



微生物発酵茶に含まれるTeadenol A および Teadenol B の効率的生産法の開発

著者	宋 芝?
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2016
報告番号	12102甲第7969号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00147857

微生物発酵茶に含まれるTeadenol AおよびTeadenol Bの効率的生産法の開発

2016年 11月

宋 芝眩

微生物発酵茶に含まれるTeadenol AおよびTeadenol Bの効率的生産法の開発

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（農学）学位論文

宋 芝眩

目次

目次	i
第1章 緒言	
1.1 植物の二次代謝	1
1.2 Catechin	3
1.3 茶の分類	3
1.4 微生物醗酵茶	5
1.5 本論文の構成	9
第2章 Teadenol AおよびTeadenol B標準品の単離	
2.1 序	11
2.2 実験材料および実験方法	14
2.2.1 Teadenol Aの単離	14
2.2.1.1 実験材料	14
2.2.1.2 Teadenol Aの抽出液の調製	14
2.2.1.3 カラムクロマトグラフィーによるTeadenol Aの分離	15
2.2.1.4 HPLCによるTeadenol Aの精製	15
2.2.1.5 Teadenol Aの純度検定	16
2.2.1.6 Teadenol Aの構造の確認	16
2.2.1.7 Teadenol AのHPLC分析における検量線の作成	16

2.2.1.8	微生物醗酵茶中のTeadenol Aの定量	17
2.2.2	Teadenol Bの単離	17
2.2.2.1	実験材料	17
2.2.2.2	Teadenol Bの抽出液の調製	17
2.2.2.3	カラムクロマトグラフィーによるTeadenol Bの分離	18
2.2.2.4	HPLCによるTeadenol Bの精製	18
2.2.2.5	Teadenol Bの純度検定	19
2.2.2.6	Teadenol Bの構造の確認	19
2.2.2.7	Teadenol BのHPLC分析における検量線の作成	19
2.2.2.8	微生物醗酵茶中の茶葉のTeadenol Bの定量	20
2.3	結果および考察	20
2.3.1	Teadenol AおよびTeadenol B標準品の単離	20
2.3.2	Teadenol AおよびTeadenol Bの構造解析	21
2.3.3	Teadenol AおよびTeadenol BのHPLC分析における検量線の作成	21
2.3.4	微生物醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの含有量の測定	22
第3章 カテキンを出発原料とするTeadenol AおよびTeadenol Bの生産		
3.1	序	34
3.2	実験材料および実験方法	35
3.2.1	実験材料	35
3.2.2	液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産	36
3.2.2.1	試験用培地の調製	36

3.2.2.2	植菌および培養条件	37
3.2.2.3	サンプリングおよび経時変化の測定	37
3.2.3	固体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産	38
3.2.3.1	試験用培地の調製	38
3.2.3.2	植菌および培養条件	38
3.2.3.3	サンプリングおよび経時変化の測定	38
3.2.4	各種醗酵茶の抽出液の調製	38
3.2.5	培養上清および各種醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの定量	39
3.2.6	培養上清および各種醗酵茶中の総ポリフェノール含量の測定	39
3.3	結果および考察	40
3.3.1	液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産	40
3.3.1.1	培地成分およびEGCG添加濃度の影響	40
3.3.1.2	液体培地への緑茶粉末添加の影響	42
3.3.2	固体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産	43
3.3.3	液体培養上清および醗酵茶中のTeadenol類および総ポリフェノール含量の比較	44
第4章 EGCGおよび緑茶粉末を用いた<i>Aspergillus sp.</i>の培養上清からTeadenol AおよびTeadenol Bの調製		
4.1	序	56
4.2	実験材料および実験方法	57
4.2.1	液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産	57

4.2.2	カラムクロマトグラフィーによるTeadenol AおよびTeadenol Bの分離	57
4.2.3	分取用HPLCによるTeadenol AおよびTeadenol Bの精製	58
4.2.4	Teadenol AおよびTeadenol Bの純度検定	58
4.3	結果および考察	58
4.3.1	<i>Aspergillus</i> sp.の液体培養によるTeadenol類の生産	58
4.3.2	カラムクロマトグラフィーによるTeadenol類の分離	59
第5章 総括		64
引用文献		69
謝辞		86

第1章 緒言

1.1 植物の二次代謝

植物はフラボノイドやフェノール性化合物などの幅広い二次代謝産物を構成成分として生合成する。フラボノイドおよびフェノール性化合物は植物中に蓄積し、植物の生活環境において多種多様な機能を発現している (Jaganath and Crozier, 2010)。

現在までに報告されているフラボノイドの種類は6000以上であり、まだこの数は増加している (Harborn and Williams, 2000)。フラボノイドは3つの炭素原子により結合している2つのベンゼン環から成るFlavanを基本骨格とするポリフェノール化合物である (Jaganath and Crozier, 2010)。フラボノイドはFlavan骨格への水酸基の結合や修飾によってさらにFlavonol、Flavone、Flavan-3-ol、Flavanone、Isoflavone、Anthocyanidinなどに分類されている中でもFlavonolは最も多くの植物中に存在するフラボノイドであり、白色から淡黄色を示す。代表的なFlavonolとしてQuercetin、Kaempferol、Myricetinがあり、果物や野菜に多量に含まれている (Crozier et al., 1997)。FlavoneはEpigeninやLuteolinが代表的な例であり、セロリ、パセリ、チョウセンアザミに含まれていると報告されている (Jaganath and Crozier, 2010)。Flavan-3-olも植物に広く存在し、ヒトにおいて食品からの摂取量が非常に多く、食品の渋味や苦味、酸味、甘味、唾液、粘性、アロマ、色素形成などに影響している (Aron and Kennedy, 2007)。Flavan-3-olの例としてCatechin、Proanthocyanidin、Theaflavin、Thearubiginが挙げられる。Flavanoneは水酸化

反応、グリコシル化反応、メチル化反応を起こすことが報告されており、Naringenin、Hesperetin、Eriodictyolなどがこれに属する (Manach et al., 2004)。Isoflavoneはマメ科の植物に含まれ (Gramham, 1991)、エストロゲンレセプターと結合するエストロゲン様活性が確認され、乳がんや骨粗しょう症の予防効果が認められている (Barnes, 2003)。Anthocyanidinは赤色や青色、紫色など果物や花で存在する色素として知られている (Jaganath and Crozier, 2010)。

フラボノイドおよびフェノール化合物は植物中に蓄積され、組織の保護作用、花粉を運ぶ媒体である昆虫、哺乳類、鳥類などの誘引物質、アレロパシー作用物質、紫外線保護剤などとしての役割を果たす (Jaganath and Crozier, 2010)。フラボノイド中でFlavonolおよびIsoflavoneはそれぞれ280~320 nmのUV-Bに対する保護作用や害虫からの防御作用が見られ、Anthocyaninは光分解反応から葉緑体を保護する (Jaganath and Crozier, 2010)。このような作用を示すフラボノイドおよびフェノール性化合物は様々な産業分野に応用されており、染料、布や生地、接着剤、ワックス、香料添加剤、医薬品、香料などの分野で使用され、新規な医薬品、抗生物質、殺虫剤、除草剤の原料としても期待されている (Dewick, 2002)。

近年、フラボノイドなどのフェノール性化合物は人々の健康に有益な機能性が多く確認されている。フラボノイドなどのフェノール性化合物は抗ガン性、抗アレルギー性、抗炎症性などの作用を有することが知られている (Riboli and Norat, 2003; Das and Rosazza, 2006)。また、コレステロールレベルの低下、血圧の低下、酸化ストレスの減少も引き起こす (Anderson et al., 1999)。

1.2 Catechin

カテキン類は無色、水溶性の成分として緑茶の味に関与している。カテキン類は酵素や微生物の作用により構造変化を起こし、緑茶以外の紅茶や微生物醗酵茶などの味、香り、色などにも関連している (Guo et al., 2004; Zhong et al, 2008)。緑茶に含まれている主な成分はカテキン類であるが、チャ (*Camellia sinensis* L.) のカテキンの含量は乾燥方法および栽培した地域や栽培の条件により差異が見られる (Mckay and Blumberg, 2002)。

茶に含有されるカテキン類は主に4つであり、(-)-Epicatechin (EC)、(-)-Epigallocatechin (EGC)、(-)-Epicatechin Gallate (ECG)、(-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG)である (Zhong et al, 2008)。茶カテキン類の50%以上はEGCGであり、次いでEGC、ECG、ECの順で含まれている。また、(-)-Gallocatechin (GC)、(-)-Catechin Gallate (CG)、(-)-Gallocatechin Gallate (GCG)、(-)-Catechin (C) も微量に加工された茶に含まれている (Demeule et al., 2002)。

カテキン類は抗酸化活性、抗腫瘍活性、抗変異原性作用、抗炎症活性、血糖低下作用、インスリン分泌の抑制作用などが報告されており (Nagle et al, 2006; Hagerman et al, 2003; Shi et al, 2000; Ahmed et al, 2002; Sakuma et al., 2013)、機能性成分として医薬品、健康、食品、化粧品分野で広く利用できると考えられる (Zhong et al, 2008)。

1.3 茶の分類

茶は世界で一番長い伝統を持っている飲料の一つであり、チャ (*Camellia sinensis* L.)の葉や茎を原料としている。茶の特徴的な香りが好まれ、広く嗜好品と

して利用されているが、さらに最近の研究結果より茶のポリフェノール成分であるカテキン類に様々な機能性が見い出され、消費者の関心もますます高くなっている (Cabrerera et al., 2006; Kim et al., 2010)。

茶は醗酵条件に基づいて不醗酵茶、弱醗酵茶、半醗酵茶、醗酵茶、微生物醗酵茶に分類されている (Fig. 1)。不醗酵茶は醗酵過程工程がなく、葉や茎をただ蒸すまたは炒ることにより酵素を失活させたもので、緑茶や黄茶がこれに当たる。弱醗酵茶、半醗酵茶、醗酵茶は醗酵度合により分類されるが、いずれもチャの内在的酵素により酸化醗酵した茶である。弱醗酵茶には白茶、半醗酵茶には烏龍茶、醗酵茶には紅茶などがある。微生物醗酵茶は茶葉を微生物によって醗酵させた茶で、後醗酵茶と呼ばれる (Wulandari et al., 2011a; Wan and Zhang, 2008; Tamura et al., 1994)。この微生物醗酵茶の製造工程では必ず微生物が関与し、好気性菌や嫌気性菌によって醗酵が進行する (Tamura et al., 1994)。醗酵に使用した微生物によって好気醗酵茶、嫌気醗酵茶、二段醗酵茶に分類されている。主にカビなどによる好気醗酵から生産された好気醗酵茶には中国のプーアル茶や日本のバタバタ茶などがある。バクテリアにより嫌気醗酵で生産された嫌気醗酵茶にはタイのミエン茶、ビルマのラペソウなどがあり、好気醗酵と嫌気醗酵の二段醗酵茶には中国の酸茶、日本の碁石茶などが含まれる (Ishimaru et al., 2012a; Tamura et al., 1994)。

醗酵工程における茶の主な成分であるカテキン類の変化に関して研究が進められている (Zhu et al., 2015)。カテキン類は緑茶に多く含まれるが、それは生葉を収穫後すぐに蒸すまたは炒ることによりポリフェノール酸化酵素や付着している天然の微生物が不活性化になったためと考えられる (Toschi et al., 2000)。烏龍茶や紅茶、微生物醗酵茶中のカテキン類は不醗酵茶と比べ少ないことが報告されている。烏龍茶

や紅茶の醗酵工程ではポリフェノール酸化酵素によりカテキン類が酸化されテアフラビン類が生成する。このテアフラビンは茶の品質に関与する。また、Tearubiginは醗酵茶の色や香味に関与する (Chen et al., 2010)。

茶の生産および消費量の統計データによると、全体の約78%が紅茶、20%が緑茶であり、残りの2%以下に烏龍茶などが含まれる (McKay and Blumberg, 2002)。紅茶は主に西洋諸国およびインドなどの一部のアジア諸国で消費され、緑茶は主に中国、日本、韓国、中東および少数の北アフリカ諸国で消費されている。烏龍茶は台湾や中国南東部のみで生産ならびに消費されている (Karori et al., 2007)。一方、微生物醗酵茶は主に中国や日本で消費されているが、緑茶や紅茶より消費量が少ない (Tanaka et al., 2011)。

1.4 微生物醗酵茶

微生物醗酵茶は熱処理した茶葉を微生物によって醗酵するもので、主に中国南部で生産され、カテキンの含量は緑茶に比べ非常に少ない。代表的な微生物醗酵茶である中国のプーアル茶は数ヶ月から数年間の醗酵工程を必要とするため、茶の品質や香味に大きく影響を及ぼす (Kapoor et al., 2013)。プーアル茶は赤色や褐色の色調を有し、醗酵の進行や醗酵期間により特異的に生成される独特な香味を持っている (Jeng et al, 2007)。

醗酵工程で微生物の酵素による反応や各成分の自動酸化、分解反応などが起きるため、微生物醗酵茶はその成分組成が他の茶種と異なる (Guo et al., 2004)。微生物醗酵茶では微生物の作用により茶葉に含まれているカテキン類が分解され、醗酵の進行に伴い、カテキン類の含量は減少することが報告されている (Jiang et al.,

2011; Zuo et al., 2002)。微生物醱酵茶中には醱酵生成物であるGABAなどのアミノ酸類、カテキン類の酸化物などが確認されている (Zhang et al., 2011; Jeng et al., 2007)。茶葉に多く含まれているカテキン類は無色であるが、微生物醱酵中に酸化され、一部は褐色の重合体になる。これらの色素の生成のため微生物醱酵茶の色は褐色や黒色であり、赤色のものは、微生物醱酵茶の色の方が紅茶に比べて濃い赤色であることが多い。また、微生物醱酵茶の香りは微生物の酵素作用による生成物等が深く関与しているので、特徴的な香りを形成している。茶葉に含まれているアミノ酸や炭水化物は微生物により消費され減少する (Guo et al., 2004)。

微生物醱酵茶の代表的な例であるプーアル茶の生産方法は、緑茶や烏龍茶および紅茶とは大きく異なる。茶葉を集め加熱処理し、茶葉に含まれている酸化酵素を不活性化する。この加熱処理は茶の保存期間を延ばすために行う工程である。不活性化された茶葉は乾燥し、適切な水分含量に調整した後、茶葉の微生物醱酵を行う。茶葉の色や香りの変化を見ながら醱酵程度を判断し、醱酵の終点は製造業者により決定される (Abe et al., 2008)。プーアル茶は水分を調整した茶葉を室温で長期間醱酵を行うため、人々に有害な微生物が生育される可能性も考えられる (Hou et al., 2009a)。また、プーアル茶は伝統的には長い時間をかけ茶葉を発酵して生産されているが、発酵工程を促進するため、発酵中にぬれた布で覆う方法を用いることもある。この方法により発酵期間を短縮した場合は、茶の香味を強化する有益な微生物の成長を妨害したり、反対に生体に有害な微生物が成長したりする可能性が高くなる (Jeng et al, 2007)。しかし、貯蔵期間1年と10年のプーアル茶においてマウスを用いた急性毒性試験を行ったところ、それらのLD₅₀は緑茶よりも低かったとの報告があり (Guo et al., 2004)、プーアル茶の安全性に関する追加研究が必要であると考

えられる。

微生物醗酵茶の製造に使われる微生物には *Aspergillus*, *Blastobotry*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Saccharomyces*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Yeast* などの代表的なカビやバクテリアがある (Yuh et al., 2010; Abe et al., 2008; Xu et al., 2005; Zhao et al., 2010)。その中でも *Aspergillus* が微生物醗酵茶の重要な微生物である (Zhao et al., 2015)。

微生物醗酵茶には高脂血症抑制効果 (Oyaizu et al., 2005)、動脈硬化抑制効果 (Hou et al., 2009b)、高コレステロール血症抑制効果 (Yang and Koo, 1997)、脂質合成抑制作用 (Chiang et al., 2006)、ウイルス抑制免疫作用 (Noguchi et al., 2008)、NO生産抑制効果 (Ku et al., 2010)、抗癌作用 (Zhao et al., 2011) などが報告されており、機能性食品として注目されている。微生物醗酵茶は製造工程に微生物が関与するので、カテキン類などの含有量は緑茶とは異なり、上述した薬理作用はカテキン類以外に起因するものと推定されている (Miyamura et al., 2008)。

醗酵は昔から食品の保存性の強化や栄養性の質を高めるために使用された技術の一つであり、醗酵工程で食品の栄養素および非栄養素の比率が変化したり、新しい成分が生成したりする (Zhang et al., 2012)。新たなカテキン酸化物は日本と中国の微生物醗酵茶などから発見された。日本の微生物醗酵茶から Teadenol A および Teadenol B、日本で生産されたプーアル茶から EC および EGC の代謝産物が発見された (Tanaka et al., 2011; Wang et al., 2001)。また、中国の伝統的な微生物醗酵茶であるプーアル茶と Liu-pao tea からそれぞれ Teasperol および Teasperin (Kanagae et al., 2013)、Puerins A-F が単離された (Zuou et al., 2005; Tao et al., 2014)。また、中国の微生物醗酵茶である Fuzhuan tea では Flavan-3-ol の誘導体である Fuzuanins

A-Fが発見された (Ling et al., 2010; Luo et al., 2013; Zhu et al., 2015)。この中で Fuzuanin BはHeLa細胞に対する抗増殖作用が明らかになっている (Luo et al., 2013)。微生物醗酵茶から様々な成分が発見されたが、それらの生成する詳しいメカニズムは未解明であり、いまだ未知の成分が含まれていると考えられる。

最近、日本において特定な微生物を利用し、醗酵処理を行う醗酵茶が開発され、その製品が市販され始めた。この醗酵茶は*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶で、生成した新規ポリフェノール成分である Teadenol Aおよび Teadenol Bが分離された (Wulandari et al., 2011a, 2011b)。この両化合物は各々(-)-Epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCG)および(-)-Gallocatechin 3-*O*-gallate (GCG)から生合成されると報告され、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280)の酵素反応によりカテキン類から生成される (Wulandari et al., 2011c)。この化学構造式をFig. 2に示す。このTeadenol AおよびTeadenol Bは機能性成分として注目され、脂肪細胞のアディポネクチンの分泌促進作用、PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) の発現抑制作用に関する研究が報告されており、新しい抗メタボリックシンドローム成分として期待されている (Yanagita et al., 2011a, 2011b)。

Teadenol AおよびTeadenol Bは*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶に含有されるが (Wulandari et al., 2011a, 2011b)、この含量は非常に微量である (Wulandari et al., 2011a; Ishimaru et al., 2012a, 2012b)。微生物醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの含量では上記に示した健康促進の効果が見られるほど十分ではないと考えられる。

Teadenol AおよびTeadenol Bは抗メタボリックシンドローム成分として期待されているため (Yanagita et al., 2011a, 2011b)、茶だけではなく食品添加物としても利

用可能であると考えられ、Teadenol類が強化された茶や飲料など色々な分野において活用できると予想される。そのため、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成を増加させることにより簡便な方法でTeadenol AおよびTeadenol Bを得る必要がある。

そこで本研究では、この微生物醗酵茶のTeadenol AおよびTeadenol Bの効率的生産を目的として、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) によってTeadenol AおよびTeadenol Bが生成する生産条件の検討とその分離法の検討を行った。

1.5 本論文の構成

本論文ではTeadenol AおよびTeadenol Bを安定的に供給するために多量生産を行うことを目的とした。

各章の内容は以下の通りである。

第2章 Teadenol AおよびTeadenol B標準品の単離

カテキン類から微生物醗酵により生成した新規ポリフェノール成分であるTeadenol AおよびTeadenol Bの標準品を調製するために、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いて醗酵した微生物醗酵茶を出発原料として、Teadenol AおよびTeadenol Bの分離方法の検討を行った。

第3章 カテキンを出発原料とするTeadenol AおよびTeadenol Bの生産

Aspergillus sp. (FARM AP-21280) を用いて液体培養及び固体培養を用いてTeadenol AおよびTeadenol Bの生産条件を検討した。そこで、微生物の生育の状態およびTeadenol AおよびTeadenol Bの生産量を検定した。

第4章 EGCGおよび緑茶粉末を用いた*Aspergillus sp.*の培養上清からTeadenol AおよびTeadenol Bの調製

第3章で確立したTeadenol AおよびTeadenol Bの生産条件に基づいて液体培養を行った。得られた培養ろ液からTeadenol AおよびTeadenol Bを調製するための効率的分離方法について検討を行った。

第5章 総括

本論文で行った研究結果の総合考察として、Teadenol AおよびTeadenol Bの精製法や液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの大量生産、Teadenol AおよびTeadenol Bの新しい生産方法について考察を行った。

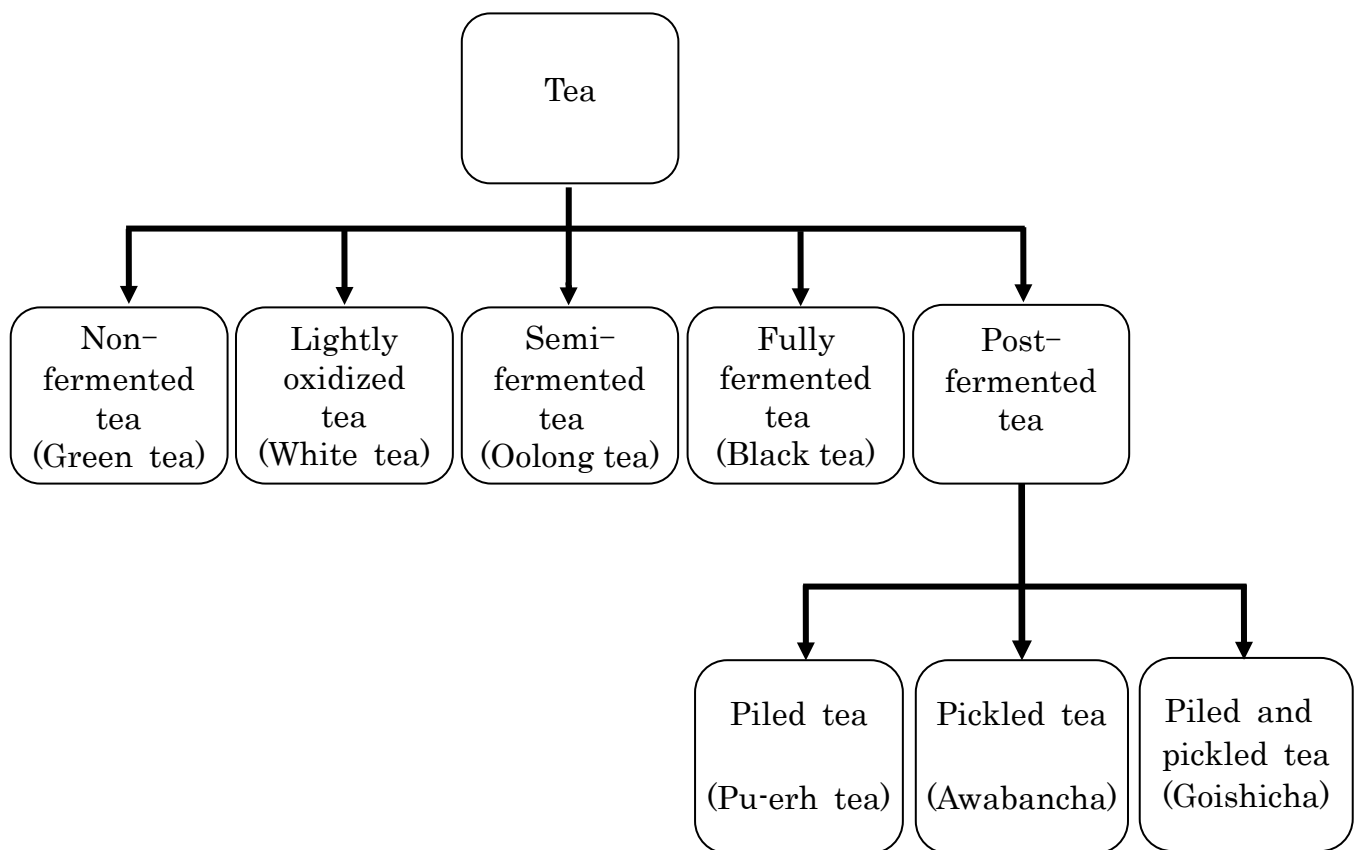
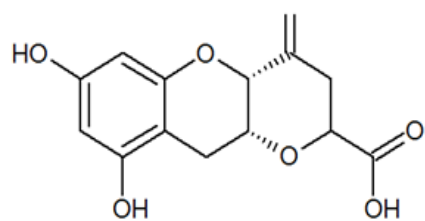


Fig. 1. Classification of Teas by the Manufacturing Process.

(Ryo et al., 2004)

(A)



(B)

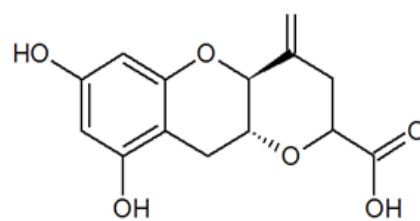


Fig. 2. Chemical Structures of Teadenol A (A) and Teadenol B (B).
(Wulandari et al., 2011b)

第2章 Teadenol AおよびTeadenol B標準品の単離

2.1 序

茶はチャ (*Camellia sinensis* L.) の葉や茎を原料として、世界で広く消費されている飲料の中で一つである (Sang et al., 2005)。特に茶は抗酸化成分を多量に含有している食品として知られている。茶抽出液から血圧の降圧作用、抗変異原活性 (kurita et al., 2010)、抗肥満活性 (Murase et al., 2002)、抗酸化作用 (Salah et al., 1995)、抗腫瘍作用 (Suganuma et al., 2003)、コレステロール低下作用 (Yang and Koo, 2000) などが報告されている。

茶抽出液から得られる上記の効果は茶に含まれているポリフェノール類に起因していると考えられる (Xie et al., 2013)。茶ポリフェノールの誘導体は緑茶 (不醗酵茶)、ウーロン茶 (半醗酵茶)、紅茶 (醗酵茶、前醗酵茶) 等の茶に様々な構造や含量で存在している (Peterson et al., 2005)。

日本において特定の微生物を利用し、醗酵処理を行う醗酵茶が開発され、その製品が市販され始めた (Wulandari et al., 2011b; Ishimaru et al., 2012a)。これらの化合物の醗酵茶は *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶で、新規ポリフェノール成分である Teadenol A および Teadenol B が分離された (Wulandari et al., 2011b)。Teadenol A および Teadenol B は緑茶、烏龍茶、紅茶には全く存在しない。この化学構造式を Fig. 2 に示す。Teadenol A および Teadenol B は機能性成分として注目され、脂肪細胞のアディポネクチンの分泌を増大させ、Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) の発現を抑制すると報告されており、新しい抗メタボリ

ックシンドローム成分として期待されている (Yanagita et al., 2011a; Yanagita et al., 2011b)。

そこで第2章では、この新規ポリフェノール成分であるTeadenol AおよびTeadenol B標準品を調製し、同標準品を用いた定量法を確定するために *Aspergillus sp.* (FARM AP-21280) を用いて醗酵した微生物醗酵茶を出発原料として、Teadenol A およびTeadenol Bの分離方法の検討を行った。

2.2 実験材料および実験方法

2.2.1 Teadenol Aの単離

2.2.1.1 実験材料

Aspergillus sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶の茶葉粉末は (株) リバーソン (静岡) から供与された。

2.2.1.2 Teadenol Aの抽出液の調製

Teadenol Aの抽出は、茶葉粉末 (200 g) に800 mlの80% エタノールを加え、室温で一晩攪拌した後、Advantec No.2 (Advantec、東京) ろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液はロータリーエバポレーターを用いてアルコール分を除去した。吸引濾過の残渣は800 mlの蒸留水を加え、80°Cで一晩静置して、遠心分離 (4,600 × *g*、30分間) を行った。濃縮した80% エタノール抽出物とこの上清を合わせ、抽出液とした。茶

葉粉末200 gからの操作を2回繰り返して、茶葉粉末合計400 gから抽出液を調製した。

2.2.1.3 カラムクロマトグラフィーによるTeadenol Aの分離

抽出液の2分の1量 (2.0 L) を一回のクロマトグラフィーに供した。抽出液2.0 LをDiaion HP 20 カラム (Φ7 × 44 cm、三菱化学株式会社、東京) に流速 980 ml/hで負荷した。負荷した後、7 Lの水で非吸着物を洗浄し、次いで20% メタノール、40% メタノール、60% メタノール、80% メタノール、100% メタノールを各々7 Lずつ流し、カラム中の吸着物を溶出した。残りの2分の1量 (2.0 L) を上記と同様に分離を行い、40% メタノール溶出液を集め、ロータリーエバポレーターで濃縮した。この濃縮液を水で平衡化したSephadex LH-20 カラム (Φ4 × 50 cm、GE Healthcare、Little Chalfont、UK) に流速 36 ml/hで負荷した。水で洗浄した後、60% メタノールで溶出し、溶出液は20分間ごと分画した。

2.2.1.4 HPLCによるTeadenol Aの精製

Diaion HP 20およびSephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで分離した後、分取用HPLCを用いて精製を行った。HPLCはPU-980 Intelligent HPLC Pump (日本分光、東京) を用いた。カラムはInertSustain™ C18 (Φ10 × 250 mm、5 μm、GLサイエンス、東京) を使用し、溶離液および濃度勾配は(A) 0.1% Formic acid水溶液、(B) Acetonitrileを用い、90% A (0分) → 46% A (24分後) → 37% A (53分後) → 20% A (65分後) で溶出した。流速は2 ml/minとし、サンプルは60% メタノール溶出液を2 ml注入し、溶出液を5分間ごとに分画した。

2.2.1.5 Teadenol Aの純度検定

分取HPLCで調製したTeadenol AはDMSOで濃度1 mg/150 μ lに調整した後、HPLCを用いて純度検定を行った。HPLCはPU-980 Intelligent HPLC Pump (日本分光、東京) を用い、検出器はUV-970 Intelligent UV/VIS Detector (日本分光、東京) を用いた。カラムはInertSustain™ C18 (Φ 4.6 \times 250 mm、5 μ m、GLサイエンス、東京) を使用し、移動相および濃度勾配は(A) 0.1% Formic acidを含む10 mM Ammonium acetate水溶液、(B) Acetonitrileを用い、95% A (0分) \rightarrow 50% A(30分後) \rightarrow 10% A (40分後) \rightarrow 10% A (45分後) \rightarrow 95% A (50分後) \rightarrow 95% A (60分後) で分析を行った。流速および検出はそれぞれ0.6 ml/min、280 nmの吸光度を測定した。得られたデータはChromato-PRO (ランタイムインストルメンツ、神奈川) を用いて解析した。

2.2.1.6 Teadenol Aの構造の確認

単離したTeadenol Aの化学構造をNuclear magnetic resonance (NMR) により分析を行った。Teadenol AのNMRスペクトルはAVANCE 600 (600 MHz 1 H NMR、Bruker、Billerica、MA、USA) で測定した。Tetramethyl silane (TMS) を内部標準として使用した。調製したTeadenol Aは、9 mgをDMSO- d_6 0.75 mlに溶解した後、遠心分離 (5,510 $\times g$ 、5分間) し、上清をNMRチューブに入れ、分析を行った。

2.2.1.7 Teadenol AのHPLC分析における検量線の作成

精製したTeadenol A標準品はDMSOに溶解した。Teadenol Aは濃度1 mg/100 μ lに調製後、さらに40倍希釈し、HPLCを用いて50 μ lを注入し、検量線作成を行った。

HPLCの分析は2.2.1.5と同様の条件で行った。

2.2.1.8 微生物醗酵茶中のTeadenol Aの定量

茶葉粉末 0.15 gを10 mlの80% エタノールに懸濁し、室温で一晩攪拌した。抽出後遠心分離（4,600 × *g*、5分間）を行い、上清を試料溶液としてHPLCを用いて定量を行った。HPLCの分析条件は、2.2.1.5と同様に行った。

2.2.2 Teadenol Bの単離

2.2.2.1 実験材料

Aspergillus sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶の茶葉は（株）リバーソン（静岡）から供与された。

2.2.2.2 Teadenol Bの抽出液の調製

茶葉の抽出は、Ishimaruら（2012a）の方法に準じて行った。*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) で醗酵した微生物醗酵茶の茶葉の800 gを布袋に入れ、3 Lの熱水（90℃）を加え、3時間静置して抽出した。デカンテーションにより抽出液を回収した。再び3 Lの熱水（90℃）により上記と同様に抽出し、その抽出液を先の抽出液と合わせた。

2.2.2.3 カラムクロマトグラフィーによるTeadenol Bの分離

この抽出液の1/2量 (1.4 L) を一回のクロマトグラフィーに負荷した。抽出液 1.4 Lを水で平衡化したDiaion HP 20カラム (Φ4 × 50 cm、三菱化学株式会社、東京) に流速 500 ml/hで負荷した。負荷した後、1.5 Lの水で非吸着物を洗浄した。次いで4 Lの60% メタノール、3 Lの100% メタノールで吸着物を溶出した。得られた60% メタノール溶出液を画分1とし、100% メタノール溶出液を画分2とした。同様に残りの1/2量 (1.4 L) を上記と同様に分離を行い、相同の画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮した。そのうち60% メタノール溶出画分は水で平衡化したSephadex LH-20カラム (Φ3.5 × 50 cm、GE Healthcare、Little Chalfont、UK) に流速 36 ml/hで負荷した。水洗後、50% メタノールで溶出し、溶出液を30分間ごとに分画した。一方、100% メタノール溶出画分はロータリーエバポレーターで濃縮した後、水で平衡化したSephadex LH-20カラム (Φ3.5 × 50 cm、GE Healthcare、Little Chalfont、UK) に流速 36 ml/hで負荷した。水で洗浄した後、50% メタノールで溶出し、溶出液を30分間ごとに分画した。

2.2.2.4 HPLCによるTeadenol Bの精製

Diaion HP 20およびSephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで分離した後、分取用HPLCを用いてTeadenol Bの精製を行った。HPLCはPU-980 Intelligent HPLC Pump (日本分光、東京) を用いた。カラムはInertSustain™ C18 (Φ10 × 250 mm、5 μm、GLサイエンス、東京) を使用し、溶離液および濃度勾配は(A) 0.1% Formic acid水溶液、(B) Acetonitrileを用い、90% A (0分) → 37% A (33分後) → 34% A (43分後) → 20% A (45分後) で溶出した。流速は2 ml/minにした。サンプルは

Sephadex LH-20 クロマトグラフィーにおける60% メタノール溶出液および100% メタノールの溶出液をそれぞれ濃縮後、一回に2 mlを注入し、溶出液を1分間ごとに分画した。

2.2.2.5. Teadenol Bの純度検定

微生物醗酵茶の茶葉から得られたTeadenol Bはメタノールで濃度1 mg/100 μ lに調整後、HPLCを用いて純度検定を行った。HPLCはPU-980 Intelligent HPLC Pump (日本分光、東京)を用いた。検出器はUV-970 Intelligent UV/VIS Detector (日本分光、東京)を用いた。カラムはTOSOH ODS 80TS (Φ 4.8 \times 250 mm、5 μ m、TOSOH、東京)を使用し、移動相および濃度勾配は(A) 0.1% formic acid水溶液、(B) acetonitrileを用い、90% A (0分) \rightarrow 20% A (30分後) で分析を行った。流速および検出はそれぞれ0.6 ml/min、280 nmの吸光度で測定した。得られたデータはChromato-PRO (ランタイムインスツルメンツ、神奈川)を用いて解析した。

2.2.2.6 Teadenol Bの構造の確認

単離したTeadenol Bの化学構造をNuclear magnetic resonance (NMR)により分析を行った。Teadenol BのNMRスペクトルはAVANCE 500 (500 MHz 1 H NMR、Bruker、Billerica、MA、USA)で測定した。この以降の操作は2.2.1.6と同様に行った。

2.2.2.7 Teadenol BのHPLC分析における検量線の作成

精製したTeadenol B標準品はメタノールに溶解した。Teadenol Bは濃度1 mg/100

μlに調整後、さらに50倍希釈しHPLCを用いて50 μlを注入し、検量線作成を行った。HPLCの分析は2.2.2.5と同様の条件で行った。

2.2.2.8 微生物醗酵茶中の茶葉のTeadenol Bの定量

微生物醗酵茶の茶葉 0.5 gを25 mlの熱水に懸濁し、室温で3時間放置した後、遠心分離 (4,600 × g、10分間) した。上清を試料溶液としてHPLCを用いて定量を行った。HPLCの分析条件は、2.2.2.5と同様の条件を用いた。

2.3 結果および考察

2.3.1 Teadenol AおよびTeadenol B標準品の単離

2.3.1.1 Teadenol A標準品の単離

Diaion HP 20およびSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィー、さらに分取用HPLCを用いて微生物醗酵茶の茶葉粉末からTeadenol Aの単離を行った (Fig. 3)。茶葉粉末を出発原料とし、Sephadex LH-20カラムまでの同様の分離操作を2回行った。それぞれの60% メタノール溶出画分を合わせ、ロータリーエバポレーターで濃縮し、さらに分取用HPLCによる分離を行った。分取後、Teadenol A画分を濃縮することにより結晶が得られた。すべての結晶を集め、乾燥した結果、収量は100 mgであった。得られた結晶の純度をHPLCで分析した結果をFig. 5Aに示す。精製したTeadenol Aの純度はHPLCのピーク面積から算出して99%以上であった。

2.3.1.2 Teadenol B標準品の単離

Diaion HP 20およびSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィー、さらに分取用HPLCを用いて微生物醗酵茶の茶葉からTeadenol Bの精製を行った (Fig. 4)。微生物醗酵茶の茶葉の抽出液をDiaion HP 20およびSephadex LH-20を用いた分離を2回行い、それぞれの60% メタノール溶出画分および100% メタノール溶出画分を合わせた。各溶出画分をそれぞれロータリーエバポレーターで濃縮し、さらに分取用HPLCによる分離を行った。分取後、Teadenol B画分を濃縮することにより30.0 mgの結晶が得られた。HPLC分析の結果、Teadenol Bの純度は99%以上であった (Fig. 5B)。

2.3.2 Teadenol AおよびTeadenol Bの構造解析

調製したTeadenol AおよびTeadenol Bの構造を確認するため¹H NMR分析を行った。その結果をそれぞれFig. 6およびFig. 7に示す。また、各シグナルの帰属と文献値との比較をTable 1およびTable 2に示す。Teadenol AおよびTeadenol BのシグナルはWulandariら (2011b) の結果とよく一致し、精製した化合物はそれぞれTeadenol AおよびTeadenol Bと確認された。

2.3.3 Teadenol AおよびTeadenol BのHPLC分析における検量線の作成

精製したTeadenol AおよびTeadenol B標準品を用いて検量線を作成した。Fig. 8にTeadenol AおよびTeadenol Bの検量線を示す。Fig. 8より、Teadenol Aは2.50–25.0 µg/ml、Teadenol Bは2.00–20.0 µg/mlの範囲で直線性が得られた。次に作成した検量線を用いて、茶葉粉末中のTeadenol Aおよび微生物醗酵茶の茶葉中の

Teadenol Bの定量を行った。

2.3.4 微生物醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの含有量の測定

作成したTeadenol AおよびTeadenol Bの検量線を用いて、茶葉粉末中のTeadenol Aの定量、微生物醗酵茶の茶葉中のTeadenol Bの定量を行った (Fig. 9)。Table 3に茶葉粉末 1 g当りのTeadenol Aおよび微生物醗酵茶の茶葉 1 g当りのTeadenol Bの含有量を示す。Table 3より、茶葉粉末 1 g当りでは、Teadenol Aが1.35 mg含まれていた。また、微生物醗酵茶の茶葉 1 g当りには、Teadenol Bは0.26 mg含まれていた。Ishimaruら (2012a) によると、微生物醗酵茶の市販品には1 g当りに、Teadenol Aは0.60~5.50 mg、Teadenol Bは1.50~3.80 mgが含まれていた。本研究に用いた微生物醗酵茶の茶葉粉末および茶葉と比較して、Ishimaruら (2012a) の報告の値は本研究で得られたものより、Teadenol Aで約0.5~4倍であったが、Teadenol Bでは約5.7~14倍多かった。また、Wulandariら (2011a) の報告では、本研究での茶葉粉末の結果よりTeadenol Aは約2.5倍多く含まれていた。また、茶葉のTeadenol Bの含量には約9倍の差が認められた。同じ微生物を用いて醗酵しても、原料である茶葉の品質やその醗酵条件が異なると、構成成分に差異が生じることが報告されている (Ishimaru et al., 2012a)。微生物醗酵茶の茶葉粉末と茶葉を比較すると、微生物醗酵茶の茶葉粉末にはTeadenol Aが、茶葉にはTeadenol Bが多く見られたが、これは上述のロット間差によるものであると考えられる。

上記の定量結果に基づいて、微生物醗酵茶の茶葉粉末からのTeadenol A、微生物醗酵茶の茶葉からのTeadenol Bの収率を求めた結果をTable 3に示す。Table 3より、Diaion HP 20およびSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィー、分取用

HPLCを用いたTeadenol Aの収率は、茶葉粉末から15.5%であった。Diaion HP 20 およびSephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィー、分取用HPLCを用いたTeadenol Bの収率は、微生物醗酵茶の茶葉から14.3%であり、3ステップでの分離であることを考えると高い値ではない。この収率は低かった理由として、不純物との分離が困難であるためと考えられる。今後、Teadenol類を選択的に生産可能となれば分離精製における収率は向上すると考えられる。

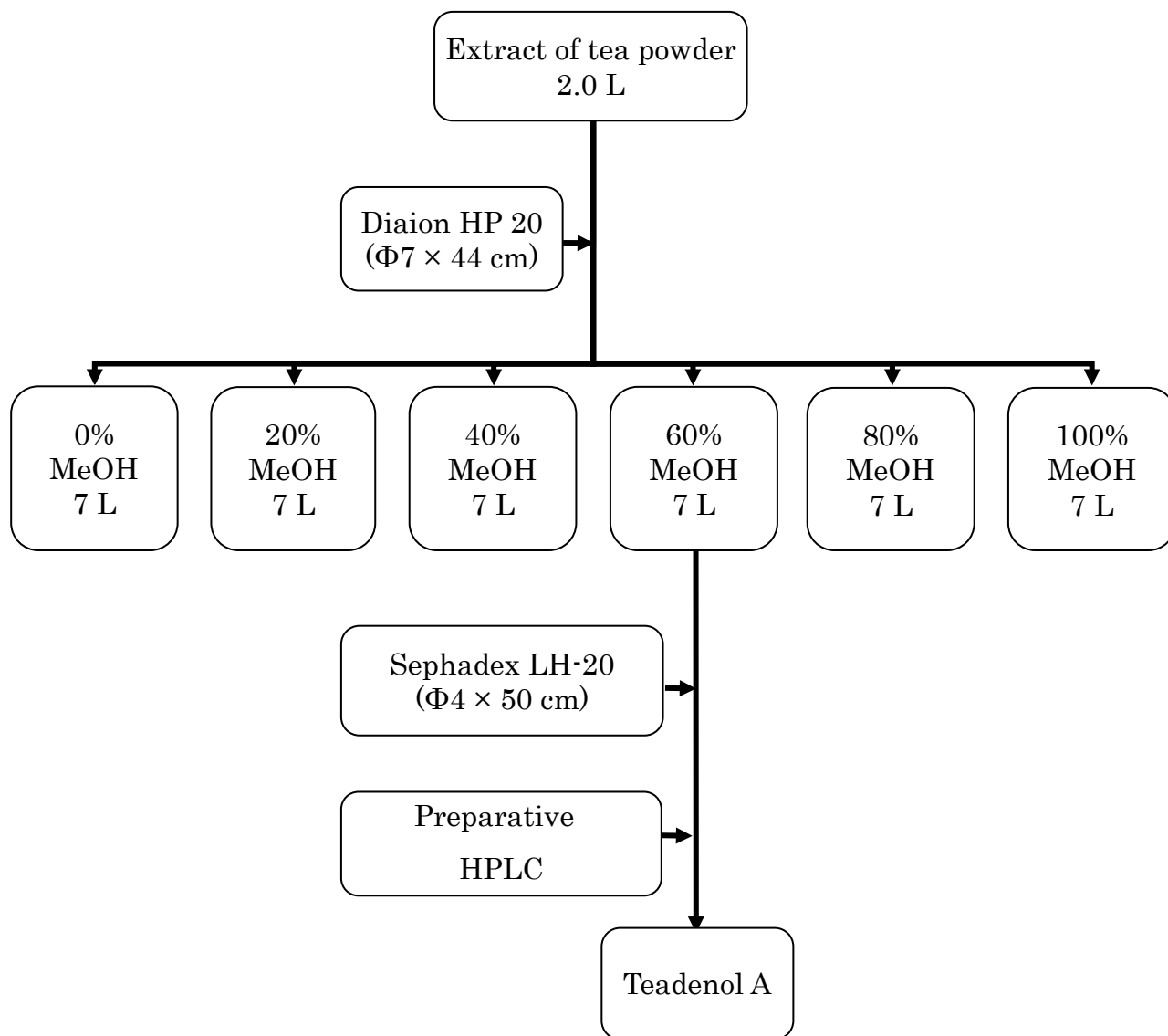


Fig. 3. A Schematic Diagram of the Isolation of Teadenol A.

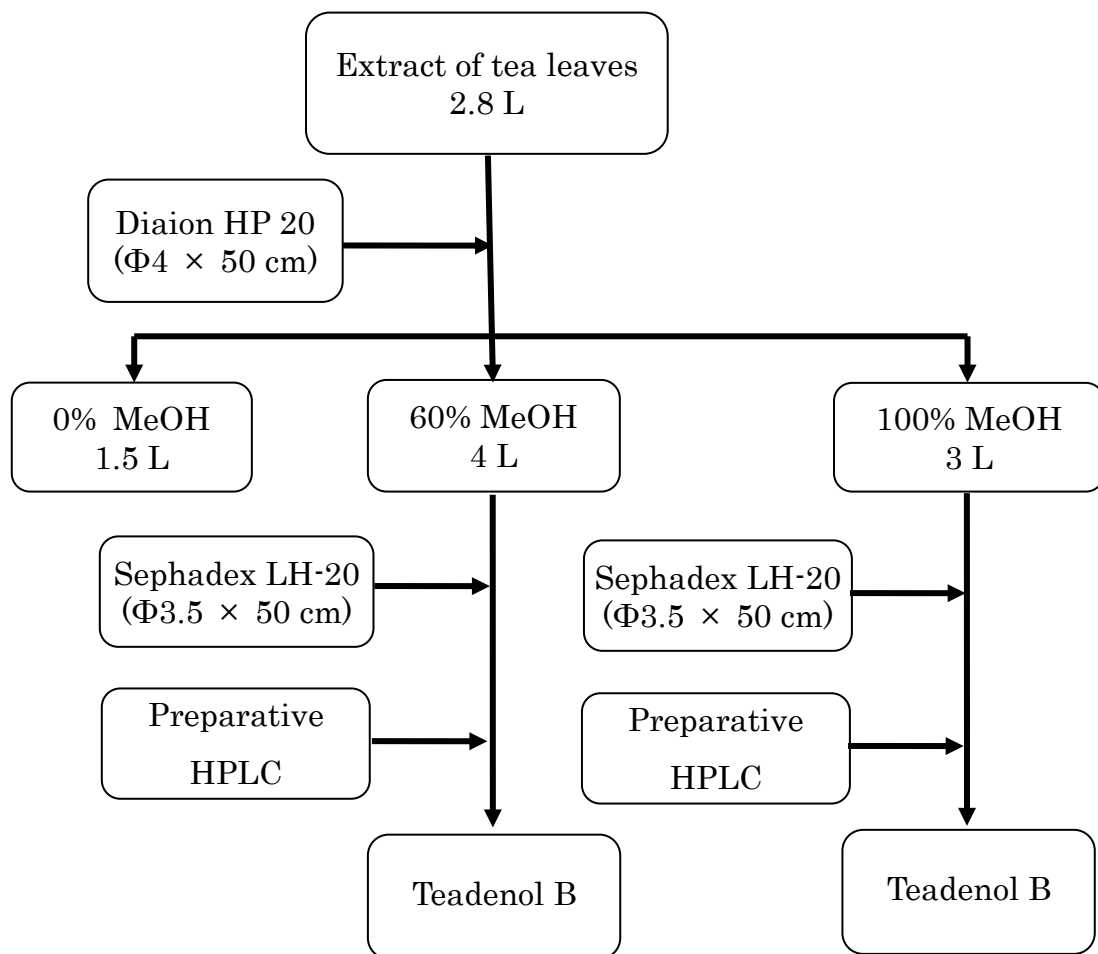


Fig. 4. A Schematic Diagram of the Isolation of Teadenol B.

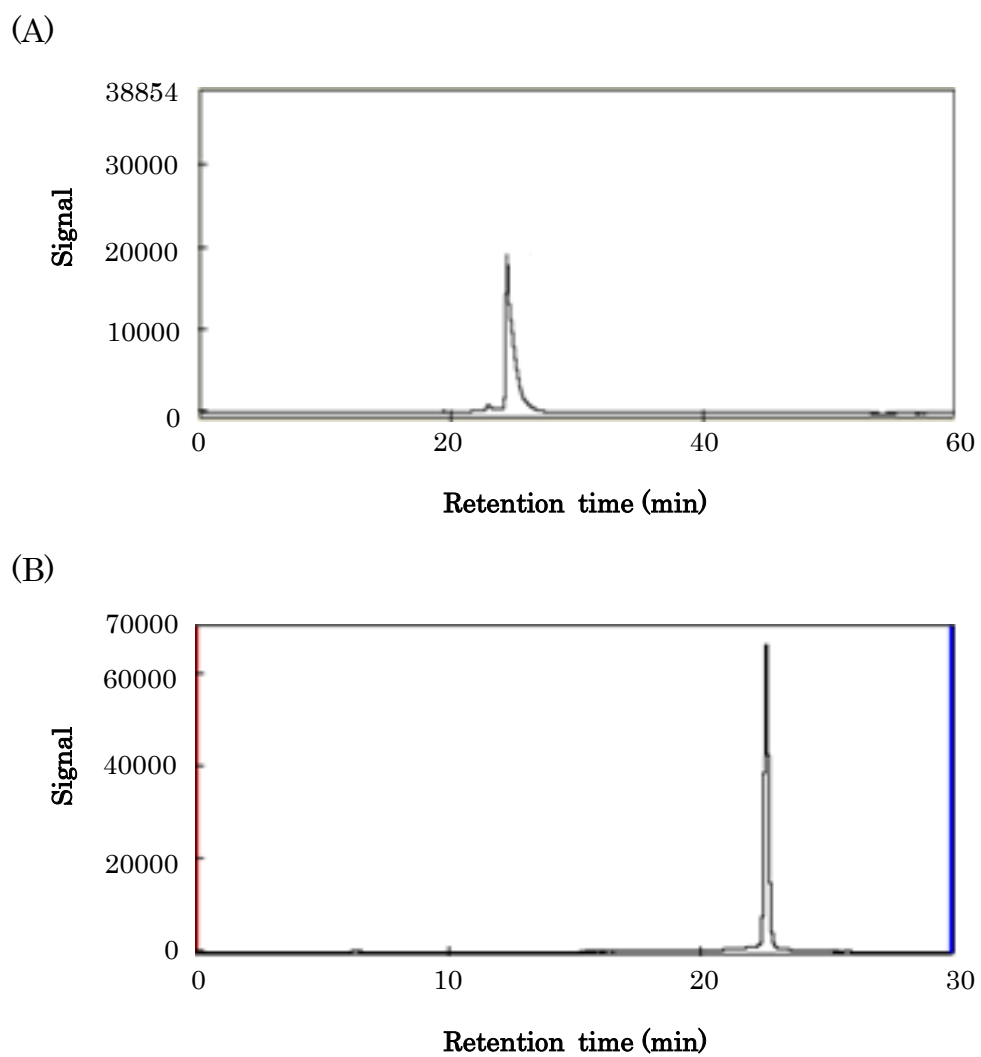


Fig. 5. HPLC Chromatograms of Purified Teadenol A (A) and Teadenol B (B).

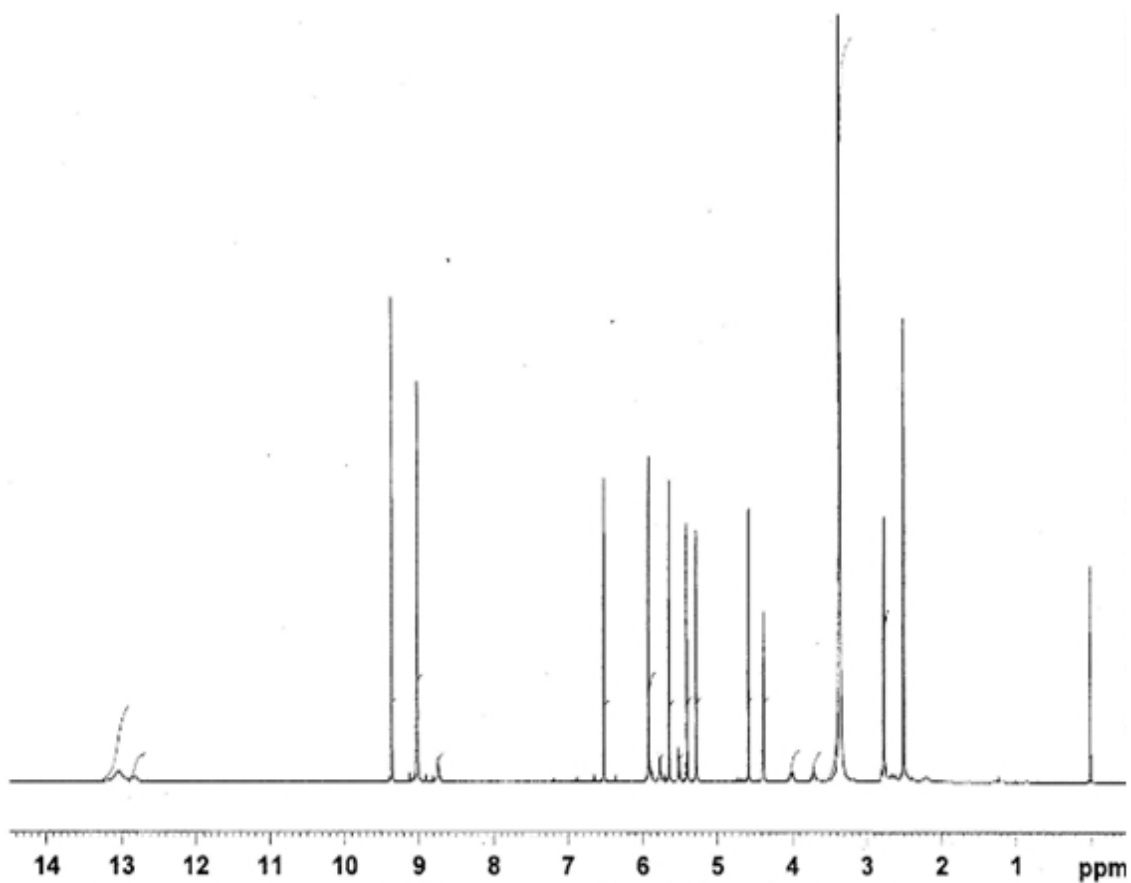


Fig. 6. ^1H NMR of Teadenol A.

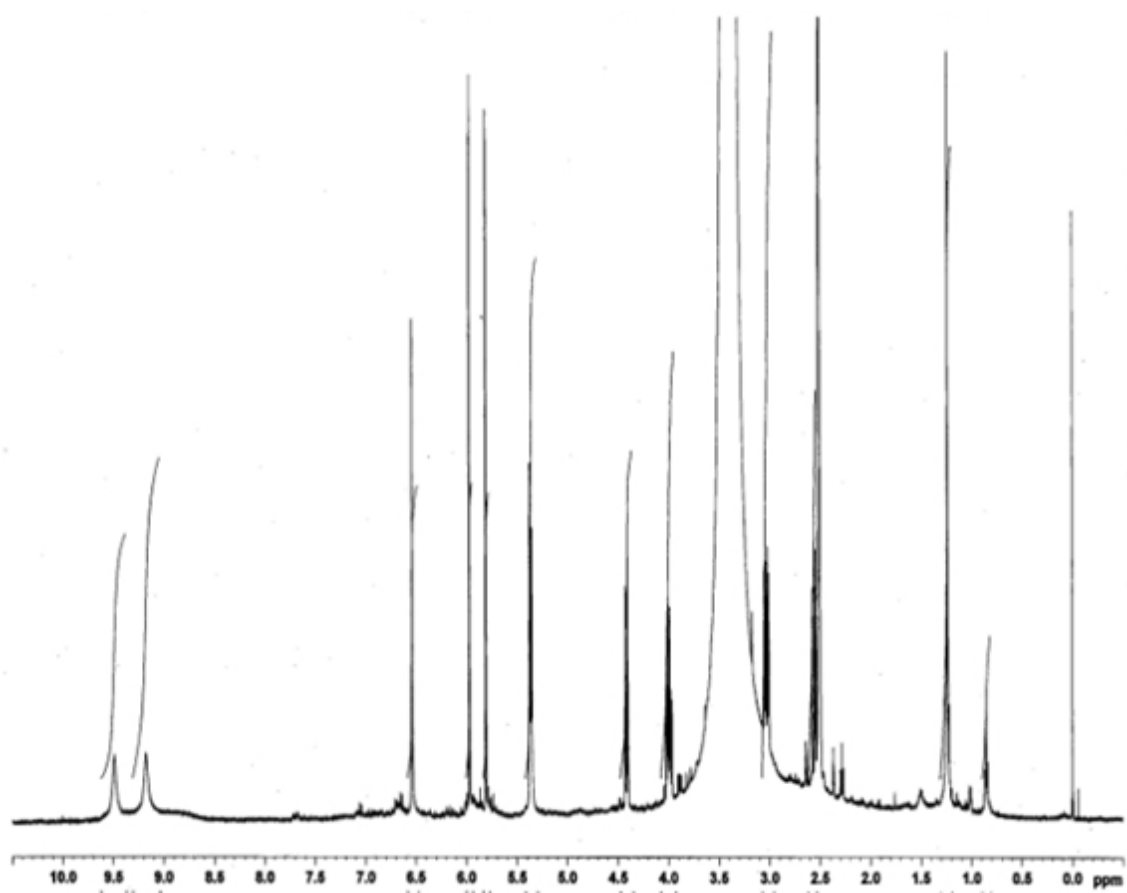


Fig. 7. ¹H NMR of Teadenol B.

Table 1. ¹H NMR Data of Teadenol A

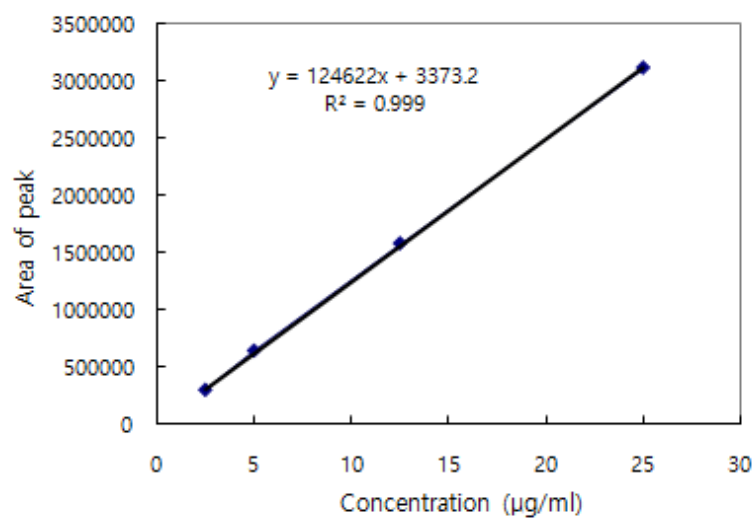
	Wulandari et al (2011b)	The present study
Position	δ_{H}	δ_{H}
2	4.56 (1H, s)	4.58
3	4.36 (1H, m)	4.38
4	2.76 (2H, m)	2.76
5	-	-
6	5.91 (1H, d, J=2.3 Hz)	5.92
7	-	-
8	5.64 (1H, d, J=2.3 Hz)	5.65
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	6.51 (1H, d, J=0.9 Hz)	6.53
14	-	-
15	5.27 (1H, br.s)	5.29
	9.33 (1H)	5.41
16	-	-
5-OH	9.00 (1H)	9.02
7-OH		9.36

Table 2. ¹H NMR Data of Teadenol B

	Wulandari et al (2011b) ^{a)}	The present study ^{b)}
Position	δ_{H}	δ_{H}
2	4.36 (1H, d, J=10.5 Hz)	4.41
3	4.01 (1H, m)	4.01
4	2.66 (1H, dd, J=10.3, 15.7 Hz)	2.52
	3.20 (1H, dd, J=5.9, 15.7 Hz)	3.04
5	-	-
6	5.96 (1H, d, J=2.3 Hz)	5.97
7	-	-
8	5.91 (1H, d, J=2.3 Hz)	5.81
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	6.63 (1H, s)	6.54
14	-	-
15	5.33 (1H, s)	5.36
	5.51 (1H, s)	5.37
16	-	-
5-OH		9.17
7-OH		9.49

a) in CD₃OD, b) in DMSO-d₆

(A)



(B)

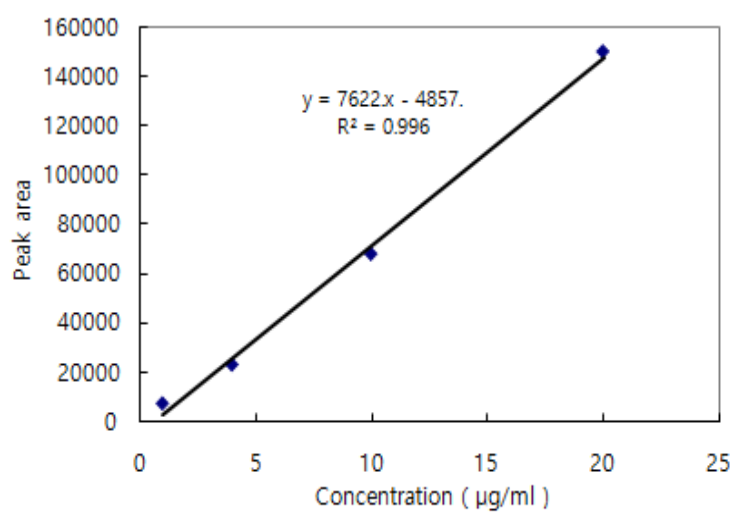
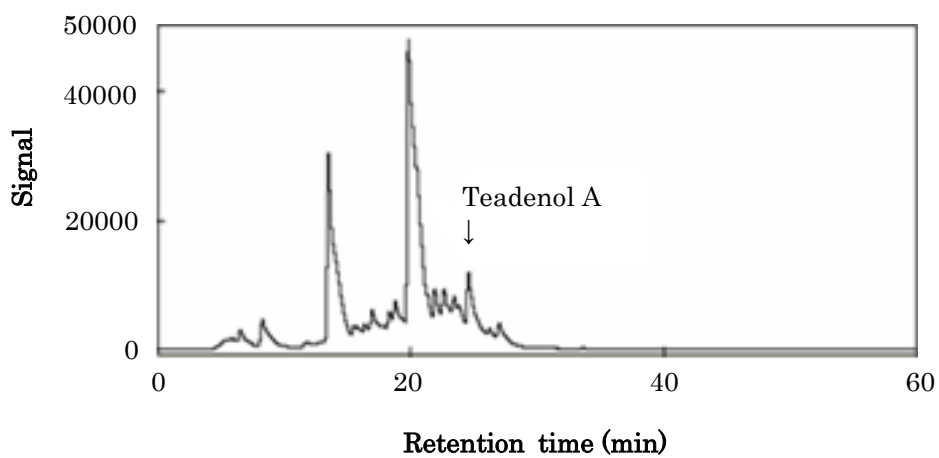


Fig. 8. Calibration Curve of Teadenol A (A) and Teadenol B (B).

(A)



(B)

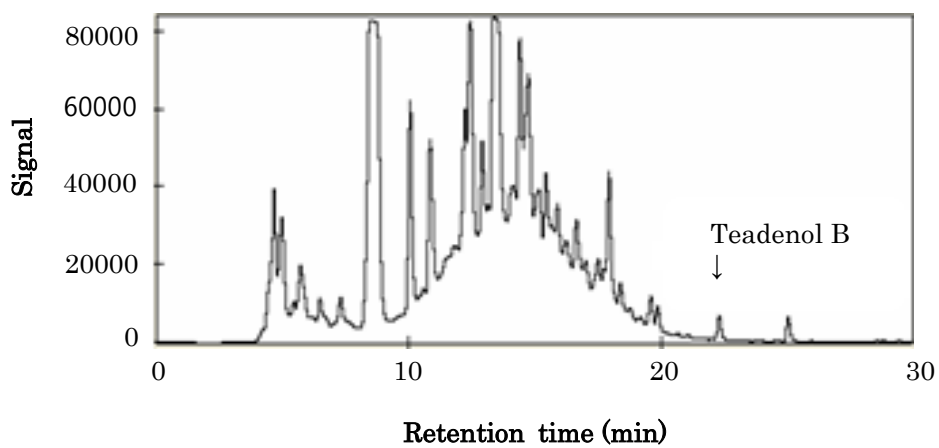


Fig. 9. HPLC Chromatograms of Post-fermented Tea Powder (A) and Post-fermented Tea Leaves (B).

Table 3. Summary of the Purification of Teadenol A and Teadenol B

	Teadenol A		Teadenol B	
	Contents	Yield	Contents	Yield
	(mg)	(%)	(mg)	(%)
Extract of tea powder	540	100		
Diaion HP20 and Sephadex LH20 Chromatography 60% MeOH	152	28.1		
Preparative HPLC	100	15.5		
Extract of tea leaves			210	100
Diaion HP20 and Sephadex LH20 Chromatography 60% MeOH			25	11.9
100% MeOH			21	10.0
Preparative HPLC			30	14.3

第3章 カテキンを出発原料とするTeadenol AおよびTeadenol Bの生産

3.1 序

微生物醗酵茶では、微生物による醗酵により茶葉に含まれているカテキン類が分解され、醗酵の進行に伴い、カテキンの含量は減少することが報告されている (Jiang et al., 2011; Zuo et al., 2002)。一方、微生物醗酵茶には醗酵により新たな化合物の生成も観察され、構造および生理活性がまだ不明な成分が数多く存在することから、化学的あるいは薬学的な研究が進められている。

最近日本では、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶中に生成された新規ポリフェノール成分であるTeadenol AおよびTeadenol Bが発見された (Wulandari et al., 2011b)。このTeadenol AおよびTeadenol Bは緑茶、烏龍茶、紅茶には全く含有されず (Wulandari et al., 2011a)、*Aspergillus*由来の酵素反応によりそれぞれEGCGおよびGCGから変換されると報告されている (Wulandari et al., 2011c)。

日本で市販されている*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280)を用いて醗酵した微生物醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの含量には差異が認められた (Wulandari et al., 2011a; Ishimaru et al., 2012b; Nakayama et al., 2015)。このTeadenol AおよびTeadenol Bを含む醗酵茶の生産条件は確立されているが (Yanagita et al., 2011a, 2011b)、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成は、原料である茶葉中のカテキン含量や醗酵条件により構成成分の違いが生じると考えられる。

微生物を用いたバイオテクノロジー技術は、食品や医薬品産業に実際に広く利用

され経済的にも利点がある。この醗酵技術は適切な環境下で安い基質を用いて有用な成分が得られるため、抗生物質、ビタミン、ステロイド、有機酸、アミノ酸、微生物酵素、微生物多糖類等の生産に利用されている (Demain, 2000; Wilike, 2000; Wang et al., 2005)。

微生物の培養法のうち、液体培養は固体培養より低コストで他の微生物による汚染の危険性を低く抑え、多量の目的物の生産量やその生産性も高められる (Ho and Hood, 2014)。一方、固体培養は適切な水分含量の固体基質の表面に微生物を培養する。実験室では寒天培地を主に使用しているが、大規模な工業的な生産では小麦ふすまのような農産物や廃棄物を用いて培養を行っている。低い水分含量の環境ではバクテリアの成長は抑制され、有用な糸状菌を優先的に生育できる。様々な糸状菌を用いた固体培養は醸造・食品工業で加水分解酵素などの生産に利用されている。さらに固体培養は酵素生産だけではなく二次代謝産物および生物活性化合物の生産にも応用されている (Chang and Chang, 2014)。

そこで第3章では、Teadenol AおよびTeadenol Bの効率的な生産方法を確立するために、茶葉を醗酵するのではなく、カテキン類を出発原料として両化合物を生産する *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) の培養条件について検討を行った。

3.2 実験材料および実験方法

3.2.1 実験材料

Teadenol AおよびTeadenol Bの生成に使用した微生物 *Aspergillus* sp. (FARM AP-

21280) は株式会社リバーソン (静岡) から供与された。食品添加物用EGCGおよび緑茶粉末はそれぞれ茶研究・原事務所株式会社 (東京) と株式会社水上房吉商店 (静岡) から購入した。Epigallocatechin (EGCG) とGalocatechin gallate (GCG) の標準品は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。

微生物醗酵茶 (山吹撫子) は株式会社リバーソン (静岡) から供与された。日本産の茶葉から生産されたプーアル茶 (茶流瘦々) は荒畑園 (静岡) から、中国産茶葉を用いて日本国内で生産されたプーアル茶は健康生活研究所 (奈良) からそれぞれ購入した。

3.2.2 液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産

3.2.2.1 試験用培地の調製

3.2.2.1.1 EGCGのみを含む培地の調製

EGCGのみを含む培地の調製は参考論文 (Wulandari et al., 2011c) の方法で行った。EGCG溶液は EGCG 100 mgに蒸留水 100 mlを用いて作成した。このEGCG溶液をオートクレーブを用いて121°Cで15分間滅菌して培地とした。

3.2.2.1.2 EGCG含有培地の調製

本来のCzapex-Dox培地よりSucrose濃度およびpHを低くした改変培地を基本培地として用いた。本実験で使用したCzapex-Dox改変培地はNaNO₃ 3.0 g/L、K₂HPO₄ 1.0 g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5 g/L、KCl 0.5 g/L、FeSO₄・7H₂O 0.01 g/L、Sucrose 0.5

g/Lで調製した。この基本培地にEGCGを終濃度0.1% (w/v)、1.0% (w/v)、2.0% (w/v)、5.0% (w/v)、7.0% (w/v) になるように溶解し、4 N HClでpH 6.0に調節した。この後、振とうフラスコ (500 ml容) に100 mlずつ分注し、オートクレーブ (121°C、15分間) で滅菌した。

3.2.2.1.3 緑茶粉末含有培地の調製

緑茶粉末を終濃度0.5% (w/v)、1.0% (w/v)、1.5% (w/v)、2.0% (w/v)になるように振とうフラスコ (500 ml容) に添加し、各濃度のEGCGを含む100 mlの上記基本培地を分注した後、オートクレーブ (121°C、15分間)で滅菌した。

3.2.2.2 植菌および培養条件

Aspergillus sp. (FARM AP-21280) はPotato Dextrose Agar (PDA) 培地上で25°Cで2週間培養を行った。PDAで培養した*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を寒天培地ごと1 cm x 1 cmで接種し、暗黒下、25°C、120 strokeの条件で培養した。

3.2.2.3 経時変化の測定

培養液は一定時間ごとに15.0 ml (5.0 ml × 3本) ずつマイクロチューブに採取した。採取した培地は遠心分離 (4,600 × g、10分間) を行い、培地上清を回収し、HPLC分析を行った。

3.2.3 固体培養によるteadenol Aおよびteadenol Bの生産

3.2.3.1 試験用培地の調製

緑茶粉末を終濃度1.0% (w/v)、2.0% (w/v)になるように添加した小麦ふすま (素材舎、三重) 10 gを三角フラスコに入れた。この後、5.0% EGCGを含むCzapex-Dox改変培地 10 mlを分注し、オートクレーブ (121°C、15分間) で滅菌した。

3.2.3.2 植菌および培養条件

PDA培地で培養した *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いて 1.0×10^5 spores/mlになるように調製し、滅菌した小麦ふすまに1 mlを植菌し、30°C、15日間培養を行った。

3.2.3.3 サンプルングおよび経時変化の測定

固体培養では一定時間ごとに0.5 gずつ採取し、20 mlの80% エタノールを加え3時間抽出した。抽出液を遠心分離 ($4,600 \times g$ 、10分間) し、上清を回収し、HPLC分析に供した。

3.2.4 各種醗酵茶の抽出液の調製

微生物醗酵茶 (山吹撫子)、日本産または中国産の茶葉から生産されたプーアル茶はそれぞれ0.5 gを30 mlの80% エタノールを加え、室温で8時間攪拌した。この後、Advantec No.2ろ紙を用いて吸引ろ過し、ろ液を回収した。吸引ろ過の残渣に30 mlの80% エタノールを加え、もう一度室温で8時間攪拌して抽出した後、Advantec

No.2ろ紙を用いて吸引ろ過した。2回のろ液を合わせ、各種醗酵茶の抽出液として Teadenol類と総ポリフェノール量の測定に用いた。

3.2.5 培養上清および各種醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの定量

サンプリングした培地上清および各種醗酵茶の抽出液はTeadenol Aおよび Teadenol Bの含量を測定するためHPLC分析に供した。HPLCはPU-2089 Quaternary Gradient Pump（日本分光、東京）を用いて、検出器はUV-2075 Intelligent UV/VIS detector（日本分光、東京）を用いた。カラムはTSK-gel ODS 80TS（Φ4.6×250 mm、5 μm、東ソー、東京）を使用し、移動相は（A）1.0% Acetic acid水溶液、（B）Acetonitrileを用いた。濃度勾配は90% A（0分）→ 20% A（30分）で分析を行った。流速および検出はそれぞれ0.6 ml/min、280nmの吸光度で測定した。得られたデータはChromato-PRO（ランタイムインスツルメンツ、神奈川）を用いて解析した。

3.2.6 培養上清および各種醗酵茶中の総ポリフェノール含量の測定

総ポリフェノール含量はFolin-Ciocalteu法を用いて測定した（Singleton et al., 1999）。液体培養の培養上清は、エバポレーターで濃縮した濃縮液をサンプルとして使用した。また、茶葉中の総ポリフェノール含量は3.2.4と同様の濃縮した抽出液を用いた。各サンプル500 μlに市販2 N Folin-Ciocalteu reagent（Sigma-aldrich、St. Louis、MO、USA）の10倍希釈液（終濃度 0.2 N）2.5 mlを添加し、さらに炭酸ナトリウム溶液（75 g/L）2.0 mlを加えた。この混合液を室温で2時間放置し、760 nmの吸光度を測定した。標準品として没食子酸（Sigma-aldrich、St. Louis、MO、USA）

を用い、5~25 mg/l (Pearson's correlation coefficient : $r^2=0.999$) の範囲で検量線を作成した。

3.3 結果および考察

3.3.1 液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産

3.3.1.1 培地成分およびEGCG添加濃度の影響

既報に従い0.1% EGCGのみを含む培地を用いて *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を培養し、培養上清をHPLCにより分析した結果、目的としたTeadenol AおよびTeadenol Bの存在は確認されなかった (Fig. 10)。他の培地成分を含まず、EGCGのみを含む培地を用いた本実験では微生物の増殖がほとんど観察されなかった。そこで、他の培地成分を添加して培養を行うことにした。

Czapex-Dox改変培地を用い、終濃度 0.1~7.0% EGCGを加え培養した結果をFig. 11およびTable 4に示す。いずれのEGCG濃度においても培養初期からEGCGとGCGの含量が減少し6日目までには消失した。一方、6日目からTeadenol AおよびTeadenol Bの生産が確認でき、19日目で最も生産量が高かった。しかし、19日目以降はほとんど増加せず、逆に培養上清中の含量が減少した。Teadenol Aは0.1%、1.0%、2.0%、5.0%、7.0% EGCG含有培地いずれにおいても生産量は19日目が最大でそれぞれ 5.41 ± 1.29 $\mu\text{g/ml}$ 、 0.22 ± 0.25 mg/ml 、 0.61 ± 0.04 mg/ml 、 1.25 ± 0.33 mg/ml 、 1.56 ± 0.04 mg/ml であった。Teadenol Bも0.1%、1.0%、2.0%、5.0%、

7.0% EGCG含有培地いずれにおいても19日目が最大でそれぞれ $30.9 \pm 4.17 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.51 \pm 0.09 \text{ mg/ml}$ 、 $0.93 \pm 0.10 \text{ mg}$ 、 $1.60 \pm 0.34 \text{ mg/ml}$ 、 $1.77 \pm 0.22 \text{ mg/ml}$ であった。この結果から、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成のためにはまず菌が増殖しカテキン類を代謝することが重要であり、そのためにEGCG以外の培地成分の使用が必要となる。また、EGCGの終濃度が高くなるほどTeadenol AおよびTeadenol Bの生産量も高くなることが示唆された。しかし、EGCGの濃度が5.0%以上になると、Teadenol AおよびTeadenol Bのカテキンからの変換効率が低下したことから、EGCG 5.0%含有培地が最もTeadenol AおよびTeadenol B産生に適切な濃度と判断した。

Czapex-Dox培地は微生物の成長に関する比較研究に古くから使われている (Raper and Fennell, 1965)。液体培養でTeadenol AおよびTeadenol Bを生産するため、Sucroseの含量を3.0%から0.5%に減らし、pHは6.0に調整した。

カテキンはアルカリ条件では不安定であり、酸性条件では安定であることが報告されている (Zhong et al., 2008; Xie et al., 2013)。また、*Aspergillus*は炭素原からクエン酸を生成するので (Xu et al., 1989)、Sucroseの含量を低くするとともにpHも6.0に調整したCzapex-Dox改変培地を本実験では用いた。

EGCGは茶葉に多量 (約50%以上) に含まれているカテキンであり、この EGCG を用いて茶の品質を評価している (Wang and Helliwell, 2000; Xie et al., 2013)。GCGはEGCGの異性体であり茶葉に微量に含まれており、EGCGより高い生物活性が報告されている (Ikeda et al., 2003; Sang et al., 2005)。EGCGの異性化は高温条件下でよく進行し、オートクレーブを用いることでEGCGからGCGが生成することが知られている (Kolarić and Šunjić, 1996; Ikeda et al., 2003; Huang et al., 2004;

Xie et al., 2013)。本研究でもEGCG含有培地はオートクレーブすることで異性化が起こり、EGCGの約20%がGCGに変換した。さらにこのGCGが*Aspergillus*の作用により、Teadenol Bに変換されたと考えられる。

3.3.1.2 液体培地への緑茶粉末添加の影響

液体培養でTeadenol AおよびTeadenol Bの生成量を向上させるため、緑茶粉末を本実験で用いた。3.3.1.1で最もTeadenol類の生成量が高かった5.0% EGCG含有培地を用いて緑茶粉末添加の有無によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生成量の変化を調べた。その結果をFig. 12およびTable 5に示す。5.0% EGCG含有培地に緑茶粉末を加えたところ、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成量の増加が確認された。Fig. 12およびTable 5に示すように、0-4日目にEGCGとGCGの含量が減少し、6日目からTeadenol AおよびTeadenol Bの生成が確認でき、19日目に最も高い含有量を示した。しかし、19日目以降はほとんど増加せず、逆に生成量が減少した。この生産パターンはEGCGだけを用いた実験と同様であった。Teadenol Aは5.0% EGCGと0.5%、1.0%、1.5%、2.0% 緑茶粉末含有培地で19日目が生成量の最大で、それぞれ 2.54 ± 0.41 mg/ml、 3.22 ± 0.23 mg/ml、 2.85 ± 0.40 mg/ml、 2.66 ± 0.26 mg/mlであった。Teadenol Bも同様に19日目が最大でそれぞれ 3.05 ± 0.31 mg/ml、 4.49 ± 0.38 mg/ml、 3.73 ± 0.57 mg/ml、 3.70 ± 0.27 mg/mlであった。この結果から、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成に5.0% EGCGと1.0% 緑茶粉末含有培地が最適であることが確認された。この培地での生成量は緑茶粉末無添加の5.0% EGCG含有培地よりTeadenol Aが約2.6倍、Teadenol Bが約2.8倍高い値であった。一方、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成に対する緑茶粉末そのものの影響を調べるため、EGCGを含

まない、1.0%、2.0% 緑茶粉末含有培地を用いた。Fig. 13に示すように、緑茶粉末のみではEGCGとGCGの含量が低くなったが、Teadenol Aの生成は2日目から確認できた。しかし、Teadenol Aの生産量はEGCGを含む培地を用いた場合に比べ低く、培養日数を長くしてもあまり増加せず、減少した。また、Teadenol Bの生成は確認できなかった。Teadenol Aは1.0% 緑茶粉末含有培地で6日目で最大で 0.78 ± 0.36 $\mu\text{g/ml}$ であり、2.0% 緑茶粉末含有培地では2日目最大で 1.88 ± 0.63 $\mu\text{g/ml}$ であった。

Houら (2009a) によると、プーアル茶の生産工程において水分含量をコントロールするために加水するが、これに茶葉抽出液を用いたプーアル茶は水のみを用いた場合より γ -Aminobutyric acid (GABA) などの代謝物の生成量が増加した。また、Teadenol AはEGCGから、Teadenol BはTeadenol AのエピマーとしてGCGからほぼ同様な経路で生成される。Teadenol Aは、最初にEGCGが*Aspergillus*の酵素により加水分解されEGCになり、EGCのBリングがジオキシゲナーゼにより二酸化物が生成した後、脱炭酸および脱水素化により生成される (Wulandari et al., 2011c)。この報告から、この経路に関与する酵素の誘導に緑茶粉末の成分が関係しており、結果としてTeadenol類の生産が増加したと考えられる。

3.3.2 固体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産

5.0% EGCGと緑茶粉末 (1.0%あるいは2.0%) を含有する培地を用いた固体培養の結果をFig. 14に示す。Fig. 14により、固体培養でもEGCGとGCGの含量の減少とTeadenol AおよびTeadenol Bの生成が確認された。しかし、液体培養と比べTeadenol AおよびTeadenol Bの生成量が最大になる培養時間とその含量に差異が見

られ、緑茶粉末添加量にかかわらずTeadenol Aは4日目に、Teadenol Bは9日目に生産量が最大となった。液体培養における生産性と比較するため、固体培養は0.5 gをサンプリングし、80% EtOH 20 mlで抽出したものを加水に用いた培地 ml当りに換算した。固体培養におけるTeadenol Aの生成量は1.0%および2.0% 緑茶粉末含有培地で培地 ml当たり、それぞれ 0.30 ± 0.08 mg、 0.34 ± 0.07 mgであった。一方、Teadenol Bは1.0%および2.0% 緑茶粉末含有培地でそれぞれ 2.34 ± 0.60 mg、 4.68 ± 1.12 mgであった。この結果は同様の実験を行った液体培養と比べ、Teadenol Aが約9.5分の1低い生成量であり、Teadenol Bはほぼ同様な生成量が見られた。この結果から、Teadenol AおよびTeadenol Bの生成には固体培養より液体培養の方が生成に適するものと考えられる。

3.3.3 液体培養上清および醗酵茶中のTeadenol類および総ポリフェノール含量の比較

HPLC分析およびFolin-Ciocalteu法により液体培養の培養上清および各種醗酵茶の抽出液に含まれているTeadenol類と総ポリフェノール含量を比較した。その結果をTable 6に、Teadenol類定量のHPLC分析の結果をFig. 15に示す。

表 6より、培養上清の総ポリフェノール含量は 8.09 ± 0.06 mg GAE/mlであり、Teadenol AおよびTeadenol Bの含量は、それぞれ 3.22 ± 0.23 、 4.49 ± 0.38 mg/mlであった。培養上清中のポリフェノール含量は高かったが、両分析値からTeadenol類の含量が98%以上になり、培養上清に含まれるポリフェノールは、ほぼTeadenol類であると考えられる。この結果はFig. 15のクロマトグラムの結果ともよく一致しており、クロマトグラム上でTeadenol AおよびTeadenol Bのピークが主成分として存

在している。一方、山吹撫子の抽出液の総ポリフェノール含量は 1.21 ± 0.03 mg GAE/mlであり、Teadenol AおよびTeadenol Bの含量は、それぞれ 3.10 ± 2.52 、 9.51 ± 4.82 $\mu\text{g/ml}$ であった。山吹撫子の抽出液のポリフェノールに対するTeadenol類の比率は約1%であり、この結果から、山吹撫子の抽出液には全体的なポリフェノール含量が高く相対的にTeadenol類の含量が低いことが明らかで、Fig. 15のクロマトグラム上でもTeadenol類のピークは非常に小さかった。また、中国産茶葉使用のプーアル茶の抽出液の総ポリフェノール含量は 0.16 ± 0.01 mg GAE/mlであったが、Teadenol AおよびTeadenol Bは検出されなかった。しかし、日本産茶葉使用のプーアル茶の抽出液の総ポリフェノール含量は 0.53 ± 0.01 mg GAE/mlであり、Teadenol AおよびTeadenol Bは、それぞれ 0.20 ± 0.15 、 0.57 ± 0.29 mg/mlが含まれていた。この結果から、プーアル茶の抽出液のTeadenol類およびポリフェノール含量は液体培養の培養上清のものより非常に低かった。また、この結果は中国産のプーアル茶にはTeadenol類の存在が認められなかった以前の報告ともよく一致した (Wulandari et al., 2011a; Ishimaru et al., 2012b)。プーアル茶は多くの微生物 *Asperillus*、*Rhizopus*、*Penicillium*、*Saccharomyces*などが醗酵過程で関与し、長時間室温で醗酵を行っているので、醗酵温度、湿度、光条件などの要因により構成成分の差異が認められ、さらに未知の代謝産物が生成される (Jiang et al., 2011; Wulandari et al., 2011a; Ishimaru et al., 2012b; Yamazaki et al., 2013)。従ってTeadenol類の含量も少ない結果となったと考えられる。また、Ishimaruら (2012b)によると、すべて*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いて醗酵処理された茶の中でもTeadenol AおよびTeadenol Bの含量に差異が認められた。これらの成分含量の差異は醗酵微生物は同一でも茶葉の加工または醗酵条件の違いにより構成成分に

差異が見られたと考えられる。

上述したようにFig. 15のクロマトグラムを比較すると、山吹撫子の抽出液はクロマトグラム上に様々なポリフェノール成分のピークが確認され、この中でTeadenol類の含量は非常に低い。一方、液体培養の培養上清にも他のポリフェノール成分のピークが見られたが、山吹撫子の抽出液より小さく、HPLC上のピーク面積から算出したTeadenol類の含量が76%以上であった。このことから、山吹撫子の抽出液より液体培養の培養上清を用いてTeadenol類を精製することの方が容易であり、工業的に有利であると考えられる。

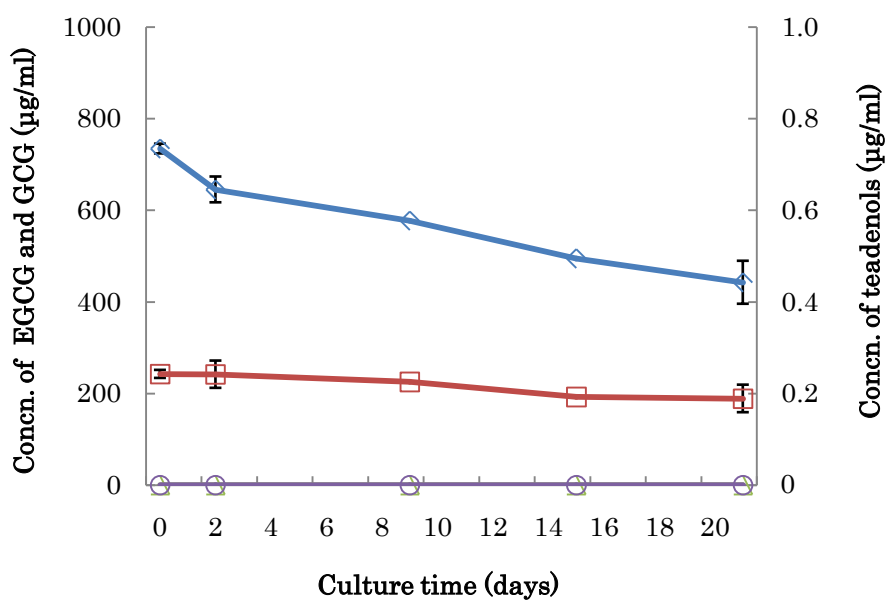


Fig. 10. Time Course for the Production of Teadenol A and Teadenol B in 0.1% EGCG Solution. Symbols; \diamond , EGCG; \square , GCG; Δ , teadenol A; \circ , teadenol B. The data represent means \pm SD in triplicate.

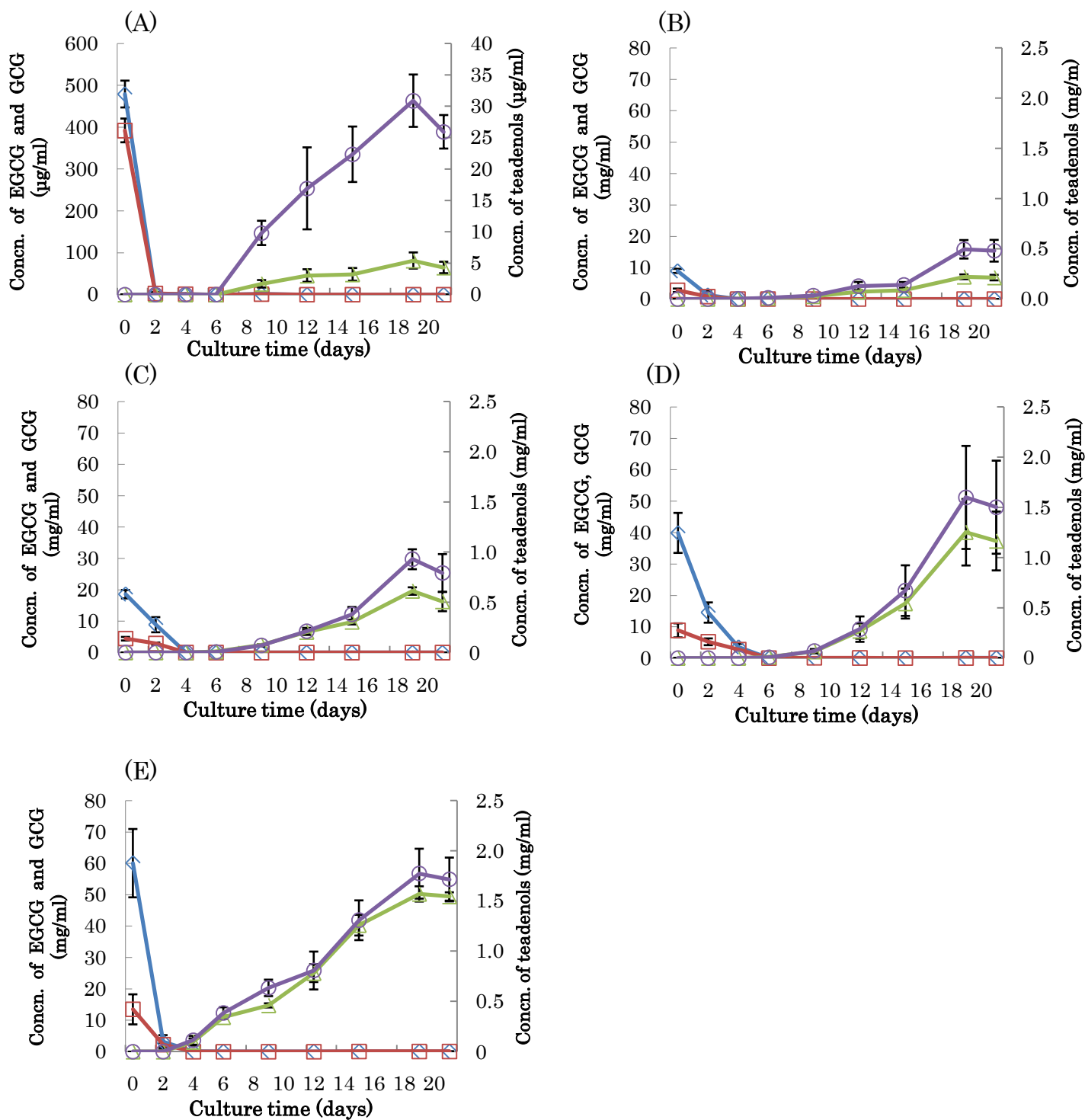


Fig. 11. Time Course for the Production of Teadenol A and Teadenol B in the Modified Czapek-Dox Medium Containing EGCG. Symbols; \diamond , EGCG; \square , GCG; Δ , teadenol A; \circ , teadenol B. The data represent means \pm SD in triplicate. (A), 0.1% EGCG; (B), 1.0% EGCG; (C), 2.0% EGCG; (D), 5.0% EGCG; (E), 7.0% EGCG.

Table 4. Contents of Teadenol A and Teadenol B Produced by *Aspergillus* sp. in the Modified Czapek-Dox Medium Containing EGCG

EGCG (%)	Contents	Culture time (days)												
		0	2	4	6	9	12	15	19	21				
0.1	EGCG	479 ± 32.1 ^a	2.32 ± 1.90 ^a	1.16 ± 1.02 ^a	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c
	GCG	392 ± 28.4 ^a	2.69 ± 2.77 ^a	1.21 ± 1.18 ^a	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c
	Teadenol A	-c	-c	-c	-c	1.69 ± 0.60 ^a	3.01 ± 1.00 ^a	3.20 ± 1.01 ^a	5.41 ± 1.29 ^a	4.30 ± 0.91 ^a				
	Teadenol B	-c	-c	-c	-c	9.80 ± 1.93 ^a	16.9 ± 6.53 ^a	22.3 ± 4.42 ^a	30.9 ± 4.17 ^a	25.9 ± 2.67 ^a				
1.0	EGCG	8.97 ± 0.66 ^b	1.27 ± 0.19 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	
	GCG	2.79 ± 0.56 ^b	0.80 ± 0.07 ^b	0.05 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	
	Teadenol A	-c	-c	-c	-c	-c	0.07 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.02 ^b	0.22 ± 0.02 ^b	0.21 ± 0.03 ^b				
	Teadenol B	-c	-c	-c	-c	0.03 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.04 ^b	0.14 ± 0.03 ^b	0.50 ± 0.09 ^b	0.48 ± 0.02 ^b				
2.0	EGCG	18.6 ± 1.34 ^b	8.91 ± 2.41 ^b	0.06 ± 0.01 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.01 ^b	-c	-c	-c	-c	-c	-c	-c	
	GCG	4.46 ± 0.57 ^b	2.88 ± 0.36 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.01 ^b	0.01 ± 0.01 ^b	-c	-c	-c	-c	-c	-c	
	Teadenol A	-c	-c	-c	-c	0.08 ± 0.01 ^b	0.20 ± 0.02 ^b	0.30 ± 0.02 ^b	0.61 ± 0.04 ^b	0.51 ± 0.01 ^b				
	Teadenol B	-c	-c	-c	-c	0.07 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.08 ^b	0.93 ± 0.10 ^b	0.79 ± 0.19 ^b				
5.0	EGCG	39.9 ± 6.37 ^b	14.5 ± 3.23 ^b	3.51 ± 1.03 ^b	-c	0.02 ± 0.01 ^b	-c	-c	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b				
	GCG	8.84 ± 2.24 ^b	5.20 ± 1.08 ^b	2.73 ± 0.21 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	-c	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b				
	Teadenol A	-c	-c	-c	0.01 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.02 ^b	0.27 ± 0.08 ^b	0.54 ± 0.15 ^b	1.25 ± 0.33 ^b	1.17 ± 0.29 ^b				
	Teadenol B	-c	-c	-c	0.01 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.02 ^b	0.29 ± 0.13 ^b	0.67 ± 0.25 ^b	1.60 ± 0.51 ^b	1.50 ± 0.46 ^b				
7.0	EGCG	60.1 ± 10.9 ^b	3.10 ± 2.18 ^b	0.12 ± 0.03 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.01 ^b				
	GCG	13.5 ± 4.79 ^b	2.22 ± 0.58 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.02 ^b	0.03 ± 0.01 ^b				
	Teadenol A	-c	-c	0.10 ± 0.04 ^b	0.34 ± 0.02 ^b	0.46 ± 0.02 ^b	0.78 ± 0.09 ^b	1.26 ± 0.10 ^b	1.57 ± 0.08 ^b	1.55 ± 0.04 ^b				
	Teadenol B	-c	-c	0.11 ± 0.04 ^b	0.39 ± 0.06 ^b	0.64 ± 0.08 ^b	0.81 ± 0.19 ^b	1.31 ± 0.20 ^b	1.77 ± 0.25 ^b	1.71 ± 0.22 ^b				

^a µg/ml.

^b mg/ml.

^c not detected.

The data represent means ± SD in triplicate.

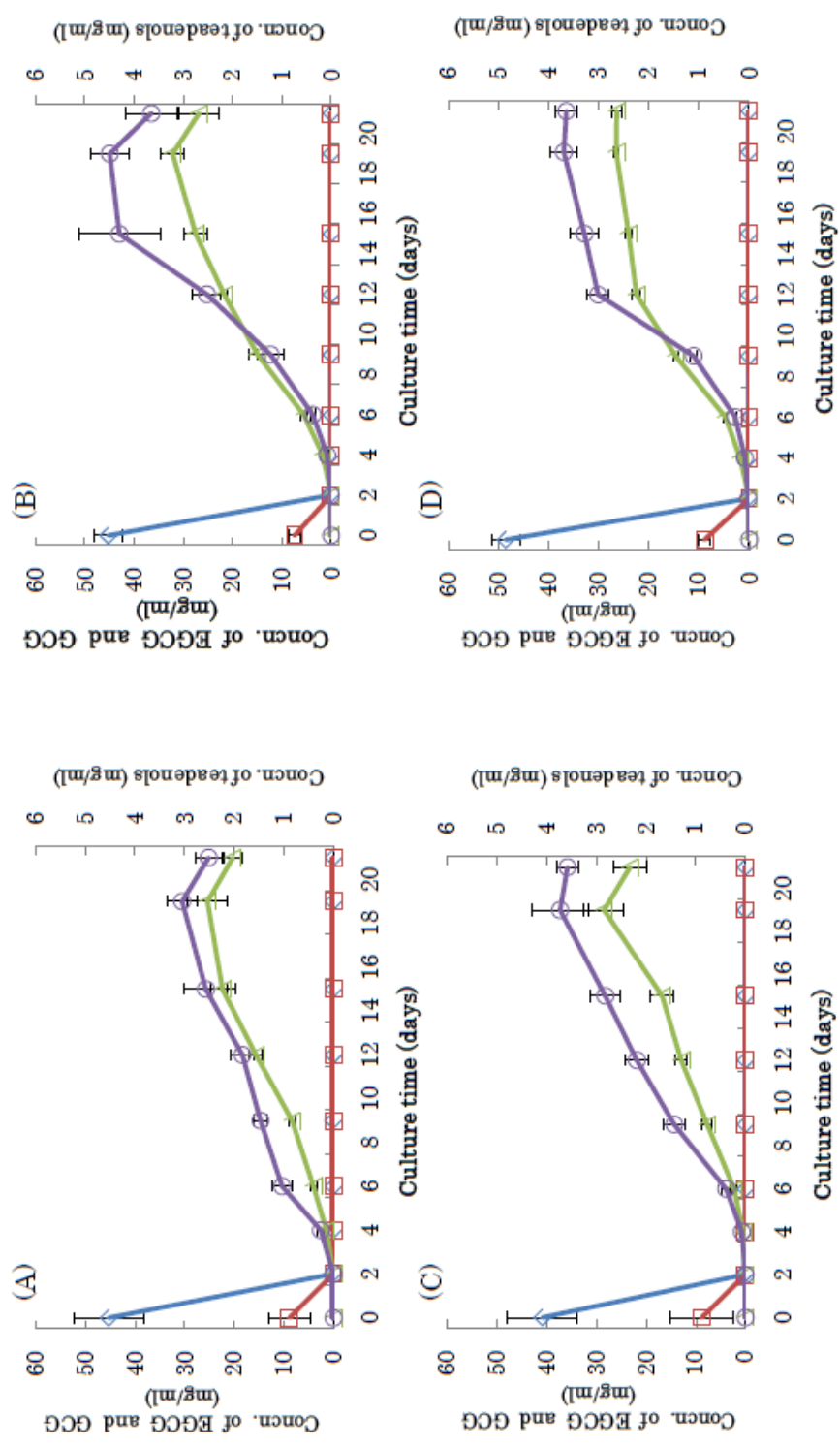


Fig. 12. Time Course for the Production of Teadenol A and Teadenol B in the Modified Czapek-Dox Medium Containing EGCG and Green Tea Powder. Symbols: ◇, EGCG; Δ, GCG; □, teadenol A; ○, teadenol B. The data represent means ± SD in triplicate.
 (A), 5.0% EGCG and 0.5% green tea powder; (B), 5.0% EGCG and 1.0% green tea powder; (C), 5.0% EGCG and 1.5% green tea powder; (D), 5.0% EGCG and 2.0% green tea powder.

Table 5. Contents of Teadenol A and Teadenol B Produced by *Aspergillus* sp. in the Modified Czapek-Dox Medium Containing EGCG and Green Tea Powder

Tea powder (%)	Content (mg/ml)	Culture time (days)										
		0	2	4	6	9	12	15	19	21		
0.5	EGCG	35.3±6.95	0.23±0.08	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	- a	- a	- a	- a	
	GCG	18.9±4.23	0.11±0.15	- a	- a	0.02±0.01	- a	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	
	Teadenol A	- a	- a	0.15±0.03	0.41±0.07	0.84±0.06	1.56±0.13	2.23±0.26	2.54±0.41	2.03±0.20	2.03±0.20	
	Teadenol B	- a	- a	0.26±0.06	1.04±0.19	1.47±0.14	1.83±0.24	2.57±0.44	3.05±0.32	2.51±0.28	2.51±0.28	
1.0	EGCG	35.2±2.91	0.24±0.01	0.10±0.04	- a	- a	- a	- a	- a	- a	0.01±0.01	0.01±0.01
	GCG	17.4±1.27	- a	0.01±0.01	0.07±0.03	0.09±0.05	0.10±0.04	0.10±0.04	0.10±0.03	0.10±0.03	0.10±0.03	0.10±0.03
	Teadenol A	- a	- a	0.17±0.04	0.56±0.06	1.49±0.17	2.17±0.07	2.75±0.23	3.22±0.23	2.69±0.41	2.69±0.41	2.69±0.41
	Teadenol B	- a	- a	0.08±0.03	0.37±0.06	1.23±0.26	2.52±0.28	4.30±0.82	4.49±0.38	3.65±0.53	3.65±0.53	3.65±0.53
1.5	EGCG	30.9±6.94	0.29±0.01	0.03±0.02	- a	- a	- a	- a	- a	- a	- a	0.02±0.01
	GCG	22.8±6.41	0.03±0.01	0.04±0.01	- a	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.02
	Teadenol A	- a	- a	0.05±0.02	0.23±0.06	0.77±0.11	1.29±0.12	1.68±0.23	2.85±0.40	2.33±0.33	2.33±0.33	2.33±0.33
	Teadenol B	- a	- a	0.07±0.03	0.39±0.09	1.44±0.23	2.19±0.23	2.82±0.29	3.73±0.57	3.59±0.22	3.59±0.22	3.59±0.22
2.0	EGCG	38.6±2.83	0.37±0.01	0.04±0.02	- a	0.03±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.01	0.01±0.01
	GCG	18.9±1.22	- a	0.05±0.01	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02	0.05±0.02
	Teadenol A	- a	- a	0.18±0.02	0.47±0.02	1.47±0.05	2.25±0.09	2.41±0.08	2.65±0.06	2.64±0.09	2.64±0.09	2.64±0.09
	Teadenol B	- a	- a	0.09±0.02	0.28±0.02	1.11±0.07	3.02±0.22	3.29±0.27	3.70±0.27	3.65±0.22	3.65±0.22	3.65±0.22

^a not detected.

The data represent means ± SD in triplicate.

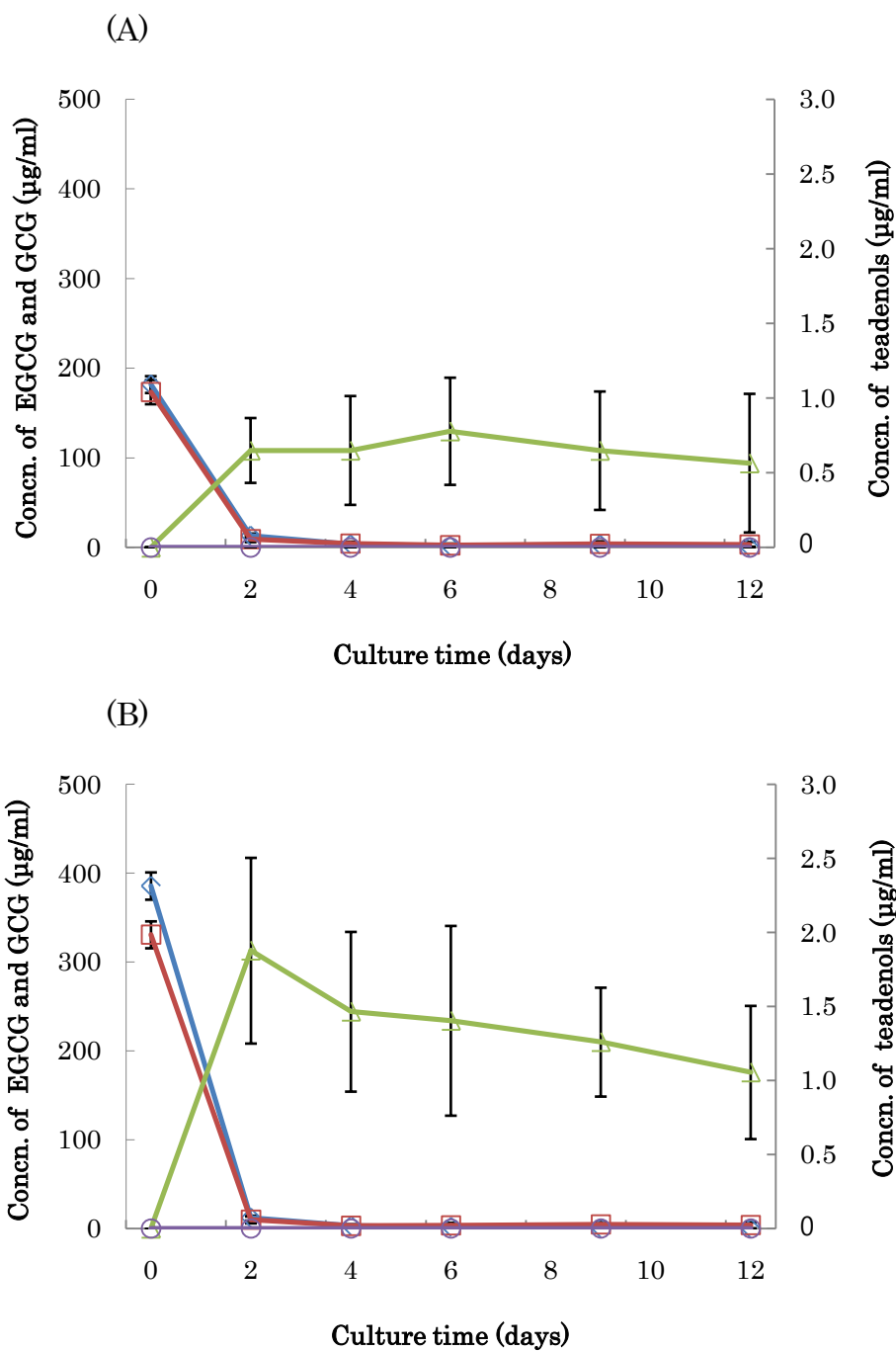


Fig. 13. Time Course for the Production of Teadenol A and Teadenol B in the Modified Czapek-Dox Medium Containing Green Tea Powder. Symbols; \diamond , EGCG; \square , GCG; Δ , teadenol A; \circ , teadenol B. The data represent means \pm SD in triplicate. (A), 1.0% green tea powder; (B), 2.0% green tea powder.

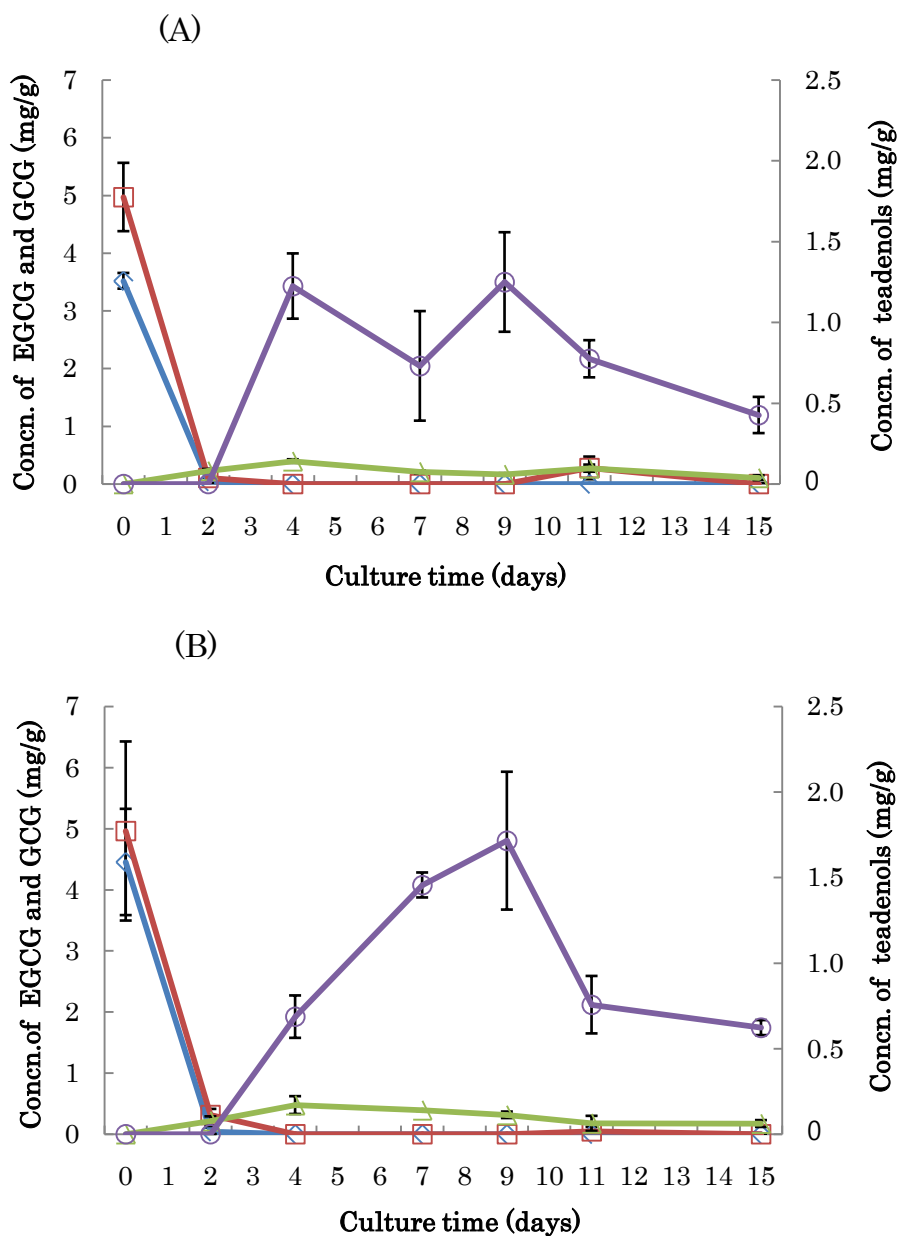


Fig. 14. Time Course for the Production of Teadenol A and Teadenol B by Solid Culture on Wheat Bran Containing Modified Czapek-Dox Medium. Symbols; \diamond , EGCG; \square , GCG; Δ , teadenol A; \circ , teadenol B. The data represent means \pm SD in triplicate.

(A), 5.0% EGCG and 1.0% tea powder; (B), 5.0% EGCG and 2.0% tea powder.

Table 6. Composition of Contents of Total Polyphenols, Teadenol A, and Teadenol B in Culture Filtrate of *Aspergillus* sp. with Those of Extracts of Commercial Teas

		Total polyphenol (mg GAE/mL)	Teadenol A	Teadenol B
Culture filtrate ^a		8.09 ± 0.06	3.22 ± 0.23 ^d	4.49 ± 0.38 ^d
Extract	YN	1.21 ± 0.03	3.10 ± 2.52 ^e	9.51 ± 4.82 ^e
	PTC ^b	0.16 ± 0.01	- *	- *
	PTJ ^c	0.53 ± 0.01	0.20 ± 0.15 ^e	0.57 ± 0.29 ^e

^a) Culture filtrate of *Aspergillus* sp. grown on the modified Czapek-Dox medium containing 5.0% EGCG and 1.0% green tea powder for 19 days.

^b) Tea leaves harvested in China.

^c) Tea leaves harvested in Japan.

^d) mg/mL.

^e) µg/mL.

* Not detected.

The data represent means ± SD in triplicate.

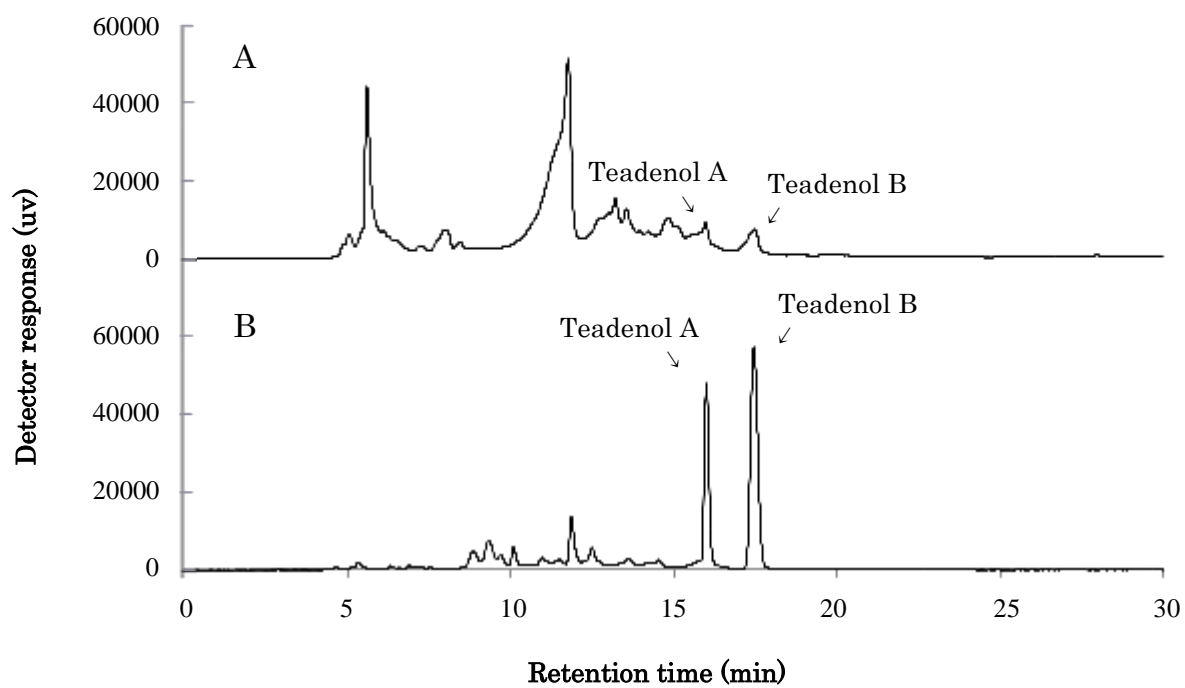


Fig. 15. HPLC Chromatograms of Extracts of Commercial Post Fermented Tea (Yamabuki-Nadeshiko) (A) and the Culture Filtrate of *Aspergillus* sp. Grown on the Modified Czapek-Dox Medium Containing 5.0% EGCG and 1.0% Green Tea Powder (B).

第4章 EGCGおよび緑茶粉末を用いた*Aspergillus* sp.の培養上清からTeadenol AおよびTeadenol Bの調製

4.1 序

*Aspergillus*は世界中に広く分布する糸状菌で、産業的に重要な微生物の1つであり、有機酸や酵素の生産に広く使用されている (Buzina, 2013; Pariza and Johnson, 2001)。 *Aspergillus*は醗酵食品の製造に広く使用されるが、特に微生物醗酵茶であるプーアル茶中に見いだされる微生物の1つでもある (Zhao et al., 2015)。しかし、*Aspergillus*の一部は人体に有害な影響を及ぼすと報告されている。 *Aspergillus flavus*および*Aspergillus parasiticus*は湿度の高い環境でAflatoxinを生産し、*Aspergillus ochraceus*や*Aspergillus carbonarius*はFumonisinおよびOchratoxin Aを生産する (Meca and Ritieni, 2009)。 *Aspergillus niger*はOchratoxin Aを生成し、*Aspergillus niger*の3~10%は毒性成分を生成する菌株である (Schuster et al., 2002)。

Aspergillus sp. (FARM AP-21280) は日本で伝統的に使用されている黒麹から単離された微生物である。この微生物を用いた微生物醗酵茶から新規ポリフェノール成分であるTeadenol AおよびTeadenol Bが分離された (Wulandari et al., 2011b)。しかし、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いた微生物醗酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol Bの含量は非常に微量であるために (Wulandari et al., 2011a; Ishimaru et al., 2012a, 2012b)、抗メタボリックシンドローム成分として健康促進の効果を十分に発揮するためには十分ではないと考えられる。そのため、第3章では

Teadenol AおよびTeadenol Bをカテキンから液体培養で生産するための条件検討を行った。その結果、カテキンから同菌の液体培養によってTeadenol類の生産が可能であり、夾雑する他のポリフェノールもすくないことが明らかになった。そこで、第4章では、液体培養により得られた培養上清からのTeadenol AおよびTeadenol Bの調製法を検討することにした。

4.2 実験材料および実験方法

4.2.1 液体培養によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産

培地は、第三章と同様にCzapek-Dox改変培地を基本培地とし、EGCGおよび緑茶パウダーの濃度がそれぞれ終濃度5.0%、1.0%になるよう溶解し、4 N HClでpH 6.0に調整した。その後、振とうフラスコ (500 ml容) に100 mlずつ分注し、オートクレーブ (121℃、15分間) で滅菌した。

植菌および培養条件は3.2.2.2と同様に行った。19日間培養を行った後、Advantec No. 2のろ紙を用いて吸引ろ過し上清を得た。

4.2.2 カラムクロマトグラフィーによるTeadenol AおよびTeadenol Bの分離

ろ液はロータリーエバポレーターを用いて150 mlまで濃縮し、この濃縮液をSephadex LH-20 カラム (Φ3.5 × 44 cm、GE Healthcare、Little Chalfont、UK) に流速 60 ml/hで負荷した。負荷後、400 mlの水で洗浄し、次いで20% エタノール、40% エタノール、60% エタノール、80% エタノール、100% エタノールを各々

400 mlずつ流し、カラムの吸着物を溶出した。60% エタノール画分および100% エタノール画分を回収し、それぞれロータリーエバポレーターで濃縮した。

4.2.3 分取用HPLCによるTeadenol AおよびTeadenol Bの精製

Sephadex LH-20カラムにより得られた60% エタノール画分および100% エタノール画分の濃縮液を、分取用HPLCを用いて精製した。分取条件は第三章と同様に行ったが、濃度勾配は90% A (0分) → 45% A (17分) → 42% A (30分) → 20% A (40分) とし、流速は3 ml/min、サンプルは700 μ Lを注入した。

4.2.4 Teadenol AおよびTeadenol Bの純度検定

HPLC分析は第三章と同様に行ったが、流速を0.4 ml/min、また濃度勾配は90% A (0分) → 20% A (45分後) とした。

4.3 結果および考察

4.3.1 *Aspergillus* sp.の液体培養によるTeadenol類の生産

100 mlずつ分注した振とうフラスコ (500 ml容) 12本を19日間培養し、吸引濾過し、上清を得た。12本の上清は総量は970 mlであり、Teadenol Aは2.73 g、Teadenol Bは3.15 gが含まれていた。この上清の3分の1量 (Teadenol A 0.91 g、Teadenol B 1.05 g) を一回のSephadex LH-20クロマトグラフィーに供した。

4.3.2 カラムクロマトグラフィーによるTeadenol類の分離

Sephadex LH-20を用いたカラムクロマトグラフィーおよび分取用HPLCを用いて培養上清からTeadenol AおよびTeadenol Bの精製を行った (Fig. 16)。培養上清のHPLC分析結果をFig. 17Aに示す。HPLC分析の結果、Teadenol AおよびTeadenol Bのピークが主要成分として検出され、醗酵茶抽出液に比べて他の成分が非常に少ないことからDiaion HP20による分画を行わず直接この培養上清をSephadex LH-20を用いた分離に供した。各画分のHPLC分析結果 (Fig. 17Bおよび17D) より、60% エタノール溶出画分にTeadenol A、100% エタノール溶出画分にTeadenol Bが含まれていた。それぞれの画分を回収後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、さらに分取用HPLCでの精製を行った。その結果、HPLC分析において純度98%以上のTeadenol AおよびTeadenol Bを得た (Fig. 17Cおよび17E)。Table 7に培養上清から各分離ステップにおけるTeadenol類の収率を示す。Teadenol Aの最終収率は29.7%であり、Teadenol Bの最終収率は44.6%であった。Teadenol AとTeadenol Bの収率はSephadex LH20カラムクロマトグラフィーによる単離ステップまでは、それぞれ57.1%、59.0%であった。分取用HPLCによる単離ステップ後に収率の差が見られた。Fig. 17Bおよび17Dに示されるTeadenol類のピークを比較すると、100% エタノール画分中のTeadenol Bの純度は、60% エタノール画分のTeadenol Aの純度よりも高い。したがって、分取用HPLC後のTeadenol Bの収率が高くなったと考えられる。また、この結果は第二章の結果と比べ、特にTeadenol Bの収率が高かった。今回行った実験において、Teadenol Aの収率は茶葉粉末からの収率より2.3倍、Teadenol Bの収率は茶葉からの収率より3.1倍に増加し、培養上清中にTeadenol類以外の成分が少ないことが、収率を高めている原因であると考えられた。結論として、Teadenol

類を醗酵茶葉からカラムクロマトグラフィーにより精製する (Wulandari et al., 2011b; Ishimaru et al., 2012a) 方法と比べ、EGCGと緑茶粉末を含む培地を用いた液体培養の方がより高収量でTeadenol類の単離が可能であり、工業的な生産に有用と考えられる。

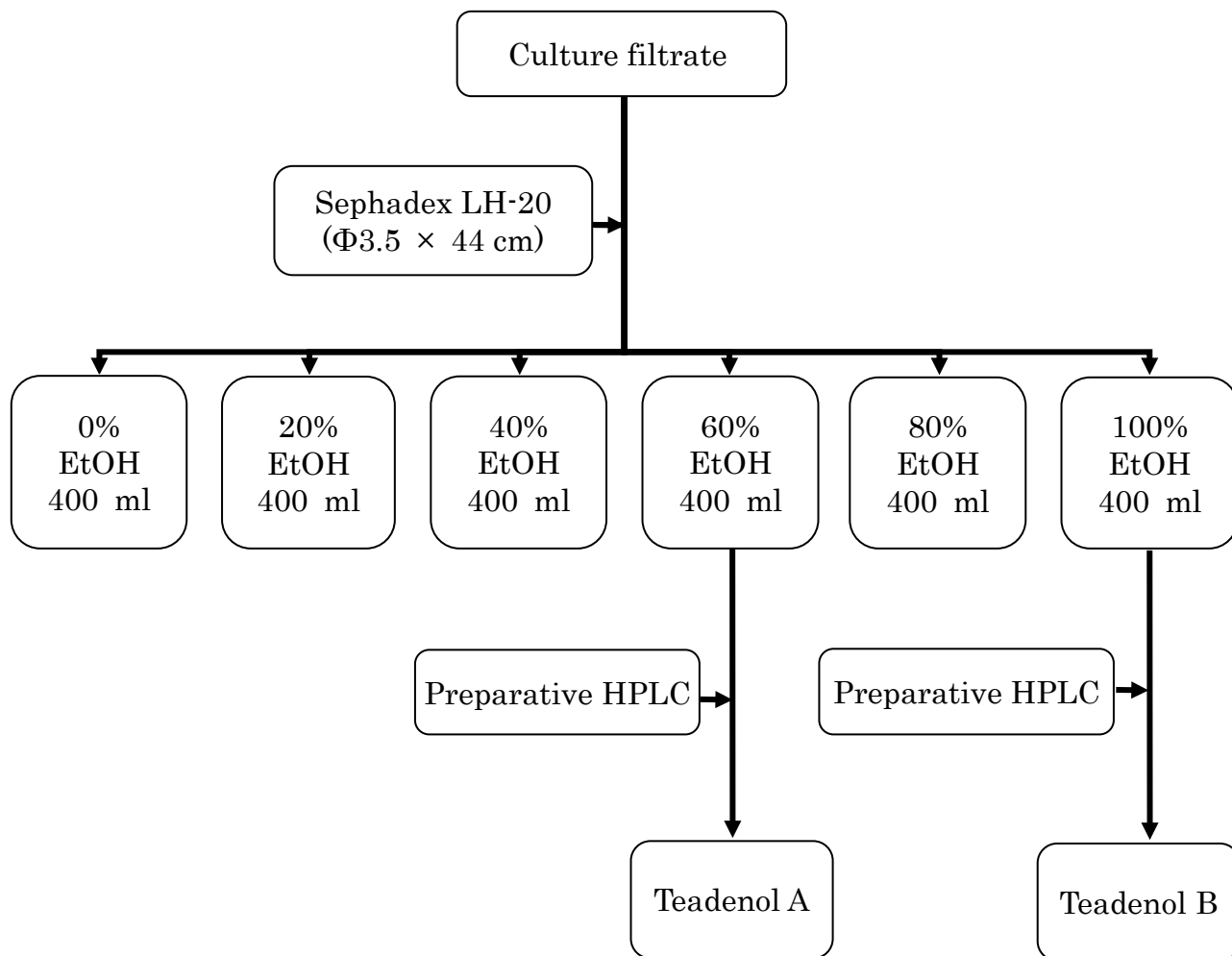


Fig. 16. A Schematic Diagram of the Isolation of Teadenol A and Teadenol B.

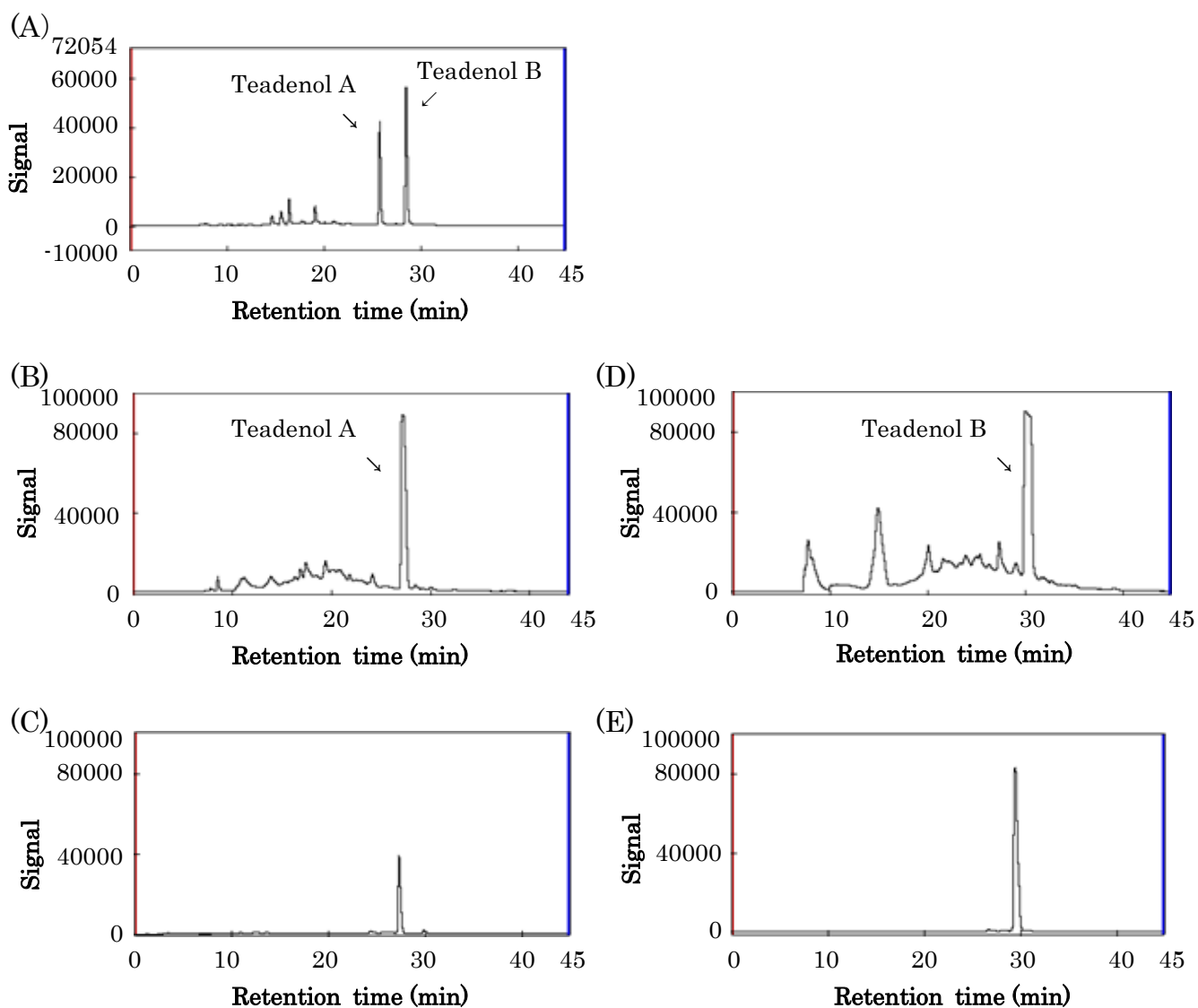


Fig. 17. HPLC Chromatograms of Each Sample Obtained by Sequential Purification of Teadenol A and Teadenol B.

(A), Culture filtrate of *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280); (B), 60% EtOH fraction after Sephadex LH-20 column chromatography; (C), purified teadenol A; (D), 100% EtOH fraction after Sephadex LH-20 column chromatography; (E), purified teadenol B.

Table 7. Summary of the Purification of Teadenol A and Teadenol B

	Teadenol A		Teadenol B	
	Contents (mg)	Yield (%)	Contents (mg)	Yield (%)
Culture filtrate	0.91	100	1.05	100
Sephadex LH20				
60% EtOH	0.52	57.1		
100% EtOH			0.65	59.0
Preparative HPLC				
60% EtOH	0.27	29.7		
100% EtOH			0.45	44.6

第5章 総括

チャ (*Camellia sinensis* L.) は多くの生理活性成分を含み、健康に有益であるため、世界的に飲用されている。茶を加工工程の発酵条件に基づいて分類すると、不発酵茶、弱発酵茶、半発酵茶、発酵茶(前発酵茶)、微生物発酵茶(後発酵茶)に分類される。微生物を用いて発酵した微生物発酵茶には、カビにより発酵させた好気発酵茶、バクテリアにより発酵させた嫌気発酵茶、カビとバクテリアにより発酵させた二段発酵茶がある。これらは自然発酵により生産されているが、最近日本で *Aspergillus* sp.(FARM AP-21280) のみを用いて発酵した微生物発酵茶が開発され、その中に特有に含有するTeadenol AおよびTeadenol Bが単離された。その後、両化合物に関する様々な生理活性の研究が報告されており (Yanagita et al., 2011a; Yanagita et al., 2011b)、両化合物は新しい抗メタボリックシンドローム成分として期待されている (Wulandari et al., 2011c)。

そこで本研究では、微生物発酵茶に見いだされた特有のTeadenol AおよびTeadenol B標準品の単離方法を検討し、調製した標準品を用いて各種微生物発酵茶中のTeadenol AおよびTeadenol B含量を明らかにした。さらに、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を用いてTeadenol AおよびTeadenol Bの効率的な生産のための培養条件の検討を行い、Teadenol AおよびTeadenol Bの大量調製を行った。

まず第2章では、Diaion HP 20 および Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィ、さらに分取用HPLCを用いてTeadenol AおよびTeadenol Bの標準品の単離を行った。その結果、HPLCで単一ピークを示すTeadenol AおよびTeadenol Bをそれぞれ

れ100 mgおよび30.0 mgを得た。得られたTeadenol AおよびTeadenol Bの純度はHPLC分析の結果、それぞれ99%以上であった。次に、¹H NMRを用いてTeadenol AおよびTeadenol Bの構造解析を行った。この結果、両化合物とも各シグナルは文献値とよく一致した。次いで精製したTeadenol AおよびTeadenol Bの標準品を用いて、HPLC分析におけるTeadenol AおよびTeadenol Bの検量線を作成後、各単離ステップごとの両化合物の収率を算出した。Teadenol Aの収率は、微生物醗酵茶の茶葉粉末から15.5%、Teadenol Bの収率は、微生物醗酵茶の茶葉から14.3%であった。Teadenol Aの方がTeadenol Bより分取収率が高かった。Fig. 9に示したTeadenol AおよびTeadenol BのDiaion HP20およびSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーによって分離した結果を比較すると、Teadenol Aの方が不純物が少ないため、Teadenol AがTeadenol Bより効率的に精製できたことが明らかになった。

第3章では、Teadenol AおよびTeadenol Bの効率的な生産のために、出発物質としてEGCGを添加した液体培養および固体培養の検討を行った。まず、既報に従って(Wulandari et al., 2011c) 培地としてEGCG溶液のみを用いて*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) による液体培養を行った。この培養では菌の増殖がほとんど見られず、培養上清をHPLCによって分析した結果、Teadenol AおよびTeadenol Bは検出できなかった。そこで、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) の増殖やTeadenol AおよびTeadenol Bの生産にCzapek-Dox改変培地を使用することとした。Czapek-Dox培地は様々な糸状菌の培養に一般的に使用されている培地であり、特に*Aspergillus*の培養や同定に広く使われる (Raper and Fennell, 1965)。Czapek-Dox改変培地を用いて*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産の可能性を検証した。また、出発物質であるEGCGの各濃度を含

んだ培地でのTeadenol AおよびTeadenol Bの生産量の経時変化を調べた。EGCG含有培地を用いて培養したところ、EGCGの濃度依存的にTeadenol AおよびTeadenol Bの生産が増加することが観察された。この結果より、Czapek-Dox改変培地を基本培地として使用することで*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) によるTeadenol AおよびTeadenol Bの生産が可能であることが明らかとなった。また、EGCGおよびGCGからTeadenol AおよびTeadenol Bが生合成されるという報告から (Wulandari et al., 2011c)、EGCGの含量が高いほどTeadenol AおよびTeadenol Bの生産量が増加することも明らかになった。Teadenol AおよびTeadenol Bの生産量は、5.0% EGCG添加培地で 1.25 ± 0.33 mg/ml、 1.60 ± 0.34 mg/mlであり、7.0% EGCG添加培地で 1.56 ± 0.04 mg/ml、 1.77 ± 0.22 mg/mlであった。Teadenol AおよびTeadenol Bの生産量は7.0% EGCG添加培地を用いた方が高かったが、Teadenol AおよびTeadenol BのEGCGおよびGCGからの変換効率については5.0% EGCG添加培地を用いた方より低かった。この結果から、Teadenol AおよびTeadenol Bの生産の培養条件として5.0% EGCGを添加した培地が最も適切であると考えられる。また、Teadenol AおよびTeadenol Bの生産性を向上させる目的で、生合成に関与する酵素をより高く誘導するために、緑茶粉末を用いた。茶葉抽出液を醗酵工程で添加することで醗酵程度が強化され、プーアル茶の含有成分が増加すると報告されており (Hou et al., 2009a)、緑茶粉末を添加して液体培養を行った。Czapek-Dox改変培地にEGCGと緑茶粉末を添加し、それらを含んだ培地中での*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) の増殖、Teadenol AおよびTeadenol Bの生産量の経時変化を測定した。5.0% EGCGと茶粉末を各濃度で添加したCzapek-Dox改変培地で培養したところ、5.0% EGCGと1.0% 緑茶粉末を添加した培地で最も高いTeadenol AおよびTeadenol

Bの生産が認められ、それぞれの生産量は 3.22 ± 0.23 mg/ml、 4.49 ± 0.38 mg/mlであった。Teadenol AおよびTeadenol Bの生産に対する緑茶粉末の直接的な影響を調べるため、Czapek-Dox改変培地にEGCGを含まず緑茶粉末だけを添加して培養を行った。この結果、Teadenol Aの生産量はほとんど増加せず、Teadenol Bの生産は確認できなかった。これらの結果から、緑茶粉末はTeadenol AおよびTeadenol Bの生産に直接的に影響を及ぼすのではなく、生合成に関与する酵素の誘導を促進し、その結果、Teadenol AおよびTeadenol Bの生産量を増加させたと考えられる。液体培養の結果に基づいて、上記の培地成分を小麦フスマに添加して固体培養を行った。固体培養では5.0% EGCG、2.0% 緑茶粉末を添加したCzapek-Dox改変培地で加水した小麦フスマを培地とした場合に最も高い生産量が示された。同培地でのTeadenol AおよびTeadenol Bの生産量は、それぞれ 0.34 ± 0.07 mg/ml、 4.68 ± 1.12 mg/mlであった。固体培養の結果は液体培養と比べ、Teadenol Aは約9.5分の1と低い生産量であり、Teadenol Bはほぼ同様な生成量が見られた。この結果から、Teadenol AおよびTeadenol Bの生産には個体培養より液体培養の方が適切であると考えられる。本研究で行った*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) による液体培養を用いたTeadenol AおよびTeadenol Bの生産量は、 3.22 ± 0.23 mg/ml、 4.49 ± 0.38 mg/mlであり、日本や中国で市販されている茶葉より高い生産効率であると考えられる。また、各種醗酵茶製品ではTeadenol Aの方がTeadenol Bの含有量より高かったが、本研究で行った液体培養では、Teadenol Bの含有量がTeadenol Aより高かった。

第4章では、第3章で得られた最適条件に基づいてTeadenol AおよびTeadenol Bの液体培養での生産を行い、さらにその上清からの両化合物の調製法について検討し

た。培養上清をSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーで分画し、さらに分取用HPLCを用いてTeadenol AおよびTeadenol Bの標準品の調製を行った。Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーおよび分取用HPLCを用いた培養上清からのTeadenol Aの収率は29.7%であり、Teadenol Bの収率は44.6%であった。この結果は醗酵茶葉の抽出液から調製した第2章の結果と比べ、特にTeadenol Bの収率が高くなった。これはTeadenol AおよびTeadenol B以外の不純物の含量が、EGCGを用いて液体培養で生産した方がより少ないため、分離方法が第2章の方法より簡略化され、各分離ステップでの損失が少ないためと考えられる。得られたTeadenol AおよびTeadenol Bの純度はHPLC分析の結果、それぞれ98%以上であった。¹H NMRおよび¹³C NMRを用いてTeadenol AおよびTeadenol Bの構造確認を行ったところ、第2章で調製した標準品と同一であった。

以上、本研究により微生物醗酵茶に見い出された機能性成分Teadenol AおよびTeadenol Bを簡易に調製することが可能となり、同化合物の新しい機能の発見の可能性も考えられる。また、本化合物の含量を強化した機能性醗酵茶や、全く別の食品への添加による機能性食品の開発にも大きく貢献することが期待される。

引用文献

- Abe, M., Takaoka, N., Idemoto, Y., Imai, T. and Nakasaki, K. (2008) Characteristic fungi observed to the fermentation process for puer tea. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 199-203.
- Ahmed, S., Rahman, A., Hanain, A., Lalonde, M., Goldberg, V. M. and Haqqi, T.M. (2002) Green tea polyphenol epigallo-catechin-3-gallate inhibits the IL-1 β -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes, *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 1097-1105.
- Anderson, J.J., Anthony, M.S., Cline, J.M., Washburn, S.A. and Garner, S.C. (1999) Health potential of soy isoflavones for menopausal women, *Public Health Nutrition*, 2, 489-504.
- Aron, P.M. and Kennedy, J.A. (2007) Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. cv *Pinot Noir* during fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5670-5680.
- Barnes, S. (2003) Phyto-oestrogens and osteoporosis : What is a safe dose?, *British Journal of Nutrition*, 89, 101-108.

- Buzina, W. (2013) *Aspergillus* - classification and antifungal susceptibilities, *Current Pharmaceutical Design*, 19, 3615-3628.
- Cabrera, C., Artacho, R. and Gimenez, R. (2006) Beneficial effects of green tea – a review, *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 79-99.
- Chang, B.V. and Chang, Y.M. (2014) Biodegradation of toxic chemicals by *Pleurotus eryngii* in submerged fermentation and solid-state fermentation, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49, 175-181.
- Chen, Y.S., Liu, L.B. and Chang, Y.N. (2010) Bioactivities and sensory evaluation of pu-erh teas made from three tea leaves, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 557-563.
- Chiang, C.T., Weng, M.S., Lin-Shiau, S.Y., Kuo, K.L., Tsai, Y.J. and Lin, J.K. (2006) Pu-erh tea supplementation suppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through down regulating Akt and JNK signalings as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells, *Oncology Research*, 16, 119-128.
- Crozier, A., McDonald, M.S., Lean, M. E.J. and Black, C. (1997) Quantitative

analysis of the flavonoid content of tomatoes, onions, lettuce and celery, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 590-595.

Das, S. and Rosazza, J.P.N. (2006) Microbial and enzymatic transformations of flavonoids, *Journal of Natural Products*, 69, 499-508.

Demain, A.L. (2000) Small bugs, big business : the economic poser of the microbe, *Biotechnology Advances*, 18, 499-514.

Demeule, M., Michaud-Levesque, J., Annabi, B., Gingras, D., Boivin, D., Jodoin, J., Lamy, S., Bertrand, Y. and Beliveau, R. (2002) Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds, *Current Medicinal Chemistry-anticancer Agents*, 2, 441-463.

Dewick, D.M. (2002) Medicinal natural products : A biosynthetic approach, Wiley, Chichester.

Gramham, T.L. (1991) Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seeding tissues and in seed and root exudates, *Plant Physiology*, 95, 594-603.

Guo, W., Lu, Y., Luo, S. and Sakata, K. (2004) Dark tea - a tea made via microbial fermentation process, *Journal of the Japanese Society for Food Science and*

Technology, 51, 323-331.

Hagerman, A., Dean, R.T. and Davis, M.J. (2003) Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414, 115-120.

Harborn, J.B. and Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoids research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481-504.

Hirouchi, Y., Toda, M., Okubo, S., Hara, Y. and Shimamura, T. (1992) Protective activity of tea and catechins against *Bordetella pertussis*, *Japanese Journal of Infectious Disease*, 66, 599-602.

Ho, H.L. and Hood, J.S. (2014) Optimization of medium formulation and growth conditions for xylanase production by *Aspergillus brasiliensis* in submerged fermentation, *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 1, 1-13.

Hou, C.W., Jeng, K.C. and Chen, Y.S. (2009a) Enhancement of fermentation process in pu-erh tea by tea leaf extract, *Journal of Food Science*, 75, 44-48.

Hou, Y., Shao, W., Xiao, R., Xu, K., Ma, Z., Johnstone, B.H. and Du, Y. (2009b) Pu-erh tea aqueous extracts lower atherosclerotic risk factors in a rat

hyperlipidemia model. *Experimental Gerontology*, 44, 434-439.

Huang, S., Inoue, K., Li, Y., Tanaka, T. and Ishimura, K. (2004) Analysis of catechins in autoclaved tea leaves and drinks, *Japanese Journal of Food Chemistry*, 11, 99-102.

Ikeda, I., Kobayashi, M., Hamada, T., Tsuda, K., Goto, H., Imaizumi, K., Kozawa, A., Sugimoto, A. and Kakuda, T. (2003) Heat-epimerized tea catechins rich in gallocatechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechingallate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7303-7307.

Ishimaru, K., Koga, S. and Takada, M. (2012a) Concentration of bioactive compounds, theadenols A and B, and catechins in fermented tea, *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 59, 45-48.

Ishimaru, K., Kanagae, A., Sakamoto, A., Nakazono, Y., Nakayama, H., Yakashiro, I., Liu, D., Kawamura, D., Matsuo, Y. and Tanaka, T. (2012b) Concentrations of theadenols in various Chinese tea products, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 191-196.

Jaganath, I.B. and Crozier, A. (2010) Dietary flavonoid and phenolic compounds,

in “Plant phenolic and human health : Biochemistry, nutrition, and pharmacology”, ed by Fraga, C.G., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, pp-1-49.

Jeng, K.C., Chen, C.S., Fang, Y.P., Hou, R.C.W. and Chen, Y.S. (2007) Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in pu-erh tea, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 8787-8792.

Jiang, H.Y., Shii, T., Matsuo, Y., Tanaka, T., Jiang, Z.H. and Kouno, I. (2011) A new catechin oxidation product and polymeric polyphenols of post-fermented tea, *Food Chemistry*, 129, 830-836.

Kanegae, A., Sakamoto, A., Nakayama, H., Nakazono, Y., Yakashiro, I., Matsuo, Y., Tanaka, T. and Ishimaru, K. (2013) New phenolic compounds from *Camellia sinensis* L. fermented leaves, *Journal of Natural Medicines*, 67, 652-656.

Kaori, S.M., Wachira, F.N., Wanyoko, J.K. and Ngure, G.M. (2007) Antioxidant capacity of different types of tea products, *African Journal of Biotechnology*, 6, 2287-2296.

Kapoor, M.P., Rao, T.P., Okubo, T. and Juneja, L.R. (2013) Green tea history, processing techniques, principles, traditions, features, and attractions. In

“Green tea polyphenols : Nutraceuticals of modern life” ed by Juneja, L.R., Kapoor, M.P., Okubo, T. and Rao, T.P., CRC press, Boca raton, pp.1-18.

Kim, Y.S., Choi, G.H. and Lee, K.H. (2010) Changes of chemical components of fermented tea during fermentation period, *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 39, 1807-1813.

Kolarić, S., and Šunjić, V. (1996). Comparative study of C(2) epimerization of D-glucose and D-mannose catalyzed by water soluble organo-metallic complexes with nitrogen ligands. *Journal Molecular Catalysis A : Chemical*, 110, 181-188.

Ku, K.M., Kim, J.Y., Park, H.J., Liu, K.H. and Lee, C.H. (2010). Application of metabolomics in the analysis of manufacturing type of pu-erh tea and composition changes with different postfermentation year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 345-352.

Kurita, I., Maeda-Yamamoto, M., Tachibana. H. and Kamei. M. (2010) Antihypertensive effect of Benifuuki tea containing *O*-methylated EGCG. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 1903-1908.

Ling, T.J., Wan, X.C., Ling, W.W., Zhang, Z.Z. Xia, T. and Li, D.X. (2010) New triterpenoids and other constituents from a special microbial-fermented

tea-fuzhuan brick tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4945-4950.

Luo, Z.L., Du, H.X., Li, L.X., An, M.Q., Zhang, Z.Z., Wan, Z.C., Bao, G.H., Zhang, L. and Ling, T.J. (2013) Fuzhuanins A and B : the B-ring fission lactones of flavan-3-ols from fuzhuan brick-tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 6982-6990.

Manach, C., Scalbert, A., Mornard, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004) Polyphenols : Food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.

Mckay, D.L. and Blumberg, J.B. (2002) The role of tea in human health : an update, *The Journal of the American College of Nutrition*, 21, 1-13.

Meca, G. and Ritieni, A. (2009) Production and analysis of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* ITEM 5137 in submerged culture, *Food Chemistry*, 117, 470-472.

Miyamura, M., Morishita, H., Murata, S., Yokota, J., Yoshioka, S., Takuma, D., Hamada, A. and Nishioka, Y. (2008) Inhibitory effects of “Goishi- tea” as a post-fermented- tea on dietary-induced hypercholesteremia and atherosclerosis in rabbit, *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*,

128, 1037-1044.

Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., Hase, T. and Tokimistu, I. (2002) Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity : stimulation of lipid catabolism in the liver, *International Journal of Obesity*, 26, 1459-1464.

Nagle, D.G., Ferreira, D. and Zhou, Y.D. (2006) Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) : Chemical and biomedical perspectives, *Phytochemistry*, 67, 1849-1855.

Nakayama, H., Nakazono, Y., Yakashiro, I., Matsuo, Y., Yanaka, T., Usui, A. and Ishimaru, K. (2015) HPLC and HPLC-TOFMS analyses of post-fermented teas in Japan, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 22, 94-99.

Noguchi, A., Hamazu, Y. and Yasui, H. (2008) Inhibitory effects of goishi tea against influenza virus infection, *Food Science and Technology Research*, 14, 277-284.

Oyaizu, M., Hotsumi, H., Takagi, M., Matsumoto, Y., Fujita, M., Matsuzaki, N. and Yamashita, S. (2005) Effects of extracts from goishi cha on serum and liver lipid concentrations in rats, *Journal of Oleo Science*, 54, 537-541.

Pariza, M.W. and Johnson, E.A. (2001) Evaluation the safety of microbial enzyme

preparations used in food processing : Update for a new century,
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 33, 173-186.

Peterson, J., Dwter, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A. L.,
Beecher, G. and Aladesanmi, J. (2005) Major flavonoids in dry tea.
Journal of Food Composition and Analysis, 18, 487-501.

Raper, K.B., and Fennell, D.I. (1965). "The genus *Aspergillus*." The Williams &
Wilkins Company, Baltimore.

Riboli, E. and Norat, T. (2003) Epidemiologic evidence of the protective effect of
fruit and vegetables on cancer risk, *The American Journal of Clinical
Nutrition*, 78, 559-569.

Sakuma, T., Takase, H., Hase, T. and Tokimistu, I. (2013) Green tea polyphenols
in weight management (obesity) and diabetes. In "Green tea polyphenols :
Nutraceuticals of modern life" ed by Juneja, L.R., Kapoor, M.P., Okubo, T.
and Rao, T.P., CRC press, Boca raton, pp.157-176.

Salah, N., Miller, N.J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C.
(1995) Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and
as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*,
322, 339-346.

- Sang, S., Lee, M.J., Hou, Z., Ho, C.T. and Yang, C.S. (2005) Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimmers and epimers under common experimental conditions, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 9478-9484.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J.C. and Van-Dijk, P.W. (2002) On the safety of *Aspergillus niger* - a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 426-435.
- Shi, X., Leonard, S.S., Ding, M., Vallyathan, V., Castranova, V., Rojanasaki, Y. and Dong, Z. (2000) Antioxidant properties of (-)-epigallocatechin-3-gallate and its inhibition of Cr (VI) -induced DMA damage and Er (IV) 0 or TPA-stimulated NF-kappaB activation, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206, 125-132.
- Tao, M.K., Xu, M., Zhu, H.T., Cheng, R.R., Wang, D., Yang, C.R. and Zhang, Y.J. (2014) New phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols from pu-er ripe tea, *Natural Product Communications*, 9, 1167-1170.
- Tamura, A., Kato, M., Omori, M., Nanba, A., Miyagawa, K. (1994) Characterization of microorganisms in post-heating fermented teas in Japan, *Journal of Home Economics of Japan*, 45, 1095-1101.

- Tanaka, T., Nagai, S., Shii, T., Matsuo, Y. and Kouno, I. (2011) Isolation of 1,3-diphenylpropan-2-ols, identical to tea catechin metabolites produced by intestinal bacteria, and pyrogallol from Japanese post-fermented tea, *Japanese Journal of Food Chemistry*, 18, 6-11.
- Toschi, T.G., Bordoni, A., Hrelia, S., Bendini, A., Lercker, G. and Biagi, P.L. (2000) The protective role of different green tea extracts after oxidative damage is related to their catechin composition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3973-3978.
- Wan, X., Li, D. and Zhang, Z. (2008). Green tea and black tea. In “Tea and tea products : Chemistry and health promoting properties.” ed by C.T. Ho, J.K. Lin,. and F. Shahidi. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-8.
- Wang, H. and Helliwell, K. (2000) Epimerization of catechins in green tea infusions, *Food Chemistry*, 70, 337-344.
- Wang, L.Q., Meselhy, M.R., Li, Y., Nakamura, N., Min, B.S. and Qin, G.W. (2001) The heterocyclic ring fission and dehydroxylation of catechins and related compounds by *Eubacterium* sp. Strain SDG-2, a human intestinal bacterium, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49, 1640-1643.

- Wang, X., Hu, S., Wan, X. and Pan, C. (2005) Effect of microbial fermentation on caffeine content of tea leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7238-7242.
- Wlike, D. (2000) Chemiclas from biotechnology : molecular palnt genetics will challenge the chemical and the fermentation industry, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 135-145.
- Wu, S.C., Yen, G.C., Wang, B.S., Chiu, C.K., Yen, W.J., Chang, L.W. and Duh, P.D. (2007) Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea, *LWT-food Science and Technology*, 40, 506-512.
- Wulandari, R.A., Haraguchi, N., Nakayama, H., Furukawa, Y., Tanaka, T., Kouno, I., Kawamura, D. and Ishimura, K., (2011a) HPLC and HPLC-TOFMS analyses of tea catechins and teadenols, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 18, 116-121.
- Wulandari, R.A., Amano, M., Yanagita, T., Tanaka, T., Kouno, I., Kawamura, D. and Ishimaru, K. (2011b) New phenolic compounds from *Camellia sinensis* L. leaves fermented with *Aspergillus* sp., *Journal of Natural Medicines*, 65, 594-597.
- Wulandari, R.A., Haraguchi, N., Nakano, S., Furukawa, Y., Tanaka, T., Kouno, I.,

- Kitagaki, H. and Ishimaru, K. (2011c) Teadenol biotransformed from tea catechins, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 18, 137-142.
- Xie, L., Guo, Y., Cai, B. and Yang, J. (2013) Epimerization of epigallocatechin gallate to gallocatechin gallate and its anti-diabetic activity, *Medicinal Chemistry Research*, 22, 3372-3378.
- Xu, D.B., Madrid, C.P., Rohr, M., and Kubicek, C.P. (1989). The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 553-558.
- Xu, X., Yan, M. and Zhu, Y. (2005) Influence of fungal fermentation on the development of volatile compounds in the puer tea manufacturing process, *Engineering in Life Science*, 5, 382-386.
- Yamazaki, K., Murakami, T., Okada, N., Terai, H., Miyase, T., and Sano, M. (2013). Fluorescence characteristics of pu-erh tea. *Japanese Society for Food Science and Technology*, 60, 87-95.
- Yanagita, T., Ishimaru, K., Tanaka, T., Koba, K., Miyazaki, S., Aoyama, N. and Kawamura, D. (2011a). Functional microbial-fermented tea extract containing polyphenol derivative, and process for production thereof. *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 11, 83, 280. Apr. 28.

- Yanagita, T., Ishimaru, K., Tanaka, T., Koba, K., Miyazaki, S., Aoyama, N. and Kawamura, D. (2011b). Polyphenol derivative and method for producing the same. *Japan Kokai Tokkyo Koho*, 11, 84, 560. Apr. 28.
- Yang, T.T.C. and Koo, M.W.L. (1997) Hypocholesterolemic effects of Chinese tea, *Pharmacological Research*, 35, 505-512.
- Yang, T.T.C. and Koo, M.W.L. (2000) Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sciences*, 66, 411-423.
- Yuh, S.C., Bing, L.L. and Yaw, N.C. (2010) Bioactivities and sensory evaluation of pu-erh teas made from three tea leaves in an improved pile fermentation process, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 557-563.
- Zhang, L., Ma, Z.Z., Che, Y.Y., Li, N. and Tu, P.F. (2011) Protective effect of a new amide compound from pu-erh tea on human micro-vascular endothelial cell against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide, *Fitoterapia*, 82, 267-271.
- Zhang. Z., Li, G., Pan, H., Soccol, C. and Pandey, A. (2012) Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentation of wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 32-39.

- Zhao, L., Jia, S., Tang, W., Sheng, J., and Luo, Y. (2011) Pu-erh tea inhibits tumor cell growth by down-regulating mutant p53. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7581-7593.
- Zhao, Z.J., Tong, H.R., Zhou, L., Wang, E.X. and Liu, Q.J. (2010) Fungal colonization of pu-erh tea in yunnan, *Journal of Food Safety*, 30, 769-784.
- Zhao, Z.J., Hu, X.C. and Liu, Q.J. (2015) Recent advances on the fungi of pu-erh ripe tea, *International Food Research Journal*, 22, 1240-1246.
- Zhong, K., Shao, Z. and Hong, F. (2008) Enzymatic production of epigallocatechin by using an epigallocatechin gallate hydrolase induced from *Aspergillus oryzae*, *Biotechnology Progress*, 24, 583-587
- Zuou, Z., Zhang, Y., Xu, M. and Yang, C. (2005) Puerins A and B, two new 8-C substituted flavan-3-ols from pu-er tea, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8814-8617.
- Zhu, Y.F., Chen, J.J., Ji, X.M., Hu, X., Ling, T.J., Zhang, Z.Z. and Bao, G.H. (2015) Changes of major tea polyphenols and production of four new-bring fission metabolites, *Food Chemistry*, 170, 110-117.

Zuo, Y., Chen, H. and Deng, Y. (2002) Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiodearray detector, *Talanta*, 57, 307-316.

呂 毅、郭雯飛、駱少君、坂田 完三. (2004) 中国黒茶のすべて-微生物醱酵茶、東京：幸書房.

謝辞

本研究の遂行にあたりまして、終始ご親切なご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学生命環境系吉田滋樹准教授に心より厚く感謝申し上げます。また、本研究を進めるに当たり多くのご教示を賜りました筑波大学生命環境系宮崎均教授、佐藤誠吾教授、青柳秀紀教授に厚く御礼申し上げます。

本研究で使用した*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280) を提供いただきました(株)リバーソンの河村傳兵衛博士に心より感謝いたします。

ならびに、本研究に対し常に温かいご助力、ご助言を頂きました筑波大学大学院生命環境科学研究科食品機能化学研究室の皆様、食機能探査化学研究室の皆様我心より感謝いたします。

最後に、研究生活を支え、いかなる時も常に厚く励ましてくれた家族に心から感謝申し上げます。