

亜臨界水抽出による茶の味および香りに関する化学的研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2014-11-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮下, 知也 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00007984

静岡大学 博士論文

亜臨界水抽出による茶の味および香り
に関する化学的研究

2013 年 12 月

大学院自然科学系教育部
バイオサイエンス専攻

宮下 知也

目次

第 1 章 序論	1
1-1 はじめに	1
1-2 緑茶の成分と機能性	4
1-3 亜臨界水抽出	11
1-4 本研究の目的	14
第 2 章 亜臨界水抽出による緑茶の苦渋味抑制効果	16
2-1 実験方法	
2-1-1 試験材料および抽出方法	17
2-1-2 総カテキン含有量の測定	19
2-1-3 官能評価	19
2-1-4 味覚センサー分析による味覚評価	19
2-1-5 におい識別分析装置による香りの評価	22
2-1-6 タンパク質・アミノ酸含有量の測定	22
2-1-7 全糖量・水溶性ペクチン含有量の測定	23
2-1-8 カテキン類・カフェイン含有量の測定	23
2-1-9 苦味細胞応答試験	24
2-2 結果と考察	
2-2-1 緑茶抽出物の特徴	28
2-2-2 試飲による官能評価	28

2-2-3	味覚センサー分析による苦渋味の評価	29
2-2-4	におい識別分析による香気成分組成の評価	31
2-2-5	タンパク質・アミノ酸含有量の比較	32
2-2-6	全糖量・水溶性ペクチン含有量の比較	33
2-2-7	カテキン類・カフェイン含有量の比較	33
2-2-8	苦味細胞応答評価	34
第 3 章	亜臨界水抽出による緑茶中のアミノ酸の変化	37
3-1	実験方法	
3-1-1	試験材料および抽出方法	38
3-1-2	アミノ酸含有量の測定	38
3-1-3	アミノ酸標品によるモデル試験	38
3-1-4	構造解析	39
3-1-5	新規物質の測定	39
3-1-6	試飲および味覚センサー分析による官能評価	40
3-1-7	3-アミノ-1-エチルグルタリミドの機能性評価	40
3-2	結果と考察	
3-2-1	アミノ酸含有量の比較	41
3-2-2	テアニン・グルタミン酸標品の変動	42
3-2-3	テアニン・グルタミン酸の構造変化	43
3-2-4	新規化合物の定量	46
3-2-5	官能評価による比較	46

3-2-6 ACE 変換酵素阻害活性	47
--------------------	----

第4章 亜臨界水抽出による緑茶中の有効成分の変化	49
--------------------------	----

4-1 実験方法

4-1-1 試験材料および抽出条件	50
-------------------	----

4-1-2 アミノ酸・カテキン類(メチル化カテキン)の分析	50
-------------------------------	----

4-1-3 遊離糖類(糖類)の分析	51
-------------------	----

4-1-4 有機酸類・没食子酸の分析	52
--------------------	----

4-1-5 サポニン・ケルセチンの測定	52
---------------------	----

4-1-6 水溶性食物繊維の測定	53
------------------	----

4-1-7 ストリクチニン(カフェイン)の測定	54
-------------------------	----

4-1-8 クロロフィルの測定	55
-----------------	----

4-1-9 好中球を用いた抗酸化・抗炎症・免疫賦活作用の評価	55
--------------------------------	----

4-2 結果と考察

4-2-1 アミノ酸・カテキン類含有量の比較	56
------------------------	----

4-2-2 遊離糖類(糖類)含有量の比較	61
----------------------	----

4-2-3 有機酸類・没食子酸含有量の比較	64
-----------------------	----

4-2-4 サポニン・ケルセチン含有量の比較	65
------------------------	----

4-2-5 水溶性食物繊維含有量の比較	67
---------------------	----

4-2-6 ストリクチニン(カフェイン)含有量の比較	68
----------------------------	----

4-2-7 クロロフィル含有量の比較	70
--------------------	----

4-2-8 好中球を用いた生理活性の評価	70
----------------------	----

第 5 章 緑茶・烏龍茶・紅茶の香気変化および今後の展開	73
5-1 実験方法	
5-1-1 試験材料および抽出条件	74
5-1-2 GC-MS	74
5-1-3 味覚センサー分析による味覚評価	75
5-1-4 官能評価	75
5-1-5 脳波測定	75
5-1-6 連続式亜臨界水抽出装置の開発	76
5-2 結果と考察	
5-2-1 香気成分の変化	77
5-2-2 味覚センサー分析による評価	86
5-2-3 試飲による官能評価	87
5-2-4 脳波による快適度評価	88
5-2-5 連続式亜臨界水抽出装置の導入	93
5-2-6 今後の展開	98
要約	99
謝辞	103
参考文献	104

第1章 序論

1-1 はじめに

茶(*Camellia sinensis*)はツバキ科(*Theaceae*)に属する多年生の常緑樹であり、原産地は中国の西南部雲南から四川の地域であるとされている。茶は世界で最も長い歴史をもつ飲料であるが、いつ頃から人が茶を飲み始めたかは明らかでない。わが国へ中国から茶がいつ伝わったかは、いまのところはっきりしていない。茶は天平時代にもたらされたと推測されているが確証はない。『正倉院文書』の中に「茶」の字が出てくるが、これは苦菜のことで茶ではないとの説が強い。わが国の正史に茶が登場したのは、平安時代の初期であった。弘仁6年(815)嵯峨天皇が近江に行幸、梵釈寺に立ち寄ったとき、永忠(入唐帰朝僧)が自ら茶を煎じて献じたと『日本後紀』にある。平安時代、茶は宮廷で珍重され、また僧侶の間では儀式や眠気覚まし薬用に供せられたが、飲茶の風習は一般庶民の及ぶところではなかった。わが国に喫茶の風習が一般に広まるきっかけをつくったのは、臨済宗の開祖、栄西禅師であった。鎌倉時代の初期、栄西は南宋より茶の種子を持ち帰り、茶樹を栽培し、わが国最古の科学書『喫茶養生記(巻上、巻下)』(1211)著し、茶の効用を述べ、その普及をはかった。わが国で茶の化学研究が始まったのは明治期に入ってからで、明治13年(1880)に創刊された東京化学会(日本化学会の前身)誌1巻1号の巻頭には、高山勘太郎の「日本製茶ノ分析説」が掲載されている。

茶は、製法的な違いから、不発酵茶(緑茶;蒸したり炒ったりして酸化酵素を失活させてから揉む茶)、発酵茶(紅茶;熱をかけずに十分酸化させた茶、烏龍茶や包種茶;少し酸化萎凋させてから熱をかけて酸化を止める半発酵茶、黒茶や阿波番茶;熱処理した茶葉を微生物で発酵させた後発酵茶)等に分けられる(Fig.1)。また、摘採製造する時期により、一番・二番・三番・四番・秋冬番という分け方をし、産地によって静岡茶(川根茶・本山茶)・宇治茶・福岡の

八女茶・嬉野茶、かごしま茶、狭山茶、近江茶、三重茶、くまもと茶などという分け方をする。さらに、中国茶では、水色によって分類する。

緑茶は製造の第一段階で加熱によって茶葉の酵素活性を失わせ、成分の酸化を防ぎ、緑色を保たせた茶である。烏龍茶は茶葉を萎凋(しおらせる)しながら軽く刺激して、葉成分の一部を酸化させたものを釜炒りするもので、緑茶と紅茶の中間の性質を持っている。紅茶は世界中でもっとも消費されるお茶で 20 数カ国において生産されており、お茶生産量の約 70%を占めている。その製造は茶葉を萎凋し、よく揉み、茶中の酸化酵素の働きによって茶成分の酸化を進めて発酵を完全に行わせるという方法である。黒茶は茶葉を長時間堆積して微生物による発酵等の作用を受けさせ、十分に成分変化を行わせた茶である。

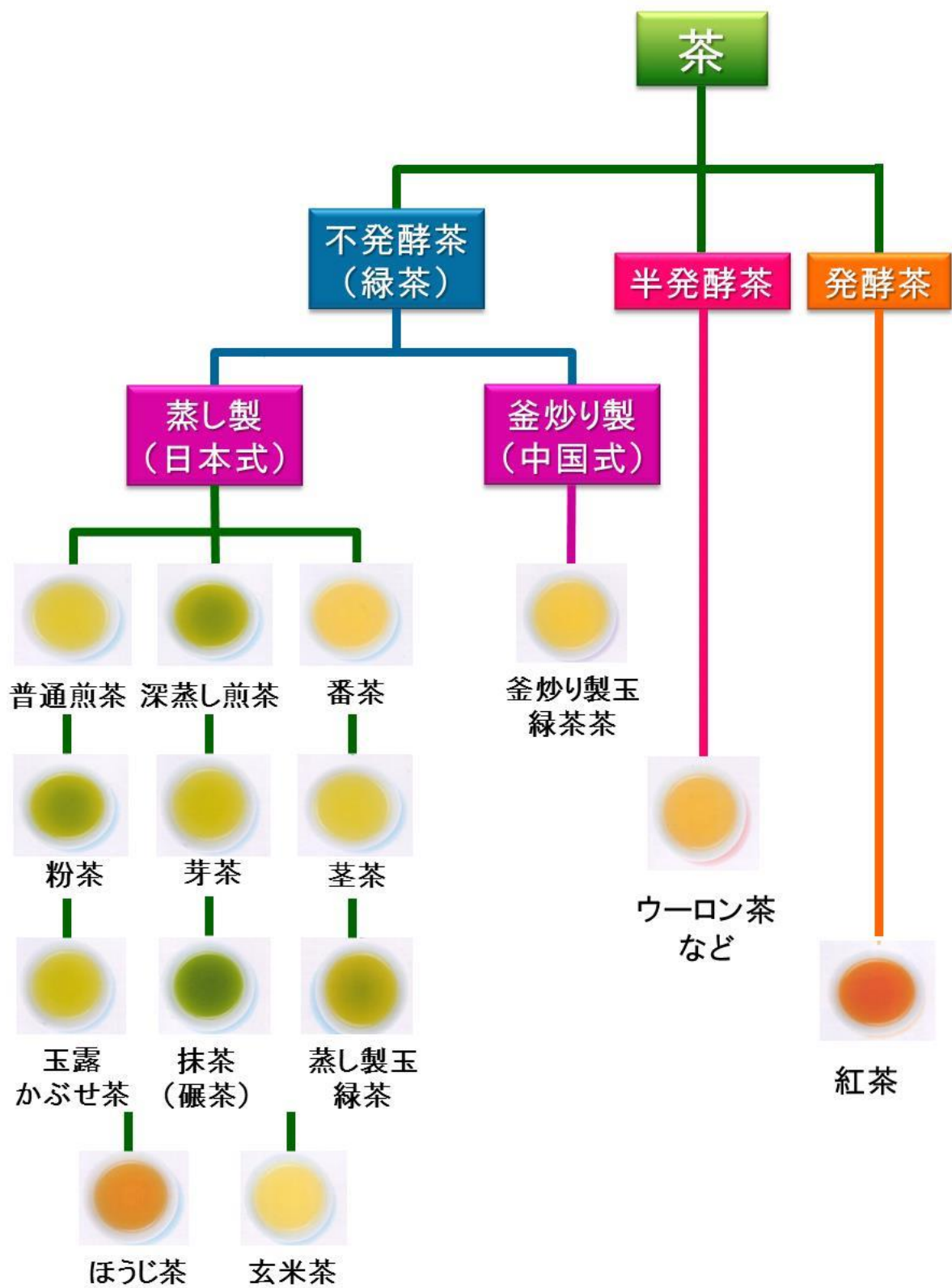


Fig.1. Classification of tea by difference of manufacturing method

1-2 緑茶の成分と機能性

日本で生産されるお茶はほとんどが緑茶である。茶に含まれる成分はカテキン類(タンニン)、カフェイン類(プリン塩基)、タンパク質、アミノ酸類など、炭水化物としては糖、デキストリン、でんぷん、セルロース、ペクチンなど、植物色素としてはクロロフィル(葉緑素)、カロチノイド、フラボノール誘導体、アントシアニンなど、その他に脂質、樹脂類、有機酸類、精油、ビタミンおよび無機成分などである。他の植物に比べてカテキン類の含有量が多く、テアニンやカフェインを含み、無機成分としてはカリウム、フッ素、アルミニウムなど、ビタミン類では C、E が多いことが分かっている。緑茶、烏龍茶、紅茶、黒茶の化学成分の違いは製造方法の違いによる影響が大きい。緑茶は茶の生葉を乾燥したものであるため、その成分は基本的には生葉に含まれていたものと変わらない。それに比べて他の茶種はカテキン類が製造過程の発酵操作によって酸化重合するため含有量が減少する。緑茶はビタミン C、ビタミン A、葉酸、クロロフィル、フィオフィチンなども多く含まれていることが明らかとなっている。

近年、緑茶中の主要成分であるカテキンが注目されている。最近の研究においてカテキンは発がん抑制作用、抗酸化作用、血圧上昇抑制作用、動脈硬化抑制作用などの様々な生理作用を持つことが報告されている⁽¹⁾。さらに、緑茶成分に抗肥満作用や抗アレルギー作用を有することも明らかにされている。緑茶にはカテキン類の他にも β -カロチンやビタミン C、ビタミン E などのビタミン類が豊富に含まれ、その抗酸化能や生活習慣病予防との関連が注目されている。このように緑茶の機能性について研究が進展し、緑茶はこれまでの嗜好性飲料から機能性飲料として世界的に注目されるようになってきた。

緑茶は摘んだ茶葉を直ちに蒸熱することにより酵素を失活させ、その後の工程中での成分変化が抑えられるため、烏龍茶や紅茶などの発酵茶に比べ、カテキン類やビタミン類などの成分が茶葉に多く残っている。緑茶には 10～20 %のカテキン類が含まれ、カテキンの主な

成分は(-)-エピカテキンガレート(EGCG)、(-)-エピガロカテキン(EGC)、(-)-エピカテキンガレート(EGC)および(-)-エピカテキン(EC)の4種類がある(Fig.2)。

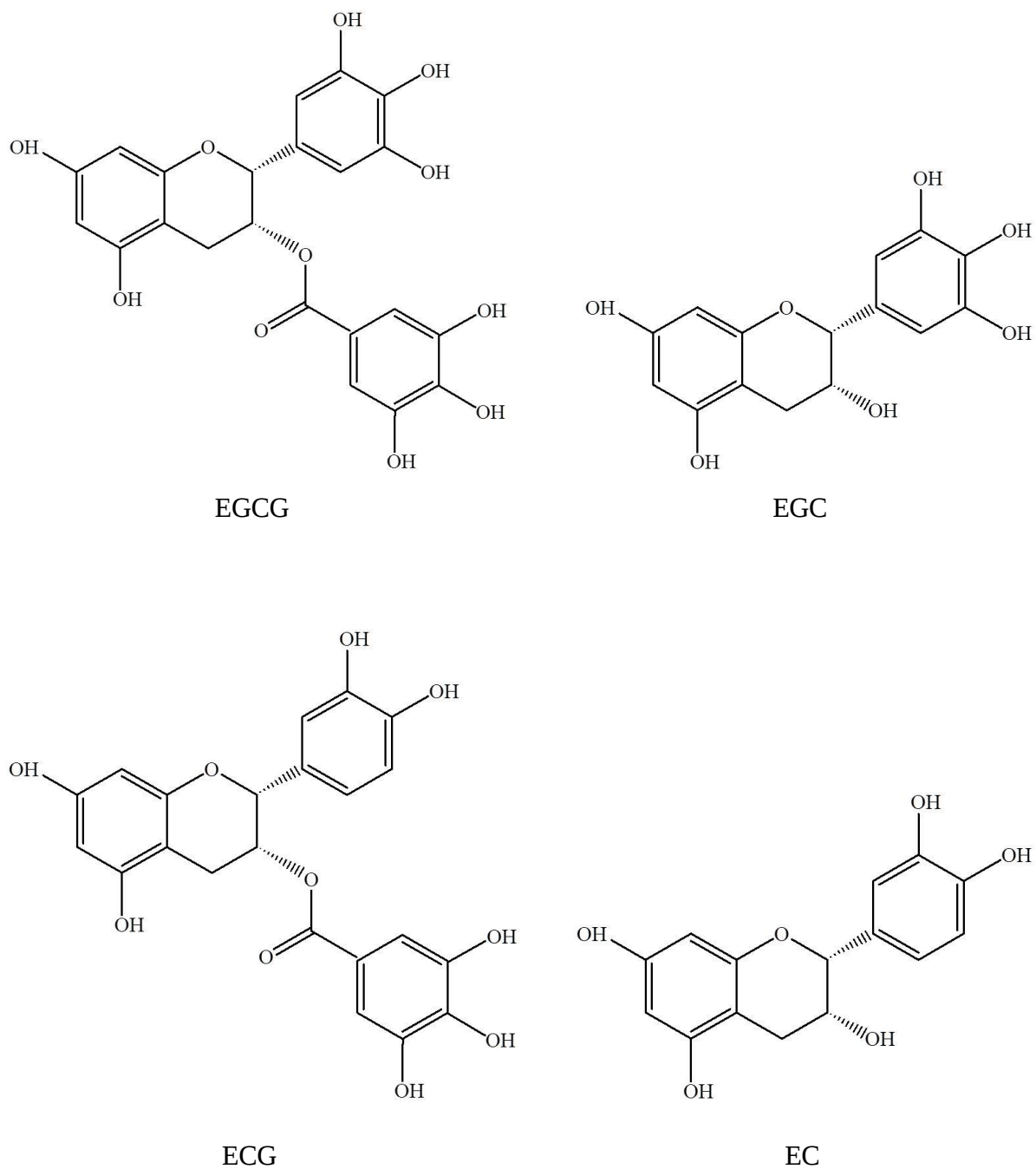


Fig.2. Chemical structures of four kinds of catechins

カテキン類の中でも EGCG は茶以外の植物では見出されていない特殊な成分であり、茶カテキン抽出物には EGCG が最も多く、50 %以上を占めているため、茶カテキンの生理機能の研究は EGCG を対象にしたものが多く報告されている⁽¹⁾。また、カテキン類は緑茶を製造する過程において加熱殺菌により異性化され、EC は(-)-カテキン(C)、EGC は(-)-ガロカテキン(GC)、ECG は(-)-カテキンガレート(CG)、EGCG は(-)-ガロカテキンガレート(GCG)が生成されることが分かっている。熱異性化体のカテキン類 4 種を Fig.3 に示す。

カフェインも緑茶の代表的な成分であり、緑茶以外にも 60 種類以上の植物に含まれている天然成分であるが、その中でも特に茶には多く含まれている。カフェインはコーヒーや 카카오 に含まれるアルカロイドの一種であるが、麻薬作用はなく、人体では中枢神経を興奮させるなどの薬理作用を示すことが明らかとなっている。その他にも利尿作用、強心作用、覚醒作用などが知られており、臨床では医薬品として用いられている。

緑茶の主な機能性成分であるカテキンについて、これまでに報告されている生体での効能について説明する。カテキンはポリフェノールの一種で昔からタンニンと呼ばれてきた緑茶の渋味の主成分である。従来、茶の渋味成分としては茶タンニンが挙げられ、茶タンニン＝茶カテキンと考えられていた。タンニンは皮を鞣す(なめす)性質を持つ植物成分の総称として使われ、口に入れると渋味があったため、渋みのある植物成分はタンニンと言われるようになった。しかし、有機化学の発展とともに有機物は化学構造を基本として分類されるようになった。茶カテキンは 1929 年に辻村らにより、その化学構造が明らかになった。タンニンは芳香環と水酸基を多数結合した構造のポリフェノールとして分類された。ポリフェノールも基本的な構造の特徴から多くのグループに分類され、そのうちフラボノイドを基本骨格として持つ化合物群をフラボノイドと呼ぶようになった。その中で茶カテキンは C6-C3-C6 の三環構造を有するフラボノイド類に属するフラバノール(フラバン-3-オール)誘導体である。3-ヒドロキシフラバン構造を有する化合物の総称で分子中に多数のポリフェノール性水酸基を持っている。カテキ

ンは 3,3',4',5,7-ペンタヒドロキシフラバン(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan) ; $C_{15}H_{14}O_6$ 、分子量 290.27 のフラボノイドの 1 つで、樹皮の皮や幹に広く含まれている。カテキンの化学構造上の特徴は、2 位と 3 位の炭素が不斉炭素となっており、同一化学構造でも 4 種の構造をとる。これらは(-)-エピカテキンガレート(EGCG)、(-)-エピガロカテキン(EGC)、(-)-エピカテキンガレート(ECG)および(-)-エピカテキン(EC)と区別され、さらに B 環の水酸基が 2 つになったものはカテキン、3 つになったものはガロカテキンと呼ばれている。カテキンやガロカテキンの多くは、3 位の水酸基に没食子酸が結合して存在している。これらはカテキンガレートやガロカテキンガレートと呼ばれる。通常フラボノイドとは異なりカテキン類が糖と結合し、配糖体として天然に存在することは稀である。茶カテキン類は全体的に渋みを有するが主要 4 種のうち EC や EGC は渋みが弱く、苦味があり、EGCG や ECG は渋み、苦みが強く、EGCG > ECG > EGC の順に渋み成分が多く含まれ、強いとされている。

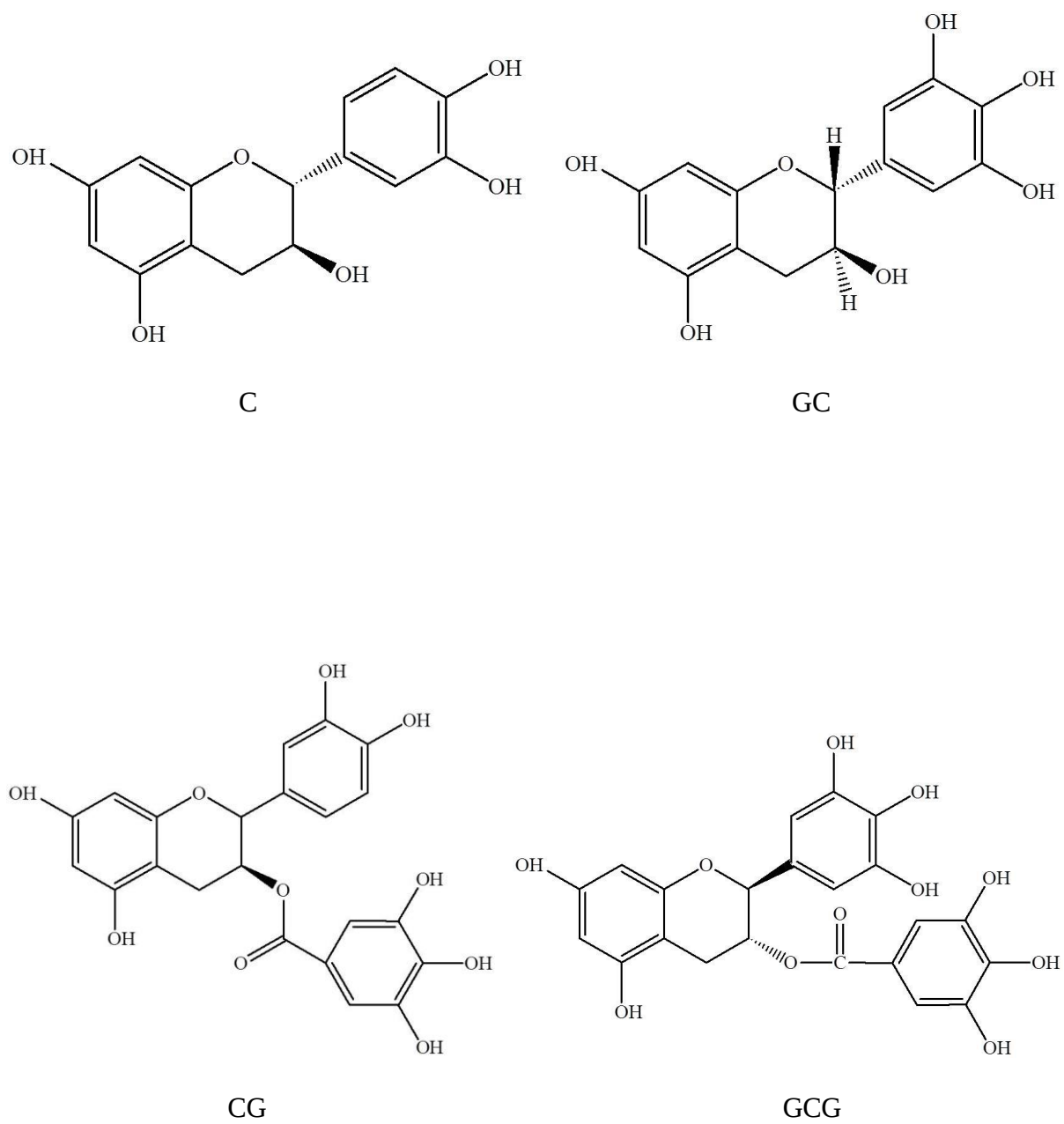


Fig.3. Chemical structures of four kinds of other catechins

茶カテキンによる生理作用はカフェインと異なり、その生理学的効果を実感しにくいいため、一般的には、お茶の味の苦渋味成分としての認識にとどまり、今日のように注目はされていなかった。1970年代に入り、生体内での酸化ストレスと老化に伴って多発する癌や動脈硬化などの様々な退行性疾患の発症とその進行との関連が検討され、生体内での活性酸素の消去機構として食品から摂取し、利用可能な抗酸化物質として注目され始めた。そして、カテキンが強い抗酸化能を有することが判明し、その後カテキンの生理学的な効能についての研究が活発になった。

これまでの研究でカテキンには実に多様な生理活性があることが報告されており、癌予防効果、抗癌作用、血圧上昇抑制作用、血中コレステロール調節作用、血糖値調節作用、抗酸化作用、老化抑制作用、抗突然変異、抗菌、抗アレルギー作用などがあることが報告されている⁽¹⁾。そして、これらの効果の多くにカテキン類の持つ抗酸化作用が関与していることが明らかとなった。茶カテキンの抗酸化作用は、その特徴的な化学構造により金属イオンをカテキンのB環およびガロイル基の隣接するフェノール性水酸基が捕らえ、酸化反応を阻止する予防型抗酸化性物質としての作用とカテキン構造のピロガロール型あるいはカテコール型のフェノール性水酸基がラジカル・活性酸素に水素原子を与え、ラジカル反応を停止させる産生したラジカル捕捉型抗酸化物質としての作用によって酸化ストレスを抑制しているということが明らかとなっている⁽²⁾。抗酸化作用として、緑茶ポリフェノール画分のマウスの投与は小腸や肝臓・肺でのグルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素の活性増加に関与するという報告がある⁽³⁾。また、茶カテキンを含む天然フラボノイド類のラジカル捕捉活性を検討した報告では、茶の主要カテキンは他のフラボノイド類と比較して高い抗酸化活性を示したことが報告された⁽⁴⁾。抗酸化作用を介した老化抑制作用として緑茶カテキン含有の水を飲んだマウスは学習や記憶などの老化に伴う認知機能の低下が抑制されるという報告がある⁽⁵⁾。カテキンは抗ウイルス作用もあり、インフルエンザウイルスに対する感染抑制効果が報告されている。

また、カテキンはウイルス表面にあるヘマグルチニンスパイクに結合し、宿主細胞表面のレセプターへのウイルスに吸着を阻止する。この効果はインフルエンザウイルスの型に関係ないと報告されている⁽⁶⁾。さらに、カテキンは細胞膜表面のインフルエンザ放出を抑制するノイタミニダーゼ結成を阻害し、ウイルスの放出を抑える作用や細胞内での増殖を抑制する作用、感染細胞のアポトーシス誘導作用などによる感染軽減効果を有している⁽⁷⁾。

茶カテキンの抗癌作用についても多くの報告がなされており、樋廻らは 1996 年にヒトリンパ球様白血病細胞 MO1T4B をカテキン類の存在下で培養すると増殖が抑制され、この増殖抑制はカテキン類がアポトーシスを誘導することによることを初めて明らかにした⁽⁸⁾。また、緑茶からのカテキン抽出物や EGCG がヒト胃癌細胞 KATOIII にもアポトーシスを誘導することを明らかにし、緑茶飲用が胃癌予防に役立つ可能性を示した⁽⁹⁾。がん転移抑制作用についても緑茶 1 g/50 ml 熱水抽出物の投与群はマウスウイルス肺癌細胞の肺への転移が対照群に比べて 55 %が抑制されたと報告している⁽¹⁰⁾。この他にも、カテキンは食道、腸、すい臓、肝臓、前立腺などの多くの癌に対して抑制効果が明らかとなっている。動脈硬化症は動脈が硬化する疾患であり、その病気には主にコレステロールが沈着し、そのことによって動脈が狭窄し、狭心症や心筋梗塞、脳卒中などを引き起こす要因となる。この予防にも緑茶カテキンが有効であるという研究報告がある。

1-3 亜臨界水抽出

一般的に、天然物からの有機化合物の抽出には有機溶媒や水蒸気蒸留を用いて行われてきた。これらの方法は、有害な溶媒を多量に使うことや、非常に長い時間がかかることから効率的な抽出方法の開発が望まれている。そこで、この 10 年間に効率的に天然物から有機化合物を抽出する方法として超臨界水抽出方法が考え出された。この方法により水だけを用いて水蒸気蒸留では抽出の難しかった低極性の化合物を短時間で抽出することが可能となった。しかし、超臨界水はその激しい分解能ゆえに多くの化合物が分解してしまうこと、装置の劣化が激しいことなどの欠点があった。そこで、超臨界水よりも穏やかな条件、つまり臨界点以下の温度、圧力領域の水を用いた亜臨界水抽出方法が開発された。

亜臨界水の利点としては比較的短い抽出時間、激しい加水分解作用、温度による誘電率の制御などが挙げられる⁽¹¹⁾。現在では亜臨界水抽出方法を用いた様々な研究が行われ、本研究室においては食品への利用について検討し、大麦から麦茶様エキスの製造、ヘマトコッカスからアスタキサンチンの抽出などの研究を行ってきた⁽¹²⁾。

水は固体、液体、気体の三つの状態を有し、その三体が合わさった状態を三重点（温度 0.01 °C、圧力 0.0006 MPa）と呼ぶ。また、温度 374 °C、圧力 22.1 MPa の状態を臨界点といい、臨界点以上の温度・圧力の状態の水を超臨界水と呼ぶ。三重点から臨界点までの液体と気体の境界を気―液平衡線という。温度 100～374 °C の範囲かつ、気―液平衡線以上の圧力の高温高圧下で液体状態を保った水のことを亜臨界水と呼ぶ。水の状態図を Fig.4 に示した。亜臨界水は通常の水とは異なった二つの性質を持つ。常温常圧下の水のイオン積は 1×10^{-14} mol/L であるが、亜臨界水領域である温度 100～374 °C の範囲では、最大 1×10^{-11} mol/L まで上昇する。これは水中の水素イオン濃度、水酸化イオン濃度が共に約 30 倍に増大したことを意味する。これにより、亜臨界水は酸触媒、塩基触媒として働き、強い加水分解力を有する。また、比誘電率に関しては、常温常圧下では 78.5 であるが、温度 100～374 °C の

亜臨界水領域では約 10～40 まで低下する。この値は有機溶媒と同程度（メタノール:32.6、エタノール:24.5、アセトン:20.7、ヘキサン:1.8）の値となる。水のイオン積と比誘電率の依存度をFig.5に示した。このことから亜臨界水は有機溶媒に似た性質を持ち、疎水性の物質を抽出することができる水となる。これらの特性を応用し、天然成分からのエッセンシャルオイルの抽出⁽¹³⁾、抗酸化物質などの有用成分の抽出⁽¹⁴⁾、難分解性および有害物質の分解、有害物質の除去⁽¹⁵⁻¹⁸⁾、タンパク質からアミノ酸の生成、多糖から単糖および有機酸の生成⁽¹⁹⁻²²⁾など、亜臨界水を用いた研究が盛んに行われている。

亜臨界水抽出を実用化するという観点で考えた場合、設備の導入費用や光熱費などが掛かるというデメリットが考えられる。しかし、水を抽出溶媒として使用するため、産廃処理という観点で考えるとコストが抑えられ、環境に優しいというメリットがある。また、処理時間が短く、抽出効率が良好という利点もあり、実用化を考えた場合には収率面と目的物質の利用価値が重要な要素となる。

従来の抽出方法では高濃度のカテキンを緑茶から抽出するのに、高温域における熱水抽出やエタノールやメタノールなどの溶媒抽出が利用されているが、本研究の亜臨界水抽出は高温高圧下で液体状態を保った“特殊な水”による抽出であり、優れた成分抽出作用と強い加水分解作用の性質を持った技術である。また、使用するのは通常の水のみであるため、人体や環境に無害であり、さらに従来の抽出方法に比べて、抽出時間を 1/10～1/40 に短縮可能なことや抽出の歩留まりが 5～10 %程度向上されること、また食品残渣・廃棄物の低減などの様々な利点も挙げられる。

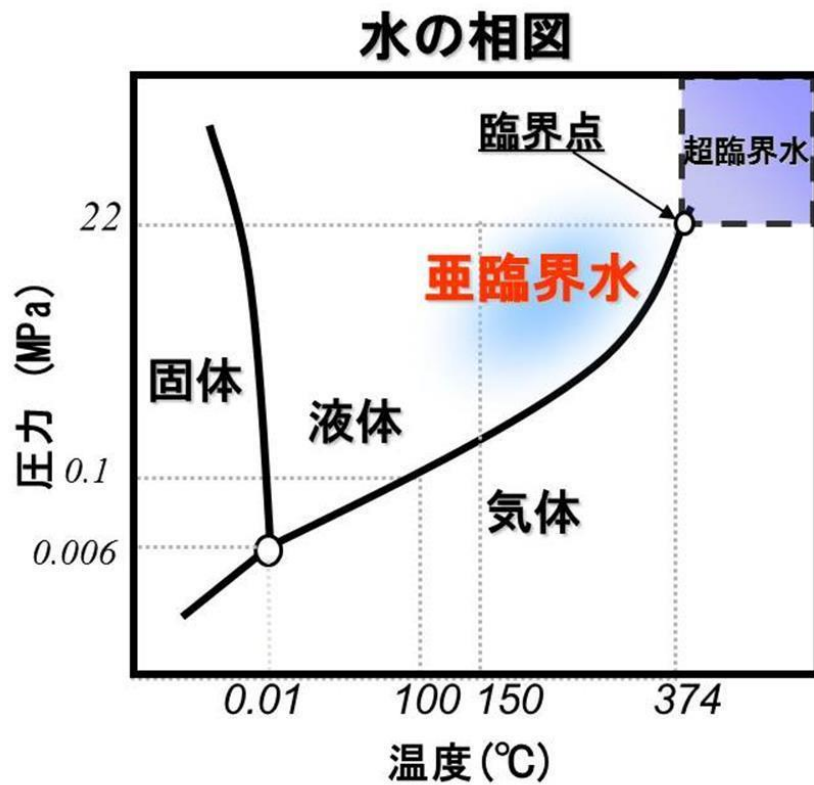


Fig.4. Existence phase diagram of water

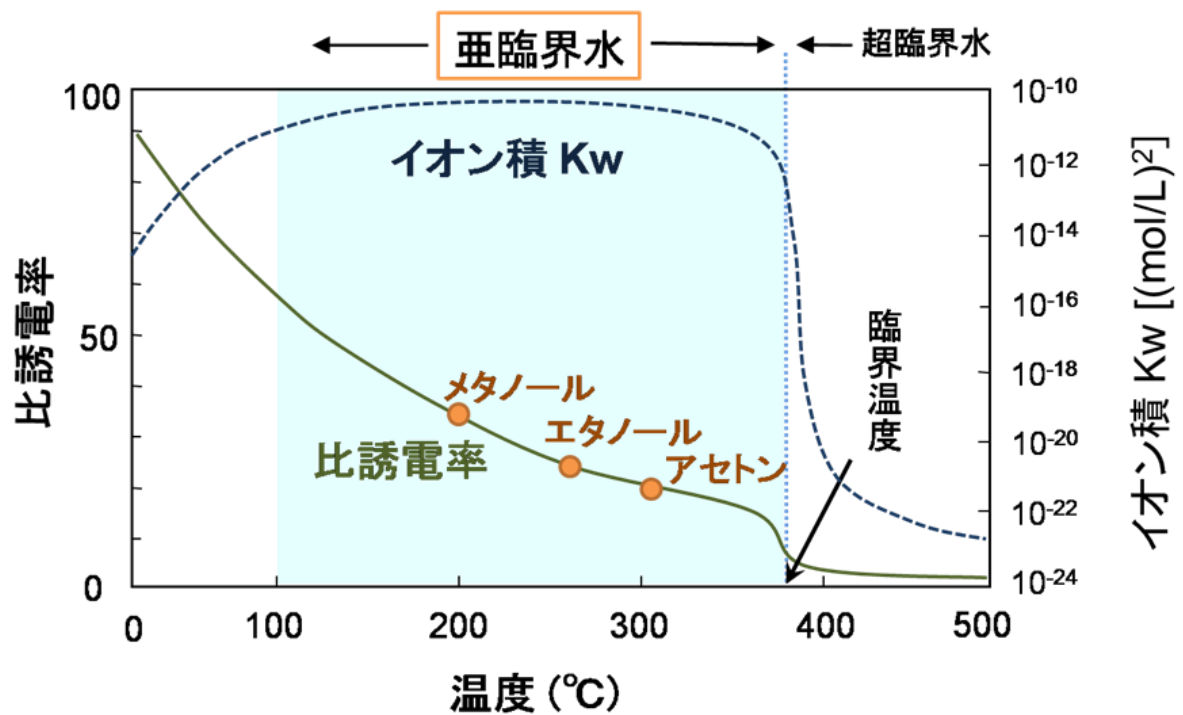


Fig.5. Dependence degree of ionic product and the dielectric constant of water

1-4 本研究の目的

本研究では亜臨界水の特殊な作用に着目し、食品素材からの抽出方法として利用できないかと考えた。そして、静岡県の特産品である緑茶の抽出に応用することを考え、亜臨界水抽出装置による緑茶の呈味、風味の改善に関する研究を行った。その結果、高濃度のカテキン含有でありながら苦味や渋味が従来の抽出方法に比べ、明らかに低減された緑茶抽出物を得ることに成功した。

第 2 章ではこの緑茶カテキンの苦渋味抑制効果について化学的に検証した結果を述べ、そのメカニズム解明を試みた。また、メカニズム解明には現在、研究が進んでいる苦味細胞を用いた応答試験により細胞レベルでの評価も行った。これまでの研究でカテキン類が苦渋味を呈することやカテキンの種類や濃度の違いが味にどのように影響するかをヒト官能検査やマウスの嗜好性試験によって明らかにされた。その結果、カテキンに対する味覚はヒトとマウスで同様の傾向を示し、マウス細胞を用いた評価が可能であることが分かった(マウス有郭乳頭由来の味細胞がカテキンの刺激に対してカルシウム応答を示した)。このことからカテキンの味は味細胞を介して認識されることが判明し、細胞を用いた苦渋味の評価系が構築された。この評価法を用いた苦渋味抑制効果について検証を行った。さらに、亜臨界水抽出と従来の抽出方法(熱水抽出および加圧抽出)との違いを明らかにさせることや亜臨界水の抽出温度による違いについて緑茶に含まれる各成分を比較し、亜臨界水抽出の特徴を検証することを目的とした。緑茶に含まれるアミノ酸は抽出条件により増加・減少するものが存在する。そこで亜臨界水抽出において、どのような反応を示すか検証することにした。第 3 章では緑茶中のアミノ酸の変動について検証した結果について述べ、変化が確認されたアミノ酸についてはその変動量や構造変化の解明および機能性(効能)について検証を行った。本研究室では過去の研究において緑茶抽出後の残渣(茶殻)を亜臨界水抽出することで良好な焙じ茶様エキスの製造を可能にしたことを報告している⁽²³⁾。その時、圧力 3.0 MPa で 180 °C、3 分の処理

によりテアニンが著しく減少することを確認した。この成果から緑茶に主に含まれるアミノ酸のテアニン、グルタミン酸などについて検討を試みた。これまでにグルタミン酸は、熱水中でピログルタミン酸に変化することが報告されている⁽²⁴⁾。また、テアニンは植物中で加水分解酵素によってグルタミン酸とエチルアミンに加水分解されること、水の無い状態での熱反応ではグルコースの存在下でアミノカルボニル反応によって香気成分に変化することも報告されている^(25,26)。そこで、亜臨界水抽出による緑茶に含まれる成分の変化について検証を行った。第 4 章では亜臨界水抽出による緑茶中の機能性成分の変化について検証した結果について報告する。加えて、第 5 章では緑茶以外に飲用される烏龍茶および紅茶について亜臨界水抽出における変化や特徴(香り)について官能評価や GC-MS および脳波測定などを用いて検証した結果について報告する。

現在、産学官連携で開発を進めている量産型の連続式亜臨界水抽出装置の開発について得られた成果を報告する。現状では加熱および冷却用の熱交換器ユニットの設計、モノポンプの選定と設置などバッチ式亜臨界水抽出装置と同等以上の能力で稼働が行える装置の開発やその装置で得られる抽出物の安全性について急性経口毒性試験および変異原性試験を行っている。また、研究レベルのバッチ式装置と生産機レベルの連続式装置についてその再現性を官能評価および成分分析で検証した結果を報告する。そして、最後に今後の亜臨界水抽出の展望について述べていく。

第2章 亜臨界水抽出による緑茶の苦渋味抑制効果

現代社会ではペットボトル飲料の緑茶が数多く販売され、その中に機能性の高いカテキンを多く含んだ製品も存在している。しかし、緑茶カテキンは苦味や渋味が強いいため、日々の生活の中でカテキンを効率よく摂取するには苦味や渋味を抑え、飲み続けられる緑茶製品の開発が必要である。これまでにシクロデキストリンによる苦味や渋味のマスキング技術、キトサン複合体および豆乳タンパクの添加による苦味や渋味の抑制などの加工技術が研究論文や特許によって報告されている^(27,28)。しかし、添加物の使用やタンパクやキトサンなどの成分の添加による苦渋味抑制技術では緑茶本来の呈味や香りを損ねてしまう可能性が高く、また製品化するにはコスト面の増加などの問題がある。そこで、食品加工として実例が少ない亜臨界水抽出技術により、添加物なしで緑茶の呈味や香りの改善を行った。従来の方法では緑茶から高濃度のカテキンを得るのに高温熱水抽出や加圧抽出、酵素反応抽出、アルコールやアセトンなどの溶媒抽出を行っている。しかし、これらの抽出方法は抽出率を上げるために高温での長時間抽出により酸化の促進や成分の変性が生じることや酵素剤、有機溶媒を使用するため危険性や使用の取扱いが大変などのデメリットが考えられる。さらに緑茶にとって重要な香り成分を失わせてしまうなどのマイナス面もあり問題となっている。それに比べて亜臨界水抽出はこのような現象が少なく、お茶の抽出として利用価値が高い技術と言える。これまでに亜臨界水抽出の食品加工として実験を行った研究成果が本研究室より報告されている^(12,23)。しかし、まだ亜臨界水抽出の技術について分かっていない点も多く、有効な利用方法について更なる検討が必要である。今後、亜臨界水抽出による新規嗜好性緑茶製品の生産と様々な食品開発へ応用するためには基礎的な成分に関する知見を収集する必要がある。本研究では、亜臨界水抽出と従来の熱水抽出と加圧抽出との違いについて比較を行った。また、同時に各抽出方法で得られる緑茶抽出物の味、香りの違いについても評価を行った。官能評価で

は亜臨界水抽出によりカテキン特有の強い苦渋味が低減したことが確認された。また、味覚センサー分析およびにおい識別分析を用いて化学的にも明らかにした。そこで、カテキンの苦味や渋味の抑制メカニズムを明らかにするためにタンパク質、アミノ酸、全糖、水溶性ペクチン、各カテキン類およびカフェインなどの成分を定量し、検討を行った。さらに、カテキンの苦味に対する抑制効果について細胞を用いた応答評価試験を実施し、細胞レベルでの検証も行った。

2-1 実験方法

2-1-1 実験材料および抽出方法

バッチ式の亜臨界水抽出装置を用いて抽出を行った (Fig.6)。静岡大学農学部設置されている装置写真を Fig.7 に示した。抽出は有機緑茶 (有機栽培された緑茶) に対して 20 倍重量の蒸留水を加えて、3 分間攪拌し、初期圧力 3.0 MPa、加熱温度 120 °C~180 °C、反応時間達温~3 分間の条件で処理を行った。目的の処理温度および反応時間で処理した後は速やかに水で冷却し、試験サンプルを作成した。装置反応容器の容量は 350 ml である。また、従来の抽出方法と比較するため熱水抽出および加圧抽出を用いた。熱水抽出は 90 °C で 10 分間、加圧抽出は 120 °C (約 0.2 MPa) で 10 分間処理し、サンプルを作成した。それぞれ得られた緑茶抽出物は No.2 濾紙で濾過し、抽出液と茶殻に分離した。緑茶抽出物の一部を凍結乾燥により粉末化させ、試験用サンプルは溶液タイプと粉末タイプの 2 種類を準備した。溶液タイプの緑茶抽出物は使用するまで密封状態で -20 °C にて保存した。また、粉末タイプの緑茶抽出物は褐色瓶の容器に入れ、密封状態で 4 °C にて保存した。本試験に用いた有機緑茶は化学肥料や農薬を控え、有機肥料などを使って育てる栽培方法で作られ、通常の煎茶に比べてカテキンが多く含まれる茶葉である。

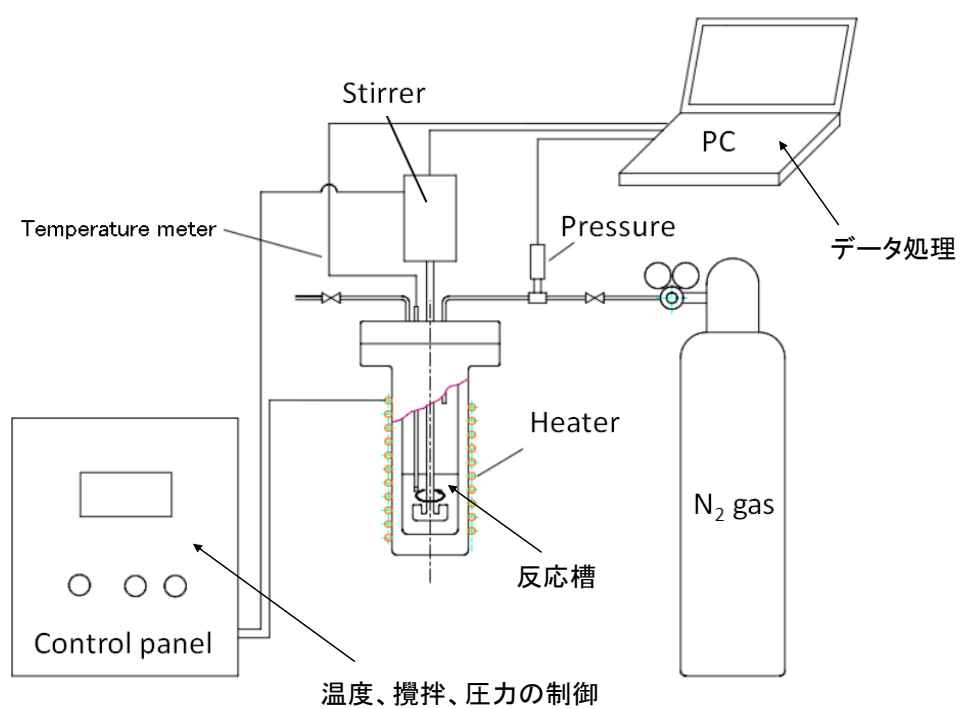


Fig.6. Batch-type Sub-critical water extraction device



Fig.7. The photograph of batch-type sub-critical water extraction device

2-1-2 総カテキン含有量の測定

総カテキン含有量は酒石酸鉄比色法を用いて定量した。酒石酸鉄試薬は硫酸第一鉄 500 mg と酒石酸カリウムナトリウム 2.5 g を水に溶解して 500 ml に調整した。リン酸緩衝液は M/15 リン酸二ナトリウム溶液と M/15 リン酸一カリウム溶液とをスターラーで攪拌しながら混合し pH 7.5 に調整した。試料 5 ml に酒石酸鉄試薬 5 ml を加え、リン酸緩衝液で 25 ml に定容したものを 540 nm の吸光度で測定した。検量線から試料の吸光度に相当する没食子酸エチルを求め、その値からカテキン量を算出した。

2-1-3 官能評価

熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出により得られた緑茶抽出物 100 ml 中にカテキン含有量 180 mg に調整して試飲および香りの官能評価を行った。このカテキン量は通常飲まれる煎茶の約 3 倍量にあたり、高濃度に調整することで苦渋味の違いを分かりやすくした。それぞれの緑茶抽出物について一切説明することなく、研究開発員 15 人で苦味の強さ、渋味の強さ、飲みやすさ、香りの良さの優劣の判定を順位法で行った。判定は 1 名ずつ個別に行い、各自飲みやすいと思うものから順番に並べ順位を付けた。なお、同一と感じられるものは同順位とした。結果については評定順位の平均値の算出を行った後、3 種の緑茶抽出物間に関心のある差が生じるかどうかについて判定した。

2-1-4 味覚センサー分析による味覚評価

熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出によりそれぞれ得られた緑茶抽出物に対してカテキン含有量を一定にさせたもの 50 ml を専用のカップに入れ、味覚センサー装置（インテリジェントセンサーテクノロジー社製 TS-5000Z）で測定した（Fig.8）。センサーは苦味（C00）、渋味（AE1）、旨味（AAE）、塩味（CT0）、酸味（CA0）の 5 種類を使用して食品を口に含んだ瞬間の

味“先味”と食品を飲み込んだ後に残る持続性のある味“後味”の 2 種類で味を評価した。基準液(30 mM KCl と 0.3 mM 酒石酸を含んだ、ほぼ無味の溶液。人間の唾液に相当)の電位をゼロとして、サンプル液との電位差を先味として測定、その後センサーを軽く洗浄して、再度基準液を測定した時の電位差を後味として測定した。測定は同一試料に対して 3 回行い、得られたセンサー出力値の平均を用いて算出した。測定原理を Fig.9 および測定方法を Fig.10 に示した。なお、熱水抽出により得られた緑茶抽出物を基準サンプルとして比較を行っている。生体味覚受容メカニズムを模倣した味覚センサーは生体の舌の表面には“脂質二分子膜”が形成されており、固有の膜電位を持っています。その膜電位は様々な呈味物質との化学反応、あるいは吸着反応により変化します。この変化量を人間の脳では味の情報として認識し、味を判断していると言われています。この生体の味覚受容メカニズムを模倣したのが味覚センサーです。味覚センサーは人工の“脂質膜”(人間の舌と同様)で構成され、様々な呈味物質と化学反応・吸着反応を起こし、人間と同様に「味」を感じることができます⁽²⁹⁾。



Fig.8. Taste sensor analyzer SA402B (Intelligent Sensor Technology)

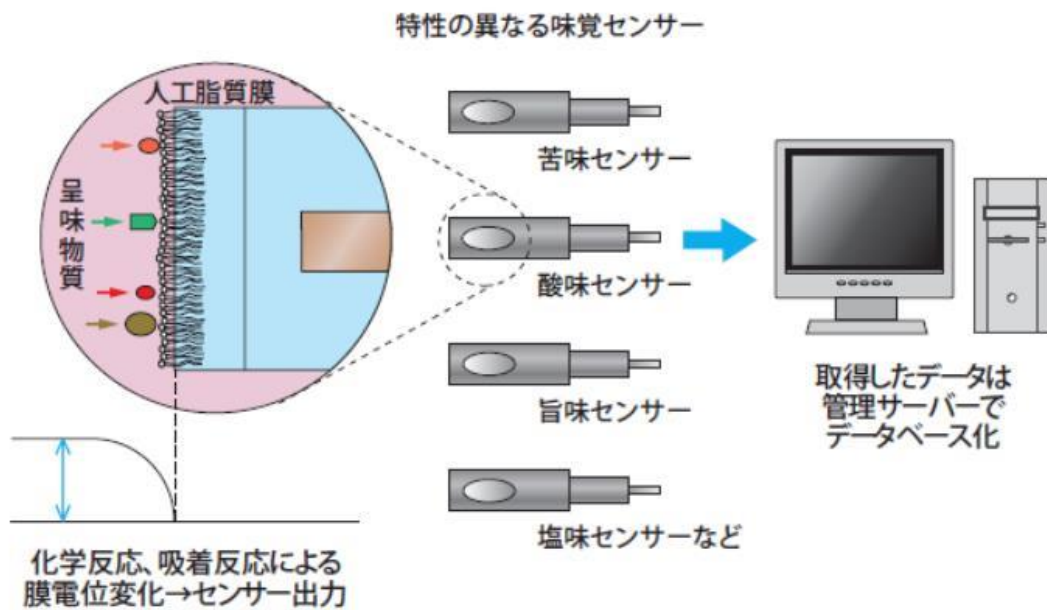


Fig.9. Reply principle of the taste sensor

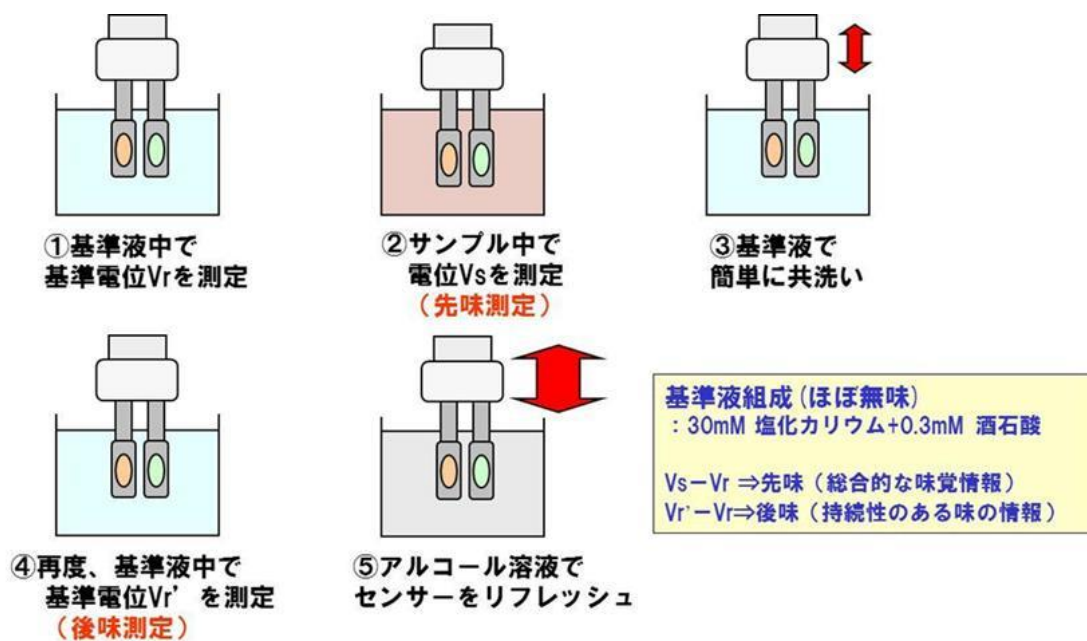


Fig.10. Method for measurement with the taste sensor

2-1-5 におい識別分析装置による香りの評価

熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出により得られた緑茶抽出物を用いてにおい識別分析装置(島津テクニサーチ社製 FF2020S)で香りの評価を行った(Fig.11)。装置には搭載する10種類の酸化物半導体ニオイセンサ素子を用いて付属する9種類の基準ガスを測定した時のセンサー出力値を表現ソフトで評価している。臭気指数や試料間の類似度を数値化させてグラフによりサンプル間のにおいの質や強さを比較した。試験操作は洗浄して無臭性を確認した2 L容量のポリエチレンテレフターレ(PET)製バッグに試料を30 ml 入れて密封し、超高純度窒素を充填して室温(25 °C)で2時間放置した。2時間放置後にバッグ内のガスのみを洗浄した別のバッグに移し入れ、そのバッグをにおい識別装置にセットして測定した。



Fig.11. Difference odor analyzer FF2020S (Shimadzu Techno-Research, Japan)

2-1-6 タンパク質・アミノ酸含有量の測定

タンパク質含有量はフォーリン・ローリー法で測定した。タンパク質サンプル溶液にアルカリ性銅溶液を加え、その後フェノール試薬をよく混和する。反応溶液をバックグラウンドとの波長

750 nm における吸光度の差を分光光度計で測定した。タンパク質濃度が明らかなスタンダードの吸光度から描いた標準直線から、タンパク質濃度を算出した^(30,31)。

アミノ酸含有量はアミノ酸分析装置 L-8900(日立ハイテック)を用いて測定した。各緑茶抽出物 1 ml を ϕ 0.45 μ m のメンブレンフィルターに通し、アミノ酸標準試薬とともに分析に供した⁽¹²⁾。

2-1-7 全糖量・水溶性ペクチン含有量の測定

全糖量はフェノール硫酸法で測定した。試料溶液 1 ml と 5 %フェノール溶液 1 ml を試験管に取り、これに濃硫酸 5 ml を一気に加えた。ただちに試験管を攪拌し、室温になるまで放置した。吸光度計を用いて吸光波長 490 nm で吸光度の測定を行った。

それぞれの緑茶抽出物の水溶性ペクチン含有量をカルバゾール比色法にて定量した。すなわち抽出液 0.8 ml に 4M スルホン酸 0.1 ml と 1M ホウ酸 0.1 ml を加えて混合後、濃硫酸 5 ml を加えて沸騰水中で反応させた。室温に戻した抽出液に 0.2 %カルバゾール／エタノール溶液を 0.2 ml 加えて攪拌し、再び沸騰水中で 10 分間放置した。室温で放冷した後、525 nm の吸光度を測定した⁽³²⁾。

2-1-8 カテキン類・カフェイン含有量の測定

カテキン類およびカフェイン含有量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量を行った⁽³³⁾。HPLC 装置は Waters 社の e2695 を使用し、UV2998 検出器で測定を行った。測定条件についてはカラムを野村化学製の Develosil ODS-HG column (150×4.6 mm) を使用し、流速 1 ml/min、検出波長 231 nm、カラム温度 40 °C で測定を行った。グラジエントは A) 蒸留水：アセトニトリル：85 %リン酸溶液 (95.45:4.5:0.05)、B) 蒸留水：アセトニトリル：85 %リン酸溶液 (49.95:50.0:0.05)、移動相溶媒の混合比は 0→5 分 (A 液 90 %、B 液 10 %) の状態を保つ。5→8 分 (8 分の時点で B 液の割合が 30 %になる) 8→10 分 (A 液 70 %、B 液 30 %) の状

態を保つ 10→15 分(15 分の時点で B 液の割合が 80 %になる) 15→20 分(A 液 20 %、B 液 80 %の状態を保つ) 初期の状態(A 液 90 %、B 液 10 %)に戻し 10 分以上おいてから次の試料を分析するようにした^(34,35)。

2-1-9 苦味細胞応答試験

カルシウムイメージング法を用いて評価を行った。苦味物質が苦味受容体に結合すると、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する。蛍光カルシウム指示薬を用い、サンプル投与時のカルシウムイオンの濃度変化を、分注機能を持つ傾向のマイクロプレートリーダーFlex Station IIで解析した(Fig.12)。細胞 G タンパクを安定発現細胞に用いて TAS2R39 に導入し発現させた(苦味受容体が G タンパク共役受容体であるため)。ネガティブコントロールに HEK293T 細胞を用いた。

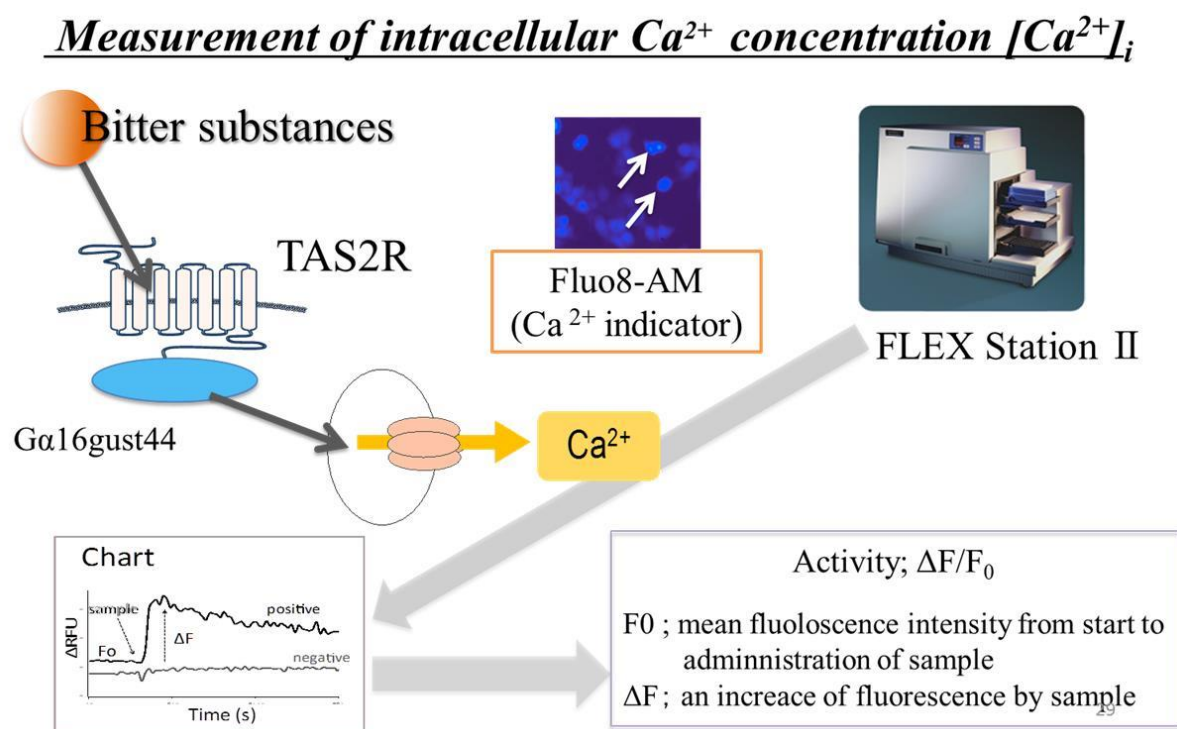


Fig.12. Reply of cells to taste bitterness

細胞:受容体解析に頻用されるヒト胎児腎由来の Human Embryonic Kidney (HEK) 293T 細胞を用いた。

細胞培養:HEK 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、100 unit/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin、250 ng/mL amphotericin B (AB)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて、37 °C、5 %CO₂ 存在下で培養した。継代は週に 2~3 回の頻度で行い、実験には継代数 30 以下のものを使用した。

トランスフェクション:トランスフェクション前日に HEK293T 細胞を細胞数 1.5×10⁵ cells/35 mm dish になるようにまいた。トランスフェクション当日、LipofectamineTM2000(6.25 μL)、Opti MEM(250 μL)を穏やかに混合し、室温で 5 分間インキュベートした。この Lipofectamine 溶液に苦味受容体プラスミド(2 μg 相当)とキメラ G タンパク質 Gα16gust44(0.5 μg 相当)、Opti MEM (250 μL)を加えた溶液を混合し、20 分間室温でインキュベートした (DNA-Lipofectamine 複合体形成)。その後、DNA-Lipofectamine 複合体(0.5 mL)に Opti MEM(1.5 mL)を混合させ、前日にまいた細胞に添加した。5 時間後に、FLEXstationTM II による測定のため、トランスフェクション細胞を DMEM+10%FBS で希釈して、細胞数が 2.0×10⁴ cells/well になるように 96 well plate にまいた。24 時間後、FLEXstationTM II により測定を行った (活性%) = $\Delta F/F \times 100$ 。

FLEXstationTM II による細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]) 測定:測定前日に、60 mm dish でセミコンフルエントになった細胞を PBS (-) で洗浄した。1×Trypsin/EDTA 処理によりシャーレ底面から細胞を剥がし、15 mL ファルコンチューブに移し、800 rpm で 4 分間遠心した。上清を吸引し、タッピングにより細胞をほぐし、新たに培地を加え、細胞数 20×10⁴ cells/mL となるように希釈調整した。その後、CO₂ インキュベーターで 37°Cにて 24 時間インキュベートした。測定当日、培地を捨て、3 μM Fluo8-AM in Loading solution (LS) 50 μL/well を加え、CO₂ インキュベーターにて 37°Cで 1 時間インキュベートした。LS を捨て、1×HEPES 100 μL/well で洗浄し、

1×HEPES 180 μL/well を加えて、あらかじめ 37℃に設定しておいた FLEXstationTM II にセットした (Fig.13)。蛍光量変化の解析は FLEXstationTM II の解析ソフト SoftMaxPro v.5.0.1 を用いた⁽³⁶⁻³⁸⁾。

投与サンプルの調整ではカテキン類 300 μM の ECG、EGCG を用いた。最終濃度の 1000 倍高濃度のサンプル (エタノール溶液) を調製し、-20℃にて保存した。測定時にサンプルが 10 倍濃度になるようコンパウンドプレート内に 1×HEPES バッファーで希釈し FLEX Station TM II に設置した。

～マスキング剤サンプルの調整～

シクロデキストリン(β-CD): 6 mM (終濃度の 20 倍高濃度) になるよう 1×HEPES バッファーで希釈し、等量の 6 mM EGCG 溶液を加え、vortex で 10 秒以上攪拌し、コンパウンドプレートに加えた。

ペクチン: ペクチンを 1×HEPES を用い 0.1% ペクチン溶液を作成した。EGCG は 0.1% ペクチン溶液を用い、3 mM に調整し細胞へ投与した。

スクロース: 1×HEPES バッファーを用い、65 mM スクロース溶液を調整した。この溶液で EGCG を 3 mM に希釈し投与した。

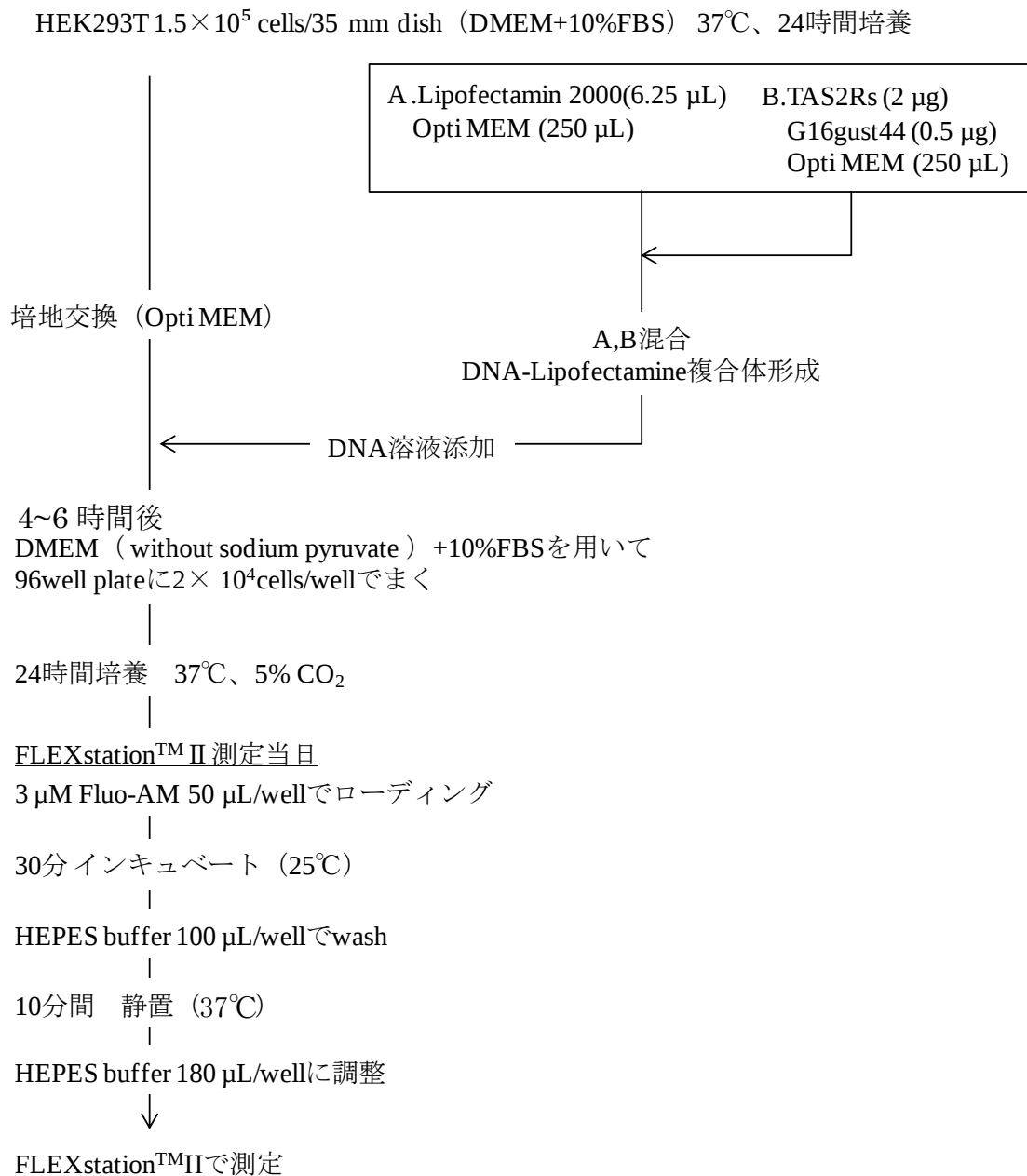


Fig.13. Method of taste bitterness reply activity test

2-2 結果と考察

2-2-1 緑茶抽出物の特徴

熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出で得られた緑茶抽出物の総カテキン量を測定した。その結果、熱水抽出 317 mg/100 ml、加圧抽出 333 mg/100 ml、亜臨界水抽出 309 mg/100 mlであった。いずれもカテキン含有量 300 mg/100 mlを超えており、緑茶から高濃度にカテキンが抽出されたことが確認された。本研究での熱水抽出の条件は茶葉から高濃度にカテキンを得るため、通常よりも抽出時間を少し長めにした。また、この抽出条件は工業的な生産に利用されており、効率良くカテキンを抽出する方法として実際に用いられている⁽³⁹⁾。加圧抽出は亜臨界水抽出とは反応が異なることを明らかにするために比較として用いた。現在、カテキンの抽出に利用されているアルコールなどの溶媒抽出に比べて、亜臨界水抽出は通常の水だけを使用しているため安全であり、安心して扱うことができる技術である。また、亜臨界水の強い加水分解作用により食品残渣や廃棄物の低減にも繋がり、環境に対して非常に良好と考えている。その他にも亜臨界水の特徴として従来の熱水抽出に比べ、抽出時間が 1/10～1/40 程短縮可能なことや抽出率が 5～10 %向上するなどのメリットが明らかとなった。本研究で用いた亜臨界水の抽出条件は加熱温度や圧力ともにそれ程高くないため、装置の導入費用やメンテナンス費用などは抑えることができる。このことから新製品の生産に要するコストおよび最終製品の価格は大幅に増大することはない、実用的であると考えられる。

2-2-2 試飲による官能評価

官能評価では緑茶製品の研究開発者 15 名で実施した。官能評価では通常緑茶で飲まれるカテキン量の約 3 倍にあたる 180 mg/100 ml と高濃度に調整して行った。この調整は苦渋味の違いをより分かりやすくするために用いた⁽⁴⁰⁾。得られた官能結果は順位法で評価した

(Table 1)。その結果、苦渋味を強く感じた順は熱水抽出＝加圧抽出＞亜臨界水抽出であった。亜臨界水抽出で得られた緑茶抽出物は渋味をととても弱く感じた。飲みやすさは亜臨界水抽出＞熱水抽出＞加圧抽出の順で良かった。また、香りについては亜臨界水抽出＞熱水抽出＞加圧抽出の順で良いと評価された。これらの結果、亜臨界水抽出で得られた緑茶抽出物は同じカテキン含有量でも明らかに渋味は抑制され、飲みやすくなっていた。今後、日本茶インストラクター資格を持った審査員や緑茶専門家に官能評価を行ってもらう予定です。

Table 1. Comparison of the sensory evaluation

	Hydrothermal extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction
Temperature	90 °C	120 °C	130 °C
Pressure	—	0.2 MPa	3.0 MPa
Extraction time	10 min	15 min	1 min
Bitterness/Astringency	Strong	Strong	Weak
Ease of drinking	Normal	Bad	Very good
Fragrance	Normal	Bad	Good

2-2-3 味覚センサー分析による苦渋味の評価

亜臨界水抽出で苦渋味の抑制傾向が見られたため、その評価を化学的に検証するため味覚センサー分析による評価を実施した。熱水抽出で得られる緑茶抽出物の測定結果を基準値 0 として評価を行った。その結果、熱水抽出の測定結果と比較して加圧抽出は酸味 0、苦味(先味)+0.18±0.07、渋味(先味)-1.90±0.15、旨味+0.56±0.22、苦味(後味)+0.40±0.07、渋味(後味)+0.78±0.09、旨味(コク)+0.21±0.23。亜臨界水抽出は酸味 0、苦味(先味)-0.95±0.35、渋味(先味)-5.04±0.45、旨味+0.22±0.30、苦味(後味)+0.19±0.03、渋味(後味)-2.29±0.20、旨味(コク)+0.35±0.12 であった(Fig.14)。亜臨界水抽出は従来の抽出方法に比

べ、渋味の先味・後味が減少していることが確認された。そこで、苦味と渋味について t-検定を行った結果、亜臨界水抽出の緑茶抽出物に有意差があることが確認された。旨味と酸味に関しては抽出方法の違いによる大きな差は認められなかった。この結果から人の官能評価と味覚センサー分析の化学的な官能評価は同様な結果が得られ、相関性があることが示唆された。渋味が低減され、非常に飲みやすい緑茶であるため、動脈硬化の予防・高血圧の抑制・糖尿病やがんの予防など様々な効能があるカテキンを一度にたくさん摂取することが可能となる。

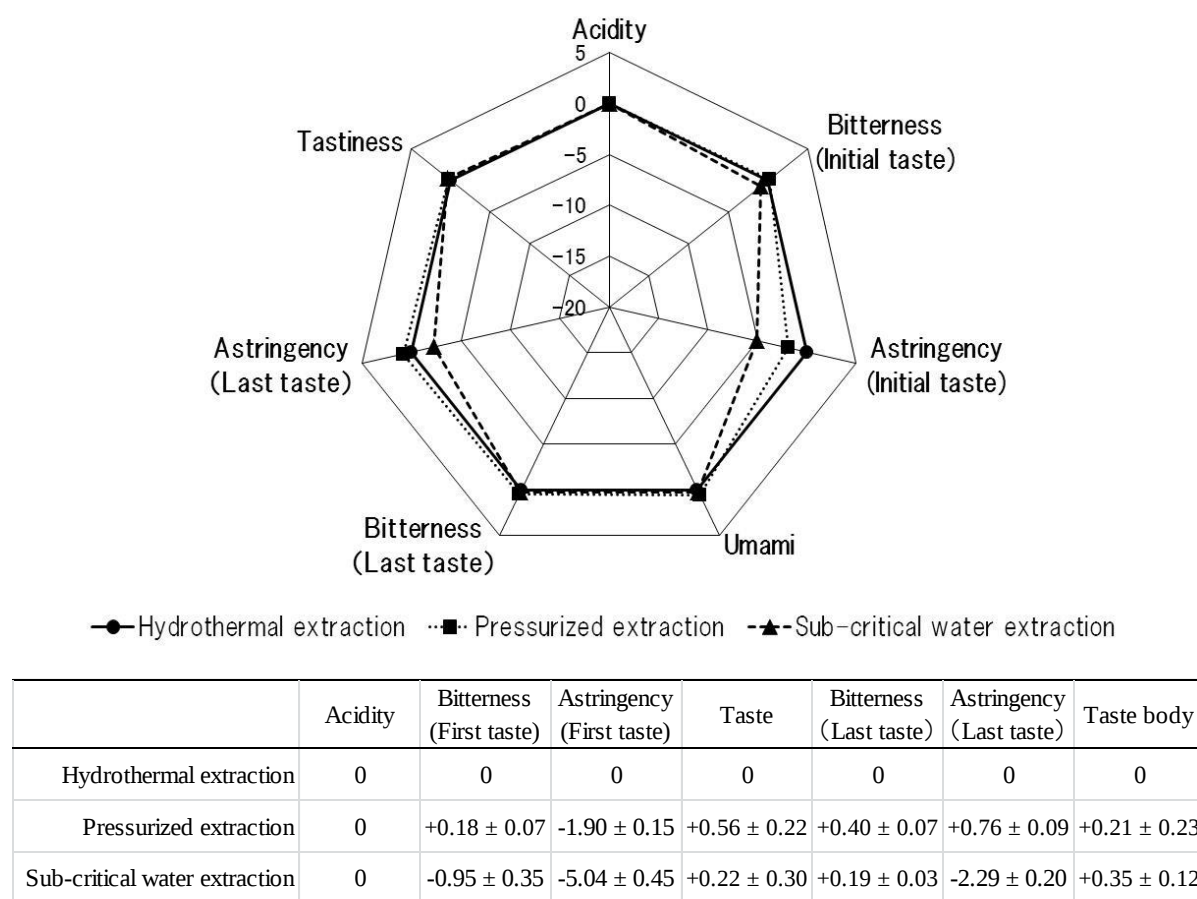


Fig.14. Comparison of extraction methods by taste sensor analysis of green tea extracts

2-2-4 におい識別分析による香気成分組成の評価

緑茶にとって香りはとても重要な要素である。その香りをにおい識別分析装置(島津テクノリサーチ(株))を用いて評価を行った。試料の“においの強さ”の特徴をレーダーチャートに示す9種類の基準ガスに置き換えて表示した。その結果、硫化水素、アンモニア、硫黄系、有機酸系などの緑茶の香りとして好まれない成分が加圧抽出に多く含まれることが確認された。それに比べて熱水抽出と亜臨界水抽出はいずれの成分も多く含まれていないことが分かった(Fig.15)。また、試料間のにおいの質を類似度で比較し、評価を行った。その結果、熱水抽出と亜臨界水抽出は同じ傾向のにおい組成であり、類似した香りを持つことが分かった。加圧抽出は類似しておらず、香りの官能評価においても好ましくなかった。よって、亜臨界水抽出は熱水抽出の緑茶と同じような成分組成であることが確認された。

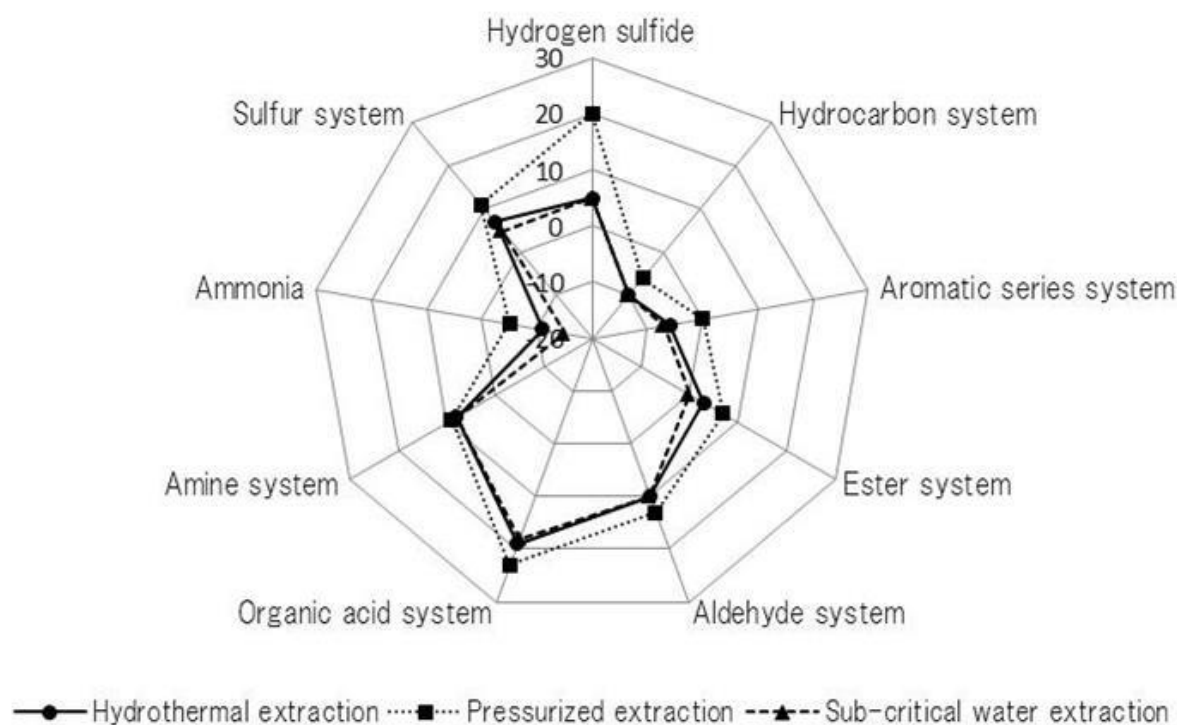


Fig.15. Comparison of extraction methods in relation to the composition of fragrance ingredients using differential odor analysis

2-2-5 タンパク質・アミノ酸含有量の比較

緑茶抽出物のタンパク質および遊離アミノ酸含有量を測定した。その結果、熱水抽出 96.5 mg/ml、加圧抽出 100.9 mg/ml、亜臨界水抽出 87.1 mg/ml であった。この結果、亜臨界水抽出にタンパク質の減少が確認された。これは亜臨界水の加水分解作用によってタンパク質が分解され、遊離アミノ酸に変化したことが示唆された。また、緑茶の呈味に関連する遊離アミノ酸の測定結果を Table 2 に示した⁽⁴¹⁾。緑茶のうま味や甘味に関与するセリン、グルタミン酸、グリシン、アルギニンが亜臨界水抽出で増加したことが確認された。その中でもセリン、アルギニンが増加していることが分かった。グルタミン酸やアルギニンは緑茶のうま味や甘味に大きく関与するアミノ酸であり、緑茶の美味しさを示す成分でもある。また、アルギニンには苦渋味に対する抑制効果があることが報告されており、この作用も苦渋味の抑制に関係していると考えられた⁽⁴²⁾。一方、アスパラギン酸、テアニン、アラニン、チロシン、ヒスチジンは亜臨界水で減少していることが分かった。これは、従来の抽出方法に比べて加水分解が促進したことやアミノ酸の構造が変化しているのではと考えられた。

Table 2. Comparison of amino acid content in the three extracts

	Hydrothermal extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction
	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)
Serine	14.3 ± 0.2	15.1 ± 0.1	19.1 ± 0.1
Glutamic acid	28.8 ± 0.5	29.3 ± 0.3	24.7 ± 0.2
Glycine	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.8 ± 0.0
Arginine	15.4 ± 0.2	17.1 ± 0.1	22.1 ± 0.3
Aspartic acid	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Theanine	46.3 ± 0.3	46.4 ± 0.4	48.0 ± 0.3
Alanine	11.7 ± 0.4	11.9 ± 0.6	10.6 ± 0.3
Tyrosine	9.4 ± 0.3	9.3 ± 0.1	8.4 ± 0.1
Histidine	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.0

2-2-6 全糖量・水溶性ペクチン含有量の比較

緑茶抽出物の全糖量および水溶性ペクチン含有量を測定した。測定結果を Table 3 に示した。糖や水溶性ペクチンなどの糖類はカテキンの強い苦渋味をマスキングする効果が考えられたため検証を行った。その結果、亜臨界水抽出で全糖量および水溶性ペクチン含有量の増加が確認された。全糖量では熱水抽出および加圧抽出の約 1.4 倍、水溶性ペクチンでは熱水抽出の約 4 倍、加圧抽出の約 2 倍の増加が確認された。これまでの研究でポリフェノールの渋味がペクチンによって抑制されることや緑茶浸出液中のペクチンがその渋味を抑制していることが確認されている⁽⁴³⁾。4 種類のカテキン水溶液に対してペクチンを添加させ、渋味の抑制効果を味覚センサー分析にて評価している。その結果、ペクチンはガレート型カテキンの EGCG と ECG に対して渋味抑制効果を示すことを明らかにした⁽⁴⁴⁾。この結果から本研究においても糖類が何らかの形で苦渋味レセプターをマスキングして、苦渋味を抑制しているのではと示唆された。実際に苦渋味が強い EGCG に水溶性ペクチンを添加して、味覚センサー分析にて評価を行った。その結果、渋味(先味、後味)の著しい減少が確認された。従って、水溶性ペクチンがカテキンの強い苦渋味をマスキングしていることが示唆された。

Table 3. Comparison of sugar and water-soluble pectin content in the three extracts

	Hydrothermal extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction
	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)
Total sugar	197.4 ± 4.9	201.9 ± 7.2	269.7 ± 7.2
Water-soluble pectin	6.1 ± 0.3	13.7 ± 0.8	23.5 ± 0.9

2-2-7 カテキン類・カフェイン含有量の比較

緑茶抽出物のカテキン類およびカフェイン含有量を測定した。測定結果を Table 4 に示した。その結果、亜臨界水抽出で各カテキン類の減少傾向が確認された⁽⁴⁵⁾。これは亜臨界水の加

水分解反応によりカテキンの分解が起こったのでは考えられた。その中で機能性が多く報告されている EGCG の含有量に減少は見られなかった。よって、亜臨界水抽出で得られた緑茶抽出物は従来の抽出方法と変わらず高い機能性が残っていることが明らかになった。その他、ECG や EC については減少が見られ、苦渋味の強い ECG の減少は官能評価に関係する可能性が考えられた⁽³⁶⁾。GCG については亜臨界水における加水分解によりガラート基がはずれたため減少したと考えられる。また、カフェインの含有量については大きな増減は確認されなかった。これらの結果、亜臨界水抽出で得られた緑茶抽出物のカテキン抽出量は変わらないがカテキン類の組成は変化していることが分かった⁽⁴⁶⁾。このカテキン類の変化による機能性や従来の抽出方法との違いについて今後、検証を行いたいと考えている。

Table 4. Comparison of catechins and caffeine content in the three extracts

	Hydrothermal extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction
	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)
EGCG	131.0 ± 3.7	120.6 ± 2.3	143.0 ± 6.5
ECG	19.2 ± 0.7	18.6 ± 1.3	8.8 ± 1.3
EGC	48.2 ± 0.9	34.0 ± 0.5	41.5 ± 1.0
EC	36.0 ± 0.2	29.8 ± 1.2	15.8 ± 0.4
GCG	31.1 ± 0.8	53.1 ± 2.1	18.9 ± 0.9
CG	2.4 ± 0.3	4.3 ± 0.7	3.4 ± 0.4
GC	37.6 ± 1.2	57.5 ± 1.2	62.5 ± 1.5
C	6.1 ± 0.9	9.7 ± 0.9	11.7 ± 1.8
Caffeine	37.8 ± 1.1	39.6 ± 1.3	36.4 ± 1.1

2-2-8 苦味細胞応答評価

苦味受容体 TAS2R39 細胞およびカテキン (ECG, EGCG) 300 μ M、 β -CD、ペクチン 0.01 %、スクロース 65 mM を用いてカテキンの苦味に対する細胞応答試験を行った。 β -CD をポジティブコントロールとして、HEK293T 細胞をネガティブコントロールとして用いた。これまでの研究で β -CD はカテキンの苦味を抑制することが報告されている。苦渋味の細胞発現について蛍光量により評価し、測定チャートを Fig.16、定量比較した結果を Fig.17(白: 共発現細胞、

黒:HEK293T)に示した。その結果、共発現細胞(TAS2R39/G)の反応では、 β -CD、0.01 %
 ペクチン、65 mM スクロースの添加によって蛍光量が減少する傾向が見られた。従って、カテ
 キン(ECG)の苦味はペクチンやスクロースの添加により抑制されたことが示された。

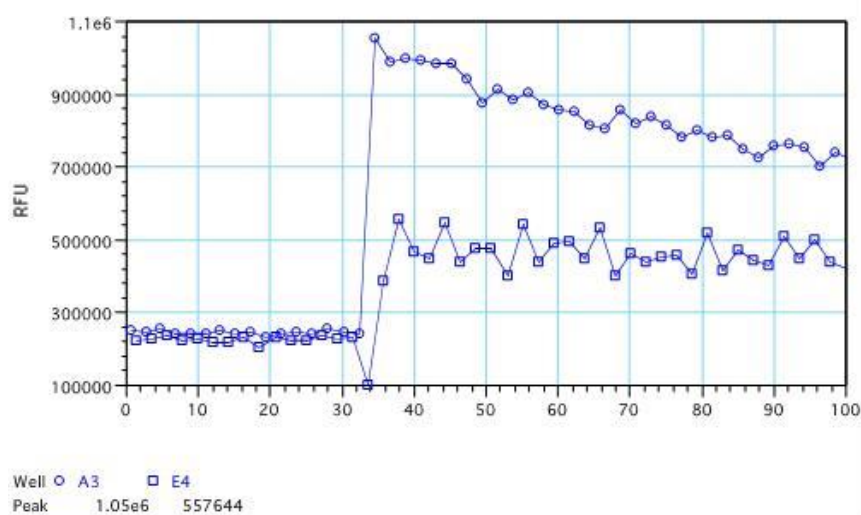


Fig.16. Measurement chart of the quantity of fluorescence

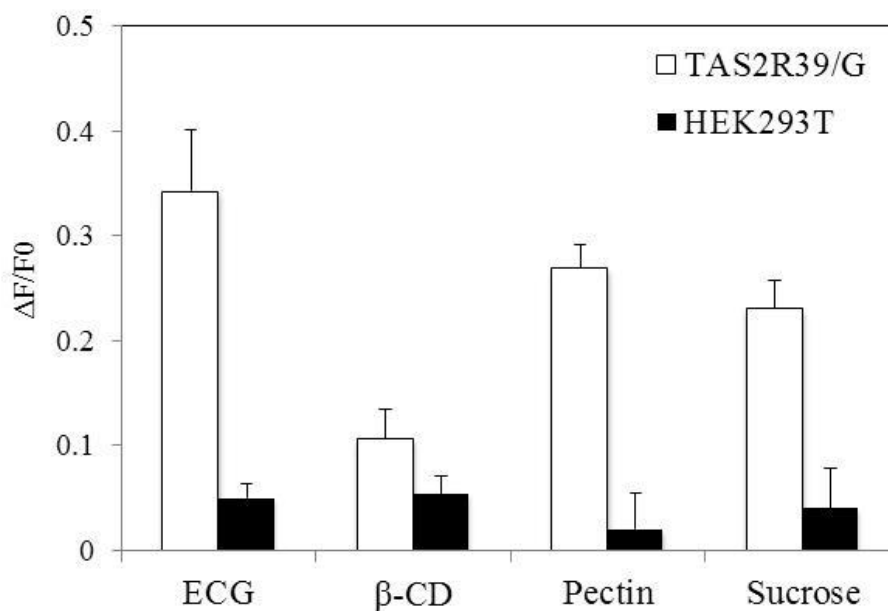


Fig.17. Cell expression reply evaluation of the distress taste

以上の結果、亜臨界水抽出は緑茶から容易に高濃度でカテキンを抽出することが可能である。さらに、カテキン特有の強い苦渋味を抑制することも分かった。また、量産するための亜臨界水抽出装置の導入についても比較的に温度、圧力とも低域での反応であるため、設計に対するコストや安全性に関しても大きな問題は発生しないと考えている。新規の嗜好性緑茶の開発として亜臨界水抽出はメリットが高く、食品の抽出技術として有効性があると考えている。カテキンの強い苦渋味の抑制は水溶性ペクチン(多糖類)などの糖類によるマスキング効果が考えられた。また、TAS2R39 細胞を用いたカテキン(EGCG)の苦味応答試験ではペクチンおよびスクロースに苦味抑制効果が確認された。よって、EGCG の減少や糖類による苦渋味の低減が示唆された。Fig.18 に示すように EGCG や ECG およびカフェインなどの苦渋味成分に糖類が直接コーティングするのではなく、苦渋味を感じる味蕾にペクチンなどの糖類が覆うことによって苦味や渋味を抑制したのではと考えている。今後は新たな機能性成分の探索や新たな効能について細胞や動物実験等で検証し、亜臨界水抽出の更なる利用価値や有効な活用方法について検討する予定である。

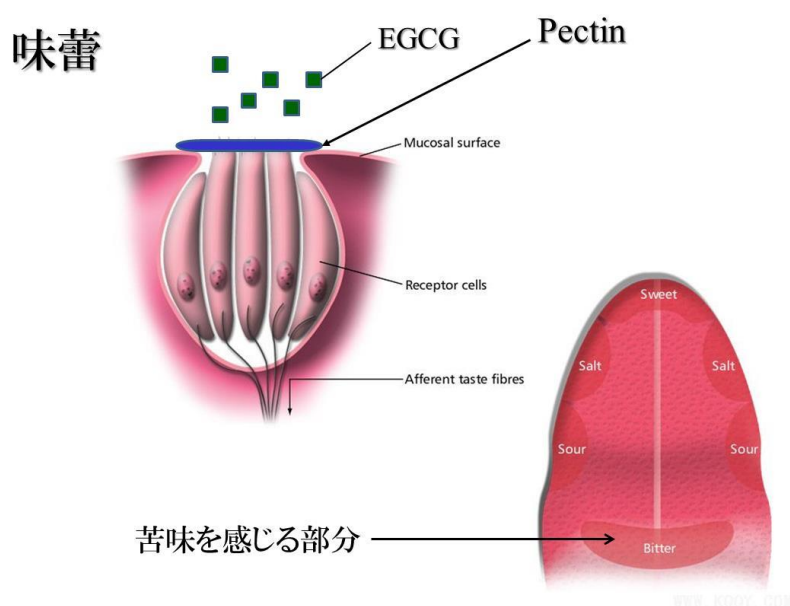


Fig.18. Sense taste by taste buds on the surface of the tongue

第3章 亜臨界水抽出による緑茶中のアミノ酸の変化

亜臨界水は通常の水とは異なる特性を有することから新加工技術、新原料への変換技術など革新的な処理技術としてその利用が期待されている。この亜臨界水は普通の水を溶媒として用いるため人体や環境に無害である。また、処理時間の短縮かつ抽出効率の向上に伴い生産コストにおいてメリットがある⁽¹¹⁾。

これまでに亜臨界水の性質を利用した廃棄物の再資源化が考えられた。廃プラスチック、廃木材、食品廃棄物などの廃棄物の資源化として活用された。主な例としては、廃木材の主成分であるセルロースから糖類の生成⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾や各種プラスチック類の再資源化⁽⁵⁰⁻⁵²⁾、有害物質の分解や除去、環境汚染物質の無害化⁽¹⁵⁻¹⁸⁾および魚のアラやチキン廃棄物などの食品廃棄物から有用成分の生成⁽¹⁹⁻²²⁾などがある。この亜臨界水の特性を食品加工として利用できないか検証が行われている。これまでに天然成分からのエッセンシャルオイルの抽出⁽¹³⁾や抗酸化物質などの有用成分の抽出⁽¹⁴⁾やヘマトコッカスからのアスタキサンチンの抽出および大麦からの機能性成分の抽出に関する研究が行われた⁽¹²⁾。

緑茶は、日本や中国で日常的に飲まれ、そのうま味や渋味、様々な効能についてはこれまでに数多くの報告がされている⁽⁵³⁻⁶⁴⁾。よって、緑茶の品質評価において機能性の高いカテキンやうま味の指標となるアミノ酸の含有量は大変重要である。さらに、緑茶は抽出する温度によって香りが変化し、異なった風味をもたらす飲料である。我々はこれまでに亜臨界水を利用することで緑茶中の有用成分が従来の抽出方法よりも効率的に得られるのではと考え、亜臨界水抽出の条件において低温域および高温域を設定し、緑茶抽出物を得た。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cにおいて高濃度のカテキンを抽出しながらも強い苦渋味を抑えた飲みやすい緑茶抽出物を得ることに成功した⁽⁶⁵⁾。また、亜臨界水抽出 180 °Cにおいて緑茶から良好なほうじ茶様エキスが得られた⁽²³⁾。そこで、本研究では亜臨界抽出条件の異なる緑茶モデル

およびほうじ茶モデルの2つの条件(130 °C, 180 °C)において成分レベルでその変化を詳細に調べることにした。また、頻繁に用いられる熱水抽出および加圧抽出との比較を行った。

3-1 実験方法

3-1-1 試験材料および抽出条件

実験はバッチ式の亜臨界水抽出装置を用いた。緑茶 18 g に蒸留水 360 ml を加え、3 分間攪拌した後に抽出を行った。亜臨界水抽出は圧力 3.0 MPa で 130 °C および 180 °C で 3 分間反応させた後、冷却水で一気に常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。熱水抽出は 90 °C で 10 分間反応させた後、常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。加圧抽出は 120 °C (約 0.2 MPa) で 10 分間反応させた後、常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。それぞれ得られた緑茶抽出液は No.2 濾紙で吸引濾過を行った。その後、凍結乾燥により粉末化させて試験サンプルを作成した。サンプルは分析するまで 4 °C の冷暗所で保存した。

3-1-2 アミノ酸含有量の測定

アミノ酸含有量は静岡大学農学部にあるアミノ酸分析装置 L-8900 (日立ハイテック)を用いて測定した。バッファー必要量やカラムの使用期限を確認後、マニュアルを参照しながら進め、各サンプルの緑茶抽出物 1 ml を $\phi 0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターに通し、アミノ酸標準試薬とともに分析に供した⁽¹²⁾。

3-1-3 アミノ酸標品によるモデル試験

緑茶中において有意な減少が確認されたテアニンおよびグルタミン酸を用いた。それぞれのアミノ酸標品 300 mg を蒸留水 300 ml に溶解させた後、同じ条件で抽出を行った。亜臨界

水抽出は圧力 3.0 MPa で 130 °C および 180 °C で 3 分間反応させた後、冷却水で一気に常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。熱水抽出は 90 °C で 10 分間反応させた後、常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。加圧抽出は 120 °C で 10 分間反応させた後、常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。また、その他のアルギニン、アスパラギン酸、セリンについても同様の条件で抽出を行った。これらの遊離アミノ酸は緑茶に多く含まれているため、検証することにした。それぞれ処理後のサンプル抽出液は分析するまで 4 °C の冷暗所で保存した。

3-1-4 構造解析

テアニンおよびグルタミン酸の亜臨界水抽出 180 °C で 3 分間処理したサンプルを薄層クロマトグラフィー (TLC) で分離した。その後、シリカゲルカラムで分離精製したサンプルを核磁気共鳴 (NMR)、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS)、赤外吸収分析 (IR) を用いて構造解析を行った。NMR は JEOL 社製の Lambda 500、ESI-MS は JEOL 社製の JMS-T100LP、IR は日本分光社製の JASCO FT/IR-400 を使用した。

3-1-5 新規物質の測定

各緑茶抽出液を凍結乾燥させたサンプルを LC-MS に供した。各サンプル 10 mg を蒸留水 50 μ l と 90 %メタノール 150 μ l (内部標準のゲニステイン 10 μ g/ml を含む) で抽出した。その後、抽出したサンプルは 2 分間攪拌し、遠心分離を行った。上澄み液を捨てた後に 90 %メタノール 200 μ l を加えてさらに遠心分離を繰り返した。各処理後のサンプルは 0.2 μ m PVDF メンブレンフィルターで濾過させ、サンプル 10 μ l を LC-MS (Agilent 1200 system) で分析した。分析では TSK-gel column ODS-100V (5 μ m, 4.6 x 250 mm) を使用し、流量 0.5 ml/min、カラム温度 40 °C で測定を行った。溶媒は A) 0.1 %ギ酸 B) アセトニトリル+0.1 %ギ酸を使用した。移動相溶媒の混合比は 0 分(A 液 97 %、B 液 3 %)、0→20 分(A 液 50 %、B 液 50 %)、20→40

分(A液 10 %、B液 90 %)、40→45 分(A液 10 %、B液 90 %の状態を保つ)、45→50 分(A液 5 %、B液 95 %)で分析した。各緑茶抽出物のテアニンと 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドの定量化は、各々の標準的な合成物で準備される校正カーブを使って解析した^(66,67)。

3-1-6 試飲および味覚センサー分析による官能評価

日本茶インストラクターの資格を持つパネリストを含む 12 名で採点法による評価を行った。選ばれたパネリストは 0.4 %ショ糖、0.02 %クエン酸、0.13 %食塩、0.05 %グルタミン酸ナトリウムおよび 0.03 %カフェインの水溶液の味を正しく識別できる者の中から選択した。評価項目はうま味、苦味、渋味で、対照品(0 点)と比較し、非常に強い(+3 点)から非常に弱い(-3 点)までの 7 段階で評価を行った。

味覚センサー分析はテアニン標品と新規化合物の比較を行った。それぞれのサンプルは 50 ml を専用カップに入れ、味覚センサー分析装置(インテリジェントセンサーテクノロジー社製 SA402B)で測定を行った。センサーは苦味(C00)、渋味(AE1)、旨味(AAE)、の 3 種類を使用して食品を口に含んだ瞬間の味“先味”と食品を飲み込んだ後に残る持続性のある味“後味”の 2 種類で味を評価した。基準液の電位をゼロとして、サンプル液との電位差を先味として測定、その後センサーを軽く洗浄して、再度基準液を測定した時の電位差を後味として測定した。測定は同一試料に対して 3 回行い、得られたセンサー出力値の平均を用いて算出した。なお、テアニン標準品を基準サンプルとして比較を行っている⁽²⁹⁾。

3-1-7 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドの機能性評価

糖尿病や脳卒中に代表される生活習慣病のひとつに高血圧があります。高血圧は動脈硬化をはじめとして、脳、心臓、腎臓などに悪影響を及ぼし、重症になると狭心症、心筋梗塞、

心不全、腎不全などの病気を引き起こします。このアンジオテンシン変換酵素阻害試験により高血圧抑制効果の有無が確認されます。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性試験は Nakano らの方法⁽⁶⁸⁾に基づき、基質 (Hip-His-Leu) から ACE により分解されるジペプチドをオルトフタルアルデヒド (OPA) により蛍光化した後、反応物の蛍光強度を測定することで実施した。ACE 活性阻害は試験溶液を加えない未処置区の活性を 100 %とした場合の相対 ACE 活性を対照として評価した。検体はテアニン標準品および 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドを用いた。

検体を 0.1 mol/l HEPES 緩衝液 (pH8.3) にて適宜希釈して試験溶液を調整した。0.1 mol/l HEPES 緩衝液 (pH8.3) (未処置区) または試験溶液を 96 well マイクロプレートに 25 μ l を加え、20 mU/ml ACE 溶液を 25 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。8 mmol/l Hip-His-Leu 溶液を 25 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応した。その後、0.1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液を 25 μ l 加えて反応を停止し、1% OPA 溶液を 25 μ l を加えて室温で 20 分間放置した。さらに、0.1 mol/l 塩酸を 25 μ l 添加して室温で 10 分間放置し、マイクロプレートリーダー (検光波長 460 nm、励起波長 355 nm) で蛍光強度を測定した。なお、ブランクは 20 mU/ml ACE 溶液の代わりに PBS を用いて同様に試験した。

3-2 結果と考察

3-2-1 アミノ酸含有量の比較

それぞれの抽出方法で得られた緑茶抽出物において 15 種類のアミノ酸含有量をアミノ酸分析装置にて測定した。その結果を Table 5 に示した。アミノ酸含有量はその緑茶のうま味を評価する指標である。その中でも緑茶に含まれるテアニンはうま味や甘味を示す成分であり、全遊離アミノ酸の約 50 %以上を占めている。また、テアニンにはストレス解消やリラックス効果、

認知症予防などの機能性があることが確認されており注目されている成分である⁽⁶⁹⁻⁷³⁾。測定の結果、亜臨界水抽出 130 °Cでは従来の抽出方法に比べてテアニンやグルタミン酸およびアルギニンの含有量が多いことが確認された。一方で亜臨界水抽出 180 °Cにおいては有意な減少が確認された。その他のアミノ酸については大きな増減の変化は確認されなかった。アルギニンについてはテアニンやグルタミン酸と比べると抽出量は微量であるため有意な変化とは言えなかった。そこで、テアニンおよびグルタミン酸について亜臨界水抽出 180 °Cによって減少した要因を検証するためアミノ酸標品を用いたモデル実験を行うことにした。

Table 5. Comparison of amino acid content in the four extracts

	Hydrothermal extraction (mg/100ml)	Pressurized extraction (mg/100ml)	Sub-critical water extraction 130° (mg/100ml)	Sub-critical water extraction 180° (mg/100ml)
Theanine	7.12 ± 0.11	4.61 ± 0.16	8.21 ± 0.13	0.25 ± 0.05
Glutamic acid	2.53 ± 0.01	1.74 ± 0.01	3.06 ± 0.02	0.11 ± 0.01
Arginine	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Serine	0.13 ± 0.00	0.09 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Glycine	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Alanine	0.25 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.06 ± 0.00
Cysteine	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	—
Valine	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Methionine	—	—	—	—
Isoleucine	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Leucine	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Tyrosine	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Phenylalanine	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Lysine	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
Histidine	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	—

3-2-2 テアニン・グルタミン酸標品の変動

テアニンおよびグルタミン酸の標品を亜臨界水抽出 180 °Cで処理を行った。処理後のサンプルを HPLC 分析に供した。その結果は Table 6 に示される。その結果、亜臨界水抽出 180 °Cにおいてテアニンが 90.9 %、グルタミン酸が 94.0 %減少していることが確認された。緑茶におけるアミノ酸含有量の減少する変化と同じであることが確認された。そこで、テアニン

およびグルタミン酸の亜臨界水抽出 180 °Cで変化した成分について構造解析によりその変化物を確認することにした。

Table 6. Change of the quantity of theanine and glutamic acid by each extracting method.

	Hydrothermal extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction 130°	Sub-critical water extraction 180°
	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)
Theanine	92.3 ± 16.7	80.5 ± 4.3	90.4 ± 5.4	9.1 ± 1.9
Glutamic acid	91.1 ± 12.0	74.2 ± 6.2	88.4 ± 5.2	6.0 ± 2.1

3-2-3 テアニン・グルタミン酸の構造変化

テアニンおよびグルタミン酸標品の亜臨界水抽出 180 °Cで処理後のサンプルをシリカゲル TLC (酢酸エチル:エタノール:水:酢酸=4:1:1:3)で分離分析し、バニリン硫酸の発色で Rf 値 0.65 および 0.67 にそれぞれスポットが見られた。それらを、シリカゲルカラム (酢酸エチル:エタノール:水:酢酸=4:1:1:3)で分離精製した。その結果、テアニンからは 244 mg、グルタミン酸からは 247 mg の単一の反応生成物が得られた。

続いて、それぞれの反応生成物を各種スペクトルデータによって構造を推定した。NMR(バリアン UNITY INOVA500)では DMSO-d₆ 溶媒で TMS を内部標準として測定した。各生成物の構造は、主に ¹H と ¹³C-NMR および既知の化合物との比較を行った。また、質量分析計(日本電子 JMS-700 T100LP)では ESI(m-ニトロベンジルアルコールをマトリックス)を用いて測定した。その結果、テアニンからの反応生成物の ¹³C-NMR は、7 個の炭素を示し、そのうちの 2 つはカルボニル炭素(176.4 および 177.8)を示した。他の 5 つの炭素は、 δ_c 57.1, 34.2, 29.9, 25.5 および 18.6 で、テアニンのデータとの比較によって低磁場にシフトしていることから環構造が考えられた。DEPT 法によって、これら 5 つの炭素は 3 つのメチレン(δ_c 34.2, 29.9, 25.5)と 1 つのメチン(δ_c 57.1)および 1 つのメチル基(δ_c 18.6)であった。プロトン NMR は、4 つの多重分裂のスペクトル δ_H 2.20, 2.07, 1.90 および 3.86 で、それぞれ 2 個、1 個、1 個および 1 個

のプロトンであった。これらの 4 つの吸収のカップリングと COSY を調べた。加えて、 δ_{H} 2.79 に 2 プロトンと δ_{H} 1.11 に 3 プロトンのエチル基が観察された。ESI-MS および FAB-MS から m/z 157 $[\text{M}+\text{H}]^+$ で $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ の分子式であることが判明した。これにより化合物の構造はテアニンが環化していることが分かった。また、IR スペクトルは $1660\sim 1575\text{ cm}^{-1}$ であった。よって、これらの結果からテアニンが変化した化合物は 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドであると推定した。これまでに緑茶中での 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドの存在については報告されていない。

グルタミン酸の亜臨界水抽出 $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ の処理物とピログルタミン酸標品を TLC および HPLC 分析で比較した。その結果、それぞれの TLC スポットと HPLC ピークが一致した。これまでに L-グルタミンは熱水中でピログルタミン酸と 3-アミノグルタルイミドに変化することが報告されている⁽²⁴⁾。よって、グルタミン酸からの反応生成物はピログルタミン酸と判断した。これらの構造変化を Fig.19 に示す。グルタミン酸はうま味成分であるがピログルタミン酸は無味である。

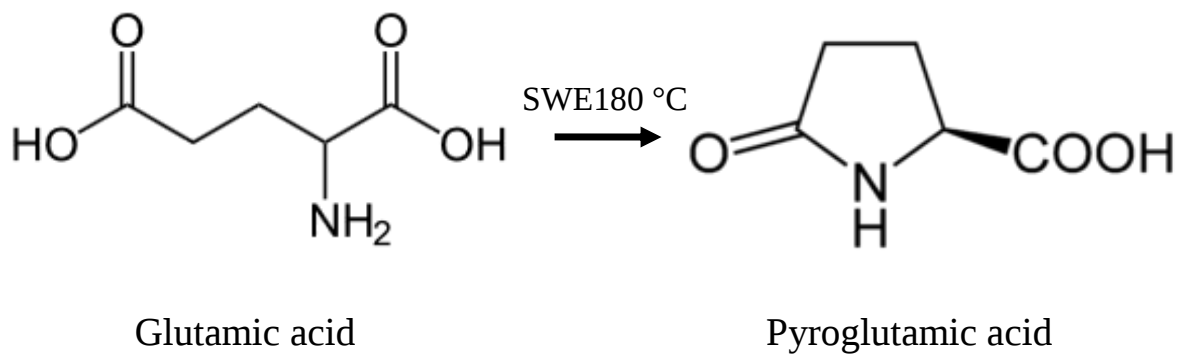
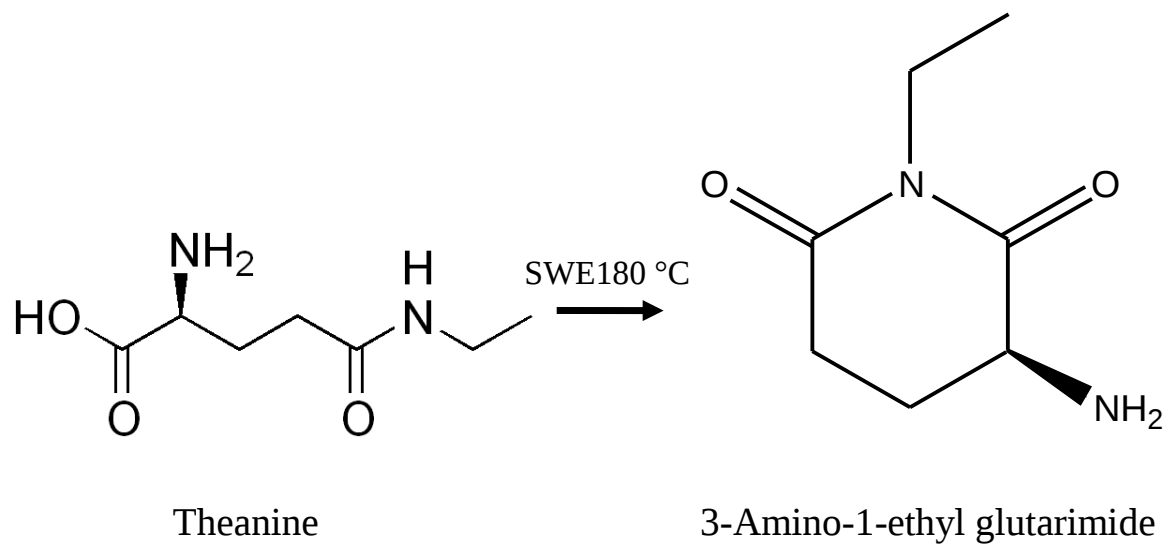


Fig.19. Structural change of theanine and glutamic acid by sub-critical water extraction at 180 °C.

3-2-4 新規化合物の定量

緑茶抽出物中の 3-アミノ-1-エチルグルタリイミド含有量を質量分析(LC-MS)にて定量を行った。その結果を Table 7 に示す。亜臨界水抽出 180 °C で生成した 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドは他の抽出方法で得たテアニン量とほぼ同等であることから、亜臨界水抽出 180 °C ではテアニンのほとんどが 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドに変化することが示された。

Table 7. Comparison of the content of theanine and 3-Amino-1-ethylglutarimide in the green tea by each extracting method.

	Hydrothermal extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction 130°	Sub-critical water extraction 180°
	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)	(mg/100ml)
Theanine	7.06 ± 0.69	4.91 ± 0.85	8.48 ± 1.33	0.25 ± 0.03
3-Amino-1-ethyl glutamide	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.39 ± 0.04	5.63 ± 0.85

3-2-5 官能評価による比較

テアニン標準品と 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドを味覚センサー分析装置により評価を行った。テアニン標準品の測定結果を基準値として、5 回の測定を行い、平均値をだして評価した。その結果、新規化合物はテアニン STD に比べ、苦味(先味)+5.96 ± 0.46、渋味(先味)+3.33 ± 0.23、うま味(先味)+9.92 ± 2.36、苦味(後味)+0.50 ± 0.04、渋味(後味)+0.14 ± 0.01、コク(後味)-0.87 ± 0.67 と評価された。苦味や渋味およびうま味(先味)の増加傾向が確認された(Fig.20)。

日本茶インストラクター資格を持つ専門家 10 人で 7 段階の採点法を用いて官能評価を行った。試験はテアニン標品を基準として水で口を漱ぎながら比較を行った。その結果、3-アミノ-1-エチルグルタリイミドのコク(後味)は-0.77 ± 1.22 で苦味は+1.67 ± 0.76 で渋みは+1.40 ± 0.72 であった。これらの結果、味覚センサー分析による評価と相関性が示唆された。

うま味(先味)については苦味(先味)と渋味(先味)のインパクトが強かったため評価することが困難であった。

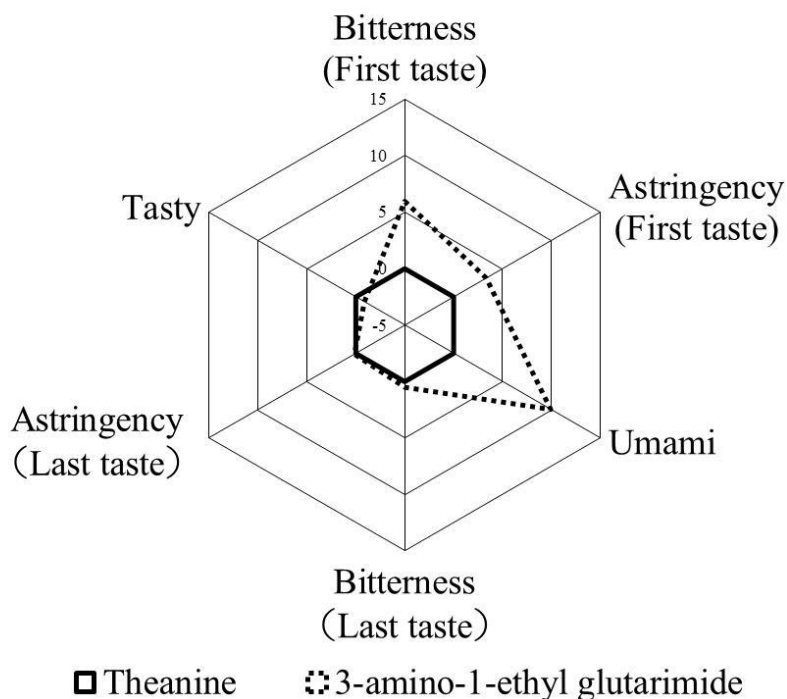


Fig.20. Comparison of extraction methods by taste sensor analysis of theanine and 3-amino-1-ethylglutarimide

3-2-6 ACE 変換酵素阻害活性

テアニン標準品および 3-アミノ-1-エチルグルタリミドの相対 ACE 活性の結果を Fig.21 に示した。その結果、テアニンは濃度 5 mg/ml、2.5 mg/ml では ACE 活性を阻害しているがそれ以外の低い濃度では阻害していることが確認できなかった。一方、3-アミノ-1-エチルグルタリミドは再現性も高く、濃度に依存して ACE 活性を阻害していることが確認された。これは、テアニンが不安定な物質であるため希釈していく過程で破壊されたと示唆された。また、3-アミノ-1-エチルグルタリミドは構造からも分かるようにとても安定した物質であり、高い ACE 阻害活性を持つことが確認され、機能性成分として有効であることが分かった。

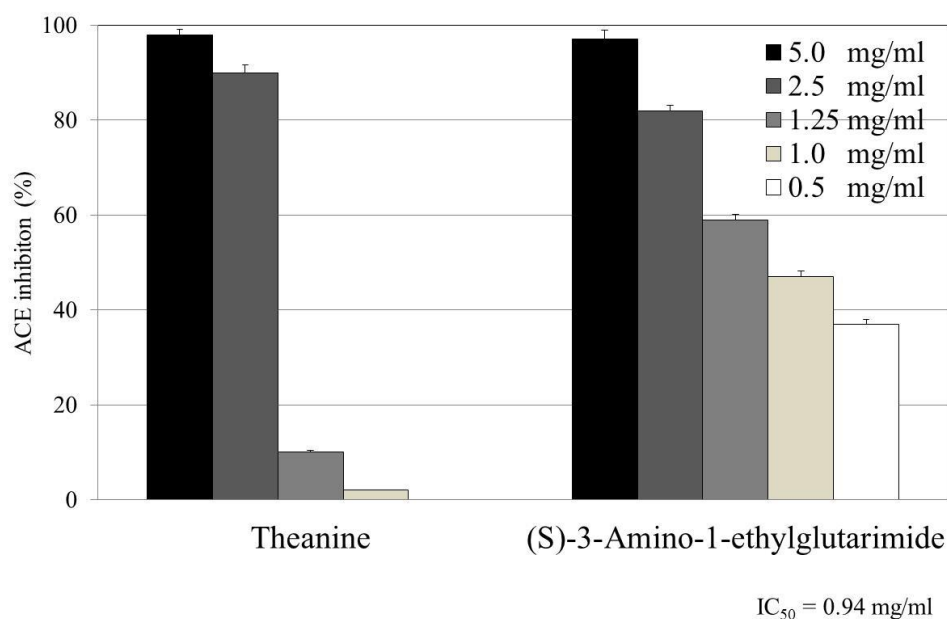


Fig.21. ACE inhibitory activity of theanine and 3-amino-1-ethylglutarimide

以上の結果から

緑茶を亜臨界水抽出 180 °Cで処理すると著しく減少するアミノ酸が存在することが確認された。そして、そのアミノ酸はテアニンとグルタミン酸であることが分かった。構造解析の結果からテアニンは亜臨界水抽出 180 °Cで処理すると 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドに変化し、グルタミン酸はピログルタミン酸に変化することが確認された。テアニンが 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドに変化し、緑茶中に含まれていることを初めて報告した。

テアニンはうま味の指標であるため試飲および味覚センサー分析による官能評価も行った。その結果、3-アミノ-1-エチルグルタルイミドはテアニンよりもうま味、苦味、渋味が強いことが確認された。また、3-アミノ-1-エチルグルタルイミドはテアニンよりも安定した物質であり、テアニン同様の機能性(血圧抑制効果)があることが分かった。今後は 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドの効能について動物レベルで検証したいと考えている。また、今回は煎茶を用いて検証を行ったが玉露や抹茶などのテアニン含有量が多い品質の茶葉で検証する予定である。

第4章 亜臨界水抽出による緑茶中の有効成分の変化

第3章では亜臨界水抽出による緑茶中のアミノ酸に関する変化を述べたが、第4章では亜臨界水抽出による緑茶中の機能性成分の変化について報告する。緑茶中には様々な機能性成分が含まれているが、一般的な緑茶においてその割合は水溶性成分でカテキン類 10-18 %、フラボノイド 0.6-0.7 %、カフェイン 2-4 %、複合多糖 0.6 %、ビタミン C 150-250 mg%、ビタミン B2 1.4 mg%、テアニン 0.6-2 %、 γ アミノ酪酸(GABA) 0.1-0.4 %、サポニン 0.1 %、香気成分 1-2 mg%、食物繊維 3-15 %、ミネラル 3-4 %が含まれ、不溶性成分では食物繊維 30-40 %、タンパク質 24 %、 β -カロチン 3-20 mg%、ビタミン E 26-70 mg%、クロロフィル 0.8-1.0 %、ミネラル 2-3 %が含まれている。代表的な機能性成分はカテキンであるが、それ以外の成分にも機能性があり緑茶の保健的飲料としての価値がこれらの成分を評価することで明らかとなる。本章では従来の抽出方法と亜臨界水抽出における機能性成分の変化に関して検証を行った。第2章では有機緑茶における成分変化を検証し、亜臨界水抽出によって抽出量が増加することを確認している。しかし、カテキン類では亜臨界水抽出によって減少することも確認した。そこで、一般的に飲まれている 2~3 番茶にあたる煎茶を用いてアミノ酸やカテキンおよびその他の機能性成分について検証を試みた。測定した機能性成分についてはリラックス効果や血圧降下に関与するアミノ酸⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾、抗酸化作用や血圧・血中コレステロール値抑制作用および発ガン抑制作用など数多くの生理機能を持つカテキン類(総カテキン)⁽²⁻¹⁰⁾、抗アレルギー作用のメチル化カテキン^(77,78)、血糖上昇抑制効果があるとされる糖類や遊離糖類^(79,80)、抗酸化作用や風邪予防および心臓・消化器系・神経系の機能調整作用の有機酸類^(81,82)、抗喘息・抗菌・血圧降下作用のサポニン^(83,84)、生活習慣病の予防・改善に効果を発揮するケルセチン、胆汁酸排泄促進・血中コレステロール低下作用の水溶性食物繊維

⁽⁸⁵⁾、インフルエンザウイルスの増殖阻害作用のストリクチニン⁽⁸⁶⁾、疲労回復、鎮痛作用のカフェイン⁽⁸⁷⁾および好中球を用いた抗酸化・抗炎症・免疫賦活作用の評価を行った。

4-1 実験方法

4-1-1 試験材料および抽出条件

バッチ式の亜臨界水抽出装置を用いて抽出を行った。煎茶 18 g(2～3 番茶)に蒸留水 360 mlを加えて3分間攪拌した後に抽出を行った。亜臨界水抽出は圧力 3.0 MPa で 130 °Cおよび 180 °Cで3分間反応させた後、冷却水で一気に常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。熱水抽出は 90 °Cで10分間反応させた後、常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。加圧抽出は 120 °Cで10分間反応させた後、常温まで冷却して緑茶抽出液を得た。それぞれ得られた緑茶抽出液は No.2 濾紙で吸引濾過し、試験サンプルを作成した。サンプルは分析するまで 4 °Cの冷暗所で保存した。

4-1-2 アミノ酸・カテキン類(メチル化カテキン)の分析

アミノ酸含有量はアミノ酸分析装置 L-8900(日立ハイテック)を用いて測定した。各緑茶抽出物 1 ml を $\phi 0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターに通し、アミノ酸標準品とともに分析に供した⁽¹²⁾。

カテキン類の分析は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて定量を行った。HPLC 装置は Waters 社の e2695 を使用し、UV2998 検出器で測定を行った。測定条件についてはカラムを野村化学製の Develosil ODS-HG column (150×4.6 mm)を使用し、流速 1 ml/min、検出波長 231 nm、カラム温度 40 °Cで測定を行った。グラジエントは A) 蒸留水:アセトニトリル:85 %リン酸溶液(95.45:4.5:0.05)、B) 蒸留水:アセトニトリル:85 %リン酸溶液(49.95:50.0:0.05)、移動相溶媒の混合比は 0→5 分(A 液 90 %、B 液 10 %)の状態を保つ。

5→8 分(8 分の時点で B 液の割合が 30 %になる)、8→10 分(A 液 70 %、B 液 30 %)の状態を保つ 10→15 分(15 分の時点で B 液の割合が 80 %になる) 15→20 分(A 液 20 %、B 液 80 %の状態を保つ) 初期の状態(A 液 90 %、B 液 10 %)に戻し 10 分以上おいてから次の試料を分析するようにした⁽³³⁻³⁵⁾。

メチル化カテキン(EGCG3”Me)含有量は高速液体クロマトグラフ法により分析を行った⁽⁸⁸⁾。各緑茶抽出液を 0.45 μ m フィルターにより固形分をろ過し、分析を行った。Waters 社製の HPLC(e2695)を使用し、UV 検出器で測定を行った。測定条件はカラム Wakopak Navi C18-5,100×4.6 mm を使用し、カラム温度 40 °C、検出波長 272 nm、流量 1.0 ml/min。

移動相 A は蒸留水:アセトニトリル:リン酸(400:10:1)、移動相 B はメタノール:移動相 A(1:2)。グラジエントは A:B=80:20 (0-2 min)→A:B=20:80 (2-27 min)→A:B=20:80 (27-37 min)→A:B=80:20 (37-45 min)で測定した。

4-1-3 遊離糖類(糖類)の分析

遊離糖類は高速液体クロマトグラフ法により分析を行った⁽⁸⁹⁾。各緑茶抽出液を 0.45 μ m フィルターにより固形分をろ過し、分析を行った。Waters 社製の HPLC(e2695)を使用し、RI 検出器で測定を行った。測定条件はカラム YMC-Pack PA-03 250×4.6 mm(ポリアミン系カラム)を使用し、カラム温度 30 °C、移動相はアセトニトリル:蒸留水(70:30)、流量 0.8 ml/min で測定した。

直接還元糖の含有量はソモギー変法⁽⁹⁰⁾により定量を行った。全糖量はフェノール硫酸法で測定した。試料溶液 1 ml と 5 %フェノール溶液 1 ml を試験管に取り、これに濃硫酸 5 ml を一気に加えた。ただちに試験管を攪拌し、室温になるまで放置した。吸光度計を用いて吸光波長 490 nm で吸光度の測定を行った。

水溶性ペクチン含有量はガルバゾール比色法にて定量した。抽出液 0.8 ml に 4 M スルホン酸 0.1 ml と 1 M ホウ酸 0.1 ml を加えて混合後、濃硫酸 5 ml を加えて沸騰水中で反応させた。室温に戻した抽出液に 0.2 %カルバゾール／エタノール溶液を 0.2 ml 加えて攪拌し、再び沸騰水中で 10 分間放置した。室温で放冷した後、525 nm の吸光度を測定した^(32,91)。

4-1-4 有機酸類・没食子酸の分析

有機酸類の分析は HPLC を用いて定量を行った。HPLC 装置は島津社製の CDD-6A を使用した。測定は島津社製の Shim-pack SCR-102H (300×8 mm)カラムを使用し、流速 0.8 ml/min、検出波長 254 nm、カラム温度 45 °C で測定を行った。溶媒は 5 mM p-トルエンスルホン酸溶液を使用して行った⁽⁹²⁻⁹⁵⁾。

没食子酸の分析は Waters 社の e2695 を使用し、UV2998 検出器で測定を行った。関東化学社製の Mightysil RP-18 column (150×4.6 mm)を使用し、流速 1 ml/min、検出波長 254 nm、室温で測定を行った。溶媒は 20 mM リン酸溶液：アセトニトリル(80:20)を使用して行った⁽⁹⁶⁾。

4-1-5 サポニン・ケルセチンの測定

サポニン含有量はフェノール硫酸法を用いて定量を行った⁽⁹⁷⁾。各緑茶抽出液 2 ml をエタノール 6 ml と蒸留水 15 ml で前処理した固相抽出カラム(Sep-Pak Plus C18:Waters)に通し、さらに試料溶液中の親水性の夾雑物除去のために、10 %エタノール水溶液 30 ml を流した。次いでエタノール 5 ml をカラムに通して溶出させ、エタノール画分として 10 ml 容メスフラスコに回収した。回収したエタノール画分を純水にて 10 ml にメスアップした。このカラム処理した試料溶液 1 ml に 5 %フェノール水溶液 1 ml、濃硫酸 5 ml を加え、80 °C で 30 分間処理した後、室温に戻した反応液の吸光度 490 nm を測定した。検量線作成用の標準物質は大豆サポニンを 0～200 µg/ml の濃度になるように 50 %エタノール溶液で希釈して用いた。

ケルセチン含有量は高速液体クロマトグラフ法により分析を行った⁽⁹⁸⁾。各緑茶抽出液を 0.45 μm フィルターにより固形分をろ過し、分析を行った。Waters 社製の HPLC (e2695) を使用し、UV 検出器で測定を行った。測定条件はカラム Shim-pack VP-ODS, 250 $\times$ 4.6 mm を使用し、カラム温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、検出波長 370 nm、流量 1.5 ml/min。移動相 A は 1.0 %リン酸(85 %リン酸を使用)、移動相 B はアセトニトリル。グラジエントは A:B=70:30 (0-12 min) $\rightarrow$ A:B=10:90 (12-15 min) $\rightarrow$ A:B=70:30 (15-20 min)で測定した。

4-1-6 水溶性食物繊維の測定

水溶性食物繊維含有量は和光純薬製の食物繊維測定キットを用いてプロスキー変法(AOAC 法)にて定量を行った⁽⁹⁹⁾。タンパク質測定用、灰分測定用の 2 つのるつぼ型ガラスフィルターに酸洗浄けいそう土 1 g を入れ、蒸留水、78 % (v/v) エタノール、95 % (v/v) エタノールの順に 1 ml $\times$ 2 回ずつ洗浄を行ってけいそう土層を均一に形成させ、130 $^{\circ}\text{C}$ で加熱後デシケーター内にて放冷し恒量を求めた。

各緑茶抽出液(適量)に 50 mM MES-TRIS 緩衝液(pH6.3) 40 ml、熱安定 α -アミラーゼ溶液 0.2 ml を加え沸騰浴中にて 5 分毎に攪拌させながら 30 分間反応させた。反応後蒸留水 10 ml を加え 60 $^{\circ}\text{C}$ 程度になるまで室温に静置した。更にプロテアーゼ溶液 0.2 ml、アミログルコシダーゼ 0.2 ml を加え振とうさせながら 60 $^{\circ}\text{C}$ にて 30 分間インキュベートした。得られた溶液に予め 60 $^{\circ}\text{C}$ に加熱した 95 %エタノールを 4 倍量加え、室温で 1 時間静置しエタノール沈殿物を得た。

恒量を求めたるつぼ型ガラスフィルターを用いてエタノール沈殿物を吸引ろ過し、残渣を得た。78 % (v/v) エタノール、95 % (v/v) エタノール、アセトンをそれぞれ 20 ml $\times$ 3 回、10 ml $\times$ 2 回、10 ml $\times$ 2 回ずつ用いて試験管内の残留物を洗い込み、るつぼ型ガラスフィルターの

中の残渣上に加えた後に 105±3 °Cで一晩乾燥させた。乾燥させたるつぼ型ガラスフィルターをデシケーター内で放冷し、恒量を求めた(R1、R2)。

ここで、タンパク質測定用のるつぼ型ガラスフィルターの残渣を用いて、粗タンパク質含量の測定を行った(P1)。測定はケルダール法を用いた。但し、分解の際、珪藻土を含む粗タンパク質測定用残渣を用いた。

もう一方の灰分測定用のるつぼ型ガラスフィルターは灰分測定用残渣をるつぼ型ガラスフィルターごと 525±5 °Cで灰化处理し、デシケーターで放冷後秤量し恒量を求めた。得られた結果とるつぼ型ガラスフィルターの恒量との差から灰分量を求めた(A1)。

得られた結果から下記の式にて食物繊維含量を求めた。

$$\text{食物繊維(\%)} = \frac{\frac{(R1 + R2)}{2} \times \left\{ 1 - \left(\frac{P1}{R1} + \frac{A1}{R2} \right) - B \right\}}{\frac{(W1 + W2)}{2}} \times 100$$

【B=ブランク値、W1=タンパク質用サンプル量(g)、W2=灰分用サンプル量(g)】

4-1-7 ストリクチニン(カフェイン)の測定

ストリクチニン含有量は高速液体クロマトグラフ法により定量を行った⁽¹⁰⁰⁾。各緑茶抽出液を 0.45 μm フィルターにより固形分をろ過し、分析を行った。Waters 社製の HPLC (e2695)を使用し、UV 検出器で測定を行った。測定条件は ODS カラム Wakopak Navi C18-5;5 μm, 150×4.6 mm を 2 本直列接続して使用し、カラム温度 40 °C、検出波長 210 nm、流量は 1.0 ml/min (0-30 min)、1.5 ml/min (30-45 min)とした。移動相 A はリン酸 5 ml とアセトニトリル 100 ml に蒸留水を加え 2 L にメスアップさせた。移動相 B は移動相 A とメタノールを 5:1 (v/v)で測定した。

カフェイン含有量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC)を用いて定量を行った⁽³³⁾。HPLC 装置は Waters 社の e2695 を使用し、UV2998 検出器で測定を行った。測定条件については

カラムを野村化学製の Develosil ODS-HG column (150×4.6 mm)を使用し、流速 1 ml/min、検出波長 231 nm、カラム温度 40 °Cで測定を行った。グラジエントは A) 蒸留水:アセトニトリル:85 %リン酸溶液(95.45:4.5:0.05)、B) 蒸留水:アセトニトリル:85 %リン酸溶液(49.95:50.0:0.05)、移動相溶媒の混合比は 0→5 分(A 液 90 %、B 液 10 %)の状態を保つ。5→8 分(8 分の時点で B 液の割合が 30 %になる)8→10 分(A 液 70 %、B 液 30 %)の状態を保つ 10→15 分(15 分の時点で B 液の割合が 80 %になる)15→20 分(A 液 20 %、B 液 80 %の状態を保つ)初期の状態(A 液 90 %、B 液 10 %)に戻し 10 分以上おいてから次の試料を分析するようにした^(34,35)。

4-1-8 クロロフィルの測定

クロロフィル a およびクロロフィル b 含有量の測定は新・食品分析法記載の mackinney 法に準拠して行った⁽¹⁰¹⁾。試料 0.2～1 g を 50 ml のメスフラスコにいれ、炭酸カルシウムを 0.1 g 加え 80 %のアセトンを加えてメスアップした。超音波洗浄器に 5 分間かけ、その後暗所に 2 時間放置してクロロフィルを抽出した。これを濾過し、濾液の吸光度を 750 nm、663 nm、645 nm で測定し、次の計算式で値を求めた。計算式の A663 と A645 はそれぞれ 663 nm, 645 nm の吸光度から 750 nm の吸光度を差し引いた値である。

$$\text{クロロフィル a} = 12.7A_{663} - 2.59A_{645}$$

$$\text{クロロフィル b} = -4.6A_{663} - 22.9A_{645}$$

4-1-9 好中球を用いた抗酸化・抗炎症・免疫賦活作用の評価

白血球の一種の好中球は自然免疫を担当し、細菌などがカラダに侵入してくると真っ先に集結し、スーパーオキシド(活性酸素)の産生によって殺菌し、外敵から身を守ります。培養した好中球に刺激(外部刺激と食品の投与に対する)を与え、好中球の細胞内のカルシウムイ

オン濃度と細胞外に放出されるスーパーオキシドアニオンを蛍光・化学発光により検出し、3つの生理活性(免疫賦活作用、抗酸化作用、抗炎症作用)を同時に評価します。自然免疫を担当している細胞での試験により、生体内環境に近い状態で生理活性を簡便に評価する(Fig.22)。

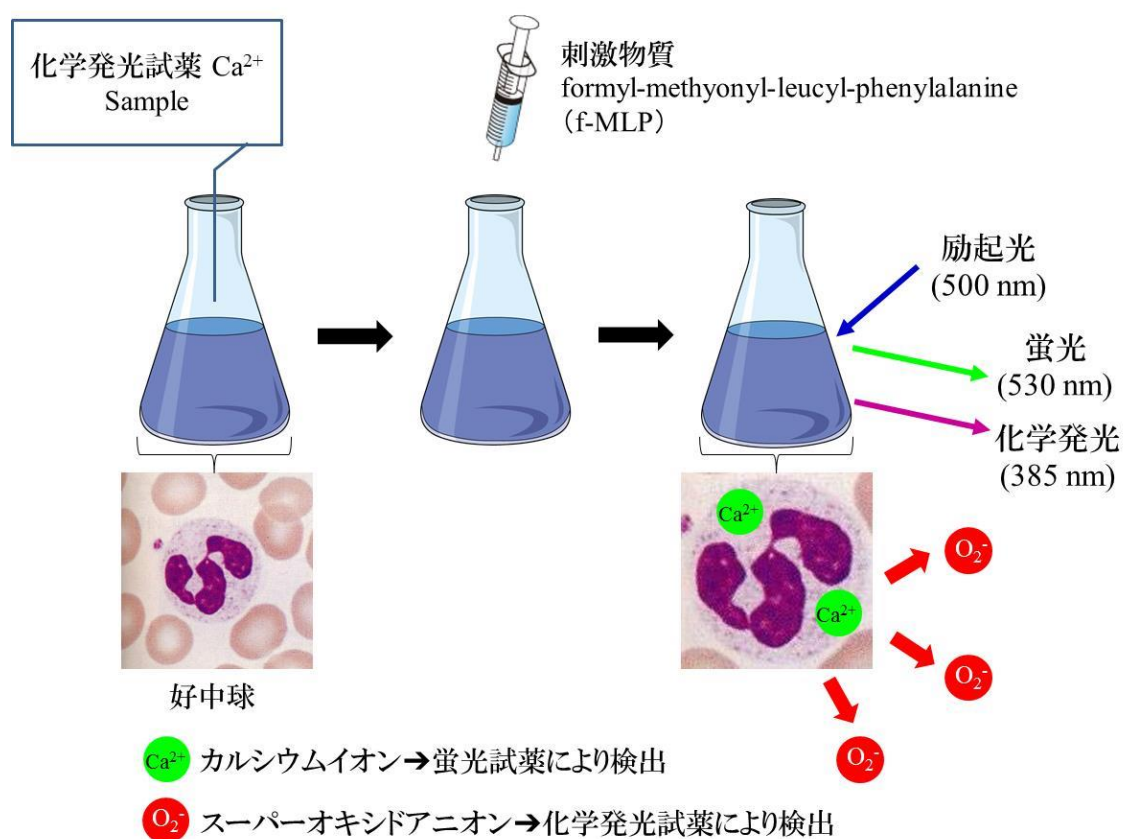


Fig.22. Evaluation of antioxidation, anti-inflammatory and adjuvant activity using the neutrophil

4-2 結果と考察

4-2-1 アミノ酸・カテキン類含有量の比較

各緑茶抽出物の遊離アミノ酸含有量を測定した。その結果を Fig.23 に示した。亜臨界水抽出 130 °Cにおいてテアニンとグルタミン酸およびアルギニンの含有量が多いことが確認さ

れた。一方、亜臨界水抽出 180 °C においては有意な減少が確認された。その他のアミノ酸については含有量が微量であり、大きな変化は確認できなかった。

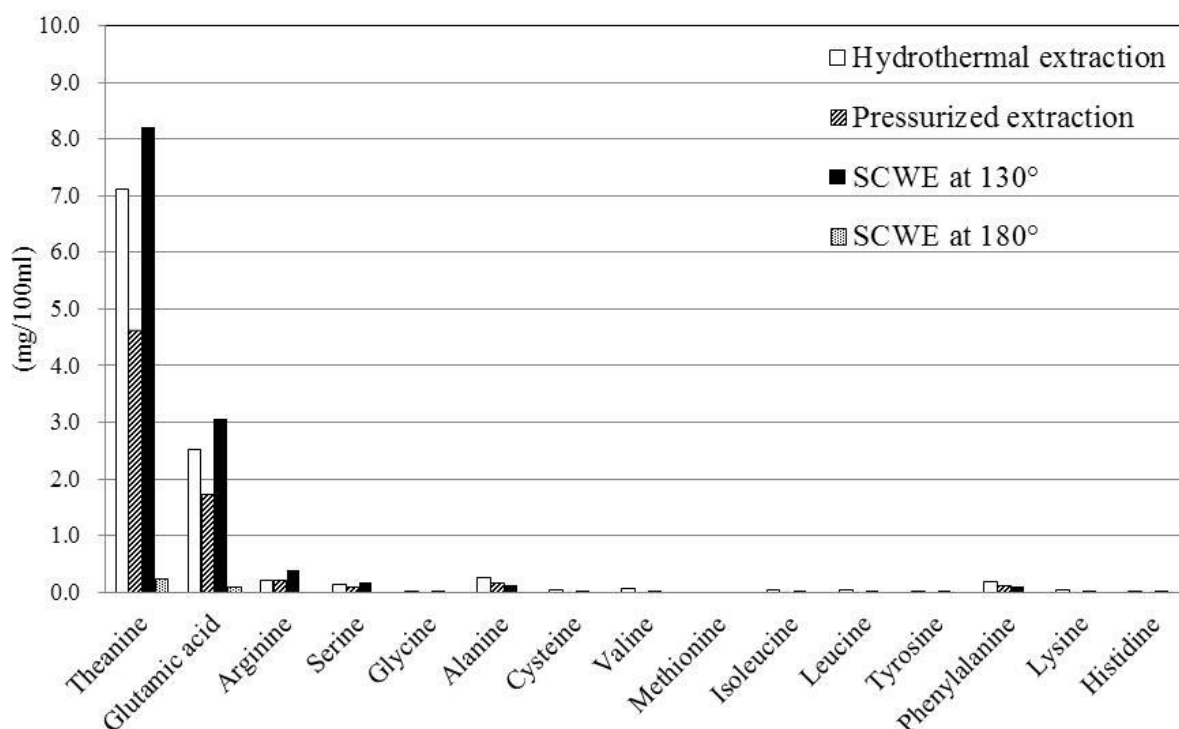


Fig.23. Comparison of amino acids content in the four extracts

次に、各緑茶抽出物のカテキン類含有量を測定した。その結果を Fig.24 に示した。カテキン含有量は緑茶の苦渋味に関与していることやその緑茶の機能性が高いことを示す指標となっている。その結果、亜臨界水抽出 130 °C において EGC および EC に増加傾向が確認された。また、亜臨界水抽出 180 °C では EGCG、ECG、EGC、EC に有意な減少が確認された。これは、EGCG や ECG 等のガレート基がついたカテキン類が亜臨界水の強い分解作用によって分解されたと示唆された。加圧抽出では EGCG、ECG、GCG、CG、GC、C がその他の抽出方法に比べて増加していることが分かった。

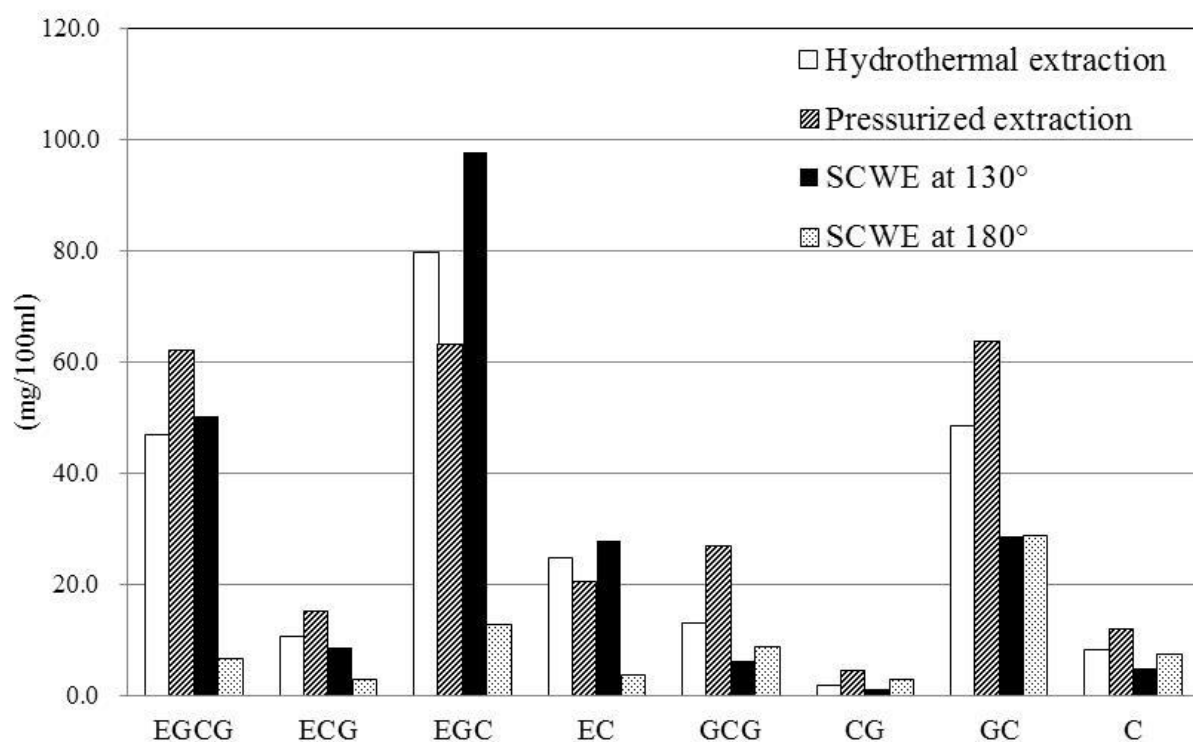


Fig.24. Comparison of catechins content in the four extracts

各緑茶抽出物の総カテキン類含有量を測定した。その結果を Fig.25 に示した。亜臨界水抽出 180 °Cでは他の抽出方法に比べて著しく減少していることが分かった。その他の抽出方法においては大きな違いは認められなかった。この結果、亜臨界水抽出 180 °Cではカテキン類が著しく減少し、カテキンの機能性としては低下していることが示唆された。

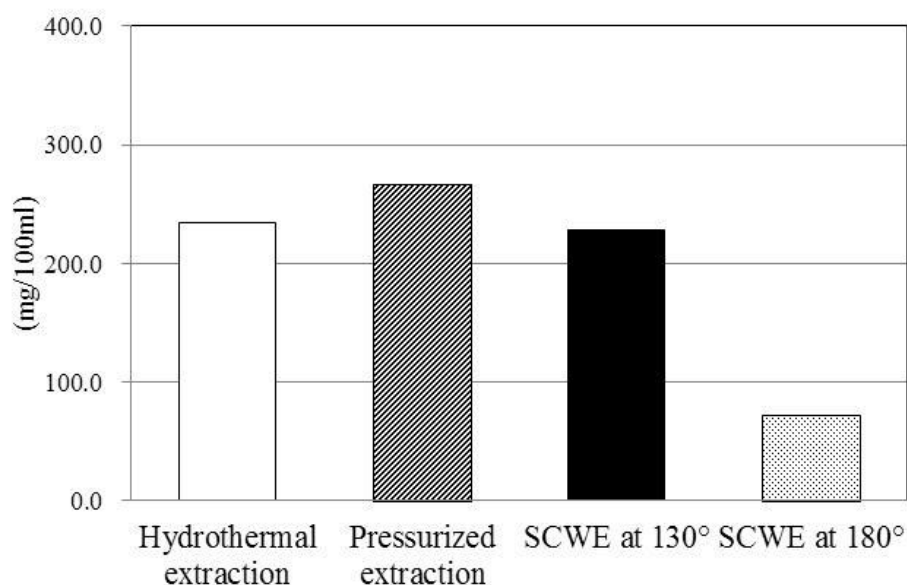


Fig.25. Comparison of total catechin content in the four extracts

さらに、各緑茶抽出物のメチル化カテキン(エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート)含有量を測定した。メチル化カテキンには通常のカテキン(EGCG)に比べて体内への吸収率が高いことや高い抗アレルギー作用を示すことなどが確認されている。また、最近の研究ではべにふうきのメチル化カテキンはカテキン EGCG よりも脂肪蓄積抑制効果が高いことが明らかにされている。その結果を Fig.26 に示した。熱水抽出が他の抽出方法よりも抽出されていることが確認された。一方で亜臨界水抽出 130 °Cおよび亜臨界水抽出 180 °Cにおいては減少傾向が確認された。これは、発酵による分解と同じように亜臨界水の分解作用によりメチル化カテキンが減少したと示唆された。この結果を受けてメチル化カテキンを多く含む品種のべにふうき(茶葉)を用いて熱水抽出と亜臨界水抽出 130 °Cにおける抽出の違いについて検証を行った。その結果を、Fig.27 に示す。前述と同様に熱水抽出では多く抽出されているのに対し、亜臨界水抽出では減少したことが確認された。これらの結果、亜臨界水抽出ではメチル化カテキンを分解し、効率的に抽出することはできないことが分かった。

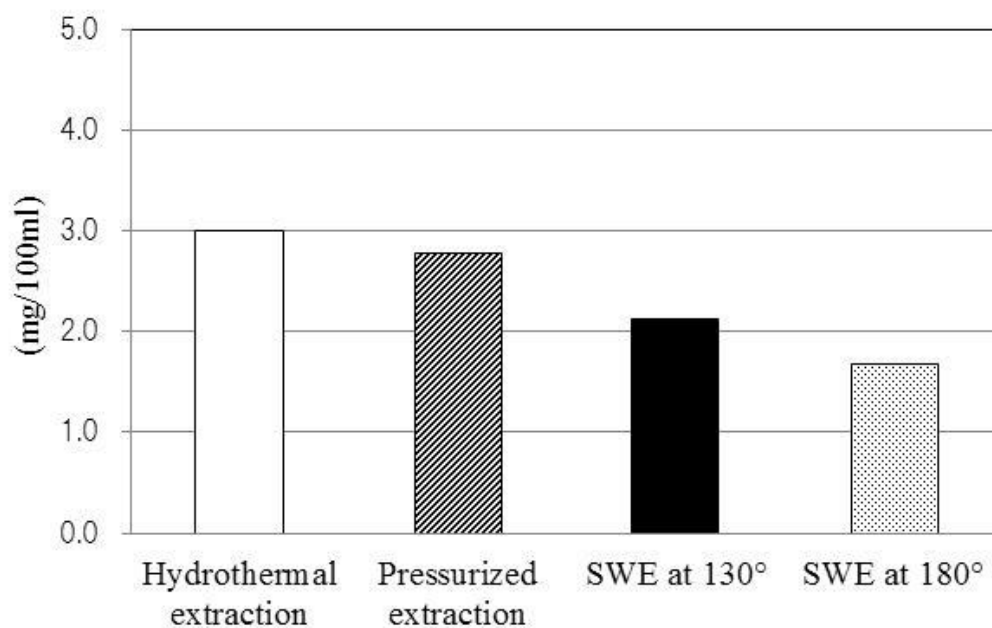


Fig.26. Comparison of epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate (EGCG3''Me) content in the four extracts

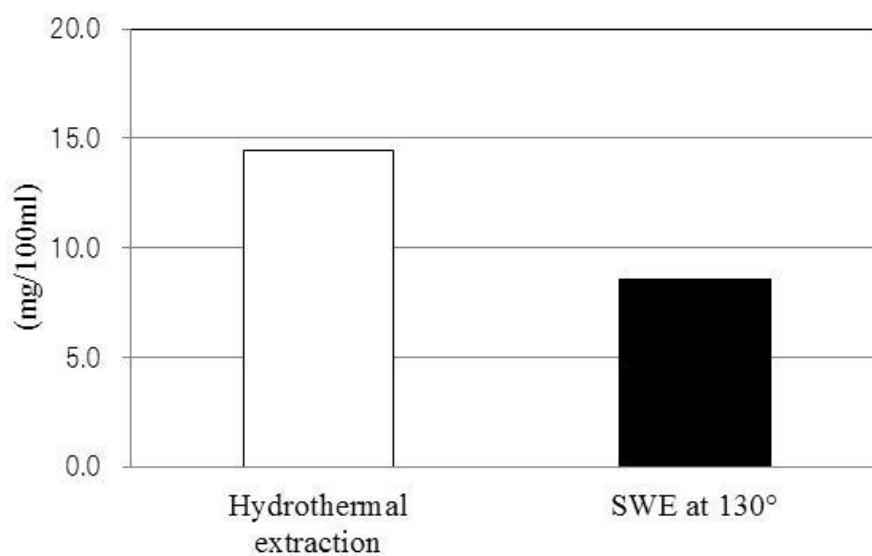


Fig.27. Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate (EGCG3''Me) contents in tea leaves of the Benifuki

4-2-2 遊離糖類(糖類)含有量の比較

各緑茶抽出物の遊離糖類(サッカロース、フルクトース、グルコース、マルトース)を分析した。その結果を Fig.28 に示す。亜臨界水抽出 130 °Cにおいてサッカロースの有意な増加が確認された。これは、亜臨界水の作用によって茶葉のセルロースが加水分解されたと示唆された。また、加圧抽出ではフルクトースとグルコースが他に比べ増えていることも分かった。サッカロースがフルクトースとグルコースに分解されたと示唆される。亜臨界水抽出 180 °Cではいずれも減少していることが分かった。これは、加熱によるカラメル化反応と糖化反応が起こり、糖類が減少したと考えられた。

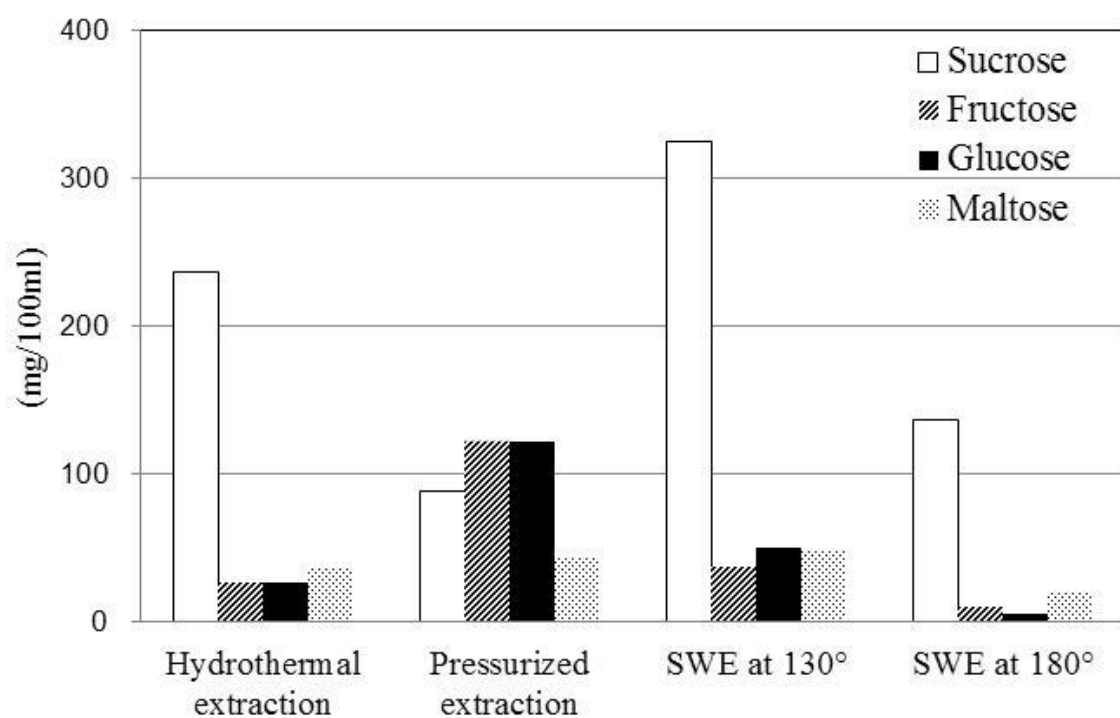


Fig.28. Comparison of free saccharide content in the four extracts

各緑茶抽出物の直接還元糖含有量を測定した。還元糖は分子内に遊離のアルデヒド基またはケント基を持った還元性を示す糖のことを示し、この糖量をブドウ糖量に換算したものである。その結果を Fig.29 に示す。

亜臨界水抽出 130 °Cにおいて高い含有量が確認された。グルコースやフルクトースなどのブドウ糖が多く含まれていることが分かった。熱水抽出では減傾向で亜臨界水抽出では増加している要因として還元糖ではないスクロースが亜臨界水の加水分解作用によって還元糖に変化したため含有量が増加したと示唆された。

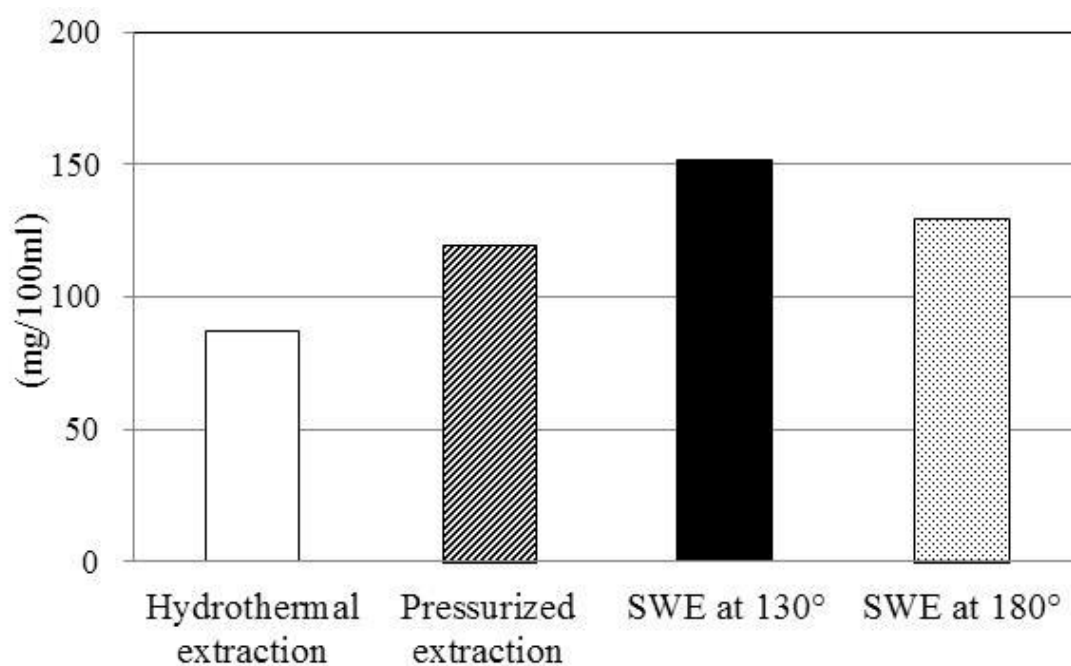


Fig.29. Comparison of reducing sugar content in the four extracts

各緑茶抽出物の全糖量および水溶性ペクチン含有量を測定した。全糖量の測定結果を Fig.30 に示した。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cが最も含有量が高いことが確認された。水溶性ペクチン含有量の測定結果を Fig.31 に示した。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cにおいて著しい増加が確認された。2-2-6 の有機緑茶での結果と同じ傾向であった。

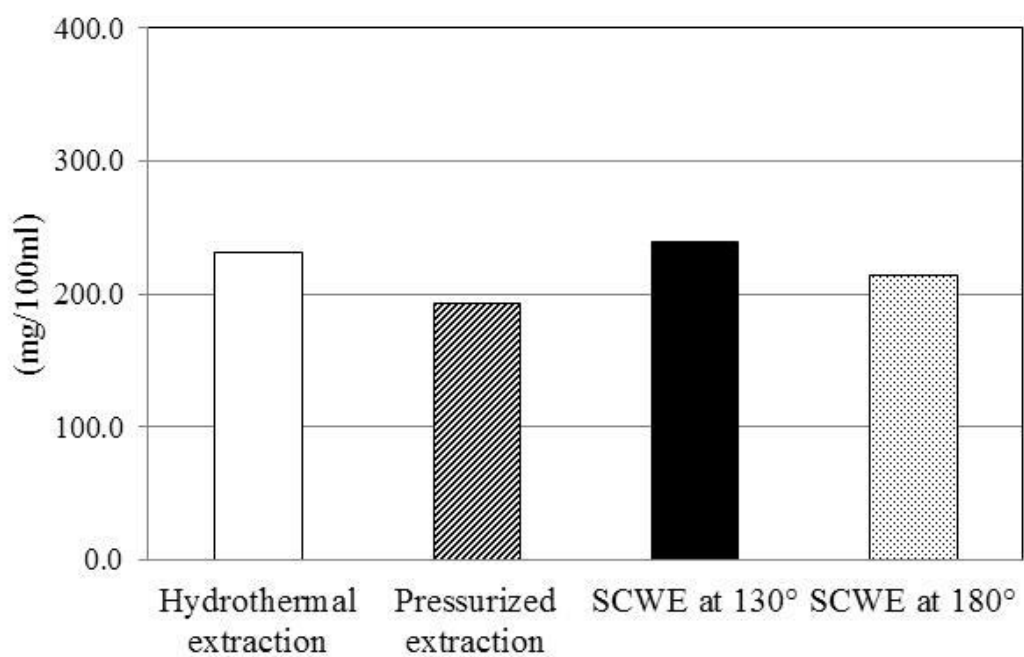


Fig.30. Comparison of all sugar content in the four extracts

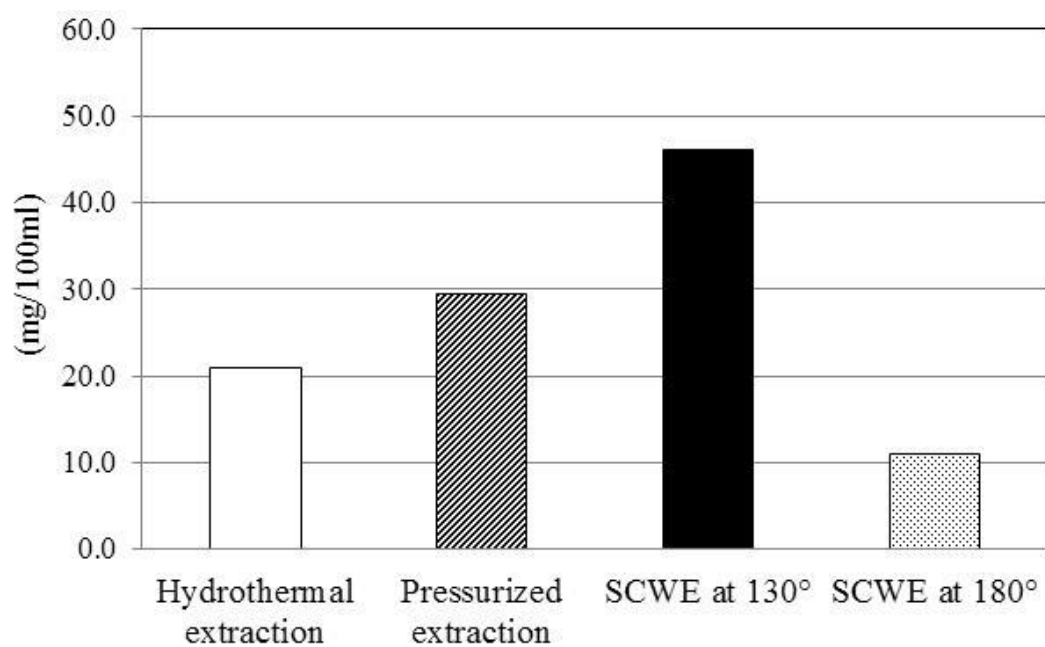


Fig.31. Comparison of water-soluble pectin content in the four extracts

4-2-3 有機酸類・没食子酸含有量の比較

各緑茶抽出物の有機酸類および没食子酸含有量を測定した。有機酸類は緑茶の味に関与しており、クエン酸やリンゴ酸は甘味、コハク酸はコク味、蔞酸はえぐ味に関与していると報告されている⁽¹⁰²⁾。また、機能性の面において優れた効能を持っており、有機酸の含有量は緑茶の品質指標として重要である。アスコルビン酸(ビタミン C)には抗酸化作用があり、がんをはじめとする生活習慣病の予防に重要な働きがある。また、美容効果や風邪予防、その他にも変色、変味防止効果がある。没食子酸は別名 3,4,5 - トリオキシ安息香酸ともいい、強い抗酸化作用を持ち、活性酸素を消去させる働きがある。また、近年では脂肪蓄積抑制などダイエットの促進をサポートする成分として注目されている。有機酸類の測定結果を Fig.32 に示した。アスコルビン酸では加圧抽出と亜臨界水抽出 180 °Cにおいて減少傾向が見られた。さらに、クエン酸・リンゴ酸・コハク酸および蔞酸でも亜臨界水抽出 180 °Cにおいて減少傾向が確認された。一方で没食子酸においては亜臨界水抽出 180 °Cで著しい増加が確認された。これは、カテキンの EGCG や ECG などのガレート基を持つカテキン類が亜臨界水の作用によって分解され、遊離した没食子酸が増加したと考えられた。

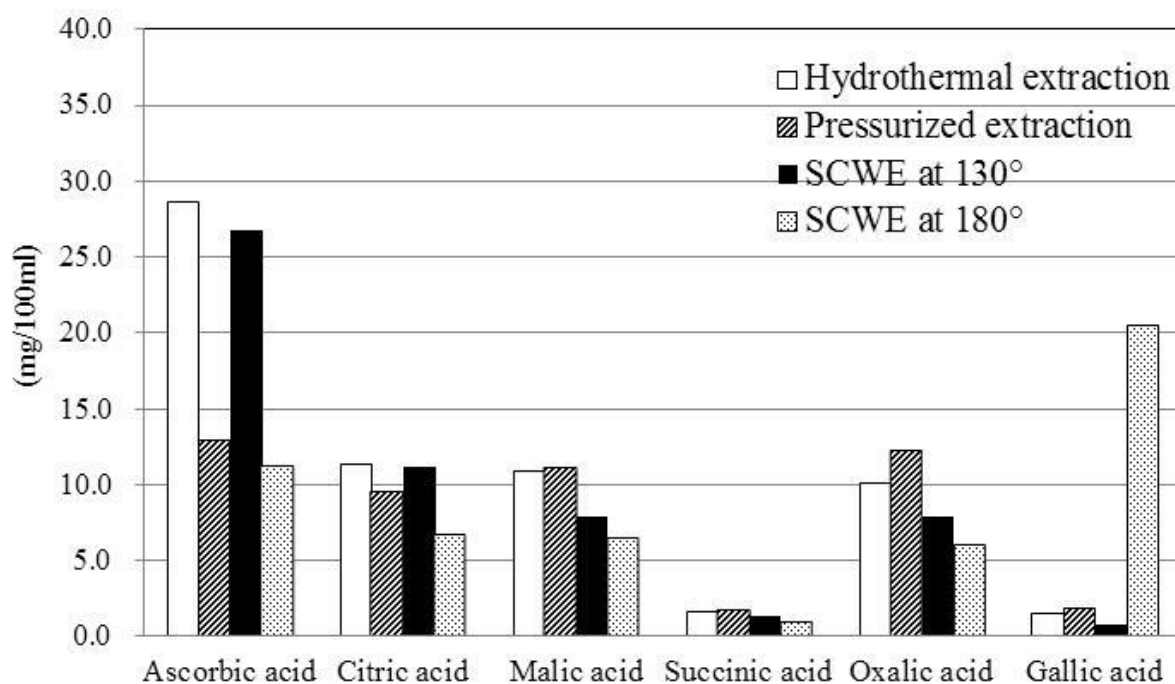


Fig.32. Comparison of ascorbic acid, citric acid, malic acid, succinic acid, oxalic acid and gallic acid content in the four extracts

4-2-4 サポニン・ケルセチン含有量の比較

各緑茶抽出物のサポニン含有量を測定した。その結果をFig.33に示した。緑茶中のサポニンは強い苦み、エグみや抹茶などでみられるような起泡性を持つという特徴がある。機能性としては抗炎症作用や抗菌作用があることが古くから知られており、また近年では血圧降下作用や抗アレルギー作用等の興味ある生理作用も明らかとなってきた。これらの作用はあまり強くはないが、カテキンの持っている作用を補うものと期待されている。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cにおいてサポニン含有量が最も多いことが確認された。亜臨界水抽出 180 °Cでは減少することが確認された。これは、亜臨界水の作用によりサポニンが分解され、減少したのではと示唆された。

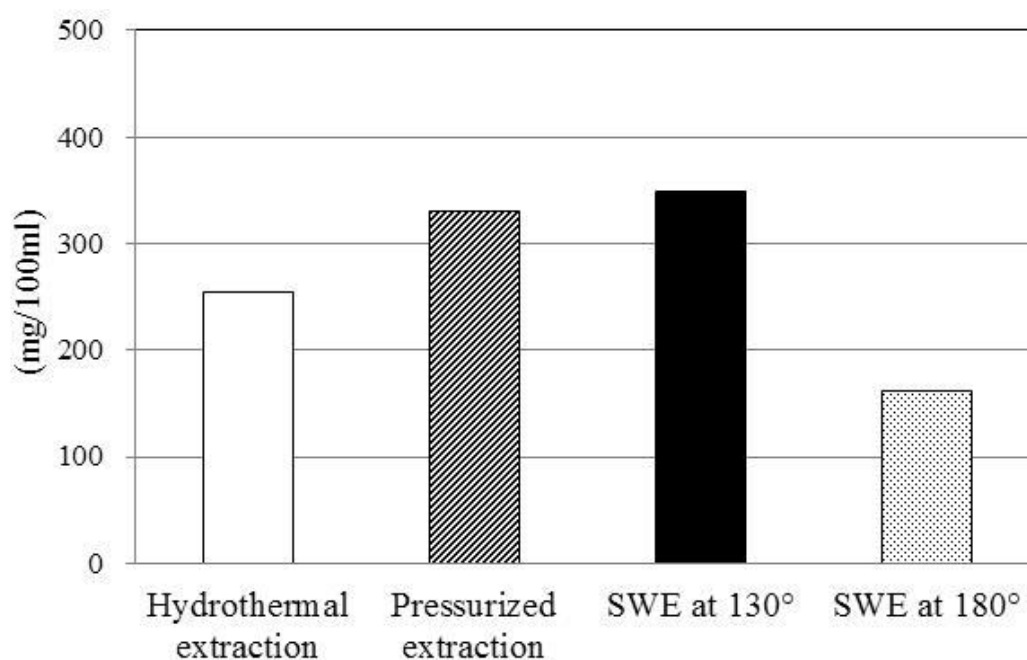


Fig.33. Comparison of saponin content in the four extracts

各緑茶抽出物のケルセチン含有量を測定した。その結果を Fig.34 に示す。緑茶中のケルセチンはポリフェノール化合物の一種で生活習慣病の予防・改善に効果を発揮するとして、食べ物はもちろんサプリメントとしても積極的に摂取したい栄養成分となっている。また、ルチン、ヘスペリジンと共にビタミン P の一部で、ケルセチン配糖体にはさまざまな薬理作用を示すことが知られている。ケルセチン自体も抗炎症作用を示し、これはヒスタミンの生成や遊離など炎症に関与するいくつかの過程を抑制するためと考えられている。また強い抗酸化作用を示し、さらに細胞増殖などに関わるいくつかの酵素を阻害することも報告されている⁽¹⁰³⁾。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cにおいてケルセチン含有量が最も多いことが確認された。一方、亜臨界水抽出 180 °Cでは減少することが確認された。この要因としては亜臨界水抽出 180 °Cによって酸化反応が促進され、分解作用が進んだためと考えられる。よって、抽出時間が長い程酸化が進みケルセチンが減少すると示唆された。

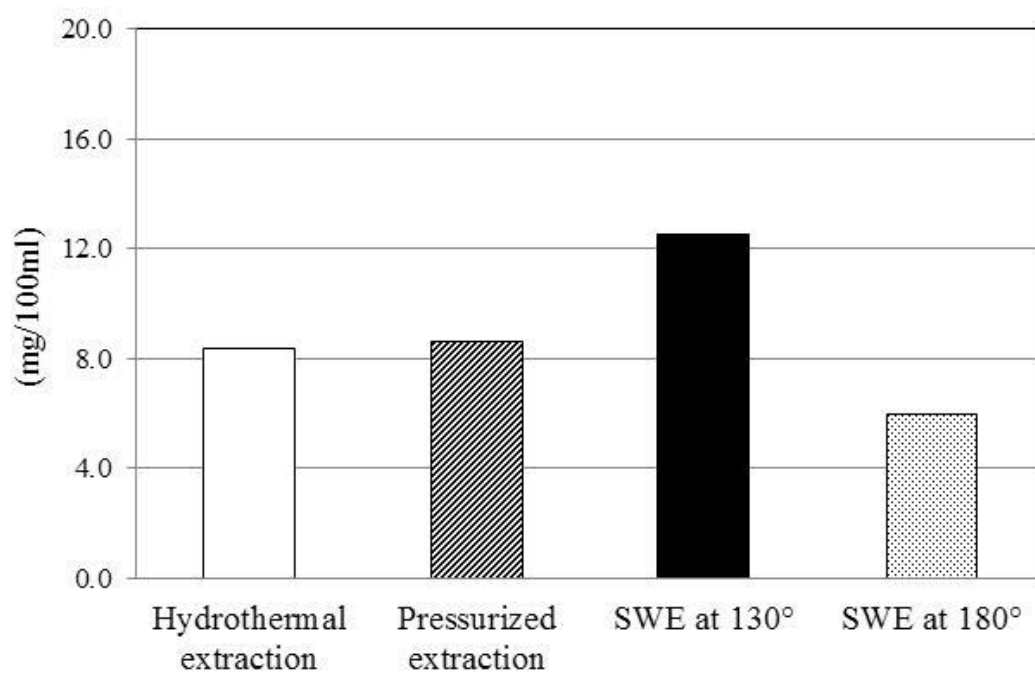


Fig.34. Comparison of quercetin content in the four extracts

4-2-5 水溶性食物繊維含有量の比較

各緑茶抽出物の水溶性食物繊維含有量を測定した。その結果を Fig.35 に示す。亜臨界水抽出 180 °C および加圧抽出において水溶性食物繊維含有量が多いことが確認された。加圧抽出については抽出時間が長いことが要因として考えられた。また、熱水抽出および亜臨界水抽出 180 °C ではあまり抽出されないことが判明した。

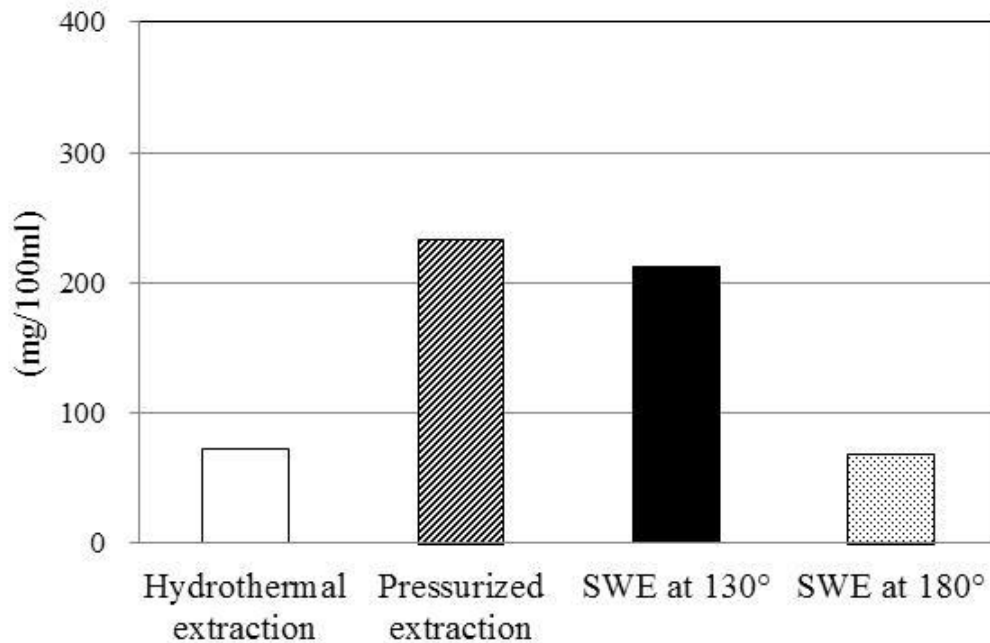


Fig.35. Comparison of water-soluble dietary content in the four extracts

4-2-6 ストリクチニン(カフェイン)含有量の比較

各緑茶抽出物のストリクチニン含有量を測定した。その結果を Fig.36 に示す。熱水抽出においてストリクチニン含有量が最も多いことが確認された。一方で加圧抽出では減少することが分かった。ストリクチニンとはポリフェノールの一種で生体内においては IgE(免疫グロブリン E) 抗体のクラススイッチを抑制する働きがあります。つまりアレルギー反応は、抗原(アレルゲン)に対して IgE(免疫グロブリン E) 抗体が過剰に作られるのが大きな原因とされているため、クラススイッチを抑制するということは IgE(免疫グロブリン E) 抗体を沢山つくらないということになります。カフェインの含有量については大きな増減は確認されなかった(Fig.37)。

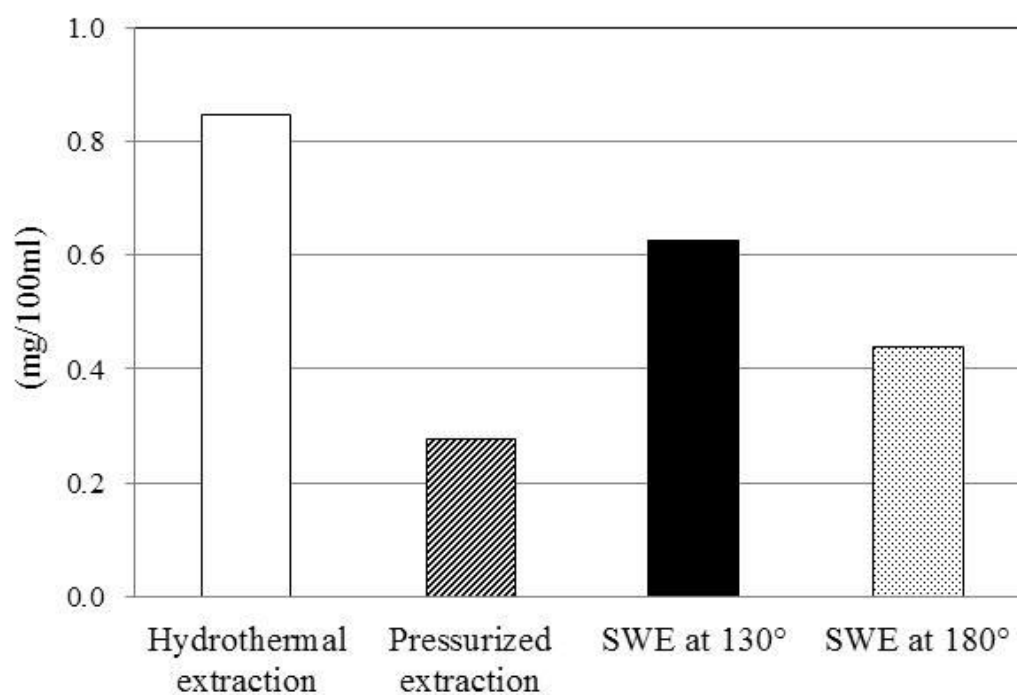


Fig.36. Comparison of strictinin content in the four extracts

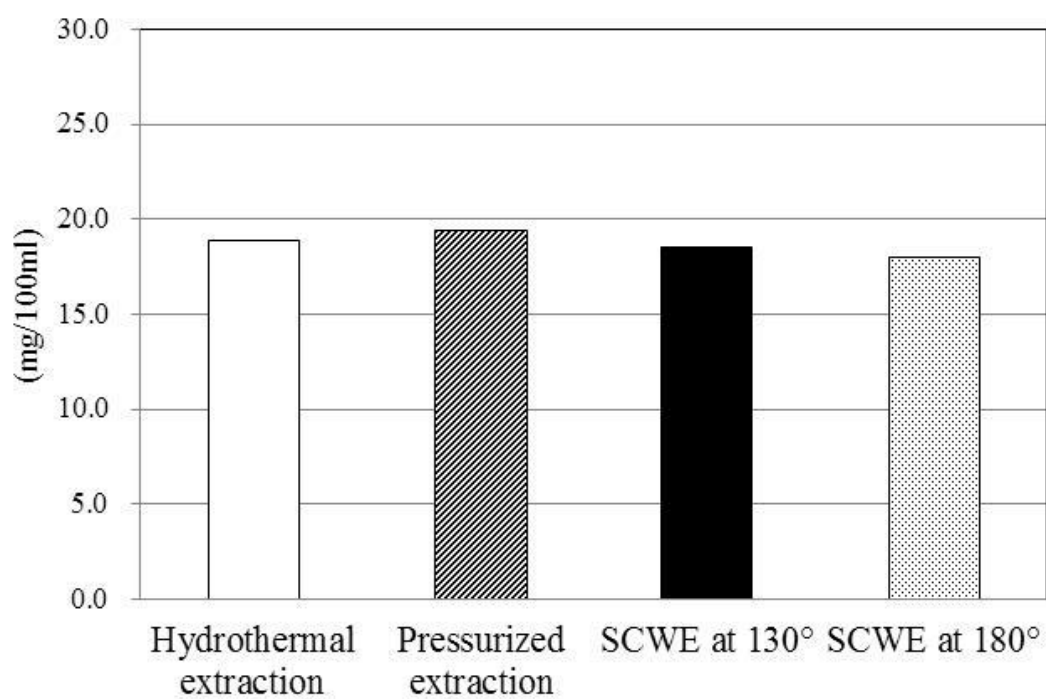


Fig.37. Comparison of caffeine content in the four extracts

4-2-7 クロロフィル含有量の比較

それぞれの抽出方法で得られた緑茶抽出物のクロロフィル a およびクロロフィル b の含有量を測定した。その結果を Fig.38 に示した。クロロフィル含有量は緑茶の色(緑色)に関係し、その緑茶の品質指標となる成分である。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cにおいてクロロフィル a およびクロロフィル b の含有量が有意な増加が確認された。その他の抽出方法ではクロロフィル含有量が低く、緑色が少ないことが分かった。これは加熱温度の高さや反応時間の長さにより緑茶抽出物が褐変したと考えられる。それに比べて亜臨界水抽出 130 °Cは反応時間が非常に短いため変色が抑えられたことが示唆された。

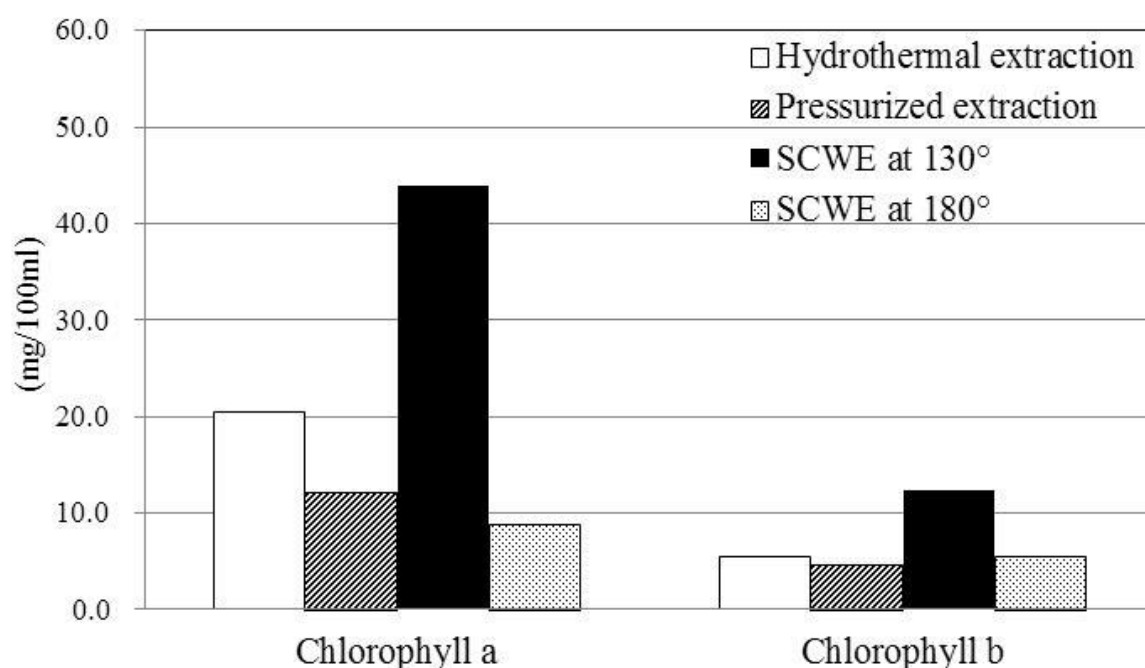


Fig.38. Comparison of chlorophyll a and chlorophyll b content in the four extracts

4-2-8 好中球を用いた生理活性の評価

ヒトでの有効摂取量の換算量 1000 $\mu\text{g/ml}$ を中心として 100、500、1000、5000、10000 $\mu\text{g/ml}$ の 5 濃度での投与を予定していたが、1000 $\mu\text{g/ml}$ では全くピークが出ない状態であったため、

ほとんど化学発光のピークが見られなかった 100 $\mu\text{g/ml}$ を最大として、さらに低濃度でピークの上昇が見られたため、もう一段階薄い濃度を加えた 6 濃度で評価を行った。50 $\mu\text{g/ml}$ 以上で、細胞内カルシウムイオン濃度上昇とスーパーオキシド産生共にコントロールと比較して大きく減少していたことから、評価試料は、細胞内にカルシウムイオンを取込む作用を抑えてスーパーオキシド産生を抑制する働き、すなわち抗炎症作用を有していると考えられる。しかし 1.0 $\mu\text{g/ml}$ では、スーパーオキシド産生がコントロールと比較して高めに出る傾向が見られた。これらの結果より、抗炎症作用を示す物質と自然免疫を賦活する物質が本評価試料には混在しており、これらの含有割合で濃度によって違った作用が見られたと推察される。

また、通常は一定であるはずの刺激剤添加前の化学発光ベースが、通常よりやや高値から徐々に下がるという現象が高濃度域で見られた。このことから、評価試料そのものに好中球を刺激し、スーパーオキシド産生を惹起するような作用があると推測された。そこで、上述の 6 濃度について、好中球刺激能(免疫賦活能)を評価した(n=1)ところ、多少好中球のスーパーオキシド産生を惹起する作用が見られたがそれほど強力ではなかった。このことから、抗炎症作用を示す物質を除いた場合、高濃度域でも免疫賦活作用が現れる可能性がある。これらの分析結果を Table 8 に示した。なお、カルシウムイオン濃度上昇(蛍光)の IC_{50} は 28.6 ± 8.7 $\mu\text{g/ml}$ 、スーパーオキシド産生能(化学発光)の IC_{50} は 22.3 ± 6.8 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Table 8. Bioactive evaluation of the green tea by sub-critical water extraction

投与濃度	換算量 (成人摂取量)	カルシウムイオン 濃度上昇 (コントロール比)	スーパーオキシド 産生量 (コントロール比)
0.5 $\mu\text{g/ml}$	2.25 mg	0.990	1.180
1.0 $\mu\text{g/ml}$	4.5 mg	1.200	1.600
5.0 $\mu\text{g/ml}$	22.5 mg	1.180	1.040
10.0 $\mu\text{g/ml}$	45 mg	1.050	0.940
50.0 $\mu\text{g/ml}$	225 mg	0.214	0.119
100.0 $\mu\text{g/ml}$	450 mg	0.197	0.003

以上の結果から

亜臨界水抽出 130 °Cにおいてテアニン、グルタミン酸、アルギニン、EGC、EC、全糖量、還元糖、ペクチン、スクロース、サポニン、ケルセチン、クロロフィル a、クロロフィル b の含有量が他の抽出方法に比べて高いことが確認された。亜臨界水抽出 130 °Cで処理することでこれらの成分がより抽出されることが分かったため、機能性の面からも亜臨界水抽出 130 °Cは抽出条件として良好と考えられた。

一方で亜臨界水抽出 180 °Cにおいては遊離アミノ酸類、総カテキン、カテキン類 4 種 (EGCG, ECG, EGC, EC)、メチル化カテキン、遊離糖類、ペクチン、有機酸類、サポニン、ケルセチン、水溶性食物繊維の含有量が減少する傾向が確認された。これは亜臨界水抽出 130 °Cよりも高い 180 °Cで処理することによってより強い分解作用が働いたためと考えられた。これまでの研究から 150 °Cからこれらの成分が著しく減少していくことを確認している。従って、機能性成分の抽出として亜臨界水抽出が適すものと適さないものがあることが分かった。また、亜臨界水抽出も処理温度(抽出条件)によって大きく異なることも突き止めた。亜臨界水抽出の技術を上手に応用することができれば付加価値のある機能性成分を従来の抽出方法よりも効率的に得ることができ、汎用性があることが分かった。

さらに、抽出方法として良好である亜臨界水抽出 130 °Cで処理した緑茶抽出物について好中球を用いた生理活性評価した結果から抗炎症作用を持つことが確認された。また、緑茶抽出物を高濃度に摂取した場合でも免疫賦活作用があることも分かった。

第5章 緑茶・烏龍茶・紅茶の香気変化および今後の展開

茶の初期には薬用を目的として飲用されたが、保存するため乾燥したり、蒸したり、煎じたりしているうちに、その味と香りが好ましく変化することが分かり、長い年月の経験と工夫を経て現在のような特徴のある多くの種類の茶が作られるようになり、薬用から日常の嗜好飲料として世界で広く愛用されている。茶の中でも緑茶は中国、日本などの東アジア地域で多く飲用され、紅茶はイギリスを中心とする欧米に多く、烏龍茶、微生物発酵茶、加工茶はその生産量が少なかったことから、消費はほとんど中国に限られていた。ところが数年前から日本でも烏龍茶ブームを呼び、消費もかなりの量となった。このような消費の背景から、茶の香気成分の研究も消費量の多い緑茶、烏龍茶、紅茶にその多くが集中されてきたという経緯がある。

茶の香気成分研究の最初は 1916 年 Deuss⁽¹⁰⁴⁾ がジャバ産アッサム種の紅茶精油からサリチル酸メチルをまた茶生葉からメタノールを分離したことに始まる。続いて 1920 年には Van Romburgh⁽¹⁰⁵⁾ が同一品種紅茶より β 、 γ -ヘキセノール(3-ヘキセン-1-オール)を分離した。その後、武居ら⁽¹⁰⁶⁾ は主に茶生葉、緑茶の香気成分について研究し、また、山本ら⁽¹⁰⁷⁾ は主に台湾産紅茶の香気成分について研究し、数々の成果を発表した。茶の香気成分は茶葉細胞中に蓄積している不揮発性の前駆物質から茶芽摘採後の茶葉酵素による生合成と熱化学反応により形成されとの考えに基づき、茶の香気成分の生成に関わる酵素反応および香気成分の生合成についての研究が関心を集めている。このように茶の種類における香気成分や種類および香りの組成が嗜好性飲料として重要なファクターとなっている。

そこで、本章では一般的に多く飲用されている緑茶・烏龍茶・紅茶において亜臨界水抽出と従来の抽出方法における香気成分の変化を明らかにすることを目的に GC-MS、官能試験および香気による脳波の変化(快適度)について検証を試みた。また、本研究で得られた研

究結果をもとに新製品(緑茶)の製造を目的とした連続式亜臨界水抽出装置の開発を進めている。これまでの進捗状況および今後の展開について報告する。

5-1 実験方法

5-1-1 試験材料および抽出条件

実験はバッチ式の亜臨界水抽出装置を用いた。茶葉は緑茶(静岡県産、煎茶)、烏龍茶(台湾産、鉄観音)、紅茶(ケニア産、ダージリン)を用いた。各茶葉 18 g に蒸留水 360 ml を加えて 3 分間攪拌した後に抽出を行った。亜臨界水抽出は圧力 3.0 MPa、130 °C で 3 分間反応させた後、冷却水で一気に常温まで冷却して抽出液を得た。熱水抽出は 95 °C で 10 分間反応させた後、常温まで冷却して抽出液を得た。加圧抽出は 120 °C で 10 分間反応させた後、常温まで冷却して抽出液を得た。それぞれ得られた緑茶抽出液は No.2 濾紙で吸引濾過を行った。その後、速やかにサンプルを GC-MS 分析および官能試験、味覚センサー分析に供した。

5-1-2 GC-MS

緑茶、烏龍茶、紅茶の香気成分についてヘッドスペースを用いたガスクロマトグラフ質量分析計(Agilent 社製 7890 GC/5975 MSD)で分析した。緑茶は比較サンプルとして用いた。各抽出液を専用のバイアルに採り内部標準物質(デカン酸エチル)を加えて密栓し混和する。これらのバイアルを一定温度で保持し、気相部分をGC-MSで定量した。茶飲料における香りはとても大事な要素であり、品質の良し悪しを判断するポイントである。香気成分を分析することによってその抽出物の特徴を把握できるため GC-MS 分析で評価した⁽¹⁰⁸⁾。

5-1-3 味覚センサー分析による味覚評価

烏龍茶・紅茶は嗜好性飲料として緑茶と同じように飲まれ、緑茶とは異なる味覚や風味を持っている。風味(香り)については GC-MS 分析にて評価したが味覚も重要であるため評価することにした。そこで、烏龍茶、紅茶を味覚センサー分析により化学的に評価した。分析方法は前述 2-1-4 と同じ条件で行った。

5-1-4 官能評価

烏龍茶および紅茶についてヒトによる味、香りに対する官能評価を実施した。サンプルは烏龍茶、紅茶の熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出 130 °C で得られた抽出液を使用した。方法は各サンプルについて一切の説明をすることなく、大学生を含む被験者 20 人を対象に香りの良さ、飲みやすさ、苦渋味の優劣について熱水抽出を対照群として比較し、順位法(5 段階)で評価を行った。

5-1-5 脳波測定

烏龍茶と紅茶におけるリラックス効果をヒトの脳波測定にて検証した。試験は静岡大学電子工学研究所の杉浦敏文教授のもと測定を行った。測定方法は吉田法による快適度評価で実施し、脳波における電極配置の位置で前頭前野の α 波を測定した (Fig.39)。20 秒ごとに脳波から興奮、沈静と快・不快、また、心電図からは心拍周期変動解析による自律神経活動を読み取った。吉田法とは脳波の α 波のリズム変動から快適感・ストレス感を客観的に評価し、左右前額部 (F3、F4) で記録される α 波の揺らぎの性質から心理状態(快－不快、興奮－鎮静)を推定する方法である。安静時(リラックス)の脳波では α 波の割合が高く検出される⁽¹⁰⁹⁾。

①被験者には温度と湿度をほぼ一定に保った部屋の椅子にゆったりと座ってもらう。②測定中は眼を閉じてもらうようにする。③脳波と心電図電極を装着後、10 分程度安静にする。④5

分の安静の後 5 分の匂い呈示、その後 5 分安静の 15 分の測定を行う。ウーロン茶および紅茶の熱水抽出、加圧抽出、亜臨界水抽出を用いて行った。

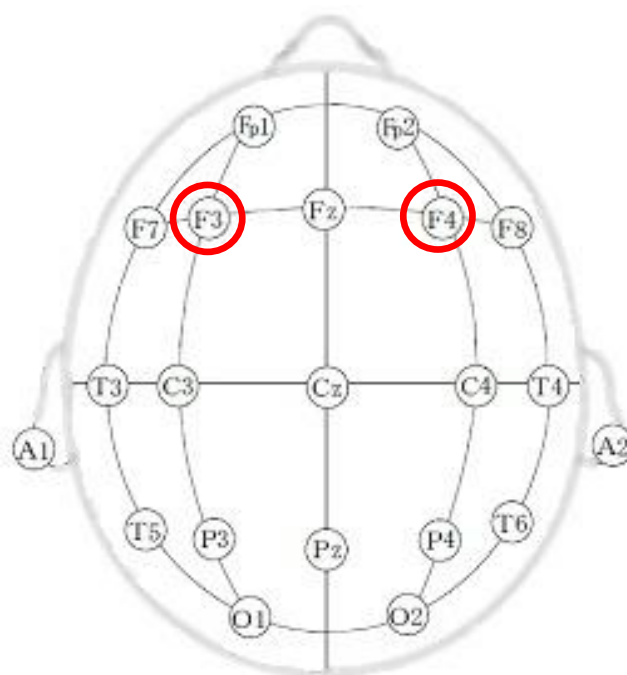


Fig.39. Electrode placement based on the ten-twenty system advocated by the international electroencephalographic society

5-1-6 連続式亜臨界水抽出装置の開発

現状ではバッチ式の亜臨界水抽出装置にて研究開発を行ってきたが、量産化には連続式の装置が必須である。また、量産化を行うためにはバッチ式の抽出装置と同等以上の能力で連続的に稼働、抽出反応が行える加熱部ユニット、冷却部ユニットの開発が必要である。また、安定的に試料(原料サンプル)を送液、圧力付加することが可能なポンプユニットおよび制御装置等の設備の構築も同時に必要である。これらを試験的に検討するための小中規模の連続式亜臨界水抽出試験装置の開発(設計、設置)および動作確認を行っていく。さらに、導入された連続式亜臨界水抽出装置により抽出された緑茶抽出物を化学的な成分分析や味覚評価により品質およびバッチ式抽出機との再現性を確認していく。実生産装置の導入が可能と

なれば製品の販売活動が開始することができ、様々な食品素材の商品化が考えられる。たとえば、緑茶以外のお茶やコーヒーなどの飲料や各種調味料の抽出にも利用できる。この取り組みが成功すれば静岡県産の茶葉を使用した高付加価値商品を世に送り出し、国産初の亜臨界水抽出緑茶ブランドを確立することが可能となる。我々は亜臨界水抽出の事業化を目指した研究開発を進めている。

5-2 結果と考察

5-2-1 香気成分の変化

① 香気成分総量の測定

測定結果を Table 9 に示す(内部標準物質のデカン酸エチルのピーク面積から緑茶・烏龍茶・紅茶 100 ml 当たりの香気成分量を換算)。その結果、緑茶・烏龍茶・紅茶のいずれも亜臨界水抽出で熱水抽出や加圧抽出に比べ香気成分量が多いことが確認された。その中でも烏龍茶が最も香気成分量が多いことが分かった。

Table 9. Comparison of the quantity of fragrance ingredient

	Hydrotherml extraction	Pressurized extraction	Sub-critical water extraction
	($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)
Green Tea	1.42	1.83	2.03
Oolong tea	4.19	5.96	7.32
Black tea	2.84	3.81	4.23

② 各香気成分の定量

(緑茶・烏龍茶・紅茶 100 ml 当たりの各香気成分量)

GC-MS の結果から主にアルデヒド類、アルコール類、ケトン類、含窒素化合物類、フラン類、炭化水素類、ラクトン類、エステル類、エーテル類、フェノール類の 25 種類の香気成分の含有量を定量した。

緑茶の結果を Table 10 および Fig.40 で示した。烏龍茶の各香気成分含有量を Table 11 および Fig.41 で示した。紅茶の各香気成分含有量を Table 12 および Fig.42 で示した。

Table 10. Fragrance ingredient content in green tea

温度条件		熱水抽出	加圧抽出	亜臨界水抽出
		100℃	120℃	130℃
アルデヒド類	benzaldehyde	0.0457	0.0479	0.0365
アルコール類	linalool	0.0059	0.0094	0.0135
	linalool oxide	0.0072	0.0096	0.0068
	benzyl Alcohol	0.0644	0.1601	0.0862
	α -terpineol	–	0.0072	0.0056
	1-Hexanol, 2-ethyl-	0.0489	0.0521	0.0127
ケトン類	methyl jasmonate	0.0037	0.0038	0.0019
	Methyl Isobutyl Ketone	–	–	0.0009
	3,5-octadien-2-one	0.0159	0.0097	0.0195
	3-penten-2-one, 4-methyl-	0.0017	–	0.0023
含窒素化合物類	Indole	0.0789	0.0891	0.0588
	N-ethylsuccinimide	0.0087	0.0113	0.0084
	pyrazine, 2,5-dimethyl-	–	–	–
	pyrazine, 2,6-dimethyl-	–	–	–
	pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	–	–	–
	pyrazine, ethyl-	–	–	–
	pyrazine, methyl-	–	–	–
フラン類	dihydroactinidiolide	0.1954	0.2388	0.2527
	furfural	0.0024	0.0154	0.0049
	2-furancarboxaldehyde, 5-methyl-	–	0.0066	–
炭化水素類	limonene	0.0112	0.0119	0.0074
ラクトン類	jasmine lactone	0.0024	0.0028	0.0015
エステル類	methyl salicylate	0.0053	0.0044	0.0071
エーテル類	pentanedioic acid, dimethyl ester	–	–	0.0659
フェノール類	phenol	0.0156	0.0207	0.0200
(緑茶100mlあたりの各香気成分量 $\mu\text{g}/100\text{ml}$)				

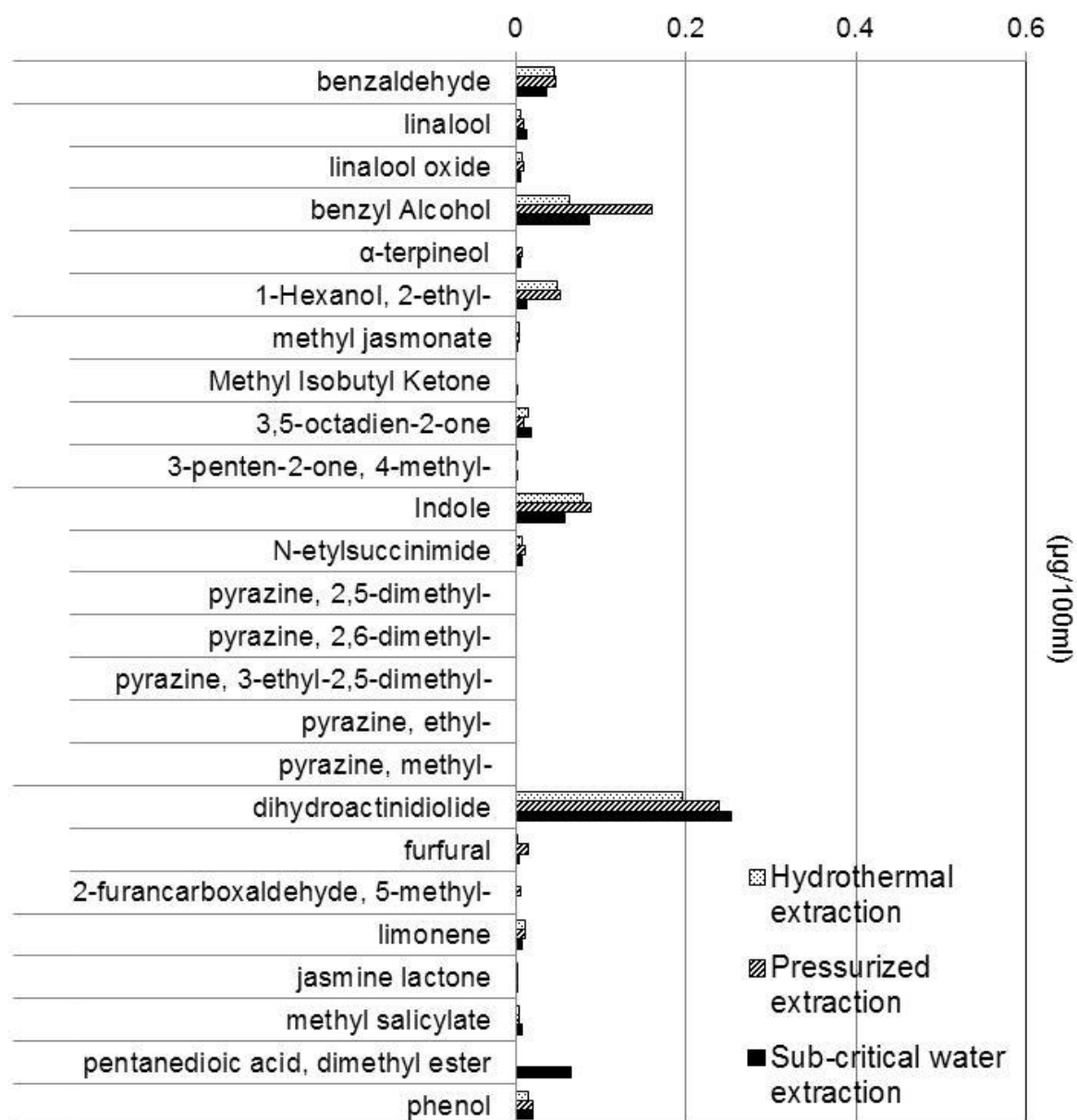


Fig.40. Comparison of fragrance ingredient content in green tea

Table 11. Fragrance ingredient content in oolong tea

温度条件		熱水抽出	加圧抽出	亜臨界水抽出
		100℃	120℃	130℃
アルデヒド類	benzaldehyde	0.0671	0.0869	0.1208
アルコール類	linalool	0.0019	0.0052	0.0156
	linalool oxide	0.0097	0.0154	0.0196
	benzyl Alcohol	0.3606	0.5026	0.5703
	α -terpineol	—	—	—
	1-Hexanol, 2-ethyl-	0.0294	0.0241	0.0434
ケトン類	methyl jasmonate	0.0128	0.0200	0.0183
	Methyl Isobutyl Ketone	—	—	—
	3,5-octadien-2-one	0.0516	0.0881	0.1467
	3-penten-2-one, 4-methyl-	—	—	0.0024
含窒素化合物類	Indole	0.1119	0.1494	0.1426
	N-ethylsuccinimide	0.3056	0.3314	0.3935
	pyrazine, 2,5-dimethyl-	0.0618	0.0962	0.1325
	pyrazine, 2,6-dimethyl-	0.0087	0.0160	0.0217
	pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	0.0137	0.0209	0.0417
	pyrazine, ethyl-	0.0099	0.0181	0.0305
	pyrazine, methyl-	0.0231	0.0378	0.0532
フラン類	dihydroactinidiolide	0.3937	0.4730	0.5938
	furfural	0.0593	0.0721	0.1421
	2-furancarboxaldehyde, 5-methyl-	0.0962	0.1314	0.2106
炭化水素類	limonene	0.0014	0.0038	0.0062
ラクトン類	jasmine lactone	0.1528	0.1494	0.2257
エステル類	methyl salicylate	0.0268	0.0302	0.0681
エーテル類	pentanedioic acid, dimethyl ester	0.0130	0.0155	0.0322
フェノール類	phenol	0.0379	0.0222	0.0257
(烏龍茶100mlあたりの各香気成分量 μ g/100ml)				

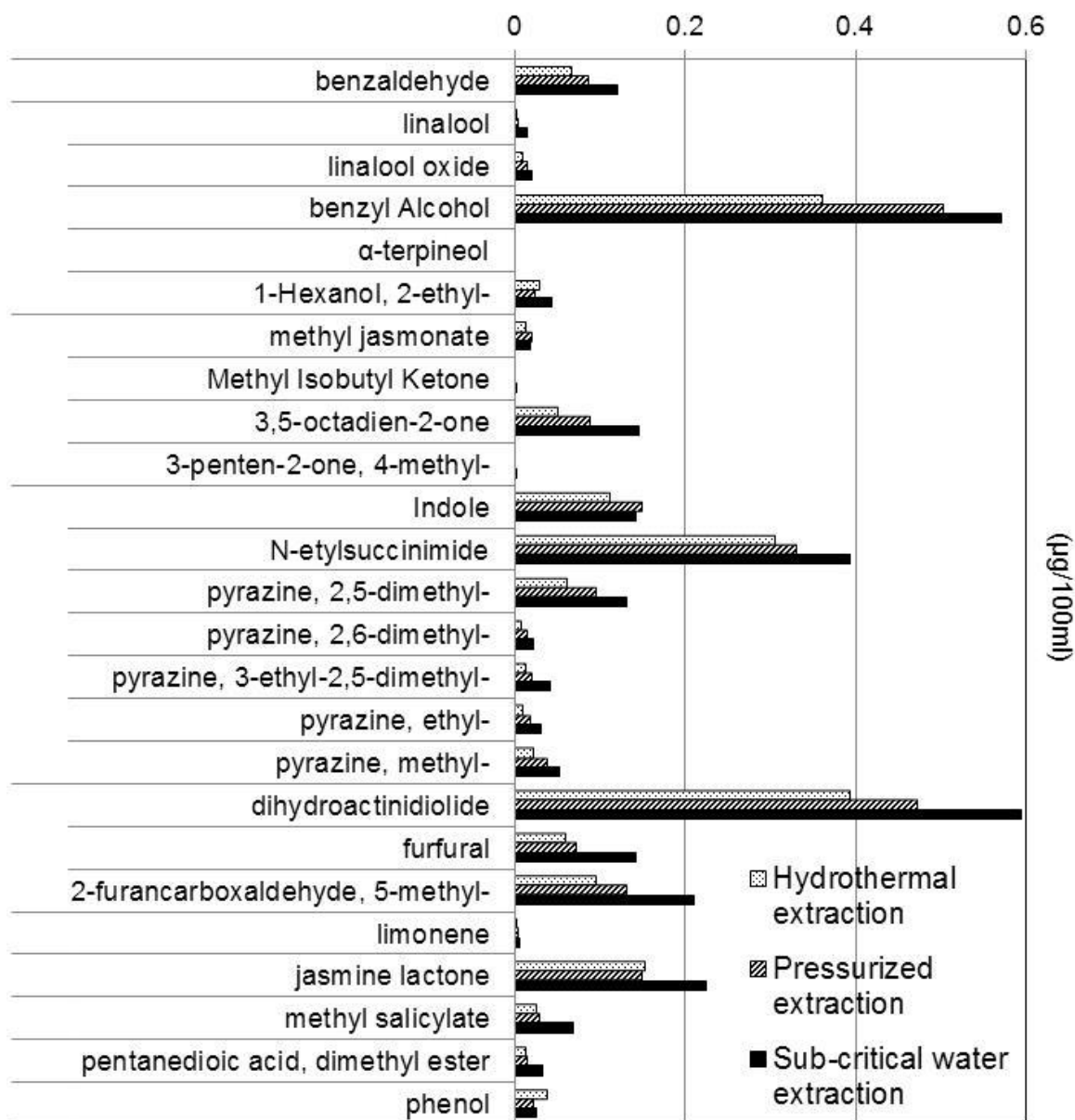


Fig.41. Comparison of fragrance ingredient content in oolong tea

Table 12. Fragrance ingredient content in black tea

温度条件		熱水抽出	加圧抽出	亜臨界水抽出
		100℃	120℃	130℃
アルデヒド類	benzaldehyde	0.1236	0.1469	0.1820
アルコール類	linalool	0.0318	0.0277	0.2243
	linalool oxide	0.0688	0.0980	0.1072
	benzyl Alcohol	0.1762	0.2610	0.2342
	α -terpineol	0.0066	0.0211	0.0300
	1-Hexanol, 2-ethyl-	0.0481	0.0437	0.0536
ケトン類	methyl jasmonate	0.0015	0.0009	0.0017
	Methyl Isobutyl Ketone	-	-	-
	3,5-octadien-2-one	0.0096	0.0227	0.0414
	3-penten-2-one, 4-methyl-	-	-	0.0021
含窒素化合物類	Indole	0.0083	0.0107	0.0043
	N-ethylsuccinimide	0.4099	0.5634	0.5413
	pyrazine, 2,5-dimethyl-	-	-	-
	pyrazine, 2,6-dimethyl-	-	-	-
	pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	-	-	-
	pyrazine, ethyl-	-	-	-
	pyrazine, methyl-	-	-	-
フラン類	dihydroactinidiolide	0.2919	0.3104	0.2723
	furfural	0.0078	0.0405	0.0188
	2-furancarboxaldehyde, 5-methyl-	0.0051	0.0140	0.0142
炭化水素類	limonene	0.0135	0.0223	0.0531
ラクトン類	jasmine lactone	0.0163	0.0024	0.0016
エステル類	methyl salicylate	0.0355	0.0612	0.1195
エーテル類	pentanedioic acid, dimethyl ester	0.0327	0.0214	0.0500
フェノール類	phenol	0.0112	0.0192	0.0270
(紅茶100mlあたりの各香気成分量 $\mu\text{g}/100\text{ml}$)				

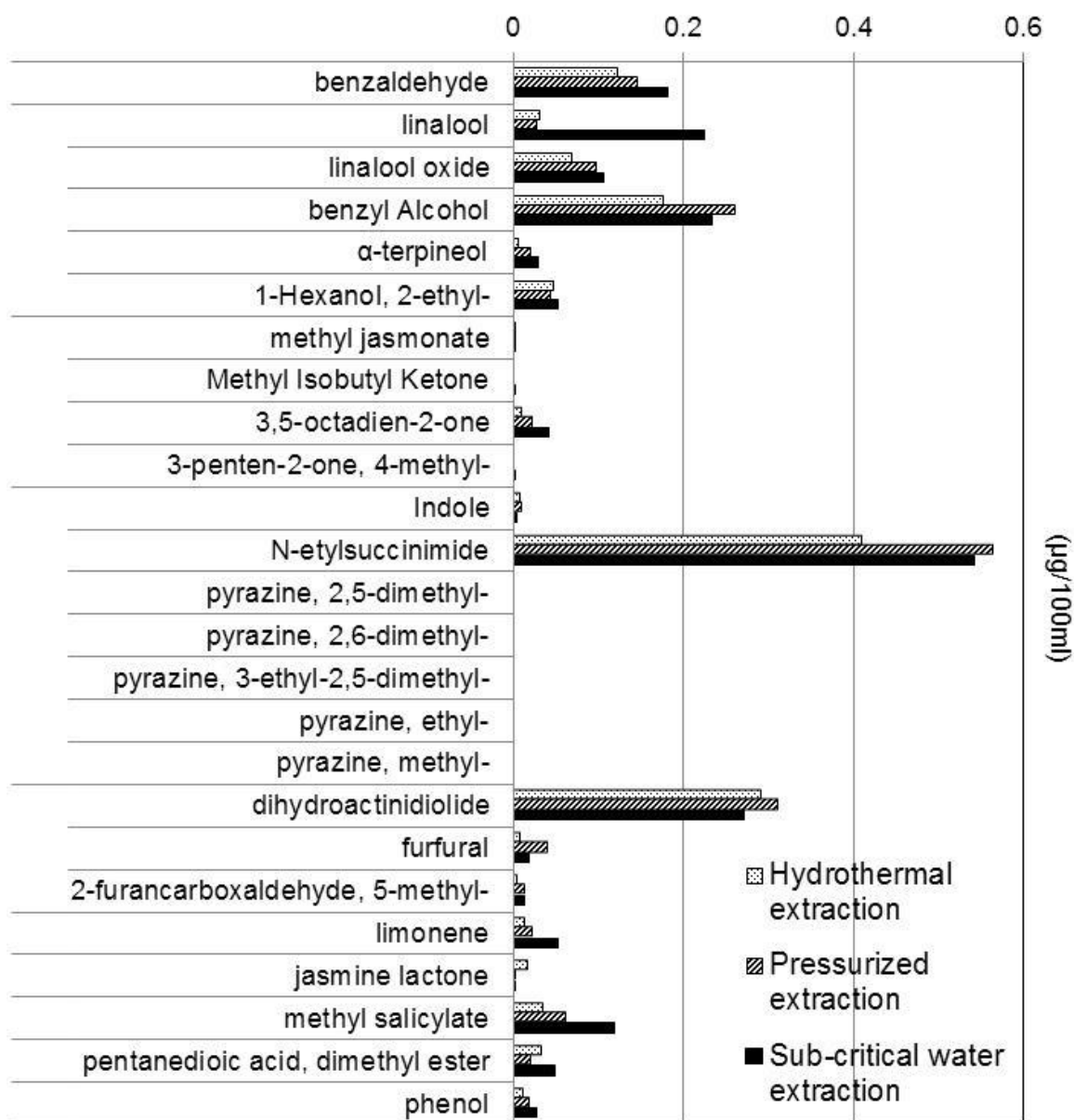


Fig.42. Comparison of fragrance ingredient content in black tea

③ 各香気成分の臭気特徴を Table 13 に示した。

Table 13. Odor characteristic of the fragrance ingredient

主な香気成分	匂いの特徴
linalool oxide	さわやかなウッディー調
metyl jasmonate	甘いウッディー調
jasmine lacone	甘い
linalool	軽くさわやかな花様
α -terpineol	青く重たいハーブ調
metyl salicylate	甘いウッディー調
indole	青苦い香り、糞尿臭
dihydroactinidiolide	他の香気成分保香効果
furfural	アーモンド臭
benzaldehyde	アーモンド臭
Limonene	柑橘様、フルーティ
Pyrazine, ethyl-	ナッツ様、バター様
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	スグリ様、パン様、甘い
Pyrazine, 2,6-dimethyl-	エステル臭、酸化臭、コショウ様、モルト様
3,5-Octadien-2-one	脂肪臭、フルーティ

④ linalool oxide、linalool、methyl salicylate 等は茶葉中に配糖体として存在することが知られている。茶葉に配糖体で存在する香気成分を Table 14 に示した⁽¹¹⁰⁾。

Table 14. Fragrance ingredient which is present in tea as a glucoside

香気成分
(Z)-3-hexen-1-ol
Linalool
Linalool oxide
Methyl salicylate
Geraniol
Benzyl alcohol
2-phenylethanol
(3E,6S)-2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol

⑤ 茶の香気成分が生成される要因として加水分解酵素の関与が挙げられる。茶は香気配糖体を細胞の液胞内に蓄積しつつ加水分解酵素を細胞壁に局在させている。萎凋の工程の際、香気成分配糖体が加水分解配糖体の働きによって分解され茶は香気成分を揮発する。香気成分配糖体の加水分解作用の一例を Fig.43 に示した⁽¹¹¹⁾。

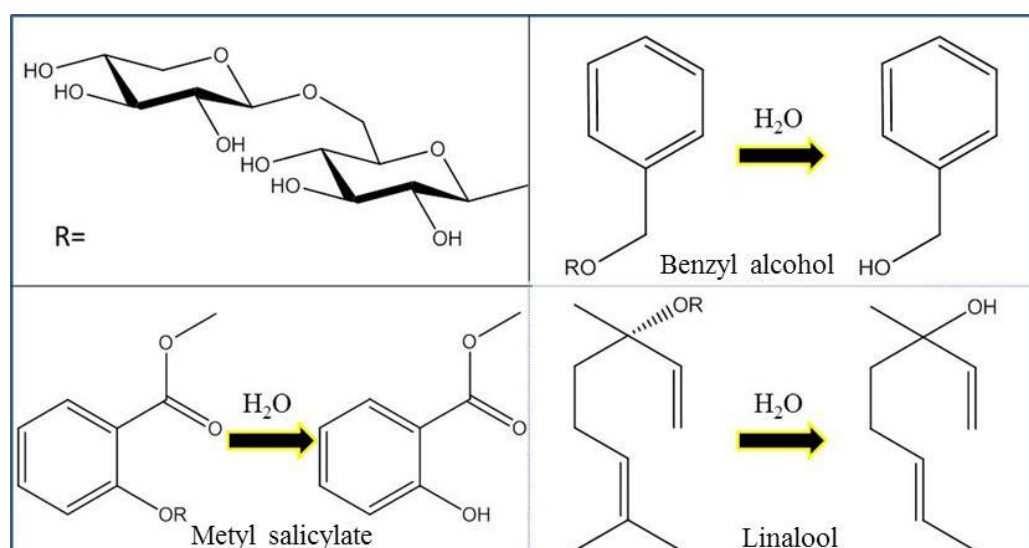


Fig.43. Hydrolysis effects of the glucoside

5-2-2 味覚センサー分析による評価

熱水抽出、加圧抽出および亜臨界水抽出 130 °Cを味覚センサー分析装置により比較評価を行った。熱水抽出の測定結果を基準値として 5 回の平均値で評価した。その結果、烏龍茶において亜臨界水抽出は熱水抽出および加圧抽出に比べ、うま味の増加が確認された。特にうま味の後味が著しく増えていた (Fig.44)。紅茶においては亜臨界水抽出で熱水抽出および加圧抽出に比べ、うま味の後味に著しい増加を確認した。加圧抽出ではうま味の先味は増加したものの後味が減少していることが分かった (Fig.45)。亜臨界水抽出によってうま味の後味が増加した理由として亜臨界水の加水分解作用により香気成分配糖体が加水分解されて糖量が増加したことが要因と考えられた。

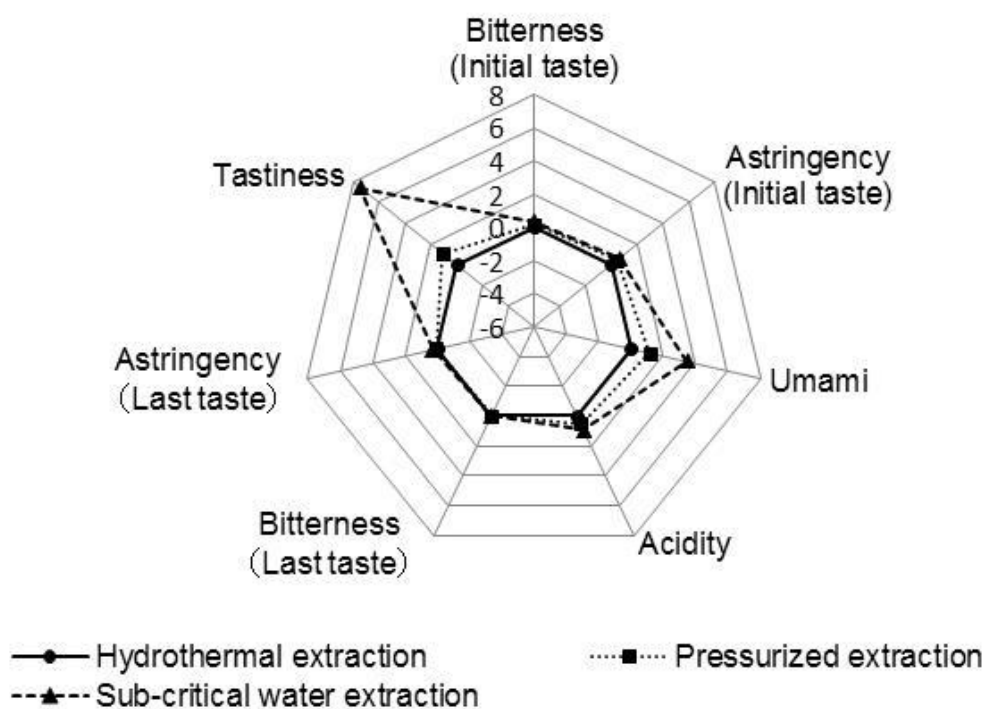


Fig.44. Comparison of the oolong tea by the taste sensor analysis

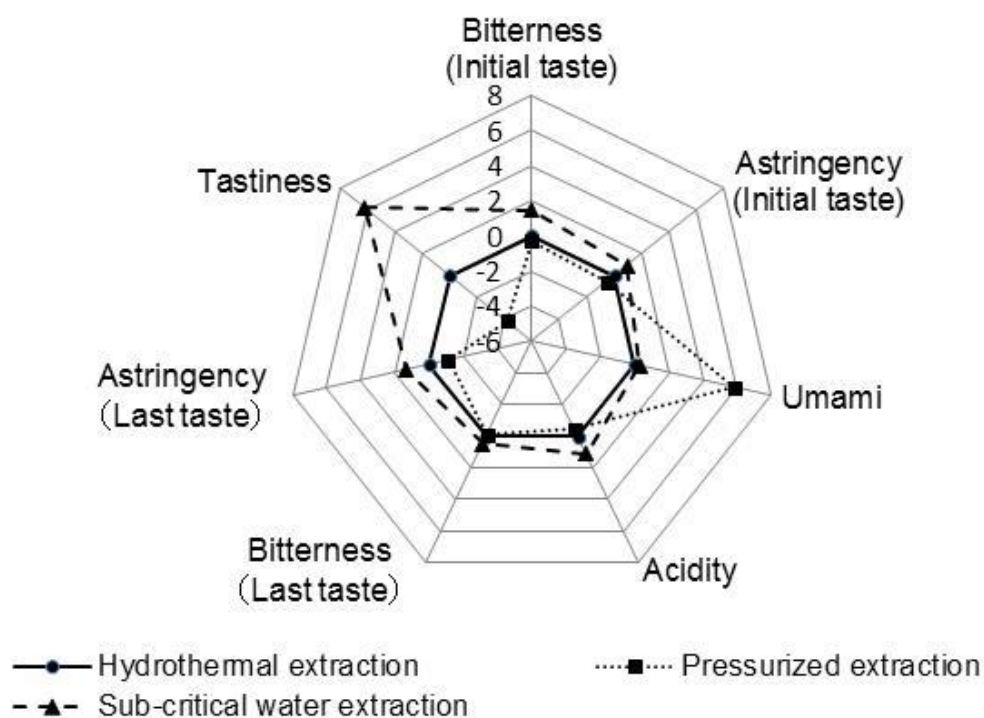


Fig.45. Comparison of the black tea by the taste sensor analysis

5-2-3 試飲による官能評価

官能評価は大学生を含む被験者 20 名で実施した。得られた結果は熱水抽出を基準値として 5 段階(-2~+2)の採点法で評価した(Table 15)。その結果、烏龍茶では亜臨界水抽出に香りの良さと飲みやすさが認められた。苦渋味については大きな差はなく熱水抽出よりも若干強いと評価された。紅茶では亜臨界水抽出に香りの良さが認められた。苦渋味や飲みやすさについてはあまり変わらないと評価された。これにより亜臨界水抽出で処理することで香りの向上が示唆され、香気成分量との関連性が考えられた。

Table 15. Sensuality evaluation of oolong tea and black tea

oolong tea	Fragrance	Bitterness / Astringency	Ease of drinking
Hydrothermal extraction	-	-	-
Pressurized extraction	+1.2	+0.6	-0.6
Sub-critical water extraction	+1.6	+0.4	+0.8

black tea	Fragrance	Bitterness / Astringency	Ease of drinking
Hydrothermal extraction	-	-	-
Pressurized extraction	-1.6	+0.2	+0.2
Sub-critical water extraction	+1.4	+1.0	+0.4

5-2-4 脳波による快適度評価

烏龍茶の脳波測定結果を興奮、沈静 (Fig.46) および快、不快 (Fig.47) に示した。亜臨界水抽出と加圧抽出においてニオイ呈示中 (嗅いでいる時) に沈静の割合が増加したことが確認された。烏龍茶の香りは前安静よりも後安静において沈静の割合が増えていることが分かった。また、亜臨界水抽出と加圧抽出においてニオイ呈示中に快の割合が増加し、後安静では不快の割合が増加したことが確認された。よって、脳波測定から亜臨界水抽出と加圧抽出は熱水抽出よりも良好と感ずることが示唆された。ニオイ呈示中の結果から亜臨界水抽出した烏龍茶の香りは良好であると判断された。

紅茶の脳波測定結果を興奮、沈静 (Fig.48) および快、不快 (Fig.49) に示した。亜臨界水抽出と加圧抽出において前安静時と比較してニオイ呈示中および後安静は興奮の割合が増加したことが確認された。亜臨界水抽出はニオイ呈示中に不快の割合が増加した。また、熱水抽出ではニオイ呈示中に後安静で快の割合が増加した。よって、亜臨界水抽出した紅茶の香りについては良好と判断することはできなかった。

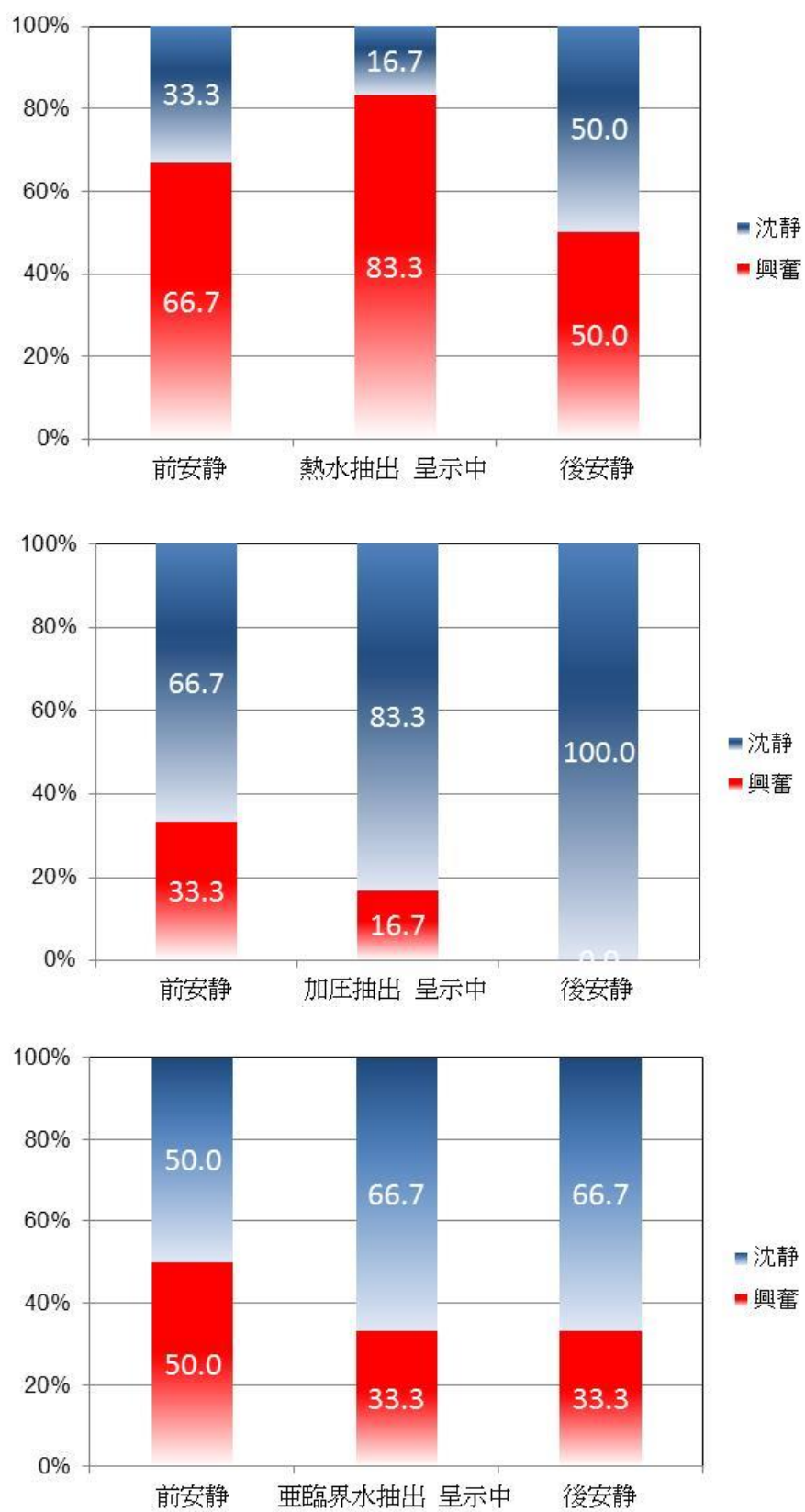


Fig.46. Electroencephalographic measurement (stillness or excitement) of oolong tea



Fig.47. Electroencephalographic measurement (comfortable or dysphoria) of oolong tea



Fig.48. Electroencephalographic measurement (stillness or excitement) of black tea



Fig.49. Electroencephalographic measurement (comfortable or dysphoria) of black tea

5-2-5 連続式亜臨界水抽出装置の導入

熱交換器(加熱部・冷却部)、誘導加熱装置、モノポンプ、背圧弁、制御装置の設計・設置を検討した。これらの導入により短時間で効率的に加温および冷却することが可能となった。設計および設置された連続式亜臨界水抽出装置の全体写真およびフロー図を Fig.50 に示した。

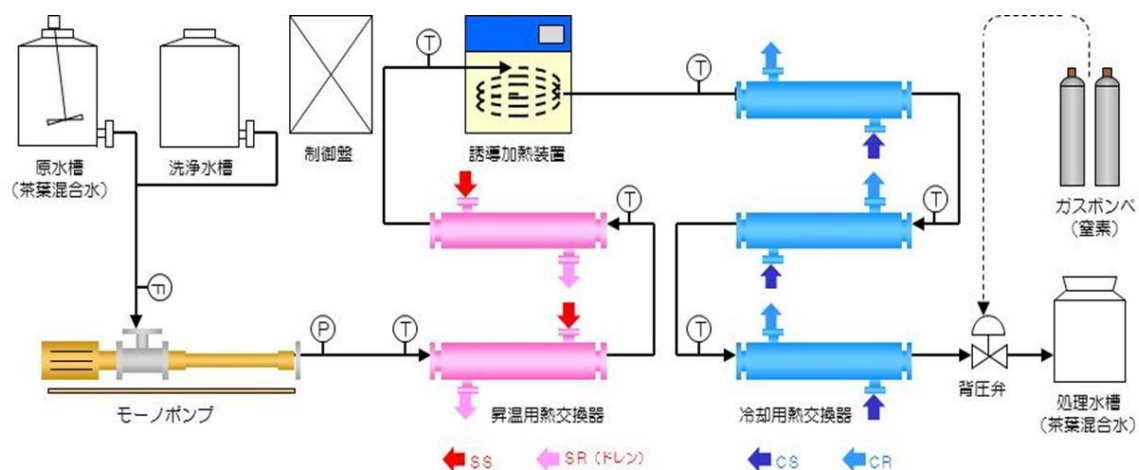


Fig.50. Continuous-type sub-critical water extraction device

バッチ式装置と連続式装置との再現性評価を行った。バッチ式亜臨界水抽出装置で得られた緑茶抽出液と連続式亜臨界水抽出装置で得られた緑茶抽出液に対して緑茶の研究開発員を含む10名で試飲による官能評価を行った。なお、比較対照として熱水抽出で得られた緑茶抽出液を用いた。判定は◎非常に良い、○良い、△普通、×悪いで表示した。その結果、バッチ式と連続式の官能評価は同じであった。熱水抽出に比べて苦渋味が少なく、飲みやすいと評価された (Table 16)。

Table 16. Comparison of the sensuality evaluation

	熱水抽出	亜臨界水抽出	
抽出法	従来法	バッチ式	連続式
苦渋味	強	弱	弱
飲みやすさ	×	◎	◎
香り	×	○	○

さらに、バッチ式亜臨界水抽出装置で得られた緑茶抽出液と連続式亜臨界水抽出装置で得られた緑茶抽出液に対して味覚センサー分析による評価を実施した。その結果、バッチ式と連続式では類似した分析結果が得られ、渋味(先味、後味)の低減が確認された (Fig.51)。よって、バッチ式と連続式の亜臨界水抽出装置で得られる緑茶サンプルに対する苦渋味抑制について再現性が確認された。

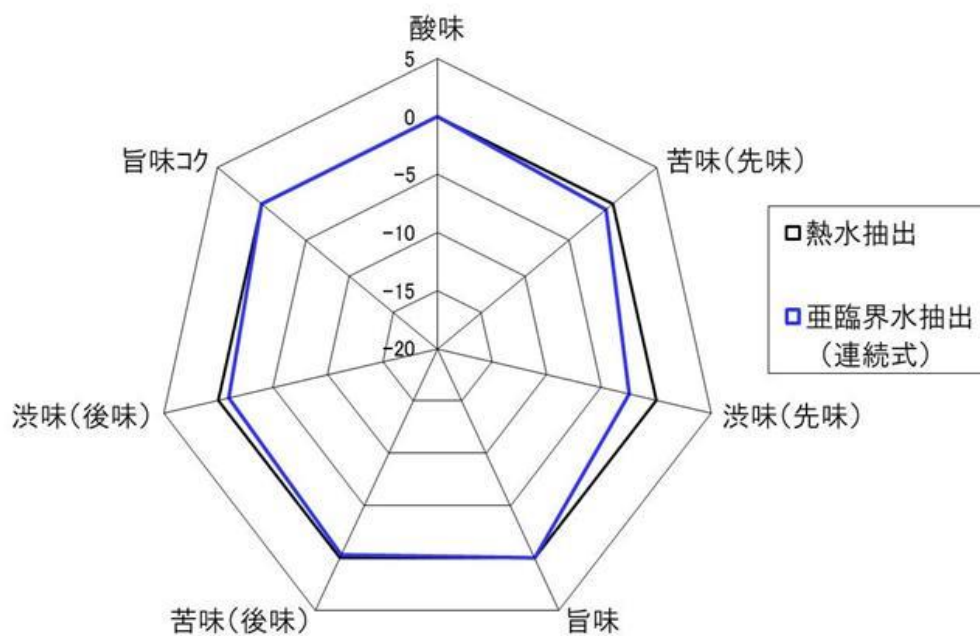
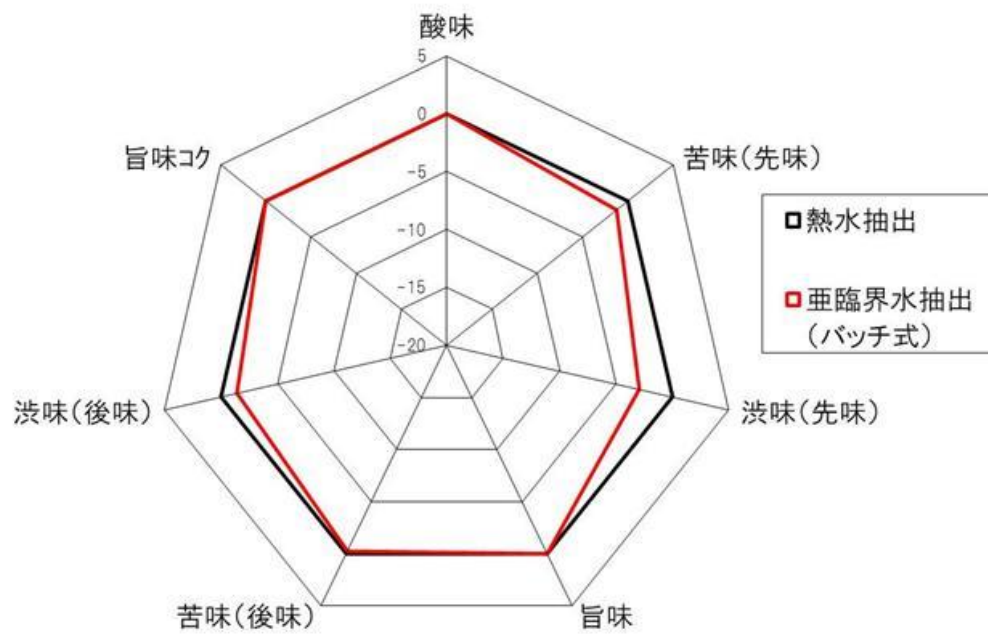


Fig.51. Reproducible evaluation by the taste sensor analysis

連続式亜臨界水抽出装置で得られた緑茶抽出物に対して安全性評価試験を行った。

～急性経口毒性試験～

6 週齢の雌 Slc:Wistar(SPF)ラット 5 匹を用いて急性経口毒性試験を行った。一般的な単回経口投与毒性試験において投与用量の上限とされる 2000 mg/kg を本試験の用量に設定した。投与前に 16 時間以上絶食させた動物に 200 mg/mL の投与液を、体重 100 g 当たり 1.0 mL の投与用量で 1 匹ごとに攪拌しながら胃ゾンデおよびシリンジを用いて単回強制経口投与した。投与日を Day 0 と定め、Day 7 までを観察期間とした。各動物について、Day 0 は、投与後 30 分以内に 1 回、その後は投与後 4 時間まで 1 時間に 1 回、Day 1 以降は 1 日 1 回、観察した。

その結果、死亡状況:観察期間を通じて死亡例は認められなかった。

一般状態の観察:いずれの動物にも異常所見は認められなかった。体重:いずれの動物も順調な体重増加を示した。部検所見:いずれの動物にも異常所見は認められなかった。

～復帰突然変異試験～

遺伝子突然変異誘発性を検討するため、ネズミチフス菌 TA100、TA1535、TA98 および TA1537 株ならびに大腸菌 WP2uvrA 株を用いて復帰突然変異試験を行った。試験はプレインキュベーション法により、ラット肝 S9 による代謝活性化系の存在下(+S9 処理)および非存在下(-S9 処理)で実施した。

その結果、-S9 処理の菌株および+S9 処理のすべての菌株において、陰性対照群と比較して 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。また、試験菌株に対する生育阻害作用は、両処理のいずれの菌株においても観察されなかった。陽性対照物質は、復帰突然変異を顕著に誘発した。よって、連続式亜臨界水抽出により得られる緑茶抽出物の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された。

以上の結果から

緑茶、烏龍茶、紅茶ともに亜臨界水抽出することにより香気成分の含有量が増加することが確認された。特に烏龍茶の香気成分含有量の増加が著しく、また各香気成分の種類が多いことが分かり、茶の香りについては烏龍茶が最も特徴的であった。Pyrazine 類の含有窒素化合物やケトン類およびフラン類の増加がみられた。緑茶や紅茶においてはこれらの増加傾向は確認されなかった。烏龍茶は緑茶や紅茶をつくる際に用いられる茶葉よりも摘採の時期が遅く、第五葉展開時に第三葉まで摘採されている。摘採の時期を遅らせることでグリコンダーゼが若い葉へと移り、香気成分含有量が増加したと考えられる。さらに、烏龍茶には製造過程に日光乾燥の工程があり、これによって様々な香気成分がつけられたと示唆された。加えて、このような要素や工程で作られた烏龍茶が亜臨界水抽出の加水分解作用によって香気成分配糖体が分解され、また有機溶媒のような性質により疎水性のアルコール類やケトン類およびアルデヒド類などの香気成分を従来の抽出方法よりも多く抽出されたのではと示唆された。緑茶の香気成分については烏龍茶や紅茶に比べ、もともと含有している香気成分量が少ないため従来の抽出方法との大きな違いは確認されなかった。また、紅茶については微生物による発酵が終わっているため紅茶の茶葉がつけられた時にはすでに香気成分が産生されているため緑茶同様に従来の抽出方法との大きな違いは確認されなかった。緑茶や紅茶に対して烏龍茶は半発酵という微生物による発酵を途中で止めており、中間体の香気成分がある状態でつくられているため従来の抽出方法と大きな違いが見られたと思われる。

味覚センサー分析による味の評価においては烏龍茶では亜臨界水抽出によりうま味やコクが増加することが確認された。紅茶においてはコクが増加することが分かった。これらは亜臨界水抽出の分解作用により香気成分の配糖体が加水分解され、糖の含有量が増加したことが要因であると示唆された。特に烏龍茶においてはこの要因が大きく関わっていると考えられた。

飲用時に主に香りを楽しむ烏龍茶および紅茶についてヒトの脳波によるリラックス効果を測定した結果では烏龍茶に関しては亜臨界水抽出サンプルにおいてニオイ呈示中に沈静、快の割合が増加し、リラックスした状態になったことを確認した。紅茶に関しては亜臨界水抽出サンプルにおいてニオイ呈示中に興奮および不快の割合が増加し、刺激された状態であったことが分かった。これらの結果から亜臨界水抽出が有効であるのは烏龍茶の抽出に用いた時であることが確認された。よって、烏龍茶においては亜臨界水抽出により香りの改善が可能であると判断された。

5-2-6 今後の展開

本研究において緑茶カテキンの苦渋味をマスキングし、飲みやすくすることやテアニンを3-アミノ-1-エチルグルタルイミドという機能性成分に変化させることなど亜臨界水抽出の有用性を見出した。そして、この成果を活かした新製品開発に今後、取り組んでいきたいと考えている。そこで、製品の量産化を可能にさせる連続式亜臨界水抽出装置の開発に着手した。連続式亜臨界水抽出装置においては熱交換器、誘導加熱装置、モノポンプ、背圧弁等、制御装置などを導入することでバッチ式での抽出条件を保持したまま、連続的に処理することが可能な装置に仕上げた。また、その装置から得られる抽出物に対する安全性についても実証した。今後は連続式亜臨界水抽出で得られた緑茶抽出物を加工し、インスタント茶として製品化を行っていく計画である。そして、お客様ニーズに合った製品の開発および機能性素材として新市場参入についても検討を行っていく予定である。また、お茶以外の素材についても研究を行い、新しい機能性の検証など更なる高付加価値を模索していきたいと考えている。本研究によって亜臨界水抽出が食品技術として十分利用できることを証明した。

要約

亜臨界水は過熱水蒸気と違い“水”を高温高压化したものである。即ち、水を完全に密閉した状態で圧力を高めていくと 22 MPa で 374 °C に達し、水と水蒸気の密度が等しくなり、液体でもなく気体でもない不思議な流体になる。これを臨界点と呼び、臨界点以上の状態を超臨界水、それより下の状態を亜臨界水という。こうした特性から亜臨界水には有機物を加水分解（高分子の鎖を絶つ性質）して有価物を取り出し、また疎水性物質や油などを溶解させる（強い溶解力）などの画期的な作用を持つ。

この亜臨界水処理の技術は環境保全、資源の有効活用など様々な廃棄物の処理技術として注目され、現在では一部でこの技術が利用されている。しかしながら、食品分野での利用は少なく、亜臨界水を活かしきれていないのが現状である。そこで、我々は静岡県の特産品である緑茶の抽出に亜臨界水を利用することを考え、緑茶の呈味および香りの改善を目的に研究を行った。緑茶にはカテキンをはじめとする生理機能が高い成分が多く含まれている。近年では生理機能を有する緑茶が世界的にも注目され、アジア、ヨーロッパ諸国、アフリカなどにも輸出されるようになった。しかし、緑茶特有の苦渋味は必ずしも受け入れられるものではなく、世界に向けて緑茶をさらに普及、拡大するためには苦渋味の抑制が重要な課題となっている。

本研究において緑茶を亜臨界水抽出 130 °C で処理した結果、高濃度にカテキンが含有しながらもカテキン特有の強い苦渋味を抑制させた緑茶抽出物を得ることに成功した。なお、従来の抽出方法と比較するために熱水抽出を、亜臨界水抽出との違いを比較するために加圧抽出を用いた。ヒトによる官能評価と味覚センサー分析による評価によって明らかな渋味の抑制を確認した。また、におい識別分析では香り成分の組成が熱水抽出で入れる緑茶と同じであることも確認した。苦渋味抑制の要因は苦渋味が強いとされる ECG の減少や水溶性ペクチ

ン(多糖類)およびスクロースを含む糖類のマスキング効果が示唆された。苦味細胞による応答試験においても水溶性ペクチンおよびスクロースに苦味の低減傾向が確認された。

次に、亜臨界水抽出による緑茶に含まれるアミノ酸の変化について検証を行った。緑茶に主に含まれ、うま味の指標となるテアニン、グルタミン酸等のアミノ酸や苦渋味や機能性に関係するカテキン類、味に関係する有機酸類および緑茶の色(緑色)に関係するクロロフィル a、b の成分について分析比較を行った。過去の研究において亜臨界水抽出 180 °C で緑茶から良好なほうじ茶様抽出物を得られたことを報告している。そこで、前述の亜臨界水抽出 130 °C と 180 °C の 2 つの条件も比較することにした。その結果、亜臨界水抽出 180 °C によってテアニンおよびグルタミン酸が著しく減少することが確認された。これらのアミノ酸を分離し、NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR)、ESI-MS を用いて構造解析したところテアニンは新規物質の 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドに変化し、グルタミン酸はピログルタミン酸に変化していることを確認した。また、LC-MS により亜臨界水抽出 180 °C で処理した緑茶に新規物質の 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドが含まれていることも確認した。テアニンはうま味の指標であるため、この 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドについても官能評価を行った。味覚センサー分析から 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドはテアニンよりもうま味、苦味、渋味が強いことが判った。テアニンを亜臨界水抽出 180 °C により得られた 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドについて機能性評価を実施した。テアニンには高血圧抑制効果があることが分かっているためアンジオテンシン変換酵素阻害試験によりテアニンと 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドの効果を検証した。その結果、テアニンは濃度 5 mg/ml、2.5 mg/ml では ACE 活性を阻害しているが低い濃度においては阻害していることが確認できなかった。一方、3-アミノ-1-エチルグルタリイミドは再現性も高く、濃度に依存して ACE 活性を阻害していることが確認された。テアニンは不安定な物質で希釈していく過程で何らかの理由で破壊されたのではと示唆された。それに比べて 3-アミノ-1-エチルグルタリイミドは非常に安定した物質であり、高い ACE 阻害活性を持つことが

確認された。よって、この新規物質 3-アミノ-1-エチルグルタルイミドはテアニンよりも機能性成分として有効であることが示唆された。

続いて、亜臨界水抽出における緑茶中の機能性成分の変化について検証を行った。緑茶中のアミノ酸、カテキン類、遊離糖類、有機酸類、サポニン、ケルセチン、水溶性食物繊維、ストリクチニン、クロロフィル含有量および好中球を用いた生理活性(機能性)の評価を行った。その結果、亜臨界水抽出 130 °Cにおいて他の抽出方法に比べてスクロース、サポニン、ケルセチン含有量が多いことが確認された。ストリクチニンおよびメチル化カテキンについては熱水抽出が最も抽出量が良いことが分かった。一方、亜臨界水抽出 180 °Cにおいてはいずれの栄養成分、機能性成分が減少傾向であることが確認された。機能性成分の面において亜臨界水抽出 180 °Cはあまり適していないことが示唆された。サポニンは抗炎症作用や抗菌作用が、ケルセチンには生活習慣病の予防効果があることが分かっており、亜臨界水抽出 130 °Cでは機能性の面において良好と示唆された。また、亜臨界水抽出 130 °Cで処理した緑茶抽出物について好中球を用いた抗酸化、抗炎症、免疫賦活作用の評価を実施した結果では抗酸化作用が確認された。また、抗炎症作用を示す物質と免疫賦活作用を示す物質が含まれており、含有濃度によって違った作用があることが推察された。

次に、亜臨界水抽出における烏龍茶・紅茶の香気成分の変化および効能について検証を行った。なお、緑茶を比較対照として用いた。GC-MS により総香気成分量および香気成分の種類について定量的に評価し、従来の抽出方法との違いを明らかにさせた。また、烏龍茶・紅茶については香りを楽しむ飲料であり、その効果をヒトの脳波測定より評価した。その結果、緑茶・烏龍茶・紅茶のいずれも亜臨界水抽出によって香気成分総量が増加することを確認した。特に烏龍茶の香気成分が著しく増加し、香気成分の種類も多いことが確認された。この要因として亜臨界水の加水分解作用により香気成分配糖体が分解され、従来の抽出方法よりも多く香気成分が抽出されたと示唆された。また、脳波測定の結果から亜臨界水抽出で得られ

た烏龍茶についてはニオイ呈示中に沈静と快適の割合が増加し、リラックス状態になったことが確認された。亜臨界水抽出で得られた紅茶についてはニオイ呈示中に興奮と不快の割合が増加し、刺激状態になったことが確認された。よって、リラックス効果の面では亜臨界水抽出した烏龍茶が良好であると判断された。また、烏龍茶については亜臨界水抽出によって香りの改善が可能であることが示唆され、低級な烏龍茶も品質を向上させ、価値が高められると考えられた。

最後にバッチ式の亜臨界水抽出装置で得られた研究成果を活用し、製品の事業化を目的とした量産型の連続式亜臨界水抽出装置の開発を行っている。開発にあたり連続式装置で処理された抽出物に対する安全性評価が必要となり、ラットを用いた急性経口毒性試験および復帰突然変異試験で検証した。現状では食品加工用の亜臨界水抽出装置はなく開発が成功すれば日本初の生産設備となる。研究用のバッチ式亜臨界水抽出装置と同等以上の能力を持ち、連続的に稼働および反応が行える装置を開発するため各種装置(加熱・冷却モジュール、モノポンプ、圧力弁等)を設計・設置し、運転テストを実施した。その結果、バッチ式の亜臨界水抽出での抽出条件を保持したまま、連続的に処理(反応)することが可能な亜臨界水抽出装置が導入された。また、この装置から得られる抽出物に対する安全性についても問題ないことを確認した。

以上の結果から亜臨界水抽出は食品分野での抽出技術として利用価値があり、新規の製品開発の可能性が高いことが示唆された。今後、カテキンの苦渋味を抑えた老若男女問わず飲みやすい飲料を提供していく。また、テアニンをテアニン以上の機能性(効能)が示唆される3-アミノ-1-エチルグルタルイミドに変化させ、機能性素材として利用することを考えている。さらに、茶の香りを向上させる技術として利用し、烏龍茶などを高品質化させ、付加価値を与えた飲料を開発していく。本研究で得られた成果をもとに新規製品(茶飲料)を開発し、事業化を目指した取り組みを実施していきたいと考えている。

謝辞

本研究を行うに当たり御指導下さいました静岡大学農学部森田達也教授および衛藤英男名誉教授に衷心より感謝致します。副指導教官として助言賜りました原正和教授、小林健二教授に深甚なる謝意を表します。また、御高閲・御審査頂きました、河岸洋和教授、茶山和敏准教授に深謝致します。

カテキンの苦味細胞応答試験の多大なる御助力を賜りました静岡県立大学食品栄養環境科学研究所、渡辺達夫教授に厚く御礼申し上げます。

3-アミノ-1-エチルグルタルイミドの構造解析に御助言を頂き、多大なる御助力を賜りました名城大学薬学部、田中斉教授に厚く御礼申し上げます。また、3-アミノ-1-エチルグルタルイミドの定量などに御助言を頂き、多大なる御助力を頂きました神奈川工科大学応用バイオ科学部、飯島陽子准教授に厚く御礼申し上げます。

烏龍茶や紅茶の脳波測定などに御助言を頂き、多大なる御助力を頂きました静岡大学工学部 杉浦敏文教授に厚く御礼申し上げます。

緑茶中の成分分析などに多大なる御助力を頂きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科、田中隆教授に厚く御礼申し上げます。

GC-MS や LC-MS の分析および解析に御協力下さいました静岡県工業技術研究所、DNA かずさ研究所に厚く御礼申し上げます。

NMR や ESI-MS などの各種機器分析の測定に御指導下さいました本学技官、八木昭仁氏に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うに当たり、御支援下さいました Aditya Kulkarani 博士、岡村拓哉氏、木戸康嗣氏の皆様に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 村松敬一郎、小國伊太郎、伊勢村護、杉山公男、山本(前田)万理:茶の機能, 学会出版センター (2002).
- 2) Senba Y, Nishishita T, Saito K, Yoshioka H. Stopped-Flow and Spectrophotometric Study on Radical Scavenging by Tea Catechins and the Model Compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1369-1374 (1999).
- 3) Khan SG, Katiyar SK, Aqarwal R, Mukntar H. Enhancement of Antioxidant and Phase II Enzymes by Oral Feeding of Green Tea Polyphenols in Drinking Water to SKH-1 Hairless Mice: Possible Role in Cancer Chemoprevention. *Cancer Res.*, **52**, 4050-4052 (1992).
- 4) Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.*, **20**, 933-956 (1996).
- 5) Unno K, Takabayashi F, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, Kikunaga N, Kishido T, Oku N, Hoshino M. Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. *Biogerontology.*, **8**, 89-95 (2007).
- 6) Nakayama M, Suzuki K, Tada M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res.*, **21**, 289-299 (1993).
- 7) Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.*, **68**, 66-74 (2005).

- 8) Hibasami H, Achiwa Y, Fujikawa T, Komiya T. Induction of programmed cell death (apoptosis) in human Lymphoid Leukemia cells by catechin compounds. *Anticancer Res.*, **16**, 1943-1946 (1996).
- 9) Hibasami H, Komiya T, Achiwa Y, Ohnishi K, Kojima T, Nkanishi K. Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins. *Oncol Rep.*, **5**, 527-529 (1998).
- 10) Sazuka M, Murakami S, Isemura M, Satoh K, Nukiwa T. Inhibitory effects of green tea infusion on in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse lung carcinoma cells. *Cancer Lett.*, **98**, 27-31 (1995).
- 11) Kruse A and Dinjus E. Hot compressed water as reaction medium and reactant properties and sythesis reactions. *J. Supercritical Fluids.*, **39**, 362-380 (2007).
- 12) Kulkarni A, Yokota T, Suzuki S, Etoh H. Subcritical water extraction of barley to produce a functional drink. *Biosci.Biotechnol. Biochem.*, **72**, 236-239 (2008).
- 13) Jiménez-Carmona M M, Luque de Castro M D. Isolation of eucalyptus essential oil for GC-MS analysis by extraction with subcritical water. *Chromatographia.*, **50**, 578-582 (1999).
- 14) Ibañez E, Kubátová A, Señoráns FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J. Agric Food Chem.*, **51**, 375-382 (2003).

- 15) Onwudili J A, Williams P T. Reaction mechanisms for the decomposition of phenanthrene and naphthalene under hydrothermal conditions. *J. Supercritical Fluids.*, **43**, 81-90 (2007).
- 16) Wang B, Li W, Li B, Wang G. Study on the fate of As, Hg and Pb in Yima coal via sub-critical water extraction. *Fuel.*, **86**, 1822-1830 (2007).
- 17) Wang B, Li W, Chen H, Li B, Wang G. The removal of mercury from coal via sub-critical water extraction. *Fuel Process Technol.*, **87**, 443–448 (2006).
- 18) Tavakoli O, Yoshida H. Effective recovery of harmful metal ions from squid wastes using subcritical and supercritical water treatments. *Environ Sci. Technol.*, **39**, 2357-2363 (2005).
- 19) Yoshida H, Takahashi Y and Terashima M. A Simplified Reaction Model for Production of Oil, Amino Acids, and Organic Acids from Fish Meat by Hydrolysis under Sub-Critical and Supercritical Conditions. *J. Chem. Eng. Japan.*, **36**, 441-448 (2003).
- 20) Yoshida H and Tavakoli O. Sub-critical Water Hydrolysis Treatment for Waste Squid Entrails and Production of Amino Acids, Organic Acids, and Fatty Acids. *J. Chem. Japan.*, **37**, 253-260 (2004).
- 21) Yoshida H, Terashima M, Takahashi Y. Production of organic acids and amino acids from fish meat by sub-critical water hydrolysis. *Biotechnol Prog.*, **15**, 1090-1094 (1999).
- 22) Tavakoli O and Yoshida H. Squid Oil and Fat Production from Squid Wastes Using Subcritical Water Hydrolysis: Free Fatty Acids and Transesterification. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **45**, 5675-5680 (2006).

- 23) Etoh H, Ohtaki N, Kato H, Kulkarni A, and Morita A. Sub-critical water extraction of residual green tea to produce a roasted green tea-like extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 858-860 (2010).
- 24) Sandal I, Bhattacharya A, Saini U, Kaur D, Sharma S, Gulati A, Kumar JK, Kumar N, Dayma J, Das P, Singh B, and Ahuja PS. Chemical modification of L-glutamine to alpha-amino glutarimide on autoclaving facilitates Agrobacterium infection of host and non-host plants: A new use of a known compound. *BMC Chem. Biol.*, **11**, 1-13 (2011).
- 25) Soda K, Uchiyama K, and Ogata K. Enzymatic Hydrolysis of Theanine and the Related Compounds. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University.*, **43**, 480-498 (1996).
- 26) Hara T. Volatile compounds formed on roasting L-theanine with D-glucose. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **55**, 1069-1072 (1981).
- 27) Okumura H, Ichitani M, Takiyama T and Kunimoto K. Effect of cyclodextrins on the thermal epimerization of tea catechins. *Food Sci. Technol. Res.*, **14**, 83-88 (2008).
- 28) Hayashi N, Chen R, Hiraoka M, Ujihara T and Ikezaki H. Beta-cyclodextrin/surface plasmon resonance detection system for sensing bitter-astringent taste intensity of green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 8351-8356 (2010).
- 29) Hayashi N, Chen R, Ikezaki H, Yamaguchi S, Maruyama D, Yamaguchi Y, Ujihara T and Kohata K. Techniques for universal evaluation of astringency of

green tea infusion by the use of a taste sensor system. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 626-631 (2006).

30) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).

31) Tangkhavanich B, Kobayashi T and Adachi S. Properties of rice straw extract after subcritical water treatment. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**, 1146-1149 (2012).

32) Furutani S and Osajima Y. Colorimetric estimation of pectin. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University.*, **22**, 35-44 (1965).

33) Goto T, Yoshida Y, Kiso M and Nagashima H. Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *J. Chromatogr.*, **749**, 295-299 (1996).

34) Terada S, Maeda Y, Masui T, Suzuki Y and Ina K. Comparison of caffeine and catechin components in infusion of various tea (Green, Oolong and Black Tea) and tea drinks. *J. Food Sci. Technol.*, **34**, 20-27 (1987).

35) Yoshida Y, Kiso M and Goto Y. Efficiency of the extraction of catechins from green tea. *Food Chem.*, **67**, 429-433 (1999).

36) Narukawa M, Kimura H, Noga C, Watanabe T. Taste characterization of green tea catechins. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **45**, 1579-1585 (2010).

37) Narukawa M, Noga C, Ueno Y, Sato T, Misaka T, Watanabe T. Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39. *Biochem Biophys Res Commun.*, **405**, 620-625 (2011).

- 38) Nicole J. G and Gary J. P. Optimizing the Orosensory Properties of Model Functional Beverages: The Influence of Novel Sweeteners, Odorants, Bitter Blockers, and Their Mixtures on (+)-Catechin. *J. Food Sci.*, **77**, 226-232 (2012).
- 39) Ikeda S, Nakagawa M and Iwasa K. Relation between infusing condition of green tea and soluble component. *Tea Res J.*, **37**, 69-78 (1972).
- 40) Kanbe T, Shimadzu-Ikuta N and Hirano T. Conditions for decocting green tea leaves and constituents in the decoction. *Memoirs of Beppu University*, **47**, 61-70 (2006).
- 41) Anan T and Kato H. Interaction between polyphenols of tea and amino acids during heating. *J. Food Sci. Technol.*, **31**, 321-326 (1984).
- 42) Ogawa T, Nakamura T, Tsuji E, Miyanaga Y, Nakagawa H, Hirabayashi H and Uchida T. The combination effect of L-arginine and NaCl on bitterness suppression of amino acid solutions. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 172-177 (2004).
- 43) Taira S, Ono M and Matsumoto N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biol. Technol.*, **12**, 265-271 (1997).
- 44) Hayashi N, Ujihara T and Kohata K. Reduction of catechin astringency by the complexation of gallate-type catechins with pectin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 1306-1310 (2005).
- 45) Komatsu Y, Suematsu S, Hisanobu Y, Saigo H, Matsuda R and Hara K. Effects of pH and temperature on reaction kinetics of catechins in green tea infusion. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 907-910 (1993).

- 46) Chen Z, Zhu Q, Tsang D and Huang Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 477-482 (2001).
- 47) Matsunaga M, Matsui H, Otsuka Y, Yamamoto S. Chemical conversion of wood by treatment in a semi-batch reactor with subcritical water. *J. Supercritical Fluids.*, **44**, 364-369 (2007).
- 48) Asghari F. S and Yoshida H. Acid-Catalyzed Production of 5-Hydroxymethyl Furfural from d-Fructose in Subcritical Water. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **45**, 2163-2173 (2006).
- 49) Asghari F. S and Yoshida H. Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub-critical water over heterogeneous zirconium phosphate catalysts. *Carbohydrate Res.*, **341**, 2379–2387 (2006).
- 50) Okajima I, Hiramatsu M and Sako T. Recycling of carbon fiber reinforced plastics using subcritical water. *Advanced Materials Res.*, **222**, 243-246 (2011).
- 51) Okajima I, Kawase N, Shimizu T, Tamura K, Kanno N, Kawajiri S and Sako T. Production of Composite Fuel with High Heating Value from Waste Mixture of Food and Plastic Using Subcritical Water. *J. Jpn. Inst. Energy.*, **91**, 998-1006 (2012).
- 52) Abdelmoez W and Yoshida H. Synthesis of a novel protein-based plastic using sub-critical water technology. *AIChE J.*, **52**, 2607-2617 (2006).
- 53) Taniguchi S, Fujiki H, Kobayashi H, Go H, Miyado K, Sadano H, Shimokawa R. Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines. *Cancer Lett.*, **65**, 51-54 (1992).

- 54) Okuda T, Kimura Y, Yoshida T, Hatano T, Okuda H, Arichi S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem Pharm Bull*, **32**, 1625–1631 (1983).
- 55) Yen G C, Chen H Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 27–32 (1995).
- 56) Kada T, Kaneko K, Matsuzaki S, Matsuzaki T and Hara Y. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of the green tea factor. *Mutation Res.*, **150**, 127–132 (1985).
- 57) Komori A, Yatsunami J, Okabe S, Abe S, Hara K, Suganuma M, Kim SJ, Fujiki H. Anticarcinogenic activity of green tea polyphenols. *Jpn J Clin Oncol.*, **23**, 186-190 (1993).
- 58) Okuda T, Mori K and Hayatsu H. Inhibitory effect of tannins on direct-acting mutagens. *Chem, Pharm. Bull.*, **32**, 3755–3758 (1984).
- 59) Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol.*, **32**, 613-22 (1986).
- 60) Iwata K, Inayama T and Miwa S. Effects of Chinese green tea, oolong tea and black tea on plasma and Liver Lipid Metabolism in Fructose-induced Hyperlipidemia Rats. *Jpn. J. Nutr.*, **46**, 289-298 (1988).
- 61) Matsuo N, Yamada K, Shoji K, Mori M and Sugano M. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: the structure–inhibitory activity relationship. *Allergy.*, **52**, 58-64 (1997).

- 62) Sugiyama K, Noda Y and He P. Suppressive effect of caffeine on hepatitis and apoptosis induced by tumor necrosis factor- α , but not by the anti-Fas antibody, in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 674-677 (2001).
- 63) Oyama J, Maeda T, Sasaki M, Kozuma K, Ochiai R, Tokimitsu I, Taguchi S, Higuchi Y, Makino N. Green Tea Catechins Improve Human Forearm Vascular Function and Have Potent Anti-Inflammatory and Anti-Apoptotic Effects in Smokers. *Intern Med.*, **49**, 2553-2559 (2010).
- 64) Iso H, Date C, Wakai K, Fukui M, Tamakoshi A; JACC Study Group. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med.*, **144**, 554-562 (2006).
- 65) Miyashita T, Etoh H. Improvement of the bitterness and astringency of green tea by sub-critical water extraction. *Food Science and Technol Res.*, **19**, 471-478 (2013).
- 66) Iijima Y, Nakamura Y, Ogata1 Y, Tanaka K, Sakurai N, Suda K, Suzuki T, Suzuki H, Okazaki K, Kitayama M, Kanaya S, Aoki K, Shibata D. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J.*, **54**, 949-962 (2008).
- 67) Iijima Y, Suda K, Suzuki T, Aoki K, Shibata D. Metabolite Profiling of Chalcones and Flavanones in Tomato Fruit. *J. Japan Hort. Sci.*, **77**, 94-102 (2008).
- 68) Nakano D, Ogura K, Miyakoshi M, Ishii F, Kawanishi H et al, Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides

from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats.

Biosci.Biotechnol.Biochem., **70**, 1118-1126 (2006).

69) Kimura K, Ozeki M, Juneja LR, Ohira H. L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses. *Biol Psychol.*, **74**, 39-45 (2007).

70) Juneja L R, Chu D C, Okubo T, Nagato Y, Yokogoshi H. L-theanine—a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans. *Trends Food Sci Technol.*, **10**, 199-204 (1999).

71) Tian X, Sun L, Gou L, Ling X, Feng Y, Wang L, Yin X, Liu Y. Protective effect of l-theanine on chronic restraint stress-induced cognitive impairments in mice. *Brain Res.*, **1503**, 24-32 (2013).

72) Kakuda T. Neuroprotective effects of theanine and its preventive effects on cognitive dysfunction. *Pharmacol Res.*, **64**, 162-168 (2011).

73) Tamano H, Fukura K, Suzuki M, Sakamoto K, Yokogoshi H, Takeda A. Preventive effect of theanine intake on stress-induced impairments of hippocampal long-term potentiation and recognition memory. *Brain Res Bull.*, **95**, 1-6 (2013).

74) Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka YM, Takihara-Matsuura T, Kakuda T, Takeuchi N. Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **59**, 615-618 (1995).

75) Yokogoshi H, Mochizuki M, Saitoh K. Theanine-induced reduction of brain serotonin concentration in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **62**, 816-817 (1998).

- 76) Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, Terashima T. Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochem Res.*, **23**, 667-673 (1998).
- 77) Sano M, Suzuki M, Miyase T, Yoshino K, Maeda-Yamamoto M. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *J Agric Food Chem.*, **47**, 1906-1910 (1999).
- 78) Suzuki M, Yoshino K, Maeda-Yamamoto M, Miyase T, Sano M. Inhibitory effects of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy. *J Agric Food Chem.*, **48**, 5649-5653 (2000).
- 79) 松浦寿喜、堀名恵美。岸本三香子、市川富夫、日本栄養・食糧学会誌, **54**, 155-160 (2001).
- 80) 村松敬一郎、小國伊太郎、伊勢村護、杉山公男、山本(前田)万理:茶の機能, 学会出版センター, p.188-192 (2002).
- 81) Sanderson G. W. Chemistry of tea and tea manufacturing. *Recent. Adv. Phytochem.*, **5**, 247-316 (1972).
- 82) 衛藤英男、富田勲、榛村純一、伊勢村護、原征彦、横越英彦、山本(前田)万理:新版茶の機能, 農文協, p.466-479 (2013).
- 83) Peng WD. Hypotensive effect of tenuifolic saponin and its mechanism. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.*, **20**, 639-42 (1999).
- 84) Hayashi K, Sagesaka YM, Suzuki T, Suzuki Y. Inactivation of human type A and B influenza viruses by tea-seed saponins. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **64**, 184-186 (2000).

- 85) James W. A, Dee A. D, Susan R. B. Dietary Fiber “Soluble Fiber”. *Plenum Press*, NY, p.339-363 (1990).
- 86) Tachibana H, Kubo T, Miyase T, Tanino S, Yoshimoto M, Sano M, Yamamoto-Maeda M, Yamada K. Identification of an inhibitor for interleukin 4-induced epsilon germline transcription and antigen-specific IgE production in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*, **280**, 53-60 (2001).
- 87) 村松敬一郎、小國伊太郎、伊勢村護、杉山公男、山本(前田)万理:茶の機能, 学会出版センター, p.340-363 (2002).
- 88) 山本(前田)万理:食品機能性評価マニュアル集.
- 89) Furuta M, Kuroda R, Tsukatani T, Higuchi T, Hirofuji Y. Research on Materializing by Functional Addition of Food Related Unused Resources Effective Use of The Stock of Beans and The Husk of Beans. *Fukuoka engineering center.*, **15** (2005).
- 90) Kobayashi T and Tabuchi T. A method employing a tribasic sodium phosphate buffered reagent for estimating semimicro quantities of reducing sugars. *J. Agric. Chem. Soc. Japan.*, **28**, 171-174 (1954).
- 91) Nakamura K and Kimura R. Sulfite removal from wine containing high concentration of sulfite by sulfur-oxidizing bacterium. *J. ASEV Jpn.*, **22**, 10-15 (2011).
- 92) Horie H, Kohata K. The Contents of Oxalic Acid in Green Teas and Its Contribution to the Taste of Tea. *National Inst. Vegetable And Tea Sci.*, **89**, 23-27 (2000).

- 93) Horie H, Ujihara T and Kohata K. Contents of organic acids in green teas and their contribution to tea quality. *National Inst. Vegetable And Tea Sci.*, **93**, 26-33 (2002).
- 94) Maeda T, Yoshimura T, Shimazu T, Shirai Y, Ogawa HI. Enhanced production of lactic acid with reducing excess sludge by lactate fermentation. *J Hazard Mater.*, **168**, 656-663 (2009).
- 95) Wanga H F, Tsaib Y S, Linb M L, Ou A S. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan. *Food Chem.*, **96**, 648-653 (2006).
- 96) Yang DJ, Hwang LS, Lin JT. Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *J Chromatogr A.*, **1156**, 312-320 (2006).
- 97) Mukai T, Horie H and Goto T. A simple method for determining saponin in tea seed. *National Inst. Vegetable And Tea Sci.*, **75**, 29-31 (1992).
- 98) SHIMADZU Applications. Analysis of Flavonoids in Ginkgo Biloba Extract (2010).
- 99) Sebata M, Suga Y, Makita M, Miyakoshi Y, Hayashi K, Sanada H and Egashira Y. Contents of dietary fiber and total polyphenol in nineteen varieties of Adlay (*Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf). *Hort Res.*, **65**, 131-134 (2011).
- 100) Mizukami Y, Sawai Y, Yamaguchi Y. Simultaneous analysis of catechins, gallic acid, strictinin, and purine alkaloids in green tea by using catechol as an internal standard. *J Agric Food Chem.*, **55**, 4957-4964 (2007).

- 101) Wei K, Wang L Y, Zhou J, He W, Zeng J M, Jiang Y W, Cheng H.
Comparison of catechins and purine alkaloids in albino and normal green tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) by HPLC. *Food Chem.*, **130**, 720-724 (2012).
- 102) 寺島健彦、横越英彦:お茶の効能とは-緑茶成分の有効性, 食品と技術, p.1-10 (2005).
- 103) Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **30**, 749-757 (2010).
- 104) Deuss I B: C. (1916) II, 589.
- 105) Romburgh, P. Van: *Proc. Acad. Sci. Amsterdam*, **22**, 758 (1920)
- 106) 武居三吉、酒戸弥二郎、大野稔:理研彙報, **17**, 871 (1938).
- 107) 山本亮、伊藤謙、陳発清:農化, **16**, 800 (1940).
- 108) 木戸 康嗣、卒業論文(2013).
- 109) Jasper HH. The ten-twenty electrode system of the International Federation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.*, **10**, 371-375 (1958).
- 110) 伊奈和夫、坂田完三、富田勲、伊勢村護。茶の化学成分と機能, 弘学出版 (2002).
- 111) Ma SJ, Mizutani M, Hiratake J, Hayashi K, Yagi K, Watanabe N, Sakata K. Substrate specificity of beta-primeverosidase, a key enzyme in aroma formation during oolong tea and black tea manufacturing. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **65**, 2719-29 (2001).

本論文の著作権は、国立大学法人静岡大学大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻(宮下知也)が所有しています。本論文の記事・図面の無断複写、複製および無断転載を禁じます。

ただし、著者は本論文の複写権を国立大学法人静岡大学に唯一許諾します。

平成 26 年 3 月 21 日