

緑茶飲料水及び海藻抽出液の 総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害

花田 美貴*¹・古川 真一*²

1. 緒言

最近、ストレスやタバコ、大量のアルコール、紫外線、排気ガス、農薬など活性酸素のもとになるといわれる要因が生活の中に溢れている。呼吸で取り込んだ空気中の酸素が体内で反応してエネルギーが作り出されるとき、この酸素の一部が、酸化力の強い活性酸素に変わる。活性酸素はとてもし反応性が強く、体を構成しているタンパク質、脂質、DNAなどを酸化させるために、老化を促進させ、がんや動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病を引き起こす要因といわれている。活性酸素とアンチエイジングには深い関係があるといわれている。アンチエイジングとは加齢に伴う症状の予防と治療、老化防止という意味である。老化のメカニズムはすべて解明されているわけではないが、体内で活性酸素の作用により生じた有害な過酸化物が蓄積されて老化を進行させていることが分かってきている。

このような状況を背景にして、活性酸素やフリーラジカルなどによるヒトへの細胞傷害や生活習慣病の予防対策として、抗酸化性を有するビタミン類に加えて、植物性食材中の抗酸化性成分に着目し、食品の三次機能に焦点をあてた研究が進んでいる。

活性酸素を消去するスカベンジャーと呼ばれる抗酸化物質には、ビタミンE、ビタミンC、 β -カロテンなどが有名であるが、植物色素の成分であるファイトケミカル（ポリフェノール類、フラボノイド類など）にも抗酸化作用がある。その中でも、茶葉や野菜のポリフェノールについては研究報告が多く、特に茶カテキンの消化酵素 α -アミラーゼ阻害に関するものは多い。¹⁾ また、海藻のフロロタンニンにも同様な α -アミラーゼ阻害活性があるとの報告もある。²⁾

一方、ポリフェノール類の抗酸化力測定には、

DPPH法³⁾を用いる場合が多いが、最近呈色液クロモゲンを使用した操作方法も簡便なOXY吸着テスト法⁴⁾を基準としたフリーラジカル評価装置（Wismell社Free Radical Elective Evaluator：以下F.R.E.Eとする）が出現して、血液、野菜、果物等の抗酸化力測定に利用されている。

そこで、本研究では、日本型食事において極めて身近な食材を題材に、且つ抗酸化力を有するポリフェノール成分の茶カテキンや海藻フロロタンニンに注目して、それらのポリフェノール成分を含む市販緑茶飲料や食用海藻の抽出液を検体として、それらの総抗酸化力と消化酵素 α -アミラーゼ阻害の関係を調べた。

本報告は、比治山大学短期大学部専攻科栄養専攻における特別研究論文の一部をまとめたものであることを明記しておく。

2. 実験材料及び実験方法

1) 試薬・実験材料

〈試薬〉

(-)エピガロカテキンガレード (EGCG結晶)：フナコシ株式会社、マルトース (特級)：片山化学工業株式会社、 α -アミラーゼ (豚膵臓)：SIGMA Chemical. Co. Ltd. 可溶性でんぷん (一級)：片山化学工業株式会社、ソモギー・ネルソン溶液：片山化学工業株式会社

〈実験材料〉

・緑茶飲料……「おーいお茶濃い味」(株式会社伊藤園)、「伊右衛門」(サントリー株式会社)、「ヘルシア緑茶」(花王株式会社)、「伊右衛門濃いめ」(サントリー株式会社)、「カテキン緑茶」(株式会社伊藤園)を購入し、実験に使用した。実験に使用し

*¹専攻科栄養専攻修了生、*²総合生活デザイン学科

た緑茶飲料は次のような条件で選定した。「おーいお茶濃い味」, 「伊右衛門」は日経プラス1「読者が緑茶ボトルを飲み比べ2006年6月15日」ランキングにおける人気上位5位以内を基準に選定した。「伊右衛門濃いめ」は「伊右衛門」との比較を基準として選定した。また, 「ヘルシア緑茶」はペットボトル(350ml)中にカテキン成分540mgが⁵⁾, 「カテキン緑茶」はガレート型カテキン90%が添加されており, 特定保健用食品であることも選定基準である。・海藻試料……「コンブ」, 「アラメ」, 「芽ヒジキ」, 「長ヒジキ」は市販品(ヤマナカフーズ株式会社)を使用した。

2) 海藻抽出液の調整

実験に使用した海藻抽出液の調整方法は, 実際に和食料理で使用される「昆布出汁」の条件を用いて, 次のように行った。各海藻は冷水または熱水(すなわち, 冷水抽出と熱水抽出)で抽出した。冷水抽出では三角フラスコ中で各藻体3.0gを蒸留水100mlに浸漬し, アルミホイルで遮光して3日間冷蔵中(5℃)に放置した。その後, 各藻体を除去し, 遠心分離により沈殿物を除去した。得られた上清を冷水抽出液として少量ずつに分割して凍結保存した。

熱水抽出では, 三角フラスコ中で各藻体3.0gを蒸留水100mlに30分間浸漬した後, 時々沸騰する湯浴中で15分間加熱し, 冷却後初期の水量まで蒸留水を添加し, アルミホイルで遮光して3日間冷蔵中(5℃)に放置した。その後, 各藻体を除去し, 遠心分離により沈殿物を除去した。得られた上清を熱水抽出液として, 少量ずつに分割して凍結保存した。

3) フリーラジカル評価装置(F.R.E.E)による総抗酸化力テスト

(-)EGCA溶液の総抗酸化力テスト⁵⁾

(-)EGCGの濃度勾配を0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ として調整し, 各濃度EGCG溶液の総抗酸化力をF.R.E.Eの操作方法に従って測定し, (-)EGCGの検量線を作成した。

4) 市販緑茶飲料・海藻抽出液の総抗酸化力テスト

市販緑茶飲料(「おーいお茶濃い味」, 「伊右衛門」, 「伊右衛門濃いめ」, 「カテキン緑茶」, 「ヘルシア緑茶」)及び海藻抽出液(「コンブ」, 「アラメ」, 「芽ヒジキ」, 「長ヒジキ」の各冷水及び熱水抽出液)の総抗酸化力をF.R.E.Eにより測定した。

5) 市販緑茶飲料・海藻抽出液の α -アマラーゼ阻害活性測定

α -アマラーゼ活性測定は, 一定時間に可溶性でんぷんより酵素作用により切り出される糖類をソモギー・ネルソン法による還元力測定によりマルトース量として定量した。⁶⁾

ソモギー・ネルソン法の操作方法は次のように操作した。

①試料(「おーいお茶濃い味」, 「伊右衛門」, 「ヘルシア緑茶」, 「伊右衛門濃いめ」, 「カテキン緑茶」及び「コンブ」, 「アラメ」, 「芽ヒジキ」, 「長ヒジキ」の各冷水・熱水抽出)25.0 μl をそれぞれ試験管に入れた。②試験管の中に1%可溶性でんぷん溶液75.0 μl をそれぞれ試験管に添加した。③ α -アマラーゼ溶液25.0 μl を入れる。④38℃, 20分間酵素反応させた。⑤それぞれの試験管にソモギー液125 μl を入れた。⑥⑤を20分間煮沸させる。⑦⑥を10分間水冷した。⑧ネルソン液250 μl を添加した。⑨⑧で30分間静置させた。⑩それぞれ試験管に蒸留水1.75mlを入れた。⑪反応液の吸光度500nmをハーフセルで島津分光光度計UV-1200で測定した。

6) マルトースの検量線作成

マルトースの濃度勾配溶液を0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で調整し, 各濃度のマルトース溶液を使用して, ソモギー・ネルソン法に従って発色させ, 吸光度500nmを測定した。また, 得られた測定値をマルトースの濃度に対してプロットした。

3. 結果と考察

1) (-)EGCA溶液の総抗酸化力テスト

図1で明らかなように, (-)EGCG溶液の各濃度0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対して, F.R.E.Eの総抗酸化力値(単位 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$)のプロットは直線を示した。これは(-)EGCGの濃度勾配と総抗酸化力値が比例的な関係にあることを示している。このことにより, F.R.E.Eの測定値を総抗酸化力として使用できることが明確となった。これにより, 各種検体の総抗酸化力測定にF.R.E.Eを使用することとした。

2) 市販緑茶飲料・海藻抽出液の総抗酸化力テスト

市販緑茶飲料(「おーいお茶濃い味」, 「伊右衛門」, 「伊右衛門濃いめ」, 「カテキン緑茶」, 「ヘルシア緑茶」)

緑茶飲料水及び海藻抽出液の総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害

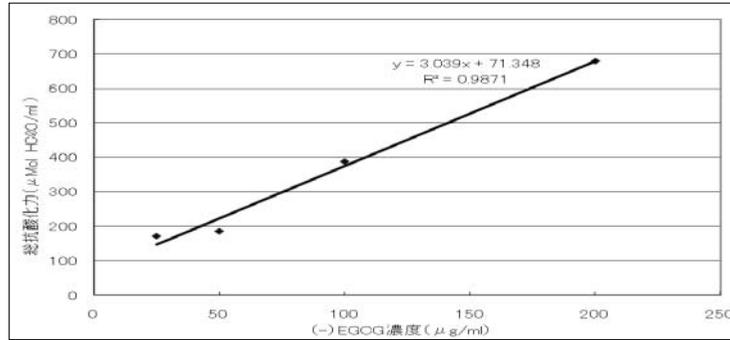


図1 (-)EGCG総抗酸化力の検量線⁵⁾

表1 F.R.E.Eによる各検体の総抗酸化力テスト

検体名	総抗酸化力 ($\mu\text{molHClO}/\text{ml}$)	検体名	総抗酸化力 ($\mu\text{molHClO}/\text{ml}$)
蒸留水	0	蒸留水	0
ヘルシア	726	昆布(煮)	712
おーいお茶濃い味	717	昆布(水)	707
伊右衛門	714	アラメ(煮)	701
伊右衛門濃いめ	717	アラメ(水)	714
カテキン緑茶	717	芽ヒジキ(煮)	321
		芽ヒジキ(水)	484
		長ヒジキ(煮)	426
		長ヒジキ(水)	379

蒸留水：コントロール

及び海藻抽出液(「コンブ」, 「アラメ」, 「芽ヒジキ」, 「長ヒジキ」の各冷水及び熱水抽出液)の総抗酸化力をF.R.E.Eにより測定した。また、得られた測定値を表にまとめた。

表1で明らかになったように、各検体の総抗酸化力テストの結果は、「ヘルシア緑茶」, 「おーいお茶濃い味」, 「伊右衛門」, 「伊右衛門濃いめ」, 「カテキン茶」の総抗酸化力値は、どれも700 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ 以上という結果であった。「ヘルシア緑茶」は、今回使用した検体中で最も高く726 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ であった。「おーいお茶濃い味」, 「伊右衛門濃いめ」, 「カテキン茶」は同一の717 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ 値であった。「伊右衛門」も714 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ と高い数値であった。以上のことから、今回使用した市販緑茶飲料は、食品表示におけるカテキン含有量には差があるものの、総抗酸化力には大きな差はないことが分かった。

一方、海藻類では、「コンブ」の熱水・冷水抽出と「アラメ」の熱水・冷水抽出では、どれも700 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ 以上と高い数値であったが、「芽ヒジキ」の冷水抽出、「長ヒジキ」の熱水抽出、「長ヒジキ」の冷水抽出、「芽ヒジキ」の熱水抽出ではそれぞれ484 μmol

HClO/ml, 426 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$, 379 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$, 321 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ であり、総抗酸化力に大きな幅があることが分かった。また、海藻の熱水抽出と冷水抽出との比較で、両者間では測定値にあまり大きな差がなく、その点では、抽出条件の違いによる影響は少ないものと推測する。

以上のことから、通常飲料水として利用する市販緑茶飲料では、緑茶飲料の銘柄にかかわらず、総抗酸化力が高いことが分かった。このことは、これらの市販緑茶飲料を利用すれば、日常的な飲用において、人体に影響を及ぼす活性酸素量の削減に有効であると考ええる。

5) 市販緑茶飲料・海藻抽出液の α -アミラーゼ阻害活性測定

マルトースの検量線作成

図2で明らかになったように、マルトース溶液の各濃度0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に対し、 ΔOD_{500} のプロットは直線となった。この直線式 $y = 0.0008x - 0.0518$ を α -アミラーゼ活性測定でのマルトース量を求める

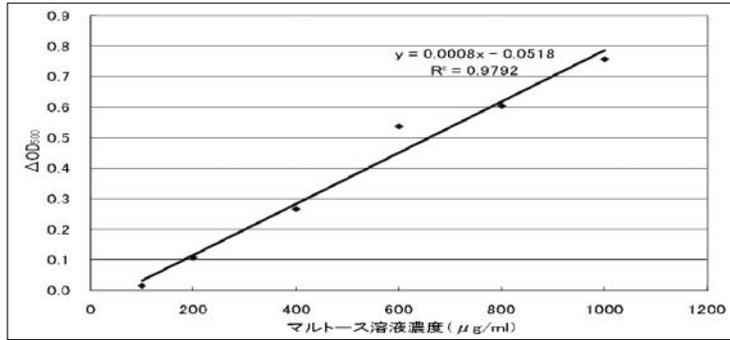


図2 マルトースの検量線

表2 EGCGの総酸化力とα-アミラーゼ阻害

検体名	ΔOD ₅₀₀ (平均値)	マルトース量 (μg/ml)	比活性(%) ※1	阻害率(%) ※2	総抗酸化力 (μmol HClO/ml)
蒸留水	0.349	501	100.0	0.0	0
EGCG (25μg/ml)	0.328	475	76.7	23.3	172
EGCG (50μg/ml)	0.262	392	63.3	36.7	186
EGCG (100μg/ml)	0.193	306	49.4	50.6	388
EGCG (200μg/ml)	0.179	289	46.7	53.3	679

※1: α-アミラーゼの残存活性は蒸留水(コントロール)を使用した場合の酵素活性を100とした比活性(%)で表わす

※2: 阻害率(%)は、各溶液中のα-アミラーゼの残存活性を100から差し引いた数値(%)で表わす

ために使用することにした。

α-アミラーゼ阻害活性測定

市販緑茶飲料(「おーいお茶濃い味」,「伊右衛門」,「伊右衛門濃いめ」,「カテキン緑茶」,「ヘルシア緑茶」)及び海藻抽出液(「コンブ」,「アラメ」,「芽ヒジキ」,「長ヒジキ」の冷水・熱水抽出),(-)EGCG溶液(0 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml)を使用し,ソモギー・ネルソン法の操作方法に従って,検体のマルトース量を測定した。α-アミラーゼの残存活性は蒸留水(コントロール)を使用した場合の酵素活性を100とした比活性(%)で表わし,阻害率(%)は、各溶液中のα-アミラーゼの残存活性を100から差し引いた数値(%)で表した。

(-)EGCG溶液では、表2に示したように、EGCGの濃度勾配に比例してα-アミラーゼ阻害活性も増えていることが分かった。また、その阻害活性は、(-)EGCGの総抗酸化力との間でも比例関係にあった。このことにより、(-)EGCGの総抗酸化力とα-アミラーゼ阻害との関係をOXY吸着試験により確認することができた。

表3と表4で明らかになったように、α-アミラーゼ阻害率が一番高かったのは「ヘルシア緑茶」で64.6%であった。次に阻害率が高かったのは「おーい

お茶濃い味」の49.2%であった。3番目は「長ヒジキ」の冷水抽出の21%であった。海藻類では、1番α-アミラーゼ阻害率が高かった。緑茶飲料では「伊右衛門」が最も阻害率が低く6.0%であった。「伊右衛門濃いめ」,「カテキン茶」ではそれぞれ17.7%, 20.2%であった。

海藻類では「長ヒジキ」の冷水抽出の次に「芽ヒジキ」の熱水抽出で14.0%, 3番目では「芽ヒジキ」の冷水抽出の3.0%であった。「コンブ」の熱水抽出では、阻害率が全く認められず、0.0%であった。「コンブ」の冷水抽出では-9.4%,「アラメ」の熱水抽出では-36.4%・冷水抽出では-36.4%,「長ヒジキ」の熱水抽出では-2.2%でマイナスになっており、むしろ促進されていることが分かった。

カテキン類にα-アミラーゼ阻害活性があることは、いろいろな文献で報告¹⁾されているが、通常利用する飲料水や食事素材などでα-アミラーゼ阻害を確認できたことは意味のあることと考える。また、市販緑茶飲料の利用は、小腸でのデンプン消化に際してα-アミラーゼ阻害による血糖値の急激な上昇などを抑え、結果的に肥満の防止や糖尿病などの生活習慣病予防に効果的だと言えそうだ。

一方、海藻抽出液では、数値がマイナスになってい

緑茶飲料水及び海藻抽出液の総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害

表3 市販緑茶飲料の総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害

検体名	ΔOD_{500} (平均値)	マルトース量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	比活性(%) ^{※1}	阻害率(%) ^{※2}	総抗酸化力 ($\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$)
蒸留水	0.349	501	100.0	0.0	0
ヘルシア	0.090	177	35.4	64.6	726
おーいお茶濃い味	0.152	255	50.8	49.2	717
伊右衛門	0.325	471	94.0	6.0	714
伊右衛門濃いめ	0.254	381	82.3	17.7	717
カテキン緑茶	0.247	372	79.8	20.2	717

※1: α -アミラーゼの残存活性は蒸留水(コントロール)を使用した場合の酵素活性を100とした比活性(%)で表わす

※2: 阻害率(%)は、各溶液中の α -アミラーゼの残存活性を100から差し引いた数値(%)で表わす

表4 海藻抽出液の総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害

検体名	ΔOD_{500} (平均値)	マルトース量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	比活性(%) ^{※1}	阻害率(%) ^{※2}	総抗酸化力 ($\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$)
蒸留水	0.349	501	100.0	0.0	0
昆布(煮)	0.236	501	100.0	0.0	712
昆布(水)	0.387	548	109.4	-9.4	707
アラメ(煮)	0.495	684	136.4	-36.4	701
アラメ(水)	0.456	635	127.0	-26.7	714
芽ヒジキ(煮)	0.293	431	86.0	14.0	321
芽ヒジキ(水)	0.337	486	97.0	3.0	484
長ヒジキ(煮)	0.358	512	102.2	-2.2	426
長ヒジキ(水)	0.265	396	79.0	21.0	379

※1: α -アミラーゼの残存活性は蒸留水(コントロール)を使用した場合の酵素活性を100とした比活性(%)で表わす

※2: 阻害率(%)は、各溶液中の α -アミラーゼの残存活性を100から差し引いた数値(%)で表わす

るものもあり、このことは α -アミラーゼの活性促進効果を支持する結果となっている。文献では、海藻類の成分には α -アミラーゼなどに対する活性阻害作用が確認されたものが多く、酵素の活性化効果に関する文献は見当たらない。この点に関しては、さらに詳細な検討が必要である。ただし、今回使用した海藻には、フコイダンやアルギン酸などの水溶性食物繊維が多く存在しているものもあるため、それらの成分が何らかの影響を及ぼしている可能性もあると想像する。⁷⁾

今回の実験結果では、まず(-)EGCGを指標としてF.R.E.EのOXY吸着テスト法が緑茶飲料や海藻抽出液の総抗酸化力を測定できることを示すことが出来た。実際の実験結果では、緑茶飲料の総抗酸化力はどれも高く、 α -アミラーゼ阻害も認められた。実際に飲用している緑茶飲料のデータとして総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害の関係が捕まえられることは大変意味のあることと考える。海藻類に関しては、総抗酸化力と α -アミラーゼとの関係については明確ではない。しかし一部、 α -アミラーゼ阻害を認められる結果もある。今回使用した海藻抽出液中にはフコイダ

ンやアルギン酸などの水溶性食物繊維が存在しており、 α -アミラーゼ阻害が認められず、むしろ α -アミラーゼが促進されていたアラメには、他の海藻類と比較してみると食物繊維が豊富に含まれている。水溶性食物繊維はSDFともいい、高い粘着性をもっていることから、胃から小腸への食物の移動速度と小腸における糖質(でんぷん)の消化速度を遅らせ、その結果として、小腸粘膜上皮細胞からグルコースの吸収が穏やかになり、食後の急激な血糖値の上昇を抑えると考えられている。この時、インスリンの分泌刺激も抑えられるので、糖尿病患者の症状も軽減でき、血中コレステロール値も下がる。また、食物繊維は小腸内で胆汁酸やコレステロールを吸着し、それらの糞便中排泄を促進する。その結果、脂質吸収のためのミセル形成が阻害されるので、食事由来のコレステロールの吸収や食後の血中コレステロール値の急激な上昇を抑えられ、動脈硬化や虚血性心疾患の予防に効果的であり、それらの影響もあると考えると、コンブやアラメ以外の芽ヒジキや長ヒジキも再検討が必要である。

今回行ったアンケート調査は、10歳代~20歳代が対

象だったが、平成17年度の食料品消費モニターの調査結果を見てみると、中年層での緑茶を飲む頻度は他の年代と比較して少なく、肥満者が増加し生活習慣病者も増加する年代である。ヘルシア緑茶などの利用は α -アミラーゼ阻害による、肥満防止や血糖値の急激な上昇などを抑え、その結果として肥満防止や生活習慣病予防に効果的だとも感じた。

今回着目した緑茶に含まれるカテキンと海藻類に含まれるフロロタンニンには抗酸化作用などたくさんの効能があり、緑茶や海藻類は食事と一緒に飲用したり、出汁に使用したりと日本型の食事には欠かせないものだ。また、世代が高くなるほどに、緑茶や海藻類を摂取する頻度が高くなっており、日本人の寿命は延びてきている。今回の実験では、緑茶飲料を使用して、総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害には正の相関があることが分ったが、今後さらに研究を重ね、いろいろな食材の総抗酸化力を測定することで、日本型の食事との関係について検討したい。

要 約

市販緑茶飲料や海藻抽出液の総抗酸化力と α -アミラーゼ阻害活性の関係を調べた。

F.R.E.E測定では、5種類の市販緑茶飲料の総抗酸化力は、いずれも $700\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ 以上と高い値であり、 α -アミラーゼ阻害活性も認められた。一方、海藻抽出液は、現在のところ明確でなかった。

V. 謝 辞

終わりにあたり、本研究にご協力賜った本学の学生諸氏に深く感謝の意を表する。

VI. 文 献

- 1) 岡本佳乃：高知県工業技術センター研究報告，No.35，2004.
- 2) 奥山 徹，藤多哲郎：「海藻ポリフェノールエキスの抗糖尿病効果について」第3回国際ポリフェノール学会にて，2007，pp.1-4.
- 3) 的場輝佳：日本食生活学会誌，Vol.18，No.3，2007，pp.205-210.
- 4) 鈴木慎太郎，中村陽一，山本真弓，足立 満：日本呼吸器学会雑誌，第45巻増刊号，2007年，pp.181.
- 5) 古川真一：比治山大学短期大学部紀要，Vol.44，2008，pp.81-81.
- 6) 柏木 豊：MAFF Microorganism Genetic Resources Manual No.16.
- 7) 灘本知憲，西川善之：「基礎栄養学」株式会社化学同人，2003，pp.117-120.
- 8) 一之瀬幸男・松井永一・黒田圭一：「食品学実験法」三井出版株式会社，1988年，pp.75.
- 9) 平成17年度食料品消費モニター 第2回定期調査結果.
- 10) 健康局総務課生活習慣病対策室：平成18年国民健康栄養調査.

(受理 平成21年10月31日)

Abstract

Total antioxidative potency of green tea drinking water and seaweed extracted material and α -amylase inhibitions

Miki HANADA*¹ and Shinichi FURUKAWA*²

SUMMARY

The relation of the amylase inhibitory activity and a total antioxidative potency of marketing and green the tea beverage and the seaweed extracted material was examined.

In the F.R.E.E measurement, both of a total antioxidative potency of five kinds of marketing and green tea beverages were high values (700 $\mu\text{mol HClO}/\text{ml}$ or more), and the inhibitory activity of the α -amylase was admitted. On the other hand, the seaweed extracted material was not at present clear.

(Received October 31, 2009)

*¹ Graduate of Dvanced course of Department of Junior College at Hijiya University nourishment major

*² Department of Commperhensive Human Life Studies