

# 茶葉とびわ葉を原料とした高機能性発酵茶の新機能解明と 実用化に向けた研究

食品・環境科 主任研究員 玉屋 圭  
研究員 前田 正道  
農林技術開発センター 茶業研究室 主任研究員 宮田 裕次

長崎県産の未利用資源であるびわ葉と緑茶番茶を原料とした発酵茶の製造方法を確立した<sup>[1],[2]</sup>。本報告では、発酵茶が有する中性脂肪低下作用を検討するために、*in vitro*での評価(腭リパーゼ阻害性)を実施した。さらに官能試験を行った結果、本発酵茶は渋味が少なく、爽快で飲みやすい茶であることが示されている。そこで本研究では、味認識装置を用いて発酵茶の味測定を実施し、味に関する特徴の解明を試みた。

## 1. 緒言

近年、食生活の欧米化とともに、がん、循環器系疾患、アレルギー等の生活習慣病が若年から老年層にわたって増大している。それに伴って、機能性食品の売り上げが年々増加(特定保健用食品の市場規模(2005年); 6229億円(日本健康・栄養食品協会調べ))している。今後の高齢化の進展や医療費の増大等を考慮すると、この分野は更なる成長を遂げると予想されることから、疾病リスクを軽減する機能性食品の開発は新事業の創出及び育成に繋がると考えられる。

一方、長崎県の園芸特産品であるお茶は近年の輸入茶の増大により、番茶の価格が低下している。同じく園芸特産品であるびわも競争果実の多様化の影響を受けていることから、葉などの未利用部分を用いた新たな製品開発が急務とされている。

そこで我々は本県産の未利用資源である緑茶とびわ葉を利用した発酵茶の製造方法を確立した<sup>[1],[2]</sup>。

本研究では、本発酵茶の健康機能性(中性脂肪低下作用)を検討するために、腭リパーゼ阻害性を測定した。さらに、本発酵茶が機能性食品として日常的に摂取されるためには、茶飲料としての美味しさを担保する必要がある。そこで、発酵茶の味に関する特徴を明らかにすることを目的として、味認識装置による測定を実施し、緑茶との比較を行った。

## 2. 実験方法

発酵茶は最も高い香味が得られた条件(緑茶番茶とびわ葉の混合比9:1)で製造したものを使用した。なお、発酵茶の原料である緑茶は7月採取された三番茶を使用した。同じく発酵茶の原料であるびわ葉も7月に採取されたものを使用した。

発酵茶葉 20 g を熱水 1 L 中で 10 分間攪拌し、ろ過により得られたエキスを濃縮後、凍結乾燥によって粉末を得た。本検討にはこの乾燥粉末を用いた。

### ① 発酵茶の腭リパーゼ阻害性

ブタ膵臓由来リパーゼ (Type VI -S) 及び腭リパーゼの疑似基質 4-methylumbelliferyl oleate (4-MU) はシグマ製を使用した。活性測定は以下のように実施した<sup>[3]</sup>。水に溶解したサンプル 25  $\mu$  l をマイクロプレートに添加し、13 mM Tris-HCl containing 0.15 M NaCl and 1.3 mM CaCl<sub>2</sub> (pH8.0) に溶解した基質 (0.1 mM 4-MU) を 50  $\mu$  l 添加した後に、25°C、5 分間プレインキュベートした。同じ緩衝液に溶解した酵素溶液 (50 U/ml) を 25  $\mu$  l 添加し、酵素反応を開始した。25°C、30 分間反応させた後に、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH4.2) 溶液を 1ml 添加し、反応を停止させた。リパーゼにより遊離した 4-methylumbelliferone 量を蛍光光度法(励起波長; 355 nm、蛍光波長; 460 nm)により測定した。

### ② カテキン及びテアフラビンの分析

茶の主要成分であるカテキン類、茶葉の発酵によって生成する紅茶色素のテアフラビン類の腭リパーゼ阻害性を測定した。茶中のカテキン類として、(-)-エピカテキン(EG)、(-)-エピカテキンガレート(ECG)、(-)-エピガロカテキン(EGC)、(-)-エピガロカテキンガレート(EGCG)の4種類を測定に供した。これらのカテキン類の標品は、株式会社フナコシ製を用いた。

また、テアフラビン類として、テアフラビン(TF)、TF-3'-モノガレート(3-TF)、TF-3'-モノガレート(3'-TF)、及びTF-3、3'-ジガレート(3,3'-TF)の4種類を測定した。標品には和光純薬製のものを使用した。

### ③ 発酵茶の味測定

発酵茶葉 2g を熱水 100 ml 中で 5 分間攪拌し、ろ過によりエキスを調製した。味測定には本エキスを 10 倍希釈したものを用いた。比較対象の緑茶についてもエキスを同様に調製し、測定に供した。

発酵茶の味測定にはインテリジェントセンサーテクノロジー製の味認識装置 TS-5000Z を用いた。酸味、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味後味、苦味後味、渋味後味の 8 種の味を測定した。

### ④ アミノ酸分析

アミノ酸の測定は中村らの報告<sup>[4]</sup>に準じて行った。茶葉 100mg を 100ml のメスフラスコにとり、熱湯 70 ml を加えて 80℃ の恒温槽中で 30 分間加温抽出した。室温に冷却後、100ml に定容した。0.45 μm のメンブランフィルターでろ過後、50 μl を全自動アミノ酸分析装置 (日本電子製) に供した。

## 3. 実験結果

### ① 発酵茶の腓リパーゼ阻害性

本年度に製造した発酵茶のリパーゼ阻害性を表 1 に示した。発酵茶は 22.3 μg/ml と高い阻害性を有していた。昨年度の発酵茶と比較するとほぼ同等の阻害性を有しており、均一の品質を有する発酵茶が製造出来ることが示された。

表 1 発酵茶のリパーゼ阻害性

	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
<b>発酵茶 (20 年製造)</b>	<b>22.3</b>
発酵茶 (19 年製造)	13.6

本プロジェクト研究では、発酵茶が優れた血糖値上昇抑制作用を有することを明らかにしてきた<sup>[5]</sup>。その作用機序としては、二糖類分解酵素マルターゼに対する阻害性が特定された。これまでの検討で、4 年間に渡り発酵茶のマルターゼ阻害性を評価してきた結果、活性値 IC<sub>50</sub> は 0.05 ~ 0.15 mg/ml と一定の範囲にある<sup>[2]</sup>ことを確認した。

本試験においても、腓リパーゼ阻害性は一定の値を示しており、マルターゼ阻害性の結果と合わせて考慮すると、製造時期の発酵茶品質に及ぼす影響はほとんど見受けられないことがわかった。

### ② カテキン及びテアフラビンの腓リパーゼ阻害性

発酵茶における機能性成分を明らかにすることを目的として、緑茶由来のカテキン、並びにカテキンの酸化生成物であるテアフラビンの腓リパーゼ阻害性を測定した。

表 2 カテキン類のリパーゼ阻害性

	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
EGC	1000
<b>EGCg</b>	<b>0.59</b>
EC	187
ECg	5.27

カテキン 4 種の中では、没食子酸を有する EGCg 及び ECg が高い阻害性を有していた。特に、EGCg は 0.59 μg/ml と高活性を示しており、同じガレート体の ECg の 10 倍高いものであった。通常、緑茶には EGCg は 7 ~ 8% 含まれており、緑茶の有する中性脂肪低下作用<sup>[6]・[7]</sup>には EGCg が大きく関わっていることが示唆された。

本発酵茶にも EGCg は 1% 程度含有されて<sup>[8]</sup>おり、本発酵茶の機能に関与していることが推察された。

さらに、2 分子のカテキンが酸化重合して得られるテアフラビン類については、カテキンと同様にガレート体が強い活性を示し、特に 2 つのガレート基を有する 3, 3'-TF が 0.56 μg/ml と優れた阻害性を有していた。

表 3 テアフラビン類のリパーゼ阻害性

	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
TF	1908
3-TF	26.5
3'-TF	5.00
<b>3, 3'-TF</b>	<b>0.56</b>

3, 3'-TF のリパーゼ阻害性については、中井らが茶ポリフェノールについて検討<sup>[9]</sup>した際に報告している。その値は 0.08 μg/ml であり、本検討で得られた活性値とほぼ同等であった。しかしながら、3, 3'-TF の中性脂肪低下作用については未解明である点が多く、検討を続けていく必要がある。

本研究では、テアフラビンのマルターゼ阻害性につ

いて検討を行っており、4種の中でも3-TFが最も強い活性を有することを示した。さらに、3-TFはマルトースを負荷したSDラットに対して低用量(10 mg/kg)で顕著な血糖値上昇抑制作用を示すことをはじめて明らかにした<sup>[10]</sup>。

TFの機能性については、これまでに抗酸化性などが報告されているが、脂質代謝改善作用に関してはメカニズムなど不明確な点が多い。今後、TFの健康機能について解明を行っていく予定である。

### ③ 発酵茶の味について

発酵茶の味測定の結果を表1に示す。酸味、塩味、苦味後味については、測定値が原点(0、酸味;-13、塩味;-6)以下のものであったことから、発酵茶はこれら味を示さないと判断された。

表4 発酵茶の味測定結果

	苦味	渋味	旨味	渋味 後味	旨味 後味
一番茶	11.1±0.0	18.3±0.0	10.5±0.0	3.1±0.0	1.3±0.0
三番茶	11.0±0.0	18.3±0.1	10.6±0.0	3.4±0.1	1.5±0.0
発酵茶	10.7±0.1	12.3±0.3	9.5±0.0	1.4±0.1	0.8±0.1

苦味先味については、発酵茶(10.7)は一番茶(11.1)及び三番茶(11.0)とほとんど差異が認められなかった。また、旨味並びに旨味後味については、緑茶よりも低い値を示す傾向(旨味:9.5(発酵茶)、10.5(一番茶)、10.6(三番茶);旨味後味:0.8(発酵茶)、1.3(一番茶)、1.5(三番茶))にあった。さらに、渋味と渋味後味については、本発酵茶は緑茶よりも大幅に低い値を示していること(渋味:12.3(発酵茶)、18.3(一番茶)、18.3(三番茶);渋味後味:1.4(発酵茶)、3.1(一番茶)、3.4(三番茶))が明らかになった。

本プロジェクトでは、これまでに専門の研究者による官能検査を実施し、発酵茶は味、香りについて玉緑茶とほぼ同等の評価を得られたこと、爽快で飲みやすく、かつ苦みや渋みが低いことなどを報告している<sup>[1]</sup>。

今回、発酵茶の味を明らかにするために用いた味認識装置は、脂質/高分子ブレンド膜を味物質の受容選択性部分とし、この複数の脂質膜からなる電位出力応

答パターンから味を数値化する装置である。これまでに本装置を用いて、焼酎<sup>[11]</sup>、日本酒<sup>[12]</sup>、醤油<sup>[13]</sup>などの食品の味識別が報告されている。

今回の試験、発酵茶は緑茶と比較して、渋味と苦味が低く、あっさりとした味を有する結果を示した。この結果はこれまでの官能検査結果と完全に一致するものであった。

比較対照として使用した緑茶には、カテキンなどのポリフェノールが豊富に含まれている。特に、夏に収穫される三番茶にはカテキンが高度に含まれていることから、渋みを有している<sup>[14]</sup>。また、緑茶カテキンの中で高含量を示すのはエピガロカテキンガレート(EGCg)であり、EGCgは味認識装置の渋味センサーに対して高い応答を示すことも明らかになっている<sup>[15]</sup>。

発酵茶は、原料として緑茶を使用していることからカテキンを含んでいるが、揉捻・酸化発酵工程によりその含量は大幅に減少している。通常、緑茶にはEGCgは7~8%含まれているのに対して、本発酵茶には1%程度の含有量<sup>[8]</sup>であった。

従って、今回の試験で見いだされた発酵茶の渋味低下は、主としてカテキン量の減少に起因していることが推察された。

### ④ 発酵茶のアミノ酸分析結果

発酵茶を味測定に供した結果、旨味が緑茶よりも低い値を示すことが示された。

茶の旨味については、グルタミン酸、アスパラギン酸、テアニンのアミノ酸が関与している。発酵茶の旨味を検討するために、これらアミノ酸の測定を行った。その結果を表5に示す。

表5 発酵茶のアミノ酸分析結果

mg/100 g (茶葉あたり)	グルタミ ン酸	アスパラ ギン酸	テアニン
一番茶	333	264	450
三番茶	123	123	58
発酵茶	40.3	19.3	19.4

グルタミン酸、アスパラギン酸、テアニンのアミノ酸が最も多く含まれていたのは一番茶であり、三番茶はその2分の1以下の含量であった。味測定の結果では、旨味に関して一番茶と三番茶の間に大きな差異は認められなかったが、アミノ酸含量は一番茶が明らかに高値を示していた。

発酵茶については、いずれのアミノ酸も一番茶の約10分の1、三番茶の3分の1以下の含量であった。味測定では、発酵茶は緑茶より旨味が低いことが示されたが、今回のアミノ酸分析結果と一致するものであった。

今回の味測定の結果、発酵茶は緑茶よりも渋味及び旨味が低いという結果が得られ、これら2つの味とその呈味成分(カテキン、アミノ酸)の含量との間に関連があることを確認した。

また、発酵茶について、これまでの官能試験で得られた「渋味が低く、あっさりとした」茶であるという結果は、味測定結果と一致しており、味認識装置と呈味成分の分析を同時に行うことにより、食品の味を正確に評価することが可能であることが示された。

#### 4. 考 察

発酵茶の中性脂肪低下作用を明らかにするために、隣りパーゼ阻害性を検討した結果、優れた阻害性を有することが明らかとなった。発酵茶に含まれる成分の中でも、カテキン及びテアフラビンのガラクト体((-)-エピガロカテキンガラクト及びテアフラビン--3,3'-ジガラクト)が強い阻害性を有することが明らかになった。

さらに、長崎県産の未利用資源であるピロ葉と緑茶番茶を原料とした発酵茶の味を解明することを目的として、味認識装置を用いての味測定を実施した。

その結果、発酵茶は旨味並びに旨味後味について緑茶よりも低い値を示していた。さらに、渋味と渋味後味については、緑茶よりも大幅に低い値を示していることが明らかになった。さらに、旨味成分としてアミノ酸、渋味成分としてカテキンの含量を検討した結果、味数値との関連が確認された。

以上の検討により、本発酵茶は渋味の低い、あっさりとした茶であることが実証された。

なお、本発酵茶は商品名「ワンダーリーフ」として、平成21年10月から販売開始された。

本研究は長崎県試験研究機関連携プロジェクトとして、長崎県工業技術センター、長崎県農林技術開発センター茶業研究室(中核機関)、長崎県農林技術開発センター果樹研究部門、九州大学大学院農学研究院、長崎県立大学シーボルト校看護栄養学部、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科が参画して研究推進を行った。

#### 参考文献

- [1] 玉屋 圭、前田正道、宮田裕次：長崎県産の未利用資源を活用した機能性茶葉の開発、日本食品科学工学会第51回大会、47(2004)
- [2] 玉屋 圭、前田正道、宮田裕次ら：特願2005-002583(2004)
- [3] L.-K. Han, Y. Kimura, M. Kawashima, T. Takaku: *Int J. Obes.*, 25, 1459(2001)
- [4] 中村ら：茶業研究報告、49(1990)
- [5] K. Tamaya, T. Matsui, A. Toshima, M. Noguchi, Ju Qiu, Y. Miyata, T. Tanaka, K. Tanaka: *J. Sci. Food Agric.*, 90(5), 779-783(2010)
- [6] Y. Yamaguchi, M. Hayashi, H. Yamazoe, M. Kunitomo: *Proc. Intern. Sympo. Tea Science (ISTS)*, Shizuoka, 322(1991)
- [7] K. Nakagawa, M. Ninomiya, T. Okuda, N. Aoi, L.R. Juneja, M. Kim, K. Yamanaka, T. Miyazawa: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3967(1999)
- [8] 玉屋 圭、前田正道、宮田裕次、田中一成、西園祥子、松井利郎、中島則房：未利用資源を活用した機能性茶葉の開発、日本食品科学工学会第54回大会、65(2005)
- [9] M. Nakai, Y. Fujii, S. Asami, Y. Toyoda-Ono, T. Iwashita, H. Shiba, Y. Kiso: *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4593-4598(2005)
- [10] A. Toshima, T. Matsui, K. Tamaya, M. Noguchi, Ju Qiu, Y. Miyata, T. Tanaka, K. Tanaka: *J. Sci. Food Agric.*, 90(9), 1545-1550(2010)
- [11] 中原徳昭、境田博至、甲斐孝憲、榊原陽一、西山和夫、福田亘博、水光正仁：味覚センサを用いた本格焼酎の味評価、日本食品科学工学会、145(2005)
- [12] Y. Arikawa, K. Toko, H. Ikezaki, Y. Shinha, T. Ito, I. Oguri, S. Baba: *Sens. Mater.*, 7, 261(1995)
- [13] 飯山悟、池田知弘、都甲潔、八尋美希、マルチチャンネル味覚センサを用いた醤油の味の評価、日本食品科学工学会、615(1997)
- [14] 村松敬一郎、小国伊太郎、伊勢村護、杉山公男、山本(前田)真理、茶の機能、45、学会出版センター(2002)
- [15] N. Hayashi, R. Chen, H. Ikezaki, S. Yamaguchi, D. Maruyama, Y. Yamaguchi, T. Ujihara, K. Kohata: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 626(2006)