

カンキツリモノイドの抽出技術の開発

(株)和歌山アグリバイオ研究センター 伊福 靖

カンキツ類の苦味成分は、フラボノイド系のナリンジン、ネオヘスペリジンおよびリモノイドに分類される。リモノイドはトリテルペン誘導体の一群であり、ミカン科およびセンダン科の植物に広く存在することが知られている。カンキツ類およびその雑種から、今まで37種類のリモノイドが単離されている。なかでもリモニン、ノミリン、アイチャンゲンおよびノミリン酸は、苦味を有する物質として知られ、とくにリモニン、ノミリンは食用カンキツ類に高い濃度で含有されているため、カンキツの苦味成分として位置付けられてきた。カンキツの果汁加工においては、リモノイドによる苦味発現によって果汁の商品価値低下を余儀なくされ、世界のカンキツ業界にとって深刻な経済的課題である。一方、カンキツの主要なリモノイドであるリモニンやノミリンは、マウスの肝臓、小腸粘膜中でグルタチオンS-トランスフェラーゼを誘導することが報告されている¹⁾また、昆虫に対する摂食阻害作用も見出されており²⁾、殺虫剤として応用される可能性も持っている。現在、カンキツ加工廃棄物は家畜用の飼料として利用されているにすぎないが、将来リモノイドの重要な回収源となる可能性が大きい。

このような背景のもと、リモノイドを簡便に単離するための効率的な抽出・回収技術の確立が必要と考えられる。ここでは、演者らの研究成果を中心にカンキツからのリモノイドの抽出技術について報告する。

1. リモノイドの化学

リモノイドに関する研究は、1970年代から始められたネーブルオレンジ、ナツミカン、ハッサク果汁などを対象とした脱苦味に関する研究が中心であり³⁾、1980年代には樹脂吸着法による工業的な脱苦味工程が確立され⁴⁾、カンキツ搾汁工場に導入されるに至った。これまで、リモノイドの脱苦味方法としてはプレハーベスト法としてカンキツ樹木への薬剤の散布⁵⁾、ポストハーベスト法としてエチレンガスによる処理⁶⁾、果汁処理法として苦味抑制剤の添加^{7,8)}、 β -サイクロデキストリンポリマー⁹⁾、イオン交換樹脂、合成吸着樹脂によるカラム処理^{4,10)}などが報告されている。

カンキツ果汁の苦味のうち、ナリンジンは水溶性であり、爽快な苦味であるのに対して、リモノイドは水不溶性であり、苦味感知後も口内にその苦味が長く残ることが特徴である。果汁中でほとんどの人が苦味を感じる閾値は、ナリンジンが20ppmであるのに対して¹¹⁾、主要なリモノイドであるリモニンは6ppm¹²⁾、ノミリンは3~6ppm¹³⁾という報告がある。図1にリモニン、ノミリンの構造式を示す。リモノイドは4つの環からなる基本骨格を有するが、このうちのA環、D環はラクトン環であり、D環の可逆的開閉は酵素的あるいは化学的に比較的容易に起こる。一般にD環の開環したものをダイラクトン型リモノイド、開環したものをモノラクトン型リモノイドと呼んでいる(図2)。1968年にMaierらによってリモニンは果

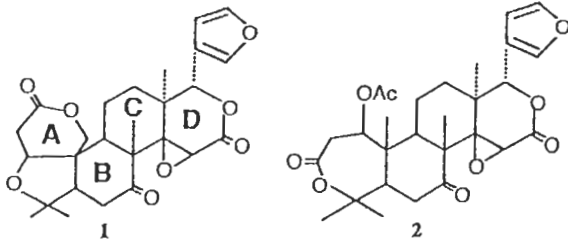


図1 主要なリモノイドの構造

1, リモニン 2, ノミリン

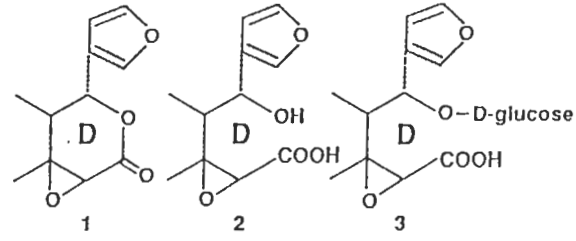


図2 リモノイドD環ラク톤の構造

1. ダイラクトン型リモノイド 2. モノラクトン型リモノイド
3. リモノイド配糖体

実中では苦味のない limonoate A-ring lactone (LARL) として存在し、果実加工され LARL が果汁中に溶出するとその酸性条件下でリモニンへと変化する、いわゆる“delayed bitterness”の機構が報告された¹⁴⁾。長谷川らはネーブルオレンジ果実中のリモニン濃度の季節的变化を調べる過程でリモニンが配糖体としても存在することを発見した¹⁵⁾。構造的にはリモニンのC-17位に1分子のD-グルコースがβ-グルコシド結合している(図2)。これまでカンキツ類及びその雑種から19種のリモノイド配糖体が単離されており、これらすべてのリモノイド配糖体は苦味を持たないことがわかっている¹⁶⁾

2. リモノイドの代謝経路

これまでに、放射性同位体を用いた実験から、カンキツ果実組織では図3のような経路でリモノイドが代謝されることが明らかにされている。リモノイドは莖部で酢酸、メバロン酸などを経てデアセチルノミリン酸にまで合成される¹⁷⁾。この後、デアセチルノミリン酸は果実組織に移動し、果実組織ではデアセチルノミリン酸を出発物質としてリモノイドの代謝が行われる。果実組織中での最初の形態であるノミリンとアグリコンとしての最終代謝物であるリモニンがカンキツ果実中で最も一般的に見出されるリモノイド化合物である。さらに、リモニンは図3の①の経路で示されるようなリモノイドに代謝されることが知られていたが、これらはいずれも果実中には極微量しか含有されず、リモニンの真の最終代謝産物は明らかにされていなかった。しかし、リモノイド配糖体の発見および果実組織中でのリモノイドアグリコンから配糖体の合成の確認により、現在では図3の②の経路が主流であるとされている¹⁸⁾。以前は、その後リモニンが果実組織から種子に移行し、種子にはリモニンが蓄積され、種子は苦くなると考えられていた。しかし、リモノイド配糖体の発見により、果実成熟の後期に果実組織からリモノイドアグリコンが姿を消すのは、グルコシル化によることが判明した。同時に、果実組織で合成されたリモノイドを蓄積するだけであると考えられていた種子もリモノイドの代謝を行うことが明らかとなった¹⁹⁾。従来、種子はリモノイドの蓄積の場であり、種子に含まれるリモノイドは大部分が生化学的に不活性なダイラクトン型であるとされていた。しかし、後述するように、演者らの実験結果から、²⁰⁾種子にも比較的多くのモノラクトン型リモノイドが存在していることが判明した。

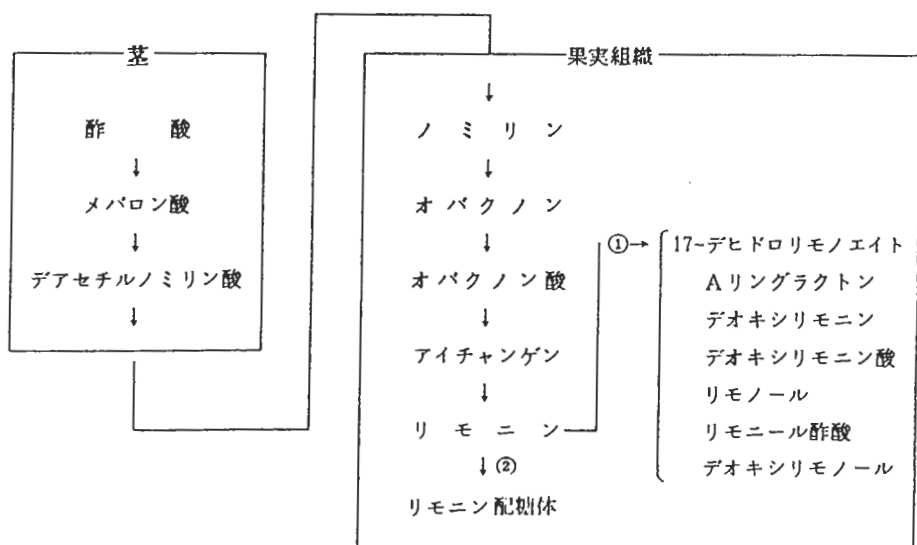


図3 カンキツにおけるリモノイド代謝経路の概略

一方、リモノイド配糖体についても放射性同位体を用いたトレーサー実験から配糖体は果実の成熟にともない、果実と種子の中で合成されることが明らかとなっている¹⁸⁾。また、種子中に存在する配糖体は果実組織とは独立して合成されることも示されている²¹⁾。配糖体はモノラクトン型リモノイドにグルコースが導入されて合成されるが、種子および果実組織での通常のpHのもとではモノラクトン型⇌ダイラクトン型の反応は、ダイラクトン型方向にほぼ不可逆であり、これらの事実も種子中でのモノラクトン型リモノイドの存在を裏付けている。

3. 種子中のリモノイド

カンキツの種子は表1に示したように、かなり高い濃度でリモノイドを含有している。その含量はいずれもリモニンが最も多く、ノミリン、デアセチルノミリン、オバクノンが主要なものである。総リモノイド量としてはグレープフルーツ種子が最も多いが、いずれもリモノイド回収源として優れている。

表1 カンキツ種子中のリモノイド

| 種子 | リモノイド含量 (mg/g) | | | | | |
|-----------|----------------|------|-------|---------|-----------|-------|
| | リモニン | ノミリン | オバクノン | アイチャンゲン | デアセチルノミリン | 合計 |
| 福原オレンジ | 9.77 | 3.88 | 0.37 | trace | 2.14 | 15.92 |
| 日向夏 | 4.68 | 3.73 | 0.28 | trace | 0.35 | 9.04 |
| 三宝柑 | 3.95 | 1.02 | 0.30 | 0.16 | 1.36 | 6.79 |
| 島ミカン | 7.85 | 2.01 | 0.28 | 0.16 | 2.01 | 12.31 |
| グレープフルーツ | 19.06 | 1.84 | 1.86 | trace | 1.10 | 23.86 |
| レモン | 8.95 | 3.03 | 0.58 | trace | trace | 12.56 |
| バレンシアオレンジ | 10.00 | 2.03 | 0.08 | 1.16 | 1.24 | 14.78 |
| タンジェリン | 4.10 | 1.37 | 0.35 | 0.38 | 3.11 | 9.31 |

4. リモノイドの抽出

演者らは、カンキツ種子からリモノイド、特にリモニン、ノミリンの効率的な抽出方法を検討する過程でリモニン、ノミリン、デアセチルノミリン、オバクノンなどの中性リモノイドの収量が抽出方法の違いにより大きく異なることを知り、その要因を明らかにするべく検討を行った。リモノイドの抽出は有機溶媒抽出法、酵素抽出法の二つの方法で行い、その方式を図4に示した。

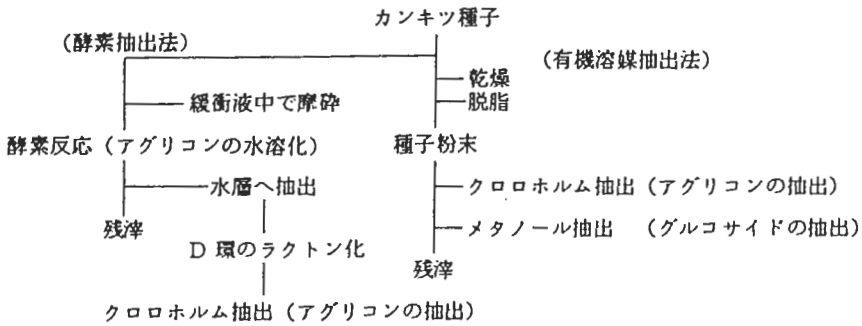


図4 リモノイドアグリコンおよびグルコサイドの抽出法

有機溶媒抽出法は、酢酸エチル、ベンゼン、クロロホルム、塩化メチレン、メタノール、アセトンなど各種溶媒を用い、溶媒を還流させることにより、脱脂乾燥種子粉末からリモノイドの抽出を行った。

酵素抽出法は、カンキツ種子中に存在する酵素リモニンD環ラクトンヒドロラーゼを用いて不溶性のダイラクトン型リモノイドのD環を加水分解し、水溶性のモノラクトン型リモノイドに変換して抽出する方法である。有機溶媒抽出法はダイラクトンを抽出するが、酵素抽出法はモノラクトン、ダイラクトンの双方を抽出することができる。実験結果によると、リモノイドの抽出収量は有機溶媒抽出法に比べ酵素抽出法で著しく高い値が得られた。これはその差に相当するモノラクトン型リモノイドが種子中に存在することを意味する。また、有機溶媒抽出法において、種子の乾燥条件によってもリモノイドの抽出収量は大きく異なることが示された。この結果は、カンキツ種子にはダイラクトン型だけでなく、かなりの割合のモノラクトン型リモノイドが存在することを強く示唆するものである。種子中のダイラクトン、モノラクトン型の比率は種子の成熟度あるいは採取後の保存状態により大きく左右されるものと考えられる。各抽出法によるリモノイドの回収量を表2に示した。検出されたすべてのアグリコンで酵素抽出法の値が溶媒抽出法の値を上回っていた。酵素抽出法は、種子中のリモノイドD環ラクトンヒドロラーゼなどの酵素により、各リモノイドダイラクトンのD環を開環させて水溶性のモノラクトンとして水で補集する形になっている。したがって酵素抽出法ではダイラクトンとモノラクトンの両方を抽出していることになり、回収率も溶媒抽出法に比べて高い値を示したと考えられる。

表2 酵素抽出法および溶媒抽出法による夏柑種子中の中性リモノイド量の比較

| | | リモノイド濃度 (ppm/新鮮重) | | | | | 総 量 |
|-------|-------|-------------------|-------|---------------|-------|---------|-------|
| | | リモニン | ノミリン | デアセチル ノミリン | オバクノン | アイチャンゲン | |
| 酵素抽出法 | サンプル1 | 2,460 | 1,970 | 198 | 172 | tr. | 4,800 |
| | サンプル2 | 2,400 | 1,960 | 198 | 175 | tr. | 4,733 |
| 溶媒抽出法 | サンプル1 | 341 | 263 | tr. | tr. | tr. | 604 |
| | サンプル2 | 1,590 | 1,340 | 69 | 144 | tr. | 3,143 |

カンキツ種子にはダイラクトン型だけでなく、かなりの割合でモノラクトン型のリモノイドも含まれていることが明らかとなった。この割合は種子の成熟度、あるいは採取後の保存状態により大きく左右されるものと考えられる。種子からリモノイドを回収する場合に、モノラクトン型リモノイドをダイラクトン型に変換してやることにより、抽出収量の大幅な向上が図られることが示された。

近年、超臨界炭酸ガスを用いた抽出法が注目されている。この方法は、低温で抽出が行える、抽出溶剤の毒性がない、CO₂と抽出物の分離が容易であるなどの利点を有する事から、その応用が期待されている技術である。演者らは超臨界CO₂抽出法のリモノイドへの適用を試み、供試試料として夏柑種子粉末を用いて抽出したときCO₂単独では各リモノイドの抽出率は有機溶媒抽出法に比べて著しく低かった。そこで抽出率の向上を目的として抽出圧力、温度、時間、エントレーナーの併用およびCO₂量の条件について検討した。その結果、リモノイドの抽出率は抽出圧力とCO₂量に大きく依存したが、抽出温度の影響はほとんど受けなかった。各リモノイドの抽出率は抽出圧力を高めるに従い増加し、300kg/cm²で最高となった。また、

エントレーナーとしてはアセトンを添加したとき最も効果的であった。CO₂の使用量については、その使用量が多いほど高い抽出率が得られ、試料重量に対し50倍量のCO₂量になるまでの変化が大きかった。

最適条件(抽出温度60℃、圧力300kg/cm²、エントレーナー、アセトン3%、CO₂量100g-CO₂/g)における各リモノイドの抽出率はノミリン82.1%、オバクノン38.9%、リモニン19.1%、デアセチルノミリン13.9%であった。リモノイド配糖体については、リモニン配糖体を除き高い抽出率が得られたが、各成分の分画抽出はできなかった(図5)。

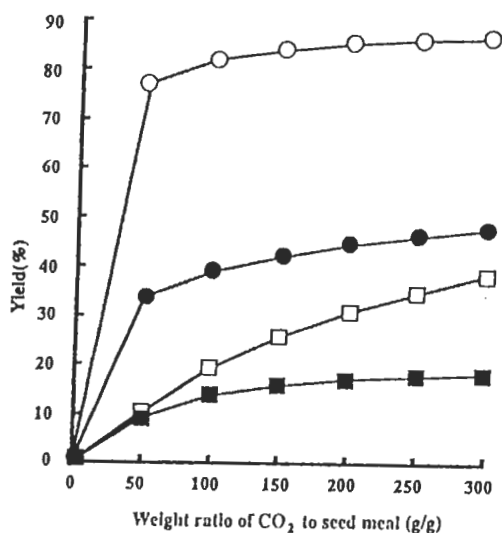


図5 超臨界炭酸ガスを用いたリモノイドの抽出率

■, Deacetylnomillin; □, Limonin;
○, Nonillin; ●, Obacunone.

5. リモノイドの生理活性

これまでに、ベンツピレンなどの化学物質に誘発される腫瘍に対する抑制物質の多くが、解毒酵素であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)の活性を誘導することが見いだされている。リモニンおよびノミリンはフラン環を含む天然物であり、ノミリンの酵素誘導ならびに発がん抑制の作用は、既知の抗腫瘍物質であるブチルヒドロキシアニソール(BHA)に匹敵する効果があり、ノミリンはBHAに比べて3倍量の分子量を持つため、モル濃度当たりではフェノール性抗酸化剤よりもノミリンの方が生理活性は高いと考えられる。LamらのICR/IIaマウスの噴門洞部、小腸粘膜、肝臓のGST活性におよぼすリモニン、ノミリンの誘導効果を表3に示した。肝臓組織ではノミリン5mg, 10mg区でGSTの活性は対照区の2.48倍、3.44倍に増加した。小腸粘膜ではノミリン5mg, 10mg区でそれぞれ3.00倍、4.17倍にGST活性が増加した。

カンキツ果汁中でのリモニンとノミリンの比率はカンキツの種類、収穫時期、搾汁処理後の時間や加熱温度などいくつかの要因によって大きく異なる。しかし、一般的にリモニンの濃度はノミリンの5~10倍とされている。果汁中でのリモニン濃度が6ppmを越えると苦味を感じるといわれており、これら2つのリモノイドの摂取量はさほど多くない。しかしながら、オバクノン、イソオバクノン酸、アイチャンゲンなど他のリモノイドについても、リモニン、ノミリンと同様の酵素誘導活性を示していることから、これらの物質の効果的な予防薬になることが予想される。

最近、リモノイド配糖体も同様の効果を有することがハムスターを用いた実験で発見されており、リモノイド配糖体はオレンジジュース中に平均200ppmも含まれているという報告もあり、リモノイド配糖体が無味であることから機能性食品としての利用の可能性が期待される。

表3 カンキツリモノイドおよびブチルヒドロキシアニソールが ICR/IIa マウス各組織のグルタチオン-S-トランスフェラーゼにおよぼす影響⁴⁾

| 投与物質 | 投与量 | 小腸粘膜 | | 肝臓 | | 噴門洞 | | 肺 | | 結腸 | |
|-----------|--------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| | | GST活性 | 活性比 | GST活性 | 活性比 | GST活性 | 活性比 | GST活性 | 活性比 | GST活性 | 活性比 |
| 対 照 | | 0.33±0.04 | | 1.15±0.19 | | 0.66±0.08 | | 0.36±0.05 | | | |
| B H A | 7.5 mg | 1.08±0.03 | 3.25 | 5.24±0.60 | 4.55 | 0.84±0.18 | 1.29 | 0.45±0.07 | 1.24 | | |
| リモニン | 5 | 0.45±0.08 | 1.33 | 1.29±0.35 | 1.12 | 0.69±0.13 | 1.05 | 0.35±0.11 | 0.98 | | |
| リモニン | 10 | 0.45±0.09 | 1.36 | 1.24±0.23 | 1.08 | 0.60±0.12 | 0.92 | 0.33±0.04 | 0.91 | | |
| リモニン | 20 | 0.49±0.06 | 1.46 | 1.42±0.17 | 1.23 | 0.68±0.20 | 1.03 | 0.34±0.03 | 0.93 | | |
| ノミリン | 5 | 1.00±0.03 | 3.00 | 2.86±0.60 | 2.48 | 0.70±0.16 | 1.07 | 0.34±0.07 | 0.96 | | |
| ノミリン | 10 | 1.39±0.15 | 4.17 | 3.96±0.81 | 3.44 | 0.76±0.15 | 1.16 | 0.39±0.04 | 1.07 | | |
| ノミリン | 20 | 1.50±0.35 | 4.51 | 4.36±1.02 | 3.79 | 0.94±0.39 | 1.43 | 0.32±0.04 | 0.87 | | |
| 対 照 | | 0.75±0.02 | | 2.21±0.21 | | 0.80±0.04 | | 0.50±0.10 | | 0.65±0.03 | |
| ノミリン | 10 | 2.09±0.32 | 2.77 | 6.05±1.08 | 2.74 | 1.04±0.01 | 1.3 | 0.51±0.05 | 1.02 | 0.77±0.13 | 1.18 |
| デアセチルノミリン | 10 | 0.80±0.10 | 1.06 | 3.12±0.62 | 1.41 | 0.99±0.20 | 1.24 | 0.63±0.05 | 1.27 | 0.79±0.05 | 1.22 |
| オバクノン | 10 | 1.24±0.05 | 1.65 | 5.55±0.76 | 2.51 | 1.01±0.02 | 1.26 | 0.50±0.06 | 1.00 | 0.75±0.05 | 1.15 |
| イソオバクノン酸 | 10 | 1.26±0.06 | 1.67 | 7.77±0.39 | 3.52 | 1.17±0.07 | 1.47 | 0.52±0.08 | 1.03 | 0.73±0.09 | 1.12 |
| リモノール | 10 | 0.89±0.10 | 1.18 | 2.65±0.45 | 1.20 | 1.01±0.12 | 1.26 | 0.48±0.08 | 0.96 | 0.66±0.05 | 1.01 |
| デオキシリモニン | 10 | 0.74±0.03 | 0.98 | 2.31±0.21 | 1.05 | 0.84±0.08 | 1.06 | 0.54±0.07 | 1.08 | 0.69±0.06 | 1.05 |
| アイチャンゲン | | 1.10±0.20 | 1.45 | 4.04±0.69 | 1.83 | 1.05±0.02 | 1.32 | 0.54±0.10 | 1.09 | 0.79±0.07 | 1.20 |

(L. K. T. Lam ら, *J. Agric. Food Chem.*, Vol.37, No. 4 (1989) より引用)

6. おわりに

以上述べたように、カンキツ中のリモノイドの生合成経路が明らかになり、リモノイドの蓄積経路が解明された。しかし、リモノイドの効率的な抽出方法はまだ検討段階であり十分な成果が得られていない。だが、リモノイドの蓄積過程の解明により、さらに効率的なリモノイドの回収方法の検討が進められる可能性がある。

一方、カンキツ加工時に排出される搾汁粕は50%以上を占めるが、現在では加熱乾燥され、家畜の飼料として利用されているに過ぎず、副産物の有効利用はほとんど行われていないのが現状である。リモノイドなどの苦味成分は排出される種子および果皮中にその大部分が含有されており、リモノイド抽出用原料素材としての利用の可能性は非常に大きい。これまでの研究成果により、リモノイドの持つ生理活性を利用して抗腫瘍作用を有する機能性食品の開発、昆虫摂食阻害機能を利用した防虫剤の開発など興味深い課題が期待され、さらにはリモノイドの生合成経路に分子生物学的技術を導入することにより、苦味が生成されないカンキツの新品種の開発も現実となろう。

参考文献

- 1) L. K. T. Lam and S. Hasegawa : *Nutr. Cancer*, 12, 43 (1989).
- 2) A. R. Alford, J. A. Cullen, R. H. Storch and M. D. Bentley : *J. Econ. Entomol.*, 80, 575 (1987).
- 3) S. Hasegawa, L. C. Brewster and V. P. Maier : *J. Food Sci.*, 38, 1153 (1973).
- 4) 前田久夫・高橋保男・三宅正起・伊福靖 : *日食工誌*, 31, 414 (1984).
- 5) S. Hasegawa, H. Yokoyama and J. E. Hoagland : *Phytochemistry*, 16, 1083 (1977).
- 6) V. P. Maier, L. C. Brewster and A. C. Hsu : *J. Agric. Food Chem.*, 21, 490 (1973).
- 7) D. G. Guadagni, V. P. Maier and J. G. Turnbaugh : *J. Food Sci.*, 41, 681 (1976).
- 8) M. Misaki, A. Konno, M. Miyawaki and K. Yasumatsu : *Proc. Int. Soc. Citriculture*, Vol.2 p.924 (1981).
- 9) P. E. Shaw, J. H. Tatum and C. W. Wilson : *J. Agric. Food Chem.*, 32, 832 (1984).
- 10) R. L. Johnson, and B. W. Chandler : *J. Sci. Food Agric.*, 33, 287 (1982).
- 11) 福谷敬三・宮本 等 : *日食工誌*, 30, 642 (1983).
- 12) D. G. Guadagni, V. P. Maier and J. C. Turnbaugh : *J. Sci. Food Agric.*, 24, 1277 (1973).
- 13) R. L. Rouseff and R. F. Mathews : *J. Food Sci.*, 49, 777 (1984).
- 14) V. P. Maier and G. D. Beverely : *J. Food Sci.*, 33, 488 (1968).
- 15) S. Hasegawa, R. D. Bennett, Z. Herman, C. H. Fong and P. Ou : *Phytochemistry*, 28, 1717 (1989).
- 16) S. Hasegawa, C. H. Fong, Z. Herman and M. Miyake : 198th National Meeting of
- 17) American Chemical Society, New York, (1991).
- 18) S. Hasegawa, P. Ou, C. H. Fong, Z. Herman, C. W. Coggins, Jr. and D. R. Atkin : *J. Agric. Food Chem.*, 39, 262 (1991).
- 19) C. H. Fong, S. Hasegawa, Z. Herman and P. Ou : *J. Sci. Food Agric.*, 54, 393 (1991).
- 20) 三宅正起, 綾野茂, 尾崎嘉彦, 前田久夫, 伊福靖, 長谷川信, 農化, 65, 987 (1991)
- 21) 前田久夫, 尾崎嘉彦, 三宅正起, 伊福靖, 長谷川信, 農化, 64, 1231 (1990)
- 22) L. K. T. Lam, Y. Li and S. Hasegawa : *J. Agric. Food Chem.*, 37, 878 (1989).