日本食品保蔵科学会誌

VOL. 41　NO. 5

会　　長　高井　陸雄　　副　会　長　太田　英明　　小宮山美弘　　早坂　　薫
編集委員長　太田　英明
編 集 委 員　稲熊　隆博　　井上　茂孝　　今堀　義洋　　恩田　　匠　　竹永　章生
古庄　　律　　松田　茂樹　　宮本　敬久

＜報　　文＞
急速加減圧抽出法による緑茶有用性成分の抽出とその抗酸化活性・保存性評価 ……（191）
／安田みどり・中多啓子・大城あゆみ・山内良子
相浦正文・塚本敏朗・林　伊久・石川洋哉

＜研究ノート＞
双子型恒温壁熱量計による小麦粉の比熱測定と有効熱拡散率の推定 ……（199）
／村松良樹・坂口栄一郎・川上昭太郎・田川彰男

＜技術報告＞
γ-アミノ酪酸（GABA）生成乳酸菌を用いた発酵バター様食品の開発とその品質について
……（207）
／田中智大・小泉亮輔・入澤友啓
寺島晃也・多田耕太郎・鈴木敏郎

＜講　　座＞
HACCP教育講座（11）　生鮮食品の品質評価に関する最近の動向 ……（215）
／椎名武夫

＜文献抄録＞ ……（221）
＜本会記事＞ ……（222）
＜記　　事＞ ……（237）

Food Preservation Science

CONTENTS OF VOL. 41 NO. 5 (2015)

<Article> (Japanese)

The Extraction of Green Tea Components by the Rapid Increasing-decreasing Pressure Method and Antioxidative Activity and Stability of the Extracts
YASUDA Midori, NAKATA Keiko, OHSHIRO Ayumi, YAMAUCHI Ryoko, AIURA Masafumi, TSUKAMOTO Toshirou, HAYASHI Tadahisa and ISHIKAWA Hiroya ····· (191)

<Research Note> (Japanese)

Measurement of Specific Heat Using Twin Isoperibol Calorimeters and Estimation of the Effective Thermal Diffusivity of Wheat Flour
MURAMATSU Yoshiki, SAKAGUCHI Eiichiro, KAWAKAMI Shotaro and TAGAWA Akio····· (199)

<Technical Report> (Japanese)

Development and Quality Analysis of Fermented Butter-like Food Prepared Using Gamma Aminobutyric Acid (GABA)-Producing Lactic Acid Bacterium
TANAKA Tomohiro, KOIZUMI Ryosuke, IRISAWA Tomohiro, TERASHIMA Teruya, TADA Kotaro and SUZUKI Toshiro ····· (207)

<Serialization Lecture> (Japanese)

Recent Trends in Quality Evaluation of Fresh Produces
SHIINA Takeo ····· (215)

急速加減圧抽出法による緑茶有用性成分の抽出とその抗酸化活性・保存性評価

安田みどり[*1§]・中多啓子[*1]・大城あゆみ[*2]・山内良子[*3]
相浦正文[*4]・塚本敏朗[*4]・林　伊久[*5]・石川洋哉[*3]

＊1　西九州大学健康栄養学部
＊2　西九州大学子ども学部
＊3　福岡女子大学国際文理学部
＊4　(株)ワコー
＊5　公益財団法人飯塚研究開発機構

The Extraction of Green Tea Components by the Rapid Increasing-decreasing Pressure Method and Antioxidative Activity and Stability of the Extracts

YASUDA Midori[*1], NAKATA Keiko[*1], OHSHIRO Ayumi[*2], YAMAUCHI Ryoko[*3], AIURA Masafumi[*4], TSUKAMOTO Toshirou[*4], HAYASHI Tadahisa[*5] and ISHIKAWA Hiroya[*3]

＊1　*Department of Health and Nutrition Sciences, Nishikyushu University, 4490−9 Ozaki, Kanzaki-shi, Saga　842−8585*
＊2　*Department of Children's Studies, Nishikyushu University, 3−18−15 Kamizono, Saga-shi, Saga 840−0806*
＊3　*Department of Food and Health Sciences, Fukuoka Women's University, 1−1−1 Kasumigaoka, Higashi−ku, Fukuoka　813−8529*
＊4　*Wako Inc., 1264 Kamikitajima, Chikugo-shi, Fukuoka 833−0033*
＊5　*Iizuka Research and Dvelopment Organization, 680−41 Kawazu, Iizuka-shi, Fukuoka　820−8517*

To establish an efficient extraction method for functional components from food materials, we developed a piece of equipment for increasing-decreasing pressure extractions, which utilizes the pressure difference caused by a flow of water. We extracted the functional components of green tea using this equipment. As a result, catechins, caffeine, amino acids, chlorophyll, and α-tocopherol were efficiently extracted from green tea at a room temperature (20〜25℃) in a short time (15 min). In addition, significant antioxidant activity attributed to the green tea extracts was confirmed, which the ethanol concentration was more than 60 % (v/v). Although the concentration of chlorophyll decreased after storage for three months, the concentrations of the catechins, caffeine, and amino acids did not change significantly upon storage. Therefore, even though there was an issue regarding the retention of color owing to the decrease in chlorophyll, this method is suitable for the extraction and storage of functional components from food materials.

(Received Mar. 26, 2015；Accepted Jul. 22, 2015)

Key words：*green tea, rapid increasing-decreasing pressure method, antioxidative activity, catechins, chlorophyll*
緑茶，急速加減圧抽出法，抗酸化活性，カテキン類，クロロフィル

緑茶は，昔から日本人にとって最も親しまれている嗜好飲料である。緑茶には，カテキン類，カフェイン，ビタミン類（ビタミンC, E），テアニン等のアミノ酸，クロロフィル等が含まれている[1)]。その中でも，カテキン

＊1　〒842−8585　佐賀県神埼市神埼町尾崎4490− 9
§　Corresponding author, E-mail : midori@nisikyu-u.ac.jp
＊2　〒840−0806　佐賀県佐賀市神園 3 −18−15
＊3　〒813−8529　福岡県福岡市東区香住ヶ丘 1 − 1 − 1
＊4　〒833−0033　福岡県筑後市大字上北島1264
＊5　〒820−8517　福岡県飯塚市川津680−41

類は多くの生理機能性があることが報告されている[2]。特に，カテキン類には強い抗酸化活性が認められており[3]，茶葉に多く含まれているビタミンEとともに緑茶の抗酸化活性を高めている[4]。カフェインには，覚醒作用があり，作業能力の向上につながることが確認され[5]，旨味を示すテアニンについては，リラックス効果が科学的に証明されている[6]。クロロフィルは，鮮やかな緑色を示す脂溶性の色素で緑茶の品質に影響している。このように，茶に含まれている成分は，食品の2次および3次機能に関与する成分が多く，これらを有効に抽出する方法が求められている。

通常，緑茶の抽出には熱水抽出法が一般的であるが，カテキンの酸化や分解[7),8)]，エピマー化[7),9)]が生じる。また，加熱により，緑茶浸出液のフレーバーや色の変化が生じることも問題となっている[10]。熱による変敗を防ぐために，低温での抽出も試みられているが，有効成分の抽出に時間がかかり，それに伴う変質もみられている[11]。最近では，超臨界流体抽出法を用いて，カテキンの抽出[12]，脱カフェイン[13]などが試みられているものの，装置が高価であるため一般には用いられていない。

これまでに，私たちは植物の細胞壁内外の圧力差によって水が細胞内外を出入する現象に着目し，水流によって圧力差をさらに大きくすることで植物中の有効成分を効率的に抽出する急速加減圧抽出技術を開発した[14]。本技術では低温且つ短時間での抽出が可能であるため，抽出過程における成分変化を伴わず，高機能且つ高品質な新規食品・天然物抽出液の製造が可能になると期待されている。本研究では，緑茶有用成分の抽出法の確立を目的として，本抽出技術を活用した急速加減圧抽出装置を新たに設計・製造した。この装置を用いて，試験的に緑茶抽出液を作製し，抽出液中に含まれる各種有用成分の含有量を調べるとともに，抽出液の抗酸化活性評価を実施した。さらに，抽出後の保存安定性試験も実施し，カテキン，カフェイン，アミノ酸成分量の経時変化を観察するとともに，クロロフィルの安定性に起因する色調の変化を確認した。

実験方法

1．試　薬

カテキン（(－)-エピカテキン：EC，(－)-エピガロカテキン：EGC，(－)-エピカテキンガレート：ECG，(－)-エピガロカテキンガレート：EGCG）は，長良サイエンス製のものを用いた。アミノ酸は，緑茶に含まれている主要な6種類，アスパラギン酸（Asp），セリン（Ser），グルタミン酸（Glu），グルタミン（Gln），アルギニン（Arg），テアニン（The）（特級，和光純薬工業）を用いた。カフェイン（特級），α-トコフェロール（α-Toc，特級），クロロフィル-a（スピルナ製，生化学用）は，和光純薬工業から購入したものを使用した。エタノールは，日本アルコール産業の1級（トレーサブル99，純度99%）を用い，これを100%エタノールとした。なお，エタノール水溶液中のエタノールの濃度は%（v/v）で示すこととする。

抗酸化活性試験試薬は，2，2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS）（Roche Diagnostics），ペルオキソ二硫酸カリウム（和光純薬工業），1，1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）（和光純薬工業），フルオレセインナトリウム塩（SIGMA-ALDRICH），2，2'-アゾビス（2-メチルプロピオンアミジン）二塩酸塩（AAPH）（ALDRICH），SOD Assay Kit-WST（S311，同仁化学研究所）を用いた。また，基準物質として（±）-6-ヒドロキシ-2，5，7，8-テトラメチルクロマン-2-カルボン酸（トロロックス）（SIGMA）を使用した。その他一般試薬は，和光純薬工業の特級試薬を用いた。超純水は，MILLI-Q Labo（MILLIPORE）により作製した。

2．抽出装置

今回，開発した装置は，抽出容器，循環容器，循環ポンプ，電磁弁の4点で，非常に単純な構成となっている。この装置は，抽出物外部の圧力を急速に加減圧することにより生じる抽出物内外の瞬間的圧力差を活用したものである。すなわち，急速加圧により細胞内に溶媒を浸水させた後，急速に減圧することにより内容成分を抽出する。なお，急速加圧には循環水を電磁弁に衝突させて生じる衝突エネルギーを利用している[14]。この装置の概要をFig. 1に示す。抽出容器と循環容器は，径100mm，高さ100mmの筒状で樹脂製チューブにより繋がっており，その間に電磁弁が配置されている。循環容器内には，緑茶サンプルが入った球形の網状の容器（90mm）を設置した。溶媒は，循環容器に入れ，循環ポンプにて抽出容

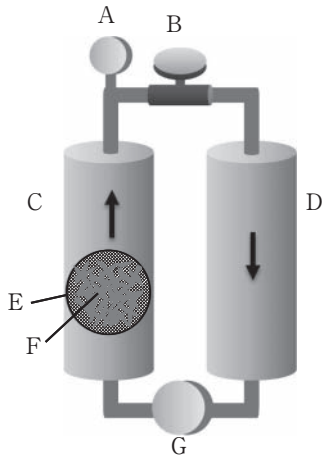


Fig. 1　The principle of the osmotic pressure-style extraction method

A) pressure gauge, B) electromagnetic valve, C) circulation vessel, D) extraction vessel, E) meshed vessel, F) sample (green tea), G) circulation pump

Table 1　Content of compounds in green tea leaves

Catechins（g/100g）					Caffeine	α-Toc
EC	EGC	ECG	EGCG	total	（g/100g）	（mg/100g）
0.6	2.6	1.4	9.0	13.6	1.3	36.9
Amino acids（g/100g）						
Asp	Ser	Glu	Gln	Arg	The	total
0.3	0.1	0.3	0.1	0.2	1.5	2.5

器に送り込むようにした。また，抽出温度を一定にするための温度コントローラー，溶存酸素を除去するための真空装置および窒素ガス導入装置も設置した。なお，抽出時の圧力は2.2MPaとし，抽出温度は室温（20～25℃）であった。

また，用いた茶葉は，平成24年に福岡県八女市星野村にて栽培，加工された煎茶であった。その主要な成分の含有量をTable 1に示す。抽出には，溶媒5Lあたり茶葉量160gを使用した。

3．緑茶成分のHPLC分析

カテキン類およびカフェインの分析は，山口ら[15]による方法を参考にした。分析カラムは，Develosil ODS-HG－5（φ4.6mm×150mm，野村化学）2本を直列に接続して用いた。溶離液は，A液（0.085%リン酸水溶液）およびB液（A液：アセトニトリル＝3：2 v/v）を用い，分析開始時から10分までA：B＝80：20（v/v）とし，40分後にA：B＝36：64（v/v）となるように直線グラジエントを設定した。40分から55分まではA：B＝25：75（v/v）とした。分析条件は，移動相流量1 mℓ/min，カラム温度40℃，注入量10μℓ，検出波長UV230nmであった。

アミノ酸の分析は，AccQ・Tag法[16]にて行った。前処理方法はAccQ・Tag誘導体化試薬キット（Waters）を用いて，次のように行った。バイアルに試料20μℓを入れ，誘導体化用緩衝溶液60μℓ，誘導体化試薬20μℓを添加した。これを攪拌後，1分間静置し，55℃にて10分間加温した。HPLC分析は，既報[16]と同様に行った。

クロロフィルは，クロロフィル類のうち茶葉に最も多く含まれているクロロフィル-aをHPLCにより分析することにより求めた。分析条件は，カラム：CAPCELL PAK C18　MGⅡ（φ4.6×250mm，資生堂），溶離液：メタノール，カラム温度：40℃，注入量：10μℓ，流速：1 mℓ/min，検出：UV-Vis 430nmとした。

α-トコフェロール（以下，α-Toc）は，既報[17]に準じて分析を行った。

4．緑茶抽出液の抗酸化活性評価

緑茶抽出液の抗酸化活性として，ABTS法およびDPPH法によりラジカル消去活性，ORAC法により活性酸素吸収能，さらにWST-1法によりスーパーオキシド捕捉活性を評価した。ABTS・DPPH法は，既報と同様に行った[18]。すなわち，コントロール溶液（サンプル無添加）に対するサンプル溶液の吸光度比より阻害（ラジカル消去）率（%）を算出し，緑茶抽出液のIC_{50}値（50%阻害率を与えるサンプル濃度）を求めた。同様に，基準物質トロロックスのIC_{50}値を求め，トロロックスのIC_{50}値を緑茶抽出液のIC_{50}値で除することにより，緑茶抽出液のトロロックス等価活性値（TEAC値）を求めた。

ORAC法は，蛍光プローブである48nMフルオレセイン溶液1.8mℓとトロロックス標準溶液300μℓの混合溶液に対して，43mM AAPH溶液（ラジカル発生剤）900μℓを添加後，37℃で40分間蛍光強度測定（励起485nm，蛍光520nm）を行った。測定には，日本分光社製蛍光光度計（Jasco FW-6500）を用いた。測定後得られたトロロックス添加時と無添加時の曲線下面積差（net AUC）を求め，トロロックス濃度に対してプロットすることにより検量線を作成した。続いて，緑茶抽出液で得られたnet AUC値をトロロックス検量線に代入することにより，緑茶抽出液の相対ORAC値をTEAC値として算出した。

WST-1法は，既報と同様に行った[18]。緑茶抽出液のスーパーオキシド阻害率を算出し，IC_{50}値を求めた。なお，スーパーオキシド消去活性は，WST法におけるユニットの定義『WST還元の50%阻害を示すサンプル溶液20μℓに含まれるSOD量を1単位（U）とする』に基づいて算出した。

5．緑茶抽出液の保存試験

緑茶抽出液の保存試験では，茶葉320gを100%エタノール5 ℓにて30分間抽出した抽出液を用い，20%エタノール濃度になるよう水にて希釈した。この緑茶抽出液を遮光して4℃にて1，2，3か月間保存し，緑茶抽出液中の各成分の分析を行った。なお，緑茶抽出液の色調の変化は，色差計（CM3500d，コニカミノルタ）を用いて，a^*，b^*の測定を行い，緑色度（a^*/b^*）を算出することにより測定した。

結果および考察

1．緑茶成分の抽出に及ぼす抽出溶媒の影響

抽出溶媒として用いたエタノール水溶液中のエタノールの濃度を変えて5分間抽出を行い，その抽出液中の緑茶成分の濃度を調べた。20，40，60，80，100%のエタ

Table 2 Effect of ethanol concentration on content of compounds in green tea extracts by the rapid increasing-decreasing pressure method

Ethanol (%)	Catechins (mg/100mℓ)					Caffeine (mg/100mℓ)	Amino acids (mg/100mℓ)							Chlorophyll (μg/100mℓ)	α-Toc (μg/100mℓ)
	EC	EGC	ECG	EGCG	total		Asp	Ser	Glu	Gln	Arg	The	total		
20	9.6	56.7	11.3	40.6	118	22.0	4.9	1.4	3.9	2.0	1.7	24.2	38.0	5	1.5
40	8.9	65.8	12.7	89.4	177	35.1	7.5	2.5	5.7	2.8	2.4	32.9	53.9	33	3.1
60	5.2	61.8	14.3	105	187	33.0	5.5	1.8	4.3	2.2	1.8	26.7	42.2	90	27
80	5.2	48.0	16.0	93.2	162	26.1	4.4	1.4	3.6	1.9	1.5	25.2	37.9	1,330	216
100	4.0	20.5	11.3	44.4	80.2	14.2	0.6	0.4	1.0	0.6	0.3	11.0	13.9	2,830	316

Extraction conditions were as follows: amount of green tea; 160g, amount of solvent; 5ℓ, extraction pressure; 2.2 MPa, extraction temperature; 20～25℃ and extraction time; 5min.

ノール水溶液を用いて抽出試験を行った場合のカテキン類，カフェイン，アミノ酸類，クロロフィル，α-トコフェロールの濃度をTable 2に示す。まず，緑茶抽出液のカテキン濃度は，60%エタノール水溶液で抽出した場合に最も高いことがわかった。さらに，カテキン類の中ではEGC, EGCGがECG, ECに比べて多く抽出されていることが明らかになった。ECやEGCは水に溶けやすい性質のため，エタノール濃度の低い溶媒で多く抽出された。例えば，EC，EGCは100%エタノール水溶液より20%エタノール水溶液のほうがそれぞれ2.4，2.8倍多く抽出された。一方，ECGやEGCGはガロイル基を有し，ECやEGCよりも疎水的であるため，20%エタノールよりも60や80%エタノール水溶液によく抽出されたと考えられる。しかし，100%エタノール溶液ではECGやEGCGの抽出量が最も高くなるものと思われたが，実際には最もカテキン濃度が低い結果となった。

また，カフェインについては，40および60%エタノール水溶液にて抽出した場合が他の溶液より多くなった。カフェインは疎水性の物質であるが，100%エタノール溶液では40および60%エタノール水溶液の約4割しか抽出されていなかった。

アミノ酸については，テアニンがすべてのアミノ酸の60～70%と最も多く抽出され，次に，アスパラギン酸，グルタミン酸であった。アミノ酸についても100%エタノール溶液では，他の溶液に比べて25～37%しか抽出されていなかったが，その他の溶液ではあまり大きな変化はなかった。

堀江ら[19]によると，一番茶3gを200mℓの水にて2分間抽出した場合，EC, EGC, ECG, EGCG，テアニン，カフェインの抽出量はそれぞれ，20℃で2.0，8.1，0.5，2.1，7.7，3.5mg/100mℓ，90℃で9.1，37.3，5.1，37.7，21.6，23.9mg/100mℓであった。本実験では，水に対する茶葉の量が堀江ら[19]の方法より約2倍多いが，これを考慮しても，本装置を用いた40%エタノール水溶液での抽出では，堀江ら[19]の20℃での抽出に比べて，EC，EGC，ECG，EGCG，テアニン，カテキンはそれぞれ2.2，4.1，12.7，21.3，2.1，5.0倍となった。特に，疎水性の高い成分が多く抽出していることがわかった。また，90℃の場合と比べるとテアニン，カフェインがやや少ないもののカテキンは同等の量が抽出されていた。このように，本法では，室温でも90℃と同等の抽出が行えることが示唆された。

上述のように，100%エタノール溶液での抽出では，緑茶成分の中でカテキン類，カフェイン，アミノ酸などの抽出量がいずれも低いことが明らかになった。この理由は，茶葉中のタンパク質が変性し，硬くなったために茶葉が十分に広がらず，抽出が妨げられたためではないかと推察された。実際，100%エタノール溶液では，処理後に茶葉が十分に開いていないことが確認されており，茶葉の開き具合は抽出効率に重大な影響を与えるものと考えられた。

一方，緑色色素であるクロロフィルは，20～60%エタノール水溶液では5～90μg/100mℓとほとんど抽出されなかったが，80，100%エタノール溶液ではそれぞれ1,330，2,830μg/100mℓと抽出量の増加が認められた。α-トコフェロールでも同様の傾向が確認され，100%エタノール溶液は20%エタノール水溶液の約210倍と顕著な抽出量の増大が確認された。クロロフィルやα-トコフェロールは，疎水性の高い物質であるため，茶葉が開いていない場合にも一定の抽出が可能であったと考えられた。

2．緑茶成分の抽出に及ぼす抽出時間の影響

緑茶成分の抽出量に及ぼす抽出時間（5，10，15分）の影響をTable 3にまとめた。なお，本実験では親水性から疎水性まで幅広く効率的に緑茶成分を抽出することを目的として，エタノール濃度を60，80，100%に設定した。また，上述のとおり高エタノール濃度条件で，茶葉の委縮が懸念されたことから，今回は少量の水で茶葉を広げた後に各溶液を注入することにより抽出効率の改善を試みた。その結果，比較的親水性の高いカテキン，アミノ酸では，抽出時間5～15分での抽出量の違いはほとんど観察されなかった。同様にカフェインでも抽出時間の影響は認められなかった。これらの化合物の抽出に関しては，短時間でも高い抽出量が得られており，また時間の延長効果は小さかったことから，5分間の抽出時

Table 3 Effect of ethanol concentration and extraction time on content of compounds in green tea extracts after adding a small amount of water

Ethanol (%)	Extraction time (min)	Caffeine (mg/100mℓ)					Caffeine (mg/100mℓ)	Amino acids (mg/100mℓ)							Chlorophyll (μg/100mℓ)	α-Toc (μg/100mℓ)
		EC	EGC	ECG	EGCG	total		Asp	Ser	Glu	Gln	Arg	The	total		
60	5	6.0	63.7	12.2	64.0	146	87.2	10.5	4.5	7.9	4.1	3.8	50.6	81.3	60	6.9
	10	6.7	68.7	16.2	71.4	163	94.5	13.7	5.8	10.2	5.4	4.5	67.0	107	440	8.5
	15	6.2	61.5	13.7	66.8	148	84.2	12.0	5.1	8.9	4.8	4.1	57.5	92.4	490	8.7
80	5	6.1	59.5	12.4	62.6	141	87.0	9.7	4.9	7.9	4.3	3.3	56.7	86.8	4,510	14.5
	10	4.7	40.4	11.9	56.0	113	56.5	5.9	3.2	5.4	3.2	2.5	36.4	56.7	5,340	186
	15	7.2	65.3	16.5	68.3	157	96.6	8.5	4.5	7.2	4.2	3.2	57.3	84.8	9,930	643
100	5	4.7	34.1	11.2	47.8	97.8	59.2	2.0	2.2	2.6	1.5	1.6	29.2	39.2	9,500	445
	10	3.8	27.3	7.6	36.8	75.5	45.3	3.0	1.9	2.7	1.8	1.9	28.1	39.4	7,230	644
	15	4.4	32.7	9.6	48.4	95.1	50.9	3.2	2.1	3.0	1.8	2.9	31.8	44.8	8,690	743

Extraction conditions were as follows: amount of green tea; 160g, amount of solvent; 5ℓ, extraction pressure; 2.2 MPa and extraction temperature; 20～25℃.

間で十分であると判断された。一方，クロロフィルとα-トコフェロールでは抽出時間の影響が顕著に現れる結果となった。クロロフィルは，60%エタノール水溶液では15分の抽出時間でもほとんど抽出されなかったが，80%エタノール水溶液では抽出時間と共にクロロフィルの濃度は顕著に増大し，15分抽出時には5分間抽出時の倍以上の9,930μg/100mℓの値が得られた。100%エタノール溶液では，5分間の抽出時間でも9,500μg/100mℓの値が得られ，その後の抽出量の増加は認められなかった。このことは，100%エタノール溶液を使用することにより，クロロフィルの短時間抽出が可能であることを示唆している。α-トコフェロールでは，60%エタノール水溶液では抽出が困難であり，抽出時間の延長も効果はなかったが，80%および100%エタノール溶液では，抽出時間と共にα-トコフェロール濃度が増大することが明らかになった。特に，80%エタノール溶液では，5分ではほとんど抽出されなかったのに対し，10，15分では，5分の場合のそれぞれ約13，44倍多く抽出されることが判明した。100%エタノール溶液を用いた場合には，5分間抽出でも445μg/100mℓの抽出が可能であり，15分間抽出時には743μg/100mℓ（茶葉からの抽出率約63%）という高い抽出効果が得られた。このように，疎水性の高い化合物（α-トコフェロール，クロロフィル）については，高エタノール条件下でより15分間の抽出が効果的であることが示唆された。

3．緑茶抽出液の抗酸化活性評価

抽出条件を変えて調製した各緑茶抽出液の抗酸化活性を，まずABTSおよびDPPH法により検討した。エタノール濃度を60，80，100%(v/v)，抽出時間を5，10，15分に設定して抽出を行った場合の各緑茶抽出液のABTS, DPPH活性をFig.2に示した。まず，抽出時のエタノール濃度ごとにみると，全体的な傾向はABTS法とDPPH法で類似しており，80%および100%エタノール溶液を用いた場合，時間の延長に伴う影響はほとんど確認され

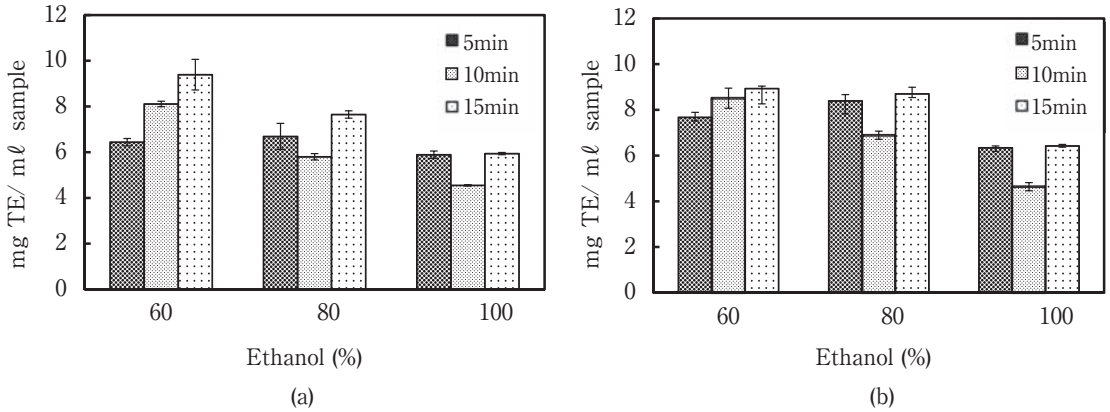


Fig. 2 Effect of ethanol concentration and extraction time on antioxidant activity of green tea extracts

a) ABTS method, b) DPPH method

なかったものの，60%エタノール水溶液では時間の延長に伴い抗酸化活性の増加傾向が認められた。特に，ABTS活性では60%エタノール水溶液を用いた場合に抽出時間の影響が顕著に現れる結果となった。すなわち，ABTS活性では抽出時間5分間では6.44±0.16（mgTE/mℓ-sample）であった活性が，15分間抽出では9.39±0.67（mg TE/mℓ-sample）まで上昇し，TEAC値で2.95（mg TE/mℓ-sample）の増加が観察された。DPPH活性でも同様の傾向は観察されたが，その変化量は小さく，TEAC値で1.26（mg TE/mℓ-sample）程度の増加しか確認されなかった。DPPH法とABTS法は，同様の測定原理（一電子転移反応）に基づくラジカル消去活性測定法であり，類似した活性傾向を示すと考えられているが，私たちはカテコール構造を有する抗酸化物においてABTS法とDPPH法での活性発現挙動が一部異なることを報告している[20]。緑茶抽出物中においても，EC，ECGなどのカテコール構造を有する化合物が含まれており，これら一連の化合物の影響により，ABTS法とDPPH法での活性発現挙動の差が生じたものと推察した。

続いて，ORAC法，WST-1法を加えて，緑茶抽出物の抗酸化活性に及ぼすエタノール濃度の影響を検討した。抽出時間15分に設定して抽出を行った場合の各緑茶抽出液のABTS, DPPH, ORAC法，WST-1法の活性に及ぼす抽出エタノール濃度の影響をFig. 3にまとめて示した。図に示したように，測定法の違いによりエタノール濃度の影響の違いが顕著に現れる結果となった。ABTSとDPPH法では類似した傾向が認められたのに対して，ORAC法とWST-1法では全く異なる挙動が得られた。具体的には，ABTS法では60%エタノール水溶液を用いた場合において，今回供試した抽出液中で最高の活性値，9.39±0.67（mg TE/mℓ-sample）が得られたものの，エタノール濃度の上昇に伴い活性値が順次低下し，100%エタノール溶液では活性値が5.94±0.05（mg TE/mℓ-sample）まで急激に低下（36.7%の活性低下）した。同様に，DPPH法においても60から100%へのエタノール濃度の増加に伴い活性値の低下が観察され，28.1%の活性低下が認められた。これら，エタノール濃度上昇に伴うDPPH・ABTS活性の低下挙動は，緑茶中の主要な抗酸化物と考えられるカテキン類の抽出挙動と類似したものであった。EC, EGC, ECG, EGCGは既報で報告しているように高いDPPH，ABTS活性を有している[20]。EC, EGC, ECG, EGCGの既報の活性データ（ABTS活 性1.35，2.44，1.76，2.55mg TE/mg，DPPH活性2.89，2.55，2.75，2.64mg TE/mg）と今回のカテキン類の定量データを併せて考えると，緑茶抽出物中のカテキン類の活性位寄与率は50%程度とかなりの割合を占めるものと推定される。したがって，エタノール濃度の増加に伴う緑茶抽出液のABTS・DPPH活性の低下には，カテキン類の抽出率の低下が大きな影響を与えているものと推察された。

一方，ORAC法とWST-1法ではDPPH・ABTS法と異なる挙動が認められた。すなわち，ORAC法とWST-1法ではより高いエタノール濃度において高い活性値が確認された。60%と100%エタノール溶液を用いた場合の抽出液の活性値を比較すると，ORAC法ではそれぞれ4.76±0.64と6.50±0.20（μmol TE/mℓ-sample）となり，約1.37倍の活性増加が確認された。さらに，WST-1法では約3倍の活性増加が確認された。これらの結果は，ORAC法とWST-1法ではカテキン類よりも疎水性の高い成分が活性増強に寄与している可能性を示唆している。エタノール濃度の増加に伴い，α-トコフェロール量が増加することは上述のとおりであるが，含有量等も考慮するとその他の疎水性成分が関与している可能性が高い。この関与成分については，本実験では確認出来ておらず，今後詳細に検討する予定である。

4．緑茶抽出液の保存試験

緑茶抽出液を作製後，4℃で1，2，3か月間保存し，それぞれの成分分析を行った結果をTable 4にまとめて示した。カテキン，カフェイン含量については，3か月間の保存期間中にほとんど変化がみられなかった。アミ

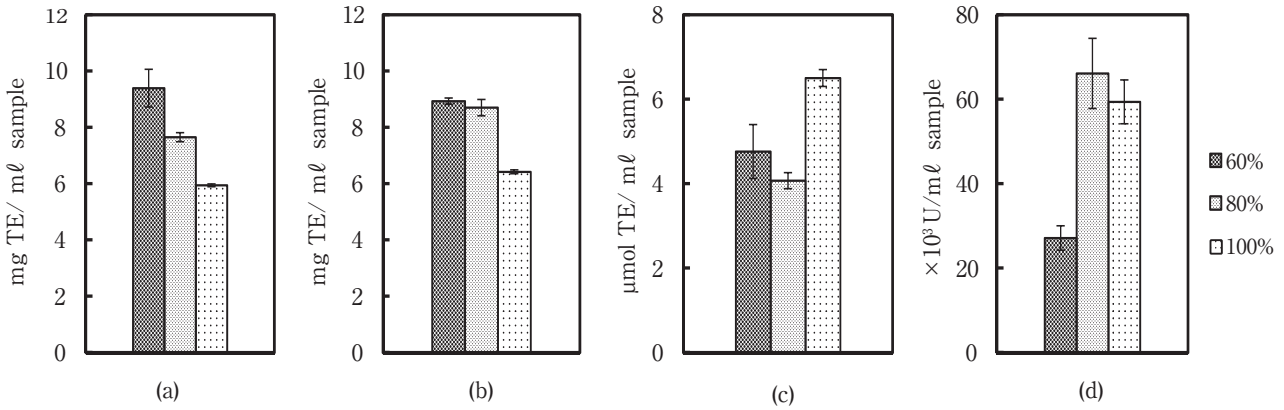


Fig. 3　Antioxidant activity of green tea extracts by four different assay methods;
a) ABTS, b) DPPH, c) ORAC, d) WST-1

Table 4 Change in content of compounds in green tea extracts during the storage

Storage time (month)	Catechins (mg/100mℓ)					Caffeine (mg/100mℓ)	Amino acids (mg/100mℓ)							Chlorophyll (μg/100mℓ)	α-Toc (μg/100mℓ)	Color difference		
	EC	EGC	ECG	EGCG	total		Asp	Ser	Glu	Gln	Arg	The	total			a^*	b^*	a^*/b^*
0	2.8	13.8	5.0	36.5	58.2	10.9	2.9	0.9	2.5	1.4	0.9	20.0	28.7	216	28.0	−2.6	35.9	−0.073
1	2.9	17.7	8.0	39.8	68.4	11.6	1.7	0.6	1.5	0.9	0.6	13.4	18.7	43	38.2	−2.9	53.5	−0.055
2	3.7	17.0	3.9	35.3	59.9	11.6	1.9	0.6	1.6	0.9	0.6	13.5	19.2	−	45.3	−1.6	40.0	−0.040
3	4.6	20.9	12.5	43.1	80.9	13.7	1.8	0.6	1.6	0.9	0.6	14.1	19.8	−	76.4	−1.2	52.6	−0.023

The extraction conditions were as follows: amount of green tea; 320g, solvent; 100% ethanol, amount of solvent; 5ℓ, extraction pressure; 2.2 MPa, extraction temperature; 20～25℃ and extraction time; 30 min. Green tea extract was diluted to 20% ethanol for the storage. The storage was performed in the dark at 4℃.

ノ酸については，保存1か月後急激に減少したが，その後は一定であった。α-トコフェロールは，1，2，3か月保存後は抽出直後に比べてそれぞれ1.4，1.6，2.7倍増大した。この要因については不明であるものの，茶葉の微粒子からα-トコフェロールが徐々に抽出されたためではないかと思われる。クロロフィルは，1か月以降は検出されなかった。クロロフィルは本来安定性が低い（退色しやすい）ため[21]，保存期間中に酸化もしくは分解したものと判断された。クロロフィルの減少に伴い，色差計の緑色度（a^*/b^*）の変化が認められた。すなわち，保存期間が長くなるほど緑色度は増大し，抽出物の色調が緑色から黄色へ変化したことが明らかになった。

このように，クロロフィル以外の成分については，3か月間の保存でも大きく減少しなかったことから，機能性を有した緑茶抽出液の作製が可能であることが示唆された。クロロフィルの退色抑制については今後の課題と考えられる。

要　約

食品素材から有用成分を効率的に抽出する方法を確立することを目的として，水流による圧力差を利用した急速加減圧抽出装置を開発し，緑茶に含まれる有用成分の抽出を行った。その結果，室温（20～25℃），短時間（15分）で緑茶からカテキン，カフェイン，アミノ酸をはじめ，脂溶性のクロロフィルやα-トコフェロールが効率よく抽出されることが判明した。また，エタノール濃度が60%以上の抽出液では高い抗酸化活性が確認された。3か月の保存試験の結果，クロロフィルについては減少したが，カテキン，カフェイン，アミノ酸についてはあまり変化がみられなかった。したがって，本装置にて抽出した緑茶有用成分は，色の保持については課題が残ったものの，機能性成分は十分保持されており，本抽出法は食品素材から機能性成分の抽出に適した方法であることが示唆された。

文　献

1）村松敬一郎：茶の科学（朝倉書店，東京），pp. 85～93（2000）
2）山本（前田）万里：茶の体調調節機能，日食科工，**43**，653～662（1996）
3）Kumamoto, M. and Sonda, T.: Evaluation of the Antioxidative Activity of Tea by an Oxygen Electrode Method, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 175～177（1998）
4）Yin, J., Becker, E. M., Andersen, ML. and Skibsted, L. H.: Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α-tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems, *Food Chem.*, **135**, 2195～2202（2012）
5）Kuznicki, J. T. and Turner, L. S.: The effects of caffeine on caffeine users and non-users, *PHYSIOL. Behav.*, **37**, 397～408（1986）
6）Juneja, L. R., Chu, D.-C., Okubo, T., Nagato Y. and Yokogoshi H.: L-theanine-a unique amino acid of green tea and its relaxation effect in humans, *Trends in Food Sci. Technol.*, **10**, 199～204（1999）
7）Ananingsih, V. K., Sharma, A. and Zhou, W.: Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection, *Food Res. Int.*, **50**, 469～479（2013）
8）Li, N., Taylorv L. S., Ferruzzi, M. G. and Mauer, L. J.: Color and chemical stability of tea polyphenol（−）-epigallocatechin-3-gallate in solution and solid states, *Food Res. Int.*, **53**, 909～921（2013）
9）Seto, R., Nakamura, H., Nanjo F. and Hara, Y.: Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1434～1439（1997）
10）Kim, E. S., Liang, Y. R., Jin, J., Sun Q. f., Lu, J. I., Du, Y. Y. and Lin C.: Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor, *Food Chem.*, **103**, 1263～1267（2007）
11）福司山エツ子・徳田和子・武弓利雄・佐波哲次：水だし煎茶における浸出時間と嗜好性および溶出成分量との関係，日家政誌，**50**，63～68（1999）
12）Chang, C. J., Chiu, K.-L., Chen, Y.-L. and Chang,

C.-Y.: Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction, *Food Chem.*, **68**, 109～113 (2000)
13) PARK, H. S., IM, N. G. and KIM K. H.: Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves, *LWT Food Sci. Technol.*, **45**, 73～78 (2012)
14) 林 伊久・安田みどり・相浦正文・塚本敏郎：天然物からの有効成分高効率抽出技術の研究開発，福岡県工業技術センター研究報告，**20**，55～58 (2010)
15) 山口優一・山本 (前田) 万里・辻 顕光：カテコールを内部標準としたカテキン類及びカフェインのHPLC分析，茶研報，**84**，32～34 (1997)
16) KABELOVA, I., DVORAKOVA, M., CIZKOVA, H., DOSTALEK, P. and MELZOCH, K.: Determination of free amino acids in beers: A comparison of Czech and foreign brands, *J. Food Compos. Anal.*, **21**, 736～741 (2008)
17) 安本教傳・竹内昌昭・安井明美・渡邉智子：五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル (建帛社，東京)，pp. 92～94 (2006)
18) 島村智子・松浦理太郎・徳田貴志・杉本直樹・山崎壮・松藤 寛・松井利郎・松本 清・受田浩之：酸化防止剤力価評価のための各種抗酸化活性測定法の共同試験，日食科工，**54**，482～487 (2007)
19) 堀江秀樹・氏原ともみ・木幡勝則：茶主要成分の茶浸出液への溶出特性，茶研報，**91**，29～33 (2001)
20) 山内良子・深水さやか・小浜友紀子・島村智子・柏木丈拡・受田浩之・穐山 浩・松井利郎・石川洋哉：酸化防止剤力価評価を目的としたDPPHおよびABTSラジカル消去能評価法の特性比較，日食保蔵誌，**40**，55～63 (2014)
21) 尾崎加奈・太田英明・安田みどり・水流美智子：(-)-エピガロカテキンガレートによるクロロフィルaの光退色抑制作用，日食保蔵誌，**32**，263～268 (2006)

(平成27年 3 月26日受付；平成27年 7 月22日受理)

双子型恒温壁熱量計による小麦粉の比熱測定と有効熱拡散率の推定

村 松 良 樹[*1§]・坂口栄一郎[*1]・川上昭太郎[*1]・田 川 彰 男[*2]

＊1　東京農業大学地域環境科学部
＊2　鹿児島県大隅加工技術研究センター

Measurement of Specific Heat Using Twin Isoperibol Calorimeters and Estimation of the Effective Thermal Diffusivity of Wheat Flour

MURAMATSU Yoshiki[*1§], SAKAGUCHI Eiichiro[*1], KAWAKAMI Shotaro[*1] and TAGAWA Akio[*2]

＊1 *Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502*
＊2 *Kagoshima-Osumi Food Technology Development Center, 4938, Hosoyamada, Kushira-cho, Kanoya-shi, Kagoshima 893-1601*

The specific heat of wheat flour was measured at four different moisture contents（9～18%）and five different temperatures（10～50℃）, using twin isoperibol calorimeters. This type of calorimeter is suitable for specific heat measurements of liquids. In this study, wheat flour samples were added to water, and the specific heat of each sample suspension was determined at each measurement condition. An additive relationship exists between the specific heat of a food material, its composition, and the specific heat of each component. The specific heat of the sample（wheat flour）was determined from the specific heat of the sample suspension using the additive property of specific heats. Furthermore, the effective thermal diffusivity of the sample（wheat flour）packed bed was estimated by substituting the literature data of effective thermal conductivity, the measured data of specific heat of the sample, and the bulk density of sample packed bed. The effects of moisture content, temperature, and bulk density on these thermophysical properties of the sample were investigated, and we proposed predictive models for these properties.

（Received Mar. 11, 2015；Accepted Jul. 8, 2015）

Key words：*wheat flour, specific heat, effective thermal diffusivity, twin isoperibol calorimeters, predictive model*
小麦粉，比熱，有効熱拡散率，双子型恒温壁熱量計，予測モデル

食品の流通・貯蔵・加工・調理などのプロセスには，加熱や冷却を伴う様々な熱操作が含まれる。これらの操作を行う装置・設備の設計や合理的操作法を検討するためには，対象とする食品の熱物性値を正確に把握することが必要となる。物体内部での熱の伝わりやすさを示す熱伝導率，加熱・冷却に必要な熱量を求める際に必要な比熱，および非定常状態における物体内部の温度プロフィールを知るうえで必要となる熱拡散率は代表的な熱物性値である。食品の熱物性値は熱物性ハンドブック[1)]などのいくつかの書籍[2)~4)]に取りまとめられているが，粉体食品に関する熱物性データは不足している。

粉体食品も含め，バルク状態で測定された熱物性，たとえば有効熱伝導率や有効熱拡散率は，温度や水分の関数であるとともに，かさ密度などの充填状態によって異なることが予測される。そのため，幅広い同一充填条件下での熱物性データは，より実用的になると考えられる。

筆者ら（2002）[5)]は非定常双子型プローブ法により小麦粉充填層の有効熱伝導率（以下，熱伝導率）を数段階の水分，温度，およびかさ密度条件下において測定し，小麦粉の熱伝導率を精度良く推定することができるモデルを提案した。本研究では，小麦粉の比熱を熱伝導率測定時と同じ水分および温度条件下で測定した。さらに熱拡

＊1　〒156-8502　東京都世田谷区桜丘1-1-1
§　Corresponding author, E-mail：y-murama@nodai.ac.jp
＊2　〒893-1601　鹿児島県鹿屋市串良町細山田4938

散率の定義式を利用して，同条件における小麦粉の熱伝導率と比熱の値，および小麦粉充填層のかさ密度の値から，熱伝導率測定時と同一充填状態における小麦粉充填層の有効熱拡散率（以下，熱拡散率）を算定した。

食品の比熱測定には，混合法[6]をはじめDSC[7]など様々な方法が用いられている。KALETUNÇ（2007）[8]は，圧力可変DSCを用いて小麦粉やコーンフラワー，米粉の比熱を測定している。最近ではDSCが多く利用されているが，この方法は非等温的測定法である。また，DSC法は，きわめて少量の試料しか用いることができない，装置が高価であるなどの短所をもっている。また，混合法による測定では，精度良く測るための装置が大がかりとなる。これに対し，双子型恒温壁熱量計による比熱の測定は比較法であり，測定装置および操作が簡単で，測定精度が高いなどの有利な点が多い[9]。この熱量計は液体の比熱測定に適する装置[9]で，筆者ら（2000）[10]は，リンゴ果汁の比熱を，双子型恒温壁熱量計を用いて測定した。また，粕淵（1982）[11]は，土壌の比熱測定に双子型恒温壁熱量計を用い，高精度のデータを得ている。しかし，粉体食品の比熱測定に双子型恒温壁熱量計を適用した例はみあたらない。

熱拡散率の測定法は間接的測定法と直接的測定法に大別される[12]。間接的方法は，熱拡散率の定義式を利用して熱伝導率や比熱および密度のデータから熱拡散率を算定する方法である。直接的測定法には，非定常熱伝導方程式の厳密解や数値解を利用した方法，パルス加熱法による方法などがある[12]。非定常熱伝導現象の解析，例えば加熱殺菌時における温度変化シミュレーションならびに微生物死滅シミュレーションを行う際には熱拡散率は必須の熱物性値である。しかし，小麦粉の熱拡散率に関しては，村田と宮内（1993）[13]，MAGEE（1995）[14]，GUPTA（1996）[15]による報告がみられる程度で，データはきわめて少ない。ましてや小麦粉の熱拡散率に及ぼす水分や温度，かさ密度の影響を調べた例はみあたらない。

本研究における比熱測定では，小麦粉と水を混合した溶液の比熱を双子型恒温壁熱量計により測定した。比熱の加成性が成り立つと仮定し，小麦粉と水の混合溶液のデータから小麦粉自体の比熱を求めた。さらに小麦粉の熱伝導率に関する既往データ[5]を利用して小麦粉の熱拡散率を得た。得られた小麦粉の熱物性値と水分，温度，およびかさ密度との関係を調べ，これらの熱物性値の予測モデルを提案したので報告する。

実 験 方 法

1．試　　料

測定には日清製粉(株)製の小麦粉（中力粉，つらら）を使用した。実験室搬入時における試料の水分を2 g-135℃-1時間炉乾法[16]により測定したところ，その値は12%であった。

試料の比熱は，9，12，15，18%の4段階の各水分に対し，10，20，30，40，50℃の5段階の温度で測定した。試料の水分は，設定した水分になるよう乾燥あるいは吸湿させることによって調整した。すなわち，薄く広げた試料に対し，15，18%に調整するときは，霧吹きで所要の蒸留水を噴霧し，密封して撹拌しながら3日間静置したもの，9%については，定温乾燥機温度を35℃に設定し，その中で30分間乾燥させることによって得たものを用いた。

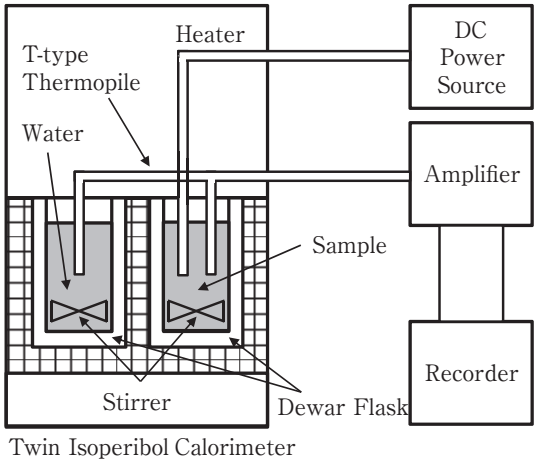
2．比熱測定装置

比熱測定装置の概略をFig. 1に示す。この装置は，双子型恒温壁熱量計（TIC-22，東京理工(株)），直流定電圧電源，アンプ（CA-25F，東京理工(株)），およびペンレコーダー（CU-228，東京理工(株)）で構成されている。熱量計には，熱電堆，ヒーター，およびスターラーを備えた二つのデュワービンがセットされていて，二つのデュワービンの温度差を，T型熱電対を5対直列に接続した熱電堆で探知することにより高感度の測定が可能となっている。例えば，T型熱電対の20℃での熱起電力は40 μV ℃$^{-1}$程度であるが，これに対し，本測定で用いた熱電堆では5倍の200 μV ℃$^{-1}$程度となる。

3．比熱の測定方法

双子型恒温壁熱量計を用いた比熱測定法は，比熱既知の基準物質と未知の試料に同一の熱量を供給し，それぞれの温度上昇値から試料比熱を求める比較法である。本研究では，比熱の加成性が成り立つと仮定し，小麦粉と水を混合した溶液の熱容量を測定して，水の部分の熱容量を差し引くことにより，小麦粉自体の比熱を求めた。

混合溶液の熱容量のデータから小麦粉の比熱を精度良く求めるためには，混合溶液中の小麦粉に対する水の熱容量の比をできるだけ小さくする必要がある。双子型恒温壁熱量計による比熱測定は比較測定であるため，測定に用いる基準物質と試料の容積は同一にし，また，基準物質と試料の双方の測定において同一のデュワービンを用いなければならない。これは，基準物質と試料の双方



Twin Isoperibol Calorimeter

Fig. 1　A schematic of the experimental apparatus for measuring specific heat

の測定において，デュワービンの見かけの熱容量を等しくするためと，デュワービン内壁と液体との接触面積（液面高さ）を等しくし，デュワービン内壁での熱伝導による熱の逸脱の影響を相殺するためである。粕淵(1982)[11]は，土壌の比熱測定において，土壌と水の質量比を１：10（熱容量の比は１：50）として，高精度のデータを得ている。本研究においても，デュワービン内の試料が均一に撹拌でき，且つ基準物質（精製水）と試料（小麦粉と水の混合溶液）の容積を同一とみなせるように，粕淵（1982)[11]の方法を参考に，小麦粉と水の質量比は１：10として測定した。また，文献[1]によると小麦粉の比熱は約1.8 kJ kg^{-1}℃$^{-1}$であるから，質量比が１：10ならば熱容量の比は１：25程度となる。なお，基準物質として精製水（和光(株)）を用いた。

基準物質の温度上昇値の測定では，二つのデュワービンのそれぞれに80.000±0.005 gの精製水（以下，水）を入れ，撹拌しながら設定温度と平衡化させた。平衡に達した後，右側のデュワービン内のみにジュール熱を供給し，このとき発生する熱起電力変化，すなわち温度変化をアンプで増幅してペンレコーダーに記録した。小麦粉と水の混合溶液の温度上昇値については，左側のデュワービンに80.000±0.005 gの水，右側に80.000±0.005 gの水と試料の小麦粉8.000±0.002 gを入れ，基準物質の場合と同様に測定した。なお，スターラーの回転速度は400 rpm，供給熱量は0.108 kJ（供給電圧６Ｖ，ヒーター線抵抗100 Ω，通電時間300 s）とした。

測定データである熱起電力から温度上昇値への換算には次式を用いた。

$$T_{m\ \text{or}\ w}=\frac{X_v}{s\cdot H_v} \quad \cdots\cdots(1)$$

$T_{m\ \text{or}\ w}$：小麦粉と水の混合溶液，または水の温度上昇値（℃），X_v：発生した熱起電力（μV），s：熱電対の直列対数，H_v：測定温度での１℃の熱起電力（μV ℃$^{-1}$）

熱起電力は製図用定規（1-882-0130,（株)内田洋行）を用いて最小0.125 μVまで読み取り，測定された温度上昇値は0.25～0.29℃程度であった。

熱量Q_wを供給したときの基準物質（水）の温度上昇値をT_wとすると，Q_wは次式で表すことができる。

$$Q_w=(W_w\cdot c_{pw}+W_v\cdot c_{pv})\times T_w \quad \cdots\cdots(2)$$

Q_w：水に供給した熱量(kJ)，W_w：水の質量(kg)，c_{pw}：水の比熱（kJ kg^{-1}℃$^{-1}$），$W_w\cdot c_{pw}$：水の熱容量（kJ ℃$^{-1}$），W_v：デュワービンの見掛け質量(kg)，c_{pv}：デュワービンの見掛け比熱（kJ kg^{-1}℃$^{-1}$），$W_v\cdot c_{pv}$：デュワービンの見掛け熱容量（kJ ℃$^{-1}$），T_w：水の温度上昇値（℃）

同様に，小麦粉と水の混合溶液に供給した熱量をQ_m，このときの温度上昇値をT_mとすると，

$$Q_m=(W_m\cdot c_{pm}+W_v\cdot c_{pv})\times T_m \quad \cdots\cdots(3)$$

Q_m：小麦粉と水の混合溶液に供給した熱量（kJ），W_m：小麦粉と水の混合溶液の質量（kg），c_{pm}：小麦粉と水の混合溶液の比熱（kJ kg^{-1}℃$^{-1}$），$W_m\cdot c_{pm}$：小麦粉と水の混合溶液の熱容量（kJ ℃$^{-1}$），T_m：小麦粉と水の混合溶液の温度上昇値（℃）

が成り立つ。式（２），（３）をそれぞれ$W_v\cdot c_{pv}$について解き，等値すると，

$$\frac{Q_w}{T_w}-W_w\cdot c_{pw}=\frac{Q_m}{T_m}-W_m\cdot c_{pm} \quad \cdots\cdots(4)$$

が得られ，これより小麦粉と水の混合溶液の熱容量$W_m\cdot c_{pm}$は，

$$W_m\cdot c_{pm}=\frac{Q_m}{T_m}-\frac{Q_w}{T_w}+W_w\cdot c_{pw} \quad \cdots\cdots(5)$$

小麦粉と水の混合溶液において比熱の加成性が成り立つと仮定すると，$W_m\cdot c_{pm}$は次式のように表される。

$$W_m\cdot c_{pm}=W_s\cdot c_{ps}+W_w\cdot c_{pw} \quad \cdots\cdots(6)$$

W_s：小麦粉の質量（kg），c_{ps}：小麦粉の比熱（kJ kg^{-1}℃$^{-1}$），$W_s\cdot c_{ps}$：小麦粉の熱容量（kJ ℃$^{-1}$）

したがって式（５），（６）から$W_w\cdot c_{pw}$は消去でき，また，供給した熱量は水の場合と小麦粉と水の混合溶液の場合では等しいので$Q=Q_m=Q_w$とすると小麦粉の比熱c_{ps}は次式から求めることができる。

$$c_{ps}=\frac{Q}{W_s}\left(\frac{1}{T_m}-\frac{1}{T_w}\right) \quad \cdots\cdots(7)$$

Q：水，および小麦粉と水の混合溶液に供給した熱量（kJ）

なお，比熱の測定は，小麦粉の熱伝導率測定[5]と併行して2002年に実施した。

実験結果および考察

１．比　　熱

双子型恒温壁熱量計を用い，小麦粉の比熱を測定した結果，測定時の試料水分（９～18%），温度範囲（10～50℃）では，小麦粉の比熱は1.7～2.1 kJ kg^{-1}℃$^{-1}$程度となった。文献[1]において，小麦粉の比熱は，1.797 kJ kg^{-1}℃$^{-1}$（水分12%），1.674 kJ kg^{-1}℃$^{-1}$（水分10%，温度15～30℃），1.884 kJ kg^{-1}℃$^{-1}$（水分18%，温度15～30℃）と報告されている。本研究での測定データと文献値を比較したところ，試料比熱の測定値は文献値と同程度の値が得られた。これより双子型恒温壁熱量計を用い，比熱の加成性を仮定して式（７）から小麦粉の比熱を測定する本研究で提案した方法は妥当であると判断した。

各水分における温度と小麦粉の比熱の関係をFig.2に示す。図中の○，▲などの記号は，各条件における３回の測定値であり，各条件における比熱の平均値と各測定データとの誤差範囲は±３%以下であった。図から温度の上昇に伴って比熱は大きくなる傾向があり，比熱と温度の間に一次の関係があることがわかった。また，水分との関係については，穀物の比熱が水分の一次式で整理

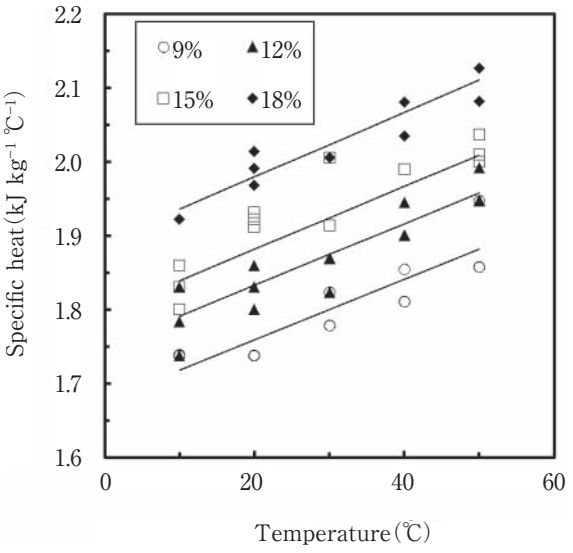


Fig. 2　The specific heat measured at four different moisture contents of wheat flour

The solid line shows the value calculated from equation (8).

されている[1]ように，小麦粉を乾物と水の単純混合物と考えると小麦粉の比熱は水分の一次式で表されることが予測される。そこで試料比熱を水分に対してプロットした結果，いずれの温度においてもこの間に直線関係が成り立った。これより，試料比熱の測定値を，比熱を温度に関して一次式，また水分についても一次式とした次式に，最小二乗法を適用してあてはめた。

$$c_{ps}=a_1M\cdot T+b_1M+c_1T+d_1 \quad \cdots\cdots(8)$$

M：水分（%），T：温度（℃），a_1～d_1は定数

なお，式（8）におけるパラメータa_1～d_1は，測定値と式（8）による計算値の残差二乗和（式（9））を最小にするように決定した。

$$S=\sum_{i=1}^{n}\{Y_i-(a_1M_i\cdot T_i+b_1M_i+c_1T_i+d_1)\}^2 \quad \cdots\cdots(9)$$

S：残差二乗和，n：データ数，Y_i：測定値

すなわち，以下の式（10）～（13）から成る連立方程式を解くことにより，式（8）における4つのパラメータa_1～d_1を決定した。

$$\frac{\partial S}{\partial a_1}=0 \quad \cdots\cdots(10)$$

$$\frac{\partial S}{\partial b_1}=0 \quad \cdots\cdots(11)$$

$$\frac{\partial S}{\partial c_1}=0 \quad \cdots\cdots(12)$$

$$\frac{\partial S}{\partial d_1}=0 \quad \cdots\cdots(13)$$

Fig. 2における実線は式（8）による計算値で，式（8）のパラメータの値は，$a_1=3.44\times10^{-5}$（kJ kg^{-1} ℃$^{-2}$ %$^{-1}$），$b_1=2.38\times10^{-2}$（kJ kg^{-1} ℃$^{-1}$ %$^{-1}$），$c_1=3.77\times10^{-3}$（kJ kg^{-1} ℃$^{-2}$），$d_1=1.46$（kJ kg^{-1} ℃$^{-1}$），測定値と計算値との平均平方誤差RMSEの値は1.60×10^{-2}（kJ kg^{-1} ℃$^{-1}$）となった。このように，試料比熱は，水分，温度双方の関数とした式（8）で近似することができた。

2．熱拡散率

筆者ら(2002)[5]は小麦粉充填層の熱伝導率を9，12，15，18%の4段階の各水分に対し，温度は10，20，30，40，50℃の5段階，かさ密度は436，500，600，700 kg m^{-3}の4段階についてそれぞれ測定した。この結果と比熱測定結果を利用し，小麦粉充填層の熱拡散率を推算した。すなわち，同条件における熱伝導率，比熱の測定値，および熱伝導率測定時のかさ密度の値を，それぞれ次の熱拡散率の定義式に代入することによって，小麦粉充填層の熱拡散率を求めた。

$$\alpha=\frac{k}{1,000\times c_{ps}\cdot\rho} \quad \cdots\cdots(14)$$

α：熱拡散率（m^2 s^{-1}），k：熱伝導率（W m^{-1} ℃$^{-1}$），ρ：かさ密度（kg m^{-3}）

なお，比熱測定と熱伝導率測定に用いられた試料は同一で，これらの測定は併行して実施した。

食品の熱拡散率は比熱と同様に水分や温度の関数であることが予測されたため，小麦粉の熱拡散率と水分，温度との関係を調べた。その結果，小麦粉の熱拡散率は，各かさ密度において，水分，温度が高くなるにつれて直線的に増加する傾向が得られた。一例として，かさ密度500 kg m^{-3}における小麦粉の熱拡散率と水分の関係をFig. 3に示す。比熱の場合と同様に，熱拡散率を水分に関して一次式，また温度についても一次式とした次式に，最小二乗法を適用して各かさ密度ごとにあてはめた。

$$\alpha=a_2M\cdot T+b_2M+c_2T+d_2 \quad \cdots\cdots(15)$$

a_2～d_2は定数

Fig. 3中の実線は式（15）による計算値である。各かさ

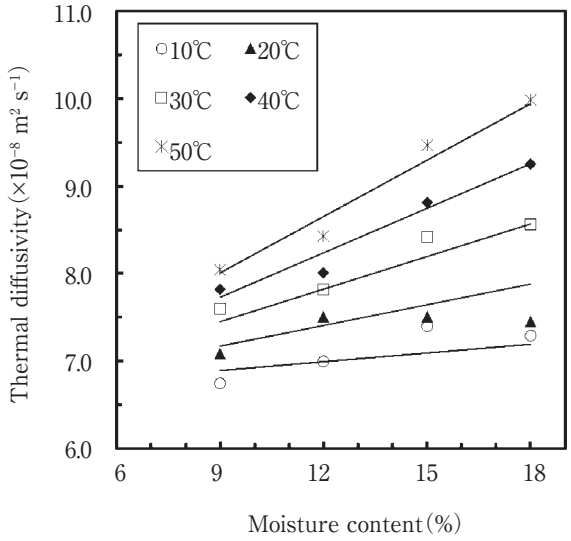


Fig. 3　Relationships between the effective thermal diffusivity and the moisture content at five different temperatures of wheat flour (bulk density: 500 kg m^{-3})

The solid line shows the value calculated from equation (15).

Table 1 Values of the parameters and root mean squared error (RMSE) of equation (15)

Parameter	Bulk Density ($kg\ m^{-3}$)			
	436	500	600	700
a_2 ($m^2 s^{-1}\ \%^{-1}\ ℃^{-1}$)	2.59×10^{-11}	4.54×10^{-11}	4.46×10^{-11}	3.58×10^{-11}
b_2 ($m^2 s^{-1}\ \%^{-1}$)	-1.02×10^{-10}	-1.19×10^{-10}	-2.90×10^{-10}	1.33×10^{-10}
c_2 ($m^2 s^{-1}\ ℃^{-1}$)	2.80×10^{-11}	-1.29×10^{-10}	-1.63×10^{-10}	-1.80×10^{-11}
d_2 ($m^2 s^{-1}$)	6.69×10^{-8}	6.72×10^{-8}	7.38×10^{-8}	6.67×10^{-8}
RMSE ($m^2 s^{-1}$)	1.45×10^{-9}	1.69×10^{-9}	1.78×10^{-9}	1.52×10^{-9}

密度における式（15）のパラメータおよびRMSEの値をTable 1 に示す。

充填層の熱伝導率と同様に充填層の熱拡散率もかさ密度の関数として表されることが予測される。そのため，かさ密度と試料の熱拡散率との関係を各水分の各温度に対して調べた。その結果，試料の熱拡散率はかさ密度の一次式または二次式で表されることが示されたため，各水分の各温度における試料の熱拡散率を，以下の式（16）と（17）に最小二乗法を適用してそれぞれあてはめた。

$$\alpha = a_3\rho^2 + b_3\rho + c_3 \quad \cdots\cdots(16)$$

a_3〜c_3は定数

$$\alpha = a_4\rho + b_4 \quad \cdots\cdots(17)$$

a_4，b_4は定数

いずれの式も熱拡散率とかさ密度の関係を近似できたが，RMSEの値は，式（16）では2.54×10^{-11}〜2.41×10^{-9}（$m^2 s^{-1}$），式（17）で　は3.54×10^{-10}〜3.53×10^{-9}（$m^2 s^{-1}$）となり，測定データとの適合性は，式（16）の方が式（17）より高いことが示された。一例として水分12%における熱拡散率とかさ密度の関係をFig. 4に示す。Fig. 4中の実線は式（16）による計算値である。Fig. 4に示すように水分12%における試料の熱拡散率とかさ密度の関係は式（16）で表され，他の水分の各温度についても，試料の熱拡散率はかさ密度の二次式で整理できた。熱伝導率同様に熱拡散率も構造にも依存する熱物性値であるため，今後は構造も加味した形のモデルで熱拡散率のモデル化も図る必要があると考える。最小二乗法を適用して得られた各水分，各温度における式（16）のパラメータおよびRMSEの値をTable 2 に示す。

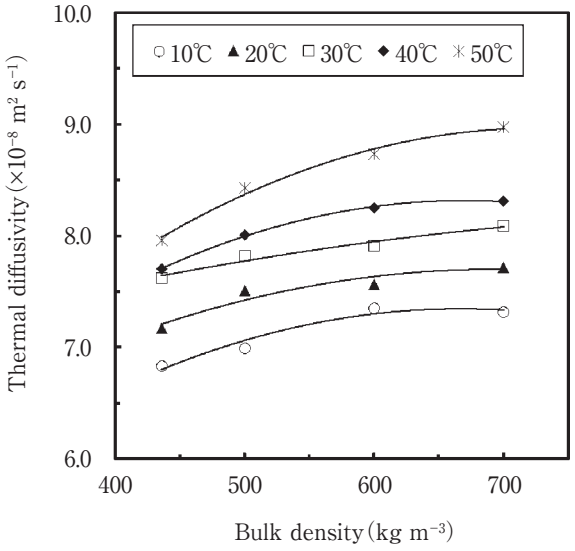


Fig. 4 Relationships between the effective thermal diffusivity and the bulk density at five different temperatures of wheat flour (moisture content: 12%)

The solid line shows the values calculated from equation (16).

以上のように本研究では，双子型恒温壁熱量計を利用して小麦粉の比熱を測定し，この結果と熱伝導率の文献値から小麦粉の熱拡散率を推算した。これらの熱物性値と水分，温度，かさ密度との関係を調べ，小麦粉の比熱および熱拡散率を容易に推定できるモデルを提案した。これらは熱計算や熱操作を合理的に行うためのシミュレーションの際に有用な基礎資料となる。

要　約

小麦粉の比熱を水分 9 〜18%，温度10〜50℃の範囲で測定した。比熱測定には双子型恒温壁熱量計を使用した。熱伝導率の文献値と比熱の測定結果を利用して，水分 9 〜18%，温度10〜50℃，かさ密度430〜700 kg m^{-3}の範囲において小麦粉の熱拡散率も推算し，小麦粉の比熱，および熱拡散率と水分，温度，かさ密度の関係を調べ，これらの熱物性値の予測モデルを提案した。その結果，以下の知見を得た。

① 小麦粉の比熱の測定値と文献値と比較したところ，同程度の値を得ることができ，本測定法の妥当性が示された。

② 小麦粉の比熱は，水分，温度双方に関して一次式とした次の式で表された。

$$c_{ps} = a_1 M \cdot T + b_1 M + c_1 T + d_1$$

③ 各かさ密度における小麦粉の熱拡散率と水分，温度の関係は以下の式で表された。

$$\alpha = a_2 M \cdot T + b_2 M + c_2 T + d_2$$

また，各水分の各温度における小麦粉の熱拡散率とかさ密度との関係は二次式で近似することができた。

Table 2 Values of the parameters and root mean squared error (RMSE) of equation (16)

MC (%)	Temp. (℃)	a_3 ($m^8\ s^{-1}\ kg^{-2}$)	b_3 ($m^5\ s^{-1}\ kg^{-1}$)	c_3 ($m^2\ s^{-1}$)	RMSE ($m^2\ s^{-1}$)
9	10	-1.37×10^{-13}	1.66×10^{-10}	2.12×10^{-8}	1.59×10^{-9}
	20	-1.16×10^{-13}	1.47×10^{-10}	2.95×10^{-8}	1.97×10^{-9}
	30	-1.94×10^{-13}	2.26×10^{-10}	1.26×10^{-8}	8.03×10^{-10}
	40	-9.77×10^{-14}	1.25×10^{-10}	4.13×10^{-8}	8.41×10^{-10}
	50	-7.73×10^{-14}	9.69×10^{-11}	5.22×10^{-8}	6.05×10^{-10}
12	10	-1.02×10^{-13}	1.36×10^{-10}	2.81×10^{-8}	4.56×10^{-10}
	20	-7.41×10^{-14}	1.03×10^{-10}	4.14×10^{-8}	5.88×10^{-10}
	30	-2.05×10^{-14}	3.98×10^{-11}	6.30×10^{-8}	3.20×10^{-10}
	40	-1.11×10^{-13}	1.49×10^{-10}	3.33×10^{-8}	1.02×10^{-10}
	50	-1.15×10^{-13}	1.67×10^{-10}	2.88×10^{-8}	4.09×10^{-10}
15	10	-1.83×10^{-13}	2.35×10^{-10}	1.53×10^{-9}	4.35×10^{-10}
	20	-1.61×10^{-13}	2.14×10^{-10}	8.22×10^{-9}	2.54×10^{-11}
	30	-3.06×10^{-13}	3.77×10^{-10}	-2.86×10^{-8}	4.96×10^{-10}
	40	-1.54×10^{-13}	2.00×10^{-10}	2.60×10^{-8}	2.92×10^{-10}
	50	-3.38×10^{-13}	4.25×10^{-10}	-3.48×10^{-8}	1.05×10^{-9}
18	10	-1.54×10^{-13}	1.98×10^{-10}	1.28×10^{-8}	7.62×10^{-11}
	20	-1.23×10^{-13}	1.56×10^{-10}	3.09×10^{-8}	6.22×10^{-10}
	30	-1.87×10^{-13}	2.31×10^{-10}	1.62×10^{-8}	5.56×10^{-10}
	40	-4.76×10^{-13}	5.63×10^{-10}	-6.95×10^{-8}	2.49×10^{-10}
	50	-2.88×10^{-13}	3.65×10^{-10}	-1.40×10^{-8}	2.41×10^{-9}

記　号

α ：熱拡散率（$m^2\ s^{-1}$）
ρ ：かさ密度（$kg\ m^{-3}$）
a_1 ：定数（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-2}\ \%^{-1}$）
a_2 ：定数（$m^2\ s^{-1}\ \%^{-1}\ ℃^{-1}$）
a_3 ：定数（$m^8\ s^{-1}\ kg^{-2}$）
a_4 ：定数（$m^5\ s^{-1}\ kg^{-1}$）
b_1 ：定数（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}\ \%^{-1}$）
b_2 ：定数（$m^2\ s^{-1}\ \%^{-1}$）
b_3 ：定数（$m^5\ s^{-1}\ kg^{-1}$）
b_4 ：定数（$m^2\ s^{-1}$）
c_1 ：定数（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-2}$）
c_2 ：定数（$m^2\ s^{-1}\ ℃^{-1}$）
c_3 ：定数（$m^2\ s^{-1}$）
c_{pm} ：小麦粉と水の混合溶液の比熱（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}$）
c_{ps} ：小麦粉の比熱（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}$）
c_{pv} ：デュワービンの見掛け比熱（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}$）
c_{pw} ：水の比熱（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}$）
d_1 ：定数（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}$）
d_2 ：定数（$m^2\ s^{-1}$）
H_v ：測定温度での１℃の熱起電力（$\mu V\ ℃^{-1}$）
k ：熱伝導率（$W\ m^{-1}\ ℃^{-1}$）
M ：水分（%）
n ：データ数
Q ：水，および小麦粉と水の混合溶液に供給した熱量（kJ）
Q_m ：小麦粉と水の混合溶液に供給した熱量（kJ）
Q_w ：水に供給した熱量（kJ）
S ：残差二乗和
s ：熱電対の直列対数
T ：温度（℃）
T_m ：小麦粉と水の混合溶液の温度上昇値（℃）
T_w ：水の温度上昇値（℃）
$T_{m\ or\ w}$ ：小麦粉と水の混合溶液，または水の温度上昇値（℃），
W_m ：小麦粉と水の混合溶液の質量（kg）
$W_m \cdot c_{pm}$ ：小麦粉と水の混合溶液の熱容量（$kJ\ ℃^{-1}$）
W_s ：小麦粉の質量（kg）
$W_s \cdot c_{ps}$ ：小麦粉の熱容量（$kJ\ ℃^{-1}$）
W_v ：デュワービンの見掛け質量（kg）
$W_v \cdot c_{pv}$ ：デュワービンの見掛け熱容量（$kJ\ ℃^{-1}$）
W_w ：水の質量（kg）
$W_w \cdot c_{pw}$ ：水の熱容量（$kJ\ ℃^{-1}$）
X_v ：発生した熱起電力（μV）
Y_i ：測定値（$kJ\ kg^{-1}\ ℃^{-1}$）

文　献

1）日本熱物性学会編：新編熱物性ハンドブック（養賢堂，東京），pp. 514～535（2008）
2）大下誠一：食品加熱の科学（渋川祥子編，朝倉書店，東京），pp. 58～73（1996）
3）Saravacos, G. D. and Maroulis, Z. B.: Thermal conductivity and diffusivity of foods,In Transport properties of foods （Marcel Dekker Inc., New

York), pp. 269～358 (2001)
4) SINGH, R. P.: Heating and cooling processes for foods, In HELDMAN, D. R. and LUND D. B. (Eds.), Handbook of food engineering (Marcel Dekker Inc., New York), pp. 247～276 (1992)
5) 村松良樹・田川彰男・笠井孝正・武谷宏二・福島正義：小麦粉の有効熱伝導率，農機誌，**64** (1)，70～76 (2002)
6) KAZARIAN, E. A. and HALL, C. W.: Thermal properties of grain, *Trans. ASAE*, **8** (1)，33～37 (1965)
7) 村田　敏・田川彰男・石橋貞人：DSCによる穀物の比熱測定，農機誌，**46** (6)，547～554 (1987)
8) KALETUNÇ, G.: Prediction of specific heat of cereal flours: A quantitative empirical correlation, *J. Food Eng.*, **82** (4), 589～594 (2007)
9) 萩原清市：各種熱量計の開発と材料研究への応用 (東京理工熱測定センター，東京)，pp. 17～54 (2002)
10) 村松良樹・田川彰男・笠井孝正・境　博成・福島正義：リンゴ果汁の熱物性，日食科工誌，**47** (7)，548～550 (2000)
11) 粕淵辰昭：土壌の熱伝導に関する研究，農業技術研究所報告B土壌・肥料，**33**，1～54 (1982)
12) RAHMAN, M. S. and Al-SAIDI, G. S.: Thermal diffusivity of foods: Measurement, data, and prediction. In Rahman M. S. (Eds.), Food properties handbook 2nd ed. (Florida, CRC Press), pp. 649～695 (2009)
13) 村田　敏・宮内樹代史：穀粉の熱特性の測定，九大農学芸誌，**47** (1/2)，93～99 (1993)
14) MAGEE, T. R. A.: Measurement of thermal diffsivity of potato, malt bread and wheat flour,*J. Food Eng.*, **25** (2)，223～232 (1995)
15) GUPTA, T. R.: Thermal diffusivity measurements of wheat flour and wheat flour dough, *J. Food Process Eng.*, **19** (3)，343～352 (1996)
16) 食品分析研究会：食品分析研究会報告書，**21**，21～22 (1973)

（平成27年 3 月11日受付；平成27年 7 月 8 日受理）

γ-アミノ酪酸（GABA）生成乳酸菌を用いた発酵バター様食品の開発とその品質について

田中智大[*1,*2]・小泉亮輔[*1]・入澤友啓[*1]
寺島晃也[*3]・多田耕太郎[*1§]・鈴木敏郎[*1]

＊1　東京農業大学農学部
＊2　サンダイヤ㈱東京研究所
＊3　富山県食品研究所

Development and Quality Analysis of Fermented Butter-like Food Prepared Using Gamma Aminobutyric Acid (GABA)-Producing Lactic Acid Bacterium

TANAKA Tomohiro[*1,*2], KOIZUMI Ryosuke[*1], IRISAWA Tomohiro[*1],
TERASHIMA Teruya[*3], TADA Kotaro[*1§] and SUZUKI Toshiro[*1]

＊1　*Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1737 Funako,Atsugi-shi,Kanagawa　243−0405*
＊2　*Tokyo Research Laboratory, SUNDIA Co.,Ltd., 2−35−3 Eitai,Kohtoh-ku,Tokyo　135−0034*
＊3　*Toyama Prefectual Food Research Institute, 360 Yoshioka, Toyama-shi,Toyama　939−8153*

In this study, the gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing *Lactobacillus buchneri* 1001 strain, isolated from kaburazushi (a regional specialty food of Japan's Toyama Prefecture consisting of pickled fish, rice, and turnip), was employed to prepare fermented butter-like food. GABA was effectively produced during fermentation by inoculating sodium glutamate-containing fresh cream with L. buchneri 1001 together with *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. Furthermore, using freeze-drying instead of the churning process traditionally used after fermentation resulted in the production of fermented butter-like food with high GABA content, as well as a greater amount of protein and carbohydrates. The resulting fermented butter-like food met compositional standards, and its organoleptic characteristics were found to be as good as those of commercially available products.

(Received Jun. 15, 2015；Accepted Jul. 22, 2015)

Key words：*butter, lactic acid bacterium, fermentation, GABA*
バター，乳酸菌，発酵，γ-アミノ酪酸

γ-アミノ酪酸（GABA）は哺乳動物中枢神経系において興奮を抑制する神経伝達物質として関与するアミノ酸の一種でグルタミン酸がグルタミン酸脱炭酸酵素により脱炭酸されることで生成する[1),2)]。GABAには血圧上昇抑制，自律神経障害の改善，肝機能の向上，慢性疲労の軽減など，様々な生理作用があるとされており[1),3)~6)]，茶，チョコレート，乳製品などGABAを含有する食品が数多く開発されている[5),7),8)]。これらのGABA含有食品は原料由来のGABAを利用したものや製造工程でGABAを添加したもので，製造工程中にGABAを生成させた製品はみられない。

一方，近年，乳酸菌の一部にGABA生成能を持つものが見出され，漬物，野菜，醤油などの食品から分離されている[9)~11)]。GABA生成乳酸菌は乳酸発酵の代謝産物である乳酸により，生育環境が酸性化するとグルタミン酸を利用しGABAを生成することで環境を中性に戻そうとする性質を備えており[12),13)]，この性質を利用し，GABA含量を高めた飲料，チーズ，ソーセージなどの開発が行われている[10),14),15)]。

乳酸菌を利用する乳製品の一つである発酵バターはク

＊1　〒243−0034　神奈川県厚木市船子1737
§　Corresponding author, E-mail : k3tada@nodai.ac.jp
＊2　〒135−0034　東京都江東区永代 2 −35− 3
＊3　〒939−8153　富山県富山市吉岡360

リームに乳酸菌スターターを添加し，乳酸発酵させた後にチャーニング（攪拌）およびワーキング（練圧）するもので[16]，ヨーロッパでは古くから食されている。一般的に発酵バターに使用する乳酸菌は乳酸生成能が高いものと，芳香性成分を多く生成するものなどの異なる２種以上を目的に応じて組み合わせており，乳酸菌スターターの種類により，風味や芳香が異なる独特の製品になる[16]。

そこで本研究では，GABA生成乳酸菌をスターターとして生クリームに接種し，製造工程中にGABAを生成させることで，GABAを豊富に含有する発酵バター様食品の開発を試み，その性状について検討した。

実 験 方 法

１．乳酸菌液の調製

富山県食品研究所から分与された「かぶらずし」由来のGABA生成乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* 1001[17]および市販ヨーグルト（(株)明治製）から単離した発酵乳製品の製造に用いられる代表的な乳酸菌である*Lactobacillus bulgaricus*（命名：*L. bulgaricus* TT1）および*Streptococcus thermophiles*（命名：*S. thermophilus* TT2）を用いた。これらの乳酸菌はMRSブイヨン培地（関東化学）で35℃，24時間嫌気下にて静置培養した。培養後，遠心分離（3,000rpm，5min）により集菌し，滅菌生理食塩水で２回洗浄を行い，濁度を指標に10^8cells/gになるよう調整したものを乳酸菌液とした。

２．発酵バター様食品の製造

バターは通常チャーニングによりバターミルクを除去することで脂肪分を高めている。しかし，GABAは水溶性であるため，チャーニングを行うとGABAがバターミルクとともに流出する可能性が高い。そこで水分のみを除去できる凍結乾燥を用いて発酵バター様食品の製造を試みた。

発酵バター様食品の製造方法を図１に示した。すなわち，乳脂肪分47%の生クリームにグルコース２%とグルタミン酸ナトリウム20mMを加え，75℃に達温後10分間保持することで加熱殺菌した。放冷後，*L. buchneri* 1001を10^5CFU/g，*L. bulgaricus* TT1 および *S. thermophilus* TT2 をそれぞれ10^6CFU/gになるように先に調整した乳酸菌液を接種した。なお，試験区には，①GABA生成乳酸菌*L. buchneri* 1001のみを接種した試験区（以後1001区と略す），②*L. bulgaricus* TT1 と*S. thermophilus* TT 2 を接種した試験区（同LS区），③*L. buchneri* 1001と *L. bulgaricus* TT1, *S. thermophilus* TT2 を接種した試験区（同LS1001区）の３区を設定した。乳酸菌接種後の発酵は35℃で３日間嫌気培養にて行った。発酵後，凍結乾燥機（EYLER社，FDU-1200型）を用い24時間凍結乾燥を行った。また，従来どおりのチャーニングによる調製も行うため，500mℓ容の容器に発酵熟成後のクリームを150 mℓ入れ密封し，約30分間激しく撹拌した後，バターミルクを排してバター粒を得た。凍結乾燥したクリームおよびチャーニングで得たバター粒はワーキングして発酵バター様食品とした。

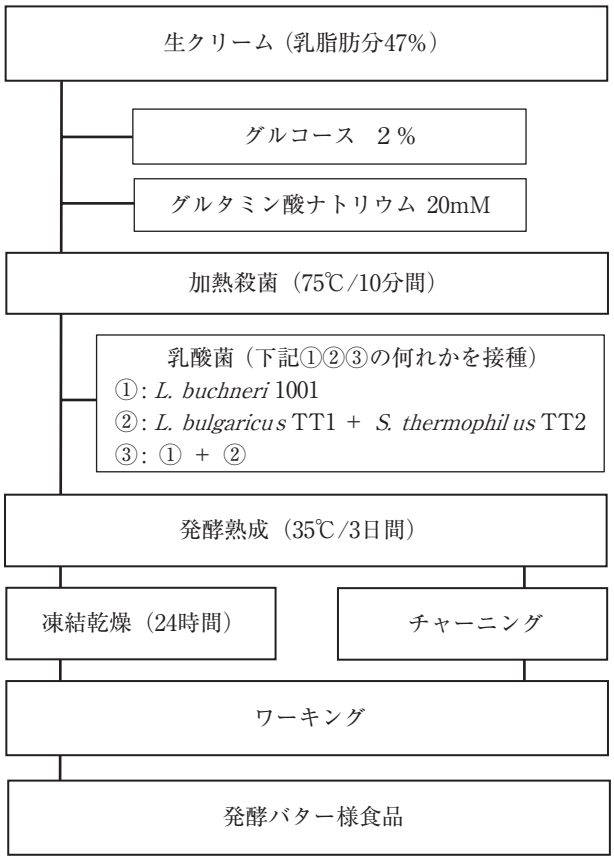


図１　発酵バター様食品の製造工程

３．微生物の測定

発酵期間の生クリームおよび凍結乾燥後の発酵バター様食品について，以下の方法により測定した。①乳酸菌数[18]：BCP加プレートカウント寒天培地（栄研），混釈法，35℃/３日間培養。②黄色ブドウ球菌[19]：卵黄加マンニット食塩寒天培地（栄研），塗沫法，35℃/48時間培養。③大腸菌群[20]：デソキシコレート寒天培地（栄研），混釈法，35℃/24時間培養。④サルモネラ[21]：EEMブイヨン培地，ハーナテトラチオン酸塩培地（栄研）で35℃/24時間前培養後，DHL培地（栄研）へ画線塗沫し35℃/24時間培養。

４．pHの測定

発酵期間の生クリームについて，ガラス電極pHメーター（堀場製作所，F-52型）を用いて測定した。

５．乳酸量の測定

発酵期間の生クリーム約５gに５%スルホサルチル酸溶液10mℓとクロロホルム10mℓを加えて30分間混合後，遠心分離（3,000rpm，10min）し，上層を採取した。これを３回繰り返して有機酸を抽出した[22]。抽出した溶液は１mol/ℓの水酸化ナトリウム溶液でpH2.2に調整した後，50mℓに定容し，0.45μmのフィルターでろ過した。測定には有機酸分析システム（島津製作所）を用い，分離

カラムShim-pack SCR-102H（8.0mm i.d.×300mm）で分離した後にポストカラムpH緩衝電気伝導検出法で検出した。溶離液には5 mM p-トルエンスルホン酸を用い，流速は0.8mℓ/minとした。なお，同定及び定量は市販の有機酸（特級）により行った。

6．グルタミン酸量およびGABA量の測定

発酵期間の生クリーム，チャーニング後および凍結乾燥後の発酵バター様食品について，上記の乳酸量の測定と同様に抽出した検液を希釈し，アミノ酸分析システムNa型（島津製作所）を用いて，分離カラム（Shim-pack Amino-Na）で分離した後にOPA/N-アセチルシステインによる蛍光誘導体化検出法で検出した。なお，同定及び定量はアミノ酸標準物質（和光純薬，アミノ酸混合標準法AN-Ⅱ型及びB型）を用いて行った。

7．一般成分の測定

生クリームおよび凍結乾燥後の発酵バター様食品について，水分は常圧加熱乾燥法[23]，タンパク質はマクロ改良ケルダール法[24]，脂肪は生クリームがレーゼ・ゴットリーブ法[25]，バターが間接法[26]，灰分は直接灰化法[27]で測定し，炭水化物は差し引きで求めた。

8．油脂の検査

凍結乾燥後の発酵バター様食品の酸価，過酸化物価およびヨウ素価を測定した。すなわち，試料約10gを共栓三角フラスコに採取し，試料の5倍量に相当するジエチルエーテルを加え攪拌した。次に，無水硫酸ナトリウムを約15g加え脱水し，固形物を取り除くため，ろ紙を用いてろ過した。その後，ジエチルエーテルを約10mℓ加え残渣を洗い，再びろ過し，ろ液を減圧濃縮した後に窒素を通じながらエーテルを十分に除去し，得られた抽出油について，酸価は滴定法[28]にて，過酸化物価は酢酸－イソオクタン法[29]にて，ヨウ素価はウィイス－シクロヘキサン法[30]にてそれぞれ測定した。

9．官 能 試 験

凍結乾燥により調製したLS1001区の発酵バター様食品と市販発酵バターについて，20歳代の大学生男女5名ずつの計10名のパネラーにより，色，香り，口溶け，舌触り，味の5項目における個人の嗜好基準による評価を，大変良い（5点），良い（4点），普通（3点），悪い（2点），大変悪い（1点）の5段階の指標を用いて行った。

実験結果および考察

1．微生物数の推移

発酵期間の生クリームおよび凍結乾燥後の発酵バター様食品の乳酸菌数を図2に示した。発酵開始時はほぼ目標接種量どおりに1001区が1.9×10^5CFU/g，LS区が1.6×10^6CFU/g，LS1001区が2.3×10^6CFU/gであった。1001区は発酵2日後に6.2×10^7CFU/gまで増加し，発酵3日後での推移はみられなかった。LS区は発酵1日後に4.7×10^7CFU/gまで増加した後，幾分増加する傾向を示し，発酵3日後には1.4×10^8CFU/gとなった。LS1001区は

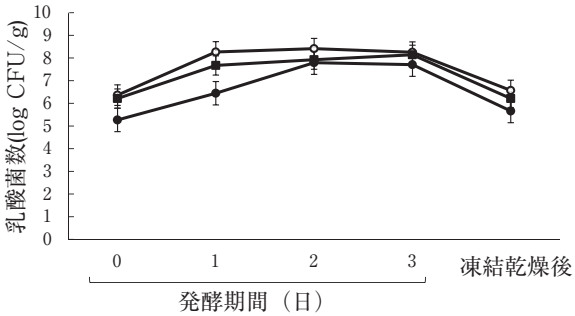


図2　発酵期間の生クリームおよび凍結乾燥後の発酵バター様食品の乳酸菌数

●：1001区，　■：LS区，　○：LS1001区
平均値±標準偏差（n＝6）

発酵1日後に1.9×10^8CFU/gまで大きく増加した後，発酵3日後まで推移はみられなかった。これらの結果から，乳脂肪分47%の生クリーム中でも本試験で接種した乳酸菌は増殖可能であることが明らかになった。なお，凍結乾燥後の乳酸菌数は，1001区が4.6×10^5CFU/g，LS区が1.6×10^6CFU/g，LS1001区が3.7×10^6CFU/gとなり，全試験区ともに減少し，凍結乾燥により一部の乳酸菌が死滅したものと考えられた。大腸菌群（0.1g当量），黄色ブドウ球菌（0.01g当量）およびサルモネラ菌（0.1g当量）は発酵期間中，凍結乾燥後ともに検出されなかった。

2．pHおよび乳酸量の変化

発酵期間の生クリームのpHを図3，乳酸量を図4に

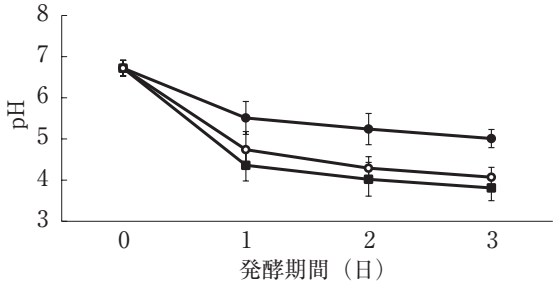


図3　発酵期間の生クリームのpH

●：1001区，　■：LS区，　○：LS1001区
平均値±標準偏差（n＝6）

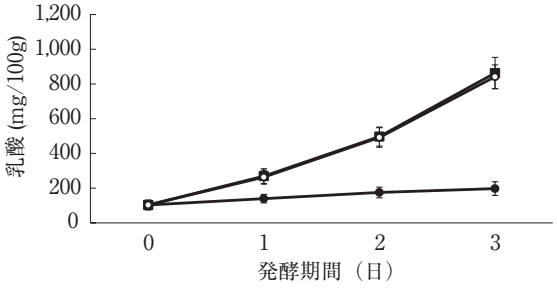


図4　発酵期間の生クリームの乳酸量

●：1001区，　■：LS区，　○：LS1001区
平均値±標準偏差（n＝6）

示した。全試験区とも発酵開始前のpHは6.72，乳酸量は100mg/100gであった。1001区のpHは発酵１日後に5.51へ低下し，その後も徐々に低下し，発酵３日後には5.01となり３日間で1.5程度低下した。乳酸量は経時的に緩やかに増加し発酵３日後に200mg/100gと発酵開始前の２倍となった。LS区のpHは発酵１日後に4.36へ大きく低下し，その後も徐々に低下し，発酵３日後には3.81となり３日間で３程度低下し，1001区よりも顕著な低下が認められた。乳酸量も1001区に比べ顕著な増加がみられ，発酵１日後は270mg/100g，発酵３日後には860mg/100gに達した。このことから，GABA生成乳酸菌 *L. buchneri* 1001は，発酵乳製品などによく用いられる動物性乳酸菌である *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* に比べ，乳酸生成能が低く，pHを緩慢に低下させることが明らかになった。一方，LS1001区のpHは発酵１日後に4.74へ大きく低下し，その後も徐々に低下し，発酵３日後には4.07となり，３日間で2.7程度低下したが，LS区に比べると低下の度合いは抑えられていた。乳酸量についてはLS区と同様に顕著な増加を示し，発酵３日後には840mg/100gとなった。

３．グルタミン酸量，GABA量の変化

発酵期間の生クリーム，チャーニング後および凍結乾燥後の発酵バター様食品のグルタミン酸量，GABA量を図５～７に示した。全試験区ともに発酵開始時のグルタミン酸濃度は添加量に相当する20mM程度を示した。*L. buchneri* 1001のみを接種した1001区は，発酵１日後からGABAの生成が認められ，発酵３日後には添加したグルタミン酸の半分強を変換し，約12mMのGABAを生成した。しかし，チャーニング法によりバターミルクを排除した後のGABA量は約2.5mMとなり，著しく減少した。一方，凍結乾燥を用いた場合のGABA量は約22mMと高い値を示した。しかし，発酵３日後時点でGABAへ変換されなかったグルタミン酸も多く，凍結乾燥後に約20mM残存した。GABA生成乳酸菌を接種していないLS区については，発酵期間を通してGABAの生成は認められず，凍結乾燥後もGABAは検出されなかった。*L. buchneri* 1001と *L. bulgaricus* TT1，*S. thermophilus* TT2を混合接種したLS1001区は，1001区と同様に発酵１日後からGABAの生成が認められ，発酵３日後には1001区を大きく上回る約19mMに達し，添加したグルタミン酸の約90%をGABAに変換した。LS1001区でもチャーニング法を用いた場合のGABA量は1001区と同様に著しく減少し，約2.8mMとなったが，凍結乾燥を用いたものは約38mMとなり，1001区の約1.7倍のGABAを含有した。LS1001区と1001区でGABA生成量に差異が生じたのは，GABA生成乳酸菌はpHの低下した環境下でグルタミン酸を利用しGABAを生成する[9),10),14)]ため，本研究で用いた *L. buchneri* 1001も同様の働きをする[15),17)]ことが影響したものと考えられた。すなわち，*L. buchneri* 1001と発酵乳製品などによく用いられる乳酸生成能の高い *L.*

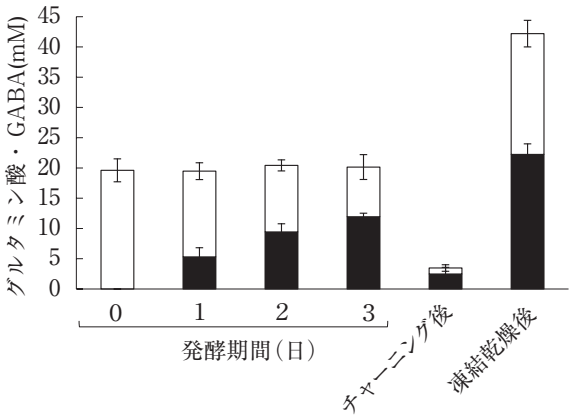


図５　発酵期間の生クリームおよびチャーニング後，凍結乾燥後の発酵バター様食品のグルタミン酸量およびGABA量（1001区）

□：グルタミン酸，　■：GABA
平均値±標準偏差（n＝６）

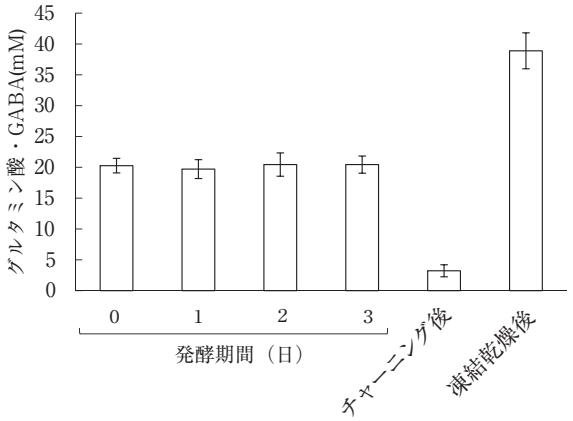


図６　発酵期間の生クリームおよびチャーニング後，凍結乾燥後の発酵バター様食品のグルタミン酸量およびGABA量（LS区）

□：グルタミン酸，　■：GABA
平均値±標準偏差（n＝６）

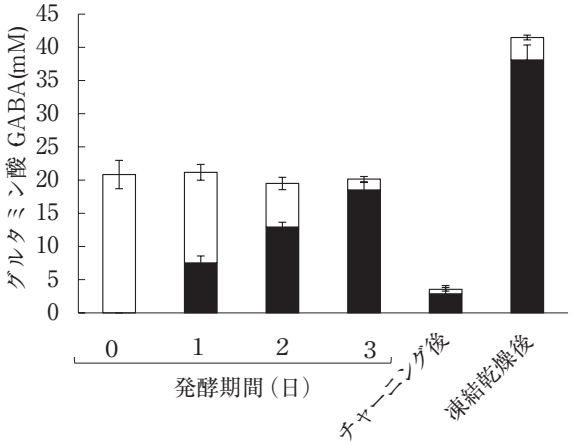


図７　発酵期間の生クリームおよびチャーニング後，凍結乾燥後の発酵バター様食品のグルタミン酸量およびGABA量（LS1001区）

□：グルタミン酸，　■：GABA
平均値±標準偏差（n＝６）

*bulgaricus, S. thermophilus*が混在し，pHが大きく低下したLS1001区は多くのGABAを生成したのに対し，*L. buchneri* 1001は*L. bulgaricus, S. thermophilus*に比べて乳酸生成能が低いため，*L. buchneri* 1001のみを接種した1001区ではpHの低下が緩慢でGABA生成能の働きが弱く，多くのグルタミン酸がGABAに変換されずに残存したものと考えられた。先の結果でLS区とLS1001区の発酵期間における乳酸量はほぼ同値で推移したが，pHはLS1001区がLS区よりも若干高い値を示した。これは，LS1001区は多くのGABAを生成することから，GABA生成時のグルタミン酸の脱炭酸によるpH上昇作用[12),13)]が影響したものと推察された。寺島ら[17)]は培地中ではpH４付近まで低下すると*L. buchneri*1001の活動が鈍り，GABA生成がみられなくなることを報告しているが，本試験で最も多くのGABAを生成したLS1001区ではpH４まで低下している。これは乳にはpH緩衝作用があることから，その環境下で*L. buchneri* 1001が酸耐性を獲得し，pHが４付近まで低下してもGABA生成能を働かせたものと考えられた。

これらの結果から，GABA生成乳酸菌を発酵バターのスターターとして利用し，GABA生成能を向上させ，効率よくGABAを生成させるためには*L. bulgaricus*，*S. thermophilus*などの乳酸生成能が高い乳酸菌と混合接種することが有効であると考えられた。

４．一 般 成 分

原料に用いた生クリーム，市販発酵バター（仏産）および凍結乾燥により製造したGABA含有発酵バター様食品LS1001区の一般成分を表１に示した。

LS1001区の発酵バター様食品は市販発酵バターに比べ水分は約１/４の3.8%と少なく，これにより固形分割合は増すことから，タンパク質は約５倍の3.1%，脂肪は3.5%高い86.9%，炭水化物は顕著に高い5.7%を示した。これは凍結乾燥では水分のみがほとんど昇華し除去されることから，チャーニング法ではバターミルク排出時に流出する生クリーム中のタンパク質や炭水化物が凍結乾燥後も残存したためと考えられた。なお，厚生労働省で定められた乳及び乳製品の成分規格等に関する省令[31)]では，バターの成分規格は乳脂肪分80%以上，水分17%以下とされているため，本試験で製造したGABA含有発酵バター様食品は十分に成分規格を満たしていた。この結果から，凍結乾燥を用いることで従来製法のバターに比べ，原料に含まれる脂肪だけでなく，タンパク質や炭水化物の有用成分を漏れなく含有した栄養面でも優れたGABA含有発酵バター様食品を製造できることが明らかになった。

５．油脂の品質

凍結乾燥により製造したGABA含有発酵バター様食品LS1001区の酸価は1.81，過酸化物価は4.10であった。バターの単体での安全基準はないが，厚生労働省が定める衛生規範による生洋菓子に用いる原材料の成分規格では，油脂類は酸価３以下，過酸化物価30以下[32)]と定められており，本試験で製造したGABA含有発酵バター様食品はこの規格を満たしていた。また，ヨウ素価は31.70で，通常のバターと同程度（夏：38，冬：32）[33)]の結果が得られたことから，油脂の品質の上でも問題ないものと考えられた。

６．官 能 評 価

市販の発酵バター（国産，仏産）および凍結乾燥により製造したGABA含有発酵バター様食品LS1001区の官能試験の結果を表２に示した。色，香り，口溶け，舌触りおよび味の全ての項目で各試料間に有意差は認められなかった。パネラーは発酵バターの摂食経験がほとんど無い学生であったが，GABA含有発酵バター様食品LS1001区の各評価項目の５段階指標の平均値は2.8～3.8で，市販の発酵バターと遜色ない官能評価を得たことから，嗜好性の面でも問題ないものと考えられた。なお，LS1001区についてはヨーグルト様の香りとともに味の濃厚さを感じるとの感想があげられ，これがパネラーの嗜好に合致したものと思われた。これは先述のとおりLS1001区は凍結乾燥で水分のみがほとんど除去され，脂肪分が高まることに加え，生クリーム中のタンパク質や炭水化物が残存したことが影響したものと考えられた。

以上の結果から，うま味を付与するために食品製造で広く使われているグルタミン酸ナトリウムを添加した生クリームへ，GABA生成乳酸菌*L. buchneri* 1001を乳酸

表１　生クリーム，市販発酵バターおよび凍結乾燥法で製造したGABA含有発酵バター様食品（LS1001区）の一般成分

	生クリーム	市販発酵バター（仏産）	GABA含有発酵バター様食品（LS1001区）
水　分（%）	48.4	15.4	3.8
タンパク質（%）	1.7	0.6	3.1
脂　質（%）	47.0	83.4	86.9
灰　分（%）	0.3	0.4	0.5
炭水化物（%）	2.6	0.2	5.7

表2　市販発酵バターおよび凍結乾燥法で製造したGABA含有発酵バター様食品（LS1001区）の官能評価

	色	香り	口溶け	舌触り	味
市販発酵バター（国産）	3.1±1.28	3.4±1.26	3.3±0.82	3.6±1.05	3.1±1.19
市販発酵バター（仏産）	3.3±1.41	3.6±1.07	4.1±1.10	2.9±1.37	3.5±1.26
GABA含有発酵バター様食品（LS1001区）	3.8±0.78	3.6±1.07	3.3±1.10	2.8±1.37	3.4±1.26

評価指標（5段階）：大変良い（5点），良い（4点），普通（3点），悪い（2点），大変悪い（1点）
平均値±標準偏差（n＝10）

生成能が高い乳酸菌とともに混合接種することで，発酵中にGABAが効率的に生成され，さらに，発酵後にチャーニングせずに凍結乾燥することにより，GABAを添加することなく，GABAを高濃度に含有する良好な品質を備えた発酵バター様食品を製造できることが明らかになった。なお，血圧上昇抑制に必要なGABA摂取量は約10～20㎎/日[3),34)]であり，本試験で製造したGABA含有発酵バター様食品はGABAを約4㎎/g含有することから，パン1枚当たりに塗る量とされる10gで十分に効果が期待できるものと考えられた。

要　約

富山県の伝統食品「かぶらずし」から分離したGABA生成乳酸菌である*Lactobacillus buchneri* 1001を用いて発酵バター様食品の開発を試みた。その結果，グルタミン酸を添加した生クリームへ，*L. buchneri* 1001を*L. bulgaricus*，*Streptococcus thermophilus*とともに接種することで，発酵中にGABAが効率的に生成した。さらに，発酵後に従来のバター製造法であるチャーニングの代わりに凍結乾燥することにより，GABA含有量が高く，タンパク質と炭水化物も含む発酵バター様食品が得られた。この発酵バター様食品は成分規格を満たし，官能的にも市販の発酵バターと同等の良好な評価を得た。

文　献

1）吉岡義明・堀江健二・谷川鯉沙・横越英彦：GABAの製法・安全性・効能効果に関する最近の進捗，FFIジャーナル，**213**，1145～1156（2008）
2）渡辺正仁・出田めぐみ・中俣恵美・林部博光・西井正樹：GABAとGABAシステム，保健医療学雑誌，**1**，3～9（2010）
3）梶本修身・平田　洋・中川聡史・梶本佳孝・早川和仁・木村雅行：GABA含有はっ酵乳製品の正常高値血圧者に対する降圧効果，日食科工誌，**51**，79～85（2004）
4）岡田忠司・杉下朋子・村上太郎・村井弘道・三枝貴代・堀野俊郎・小野田明彦・梶本修身・高橋　励・高橋丈夫：γ-アミノ酪酸蓄積脱脂コメ胚芽の経口投与における更年期障害及び初老期精神障害に対する効果，日食科工誌，**47**，596～603（2000）
5）大森正司・矢野とし子・岡本順子・津志田藤二郎・村井敏信・樋口　満：嫌気処理緑茶（ギャバロン茶）による高血圧自然発症ラットの血圧上昇抑制作用，日農化会誌，**61**，1449～1451（1987）
6）中村寿雄・松林恒夫・蒲池加寿子・長谷川節・安藤洋太郎・大森正司：γ-アミノ酪酸（GABA）富化クロレラは高血圧自然発症ラット（SHR）の血圧上昇を抑制する，日農化会誌，**74**，907～909（2000）
7）津志田藤次郎：茶生葉におけるアミノ酸代謝の解明とその利用による新製品（ギャバロン茶）の開発，茶業研究報告，**72**，43～51（1990）
8）ヤクルト本社：GABA含有発酵乳の製造方法，特開2001－120179（2001）
9）上野義栄・平賀和三・森　義治・小田耕平：漬物からγ-アミノ酪酸（GABA）高生産性乳酸菌の分離とその応用，生物工学会誌，**85**，109～114（2007）
10）八十川大輔・中川良二・能登裕子：GABA高産生乳酸菌を用いた植物性飲料の開発，北海道立食品加工研究センター報告，**50**，25～28（2009）
11）細井永次：新規のγ-アミノ酪酸高生産菌の検索及び食品加工残渣への応用，埼玉県産業技術総合センター研究報告，**6**，88～92（2007）
12）Sanders, J. W., Leenhounts, K., Burghoorn, J., Brands, J. R., Venema, G. and Kok, J.: A chloride-inducible acid resistance mechanism in *LACTOCOCCUS lactis* and its regulation. *MOL. Microbiol*., **27**, 299～310（1998）
13）Kanehira, T., Nakamura, Y., Nakamura, K., Horie, K., Horie, N., Furugori, K., Sauchi, Y. and Yokogoshi, H.: Relieving occupational fatigue by consumption of a beverage containing γ-amino butyric acid, *J. Nutr. Sci. Vitaminol*., **57**, 9～15（2011）
14）Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S. and Suzuki, I.: Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening, *J. Dairy Sci*., **81**, 1486～1491（1998）
15）寺島晃也・多田耕太郎・加藤一郎・中川義久・平野　寛・鈴木敏郎：GABA生産乳酸菌の非加熱発酵ソーセージへの応用，日本微生物資源学会誌，**28**，19～27（2012）
16）伊藤肇躬：乳製品製造学（光琳，東京），p. 423（2007）

17）寺島晃也・多田耕太郎・加藤一郎・中川義久・平野寛・鈴木敏郎：富山地域資源からのγ-アミノ酪酸（GABA）生成乳酸菌の分離，日本微生物資源学会誌，**28**，11～18（2012）
18）森地敏樹：食品微生物検査マニュアル改訂第2版（栄研化学，東京），pp.138～139（2009）
19）森地敏樹：食品微生物検査マニュアル改訂第2版（栄研化学，東京），pp.194～197（2009）
20）森地敏樹：食品微生物検査マニュアル改訂第2版（栄研化学，東京），pp.146～154（2009）
21）森地敏樹：食品微生物検査マニュアル改訂第2版（栄研化学，東京），pp.180～185（2009）
22）岸　雅代・宇賀神功・増田豊・鵜澤昌好：市販バニラアイスクリーム及び原材料の遊離アミノ酸組成，日食工誌，**81**，811～816（1991）
23）日本薬学会編：乳製品試験法注解（金原出版，東京），p.34（1991）
24）財団法人日本食品分析センター編：五訂日本食品標準成分表分析マニュアルの解説（中央法規出版，東京），pp.29～34（2002）
25）日本薬学会編：乳製品試験法注解（金原出版，東京），pp.46～48（1991）
26）日本薬学会編：乳製品試験法注解（金原出版，東京），p.170（1991）
27）日本薬学会編：乳製品試験法注解（金原出版，東京），p.36（1991）
28）日本油化学会編：基準油脂分析試験法2013年版（日本油化学会，東京），2.3.1－2013（1～2）（2013）
29）日本油化学会編：基準油脂分析試験法2013年版（日本油化学会，東京），2.5.2.1－2013（1～2）（2013）
30）日本油化学会編：基準油脂分析試験法2013年版（日本油化学会，東京），2.3.4.1－2013（1～2）（2013）
31）厚生労働省ホームページ：乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S26/S26F03601000052.html）
32）厚生労働省ホームページ：酸価・過酸化物価に関する規程等（http://www.mhlw.go.jp/stf2/shingi2/2r9852000000ip55-att/2r9852000000ipvm.pdf）
33）上野川修一編：乳の科学（朝倉書店，東京），pp.155～163（1996）
34）榊原正樹・吉川典孝・太郎田博之・稲福桂一郎・宮城　健：スピルリナの乳酸発酵によるγ-アミノ酪酸（GABA）の高含有化及び血圧降下作用，DIC Technical Review，**12**，13～19（2006）

（平成27年6月15日受付；平成27年7月22日受理）