

# 乳酸生成糸状菌によるポテトパルプ発酵中の抗酸化性および ポリフェノールの経時的変化

松坂裕子、知地英征、葛西隆則  
藤女子大学 人間生活学部 食物栄養学科

## ABSTRACT

Changes in DPPH radical -scavenging activity and total polyphenol content during the fermentation of potato pulp with *Rhizopus oryzae* were investigated.

- 1) DPPH radical -scavenging activity and total polyphenol content in methanol extracts of fermented potato pulp with *Rhizopus oryzae* increased during the fermentation.
- 2) HPLC analysis revealed that the dominant polyphenols in methanol extracts of fermented potato pulp were caffeic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, protocatechuic acid and vanillic acid and two of them, caffeic acid and *p*-hydroxybenzoic acid increased considerably during the fermentation.
- 3) These results suggested that the increase of caffeic acid and *p*-hydroxybenzoic acid contributed primarily to the increase of DPPH radical -scavenging activity during the fermentation of potato pulp.

## 1. はじめに

現在、十勝など北海道東部でデンプン原料バレイショが広く栽培され、デンプンが製造されている。その工程でデンプン加工副産物のポテトパルプが排出され、年間 10 万トンにも達している。ポテトパルプの成分分析結果では、デンプンが 79.1%、粗タンパク質 4.4%、粗脂肪 0.2%、粗繊維 14.5%、灰分 1.8% (いずれも乾物当たり) となっており、未抽出のデンプンが豊富に含まれている。しかし、家畜飼料として利用しようとしても、消化性が悪いなどの問題があり、有効には利用されていないのが現状である。ポテトパルプ中のデンプンは堅い細胞壁内部に存在しており、生デンプン分解性を備えた乳酸菌でも容易に利用できる状態ではないためにポテトパ

ルプだけでサイレージ (発酵飼料) を調製することは難しいと考えられていた。このような中、Oda ら<sup>1)</sup> は、乳酸を生成する糸状菌 *Rhizopus oryzae* がポテトパルプ中のデンプンを素早く分解して乳酸を生成することを見い出した。

そこで、ポテトパルプを乳酸生成糸状菌である *Rhizopus oryzae* によって乳酸発酵を行い、家畜飼料としての利用性の向上や、食品素材としての機能性の解明を検討するプロジェクトが、3 年前から進められた。

田村ら<sup>2)</sup> は、*in vitro* の実験において *Rhizopus oryzae* によって乳酸発酵させた発酵ポテトパルプにはラジカル消去活性を有していることを見い出した。さらに、乳酸発酵の過程で生成した風味や有効成分が損なわれないような調理方法および形態について検討し、味噌、ソース、シリアル、ジャムなどに適用可能であることを明らかにしている。

一方、知地ら<sup>3)</sup> は、ラットを用いた実験で、

*Rhizopus oryzae* で発酵させたポテトパルプ添加飼料の長期摂取により、血清コレステロール濃度の上昇抑制効果やアセトアミノフェンによる肝臓障害に対する予防効果を報告している。

そこで、本研究では、この発酵ポテトパルプの抗酸化性物質を明らかにする目的で、発酵過程におけるポリフェノールの同定と DPPH ラジカル消去活性およびポリフェノール量の経時的変化を調べた。

## 2. 実験方法

### 1) 発酵ポテトパルプの調製法

発酵ポテトパルプの調製法を図 1 に示した。

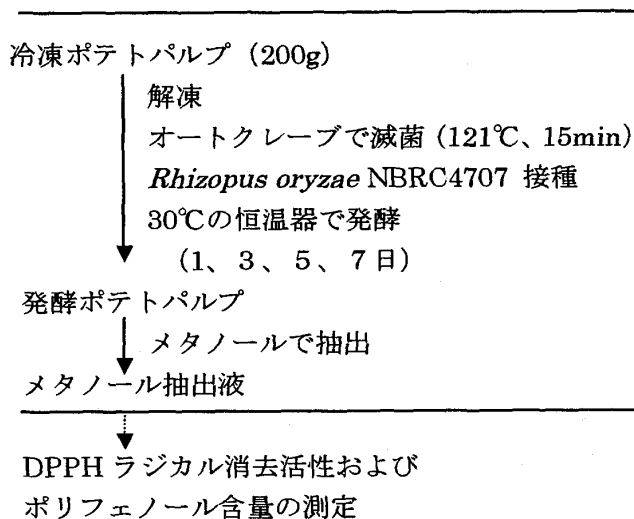


図 1 *Rhizopus oryzae*によるポテトパルプの調製法

冷凍貯蔵しておいた冷凍ポテトパルプを室温で解凍し、200 g ずつ秤量して、121°C、15 分間高圧滅菌、冷却後、乳酸生成糸状菌 (*Rhizopus oryzae* NBRC 4704) を接種し、30°C の恒温器で 1 日、3 日、5 日、7 日発酵させたものを、発酵ポテトパルプとした。また、滅菌後、*Rhizopus oryzae* で発酵させず、そのままのものを未発酵ポテトパルプ (0 日) とし、それぞれを 2 倍量 (400ml) のメタノールで 2 回抽出した。抽出液で、pH、DPPH ラジカル消去活性、総ポリフェノール含量を測定した。

### 2) DPPH ラジカル消去活性と総ポリフェノール含量

DPPH ラジカル消去活性の測定は福沢ら<sup>4)</sup>の方法に従った。即ち、試料を添加したエタノール溶液 2ml、0.1M の酢酸緩衝液 (pH 5.5) 2ml、0.5mM の DPPH エタノール溶液 1ml を混合した後、30 分反応後、減少した DPPH 量を日立分光光度計 U-2001 型を用いて 517nm の吸光度で測定した。試料溶液の代わりにエタノール溶液を加えたものをコントロールとして調製した。測定はいずれも 3 回行い、その平均値を用いた。ラジカル消去活性 (%) の算出は次の式に従った。

ラジカル消去活性 (%) = 100 - (サンプルの吸光度 / コントロールの吸光度 × 100)

総ポリフェノール含量は、Folin-Denis 法<sup>5)</sup>で測定した。即ち、一定濃度に希釈した試料溶液 5ml に Folin-Denis 試薬 (2 倍希釈液) 5ml を加え混合し、3 分後に 10% 炭酸ナトリウム溶液 5ml 加えて混合し、1 時間放置後、760nm における吸光度を測定した。標準物質の (+)-カテキンで検量線を作成して定量し、カテキンの量に換算して示した。測定はいずれも 3 回行い、その平均値を用いた。

### 3) 高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) 分析

HPLC の分析は以下の条件で行った。

カラム : Inertsil PREP-ODS ( 6.0×250mm)、  
移動相 : 12% アセトニトリルの 0.1% りん酸溶液、  
流速 : 1ml/min、検出 : 250nm (UV)。化合物の同定は標準物質との保持時間の比較で行った。

## 3. 結果と考察

発酵ポテトパルプ中の pH とメタノール抽出物量 (g/200g 試料) の変化を図 2 に示した。発酵ポテトパルプの pH は 0 日目の 6.75 から徐々に低下し、発酵 1 日目で 4.97 まで低下し、発酵 7 日目で 4.53 に低下した。この発酵による pH の低下は主として乳酸の生成による。一方、メタノール抽出物量は未発酵 (0 日目) では 1.69g、発酵 7 日目では 10.34g となり、発酵に伴ってほぼ直線的に増加した。

発酵によって可溶性糖などが増加するとの報告<sup>6)</sup>があり、水溶性画分の乾固物量は、未発酵で 1.38g であったが、発酵 5 日目、7 日目ではそれぞれ、6.33g、

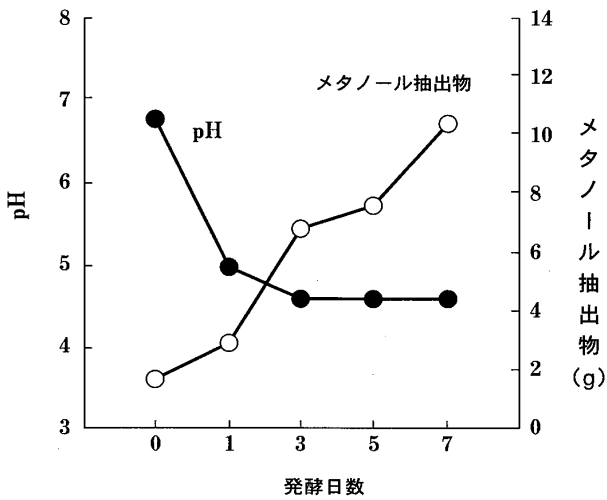


図2 ポテトバルブ発酵中の pH とメタノール抽出物量の変化

9.80g となり、明らかに水溶性成分が多くなっていた。

次に DPPH ラジカル消去活性と総ポリフェノール含量の変化を図3に示した。DPPH ラジカル消去活性は発酵3日目まで増加し、その後、変化は少なかったが増加傾向を示した。総ポリフェノール含量は、未発酵では  $20 \mu\text{g}/100\text{g}$  と少なく、発酵3日目から顕著に増加し、発酵7日目で  $40 \mu\text{g}/100\text{g}$  となった。DPPH ラジカル消去活性とポリフェノール含量との間に相関関係があるとの報告<sup>7)</sup>があることから、発酵ポテトバルブの DPPH ラジカル消去活性の増加は、*Rhizopus oryzae* の発酵によるポリフェノール量の増加が原因のひとつと考えられる。

そこで、ラジカル消去活性に寄与するポリフェノール成分を分析するために、メタノール抽出液を濃縮、乾固後、水と酢酸エチルで溶媒分画を行った(図4)。

溶媒分画後の各画分(酸性画分、非酸性画分、水溶性画分)の抽出物  $0.05\text{mg}$  当りの DPPH ラジカル消去活性の結果を図5に示した。1日発酵の結果を示したが、非酸性画分、水溶性画分に比べて酸性画分でラジカル消去活性が強くなった。0、3、5、7日発酵でも1日発酵と同じ結果が得られたので、今回は酸性画分を検討した。

ポリフェノール成分を同定するために、0~7日発酵のポテトバルブの酸性画分をそれぞれ HPLC に供した。発酵1日目と7日目のクロマトグラムを図6に示した。化合物の同定は標準物質との保持時間、添加試験との比較で行った。発酵1日目では、12.51分のプロトカテキ酸、28.39分のバニリン酸、30.17

分のコーヒー酸のピークが見られ、発酵7日目ではプロトカテキ酸、バニリン酸、コーヒー酸の他に *p*-ヒドロキシ安息香酸(22.62分)のピークが認められた。

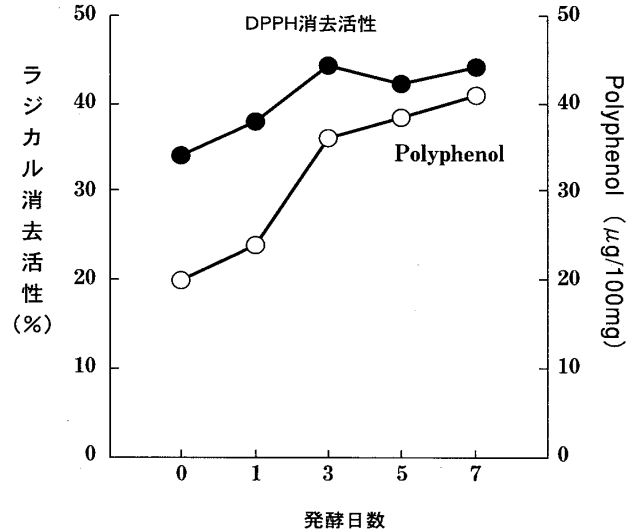


図3 ポテトバルブ発酵中の DPPH 消去活性とポリフェノール濃度の変化

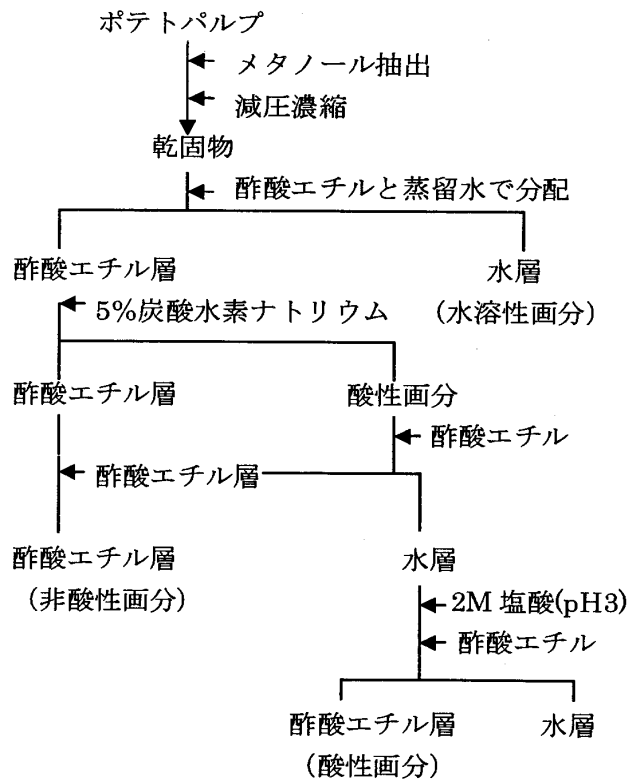


図4 ポテトバルブメタノール抽出物から酸性物質の溶媒分画法

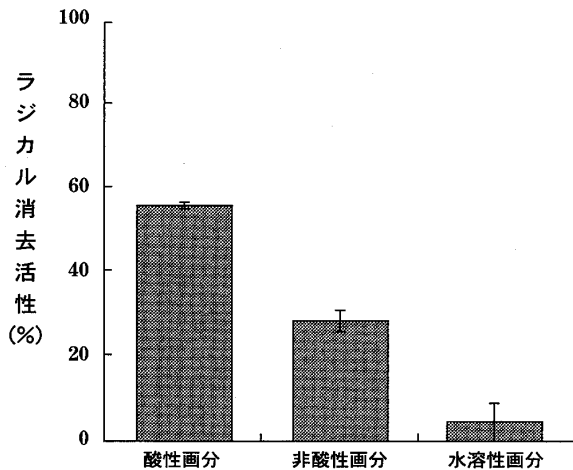


図5 発酵ポテトパルプ抽出物からの各画分のDPPHラジカル消去活性(1日発酵)

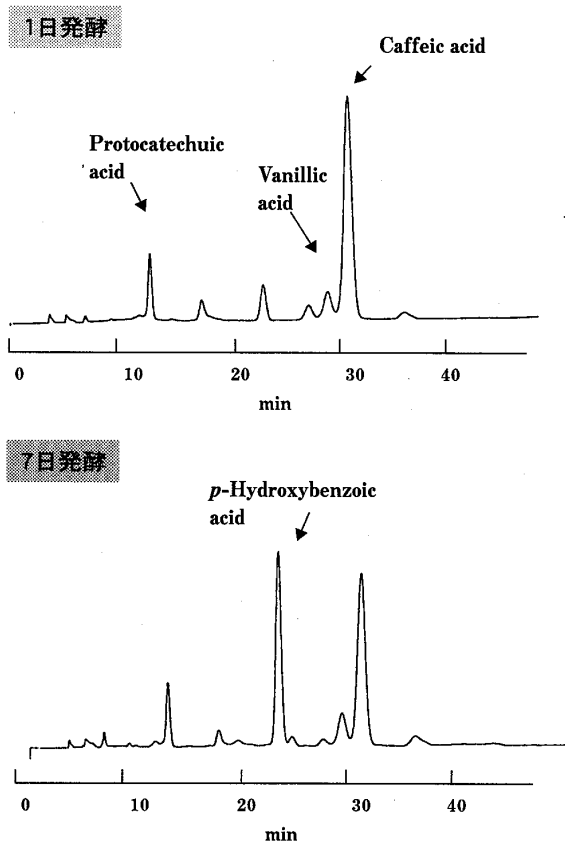


図6 発酵ポテトパルプ酸性画分中に含まれる各ポリフェノールのHPLC分析

HPLCで同定された4つのフェノール化合物、プロトカテク酸、バニリン酸、コーヒー酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸それぞれの発酵過程での変化を検討した。各標準物質の検量線を作成し、HPLCのピーク

面積からそれぞれのフェノール量を定量し、ポテトパルプ抽出物200g当りのモル濃度で示した

(図7)。測定はいずれも3回行い、その平均値を用いた。その結果、顕著な変化が認められたのは、コーヒー酸で、発酵0日目では175 $\mu$ M、発酵3日目で225 $\mu$ Mに増加したが、5日目で減少し、7日目で増加した。一方、*p*-ヒドロキシ安息香酸は発酵に伴ってほぼ直線的に増加し、発酵7日目で120 $\mu$ Mとなった。

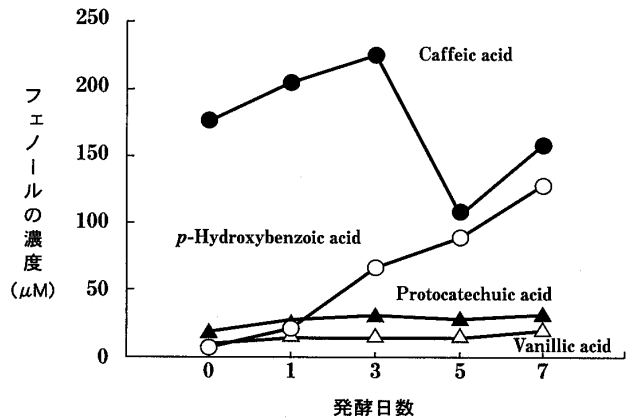


図7 *Rhizopus oryzae*によるポテトパルプ発酵中のフェノール成分の変化

プロトカテク酸とバニリン酸も増加傾向であったが、変化は少なかった。田崎ら<sup>8)</sup>も、*Rhizopus oryzae*を用いた違った系で発酵ポテトパルプのフェノール成分の変化を調べ、コーヒー酸、プロトカテク酸、バニリン酸が増加することを報告している。今回、HPLCで同定された4つのフェノール化合物、コーヒー酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸、プロトカテク酸、バニリン酸はいずれもDPPHラジカル消去活性を有することが報告されている。Sangら<sup>9)</sup>は、カテキン、プロトカテク酸、バニリン酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸のDPPHラジカル消去活性を比較して、カテキンとプロトカテク酸は非常に強く、バニリン酸、*p*-ヒドロキシ安息香酸は強い活性であるとしている。また、Wangら<sup>10)</sup>も、コーヒー酸と*p*-ヒドロキシ安息香酸のDPPHラジカル消去活性を比較して、コーヒー酸の活性は非常に強いと報告している。発酵ポテトパルプ中のコーヒー酸や*p*-ヒドロキシ安息香酸が顕著に増加することが、発酵ポテトパルプのDPPHラジカル消去活性に寄与していると考えられる。

一方、バレイショ(ジャガイモ)中に含まれるフェノール化合物のうち、クロロゲン酸が最も主要な

化合物であるとの報告<sup>11)</sup>がある。クロロゲン酸はコーヒー酸とキナ酸がエステル結合して生成するが、今回の酸性画分の分析では、クロロゲン酸は検出されなかった。同じフェノール化合物でもコーヒー酸やプロトカテク酸などと異なり、クロロゲン酸はキナ酸と結合しているため水溶性のフェノール化合物であり、酢酸エチルにはほとんど溶解しないので、溶媒分画後に水溶性画分に移行したとも考えられる。また、デンプンを工場で製造する際に、数回、水洗操作を行うので、その工程中に流出したことも考えられる。

ポテトパルプを *Rhizopus oryzae* で発酵させることによって、コーヒー酸や *p*-ヒドロキシ安息香酸などのフェノール化合物が増加したのは、細胞壁を構成しているリグニンの分解によると推定される。リグニンはセルロース、ヘミセルロースなどととも植物の細胞壁を構成し、細胞壁全体の約 25% を占める複雑な芳香族高分子化合物である。リグニンは分解されにくく、未利用資源とされているが、近年、このリグニンの有効利用が注目されている。リグニン<sup>12)</sup>は、主としてシキミ酸経路を通じて合成される芳香族アミノ酸のフェニルアラニンやチロシンがそれぞれ、フェニルアラニンアンモニアリアーゼおよびチロシンアンモニアリアーゼによって、桂皮酸およびクマル酸に変わり、一連の反応を経て生成することが知られている。*Rhizopus oryzae* の生産する酵素によって、この複雑なリグニンを分解し、漸次、低分子のフェノール化合物を生成したと推定される。

ポテトパルプを *Rhizopus oryzae* で発酵させることによって抗酸化性の強いコーヒー酸や *p*-ヒドロキシ安息香酸を生成することから、これらのフェノール化合物を含む機能性食品素材としての利用が期待される。

#### 4. 要約

- 1) 乳酸生成糸状菌 (*Rhizopus oryzae* NBRC 4704) で発酵させたポテトパルプのメタノール抽出液は、発酵日数の経過に伴って、総ポリフェノール含量および DPPH ラジカル消去活性が増加した。
- 2) DPPH ラジカル消去活性の強い酸性画分を HPLC で分析した結果、コーヒー酸、*p*-ヒドロキ

シ安息香酸、プロトカテク酸、バニリン酸が同定された。特に、コーヒー酸と *p*-ヒドロキシ安息香酸の増加が顕著であった。

- 3) コーヒー酸や *p*-ヒドロキシ安息香酸の増加が、発酵ポテトパルプの DPPH ラジカル消去活性の上昇に起因していると考えられる。

#### 5. 謝辞

なお、この研究にあたって、*Rhizopus oryzae* NBRC 4704 の培養方法についてご指導頂いた、元札幌国際大学教授 佐々木 博先生に厚くお礼申し上げます。

本研究は「科学技術総合研究委託費、乳酸生成糸状菌による農産加工副産物利用技術の開発」の中で行われたものである。

#### 参考文献

- 1) Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H. and Mori, M.: Lactic Acid Fermentation of Potato Pulp by the Fungus *Rhizopus oryzae*, *Curr. Microbiol.*, 45, 1-4 (2002)
- 2) 田村吉史, 岩下敦子, 佐々木茂文, 大堀忠志: 糸状菌で乳酸発酵した農産加工副産物の食品への利用, 乳酸生成糸状菌による農産加工副産物利用技術の開発, 平成 14 年度研究成果報告書, 110-143 (2003)
- 3) 知地英征, 池田隆幸, 松本恵, 葛西隆則: 乳酸発酵した農産加工副産物の生体機能性, 乳酸生成糸状菌による農産加工副産物利用技術の開発, 平成 14 年度研究成果報告書, 146-162 (2003)
- 4) 福沢健治, 寺尾純二: 「脂質過酸化実験法」, (廣川書店, 東京), pp.69-83 (1990)
- 5) 真部孝明: 「食品分析の実際」, (幸書房, 東京), pp.79-80 (2003)
- 6) 小田有ニ, 斎藤勝一, 山内宏昭, 森元幸: *Rhizopus oryzae* によるポテトパルプの乳酸発酵, 日本農芸化学会総会講演要旨集, 200 (2002)
- 7) 立山千草, 太田雅壽, 内山武夫: 食用花卉抽出液のフリーラジカル消去活性, 日本食品科学工学会誌, 44, 640-646 (1997)
- 8) 田崎弘之, 大西正男, 小田有ニ, 斎藤勝一, 知地

英征, 松本恵: 発酵処理によるポテトパルプに含まれるフェノール成分の変化, 日本栄養・食糧学会総会講演要旨集, 320 (2004)

- 9) Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W.S., Lachance P.A., Ho, C.T. and Rosen, R.T.: Antioxidative Phenolic Compounds Isolated from Almond Skins (*Prunus amygdalus Batsch*), *J.Agric.Food Chem.*, 50, 2459-2463 (2002)
- 10) Wang, M., Zhu, N., Sang, S., Ho, C.T., Kikuzaki, H., Nakatani, N.: Isolation and Structural Elucidation of Two New Glycosides from Sage (*Salvia Officinalis* L.), *J.Agric.Food Chem.*, 48, 235-238 (2000)
- 11) Mendez, C. M. V., Delgado, M.A.R., Rodriguez, E.M.R., Romero, C.D.: Content of Free Phenolic Compounds in Cultivars of Potatoes Harvested in Tenerife (Canary Islands), *J.Agric.Food Chem.*, 52, 1323-1327 (2004)
- 12) Hans-Walter Heldt, 金井龍二訳: 「植物生化学」, (シュプリンガー・フェアラーク東京), pp.343-351 (2000)