

トウモロコシに含まれるβカロテンの定量方法の確立

愛媛県立松山南高等学校 ビタミン班

上笹莉子 上甲莉沙 宮本凜 担当教諭 目見田拓

1. はじめに

伊藤ら(2019)によると、異なる光条件下で培養したシアノバクテリアに含まれるアスコルビン酸量は2時間の強光によって2倍に増加すること、また、暗黒条件の場合通常光条件よりAsA量が多いことが示唆されている(図1)。また、黒田ら(2021)が、単細胞生物のシアノバクテリアだけでなく、高等植物であるトウモロコシでも収穫前に光条件を変えることで、アスコルビン酸量が増えるのかを調べた結果、高等植物でもアスコルビン酸量は通常光条件よりも強光条件の方がAsA量が増え、暗黒条件の場合は減っていることが分かっている。これらのことから光の量によってAsA量が増えることが示唆されている。

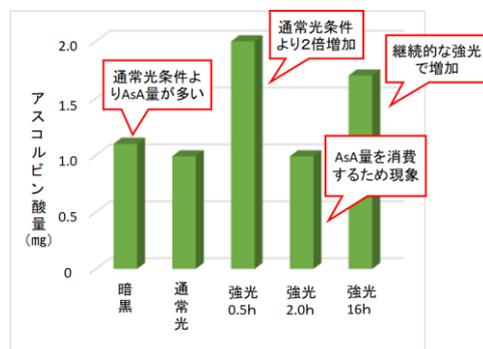


図1 光条件と細胞内のAsAの変化

そこで私たちは、アスコルビン酸以外の抗酸化作用をもつ脂溶性ビタミンであるβカロテンに注目し、脂溶性ビタミンを抽出・定量する方法を確立させることで、光と脂溶性ビタミン量変化の関係を明らかにし、栄養価を高めた野菜の栽培方法や、保存方法を提案したいと考え研究を行った。

2. 実験方法の検討と課題

2-1 ホウレンソウによるペーパークロマトグラフィーの実験方法

βカロテンが多く含まれていてホウレンソウの葉を10g用意し葉脈を取り除き、1cm角程度の大きさにちぎり乳鉢に入れ、抽出溶液(石油エーテルとメタノールを1:3の割合で混合)を10mLずつ5分ごとに計40mL入れ、乳棒を使ってすりつぶした(図2)。抽出液をろ紙でろ過し三角フラスコに回収した。その抽出液に10%食塩水を80mL加えて混合した。次に20mLの石油エーテルを加え20分間よく攪拌しながら、成分を石油エーテル層(上澄み)に抽出した(図3)。その上澄み液をバイアル瓶に入れた(図4)。その色素抽出液を毛細管で吸い上げ、下から3cmのところを鉛筆で線を描いた展開用ろ紙の鉛筆の上に薄く毛細管で吸い上げた色素の線を描いては乾かすという操作を10回ほど繰り返した。その後展開溶媒(ヘキサンとアセトンを15:1の割合で混合)200mLを入れ、30分間展開溶媒の蒸気で満たした展開槽に立てかけ、溶媒がろ紙の上端から約2cmのところまで達した後、ろ紙を取り出し、色素の境界線に鉛筆で線を描いた(図5)。この作業によって分けられた色素部分を切り出し約2mLのヘキサンで抽出した。この色素溶液を分光光度計を用いて、紫外可視吸収スペクトルで測定した。



図2 すりつぶした
ホウレンソウ



図3 上澄み溶液
の抽出



図4 上澄み溶液
の保管

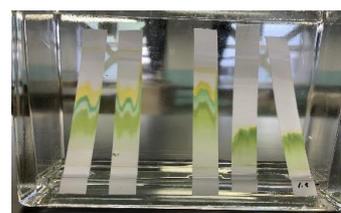


図5 展開

2-2 クロマトグラフィーの再現性に関する実験方法

2-1の方法で脂溶性ビタミンの抽出・分離を行った(図6ア)。代谷ら(1972)より6つの色素が得られることがわかっているが(表1)、私たちは何度実験を行っても同じ結果が得られることがなく再現性が低く、脂溶性ビタミンが分離抽出できないという課題が見つかった。その原因として、抽出時にホウレンソウの細胞壁が破壊されておらず細胞内に含まれている色素が抽出されていない可能性と葉に付着した水分が抽出に影響している可能性を考えた。

そこで、抽出時にホウレンソウの細胞壁が破壊されておらず細胞内に含まれている色素が抽出されていない可能性を確認するため、冷凍したホウレンソウを実験に用い、細胞壁を物理的に破壊させた後、同様にペーパークロマトグラフィーを行った。僧都ら(2018)によると、冷凍することでできた氷の結晶が細胞壁を破壊していることが分かっている。その結果、脂溶性ビタミンを分離抽出することができた(図6イ)。このことから、細胞壁が破壊されたことが分離抽出に影響を及ぼしているのではないかと考え、細胞壁の破碎の有無を調べるための実験を行った。冷凍した試料を1cm各程度に切ったホウレンソウのシートを一枚入れて、10%食塩水1mLとともに遠心チューブに入れ、5分間遠心分離機にかけた(図7)。その結果、試料における色素の流出に顕著な差は見られなかった。この実験結果から、冷凍による細胞壁破壊は色素抽出に及ぼす影響が少ないことが分かった。色素抽出がうまくいかない原因として2つ目に、葉に付着した水分が色素抽出に影響を及ぼしている可能性を確認するために、試料の水分を乾燥させることにした。まず初めに120℃のオーブンで8分間乾燥処理した後、ペーパークロマトグラフィーで分離抽出を行った。その結果、代谷ら(1972)による色素数を得ることができた(図6ウ)。

また、より正確に実験を進めるためにペーパークロマトグラフィーより分離能に優れている薄層クロマトグラフィー(図6エ)を用いることにした。

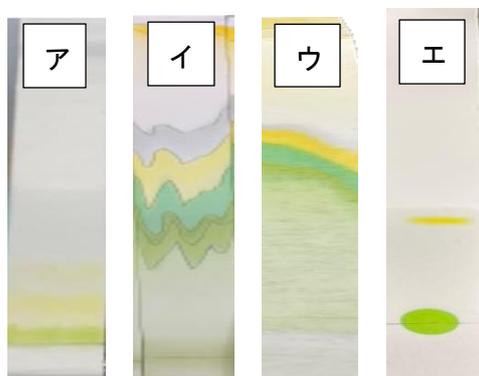


図6 脂溶性ビタミンのクロマトグラフィー

ア：コントロール イ：冷凍試料 ウ：乾燥試料
エ：乾燥試料の薄層クロマトグラム

表1 試料に含まれる色素(代谷ら, 1972)

色素名	色	極大吸収波長(mμ)
βカロテン	橙	450
フェオフィチンa	暗緑	412
フェオフィチンb	—	—
キサントフィル	黄	448
クロロフィルa	緑	432
クロロフィルb	黄緑	455

※フェオフィチンbの記載はなし



図7 遠心分離した試料

2-3 トウモロコシに含まれるβカロテンの定量方法

次にクロマトグラフィーによって脂溶性ビタミンを分離することが可能になったため、脂溶性ビタミンの定量についての研究を行った。クロマトグラフィーによって脂溶性ビタミンを分離した後、βカロテンを定量するために、各成分がもつ極大吸収波長に着目した(図8)。

極大吸収波長からトウモロコシに含まれるβカロテン量を調べるためにβカロテンの検量線を引くことを試みた。まず、βカロテン1mgをヘキサン100mL溶かした標準溶液を作成し、1/2倍希釈、1/4倍希釈、1/8倍希釈、1/10倍希釈、1/16倍希釈、1/32倍に希釈した標準溶液(図9)の480nmにおける吸光度を分光光度計によって測定し、得られた吸光度とβカロテン濃度の検量線を作成した。ここで、

480nm における吸光度を測定したのは代谷ら (1972) によると β カロテンは 480nm で極大吸収波長を得ることが記されているからである。そして、実際にトウモロコシから分離抽出した β カロテンの 480 nm における吸光度の値を検量線に照らし合わせることで、トウモロコシに含まれる β カロテン量を定量することができるようになった。

2-4 光条件における β カロテン量の変化

確立した β カロテンの定量方法を用いて β カロテン量と光の量の関係について実験を行った。トウモロコシ 1 株を半分に分け (図 10 左)、紫外線照射を 30 分行ったもの (図 10 右) と通常光条件のものそれぞれの β カロテン量を定量した。また、上記のものと同様にトウモロコシ 1 株を半分に分け暗黒状態で 21 時間置いたものと通常光条件のものそれぞれの β カロテン量を定量した。

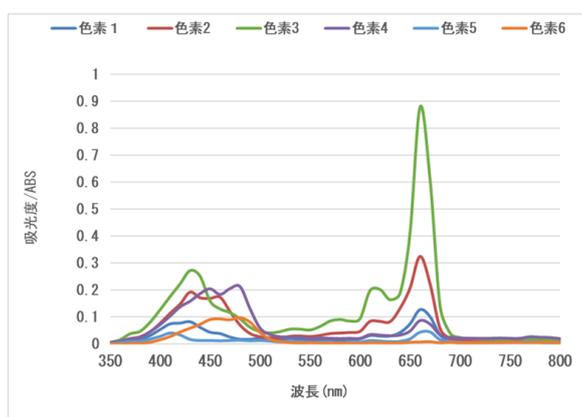


図 8 各色素成分の吸収スペクトル



図 9 希釈した標準溶液



図 10 トウモロコシの処理

左：株分け(半分) 右：紫外線照射

3. 実験結果

紫外線照射を 30 分行ったトウモロコシと通常光条件のトウモロコシでは、紫外線照射を行っていないトウモロコシは β カロテンの 480nm における吸光度は 0.067、紫外線照射を行ったトウモロコシは β カロテンの 480nm における吸光度は 0.111 になった (図 11)。よって、検量線に得た吸光度を代入して β カロテン濃度を求めた。9g あたり $9.27 \mu\text{g}$ の β カロテンが含まれていることが分かった (図 12, 表 2)。一方、紫外線照射を行ったトウモロコシ 9g あたり $15.4 \mu\text{g}$ の β カロテンが含まれていた。30 分の紫外線照射により、トウモロコシに含まれる β カロテン量が約 1.66 倍に増加することがわかった。この結果、アスコルビン酸同様に、紫外線照射によって β カロテンも増加することが示唆された。一方で、通常光条件のトウモロコシの 480nm における吸光度は 0.143、暗黒条件のトウモロコシの 480nm における吸光度は 0.094 であった (図 13)。よって、通常光条件のトウモロコシ 8g あたり $4.71 \mu\text{g}$ の β カロテンが含まれており、暗黒条件ではトウモロコシ 8g あたり $3.10 \mu\text{g}$ の β カロテンが含まれていた (図 14, 表 3)。

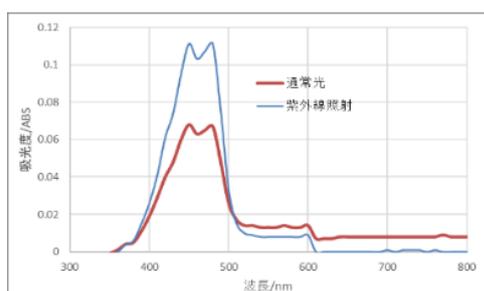


図 11 紫外線照射による効果

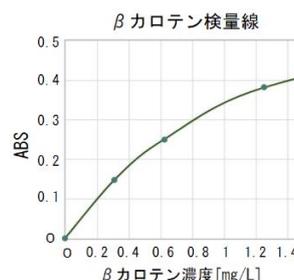


図 12 β カロテンの定量(紫外線照射)

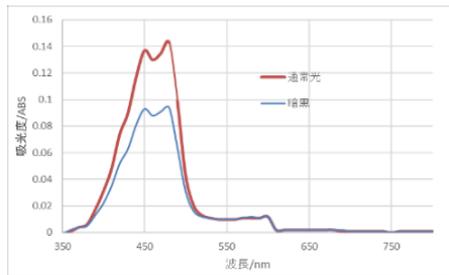


図 13 暗黒条件による影響

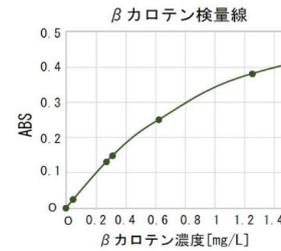


図 14 β カロテンの定量（暗黒条件）

表 2 紫外線照射が β カロテン量に及ぼす影響

	吸光度	β カロテン量 (μg)	濃度 (mg/L)
紫外線あり	0.111	15.40	0.0526
紫外線なし	0.067	9.27	0.0316

表 3 暗黒条件が β カロテン量に及ぼす影響

	吸光度	β カロテン量 (μg)	濃度 (mg/L)
通常光	0.143	4.71	0.0678
暗黒	0.094	3.10	0.0445

4. 考察

脂溶性ビタミンを分離抽出する際に、試料表面および試料内に含まれる水分が抽出溶媒中に混入することで、脂溶性ビタミンの抽出に影響し再現性を低くしている。よって、試料を乾燥させることで、水分量を減らすことが大切である。また、冷凍させた試料のクロマトグラフィーの再現性が高まったのは、葉の中の水分が外部に排出され、結果的に普通のホウレンソウよりも水分量が減ったためだと考える。

トウモロコシに 30 分間の紫外線照射を行うことで β カロテン量が増加するのは、伊藤ら(2019)で示唆されるように、紫外線照射によって発生する活性酸素などから細胞を守る防御反応のために、 β カロテン類やアスコルビン酸などの抗酸化物質を生合成するためのタンパク発現が活性化した結果、細胞内に β カロテンが蓄えられるためであると考えられる。この結果から、アスコルビン酸以外でも細胞を守るための抗酸化作用を示す物質は、光照射によって瞬間的に増加する可能性が示唆された。そのため、野菜を調理する前の 30 分間で瞬間的に野菜の持つ栄養価を高められる可能性がある。また、光が当たらないと光合成がされないのでトウモロコシ内では栄養が作られず、その不足している栄養を補うためにもともとあった β カロテンが消費され、 β カロテン量が減ったのではないかと考えられる。この結果から、輸送する際、トラックの中は暗くなっているため野菜の持つ栄養価がへっている可能性が示唆される。

5. 今後の展望

瞬間的な紫外線照射以外に紫外線を経時的に当てるなど、様々な光条件における β カロテン量の変化を調べることで、栄養価を高めるための最適な光条件を見つけたい。そして、栄養価を高めるための野菜の栽培方法や輸送方法、保存方法などの提案を行うことで、人々の健康増進に繋がりたいと考えている。

6. 参考文献

- ・伊藤祐希、藤原諒 (2019) 「異なる光条件下におけるシアノバクテリアに含まれるアスコルビン酸量に関する研究」『令和元年度愛媛県立松山南高等学校課題研究論文集』愛媛県立松山南高等学校
- ・黒田耕生、富田晃宏、澤原仁愛、河瀬茉結(2021) 「異なる光条件下におけるトウモロコシに含まれるアスコルビン酸量に関する研究」『令和元年度愛媛県立松山南高等学校課題研究論文集』愛媛県立松山南高等学校
- ・僧都博(2018) 「生細胞の凍結による障害と保護の機構」
https://www.jstage.jst.go.jp/article/kagakutoseibutsu1962/18/2/18_2_78/_pdf/-char/ja
- ・代谷沢、片岡慶子、勝元みどり(1972) 「ほうれん草の調理科学的研究」
http://repo.kyoto-wu.ac.jp/dspace/bitstream/11173/1227/1/0100_027_004.pdf