

摘果みかんの有効利用

2年3組 酒井 寛吉 2年4組 白江 颯太 2年4組 藤田 晶
指導者 窪地 育哉

1 背景・目的

宇和島市は温暖な風土の恩恵を受け、古くからみかんの栽培が盛んである。みかん栽培の過程で廃棄されてしまう摘果みかんを何かに利用できないかと考え、研究の題材とした。家藤ら（2018）は、塩酸による処理等により、摘果みかんから糖類が得られるということを明らかにしている。一方で、糖度計の信頼性が疑われるため、糖の定量において課題を残している。また八十島ら（2019）は、柑橘果皮からの糖生成を行い、その定量において、Somogyi-Nelson 法を用いた定量を行い、溶液の液性を中性とすることでより正確な定量とすることができるのではないかと課題を残している。

私たちは、摘果みかん果皮を強酸により加水分解してグルコースとし、さらにグルコースを酵母菌によりアルコール発酵させてエタノールを得ることを目的として本研究を行った。グルコースの定量には Somogyi-Nelson 法とフェノール硫酸法を用い、正確な『糖の定量』に取り組むこととした。また、平田ら（2019）は、もみ殻を分解して得た糖をアルコール発酵させることにより、エタノールの生成に成功している。そこで我々も同様に柑橘果皮から得られた糖を用いてアルコール発酵によりエタノールとし、その定性を行うこととした。

2 糖濃度測定法の原理

(1) Somogyi-Nelson 法

Somogyi-Nelson 法は銅試薬による還元糖の定量方法である。Nelson の発色試薬（**図 1**）を用いて、最終的には比色計（分光光度計）で吸光度を測定する。この方法は、比色法として考案された糖定量法の最初のもので、糖-銅試薬の反応で生じた Cu_2O を硫酸酸性下で、リンモリブデン酸と反応させて、モリブデン青として比色する。Nelson 法はリンモリブデン酸の代わりにヒ素モリブデン酸塩を用いたアルカリ性銅試薬との反応を利用するので、Somogyi の定量法と同様にアルカリ度と加熱時間との間に密接な関係がある。

Somogyi-Nelson 法における基本反応は以下のとおりである。

《Somogyi-Nelson 法における基本反応》

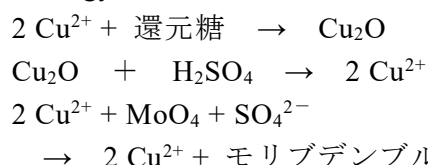


図 2 に、Somogyi-Nelson 法による糖の定量に用いる検量線を示した。すなわち試料溶液の 660 nm における吸光度を測定して糖濃度を決定するものとする。



図 1 Somogyi 試薬と Nelson 試薬

Somogyi-Nelson法による吸光度のグルコース濃度依存性

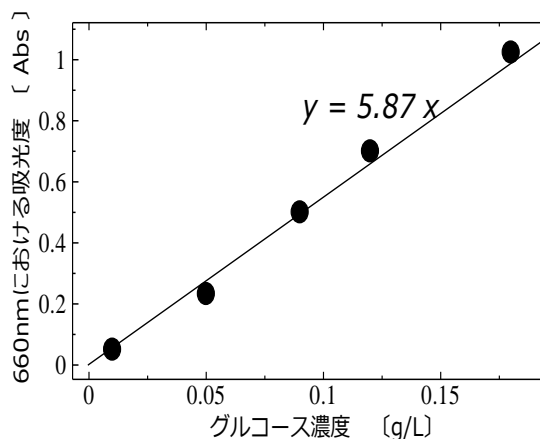


図 2 糖濃度の検量線 (Somogyi-Nelson 法)

(2) フェノール硫酸法

フェノール硫酸法とは、塩酸処理を基本とする定量法である。M.Dubois らにより考案され、現在でも広く使われている。濃硫酸により糖がフルフラール誘導体となりフェノールと反応する。Somogyi-Nelson 法と違い還元糖だけでなくすべての糖において定量することができる。

フェノール硫酸法における基本反応は以下のとおりである。

《フェノール硫酸法における基本反応》

糖 → フルフラール誘導体

フルフラール+フェノール

→呈色反応

図4に、フェノール硫酸法による糖の定量に用いる検量線を示した。すなわち、試料溶液の490 nmにおける吸光度を測定して糖濃度を決定するものとする。

(3) ヨードホルム反応

また、ヨードホルム反応とは、ある特定の基をもつ有機化合物に特有の反応である。試料水溶液に水酸化ナトリウム水溶液とヨウ素ヨウ化カリウム水溶液を加え温める。エタノールの存在により黄色に呈色、ヨードホルム CHI_3 の黄色沈殿が得られる

《ヨードホルム反応陽性となる部位》



※ ただし R は水素原子もしくは炭素原子である。



図3 フェノール硫酸法による呈色の様子

フェノール硫酸法による吸光度のグルコース濃度依存性

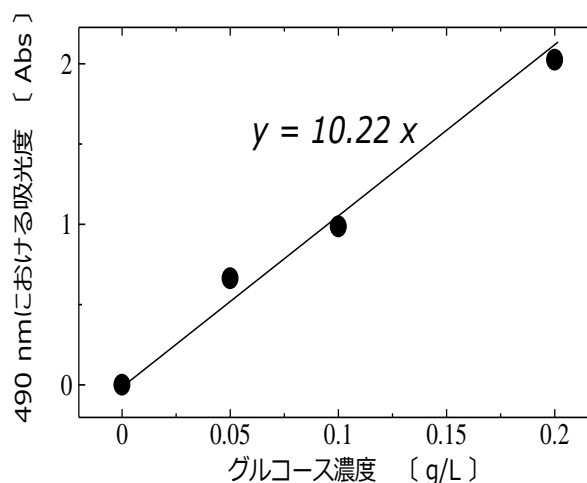


図4 糖濃度の検量線 (フェノール硫酸法)

3 実験方法

(1) みかん果皮からの糖生成

摘果みかんの皮をフラベド・アルベドと維管束・じょうのうに分け、1日乾燥させ、蒸留水、0.6 mol/L 硫酸、3.0 mol/L 硫酸、セルラーゼをそれぞれ添加した。常温で静置した。静置1週間後、pHメーターで液性を確認しながら水酸化ナトリウムにより硫酸を中和し、これを試料溶液とした(図5)。



図5 中和後の試料溶液

(2) 糖の定量

ア Somogyi-Nelson 法による糖の検出と定量

Somogyi-Nelson 法により、糖濃度を決定した。予め濃度の分かっているグルコース溶液により検量線を作成し(図2)、未知の試料の濃度決定を行った。1日後、3日後の糖の量を Somogyi-Nelson 法により定量した。

イ フェノール硫酸法による糖の検出と定量

200 倍に希釈した試料水溶液 1.0mL に 5%フェノール水溶液を 1.0 mL 加え混ぜた。次に濃硫酸 5 mL を加え混合し、10 分放置後、黄色から褐色に呈色するので、常温の水浴中でさらに 10 分間冷却した。この呈色した試料の 490nm における吸光度を測定した。予め濃度の分かっているグルコース溶液により検量線を作成し (図 4)、未知の試料の濃度決定を行った。



図 6 蒸留の様子

(3) エタノールの生成と定性

摘果みかんのアルベド 10 g に硫酸を加え、3 日間静置後中和し、試料溶液とした。これに酵母菌を加え、攪拌した後 3 日間常温で静置した。試料溶液を蒸留し (図 6)、蒸留して得られた溶液にヨウ素ヨウ化カリウム水溶液および水酸化ナトリウム水溶液を加え加温、色調の変化および匂いの変化を確認した。

4 結果と考察

(1) 糖の定量

ア Somogyi-Nelson 法による糖の定量

図 7 に Somogyi-Nelson 法による糖の定量結果を示した。蒸留水とセルラーゼ処理において明らかな糖の存在を確認した。蒸留水で処理した場合、時間経過後グルコース量が減少し、硫酸の添加により、グルコース量がわずかに増加する。セルラーゼ処理により、3 日後グルコース量増加する。液性による試薬変化が考えられるので中和を手順に加える必要がある。

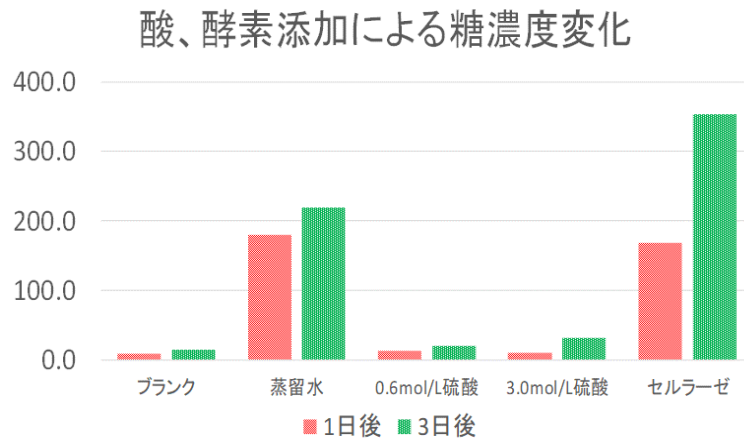


図 7 Somogyi-Nelson 法による糖の定量結果

イ フェノール硫酸法による糖の定量

図 8 にフェノール硫酸法による糖の定量結果を示した。硫酸処理において明らかな糖の存在が確認でき、処理硫酸濃度が 0.5 mol/L でも 3 mol/L でも得られる糖の量に大きな変化はないことが分かった。したがってセルロースを分解する硫酸の濃度は 0.5 mol/L で十分である。グルコース濃度は約 0.022 g/L であり、これが 200 倍に希釈された試料であることから、10 g のアルベドから約 0.9 g のグルコースを得ることができたと見積もることができる。

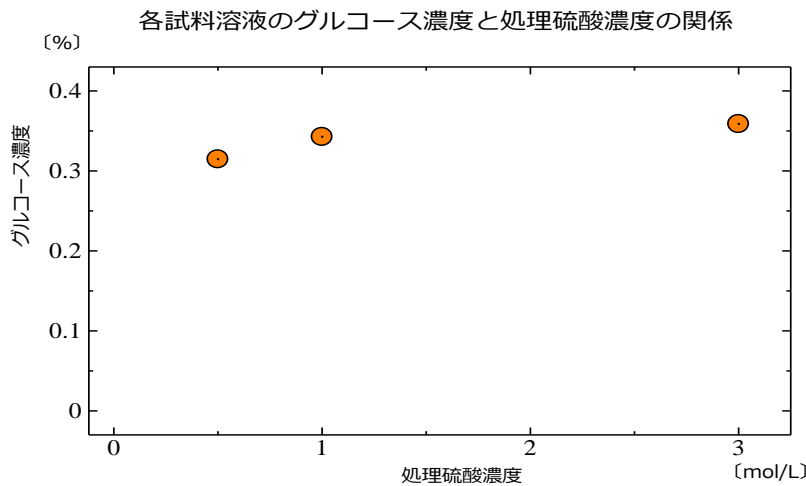


図8 フェノール硫酸法による糖の定量結果

(3) エタノールの生成と定性

蒸留中の枝つきフラスコの枝付近の温度はおよそ90°C、溶液の温度は80°Cであった。ヨードホルム反応において、黄色への色調の変化、特異臭を確認した(図9)。

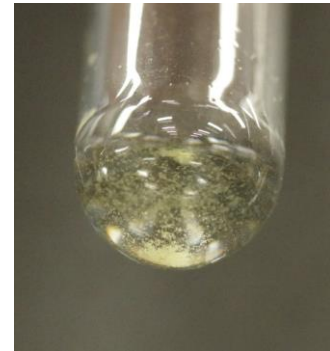


図9 ヨードホルムの様子

5 まとめと考察、今後の課題

Somogyi-Nelson法、フェノール硫酸法ともに明確な糖の存在を確認することができた。フェノール硫酸法では、先行研究に近い糖の量の値を得ることができた一方で、中和の手順が不十分であったSomogyi-Nelson法では硫酸処理により得られた糖の量が低い値となった。酸を用いたセルロースの加水分解においては、低濃度でも十分な糖を得られる結果を得た。10gのアルベドから0.9gの糖を得たと見積もることができるので、より多くの糖を得るための研究が今後の課題である。

酸でセルロースを加水分解し、中和後、酵母菌を添加することで、エタノールを得ることができた。エタノールの定量を行うことで、収率の向上につなげられると期待したい。

参考文献

- ・「カンキツ果実の機能性成分の検索とその有効利用に関する研究」野方洋一、『近畿中国四国農業研究センター研究報告第5号』p19-84,2005
- ・「アレルギー症状緩和効果のある柑橘果皮等を利用したヨーグルトの開発」大野一仁他
- ・『果樹園芸大百科カンキツ』岩政正男ほか、社団法人農山漁村文化協会発行、2000年2月
- ・『糖の定量法』北村進一ほか、日本生物工学会発行、生物工学第90巻p790-793,2013
- ・『SSH生徒課題研究論文集』蔵谷さくらほか、愛媛県立宇和島東高等学校、2018
- ・『SSH生徒課題研究論文集』岡森积至ほか、愛媛県立宇和島東高等学校、2017
- ・『第21回中国・四国・九州地区理数科高等学校課題研究発表大会要旨集』平田啓晃ほか、鹿児島県立国分高等学校、2019