samples were weighed using an electric balance accurate to 0.001 g. Wet basis moisture content was presented as a percentage.

5. Statistical analysis

For real density between two fruit sizes (L and 2 L, small and large for Lime) in all species, the t -test (independent sample) with a level of significance of $P < 0.05$ was applied to assess the differences. We used Tukey's test with a level of significance of $P < 0.05$ to determine the significance of differences among means of species. To analyze the data, we used SPSS software for Windows version 16.0 (SPSS Inc., IL, USA) and Microsoft Excel 2010.

Results and Discussion

1. Real density and moisture content

Table 2 shows the size, real density, and moisture content of eight citrus species. Real density did not significantly differ between the two fruit sizes for all the species ($P < 0.05$). This result suggests that the mean value of the two fruit sizes for all species can be applied to the other sizes. Using Navel as an example, the mean value of 1.0676 for L and 2 L can be applied to the other three sizes (S, M, 3 L).

For real density among the species, Unshu and Lime were grouped together and the six remaining species were grouped together, with a significant difference between the two groups. To investigate the difference in real density among the species, the relationship between moisture content and real density was examined. As shown in Table 2, species with higher moisture content had lower real density, and vice versa. For instance, while the average of the means for moisture content and real density of Lime and Unshu were 86.29% and 1.0531 g/cm³, respectively, the corresponding average mean values for Navel, Iyokan, Ponkan, Siranui, Amanatsu, and 'Kiyomi' tangor were 82.96% and 1.0678 g/cm³, respectively. This result was consistent with a study by ABHAYAWICK *et al.*¹⁷⁾, in which the moisture content of three onion varieties was investigated;

Table 2 Real density and moisture content of sizes L and 2 L for eight species of citrus fruits

Species	Size	Real Density* (g/cm ³)	Moisture content** (%)
Navel	L	1.0667	81.32
	2 L	1.0685	81.32
	Mean	1.0676 ^a	81.32
Iyo	L	1.0661	84.72
	2 L	1.0648	84.33
	Mean	1.0655 ^a	84.53
Ponkan	L	1.0697	83.81
	2 L	1.0704	82.62
	Mean	1.0700 ^a	83.22
Siranui	L	1.0710	81.61
	2 L	1.0666	80.43
	Mean	1.0688 ^a	81.02
Amanatsu	L	1.0675	83.35
	2 L	1.0627	83.12
	Mean	1.0651 ^a	83.24
'Kiyomi'	L	1.0736	84.45
	2 L	1.0659	84.37
	Mean	1.0697 ^a	84.41
Lime	Small	1.0577	86.91
	Large	1.0546	86.16
	Mean	1.0562 ^b	86.53
Unshu	L	1.0515	86.56
	2 L	1.0485	85.54
	Mean	1.0500 ^b	86.05

*All measurements were performed in quintuplicate (n = 5).

**All measurements were performed once (n = 1).

Means of real density followed by different letters are significantly different as determined by the Tukey test at $P < 0.05$.

Values of real density are not significantly different as determined by the t -test at $P < 0.05$ on the L and 2 L sizes for all species, including Lime with small and large sizes.

the onion varieties with higher moisture had lower real density.

Table 3 presents the real density and moisture content of the peel, flesh, and a mixture of peel and flesh for two sizes (L and 2 L) of Unshu. The real density of peel was higher than that of flesh and a mixture of peel and flesh at 1.0696 g/cm³, 1.0420 g/cm³, and 1.0500 g/cm³, respectively. Tukey's test revealed differences in the real density of peel compared with flesh and a mixture of peel and

Table 3 Real density and moisture content of peel, flesh, and mixture of peel and flesh for Unshu

Measurements	Real density* (g/cm ³)	Moisture content** (%)
Peel	1.0696 ^a	77.22
Flesh	1.0420 ^b	88.46
Mixture of peel and flesh	1.0500 ^b	86.05

*All measurements were performed ten times (n = 10): size L = 5 and 2L = 5.

**All measurements were performed twice (n = 2): size L = 1 and 2L = 1.

All data are expressed as the mean. Means of real density followed by different letters are significantly different, as determined by the Tukey test at $P < 0.05$.

Real density for the mixture of peel and flesh is taken from Table 2.

flesh. A distinct difference in moisture content suggested the difference in real density. This phenomenon was similar to the previous discussion, showing that the higher the moisture content, the lower the real density.

The real density of Lime and Unshu was less than that of the other six species; however, total real densities ranged from a minimum of 1.0409 g/cm³ to a maximum of 1.0838 g/cm³ with a very small standard deviation of 0.0077 g/cm³ and standard error of 0.00057 g/cm³, and the total mean was 1.0647 g/cm³. All the species were therefore considered to have generally the same value as the total mean. The real density range was similar to that found in a previous study of mandarin citrus with a range from 0.81 g/cm³ to 1.08 g/cm³ ¹⁸⁾.

2. Intercellular space volume and porosity

Table 4 shows the physical properties of the eight citrus species. While the intercellular space volume (V_{in}) of the L and 2L sizes was calculated by measuring real density, V_{in} of the other three sizes (S, M, 3L) was calculated by applying the mean value of real density from the L and 2L sizes, except for Lime. V_{in} is a property of the cultivars that depends on the growing season ^{19), 20)}. From the results, we see that size, mass, and total volume were proportional to V_{in} for each species. For all species, V_{in} ranged from 4.2 cm³ to 142.2 cm³, in which 3 L Amanatsu was the highest.

The porosity of all species ranged from 6.7% to 29.4%. The results showed that while Amanatsu and Lime had a porosity proportional to their size, the remaining samples showed otherwise. For

Table 4 Physical properties of citrus fruits: mass (m), total volume determined using Archimedes' principle (V_t), apparent density (P_a), intercellular space volume (V_{in}), and porosity (ϕ)

Species	Size	m (g)	V_t (cm ³)	P_a (g/cm ³)	V_{in} (cm ³)	ϕ (%)
Navel	S	137.7	143.3	0.9608	14.3	10.0
	M	166.7	172.7	0.9653	16.5	9.5
	L	224.2	243.7	0.9199	33.6	13.7
	2L	272.4	297.7	0.9152	42.7	14.3
	3L	329.2	363.9	0.9407	55.5	15.3
Iyo	S	132.6	167.2	0.7927	42.8	25.7
	M	185.8	247.1	0.7522	72.6	29.3
	L	248.3	306.5	0.8102	73.5	23.9
	2L	290.3	377.8	0.7682	105.2	27.8
	3L	336.3	446.8	0.7528	131.1	29.4
Ponkan	S	90.4	107.1	0.8448	22.5	21.1
	M	113.4	131.6	0.8611	25.7	19.6
	L	125.6	155.4	0.8079	38.0	24.5
	2L	162.1	205.8	0.7876	54.3	26.4
	3L	192.2	253.2	0.7589	73.6	29.0
Siranui	S	123.5	133.0	0.9289	17.4	13.0
	M	155.5	172.5	0.9013	27.0	15.6
	L	199.1	226.7	0.8780	40.9	18.0
	2L	241.4	269.1	0.8972	42.8	15.9
	3L	290.5	331.8	0.8756	59.6	17.9
Amanatsu	S	263.0	305.3	0.8614	58.4	19.1
	M	303.4	353.5	0.8584	68.6	19.4
	L	342.5	404.7	0.8464	83.8	20.6
	2L	391.3	473.2	0.8269	104.9	22.2
	3L	465.2	579.0	0.8035	142.2	24.6
'Kiyomi' tangor	S	95.1	105.4	0.9029	16.4	15.6
	M	126.0	139.3	0.9048	21.5	15.4
	L	135.7	154.0	0.8815	27.6	17.8
	2L	192.3	216.5	0.8881	35.2	16.3
	3L	238.3	269.5	0.8845	46.7	17.3
Lime	Small	61.2	62.0	0.9868	4.2	6.7
	Large	101.6	104.0	0.9775	7.6	7.3
Unshu	S	88.7	96.7	0.9175	12.2	12.6
	M	111.6	120.1	0.9290	13.8	11.5
	L	137.4	152.6	0.9002	21.9	14.4
	2L	168.8	191.9	0.8800	30.8	15.9
	3L	209.2	249.9	0.8371	50.7	20.2

All measurements were performed in quintuplicate ($n = 5$). Data are expressed as the mean.

We calculated the V_{in} of S, M, and 3L by applying the mean value of real density from L and 2L.

example, Iyo size L had only 23.9% porosity, while size M had 29.3% porosity. BAUMAN and HENZE¹⁰⁾, reported similar results for apples, investigating small and large varieties. Porosity is useful as an additional factor in estimating sensitivity to low

levels of O_2 , high levels of CO_2 , or both in the surrounding atmosphere and in determining tolerable concentrations for $CA^{10)}$. For example, BAUMAN and HENZE¹⁰⁾ categorized the porosity of the apple cultivar Cox's Orange for three levels of tolerance to CA: low level ($<14\%$), mid-level (14.1%~16%), and high level ($>16\%$). The values for porosity in Table 4 can teach us more about the relationship between citrus porosity and its tolerance to CA.

The apparent density of a citrus segment was also measured in L and 2L Unshu. The mean apparent density of the citrus segments (1.0147 g/cm³) was greater than that of intact citrus (0.8901 g/cm³), indicating that the porosity of intact fruit is greater than that of a segment. The porosity of citrus segments was only 2.6%, while the porosity of whole fruit was 15.2%, suggesting that the majority of intercellular space is outside segments. Most V_{in} is in the central cavity and under the skin of the citrus.

3. Simple prediction method for intercellular space volume

The following two steps were applied to develop a simple prediction model for V_{in} using measurements of mass and volume. First, models were developed using Equation (3). Second, a validation test was performed by comparing the measured and predicted values of V_{in} for the eight species.

We can select the best model based on the higher values for the determination coefficient (R^2), modeling efficiency (EF), index of agreement (d), and paired t -test. R^2 provides a measure of how well the model replicates the measured values model. To obtain an acceptable goodness of fit, the values for R^2 must approach 1. EF and d are dimensionless statistics ranging from $-\infty$ to 1 and from 0 to 1, respectively, which suggests that the value should be equal to or greater than 0 for EF and 0.75 for d to evaluate a model precisely²¹⁾. We can determine both EF and d by using Equations (5) and (6)²¹⁾.

$$EF = 1 - \frac{\sum (y - \hat{x})^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \dots\dots\dots (5)$$

$$d = 1 - \frac{\sum (y - \bar{x})^2}{\sum (|y - \bar{x}| + |\bar{x} - \bar{y}|)^2} \dots\dots\dots (6)$$

where x is the measured value, y is the predicted value, \bar{x} is the measured mean, and \bar{y} is the predicted mean. Finally, to test for a significant

difference between measured and predicted, the paired *t*-test can be used with a level of significance of $P < 0.05$.

In the first model, we used mass (*m*), total volume (V_t) determined using Archimedes' principle, and real density (P_t) to develop a simple prediction method for V_{in} . From Equation (3), Equation (7) was developed by assuming that the values for real density (P_t) are similar in all species based on our findings in this study (1.0647 g/cm³).

$$V_{in} = V_t - \frac{m}{1.0647} \dots\dots\dots (7)$$

where V_{in} and V_t are in cubic centimeters and *m* is in grams. To confirm the applicability of Equation (7), the predicted values for V_{in} from Equation (7) were compared with the measured values for V_{in} from Equation (3) using R^2 , EF, *d*, and the paired *t*-test. We used total measured and predicted values from 185 samples to validate the model. Fig. 1 shows the results of the comparison between measured and predicted values for all species. The measured and predicted V_{in} values were very close. In addition, the high values for R^2 (0.999), EF (0.999), and *d* (0.999) in Equation (7) indicate the low variability of V_{in} prediction. Then, the paired *t*-test (0.365) indicates that measured and predicted V_{in} were not significantly different. Therefore, we can conclude that Equation (7) provides precise predicted values of V_{in} for the citrus fruits which have real density of nearly 1.0647 g/cm³.

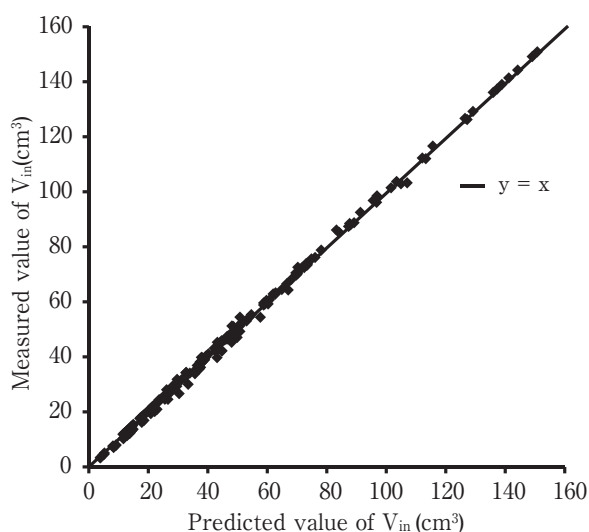


Fig.1 Comparison of predicted (Equation 7) and measured values (Equation 3) of V_{in} in all citrus species ($n = 185$)

Each data point represents individual fruits.

We also examined a second model in which total volume was replaced with sphere equivalent volume (V_s). From Equation (7), Equation (8) was developed by replacing V_t with V_s .

$$V_{in} = V_s - \frac{m}{1.0647} \dots\dots\dots (8)$$

where V_{in} and V_s are in cubic centimeters and *m* is in grams. To validate the model, the measured and predicted values for V_{in} were compared using R^2 , EF, *d*, and the paired *t*-test. Total measured and predicted values from 185 samples validated the model. The values for R^2 (0.860), EF (0.679), and *d* (0.904) could be generally acceptable. However, the paired *t*-test (0.000) shows that measured and predicted V_{in} were significantly different. The paired *t*-test values of each species were less than 0.05, except for Siranui (0.391), indicating that the model in Equation (8) is not suitable for precisely predicting V_{in} .

Conclusion

In this paper, we have presented the determination of intercellular space volume (V_{in}) in eight species of citrus fruits and the development of a simple prediction method for V_{in} . For all eight species, V_{in} ranged from 9.2 cm³ to 142.2 cm³. For each species, we can see that size, mass, and total volume were proportional to V_{in} . The porosity of the eight species ranged from 6.7% to 29.4%. The real density of the species was almost similar to the mean value, 1.0647 g/cm³. On the basis of the mean value, we developed two mathematical models to predict V_{in} .

On the basis of four statistical evaluation methods, where V_t is the total volume measured using Archimedes' principle and *m* is mass of a fruit, we evaluated model $V_{in} = V_t - \frac{m}{1.0647}$, and determined it to be acceptable for predicting V_{in} . However, the alternative model, $V_{in} = V_s - \frac{m}{1.0647}$, where V_s is the sphere equivalent volume calculated by average diameter, was not acceptable.

Acknowledgment This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 24380135.

References

- 1) FAO : Citrus fruit, Fresh and processed, Annual statistics 2012, (FAO, New York), p. 6 (2012)
- 2) HAGENMAIER, R.: Methods for measuring internal

- gases of citrus fruit and determining peel permeance, *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **116**, 418~423 (2003)
- 3) KUROKI, S., OSHITA, S., SOTOME, I., KAWAGOE, Y. and SEO, Y. : Visualization of 3-D network of gas-filled intercellular spaces in cucumber fruit after harvest, *Postharvest Biol. Technol.*, **33**, 255~262 (2004)
 - 4) CALBO, A. and NERY, A. : Methods for measurement of gas volume of fruits and vegetables, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **120**, 217~221 (1995)
 - 5) CALBO, A. G. and NERY, A. A. : Methods to measure gaseous volume in plants, *R. Bras. Fisiol. Veg.*, **I**, 153~162 (1994)
 - 6) CAMERON, A. C. and YANG, S. F. : A simple method for the determination of resistance to gas diffusion in plant organs., *Plant Physiol.*, **70**, 21~23 (1982)
 - 7) KNEE, M. : Rapid measurement of diffusion of gas through the skin of apple fruits, *Hort Sci.*, **26**, 885~887 (1991)
 - 8) DE Wild, H. P. and PEPPELENBOS, H. W. : Improving the measurement of gas exchange in closed systems, *Postharvest Biol. Technol.*, **22**, 111~119 (2001)
 - 9) BANKS, N. H. : Estimating skin resistance to gas diffusion in apples and potatoes, *J. Exp. Bot.*, **36**, 1842~1850 (1985)
 - 10) BAUMAN, H. and HENZE, J. : Intercellular space volume of fruit, *Acta Hortic.*, **138**, 107~111 (1983)
 - 11) RAJAPAKSE, N. C., BANKS, N. H., HEWETT, E. W. and CLELAND, D. J. : Development of oxygen concentration gradients in flesh tissues of bulky plant organs, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **115**, 793~797 (1990)
 - 12) HO, Q. T., VERLINDEN, B. E., VERBOVEN, P., VANDEWALLE, S. and NICOLAI, B. M. : A permeation - diffusion - reaction model of gas transport in cellular tissue of plant materials, *J. Exp. Bot.*, **57**, 4215~4224 (2006)
 - 13) YEARSLEY, W. I., BANKS, N. H. and GANESH, S. : Temperature effects on the internal lower oxygen limits of apple fruit, *Postharvest Biol. Technol.*, **11**, 73~83 (1997)
 - 14) TU, K., DE Baerdemaeker, J., DELTOUR, R. and DE BARSY, T. : Monitoring post-harvest quality of Granny Smith apple under simulated shelf-life conditions : destructive, non - destructive and analytical measurements, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **31**, 267~276 (1996)
 - 15) DIRPAN, A. and HIKIDA, Y. : Effect of fruit sizes on resistance to gas diffusion of citrus, *Proc. The 5 th Int. conf. Bali. Sustainable future for human security.*, **5**, 77 (2014)
 - 16) TARUTANI, T., NADA, T. and KITAGAWA, H. : On the porosity of fresh produce, *Supl. Hortic. Res.*, **S 48**, 406~407 (1973) (In Japanese)
 - 17) ABHAYAWICK, L., LAGUERRE, J. ., TAUZIN, V. and DUQUENOY, A. : Physical properties of three onion varieties as affected by the moisture content, *J. Food Eng.*, **55**, 253~262 (2002)
 - 18) YEHA, I., KABEEL, M. H. and GALEEL, M. M. A. : Physical and mechanical properties of ponkan mandarin applied to grading machine, *Misr J. Agric. Eng.*, **26**, 1036~1053 (2009)
 - 19) SCHOTSMANS, W., VERLINDEN, B. E., LAMMERTYN, J., PEIRS, A., JANCsÓK, P. T., SCHEERLINCK, N. and NICOLAI, B. M. : Factors affecting skin resistance measurements in pipfruit, *Postharvest Biol. Technol.*, **25**, 169~179 (2002)
 - 20) EBRAHIM REZAGAH, M., ISHIDA, S., TANAKA, F., UCHINO, T., HAMANAKA, D. and HIKIDA, Y. : Determination of gas diffusivity and skin resistance for three cultivars of Japanese Pear using their actual 3D geometry, *Environ. Control Biol.*, **51**, 193~200 (2013)
 - 21) YANG, J. M., YANG, J. Y., LIU, S. and HOOGENBOOM, G. : An evaluation of the statistical methods for testing the performance of crop models with observed data, *Agric. Syst.*, **127**, 81~89 (2014)

カンキツ果実における細胞間隙体積の推定モデル

ディルパン アンディ^{*1, *2}・疋田慶夫^{*1}

千葉浩徳^{*1}・小川幸春^{*3}

* 1 愛媛大学農学部

(〒790-8566 愛媛県松山市樽味3丁目5-7)

* 2 ハサヌデイン大学食品科学工学科

(Makassar 90245, Indonesia)

* 3 千葉大学大学院園芸学研究科

(〒271-8510 千葉県松戸市松戸648)

カンキツ果実の細胞間隙体積 (V_{in}) を測定し、これを簡便に推定する方法を確立することを目的に、8品種のサイズの異なるカンキツを対象にした質量 (m)、縦および横径 (vd , hd)、体積 (V_t)、真密度 (P_t) の測定を行った。間隙体積は品種毎の値を示したが、一つの品種においては果実のサイズに依存した。すなわち、サイズが大きい果実ほど間隙体積は大きかった。しかしながら、間隙率 (ϕ) ではその傾向が顕著ではなかった。間隙体積を簡便に推定する方法として得られた $V_{in}=V_t - \frac{m}{1.0647}$ の推定モデルは、実測値との間にそれぞれ高い決定係数 (0.999)、EF値 (0.999)、IA値 (0.999)、t検定値 (0.365) を示した。これより、得られた推定モデルは、カンキツ果実の間隙体積を推定するために適用できるものと考えた。

(平成26年9月22日受付, 平成27年2月12日受理)

生姜汁を用いた牛乳ゲルの形成について

山田 徳広^{*1§}・永島 伸浩^{*2}・志垣 瞳^{*3}・稲熊 隆博^{*3}

^{*1} 津市立三重短期大学生活科学科食物栄養学専攻

^{*2} 武蔵丘短期大学健康栄養専攻

^{*3} 帝塚山大学現代生活学部食物栄養学科

Preparation of Milk Gels by Incubating a Mixture of Milk and Ginger Juice

YAMADA Norihiro^{*1§}, NAGASHIMA Nobuhiro^{*2},
SHIGAKI Hitomi^{*3} and INAKUMA Takahiro^{*3}

^{*1} Food and Nutrition major, Department of Life Science, Tsu City College,
157 Ishinden-nakano, Tsu, Mie 514-0112

^{*2} Department of Health and Nutrition, Musashigaoka Collage,
111-1 Minamiyoshimi, Yoshimi, Hiki-gun, Saitama 355-0154

^{*3} Department of Food and Nutrition, Faculty of Contemporary Human Life Science, Tezukayama University,
3-1-3 Gakuenminami, Nara-shi, Nara 631-8585

Milk gels were prepared by incubating a mixture of milk and ginger juice at different temperatures and incubation times. This was done to determine the effects of variation in temperature and incubation time on the hardness, adhesiveness, and cohesiveness of milk gels. Our results demonstrated that it was favorable to incubate the mixture for 30 minutes at 60–70°C, after mixing the milk and ginger juice by stirring. The hardness increased with additional heating to 80°C after gel formation using ginger protease. Our findings suggest that it is possible to adjust the hardness of the gels by combining the enzyme reaction with heating. The hardness of the gel could be adjusted by addition of 1.5–2.0w/w% gelatin, therefore, gels prepared by a mixing milk and ginger juice have promising applications as food sources for elderly people or as foods for swallowing training.

(Received Nov. 4, 2014 ; Accepted Mar. 19, 2015)

Key words : milk, ginger, protease, gelation, swallowing training

牛乳, 生姜, プロテアーゼ, ゲル化, 嚥下訓練食

高齢社会を迎えた日本では、高齢者の生活習慣病¹⁾、低栄養²⁾、摂食機能の低下³⁾などが問題となっている。特に低栄養では、良質なたんぱく質とカルシウムの補給が課題である²⁾。牛乳はたんぱく質含量が高く、アミノ酸スコア100の完全たんぱく質食として評価されている⁴⁾。また、カルシウム含量が90–140mg/100mlと高く⁴⁾、希釈性に優れ、食感をなめらかにする、色合いをよくする、生臭さを脱臭する、硬さを調節するなど料理に対する応用性も広いことから⁵⁾、高齢者に向けた食品であると考えられている⁴⁾。一方、高齢者は嚥下機能が低下している場合がみられることから、ゼリーなどの適度な粘弾性をもった食品が好ましいといわれている⁶⁾。嚥下訓練食

として1.0–2.0w/w%ゼラチンゲルが向いている⁷⁾ことから、同様の粘弾性をもった牛乳ゲル化食品を調製することは高齢者の栄養補給の面から重要である。

中国には加温した牛乳または水牛乳に生姜の絞り汁を加えてゲル化した薑汁撞奶(キョンジャツゾンナーイ)、薑撞牛奶(キョンゾンアウナーイ)または薑埋奶(キョンマーイナーイ)と呼ばれる食品がある^{8)–10)}。生姜はその特有の風味と芳香性から広く薬味や香辛料として利用されている¹⁰⁾だけではなく、血中コレステロール低下作用、解熱作用、鎮痛作用、および抗酸化作用など、健康に寄与する食材としても注目を集めている¹²⁾。高齢者用食品を評価するために、硬さ、凝集性および付着性を把

^{*1} 〒514-0112 三重県津市一身田中野157

§ Corresponding author, E-mail: nyamada@tsu-cc.ac.jp

^{*2} 〒355-0154 埼玉県比企郡吉見町南吉見111-1

^{*3} 〒631-8585 奈良県奈良市学園南3-1-3

握することが重要であると指摘されている¹³⁾が、生姜汁によって形成される牛乳ゲルをこれらの指標で調整した研究は行われていない。

本研究は、栄養価が高く高齢者が摂取しやすい牛乳ゲル化食品を調製するために生姜汁を用いて牛乳ゲルを形成する場合の生姜プロテアーゼの反応条件と加熱が硬さ、凝集性および付着性に及ぼす影響を調べ、牛乳ゲルの形成状態を調整することを検討した。また、嚥下訓練食として1.0~2.0w/w%ゼラチンゲルが向いている⁷⁾ことから、牛乳ゲルと1.0~3.0w/w%ゼラチンゲルとの比較を行った。

実験方法

1. 試料と試薬

生姜は予備実験においてプロテアーゼの活性が最も高かった清水物産株式会社より購入した中国産のひね生姜を使用した。牛乳は予備実験においてゲルの形成状態が最もよかった蒜山ジャージー牛乳プレミアム5.0 (蒜山酪農業協同組合 (以下牛乳とする)) を使用した。トリプシンは生化学用Trypsin. Cryst (4830USP trypsin units/mg (14490BAEE units/mg)) (和光純薬工業(株) (大阪)), オイルレッドO染色液は (武藤化学(株) (東京)) を使用した。ゼラチンと寒天は関東化学(株) (東京) の一級試薬を, その他の試薬は関東化学(株) (東京) の特級試薬を使用した。

2. 生姜汁の調製

皮を剥かない状態の生姜を約2cm角に切り, 低速圧縮ジューサー (ヘルシオジュースプレッソ, SHARP (株) (大阪)) を用いて搾汁した。得られた生姜汁を3,000 r.p.m.で10分間遠心分離した後, 上清をろ紙No. 2でろ過し, -80℃で保存したものを試料生姜汁として用いた。

3. 生姜プロテアーゼ活性の測定

生姜プロテアーゼの活性は大山らの方法¹⁷⁾を改変して測定した。1%カゼイン溶液 (pH7.0) 500 μ l に生姜汁10 μ l を添加して生姜プロテアーゼの最適温度である60℃¹⁵⁾において30分間反応させ, 4.0Mのトリクロロ酢酸 (TCA) 500 μ l を添加して酵素反応を停止させた。室温で30分以上放置した後, 20,000 \times gで15分間遠心分離した上清の280nmにおける吸光度を測定し, 吸光度の上昇度である ΔA_{280} によってプロテアーゼ活性を評価した。生化学用Trypsin. Cryst (4830USP trypsin units/mg (14490BAEE units/mg)) を用いて10 μ g/mlのトリプシン溶液を作成し, トリプシンの最適反応条件である37℃, pH7.6において1%カゼイン溶液を30分間分解させた場合のプロテアーゼ活性と比較した。

4. 生姜プロテアーゼによる牛乳ゲルの形成

ゲルは直径48mmの円形容器に形成した。最終検体量50ml, 反応温度60℃, 反応時間60分の条件において予備実験を実施した結果, 生姜汁濃度を3%より上昇させてもゲルの硬さは変化しないことを認めた。以上のことから,

牛乳50mlに対して1.5mlの生姜汁を添加することによってゲルを形成することとした (最終生姜汁濃度2.9%)。反応時間は生姜汁を添加した後, 検体を各反応温度の恒温水槽に入れた時点から計測した。反応終了後, 直ちに氷冷水中に入れて反応を停止させた。ゲルの硬さ, 凝集性および付着性は, 4℃で保存したゲルを25℃の条件下で測定した。

反応温度の影響は反応時間を60分として40~90℃の間を10℃きざみで測定した。反応時間の影響は生姜プロテアーゼの最適温度であると報告されている60℃¹⁵⁾において, 15, 30, 45, 60および90分の反応時間で測定した。追加加熱の影響は, 40, 50, 60および70℃において60分間反応させて形成したゲルをさらに80℃で30分間追加加熱したものと, 追加加熱しないものとを比較した。今回調製した各種牛乳ゲルの水分含有量はすべて85%であり, 牛乳ゲル間に有意な差は認められなかった。

5. ゼラチンゲルの形成

牛乳ゲルと同じ直径48mmの円形容器に形成した。ゼラチン粉末を蒸留水で30分間膨潤した後に50℃の湯せんで溶解し, 1.0, 1.5, 2.0または3.0w/w%としたものを用いて4℃でゲル化させた。ゲルの硬さ, 付着性および凝集性は25℃の条件下で測定した。

6. ゲルの硬さ, 付着性および凝集性の測定

クリープメーターRE-3305 ((株)山電, 東京) を用いてゲルの硬さ, 凝集性および付着性を測定した。測定条件はロードセル20N, プランジャー径16mmの円形, 圧縮速度1mm/sec, 測定歪率 (クリアランス) 50%, 試料高25.26mm, 試料径48mmの円柱形とした。ゲルを2回圧縮し, 応力-移動歪率 (%) 曲線を描き, テクスチャー解析Windows (TAS-3305 (W)) ((株)山電, 東京) を用いて解析した。なお, 測定値は10回の平均とした。応力-移動歪率 (%) 曲線 (Texture profile curve) をFig.1に示した。硬さ [$\times 10^3$ N/m²] は最大応力 [N]/(プランジャーの面積 [mm²] $\times 10^6$) から求めた。付着性 [J/m³] はFig.1のBの面積より求めた。凝集性 [単位なし] はFig.1のA₁の面積に対するA₂の面積の比 (A₂/

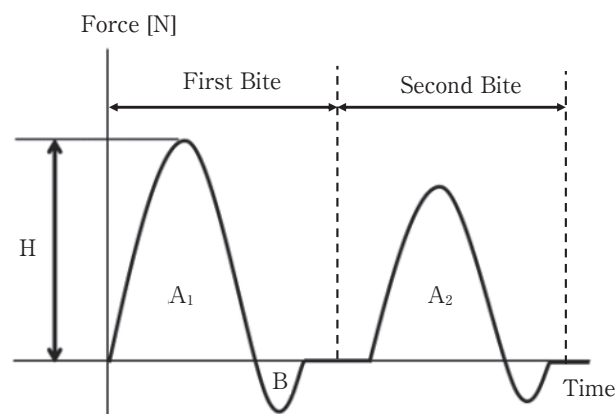


Fig.1 Texture profile curve

A₁)として求めた。

7. 統計処理

測定結果は平均値±標準誤差で表した。統計処理は分散の正規性を検定し、正規性が認められない群との比較はMann-Whitney-U-test, 正規性が認められたが、母分散が等しいと認められなかった2群間の比較はWelche's t-test, 正規性が認められ、かつ母分散が等しいと認められた2群間の比較はStudent's t-testを用いて検定した。有意水準は1% ($p < 0.01$)とした。

8. 共焦点顕微鏡による観察

共焦点顕微鏡は、OPTELCIS H1200 (WIDE) ((株)レーザーテック, 横浜)を用いた。スライドガラスに10 mm×10 mm四方で1 mm程度の厚さの試料を乗せ、切片を10%アクロレイン (0.1 Mリン酸緩衝液, pH7.4) に60分間浸漬後、チオニン・シッフ試薬 (煮沸後冷却した0.2%チオニン水溶液100 mlに2-メチル-2-プロパノール100 mlと1 N塩酸30 mlおよび二亜硫酸ナトリウム2 gを添加) に30分間反応させた。水洗後、60%の2-プロパノール水溶液に1分間浸漬させ、その後オイルレッドO染色液で15分間浸漬した。再度60%の2-プロパノール水溶液で2分間浸漬し、水洗した後に室温で減圧乾燥させたものを観察した¹⁶⁾。

結果および考察

1. 生姜汁のプロテアーゼ活性

1%カゼイン溶液を30分間分解させたときのプロテアーゼ活性は、生姜汁が 0.467 ± 0.004 ($n = 5$), トリプシン溶液が 0.353 ± 0.010 ($n = 5$)であった。このことから、今回用いた生姜汁のプロテアーゼ活性は、トリプシン (4830 USP trypsin units/mg (14490 BAEE units/mg)) 10 μ g/ml溶液と比較して約30%高いものであった。

1. 生姜汁による牛乳ゲルの硬さ、付着性および凝集性への影響

(1) 反応温度の影響 反応温度の影響の結果をTable 1に示した。硬さと付着性は80℃で最高値となった。凝集性は40℃に比べて50~80℃で低い値となった。

Table 1 Effects of reaction temperatures on hardness, adhesiveness and cohesiveness of milk gels

Reaction temperatures (°C)	Hardness [$\times 10^3$ N/m ²]	Adhesiveness [J/cm ²]	Cohesiveness
40	1.36 ± 0.04^a	57 ± 2^a	0.549 ± 0.014^a
50	1.82 ± 0.02^b	64 ± 4^a	0.503 ± 0.005^b
60	1.82 ± 0.02^b	82 ± 2^b	0.505 ± 0.007^b
70	2.04 ± 0.02^c	95 ± 6^c	0.514 ± 0.009^{ab}
80	2.19 ± 0.03^d	112 ± 4^d	0.513 ± 0.006^b
90	0.49 ± 0.06^e	13 ± 4^e	0.724 ± 0.036^c

Means \pm SE of 10 experiments.

Means in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.01$).

60, 70℃で硬いゲルを形成したことは、生姜プロテアーゼの最適温度が60℃であること¹⁵⁾と一致した。

(2) 反応時間の影響 反応時間の影響の結果をTable 2に示した。60℃における反応時間の影響を検討したところ、ゲルの硬さと付着性は30分までは値が高くなり、30分以降値が安定した。

ゲルの硬さは30分までは上昇し続け、それ以上反応時間を長くしても値は上昇しなかったことから、反応時間は30分程度で十分であると考えた。

(3) 追加加熱の影響 ゲルの硬さに及ぼす追加加熱の影響をFig. 2に示した。40℃で60分間ゲル形成を行った後に80℃で追加加熱したものが 2.80 ± 0.09 [$\times 10^3$ N/m²]と、今回の実験において最も硬いゲルとなった。この場合、40℃でゲル形成を行ったものに比べて硬さは107%上昇した。40℃または60℃でゲル形成を行ったものと、40℃でゲル形成した後に80℃で追加加熱したものの共焦点顕微鏡画像をFig. 3に示した。40℃でゲルを形成したa, 60℃でゲル形成したb, 40℃でゲルを形成した後に80℃で追加加熱したcの順番でゲルの構造が細くなり、密度が増していることが観察された。

生姜汁を加えて70℃未満でゲルを形成した後に80℃で追加加熱することによってゲルの硬さが増大したが、こ

Table 2 Effects of reaction times on hardness, adhesiveness and cohesiveness of milk gels

Reaction times (min)	Hardness [$\times 10^3$ N/m ²]	Adhesiveness [J/m ²]	Cohesiveness
15	1.46 ± 0.04^a	62 ± 3^a	0.537 ± 0.013^a
30	1.71 ± 0.03^b	81 ± 4^b	0.506 ± 0.013^{ab}
45	1.72 ± 0.05^b	87 ± 4^b	0.546 ± 0.016^a
60	1.82 ± 0.02^c	82 ± 2^b	0.505 ± 0.007^b
90	1.75 ± 0.02^{bc}	92 ± 5^b	0.493 ± 0.006^{bc}

Means \pm SE of 10 experiments.

Means in the same column not sharing a common superscript letter are significantly different ($p < 0.01$).

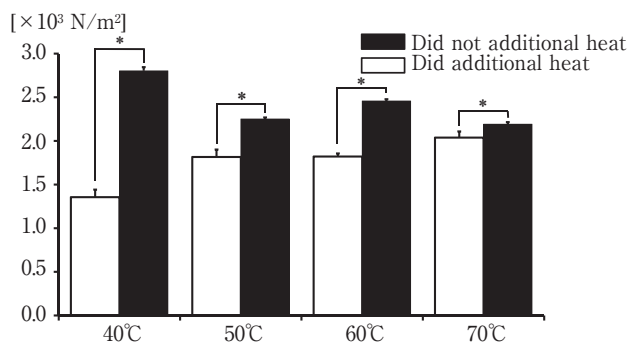


Fig. 2 Effects of additional heating of 80 °C for 30 minutes on hardness of milk gels

Mean \pm SE of 10 experiments.

Asterisk indicate significantly different ($p < 0.01$).

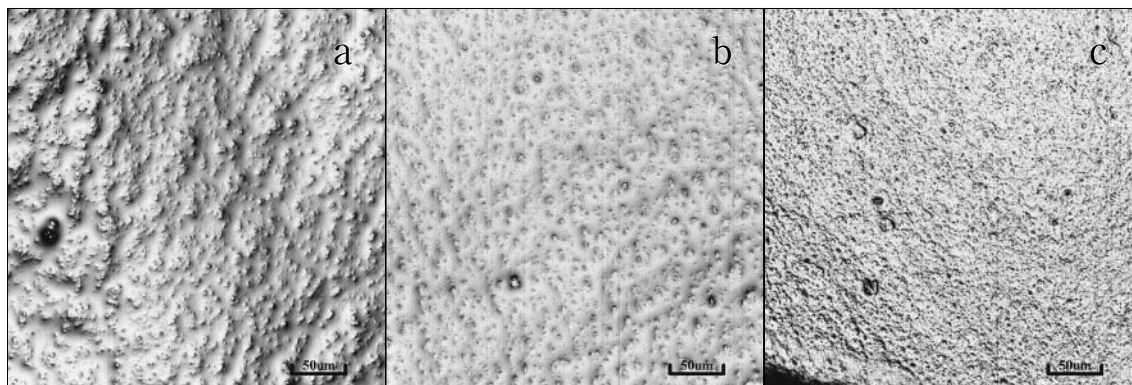


Fig. 3 Confocal micrographs of ginger milk gels

a : Gel formed at 40°C for 30 minutes.

b : Gel formed at 60°C for 30 minutes.

c : Gel formed at 40°C for 30 minutes and additional heated at 80°C for 30 minutes.

の現象はゲルの密度が増加するために起こるものであり、共焦点顕微鏡画像の結果から立証された。この現象は、40°Cから60、70°Cの間は生姜プロテアーゼによって牛乳中のカゼインミセルの表面にある κ -カゼインが分解され、それに伴ってカゼインミセルのゼータ電位が減少することによってカゼインミセルの凝集が起こって密度が低いゲルが形成され¹⁷⁾、80°Cで追加加熱するとカゼインと熱変性した乳清たんぱく質との結合が起こる¹⁸⁾ことによってより密な構造のゲルが形成されたことによるものと考えた。

40°Cで形成したゲルは60または70°Cで形成したゲルよりも柔らかいゲルとなったが、80°Cによる追加加熱によって最も硬いゲルとなった。この現象は、キモシンは α -カゼインのみに特異的に作用する¹⁹⁾のに対し、生姜プロテアーゼは α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼインと幅広く作用する¹⁴⁾ことから、生姜プロテアーゼによる牛乳たんぱく質の分解が進み過ぎると追加加熱によるカゼインと熱変性した乳清たんぱく質との結合が強くなり起こらなくなるためであると考えた。

(4) ゼラチンゲルとの比較 ゼラチンゲルの硬さ、付着性および凝集性をTable 3に示した。今回調製した各種牛乳ゲルは、硬さと付着性は概ね1.5~2.0w/w%ゼラチンゲルの間の値となった。凝集性は、一番値の低い2.0w/w%ゼラチンゲルと比較して65~80%の値とな

った。

以上、生姜プロテアーゼによる凝乳作用と、追加加熱によるカゼインと熱変性した乳清たんぱく質との結合を組み合わせることによって様々な硬さの牛乳ゲルを調製することができることがわかった。このゲルの硬さは、概ね1.5~2.0w/w%ゼラチンゲルの間の値となった。嚥下訓練食として1.0~2.0w/w%ゼラチンゲルが向いている⁷⁾ことから、生姜汁によって作成した牛乳ゲルは、高齢者用食品や嚥下訓練食として利用できるものと考えられた。

要 約

生姜汁による牛乳ゲルの形成について検討した。牛乳に対して約3%の生姜汁を添加して酵素反応と加熱を組み合わせることによってゲルの硬さを調整することが可能であることがわかった。また、生成した牛乳ゲルは概ね1.5~2.0w/w%ゼラチンゲルの間の硬さとなり、高齢者用食品や嚥下訓練食としての可能性があるものと考えられた。

文 献

- 1) 島本和明：高齢者における生活習慣病，日本老年医学会誌，**44**，551~555（2007）
- 2) 大塚 礼：高齢期における生活習慣病の予防(1)食生活・食習慣，Advances in Aging and Health Research 2012 高齢期における生活習慣病，長寿科学振興財団，pp.151~157（2013）
- 3) 大越ひろ：嚥下障害者のための食事—高齢者を対象とした食事の安全性とテクスチャーの面から—，日本食生活学会誌，**17**，288~296（2007）
- 4) 上野川修一編：ミルクの事典（朝倉書店，東京），pp.38，pp.198~236（2009）
- 5) 野口洋介：牛乳と調理，調理科学，**10**，53~61（1977）

Table 3 Hardness, adhesiveness and cohesiveness of 1.0,1.5,2.0 and 3.0 w/w% gelatin gels

Gelatin concentrations (w/w%)	Hardness [$\times 10^3$ N/m ²]	Adhesiveness [J/m ²]	Cohesiveness
1.0	0.32 \pm 0.00	0 \pm 0	0.884 \pm 0.005
1.5	1.19 \pm 0.05	58 \pm 3	0.774 \pm 0.018
2.0	2.45 \pm 0.15	105 \pm 5	0.693 \pm 0.054
3.0	6.32 \pm 0.58	125 \pm 10	0.873 \pm 0.099

Means \pm SE of 10 experiments.

- 6) 熊谷 仁・熊谷日登美：レオロジーと食品工学—嚥下障害者用介護食の物性を中心として，日本食品科学工学会誌，**10**，137～148 (2009)
- 7) 渡瀬峰雄：高齢者社会における段階的な摂食・嚥下訓練食の開発，*J. Appl. Glycosi.*, **49**，319～325 (2002)
- 8) 山本誠子・奥村麻里・大場智美：良質の乳カード形成にむけての生姜搾汁の牛乳凝固性についての研究，日本調理科学会誌，**42**，309～314 (2009)
- 9) ZHANG, J., WANG, J., WAN, G. and CHU, Q.: Study on the Influence Factors of Milk Coagulation (in Chinese), *Food Ferment. Industries.*, **31**，57～59 (2005)
- 10) NISHIMURA, K. and GOTO, M.: Identification of the Protease Involved in and the Effects of Vitamin C on Gel Formation in Ginger Milk Pudding (Jiang Zhi Zhuang Nai), *J. Home Econ. Jpn.*, **61**，463～471 (2010)
- 11) 吉田真美・後藤 潔・田名部尚子：料理書にみる中国，朝鮮，日本料理中のショウガ利用比較，日本調理科学会誌，**36**，255～265 (2003)
- 12) 岩井和夫・中谷延二編：香辛料成分の食品機能（光生館，東京），pp.12～13，p.80 (1989)
- 13) 高橋智子：高齢者の摂食機能に応じた食事のテクスチャー面から見た特徴，日本食生活学会誌，**20**，87～92 (2009)
- 14) 大山秀夫・榎本俊樹・光永伸一郎：キウイ果実プロテアーゼの多様性とコラーゲン分解活性，日本栄養・食糧学会誌，**50**，57～62 (1997)
- 15) HUANG, X.W., CHEN, L.J., LUO, Y.B., GUO, H.Y. and REN, F.Z.: Purification, characterization, and milk coagulating properties of ginger proteases, *J. Dairy Sci.*, **94**，2259～2269 (2011)
- 16) 長縄貴直・渡邊康一・神崎文次・太田智章・虻川久美子・細野明義・山口高弘：組織化学的手法によるチーズならびにバターのタンパク質と脂肪の存在様式とその分布に関する研究，ミルクサイエンス，**51**，33～37 (2002)
- 17) 二木良哉・有馬俊六郎：牛乳カゼイン—その構造的特徴を中心として，化学と生物，**22**，219～227 (1984)
- 18) ANEMA, S.G. and LI, Y.: Effect of pH on the association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk, *J. Agric. Food Chem.*, **51**，1640～1646 (2003)
- 19) CARLES, C. and RIBADEAU, D.B.: Kinetics of the action of chymosin (rennin) on a peptide bond of bovine alpha s1-casein. Comparison of the behaviour of this substrate with that of beta-and kappa o-caseins, *FEBS Lett.*, **185**，282～826 (1985)
- (平成26年11月4日受付，平成27年3月19日受理)
-

Effects of Curtain Treatment with White Reflection Sheets in Improving Berry Coloration and Wine Quality in ‘Cabernet Sauvignon’ Grapes

MATSUMOTO Toshikazu^{*1§}, ISHIHARA Ai^{*1}, ABE Norio^{*2},
SAKURAI Takafumi^{*3}, MISHIMA Shota^{*1} and AKIHIRO Takashi^{*1}

^{*1} Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Nishikawatsu 1060, Matsue-shi, Shimane 690-8504

^{*2} OKU-IZUMO VINEYARD, Jiryo 2273-1, Kisuki-cho, Unnan-shi, Shimane 699-1322

^{*3} MARUWA Biochemical Co.,Ltd., Hirano-machi 3-6-1, Chuo-ku, Osaka 541-0046

Curtain treatment with white reflection sheets at the veraison stage was applied to the wine grape ‘Cabernet Sauvignon’. Compared with mulch treatment and the control, hanging sheets on both sides of the main stem of the grape tree significantly increased the coloration of the berries and wine and the anthocyanin content in the grape skins. Yeast-assimilable amino acid in the juice in curtain-treated grapes was significantly decreased compared with that in the control. Curtain treatment with white reflection sheets improved the color of red wine grapes.

(Received Jul. 31, 2014 ; Accepted Feb. 26, 2015)

Key words : curtain treatment, white reflection sheet, coloration, grape, wine
カーテン処理, 白色反射シート, 着色, ブドウ, ワイン

High night temperatures related to global warming cause serious problems such as low sugar content and lightened skin color in grapes. Several methods to overcome these problems have been tested, including girdling, abscisic acid fertilizer, and reflective mulch treatment. Mulch treatment with reflective sheets improves the light environment around grape trees and is effective in deepening the coloring of grape berry skin^{1),2)}. Recently, curtain treatment with white reflection sheets was developed to improve the coloration of the table grape cultivar ‘Izunishiki’³⁾. The berry skin coloration in the treated grapes was significantly increased compared with that in the mulch treatment and control groups. In the present study, curtain treatment was applied to the wine grape cultivar ‘Cabernet Sauvignon’, and the resulting wine quality was also investigated.

Materials and Methods

1. Plant material and treatments (white reflective sheet curtains and mulch)

The experiments were conducted on 12- and 13-year-old wine grapes (*Vitis vinifera* L. ‘Cabernet Sauvignon’) in 2011 and 2012, respectively, at the

Oku-Izumo Vineyard (Unnan, Shimane, Japan). The trees were using a single-wire trellis training system. Two treatments and a control were used to assess the anthocyanin concentration in the grape juice : ① the curtain treatment as shown in Fig. 1, in which 150-cm-wide white polyethylene reflection sheets (700AG; DuPont™ Tyvek®, E.I. Du Pont de Nemours and Company, Wilmington, DE, USA) were hung 200 cm from both sides of the main stems ; ② a mulch treatment in which the ground

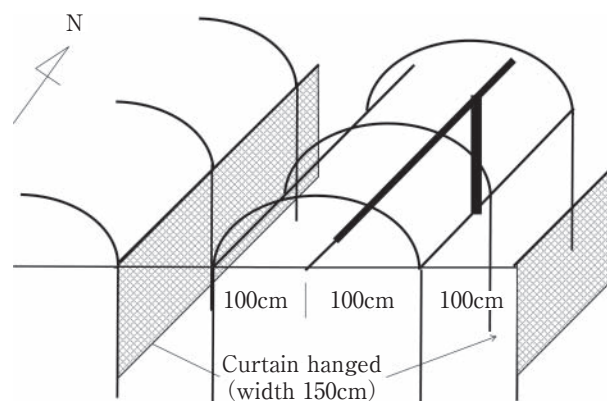


Fig. 1 Curtain treatment with white reflective sheets in tunnel mesh cultivation of ‘Cabernet Sauvignon’ grapes

under the main stems were covered with mulch at the veraison stage (the developmental stage at which berry ripening began on 7 September 2011 and 31 August 2012); and ③ a control treatment in which no reflection sheets or mulch were used. Ten trees were used for each treatment.

2. Fruit analysis

Ten grape clusters were randomly collected from the ten trees in each group on 12 October 2011 and 31 September 2012 and assessed for berry weight and soluble solids concentration (Brix; ASONE MASTER-A1T, Osaka, Japan). The color chart value (Japan Fruit Growers Cooperative Association) of the grape skin was determined in the grapes collected in 2011. The tartaric acid concentration and organic acid composition of the grape juice were determined with a titratable acidity test and high-performance liquid chromatography, respectively, in 2011. Determinations of the anthocyanin concentration of the berry skin and free amino acid analysis of the juice were performed determined according to methods described in our previous report³⁾.

3. Wine production and analysis

Approximately 4 kg grape grains were squeezed, providing approximately 3 l juice. The juice and pulp were placed in a 5-l bottle to which potassium metabisulfite was added in appropriate amounts before and after fermentation to prevent oxidation and sterilization and to stop the fermentation, respectively. Glucose and tartaric acid were added to become 22% and 0.7% in the juice, respectively, and the mixture was fermented for approximately 2 weeks at 20~25°C. The composition of the wine produced from the grapes in the treatment groups

and control in 2011 were analyzed according to the method of Japan's National Tax Agency.

Results

The effects of curtain treatment with white reflection sheets on the wine grape 'Cabernet Sauvignon' are shown in Table 1. No significant difference in berry weight was found among the curtain treatment, mulch treatment, and control groups; however, the soluble solid concentration (Brix) of the juice and color chart values of the grape skins in the curtain and mulch treatment groups were greater than those in the controls in 2011 and 2012. The titratable acidity (tartaric acid) in the control was lower than that in the curtain and mulch treatment groups in 2011. Compared with that in the control, the anthocyanin concentration in the skin of curtain- and mulch-treated grapes was also significantly increased in 2011 and 2012 (Fig. 2). As shown in Fig. 3, no significant differences in amino acid content were found among the experimental groups. However, yeast-assimilable amino acid (all amino acids except proline) content in curtain-treated grapes was lower than that in control grapes.

The composition of wine produced from grapes in the treatment and control groups is shown in Table 2. The specific gravity, concentration of alcohol, wine extract, tartaric acid content, and pH of the wines were not significantly different among the treatment groups. However, compared with that in the control group, the wine color value based on absorbances at 420 and 530 nm was greater for the curtain treatment group in both years (see Table 2). The coloration of wine produced from curtain-

Table 1 Improvements to 'Cabernet Sauvignon' wine grapes by curtain treatment with white reflection sheets

Treatments	10 grain weight (g)	Brix (%)	CC value*	Tartaric acid (%)
2011				
Control	13.3 a	16.9 b	4.1 b	0.52
Mulch	11.7 a	18.3 ab	6.2 a	0.31
Curtain	14.5 a	19.3 a	6.4 a	
2012				
Control	16.2 a	16.2 a		
Mulch	15.8 a	17.0 a		
Curtain	16.4 a	17.0 a		

*Color Chart for black grape; Different letters indicate significant differences (P < 0.05) according to Tukey's multiple range test.

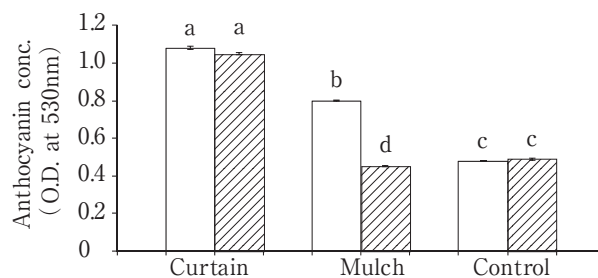


Fig. 2 Anthocyanin concentration in grape juice from curtain- and mulch-treated grapes (left: 2011; right: 2012)

Bar = standard error. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) according to Tukey's multiple range test ($n = 20$).

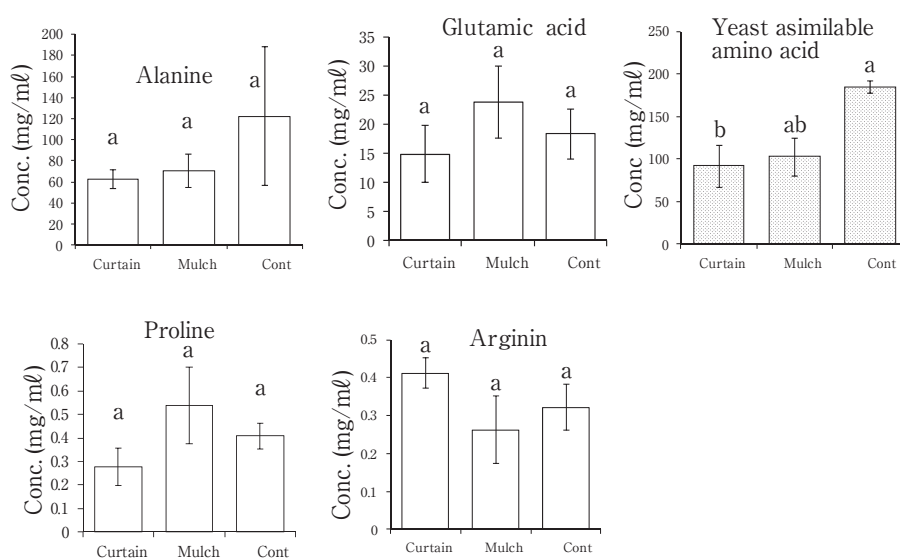


Fig. 3 Amino acid concentration in grape juice from curtain- and mulch-treated grapes (2011)

Vertical bars represent standard error. Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) according to Tukey's multiple range test ($n = 5$).

Table 2 Composition of wine from curtain- and mulch-treated 'Cabernet Sauvignon' grapes

Treatment	Specific gravity	Alcohol (%)	Wine extract (%)	pH	Total acid (%)	Absorbance	
						at 420 nm	at 530 nm
2011							
Control	0.996	11.8	3.17	3.54	0.65	0.52	0.63
Mulch	0.996	12.5	3.36	3.55	0.65	0.67	0.94
Curtain	0.996	11.9	3.20	3.55	0.67	0.82	1.26
2012							
Control	0.999	11.7	3.93	3.54	0.72	0.52	0.49
Mulch	1.000	11.8	4.21	3.40	0.83	0.55	0.52
Curtain	1.000	12.3	4.34	3.56	0.78	0.92	1.13

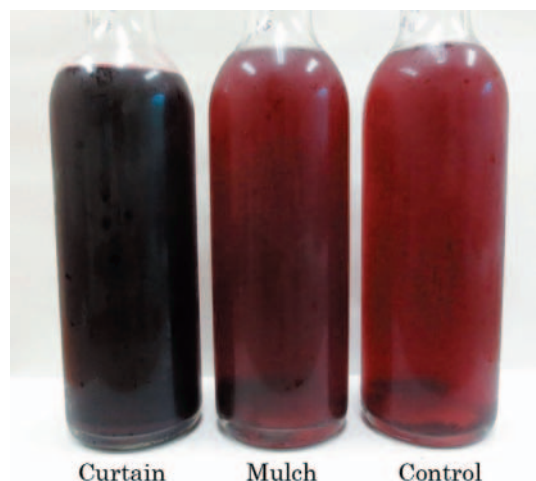


Fig. 4 The appearance of wines among three treatments

treated grapes was darker than that of wine from mulch-treated and control grapes (Fig. 4).

Discussion

Some of the most serious challenges in grape cultivation are low sugar content and reduced skin coloring of fruit caused by high night temperatures. Poor coloring in berry skin reduces the economic value of grapes for both the table and processing. MORI *et al.*⁴⁾ and KOSHITA *et al.*⁵⁾ have reported that high night temperatures related to global warming reduce anthocyanin accumulation in berry skins, causing poor coloration in red and black grapes and posing a persistent problem for viticulture. Mulch treatments with reflective sheets^{6)~8)} have been applied to overcome these problems.

PIRIE and MULLINS⁹⁾ have suggested that anthocyanin concentration in grape skin is increased by the accumulation of sugar in the berry. It is well known that sugar is synthesized by photosynthesis, and light conditions around grape trees affect photosynthesis. Anthocyanin in grape berries accumulates when sucrose concentration increases¹⁰⁾. We previously reported³⁾ that the skin color of the table grape 'Izunishiki' (*Vitis labruscana* Bailey) was significantly increased by curtain treatment with white reflection sheets. In the present study, the anthocyanin concentration in the skin of 'Cabernet Sauvignon' wine grapes was significantly improved by curtain treatment (see Fig. 2), which also improved wine color (see Table 2, Fig. 4).

We have also reported that the photon flux densities on the upper/west sides of trees treated with curtains (white reflection sheets hanging 90

cm from the sides of the main stem), mulch, and neither curtains nor mulch (control) were 185.5/353.4, 413.6/273.1, and 97.5/273.1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively³⁾, and the light environment around table grape 'Izunishiki' trees in the curtain treatment group was 1.3~1.7 times that of the control, which resulted in significant improvement in grape skin coloration. High acidity in the juice of control grapes may be promoted by the maturation of grapes with curtain and mulch treatments. The increased sugar content caused by increases in photosynthesis seemed to be used for anthocyanin synthesis.

In both our previous study³⁾ and the present study, we demonstrated that the coloration of dark grape skin is significantly improved by curtain treatment. The sugar concentration of white grapes may also be increased by curtain treatment before veraison. Furthermore, lower concentrations of yeast-assimilable amino acids, which are used for yeast fermentation in grape juice, have been measured in curtain-treated grapes. Lower levels of yeast-assimilable amino acids in grape juice from curtain-treated grapes may affect the taste and flavor of wine.

The light reflection efficiency of the white sheets used in this study is reportedly higher than that of aluminum vapor deposition sheets commonly used in mulch treatment. The sheets also improved plant growth and reduced the deleterious effects of insects and pests^{1),2)}. Compared with other mulch sheets used in orchards, white reflective sheets as on-ground mulch are disadvantageous because they are expensive and easily become dirty during cultivation. Because the sheets do not contact the ground during curtain treatment, they are not easily soiled. The durability of these sheets during curtain treatment is more than twice that in mulch treatment³⁾. This curtain treatment method is effective for both table and wine grape cultivation. Moreover, the color of wine produced from curtain-treated grapes was darker than that from mulch-treated and control grapes (see Table 2, Fig. 4). The results of this study suggest that curtain treatment with white reflection sheets improves the fruit color of red wine grapes.

References

- 1) IMON, K., MATSUMOTO, H., MIYATA, N. and YANO, T.: Effects of improved light conditions on

- coloration of ‘Aki-Queen’ grape berries, *Bull. Fruit Tree Res. Center, Ehime Res. Inst. Agr.*, **1**, 43~51 (2009) (In Japanese with English summary)
- 2) NISHIKAWA, Y., TOMIMORI, S., WADA, K. and KONDO, H.: Effect of cultivation practices on resveratrol content in grape berry skins, *Hort. Res. (Japan)*, **10**, 249~253 (2011) (In Japanese with English summary)
- 3) MATSUMOTO, T., SAKURAI, N., FURUTA, K., INOUE, M., KADOWAKI, M., MATSUMOTO, S. and AKIHIRO, T.: Effects of curtain treatment of white reflection sheet on improving the coloration of grape berries, *J. ASEV Japan*, **24**, 134~140 (2012) (In Japanese with English summary)
- 4) MORI, K., SUGAYA, S. and GENMA, H.: Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition, *Scientia Horticulturae*, **105**, 319~330 (2005)
- 5) KOSHITA, Y., ASAKURA, T., FUKUDA, H. and TSUCHIDA, Y.: Nighttime temperature treatment of fruit clusters of ‘Aki Queen’ grapes during maturation and its effect on the skin color and abscisic acid content, *Vitis*, **46**, 208~209 (2006)
- 6) COVENTRY, J.M., FISHER, K.H., STROMMER, J.N. and REYNOLDS, A.G.: Reflective mulch to enhance berry quality in Ontario wine grapes, *ISHS Acta. Horticulturae*, **689**, 95~102 (2005)
- 7) LAYNE, D.R., JIANG, Z. and RUSHING, J.W.: Tree fruit reflective film improves red skin coloration and advances maturity in peach, *HortTechnology*, **11**, 234~242 (2001)
- 8) TODIC, S., BESLIC, Z., VAJIC, A. and TESIC, D.: The effect of reflective plastic foils on berry quality of Cabernet Sauvignon, *Bulletin de l’OIV*, **81**, 165~170 (2008)
- 9) PIRIE, A. and MULLINS, M.G.: Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening, *Amer. J. Enol. Vitic.*, **28**, 204~209 (1977)
- 10) DO, C.B. and CORMIER, F.: Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension, *Plant Cell Reports*, **9**, 500~504 (1991)
- 白色反射シートのカーテン処理による
ワイン用ブドウ ‘カベルネ・ソービニヨン’ の
着色促進効果およびワイン品質**
- 松本敏一^{*1§}・石原 藍^{*1}・安部紀夫^{*2}
桜井尚史^{*3}・三島晶太^{*1}・秋廣高志^{*1}
- * 1 島根大学生物資源科学部
(〒690-8504 島根県松江市西川津町1060)
- * 2 (有)奥出雲葡萄園
(〒699-1322 島根県雲南市木次町寺領2273-1)
- * 3 丸和バイオケミカル(株)大阪営業所
(〒541-0046 大阪府大阪市中央区平野町3-6-1)
- 白色反射シートのカーテン方式でのワイン用ブドウ ‘カベルネ・ソービニヨン’ の着色促進効果を検討した。ベレーゾン期に白色反射シートカーテンを一文字整枝の両側にカーテン状に設置したところ、果皮の着色とアントシアニン含量がマルチ区および無処理区より優れたが、果汁中の資化性アミノ酸含量は有意に低くなった。
- 以上のことから、反射シートの両側カーテン処理は、赤ワイン原料用ブドウとして有用な濃い色調が得られる傾向が認められた。
- (平成26年7月31日受付, 平成27年2月26日受理)