

県産農産品の機能性成分の調査研究

“青切り” 福来みかんの機能性成分

坂井 祥平* 宇津野 典彦* 武田 文宣** 中川 力夫*

1. はじめに

フクレミカンは茨城県の筑波山麓で栽培され、地域で親しまれてきたカンキツである。熟すと外果皮が膨れてみえることからその名がついたと言われ、地元ではフクレに「福来」と当て字し、縁起のよいみかんとしてかつては生食用として、現在では独特の香りを活かし、果皮を乾燥させて特産の七味唐辛子の原料として用いている。(1) 地場食品部門では、この県産フクレミカン（福来みかん）の機能性成分に着目した新たな加工食品の開発を目標に、平成 19 年度から研究を続けている。これまでに、フクレミカンの果皮にはポリメトキシフラボノイドのノビレチンが多く含まれていることが明らかにした。ノビレチンはシークワサーなどに多く含まれることで知られている機能性成分で、フクレミカンの特徴付けるものであった。(2)

平成 20 年度は、この特徴ある成分を十分に活かした加工食品開発のために必要な基礎的な知見を集めるため①機能性成分と収穫時期の関係②加工現場で問題になっている苦味の低減について 試験を行ったので報告する。

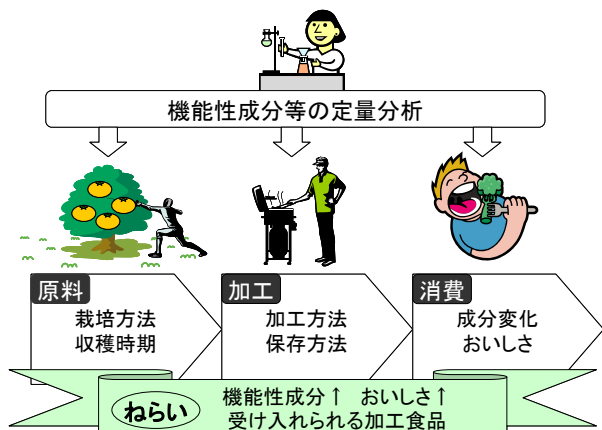


図 1 研究のねらい 原料～消費までのプロセスにおける機能性成分の変化を解析し、県産農産品を原料とした機能性成分を豊富に含んだ新たな加工食品の開発を行う。

2. 試料および実験方法

試薬類 ノビレチン (NOB) , タンゲレチン (TNG) , の HPLC スタンダード及びフルオロセインナトリウム塩, Trolox, フォリン・チオカルト試薬, リモニン, 豚腭リパーゼ (Type II), 4-メチルウンベリフェリルオレートはシグマアルドリッチ製を用いた。ヘスペリジン (HSP) , HPLC 移動相, 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)ニ塩酸塩 (AAPH) は和光純薬工業製を用いた。その他は特級試薬を用いた。

供試試料 フクレミカンの果実は、まだ果実が青い平成 20 年 10 月初旬、および通常の収穫期である 12 月中旬に県内で採取したものをを用いた。いずれも、収穫後すぐに果皮を剥き、果皮と果実に分けて -80℃で保存した。

被検試料の調製 フラボノイド定量用試料は、凍結乾燥粉末から成分を溶剤抽出して得た。具体的には、果皮・果実のそれぞれを凍結乾燥し、ミカン 8 個分を乳鉢で粉碎した粉末から 0.1g とり、ここに 4mL の抽出溶媒を加えて 12 時間室温で回転振とうして抽出した。抽出溶媒の組成はメタノール：ジメチルスルホキシド=1：1 (体積比) である。抽出後は遠心分離して上清を回収し、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルタでろ過して分析まで -80℃で保存した。

リモニン定量用試料は、凍結した果皮・果実をそれぞれ 8 個分解凍し、果皮・じょうのう膜・種子・果汁の部位ごとに分けて有機溶媒による抽出を行った。果汁については、約 20g の果汁に対して、酢酸エチルを 70ml 加え、1 分間激しく攪拌した後、分液ロートで酢酸エチル層を分離した。残った水層に再び酢酸エチルを加えて同様の操作を行い、計 3 回抽出した後に、酢酸エチル層を合わせ、無水硫酸ナトリウムを 20g 程度加えて脱水した。これをろ紙でろ過した後、減圧濃縮・乾固させ、3ml 程度のアセトニトリルで溶解し 5ml にメスアップしたものを被検試料とした。

種子については、果実から採取した種子を水洗・乾燥したのち、ホモジナイザーを用いて 0.1Mtris-HCl (pH 8.0) 中で摩砕した。これを室温で 20 時間回転振とうした後、遠心分離して上清を回収し、1M塩酸で pH2 程度に調製した後、上記の果汁と同様に酢酸エチルで抽出し、アセトニトリルに溶解した。その他の果実組織 (果皮・じょうのう膜) については、20 時間回転振とうする際に 0.1%程度のペクチナーゼを加えたこと以外は種子と同様の方法で抽出を行った。いずれの被検試料も抽出後すぐに HPLC 分析に供した。

果汁の親水性 ORAC 測定、総ポリフェノール測定および豚腭リパーゼ阻害活性測定用試料は解凍した果実をスクイザーで搾って得た果汁を 8 個分合わせた上で用いた。

HPLC 分析条件①フラボノイド フラボノイド分析は既報(2)の方法を一部改変して行った。Agilent 1100HPLC システムを用い、フォトダイオードアレイで 200-450nm の吸収スペクトルを検出した。分離カラムはアジレント製 ZORBAX SB-C8 (150mm×3.0mm i. d.) 及びガードカラムを用いた。カラムオープン

*地場食品部門 **食品バイオ部門

温度は 40℃とし、流速は 1.0ml/min, サンプルは 10 μL 注入した。分離は 0.05%ギ酸水溶液, メタノールの 2 液の 2 ステップによるグラジエントで、0.05%ギ酸水溶液①0-20 分 80-0% ②20-25 分 0% と線形的に変化させた。また 1 測定終了後は測定開始時の移動相組成で 10 分間流し、安定させる操作を行った。35 分を 1 サイクルとして測定した。溶出成分はリテンションタイム及びスペクトルをスタンダードと比較し同定した。定量は絶対検量線法により行った。

HPLC分析条件②リモニン リモニンの定量は文献(3)を参考に行った。Agilent1100HPLCシステムを用い、210nmの吸収スペクトルで検出した。カラムはフラボノイド分析と同じものを用いて、カラム温度 25℃, 流速0.8ml/min, サンプルは10 μL注入した。分離は蒸留水・メタノール・アセトニトリルの 3 液によるアイソクラティック (49:41:10) で40分間流した。溶出成分はリテンションタイムをスタンダードと比較して同定した。定量は絶対検量線法により行った。

総ポリフェノール測定 フォリン・チオカルト試薬を用いて定量した。990 μL の 0.2M MES 緩衝液 (pH 6.1) に被検試料 60 μL (果汁を 10 倍または 20 倍に希釈したもの) を加え、フォリン・チオカルト試薬を 30 μL 加えて攪拌した後、飽和炭酸ナトリウム水溶液を 120 μL 加えて 30 分反応させた。この溶液の 760nm の吸光度を測定して標準曲線から総ポリフェノールを定量した。なお、ブランクは蒸留水を、標準物質としてはヘスペリジンをを用いた。ヘスペリジンは 19.8mg を 48mL の蒸留水中に分散し、0.1M 水酸化ナトリウムを 2mL 加えて溶解した後、これを 2.5mL とって MES 緩衝液で 25mL にメスアップして使用した。飽和炭酸ナトリウム水溶液は、無水炭酸ナトリウム 35g に 100mL の水を加え、70℃程度で溶解した後、一夜室温に放置した溶液の沈殿を除いた上澄みを用いた。

親水性ORAC 親水性ORAC測定は既報(2)に従って一般的なORAC法の条件で測定を行った。

豚腭リパーゼ阻害作用 リパーゼ活性の測定は文献(4)の方法を一部改変して用いた。すなわち、基質に蛍光性の 4-メチルウンベリフェリルオレート (4-MUO) を使用し、リパーゼの働きによって生ずる 4-メチルウンベリフェロン の蛍光を測定する方法で行った。

4-MUO は 0.1M の DMSO 溶液として調製したものを、用時に緩衝液①で 1000 倍希釈して使用した。緩衝液①は、150mM 塩化ナトリウム、1.36mM 塩化カルシウムを含む 13mM Tris-HCl (pH8.0) である。豚腭リパーゼはこの緩衝液①を用いて、2mg/mL の濃度で用時に調製した。測定対象としたカンキツ果汁等は、pH4.0 前後の酸性であったため、予め緩衝液②を 30%加えて pH 調製を行った後、緩衝液①で 2 倍から 25 倍の間で希釈して被検溶液とした。緩衝

液②は 1MTris-HCl (pH8.0) である。

試験はグレーティングマイクロプレートリーダー SH-8000Lab を用いて行った。96 ウェルの黒色マイクロプレートに 50 μL の 4-MUO 溶液, 25 μL の被検試料を添加した後に攪拌、予め雰囲気温度を 37℃としたプレートリーダーに当該プレートを挿入し、10 分間保持した。これに 25 μL のリパーゼ溶液を各ウェルに分注し、30 分間反応させた後、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) を加えて反応を停止させ、反応によって生じた 4-メチルウンベリフェロンの蛍光を測定した。(励起:355nm, 蛍光:460nm) コントロールとして 4-MUO, 被検試料を加え、更にクエン酸緩衝液を加えた後でリパーゼ溶液を加えたものを準備した。

被検試料の蛍光強度と対応するコントロールの蛍光強度との差を求め、それをブランク (蒸留水) の活性と比較してリパーゼ阻害率を求めた。試験は各濃度に希釈した果汁試料に対してそれぞれ 9 回繰返し測定を行い、平均値をその果汁濃度における阻害率とし、最終的な結果は、阻害率が 50%の近傍となる 2 点の果汁濃度から算出した IC₅₀ として求めた。

3. 実験結果および考察

収穫時期とフラボノイド含有量 フラボノイド分析のクロマトグラムを図 2 に示した。各試料について試験を行った結果については表 1 にまとめて示した。10 月に採取したものでは、果皮・実ともに各成分 12 月の 2 倍程度高いことがわかった。フクレミカンの特徴づける成分であるノビレチン・タンゲレチンも従来の適熟期と考えていた 12 月に採取したものよりも 10 月の“青切り”には高濃度で含まれていることが明らかになった。

表 1 収穫時期とフラボノイド量 (mg/100g 新鮮重)

フラボノイド	10 月採取 (青)		12 月採取 (黄)	
	実	果皮	実	果皮
HSP	436	2090	245	913
NOB	—	228	—	132
TNG	—	241	—	121

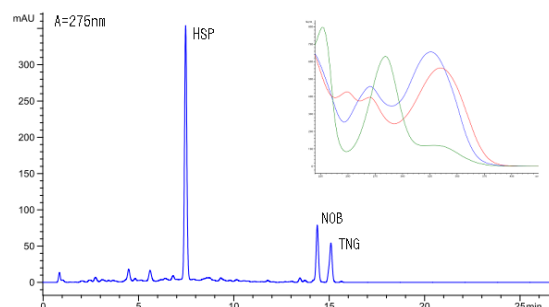


図 2 果皮 (10 月採取) 抽出液のクロマトグラム 検出波長は 275nm。なお、NOB, TNG の定量では 330nm での吸光度を使用した。HSP, NOB 及び TNG を短時間で分離よく定量することができた。

収穫時期と果汁中の総ポリフェノール量 フクレミカン果汁の総ポリフェノール量の測定結果を図 3 に示した。12 月に採取したものよりも 10 月に採取

したものの方が約 1.4 倍高かった。

収穫時期と果汁の親水性 ORAC 値 フクレミカン果汁の親水性 ORAC 値の測定結果を図 4 に示した。12 月に採取したものよりも 10 月に採取したものの方が約 2.4 倍高かった。

親水性 ORAC 値は水溶性の抗酸化物質、すなわちビタミン C やポリフェノール類の影響を受ける。上記のとおり 10 月に採取したフクレミカンにおいては、抗酸化力の強いフラボノイドと言われる HSP の含有量および総ポリフェノール量でも 12 月に採取したものよりも高い結果が得られており、親水性 ORAC 値もこれに矛盾しない結果になった。

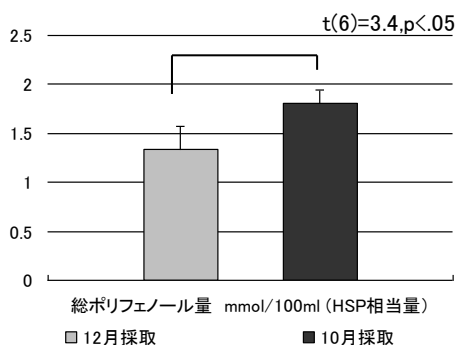


図 3 フクレミカン果汁の総ポリフェノール量 10 月に採取したみかん果汁の総ポリフェノールは 1.8 ± 0.1 で 12 月に採取したみかんの 1.4 ± 0.2 に比べて約 1.4 倍高かった。(単位 mmol/100ml)

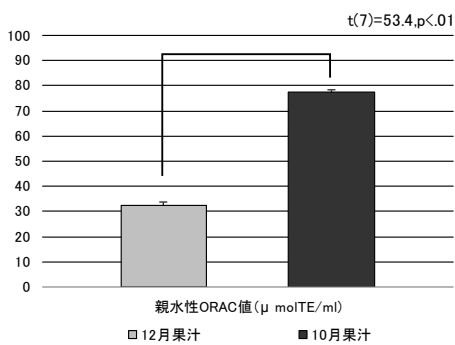


図 4 フクレミカン果汁の親水性 ORAC 値 10 月に採取したみかんの果汁の親水性 ORAC 値が 77.0 ± 0.8 で 12 月に採取したみかんの 32.5 ± 1.3 に比べて約 2.4 倍高かった。(単位 μmolTE/ml)

果汁の豚腭リパーゼ阻害作用 豚腭リパーゼ阻害作用の測定結果を図 5 に示した。グレープフルーツ果汁はほとんどリパーゼ阻害作用を示さなかったが、フクレミカン果汁では採取時期によらず、リパーゼ阻害作用を示した。また、採取時期で比較すると、10 月に採取したものの方がより強い阻害作用を示しており、“青切りフクレミカン”は機能性食品素材として有望であることが示された。

青切りフクレミカンの今後の利活用 青切りフクレミカンは機能性成分の含有量や抗酸化性・リパーゼ阻害作用に優れていることが分かった。また、味

や香りも従来の黄色く熟したフクレミカンと比べて特徴的であり、食品素材として有望であると思われる。今後、加工方法などの検討を続けるとともに、地域の皆様と協力して、特産品としてのプロモーション活動等も行なって参りたい。

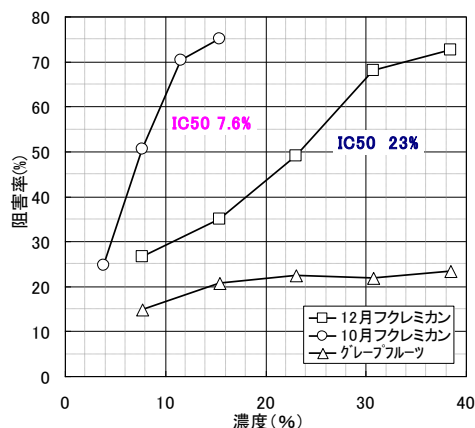


図 5 フクレミカン果汁の豚腭リパーゼ阻害作用 12 月に採取したミカンの果汁では IC₅₀ は果汁濃度が 23% のとき、10 月に採取したものでは 7.6% のときと 10 月に採取したものの方がより強くリパーゼの阻害作用を示すことがわかった。

フクレミカンの苦味成分について フクレミカンの加工利用上の課題の一つが「苦味」である。加工現場では「フクレミカン＝苦い」という評価を耳にすることが多い。カンキツの苦味成分としては代表的な成分はフラボノイド系やリモノイドと言われる。平成 19 年度にフクレミカンのフラボノイド組成について検討したところ、苦味を呈すると言われるナリンギン、ネオヘスペリジンはほとんど検出されなかった。したがってフクレミカンの苦味の主たる原因物質はリモノイドと考えることができる。そこで、平成 20 年度はリモノイドの中でリモニンに着目し、部位ごとにその含有量を調べた。その結果を表 2 に示した。部位別では、種子が最も濃度が高く次いで果皮が高く、一方でじょうのうは低かった。この濃度分布は他のカンキツと比較して大きな差異はなく、また値それ自体も著しく高いわけではなかった。(5) その他には、種子等でリモニンの他にノミリンと思われるピークも検出されたが(図 8)、じょうのうからはほとんど検出されなかったため、フクレミカン果汁の苦味の主たる原因物質ではないと考え、今回は定量を行わなかった。従って、「フクレミカン＝苦い」というイメージは、フクレミカン自体の特性ではなく、搾汁等の加工方法に起因するものだと考えられる。

表 2 フクレミカン果実中のリモニン分布 (ppm)

部位	12月採取
じょうのう	9.91
じょうのう膜	31.9
果皮	105
種子	1550

フクレミカン加工の現場では、搾汁後に徐々に苦

味が増していく現象が問題となっている。これはリモニンの化学変化によるもので、様々なカンキツにおいて発生することが知られるものである(6)。この対策には、搾汁時にリモニン及びその前駆体を製品中に溶出させないことが重要である。リモニンの含有量の高い部位(じょうのう膜・果皮・種子)を製品に接触させることにより、製品に溶出するリモニン濃度は高くなる。その現象を実験室でモデル的に再現した結果が表 3、表 4 および図 6、図 7 である。果汁の製造を想定し、種子・果皮を除いたフレミカンを搾って、じょうのう膜の製品への接触と苦味成分の溶出を調べたものである。表 3 は収穫時期の異なるフレミカンについて、それぞれ①「じょうのうのみ」をホモジナイズしたもの ②「じょうのう+じょうのう膜」をホモジナイズしたものを準備し、測定直前に遠心分離した上清について、リモニン濃度を測定したものである。表 4 にはホモジナイズ後 3 日経過した後に遠心分離した上清の値を示した。いずれの場合も 3 日後ではリモニンの濃度が増加しているがその増加割合は、じょうのうのみから搾った果汁の方が小さい傾向が見られた。

この結果からは、じょうのう膜が製品に接触すると、搾汁当日だけでなく、時間経過後よりさらに苦くなる可能性があることを示唆するものである。

そもそもフレミカン果実には種子が多い。種子には他の部位と比較して多量の苦味物質が含まれる。フレミカンの搾汁・加工に際しては、種子を初めとして苦味物質およびその前駆体を多く含む部位を製品に接触させない工夫が必要である。

表 3 搾汁する部位と抽出されるリモニン濃度 (ppm)

搾汁方法	10月採取	12月採取
果汁(じょうのう)	31.1	9.91
果汁(じょうのう+膜)	72.4	13.8

表 4 搾汁 3 日経過後のリモニン濃度 (ppm)

搾汁方法	10月採取	12月採取
果汁(じょうのう)	28.9	12.0
果汁(じょうのう+膜)	87.5	18.6

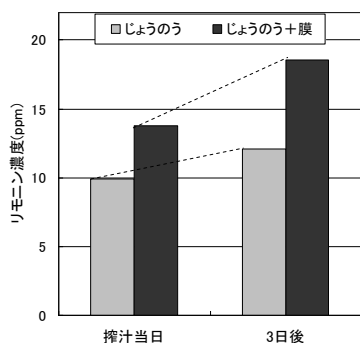


図 6 果汁中リモニン濃度の変化(12月) リモニン増加はじょうのうだけを搾った場合は 21%、じょうのうとじょうのう膜を一緒に搾ったものは 34%

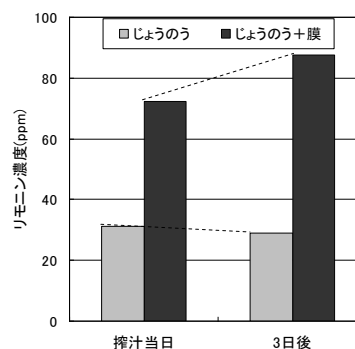


図 7 果汁中リモニン濃度の経時変化(10月) リモニン増加はじょうのうだけを搾った場合はみられず、じょうのうとじょうのう膜を一緒に搾ったものでは 21%増

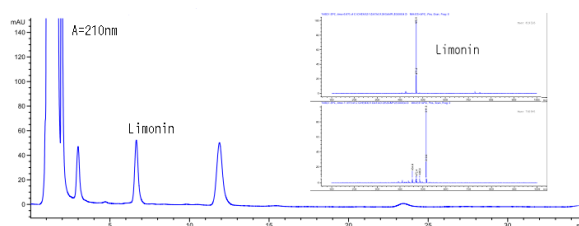


図 8 種子のリモニン分析クロマトグラム リモニンの他にも紫外吸収スペクトルが良く似た化合物が検出された。マススペクトル(右上 2 段目)からノミリンと思われたが今回は定量は行わなかった。

4. まとめ

- 青切りフレミカンはノビレチンやポリフェノール類などの機能性成分の含有量が多い。
- 青切りフレミカンは抗酸化性も高く、リパーゼ阻害作用も強い
- フレミカンの苦味の主体はリモニン等のリモノイド化合物で、種子や果皮などに多く含まれる。
- フレミカンの加工においては、苦味成分の多く含まれる部位が製品に混入することを避ける工夫が必要である。

参考文献

- (1) つくばの良い品有限責任事業組合 Web サイト <http://www.tsukuba-yoishina.com/yuisyo.html>
- (2) 坂井ほか:茨城県工業技術センター研究報告, 2008, 36, 25-27
- (3) 食品機能性の科学. 食品機能性の科学編集委員会編. 2008, 1009-1015
- (4) 公開特許公報 リパーゼ阻害剤. 2006-56850
- (5) 大きな目小さな目. 農林水産消費技術センター. 2002, 61, 4-5
- (6) 最新果汁・果実飲料辞典. 日本果汁協会監修. 1997, 76