

# 阿波晩茶の浸出条件が抗酸化活性とカテキン類含量に及ぼす影響

## Effect of Infusing Condition of Awa-bancha on Antioxidative Activity and Catechin Content

池田 絵梨\*, 新居 佳孝\*  
IKEDA Eri and NII Yoshitaka

### 抄録

浸出温度や時間が阿波晩茶浸出液の機能性に及ぼす影響について調べるため、酸素ラジカル吸収能力（ORAC）法による抗酸化活性の測定やカテキン類含量等の分析を行った。その結果、阿波晩茶浸出液の抗酸化活性は浸出条件によって変化し、沸騰水で浸出した場合が最も高かった。カテキン類についてはエステル型カテキンよりも遊離型カテキンの方が多く含まれていたが、カテキン類の組成は浸出条件によって異なっていた。

### 1 はじめに

徳島県内の山間部（那賀町、上勝町など）で製造されている阿波晩茶（番茶）は、茹でて揉捻した茶葉を木桶等に漬け込み、2週間程度嫌気的に発酵させた後に天日乾燥させ作られている。このように茶葉に熱を加えて酵素を失活させた後（殺青後）、微生物を利用して発酵させたお茶は後発酵茶と呼ばれ、世界的にも珍しいものである<sup>1)</sup>。

阿波晩茶に関しては嫌気発酵に関与する乳酸菌や、発酵工程での茶葉自体の成分変化等についての報告はあるものの<sup>2), 3)</sup>、その浸出液の成分や機能性に関する知見はあまり多くない。

また阿波晩茶の飲用方法は沸騰水で浸出する一般的な方法の他に、生産農家などでは夏場を中心に水出しして飲用するなどされているが、このような浸出条件の違いによる浸出液中の成分変化等についての検討もほとんど行われていない。

そこで本研究では、浸出条件の違いが阿波晩茶浸出液の機能性や成分含量などに及ぼす影響に関する知見を得ることを目的として、酸素ラジカル吸収能力（ORAC）法による抗酸化活性の測定や総ポリフェノール量、カテキン類含量等について分析を行った。

### 2 実験方法

#### 2・1 試料

那賀町の阿波晩茶生産農家より入手した阿波晩茶

茶葉を分析に供した。

阿波晩茶浸出液の調製は飲用時の条件を基に熱水または水出して、ポリプロピレン製茶こし袋に入れた茶葉3gに蒸留水1Lを加え静置することで調製した。

熱水抽出は沸騰水（95°C）または70°Cの蒸留水を加えた後、沸騰水浴や恒温水槽で水温を保持し、所定の時間（5分、10分、20分）静置した。静置後、茶葉の入った茶こし袋を取り出し、室温まで冷却した各浸出液はろ紙を用いてろ過を行い、分析試料とした。水出しは生産農家の飲用実態を参考に、5°Cの蒸留水を加え冷蔵庫内で所定の時間（4時間、8時間、12時間）静置した後、茶葉の入った茶こし袋を取り出しろ過することで分析試料とした。これらの試料は分析に用いるまで-30°Cで保存した。

#### 2・2 ORAC法による抗酸化活性測定

試料1gにヘキサン10mLを加え、3,000rpmで10分間遠心分離後、上清を除去した。得られた残渣に同様の操作を繰り返し、窒素気流下で残渣中の溶媒を除去した後、MWA溶液（メタノール：水：酢酸=90:9.5:0.5）を10mL加え、37°Cで5分間超音波処理した。室温で10分静置した後、3,000rpmで10分間遠心分離し、上清を回収した。残渣に同様の操作を繰り返し、最終的に25mLに定容することで、測定用試料溶液を得た。

得られた親水性画分について、ラジカル発生剤添

\* 食品・応用生物担当

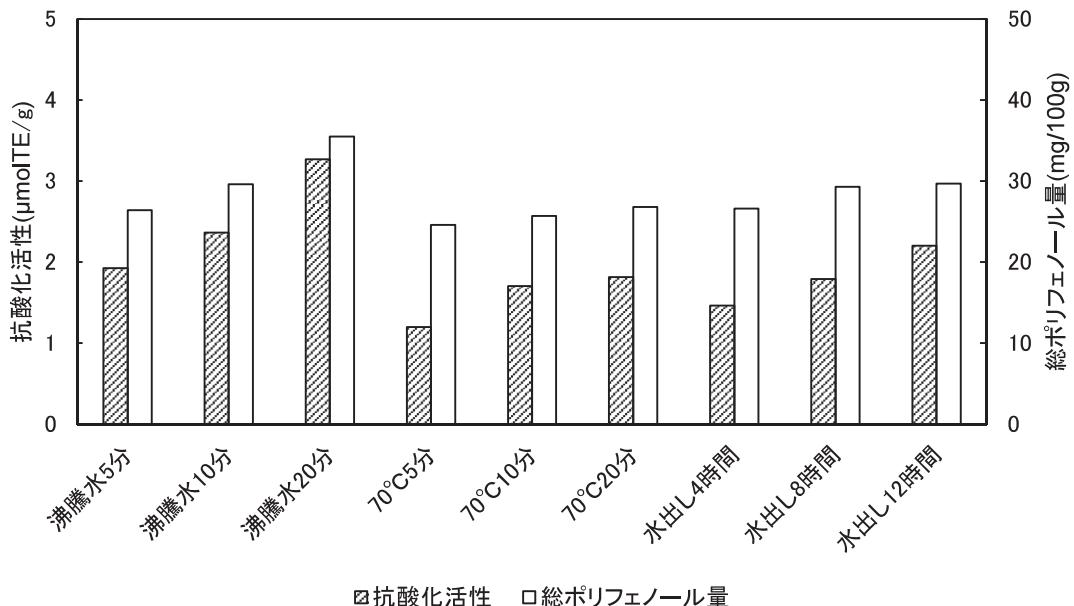


図1 浸出条件の違いによる阿波晩茶抽出液の抗酸化活性 (H-ORAC) と総ポリフェノール量の変化

加後の蛍光強度の経時変化を Tecan 製マイクロプレートリーダー Infinite F200PRO により測定し、親水性の抗酸化活性 (H-ORAC) を算出した<sup>4)</sup>。H-ORAC 値は、試料 1g 当たりの Trolox 相当量 ( $\mu\text{molTE/g}$ ) として示した。

### 2・3 総ポリフェノール量測定

総ポリフェノール量の測定は、フォーリン-チオカルト法<sup>5), 6)</sup>により行った。96 穴マイクロプレートに上述の H-ORAC 測定に使用した MWA 溶液  $10\mu\text{l}$  を加え、10 倍希釈したフェノール試薬を  $75\mu\text{l}$  加えて攪拌後、室温で 5 分間静置した。その後、2%炭酸ナトリウム溶液を  $75\mu\text{l}$  加えて攪拌し、室温で 30 分間反応させた。反応後、Tecan 製マイクロプレートリーダー Infinite F200PRO を用いて、750nm の吸光度を測定した。総ポリフェノール量は、没食子酸を標準物質として作成した検量線より没食子酸相当量として換算した。

### 2・4 カテキン類およびカフェインの分析

カテキン類およびカフェインの分析は既報<sup>7)</sup>に準じ、試料を  $0.45\mu\text{m}$  メンブランフィルターでろ過し、Waters 社製 HPLC 装置を用い以下の条件で行った。カラム : CAPCELLPAK C18 UG120 S3 (4.6 mm i.d.×100mm)  
移動相 : 0.5 vol% リン酸/メタノール=82/18

流速 : 0.8mL/分

カラム温度 : 40°C

検出波長 : 280nm

標準試薬には三井農林（株）製の(−)-エピガロカテキン（以下 EGC）、(+)-カテキン（以下 C）、(−)-エピガロカテキンガレート（以下 EGCg）、(−)-エピカテキン（以下 EC）、(−)-エピカテキンガレート（以下 ECg）のカテキン類 5 種並びに富士フイルム和光純薬工業（株）製のカフェインを使用した。

## 3 結果および考察

### 3・1 浸出条件の違いによる抗酸化活性と総ポリフェノール量の変化

阿波晩茶抽出液の抗酸化活性および総ポリフェノール量を図1に示した。どの試験区も浸出時間が長くなるほど、抗酸化活性、総ポリフェノール量ともに増加する傾向にあった。また沸騰水と 70°C の試験区を比較すると、抗酸化活性は浸出時間が同じでも沸騰水の方が 1.4~1.8 倍高かった。一方、総ポリフェノール量は浸出時間 5 分ではほとんど差は見られなかったが、10 分および 20 分では沸騰水の方が多かった。水出しで浸出した試験区の抗酸化活性および総ポリフェノール量は、70°C 試験区と同等以上であることが確認された。

阿波晩茶の抗酸化活性に関与する主要な成分は、

緑茶などと同じくカテキン類であると考えられる。カテキン類の抗酸化力については、松崎ら<sup>8)</sup>が EC, EGC, ECg, EGCg の 4 種のカテキンのラードに対する抗酸化力の強さを抗酸化剤であるブチルヒドロキシアニソール (BHA) や dl- $\alpha$ -トコフェノールと比較した結果、等重量濃度では dl- $\alpha$ -トコフェノール < BHA < ECg < EC < EGCg < EGC となること、さらにカテキン類 4 種を等モル濃度で比較すると EC < ECg < EGC < EGCg となり、構造式との相関関係が推測されると報告している。

今回の研究では沸騰水試験区と他の試験区で抗酸化活性に顕著な差が認められたことから、各浸出液中のカテキン類含量や組成に違いがあると推測される。

### 3・2 浸出条件の違いによる成分含量の変化

阿波晩茶浸出液のカテキン類組成と含量を図 2 に示した。全ての試験区において遊離型カテキンの EGC が最も多く含まれており、次いで同じく遊離型カテキンの EC が多かった。一方、エステル型カテキンの EGCg は、浸出温度が高いほど多くなる傾向が見られた。

緑茶浸出液では、エステル型カテキンである ECg や EGCg は、遊離型カテキンの EC や EGC に比べて溶出されにくいこと、高温条件で各成分の溶出が促進されることが報告されており<sup>9)</sup>、今回の阿波晩茶浸出液に関する実験においても同様の結果が得られた。

水出しでも時間をかけば熱水抽出と同程度のカテキン類が含まれており、12 時間浸出した試験区のカテキン類含量は沸騰水で 20 分浸出した試験区とほぼ同じであったが、両試験区のカテキン類組成は異なっていた。この組成の違いが抗酸化活性の差に影響している可能性がある。

また、今回分析したカテキン類の合計量は総ポリフェノール量よりも少なかったことから、他のカテキン類やカテキン重合体の存在が示唆されるが、詳細については今後さらなる検討が必要である。

茶の主要成分のひとつであるカフェインについても、阿波晩茶浸出液中の含有量を分析した(図 3)。カフェインは熱水で容易に溶出される<sup>10)</sup>ことから、沸騰水で浸出した試験区には他の試験区より多くカ

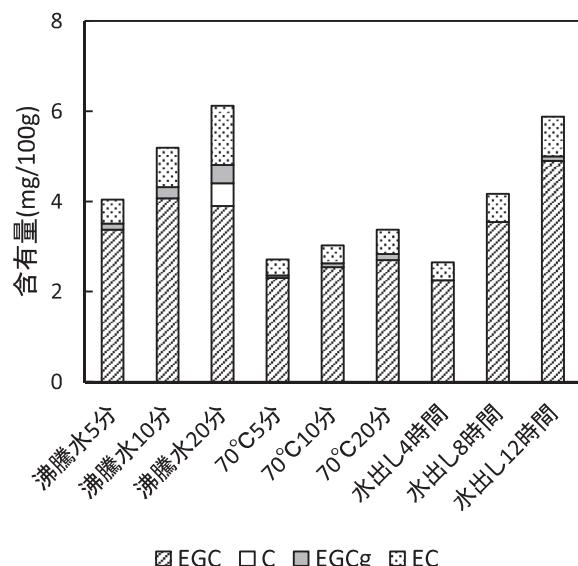


図 2 阿波晩茶浸出液のカテキン

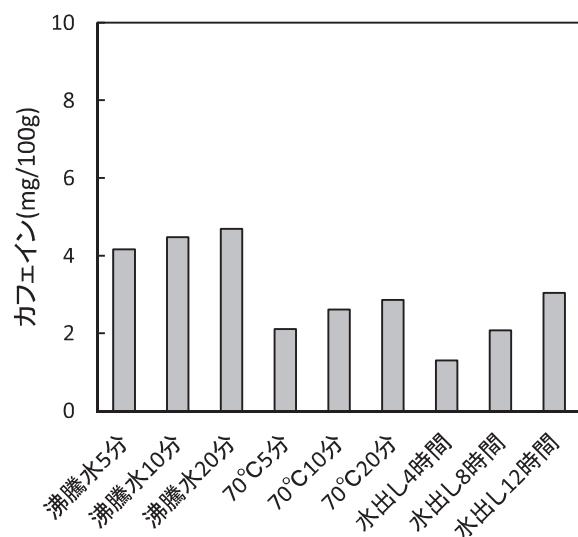


図 3 阿波晩茶浸出液のカフェイン

フェインが含まれており、5 分間の浸出で 20 分浸出の 90% 近いカフェインが溶出していた。またカテキン類の場合と同様に、水出しでも時間をかけば沸騰水で浸出した試験区の 60% 程度のカフェインが含まれていた。

カテキン類およびカフェインは茶の呈味を構成する成分として重要であり、遊離型カテキンは苦味、エステル型カテキンは強い苦渋味、カフェインは苦味を示すことが知られている<sup>11)</sup>。浸出条件の違いによってこれら成分の組成や含量に違いが見られることから、浸出条件が阿波晩茶の呈味特性にも影響を及ぼす可能性がある。しかしながらこのことについては、官能評価や味覚センサーによる分析などと

の相関を検討する必要があると考えられる。

#### 4まとめ

浸出条件の違いによる阿波晩茶浸出液の抗酸化活性やカテキン類含量などに及ぼす影響について検討し、以下のような結果が得られた。

- (1) 阿波晩茶浸出液の抗酸化活性は浸出温度や時間によって変化し、沸騰水試験区と他の試験区で顕著な差が認められた。
- (2) 全ての試験区において、阿波晩茶浸出液中にはエステル型カテキンより遊離型カテキンの方が多く含まれていたが、カテキン類の組成は浸出条件によって異なっていた。

#### 謝辞

本研究を実施するにあたり分析試料をご提供いただいた、宮口園の宮口由基子様に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 宮川金二郎. “後発酵茶とは”. 日本の後発酵茶－中国・東南アジアとの関連－. 宮川金二郎編. さんえい出版, 1994, p. 7-10.
- 2) Nishioka, H. ; Mizuno, T. ; Iwahashi, H. ; Horie, M. “Changes in lactic acid bacteria and components of Awa-bancha by anaerobic fermentation”. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2020, Vol. 84, No. 9, p. 1921-1935.
- 3) 加藤みゆき, 田村朝子, 水落由美子, 大森正司, 難波敦子, 宮川金二郎. “阿波晩茶製造工程における風味成分の変化とその特徴”. 日本家政学会誌, 1993, Vol. 44, No. 7, p. 561-565.
- 4) Watanabe, J. ; Oki, T. ; Takebayashi, J. ; Yamasaki, K. ; Takano-Ishikawa, Y. ; Hino, A. ; Yasui, A. “Method validation by interlaboratory studies of improved hydrophilic oxygen radical absorbance capacity methods for the determination of antioxidant capacities of antioxidant solutions and food extracts”. Analytical Sciences, 2012, Vol. 28, p. 159-243.
- 5) 金谷建一郎. “ポリフェノール類・総量”. 新・食品分析法〔II〕. (社)日本食品科学工学会食品分析研究会, 光琳, 2006, p. 68-79.
- 6) 鶴田裕美, 吉村臣史, 澤田和敬. “農水産物の機能性を強化する加工条件の構築と応用－レンコンの部位ごとにおける成分および機能性比較－”. 佐賀県工業技術センター研究報告, 2014, 第23号, p. 57-62.
- 7) 宮崎絵梨, 中西謙二. “春期阿波晩茶製造工程における各種成分分析”. 徳島県立工業技術センター研究報告, 2007, 第16号, p. 37-40.
- 8) 松崎妙子, 原征彦. “茶葉カテキン類の抗酸化作用について”. 日本農芸化学会誌, 1985, Vol. 59, No. 2, p. 129-134.
- 9) 堀江秀樹, 氏原ともみ, 木幡勝則. “茶主要成分の茶浸出液への溶出特性”. 茶業研究報告, 2001, No. 91, p. 29-33.
- 10) 津志田藤二郎, 村井敏信. “茶葉に存在するカフェインの熱湯による特異的溶出”. 日本農芸化学会誌, 1985, Vol. 59, No. 9, p. 917-919.
- 11) 中川致之. “茶の味の成分”. 茶の科学. 村松敬一郎編. 朝倉書店, 1991, p. 106-115.