製造工程の違いが柿葉茶の機能性および機能性成分に与える影響

鶴永陽子[§], 松崎 一, 持田圭介*, 板村裕之**

しまねの味開発指導センター

* 島根県農業試験場

** 島根大学生物資源科学部

Effects of Manufacturing Process on Functionality and Functional Component of Persimmon Leaf Tea

Yoko Tsurunaga[§], Hajime Matsuzaki, Keisuke Mochida* and Hiroyuki Itamura**

Food Processing Research Institute of Shimane Prefecture, Shimoko 338-3, Hamada, Shimane, 697-0006

* Shimane Agricultural Experiment Station, Ashiwata 2440, Izumo, Shimane, 693-0005

** Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University,
Nishikawatsu 1060, Matsue, Shimane, 690-8504

The effective manufacturing process of persimmon leaf tea was investigated for maintenance of high level of the functionality. By steaming treatment for 10 minutes following the drying process, total ascorbic acid and radical scavenging activities were increased in comparison with the short time steaming. The level of total ascorbic acid and radical scavenging activities of the machine drying method was higher than that of the shade drying method. A high level of anti-allergy activities was observed in all processes, and no difference was observed in anti-allergy activities resulted from the steaming time and drying method. These results show that the steaming treatment for 10 minutes following the machine-drying method was suitable for the production of persimmon leaf tea.

(Received Dec. 19, 2003 ; Accepted May 17, 2004)

消費者の健康志向が高まる中、薬草・山野草などを利用した健康茶が数多く市販されている。その中で、柿葉は、アスコルビン酸含量が高いことが知られ¹⁾²⁾、最近注目を浴びている健康茶素材の一つである。

島根県では渋柿であるカキ「西条」の栽培が盛んであり、約 600 ha (1998 年) で栽培されている³⁾。果実は主に生果、干し柿として利用されているが、機能性成分を豊富に含む葉はほとんど利用されていない。

近年の研究では、柿葉の機能性に関する研究も多くなされている。桑名ら⁴⁾は、培養ヒト毛包細胞を用いて柿葉エキスの育毛効果を確認し、棟久ら⁵⁾は柿葉にイソケルシトリン、アストラガリンが含まれ、ラジカル捕捉活性が強いことを明らかにしている。また、小谷ら⁶⁾、松本ら⁷⁾は、柿葉熱水抽出物に強い抗アレルギー活性があることを、奥田²⁾は、柿葉に含まれるケルセチン誘導体の血圧上昇物質アンジオテンシン II 生成抑制作用について報告している。

しかし、柿葉茶の製造工程が機能性や機能性に関与する成分に与える影響について検討した例は少ない。

今回、我々は 6 月中旬の柿葉を利用し、柿葉製茶行程の蒸熱時間、乾燥方法が総アスコルビン酸残存量、ラジカル捕捉活性、抗アレルギー作用に関与する脱顆粒抑制活性に与える影響について検討した。その結果、通常 1 分程度しか行われない蒸熱処理を 10 分間と長くすることにより、半年間常温保存した場合でも柿葉茶中の総アスコルビン酸残存量を高く保持できることを明らかにしたので報告する。

実 験 方 法

1. 材料および柿葉製茶方法

平成 14 年 6 月中旬に島根県農業試験場(益田市)栽植のカキ「西条」の葉を採取し、直ちに柿葉製茶試験に供した。柿葉茶の製造方法は、Fig. 1 に示すとおり、水道水で洗浄した葉を十分に水切りした後、せいろ (40 cm × 40 cm) を 1 処理区につき 3 段重ね、蒸熱処理は 0, 1, 3, 5 および 10 分間とした。乾燥試験としては、日陰乾燥区 (4 日間) と機械乾燥区 (60℃ 12 時間の送風乾燥) を設けた。以上の組み

〒697-0006 島根県浜田市下府町 388-3

* 〒693-0005 島根県出雲市芦渡町 2440

** 〒690-8504 島根県松江市西川津町 1060

§ 連絡先 (Corresponding author), tsurunaga-yoko@pref.shimane.jp

Fig. 1 Manufacturing process for persimmon leaf tea

合わせにより処理区を設定し、1 処理区につき生葉 500 g を使用した。また、原料の一部を凍結乾燥し、分析試料とした。

2. 分析方法

(1) 分析試料

原料の凍結乾燥品（以下 FD 品）および柿葉茶を粉碎器で粉末とした。FD 品および柿葉茶とも、流通期間を考慮し、デシケーター内（常温）で半年間保存したものを分析試料とした。

(2) 還元型および酸化型アスコルビン酸含量の測定

池ヶ谷らの方法⁸⁾に準じた。すなわち、試料 200 mg に 2% メタリン酸 40 ml 加え、1 時間放置して抽出し、抽出液を 50 ml に定容した。その抽出液を 0.45 μ m のマイクロフィルターでろ過して、高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC）に供し、還元型アスコルビン酸（以下 AsA）を測定した。また、酸化型アスコルビン酸（以下 DHA）は、上記抽出液にジチオスレイトールを添加して DHA を還元型に変換して総アスコルビン（以下 T-AsA）含量を測定し、先の AsA の測定値を差し引いて求めた。HPLC は島津製作所製 LC10AT ポンプ、SPD10A 型検出器を用いた。

(3) ラジカル捕捉活性の測定

測定用の試料溶液は、熱水を用いて調整した。すなわち、試料 200 mg にミリ Q 水 20 ml を加え、沸騰水中で 10 分間加熱抽出し、50 ml に定容後ろ過した。ラジカル捕捉活性の測定は、安定な DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル用いる須田⁹⁾の方法に準じ、水溶性 α -トコフェロールである Trolox 相当量 (μ mol Trolox eq./1 g DW.) で表した。

(4) 脱顆粒抑制活性の測定

熱水を用いて脱顆粒抑制活性測定のための抽出液を得た。試料 1 g にミリ Q 水 20 ml を加え、沸騰水中で 15 分間加熱抽出後、ろ過 (0.45 μ m) した。測定は、ヒューマンサイエンス振興財団から入手したラット好塩基球白血病細胞（以下 RBL-2H3 細胞）を用い、片岡ら¹⁰⁾の方法を一部改良した勝部¹¹⁾の方法に準じた。すなわち、 5×10^5 cell/mL に調製した RBL-2H3 細胞に、DNP-BSA マウス IgE 抗体 (SIGMA) を最終 0.3 μ g/mL になるよう加え、48 穴プレート (NUNC) に播種し、CO₂ インキュベータで一晩培養し

た。翌日、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水（以下 PBS）で洗浄した後、遊離液 (116.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.6 mM グルコース, 25 mM HEPES, 2.0 mM CaCl₂, 1 mg/ml BSA, pH 7.7) を 130 μ L、各抽出液及び陰性対照である PBS を 20 μ L 添加し、CO₂ インキュベータで 10 分間静置した。次に、4 μ g/mL の DNP-BSA（コスモ・バイオ）を 20 μ L 加え、CO₂ インキュベータ中で 1 時間静置し、脱顆粒を惹起した。上澄み液 16 μ L を 96 穴プレート (NUNC) に移し、66 μ L の 5 mM ヘキソサミニダーゼ基質溶液 (5 mM *p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (SIGMA), クエン酸緩衝液 pH 4.5) を加え、37°C で 30 分間反応させた。これに 166 μ L の反応停止液 (100 mM 炭酸緩衝液, pH 10.0) を加え、405 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

ヘキソサミニダーゼ阻害率は次式¹¹⁾により求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{1 - (S - B) / (C - b)\} \times 100$$

S: 各抽出液を細胞に加えたときの A₄₀₅

B: 細胞非存在下で各抽出液を加えたときの A₄₀₅

C: 陰性対照 (PBS を細胞に加えたとき) の A₄₀₅

b: 細胞非存在下で PBS を加えたときの A₄₀₅

実験結果および考察

1. T-AsA 残存量

Fig. 2 に柿葉 FD 品と柿葉茶の AsA 残存量および DHA 残存量を示した。蒸熱せずに乾燥した柿葉茶は、T-AsA が低く、FD 品の 10% にも満たなかった。また乾燥処理は凍結乾燥 > 機械乾燥 > 日陰乾燥の順に、蒸熱時間は長い方が T-AsA 残存量は多いという結果になった。凍結乾燥により製造された食品は、色調、香り、ビタミン類等の成分をより高く保持できること¹²⁾は良く知られており、本試験においても同様の結果が得られた。FD 品には及ばなかったが、10 分間蒸熱処理後に機械乾燥した柿葉茶は、半年間常温で保存したにも関わらず、400 mg/100g DW. の T-AsA が残存していた。AsA は強い還元性を持つため、容易に酸化され DHA となる。DHA は AsA と比較して非常に不安定で、水共存下ではラクトン環が加水分解され、更に不安定な物質である 2,3-ジケトグルコン酸になり、順次分解反応が進むことが知られている¹³⁾¹⁴⁾。我々は、

Fig. 2 Effect of process technique on AsA and DHA contents of persimmon leaf tea

■ AsA : ascorbic acid (reduced) □ DHA : dehydro-ascorbic acid. FD : Freeze drying.

Vertical bars indicate standard deviations (n=3) of means.

Total ascorbic acids (AsA+DHA) with asterisk marks are significantly different from non-steaming (identical drying) at $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$.

AsA 残存量と AsA の酸化に関与する酵素群に注目した。AsA の酸化には、アスコルビン酸オキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、パーオキシダーゼ等多くの酵素が関与しており¹⁵⁾¹⁶⁾、これら酵素群の残存による複合的な働きによるものと考えられる。すなわち、日陰乾燥は4日間を要したため、乾燥途中で酵素群により AsA が酸化されて DHA となり更に分解が進んだと推察される。一方、蒸熱時間が長くなるに従い AsA 残存量が高くなる傾向は、蒸熱時間を長くすることで柿葉中におけるアスコルビン酸オキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ等の酵素群が失活したことに起因すると考えられる。蒸熱処理が T-AsA 残存量を高めることは曾根原¹⁷⁾も報告しているが、蒸熱時間についての報告はない。アスコルビン酸オキシダーゼは 75℃ 以上¹⁸⁾で、ポリフェノールオキシダーゼは 70℃ 以上¹⁶⁾で失活すると言われている。通常、緑茶の蒸熱時間は 30 秒から 1 分程度だが、柿葉の場合、酵素の失活には緑茶より長い蒸熱時間が必要であると推定された。

試作柿葉茶と市販柿葉茶との AsA および DHA 含量比較を行った。柿葉茶は T-AsA 含量が高いことで知られているが、市販柿葉茶には、T-AsA がほとんど含まれていないことが明らかとなった (Fig. 3)。市販品の T-AsA 含量が著しく低かったことの原因としては、蒸熱無しの乾燥及び流通段階での消失、焙煎の影響が考えられた。柿葉茶などの健康茶の流通を想定すると、室温で長期間保存する場合が多い。本研究において蒸熱処理を 10 分間行うことで T-AsA 残存量の減少を抑えることが明らかとなり、蒸熱

Fig. 3 Comparison of ascorbic acid contents among trial product* and three kinds of commercial products**

■ AsA : ascorbic acid (reduced). □ DHA : dehydro-ascorbic acid.

* : Persimmon leaf tea I.

** : Persimmon leaf tea II, III, IV, Green tea and Coarse tea.

処理は柿葉茶の付加価値を高める有効な手段であることが示された。

2. ラジカル捕捉活性

ラジカル捕捉活性に対する蒸熱時間の影響をみたところ、処理時間を長くすることで無処理区より高い活性が認められた (Fig. 4)。Fig. 3 で示すとおり、抗酸化力を有する T-AsA 残存量も蒸熱時間を長くした方が高い結果が得られていることから、ラジカル捕捉活性の上昇には T-AsA 残存量の影響が考えられた。しかし、T-AsA 残存量が低かった日陰乾燥区も、凍結乾燥区および機械乾燥区と同程度のラジカル捕捉活性を示しており、ラジカル捕捉活性の主要因を T-AsA 残存量に限定すると矛盾が生じる。柿葉には T-AsA の他に、強い抗酸化性を示すカテキン類やフラボノイド類が含まれており⁵⁾、これらの物質が蒸熱処理や乾燥方法により何らかの影響を受け、ラジカル捕捉活性に関与していると推察される。蒸熱処理時間および乾燥方法とこれらの物質との関係について今後検討していきたいと考えている。

3. 脱顆粒抑制活性

アレルギー症状は、I 型から IV 型の 4 タイプに分類され、アトピー性皮膚炎、喘息、花粉症等は、即時型である I 型アレルギーに分類される¹⁹⁾。食品の抗 I 型アレルギー作用の評価方法に、肥満細胞や好塩基球からの化学伝達物質の遊離反応すなわち脱顆粒抑制を測定する評価系がある。我々は、ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3) からの β -ヘキソサミニダーゼ遊離阻害活性を測定することにより、試作柿葉茶の脱顆粒抑制について検討した (Fig. 5)。いずれの処理区も強い活性を示し、処理区間による有

Fig. 4 The effect of the process technique on radical scavenging activities of persimmon leaf tea

D : Freeze drying

Extracting method : 200 mg of powdered sample was extracted with 20 ml of boiling milli-Q water for 10 min, and then fill up to 50 ml.

Vertical bar indicate standard deviations (n=3) of means.

Radical scavenging activities with asterisk marks are significantly different from non-steaming (identical drying) at $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$.

意差は認められなかった。このことから、脱顆粒抑制に関与している成分は、蒸熱処理などの加熱処理でも変化しにくく、酵素による影響を受けにくい物質であると考えられる。柿葉茶の抗アレルギーに起因する主成分は現在のところ明らかにされていないが、小谷ら⁷⁾は、アトピー性皮膚炎のモデルマウスとして利用されている NC/Nga マウスに柿葉熱水抽出物を経口投与すると、血清中の IgE レベルを低下させ、皮膚の炎症を抑制すると報告している。そして、その抽出物にはアストラガリン、トリフォリン、イソケルシトリンが含まれ、それらが IgE レベル低下に関与すると示唆している。

今後は抽出液の分画を行い脱顆粒抑制活性の主成分について検討する必要があると考える。

以上、10 分間の蒸熱処理と機械乾燥で、原料葉の機能性をより保持した柿葉茶の製造が可能であることが判った。

要 約

6 月中旬のカキ「西条」の葉を利用し、柿葉が有している機能性の低下を抑制する柿葉茶の製造方法を検討した。製造工程の蒸熱時間、乾燥方法を変えて柿葉茶を製造し、常温保存 6 ヶ月後の AsA および DHA 残存量、ラジカル捕捉活性及び脱顆粒抑制活性を測定した。

Fig. 5 The effect of the process technique on β-hexosaminidase interference activities of persimmon leaf tea

FD : Freeze drying

Extracting method : One gram of powdered sample was extracted with 19 ml of boiling milli-Q water for 15 min.

Vertical bar indicate standard deviations (n=3) of means.

機械乾燥前に、10 分間蒸熱処理したところ、短時間処理区と比較して AsA 残存量およびラジカル捕捉活性は増加した。一方、脱顆粒抑制活性は、いずれの処理区においても強い活性が認められ、乾燥方法および蒸熱時間による有意差は認められなかった。

以上の結果から、原料葉の機能性を低下させにくい柿葉茶の製造方法として、10 分間の蒸熱処理と、機械乾燥の組み合わせが適していることが推察された。

本稿を取りまとめるにあたり、島根県農業試験場園芸部の松本敏一博士に多大なるご指導とご協力をいただきました。ここに記して心からの感謝を表します。

文 献

- 1) 水野瑞夫, カキノキ, 「日本薬草全書」, 第 2 版 (新日本法規, 東京), pp. 143-145 (1995).
- 2) 奥田拓道, 柿の葉茶, 「健康, 栄養食品辞典」, 第 1 版 (東洋医学舎, 東京), pp. 385-386 (2002).
- 3) 倉橋孝夫, 持田圭介, 小島正至, 光強度の異なる長日処理がカキ「西条」果実の成熟抑制と品質に及ぼす影響, 園学雑, **71**, 262-266 (2002).
- 4) 桑名隆一郎, 伊達あけみ, 沢村 豊, 盛岡雅史, 毛乳頭をめぐる育毛剤の新しい研究開発, Fragrance Journal, **23**, 41-48 (1995).
- 5) 棟久美佐子, 井上知明, 小松正幹, 日本茶及び「健康茶」浸出液の抗酸化作用について (Ⅱ), 京都府保環研年報, **44**, 20-25 (1999).
- 6) 小谷麻由美, 藤田晃人, 田中敏郎, ヒト好塩基球細胞およびマウスにおける柿の葉抽出物のアレルギー抑制効果, 栄養誌, **52**, 147-150 (1999).
- 7) 松本元伸, 小谷麻由美, 藤田晃人, 田中敏郎, 柿葉抽出物の

- NC/Nga マウスにおけるアトピー性皮膚炎抑制作用, 栄食誌, **54**, 3-7 (2001).
- 8) 池ヶ谷賢次郎, 高柳博次, 阿南豊正, 茶の分析法, 茶業研究報告, **71**, 55-57 (1990).
- 9) 須田郁夫, 抗酸化機能, 「食品機能研究法」, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編著, (光琳, 東京), pp. 218-220 (2000).
- 10) 片岡正博, 高垣 弘, ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3) による生薬の抗アレルギースクリーニング, 生薬学雑誌, **46**, 25-29 (1992).
- 11) 勝部拓矢, ラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3) を用いた脱顆粒抑制活性の測定, 「県内食品素材の機能性成分の解析と高付加価値化食品の開発研究報告書」(平成 11 年度～平成 13 年度 県立試験研究期間連携推進事業), 島根県, pp. 116-120 (2002).
- 12) 亀和田光男, 乾燥食品とは, 「乾燥食品の基礎と応用」, 第 1 版 (幸書房, 東京), pp. 6-8 (1997).
- 13) 林 建樹, アスコルビン酸の化学と食品への利用, 日食工試, **33**, 456-462 (1986).
- 14) 倉田忠男, 食品加工におけるアスコルビン酸の利用に関する基礎研究, 食品科学振興財団年報, 236-240 (1991).
- 15) 小池五郎, 福場博保, 「栄養学辞典」, 第 11 版 (朝倉書店, 東京), 143-145 (1995).
- 16) 村田容常, 本間清一, ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御, 食科工, **45**, 177-185 (1998).
- 17) 曾根原直子, 泉 敬子, 柿葉のビタミン C とポリフェノール成分との関係, 栄食誌, **44**, 213-219 (1991).
- 18) 桐淵壽子, 川嶋かほる, 調理時におけるアスコルビン酸の変化, 家政誌, **38**, 877-887 (1987).
- 19) 立花宏文, 山田耕路, IgE の生成を調節する食品成分, 臨床免疫, **35**, 611-618 (2001).
- (平成 15 年 12 月 19 日受付, 平成 16 年 5 月 17 日受理)