

ザクロ果実の機能性に関する研究

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部
酒井 彩那 大益 美優 塚田麗

はじめに

本校の正門横には数本のザクロの木があり、初夏には花が咲き、秋には果実がたわわに実る(図1)。先輩達の研究はザクロ由来酵母を分離しその細胞破碎液を試料として機能性を探求した。ザクロ由来酵母菌体エキスは高い抗酸化性やチロシナーゼ阻害性を有し、化粧品として高く評価された。その際、比較として供試したザクロ果実果汁も高い活性を有し、特に抗酸化性は酵母エキスよりも高い値であった。ザクロの持つ高機能性は果汁のみならず果実の非可食部位にも該当し、食品素材、化粧品利用の可能性を拡大できると考えて、機能性の比較検討を試みた。抗酸化活性測定、抗菌活性測定、さらにそれらに関連すると考えられるポリフェノール量についてしらべたのでその結果を報告する。



図1 本校ザクロ木

1. ザクロ果実の試料作成

収穫後のザクロ果実を選別し、可食部位はミキシングし遠心分離後の上清と残渣に、非可食部位は果皮と果肉に分別した(図2)。可食部位の果汁(遠心分離後の上清)を0.45 μm フィルターで無菌濾過し、果汁残渣と非可食部位の果皮、果肉は各50gに10mM 酢酸バッファー100mlを加えミキシング後、振とう抽出し、遠心分離後の上清を同様に無菌濾過して試料とした(図3)。



図2 果実断面図



図3 作成試料(左から果汁 S1、残渣 S2、果皮 S3、果肉 S4)

2. ザクロ果実の抗酸化活性測定

抗酸化活性測定はABTS法で行った。数ある測定法でABTS法は水溶性、脂溶性の抗酸化物質を測定できる有利さがある。その原理はABTSであるアジノービスにペルオキシニ 硫酸カリウムを加えて活性化したABTSラジカルと抗酸化物質との反応により青色が消失する。青色退色度合を734nmの吸光度測定から活性を評価できる。

2.1 標準物質の抗酸化活性

方法: 試料の抗酸化活性を数値化するために標準の抗酸化物質としてビタミンE誘導体であるトロロックス(図4)を用い、その相当量を求めることで判定した。I液のABTS working solutionは、50%エタノールに溶解した7mM ABTS溶液100mlに140mMペルオキシニ硫酸カリウム溶液1.7mlをよく混和し、常温で暗所に24時間放置して作成した(図5)。この溶液の734nmにおける吸光度が0.7±0.02となるように50%エタノールで希釈したものを使用した。試験管にABTS working solutionを3ml採り、0.2mMトロロックス溶液の6区分30μlを添加した。添加後攪拌し常温で4分間インキュベーションした後、734nmにおける吸光度を測定し、測定値を基に検量線を作成した。



図4 試薬 トロロックス



図5 ABTS ラジカル

結果: 呈色反応(図6)からトロロックス濃度が高いほど青色が消失していることが確認できた。又、検量線の傾きから添加量0.2nmolが0.0460アブソーバンスに相当した。



図6 トロロックスとABTSラジカルの呈色反応(トロロックス添加量は左から0, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9 nmol)

2.2 ザクロ果実試料の抗酸化活性

方法と結果: 2.1と同様の方法でザクロ果実各部位を調べた。試料は測定適正範囲になるように希釈して測定した。10倍希釈した試料の反応(図7)ではS3、S4は無色透明で測定不能であった。S1は20倍希釈、S2は原液、S3は75倍、S4は50倍希釈液の測定が適当であった。又、I液のかわりに50%エタノール3mlをブランク(b)として測定した。試料1ml当たりのトロロックス相当量(TE)を測定値から算出し表1に纏めた。



図7 ABTS法による10倍希釈試料の抗酸化活性測定(左からC, S1, S2, S3, S4 尚Cは試料のかわりに蒸留水を同量添加し対照とした)

試料種類	希釈倍数(D)	吸光度(abs)	吸光度差×D	TE μmol/ml
C		0.695	0.685	
Cb		0.010		
S1	10	0.195	5.01	0.167
S1b	10	0.011		
S2	1	0.140	0.112	0.0830
S2b	1	0.028		
S3	75	0.340	27.2	0.907
S3b	75	0.018		
S4	50	0.230	25.2	0.840
S4b	50	0.049		

考察: 試料1mlあたりのトロロックス相当量を比較すると非可食部位の果皮(S3)が0.907 μmol、果肉(S4)が0.840 μmolと群を抜いて高く、果汁(S1)の5~6倍以上(非可食部位は10mM酢酸バッファーにより抽出)であることが判明した。非可食部位の有効利用に向けて検討する価値があると考えられる。

3. ザクロ果実の抗菌活性測定

ザクロ果実の酸味成分や他の栄養成分などは健康を保持する機能性である抗菌性を有していると考えザクロ果実各部位の抗菌活性測定を行った。

方法: 検定菌(図8)はコクリア菌、大腸菌、枯草菌でそれぞれNBRCの標準株の培養液を用意した。寒天穿孔平板法で直径5mm穿孔に作成したザクロ果実各部位試料S1、S2、S3、S4と10mM酢酸バッファーの5種類を30μl注入し24時間、37°Cで培養した。



図8 抗菌活性検定菌種類(左からコクリア菌(G+), 大腸菌(G-), 枯草菌(G+))

コクリア菌、大腸菌、枯草菌



図9 寒天穿孔平板法によるザクロ果実各部位の抗菌活性測定

結果と考察: 培養後の観察(図9)からS3、S4に形成された阻止円の直径は20mmを計測した。ザクロ果汁(S1)は3種の菌に対して弱い抗菌活性を有したが、果皮(S3)と果肉(S4)ははるかに高い活性を有した。又、グラム陽性菌、陰性菌に対して同程度の活性を有するところが注目すべき点である。非可食部位に含有する抗菌成分の利用に向けて検討する価値があると考えられる。ザクロ果実非可食部位は抗酸化活性のみならず抗菌活性においても高い値を示した。これらに関連する機能性成分にポリフェノールが考えられる

4. ザクロ果実のポリフェノール定量

ザクロ試料の高い抗酸化活性、抗菌活性はポリフェノール量に相関すると予想し、ポリフェノール定量を行った。



図10 タンニン酸

4.1 標準物質タンニン酸の定量

試料のポリフェノール量を標準物質のタンニン酸(図10)相当量として定量した。

方法: タンニン酸濃度5区分(0, 0.025, 0.5, 0.075, 0.1 mg/ml)の0.1mlと10%炭酸ナトリウムアルカリ溶液1mlとフェノール試薬(図11)1mlの混合液を60分間室温で反応、呈色液の750nm吸光度を測定し測定値を基に検量線を作成した。



図11 フェノール試薬

結果: 呈色反応(図12)からタンニン酸濃度が高いほど青色が濃くなることを確認できた。又、検量線の傾きからタンニン酸0.05mg/mlが吸光度差0.304アブソーバンスに相当した。



図12 タンニン酸(濃度5区分)の呈色反応(試験管左から0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1mg/ml)

4.2 ザクロ果実試料のタンニン酸の定量

方法と結果: 4.1と同様の方法でザクロ果実各部位を試料した。試料原液はポリフェノールの濃度が高すぎて測定ができないために20倍から100倍まで希釈し測定した(図13は原液試料、図14は100倍希釈試料の呈色反応)。吸光度差からポリフェノール濃度を算出しグラフ化した(図15)。



図13 原液のポリフェノール呈色反応(試験管左からコントロール、試料S1、S2、S3、S4の順)



図14 倍希釈液のポリフェノール呈色反応(試験管左から試料S1、S2、S3、S4の順)

考察:と展望: ザクロ果実各部位の抗酸化活性は非可食部位が果汁の5倍以上と高く、抗菌活性も非可食部位が高く、ザクロ果実各部位のポリフェノール含量測定では非可食部位が高含量で果汁の約40倍であった。非可食部位の含有ポリフェノール量と抗酸化・抗菌作用との関連性は高いと推察される。今まで廃棄していたザクロ非可食部位の利用について、例えば、高機能食品素材、化粧品利用が期待できる。今後、抗カビ活性試験、α-グルコシダーゼ阻害活性測定など他の機能性を探索しザクロ果実の健康効果を検証していきたい。

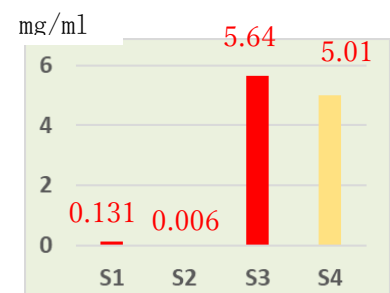


図15 ザクロ果実各部位のポリフェノール含量