

亜熱帯果実及びきんかんを利用したワイン及びリキュールの開発*

岡崎 益己^{*1}・柏田 雅徳^{*1}・日高 照利^{*2}・水谷 政美^{*1}・工藤 哲三^{*1}

Development of wines and liqueurs made from subtropical fruits and kumquats

Masumi OKAZAKI, Masanori KASHIWADA, Terutoshi HIDAKA,
Masami MIZUTANI and Tetsuzo KUDO

本県ではフルーツランド構想のもとで県産リゾート果実及びきんかんの生産が拡大してきている。

本研究では、これらの果実を利用してリキュールの試験醸造を行い、各製成酒のアンギオテンシン変換酵素阻害活性を比較したところ、きんかんリキュールが25.9%で最も高い阻害率を示した。また、きんかん果実中からACE阻害物質を見だし、FAB-MS測定によりその分子量を決定した。

さらに、浸漬時間等の異なる各きんかんリキュールのACE阻害率と阻害活性画分（E5⁻）のHPLCクロマトグラム上の各ピーク面積との関係について調べたところ、E5⁻の各ピーク面積と各きんかんリキュールのACE阻害率に高い相関（ $R^2 = 0.93$ ）が認められた。

キーワード：亜熱帯果実、きんかん、リキュール、ACE阻害活性

1 はじめに

県産リゾート果実のうち生産拡大が図られているマンゴー、スターフルーツ果実や全国一の栽培実績があるきんかんの高付加価値化、原料特性を活かした製品化を目的に11年度より県産リゾート果実及びきんかんを利用したワイン及びリキュールの試験醸造を行ってきた^{1),2)}。今年度は、これらの果実を利用した製成酒のACE阻害活性を比較した。また、きんかん果実からACE阻害物質を見出した。さらに、浸漬期間等の異なるきんかんリキュールのACE阻害率と阻害活性画分のHPLCクロマトグラム上の各ピーク面積との関係等について調べたので報告する。

2 実験方法

2-1 各製成酒のACE阻害活性

アンギオテンシン変換酵素（以下ACEと略す）は高血圧の引き金となる酵素であり、その阻

害物質は、血圧上昇抑制作用が期待できる。

今回は亜熱帯果実及びきんかんを利用した各リキュールの機能性を明らかにするために、ACE阻害活性を調べ阻害率の比較を行った。

2-1-1 供試試料（製成酒）

供試試料は、平成11年度及び12年度試験醸造で製造したマンゴー、スターフルーツ及びきんかんリキュールを用いた。

2-1-2 試料調整及び測定

各製成酒は果汁割合がそれぞれ異なるため、果汁割合の最も少なかったきんかんリキュールにあわせるため、他のリキュールを適宜水で希釈、調整後、さらに水で20倍希釈し、0.45 μ フィルターろ過したろ液を試料溶液とした。アンギオテンシン変換酵素阻害活性の測定は、堀江ら³⁾の方法に準じ以下の方法で行った。

酵素基質：Hipparyl-His-Leu（2 mgに対しリン酸緩衝液1mlの割合で溶解した溶液-4.7mM）

酵素：（和光 ウシ肺製）0.2Uに蒸留水8 ml加えて溶解した溶液（0.025U/ml）

上記の酵素基質を0.1ml、酵素溶液を0.1ml及び試料溶液0.05mlを混合し、37℃で30分間反応

* 亜熱帯果実及びきんかんを利用したワイン及びリキュールの開発（第3報）

* 1 応用微生物部

* 2 食品開発部

を行った。反応は0.3M - NaOH1.5mlを用いて終了させた。反応終了液に2%オルトフタルアルデヒド(メタノールに溶解)を0.1ml入れVortexで10秒攪拌し、正確に10分後3M-HCL0.2mlを加え反応を停止した。この液を水で250倍に希釈し、60分後の蛍光強度(励起波長360nm 蛍光波長480nm)(b)を測定した。阻害率は阻害剤なしで反応したときの酵素基質、酵素溶液、水の組み合わせ蛍光強度(a)及び酵素基質、水、試料溶液の組み合わせ蛍光強度(c)とし、次のように求めた。

$$\text{ACE阻害率(\%)} = (1 - (b - c)/a) \times 100$$

2-2 きんかん果実中の機能性成分(アンギオテンシン変換酵素阻害物質、 α -グルコシダーゼ阻害物質及び抗酸化物質)の探索について

果実の消費拡大には、果実の健康増進効果を明らかにする必要がある。今回は、前報²⁾で最もACE阻害率(相対値)が高い値を示したきんかん果実についてACE阻害物質の検索を行った。併せて各画分の α -グルコシダーゼ阻害活性及び抗酸化活性を調べた。

2-2-1 原料きんかん及び粗サンプルの調整

原材料きんかんは、経済連宮崎の完熟きんかんを使用した。活性試験に供する試料は、きんかん果実を乳鉢で磨砕し、うち果汁7gを採取し試料とした。

2-2-2 きんかん果汁の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフィーによる分画

試料(きんかん果汁)7gを多孔質合成吸着樹脂

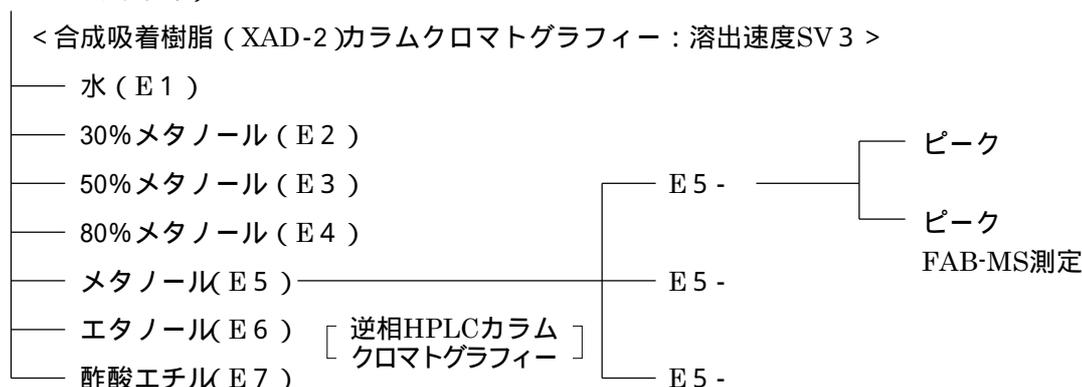
脂(XAD-2 オルガノ株製)カラムクロマトグラフィー(層高150mm)を行うことで表1のとおり分画した。溶出は水(E1)、30%メタノール(E2)、50%メタノール(E3)、80%メタノール(E4)、メタノール(E5)、エタノール(E6)及び酢酸エチル(E7)の順序で行った(溶出量は何れも120ml)。また、溶出速度はSV3とし、得られた各画分(E1~E7)を70 減圧乾固後、水及び80%エタノール水溶液で各画分を7mlに定容し試験液とした。

2-2-3 各画分(E1~E7)の抗酸化活性、ACE阻害率及び α -グルコシダーゼ阻害活性

2-2-2で得られた試験液を次のとおり調整した。抗酸化活性測定は80%エタノール水溶液で3倍希釈、ACE阻害活性測定はHEPES緩衝液で2倍希釈し試料溶液とした。また、 α -グルコシダーゼ阻害活性は50%ジメチルスルホキシド水溶液で20倍希釈し定容することで試料溶液とした。各画分(E1~E7)の抗酸化活性測定は前報²⁾に準じ、ACE阻害活性測定は堀江ら³⁾の方法に準じて行った。 α -グルコシダーゼ阻害活性の測定は川端ら⁵⁾の方法に準じて以下のとおり行った。基質としてはシュクロースを用い、標準反応液組成は、60mM基質溶液(シュクロースを0.1Mリン酸カリウム緩衝液pH6.3に溶解したもの)0.7ml、(各画分E5~E7分画成分を濃縮乾固してから50%ジメチルスルホキシド水溶液で20倍に希釈定容)0.2ml、 α -グルコシダーゼ酵素液(TOYOBO製0.02U)0.1mlとした。これを37、15分間反応

表1 きんかん果汁の多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフィー等による分画

(きんかん破碎果汁)



させ、2 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) 1.5ml を用いて反応を停止させ試験液とした。次に発色試薬〔グルコース B テストワコー (和光純薬製)〕2.0ml に試験液 0.5ml を加え 37 °C で 30 分間インキュベートした後、490nm の吸光度を測定した。基質溶液の代わりに 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH6.3) を加えた時の吸光度をブランク値とし、この値を差し引いた値を A490s とした。試験液の代わりに 50% ジメチルスルホキシド水溶液を加えた時の吸光度をコントロール値 (A490c) とし、下式により α -グルコシダーゼ阻害活性を求めた。

α -グルコシダーゼ阻害活性 (%)

$$= [(A490c - A490s) / A490c] \times 100$$

2 - 2 - 4 逆相 HPLC による ACE 阻害活性画分の精製及び各画分の ACE 阻害率

多孔質イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーで分画した各画分のうち、ACE 阻害活性の最も高かった画分 (E5) について逆相 HPLC を十数回繰り返して、活性画分を更に E5-1 ~ E5-3 の 3 画分に分画し、各画分の ACE 阻害活性を測定した。

逆相 HPLC : SHIMADZU SPD10A システム

カラム : NaviC30 (4.6mm × 150mm)

移動相 : MeOH/H₂O = 70/30.

流速 : 0.5ml/min.、検出 : 340nm.

注入量 : 20 μ l

E5-1 画分については更に逆相 HPLC を十数回繰り返して、主要ピークを単離回収した。

2 - 2 - 5 FAB-MS 測定による ACE 阻害物質の分子量の決定

質量分析は JEOL 製質量分析計 JMS-AX505W を用い、単離・回収した主要ピークについてグリセロールをマトリックスとして、FAB-MS 法により分子量を測定した。

2 - 3 逆相 HPLC による各きんかんリキュールの ACE 阻害活性画分の各ピーク面積と ACE 阻害率との相関について

2 - 3 - 1 きんかんリキュールの試験醸造原料果実

供試果実は宮崎県高千穂産の完熟きんかんを用いた。

2 - 3 - 2 基本仕込配合及び原料処理

各きんかんリキュールの基本仕込配合を表 2 にまとめた。また、原料処理及び浸漬期間は表 3 のとおりとした。

表 2 基本仕込配合

項目	配合量
果実	0.5kg
麦焼酎 (AL44%)	0.5L
糖類	0.2kg

表 3 原料処理及び浸漬期間

NO	原料果実処理方法	浸漬期間
1	果実原形のまま	20日
2	果実原形のまま	30日
3	果実原形のまま	40日
4	二つ切り	30日

2 - 3 - 3 各きんかんリキュールの ACE 阻害活性

2 - 3 - 2 の製造方法により得られた各製成酒の試料調整及び ACE 阻害活性測定は 2 - 1 の方法に準じて測定し、各きんかんリキュールの ACE 阻害活性を比較した。

2 - 3 - 4 逆相 HPLC による各きんかんリキュールの ACE 阻害活性画分 (E5-1) 及び阻害物質 (ピーク) のピーク面積と ACE 阻害率との関係

各きんかんリキュール (NO1~4) を水で 20 倍希釈調整後、0.45 μ l フィルターろ過したろ液を試料溶液とした。これらを 2 - 2 - 4 と同様のカラム条件により分析し、各きんかんリキュールの E5-1 画分のピーク面積和及びピーク 1 の面積を求め、ACE 阻害活性との相関について調べた。

3 結果及び考察

3 - 1 各製成酒（リキュール類）のACE阻害活性測定結果

結果を表4に示す。今回の各製成酒のなかでは、きんかんリキュールが25.9%で最も高い阻害率を示した。前報2)において示した原料果実のACE阻害率を反映する結果となった。

表4 各製成酒のACE阻害率(%)

試料名	ACE阻害率(%)
マンゴーリキュール	18.4
スターフルーツリキュール	22.8
きんかんリキュール	25.9

添加量は1.5mgの各試料に相当
この数値が高いほど血圧上昇抑制作用の可能性が高いことを示す。

3 - 2 きんかん果汁の機能性成分の特定・単離

3 - 2 - 1 きんかん果汁の各画分における抗酸化活性、ACE阻害活性及び α -グルコシダーゼ阻害活性

結果を図1及び図2に示す。ACE阻害活性及び抗酸化活性のいずれも図1のとおりE5画分(メタノール溶出画分)が最も高い活性を示した。 α -グルコシダーゼ阻害活性については、E1~E4画分はHPLCによる糖分析によりシュクロース及びグルコースを含んでいることが判明したため測定から除き、E5~E7について α -グルコシダーゼ阻害活性を測定した。図2のとおりE6画分(エタノール溶出画分)が最も高い活性を示した。

3 - 2 - 2 逆相HPLCによるACE阻害活性画分(E5-)の精製及び各画分のACE阻害率測定結果

結果を図3に示す。多孔質合成吸着樹脂による分画において最も阻害率の高かったE5画分のうち逆相HPLCによる分画ではE5-画分(Rt4.0~12.0)のACE阻害率が22.3%と最も高い値を示した。

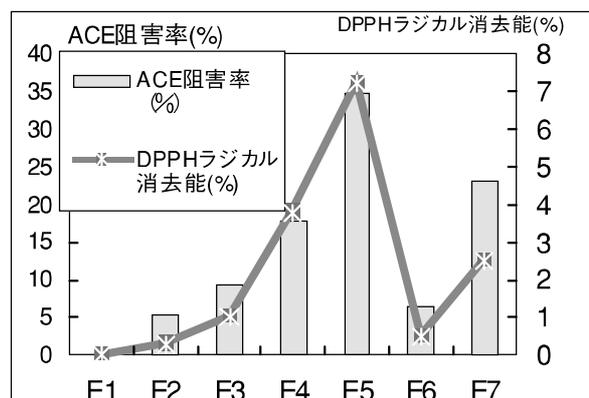


図1 各溶出画分の抗酸化活性及びACE阻害率

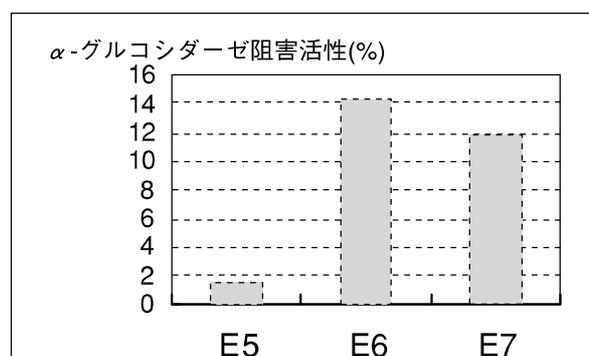


図2 各溶出画分の α -グルコシダーゼ阻害活性

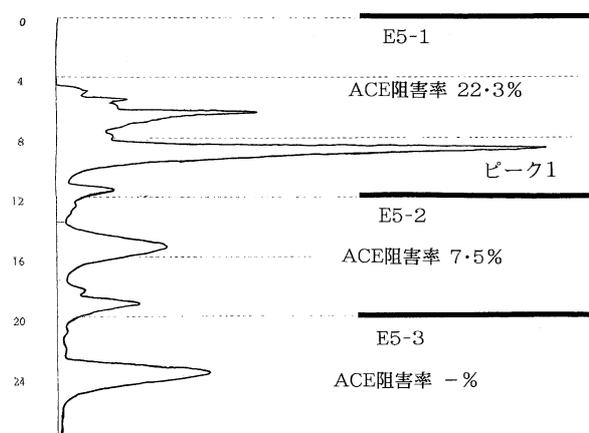


図3 E5画分の逆相HPLCクロマトグラム

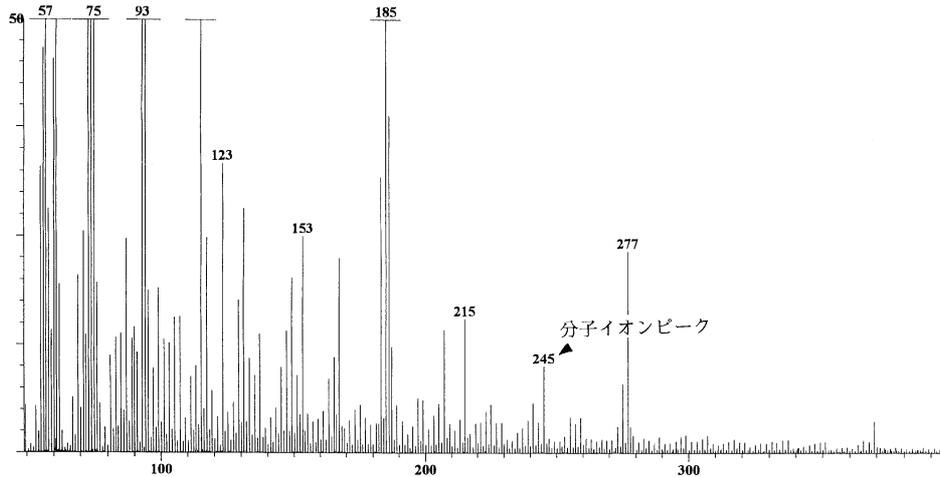


図4 FAB-MS法によるピーク の正イオンFABスペクトル

表5 各きんかんリキュールのACE阻害率(%)

NO	ACE阻害率(%)
1	8.0
2	14.6
3	29.2
4	37.6

添加量は1.5mgの各試料に相当

m/z245 (M + H)⁺ に特徴的な分子イオンピークを検出したため、ACE阻害物質の分子量を244と推定した。

3 - 3 リキュールのACE阻害率と阻害活性画分
3 - 3 - 1 各きんかんリキュールのACE阻害率測定結果

結果を表5に示した。基本配合は同一でも浸漬期間や原料処理条件等の違いがきんかんリキュールのACE阻害率に影響を与えることが示唆された。

3 - 3 - 2 逆相HPLCによる各きんかんリキュールのACE阻害活性画分のピーク面積とACE阻害率との相関

図5にきんかんリキュールについてのACE阻害率とACE阻害活性を有する画分(E5- : Rt 4.0~12.0)の各ピーク面積の相関関係を示す。相関係数は0.9以上と高い相関が認められた。また、E5-画分の主要ピークであるピークの面積との相関も0.81であり高かった。

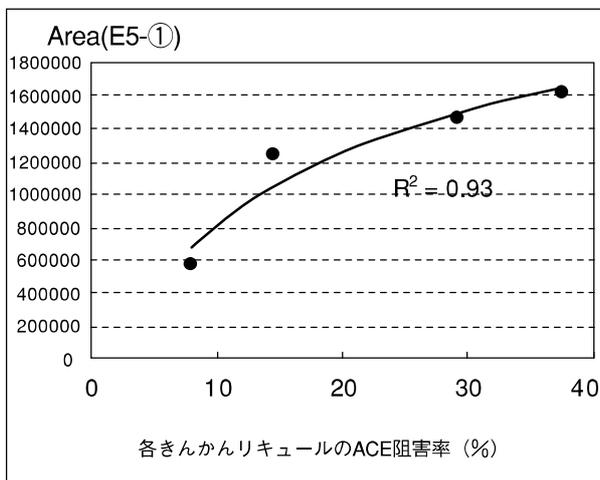


図5 ACE阻害活性とE5-画分のピーク面積

3 - 2 - 3 FAB-MSによるACE阻害物質の分子量の測定

E5画分のうちACE阻害率が最も高かったE5-画分の主要ピークについてFAB-MS及びFrit-FAB LC/MSで分子量を調べた。ピークのFAB-MSスペクトルについては、図4に示す。

4 まとめ

- (1) 亜熱帯果実及びきんかんを利用したりキュールのACE阻害率を相対比較したところ、きんかんリキュールが25.9%で最も高い阻害率を示した。
- (2) きんかん果実から、多孔質合成吸着樹脂カラムクロマトグラフィー、逆相HPLCを行ってACE阻害物質を単離し、FAB-MSにより阻害物質の分子量を推定した。分子量は244 (Rt

8.7) であった。

- (3) 浸漬期間や原料処理条件がきんかんリキュールのACE阻害率に影響を与えることが示唆された。また、きんかん果実のACE阻害物質の単離精製過程で明らかになったACE阻害活性画分(E5-)の各ピーク面積ときんかんリキュールのACE阻害率に高い相関($R^2 = 0.93$)が認められた。

単離した阻害物質(ピーク)のピーク面積と各きんかんリキュールのACE阻害率との相関も0.81であり高かった。

5 参考文献

- 1) 岡崎益己・柏田雅徳・日高照利・松田儀四郎・二見久雄；宮崎県工技センター・食品開発センター研究報告 第44号 p119~p124 (1999)
- 2) 岡崎益己・柏田雅徳・日高照利・松田儀四郎・二見久雄；宮崎県工技センター・食品開発センター研究報告 第45号 p145~p152 (2000)
- 3) 食品の機能性評価マニュアル集(農林水産省農林水産技術会議事務局 1999) p117~p121
- 4) 田口ら：特開2001-240539
- 5) 川端ら：特開2000-229875(P2000-229875A)