

県産農産品の機能性成分の調査研究

坂井 祥平* 中川 力夫*

1. はじめに

福来みかんは、茨城県の筑波山麓で昔から親しまれてきた小粒の柑橘で、毎年11月になると黄金色の実をたわわに実らせ、秋の筑波道を豊かに演出している。近年、この貴重な地域資源が注目され、農商工観光産業の連携により、これを活用した地域づくりが積極的に進められている。福来みかんの実は4~5cmにしかならず、種も多い。昔は生食用として県内各地で食べられていたという話もあるが、現在は生食用としては用いられることは少ない。一方、加工食品原料としては、果皮を乾燥したうえで粉碎し、七味唐辛子を製造するものが古く、最近では、菓子・ジャム・飲料・調味料等への利用も進んできている。工業技術センターでも、平成19年から福来みかんの成分分析や加工法開発に着手し、これまでにリキュール・アイスクリーム・ボン酢等の開発を支援し商品化している。成分面からは、福来みかんの果皮にはポリメトキシフラボン類が他の柑橘類と比較して多く含まれることがこれまでの研究でわかっている。本研究は、福来みかん加工品の更なる高付加価値化を目指し、果皮に含まれる機能性成分であるポリメトキシフラボンの有効利用の方法を開発することを目標としている。

2. 目的

福来みかん果皮に含まれるポリメトキシフラボン、すなわちノビレチンやタンゲレチンの利用にあたって障害となるのは、皮に含まれる苦味成分である。福来みかんの果皮にはリモニンやノミリンといった少ない含量でも強い苦味を呈する成分が多量に含まれている。ポリメトキシフラボンは大部分が福来みかんの果皮に含まれており、果皮を利用するためには苦味の問題の解決が不可欠である。そこで機能性成分を保持しつつ苦味成分のみを除去する手法を確立することを本年度の課題とした。

3. 研究内容

柑橘果皮を利用する際における苦味除去方法は広く検討されており、公知の技術が様々存在している。例えば、果皮を水にさらして、しばらく経ったら压榨、これを繰り返して苦味を抜き、マーマレードを製造する方法がある⁽¹⁾。地域の農産加工の現場ではよく用いられる方法であり、簡単かつ安価に実施できる利点がある。工業的には、破砕等なんらかの方法によりスラリー状にした果皮に合成樹脂吸着材を接触し、苦味成分を吸着除去するという方法も用いられる⁽²⁾。

合成樹脂吸着材は様々なものが市販されており、柑橘類の苦味除去のために特に用いられる製品等もあり、比較的簡単に苦味成分を除去し、呈味を改善すること

ができる。

しかし、公知の技術によっては、苦味成分だけを選択的に除去することは困難である。その理由は、リモニンとノビレチンは疎水性・合成樹脂との相互作用の点において類似があり、合成樹脂吸着材でリモニンを除去する際に、同時にノビレチンも除去されてしまうからである。苦味成分と同時に機能性成分も失われてしまうのでは、問題の本来的な解決にはつながらない。

この点について、公知のノビレチンの精製方法⁽³⁾としては、合成樹脂に吸着したノビレチンを溶剤を用いて選択濃縮するというものがある。すなわち、ノビレチン等を含む溶液を合成樹脂吸着材に接触し、ノビレチン等を吸着させた後、濃度の異なるエタノール水溶液で順次洗浄して不純物を洗い流した後、一定以上の高濃度のエタノール水溶液にてノビレチン等の溶出を行うのである。このような方法を用いると、リモニンとノビレチンの疎水性の僅かな差を利用して、選択的にノビレチンを回収することができる。

しかし、この方法の短所として『①操作が煩雑なこと、②最終的にノビレチンの溶出のためには高濃度のエタノールを使用すること、③不純物の洗浄用にも低濃度ではあるもののエタノールを使用すること』がある。操作が煩雑であれば、地場食品の加工現場への適用性は低い。また、高濃度のエタノールは我々の加工食品の原料としては適さないし、合成樹脂の洗浄用としてもエタノールを使用すると、コスト高になってしまう。

そこで今回は、上記方法を改良し、少なくとも40%以下の濃度のエタノールの1回通液・溶出で十分な量のノビレチンを選択的に回収できる方法の開発を試みることとした。その理由は、40%以下の濃度のエタノールは、焼酎で代用することができるためである。福来みかんを予め搾汁し、皮を含む残渣から焼酎でノビレチン等の有用成分を抽出し、それを果汁と混ぜ合わせることができれば苦味のない機能性成分を豊富に含むリキュールの製造に適用できる。

具体的には、福来みかんの種に含まれる酵素(limonin D-ring lactone hydrolase)を利用し、リモニンのラク톤を開環することで親水性を高め、ノビレチンとの化学的性質に差異を生じさせ、合成樹脂吸着材を用いて両者を選択分離する方法の適用を試みた。幸い、福来みかんには、果実全体の重量の4~5wt%の種が含まれており、この方法を試行するには十分であった。

4. 試験方法

まず、合成樹脂吸着材によって福来みかん果皮スラリからリモニンを除去する際にノビレチンも同時に除去されてしまうことを確認するための試験を行った。

(吸着試験)

次に、当該合成樹脂吸着材から、低濃度エタノールを用いてノビレチンのみを選択的に溶出することは難しいことを確認するための試験を行った。(溶出試験)

そして最後に、種に含まれる酵素を用いる新しい方法を試行し、ノビレチンの回収率とリモニンの除去率について検討した。(酵素法試行)

4.1 吸着試験

福来みかん約 1500 g 程度をホモジナイザーを使って皮ごと破碎した後、冷蔵庫で一晩おいたスラリを準備した。これを 200ml ずつに分け、予めコンディショニングしておいた合成樹脂吸着材を 20ml 加え、2 時間スターラで攪拌した。樹脂のコンディショニングは、50%メタノール中に樹脂を投入し、ときどきかき混ぜながら 1 時間浸漬した後、純水で洗浄することとした。スラリは、2 時間後に遠心分離し、リモニンとノビレチンの測定を行った。すなわち、上清 20 g に対して、酢酸エチルを 70ml 加え、スターラで 1 分間攪拌した後、分液ロートで酢酸エチル層をとり、水槽には再び酢酸エチルを加えると操作を 3 回繰返した。それぞれの酢酸エチル層を合わせて蒸発乾固し、5ml のアセトニトリルで溶解、供試試料とした。測定には C18-HPLC を用い、溶出はメタノール:0.05%ギ酸水溶液の 1:1 のイソクラティック、検出は 210nm, 330nm の吸光度、リテンションタイムの確認はスタンダード及び MS 検出器の m/z で行った。

合成樹脂による処理を行わなかったものを基準として、処理後のサンプルについて、リモニン、ノビレチン濃度比を計算した。

4.2 溶出試験

福来みかん約 300 g 程度をホモジナイザーを使って皮ごと破碎した後、冷蔵庫で一晩おいて、遠心分離した。この上清を蒸留水で 3 倍に希釈し、予めコンディショニングした合成樹脂吸着材 3ml を詰めたシリンジに 30ml ずつ通液、自然流下させた。その後、100ml の蒸留水で洗浄し、次いで 40%エタノール水溶液 30ml、エタノール 30ml を通液した。画分については吸着試験同様、リモニンとノビレチンの濃度を測定した。結果は、合成樹脂による処理を行わないものと比較し、濃度の比を計算した。

4.3 酵素法

福来みかん約 400g を準備し、皮を剥いた。中身については手搾りジュースで押しつぶしながら種を潰さないよう搾り、搾汁残渣から種を分別した。皮と残渣(種を除く)はホモジナイザーで破碎した後、1M 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、pH を 10 に調製した後、400ml の 1M(pH9.8)の炭酸一重炭酸緩衝液を加えた。そ

こに分別した種を加えて破碎し、室温で 2 時間反応させた上で遠心分離して上清を得た。上清は蒸留水で 10 倍に希釈し、その上でコンディショニングした合成樹脂吸着材 3ml を詰めたシリンジに 300ml 通液、自然流下させた。その後、100ml の蒸留水で洗浄し、次いで 40%エタノール水溶液 30ml、エタノール 30ml を通液し、上記と同様に濃度を測定した。結果は、合成樹脂による処理を行わないもの(塩酸を使って pH を 2 まで低下させたもの)を基準として、濃度の比を計算した。

5. 結果と考察

5.1 吸着試験

柑橘果汁におけるリモノイドの閾値は数 ppm とされており、柑橘の代表的な苦み物質であるナリンギンが 20~100ppm 程度と言われていることを考えると敏感に感じられると言える。また、その苦味も後まで残る好ましくないものとして認識されている。今回の吸着試験を行った果汁については、苦味が感じられず、リモニンを含むリモノイドは問題にならない程度に除去されていることが確認できた。

表 1 には吸着試験による成分変化を示した。値は、無処理の果汁中に含まれる各成分の濃度を基準として示したものである。7 種類準備した吸着材のいずれもリモニンは 95%以上除去されていることが機器測定でも確認された。一方でノビレチン濃度は無処理の果汁の 10%以下まで下がっており、苦味の除去の際にノビレチンも樹脂に吸着されてしまうことがわかった。

表 1 吸着試験による成分変化

樹脂	型番	リモニン (%)	ノビレチン (%)
アンバーライト	FPX66	0	1.4
	XAD1180N	0	8.8
	XAD4	4.4	6.1
	XAD7HP	0	2.7
セパビーズ	SP70	0	1.2
	SP850	0	2.8
ダイヤイオン	HP20	0	1.2

5.2 溶出試験

溶出試験の結果を次に示した。表 2 は 40%エタノール画分、表 3 は 100%エタノール画分についての結果である。吸着試験において、十分な苦味除去性能が確認できたものの、同時にノビレチンまで吸着されてしまうことがわかったため、それをエタノールを用いて洗い出すことができるかを確認したものである。

表 2 に示した結果から、40%のエタノールでは、リモニンの溶出はほとんどないものの、ノビレチンも最大で 26%と十分には溶出しないことがわかった。40%エタノールを用いたのは、焼酎で代用することによりノビレチンを濃縮した福来みかんリキュールの製造に応用がきくからである。しかし、単純に吸着樹脂に焼酎を流すだけでは、ノビレチンを十分溶出することは不可能である。

一方で 100%エタノールを用いた場合 (表 3) にはノビレチンも溶出する。しかし、ノビレチンが溶出すると同時にリモニンも溶出しており、両者の溶出割合の傾向は類似である。すなわち、ノビレチンを溶出しようとするときリモニンも同時に溶出し、リモニンの溶出を防ごうと思えばノビレチンも溶出しないのである。

そもそも、高濃度のエタノール溶液は食品の製造には使いにくく現実的ではない。公知の方法では、低濃度のエタノール溶液で洗浄し、その後高濃度エタノールで溶出するという方法が提案されている。低濃度のエタノール洗浄によりリモニンを含む不要物は洗浄され、その後高濃度エタノールでノビレチンを溶出するという方法である。しかし、この方法はエタノール濃度と樹脂の組合せ条件の設定が難しい上に、低濃度の洗浄用エタノールが食品原料とは別に必要になること、また、高濃度エタノールはそもそも食品への応用の幅が狭いことなどの問題がある。

表 2 40%エタノール溶出試験結果

樹脂	型番	リモニン (%)	ノビレチン (%)
アンバーライト	FPX66	5	10
	XAD1180N	5	8
	XAD4	0	0
	XAD7HP	4	26
セパレーター	SP70	4	7
	SP850	8	12
ダイアイオン	HP20	6	11

表 3 100%エタノール溶出

樹脂	型番	リモニン (%)	ノビレチン (%)
アンバーライト	FPX66	57	71
	XAD1180N	31	37
	XAD4	12	25
	XAD7HP	54	105
セパレーター	SP70	31	34
	SP850	54	48
ダイアイオン	HP20	104	137

5.3 酵素法

種に多く含まれる酵素を用いて搾汁液を処理した上で吸着・溶出を行い、濃縮する方法 (酵素法) を試した結果を次の表 4、表 5 に示した。それぞれ、溶出に用いるエタノール濃度を溶出試験と同様に 40%、100%とした。

その結果、溶出に用いたエタノール濃度を問わず、リモニンはすべて除去されていた。これは、酵素処理後の搾汁液を合成樹脂吸着材に通液した時点で、リモニンとして樹脂に保持されていないこと、すなわち、酵素によって化学変化してより水に溶けやすい物質に変化していることを示唆している。

この方法を用いることによって、低濃度エタノール溶液による不純物の洗浄工程を省きつつ、ノビレチンを濃縮することが可能になった。

表 4 酵素処理後 40%エタノール溶出

樹脂	型番	リモニン (%)	ノビレチン (%)
アンバーライト	FPX66	0	3
	XAD1180N	0	11
	XAD4	0	3
	XAD7HP	0	45
セパレーター	SP70	0	6
	SP850	0	15
ダイアイオン	HP20	0	6

表 5 100%エタノール溶出

樹脂	型番	リモニン (%)	ノビレチン (%)
アンバーライト	FPX66	0	13
	XAD1180N	0	50
	XAD4	0	12
	XAD7HP	0	36
セパレーター	SP70	0	25
	SP850	0	47
ダイアイオン	HP20	0	36

6. 今後の課題

今回試行した酵素を使った処理方法を図 1 に示した。酵素反応の際に pH を 8~12 に調整する必要があるが、これをそのまま合成樹脂吸着材に通液してもノビレチンを保持することはできなかったため、これが保持される程度に通液前に十分に稀釈を行っている。pH を酸性側に調整してしまうと再度リモニンが合成されてしまうため、それも難しい。リキュール製造に応用するためには吸着材の選定・酵素処理後の pH 調整の点で更に検討を加える必要がある。

7. 来年度の予定

本研究では、福来みかんの他に、干し芋 (サツマイモ) の高機能化を目指し、並行して検討を行っている。現在、干し芋の持つ抗酸化力に着目して、加工過程での変化の測定等を行っている。表 6 には干し芋製造工程から実際にサンプリングを行って測定した抗酸化力変化の値を示した。平成 23 年度は芋の品種間差や加工方法の違いによる抗酸化力変化などを測定する予定である。

表 6 干し芋生産工程中の抗酸化力変化

試料	ORAC 値 ($\mu\text{molTE/g}$)		水分 (%)
	乾燥	生	
生芋	32	8.0	75
蒸し芋	39	9.4	76
乾燥中	17	9.4	45
完成品	29	17	39
残渣	120	34	72

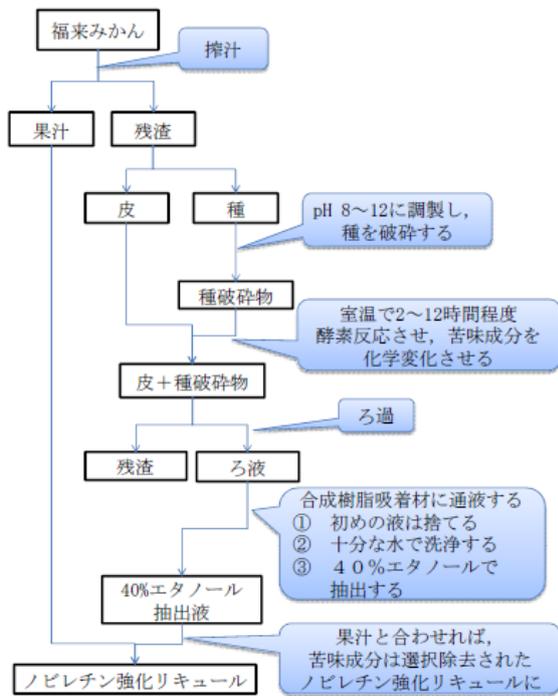


図1 酵素反応を利用したノビレチン濃縮

参考文献

- (1) 農文協(2000) 『食品加工総覧』 p784 の 29
- (2) 果汁協(2007) 『最新果汁・果実飲料事典』 p310
- (3) 公開特許公報 特開 2004-210682