

高機能紅茶飲料の開発

Development of Functional Tea Drink

中村優子・高橋祐介*・景山誠二**

Yuko Nakamura-Sugimoto, Yusuke Takahashi and Seiji Kageyama

食品開発研究所 応用生物科、*現所属：宮城県保健環境センター、**鳥取大学医学部感染制御学講座ウイルス学分野

紅茶には、テアフラビン類というポリフェノールが多く含まれ、カテキン類よりも力価が高いことが知られている。そのため、高い生活習慣病予防や抗微生物作用を持つが、その効果はあまり知られていない。本研究では、インフルエンザウイルスに対する予防効果が期待される紅茶製造条件の確立を行い、この紅茶が抗酸化性にも優れているという機能性を示唆した。

1. はじめに

紅茶に特有のポリフェノールとして、紅茶の紅色成分であるテアフラビン類がある。その中でもテアフラビンジガレート(TFDG)が最も力価が高いことが分かっている。その機能性として、高い抗酸化性由来する抗微生物効果や¹⁾、血中コレステロール値の低下などが報告されているが²⁾、緑茶の機能性成分であるエピガロカテキンガレートより、その効果は高いとされている³⁾。しかしながら、生体利用性がカテキンより低く、主要な紅茶高分子化合物の多くの構造が決定されていない点などから、カテキンほどの知見は集積しておらず、テアフラビンの機能性が見過ごされているのが現状である⁴⁾。本研究では、紅茶うがいインフルエンザに対して効果があるという知見から⁵⁾、機能性飲料としての紅茶に着目した。テアフラビン類を高濃度に含む紅茶飲料を開発し、そのインフルエンザ予防効果を培養細胞レベルで実証する。

2. 実験方法

2.1 茶葉の選定

(株)澤井珈琲より提供を受けた、キーン、ダーズリン、セイロン、オレンジペコー、アッサム、ウバ、ノンカフェインの各茶葉 1g を、熱水で 5 分間抽出して、最終液量 100ml とした。0.45 μ m フィルター(ザルトリウス)でろ過し、高速液体クロマトグ

ラフィー(HPLC、島津製作所)の分析に供した。分析条件は、以下の通りである。

分析カラム：CAPCELLPAK C18 MG S-5 (4.6mm Φ × 150mm、資生堂)

分離液：水-アセトニトリル-リン酸 (76:23:1)

カラム温度：40°C

検出波長：UV280nm

標準物質としてテアフラビン(TF)、テアフラビン-3-ガレート(TF3G)、テアフラビン-3'-ガレート(TF3'G)、テアフラビンジガレート(TFDG、いずれも和光純薬製)、を用いテアフラビン類の測定を行い、TFDG濃度の高いものを選抜した。

インフルエンザウイルスに対する茶葉熱水抽出物の効果試験については、鳥取大学医学部で実施された。

2.2 クリームダウン(混濁)防止策の検討

2.2.1 水抽出法によるカフェイン除去

茶葉を蒸留水で抽出し、茶こしで茶葉を回収し常温で水分を除去した。その後熱水で 5 分抽出を行った。水抽出ならびに熱水抽出液を、2.1 項の方法に基づいて HPLC 法に供した。クリームダウンの判定は、熱水抽出液を放冷後、4°C で 12 時間以上静置したもので行った。

2.2.2 タンナーゼ処理

茶葉熱水抽出液にタンナーゼ(和光純薬)を混和

し保温処理した。酵素反応停止は抽出液の pH を操作することで行った（反応条件等は製法に関わるため非公開）。TFDG 測定は、2.1 項の方法に基づいて実施した。

2.2.3 ポリフェノールに対する影響

ポリフェノール濃度は、既報に基づきフォーリン・チオカルト法で測定した⁶⁾。96 穴マイクロプレート上で、蒸留水で希釈した試料 70 μ l と蒸留水で 2 倍希釈したフォーリン・チオカルト試薬（シグマ）を 15 μ l 混和した。5 分後 2%炭酸ナトリウム水溶液を 75 μ l 加え攪拌した後、15 分間反応させた。吸光度 660nm を測定し、没食子酸水溶液で作成した検量線からポリフェノール含量を没食子酸相当量 (mg/ml GAE) として算出した。

抗酸化性測定は、既報に基づき ORAC 法 (Oxygen Radical Absorbance Capacity) にて実施した⁷⁾。試料をヘキサン：ジクロロメタン(1:1、v/v)で抽出 (L-ORAC 試料) 後、AWA 溶液 (アセトン:水:酢酸=70:29.5:0.5、v/v) で抽出した (H-ORAC 試料)。各抽出液をリン酸カリウム緩衝液で希釈し、抽出液とした。各抽出液または Trolox 標準溶液に標識物質として 94.4nM Fluorescein (シグマ)を加え、これにラジカル発生剤として 31.7mM AAPH (和光純薬)を加えた。反応は 37°Cで行い、Fluorescein の蛍光強度の減弱を、プレートリーダー (Tecan) を用いて 90 分間継時的に測定した (Ex. 480nm、Em. 530nm)。標準試料より得られた検量線から L-ORAC と H-ORAC 試料の Trolox 等量を換算し、その総和を ORAC 値とした。

3. 結果と考察

3.1 茶葉の選定

市場に流通している様々な茶葉を入手し、成分比較を行ったところ、アッサム茶葉が最も TFDG の豊富な茶葉であることが分かったため、用いる茶葉としてアッサムを選定した (表 1)。

表 1 茶葉熱水抽出液中のテアフラビン類の定量

茶葉	テアフラビン類			
	TF	TF3G	TF3'G	TFDG
キームン	1.62	12.69	2.83	2.99
ダーズリン	0.73	6.44	1.14	1.68
セイロン	0.83	4.55	1.06	1.02
オレンジペコ	0.75	0.94	0.37	1.19
アッサム	0.45	3.28	1.59	3.52
ウバ	2.93	7.30	1.48	0.99
ノンカフェイン	0.27	0.31	0.14	0.44

(単位: mg/g 茶葉)

アッサム熱水抽出液をインフルエンザウイルス感染細胞に投与したところ、ウイルス感染抑制効果があることが分かった (データ非公開)。この試験結果から、ウイルス感染抑制が期待される紅茶濃度を算定した (濃度非公開)。

ウイルスへの効果が期待される TFDG 濃度を達成する抽出条件の決定のため、茶葉の重量変化に伴う TFDG 量の推移を調べた (図 1)。

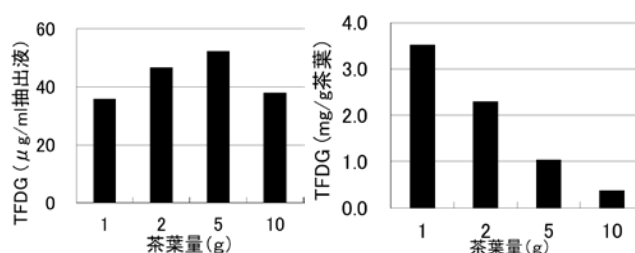


図 1 抽出液 (右)、茶葉 (左) あたりの TFDG 濃度の推移

抽出液 100ml あたり茶葉 5g までは茶葉量依存的に TFDG 濃度の上昇がみられるが、茶葉量換算にすると茶葉量を増加しても抽出効率はむしろ低下することが分かった。また、株式会社澤井珈琲における官能評価から、飲用に適した抽出条件を決定した (データ非公開)。

3.2 クリームダウン (白濁) 防止策の検討

3.2.1 水抽出法によるカフェイン除去

成分が豊富な紅茶飲料は冷えると混濁 (クリーム

ダウン) が起こるが、これはカテキンとカフェインが重合することで起こる現象であり、製品の外観を損なうため防止策を講じる必要がある。本研究の浸出条件ではクリームダウンを起こしたため、最初にコーヒーで常用されている水抽出⁸⁾による除カフェインを試みた。TF 類をはじめとする紅茶ポリフェノールの水相への溶出は 100 分程度でプラトーに達し、このときの TFDG の推移も同様であることが分かった (図 2)。また、水抽出後茶葉の熱水抽出液であっても、高濃度 TFDG が達成できることが分かった (図 3)。しかしながら、水抽出法で得られた熱水抽出液では、どの水洗条件でも熱水抽出液の清澄化へは至らず、他の方法を講じることにした。

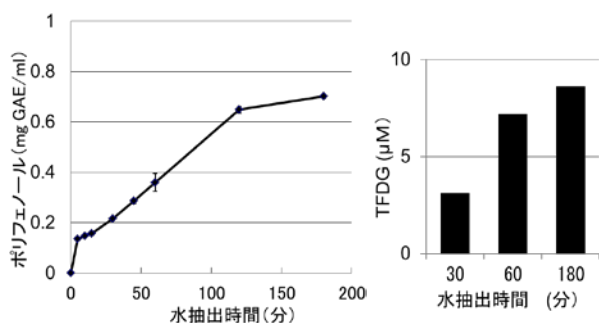


図2 水相へのポリフェノール (右)、TFDG (左) の転溶

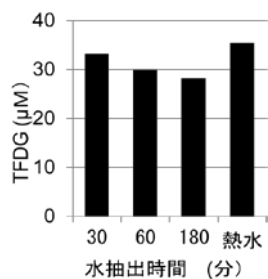


図3 水洗茶葉を用いた熱水抽出液中の TFDG 量の推移

3.2.2 タンナーゼ処理

クリームダウン防止にはタンナーゼによる酵素処理を行い、カテキンとカフェインの重合を抑える方法がある。熱水抽出液に対してタンナーゼ処理を行ったところ、クリームダウンを抑制することができた。

ところが成分の確認を行うと、テアフラビンジガレートが顕著に低下していることが分かった (図 4)。これは、用いた酵素がテアフラビンのガレートを切

断するためと推測された。このことは、TF3G や TF3'G も減少し、TF が圧倒的に増加していることから示唆される。しかしながら、この熱水抽出液でインフルエンザウイルス感染抑制効果が確認されたことから (データ非公開)、タンナーゼ処理による清澄化を製品に採用することとした。

表2 タンナーゼ処理によるテアフラビン類の変化

タンナーゼ	テアフラビン類				
	TF	TF3G	TF3'G	TFDG	total TFs
処理前	16.7	22.5	14.1	26.9	80.2
処理後	56.0	6.4	3.6	2.6	68.6

(単位: μM)

3.2.3 ポリフェノールに対する影響

タンナーゼによる熱水抽出液の処理により、TF-ガレート類は顕著に減少したが、他のポリフェノールに対する影響についても総ポリフェノール量の定量により確認した (図 4)。熱水抽出液はタンナーゼ処理の有無にかかわらず、同等程度のポリフェノール濃度を示した。また、このポリフェノール濃度は市販紅茶 (無糖ストレートティ、A社製品) と比較し、有意に高いことが分かった。

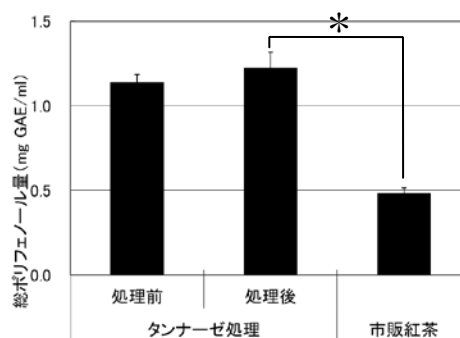


図4 ポリフェノールに対するタンナーゼの影響 (* $p < 0.01$)

熱水抽出液中にポリフェノールが増加していることを確かめるために、ポリフェノールの主要な機能である抗酸化性を測定した。測定法としてポリフェノールのラジカル捕捉能を利用した、ORAC 法を適用した (図 5)。その結果、ポリフェノール量と同等に、ORAC 値も増加していることが分かった。

以上の結果から、本研究で得られたタンナーゼ処理茶葉熱水抽出物は、インフルエンザウイルスに対する予防効果を期待できるだけでなく、一般の紅茶と比して抗酸化性の高い、機能的な紅茶飲料としての可能性が示唆された。

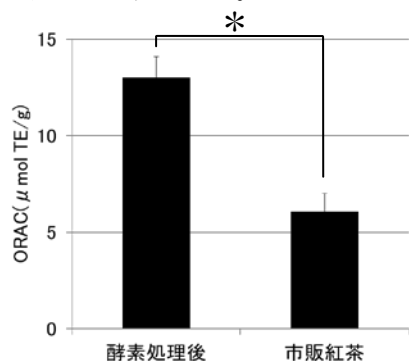


図5 ORAC測定によるポリフェノール量の確認(* p<0.01)

4. おわりに

本研究は、インフルエンザ予防が期待される高機能な紅茶飲料の開発を目標とし、その達成に必要な、1) 茶葉の選定、2) 熱水抽出液の清澄化とその影響確認、について実施した。

市場に流通している様々な茶葉を入手し、成分比較を行ったところ、アッサム茶葉が最もTFDGの豊富な茶葉であることが分かったため、使用する茶葉に選定し、そのインフルエンザウイルス予防効果を細胞実験で検証した。

TFDGを高濃度に含む条件では、当然他の紅茶成分を多く含む紅茶飲料となる。そのため高濃度の紅茶で発生するクリームダウンの防止のため、酵素処理を行ったところ、TFDGが検出限界近くまで低下していることが分かった。しかしながら酵素分解後の熱水抽出液では、1) テアフラビン総量は分解前より大きく変化しないこと、2) インフルエンザウイルス予防効果を認めること、を確認している。

また本研究の結果から、アッサムにはTFDG以外

のインフルエンザ予防に有効な成分が含まれていることが示唆された。

本研究は製品化に活用され一定の成果を見たが、今後も継続しTFDG以外の新たなインフルエンザ予防因子の探索を行いたいと考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、株式会社澤井珈琲様に試料の提供をはじめとした様々なご協力を頂きました。深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 戸田ら；日本細菌学雑誌、第44巻(4), p.669-672(1989).
- 2) Maron *et.al.*；Arch. Intern. Med., 163 (12), p.1448-1453(2003).
- 3) Nakayama *et.al.*；Antiviral Research, 21, p.289-299(1993).
- 4) 鳥居恭好；「食品機能性の科学」(食品機能性の科学編纂委員会 編集), In Tech Information, p.360-362(2008).
- 5) 岩田ら；感染医学雑誌、第71巻(6), p.487-493(1997).
- 6) 辻ら；山梨県工業技術センター研究報告, 15, p.34-39(2000).
- 7) Prior, L. R., *et.al.*；Assays for hydrophilic and lipidphilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and the other biological and food samples. J. Agric. Food. Chem., 51, p.3273-3279(2003).
- 8) Maria *et.al.*；Plant biochemistry: a naturally decaffeinated arabica coffee. Nature, 429, p.826 (2004).