

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

微生物発酵茶のアミノ酸類

作成者：高知県工業技術センター 主任研究員 森山 洋憲

1. 微生物発酵茶について

1. 1 概要

微生物発酵茶はその名称が示す通り、微生物の発酵によって作られるお茶である。紅茶や烏龍茶は茶の分類において発酵茶という名称で区分されているものの、微生物が関与しないものであり、微生物発酵茶とは区分されている。微生物発酵茶は好気性のカビで発酵させた好氣的発酵茶、空気を遮断した条件下で嫌気性菌によって発酵させた嫌氣的発酵茶、好氣的発酵の後に嫌氣的発酵を行って製造された2段階発酵茶の3種類に分類される。好氣的発酵茶には中国のプーアル茶や富山県の黒茶、嫌氣的発酵茶にはミャンマーのラペ・ソーや徳島県の阿波番茶、2段階発酵茶には愛媛県の石鎚黒茶や高知県の碁石茶が存在する。



日本の微生物発酵茶については、一般的なお茶である緑茶、烏龍茶、紅茶に比べると研究例が少ないもののいくつか報告されており、系統的に行われた研究の成果が宮川金二郎氏の著書「日本の発酵茶」（宮川金二郎編、さんえい出版、1994）にまとめられている。また四国には特徴的な3つの微生物発酵茶が存在しており、それらのルーツを民俗学的に調べた結果は同氏の著書「漬物茶考」（宮川・難波共著、さんえい出版、2003）に述べられている。

石鎚黒茶は愛媛県西条市小松町でのみ生産されている茶である。現在は天狗黒茶という名称で販売されている。石鎚黒茶は碁石茶と同じく2段階の微生物発酵を経て製造される。枝ごと刈り取った茶葉を蒸した後、好氣的な1次発酵、嫌氣的な2次発酵、天日乾燥後に出来上がる。

阿波番茶は碁石茶や石鎚黒茶とは異なって1段階の嫌氣的な発酵によってつくられる。茶樹よりしごきとった茶葉を蒸した後、揉捻、嫌氣的発酵、天日乾燥の工程で出来上がる。

1. 2 食品あるいは含有成分の機能性

緑茶には種々のアミノ酸が含まれており、そのうま味に関与する主な成分としてアルギニン、グルタミン酸、テアニンが知られている¹⁾。テアニンは緑茶特有のアミノ酸であり、そのリラックス効果²⁾を応用した食品の研究開発³⁾も行われている。微生物発酵茶は緑茶に比べるとアミノ酸量が低い傾向にあり、発酵工程によって減少すると考えられている。一方で発酵工程において γ -アミノ酪酸（GABA）を生成し、緑茶にはほとんど存在しない成分を含んでいる。 γ -アミノ酪酸は血圧上昇抑制作用等⁴⁾が知られており、微生物発酵茶の特徴的な成分のひとつである。加藤らが阿波番茶⁵⁾、石鎚黒茶⁶⁾、碁石茶⁷⁾のアミノ酸類の分析結果をそれぞれ報告している。新谷らは石鎚黒茶の主要アミノ酸がテアニン、GABA、アラニン、グルタミン酸、ロイシンであること、GABAが嫌氣的発酵後に増加することを報告している⁸⁾。

1. 2. 1 テアニン、GABAを含む食品

テアニンは緑茶に含まれるアミノ酸の中で最も多く、旨味にも関与している。ギャバロン茶は茶生葉を嫌氣的条件下に置いてGABA含量を高めたものであり、この成分による血圧降下作用を期待できる茶である。カカオマスに由来するGABAに着目した菓子類も開発されている。

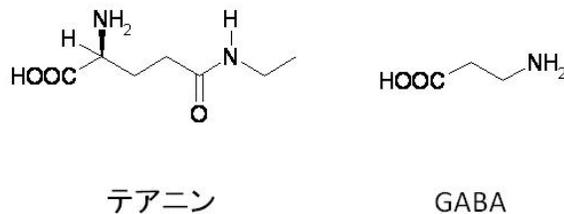
<引用・参考文献>

1. 後藤ら、茶研報、78、29（1993）
2. 小林ら、農化誌、72、153（1998）
3. 大久保ら、ジャパンフードサイエンス、40、33（2001）
4. 大森ら、農化誌、61、1449（1987）
5. 加藤みゆき、田村朝子、水落由美子、大森正司、難波敦子、宮川金二郎：家政誌、44、561-565（1993）
6. 加藤みゆき、田村朝子、斉藤ひろみ、大森正司、難波敦子、宮川金二郎：家政誌、

- 46, 525-530(1995)
7. 加藤みゆき, 田村朝子, 斉藤ひろみ, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎: 家政誌, 45, 527-532(1994)
 8. H10 愛媛県農林水産加工利用開発会議報告書

2. 微生物発酵茶のアミノ酸の説明

テアニンはグルタミン酸のエチルアミドである。脳内に取り込まれた各種生理作用を示す。GABAは脳内に神経伝達物質として存在する。GABAは脳内に取り込まれないものの、その抗ストレス作用について期待されている。



3. 定量分析の方法について

微生物発酵茶のアミノ酸類をダブシルクロライドによる誘導体化後、ODS カラムで分離検出する高速液体クロマトグラフィー定量法について述べる。

3. 1 準備する器具など

1. ブロックヒーター
2. 試験管ミキサー
3. 試料濾過用フィルター(親水性テフロン膜を使用したもの、ポアサイズ 0.2 μ m、13 mm 径)
4. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) システム (システム構成例: 日本分光製 X-LC システム 3185PU 型ポンプ 2 台、3080 型 DG デガッサー 1 台、3180MX 型高圧ミキサー 1 台、3067C0 型カラムオーブン、3070 型 UV/Vis 検出器 1 台、3159 型 AS オートサンプラー、ChromNAV データステーション)
5. C18 逆相カラム (例: ZORBAX Eclipse Plus C18、1.8 μ m、3.0 mm I.D. \times 50 mm)

[試薬]

1. アセトニトリル (HPLC 用)
2. ダブシルクロライド (4-(Dimethylamino)azobenzene-4'-sulfonyl chloride、サーモサイエンティフィック製)
3. アミノ酸標準液 (和光純薬製)

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

微生物発酵茶の抽出条件は島村ら（食科工、55、640(2008)）の方法に準じて次の手順で行う。

1. 茶葉 3 g に沸騰水 200 mL を加えた後、5 分間放置する。
2. 茶浸出液をろ紙ろ過する。
3. ろ液をメスアップし、200mL に定溶する。
4. 茶浸出液 5mL を 15mL 容のディスポ遠沈管に採取し、0.5g のポリビニルポリピロリドンを追加した後、1 時間静置する。
5. 遠心分離（3000×g、5 分間）によって上清を得る。
6. 上清を試料ろ過用フィルターに通過させる。
7. 炭酸水素ナトリウム溶液（0.05 mmol/L）を用いて任意の割合で希釈する（試料液中の各アミノ酸濃度を 50 nmol/mL 以下に調製）。
8. ダブシルクロライドはアセトニトリルを用いて 1.3 mg/mL のダブシル化試薬を調製する（調整後 1 時間経過したものは使用難）。
9. 炭酸水素ナトリウム溶液で希釈した試料液 20 μ L とダブシル化試薬 40 μ L とを混合し、ヒートブロック等で 70°C、12 分間の反応を行う。（70°C で反応開始後に攪拌を十分に行わないと誘導体化に失敗の可能性有）
10. 反応終了後の試料に希釈用緩衝液を 440 μ L 添加する。
11. バイアル瓶に移し、分析装置のオートサンプラーに設置する。

3. 3 HPLC による分析方法

3. 3. 1 「HPLC 装置の場合」

（1）移動相の調製

移動相 A 及び移動相 B を以下のように調製する。

A 液：20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）／アセトニトリル（85/15、v/v）

B 液：アセトニトリル

（2）分析条件

- ① 検出器、恒温槽、溶媒の流量等の条件は以下の通りとする。
検出波長：465nm
恒温槽：25°C
流量：移動相 A、移動相 B の合計で毎分 0.8mL
試料注入量：5 μ L
- ② 移動相溶媒の混合比（グラジエント）は以下のように調整する。
初期条件を A 液 95% とする。
0 分から 2.5 分：A 液 95% を維持する。
2.5 分から 7.5 分：A 液 95% から 80% に混合比を直線的に変化させる。
7.5 分から 11 分：A 液 80% から 45% に混合比を直線的に変化させる。
11 分から 11.5 分：A 液 45% から 15% に混合比を直線的に変化させる。
11.5 分から 12 分：A 液 15% を維持する。
12 分から 12.05 分：A 液 15% から初期条件 95% に戻す。

分析時間は12分間とする。1分析サイクルを15分間とし、次の試料を注入する。

(3) 定性及び定量

- ① 各標準品のピーク面積との比較によって定量する。

4. 分析例

4. 1 HPLC 装置による分析例

分離された物質は保持時間から(標準物質と比べ)特定する。定量には標準試料を用い、クロマトグラムのピーク面積から濃度を算出する。以下に典型的なクロマトグラフを図に示す。

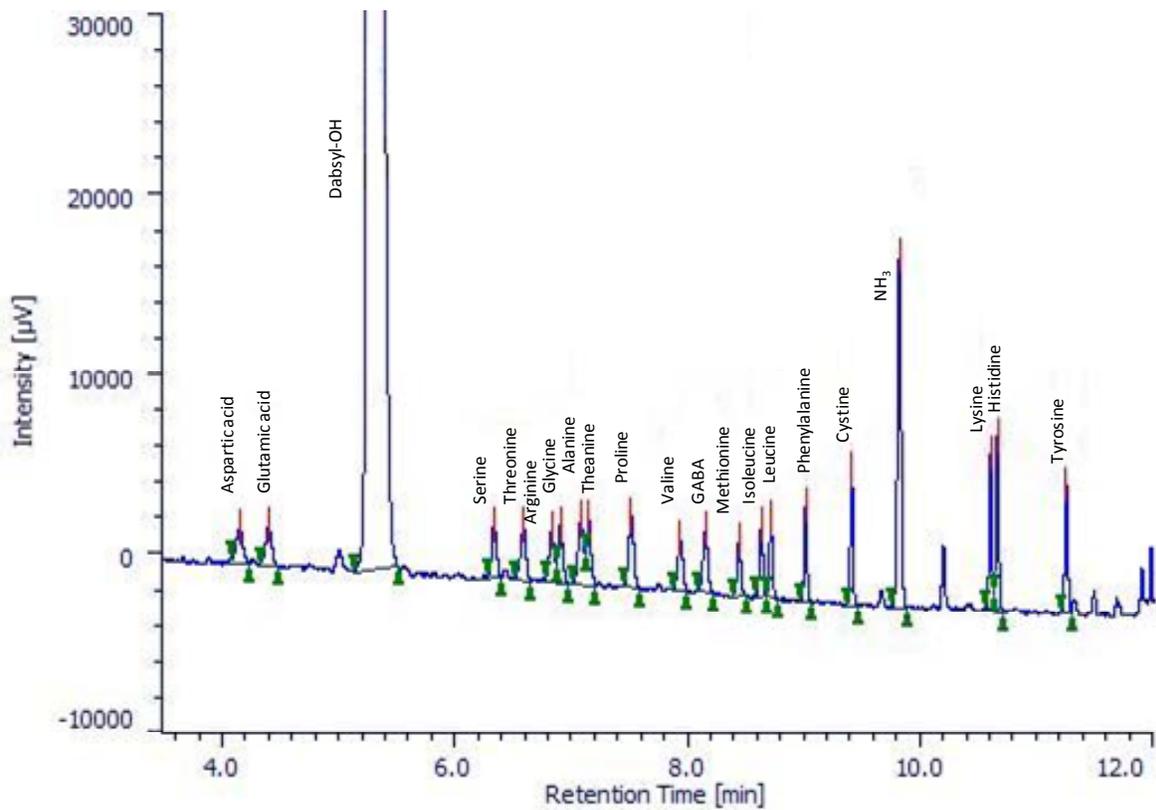


図 4. 1 - 1 アミノ酸標準液のクロマトグラム

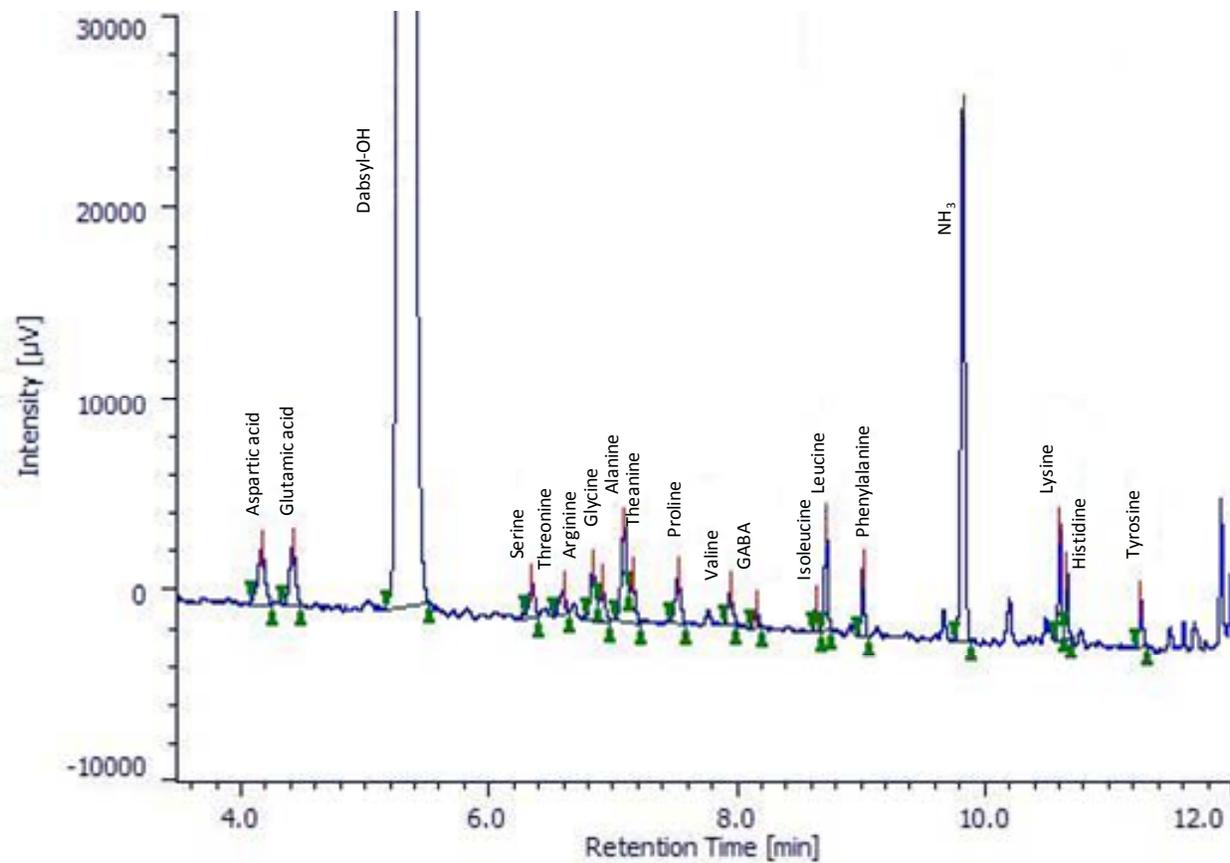


図 4. 1 - 2 碁石茶浸出液のアミノ酸分析クロマトグラム

5. 食品の分析結果例

上記手法を用いて、四国の微生物発酵茶の浸出液中に含まれているアミノ酸量を測定し、茶葉重量当たり換算して示した。天狗黒茶は愛媛県産業技術研究所、阿波番茶は徳島県立工業技術センターからそれぞれ提供されたものを使用した。また碁石茶と緑茶については高知県内で市販されているものを使用した。

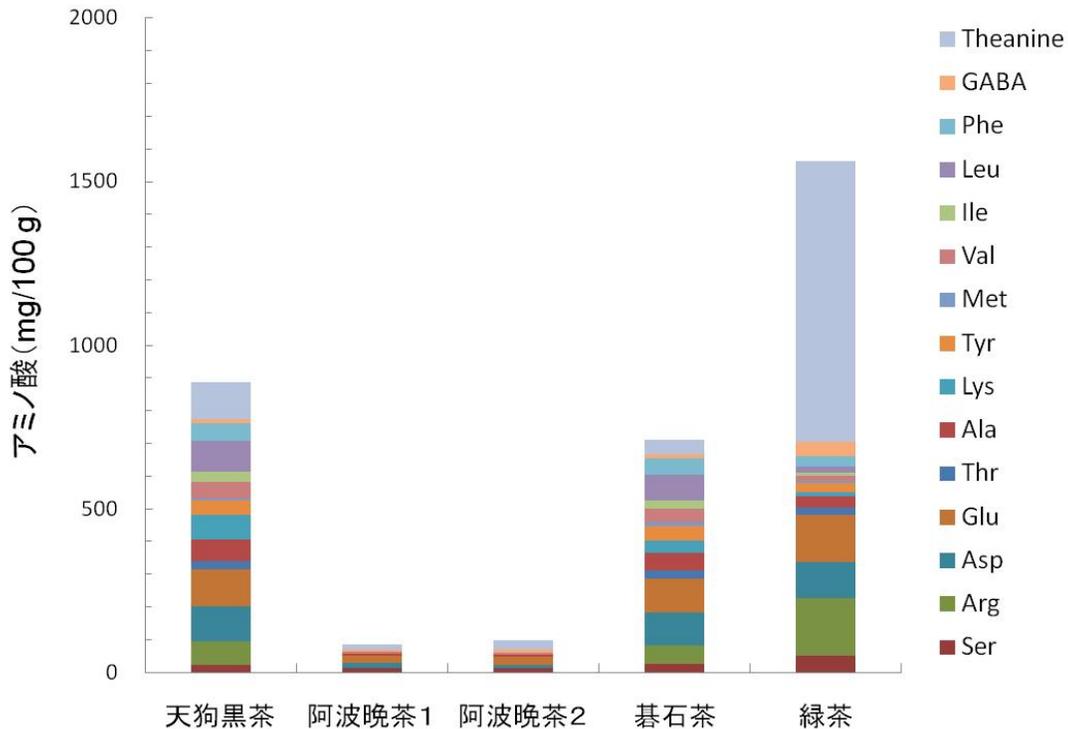


図5-1 茶のアミノ酸分析例

(*注意) なおこの測定結果はいくつかの微生物発酵茶商品のうちの一例であり、微生物発酵茶一般の分析結果ではない。

6. 分析上の留意、注意点

簡便かつ低コストでアミノ酸量をスクリーニングする場合に適した方法である。ウォーターズ製 UPLC システムを用いた方法も簡便で有効である。

7. その他

特になし。

8. 定量法に関する引用・参考文献

1. 後藤哲久, 堀江秀樹, 向井俊博, 茶研報, 77, 29-33(1993)

—以上—

[トップページに戻る](#)