

蛍光指紋によるオリーブ葉の機能性成分の評価

指導教員 粉川美踏
副指導教員 北村豊

遠藤加奈子(201610643)

1. 背景

近年世界的にオリーブオイルの需要・生産量が上がっているが、収穫シーズンを終え剪定されたオリーブの葉の多くが廃棄されている。

一方でオリーブ葉に多く含まれるポリフェノールであるオレウロペインの生体における機能性が注目され、地球温暖化による家畜の暑熱ストレスに対する軽減作用も期待されている¹⁾。しかしオリーブ葉のオレウロペイン含量は品種・生産場所・保存状態によって異なる為、機能性を評価する際ロットごとに量る必要がある²⁾。

2. 目的

本研究では、蛍光指紋を用いてオリーブ葉のオレウロペイン含量の推定モデルを作成し、未利用資源であるオリーブ葉の利用拡大につなげることを目的とした。蛍光指紋の利点として、非破壊で迅速な測定が出来ること、高価な分析機材や煩雑な前処理を必要としないことが挙げられるため、オリーブ葉の機能性に着目した生産・流通の現場での利用が期待される。

蛍光指紋測定時のオリーブ葉のオレウロペイン抽出条件を検討し、簡易・迅速なオレウロペイン量推定モデルを作成した。

3. 材料・方法

1) 抽出条件の検討

オリーブ葉粉末を直接測定した結果、オレウロペイン由来の蛍光が観察されなかったため、抽出液での測定を試みた。粉末はオレウロペイン含量 2.9 g/100 g のものを用い、それぞれ 20 g/L、50 g/L、80 g/L 濃度で熱水と 80%エタノールによって抽出を行い、液体用セルに入れて蛍光指紋を測定した。さらにそれぞれを 1/100 倍濃度、1/1000 倍濃度で熱水抽出した溶液についても蛍光指紋を測定した

2) 本実験

8 種類のオリーブ葉乾燥粉末(オレウロペイン含量が乾燥粉末中 2.70 g、4.31 g、4.49 g、4.50 g、4.90 g、4.92 g、5.08 g、9.57 g)それぞれ 0.04 g/L 濃度で熱水抽出し、各オリーブ葉につき抽出液を 3 回調製し、それぞれ 3 サンプルの測定を行って 72 個の蛍光指紋データを得た。測定波長は励起・蛍光ともに 200~700 nm に設定した。

蛍光指紋の測定には分光蛍光光度計(F7000(株)日立ハイテクサイエンス)を用い、解析には統計ソフト MATLAB を用い PLS(Partial Least Square、部分最小二乗)回帰を行った。モデルの有効性を調べる為に、葉乾燥粉末(オレウロペイン含量が 100g 中 2.70 g、4.31 g、9.57 g) 抽出液を用いて prediction の精度を検討した。

また、2つの葉乾燥粉末(オレウロペイン含量が 100g 中 4.31 g、9.57 g) 抽出液に、それぞれ 0.025 g/L オレウロペイン標準溶液を 1~4 mL 添加し、オレウロペイン量の異なる疑似的な 8 個の抽出液

サンプルの蛍光指紋を測定し、標準品の添加がモデル精度向上に寄与するかを検討した。

4. 結果と考察

20 g/L、50 g/L、80 g/L 濃度では熱水抽出・エタノール抽出どちらも濃度消光によりオレウロペイン由来の蛍光が観察されなかった。1/1000 倍、1/100 倍濃度では蛍光が観察され、うち低濃度の 4 サンプルでオレウロペイン濃度と蛍光強度に線形性がみられた。

本実験において 72 個抽出溶液の蛍光指紋のうち、主成分分析で外れ値とされた 6 サンプルを除いた 66 個の蛍光指紋図に PLS 回帰を適用し、検量線を作成した(図 1)。Prediction を実行した決定係数 R^2 Pred は 0.997、予想二乗平均平方根誤差(Root Mean Square Error)はオリーブ葉乾燥粉末 100 g に置き換えると 0.525g であった。このモデルは、暑熱ストレスによる不妊問題の解決策として期待されているオリーブ葉の活用に十分な精度で推定が可能であると言える(図 1)。

また、上記の比較として 66 サンプルに疑似的な 8 サンプル(×3 回分)を加えた蛍光指紋図の 90 サンプル群に対しても PLS 回帰を適用したところ、RMSEP の値は 1.15 g であり、疑似サンプルを加えない 66 サンプル群の方が、RMSEP の値が小さく Calibration データセットの作り方として適切であった。このことは標準品添加サンプルを加えることによるモデルの精度向上はほとんど見られなかったことを示している。

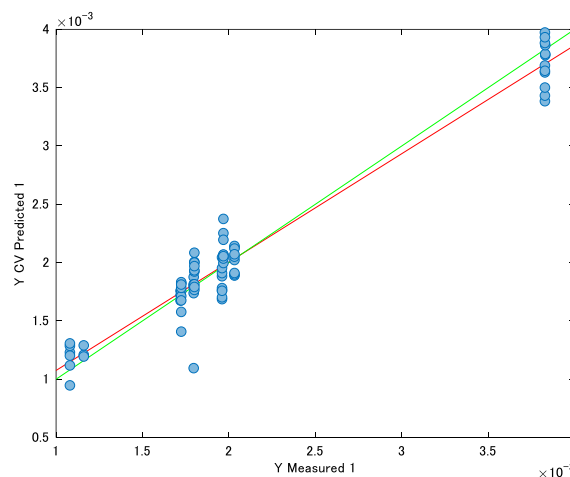


図 1 オレウロペイン濃度推定モデル

¹⁾ 若林由季ほか『オリーブ葉含有化合物による卵巣機能の改善作用』(2008)

²⁾ 大山憲一ほか『香川県産飼料用オリーブ葉のポリフェノール含量に及ぼす保存方法の影響』(2016)