

茶カテキン類の安定性の向上を目指した凝集・沈殿反応の解析

静岡県立大学食品栄養科学部

石井 剛志

1. 研究の目的と背景

茶ポリフェノールは、苦渋味成分として茶の風味形成に関与するほか、抗酸化作用、抗菌作用、抗肥満作用および抗アレルギー作用などを有する機能性成分として茶の健康機能に関与する。緑茶に特徴的な茶ポリフェノールとしては、エピカテキン (EC), エピガロカテキン (EGC), エピカテキン-3-ガレート (ECg) およびエピガロカテキン-3-ガレート (EGCg) などのカテキン類があり (図 1), 紅茶に特徴的な茶ポリフェノールとしては、カテキン類に加えて、テアフラビン (TF1), テアフラビン-3-O-ガレート (TF2A), テアフラビン-3'-O-ガレート (TF2B) およびテアフラビン-3,3'-O-ジガレート (TF3) などのテアフラビン類がある。テアフラビン類は、2分子のカテキン類が酸化重合したものであり、紅茶の赤色色素成分のひとつである。これらの茶ポリフェノールは、水溶液中における安定性が低く、調理、加工および保存の過程で金属、光あるいは熱 (加温・冷却) などに晒されることで、酸化分解や重合あるいは凝集・沈殿を引き起こすことが知られている。凝集・沈殿には、茶ポリフェノール同士あるいは茶ポリフェノールと他の茶成分との分子間相互作用が関与していると考えられるが、その詳細は殆ど明らかになっていない。本研究では、紅茶成分、特にその主要なポリフェノールであるカテキン類およびテアフラビン類の凝集・沈殿反応の詳細を主に物理化学的手法により解析し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の方法

2-1. 試薬

カテキン類および茶葉 (紅茶) は、三井農林株式会社より供与いただいた。テアフラビン類は、紅茶抽出物から単離精製した。電気泳動に関連する試薬・消耗品は、ライフテクノロジーズ株式会社より購入した。特記しない限り、試薬は和光純薬工業株式会社あるいはシグマアルドリッチ社の特級あるいはそれ以上のグレードのものを用いた。

2-2. 茶抽出液の調製

3種類の市販の紅茶葉 (商品 A-C) をそれぞれミルで粉碎し、ふるいを用いて 150-500 μm となるように選別した。それぞれの茶葉を 0.75 g をビーカーに量り取り、お湯 (90 $^{\circ}\text{C}$) を加えて 2 分間攪拌・抽出を行った。0.2 μm のフィルターを用いて、抽出後の溶液から茶葉を取り除き、茶抽出液とした。

2-3. 茶抽出液の評価

茶抽出液に含まれる成分の凝集・沈殿は、白濁 (クリーム) の形成に伴う濁度上昇を測定することにより評価した。各抽出液 (200 μL) をマイクロプレートに添加後にプレートごと氷冷し、マイクロプレートリーダーにて 650 nm の波長を測定し、濁度を求めた。

茶抽出液に含まれる茶ポリフェノールの含有量は、当研究室で構築したポリフェノール検出法であるレドックスサイクリング染色法により評価した (Ishii et al. *Free Radic.*

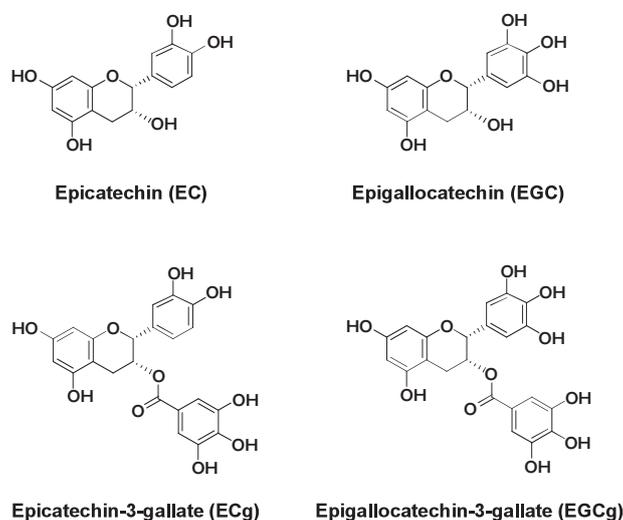


図 1 カテキン類の化学構造

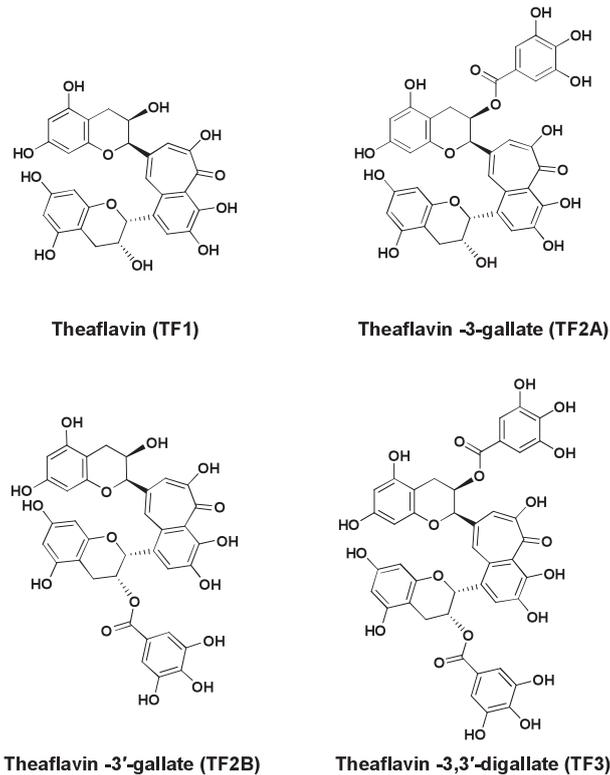


図2 テアフラビン類の化学構造

Biol. Med. 2008). 希釈した各抽出液 (10 μ L) をマイクロプレートに添加し, その後 2 M グリシン溶液 (pH 10.0) に溶解した水溶性ホルマザン (190 μ L) を添加した. 一定時間後にマイクロプレートリーダーにて 450 nm の波長を測定し, ポリフェノール含有量を求めた.

クリーム形成前後の茶抽出液の渋味は, 味覚センサ (渋味および苦味) を用いて, 定法に従い評価した. また, 精製したクリームの成分分析は逆相カラム (Cadenza CL-C-18, インタクト株式会社) を備えた高速液体クロマトグラフィシステム (日本分光株式会社) により評価した.

2-4. 近赤外スペクトル法による茶成分の分子間相互作用の評価

茶抽出液 (液温 70°C 前後) の温度低下に伴う近赤外スペクトルの変化を, 近赤外光を用いた組成イメージングシステム Compovision (住友電気株式会社にて測定) により解析し, 成分変化を評価した. また, あらかじめカフェイン (1 mM) を添加した抽出液の分析も行い, 成分変化にカフェインが及ぼす影響を検討した. 解析の際に, 水温の変化による近赤外スペクトルの変化を少なくするために, 温度変化の影響が少ない波長帯である 1,450–1,600 nm に着目した. また, お湯およびカフェイン溶液の温度変化も併せて評価した. なお, 測定結果は二次微分スペクトルに変換した.

2-5. カロリメトリ法による茶成分の分子間相互作用の評価

カテキン類 (メチル化カテキン類やカテキン類の類縁体を含む), テアフラビン類およびカフェインを試料とした. 各試料の相互作用に伴う熱量変化を等温滴定型カロリメトリ iTC200 (マイクロキャル社) により解析し, 茶成分の分子間相互作用を評価した. 測定においては, 試料をサンプルセルあるいは滴定シリンジに充填し, サンプルセル内の熱量変化を 25°C に設定した. 滴定シリンジからサンプルセルへ滴定を開始し, 攪拌により完全に平衡化される 2 分間隔で連続的に滴定を行った. 得られた熱量変化 (サーモグラム) を基に解析ソフト Origin7 により相互作用を評価した.

2-6. 電気泳動法によるカテキン類の相互作用の検出

カテキン類の分子間相互作用を電気泳動法 (Native-PAGE) により評価した. Native-PAGE は NOVEX 電気泳動システム (ライフテクノロジー社) により行った. ゲルは 4–16% Native グラジエントゲル, 泳動溶液は Native-PAGE-Running buffer を用いた. 泳動後のゲルは CBB 染色により検出を試みた.

3. 研究内容

緑茶や紅茶は, 冷却した際に成分が凝集・沈殿することで白濁 (クリーム) を生じることがある (図 3). これは, クリームダウンとよばれる現象であり, 茶の風味や機能性を低下させることで品質の低下を引き起こすために, 茶飲

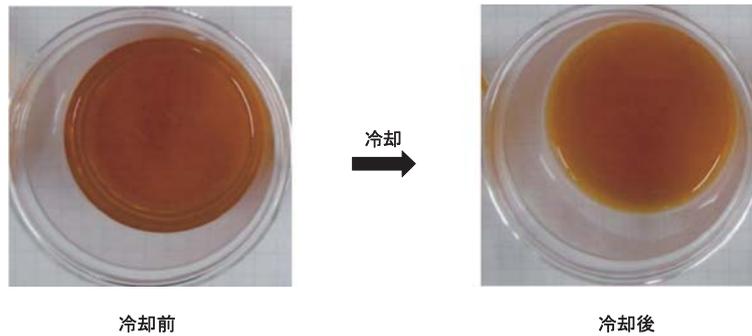


図3 紅茶クリームダウン

料の調理あるいは製造工程において問題となる。クリーム形成には茶の渋味成分であるタンニン（カテキン類やテアフラビン類など）と茶の苦味成分であるカフェインの分子間相互作用が重要であると考えられている。そこで、紅茶のクリームダウンに着目し、主要な苦味成分であるカテキン類、テアフラビン類およびカフェインの分子間相互作用を解析した。

まず、市販されている3種類の紅茶葉から抽出した茶抽出液を用いて氷冷した際のクリーム形成能とポリフェノール含有量の関係を評価した。また、クリームダウン前後の茶抽出液の苦味を評価するとともに、凝集・沈殿物の成分分析を行った。得られた結果より、紅茶クリームダウンにおけるカテキン類、テアフラビン類及びカフェインの寄与とクリーム形成が味に与える影響を解析した。

次に、近赤外スペクトル法により、茶抽出液の温度低下と含有成分の状態変化の関係を評価し、クリーム形成（凝集・沈殿）前に生じる茶成分同士の分子間相互作用を評価した。

さらに、カテキン類、テアフラビン類およびカフェインの分子間相互作用をカロリメトリ法により評価し、クリーム形成のメカニズム解析を試みた。

そして、茶成分（特にカテキン類）の分子間相互作用の評価法を開発するために、Native-PAGEを利用した相互作用の検出法の構築を試みた。

4. 研究の実施経過

3種類の紅茶葉から調製した茶抽出液のクリーム形成能とポリフェノール含有量の関係を図4に示す。クリーム形成能の高い茶葉には、茶ポリフェノールが多く含まれていることが確認された（相関係数0.989）。クリームダウン前後の茶抽出液の苦味を図5に示す。クリームダウンにより、茶の苦味（特に渋味）が減弱することが明らかになった。また、凝集・沈殿物中には苦味成分であるカテキン類、テアフラビン類およびカフェインが含まれていることが明らかになった（データは示さず）。

お湯、カフェイン溶液、茶抽出液およびカフェインを添加した茶抽出液の温度変化に伴う近赤外スペクトルの変化を図6に示す。カフェイン溶液および茶抽出液のピーク波長は1490 nm付近であり、お湯のピーク波長（1480 nm付近）とは異なることが確認された。また、茶抽出液では温度の低下に伴いピーク波長が長波長側にシフトすることが明らかになった。茶抽出液にカフェインを添加するとスペクトル変化は顕著になり、ピーク波長は1,520-1,530 nm付近であった。同様の傾向は、茶ポリフェノール混合物にカフェインを添加した際にも確認された（データは示さず）。また、茶抽出液に含まれるカテキン類、テアフラビン類及びカフェインの量は、70℃から30℃までの温度変化では殆ど変化しなかった（データは示さず）。以上の結果より、このスペクトル変化はカテキン類やテアフラビン類の量的変化は伴わず、それらの質的な変化、すなわち溶

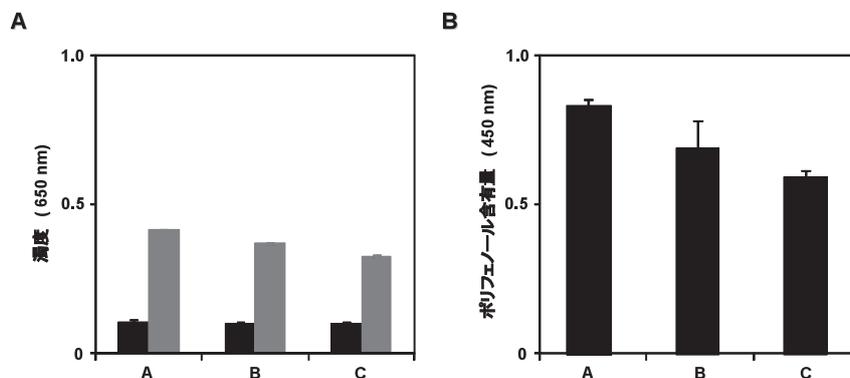


図4 茶抽出液のクリーム形成能とポリフェノール含有量の関係

A: クリーム形成能 B: ポリフェノール含有量

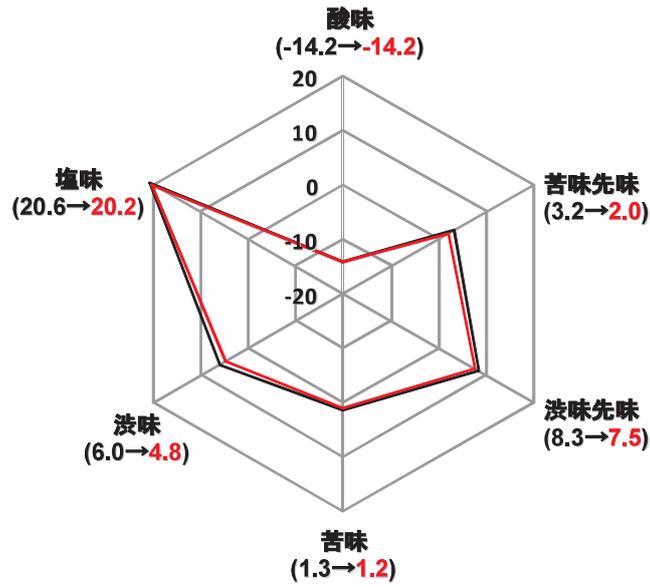


図5 クリームダウン前後の茶抽出液の苦渋味

黒：クリームダウン前 赤：クリームダウン後

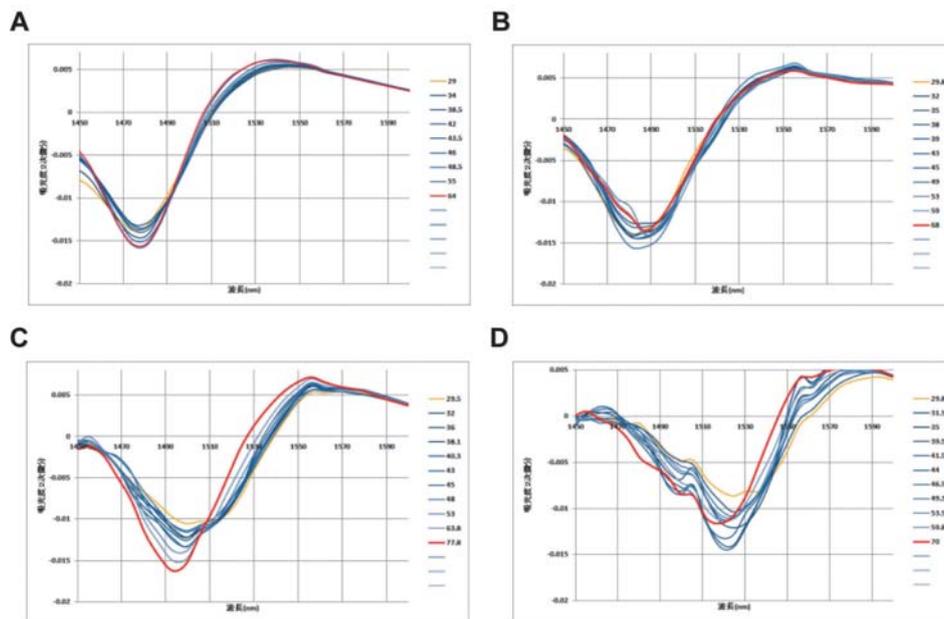


図6 茶抽出溶液の温度変化に伴う近赤外スペクトルの変化

A：お湯 B：お湯+カフェイン C：茶抽出液 D：茶抽出液+カフェイン

液中での分子の存在形態の変化を伴うことが強く示唆された。なお、茶抽出液の温度が30度以下になった際には、凝集・沈殿物の形成が確認された。

EGCgをサンプルセル(1.0mM)と滴定シリンジ(10.0mM)に充填し一定時間ごとに滴定(2μL/回)を行いカロリメトリにより分析した結果を図7に示す。各滴定において熱量変化は殆ど観測されなかった。カテキン類とカテキン類、カテキン類とテアフラビン類、テアフラビン類とテアフラビン類およびカフェインとカフェインの組

み合わせにおいても、EGCgとEGCgを組み合わせた場合と同様に、十分な熱量が観測されなかった(データは示さず)。

カフェインとテアフラビン類をそれぞれサンプルセル(50.0mM)と滴定シリンジ(1.0-mM)に充填し一定時間ごとに滴定(2μL/回)を行った結果を図8に示す。テアフラビン類を含む溶液に水を加えたコントロールでは、希釈熱と予想される吸熱反応が観測された(図中のControl)。分子内にガロイル基を持つTF2A, TF2B,

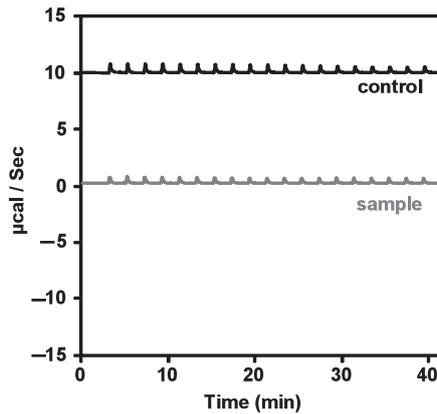


図7 EGCg と EGCg の相互作用に伴う熱量変化

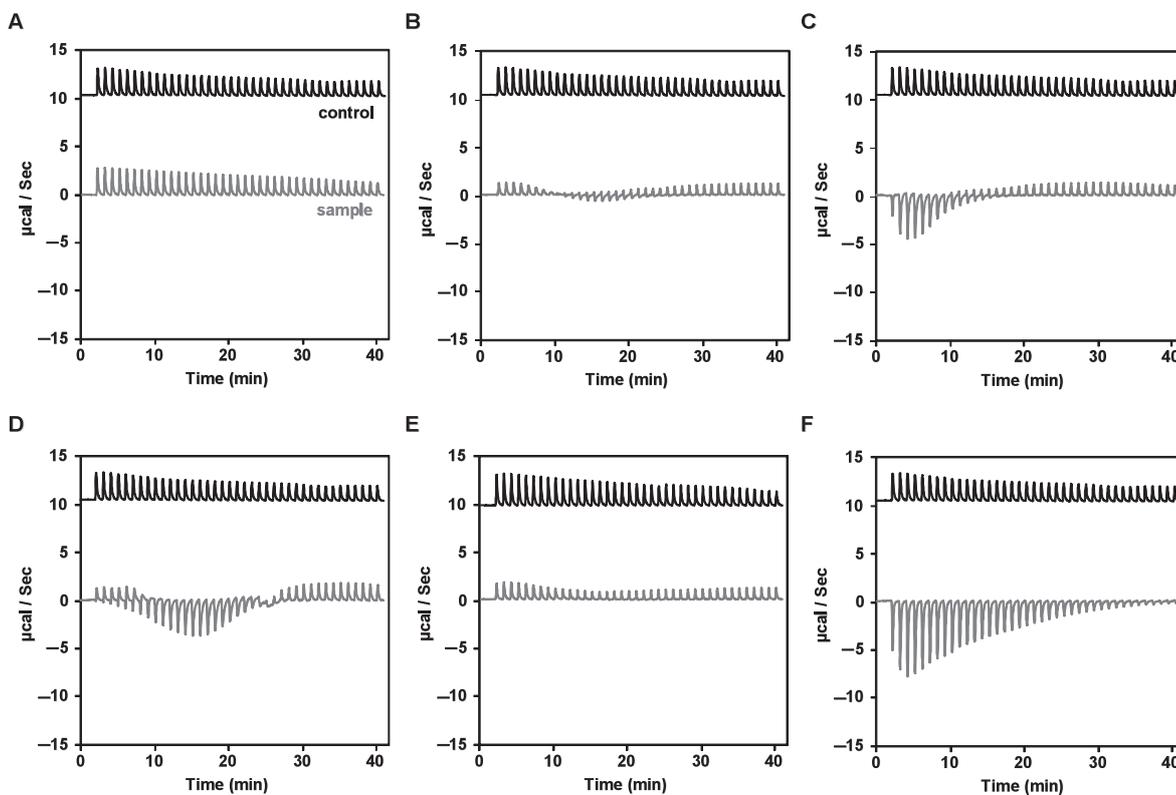


図8 テアフラビン類とカフェインの相互作用に伴う熱量変化

A : TF1 B : TF2A C : TF2B D : TF3 E : TF 4種 mix F : 飽和 TF mix 80%

TF3 およびそれらを含む混合物では分子間の相互作用を示す発熱反応が観測されたが、分子内にガロイル基を持たない TF1 においては熱量変化が観測されなかった。TF2A, TF2B および TF3 のサームグラムはそれぞれ異なっていたことから、各テアフラビン類とカフェインの相互作用様式は、それぞれ異なることが示唆された。テアフラビン類とカフェインを混合し冷却した際の濁度の変化を図9に示す。TF2A, TF2B, TF3 およびそれらを含む混合物では濁度が上昇し、クリームを形成確認できたが、分子内にガロイル基を持たない TF1 においては濁度が上昇せずクリームの形成を確認できなかった。

カテキン類同士、テアフラビン類同士あるいはカテキン

類とテアフラビン類などの茶ポリフェノール同士の相互作用を簡便に検出できる方法の構築を目指し、電気泳動法による検討を行った。タンパク質複合体の分析に汎用される電気泳動法である Native-PAGE を用いた結果を図10に示す。ガロイル基を持つ ECg と EGCg において、溶液中で高分子量の複合体が形成されることが確認された。

5. 研究から得た結論・考察

本研究により得られた知見を以下に示す。

- (1) 紅茶の水温が低下した際に生じるクリームダウンにおいては、カテキン類、テアフラビン類およびカフェインなど凝集・沈殿し、苦渋味の減少や外観の変化を生

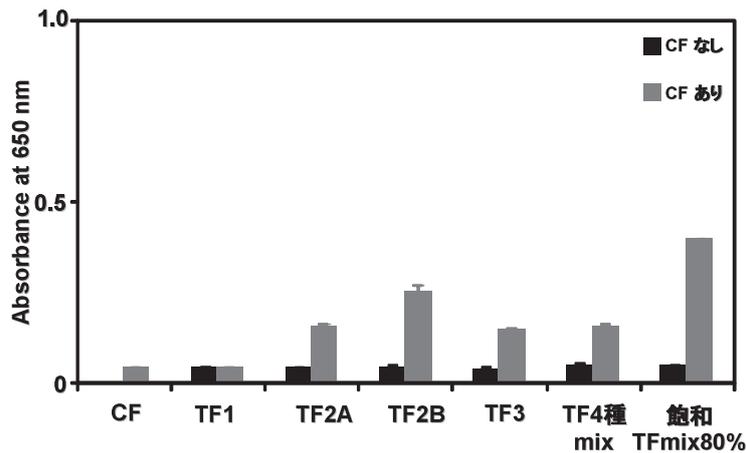


図9 カフェイン非存在下・存在下における冷却後のテアフラビン溶液の濁度

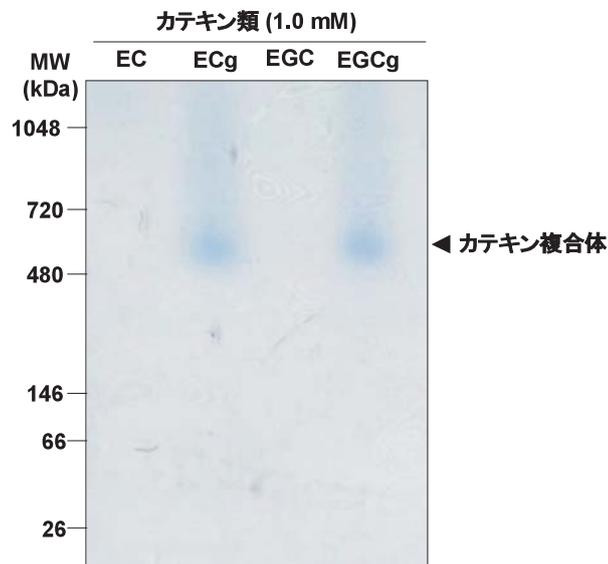


図10 Native-PAGEにより検出されたカテキン複合体

じる。

- (2) 紅茶の温度が低下すると、茶ポリフェノールの量的変化は認められないが、質的变化が認められる。また、その変化は、カフェインの存在量が増加すると顕著になる。
- (3) ガロイル基を持つテアフラビン類 (TF2A, TF2B, TF3) は、ガロイル基を持たないテアフラビン類 (TF1) よりもカフェインと親和性が高く相互作用し易い。
- (4) ガロイル基を持つテアフラビン類とカフェインを含む溶液は、ガロイル基を持たないテアフラビン類とカフェインを含む溶液よりも冷却により凝集・沈殿し易い。
- (5) ガロイル基を持つカテキン類 (ECg および EGCg) は、ガロイル基を持たないカテキン類 (EC および EGC) に比べてそれ自身の間で相互作用し易い。

得られた知見を基に、茶ポリフェノールの凝集・沈殿反応が関与するクリームダウン現象の作用機序を以下のように

推定した (図 11)。

茶ポリフェノールとカフェインは、溶液中で分子間力(水素結合など)の弱い結合により相互作用することができる。しかし、水温が高いときには、分子の動きが激しく、茶ポリフェノールとカフェインが近接しても相互作用し難く、複合体を形成し難い。水温が低くなると、分子の動きが緩くなり、茶ポリフェノールとカフェインが近接したときに、分子間力により結合し、複合体(核)を形成する。核に含まれる茶ポリフェノールやカフェインでは、水素結合の形成により電氣的偏りが中和されることで分子に結合できる水分子の数が減少するため、茶ポリフェノールやカフェイン単独の場合に比べて疎水性が高くなり、水に溶け難い性質を持つ。疎水性が高く水に溶け難い物質は、同様の性質を持つ物質と疎水性相互作用により結合するために、核と核はさらに結びつきより大きな複合体を形成する。複合体は、ある程度の大きさになると水に溶けられなくなり、最終的に沈殿しクリームとなることが推察される。ガロイ

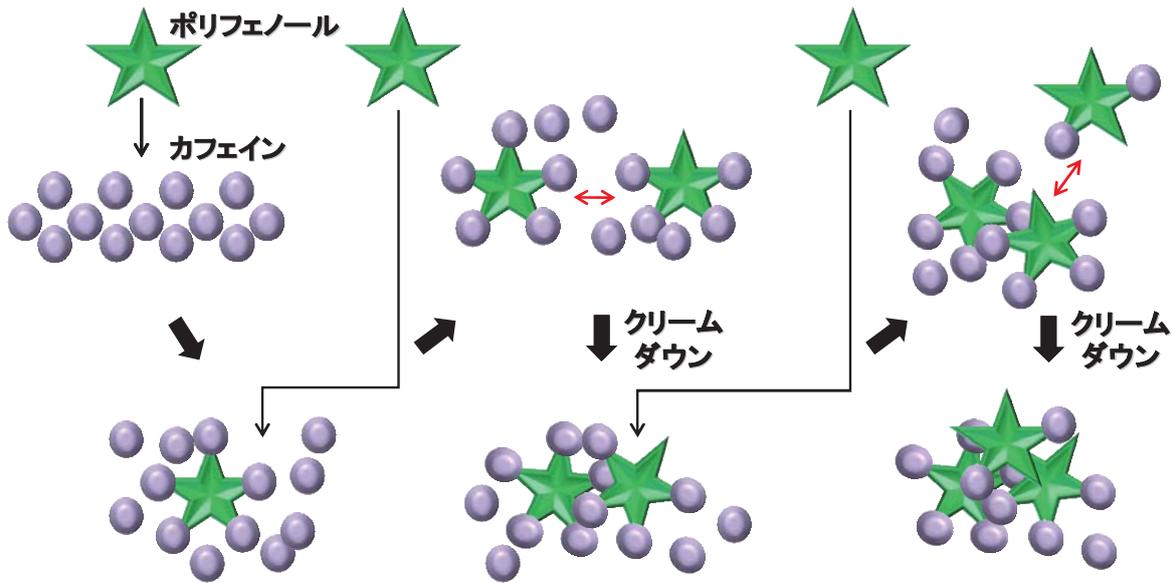


図 11 推定したクリームダウン現象の作用機序

ル基を持つカテキン類やテアフラビン類は、ガロイル基を持たないカテキン類やテアフラビン類に比べて、それ自身やカフェインとの親和性が高く核を形成し易いため、水温の低下に伴い凝集・沈殿し易くなると予想される。

6. 残された問題、今後の課題

本研究では、紅茶を冷却する際に認められるクリームダウン現象に着目し、主要なポリフェノールであるカテキン類およびテアフラビン類の凝集・沈殿反応を解析することで、その作用機序を推定した。しかし、等温滴定型カロリメトリで得られる相互作用に起因する熱量変化が予想以上に小さく、期待していた結合定数の算出や結合様式の決定には至らなかった。

また、茶ポリフェノール同士の相互作用に関する情報に関しては殆ど得ることができなかった。図 8 や図 10 に示すように、カフェインやそれ自身との相互作用は、ポリフェノールの化学構造の違いに強く影響を受ける。そのため、作用機序の解明には、各茶ポリフェノールとカフェインおよび各茶ポリフェノール同士の相互作用を詳細に解析し明らかにする必要がある。現在、住友電工株式会社の協力のもと、近赤外光組成イメージングシステムにより茶ポリフェノール同士の相互作用（状態変化）を詳細に検討できる系の構築を進めている。また、電気泳動法を用いた解析に関して、他のポリフェノールを用いた検討やカフェイン存在下での泳動法の確立を模索している。これらの実験系が構築できれば、研究が進展し更なる知見が得られるものと期待している。

茶成分の凝集・沈殿には、成分の酸化反応や他の成分（タンパク質や金属など）の関与も考えられるが、本研究ではそれらの点を検討しなかった。また、凝集・沈殿を抑制する物質の探索を予定していたが、本研究では十分に検討することができなかった。今後は、金属イオンの有無

や pH の影響（ポリフェノールの酸化に関与）やタンパク質との分子間相互作用の解析を行うとともに、沈殿抑制成分の探索を併せて行うことで、凝集・沈殿機構の解明や凝集・沈殿を抑制できる物質の開発などを目指していきたいと考えている。現在、得られた成果の一部に関して、日本分析化学会第 61 年会や第 16 回日本フードファクター学会・日本カテキン学会合同大会での発表を目指し、準備を進めている。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人 東洋食品研究所ならびにご審査頂きました審査委員の先生や関係者の方々に厚く御礼申し上げます。また、近赤外光組成イメージングシステムの利用・測定に関しご協力頂きました住友電工株式会社 鈴木俊美様に感謝申し上げます。