

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500959

研究課題名(和文)二段階発酵茶・碁石茶の暗黙知を科学的に解明する

研究課題名(英文)Scientific study on tacit knowledge of Goishi tea

研究代表者

受田 浩之(UKEDA, Hiroyuki)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：60184991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：高知県長岡郡大豊町の碁石茶は、好気発酵と嫌気発酵の二段階の発酵を経て製造されるユニークなお茶である。本研究では、碁石茶の二次機能と三次機能に関する研究を行い、伝統的製法の暗黙知を形式知へと科学的に変換することを目的とした。二次機能：味覚センサーによる分析を行った結果、碁石茶は他の嗜好飲料の味とは異なるパターンを示し、うま味と渋味が弱く、酸味が強いという特徴を有していた。三次機能：抗酸化活性、及び脂肪前駆細胞の分化抑制効果を調べた。その結果、碁石茶中の主要抗酸化成分としてピロガロールを、脂肪前駆細胞分化抑制効果への関与成分としてピロガロール、没食子酸、ガロカテキンを同定した。

研究成果の概要(英文)：Goishi tea, a post fermented tea, is produced in Otoyo town in Kochi Prefecture, Japan. Two fermentation steps by aerobic and anaerobic fungi and microorganisms are conducted in the production of Goishi tea. In this study, the sensory and physiological functions of Goishi tea were investigated using scientific analyses in order to convert the tacit knowledge of traditional manufacturing process into the explicit knowledge. As a result of analysis using a taste sensor, it was found that, in Goishi tea, umami and astringency were weaker and sourness was stronger than other beverages. As for the physiological functions, the antioxidant activity and suppressive effect on differentiation of preadipocytes were investigated. As a result, pyrogallol was identified as the main antioxidant in Goishi tea. It was also elucidated that pyrogallol, gallic acid, and gallic acid catechin involved in the suppressive effect on differentiation of preadipocytes.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：茶 発酵茶 味 機能性 抗酸化活性 脂肪前駆細胞分化抑制効果

## 1. 研究開始当初の背景

世界には様々な種類の発酵茶が存在する。カビや乳酸菌が関与する微生物発酵茶が知られているが、このうち乳酸菌で発酵させたお茶は日本では四国地方でしか生産されていない。さらに乳酸菌発酵茶の中で、カビによる発酵と組み合わせた二段階発酵茶が二種類生産されている。それらは、愛媛県で生産されている石鎚黒茶と高知県長岡郡大豊町で生産されている碁石茶である。2010年当時、産業的規模で生産されているものは碁石茶のみであったことから、碁石茶は日本国内で唯一生産されている二段階発酵茶と位置づけられていた。

碁石茶は、原料茶葉を枝ごと刈り取り、2時間ほど蒸し、その後、7日間程度の好気発酵、14日間程度の嫌気発酵、2日間程度の天日乾燥を経て製品となる。このうち、嫌気発酵段階において乳酸菌が発酵にかかわる。嫌気発酵後に裁断されたお茶を天日干しにする際に、上から見ると碁盤に碁石を並べているように見えたことから「碁石茶」と名付けられたと言われている。

碁石茶の生産は歴史的に見て17世紀頃に遡ると考えられ、約400年もの長い歴史を持つ伝統製品である。しかし、どのように大豊町に伝えられたのか、なぜ大豊町において伝統的に生産されているのか、その特殊な生産工程がどのような必然性に基づき継承されてきたのか、など碁石茶を巡っては解明すべき問題が山積している状況にあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、伝統として継承されてきた碁石茶の製造方法と、その方法で生産されたお茶の品質、特に色、味、香りで表現される二次機能（感覚機能）とヒトの健康増進作用にかかわる三次機能（生体調節機能）について分析化学的に詳細に解析することで、現在継承されている生産方法の必然性を食品機能学的に解明する。これにより、地域文化において伝統的に共有されている「暗黙知」を市場価値の「形式知」へ科学的に変換することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 味覚センサーを用いた碁石茶の分析

味覚認識装置 TS5000Z（インテリジェントセンサーテクノロジー製）を用い、味覚センサーによる基本的な味覚（旨味、苦味、塩味、甘味、渋味）の数値化を行った。碁石茶に加え、対照として代表的な嗜好飲料（緑茶、ほうじ茶、紅茶、コーヒー、赤ワイン）の測定も行った。

### (2) 碁石茶の抗酸化活性と関与成分の解明

碁石茶茶葉 3 g を沸騰水 200 mL に5分間浸漬し、ろ紙でろ過後、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過したものを碁石茶抽出液とした。碁石茶抽出液に中に含まれる抗酸化成分は液-液分配、ODS オープンカラムクロマトグラフィー、及び HPLC にて単離・精製した。各精製過程で得られた各画分の抗酸化活性（スーパーオキシドアニオン消去活性：SOSA）は、SOD Assay Kit-WST（同仁化学研究所製）を用いて評価した。具体的には、96穴マイクロプレートに試料 20  $\mu\text{L}$ 、WST working solution 200  $\mu\text{L}$ 、Enzyme working solution 20  $\mu\text{L}$  を順次添加し、10分間撹拌した。その後、450 nm の吸光度を測定し、各試料の阻害率（%）、50%阻害濃度（ $\text{IC}_{50}$ ）、及び SOD 等価活性を求めた。単離・精製した抗酸化成分の構造解析は、LC-MS、IR、UV スペクトル、及び NMR 分析にて行った。

### (3) 碁石茶の脂肪前駆細胞分化抑制効果と関与成分の解明

ミキサーにて粉碎した碁石茶茶葉 1 g に超純水 200 mL を加え、オートクレーブを用い 110  $^{\circ}\text{C}$  で10分間抽出したものを碁石茶抽出液とした。碁石茶抽出液に含まれる活性成分は、ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、及び HPLC にて単離・精製した。各精製過程で得られた各画分の脂肪前駆細胞分化抑制効果は、分化誘導試験により評価した。すなわち、24穴マイクロプレートに播種した 3T3-L1 細胞に、デキサメサゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、インシュリンを含む培地を加え、分化誘導、脂肪蓄積を行った。その際、1 mg eq./mL になるように培地に碁石茶由来試料を添加した。Oil Red で染色・抽出後、540 nm の吸光度を測定し、各試料の分化阻害率を算出した。単離・精製した活性成分の構造解析は、LC-MS、及び NMR 分析にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 味覚センサーを用いた碁石茶の分析

碁石茶、緑茶、ほうじ茶、紅茶、コーヒー、赤ワインの味覚センサーによる分析結果を図1に示した。碁石茶の味バランス（レーダーチャート）は緑茶、ほうじ茶、紅茶、コーヒーとは大きく異なっていた。具体的には、碁石茶はこれらの飲料と比較して旨味と渋味が弱く、酸味が強い傾向にあった。今回対照として用いた飲料の中では、赤ワインと比較的に似たレーダーチャートを示した。以上のように味覚センサーを用いることにより、碁石茶の味を視覚化することに成功した。

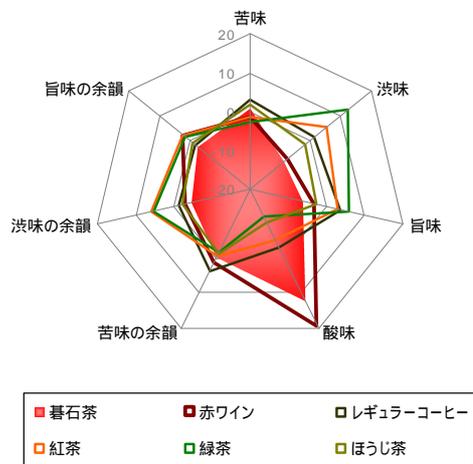


図1 味覚センサーによる碇石茶の分析結果

(2) 碇石茶の抗酸化活性と関与成分の解明

2-1) 碇石茶中の抗酸化成分の解明

碇石茶抽出液を液-液分配にて水層と酢酸エチル層に分けたところ、酢酸エチル層により高いSOSAが認められた(17.3 U/mg)。そこで酢酸エチル層をODSオープンカラムにて30、50、100% MeOH画分に分画した。その結果、30% MeOH画分に最も高いSOSAが認められた(21.6 U/mg)。さらにこの30% MeOH画分をHPLCに供して分画を行ったところ、保持時間7.2分のピークが最も高いSOSAを示すことが明らかとなった(3.28 U/mg)。このピークに相当する物質の単離を行い、構造解析を行った結果、没食子酸が脱炭酸して生じるピロガロールであることが明らかとなった(図2)。ピロガロールは碇石茶抽出液1 mL中に178 μg含まれており、碇石茶のSOSAへの寄与率は約28%であった。過去に主要カテキン8種類と没食子酸のSOSAへの寄与率は合計で約5%であることが判明している。今回判明したピロガロールの寄与率はカテキン類や没食子酸と比較して非常に大きいことが判明した。この結果より、ピロガロールは碇石茶中に含まれる主要抗酸化成分の一つであると判断した。

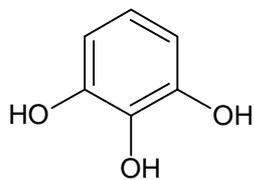


図2 ピロガロール

2-2) 碇石茶製造中のピロガロールの消長

碇石茶中の主要抗酸化成分であることが判明したピロガロールの製造中の変化について調べた。生葉、蒸し後、好気発酵、嫌気発酵、天日乾燥後の各段階での定量結果を図3に示した。測定の結果、ピロガロール含量は好気発酵段階において急速に増加することが判明した。好気発酵段階では、

*Aspergillus* 属や *Mucor* 属のカビの繁殖が起こり、続いて細菌類の繁殖が起こる。細菌類については、好気発酵段階から嫌気発酵段階への環境変化と共に、好気性菌から嫌気性菌への遷移が起こると推察されている。これらのカビ、及び細菌類がピロガロールの生成にかかわっているものと考えられた。

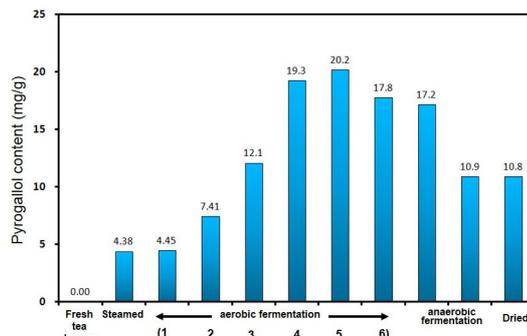


図3 碇石茶製造工程中のピロガロール含量の変化

(3) 碇石茶の脂肪前駆細胞分化抑制効果と関与成分の解明

碇石茶抽出液をODS中圧クロマトグラフィーにより、水溶出画分、20%、40%、100% MeOH溶出画分に分けた後、各画分の濃度が1 mg eq./mLになるように分化培地と維持培地に添加し、分化誘導後、Oil Red染色法により脂肪前駆細胞の分化抑制効果を測定した。その結果、水溶出画分に最も高い効果(阻害率=55.9%)が認められた。続いて、20% MeOH溶出画分が36.3%の阻害率を示した。その一方で、40% MeOH溶出画分と100% MeOH溶出画分の阻害率はそれぞれ2.49%と-6.15%であり、分化抑制効果を示さなかった。この結果に基づき、水溶出画分中における脂肪前駆細胞の分化抑制効果に関与する成分の同定を行うこととした。

前述の水溶出画分を逆粗HPLCに供し、6つの画分(Fr.)に分画し、分化抑制効果を測定した。その結果を図4に示した。

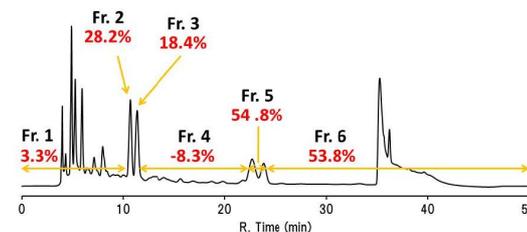


図4 碇石茶水溶出画分のHPLCクロマトグラムと各画分の脂肪前駆細胞分化抑制効果

測定の結果、複数の画分に分化抑制効果が認められた。また、単独で非常に強い分化抑制効果を示す画分は認められなかったことから、碇石茶水溶出画分の脂肪前駆細胞分化抑制効果には複数の成分が関与しており、相加的、或いは相乗的效果を示していると推察された。そこで、各画分を組み合わせで分化

抑制効果を評価したところ、画分2、画分3、画分5の三つを組み合わせた際に、分画前の碁石茶水溶出画分と同等程度の脂肪前駆細胞分化抑制効果が認められた。このことから、画分2、画分3、画分5に含まれる成分が碁石茶水溶出画分の分化抑制効果に大きく関与しているものと考えられた。

続いて、画分2、画分3、画分5に含まれる活性成分の単離・精製を行い、各種機器分析に供した結果、画分2よりピロガロール(図2)、画分3より没食子酸(図5)、画分5よりガロカテキン(図6)が同定された。ピロガロール、没食子酸、ガロカテキンのいずれも既に碁石茶中での存在が確認されている物質である。今後、これらの成分の相加的、或いは相乗的な分化抑制効果の発現メカニズムを明らかにすることで、碁石茶の3T3-L1脂肪前駆細胞分化抑制効果の解明が達成できるものと期待される。

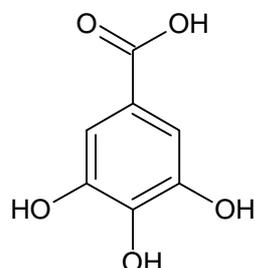


図5 没食子酸の構造

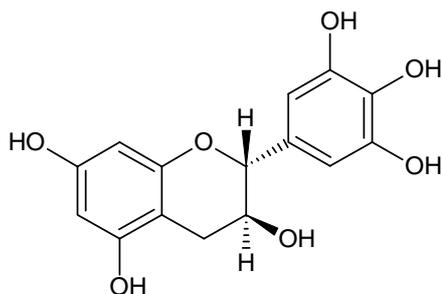


図6 ガロカテキンの構造

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

Hiroyuki Ukeda, The history of Goishi-cha production in town Otoyochi, Kochi, Japan, International Symposium on Research towards Green Innovation, 2014/1/12-13, Thailand

Tomoko Shimamura, Food function of Goshi-cha, International Symposium on Research towards Green Innovation, 2014/1/12-13, Thailand

森山洋憲、島村智子、柏木丈拡、石塚悟史、受田浩之、邑田修三、大石雅夫、横田淳子、吉岡三郎、宮村充彦、碁石茶を巡る産学官連携の取り組み、産学連携学会第10回大会、2012/6/14-15、高知  
横田淳子、常風興平、小野川雅英、吉岡三郎、宮村充彦、柏木丈拡、島村智子、受田浩之、森山洋憲、邑田修三、大石雅夫、食餌性肥満モデルマウスにおけるAdipocytokine分泌に及ぼす碁石茶の影響、日本生薬学会第58回年会、2011/9/24-25、東京

〔図書〕(計1件)

受田浩之、碁石茶、食品と容器、缶詰技術学会、2013、726-730

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

受田 浩之 (UKEDA, Hiroyuki)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号：60184991

### (2) 研究分担者

島村 智子 (SHIMAMURA, Tomoko)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号：50350179

柏木 丈拡 (KASHIWAGI, Takehiro)

高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号：60363256