

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05906

研究課題名(和文) 果実の不溶性ポリフェノールの機能性評価とその形成を促進する加工法の検討

研究課題名(英文) Study on the food function of insoluble polyphenols in fruit and the processing condition that accelerates their formation

研究代表者

濱渦 康範 (Hamazu, Yasunori)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：90283241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：プロアントシアニジン(PA)に富む果実を加工した場合、PAが不溶化し、非抽出性PA(NEPA)となることがある。本研究ではNEPAの食品成分としての利点や加工時の形成条件を調査した。干柿のNEPA画分をマウスに摂取させたところ、対照群と比較して顕著な胆汁酸排泄促進効果がみとめられ、また、腸内環境の改善効果も示唆された。果実のNEPA形成は乾燥、煮沸、均質化、加熱調理や凍結によってもみとめられ、マルメロの乾燥では60℃高温乾燥により、また、カリンPAと繊維の懸濁液では高温酸性下で形成が促進されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、果実の加工時に形成される非抽出性プロアントシアニジン(NEPA)が食品成分として何らかの有益性を持つかという点を、特に胆汁酸排泄促進作用に焦点を当てて確認した部分が大いである。また、果実加工の際、通常分析法で定量されるプロアントシアニジンが減少したように見えても実際はNEPAの形で存在する場合があることを示し、このことは、成分分析により品質評価を行う際の新たな留意点を提示するものとなっている。さらに、本研究は、果汁飲料などの調製時にPA含量を高く維持する条件を考える基礎的情報を提示したことにも意義がある。

研究成果の概要(英文)：Processing of proanthocyanidin (PA)-rich fruits sometimes cause insolubilization of PAs, in other words, the formation of non-extractable PAs (NEPAs). In this study, superiority of NEPAs as a food components and the NEPA forming conditions during processing are investigated. Strong bile acid-excretion effect has been shown in the mice fed NEPA fraction prepared from dried persimmons. Potential health benefit to the intestinal environment of NEPA-fed mice was also suggested. The NEPA formation in fruit was observed by drying, boiling, homogenization, cooking, or freezing. In case of drying of quince pieces, drying with 60 °C cause a large NEPA formation. While association of Chinese quince PA to the fiber components in a suspending solution was accelerated under the high temperature and low pH condition.

研究分野：園芸利用学

キーワード：果実 不溶性タンニン プロアントシアニジン 胆汁酸吸着 加工条件 細胞壁繊維

1. 研究開始当初の背景

果実にはポリフェノールの一種、プロアントシアニジン (PA) を多く含むものがある。PA は果実の健康関連成分として注目されるが、加工に伴う変化も大きい。加工に伴う PA の変化の 1 つには、不溶化し、通常の水/有機溶媒系では抽出不能となる状態変化があり、このような形で存在する PA を非抽出性 PA (NEPA) と称している (Saura-Calixto, 2018; Hamauzu, 2018)。NEPA は果実が成熟する中で自己会合して形成される場合や種々の加工処理に伴う細胞破壊によってタンパク質や細胞壁繊維などの高分子化合物と強固に結合して形成される場合がある。しかし、NEPA に関する研究は通常の PA に比較すると非常に少なく、加工時の形成条件も明確ではない。また、NEPA が食品成分として有益性があるのかどうかについても未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、果実の加工時に形成される不溶性 PA (NEPA) について、(1) 食品成分としての有益性を動物試験レベルで明確化すること、および (2) 加工時の NEPA 形成条件を明らかにし、果実の加工技術と品質・機能を考える際の一助とすることである。

3. 研究の方法

(1) NEPA 健康有益性の調査

食品成分としての有益性については、コレステロール低下に関連した機能である胆汁酸吸着・排泄促進作用に焦点を当て、干柿から分画した NEPA 画分 (NEPA と細胞壁繊維成分を主体とする画分) について、*in vitro* 試験と動物試験による検証を行った。

(2) 果実加工中の NEPA 形成の調査

NEPA がいかなる加工処理によって形成されるのか、乾燥、破碎・均質化、加熱調理、凍結により確認した。

① 乾燥中の NEPA 形成：渋柿 (市田柿) を通常の干柿加工法で乾燥させ、NEPA 形成の推移と、NEPA 画分の胆汁酸吸着活性を調べた。また、マルメロ (品種 スミルナ) の果肉切片を食品乾燥機で 40℃、50℃および 60℃で乾燥させ、可溶性 PA (EPA) および NEPA 含量の変化を調べた。また、酸化ストレス状態の指標として、アスコルビン酸やペルオキシダーゼ (POD) 活性の変化を調べた。

② 果実類の破碎・均質化：渋柿、マルメロ、カリンについて、組織を乳鉢・乳棒で破碎・均質化したときの NEPA 形成を調べ、ブランピング (PE 袋内、沸騰水中、5 分) やアスコルビン酸添加の影響を調べた。

③ 加熱調理の影響：マルメロを果肉ペースト (ポルトガルのマルメラード) に加工し、加工前後の NEPA 含量の変化を調べた。

④ 凍結の影響：渋柿、マルメロ、カリンを凍結処理後に均質化し、未凍結のものと NEPA 含量を比較した。また、凍結渋柿の繊維画分 (NEPA 画分) と干柿の繊維画分について NEPA 含量と胆汁酸吸着能を比較した。

(3) NEPA 形成条件の追究

EPA と細胞壁繊維成分はいかなる条件で結合が促進され、NEPA が形成されやすいのかを、果実から単離した EPA と細胞壁繊維成分を反応させるモデル実験を行った。

① マルメロ乾燥中の NEPA 形成に関するモデル実験：フラボノイドを重合させる可能性のある POD の作用が関係することを想定し、マルメロ粗酵素液を用いて POD の至適温度を調べた。また、果実から抽出したポリフェノール、粗酵素液および繊維画分を組合せ、過酸化水素の添加の有無や、ポリフェノールと繊維画分のみ濃縮条件についても設定し、NEPA の形成量を調べた。

② 懸濁液中の NEPA 形成試験：カリンから固相抽出樹脂で粗精製した EPA を使用し、ポリガラクトuron酸、リンゴペクチン、およびリンゴ繊維画分などと混合した懸濁液について、温度や pH 条件を変更した場合の NEPA 形成量を経時的に調べた。

4. 研究成果

(1) NEPA の健康有益性

干柿から調製した NEPA 画分を 1% 配合した高脂肪食でマウスを飼育したところ、糞便への胆汁酸排泄量は 14 週齢時点で 5.2 $\mu\text{mol/day}$ であり、高脂肪食摂取対照群 (3.5 $\mu\text{mol/day}$) よりも有意に多かった (図 1)。また、胆汁酸排泄効果は、干柿まるごとの粉末を 4% 配合した高脂肪食の方が強かった (8.0 $\mu\text{mol/day}$)。この群では摂取された NEPA 量から考えられる胆汁酸排泄量よりも排泄効果が高かったことから、干柿には NEPA 画分以外にも胆汁酸排泄に寄与する因子が存在することが示唆された。食餌摂取量に基づき、配合した検体 1g 当たりの排泄効果を比較したところ、NEPA 画分は 48.6 $\mu\text{mol/g}$ 、干柿粉末は 31.4 $\mu\text{mol/g}$ であり、NEPA 画分の方が

強かった。この結果は *in vitro* における胆汁酸吸着能の比較においても同様の傾向であったが、吸着力の差はより大きかった (NEPA 画分は $41.5 \mu\text{mol/g}$ 、干柿粉末は $15.5 \mu\text{mol/g}$)。なお、本動物試験においては高脂肪食対照群においても高脂血症の症状を誘発できず、全ての群で血漿コレステロール濃度が正常範囲であったことから、血中コレステロール低下作用については確認することができなかった。

糞便から腸内細菌叢を調べたところ、通常食群、高脂肪食群、NEPA 画分配合高脂肪食群および干柿配合高脂肪食群は、それぞれ特徴的な菌門が異なり、腸内環境は大きく異なることが示された。また、機能遺伝子解析から推測されたこととして、NEPA 画分や干柿粉末を配合した高脂肪食摂取群では、高脂肪食群よりもトリメチルアミン-N-オキシドの産性が抑制された可能性があり、これらの検体の摂取は動脈硬化予防につながる可能性が示唆された。

以上のことから、NEPA は、胆汁酸の吸着・排泄機能や腸内菌叢への影響から、動脈硬化予防に寄与する可能性の高い、利点を持つ食品成分であると考えられた。

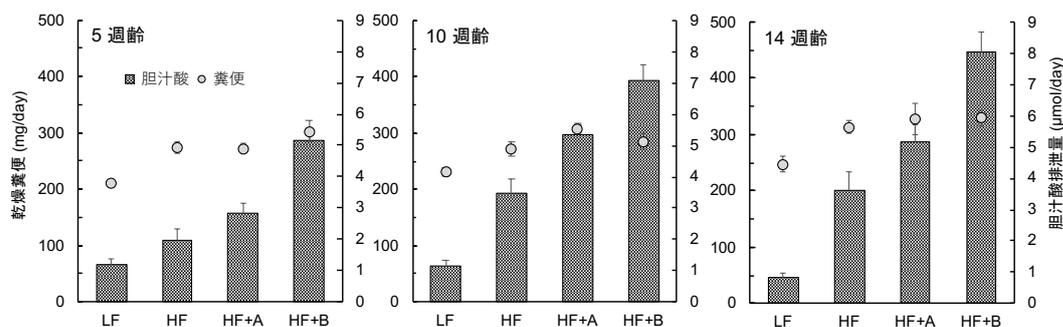


図1 配合飼料で飼育したマウスの糞便および胆汁酸排泄量
LF, 通常食群; HF, 高脂肪食群; HF+A, 干柿 NEPA 画分配合 HF 群;
HF+B, 干柿粉末配合 HF 群

(2) 果実加工中の NEPA 形成

① 乾燥: 干柿の乾燥加工中に EPA は減少し、一方で NEPA が増加し、これに伴って NEPA 画分の胆汁酸吸着活性も増大した。また、マルメロ果肉切片の熱風乾燥処理において、 50°C および 60°C の高温乾燥の終盤に NEPA の増加がみとめられ、特に 60°C で顕著であった (図 2)。また、高温乾燥区ほどペルオキシダーゼ (POD) 活性の低下が早く、 60°C 乾燥区ではアスコルビン酸の減少も大きく、酸化ストレス向上との関連性が示唆された。

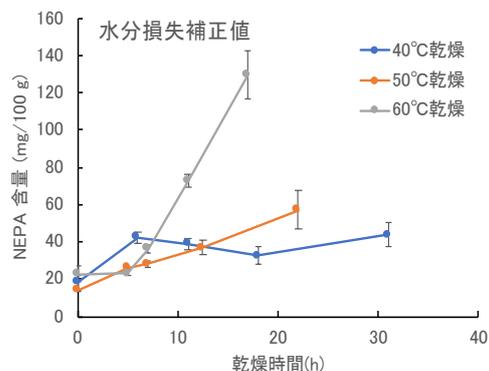


図2 マルメロ果肉切片の熱風乾燥中の NEPA 含量の変化。
水分損失に伴う濃縮を補正した値で表示。

② 破碎・均質化処理: 渋柿、カリン、マルメロのような PA 含量が多い果実を磨碎すると、この処理だけで NEPA が形成された。このとき、柿やカリンではブランチング処理が NEPA 形成を促進したが、マルメロでは逆に NEPA 形成を低下させ、ブランチング処理の影響は品目により異なることが示唆された。また、マルメロではアスコルビン酸の添加も破碎時の NEPA 形成を低下させたことから、酸化酵素の関与が示唆された。

③ 加熱調理: マルメロを果肉ペーストに加工したところ、加工前の果実よりも加工後の果実 (同重量の果肉換算) で NEPA 含量が多くなり、長時間の加熱加工品においても NEPA が形成されることが確認された。なお、マルメロ繊維

画分 (NEPA 画分) 当たりでは胆汁酸吸着能への影響は明確でなかったが、同重量の果肉当たりでは吸着能の向上がみとめられた。

④ 凍結: 渋柿およびマルメロは凍結後に破碎した場合、NEPA 形成が多くなった。また、凍結した生鮮渋柿から調製した NEPA 画分は、未凍結の生鮮渋柿から調製した NEPA 画分よりも、胆汁酸吸着能が高かった。また、凍結渋柿の NEPA 画分と干柿の NEPA 画分を比較したところ、NEPA 量からみた胆汁酸吸着能は凍結干柿の画分の方が強かった。

(3) NEPA 形成条件および要因について

① マルメロ果肉切片の乾燥中の NEPA 形成

マルメロの POD は至適温度が 50°C ~ 60°C 付近であり、高温乾燥中においても作用できることが示された。POD はフラボノイドを重合させる作用も示されていることから、NEPA 形成に

関わる可能性を念頭に、粗酵素液と抽出ポリフェノール、リンゴの繊維画分および過酸化水素より成る反応混合系で試験したところ、POD活性は褐変色素の形成を促進することにより、むしろNEPA形成を低下させる方向に作用することがみとめられた。一方で、抽出ポリフェノールとリンゴ繊維画分のみを溶液を40℃、50℃および60℃で加熱濃縮した場合、いずれの温度においてもNEPAの形成が認められた。マルメロEPAとリンゴ繊維の懸濁液の濃縮では温度によるNEPA形成量に違いが認められなかったが、リンゴポリフェノールを使用した場合には高温ほどNEPA形成量が多くなる傾向であった(図3)。以上のことから、マルメロ果肉切片の熱風乾燥に伴うNEPA形成は、高温乾燥下での濃縮による反応が主体であり、60℃高温下でのPOD活性やアスコルビン酸など抗酸化性因子の低下が、顕著なNEPA増大に関係したものと推察した。

② 懸濁液におけるNEPA形成

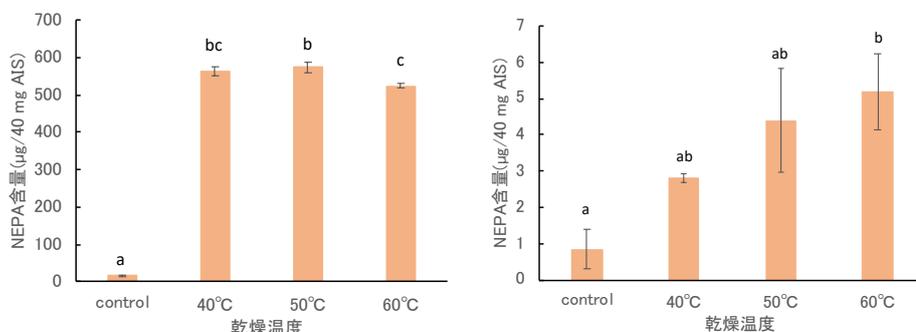


図3 マルメロポリフェノール (PP) (左) またはリンゴ PP (右) とリンゴ繊維画分 (AIS) 40 mg の懸濁液の濃縮乾燥によるNEPA形成。当初添加したPPはマルメロ 2000 µg, リンゴ 400 µg. Controlは溶液とAISを混合直後に70%アセトンで可溶性PPを洗浄除去した。

カリンPAをポリガラクトuron酸およびリンゴペクチンと反応させたときのNEPA形成は高温ほど多く、また、ペクチンとの結合が大きかった。また、カリンPAとリンゴペクチンの結合は中性よりも酸性条件(pH2.6)において多く(図4)、NEPA形成は加熱30分で最大となり、添加したPAのおよそ30%がNEPA化した(図5)。加熱時間が長時間になると褐色物質への変化が誘導され、NEPA形成は進行せず、PA総量の減少が認められた。また、カリンPAとリンゴAISの結合試験では特に加熱1分から5分で特に顕著なNEPA形成が確認された。このように、カリンPAはポリガラクトuron酸よりもリンゴペクチンと結合しやすく、特に高温酸性条件下で有意なNEPA形成が認められること、また、NEPA形成は加熱30分以内が顕著であり、長時間の加熱はPAの大幅な損失をもたらすことが確認された。

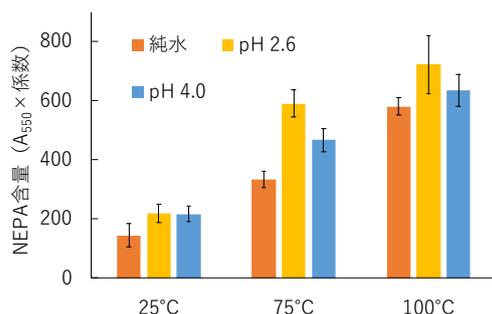


図4 カリン可溶性プロアントシアニジン (EPA) とリンゴペクチン懸濁液の加熱中のNEPA形成
粗精製PA 20 mg + ペクチン 20 mg

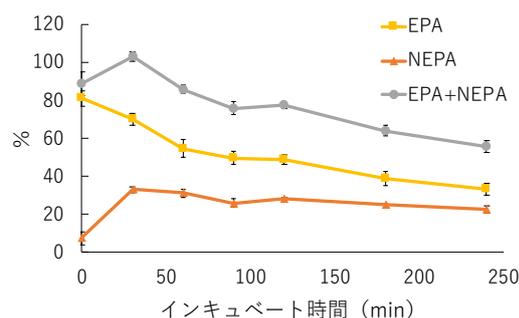


図5 カリンEPAとリンゴペクチン懸濁液の加熱中のNEPA形成 (pH2.6)
粗精製PA 20 mg + ペクチン 80 mg

(4) まとめ

NEPAは胆汁酸吸着・排泄促進作用の点で有益性のある食品成分であることが、干柿NEPA画分による動物試験で確認された。また、NEPAが多い繊維画分は胆汁酸吸着能も高かった。NEPAの形成は、カキやマルメロにおいて、破碎・均質化、加熱調理、乾燥、凍結などの処理によって認められた。マルメロの乾燥加工では60℃高温の終盤において顕著であり、また、カリンEPAを用いた懸濁液においては高温酸性条件によりNEPA化が促進されることが示された。一方、褐変が顕著に進行する条件下ではNEPA形成量は低下し、PA総量も減少することが示された。

これらのことは、果汁飲料などを調製する際においては PA のロスに注意が必要であること、また、可能であればスムージーのように繊維画分を無駄なく摂取できる食形態に利点があることを示すものと考えられる。

<引用文献>

- ① Saura-Calixto, F. The story of the introduction of non-extractable polyphenols into polyphenol research: origin, development and perspectives. In *Non-extractable Polyphenols and Carotenoids*, 2018, pp. 1 – 16.
- ② Hamauzu, Y. (2018). Non-extractable polyphenols in fruit: Distribution, changes, and potential health effects. In *Non-Extractable Polyphenols and Carotenoids*, 2018, pp. 284–306.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hamauzu Yasunori, Ikeda Erika	4. 巻 373
2. 論文標題 In vitro and in vivo evaluation of the bile acid-binding properties of dried persimmon and its non-extractable proanthocyanidin fraction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 131617 ~ 131617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2021.131617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田エリカ , 瀧渦康範
2. 発表標題 干柿の胆汁酸吸着・排泄作用における非抽出性プロアントシアニジンの影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasunori Hamauzu and Erika Ikeda
2. 発表標題 Insoluble tannins are important functional components of dried persimmons for their bile acid-binding and excretion effects
3. 学会等名 31th International Horticultural Congress (IHC2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧渦康範, 野中嘉貴
2. 発表標題 マルメロ果肉切片の熱風乾燥に伴う生理活性の変化とプロシアニジンの不溶化について
3. 学会等名 第72回 日本食品保蔵科学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	荻田 佑 (Ogita Tasuku) (50738010)	信州大学・学術研究院農学系・助教 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------