

# 柑橘類果皮含有カロテノイドのバイオ変換技術の開発による高付加価値化

静岡県立大学 食品栄養科学部  
原 清敬

## 1. 研究の目的と背景

柑橘類は、飲料、食品や香料として私達の生活に根付いた果物の一種である。しかし、ほとんどは果実のみが利用され、果皮に関しては有効活用されていないのが現状である。一方、アスタキサンチンは、魚の色揚げ剤のほか、最近ではその抗酸化力の高さから医薬品や健康食品への利用も注目されている。本研究では、アスタキサンチンの生産能力を有することが知られている唯一の酵母である、*Xanthophyllomyces dendrorhous* (赤色酵母) の発酵に柑橘果皮を用い、生育とアスタキサンチン生産への影響を調べ、柑橘果皮の発酵原料としての利用の可能性について検討を行った。

## 2. 研究の方法

乾燥した柑橘果皮をミキサーやピーズショッカーを用いて細かく破碎し、その柑橘果皮粉末を蒸留水などに添加し、オートクレーブによる高温滅菌にて抽出された溶液を柑橘果皮培地と位置づけ、赤色酵母を 22°C, 250 rpm, 72 h の条件で培養を行った。24 時間毎にサンプリングを行い、分光光度計による細胞濃度 (OD<sub>600</sub>) の測定と HPLC による菌体内のアスタキサンチン量の測定を行い赤色酵母の発酵原料としての柑橘果皮の可能性について評価を行った。

### 2-1. 実験材料

#### 1) 柑橘類果皮サンプル

清水太田ポンカン (静岡県農林技術研究所果樹研究センターおよび静岡県立大学食品栄養環境科学研究院 若林敬二先生よりご提供)

#### 2) 使用酵母

赤色酵母:*Xanthophyllomyces dendrorhous* (NBRC 10129 株)

### 2-2. 培地の作製方法

#### 1) SD 培地

ガラス製容器にグルコース 20.0 g/L, Yeast Nitrogen Base (YNB) 6.7 g/L を加え、メスシリンダーと蒸留水 (DW) を用いて規定濃度に調製した。その後、容器の蓋をアルミホイルで覆い、オートクレーブ (120°C, 20 min) にて滅菌を行い、SD 培地を調製した。

#### 2) 柑橘類果皮抽出液

滅菌前の蒸留水または培地に乾燥ポンカン果皮を適量加え、オートクレーブによる滅菌後にクリーンベンチ内で 50 mL の遠沈管に移し、遠心分離 (9,000 rpm, 10 min, 4°C) 後、その上清をポンカン果皮抽出液または柑橘果皮抽出物含有培地とした。本研究の結果を示す際に、たとえば 10 g/L のポンカン果皮抽出液といった場合、乾燥ポンカン果皮 10 g を蒸留水に加え 1 L にメスアップし、上記のように調製した溶液を示している。

### 2-3. 培養方法

YM (5.0 g/L Triptone, 3.0 g/L Yeast extract, 3.0 g/L Malt extract, 10.0 g/L D-Glucose) 寒天プレートに赤色酵母 *X. dendrorhous* (-80°C にてグリセロールストックとして保存) を播種し、22°C で 3 日間保温した。複数のコロニーを試験管内の YM 培地 5 mL に植菌し、22°C, 250 rpm, 往復振盪で 24 時間培養した。前培養液を細胞濃度 (OD<sub>600</sub>) が 0.15 となるように 50 mL 三角フラスコ内の各種培地 10 mL に添加し、22°C, 250 rpm, 回転振盪にて 72 時間培養した。24 時間ごとにサンプリングし、下記の方法にて細胞濃度 (OD<sub>600</sub>) を測定した。

### 2-4. 分析方法

#### 1) 細胞濃度 (OD<sub>600</sub>) 測定法

サンプリングした培養液 20 μL ~ 100 μL を、DW で任意の濃度に希釈後、吸光度計を使用し波長 600 nm にて希釈溶液の濁度を測定し、そのサンプリング時での細胞濃度とした。

#### 2) アスタキサンチンの測定法

72 時間目にサンプリングした菌液 1 mL を遠心分離 (8,000 × g, 10 min, 4°C) し、上清を取り除いた。沈殿物 (細胞ペレット) に 5.0 mm, 0.6 mm のジルコニアピーズ (それぞれ 1 個, 0.2 mL チューブ 1 杯分) とアセトン 500 μL を加え、マルチピーズショッカーにて菌体を破碎 (1,500 rpm, 30 s / 0 rpm, 30 s を 15 回繰り返した)。破碎液を遠心分離 (16,000 × g, 10 min, 4°C) 後、上清を 0.2 μm フィルターを使用してろ過し、HPLC (カラム: Devosil ODS-HG-5 (野村化学), 移動相: アセトニトリル/メタノール/イソプロパノール (85:10:5), 流速: 0.8 ml/min, 検出波長: 471 nm, 注入量: 20 μL) にてアスタキサンチン濃度を測定した。

### 3. 研究内容

#### 3-1. 赤色酵母の細胞濃度に与えるポンカン果皮抽出物の影響

最小培地であるSD培地にポンカン果皮抽出物を含む培地を用い、培養後72時間目における細胞濃度(OD<sub>600</sub>)を測定した。その結果、柑橘果皮の添加量が増加することにより、細胞濃度が増加した。また、10~40 g/L添加範囲における細胞の増加率の伸びに比べ、40~50 g/L添加範囲における増加率の伸びが低下した。

本結果より、ポンカン果皮に含まれる成分が赤色酵母の細胞増殖を高める効果をもつ可能性が考えられる。

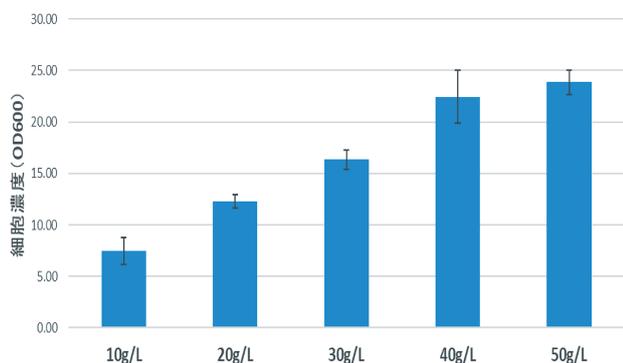


図1 赤色酵母の細胞濃度に与えるポンカン果皮抽出物の影響

#### 3-2. ポンカン果皮成分の培地成分代替効果の検証

次に、ポンカン果皮に含まれる成分が最小培地中の成分を代替できるかについて調べた。酵母の最小培地としてよく用いられるSD培地は、炭素源として20 g/Lグルコースを含み、窒素・ミネラル源として6.7 g/L YNBを含む。そこで、これらをポンカン果皮由来成分が代替可能であるか調べるため、SD培地からグルコースを抜いた培地やYNBを抜いた培地にポンカン果皮を40 g加えてオートクレーブにて高温高圧抽出したポンカン果皮抽出物含有培地や、単にポンカン果皮40 gを蒸留水に加えて高温高圧抽出したポンカン果皮抽出液を用いて、赤色酵母 *X. dendrorhous* の培養を行った。さらに、ポンカン果皮40 gに含まれていると考えられるペクチン12.5 gにYNBを加えた培地についても試験した。

以下に得られた結果を列挙する。

- 赤色酵母 *X. dendrorhous* を植菌していない柑橘果皮添加培地では、濁度(OD<sub>600</sub>)が増加しないことから、柑橘果皮抽出物自身による濁度変化の影響はない(data not shown)。
- 窒素およびミネラル源であるYNBを含んでいない柑橘果皮添加培地PD培地を用いた結果、赤色酵母がYNBを含むSPD培地やSP培地と同様に、SD培地よりも約1.7~2.0倍増加することがわかった。本結果より、40 g/Lの柑橘果皮抽出液には赤色酵母が増

殖するのに十分量の窒素およびミネラル源が含まれていると考えられる。

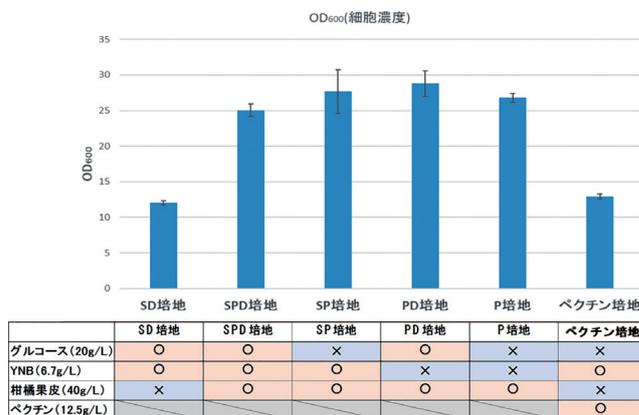


図2 ポンカン果皮成分の培地成分代替効果

### 4. 研究の実施経過

#### 4-1. 赤色酵母のアスタキサンチン生産に与えるポンカン果皮抽出物の影響

3-1のポンカン果皮の最適添加濃度決定実験において培養開始72時間後にサンプリングした菌体内のアスタキサンチン濃度と細胞濃度(OD<sub>600</sub>)の両方を比較した。ポンカン果皮40 g/L添加培地にてアスタキサンチン濃度が最も高くなった。細胞濃度(OD<sub>600</sub>)の結果を加味した際、ポンカン果皮40 g/LをSD培地に添加することで菌体量、アスタキサンチン総量がともに増加したことから、ポンカン果皮40 g/Lを最適添加濃度に決定した。

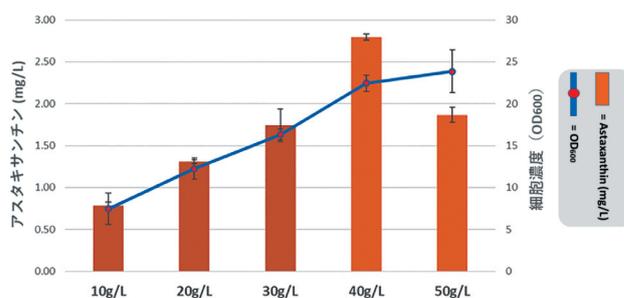


図3 赤色酵母のアスタキサンチン生産に与えるポンカン果皮抽出物の影響

アスタキサンチン濃度測定の結果から柑橘果皮による赤色酵母の増殖の向上に伴い、アスタキサンチン総量が増加していることがわかった。このことから柑橘果皮は赤色酵母のアスタキサンチン合成に悪影響は与えていないことがわかった。しかし、当初想定していた「柑橘果皮に含まれるカロテノイド類が赤色酵母のアスタキサンチン合成中間体として利用されることで赤色酵母あたりのアスタキサンチン量が増加する」という結果は得られなかった。

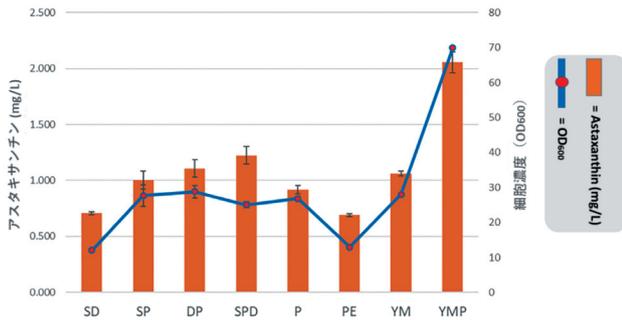


図4 赤色酵母のアスタキサンチン生産に与えるポンカン果皮抽出物およびその他の成分の影響

#### 4-2. ポンカン果皮由来成分のみを用いた赤色酵母によるアスタキサンチン生産

前回までの実験で、ポンカン果皮抽出液のみを水に添加したP培地を作製し、赤色酵母の発酵資源として利用しアスタキサンチン生成に成功した。そこで、これまでのポンカン果皮抽出液濃度である40 g/Lと50 g/Lより、さらに濃度を高くし、培地内の栄養源分の濃度を高くすれば、赤色酵母の生育が向上しアスタキサンチン生成量の増加に繋がることが期待される。今回の実験ではポンカン果皮抽出液濃度を50 g/Lよりも高くし、ポンカン果皮を利用したさらなるアスタキサンチン生成の増加を目的とした。

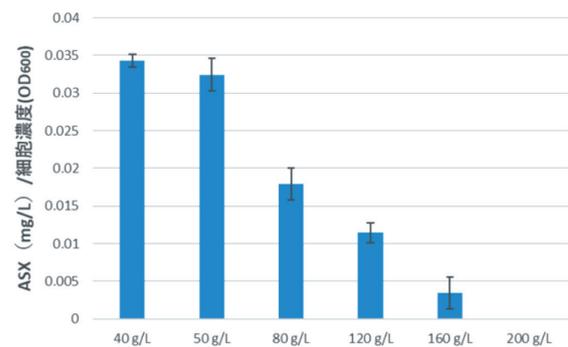
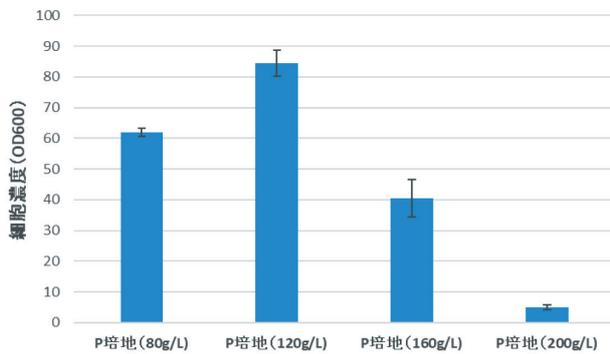


図5 高濃度のポンカン果皮抽出物の影響 (左図：細胞増殖, 右図：アスタキサンチン (ASX) 生産性)

測定の結果から、ポンカン果皮抽出液の添加により赤色酵母の菌体量の増加は確認できたが、細胞あたりのアスタキサンチン生産量の増加を確認することはできなかった。しかし、ポンカン果皮抽出液 80 g/L を含む培地ににて菌体量が最も多くなり、赤色酵母の培養の面で考えるとポンカン果皮濃度 80 g/L が最適添加濃度であると考えられる。

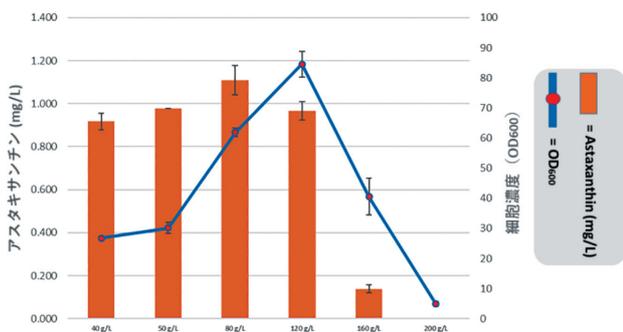


図6 赤色酵母のアスタキサンチン生産に与える高濃度ポンカン果皮抽出物の影響

#### 5. 研究から得た結論・考察

最小培地であるSD培地を基準とし、ポンカン果皮抽出液を添加した培地では、ポンカン果皮抽出液が増すごとに細胞濃度 (OD<sub>600</sub>) が高くなった。次に、酵母の生育に必須となる炭素源、窒素源およびミネラル源がポンカン果皮抽出液に含まれているかを、SD培地に含まれる炭素源であるD-Glucoseや、窒素およびミネラル源であるYeast Nitrogen Base (YNB)の代わりにポンカン果皮抽出液を加えた培地等を用いて培養を行い、ポンカン果皮抽出液が炭素源または窒素・ミネラル源として使用できるか調べた。その結果、ポンカン果皮抽出液には、酵母の増殖に利用可能な炭素源や窒素・ミネラル源が含まれていることを確認できた。また、培養の結果、ポンカン果皮成分を占める多糖類のペクチンが酵母の炭素源として利用できることがわかり、特にペクチンに含まれる単糖であるアラビノースが、赤色酵母の増殖に最も寄与していることが示唆された。さらに、ポンカン果皮抽出液が赤色酵母のアスタキサンチン生産量に及ぼす影響について調べたところ、ポンカン果皮抽出液の添加量の増加に伴い、アスタキサンチン総量は増加した。

## 6. 残された問題, 今後の課題

本研究では, ポンカン果皮抽出液の添加による赤色酵母の細胞あたりのアスタキサンチン量は 変化しなかったため残された問題であるが, 少なくとも食品廃棄物である柑橘果皮の 1 つであるポンカン果皮が赤色酵母のアスタキサンチン発酵資源として有用であることを示すことができた. ポンカン果皮以外の柑橘果皮が, 赤色酵母のアスタキサンチン発酵資源として利用可能であるかについては今後の課題である.