

桑抹茶の利用法に関する研究

～ココアとの組み合わせによる抗酸化活性の変化について～

大石 絢菜*, 高橋 計史**, 本間 知夫

Study on usage of mulberry leaf powder

～Antioxidant activity changes by combination with cocoa drink～

Ayana Ooishi*, Keiji Takahashi**, Tomoo Homma

In order to develop a new utilization method of mulberry leaf powder (MLP), this study tried to combine MLP with cocoa drink and measured antioxidant activity (AA) of combined sample solution expecting a synergistic effect. Contrary to expectation, AA of combined solutions was decreased with increasing in combined quantities of MLP by comparing with AA of each sample solution of MLP and cocoa drink. Reason of this result and effects of combination of MLP with cocoa drink on other functionalities are not yet known, so we cannot yet conclude whether this combination was not good.

Key words : Mulberry leaf powder, Cocoa drink, Antioxidant activity, Combination

1 はじめに

かつて養蚕が盛んであった群馬県には、養蚕の衰退と共に放棄されてしまっている桑園が多く存在する。桑の葉はカイコの餌であるが、葉や根は古くから薬用にも利用されており、利尿、血圧降下、解熱、鎮咳などの効果が知られている。特にブドウ糖の類似物質（アザ糖類の一種）である1-デオキシノジリマイシンが桑には特異的に含まれており、小腸において糖質分解酵素である α -グルコシダーゼの活性を阻害し、その結果として糖質分解からのグルコース生成が抑制され、血糖値上昇を抑制できる機能性を有していることが知られている。こうした桑の機能性を期待して、桑葉を加工・製造した桑茶やサプリメントとしての利用が広がっている。桑葉を乾燥して粉末化した桑抹茶は、緑茶の抹茶のように、飲むだけでなく、料理に加えるなどの利用もなされている。

当研究室では、これまで桑葉の加工・機能性・新たな利用法に関する研究を行ってきた¹⁾。特に桑茶として摂取する場合、その独特の香りから、かつて養蚕を行っていた方はカイコを連想してとても飲めないということを言われていた。また、後味が良くないという方もいた。しかし、健康に良ければ摂取したいという方も多くいるため、何か良い利用法がないものかと常々考えていた。そこで、桑茶単独での利用を考えるのではなく、何か別のものと組み合わせることで桑の独特の香りや味を薄め、しかし桑の持つ機能性は期待出来、さらに言えば組み合わせる相手の特性との相乗効果があれば、非常に有用な

利用法となるのではないかと考えた。桑抹茶を利用する場合、その鮮やかな緑色を生かす使い方がほとんどであり、緑色のうどん、パン、ケーキなどが、またホワイトチョコレートと組み合わせることで、正に葉のような桑茶チョコレートも出ている。

チョコレートは原料であるカカオ豆を発酵、乾燥、焙焼、粉碎して得られるカカオマスとカカオバターを原料にして製造されるが、ホワイトチョコレートはカカオマスを含めず、カカオバターのみを主原料として製造される。カカオマスには、抗酸化活性、免疫調節作用、動脈硬化抑制作用など様々な生理機能を示すカカオポリフェノールが含まれている²⁾が、ホワイトチョコレートにはカカオマスが含まれないことから、こうした機能性は期待出来ないことになる。桑抹茶の緑色に拘らなければ、ホワイトチョコレートではなく、通常のチョコレートと組み合わせることは、双方の材料の機能性が期待出来る。そこで、桑抹茶とチョコレートを組み合わせたものを作ることを考えた。チョコレートを溶かし、桑抹茶と混ぜて再度固めることで桑抹茶チョコレートを作るというものだが、後に桑抹茶チョコレートの機能性を調べる際に再度溶かすと液体と固形分が分離する、体積(量)を正確に測り取ることが困難などの問題が挙げられたため³⁾、カカオポリフェノールを含み、機能性の調べるにあたって液体状態で扱いやすいココアを利用することとした。

調べるべき機能性についてはいくつか候補があったが、本研究報告ではまずカカオポリフェノール²⁾および桑茶

† 原稿受理 平成29年2月24日 Received February 24, 2017

* 生物工学科(Department of Biotechnology)

** 大学院工学研究科生物工学専攻 (Graduate School of Engineering, Division of Biotechnology)

抽出液¹⁾でもその活性が認められている抗酸化活性について調べた結果を報告する。

2 方法³⁾

2・1 材料

本研究では、桑抹茶として神戸万吉商店から発売されている「有機桑の葉まっ茶」を、ココア粉末として森永製菓株式会社から発売されている「純ココア」を使用した (Fig. 1)。



Fig.1 Mulberry leaf powder & Cocoa powder

2・2 試料溶液の調製方法

各粉末を湯に溶かして試料を調製するにあたり、一般的に飲まれている濃度 (量) とした。桑抹茶の場合、「コップ1杯 (200 cc) に付属のスプーン2~3杯を入れて水またはお湯を注いで出来上がり (お好みで量を調整してください)」と記載されている。付属のスプーンで測り取ることが出来る量は、山盛りで取るのか、ちょうどスプーンのくぼみで納まるように取るのかで当然変わってくる。しかし実際にはそこまで正確な量は想定していないと思われる。そこで若干山盛りになる程度にスプーンで2杯取ってその重さを測ったところ、約0.2gであった。なお、0.2gの桑抹茶粉末を溶かすための湯の量は、次に記すココア粉末の場合にあわせることとした。ココア粉末の場合、箱の裏面に「おいしい飲み方」として、「①水 (約10 mL)、砂糖小さじ山盛り2杯 (約7g)、ココア小さじ山盛り2杯 (約5g) を小さな鍋に入れ、弱火にかけペースト状になるまでよく練る、②牛乳 (約120 mL) を加え、沸とう直前で火からおろしてカップに注ぐ、③できあがり」と記載されている。本研究では各粉末由来の成分による機能性をまず評価するため、砂糖、牛乳は使わず、水 (湯) だけで粉末を溶かすこととした。また鍋で火に掛けるのではなく、熱湯を加えて粉末を溶かすこととした。

本研究では試料溶液として、①ココア+桑抹茶、②ココアのみ、③桑抹茶のみ、とした。ココア粉末は5g、桑抹茶は0.2gを通常量とし、以下の手順に従って調製を行った。なお、添加する桑抹茶の量を3倍量 (= 0.6g)、5倍量 (= 1.0g) にした場合についても検討した。

試料溶液の調製の手順

- 1) ココア粉末 5g と桑抹茶 0.2g (3倍量の場合は0.6g, 5倍量の場合は1.0g) をビーカーに測り取り、水10 mLを加えてよく攪拌して溶解した。
- 2) 熱水 120 mLを加えてよく攪拌してさらに溶解した後、60分間放冷し、粉末中の成分抽出を行った。
- 3) 遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 25分間) を行った後、上清を回収して試料溶液とした。

2・3 抗酸化活性の測定方法

2・3・1 試薬溶液の調製

- 1) 0.2 M MES 水溶液 (pH 6.0)
MES (2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate, MW: 213.25, 和光純薬工業) 21.325 g を精秤し、300 mL 程度の蒸留水に溶かし、1N NaOH で pH 6.0 に調製した後、メスシリンダーを用いて蒸留水で500 mL にメスアップした。
- 2) 0.4 mM DPPH 溶液
DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, MW: 394.32, 和光純薬工業) 0.0039g を精秤し、10 mL 程度のエタノールで溶解した後、メスシリンダーを用いて25 mL にメスアップした。
- 3) 0.1 mM Trolox 溶液
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid, MW: 250.29, Aldrich) 0.01 g を精秤し、20 mL 程度のエタノールで溶解した後、メスシリンダーを用いて40 mL にメスアップして1 mM Trolox 溶液を調製し、さらにその溶液を10倍希釈して0.1 mM Trolox 溶液を調製した。
- 4) 検量線用 Trolox 標準溶液
検量線を作成するために6種類の濃度の Trolox 標準溶液を、0.1 mM Trolox 溶液を以下の表の通りにエタノールで希釈することで調製した。

Table 1 Preparation of standard Trolox solution at 6 different concentrations

Trolox 濃度 (μM)	0.1mM Trolox 溶液 (mL)	エタノール (mL)
100	3.5	0
75	3.0	1.0
50	2.0	2.0
25	1.0	3.0
10	0.5	4.5
0	0	4.0

2・3・2 試料溶液の希釈

各試料溶液原液から20倍希釈試料溶液を調製した後、その希釈溶液をさらに2倍 (最終試料濃度 25.0 μL-sample/mL)、5倍 (最終試料濃度 10.0 μL-sample/mL)、10倍 (最終試料濃度 5.00 μL-sample/mL) に希釈した。

2・3・3 抗酸化活性の測定手順¹⁾

測定には分光光度計（島津製作所 UV mini-1240）を使用し、以下の手順で Trolox 標準溶液および希釈試料溶液による DPPH ラジカルの消去率を算出し、試料溶液のラジカル消去活性を Trolox 当量へ換算することで抗酸化活性を評価した。

抗酸化活性の測定手順

- 1) ガラスセルにエタノール 3 mL を入れ、このセルを用いてオートゼロを取った。
- 2) 三角フラスコにエタノール、0.2 M MES 水溶液 (pH 6.0)、0.4 mM DPPH 溶液の順で各 10 mL ずつ取って混合し、約 5 分間攪拌して DPPH 混合溶液を調製した。
- 3) ガラスセルに DPPH 混合溶液を各 2 mL ずつ分注した。
- 4) まず、検量線用 Trolox 標準溶液（計 6 点）について測定した。すなわち、DPPH 混合溶液を 2 mL 入れたガラスセルに各種濃度の Trolox 標準溶液 1 mL を添加して混合し、混合直後およびその 10 分後に 517 nm の吸光度を分光光度計で測定した。
- 5) 希釈した各試料溶液についても、4) と同様の方法で 517 nm の吸光度を測定した。
- 6) 各試料の 10 分後の吸光度から、以下の式を用いてラジカル消去率を算出した。

ラジカル消去率 (%)

$$= \{1 - (\text{サンプル吸光度} / \text{ブランク吸光度})\} \times 100$$

- 7) Trolox 濃度に対する消去率をプロットして検量線を作成した後、算出したラジカル消去率から検量線を用いて各希釈試料溶液のラジカル消去活性の Trolox 当量 (μM) を求めた。そしてさらに試料 1 mL 当たりの Trolox 当量 (μmol-Trolox/mL) を求めて平均値を算出することで、希釈前の各試料溶液のラジカル消去活性の Trolox 当量 (μmol-Trolox/mL) を抗酸化活性として求めた。

3 結果 および 考察

3・1 検量線

各 Trolox 濃度に対する消去率は、10 μM : 7.66%, 25 μM : 20.6%, 50 μM : 41.1%, 75 μM : 62.5%, 100 μM : 82.6% となり、Fig. 2 に示す検量線を作成した。

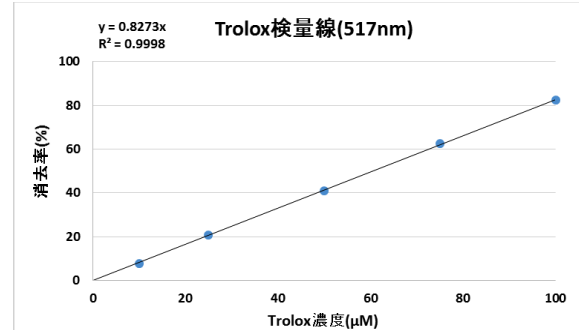


Fig.2 Calibration curve

3・2 各試料溶液の抗酸化活性

桑抹茶の量を通常量、3 倍量、5 倍量と変えて、それぞれ調製した①ココア+桑抹茶、②ココアのみ、③桑抹茶のみ、の各試料溶液の抗酸化活性 (Trolox 当量) を求めてまとめた結果を Fig. 3 に示した。

桑抹茶のみの抗酸化活性はココアの方に比べてかなり低い値を示したが、今回使用した各粉末の量は一般的に飲む時の量にしたためであり、これは仕方がないことである。そこで桑抹茶の量を通常量の 3 倍量、5 倍量に増やした場合についても検討を行ったが、桑抹茶の量が多くなると抗酸化活性も大きくなった。しかし、実際に濃くして飲んでみると粉っぽさを感じたり、桑で感じる独特の香りや味があって飲みにくくなると感じた。しかし、ココアと組み合わせることで飲みにくさは和らいだように

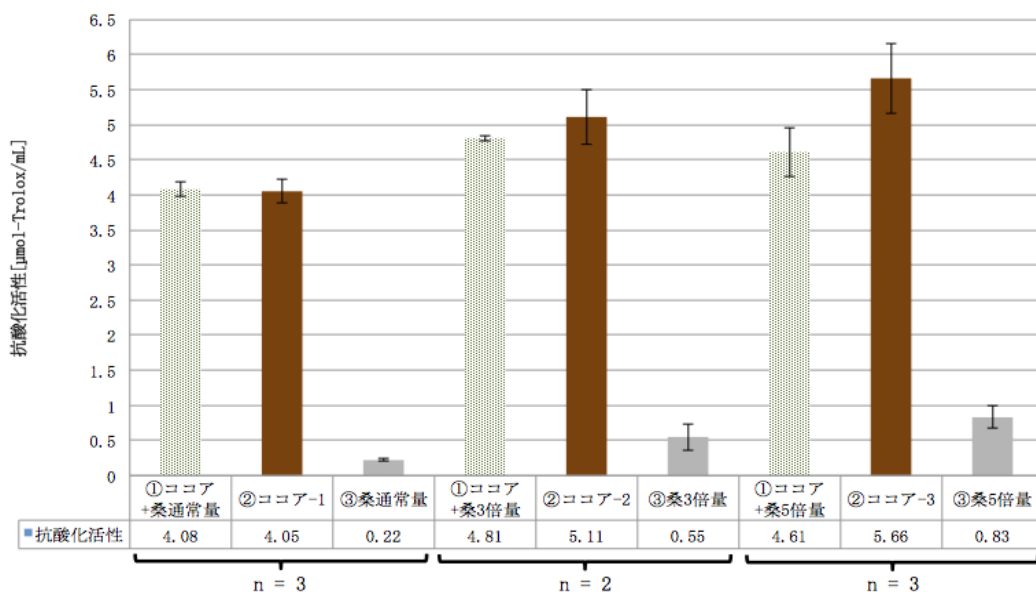


Fig.3 Antioxidant activity of each sample solution

感じた。

ココアのみ抗酸化活性が実験毎に異なったが、一般的に考えれば、ココア粉末の量が異なっていた、溶かした時の状態が異なっていたことなどが原因として考えられるが、この原因については不明である。しかしココアには、おおよそ 4~6(μ mol-Trolox/mL)の抗酸化活性があることが分かった。

両者を組み合わせた場合、ココアのみ抗酸化活性と桑抹茶のみ抗酸化活性を足し合わせた数値になると予想していた。そして場合によっては足し合わせた以上の数値となり、何かしら相乗効果が出ることになれば、新しい利用法としても有望であると考えていた。しかし実際に結果を見てみると、添加した桑抹茶の量が通常量の場合、①ココア+桑抹茶の抗酸化活性は、②ココアのみ抗酸化活性とほとんど同じであり、①ココア+桑抹茶の抗酸化活性はココアに由来する成分によるものと考えられ、桑抹茶由来の成分の寄与はほとんど無いと思われた。しかし、添加する桑抹茶の量を3倍量、5倍量と増やした場合、①ココア+桑抹茶の抗酸化活性は添加した桑抹茶の量が増えるに従って減少する傾向が見られた。すなわち、ココアに含まれる成分と桑抹茶に含まれる成分の間で何らかの相互作用が起こり、抗酸化活性が打ち消されるようなことが起こってしまったと考えられた。その原因については全く分からないが、相乗効果を期待して組み合わせてみたものの、むしろ抗酸化活性についてはマイナスに働いてしまったようである。

しかし、この結果をもって、ココアと桑抹茶を組み合わせることは良くないという結論を導くのはまだ早いと思われる。なぜなら、抗アレルギー活性(ヒスタミン合成酵素の阻害活性)を調べた場合、両者には抗アレルギー活性があり、両者を足し合わせたような結果も得られており³⁾、両者を組み合わせることによるプラスの効果が期待出来る機能性もあると思われるからである。

今後は別の機能性についてさらに調べ、組み合わせることによりプラスの効果が見出されれば、桑抹茶を隠し味的な方法で添加するという新たな利用法にもつながると思われる。

参考文献

- 1)高橋計史：「桑茶の機能性に及ぼす加工方法・採取時期・各種処理の影響」,平成27年度前橋工科大学大学院修士論文
- 2)福場博保他,『チョコレート・ココアの科学と機能』,アイ・ケイコーポレーション(2004)
- 3)大石絢菜:「桑抹茶の利用法に関する研究〜ココア飲料との組み合わせ〜」,平成27年度前橋工科大学卒業論文

謝辞

有機桑の葉まっ茶を提供して下さった群馬県下仁田町・神戸万吉商店・神戸隆介氏に感謝いたします。