

研究ノート

宮城県で栽培したオリーブの有効成分の基礎研究 －オリーブ葉ポリフェノール含量と水抽出条件の検討－

山口政人¹、岩田一樹¹、庭野道夫¹、磯田博子²

¹東北福祉大学 ²筑波大学

要旨

本研究は、2018年に寒冷地宮城県の休耕地に試験栽培したチュニジア産オリーブ Chetoui (シエトウイ)、スペイン産 Arbequina (アルベキナ)、ギリシャ産 Koroneiki (コロネイキ) の葉中ポリフェノールを定量すること、また、オリーブ葉の利活用のための基礎データを得るため、水抽出によるポリフェノールの回収率を調べることを目的とした。オリーブの試験栽培地は、石巻市網地島 (1 地点)、仙台市国見ヶ丘 (2 地点) の 3 地点とし、収穫時期は2021年10月下旬から11月下旬とした。オリーブ葉ポリフェノール含量は 3 種全てにおいて、石巻市網地島で栽培したオリーブ (3 種の平均値 $105.6 \pm 0.13\text{mgGAE/g-DW}$) が仙台市国見ヶ丘 2 地点 (3 種の平均値 $73.6 \pm 0.15\text{mgGAE/g-DW}$) に比べて1.4倍多く、有意に高い値を示した。国内外の文献と比較し同程度の定量値であった。オリーブ葉ポリフェノールに着目した場合、石巻市網地島でのオリーブ栽培は適しているものと示唆された。水抽出によるオリーブ葉ポリフェノールの回収率については、水温が高く、滲出時間が長いほど回収率は上がった。室温 ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) の水抽出では10分の滲出時間で20.8%、24時間後で57.9%の回収率であったが、 100°C (沸騰水) の場合、10分の滲出時間では73.1%、24時間では78.9%のポリフェノールが回収された。沸騰水を用いることにより、短時間でオリーブ葉中ポリフェノールの抽出が可能であることが分かった。

キーワード: オリーブ葉、寒冷地栽培、ポリフェノール、チュニジア、網地島

1. 緒言

我々は宮城県の地域振興を目的とし、休耕地を活用した寒冷地オリーブ試験栽培を2018年に開始し、今年で3年目を迎えた¹⁾。栽培品種はチュニジア産の Chetoui (シエトウイ)、スペイン産 Arbequina (アルベキナ)、ギリシャ産 Koroneiki (コロネイキ) の 3 品種である。日頃のオリーブ栽培の管理、収穫作業等は網地島の離島振興に従事する NPO 法人ジョイフル網地島の職員や島民が担当している。国内における寒冷地栽培では宮城県が北限と言われており、東日本大震災後、石巻市は網地島を含む 4 地域でオリーブ栽培を開始した。これまで1600本以上が定植され、果実の収穫量は500kgを超えている²⁾。また石巻市は2021年東京オリンピックのチュニジア共和国選手団のホストタウンとして貢献したが、事前合宿を終えた選手団を東京へ送り出す際、網地島で栽培したチュニジア産オリーブ (Chetoui) の枝葉で作った冠を市長が選手団にプレゼントした報道は我々の記憶に新しい³⁾。このオリーブの冠は当 NPO 法人職員や島民が作成し、離島振興のために貢献している。このように石巻市はオリーブ栽培を地域振興の一つの軸として、オリーブオイルの 6 次産業化、オイルの搾り滓や枝葉の成分の活用、オリーブ葉茶の製造、水産養殖業の飼料開発、観光産業の活性化、雇用創出など様々な目的を掲げている⁴⁾。一方、現時点ではオリーブの寒冷地栽培に関する学術的な知見がない。そのため、寒冷地におけるオリーブの生育条件や有効

成分の分析を継続的に実施し、それらの結果を栽培方法の最適化に応用したり、地元宮城の産業振興のための基礎情報の一つとして発信していくことは意義が深いと考える。また、日本におけるチュニジア産 Chetoui の栽培は他に事例がなく、珍しい取り組みと言える。2018年、オリーブの苗木を定植した際、背丈は30cm程度であったが、現在は樹高が2～3m、樹径が5cmを超える樹も多く見られ、順調に生育している (Fig.1)。

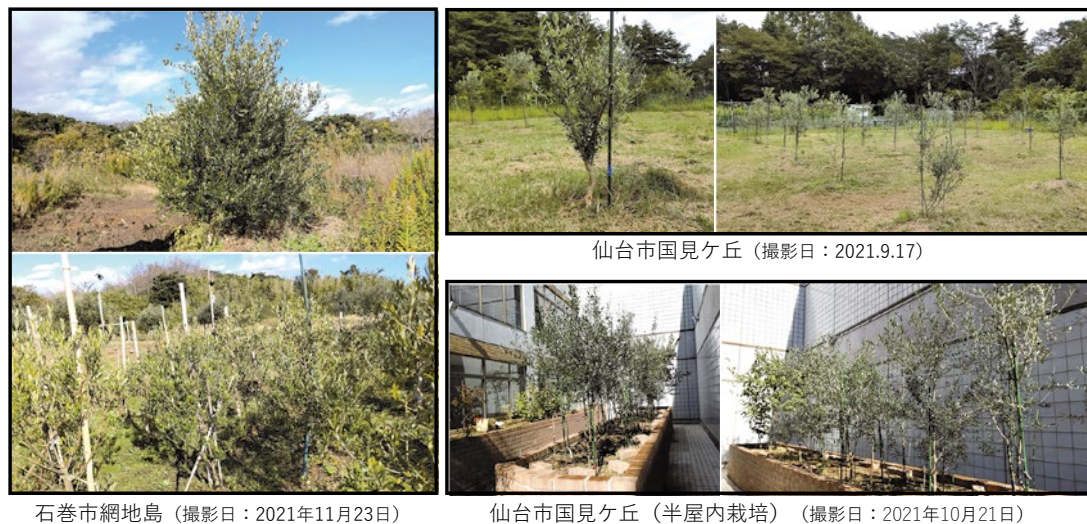


Fig. 1 オリーブの試験栽培の様子

ところで、オリーブが産生するポリフェノールは、抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用、血糖値上昇抑制作用などの機能が知られていること、チュニジア産オリーブは、ヨーロッパ産オリーブと比べてポリフェノール含量が高いなどの特徴が報告されている⁵⁾。オリーブ葉から抽出したポリフェノールには抗がん作用や抗アレルギー作用など様々な生理活性があることが報告されている⁶⁻¹¹⁾。更にポリフェノールの生理機能を期待したオリーブ葉茶、枝葉の乾燥粉末を材料とした畜産用、養魚用飼料の開発など多面的にオリーブ研究が行なわれており¹²⁻¹³⁾、オリーブは興味が尽きない植物である。

本研究では、寒冷地宮城県で栽培したオリーブの特色を明らかにしていくため、今回2つの実験を実施した。1つ目は、石巻市網地島、仙台市国見ヶ丘において試験栽培し、3年半生育したオリーブ3品種の葉中総ポリフェノールを定量した。抽出方法は、一般的に植物の葉中ポリフェノールの定量に用いられる含水エタノールを用いた抽出法とした¹⁴⁾。尚、寒冷地栽培による影響の有無等について調査するため、オリーブ葉ポリフェノールの定量は継続的に実施していく予定である。2つ目は、水抽出によるオリーブ葉ポリフェノールの回収率を調べた。オリーブ葉においては、食品素材、動物飼料の用途として一般に乾燥粉末が利用されていること、あるいは嗜好飲料としてオリーブ葉エキス、オリーブ葉茶という形態で飲用されていることから、水を溶媒とした抽出法が用いられている。総ポリフェノールの定量分析においては、一般的に含水有機溶剤による抽出法が用いられるが¹⁴⁾、使用目的が食用あるいは飲用の場合には生体に安全な水を用いた抽出法が望ましい。オリーブ葉には水溶性フェノール化合物が多いことから、水抽出によってポリフェノールがどの程度回収されるのか調べる必要がある。またこれらの詳しいデータについては一部報告はあるが少ないのも事実である¹⁵⁾。よってポリフェノール回収試験では水を溶媒として用い、その温度と滲出時間の各条件によって抽出されるオリーブ葉の総ポリフェノールを定量し、回収率を求めた。これらの継続的な研究を通じて、将来的には寒冷地宮城で栽培したオリーブ等から健康機能に寄与する成分を明らかにし、付加価値向上と地域振興に寄与することを目指す。

2. 実験方法

2-1. 試料及び実験方法

試料としたオリーブの葉は、石巻市網地島オリーブ農園（採取日：2021年11月23日）、仙台市国見ヶ丘の本学教育実践農園、並びに感性福祉研究所の中庭花壇（半屋内栽培：周囲がガラスとコンクリート壁に覆われ、屋根が無い場所）（採取日：2021年10月21日）において、試験栽培中のオリーブ3品種（Chetoui、Arbequina、Koroneiki）から、樹勢が良い5本を各品種から選定し、樹1本あたり100枚程度の葉を採取した。

尚、栽培条件を以下に記す。石巻市網地島の休耕地には、オリーブを30本定植（各品種10本ずつ）、仙台市国見ヶ丘の教育実践農園には45本定植（各品種15本ずつ）、仙台市国見ヶ丘感性福祉研究所の中庭花壇には21本定植（各品種7本ずつ）している。3地点に共通して、窒素、リン、カリウムを配合した市販の混合肥料を年1回施肥、灌水はせず自然降雨のみとし、病原菌への抵抗性を維持するため無機性銅水和剤を年1回散布、風通しを良くするため年1回の枝の剪定を実施した。樹勢が良い条件として、樹高が1.5～2m、樹径5～10cm（地上から5cmの高さ）、害虫被害を受けておらず、枝は弾力性に富み、濃い緑色を呈した葉を有する樹とし、各品種5本ずつを選定した。

2-2. 試料の調製

オリーブ葉からの総ポリフェノールの抽出法については既報に従って調製した¹⁶⁾。採取した各品種オリーブの葉から100～200枚程度を蒸留水で洗浄後、乾燥機（Food Dehydrator LT-81）で80℃、2時間乾燥し、粉碎機（Multi Grinder, BioloMix700）で粉末にした。各種オリーブ葉の乾燥粉末1.0gを遠沈管に入れ、70%エタノール10mLを加え、室温（24℃±2℃）、暗所下で3日間振とうした。その後、遠心力5,500×g、10分間遠心分離し、上清を回収後10mLに定容し、ポリフェノール抽出液とした。各種分析実験を実施するまで4℃下で遮光保存した。

2-3. 総ポリフェノール含量の測定

Folin-Ciocalteu法によりオリーブ葉に含まれる総ポリフェノールを定量した¹⁷⁾。抽出液はISO14502-1:2005に基づき、エタノール濃度が20%を超えない範囲で適宜純水を用いて希釈し、全容を1.0mLとし、フェノール試薬（関東化学）5mLを加えた後、5分後に7.5%（W/V）の炭酸ナトリウム溶液4.0mLを加え、室温で60分放置後、分光光度計（Novaspec II Spectrophotometer）により、765nmにおける吸光度を測定した。ブランクは純水とした。検量線は10、20、30、40、50μg/mLに溶解した没食子酸一水和物（FUJIFILM Wako）を用いて作成し、試料中の総ポリフェノール含量を没食子酸相当量（mgGAE/g-DW）として求めた。尚、GAEはGallic acid equivalent、DWはDry weightを示す。

各試験は3回行い、得られたデータは平均値±標準偏差で表した。総ポリフェノール含量の栽培地間での有意差検定には、post-hoc testとしてDunnnettの多重比較法により行った。*p<0.05で示した。総ポリフェノール量の計算式は次の通りである。

$$W_t = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \times V_{\text{sample}} \times d}{S_{\text{std}} \times M_{\text{sample}}}$$

W_t：試料中の総ポリフェノール量、D_{sample}：試料溶液の吸光度、D_{intercept}：検量線 Y 軸切片の吸光度、S_{std}：検量線の傾き、M_{sample}：試料量（g）、V_{sample}：試料抽出液量（mL）、d：比色定量した時の試料希釈倍率を表す。

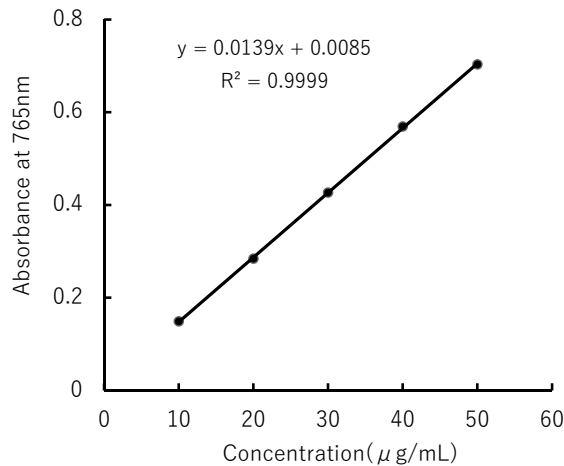


Fig. 2 ポリフェノールの定量に用いた没食子酸の検量線

2-4. 水抽出によるポリフェノールの回収試験

試料は石巻市網地島オリーブの Chetoui の葉を用いた。Chetoui の葉粉末を0.1g 秤量し、容量15mL のコニカルチューブに入れ、これに10mL の各温度に調整した純水を加えて蓋をした。水の温度は、室温 (24 ± 2℃)、60℃、80℃、沸騰水 (100℃) の4種類とし、滲出時間は、5分、10分、30分、60分、24時間とした。各時間経過後、Folin-Ciocalteu 法によりオリーブ葉粉末に含まれる総ポリフェノールを定量した。回収率は、オリーブ葉粉末を70% エタノール抽出した総ポリフェノール含量を当該試料に含まれる全ポリフェノール含量とし、各水抽出条件で抽出されたポリフェノール含量の割合を算出した。

3. 結果並びに考察

3-1. オリーブ葉抽出物の総ポリフェノール含量

オリーブ葉中の総ポリフェノール含量は、Folin-Ciocalteu 法を用い、Fig.2に示した没食子酸の検量線 ($R^2=0.9999$)、並びに前述した計算式に基づき、乾燥葉 1g 当たりの重量 (mg) を没食子酸換算 (mgGAE/g-DW) で表し、得られた定量値を Fig.3に示した。オリーブ葉の総ポリフェノール含量は、3種全てにおいて、石巻市網地島で栽培したオリーブが仙台市国見ヶ丘に比べて有意に高い値を示した。即ち、Chetoui においては、石巻網地島 ($111.9 \pm 0.08 \text{mgGAE/g-DW}$) は仙台市国見ヶ丘 ($80.5 \pm 0.14 \sim 82.7 \pm 0.08 \text{mgGAE/g-DW}$) と比較して1.4倍多かった。Arbequina においては、石巻市網地島 ($104.4 \pm 0.08 \text{mgGAE/g-DW}$) は仙台市国見ヶ丘 ($66.0 \pm 0.08 \sim 67.1 \pm 0.14 \text{mgGAE/g-DW}$) と比較して1.6倍多かった。Koroneiki においては、石巻市網地島 ($100.4 \pm 0.08 \text{mgGAE/g-DW}$) は仙台市国見ヶ丘 ($69.8 \pm 0.14 \sim 75.4 \pm 0.08 \text{mgGAE/g-DW}$) と比較して1.4倍多かった。宮城県内の栽培であるが地域によってポリフェノール含量に差異が認められたことについては興味深い。尚、仙台市国見ヶ丘での試験栽培は、露地栽培と半屋内栽培の異なる条件で実施したが、両地点での総ポリフェノール含量に差異はほとんど認められなかった。

ところで我々は、気象条件による寒冷地オリーブ栽培への影響を調査するため、石巻市網地島と仙台市国見ヶ丘の農地に気象観測装置を昨年設置した。気象データの分析の結果、3地点で違いが認められたのは、気温、日照量、風速の3項目であった。特に日照量については、石巻市網地島は仙台市国見ヶ丘よりも2倍以上多く、差異が認められた。植物は太陽光を利用し、光合成によって生命を営むが、永続的に紫外線に暴露されるため、細胞中の DNA やタンパク質は変異を受ける。植物は環境因子からの様々な影響に対抗するため様々な防御物質を産生するが、特にポリフェノールは有害な紫外線から自身の細胞を守る

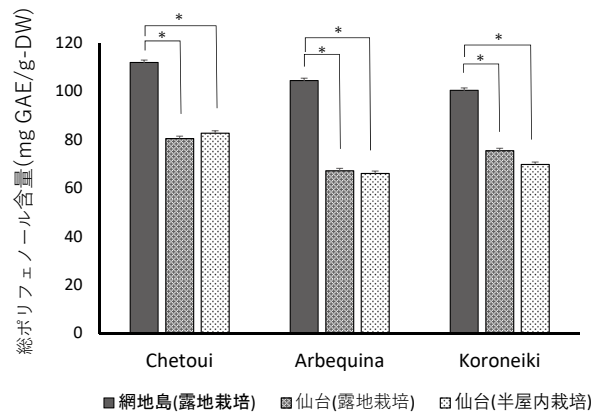


Fig. 3 オリーブ葉抽出物の総ポリフェノール含量

Polyphenol content: mgGAE/g-DW, GAE: Gallic acid equivalent, DW: Dry weight
 Data represent the mean of three determination ± standard deviation
 * : p<0.05 at same cultivar

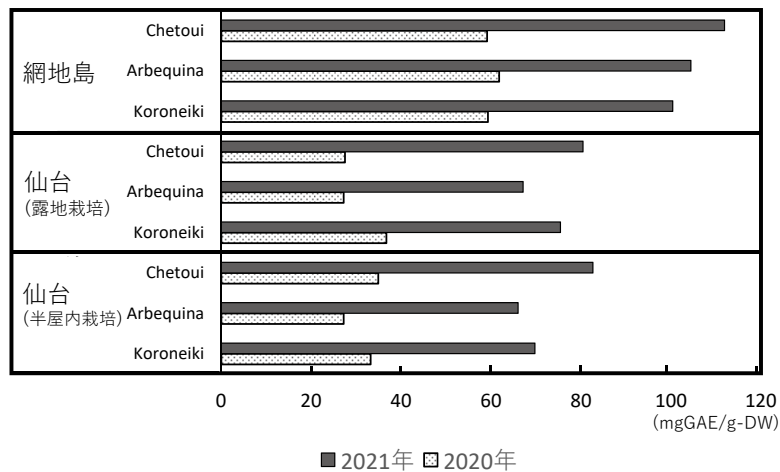


Fig. 4 オリーブ葉抽出物の総ポリフェノール含量 ~昨年との比較~
 (棒グラフは平均値を示す)

作用がある。植物の生体防御機構の視点から見ると、石巻市網地島で生育したオリーブの葉中ポリフェノール含量が高い値を示したことについて、日照量の多さが理由の一つと考えられる。気象データに関する詳細な分析については、共著者が同年報で報告するので本稿で述べることは差し控える。

オリーブ葉ポリフェノール含量の定量試験は今回で2回目となる。前回2020年の測定結果では、石巻市網地島の Chetoui が 59.1 ± 0.10 mgGAE/g-DW、Arbequina が 61.8 ± 0.10 mgGAE/g-DW、Koroneiki が 59.3 ± 0.85 mgGAE/g-DW であった¹⁶⁾。今年の定量値と比較すると Chetoui においては1.9倍、Arbequina と Koroneiki においては1.7倍増加した。仙台市国見ヶ丘のオリーブでは、Chetoui においては2.4~2.9倍、Arbequina においては2.5倍、Koroneiki においては2.1倍増加した。仙台市国見ヶ丘で栽培したオリーブのほうが増加の程度が大きい傾向が分かった (Fig.4)。オリーブは樹齢の長い植物であるため、生育期が長期にわたり継続する。例えば、国内には観賞用として海外から運び込まれた樹齢100年以上の樹があるが、イタリアには樹高15m、樹径9mに達するオリーブも存在し、樹齢は1000年以上と言われている¹⁸⁾。我々が定植したオリーブは苗木から換算して樹齢は4年であり、まだ若い樹である。ポリフェノールを始めた有効成分の含量推移については他にデータがないため、今後も調査を継続していきたい。

国内外で栽培されているオリーブの葉中ポリフェノール含量に関しては幾つかの文献がある。栽培品種は異なるが、大山らは香川県小豆島で栽培したルッカ、ミッション、ネバディロブランコについて、それぞれ82.4mgGAE/g-DW、73.4mgGAE/g-DW、80.2mgGAE/g-DWであったと報告している（文献記載の単位は [gGAE/100g-DW] であるため、ここでは本報の単位表記に換算したものを記述した）。抽出方法はオリーブ葉乾燥粉末を80% エタノールを用いて抽出している¹³⁾。一方、Myriam らはチュニジアで栽培した8品種のオリーブ葉粉末を、我々と同様に70% エタノールを用いて抽出を行い、ポリフェノール含量を調べている。8品種の含量の範囲は73mg~144mgGAE/g-DWであり、Chetouiについては102.32mgGAE/g-DWであったと述べている¹⁹⁾。上述の通り、石巻市網地島で栽培したChetouiを始めとするオリーブ葉ポリフェノール含量は、100.4~111.9mgGAE/g-DWの範囲にあったため、現地チュニジアのものと同程度の定量値であった。オリーブ葉のポリフェノールに着目した場合、石巻市網地島はオリーブの栽培地として好適地である可能性が示唆された。

3-2. 水抽出によるオリーブ葉総ポリフェノールの回収率

Fig.5は、70% エタノール抽出によるオリーブ葉粉末の総ポリフェノール含量を100%とした場合の各水抽出条件における総ポリフェノール含量の回収率を示したグラフである。室温（24±2℃）の水抽出では、10分の滲出時間で20.8%、24時間後で57.9%という回収率であった。一方、100℃（沸騰水）の場合、10分の滲出時間では73.1%、24時間では78.9%のポリフェノールが回収された。沸騰水を用いることにより、比較的短時間でオリーブ葉中ポリフェノールの抽出が可能であることが分かった。Folin-Ciocalteu 法によるポリフェノールの定量試験で用いた含水エタノールを溶媒とした場合と比べて21.1%の抽出ロスはあるが、例えばオリーブ葉茶を淹れる場合やオリーブ葉エキスの抽出作業など実用性を考慮すると、10分程度の熱湯抽出時間が許容できる範囲と思われる。尚、オリーブ葉中ポリフェノールの主要成分であるオレウロペインやヒドロキシチロソールの回収率、抗酸化活性など特定分子を対象とした性状解析については今後実施していきたい。

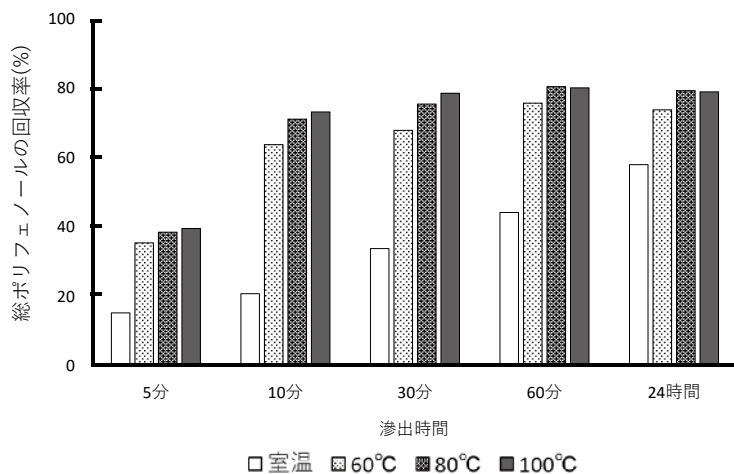


Fig. 5 各水抽出条件におけるオリーブ葉の総ポリフェノール回収率 (%)

結言

宮城県内3地点（石巻市網地島、仙台市国見ヶ丘）で試験栽培している3種オリーブ（Chetoui、Arbequina、Koroneiki）の葉中総ポリフェノール含量と水抽出によるポリフェノールの回収率を調べた。その結果、石巻市網地島で栽培したオリーブは、仙台市国見ヶ丘で栽培したオリーブよりも葉中総ポリフェノール含量が1.4倍高いことが分かった。この理由として、本年報の他頁で報告するが、2地点の気象観測結果の解析によると、石巻市網地島の日照量は仙台市国見ヶ丘と比べて2倍以上多かった。植物ポリフェノールが紫外線から自身の細胞を防御する役割があることを考えると、石巻市網地島の日照量が葉中ポリフェノールの増加に影響している一要因として挙げられる。また文献によると原産地チュニジアで栽培しているChetouiの葉中総ポリフェノール含量は我々の定量値と同程度であった。以上より、オリーブ葉ポリフェノールに着目した場合、石巻市網地島はオリーブ栽培において好適地であると示唆された。また水抽出によるポリフェノールの回収試験では、100℃の沸騰水で10分の滲出時間の場合、73.1%回収できることが分かった。室温による水抽出は適切でないことも分かった。オリーブ葉を用いた飲料や飼料等の製品開発分野において基礎的な知見を得ることができた。将来的には寒冷地でのオリーブ栽培の可能性を高めていくと共に網地島産オリーブの付加価値を高め、離島振興の一助になることを期待する。

謝辞

本研究は、東北福祉大学感性福祉研究所において、文部科学省の研究施設運営支援の助成を得て行なわれました。本研究は、チュニジア種苗会社のMuhammed Gahbi Mahjoub 社長、チュニジア農業大学元学長のHarrabi教授、石巻市牡鹿総合支所、NPO法人ジョイフル網地島の阿部孝博代表他事務局の皆様、網地島島民の皆様ほか多くの方の協力の下で行なわれました。ご関係の皆様へ深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 庭野道夫、山口政人、渡邊圭、磯田博子「チュニジア産オリーブ栽培の実践的研究Ⅰ」『感性福祉研究所年報』20, 79-94, 2019
- 2) 宮城県石巻オリーブ記事一覧.「石巻産オリーブを収穫しました」<https://www.pref.miyagi.jp/soshiki/et-sgsin-ns/201110.html> 東部地方振興事務所 農業農村整備部農村振興班. 2011年
- 3) 河北新報「東京五輪 チュニジア選手団、事前合宿終え選手村へ「ありがとう石巻」」<https://kahoku.news/articles/20210723khn000021.html>、2021年
- 4) 宮城県石巻オリーブ記事一覧.「平成30年産「石巻産オリーブオイル」試食会」<https://www.pref.miyagi.jp/soshiki/et-sgsin-ns/olive-2018-3.html> 東部地方振興事務所 農業農村整備部農村振興班. 2018年
- 5) JSTNews jst.go.jp/pr/jst-news/backnumber/2010/201011/pdf/2010_11_p14.pdf 1 バックナンバー 11月号 (独) 科学技術振興機構発行, 7 (8), 2010
- 6) Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K. and Balansard, G. "Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves" *Journal of Agricultural Food chemistry* 49, 618-621, 2001
- 7) Gonzales, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J. and Osuna, I. "Hypoglycemic activity of olive leaf" *Planta Med* 58, 513-515, 1992
- 8) Bisignano, G., Tomaino, A., LoCascio, R., Crisafi, G., Ussella, N. and Saija, A. "On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol" *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 51 (8), 971-974, 1999

- 9) Parida, Y., Junkyu, H. and Hiroko, I. 「オリーブ由来ポリフェノール成分の抗がん・抗アレルギー活性解析」『沙漠研究』18 (4), 183-187, 2009
- 10) Nakazaki, E., Junkyu, H. and Hiroko, I. 「チュニジア産オリーブ葉抽出物のヒト白血病細胞分化誘導作用」『New Food Industry』52 (7), 21-27, 2010
- 11) Bouarab, C., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J. and Oulahi, N. "Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives" *Journal of Food Agriculture* 15;99 (4), 1457-1474, 2018
- 12) 大山憲一、大西茂彦、松岡博美、東畑顕、石田典子、小川雅廣 「オリーブ葉添加飼料を投与した養殖ブリ筋肉の脂質および呈味評価」『Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi』64 (10), 507-514, 2017
- 13) 大山憲一、柴崎博行、大西茂彦、柴田英明、小川雅廣 「香川県産飼料用オリーブ葉のポリフェノール含量に及ぼす保存方法の影響」『日本水産学会誌』63 (12), 570-574, 2016
- 14) 津志田藤二郎. ポリフェノールの分析技術. 『食品と開発』40, 11-13, 2005
- 15) 柴崎博行、藤井浩子、大谷尚美、吉岡尚美 「オリーブ葉のポリフェノール回収のための水抽出条件の検討」『香川県産業技術センター 研究報告』16, 74-76, 2016
- 16) 山口政人、庭野道夫、渡邊圭、磯田博子 「宮城県で栽培したチュニジア産オリーブ葉抽出物のポリフェノール含量と抗菌活性」『感性福祉研究所年報』21, 27-37, 2020
- 17) Folin, O. and Denis, W. "A Colorimetric method for the determination of phenols (and phenolderivatives) in urine" *Journal of biological chemistry* 22, 305-308, 1915
- 18) Giosue Della Porta, Miyuki Yamamoto (翻訳) 『オリーブオイルのすべて』Babelcube Inc. 2015
- 19) Myriam, B.S., Hafedh, A., and Manef, A. "Study of Phenolic Composition and Biological Activities Assessment of Olive Leaves from different Varieties Grown in Tunisia" *Medicinal chemistry* 2 (5), 107-111, 2012