

## 研究論文

## 剪定イチジク葉を用いた茶の開発

鳥居貴佳\*<sup>1</sup>、近藤温子\*<sup>1</sup>

## Development of the Tea Using the Pruned Fig Leaves

Takayoshi TORII\*<sup>1</sup> and Atsuko KONDO\*<sup>1</sup>Food Research Center\*<sup>1</sup>

剪定後に廃棄されるイチジク葉を茶葉として利用することを目的とした。発酵処理した茶葉から抽出したイチジク茶は、苦味や渋味が強く、飲みにくいいため、風香味の改善が必要であった。5種類の酵素製剤を作用させたところ、 $\beta$ -グルコシダーゼ製剤を作用させると風香味が向上し、苦味や渋味が低減化した。抗アレルギー効果の指標である $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離阻害活性は、酵素製剤を作用させた後も約80%が保持された。

## 1. はじめに

愛知県における平成25年のイチジクの栽培状況は、収穫量2,734t、出荷量2,414t、栽培面積138haであり、そのすべてにおいて全国1位である<sup>1)</sup>。収穫された果実の多くは、生食用として消費される。しかし、規格外品の加工用果実や、剪定時に廃棄される枝葉が多量に発生し、それらの用途開発が求められている。そこで我々は、イチジク葉の茶葉への利用開発に着手した。前報<sup>2)</sup>では、イチジク葉に対し、発酵処理、蒸し処理および焙煎処理を行い、それぞれ抽出したイチジク茶の機能性を検討したところ、抗アレルギー活性を有することが明らかにした。イチジク茶が食品として消費者に受け入れられるためには、機能性を有することだけでなく、風香味がよく、飲みやすいことが重要である。そこで今回は、イチジク茶の抽出方法、酵素製剤の利用による風香味への影響について検討した。合わせて機能性として抗アレルギー効果の指標となる $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ阻害活性について評価した。

## 2. 実験方法

## 2.1 発酵イチジク茶製

-20℃で凍結保存したイチジク葉（愛知県産、榊井ドーフィン）を用いた。自然解凍したイチジク葉を麵棒を用いて揉捻し、25℃で5時間、酸化発酵させた。この後65℃で通風乾燥したものを発酵イチジク茶葉とした。

## 2.2 発酵イチジク茶の抽出方法

発酵イチジク茶葉2gを100mLの蒸留水を用いて抽

出し、試料溶液として分析に用いた。抽出条件は以下のとおりとした。

①低温抽出法：5℃で15時間

②低温抽出法：60℃で30秒、1分、5分、15分

③高温抽出法：95℃で30秒、1分、5分、15分

## 2.3 ポリフェノールの測定

2倍希釈したフェノール試薬（和光純薬(株)製）40 $\mu$ L、10%炭酸ナトリウム溶液100 $\mu$ L、蒸留水860 $\mu$ Lおよび試料溶液40 $\mu$ Lを混合し、暗所で1時間放置後、吸光度(760nm)を測定した。タンニン酸を用いて作成した検量線により、試料溶液のポリフェノール濃度を算出した。

## 2.4 イチジク茶の酵素製剤処理

イチジク茶葉重量の0.3%(w/w)の酵素製剤を発酵イチジク茶葉抽出液にそれぞれ添加し、50℃で3時間反応した。酵素製剤は、ポリフェノールオキシダーゼとしてラッカーゼM120（天野エンザイム(株)製）、ヘミセルラーゼとしてヘミセルラーゼ「アマノ」90（天野エンザイム(株)製）、 $\beta$ -グルコシダーゼとしてアロマーゼH（天野エンザイム(株)製）およびタンナーゼ（三菱化学フーズ(株)製）を使用した。

## 2.5 液体クロマトグラフ質量分析を利用した多変量解析

液体クロマトグラフ装置はUltiMate3000（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、質量分析装置はmaXis（ブルカー・ダルトニクス社製）を使用した。カラムはACQUITY UPLC HSS T3(内径2.1mm、長さ150mm、日本ウォーターズ社製)を使用し、0.1%ギ酸と

\*<sup>1</sup>食品工業技術センター 保蔵包装技術室

0.1%ギ酸添加アセトニトリルによるグラジエント法を用いた。質量分析は、質量範囲 50-1000m/z、測定モードは ESI ポジティブモードで行った。多変量解析は SIMCA13 (インフォコム (株) 製) を用いた。

## 2.6 $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離阻害率の測定

肥満細胞のモデルとしてラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3 細胞) を使用した。ウシ胎児血清、ペニシリン G、ストレプトマイシン含有 Minimum Essential Medium Eagle (シグマ社製) を用いて 95% Air-5% CO<sub>2</sub>、37°C で培養を行った。細胞を播種し、ラットモノクローナル抗 DNP-IgE 抗体 (アレルゲン IgE モデル) を培養液に加え、感作させた。細胞をタイロッド緩衝液で洗浄した後、試料溶液と DNP-BSA (抗原モデル) を加え、細胞の脱顆粒を惹起させた。氷冷して反応を止めた後、上清を 96 ウェル平底マイクロプレートに移し、*p*-ニトロフェニル-N-アセチル- $\beta$ -D-グルコサミドを加えて混和後、37°C で 1 時間反応させた。反応溶液に炭酸緩衝液 (pH10) を加えて混和し、マイクロプレートリーダーにて吸光度 405nm を測定した。以下の式により  $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ ( $\beta$ -HEX) 遊離阻害率を求めた。

$$\beta\text{-HEX 遊離阻害率 (\%)} = \{1 - (C - D) / (A - B)\} \times 100$$

- A: 陽性対照の吸光度 (試料の代わりにタイロッド緩衝液を添加し、抗原刺激したもの)  
 B: 陰性対照の吸光度 (試料と抗原の代わりにタイロッド緩衝液を添加したもの)  
 C: 検体の吸光度 (試料と抗原を添加したもの)  
 D: 検体対照の吸光度 (試料を添加し、抗原の代わりにタイロッド緩衝液を添加したもの)

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 イチジク茶の抽出方法と風香味への影響

前報<sup>2)</sup>で報告した方法で調製した茶を試飲したところ、苦味や渋味が強く、飲用に適した呈味ではなかった。このため、茶葉として流通させるには困難であり、飲みやすく加工する必要があると考えた。緑茶においては、カテキン類のようなポリフェノールが苦味や渋味を呈し、その味強度は濃度依存的に増加することが知られている<sup>3)</sup>。また、茶のポリフェノールの溶出量は、茶葉を抽出する温度や時間の影響を受ける<sup>4, 5)</sup>。発酵イチジク茶においても、イチジク葉に含まれているポリフェノールの溶出量が苦味や渋味に影響を与えると考え、製品として流通した場合に一般家庭でも容易に再現できる抽出方法と苦味や渋味の間接関係を検討した。

各温度で所定時間抽出した際のポリフェノール量を測定した結果を表 1 に示す。最もポリフェノールの溶

出量が多かったのは、高温 (95°C) で 1 分間抽出した試験区で、タンニン酸換算で 35.2mg/100mL であった。低温抽出法と高温抽出法によるポリフェノールの溶出量を比較すると、抽出時間 30 秒から 15 分では、いずれも、高温抽出法の方が多くなった。官能的には、苦味渋味の強さは、抽出時間が長いほど強く、さらに抽出温度が高いほど強く感じられ、ポリフェノール濃度とほぼ比例関係を示した。また、溶出ポリフェノール量が最も少なかった低温 (60°C) で 30 秒間抽出した試験区においても強い苦味と渋味が感じられ、飲みにくかった。国民生活センターが実施した調査<sup>6)</sup>によると、缶・ペットボトル入り緑茶飲料に含まれるポリフェノール濃度の平均値は、67 mg/100mL であり、発酵イチジク茶のポリフェノール濃度より大きい。発酵イチジク茶は、緑茶よりも苦味や渋味が強く感じられることから、溶出された発酵イチジク茶のポリフェノールの種類が強い苦味や渋味の一つの要因となっていると考えられる。なお、抽出時間が 30 秒という条件は、実用上の最短時間である。一般家庭で対応できる抽出法だけでは、風香味を改善させることは困難であると思われる。そこで、発酵イチジク茶の苦味や渋味を抑制する方策として、酵素製剤を用いた加工工程の導入を検討することとした。

表 1 発酵イチジク茶の抽出方法とポリフェノール濃度

	30秒	1分	5分	15分	15時間
①冷水抽出法 (5°C)	—	—	—	—	25.5
②低温抽出法 (60°C)	20.0	20.9	29.2	31.1	—
③高温抽出法 (95°C)	21.6	35.2	32.0	34.8	—

タンニン酸として (mg/100ml)

### 3.2 酵素製剤の使用による風香味への影響

食品に酵素を作用させると、物性や風香味が変化する。例えば、茶葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼは、紅茶やウーロン茶のような発酵茶の製造において、緑茶とは異なる香りや苦渋味の風香味形成に寄与している。また、ナリンギナーゼは、かんきつ類の苦味成分であるナリンギンを無味のナリンゲニンに変化させるため、缶詰やジュースの製造で苦味を調整する目的で使用されている。そこで、主にポリフェノールに作用する酵素製剤を用い、発酵イチジク茶の風香味の変化について検討した。多くの種類のポリフェノールが溶出されると考えられる高温、長時間の条件 (95°C で 15 分間) で抽出した試料に、各酵素を作用させた。簡易な官能試験を行っ

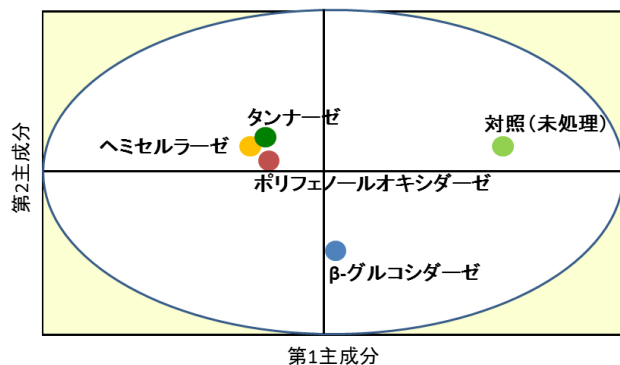
た結果を表2に示す。

$\beta$ -グルコシダーゼ用いた試験区において、対照（未処理）と比較して苦味や渋味が軽減した。 $\beta$ -グルコシダーゼは、二糖配糖体を二糖単位で加水分解する酵素である。したがって、発酵イチジク葉に含まれているポリフェノールの一部が分解（脱糖鎖）されたことにより、風香味が変化した（苦味や渋味が軽減化された）と考えられた。ポリフェノールオキシダーゼ、ヘミセルラーゼおよびタンナーゼ処理した試験区は、それぞれ対照（未処理）と比較して、香りなど風香味の変化が認められたが、苦味や渋味の軽減化という観点では、試験区の中では $\beta$ -グルコシダーゼを用いると最も効果的であった。

**表2** 酵素製剤処理による発酵イチジク茶の風香味の変化

酵素名	風香味
①対照(未処理)	苦み渋み強い、イチジク特有の香りがある。
② $\beta$ -グルコシダーゼ	甘い香りが強くなる、苦みがやや軽減している。
③ポリフェノールオキシダーゼ	対照より香りが弱く、異なる。苦みは緩和、渋みはそのまま。
④ヘミセルラーゼ	対照と同様に苦み渋みが強い。
⑤タンナーゼ	対照よりも軽い感じ。苦みは対照と変わらない。

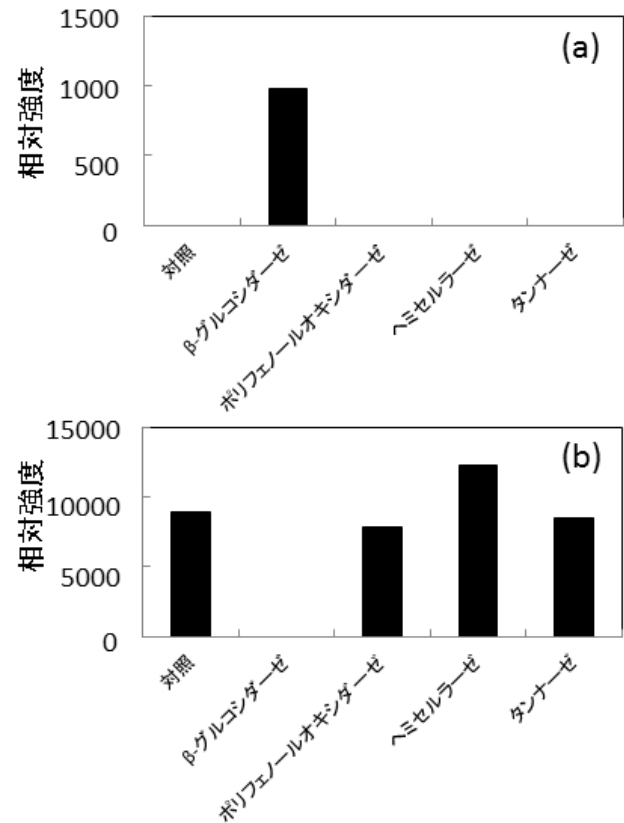
そこで、 $\beta$ -グルコシダーゼ処理による成分の変化を調べるため、各種の酵素製剤を作用させた試料の液体クロマトグラフ質量分析を行った。そのデータを基に主成分分析を行ったところ、対照（未処理）、ヘミセルラーゼ・タンナーゼ・ポリフェノールオキシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼの3つのグループに分かれた。その結果を図1に示す。



**図1** 酵素製剤処理を行った発酵イチジク茶の主成分分析

$\beta$ -グルコシダーゼ処理を行った試料は、他の酵素製剤処理試験区とプロット位置が大きく離れていることから、他の酵素製剤処理試験区と比べて構成成分が異なると考えられた。液体クロマトグラフ質量分析で分離され

た成分の解析を行ったところ、他の3つの酵素製剤と比較して、 $\beta$ -グルコシダーゼ処理により特徴的に消失する成分や増加する成分が複数存在していた（図2）。これらの結果から、 $\beta$ -グルコシダーゼ処理が発酵イチジク茶の成分に変化を与え、他の酵素製剤と比べて特に苦味や渋味の緩和に有効であることが明らかになった。



**図2** 酵素処理を行った発酵イチジク茶の特定質量数における相対強度の変化  
(a) 114.29m/z, (b) 325.16m/z

### 3.3 酵素製剤の使用による発酵イチジク茶の $\beta$ -ヘキサミニダーゼ阻害率の変化

イチジク茶には $\beta$ -ヘキサミニダーゼ（以下 $\beta$ -HEX）の遊離を阻害する活性があり、発酵処理によってその活性が高くなる傾向がある<sup>2)</sup>。このため、発酵イチジク茶を飲用すると、花粉症などのアレルギー疾患の予防や症状の緩和が期待される。3.2の結果より、酵素製剤処理を行うと成分が変化することが明らかになったが、ポリフェノールの構造変化や酵素製剤そのものが $\beta$ -HEXの遊離阻害活性に影響を与える可能性がある。そこで、酵素製剤を使用した発酵イチジク茶の $\beta$ -HEX阻害率を測定した。その結果を図3に示す。すべての酵素製剤処理区において、対照となる未処理の試験区より $\beta$ -HEX遊離阻害率が低下した。しかし、苦味や渋味

が官能的に軽減した $\beta$ -グルコシダーゼ処理を行った試験区でも、対照の約7割の阻害率を保持していた。したがって、アロマーゼ処理したイチジク茶を摂取することによってもアレルギーの予防や症状の緩和が可能になることが期待できる。

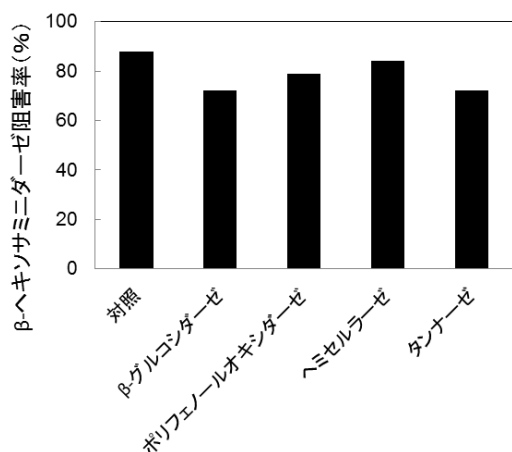


図3 酵素処理による発酵イチジク茶の $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ阻害率の変化

#### 4. 結び

イチジク葉の発酵処理を行い、茶葉として活用することを試みた。しかし、苦味や渋味が強く、飲みにくいため、改善する必要がある。そこで、抽出条件や酵素製剤処理について検討を行ったところ、以下の結果が得られた。

(1)発酵イチジク茶の抽出温度を冷温（5℃）、低温（60℃）、高温（95℃）とし、冷温以外の抽出時間を30秒から5分間に設定して評価したが、どの試験区でも強い苦味渋味が認められた。抽出温度や時

間の制御だけでは、苦味や渋味を低減化することは困難であった。

- (2)ポリフェノールの構造に作用が期待される4種類の酵素製剤を試料溶液に添加した。その結果、 $\beta$ グルコシダーゼを用いた試験区で、香りの向上や若干の苦味渋味の低下が認められた。しかし、苦味渋味が残るため、さらに検討していく必要がある。
- (3)酵素製剤処理を行っても抗アレルギー作用の指標となる $\beta$ -HEXの遊離を阻害する活性の大部分は保持された。このことから、酵素製剤処理イチジク茶の飲用によってもアレルギーの予防や症状の緩和が期待できると考えた。

#### 文献

- 1) 農林水産省：平成25年産特産果樹生産動態等調査 [http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan\\_kazyu/](http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/), (2016/5/27)
- 2) 鳥居貴佳, 近藤温子, 石川健一：あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 112(2015)
- 3) 森田明雄, 増田修一, 中村順行, 角川修, 鈴木壮幸：茶の機能と科学, P124(2013), 朝倉書店
- 4) 貝沼やす子, 今井明菜：平成18年度日本調理科学会大会要旨集「緑茶の浸出条件が溶出成分および茶飯の性状に及ぼす影響」
- 5) 矢島エイ子, 三枝由香莉：長崎女子短期大学紀要, **36**, 57(2012)
- 6) 独立行政法人国民生活センター：ポリフェノール含有食品の商品テスト結果, [http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20000508\\_1.pdf](http://www.kokusen.go.jp/pdf/n-20000508_1.pdf), (2016/5/27)