

# 地域資源を活用した食品加工技術に関する研究

## —地域特産品(エゴマ)の有効利用に関する研究(第2報)—

鈴木 寿、今泉茂巳

### Utilization of Egoma. *Perilla frutescens* (II)

Hisashi SUZUKI and Shigemi IMAIZUMI

未利用資源であるエゴマ葉を食品素材として利用することを目的として、エゴマ葉中の抗酸化成分であるロスマリン酸の抽出・精製方法、またその抗酸化力を活かすための脂質の酸化防止効果について検討した。さらにエゴマ葉中の乳化力を有する成分の存在を期待し、抽出物の乳化特性についても検討を行った。その結果、エゴマ生葉からのロスマリン酸の抽出には80%エタノールが最適であり、また、精製では合成吸着樹脂(セパビーズSP207)を用いることにより、バッチ処理で回収率93.9%、純度23.8%、カラム処理で回収率66.1%、純度48.8%の精製物を得ることができた。そしてエゴマ葉乾燥粉末をサラダ油へ添加したところ酸化防止効果はあまりみられなかったが、クッキーへの添加では高い酸化防止効果を示した。乳化特性の検討においては、エゴマ葉乾燥粉末中にはo/w型エマルジョンを形成する成分を含有している可能性が示唆された。

## 1. はじめに

エゴマはシソ科の一年草であり、古くから飛騨地域を中心に栽培されてきた特産作物である。その種子には油脂が多く含まれていることから搾油原料として、また食材として和え物や五平餅などに利用されてきた。一方でその葉は抗酸化成分でポリフェノールの一種であるロスマリン酸が多く含まれているにも関わらず、ほとんど利用されてこなかった。このため、エゴマ葉を有効利用できればエゴマの需要拡大が期待でき、さらにはそれに伴う栽培面積の拡大などが期待され、農業から食品産業まで含めて飛騨地域の活性化につながるものと思われる。

そこでエゴマ葉を食品素材として利用することを目的として、昨年度は中山間農業研究所と共同で、その機能性成分であるロスマリン酸に注目した栽培方法及び乾燥粉末にするための加工方法について検討を行い、エゴマ葉のロスマリン酸含量を高める施肥方法や収穫時期等の栽培条件や、ロスマリン酸の減少を抑える加工条件を把握した<sup>1)</sup>。

ロスマリン酸は、抗酸化力を有していることから、食品へ添加した場合の酸化防止効果が期待でき、さらに抽出や精製により濃度を高めたエキス等にすることができれば化粧品原料など食品以外にも用途は広がる。また、エゴマはその種子に油脂を多く含むことから乳化剤の効果を示す成分を含む可能性がある。そこで今年度はエゴマの葉の用途開発を目的として、ロスマリン酸の抽出・精製方法、エゴマ葉の酸化防止効果、乳化特性について検討を行った。

## 2. 実験

### 2. 1 原材料

実験に用いたエゴマ葉は、岐阜県中山間農業研究所の圃場で栽培されているエゴマ(選抜品種)から採取した。

### 2. 2 エゴマ葉乾燥粉末の調製

エゴマ生葉を沸騰水で1分間ブランチング処理した後、熱

風乾燥機を用いて50°Cで乾燥し、これをアブソリュートミルで粉碎して粉末とした。

### 2. 3 エゴマ葉抽出液の調製

エゴマ生葉に10倍量の80%エタノールを加えホモジナイザーで磨砕した。これをろ紙(5A)でろ過したものをエゴマ葉抽出液(以下、80%エタノール抽出液)とした。

### 2. 4 ロスマリン酸の抽出方法の検討

エゴマ生葉2gに含水エタノール(エタノール濃度0, 20, 40, 60, 80, 100%)20mlを添加しホモジナイザーで磨砕した後、遠心分離(3800rpm, 10min)により上澄液を回収した。この上澄液を抽出に使用した含水エタノールで100mlに定容し、0.45 $\mu$ mのフィルターでろ過した後、HPLC装置でロスマリン酸を定量した。

また乾燥粉末からの抽出についても検討した。乾燥粉末0.2gに含水エタノール4mlを添加し超音波処理した後、遠心分離(3000rpm, 5min)し、上澄液を10mlに定容した後、ロスマリン酸を定量した。

### 2. 5 ロスマリン酸の精製方法の検討

精製については合成吸着樹脂(三菱化学(株)製ダイアイオンHP20およびセパビーズSP207)によるバッチ処理とカラム処理を検討した。精製用試料には80%エタノール抽出液からエバポレーターでエタノールを除去し、水を加えて初期量と同量にしたもの(水置換サンプル)を用いた。

バッチ処理は、水で平衡化した樹脂25mlに水置換サンプル10mlを加え十分に混合して樹脂に吸着させた。これに含水エタノール50mlを添加して振とう(70回/min, 30min)した後、上澄液を回収した。この操作を2回行った。残った樹脂を用いて同様の操作を繰り返し、順次含水エタノールのエタノール濃度を高くしていきロスマリン酸を樹脂から溶離させた。

カラム処理はガラスカラム(2cm $\phi$ )に樹脂を30ml充填したものをを用いた。あらかじめ水で平衡化した樹脂に水置換サンプル10mlを添加後、含水エタノールを溶離液として流し、

順次エタノール濃度を高めていきロスマリン酸を溶出させた。

## 2. 6 酸化防止効果の検討

酸化防止効果はサラダ油およびクッキーにエゴマ葉乾燥粉末またはエゴマ葉抽出液を添加し、一定期間保存後に脂質の過酸化価(POV)を測定して評価した。

サラダ油に対する酸化防止効果の検証については新田<sup>2)</sup>の方法に従い、市販のサラダ油(日清オイリオ(株)製)25gにエゴマ葉乾燥粉末または80%エタノール抽出液を添加し40℃の恒温器で隔日に振とうしながら7週間保存した。比較対象として市販の酸化防止剤RMキーパーOS(三菱化学フーズ(株)製)および試薬ロスマリン酸(フナコシ(株)製)も合わせて測定した。

クッキーの試作は加島<sup>3)</sup>の方法に準じて行った。薄力粉200g、無塩バター90g、グラニュー糖55g、卵白39g(約1個分)、牛乳10mL、粗塩 0.43g、エゴマ葉乾燥粉末6.9g(生地重量の約1.8%)の配合で生地を混練後、直径3cm厚さ5mmにスライスし、160℃で13分間焼成した。これを50℃で保存した後、経時的にクッキーを採取しジエチルエーテルで油脂を抽出してPOVを測定した。

## 2. 7 乳化特性の検討

クロロホルム・メタノール混液はほとんど全ての脂質を溶解し、アセトンは中性脂質のような単純脂質は溶解するがリン脂質は溶解しない<sup>4)</sup>。そこで乳化力を有する成分をエゴマ葉中のリン脂質と想定し、この有機溶媒に対する溶解性の違いを利用して以下の方法によりエゴマ葉乾燥粉末からリン脂質を含む抽出物を調製した。エゴマ葉乾燥粉末に2.5倍量のアセトンを加えて十分に洗浄後、遠心分離により上澄のアセトンを除去した。これを数回繰り返した後、得られた沈殿にクロロホルム・メタノール混液(2:1)を2.5倍量加えて一晩攪拌した。遠心分離により上澄液を回収し、エバポレーターで溶媒を除去して得られた抽出物を測定用試料とした。この試料をサラダ油10gに添加し、十分に攪拌して溶解させた後、水10gを加えてホモジナイザー(3000rpm、5min)で混合した。この液を室温に放置すると次第に分離していくので、その分離した中間層の高さを経時的に測定した。また、この中間層の乳化状態の型の判定は希釈法<sup>5)</sup>により行った。

## 2. 8 ロスマリン酸の定量

高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量した。カラムにはMightysil RP-18 GP 250-4.6(5 $\mu$ m)(関東化学(株)製)を用い、カラム温度を40℃とした。移動相は1.0ml/minで、溶媒A(0.2%TFAを含む10%アセトニトリル)、溶媒B(0.2%TFAを含む30%アセトニトリル)および溶媒C(0.2%TFAを含むアセトニトリル)を用い、A/B/Cの組成を100/0/0でスタートし、20分後に0/100/0、25分後に0/0/100となる直線的なグラジェントで行った。検出波長は280nmで行い、標準試料にはフナコシ(株)製のロスマリン酸を用いた。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 ロスマリン酸の抽出条件の検討

エタノール濃度を変えてエゴマ生葉およびエゴマ葉乾燥粉末からロスマリン酸を抽出したときの抽出量をそれぞれ図1、図2に示す。

図1よりエゴマ生葉から抽出した場合、0%ではまったく抽出されず、エタノール濃度を増やしていくと抽出量も増加していった。そして80%で最も高くなり100%にすると逆に低下した。以上のことから、エゴマ生葉からロスマリン酸を抽出するためには、水のみでは不可能であり、エタノールが必要で、その濃度は80%が最適であることがわかった。

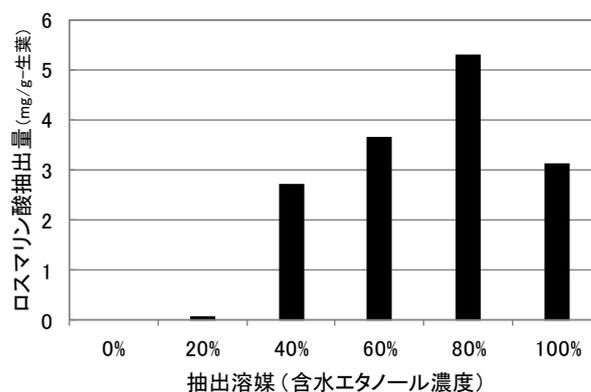


図1 エゴマ生葉からロスマリン酸の抽出条件

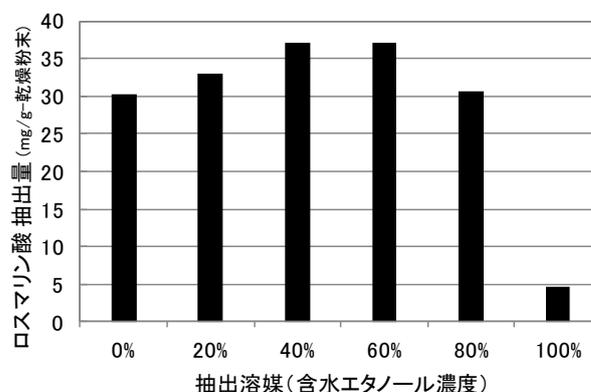


図2 エゴマ葉乾燥粉末からロスマリン酸の抽出条件

図2よりエゴマ葉乾燥粉末の場合は、40%~60%の時の抽出量が最も多く、この濃度が最適であると考えられた。また、生葉の場合とは逆に水のみでもある程度は抽出され、エタノール濃度100%ではほとんど抽出されなかった。乾燥粉末は、ブラッシング処理や加熱乾燥などにより組織がある程度壊されているためと考えられ、0%や20%の様な低エタノール濃度でも抽出されたのではないかと推察した。一方、生葉である程度抽出されていたエタノール濃度100%において乾燥粉末でほとんど抽出されなかったことに関しては、生葉はそれ自体に水分を含んでおり実際は90%程度になっていると考え

られ、このためにロスマリン酸が抽出されたのではないかと  
 思われる。全くのエタノール濃度100%であれば、乾燥粉末  
 からの抽出の場合と同様にほとんど抽出されない可能性も  
 あると思われる。

### 3. 2 ロスマリン酸の精製条件の検討

合成吸着樹脂HP20、SP207はポリフェノールやペプチド  
 などの成分の分離精製に利用されることから、この樹脂を用  
 いてロスマリン酸の精製の検討を行った。まず始めにこれら  
 の樹脂のロスマリン酸の吸着特性を把握した。樹脂5mlに  
 80%エタノール抽出液1mlと含水エタノール10mlを加え振とう  
 した後の上澄液を分析することにより樹脂に吸着しなかった  
 ロスマリン酸を測定した。その結果を図3に示す。濃度0%で  
 はいずれの樹脂でもピーク面積が僅かでありロスマリン酸を  
 ほとんど吸着していた。また、HP20では40%以上で、SP207  
 では60%以上の濃度でピーク面積が一定になっており、この  
 濃度ではロスマリン酸を吸着しなくなることがわかった。この  
 特性をもとにバッチ処理とカラム処理の検討を行った。

精製に用いた試料は水置換サンプルであり、80%エタノール  
 抽出液から水置換サンプルにすることによりロスマリン酸の  
 純度(試料中の固形分に含まれるロスマリン酸の割合)は  
 6.1%から7.6%へと向上した。この水に置換する操作によつて、  
 エタノールに可溶であった疎水性の成分が不溶化してある  
 程度除くことができ、純度を高めることができた。また、回収  
 率も95.9%と非常に高い値であり、ロスマリン酸の損失が僅か  
 であった。

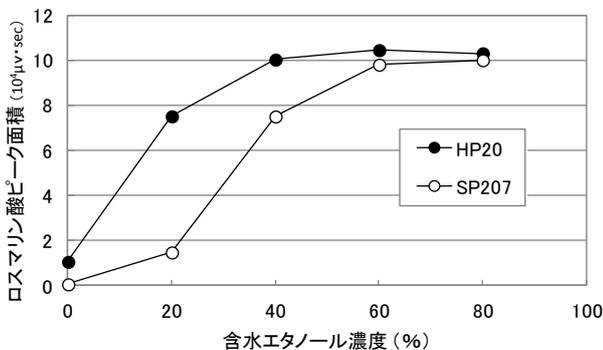


図3 合成吸着樹脂へのロスマリン酸の吸着特性

この水置換サンプルを試料としバッチ処理を行った結果  
 を図4に示す。HP20では30%エタノール画分の回収率が  
 72.8%で純度が27.8%であった。SP207では60%エタノール画  
 分の回収率が93.9%と非常に高く、純度23.8%であった。  
 HPLCクロマトグラムから、HP20の方が疎水性成分をより除  
 去できており、純度が高くなった要因の一つと考えられた。  
 また、いずれの樹脂においても0%エタノール画分が着色し  
 ており、ロスマリン酸はほとんど含まれておらず、この画分で  
 大部分の色素成分を除去できることがわかった。

次にカラム処理の結果を図5に示す。HP20では30%エタ  
 ノール画分の回収率が60.8%で純度が33.3%であった。SP207

では40%エタノール画分の回収率が66.1%で純度が48.8%  
 であった。カラム処理は、バッチ処理に比べて回収率は低くな  
 るもののロスマリン酸の純度を高めることができ、特にSP207  
 では最初の水置換サンプルの7.6%を48.8%まで向上させる  
 ことができた。また、バッチ処理と同様にいずれの樹脂でも0%  
 エタノール画分に色素が溶出しており、この画分で大部分  
 の色素を除去できることがわかった。

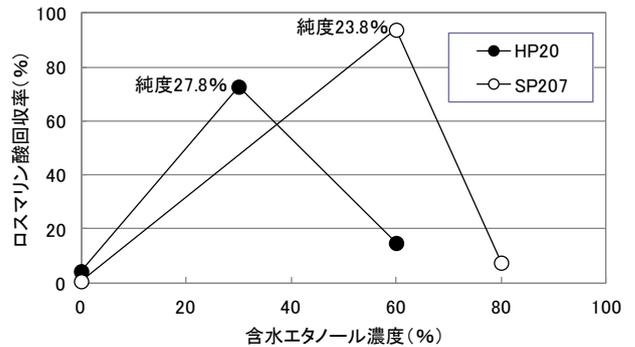


図4 バッチ処理によるロスマリン酸の回収率

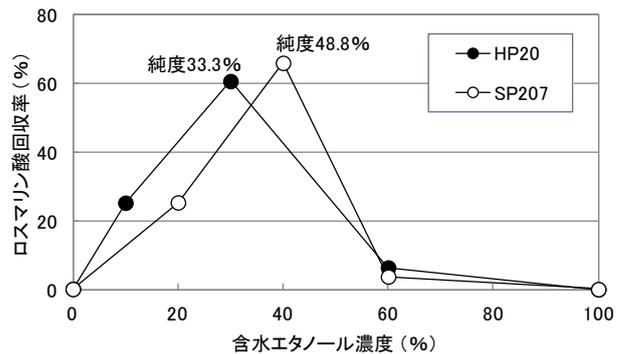


図5 カラム処理によるロスマリン酸の回収率

以上の結果をまとめると、バッチ処理ではHP20の方が純  
 度は高いもののSP207との差は4%であり、回収率に関しては  
 SP207の方が93.9%とHP20よりも20%以上も高く、大部分のロ  
 スマリン酸を回収できていた。また、カラム処理では純度、回  
 収率共にSP207の方が高かった。これらのことからロスマリン  
 酸の精製にはSP207が有効であると考えられ、処理量や純  
 度など必要に応じてバッチ処理とカラム処理を使い分けるこ  
 とが効果的であると思われる。

### 3. 3 酸化防止効果の検討

ロスマリン酸は抗酸化力を有していることから酸化防止効  
 果が期待できるため、サラダ油とクッキーへ添加したときの  
 効果について検討した。

エゴマ葉乾燥粉末または80%エタノール抽出液をサラダ  
 油へ添加したときの7週間後のPOVを図6に示す。その結果、  
 乾燥粉末ではほとんどPOVを抑制しておらず4%添加でも  
 86.9であった。抽出液では4ml添加することにより54.0と半分  
 程度にまで抑制していた。試薬ロスマリン酸の結果からロス

マリネン酸自体に酸化抑制効果があることは明らかである。しかし、乾燥粉末では、そのロスマリン酸を多く含んでおり、その添加量が抽出液の15倍であるにもかかわらず、その効果は若干はみられるものの十分得られていない。乾燥粉末中のロスマリン酸がうまく油の方へ移行していないと思われる。この結果から、実用的にはエキスのような抽出物であれば酸化防止効果は期待できるが、乾燥粉末では添加方法を工夫する必要があると思われる。

図7にエゴマ葉乾燥粉末をクッキーへ添加したときの保存中のPOVの変化を示す。コントロール(無添加)は2週間経過後からPOVが上昇し、6週間後には364となった。一方、乾燥粉末を添加したクッキーはPOVの上昇が低く抑えられており、6週間後でも37.6でコントロールの1/10と低く、高い酸化防止効果を示した。サラダ油では効果が低かった乾燥粉末であるが、クッキーでは高い効果を示した。油脂の種類によって効果に差が現れることは報告<sup>2)</sup>されており、またサラダ油の場合はそのままだけに添加しているが、クッキーは160℃で焼成している。この条件の違いの影響もあるのかもしれないが、原因の解明にはさらなる検討が必要である。

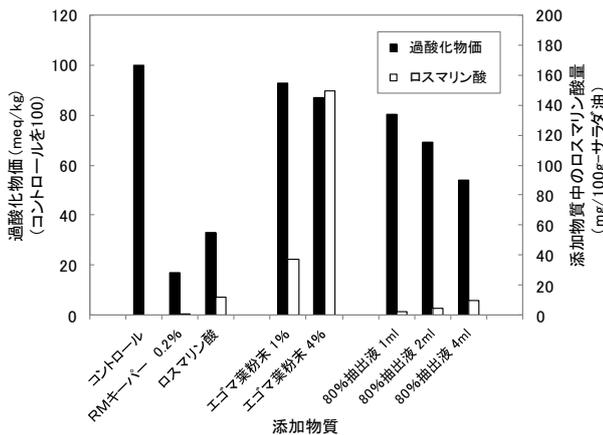


図6 サラダ油のPOVへの効果

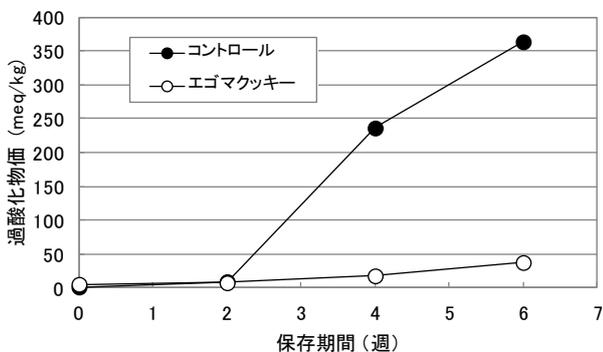


図7 エゴマ葉乾燥粉末添加クッキーのPOVの変化

### 3. 4 乳化特性の検討

エゴマの種子は搾油原料として利用されるほど脂質を多く含むことから、エゴマ自体に乳化剤として働く成分を生成、

含有している可能性が考えられる。このためエゴマ葉乾燥粉末の抽出物を用いてそのような効果があるか検討を行った。水とサラダ油と抽出物を混合して静置すると次第に2層に分離し、さらに放置すると3層に分離してくる。この中間層を希釈法により調べたところ、水へ滴下し攪拌すると白濁して分散するが、油に滴下し攪拌しても分散せず油は透明であった。このことからこの中間層は連続層が水のo/w型のエマルジョンを形成しているのではないかと考えられた。この中間層(乳化層)の高さを経時的に測定した結果を図8に示す。乳化層は静置後一日は速やかに低くなっていくが、それ以降は大きくは低下せず一定の高さを保っていた。その高さは、添加量が多いほど高く効果が大きかった。このことからエゴマ葉乾燥粉末中には乳化力を示す成分が含まれていることが示唆される。

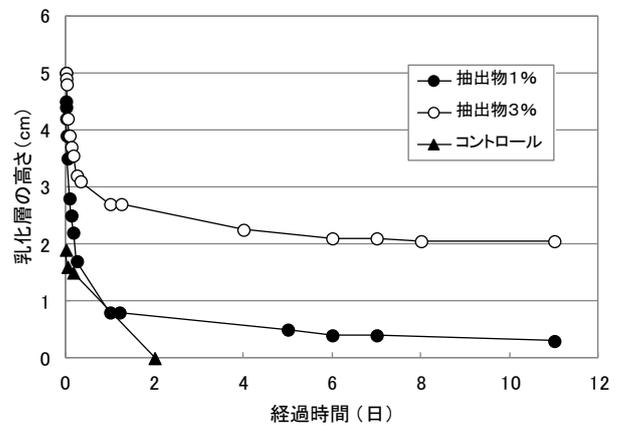


図8 エゴマ葉乾燥粉末の乳化特性

### 4. まとめ

未利用資源であるエゴマ葉を食品素材として利用することを目的として、その抗酸化成分であるロスマリン酸の抽出・精製方法、またその抗酸化力を活かすための脂質の酸化防止効果について検討した。さらにエゴマ葉中の乳化力を有する成分の存在を期待し、抽出物の乳化特性についても検討を行った。

その結果、エゴマ生葉からロスマリン酸を抽出するためには80%エタノールが最適であった。また、合成吸着樹脂を用いた精製では、SP207が有効であり、純度7.6%であった試料をバッチ処理で純度23.8%(回収率93.9%)、カラム処理で純度48.8%(回収率66.1%)まで高めることができた。処理量や純度などの必要性に応じてバッチ処理とカラム処理を使い分けることにより、効率よくロスマリン酸を精製できるものと思われる。

酸化防止効果については、エゴマ葉乾燥粉末をサラダ油へ添加したところその効果はあまりみられなかった。しかし、クッキーへの添加ではPOVが無添加の約1/10と低く抑えられ、高い酸化防止効果を示した。一方で80%エタノール抽出液の添加であればサラダ油でもPOVの上昇を抑制してい

た。

乳化特性の検討においては、エゴマ葉乾燥粉末中にはo/w型エマルジョンを形成する成分が含有されている可能性が示唆された。

#### 【謝 辞】

エゴマの試料を提供していただきました中山間農業研究所 袖垣一也部長、乳化について助言をいただきました岐阜大学応用生物科学部 岩本悟志准教授に感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

- 1) 鈴木ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 6, pp.36-39, 2012
- 2) 新田, 調理科学, 10(4), pp.57-60, 1977
- 3) 加島ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 6, pp.32-35, 2012
- 5) 油脂化学便覧(日本油化学協会編), 丸善, pp.297, 1990.

- 4) 佐藤ら, 日本家政学会誌, 43(2), pp.159-163, 1992

#### Abstract

In order to utilize a leaf of Egoma plant (*Perilla frutescens* var. *frutescens*) as functional foods, we investigated about extraction and partial purification of rosmarinic acid which is antioxidant compound from the leaf. Further, we examined the effect as antioxidant of dry powder of the leaf.

As the result, most rosmarinic acid was extracted from the leaf by using 80% ethanol. After partially purifying the extract by batchwise operation or column chromatography using Synthetic absorbents SEPABEADS SP207 (Mitsubishi Chemical Co.), purity of rosmarinic acid which was obtained was 23.8% or 48.8%, respectively.

After having stored a cookie which added dry powder of the leaf at 50°C for 6 weeks, peroxide value of lipid in the cookie was 1/10 than it which was no additive. Therefore, it is thought that the leaf is able to utilize as antioxidant for food.