

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2009年10月1日(01.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/119111 A1

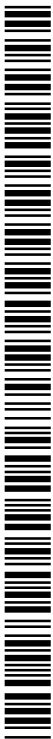
- (51) 国際特許分類:  
C12P 17/16 (2006.01) A23F 3/16 (2006.01)  
A23F 3/08 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/001393
- (22) 国際出願日: 2009年3月27日(27.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-087500 2008年3月28日(28.03.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 静岡県公立大学法人 (SHIZUOKA PREFECTURAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒4228021 静岡県静岡市駿河区小鹿二丁目2番1号 Shizuoka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 竹元万壽美 (TAKEMOTO, Masumi) [JP/JP]; 〒4228526 静岡県静岡市駿河区谷田52番1号 静岡県公立大学法人 静岡県立大学内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 大野聖二, 外 (OHNO, Seiji et al.); 〒1006036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号
- 震が関ビル36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: MANUFACTURING METHOD FOR THEAFLAVINS, USING RAW TEA LEAVES

(54) 発明の名称: 生茶葉を用いたテアフラビン類の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for cheaply and easily producing theaflavins. After adding a large quantity of water to raw tea leaves that have not undergone wilt treatment, the tea leaves are crushed in a blender and then let stand, shaken, or agitated, thereby efficiently converting four types of catechins in the raw tea leaves to theaflavins. After adding water and crushing the raw tea leaves, letting the tea leaves stand allows theaflavins to be selectively obtained with high yield. Shaking the raw tea leaves which have had water added and been crushed allows four types of theaflavins to be obtained with high yield. The generated theaflavins can be easily collected using a method such as extraction by organic solvent.

(57) 要約: テアフラビン類を安価かつ簡単に製造する方法が開示される。萎凋処理前の生茶葉に大量の水を加えミキサーで破碎後、静置または振とうまたは攪拌することにより、茶生葉中の4種類のカテキン類を効率よくテアフラビン類に変換することができる。水を加えて破碎した生茶葉を静置すると、テアフラビンを選択的に高収率で得ることができる。また、水を加えて破碎した生茶葉を振とうすると、4種類のアフラビン類を高収率で得ることができる。生成したテアフラビン類は有機溶媒による抽出などの方法により容易に回収することができる。



WO 2009/119111 A1

## 明 細 書

### 生茶葉を用いたテアフラビン類の製造方法

#### 技術分野

##### [0001] 関連する出願

本出願は、日本特許出願2008-87500（2008年3月28日出願）に基づく優先権を主張しており、この内容は本明細書に参照として取り込まれる。

##### [0002] 技術分野

本発明は、テアフラビン類の製造方法に関する。

#### 背景技術

[0003] 紅茶の赤色色素であるテアフラビン類は、紅茶中に約1%含まれており、主としてテアフラビン(TF)、テアフラビン3-O-ガラート(TF3-G)、テアフラビン3'-O-ガラート(TF3'-G)、テアフラビン3,3'-ジ-O-ガラート(TFDG)の4種類がある。

[0004] テアフラビン類には、抗菌作用、抗酸化作用、血糖降下作用、抗腫瘍活性、血小板凝集抑制作用、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する効果など、さまざまな生理作用のあることが知られており、天然着色料としてだけでなく、生理活性物質としても有用であると考えられる。

[0005] テアフラビンの合成法としては、これまでに、フェリシアン化カリウムを用いる方法（非特許文献1）、酵素試料（やぶきた若葉の水不溶画分）を用いる方法（非特許文献2）、茶葉から得たポリフェノールオキシダーゼを用いる方法（非特許文献3）、各種果実ホモジネート体を用いる方法（非特許文献4）、緑茶抽出液とポリフェノール酸化酵素を含有する植物抽出液とを用いる方法（特許文献1）、西洋ワサビペルオキシダーゼを用いる方法（非特許文献5）、加工緑茶葉とポリフェノールオキシダーゼとを接触させる方法（特許文献2）、緑茶のスラリーをタンナーゼで処理し、アルゴン又は窒素雰囲気下発酵させる方法（特許文献3）、生葉の搾汁を発酵させることに

より得る方法（非特許文献6）などが報告されている。しかし、いずれの方法もテアフラビン類の収率が低い。また、エピカテキンとエピガロカテキンを原料とし、ペルオキシダーゼを含有する植物培養細胞と過酸化水素を用いる方法（特許文献4）や、加工茶葉の水溶液に茶培養細胞と過酸化水素を添加する方法（特許文献5）もあるが、高価な原料や酵素を使用する必要があった。

[0006] 本明細書において引用される参考文献は以下のとおりである。これらの文献に記載される内容はすべて本明細書に参照として取り込まれる。

特許文献1：特開2002-95415

特許文献2：特表2005-523242

特許文献3：特開平11-225672

特許文献4：特開2007-143461

特許文献5：特願2007-182217（未公開）

非特許文献1：Yoshinori Takino, Hiroshi Imagawa, *Agr. Biol. Chem.*, 27, 319-321 (1963)

非特許文献2：滝野慶則、今川弘、*農化*、37, 417-422 (1963)

非特許文献3：Alastair Robertson, Derek S. Bendall., *Phytochemistry*, 22, 883-887 (1983)

非特許文献4：Takashi Tanaka, Yayoi Betsumiya, Chie Mine, Isao kouno, *Chem. Commun.*, 2000, 1365-1366

非特許文献5：Shengmin Sang., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 459-467 (2004)

非特許文献6：J. Food. ENG., 82, 276-283 (2007)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、テアフラビン類を安価かつ簡単に製造する方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者は、萎凋処理前の生茶葉に大量の水を加えミキサーで破碎後、静置または振とうまたは攪拌することにより、茶生葉中の4種類のカテキン類を効率よくテアフラビン類に変換しうることを見いだした。すなわち、本発明は、テアフラビン類の製造方法であって、生茶葉に水および／または緑茶葉抽出液を加えて破碎し、静置または振とうまたは攪拌により培養した後に培養物からテアフラビン類を回収することを特徴とする方法を提供する。
- [0009] 本発明の1つの態様においては、水および／または緑茶葉抽出液を加えて破碎した生茶葉を24時間から120時間静置する。このことにより、カテキン類を効率よくテアフラビン類に変換させるとともに、テアフラビン3-*O*-ガレート、テアフラビン3'-*O*-ガレート、テアフラビン3, 3'-ジ-*O*-ガレートと比較して、テアフラビンを高収率で得ることができる。
- [0010] 本発明の別の態様においては、水および／または緑茶葉抽出液を加えて破碎した生茶葉を10分間から1時間振とうする。このことにより、カテキン類を効率よくテアフラビン類に変換させるとともに、テアフラビン、テアフラビン3-*O*-ガレート、テアフラビン3'-*O*-ガレート、テアフラビン3, 3'-ジ-*O*-ガレートの4種類の混合物を得ることができる。
- [0011] 本発明の別の態様においては、水および／または緑茶葉抽出液を加えて破碎した生茶葉を10分間から8時間スターラーにて攪拌する。このことにより、カテキン類を効率よくテアフラビン類に変換させるとともに、テアフラビン、テアフラビン3-*O*-ガレート、テアフラビン3'-*O*-ガレート、テアフラビン3, 3'-ジ-*O*-ガレートの4種類の混合物を高収率で得ることができる。攪拌のスピードをコントロールする事によりテアフラビンを選択的に得るか、または4種類のテアフラビンの混合物を得るか選択する事が可能である。
- [0012] 好ましくは、生成したテアフラビン類は、有機溶媒による抽出、クロマト分離、反応混合物からカフェインと没食子酸を昇華させること、または反応水溶液の温度を適宜に変える事により分別再結晶させることにより回収する。より好ましくは、反応水溶液中のカフェインをクロロホルムで抽出したの

ち、テアフラビン類を酢酸エチルなどの有機溶媒で抽出する。別の態様では、テアフラビン類はカフェインと没食子酸とともに回収される。

### 発明の効果

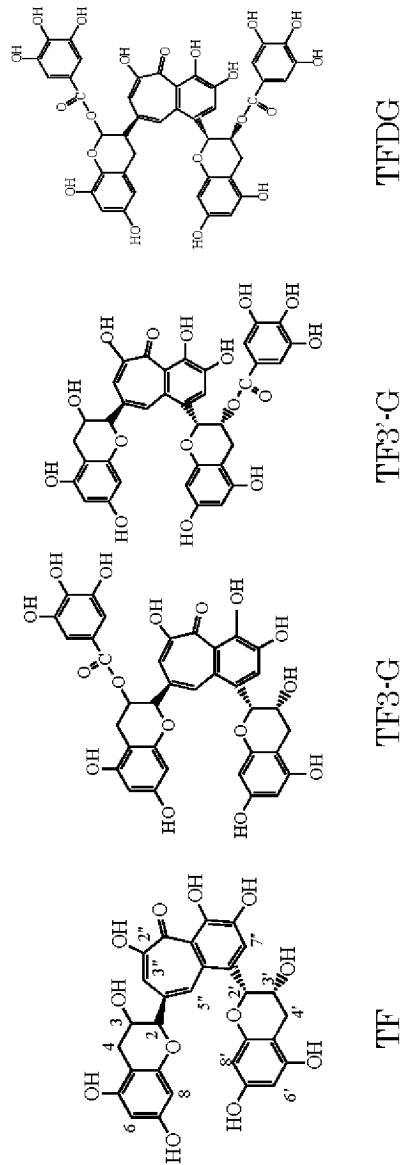
[0013] 本発明の方法によれば、極めて安価かつ簡単な方法により、テアフラビン類を効率よく製造することができる。また、培養条件を調節することにより、テアフラビンを選択的に製造するか、4種類のテアフラビン類を製造するかを選択することができる。

### 発明を実施するための形態

[0014] テアフラビン類

テアフラビン類には、主に下記に示す4種類がある。

[化1]



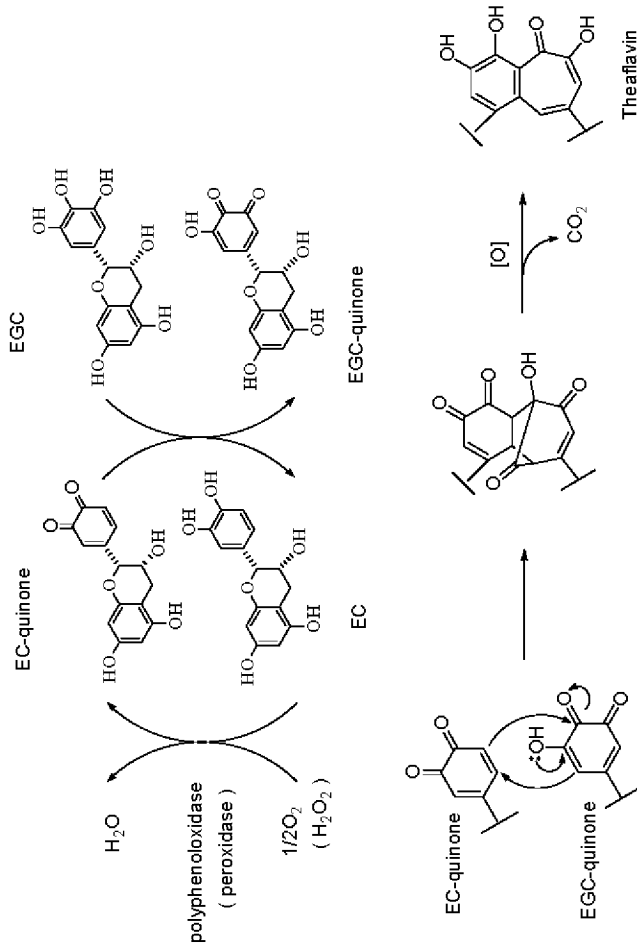
テアフラビン類の化学構造

[0015] 紅茶葉のテアフラビン類の含有比率は、テアフラビン(TF) 0.08%、テアフラビン3-O-ガレート(TF3-G) 0.3%、テアフラビン3'-O-ガレート(TF3'-G) 0.2%、テアフラビン3,3'-ジ-O-ガレート(TFDG)0.4%である。

[0016] テアフラビンの生合成経路

テアフラビンの生合成経路は下記のとおりである (Takashi Tanaka, Chie Mine, Kyoko Inoue, Miyuki Matsuda and Isao Kouno, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 2141-2148)。

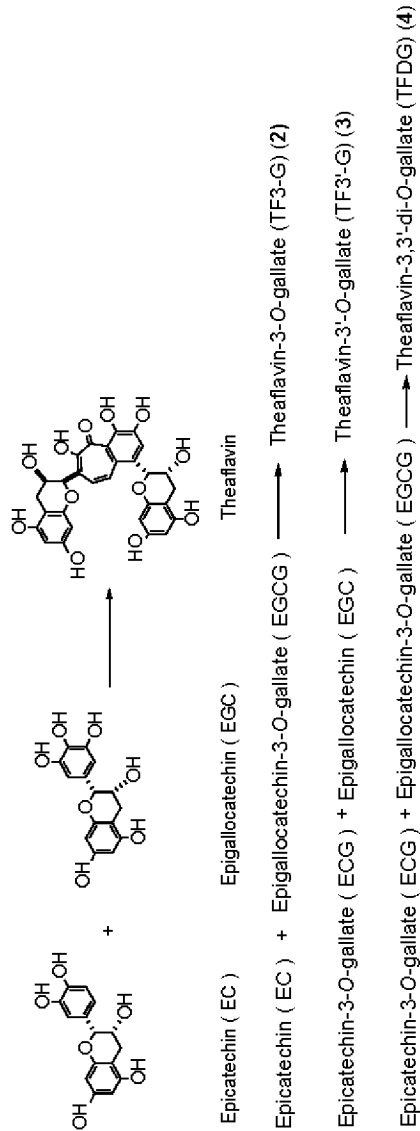
[化2]



[0017] まず、EC（エピカテキン）が、茶葉中のポリフェノールオキシダーゼまたはペルオキシダーゼにより速やかに酸化されてEG-キノンとなり、つづいてEC-キノンはEGC（エピガロカテキン）を酸化して、EGC-キノンを生成させる。これらの酸化過程で得られたEGC-キノンのEC-キノンへのマイケル付加、つづくカルボニル付加により3員環中間体を生成し、つづいて酸化、脱炭酸を経てトロポノイド骨格を形成し、テアフラビンが生成される。

[0018] 茶葉中には主として4種類のカテキン〔EC、EGC、ECG（エピカテキンガレート）、EGCG（エピガロカテキンガレート）〕が存在し、紅茶の製茶工程、いわゆる発酵工程では、上記と同様の経路にて、以下のカテキンの組み合わせにより、4種類のアフラビン類（TF、TF3-G、TF3'-G、TFDG）が生成される。

[化3]



[0019] 紅茶葉中の4種類のアフラビン類の割合は、原料となるカテキンの含量により左右される。紅茶葉中のアフラビン（TF）の割合が全アフラビン中8%と低いのはエピカテキンの含量が他のカテキンに比べ低いためである。4種類のアフラビン類の中でアフラビン（TF）は紅茶の紅色が鮮やかであるため、TFの含量が高い程、高価な紅茶葉である。

[0020] 原料

本発明の方法において使用する生茶葉とは、収穫後、萎凋処理をする前の茶葉をいい、好ましくは茶葉を破碎処理せずに用いる。茶葉とは茶の葉及び茎であり別々に使っても良いし、あわせて使用してもよい。原料となる生茶



葉としては、一般に栽培されている緑茶品種および紅茶品種のいずれの茶葉も用いることができる。生茶葉は、採取直後に冷凍して使用しても良い。茶葉の採取時期は、1番茶、2番茶、3番茶、4番茶のいずれでも良い。ただし、それぞれの葉ごとにカテキン量、ポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、タンナーゼ、加水分解酵素の活性が異なるため、高収率を得るために反応条件を適宜調節することが好ましい。価格、カテキン量、酵素活性等を総合的に判定すると、本発明の方法において用いる茶葉としては2番茶および3番茶が望ましい。

[0021] 茶葉の品種の違い

日本で栽培されている代表的な茶葉としては、あさつゆ、やぶきた、やまとみどり、まきのはらわせ、かなやみどり、おくみどり、おおいわせ、おくひかり、めいりよく、さみどり、こまかげ、やまなみ、みねかおり、はつもみじ、紅富貴、紅ほまれ、べにひかり等があり、本発明の方法では世界中で栽培されている茶葉のいずれをも好適に用いることができる。例えば、やぶきた茶は緑茶品種、紅富貴および紅ほまれば紅茶品種である。これらの茶葉に含まれる主なカテキン類は以下のとおりである。

やぶきた茶：EGCG, ECG, EGC, EC

紅富貴：EGCG, ECG, EGC, EC, エピガロカテキン3-(3"-0-メチル)ガレート (EGC3" methyl), エピガロカテキン3-(4"-0-メチル)ガレート (EGC4" methyl), エピカテキン3-(3"-0-メチル)ガレート (EC3" methyl),

紅ほまれ：EGCG, ECG, EGC, EC, EGC3" methyl, EGC4" methyl, EC3" methyl

[0022] 紅富貴および紅ほまれには、やぶきた茶には含まれていないEGC3" methyl, EGC4" methyl, EC3" methyl が存在する。これらの成分は花粉症に有効とされる抗アレルギー物質である。紅富貴及び紅ほまれば紅茶品種であるため、従来の紅茶製法で製茶した場合、EGC3" methyl, EGC4" methyl, EC3" methyl の成分は消失してしまう。

[0023] 1番茶から4番茶等、茶葉の収穫時期による相違

やぶきた1番茶、2番茶及び3番茶を用いた場合、葉を摘み取った後または冷凍庫で冷凍した後、すぐミキサーで破碎し、静置または振とう、または攪拌することができる。しかしやぶきた4番茶の場合、同様の方法ではテアフラビン類の生成量は低かった。これは、4番茶は1番茶、2番茶及び3番茶に比べポリフェノールオキシダーゼやペルオキシダーゼの酵素活性が低いため、あるいはカテキン量が低いためであると考えられる。また、そこで葉を摘みとったのち、2日から5日間程、室温下放置後、同様の操作を行うことが望ましい。またカテキン量が低く、テアフラビン類の生成量が低い場合、2日から5日間程、室温下放置後、葉に水と番茶抽出液（番茶に水を加え抽出した液）を加え同様の操作を行うことが望ましい。

#### [0024] テアフラビン類の製造法

本発明の方法においては、萎凋処理前の生茶葉に水を加え、ミキサー等を用いて生茶葉を破碎した後、分離せずに静置または振とうまたは攪拌する。生茶葉に水を加えて破碎すると、茶葉の細胞中に存在するポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、タンナーゼ、加水分解酵素、さらに各種茶の成分カテキン類、カフェイン等の成分が水中へ浸出される。これらの酵素及び成分が浸出された液を静置または振とうまたは攪拌すると、これらの酵素の作用により、カテキン類の全てがテアフラビン類に変換されると共に没食子酸が生成される。ペルオキシダーゼは過酸化水素存在下、テアフラビンを生成させる酵素である。この場合、過酸化水素は代謝により生成されるので、外から添加しなくてもよい。一方、ポリフェノールオキシダーゼは、酸素存在下、テアフラビン類を生成させる酵素である。タンナーゼは、カテキン類およびテアフラビン類のガレート基を切断することができる。また、ガレート基は加水分解酵素の作用によっても切断される。

#### [0025] 静置法

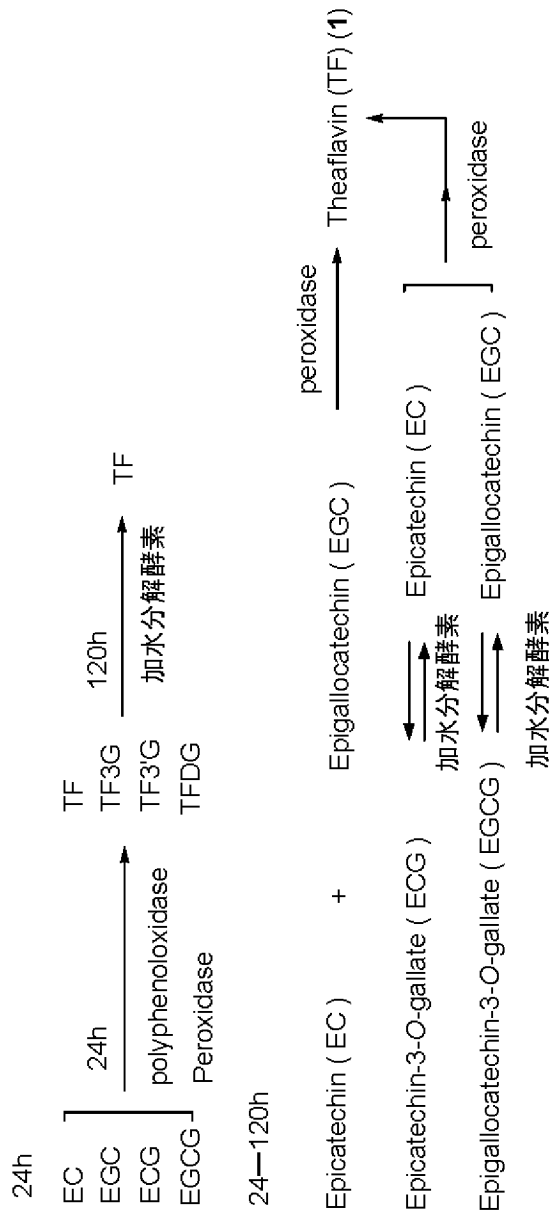
本発明の1つの態様においては、生茶葉に水を加えて破碎した後、固液を分離せずに所定時間静置する。採取直後のやぶきた茶の二番茶の生葉に水を加えミキサーにて1分破碎した後、24時間静置したところ、TF、TF3

G, TF3'GおよびTFDGが生成した（実施例1）。120時間静置すると全てのカテキン類がテアフラビン(TF)に変換した（実施例2）。一方、ミキサーにて破碎した後に振とうすると、他のテアフラビン類の生成率が高くなった（実施例7）。

[0026] 本発明では、生茶葉に水を加え破碎すると、ポリフェノールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、加水分解酵素、さらに各種茶の成分カテキン類、カフェイン等の成分が水中へ浸出される。これらの酵素及び成分が浸出された液を静置させた場合、振とう法に比べ酸素の供給が断たれるため、テアフラビン生成に関わるポリフェノールオキシダーゼとペルオキシダーゼのうち、ポリフェノールオキシダーゼの作用が低い（ポリフェノールオキシダーゼは酸素存在下酸化反応を触媒するため、静置法では水中の溶存酸素が消費されれば働けない）。このため、24時間静置では、TF3G, TF3'G, TFDGは生成するが、振とう法に比べ他のテアフラビン類の生成率は抑えられたと考えられる（実施例1と7の比較）。一方120時間放置すると、酸素供給が絶たれているためペルオキシダーゼが主として作用するとともに、加水分解酵素が働き、24時間の反応で得られたTF3G, TF3'G, TFDGの加水分解反応が進行し、全てTFに変換する（実施例1と2の比較）。さらにこの時、次のような反応も進行すると考えられる。まず、EGとEGCよりペルオキシダーゼの酵素反応によりTFが生成する。一方、TFに関与しないECG及びEGCGは、タンナーゼあるいは加水分解酵素によりガレート基が切断され、EC及びEGCに変換された後、ペルオキシダーゼによりTFへと変換される。加水分解反応は平衡反応であるが、加水分解により得られたEC及びEGCはペルオキシダーゼによりテアフラビンに変換するため、EC及びEGCの消費に伴い平衡反応は右に傾き、ECG及びEGCGの加水分解反応は完全に進行して、120時間後では4種類のカテキンが全てテアフラビン(TF)に変換した。

[0027]

[化4]



[0028] 静置時間は、使用する茶葉の種類、含有水分、保存状態等によって異なるが、好ましくは12時間以上、より好ましくは24時間以上、さらにより好ましくは120時間以上である。静置時間の上限は特になく、テアフラビン類の生成をモニターしながら、適当な時期に反応を終了させることができる。静置温度は、酵素が作用する温度範囲内であれば特に制限はなく、例えば10℃から40℃、好ましくは20℃から30℃である。

[0029] 振とう法

本発明の別の態様においては、生茶葉に水を加えて破碎した後、固液を分

離せずに所定時間振とうする。萎凋処理前の生茶葉に大量の水を加えミキサーで1分から5分間破碎後、10分から1時間振とうすると、茶生葉中の4種類のカテキン類が全て4種類のテアフラビン類に変換する。振とうすることにより、ポリフェノールオキシダーゼとペルオキシダーゼが共に作用するため、テアフラビン、テアフラビン3-O-ガラート、テアフラビン3'-O-ガラート、テアフラビン3, 3'-ジ-O-ガラートの4種類の混合物を得ることができる。

[0030] 振とう時間は、使用する茶葉の種類、含有水分、保存状態等によって異なるが、好ましくは3分間から2時間、より好ましくは10分間から1時間である。カテキン類がテアフラビン類に変換した後にさらに振とうを続けると、テアフラビン類がポリマー化していくため、収量の低下が顕著である。最適な振とう時間は用いる茶葉により異なり、当業者は容易に条件を最適化することができる。振とう温度は、酵素が作用する温度範囲内であれば特に制限はなく、例えば10℃から40℃、好ましくは20℃から30℃である。

[0031] 攪拌法

本発明の別の態様においては、生茶葉に水を加えて破碎した後、固液を分離せずに所定時間攪拌を行う。攪拌は、ミキサー、スターラー、回転板、ボトルローラーなどを用いて空気が液体中に巻き込まれないような速度で運転することにより行うことができる。萎凋処理前の生茶葉に大量の水を加えミキサーで1分から5分間破碎後、10分から8時間攪拌すると、茶生葉中の4種類のカテキン類が全て4種類のテアフラビン類に変換する。空気の巻き込みに注意して非常にゆっくり攪拌すると全てのカテキン類がテアフラビン(TF)に変換した(実施例10)。攪拌速度をあげると空気の巻き込みがおこるため他のテアフラビン類の生成率が高くなった(実施例11)。攪拌法は静置法に比べ反応の時間を非常に短くすることができるという利点を有する。

[0032] 茶葉の破碎条件

破碎は0℃から30℃の温度で行うことができる。ミキサーによる破碎時

間を3分にすると、1分に比べ、テアフラビン類の含量が大幅に増えた。その後静置し、24時間と120時間でテアフラビン類の含量を測定したところ、120時間後では24時間後に比べTF3G, TF3' G, TFDGの含量は減ったが、実施例2のように完全にTFに変換できなかった。この理由として、3分の振とうではTF3G, TF3' G, TFDGの含量が増えたため、120時間の加水分解では完全に加水分解反応が進行しなかったと思われる。この場合さらに長時間静置する必要がある。もしくはEGCG及びECGは加水分解されやすく、TF3G, TF3' G及びTFDGは加水分解されにくいいため、120時間の加水分解では3分の振とうにより増大したTF3G, TF3' G及びTFDGの加水分解を完全に進行させることが出来なかったと考えられる(実施例2と4と5の比較)。なお、ここでいうミキサーとは容量約700~1000ml、出力200~300W程度の家庭用のミキサー(ブレンダー)であり、工業生産用にスケールアップして本発明を実施する場合には、当業者は、用いる機械と処理量に応じて適切な破碎時間を設定することができる。本発明の方法に用いることができる工業生産用ミキサーの例は、容量約4000ml、出力1400W程度の業務用のミキサー(ブレンダー)であり、回転数は高速(18,500rpm)、中速(16,300rpm)、低速(14,000rpm)である。さらに大量のスケールで行う場合は特注のブレンダーを使うか、茶葉の量に合わせミキサー操作を繰り返しても良い。生茶葉の破碎は破碎できればどのような機械でも使用可能であり、例えばミキサー、ウルトラマイザー、ハンマーミル、ホモゲナイザーなどを使用できるが特にミキサー(ブレンダー)が好ましい。

#### [0033] 水の量

生茶葉に加える水の量は、使用する茶葉の種類、含有水分、保存状態等によって適宜選択することができるが、好ましくは生茶葉1gに対して5mlから500ml、より好ましくは7mlから200ml、さらに好ましくは10mlから100mlである。5mlより少ないと、収率が低下し、500mlより多いと、酵素反応の効率および生成物の精製効率が低下する。水の量を大量にした

場合、テアフラビンまたはテアフラビン類の含量が増大した（実施例 2 と 3 の比較、実施例 5 と 6 の比較）。

[0034] 緑茶葉抽出液

生茶葉中のカテキン量は限られているため、テアフラビン類の収量をさらに高めるためには、生茶葉または冷凍生茶葉に水と緑茶抽出液を加え同様の操作を行うことが望ましい。緑茶抽出液としては、加熱処理した緑茶葉に水を加え抽出した液、加熱処理した緑茶葉に水を加え抽出し濃縮した茶エキスに水を添加した液、茶抽出物に水を添加した液などの、4種類のカテキン類が含まれている水溶液を用いることができる。この場合、生茶葉中の酵素の作用により、生茶葉に含まれるカテキン類と緑茶抽出液に含まれるカテキン類との両方を効率よくテアフラビンに変換でき、より高含量のテアフラビンまたはテアフラビン類を得ることができる。

[0035] 精製

得られたテアフラビン類は、反応水溶液を有機溶媒で抽出することにより容易に高純度で回収することができる。例えばクロロホルムでカフェイン (caffeine) を抽出して除去したのち、酢酸エチル、エーテルなどの有機溶媒で抽出することにより、テアフラビン類を高純度で得ることができる。クロマト分離によっても高純度で回収することができる。反応混合物からカフェインと没食子酸を昇華させてテアフラビン類を高純度で回収することができる。反応水溶液の温度を適宜に変える事により分別再結晶によりテアフラビン類を高純度で回収することもできる。以上はテアフラビン類を高純度で得る方法について述べたが、用途によってはテアフラビン類を単離せず、カフェイン及び没食子酸を含む混合物で用いる事も可能である。その場合は従来良く知られた技術、例えばスプレードライ法、凍結乾燥法などを用いて水を除去すれば良い。生成したテアフラビン類の種類および量は、定法にしたがって HPLC 等を用いて測定することができる。

[0036] 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書に参照として取り込まれる。

## 実施例

[0037] 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。下記の実施例においては、EC, ECG, EGC, EGCG, TF, TF3G, TF3' GおよびTFDGの分析にはHPLC装置 (JASCO(株)、PU-980、UV-970) とODS120A(TOSO, 4.6mm×250mm) カラムを用いた。HPLCの条件は溶媒 : アセトニトリル : 酢酸エチル : 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> =21:3:76、流速 ; 1.0ml/min、温度 ; 25℃である。検出は、UV280nmでおこなった。それぞれ検量線を作成し測定した。

### [0038] 実施例1

7月18日採取やぶきた茶葉9.55gに蒸留水100mlを加え、家庭用ミキサーにて1分間破碎後、100ml三角フラスコに移しアルミホイルにてふたをし24時間静置後吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLCで分析した。100g生葉に換算するとTF 75.2 mg (0.075%), TF3G 14.0mg (0.014%), TF3' G 8.0 mg (0.008%), TFDG 3.9mg (0.004%), EGCG 3.9g (3.9%), ECG 81mg (0.081%), caffeine 499.7 mg (0.5%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し、テアフラビン類を11mg(茶葉9.55gあたり)得た。

### [0039] 実施例2

7月18日採取やぶきた茶葉9.55gに蒸留水100mlを加え、家庭用ミキサーにて1分間破碎後、100ml三角フラスコに移しアルミホイルにてふたをし120時間静置する。吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLCで分析した。100g生葉に換算するとTF 444.8 mg (0.44%), caffeine 440 mg (0.44%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し、テアフラビンを46 mg (茶葉9.55gあたり)得た。

### [0040] 実施例3

7月18日採取やぶきた茶葉9.55gに蒸留水800mlを加え、家庭用ミキサーにて1分間破碎後、1000ml三角フラスコに移しアルミホイルにてふたをし120時間静置する。吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLC分析した。100g生葉に換算す



るとTF 850 mg (0.85%), caffeine 435 mg (0.44%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し、テアフラビンを 79 mg (茶葉9.55gあたり)得た。

[0041] 実施例4

7月18日採取やぶきた茶葉10.91gに蒸留水100mlを加え、家庭用ミキサーにて3分間破碎後、100ml三角フラスコに移しアルミホイルにてふたをし24時間静置後吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLCで分析した。100g生葉に換算するとTF 289 mg (0.29%), TF3G 70mg (0.07%), TF3' G 42 mg (0.042%), TFDG 34mg (0.034%), EGCG 3.1g (3.1%), ECG 40.3mg (0.04%), caffeine 355 mg (0.36%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し、テアフラビン類を 42 mg (茶葉10.91gあたり)得た。

[0042] 実施例5

7月18日採取やぶきた茶葉10.91gに蒸留水100mlを加え、家庭用ミキサーにて3分間破碎後、100ml三角フラスコに移しアルミホイルにてふたをし120時間静置する。吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLC分析した。100g生葉に換算するとTF 402 mg (0.4%), TF3G 29.3mg (0.029%), TF3' G 14.9 mg (0.015%), TFDG 9.1mg (0.009%), caffeine 307 mg (0.31%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し、テアフラビン類を 53 mg (茶葉10.91gあたり)得た。

[0043] 実施例6

7月18日採取やぶきた茶葉9.70gに蒸留水800mlを加え、家庭用ミキサーにて3分間破碎後、1000ml三角フラスコに移しアルミホイルにてふたをし120時間静置する。吸引ろ取を行い得られたろ液をガラスビンに移し、アルミホイルでふたをした後、HPLC分析した。100g生葉に換算するとTF 699 mg (0.7%), TF3G 89.5mg (0.09%), TF3' G 24.5 mg (0.025%), TFDG 38.3mg (0.038%), caffeine 435 mg (0.44%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し、テアフラビン類を 85 mg (茶葉9.70

gあたり)得た。

[0044] 実施例7

6月15日採取したやぶきた茶葉26.68gに蒸留水218mlを加え、家庭用ミキサーにて3分間破碎後、30分間振とう後、吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLC分析した。100g生葉に換算するとTF 176 mg (0.18%), TF3G 106 mg (0.11%), TF3' G 74.0 mg (0.074%), TFDG 106 mg (0.11%), caffeine 200 mg (0.20%), EGCG 0 g (0%), ECG 0 mg (0%)である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し4種類のテアフラビン類を 120 mg (茶葉26.68gあたり)得た。

[0045] 実施例8

7月23日採取した紅富貴二番茶10.00gに蒸留水100mlを加え、家庭用ミキサーにて5分間破碎後、5分間振とう (120rpm) した後、吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLCで分析した。100g生葉に換算するとTF 257 mg (0.26%), TF3G 92.7mg (0.093%), TF3' G 49.2 mg (0.049%), TFDG 48.1mg (0.048%), caffeine 495 mg (0.50%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し4種類のテアフラビン類を 41 mg (茶葉10.00 gあたり)得た。

[0046] 実施例9

10月7日採取したやぶきた茶葉を4日間室温下放置後の葉14.76gに蒸留水140mlを加え、家庭用ミキサーにて1分間破碎後、37分間振とう (120rpm) した後吸引ろ取を行い得られたろ液をHPLCで分析した。100g生葉に換算するとTF 132.4 mg (0.13%), TF3G 46.0mg (0.046%), TF3' G 33 mg (0.033%), TFDG 24mg (0.024%), caffeine 261 mg (0.26%) である。ろ液をクロロホルムで抽出した水相を酢酸エチルで抽出し4種類のテアフラビン類を 30 mg (茶葉 14.76 gあたり)得た。

[0047] 実施例1～9の結果を下記の表にまとめる。

[表1]

No	生葉	重量(g)	水(ml)	方法	TF (%)	TF 3G(%)	TF3G(%)	TFDG(%)	EGCG(%)	ECG(%)	Caffein(%)
実施例1	やぶきた	9.55	100	ミキサー1 min、 静置 24 h、	0.075	0.014	0.008	0.004	3.9	0.081	0.50
実施例2	やぶきた	9.55	100	ミキサー1 min、 静置 120 h、	0.44	0	0	0	0	0	0.44
実施例3	やぶきた	9.55	800	ミキサー1 min、 静置 120 h、	0.85	0	0	0	0	0	0.44
実施例4	やぶきた	10.91	100	ミキサー3 min、 静置 24 h	0.29	0.07	0.042	0.034	3.1	0.040	0.36
実施例5	やぶきた	10.91	100	ミキサー3 min、 静置 120 h、	0.40	0.029	0.015	0.009	0	0	0.31
実施例6	やぶきた	9.70	800	ミキサー3 min、 静置 120 h、	0.70	0.09	0.025	0.038	0	0	0.44
実施例7	やぶきた	26.68	218	ミキサー3 min、 振とう 30 min、	0.18	0.11	0.074	0.11	0	0	0.20
実施例8	紅富貴	10.00	100	ミキサー5 min、 振とう 5 min、	0.26	0.093	0.049	0.048	0	0	0.50
実施例9	4番茶 やぶきた	14.77	140	ミキサー1 min、 振とう 37 min、	0.13	0.046	0.033	0.024	0	0	0.26

## [0048] 実施例10

冷凍茶葉（6月25採取茶葉）200gに、加熱加工した4番茶（100g）を4リットルの水で抽出した液を加え、工業用ミキサー(High スピード)にて1分間破碎し、工業用スターラーで40分間水面が動かないように静かに攪拌した。粗濾過を行った後、得られたろ液をクロロホルムで抽出してカフェインを除去した後、水相を酢酸エチルにて抽出し、濃縮して、テアフラビン5.2g（

HPLC分析80%純度)を得た。

[0049] 実施例11

冷凍茶葉（6月25採取茶葉）100gに、加熱加工した4番茶（50g）を2リットルの水で抽出した液を加え、工業用ミキサー（High スピード）にて1分間破碎し、工業用スターラーで30分間水面の中央が渦ができる程度に激しく攪拌した。粗濾過を行った後、得られたろ液をクロロホルムで1回抽出した後、水相を酢酸エチルにて抽出し、濃縮して、テアフラビン類2.0g（HPLC分析：カフェイン9%，TF 24%，TF3G 18%，TF3' G 13%，TFDG 15%）を得た。

## 請求の範囲

- [1] テアフラビン類の製造方法であって、生茶葉に水および／または緑茶葉抽出液を加えて破碎し、静置または振とうまたは攪拌により培養した後に培養物からテアフラビン類を回収することを特徴とする方法。
- [2] 培養が24時間から120時間静置することにより行われる、請求項1記載の方法。
- [3] 培養が10分間から1時間振とうすることにより行われる、請求項1記載の方法。
- [4] 攪拌が10分から8時間スターラー攪拌することにより行われる請求項1記載の方法。
- [5] テアフラビン類の回収が有機溶媒による抽出により行われる、請求項1-4のいずれかに記載の方法。
- [6] テアフラビン類の回収がクロマト分離により行われる、請求項1-4のいずれかに記載の方法。
- [7] テアフラビン類の回収が反応混合物からカフェインと没食子酸を昇華させることにより行われる、請求項1-4のいずれかに記載の方法。
- [8] テアフラビン類の回収が反応水溶液の温度を適宜に変える事により分別再結晶させることにより行われる、請求項1-4のいずれかに記載の方法。
- [9] テアフラビン類がカフェインと没食子酸とともに回収される、請求項1-8のいずれかに記載の方法。
- [10] 生茶葉として茶葉の茎を用いる、請求項1-9のいずれかに記載の方法。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2009/001393

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12P17/16(2006.01)i, A23F3/08(2006.01)n, A23F3/16(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12P17/16, A23F3/08, A23F3/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-095415 A (Usaien Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 2002 (02.04.02), (Family: none)	1,3-10
X	JP 2005-523242 A (Nashai Biotech, L.L.C.), 04 August, 2005 (04.08.05), & US 2007/0098765 A1 & EP 1460999 A1	1,3-10
X	JP 11-225672 A (Unilever N.V.), 24 August, 1999 (24.08.99), & US 6113965 A1 & EP 0891973 A1	1,3-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 11 June, 2009 (11.06.09)	Date of mailing of the international search report 23 June, 2009 (23.06.09)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001393

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROBERTS, E. A. H. et al., The phenolic substances of manufactured tea. II. Their origin as enzymic oxidation products in fermentation J. Sci. Food Agric. (1958) Vol.9, pp.212-216	1,3-10
X	MILLIN, D. J. et al., Fermentation of tea in aqueous suspension, J. Sci. Food Agric. (1981) Vol.32, pp.905-919	1,3-10
Y	JP 2007-143461 A (Hamamatsu Foundation for Science and Technology Promotion), 14 June, 2007 (14.06.07), (Family: none)	1,2,5-10
Y	SINIJA, V. R. et al., Process technology for production of soluble tea powder, Journal of Food Engineering (2007) Vol.82, pp.276-283	1,2,5-10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001393

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

It appears that the technical feature common to the inventions as set forth in claims 1 to 10 resides in producing theaflavins by adding water to fresh tea leaves, milling the same and culturing. As described in documents 1 and 5 that are cited in the international search report, however, the preceding technical feature has been publicly known. Thus, it cannot be considered as a special technical feature making a contribution over prior art.

Therefore, it does not appear that the inventions as set forth in claims 1 to 10 are a group of inventions which are so linked as to form a single general inventive concept. Thus, it is (continued to extra sheet)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/001393

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

recognized that claims of the present application have the following two invention groups.

1. Claims 1, 2 and 5 to 10: a method of producing theaflavins by adding water to fresh tea leaves, milling the same and culturing by the stationary culture method, and inventions relating thereto.
2. Claims 1 and 3 to 10: a method of producing theaflavins by adding water to fresh tea leaves, milling the same and culturing by the shaken or agitation culture method, and inventions relating thereto.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P17/16(2006.01)i, A23F3/08(2006.01)n, A23F3/16(2006.01)n

B. 調査を行った分野  
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
 Int.Cl. C12P17/16, A23F3/08, A23F3/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの  
 日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2009年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2009年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2002-095415 A (ウサイエン製薬株式会社) 2002.04.02 (ファミリーなし)	1,3-10
X	JP 2005-523242 A (ナシャイ・バイオテック・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー) 2005.08.04 & US 2007/0098765 A1 & EP 1460999 A1	1,3-10
X	JP 11-225672 A (ユニリーバー・ナムローゼ・ベンノート・シヤープ) 1999.08.24 & US 6113965 A1 & EP 0891973 A1	1,3-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。  パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー                  「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献                  「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 11.06.2009	国際調査報告の発送日 23.06.2009
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	ROBERTS, E. A. H. et al., The phenolic substances of manufactured tea. II. Their origin as enzymic oxidation products in fermentation J. Sci. Food Agric. (1958) Vol.9, pp.212-216	1,3-10
X	MILLIN, D. J. et al., Fermentation of tea in aqueous suspension J. Sci. Food Agric. (1981) Vol.32, pp.905-919	1,3-10
Y	JP 2007-143461 A (財団法人浜松科学技術研究振興会) 2007.06.14 (ファミリーなし)	1,2,5-10
Y	SINIJA, V. R. et al., Process technology for production of soluble tea powder Journal of Food Engineering (2007) Vol.82, pp.276-283	1,2,5-10

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
  
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
  
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-10に記載された発明に共通する技術的特徴は、生茶葉に水を加えて破碎し、培養してテアフラビンを製造することであると認められるが、当該技術的特徴は国際調査報告に引用された文献1や5に記載されるように公知であるから、先行技術に対する貢献をもたらすものではなく、特別な技術的特徴であるとはいえない。

したがって、請求の範囲1-10に記載された発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、本願の請求の範囲には下記のとおり、2つの発明が記載されているものと認められる。

（特別ページに続く。）

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

(第 III 欄の続き)

1. 請求の範囲 1、2、5-10：生茶葉に水を加えて破碎し、静置により培養してテアフラビンを製造する方法及びそれに係る発明
2. 請求の範囲 1、3-10：生茶葉に水を加えて破碎し、振とうまたは攪拌により培養してテアフラビンを製造する方法及びそれに係る発明