

# 県産農産物からの有用物質の抽出およびその活用

## －レンコンポリフェノールの抽出条件検討－

食品工業部

鶴田裕美 柘植圭介 吉村臣史

レンコンのポリフェノール抽出物を機能性食品素材として利用するために、安全かつ効率的にレンコンからポリフェノールを抽出する方法を検討した。水、熱水、含水エタノール、酢酸水およびセルラーゼ等の酵素によるポリフェノールの抽出率を比較した結果、熱水抽出では、レンコンのムチンやデンプン質が糊化し、抽出液を得ることができなかった。酢酸水による抽出では水の約 1.4～1.5 倍、25～80%エタノール抽出では水の約 1.6～1.7 倍に抽出率が向上し、抗酸化活性もポリフェノール量と相関した。セルラーゼとアミラーゼを添加した抽出では、酵素無添加の抽出液に比べて、ポリフェノール量は顕著に増加したものの、抗酸化活性とプロアントシアニジン量には差が認められなかった。したがって、レンコンからのポリフェノール抽出条件として、25～50%エタノールの使用が有効であることが認められた。

### 1. はじめに

佐賀県は、全国 3 位、九州 1 位（平成 22 年度）とレンコンの生産量が多い地域である。その一方で、通常よりも味や外観などの品質が劣るために廃棄される未利用レンコン（図 1）の量も多いのが現状である。県内では、出荷量の約 2 割から 3 割が年間に廃棄されると言われており、これらの有効利用法が求められている。

我々は、これまでに、レンコンがポリフェノールを多く含み、肥満モデル動物の脂質代謝を改善することを明らかにしており、未利用レンコンを新たな機能性食品素材として利用することを目的として研究を行ってきた<sup>1-4)</sup>。

また、レンコンに含まれるポリフェノールは、主にカテキンおよびガロカテキンを構成成分とした縮合型タンニン・プロアントシアニジン（PA）であり（図 2）、PA は一般的に含水アセトンや熱水で効率良く抽出されると言われている。しかし、我が国の食品衛生法では、ポリフェノールの抽出にアセトンを使用することは許可されていない。

そこで、本研究ではレンコンのポリフェノール抽出物を機能性食品素材として利用するために、アセトンを使用しない安全かつ効率的なポリフェノールの抽出方法の検討を行なった。また、ポリフェノールの代表的な機能性である抗酸化活性および PA 量についても比較検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料調製

レンコンは、佐賀県農業試験研究センター白石分場から供与された。可食部を水洗い後、真空凍結乾燥後、粉碎機で粉末化し、試料とした。

#### 2.2 抽出条件

##### (1) 抽出条件 1

レンコン粉末試料 1g に抽出溶媒として、80% アセトン、80% エタノール、1% 酢酸水、蒸留水・常温、90℃熱水（90℃加温）50 mL を加え、1 時間攪拌抽出後、遠心分離し（3,000 rpm、5 分間）、上清を回収した。この操作をさらに 2 回繰り返す（計 3 回抽出）、回収した抽出液を減圧濃縮後、0.1%酢酸を含む 50%メタノールで 50 mL に定容し、ろ紙（ADVANTEC, No.2）でろ過



図 1 未利用レンコン  
（末節部位，変形，傷付いたレンコン）

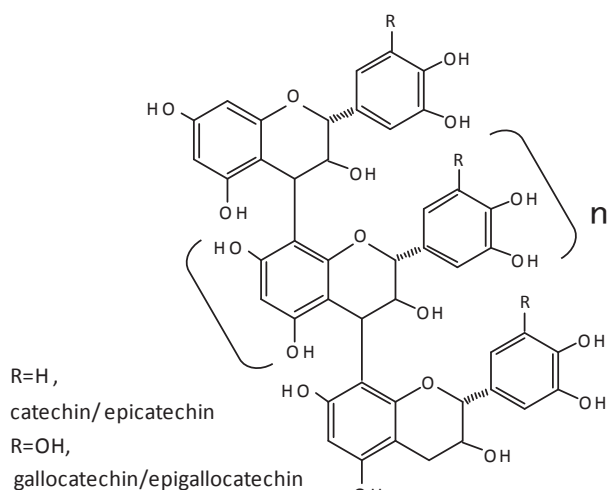


図 2 レンコンポリフェノールの推定構造

した。ろ液を総ポリフェノールおよび DPPH ラジカル消去活性測定に用いた。

(2) 抽出条件 2

レンコン粉末試料 1g に抽出溶媒として、80% アセトン、25%エタノール、50%エタノール、80% エタノール、1%酢酸水、5% 酢酸水、蒸留水を用い、抽出条件 1 と同様に抽出操作を行なった。

(3) 抽出条件 3

レンコン粉末試料 1g にセルラーゼ (アクレモセルラーゼ KM, 協和化成株式会社) またはアミラーゼ (ラクターゼ 2000, 洛東化成工業株式会社) を粉末試料の 1%, あるいは両酵素を 1%ずつ添加し、10mM 酢酸緩衝液 (pH 4) 6mL を加え、40°C で一晩反応させた。25% エタノールを用い、抽出条件 1 と同様に抽出操作を行なった。

2.3 総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール量の測定は Folin-Ciocalteu 法<sup>5)</sup>を一部改良して行なった。すなわち、96 穴マイクロプレートに 10 μL の試料溶液を加え、10 倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬 75 μL を加えて攪拌し、室温で 5 分間静置した。さらに、2%炭酸ナトリウム溶液 75 μL を加え、攪拌し、室温で 15 分間静置後、750nm の吸光度を測定した。標準物質に没食子酸を用いて検量線を作成し、試料の総ポリフェノール量を没食子酸当量として換算した。

2.4 DPPH ラジカル消去活性の測定

DPPH ラジカル消去活性を須田らの方法<sup>6)</sup>を用いて測定し、抗酸化能の評価を行った。すなわち、96 穴マイクロプレートに 200 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) 50 μL, 適宜希釈した試料溶液 50 μL を加え攪拌し、エタノールに溶解した 200 μM DPPH 溶液を加え、室温で 20 分

間反応後、520nm の吸光度を測定した。標準物質には、抗酸化物質である Trolox を用いて検量線を作成し、DPPH の退色率から試料の抗酸化能を Trolox 当量として換算した。

2.5 総プロアントシアニジン (PA) 量の測定

総 PA 量の測定は、バニリン-塩酸法<sup>7)</sup>を用いて行なった。すなわち、試料 0.5 mL に 4% バニリン-メタノール溶液 3 mL を加え、攪拌した。さらに、塩酸 1.5 mL を添加し、攪拌後、室温で 15 分間静置後、500 nm の吸光度を測定した。標準物質にカテキンを用いて検量線を作成し、試料の総 PA 量をカテキン当量として換算した。

3. 結果および考察

3.1 抽出条件 1 - 含水エタノール、酢酸水、熱水による抽出 -

図 3 に抽出条件 1 において、レンコンからポリフェノールを抽出した結果を示す。水による抽出率を 100% として表した。水抽出に比べて、80%アセトンでは約 2.8 倍、80%エタノールでは約 1.5 倍、1%酢酸水では約 1.8 倍、90°C・熱水では約 1.3 倍抽出率が高かった。また、データには示していないが、加温抽出する際に 100°C 以上に加熱すると、レンコンのムチン質やデンプン質が糊化し、抽出液を回収することができなかった。

図 4 に抽出条件 1 における抗酸化活性を DPPH ラジカル消去活性にて測定した結果を示す。水抽出による抗酸化活性を 100% として比較した。各抽出溶媒による抗酸化活性は、ポリフェノール量に相関することが認められ、いずれも 80%アセトン抽出に比べると著しく低い値を示した。しかし、ポリフェノールの抽出効率には、水のみでの抽出に比べて、エタノールまたは酢酸を添加することで改善する傾向が認められた。

3.2 抽出条件 2 - エタノール濃度、酢酸濃度の影響 -

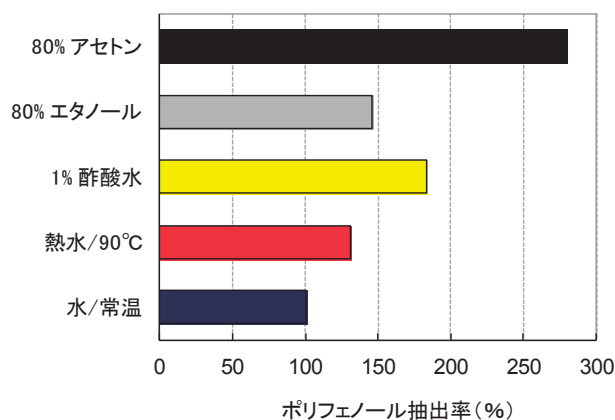


図 3 抽出条件 1 におけるポリフェノールの抽出率

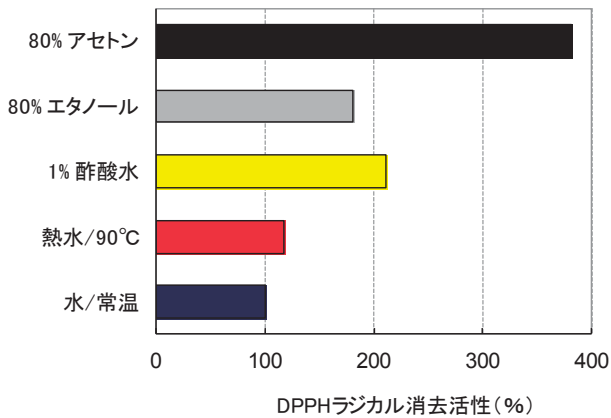


図 4 抽出条件 1 における抗酸化活性の比較

図 5 に抽出条件 2 において、エタノール濃度および酢酸濃度を変えて抽出を行なった結果を示す。水によるポリフェノールの抽出率を 100% として表した。エタノール濃度 50% および 80% では、同等の値を示し、水抽出よりも約 1.7 倍高かった。25% エタノールは約 1.6 倍高い値を示した。また、1% 酢酸水は、水抽出に比べて約 1.4 倍、5% 酢酸水は約 1.5 倍高かった。

図 6 に抗酸化活性を測定した結果を示す。水抽出による抗酸化活性を 100% として比較した。抗酸化活性はポリフェノール量と相関していた。80% アセトン以外で比較すると、50% エタノールで最も高い値を示した。

図 7 に総 PA 量を比較した結果を示す。水抽出による PA 抽出量を 100% として表した。PA 量は、ポリフェノール量と相関しており、80% アセトンで最も高かった。含水エタノールでは、水抽出の約 1.4~1.6 倍高い値を示し、酢酸の添加では約 1.3 倍に増加した。以上の結果より、レンコンポリフェノールは、エタノールを 25

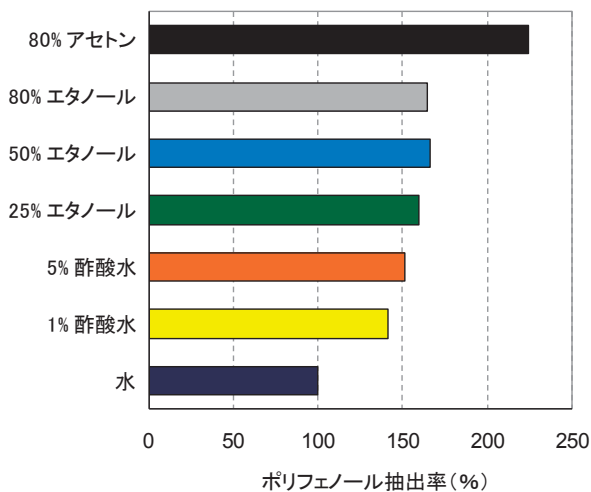


図 5 抽出条件 2 におけるポリフェノールの抽出率

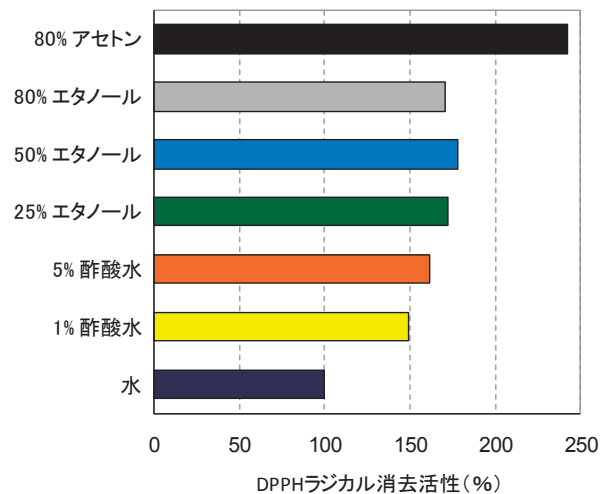


図 6 抽出条件 2 における抗酸化活性の比較

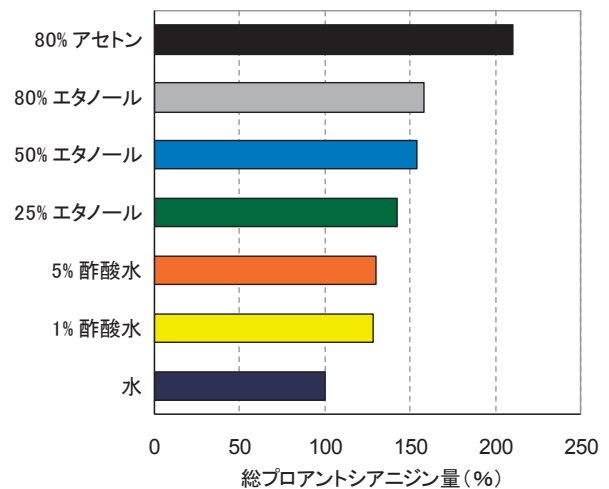


図 7 抽出条件 2 における PA 量の比較

~50% 添加することで水抽出よりも効率的に抽出できることが認められた。また、抽出条件 1 と抽出条件 2 を比較すると、抽出条件 2 において、水によるポリフェノールの抽出効率が高く、含水エタノールや酢酸水との差が小さかった。抽出条件 1 では良品質なレンコンを用いたが、抽出条件 2 では、レンコンの末節が多く含まれる未利用レンコンの粉末試料を用いた。これまでに、レンコンの末節部分は、良品質なレンコンよりもデンプンやタンパク質含量が少ないことが認められている<sup>9)</sup>。デンプンやタンパク質は、ポリフェノールを抽出する際、抽出の妨げになる可能性があり、このことが抽出条件 2 において、水抽出のポリフェノール量が高かった原因であるかもしれない。

### 3.3 抽出条件 3 - 酵素を利用した抽出 -

図 8 にセルラーゼおよびアミラーゼの添加処理後に 25% エタノールでポリフェノールを抽出した結果を示

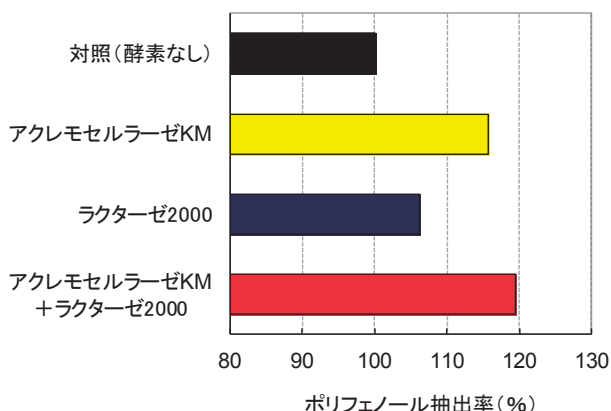


図 8 抽出条件 3 におけるポリフェノールの抽出率

す。酵素無添加を対照とし、その抽出率を 100%として表した。アクレモセルラーゼ KM 処理によるポリフェノールの抽出率は、対照に比べて約 15%高く、ラクターゼ 2000 処理では約 6%増加した。一方、両酵素を併用すると、ポリフェノールの抽出率が対照より 20%増加した。セルラーゼとアマラーゼによって細胞壁やデンプンを分解することでポリフェノールが抽出されやすくなる可能性が考えられた。

図 9 に抗酸化活性を測定した結果を示す。対照（酵素無添加）の抗酸化活性を 100%として比較した結果、抗酸化活性とポリフェノール量との相関は認められなかった。ポリフェノール量が顕著に増加したアクレモセルラーゼ KM 処理および両酵素の併用でも抗酸化活性は約 3%しか増加しなかった。

図 10 に総 PA 量を比較した結果を示す。対照（酵素無添加）の総 PA 量を 100%として比較したところ、いずれも対照と差が認められなかった。したがって、酵素を用いた抽出では、総ポリフェノール量の増加は認められるものの、レンコンの主なポリフェノールである PA の抽出量に差がないことが認められた。その原因として、セルラーゼやアマラーゼによって、他のポリフェノールの溶出が増加した可能性も考えられる。しかし、Folin-Ciocalteu 法による総ポリフェノールの測定は、ポリフェノール以外の還元性物質の影響も受けることが知られており、酵素の添加によって何らかの生成物が測定に影響を及ぼした可能性も考えられる。今回は、セルラーゼとアマラーゼの中でも、ポリフェノールを分解するクロロゲン酸エステラーゼやタンナーゼ等を含まないことが知られていた 2 種類の酵素のみを用いて検討した。今後、新たな酵素や酵素の組み合わせ条件によっては、PA の抽出効率の改善も期待できるかもしれない。これらの可能性については、今後、機器分析等により増加した成分の分析を行なう予定

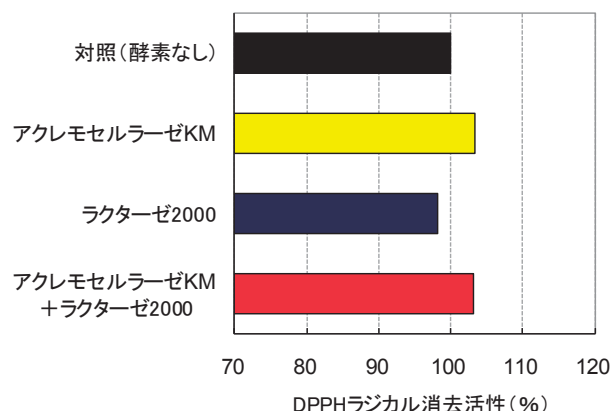


図 9 抽出条件 3 における抗酸化活性の比較

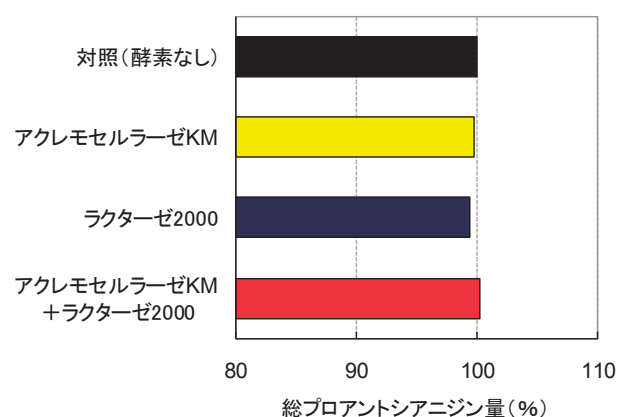


図 10 抽出条件 3 における PA 量の比較

であり、その結果から検討を加えていきたい。

#### 4. おわりに

本研究では、レンコンからポリフェノールを効率的かつ安全に抽出する方法を検討した。通常、食品原料として使用されるポリフェノールは、熱水抽出で製造されることが多いが、レンコンは、ムチンやデンプン質が多く、加熱するとゲル化が進み、100℃以上の熱水によるポリフェノールの抽出は困難であった。

一方、酢酸水や含水エタノールを用いると水抽出よりもポリフェノールの抽出率が向上した。また、セルラーゼやアマラーゼ処理後、25%エタノールで抽出することで更なる抽出率の向上を試みたが、ポリフェノール量の増加に反し、抗酸化活性と総 PA 量に改善が認められなかった。

最後に、本研究に試料をご提供頂きました佐賀県農業試験研究センター白石分場に感謝致します。

#### 参考文献

- 1) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 柳田

- 晃良, 永尾晃治 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **16**, 51-53 (2007)
- 2) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義, 柳田晃良, 永尾晃治 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **18**, 41-47 (2009)
- 3) Tsuruta Y, Nagao K, Shirouchi B, Nomura S, Tsuge K, Koganemaru K, Yanagita T. : Effects of Lotus root (the edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) on the development of non-alcoholic fatty liver disease in obese diabetic db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **76** (3), 462-466 (2012)
- 4) Tsuruta Y, Nagao K, Kai S, Tsuge K, Yoshimura T, Koganemaru K, Yanagita T. : Polyphenolic extract of lotus root (edible rhizome of *Nelumbo nucifera*) alleviates hepatic steatosis in obese diabetic db/db mice. *Lipids Health Dis* **10**, 202 (2011)
- 5) Sun T, Tang J, Powers J. R.: Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of asparagus juice. *J. Agric. Food Chem*, **53** (1), 42-48 (2005).
- 6) 須田郁夫, 食品機能研究法, 光琳, 218-220 (2000).
- 7) Sun JS, Tsunga YH, Chen IJ, Huang WC, Hang YS, Lu FJ.: An ultra-weak chemiluminescence study on oxidative stress in rabbits following acute thermal injury. *Burns*, **24**, 225-231 (2000).
- 8) 鶴田裕美, 柘植圭介, 吉村臣史, 小金丸和義 : 佐賀県工業技術センター研究報告書, **19**, 29-33 (2007)