

## シトルリン高含有スイカ酢の開発と機能性

## Development and Functionality of Watermelon Vinegar with High Citrulline Content

西尾 昭

Akira Nishio

電子・有機素材研究所 発酵生産科

スイカ果汁からスイカ酢の製造を検討した結果、途中段階であるスイカ酒の製造に使用する酵母をワイン酵母等の実用化酵母に代えて、実験室酵母、特にアミノ酸要求性株を用いることによりシトルリンの減少が抑えられることがわかり、スイカ酢の段階で従来 70%位であったものを 90%以上（原料対比）残存させることが可能となった。

## 1. はじめに

スイカは全国 4 位の収穫量（平成 22 年産）を誇る鳥取県の特産品である<sup>1)</sup>。そのスイカの機能性成分として抗酸化力を有する赤色色素のリコペンやナトリウムを排泄する作用を持つカリウム等が知られているが、スイカに特異的に多く含まれているものとして「シトルリン」がある。

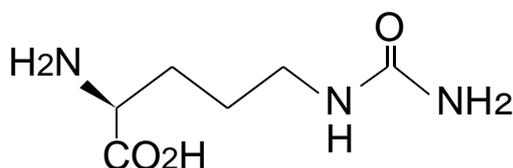


図 1 L-シトルリン

シトルリン（図 1）はアミノ酸の一種であるがタンパク質を構成せず、主に遊離の状態が存在してい

表 1 食品中のシトルリン含量

食品名	シトルリン含量 (mg/100g)
スイカ	180
メロン	50
冬瓜	18
キュウリ	9.6
にがうり	16
ヘチマ	57
クコの実	34
にんにく	3.9

る。ウリ科の植物に多く含まれており、特にスイカに多く含まれる（表 1）<sup>2)</sup>。アメリカでは健康食品素材として、ヨーロッパではシトルリン-リンゴ酸塩が医薬品として 30 年以上使用されている。日本でも 2007 年に食品への使用が認められ、健康飲料やガム等が製品化された。

シトルリンは一酸化窒素 (NO) サイクルにおける NO の産生を促進し（図 2）、NO 産生を介した血管拡張による血圧降下、血流改善および抗動脈硬化作用が知られている<sup>2)~4)</sup>。その他にも抗酸化作用、血中アルギニン濃度を上昇させる作用、尿素サイクルを円滑に機能させアンモニアを尿素に変えて無毒化する作用等が知られている<sup>2)~4)</sup>。

私たちはシトルリンに注目してスイカを原料とした新しい加工品の開発を目的に、健康によいとされる酢との組み合わせでスイカ酢の開発に取り組んだ。

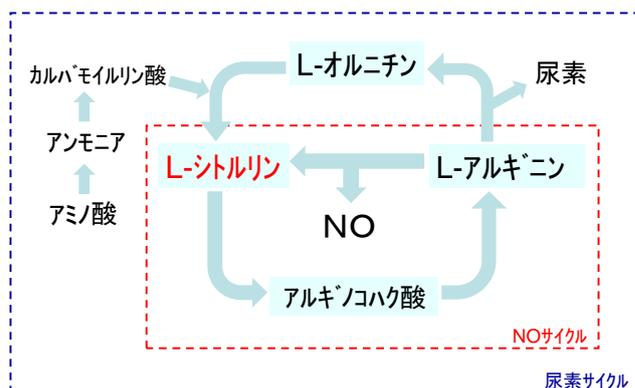


図 2 一酸化窒素 (NO) サイクルと尿素サイクル

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌株

酵母は、実用酵母として清酒酵母協会7号（以下K7）、ワイン酵母協会1号（以下KW1）、実験室酵母として *Saccharomyces cerevisiae* H42 (*MATa gal4*)、S288C (*MATa SUC2 mal me1 gal2 CUP1*)、NBRC10478 (*MATa arg6 PHO3+*)、NBRC10479 (*MATa arg6 PHO3+*)、NBRC10482 (*MATa his4-519 gal2 PHO3+*)、NBRC10483 (*MATa leu2-3, 112 gal2 PHO3+*) を使用した。

酢酸菌は *Acetobacter aceti* NBRC14818 を使用した。

### 2.2 培地

YPD 培地及びシトルリン培地の組成は以下のとおりとした。YPD 培地 (Polypepton 0.5%, Yeast extract 0.5%, Glucose 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1%)、シトルリン培地 (L-Citrulline 0.01%, Yeast nitrogen base w/o aminoacids and ammonium sulfate 0.17%, Glucose 0.5%, Agar 2%)

### 2.3 スイカ酢の製造

スイカは平成20年倉吉産の極実スイカを使用した。

スイカ酢の製造は通常の酢の製造方法に従って行った。すなわち、スイカの可食部をミキサーで破碎したスイカ果汁 200 ml に、オートクレーブ滅菌したスイカ果汁 (120℃、1分) で前培養した酵母 10 ml を加えて室温でアルコール発酵を行わせた。発酵終了後、5000rpm、20分間の遠心分離でスイカ酒を上槽し、製成したスイカ酒に YPD 培地で前培養した酢酸菌の表面の膜を接種し酢酸発酵 (室温、1~2ヶ月) を行わせた。目標の酸度に達したとき、10000rpm、20分間の遠心分離で上槽しスイカ酢とした。

### 2.4 分析

糖分は屈折計 (ATC-1E アタゴ製)、アルコール分はアルコール濃度計 (YSA-200 矢崎計器製) を使用して測定した。

酸度は、試料 1 ml をとり 10 ml の水を加えフェノ

ールフタレインを指示薬として N/10 水酸化ナトリウム溶液による中和滴定法で測定し、次式により酢酸として算出した。

$$\text{酢酸 (g/100 ml)} = \text{酸度} \times 0.006 \times 100$$

シトルリン含量は、アミノ酸分析システム (島津製作所) により測定した。

### 2.5 血圧上昇抑制効果

血圧上昇抑制効果はアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を測定することにより評価した<sup>5)</sup>。すなわち、試料溶液 30  $\mu$ l と ACE 溶液 (0.06units/mL, Sigma) 100  $\mu$ l を 37℃ で 6 分間インキュベートした後、7.6 mM Hip-His-Leu 250  $\mu$ l を加えて、37℃ で 30 分間反応させた。1 N 塩酸 250  $\mu$ l を加え反応を停止させた後、酢酸エチル 1.5 ml を添加し遊離した馬尿酸を抽出する。3000rpm、10 分間の遠心後、上層の酢酸エチルを 0.5 ml 回収し、減圧乾固させる。蒸留水 4 ml を加え馬尿酸を溶解させた後、228 nm における吸光度を測定した。

なお、ACE 阻害率は次式により算出した。

$$\text{ACE 阻害率 (\%)} = (\text{Ec} - \text{Es}) / (\text{Ec} - \text{Eb}) \times 100$$

Es : 試料溶液を用いた場合の吸光度

Ec : 試料溶液の代わりに蒸留水を用いた場合の吸光度

Eb : 試料溶液にあらかじめ 1 N 塩酸を加えて反応させた場合の吸光度

## 3. 結果と考察

### 3.1 スイカ酢の製造

スイカ果汁を室温 (20~25℃) でアルコール発酵させると 5 日程度で発酵が終了し、スイカの糖分 (Brix10%) がエタノールに変わりスイカ酒が製成された。アルコール分は 4.5~5% で、歩留まりは 95% 程度であった。そこに酢酸菌を添加して酢酸発酵 (室温、1~2ヶ月) を行わせると、エタノールが酢酸に変わりスイカ酢が製成された (図3)。酸度は 4~4.5% で、歩留まりは 97% 程度であった。以上のように高収率でスイカ酢の製造が可能であることを確認した。

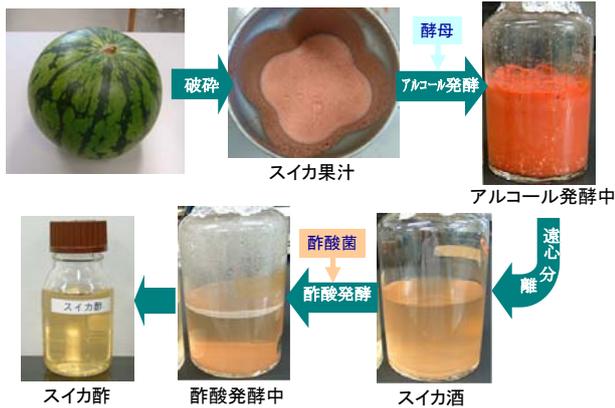


図3 スイカ酢の製造工程

### 3.2 スイカ酢中のシトルリン含量

スイカ酢製造工程中のアミノ酸の含有量を調べたところ、アルギニンやGABA等のほとんどのアミノ酸がアルコール発酵の段階で消費されてしまうのに対し、シトルリンは、果汁 100 ml 中に 300 mg 位あったものがスイカ酒の段階では約 230 mg、スイカ酢の段階では約 200 mg 残存していた。残存してはいたがスイカ酢の段階で原料果汁の 1/3 程度が減少していたので、さらに残存量を増やすことができなから検討することとした。減少量を見てみるとアルコール発酵の段階での減少が大きいため、酵母による影響が大きいと考え、酵母の種類を変えて発酵試験を行った。

これまでは実用酵母であるワイン酵母や清酒酵母を使用していたが、代わりにアルギニン要求性酵母を使用して試験を行った。アルギニン要求性酵母を使用した理由として、L-シトルリンの発酵生産

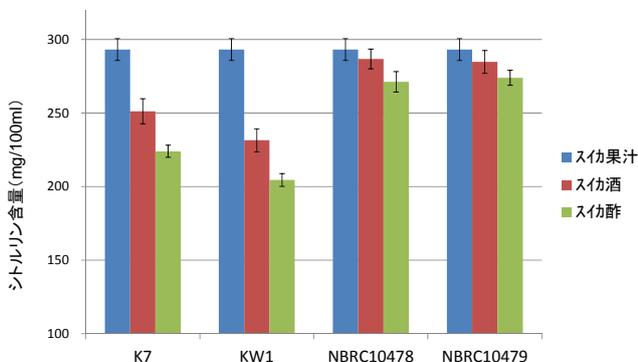


図4 実用酵母と実験室酵母（アルギニン要求性）のシトルリン含量の比較

K7 : 清酒酵母, KW1 : ワイン酵母  
 NBRC10478 : 実験室酵母（アルギニン要求性）  
 NBRC10479 : " "

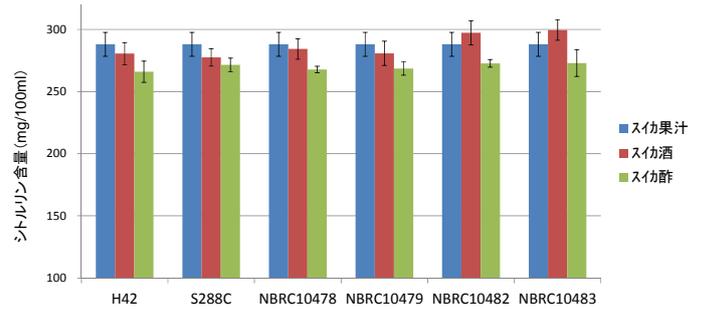


図5 実験室酵母におけるシトルリン含量の比較

H42 : MATa  
 S288C : MATα  
 NBRC10478 : MATa, アルギニン要求性, H42 系統  
 NBRC10479 : MATα, アルギニン要求性, H42 系統  
 NBRC10482 : MATa, ヒスチジン要求性, S288C 系統  
 NBRC10483 : MATα, ロイシン要求性, S288C 系統

にL-アルギニン要求性変異株の *B.subtilis* 等が用いられており、酵母においても同様の効果が期待された<sup>6)</sup>。発酵試験の結果、アルギニン要求性酵母として実験室株 NBRC10478、10479 を使用したところワイン酵母や清酒酵母に比べシトルリンの減少を低く抑えることが可能であった(図4)。

しかし、実用株と実験室株との比較であったため実験室株同士での比較を行ったところ、アルギニン要求性を持たない酵母(H42、S288C)においてもシトルリンの減少が抑えられることが分かった。さらに他のアミノ酸要求性酵母(NBRC10482、10483)を用いた時、より多くシトルリンが残存していた(図5)。それらの酵母を用いてシトルリンを唯一の窒素源とする培地(シトルリン培地)での生育を調べたところ、NBRC10482、10483の2株は生育せず、シトルリンの取り込み能がないことが示唆された。すなわち、酵母がシトルリンを取り込まなかったためより多くのシトルリンが残存したと考えられた。

以上の結果、実験室酵母を用いることによりシトルリンを高含有するスイカ酢の製造が可能であった。また、シトルリンの取り込み能がない一部のアミノ酸要求性株を用いるとより多く残存することが分かった。

### 3.3 スイカ酢の機能性

酢は健康によいとされ、疲労、高血圧、動脈硬化や糖尿病等に効果があるといわれている<sup>7)</sup>。そこで、

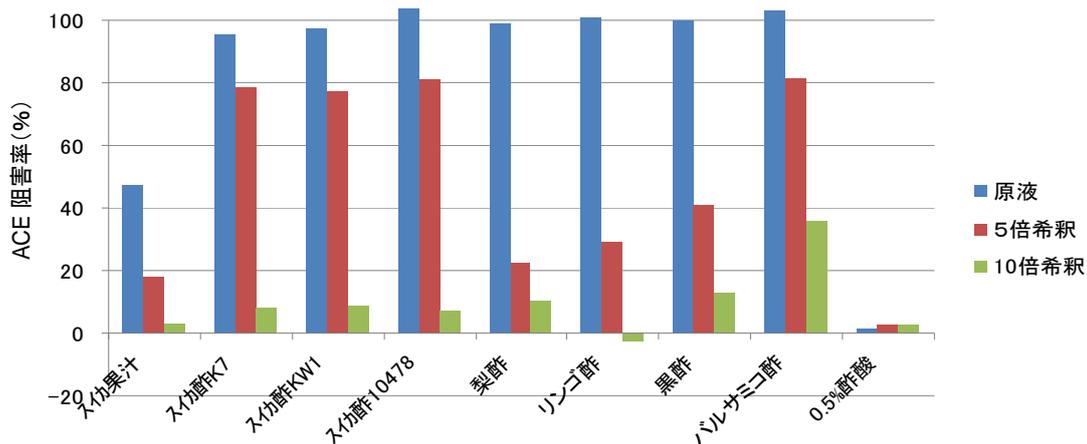


図6 スイカ酢の血圧上昇抑制効果 (ACE 阻害活性)

酸度:スイカ酢 4.1%、梨酢 4.5%、リンゴ酢 4.8%、黒酢 4.2%、バルサミコ酢 6.0%

シトルリンの血流改善効果と酢の血圧上昇抑制効果の相乗効果に期待して、スイカ酢の高血圧防止効果についてアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害活性を測定することにより調べた。対照に、スイカ果汁、梨酢、リンゴ酢、黒酢、バルサミコ酢を用い測定を行った。その結果、スイカ酢はスイカ果汁より高い活性を示し、原液ではほぼ 100%、5 倍希釈でも 80%の阻害活性を維持し、高血圧に効果があるといわれている黒酢と同程度の活性があることが分かった (図6)。

#### 4. おわりに

(1) 常法によりスイカ果汁からスイカ酢が高収率で製造できることがわかった。

(2) スイカ酢製造工程の途中段階であるスイカ酒の製造において、使用する酵母をワイン酵母等の実用酵母に代えて実験室酵母にすることによりシトルリンが多く残存することがわかった。

(3) 特に、シトルリン取り込み能がない一部のアミノ酸要求性酵母を用いるとより多くのシトルリンが残存した。

(4) スイカ酢のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を調べたところ、高血圧に効果があるといわれている黒酢と同程度の活性があることがわかった。

#### 参考文献

- 1) [http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_yasai/pdf/yasai\\_syutou\\_10.pdf](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/pdf/yasai_syutou_10.pdf)
- 2) 林登志雄;シトルリンの代謝と薬効, 化学と生物, 46, p.460-464 (2008).
- 3) 柴崎剛; L-シトルリンの機能と物性について, FOOD Style 21, 11, p.1-4 (2007).
- 4) 木崎美穂; L-シトルリンの機能性と食品への応用, FOOD RESEARCH, 649, p.10-13 (2009).
- 5) 川岸舜朗編著; 生物化学実験法 38 食品中の生体機能調節物質研究法, p.116, 学会出版センター
- 6) 発酵ハンドブック, p.40, 共立出版
- 7) 柳田藤治; 酢の機能性について, 醸協, 85, p.134-141 (1990).