

カボチャ種子及びワタの有効利用に関する研究 (平成11年度)

研究開発課 葛西大介、大庭 潔、永草 淳

1. 研究の目的と概要

道内有数の畑作地帯である十勝地域は、カボチャの栽培も盛んであり、その加工副産物としての種子・ワタは年間推定約 1,000t (5社調べ)といわれている。これらは、現在堆肥として処分されており、その有効利用が望まれている。

また、これまでにカボチャの種子については抗菌活性物質の存在が報告*されているが、ワタについては何の取り組みもなされていないのが現状である。

本試験では、これら加工副産物の有効利用を目的として、カボチャワタ中にも種子と同様に抗菌活性を見出し、これら抗菌活性物質についていくつかの知見を得たので報告する。

2. 試験研究の方法

(1) 供試材料

提供された種子・ワタから種子を取り除き、ホモジナイザーで均質化後、生のまま使用した。

(2) 抗菌活性物質の抽出

水溶性成分の抽出

ワタ固形分に対して 10 倍量の蒸留水を加え、37℃、1 晩振とう後、遠心分離 (7,000rpm、10min.) を行い、上清を水抽出液とした。抽出液は濃縮乾固後、重量を測定し、蒸留水に一定濃度となるように溶解し、試験に供した。

脂溶性成分の抽出

ワタ固形分に対して 10 倍量のエーテルを加え、37℃、1 晩振とう後、遠心分離 (7,000rpm、10min.) を行い上清を得た。残った沈澱物は同様の操作をさらに 2 回繰り返して行い、その都度上清を初めの上清に加えた。こうして得られた上清に等量の蒸留水を加え、分液漏斗で分配抽出し、エーテル抽出液とした。抽出液は濃縮乾固後、重量を測定し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に一定濃度となるように溶解し、試験に供した。

(3) 供試菌株

抗菌活性試験の対象とした菌は、カビとして *A.niger* (JCM5697)、グラム陽性菌として *B.s ubtilis* (AHU1037)、グラム陰性菌として *E.coli* (JCM1649T) を使用した。カビについてはポテトデキストロースブロスを用い、37℃にて 2 晩、細菌についてはトリプトソーヤブイヨンを用い、37℃にて 1 晩培養しホモジナイズして供試菌株とした。

(4) 抗菌活性スクリーニング

抗菌活性試験はペーパーディスク法にて行った。カビについてはポテトデキストロース寒天培地、細菌についてはトリプトソイ寒天培地を用い、径 90mm のシャーレに注入固化した。培地に菌液 50 µl を平板塗沫し、乾熱滅菌してあるペーパーディスク (ADVANTEC TOYO PA PERDISK Thick ,直径 8mm) を乗せて、既知濃度のサンプルを 50 µl 滴下し、カビは 37℃、48 時間培養後、細菌は 37℃、24 時間培養後に生育阻止円の有無を調べた。

(5) 抗菌活性物質の分画

エーテル抽出物について、常法に従って酸性度の差により有機酸性物質、フェノール性物質、塩基性物質、中性物質に分画 (図 1) し、これらの分画液を濃縮乾固後、重量を測定し DMSO に一定濃度となるように溶解し、抗菌活性試験を実施した。

(6) ケイ酸カラムクロマトグラフィー分画

分画した中性物質をさらにケイ酸カラムクロマトグラフィーを用いて分画した。充填剤として Silica gel 60 (MERCK 製) を用い、溶媒としてヘキサン 500ml、ヘキサン - ベンゼン (85:15) 500ml、ヘキサン - エーテル (95:5) 1000ml、ヘキサン - エーテル (85:15) 1000ml、ヘキサン - エーテル (70:30) 500ml、ヘキサン - エーテル (50:50) 500ml、エーテル 500ml、エーテル - メタノール (97:3) 500ml、エーテル - メタノール (20:80) 500ml を順次流して段階溶出を行った。

溶出液は 200ml ずつの画分として集め、乾固後重量を測定してグラフ (図 2) を作成し、再度エーテルに溶解して ~ の画分を得た。

これらの画分はそれぞれ濃縮乾固後、重量を測定し DMSO に一定濃度となるように溶解し、抗菌活性試験を実施した。

3 . 試験研究の結果

(1) 水溶性成分、脂溶性成分の抗菌活性試験

抽出した水溶性成分と脂溶性成分の抗菌活性試験を行ったところ、*A.niger*、*E.Coli* に対してはどちらも阻止円の形成は認められなかったが、*B.subtilis* に対しては脂溶性成分において阻止円の形成が認められた。

また水溶性成分の収量は 28.078g/100g 固形、脂溶性成分の収量は 2.6565g/100g 固形であった。

(2) 抗菌活性物質の分画

図 1 のスキームに従い、エーテル抽出液を分画して得られた有機酸性物質、フェノール性物質、塩基性物質、中性物質について、*B.subtilis* に対する抗菌活性試験を行ったところ、有機酸性物質、フェノール性物質、中性物質において阻止円の形成が認められた。

また、それぞれの画分の収量は有機酸性物質、フェノール性物質、塩基性物質、中性物質の順に 0.0111g、0.1587g、0.2226g、2.0696g/100g 固形であった。

(3) ケイ酸カラムクロマトグラフィー分画

得られた画分の には炭化水素、ステロールエステル、 にはトリグリセリド、遊離脂肪酸、 には遊離ステロール、 にはジグリセリド、 にはモノグリセリド、 には混入していたリン脂質が含まれる。

画分 ~ のそれぞれについて、*B.subtilis* に対する抗菌活性試験を行ったところ、画分 には阻止円が認められなかったが、その他の画分 ~ の全てにおいて明確な阻止円が認められた。これは、抗菌活性を有する物質が複数存在するか、分画方法が適正でなく十分に分画されていない可能性があり、今後の検討が必要と思われる。

また、画分 ~ の収量は順に 0.2122g、0.7707g、0.1476g、0.1743g、0.4864g、0.1856g/100g 固形であった。

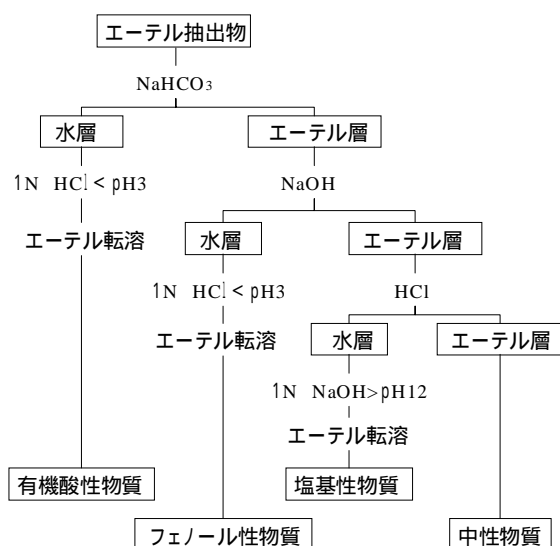


図1 酸性度の差による分画

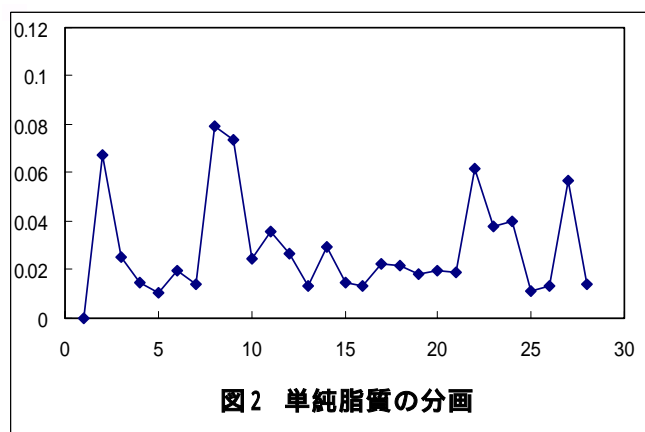


図2 単純脂質の分画

4．まとめ

- (1) カボチャ加工副産物の有効利用を目的としてワタ中に含まれる抗菌活性について検討したところ、エーテル抽出物において、*B.subtilis* に対する阻止円の形成を確認した。
- (2) エーテル抽出液を酸性度の差により分画したところ、有機酸性物質、フェノール性物質、中性物質画分において、*B.subtilis* に対する阻止円の形成を確認した。
- (3) 中性物質画分について、更にケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画を行ったところ、画分 ~ において *B.subtilis* に対する阻止円の形成を確認した。

5．今後の課題

- (1) 各試料間の抗菌活性の強さを比較する上で、活性単位の定義を作成する必要がある。
- (2) 本試験では抗菌活性の有無および抗菌活性物質の分画を行った。今後、抗菌活性を示した各画分について、さらなる精製方法の検討が必要であると考えられる。

- 謝 辞 -

本試験の実施にあたり、ご指導、ご協力を賜りました冷凍食品研究会の皆様にお礼申し上げます。

* 参考文献) 西村弘行：H 6 - 8 産学等共同研究推進事業研究報告書、p.10(1997)

カボチャ種子及びワタの有効利用に関する研究 (第2報) (平成12年度)

研究開発課 葛西 大介、大庭 潔、永草 淳

1. 研究の目的と概要

加工副産物としてのカボチャ種子・ワタの有効利用を目的として、カボチャワタ中の抗菌活性物質とその利用について検討した。前報では、カボチャワタの脂溶性画分が *B.subtilis* に対する抗菌活性を有することを報告した。

本試験では、抗菌活性を有する脂溶性画分を精製し、更なる知見を得るとともに、この抗菌活性の応用について検討を試みた。

2. 試験研究の方法

(1) 供試材料

提供された種子・ワタから種子を取り除き、ホモジナイザーで均質化後、生のまま使用した。

(2) 抗菌活性物質のスクリーニング

抗菌活性物質の抽出

ワタ固形分に対して10倍量のエーテルを加え、37℃、1晩振とう後、遠心分離(7,000 rpm、10min.)して上清を得た。遠心残渣は同様の操作を2回繰り返して、初めの上清に加えた。得られた上清に等量の蒸留水を加え、分液ロートで分配抽出し、濃縮乾固後、重量を測定し、エーテル抽出液とした。

抗菌活性物質の分画

エーテル抽出液について、ケイ酸薄層クロマトグラフィー(ヘキサン:エーテル:酢酸=85:15:1)を行い、得られたスポットをそれぞれスパチュラでかきとり、エーテルを用いて再抽出を行った。再抽出液は濃縮乾固後、重量を測定し、再度エーテルに溶解して ~ の画分を得た。

抗菌活性スクリーニング

ケイ酸薄層クロマトグラフィー(TLC)により得られた画分 ~ はジメチルスルホキシド(DMSO)に転溶後、前報同様、*B.subtilis* を使用してペーパーディスク法にて生育阻止円の有無を確認した。

抗菌活性物質の同定

ガスクロマトグラフィー(column: Silar10-C)を用いて遊離脂肪酸組成分析を行い、組成比に基づき調整した標準品単品および混合物を DMSO に転溶後、ペーパーディスク法にて活性画分と比較した。

(3) 抗菌活性画分の性状試験

抗菌スペクトル試験

供試菌株として *B.subtilis* 以外に、*E.coli*、*S.aureus*、*S.lactis*、*P.fluorescence*、*S.cerevisie* を用い、ペーパーディスク法にて抗菌活性を試験した。培地は *S.cerevisie* については PDA 寒天を使用し、それ以外はトリプトソイ寒天培地を使用した。温度、培養時間は *P.fluorescence* については 10℃、10日間、*S.cerevisie* については 20℃、7日間、それ以外は 35℃、2~7日間培養した。

デンプンによる活性阻害試験

活性物質に対するデンプンの影響を調べるため、トリプトソイ寒天培地に1~5%のデンプンを添加したものを調整し、*B.subtilis* を用いてペーパーディスク法を行い、阻止円の形成を観察した。

加熱耐性試験

活性物質をオートクレーブ(121℃)にて30、60、120分間滅菌したものについて、*B.subtilis* を用いてペーパーディスク法を行い非加熱のものと比較した。

最小発育阻止濃度 (MIC) 試験

エーテル抽出物および TLC 活性画分について、それぞれ 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0mg/ml 培地となるよう DMSO に転溶し、トリプトソイ寒天培地に混釈して寒天平板を調整した。寒天平板をよく乾燥後、*B.subtilis*、*E.coli*、*S.aureus* を塗抹し、35℃、2～7日間培養してコロニー生育の有無を確認した。

(4) カボチャワタの利用 (きのこ菌床への静菌剤としての利用)

きのこ菌床 (オガ粉 20g、米ヌカ 20g、水 75g) の栄養源として、従来物 (米ヌカ) と 0、50、100% の割合で代替し、オートクレーブにて滅菌後、*B.subtilis* を菌床 1 g あたり 10^{-1} となるよう接種し、菌の増殖を比較した。

3. 試験研究の結果

(1) 抗菌活性物質のスクリーニング

TLC 画分の抗菌活性スクリーニング

得られた画分にはリン脂質などの複合脂質、中にはトリグリセリド、ステロール、には遊離脂肪酸、中にはステロールエステルが含まれる。

B.subtilis に対する抗菌活性試験では、画分 1 に極大阻止円が形成され、次いで画分 2 に阻止円が確認された。他の画分には阻止円は形成されなかった。

活性物質の同定

抗菌活性を示す主要な成分と考えられる画分 2 (遊離脂肪酸) の遊離脂肪酸組成分析の結果 (表 1、図 1) をもとに調整した標準品単品および混合物の抗菌活性試験を行ったところ、18:1 (オレイン酸) が主な活性物質と考えられた。

表 1: TLC 画分 の
遊離脂肪酸量

	(mg/100mg)
14:0	1.2
16:0	16.0
18:0	5.1
18:1	25.5
18:2	33.9
18:3	10.6

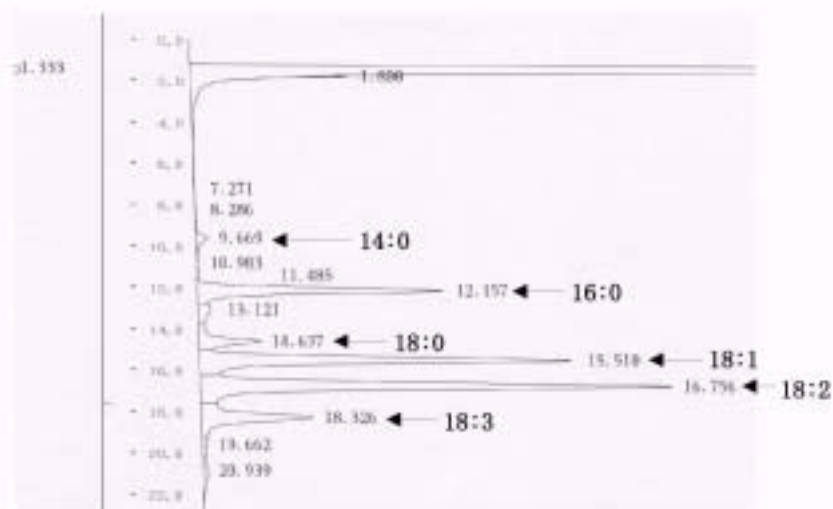


図 1 TLC 画分 の遊離脂肪酸組成

(2) 抗菌活性画分の性状試験

抗菌スペクトル

供試した菌株を用いて抗菌活性試験を行ったところ、すべての菌株で抗菌活性を示したが、*S.aureus*、*S.cerevisie* では培養日数の経過とともに阻止円が侵食され、むしろ静菌活性と考えられる。

デンプンによる活性阻害試験

デンプン添加 2% までは阻止円が形成されたが、デンプン添加 3% 以上では阻止円は形成されなかった。

加熱耐性試験

オートクレーブ（121℃）による試験では2時間の滅菌でも阻止円が形成され、抗菌活性に影響はなかった。

最小発育阻止濃度（MIC）試験

MIC試験の結果を表2に示した。

表1：カボチャワタ抽出物の最小発育阻止濃度

	<i>B.subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
TLC画分	0.5mg/ml	0.5mg/ml	<0.1mg/ml
エーテル抽出物	5.0mg/ml	5.0mg/ml	<0.5mg/ml

(3) カボチャワタの利用（きのこ菌床への静菌剤としての利用）

きのこ菌床にカボチャワタを混合した際の *B.subtilis* における増殖の抑制効果を表3に示した。

0%代替区では、3日後に 10^7 レベルに達したのに対し、50%区、100%区では7日後においても <300以下のレベルを保っていた。

表2：カボチャワタを使用したきのこ菌床の *B.subtilis* における菌の増殖

代替率	摂取日	1日後	3日後	7日後
0%	1.5×10^{-1}	9.9×10^4	4.3×10^7	1.5×10^8
50%	1.5×10^{-1}	<300(0)	<300(0)	<300(0)
100%	1.5×10^{-1}	<300(0)	<300(0)	<300(0)

4. まとめ

- (1) カボチャワタにおける抗菌活性は主に遊離脂肪酸であるオレイン酸であり、その他にリン脂質を含む複合脂質が作用しているものと考えられた。
- (2) カボチャワタに含まれる抗菌活性物質は幅広い抗菌スペクトルを有するが、その効力はむしろ静菌効果と考えられ、熱に対しては非常に安定であるが、拮抗阻害物質（デンプンなど）に対しては活性が阻害されやすかった。
- (3) カボチャワタ抽出物の抗菌活性の強さは、MICとして *B.subtilis* に対してエーテル抽出物では5.0mg/ml、精製したTLC画分では0.5mg/mlであった。
- (4) 現在、きのこ菌床の汚染菌として *Bacillus* 属及び真菌類（カビ）が問題になっているが、カボチャワタをきのこ菌床の栄養源と代替して混合することにより、菌床の汚染菌を抑制し、きのこの生育阻害（遅延）を予防できる可能性が示唆された。

5. 今後の課題

- (1) カボチャワタの単独利用はコスト的に望ましくなく、また、主な抗菌性物質がオレイン酸であるならば、種子により多く含まれると考えられ、今後、排出された種子ワタ全体での静菌効果、応用について検討する必要がある。
- (2) きんのこ菌床への応用については、今後、関係機関との連携を深め、更なる検討を進めていく予定である。

謝辞 本試験の実施にあたり、ご指導、ご協力を賜りました北海道立林産試験場、(株)大望様、および冷凍食品研究会の皆様にお礼申し上げます。

カボチャ種子及びワタの有効利用に関する研究（第3報）

～未利用資源循環システム構築への提案～（平成13年度）

研究開発課 葛西 大介、大庭 潔、永草 淳

1. 研究の目的と概要

カボチャ加工において排出される種子・ワタはこれまで農地に堆肥として還元されてきたが、発芽したり、完熟に長期間を要するなど堆肥に適しているとは言えなかった。

このため、工業的に肥料・飼料化することも試みられてきたが、破碎・乾燥工程での高コストが課題となり実用化が困難であった。

このような背景から、当センターでは平成11年度から加工副産物としてのカボチャ種子・ワタの有効利用について試験研究を行ってきた。その結果、カボチャワタの抗菌活性を見出し、これを利用したキノコ菌床（汚染菌の抑制）としての可能性（前報）を提案してきたが、キノコ菌床においても前処理（破碎・乾燥）コストが課題となり実用化が難しいと考えられた。

そこで本報では、前処理工程のコストを吸収し得る高付加価値製品を新たに開発することを目的として、カボチャシードオイルの製品化を検討するとともに、これまでの総括としてカボチャの未利用資源循環システムについて提案する。

2. 試験研究の方法

（1）供試材料

原料の種子・ワタは（有）林屋様から提供いただいた。

カボチャシードオイルは圧搾法により深川油脂工業（株）様に試作、提供いただいた。

（2）試験分析方法

理化学試験

屈折率はアッペ屈折計（ATAGO）にて20℃のときの屈折率を測定した。

酸価、過酸化物価、ケン化価、ヨウ素価、不ケン化物%は常法に従い測定した。

成分分析

脂肪酸組成は試料をケン化抽出後、メチルエステル化を行い、ガスクロマトグラフ（Column：SHIMADZU Silar-10C）を用いて分析した。

植物ステロールは試料をケン化抽出後、TMS化を行い、ガスクロマトグラフ（Column：SHIMADZU Silicone OV-1）を用いて分析し、 β -シトステロール量として換算した。トコフェロールは直接ヘキサンに溶解し、高速液体クロマトグラフ（Column：TOSO TSKgel NH₂-60）を用いて分析した。レチノール当量は試料をケン化抽出後、エタノールに転溶し、高速液体クロマトグラフ（Column：TOSO TSKgel ODS-80Ts）を用いて α -カロテンを定量し、レチノール当量に換算した。

酸化安定性

酸化安定性は油脂5gに50mMリン酸緩衝液（pH7.0）10mlを加えてエタノールを用いて25mlに定容し、40℃暗所で5日間保存中の過酸化物の増加をロダン鉄法により分光光度計（Shimadzu UV-2200A）にて500nmのときの吸光度として測定した。

3. 試験研究の結果

（1）理化学試験

表1に理化学的性状を示した。その結果、カボチャシードオイルは不飽和脂肪酸、特にリノール酸の組成比が大きい半乾性油であることを示唆し、市販されている食用植物油脂と同様の性状をもつ油脂であった。

表1) 理化学的性状

屈折率(20)	酸価	過酸化物価	ケン化価	ヨウ素価	不ケン化物%
1.4745	0.36	0.0	198	120	1.3

(2) 成分分析

表2に脂肪酸組成を、表3に植物ステロール、トコフェロール、 β -カロテン、レチノール当量を示した。

その結果、カボチャシードオイルは β -カロテンを多く含む特徴的な油脂であった。

表2) 脂肪酸組成 (%)

16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	その他
4.9	7.2	20.7	54.4	2.3	0.5

表3) 植物ステロール、トコフェロール及びレチノール当量

全ステロール (mg/100g)	トコフェロール(mg/100g)	β -カロテン (μ g/100g)	レチノール当量 (μ g/100g)
653	2.7	7.8	8300

(3) 酸化安定性

図1に40 保存中の過酸化物の増加を示した。

その結果、カボチャシードオイルは酸化安定性が低く、グレープシードオイルと同様の挙動を示した。

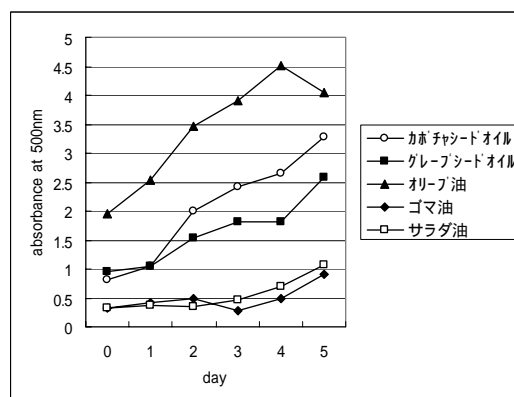


図1) 40 保存中の過酸化物の経日変化

4. まとめ

(1) 試作されたカボチャシードオイルは食用油脂として十分な性状を有しており、 β -カロテンを多く含む油脂であった。また、酸化安定性を考慮するとグレープシードオイルと同様の用途が適していると考えられた。

(2) カボチャシードオイル製造の副産物である圧搾残渣を肥料・飼料及びキノコ菌床へ利用することにより、これまでの課題であった前処理工程のコスト削減が可能であると考えられる。

(3) カボチャシードオイルを製品化することにより、廃棄物ゼロの未利用資源循環システムの構築が期待できる(図2)。

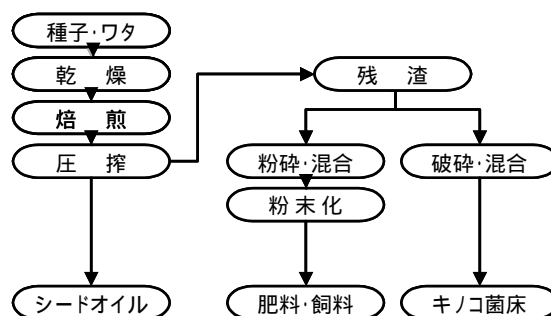


図2) 種子・ワタの資源化システム

謝辞 本試験の実施にあたり、ご指導、ご協力を賜りました(有)林屋様、深川油脂工業(株)様、(株)大望様並びに北海道立林産試験場、冷凍食品研究会の皆様へ御礼申し上げます。