

<令和4年度助成>

石臼湿式微粉碎による高効率スパイス抽出法の開発と特性解明

粉川 美踏・宮前 友策
(筑波大学 生命環境系)

スパイスは古くから生薬や薬草として用いられ、特にその二次代謝物にはテルペン類、配糖体類、アルカロイド類、フラボノイド類等、抗酸化能や抗炎症作用などの生体調節機能を有し、疾病の予防や健康の維持・増進に寄与することが報告されている。しかし種子や果実由来の植物体は組織が非常に硬いことが多いため、植物体から十分に有効成分を抽出することは困難である。特にスパイス内部に含まれる成分を抽出する際に行う粉碎工程では、温度上昇によって機能性成分の散逸や酸化が生じてしまう可能性が高い。

このような課題に対し、著者らは石臼を用いて湿式微粉碎と抽出を同時に行うプロセス、Simultaneous Milling and Extraction (SME) 法を開発してきた¹⁾。SME 法をアニスシードやスターアニスなど4種のスパイスに対して適用したところ、超音波抽出や72時間浸漬法など従来の抽出法に比べて、より短時間で効率的な抽出が可能であることが示された。この

ように従来的な抽出法と比べて高い有効性が示された SME 法に対し、本研究では以下の三点を明らかにすることを目的とした。まず、SME 法の最適条件の探索では、試料の前処理、石臼の回転速度や粉碎時間、回数などを変え、総ポリフェノール等を最大化する条件を探った。次に SME 法の有効性の理由を明らかにするため、抽出液の成分一斉分析を行い、従来的な抽出法から得られた抽出液と比較した。最後に SME 法で得られた抽出法の生物活性を調べるため、がん細胞等に対する増殖抑制効果を調べた。

SME 法の最適化

スパイス試料として、比較的厚い外殻に覆われているオールスパイス、および繊維質で軟質な外皮の中に子実体が入っているコリアンダーシードの二種類の試料を選択した(図1)。

SME 法では石臼を用いて試料を粉碎する際、比較

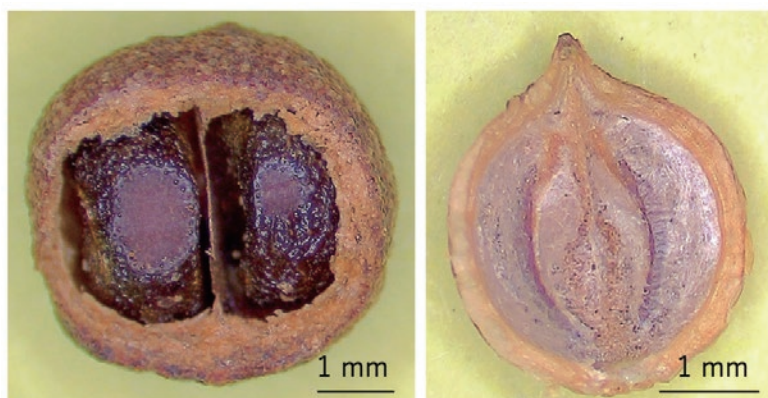


図1 試料切断面：オールスパイス(左) コリアンダーシード(右)

低い回転数を使用するため、粉碎試料に対して遠心力がほとんど働かず、後から投入した試料や溶媒に押し出される形で試料が排出される。そのため、試料の投入速度を調整することで粉碎速度をある程度制御することができる。本研究では総粉碎時間を30分と一定にし、30分を1回、15分を2回、10分を3回という三通りの方法で粉碎を行った。それぞれの条件で得られた抽出液に対して、総ポリフェノール量および抗酸化能（DPPH法）を計測し、粉碎条件による抽出効率を比較した。なお、2回以上の粉碎を行う条件では、石臼から排出された抽出液や固形分を回収し、再度石臼に投入する作業を行った。また、比較のために従来法として浸軟法（試料と溶媒を三角フラスコに封入し、30分振盪）および熱水抽出法（50℃の恒温水槽にて30分抽出）を用いた。これらの方法に用いた試料は、抽出前にカッターミキサーを用いて1分間粉碎した。なお、すべての抽出液の溶媒は70%エタノールとした。

図2(a)および(c)にオールスパイスおよびコリアンダーシード抽出物の総ポリフェノール量（没食子酸相当量）および抗酸化能を示した。なお抗酸化能の測定にあたり、オールスパイス抽出液は100倍希釈し、コリアンダーシード抽出液は原液のまま測定に供している。SME法と従来法である浸軟法と熱水抽出法を比較すると、オールスパイスではSME法の優位性が見られなかったのに対し、コリアンダーシードではSME法を用いることで抽出効率が大幅に向上した。この理由として、コリアンダーシードは種子の内部にポリフェノール類が分布するのに対し、オールスパイスは種子表面付近にも多くのポリフェノール類が存在している点が挙げられる。図1の種子断面画像からも、両種子の構造の違いが見て取れる。

また、同じSME法の中でも、短時間の粉碎を複数回実施することで得られた抽出液の方が、総ポリフェノールおよび抗酸化能が高いことがわかった。

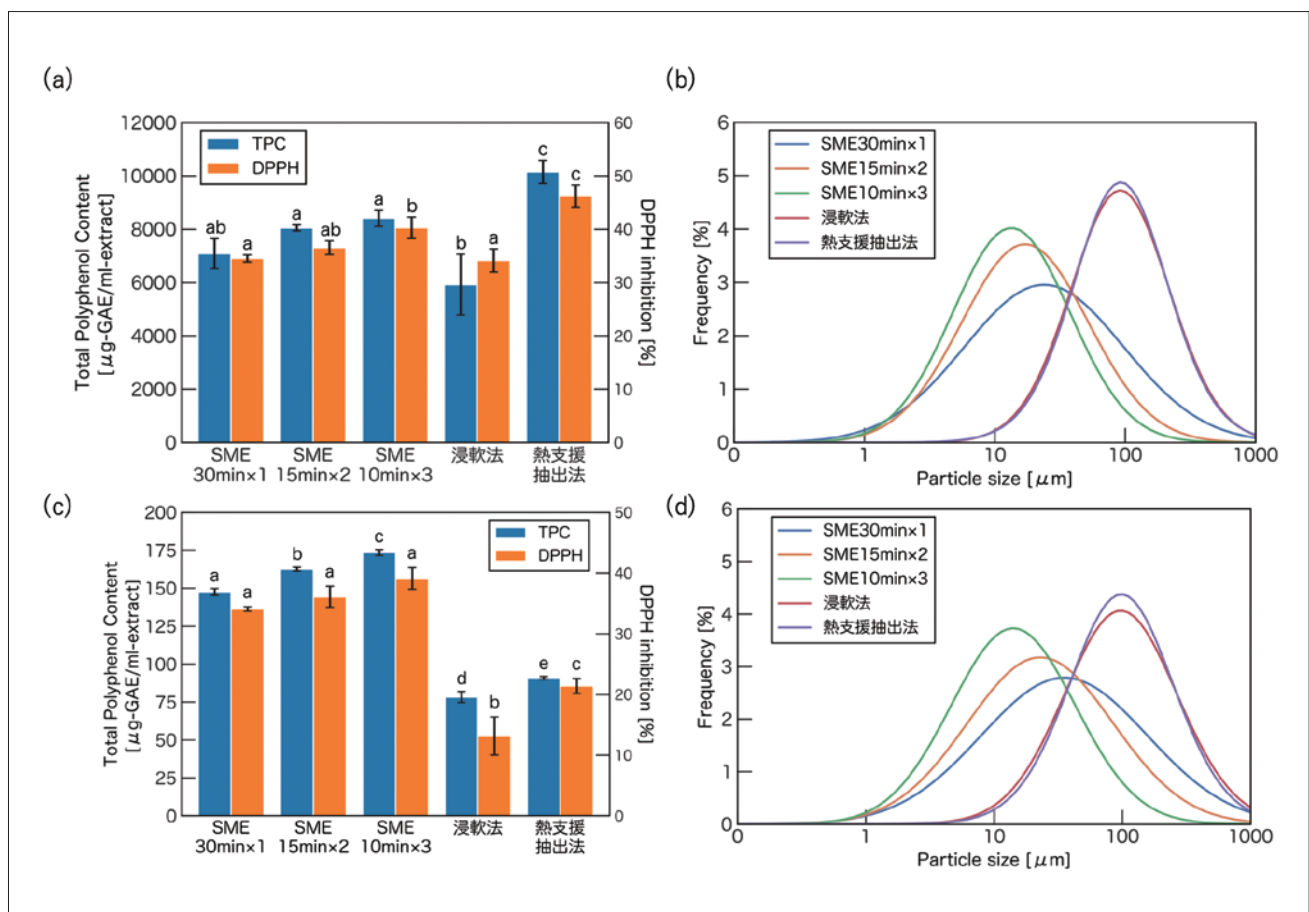


図2 オールスパイス（上段）およびコリアンダーシード（下段）抽出物の総ポリフェノール量と抗酸化能（左列）、および抽出残渣の粒度分布（右列）

特にコリアンダーシード抽出物においては、30分1回、15分2回、10分3回の抽出液の総ポリフェノール類には有意な差が見られ、粉碎条件が抽出効率に影響を及ぼすことが明らかとなった。

粉碎物の粒度分布（図2の(b)および(d)）から、SME法によって粒子径が大幅に小さくなること、粉碎回数の増加に伴い、粒子径がさらに小さくなったことがわかる。オールスパイス抽出残渣のメディアン径は浸軟法・熱支援抽出法で85～88 μm 程度、SME法では12 μm （10分×3回）から22 μm （30分×1回）であった。対して、コリアンダーシードのメディアン径は浸軟法・熱支援抽出法で92 μm 程度、SME法では13 μm （10分×3回）から33 μm （30分×1回）であった。試料が微細化されるにしたがって比表面積が増えるため、固体から液体への成分移動速度が上がり、結果として抽出効率が向上することが示された。なお、オールスパイスでは熱支援抽出法の抽出効率が高かったことから、今後は石臼粉碎中における温度制御を行うことで、抽材に合わせた抽出条件を実現することを目指す予定である。

SME法を用いて得られた抽出液評価①： 成分一斉分析

微細化によってどのような成分が多く抽出されるかを調べるため、抽出液の揮発性成分をGC-MSを用いて定量した。ここでは、オールスパイスの主要揮発性成分であるオイゲノール、メチルオイゲノール、1,8-シネオール、 α -ファランドレン、および β -カリオフィレンの定量結果を図3に示す。なお、SME法の中で最も抽出効率が高かった10分×3回抽出の抽出液中濃度を100とし、浸軟法による抽出液中の成分濃度を相対値として示している。測定結果より、メチルオイゲノールや1,8-シネオールのようSME法が従来法に対して2倍程度の抽出効率を示す成分が存在する一方、ほとんど含有量が変わらない成分もあることがわかった。これらの成分がオールスパイス種子中にどのように分布し、抽出方法による抽出量の違いが何に起因するかを調べた研究は見つけられておらず、更なる検討が必要と考えられる。

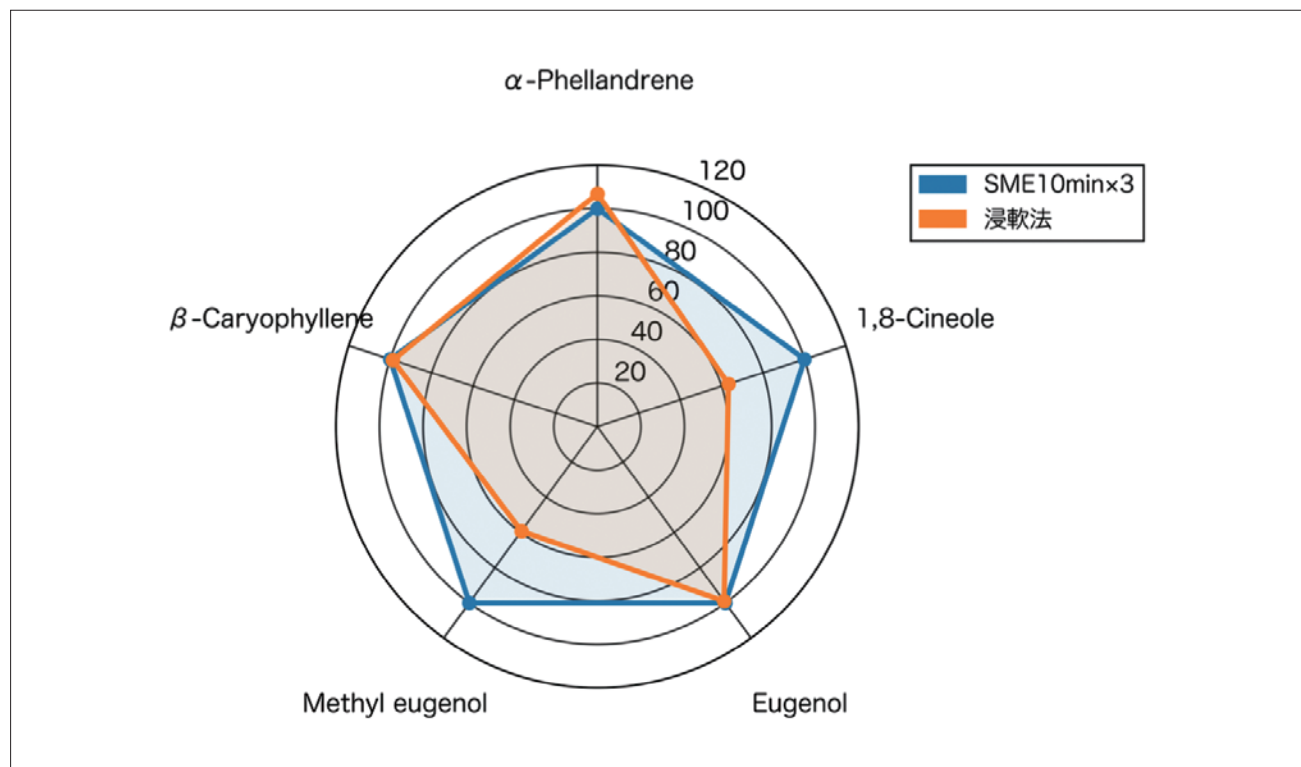


図3 オールスパイス抽出液中の揮発性成分

SME法を用いて得られた抽出液評価②： バイオアッセイ

スパイスの抽出方法が生細胞に対する作用に及ぼす影響を評価するため、RAW264細胞における抗炎症活性を調べた。抗炎症活性試験では、細胞に対して炎症を起こすリポ多糖（Lipopolysaccharide：LPS）と炎症を抑える効果があると期待される試料を投与し、炎症の発生を示す一酸化窒素（NO）量を計測する。この際、細胞自体が死亡してしまうとNOは発生せず、見かけ上、抗炎症活性があるように評価されてしまうため、予め細胞毒性評価試験を実施する必要がある。

細胞毒性評価試験は、生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素による還元力を利用するMTTアッセイを用いて行った。オールスパイス抽出液およびコリアンダーシード抽出液を純水で1/500および1/1000に希釈してRAW264細胞に投与し、MTT

アッセイを行ったところ、純水を投与したコントロールと比較し、より高い細胞活性度が得られた（100%から140%）。以上より、今回調製したスパイス抽出液は500倍程度に希釈すれば、細胞毒性はないことが示された。

図4に抗炎症活性試験の結果を示す。コントロールの青いバーは炎症を引き起こすLPSを投与せず、代わりに細胞に影響を及ぼさないDMSOを投与した細胞の結果、赤いバーはLPSのみを投与し、炎症を抑える試料を何も加えなかった細胞のNO産生結果である。赤いバーに対して、NO産生量が抑制された試験区では、抗炎症作用があったと評価できる。

細胞に対して500倍および1000倍希釈したスパイス抽出液を投与したが、500倍希釈の抽出液では、オールスパイス抽出液のSME15分×2回、10分×3回、および熱支援抽出による抽出液、コリアンダーシード抽出液では、SME15分×2回および10分×3回の抽出液でコントロールに対して有意（ $p < 0.05$ 、

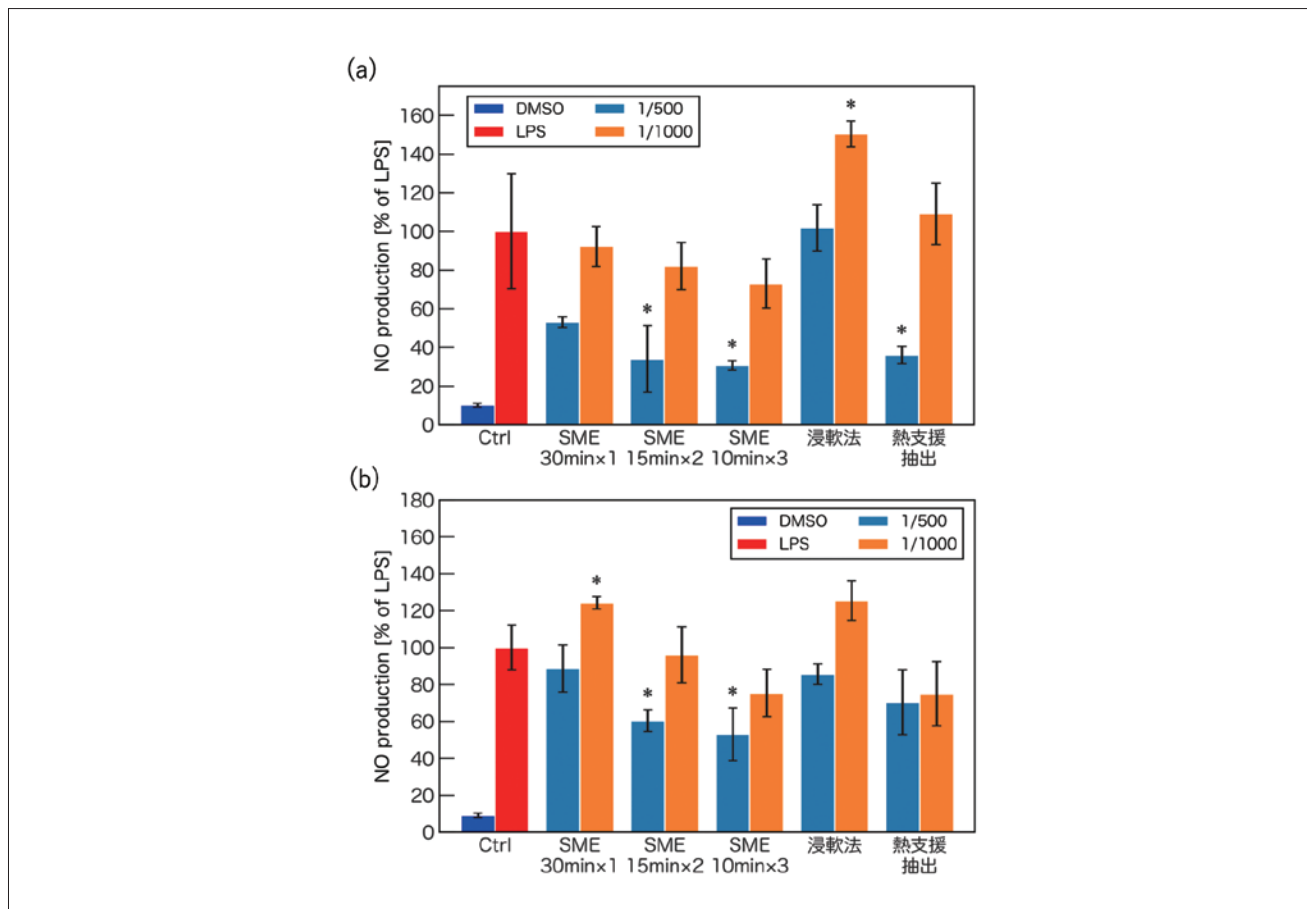


図4 抗炎症活性試験の結果、(a) オールスパイス抽出液投与、(b) コリアンダーシード抽出液投与

t検定)にNO産生を抑える効果が得られた(図4にてアステリスクにより表示)。総ポリフェノール量・抗酸化能の計測結果と同様に、SME法では粉碎回数を上げることでスパイス抽出効率が向上すること、オールスパイスの抽出においては、高めの抽出温度を用いることが効果的であることが示された。

500倍希釈抽出液では抗炎症効果が観察できたのに対し、1000倍希釈抽出液ではNO産生量がむしろ上がる試験区が多い結果となった。これは細胞毒性評価試験において細胞の活性がコントロールに対して最大140%程度まで上がったことが関係している可能性がある。つまり細胞の活性が上がった一方で、大幅に希釈した抽出液には炎症を抑える効果がなく、結果としてコントロール以上にNO産生量が上がってしまったと考えられる。

なお、今回はエタノール抽出液を用いたため、細胞に対するエタノールの影響を排除するため最低でも500倍の希釈を行った。エバポレーター等でエタノールを除去した上で、純水等で適切に希釈することで、より明確な効果が観察できる可能性がある。

まとめ

今回得られた結果により、石臼を用いて湿式粉碎を行いながら同時に抽出を行うSME法は、スパイスに対して効果的であること、また粉碎回数を増やすことで抽出効率が向上することが示された。一方で、適度な熱支援はスパイス試料によっては効果的であることが示され、抽出温度の制御も今後検討すべき点であることが示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Bui, T. B. C., Kokawa, M., et al. (2022). Simultaneous stone-milling and extraction enables efficient one-step extraction of hard plant materials. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, 80, 103096.

Development of a Novel Extraction Method for Spices Using Wet Stone Micro-Milling

Mito KOKAWA, and Yusaku MIYAMAE

Institute of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

In this study, a novel extraction method, simultaneous stone-milling and extraction (SME) was developed for extracting bioactive compounds from hard plant materials such as spices. Two spices with different seed structures, allspice and coriander seeds, were chosen to evaluate the extraction method. Various milling conditions for SME, as well as conventional extraction methods such as maceration and heat-assisted extraction were compared based on efficiencies for extracting polyphenols and antioxidant substances. While SME extracted higher concentrations of polyphenols and antioxidant substances than conventional methods for coriander seeds, heat-assisted extraction was shown to be more efficient for allspice. In the comparison of different conditions for SME, passing the material quickly through the stone mill multiple times (3×10 min passes or 2×15 min passes) was shown to be more effective for milling the material than a single 30 min pass. A particle size analysis showed that SME samples had a much smaller particle size than the dry-milled spices used for conventional extraction methods. An analysis of the volatile compounds in the extracts indicated that SME enhanced the extraction efficiencies of certain chemicals such as methyl eugenol compared to conventional extraction methods, but exhibited similar efficiencies for other chemicals. Finally, anti-inflammatory assays using viable cells indicated that 500-times diluted extracts, particularly those obtained via SME using multiple passes, lowered inflammation in cells. In conclusion, SME was shown to be an effective method for extracting bioactive compounds from spices, and its effectiveness may be enhanced via coupling with heat-assisted methods.