

平成23年度 戦略的基盤技術高度化支援事業

「ファーマントミクス(統合微生物発酵制御技術)による
黒茶ポリフェノールの生産と素材化技術の開発」

研究開発成果等報告書

平成24年3月

委託者 九州経済産業局

委託先 一番食品株式会社

目 次

第1章	研究開発の概要	1
	事業管理者 一番食品(株)		
第2章	茶葉の最適発酵制御条件の検討	7
	九州大学大学院農学研究院		
第3章	実用規模培養装置による発酵制御条件の検討	11
	福岡県醤油醸造協同組合		
第4章	黒茶ポリフェノールの抽出と素材化技術の検討	15
	一番食品(株)		
第5章	黒茶ポリフェノールの医学的評価	19
	(株)レオロジー機能食品研究所		
第6章	全体総括	23
	事業管理者 一番食品(株)		

第1章 研究開発の概要

事業管理者 一番食品株式会社

1.1 研究開発の背景・研究目的および目標

「茶」は「不発酵茶」と「発酵茶」に大別され、緑茶は「不発酵茶」に分類される。他方、「発酵茶」は小区分として「前発酵茶」と「後発酵茶」に分類される。前者「前発酵茶」にはウーロン茶（半発酵茶）や紅茶（全発酵茶）が含まれる。この「前発酵茶」の発酵とは、微生物が関与しない茶葉由来の酸化酵素による「酸化反応」である。後者「後発酵茶」にはプーアル茶（好気発酵）や阿波番茶（嫌気発酵）、碁石茶（好気・嫌気発酵）などが含まれる。この「後発酵茶」の発酵とは、微生物が関与した発酵を言う。

本研究開発は、この「後発酵茶」の研究に端を発している。すなわち、平成19年度から20年度にかけて実施した経済産業省委託の地域資源活用型研究開発事業において、本共同研究体は福岡県の地域資源である八女茶を原料に、後発酵茶の実用生産に成功し、商品化した（商品名「発酵黒八女茶」）。その発酵過程で、原料茶葉に含まれるポリフェノール類より新たに生成する「黒茶ポリフェノール」を見出し、その一部がヒト赤血球変形能の低下抑制、すなわち血液循環能改善効果を示すこと、および α -グルコシダーゼ阻害活性とリパーゼ阻害活性を有することを発見した。（特願2009-068709）

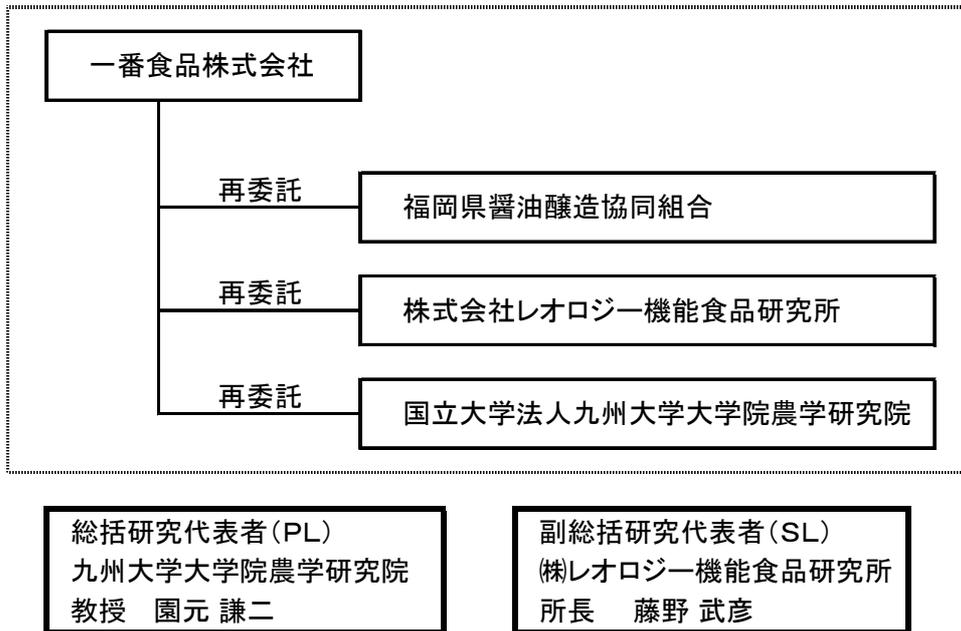
本研究開発では、茶葉を原料とし新規「黒茶ポリフェノール」を含む高品質で多様な機能性食品素材を製造する高度な発酵制御技術の開発を目的としている。この発酵技術は微生物（麹菌、乳酸菌など）や酵素といった生体触媒を組み合わせ活用し、有用物質を発酵生産する統合微生物発酵制御技術「ファーマントミクス」である。

この発酵技術では、茶葉の麹菌酵素あるいは酵素製剤などによる分解と、「黒茶ポリフェノール」へのバイオコンバージョンを効率的に進めるため、目的成分である「黒茶ポリフェノール」に連動した「指標」を選定し、発酵条件の最適化を行なう。同時に発酵物、抽出物、試作素材などの医学的評価を行い、生体機能性の観点からも発酵条件の的確性を検証する。

本研究開発の「黒茶ポリフェノール」は、赤血球の“しなやかさ”を向上させ、微小血管における血液の循環能を向上させる機能を有していることが判明しており、これに加えて肝解毒効果、腎機能向上効果などの生体機能性が期待できることから、多様な生活習慣病やメタボリックシンドロームに対応した機能性食品素材として茶飲料以外の需要も期待される。

1.2 研究体制

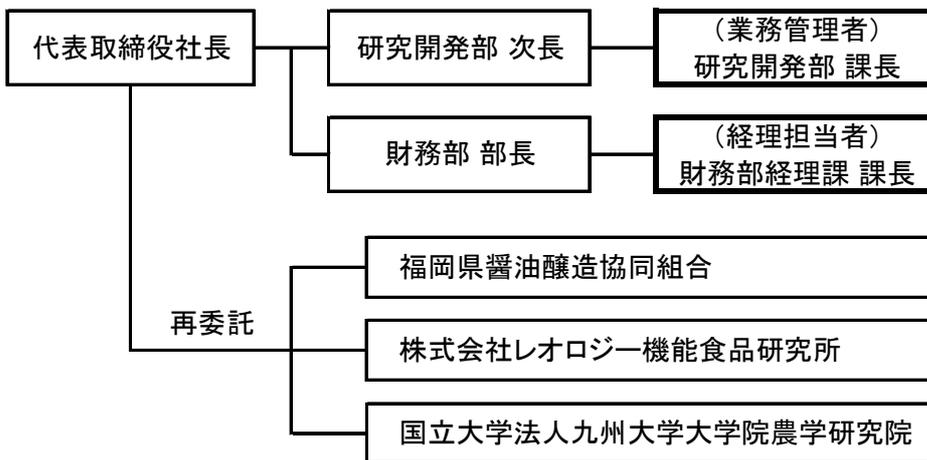
1.2.1 研究組織



1.2.2 管理体制（平成23年度）

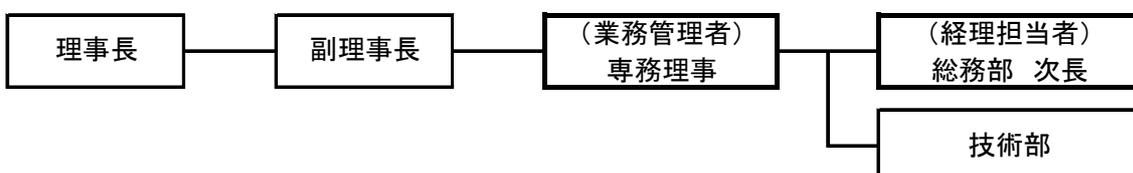
①事業管理者

一番食品株式会社

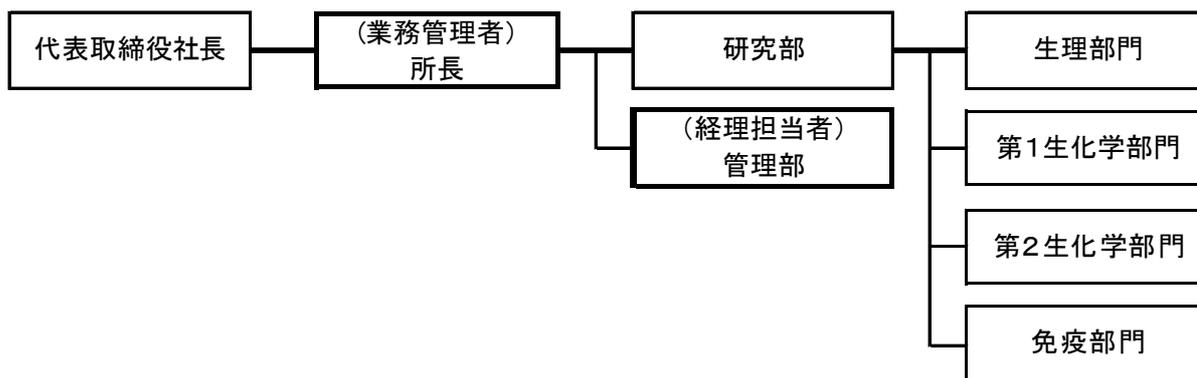


②再委託先

福岡県醤油醸造協同組合



株式会社レオロジー機能食品研究所



国立大学法人九州大学大学院農学研究院



1. 2. 3 研究者氏名 (平成23年度)

1) 総括研究代表者(PL)

氏名	所属・役職
園元 謙二	国立大学法人九州大学大学院農学研究院 教授

2) 副総括研究代表者(SL)

氏名	所属・役職
藤野 武彦	株式会社レオロジー機能食品研究所 所長

3) 事業管理者

一番食品株式会社

①プロジェクト管理員

氏名	所属・役職
吉野 貴唯	研究開発部 次長
田中 俊昭	研究開発部 課長
奥村 俊二	財務部経理課 課長
大賀 和孝	財務部経理課 主任

② 研究員

氏名	所属・役職
吉野 貴唯	研究開発部 次長
田中 俊昭	研究開発部 課長

3) 再委託先

福岡県醤油醸造協同組合

氏名	所属・役職
野田義治	専務理事
植木達朗	技術部 部長
片岡由希子	技術部 研究員
案浦謙二	技術部 研究員

株式会社レオロジー機能食品研究所

氏名	所属・役職
藤野 武彦	所長
馬渡 志郎	顧問
佐藤 亜弥	研究員
坂本 哲也	研究員

国立大学法人九州大学大学院農学研究院

氏名	所属・役職
園元 謙二	生命機能科学部門 教授
善藤 威史	生命機能科学部門 助教
折居 千賀	生命機能科学部門 学術研究員

1.2.4 協力者(研究推進委員)

氏名	所属・役職	備考
(外部推進委員) 小川 勝 久保田 朗 岡田 早苗	中央技術環境研究所 代表 福岡県農業総合試験場八女分場 茶チーム長 東京農業大学 応用生物科学部 教授	アドバイザー アドバイザー アドバイザー
(内部推進委員) 園元 謙二 藤野 武彦 野田 義治 吉野 貴唯	九州大学大学院農学研究院 教授 株式会社レオロジー機能食品研究所 所長 福岡県醤油醸造協同組合 専務理事 一番食品株式会社 研究開発部 次長	総括研究代表者 副総括研究代表者

1.3 成果概要

1.3.1 茶葉の最適発酵制御条件の検討 (九州大学大学院)

発酵茶の熱水抽出液を薄層クロマトグラフィーに供した結果、微生物発酵によって生成する黒茶ポリフェノール(X成分)は、従来のカテキン類とは R_f 値、呈色の有無や発色パターンが大きく異なっていた。そこで、 $^1\text{H-NMR}$ や $^{13}\text{C-NMR}$ といった各種 NMR、質量分析法を用いて同化合物の構造を解析、同定した。

次に、X成分を簡易かつ効率的に生成するため液体発酵系の検討を行ったがX成分の生成は見られなかった。しかし、半固体発酵では *Aspergillus* 属菌A株においてX成分の生成が見られた。そこで同菌株を用いて半固体発酵を行い、各種成分の変化を調べたところ、EGCG、EGC、没食子酸の増減に伴いX成分の生成が見られた。

1.3.2 実用規模培養装置による発酵制御条件の検討 (福岡県醤油醸造協同組合)

X成分の生産性は、原料茶葉の種類および加熱温度の影響を受けた。数種の要因を組み合わせた発酵試験の結果から、*Aspergillus* 属菌の生産物(酵素など)がX成分生産の主要因と考えられた。*Aspergillus* 属菌A株と同属のB株のX成分生産性は異なり、B株はA株よりも高い生産性を示した。

次に、培養装置を用いた半固体発酵によるX成分の生産を試み、半固体発酵法は固体発酵に比べ固形分あたりのX成分生産性が高いことを確認した。EGCG添加 Czapek培地による培養試験において、EGCG から EGC、没食子酸、X成分が産生することを確認した。半固体発酵では、発酵初期に菌体量が上昇すると共にEGCGが消失しEGCが低下した。次いで、菌体量に変化はないがX成分は上昇した。

1.3.3 黒茶ポリフェノールの抽出と素材化技術の検討（一番食品）

発酵茶葉からのX成分の抽出・素材化技術として、熱水抽出法および樹脂処理法について工業生産ラインを用いた検討を行い、共に実用レベルで確立した。この内、樹脂処理法によりX成分が粗精製状態となった抽出画分（黒茶ポリフェノール素材）を得た。また、熱水抽出物および樹脂処理画分の機能性として血液循環能（ヒト赤血球変形能）を評価した結果、樹脂処理画分に高い改善効果を確認した。

長期保存試験により、食品（乾燥物・水溶液）状態でのX成分の成分的な安定性を確認し、機能性食品素材としての利用適性についても良好な評価を得た。

更に、様々な食品形態やカテゴリーに適合した商品展開を図るため、黒茶ポリフェノール素材を用いた製品モデルとして、飲料やタブレット・カプセル・ゼリーなどを実用レベルで試作した。

1.3.4 黒茶ポリフェノールの医学的評価（レオロジー機能食品研究所）

発酵茶葉からX成分を効率的に抽出・分取するため、既に特許取得済みの技術をもとに検討し、X成分の結晶化まで成功した。また、熱水抽出物について急性経口毒性試験、復帰突然変異試験、小核試験の動物安全性試験を行い、全ての試験項目で陰性となった。

緑茶抽出物ではAAPHによるヒト赤血球変形能の低下抑制は見られなかったが、発酵茶の熱水抽出物は赤血球変形能の低下を抑制した。また、肥満とⅡ型糖尿病モデルラットにおいて、摂食量を有意に増加させたが、逆に有意に体重増加率を抑制した。肥満とⅡ型糖尿病マウスモデルにおいて摂食量を有意に増加させ、インスリン濃度の上昇を抑制する傾向がみられた。

発酵茶抽出物は、糖尿病モデルラットにおいて統計的に有意な血糖値上昇抑制効果、中性脂肪低減効果、および肝・腎機能の改善傾向、赤血球変形能改善傾向を示した。また、遺伝的に糖尿病を発症するマウスにおいても、明らかな血糖値上昇抑制効果が見られた。更に高血圧自然発症ラットにおいて統計的に有意な腎機能の改善効果、血圧上昇抑制効果、コレステロールの代謝改善効果、および肝機能の改善傾向が見られた。

X成分は、遺伝的に糖尿病を発症するマウスにおいて、明らかな血糖値上昇抑制効果を示した。更に、高血圧自然発症ラットにおいて投与1週後から、血圧上昇抑制傾向を示した。

1.4 当該研究開発の連絡窓口

一番食品株式会社 研究開発部 田中俊昭

TEL:0948-26-1689 FAX:0948-26-1698

E-mail:toshiaki-tanaka@ichiban-foods.co.jp

第2章 茶葉の最適発酵制御条件の検討

国立大学法人 九州大学大学院農学研究院

2.1 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

これまでに当研究チームが固体発酵茶に特異的に含まれることを見出した「黒茶ポリフェノール(X成分)」の同定を行うことで、X成分に関する情報だけではなく、安全性や生理活性機能に関する情報の提供に繋げる。

また、効率的にX成分を生産するための最適発酵制御条件に関する検討の一つとして、液体発酵系あるいはそれに準じる発酵系の確立による発酵プロセスの効率化を目指す。これらることより、X成分の効率的生産あるいは発酵茶に含まれるその他機能性成分に関する情報提供に寄与する。

2.2 研究成果

2.2.1 黒茶ポリフェノール(X成分)の同定

本課題では、黒茶ポリフェノール(X成分)の構造を解明するに当たり、まずX成分が白色結晶であり、分子量 276、構造式は $C_{14}H_{12}O_6$ であることが明らかにした。そこで、X成分同定のため、発酵茶抽出液を薄層クロマトグラフィー(TLC)に供し、定性分析を行った。X成分の標品はレオロジー機能食品研究所にて精製および結晶化されたものを用いた。

発酵茶葉のエタノールあるいはメタノール抽出液をシリカゲル薄層プレート(Whatman Silica Gel 60A)に負荷し、溶媒(クロロホルム:酢酸エチル:ギ酸=4:5:1)にて展開後、UV検出および発色試薬を用いた呈色の有無、色および R_f 値(移動度)による比較を行った。発酵茶に含まれるX成分および精製X成分は R_f 値を 0.57 に示し、UVによる検出、*p*-アニスアルデヒド、およびジフェニルアミン、10% H_2SO_4 による呈色が見られたが、他のカテキン類とは異なり、2% $FeCl_3$ では呈色を示さなかった(表1、図1)。従って、X成分はカテキン類とは構造的に異なる可能性が示唆された。

表 1. 茶葉および発酵茶由来各種成分におけるTLC分析結果

	UV	$FeCl_3$	<i>p</i> -アニスアルデヒド	ジフェニルアミン	10% H_2SO_4	ニンヒドリン
カテキン ($R_f=0.48$)	+	+	+	+	+	-
没食子酸 ($R_f=0.49$)	+	+	+	+	+	-
X成分 ($R_f=0.57$)	+	-	+	+	+	-

X成分
($R_f=0.57$)



2% FeCl₃



p-アニスアルデヒド



ジフェニルアミン

図 1. 各種発色試薬におけるX成分の呈色

更に、レオロジー機能食品研究所にて発酵茶より同成分の抽出、精製および結晶化を行い、¹H-NMR (500 MHz in C₄H₈O₂)、¹H-NMR (重水添加)、¹³C-NMR (126.5 MHz in C₄H₈O₂)、¹³C-NMR (DEPT 135)、二次元 NMR (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HMQR、¹H-¹³C HMBC、NOESY) による解析を行った。その結果、検出された全てのピークを帰属し、X成分の構造を次のように決定した(図 2)。

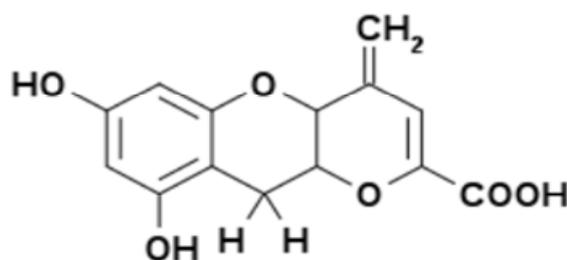


図 2. 黒茶ポリフェノール X成分(4, 4a α , 10, 10a α -テトラヒドロ-7, 9-ジヒドロキシ-4-メチレンピラノ[3, 2-b][1]ベンゾピラン-2-カルボン酸)の構造

2. 2. 2 茶葉を用いたスラリーおよび液体発酵に関する検討

従来の固体発酵系では最適発酵制御条件の検討において、発酵の管理や検討のための条件設定が難しいという問題があった。工業的にも発酵プロセスの改善あるいは簡略化は今後の事業化および製品化に際して重要となることが考えられた。そのため、構造および一部の機能性が明らかにされたX成分を指標に、固体発酵系から液体発酵系への移行に関する検討を試みた。

以前の検討で試験管小スケールスラリー(半固体)発酵にてX成分の生成が見られたため、バッフルフラスコを用いたスラリー発酵および茶葉を煮出した茶汁(茶熱水抽出液)のみを用いた液体発酵系の検討を行った。発酵には福岡県醤油醸造協同組合より提供された *Aspergillus* 属 A 株を用いた(第 3 章参照)。

発酵は滅菌した茶葉スラリー培地に同菌の孢子懸濁液を接種し、好気発酵を 35°C で 1 週間行った後、嫌気発酵を 30°C で 1 週間行った。殺菌処理およびその他条件は福岡県醤油醸造協同組合の発酵条件に準じた。茶汁培地は熱水を用いて抽出した後、濾過により茶葉を取り除いたものを用いた。7 日目および 14 日目に発酵物をサンプリングおよび抽出し、HPLC にて X成分の定量を行った。凍結乾燥重量を求めた後、乾燥発酵茶葉 1g 中のX成分量を求めて比較した。

本課題で検討した発酵条件は、(1)スラリー発酵系、(2)茶汁液体発酵系である。なお、ネガティブコントロールとして菌を接種しないスラリーおよび茶汁培地を用意し、同様の条件で発酵を行った。

結果を図 3 に示す。バッフルフラスコを用いたスラリー発酵系においてもX成分の生成が見られた。スラリー発酵 14 日目における乾燥発酵茶葉 1g 当たりのX成分生成量は、(1)スラリー発酵系においては 0.87mg であった。また、嫌気発酵を行った 14 日目にX成分の減少が見られた。しかし、茶汁のみを用いた液体発酵系ではX成分の生成は見られなかった。このことより、発酵茶におけるX成分の生成に関しては茶葉由来の各種成分だけではなく、茶葉の有無もまた何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

これらの結果より、発酵茶におけるX成分の高効率生産において茶葉を用いたスラリー発酵系への移行が可能であり、更にはその有効性が示唆された。

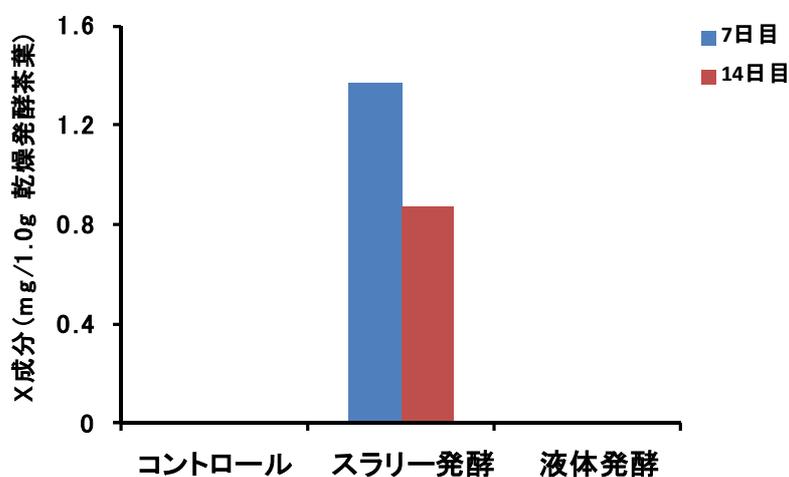


図 3. スラリーおよび液体発酵系におけるX成分生成量

2. 2. 3 スラリー発酵における各種成分の経時変化

スラリー発酵にてX成分の生成が見られたことから、カテキンをはじめとした茶葉、発酵茶由来各種成分の経時変化を調べた。滅菌した茶葉スラリー培地に *Aspergillus* 属 A 株を接種し、発酵を行った。発酵は好気条件で 30°C、30 日間振とう培養を行った。1 日おきに発酵物をサンプリングし、濾過滅菌後に HPLC を用いてX成分および各種成分を定量した。

結果を図 4 に示す。同発酵系において、EGCG の減少に伴い、EGC および没食子酸 (GA) の増加後、それらの減少に伴いX成分の生成が見られた。EGCG は発酵開始直後より減少、3 日目にはほぼ消失していた。また、X成分は 3 日目より生成が見られ、14 日目に最も高い値を示した (12.71mg/1g 乾燥発酵茶葉)。14 日目以降に見られたX成分の減少は EGC をはじめとした茶葉由来成分が栄養源として早期に消費されたため、X成分もまた同様に消費された可能性が考えられる。

これらの結果より、X成分の生成には没食子酸、EGC、EGCG が関与している可能性が示唆された。

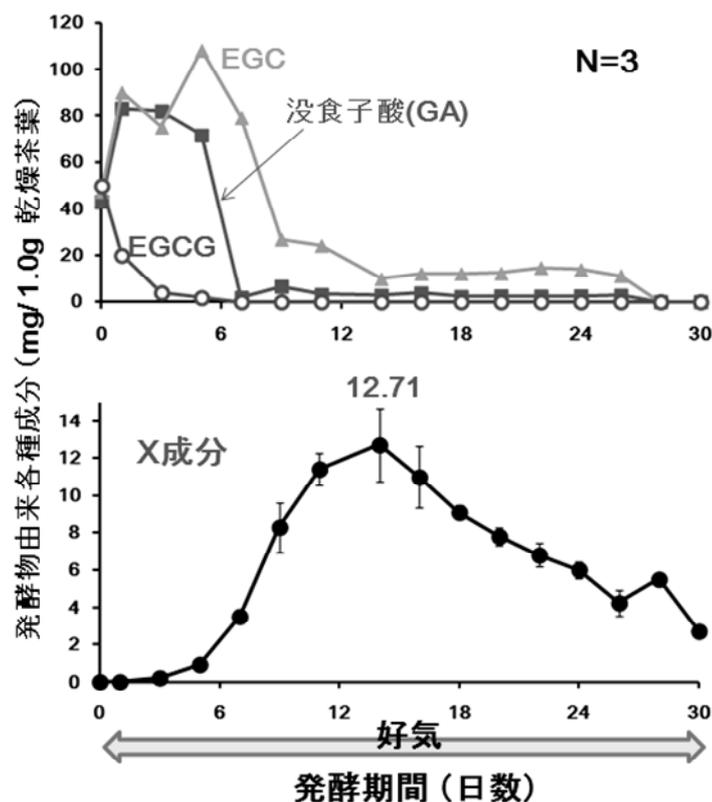


図 4. スラリー発酵系における各種成分の経時変化

2.3 研究成果のまとめと今後の取り組み

発酵茶に含まれる黒茶ポリフェノール(X成分)の構造決定を行った。その結果、従来のカテキン類とは異なる構造の新規化合物であることが明らかになった。

茶葉を煮出した茶汁を用いた液体発酵系ではX成分の生成が認められなかった。このため、茶葉の有無による影響が菌の生育にも関与する可能性が示唆された。しかし、半固体発酵系であるスラリー発酵系を新たに確立することができた。従来の固体発酵と比較すると、X成分の生成量やコスト的な面において解決すべき点も多い。しかしそれらの問題を解決することで発酵制御が容易になり、X成分の効率的かつ安定な生産のための検討を円滑に進めることができると考えられる。その他、抽出から製品化に至る工程のスリム化、原材料のコスト削減を図るなど製造過程に関しても大きく寄与することが期待される。

本研究において、茶葉由来のポリフェノールおよび製品としての発酵茶について様々な知見が得られた。これらをもとに、今後の事業化や機能性食品として更なる発展が期待される。

第3章 実用規模培養装置による発酵制御条件の検討

福岡県醤油醸造協同組合

3.1 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

黒茶ポリフェノールは茶葉を原料として生産される。現在想定しているその製造工程は、原料受入⇒原料処理工程(加熱)⇒発酵工程(黒茶ポリフェノール産生)⇒一次精製工程(固液分離、濃縮、成分調整)から構成され、「黒茶ポリフェノール原液」を製造し、外注加工して食品素材とする。

本課題では、黒茶ポリフェノール、特にX成分の生産に対する原料処理条件、発酵工程に関連する要因(食品用酵素製剤、*Aspergillus* 属菌、乳酸菌)の影響、原料処理における加熱時間の影響と発酵工程(半固体発酵)における生産条件の最適化を検討する。更に、実験室レベルから実用規模へのスケールアップのための発酵試験を行う。

3.2 研究成果

3.2.1 原料茶葉の加熱処理の検討

原料茶葉の加熱処理工程が、一般細菌数低減、茶葉可溶化率、黒茶ポリフェノール(X成分)の生産性に与える影響について検討した。

その結果、加熱時間の長さは 100℃と 100℃以上の間では一般細菌数低減と茶葉可溶化に大きな差は無かった。一方、X成分の生産性は、加熱温度の影響を受け 100℃以上<100℃の関係にあることが判明した。

3.2.2 茶葉の分解・可溶化条件の検討

原料茶葉の可溶化およびX成分の生産性に対する、食品用酵素製剤、*Aspergillus* 属菌、乳酸菌の関係を検討した。食品用酵素製剤と *Aspergillus* 属菌は、茶葉をほぼ同程度可溶化したが乳酸菌には可溶化作用を認めなかった。X成分は、*Aspergillus* 属菌単独または乳酸菌と共に作用させた場合にのみ生産され、特に後者で最も多く生産された。一方、食品酵素製剤単独、乳酸菌単独、食品用酵素製剤と乳酸菌の組み合わせでは、X成分は生産されなかった。

これらの結果から、*Aspergillus* 属菌の生産物(酵素など)がX成分生産の主要因で、乳酸菌はこれを促進しているものと推察した。

3.2.3 市販種麹菌の茶葉由来黒茶ポリフェノール生産性評価

X成分の生産に関連する因子をL8直交実験(半固体発酵)により評価し、茶葉の加熱条件の影響を検討した。茶葉によりX成分の生産性は異なり、加熱条件も影響を及ぼす。更に、市販種麹菌の *Aspergillus* 属菌、*Monascus* 属菌、*Rhizopus* 属菌などを用いてX成分の生産性を評価した結果、*Aspergillus* 属菌でX成分の生産が認められた(図 1)。加えて同じ *Aspergillus*

属の種麴菌でもその生産性は異なり、*Aspergillus* 属菌B株が A 株よりも高い生産性を示した（図 2）。

次に、小型培養装置（半固体発酵）によるX成分の生産を試みたところ、茶葉発酵物当りの生産量が固体発酵と同程度であることを確認した。

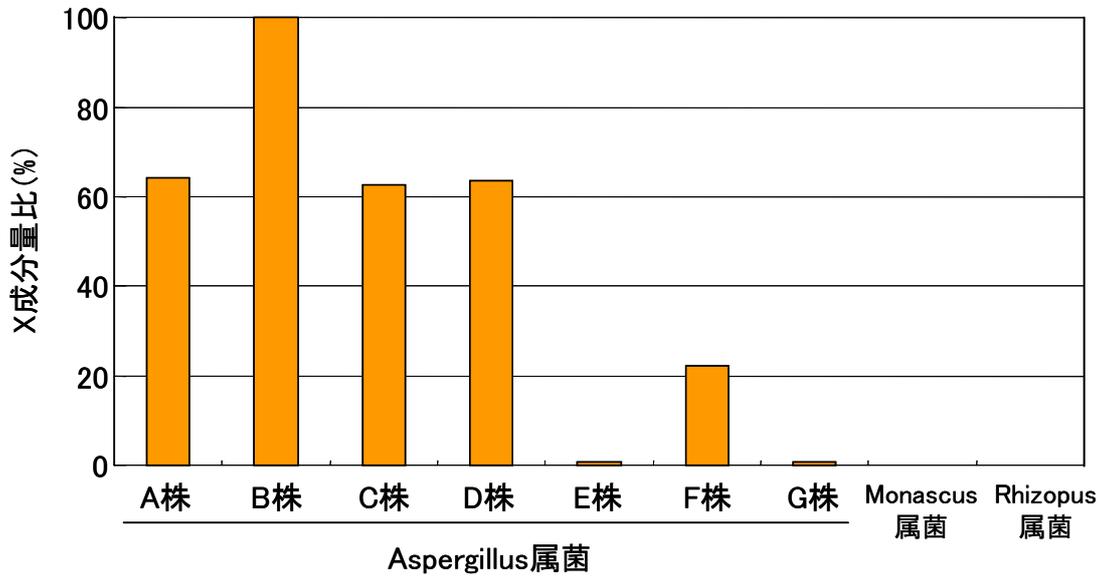


図 1. 市販種麴発酵による茶葉からのX成分生産試験

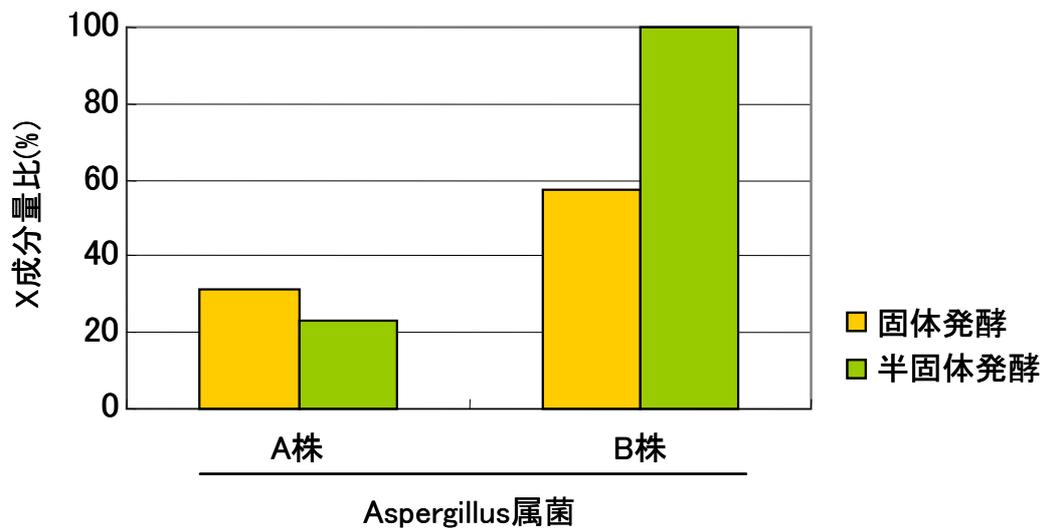


図 2. *Aspergillus* 属菌 A 株、B 株の固体発酵、半固体発酵によるX成分生産量

3. 2. 4 実用規模培養装置による発酵制御条件の検討

半固体発酵と固体発酵の両発酵法で *Aspergillus* 属菌B株がA株に比べてX成分の生産に適していた。エピガロカテキンガレート(EGCG)添加 Czapek 培地による培養試験において、EGCG からエピガロカテキン(EGC)、没食子酸(GA)、X成分が産生することを確認した(図3)。

培養装置を用いた半固体発酵では、発酵前期に菌体量が上昇すると共に EGCG が消失し、EGC が低下した(図4)。次いで、発酵後期では菌体量に変化ないがX成分は上昇した(図4)。

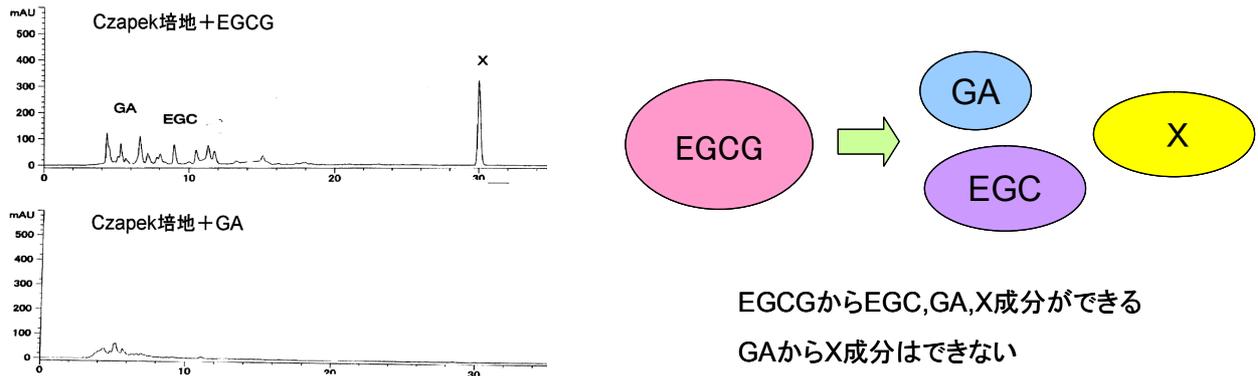


図 3. EGCG 添加 Czapek 培地に接種した *Aspergillus* 属菌により生成された GA、EGC およびX成分

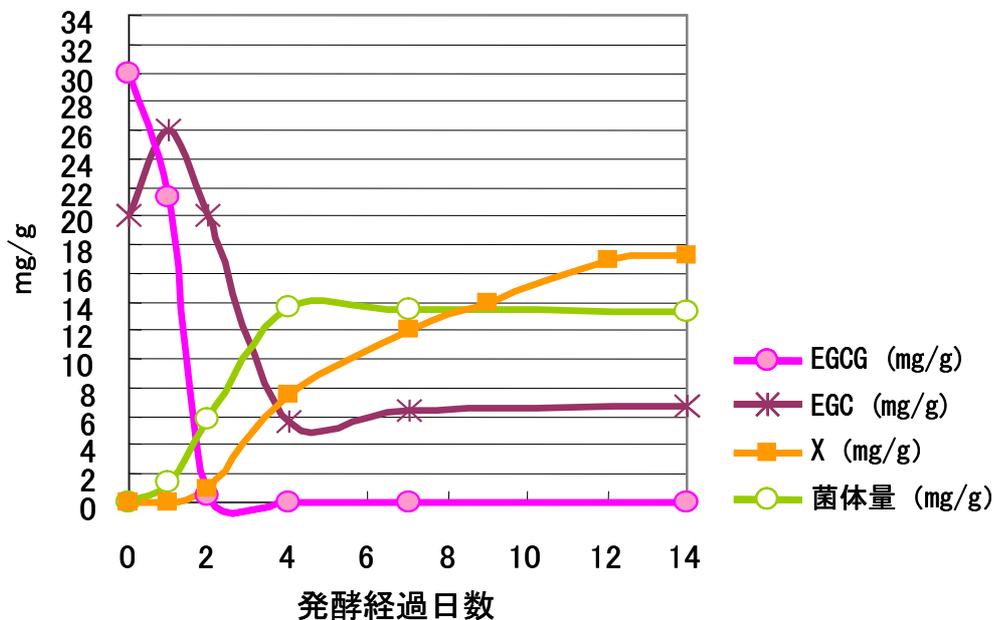


図 4. 培養装置で半固体培養した発酵物の発酵期間中の EGCG、EGC、X成分および菌体量の変化
(体量は乾燥発酵物中のグルコサミン量を測定)

3.3 研究成果のまとめと今後の取り組み

茶葉から黒茶ポリフェノール(X成分)を生成する優良な *Aspergillus* 属菌を選抜し、これらを用いた固体発酵および半固体発酵の両発酵法において生産させることが出来た。フラスコ試験において茶抽出物を発酵系へ添加することでX分量が増加することを確認した。更に、小型培養装置を用いた半固体発酵においても同じ結果が得られた。

なお、ここではX成分の生産方式としては、大量発酵が容易で既存の醸造機械の活用が可能な固体発酵方式が現時点で実用的な方法と判断し、第4章の黒茶ポリフェノールの抽出・素材化試験用の試料を固体発酵法で調整し、一番食品に提供した。

半固体発酵法のスケールアップ技術には課題が残るものの、効率的なX成分発酵生産法としての可能性が示されたことから、今後、中型および大型培養装置における最適培養条件を確立する。

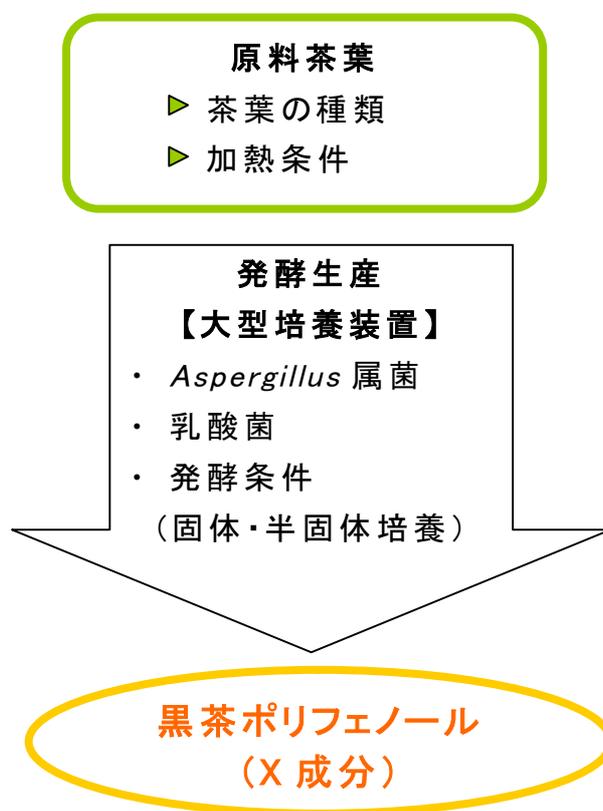


図 5. 黒茶ポリフェノール(X成分)生成のスケールアップ技術

第4章 黒茶ポリフェノールの抽出と素材化技術の検討

一番食品株式会社

4.1 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

本プロジェクトにより開発を行う高濃度の黒茶ポリフェノール(X成分)を含有する茶発酵物より、同成分の工業的な抽出・素材化技術を確立する。

また、得られた黒茶ポリフェノール素材について、成分的安定性および食品素材としての加工適性等を評価し、更にこれを用いた製品モデルの試作を行うことで、研究終了後に速やかに事業化・商品化へと移行させる。

4.2 研究成果

4.2.1 発酵黒八女茶

当研究チームでは、平成19年度から20年度に実施した経済産業省委託 地域資源活用型研究開発事業において麹菌を用いた固体発酵茶である「発酵黒八女茶」を開発・商品化した(図1)。本課題では、この生産方法をモデルとして開発された高濃度黒茶ポリフェノールを含有する固体発酵茶を用い、黒茶ポリフェノールの抽出・素材化技術について検討を行った。



図1. 発酵黒八女茶 (商品外観と発酵茶葉)

4.2.2 黒茶ポリフェノールの素材化技術の確立

本課題では発酵茶葉よりX成分を抽出・精製し、素材化する技術の開発に当たり、福岡県醤油醸造協同組合が選定した菌株を用い、同組合が固体発酵法により中規模スケールで生産した発酵茶葉を原料素材として用いた(第3章参照)。

黒茶ポリフェノールの素材化試験は、食品素材からの成分抽出を専門とするA社が保有する工業的抽出ラインを用いて実用規模にて実施した。

ここでは、黒茶ポリフェノールの素材化技術として、熱水抽出法(発酵茶葉を熱水抽出し、噴霧乾燥により粉末化)、および樹脂処理法(乾燥茶葉を熱水抽出し、これを樹脂処理して得られた画分を噴霧乾燥により粉末化)の2通りで検討した。樹脂処理法的主要な工程を図2に示す。熱水抽出法については、樹脂処理工程を経ない以外は基本的に樹脂処理法と同様である。

図2の工程において採取した熱水抽出液および樹脂処理画分(賦形材添加前)を粉末化した試料についてポリフェノール分析を行った結果を図3に示す。



図2. 黒茶ポリフェノールの樹脂処理工程

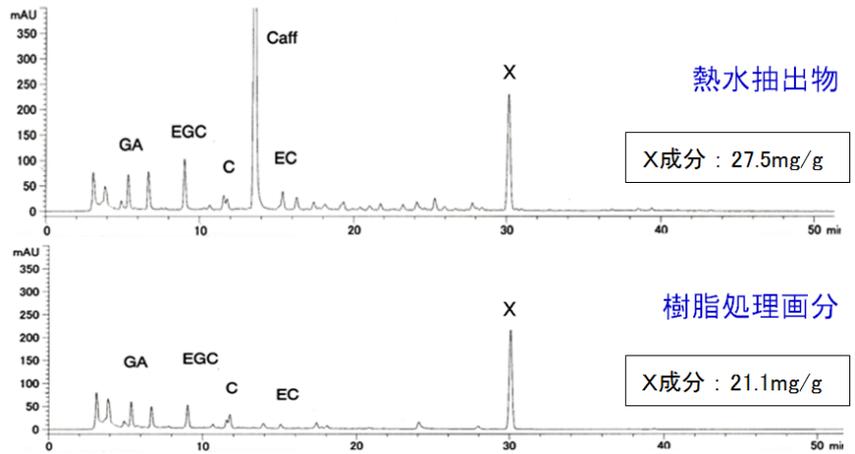


図3. 抽出画分のポリフェノールクロマトグラム

図3より、ポリフェノール成分に限定して考察すれば、熱水抽出物はX成分の濃度が高いが、カテキン類やカフェインなどの共存物も多いことがわかる。一方、樹脂処理画分はX成分がほぼ単独な粗精製状態にあることがわかる。

熱水抽出法および樹脂処理法は共に工業生産に移行することは可能であり、黒茶ポリフェノールの含有濃度レベルに応じた素材化技術として確立することができた。

4. 2. 3 黒茶ポリフェノール素材の機能性評価

前項で得られた発酵茶の熱水抽出物、樹脂処理画分(黒茶ポリフェノール素材)について血液循環能(ヒト赤血球変形能)の改善効果を評価した(図4)。

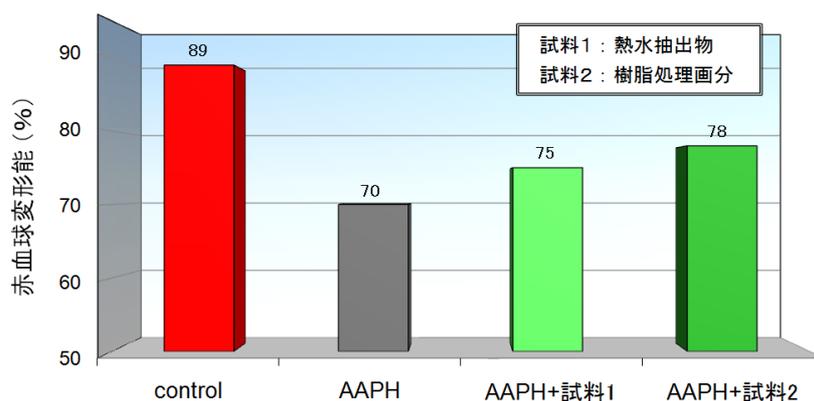


図4. 抽出画分の血液循環能改善効果

図4の通り、発酵茶の熱水抽出物および樹脂処理画分には、共に血液循環の改善傾向が認められ、この内、樹脂処理画分が最も効果が高かった。すなわち、樹脂処理によりX成分を粗精製状態にすることで同効果が更に高まることが示された。

以上より、樹脂処理画分はX成分がほぼ単独で存在し、高い水溶性と、生体調節機能として血液循環能改善効果を有しているため、機能性食品素材としての利用適性が高く、本研究プロジェクトの目的物である黒茶ポリフェノール素材として適合したものであると考えられた。

4.2.4 黒茶ポリフェノールの安定性評価

X成分について、各種食品状態での成分的安定性を評価するため、以下の2試料を用いた長期保存試験を実施した。X成分濃度の経時変化を図5に示す。

■発酵黒八女茶(乾燥物試料)

先行製品「発酵黒八女茶」(1.5g/ティーバッグ1袋)を24か月間、25°Cで保管した。定期的にサンプリングし、発酵茶葉に100倍量の熱水を加えて85°Cで20分間抽出した。

■発酵黒八女茶ドリンク(水溶液試料)

発酵黒八女茶ドリンク(1本500ml当たり発酵茶葉4gを使用)を17か月間、25°Cで保管し、定期的にサンプリングした。

図5より、X成分は乾燥物状態では濃度減少は認められず、極めて安定性が高いことが確認された。

水溶液状態では、X成分は12か月目で20%程度の濃度減少が認められたが、比較的安定に残存していた。

従って、X成分は安定性の観点からも種々の食品形態に対応した機能性食品素材として利用性が高いと考えられた。

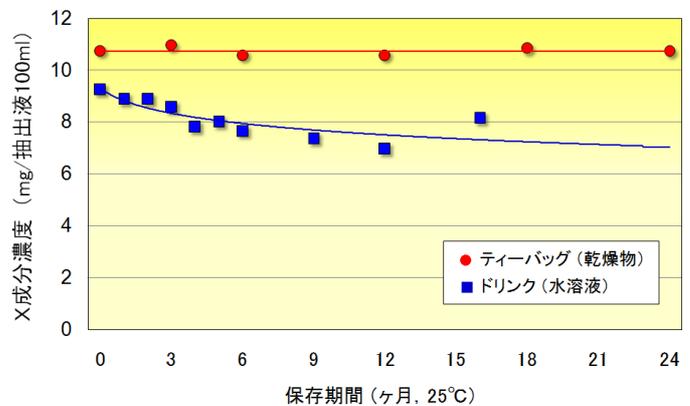


図5. X成分の安定性評価

4.2.5 黒茶ポリフェノール素材を用いた製品試作

本研究で開発を行う黒茶ポリフェノール素材については、別に実施したヒト臨床試験や第5章の動物試験などの医学的評価の結果より、抗メタボリックシンドローム効果、心臓血管病のリスク低減など有効な生体調整機能のエビデンスが得られている。このことは、黒茶ポリフェノール素材を効果的に摂取することにより、国民の健康維持・向上に大きく寄与することが期待できるものである(図6)。

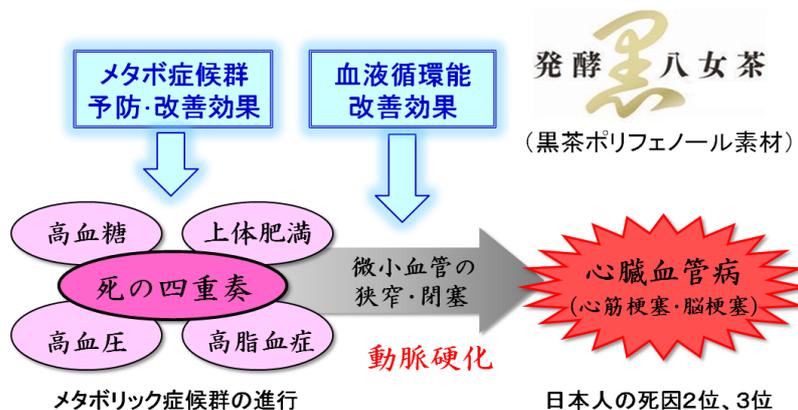


図6. 黒茶ポリフェノール素材による心臓血管病リスクの低減

本研究では、これらの医学的エビデンスに基づき、開発した発酵茶および黒茶ポリフェノール素材を用いて、①発酵茶葉(乾燥・粉碎加工品)、②抽出エキスパウダー、③ゼリー、④ドリンク、⑤カプセル・タブレットといった種々の製品モデルを実用レベルで試作した(図7)。

すなわち、これらの試作品はそれぞれ、①食品原料素材、②機能性食品素材、③明らか食品、④健康飲料、⑤機能性・健康食品といったあらゆる食品形態やカテゴリーに対応したものであり、黒茶ポリフェノール素材の応用範囲が極めて広いことを示すものである。



図7. 黒茶ポリフェノール素材を用いた製品モデル

4.3 研究成果のまとめと今後の取り組み

本研究では、ファーマントミクス(統合微生物発酵制御技術)による黒茶ポリフェノールの効率的生産技術として、麹菌を用いた茶葉の固体発酵法を確立させた。これと並行して、更なる生産性の向上を目指した半固体発酵(スラリー発酵)法について第2章、第3章で示された通り現在も検討が進められているところである。

また、茶発酵物に含まれる黒茶ポリフェノールの素材化技術としては、平成21年度に実用規模での熱水抽出および粉末化技術を確立し、更に平成23年度には樹脂処理による抽出・精製技術も確立した。

すなわち、本研究では発酵技術として、①固体発酵法と②半固体発酵(スラリー発酵)法、また抽出・素材化技術として、③熱水抽出法と④樹脂処理法を検討し、本年度中に①、③および④の技術を確立した。茶発酵物の生産性、物性および成分組成、更に次章の医学的評価の結果を指標として、これらの生産技術を適切に組み合わせることで、黒茶ポリフェノールを高濃度含有し、かつ優れた生体調節機能を有する機能性食品素材の開発が可能である。

本研究では、確立した固体発酵技術と抽出・素材化技術により得られた黒茶ポリフェノール素材を用いたタブレットや飲料等、数種の製品モデルを実用レベルで試作しており、その事業化は極めて現実的な段階に達している。

本研究事業の終了後は、速やかに開発した黒茶ポリフェノール素材および各製品モデルについて、一番食品の通信販売事業を中心に商品化、事業化への展開を図る予定である。

第5章 黒茶ポリフェノールの医学的評価

株式会社レオロジー機能食品研究所

5.1 プロジェクト全体における本研究開発部分の位置づけ

発酵プロセス技術により生産された機能性食品素材の生体機能性について、医学的手法により、抗メタボリックシンドローム効果、血液循環能(ヒト赤血球変形能)改善効果、および抗毒性効果等を評価する。

これによって、目的機能性に対応した指標を設定すると共に、製造プロセスの最適化と、それぞれのプロセス制御の精密化を促進する。また、安全性試験を行うことでヒトへの効果評価を行う上での知見を得る。

5.2 研究成果

5.2.1 抗メタボリックシンドローム効果

1) 茶抽出黒物の効果

(1) 9週齢の肥満Ⅱ型糖尿病モデルラット(ZDFラット)に、発酵茶の熱水抽出物(以下、黒茶抽出物)0.65%を含有する固型飼料を4週間自由摂取させた。対照群には固型飼料のみを自由摂取させた。その結果、12週齢において、試料投与群が有意に低体重を示した。

(2) 5週齢糖尿病モデルマウス(KK-Ayマウス)に黒茶抽出物0.4%と0.05%アスコルビン酸を含有する飲料水を自由摂取させ、対照群には0.05%アスコルビン酸飲料水を自由摂取させた。その結果、有意な血糖値の低下、総コレステロール、中性脂肪の低下が見られた。

(3) 9週齢自然発症高血圧ラット(SHRラット)において、黒茶抽出物(0.65%)を含む固型飼料を投与した群と、黒茶抽出物を含まない固型飼料を投与した対照群とを比較した。その結果、黒茶抽出物投与群で統計的に有意な著明な血圧低下が認められた。また、肝機能の有意な改善と、有意な脂質代謝の改善(HDLコレステロールの上昇)が見られた。

2) 黒茶ポリフェノール(X成分)の効果

(1) 5週齢糖尿病モデルマウス(KK-Ayマウス)に、発酵茶熱水抽出物より抽出、精製(結晶化)した黒茶ポリフェノール(X成分)0.01%と、0.05%アスコルビン酸を含有する飲料水を自由摂取させ、対照群には0.05%アスコルビン酸飲料水を自由摂取させた。その結果、統計的に有意な血糖値の低下、総コレステロール、中性脂肪、尿素窒素の低下が見られた。

(2) 9 週齢自然発症高血圧ラット(SHR ラット)において、精製X成分(0.013%)を含む固型飼料を投与した群と、X成分を含まない固型飼料を投与した対照群とを比較した。その結果、X成分投与群で血圧低下傾向が認められた。

5. 2. 2 抗毒性効果

1) 黒茶抽出物の効果

(1) 8 週齢の汎臓器異常モデルラット(STZ 投与ラット)において、黒茶抽出物(0.65%)含有固型飼料を 3 週間自由摂取させた。その結果、対照群に比し血糖異常高値、中性脂肪異常高値を統計的に有意に防止した。また、肝機能悪化、腎機能悪化、赤血球変形能の悪化を防止する傾向を示した。

(2) 第 4 章で述べられているように、ヒト赤血球酸化モデル(AAPH 負荷)において、黒茶熱水抽出物は赤血球変形能の改善傾向を示した。一方、緑茶抽出物では全く効果が見られなかった。

2) X成分の効果

(1) 8 週齢の汎臓器異常モデルラット(STZ 投与ラット)において、精製X成分を 0.013%含有する固型飼料を 3 週間自由摂取させた。その結果、X成分投与群で統計的に有意ではなかったが、肝機能悪化、腎機能悪化、赤血球変形能の悪化を防止する傾向を示した。

(2) ヒト赤血球酸化モデル(AAPH 負荷)において、精製X成分は有意に赤血球変形能悪化を防止した。

5. 2. 3 赤血球変形能に対する効果

1) 黒茶抽出物の効果

(1) 汎臓器異常モデルラット(STZ 投与ラット)において、対照群に比し赤血球変形能の悪化を防止する傾向を示した

(2) ヒト赤血球酸化モデル(AAPH 負荷)において、有意に赤血球変形能の悪化を抑制した。

2) X成分の効果

(1) 汎臓器異常モデルラット(STZ 投与ラット)において、対照群に比し赤血球変形能の悪化を防止する傾向を示した。

(2) ヒト赤血球酸化モデル(AAPH 負荷)において、有意に赤血球変形能の悪化を抑制した。

5. 2. 4 黒茶抽出物およびX成分の安全性について

1) 黒茶抽出物について

(1) 急性経口毒性試験

試験群には2000mg/kgの用量の検体を、対照群には溶媒対照として注射用水を雌雄ラットに単回経口投与し、14日間の観察を行った。その結果、観察期間中に死亡例は認められなかったことから、検体のラットにおける単回経口投与によるLD50値は、雌雄ともに2000mg/kg以上であるものと考えられた。

(2) 復帰突然変異試験

黒茶抽出物の突然変異誘起性を調べる目的で、「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」(平成11年11月1日 医薬審第1604号)の別添「遺伝毒性試験ガイドライン」に従い、*Escherichia coli* WP2uvrA 及び *Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて復帰突然変異試験を実施した。検体について、313~5000 µg/プレートの用量で試験を行った。その結果、復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は、陰性と結論した。

(3) 小核試験

黒茶抽出物についてマウスによる小核試験を行った。試験群には2000mg/kg/dayを24時間間隔で2回経口投与し、2回目投与の23~24時間後に骨髄塗抹標本作製した。1個体当たり2,000個の幼若赤血球(IE)を観察し、その中に含まれる小核を有する幼若赤血球(MNIE)出現率(%)を算出した。また、全赤血球数を1個体につき1000個以上観察し、全赤血球中に占めるIEの割合[IE(%)]を求めた。これらより、骨髄幼若赤血球に対する小核誘発性(染色体異常誘発性)および骨髄細胞増殖抑制作用について検討した。その結果、陰性対照群(媒体)と比較して、被験物質群の小核出現率に有意な増加は認められなかった。

2) X成分について

急性経口毒性試験

試験群には 150mg/kg の用量の検体を、対照群には溶媒対照として注射用水を雌雄ラットに単回経口投与し、14 日間の観察を行った。その結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。このことから、検体のラットにおける単回経口投与による LD50 値は、雌雄ともに 150mg/kg 以上であるものと考えられた。

5.3 研究成果のまとめと今後の取り組み

3 年間に当研究所が行った研究成果を総括すれば以下の通りである。

- 1) 発酵茶の医学的有効性を抗メタボリックシンドローム効果、抗毒性効果、血液循環能改善効果を中心に検討した結果、その全てに有効性を示した。特に、糖尿病、高血圧症、肥満症に著明な効果を示した
- 2) 発酵茶より本研究の指標成分である黒茶ポリフェノール(X成分)を抽出・精製(結晶化)する事に成功した。それが新規物質である事は第 2 章で述べられている通りである。
- 3) X成分単独の医学的有効性はクルードの発酵茶熱水抽出物とほぼ同様であった。このことは発酵茶の医学的有効性の重要な部分がX成分に起因するものである事を示している。また、X成分が緑茶には存在しないこと、ヒト赤血球変形能改善効果が緑茶にはなく、発酵茶には認められたことより、上記医学的効果のほとんどは発酵茶固有のものである事を示している。
- 4) 発酵茶およびX成分の安全性について、法定の動物安全性試験を行った結果、安全性に全く問題は見られなかった。

以上の結果から、本発酵茶がメタボリックシンドローム、ストレス毒性、血液循環不全(脳梗塞、心筋梗塞)が最大の健康課題となっている時代状況に対応した優れた機能性食品となることを示し、またその事業化が大いに期待されるものである。

今後も、当研究チームによりファーマメントミクスを駆使して生産された発酵茶試料や製品モデルについても機能性エビデンスを確立するための医学的評価を行っていく予定である。

第6章 全体総括

事業管理者 一番食品株式会社

6.1 研究の背景・目的

本研究チームでは、平成19年度から20年度に実施した経済産業省委託の地域資源活用型研究開発事業において、福岡県の地域資源「八女茶」を原料に、微生物発酵茶の実用生産に成功した。その過程で、茶葉に含まれるポリフェノール類より生成する新規成分「黒茶ポリフェノール」を見出し、その一部がヒト赤血球変形能の低下抑制（血液循環能改善効果）を示すこと、および α -グルコシダーゼ阻害活性とリパーゼ阻害活性を有することを発見した。

本研究開発では、生体触媒（微生物、酵素）を組み合わせ、有用物質を発酵生産する統合微生物発酵制御技術「ファーマントミクス」により、茶葉を原料とし「黒茶ポリフェノール」を含む高品質で多様な機能性食品素材を製造する高度な発酵制御技術の開発を目的とする

6.2 研究の概要

本研究では、発酵技術として茶葉の麹菌発酵あるいは酵素等による分解と、目的成分である黒茶ポリフェノール(X成分)へのバイオコンバージョンを効率的に進めるため、本成分に連動した「指標」を選定し、発酵条件の最適化を検討した。

また、黒茶ポリフェノールの構造決定を行うと共に、発酵茶葉、抽出物、試作素材などの医学的評価を行い、生体機能性の観点からも発酵条件の的確性を検証した。

6.3 実施内容

6.3.1 茶葉の最適発酵制御条件の検討（九州大学大学院）

発酵茶葉に含まれる黒茶ポリフェノール(X成分)の構造決定を行った。その結果、X成分は、従来のカテキン類とは異なる構造を有する新規化合物であることが明らかになった(図1)。

次に、X成分を簡易かつ効率的に生成するため液体発酵系の検討を行ったがX成分の生成は見られなかった。しかし、半固体発酵では *Aspergillus* 属菌においてX成分の生成が見られた。そこで、同菌株を用いた半固体発酵における各種成分の変化を調べた結果、EGCG、EGC、没食子酸の増減に伴いX成分の生成が見られ、半固体発酵技術確立のための指標を得た。

従来の固体発酵と比較すると、X成分の生成量やコスト的な面において解決すべき点多いが、これらの問題を解決することで発酵制御が容易になり、X成分の効率的かつ安定な生産のための検討を円滑に進めることができると考えられた。

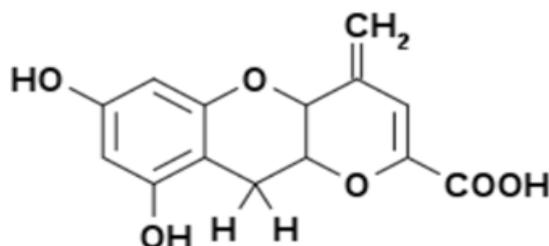


図1. 黒茶ポリフェノール(X成分)の構造

6.3.2 実用規模培養装置による発酵制御条件の検討（福岡県醤油醸造協同組合）

黒茶ポリフェノール(X成分)の生産性は、原料茶葉の種類および加熱温度の影響を受けた。市販種麹菌9種の中から、茶葉からX成分の生成に適した2種の優良な *Aspergillus* 属菌を選抜した(A株、B株)。*Aspergillus* 属菌A株と同属のB株のX成分生産性は異なり、B株はA株よりも高い生産性を示した。

これらを用いた固体発酵および半固体発酵の両発酵法においてX成分を生産させることができ、半固体発酵法は固体発酵法に比べて固形分当たりのX成分の生産性が高いことを確認した(図2)。

また、エピガロカテキンガレート(EGCG)を発酵系へ添加することでX成分の生産量が増加することを確認し、更に小型培養装置を用いたB株による半固体発酵においても同様の結果が得られた(図3)。このことから、半固体発酵法はスケールアップ技術に課題が残るものの効率的なX成分の発酵生産法としての可能性が示された。

現段階でX成分の実用的な生産法として、大量発酵が容易で既存醸造機械の活用が可能な固体発酵法で、X成分の抽出・素材化試験用の発酵茶葉を調整し、一番食品に提供した。

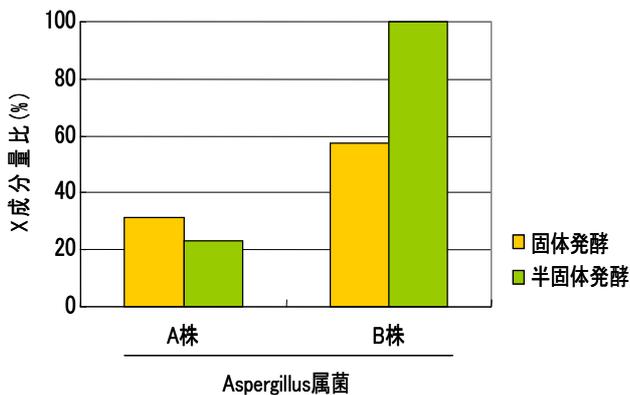


図2. *Aspergillus* 属菌 A、B 株の固体発酵、半固体発酵によるX成分生産量

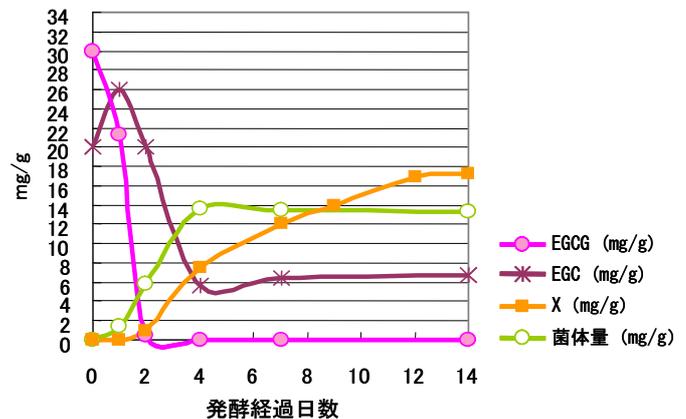


図3. 半固体培養した発酵物のカテキン類、X成分および菌体量の変化

6.3.3 黒茶ポリフェノールの抽出と素材化技術の検討（一番食品）

発酵茶葉からの黒茶ポリフェノール(X成分)の抽出・素材化技術として、熱水抽出法および樹脂処理法について工業生産ラインを用いた検討を行い、共に実用レベルで確立することができた。熱水抽出法により得られた熱水抽出物はコストおよび収量の点から生産性が高く、一方、樹脂処理法によりポリフェノール成分としてX成分が粗精製状態となった樹脂処理画分(黒茶ポリフェノール素材)を得ることができた(図4)。

上述の熱水抽出物および樹脂処理画分の生体調節機能として血液循環能(ヒト赤血球変形能)改善効果を評価した結果、樹脂処理画分が高い効果を有することを確認した。

長期保存試験により、食品(乾燥物・水溶液)状態でのX成分の成分的な安定性を確認し、機能性食品素材としての利用適性についても良好な評価を得た。

更に、様々な食品形態に適合した商品展開を図るため、黒茶ポリフェノール素材を用いた製品モデルとして、タブレット、カプセル、ゼリーおよび飲料などを実用レベルで試作した(図5)。

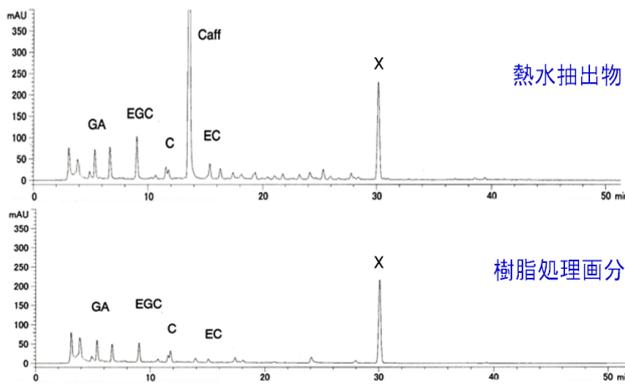


図4. 抽出画分のポリフェノールクロマトグラム



図5. 黒茶ポリフェノール素材の製品モデル

6. 3. 4 抗黒茶ポリフェノールの医学的評価（レオロジー機能食品研究所）

発酵茶の医学的有効性を抗メタボリックシンドローム効果、抗毒性効果、血液循環能（ヒト赤血球変形能）改善効果を中心に検討した結果、その全てに有効性を示した。特に、糖尿病、高血圧症、肥満症に著明な効果を示した。

本課題では、発酵茶より本研究の指標成分である黒茶ポリフェノール（X成分）を抽出・精製（結晶化）する事に成功した。それが新規物質であることは6. 3. 1項で示された通りである。

X成分単独の医学的有効性はクルードの発酵茶熱水抽出物とほぼ同様であった。このことは発酵茶の医学的有効性の重要な部分がX成分に起因するものである事を示している。また、X成分が緑茶には存在しないこと、ヒト赤血球変形能改善効果が緑茶にはなく、発酵茶に認められた事より、上記医学的効果のほとんどは発酵茶固有のものである事を示している。

更に、発酵茶およびX成分の安全性について、法定の動物安全性試験を行った結果、安全性に全く問題は見られなかった。

以上の結果は、本発酵茶がメタボリックシンドローム、ストレス毒性、血液循環不全（脳梗塞、心筋梗塞）が最大の健康課題となっている時代状況に対応した優れた機能性食品となる事を示し、またその事業化が大いに期待されるものである。

6. 4 成果の優位性、今後の展望

本研究開発では、有用物質を発酵生産する統合微生物発酵制御技術「ファーメントミクス」により、茶葉を原料とし新規成分「黒茶ポリフェノール」を含む高品質で多様な機能性食品素材を製造する高度な発酵制御技術について検討を行った。

①統合微生物発酵制御技術「ファーメントミクスの」確立

半固体発酵はスケールアップ技術に課題が残るものの、効率的な黒茶ポリフェノールの発酵生産法として技術を確立させるための有用な指標が得られ、その可能性が示された。今後も補完研究により中型および大型培養装置における最適生産技術を確立していく。

②黒茶ポリフェノールの機能性食品・医療分野への展開

茶葉の微生物発酵の過程で選択的に生成される新規成分「黒茶ポリフェノール」について、その構造（特許出願中）、および医学的機能を示したことは、抗加齢（アンチエイジング）研究の

観点から学術的な意義は大きい。今後、同成分について更に詳細な代謝プロセス、医学的機能および生体メカニズムを解明、実証することにより、医療分野への応用展開が期待される。

③黒茶ポリフェノールの事業展開

上述の医学的機能が実証された抗加齢食品を開発し、市場投入することは、脳梗塞や心梗塞などの生活習慣病の予防や治療に対する選択肢が広がり、国民の健康の維持・増進に大きく寄与することを示唆している。黒茶ポリフェノールを配合した製品は顧客4万人を擁する一番食品の通信販売事業を中心とした事業化を計画すると共に、同成分を機能性素材として販売力の強い業者にも供給することで多方面から新規市場を創出し、その普及に務めていく。

以上の技術課題への対応、黒茶ポリフェノールに関する探査および事業化モデルの検討を今後も継続することにより、5年後を目途に本研究開発成果の事業展開を目指す。

6.5 成果実績

①特許出願

名 称 : 医薬用組成物

特許出願番号(特許出願日): 特願2011-088448(2011年4月12日)

特許出願人 : 株式会社レオロジー機能食品研究所、福岡県醤油醸造協同組合、九州大学大学院農学研究院、一番食品株式会社

②発表等

名称(発表者): 食品開発展2010 企業プレゼンテーション(一番食品)

発表日 : 2010年10月14日

題 目 : 地域資源の高付加価値化と商品開発～黒麹発酵!発酵黒八女茶～

名称(発表者): 食品開発展2011 企業プレゼンテーション(一番食品)

発表日 : 2011年10月6日

題 目 : 産学官連携による高品質な黒麹発酵茶の開発～発酵黒八女茶～

名称(発表者): 日本農芸化学会 2012年度農芸化学会大会 一般講演(九州大学)

発表日 : 2012年3月23日

題 目 : 発酵黒八女茶由来機能性ポリフェノールX成分の構造解析およびその機能性

平成23年度 戦略的基盤技術高度化支援事業
ファーマントミクス(統合微生物発酵制御技術)による
黒茶ポリフェノールの生産と素材化技術の開発

研究開発成果等報告書

平成24年3月

委託者 九州経済産業局
〒812-8546 福岡市博多区博多駅東 2-11-1

委託先 一番食品株式会社
〒820-8601 福岡県飯塚市伊川 1115
TEL 0948-26-1689 FAX 0948-26-1698