カキ果皮からβ-クリプトキサンチン含有物の抽出と食品への応用

高橋　英史*，稲田有美子*，井土　良一*

Extract Containing β-Cryptoxanthin Component from Persimmon Peel and Applied to Foods

Hidehito Takahashi*, Yumiko Inada* and Ryouich Izuchi*

The purpose is health promotion of consumer and demand expansion of persimmon by using functional ingredient of persimmon. A persimmon includes β-cryptoxanthin is said to control a incidence of cancer. The concentration of β-cryptoxanthin was 0.97 mg/raw-flesh-100 g and 8.36 mg/raw-peel-100 g in the sweet persimmon variety Fuyu (*Diospyros kaki* L.f. 'Fuyu'). The astringent persimmon variety Atago (*Diospyros kaki* L.f. 'Atago') was 0.80 mg/raw-flesh-100 g and 8.80 mg/raw-peel-100 g. The practical extraction methods of β-cryptoxanthin from the persimmon peel (*Diospyros kaki* L.f. 'Ichida') were studied. For using the extract containing a β-cryptoxanthin as food additive, it has to be extracted by ethanol and its aqueous solution as solvent.

According to that way, the β-cryptoxanthin in the extract from the peel of Atago was 78.4 mg/100g. The extract resisted heating at the time of juice processing, and was able to dissolve in ice cream and yoghurt. Because the extract containing β-Cryptoxanthin was dispersed by using emulsifier, it was suggested that enable β-Cryptoxanthin to mingle with various foods.

Key words：β-cryptoxanthin，persimmon fruit，peel，processing residue，extract，functional food，ice cream，yougrt，dispersion

カキは生食用として年間20万トンほど国内流通しているが未利用物も多い．国内で充分な生産が可能でありながら，容器詰飲料・食品等の加工原料としてあまり用いられていない．その理由は，カキ果肉のpHがミカン科やバラ科の果実と異なり中性で，水分活性を低下させて保存する乾燥法以外では，加熱が必要となり，加熱により干し柿様の香りを呈し，用途を狭めているからである．

甘柿，渋柿を問わず，カキにはプロビタミンA特性や発がん抑制作用[1]のある，カロテノイド類のβ-クリプトキサンチンが存在する．これは，果肉より果皮に多く分布している．

カキのへたや葉は漢方薬として使われている．干し柿加工時に排出される果皮は年間10000トンとの報告[2]があるが，果皮は殆ど利用されていない．果皮が魚の飼料に使えても家畜飼料に使えないのは，カロテノイド類の影響で卵や乳が黄ばみ易くなるためである．果皮の処分は産廃業者に委託しているのが現状である．

カキ果皮からβ-クリプトキサンチン含有物を抽出し，飲食物製造に利用出来れば，消費者の健康増進，カキの需要増，加工残渣の減少につながる．ただし，β-クリプトキサンチンは脂溶性であるため，製造には工夫が必要である．

本報では，カキに含まれるβ-クリプトキサンチンの濃度，経口摂取用β-クリプトキサンチン含有液の製造法とその応用について検討した結果を報告する．

実験方法

1．供試材料と試薬

カキの含有するβ-クリプトキサンチンの濃度測定には，甘柿として当所農場で収穫した富有（*Diospyros kaki* L.f. 'Fuyu'）を用い，渋柿として愛宕（*Diospyros kaki* L.f. 'Atago'）を最寄りの市場より購入し実験に供した．

加工残渣である果皮からの抽出・分画実験には，干し柿加工時に排出された長野県産の市田（*Diospyros kaki* L.f. 'Ichida'）の果皮を用いた．果皮は，ごみ除去後，むしろに敷いて10～15℃のもと7日間天日干しにて乾燥させた．

バレンシアオレンジ果汁は市販の濃縮還元果汁を用いた．

試薬はβ-クリプトキサンチンはフナコシ製を，*n*-ヘキサン（特級），エタノール（特級），塩化ナトリウム（特級），水酸化カリウム（特級），酢酸アンモニウム（特級），メタノール（HPLC用），ブチルヒドロキシトルエン（特級，以下BHT）は和光純薬製を，メチル *t*-ブチル エ

＊：東洋食品研究所　食品加工研究室

ーテル（HPLC用，以下MTBE）はアルドリッチ製を，珪砂はシグマアルドリッチジャパン製を用いた．

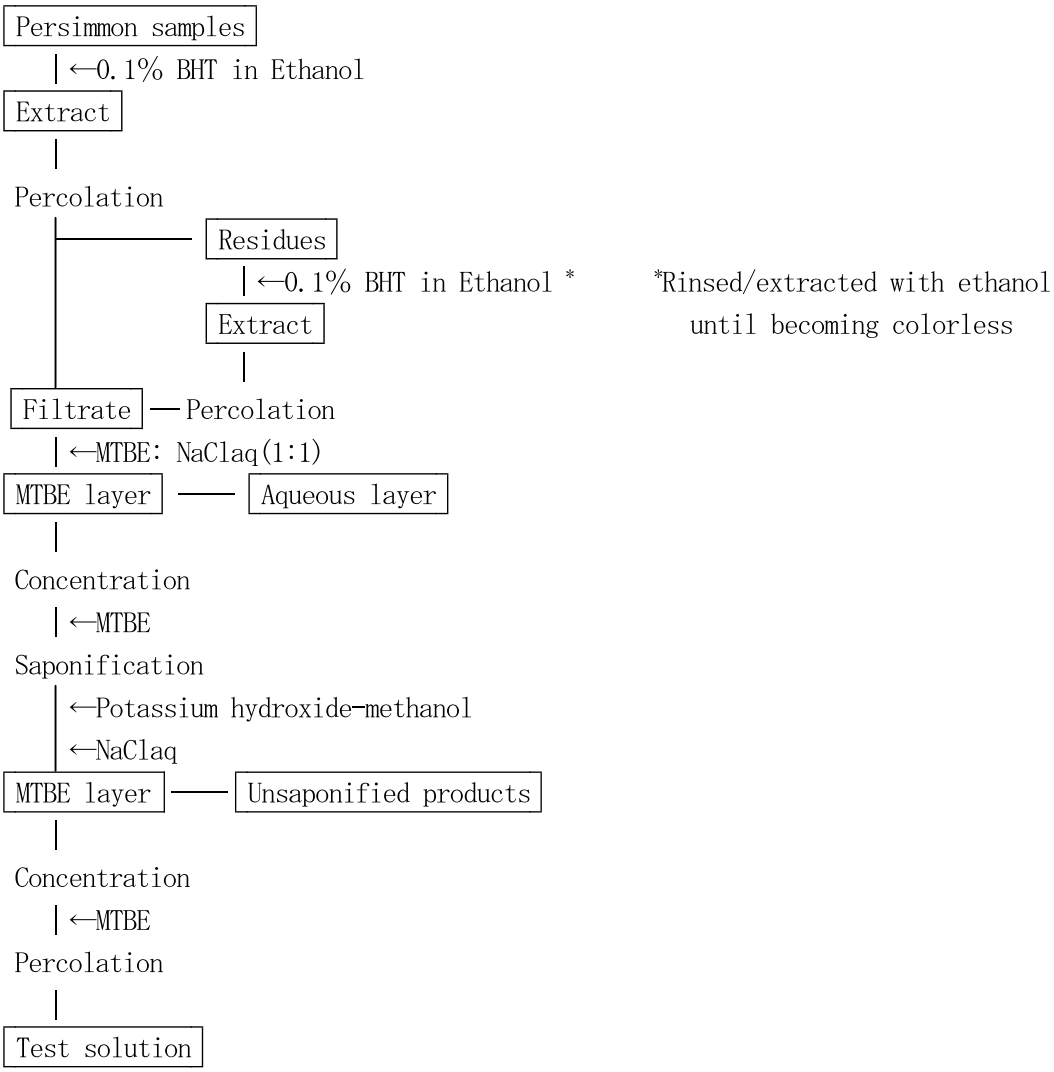
2．カキ果皮からの抽出方法

1）β-クリプトキサンチン濃度測定のための抽出

β-クリプトキサンチン濃度は，MTBE等の有機溶媒を用い，柿から全量抽出し測定した．抽出法は**Scheme 1**に示した．食品に添加する場合は後述のように水とエタノールのみで抽出した．

‘富有’および‘愛宕’のカキ果皮をそれぞれ陶製の包丁で剥皮後，細断した．果肉をサンプルとする場合は10 g，果皮をサンプルとする場合は5 gを乳鉢に量りとり，0.1% BHT添加のエタノール15 mLと珪砂1 gを加え，すり潰し，ガラスフィルターを用い吸引ろ過した．残渣を集め，色がなくなるまでBHT入りエタノールで洗浄抽出した．洗液を最初の抽出液に合わせた．ろ液を分液漏斗に移し，等量のMTBE，飽和食塩水を添加後，振盪してβ-クリプトキサンチン成分をMTBE層に分配した．このMTBE層に再度飽和食塩水を加え，振盪しβ-クリプトキサンチン含有成分をMTBE層に分配した．MTBE層を減圧下で濃縮後，MTBEにて20 mLに定容し抽出液を得た．

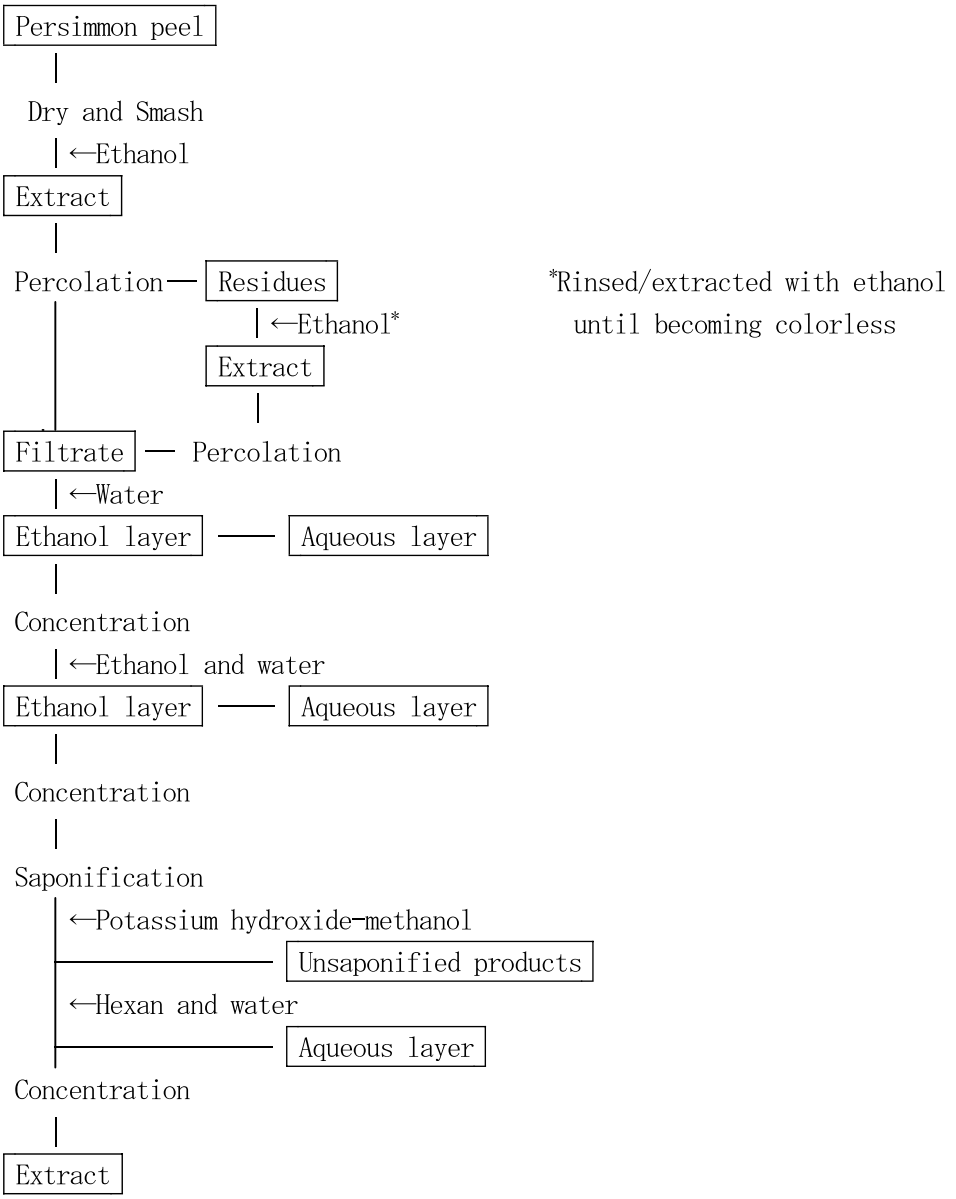
β-クリプトキサンチンのケン化は，抽出液10 mLと10%水酸化カリウム･メタノール溶液10 mLを分液漏斗にとり，窒素雰囲気下で振盪後，室温で1時間静置することで行った．ケン化後溶液に10 mLの水を加え振盪後，水を除去し，次いでMTBE層に飽和食塩水を10 mL加え振盪後，アルカリ分を除去した．MTBE層を減圧下で濃縮後，MTBEにて10 mLに定容した．0.2 μmメンブランフィルターでろ過後，HPLC供試液とした．



Scheme 1　Extraction scheme for the concentration measurement of β-Cryptoxanthin

2）干し柿加工時の残渣である果皮からβ-クリプトキサンチン含有溶液の抽出と分画

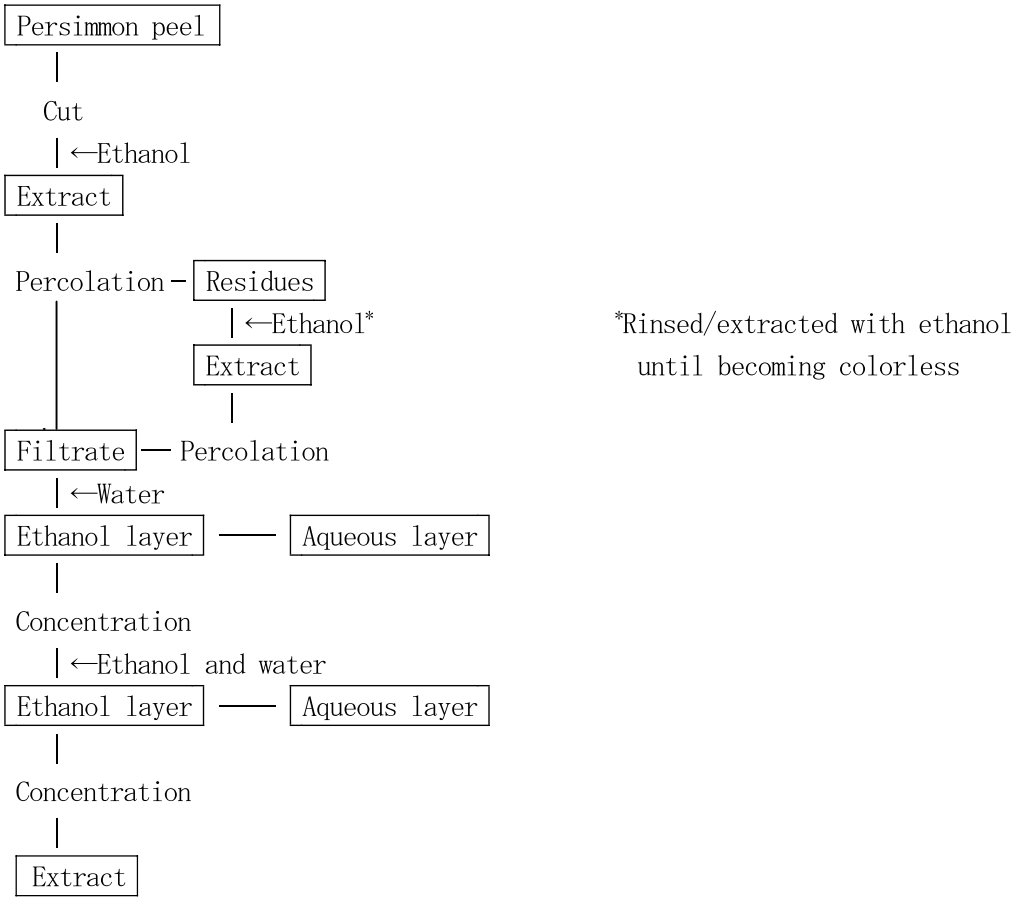
加工残渣からβ-クリプトキサンチンの分画を目的としてScheme 2に示す方法で抽出を行った．天日乾燥後のカキ果皮をミルサーで粉末化した．実験に供するまで－20℃で保管した．粉砕し易くするため実験前日より－40℃で保管した．カキ果皮粉末97.0 gを99.5%エタノールと共に乳鉢で磨砕しながら抽出操作を行い，抽出液を吸引ろ過した．残渣の色調の黄色が薄くなるまでエタノールを用いた抽出操作を繰り返し，洗液を最初の抽出液と合わせた．ろ液に水を添加し振盪後，水溶性画分を除去し，減圧濃縮した．減圧濃縮物に再度，99.5%エタノールと水を加え振盪，水溶性画分を除去後，減圧濃縮し，これをβ-クリプトキサンチン含有物とした．さらに，ケン化後，水とヘキサンを加え分液して水溶性成分を除去し，ヘキサン層を回収した．得られた溶液を濃縮乾固した．



Scheme 2　Extraction scheme from the persimmon peel

3）カキ果皮由来のβ－クリプトキサンチン含有の経口摂取用抽出液の調製

経口摂取用のβ-クリプトキサンチン含有抽出液はScheme 3に示した方法で“愛宕”の生の果皮2007 gからエタノールで調製した*1．エタノールは5000 mL準備し，不足分は減圧濃縮時に回収したエタノールを使用した．果皮を陶製ナイフで細刻後，アジテータでエタノールと共に粉砕後，吸引ろ過した．粉砕物を乳鉢にとり，粉砕物の色調が白くなるまでエタノールと共に磨砕した．粉砕物からの洗液と最初の抽出液を全て合わせ，ナスフラスコに入れ減圧濃縮した．濃縮時に揮発したエタノールは冷却し捕集した．この時点では濃縮液は干し柿様の臭いを呈した．濃縮物を再度エタノールで洗浄,ろ過して夾雑物を分画除去，洗浄液を減圧下で濃縮する作業を数回繰り返し，最終的にエタノール100 gにて定容した干し柿臭のないカキ果皮由来の抽出液を得た．



Scheme 3　Extraction scheme from the persimmon peel for orally ingestion

3．β-クリプトキサンチンの分画

β-クリプトキサンチン含有画分の分画はシリカゲルクロマトグラフィを用いて行った．移動相はScheme 2で得た抽出物の各種溶媒を用いた薄層クロマトグラフィ（TLC）のRf値より選択した．その結果，ヘキサン：エタノール＝20：1を用いて行うことにした．

その他の分画条件は，ガラスカラム径30 mm，ゲル長150 mm，ワコーゲルC-200（活性化処理：150℃・2時間），流速：0.3～0.5滴/秒．画分はそれぞれ濃縮乾固し，HPLCを用いてβ-クリプトキサンチン濃度を測定した．

＊1：天然物から経口摂取用の抽出物（食品添加物）を得る場合，法律上（食品添加物公定書の製造基準），一部例外（ウコン抽出物を含む27種類の抽出物と天然香料74種類）を除き，溶媒には水とエタノールしか使えない．医薬・化粧品はこれに該当しない．

4．β-クリプトキサンチン標品の濃度検定と濃度測定用HPLC条件

1）濃度検定

β-クリプトキサンチン標準品をn-ヘキサンに溶解し451nmの吸光度を測定後，β-クリプトキサンチンの吸光度係数の文献値（$E^{1\%}_{1cm}$＝2460）を用い[3]，標準溶液中のβ-クリプトキサンチン濃度を次式より求めた．

$$A = E \times c\,(\%) \times l\,(cm)$$

A：吸光度　　E：比吸光度
c：物質のモル濃度　　l：溶液層の厚さ

次に標準溶液のn-ヘキサンをエバポレータで捕集除去後，MTBEで同濃度に戻し，MTBEで2，20，200倍に希釈し，それらの20 μLをHPLCに供し，各ピーク面積から検量線を作成した．標準品はわずかにα-クリプトキサンチンを含むため（β-クリプトキサンチンのピーク面積）/（β-クリプトキサンチンのピーク面積＋α-クリプトキサンチンのピーク面積）により補正した．

2）HPLC分析条件

オーブン温度以外のHPLC分析条件および濃度補正は隅田らの方法[4]に準じ行った．条件は，以下の通りとした．カラム：YMC社製　Carotenoid 5 μ C_{30}（4.6 mmI.D.×250 mm），HPLC：島津製作所製　HPLC-20A，検出器：島津製作所製SPD-20AV，移動相：A溶媒メタノール：MTBE：水：酢酸アンモニウム＝81：15：4：0.1（v/v/v/w），B溶媒メタノール：MTBE：酢酸アンモニウム＝10：90：0.1（v/v/w），タイムプログラム：0～30分までBが0～85%，50分にBが100%，70分で終了，流速：1.0 mL/min，オーブン温度：32℃，検出波長：450 nm，注入量：20 μL．

5．飲食品への添加

1）飲料への添加

Scheme 3の方法で経口摂取用として，カキ果皮より抽出した“愛宕”果皮由来抽出液1 gを市販のバレンシアオレンジ果汁99 gに添加し，バレンシアオレンジ果汁での歩留まりを測定した．

さらに同割合で添加したサンプルをキャップ付き試験管に入れ，ウォーターバスを用い，品温が90℃に達してから5分間加熱した．温度はあらかじめキャップを貫通させ固定した温度計で測定した．加熱後のβ-クリプトキサンチン濃度をHPLCにて測定した．

2）β-クリプトキサンチン入りバニラアイスクリームの試作

卵黄80 gとグラニュー糖120 gを混合，白色化し粘性がつくまでハンドミキサで泡立てた．そこに沸騰直前で加熱を止め加温しておいた牛乳400 gを少量ずつ加えながら撹拌した．弱火で加熱しながら泡立て，トロミがついた時点で氷水にて冷却した．

生クリーム10 gにβ-クリプトキサンチンとして1 mg（愛宕果皮由来の抽出液1.28 g）を添加・混合，6～8分立てまで泡立てた生クリーム90 gを添加・混合した．この生クリームに，冷却しておいた卵黄・グラニュー糖・牛乳の混合物，バニラエッセンス6振り（0.4 g）を添加，食塩で温度低下させた氷水上で，2時間ハンドミキサで撹拌した．－20℃の冷凍庫に30分間入庫後，取り出して撹拌する作業を3回繰り返し，β-クリプトキサンチン含有アイスクリームを得た．

3）β-クリプトキサンチン入りヨーグルトの試作

β-クリプトキサンチンとして5 mgとなるよう愛宕果皮由来抽出液6.4 gを褐色器具に入れエバポレータでエタノールを揮発させ，生クリーム20 mLを入れ混合後，牛乳10 mLを添加した．さらにヨーグルトの種菌（カスピ海ヨーグルト）0.66 gを加え攪拌した．室温に放置し1時間おきに7度の振盪を行った．その後，5℃の冷蔵庫に1晩放置しスタータと呼ばれる種菌約40 mLを得た．スタータ20 mLを別の滅菌済みガラス容器に移し，生クリーム100 mL，牛乳100 mLの順で少量ずつ加え混合後，5℃の冷蔵庫で放置し，β-クリプトキサンチン含有ヨーグルトを得た．

4）β-クリプトキサンチンの分散剤選択

乳化剤は食品添加物として認可され，界面活性能のうち耐酸性・耐塩性・耐熱性を有し，pHによる経時変化がなく，添加後の食味に影響を及ぼさない風味であることを要件として，ポリグリセリン脂肪酸エステルを選択した．

ポリグリセリン脂肪酸エステル（日本サーファクト工業製，日光ケミカルズ販売）は，モノミリスチン酸デカグリセリル（HLB14.0）：ペースト状，モノステアリン酸デカグリセリル（HLB12.0）：プレート状，モノオレイン酸デカグリセリル（HLB12.0）：粘性液体を選択し，40℃のイオン交換水で希釈して用いた．

乳化剤の濃度が0.5，1，3，5%となるように希釈溶液を作り，それぞれ共栓付き試験管に10 mLずつ入れ，そこにScheme 3で得た“愛宕”果皮由来抽出液2 mL（β-クリプトキサンチン約1.2 mg）を添加，撹拌し，分散させた．撹拌だけでは分散しなかった成分は乳鉢と乳棒で擦り潰し，分散溶液と合わせ，β-クリプトキサンチン分散溶液として調製した．1時間静置後，分散状態を目視にて観察した．

次いで，分散溶液の水へのさらなる分散性を調べるため，分散溶液をイオン交換水で1/200，1/20，1/10，1/5に希釈し，1時間放置後，分散状態を目視にて観察した．

実験結果と考察

1．カキのβ - クリプトキサンチン濃度

1）カキ果皮に含まれるβ-クリプトキサンチン濃度

Table 1にβ-クリプトキサンチン濃度の分析結果を示した．果肉よりも果皮に多く含まれることを確認した．甘柿の“富有”と渋柿の“愛宕”の間に濃度的差は無かった．

β-クリプトキサンチンは，温州ミカンには 1.6～2.0 mg/100g[5]，温州みかんシラップ漬缶詰には 1.2 mg/100g含まれる[6] との報告があるが，カキ果皮はそれらを上回る濃度であった．

Table 1　Concentration of β-Cryptoxanthin

Sample	Concentration（mg/raw peel 100g）
The flesh of the sweet persimmon variety Fuyu	0.97
The peel of the sweet persimmon variety Fuyu	8.36
The flesh of the astringent persimmon variety Atago	0.80
The peel of the astringent persimmon variety Atago	8.80

2）シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画

ヘキサン：エタノールを移動相として，シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った結果，4つの有色バンドに分かれ，それぞれHPLCに供したところ，Fig. 1に示したように，溶出順で2番目のバンドが，β-クリプトキサンチンを多く含む画分であった．約21.5分にβ-クリプトキサンチンを確認し，続いてα-カロテンとβ-カロテンのピークを確認した．濃度検定済みの標品を用い定量したところ，97 gの乾燥カキ果皮から抽出した画分には約8.9 mgのβ-クリプトキサンチンが含まれていた．乾燥果皮100 gに換算するとβ-クリプトキサンチンは9.2 mg含有となる．生の果皮に比べ水分が少ない分，乾燥果皮のβ-クリプトキサンチン濃度は増加するはずだが，そのようにならなかったのは，Scheme 2ではScheme 1のように海砂を用いることも，残渣の色調がほとんど白色なるまで磨砕することも実施しなかったため，β-クリプトキサンチンの全量が抽出されなかったためと思われる．

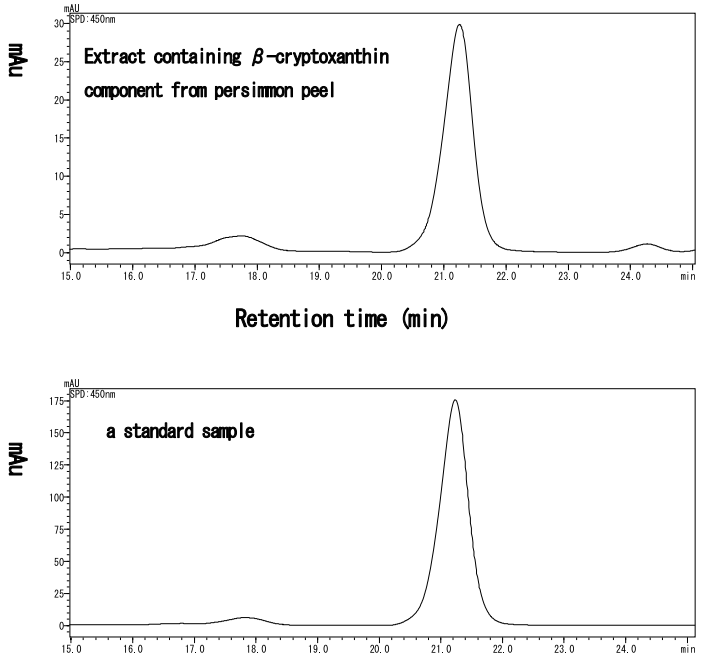


Fig. 1　HPLC chromatogram of the persimmon extraction or a standard sample

3）経口摂取用の抽出液のβ-クリプトキサンチン濃度

エタノール100 gで定容した“愛宕”の果皮由来抽出液のβ-クリプトキサンチン濃度は78.4 mg/100gであった．

β-クリプトキサンチンは果実内ではエステル体の方が非エステル体よりも多い．濃度測定用のサンプル調製時にはケン化を行ったが，生体内では酵素的にエステル体が非エステル体化され生理機能を発揮することが，パパイアを用いた研究[7]で証明されている．そのため，経口摂取用の抽出液を調製する際は，ケン化は行わなかった．

2．飲食品への添加

1）バレンシアオレンジ果汁への添加結果

β-クリプトキサンチン濃度が0.02 mg/100gの市販のバレンシアオレンジ果汁99 gに，β-クリプトキサンチン濃度が78.4 mg/100gの“愛宕”果皮由来抽出液1 gを添加し，β-クリプトキサンチン濃度が0.80 mg/100gの果汁を得た．飲料製造時に受けると想定される90℃で5分間の加熱を実施したところ，その果汁のβ-クリプトキサンチン濃度は0.63 mg/100gとなった．加熱後の残存率は78.8%だった．バレンシアオレンジ果汁のみ90℃で5分間加熱した場合のβ-クリプトキサンチン濃度は0.01 mg/100mgであった．**Table 2**参照．

Table 2　Heat resistance of β-Cryptoxanthin

Sample	Concentration of β-Cryptoxanthin (mg/100g)
Valencia orange juice	0.02
After heating at 90℃ for 5-minutes of Valencia orange juice	0.01
Valencia orange juice with added extract of persimmon peel origin※	0.80
After heating at 90℃ for 5-minutes of Valencia orange juice with added extract of persimmon peel origin	0.63

※ The β-Cryptoxanthin concentration of an extract from the peel of Atago was 78.4 mg/100g. 1 g of the extract was added to 99 g of Valencia orange juice to obtain 100 g of fruit juice with a concentration of β-Cryptoxanthin of 0.8 mg/100g.

80%近くの歩留りが得られたことは，β-クリプトキサンチンを含まない飲料にβ-クリプトキサンチンの機能性を付与することは可能であることを示唆するものと考えられた．

2）β-クリプトキサンチン入りバニラアイスクリームの試作結果

β-クリプトキサンチンは脂溶性のため油脂分を含む食品には溶け易い．β-クリプトキサンチンは培養細胞で骨代謝を改善し[8]骨中のカルシウム量を高める[9]ため，骨粗しょう症の予防に有効と考えられている．アイスクリームのような油脂とカルシウムを含有する食品は，β-クリプトキサンチン抽出液を添加し易く，またカルシウムと同時に摂取でき，より一層の骨粗しょう症予防効果を発揮するのではないかと考えた．

カキ皮由来のβ-クリプトキサンチンが約1.4 ppm存在するβ-クリプトキサンチン入りバニラアイスクリーム約700 gを試作した．**Fig. 2**に外観を示す．

Fig. 2　Ice cream with a β-Cryptoxanthin component from the astringent persimmon peel

β-クリプトキサンチンの溶解に乳脂肪は好適で，カキ皮由来のβ-クリプトキサンチン含有抽出液はバニラアイスクリームに溶解し，色はほのかに黄色を帯び，食欲を誘う色調となった．色の影響を受けないように目隠しをしたパネラ9名で2点嗜好試験法を行い，β-クリプトキサンチン含有抽出液の有無でバニラアイスクリームの好みに差が生じるかを評価した．パネラ9名のうち5名がβ-クリプトキサンチン含有抽出液入りバニラアイスクリームを好むと回答したが，両者間に有意差は無かった．よってβ-クリプトキサンチン含有抽出液の添加で，味に変化を及ぼすことはなかった．カルシウム総量を食品成分表[10]を参考に算出したところ620 mgであった．

3）β-クリプトキサンチン入りヨーグルトの試作結果

ヨーグルトにはβ-クリプトキサンチン抽出物は溶解しにくかったので，あらかじめ生クリームに抽出物を溶解後，それをヨーグルトと混和した．試作品の外観を**Fig. 3**に示した．これのβ-クリプトキサンチン濃度は11.3 ppmであった．カルシウム総量を食品成分表[10]を参考に算出したところ193 mgであった．

Fig. 3　Yougrt with a β-Cryptoxanthin component from the astringent persimmon peel

4）β-クリプトキサンチンの分散性

脂肪酸や性状の異なる乳化剤の中で，イオン交換水に易溶で作業性が良いものは，モノオレイン酸デカグリセリル（商品名 DECAGLYN1-OV）であった．溶解後の風味に苦味等の違和感はなかった．

乳化剤濃度を0.5，1，3，5％として，果皮由来抽出液の分散程度を観察したところ，0.5%では分散しきれなかった細かい橙色の沈澱を生じたが，1％以上では沈澱は生じず，溶液は黄色となった．β-クリプトキサンチン約1.2 mgが乳化剤含有溶液10 mLに分散することを確認した．

β-クリプトキサンチン分散溶液のさらなる水への分散性を調べた結果，1/200，1/20，1/10希釈までは沈澱は見られなかった．1/5希釈では沈澱が生じた．

脂溶性成分を含まない飲食品には，β-クリプトキサンチン抽出溶液を乳化剤で分散させることで，多くの飲食品にβ-クリプトキサンチンの持つ機能性を付与できることが示唆された．

文　献

1）Tanaka T. and Kohno H.：*Foods Food Ingredients J. Jpn.*, **200**, 36-42,（2002）.

2）村上博ら：化学工学会九州支部大会研究発表講演要旨集　p.47（2002）.

3）Davies, B.H.：Chemistry and biochemistry of plant pigments, ed., GOODWIN, T.W.（Academic Press, New York）（1965）.

4）隅田ら：日食科工誌, **46**, 467（1999）.

5）矢野昌充：第41回果汁技術研究発表会特別講演要旨（1998）.

6）二松弘光：日本蜜柑缶詰工業組合平成11年度研究発表会発表要旨（1979）.

7）Dietmar E. Breithaupt, Philipp Weller, Maike Wolters and Andreas Hahn：British：*Journal of Nutrition*, **90**, 795-801（2003）.

8）Yamaguchi M. and Uchiyama S.：*Biol. Pharm.* Bull, **26**, 1189-1191（2004）.

9）Uchiyama S., Sumida T., Yamaguchi M.：*Biol. Pharm. Bull*, **27**, 232-235（2004）.

10）香川芳子監修：五訂増補食品成分表2006，女子栄養大学出版部,（2005）.