碁石茶製造工程におけるカテキン含量とスーパーオキシドアニオン消去活性の変化

島村智子[§], 松浦理太郎, 森山洋憲*,
竹田匠輝*, 受田浩之

高知大学農学部

* 高知県工業技術センター

Changes in Catechin Content and Superoxide Anion Scavenging Activity of *Goishi* Tea During Manufacturing

Tomoko Shimamura[§], Ritaro Matsuura,
Hironori Moriyama*, Naruki Takeda*
and Hiroyuki Ukeda

Faculty of Agriculture, Kochi University,
Monobe B-200, Nankoku 783-8502

* Industrial Technology Center of Kochi Prefecture,
Nunoshida 3992-3, Kochi 781-5101

Goishi tea, a post-heating fermented tea, is produced in Otoyō town in Kochi Prefecture, Japan. Two natural fermentation steps by aerobic and anaerobic fungi and microorganisms participate in the production of *Goishi* tea. To investigate the effects of the manufacturing process on the functionality of *Goishi* tea, changes in superoxide anion scavenging activity and catechin content in hot water extracts of *Goishi* tea were examined. Superoxide anion scavenging activity and catechin content drastically changed in the two fermentation steps. In addition, high levels of (–)-catechin and (–)-gallocatechine were observed in the final product of *Goishi* tea. However, the contribution of catechin and gallic acid determined in this study to the superoxide anion scavenging activity of *Goishi* tea was low. These results suggest that some other component generated during the two steps of fermentation is the main contributor to the superoxide anion scavenging activity of *Goishi* tea.

(Received Jun. 20, 2008 ; Accepted Sep. 3, 2008)

Keywords: catechin, *Goishi* tea, post-heating fermented tea, superoxide anion scavenging activity

キーワード: 碁石茶, 後発酵茶, スーパーオキシドアニオン消去活性, カテキン

後発酵茶は微生物発酵によって作られる茶であり, 好気性のカビで発酵させた好氣的発酵茶, 空気を遮断して嫌気性菌で発酵させた嫌氣的発酵茶, 好氣的発酵の後に嫌氣的発酵を行い製造された2段階発酵茶の3種に分類される。好氣的発酵茶には中国のプーアル茶や富山県の黒茶, 嫌気

的発酵茶にはミャンマーのラペ・ソーや徳島県の阿波番茶, 2段階発酵茶には愛媛県の石槌黒茶や高知県の碁石茶が存在する¹⁾。

碁石茶は高知県長岡郡大豊町でのみ生産されている茶である。かつては当該地域の主要産品であったが, 時代の変遷と共に生産農家が減少し, 1990年代にはわずか1軒となるなど, その生産は廃絶寸前の状態にあった。しかし, 珍しい伝統的製法により製造される地方茶としてマスメディアに紹介されたことがきっかけとなり, 2004年以降, 数軒の農家が生産を開始すると共に, 生産組合も設立された。2007年には地域食品ブランドの表示基準である「本場の本物」のブランド認定を受けるに至った²⁾。今後, 生体調節機能などに関する科学的知見が付与されることにより, 特徴的な地域資源としての認識が広まるものと期待されている。

茶の代表的な機能性である抗酸化活性については, 不発酵茶(緑茶), 半発酵茶(烏龍茶), 発酵茶(紅茶)に関する報告が多数なされており, カテキン類が主要な抗酸化成分であることが明らかとなっている³⁾⁴⁾。その一方, 後発酵茶, 特に碁石茶の抗酸化活性に関する研究例は少なく, 我々の知る限り森山ら⁵⁾, および宮村ら⁶⁾により碁石茶にスーパーオキシドアニオン消去活性, ならびにDPPHラジカル消去活性が認められるとの報告がなされているのみである。しかしながら, 碁石茶は近年増産傾向にあり, 消費者の注目が集まっている。加えて, 碁石茶の機能性に対する関心も高まっており, 最近, 碁石茶の熱水抽出物に抗インフルエンザウイルス作用があるとの報告もなされた⁷⁾。このような背景の下, 抗酸化活性についてもより詳細な追究が必要であると考えられたため, 本研究では, 碁石茶の製造工程におけるスーパーオキシドアニオン消去活性, カテキン類, ならびに没食子酸含量の変化について調べた。

1. 実験方法

(1) 試薬

(–)-カテキン(C), (–)-エピカテキン(EC), (–)-エピカテキン3-ガレート(ECg), (–)-エピガロカテキン(EGC), (–)-エピガロカテキン3-ガレート(EGCg), (–)-ガロカテキン(GC), (–)-ガロカテキン3-ガレート(GCg), 没食子酸(GA)はSigma社製を使用した。Cu, Zn-SOD(superoxide dismutase, EC 1.15.1.1, 4733 units/mg, ウシ赤血球由来)はAldrich製を, SOD Assay Kit-WSTは同仁化学研究所製を使用した。その他の試薬は全て市販の特級もしくはHPLCグレードのものをを用いた。また, 全ての実験において蒸留水をAuto Pure WQ501(ミリポア社製)にて処理した超純水を用いた。

(2) 碁石茶試料

碁石茶の製造工程は下記の通りである。枝ごと刈り取った茶葉を2時間蒸し, 枝を取り除いて堆積し, カビ付けと呼ばれる1段階目の好氣的発酵を7日間行った。好氣的発酵後の茶葉を桶に詰め込み重石を載せ, 漬け込みと呼ばれ

〒783-8502 高知県南国市物部乙 200

* 〒781-5101 高知県高知市布師田 3992-3

[§] 連絡先 (Corresponding author), tomokos@kochi-u.ac.jp

Fig. 1 Changes of the superoxide anion scavenging activity of *Goishi* tea during the manufacturing process

L, fresh leaf ; SL, steamed leaf ; PFL, pre-fermented (under aerobic condition for 1-7 days) leaf ; FL, fermented (under anaerobic condition for 10 days) leaf ; DL, sun-dried (for 1-2 days) leaf.

る2段階目の嫌氣的発酵を約20日間行った。漬け込み後の茶葉を取り出して裁断後、2日間天日干しした。

製造工程ごとの茶葉の採取は以下のように行った。最も生産歴の長い碁石茶生産農家1軒から、収穫直後、蒸し後、好氣的発酵(1-7日目)、嫌氣的発酵後、天日干し(1-2日目)の茶葉を採取した。好氣的、および嫌氣的発酵工程の試料採取の際は、表層の茶葉を避け、中層から採取した。採取した茶葉は分析まで-20℃で冷凍保存した。

碁石茶抽出液は飲用条件を参考にして調製した。茶葉3gに沸騰水200mlを加えた後5分間静置し、ろ紙(No. 2, アドバンテック東洋製)でろ過後、孔径0.45μmのメンブレンフィルター(アドバンテック東洋製)で処理した溶液を測定試料とした。

(3) スーパーオキシドアニオン消去活性

Ukeda ら⁸⁾の開発した2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-1) 法を測定原理とする SOD Assay Kit-WST の分析マニュアルに従って測定した。ただし、反応時間は10分に変更した。2回の繰り返し測定を行い、各試料の50%阻害濃度(IC₅₀)を求めた。試料のIC₅₀とSODのIC₅₀が等しいとみなし、各試料のスーパーオキシドアニオン消去活性をSOD等価活性(units SOD eq./g DW)として示した。

(4) 碁石茶、カテキン類、および没食子酸のHPLC分析

碁石茶、カテキン類、ならびに没食子酸のHPLC分析条件はDel Rio ら⁹⁾の方法に従った。分析カラムとしてPhenomenex synergi 4μ MAX-RP 80A (4.6 mm i.d.×250 mm, Phenomenex 製)、溶離液として溶媒A:1%ギ酸(v/v)、溶媒B:1%ギ酸を含むアセトニトリル(v/v)を使用した。流速は1 ml/min、リニアグラジエント条件は溶媒A:4-25% (60分)、検出波長は280 nmとした。HPLC 検出器は

UV-2070 plus, HPLC ポンプはPU-1580 (共に日本分光製)を使用した。

2. 実験結果

収穫直後(L)、蒸し後(SL)、好氣的発酵(1-7日:PFL 1-7)、嫌氣的発酵(FL)、天日干し(1-2日:DL1-2)の茶葉を採取し、碁石茶の製造工程がスーパーオキシドアニオン消去活性に及ぼす影響について調べた(Fig. 1)。その結果、碁石茶熱水抽出物のスーパーオキシドアニオン消去活性は、好氣的発酵の5日目(PFL5)まで段階的に上昇し、6日目(PFL6)で減少に転じ、嫌氣的発酵終了時(FL)で再び大きく上昇し、天日干し工程(DL1, 2)で減少するという傾向を示した。微生物が関与する好氣的発酵、および嫌氣的発酵で特徴的な活性の変化が見られたことから、碁石茶最終製品(DL2)の示すスーパーオキシドアニオン消去活性において、両発酵工程中の茶抽出成分の変化が特に注目すべき点であると判断した。

茶類の示すスーパーオキシドアニオン消去活性やラジカル消去活性にはカテキン類、ならびに没食子酸の関与が大きいことが明らかとなっている⁴⁾¹⁰⁾¹¹⁾。そこで本研究では、緑茶中に一般的に認められるカテキン類である(-)-カテキン(C), (-)-エピカテキン(EC), (-)-エピカテキン3-ガレート(ECg), (-)-エピガロカテキン(EGC), (-)-エピガロカテキン3-ガレート(EGCg), (-)-ガロカテキン(GC), (-)-ガロカテキン3-ガレート(GCg)の含量を調べると共に、没食子酸(GA)も分析対象とした(Table 1)。測定試料はFig. 1と同一のものを使用した。測定の結果、碁石茶最終製品の抽出液にはGCが最も多く含まれていることが明らかとなった。続いて、C>EGC>EGCg=GA>EC>GCgの順であった。また、碁石茶最終製品の抽出液中にECgは検出されなかった。製造工程中の変化において

Table 1 Changes in the composition of catechins and gallic acid and its contribution ratio to the superoxide scavenging activity of *Goishi* tea during the manufacturing processes

	Contents (mg/g DW)									Contribution ratio (%)
	C	EC	ECg	EGC	EGCg	GC	GCg	GA	Total	
L	nd	0.60	2.96	0.93	1.97	nd	0.12	0.35	6.93	121
SL	0.43	0.83	nd	2.39	2.19	1.11	0.36	0.23	7.54	43.9
PFL1	1.21	1.69	0.51	4.58	3.68	3.82	0.87	0.52	16.89	27.9
PFL2	0.88	1.75	0.72	4.74	3.96	2.64	1.22	0.63	16.55	25.2
PFL3	0.78	1.87	0.13	5.83	2.82	2.31	0.66	1.96	16.37	22.6
PFL4	1.20	2.77	nd	9.98	2.21	3.78	0.56	0.77	21.27	11.8
PFL5	1.89	4.54	nd	17.1	2.33	7.48	0.56	7.19	41.05	20.0
PFL6	1.69	4.20	nd	14.8	2.25	6.86	0.29	0.93	31.04	21.8
PFL7	0.90	2.18	nd	6.79	2.21	4.04	0.28	3.56	19.97	18.5
FL	2.81	0.24	nd	4.87	2.07	13.5	0.12	0.55	24.17	6.20
DL1	2.24	0.33	nd	1.51	1.15	6.99	0.15	1.04	13.40	5.38
DL2	2.32	0.19	nd	0.87	0.66	7.69	0.08	0.66	12.48	5.15

L, fresh leaf ; SL, steamed leaf ; PFL, pre-fermented (under aerobic condition for 1-7 days) leaf ; FL, fermented (under anaerobic condition for 10 days) leaf ; DL, sun-dried (for 1-2 days) leaf.

nd, not detectable.

は、EC, ECg, EGC, EGCg, GCg, GA が好氣的発酵工程 (PFL) 中に最大値となり、その後の工程では徐々に減少する傾向を示した。その一方で、最終製品の抽出液中に多く含まれた C と GC は上記の物質とは異なり、嫌氣的発酵工程 (FL) で最大値を示し、天日干し工程 (DL) で減少するものの、そのまま最終製品に多く含まれていることが明らかとなった。

続いて、今回定量を行ったカテキン類 (7 種類) と没食子酸について各々の SOD 等価活性を求め、その合計から製造工程ごとの碁石茶のスーパーオキシドアニオン消去活性に対する寄与率を算出した。その結果を Table 1 に併せて示した。その結果、収穫直後 (L)、蒸し後 (SL) の茶葉の示すスーパーオキシドアニオン消去活性に対するカテキン類、ならびに没食子酸の寄与率は高いものの、好氣的発酵 (PFL)、嫌氣的発酵 (FL)、ならびに天日干し (DL) の製造工程を経ることにより寄与率が低下することが判明した。特に、碁石茶の最終製品 (DL2) のスーパーオキシドアニオン消去活性に対する寄与率は 5.15% と極めて低いことが明らかとなった。この結果より、碁石茶最終製品中に含まれる主要抗酸化物質は今回対象とした 7 種類のカテキン、ならびに没食子酸以外の物質であり、それらの物質は発酵、ならびに乾燥工程において生じている可能性が高いと考えられた。

3. 考 察

これまでの碁石茶に関する研究は、その歴史的背景¹⁾、風味特性¹²⁾¹³⁾、微生物学的特性¹⁴⁾¹⁵⁾を追究するものが主であり、機能性に関する情報は乏しい状態にあった。しかし近年、その機能性が注目を集めるようになり、抗酸化活性、高脂血症及び動脈硬化抑制効果、抗インフルエンザウイルス

ス作用に関する報告が立て続けになされた^{5)~7)}。碁石茶熱水抽出物のスーパーオキシドアニオン消去活性は、本研究で用いた手法と同じ WST-1 法による測定において、不発酵茶である緑茶とほぼ同等の値を示すこと、ならびに半発酵茶である烏龍茶、発酵茶である紅茶と比較して有意に高い値を示すことが既に明らかとされている⁶⁾。また、ESR 法と化学発光法による測定において、生葉に嫌氣的処理を施し γ -アミノ酪酸含量を高めたギャバロン茶よりも碁石茶水抽出物が高いスーパーオキシドアニオン消去活性を示すことも報告されている⁵⁾。本研究では、その抗酸化活性に対してより詳しい情報を付与するべく、碁石茶製造工程中のスーパーオキシドアニオン消去活性、カテキン類含量、ならびに没食子酸含量の変化を調べた。碁石茶のスーパーオキシドアニオン消去活性は Fig. 1 に示した通り、1 段階目の好氣的発酵 (PFL) と 2 段階目の嫌氣的発酵 (FL) において大きく変化することが明らかとなった。また、Table 1 に示したカテキン類と没食子酸含量も 2 段階の発酵工程において大きく変化することが明らかとなった。蒸煮後、茶葉を 30-40 cm 程度の高さに堆積して行う好氣的発酵では 50℃ 程度の発熱が認められる。岡田らの報告¹⁵⁾によると、好氣的発酵段階では高温でも生育可能な糸状菌 *Aspergillus fumigatus* が主に働いており、茶葉細胞壁に傷を付け栄養価に富んだ細胞内容物を放出させ、発酵微生物に栄養補給を行っていると考えられている。また、桶に漬け込み空気を遮断して行う嫌氣的発酵では、茶葉成分であるタンニンに生育阻害を受けない *Lactobacillus plantarum* が増殖し、乳酸を生成することにより碁石茶の酸味を特徴とする風味が生じるとされている。このような糸状菌や乳酸菌による茶葉成分の変化がスーパーオキシドアニオン消

去活性の変化に寄与しているものと推察された。

今回の研究では、通常の飲用条件を参考に茶葉の抽出物を調製した。従って、天日干し2日目の碁石茶(DL2)の抽出液は市販の碁石茶を飲用する際のカテキン類、ならびに没食子酸の組成に相当する。宮村ら⁶⁾は緑茶と碁石茶のカテキン類のHPLCパターンが異なることを報告しているが、その詳しい組成は論じていない。また、加藤ら¹³⁾は碁石茶の風味特性を調べる際、茶葉を粉碎した上で熱水抽出液を調製し、苦味ならびに渋み成分であるEGC (0.870 g/100 g dry matter), EC (0.410 g/100 g dry matter), EGCg (trace), ECg (trace)の組成を報告している。この報告と本研究とは抽出方法が異なるため直接的な比較を行うことはできないが、ガレートエステル型カテキンに比べて遊離型カテキンの含有量が高いという傾向は一致していた。一方、Noguchi ら⁷⁾は碁石茶熱水抽出物中にEGCgの存在を確認しているが、その他のカテキン類に関する報告は行っていない。今回、碁石茶中に存在が確認されたカテキン類(C, EC, EGC, EGCg, GC, GCg)はスーパーオキシドアニオン消去活性を示すことが明らかとされている¹⁰⁾¹⁶⁾。また、先に挙げたカテキン類に加え碁石茶中での存在が確認された没食子酸は、碁石茶と同じ後発酵茶に分類される富山黒茶の抗酸化成分であることが示されていることから¹¹⁾、本物質のスーパーオキシドアニオン消去活性への寄与が期待された。しかし、我々の予想に反して、今回の研究において存在が明らかとなったカテキン類、ならびに没食子酸の碁石茶最終製品熱水抽出物の示すスーパーオキシドアニオン消去活性に対する寄与率は5.15%と低かった。収穫直後(L)、蒸し後(SL)の茶葉の示すスーパーオキシドアニオン消去活性に対するカテキン類、ならびに没食子酸の寄与率は、それぞれ121%, 43.9%と高かったが、その後、好氣的発酵(PFL)、嫌氣的発酵(FL)、天日干し(DL)の工程を経るごとに寄与率は低下する傾向を示した。これは、2段階の発酵、ならびに乾燥の工程においてカテキン類の二次的な変化が生じ、今回分析対象としたカテキン類と没食子酸以外の物質の寄与が大きくなっていることを示唆していると考えられた。従って、今後、好氣的発酵、ならびに嫌氣的発酵工程で生成される未知の抗酸化成分の特定が碁石茶のスーパーオキシドアニオン消去活性の全容解明のために必要であると考えられた。抗酸化成分の解明が達成されれば、科学的根拠に基づいた機能性が付加され、碁石茶のみならず後発酵茶の機能性食品としての地位が確立できるものと期待される。

4. 要 約

高知県長岡郡大豊町で生産されている碁石茶熱水抽出物のスーパーオキシドアニオン消去活性、カテキン類含量、ならびに没食子酸含量の製造工程中の変化を調べた。その結果、碁石茶のスーパーオキシドアニオン消去活性はその製造工程中、好氣的発酵と嫌氣的発酵で大きく増加するこ

とが判明した。また、カテキン類の大部分(EC, ECG, EGC, EGCg, GCg, GA)は好氣的発酵工程中に最大となり、その後減少するのに対して、CとGCは嫌氣的発酵工程において最大値に達し、碁石茶最終製品中に高い濃度で含まれることが明らかとなった。しかし、今回分析対象として定量したカテキン7種類、ならびに没食子酸の碁石茶最終製品のスーパーオキシドアニオン消去活性に対する寄与率は低かった。従って、好氣的、および嫌氣的発酵工程で生成される他の物質が主要な抗酸化物質である可能性が高いと考えられた。今後、関与成分の全容を明らかにすることで、高知県の貴重な地域資源である碁石茶に科学的知見が付与され、高付加価値化を図ることができるものと期待される。

本研究は平成19年度都市再生プロジェクト推進調査委託事業の一部として行われたものであり、ここに深謝致します。

文 献

- 1) 宮川金二郎, 大坪藤代, 片渕きょう子, 日本の後発酵茶, 家政誌, **40**, 545-551 (1989).
- 2) 森山洋憲, 高知県工業技術センターの機能性食品開発への取り組み, 食品と開発, **41**, 80-81 (2005).
- 3) 南条文雄, 原 征彦, 茶の科学と抗酸化物質, 「活性酸素と医食同源」, 第1版, 井上正康編, (共立出版, 東京), pp. 315-320 (1996).
- 4) Luczaj, W. and Skrzydlewska, E., Antioxidative properties of black tea. *Prev. Med.*, **40**, 910-918 (2005).
- 5) 森山洋憲, 片山泰幸, 中林錦一, 受田浩之, 沢村正義, 高知県産茶および青果物の有するスーパーオキシドアニオン消去能の測定, 食科工, **49**, 679-682 (2002).
- 6) 宮村充彦, 森山洋憲, 邑田修三, 横田淳子, 吉岡三郎, 宅間大祐, 濱田篤秀, 西岡 豊, コレステロール負荷家兎における後発酵茶「碁石茶」の高脂血症及び動脈硬化抑制効果, 薬学雑誌, **128**, 1037-1044 (2008).
- 7) Noguchi, A., Hamauzu, Y. and Yasui, H., Inhibitory effects of *Goishi* tea against influenza virus infection. *Food Sci. Technol. Res.*, **14**, 277-284 (2008).
- 8) Ukeda, H., Kawana, D., Maeda, S. and Sawamura, M., Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 485-488 (1999).
- 9) Del Rio, D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M. E., Brighenti, F. and Crozier, A., HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 2807-2815 (2004).
- 10) Unno, T., Sugimoto, A. and Kakuda, T., Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine and xanthine oxidase system. *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 601-606 (2002).
- 11) Terasawa, N. and Yamazaki, N., Radical Scavenging Activity of Japanese Black Tea, *Toyama Kurocha. Food Sci. Technol. Res.*, **8**, 218-220 (2002).
- 12) 川上美智子, 小林彰夫, 山村 貞, 漬物茶碁石茶と阿波晩茶の香気特性, 農化, **61**, 345-352 (1987).

-
- 13) 加藤みゆき, 田村朝子, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎, 西村 修, 亀田 弥, 碁石茶製造工程における風味成分の変化とその特徴, 家政誌, **45**, 527-532 (1994).
- 14) 田村朝子, 加藤みゆき, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎, 後発酵茶に存在する微生物の特徴, 家政誌, **45**, 1095-1101 (1994).
- 15) 岡田早苗, 高橋尚人, 小原直弘, 内村 泰, 小崎道雄, 碁石茶の発酵に関する微生物, 食科工, **43**, 1019-1027 (1996).
- 16) Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J. and Xin, W., ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1427**, 13-23 (1999).
- (平成 20 年 6 月 20 日受付, 平成 20 年 9 月 3 日受理)
-