

# 乾燥デラウェア果皮の有効利用に関する研究

## 一果皮抽出液の納豆菌に対する抗菌効果の検討一

にしかわ のり え      おかばやし いずみ  
西川 章江\*      岡 林 泉\*\*

要旨：本研究では、種なしブドウの柏原産デラウェア果皮の有効利用のために、果皮抽出液ポリフェノールのグラム陽性菌の納豆菌に対する抗菌効果について調査した。オートクレーブ加熱処理なし乾燥果皮ポリフェノールは、80%水性エタノールによる抽出が良好であった（8.77mg エピカテキン相当量/g 乾燥重量）。オートクレーブ加熱処理なし果皮抽出液は納豆菌の増殖を抑制する効果があり、納豆菌のコロニー数とポリフェノール濃度に強い負の相関（ $r = -0.85$ ）を示した。10,000 倍に希釈した納豆菌の発育阻止濃度はブドウ果皮抽出液 700 $\mu$ l 以上であった。さらに、ブドウ果皮に含まれるポリフェノール化合物のうち、ケンフェロールに高い納豆菌に対する増殖抑制効果が認められた。

キーワード：柏原産デラウェア、乾燥果皮、納豆菌、抗菌効果、ポリフェノール

### I はじめに

#### 1-1 大阪府のデラウェア栽培とその利用

大阪府はぶどう栽培が盛んで、令和5年の収穫量は3,520 トン<sup>1)</sup>全国第8位、栽培面積全国第9位を誇り、全国に出荷している。本学のある柏原市や羽曳野市、交野市、枚方市が主な産地で、デラウェア、ピオーネ、シャインマスカット、マスカット・ベリーA、ネオマスカット、甲州など多くの品種が栽培されている<sup>2)</sup>。そのなかでも主力品種のデラウェアでは栽培面積全国第3位を誇る。デラウェアはアメリカで偶発実生として発見された品種で、栽培時にジベレリン処理により種なしブドウである。デラウェアは、ワインをはじめ、ジャム、グミ、金平糖等の食品にも利用されている。果皮を剥いたぶどう果実が入った飲料も開発された<sup>3)</sup>。2022年6月には株式会社ダスキンが運営するミスタードーナツで、大阪産デラウェアを使用した「エンゼルフルーツ 大阪産デラウェア」として期間限定商品が販売された<sup>4)</sup>。柏原市にあるカタシモワインフード株式会社によると、デラウェアの果汁を搾った後の皮もブランデーの原料としても活用し、さらにその後の皮は、肥料としても利用しているとのことである。

#### 1-2 ブドウに含まれるポリフェノールと機能性

ブドウに一番多く含まれているポリフェノールは、色素であるアントシアニンや渋みのもとになるカテキン、プロシアニジン類等のフラボノイド類と言われる化合物で、ワインでは色や呈味性に大きく寄与している<sup>5)</sup>。ブドウのポリフェノールは、その70%近くが種子に含まれており、果皮には全体の20~30%とされる。プロアントシアニジンを主成分とするブドウ種子抽出物は既存添加物の抗酸化剤として知られており、抗ウイルス効果についても報告されている<sup>6)</sup>。ブドウ果皮色素は、アメリカブドウ (*Vitis labrusca* L.) 又はブドウ (*Vitis vinifera* L.) の果皮から得られるアントシアニン

\*大阪教育大学 健康安全教育学系 健康安全科学部門， \*\*2022 年度大阪教育大学 健康安全科学専攻 卒業生

を主成分とする天然由来添加物<sup>7)</sup>で、主に、飲料、ガム、ワイン、ジャム、アイスクリームなどを赤色または、赤紫色に着色する目的で使われている。また、ブドウ果皮由来の抽出物に含まれる、特にプロシアニジンオリゴマーが、化膿細菌、食中毒関連細菌、MRSA に対して抗菌作用を示した報告もあり、抗菌剤としても開発されている<sup>8)</sup>。老田ら<sup>9)</sup>は、耐酸耐熱性細菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* に対する巨峰種子ポリフェノール類の抗菌効果を報告した。ブドウの品種で含まれるポリフェノールの種類と濃度が変わる<sup>10)</sup>。抗菌効果についてはブドウの品種で異なると考えられる。しかしながら、デラウェア果皮を用いた細菌に対する抗菌効果の報告はみあたらない。

### 1-3 研究の目的

本稿では、柏原産のデラウェア果皮の有効利用のために、納豆菌に対する果皮抽出液の抗菌効果と総ポリフェノール濃度に関係を明らかにする。また、ブドウ果皮ポリフェノール化合物について納豆菌に対する抗菌効果も調査する。

## II 研究方法

### 2-1 乾燥デラウェア果皮エキスの総ポリフェノール量

#### 1) 材料と乾燥デラウェア果皮の調製

大阪府柏原産デラウェアを 2022 年 6 月に購入した。デラウェア果皮（新鮮重量 98.7g）を水で洗浄後食品乾燥機（ラボネクト株式会社/家庭用食品乾燥機 ドライミニ）にて 60℃で 72 時間乾燥させた。乾燥した果皮（乾燥重量 16.1g）は、乳鉢にて粉碎した。乾燥果皮の半分はオートクレーブ（アルプ株式会社/高圧蒸気滅菌器 KTR-3045A）で 121℃20 分間加熱処理をした。

#### 2) 分析用試料液の調製

乾燥果皮（オートクレーブ処理なし・あり）0.5g に対して、80%水性エタノール、イオン交換水および 5%酢酸水溶液を 10ml 加えて 1 晩室温抽出し、濾紙（ADVANTEC No.5B）で濾過した。各濾液を抽出液とし各実験に供した。

#### 3) 乾燥デラウェア果皮抽出液の総ポリフェノール含有量の測定

乾燥果皮の総ポリフェノール量の測定は、既報<sup>11)</sup>に準拠してフォリン・チオカルト試薬を用いて測定した。総ポリフェノール含有量は、乾燥果皮の乾燥重量（DW）1g あたりのエピカテキン相当量（mg/gDW）で算出した。

### 2-2 抗菌効果実験

#### 1) ポリフェノール化合物

本研究で使用したブドウに含まれるポリフェノール化合物は、Shivraj Hariram Nile ら<sup>12)</sup>と Yan Du らによる研究<sup>13)</sup>を参考に、(+)-カテキン(1)、(-)-エピカテキン(2)、ケンフェロール(3)、ケルセチン(4)、ミリスチン(5)、ルチン(6)、カフェー酸(7)、trans-*p*-クマル酸(8)、trans-ケイ皮酸(9)、レスベラトロール(10)（すべて東京化成工業株式会社）の 10 種類とした。各ポリフェノールの濃度は 1mg/ml になるように、イオン交換水またはエタノールで溶解し調製した。

#### 2) 納豆菌の分離

一般に、植物ポリフェノールの抗菌効果の実験で使用する菌は食中毒や健康に害を及ぼすような病原性微生物を用いる。しかしながら、本研究では、実験環境の安全性の面から市販納豆から分離した納豆菌を供試菌とした。納豆菌はグラム陽性菌腐敗原因菌の代替細菌とした。

### 3) 抗菌効果測定用菌液の調製

標準寒天培地にて室温で一晩培養した納豆菌のコロニーを 20 ml の液体培地に 1 白金耳植菌し、室温で 24 時間培養した。この培養液を納豆菌原液とした。納豆菌培養原液の OD<sub>600</sub> は約 0.65 で、滅菌イオン交換水で 10,000 倍に希釈したものを抗菌効果の実験に供した。

### 4) 抗菌効果の測定

納豆菌に対する抗菌効果の測定には、外径 90 mm 滅菌 DH シャーレに、200  $\mu$ l の①イオン交換水（対照区）、②80%エタノール（対照区）、③オートクレーブ加熱処理ありの乾燥果皮の 80%含水エタノール抽出液、④オートクレーブ加熱処理なしの乾燥果皮 80%エタノール抽出液に 10,000 倍に希釈した納豆菌液 1 ml をそれぞれに加え、さらに 15ml 標準寒天培地を注ぎ混ぜ固めた。なお、80%エタノール試料（②～④）はアルコール分を揮発後に納豆菌液を加えた。各寒天培地は室温（25℃）で 48 時間培養した後にコロニー数を計測した。納豆菌に対して増殖抑制作用のあった試料においては最小発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration, MIC）を計測した。100  $\mu$ l～800  $\mu$ l 乾燥果皮抽出液に 10,000 倍希釈納豆菌液 1 ml を加え平板混濁法で算定した。各濃度の乾燥果皮抽出液は最終液量 600  $\mu$ l あるいは 800  $\mu$ l になるように 80%エタノールで調製した。また、各抽出液はアルコール分を揮発させ、その後納豆菌液と混合させた。各寒天培地は室温（25℃）で 48 時間培養後コロニー数を計測した。ポリフェノール化合物の納豆菌に対する抗菌効果については、コントロールを 80%エタノールとし、カテキン、エピカテキン、ケンフェロール、ケルセチン、ミリセチン、ルチン、カフェー酸、クマル酸、ケイ皮酸、レスベラトロールをそれぞれ 200  $\mu$ g 加え、室温（25℃）48 時間培養した後にコロニー数を計測した。

## III 結果および考察

### 3-1 乾燥デラウェア果皮エキスの総ポリフェノール量

乾燥デラウェア果皮の抽出液別の総ポリフェノール含有量の測定結果を表 1 に示す。総ポリフェノール含有量は、オートクレーブ加熱なしの果皮は、80%エタノール抽出、水抽出および 5%酢酸抽出のいずれにおいてもオートクレーブ加熱ありの果皮よりも高値であった。総ポリフェノール量の減少は、高温高压のオートクレーブ加熱により加水分解されたためと示唆される<sup>14)</sup>。また、

(+) -カテキンのような低分子のポリフェノール成分は加熱処理（ここではオートクレーブ処理）すると、高分子化することが報告されている<sup>15)</sup>。また、ポリフェノール分析法では、高分子含有量が低く見積もられる可能性も考えられる。

表 1 乾燥デラウェア果皮の抽出液別の総ポリフェノール含有量

	80%エタノール抽出液	水抽出液	5%酢酸抽出液
	エピカテキン相当量 mg/gDW		
オートクレーブ加熱なし	8.77 (0.06)	7.48 (0.02)	7.81 (0.02)
オートクレーブ加熱あり	6.13 (0.02)	6.05 (0.01)	6.46 (0.02)

数値は、平均値（標準偏差）を示す（n=5）。

DW:乾燥重量

### 3-2 納豆菌に対する抗菌効果実験

#### 1) 納豆菌増殖に及ぼす乾燥デラウェア果皮のオートクレーブ加熱処理の影響

本研究では、実験の安全面を考慮して市販納豆から分離した納豆菌を、腐敗原因菌の代替細菌

として利用した。本実験では納豆菌は、10,000倍希釈して使用した。図1は、各条件下の乾燥デラウェア果皮抽出液に対する納豆菌増殖の様子である。オートクレーブ加熱処理なし果皮の80%エタノール抽出液だけが納豆菌の増殖を抑制していた。総ポリフェノール量と納豆菌の増殖の結果から、オートクレーブ処理あり果皮から抽出されたポリフェノールには、納豆菌に対する抗菌作用はないと考えられる。また、納豆菌に対する抗菌作用を示す物質はオートクレーブ加熱処理によって分解され活性を失ったことが示唆される（表2）。

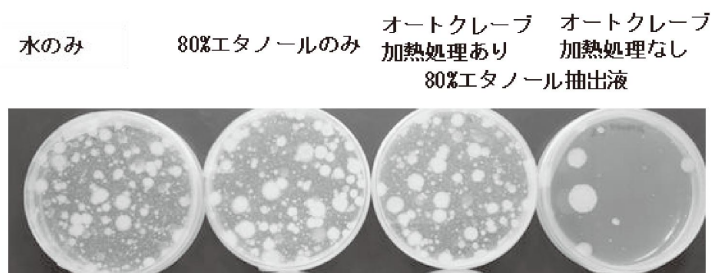


図1 乾燥デラウェア果皮抽出液を含む培地での納豆菌増殖の様子（室温 48 時間培養）

左から水のみ・エタノールのみ（コントロール）、オートクレーブ加熱処理あり果皮の抽出液、処理なしの果皮抽出液

表2 納豆菌増殖に及ぼすオートクレーブ加熱処理の影響

条件	コロニー数 (CFU/ml)	総ポリフェノール量* エピカテキン相当量(μg/200μl抽出液)
水（コントロール）	$1.9 \times 10^7$	-
80%水性エタノール（コントロール）	$1.5 \times 10^7$	-
オートクレーブ加熱処理ありデラウェア果皮抽出液	$2.0 \times 10^7$	61.3
オートクレーブ加熱処理なしデラウェア果皮抽出液	$1.3 \times 10^6$	87.7

\*総ポリフェノール量は表1のデータを用いた。

## 2) 乾燥デラウェア果皮（オートクレーブ加熱処理あり）抽出液における納豆菌発育阻止濃度の検討

オートクレーブ加熱処理なしの乾燥デラウェア果皮のエタノール抽出液の方が納豆菌の増殖抑制効果が認められた。そのため、この乾燥デラウェア果皮エタノール抽出液を使用し、納豆菌に対する発育阻止濃度（MIC）を検討した。デラウェア果皮抽出液の量が増加するにつれ、すなわち、総ポリフェノール量が増加するにつれコロニー数が減少した（表3）。納豆菌のコロニー数と総ポリフェノール量の相関係数は、 $r = -0.85$ で、強い負の相関が認められた。納豆菌に対するMICは、抽出液 700μl（総ポリフェノール量: 307.1 μg エピカテキン相当量）であった。

表 3 乾燥デラウェア果皮エタノール抽出液の納豆菌に対する発育阻止濃度

乾燥デラウェア果皮 80%エタノール抽出液 添加量 (μl)	納豆菌の増殖	総ポリフェノール量* エピカテキン相当量 (μg/ml)
0	+	0
100	+	43.9
300	+	131.6
400	+	175.4
500	+	219.3
600	+	263.1
700	-	307.0
800	-	350.8

\*総ポリフェノール量は表1のデータを用いた

## 3) 納豆菌の増殖に及ぼすブドウ果ポリフェノールの影響

果皮抽出液には、さまざまなポリフェノールが存在しているため、そのすべてが納豆菌の増殖抑制に関与していると考えられない。そこで、デラウェア果皮に含まれる既知のポリフェノール化合物 (図 2) が納豆菌の増殖抑制に関与しているか検討した。まず、一律、各化合物 1 シャーレあたり 200μg 濃度において、納豆菌に対する増殖抑制効果を比較した。その結果、10 種のポリフェノール化合物のうち、フラボノール類のケンフェロールのみ、納豆菌の増殖が認められなかった。カテキン類 (フラバノール類) のカテキン、エピカテキン、フラボノール類のケルセチンおよびミリセチンでは菌の増殖量がとても多く、培地全体を覆っていたため計測が不可能だった。また、ルチン、レスベラトロール、カフェー酸、クマル酸、ケイ皮酸において、200μg 濃度では増殖抑制効果は見られなかった。ブドウ果皮抽出液による納豆菌の増殖抑制効果は、ケンフェロールの可能性が示唆されるが、定量できていないため現段階では不明ある。ケンフェロールは茶葉やブロッコリーリングやイチゴ

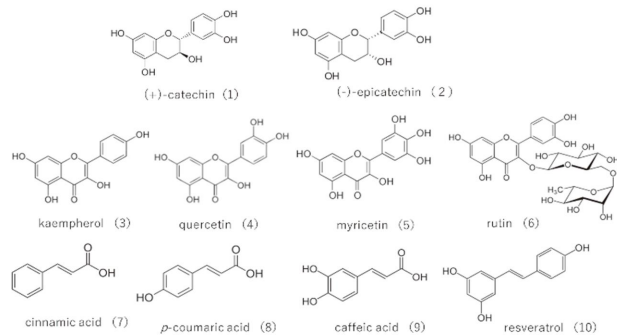
図 2 ブドウ果皮に含まれるポリフェノール化合物<sup>10), 11)</sup>

表 4 ポリフェノール化合物の納豆菌に対する抗菌

ポリフェノール化合物 (200μg/ml)	納豆菌のコロニー数 (CFU/ml)
コントロール	$3.8 \times 10^7$
1 (+)-カテキン	※
2 (-)-エピカテキン	※
3 ケンフェロール	0
4 ケルセチン	※
5 ミリセチン	※
6 ルチン	$4.7 \times 10^7$
7 カフェー酸	$3.7 \times 10^7$
8 クマル酸	$2.9 \times 10^7$
9 ケイ皮酸	$8.9 \times 10^7$
10 レスベラトロール	$9.1 \times 10^7$

数値：平均値を示す (n=3)

※：計測不能

などに含まれているフラボノイドである。ケンフェロールには、抗酸化作用、抗炎皮作用や抗腫瘍作用など有益な薬理作用を持つことが知られている。最近では皮膚線維化を抑制することも報告されている<sup>16)</sup>。したがって、デラウェア果皮にもそれらの生理作用を有するかもしれない。老田ら<sup>9)</sup>の研究では、ポリフェノール化合物の組み合わせによっては効果を発揮するものもみられたことから、今回単体では増殖抑制効果を示さなくても、組み合わせることで効果を発揮する可能性も考えられる。本実験で使用したポリフェノール化合物は、本研究の乾燥ブドウ果皮から単離されたものではなく、ブドウ果皮化合物に関する先行研究<sup>11),12)</sup>を参考に市販でも比較的入手容易の10種を選択したものである。そのため、それら以外のプロシアニジンのような成分が抗菌効果を示したとも考えられる。今後、乾燥デラウェア果皮に含まれるポリフェノール成分について詳細に分析する必要がある。

納豆菌は、枯草菌 *Bacillus subtilis* の一種とされ、病原性のないグラム陽性の桿菌であり、また、納豆菌は芽胞形成菌でもある。環境が適さないと芽胞を形成する食中毒細菌として、セレウス菌やウェルシュ菌、ボツリヌス菌がある<sup>17)</sup>。納豆菌に対して抗菌効果を示したことは、デラウェア果皮抽出液やポリフェノール化合物でそれらの食中毒細菌の増殖抑制効果がある可能性も考えられる。

本研究の限界として、実験環境の安全の観点から、抗菌実験に食中毒菌を用いることは出来なかった。また、オートクレーブ加熱前後の乾燥デラウェア果皮に含まれるポリフェノールの種類や含有量が明らかになっていないため詳細な分析が必要である。

#### IV まとめ

本研究では、乾燥デラウェア果皮の有効利用のために、納豆菌を使用し果皮抽出液の増殖抑制効果や果皮に含まれると考えられるポリフェノール化合物の増殖抑制効果について調査した。

乾燥デラウェア果皮の総ポリフェノール量はオートクレーブ加熱処理をしない方が高値で、80%水性エタノールによる抽出が良好であった。オートクレーブ加熱処理なしの乾燥デラウェア果皮抽出液は、納豆菌の増殖を抑制する抗菌効果があった。総ポリフェノール含量と納豆菌のコロニー数は強い負の相関がみられた。10,000倍に希釈した納豆菌の発育阻止濃度はブドウ果皮抽出液 700  $\mu\text{l}$  以上であった。さらに、ブドウ果皮に含まれるポリフェノール化合物のうち、ケンフェロールに納豆菌抑制効果が認められた。

#### 引用文献・参考文献

- 1) 作物統計調査 令和5年産都道府県別の結果樹面積・10a当たり収量・収穫量・出荷量。
- 2) 大阪府ホームページ：ぶどう [https://www.pref.osaka.lg.jp/chubunm/chubu\\_nm/fq-budo.html](https://www.pref.osaka.lg.jp/chubunm/chubu_nm/fq-budo.html)(最終閲覧：2024/12/24)。
- 3) 株式会社ダスキン、『エンゼルフruits』6月1日(水)から期間限定発売。  
[https://www.misterdonut.jp/businessinfo/news\\_release/pdf/nr\\_220526\\_01.pdf](https://www.misterdonut.jp/businessinfo/news_release/pdf/nr_220526_01.pdf)(最終閲覧：2024/12/24)。
- 4) 古川 真, 大阪産 (もん) を利用した加工食品開発の取り組み, 美味技術学会誌, 2019, 18 巻, 1 号, p. 29-30.
- 5) 佐藤充克, ブドウとワインに含まれるポリフェノール類の健康効果, 2018, p.296-308.



- 6) 田坂 寛之, 國武 広一郎, 西谷 巧太, 盛田 隆行, 勢戸 祥介, ネコカリシウイルスに対する抗ウイルス活性を示す食品添加物および食品素材の探索, 日本食品微生物学会雑誌, 2019, 36 巻, 2, p.100-104.
- 7) 厚生労働省, 第 9 版食品添加物公定書, <https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000641285.pdf> (最終閲覧 : 2024/12/27).
- 8) 上西 秀則, 松永 勝政, ブドウ果皮由来のプロシアニジンオリゴマーを含む抗菌剤および抗菌性組成物, 公開特許公報, 2009, JP2010208970A
- 9) 老田 茂, 神山 紀子, 耐酸耐熱性細菌 *Alicyclobacillus acidoterrestris* に対するブドウポリフェノールの抗菌効果, 日本食品科学工学会誌, 2002, 49 巻, 8 号, 555-558.
- 10) 益岡 典芳, 黒田 耕平, 岡田 武彦, 橋本 麻希, 石原 浩二, 岡山産ぶどうに含まれるポリフェノールの分析 岡山理科大学紀要. A, 自然科学 2010, 46, 1-7.
- 11) 沖智之 : 総ポリフェノール分析法/国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター <http://fmric.or.jp/ffd/ffmanual/manual40111.pdf> (最終閲覧 : 2024/11/28).
- 12) Shivraj Hariram Nile, S. H. Kim, Eun Young Ko, and Se Won Park, Polyphenolic Contents and Antioxidant Properties of Different Grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) Cultivars, Biomed Res Int., 2013:2013:718065. doi: 10.1155/2013/718065.
- 13) Yan Du , Xingyan Li, Xiaolin Xiong , Xinyu Cai , Xueyan Ren , Qingjun Kong, An investigation on polyphenol composition and content in skin of grape (*Vitis vinifera* L. cv. Hutai No.8) fruit during ripening by UHPLC-MS2 technology combined with multivariate statistical analysis , Food Bioscience, 2021, 43, 1012761
- 14) 黄 素梅, 関 清彦, 神田 康三, 加藤 富民雄, 田中 隆, 河野 功, 石丸 幹二, ゲラニイン含有植物の加工処理と生成物の解析, 日本食品化学学会誌, 2006, 13 (3), 118-124.
- 15) 毛利 哲, 長坂 歩美, 高橋 里奈, 菊地 風花, ルテオリン配糖体の加水分解に及ぼす加熱処理の影響, 日本調理科学会誌, 2023, 56(3), 86-93.
- 16) Akiko Sekiguchi , Sei-ichiro Motegi, Chisako Fujiwara, Sahori Yamazaki, Yuta Inoue, Akihiko Uchiyama, Ryoko Akai, Takao Iwawaki, Osamu Ishikawa, Inhibitory effect of kaempferol on skin fibrosis in systemic sclerosis by the suppression of oxidative stress, Journal of Dermatological Science, 2019, 96(1), 8-17.
- 17) 東京都福祉保健局 : 食品衛生の窓、食中毒を起こす微生物  
<https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/micro/index.html>

---

Study on Effective Utilization of Dried 'Delaware' Grape Skins  
—Antimicrobial Effect of Grape Peel Extract against *Bacillus subtilis* var. 'natto'—

Norie NISHIKAWA\* ・ Izumi OKABAYASHI\*\* ・

*\*Division of Health and Safety Science Education, Osaka Kyoiku University*

*\*\* Graduate of Faculty of Education, Osaka Kyoiku University*

Key Words : Delaware Grapes, dried grape skins, *Bacillus subtilis* var. natto, antibacterial effect, polyphenols

---