

ブルーベリー葉に含まれる有効成分の効率的抽出と 渋味マスキング法*

松浦 靖*¹・高橋 克嘉*¹・酒井 美穂*²・児玉 浩子*³・永山 志穂*⁴・二階 遙*¹・
柚木崎 千鶴子*¹・平原 秀秋*⁵・日高 史絵*⁵・境田 博至*⁵・甲斐 孝憲*⁵

Effective Extraction of Active Element Included Blueberry Leaf and Masking Method of Astringency

Yasushi MATSUURA, Katsuyoshi TAKAHASHI, Miho SAKAI, Hiroko KODAMA,
Shiho NAGAYAMA, Haruka NIKAI, Chizuko YUKIZAKI, Hideaki HIRABARU, Fumie HIDAKA,
Hiroshi SAKAIDA and Takanori KAI

ブルーベリー葉からの有効成分の抽出において、抽出条件の違いによる有効成分含量および抗酸化活性を調べた結果、プロアントシアニジンは抽出温度が高くなるに従い抽出率が高くなり、抗酸化活性はPACを含むポリフェノールの濃度に依存して高くなり、正の相関がみられた。一方60℃程度の比較的低い抽出温度では、キナ酸やクロロゲン酸の抽出率が高いことから、有用成分を選択的に抽出できる可能性が示唆された。

また、ブルーベリー葉飲料の渋味低減化法について、マスキング剤添加によるマスキング効果や酵素処理による渋味低減化を検討した結果、 β 、 γ -シクロデキストリンやタンナーゼ処理が有効であった。

キーワード：ブルーベリー葉、プロアントシアニジン、渋味、マスキング、タンナーゼ

1 はじめに

当県では、これまでに食の機能性活用基盤技術開発研究において、抗酸化作用、脂肪肝抑制作用、血圧上昇抑制効果、抗HCV（ヒトC型肝炎ウイルス）作用等の生理機能を有する農作物として「ブルーベリー葉」を見出し、産地化・事業化が進められている。これら数多くの生理機能の活性本体はプロアントシアニジン(Proanthocyanidin, PAC)であると考えられ、このPACは高い抗酸化活性を有し、その高い抗酸化機能が様々な疾病予防に期待できる^{1)・2)}。

しかし、このPACは一般的に渋味を与えることが知られており、ブルーベリー葉飲料にも強烈的な渋味を与える。

このようなことから、本研究では種々の条件で抽出した抽出液のPAC含量や抗酸化活性をin vitroで評価し、機能性が高く、渋味を低減させたブルーベリー葉飲料の開発を目的として、種々のマスキング剤添加によるマスキング効果や酵素処理による渋味低減化について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 原材料および前処理

2008年11月4日に(有)雲海農園で収穫し、2分間スチームブランチング後、80℃で5時間乾燥処理したラビットアイ系のブルーベリー葉を使用した。乾燥後は、一片約1.0~1.3cm以内になるよう手揉みにより粗粉碎したものを試料とした。

2-2 抽出条件の検討

湯量に対して0.5, 0.75, 1% (w/w)の茶葉を使用し、次に示す条件で抽出した。抽出温度を60、

* 宮崎県産高機能性ブルーベリー葉を用いた飲料の開発
(H20-21年度地域イノベーション創出研究開発事業)

*1 食品開発部

*2 現 宮崎県総合農業試験場

*3 現 宮崎県工業技術センター材料開発部

*4 現 財団法人宮崎県公園協会

*5 雲海酒造株式会社研究開発部

80°Cおよび95°Cの3試験区とし、それぞれの温度での抽出時間を5, 10, 15, 20分として抽出した。抽出後は、110メッシュのナイロンろ布を用いて茶葉を除き、0.45 μm フィルターでろ過した試料溶液のBrix示度(ATAGO RX-5000)、ポリフェノール、PAC、キナ酸含量およびDPPHラジカル消去活性を測定した。

2-3 分析方法

1) 総ポリフェノール含量

Folin-Ciocalteu法³⁾を用いてポリフェノール含量を測定し、試料溶液100mlあたりの没食子酸相当量として表した。

2) 各種ポリフェノール含量

各種ポリフェノール測定は、UFLC(超高速液体クロマトグラフィ)を用いて、(+)-カテキン、(-)-エピカテキン、クロロゲン酸およびルチンを標準溶液とし、以下の条件により測定した。定量値は、各試料溶液でのピーク面積と各種標準溶液でのピーク面積を比較し算出した。

分析装置 : Prominence UFLC (株島津製作所製)

カラム : Shim-pack XR-ODS II
3.0 mm i. d. × 7.5 mm

カラム温度 : 40°C

移動相A : 50 mM リン酸緩衝液

移動相B : 100%アセトニトリル

グラジェント条件 : 0 → 5 min B液 : 4% → 30%
5 → 6.9 min B液 : 30% → 75%
6.9 → 8.8 min B液 : 100%
8.8 → 10.7 min B液 : 4%

注入量 : 3 μl

流速 : 0.8 ml/min

検出器 : prominence DIODE ARRAY DETECTOR
SPD-M20

検出波長 : 270 nm, 325 nm, max abs

3) PAC 含量

Porter *et al* の方法⁴⁾に準じ、試料溶液に2%(w/v)NH₄Fe(SO₄)₂ · 12H₂O(in 2M HCl)を含むブタノール-塩酸(95:5)混液を加え、105°Cで30分間加熱した。加水分解後は、氷水中で15分間冷却し、550 nmの波長で吸光度を測定し、Procyanidin B2 (SIGMA ALDRICH)を用い、作製した検量線により、PAC含量を算出し、試料溶液100mlあたりの

Procyanidin B2相当量として表した。

4) キナ酸含量

キナ酸の測定は、HPLCを用いてD-(-)-キナ酸を標準溶液とし、以下の条件により測定した。定量値は、各試料溶液でのピーク面積と標準溶液のピーク面積を比較し算出した。

分析装置 : 有機酸分析装置 (株島津製作所製)

カラム : Shim-pack SPR-H
250 mm × 7.8 mm i. d. × 2 (直列)

カラム温度 : 40°C

移動相 : 4 mM p-トルエンスルホン酸

緩衝液 : 4 mM p-トルエンスルホン酸,
100 mM EDTA, 16 mM Bis-tris

注入量 : 10 μl

流速 : 0.8 ml/min

検出器 : 電気伝導度検出器

5) 抗酸化活性 (DPPHラジカル消去活性)

沖らの方法⁵⁾に準じ、DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 和光純薬)溶液の520 nmにおける吸光度を96穴マイクロプレート法(マイクロプレートリーダー, ナルジェヌンクインターナショナル, Immuno Mini NJ-2300)にて測定した。DPPHラジカル消去活性値は、試料溶液100mlあたりのTrolox (Aldrich)相当量で表した。

2-4 モデル溶液を用いた渋味評価基準の作成

グラヴィノールN(ブドウ種子由来のPACを38%以上含む, キッコーマン(株)製の抗酸化素材)を、モデル溶液1mLあたり0, 0.40, 1.2, 2.0, 2.8 mg含む濃度となるように溶解し、調製したサンプルの渋味について官能評価を行った。モデル溶液は、ブルーベリー葉の有機酸組成に準じて、蒸留水1mLあたりクロロゲン酸を0.30 mg, キナ酸を0.60 mg含む濃度となるように調製した。

官能評価は、プロアントシアニジン濃度の薄い試料から順番に評価を行い、次の評価点により渋味評価基準の作成を行った。(0点: 渋味を感じない 1点: やや渋い 2点: 渋い 3点: かなり渋い)

2-5 マスキング剤を用いた渋味低減化

1) 供試添加物剤

マスキング試験の実施にあたり、5種類のマスキング剤を用いた(表1)。これらは、市販され

ている食品添加物で、全てマスキング効果が認められているものを使用した。

表 1 供試添加物剤一覧

食品添加物名	成分および重量%	メーカー
α -シクロデキストリン (シクロヘキサアミロース)	98.0%以上	三菱化学フーズ㈱
β -シクロデキストリン (シクロヘプタアミロース)	98.0%以上	三菱化学フーズ㈱
γ -シクロデキストリン (シクロオクタアミロース)	98.0%以上	三菱化学フーズ㈱
ネオサンマルクAG (ソーマチン製剤)	アラビアガム 1.35% ソーマチン 0.15% 食品素材(粉砕) 98.5%	三栄源エフ・エフ・アイ㈱
ヘルシャスA (グルコン酸ナトリウム)	-	扶桑化学工業㈱

2) 官能評価

湯量に対して 1%(w/w)の茶葉を使用し、沸騰水中で 5 分間煮出した抽出液を試験に供した。試験は、抽出液に各種マスキング剤をそれぞれ 0.1%, 0.5%, 1% 添加し、渋味について順位法 (*ranking*) による官能評価を行なった。官能評価には、宮崎県食品開発センター職員 12 名をパネラーとし、解析は、*Newell* と *MacFarlane* の多重比較検定法⁶⁾ を用いた。

2-6 タンナーゼ処理による渋味低減化

1) 抽出方法

茶葉抽出液は、95℃以上の熱水に乾燥茶葉を 1%(w/w)の割合で加え、湯温を 95℃に保ちながら 15 分間攪拌、5 分間静置した後、110 メッシュのナイロンろ布でろ過したものを用いた。

2) 酵素処理

抽出液にタンナーゼ (表 2) を 1% 添加し、40℃で 30 分間振とうした。反応後、沸騰湯浴中で 10 分間加熱処理により反応を停止させ、4,000 回転で 10 分間遠心分離し、上澄液を酵素分解試料溶液とした。

なお、酵素添加なしの場合も同様に処理し、コントロールとした。

表 2 供試酵素剤

酵素製剤：タンナーゼ KTFH
成分重量%：タンナーゼ 1%，ブドウ糖 99%
タンナーゼ活性：500 U/g
製造者：キッコーマン株式会社 KLS

3) 分析方法

酵素分解処理した試料溶液について、Brix 示度、ポリフェノール、PAC、キナ酸含量および抗酸化活性を 2-3 に示した方法と同様に測定した。

3 結果および考察

3-1 抽出条件の検討

抽出条件の違いによる PAC 含量および抗酸化活性を調べるため、茶葉使用割合、抽出温度、抽出時間を変え、得られた結果を表 3 に示す。機能性成分である PAC は、抽出温度が高く、また抽出時間が長くなるに従い抽出率が高くなる傾向にあった。DPPH ラジカル消去活性は、PAC を含むポリフェノールの濃度に依存して高くなり、正の相関がみられた。この PAC の高温での抽出は、PAC がエステル型カテキン類に類似した構造を一部もつことが考えられるため、低温では抽出されにくく、高温での抽出率が高まったものと推測された。

一方、60℃の比較的低い温度では、キナ酸やクロロゲン酸等の抽出率が高かった。

これより、抽出時間・温度の検討を更に進めていくことで、キナ酸やクロロゲン酸および PAC を選択的に抽出できる可能性が示唆された。

3-2 モデル溶液を用いた渋味評価基準の作成

ブドウ種子由来の PAC を含むモデル溶液を用いて、渋味の官能評価を行った結果を図 1 に示す。グラヴィノール N 添加濃度をそれぞれ 0, 0.40, 1.2, 2.0, 2.8 mg/mL としたときの PAC 濃度は、0, 0.15, 0.46, 0.76, 1.1 mg/mL であり、サンプルの渋味評価点はそれぞれ 0.455, 0.909, 1.73, 2.27, 2.55 であった。

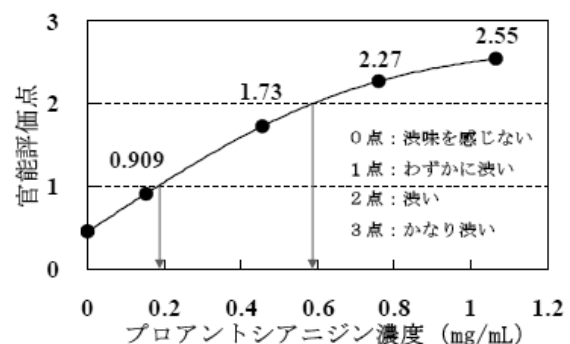


図 1 モデル溶液を用いた渋味評価基準

これより、わずかに渋味を感じ始める評価点 1、また、渋いと感じ始める評価点 2 の PAC 濃度はそれぞれ 0.19 mg/mL, 0.59 mg/mL であり、これを渋味の評価基準とした。

表3 抽出条件の違いによる有効成分含量と抗酸化活性

茶葉使用割合	抽出温度	抽出時間(分)	Brix示度 (%)	ホリフェノール (mg-gallic acid eq./100mL)	プロアントシアニン (mg-procyanidinB2 eq./100mL)	(+)-カテキン (mg/100mL)	(-)-エピカテキン (mg/100mL)	クロロゲン酸 (mg/100mL)	ルチン (mg/100mL)	キナ酸 (mg/100mL)	DPPHラジカル消去活性 (mmol-Trolox eq./100mL)
0.50%	60°C	5	0.12	35.6	13.9	0.3	1.7	9.1	1.5	25.3	0.28
		10	0.14	45.5	16.8	0.5	1.9	11.0	1.9	29.1	0.32
		15	0.17	50.2	19.1	0.6	2.2	13.3	2.2	35.5	0.33
		20	0.19	57.2	19.1	0.6	2.4	14.1	2.4	35.4	0.39
	80°C	5	0.12	45.3	26.0	0.5	2.1	10.3	1.8	28.3	0.30
		10	0.19	63.6	36.4	0.7	2.6	14.0	3.4	36.2	0.32
		15	0.22	72.2	38.8	0.8	3.8	18.1	3.3	39.7	0.44
		20	0.21	72.8	42.2	0.9	2.6	14.2	2.8	38.5	0.44
	95°C	5	0.17	57.9	27.2	0.6	2.1	12.8	2.9	31.3	0.31
		10	0.24	83.7	37.6	0.9	3.3	17.5	3.5	40.9	0.53
		15	0.25	89.5	42.2	1.1	4.5	20.0	5.0	41.4	0.55
		20	0.25	89.4	48.0	1.2	3.3	17.9	3.6	38.4	0.54
0.75%	60°C	5	0.19	56.1	19.1	0.6	2.8	14.7	3.1	38.8	0.37
		10	0.20	57.9	19.1	0.7	2.8	14.9	2.5	38.5	0.43
		15	0.24	68.7	39.3	0.9	3.0	17.5	3.0	47.7	0.46
		20	0.28	79.4	38.8	1.0	4.0	21.8	4.7	56.3	0.54
	80°C	5	0.24	74.9	43.4	1.0	3.4	17.1	3.1	48.3	0.38
		10	0.29	85.8	46.3	1.0	3.9	21.6	4.9	53.9	0.56
		15	0.28	92.2	55.5	1.0	3.8	20.7	3.5	52.3	0.54
		20	0.34	107.2	60.2	1.3	4.8	27.2	6.8	62.1	0.63
	95°C	5	0.28	91.4	50.9	1.0	4.0	20.6	5.0	47.7	0.51
		10	0.31	114.8	62.5	1.4	4.2	22.2	4.0	54.7	0.61
		15	0.40	137.3	77.5	1.7	5.8	27.0	5.4	62.4	0.74
		20	0.41	150.5	84.5	1.7	5.3	29.0	5.9	62.6	0.78
1%	60°C	5	0.20	55.3	26.0	0.5	2.6	14.3	2.3	40.4	0.53
		10	0.30	86.0	45.7	0.9	4.0	22.9	3.9	63.7	0.73
		15	0.32	88.2	50.3	1.1	4.4	24.6	4.0	65.3	0.67
		20	0.38	111.6	62.5	1.4	6.0	29.6	6.6	69.3	0.79
	80°C	5	0.27	79.4	42.2	0.8	3.9	19.8	3.4	53.8	0.47
		10	0.35	104.6	60.7	1.4	4.9	26.0	4.6	65.1	0.80
		15	0.45	138.5	72.3	1.6	7.0	34.2	8.5	78.6	0.78
		20	0.48	147.7	82.1	1.7	7.3	35.4	9.1	80.0	1.03
	95°C	5	0.38	130.2	70.0	1.3	5.6	27.5	6.5	64.9	0.77
		10	0.46	155.6	90.8	1.6	5.9	30.6	6.1	74.7	0.99
		15	0.54	188.9	119.2	2.2	8.8	39.3	7.7	82.0	1.20
		20	0.55	189.8	114.5	2.1	7.1	36.8	9.8	81.4	1.34

なお、この評価基準を抽出試験結果に当てはめると、機能性を高めた飲料設計を行えば、ブルーベリー葉飲料はかなり渋く、渋味のマスキングが必要であることがわかった。

3-3 マスキング剤を用いた渋味低減化

シクロデキストリン (Cyclodextrin, CD) 3種類、ソーマチン製剤、グルコン酸塩を添加し、渋味のマスキング効果を評価した結果を図2に示す。α-CDでは、1%添加でもマスキング効果はみられなかったが、β、γ-CD 1%添加ではコントロール (CD無添加区) との順位合計に有意差が得られ、マスキング効果が認められた。これは、β、γ-CDがPACを包接し、痛点への接触回避によるものと推測された。

一方、ソーマチン製剤およびグルコン酸塩を1%添加してもマスキング効果が見られなかった。

3-4 タンナーゼ処理による渋味低減化

タンナーゼ処理が、ブルーベリー葉抽出液の渋味低減に及ぼす影響について官能評価を実施した結果を表4に示す。タンナーゼ処理区では、未処理区に対し有意に渋味が低減されていることがわかった。

一方、タンナーゼ処理がブルーベリー葉抽出液のPAC含量および抗酸化活性に及ぼす影響について検討した結果を表5に示す。Brix示度は、タンナーゼ未処理区で0.48%、タンナーゼ処理区では1.44%とタンナーゼ処理により値が高くなっていったが、これはタンナーゼ製剤に含まれるブドウ糖によるものであった。その他、PAC含量および抗酸化活性には、ほとんど影響はみられなかった。

これより、タンナーゼ処理の有効性が示唆された。引き続き、化学的にタンナーゼ処理の有効性について検討する。

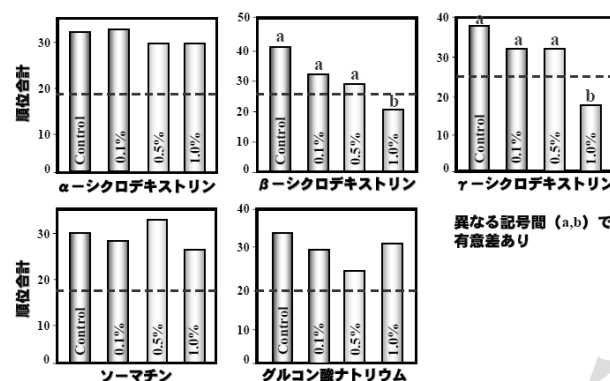


図2 各種マスキング剤を用いた渋味のマスキング効果

表4 タンナーゼ処理後のブルーベリー葉抽出液の官能評価結果

タンナーゼ 処理無	タンナーゼ 処理有
1	10 ^{*3}

※1 2点比較法(両側検定)により、渋味が低いものを選択

※2 パネラー数11

※3 有意水準5%

表5 タンナーゼ処理後の有効成分含量及び抗酸化活性

試験区	Brix. (%)	pH	α-リポリン酸 (mg-GAeq/mL)	プロトシアニン (mg-B2eq/mL)	DPPHラジカル 消去活性 (μmol-Teq/mL)	材酸(mg/L)
タンナーゼ処理無	0.48	3.65	1.86	0.95	11.5	415.6
タンナーゼ処理有	1.44	3.64	1.92	0.91	11.3	418.4

4 まとめ

ブルーベリー葉からの有効成分の抽出およびブルーベリー葉飲料の渋味低減化法について検討したところ、次のことがわかった。

- 1) ブルーベリー葉に含まれる PAC は、抽出温度が高くなるに従い効率良く抽出される傾向にあり、それに伴い抗酸化活性値も高くなることがわかった。
- 2) ブルーベリー葉飲料に PAC が 0.59 mg 以上含まれると、渋味が強いため、渋味を低減化させる工夫が必要であることがわかった。
- 3) 渋味のマスキングにおいて、β, γ-シクロデキ

ストリンの有効性が示唆された。

- 4) タンナーゼ処理により PAC 含量および抗酸化活性に影響を与えず、渋味を低減化できる傾向にあった。

5 謝辞

本研究の推進にあたりグラヴィノール N、酵素剤の提供に御協力いただいたキッコーマン(株)に深く感謝いたします。

6 参考文献

- 1) M. TAKESHITA *et al*, *J Biol Chem.*, **284**-32, 21165-21176(2009)
- 2) 有賀敏明：日本油化学会誌, **48**-10, 127-136(1999)
- 3) 須田郁夫：食品機能研究法, 光琳, 218-221(2000)
- 4) Porter, L. J., Hrstich, L. N. and Chan, B. G., *Phytochemistry*, **25**, 223-230(1986)
- 5) 沖智之ら：日食科工誌, **48**, 926-932(2001)
- 6) 中村良ら：新・食品分析法, 光琳, 806-808(1998)