

学 位 論 文 要 旨

氏 名

黄 素 梅

題 目

植物ポリフェノールの効率的抽出と加工過程
における化学的変換に関する研究
(Studies on the efficient extraction and chemical
transformation during processing of plant polyphenols)

ポリフェノールは、多くの植物に含まれている重要な機能性成分である。ポリフェノールの抽出には、有機溶媒によるカラムクロマトグラフィー等の煩雑な操作が必要であり、より効率的な精製法の開発が望まれている。本研究では、豆タンパク質を用いて、効率的なポリフェノール抽出法を開発すると共に、豆タンパク質によるポリフェノールの抽出効率とポリフェノールの化学構造の相関性を明らかにした。また、現在殆ど研究されていない加熱および微生物発酵過程におけるポリフェノールの化学的変換機構についても調査した。

大豆タンパク質を用いて、ポリフェノール-大豆タンパク質複合体の調製することにより、各ポリフェノール類（アントシアニン、カテキンおよび加水分解タンニンなど）の効率的な抽出に成功した。ポリフェノール成分中の galloyl 基は、ポリフェノール類と豆タンパク質の結合性に非常に重要であり、タンパク質に関しては、変性豆タンパク質は未変性タンパク質よりポリフェノールとの結合性が強いことが明らかになった。また、黒豆、小豆や大正金時由来の豆タンパク質-ポリフェノール複合体はこれらの豆類のアントシアニン成分にも起因する強い DPPH ラジカル捕捉活性を示した。従って、これらの豆類は、ポリフェノールの抽出にとって有用なタンパク質素材である。

加熱過程におけるポリフェノールの変換に関しては、オートクレーブ処理することにより、茶のカテキン類（EGCG, ECG, EGC および EC）が異性化し、GCG, CG, GC および C になることが明らかになった。この処理法を応用することにより、GCG や CG 高含有茶葉の調製に成功した。また、加熱過程におけるナンキンハゼおよびコミカンソウ葉の主成分である geraniin の分解物を同定した。これらの結果は、加熱過程におけるポリフェノールの分解機構に関する重要な知見である。

微生物による発酵過程におけるポリフェノールの変換に関しては、4 株の *Bacillus subtilis* および 3 種のカビ (*Penicillium sp.*, *Fusarium solani* および *Rosellinia necafrix*) による加水分解型タンニン含有植物（ナンキンハゼおよびコミカンソウ）の発酵過程におけるポリフェノール類の分解パターンを解明した。また、*F. solani* で処理した茶エキスから、rutin および blumenol B の単離にも成功した。このことは、微生物によるポリフェノール素材の発酵過程における新規成分の生産の可能性も示すものである。

本研究により、植物ポリフェノールの効率的な抽出法を確立すると共に、加熱や発酵過程におけるポリフェノール類の変換機構に関して、新しい知見が得られた。さらに、機能性食品素材として、食品分野で応用される新しいポリフェノール加工素材の開発に成功した。

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Huang Sumei
題 目	Studies on the efficient extraction and chemical transformation during processing of plant polyphenols (植物ポリフェノールの効率的抽出と加工過程における化学的変換に関する研究)
<p>Polyphenols are a group of functional phytochemicals widely distributed in various plants. In generally, the techniques of polyphenols extraction are complicated and take lots of time because of their various column chromatographies using lots of organic solvent. More efficient techniques are expected to be developed for the extraction of polyphenols. In this study, an efficient extraction method of polyphenols was established by using bean protein; and the correlations between chemical structures of polyphenols and the extraction efficiency of polyphenols by using bean protein, was also elucidated. In addition, the chemical transformation of polyphenols during the heating or microbial fermentation processing, which has not been studied so much, was also investigated.</p> <p>Using soybean protein, various polyphenols such as anthocyanins, catechins, hydrolysable tannins etc. were successfully extracted as the preparation of polyphenol-soy bean protein complexes. Galloyl moiety of polyphenols was found to be very important for the conjugation of polyphenols to bean protein. It was also proved that the polyphenols' conjugation abilities to degenerated beans protein were stronger than those to non-generated beans protein. In addition, the bean protein-polyphenols complexes from black bean, <i>Azuki</i> bean and <i>Taishoukintoki</i> bean showed strong DPPH radical scavenging activities which were also originated from the anthocyanins of these beans. Thus, these beans are considered to be useful protein materials for the extraction of polyphenols.</p> <p>In the case of the transformation of polyphenols during the heating processing, some tea catechins (EGCG, ECG, EGC and EC) were epimerized and converted to their isomers (GCG, CG, GC and C) during autoclave processing. The tea leaves with high GCG and CG contents were successfully obtained by autoclaving. Gerannin, the main hydrolysable type tannin in the leaves of <i>Sapium sebiferum</i> and <i>Phyllanthus urinaria</i>, were degraded during the heating processing of these leaves. And the degradation products of gerannin were identified. These results offer important knowledge on the degradation mechanism of polyphenols during heating processing.</p> <p>In the case of the transformation of polyphenols during the microbial fermentation processing, the plants (<i>S. sebiferum</i> and <i>P. urinaria</i>) containing hydrolysable type tannin were fermented with the strain of four <i>Bacillus subtilis</i> or the strain of three fungi (<i>Penicillium sp.</i>, <i>Fusarium solani</i> and <i>Rosellinia necatrix</i>), and the degradation pattern of the polyphenols was also clarified. From the fermented tea extract treated with <i>F. solani</i>, isolations of rutin and blumenol B were also succeeded. The result shows the possibilities of production of new compounds by the microbial fermentation of materials containing polyphenols.</p> <p>In this research, an efficient extraction method of polyphenols was established. The new findings concerning transformation mechanism of the polyphenols during the heating and microbial fermentation processing were obtained. Furthermore, it was also succeeded in developing new polyphenol materials which are anticipated to be applied as functional food materials.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	黄 素梅
審査委員	主査 佐賀 大学 准教授 石丸 幹二
	副査 佐賀 大学 准教授 一色 司郎
	副査 鹿児島 大学 教授 坂田 祐介
	副査 鹿児島 大学 准教授 橋本 文雄
	副査 佐賀 大学 教授 藤田 修二
審査協力者	
題 目	<p>Studies on the efficient extraction and chemical transformation during processing of plant polyphenols.</p> <p>(植物ポリフェノールの効率的抽出と加工過程における化学的変換に関する研究)</p>
<p>植物ポリフェノールは、抗酸化、抗菌活性等多くの機能性が注目されており、医薬また食品素材として重要な化学成分である。植物ポリフェノールの抽出、単離においては、有機溶媒の使用、また煩雑なカラムクロマトグラフィーの操作が必須であり、大量のポリフェノールを簡便に、かつ効率的に調製する方法の開発が望まれている。</p> <p>本研究では、大豆等の豆タンパク質を用いて、ポリフェノールの効率的抽出法を開発するとともに、ポリフェノールの化学構造と抽出効率との相関を解析した。また、ポリフェノール含有植物の加工過程におけるポリフェノールの化学的な変換機構についても明らかにした。具体的な研究成果は、以下の様である。</p> <p>1) 大豆タンパク質を用いて、植物ポリフェノール-大豆タンパク質複合体を調製することにより、各種植物ポリフェノール類（アントシアニン、カテキンおよび加水分解タンニンなど）の効率的抽出に成功した。化学構造と抽出効率の相関に関しては、ポリフェノール構造中の galloyl 基が、ポリフェノールと豆タンパ</p>	

ク質の結合性に非常に重要であること、豆タンパク質に関しては、変性豆タンパク質の方が、未変性タンパク質よりポリフェノールとの結合性が強いことを明らかにした。また、黒豆、小豆や大正金時由来の豆タンパク質—ポリフェノール複合体は、これらの豆類由来のアントシアニン成分に起因する強いラジカル捕捉活性も認められ、新しい機能性食品素材としても有用であることが示された。

2) 加工過程におけるポリフェノールの化学的変換機構の解析については、まず加熱などの物理的処理における、ポリフェノールの変換について調査した。オートクレーブ処理により加熱した茶のカテキン類（エピカテキンタイプ）は、C環2位の炭素において異性化し、カテキンタイプの構造に変換することを明らかにした。この加熱処理法を応用することにより、カテキンタイプのポリフェノールを高含量で含有する茶葉の調製に初めて成功した。また、加熱過程における加水分解型タンニン類の変化についても調査し、ナンキンハゼおよびコミカンソウ葉の主成分である geraniin の分解物の化学構造を同定した。これらの結果は、加熱過程における各種植物由来の多様なポリフェノール類の分解機構に関する重要な知見である。

3) 各種微生物による発酵過程におけるポリフェノールの化学的変換についても調査した。4株の *Bacillus subtilis* および3種のカビ (*Penicillium sp.*, *Fusarium solani* および *Rosellinia necatrix*) を用い、加水分解型タンニン類を含有する植物（ナンキンハゼおよびコミカンソウ）の葉について発酵処理を行い、ポリフェノール類の分解パターンを解析した。また、*F. solani* で処理した茶エキスからは、天然の茶素材からは検出されていない香り成分である blumenol B を単離するとともに、機能性フラボノイドである rutin の増加も認めた。このことは、本微生物を利用した、新しい食品素材開発の可能性も示したものである。

本研究により、植物ポリフェノールの簡便かつ効率的な抽出法を開発すると共に、加熱や発酵処理などの食品加工過程におけるポリフェノール類の化学的変換機構に関しても、多くの新しい知見が得られた。本研究で得られた各種ポリフェノール加工素材は、新しい機能性食品素材としても注目されるものである。

これらの業績からなる本論文は、博士（農学）の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	黄 素梅
審査委員	主査 佐賀 大学 准教授 石丸 幹二
	副査 佐賀 大学 准教授 一色 司郎
	副査 鹿児島 大学 教授 坂田 祐介
	副査 鹿児島 大学 准教授 橋本 文雄
	副査 佐賀 大学 教授 藤田 修二
審査協力者	
実施年月日	平成20年 1月23日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成20年1月23日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	黄 素梅
[質問 1]カビ等で発酵させた場合、有用なもの以外、体に有害な物質等の産生の可能性はありますか？安全性についてどう考えられますか？	
[回答 1]はい。その可能性があると思います。発酵製品を利用するためには、十分な安全性の検討が必要です。	
[質問 2]今回の場合は、有用な物質を抽出して、利用しようという考えでしょうか？	
[回答 2]今回は、微生物によるポリフェノールの代謝機構の解明が主な目的です。	
[質問 3]お茶カテキン類の抽出に使う豆は栽培品種で、豆の品種に関する抽出効果の差について調べましたか？	
[回答 3]調べませんでした。豆の品種による抽出効果の差があると思います。	
[質問 4]いろいろな加熱処理がありますが、オートクレーブ処理を選んだ理由は何ですか？	
[回答 4]高温、加圧の条件で、タンパク質を変性させ、その変性によって、ポリフェノールと結合しやすくなる可能性があると考えました。また、オートクレーブ処理は操作が簡単で、使いやすいことも選んだ理由です。	
[質問 5]複合体が褐色化していますが、それを脱色できますか？	
[回答 5]それについては、分かりませんが、有機溶媒によるポリフェノール抽出時には脱色しませんでした。	
[質問 6]22 種のポリフェノールを用いて大豆タンパク質との結合性を検討しましたが、なぜガロイル基が吸着率を増加させるか？	
[回答 6]ガロイル基を持っている物質の立体構造に関係すると思います。ガロイル基の結合によって、疎水部分が出現し、大豆タンパク質との疎水結合も強くなって、吸着率が高くなると考えています。	
[質問 7]変性豆タンパク質は未変性豆タンパク質よりポリフェノールの抽出効率が良かった、その理由はなんですか？	
[回答 7]オートクレーブ処理過程で、高温、加圧により豆タンパク質の gelation 化が促進し、タンパク質が沈殿しやすくなり、また、豆タンパク質の二次構造が壊され、特に S-H 結合や S-S 結合が壊されたため、ポリフェノールとの結合性が	

強くなると考えています。

[質問 8]お湯で茶を抽出することにより、茶カテキンの EGCG が GCG に変換するようなことが起こりますか？正確には熱による変換は何度くらいだと思いますか？

[回答 8]お湯での抽出だけでは、このような構造変換が起きないと思います。105℃以上が必要だと思います。

[質問 9]ルチンは多くの植物に含まれる物質で、微生物発酵によって生産する必要はないのでは？

[回答 9]確かに、ルチンはいろいろな植物から得られます。今回、発酵によってルチンが増えることは、現象の一つとして面白いと思います。

[質問 10]ポリフェノール類の吸着性について考えを述べてください。HHDP 基の存在は吸着率が上がりますか？

[回答 10]ポリフェノール類の吸着性には galloyl 基が大きく影響します。HHDP 基は吸着率への影響は比較的に大きいとは言えません。

[質問 11]EGCG が GCG に変換するメカニズムについて説明してください。例えば、EGCG がオートクレーブ処理によって、C 環の開環反応が起き、その後、カテキンタイプになったと思いますか？

[回答 11]はい、その通りだと思います。

[質問 12]発酵の実験に用いた *Penicillium*、*Fusarium*、*Rosellinia* を選んだ理由をもう少し説明してください。

[回答 12]*Penicillium* がプーアル茶から検出されたが、今回、プーアル茶から検出されていない *Fusarium*、*Rosellinia* を使って、それらのカビによるポリフェノールの代謝について調べてみたいと思いました。

[質問 13] blumenol B の由来は何だと思いますか？

[回答 13] 茶の香気成分の配糖体などが考えられます。