

シークワサー搾汁残渣精油の殺菌効果とそのメカニズムの推定

Bactericidal effect of essential oil of Shiikuwasha squeezed juice residue and estimation of its mechanism

○岡本拓実^{*1}, 岡本威明^{*2}

OKAMOTO Takumi^{*1}, OKAMOTO Takeaki^{*2}

^{*1}愛媛大学農学部, ^{*2}愛媛大学教育学部

^{*1}Faculty of Agriculture, Ehime University, ^{*2}Faculty of Education, Ehime University

[要約] 沖縄県の特産品であるシークワサーは現在、果肉を利用したジュースなど果汁加工品として主に利用されており、その過程で果皮などの搾汁残渣は大量に廃棄されている。本研究ではシークワサー搾汁残渣から低温真空乾燥法により精油を抽出し、精油による殺菌効果とその活性成分について検討した。その結果、希釈率2倍以下の精油において濃度依存的な殺菌効果が認められた。また、その活性成分を検討した結果、精油の香気成分のうち高い割合を占めているリモネンと γ -テルピネンに浸漬した試験区において大腸菌群のコロニー数が減少した。よって、これらの香気成分が精油における殺菌効果の活性成分となることが推察された。また、それら2種を混合することで1種類のみ香気成分を作用させた場合よりも強い殺菌効果が発揮されることが確認された。

[キーワード] シークワサー, 搾汁残渣, 精油, 殺菌効果

I. 研究の背景と目的

シークワサー (*Citrus depressa* Hayata) とは、沖縄県で主に生産されている香酸柑橘の総称である。沖縄県園芸振興課の資料によると令和元年度のシークワサーの販売量は2,554 tであり、そのうち加工用が2,404 t、生果用が150 tである。販売量の90%以上が加工用に販売されており、ジュースやポン酢など果汁を加工した商品に利用されている。しかし、シークワサーの搾汁効率は50%程度であり、毎年1,200 t程度が廃棄されている。そのため、加工後の搾りかすである搾汁残渣から低温真空乾燥法で精油を抽出し、機能性を付与することを考えた。

また、微生物における食品の腐敗は健康被害や食品廃棄などの問題にもつながり、我々の生活においても身近かつ重大な問題である。日本でも、毎年、病原性大腸菌やサルモネラ菌による食中毒が発生している。そして、一般生菌や大腸菌、大腸菌群は衛生指標菌として、食品汚染の評価基準にもなっている。さらに、そのような食品腐敗菌に対する抗菌効果がティーツリーオイルなどさまざまな精油において認められており(Carson. *et al.*, 2006), その効果に関する研究も広く行われている。

よって、本研究ではモヤシ表面上に常在している大腸菌群に対するシークワサー搾汁残渣精油の殺菌効果とその活性成分を検討した。また、これらの研究成果をもとに、シークワサー搾汁残渣精油に機能性

を付与し、付加価値のある製品の開発の一助となることを目的とした。

II. 研究の方法

1. 材料と実験機器

<試薬>

シークワサー搾汁残渣から低温真空乾燥法により抽出した精油は、(株) 沖縄アロエから提供された。リモネンは、富士フィルム和光純薬から購入した。 γ -テルピネンは、Sigma-Aldrich から購入した。ホホバオイルは、生活の木(オンラインショップ)で購入した。酢(ミツカン)は、松山市内のスーパーで購入した。

<サンプル及び細菌の培養方法>

松山市内のスーパーで購入したモヤシ表面上の細菌をフードスタンプ® XM-G 寒天(ニッスイ)を用いて、カルチャーインキュベーターFI-280(アイキューブ)で培養した。

2. 分析方法

a. シークワサー搾汁残渣精油の殺菌効果の検討

シークワサー搾汁残渣精油(原液, 2倍希釈溶液, 4倍希釈溶液), 酢(positive control), ホホバオイル(negative control)各10 mlに約4 cmに切断したモヤシを1分間浸漬した。その後、浸漬したモヤシを大腸菌および大腸菌群を特異的に増殖させる培地であ

るフードスタンプに押し付け、24~48 時間 37℃で培養し、1 cm²あたりのコロニー数を計測した。

b. 香気成分の成分分析

シークワサー搾汁残渣精油を(株)一十八日に依頼して、ガスクロマトグラフィーによる香気成分の成分分析を行った。

c. 香気成分に着眼した活性成分の検討

シークワサー搾汁残渣精油に含まれている香気成分であるリモネン(原液, 2倍希釈), γ -テルピネン(原液, 3倍希釈), 酢, ホホバオイルにモヤシを押し付け、前述と同様の条件で培養した。

さらに、殺菌効果を示す活性成分の検討をより詳細に行うため、リモネン, γ -テルピネン, ホホバオイルの比が5:3:2になるよう混合したものにモヤシを1分間浸漬し、前述と同様の条件で培養した。

III. 結果

1. シークワサー搾汁残渣精油の殺菌効果の検討

シークワサー搾汁残渣精油に浸漬したモヤシ表面上の大腸菌群のコロニー数を計測した結果、ホホバオイルの試験区は138個、精油原液の試験区は48個、精油2倍希釈の試験区は99個、精油4倍希釈の試験区は134個確認された(図1, 写真1, 2, 3, 4)。原液の試験区と2倍希釈の試験区のコロニー数を比較すると、原液の試験区は、その半分程度に減少していた。

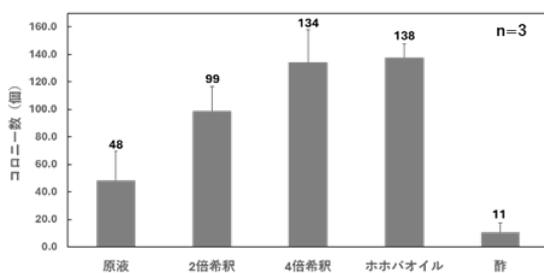


図1 精油の殺菌効果コロニー数



写真1 精油原液



写真2 精油2倍希釈



写真3 精油4倍希釈

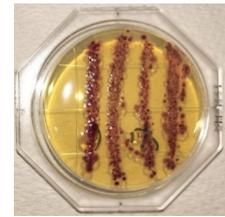


写真4 ホホバオイル

2. 香気成分の成分分析

シークワサー搾汁残渣精油における香気成分の組成をガスクロマトグラフィーによって分析した。その結果、リモネンが約47%, γ -テルピネンが約30%, p-シメンが約7%, その他5%未満の香気成分が約25%であった(表1)。

表1 精油中の香気成分

香気成分	割合
リモネン	47.4%
γ -テルピネン	30.3%
p-シメン	7.2%
α -ピネン	4.2%
β -ピネン	2.7%
ミルセン	1.6%
その他の香気成分(1%未満)	6.6%
合計	100%

3. 活性成分となる香気成分の検討

各種香気成分に浸漬したモヤシ表面上の大腸菌群のコロニー数を計測した結果、リモネン原液の試験区は66個、リモネン2倍希釈の試験区は105個、 γ -テルピネン原液の試験区は48個、 γ -テルピネン3倍希釈の試験区は142個、ホホバオイルの試験区は138個確認された(図2, 写真5, 6, 7, 8)。

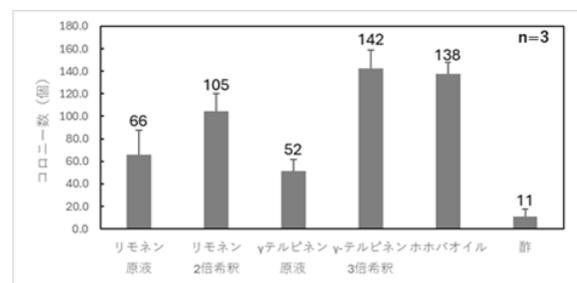


図2 香気成分による殺菌効果①

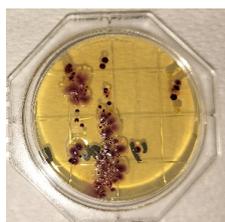


写真5 リモネン原液



写真6 リモネン2倍希釈



写真7 γ -テルピネン原液

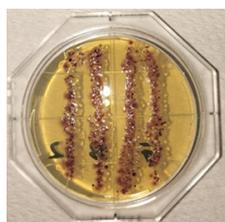


写真8 γ -テルピネン3倍希釈

さらに、リモネン、 γ -テルピネン、ホホバオイルを5:3:2の割合で混合した試験区は67個のコロニーが確認された(図3, 写真9)。1種類の香り成分のみの試験区と比較すると、混合した試験区の方がコロニー数は減少していた。

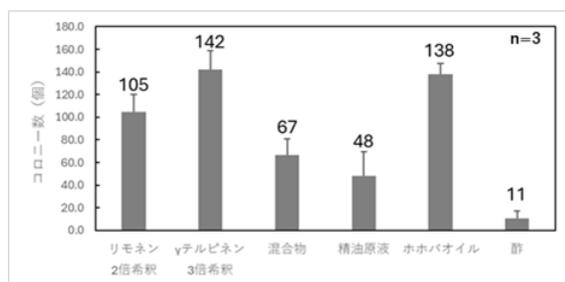


図3 香り成分による殺菌効果②



写真9 リモネン・ γ テルピネン・ホホバオイル混合液

IV. 考察

1. シークワーサー搾汁残渣精油の殺菌効果の検討

シークワーサー搾汁残渣精油に浸漬したモヤシを押し付けたフードスタンプでは、対照群と比較して2倍希釈以下の濃度で明らかな殺菌効果が見られた。さらに、その効果は希釈倍率が小さいほど殺菌効果は大きくなることから、濃度依存的に殺菌効果は上昇する

と推察された。

また、精油の殺菌効果のメカニズムの推定のため、シークワーサー搾汁残渣精油と同様にリモネンと γ -テルピネンを多く含んでいる仏手柑精油を用いたLiらの研究を調査した。その研究において、仏手柑精油の細菌に対する抗菌効果が認められ、そのメカニズムとして、大腸菌と黄色ブドウ球菌の細胞膜の破壊と細胞膜の破壊に伴う細胞内物質の漏出によって引き起こされることが示唆されている。また、精油による細菌の細胞の変形が用量依存的に発生しており、さらに、仏手柑精油で処理した大腸菌は細胞膜の透過性が上昇し、細胞膜が破壊されることが確認された。これにより、細胞膜の破壊とそれに伴う核酸とタンパク質の漏出によって細胞死が引き起こされることが示唆されている(Li, *et al.*, 2019)。そのため、同様の香り成分を含むシークワーサー搾汁残渣精油においても、同様のメカニズムで殺菌効果が発揮されるのではないかと推察された。

また、リモネンと γ -テルピネンの原液に浸漬したモヤシを押し付けたフードスタンプにおいても対照群と比較してコロニーが明らかに減少していたため、リモネンと γ -テルピネンには殺菌効果があると考えられた。さらに、精油に含まれている各種香り成分の濃度程度(リモネン50%, γ -テルピネン33%)まで希釈すると、リモネン単独ではコロニー数が減少していたが、 γ -テルピネン単独では対照群とほぼ同程度の数のコロニーが確認された。しかし、2種類の香り成分を混合すると、各種香り成分1種類のみの試験区よりもコロニー数が減少し、精油原液に浸漬したときのコロニー数に近づいた。以上のことから、シークワーサー搾汁残渣精油の殺菌効果は、主にリモネンと γ -テルピネンの2種類の香り成分の働きで引き起こされたと推察された。

また、各種香り成分を混合した試験区のコロニー数は、リモネン2倍希釈あるいは γ -テルピネン3倍希釈で変化したコロニー数の総和よりも多く減少していた。よって、この2種類の香り成分の相乗効果により、シークワーサー搾汁残渣精油は強い殺菌効果を発揮したと考えられる。実際、多くの香り成分は1種類作用させた時よりも複数種類を組み合わせた場合において殺菌効果が増強されることも報告されている(Baginska, *et al.*, 2023)。

2. 殺菌効果のメカニズムの推定

本研究の結果から、リモネンと γ -テルピネンの香気成分によりシークワサー搾汁残渣精油は殺菌効果を示すことが推察された。そのため、各種香気成分における殺菌効果の作用機序を先行研究の調査により検討した。

まず、Chueca らの研究によるとリモネンは、TCA 回路の活性化による電子伝達系の過剰な活性化、電子伝達系を介した NADH の枯渇およびフェントン反応による活性酸素の生成を引き起こす。この活性酸素により DNA や生体膜が損傷されることで、殺菌効果が発揮されることが示唆されている (図 4) (Chueca, *et al.*, 2014)。

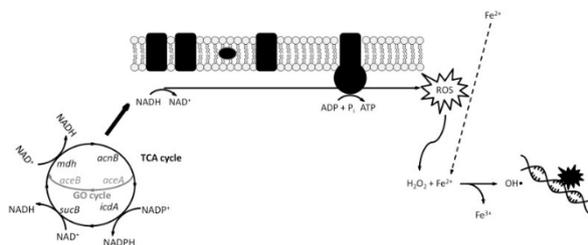


図 4 リモネンの殺菌効果メカニズム

また、リモネンは活性酸素の生成のほか、走化性、酵素阻害、タンパク質合成阻害、細菌外膜の変化または破壊、細胞壁合成阻害、細胞内容物の漏出、内膜の脱分極、核酸合成阻害などさまざまなメカニズムで大腸菌への殺菌効果が発揮されることも報告されている (Chen, *et al.*, 2024)。

そして、 γ -テルピネンやリモネンなどモノテルペン類は微生物の細胞膜の脂質画分をかき乱すことにより、膜特性の変化を引き起こし、抗菌効果をもたらすことが認められている。さらに、モノテルペン類は細胞膜を通過して細胞内部に浸透し、抗菌活性に関与する細胞内の標的部位と相互作用することも示唆されている (Cristani, *et al.*, 2007)。

以上のことから、シークワサー搾汁残渣精油の殺菌効果の作用機序は、まず、リモネンや γ -テルピネンなどモノテルペン類の香気成分が細胞膜に作用し、細胞膜の損傷を引き起こす。その後、 γ -テルピネンとリモネンが細胞内に侵入し、細胞内のミトコンドリアなどさまざまな標的部位に作用する。これらの作用により、細胞膜の破壊と活性酸素の産生を引き起こし、シークワサー搾汁残渣精油は強い殺菌効果を示すと推測された。

また、疎水性の高さを示す数値である LogPow (オクタノール-水分配係数) は、リモネン 4.57 (ChemicalBook, 2024)、 γ -テルピネン 5.4 (ChemicalBook, 2024) である。そのため、モノテルペン類の細胞膜の損傷作用において、疎水性が高い γ -テルピネンはリモネンよりも細胞膜に作用しやすく、リモネンよりも先に細胞膜を破壊すると推測された。

V. おわりに

本研究では、シークワサー搾汁残渣精油において濃度依存的な殺菌効果が認められた。さらに、その活性成分は主としてリモネンと γ -テルピネンであり、その相乗効果によって強い殺菌効果が発揮されることが確認された。今後は、リモネンあるいは γ -テルピネンのみを 80%になるよう調製した溶液を用いて実験を行い、本研究のデータとの比較検討を行う必要がある。また、各種香気成分の混合比によって殺菌効果に変化する可能性があるため、様々な混合比条件下でのデータを蓄積していく。さらに、シークワサー搾汁残渣精油による殺菌メカニズムの検討を行うため、シークワサー搾汁残渣精油で処理した細菌の細胞膜損傷レベルの評価等も行う必要があると考える。

本研究で明らかとなった精油の殺菌効果の活用として、将来的に、精油の香りのよさと精油の殺菌効果とを組み合わせた除菌スプレーなどの除菌・抗菌グッズへの利用を考えている。

謝辞

本研究は第 23 回愛媛大学学生による調査研究プロジェクト (プロジェクト E) の助成を受けて実施した。

また、シークワサー搾汁残渣及びその精油の提供において(株)沖縄アロエの皆様、精油抽出において(株)協栄産業の皆様、ガスクロマトグラフィーの実施において(株)一十八日の皆様の協力を得た。深く感謝の意を表す。

文献

C F Carson A Hammer, T V Riley K. (2006). Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan;19(1):50-62.

Baginska, Golonko, Swislocka, *et al.*, . (2023).

MONOTERPENES AS MEDICINAL AGENTEXPLORING THE PHARMACEUTICAL POTENTIAL OF p-CYMENE, p-CYMENENE, AND γ -TERPINENE. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, Vol. 80 No. 6 pp. 879-892.

ChemicalBook. (2024年5月9日). 安全データシート (+)-リモネン. 参照先: ChemicalBook: <https://www.chemicalbook.com/msds/jp/5989-27-5.pdf>

ChemicalBook. (2024年1月24日). 安全データシート γ -テルピネン. 参照先: ChemicalBook: <https://www.chemicalbook.com/msds/jp/99-85-4.pdf>

Chueca, Pagán, García-Gonzalo. (2014). Differential Mechanism of *Escherichia coli* Inactivation by (+)-Limonene as a Function of Cell Physiological State and Drug's Concentration. *PLoS One*. 2014 Apr 4;9(4):e94072.

ChenDing, Guan, Zhou, *et al.*, (2024). The Pharmacological Effects and Potential Applications of Limonene From Citrus Plants: A Review. *Natural Product Communications* Volume 19(5): 1-12.

Cristani, D'Arrigo, Mandalari, *et al.*, (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 15, 6300-6308.

LiCai, Liu, Sun, *et al.*, (2019). Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules* 2019, 24(8), 1577