

## 抄紙法により作製された緑茶の茶殻配合紙の抗菌性

島根大学教育学部 高橋哲也  
九州大学バイオアーキテクチャーセンター 笠井稚子・近藤哲男  
愛媛製紙株式会社 開発企画課 横田博志・国武哲則

### Antibacterial Activity of Compounded Papers using Wasted Green Tealeaves Produced by Paper-making Method

*Tetsuya Takahashi*<sup>\*1</sup>, *Wakako Kasai*<sup>\*2</sup>, *Tetsuo Kondo*<sup>\*2</sup>, *Hiroshi Yokota*<sup>\*3</sup>, and *Tetsunori Kunitake*<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup> Faculty of Education, Shimane University, 1060 Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan

<sup>\*2</sup> Bio-Architecture Center, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

<sup>\*3</sup> Ehime Paper Mfg. Co.,LTD, 370 Muramatsu-cho, Shikokuchuo, Ehime 799-0401, Japan

**Abstract**: Various studies were conducted to improve antibacterial properties of compounded papers using wasted green tealeaves prepared by a paper-making technique. The research included the elucidation of a cause of low antibacterial activity. Different binders and different degrees of grinding wasted tealeaves were tested with no effect on antibacterial properties of compounded papers using wasted green tealeaves. However, when a suspension of pulp and wasted tealeaves was air-dried and used to prepare a compounded paper, the compounded paper was found to have excellent antibacterial properties. The result indicated a cause for the low antibacterial activity of compounded papers using wasted green tealeaves prepared by the paper-making technique. That is, catechins abundant in wasted green tealeaves dissolved in water when ground and ran off with waste water during the paper-making process without settling in compounded papers. To confirm that, liquid from a mass-colloider used for wet-grinding wasted tealeaves was sampled and filtered. The filtrate was dropped onto a 100 wt% pulp paper. No viable bacterial cell was found in the pulp paper to which more than 1.0 ml/g of the filtrate was applied; the result showed that the liquid possessed good antibacterial properties. In other words, the liquid was confirmed to possess a high antibacterial activity. In paper making by the paper-making technique, aluminum sulfate was added to a suspension of pulp and ground, wasted tealeaves in order to readily settle catechins contained in liquid resulting from grinding wasted tealeaves in compounded papers using wasted tealeaves. The result revealed that a 2.70 wt% addition of aluminum sulfate to compounded papers using wasted green tealeaves improved antibacterial properties of the papers.

(Received 19 May, 2008 ; Accepted 31 July, 2008)

## 1. 緒言

近年、健康ブームによってPETボトル入り茶飲料の市場が増大し、それにとまって茶殻が産業廃棄物として多く排出されている。一方、茶には多くの有用成分が含まれており、とりわけカテキン類には抗菌活性[1,2]、抗酸化活性[3]、消臭性などの多機能を有することも知られている。著者らは茶殻の有効利用を目的に、抄紙法によってカテキンを生かした機能性を有する茶殻配合紙の作製を行っている。衛生材料などの用途を想定した場合、抗菌性を有することは様々な利点がある。種々の研究の結果、紅茶や焙じ茶の茶殻を用いた場合には、抄紙後の茶殻配合紙に優れた抗菌性を有することを明らかにした[4]。一方、緑茶の茶殻配合紙では、他種の茶殻配合紙に比べて抗菌性が明らかに劣っていた[4]。しかしながら、緑茶

であっても茶殻自体は他種に比べて抗菌性が劣るわけではなく、微量でも高い抗菌活性を有していた[4]。つまり、茶殻を抄紙する過程に原因があり、緑茶の茶殻配合紙の抗菌性が低くなったものと考えられる。そこで、本研究では緑茶に多く含まれている水溶性のカテキン類の抄紙工程[5]での溶出について注目して検討を行った。さらに、緑茶の茶殻配合紙の抗菌性向上を図るべく、カテキン類を茶殻配合紙に定着させやすくするために硫酸アルミニウムの添加も試みたので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 試料

#### 2.1.1 供試した茶葉

緑茶、ウーロン茶、紅茶、プーアル茶はいずれもツバ

キ科のチャ(学名 *Camellia sinensis*)の葉から作られるが、緑茶は摘み取った葉をできるだけ速やかに加熱して葉の中の酵素を不活化し、酸化を止めて作った茶葉である。その代表として最も一般的なものは、若芽を蒸した後、よく揉んで仕上げた煎茶である。本実験では、市販の国内産の緑茶(煎茶)である伊藤園株「おーいお茶」の茶葉を試料として用いた。

### 2.1.2 添加剤

抄紙時のパルプと茶殻の接着を向上させるため、アイカ工業株式会社製のSBR系のラテックスバインダー[5]であるアイカアイボンRAX117と、ポリアクリルアミドであるAE100を用いた。どちらもバインダーとしての役割は同じであるが、ラテックスバインダーは透水性がほとんど無く、ポリアクリルアミド[6,7]は透水性が高いという異なる特徴を持っている。また、水に溶解したカテキン類をパルプに定着させやすくするため、パルプ懸濁液に含有量26.8~27.4%の日本軽金属株式会社製の液体硫酸アルミニウム( $Al_2(SO_4)_3$ )水溶液を添加した。その際、添加量の表記は、茶殻配合紙中の硫酸アルミニウム自体の含有量で表すこととした。

### 2.1.3 供試菌株

黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* NBRC 12732)を独立行政法人製品評価技術基盤機構より入手し、抗菌性評価に用いた。黄色ブドウ球菌はグラム陽性の球菌であり、食中毒の原因菌であるほか、化膿性疾患の起因菌としても知られている。

### 2.2 茶殻の採取方法

ホーロー製鍋に注いだ蒸留水4リットルに対して茶葉400gを添加し、70℃で30分間煮出した。その後、目開きの細かなステンレス製金網で濾して茶殻を採取した。なお、煮出しの条件は、工業的に生産されている茶飲料の製造条件を基に設定した。

### 2.3 茶殻配合紙の作製方法

採取した緑茶の茶殻を増幸産業株式会社製スーパーマスコロイダー MKZA6(石臼式粉砕機)を用い、所定のクリアランスに調整して回転数1,800 rpm、処理速度30 kg/hにて湿式粉砕を行った[8]。そして、針葉樹晒クラフトパルプ、ラテックスバインダーと配合した。このとき、茶殻配合率が0, 20, 60wt%になるようにパルプと調整し、バインダーは全てのサンプルとも0.3wt%配合することとした。所定の配合率に調整した後、蒸留水を加えてミキサーで10秒間攪拌し、均一な分散スラリーを作製した。図1に示すテスター産業製角型シートマシン(型式PU-401)を用いて、JIS-P8209に従って坪量100 g/m<sup>2</sup>になるように注入量を調整して投入し、25×25cmの寸法にて抄紙した[9]。その後、室温下で410 kPaの圧力でプレスし、回転ドライヤーにより約120℃で乾燥して、茶殻配合紙を作製した[9]。なお、特に記載をしていないときは、マスコロイダーのクリアランスを40μmにして湿式粉砕を行った。また、硫酸アルミニウムを用いる場合には、粉

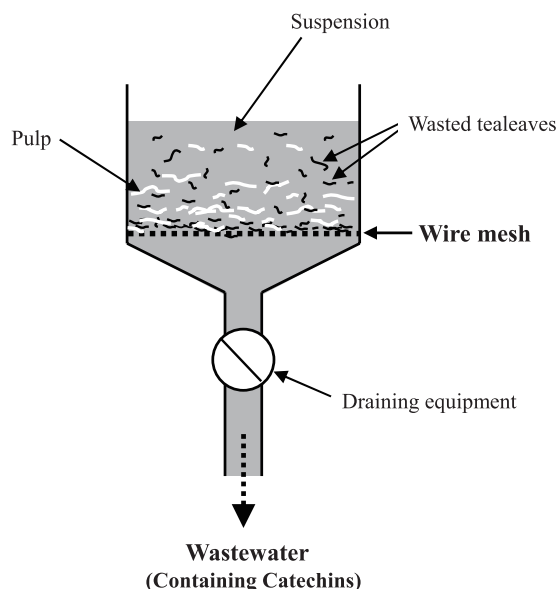


Fig. 1 The schematic representation of the paper machine.

砕した茶殻とパルプの懸濁液に対して所定量の硫酸アルミニウムを添加した後、バインダーを加えることとした。

### 2.4 測定方法

#### 2.4.1 抗菌性評価試験方法

JIS-L-1902を参考にして、抗菌性の評価試験を実施した。まずバイアル瓶に5×5mm程度に切断した茶殻配合紙0.20gを挿入し、トミー工業株式会社製オートクレーブBS-245型を用いて121℃で15分間滅菌した。その後、バイアル瓶の蓋を開放して乾燥させた。Becton Dickinson社製ペプトン(1.0wt%)とBecton Dickinson社製酵母エキス(0.5wt%)、およびマナック株式会社製塩化ナトリウム(0.5wt%)を用いてペプトン水を作製した。そのペプトン水を用いて黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus* NBRC 12732)を $1 \pm 0.3 \times 10^8$  CFU/mlに濃度調整した後、その懸濁液0.1mlを試料に接種して密栓した。そして、37±1℃に設定した恒温器内で18時間培養した。

培養後のバイアル瓶中に、マナック株式会社製塩化ナトリウム(0.85wt%)とSIGMA CHEMICAL社製Tween80(0.2wt%)を用いて調整した洗い出し用生理食塩水を10ml加え、菌を振とう分散させた。それらの試料の分散液に対して、マナック株式会社製塩化ナトリウム(0.85wt%)で作製した生理食塩水を用いて原液から10<sup>7</sup>倍にまで所定濃度に希釈した。日本製薬株式会社製マンニット食塩培地(顆粒)を用いて11.1wt%に調整した培地に、各々の濃度に希釈した菌液を接種した。その際、培地を4分割して1つの区画に同じ希釈濃度の菌液を5μlずつ5ヶ所に滴下する方法を採用した[10]。37±1℃の恒温器内で、シャーレを44時間倒置培養した。培養後の生育コロニー数を計測し、希釈倍数を乗じて生菌数を算出した。また、JIS-L-1902に準じて静菌活性値と殺菌活性値を求めた。その際、同じ量の硫酸アルミニウムを添加したパルプ紙を比較として計算を行った。

## 2.4.2 紙の水抽出液の pH

紙を 5×5mm 程度に切断し、絶乾相当量 2.0g を量り採る。200ml のすり合せ共栓付き三角フラスコに蒸留水 100 ml と共に入れ、振とうした後、共栓して 23℃ にて 1 時間放置した。その上澄み液を 23℃ にてガラス電極 pH 計を用いて pH 測定した。

## 2.4.3 力学的性質

作製した茶殻配合紙に対して、JIS-P8113(紙及び板紙-引張特性の試験方法)に準じた乾燥時の引張試験を行った。引張試験の試験片は、幅 15.0±0.1mm、長さ 250±1mm に裁断して用いた。定速伸張型引張試験機を用いて、間隔 180 ±1.0mm に合わせた 2 つのつまみ具に試験片の端を固く締め付け、20 mm/min で引張荷重をかけて試験片が破断するまでの最大荷重及び引張破断時の伸び量を読み取った。その読み取った値と配合紙の坪量から比引張強さを算出した。

また、JIS-8131(紙及び板紙のミューレンの高圧形試験機による破裂強さ試験法)に準じた破裂試験も行った。試験片は 100×100mm に裁断した。ミューレン高圧形試験機を用い、試験片が締付板を覆うような位置に強く締め付け、加圧装置によって試験片が破れるまで加えてその最大圧力を読み取った。その値と配合紙の坪量から比破裂強さを算出した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 バインダーが茶殻配合紙の抗菌性に及ぼす影響

緑茶、ウーロン茶、紅茶、プアール茶の茶殻は、いずれも黄色ブドウ球菌に対して優れた抗菌性を持つ。しかし、その茶殻配合紙になると緑茶の場合のみに生菌が 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup> CFU/ml 程度も見られ、他の茶種の茶殻配合紙に比べて抗菌性が劣っていた[4]。このことから、緑茶の茶

殻配合紙の抗菌性が劣る理由としては、茶殻配合紙を作製する抄紙工程に要因が潜んでいるものと考えられる。その理由を明らかにするため、まず茶殻配合紙の原料として加えているバインダーに着目した。

一般に、紙加工に使用するバインダーは、パルプに定着してその接着力を高める[11]。バインダーの添加量が増えれば、紙力増強の効果をもたらす[11]。茶殻は粉碎されて繊維長が短く自己接着性をほとんど持っていないため、本研究の茶殻配合紙にはバインダーを 0.3wt% 添加している。このバインダーは粘性が高いために、微量であっても茶殻を包み込むように付着するものと考えられる。さらに、実験に用いたラテックスバインダーは透水性がほとんど無いため、抗菌性試験の際に接種した菌液が茶殻まで浸透しにくくなる可能性もある。

そこで、親水性の高いバインダーであるポリアクリルアמיד[7,8]を 0.3wt% 添加して、緑茶の茶殻配合紙を作製してみた。そのことによってバインダーが茶殻を包み込んでいたとしても菌液が茶殻まで浸透しやすくなり、茶殻中のカテキン類が抗菌作用を示しやすいものと推定した。しかし、親水性のバインダーであっても完全には菌液と茶殻が接触できるとは限らないため、比較としてバインダーを全く添加しない茶殻配合紙も作製した。それらの茶殻配合紙に対して、黄色ブドウ球菌を用いて抗菌性の評価試験を行った。その際、茶殻とパルプの配合比は、いずれも 60:40 に設定した。

親水性のほとんど無いラテックスバインダーを添加して作製した茶殻配合紙、透水性の高いポリアクリルアמידのバインダーを添加して作製した茶殻配合紙、及びバインダーを全く添加せずに作製した茶殻配合紙における各々の生菌数を調べた(表 1)。その結果、いずれの茶殻配合紙においても 18 時間培養後の生菌数は 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>

**Table 1** The antibacterial properties of papers containing wasted green tealeaves for *Staphylococcus aureus* for different binders and clearance in the mass-colloider.

Sample	Wasted tealeaves content (wt%)	Kinds* of Binder	Clearance of the grinder (µm)	Incubation time (Hr.)	Antibacterial properties			
					Viable bacteria (CFU/ml)	Log C	Bacteriostatic activity	Bactericidal activity
Initial	—	—	—	0	1.0×10 <sup>5</sup>	5	—	—
Papers containing wasted green tealeaves	60	Latex	40	18	6.88×10 <sup>7</sup>	7.84	0.59	-2.84
	60	Polyacryl amid	40	18	1.03×10 <sup>8</sup>	8.01	0.42	-3.01
	60	—	40	18	5.28×10 <sup>7</sup>	7.72	0.71	-2.72
	60	—	40	18	5.28×10 <sup>7</sup>	7.72	0.71	-2.72
	60	—	100	18	1.01×10 <sup>8</sup>	8.00	0.43	-3.00
	60	—	150	18	2.68×10 <sup>7</sup>	7.43	1.00	-2.43
Ref.) Pulp paper	0	Latex	—	18	2.68×10 <sup>8</sup>	8.43	—	—

\* Binder content: 0.3wt%

CFU/ml 程度であり、バインダーの種類や有無による影響はほとんど見られなかった。つまり、バインダーによる茶殻配合紙の抗菌性への影響は、全く無いことがわかった。

### 3.2 茶殻の粉碎度合いが茶殻配合紙の抗菌性に及ぼす影響

茶殻配合紙の抗菌性に影響を及ぼすバインダー以外の要因として、抄紙工程中の水抜きによる細かな茶殻粉砕物の脱落を考えた。そこで、まず茶殻の粉碎度合いについて着目した。本実験では、茶殻はマスコロイダーという石臼式粉碎機を用い、臼の間隙(クリアランス)にて粉碎を行っている。つまり、臼のクリアランスが狭いほど、細かく粉碎される。通常はクリアランス 40 $\mu$ m で粉碎を行っており、茶殻は非常に細かく粉碎されている。そのため、パルプ繊維との絡み合いが不十分となり、抄紙工程の水抜きの際にワイヤーメッシュの隙間(目開き 0.177mm)より排水とともに流出してしまっている可能性がある(図 1)。つまり、茶殻配合紙中の実際に含まれている茶殻量は、仕込み量よりも少ない可能性がある。また、仮に微粉碎された茶殻が全て茶殻配合紙に残存していたとしても、茶殻に含まれていたカテキン類は水に溶解していることも考えられる。つまり、粉碎した細かな茶殻や水に溶解したカテキン類が、抄紙工程の水抜きの際に排水とともに流出した可能性がある。

そこで、茶殻の粉碎度合いを変えて茶殻配合紙を作製することとした。粉碎度合いを変える方法として、マスコロイダーのクリアランスを 40 $\mu$ m, 100 $\mu$ m, 150 $\mu$ m へと変化させて粉碎を行った。つまり、クリアランスを広くして、茶殻の粉碎度合いを粗くすることを試みた。さらに、マスコロイダーのクリアランスを 150 $\mu$ m よりも広くすることも試みたが、粉碎自体ができなくなった。

粉碎した茶殻を乾燥し、目開きの異なる 6 種類の篩を通してその粒度分布を調べた。つまり、目開きの細かな篩より順に通して、通過する茶殻粉砕物の全体に占める割合を調べた。その際、目開き 100 $\mu$ m の篩(149 メッシュ)、目開き 150 $\mu$ m の篩(100 メッシュ)、目開き 180 $\mu$ m の篩(83 メッシュ)、目開き 250 $\mu$ m の篩(60 メッシュ)、目開き 425 $\mu$ m の篩(36 メッシュ)、目開き 600 $\mu$ m の篩(26 メッシュ)の篩を用いた。マスコロイダーのクリアランス 40 $\mu$ m で粉碎した茶殻では、各々の篩を通過できたものは順に全体の 3.4%, 6.8%, 11.7%, 24.2%, 33.6%, 11.4% であり、通過できなかったものは 8.9% であった。一方、マスコロイダーのクリアランス 100 $\mu$ m で粉碎した茶殻では、順に 0.6%, 6.1%, 7.9%, 18.6%, 35.8%, 19.6%, 11.4% であった。また、マスコロイダーのクリアランス 150 $\mu$ m で粉碎した茶殻では、順に 0.1%, 3.8%, 6.4%, 17.3%, 32.8%, 26.4%, 13.2% であった。このように、マスコロイダーのクリアランスを広げることによって、比較的大きな粉碎された茶殻の占める割合が多くなっていることがわかった。

マスコロイダーのクリアランスを変化させて作製した緑茶の茶殻配合紙に対して、黄色ブドウ球菌を用いて抗菌性の評価試験を行った。表 1 に抗菌性の評価結果を示す。なお、この実験ではバインダーの影響を排除するため、バインダーを全く添加せずに茶殻配合紙を作製した。その結果、茶殻の粉碎度合いを粗くしても、得られた茶殻配合紙における生菌数は 10<sup>7</sup>CFU/ml 程度にまで増殖していた。つまり、茶殻の粉碎度合いは、抄紙後の茶殻配合紙の抗菌性には全く影響していないことがわかった。このように、茶殻の粉碎度合いを粗くしても茶殻配合紙の抗菌性を向上させることはできなかった。

ここまでの検討では、茶殻の粉碎の度合いを粗くして、抄紙工程での水抜きの際に細かく粉碎された茶殻を流れ落ちにくくした。また、別のアプローチとして、ワイヤーメッシュの開口部の大きさにも着目した。つまり、ワイヤーメッシュの開口部を小さくすることで、細かく粉碎した茶殻の流出を抑え、茶殻配合紙に残存させやすくした。それまでの実験に用いたワイヤーメッシュ(No.80)は、目開きが 0.177mm, 空間率 31.0% のものである。さらに細かな No.100(目開き: 0.149mm, 空間率: 34.3%)と No.120(目開き: 0.125mm, 空間率: 34.8%)のワイヤーメッシュを用いて、抄紙を行った。しかし、最も細かな No.120 のワイヤーメッシュを使用しても、その目開きは 0.125mm もある。そこで、さらに細かな茶殻も流れ落とさないように、ワイヤーメッシュの代わりにアドバンテックス東洋製・定性濾紙 No.1(保留粒子径: 6 $\mu$ m)を用いて、アスピレーターによって強制的に水を吸引して茶殻配合紙を作製した。つまり、濾紙の空隙はワイヤーメッシュに比べて非常に小さく、微粉碎した細かな茶殻も排水と共に流れ落ちることはないものと考えた。このアスピレーター吸引による茶殻配合紙の作製においては、茶殻を 60wt% 配合すると繊維同士が接着しにくく、実使用に耐えられるような茶殻配合紙を得ることができなかった。そのため、茶殻 20wt% 配合紙のみ作製した。なお、これらのワイヤーメッシュを変えて抄紙した今回の茶殻配合紙も、全てバインダーを添加せずに行った。

得られた茶殻配合紙に対して、黄色ブドウ球菌を用いて抗菌性評価試験を行った。表 2 に、抗菌性の評価結果を示す。その結果、ワイヤーメッシュの目開きを従来の 0.177mm(No.80)よりも細かな 0.149mm(No.100)や 0.125mm(No.120)のものを用いても、得られた茶殻配合紙の生菌数はいずれも 10<sup>7</sup>CFU/ml 程度であった。つまり、ワイヤーメッシュの目開きによる茶殻配合紙の抗菌性への影響は見られなかった。また、ワイヤーメッシュの代わりに濾紙(保留粒子径: 6 $\mu$ m)を用いて作製した茶殻配合紙においても、生菌数は 1.29 $\times$ 10<sup>9</sup> CFU/ml であった。なお、濾紙を用いて作製した茶殻配合紙の生菌数が他の茶殻配合紙に比べて多いのは、茶殻の配合率が 20wt% と少ないためである。

以上のように、抄紙工程において細かく粉碎された茶



**Table 2** The antibacterial properties of papers containing wasted green tealeaves for *Staphylococcus aureus* for different aperture in the wire mesh.

Sample	Wasted tealeaves content (wt%)	Kinds of the binder	Clearance of the grinder (μm)	Aperture of the wire mesh	Incubation time (Hr.)	Antibacterial properties			
						Viable bacteria (CFU/ml)	Log C	Bacteriostatic activity	Bactericidal activity
Initial	—	—	—	—	0	$1.0 \times 10^5$	5	—	—
Papers containing wasted green tealeaves	60	—	40	<b>0.177</b> (No. 80)	18	$5.28 \times 10^7$	7.72	0.71	-2.72
	60	—	40	<b>0.149</b> (No. 100)	18	$4.44 \times 10^7$	7.65	0.78	-2.65
	60	—	40	<b>0.125</b> (No. 120)	18	$7.00 \times 10^7$	7.85	0.58	-2.85
	20	—	40	<b>Filter<sup>*1)</sup></b> <b>paper</b>	18	$1.29 \times 10^9$	9.11	-0.68	-4.11
	20	—	40	<b>Without<sup>*2)</sup></b>	18	<b>ND<sup>*3)</sup></b>	—	—	—
60	—	40	<b>Without<sup>*2)</sup></b>	18	<b>ND</b>	—	—	—	
Ref.) Pulp paper	0	Latex	—	<b>0.177</b> (No. 80)	18	$2.68 \times 10^8$	8.43	—	—

\*1) Collected particle diameter: 6 μm

\*2) Natural drying

\*3) Not detected (<440)

殻を茶殻配合紙に残存しやすくしたにも関わらず、緑茶の茶殻配合紙の抗菌性の向上には至らなかった。これらのことより、緑茶の茶殻配合紙の抗菌性を低下させている要因は、抄紙時の細かな茶殻の流れ落ちではなく、茶殻に含まれているカテキン類が水に溶解して排水とともに流れ落ちたことを示唆している。

そこで、そのことを確かめるべく、以下に示す水抜きを全く行わない方法での茶殻配合紙の作製を試みた。まず、クリアランス 40μm のマスコロイダー粉碎した緑茶の茶殻とパルプを混合し、水を加えてミキサーで 10 秒攪拌して均一な分散スラリーを調整した。この懸濁液をバットに移し、自然乾燥によって水分を蒸発させて茶殻配合紙を作製した。その際、茶殻配合率が 20wt%、60wt% になるように原料の配合比を調整した。この実験においても、バインダーを全く添加せずに行うとともに、配合紙の坪量はこれまでと同じく 100g/m<sup>2</sup> に設定した。

これらの懸濁液を自然乾燥して作製した茶殻配合紙に対しても、同様の抗菌試験を行った。表 2 に抗菌性の評価結果を示す。その結果、作製した緑茶の茶殻配合紙には生菌が全く確認されず、優れた抗菌性を示した。また、茶殻配合率が 20wt% の場合であっても生菌は全く確認されず、非常に高い抗菌性を有することがわかった。今回の試料はパルプと茶殻の懸濁液を自然乾燥させているため、水に溶解したカテキン類も全て茶殻配合紙に残存する。その結果、緑茶の茶殻配合率が僅か 20wt% であっても優れた抗菌性を示したものと考えられる。

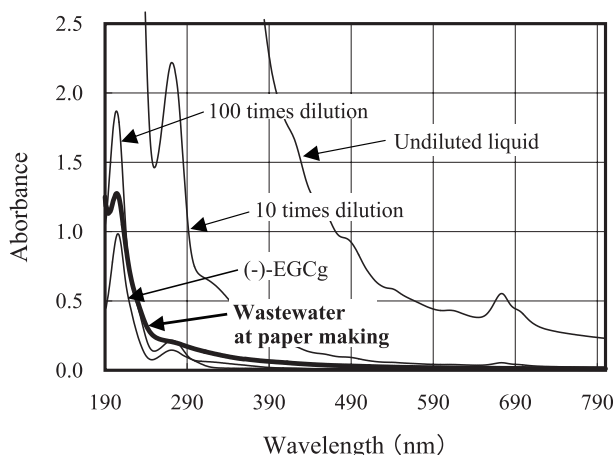
以上の結果から、通常茶殻配合紙の作製方法では緑茶の茶殻に残存していたカテキン類が粉碎工程や抄紙工程で水に溶解し、抄紙工程での水抜きの段階で排水と共

に流れ落ち、カテキン類は茶殻配合紙に残存しにくいことがわかった。その結果、得られた緑茶の茶殻配合紙の抗菌性が低かったものと考えられる。また、無発酵である緑茶の茶殻で作製した茶殻配合紙だけが抗菌性が劣っていた理由としては、発酵茶の茶殻に比べて茶殻に含まれているテアフラビン類の割合が少なく、カテキン類の割合が多いためと考えられる。つまり、カテキン類がテアフラビン類よりも抗菌性が劣ることに加えて、カテキン類の方がテアフラビン類よりも水に溶解しやすいため、抄紙工程で排水とともに流出しやすかったものと推測された。

### 3.3 茶殻の湿式粉碎時に発生する粉碎液

マスコロイダーを用いて茶殻を湿式粉碎すると粉碎液が発生する。この緑茶の茶殻を粉碎した際に発生する粉碎液を濾紙で濾し、分光光度計を用いて濾液の吸光度を測定した(図 2)。また、抄紙工程の水抜きの際の排水も採取し、その濾液に対しても同様の測定を行った(図 2)。茶殻の粉碎液の濾液は濃度が高いため、390nm 以下の波長の吸光度は 2.5 を超えて測定できなかった。そこで、粉碎液の濾液については、10 倍と 100 倍の希釈液を作って同様の測定を行った。比較として、緑茶に最も多く含まれていることが知られているエピガロカテキンガレート(-)-EGCg の試薬より 0.01mM 水溶液を作製し、同様に測定を行った(図 2)。

その結果、希釈しない濾液の原液では、670 nm 付近にクロロフィルと考えられる吸収ピークが見られる。10 倍の希釈液になると、270 nm 付近にも吸収ピークが見られる。さらに 100 倍の希釈液になると、200 nm 付近に芳香環に由来すると考えられる紫外線の吸収ピークも確認さ



**Fig. 2** Absorbance of milling liquids of wasted green tealeaves versus wavelength for different dilution times.

れた。一方、抄紙時の排水についても測定したところ、同じく 200 nm 付近に紫外線の吸収ピークが見られた。つまり、抄紙時の排水には、茶殻を粉碎した粉碎液が含まれていると云える。また(-)-EGCgの水溶液では、270 nm 付近と 200 nm 付近に吸収ピークが見られた。つまり、抄紙時の排水に見られた 200 nm 付近の吸収ピークは、(-)-EGCgでも現れた。

このように、茶殻の粉碎液や抄紙時の排水には様々な成分が溶け込んでいることが確認できた。茶殻より水に溶解したこのような成分は、抗菌性を有しているものと考えられる。そこで、パルプ 100wt%紙に対して緑茶の茶殻の粉碎液の濾液を所定量滴下し、自然乾燥させた。そして、そのパルプ紙に対して抗菌試験を行った。その際、滴下した液がパルプ紙に均一に斑なく完全に吸収されるように、パルプ紙の 500±5mg に対する滴下する液の 1 回

の量を 1,000μl とした。そして、パルプ紙に対する茶殻の粉碎液が所定の滴下量になるように、滴下する液の濃度や滴下する回数を調整した。具体的には、滴下量が 0.01ml/g から 1.0ml/g の場合では、茶殻の粉碎液を 200 倍から 2 倍にまで蒸留水で希釈し、パルプ紙に 1,000μl を 1 回滴下した。また、滴下量 5.0 ml/g の場合では、自然乾燥を繰り返しながら希釈していない茶殻の粉碎液 1,000μl を 2 回と 500μl を 1 回滴下した。滴下量 10.0 ml/g の場合では、希釈していない茶殻の粉碎液 1,000μl を自然乾燥を繰り返しながら 5 回滴下した。

表 3 に、茶殻の粉碎液を滴下したパルプ紙の抗菌性の評価結果を示す。その結果、0.5 ml/g 以下の茶殻の粉碎液を滴下したパルプ紙では、滴下していないパルプ 100wt%紙と同程度の生菌数が確認された。つまり、全く抗菌性が見られていない。しかし、茶殻の粉碎液の滴下量が 1.0 ml/g を超えると完全に生菌が見られなくなり、優れた抗菌性が発現するようになった。

これらのことより、茶殻の粉碎工程で発生した粉碎液には、優れた抗菌性を有していることが明確となった。つまり、茶殻の粉碎工程でカテキン類などの有用成分が水に溶解し、これらが抄紙時の水抜きの際に排水と共に脱落したと云える。その結果、茶殻配合紙には定着せず、得られた緑茶の茶殻配合紙の抗菌性が低く現われたものと考えられる。

### 3.4 硫酸アルミニウムの添加効果

緑茶の抽出液乾燥物中には、30~42wt%のカテキン類とともにタンパク質も 6wt%程度含まれていることが知られている [12]。また、カテキン類はタンパク質と結合して複合体を生成することも知られている [13]。緑茶の茶殻配合紙の抗菌性の向上のためには、抄紙工程において水に溶解したカテキン類などの有用成分を茶殻配合紙に

**Table 3** The antibacterial properties of pulp papers with dripped milling liquids of wasted green tealeaves for *Staphylococcus aureus*.

Sample	The despensed quantity of milling liquids (ml/g)	Incubation time (Hr.)	Antibacterial properties			
			Viable bacteria (CFU/ml)	Log C	Bacteriostatic activity	Bactericidal activity
Initial	—	0	$1.00 \times 10^5$	5	—	—
Pulp papers with dripped milling liquids	0.01	18	$2.24 \times 10^8$	8.35	0.06	-3.35
	0.10	18	$3.12 \times 10^8$	8.49	-0.08	-3.49
	0.50	18	$7.04 \times 10^8$	8.85	-0.44	-3.85
	0.80	18	$7.32 \times 10^6$	6.86	1.55	-1.86
	1.0	18	ND <sup>*)</sup>	—	—	—
	5.0	18	ND	—	—	—
	10.0	18	ND	—	—	—
Ref.) Pulp paper	—	18	$2.60 \times 10^8$	8.41	—	—

<sup>\*)</sup> Not detected (<440)

**Table 4** The antibacterial properties of papers containing wasted green tealeaves for *Staphylococcus aureus* for different Aluminium sulfate content.

Sample	Aluminium sulfate content (wt%)	Reaction time (Hr.)	Incubation time (Hr.)	Antibacterial properties			
				Viable bacteria (CFU/ml)	Log C	Bacteriostatic activity	Bactericidal activity
Initial	—	—	0	$1.0 \times 10^5$			
Papers containing wasted green tealeaves	0	—	18	$1.20 \times 10^7$	7.08	0.97	-2.08
	0.81	—	18	$3.40 \times 10^6$	6.53	1.41	-1.53
	2.70	—	18	$1.24 \times 10^5$	5.09	1.68	-0.09
	0	1.0	18	$2.40 \times 10^7$	7.38	0.67	-2.38
	0.81	1.0	18	$1.28 \times 10^6$	6.11	1.83	-1.11
	2.70	1.0	18	$3.20 \times 10^4$	4.51	2.26	0.49
Ref.) Pulp paper	0	—	18	$1.12 \times 10^8$	8.05	—	—
	0.81	—	18	$8.67 \times 10^7$	7.94	—	—
	2.70	—	18	$5.92 \times 10^6$	6.77	—	—

**Table 5** Mechanical properties of papers containing wasted tealeaves and Aluminium sulfate.

Sample	Aluminium sulfate content (wt%)	Reaction time (hr.)	Acidity of Paper <sup>*)</sup> (pH)	Density of papers (g/cm <sup>3</sup> )	Mechanical properties	
					Tensile index (N·m/g)	Burst in (kPa/g/m <sup>2</sup> )
Papers containing wasted green tealeaves	0	—	6.4	0.460	21.9	2.33
	0.81	—	5.6	0.451	22.1	2.30
	2.70	—	4.5	0.457	18.8	2.09
	0	1.0	6.4	0.462	22.0	2.32
	0.81	1.0	5.5	0.449	21.9	2.30
	2.70	1.0	4.5	0.463	18.6	2.04
Ref.) Pulp paper	0	—	6.8	0.577	53.3	5.20
	0.81	—	6.1	0.574	54.4	5.25
	2.70	—	5.7	0.570	53.3	5.24

\*) Cold water extract

多く定着させる必要がある。カテキン類を沈殿析出させて茶殻配合紙に定着させる方法として、ロンジンサイズ剤(松脂石鹼)の定着に用いられている硫酸アルミニウムに着目した[14,15]。この硫酸アルミニウムは水に容易に溶解し、弱アルカリ性のアルミニウムイオンと強酸性の硫酸イオンに電離する。そのため、カテキン類と複合化されたタンパク質は酸と結合して沈殿し[16]、茶殻配合紙に定着し易くなるものと考えた。そこで、粉碎した茶殻とパルプの懸濁液に、硫酸アルミニウムも添加、攪拌して抄紙した。その際、粉碎茶殻とパルプの懸濁液に硫酸アルミニウムを加えて直ちに抄紙した場合と、添加してから1時間放置して十分に反応する時間をとってから抄紙した場合の、2通りの方法で茶殻配合紙を作製した。

得られた茶殻配合紙に対して、抗菌試験を行った。表4に抗菌性の評価結果を示す。その結果、硫酸アルミニウムを0.81wt%添加した緑茶の茶殻60wt%配合紙では、硫酸アルミニウムを添加していないものに比べて僅かには

生菌数の低下が認められる。一方、硫酸アルミニウムを2.70wt%添加したものでは、18時間培養後も生菌数 $10^4 \sim 10^5$  CFU/ml程度まで黄色ブドウ球菌の増殖を抑制することがわかった。このことは、硫酸アルミニウムの添加によって抄紙後もカテキン類が茶殻配合紙に定着しやすくなったためと考えられる。そのために、緑茶の茶殻配合紙の抗菌性が向上したものと考えられる。但し、後述するように硫酸アルミニウムを添加することによって茶殻配合紙のpHは低下している。酸性条件下において、菌の増殖が抑制された可能性もある。硫酸アルミニウムの添加で茶殻配合紙の抗菌性が向上した理由について、今後さらに検討していきたい。なお、粉碎茶殻とパルプの懸濁液に硫酸アルミニウムを加えて直ちに抄紙した場合と添加してから1時間放置して反応させてから抄紙した場合を比較すると、1時間放置して反応させた方が抗菌性が僅かながら高く現われる傾向も見られる。

比較として、茶殻を配合せずに硫酸アルミニウムのみ

2.70wt%添加したパルプ紙に対しても、抗菌試験を行った。その結果、 $10^6$ CFU/ml程度の生菌が認められた。つまり、硫酸アルミニウムの添加によっても菌の増殖抑制は認められるものの、硫酸アルミニウムを添加することによって緑茶の茶殻配合紙の抗菌性がより向上することがわかった。

以上のように、茶殻配合紙の抗菌性を向上させるには、抄紙工程で硫酸アルミニウムを添加することが有効であることがわかった。しかし、茶殻配合紙の実用的な使用を考えると、硫酸アルミニウムを添加することによる力学的性質の低下が懸念される。そこで、硫酸アルミニウムを添加した茶殻配合紙の力学的性質を調べた。その結果、茶殻配合紙の比引張強さ、比破裂強さとも、硫酸アルミニウムの添加量が増すのに従って低下する傾向が見られた(表5)。一方、1時間放置してから抄紙した茶殻配合紙と直後に抄紙した茶殻配合紙の力学的性質の差は、非常に僅かであることもわかった。このように硫酸アルミニウムを添加すると、茶殻配合紙の力学的性質は低下することがわかった。しかし、硫酸アルミニウムを2.70wt%と比較的多く加えても、茶殻配合紙の比引張強さは $18.6 \text{ N}\cdot\text{m/g}$ 、比破裂強さは $2.04 \text{ kPa/g/m}^2$ であり、実用的には使用可能な値を維持していることもわかった。

#### 4. 結 論

緑茶の茶殻配合紙の抗菌性向上を目指し、茶殻配合紙中にカテキン類を残存させ易くするべく種々の検討を行った。

- (1) 親水性であるポリアクリルアミドや親水性のないラテックスバインダーを用いて茶殻配合紙を作製した。その結果、得られた茶殻配合紙の抗菌性は、バインダーの種類には関係なくバインダーを添加していないものと同程度であった。つまり、バインダーの添加は、茶殻配合紙の抗菌性には全く影響を及ぼしていなかった。
- (2) マスコロイダのクリアランスを変化させて、茶殻の粉碎度合いを変化させた。また、抄紙時に使用するワイヤーメッシュの目開きを変化させたり、ワイヤーメッシュの変わりに濾紙を用いて抄紙を行った。その結果、得られた茶殻配合紙の抗菌性には差異は見られなかった。このことより、抄紙工程における粉碎された細かな茶殻の抜け落ちが問題ではないことがわかった。
- (3) パルプと茶殻の懸濁液を自然乾燥してその抗菌性を評価したところ、茶殻配合率が20wt%であっても生菌

が全く現れなかった。また、茶殻のマスコロイダ粉砕時に発生する粉碎液を採取し、その濾液をパルプ紙に滴下した。その結果、滴下量が $1.0 \text{ ml/g}$ を超えるものでは、生菌が全く認められなかった。これらのことから、緑茶の茶殻配合紙の抗菌性が劣る理由として、茶殻に含まれているカテキン類が水に溶解し、抄紙工程の水抜き段階で排水に含まれて流れ落ち、茶殻配合紙には残存し難かったためと考えられた。

- (4) 緑茶の茶殻配合紙の抗菌性向上を目的に、硫酸アルミニウムを添加して抄紙した。その結果、硫酸アルミニウムの添加量が2.70wt%になると18時間培養後の生菌数が $10^5$ CFU/ml程度となり、茶殻配合紙の抗菌性は明らかに向上した。

#### 文 献

1. F. Mendel, R. H. Philip, E. L. Carol, E. M. Robert, N. Kozukue, *J. Food Prot.*, **69**, (2), 354-361 (2006).
2. T. Taguri, T. Tanaka, I. Kouno, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1965-1969 (2004).
3. Y. Sakihama, M. F. Cohen, S. C. Grace, H. Yamasaki, *Toxicol.*, **177**, (1), 67-80 (2002).
4. T. Takahashi, T. Kondo, W. Kasai, H. Yokota, and T. Kunitake, **64**, 252-258 (2008).
5. D. I. Lee, *NATO ASI Ser. E.*, **335**, 497-513 (1997).
6. Y. Iwasa, *Kami Pulp no Gijyutsu*, **56**, 2, 19-29 (2005).
7. T. Hirasawa, *Japan Tappi Journal*, **51**, 9, 1295-1307 (1997).
8. Y. Masuda, *Plant and Process*, **9**, 47-50 (2005).
9. Japanese Standards Association, JIS P-8209.
10. Y. Gohya, and S. Nakamura, *SUISANZOSHOKU*, **42**, 4, 567-570 (1994).
11. M. Kawamura, and H. Moriya, *Kami Pulp no Gijyutsu*, **40**, 3/4, 17-20 (1990).
12. D.A. Balentine, S.A. Wiseman, and L.C.M. Bouwens, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **37**, 693 (1997).
13. M. Kusuda, T. Hatano, and T. Yoshida, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1, 152-160 (2006).
14. S. Subrahmanyam, and C. J. Biermann, *TAPPI J.*, **75**, 3, 223-228 (1992).
15. Y. Matsushita, and S. Yasuda, *Japan Tappi Journal*, **57**, 6, 882-892 (2003).
16. D. J. Salt, P. Dunnill, R. B. Leslie, and P. J. Lillford, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 3, 144-148 (1982).