

# 未利用柑橘資源の高度利用技術の開発

安藤浩毅\*, 古川郁子\*, 西元研了\*\*, 中野隆之\*\*\*

## Technical Development for the Advanced Utilization of Unused Citrus Resources

Hiroki ANDO, Ikuko FURUKAWA, Kenryo NISHIMOTO and Takayuki NAKANO

柑橘の青切りミカン（未熟果）の果皮に多く含まれる精油およびフラボノイドを中心に、それらの機能性成分を効率良く抽出するための前処理技術として超高压処理技術の適用を検討した。その結果、超高压処理により腐敗を抑えた酵素処理が可能であることを確認した。また、桜島小ミカン由来の未熟果より精製したフラボノイド（ノビレチン含有量：19～23wt%）の機能性について、抗酸化能および美白効果（メラニン生成抑制効果）を調べた結果、抗酸化能は緑茶（50wt%エタノール抽出物）の1/3程度の効果を示し、メラニン生成抑制効果については今回の試験濃度では明瞭な効果はみられなかった。

**Keyword**：桜島小ミカン，未熟果，精油，フラボノイド，超高压処理技術

### 1. 緒言

桜島の小ミカン、屋久島のタンカン、川薩地区と南さつまのハウスきんかん、出水の紅甘夏などの柑橘類は「かごしまブランド」に指定されている柑橘類である。中でも小ミカンやタンカンについては、その生産・加工において、青切りミカン（摘果した未熟果）や果皮などほとんど未利用のまま廃棄されているものが多く、その有効利用が求められている。柑橘類には、リラックス効果をもつ精油成分や血圧上昇抑制や血糖上昇抑制効果、発ガン抑制効果等を持つ成分を多く含んでいることが知られている<sup>1)</sup>が、その多くは果皮部に含まれているため、その機能性を十分に活かした商品が少ない。

柑橘果皮から有用成分を抽出する方法としては、精油を抽出する従来型の蒸留法<sup>2) 3)</sup>や搾法に加え、超臨界二酸化炭素抽出<sup>4)</sup>やマイクロ波を用いた方法<sup>5)</sup>等様々な方法が検討されている。しかし、効率良く抽出するには前処理との組み合わせも必要になってくる。一般的に柑橘果皮を粗粉碎し、直接あるいは水又は酵素液を添加した後に、前述に示した抽出方法で分離するが、粉碎時（特にホモジナイザーによる微粉碎）の精油成分の損失や酵素処理における微生物汚染等が懸念される。

これに対し、超高压処理技術<sup>6) 7)</sup>は微生物による腐敗を抑えて有用な酵素反応を促進する働きがあるとして、最近食品加工技術の新たな手法として期待されている。

そこで本研究では、未利用柑橘資源（特に未熟果の果皮部）の前処理として超高压処理技術の適用性を検討すると

共に、未利用柑橘資源の有効活用の1つとして、桜島小ミカンの青切り（未熟果）を原料とした化粧品素材への利用可能性（美白効果）について検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 供試試料

供試試料は桜島産小ミカンの未熟果（8月～10月上旬に摘果したもの）を用い、図1に示すようにまず果肉と皮に分け、果皮部分を5～10mm程度の大きさに粗く裁断した後、100gずつアルミパウチの容器に小分けし、-80℃で保存したものをを用いた。なお、解凍は自然解凍にて行った。

#### 2.2 超高压処理実験および機能性成分の分離

超高压処理実験は、図2に示すまるとエキス機（東洋高压（株））を用い、図1の原料処理および図3の実験手順に従って行った。すなわち、100gの果皮原料（実験直前にミキサーで粗粉碎したもの）を酵素液と共にアルミパ



図1 原料の処理工程

\*食品・化学部

\*\*研究主幹（食品・化学担当）

\*\*\*鹿児島純心女子大学



図2 超高压実験装置

ウチに仕込み、シーラーで完全に密封した後に実験装置に装着し、40℃、100MPa一定条件のもと24~72時間の超高压処理を行った。なお添加した酵素は、セルラーゼとしてセルロシンAC40 (エイチビィアイ (株) 製)、ペクチナーゼとしてセルロシンPE60 (エイチビィアイ (株) 製) を用い、原料に対してセルラーゼは0.2wt%、ペクチナーゼは0.04 wt%添加し、さらに酵素液量として原料が十分に酵素液に浸漬する液量 (原料100 g に対して100mL) とした。超高压処理後は、アルミパウチより全量を取り出し、固液分離 (10,000rpm×10min) した後、固形部の一部を用いて遠心分離で得られる固形分収率を求め、残りの固形分は蒸留 (主に常圧蒸留) により精油収率を求めた。一方、液部に関しては、その一部を用いて液部に含まれる固形分 (水可溶性成分) 収率を求め、残り (45mL) はカートリッジカラム (Sep-Pak C18, ウォーターズ製) に通してフラボノイドを吸着させ (15mL×3回)、エタノール (99.5vol%) を用いて溶出させた。エタノール溶出液を1つにまとめて、エバポレーターでエタノールを完全に除去した後、さら超純水 (15mL) を加え、凍結乾燥にてフラボノイドの粗精製物を得た。この粗精製物は抗酸化能の測定に用い、この粗精製物にさらに超純水を加えて細胞実験用の水可溶性フラボノイド (凍結乾燥物) を得た。なおこの粗精製物については、水への溶解度およびフラボノイドの含有量も測定した。

2.3 フラボノイドの成分分析

フラボノイドの分析は、前報<sup>8)</sup>に従って行った。すなわち、抽出液を遠心分離 (3,000rpm×10min) し、固形物を除いた上澄液を所定の濃度になるように超純水で希釈した後、SepPak C18カートリッジに吸着させ、MeOH-DMSO (1:1) で溶出したものをHPLC (Agilent 1100 series) で分析を行った。また、フラボノイドの定量には、内部標準物質 (I.S.) としてAuraptinを使用した。

2.4 機能性評価

2.4.1 抗酸化能

抗酸化能は、須田ら<sup>9)</sup>の方法を用いて、DPPHラジカル消

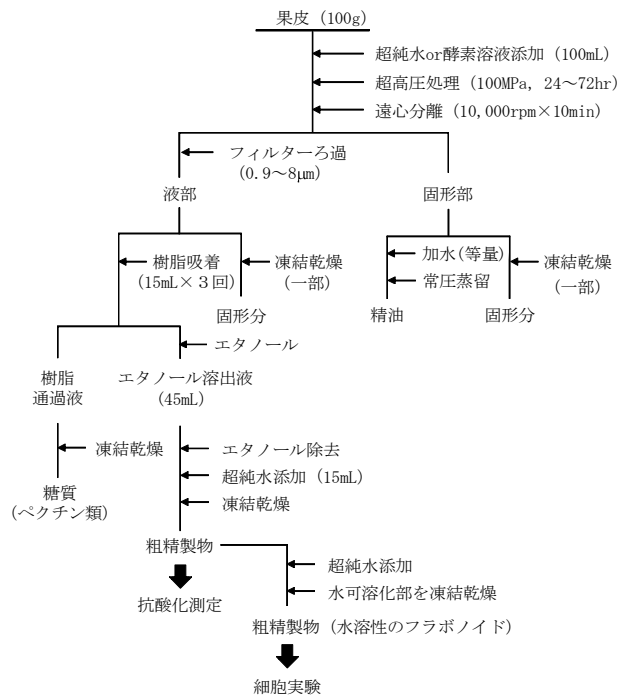


図3 実験手順

去能を測定した。

2.4.2 美白効果試験

**細胞培養** マウスメラノーマB16F1をRPMI1640培地 (10%FBS, 1%ペニシリンストレプトマイシン含有) に懸濁し、12ウェルプレートに1.00×10<sup>6</sup> cell/wellになるよう播種した。24時間培養後、培地 (2mL) を交換し、2mg/10mLの濃度 (生理食塩水に溶解) の試験サンプルを10μLを添加した (n=4)。コントロール (n=4) として生理食塩水、ポジティブコントロール (n=4) としてアルブチン (arb: 終濃度0.1mM)、さらにarbおよび各試験サンプルにはメラノサイト刺激ホルモン (MSH: 終濃度0.5μM) を加えた。試験サンプルを添加後、さらに24時間培養を行い、生成したメラニン量を測定した。

**メラニンの定量** 細胞表面を3mLのPBS (リン酸緩衝食塩液) で2回洗浄後、1mLのトリプシンEDTAで細胞を剥離して1.5mLのエッペンチューブに回収した。回収した細胞は遠心分離 (1,000rpm×5min) によって沈殿させ、沈殿した細胞を3mLのPBSで洗浄した。洗浄後の細胞に1mLのPBSを加え懸濁させ、これを1mLのエッペンチューブ2本に各450μL加え、遠心分離 (5,000G×10min) で上清を除去した。これに2N-NaOHを300μL加えてピペティングし、超音波処理を行い完全に細胞を破砕した後、さらに2N-NaOHを各300μL加え、マイクロプレートリーダー (Biotrak II, アマジャムバイオサイエンス (株) 製) にて405nmの吸光度を測定した。

なお、メラニン阻害活性は、MSHの吸光度を100とした時の相対値で表した。

表 1 実験結果 (10月上旬に摘果した果実)

添加酵素	液部 <sup>※1</sup>		固形部 <sup>※1</sup>		精油量 <sup>※2</sup>		フラボノイド 粗精製物収量 (mg/100 g 原料)
	液量 <sup>※1</sup> (mL)	固形分 (wt%)	固形量 (g)	固形分 (wt%)	収量 (mL)	収率 (mL/100 g)	
A	66	3.4	122	24.8	0.85	0.7	310
B	114	12.4	74	16.9	0.67	0.9	460
C	132	16.7	55	11.9	0.66	1.2	530

A : 無添加 (対照), B : ペクチナーゼ (PE60), C : セルラーゼ (AC40) とペクチナーゼ (PE60) の混合物

※1 原料100 g (固形分: 29.7wt%) に酵素液100mLを加えて超高压処理後, 遠心分離して得られる液部と固形部

※2 固形部に含まれる精油量

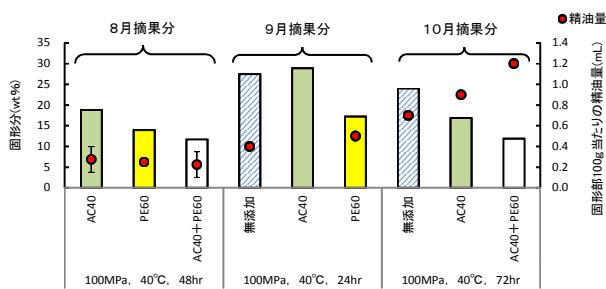
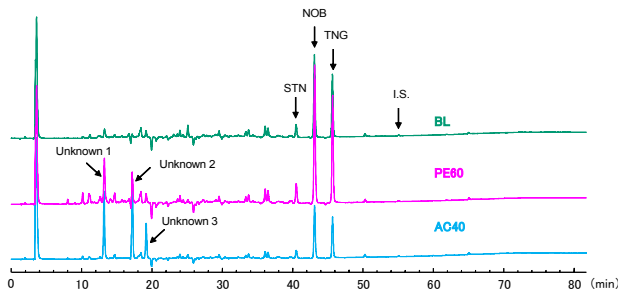


図 4 超高压処理後の固形分と精油量



SNT : Sinensetin, NOB : Nobiletin, TNG : Tangeretin

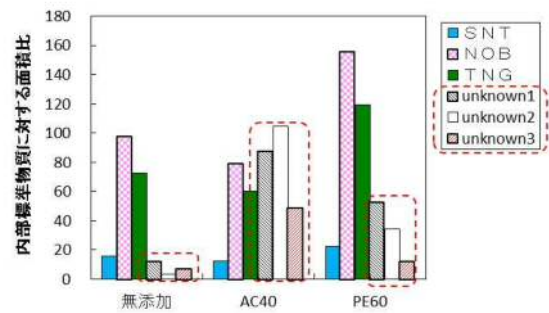
I.S. : 内部標準

図 5 超高压処理後の液部のHPLCクロマトグラム

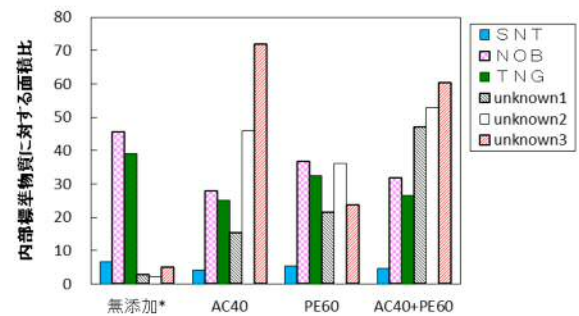
### 3. 結果及び考察

#### 3.1 超高压処理を前処理とした機能性成分の収量

図3の実験手順に従って得られた結果を表1に示す。この実験で用いた原料は10月上旬に摘果した果実(平均直径:38mm, 重さ:29g, 水分:70.3wt%)で, 超高压処理の条件は, 40°C, 100MPa, 72時間である。この結果から, 100gの原料に対して100mLのペクチナーゼを加えることで液部の回収量は増加した。また, ペクチナーゼと共にセルラーゼを添加することで液部の回収率はさらに向上した。一方, 固形部に関しては原料の一部が水に可溶化した分だけその収量は少なくなったが, 固形部から得られる精油収率は, 酵素を添加することで増加した。この結果から, 精油の一



超高压処理条件: 40°C, 100MPa, 24時間



超高压処理条件: 40°C, 100MPa, 42時間

(\* 超高压処理を行っていないブランク)

図 6 酵素添加および超高压処理によるフラボノイド等への影響

部は液部へ移行しその分の損失は生じるものの, 固形分に精油が濃縮されると考えると蒸留操作の観点から作業効率の向上に繋がると考えられる。また未熟果から精油を回収する場合は, 未熟果の摘果時期(大きさ)に左右され, 特に8月上旬の小さな未熟果(平均直径:26mm, 重さ:7.8g, 精油収率:0.1~0.4mL/100g)ではもともと含有する精油量が少なく, 酵素添加による違いはみられなかった(図4)。従って, 精油の回収まで含めたカスケード利用を図る場合は, ある程度肥大した未熟果を利用した方が好ましいと思

表2 粗精製物<sup>\*1</sup>の抗酸化活性

添加酵素	μmol / 1 g <sup>*2</sup>
A	210
B	220
C	350
緑茶 (50wt%エタノール抽出物) <sup>10)</sup>	1,000

A, B, Cは表1に同じ

※1 凍結乾燥物, ※2 Trolox 相当量

われる。また、本実験では精油収率を評価する際に常圧蒸留を行ったが、この場合、得られる精油に加熱臭があり、蒸留残渣のカスケード利用の妨げになる場合がある。このため、現実的には精油の品質や蒸留残渣の利用を考慮して、減圧蒸留が適していると考えられる。

続いて超高压処理後に得られた液部（表1に示す液部に該当）のフラボノイドのHPLC分析結果を図5に示す。この結果から、酵素の添加により3つの未同定成分(Unknown1~3)が検出され、図6に示されるように、特にセルラーゼ系のAC40を添加することでそれらの成分は増加傾向を示した。一方、桜島小ミカンの未熟果に含まれる主なフラボノイドであるSNT（シネンセチン）、NOB（ノビレチン）、TNG（タンゲレチン）の3種に対して、AC40およびPE60の酵素種類により若干の増減が見られたが、超高压処理のフラボノイド生成に対する効果については、酵素添加効果と原料の個体差による影響が大きく、本実験条件では有意な差は見られなかった。

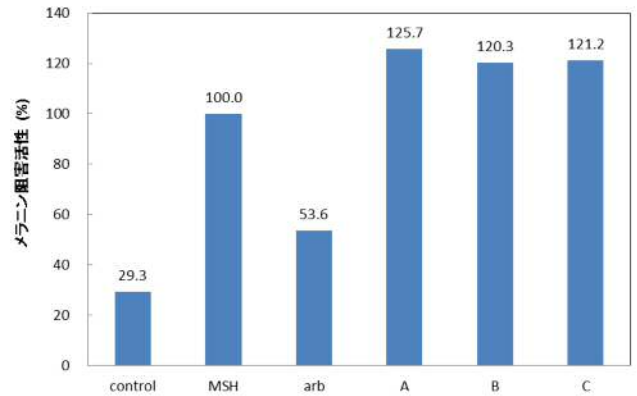
酵素添加効果については、液部の収量が増える分、フラボノイドを含む粗精製物の収量（エタノール溶出液に含まれる溶質量）が、1.5倍以上（100gの原料当たり約300mgから500mg程度に増加）に向上することがわかった。

また、超高压下における自己分解酵素および添加酵素の促進効果を調べるため、常圧での比較実験も行ったが、常圧では24~48時間後に腐敗し（一部にカビも発生）、比較できる状態ではなかった。従って、今回の超高压処理の効果としては、超高压による酵素促進効果（酵素活性の向上）の確認までには至らなかったが、微生物汚染を抑制した柑橘類の酵素糖化（液状化）に対して有効であることが示された。

### 3. 2 機能性評価

#### 3. 2. 1 抗酸化活性

固相抽出により精製した桜島小ミカンの青切りのフラボノイドの粗精製物について、DPPH法による抗酸化活性を調べた。その結果、表2に示されるように、フラボノイド粗



control:生理食塩水, MSH:メラノサイト刺激ホルモン  
arb:アルブチン, A, B, C:表1に同じ

図7 メラニン阻害活性試験の結果

表3 粗精製物<sup>\*</sup>に含まれるフラボノイドの含有量

添加酵素	SNT	NOB	TNG
A	2.2	23.3	4.2
B	2.2	21.4	3.7
C	2.0	18.6	3.2

A, B, Cは表1に同じ

(単位: wt%)

※凍結乾燥物

精製物の抗酸化能はAC40とPE60と酵素を添加することにより向上し、緑茶（50wt%エタノール抽出物）のもつ抗酸化能<sup>10)</sup>の1/3程度の効果を有することが確認された。

#### 3. 2. 2 美白効果試験

柑橘類のフラボノイドや精油には、メラニン生成を抑制する効果、すなわち美白効果があることが知られており<sup>11-13)</sup>、Citrus fruitの果皮より精製したノビレチンでは50μg/mLで約80%のメラニン生成を抑制（IC<sub>50</sub>: 18.6μg/mL）し<sup>11)</sup>、またヒラミレモン（シークワサー）果皮抽出物では20μg/mLで60%のメラニン生成率（%）<sup>13)</sup>との報告がある。

そこで、桜島小ミカンの青切りより精製したフラボノイド粗精製物について、マウスメラノーマB16細胞を用いたメラニン生成抑制試験を行った。その結果、図7に示されるように、アルブチン（arb）では約50%の抑制効果が見られたのに対し、今回用いた試験サンプルはメラニン抑制作用が期待される濃度であったが（表3）、A, B, Cのいずれも100%を超えており、メラニン抑制作用を示す明瞭な結果は得られなかった。

#### 4. 結 言

桜島小ミカンの青切り(未熟果)果皮を主な原料として、それらに含まれる機能性成分である精油やフラボノイドを効率良く抽出するための前処理技術として、超高压処理技術の適用性を検討した。また、フラボノイドの付加価値の高い利用として化粧品素材としての利用可能性を検討した。その結果、超高压処理の前処理効果としては、腐敗を抑えた処理が可能であることを確認し、また超高压処理の効果は不明であるが、酵素添加により柑橘果皮の液状化が進み、フラボノイド収率は向上することがわかった。

また、化粧品素材としての利用を検討するために、果皮より精製したフラボノイドについて、マウスメラノーマB16細胞を用いたメラニン生成を抑制試験を行った。その結果、今回調製したものは、まだクルードな状態であったため明瞭な効果は得られなかった。

しかし、粗精製物は抗酸化能を有していることから、さらに新たな評価方法で機能性素材としての付加価値の高い利用方法を検討していく必要がある。

#### 謝 辞

本研究で用いた原料の桜島小ミカン未熟果は、(有)さくらじま旬彩館より提供していただいた。また、超高压処理実験には鹿児島大学の菅沼教授、北原准教授、美白効果実験には沖縄県工業技術センターの荻研究員にご協力いただいた。ここに深く感謝する。

#### 参 考 文 献

- 1) 野方洋一：近畿中国四国農業研究センター研究報告第5号, 19-84(2005)
- 2) 後藤元信：日本食品工学会誌, **6** (1), 21-28(2005)
- 3) 景山知津子, 原節生, 上野明, 梅原薫：静岡柑試研報, **24**, 25-32 (1992)
- 4) 杉本篤史, 上東治彦：高知県工業技術センター研究報告, No. 35, 7-12(2004)
- 5) 津嘉山正夫, 市川亮一, 山元幹二, 佐々木貴啓, 河村保彦：日本食品科学工学会誌, **56** (6), 359-362(2009)
- 6) 笹川秋彦：日本ゴム協会誌, **79** (4), 231-236 (2006)
- 7) 広島県：特許第3475328号
- 8) 安藤浩毅, 古川郁子, 西元研了, 中島孝子：鹿児島県工業技術センター研究報告, **23**, 35-38(2009)
- 9) 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一：“食品機能研究法”光琳 (2000) p218
- 10) 安藤浩毅, 森田慎一, 田島英俊, 古川郁子, 神野好孝：鹿児島県工業技術センター研究報告, **17**, 21-28(2003)
- 11) Kenroh SASAKI and Fumihiko YOSHIZAKI: Biol. Pharm. Bull, **25**(6), 806-808(2002)
- 12) Kimihisa ITO, Noriko HIRATA, Megumi MASUDA, Shunsuke NARUTO, Kazuya MURATA, Keitaro WAKABAYASHI and Hideaki MATSUDA : Bio. Pharm. Bull, **32**(3), 410-415 (2009)
- 13) 日油株式会社：特開2009-73769