

烏龍茶の亜臨界水抽出による効果

吴 媛媛 (浙江大学 茶学部, yuanyuanwu983050@163.com)
 横田 正 (愛知学泉短期大学 食物栄養学科, tyokota@gakusen.ac.jp)
 河合 智也 (静岡大学 農学部, q27c73784bz8x@softbank.ne.jp)
 木戸 康嗣 (静岡大学 農学部, suc10584@po4.across.or.jp)
 高橋 しほり (静岡大学 農学部, pickky_pokky_aniko13@yahoo.co.jp)
 宮下 知也 (静岡大学 創造科学技術大学院, p52102001@yahoo.co.jp)
 杉浦 敏文 (静岡大学 電子工学研究所, jktoshiohai2004@docomo.ne.jp)
 屠 幼英 (浙江大学 茶学部, youyutu@zju.edu.cn)
 衛藤 英男 (静岡大学 農学部, srqe4yjl@qc.commufa.jp)

Effect for oolong tea by sub-critical water extraction

Yuanyuan Wu (Department of Tea Science, Zhejiang University, China)
 Tadashi Yokota (Nutrition and Food Sciences, Aichi Gakusen College, Japan)
 Tomoya Kawai (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Koji Kido (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Shihori Takahashi (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)
 Tomoya Miyashita (Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Japan)
 Toshifumi Sugiura (Research Institute of Electronics, Shizuoka University, Japan)
 Youying Tu (Department of Tea Science, Zhejiang University, China)
 Hideo Etoh (Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Japan)

要約

近年、烏龍茶は一般的な飲料の一つとなったが、烏龍茶製造工程において品質の悪い烏龍茶葉が未利用資源として多く存在している。これら低品質の烏龍茶葉を亜臨界水により抽出することで、香氣成分などをはじめとした多くの成分を抽出することができ、高品質化に期待ができる。そこで、烏龍茶葉の熱水抽出サンプルと亜臨界水抽出サンプルとの官能評価、各成分の比較を行った。官能評価では亜臨界水抽出サンプルのほうが、熱水抽出サンプルよりも優れており、3 MPa、130 °Cでの抽出が最も良好であった。熱水抽出サンプルより凍結乾燥物重量は多く、タンパク質、総アミノ酸、グルコース、ガラクトース、マンノース含有量も多かった。また、烏龍茶に重要な香氣成分であるリナロール、ゲラニオールおよびヘキサナールの量は顕著に上昇し、さらに脳波測定によりリラックス効果も確認された。これらの結果から、亜臨界水抽出は低品質の烏龍茶の高品質化に適していることが分かった。

キーワード

烏龍茶, 亜臨界水抽出, リナロール, ゲラニオール, 脳波測定

1. はじめに

近年、烏龍茶は一般的な飲料の一つとなり、大きな市場を形成するようになった。中国では、烏龍茶製造工程において、色、形、および味の観点で除外された品質の悪い烏龍茶葉が未利用資源として多く存在する。これら低品質烏龍茶葉の効果的な利用により、製茶企業の負担軽減、茶産業の活性化が期待される。

一方、以前より天然物からの抽出において亜臨界水を用いた研究が行われている。大麦からの亜臨界水抽出では、より機能性を持った麦茶様エキスを得ることが報告され (Kulkarni et al., 2008)、生コーヒー豆からの亜臨界水抽出でも機能性を持ったコーヒー様エキスを得ることができた (横田他, 2014)。緑茶の亜臨界水抽出は、高濃度カテキン含有でありながら苦渋味を抑制し、飲みやすい飲料となった (Miyashita et al., 2013, 2014, 2015)。低品質の烏龍茶葉の亜臨界水抽出を行うことで、特徴的な成分が多く抽出され、烏龍茶の高品質

化に期待できる。そこで、本研究では、低品質の烏龍茶葉の熱水抽出物と亜臨界水抽出物のタンパク質、総アミノ酸、全糖、単糖、官能評価について分析、定量を行った。さらに、最も官能評価が良好であった亜臨界水抽出物と熱水抽出物の香氣成分および脳波測定を実施した。

2. 実験方法

2.1 試料

- (1) 烏龍茶葉
 烏龍茶葉は、中国浙江大学から提供された製造工程で除かれた鉄観音茶を用いた。
- (2) 試料の調整
 - (a) 官能評価、タンパク質、総アミノ酸、全糖、単糖および脳波測定の分析のための試料
 亜臨界水抽出は烏龍茶葉 10 g に水 250 ml を加え、亜臨界水抽出装置 (静甲株式会社製) にかき (Etoh et al., 2012; Miyashita et al., 2014)、圧力 3 MPa、到達温度は、110、120、130、140 °C に設定し、各温度に達した後その温度で 5 分間保持し抽出した。また、熱水抽出は烏龍茶葉 10 g を 100 °C の熱水 250 ml で 5 分間抽出した。これらを濾

紙によって濾過し、それぞれ亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルとした。

(b) 香気成分の分析のための試料

亜臨界水抽出は烏龍茶葉4 gに水200 mlを加え、亜臨界水抽出装置（静甲株式会社製）にかけ、圧力3 MPa、到達温度は130 °Cに設定し、130 °Cに達した後、その温度で5分間保持し抽出した。また、熱水抽出は烏龍茶葉4 gを100 °Cの熱水200 mlで5分間抽出した。これらを濾紙によって濾過し、それぞれ亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルとした。

2.2 官能評価法

本研究室の研究員5名により、熱水抽出サンプルおよび110 °C、120 °C、130 °C、140 °Cの各亜臨界水抽出サンプルを熱水で4倍希釈し、色、味、香りについて官能評価を実施した。評価の高いほうから順にA、B、C、Dの4段階で評価した。

2.3 各成分の定量

(1) タンパク質の定量

亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルの凍結乾燥物を2.5 mg/ml に調製し、測定サンプルとした。この測定サンプルをProtein Quantification Kit（株式会社同仁化学研究所製）で処理し600 nmの吸光度を測定しタンパク質量を算出した。

(2) 総アミノ酸の定量

亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルの凍結乾燥物を5.0 mg/ml に調製し、測定サンプルとした。この測定サンプルを0.45 μmメンブレンフィルターで濾過し、アミノ酸分析機（株式会社日立ハイテクノロジーズ製L-8900型）に供し、16種類のアミノ酸について分析し、これらを合計して総アミノ酸量とした。

(3) 全糖の定量

亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルの凍結乾燥物を3.0 mg/ml に調製し、測定サンプルとした。この測定サンプルをフェノール-硫酸法にて、標準試料にグルコースを使用し、グルコース相当量として算出した。

(4) 単糖の定量

ABEE (4-アミノ安息香酸エチルエステル) 標識試薬によって標識化された単糖を、HPLCで分析し定量する方法を用いた。亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルの凍結乾燥物2 mgに蒸留水10 μlを加え、測定サンプルとした。グルコース、マンノース、ガラクトースも同様に蒸留水で希釈し、検量線サンプルとした。各測定、検量線サン

プルにABEE 標識試薬を40 μl加えた後、混合し、80 °Cで60分保ったことで標識化した。そこに、蒸留水とクロロホルムを200 μlずつ加え混合し、上層を0.45 μmメンブレンフィルターで濾過しHPLCで分析した。検量線を作製し、亜臨界水サンプル、熱水抽出サンプルの各単糖量を算出した。HPLCの使用カラム、測定条件は以下の通りであった。

Column: Honenpak C18 (Φ4.6×75 mm), Mobile phase A: 0.2 M K/B buffer, Mobile phase B: CH3CN, Gradient: Mobile phase B 0→20 min (0→6%), 20→35 min (6→50%), 35→45 min (50→50%), Flow rate: 1 ml/min, Temp.:45 °C, Detector: 305 nm.

2.4 香気成分の測定

亜臨界水抽出サンプル、熱水抽出サンプルからTwisterを用いたSBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) 法によって香気成分を抽出する方法を用いた。各抽出サンプル10 mlにTwister-Iを加えSBSEによって60分間抽出した。その後Twister-IIを取り出し、NaClを3 g加えて塩析しTwister-IIを加えてさらにSBSEによって60分間抽出した。その後Twister-IIを取り出し、Twister-Iと併せてGCインサートへ移し、GC-MS分析に供した。各香気成分量は、GC分析で得られたピーク面積を、同時に得られたカフェインの面積に対する比で示した。GCの分析条件は以下の通りである。

Column: J & W Scientific DB-WAX (60 m×0.25 mm ID×0.25 μm DF), Carrier gas: He, Carrier gas flow rate: 1.87 (ml/min), injector: 250 °C, Column oven temp.: 40 °C, 2 min → 250 °C (5 °C/min)、21 min.

2.5 脳波測定

各サンプルを蒸留水で2倍に希釈したものを湯浴加熱して90 °Cとしてニオイを呈示し、脳波の測定を行った。ニオイ呈示は呈示前安静2分、ニオイ呈示2分、ニオイ呈示後2分の計6分で行った。測定方法には吉田法による快適度評価を用いて測定した。脳波測定における電極の位置は、前額部のFp1、Fp2でα波を測定した（吉田, 2002; 杉浦他, 2008）。約20秒ごとに脳波から興奮、沈静と快、不快を読み取り、眼球電位等の雑音の多い脳波は解析対象から除いた。

3. 実験結果および考察

3.1 官能評価

熱水抽出サンプルおよび各温度の亜臨界水抽出サンプルの官能評価の結果を表1に示した。亜臨界水抽出130°Cが最も

表1：熱水および亜臨界水抽出サンプルの官能評価

サンプル	香り	味	色	pH	ランク
熱水抽出物	D	D	C	5.19	5
110 °C	D	D	C	5.14	4
120 °C	B	B	C	5.08	2
130 °C	A	A	C	5.03	1
140 °C	C	C	C	5.00	3

良い評価であった。熱水抽出サンプルでは、低品質烏龍茶のカビ臭さがあつたが、130℃、140℃では、これらのカビ臭さがなくなり、紅茶様の芳香へと変化した。色に関しては、大きな変化は認められなかった。過去の研究において単糖が亜臨界水処理によって有機酸になるという報告(藤村他, 2014)があることから、烏龍茶葉から抽出された単糖、もしくは多糖から加水分解して生成した単糖が有機酸になったと考えられる。

3.2 凍結乾燥物重量の測定

凍結乾燥物重量は、亜臨界水抽出サンプルのほうがすべての温度帯で熱水抽出サンプルより多かつた(図1)。また、温度帯による変化は、110℃から140℃にかけて温度の上昇とともに抽出量も上昇した。これまでの研究においても温度上昇とともに抽出量は増大しており、烏龍茶葉の抽出においても、亜臨界抽出のほうが熱水抽出よりも抽出能が高く、より高品質化に期待ができると考えられた。

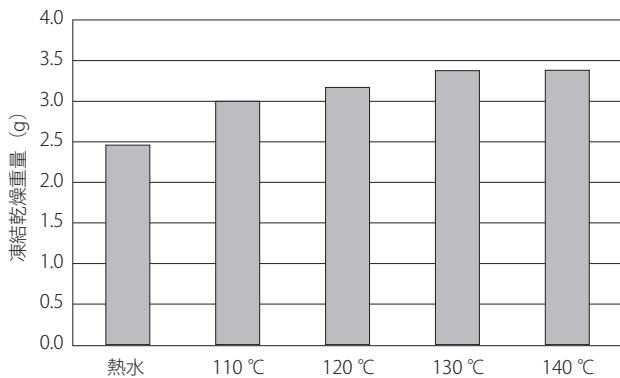


図1：熱水および亜臨界水抽出サンプルの凍結乾燥重量

3.3 各成分の定量

(1) タンパク質

タンパク質量は、110℃の亜臨界水抽出サンプルは熱水抽出サンプルよりも少なかったが、それより高い温度帯では、熱水抽出サンプルよりも多く、120℃、130℃、140℃と温度上昇と共にタンパク質量も増大した(表2)。官能評価で最も良い評価を得た亜臨界水抽出130℃は、熱水抽出サンプルよりも12.5 mg多かつた。高温になると、加水分解により減少することも考えられたが、この程度の温度であれば減少することはなくタンパク質をより抽出できることがわかつた。

(2) 総アミノ酸

総アミノ酸量は、亜臨界水抽出サンプルのほうがすべての温度帯で高い値を示した(表2)。最も多く抽出されたのは、140℃であった。官能評価で最も良い評価を得た亜臨界水抽出130℃は、熱水抽出サンプルよりも10.1 mg多かつた。

(3) 全糖

全糖量は、亜臨界水抽出サンプルのほうが、すべての温度帯で高い値を示した(表2)。温度帯による変化としては、温度上昇と共に全糖量も増加した。官能評価で最も良い評価を得た亜臨界水抽出130℃は熱水抽出サンプルよりも121.1 mg高い値を示した。今回は全糖量を測定したため、加水分解による多糖、少糖、単糖の変化を見ることは出来なかつた。今回温度上昇とともに増大したのは、単純に抽出量が増えたことによるものであると考えられる。

(4) 単糖

マンノースとグルコースは、110℃と120℃、ガラクトースは110℃のサンプルが、熱水抽出サンプルよりも少なかった。それ以上の温度帯では、温度の上昇と共に単糖類も上昇した。烏龍茶葉には、でんぷんやペクチン、セルロースなど多くの種類の多糖類が含まれており(中林他, 1994)、これらが、温度上昇とともに加水分解して各単糖類が生成したものと思われる。

タンパク質(総アミノ酸)と糖類の抽出量の変化を見ると、いずれも温度上昇とともに増加している。生コーヒー豆の亜臨界水抽出(横田他, 2014)では、総アミノ酸は180℃、グルコースは220℃以上で減少した。これらは、メイラード反応によるものと考えられた。今回、官能評価の色の評価においては、どの温度帯でも変化は見られず、アミノ酸や単糖類の減少もないことから、140℃の温度ではメイラード反応は進行していないことが強く示唆された。

3.4 香気成分

官能検査で最も好評であつた130℃の亜臨界水抽出サンプルと熱水抽出サンプルの香気成分の総量と主な香気成分量、香気の特徴(大崎他, 1987; 水上他, 2009)を表3に示した。香気成分の総量は、130℃の亜臨界水抽出サンプルは17.7 mg、熱水抽出サンプルは10.6 mgであり、130℃の亜臨界水抽出サンプルの方が約1.7倍多かつた。また、ほとんどの香気成分が、亜臨界水抽出サンプルのほうが熱水抽出サンプルよりも増大、もしくは新たに生成した。特に烏龍茶に重要な

表2：熱水および亜臨界水抽出サンプルの各成分量(mg / 烏龍茶葉 10g)

サンプル	タンパク質	総アミノ酸	全糖	グルコース	ガラクトース	マンノース
熱水抽出物	56.5	62.3	317.1	89.3	17.0	15.3
110℃	51.1	71.3	388.6	65.5	16.4	11.1
120℃	58.8	74.5	409.6	73.0	17.5	12.0
130℃	69.0	72.4	438.2	122.1	22.0	20.4
140℃	75.6	82.2	442.2	135.6	26.7	24.3

表3：熱水および亜臨界水抽出サンプルの香気成分量と香気の特徴

香気成分	熱水抽出物	亜臨界水抽出物 130 °C	香気の特徴
ヘキサナール	—	0.384	酸味果実様
リナロールオキサイド	—	0.142	さわやかなウッディー調
α-イオノン	—	0.123	甘く重厚な花様
β-イオノン	0.105	0.391	甘く重厚な花様、スミレ様
(Z)-ジャスモン	0.143	0.448	フルーティーな花様、グリーン調
メチルジャスモネイト	0.948	1.153	花様
ジャスミンラクトン	2.422	2.903	甘い
リナロール	0.072	0.735	軽くさわやかな花様
α-テルピネオール	—	0.108	青く重たいハーブ調
ゲラニオール	—	0.470	甘い花様、バラ様
フェニルラクトアルデヒド	0.101	0.087	甘い花様
メチルサリシレイト	—	0.180	甘いウッディー調
ジヒドロアクチニジオリド	1.881	3.377	他の香気成分保香効果
総量	10.590	17.730	

注：香気成分量(香気成分ピーク面積値/カフェインピーク面積値)

香気成分であるリナロールは熱水抽出よりも10倍以上増大し、リナロールオキサイド、ゲラニオールは熱水抽出サンプルには含まれていなかったが新たに生成した。これらの香気成分の生成が、熱水抽出物よりも亜臨界抽出物のほうが香りの官能評価において好評価を得られた原因と考えられる。これらの香気成分は、茶葉内に配糖体として存在することが知られている香気成分である。茶の香気が生成する理由の一つとして、加水分解酵素の関与が挙げられる。茶葉は、香気配糖体を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。萎凋時に、香気配糖体が加水分解酵素の働きによって加水分解されることにより香気成分を揮発する。今回、香気配糖体の加水分解により各香気成分が生成、増大したものと考えられる(中林他, 1994)。

また、他の香気成分を保香する効果をもつジヒドロアクチニジオリドは、紅茶やい草に含まれる香気成分であり、亜臨界水抽出サンプルのほうが熱水抽出サンプルよりも約1.8倍増大した。このことも亜臨界水抽出が熱水抽出よりも香りが優れている要因となったと考えられる。

3.5 脳波測定

官能検査で最も好評であった130 °Cの亜臨界水抽出サンプルと熱水抽出サンプルの脳波測定を行った。図2は、沈静・興奮を、図3は快・不快の結果を示した。熱水抽出サンプルは、ニオイ呈示中に興奮が増加したのに対し、亜臨界抽出サンプルは、ニオイ呈示中に沈静の割合が増加した。亜臨界水抽出にはリラックスの効果が示唆された。快、不快では亜臨界水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。後安静において不快が増加したことは、良いニオイがなくなったことに対する反応であることも考えられるため、後安静の結果から、このニオイがもたらした効果を一概に述べることはできないが、ニオイ呈示中の脳波から亜臨界水抽出サンプルは、熱水抽出サンプルよりも優

れているという結果が得られた。

4. まとめ

低品質の烏龍茶葉の亜臨界水抽出を行い、熱水抽出と比較した。その結果、官能評価では、熱水抽出に比べ良好であったが、3 MPa、130 °Cで抽出したものが最も良い結果が得られた。また、凍結乾燥物重量、タンパク質、総アミノ酸、全糖、

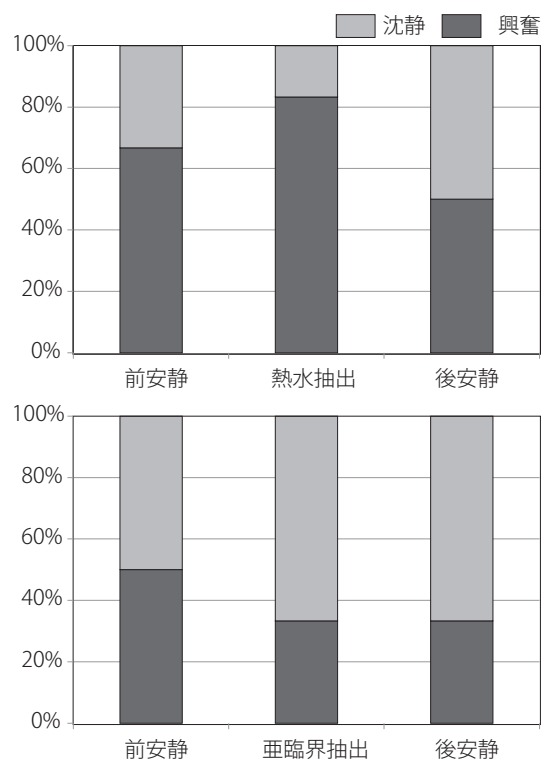


図2：各試料呈示中および前後の脳波測定による沈静・興奮の割合(%)

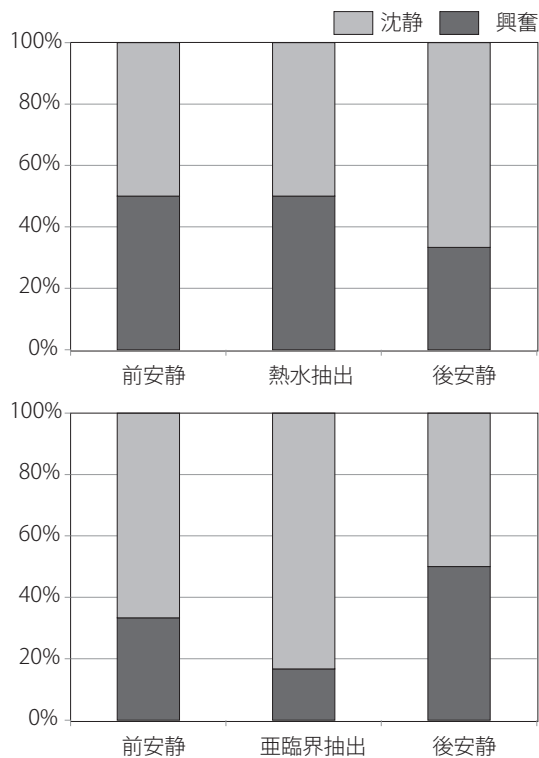


図3：各試料呈示中および前後の脳波測定による快・不快の割合(%)

グルコース、ガラクトース、マンノースの生成量においても高い値を示した。香気成分、脳波測定については、官能評価の最も良好であった130℃での亜臨界水抽出サンプルと熱水抽出サンプルの比較を行った。香気成分は、亜臨界水抽出において増加が見られ、特に烏龍茶に重要なリナロール、ゲラニオールなどの香気成分の抽出量も高い値を示した。さらに、他の香気を保香するジヒドロアクチニジオリドも増加した。また、脳波測定においては、亜臨界水抽出のほうが沈静および快適な効果に期待ができる結果となった。

以上の結果、低品質の烏龍茶葉は亜臨界水130℃で抽出することで、品質の良い香りを持ち、リラックス効果のあるお茶に変えることができた。このことから、亜臨界水抽出は烏龍茶製造における新しい技術として有用であることが分かった。今後、さらに実用化に向けた検討を行っていきたい。

引用文献

Etoh, H., Maejima, Y., Imaeda, Y., Sugiyama, S., Tokuyama, S., Kato, H., Kulkarni, A. and Maoka T. (2012). Extraction of astaxanthin by sub-critical water from the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Carotenoid Science*, Vol. 17, 15-17.

大崎和彦・島田貢(1987). 嗜好飲料. 香料, 153, 106.

藤村庄・桑田実・原田修・宮本知左子・吉田和利(2014). 植物性食品加工副産物の亜臨界水処理による生理活性物質の生産と利用. 中小企業技術開発産学官連携促進事業.

Kulkarni A., Yokota T., Suzuki A. and Etoh H. (2008). Subcritical water extraction of barley to produced a functional drink,

Biosci. Biotechnol. *Biochemistry*, Vol. 72, No. 1, 236-239.

水上裕造・山口優一(2009). 香気エキス希釈分析法を用いた緑茶の萎凋香に関与する成分の同定. 茶研報, Vol. 107, 81-84.

Miyashita, T. and Etoh, H. (2013). Improvement of the bitterness and astringency of green tea by sub-critical water extraction. *Food Science and Technology Research*, Vol. 19, 471-478.

Miyashita, T., Okamura, T., Ijima, Y., Suzuki, H., Shibata, D., Takaya, Y., Tanaka, H. and Etoh, H. (2014). (S)-3-Amino-1-ethylglutaramide from green tea (*Camellia sinensis*). *Studies in Science and Technology*, Vol. 3, No. 1, 45-48.

宮下知也・横田正・木戸康嗣・岡村拓哉・飯島陽子・鈴木英之・柴田大輔・衛藤英男(2015). 亜臨界水抽出による緑茶の高品質化. 科学・技術研究, Vol. 4, No. 1, 95-100.

小林敏郎・伊奈和男・坂田完三(1994). 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能 訂正1版. 弘学出版.

杉浦敏文・沖田善光・鈴木紳弐・衛藤英男(2008). 吉田法による麦茶のにおいの効果の基礎的検討. *Aroma Research*, Vol. 9, No. 3, 269-272.

横田正・加藤久喜・宮下知也・衛藤英男(2014). 生コーヒー豆の亜臨界水抽出による機能性飲料の製造. 科学・技術研究, Vol. 3, No. 2, 121-126.

吉田倫幸(2002). 快適さの客観的計測と評価. 計測と制御, Vol. 41, No. 10, 696-701.

(受稿：2015年11月4日 受理：2015年11月14日)