

大豆タンパクによる茶カテキン類の分離法

石丸幹二*・野中源一郎**

Rapid purification of catechins using soybean protein

Kanji ISHIMARU* and Gen-ichiro NONAKA**

*Saga University, 1 Honjo, Saga 840-8502

**Usaien Pharmaceutical Company, 1-4-6 Zaimoku, Saga 840-0055

For the rapid purification of catechins from tea leaves, soybean protein was applied. Amongst catechins [(-)-epigallocatechin (EGC), (+)-catechin (C), (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG), (-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG)] in a tea leaf extract, the catechin gallates (EGCG and ECG) were specifically extracted by complex formation with soybean protein. The procedure is as follows: 1) Soybean protein was prepared from autoclaved de-fatted soybean. 2) The protein extract was mixed with a water extract of tea leaf and the pH of the mixture was adjusted to 4.5. 3) Catechin-protein complex, precipitated in the mixture, was filtrated and dried. 4) Catechins were extracted with acetone-water (1:1) from the catechin-protein complex. The complex of the catechin and soybean-protein would be a new food and/or pharmaceutical product, which is attractive by its bio-activities originated from both catechins and soy protein.

(Received Mar. 28, 2001 ; Accepted May 30, 2001)

茶カテキン類は、抗菌、抗酸化活性などの多様な生理活性^{1)~6)}を有し、食品分野をはじめとして、さまざまな産業分野で利用されている⁷⁾⁸⁾。その抽出、精製においては、有機溶媒の使用、各種カラムクロマトグラフィーの実施が不可欠であり、操作も煩雑である。このことが、精製カテキンの高価格の要因となっている。著者らは、前報⁹⁾において、活性白土を用いた脱カフェイン法、ならびに水酸化カルシウムによるカテキンカルシウム塩の調製法について紹介した。その手法は、茶葉から有機溶媒を全く使用せず、簡便な操作でカテキン類を、食品分野での応用が可能なカルシウム塩として分離する優れた方法であった。本研究では、カテキン類の新たな効率的抽出法として、大豆タンパクを利用する方法について検討した。カテキン類のようなタンニン類がタンパクと結合することは古くから一般的に知られているが、実際にどの種のタンパクがこういった化学構造のタンニン類と結合(多分に特異的である)するかは、詳しくは知られ

ていない。今回は、比較的供給の容易な大豆タンパクとして、脱脂大豆をオートクレーブにより加熱、加圧して得られる変性分離タンパクを用い、そのタンパクに対する茶カテキン類の結合性を調べた。さらに、得られる大豆タンパク-カテキン複合体から、再度カテキン類を分離抽出することにより、茶葉からのカテキン類の新しい簡便抽出、精製法を確立した。

実験方法

1. 大豆タンパクの調製

市販の脱脂大豆 100g および水(イオン交換水) 1l を三角フラスコに入れ、オートクレーブ(120°C, 15分)により加熱、加圧をおこなった。オートクレーブした脱脂大豆と水の混合物は、室温まで冷却後、大豆固形分をガーゼ(四重)にて圧搾濾去した。濾液として得られるエキス(730ml)を大豆タンパク抽出物とした。

* 佐賀大学農学部 (〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄 1)

** ウサイエン製薬 (〒840-0055 佐賀県佐賀市材木 1-4-6)

2. 茶エキスの調製

市販の緑茶（佐賀県嬉野釜入り茶，玉緑茶）50 gをビーカーにいれ，85℃の熱湯を800 ml加え，2時間室温に静置して抽出した。茶抽出エキスは，プフナーロートを用いて濾紙（ADVANTEC，5B）にて吸引濾過した。得られる濾液（580 ml）を茶エキスとした。

3. 大豆タンパク-カテキン複合体の調製

前述の大豆タンパク抽出物（730 ml）と茶エキス（580 ml）をビーカー内にて混合した。混合液のpHは6.23であった。その混合液に，アスコルビン酸水（pH 2.57，30 g/l）を200 ml加え，pH 4.5に調整した。析出する沈殿は，上澄み液をデカンテーションにて除いた後，アスコルビン酸水（pH 4.5）にて2回洗浄（デカンテーション）した。得られた沈殿を，大豆タンパク-カテキン複合体として定温乾燥機にて乾燥した（乾燥重量14.5 g）。

また，1と同様の操作により得られる大豆タンパク抽出物（730 ml）を，3と同様の方法によりアスコルビン酸水にてpH 4.5に調製し，析出する沈殿をアスコルビン酸水（pH 4.5）にて洗浄後（デカンテーション法），乾燥し，大豆タンパク（13 g）とした。

4. HPLC分析

茶抽出エキス（茶エキス），大豆タンパク抽出物と茶エキスの混合物をpH 4.5に調製した上澄み液（混合液），大豆タンパク-カテキン複合体（タンパク-カテキン）および大豆タンパク（タンパク）をサンプルとした。茶エキスおよび混合液は，液をそのままミリポアフィルター

にて濾過した濾液を用いた。また，タンパク-カテキンは7 mgを1 mlの水，50%水性アセトンまたアセトンにてそれぞれ室温下2時間抽出したものをミリポアフィルターにて濾過し，サンプルとした。タンパクは7 mgを1 mlの水，アセトン，また50%水性アセトンにてそれぞれ室温下2時間抽出したものをミリポアフィルターにて濾過したものをサンプルとした。それぞれ2-4 μ lをHPLC分析に供した。HPLC条件は以下の様である。カラム：TSK-gel ODS-80Ts（4.6×250 mm），カラム温度：40℃，移動相：A；1 mM テトラブチルアンモニウムクロライド（pH 2.9 酢酸にて），B；CH₃CN，A：B=9：1⇔1：4（30分間），流速：0.75 ml/min，検出：280 nm（UV），溶出時間（min）：アスコルビン酸（4.5），（-）-エピガロカテキン（15.0），（+）-カテキン（17.0），カフェイン（17.4），（-）-エピカテキン（20.0），（-）-エピガロカテキン3-O-ガレート（20.7），（-）-エピカテキン3-O-ガレート（24.1）。なおカテキン類の化学構造はFig. 1に示した。

実験結果および考察

1. カテキン類の分離

茶エキスおよび混合液のHPLCプロフィールをFig. 2とFig. 3に示した。また，茶エキスおよび混合液中の各種カテキン類およびカフェインの含量（mg/100 ml エキス）をTable 1にまとめた。今回実験に供した緑茶は，一般的な緑茶と同様に（-）-エピガロカテキン

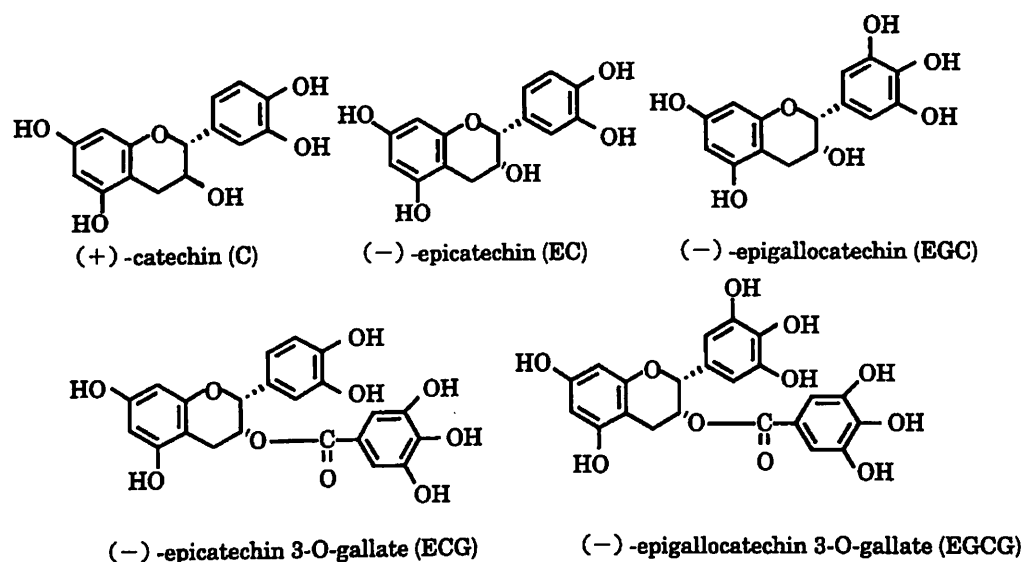
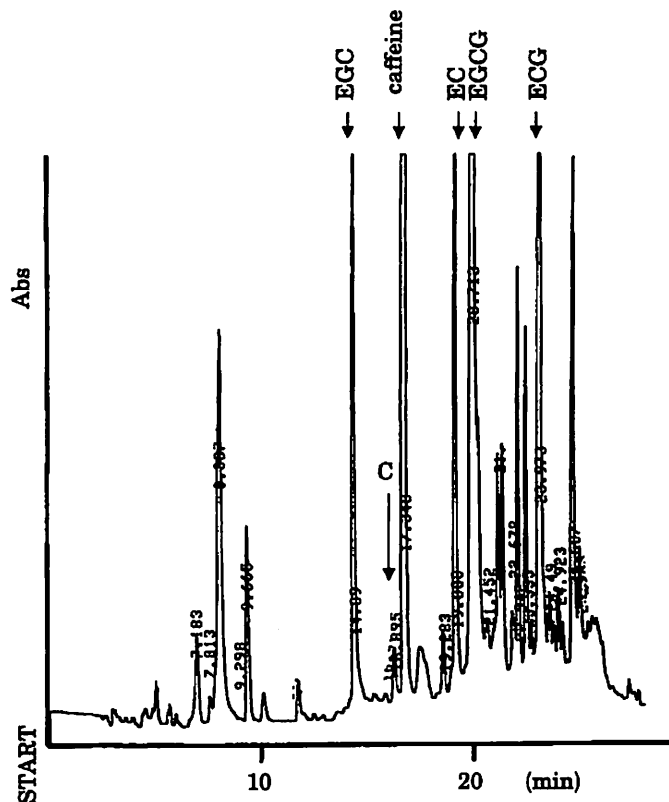


Fig. 1 Chemical structures of polyphenols in tea leaf



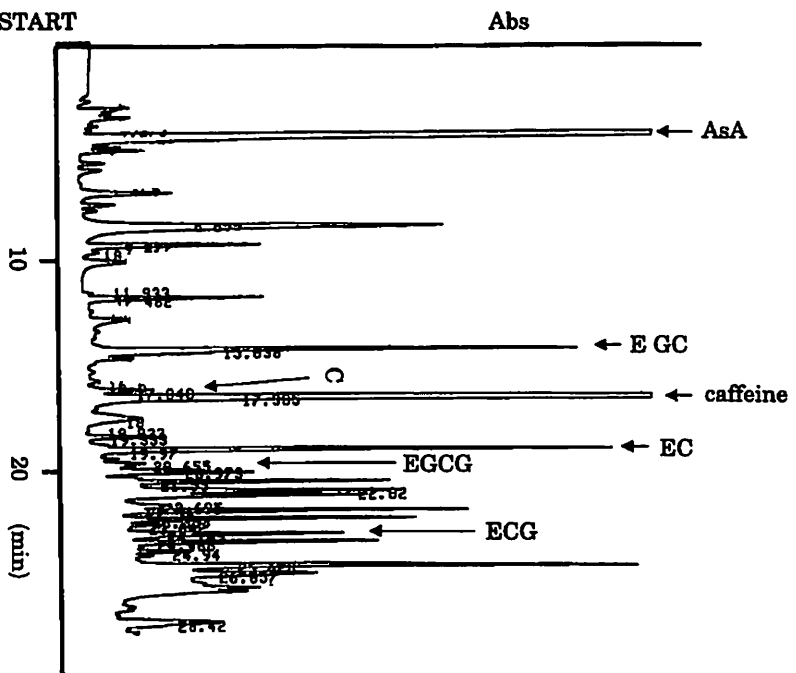


Fig. 3 HPLC profile of the mixture of tea extract and soy protein (pH 4.5)
AsA : ascorbic acid

の含量が、もとの素材である茶葉エキスのそれと比べてそれぞれ3%および26%と激減していた (Table 1). それに対して、(-)-エピガロカテキン (EGC), (+)-カテキン (C) および(-)-エピカテキン (EC) などのカテキン類は66-70%, またカフエインは86%の残存率 (茶葉エキスと比較して) であった. このことは、茶カテキン類、特にEGCGやECG等のガレート類が、大豆タンパクと複合体を形成し、その不溶性に伴う沈殿形成時に、タンパク-カテキン複合体として共沈していることを示している. したがって、大豆変性タンパクを利用して、茶葉エキスから上記のような簡便な操作により、カテキン類 (特にガレート類) を分離することができることが明らかになった. なお、大豆タンパクの沈殿化のための試薬として、今回アスコルビン酸水を用いたが、大量の試料を調整する際はIN HCl等の使用も可能であった.

2. 複合体からのカテキン類の溶出

次に、水-アセトン系の溶媒を用いて、複合体からのカテキン類の溶出試験を行った. タンパク-カテキン水を、50%水性アセトンまたはアセトンで抽出した抽出液の

HPLCプロファイルを Fig. 4に、溶出されたカテキン類およびカフエインの、抽出したタンパク-カテキン量に対する含量 (%、乾燥重量あたり) を Table 2に示した. タンパク-カテキン水を水で抽出した場合は、カフエインとともに若干のカテキン類 (EGC, EC および EGCG) のピークが認められたが、EGCやECと比較してEGCG等のガレート類の溶出が少しい傾向が認められた. アセトン抽出ではカテキン類の溶出はほとんど認められなかった. カテキン類の溶出効率は、水、アセトンの1:1混液である50%水性アセトンが最も良好で、主成分であるEGCGを中心に多量のカテキン類の複合体からの溶出が認められた (Table 2). 本論文では示していないが、茶葉エキスを混合する大豆タンパク抽出液の割合を少なくすれば、それから得られるタンパク-カテキン中のカテキン類の結合割合 (カテキン含量) は増加することが認められている. その場合、EGC, EC, EGCG および ECG の量的比率は変わらないが、EGCG が10%以上 (タンパク-カテキンの乾燥重量あたり) 溶出してくるタンパク-カテキンも著者らの実験で得られ

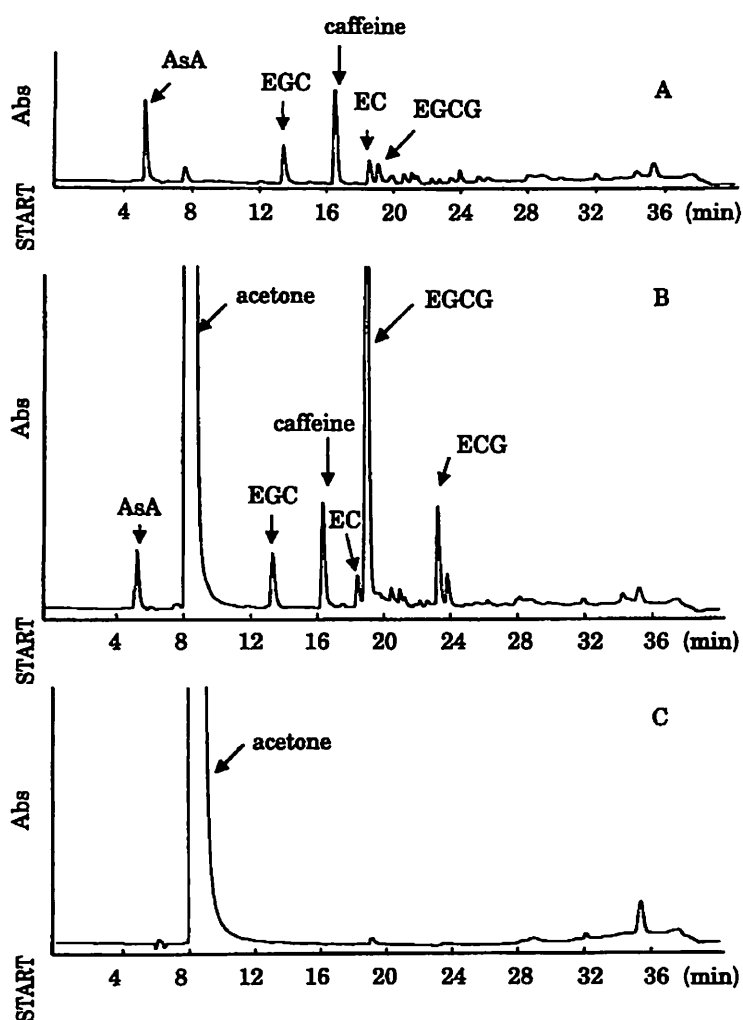


Fig. 4 HPLC profiles of the extract of protein-catechin

A : water, B : water-acetone (1 : 1), C : acetone. AsA : ascorbic acid

Table 2 The concentrations of polyphenols and caffeine extracted from protein-catechin complex (% as dry weight of the complex)

Solvent for extraction	EGC	C	EC	EGCG	ECG	Caffeine
Water	0.4	—	—	0.1	—	0.2
Water-acetone (1 : 1)	0.6	—	0.2	4	0.5	0.2
Acetone	—	—	—	0.01	—	—
Methanol	0.3	—	0.1	2.1	0.2	0.2
Ethanol	—	—	—	0.05	—	0.1
Water-ethanol (1 : 1)	0.4	—	0.1	2.9	0.3	0.2

EGC : (-)-epigallocatechin, C : (+)-catechin, EC : (-)-epicatechin, EGCG : (-)-epigallocatechin 3-O-gallate, ECG : (-)-epicatechin 3-O-gallate

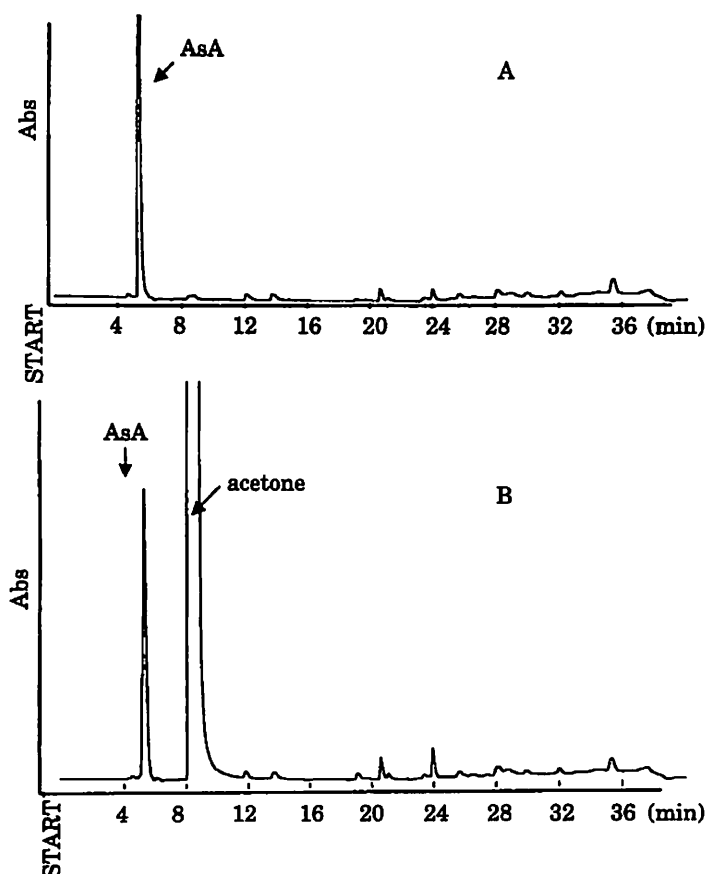


Fig. 5 HPLC profiles of the extract of soy protein

A : water, B : water-acetone (1 : 1). AsA : ascorbic acid

ている。従って、本法により、茶葉の水エキスから特にEGCG等のカテキンガレート類を効率的に分離することが可能であった。

タンパク-カテキン複合体からのカテキン類の溶出溶媒に関しては、メタノールおよびエタノール-水系の溶媒についても検討した (Table 2)。溶出溶媒として100%メタノールを使用した場合は、50%水性アセトンのその約50%の溶出量、100%エタノールではほとんど溶出されず、50%水性エタノールで50%水性アセトンのその約70%の溶出量であった。溶媒の種類により、溶出量には差が認められたが、溶出されるカテキン類の構成比率はほぼ同様であった。

なお、大豆タンパクを同様に水また50%水性アセトンにて抽出した抽出液のHPLCプロフィールをFig. 5に示しているが、若干のフラボノイド類のピーク (20-36分) が認められた。

今回得られたタンパク-カテキン複合体は、茶葉エキ

スから簡便な手法で調製できること、有機溶媒を使用しないで調製できること、大豆タンパクによる栄養面での付加価値があること、また、大豆タンパクと茶カテキンの両成分による機能面での相乗効果も期待されること、など多くの利点があり、新しい食品素材としても非常に興味深いものと思われる。以上のように、今回開発した方法は、大豆タンパクと茶カテキンの結合性を利用して、茶葉エキスからカテキン類を簡便に分離する非常にユニークな方法といえる。

要 約

- (1) 茶葉からカテキン類を効率的に分離する方法として、カテキン類を大豆タンパクと結合させ、大豆タンパク-カテキン複合体として調製する方法を開発した。
- (2) 茶葉の水エキスに、脱脂大豆から抽出した変性タンパクを混合し、酸性に調整することによりタンパク-カテキン複合体を沈殿物として得た。得られた大豆タンバ

ク-カテキン複合体は、50%水性アセトンで抽出することにより EGCG を主とするカテキン類を多量に遊離した。

(3) この複合体は、大豆タンパクと茶カテキンの機能性の相乗効果も期待され、新しい食品素材としても注目された。

本研究の一部は、平成 10-12 年度佐賀県提案公募型産学官共同研究プロジェクト事業、また、2001 年度中壘研究奨励会研究助成によりおこなった。

文 献

- 1) 黒田行昭・原征彦：お茶はなぜ体によいのかーカテキンパワーの秘密，裳華房（1999）。
- 2) LEDNICER, D. and SNADER, K., M. : Economic and Medicinal Plant Research Volume 5 (edited by WAGNER H. and FARNSWORTH N.R.), 1, ACADEMIC PRESS (1991).
- 3) 尾形有規・伊勢村譲：組織培養, 20, 121 (1994).
- 4) 山本（前田）万里：食科工, 43, 653 (1996).
- 5) YEN, G-CHIN, CHEN, H-YIN and PENG H-HSUAN : *J. Agric. Food Chem.*, 45, 30 (1997).
- 6) JANKUN, J., SELMAN, S., H., SWIERCZ, R. and S-JANKUN, E. : *Nature*, 387, 561 (1997).
- 7) 川上正子・原 征彦： *New Food Industry*, 40, 33 (1998).
- 8) 良辺文久・海野知紀： *New Food Industry*, 40, 27 (1998).
- 9) 石丸幹二・野中源一郎：日本食品化学学会誌, 8, 44 (2001).

(平成 13 年 3 月 28 日受付, 平成 13 年 5 月 30 日受理)