三番茶葉とビワ葉を混合揉捻した発酵茶の開発に関する研究

宮田　裕次

Studies on the development of fermented tea product obtained by the tea-rolling processing of third crop of tea leaves and loquat leaves

Yuji　Miyata

目次

第１章　緒論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

第２章　　三番茶葉とビワ葉を混合揉捻した新たな発酵茶の開発・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
第１節　三番茶葉とビワ葉を混合揉捻した新たな発酵茶の製造法・・・・・・・・・・・・・・ 6
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・11
第２節　三番茶葉摘採時期の違いが混合揉捻発酵茶葉の品質に及ぼす影響・・・・・・・・・12
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・12
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18

第３章　　混合揉捻発酵茶の香り特性と香味向上の検討・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
第１節　混合揉捻発酵茶の香り特性・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
第２節　火入れによる混合揉捻発酵茶の香味向上・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・22
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・23
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・31
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32

第 4 章　紅茶ポリフェノールがラット小腸からのトリグリセリド吸収に及ぼす影響・・・・・・33
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・33
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39

第 5 章　紅茶ポリフェノールの摂取がラット脂質代謝に及ぼす影響・・・・・・・・・・・・・・40
第 1 節　10%脂肪食における紅茶ポリフェノールの摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響・・ 40
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・40
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・41
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
第 2 節　25%脂肪食における紅茶ポリフェノールの摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響・・ 46
緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46
実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・50
要約・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

第 6 章　総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・55

Summary ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61

第1章　緒論

本論文では，未利用資源である緑茶三番茶葉とビワ葉を活用して短時間低コストに加えて香味が優れる品質の高い発酵茶の製造とそれにより生成される紅茶ポリフェノールが脂質代謝に及ぼす影響ついて報告する．

茶（*Camellia sinensis* L.）は，発酵の程度により不発酵茶，半発酵茶，発酵茶に分類され，それぞれの代表的な茶は緑茶，ウーロン茶，紅茶である．緑茶の原料である中国種は，葉が小さく，渋みの成分であるカテキン含量が低いのが特徴である．一方，紅茶の原料であるアッサム種は，カテキンが多量に含まれている[1)]．緑茶，ウーロン茶および紅茶の製造法は異なることから，それぞれの茶の香味や含まれる成分には違いがある．緑茶製造においては，摘みとられた茶葉を蒸気で蒸すことで酸化酵素ポリフェノールオキシダーゼを失活させるので，カテキン量が変化しないことから，カテキンの渋味がそのまま保持されるが，茶葉中に含まれるアミノ酸のうま味と調和して，緑茶特有の味になる．紅茶では，はじめに茶葉を萎凋させ，萎凋した茶葉を強く揉捻することで細胞が破壊され，カテキン類が酸化酵素の作用によって酸化重合（発酵）することでカテキン含量が急速に減少し，それに伴って紅茶ポリフェノールが生成され，結果として渋味が緩和し，紅茶有の味と香りを呈する[2)]．

長崎県内で摘採される茶葉のうち，一番茶葉は 4 月中旬から5月上旬, 二番茶葉は6月中旬から下旬, 三番茶葉は 7 月下旬から 8 月上旬に摘採され，同じ茶園（茶樹）から年 3 回の摘採が行われる．一番茶葉は，アミノ酸含量が多くカテキン含量が少ないため，うま味が強く渋味が弱い．また，一番茶葉は新茶独特の若芽の香りとあいまって香味に優れる[3)]ことから, 品質の高い茶葉として取り扱われる. 一方, 三番茶葉は，アミノ酸含量が少なくカテキン含量が多いため，うま味が弱く渋味が強い．また，単価が安く, 香りに特有のいやみがあり香味に劣る[4)]ため, ほとんど利用されていないのが現状である.

ビワ（*Eriobotrya japonica* L.）は長崎県特産品の一つであり，その生産量は全国一である[5)]が，近年の価格低迷，生産者の高齢化，放棄園の増加などにより生産量は減少傾向にある．ビワは果実生産を主な目的で栽培されているが，ビワ葉はせん定によって切除され，長崎県の一部地域においてビワ茶の原料として用いられているにすぎない．ビワの果実や葉にはクロロゲン酸が含まれており，抗酸化作用[6)]や抗ガン作用[7)]が報告されている．最近，ビワ葉に含まれるクロロゲン酸がカテキンの酵素反応による酸化を触媒的に促進し[8)]，さらに，ビワ葉が他の植物よりも強いポリフェノール酸化活性を有しており，カテキンの酸化重合を促進することが報告されている[9)]．そこで，三番茶葉とビワ葉を混合揉捻することで，紅茶ポリフェノールの生成が促進され，渋味が抑えられ香味が向上するのではないかと推察し，混合揉捻発酵茶の製造法の確立を試みた．混合揉捻発酵茶葉を製造する上で重要なことは，三番茶葉中に含まれる多くのカテキンを効率よく酸化重合させることであるが，カテキンの酸化重合を促進するには，まず，萎凋を行う必要がある．萎凋工程では，茶葉を萎れさせて柔らかくし，次の揉捻工程で揉みやすくするとともに，茶葉の酸化酵素を活性化させる．萎凋には萎凋機を使用しない自然萎凋と萎凋機を使用する人工萎凋があり，紅茶の製造が盛んなインドなどでは人工萎凋設備が整っており，その萎凋時間は 6～8 時間である．一方，緑茶の製造が盛んな日本では，人工萎凋設備がほとんど整っていないことから自然萎凋を行っているが, それには 24 時間を要する．未利用資源である三番茶葉とビワ葉を用いて香味が優れ，機能性を有する発酵茶を従来の紅茶製造と同様の方法で国内で製造すると，長い工程時間を要しコストが高くなる．そこで，緑茶製茶機械である粗揉機を利用する方法を検討した．一般に，粗揉機は蒸した茶葉に熱風を当て撹拌させながら効率よく乾燥させる製茶機械であり，これまでに熱風温度の違いが蒸した茶葉の温度や水分含量の経時変化および品質に及ぼす影響について，数多く報告されているが，熱風温度の違いが蒸していない茶葉の温度や水分含量の推移および品質に及ぼす影響ついては，ほとんど研究が行われていない．そこで，粗揉機を用いる萎凋法を確立し，短時間低コストで大量生産が可能な技術を確立することを目的に，三番茶葉とビワ葉を混合する製造法の開発に取り組んだ.

本論文では，第 2 章において，緑茶の製茶機械を用いて未利用資源である三番茶葉とビワ葉を混合した新しい混合揉捻発酵茶の製造方法について検討し

た．さらに，三番茶葉の摘採時期の違いにより粗繊維，カテキン，アミノ酸含量が異なるが，これら成分の含量の違いが香りや味に影響することから，三番茶葉の摘採時期の違いが混合揉捻発酵茶の品質に異なる影響を及ぼすことが考えられる．そこで，同じ茶園から三番茶葉の摘採時期を変えて茶葉を摘採し，それぞれの茶葉をビワ葉と混合揉捻することにより混合揉捻発酵茶葉を製造し，三番茶葉の摘採時期の違いがカテキンの酸化の程度や味および香りに及ぼす影響を検討した．

第 2 章で混合揉捻発酵茶葉の製造法を確立し品質の高い混合揉捻発酵茶を製造するための茶葉の最適摘採時期を明らかにしたが，混合揉捻発酵茶葉では揉捻工程で緑茶葉にビワ葉を添加して製造することから，緑茶葉のみから製造される緑茶や紅茶とは異なる香りを有する可能性がある．次に第 3 章では混合揉捻発酵茶の香り特性を測定した．茶の香りを向上させ，品質を高めるとともに，保存性を良くするために火入れを行うが，火入れ条件の違いが混合揉捻発酵茶の品質に異なる影響を及ぼすかもしれない．そこで，香味が優れる混合揉捻発酵茶葉を製造するための火入れ条件について検討した．

このように，第 2，3 章において，緑茶の製茶機械を利用した混合揉捻発酵茶葉製造技術の確立，ビワ葉添加による香りおよび味の向上，三番茶葉の最適摘採時期および混合揉捻発酵茶葉の香りの特性の解明，香味を発揚するための焙煎技術を確立した．

動物やヒトにおいて混合揉捻発酵茶葉は血糖上昇抑制作用，脂質代謝改善作用を有することを確認している [10-13]．血糖上昇抑制に関与する成分とその作用メカニズムについては，混合揉捻発酵茶葉の製造でカテキンの酸化重合により生成したテアフラビン（TF）類，テアシネンシン（TS）類およびテアルビジン（TR）類が小腸での α-グルコシダーゼの活性を阻害することにより発現することを観察している [13]．しかし，血清および肝臓トリグリセリド（TG）濃度低下作用，体脂肪低下作用を発揮する成分とその作用メカニズムについて明らかではない．

茶類の機能性成分としては，これまでにポリフェノール類が報告されている．緑茶の機能性に関与する成分は，主にカテキンであると考えられている．緑茶に含まれるカテキンは主に(—)- エピガロカテキン（EGC），(—)-エピガロカテキンガレート（EGCg），(—)-エピカテキン（EC）および (—)- エピカテキンガレート（ECg）の主に 4 種類が存在する．カテキンの生理作用には，動物やヒトにおいて抗酸化作用 [14]，抗ガン作用 [15]，抗菌作用 [16]，血糖上昇抑制作用 [17]，脂質代謝改善作用 [18-23] などが報告されており，その作用機序についても解明が進んでいる．日本では，緑茶が一般的に飲用されているが，世界で生産される茶の 80%が紅茶であり，世界中で最も多量に飲用されている嗜好飲料である. しかし，紅茶に多く含まれる紅茶ポリフェノールについては，緑茶カテキンに比べ作用機序やその分子構造に関して未解明な点が多いのが現状である．その背景として，緑茶のポリフェノール（カテキン）組成が比較的に単純で，有効成分を特定しやすいのに対して，紅茶のポリフェノールは組成が非常に複雑なことから単離・精製が難しく有効成分を特定しにくいことなどが挙げられる．紅茶には茶葉の揉捻，発酵の過程において酸化酵素の作用によりカテキンの酸化重合物である TF 類，TS 類および TR 類などが生成されていることが知られている [24]．TF 類には，テアフラビン（TF），テアフラビン 3-*O*-ガレート（TF3g），テアフラビン 3'-*O*-ガレート（TF3'g）およびテアフラビン 3，3'-ジ-*O*-ガレート（TFdig）などがある．TF 類の生理作用に関しては，抗肥満 [25]，TG 低下作用 [25]，コレステロール（CHOL）低下作用 [26]，抗糖尿病作用 [27] および抗ガン作用 [28] が報告されている．TS 類の構造は明らかにされているが, その生理作用については不明である．TR 類は構造も生理作用も明らかではない．

混合揉捻発酵茶葉には，茶葉中のカテキンが酸化されて TF 類，テアシネンシン A（TSA），TR 類の紅茶ポリフェノールが多く生成される [29] ことが特徴である．そこで，混合揉捻発酵茶に含まれるこれら紅茶ポリフェノールが脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った．

第 4 章では混合揉捻発酵茶に含まれる紅茶ポリフェノールのうち TF 類, TSA および TR 類を単離し，それぞれを胃内に投与して小腸からの油脂の吸収濃度を観察し，食後高脂血症に及ぼす影響について検討をおこなった．次に第 5 章では，Sprague-Dawley（SD）系雄ラットに TF 類, TSA および TR 類を 0.2%含む食餌をそれぞれ 4 週間摂食させ，これら紅茶ポリフェノール摂取が血清や肝臓脂質濃度に及ぼす影響について検討を行った．さらに，脂質代謝に影響を及ぼすメカニズム解明のため，肝臓における脂肪

合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性に及ぼす影響や，糞中への脂肪酸やステロイド排泄について検討した.

第 2 章　三番茶葉とビワ葉を混合揉捻した新たな発酵茶の開発

第 1 節　三番茶葉とビワ葉を混合揉捻した新たな発酵茶の製造法

1.　緒言

夏場に摘採される三番茶葉は，一番茶に比べ渋味の成分であるカテキン含量が多く，うま味成分のアミノ酸含量が少ないことから，三番茶葉を原料として製造した緑茶では渋味が強く香りが劣る. 一方で，紅茶葉にもカテキンが多く含まれているが，紅茶製造では酸化酵素によりカテキンが紅茶ポリフェノールに変化することで，苦渋味が緩和され，優れた香味になる [30-33]．したがって，三番茶葉に含まれるカテキンの酸化重合を促進して紅茶ポリフェノールを生成させた発酵茶を製品化することで三番茶葉を有効に利用できると推測した．しかし，緑茶葉の酸化酵素の活性は非常に弱いので，通常の紅茶の製法を適用しても, カテキンの酸化が進みにくいことから，品質の高い紅茶を製造することは難しい．ビワ葉に含まれるクロロゲン酸がカテキンの酵素反応による酸化を触媒的に促進し [8]，さらに，ビワ葉が強いポリフェノール酸化活性を有する [9]ことから，三番茶葉にビワ葉を添加することによって三番茶葉中のカテキンを効率よく酸化させ，紅茶ポリフェノールを多量に生成させることで香味を改善できる可能性がある．三番茶葉を 24 時間自然萎凋し，茶葉とビワ葉を混合割合 9:1 で 20 分間揉み込み，30 分間乾燥することで，味，香りに優れ，α-グルコシダーゼ阻害活性の高い混合揉捻発酵茶葉が製造されることを明らかにした [10~13]．そこで，本研究では，紅茶製造で最も時間を要する萎凋工程について，緑茶機械の粗揉機を利用することで品質を向上させ，簡易に萎凋できる製造法の検討を行った.

2.　実験方法

1.　材料

緑茶の供試品種は「やぶきた」で，2007 年 8 月 2 日に摘採した三番茶葉を用いた．摘採した茶葉をそのまま放置すると茶葉の温度（茶温）が上昇することで茶の品質が低下する．そこで，摘採した茶葉を生葉自動コンテナ内に入れ，送風することにより茶温の上昇を抑えた. 本試験に供試したビワ品種は「涼風」で，２年生夏葉（古葉）を 2007 年 7 月に摘採し, 冷蔵（5℃）保存したものをビワ葉として用いた.

2.　製造方法

粗揉機は茶葉に熱風を当て撹拌しながら効率よく乾燥させる製茶機械である．緑茶ではカテキンの酸化が進まないように茶葉を蒸熱処理した後に粗揉機に入れるが，本実験では三番茶葉に含まれるカテキンの酸化を促進させることを目的とするために，蒸熱処理を施していない茶葉を粗揉機（60k-A，カワサキ機工（株），静岡）に入れて熱風撹拌した（人工萎凋）. 蒸熱処理をしていない茶葉の容積は，通常の緑茶葉製造で蒸熱処理をした茶葉に比べてかなり大きいことから，効率よく熱風処理をするために粗揉機に入れる茶葉の量を一般の緑茶葉製造の半分程度とした．また，熱風温度は粗揉機に入れる茶葉の量が約半分と少ないことから，通常の緑茶葉製造温度である 100℃より低い 70，80 および 90℃とし，工程時間も通常の 50 分より短い 20 分とした.

次に, 各熱風温度で萎凋した茶葉を揉捻機に移し, ビワ葉を全重量の 10%添加し 20 分間揉み込んだ. なお，対照として萎凋した三番茶葉のみを同様の方法で 20 分間揉捻した茶葉を三番茶発酵茶葉とした.

最終工程として，混合揉捻発酵茶葉および三番茶発酵茶葉を自動乾燥機（120k-2, カワサキ機工（株）, 静岡）内で 100℃, 30 分間の熱風処理をすることで, 茶葉の発酵停止と乾燥（湿量基準含水率として 5%程度）を行った.

さらに，本実験では比較として三番茶葉から通常の紅茶の製法 [34]と同様の工程で紅茶葉を製造した. すなわち，粗揉機を使用せずに三番茶葉を温度約 26℃，湿度約 55%で 24 時間静置して自然萎凋を行い，次に萎凋した三番茶葉のみを揉捻機（60k-A，カワサキ機工（株），静岡）で 40 分間揉捻後，約 4 時間発酵させ，最後に混合揉捻発酵茶葉および三番茶発酵茶葉と同様に乾燥させたものを紅茶葉とした.

3.　茶温および茶葉含水率の測定

粗揉機に投入した茶葉の温度および含水率の測定については，2.5 分毎に 20 分間行った．茶葉含水率測定のために約 10 g の茶葉を採取し，105℃，3 時間加熱乾燥する常圧加熱乾燥法 [35]により含水率を算出した.

4.　カテキン量の測定

茶葉のカテキン含量を測定するための試料の調製については, 山口ら[36]の方法を一部改変して行った．まず, 粉砕した茶葉 0.5 g に 50%アセトニトリル溶液を 100 mL 加え，室温で 1 時間撹拌し，カテキンを抽出した．次に，0.45 µm メンブランフィルターに通したろ液を蒸留水で 10 倍に希釈した後, 高速液体クロマトグラフ（HPLC）（Module I plus，日本ウォーターズ（株），東京）を用いて主要 4 種のカテキンである EGC，EGCg，EC および ECg 量を測定した．同一茶葉の抽出を 3 反復行いその平均値を測定値とした．カラムは CAPCELL PAK C18 UG120 S-5（（株）資生堂製，東京）4.6 mm I.D.×250 mm を使用し，溶離液 20%メタノール/0.05%リン酸，流速 1.0 mL/分，カラム温度 37℃，検出波長 270 nm で測定した．

5.　官能検査（水色，香りおよび味）

混合揉捻発酵茶，三番茶発酵茶および紅茶の官能検査を茶品評会審査の経験者 4 名により，緑茶の検査法[37]を一部改変して行った．すなわち，水色および味については，緑茶審査専用の米国式茶碗に茶葉を正確に 2 g 採取し，100℃の熱湯 180 mL を加え，4 分間放置し，抽出した溶液で審査した．香りについては, 同様に茶葉 2 g に対して熱湯 180 mL を加えた直後，審査を行った．全ての評価は審査員 4 名の合議制により行った.

6.　色調の測定

茶葉 2 g に熱湯 180 mL を加え 4 分間抽出し，冷却後，色素抽出液をガラスセルに入れて背後に白板をあて，色彩色差計（CT-210，ミノルタ社（株），東京）で明度（L*値：色の明るさの指標），彩度（C*値：色の鮮やかさの指標），色相（h 値：色あいの指標）を測定した．それぞれ 3 回測定し，その平均値を求めた.

3.　実験結果

1.　粗揉工程における茶温と茶葉含水率の経時変化

粗揉工程における熱風温度の違いによる茶温の推移を図 2-1-1 に示す．熱風温度 90℃処理では粗揉機への茶葉投入 12.5 分以降から茶温が上昇を始め，茶葉投入 20 分後の取出し時には 50℃を超えた．80℃処理では 15 分以降上昇を始め，茶葉取出し時には 45℃近くにまで達し，70℃処理では処理時間中（20 分間）40℃以下であった.

熱風温度の違いによる茶葉含水率（湿量基準含水率%w.b.）の推移を図 2-1-2 に示す．粗揉機からの茶葉取出し時の茶葉含水率（%w.b.）は，70℃では 54.1%，80℃では 47.5%，90℃では 42.6%であり，熱風温度が高いほど低かった.

2.　カテキンの減少率

混合揉捻発酵茶葉，三番茶発酵茶葉および紅茶葉のカテキン減少率を表 2-1-1 に示す. 主要 4 種のカテキン（EGC，EGCg ，EC，ECg）および総カテキンの減少率は，混合揉捻発酵茶葉および三番茶発酵茶葉ともに，低い熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いるほど高い傾向を示した．同じ熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いて製造した場合，カテキンの減少率は混合揉捻発酵茶葉で三番茶発酵茶葉より高かった．紅茶葉のカテキンの減少率は，熱風温度 90℃で萎凋した三番茶葉から製造した混合揉捻発酵茶葉や熱風温度 70℃で処理した三番茶発酵茶葉と同程度であった.

3.　官能検査結果

混合揉捻発酵茶葉，三番茶発酵茶葉および紅茶葉から熱水抽出した各発酵茶の官能検査結果を表 2-1-2 に示す．水色は，混合揉捻発酵茶および三番茶発酵茶とも粗揉工程において熱風温度 70℃で萎凋した三番茶葉から製造されたもので, 80 および 90℃で萎凋した三番茶葉からのものに比べ濃く，同じ熱風温度の場合では混合揉捻発酵茶で三番茶発酵茶より濃い傾向にあった．紅茶では薄いという評価であった.

香りは，混合揉捻発酵茶で三番茶発酵茶および紅茶より優れるという評価であった．特に熱風温度 70℃で萎凋した三番茶葉から製造した混合揉捻発酵茶で最も優れていた．三番茶発酵茶および紅茶の香りと粗揉工程での三番茶葉に送風する熱風温度との間に関連は認められず，全て青臭いと評価された.

味は，熱風温度 70℃で萎凋した三番茶葉から製造した混合揉捻発酵茶で優れ, 熱風温度 80 および 90℃で萎凋した三番茶葉から製造した混合揉捻発酵茶ではやや渋味が認められた．三番茶発酵茶および紅茶の味には，粗揉工程で三番茶葉に送風する熱風温度の違いによる影響は認められず，全て薄いと評価された.

4.　色調の測定

混合揉捻発酵茶葉，三番茶発酵茶葉および紅茶葉から熱水抽出した各発酵茶の色調を表 2-1-3 に示す.
色の明るさの指標である L*値は, 低い熱風温度で萎

凋した三番茶葉を用いるほど低い傾向を示した．同じ熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いて製造した場合，混合揉捻発酵茶で三番茶発酵茶より L*値は低かった．紅茶の L*値は，混合揉捻発酵茶 90℃および三番茶発酵茶 70℃と同程度であった．色の鮮やかさの指標である C*値は，低い熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いるほど高い傾向を示した．同じ熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いて製造した場合，混合揉捻発酵茶で三番茶発酵茶より C*値は高かった．紅茶の C*値は，三番茶発酵茶 80℃と同程度であった．色あいの指標である h 値は，低い熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いるほど低い傾向を示した．同じ熱風温度で萎凋した三番茶葉を用いて製造した場合，混合揉捻発酵茶で三番茶発酵茶より h 値は低かった．紅茶の h 値は，混合揉捻発酵茶 80℃および三番茶発酵茶 70℃と同程度であった．

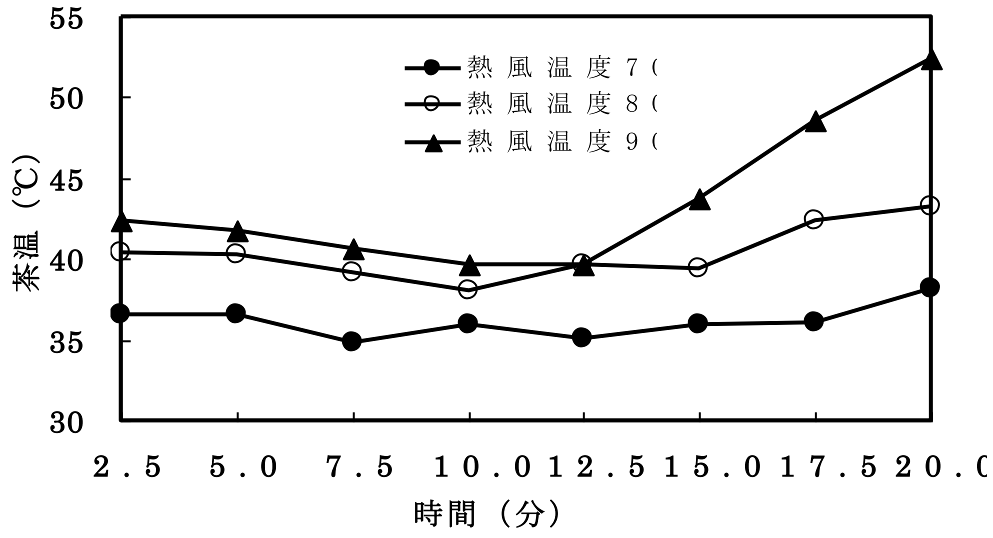


図 2-1-1. 粗揉工程における熱風温度の違いによる茶温の推移

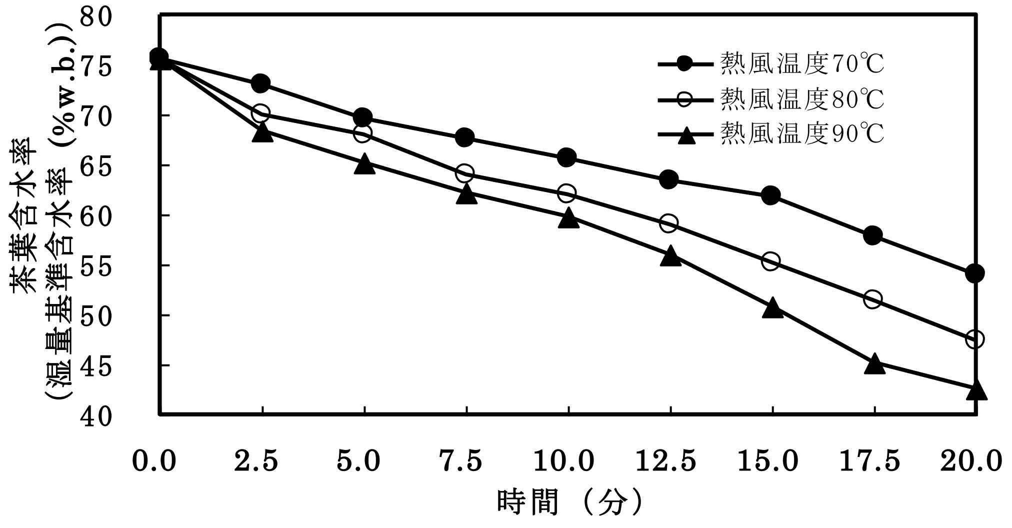


図 2-1-2. 粗揉工程における熱風温度の違いによる茶葉含水率の推移

表 2-1-1. 混合揉捻発酵茶葉、三番茶発酵茶葉および紅茶葉のカテキン減少率（%）

茶　葉	熱風温度 a)	EGC	EGCg	EC	ECg	総カテキン
混合揉捻発酵茶葉	70℃	50.1 ± 0.2	85.4 ± 0.8	82.9 ± 0.1	49.3 ± 0.7	87.7 ± 1.4
混合揉捻発酵茶葉	80℃	46.4 ± 0.2	67.5 ± 1.5	69.0 ± 0.4	36.3 ± 0.4	63.3 ± 2.2
混合揉捻発酵茶葉	90℃	42.7 ± 1.0	65.8 ± 0.5	62.6 ± 0.2	36.4 ± 0.6	59.8 ± 0.9
三番茶発酵茶葉	70℃	34.8 ± 0.1	63.3 ± 0.7	62.8 ± 0.2	45.3 ± 0.6	59.7 ± 1.6
三番茶発酵茶葉	80℃	26.4 ± 0.1	51.1 ± 0.2	50.2 ± 0.1	23.2 ± 0.2	46.1 ± 0.4
三番茶発酵茶葉	90℃	15.4 ± 0.6	42.3 ± 1.5	37.4 ± 1.0	17.6 ± 0.8	33.3 ± 3.0
紅茶葉 b)		36.0 ± 0.2	63.2 ± 0.5	65.0 ± 0.4	46.8 ± 0.3	61.1 ± 0.9

平均値 ± 標準偏差（n=3）

a) 粗揉工程において、各熱風温度の熱風を20分間三番茶葉に当て撹拌させ揉捻工程で揉みこんだもの、
混合揉捻発酵茶葉の場合は揉捻工程でビワ葉を添加

b) 通常の紅茶葉製造法に準じて、三番茶葉のみを40分間揉み込んだ後、4時間発酵させたもの

表 2-1-2. 混合揉捻発酵茶、三番茶発酵茶および紅茶の官能検査結果

茶　葉	熱風温度 a)	水 色	香 り	味
混合揉捻発酵茶葉	70℃	濃い	優れる	優れる
混合揉捻発酵茶葉	80℃	やや薄い	やや優れる	やや渋み
混合揉捻発酵茶葉	90℃	やや薄い	やや優れる	やや渋み
三番茶発酵茶葉	70℃	やや薄い	青臭い	薄い
三番茶発酵茶葉	80℃	薄い	青臭い	薄い
三番茶発酵茶葉	90℃	薄い	青臭い	薄い
紅茶葉 b)		薄い	青臭い	薄い

a) 粗揉工程において、各熱風温度の熱風を20分間三番茶葉に当て撹拌させ揉捻工程で揉みこんだもの、
混合揉捻発酵茶葉の場合は揉捻工程でビワ葉を添加

b) 通常の紅茶葉製造法に準じて、三番茶葉のみを40分間揉み込んだ後、
4時間発酵させたもの

表 2-1-3. 混合揉捻発酵茶、三番茶発酵茶および紅茶の色調

茶　葉	熱風温度 a)	L*	C*	h
混合揉捻発酵茶葉	70℃	88.9 ± 0.3	43.2 ± 2.4	89.1 ± 0.1
混合揉捻発酵茶葉	80℃	89.8 ± 0.2	41.9 ± 0.4	90.5 ± 0.2
混合揉捻発酵茶葉	90℃	90.4 ± 0.6	39.7 ± 1.5	91.7 ± 0.5
三番茶発酵茶葉	70℃	90.3 ± 0.7	39.5 ± 1.2	90.7 ± 0.8
三番茶発酵茶葉	80℃	91.6 ± 0.3	36.7 ± 1.0	92.2 ± 0.5
三番茶発酵茶葉	90℃	92.4 ± 0.4	32.2 ± 1.7	92.3 ± 0.5
紅茶葉 b)		90.0 ± 0.3	35.2 ± 0.8	90.5 ± 0.1

平均値 ± 標準偏差（n=3）
L* 色の明るさの指標：数値が高いほど透明度が高い。純水の場合の値が100である
C* 色の鮮やかさの指標：数値が高いほど色が鮮やかである
h 色あいの指標：数値が低いほど赤色が強い
a) 粗揉工程において、各熱風温度の熱風を20分間三番茶葉に当て撹拌させ
揉捻工程で揉みこんだもの、
混合揉捻発酵茶葉の場合は揉捻工程でビワ葉を添加
b) 通常の紅茶葉製造法に準じて、三番茶葉のみを40分間揉み込んだ後、
4時間発酵させたもの

4. 考察

粗揉機は蒸熱処理した茶葉を効率よく乾燥させる製茶機械である．本実験ではまず，三番茶葉に多く含まれるカテキンの酸化重合を促進させる酸化酵素が失活しないように蒸熱処理を施していない三番茶葉について，粗揉機を用いて萎凋させる場合の熱風温度の違いと茶温との関連について検討した．70, 80 および 90℃の熱風温度で処理した場合, 12.5 分頃まで茶温は上昇せず40℃以下のほぼ一定の温度を保っていた．これは茶葉に含まれる水分が蒸散して茶葉自体を冷やすことで，茶温の上昇が抑制されたことによるものと考えられる．しかし，粗揉工程の後半では, 茶葉含水率の減少から蒸散量が少なくなり，蒸散により茶葉を冷やす効率が低下することで，熱風温度が高いほど茶温が上昇しやすくなり，20 分後の茶葉取出し時の茶温は熱風温度90℃の茶葉で最も高く，80℃以上では 40℃以上になった．一方，熱風温度 70℃では茶温は 40℃以下に保たれていた（図 2-1-1）．通常の紅茶葉製造では，萎凋を行う場合の茶温が 40℃を超えると酸化酵素の活性が低下することで，カテキンの酸化が抑制され，品質が低下することが報告されている [38,39]．粗揉工程において，70 から 90℃の範囲で三番茶葉に熱風を当てた場合，低い熱風温度で萎凋した三番茶葉で製造した混合揉捻発酵茶葉および三番茶発酵茶葉でカテキンの減少率が高い（表 2-1-1）ことから，熱風温度が 80℃よりも低ければ茶温が上昇しないことで（図 2-1-1），茶葉中の酸化酵素の活性が保たれ，揉捻工程でカテキンの酸化が効率よく行われたと推察される．また，茶温の上昇は茶葉含水率を減少させる．茶温 50℃の場合，茶葉含水率が 45%w.b.以下になるが，その時の酸化酵素の活性は低下することが報告されている [38]．熱風温度 70℃で萎凋した三番茶葉（茶葉取出し時の茶温；40℃以下，茶葉取出し時茶葉含水率；54.1%w.b.）から製造された発酵茶葉は，熱風温度 90℃で萎凋した三番茶葉（茶葉取出し時の茶温；53.8℃，茶葉取出し時茶葉含水率；42.6%w.b.）から製造された三番茶発酵茶葉に比べ総カテキンの減少率が 2 倍程度高いが（図 2-1-1，表 2-1-1），これは酸化酵素の活性が高いことによるものと推察される．これらのことから，三番茶葉を粗揉機により萎凋する場合，70 から 90℃の熱風温度では 70℃が最適であると考えられる．

揉捻工程でビワ葉を添加して製造した混合揉捻発酵茶葉は，ビワ葉を添加していない同じ熱風温度で萎凋した三番茶葉から製造した三番茶発酵茶葉に比べ，カテキンの減少率が高かったことから（表 2-1-1），ビワ葉を添加することで三番茶葉に含まれ

るカテキンの酸化が進んでいると考えられる．ビワ葉が強いポリフェノール酸化活性を有する [9]ことに加え，クロロゲン酸がカテキンの酵素反応による酸化を触媒的に促進する [8]．クロロゲン酸に対する酵素の基質特異性が高いため，カテキンよりもクロロゲン酸が速やかに酸化されてクロロゲン酸キノンが生成する．このクロロゲン酸キノンは強い酸化剤として働き，カテキンを酸化すると同時に，還元されてクロロゲン酸に戻り再び酵素の基質となる [40]ことから，クロロゲン酸は強くカテキンの酸化に寄与していると考えられる．これらの作用により，茶葉中のカテキンの酸化重合が促進したものと推察される．熱風温度 70℃で萎凋した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶葉で最もカテキンの減少率が高かったことから，三番茶葉に含まれるカテキンの酸化を効率よく促進させるためには，粗揉工程での茶温を 40℃以下に保ち，さらに，揉捻工程でビワ葉を添加することが重要であると考えられる．

水色，香りおよび味の品質に及ぼす影響を官能検査により検討したところ，水色については， 熱風温度 70℃の混合揉捻発酵茶で最も濃いと評価された（表 2-1-2）．さらに，色彩色差計で分析した結果，L*値は低く，C*値は高く，h 値は低い（表 2-1-3）ことから，官能検査と同様に濃い鮮やかな紅色を呈することが明らかになった．このことから，熱風温度 70℃の混合揉捻発酵茶でカテキンの酸化が進み紅茶ポリフェノールが多く生成していると推察される．

香りについては，混合揉捻発酵茶で三番茶発酵茶や紅茶よりも高い評価であった．三番茶葉中に存在する β-グリコシダーゼ [41]に加えてビワ葉中の β-グリコシダーゼ [41]が，三番茶葉中の geraniol や linalool などのアルコール系香気前駆体に作用して花香の芳香成分である紅茶様の香りが多く生成したと可能性がある．今後，混合揉捻発酵茶の香りの成分およびその生成機構について，解明する必要がある．

味については，熱風温度 70℃で萎凋した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶で最も高い評価であったが，それは熱風温度 80 および 90℃で萎凋した三番茶葉から製造されたものに比べ，渋味に関与する EGCg と ECg[42]の減少率が大きく，これらカテキンの酸化重合によって渋味が抑えられた [30]ことによるものと考えられる．また，ビワ葉を添加することでビワ葉に含まれる成分が付与されて三番茶発酵茶より高い評価になった可能性もある．一方，三番茶発酵茶および紅茶で EGCg と ECg の残存量が多いにも関わらず，やや薄いという評価になった原因については，カテキン含量の面からは明らかにできなかった．今後，カテキン以外の成分と味との関連を検討する必要がある．

粗揉機や揉捻機の緑茶製茶機械を用いた本製造法は，粗揉工程における熱風処理時間の短縮や揉捻時間の短縮で緑茶葉製造より短時間で行うことができ，また，紅茶葉製造法で行う自然萎凋や発酵工程を省略できることで，紅茶葉製造よりかなり時間を短縮することができるなどの長所があり，製造コストの削減につながると考えられる．

以上のことから，混合揉捻発酵茶葉のカテキンの酸化および香りや味などの品質は粗揉工程での茶温や揉捻工程でのビワ葉添加により影響を受けることが明らかとなった．混合揉捻発酵茶葉中の三番茶葉に含まれるカテキンの酸化を促進し品質を高めるためには，粗揉工程で三番茶葉を萎凋する際の熱風温度を 70℃にして茶温を 40℃以下に保ち, 次の揉捻工程で萎凋した茶葉に全量の 10%のビワ葉を添加し混合揉捻することが重要で，その結果，味や香りに優れ，水色が鮮やかな混合揉捻発酵茶が生成された．緑茶の製茶機械を用いて未利用資源である三番茶葉とビワ葉を混合した新たな発酵茶の開発に取り組み，浸出液が鮮やかな紅色を呈し，渋味や苦味が少なく香味に優れる新しい混合揉捻発酵茶の製造法を確立した．

5. 要約

有効利用されていない三番茶葉とビワ葉を混合した新たな発酵茶の製造法を検討した．緑茶製茶機械の粗揉機を利用して三番茶葉に 70℃の熱風を当て茶温を 40℃以下に保ち 20 分間撹拌して茶葉を萎凋させた．次に揉捻機を用いて萎凋した三番茶葉にビワ葉を全量の 10%添加し揉捻することで，カテキンの酸化重合が促進され，味，香りに優れ，浸出液の色が鮮やかな紅色を呈する品質の高い混合揉捻発酵茶が生成された．

第2節　三番茶葉摘採時期の違いが混合揉捻発酵茶葉の品質に及ぼす影響

1.　緒言

一般に茶葉は生育が進むに伴って全窒素，遊離アミノ酸，カテキン，粗繊維等の含量が変動することが知られている[43-45]．高品質な茶葉として取り扱われる一番茶葉では，生育が進むとともに収量は増加する．しかし，うま味成分である遊離アミノ酸含量が減少し，茶葉の硬化度を示す粗繊維含量が増加するために品質(水色, 香りおよび味)は低下する[45-47]．したがって，生育が進んだ茶葉を用いて緑茶葉の製造を行うとその市場取引価格は大幅に下がる．そのため，緑茶生産者は品質を低下させず収量も確保できるよう比較的早期の一定期間内に一番茶葉を摘採する．一方，三番茶葉では生育初期からアミノ酸含量が少なく粗繊維含量が多い[43-46]など元々品質が劣り市場での取引価格が低いことから，緑茶生産者は品質より収量の確保を優先して，やや遅めに茶葉を摘採する．一般に，緑茶製造における三番茶葉の最適摘採時期は気象条件にもよるが二番茶葉摘採日から35日頃である[47]．

本章第一節において，短時間で三番茶葉を萎凋させ，ビワ葉を添加することで三番茶葉に含まれるカテキンの酸化重合を促進させて製造する混合揉捻発酵茶を開発した．この混合揉捻発酵茶は味と香りに優れ，水色も鮮やかな紅色を呈するなど高い品質を有する．しかし，三番茶葉の摘採時期の違いが混合揉捻発酵茶の品質に及ぼす影響については不明である．

そこで本研究では，三番茶葉を生育初期の未熟茶葉から生育後期の硬化茶葉まで4回摘採し，それぞれの三番茶葉にビワ葉を添加して混合揉捻発酵茶葉を製造し，三番茶葉に含まれるカテキン含量の測定と混合揉捻発酵茶の品質評価を行い，混合揉捻発酵茶葉の製造に用いる三番茶葉の最適摘採時期を検討した．

2.　実験方法

1.　材料および混合揉捻発酵茶葉製造方法

緑茶の供試品種は「やぶきた」である．一般に，三番茶葉の最適摘採時期は気象条件にもよるが二番茶葉摘採日から35日頃である[47]．そこで，本試験では同一茶園において, 二番茶葉摘採日から31日目の2008年7月26日（生育Ⅰ），35日目の7月30日（生育Ⅱ），39日目の8月3日（生育Ⅲ）および43日目の8月7日（生育Ⅳ）に三番茶葉を摘採した．ビワの品種は「涼風」で，ビワの2年生夏葉（古葉）を2008年7月に摘採し, 混合揉捻発酵茶葉を製造するまで冷蔵保存した．

本章第一節の方法に準じて，生育毎に摘採した三番茶葉を粗揉機（60k-A，カワサキ機工（株），静岡）に投入し，70℃の熱風を当てることで茶温を40℃以下に保ち，20分間人工萎凋させた．次に，萎凋した茶葉に全量の 10%のビワ葉を添加して，揉捻機（60k-A，カワサキ機工（株），静岡）を用いて 20分間揉捻することで発酵させた．この混合揉捻発酵茶葉を自動乾燥機（120k-2，カワサキ機工（株），静岡）内で100℃，30分間の熱風処理により，茶葉の発酵を停止させるとともに湿量基準含水率が約 5%になるまで乾燥させた．

2.　全窒素含量および中性デタージェント繊維含量の測定

全窒素および茶葉の熟度を示す指標である中性デタージェント繊維（NDF）含量の測定については，摘採した三番茶葉を直ちに電子レンジ（600W）で1～2 分間ブランチング処理し，70℃で一晩温風乾燥後，粉砕したものを試料として近赤外分光法（茶成分分析計（GT-8S），静岡製機（株），静岡）により行った．

3.　総ポリフェノール量の測定

総ポリフェノール含量についてはフォーリン・デニス法[48]にて定量し，没食子酸相当量として算出した．粉砕した茶葉1 mgをメタノール10 mLに溶解した．3.2 mLの蒸留水を入れた試験管に200 µLの分析用試料溶液を加えた．これに，200 µLのフォーリン・デニス試薬を加えて攪拌した後に 400 µL の飽和炭酸ナトリウム溶液を加え，30 分間放置した．この溶液を分光光度計（U-2000A，（株）日立製作所，東京）を用いて，検出波長760 nmの吸光度で測定した．ブランクには，フォーリン・デニス試薬の代わりに蒸留水を加え，同様に測定した．

4.　DPPH法によるラジカル消去能の測定

80%メタノールで希釈した試料抽出物300 µLに，900 µLの1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl（DPPH）溶液（133 µmol/L，67 µmol/L MES緩衝液pH6.9， 6.7%エタノール）を加え直ちに混和した．反応液は室温

で 20 分間放置後，分光光度計（U- 2000A，（株）日立製作所，東京）を用いて，検出波長 520 nm の吸光度で測定した[49]．茶葉 1 mg 消去できるラジカル量の Trolox の mol で表し，同一茶葉の抽出を 3 反復行い，その平均値を測定値とした.

5. カテキン含量の測定，官能検査（水色，香りおよび味）および色調の測定

カテキン含量の測定，官能検査（水色，香りおよび味）および色調の測定は，本章第一節の方法に準じて行った.

3. 実験結果

1. 三番茶葉摘採時期の違いによる茶葉中の全室素含有率，NDF 含有率，総ポリフェノール含量，ラジカル消去能

三番茶葉摘採時期の違いによる茶葉中に含まれる全窒素および NDF 含有率，総ポリフェノール含量，ラジカル消去能を表 2-2-1 に示す. 全窒素含有率は生育が進むに伴って減少した．NDF 含有率は生育が進むに伴って増加した．生育Ⅳに摘採した三番茶葉の総ポリフェノール含量は，生育Ⅰ～Ⅲに摘採した三番茶葉と比較して 10%程度低かった．生育の違いによりラジカル消去能に差は観察されなかった.

2. カテキン含量と減少率

三番茶葉摘採時期の違いによる混合揉捻発酵茶葉製造前（茶葉摘採直後；茶葉のみ）と製造後（茶葉とビワ葉の混合）のカテキン含量および混合揉捻発酵茶葉製造によるカテキン減少率を表 2-2-2 に示す. ガレート型カテキン（ECg ，EGCg）含量は，熟度が進むにつれて減少したのに対して，非ガレート型カテキン（EGC ，EC）含量は増加したが，ガレート型カテキン含量の減少が大きいことから総カテキン含量は減少した．混合揉捻発酵茶葉製造によるカテキンの減少率は EGC，EGCg ，EC および ECg とも生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉で生育ⅢおよびⅣに摘採したそれらより高く，総カテキン含量の減少率は生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉により製造した混合揉捻発酵茶葉で約 85%であったが，生育ⅢおよびⅣに摘採した混合揉捻発酵茶葉で約 60%であった.

3. 官能検査結果

三番茶葉摘採時期の違いによる混合揉捻発酵茶の官能検査結果を表 2-2-5 に示す. 水色は生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉により製造された混合揉捻発酵茶で生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶より濃いと評価された．香りは生育Ⅱに摘採した三番茶葉により製造された混合揉捻発酵茶で優れ，生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶ではやや優れていたが，生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶では劣っていると評価された．味は生育Ⅱに摘採した三番茶葉により製造された混合揉捻発酵茶で優れ，生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶では渋味やえぐ味を感じ，生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶では生育Ⅱによる混合揉捻発酵茶より薄いと評価された.

4. 色調の測定

三番茶葉の摘採時期の違いによる混合揉捻発酵茶葉の色調を表 2-2-6 に示す. 色の明るさの指標である L*値は，生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉により製造された混合揉捻発酵茶で生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶より低かった．色の鮮やかさの指標である C*値は，生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉により製造された混合揉捻発酵茶で生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶より高かった．色あいの指標である h 値は，生育ⅠおよびⅡに摘採され，製造された混合揉捻発酵茶で，生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶より低かった．以上のことから，色が濃く鮮やかな紅色を呈する混合揉捻発酵茶は，生育Ⅰおよび生育Ⅱで摘採された三番茶葉であった.

表2-2-1. 三番茶葉摘採時期の違いによる茶葉中の全窒素含有率、中性デタージェント繊維含有率、総ポリフェノール含量、ラジカル消去能

茶　　葉	全窒素含有率 乾物（%）	NDF含有率 乾物（%）	総ポリフェノール含量 （µg/mg）	ラジカル消去能 （µmol/mg）
生育Ⅰ三番茶葉 a)	5.0	14.8	270 ± 4	1.24 ± 0.21
生育Ⅱ三番茶葉 b)	4.4	21.2	260 ± 3	1.30 ± 0.18
生育Ⅲ三番茶葉 c)	3.8	24.3	264 ± 5	1.50 ± 0.10
生育Ⅳ三番茶葉 d)	3.6	26.3	235 ± 7	1.38 ± 0.03

NDF：中性デタージェント繊維
平均値 ± 標準偏差（n=3）
a) 二番茶葉摘採日から31日目に摘採した三番茶葉
b) 二番茶葉摘採日から35日目に摘採した三番茶葉
c) 二番茶葉摘採日から39日目に摘採した三番茶葉
d) 二番茶葉摘採日から43日目に摘採した三番茶葉

表 2-2-2. 三番茶葉摘採時期の違いによる製造前と製造後の茶葉中に含まれるカテキン含量およびカテキン減少率

茶　　葉		EGC	EGCg	EC	ECg	総カテキン
生育Ⅰ混合揉捻発酵茶葉 [a)]	製造前(mg/100 mg)	3.36 ± 0.02	21.12 ± 0.08	1.15 ± 0.06	3.05 ± 0.06	28.68 ± 0.13
	製造後(mg/100 mg)	1.10 ± 0.00	2.07 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.99 ± 0.03	4.37 ± 0.03
	減少率(%)	67.27 ± 0.07	90.20 ± 0.10	81.74 ± 0.84	67.55 ± 0.47	84.77 ± 0.21
生育Ⅱ混合揉捻発酵茶葉 [b)]	製造前(mg/100 mg)	3.98 ± 0.05	19.48 ± 0.17	1.04 ± 0.01	2.90 ± 0.04	27.40 ± 0.27
	製造後(mg/100 mg)	0.72 ± 0.01	2.36 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.94 ± 0.01	4.25 ± 0.03
	減少率(%)	81.91 ± 0.43	87.89 ± 0.22	77.89 ± 0.54	67.59 ± 0.45	84.49 ± 0.24
生育Ⅲ混合揉捻発酵茶葉 [c)]	製造前(mg/100 mg)	5.24 ± 0.02	18.04 ± 0.05	1.75 ± 0.06	2.42 ± 0.02	27.45 ± 0.11
	製造後(mg/100 mg)	2.76 ± 0.01	5.27 ± 0.03	0.52 ± 0.00	1.51 ± 0.05	10.06 ± 0.05
	減少率(%)	47.33 ± 0.36	70.79 ± 0.52	70.29 ± 0.92	37.61 ± 1.32	63.36 ± 0.55
生育Ⅳ混合揉捻発酵茶葉 [d)]	製造前(mg/100 mg)	5.21 ± 0.08	17.82 ± 0.23	1.50 ± 0.04	2.32 ± 0.01	26.85 ± 0.35
	製造後(mg/100 mg)	2.80 ± 0.02	5.92 ± 0.06	0.50 ± 0.03	1.34 ± 0.02	10.56 ± 0.07
	減少率(%)	46.26 ± 1.18	66.78 ± 0.21	66.67 ± 1.24	42.25 ± 1.16	60.68 ± 0.42

平均値 ± 標準偏差（n=3)

a) 二番茶葉摘採日から31日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉

b) 二番茶葉摘採日から35日目の三番茶葉を使用して製造した混合発酵揉捻茶葉

c) 二番茶葉摘採日から39日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉

d) 二番茶葉摘採日から43日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉

表 2-2-3. 三番茶葉摘採時期の違いによる混合揉捻発酵茶の官能検査

茶　　葉	水色	香り	味
生育Ⅰ混合揉捻発酵茶葉 a)	濃い	劣る	劣る（渋味、えぐ味）
生育Ⅱ混合揉捻発酵茶葉 b)	濃い	優れる	優れる
生育Ⅲ混合揉捻発酵茶葉 c)	やや薄い	やや優れる	やや優れる（薄い）
生育Ⅳ混合揉捻発酵茶葉 d)	やや薄い	やや優れる	やや優れる（薄い）

a) 二番茶葉摘採日から31日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物
b) 二番茶葉摘採日から35日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物
c) 二番茶葉摘採日から39日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物
d) 二番茶葉摘採日から43日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物

表 2-2-4. 三番茶葉摘採時期の違いによる混合揉捻発酵茶の色調

茶　　葉	L*	C*	h
生育Ⅰ混合揉捻発酵茶葉 a)	85.2 ± 0.3	51.2 ± 1.3	88.3 ± 0.2
生育Ⅱ混合揉捻発酵茶葉 b)	84.3 ± 0.1	54.5 ± 1.0	88.0 ± 0.2
生育Ⅲ混合揉捻発酵茶葉 c)	87.3 ± 0.7	45.7 ± 2.2	90.2 ± 0.4
生育Ⅳ混合揉捻発酵茶葉 d)	87.5 ± 0.4	46.4 ± 2.1	90.0 ± 0.2

平均値 ± 標準偏差（n=3）
L^* 色の明るさの指標：数値が高いほど透明度が高い。純水の場合の値が100である
C^* 色の鮮やかさの指標：数値が高いほど色が鮮やかである
h　色あいの指標：数値が低いほど赤色が強い
a) 二番茶葉摘採日から31日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物
b) 二番茶葉摘採日から35日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物
c) 二番茶葉摘採日から39日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物
d) 二番茶葉摘採日から43日目の三番茶葉を使用して製造した混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物

4. 考察

茶葉は生育が進むに伴って全窒素，カテキン，粗繊維等の含量が変動することが知られている[43-45]．そこで，三番茶葉の生育の違いが茶葉中に含まれる成分に及ぼす影響について検討した．生育が進むに伴い，全窒素含有率は減少し，NDF 含有率は増加した（表 2-2-1）．さらに，生育が進むにつれてガレート型カテキン（EGCg ，ECg）含量は減少するのに対して，非ガレート型カテキン（EGC ，EC）含量は増加したが，ガレート型カテキン含量の減少の方が大きいことから総カテキン含量は減少した（表 2-2-2）．生育Ⅳ（三番茶葉摘採日から 43 日目）に摘採された三番茶葉の総ポリフェノール含量が，生育Ⅰ～Ⅲ（三番茶葉摘採日から 39 日目までに摘採）と比較して減少したのは（表 2-2-1），総カテキン含量の減少によるものと考えられる．生育Ⅳに摘採した茶葉のラジカル消去能はカテキン含量が最も少ないにもかかわらず，生育ⅠおよびⅡに摘採された茶葉と同様であった（表 2-2-1）．この原因については明らかではないが，カテキンの効果がすでにプラトーに達している可能性も残されている．

本研究で開発した混合揉捻発酵茶葉は，三番茶葉とビワ葉を揉捻する製造工程においてビワ葉が三番茶葉に含まれるカテキンの酸化を促進することで品質が向上する特徴を有している．生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉では，生育ⅢおよびⅣに摘採した三番茶葉より NDF 含有率が低い（表 2-2-1）ことから，茶葉の硬化がそれほど進んでいないとみなされる．硬化していない三番茶葉の組織は揉捻により容易に破壊され，ビワ葉を混合することでビワ葉に含まれるクロロゲン酸によって三番茶葉中のカテキンの酸化重合が促進することから，生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶葉でカテキンの減少率が高くなったと推察される．一方，生育の後半になると三番茶葉の葉長が長くなり，

茶葉の容積が増加するとともに茶葉が硬化する[44,50]．茶葉のかさの増加や硬化促進は，揉捻工程における茶葉の揉捻を阻害して，茶葉中に含まれる成分の溶出が抑制される[51,52]ことで，カテキンの酸化重合が促進せず，結果として生育ⅢおよびⅣに摘採した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶葉でカテキンの減少率が低くなったと推察される．

生育前半に摘採された三番茶葉とビワ葉を混合揉捻することで茶葉中のカテキンの酸化が促進されることが明らかになったが，次に，香りや味などの品質に及ぼす影響を官能検査結果により検討した（表2-2-3）．水色については，生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶で，生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶より濃かった（表2-2-3）．さらに，色彩色差計で分析した結果，生育ⅠおよびⅡに摘採した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶で，L*値は低く，C*値は高く，h 値は低い（表 2-2-4）ことから，官能検査結果と同様に濃い鮮やかな紅色を呈することが明らかになった．このことから，生育ⅠおよびⅡによる混合揉捻発酵茶葉でカテキンの酸化が進み紅茶ポリフェノールが多く生成していると考えられる．

香りについては，生育Ⅱに摘採した三番茶葉から製造された混合揉捻発酵茶で最も優れ，生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶で劣り，生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶でやや優れる結果となった（表 2-2-3）．茶葉の発酵により生成される花香の芳香成分である linalool や geraniol[31-33]などは，発酵させる原料茶葉の生育が進んだものほど多く生成されることが知られている[53]．本実験において，生育がそれほど進んでいない生育Ⅰの三番茶葉で製造された混合揉捻発酵茶における香りの評価は最も低く，生育が進んだ生育Ⅱ以降による混合揉捻発酵茶で，生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶より高い評価であった．混合揉捻発酵茶ではある程度生育の進んだ茶葉を使用することで香りが向上すると考えられる．しかし，茶葉の生育が進むに伴って NDF 含有率が高くなり，硬葉臭が強くなる．生育が進んだ生育ⅢおよびⅣに摘採した三番茶葉で製造された混合揉捻発酵茶で硬葉臭が生成し，そのことが生育Ⅱによる混合揉捻発酵茶よりやや評価が低くなった可能性がある．これらのことから，生育Ⅱに摘採した三番茶葉で製造した混合揉捻発酵茶で最も高い香りの評価になったと推察される．

味については，生育Ⅱの三番茶葉で製造された混合揉捻発酵茶で最も優れ，生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶では渋味やえぐ味を感じ，生育ⅢおよびⅣによる混合揉捻発酵茶では生育Ⅱによる混合揉捻発酵茶より劣っていた（表 2-2-3）．生育Ⅱの三番茶葉で製造された混合揉捻発酵茶で優れたのは，総カテキンの減少率が高かったことから，カテキンの酸化重合が進んだことで渋味が抑えられた[32]ことによるものと考えられる．しかし，強い渋味に関与する EGCg および ECg[38]の含量は，生育Ⅰおよび生育Ⅱの三番茶葉で製造された混合揉捻発酵茶葉と同程度であるにもかかわらず，生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶では渋味やえぐ味を感じる評価となった．また，生育ⅢおよびⅣの三番茶葉で製造された混合揉捻発酵茶では生育Ⅰによる混合揉捻発酵茶より EGCg や ECg 含量が高いにも関わらず，渋味は感知されなかった．このように混合揉捻発酵茶葉の場合，カテキン含量のみでは味を評価することができなかった．混合揉捻発酵茶葉の浸出液にはカテキン以外にカフェイン，糖，シュウ酸など茶葉やビワ葉に由来する成分が含まれる[54-56]ことから，今後，カテキン以外の成分と味との関連を検討する必要がある．

以上のことから，混合揉捻発酵茶の品質は，三番茶葉の摘採時期の影響を受けることが明らかとなり，カテキンの酸化を促進し品質を高めるために，混合揉捻発酵茶葉製造に使用する三番茶葉は，二番茶葉摘採日から一般の緑茶の三番茶葉の最適摘採時期と同じ 35 日頃が最適であると考えられる．

5. 要約

三番茶葉とビワ葉を用いた混合揉捻発酵茶葉製造に用いる三番茶葉の摘採時期の違いがカテキンの酸化重合および品質に与える影響を明らかにするために，二番茶葉摘採日から 31 日目，35 日目，39 日目および 43 日目に三番茶葉を摘採し，ビワ葉と混合揉捻して混合揉捻発酵茶葉を製造した．31 日目および 35 日目に摘採した三番茶葉を用いて製造した混合揉捻発酵茶葉でカテキンの酸化が促進していた．35 日目に摘採した三番茶葉で製造した混合揉捻発酵茶の水色，香り,味は全ての摘採日の中で最も高い評価であった．よって，品質の高い混合揉捻発酵茶葉製造には二番茶葉摘採日から 35 日頃に摘採した三番茶葉を用いることが最適であることが明らかになった．

第 3 章　混合揉捻発酵茶の香り特性と香味向上の検討

第 1 節　混合揉捻発酵茶の香り特性

1.　緒言

茶の香りは，その品質を決定する上で非常に重要な要素である．Takei ら[57]は(*Z*)-3-hexenyl-(*E*)-2-hexenoate，(*Z*)-3-hexenylhexanoate，6-methyl-3,5-hept-adiene-2-one, 3-hexenyl-(*E*)-2-hexenoate などが緑茶の新茶の香りに寄与することを報告している．一般に高級茶として取り扱われるてん茶や玉露にはアオノリ様の香りを呈する dimethyl sulfide が多く含まれている[58]．世界中で最も飲用されている紅茶には，茶葉の揉捻，発酵により生成される花様の香りを特徴とする linalooloxide 類，linalool，benzaldehyde，benzylalcohol，geraniol，phenylethyl alcohol，β-ionone などが主要な香気成分として含まれている[59]．ウーロン茶は不発酵茶の緑茶と発酵茶の紅茶の中間に位置する半発酵茶で，Tokimoto ら[60]はその主要な香りの成分を nerolidol であると報告している．このように，茶の種類によって特徴的な香り成分が異なっている．

第 2 章において，短時間で三番茶葉を萎凋し，ビワ葉を添加することで三番茶葉に含まれるカテキンの酸化重合を促進させて製造する混合揉捻発酵茶葉を開発した．この茶葉を熱水抽出した混合揉捻発酵茶は味と香りに優れ，水色は鮮やかな紅色を呈するなど高い品質を有している．混合揉捻発酵茶葉は揉捻工程で緑茶葉にビワ葉を添加して製造することから，緑茶葉のみから製造される緑茶や紅茶とは異なる香気成分を有する可能性がある. そこで本節では，混合揉捻発酵茶の香り特性について調べた.

2.　実験方法

1.　試料および混合揉捻発酵茶葉製造法

緑茶の供試品種は「やぶきた」で，2008 年 8 月 2 日（二番茶葉摘採後 35 日目）に三番茶葉を摘採した．ビワの供試品種は「涼風」で，2008 年 7 月にビワの 2 年生夏葉（古葉）を摘採し，混合揉捻発酵茶葉を製造するまで冷蔵保存した．第 2 章第一節に準じて混合揉捻発酵茶葉を製造した．つまり，蒸熱処理を施していない茶葉を粗揉機（60k-A，カワサキ機工（株），静岡）に入れて 70℃の熱風で 20 分間攪拌した（人工萎凋）. 次に, 萎凋した茶葉を揉捻機（60k-A, カワサキ機工（株），静岡）に移し，ビワ葉を全重量の 10%添加し 20 分間一緒に揉み込んだ．最後に，自動乾燥機（120k-2，カワサキ機工（株），静岡）内で 100℃，30 分間の熱風処理をすることで，茶葉の発酵停止と乾燥（湿量基準含水率として 5%程度）を行った.

混合揉捻発酵茶は紅茶と同様に茶葉とビワ葉を発酵させて製造することから，紅茶の香りとの違いを比較するために対照として市販紅茶葉（ダージリンおよびセイロン）, および混合揉捻発酵茶葉製造時に使用したのと同じ三番茶葉を用いて通常の紅茶の製法[34]で製造した紅茶葉を用いた．本実験では三番茶葉からと同様な工程に従い紅茶葉を製造した．粗揉機を使用せずに三番茶葉を温度約 26℃, 湿度約 55%で 24 時間静置して自然萎凋を行い, 次に萎凋した三番茶葉のみを揉捻機（60k-A，カワサキ機工（株））で 40 分間揉捻後, 約 4 時間発酵させ, 最後に混合揉捻発酵茶葉と同様に乾燥させたものを紅茶葉とした. また，緑茶三番茶葉，ビワ葉を摘採後直ちに熱風乾燥させたビワ茶葉およびビワ葉を揉捻機でそのまま揉み込み発酵させたビワ発酵茶葉も測定に用いた.

2.　香気成分分析

香気成分分析については，樋口ら[61]の方法を一部改変して行った．200 mL の三角フラスコに茶葉 15 g を入れ，80℃の蒸留水を 150 mL，30%塩化ナトリウム水溶液を 1 mL, 内部標準として 1%　シクロヘキサノールを 50 µL 加え密栓した．その後，80℃で 5 分間加熱処理を行い，三角フラスコ内が気液平衡に達した後, 捕集管を 20 分間挿入することによって香気成分をトラップした. 250℃に加熱したガスクロマトグラフのカラム注入口に捕集管を挿入し，そこへ発生した香気成分を 3 分間の熱脱着により捕集し，カラムに注入した．捕集管には Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylcyclohexane（SUPELCO 社，米国）を用いた．ガスクロマトグラフ（GC）（GC-2010，（株）島津製作所，京都）の分析条件については，ポリエチレングリコール系の stabil-WAX（Reapect 社，米国）60 m×0.25 mm，膜厚 0.25 µm のカラムを使用し，カラム温度を 70℃で 3 分間保持後，250℃まで 10℃/分で昇温し，その後

250℃で 12 分間保持した．注入口温度は 250℃，ヘリウム圧力は 120 kPa とした．成分同定のガスクロマトグラフ質量計分析計（GC-MS）（QP2010,（株）島津製作所，京都）の条件については，インタフェース温度 250℃，イオン化電圧 70eV，イオン化電流 60μA とした．香気成分を測定し，内部標準に対する相対ピーク面積比を求めた.

3. 実験結果

混合揉捻発酵茶，市販紅茶，紅茶，緑茶，ビワ茶およびビワ発酵茶に含まれる主要な香気成分のピーク面積比を表 3-1-1 に示す. 混合揉捻発酵茶の主要な香気成分として 10 種類が検出された．*(Z)*-3-hexen-1-ol acetate は市販紅茶，紅茶，緑茶，ビワ茶には全く含まれていなかったが，混合揉捻発酵茶とビワ発酵茶で検出された．*(E,E)*-2,4-heptadienal は，市販紅茶ダージリン，緑茶およびビワ茶では検出されなかったが，混合揉捻発酵茶，市販紅茶セイロン，紅茶およびビワ発酵茶に含まれていた．Linalool oxide（Ⅰ）および linalool は，原料の緑茶やビワ茶には全く含まれていないか少量含まれているだけであったが，混合揉捻発酵茶でより多く含まれていた．しかし，その量は市販紅茶および紅茶より少なかった．Benzaldehyde および benzylalcohol は混合揉捻発酵茶で市販紅茶，紅茶，緑茶，ビワ茶およびビワ発酵茶より多かった．Geraniol と phenylethyl alcohol は混合揉捻発酵茶で緑茶，ビワ茶およびビワ発酵茶より多く検出されたが，その量はダージリンとセイロンの間であった．Geraniol は混合揉捻発酵茶で多く含まれていた．β-ionone は混合揉捻発酵茶で緑茶，ビワ茶およびビワ発酵茶より多く，市販紅茶および紅茶より少なかった．混合揉捻発酵茶に含まれる nerolidol は，benzaldehyde や benzylalcohol と同様に緑茶，ビワ茶およびビワ発酵茶より多く，さらに市販紅茶や紅茶よりも多かった．混合揉捻発酵茶では *(Z)*-3-hexen-1-ol acetate，benzaldehyde，benzylalcohol および nerolidol が市販紅茶，紅茶，緑茶およびビワ茶より多く含まれていた.

表3-1-1. 混合揉捻発酵茶、市販紅茶、緑茶、緑茶発酵茶、ビワ茶およびビワ発酵茶に含まれる香気成分の内部標準に対するピーク面積比

香気成分	混合揉捻発酵茶	市販紅茶（ダージリン）	市販紅茶（セイロン）	緑茶	紅茶 [a)]（緑茶発酵茶）	ビワ茶 [b)]	ビワ発酵茶 [c)]
(Z)-3-hexen-1-ol acetate	0.33 ± 0.04	ND	ND	ND	ND	ND	1.33 ± 0.16
(E,E)-2,4-heptadienal	0.51 ± 0.04	ND	1.41 ± 0.18	ND	0.40 ± 0.11	ND	1.09 ± 0.10
linalool oxide(I)	0.45 ± 0.03	2.23 ± 0.22	0.95 ± 0.08	ND	0.78 ± 0.09	ND	ND
linalool	1.78 ± 0.14	6.40 ± 1.36	2.91 ± 0.25	0.18 ± 0.05	2.40 ± 0.30	0.22 ± 0.01	0.08 ± 0.00
benzaldehyde	1.47 ± 0.13	1.30 ± 0.14	0.83 ± 0.13	0.33 ± 0.00	0.45 ± 0.07	0.12 ± 0.03	0.69 ± 0.01
benzylalcohol	0.78 ± 0.10	0.49 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.16 ± 0.02	ND	0.11 ± 0.00
geraniol	3.71 ± 0.45	14.80 ± 2.01	2.07 ± 0.21	0.45 ± 0.01	3.05 ± 0.56	ND	ND
phenylethyl alcohol	1.18 ± 0.24	1.82 ± 0.23	0.37 ± 0.05	ND	0.97 ± 0.15	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00
β-ionone	0.53 ± 0.11	1.40 ± 0.18	0.84 ± 0.09	0.07 ± 0.00	0.67 ± 0.07	0.08 ± 0.00	0.29 ± 0.02
nerolidol	1.19 ± 0.14	0.24 ± 0.09	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.06 ± 0.00	0.12 ± 0.01

平均値 ± 標準偏差（n=3）

内部標準（1%シクロヘキサノール50 µL）に対する相対ピーク面積比

ND：not detected

a)混合揉捻発酵茶と同じ茶葉を用いて当試験場で製造した紅茶

b)ビワ葉を揉捻せず、直接熱風によって乾燥させたビワ葉から熱水抽出したビワ茶

c)ビワ葉を揉捻、発酵させたビワ葉から熱水抽出したビワ発酵茶

4. 考察

緑茶製造では，茶葉を蒸熱処理するので茶葉中の香気成分の多くが揮散することから，香気含量は著しく減少する[62]．一方，紅茶製造においては蒸熱処理を施さないことから香気成分は揮散せず，萎凋，揉捻，発酵を行うことで香気成分の生成が促進されるので，それらの含量は多い．本研究においても，混合揉捻発酵茶や紅茶で緑茶に比べ多くの香気成分が含まれていた．

混合揉捻発酵茶には市販紅茶，紅茶，緑茶およびビワ茶に含まれない(*Z*)-3-hexen-1-ol acetate が検出された．一般に，(*Z*)-3-hexen-1-ol acetate などのエステル化合物は果実や花様の芳香を呈する[63]ことから，フルーティな香りに寄与していると推察される．(*Z*)-3-hexen-1-ol acetate は，茶葉のみを揉捻，発酵させる市販紅茶には検出されず，ビワ茶にも検出されなかったが，ビワ発酵茶で確認されたことから，混合揉捻発酵茶に含まれる(*Z*)-3-hexen-1-ol acetate はビワ葉の揉捻，発酵に由来するとみなされ，混合揉捻発酵茶の香りを決定づける重要な成分の一つである可能性がある．

市販紅茶には，花様の香りである linalool oxide（Ⅰ），linalool，geraniol，phenylethylalcohol，benzaldehyde, benzylalcohol ならびにβ-ionone が検出されたが，混合揉捻発酵茶においてもこれら香気成分が確認された．Linalool oxide（Ⅰ）および linalool は，原料の緑茶やビワ茶には含まれていないか少量含まれているだけであったが，混合揉捻発酵茶で原料より多く検出された．市販紅茶にも含まれていたことから，これら成分は茶葉の発酵により生成されたと考えられる．混合揉捻発酵茶に含まれる量は市販紅茶より少なかったが，その理由は不明である．Geraniol と phenylethyl alcohol は混合揉捻発酵茶で緑茶，ビワ茶およびビワ発酵茶より多く検出されたが，その量はダージリンとセイロンの間であった．一般に発酵茶に比較的多く認められる linalool や geraniol などのアルコール系香気成分は，茶葉に存在するβ-グリコシダーゼが同じく茶葉に存在するアルコール系の物質に作用して生成されることが知られている[41, 64]．本実験において，ビワ葉のみを発酵させたビワ発酵茶でこれら成分はほとんど検出されず，紅茶葉と同様に茶葉を揉捻，発酵させた混合揉捻発酵茶で緑茶より増加していることから，これら香気成分は主に三番茶葉の揉捻，発酵により生成されたものと推察される．甘い花様の香りを有する geraniol は混合揉捻発酵茶中に最も多く含まれていた．ビワ茶およびビワ発酵茶には存在せず，市販紅茶にも多く存在することから，主に茶葉の揉捻，発酵に由来し，混合揉捻発酵茶の香りに寄与している可能性がある．

ビワ葉にはアミグダリンが含まれており，アミグダリンはβ-グリコシダーゼの作用により benzaldehyde に変化する[65]．ビワ葉のみを揉捻，発酵させたビワ発酵茶に含まれる benzaldehyde のピーク面積比は，ビワ茶より約 6 倍高かったことから，ビワ葉にも茶葉と同様にβ-グリコシダーゼが存在している可能性がある．混合揉捻発酵茶葉製造に使用されるビワ葉の添加量は全量の 10%であるので，ビワ葉のみの発酵だけで混合揉捻発酵茶が含有する benzaldehyde の量に及ぼす影響は少ないと考えられる．しかし，茶葉を添加することでβ-グリコシダーゼの酵素活性が高まり，アミグダリンから benzaldehyde に転換する量が増加し，市販紅茶および紅茶よりも多くの benzaldehyde が生成したと推察される．さらに，混合揉捻発酵茶に含まれる benzaldehyde のピーク面積比は，同じ三番茶葉を用いた紅茶よりも約 3 倍高い．混合揉捻発酵茶葉製造に添加されるビワ葉は全重量の 10%であり，ビワ葉に含まれるアミグダリンだけで顕著に増加したとは考えにくいことから，茶葉中に含まれる benzaldehyde の前駆体であるプルナシンがビワ葉に含まれるβ-グリコシダーゼの作用により紅茶よりも多く生成した可能性も考えられる．しかし，その作用メカニズムについては明らかにすることができず，今後，さらなる検討が必要である．Benzaldehyde は還元されて benzylalcohol を生成する[65]ので，市販紅茶および紅茶に比べ，混合揉捻発酵茶で benzylalcohol が多く含まれていたと推察される．Benzaldehyde および benzylalcohol はフルーティさと花様の香りを有するが，混合揉捻発酵茶で市販紅茶，紅茶，緑茶およびビワ茶よりこれら成分が多く含まれ，混合揉捻発酵茶の香気成分の中でも比較的含量が高かったことから，これら香気成分が混合揉捻発酵茶の香り特性に寄与していると考えられる．

Tokimoto ら[60]は nerolidol がウーロン茶様の香りに寄与する主要な香気成分であると報告している．Nerolidol は混合揉捻発酵茶にダージリンの約 5 倍，セイロンの約 17 倍，緑茶の約 10 倍含まれることか

ら，本成分が混合揉捻発酵茶のウーロン茶様の香りを特徴づけるもう一つの重要な成分であると推察される．Nerolidol は緑茶葉の揉捻，発酵により生成される[66, 67]ので市販紅茶にも存在するが，混合揉捻発酵茶で多く含まれていたことから，萎凋した茶葉にビワ葉を添加し揉捻，発酵させることで多く生成された可能性がある．つまり，ビワ葉には nerolidol の前駆体である配糖体が存在し[68]，この配糖体が茶葉とビワ葉に存在するβ-グリコシダーゼと反応する[41]ことによって多く生成したと推察される．

以上の結果から，混合揉捻発酵茶の香気成分は，茶葉の揉捻，発酵に由来するだけでなく，ビワ葉の添加および茶葉とビワ葉の混合揉捻，発酵に由来することが明らかになった．

5. 要約

三番茶葉とビワ葉を混合揉捻して発酵させた混合揉捻発酵茶の香り特性について検討した．混合揉捻発酵茶には，ビワ葉の揉捻，発酵に由来すると推察される(*Z*)-3-hexen-1-ol acetate，茶葉とビワ葉の混合揉捻，発酵により生成される benzaldehyde，benzylalcohol および nerolidol，茶葉の揉捻，発酵に由来し混合揉捻発酵茶の中で最も高い含量の geraniol が主要香気成分として検出された．混合揉捻発酵茶の香りは，茶葉の揉捻，発酵だけでなく，ビワ葉添加および茶葉とビワ葉の混合揉捻，発酵により特徴づけられることが明らかになった．

第 2 節　火入れによる混合揉捻発酵茶の香味向上

1. 緒言

火入れは茶の青臭い香りを消して香味を向上させることに加え，乾燥させて長期間貯蔵できるようにする重要な茶葉の仕上げ工程である．緑茶葉の火入れは製茶乾燥させた茶葉（荒茶）を茶の品質によっても異なるが 80～140℃で行う[69]．紅茶葉の火入れは荒茶を 120℃前後で行う[70]．火入れにより，茶葉中の糖とアミノ酸が加熱反応して香ばしい香り（火入れ香）を有する揮発性の加熱香気成分である pyrazine や pyrrole 類化合物が生成する[71, 72]．本節では，火入れ温度や火入れ時間の違いが混合揉捻発酵茶の芳香および加熱香気成分に及ぼす影響を検討し，香味が優れる最適な火入れ条件を明らかにすることを目的とした．

2. 実験方法

1. 材料および方法

緑茶の供試品種は「やぶきた」で 2008 年 8 月 2 日に摘採した三番茶葉を用いた．一方，ビワの品種は「涼風」2008 年 7 月にビワの 2 年生夏葉（古葉）を摘採し，混合揉捻発酵茶葉を製造するまで冷蔵保管した．製造方法は，第 2 章第 1 節にしたがって混合揉捻発酵茶葉を製造した．すなわち，蒸していない茶葉のみを粗揉機（60k 型，カワサキ機工（株），静岡）に 27 kg 投入し，茶温を 40℃以下に保ちながら 20 分間萎凋を行い，茶葉含水率 55%w.b.程度で取出した．次いで，揉捻機（60k-A，カワサキ機工（株），静岡）に 3 kg のビワ葉を添加し，萎凋した茶葉と一緒に 20 分間揉み込み，最後に自動乾燥機（120k－2，カワサキ機工（株），静岡）内で 100℃，30 分間の熱風処理を行い，茶葉の発酵停止と乾燥処理（湿量基準含水率として 5%程度）を行った．火入れを行うまで窒素充填は行わず冷蔵保管した．火入れには透気式乾燥機（50k 型 4 段型，カワサキ機工（株），静岡）を用いた．実験の混合揉捻発酵茶葉は三番茶葉を使用していることから下級茶葉と同等レベルとみなし，下級茶葉の火入れ条件が温度 130℃で 30 分程度である[71]ことから，火入れ温度を 110，120 および 130℃，火入れ時間を 60 分間とし，火入れ開始 20 分後より 10 分毎に火入れした茶葉を約 200 g 採取し，測定まで窒素充填し冷蔵保存した．

2. 茶温の経時変化

サーモレコーダー（TR81，（株）ティアンドディ社，東京）の温度計測部を茶葉の間に差し込み，1 分間隔で 60 分間茶温を測定した．

3. 芳香成分分析

本章第一節の方法に準じて分析を行った．

4. 加熱香気成分分析

加熱香気成分分析のための試料の調製については芳香香気成分分析の方法に準じて，内部標準として 100 ppm 2-acethylpyrazine を 10 μL 加えた．火入れ処理によって生成する加熱香気成分 pyrazine および pyrrole 類の分析には水素炎熱イオン化検出器（FTD）GC により測定した．GC（GC-2010，（株）島津製作

所, 京都）の分析条件については, カラムはTC-WAX（GL Sciences 社, 米国）60 m×0.25 mm, 膜厚 0.25 μm を使用し, カラム温度は 80℃に 3 分間保持後, 240℃まで 2℃/分で昇温し，その後 240℃で 10 分間保持した．注入口温度は 250℃，ヘリウム圧力は 120 kPa とした．香気成分の同定には標品との保持時間およびマススペクトルの一致により行い，標品のない成分の同定には GC-MS（GC-QP2010,（株）島津製作所,京都）を用いた．加熱香気成分の分析については，3 回繰り返し，内部標準に対する相対ピーク面積比を求めた．また，比較対照サンプルとして，長崎県農林技術開発センター茶業研究室で製造した緑茶一番茶葉を透気式乾燥機により，香味が優れるように火入れを行った緑茶についても同様の分析を行った．その時の火入れ条件は火入れ温度 110℃で火入れ時間 40 分間であった．

5.　官能検査

官能検査については茶品評会審査員の経験がある 4 名にて行った．緑茶葉の検査法 [37]を一部改変した緑茶審査専用の米国式茶碗に混合揉捻発酵茶葉を正確に 2 g 採取し，熱湯 180 mL を加え直ちに香りの官能検査を行った．評価は審査員 4 名の合議制により行った．香りの火入れ度判定基準については，火入れ香「著しく不足」，「かなり不足」，「少し不足」，「わずかに不足」，「良好」，「わずかに過度」，「少し過度」，「かなり過度」および「著しく過度」に基づいて行った．

3.　実験結果

1.　火入れ温度の違いによる茶温の経時変化

透気式乾燥機を用いた火入れ温度の違いによる茶温の経時変化を図 3-2-1 に示す．火入れ温度 110℃における茶温の経時変化は，投入開始 10 分後には約 100℃に達し，その後 100℃前後で推移した．120℃では，10 分後には約 110℃に達し，その後 110℃前後で推移した．130℃では，10 分後には 120℃近くに達し，その後 120℃近くで推移した．以上のように，透気式乾燥機を用いた場合，茶温は火入れ温度に比べ約 10℃低い温度で一定となった．

2.　火入れ条件の違いによる混合揉捻発酵茶の芳香成分のピーク面積比

火入れ温度と火入れ時間の違いによる混合揉捻発酵茶の芳香成分のピーク面積比を表 3-2-1 に示す. 検出された多くの成分でピーク面積比は，火入れ温度および火入れ時間との間に特徴的な関連は認められなかった．しかし，(*E,E*)-2,4-heptadienal は火入れ温度が高く，火入れ時間が長くなるにしたがって減少する傾向にあり，火入れ温度 120℃では火入れ時間 30 分以上で，130℃では 20 分以上で半分程度まで減少した．

3.　火入れ条件の違いによる混合揉捻発酵茶の加熱香気成分のピーク面積比

火入れ温度と火入れ時間の違いによる混合揉捻発酵茶の加熱香気成分のピーク面積比を表3-2-2に示す．1-ethylpyrrole-2-aldehyde, 1-ethyl-2-acethylpyrroleおよび 1-ethyl-5-methylpyrrole-2-aldehyde は荒茶においても検出された．検出された全ての成分で火入れ温度が高く，火入れ時間が長くなるにしたがって加熱香気成分のピーク面積比は高くなる傾向が認められたが，120および130℃で火入れした時には，50分頃までは生成量は急激に上昇したが，その後，多くの成分で一定となった．

4.　官能検査結果

火入れ温度と火入れ時間の違いによる混合揉捻発酵茶の官能検査結果を表 3-2-3 に示す．火入れ温度 110℃では 30, 40 分の火入れ時間で，120℃と 130℃では 20 分の火入れ時間で「良好」の評価であった．火入れ温度が高く，火入れ時間が長くなるにしたがい火入れ香が過度となった．

5.　緑茶一番茶と混合揉捻発酵茶の加熱香気成分の比較検討

混合揉捻発酵茶の最適な火入れ条件を明らかにするため官能検査結果において「わずかに不足」,「良好」および「わずかに過度」の評価であった混合揉捻発酵茶と緑茶一番茶の加熱香気成分のピーク面積比を表 3-2-4 に示す．「わずかに不足」の評価であった火入れ温度 110℃, 火入れ時間 20 分の混合揉捻発酵茶では，緑茶一番茶と比較して相対ピーク面積比が同程度以上であったピークは 2 成分であり，ピーク面積比合計値は半分程度であった．「良好」の評価であった火入れ条件 110℃，30, 40 分，120℃, 20 分および 130℃，20 分では，相対ピーク面積比が同程度以上であったピークはそれぞれ 5，8，3 および 8 成分であり，ピーク面積比合計値は火入れ条件 120℃，20 分において下回ったが，他の火入れ条件では 1.4～1.6 倍であった．また，「わずかに過度」の評価であった火入れ条件 110℃, 50 分および 120℃,

30 分では，相対ピーク面積比が同程度以上であったピークはそれぞれ 9 および 10 成分であり，ピーク面積比合計値は 2 倍弱であった．火入れ条件 120℃，40 分および 130℃，30 分の混合揉捻発酵茶では，相対ピーク面積比が同程度以上であったピークは，ともに 12 成分あり，ピーク面積比合計値は 120℃，40 分では 5 倍近く，130℃，30 分では 3 倍弱と高値であった．

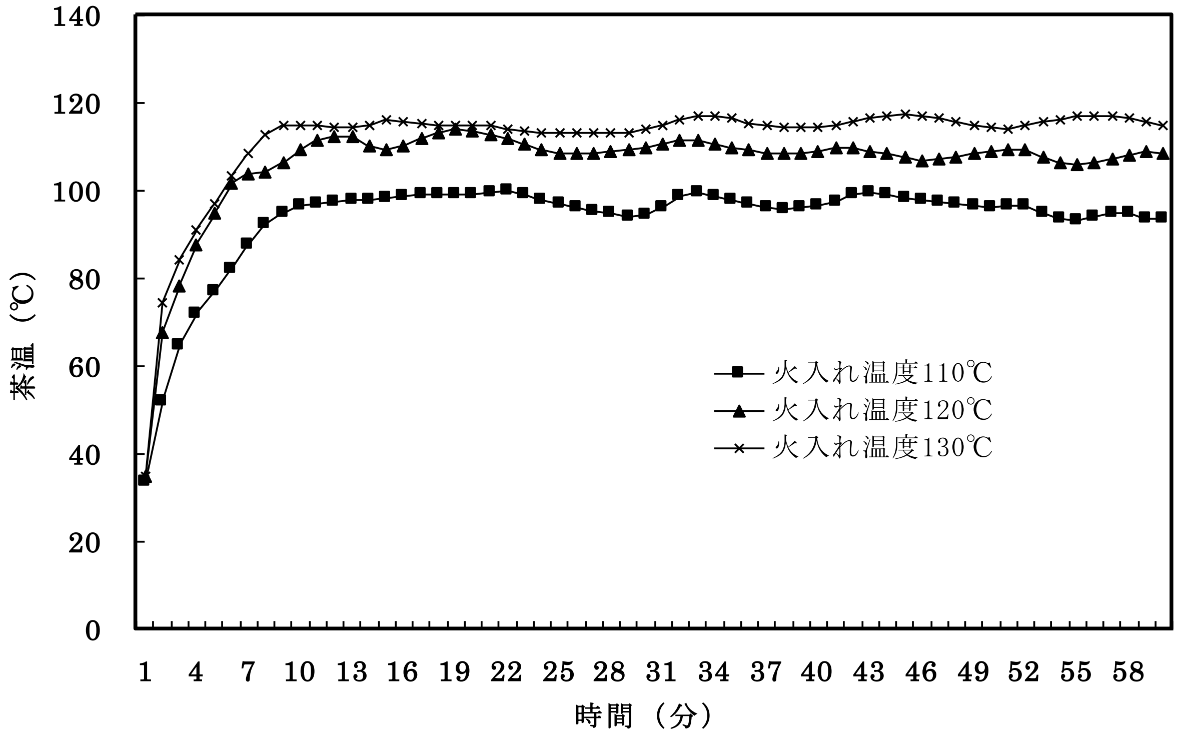


図 3-2-1. 混合揉捻発酵茶葉の火入れ温度の違いによる茶温の経時変化

表 3-2-1. 火入れ温度と火入れ時間の違いにおける混合揉捻発酵茶の芳香成分のピーク面積比

芳香香気成分	火入れ温度	荒茶 a)	20分	30分	40分	50分	60分
(Z)-3-hexen-1-ol acetate	110℃	0.33 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.32 ± 0.05	0.38 ± 0.02
	120℃	0.33 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.00	0.36 ± 0.01
	130℃	0.33 ± 0.04	0.34 ± 0.09	0.37 ± 0.06	0.35 ± 0.07	0.38 ± 0.02	0.33 ± 0.09
(E,E)-2,4-heptadienal	110℃	0.51 ± 0.04	0.45 ± 0.09	0.49 ± 0.14	0.40 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.39 ± 0.09
	120℃	0.51 ± 0.04	0.46 ± 0.05	0.25 ± 0.01	0.11 ± 0.07	0.24 ± 0.07	0.25 ± 0.06
	130℃	0.51 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.18 ± 0.03
linalool oxide(Ⅰ)	110℃	0.45 ± 0.03	0.39 ± 0.06	0.45 ± 0.04	0.42 ± 0.08	0.46 ± 0.08	0.38 ± 0.08
	120℃	0.45 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.40 ± 0.05
	130℃	0.45 ± 0.03	0.39 ± 0.06	0.44 ± 0.03	0.50 ± 0.14	0.52 ± 0.14	0.46 ± 0.09
linalool	110℃	1.78 ± 0.14	1.62 ± 0.30	1.86 ± 0.09	1.71 ± 0.32	1.70 ± 0.32	1.58 ± 0.22
	120℃	1.78 ± 0.14	1.61 ± 0.11	1.69 ± 0.17	1.55 ± 0.14	1.42 ± 0.14	1.53 ± 0.31
	130℃	1.78 ± 0.14	1.66 ± 0.24	1.81 ± 0.15	1.90 ± 0.16	1.64 ± 0.16	1.70 ± 0.17
benzalehyde	110℃	1.47 ± 0.13	1.52 ± 0.15	1.80 ± 0.29	1.64 ± 0.18	1.72 ± 0.18	1.74 ± 0.27
	120℃	1.47 ± 0.13	1.49 ± 0.16	1.66 ± 0.22	1.64 ± 0.13	1.62 ± 0.13	1.48 ± 0.26
	130℃	1.47 ± 0.13	1.34 ± 0.24	1.49 ± 0.17	1.45 ± 0.13	1.38 ± 0.13	1.60 ± 0.37
benzylalcohol	110℃	0.78 ± 0.10	0.66 ± 0.08	0.79 ± 0.14	0.73 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.84 ± 0.19
	120℃	0.78 ± 0.10	0.70 ± 0.13	0.86 ± 0.18	0.88 ± 0.06	0.87 ± 0.06	0.88 ± 0.03
	130℃	0.78 ± 0.10	0.78 ± 0.16	0.81 ± 0.05	0.76 ± 0.14	0.77 ± 0.14	0.96 ± 0.18
geraniol	110℃	3.71 ± 0.45	3.59 ± 0.72	4.11 ± 0.19	3.82 ± 0.39	4.29 ± 0.39	4.02 ± 0.42
	120℃	3.71 ± 0.45	3.49 ± 0.77	3.86 ± 0.52	3.98 ± 0.30	3.21 ± 0.33	3.76 ± 0.31
	130℃	3.71 ± 0.45	3.53 ± 0.43	3.89 ± 0.39	3.62 ± 0.41	4.18 ± 0.41	3.48 ± 0.36
phenylethyl alcohol	110℃	1.18 ± 0.24	1.21 ± 0.18	1.41 ± 0.27	1.34 ± 0.10	1.51 ± 0.10	1.50 ± 0.22
	120℃	1.18 ± 0.24	1.22 ± 0.25	1.51 ± 0.22	1.56 ± 0.07	1.45 ± 0.07	1.50 ± 0.03
	130℃	1.18 ± 0.24	1.15 ± 0.29	1.27 ± 0.15	1.16 ± 0.13	1.07 ± 0.13	1.39 ± 0.14
β-ionone	110℃	0.53 ± 0.11	0.53 ± 0.13	0.66 ± 0.19	0.60 ± 0.12	0.65 ± 0.12	0.70 ± 0.15
	120℃	0.53 ± 0.11	0.50 ± 0.16	0.64 ± 0.11	0.67 ± 0.09	0.65 ± 0.09	0.63 ± 0.05
	130℃	0.53 ± 0.11	0.50 ± 0.05	0.47 ± 0.12	0.49 ± 0.58	0.59 ± 0.04	0.58 ± 0.11
neroridol	110℃	1.19 ± 0.14	0.91 ± 0.35	1.06 ± 0.23	1.30 ± 1.04	1.37 ± 0.26	1.04 ± 0.14
	120℃	1.19 ± 0.14	1.00 ± 0.38	0.97 ± 0.23	1.11 ± 0.17	0.95 ± 0.17	1.28 ± 0.23
	130℃	1.19 ± 0.14	1.06 ± 0.29	1.16 ± 0.19	0.90 ± 0.18	1.08 ± 0.18	1.04 ± 0.26

平均値±標準偏差（n=3）
内部標準（1%シクロヘキサノール50 µL）に対する相対ピーク面積比
a)火入れ前の香気成分相対ピーク面積比

表 3-2-2. 火入れ温度と火入れ時間の違いにおける混合揉捻発酵茶の加熱香気成分のピーク面積比

加熱香気成分	火入れ温度	荒茶[a)]	20分	30分	40分	50分	60分
1-ethylpyrrole	110℃	ND	0.11 ± 0.03	1.40 ± 0.46	1.50 ± 0.23	2.73 ± 0.74	3.46 ± 0.88
	120℃	ND	0.71 ± 0.21	3.51 ± 0.54	6.39 ± 0.87	8.92 ± 1.09	8.94 ± 1.76
	130℃	ND	2.14 ± 0.73	5.38 ± 0.73	9.52 ± 1.09	9.60 ± 0.98	11.74 ± 1.39
2-methylpyrazine	110℃	ND	0.03 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.58 ± 0.11	1.08 ± 0.20	1.47 ± 0.30
	120℃	ND	ND	1.95 ± 0.18	3.79 ± 0.65	4.71 ± 0.56	4.89 ± 0.94
	130℃	ND	0.55 ± 0.20	3.39 ± 0.62	4.72 ± 0.23	8.65 ± 0.70	8.68 ± 1.55
2,5-dimethylpyrazine	110℃	ND	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.00
	120℃	ND	0.01 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.58 ± 0.13	0.79 ± 0.17	0.99 ± 0.19
	130℃	ND	0.05 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.92 ± 0.16	1.76 ± 0.19	1.59 ± 0.15
2,6-dimethylpyrazine	110℃	ND	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.00
	120℃	ND	0.01 ± 0.01	0.44 ± 0.03	0.88 ± 0.22	0.98 ± 0.12	1.31 ± 0.18
	130℃	ND	0.07 ± 0.01	0.56 ± 0.09	1.20 ± 0.22	1.93 ± 0.13	1.89 ± 0.26
2-ethylpyrazine	110℃	ND	0.03 ± 0.00	0.33 ± 0.12	0.67 ± 0.15	1.03 ± 0.18	1.09 ± 0.17
	120℃	ND	0.07 ± 0.01	1.65 ± 0.22	3.22 ± 0.58	3.38 ± 0.37	4.30 ± 0.44
	130℃	ND	0.51 ± 0.01	2.07 ±	3.59 ± 0.45	5.76 ± 0.17	6.01 ± 1.08
2,3-dimethylpyrazine	110℃	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	120℃	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	130℃	ND	ND	0.10 ± 0.00	0.30 ± 0.06	0.52 ± 0.07	0.18 ± 0.01
2-ethyl-6-methylpyrazine	110℃	ND	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
	120℃	ND	0.01 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.64 ± 0.15	0.82 ± 0.10	0.84 ± 0.14
	130℃	ND	0.14 ± 0.01	0.42 ± 0.08	0.86 ± 0.14	1.14 ± 0.11	1.10 ± 0.15
2-ethyl-5-methylpyrazine	110℃	ND	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
	120℃	ND	ND	0.09 ± 0.00	0.70 ± 0.13	1.04 ± 0.13	1.25 ± 0.29
	130℃	ND	0.05 ± 0.01	0.61 ± 0.11	1.28 ± 0.18	2.04 ± 0.23	1.88 ± 0.07
2-ethyl-3-methylpyrazine	110℃	ND	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
	120℃	ND	ND	0.06 ± 0.00	0.36 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.55 ± 0.06
	130℃	ND	0.03 ± 0.00	0.26 ± 0.05	0.54 ± 0.09	0.84 ± 0.15	0.72 ± 0.03
2,3-dihydrobenzofuran	110℃	ND	0.02 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.06	0.36 ± 0.05
	120℃	ND	0.03 ± 0.00	0.30 ± 0.07	0.59 ± 0.12	0.65 ± 0.21	0.80 ± 0.10
	130℃	ND	0.10 ± 0.01	0.43 ± 0.13	0.58 ± 0.17	1.01 ± 0.13	1.07 ± 0.14
1-ethylpyrrole-2-aldehyde	110℃	1.01 ± 0.17	5.23 ± 0.65	12.36 ± 0.65	12.55 ± 1.92	18.35 ± 1.42	20.45 ± 5.94
	120℃	1.01 ± 0.17	6.58 ± 0.70	14.40 ± 2.17	27.91 ± 3.42	29.80 ± 3.90	25.61 ± 5.62
	130℃	1.01 ± 0.17	12.10 ± 2.42	20.16 ± 3.71	26.98 ± 5.58	29.22 ± 3.86	28.55 ± 3.65
1-ethyl-2-acethylpyrrole	110℃	0.13 ± 0.01	0.26 ± 0.09	0.69 ± 0.18	0.76 ± 0.04	1.15 ± 0.08	1.21 ± 0.28
	120℃	0.13 ± 0.01	0.56 ± 0.13	1.11 ± 0.23	2.19 ± 0.24	2.79 ± 0.58	3.07 ± 0.64
	130℃	0.13 ± 0.01	0.72 ± 0.20	1.90 ± 0.44	3.42 ± 0.37	4.82 ± 0.76	4.49 ± 0.86
1-ethyl-5-methylpyrrole-2-aldehyde	110℃	0.03 ± 0.00	0.32 ± 0.09	0.89 ± 0.10	1.07 ± 0.20	1.78 ± 0.16	1.78 ± 0.30
	120℃	0.03 ± 0.00	0.45 ± 0.07	1.40 ± 0.33	2.83 ± 0.48	3.37 ± 0.40	3.51 ± 0.41
	130℃	0.03 ± 0.00	0.94 ± 0.18	2.55 ± 0.62	3.81 ± 0.26	5.61 ± 0.88	4.98 ± 0.36

平均値 ± 標準偏差（n=3）
内部標準（100 ppm 2-acethylpyrazine）に対する相対ピーク面積比
ND：not detected
a)火入れ前の香気成分相対ピーク面積比

表 3-2-3. 火入れ温度と火入れ時間の違いにおける混合揉捻発酵茶の官能検査結果

処　理	火入れ香 a)
110℃-20分	わずかに不足
110℃-30分	良好
110℃-40分	良好
110℃-50分	わずかに過度
110℃-60分	わずかに過度
120℃-20分	良好
120℃-30分	わずかに過度
120℃-40分	少し過度
120℃-50分	少し過度
120℃-60分	かなり過度
130℃-20分	良好
130℃-30分	少し過度
130℃-40分	かなり過度
130℃-50分	著しく過度
130℃-60分	著しく過度

a) 荒茶との比較

香りの火入れ度判定基準

相対評価尺度
火入れ香味著しく不足
火入れ香味かなり不足
火入れ香味少し不足
火入れ香味わずかに不足
火入れ香味良好
火入れ香味わずかに過度
火入れ香味少し過度
火入れ香味かなり過度
火入れ香味著しく過度

表 3-2-4. 緑茶一番茶と混合揉捻発酵茶の加熱香気成分のピーク面積比

	緑茶 a)	混合揉捻発酵茶 110℃				
加熱香気成分	一番茶	20分	30分	40分	50分	60分
1-ethylpyrrole	0.87 ± 0.05	0.11 ± 0.03	1.40 ± 0.46	1.50 ± 0.23	2.73 ± 0.74	3.46 ± 0.88
2-methylpyrazine	0.42 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.19 ± 0.04	0.58 ± 0.11	1.08 ± 0.20	1.47 ± 0.30
2,5-dimethylpyrazine	0.98 ± 0.09	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.00
2,6-dimethylpyrazine	0.32 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.00
2-ethylpyrazine	0.77 ± 0.14	0.03 ± 0.00	0.33 ± 0.12	0.67 ± 0.15	1.03 ± 0.18	1.09 ± 0.17
2,3-dimethylpyrazine	0.02 ± 0.00	ND b)	ND b)	ND b)	ND b)	ND b)
2-ethyl-6-methylpyrazine	0.08 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02
2-ethyl-5-methylpyrazine	0.50 ± 0.07	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
2-ethyl-3-methylpyrazine	0.15 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
2,3-dihydrobenzofuran	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.06	0.36 ± 0.05
1-ethylpyrrole-2-aldehyde	5.67 ± 1.19	5.23 ± 0.65	12.36 ± 0.65	12.55 ± 1.92	18.35 ± 1.42	20.45 ± 5.94
1-ethyl-2-acethylpyrrole	0.72 ± 0.14	0.26 ± 0.09	0.69 ± 0.18	0.76 ± 0.04	1.15 ± 0.08	1.21 ± 0.28
1-ethyl-5-methylpyrrole-2-aldehyde	0.61 ± 0.10	0.32 ± 0.09	0.89 ± 0.10	1.07 ± 0.20	1.78 ± 0.16	1.78 ± 0.30
ピーク面積比合計値	11.13 ± 1.10	6.05 ± 0.73	16.00 ± 1.8	17.60 ± 1.0	26.80 ± 3.1	30.21 ± 4.3
緑茶一番茶と比較して相対 ピーク面積比が同量以上の成分数		2	5	8	9	9

平均値 ± 標準偏差（n=3）

内部標準（100 ppm 2-acethylpyrazine）に対する相対ピーク面積比

ND：not detected

a) 緑茶一番茶を用い香味が優れるように火入れを行った（火入れ温度110℃、火入れ時間40分）

b) ピーク面積比が緑茶一番茶で0.02、混合揉捻発酵茶でNDであるが、差はないとみなした

次ページに続く

加熱香気成分	緑茶 a) 一番茶	混合揉捻発酵茶120℃ 20分	30分	40分	50分	60分
1-ethylpyrrole	0.87 ± 0.05	0.71 ± 0.21	3.51 ± 0.54	6.39 ± 0.87	8.92 ± 2.09	8.94 ± 1.76
2-methylpyrazine	0.42 ± 0.02	ND b)	1.95 ± 0.18	3.79 ± 0.65	4.71 ± 0.56	4.89 ± 0.94
2,5-dimethylpyrazine	0.98 ± 0.09	0.01 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.58 ± 0.13	0.79 ± 0.17	0.99 ± 0.19
2,6-dimethylpyrazine	0.32 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.44 ± 0.03	0.88 ± 0.22	0.98 ± 0.12	1.31 ± 0.18
2-ethylpyrazine	0.77 ± 0.14	0.07 ± 0.01	1.65 ± 0.18	3.22 ± 0.58	3.38 ± 0.37	4.30 ± 0.44
2,3-dimethylpyrazine	0.02 ± 0.00	ND b)	ND b)	ND b)	ND b)	ND b)
2-ethyl-6-methylpyrazine	0.08 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.64 ± 0.15	0.82 ± 0.10	0.84 ± 0.14
2-ethyl-5-methylpyrazine	0.50 ± 0.07	ND b)	0.09 ± 0.00	0.70 ± 0.13	1.04 ± 0.13	1.25 ± 0.29
2-ethyl-3-methylpyrazine	0.15 ± 0.01	ND b)	0.06 ± 0.00	0.36 ± 0.07	0.51 ± 0.07	0.55 ± 0.06
2,3-dihydrobenzofuran	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.30 ± 0.07	0.59 ± 0.12	0.65 ± 0.21	0.80 ± 0.10
1-ethylpyrrole-2-aldehyde	5.67 ± 1.19	6.58 ± 0.70	14.40 ± 2.17	27.90 ± 3.42	29.80 ± 3.90	25.61 ± 5.62
1-ethyl-2-acethylpyrrole	0.72 ± 0.14	0.56 ± 0.13	1.11 ± 0.23	2.19 ± 0.24	2.79 ± 0.58	3.07 ± 0.64
1-ethyl-5-methylpyrrole-2-aldehyde	0.61 ± 0.10	0.45 ± 0.07	1.40 ± 0.33	2.83 ± 0.48	3.37 ± 0.40	3.51 ± 0.41
ピーク面積比合計値	11.13 ± 1.10	8.43 ± 0.98	25.18 ± 2.9	50.07 ± 6.6	57.76 ± 7.5	56.06 ± 6.8
緑茶一番茶と比較して相対 ピーク面積比が同量以上の成分数		2	10	12	12	13

平均値 ± 標準偏差（n=3）

内部標準（100 ppm 2-acethylpyrazine）に対する相対ピーク面積比

ND：not detected

a) 緑茶一番茶を用い香味が優れるように火入れを行った（火入れ温度110℃、火入れ時間40分）

b) ピーク面積比が緑茶一番茶で0.02、混合揉捻発酵茶でNDであるが、差はないとみなした

次ページに続く

加熱香気成分	緑茶 [a] 一番茶	混合揉捻発酵茶130℃ 20分	30分	40分	50分	60分
1-ethylpyrrole	0.87 ± 0.05	2.14 ± 0.46	5.38 ± 0.73	9.52 ± 1.09	9.60 ± 2.09	11.70 ± 1.39
2-methylpyrazine	0.42 ± 0.02	0.55 ± 0.20	3.39 ± 0.62	4.72 ± 0.23	8.65 ± 0.98	8.68 ± 1.55
2,5-dimethylpyrazine	0.98 ± 0.09	0.05 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.92 ± 0.16	1.76 ± 0.70	1.59 ± 0.15
2,6-dimethylpyrazine	0.32 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.56 ± 0.09	1.20 ± 0.22	1.93 ± 0.19	1.89 ± 0.26
2-ethylpyrazine	0.77 ± 0.14	0.51 ± 0.13	2.07 ± 0.22	3.59 ± 0.45	5.76 ± 0.13	6.01 ± 1.08
2,3-dimethylpyrazine	0.02 ± 0.00	ND [b]	0.10 ± 0.00	0.30 ± 0.06	0.52 ± 0.17	0.18 ± 0.01
2-ethyl-6-methylpyrazine	0.08 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.42 ± 0.08	0.86 ± 0.14	1.14 ± 0.07	1.10 ± 0.15
2-ethyl-5-methylpyrazine	0.50 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.61 ± 0.11	1.28 ± 0.18	2.04 ± 0.11	1.88 ± 0.07
2-ethyl-3-methylpyrazine	0.15 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.26 ± 0.00	0.54 ± 0.09	0.84 ± 0.23	0.72 ± 0.03
2,3-dihydrobenzofuran	0.02 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.43 ± 0.13	0.58 ± 0.17	1.01 ± 0.15	1.07 ± 0.14
1-ethylpyrrole-2-aldehyde	5.67 ± 1.19	12.10 ± 2.42	20.20 ± 3.71	27.00 ± 5.58	29.20 ± 0.13	28.60 ± 3.65
1-ethyl-2-acethylpyrrole	0.72 ± 0.14	0.72 ± 0.20	1.90 ± 0.44	3.42 ± 0.37	4.82 ± 3.86	4.49 ± 0.86
1-ethyl-5-methylpyrrole-2-aldehyde	0.61 ± 0.10	0.94 ± 0.18	2.55 ± 0.62	3.81 ± 0.26	5.61 ± 0.76	4.98 ± 0.36
ピーク面積比合計値	11.13 ± 1.10	17.40 ± 2.60	38.22 ± 4.8	57.74 ± 6.0	72.88 ± 5.8	72.89 ± 5.1
緑茶一番茶と比較して相対ピーク面積比が同量以上の成分数		8	12	12	13	13

平均値 ± 標準偏差（n=3）

内部標準（100 ppm 2-acethylpyrazine）に対する相対ピーク面積比

ND : not detected

a) 緑茶一番茶を用い香味が優れるように火入れを行った（火入れ温度110℃、火入れ時間40分）

b) ピーク面積比が緑茶一番茶で0.02、混合揉捻発酵茶でNDであるが、差はないとみなした

4. 考察

火入れ温度や火入れ時間の違いが混合揉捻発酵茶の香気成分および官能検査に及ぼす影響を解析することにより，香味が優れる混合揉捻発酵茶葉を製造するための火入れ条件を検討した．

萎凋した茶葉中のカテキンの大部分は揉捻，発酵の過程において酸化酵素ポリフェノールオキシダーゼの作用により,酸化重合してTF類やTR類に変わるため，苦渋味が緩和し，紅茶特有の味と浸出液の色が鮮やかな紅色を呈する．紅茶の香りは，アルコール香気前駆体やプルナシンなどがβ-グリコシダーゼと作用することでlinaloolやgeraniolなどのアルコール系，benzaldehydeなどのアルデヒド系の花様の香りによるものである．一方で，発酵中にアミノ酸からアルデヒドが生成する反応について，ポリフェノールオキシダーゼによりポリフェノールが酸化されるが，続いて，生成したキノンによるアミノ酸からの非酵素的な脱炭酸と脱アミノ反応でアルデヒドが生成される[66]．また，非酵素的反応によりアミノカルボニル反応や，ストレッカー分解により加熱香気成分pyrazine類およびアルデヒド類が生成される．

茶葉とビワ葉の揉捻，発酵によって生成した(*Z*)-3-hexen-1-olacetate，linalooloxide（Ⅰ），linalool，benzaldehyde，benzylalcohol，geraniol，phenylethyl alcohol，β-iononeおよびnerolidolの芳香成分の含量について検討したところ（表3-2-1），火入れ温度130℃以下で60分間火入れした場合，これら芳香成分の火入れによる明確な含量の違いは認められなかった.好ましくない香りとされる(*E,E*)-2,4-heptadienalはα-リノレン酸の自動酸化によって生成することが知られており[73]，α-リノレン酸は若い茶葉よりも硬化した茶葉に多く[74]，貯蔵中に生成する[75, 76]．しかし，火入れすることにより含量が減少する[76]．本研究において，好ましくない香りとされる(*E,E*）-2,4-heptadienalは火入れにより含量を減少できることが明らかとなり，それ以外の芳香成分は火入れによる影響を受けなかった．火入れによる(*E,E*）-2,4-heptadienalの減少メカニズムについて明らかではないものの，加熱によるストレッカー分解により減少した可能性がある．今後，*in vitro*による検討が必要であると考えられた．

混合揉捻発酵茶の加熱香気成分のピーク面積比は，火入れ温度が高く，火入れ時間が長くなるにつれて高くなる傾向にあり（表3-2-2），緑茶の火入れと同様の結果であった[70]．一般に，加熱香気成分の含量が増大すると香ばしい香りが強くなり，さらに含量が増大すると「こげ香」となり不快な香りとなる．本実験の官能検査結果において，火入れ温度が高く，火入れ時間が長くなるにしたがって火入れ香が強くなる（表3-2-3）のは，加熱香気成分量の増大（表3-2-2）によるものと推察される．また，同一火入れ温度では緑茶三番茶の2-methylpyrazineおよび2,5-dimethylpyrazineの生成は緑茶一番茶と比較して少ないことが知られている[77]が，2-methylpyrazineは混合揉捻発酵茶で多く，アミノカルボニル反応の副反応としてストレッカー分解により生成されたと考えられる．2,3-dimethylpyrazineは，火入れ温度110℃，120℃では検出されなかったことから，アミノカルボニル反応が促進されなかったと考えられるが，その原因については，今後，検討する必要がある．

混合揉捻発酵茶の最適な火入れ条件を明らかにするために，対照サンプルとして上級茶である緑茶一番茶を用いて香味が優れるように火入れ条件を検討したところ，火入れ温度110℃，火入れ時間40分が最適であった．火入れした緑茶一番茶と火入れ条件の異なる混合揉捻発酵茶の加熱香気成分含量および官能検査結果から最適な火入れ温度，火入れ時間について検討した．一般に下級茶である緑茶三番茶の火入れは130℃，30分程度行う[71]．三番茶葉は一番茶葉に比べ加熱香気成分が生成しにくいが，これは三番茶葉に加熱香気成分の前駆物質であるアミノ酸含量が少ない[72]ことが原因であると考えられる．したがって，下級茶葉の火入れ香を上げるためには火入れ温度を上級茶である一番茶葉より約10℃高くする[72]．緑茶一番茶と同じ条件で火入れを行った混合揉捻発酵茶葉（火入れ条件；110℃，40分，表3-2-4）において，緑茶一番茶と比較して加熱香気成分ピーク面積比が同量以上であったピークは13成分中8成分であった．混合揉捻発酵茶葉の製造において，茶葉を粗揉工程で萎凋する際に茶葉の呼吸作用によるアミノ酸の増加[77]，ビワ葉に含まれるアミノ酸，茶葉の揉捻，発酵過程によるアルデヒド類の生成，加熱中に起こるアミノカルボニル反応の副反応としてストレッカー分解など一連の反応から加熱香気成分の生成が促進された可能性がある．その結果として，緑茶一番茶と同程度に加熱香気成分量が多くなり，官能検査結果においても良好と評価された（表

3-2-3）と考えられる．混合揉捻発酵茶の官能検査結果（表 3-2-3）において，「良好」の評価を得た火入れ条件 110℃，30, 40 分，120℃，20 分および 130℃，20 分（表 3-2-4）では，緑茶一番茶と比較して加熱香気成分ピーク面積比が同量以上であったピークは 13 成分中それぞれ 5, 8, 3 および 8 成分であった．120℃，20 分では同量以上のピーク数が少なく，緑茶一番茶と比較してピーク面積比合計値が低かったことから，官能検査結果とは異なり火入れ香がやや不足したと考えられる．しかし，110℃，30, 40 分および 130℃，20 分では，ピーク面積比合計値が 1.4～1.6 倍であることから「良好」と評価されたと考えられる．混合揉捻発酵茶の官能検査結果（表 3-2-3）において，「わずかに不足」の評価であった火入れ条件 110℃，20 分（表 3-2-4）では，緑茶一番茶と比較して加熱香気成分ピーク面積比が同量以上であったピークは 2 成分，ピーク面積比合計値は半分程度であり，このことが官能検査結果の評価に反映されたと考えられる．また，混合揉捻発酵茶の官能検査結果（表 3-2-3）において，「わずかに過度」の評価であった 110℃，50 分および 120℃，30 分（表 3-2-4）では，緑茶一番茶と比較して加熱香気成分ピーク面積比が同量以上であったピークは 9 および 10 成分でピーク面積比合計値は 2 倍弱であった．よって，官能検査結果において，「わずかに過度」と評価されたと考えられる．下級茶葉は上級茶葉と比較して同一火入れ温度では加熱香気成分の生成が少なく，火入れ効果を上げるためには火入れ温度を上級茶葉より約 10℃高くする必要がある [72]．そこで，本実験に使用している混合揉捻発酵茶葉は下級茶葉の三番茶葉を使用していることから上級茶である緑茶一番茶葉より火入れ温度を 10℃上げた 120℃，40 分（緑茶一番茶葉の火入れ条件；110℃，40 分）で火入れした混合揉捻発酵茶（表 3-2-3）および緑茶三番茶葉に適した条件により火入れを行った 130℃，30 分の混合揉捻発酵茶では（表 3-2-4），緑茶一番茶と比較して加熱香気成分ピーク面積比が同量以上であったピークは 12 成分であり，また，緑茶一番茶と比較してピーク面積比合計値は 3 倍弱～5 倍近くと高値を示したため，官能検査結果（表 3-2-3）において，火入れ香が過度になったと考えられる．以上のように，火入れ温度 130℃で 30 分以上では火入れ香が過度になると考えられた．120℃においては 20 分では加熱香気成分の含量から火入れ香が若干不足し，30 分以上では火入れ香が過度になることから，120℃の火入れは難しいと判断された．110℃においては 20 分では火入れ香が若干不足し，50 分以上では火入れ香が過度になる．本実験から，嗜好性を向上させるための火入れ条件については，香味が優れる緑茶一番茶と同程度の加熱香気成分量を含有し，官能検査結果において「良好」の評価を得た 110℃，30,40 分および 130℃，20 分であると考えられた．

このように，混合揉捻発酵茶葉は火入れ香が生成されにくい下級茶葉の三番茶葉を使用しているにも関わらず，緑茶一番茶葉と同じ火入れ温度，火入れ時間または緑茶三番茶葉よりも火入れ時間を短くすることにより，緑茶一番茶と同程度の加熱香気成分が生成されることが明らかとなった．

5. 要約

火入れ温度や火入れ時間の違いが混合揉捻発酵茶の官能審査，芳香および加熱香気成分に及ぼす影響を検討し，香味を向上させるための最適な火入れ条件を明らかにすることを目的とした．火入れ温度を 110，120，130℃，火入れ時間を 60 分間とし，火入れ開始 20 分後より 10 分毎に茶葉を採取して芳香成分量と加熱香気成分量を測定し，香気成分量と官能検査結果から混合揉捻発酵茶葉の最適な火入れ条件を検討した．混合揉捻発酵茶に特徴的な香り成分の含量は，火入れを行っても変化しなかった．一方，下級茶葉に多く含まれ好ましくない香り成分の一つである*(E,E)*-2,4-heptadienal の含量は，火入れにより減少した．混合揉捻発酵茶の香味を向上させるために火入れ温度と火入れ時間の条件を検討したところ，緑茶一番茶と同様の火入れ温度 110℃，火入れ時間 30, 40 分または緑茶三番茶葉の火入れ条件よりも火入れ時間が短い火入れ温度 130℃，火入れ時間 20 分が最適であると考えられた．

第 4 章　紅茶ポリフェノールがラット小腸からのトリグリセリド吸収に及ぼす影響

1.　緒言

第 2 章において，三番茶葉とビワ葉を混合した新たな発酵茶の製造方法を確立した．緑茶製茶機械の粗揉機を利用することで三番茶葉を萎凋する時間の短縮を可能にし，その萎凋した三番茶葉にビワ葉を全量の 10%添加して揉捻機を用いて揉捻することでカテキンの酸化重合が促進された．その結果，味，香りに優れ，浸出液の色が鮮やかな紅色を呈する品質の高い混合揉捻発酵茶が生成された．次に，混合揉捻発酵茶製造に使用する三番茶葉の最適摘採時期の検討を行ったところ, 二番茶葉摘採日から 35 日目に摘採した三番茶葉を用いて製造することで品質が最も優れる混合揉捻発酵茶が生成されることを明らかにした．第 3 章において，混合揉捻発酵茶の香りは，三番茶葉の揉捻，発酵だけでなく，ビワ葉添加および三番茶葉とビワ葉の混合揉捻，発酵により特徴づけられることが推察された．製造における火入れ温度と火入れ時間を検討したところ，それぞれ 110℃で 30，40 分および 130℃で 20 分が最適であることが明らかとなった．このように未利用資源である三番茶葉とビワ葉を用い，短時間低コストで製造ができる香味に優れる混合揉捻発酵茶葉を開発した．

混合揉捻発酵茶が体脂肪低減作用および脂質濃度低下作用を有することが示されている．すなわち，混合揉捻発酵茶葉を熱水抽出した凍結乾燥粉末 1%を 20%脂肪食に添加し SD 系雄ラットに 4 週間自由摂食させたところ，白色脂肪組織重量，血清および肝臓 TG 濃度が効果的に低下した [11]．さらに，ヒトでの試験においても 1%の濃度で熱水抽出した混合揉捻発酵茶 200 mL を 1 日 3 回食事とともに 3 ヶ月間，健常中高年者に摂取させると，血清 TG 濃度が低下し，体脂肪率も，3 カ月後に混合揉捻発酵茶摂取で減少した [11]．しかし，混合揉捻発酵茶が血清および肝臓 TG 濃度低下作用，体脂肪低下作用を発揮する成分とその作用メカニズムについて明らかではない．

本研究で開発した混合揉捻発酵茶葉はビワ葉添加により三番茶葉のカテキンを酸化させているため，カテキンが酸化重合することによりカテキンが減少し，それに伴って紅茶ポリフェノールである TF 類，TS 類および TR 類が多く合成されることが明らかとなっている [29]．すなわち，緑茶に含まれる EGC，EGCg，EC，ECg はビワ葉に含まれる酸化酵素やクロロゲン酸により，TF 類や TS 類などの紅茶ポリフェノールに変換される．EC または ECg の酸化型と EGC または EGCg の酸化型が重合することにより二量体の TF 類が，EGC または EGCg の酸化型が重合することで二量体の TS 類が生成される．さらに，これら紅茶ポリフェノールが重合することで TR 類が生成される．

緑茶には EGC，EGCg，EC，ECg などのカテキンが含まれており, 動物やヒトにおいて抗酸化作用 [14]，抗ガン作用 [15]，抗菌作用 [16]，血糖上昇抑制作用 [17] などの生理機能を有することが数多く報告されている．また，体脂肪低減，血清や肝臓の TG および CHOL 濃度低下作用など脂質代謝改善作用 [19-23] を有する．紅茶ポリフェノールも血清脂質濃度を低下させる [24, 78]．

混合揉捻発酵茶葉はその製造においてカテキンを多く含む三番茶葉を用いて発酵させることから，多くの紅茶ポリフェノールを含有するのが大きな特徴である．したがって，混合揉捻発酵茶の TG 低下および体脂肪減少作用に対して紅茶ポリフェノールが重要な役割を担っている可能性がある. 本研究では，混合揉捻発酵茶の体脂肪低減作用や脂質濃度低下作用が TF 類，TSA および TR 類などの紅茶ポリフェノールによる作用かについて明確にすることを目的として実験を行った．体脂肪減少や血清 TG 濃度低下作用の発現には，小腸からの食事脂肪の吸収抑制や遅延，食後高脂血症の改善，肝臓での脂肪合成の抑制や脂肪酸酸化の亢進，褐色脂肪組織における脂肪酸酸化の促進などいくつかの機構が考えられる．

そこで本章では，混合揉捻発酵茶に含まれる紅茶ポリフェノールである TF 類，TSA および TR 類をラットの胃内に投与し，その後油脂を含むイントラリピッドを胃内投与して血中の TG 濃度を経時的に測定することで，紅茶ポリフェノールが小腸からの油脂の吸収および食後高脂血症に及ぼす影響を検討した．

2.　実験方法

1.　試料の調製

混合揉捻発酵茶葉中に含まれるポリフェノールの分画法を図 4-1-1 に示す．試料の調製については

Tanaka ら[29]の方法に準じて行った．すなわち，混合揉捻発酵茶葉 1930 g を水（15℃）30 L に浸し，室温で 2 日間水に可溶な成分を抽出した後，吸引ろ過した．得られたろ液（抽出液 1）を，水で置換したセファデックス LH-20 カラム（ゲル直径 10 cm，長さ 35 cm，ファルマシア・ファイン・ケミカル社，米国）に流し込み，ポリフェノールを吸着させた．残滓として得られる水抽出後の茶葉をアセトン-蒸留水（1:1，v/v）30 L で，2 日間可溶性成分を抽出し，それを 2 回繰り返した後，ロータリーエバポレーターでアセトンを除去した．得られた沈殿を含む溶液に 20%の濃度になるようにメタノールを加えて攪拌し，残ったクロロフィルなどをろ過して除いた．得られたろ液をセファデックス LH-20 カラムに続けて流し込んだ．そのカラムに 40%メタノール 2 L を流し，糖質，カフェインおよびフラボノール配糖体を流出させた．カラムに 60%メタノール 2 L，80%メタノール 2 L，100%メタノール 4 L，メタノール-アセトン-蒸留水（8:1:1,v/v/v）2 L およびアセトン-蒸留水（6:1,v/v）6 L を，この順に流した．溶出液を蛍光剤入りシリカゲル薄層クロマトグラフ（展開溶媒はトルエン：ギ酸エチル：ギ酸=1:7:1，v/v/v，検出は紫外吸収および塩化鉄（Ⅲ）試薬噴霧）でカテキンおよび紅茶ポリフェノールの成分を確認し，分画した成分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した．このようにしてフラクション 1 およびフラクション 2 を得た．さらに，フラクション 2 を 7M 尿素-アセトン（2：3,v/v，塩酸で pH2 に調整）に溶解し，同じ溶媒で置換したセファデックス LH-20 カラム（ゲル直径 10 cm，長さ 35 cm）に流し込み高分子量成分を含むフラクション 2-1 と低分子量成分を含むフラクション 2-2 に分画した．続いて，フラクション 2-1 はアセトンを留去し，ダイアイオン HP20SS カラム（ゲル直径 5 cm，長さ 35 cm，（株）三菱化学社，東京）に流し込み，尿素と塩酸を水で洗い流した後，メタノールでポリフェノールを溶出させてフラクション 3-1 を得た．フラクション 2-2 はアセトンを留去した後，ダイアイオン HP20SS カラムに流し込み，尿素と塩酸を水で洗い流した後，順次 10,20,30,40,60,80%メタノール 0.5 L で可溶成分を溶出させ，フラクション 3-2 およびフラクション 3-3 を得た．本論文ではカテキンが酸化重合した 3 量体以上の構造式が明らかにされていない成分を TR 類とした．

TF 類, TSA および TR の HPLC 分析条件については，カラムは Cosmosil 5C$_{18}$ ARII（ナカライテスク社，京都）4.6×250 mm を使用し，移動相 A 液は 50 mM リン酸，B 液はアセトニトリル溶液を用い，グラジェント構成の移動相 B 液は TSA および TR 類で 4%~30%（39 分間），30%~75%（15 分間），TF 類で 10%~25%（5 分間），25%~80%（40 分間）とし，流速 0.8 mL/分，カラム温度 35℃，検出波長 375 nm で測定した．

2. 実験動物および試料

実験には 200 g 前後の 5 週齢の SD 系雄ラット（日本エスエルシー（株），静岡）を用いた．ラットは温度 22 ± 1℃，湿度 55 ± 5%，12 時間明暗サイクル（明期：8－20 時）に設定した県立長崎シーボルト大学動物実験室内で飼育し，MF 固形試料（オリエンタル酵母工業（株），東京）と蒸留水を自由摂取させた．12 時間の絶食後，TF 類，TSA および TR 類を 20%エタノールに溶解し，それぞれ体重 1 kg あたり 200 mg/5 mL 胃内へ投与した．5 分後，大豆油を 10%含むエマルション（イントラリピッド，テルモ（株），東京）を体重 1 kg あたり 15 mL を胃内へ投与した．コントロール群には，紅茶ポリフェノールを含まない 20%エタノール溶液を体重 1 kg あたり 5 mL 投与した．

なお，本研究は「県立長崎シーボルト大学動物実験指針」ならびに「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」（昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号）に則って実施した．

3. 採血および血清 TG 濃度の測定

紅茶ポリフェノール投与開始前，投与 1，2，3，4 および 6 時間後にラットの尾静脈から採血した．採取した血液を遠心分離し，glycerol 3-phosphate oxidase・DAOS 法によるトリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業（株），大阪）を用いて血清 TG 濃度測定した．

4. 統計処理

実験結果は平均値±標準誤差で表した．各群間の有意差検定は分散分析による検定後，Tukey-Kramer test[79]による多重比較を行い，危険率 5%未満で有意差ありとした．

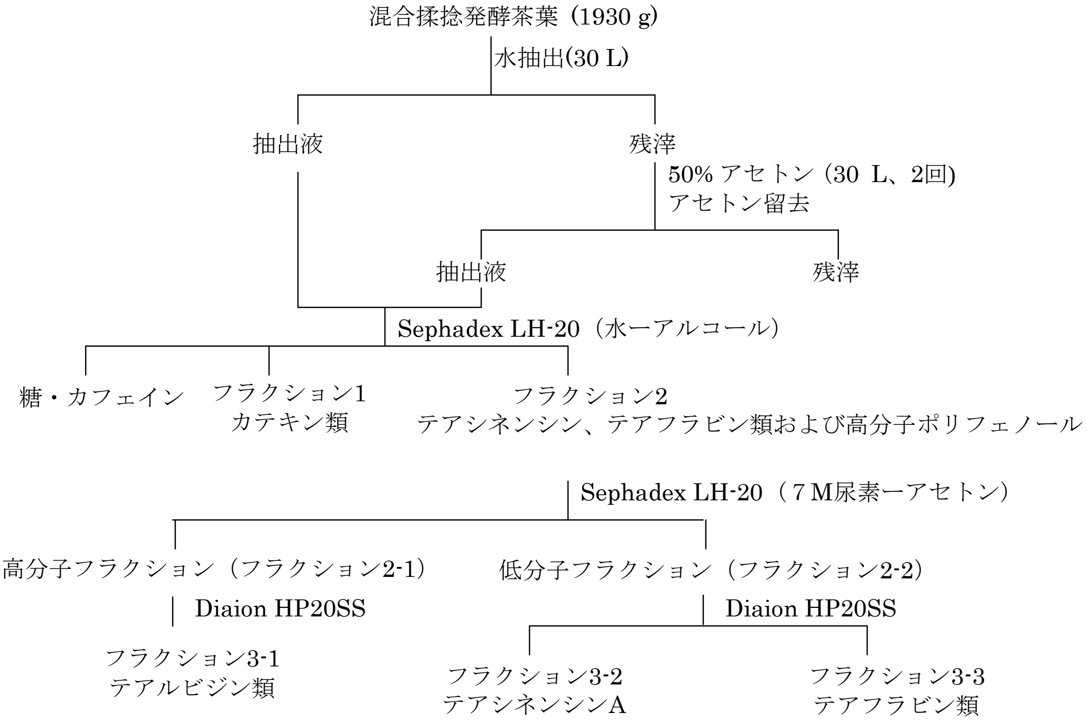


図 4-1-1. 混合揉捻発酵茶葉のポリフェノール分画法

3. 実験結果

分画によって得られた紅茶ポリフェノール量は, TF 類で 30.1 g, TSA で 8.5 g, TR 類で 21.4 g でった. 得られたフラクションの HPLC によるクロマトグラムを図 4-1-2 に示す. 図 4-1-2 の（A）はフラクション 3-1 のクロマトグラムで, ベースラインの盛り上がりとして TR 類が検出された. （B）はフラクション 3-2 のクロマトグラムで, TSA が主成分であった. （C）はフラクション 3-3 のクロマトグラムで, TF, TF3g, TF3'g および TFdig などの TF 類が検出された. TF 類および TSA の構造式, TR 類の推定部分構造式を図 4-1-3 に示す.

20%エタノールに溶解した TF 類, TSA および TR 類を胃内投与した後, 胃内に油脂を投与した後の血清 TG 濃度の経時変化を図 4-1-4 に示す. 20%エタノールの溶液のみを投与したラットの血清 TG 濃度は, 急速に上昇し 1 時間後に最大に達し, その後漸減した. TF 類を投与したラットでは, 血清 TG 濃度の上昇は緩やかで, 1 時間後の値はコントロール群と比較して有意に低値を示した. 2 時間後に最大に達し, その後は緩やかに低下した. TSA 群も, TG 濃度の上昇は緩やかで 1 時間後に最大に達し, その後減少した. TR 類群の TG 濃度の上昇も緩やかで 1 時間後に最大に達し, その後は緩やかに低下傾向を示した. TSA 群および TR 類群の 1 時間後の血清 TG 濃度は, TF 類群と同様にコントロール群と比較して有意に低値を示した. このように, TF 類, TSA および TR 類は, 油脂投与後の血清 TG 濃度上昇を効果的に抑制した.

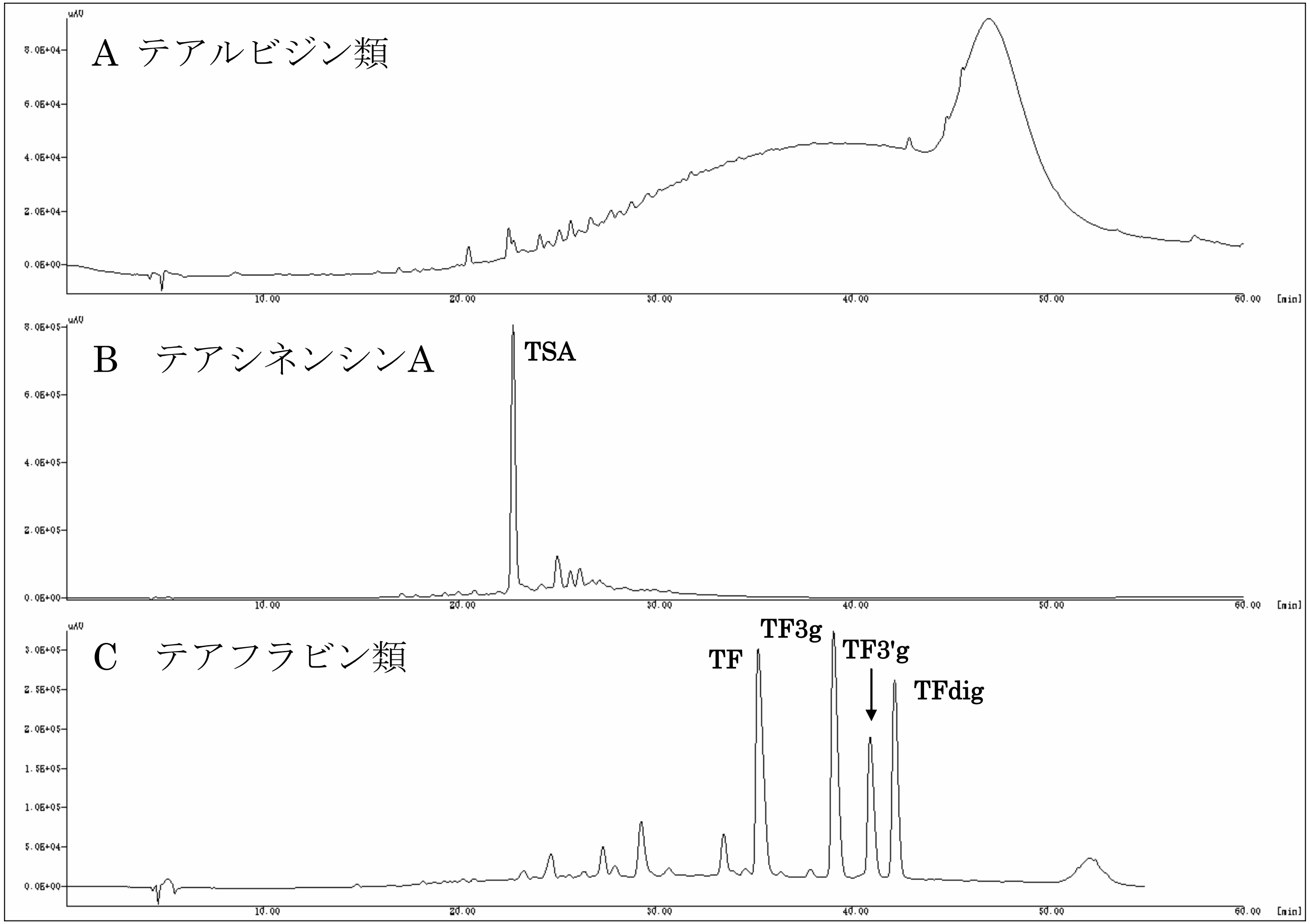
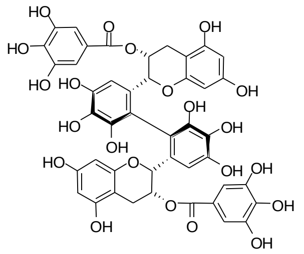
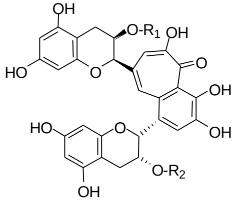


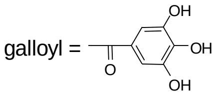
図 **4-1-2.** 混合揉捻発酵茶葉から抽出されたテアルビジン類,テアシネンシン A,テアフラビン類のクロマトグラム



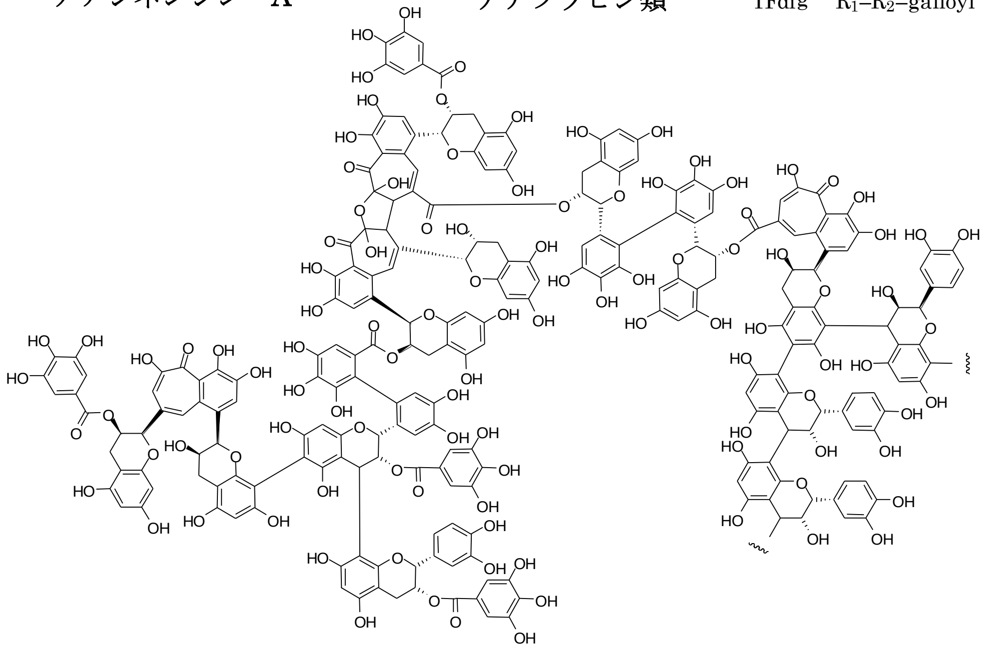
テアシネンシン　A



テアフラビン類



TF	R_1=R_2=H
TF3 g	R_1 =galloyl, R_2=H
TF3'g	R_1=H, R_2=galloyl
TFdig	R_1=R_2=galloyl



テアルビジン類の推定部分構造

図 4-1-3.　混合揉捻発酵茶葉から抽出されたテアシネンシン **A,**テアフラビン類**,**テアルビジン類の推定部分構造式

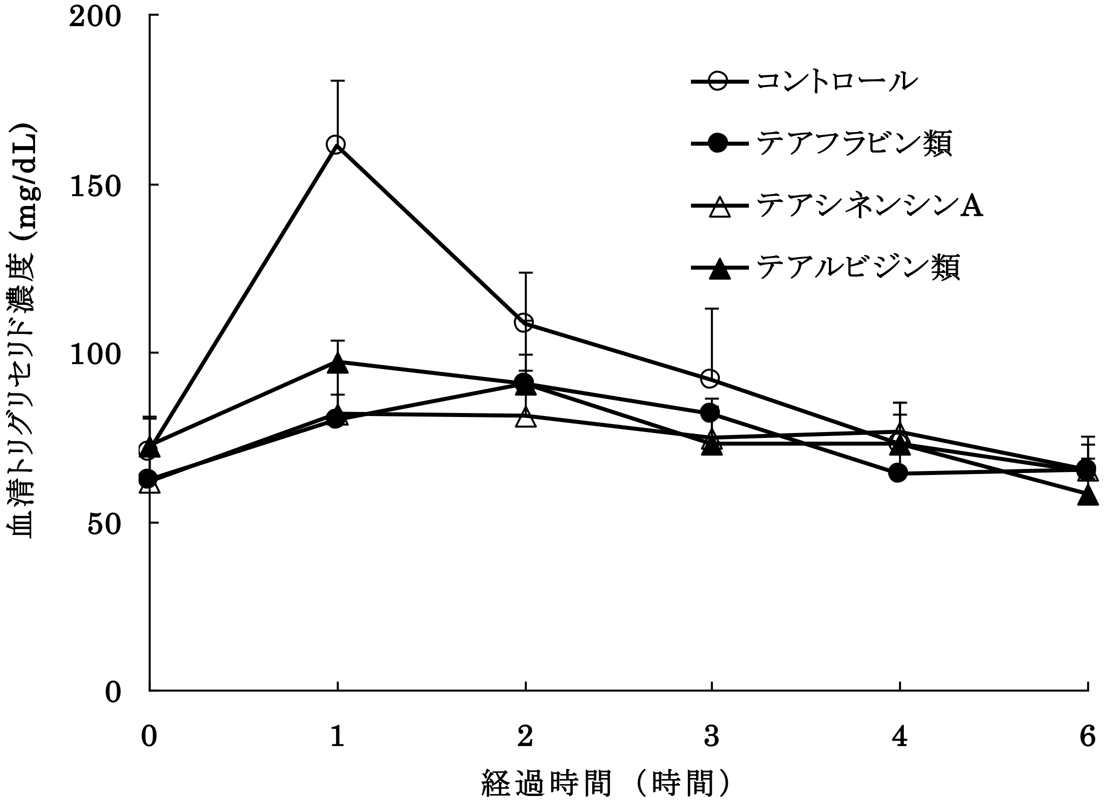


図 4-1-4. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の胃内投与がラットの血清トリグリセリド濃度に及ぼす影響

平均値±標準誤差（n=5-6）

a,b；異なる文字間に $p < 0.05$ で有意差有り

4. 考察

本実験において，TF 類，TSA および TR 類などの紅茶ポリフェノールが小腸からの油脂の吸収を抑制する可能性が示唆され，混合揉捻発酵茶摂取による食後高脂血症改善がこれら紅茶ポリフェノールにより発揮されていることが推察された. Nakai ら[80]は，TF，TF3'g および TFdig が（−）-EGC3，5-di-*O*-gallate と同程度に膵リパーゼ活性を抑制することを示している．Kusano ら[81]は，TFdig が EGCg よりも強い膵リパーゼ阻害活性を有することを観察している．TSA も TF 類より弱いものの強い阻害活性を有している[80]．TR 類の膵リパーゼ活性に対する影響についての報告はないが，TR 類と同様にカテキンが多数重合体した高分子の oolonghomobisflavan が TF 類と同程度の阻害活性を有する[80]ことから，TR 類も高い阻害活性を有している可能性がある．Ikeda ら[82]は，ガロイル基をもつカテキンが膵リパーゼ活性を抑制し，その結果小腸からの脂肪の吸収を抑制することを示唆している．Toyoda-Ono ら[83]は，ウーロン茶重合ポリフェノール（OTPP）が強い膵リパーゼ阻害活性を有し，OTPP の胃内投与で小腸からの油脂の吸収が効果的に抑制されることを観察した．このように膵リパーゼ活性の阻害が小腸からの油脂の吸収を抑制すると考えられる．

本実験における TF 類および TSA 投与による油脂負荷後の血清 TG 濃度の上昇抑制は，これら紅茶ポリフェノールによる膵リパーゼ活性の阻害により一部引き起こされたと推察される．TF 類と TSA の脂肪吸収抑制に及ぼす効果は，ほとんど変わらなかったことから，TSA は TF 類と同程度に膵リパーゼ阻害活性が強い可能性がある．TF 類と TSA が強い膵リパーゼ阻害活性を有し，油脂負荷による血清 TG 濃度上昇を効果的に抑制し，TR 類も TF 類や TSA と同程度に血清 TG 濃度上昇抑制作用を発揮したこ

とから，TR 類も膵リパーゼ活性の抑制により油脂負荷後の血清 TG 濃度の抑制に関与していると推察される．

Ikeda ら [82]は，管腔内で TG の消化産物であるモノアシルグリセロールや脂肪酸の胆汁酸混合ミセルへの溶解がカテキンによって阻害されないことを示しており，脂肪の消化産物のミセルへの溶解性の阻害が TG の小腸からの吸収を抑制しているのではないことを報告している．紅茶ポリフェノールが脂肪のミセル溶解性にどの程度影響しているかについては不明であるが，ミセル溶解性が脂肪の吸収に大きく関与していると考えられていることから，今後紅茶ポリフェノールのミセルへの溶解性に関する検討を行う必要がある．Shishikura ら [84]は，茶ポリフェノールにより小腸でのエマルションの油滴サイズが大きくなることで膵リパーゼ活性が抑制され，結果として小腸からの脂肪の吸収が減少することを指摘している．この点についても，紅茶ポリフェノールの関与については明らかではないが，いずれにしても小腸における紅茶ポリフェノールの挙動が脂肪の吸収に大きな影響を及ぼしていると考えられる．Han ら [85]は，小腸からの脂肪吸収の低下や遅延による食後高脂血症の抑制は抗肥満の主要な作用の一つであることを指摘している．TF 類，TSA および TR 類による脂肪吸収の抑制は，肥満防止や体内脂質代謝改善に効果を発揮する可能性がある．

5. 要約

SD 系雄ラットに紅茶ポリフェノールである TF 類，TSA および TR 類を胃内投与し，その後油脂を含むイントラリピッドを胃内投与して，血清 TG 濃度の経時的変化を測定した．TF 類，TSA および TR 類投与により，血清 TG 濃度は緩やかに上昇し，投与開始 1 時間後には，紅茶ポリフェノールを投与しなかったラットと比較して有意に低値を示した．このことから，TF 類，TSA および TR 類は小腸からの脂肪の吸収を抑制することで，食後高脂血症を改善する可能性が示唆された．

第 5 章　紅茶ポリフェノールの摂取がラット脂質代謝に及ぼす影響

第 1 節 10%脂肪食における紅茶ポリフェノール摂取がラット脂質代謝に及ぼす影響

1.　緒言

第 4 章において，TF 類，TSA および TR 類は小腸からの脂肪の吸収を抑制する可能性が示唆され，その効果はこれら 3 種の紅茶ポリフェノールでほぼ同程度であった．Han ら [85]は，小腸からの脂肪吸収の抑制あるいは遅延が内臓脂肪蓄積を低下させることを報告しており，血清や肝臓の TG 濃度にも影響を与えることが推測される．Matsumoto ら [24]は，紅茶から抽出したポリフェノールを 1%添加した高脂肪食をラットに摂食させたところ，血清 TG および CHOL 濃度が有意に低下することを観察した．Vinson ら [78]は，ハムスターにおいて紅茶摂取が緑茶と同様に血漿 TG および低密度リポタンパク質（LDL）-CHOL 濃度を低下させることで動脈硬化の発症を抑制することを報告している. Davis ら [86]は，高 CHOL 血症者に紅茶を摂取させると，血中 CHOL や LDL-CHOL 濃度が減少することを観察した. このような紅茶の脂質濃度低下作用については，カテキンの酸化重合により生成される紅茶ポリフェノールの作用によることが推察される．Lin ら [87]は，TF 類摂取がラットの睾丸周辺脂肪重量を減少させ，血清 TG および CHOL 濃度を低下させることを示した．また，彼らはヒト HepG2 細胞において TF 類が脂肪酸合成酵素（FAS）の活性を抑制することで脂肪の細胞への蓄積を抑えることを観察した. Du ら [25]も，TF 類が FAS の活性を強く阻害することを *in vitro* において見いだしている．Lin and Lin-Shiau[88]は，TF 類がヒト乳がん MCF-7 細胞において FAS の遺伝子発現を抑制することを観察した．Vermeer ら [89]は，紅茶から抽出した TF 類が小腸でのミセル形成を抑制することで，小腸における CHOL の吸収を阻害して，CHOL 低下効果を発揮する可能性を指摘している．Maron ら [26]も，TF 類摂取で高 CHOL 血症者の血中 LDL-CHOL 濃度が低下することを示した. このように紅茶の脂質代謝改善作用に TF 類が効果を発揮している可能性がある．しかし一方で，Bingham ら [90]は, 紅茶摂取はヒトにおいて血中の TG や CHOL 濃度に影響しないことを報告している．Trautwein ら [91]は，ヒトにおいて紅茶 TF 類摂取が血清 CHOL および LDL-CHOL，TG 濃度に影響しないことを示した．紅茶や紅茶から抽出された TF 類の脂質代謝に及ぼす影響に関しては必ずしも一致した見解は得られていない．さらに，TS 類や TR 類摂取の血清や肝臓脂質濃度への影響は報告されていない.

本章としては, 紅茶ポリフェノールである TF 類，TSA および TR 類摂取が血清と肝臓脂質濃度および体脂肪に及ぼす影響について SD ラットを用いて検討した.

2.　実験方法

1.　試料の調製

TF 類，TSA および TR 類の調製方法については，第 4 章に準じて行った.

2.　実験動物および飼料

実験には初体重 140 g 前後の 4 週齢の SD 系雄ラット（日本エスエルシー（株），静岡）を用いた．温度 22 ± 1℃，湿度 55 ± 5%，12 時間明暗サイクル（明期：8―20 時）に設定した県立長崎シーボルト大学動物実験室内でラットを飼育した. MF 固形試料（オリエンタル酵母工業（株），東京）と蒸留水を自由摂取させ 1 週間予備飼育した．予備飼育終了後，ラットの体重に群間で差がないようにコントロール群，TF 類群，TSA 群および TR 類群の 4 群に分け，試験食と蒸留水を自由摂取させた. 食餌は AIN（American Institute of Nutrition）-76 組成 [92]に基づく純化食をコントロール食とした．その組成（g/kg）は，カゼイン 200，コーン油 100，コーンスターチ 150，セルロース 50，ミネラル混合（AIN-76-MX）35，ビタミン混合（AIN-76-VX）10，DL-メチオニン 3，重酒石酸コリン 2 およびショ糖 450 である．TF 類，TSA および TR 類をそれぞれ 0.2%添加し，添加した量のショ糖を減じた．混合揉捻発酵茶葉の凍結乾燥粉末中に含まれるポリフェノール含量は約 20%であり，凍結乾燥粉末 1%をラットに摂食させており，0.2%のポリフェノール含量を含むことになり，本実験でも紅茶ポリフェノールの添加量を 0.2%に設定した．さらに, ラットにおけるポリフェノール摂食実験では, 太田ら [93]はリンゴポリフェノールを 0.2%摂食させ

ることで血清および肝臓の TG 濃度が有意に低下することを，倉兼ら[94]は0.2%の落花生ポリフェノールを食餌に添加することで脂肪組織重量を減少させることを報告している．また，シーベリー果実ポリフェノールを 0.2%摂食させた実験で有意に脂肪組織重量の減少が認められている[95]．このように，ポリフェノール摂食実験では 0.2%添加した実験が多く行われている．

4 週間試験食と蒸留水を自由摂取させ，食餌を毎日交換した．6 時間絶食後断頭屠殺し，血液，肝臓，腎臓および睾丸周辺脂肪組織を摘出した．血液を 20 分間室温で放置した後，4℃，1,200×g（3,000 rpm）で 20 分間遠心し，上清の血清を採取した．血清および肝臓は分析に供するまで−80℃で保存した．

3.　血清および肝臓の脂質濃度測定

血清 TG 濃度については，第 4 章に準じて行った．血清 CHOL 濃度の測定は cholesterol oxidase・3, 5 - dimethoxy - N - ethyl - N-（2 - hydroxyl - 3 - sulfopropyl）- aniline sodium・DAOS 法によるコレステロール E-テストワコー（和光純薬工業（株），大阪）を用いて行った．血清リン脂質（PL）濃度については cholinesterase・DAOS 法によるリン脂質 C テストワコー（和光純薬工業（株），大阪）を用いて測定した．

肝臓脂質の抽出は Folch ら[96]の方法に準じて行った．肝臓 0.5 g をクロロホルム-メタノール（2:1,v/v）50 mL でホモジナイズ後，40℃の湯浴で 30 分間加温抽出ろ過した．これに 20%の蒸留水を加え，一晩冷蔵で放置後，下層を濃縮し，25 mL のヘキサンに溶解したのを肝臓脂質抽出液とし，分析に供するまで−20℃で保存した．肝臓 TG 濃度，CHOL 濃度および PL 濃度は，上述のキットを用いて測定した．

4.　肝臓の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性の測定

肝臓 2 g にホモジネートバッファー（0.25 M スクロース，10 mM tris aminomethane hydrochloride および 1 mM EDTA，pH7.4）を 12 mL 加えてホモジナイズし，核や残渣を取り除くために 4℃，1,200×g（3,000 rpm）で 10 分間遠心し，上清を 4℃，10,000×g（11,000 rpm）で 10 分間遠心後，沈殿物にホモジネートバッファーを加えたものをミトコンドリア画分とした．上清を 4℃，125,000×g（40,000 rpm）で 60 分間遠心後，上清をサイトソル画分とし，沈殿物をミクロソーム画分とした．ミトコンドリア画分，サイトソル画分およびミクロソーム画分は各分析に供するまで−80℃で冷凍保存した．各画分のタンパク質量は Lowry ら[97]の方法により測定した．サイトソル画分およびミクロソーム画分を 200 倍希釈，ミトコンドリア画分を 100 倍希釈して測定した．

サイトソル画分の FAS 活性，Malic enzyme 活性およびグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PDH）活性は，それぞれ Kelley ら[98]，Ochoa[99] および Kelley and Kletzein[100]の方法に準じて測定した．ミクロソーム画分のホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ（PAP）活性およびミトコンドリア画分のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ（CPT）活性の測定は，それぞれ Walton and Possmayer[101]および Markwell ら[102]の方法で行った．

5.　糞中脂肪酸量およびステロイド量の測定

糞中の脂肪酸量の測定は，Jeejeebhoy ら[103]の方法に準じて行った．

糞中ステロイドの測定は，Sugano ら[104]の方法に従って行った．中性ステロイドと酸性ステロイド測定の内部標準には 5α-コレスタンと 23-ノルデオキシコール酸をそれぞれ用い，GC（水素炎イオン化検出器（FID））により行った．GC（GC17-A,（株）島津製作所，京都）の分析条件については，カラムは Supelcowax （SPB™-1） 30 m×0.25 mm，膜厚 0.25 μm を使用し，カラム温度は 280℃，インジェクターおよびディテクター温度は 300℃で行った．データの解析にはクロマトパック（C-R6A,（株）島津製作所，京都）を用いた．

6.　統計処理

第 4 章に準じて行った．

3.　実験結果

1.　成長，摂食，肝臓および脂肪組織重量

体重増加量，摂食量，肝臓および脂肪組織重量を表 5-1-1 に示す．終体重および摂食量には各群間で差は認められなかった．また，体重 100 g 当たりの肝臓重量，腎臓周辺脂肪組織重量，睾丸周辺脂肪組織重量，腸管膜脂肪組織重量および総脂肪組織重量にも差はなかった．

2.　血清および肝臓の脂質濃度

血清および肝臓の脂質濃度を表 5-1-2 に示す．血清 TG 濃度には各群間で有意な差は観察されなかっ

たが，TF 類群および TSA 群でコントロール群および TR 類群に比べ低下傾向にあった．CHOL 濃度は TF 類群, TSA 群および TR 類群でコントロール群とと比較して有意に低値を示した. PL 濃度には各群間で有意な差はなかったが，TF 類群および TSA 群でコントロール群より低い傾向を示した.

肝臓 TG 濃度には全ての群間で有意な差は観察されなかったが，TSA 群でやや低い傾向にあった．CHOL 濃度は TSA 群および TR 類群でコントロール群より有意に低い値を示し, TF 類群の値はコントロール群と TSA および TR 類群の間であった．PL 濃度も CHOL 濃度と同様に TSA 群および TR 類群でコントロール群と比較して有意に低く, TF 類群では低い傾向を示した.

3. 肝臓の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性

肝臓の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性を表 5-1-3 に示す．サイトソルにおける FAS, G6PDH および Malic enzyme 活性には各群間で有意な差は観察されなかった．ミクロソームにおける PAP 活性も各群間で有意な差は認められなかったが, TF 類群, TSA 群および TR 類群でコントロール群と比較して低い傾向を示した．ミトコンドリアにおける CPT 活性には群間における差はなかった.

4. 糞重量，糞中への脂肪酸およびステロイドの排泄量

糞重量，糞中への脂肪酸およびステロイドの排泄量を表 5-1-4 に示す．糞重量には各群間で有意な差は観察されなかったが，紅茶ポリフェノール摂取ラットでコントロール食摂取ラットより高い傾向を示した．糞中への脂肪酸の排泄量に有意な差はなかったが，TR 類群でやや高く，TF 類群でやや低い傾向を示した．糞中への中性ステロイドの排泄量に全ての群間で差は認められなかった．酸性ステロイドの排泄量は，TF 類群でやや低下し，TR 類群で高く，TF 類群と TR 類群の間に有意差が観察された．しかし，総ステロイドの排泄量には全ての群間で差は認められなかった.

表 5-1-1. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が体重増加量,摂食量,肝臓重量および脂肪組織重量に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
初体重（g）	144 ± 3	143 ± 2	143 ± 2	143 ± 1
終体重（g）	356 ± 16	358 ± 7	349 ± 7	363 ± 9
摂食量　（g/日）	19.2 ± 1.0	20.1 ± 0.7	19.2 ± 0.5	20.2 ± 0.5
肝臓重量　（g/100 g 体重）	3.65 ± 0.14	3.66 ± 0.13	3.64 ± 0.16	3.83 ± 0.16
脂肪組織重量　（g/100 g 体重）				
腎臓周辺	2.04 ± 0.20	2.52 ± 0.27	2.27 ± 0.10	2.39 ± 0.17
睾丸周辺	1.44 ± 0.09	1.64 ± 0.20	1.66 ± 0.10	1.59 ± 0.20
腸間膜	1.22 ± 0.05	1.45 ± 0.13	1.39 ± 0.09	1.34 ± 0.10
合計（腎臓+睾丸+腸間膜）	4.70 ± 0.33	5.61 ± 0.57	5.32 ± 0.27	5.31 ± 0.40

平均値±標準誤差 (n=6-7)

表 5-1-2. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が血清と肝臓の脂質濃度に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
血清脂質濃度（mg/dL）				
トリグリセリド	115 ± 18	96.9 ± 16.0	90.6 ± 20.5	120 ± 10
コレステロール	89.8 ± 3.6[a]	57.3 ± 4.9[b]	54.3 ± 5.4[b]	57.0 ± 4.0[b]
リン脂質	143 ± 11	119 ± 7	115 ± 10	126 ± 9
肝臓脂質濃度（mg/g）				
トリグリセリド	27.9 ± 2.8	27.9 ± 3.5	23.1 ± 1.0	27.8 ± 2.3
コレステロール	4.56 ± 0.27[a]	3.80 ± 0.42[ab]	3.45 ± 0.15[b]	3.37 ± 0.11[b]
リン脂質	43.6 ± 2.2[a]	38.4 ± 1.6[ab]	36.6 ± 1.7[b]	35.4 ± 0.8[b]

平均値±標準誤差 (n=6-7)

a,b；異なる文字間に $p < 0.05$ で有意差有り

表 5-1-3. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が肝臓の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素に及ぼす影

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
	nmol/min/mg protein			
脂肪合成関連酵素				
サイトソル				
脂肪酸シンターゼ	12.5 ± 2.2	17.5 ± 1.9	10.3 ± 2.2	15.5 ± 1.7
グルコース6−リン酸デヒドロゲナーゼ	59.9 ± 5.9	57.4 ± 5.0	50.9 ± 7.9	46.9 ± 6.8
マリックエンザイム	44.5 ± 4.7	53.5 ± 5.3	44.4 ± 3.3	45.5 ± 4.6
ミクロソーム				
ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ	5.46 ± 0.18	4.37 ± 0.22	4.90 ± 0.48	4.25 ± 0.22
脂肪酸β−酸化系酵素				
ミトコンドリア				
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ	4.93 ± 0.82	4.35 ± 0.44	4.27 ± 0.71	4.56 ± 0.58

平均値±標準誤差 (n=6-7)

表 5-1-4 . テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が糞中への脂肪酸,中性ステロイドおよび酸性ステロイド排泄量に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
乾燥糞重量 (g/2日間)	5.46 ± 0.45	6.99 ± 0.53	6.48 ± 0.30	6.21 ± 0.37
脂肪酸排泄量 (mg/日)	72.8 ± 17.3	59.2 ± 6.2	70.4 ± 7.0	88.1 ± 10.0
ステロイド排泄量				
中性ステロイド (mg/日)	7.44 ± 0.55	7.04 ± 0.28	7.87 ± 0.30	6.85 ± 0.25
酸性ステロイド (mg/日)	4.62 ± 0.59[ab]	3.24 ± 0.26[a]	3.75 ± 0.33[ab]	5.37 ± 0.73[b]
総ステロイド（中性+酸性） (mg/日)	12.1 ± 1.0	10.3 ± 0.4	11.6 ± 0.3	12.2 ± 0.7

平均値±標準誤差 (n=6-7)

a,b；異なる文字間に $p < 0.05$ で有意差有り

4. 考察

第 4 章において，TF 類，TSA および TR 類が小腸からの脂肪の吸収を抑制する可能性を示した．脂肪吸収の抑制は，内臓脂肪や血清および肝臓脂質濃度低下のメカニズムの一つであると考えられている [24, 105]．

TF 類摂取は血清と肝臓 TG 濃度を有意には低下させなかった．TF 類は食後高脂血症を改善したが，肝臓の FAS，G6PDH，Malic enzyme，PAP および CPT 活性に影響しなかった．肝臓での脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素の活性に影響をしなかったことが血清や肝臓 TG 濃度の変動を誘導しなかった理由の一つであるかもしれない. Lin ら [87), Du ら [25)], Lin and Lin-Shiau[88)]は，TF 類が FAS の活性を抑制することを示しており，本実験の結果とは異なっているが, 彼らの実験は培養系や *in vitro* における結果である．TF 類は EC と EGC あるいはそのガロイルエステルの二量体であることからカテキンより分子量が大きいので，それらの小腸からの吸収はかなり限られると見積もられる．したがって，摂取した TF 類が肝臓での FAS の活性を直接かつ強く阻害するとは考えにくい. EGC およびそのガロイルエステルの二量体である TSA およびカテキンが多数重合した高分子ポリフェノールである TR 類も TF 類と同様にほとんど吸収されないと推測されることから，これら紅茶ポリフェノールも体内で強く作用していないとみなされる．また，TF 類，TSA および TR 類が FAS 以外の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性に及ぼす影響に関する報告はないが, TF 類と同様にこれら成分が直接肝臓での脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性に影響を及ぼすとは考えにくい．

前章において，紅茶ポリフェノールが小腸からの脂肪の吸収を抑制する可能性が示唆されたが，本実験における 10%脂肪食摂取では糞中への脂肪酸排泄を促進しなかったことから，脂肪吸収は抑制されていないと考えられる．油脂負荷試験におけるポリフェノール投与量と 10%脂肪食における 1 日のポリフェノール摂取量はどちらも約 40 mg と同程度であったが，脂肪吸収に及ぼす影響は異なっているようである．油脂負荷試験では，一度に多量の油脂を強制的に胃内に投与するが，摂食実験では少量ずつ消化管内に油脂が取り込まれることから，紅茶ポリフェノールの油脂吸収に及ぼす影響が異なっていると考えられる．紅茶ポリフェノールは 10%食餌脂肪レベルでは油脂の吸収を抑制しないかもしれない．混合揉捻発酵茶の凍結乾燥粉末中に含まれる総ポリフェノール含量は約 20%であり，混合揉捻発酵茶由来の凍結乾燥粉末 1%添加量は，今回の実験では 0.2%ポリフェノール食と同程度の量を含むことになる．今回の摂食実験において用いた TF 類, TSA および TR 類 0.2%添加量では, 混合揉捻発酵茶摂取の実験で観察されたような体脂肪低減作用, 血清および肝臓 TG 濃度の低下が見られなかった．紅茶ポリフェノール単独摂取は，脂質代謝改善作用を発揮しにくく，他のポリフェノールと複合的に作用することで効果を発揮しているかもしれない．また，紅茶ポリフェノール以外の成分も関与している可能性があり, 今後，これらの成分についても検討する必要がある．

Davis ら [86)]は，紅茶摂取が中等度の高 CHOL 血症者において血中 CHOL および LDL-CHOL 濃度を低下させることを報告している．一方 Bingham ら [90)] は，一般成人が 4 週間毎日紅茶を摂取しても，血中 CHOL，LDL-CHOL および高密度リポタンパク質（HDL）-CHOL 濃度が変化しないことを観察した．このように，紅茶摂取の血中 CHOL レベルに及ぼす効果については一致した結果は得られていない．Vermeer ら [89)]は，*in vitro* において TF 類が CHOL のミセルへの取り込みを濃度依存的に阻害することを示した．Ikeda ら [82)]は，カテキン特にガロイルエステルが CHOL のミセル溶解性を低下させることを観察した．これら結果から，TF 類やカテキンが CHOL のミセルへの取り込みを抑制することで，小腸からの CHOL の吸収を阻害して，CHOL 低下効果を発揮すると考えられる．TF 類，TSA および TR 類摂取は血清と肝臓 CHOL 濃度を有意に低下させるか，低下させる傾向を示した．本実験において，TSA および TR 類が降 CHOL 作用を発揮することを初めて明らかにした. 一般に肝臓 CHOL 濃度低下の一因として，CHOL のミセルへの取り込みを低下させることによる糞中へのステロイド排泄の促進により誘導されることが考えられる．本実験において，TF 類は血清 CHOL 濃度を低下させ，肝臓 CHOL 濃度を低下させる傾向を示した．しかし，TF 類摂取は中性ステロイドおよび酸性ステロイドの排泄を促進しなかったことから，TF 類による降 CHOL 作用は，糞中へのス

テロイド排泄の増加によるものではないと考えられる．TSA，TR 類は血清および肝臓 CHOL 濃度を低下させた．TSA や TR 類は TF 類と同様にカテキンの酸化重合により生成されるので, TF 類と同じような効果を有するものと考えられる．中性および酸性ステロイドの排泄を促進しなかったことから，TF 類と同様に TSA と TR 類の降 CHOL 作用は糞中へのステロイド排泄の促進を介するものではないと考えられる．これら紅茶ポリフェノールは，肝臓での CHOL 合成を抑制している可能性もあるが，現時点で不明であり，さらに検討が必要である．本実験において，TF 類，TSA および TR 類摂取がラットの血清および肝臓CHOL 濃度を低下させることを初めて観察したが，その作用メカニズムを明らかにすることはできなかった．

5. 要約

TF 類，TSA および TR 類を 0.2％添加した 10％脂肪食を 5 週齢の SD 系雄ラットに 4 週間摂食させ，これら紅茶ポリフェノールがラットの血清と肝臓の脂質濃度に及ぼす影響を検討した．TF 類，TSA および TR 類摂取は，ラットの血清および肝臓 TG 濃度に影響せず，肝臓脂肪合成関連酵素と脂肪酸 β-酸化系酵素活性や糞中への脂肪排泄も変動させなかった．一方，紅茶ポリフェノールは，血清および肝臓 CHOL 濃度を低下させた．しかし，この低下は糞中へのステロイド排泄増加によるものではなかった．

第 2 節　25%脂肪食における紅茶ポリフェノールの摂取がラット脂質代謝に及ぼす影響

1. 緒言

本章第一節において，0.2%TF 類，TSA あるいは TR 類を添加した 10%脂肪食を摂取したラットで血清と肝臓の CHOL 濃度が低下することを観察し，TSA および TR 類摂取が降 CHOL 作用を発揮することを初めて明らかにした．しかし，その作用メカニズムについては明らかにできなかった．また，血清や肝臓 TG 濃度への影響は観察されなかった．ポリフェノール類の脂質代謝に及ぼす影響に関する研究では 20%以上の高脂肪食による摂食実験が多く見受けられる．

太田ら [93]は，リンゴポリフェノールを添加した 25%脂肪食をラットに摂食させると血清および肝臓 TG 濃度を低減させることを報告している. Islam and Choi[17]は，緑茶ポリフェノールを添加した 22%脂肪食をラットに摂食させると血清 TG および CHOL 濃度を低下させることを観察している．さらに Fallon ら [22]は，紅茶ポリフェノールを添加した 22%脂肪食をラットに摂食させると血清 TG 濃度を低下させることを示した．Toyoda-Ono ら [83]は，OTPP を含む高脂肪食をマウスに 12 週間投与したところ, 糞中への脂肪酸の排泄量が増加したことを報告している．さらに，高脂肪食を摂取したヒトにおいて，ポリフェノールを多く含むウーロン茶を投与すると，糞中への脂肪酸の排泄量が増加することが示されている [83]．このように，ポリフェノールの脂質代謝に及ぼす影響に関する研究については高脂肪食条件において行われているものが多く見受けられる．

そこで本節では，食餌脂肪のレベルを 25%とし，第一節と同様に 0.2%の TF 類，TSA あるいは TR 類を添加した食餌を SD 系雄ラットに摂食させて，血清や肝臓脂質濃度に及ぼす影響を検討した．

2. 実験方法

1. 試料の調製

TF 類，TSA および TR 類の調製方法については，第 4 章第二節に準じて行った．

2. 実験動物及び飼料

実験には初体重 140 g 前後の 4 週齢の SD 系雄ラット（日本エスエルシー（株），静岡）を用いた．飼育条件は本章第一節に準じて行った. 食餌は AIN-76 組成に基づく純化食をコントロール食としたが，食餌脂肪としてラード 24%にコーン油を 1%加えて，食餌脂肪のレベルを 25%とした．その組成（g/kg）は，カゼイン 200，コーン油 10，ラード 240，コーンスターチ 150，セルロース 50，ミネラル混合（AIN-76-MX）35，ビタミン混合（AIN-76-VX）10，DL-メチオニン 3, 重酒石酸コリン 2 およびショ糖 300 である．本章第一節と同様に TF 類，TS および TR 類をそれぞれ 0.2%添加し，添加した分のショ糖を減量した．

3. 血清および肝臓の脂質濃度測定

本章第一節に準じて行った．

4. 肝臓の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性の測定

本章第一節に準じた．

5. 糞中脂肪酸量およびステロイド排泄の測定

本章第一節に準じて行った．

6. 統計処理

本章第一節に準じた．

3. 実験結果

1. 成長，摂食，肝臓および脂肪組織重量

体重増加量，摂食量，肝臓および脂肪組織重量を表 5-2-1 に示す．終体重および摂食量はすべての群間で差がなかった．また，体重 100 g 当たりの肝臓重量，腎臓周辺脂肪組織重量，睾丸周辺脂肪組織重量，腸管膜脂肪組織重量および総脂肪組織重量にもすべての群間で差は認められなかった．

2. 血清および肝臓の脂質濃度

血清および肝臓の脂質濃度を表 5-2-2 に示す．血清 TG 濃度に 4 群間で差は認められなかった．CHOL 濃度にもすべての群間で有意な差はなかったが，TF 類，TSA および TR 類群で低下する傾向にあった．PL 濃度はすべての群間で差が認められなかった．

肝臓 TG 濃度は，TSA 群でコントロール群と比較して有意に低い値を示した．TF 類群および TR 類群の値は，コントロール群と TSA 群の間であった．肝臓 CHOL 濃度は，TF 類，TSA 群および TR 類群でコントロール群と比較して有意に低値を示した．PL 濃度には各群間で差は認められなかった．

3. 肝臓脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素活性

肝臓の脂肪合成関連酵素活性を表 5-2-3 に示す．サイトソルにおける FAS，G6PDH および Malic enzyme 活性は，TF 類群，TSA 群および TR 類群でコントロール群より低い傾向を示したが，その差は有意ではなかった．一方，ミクロソームの PAP 活性は，TF 類群，TSA 群および TR 類群でコントロール群と比較して有意に低値を示した．ミトコンドリアの CPT 活性は各群間において有意な差は認められなかったが，TF 類群でやや高く，TR 類群でやや低値であった．

4. 糞重量，糞中への脂肪酸およびステロイドの排泄量

糞重量，糞中への脂肪酸およびステロイドの排泄量を表 5-2-4 に示す．糞重量に，群間で有意な差は観察されなかったが，TF 類群で高い傾向を示した．糞中への脂肪酸の排泄量は, TF 類群でコントロール群と比較して有意に高い値を示し, TSA 群および TR 類群で増加する傾向を示した．中性ステロイドの排泄量は，TSA 群でコントロール群より有意に高い値を示し，TF 類群および TR 類群で高い傾向が観察された．酸性ステロイドの排泄量は，TR 類群で有意に高く，TF 類群および TSA 群でコントロール群に比べて増加する傾向であった．中性と酸性ステロイドを合計した総ステロイドの排泄量は，TSA 群および TR 類群でコントロール群と比較して有意に高く，TF 類群で高い傾向を示した．

表 5-2-1. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が体重増加量,摂食量,肝臓重量および脂肪組織重量に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
初体重（g)	141 ± 4	142 ± 3	143 ± 3	143 ± 3
終体重（g)	333 ± 11	352 ± 10	336 ± 7	345 ± 7
摂食量 （g/日）	16.0 ± 0.7	16.7 ± 0.6	16.2 ± 0.7	16.4 ± 0.4
肝臓重量 （g/100 g 体重）	4.06 ± 0.08	4.06 ± 0.12	4.06 ± 0.06	3.93 ± 0.15
脂肪組織重量 （g/100 g 体重）				
腎臓周辺	2.97 ± 0.21	2.59 ± 0.38	2.56 ± 0.42	2.85 ± 0.45
睾丸周辺	1.89 ± 0.22	2.03 ± 0.33	1.91 ± 0.30	1.59 ± 0.22
腸間膜	1.78 ± 0.19	1.79 ± 0.29	1.60 ± 0.27	1.68 ± 0.25
合計（腎臓+睾丸+腸間膜）	6.63 ± 0.58	6.41 ± 0.97	6.07 ± 0.96	6.11 ± 0.92

平均値±標準誤差 (n=6-7）

表 5-2-2. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が血清と肝臓の脂質濃度に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
血清脂質濃度（mg/dL)				
トリグリセリド	124 ± 16	136 ± 30	128 ± 15	145 ± 29
コレステロール	81.1 ± 9.8	67.4 ± 5.0	67.9 ± 7.4	72.4 ± 4.6
リン脂質	141 ± 5	134 ± 12	139 ± 8	145 ± 16
肝臓脂質濃度（mg/g)				
トリグリセリド	121 ± 7^{a}	101 ± 6^{ab}	82.2 ± 5.7^{b}	105 ± 6^{ab}
コレステロール	9.21 ± 0.61^{a}	4.21 ± 0.21^{b}	3.20 ± 0.24^{b}	4.47 ± 0.15^{b}
リン脂質	17.6 ± 0.6	19.3 ± 0.9	17.2 ± 0.7	18.2 ± 0.5

平均値±標準誤差 (n=6-7）

a,b；異なる文字間に $p < 0.05$ で有意差有り

表 5-2-3. テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が肝臓の脂肪合成関連酵素と脂肪酸β-酸化系酵素に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
	nmol/min/mg protein			
脂肪合成関連酵素				
サイトソル				
脂肪酸シンターゼ	4.35 ± 0.46	4.04 ± 0.87	4.17 ± 0.44	2.20 ± 0.59
グルコース6－リン酸デヒドロゲナーゼ	19.6 ± 2.2	17.4 ± 2.7	17.0 ± 0.84	18.6 ± 1.2
マリックエンザイム	29.0 ± 4.3	26.1 ± 3.1	25.0 ± 2.1	24.1 ± 2.4
ミクロソーム				
ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ	9.12 ± 1.98[a]	4.23 ± 0.55[b]	4.01 ± 1.45[b]	3.53 ± 0.27[b]
脂肪酸β−酸化系酵素				
ミトコンドリア				
カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ	3.78 ± 0.49	5.20 ± 1.35	3.88 ± 0.61	2.72 ± 0.23

平均値±標準誤差 (n=6-7)

a,b；異なる文字間に $p < 0.05$ で有意差有り

表 5-2-4 . テアフラビン類,テアシネシン A,テアルビジン類の摂取が糞中への脂肪酸,中性ステロイドおよび酸性ステロイド排泄量に及ぼす影響

	コントロール	テアフラビン類	テアシネンシンA	テアルビジン類
乾燥糞重量 (g/2日間)	3.40 ± 0.19	4.90 ± 0.92	3.60 ± 0.29	3.90 ± 0.25
脂肪酸排泄量 (mg/日)	74.2 ± 6.2[a]	123 ± 10[b]	107 ± 16[ab]	101 ± 15[ab]
ステロイド排泄量				
中性ステロイド (mg/日)	3.87 ± 0.27[a]	4.66 ± 0.52[ab]	5.11 ± 0.33[b]	4.35 ± 0.32[ab]
酸性ステロイド (mg/日)	3.15 ± 0.23[a]	4.04 ± 0.31[ab]	4.26 ± 0.42[ab]	5.08 ± 0.42[b]
総ステロイド（中性+酸性） (mg/日)	7.03 ± 0.42[a]	9.06 ± 0.52[ab]	9.37 ± 0.43[b]	9.43 ± 0.72[b]

平均値±標準誤差 (n=6-7)

a,b；異なる文字間に $p < 0.05$ で有意差有り

4. 考察

本章第一節において TF 類，TSA および TR 類などの紅茶ポリフェノールは 10%脂肪食において，ラットの血清と肝臓 TG 濃度に影響しなかったが，ラットの血清と肝臓 CHOL 濃度を低下させることを明らかにした．実験動物を用いたポリフェノール摂食実験では，20%以上の高脂肪食で脂質代謝に及ぼす影響が検討されていることから，本実験でも高脂肪食において，紅茶ポリフェノールが血清や肝臓の脂質濃度に及ぼす影響を検討した．

肝臓 TG 濃度は，TSA 摂取で有意に低下し，TF 類および TR 類摂取で低下する傾向を示した．肝臓 TG 濃度の低下は，肝臓での脂肪酸合成や脂肪合成の抑制あるいは脂肪酸酸化の亢進により引き起こされることが一因として推測される．TF 類，TSA および TR 類は肝臓の脂肪酸合成の律速酵素であるサイトソルの FAS，G6PDH および Malic enzyme の活性をわずかに抑制したが，その作用は必ずしも強くなかった．また，脂肪酸酸化の律速酵素であるミトコンドリアの CPT 活性にはほとんど影響しなかった．しがって，紅茶ポリフェノール摂食による肝臓 TG 濃度の低下はこれらの酵素活性の変動によるものではないと考えられる．一方，肝臓脂肪合成の律速酵素である PAP の活性は，TF 類，TSA および TR 類摂取でコントロール食摂取より有意に低く，その値はコントロール群の半分以下であった．この PAP 活性の低下が肝臓 TG 濃度の減少を誘導した可能性がある．TF 類が FAS の活性や FAS の遺伝子発現を抑制することが報告されている[25, 78]が，これらの研究は *in vitro* あるいは培養系によるものである．TF 類，TSA および TR 類などの紅茶ポリフェノールが小腸からどの程度吸収されるかについてはほとんど知られていないが，TF 類や TSA はカテキンが酸化重合した二量体で，TR 類はそれらがさらに重合して生成された高分子ポリフェノールであることから，これら紅茶ポリフェノールはほとんど吸収されないと推測される．したがって，TF 類，TSA および TR 類が小腸から吸収された後に肝臓での酵素活性に直接影響しているとは考えにくい．Matsui ら[13, 27]は，TF 類，TSA および TR 類が小腸でのα-グルコシダーゼ活性を阻害することで小腸からの糖質の吸収を抑制することを報告している．肝臓において合成される TG は，主にグリセロリン酸経路によるものである．この経路では，TG は解糖系において生じたα-グリセロリン酸を基質の一つとしていることから，α-グルコシダーゼ活性の抑制により体内に吸収されるグルコースが減少することで，TG 合成の基質であるα-グリセロリン酸が少なくなり PAP の活性が低下した可能性がある．本章第一節において，10%脂肪食摂取で TF 類，TSA および TR 類は PAP 活性を抑制する傾向を示すことを観察した．これらのことから，紅茶ポリフェノール摂取による肝臓TG 濃度の低下は，紅茶ポリフェノールがα-グルコシダーゼの活性を阻害することで惹起されたことが一因として考えられる．しかし，α-グルコシダーゼ活性の抑制により体内に吸収されるグルコースが減少することで，摂取エネルギー量が抑制し，結果として，体重が減少あるいは摂食量が増加する可能性があるが，本実験において群間で体重および摂食量に差は確認されなかった．今後，紅茶ポリフェノール摂取の小腸からのグルコース吸収に及ぼす影響について，検討する必要がある．

糞中への脂肪酸の排泄は，TF 類摂取で有意に増加し，TSA および TR 類摂取で増加する傾向にあった．小腸からの脂肪の吸収抑制は，血清や肝臓 TG 濃度の低下を誘導すると推察される．TF 類，TSA および TR 類は，高い膵リパーゼ阻害活性を有し，第 4 章で観察したように食後高脂血症を抑制することから，高脂肪食条件下では小腸からの脂肪の吸収を抑制することで体内 TG 濃度を減少させると考えられる．しかし，本実験において血清 TG 濃度には影響が見られなかった．血清 TG 濃度の変動にリポタンパク質リパーゼ（LPL）の活性が影響していることが知られている[106]カイロミクロンや超低密度リポタンパク質（VLDL）中の TG は末梢の LPL の作用により加水分解されて遊離脂肪酸が末梢組織に取り込まれることで，血清 TG 濃度が減少する．今後，紅茶ポリフェノールの LPL 活性に及ぼす影響についての検討を行う必要がある．

Malon ら[26]は，TF 類を多く含む抽出物を高 CHOL 血症者に摂取させると，CHOL 濃度が減少することを報告している．小腸からの CHOL は，①胆汁酸ミセルへの溶解，②胆汁酸ミセルから CHOL 単分子としての放出，③CHOL 単分子の小腸上皮細胞表面微絨毛膜への取組み，④上皮細胞内でのエステル化とカイロミクロンへの取組み，そして⑤リンパへの放出などの機構を経て吸収される．Ikeda ら[107]は，緑茶カテキンが胆汁酸ミセルへの CHOL の溶解を減

少させることで，小腸からの CHOL の吸収を抑制することを報告している．Malon ら[26)]も CHOL 低下作用のメカニズムについて Ikeda ら[107)]の報告を支持している．Vermeer ら[89)]は，TF 類は CHOL のミセルへの取り込みを阻害して小腸での CHOL 吸収を減少させると報告している．ミセルへの取り込み抑制が糞中への CHOL 排泄を増加させ[24, 108-110)]，肝臓中の CHOL 濃度を減少させる[78, 111)]と考えられる．本実験において，TSA および TR 類は中性および酸性ステロイドの排泄量をコントロール群と比較して有意に促進し, TF 類は促進する傾向を示した (表 5-2-4)．このことから，糞中へのステロイド排泄促進が肝臓 CHOL 濃度の低下を誘導した一因と考えられる．これらのことから，TF 類，TSA および TR 類は，TG 濃度を大きく低下はさせなかったが, 一方で, CHOL 濃度を有意に低下させる作用を新たに見出した.

このように，高脂肪食において紅茶ポリフェノールが脂質低下作用を発揮することが明らかとなった.本研究で開発した混合揉捻発酵茶は紅茶ポリフェノールを多く含有することから，混合揉捻発酵茶摂取による脂質代謝改善作用発現には紅茶ポリフェノールが関与している可能性が示唆された．しかし，その効果は，混合揉捻発酵茶摂取と同程度の効果が観察されなかったことから，TF 類，TSA および TR 類が共存することで複合的に効果を発揮していることが考えられ，また，紅茶ポリフェノール以外の成分も関与している可能性もある．今後，TF 類，TSA および TR 類の組み合わせや紅茶ポリフェノール以外の成分が脂質代謝に及ぼす影響について解明する必要がある.

5.　要約

25%高脂肪食における TF 類, TSA および TR 類摂取がラットの脂質代謝に及ぼす影響について検討した．TSA や TR 類は，TF 類と同様に肝臓 TG 濃度を低下させた．その低下は，糞中への脂肪酸の排泄量増加および肝臓での脂肪合成低下によるものと推察された．また，肝臓 CHOL 濃度も低下させたが，その作用メカニズムの一部は，糞中へのステロイド排泄の増加によるものと考えられた. 以上のことから，TSA と TR 類が TF 類と同様に肝臓 TG および CHOL 低下作用を発揮する可能性が示唆された.

第6章　総括

カテキン含量が多いため渋みが強いことなどから有効に利用されていない緑茶三番茶葉とカテキンの酸化重合を促進させるビワ葉を混合揉捻，発酵させることで品質と機能性に及ぼす影響について検討を行った．

混合揉捻発酵茶葉を製造するうえで解決する課題が，長時間を要する萎凋法の改良と萎凋させた茶葉とビワ葉を混合揉捻することで，カテキンの酸化が促進されるかであった．そこで，三番茶葉とビワ葉を混合した新たな発酵茶を短時間低コストで製造する技術の開発に取り組んだ．緑茶製茶機械の粗揉機を利用して三番茶葉に 70℃の熱風を当て，茶温を40℃以下に保ち撹拌することで，従来の紅茶製造であれば24時間要する茶葉の萎凋を20分で完了させることを可能にした．次に揉捻機を用いて萎凋した三番茶葉にビワ葉を全量の 10%添加し 20 分間揉捻することで，短時間でカテキンの酸化重合が促進され, 紅茶ポリフェノールが生成した. その結果, 味, 香りに優れ，浸出液の色が鮮やかな紅色を呈する品質の高い混合揉捻発酵茶が製造された．混合揉捻発酵茶葉は，既存の製茶機械を用いて製造するので新たな設備投資が不要で短時間低コストで製造ができる利点がある．

混合揉捻発酵茶葉の製造法が確立したことで，次に混合揉捻発酵茶葉の品質を高めるための三番茶葉の最適な摘採時期，香気成分の特性，香味を発揚する技術について検討を行った．三番茶葉の摘採時期の違いにより茶葉中に含まれる粗繊維，カテキン，アミノ酸などの含量が変動することから，三番茶葉摘採時期が混合揉捻発酵茶の品質に影響する可能性がある．そこで，摘採時期が品質に及ぼす影響について検討した結果，最も品質の高い混合揉捻発酵茶葉の製造には, 二番茶摘採日から35日目に摘採した三番茶葉を用いることが最適であることが示唆された．

混合揉捻発酵茶葉は揉捻工程で緑茶三番茶葉にビワ葉を添加して製造するので，緑茶葉のみから製造される緑茶や紅茶とは異なる香りを有する可能性があることから，混合揉捻発酵茶の香り特性を調査した．混合揉捻発酵茶には，紅茶および緑茶には含まれずビワ葉の揉捻，発酵に由来する (*Z*)-3-hexen-1-olacetate，茶葉の揉捻，発酵に加えて茶葉とビワ葉の混合揉捻，発酵により生成される花香の香気成分の geraniol およびウーロン茶に多く含まれる nerolidol が検出された．混合揉捻発酵茶の香りは，茶葉の揉捻，発酵だけでなく，ビワ葉添加および茶葉とビワ葉の混合揉捻，発酵により特徴づけられると考えられた．次に，混合揉捻発酵茶の香味を向上させるために火入れ温度と火入れ時間を検討した．混合揉捻発酵茶の官能検査および加熱香気成分含量を解析した結果，混合揉捻発酵茶の香味を高めるためには，火入れ温度 110℃，火入れ時間 30〜40 分あるいは 130℃, 20 分が最適であると考えられた．このように，三番茶葉とビワ葉を一緒に混合，揉捻することで，味，香りに優れる新しい形態の発酵茶を開発した．

また，この混合揉捻発酵茶には，優れた体脂肪低減作用や脂質低下作用があることを明らかにした．動物やヒトにおいて，混合揉捻発酵茶葉の熱水抽出物が血清および肝臓 TG 濃度低下作用，体脂肪低下作用を有することが観察されている．しかし，脂質代謝を改善する成分とその作用メカニズムについて明らかではない．混合揉捻発酵茶葉は，茶葉中のカテキンが酸化されて TF 類，TSA，TR 類の紅茶ポリフェノールが多く生成されることが特徴である．そこで，混合揉捻発酵茶葉に含まれる機能性成分とその作用メカニズムについて明らかにすることを目的とし，検討を行った．

はじめに, SD 系雄ラットを用いて, 胃内に TF 類，TSA および TR 類を負荷し，その後胃内に油脂を投与して血中 TG 濃度の経時的変化を測定したところ，TF 類，TSA および TR 類を投与したラットでは，血清 TG 濃度上昇が効果的に抑制されることを観察した．TF 類，TSA および TR 類は，小腸からの脂肪の吸収を抑制することで食後高脂血症を改善することが示唆された．続いて，紅茶ポリフェノールの摂食試験についてラットを用いて行った．*in vitro* において TF 類は，カテキンよりも強い膵リパーゼ阻害性を発揮することが報告されており[80]，TF 類，TS 類および TR 類などの紅茶ポリフェノールが，脂質代謝改善作用に及ぼしていると推測した．その結果，

10%脂肪食では TG 濃度低下作用は観察されなかったが，25%脂肪食において TF 類，TSA および TR 類は，肝臓 TG 濃度を低下させた．これは肝臓での脂肪合成を抑制し，糞中への脂肪排泄を促進することにより発揮されていると推察された．さらに，紅茶ポリフェノールは，糞中へのステロイドの排泄量の増加により肝臓CHOL 濃度を低下させることが考えられた．これらのことから，TF 類，TSA および TR 類は，TG 濃度を大きく低下はさせなかったが，一方で，CHOL 濃度を有意に低下させる作用を新たに見出した．

本研究において，特に高脂肪食の条件で，紅茶ポリフェノールは脂質低下作用を発揮した．混合揉捻発酵茶は紅茶ポリフェノールを多く含有することから，混合揉捻発酵茶摂取による脂質代謝改善作用発現には紅茶ポリフェノールが関与している可能性が示唆され，紅茶ポリフェノールである TF 類，TSA および TR 類が脂質代謝改善作用を有することを明らかにした．しかし，混合揉捻発酵茶に含まれる総紅茶ポリフェノール量とほぼ同レベルの TF 類, TSA あるいは TR 類ポリフェノールは，混合揉捻発酵茶と同じ程度の脂質代謝改善作用を発揮しなかったことから，TF 類，TSA および TR 類が共存することで複合的に作用していることも考えられ，また，紅茶ポリフェノール以外の成分も関与している可能性も示唆された．

このように本研究では，未利用資源である緑茶三番茶葉とビワ葉を活用して短時間低コストに加えて香味が優れる品質の高い発酵茶の製造法を確立し，さらに製造過程で生成される紅茶ポリフェノールが脂質代謝改善作用を有することを明らかにした．

謝辞

本研究の遂行にあたり，実験計画，実験手法，論文作成にわたり終始御懇篤なご指導・ご鞭撻を賜りました長崎県立大学シーボルト校 人間健康科学研究科 田中 一成 教授に謹んで感謝の意を表します.

また，本研究中，終始御指導と御鞭撻を頂いた長崎県立大学シーボルト校 看護栄養学部栄養健康学科 田丸 静香 助教に厚く御礼を申し上げげます.

実験にご協力下さいました県立長崎シーボルト大学看護栄養学部栄養健康学科栄養化学研究室 近藤 美穂子 氏，荒木 沙耶香 氏，太田 結子 氏，関 優子 氏, 樅木 美香 氏, 福畑 光恵 氏, 田代 岳広 氏，西崎 彩子 氏，原田 麻衣 氏，橋本 咲暁子 氏に心より御礼申し上げます.

本研究の遂行にあたりご助言を賜り，また，ご校閲の労をお取り頂きました長崎県立大学シーボルト校 人間健康科学研究科 山口 義彦 教授, 古場 一哲 教授， 冨永 美穂子 講師に深謝致します.

「混合揉捻発酵茶」の共同研究者である長崎大学大学院医歯薬学総合研究科天然物化学研究室 田中 隆 准教授, 九州大学大学院生物機能科学部門食品バイオ工学講座 松井 利郎 准教授, 長崎県工業技術センター食品・環境科 玉屋 圭 主任研究員, 長崎県農林技術開発センター農産園芸研究部門茶業研究室 古賀亮太室長, 野田 政之 主任研究員に助言を賜りましたことを厚く御礼申し上げます.

引用文献

1) 小泊重洋，お茶の種類，「お茶の何でも小辞典」，O-CHA 学構想会編，（講談社, 東京）pp. 16-19（2000）.

2） 吉富　均，茶の加工，「茶のサイエンス」，武田善行編，（筑波書房, 東京） pp. 132-165（2004）.

3） 中川致之，阿南豊正，岩淺　潔，夏茶と春茶の香味特性と化学成分の相違．茶業研究報告，**53**，74-81（1977）.

4） 中川致之，阿南豊正，高柳博次，夏茶香味の劣性要因と化学成分の関係．茶業研究報告，**55**，71-77（1978）.

5） 長崎県農林部農政課，長崎県農政ビジョン後期計画，（2006）.

6) Nattella, F., Nardini, M., Giannetti, I., Dattilo, C., and Scaccini, C., Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J. Agric. Food Chem*., **50**, 6211-6216 (2002).

7) Shimizu, M., Yoshimi, N., Yamada, Y., Matsunaga, K., Kawabata, K., Hara, A., Moriwaki, H., and Mori, H., Suppressive effects of chlorogenic acid on *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced glandular stomach carcinogenesis in male F344 rats. *J. Toxicol. Sci*., **24**, 433-439 (1999).

8) 田中　隆，草野リエ，河野　功，宮田裕次，玉屋　圭，前田正道，ビワ葉添加による発酵茶の促進機構．日本生薬学会第 52 回大会講演要旨集，p. 56，金沢（2005）.

9) Tanaka, T., Mine, C., Inoue, K., Matsuda, M., and Kouno, I., Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechin quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J.　Agric. Food Chem*., **50**, 2142-2148 (2002).

10） 田中一成，西園祥子，宮田裕次，玉屋　圭，前田正道，　番茶生葉と枇杷葉の揉捻加工による発酵茶の糖尿病予防効果，日本栄養･食糧学会第 59 回大会講演要旨集，p. 144，東京（2005）.

11） 田丸靜香，田中　隆，玉屋　圭，松井利郎，宮田裕次，田中一成，混合揉捻発酵茶のラットとヒトにおける体脂肪および中性脂肪低減作用．日本栄養・食糧学会第 62 回大会講演要旨集，p. 159，埼玉（2008）.

12） 近藤美穂子，水谷美幸，宮田裕次，玉屋　圭，西園祥子，田丸靜香，田中一成，番茶生葉と枇杷葉による混合揉捻発酵茶のヒト血糖値，血清脂質および体脂肪に及ぼす影響．日本栄養・食糧学会第 61 回大会講演要旨集，p. 102，京都（2007）.

13） 越前佳恵，荒巻美佳，宮田裕次，玉屋　圭，西園祥子，田丸靜香，田中一成，番茶生葉と枇杷葉の混合揉捻発酵茶が糖尿病発症抑制発揮する成分の特定．日本栄養・食糧学会第 61 回大会講演要旨集，p. 102，京都（2007）.

14) Huang, S. W., and Frankel, E. N., Antioxidant activity of tea catechins in different lipid system. *J. Agric. Food Chem*., **45**, 3033-3038 (1997).

15) Zhang, G., Miura, Y., and Yagasaki, K., Effects of dietary powdered green tea and theanine on tumor growth and endogenous hyperlipidemia in hepatoma-bearing rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **66**, 711-716 (2002).

16) Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., and Yamamoto, T., Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Chem*., **53**, 2307-2311 (1989).

17) Islam, S., and Choi, H., Green tea, anti-diabetic or diabetogenic: A dose response study. *Biofactors*, **29**, 45-53 (2007).

18) Ito, Y., Ichikawa, T., Morohoshi, Y., Nakamura, T., Saegusa, Y., and Ishihara, K., Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomedical Research*, **29**, 27-32 (2008).

19) Ikeda, I., Hamamoto, R., Uzu, K., Imaizumi, K., Nagao, K., Yanagita, T., Suzuki, Y., Kobayashi, M., and Kakuda, T., Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic

triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1049-1053 (2005).
20) Suzuki, Y., Unno, T., Kobayashi, M., Nozawa, A., Sagesaka, Y., and Kakuda, T., Dose-dependent suppression of tea catechins with a galloyl moiety on postprandial hypertriglyceridemia in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1288-1291 (2005).
21) Kobayashi, M., Unno, T., Suzuki, Y., Nozawa, A., Sagesaka, Y., Kakuda, T., and Ikeda, I., Heat-epimerized tea catechins have the same cholesterol-lowering activity as green tea catechins in cholesterol-fed rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2455-2458 (2005).
22) Fallon, E., Zhong, L., Furane, J. K., and Levitt, M. D., A mixture of extracts of black and green tea and mulberry leaf did not reduce weight gain in rats fed a high-fat diet. *Altern Med Rev*, **13**, 43-49 (2008).
23) Yoshino, K., Tomita, I., Sano, M., Oguni, I., Hara, Y., and Nakano, M., Effect of long term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Age*, **17**, 79-85 (1994).
24) Matsumoto, N., Okushio, K., and Hara, Y., Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *J. Nutr.*, **44**, 337-342 (1998).
25) Du, Y. T., Wang, X., Wu, X. D., and Tian, W. X., Keemun black tea extract contains potent fatty acid synthase inhibitors and reduces food intake and body weight of rats via oral administration. *J. Enzyme Inhib. Med. chem.*, **20**, 349-356 (2005)
26) Maron, D. J., Lu, G. P., Cai, N. S., Wu, Z. G., Li, Y. H., Chen, H., Zhu, J. Q., Jin, X. J., Wouters, B. G., and Zhao, J., Cholesterol-lowering effect of a theaflavin-enriched green tea extract. *Arch. Intern. med.*, **163**, 1448-1453 (2003).
27) Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A., Tamaya, K., Miyata, Y., Tanaka, K., and Matsumoto, K., α-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J. Agric. Food chem.*, **55,** 99-105 (2007).
28) Henning, S. M., Aronson, W., Niu, Y., Conde, F., Lee, N. H., Seeram, N. P., Lee, R. P., Lu, J., Harris, D. M., Moro, A., Hong, J., Shan, L. P., Barnar, R. J., Ziaee, H. G., Casthy, G., Go, V. W., Wang, H., and Heber, D., Tea polyphenols and theaflavins are present in prostate tissue of humans and mice after green and black tea consumption. *J. Nutr.*, 1839-1843 (2006).
29) Tanaka, T., Miyata, Y., Tamaya, K., Kusano, R., Matsuo, Y., Tamaru, S., Tanaka, K., Matsui, T., Maeda, M., and Kouno, I., Increase of theaflavin gallates and thearubigins by acceleration of catechin oxidation during production of new fermented tea obtained by tea-rolling processing of loquat (*Eriobotrya japonica*) and green tea leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 5816-5822 (2009).
30） 竹尾忠一，発酵茶の化学，「茶の栽培と利用加工」，第1版，岩浅　潔編，(養賢堂, 東京)，pp. 375-383（1994）.
31） 重松洋子，下田満哉，筬島　豊，紅茶香気成分の比較．日本食品科学工学会誌，**41**，768-777（1994）.
32） 原　利男，久保田悦郎，緑茶と紅茶の香気成分の比較．茶業研究報告，**50**，68-73（1976）.
33） 竹尾忠一，香気成分組成から見た半発酵茶と紅茶の香気特性の解明．日本農芸化学会誌，**57**，457-459（1983）.
34） 岩淺　潔，荒茶の製造，「茶の科学」，第1版（朝倉書店, 東京），pp. 52-64 （1991）.
35） 池ヶ谷賢次朗，高柳博次，阿南豊正，茶の分析法．茶業研究報告，**71**，43-74（1990）.
36） 山口優一，山本(前田)万里，辻　顕光，カテコールを内部標準としたカテキン類及びカフェインの HPLC 分析．茶業研究報告，**84**，32-34（1997）.
37） 竹尾忠一，茶の審査法，「新茶業全書」，第8版，社団法人静岡県茶業会議所編，（社団法人静岡県茶業会議所, 静岡），pp. 393-412（1988）.
38） 桑原穆夫，竹尾忠一，古畑　哲，西条了康，紅茶の製造操作と品質に関する研究(第2報).

茶業試験場研究報告，**1**，228-260（1962）.
39) 竹尾忠一，紅茶製造に中心を置いた茶葉ポリフェノールオキシダーゼの研究．茶業試験場研究報告，**5**，2-73（1967）.
40) 宮田裕次，田中　隆，混合揉捻発酵茶の製造法と発酵におけるビワ葉の役割．食品工業，**52**，26-34（2009）.
41) 小林彰夫，久保田紀久枝，香りの前駆体としての配糖体．化学と生物，**32**，185-189（1996）.
42) 中川致之，田村真八郎，石島紀男，緑茶の呈味構造とし好性に関する研究．茶業研究報告，**45**，26-31（1973）.
43) 阿南豊正，中川致之，茶葉の化学成分含量に及ぼす光の影響．茶業研究報告，**47**，132-138（1974）.
44) 田中伸三，岩淺　潔，深津修一，青野英也，田中静夫，佐波哲次，茶葉の摘採時期と製茶品質との関係．野菜・茶業試験場研究報告B(金谷)，**3**，55-64（1989）.
45) 木幡勝則，峰　伸一，氏原ともみ，堀江秀樹，茶葉の熟度別抗酸化能の変化．茶業研究報告，**96**，63-68（2003）.
46) 宮田裕次，寺井清宗，石灰窒素の施用が原葉形質及び荒茶中のNDF含有率に及ぼす影響．茶業研究報告，**97**，27-30（2004）.
47) 佐波哲次，摘採と整枝，「茶の栽培と利用加工」，第1版，岩浅　潔編，(養賢堂, 東京)，pp. 142-147（1994）.
48) 津志田藤二郎，ポリフェノールの分析法，「食品機能研究法」，篠原和毅，鈴木建夫，上野川修一編著（光琳, 東京），pp. 318-322（2000）.
49) Negi, P. S., and Jayaprakasha, G. K., Antioxidant and antibacterial activities of punica granatum peel extract. *J. Food Sci.*, **68**, 1473-1477 (2003).
50) 中野不二雄，鈴木勝弘，滝谷　洋，生葉の圧縮特性．茶業研究報告，**50**，74-87(1976).
51) 宮田裕次，寺井清宗，窒素施肥量および蒸熱条件の異なる蒸製玉緑茶の浸出液成分の解析．茶業研究報告，**97**，1-8（2004）.
52) 宮田裕次，低コスト・省力化と少量施肥に対応した製茶技術の合理化．平成14年度長崎県総合農林試験場東彼杵茶業支場試験成績書，68-83（2002）.
53) 小柳津　勤，下田満哉，松本　清，後藤　正，茶芽の熟度による緑茶香気成分の変化．日本食品科学工学会誌，**49**，327-334（2002）.
54) 堀江秀樹，木幡勝則，各種緑茶中のシュウ酸含量とその味への寄与．茶業研究報告，**89**，23-27（2000）.
55) 堀江秀樹，氏原ともみ，木幡勝則，茶主要成分の茶浸出液への溶出特性．茶業研究報告，**91**，29-33（2001）.
56) 堀江秀樹，氏原ともみ，木幡勝則，茶浸出液中の呈味核酸類の分析．茶業研究報告，**93**，55-61（2002）.
57) Takei, Y., Iwashita, K., and Yamashita, T., Aroma components characteristic of spring green tea. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2151-2157 (1976).
58) 川上美智子，被覆茶の香気，「茶の香り研究ノート」，第1版(光生館,東京), pp. 49-66 (2000).
59) Kobayashi, A., Uchida, A., and Kawashima, Y., Studies on the flavor of part. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1102-1105 (1966).
60) Tokimoto, Y., Ikegami, M., Juan, I. M., and Chiu, T. F., Effects of withering and mass-rolling processes on the formation of aroma components in pouchong type semi-fermented tea. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 87-91 (1984).
61) 樋口雅彦，佐藤昭一，濱崎正樹，眞正清司，固相マイクロ抽出(SPME)法による茶の加熱香気成分の分析法．茶業研究報告，**98**，33-42（2004）.
62) 池ヶ谷賢次朗，茶の品質・保健性と化学成分，「新茶業全書」，第8版，社団法人静岡県茶業会議所編，(社団法人静岡県茶業会議所, 静岡)，pp. 471-509（1988）.
63) 高橋京子，西銘　杏，柿沼　玲，小坂橋淑恵，菅谷明日香，谷藤福子，宮本朋子，沖縄産調味料コーレーグースの辛味成分と香気成分．日本食品科学工学会誌，**55**，129-136（2008）.
64) 坂田完三，烏龍茶の香気生成の秘密を探る．化学と生物，**37**，20-27（1999）.
65) 寺井理治，稗圃直史，福田伸二，前田正道，田中　隆，ビワ含有成分機能性評価とその機

能を生かした健康食品の開発．平成 13 年度長崎県果樹試験場業務報告，91-102（2001）.

66） 西條了康，紅茶の揮発性成分生成に関する生物化学的研究．茶業試験場研究報告，8, 97-174（1973）.

67） 竹尾忠一，津志田藤二郎，マハンタ・ピー・ケー，田代正樹，今村義成，烏龍茶と紅茶の香気に関する食品化学的研究．茶業試験場研究報告，20，91-180（1985）.

68) De Tommasi, N., De Simone, F., Aquino, R., Pizza, C., and Liang, Z., Plant metabolites new sesquiterpene glycosides from *Eriobotrya japonica*. *J. Nat. Prod.*, **53**, 810-815 (1990).

69） 原　利男，茶の仕上加工，「茶の栽培と利用加工」，第 1 版，岩浅　潔編，(養賢堂, 東京)，pp. 334-345（1994）.

70） 佐田康稔，紅茶の仕上げ加工，「茶大百科」，第 1 版，農村漁村分化協会編，（農村漁村分化協, 東京)，pp. 843-844（2008）.

71） 岩淺 潔，茶の仕上げ加工，「茶の科学」，第 1 版(朝倉書店, 東京)，pp. 64-67（1991）.

72） 原　利男，緑茶の加熱香気成分とオフ・フレーバー成分に関する研究．野菜・茶業試験場研究報告 B(金谷)，3，9-54（1989）.

73) Hofmann, G., Isolation of two pairs of isomeric 2,4-alkadienals from soybean oil-reversion flavor concentrate. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **38**, 31-32 (1961).

74） 阿南豊正，中川致之，緑茶の脂質に関する研究．日本食品科学工学会誌，24，305-310（1977）.

75） 原 利男，久保田悦郎，新茶の香気特性とその保存について．日本食品科学工学会誌，26, 391- 395（1979）.

76） 原　利男，久保田悦郎，緑茶貯蔵中の香気成分の変化．日本農芸化学会誌，56, 625-630(1982).

77） 岩 浅潔，茶の加工科学，「茶の科学」，第 1 版(朝倉書店, 東京)，pp. 52-64（1991）.

78) Vinson, J. A., and Dabbagh, Y. A., Effect of green and black tea supplemention on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in the hamsters: mechanisms for the epidemyological benefits of tea drinking. *FEBS. Lett.*, **433**, 44-46 (1998).

79) Gomez, K. A., and Gomez, A. A., "Statistical procedures for agricultural research" 2nd ed. Wiley, New York, pp. 13-16 (1984).

80) Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., and Kiso, Y., Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4593-4598 (2005).

81) Kusano, R., Andou, H., Fujieda, M., Tanaka, T., Matsuo, Y., and Kouno, I., Polymer-like polyphenols of black tea and their lipase and amylase inhibitory activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 266-272 (2008).

82) Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K., Nozawa, A., and Kakuda, T., Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J. Nutr.*, **135**, 155-159 (2005).

83) Toyoda-Ono, Y., Yoshimura, M., Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y., and Ikeda, I., Suppression of postprandial hypertriglyceridemia in rats and mice by oolong tea polymerized polyphenols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 971-976 (2007).

84) Shishikura, Y., Khokhar, S., and Murray, S. B., Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 1906-1913 (2006).

85) Han, L. K., Takaku, T., Li, J., Kimura, Y., and Okuda, H., Anti-obesity action of oolong tea. *Int. J. Obes.*, **23**, 98-105 (2005).

86) Davis, M. J., Judd, J. T., Baer, D. J., Clevidence, B. A., Paul, D. R., Edwards, A. J., Wiseman, S. A., Muesing, R. A., and Chen, S. C., Black tea consumption reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemic adults. *J. Nutr.*, **133**, 3298-3302 (2003).

87) Lin, C. L., Huang, H. C., and Lin, J. K.,

Theaflavins attenuate hepatic accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J. Lipid Res.*, **48,** 2334-2343 (2007).
88) Lin, J. K., and Lin-Shiau, S. Y., Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 211-217 (2006).
89) Vermeer, M. A., Mulder, T. P. J., and Molhuizen, H. O. F., Theaflavins from black tea, especially theaflavin-3-gallate, reduce the incorporation of cholesterol into mixed micelles. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 12031-12036 (2008).
90) Bingham, S. A., Vorster, H., Jerling, J. C., Magee, E., Mulligan, A., Runswick, S. A., and Cummings, J. H., Effects of black tea drinking on blood lipids, blood pressure and aspects of bowel habit. *Br. J. Nutr.*, **78**, 41-55 (1997).
91) Trautwein, E. A., Du, Y., Meynen, E., Yan, X., Wen, Y., Wang, H., and Molhuizen, H., Purified black tea theaflavins and theaflavins/ catechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations. *Eur. J. Nutr.*, **49**, 27-35 (2010).
92) American Institute of Nutrition, Report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977).
93) 太田　豊，船山　誠，清野博威，佐見　学，神田智正，庄司俊彦，大林康之，　長田恭一，リンゴポリフェノールによる易肥満性ラットの脂質代謝およびインスリン非依存性の改善．日本食品科学工学会誌，**54**，287-294（2007）．
94) 倉兼静江，海老名太，山本達也，植松恒美，山田則子，落花生ポリフェノールが食餌誘発性肥満モデルマウスに及ぼす影響．日本栄養・食糧学会第 63 回大会講演要旨集，p. 171，長崎（2009）．
95) 西　繁典，斎藤優介，小嶋道之，果実ポリフェノールのメタボリックシンドローム予防効果．日本食品科学工学会第 56 回大会講演要旨集，p. 98，名古屋（2009）．
96) Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-506 (1957).
97) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
98) Kelley, D. S., Nelson, G. J., and Hunt, J. E., Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **235**, 87-90 (1986).
99) Ochoa, S., Malic enzyme. In "Methods in Enzymology," ed. By Colowick, S. P., and Kaplan, N. O., Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 739-753 (1955).
100) Kelley, D. S., and Kletzien, R. F., Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.*, **217**, 543-549 (1984).
101) Walton, P. A., and Possmayer, F., Mg^{2+}-dependent phosphatidate phosphohydrolase of rat lung: Development of an assay employing a defined chemical substrate which reflects the phosphohydrolase activity measured using membrane-bound substrate. *Anal. Biochem.*, **151**, 479-486 (1985).
102) Markwell, M. A. K., McGroarty, E. J., Bieber, L. L., and Tolbert, N. E., The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J. Biol. Chem.*, **248**, 3426-3432 (1973).
103) Jeejeebhoy, K. N., Ahmad, S., and Kozak, G., Determination of fecal fats containing both medium and long chain triglycerides and fatty acids. *Clin. Biochem.*, **3**, 157-163 (1970).
104) Sugano, M., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., and Kimoto, M., The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats.

Atherosclerosis, **172**, 115-122 (1988).
105) Han, L. K., Kimura, Y., Kawashima, M., Takaku, T., Taniyama, T., Hayashi, T., Zheng, Y. N., and Kuda, H., Anti-obesity effects in rodents of dietary tea saponin, a lipase inhibitor. *Int. J. Obes*., **25**,1459-1464 (2001).
106）池田郁男，動脈硬化を予防する食品成分の生理機能解明．日本栄養・食糧学会誌，62, 99-105（2009）.
107) Ikeda, I., Isamoto, Y., Sasaki, E., Nakayama, M., Nagao, H., Takeo, T., Yayabe, F., and Sugano, M., The catechin decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1127**, 141-146 (1992).
108) Muramatsu, K., Fukuyo, M., and Hara, Y., Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **32**, 613-622 (1986).
109) Chan, P. T., Fong, W. P., Cheung, Y. L., Huang, Y., Ho, W. K., and Chen, Z. Y., Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. *J. Nutr*., **129**, 1094-1101 (1999).
110) Yang, T. T., and Koo, M. W., Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci*., **66**, 411-423 (2000).
111) Sayama, K., Lin, S., Zheng, G., and Oguni, I., Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice. *In Vivo*., **14**, 481-484 (2000)

Summary

In this study, the third crop of green tea leaves and loquat leaf which is unused resource utilized, and We investigated at production of fermented tea of high quality in which flavor as well as the short time's low cost are excellent and the influence the black tea polyphenol generated more to that exerts on lipid metabolism.

The third crop of green tea leaves contain a relatively large amount of catechins, so its hot-water extract is a bitter taste to drink. The loquat leaves have the strong enzyme activity to oxidize catechins and contain chlorogenic acid which accelerates the oxidation of catechins. We investigated the production method of new fermented tea by mixed kneading of third crop of green tea leaves and loquat leaves, examined the best appropriate time plucking third crop of green tea leaves. The third of fresh green tea leaves (27 kg) were withered by blowing air (70℃) for 20minutes in a primary tea-rolling dryer. Then, tea leaves were mixed with fresh loquat leaves (3 kg) and kneaded with a tea roller at room temperature for 20 minutes. The amount of the catechins contained in the green tea leaves were decreased by this process, resulting that the hot-water extract of mixed tea leaves was a good taste, an aroma and a bright red color. The fermented tea of the best quality was produced by the usage of third crop of green tea leaves plucked on day 35 from plucking second crop of green tea leaves. We established production method of new fermented tea by mixed kneading of third crop of green tea leaves and loquat leaves using a primary tea rolling dryer and tea roller, thus the good quality of fermented tea was manufactured.

To clarify the aroma characteristic of the fermented tea by mixed kneading (mixed fermented tea) manufactured by mixing the third crop of green leaves and loquat leaves, we measured aroma components included in mixed fermented tea by using GC-MS. *(Z)*-3-hexen-1-ol acetate which was not included in both green tea and the loquat tea was detected in mixed fermented tea. Geraniol was the most amounts of aroma components in mixed fermented tea. A relatively large quantity of benzaldehyde, benzylalchol and nerolidol were detected in mixed fermented tea when compared to black tea, green tea and loquat tea. The aroma components of mixed fermented tea were suggested to be possibility to be produced by the fermentation of green tea leaves through the addition of loquat leaves and the fermentation of loquat leaves. It aimed for the difference of the temperature and time of ignition to examine the sensory quality test of the fermentation tea leaves and the influence on the fragrance and the heating aroma component, and to clarify the best ignition condition to improve the aroma taste. As field firing temperature was high, and field firing time became long, (*E,E*)-2.4-heptadinenal which was a fragrance component decreased. When the condition at the ignition of temperature and time was examined to improve the aroma taste of the fermentation tea leaves, it is suggested that the taste and the aroma were excellent in 110℃ in ignition temperature 30～40 minutes in the ignition time and 130℃ in ignition temperature 20 minutes in the ignition time.

Tea catechins and theaflavins have been recognized as important green tea and black tea components that induce physiological activities. The physiological effects of theasinensin A (TSA) and thearubigin (TR) contained in the fermented tea obtained by tea-rolling processing of tea material leaves and loquat leaves are obscure. We examined effect of a lipid metabolism on the theaflavins (TFs), TSA and TR contained of new fermented tea obtained by tea-rolling processing of loquat (*Eriobotrya*) and green tea leaves. A single oral administration of 200 mg TFs, TSA and TR in 5 ml of 20%v ethanol of solution per kg body weight were perfomed by gavage 5-wk-old Sprague-Dawley (SD) rats. After 5 minutes, 15 ml of 1.5 g/kg soybean oil was administered to each rats that had been fasted for 12 h (intralipid). TFs, TSA and TR significantly suppressed the increase in serum triglyceride level 1h after administration when compared to the control group. Moreover, SD rats fed a diet containing freeze-dried TFs, TSA and TR of 0.2% respectively, for 4 weeks. We showed that the effect lipid metabolisms of TFs, TSA and TR, in the case of 10% and 25% fat diet. When the

rats were fed the 10% fat diet, the concentration of serum triglyceride tended to be lower when feeding TFs and TSA than feeding control. However, there was no significant difference among all the groups in the activities of cytosolic fatty acids synthesis, malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase, microsomal phosphatidic acid phosphohydrolase, mitochondrial carnitine palmitoyl transferase in the liver. The amount of fatty acid excretion into the feces also was comparable to among all the groups. The discrepancy between these studies cannot be explained at present.

On the other hand, when the rats were fed the 25% fat diet, the concentration of liver triglyceride was significantly lower in the TSA group than in the control group, and tended to be lower in the TFs and TR group than in the control group. In the factor of the concentration of liver triglyceride was low, inhibition of triglyceride synthesis in the liver, hypermetabolism pro-oxidation of the fatty acid, the excretion increase of the fatty acid into the feces are generally considered. The activities of microsomal phosphatidic acid phosphohydrolase level in the liver was markedly lower in the TFs, TSA and TR groups than in the control group. In addition, the fatty acid excretion tended to be higher in the TFs, TSA and TR groups than in the control group. When the rats were fed the 10% fat diet, the concentration of serum total cholesterol, feeding TSA, TFs and TR as compared to feeding control resulted in significant reduction, and the liver total cholesterol level also was significantly lower in the TSA and TR groups than in the control group. However, the amount of neutral and acidic steroid excretion into the feces was comparable among all the groups. On the other hand, in the case of 25% fat diet, the amount of neutral and acidic steroid excretion into the feces was significantly higher in the TSA, TR groups than in the control group, and tended to be higher in the TFs group. These ingredients may be inhibition cholesterol absorption into the intestinal tract like green tea catechins, in high-fat diet. Moreover, the reduction of liver total cholesterol is considered to be responsible for suppression of cholesterol shythesis in the liver, like low fat diet. In particular, TSA tended to be decrease liver total cholesterol level in high-fat diet. It suggested that TSA and TR reduce total cholesterol in the serum and liver in low fat diet, furthermore, in high-fat diet. In conclusion, it is suggested that TSA and TR possess the function to decrease a lipid concentration.