

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 ラニイ アグスチナ ウランダリ

題 目 発酵茶に含まれるフェノール性代謝成分の解析  
(Analysis of phenolic metabolites in the fermented teas.)

*Aspergillus* sp. (PK-1, FARM AP-21280)にて発酵した茶 (*Camellia sinensis* L.) から teadenol A および teadenol B と命名した新規ポリフェノール類を単離し、その化学構造を各種機器分析(MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , NOE, HMBC 等)により決定した。その化学構造における炭素の絶対配位については、茶カテキン類を *Aspergillus* sp. により発酵処理し、生物変換反応により合成することにより確認した。

*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280), *A. oryzae* (NBRS 4214), *A. awamori* (NBRS 4122) また *Eurotium* sp. (FARM AP-21291)で発酵処理したさまざまな茶葉について、HPLC 分析により成分を解析したところ、*Aspergillus* sp. 発酵茶葉において特に高含量の teadenol A と teadenol B (teadenol A: 1.01-1.79%; teadenol B: 0.16-0.37%, 乾燥重量あたり) が認められた。このことは、teadenol 類の生産に *Aspergillus* の酵素が大きく関与していることを示すものであった。

さまざまな市販茶葉(緑茶、ウーロン茶、紅茶およびプーアール茶)における代謝物の効率的な同定と構造解析を目的に、HPLC-TOFMS 分析法を活用した。627 の代謝成分が、発酵茶(PK-1) および市販茶から検出された。そのうち 359 成分は市販茶においてのみ、また 98 成分は、PK-1 においてのみ検出された。Teadenol B は PK-1 においてのみ検出されたが、teadenol A は PK-1 では高含量で、その他の市販茶では含量は低いウーロン茶のみで検出された。このことは、ウーロン茶の加工過程における *Aspergillus* sp. による自然発酵を示唆するものであった。HPLC-TOFMS 分析において、 $m/z = 756.2118$  および  $m/z = 756.2108$  を示す二つの化合物も検出され、その分子式から既知のフラボノイド類(ケンフェロール配糖体)と推察された。HPLC-TOFMS 分析のプロファイリング分析は、さまざまな茶製品の複雑な代謝物の同定に非常に有用な方法であると評価された。

Teadenol A および teadenol B の生合成的な由来を調査するために、オートクレーブした (-)-epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCG) [EGCG および (-)-gallocatechin 3-*O*-gallate (GCG) の混合物] を *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280), *A. awamori* (NRIB-2061) また *A. kawachii* (IFO-4308)にて発酵処理をおこない、teadenol A および teadenol B の生成を確認した。このことは、teadenol 類が茶カテキン類 (EGCG および GCG) から生合成されることを実証するものである。本実験の結果をもとに、茶カテキン類から生合成される teadenol A および teadenol B の代謝経路を考察した。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Rani Agustina Wulandari /
題 目	Analysis of phenolic metabolites in the fermented teas. (発酵茶に含まれるフェノール性代謝成分の解析)

Two new phenolic compounds (named as teadenol A and teadenol B, respectively) were isolated from tea (*Camellia sinensis* L.) leaves fermented with *Aspergillus* sp. (PK-1, FARM AP-21280). The chemical structures of teadenols were elucidated based on the analyses of their spectroscopic data (MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , NOE, HMBC *etc.*). The absolute configurations of the structures of teadenols were also certified with their biosynthetic preparation in the treatment of tea catechins with *Aspergillus* sp.

In HPLC analysis of teadenols in the tea leaves fermented with *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280), *A. oryzae* (NBRS 4214), *A. awamori* (NBRS 4122) and *Eurotium* sp. (FARM AP-21291), high amounts of teadenols A and B were detected in the fermented teas treated with *Aspergillus* sp. (teadenol A: 1.01-1.79 %; teadenol B: 0.16-0.37 %, as dry weight).

For the evaluation of effective identification of specific metabolites produced in various types of commercial teas (green, oolong, black and pu-er teas), HPLC-TOFMS analysis was performed. 627 compounds detected in among all samples (PK-1, green, oolong, black and pu-er teas). 359 compounds observed only in among four commercial teas (green, oolong, black and pu-er teas) and 98 compounds observed only in the fermented tea (PK-1), respectively. Teadenol B was detected only in PK-1, and teadenol A was found with relatively high amount in PK-1 and not so much in four teas group. Teadenol A was detected in a commercial tea (oolong), showing that the oolong tea might be fermented by natural *Aspergillus* sp. in the fermentation processing. Two compounds with  $m/z = 756.2118$  and  $m/z = 756.2108$ , respectively, were also supposed to be flavonoid compounds (*e.g.* kaempferol triglycosides) from the  $m/z$  data. The profiling analysis of HPLC-TOFMS was very useful for the identification of complex metabolites in processed varieties of tea products.

Teadenols A and B were biosynthetically produced in the autoclaved solution of (-)-epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCG) [mixture of EGCG and (-)-gallocatechin 3-*O*-gallate (GCG)] which was incubated with *Aspergillus* sp. (FARM AP-21280), *A. awamori* (NRIB-2061) and *A. kawachii* (IFO-4308). This result demonstrated that teadenols detected in various fermented tea products are originated from tea catechins (EGCG and GCG) in the materials. A biosynthetic pathway of teadenols A and B from tea catechins was proposed in this experiment.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Rani Agustina Wulandari
審査委員	主査 佐賀大学 教授 石丸 幹二
	副査 佐賀大学 教授 松本 亮司
	副査 鹿児島大学 教授 松尾 友明
	副査 佐賀大学 准教授 北垣 浩志
	副査 鹿児島大学 准教授 橋本 文雄
審査協力者	
題目	Analysis of phenolic metabolites in the fermented teas. (発酵茶に含まれるフェノール性代謝成分の解析)
<p>茶 (<i>Camellia sinensis</i> L.) は世界的な嗜好飲料であり、またポリフェノールである多様なカテキン代謝成分を含むことから機能性食品素材としても重要である。茶葉はその発酵度の違いから緑茶、ウーロン茶、紅茶等に製品化されるが、それぞれの発酵度に応じたポリフェノール酸化物を含んでおり、その化学的また薬理的研究が多くなされている。近年では、中国のプーアール茶の様な、茶葉を微生物で発酵処理した後発酵茶の機能性も注目され、生理活性のみならずその化学的解明が望まれている。微生物発酵茶は、発酵に関与する微生物の酵素活性が多様であり、代謝成分も複雑でまた微量なものが多いことから、化学的な解明が遅れているのが現状である。本研究では、HPLC-TOFMS等の分析機器を活用することにより、微生物発酵茶に特徴的な成分を明らかにするとともに、新規なカテキン代謝成分の単離、構造解析、ならびにその生合成経路の実験的証明を行なった。</p> <p><i>Aspergillus</i> sp. (FARM AP-21280)にて発酵した茶 (PK-1) から teadenol A および teadenol B と命名した新規ポリフェノール類を単離し、その化学構造を各種機器分析 (MS, <math>^1\text{H-NMR}</math>, <math>^{13}\text{C-NMR}</math>, NOE, HMBC 等)により決定した。その化学構造における炭素の絶対</p>	

配位については、茶カテキン類を *Aspergillus* sp. により発酵処理し、生物変換反応により teadenol 類を生合成することにより確認した。

発酵微生物と代謝成分の相関を調査するために、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280), *A. oryzae* (NBRS 4214), *A. awamori* (NBRS 4122) また *Eurotium* sp. (FARM AP-21291) で発酵処理した茶葉について成分を解析したところ、*Aspergillus* sp. 発酵茶葉において特に高含量の teadenol 類が認められた。このことは、teadenol 類の生産に *Aspergillus* の酵素が大きく関与していることを示すものであった。

さまざまな市販茶葉（緑茶、ウーロン茶、紅茶およびプーアール茶）における代謝物の効率的な同定と構造解析のための HPLC-TOFMS 分析法についても検討した。分析した茶葉から、627 の代謝成分が検出され、そのうち 359 成分は市販茶においてのみ、また 98 成分は、PK-1 においてのみ検出された。Teadenol B は PK-1 においてのみ検出されたが、teadenol A は PK-1 とウーロン茶において検出された。このことは、ウーロン茶の加工過程における *Aspergillus* sp. による自然発酵を示唆するものであった。また、 $m/z = 756.2118$  および  $m/z = 756.2108$  を示すフラボノイド類（ケンフェロール配糖体）も同定され、HPLC-TOFMS 分析を活用したプロファイリングは、さまざまな茶製品の複雑な代謝物の同定に非常に有用な方法であると評価された。

Teadenol 類の生合成的な由来を調査するために、(-)-epigallocatechin 3-*O*-gallate (EGCG) を原料とし、*Aspergillus* sp. (FARM AP-21280), *A. awamori* (NRIB-2061) また *A. kawachii* (IFO-4308) による発酵処理をおこない、EGCG からの teadenol 類の生合成に成功した。本実験の結果をもとに、茶カテキン類 (EGCG) から生合成される teadenol 類の代謝経路を考察した。

本研究は、微生物発酵茶から新規カテキン代謝成分である teadenol 類を初めて単離、構造決定したのものとして注目される。また、HPLC-TOFMS 分析等の機器分析を活用した茶成分解析法を確立し、日本および中国産の多数の茶製品の成分解析に応用するとともに、生物変換反応による茶カテキン類からの teadenol 類の生合成も実証する等、微生物発酵茶の代謝研究分野において重要な知見を提供したものである。以上のことから、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判断した。

## 最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	Rani Agustina Wulandari		
審査委員	主査	佐賀大学 教授	石丸 幹二
	副査	佐賀大学 教授	松本 亮司
	副査	鹿児島大学 教授	松尾 友明
	副査	佐賀大学 准教授	北垣 浩志
	副査	鹿児島大学 准教授	橋本 文雄
審査協力者			
実施年月日	平成24年7月21日		
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)			<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答
<p>主査及び副査は、平成24年7月21日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>			

学位申請者 氏名	Rani Agustina Wulandari
-------------	-------------------------

[質問1] 発酵処理に使用したカビの前培養条件は？

[回答1] オートクレーブした茶葉、また、生物変換反応用のサンプル溶液には、PDA培地で継代培養したものを添加した。その際、PDA培地は除去してカビのみを移植した。

[質問2] 変換反応中のカビの生育、また反応液の変化は？

[回答2] 反応溶液中に黒色成分が蓄積されていた。酵素の放出やpHの変化については調査していない。

[質問3] *Aspergillus sp.* と *Eurotium sp.* を用いた発酵においてteadenol類の蓄積パターンが違う原因は？

[回答3] カビの持つ代謝酵素の活性の差異が大きいと思われる。

[質問4] ウーロン茶でteadenol Aが検出されたことについて考えられることは？

[回答4] 発酵中に自然に感染した*Aspergillus sp.* の酵素活性によりteadenol Aが生成し、ウーロン茶の発酵過程で代謝されないものが検出されたと思われる。ご指摘の様に、teadenol Aの含量は少ないが、ウーロン茶の製品化における均一性の点で問題かもしれない。

[質問5] カビの栄養源としてのカテキン類の代謝物の生成についてどう考えるか？

[回答5] 蓄積されるteadenol類は、カビの栄養源としては利用されにくいと思われる。カテキン類から代謝される他の未知成分は栄養源の可能性はある。

[質問6] さまざまな発酵茶におけるカテキン類の分解度について

[回答6] プーアル茶は多くのカビが混合して発酵しているので、多種の酵素の作用により、*Aspergillus sp.* 単独での発酵条件では分解しにくいteadenol類も代謝・分解されている。

[質問7] プロアントシアニジンのようなポリマーの変換反応は調査したか？

[回答7] していないが、面白いと思われる。

[質問8] 変換反応液をEGCGの変換実験に使用すれば、反応液中の酵素活性が判ると思われる（コメント）

[回答8] 重要なアドバイスをありがとうございます。

[質問9] Teadenol類の生物活性の強さはEGCGと比較してどうか？

[回答9] それぞれの活性の種類が違うので強さの比較も活性それぞれで異なるが、抗メタボリックシンドローム効果（アデイポネクチン生産促進）でいえば、teadenol類の方が約10倍程度強い。

[質問10] 新規物質の発見における方法論的なコメントは？

[回答10] 発酵素材の場合は、発酵に用いる微生物の選択的利用が有効である。今回は、HPLC-TOFMS分析におけるプロファイリングが非常に役に立った。

[質問11] *Aspergillus sp.* の種類、差異、酵素についてコメントは？

[回答11] 詳細は不明であるが、適当なカビの選択と酵素活性に関する理解が、代謝研究への応用においては重要と思われる。