

## 県産素材を用いた高付加価値食品の開発

### －栗ポリフェノールの利用－

樋口誠一\* 仲島日出男\*

## Development of Value-added Foods with Agricultural Products in Saitama Prefecture

### －Utilization of Chestnut Polyphenol－

HIGUCHI Seiichi\*, NAKAJIMA Hideo\*

#### 抄録

栗渋皮ポリフェノールを有効利用した機能性食品を開発するため、製品加工中の栗渋皮ポリフェノールの変化を明らかにするとともに、エキスとして使用するための抽出条件について検討した。原料栗の初回加熱時に高分子ポリフェノールの変化が見られたが、その後の製造工程でのポリフェノール含量の大きな変動は見られず、栗渋皮ポリフェノールは加熱処理に対して安定であった。また、エキス抽出に使用する溶媒としては、熱水及び50%エタノール溶液が有効であることが確認された。

キーワード：栗，渋皮，ポリフェノール，機能性食品

## 1 はじめに

近年、生活習慣病の予防には、特定保健用食品などに代表される機能性食品が有効であるとの認識が、消費者の間に高まっている。そのため、県内の食品製造業者にとっても製品への機能性の付加は最大の関心事であり、消費者にアピールしやすい埼玉県産の機能性素材を求める声は多い。

そこで我々は県の特産品のひとつである栗の渋皮に含まれる高分子ポリフェノール（プロアントシアニジン）に着目した。高分子ポリフェノールは抗酸化作用や心疾患及びガンの予防作用があるとされ<sup>1)</sup>、機能性食品素材として注目されている。一方で、ポリフェノールは渋味などの原因となるために食品製造時に除去されることが多く、有効に利用されていない。そこで、栗渋皮ポリフェノールを有効利用した食品の開発を試みた<sup>2)</sup>。

一方で最近、（独）農業・食品産業技術総合研

究機構果樹研究所で育種された栗新品種「ぼろたん」<sup>3)</sup>が県内でも栽培されるようになった。ぼろたんは渋皮の剥皮性に優れており、加熱することで果肉と渋皮を簡単にはがすことができる。そのためこの品種は加工に適しており、今後、従来品種に置き換わるだけでなく、それまで国外で行われることが多かった剥皮工程が国内で行うことが可能となり、多くの渋皮が排出されることが予想される。本研究では栗渋皮ポリフェノールの機能性を有効活用した製品の開発を目的に、ぼろたんを用いて製品加工中での渋皮中のポリフェノールの変化を明らかにするとともに、エキスとして使用するための最適な抽出条件の検討を行った。

## 2 実験方法

### 2.1 原料加工及び供試試料

埼玉県内で収穫されたニホングリ「ぼろたん」を用い、焼き栗を製造する場合をモデルとして、その加工段階での栗渋皮中のポリフェノール含量

\* 北部研究所 生物工学担当

を測定した。まず、切れ込みを入れた栗を 200°C のオーブンで 20 分加熱したのち、果肉と外皮を分離し、さらに鬼皮と渋皮を分別した。その後、渋皮に対して 200°C で 20 分間、あるいは 135°C で 2 時間加熱乾燥処理を行った。生栗及び加熱加工後の渋皮は凍結乾燥したのち、また、加熱乾燥後の渋皮はそのまま粉碎し、30 メッシュのふるいを通したものを試験に用いた。

## 2.2 ポリフェノールの抽出

各工程の試料の 80%メタノール抽出液について、総ポリフェノール量をフォーリンチオカルト法<sup>4)</sup>により、また、総プロアントシアニジン量をバニリン硫酸法<sup>5)</sup>により測定した。なお、いずれも標準物質として(+)-カテキン水和物(シグマ社製)を用いた。また、抽出液中の溶媒を減圧留去したのち、凍結乾燥して抽出物を得た。

加工品中のポリフェノール量の評価は以下のとおり行った。渋皮粉末を 5%または 10%添加し、既報<sup>2)</sup>のとおりクッキーを作製し、焼成前後の試料について、脱脂、減圧乾燥後、70%アセトンを加えて超音波抽出し、総ポリフェノール量をフォーリンチオカルト法により測定した。

また、栗渋皮ポリフェノールの抽出条件としては、加熱乾燥後の渋皮を用いて、最適な抽出溶媒及び抽出温度の検討を行った。

## 2.3 ゲル浸透クロマトグラフィー

栗渋皮ポリフェノールの分子量分布は、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により評価した<sup>6)</sup>。カラムはジーエルサイエンス(株)製Inertsil WP300 Diol (φ 4.6×250mm、5 μm)、カラム温度 35°C、検出は 280nmで行った。溶出は流速 0.3mL/minで 0.05M塩化リチウム、0.3%(v/v)酢酸、1.7%(v/v)水を含んだN,N-ジメチルホルムアミドにより行った。

## 2.4 フロロゲルシノール分解

Kennedyらの方法<sup>7)</sup>に準じて行い、生成した分解物溶液を高速液体クロマトグラフィーに供した。カラムはジーエルサイエンス(株)製Inertsil ODS-3 (φ 4.6×250mm、5 μm)、カラム温度は室温、検出は 280nmで行った。溶出は流速

1.0mL/minで、1%(v/v)酢酸に対し、メタノールを 10 分で 5%、30 分で 20%、55 分で 40%、最後に 65 分で 90%とし 10 分間保つリニアグラジエント溶出を行った。保持時間によりピークを同定し、プロアントシアニジンの末端ユニットと延長ユニットの比から平均重合度を算出した。

## 2.5 タンパク質結合能

Hagermanらの方法<sup>8)</sup>に準じて、牛血清アルブミンとの結合により生成したポリフェノール沈殿を、5% (v/v)トリエチルアミン/1% (w/v)ドデシル硫酸ナトリウム水溶液に再溶解し、これに 0.01M塩化第二鉄を添加し、15 分後に 510nmの吸光度を測定した。

## 2.6 リパーゼ阻害活性

韓らの方法<sup>9)</sup>に従い、トリオレイン、レシチン及び胆汁酸からなる懸濁液を基質溶液として、豚由来腓リパーゼ液、検体及び Tris 緩衝液 (pH7.4) を加え、37°C、30 分反応させ、遊離した脂肪酸を銅試薬法で定量した。活性は検体無添加の値を 100%として各検体の活性値とした。

# 3 結果及び考察

## 3.1 栗渋皮の加工中におけるポリフェノールの変化

ここでは生栗から栗加工品を製造する工程において排出される渋皮を利用する場合を想定し、その工程において栗渋皮ポリフェノールがどのような変化をするか確認を行った。

各工程における渋皮のポリフェノール量を比較したところ、図 1 に示すとおり、最初の加熱工程において 33%の減少が見られたが、その後の加熱乾燥工程では、2 条件とも大きな減少は見られなかった。この最初の加熱工程でのポリフェノールの変化を明らかにするために、抽出されたポリフェノールの性質について検討することとした。

GPC により測定した、各加熱工程での渋皮中に含まれるポリフェノールの分子量分布を図 2 に示す。ポリフェノールの大部分はプロアントシアニジンと呼ばれる分子量分布を持ったカテキン類の重合体である。生渋皮抽出物は高分子側から中

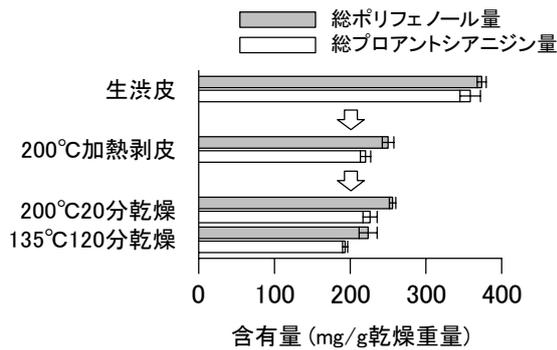


図1 各加工工程での渋皮中のポリフェノール量の変化  
誤差線は標準偏差 (n=3) を表す

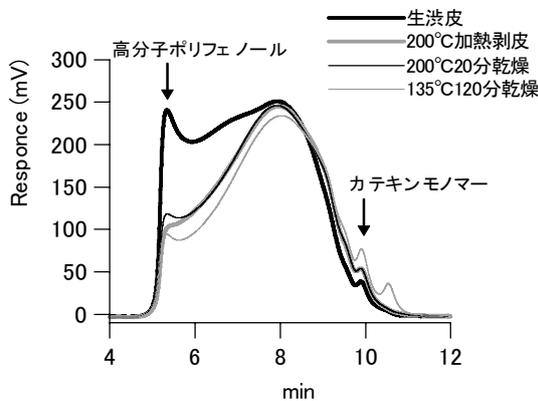


図2 各加工工程での渋皮中のポリフェノールの分子量分布

低分子側までほぼ一様に分布しているが、加熱後及び乾燥後の渋皮抽出物では高分子側の含量が減少していた。また、表1の平均重合度を比較すると生渋皮が最も高く、加熱剥皮後のもので低くなっており、GPCの結果と一致した。

プロアントシアニジンはタンパク質と結合する性質があり、その構造などにより結合量が異なってくるが、各工程で抽出物のタンパク質結合能に大きな違いは見られなかった。また、栗渋皮ポリフェノールに認められているリパーゼ阻害活性も比較したが、こちらについても大きな違いは見られなかった。

以上の結果から、最初の加熱剥皮工程におけるポリフェノール量の減少は、高分子側のポリフェノール成分の変化が影響しているものと考えられた。この変化の原因としては、酵素的または化学的な変化により、高分子ポリフェノールがさらに

表1 各加工工程での渋皮中のポリフェノールの性状変化

	平均重合度	タンパク質結合能 (Abs)	リパーゼ阻害活性 (%)
生渋皮	23.4	0.170	51
200°C加熱剥皮	19.0	0.132	49
200°C20分乾燥	19.5	0.145	47
135°C120分乾燥	18.8	0.132	47

高分子化したために不溶化したか、あるいは鬼皮や果肉へポリフェノールが移行したことが考えられた。しかし、加熱剥皮後においても、渋皮中には十分な量のポリフェノールが含まれており、さらにタンパク質結合能及びリパーゼ阻害活性に大きな変化がなかったことから、栗渋皮ポリフェノールの機能性自体に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

また、菓子製品原料に渋皮を添加したとき、焼成加工がポリフェノールに与える影響を確認したところ、焼成前後におけるポリフェノールの残存率は、渋皮 5%及び 10%添加でそれぞれ 97%、88%であり、菓子焼成加工がポリフェノール含量に与える影響は小さいことが確認された。

### 3.2 栗渋皮ポリフェノールの抽出条件

栗渋皮はそのままでも素材として活用できるが、ポリフェノール成分を抽出エキスとして使用することも想定し、その最適な抽出方法の検討を行った(表2)。

まず、抽出溶媒として、エタノール濃度を段階的に変えたものについて検討した。抽出物の収率は 50%エタノールが最も高く、比較として使用した 70%アセトン、80%メタノールといった溶媒と同程度であった。また、エタノール濃度を低くしても、高くしても収率は低下した。さらに、抽出溶媒の加温効果について、水及び 50%エタノールで検討したところ、いずれも温度を高くするにしたがって抽出物の収率が高くなることが明らかとなった。

これらのポリフェノール抽出物について、表2に示した各種の評価を行った。

表2 抽出条件の違いによる抽出物中のポリフェノールの変化<sup>a</sup>

抽出物の 収率(%)	総ポリフ ェノール 量tPP(%) <sup>b</sup>	総プロア ントシア ニジン量 tPA(%) <sup>b</sup>	tPA/tPP (%)	平均 重合度	タンパク質 結合能(Abs)	リパーゼ 阻害活性(%)	
水	17	38	26	68	14.5	0.096	35
25%エタノール	28	57	48	85	19.7	0.153	43
50%エタノール	28	57	48	85	20.2	0.149	45
75%エタノール	21	55	46	84	18.6	0.141	45
エタノール	11	53	44	83	16.3	0.156	44
70%アセトン	31	60	50	84	20.5	0.175	42
80%メタノール	26	54	40	74	18.4	0.153	41
熱水 100°C	42	60	42	70	17.9	0.140	34
熱水 120°C	50	60	39	65	15.1	0.105	27
50%エタノール 80°C	38	64	53	84	21.3	0.169	46

<sup>a</sup> 温度の表記がないものは室温で抽出を行った <sup>b</sup> 各溶媒抽出物中の割合 <sup>c</sup> オートクレーブを使用して抽出を行った。

抽出物中の総ポリフェノール量は、水のみではやや低いが、その他では 53~64%であり、それほど大きな差は見られなかった。総プロアントシアニジン量 / 総ポリフェノール量の比 (tPA/tPP) をみると、多くのものが 84%前後であるのに対して、水のみ系 (水、熱水 100°C、熱水 120°C) ではこの比率が他よりもやや低くなる傾向が見られた。

次に GPC の結果を図 3 に示すが、有機溶媒濃度が高いほど高分子側のポリフェノールが抽出されており、有機溶媒濃度が低くなるにしたがって高分子側が抽出されなくなった。また、熱水抽出では中程度の分子量のポリフェノールが多く抽出されており、これが抽出量の多さに影響していると考えられた。

抽出物の比較結果を表 2 に示す。平均重合度はエタノール濃度が高くなるにつれ微増していき、50%エタノールで最も高くなるが、75%及び 100%では逆に低くなっていった。これは、エタノール濃度が高いと高分子ポリフェノールと同時に低分子ポリフェノールの抽出量も多くなるためではないかと考えられた。また、タンパク質結合能及びリパーゼ阻害活性については、水、熱水 100°C 及び熱水 120°C が他のものよりやや低い傾向を示した。

以上の結果から、水のみ系による加温抽出で

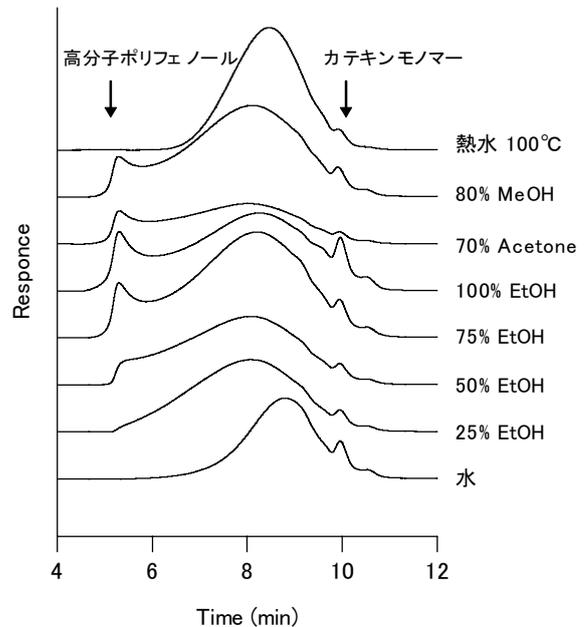


図3 抽出条件の違いによるポリフェノールの分子量分布の変化

は、有機溶媒を用いた抽出とは若干異なる抽出物が得られると考えられる。つまり、前者は抽出されるポリフェノールも多いが、高分子側のポリフェノールがなく、加温により活性などに影響する水溶性夾雑物の抽出量も多くなると考えられる。より高分子のポリフェノールがタンパク質と結合しやすく<sup>10)</sup>、ペクチンなどの多糖類がタンパク質とポリフェノールの結合を阻害することも知られている<sup>11)</sup>。これらが原因となり、タンパク質結合

能及びリパーゼ阻害活性が低下していると考えられた。したがって、抽出エキスを得ようとする場合、溶媒や温度などの抽出条件によってやや性質の異なるものが得られるということに留意する必要がある。また、それぞれの性質を考慮した利用方法を検討する必要がある。しかしながら、本研究で検討を行った水系溶媒では、活性の低下はあったものの、エタノール系溶媒と同様のタンパク質結合能やリパーゼ阻害能を有しており、エキスとしての実用上は大きな問題にはならないものと考えられた。

#### 4 まとめ

栗渋皮に含まれるポリフェノールを有効利用した機能性食品を開発するため、加工工程での栗渋皮ポリフェノールの変化を確認した。その結果、栗渋皮中のポリフェノール量は焼き栗製造工程においてやや減少するものの、その後の乾燥工程や焼き菓子に渋皮を添加した製品モデル系においても、大きく減少することなく、栗渋皮中のポリフェノールは熱に安定であることが確認された。また、栗渋皮ポリフェノールの抽出条件の検討を行ったところ、抽出されるポリフェノール量は熱水及び50%エタノールを用いた場合が多かった。これらの抽出物はやや性質が異なるものの、同様の活性を示すので実用段階では大きな問題にはならないものと考えられた。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、栗試料を提供していただきました埼玉県農業総合研究センター園芸研究所の酒井雄作担当部長に感謝の意を表します。

#### 参考文献

- 1) Prior, R. L. and Gu, L. : Occurrence and Biological Significance of Proanthocyanidins in the American Diet, *Phytochemistry* 66, (2005), 2264
- 2) 樋口誠一, 高橋学, 早川淳一, 吉川麻美, 国分由梨, 仲島日出男 : 県産食品素材を用いた

機能性食品の開発—栗ポリフェノールの利用—, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 7 (2009) 46

- 3) 齋藤寿広ら : ニホングリ新品種 ‘ぼろたん’, *果樹研報*, 9 (2009) 1
- 4) 高橋学, 樋口誠一 : 県内植物資源に由来する機能性ポリフェノールの探索, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 5 (2007) 81
- 5) Sun, B. Ricardo-da-Silva, J. M. and Spranger, I. : Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins, *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1998), 4267
- 6) Kennedy, J. A. and Taylor, A. W. : Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography, *J. Chromatogr. A*, 995 (2003) 99
- 7) Kennedy, J. A. : Proanthocyanidins : Extraction, Purification, and Determination of Subunit Composition by HPLC, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Wrolstad, R. E., New York, John Wiley & Sons, (2002) I1.4.1
- 8) Hagerman, A. E. and Butler, L. G. : Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins, *J. Agric. Food Chem.*, 26, (1978) 809
- 9) 韓立坤, Gong Xiao-Jie, 河野志穂, 齋藤雅人, 木村善行, 奥田拓道 : ショウガの抗肥満作用について, *薬学雑誌*, 125 (2005) 213
- 10) Okuda, T., Mori, K. and Hatano, T. : Relationship of the structures of tannins to the binding activities with hemoglobin and methylene blue, *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (1985) 1424
- 11) de Freitas, V., Carvalho, E. and Mateus, N. : Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry, *Food Chem.*, 81 (2003) 503