

リンゴ果汁製造工程におけるプロシアニジンの増減と蛍光指紋による簡易分析

指導教員 北村 豊
粉川 美踏

沖野聖矢 (201821082)

1. 背景と目的

近年の研究からリンゴ果実中のポリフェノールの一種であるプロシアニジンが血中の LDL 値を下げる効果があると期待されており、生鮮品における機能性表示食品に認定されたことから注目を集めている。プロシアニジンは細胞中の液胞に多く局在しており、適切な粉碎を経て、リンゴ果汁として加工することで、プロシアニジンの効率的な摂取が可能になることが期待できる。本研究では当研究室で開発された湿式微粉碎(Micro Wet Milling, 以下MWM)を用いて細胞中プロシアニジンの抽出量向上を試みると共に、リンゴ果汁製造工程の各加工処理がプロシアニジンの増減に及ぼす影響を調べることで最も機能性に富んだリンゴ果汁製造系の構築を目的とした。また、プロシアニジンはリンゴ毎に個体差があり、その含有量は加工方法によっても大きく変動する。そのため、リンゴ果汁製造工程の各加工段階において簡便かつ迅速にプロシアニジン濃度を推定できる技術は魅力的である。そのため、本研究では加工工程を経たリンゴ果汁の蛍光指紋を取得してリンゴ果汁の蛍光特性を解明すると共に様々な加工処理を受けたリンゴ果汁に対応できるプロシアニジン濃度の推定モデルの構築及び推定精度の評価を試みた。

2. 試料と方法

(1) 各粉碎リンゴ果汁の作製

実験試料としてリンゴ(品種:ふじ)を用いた。洗浄したリンゴの芯や種子を除去し、褐変抑制のためにL(+)-アスコルビン酸(Final. 1.0%)を添加した。リンゴ小片をブレンダー(CFB 990, Hamilton Beach)で2分間粉碎して粗粉碎スラリーを得た後に、半量をMWMで微細化して微粉碎スラリーを得た。各工程のスラリーを篩(目開き:925 μm , アズワン)で濾過し、各粉碎リンゴ果汁を調製した。

(2) 各粉碎果汁の加工処理

作製した各粉碎果汁に対して遠心分離処理、酵素処理、清澄化処理、殺菌処理を単独及び連続で施した。遠心分離処理は作製した各粉碎果汁を50 mLのコニカルチューブに40 mL分注し、遠心分離機(CN-1050, アズワン)を用いて3000 rpmと5000 rpmで5分間遠心分離を行い、上清を遠心分離試料として得た。酵素処理は作製した各粉碎果汁30 mLに東京化成工業(株)社製のセルラーゼを2.0%(w/w)の濃度で添加し、 $55\pm 2^\circ\text{C}$ で3時間ゆっくりと振とう(100 rpm)させたものを酵素処理試料として調製した。清澄化処理は酵素処理後の果汁を3000 rpmで5分間遠心分離を行い、上清を回収して清澄化処理試料として獲得した。殺菌処理は作製した各粉碎果汁を試験管に5 mL注入し、 $65\pm 2^\circ\text{C}$ で10分間の低温殺菌と、 $95\pm 2^\circ\text{C}$ で1分間の高温殺菌を行い殺菌試料として得た。

(3) 総プロシアニジン濃度測定

各加工処理を施したリンゴ果汁を70%アセトンで抽出及び0.45 μm PTFE シリンジフィルターで濾過し、RF-20AXS 蛍光検出器(株)島津製作所 [Ex:230 nm/Em:321 nm]を装備したHPLC((株)島津製作所)を用いてプロシアニジンの検出を行った。カラムはサイズ排除カラム(Inertsil[®] WP300 Diol, GL Science Inc.) [i. d. 4.6 \times 250 mm; 5 μm]を 30°C で用いた。総プロシアニジン濃度はプロシアニジン2から8量体の合計を総和とし、プロシアニジンB2相当量として算出した。統計解析ソフトJMP13(SAS Institute Inc)を用いて対応する2群間の比較を行い、有意差が見られたペアについて有意水準を3段階で評価した(*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001)。

(4) 抗酸化活性測定

抗酸化活性を測定するために総ポリフェノール濃度とDPPHラジカル消去活性を検討した。総ポリフェノール濃度測定にはFolin-Ciocalteu法を用いた。分光光度計(V-630, JASCO)を用いて総ポリフェノールは765 nm、DPPHラジカル消去能は517 nmの波長で測定した。総ポリフェノール濃度は検量線を利用して没食子酸相当量として示した。

(5) 蛍光指紋計測

5つの加工処理を施した各粉碎果汁を試料として計測を行った。蛍光指紋計測には分光蛍光光度計(F-7000, (株)日立ハイテクサイエンス)及び、データオペレーションソフト(FLSolutions4.0, (株)日立ハイテクノロジーズ)を用いた。石英セルにリンゴ果汁試料を3 mL充填し、励起波長:200~500 nm、蛍光波長:200~700 nmの波長範囲で蛍光指紋を取得した。また、励起光を 45°C でセルに照射する前面測定法を用いた。計測は1つの試料に対して3回を行い、各粉碎果汁の蛍光指紋を合計215個取得した。

(6) 多変量解析

数値解析ソフト(MATLAB R2018a, Mathworks)と多変量解析アドオンソフト(PLS_Toolbox, Eigenvector Research)を用いて、多変量解析の1つである部分的最小二乗回帰(PLS 回帰分析)を実施し、15個の推定モデルを作成した(Table 1)。推定精度評価の方法には実用性評価指標の1つであるRPD値を算出して検証した。

Table 1 作成したモデル

Model No	サンプル条件 (モデルに用いたサンプル数)	加工処理
Model 1	再粉碎果汁(161)	
Model 2	粗粉碎果汁(81)	粉碎・搾汁、遠心分離、
Model 3	微粉碎果汁(80)	酵素、清澄化、殺菌
Model 4	再粉碎果汁(143)	
Model 5	粗粉碎果汁(72)	粉碎・搾汁、遠心分離、
Model 6	微粉碎果汁(71)	酵素、殺菌
Model 7	再粉碎果汁(125)	
Model 8	粗粉碎果汁(63)	粉碎・搾汁、遠心分離、
Model 9	微粉碎果汁(62)	殺菌
Model 10	再粉碎果汁(107)	
Model 11	粗粉碎果汁(54)	粉碎・搾汁、酵素、殺菌
Model 12	微粉碎果汁(53)	
Model 13	再粉碎果汁(89)	
Model 14	粗粉碎果汁(45)	粉碎・搾汁、殺菌
Model 15	微粉碎果汁(44)	

3. 結果と考察

(1) 単独加工処理がプロシアニジン増減に及ぼす影響

粉碎・搾汁・遠心分離・殺菌の各加工工程がプロシアニジンの増減に及ぼす影響を調べ、最適なリンゴ果汁製造条件を探索した。粉碎工程では果皮を含めて微粉碎処理を行うことで15.6%の有意な増加が確認された。搾汁工程では搾りカス中に粗粉碎果汁の2倍近くのプロシアニジンが残存しており、搾りカスを含めて微細化した微粉碎リンゴ果汁は搾りカスの削減に繋がるだけでなく、残存した多量のプロシアニジンを摂取できる可能性が示された。遠心分離工程及び殺菌工程はプロシアニジンの減少を引き起こし、その減少率は微粉碎果汁の方が高い結果となった。そのため、プロシアニジンの損失を最小限に抑えるためには低速条件での遠心分離処理及び低温殺菌処理が最適だと考える。

(2) 連続加工処理がプロシアニジン増減に及ぼす影響

単独の加工処理で見られたプロシアニジンの増減が一連の製造工程においても確認されるか検討を行なった (Fig. 1)。その結果、各粉碎果汁の総プロシアニジン濃度は加工処理を重ねる毎に減少する傾向にあった。その減少率は粗粉碎果汁で9.9%、微粉碎果汁で21.7%と微粉碎果汁の方が高い減少率を示した。続いて、総ポリフェノール濃度、DPPH ラジカル消去活性の測定を行なった (Fig. 2, Fig. 3)。その結果、総ポリフェノール濃度は微粉碎果汁において段階的に減少し、総プロシアニジン濃度と似た傾向が見られたのに対し、粗粉碎果汁では大きな変動はなかった。DPPH ラジカル消去活性は微粉碎果汁の搾汁後の試料で最も高い値を示し、全加工工程において粗粉碎果汁よりも微粉碎果汁の方が高い抗酸化活性を示した。

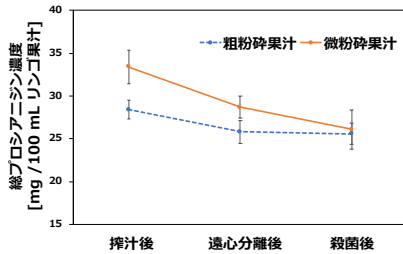


Fig. 1 連続処理による総プロシアニジン濃度の変化

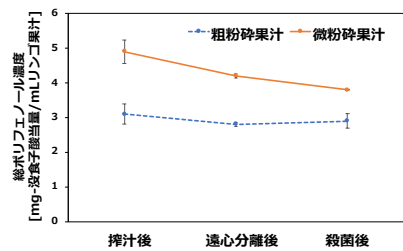


Fig. 2 連続処理による総ポリフェノール濃度の変化

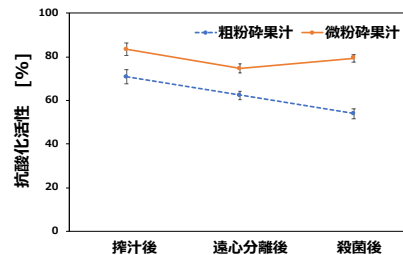


Fig. 3 連続処理によるDPPH ラジカル消去活性の変化

(3) 蛍光指紋法による推定モデル構築と精度評価

リンゴ果汁を計測して得られた前処理後の蛍光指紋データと総プロシアニジン濃度データを組み合わせる様々な加工段階における推定モデルの構築及びクロスバリデーションによるモデルの検証を行なった。モデルは粗粉碎果汁のみ、微粉碎果汁のみ、その両方の果汁 (両粉碎果汁) の3つサンプル条件において粉碎・搾汁処理、遠心分離処理、酵素処理、清澄化処理、殺菌処理の組み合わせを5パターン作成し、計15個のモデルにおいて検証を行った。続いて各モデルにおいてバリデーション群による推定精度の評価を行った。その結果、Model 11においてラフなスクリーニングが可能なレベル、Model 14において品質管理分析レベルの実用性があるモデルだと実証された (Fig. 4, Fig. 5)。このことから上記のモデルで用いた加工処理を施した粗粉碎果汁の蛍光指紋から簡易的に粗粉碎果汁中の総プロシアニジン濃度を推定できる可能性が示唆された。

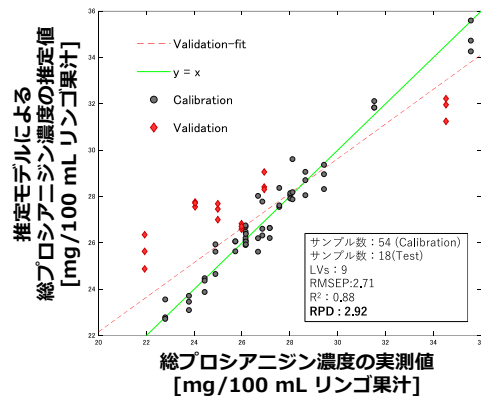


Fig. 4 Model 11における推定値と実測値の散布図

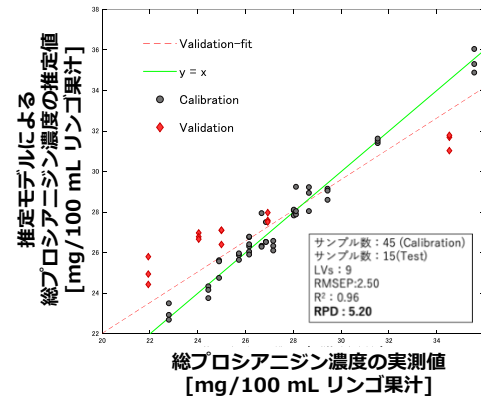


Fig. 5 Model 14における推定値と実測値の散布図

4. 結論

MWMによる微粉碎処理はプロシアニジンの抽出量を向上させ、抗酸化活性を上昇させた。そのため、リンゴ果汁に対して微粉碎処理→低速の遠心分離処理→低温殺菌処理を行う製造系が現段階の最適条件であると予想される。今後は褐変の影響を少なくするための窒素充填したMWMによる微粉碎やMWMの微粉碎能力の向上が、プロシアニジンの抽出向上に繋がると期待される。また、蛍光指紋分光法とPLS回帰分析を組み合わせることで、粗粉碎果汁中の総プロシアニジン濃度推定モデルを実用的な精度で提案できた。今後は試料数を増やし、推定精度のさらなる向上を目指していきたい。