

オリーブの抽出物がもつ抗菌作用

芝田 百合 松井 遥暉

1 要旨

オリーブには、抗酸化作用⁽¹⁾・抗糖化作用⁽²⁾・抗菌作用⁽³⁾があることが知られている。本研究では、生葉・乾燥粉末葉・枝の抗菌作用の有無を調べるとともに、抗菌作用の生理活性物質の抽出を目的としてどのような抽出方法が適しているのか実験を行った。本研究では、オリーブ葉を蒸留水、エタノールで抽出した抽出液が、大腸菌に対して抗菌作用があるか観察を行った。

乾燥粉末葉を蒸留水で抽出した場合、1時間以上抽出したものにオリーブの抗菌効果がみられた。乾燥粉末葉をエタノールで抽出した場合、30分以上抽出したものに、オリーブの抗菌効果がみられた。

本研究では、抽出時間を3時間までの範囲で実験を行ったが、抽出時間が長いほどオリーブの抗菌効果が高くなっていったため、3時間以上抽出したもののほうが、より抗菌効果が高くなることが推測される。また、生葉・乾燥葉・枝を30分間エタノール抽出したのものにもオリーブの抗菌効果が確認された。

本研究の結果から、生葉・乾燥葉・枝に抗菌作用があった。水抽出で抽出された物質とエタノール抽出で抽出された物質が、同一の物質であると仮定すると、オリーブの抗菌物質は脂溶性で比較的分子量の大きい物質であると考えられる。また、抽出方法は、エタノール抽出で3時間以上抽出することが好ましいと分かった。

2 研究目的

オリーブは香川県の県花である。国内でのオリーブ収穫量は全国シェアの94.8%を占め、果実はオリーブオイルや塩漬けなどの加工品として広く流通している。また現在、葉の粉末を飼料とするオリーブハマチや、果実の搾りかすを飼料とするオリーブ牛などがブランド化している。

オリーブは1年中葉をつけている常緑樹であるため、必ず剪定を行わなくてはならない。そこで、オリーブの果実に加え、剪定後の葉や枝を飼料の他にも有効活用できる方法を考えることで、香川県産オリーブの付加価値をさらに高めたいと思い、この研究に至った。

オリーブの実や葉にはポリフェノール的一种であるオレウロペインを多く含んでいる。一般的に、オリーブの実から抽出される油(特にエキストラバージンオイル)はポリフェノールの含有量が多いことが知られており、抗炎症作用・抗菌作用があることが分かっている⁽³⁾。他にも、オレウロペインには抗酸化作用がある⁽¹⁾ことが分かっており、葉の粉末は魚や牛などの飼料となっている。オリーブの葉の粉末を、県魚であるハマチに餌として与えた「オリーブハマチ」は酸化・変色しにくいという特徴だけでなく、さっぱりとした味わいも兼ね人気となり、年々出荷尾数が増えている⁽⁴⁾。また、血糖値を抑える効果である抗糖化作用もある⁽²⁾ため、その効果を利用して生葉からのオリーブエキスやお茶にされている。

オリーブは、そのようなポリフェノール的一种であるオレウロペインの含有量が高いことが知られている。そこで、本研究ではオリーブの葉や枝にも抗菌作用があると考え、オリーブの抗菌作用の生理活性物質の抽出を目的として、どのような抽出方法が適しているのか調べることにする。

3 研究方法

植物の中には、抗菌物質を生産し、病原菌の繁殖を阻止する仕組みが存在することが報告されている。

イチョウの葉に抗菌作用を示した岡山理科大学附属高等学校が行った研究では、寒天培地に菌を培養し、イチョウの生葉や乾燥葉から抽出した成分を加えて菌の増減を観察している⁽⁵⁾。

また、ユーカリの葉に抗菌作用を示した大阪府立岸和田高等学校が行った研究では、寒天培地に菌を培養し、ユーカリ・タンポポ・アジサイの葉や甘酒から抽出した成分を用いて、菌の増減を観察している⁽⁶⁾。

本研究では、このような先行研究を参考にし、以下のような研究方法とする。

3-1 試料の調整

試料となるオリーブの葉は、高松市国分寺町のオリーブ農園、有限会社創樹からいただいたルッカ(2019年9月末採取)を用いた。

一連の研究で使用するオリーブの乾燥葉は枝から採取後、水道水で洗い、日陰且つ風通しの良い場所で約1週間乾燥させ、ミキサーで粉砕したものを使用した。粉末葉は密閉容器に入れて、暗室で保存した⁽⁷⁾。

3-2 観察方法(ペーパーディスク法)

抗菌物質の抗菌作用を確認するため、ペーパーディスク法(図1参照)を用いた。

寒天培地に大腸菌を薄く均等に広げ、ろ紙(直径6mm)に抽出物を添加し、培地上に乗せた。一定温度(約25℃)で培養し、ろ紙添加15時間~20時間後に観察を開始する。1日1回、4日間観察を行い対照群と比較した。

本研究では、ろ紙の周辺に阻止円が見られるかで抗菌効果があるか判断した。阻止円とは、ろ紙の周辺に現れる菌が繁殖しない円状のエリアのことである。

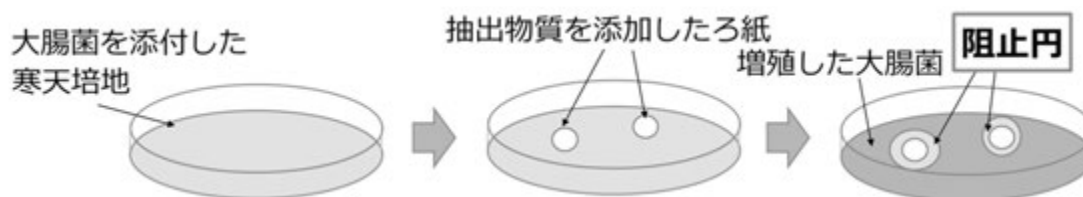


図1：ペーパーディスク法

3-3 寒天培地の調整

ペプトン 10g, イースト 2g, 寒天 15g, 蒸留水 1Lを添加し、オートクレーブ滅菌して液体培地を作成した。180℃の乾熱滅菌を行ったガラスシャーレに液体培地を注ぎ、固化させた。

3-4 オリーブ枝葉抗菌作用物質の抽出

オリーブの抗菌作用物質の抽出溶液には、蒸留水と99.5%エタノール（以下 エタノールと記載する）を用いた。抽出方法は以下のとおりである。

実験1：水抽出液（乾燥葉）の抗菌作用

蒸留水に乾燥粉末葉を10重量%添加し、70～75℃⁽⁸⁾の湯煎で抽出した。抽出時間をそれぞれ10分・30分・1時間・3時間と変え、ろ過したものを各試料とした。

これをペーパーディスク法で観察した。対照実験には蒸留水を用いた。

実験2：エタノール抽出液（乾燥葉）の抗菌作用

エタノールに乾燥粉末葉を10重量%添加し、常温で抽出した。抽出時間をそれぞれ10分・30分・1時間・3時間と変え、ろ過したものを各試料とした。

これをペーパーディスク法で観察した。対照実験にはエタノールを用いた。

実験3：エタノール抽出液（生葉・乾燥葉・枝）の抗菌作用

生葉は消毒したハサミで1cm角に刻み、枝は1センチ幅に切った。乾燥粉末葉は実験1, 2で使用したのと同じ粉末葉を使用した。エタノールに生葉・乾燥粉末葉・枝を10重量%添加し、常温で抽出した。抽出時間は30分とし、ろ過したものを各試料とした。

これをペーパーディスク法で観察した。対照実験にはエタノールを用いた。

4 結果

抗菌作用の評価方法は、できた阻止円の大きさで判断することにした。

(図2参照)

ろ紙の直径は6mmで、阻止円が見られない場合は、×。本研究では、7mm以上10mm未満を阻止円の大きさの基準として、○。6mm以上7mm未満の場合、抗菌効果は低いと判断し、△。10mm以上である場合は、抗菌効果は高いと判断し、◎とした。

6mm (ろ紙の直径)	6mm以上 7mm未満	7mm以上 10mm未満	10mm 以上
×	△	○	◎
抗菌効果なし	抗菌効果あり		
	低い	基準	高い

図2:抗菌効果の評価方法

実験1：水抽出液（乾燥葉）の抗菌作用

試料をろ紙に添加し、培地に置いてから15時間後に観察を行い、水抽出液の阻止円の大きさを蒸留水のみを対照として、比較した。(表1参照)

対照実験に用いた蒸留水は阻止円を確認できなかった。10分間抽出した抽出液と30分間抽出した抽出液も、対照実験で用いた蒸留水同様に、阻止円が見られなかった。

しかし、抽出液のうち、1時間抽出した抽出液の阻止円は直径8mm、3時間抽出した抽出液の阻止円は直径9mmとなった。

以上のことから、水抽出をする場合は1時間以上抽出するとオリーブの抗菌効果が見られることが分かった。実験1では、3時間抽出したものが最も抗菌効果が高いと判断した。また、この抗菌効果は1週間継続した。





















培養日数 抽出時間	1日後	2日後	3日後	4日後
蒸留水のみ	 ×	 ×	 ×	 ×
10分	 ×	 ×	 ×	 ×
30分	 ×	 ×	 ×	 ×
1時間	 △	 △	 △	 △
3時間	 ○	 ○	 ○	 ○

表1：実験1 水抽出液の抗菌作用結果

実験2：エタノール抽出液（乾燥葉）の抗菌効果

試料をろ紙に添加し、培地に置いてから15時間後に観察を行い、エタノール抽出液の阻止円の大きさをエタノールのみを対照として、比較した。（表2参照）

対照実験のエタノールを添加したろ紙の周辺には、エタノールの殺菌作用による阻止円がわずかに確認できた。（表1）実験2では、エタノールの抗菌作用による阻止円の大きさより、試料を添加したろ紙の周辺にできる阻止円の方が大きければ、オリーブ抽出液に抗菌作用があると判断した。10分間抽出した抽出液は対照実験のエタノールと変わらない阻止円の大きさであった。

しかし、30分以上抽出した抽出液は、対照実験よりも大きい阻止円が見られたため、最低30分以上抽出すれば、オリーブの抗菌効果が見られることが分かった。1時間抽出した抽出液は直径11mmの阻止円が、3時間抽出した抽出液は直径13mmの阻止円ができ、抗菌効果が高いと判断した。

エタノール抽出液は水抽出液と比較すると抽出時間が30分以上で、高い抗菌効果が見られた。また、この抗菌効果は1週間継続した。





















培養日数 抽出時間	1日	2日	3日	4日
エタノールのみ (対照)	 △	 △	 △	 △
10分	 △	 △	 △	 △
30分	 ○	 ○	 ○	 ○
1時間	 ⊙	 ⊙	 ⊙	 ⊙
3時間	 ⊙	 ⊙	 ⊙	 ⊙

表2：実験2 エタノール抽出液（乾燥葉）の抗菌作用結果

実験3：エタノール抽出液（生葉・乾燥葉・枝）の抗菌効果

試料をろ紙に添加し、培地に置いてから20時間後に観察を行い、エタノール抽出液の阻止円の大きさをエタノールのみを対照として、比較した。（表3参照）

生葉の抽出液・乾燥粉末葉の抽出液・枝の抽出液はすべて対照実験のエタノールよりも大きい阻止円が見られたため、オリーブの乾燥粉末葉だけでなく、生葉・枝にもオリーブの抗菌効果があるといえる。また、対照実験のエタノールは観察開始から3日目で阻止円が無くなったが、オリーブの各抽出液は阻止円が残り続けた。乾燥粉末葉の抽出液・枝の抽出液は阻止円の大きさに差異はなく直径8mmであった。最も阻止円が大きかったのは、生葉抽出液で直径11mmであった。また、この抗菌効果は1週間継続した。

















培養日数 抽出時間	1日後	2日後	3日後	4日後
エタノール のみ	 △	 △	 ×	 ×
生葉抽出液	 ◎	 ◎	 ◎	 ◎
乾燥葉抽出液	 ○	 ○	 ○	 ○
枝抽出液	 ○	 ○	 ○	 ○

表3：実験3 エタノール抽出液（葉，乾燥葉，枝）の抗菌作用結果

5 考察

実験1・実験2より、水抽出液・エタノール抽出液共に抗菌効果が確認された。水抽出液よりエタノール抽出液の方が抽出時間は短時間で高い抗菌効果が確認されたことから、抗菌作用の生理活性物質は脂溶性ではないかと考えられる。本研究で推測される効率的な抽出方法は、エタノール抽出で3時間以上抽出すると、高い抗菌効果が得られる。

実験3より、対照実験のエタノールのみでは3日目で阻止が無くなったが、オリーブの各抽出液は抗菌効果が持続していた。これは、エタノールが揮発後も培地にはオリーブの抗菌作用を持つ物質が残り続けているといえるため、抗菌作用の生理活性物質は揮発性ではないと考えられる。

本研究では、抗菌作用の生理活性物質の特定には至らなかったが、オリーブの葉や枝には何らかの抗菌作用をもつ物質が存在することが明らかになった。水抽出で抽出された物質とエタノール抽出で抽出された物質が、同一の物質であると仮定すると、揮発性でないことから、脂溶性の比較的分子量の大きい物質であることが示唆される。

一連の研究で使用した乾燥葉は、粉末葉にしてから半年以上保存していたものであったが、抗菌効果が見られた。脂溶性で、比較的分子量が大きく、培地に残り続けることから、オリーブの抗菌物質の特性を考えると、粉末状態の長期保存でも保存状態が良ければオリーブの抗菌物質は比較的安定して保持することができるのではないかと考えられる。

6 結論 課題

オリーブの葉や枝に抗菌効果があることが分かった。また、半年以上常温で保存してきた乾燥葉にも抗菌効果が見られることが実証された。

本研究では、エタノール抽出法で最低30分以上抽出すると、オリーブの抗菌物質の抽出ができた。そして、効率的な抽出方法は、3時間以上抽出すると抗菌効果が高いことが分かった。

本研究では、採取して乾燥粉末葉にしてから、半年以上経ったものを使用した。本来なら乾燥粉末にした直後に抗菌物質の抽出を行い、抗菌効果を確認すべきであった。しかし、抽出溶媒、抽出時間の条件検討を行っていた結果、時間が経過してしまい、半年以上の保存となってしまった。そこで、次の課題として、採取直後の乾燥粉末葉を使用して、エタノール抽出液の抗菌効果実験、さらに抽出液にしてからの抗菌効果の継続期間の検討も必要であると考えられる。

本研究ではモデル生物で、飼育が比較的容易であった原核生物の大腸菌を用いてオリーブの抗菌作用の有無を観察したが、真核生物であるカビなどの菌類に対してもオリーブの抗菌効果が見られるか検討する必要がある。

本研究では効率的な抽出方法が課題であるが、抽出時間は、エタノール抽出では最低30分以上抽出すると抗菌効果が見られ、結果からは、3時間抽出したものが最も抗菌効果が高いと分かった。しかし抽出時間をさらに長くすると、より高い抗菌効果が見られるのか、それとも限界抽出時間があるのか、といった最適な抽出時間の検討が必要である。

本研究では、オリーブの抗菌物質の同定はできていない。そのため、水抽出で抽出された物質とエタノール抽出で抽出された物質が、同じであるとはいえず、また、複数の成分が抽出されている可能性も考えられるので、抗菌物質の特定が必要である。

一連の研究で使用したエタノールは高濃度のエタノールであったため、すぐに揮発しやすく、肌に触れた際には、肌荒れといった悪影響を及ぼす可能性があることから、エタノール濃度の最適化が検討される。エタノール濃度が最適化されると、身近な天然系の抗菌剤として妊婦の方や子供でも安心して利用できることが期待できる。

7 参考文献

- (1) NikiChondrogianni IoannaChinou Efstathios S.Gonos (Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention 2010, Pages 1335-1343)
Anti-aging Properties of the Olive Constituent Oleuropein in Human Cells
- (2) Vassiliki G. Kontogianni, Pantelis Charisiadis, Evangelia Margianni, Fotini N. Lamari, Ioannis P. Gerothanassis, and Andreas G. Tzakos (J Med Food. 2013 Sep; 16(9): 817–822.)
Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors
- (3) Eduardo Medina , Concepción Romero, Manuel Brenes, Antonio De Castro (Agro Food Industry Hi Tech 18(4):6-8 July 2007
Antimicrobial activity of olive oil
- (4) 大山 憲一(水産研究・教育機構 瀬戸内海区水産研究所 第6回瀬戸内海水産フォーラム 2015-10)
「オリーブを利用した新たな水産物の開発」
- (5) 岡山理科大学附属高等学校 (化学と生物 53(6): 413-415 2015)
「銀杏の葉の抽出物質による抗菌作用」
- (6) 大阪府立岸和田高等学校 (平成 29 年度課題研究論文集 2017)
「岸和田高校周辺に育成する植物と甘酒の抗菌作用」
- (7) 日本食品科学工学会誌 (2016 年 63 巻 12 号 p. 570-574)
「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」
- (8) 国際事務局 (2015-10-01)
「オリーブ葉エキス及びその製造方法」

8 謝辞

この研究のご協力頂いた方々に厚く御礼申し上げます。

産業技術総合研究所 橋本芳子 様

高山園 林克修・尚子 様

高松第一高等学校 三好先生 安藤先生 鶴木先生 中島先生 伊賀先生

有限会社 創樹 様 (オリーブの葉提供)