

橘の機能性成分の調査研究（第3報）

久保 友佳子^{*1)}, 清水 浩美^{*2)}

Research of a Functionality Ingredient of *Citrus Tachibana* (3rd Report)

KUBO Yukako, SHIMIZU Hiromi

橘を利用した機能性食品の開発を推進するため、橘に含まれる機能性成分の分析を行った。フラボノイド類の分析結果から、橘には四季橘の10倍程度の Nobiletin 及び Tangeretin が含まれていることがわかった。これらの成分は、生育地域による含有量の違いがあることが示唆された。Narirutin 含有量は、ウンシュウミカンの1割以下であり、部位別では果肉部に最も多く含まれていることが分かった。その他機能性評価、酵母の分離からビールの醸造試験などを実施した。

1. 緒言

近年、健康志向を背景に食品のもつ生体調整機能（機能性）への関心が高まっている。カンキツ類は身近な機能性食品として知られ、発がん抑制作用や生活習慣病との関連など様々な研究が進められている¹⁾。

橘は別名ヤマトタチバナとも呼ばれ、日本に多くあるカンキツ類の中でも、沖縄のシークワサーと橘だけが日本原産種であることが遺伝子分析により判明している³⁾。また橘は、垂仁天皇が田道間守に不老不死の薬を持ってくるようにと命じた伝説の果物で、日本書紀などに登場する奈良県に縁のある植物である。しかし、経済栽培がないこと、生産性がきわめて低い、苦味があることなどから、研究はあまりなされていない。

当センターではこれまでに代表的な柑橘であるウンシュウミカンと比較し、橘は機能性成分である Nobiletin, Tangeretin が非常に多いこと、抗酸化作用が期待されること、葉や果実の香気成分を明らかにしてきた^{3) 4)}。

本研究では橘を利用した機能性食品の開発を目標に、Nobiletin, Tangeretin 含有量の他柑橘との比較、花粉症に効果があるとされる機能性成分である Narirutin⁵⁾の含有量調査、光毒性をもつフロクマリンの含有量調査を行った。

また、橘の機能性を評価するために、血糖値上昇抑制効果として α -グルコシダーゼであるマルターゼ、スクラーゼ阻害活性を、高血圧上昇抑制効果としてアンジオテンシン変換酵素（以下、ACEと記す。）阻害活性を測定した。

さらに種子からの油の取得や、発酵食品に応用可能な酵母及び乳酸菌を分離した。分離した酵母を育種することにより、マルトース発酵性を付与した酵母を使用したビール醸造試験を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 Nobiletin 及び Tangeretin 含有量

試料の橘果実は2018年度に大和郡山市で採取したもの及び当センターで採取したものを用いた。また、比較対象として、橘と間違われやすい四季橘（シキキツ）についても同時期に当センター（奈良市）で採取した成熟果の分析を実施した。

試料の一部を水洗いし、そのまま若しくは皮、種、果肉に分け、自然乾燥した後、粉砕機を用いて粉砕し、日本真空技術製の凍結真空乾燥機（DF-01H）を用いて凍結乾燥（以下、FDと記す。）した。

Nobiletin（以下、NOBと記す。）及びTangeretin（以下、TNGと記す。）の分析は、前報³⁾のとおりとした。

2.2 Narirutinの分析

試料の橘果実は2018年度に大和郡山市で採取されたものを用いた。

Narirutin（以下、NRと記す。）の分析は、大野ら⁶⁾の方法を一部改変し行った。分析試料の抽出は「2.1 Nobiletin 及び Tangeretin 含有量」と同様に行った。分析条件は表1のとおりとした。NRのスタンダードはフナコシ株式会社製を用いた。

表1 NRの分析条件

カラム	YMC-Pack, C18, S-5, 4.6 mm×150mm
カラム温度	40°C
流速	0.25 mL/min
試料注入量	10 μ L
移動層	アセトニトリル：蒸留水 = 2：8
検出器	UV-Vis 検出器（285 nm）
同定	リテンションタイム及びスペクトル
定量	絶対検量線法（3点検量）

*1) バイオ・食品グループ(現：奈良県環境政策課) *2) バイオ・食品グループ

2.3 フロクマリン類の分析

フロクマリン類は一般的に柑橘類に含有されていることが知られている。Psoralen, Xanthotoxin, Bergapten (以下, BP と記す。), Bergamottin (以下, BG と記す。), 6,7-dihydroxybergamottin (以下, DHB と記す。)を対象とした。分析は坂牧らの方法を改変して行った。

FD 試料が 0.1 g になるようファルコンチューブにはかりとり, DMSO/MeOH=1:1 を 10 mL 入れた。ボルテックスミキサーで攪拌した後, 10 分間超音波処理し, 遠心分離後上澄みを回収した。さらに少量の抽出溶媒を入れ, 超音波処理し, 遠心分離後上澄みを回収する操作を 2 回繰り返した。上記の上澄みを合わせた抽出液を 0.2 μm のメンブランフィルター (DISMIC-25JP) でろ過した後, 抽出溶媒 20 mL に定容したものを分析試料とした。なお, 分析試料は 1 試料あたり 3 検体とした。分析試料の定量は HPLC を用い, 分析条件は表 2 の通りとし, BG はグラジエント条件①, BG 以外はグラジエント条件②を用いた。スタンダードは Psoralen, Xanthotoxin, BP は東京化成工業株式会社製, BG, DHB は Cayman Chemical 製を使用した。

表 2 フロクマリン類の分析条件

カラム	Inersil ODS-3, 3μm, 2.1mm×150mm
カラム温度	40°C
流速	0.25 mL/min
試料注入量	10 μL
移動層	A アセトニトリル, B 蒸留水
グラジエント条件①	50%B(5 min)→20%B(20~30min)→50%B(35~45 min)
グラジエント条件②	60%B(10 min)→55%B(20 min) → 60%B(21~30 min)
検出器	UV-Vis 検出器 (210 nm)
同定	リテンションタイム及びスペクトル
定量	絶対検量線法 (3 点検量)

2.4 糖質分解酵素阻害活性

でんぷんは酵素により単糖まで分解され, 血液に吸収されることで血糖値が上昇する。糖質分解酵素である α-グルコシダーゼの活性を阻害することができれば, 生じる単糖の量が減り, 食後の血糖値上昇を抑制することができる。

そこで今回はヤマトタチバナの成熟果及び未熟果のエタノール抽出物において, マルターゼ, スクララーゼ阻害活性試験を行った。

FD 試料 3 g にエタノール 60 mL を加え, 一晩攪拌した後, 遠心分離 (3,000 rpm×10 min) し, 上澄みを回収した。回収液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固後, 0.2 M リン酸 Na 緩衝液 (pH6.8) (以下, Buffer1 と記す。) 1 mL に

再溶解した。遠心分離 (3,000 rpm×10 min) 後, 上澄みをディスクろ過し, 分析試料とした。

ラット小腸アセトンパウダー (Sigma-Aldrich 製) 1 g に buffer1 を 9 mL 加え, 氷浴中でホモジナイズした。遠心分離 (3000 rpm, 10 分, 4°C) を行い, 上清を粗酵素液とした。2 mL サンプルチューブに小分けし, -80 °C で保存した。マルターゼ阻害活性試験では 20 倍希釈, スクララーゼ阻害活性試験では 2 倍に希釈して使用した。

各分析試料の in vitro でのマルターゼ, スクララーゼ阻害活性は, 以下の方法で求めた。適宜希釈した分析試料 200 μL に, 粗酵素液 200 μL を添加し, 37°C で 5 分間プレインキュベートした。基質として 5% マルトースもしくは 5% スクロース溶液を 200 μL を添加し, 37°C で 60 分間インキュベート後, 99°C 10 分間加熱することで反応を停止した。攪拌後, 上記試料をグルコース CII-テストワコー (和光純薬製) を用いて, 505 nm の吸光度からグルコース量を測定したマルターゼ, スクララーゼ阻害率は, 下記の式を用いて算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (S - SB) / (C - CB)\} \times 100$$

S : Sample の 505 nm における吸光度

SB : Sample Blank の 505 nm における吸光度

C : Control の 505 nm における吸光度

CB : Control Blank の 505 nm における吸光度

2.5 ACE 阻害活性

ACE 阻害活性試験とは血圧上昇に関係するアンジオテンシン変換酵素の阻害率を評価する試験である。

ACE はアンジオテンシン I を II へ変換する酵素であり, また, 血管拡張作用を示すブラジキニンを分解する酵素であるため, 血圧を上昇させる一因となっている。そのため, ACE 活性を阻害することができれば, アンジオテンシン II の増加を防ぎ血圧の上昇を抑制することができる。

そこで今回は橘の成熟果及び未熟果のエタノール抽出物について ACE 阻害活性試験を行った。

分析試料の調整は, 「2.4 糖質分解酵素阻害活性」と同様に行ったが, 濃縮乾固後に Buffer 1 ではなく, 0.1 M NaCl 含有 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH8.3) (以下, Buffer 2 と記す。) に再溶解し, 分析試料とした。

各分析試料の in vitro での ACE 阻害活性は, 河村⁸⁾の方法を改変して行った。ACE 酵素液は, ウサギ肺由来アセトンパウダー (SIGMA-ALDRICH 製, L0756) 1 g に Buffer 2 を 20 mL 加え, 4°C で 24 時間攪拌後, 遠心分離 (3,000 rpm×10 min) して得た上澄み液を, Buffer 2 で 4 倍希釈し用いた。上記 ACE 酵素液 50 μL に Buffer 2 および分析試料をそれぞれ 50 μL 添加し, 37°C で 5 分間プレインキュベートした。Buffer 2 で 10 mM に調整した Bz-Gly-His-Leu 合成基質 (ペプチド研究所製, 3064) 50 μL を添加し, 37°C で 60 分間インキュベート後, 5

mol/Lの塩酸25 μ Lを添加し反応を停止した。

攪拌後、酢酸エチル 800 μ Lを加え攪拌、遠心分離(10,000 rpm \times 5 min)した。上記試料の内、酢酸エチル層 500 μ Lをとり、遠心エバポレーター(Yamato製 RE-500)を用いて酢酸エチルを除去後、蒸留水 500 μ Lを添加し攪拌した。遠心分離(10,000 rpm \times 10 min)後、上清 250 μ Lを96穴マイクロプレートにとり、マイクロプレートリーダー(米国バイオテック社, Synergy HTX S1LFA)を用い、吸光測定(228 nm)した。ACE阻害率は、下記の式を用いて算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (S - SB) / (C - CB)\} \times 100$$

S : Sample の 228 nm における吸光度

SB : Sample Blank の 228 nm における吸光度

C : Control の 228 nm における吸光度

CB : Control Blank の 228 nm における吸光度

2.6 種子油の取得

2.6.1 脂質測定

種子油の抽出にあたり、酸分解法にて脂質測定を行った。乾燥させた種子の殻をむき、中身を粉砕器で粉砕し、3gを三角フラスコに秤量した。EtOHを2mL程度加え、混和した。H₂O/HCl(11:25)を10mLを加え、ときどき振り混ぜながら、ウォーターバスを用いて70~80℃、30分程度加熱した。100mLの共栓付き試験管にエタノール8mLで洗浄しながら移した。ジエチルエーテル25mL加えたのち、石油エーテル25mLを加え振った。二層に分離するまで静置した。エーテル層をピペットで回収し、ろ紙を用いて、平底フラスコへろ過した。この操作を、ジエチルエーテル15mL、石油エーテル15mLに変え、2回繰り返した。回収したエーテル混液をウォーターバスを用いて70~80℃で留去した。105℃の乾燥機で一時間乾燥後、デシケーター内で1時間放冷し、重量をはかった。恒量になるまで乾燥、放冷を繰り返した。

2.6.2 種子油の抽出

抽出は焙煎圧搾法、常温圧搾法の2通りにより行った。焙煎圧搾法では乾燥させた種子の殻をむき、フライパンを用いて3分程度焙煎した。粉砕機を用いて粉砕し、種子重量に対し10%の水を加え混ぜた。ラップをかけ、電子レンジで1分間加熱し、石野製作所製の圧搾機を用いて搾油した。常温圧搾法では乾燥させた種子の殻をむき、粉砕機を用いて粉砕した。種子重量に対し10%の水を加え、混ぜた後、ラップをかけ、電子レンジで1分間加熱し、圧搾機を用いて搾油した。どちらの方法でも、回収し油はひだ折りろ紙でスクリーン瓶にろ過した後、アルミホイルで遮光し、暗所にて保存した。

2.7 橘の花からの酵母取得

2.7.1 使用培地

集積培地は麴汁培地(Brix10, pH3.5)を使用した。一次選抜培地はスクロース液体培地(スクロース1%, イーストニトロゲンベース0.67%, エタノール5%), 二次選抜培地はグルコース30%液体培地(グルコース30%, 酵母エキス1%, ペプトン2%), 三次選抜培地はRE培地(ラフィノース1%, イーストニトロゲンベース0.67%, エタノール8%)。四次選抜培地はダーラム管を入れたマルトース基礎培地(マルトース2%, 酵母エキス0.5%, ペプトン1%)を使用した。単コロニーの取得には、YPD寒天培地(グルコース2%, 酵母エキス1%, ペプトン2%, 寒天2%)もしくはTTC下層培地(日本醸造協会製)を使用した。酵母の増殖にはYPD液体培地(グルコース2%, 酵母エキス1%, ペプトン2%)を使用した。

2.7.2 分離源

2019年5月に大和郡山市で採取された橘の花を酵母の分離源とした。

2.7.3 選抜

スクリーニング法は殿内ら⁹⁾、鶴菌ら¹⁰⁾、安田ら¹¹⁾の文献を参考にした。

橘の花を50mLファルコンチューブに詰め、麴汁(Brix10, pH3.5)を約30mLずつ入れ、30℃で集積培養を行った。以降、白濁したサンプル100 μ Lをとり、各選抜培地に添加し、白濁、発泡を確認することで選抜した。3次選抜時に白濁、発泡したサンプルをYPD寒天培地に塗抹し、単コロニーを取得した。

Saccharomyces 属はrDNA 5.8S-ITS領域の増幅長が880bpであることが知られているため¹²⁾ PCR、電気泳動にて得られた株のrDNA 5.8S-ITS領域の増幅長を確認した。

寒天培地からかき取ったコロニーを0.125%SDS溶液25 μ Lに加え、ガラスビーズ少量を入れ、ボルテックスミキサーで攪拌後、-80℃で10分間凍結し、70℃で融解したものを14000rpmで1分間遠心分離し、その上清をPCRの鋳型として用いた。プライマーはITS1(5'-TCCGTAGGTGACCTGCGG-3')およびITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATGTGC-3')(終濃度各0.5 μ M)を使用した。PCRの反応液は、Ex taq(タカラバイオ㈱)を0.125 μ L、10 \times Ex bufferを2.5 μ L、dNTPs(2.0mM)を2.0 μ L、プライマー(10 μ M)を2.5 μ L、鋳型DNAを1 μ L加え、滅菌水で25 μ Lに調製した。Veriti Thermal Cycler(ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製)を用いて94℃、3分間でDNAの変性を行った後、94℃で1分(変性)、60℃で1分(アニーリング)、72℃で5分(伸長)を30サイクル行い、72℃で7分静置し、4℃で保存した。

PCR反応物の2%w/vアガロースゲル電気泳動を行った。

rDNA 5.8S-ITS 領域の増幅長が 880 bp である分離酵母を *Saccharomyces* 属酵母の候補株として選抜した。

2.7.4 酵母の種同定

真菌の種の推定に用いられる 28S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列を用いた。Gen とるくん (酵母用) (タカラバイオ(株)製) を用いて、候補株の DNA を抽出し、鋳型 DNA とした。プライマーは NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) および NL4 (5'-GGTCCGTGTTCAGACGG-3) を用い、PCR を行った。PCR の反応液は、KOD plus taq (東洋紡(株)製) を 0.4 μ L, KOD plus buffer を 2.0 μ L, dNTPs (2.0 mM) を 2.0 μ L, プライマー (10 μ M) を 0.6 μ L, MgSO₄ (25 mM) を 1.8 μ L, 鋳型 DNA を 1 μ L 加え、滅菌水で 20 μ L に調製した。Veriti Thermal Cycler (ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製) を用いて、94°C, 3 分間で DNA の変性を行った後、94°C で 30 秒 (変性), 52°C で 1 分 (アニーリング), 72°C で 1 分 (伸長) を 25 サイクルおこない、72°C で 7 分静置した後、4°C で保存した。Exo SAP-IT (アフィメトリックス・ジャパン(株)製) で 1 本鎖 DNA の消化と余分な dNTPs を不活性化した。DNA シーケンスはユーロフィンジェノミクス(株)に委託した。得られた塩基配列は Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性検索を行い、種の同定を行った。

2.7.5 キラー性試験

TTC 下層培地にメチレンブルー 0.003% 添加した寒天平板にきょうかい酵母を 10⁶ CFU/g 塗抹し、分離酵母を植菌した後、30°C で培養した。24 時間後に微小コロニーが培地一面に生じた時に現れるクリアゾーンを観察した。

2.7.6 糖質化性試験

酵母様真菌同定キット ID32C API (シスメックス・ピオメリユー(株)製) に接種した菌体が資化する 31 種類の炭素源 (ガラクトース, シクロヘキシミド, スクロース, N-アセチルグルコサミン, 乳酸, L-アラビノース, D-セロビオース, ラフィノース, D-マルトース, トレハロース, 2-ケトグルコン酸カルシウム, α -メチル- α -D-グルコシド, マンニトール, ラクトース, イノシトール, D-ソルビトール, D-キシロース, D-リボース, グリセリン, L-ラムノース, パラチノース, エリスリトール, D-メリピオース, グルコン酸ナトリウム, D-メレチトース, グルコン酸カリウム, レブリン酸, グルコース, L-ソルボース, D-グルコサミン塩酸塩, エスクリン) について調べた。

2.8 橘の花から取得した酵母の育種

ビールの原料である麦汁にはマルトースが多量に含まれているため、ビールに使われる酵母はマルトース発酵性がなければならない。2-デオキシグルコース (以下、2-DG と

記す) を添加し、マルトースを糖源とする培地によってマルトース発酵性を高めた変異株を取得する方法が知られている¹³⁾¹⁴⁾。橘の花から取得した酵母にマルトース発酵性を付与するため、育種を行った。

2.8.1 使用培地

酵母の増殖は YPD 液体培地を、2-DG 耐性を持つ変異株取得は 2-DG 寒天培地(イーストニトロゲンベース 0.67%, マルトース 2%, 2-DG 0.02%)を使用した。単コロニーの取得は YPD 寒天培地を使用した。

2.8.2 育種

-80°C で保存していた酵母を YPD 液体培地 5 mL, 30°C で一晚攪拌培養した。集菌・洗浄後、2-DG 寒天培地に塗抹した。30°C で 1 週間培養した後、得られた単コロニーを YPD 液体培地 5 mL に植菌し、30°C で 1 日静置培養した。安定した形質の株を得るため、この操作を 5 回繰り返し、2-DG 耐性を持つ変異株を取得した。得られた変異株をダーク管の入ったマルトース基礎培地に植菌し、白濁、発泡したサンプルを選抜し、YPD 寒天培地へ塗抹した。得られた単コロニーを麦汁に植菌し、30°C で 2 日間発酵させたのち、アルコメイト AL-2 (理研計器(株)製) にてアルコール分を測定し、アルコール分が 3% 以上の株を選抜した。

2.9 橘の花から取得した酵母を利用したビール醸造試験

2.9.1 ビールの醸造

橘の花から得られた酵母を育種し、マルトース発酵性を付与した酵母 (以下、橘花 MAL 酵母と示す) を使用したビール醸造試験を行った。ビールのスタイルはヴァイツェン、インディアペールエールの二種類を検討し、醸造方法は鈴木らの文献¹⁵⁾を参考にした。比較として、ヴァイツェン用市販酵母 (以下、WB-06 と記す) と、エール用市販酵母 (以下、US-05 と記す) を使用した。

-80°C で保存していた酵母を YPD 液体培地 5 mL, 30°C で一晚攪拌培養した後、麦汁 100 mL に培養液を 1 mL 添加した。30°C で 2 日間静置培養し、培養液を OD=60 に合わせ、各スタイル用に調製された麦汁 350 mL に添加し、20°C で最大 10 日間主発酵を行った。1 日ごとに重量測定を行い、減少量を炭酸ガス発生量として算出することで発酵経過をモニターした。一次発酵終了後、上清のみをデカンテーションによりビール瓶に移し、打栓し、後発酵として 20°C で 5 日間、さらに熟成として 4°C で 14 日間静置した。なお、醸造試験は n=3 で行った。

2.9.2 各種試験

熟成後、-20°C で保存したものを各種試験に使用した。ただし、官能試験は上清後すぐ、もしくは 4°C で数日間保存したものを使用した。アルコール分はアルコメイト AL-2

(理研計器(株)製), 香気成分はガスクロマトグラフ GCMS-QP2010Ultra (島津製作所(株)製, 以下 GC/MS と記す), 有機酸はキャピラリー電気泳動 G1602 (Agilent 社製) で測定を行い, 官能試験を 5 名により行った. 有機酸, 香気成分の測定条件は表 3, 表 4 のとおりである.

表 3 有機酸測定条件

カラム	アジレントテクノロジー(株)製 fused-silica(75 μmID, 72cm)
泳動バッファー	アジレントテクノロジー(株)製 Organic Acid Buffer for CE pH 5.6
印加電圧	-25 kv
温度	20°C
波長	350 nm ref 200 nm
注入量	2 sec./50 mmBar
キャピラリー温度	20°C

表 4 香気成分測定条件

カラム	アジレントテクノロジー (株)製 HP-INNOWAX Length 60 m, 0.250 mm ID, 0.25μm
カラム温度	40°C (0-5 min) -40-60°C (5-10 min) - 60-70°C(10-20 min)- 70-120°C(20-33 min)- 120°C(33-38 min)
キャリアガス	ヘリウム
スプリット比	1 : 5
サンプリング	ヘッドスペース.

2.10 橘の葉からの乳酸菌取得

2.10.1 使用培地

集積培養, 乳酸菌の増殖には GYP for LAB 培地 (グルコース 1%, 酵母エキス 1%, ペプトン 1%, 酢酸ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 7 水和物 400 ppm, 硫酸マンガン 4 水和物 20 ppm, 硫酸鉄 7 水和物 20 ppm, 塩化ナトリウム 20 ppm, Tween80 500 ppm, シクロヘキシミド 10 ppm, アジ化ナトリウム 10 ppm, pH 6.5) を用いた. 選択培地は BCP 加プレートアガール「ニッスイ」(以下 BPC 培地, 日水製薬(株)製) を使用した.

2.10.2 分離源

2019 年 9 月に大和郡山市で採取された橘の葉を乳酸菌の分離源とした.

2.10.3 選抜

採取した試料を無菌的に 50 mL のチューブに入れ, 集積

培地を加え, 30°C で培養した. 白濁した集積培養液のうち, pH が 4.0 を下回る培養液 100 μL を選抜培地に塗抹し, 30°C, 48 時間培養した. 生じたコロニー周囲に黄色いハロが形成されたものを釣菌し, 新たな BCP 培地に塗抹し, 再びハロが形成されることを確認した. 得られたコロニーに関してグラム染色を行い, グラム陽性であるものを選抜した. さらにカタラーゼ試験を行い, 陰性である菌株を乳酸菌の候補株とした.

2.10.4 乳酸菌の種同定

遺伝子解析による種の同定を行った. 鈴木の方法¹⁶⁾を参考にした. 細菌の種の同定に用いられる 16S rDNA の塩基配列を用いた. PCR の鋳型は, 培養液を蒸留水で 100 倍希釈したものを用いた. プライマーは 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') および 1406R (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3') を用い, PCR を行った. PCR の反応液は, KOD Plus (東洋紡(株)製) を 0.4 μL, 10×KOD buffer を 2 μL, dNTP Mixture (2.5 mM each) を 2 μL, 2.5 mM MgCl₂ を 0.8 μL, プライマー (20 μM) を 0.6 μL, 鋳型 DNA を 2 μL 加え, 滅菌水で 20 μL に調製した. Veriti Thermal Cycler (ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製) を用いて, 94°C, 3 分間で DNA の変性を行った後, 94°C で 15 秒 (変性), 45°C で 30 秒 (アニーリング), 68°C で 2 分 (伸長) を 35 サイクル行った. ExoSAP-IT (アフィメトリックス・ジャパン(株)製) で 1 本鎖 DNA の消化と余分な dNTPs を不活性化した後, これを鋳型に BigDye Terminator v.3.1 (ライフテクノロジーズ・ジャパン(株)製) を用いてシーケンス用試料を調製し, DNA シーケンサーで塩基配列を解析した. 得られた塩基配列は Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性検索を行い, 種の同定を行った.

3. 結果及び考察

3.1 Nobiletin 及び Tangeretin 含有量

2018 年度に採取した成熟果の NOB 及び TNG 含有量を表 5 に示す. 当センターで採取したものは, 大和郡山市で採取したものと比べて, 約 0.8 倍の含有量であることがわかった. 生育地の環境, 土壌, 施肥などによる NOB, TNG 含有量の違いが示唆された.

表 5 生育地域による NOB, TNG 含有量の比較 (mg/100g-乾燥重量)

	大和郡山市		センター	
	全体	皮	全体	皮
NOB	225.0	426.4	184.6	296.8
TNG	123.5	215.3	96.7	130.9

各成熟果の写真を図1に示す。四季橘はキンカンとマンダリン種の雑種と言われており¹⁷⁾, 季節を問わず丸い実をつける。内皮とじょうのう膜の間に隙間はなく, 種は果実1個に対し0~1個であった。橘は内皮とじょうのう膜が離れており, 1つの果実に対して種は5~10個であった。

各成熟果の部位別のNOB及びTNG含有量を表6に示す。橘, 四季橘ともに果皮部に最も多く含まれており, 果肉部, 種子には少量もしくは検出しなかった。また, 橘は四季橘に比べてNOBは11倍, TNGは10倍多く含まれていることがわかった。



図1 四季橘と橘

3.2 Narirutinの分析

橘の成熟果, 未熟果およびウンシュウミカンの成熟果各部位のNR含有量を表7に示す。NRは成熟果より未熟果に多く含まれており, 部位別には果肉部に最も多く含まれていることが分かった。また, 成熟果に関してウンシュウミカンと比較すると, 橘にはウンシュウミカンの1/15程度しか含まれていないことが分かった。ウンシュウミカンは果皮部に最も多く含まれているが, 橘は果肉部に多く含まれているという違いがあった。

3.3 フロクマリン類の分析

橘の成熟果, 未熟果の成熟果各部位のフロクマリン類含有量を表8に示す。Xanthotoxin, BG, DHBのピークは検出されなかった。PsoralenおよびBPは成熟果よりも未熟果に約1.2倍多く存在していることがわかった。部位別では果皮部に多く存在していることを確認した。

3.4 糖質分解酵素阻害活性

成熟果, 未熟果のエタノール抽出物におけるマルターゼ阻害活性試験及びスクラーゼ阻害活性試験の結果を図2に示す。また, 酵素活性を50%阻害するときのサンプル濃度であるIC₅₀値を表9に示す。未熟果, 成熟果ともに濃度依存的に阻害率が高くなっていくことが分かった。また, IC₅₀値を比較すると, 成熟果と未熟果のマルターゼ阻害活性は同程度であった。一方, スクラーゼ阻害活性は成熟果の方が未熟果よりも高いことが分かった。

3.5 ACE阻害活性

成熟果, 未熟果のエタノール抽出物におけるACE阻害活性試験の結果を図3に示す。また, 酵素活性を50%阻害するときのサンプル濃度を示すIC₅₀値を表10に示す。未熟果, 成熟果ともに濃度依存的に阻害率が高くなっていくことが分かった。また, IC₅₀値を比較すると, 成熟果と未熟果のACE阻害活性は同程度であった。

3.6 種子油の取得

脂質の測定の結果, 37%の脂質が橘の種子に含まれていることを確認した。

2種類の 방법으로圧搾した油の写真を図4に示す。焙煎圧搾法では緑がかかった褐色の油を, 元の種子の重量に対し14%の収率で得た。低温圧搾法では黄色の油を7%の収率で得た。焙煎圧搾法では, 焙煎時の香ばしい香りがついていた。

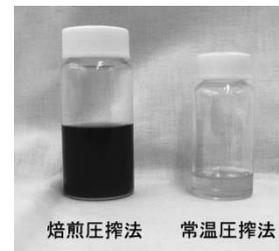


図4 橘種子油

3.7 橘の花からの酵母取得

3.7.1 橘の花から分離した酵母の同定

4次選択のマルトース基礎培地では選抜株数が0となったため, 3次選択までのスクリーニングで得た20株のrDNA 5.8S-ITS領域を確認したところ, 880bpのものが1株見つかった。遺伝子解析により種の同定を行ったところ *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。

3.7.2 キラー性試験

Saccharomyces cerevisiae には他の酵母を死滅させるキラー一因子と呼ばれるタンパク質を分泌するキラー酵母といわれる菌株があり, 従来から使用されている酵母に悪影響を及ぼすことがある。K701に対する橘花酵母のキラー性の確認結果を図5に示す。K701を塗抹した上に画線した橘花酵母との境界にハローが認められなかったことから, きょうかい酵母に対するキラー性がない事が確認できた。酒造現場で他の酵母に影響を与えないで使用することができると考えられる。

表 6 橘と四季橘の NOB, TNG 含有量 (mg/100g-乾燥重量)

	橘				四季橘			
	全体	皮	果肉	種子	全体	皮	果肉	種子
NOB	184.6	296.8	5.6	n.d.	16.2	32.7	n.d.	n.d.
TNG	96.7	130.9	5.3	n.d.	9.3	13.8	n.d.	n.d.

※n.d.: 検出せず

表 7 橘とウンシュウミカンの NR 含有量 (mg/100g-乾燥重量)

	橘								ウンシュウミカン		
	成熟果				未熟果				成熟果		
	全体	果皮	果肉	種子	全体	果皮	果肉	種子	全体	果皮	果肉
NR	36.1	12.4	66.3	5.0	55.3	22.3	92.7	n.d.	560.5	1072.1	335.5

※n.d.: 検出せず

表 8 フロクマリン類含有量 (mg/100g-乾燥重量)

	成熟果		未熟果	
	全体	果皮	全体	果皮
Xanthotoxin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Psoralen	47.6	93.5	25.8	81.9
BP	47.8	66.5	60.5	165.1
BG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DHB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

※n.d.: 検出せず

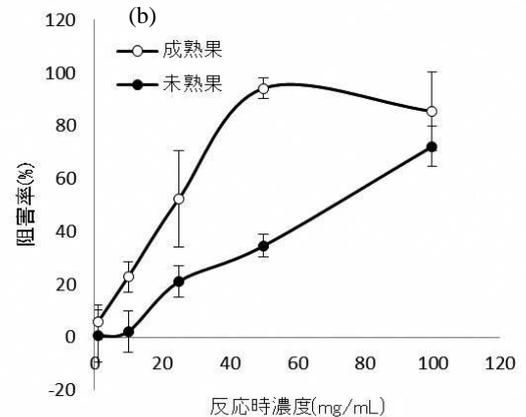
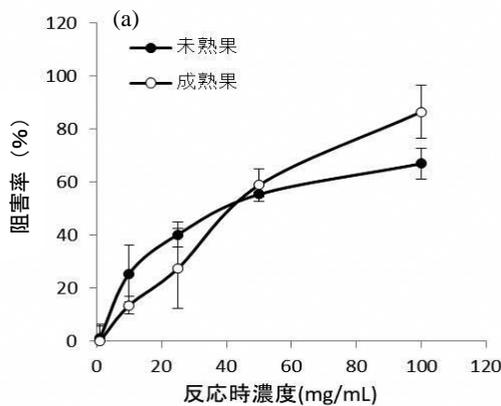


図 2 橘果実エタノール抽出物の (a) マルターゼ阻害活性, (b) スクララーゼ阻害活性

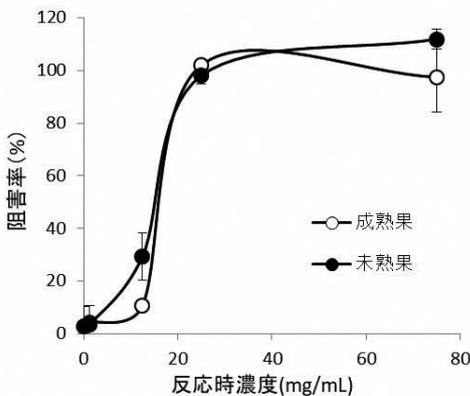


図 3 橘果実エタノール抽出物の ACE 阻害活性

表 9 マルターゼ, スクララーゼ阻害活性の IC₅₀ 値 (mg/mL)

	成熟果	未熟果
マルターゼ	41.1	39.0
スクラーゼ	23.2	66.7

表 10 ACE 阻害活性の IC₅₀ 値 (mg/mL)

	未熟果	成熟果
IC ₅₀ 値	15.4	16.8

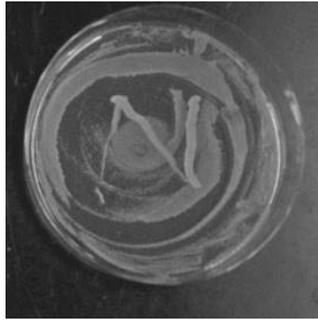


図5 キラー性試験

3.7.3 糖資化性試験

橘花酵母, K701, K901 の糖資化性試験の結果を表 11 に示す. 橘花酵母の糖資化性を表 11 に示す. ガラクトース, スクロース, ラフィノース, α -メチル- α -D-グルコシド, パラチノース, グルコースを資化した. K701, K901 と比較すると, D-マルトースはこれらで資化性が認められたのに対し, 橘花では認められなかった

表 11 各酵母の糖資化性

	橘花	K701	K901
ガラクトース	+	+	+
スクロース	+	+	+
ラフィノース	+	+	+
D-マルトース	-	+	+
α -メチル- α -D-グルコシド	+	+	+
パラチノース	+	+	+
グルコース	+	+	+

※+: 資化性有, -: 資化性無
 全ての菌株で資化されなかった炭素源 24 種類は表記略

3.8 橘の花から取得した酵母の育種

2-DG 変異株 128 株のうち, 麦汁中のアルコール分が 3 以上のサンプルが 1 つあった. このサンプルを YPD 寒培地に塗抹し, 取得した単コロニーを再び麦汁に植菌し, アルコール分が 3.8% となった. 育種により, マトース発酵性を持った橘花酵母 (以下, 橘花 MAL 酵母) を 1 株取得することができた.

3.9 ビールの醸造

3.9.1 ヴァイツェンビール

主発酵時の重量変化を図 6 に, アルコール分を表 12 に示す. 橘花 MAL 酵母は WB-06 と比較して, 5 日目から発酵力が弱くなった. アルコール分については, 橘花 MAL 酵母は WB-06 よりも低かった. 官能試験では橘花 MAL 酵母を使用したビールは甘味や味の薄さが指摘されたもの

の, 香りはフルーティー, 華やか, ビールらしさがあるとの評価であった. 各ビールの有機酸含有量を図 7, 香気成分の結果を表 13 に示す.

有機酸は橘花 MAL 酵母を使用すると WB-06 を使用した時よりもコハク酸が少なく, リン酸が多いことが分かった.

またヴァイツェンビールにおいて, 酢酸イソアミルは特徴香の一つである. WB-06 と比較しても同程度の濃度であったことから, ヴァイツェンビールに適した酵母であることが示唆された.

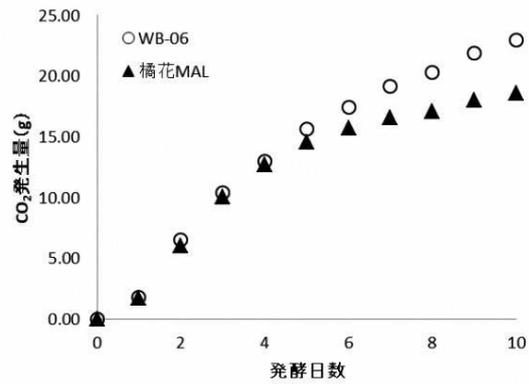


図 6 炭酸ガス発生量

表 12 アルコール分

アルコール分 (v/v%)	
橘花 MAL	4.83
WB-06	5.97

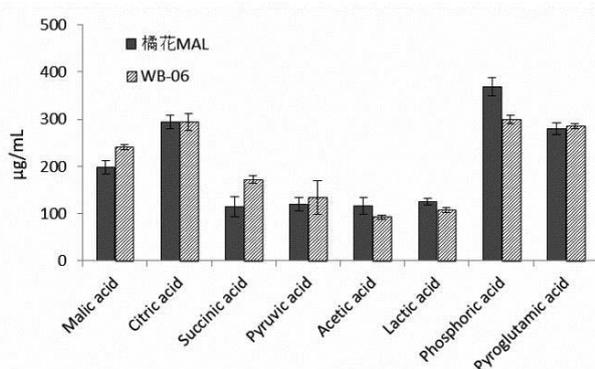


図 7 ビールの有機酸

表 13 香気成分

	(µg/mL)	
	橘花 MAL	WB-06
酢酸エチル	9.9	19.0
プロパノール	11.5	55.0
イソブタノール	12.6	17.6
酢酸イソアミル	0.8	0.7
イソアミルアルコール	51.3	85.3

3.9.2 インディアペールエール (IPA)

主発酵時の重量変化を図 8 に、アルコール分を表 14 に示す。IPA 用の麦汁では US-05 と比較して、橘花 MAL 酵母は発酵が進みにくく、アルコール分が低いことが分かった。

中山らの研究報告¹⁸⁾によると、清酒用酵母の中にはマルトース発酵性があり、麦汁中での発酵は問題なく進むにもかかわらず、ホップを含んだ麦汁の発酵力は弱いものがあるという記述があった。IPA はきわめてホップ量が多いスタイルであるため、ホップにより発酵が阻害された可能性がある。ヴァイツェンビールと IPA で用いられる各麦汁の IBU を表 15 に示す。

IBU (国際苦味単位) とはビールの苦味の程度を表す単位である。ホップから麦汁中へ抽出される苦味成分、イソ α 酸の割合として定義される¹⁹⁾。イソ α 酸にはグラム陽性菌に対する抗菌作用が知られている²⁰⁾。IPA 用の麦汁は、ヴァイツェン用の麦汁より IBU が 3.5 倍程度高い値となっており、イソ α 酸を豊富に含んでいることが分かる。イソ α 酸の抗菌作用により、橘花 MAL 酵母が増殖することができなかつたため、IPA 用の麦汁では発酵が進みにくかつたと示唆される。今後、ホップ量を調整して橘花 MAL 酵母にあったスタイルを検討する必要がある。

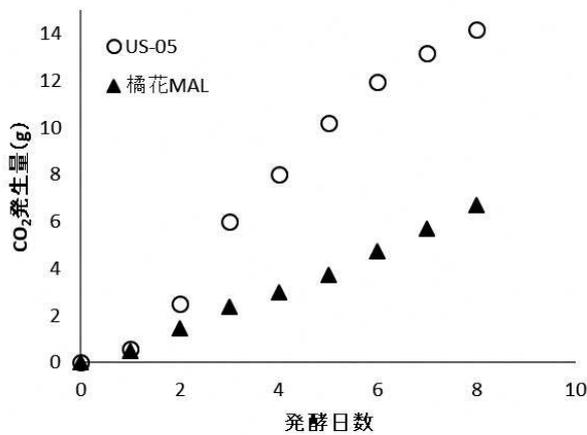


図 8 炭酸ガス発生量

表 14 アルコール分

	アルコール分 (v/v%)
橘花 MAL	4.80
US-05	2.50

表 15 各麦汁の IBU

スタイル	IBU
ヴァイツェン	16
IPA	57

3.10 橘の葉からの乳酸菌取得

採取した 50 の試料から集積培養で pH4.0 以下に低下した試料は 28 検体であった。この検体から BCP 培地に塗抹し、得られたコロニーから 2 株ずつ GYP 培地に植菌し、再び BCP 培地に塗抹した。得られたコロニーの中でグラム陽性かつカタラーゼ反応陰性であった 19 菌株を選抜した。グラム染色した乳酸菌の例を図 9 に示す。遺伝子解析により行った同定結果は表 16 の通りである。

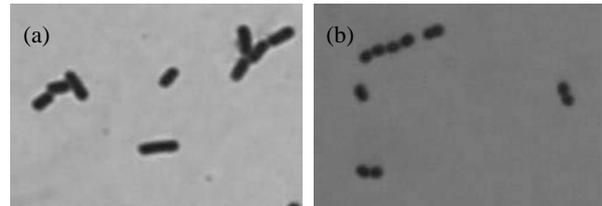


図 9 (a) 橘葉 25 (*Lactobacillus brevis*) , (b) 橘葉 4-2 (*Leuconostoc citreum*) のグラム染色

表 16 橘の葉から分離した乳酸菌

乳酸菌の種類	菌株数
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7
<i>Lactobacillus brevis</i>	1
<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	1
<i>Leuconostoc citreum</i>	2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1
<i>Weissella confusa</i>	3
<i>Weissella cibaria</i>	4

4. 結言

橘を利用した機能性食品の開発を推進するため、橘、四季橘に含まれるフラボノイド類 (NOB, TNG) 含有量の比較、NR の分析を行った。橘に含まれるフロクマリン類含有量を調査した。橘の機能性を調べるため、糖質分解酵素阻害活性、ACE 阻害活性について検討した。また、化粧品、食品への応用が期待される種子油の抽出を試みた。さらに発酵食品へ応用可能な酵母を橘の花から、乳酸菌を橘の葉から分離し、取得した酵母を育種することでマルトース発酵性を付与し、ビール醸造試験を行った。これらの試験から以下の結果を得た。

- (1) NOB, TNG の分析では生育地域による含有量の違いが示唆された。橘、四季橘ともに果皮部に含まれており、橘は四季橘に比べて NOB は 11 倍、TNG は 10 倍多く含まれていることがわかった。
- (2) NR は部位別では果肉部に多く、ウンシュウミカンより 1/15 程度しか含まれていなかった。
- (3) フロクマリン類は Xanthotoxin, BG, DHB のピークは検

出されなかったが, Psoralen と BP は存在していることを確認した.

- (4) 脂質測定の結果, 橘の種子には 37%の脂質が含まれていることを確認した. 焙煎圧搾法では 14%の収率で香ばしい香りのする褐色のオイルが得られた. 常温圧搾法では 7%の収率で黄色のオイルが得られた.
- (5) 糖阻害活性では成熟果, 未熟果のエタノール抽出物にマルターゼ, スクララーゼ阻害活性があることを確認した.
- (6) 成熟果, 未熟果のエタノール抽出物に ACE 阻害活性があることが分かった.
- (7) 橘の花から *Saccharomyces cerevisiae* を 1 菌株分離した.
- (8) 橘の花から分離した酵母を育種し, マルトース発酵性を持った酵母を取得した.
- (9) 橘の花から分離し, 育種した酵母を利用したビール醸造試験を行った. 酵母の特性に合ったビールスタイルの検討が必要である.
- (10) 橘の葉から *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc citreum* 等の乳酸菌を 19 菌株分離した.

謝辞

本研究を進めるにあたり, なら橘プロジェクト推進協議会の城会長をはじめ, 橘試料を提供頂いた関係者, そして近畿大学の米谷教授には, 多大な配慮とご協力をいただき, 深謝いたします.

参考文献

- 1) 矢野昌充, カンキツによるがん予防, 日食工誌, Vol.49, No.3, 139-144 (2002)
- 2) 野方洋一, カンキツ果実の機能性成分の検索とその有効利用に関する研究, 近中四農研報, 5, 19-84 (2005)
- 3) 岡本雄二, 首藤明子, 清水浩美, 橘の機能性成分の調査研究(第 1 報), 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.42, 19-23 (2016)
- 4) 岡本雄二, 清水浩美, 橘の機能性成分の調査研究(第 2 報), 奈良県産業振興総合センター研究報告, No.44, 1-4 (2017)
- 5) 木村美和子, 山西妃早子, 尾崎嘉彦, 実宝智子 ジャバラの脱顆粒抑制作用, 日本食品化学工学会第 50 回大会講演集, 29 (2003)
- 6) 大野一仁, 明賀久弥, 柑橘中のポリメトキシフラボン, 農水産物・加工食品中の健康機能性成分類の分析マニュアル集, 193-199, 四国地域イノベーション創出協議会 (2010)
- 7) 坂牧成恵, 中里光男, 松本ひろ子, 萩野賀世, 平田恵子, 牛山博文, グレープフルーツジュースおよび健康食品中のフラノクマリン類含有量調査, 食品衛生学雑誌, 49 巻 4 号 p. 326-331 (2008)
- 8) 河村幸雄, アンギオテンシン変換酵素阻害食品機能研究法, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, 光琳, 109 - 112 (2000)
- 9) 殿内暁夫, 森山裕理子, 青山嘉宏, 土岐春歌, 白神山地から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の利用, 日本醸造協会誌 111 巻 7 号 437-444 (2016)
- 10) 鶴藺大, 富永 達矢, 仲島日出男, 横堀正敏, 有用機能性酵母の探索と利用, 埼玉県産業技術総合センター研究報告第 3 巻 (2005)
- 11) 安田庄子 北本則行, 花からの *Saccharomyces cerevisiae* の選択的分離と遺伝的多様性, 日本食品科学工学会誌 Vol 58, No 9, 433-439 (2011)
- 12) Patricia Valente, Fabio Castro Gouveia, Glauber Almeida Lemos, Douglas Pimentel, Leda Cristina Mendonga-Hagler, and Allen Norton Hagler, PCR-amplified ITS length variation within yeast genus *Metschnikowia*, J. Gen. Appl. Microbiol., 43,179-181 (1997).
- 13) Srdkan Novak, Tony D Amore, Inge Russell and Graham G. Stewart, Sugar uptake in a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, J. of Industrial Microbiology, 735-39 (1991)
- 14) 関口昭博, 製パン用酵母「美の和酵母」の改良研究, 群馬県群馬産業技術センター研究報告, 9-12 (2008)
- 15) 鈴木雅博, 勝山聡, 岩原健二, 稲村浩宣, 静岡県オリジナルのビール酵母の開発: 微生物ライブラリー候補株を用いたビールの試作, 静岡県工業技術研究所 研究報告 第 11 号, 77-81 (2018)
- 16) 鈴木チセ, 平成 20 年度農林水産省補助事業(食料産業クラスター展開事業) 食品機能性評価マニュアル集第 III 集, 41-48, 社団法人日本食品科学工学会
- 17) 上野勇, 西浦昌男, ザイモグラフィーのカンキツ育種への応用, 果樹試験場報告, B3:1-32, 197
- 18) 中山繁喜, 平野高広, 桜井廣, 清酒酵母によるビール用麦汁の発酵, 岩手県工業技術センター研究報告, 第 7 号 (2000)
- 19) ビール酒造組国際技術委員会, BCOJ ビール分析法の 1997 年度 新設改訂分析方法, 醸協, 第 92 巻, 第 5 号 (1997)
- 20) Sakamoto K, Konings WN. , Beer spoilage bacteria and hop resistance., Int. J. Food Microbiol, 89, 105-124 (2003)