

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2013

課題番号：22500731

研究課題名（和文） 後発酵茶に存在する微生物の産生物と新規機能性成分に関する研究

研究課題名（英文） Study on the functional components and the new product of the microorganisms present in the post-heated fermented tea

研究代表者 加藤 みゆき (KATOH MIYUKI)

香川大学・教育学部・教授

研究者番号：70112654

研究成果の概要（和文）：

阿波晩茶製造工程中の桶漬けにおいて微生物を分離した。その中でも乳酸菌に分類される *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus fecium* and *Enterococcus avium* を分離同定した。この DNA を解析した結果 1494bp の塩基配列が明らかとなった。阿波晩茶から分離した微生物の中にコラゲナーゼ活性を有している微生物が明らかとなった。阿波晩茶の浸出液中に抗酸化性を示す物質があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The separation of microorganisms in a "wooden large bucket" which is an important point of Awa-bancha was done from the bottom of the bucket in the upper, central and fermented areas. I was isolated in a selective medium of the various microorganisms isolated. We re-separated and identified *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus fecium* and *Enterococcus avium*. DNA was extracted from each microorganism isolated using a QIAGEN Dneasy blood & tissue kit, 16S-rRNA analysis was performed using two primers. As a result, I have successfully revealed the nucleotide sequence 1494bp. On the other hand, I have examined the gelatin resolution of microorganisms isolated from Awa-bancha. Thirty-two microbial species were isolated in the presence of gelatinolytic activity. MIBK layer was investigated by the discoloration of β -carotene coupled with the oxidation of linoleic acid (β -carotene anti-oxidative activity) and the scavenging activity of the DPPH radical.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：後発酵茶、阿波晩茶、微生物、乳酸菌、抗酸化性

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国や東南アジア諸国には伝統

的発酵食品が数多く存在しており、米を原料としたものでは酒や発酵米麺、茶を原料とし

たものでは阿波晩茶や碁石茶・ミヤン、また大豆を原料としたものでは納豆や味噌、醤油などがある。これらの製造方法については、その素材の分解性や微生物の作用などについて、多くの研究がなされているが、機能性などの研究については相対的に、あまり多くは見出されていないのが現状である。

(2) 後発酵茶製造段階の嫌氣的発酵で、桶漬け中に乳酸や酢酸が生成することが明らかになっている。また2段階発酵茶は、好氣的カビ付けの作用で微生物によるカテキンやアミノ酸が分解している。また後発酵茶中についても多くの微生物を分離、同定している。また桶漬け中にγ-アミノ酪酸が生成し、この機能性があることは明らかとなっている。しかし、後発酵茶は特有の酸味の他に浸出液としての着色成分や微生物産生物がどのような機能性を有しているかが未だ明らかとなっていない。

1. 研究の目的

後発酵茶(茶中の酵素の働きを止めた後、自然に存在している微生物によって発酵させた茶をいう)の伝統的な製造方法や後発酵茶の風味成分は、すでに明らかとなっている。しかし、未知の成分がまだ多く存在している。未知成分として考えられるものは、発酵により生成した微生物によって産生する成分(浸出液成分の色)やその微生物が産生した機能性成分である。また微生物が茶葉中のカテキンを分解するカテキン分解産物は、未知成分でありその物質は多くの機能性を有していると考えている。他に茶中のタンパク質分解物や微生物が産生するペプチド成分などはまったく明らかとなっていない。このような新規機能性成分や微生物が産生する成分などを中心に明らかとした。

3. 研究の方法

(1) 阿波晩茶桶付けからの微生物の分

離方法

徳島県勝浦郡上勝町で製造された阿波晩茶の桶漬け葉(桶の上部・中央部・底部から採取したもの)を用いた。

採取した茶葉 1g を滅菌生理的食塩水に入れて懸濁させ、選択培地を用いて 37°C で 48 時間培養し、生菌数を測定した。LBS 寒天培地、TATAC 寒天培地から純粋分離した菌は、グラム染色)、顕微鏡による形態観察、カタラーゼ生成試験を行った。乳酸菌であると確認できたものについては、API 同定システム (apiweb™ 同定ソフトウェア・データベース V5.1) により菌種を同定した。乳酸桿菌にはアピ 50CHL、乳酸球菌にはアピ 20Strep を使用した。

(2) 阿波晩茶浸出液の分画方法

阿波晩茶の試料の 3g を 200ml の沸騰水で 3 分間抽出し、その後濾過した試料を分画試料として用いた。ろ液 100ml に MIBK を同量添加し、分液ロートにて抽出した。MIBK 層と水層に分けた。この水層に BuOH を 100ml 加え、分液ロートにて抽出した。MIBK 層、BuOH 層は、脱水、ろ過し、減圧濃縮を行った。水層は、溶媒臭を除去した。MIBK 層、BuOH 層、水層は、蒸留水で 100ml に定容した。

(3) 抗酸化性測定方法

抗酸化性の測定は、DPPH 法と β-カロテン退色方法を用いた。DPPH 測定方法は、100mM Tris-HCl バッファー 1.6ml と DPPH 溶液 2ml 試料 200 μl、総量 4ml で行った。攪拌後室温に 20 分間放置したのち 517nm で比色を行った。リノール酸・β-カロテン退色方法は、β-カロテン溶液 (100mg/100ml クロロフォルム) 0.5ml、リノール酸溶液 (10g/100ml クロロフォルム) 0.2ml、Tween80 (10g/50ml クロロフォルム) 1.0ml を 200ml の三角フラスコに入れ、窒素ガスにてクロロフォルムを除去したのち減圧濃縮して乾固

し、その後蒸留水 100ml に溶解した。この溶液 4.5ml に 0.2M pH6.8 リン酸緩衝液を 4ml 添加し、試料を 100 μ l 添加後 50°C の温浴にて 15 分間および 45 分間保持した後 470nm で比色した。15 分間後と 45 分間後の比色値の差を求めた。その差で分解能を測定した。

(4) アミノ酸・ポリフェノール・ビタミン C の測定方法

アミノ酸は、ニンヒドリン法で定量した。ポリフェノールは、岩浅らの方法を用いて定量し、没食子酸を用いて算出した。ビタミン C は、Kishida らの方法に準じて行い、HPLC にて定量した。

(5) プロテアーゼ活性等微生物選択試験ゼラチン液化試験を行い、ゼラチン分解活性を持つ菌株 32 種を得た。分離した菌株をコラゲナーゼ誘導液体培地にて培養 (37°C 48 時間) 後、遠心分離した上清を粗酵素液として用いた。基質コラーゲン (TypeI) 0.01 g に 0.1M リン酸緩衝液 300 μ l を加えて均一に懸濁し、菌株の粗酵素液を 200 μ l 加え、30°C で 6 時間反応後、1M 塩酸 1500 μ l で反応を停止した。10 分遠心分離し、上清 100 μ l と蒸留水 900 μ l 加え、標準溶液ロイシンを用いてニンヒドリン反応にて遊離アミノ酸含量を測定した。

4. 研究成果

(1) 阿波晩茶の桶漬けにおける微生物の同定結果

阿波晩茶製造工程中の桶漬けにおいて、乳酸菌に分類される *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus fecium* and *Enterococcus avium*. を分離同定した。この DNA を解析した結果 1494bp の塩基配列が明らかとなった。

(2) 阿波晩茶の浸出液の測定

阿波晩茶の浸出液を 350nm から 700nm まで HITACHI 比色計 U2001 を用いてスキャンした。

その結果、最大吸収を持たない吸光度であった。また浸出液の濃度は、緑茶・紅茶に比較して阿波晩茶は、浸出液の濃度が薄いことが認められた。

(3) 阿波晩茶の浸出液および分画液の抗酸化性の結果、阿波晩茶の浸出液中に抗酸化性が認められた。阿波晩茶は、他の茶に比べて抗酸化性が低いことが認められた。浸出液の溶媒分画液の DPPH 法による抗酸化性は、MIBK 層が一番高くなっていることが明らかとなった。ついで BuOH 層で水層が一番少ない結果であった。阿波晩茶の各画分に含まれる成分含有量を測定した結果、水層にアミノ酸が 1.67mg/100ml 含まれていた。MIBK 層には 0.02mg/100ml、BuOH 層には、0.08mg/100ml 含まれていた。ポリフェノール含量は、MIBK 層に 7.05mg/100ml、BuOH 層に 3.25mg/100ml、水層に 1.75mg/100ml 含まれていた。他の茶に比較して阿波晩茶に含まれる各成分の含有量は少ないところから、抗酸化性を示す物質が存在することが示唆された。

(4) 選択微生物のプロテアーゼ活性の結果

基質コラーゲンを用い、分離菌株 32 種のプロテアーゼ活性を検討した結果、遊離アミノ酸含量が高いもので 718.6 μ g/ml で低いもので 311.4 μ g/ml であった。また多くのものが非常に高い活性を示していた。今後は、これら微生物の産生するたんぱく質分解酵素について詳細な検討が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 加藤みゆき、加藤芳伸、木下朋美、山口優一、大森正司：増幅 DNA 断片長多型解析による紅茶の品種判別、日本食品科学工学会誌、査読有、57 巻、389-394 (2010)
- ② 加藤みゆき、長野宏子、大森正司：ベト

ナムにおける茶生葉の流通形態とその利用について、日本家政学会誌、査読有、61巻、737-740 (2010)

- ③ Miyuki Ktoh, Mie Inoue, Yoshinobu Katoh, Hiroko Nagano and Masashi Omori Characterization of microorganisms in post heated fermented tea (Awa-bancha)、The-4th International Conference on O-CHA Culture and Science, 査読有 pr-p-61pdf. (2011)
- ④ Yumiko Uchiyama, Mayumi Yamashita, Miyuki Kato, Toshihiro Suzuki, Masashi Omori and Ronggang Chen: Evaluation of the Taste of Tea with Different Degrees of Fermentation Using a Taste Sensing System, *Sensors and Materials*, 査読有、23, 501-506 (2011)
- ⑤ 加藤みゆき、大森正司、加藤芳伸: 塩基配列多型による緑茶の品種判別、日本食品化学工学会誌、査読有、58巻、421-427 (2011)
- ⑥ Miyuki Katoh, Masashi Omori, Hiroko Nagano: Antioxidant activity of soluble fractions in Awaban-cha post-heated fermented tea in Japan, IFHE 2012 World Congress Melbourne Australia, 査読有、Poster session 3 CD p. 196 (2012)

[学会発表] (計9件)

- ① 本尾有紀、佐藤香澄、加藤みゆき、大森正司: 石鎚黒茶から分離した微生物 *Rhizomucor variabilis* の茶成分への影響について、(社) 日本家政学会第62回大会研究発表要旨集 p. 91 (2010. 5. 29)
- ② 本尾有紀、築館香澄、加藤みゆき、大森正司: 石鎚黒茶から分離した微生物

Rhizomucor variabilis の特徴、(社) 日本家政学会第63回大会研究発表要旨集 p. 140 (2011. 5. 29)

- ③ 小林愛美、築館香澄、加藤みゆき、大森正司: 碁石茶に存在する微生物の茶成分への影響、(社) 日本家政学会第63回大会研究発表要旨集 p. 140 (2011. 5. 29)
- ④ 内山由美子、築館香澄、加藤みゆき、大森正司: 茶の種類と入れ方による風味の味覚センサーによる評価、(社) 日本家政学会第63回大会研究発表要旨集 p. 139 (2011. 5. 29)
- ⑤ 加藤みゆき、築館香澄、田中直義、大森正司: 美作番茶の製造方法と風味成分の特徴、(社) 日本家政学会第64回大会研究発表要旨集 p. 113 (2012. 5. 13)
- ⑥ 内山由美子、築館香澄、加藤みゆき、山口優一、陳栄剛、大森正司: 味認識装置による茶の味におよぼす水質の影響、(社) 日本家政学会第64回大会研究発表要旨集 p. 113 (2012. 5. 13)
- ⑦ Miyuki Katoh, Masashi Omori, Hiroko Nagano: Antioxidant activity of soluble fractions in Awaban-cha post-heated fermented tea in Japan, IFHE 2012 World Congress Melbourne Australia, Poster session (2012. 7. 19)
- ⑧ 本尾有紀、高尾哲也、戸田雅子、内山由美子、加藤みゆき、大森正司: 石鎚黒茶から分離した微生物を用いた、そのモデル的製造に関する研究、日本食品科学工学会第59回大会講演要旨集 p. 39 (2012. 8. 31)
- ⑨ Masashi Omori, Yumiko Uchiyama, Kasumi Tsukidate, Mayumi Yamashita, Yuki Okamoto, Miyuki Katoh: All

Purpose Utilization and Application
of Japanese Tea、茶資源総合利用研究
進展 2012、杭州 茶資源総合利用学
術検討大会論文集 p. 113-121 (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 みゆき (KATOH MIYUKI)
香川大学・教育学部・教授
研究者番号：70112654

(2) 研究分担者

大森 正司 (OMORI MASASHI)
大妻女子大学・家政学部・教授
研究者番号：80074920

長野 宏子 (NAGANO HIROKO)
岐阜大学・教育外部・教授
研究者番号：40074984

(3) 連携研究者

加藤 芳伸 (KATOH YOSHINOBU)
北海道立衛生研究所・研究員
研究者番号：00414326