

ツバキ油粕サポニンの特性を活用した用途の探索

前田 一，田嶋幸一，久林高市

キーワード：ツバキ，油粕，サポニン

Effective uses of saponins in oil cake squeezed out from *Camellia japonica* seeds.

Hajime MAEDA, Koichi TAJIMA, Takashi KUBAYASHI

目次

1. はじめに	58
2. 材料と方法	58
3. 結果と考察	59
1) ツバキ油粕のサポニンによるシイタケ害虫等への効果	59
2) ツバキ油粕のサポニンがキノコ類の菌糸伸長・子実体形成に及ぼす効果	61
4. 摘要	62
5. 引用文献	62
Summary	63

1. はじめに

長崎県（以下「本県」）五島列島ではツバキ油の生産が盛んであり（図1）、その生産量は全国シェアの約4割を占める^{10,11)}。ツバキ油の原料は地元の自生ヤブツバキ (*Camellia japonica*, 以下「ツバキ」) 林から採集したツバキ種子である。ツバキ種子にはトリテルペン配糖体であるサポニンが多く含まれており^{14,15)}（図2）、ツバキ油搾油後の油粕には高濃度のサポニンが残っている。2012年7月には「椿による五島列島活性化特区」に指定され、今後、ツバキ油の増産を目標としており、油粕もさらに増加していく。しかし、油粕の用途は肥料に限られており、新たな用途が求められている。サポニン類は多くの植物に含まれており、様々な機能性を有している¹²⁾。代表的なものとして、ツバキやエゴノキなどの魚毒性や、オタネニンジンなどの生薬では強壮効果といった作用を有している²⁾。そのほかにも、サポニンには殺虫効果があることが報告されている^{1,3,13)}。また、サポニンを添加

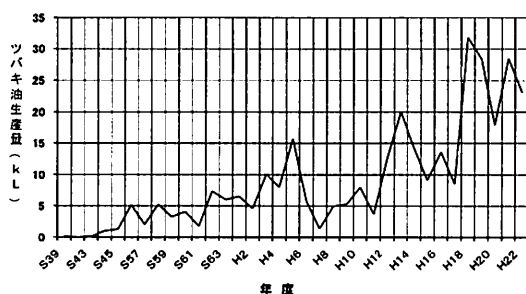
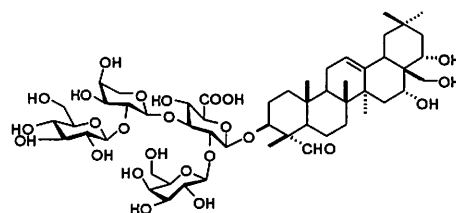


図1 長崎県のツバキ油生産量の推移

した培地においてヒラタケの子実体形成が促進された報告もある^{6,8)}。

そこで、本研究ではサポニンのこれまでの知見からツバキ油粕のサポニンについてキノコ害虫等への殺虫効果、キノコの菌糸伸長および子実体形成に対する効果について検討した。なお、本報告は第68回九州森林学会研究発表会および第124回日本森林学会大会にて口頭発表したもの^{4,5)}を中心にとまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、国立大学法人長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の田中隆教授には、サポニンの単離・精製について大変有益なご助言を頂いた。また、本県の五島列島のツバキ油関係者の方々にはツバキ油粕に関する貴重なご助言をいただいた。ここに記して深謝の意を表する。



desacyl-camelliasaponin B

図2 ツバキ油粕に含まれるサポニンの1種（デスアシルカメリアサポニンB）

2. 材料と方法

1) ツバキ油粕のサポニンの単離・精製

本研究で使用したツバキ油粕は、新上五島町振興公社が五島の自生ツバキ林より収集した種子から搾油した残渣である。ツバキ油粕に含まれるサポニンを単離・精製するため、次の手順で操作を行った。まず、室温保存したツバキ油粕（302g）を100%メタノールで3日間抽出し、ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、メ

タノール可溶部を得た。次に、この残渣にクロロホルム:メタノール(2:1)溶液を300ml加え3日間抽出し、ろ過後、ろ液をメタノール可溶部と合わせ、減圧濃縮した。これら残渣に対する操作を3回繰り返した。得られたろ液にクロロホルムと水を加え、溶媒分配し、クロロホルム可溶部と水可溶部を得た。クロロホルム可溶部は減圧濃縮し、ツバキ油

11.44gを得た。水層は、DiaionHP20SS（0～100% 水：メタノール、10% stepwise）カラムクロマトにより、フラボン配糖体 1.52g、サポニン 12.98gを得た。

2) ツバキ油粕のサポニンによるシイタケ害虫等への効果

ツバキ油粕のサポニンを用いて、長崎県農林技術開発センター内のシイタケ人工ほだ場において、次の試験を行った。

(1) シイタケ菌糸を加害する害虫への防除効果

シイタケ形成駒はオガ粉を成型したものにシイタケ菌を蔓延させたものであるが、原木に植菌した形成駒はシイタケ菌を食害する虫など被害を受け、シイタケの発生に影響が認められる。そこで、平成 23 年 10 月にシイタケ形成駒「菌興 115 号」を用いて、水のみ（対照区）とサポニン水溶液（0.1, 1.0 % w/w）を 10ml ずつ噴霧し自然乾燥後、人工ほだ場内 4 箇所それぞれ 5 個ずつ静置し、昆虫類によって形成駒が加害された個数を調査した。

(2) ナメクジに対する忌避効果の検証

サポニンはナメクジの忌避効果があることが知られている⁹⁾。そこで、ツバキ油粕のサポニンがナメクジにどの程度効果があるのか検討した。平成 24 年 6 月に、シャーレ内のフタスジナメクジ 5 匹に対し、サポニン粉末（約 10mg）をふりかけた場合、水のみ 10ml（対照区）、サポニン水溶液（0.02, 0.05, 0.11 % w/w）およびツバキ油粕懸濁液（油粕 0.5g/水 10ml）をそれぞれ 10ml ずつ噴霧した場合について 1 時間後の状態を評価した。

(3) ヤマトシロアリに対する殺蟻効果

シイタケほだ木にはヤマトシロアリの蟻道が認められることがある。ヤマトシロアリなどの殺蟻成分としてはセンノキやモッコクのサポニンが挙げられる²⁾が、ツバキ油粕のサポニンについてもその効果を検証した。平成 24 年 8 月および 10 月に蟻道が確認されたシ

イタケほだ木よりヤマトシロアリ（職蟻）を捕獲し、シャーレ内のヤマトシロアリ 6～10 匹に対して対照区（水のみ）とサポニン水溶液（0.0005, 0.005, 0.05 % w/w）3ml を噴霧し、120 分経過するまでの生存状況を 3 回評価した。

(4) シイタケ害菌であるヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. への菌糸伸長抑制効果

原木シイタケのほだ場で採取したヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. を PDA 培地で培養した。次に、培養したヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. の PDA 培地ディスク（直径 6 mm）を別の PDA 培地の中央に静置し、その周囲にサポニン濃度 0.001%, 0.01%, 0.1% の PDA 培地ディスクを配置した。その後、サポニンを添加したディスクに対するヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. の菌糸伸長の状況について調査した。

3) ツバキ油粕のサポニンがキノコ類の菌糸伸長・子実体形成に及ぼす効果

ツバキ油粕のサポニンが食用キノコに対して、菌糸伸長および子実体形成にどのような効果があるのか評価した。使用したキノコは市販のエノキダケ・エリンギ・ヒラタケ・シイタケ・マイタケの 5 種類である。

(1) 菌糸伸長に対する評価

各キノコの培養先端付近で作成した菌糸ディスク（6 mm）をサポニン添加濃度（0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0%）別の PDA 平板培地の中央に静置し、室温、暗黒下で培養した。平成 24 年 9 月 5 日より室温・暗所下で培養し、経過日数毎に菌糸が伸長した 4 方向の長さを測定した。この評価は 4 回繰り返して実施した。

(2) 子実体形成に対する評価

菌糸伸長の評価後、引き続き PDA 平板培地を暗所下に静置した。30 日経過後、暗所下と明所下に 2 シャーレずつ分けて静置した。その後の発生した子実体数を計測した。

3. 結果と考察

1) ツバキ油粕のサポニンによるシイタケ害虫等への効果

(1) シイタケ菌糸を加害する害虫への防除効果

試験結果を図 3 に示す。対照区では 3 日目

までに 75%が加害されたのに対し、サポニン水溶液1.0%処理区では加害されたものはなく、0.1%処理区でも 5%が加害されただけであり、6日目までは加害が抑制される傾向が認められた。13日目において、対照区ではすべての形成駒が加害されたのに対し、サポニン水溶液0.1%処理区では75%、1.0%処理区では15%が加害された(t検定, $p < 0.01, 0.05, n=20$)。これらのことから、サポニンにはシイタケ菌糸を加害する害虫に対する防除効果が認められた。サポニン類には昆虫類に対する忌避や防除効果を示す例があり、ツバキ油粕のサポニンについても同様の効果が確認された。なお、今回の試験で加害した昆虫類は未同定である。

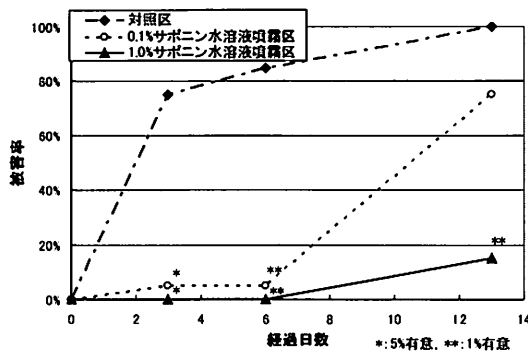


図3 シイタケ形成駒を加害する昆虫類に対するツバキ油粕サポニンの防除効果

(2) ナメクジに対する忌避効果の検証

試験結果を表1に示す。サポニン粉末散布区やサポニン水溶液(0.11%, 0.05%)噴霧区では、すべてのナメクジが1時間後に死亡した(t検定, $p < 0.01, 0.05, n=5$)。また、サポニン水溶液(0.02%)とツバキ油粕懸濁液噴霧区では、処理後1時間経過しても生存はしていたものの、対照区と比較して激しく動きまわる忌避行動が認められた。これらのこと

表1 ナメクジに対するサポニンの効果

試験区	1時間後の状況
対照区(水のみ)	生存
サポニン粉末散布区	死亡
0.11%サポニン水溶液(10ml)噴霧区	死亡
0.05%サポニン水溶液(10ml)噴霧区	死亡
0.02%サポニン水溶液(10ml)噴霧区	忌避
ツバキ油粕懸濁液(10ml)噴霧区	忌避

(n=5)

から、ツバキ油粕のサポニンにおいてもナメクジに対する忌避効果が確認された。

(3) ヤマトシロアリに対する殺蟻効果

試験結果を図4に示す。対照区(水のみ)と比較して、0.05%サポニン水溶液処理区は開始3分で74%が死亡し、30分経過するとすべて死亡した。これより濃度が低い0.005%サポニン水溶液処理区でも開始7分で43%が死亡し、120分経過すると84%が死亡した。さらに濃度が低い0.0005%処理区では120分経過しても36%が死亡するにとどまった(対照との有意差なし)。このことから、ツバキ油粕のサポニンは一定の殺蟻効果を有していることが明らかとなった。特に、0.05%サポニン水溶液ではすべてのヤマトシロアリが死亡し、優れた殺蟻効果が認められた。

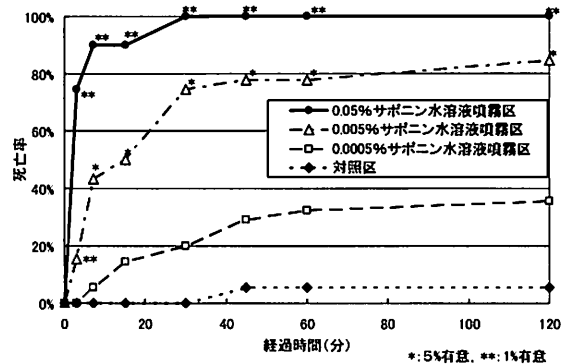


図4 ヤマトシロアリに対するサポニンの効果 (4) ヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. への菌糸伸長抑制効果

ヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. はシイタケほだ木に蔓延する害菌である。これら菌糸がサポニンに対してどのような伸長を示すか検証した。その結果、サポニン濃度別にみた菌糸伸長状況を表2に示す。0.001%, 0.01%では菌糸が伸長したが、0.1%になると菌糸が伸長しなかった。このことから、ツバ

表2 ヒポクレア sp. およびカワラタケ sp. に対するツバキ油粕のサポニンの菌糸伸長抑制効果

	サポニン添加濃度		
	0.001%	0.01%	0.1%
ヒポクレア sp.	-	-	+
カワラタケ sp.	-	-	+

+ : 効果あり, - : 効果なし

キ油粕のサポニンには濃度依存的にこれら害菌の菌糸伸長を抑制する効果があることが示唆された。これまで、これら害菌に対する天然成分を活用した防除方法はなかったことから、今後、さらに改良を進めていく予定である。

以上の検討により、ツバキ油粕のサポニンはシイタケに関係する害虫等への忌避・殺虫効果が認められた。

なお、ツバキ油粕には魚毒性があることが知られており、サポニンの活用の際、水路や水田の近くでの使用には特段の注意が必要である。

2) ツバキ油粕のサポニンがキノコ類の菌糸伸長・子実体形成に及ぼす効果

(1) 菌糸伸長に関する評価

ツバキ油粕のサポニンを濃度別に添加した培地において、食用キノコ5種類の菌糸伸長量を測定した結果、0.001%添加区においてエリンギとヒラタケの菌糸伸長が促進された(図

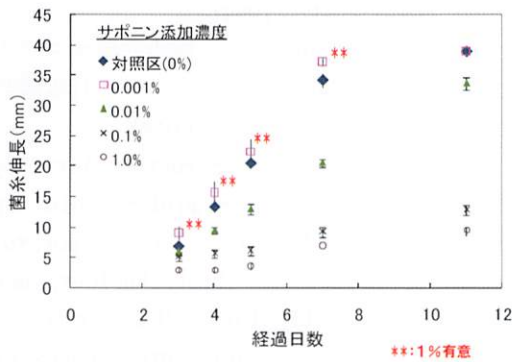


図5 ツバキ油粕のサポニン添加培地におけるエリンギの菌糸伸長状況

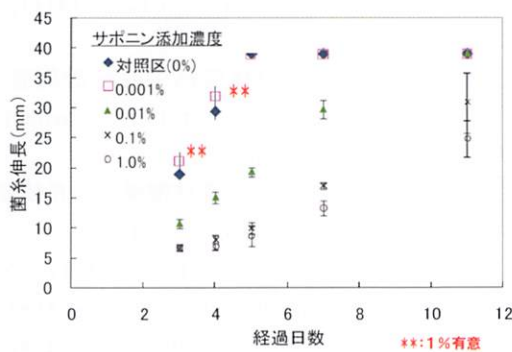


図6 ツバキ油粕のサポニン添加培地におけるヒラタケの菌糸伸長状況

5, 6). それ以外の試験区では、無添加区と同等かそれより抑制される傾向となった。特に、1.0%添加区では菌糸の伸長が大きく抑制された。

(2) 子実体形成に関する評価

菌糸伸長に関する評価を行った PDA 培地を異なる光条件下に静置し、子実体の発生数を計測した結果、エノキダケとエリンギにおいて子実体形成が確認された(表3, 4)。エノキダケでは濃度が高くなることによる子実体発生数に傾向が認められなかったが、暗所より明所で発生数が多くなった。エリンギにおいても同様に濃度が高くなることによる子実体発生数に傾向は認められなかったが、明所で発生数が多くなった。エノキダケとエリンギにおいてはサポニンを添加しても子実体の形成を抑制しないことが確認された。ヒラタケにおいて報告されている子実体形成促進効果^{6,8)}は、ツバキ油粕のサポニンでは確認できなかった。馬替ら⁷⁾は界面活性剤(乳化剤)がヒラタケの子実体形成を促進し、トリテルペンの構造と糖の結合部位などの差異が子実体形成の促進効果に影響を与えていることを明らかにした。ツバキ油粕のサポニンは結合している糖の数やトリテルペンとの結合部位が様々なパターンを有する混合物であるため、今回、構造上の特性と子実体形成の関係を明確にすることができなかった。馬替らの報告では配糖体の糖ユニットが2つ以上になると子実体が形成されなかったことから、ツバキ

表3 明所下でのサポニン添加培地における子実体発生数

	サポニン濃度 (%)				
	0	0.001	0.01	0.1	1
エノキダケ	14	3	0	1	1
シイタケ	0	0	0	0	0
マイタケ	0	0	0	0	0
エリンギ	5	3	2	4	3
ヒラタケ	0	0	0	0	0

表4 暗所下でのサポニン添加培地における子実体発生数

	サポニン濃度 (%)				
	0	0.001	0.01	0.1	1
エノキダケ	2	0	0	0	4
シイタケ	0	0	0	0	0
マイタケ	0	0	0	0	0
エリンギ	2	1	1	3	0
ヒラタケ	0	0	0	0	0

油粕のサポニンには2つ以上の糖が結合していることが推察された。

以上のことから、ツバキ油粕のサポニンはエリンギの菌糸伸長を促進し、子実体形成に

も影響がないことが明らかになった。今後、このような特性を把握した上で、ツバキ油粕の有効活用の検討を進めていく。

4. 摘要

ツバキ油粕に含まれるサポニンを活用するため、シイタケ栽培に対する害虫への効果を検証した結果、次のような知見を得た。

1) ツバキ油粕のサポニンは、ナメクジに対して忌避効果を有することが明らかになった。

2) ツバキ油粕のサポニン水溶液は、ヤマトシロアリに対して濃度依存的な殺蟻性が認められた。

また、ツバキ油粕のサポニンがキノコ類の菌

糸伸長および子実体形成に効果があるか検証した結果、次のような知見を得た。

3) ツバキ油粕のサポニンは、エリンギおよびヒラタケの菌糸伸長を促進した。

4) ツバキ油粕のサポニンは、エリンギおよびエノキダケにおいて子実体形成を抑制しなかった。

5. 引用文献

- 1) E. De Geyter, E. Lambert, D. Geelen, G. Smaghe : Novel advances with plant saponins as natural insecticides to control pest insects, *Pest Technology*, 1(2), 96~105 (2007)
- 2) 原口隆英, 寺島典二, 臼田誠人, 越島哲夫, 坂井克己, 諸星紀幸, 寺谷文之, 甲斐勇二, 志水一允, 榊原 彰: 木材の化学, 文永堂出版, 東京. 288pp (1993)
- 3) Do-Ik Kim, Jong-Dae Park, Seon-Gon Kim, Hyun Kuk, Mi-Soon Jang, Sang-Soo Kim : Screening of Some Crude Plant Extracts for Their Acaricidal and Insecticidal Efficacies, 8(1), 93~100 (2005)
- 4) 前田 一, 田嶋幸一, 久林高市, 田中 隆 : ヤブツバキ油粕に含まれるサポニンがキノコ類の菌糸伸長・子実体形成に及ぼす効果, 第124回日本森林学会大会学術講演集, (2012)
- 5) 前田 一, 田嶋幸一, 久林高市, 田中 隆 : ツバキ油粕に含まれるサポニンの有効活用に向けて—シイタケ害虫への活性評価—, 九州森林研究, 66, 107-108 (2012)
- 6) Y. Magae : Saponin Stimulates Fruiting of the Edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63(10), 1840~1842 (1999)
- 7) 馬替由美, 伊藤勇一: ショ糖脂脂肪酸エステル of ヒラタケ子実体形成に及ぼす効果, 日本農芸化学会誌, 72(5), 631~635 (1998)
- 8) Y. Magae, S. Ohara : Structure-Activity Relationships of Triterpenoid Saponins on Fruiting Body Induction in *Pleurotus ostreatus*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(8), 1979~1982 (2006)
- 9) P. Mølgaard : Food plant preferences by slugs and snails: a simple method to evaluate the relative palatability of the food plants, *Biochemical systematics and ecology*, 14(1), 113~121 (1986)
- 10) 農林水産省 : 特用林産物生産統計調査, (http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokuyou_rinsan/) (2011)
- 11) 長崎県農林部林政課・森林整備室 : 長崎県の森林・林業統計, 150pp. (2011)
- 12) S. Ramachandran, S. K. Singh, C. Larroche, C. R. Soccol, A. Pandey : Oil cakes and their biotechnological applications - A review, *Bioresource Technology*, 98(10), 2000~2009 (2007)

- 13) W. G. Taylor, P. G. Fields, and D. H. Sutherland : Insecticidal Components from Field Pea Extracts: Soyasaponins and Lysolecithins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7484~7490 (2004)
- 14) M. Yoshikawa, E. Harada, T. Murakami, H. Matsuda, J. Yamahara, N. Murakami : Camelliasaponins B₁, B₂, C₁ AND C₂, New Type Inhibitors Of Ethanol Absorption In Rats From The Seeds Of *Camellia Japonica* L., *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 42(3), 742~744 (1994)
- 15) M. Yoshikawa, T. Murakami, S. Yoshizumi, N. Murakami, J. Yamahara, H. Matsuda : Bioactive Saponins and Glycosides. V. Acylated Polyhydroxyolean-12-ene Triterpene Oligoglycosides, Camelliasaponins A₁, A₂, B₁, B₂, C₁, and C₂, from the Seeds of *Camellia japonica* L. : Structures and Inhibitory Activity on Alcohol Absorption, *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 44(10), 1899~1907 (1996)

Summary

In order to find the effective uses of saponins in oil cakes squeezed out seed of *Camellia japonica*, pesticidal activity against pest of Shiitake mushroom was evaluated.

- 1) Slugs were repelled by saponins isolated from oil cakes of seeds.
- 2) The saponins were confirmed to have termiticidal activity for *Reticulitermes speratus*. Moreover, effects of hyphal extension and fruit body formation on five edible fungi were evaluated to use the saponins.
- 3) The saponins promoted hyphal extension on *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatus*.
- 4) The saponins did not inhibit fruit body formation on *Pleurotus eryngii* and *Flammulina velutipes*.

