

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：34511

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500983

研究課題名(和文) 柑橘類搾汁残渣の有効利用について

研究課題名(英文) Effective use of citrus juice pulp

研究代表者

堀田 久子 (HOTTA, Hisako)

神戸女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00165002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：柑橘類の搾汁残渣は果汁とほぼ同じ重量で生じ、その処理が問題となっているが、肥料や家畜のエサとして利用されるかゴミとして廃棄されるのが現状である。本研究では、搾汁残渣の有効利用を目的に、温州ミカンの搾汁残渣に水を加えて120℃、30分熱水抽出したものを凍結乾燥し、実験材料とした。ラットを用いた動物実験のために、AIN93Gの基準食、シュークロス25%を含む高糖質食、高糖質食に熱水抽出物を添加した柑橘食の3種を調整し、28日間にわたって摂取させた。結果として、搾汁残渣熱水抽出物は、ビフィズス菌菌数を増加させ、血清中の中性脂肪を熱水抽出物を含まない高糖質食に比べ、有意に減少させた。

研究成果の概要(英文)：As citrus juice pulps are originated from about 50% of total citrus weight, how to process these substances is becoming a problem. At present, these are used as manure, food of livestock or discarded as garbage. In this study, we aimed at effective use of citrus juice pulp. The juice pulp from Citrus unshiu were hot water-extracted at 120C for 30 minutes and lyophilized. We fed a basal diet of AIN-93G, high sucrose diet containing 25% sucrose, high sucrose diet containing 3% of hot-water extracts to Sprague-Dawley rats. We observed the significant increase of the number of bifidobacteria and the significant decrease of serum triglyceride concentration in the rats feeding the high sucrose diets containing 3% of hot-water extracts as compared with the high sucrose diet.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：特殊栄養食品 ビフィズス菌 血清脂質 食物繊維 ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

- (1) 温州ミカンの中果皮(アルベド)から食物繊維を抽出し、0.1%の割合でこれを添加した液体培地中に、ヒト由来のビフィズス菌 (*Bifidobacterium longum* JCM1217)を加えて培養すると、その菌数は既知のビフィズス菌増加活性をもつラクチュロースに比べ、有意に増加した。これを受けて、アルベド由来の食物繊維を1%の割合で飼料に添加し、4週間にわたってラットをもちいた動物実験をおこなったところ、アルベドを含まない飼料で飼育したラットに比べ有意に盲腸内容物中にビフィズス菌数が増加し、血清中のトリグリセライド濃度は有意に減少した。このような研究成果は得られたものの、アルベドを集め、そこから食物繊維を抽出する操作は時間を費やすばかりか、酵素などの試薬に経費を必要とした。
- (2) そこで温州ミカンの搾汁残渣に注目した。搾汁残渣には、果皮や種、じょうのう膜などが含まれている。したがってアルベド食物繊維も残存しているはずであり、先の実験と同様の結果が望めると予想した。それに加えて、そこに存在するポリフェノールがさらなる効果を発揮するのではないかと期待した。

2. 研究の目的

- (1) 温州ミカンに限らず、柑橘類の搾汁残渣はゆずを除いて有効な再利用の道が開かれていない。その理由は、ポリフェノールのために苦味が強いことと、乾燥した状態の形状が非常に不均一であることだと思われる。しかし、ここから香気成分や精油成分を抽出しようとする試みは、各地の工業試験所で行われているが、ヒトを対象にした食品を開発しようとする試みはない。
- (2) 古くは、漢方薬として温州ミカンを乾燥させた陳皮を用いてきた歴史がある。

ヒトの口に入るものを開発しようという試みは、荒唐無稽ではない。特に腸内環境を改善する効果をもつビフィズス菌の増殖活性と、血清脂質の改善効果に注目した。

3. 研究の方法

(1) 搾汁残渣の処理

搾汁残渣に含まれるポリフェノールと食物繊維の両方を同時に抽出できる方法として熱水抽出法を選択した。100gの乾燥搾汁残渣に2リットルの水をくわえ、120-30分オートクレーブ処理をおこなった。従来の水抽出ではペクチン等水溶性食物繊維だけが、エタノール抽出ではポリフェノールだけが抽出されると考えたからである。抽出後の溶液をろ過により沈殿を除き(ろ紙, Advantec No.1 使用)ろ液を凍結乾燥した。得られた粉末の、試料分析としてビタミンC、還元糖、タンパク質、ポリフェノール、食物繊維(水溶性、不溶性食物繊維に分けて分析)の含量を調べた。

(2) 動物実験

凍結乾燥標品をフードプロセッサーにより粉碎し、十分に均一化したものを動物実験に使用した。動物実験には、4週令の雄性Sprague-Dawley (SD)ラット(日本クレア株式会社)を購入した。室温22-24℃、相対湿度50%、明暗周期12時間サイクル(a.m.7:00 on, p.m.7:00 off)の条件下で28日間飼育した。市販の固形飼料CE-2(日本クレア株式会社)で4日間予備飼育したのち、精製飼料にて飼育した。飼料と水は自由に摂取させ、週に3回、体重と飼料摂取量を測定

した。実験飼料投与後の 25～27 日目の 3 日間、ラットの糞便を回収し、27 日目から 18 時間絶食とした。飼料組成は次の表に示す。

表 1 飼料組成

	コントロール群	高糖質群	温州ミカン群
カゼイン	20	20	20
コーンスターチ	51.246	36.2486	33.2486
コーン油	6	6	6
スクロース	10	25	25
セルロース	5	5	5
A IN 9 3 ミネラル混合	3.5	3.5	3.5
A IN 9 3 ビタミン混合	1	1	1
L - システイン	3	3	3
酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
搾汁残渣熱水抽出物	0	0	3
合計	100	100	100

コントロール群は、アメリカ栄養研究所発表の AIN93G に従った幼若ラット用のバランス食、高糖質群はスクロース 25% の高糖質群であり、過剰の糖質摂取により血清脂質濃度が上昇するように仕向けた。麻酔方法は、イソフルラン(和光純薬)で吸入麻酔したのち、ペントバルビタールナトリウム(関東化学)を 50mg/kg の割合で腹腔内に注射した。麻酔が十分でない場合には、イソフルランを吸入させた。腹膜を切開して腹部大静脈から血液を採取した。採血した血液は 3500 回転で 10 分間遠心分離したのち、血清だけを採取してマイナス 20 で冷凍保存した。完全に脱血したのち、肝臓、盲腸、生殖器脂肪を採取し、重量を測定した。盲腸は取り出したのち切開して、pH を測定したのち、盲腸内容を 0.2g とりだし、嫌気性検体希釈液に懸濁した。この懸濁液を使って培養法と Fish 法により、盲腸内容物中のピフィズス菌の増加について調べた。使用した培地として、TOS プロピオン酸寒天培地(ヤクルト薬品)はピフィズス菌・乳酸菌用、DHL 寒天培地(日水製薬)は Enterobacteriaceae 用、m-CP 寒天培地(関東化学)はクロストリディウム用である。Fish 法については、ピフィズス菌個々の塩基配列の DNA に蛍光試薬 Cy3 を化学結合させたプローブ(シグマに合成依頼)と細菌全体が染色できる DAPI(同仁化学研究所)を使用した。血清トリグリセリド、血清コレステロール、血糖値、HDL コレステロールの測定は和光純薬のキットを用いて行った。肝臓は Folch 法に従い総脂質を抽出し、総脂質中のトリグリセリド、コレステロールを血清の時と同様に測定した。3 日間採取した糞便は 107、17 時間乾燥させたのち、重量を測定した。ミルミキサーで粉碎したのち、0.1 g とって脂質を抽出し、これについてもトリグリセリドとコレステロールを測定した。本実験は、平成 24 年と 25 年に実施した。

4. 研究成果

(1) 試料分析

温州ミカン搾汁残渣に水を加えて、120 30 分のオートクレーブ処理を行って得た熱水抽出物の試料分析結果を表 2 に示す。オートクレーブ処理を行っても、総ポリフェノールやビタミン C は残存していることが明らかとなった。

表 2 温州ミカン搾汁残渣熱水抽出物

の試料組成 (mg / 試料 1 g)

還元糖	586 ± 29
タンパク	85 ± 5
総脂質	49 ± 18
システロール	0.42 ± 0.12
総ポリフェノール	107 ± 5
ビタミン C	1.1 ± 0.1
不溶性食物繊維	70 ± 24
水溶性食物繊維	68 ± 21
その他*	76.9

* 1g から今回の分析項目の合計を引いたもの

(2) 動物実験結果

温州ミカン搾汁残渣熱水抽出物で飼育したラットの動物実験結果について表 3 に示す。

表 3 動物実験結果

	コントロール群	高糖質群	温州ミカン群	
体重(g)	319.2 ± 6.4*	339.3 ± 19.9	332.6 ± 16.5	
体重増加量 (g/日)	7.68 ± 0.28	8.16 ± 0.71	7.83 ± 0.53	
飼料摂取量 (g/日)	26.71 ± 2.17	26.57 ± 2.25	28.68 ± 3.13	
飼料効率	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.04**	0.27 ± 0.02 ^b	
肝臓重量 (g)	10.65 ± 2.58	12.62 ± 2.22	11.98 ± 1.64	
生殖器周囲脂肪重量 (g)	3.36 ± 0.93	3.59 ± 1.33	3.75 ± 0.51	
血清	Glu(mg/dl)	123 ± 9 ^a	125 ± 49 ^a	89 ± 13 ^b
	TG(mg/dl)	93 ± 26	123 ± 40	94 ± 20
	Cho(mg/dl)	85 ± 31	98 ± 28	93 ± 22
	HDL-Cho(mg/dl)	49 ± 16	55 ± 16 ^a	53 ± 10 ^b
肝臓	TG(mg / 肝臓 1 個あたり)	135 ± 37 ^a	252 ± 108 ^b	132 ± 36 ^a
	Cho (mg) / 肝臓 1 個あたり	29 ± 7	35 ± 12 ^a	25 ± 4 ^b

* 平均 ± 標準偏差、** 異なる肩字に有意差あり

(3) 温州ミカン搾汁残渣のビフィズス菌増殖効果について

培養法による腸内細菌分析結果および Fish 法によるビフィズス菌分析結果を表 4 に示す。

ビフィズス菌は高糖質群に対し有意に増加し、乳酸菌は高糖質群に対し有意に減少した。

表 4 - 1 培養法による腸内細菌分析結果 (Log CFU / 盲腸内容物 1g)

	ビフィズス菌	乳酸菌	Enterobacteriaceae	Clostridia
高糖質群	8.50 ± 1.31 ^a	11.02 ± 0.74 ^a	8.94 ± 1.47	9.13 ± 1.19
温州ミカン群	9.27 ± 1.27 ^b	9.97 ± 0.58 ^b	8.01 ± 1.44	9.36 ± 0.39

異なる肩字で有意差あり

Fish 法によるビフィズス菌分析結果を表 4 - 2 に示す。蛍光染色はビフィズス菌個々の塩基配列に蛍光試薬 Cy3 を結合させたもので染色された菌数を、細菌全体が染色される DAPI による染色菌数で割ったものであらわした。

表 4 - 2 Fish 法によるビフィズス菌分析結果 (Cy3 / DAPI)

高糖質群	0.169 ± 0.053 ^a
温州ミカン群	0.224 ± 0.048 ^b

異なる肩字で有意差あり

Fish 法においても、温州みかん群で高糖質群にくらべ有意にビフィズス菌が増加していた。

(4) 考察

温州ミカン搾汁残渣の熱水抽出物の凍結乾燥標品のポリフェノール含量は、生果実 1g あたり約 6 mg にくらべ⁽²⁾、搾汁残渣では 1g あたり 107 mg と大幅に濃縮されていた。温州ミカン搾汁残渣熱水抽出物による動物実験では、飼料効率、血糖値や肝臓 TG、肝臓 Cho の有意な低下がみられた。温州ミカンジュースの凍結乾

燥標品を市販のラット飼料と混合し、糖尿病モデルラットである GK ラットに与えると、体重増加が抑えられ、10 週間の摂取で耐糖能が改善するとの報告がある⁽³⁾。搾汁残渣熱水抽出物の今回の結果は、ポリフェノールをはじめとするファイトケミカルの混合物によるものと思われ、今後は液体クロマトグラフィーを用い 詳細な分析を行う予定である。一方、温州ミカン搾汁残渣熱水抽出物によるビフィズス菌増加活性については、すでに 報告した温州ミカンアルベド食物繊維によるビフィズス菌増加活性⁽⁴⁾を裏付けるもので、熱水抽出物に含まれる食物繊維がビフィズス菌増加活性を有していると考えられる。

引用文献

- (1) 村田武 : 食と農を結ぶ活力ある J A づくりのために 2008、2008. 1. 8、農業協同組合新聞、社団法人農協協会
- (2) Y. Nogata, K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. Yano, H. Ohta : Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 178-192, 2006
- (3) M. Sugiura, K. Ogawa, M. Yano : Effect of Chronic Administration of Fruit Extract (Citrus unshiu Marc.) on Glucose Tolerance in GK Rats, a Model of Type 2 Diabetes. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70, 293-295, 2006
- (4) Emiko Iwata, Hosako Hotta, Masahiro Goto :

Hypolipidemic and Bifidogenic Potentials in the Dietary Fiber Prepared from Mikan (Japanese Mandarin Orange : *Citrus unshiu*) Albedo. J Nutr Sci Vitaminol, 58, 175 – 180, 2012 ,

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Emiko Iwata, Hosako Hotta, Masahiro Goto : Hypolipidemic and Bifidogenic Potentials in the Dietary Fiber Prepared from Mikan (Japanese Mandarin Orange : *Citrus unshiu*) Albedo. J Nutr Sci Vitaminol, 査読あり , 58, 2012 , 175 – 180

〔学会発表〕(計4件)

西村 優希、稲垣 佳映、堀田 久子 : 柑橘類搾汁残渣のプレバイオティクス効果の検討、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 31 日、酪農学園大学

西村 優希、稲垣 佳映、堀田 久子 : 柑橘類搾汁残渣の健康増進効果の比較、第 60 回日本栄養改善学会学術総会、2013 年 9 月 14 日、神戸国際会議場

橋詰 真紀、稲垣 佳映、堀田 久子 : 晩柑搾汁残渣熱水抽出物のコレステロール低下効果について、第 59 回日本栄養改善学会学術総会、2012 年 9 月 13 日、名古屋国際会議場

堀田 久子、橋詰 真紀、稲垣 佳映 : 晩柑搾汁残渣オートクレーブ抽出物の生理活性について、第 65 回栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、お茶の水女子大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀田 久子 (HOTTA, Hisako)

神戸女子大学・家政学部・教授

研究者番号 : 0 0 1 6 5 0 0 2