

FT-NIR を用いたメタボリックフィンガープリンティングによる  
緑茶製造における蒸熱工程管理の重要指標である「蒸し度」の推定モデルの構築生命先端工学専攻  
博士前期課程修了（平成21年3月）

川 原 類

## □要 約□

本研究は、緑茶の産業用蒸熱機の最適操作変数設定を特別な熟練を必要とせず可能とするためのメタボリックフィンガープリンティング技術開発に関する研究報告である。製茶工程のうち、蒸熱工程が製茶の品質に最も大きく影響を及ぼすということが経験的に言われている。蒸熱機には多数の設定値があり、これらは互いに複雑に関与している。さらに、畑ごとの土やその年の気候、収穫日の天気によって茶葉の状態が変わるため、収穫のたびに最適な設定値を探し当てなければならないのが現状である。今のところ、「蒸し度」という指標が蒸熱機の操作変数の組み合わせの目安をつけるのに重要であると言われている。蒸し度は、種々の操作変数条件で蒸した茶葉をアセトン抽出し、クロロフィルをフェオフィチンに脱キレートさせて分光光度計で測定したデータに基づいて算出される無次元数であり、茶葉のロット間の差を無視できるため製茶工程において重要な指標となる。しかしながら、クロロフィルの脱キレートに一日かかるなど時間と労力を要し、なかなか現場に普及しないのが実状である。従って、「蒸し度」という指標を簡便かつ再現性良く推定することが出来れば、蒸熱工程の品質管理をより実用的に、より効率的に改善することができるはずである。そこで本研究では、蒸し葉を FT-NIR（フーリエ変換型近赤外分光計）で測定し、蒸し度の PLS (partial least squares) 回帰推定モデルの構築を目的とした。このように、スペクトルデータを指紋とみなしてスペクトルパターンの違いを比較することで、数種の生体サンプル中に含まれる代謝物の差を見出し議論する手法をメタボリックフィンガープリンティングという。当該研究を通して、メタボリックフィンガープリンティング技術を用いて異なる機械による異なる操作変数の相関関係を見出し、蒸し度を指標とした PLS 推定モデルを構築することができた。

## □本 文□

本研究は、緑茶の産業用蒸熱機の最適操作変数設定を特別な熟練を必要とせず可能とするための技術開発に関する研究報告である (Fig 1)。お茶、特に緑茶の品質は品評会により色、味、香り等総合的な人的官能試験から定められる (1)。現在、メタボロミクスを用いた、製品緑茶品質の官能試験結果の科学的介入は何件か報告されている (2-5)。確かに生産後の緑茶の品質の議論は重要であるが、緑茶製造工程の管理・改善に対しては無力であることは言うまでもない。そこで、製造工程の管理・改善を行うために、なぜ現在高品質の緑茶を継続して生産できないかを明確にすることを試みた。製茶工程とは、収穫した茶葉を蒸す「蒸し工程」、4つの大型機械を通して整形する「揉み工程」、そして「乾燥工程」の3工程からなる (6)。生葉から製茶に仕上げるまでに多数の大型機械が必要である。それぞれの機械は複雑な構造と機能を有するために、運転条件を設定するために複数のパラメータを持つ。それらのパラメータの設定によって製茶の品質が左右される。品質の良いお茶を作るためのパラメータ設定のパターンが1つに決まっているのが理想であるが、実際にはそうはいかない。畑ごとの土やその年の気候、収穫日の天気によって茶葉の状態が変わるためである (1)。今のところ収穫のたびに最適な設定値を探し当てなければならないのが現状であるが、これら多数の工程のうち、蒸し工程が製茶の品質に最も大きく影響を及ぼすということが経験的に言われている。これは、言い換えるとどれだけ工夫をこらして良質の茶葉を栽培しても、蒸熱工程のパラメータ設定で失敗すれば、製茶の品質は極端に低下するということである。具体的には、①葉は赤みがかかり、②組織がすれてけば立つ。また湯による抽出後、③褐変して黒味がかかり、④渋みや苦味が増え、⑤腐乱臭も発生する。こういった背景から、科学的な根拠に基づいて迅速かつ適切にパラメータ設定ができるシステムが必要とされて

いる。

そこで次に、現在使用している蒸熱機について説明する。実際に製茶工程に使われている蒸熱機は胴回転型製造用蒸熱機 (Fig 1) だが、胴傾斜角や攪拌軸回転数、胴回転数、茶葉投入量など、多数の設定値がある。これらは互いに複雑に関与している。例として胴傾斜角と胴回転数について説明する。胴傾斜角が大きいほど茶葉が蒸熱機内に存在する時間が短くなる (Fig 2)。これは不均一に葉を蒸すことにつながる。傾斜角を小さく設定した場合、ある程度の胴回転数が必要である。なぜなら胴回転数が大きすぎると遠心力で葉が胴内の壁部に押し付けられ、胴中心部にある軸に攪

拌されない。逆に、胴回転数が小さすぎると、葉が胴内の下部で動くだけでこれも軸に攪拌されない (Fig 3)。このように、均一な蒸しを保ちつつ毎回変わる茶葉の状態に合わせて最適な蒸し加減を導くパラメータの組み合わせを見出す難しさが想像できよう (6)。今のところ、上記に示した最適な蒸し加減を導くパラメータの組み合わせを見出すために、時間だけを変数に持つベルトコンベヤー型の試験用蒸熱機 (Fig 1) を用いて茶葉を試験的に蒸し、後述の「蒸し度 (SI; Steaming Index)」という指標を用いて胴回転型製造用蒸熱機の操作変数の組み合わせの目安をつけている。

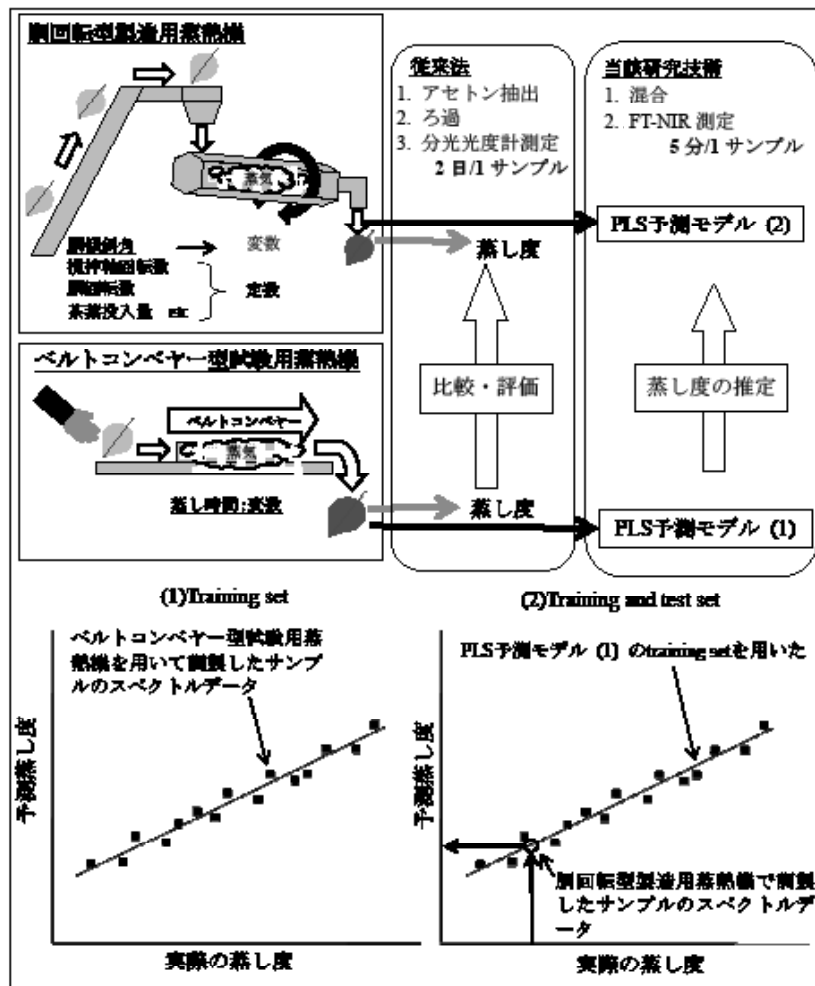


FIG. 1 本実験のコンセプト図。茶葉を異なる機械で調製するために別指標である SI を介して操作変数の関連性を把握している。収穫日ごとに茶葉の状態が変動するため、この SI は毎回算出されなければならない。従来はアセトン抽出法により SI を算出していたが、この従来法では時間と労力を要し、リアルタイムでの制御は不可能であった。当該研究で開発した新規手法は FT-NIR を用いて蒸された直後の茶葉を測定し、得られたスペクトルデータを PLS 回帰直線に供することで瞬時に SI を算出することができる。

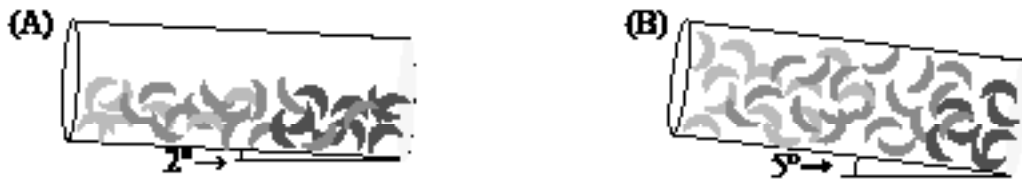


FIG. 2 胴傾斜角と茶葉投入量の関係。投入量の多い場合傾斜角は高く (A)、少ない場合は低い方が望ましい (B)。



FIG. 3 各胴回転数による茶葉の胴内での様子。(A) 適度な胴回転のとき、葉は胴の頂点に上がって垂直に落ちる。(B) 胴回転が速すぎる場合、遠心力で茶葉が胴の壁部に移動し、胴中央が空洞となる。(C) 胴回転が遅すぎる場合、葉が胴の下部に集まり、胴中央の攪拌軸に攪拌されない。

葉の蒸され具合は昔から色味や柔らかさで判断してきた。特に色味の変化に着目し、葉の蒸され具合は茶葉中のクロロフィルとフェオフィチンの比に関係すると見当をつけた。そして、クロロフィルとフェオフィチンの比により算出される数値をSIとし(式1)、蒸熱機オペレーターはこれまで経験で培った目視と触感による「蒸され具合」と、計算式で算出されるSIとの相関を感じ取る努力をした。やがてオペレーターはSIと品評会で下されるランキングの相関をも長年の経験から感じ取るようになり、今ではSIは製茶の品質をはかる良い目安となった。SIは、種々のパラメータ条件で蒸した茶葉をアセトン抽出し、クロロフィルをフェオフィチンに脱キレートさせて分光光度計で測定したデータに基づいて算出される。しかしながら、クロロフィルの脱キレートに一日かかるなど時間と労力を要し、迅速な工程管理への適用は不可能である。従って、SIという指標を簡便かつ再現性良く推定することが出来れば、蒸熱工程の管理をリアルタイムに行うことができ、品質管理をより実用的に、より効率的に改善することができるはずである。これまで製品緑茶(荒茶)の品質に関する報告の中で、GC/MS(2, 3)、FT-NMR(4)、FT-NIR(5)などを様々な分析機器をツールとして用いた例がいくつかあるが、我々は当該研究における分析機器としてFT-NIRに着

目した。FT-NIRは①操作が簡便、②測定が早い、③前処理が容易で④低コストであることから、実用的だと判断した。本実験での我々の構想は、まずSIを応答変数、時間のみが操作変数であるベルトコンベヤー型のベルトコンベヤー型試験用蒸熱機で調製した異なる蒸し時間のサンプルのFT-NIRスペクトルデータをpredictorとしたときのPLS予測モデルの評価を行い、次にこれらをTraining setとして胴回転型製造用蒸熱機で調製したサンプルのSIを推定した。

これらをふまえて、当該研究では、ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機で蒸し時間を変化させて調製した茶葉サンプルと、胴回転型製造用蒸熱機で各操作変数を変化させて調製した茶葉サンプルをSIという別指標で置き換えた。SIは無次元数であり、茶葉のロット間の差を無視できるため製茶工程において重要な指標となる。そして、メタボリックフィンガープリンティング技術を運用して、ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機の唯一の操作変数である時間と、胴回転型製造用蒸熱機の各操作変数との相関関係を見出し、SIを指標としたPLS予測モデルを構築することを目的とした。まずは胴回転型製造用蒸熱機の操作変数の一つである「胴傾斜角」と、ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機の「蒸し時間」の2変数のみを議論の対象とし、目的達成を試みた。また、PLS予測モデルを構築する際に、茶

葉を測定するツールとして、操作が簡便で低コストであり、かつ測定時間の短い実用的なFT-NIRを採用した。

緑茶 (*Camellia sinensis*) はヤブキタ種を用い、2008年一番茶(春季収穫で上位1~3枚目の葉)を採取した。採取した茶葉を以下の2通りで蒸した後、すぐに-30℃で凍結し分析まで保存した。①胴回転型製造用蒸熱機(Kawasaki Co., Ltd, 300KE-MR4S, Shizuoka, Japan)を用い、胴回転数を40、攪拌軸回転数を350に固定し、胴傾斜角を2, 3, 5, 6度に設定し、それぞれ蒸した。②ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機(TERADA ELECTRIC WORKS CO., LTD, Tokyo, Japan)を用い、蒸し時間を30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240秒に設定し、それぞれ蒸した。また、生葉も凍結させた。

凍結した生葉を含む全ての茶葉サンプルを5g測りとり、アセトン10ml入れポリトロン(Kinematica AG, Littau, Switzerland)にかけ、茶葉を均一化した。これを90%含水アセトンで50mlにメスアップし、ろ過した。ろ液を、生葉は10mlずつ2本に分注、その他の蒸し葉は1本のみ測りとり、蒸し葉サンプルと生葉サンプルの一方には90%含水アセトンを、生葉サンプルの他方には90%含水アセトン/シュウ酸飽和溶液を、それぞれ0.1ml加えた。後者は暗所で一晩静置した。抽出したサンプルを分光光度計(UV-1600, SHIMADZU, Kyoto, Japan)により測定した。測定はフェオフィチンの極大吸収波長である534nmと、フェオフィチンの吸収スペクトルとクロロフィルの吸収スペクトルが交わる549nmで行った(7)。

また、蒸し葉のSIを式1のように定義した。

$$SI = \frac{R_x - R_0}{R_{100} - R_0} \quad (1)$$

ここで、 $R_0$ はろ過後、90%含水アセトンを0.1ml添加した生葉抽出サンプルの534nmにおける吸光度を549nmの吸光度で除した値であり、 $R_{100}$ はろ過後、90%含水アセトンシュウ酸飽和溶液を0.1ml添加した生葉抽出サンプルの534nmにおける吸光度を549nmの吸光度で除した値を示す。 $R_x$ は蒸し葉抽出サンプルの534nmにおける吸光度を549nmの吸光度で除した値を指す。

続いて、凍結した生葉を5g測りとり、グリセリンを20g添加後、ポリトロンで破碎し、NIRで測定した。測定はSmart Near-IR UpDRIFTを取り付けた

Nicolet 6700 FT-IR(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)を用い、CaF<sub>2</sub>ビームスプリッター、InGaAs検出装置で1,000—2,500nmの範囲を解像度5nm、スキャン回数64で記録した。

得られたスペクトルデータをpredictor、SIを応答変数としてPLS回帰直線に供した。ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機で調製したサンプル全体をtraining set(検量線)、胴回転型製造用蒸熱機で調製したものをtest setとして、全く別の変数をPLS回帰直線で予測できるかどうかの確認を行った。算出された2つの潜在変数を用いてPLS回帰直線を作成した結果、 $R^2$ 、 $Q^2$ 値の値はそれぞれ0.928及び0.858となった。 $R^2$ はモデルの直線性、 $Q^2$ はモデルの予測性能を示し、 $Q^2$ はcross-validationにより算出される。Test setとして胴回転型製造用蒸熱機で調製したサンプルを導入したところ、Fig 4に示すようになった。Root mean square error of estimation(RMSEE)が0.0664であったのに対し、root mean square error of prediction(RMSEP)は0.2470であり、精度良い推定モデルが構築できた。

本研究では、スペクトルデータを用いたパターン認識によるメタボリックフィンガープリンティング技術がSI推定モデルの構築を可能としたことを示した。当該研究を通して、ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機で蒸し時間を変化させて調製した茶葉サンプルと、胴

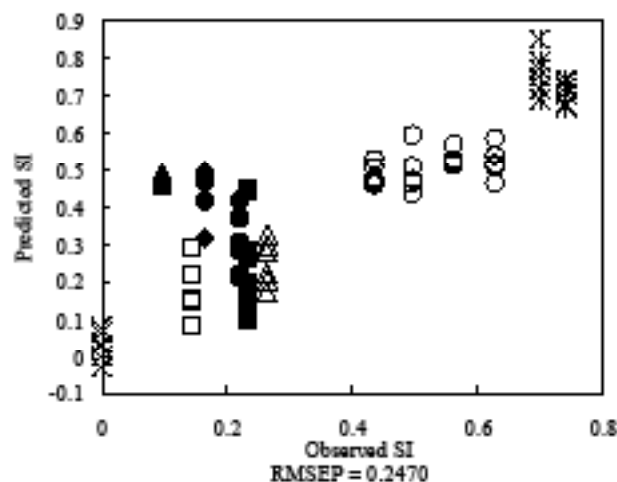


FIG. 4 PLS回帰直線によるSI予測モデル。モデルは2つの潜在変数を用いて作成した。横軸は実際のSI、縦軸は予測SIを示す。

凡例: ×、0秒; □、30秒; △、60秒; ○、90、120、150、180秒; \*、210、240秒; ●、2度; ■、3度; ◆、5度; ▲、6度。黒印は胴回転型製造用蒸熱機で調製したサンプルを示し、これらをtraining setとした。その他はベルトコンベヤー型試験用蒸熱機で調製したサンプルを示し、これらをtest setとした。

回転型製造用蒸熱機で各操作変数を変化させて調製した茶葉サンプルをSIという別指標で置き換えて表現することで、ベルトコンベヤー型試験用蒸熱機の唯一の操作変数である時間と、胴回転型製造用蒸熱機の操作変数の一つである胴傾斜角との相関関係を見出し、SIを指標としたPLS予測モデルを構築することができた。胴回転型製造用蒸熱機には多数の操作変数があり、それらが互いに複雑に影響を及ぼすが、当該研究より、どのような操作変数を組み合わせると茶葉を調製したとしても、PLS予測モデルを用いてSIが推定可能であることが示唆された。また、PLS予測モデルを構築する際、測定装置として、操作が簡便で低コストであり、かつ測定時間の短い実用的なFT-NIRを採用した。当該手法により、茶葉のSIを迅速に推定することが可能となった。科学的にSIを推定できることは、長年の経験を積んだり、若い人材を育成したりする時間の削減にもつながる。さらに、熟練の技術が必要としないため、だれでも再現性の高い評価が可能である。以上より、当該技術を用いて中間工程品をSIという無次元数で制御することでより良い品質の緑茶を効率よく製造することができ、当該研究は製茶業界に大いに役立つと期待できる。

#### <参考文献>

- [1] Yamaguchi, Y.: Quality evaluation of Japanese green tea. Proceedings of vegetable and tea science., 3, 129-134 (2006).
- [2] Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., and Kobayashi, A.: Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. J. Agric. Food Chem., 55, 231-236 (2007).
- [3] Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: Quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic fingerprinting. J. Agric. Food Chem. 56, 744-750 (2008).
- [4] Lucksanaporn, T., Osawa, M., and Fukusaki, E.: <sup>1</sup>H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. J. Agric. Food Chem., 55, 9330-9336 (2007).
- [5] Ikeda, T., Kanaya, S., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: Prediction of Japanese green tea ranking by Fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 55, 9908-9912 (2007).
- [6] Shibata, Y.: Theory and practice of tea processing by machineries. Nobunkyo. p. 22-31 (2006). (in Japanese)
- [7] Yonetani, T., and Nakanishi, Y.: Effects of storage on determination of conversion ratio of chlorophyll to pheophytin in steamed tea leaf. Bull. Nara Agr. Exp. Sta. 39, 37-38 (2008).



第一三共株式会社  
薬物動態研究所勤務

(応用生物 平成19年卒業 21年前期)

### 住所変更等のご連絡はお早めに!!

住所変更等の変更が生じた場合は、E-mail・FAX・郵送・電話により、なるべく早く事務局までお届け下さい。

FAX・郵送の場合は、封筒の『変更届』に必要事項をご記入の上、お送り下さい。

E-mailの場合は、『変更届』の内容を直接メールにご記入いただくか、メールで様式をご請求下さい。

従来どおり、お電話でも承っております。

\*市町村合併や住居表示変更の場合も、一定期間を経過しますと、「宛所に尋ねあたらず」として返送されます。

\*ご自宅はそのままの場合でも、ご本人のみ転送届が出されていますと、1年経過後に転送期間切れで返送されます。転送期間が切れる前にお忘れなく、ご連絡下さい。

『変更届』は、工業会会員データを正しく更新するためのもので、他の目的には使用いたしません。

テクノネット「会員動静」欄への掲載についても、ご本人の意思確認ができたもののみ掲載いたしますので、『変更届』送付の際は、必ず掲載の可・不可をご記入下さい。