

機能性食品・コスメ原料に関する 評価技術の確立及びその応用に関する研究（第2報）

食品コスメ部
柘植圭介

九州北西部に多く自生する芳香性樹木アオモジの機能性食品化を目指し、機能性成分の抽出率等に及ぼすアオモジ葉の乾燥及び抽出条件の影響について検討した。熱水抽出物及び50% (v/v) エタノール抽出物において、蒸煮処理葉の抽出物は、未蒸煮のものとは比して褐変が顕著に抑えられた。一方、エタノール抽出物においては、蒸煮処理葉は、未蒸煮のものとは比して緑色の退色が認められた。熱水抽出及び50% (v/v) エタノール抽出においては、蒸煮無しに比して総ポリフェノール含量並びに抗酸化活性が顕著に増大した。熱水抽出物及び50% (v/v) エタノール抽出物は高粘性を有していたが、80% (v/v) エタノール抽出物には認められなかった。アオモジ葉抽出物の粘性と糖質含量は正の相関を示したことから、アオモジ葉には水溶性多糖類や糖タンパク質が含まれることが示唆された。

1. はじめに

アオモジ (*Litsea cubeba*; 図1) は、クスノキ科ハマビワ属の落葉小高木で、九州以南から中国、マレーシア、インドに分布する¹⁾。別名「ショウガノキ」「コショウノキ」とも呼ばれ、花、果実、葉、根などのそれぞれにレモンのような芳香がある。中国や東南アジア諸国では、果実から精油を抽出して香料にしたり、果実そのものを「馬告 (マーガオ: 台湾)」「木姜子 (ムージャンズ: 中国貴州省)」と称し、香辛料や食油に加工したりして幅広く利用されている。佐賀県や長崎県はアオモジの生育密度が高く、山間道路の法面や雑木林の明るい場所に多くみられる雑木である。しかし、アオモジは3~4月の花期に芳香を発する樹木として知られてはいるものの、国内ではこれまでほとんど利用されてこなかった。

近年、アオモジ葉の生理機能性に関する研究が進展している。これまでに、葉の乾燥粉末の摂取がラットの血清ペントシジン濃度を低下させ、生体内の抗糖化



図1 アオモジ

にはたらく²⁾ことや、血清脂質濃度を低下させ、脂質代謝を改善³⁾すること、エタノール抽出物がマクロファージにおける caspase-1 や IL-1 β 分泌の抑制を介して NLRP3 インフラマソームの活性化を抑える⁴⁾こと等が報告されている。これらの知見は、アオモジ葉が、メタボリックシンドロームの基礎疾患である糖・脂質代謝異常の予防に役立つ機能性食品の有望な素材である可能性を示唆している。

以上の背景から、アオモジの機能性食品化を目指し、佐賀県産アオモジ葉の乾燥条件及び抽出条件が機能性成分の抽出率等に及ぼす影響について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 試料の調製

佐賀県太良町に自生するアオモジより葉を採取し、スチームコンベクションオープン ((株) エフエムアイ UNOX XV-706ONE) にて 95°C-4 分間蒸煮した後に熱風乾燥機 (木原製作所製 SM10S-EH-DPC) にて乾燥した。乾燥葉を粉碎機にて粉碎したものをアオモジ葉乾燥粉末とした。乾燥条件の比較のため、無蒸煮で乾燥させたものも調製した。

2.2 抽出物の調製

熱水、50% (v/v; 以後省略) エタノール及びエタノールの3種の溶媒にてアオモジ葉乾燥粉末から抽出物を得た。それぞれの抽出条件を表1に示した。

2.3 抗酸化性

活性酸素吸収能 (ORAC) を指標としてアオモジ葉抽出物の抗酸化活性を測定した。測定方法は、国立研究

開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の H-ORAC 分析法標準作業手順⁵⁾ に準じた。96 ウェルマイクロプレートにブランク（リン酸緩衝液）及びリン酸緩衝液で希釈した抽出物（1 試料あたり 4 反復）もしくは Trolox 35 μL を分注し、各ウェルに 100.7 nM fluorescein sodium salt 溶液 115 μL を加えた。10 分間のプレインキュベーション後、31.7 mM AAPH 50 μL を加えて攪拌後、蛍光マイクロプレートリーダー（TECAN 製 Infinite 200 PRO）により蛍光強度を測定した。ORAC 値は、蛍光強度の減衰曲線下面積を算出し、検量線から試料の乾燥重量当たりの Trolox 当量として表した。蛍光測定は既報⁶⁾ に準じた。

2.4 成分分析

アオモジ葉抽出物の総ポリフェノール含量及び構成糖含量をそれぞれ Folin-Ciocalteu 法及びパルスドアンペロメトリック検出-陰イオン交換高速液体クロマトグラフィー法（HP-AEC/PAD）にて測定した。Folin-Ciocalteu 法は既報⁷⁾を一部改変して実施した。すなわち、96 ウェルマイクロプレートに 10 μL の試料溶液を加え、10 倍希釈した Folin-Ciocalteu 試薬 75 μL を加えて攪拌し、室温で 5 分間静置した。さらに、2%炭酸ナトリウム溶液 75 μL を加えて攪拌し、室温で 60 分間静置後、マイクロプレートリーダーにて 750 nm の吸光度を測定した。試料溶液は各試料を抽出溶媒で溶解し、純水で適宜希釈した。総ポリフェノール含量は、抽出

物の乾燥重量当たりの没食子酸当量として表した。

HP-AEC/PAD による構成糖分析に先立ち、アオモジ葉抽出物溶液をねじ口試験管に入れ、2.6 mol/L トリフルオロ酢酸存在下密栓して 100°C で 7 時間加熱し、結合型糖を単糖まで加水分解した。この試料を所定濃度に希釈し、表 2 に示す条件で分析に供した。

3. 結果及び考察

3.1 アオモジ葉の諸特性に及ぼす蒸煮処理の影響

抽出物の外観、固形分抽出率、総ポリフェノール量及び抗酸化活性に及ぼすアオモジ葉の乾燥前の蒸煮処理の有無影響について、図 2～5 に示した。

図 2 に示すように、熱水抽出及び 50% エタノール抽出物において、蒸煮葉由来の抽出物は未蒸煮のものに比べて褐変が顕著に抑えられていた。一方、エタノール抽出物においては、蒸煮葉由来の抽出物において、未蒸煮のものに比べて緑色が褪せており、色素の退色が認められた。

また、図 3A に示すように、固形分の抽出率は蒸煮ありとなしとでは差が認められなかった。抽出溶媒の違いで比較した場合、熱水抽出及び 50% エタノール抽出では差が認められなかったが、エタノール抽出においては抽出率の顕著な低下を示した。さらに、図 3B に示すように抽出物の総ポリフェノール含量は、熱水抽出及び 50% エタノール抽出においては、蒸煮なしに比し

表 1 アオモジ葉からの抽出条件

	抽出温度 (°C)	抽出時間 (分)	攪拌	試料量 (g)	溶媒量 (mL)		固液分離
					1st	2nd	
熱水	80	15-2回	なし	8	300	300	遠心分離
50% エタノール	25	30-2回	あり	8	160	80	遠心分離
エタノール	25	30-2回	あり	8	160	80	遠心分離

表 2 HP-AEC/PAD 条件

項目	条件
装置	ICS5000plus (Thermo Fisher Scientific Dionex)
カラム	Carbopac PA200, $\phi 3 \times 250$ mm with guard (Thermo Fisher)
移動相	A: water, B: 0.1 mol/L NaOH, C: 0.1 mol/L NaOH/0.6 mol/L CH ₃ COONa. 0→7.5 min: A80%/B20%, 7.5→9.5 min: B20%→100%, 9.5→12 min: B100%→C100%, with linear gradient, 12→15 min: hold at C100%.
流量	0.5 mL/min
検出	Pulsed amperometric detection
カラム温度	30°C
注入量	25 μL

て蒸煮ありにおいて顕著に増大した。エタノール抽出においては、逆に蒸煮ありにおいて顕著なポリフェノール含量の低下を示した。

抗酸化活性についても、図3Cに示すように、総ポリフェノール含量の増大に伴い蒸煮ありにおいて増大した（エタノール抽出においては評価せず）。

このような蒸煮の有無による外観や成分値の違いは、ポリフェノールの酸化に伴う褐変や成分の変質に起因するものと考えられる。アオモジ葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼが蒸煮により失活することが、ポリフェノールの酵素的褐変を抑え、ポリフェノールや抗酸化活性の保持に働いたものと思われた。

アオモジ葉熱水抽出物及び50%エタノール抽出物において、曳糸性を伴う高粘性が認められたため、水抽出物における粘度を蒸煮処理の有無で比較したところ、蒸煮ありにおける粘度の上昇が認められた（図4、表3）。アオモジ葉における粘性成分として多糖類や糖タンパク質が考えられ、蒸煮処理はこれらの粘性高分子の抽出を促進する効果があるものと思われた。

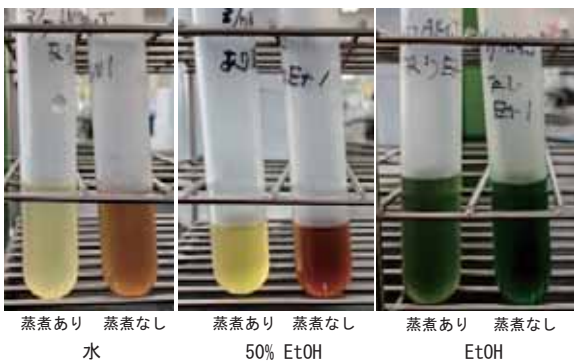


図2 アオモジ葉抽出物の外観

3.2 機能性成分の抽出率を志向した抽出条件の決定

アオモジ葉には粘性成分が含まれており、抽出条件によっては、抽出物の粘度上昇を引き起こすことが明らかとなった。抽出物を出発原料としてアオモジ由来ポリフェノール類の分画・精製を行う場合、粘性の高さは、作業効率を著しく低下させてしまう。一方、粘性高分子は、それ自体が水溶性食物繊維的な作用により生理機能性を有する可能性も考えられる。以上のことから、アオモジ葉の機能性評価試験やポリフェノール類の分画・精製を行う場合は、抽出条件と、ポリフェノール類及び粘性成分との関係性を把握しておくことが重要となる。そこで、抽出条件がポリフェノール類の抽出効率及び粘性に及ぼす影響について検討した。

乾燥アオモジ葉（蒸煮あり）を85℃熱水抽出、常温50%エタノール抽出及び常温80%エタノール抽出の3条件で抽出し、抽出物を得た。各抽出物の性状、ポリフェノール類の含量及び糖質含量を比較した。その結果、表4に示すように、熱水抽出物及び50%エタノール抽出物は高い粘性及び曳糸性を有しており、80%エタノール抽出物には粘性は認められなかった。また、表5に示すように、固形分当たりの総ポリフェノールの含量は、50%エタノール抽出物及び80%エタノール抽出物において熱水抽出物に比して上昇傾向を示した。糖質含量は、熱水抽出物が最も多く、50%エタノール抽出物、80%エタノール抽出物の順に低下した。エタノール抽出において認められた固形分抽出率の低下は、80%エタノール抽出においては認められなかった。

以上の結果から、適切な抽出溶媒を用いることによって、抽出物に含まれる機能性成分の量をコントロールすることが可能であり、粘性を排除し、高ポリフェノールを志向する場合は80%エタノール、粘性高分子を志向する場合は熱水抽出が望ましいと判断された。

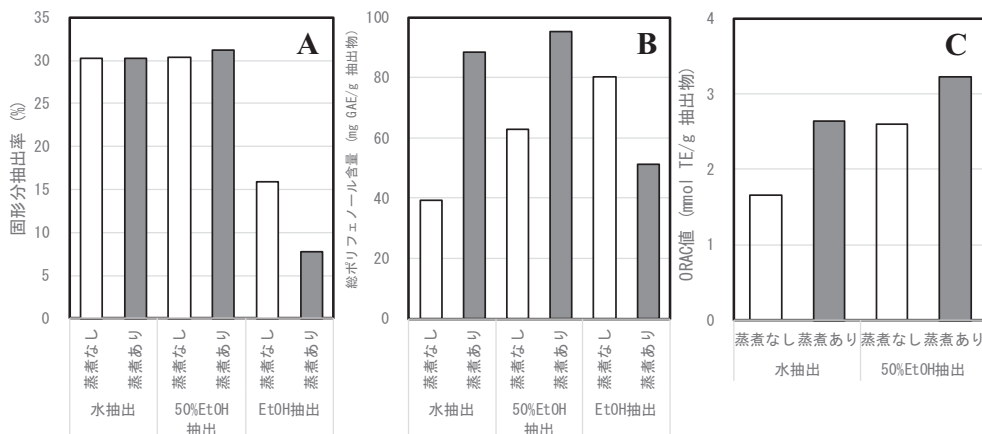


図3 アオモジ葉抽出物の固形分回収率、総ポリフェノール含量及びORAC値
EtOH：エタノール

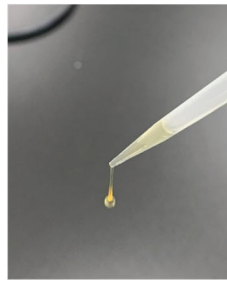


図4 アオモジ葉熱水抽出物の粘性 (チップの先端に付けて垂らしている状態)

表3 アオモジ葉熱水抽出物の粘度

粘度 (mPa・sec)	
蒸煮あり	2.56
蒸煮なし	1.93

表4 アオモジ葉抽出物の粘性比較

抽出条件	性状
熱水抽出	高い粘性と曳糸性
50%エタノール抽出	粘性と曳糸性が残存
80%エタノール抽出	粘性なし

表5 アオモジ葉熱水抽出物における成分含量の比較

	熱水	50%エタノール	80%エタノール
固形分抽出率 (%)	22.4	22.9	23.6
総ポリフェノール (mg GAE/g抽出物)	96.9	118.4	116.6
総糖 (mg/g抽出物)			
Fucose	N.D.	N.D.	N.D.
Rhamnose	8.1	40.4	20.8
Arabinose	243.2	50.0	4.0
Galactose	24.6	13.7	16.2
Glucose	182.1	128.8	60.2
Mannose	6.7	N.D.	1.9
Xylose	84.4	16.7	0.5
Galacturonic/glucuronic acid	N.D.	N.D.	N.D.
Total sugars	549.1	249.6	103.6

N.D.: 不検出

4. おわりに

アオモジはレモンのような芳香が特徴の植物で、これまで東南アジアを中心に、香辛料や精油など、香りの特徴とする製品に広く用いられている。一方、日本国内において、アオモジ葉については、ハーブティーとして上市されているものの、食品としての活用は限定的であった。近年の研究の進展によりアオモジ葉の生理機能が明らかとなり、機能性食品の原料としての利用可能性が期待されている。

本研究では、アオモジ葉に多く含まれる抗酸化物質であるポリフェノール類及び粘性物質をターゲット成分とし、アオモジ葉の乾燥条件や抽出条件がこれらの成分の抽出率等に及ぼす影響について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1) 熱水抽出物及び 50%エタノール抽出物において、蒸煮処理した葉から得られた抽出物は未蒸煮のものに比べて褐変が顕著に抑えられた。一方、エタノール抽出物においては、蒸煮葉由来の抽出物において、未蒸煮のものに比べて色素の退色が認めら

れた。

- 2) 総ポリフェノール含量並びに抗酸化活性は、熱水抽出及び 50%エタノール抽出においては、蒸煮無しに比して蒸煮有りにおいて顕著に増大した
- 3) 熱水抽出物及び 50%エタノール抽出物において、粘性の上昇が認められた。粘性は 80%エタノール抽出物においては消失していた。抽出物の粘性と糖質含量は正の相関を示したことから、アオモジ葉における多糖類や糖タンパク質の存在が示唆された。

これらの知見は、アオモジ葉を原料とした機能性食品の加工方法を確立するうえで有用な情報と考えられる。今後は、本知見を踏まえて他の研究機関とも連携しながらアオモジの種々の生理機能性と加工条件との関係性について検討を進める。また、新たな生理機能性の検証や有効成分の特定化に向けて研究開発を進展させる予定である。

なお、本研究に使用したマイクロプレートリーダー及び蛍光マイクロプレートリーダーは電源立地地域対

策交付金により導入した。

参考文献

- 1) 北村ら, 原色日本植物図鑑, 保育社, 545 (1979).
- 2) 古場ら, アオモジ葉の機能性に関する研究, 長崎県立大学 令和3年度学長裁量研究成果報告書(様式3号) 3-3.
- 3) Asija et al, Study on Hypolipidaemic activity of *Litsea cubeba* leaves in rats, *Chemistry Research Journal*, 7(2):100-115 (2022).
- 4) Wong et al, The leaves of the seasoning plant *Litsea cubeba* inhibit the NLRP3 inflammasome and ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, *Front. Nutr. Sec. Nutr. Immunology*, 9 (2022).
- 5) 渡辺純, 沖智之, 竹林純, H-ORAC 分析法標準作業手順書, 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所 (2013).
- 6) 柘植圭介, 鶴田裕美, 佐藤真佐恵, 吉村臣史, 海藻由来脂質における抗炎症作用の解明とその活用 (2)-スサビノリにおける抗炎症性脂質の特定-. 平成25年度佐賀県工業技術センター報告, 19-28 (2014).
- 7) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬, 柘植圭介, 農産物の機能性を強化する加工条件の構築と応用, 平成28年度佐賀県工業技術センター報告, 49-53 (2017).

※本研究は令和5年度に実施しましたが, 知的財産保護の観点から令和6年度の報告書に掲載しました。