

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05864

研究課題名(和文)二段階発酵茶「碁石茶」の苦味は環状ジペプチドに起因するのか？

研究課題名(英文) Is the bitterness of the two-step fermentation tea "Goishi tea" caused by cyclic dipeptide?

研究代表者

受田 浩之 (Ukeda, Hiroyuki)

高知大学・その他部局等・理事・副学長

研究者番号：60184991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高知県長岡郡大豊町で製造されている伝統的二段階発酵茶「碁石茶」の苦味因子、及びその他の味関連物質の解明を目的とした研究を実施した。本研究期間中に、碁石茶をはじめとする発酵食品中の環状ジペプチドの生成機構の解明、食品中に豊富に含まれるプロリン含有環状ジペプチドの一斉定量法の開発、ならびに味覚センサーを用いた味関連物質の解明を行った。最終的に、碁石茶の苦味の発現機構は緑茶と異なり、アミノ酸、環状ジペプチド、ペプチドに加えて、カテキン類重合体であるプロアントシアニジンの関与があると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

碁石茶は世界的に見ても珍しい二段階発酵茶であり歴史的価値も高い伝統食品である。近年、その生体調節機能に関する研究は多く実施されてきたが、食品の根幹ともいえる風味に関する学術研究は乏しい状況にあった。本研究は、碁石茶独特の風味を化学的な成分分析と味覚センサーを用いた客観的官能評価を組み合わせることで、伝統食品に新たな科学的根拠を付与したと言える。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted to elucidate the bitter taste factor and other substances involved in the taste of Goishi tea, a traditional two-step fermented tea produced in Otoyo-cho, Nagaoka-gun, Kochi. During this research period, it was elucidated that the formation mechanism of cyclic dipeptides in fermented foods such as Goishi tea, developed a simultaneous determination method for proline-containing cyclic dipeptides abundant in fermented foods, and elucidated taste-related substances using taste sensors. Finally, we conclude that the mechanism for the development of bitterness in Goishi tea differs from that of green tea and involves proanthocyanidins, a catechin polymer, in addition to amino acids, cyclic dipeptides, and peptides.

研究分野：食品化学

キーワード：後発酵茶 碁石茶 環状ジペプチド 二次機能 苦味 カテキン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高知県長岡郡大豊町に伝わる碁石茶は、不発酵茶で名高い日本茶の中において数少ない後発酵茶（微生物発酵茶）である。日本に残る伝統的後発酵茶としては、碁石茶以外には同じ四国の阿波晩茶と石鎚黒茶、及び富山のバタバタ茶のみである。碁石茶の製法は、茶葉の刈取り 蒸し 好気発酵（カビ付け）嫌気発酵（乳酸発酵） 天日干しの工程から成り、好気発酵と嫌気発酵を組み合わせ製造される世界的に見て珍しい二段階発酵茶である。その風味は独特で強い酸味を呈する。これは嫌気発酵段階で生成する乳酸に起因するものである。また、味認識装置における分析において、碁石茶の苦味はヒトが識別できるレベルで緑茶より高い値を示すことが判明した（図1）。過去の研究において、苦味に寄与すると考えられる主要カテキン類は、碁石茶の二段階発酵工程中に減少し、最終製品のカテキン含量は緑茶の15分の1程度であることが報告されている。すなわち、碁石茶の苦味は主要カテキン類に起因するものではないと考えられたが、一方、主要カテキン類に代わる苦味因子は不明な状況にあった。

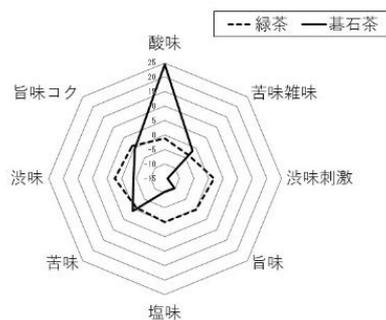


図1 碁石茶の味パターン

### 2. 研究の目的

前述の通り、碁石茶の風味の特徴は際立った酸味とマイルドな苦味にある。酸味は嫌気発酵段階で生成する乳酸に起因するが、碁石茶に特徴的な二段階発酵の結果として大幅にその含量が低下する主要カテキン類に代わる苦味因子は不明である。そこで本研究では、碁石茶の味に大きな影響を与える苦味因子、及びその他の味関与物質の解明を目的として、LC-MS/MS 等による成分化学的解析と味認識装置の味覚センサーによる客観的官能評価を関連付ける研究を実施することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 碁石茶抽出液の調製

乾燥茶葉をクラッシュミルサーにて粉碎した。超純水 200 mL を加熱装置で沸騰させた後、乾燥粉碎茶葉 2 g を加え、100 で 10 分間熱水攪拌抽出を行った。加熱の間、適宜超純水を加えてピーカーの周りに付着した茶葉を落とした。抽出後、室温まで冷ました抽出液を綿ろ過にてろ過し、ろ液に超純水を加えて 200 mL に定容した。

#### (2) 味認識装置による測定

味認識装置を用いた分析では、緑茶とその他の茶の比較を行った。各茶抽出液 35 mL を専用カップに入れたものを 2 つ用意し、味認識装置 TS-5000Z による味強度の測定を行った。味覚センサーは C00 (苦味)、AE1 (渋味)、AAE (旨味)、CT0 (塩味)、および CA0 (酸味) の 5 種類を使用した。苦味、渋味、旨味に関しては食品を口に含んだ瞬間に感じる“先味” (苦味先味、渋味先味、旨味) と食品を飲み込んだ後に口の中に残る“後味” (苦味後味、渋味後味、旨味コク) の評価を行った。安定したデータを取得するために、センサーによる測定は同一試料に対して 4 回行い、1 回目の測定結果は解析には用いず、2~4 回目の測定で得られたセンサー出力値を用いて解析を行った。なお、測定時の基準サンプルは碁石茶としたが、解析の際は緑茶の味強度を 0 とした場合の各種茶の相対的な味強度を示した。

#### (3) 環状ジペプチド (2,5-diketopiperazine: DKP) の定量

DKP の定量には LC-MS/MS を用いた。各試料は 3 回測定して平均値を求めた。分析条件は以下の通りとした。

カラム: Waters Atlantis T3 (2.1 mm I.D. × 150 mm)、ガードカラム: Waters Atlantis T3 (2.1 mm I.D. × 10 mm)、溶離液 A: 0.1% Formic acid、溶離液 B: Acetonitrile、Gradient: 0-5 min (4% B Conc.)、5-25 min (4% 45%)、25-30 min (45% 98%)、30-35 min (98%)、35-35.01 min (98% 4%)、35.01-40 min (4%)、流速: 0.2 mL/min、Ionization interface: ESI、Mode: Positive ion mode、Capillary voltage: 3 kV、Source temperature: 150、Desolvation temperature: 400、Collision gas: Ar (0.1 mL/min)、Nebulizer gas: N<sub>2</sub> (500 L/h)、Capillary temperature: 250

### 4. 研究成果

#### (1) 直鎖ペプチドからの DKP 生成機構の解明

2 分子のアミノ酸が脱水縮合したジケトピペラジン構造を基本骨格とする DKP は、加熱や発酵に伴い生成するとされている。また、過去の報告では、食品中での Pro 含有 DKP の存在が多く示

唆されているが、その生成機構の詳細については明らかでない。本研究では、直鎖ペプチドからのDKPの生成に対する各種反応条件の影響を調べ、生成機構の解明を行った。ジペプチド2種類(Pro-Leu、Leu-Pro)、トリペプチド10種類(Gly-Pro-Leu、Leu-Pro-Gly、Leu-Gly-Pro、Gly-Leu-Pro、Pro-Gly-Leu、Pro-Leu-Gly、Gly-Pro-Gly、Leu-Pro-Leu、Phe-Pro-Gly、Leu-Pro-Phe)、テトラペプチド1種類(Gly-Gly-Pro-Leu)を用い、反応温度、反応時間、反応pHがDKP生成率に及ぼす影響を調べた。その結果、直鎖ペプチドからのDKP生成率は、温度と時間に依存して増加した。ジペプチド、トリペプチドからのDKP生成率はpH 5.0~7.0で最大となり、検出されたDKPは全て直鎖ペプチドのN末端から2分子のアミノ酸が環化したDKPであった。一方、テトラペプチドではpH 6.0で最大となり、N末端のGlyが脱離してトリペプチドが生成し、その後、N末端からの2分子が環化したDKPが検出された。結果として、N末端の2残基目にProが位置する直鎖ペプチドにおいて、高いDKP生成率が認められた。原子間距離の算出の結果、N末端の2残基目にProが位置した場合、DKP生成に関わるアミノ基窒素とカルボニル炭素が求核反応に適した配置となり、環化反応が生じ易くなることが判明した。このことが、食品中にPro含有DKPが豊富に存在する理由であると考えられた。

### (2) Pro含有DKPの一斉測定法の開発

先の研究により、食品中では、その構造的特徴からPro含有DKPが生成しやすい傾向にあることが判明した。D・L体を区別しない場合、Pro含有DKPは20種類存在するが、その一斉分析法は報告されていない。そこで、Pro含有DKP20種類を測定対象としたLC-MS/MSによる一斉分析法の開発に取り組んだ。LC、及びMS条件の最適化後、各種DKP標品の検量線を作成した。その結果、相関係数は0.995以上(n=7)、DKP濃度0.05 mg/Lにおける変動係数は6%以下(n=3)となり、高い直線性と再現性が認められた。碁石茶中のDKPの定量を試みたところ、各種DKPの検出限界は0.03 mg/L以下、定量限界は0.06 mg/L以下(cyclo(-Cys-Pro)を除く)であった。DKP標品(0.05 mg/L)の添加回収試験の回収率は93~117%となり、定量性の面でも問題がないことを確認した。以上のことから、本法は食品のDKP定量法として実用可能であると判断した。さらに、碁石茶中には17種類のPro含有DKPが検出され、その総量は3.7 mg/Lであることも明らかとした。

### (3) 碁石茶製造工程中のDKP含量の変化

碁石茶製造工程中(蒸後、好気発酵、嫌気発酵、天日干し後)のDKP含量の変化を調べるために42種類のDKP(Pro含有DKP20種類、その他のDKP22種類)の定量を行った(図2)。その結果、DKP含量は製造工程の進行に伴って増加した。また、好気発酵前の蒸後の試料では13種類のDKPが検出されたのに対し、好気発酵後には15種類、嫌気発酵後には2種類のDKPが新たに検出された。両発酵段階においてタンパク質分解の進行とpHの低下が認められ、これらの変化がDKPの生成と関連していると考えられた。また、一次構造との比較からRibulose 1,5-Diphosphate CarboxylaseがDKP生成源の1つであることが判明した。

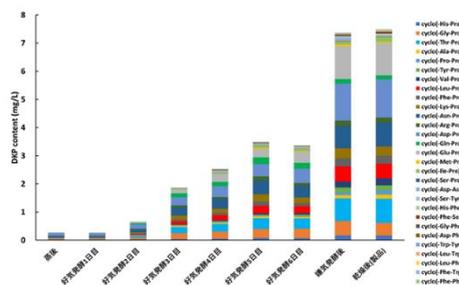


図2 碁石茶製造工程中のDKP含量の変化

### (4) 碁石茶製造工程中の味パターンの変化

碁石茶製造工程中(蒸後、好気発酵、嫌気発酵、天日干し後)の味パターンの変化を味認識装置にて測定した。解析の際は、蒸後試料の味強度を基準値0とした(図3)。その結果、碁石茶の味は製造工程を経るにつれて徐々に変化することが判明した。その変化の傾向として、製造工程を経るごとに酸味、苦味先味、苦味後味が強くなり、一方で、塩味、旨味先味、渋味先味、渋味後味が弱くなる傾向が認められた。

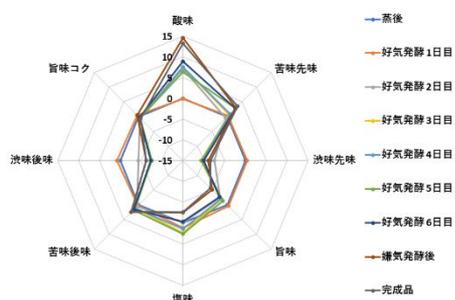


図3 碁石茶製造工程中の味パターンの変化

### (5) 碁石茶中の味関連物質

碁石茶を構成する各味に關与する成分の詳細について検討を行った。

#### 酸味

酸味については、各製造段階で生成する有機酸等に起因するpHの低下が原因であると示唆された。特に、好気発酵中の酸味の増加にはカテキン類から遊離する没食子酸が関与していた。し

かし、没食子酸は嫌気発酵中にほぼ消失していたことから、碁石茶製品の酸味はほぼ乳酸に由来すると結論付けた。

### 旨味

旨味に関しては、アミノ基量と旨味先味の間に負の相関が認められたことから、旨味呈味物質の分解、生成したペプチド類の旨味先味に対するマスキング効果、遊離アミノ酸の生成による味パターンの変化などの関連があると推察した。

### 渋味

碁石茶中のカテキン類 (GC、EGC、C、EC、GCg、EGCg、Cg、ECg) 総量は製造工程が進むにつれて減少する傾向にあったが、遊離型カテキン類 (GC、EGC、C、EC) とガレート型カテキン類 (GCg、EGCg、Cg、ECg) の減少傾向には違いがあり、遊離型カテキン含量は蒸後から嫌気発酵段階までは含量に大きな変化がなく、天日干し後の完成品で大きく減少していた (図4)。一方、ガレート型カテキン類含量は好気発酵段階で大きく減少し、その後の嫌気発酵、天日干しにおいても徐々に減少する傾向にあった (図5)。渋味先味と渋味後味の製造工程中の変化はガレート型カテキンの変化に類似しており、両者の間には有意な相関が認められた ( $r = 0.967$ ,  $n = 9$ ,  $p < 0.001$ )。この結果より、碁石茶の渋味の減少はガレート型カテキン含量の減少によるものと判断した。

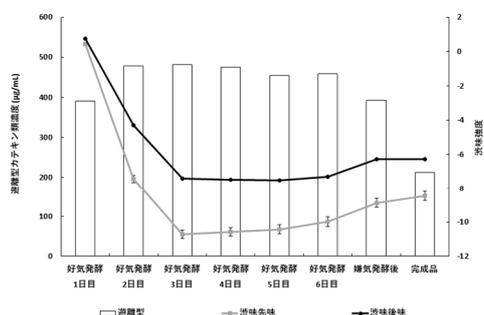


図4 碁石茶製造工程中の遊離型カテキン類と渋味の変化

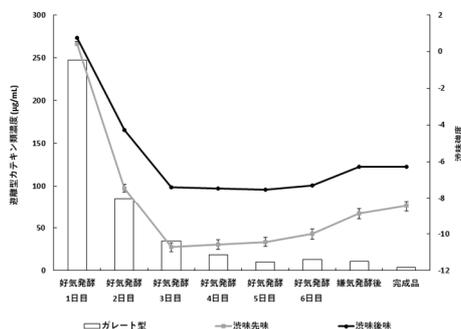


図5 碁石茶製造工程中のガレート型カテキン類と渋味の変化

### 苦味

先にも示した通り、碁石茶の苦味先味、苦味後味は製造工程の進行に伴い強くなる傾向にあった。一方、主要カテキン類の含量は製造工程中に大幅に低下することから、苦味への関与の程度は低いと考えられた。図2に示した通り、DKP含量の製造工程中の増加傾向は苦味の増加傾向と類似していたため、DKPも苦味の増加の一端を担っていると推察されたが、その一方で含量としては低く、苦味の主要因ではないと判断された。続いて、タンパク質分解の指標としてアミノ基量の測定を行ったところ、製造工程の進行に伴う増加が認められた。従って、タンパク質の分解に伴う苦味ペプチドや苦味を呈する遊離アミノ酸の生成も、苦味増加の原因の一つと推察した。さらに苦味成分に関する詳細な検討を行ったところ、碁石茶由来 10-50 kDa 画分に苦味が認められた。このような高分子量画分の苦味は緑茶では認められなかったことから、碁石茶特有の苦味成分である可能性が高いと考えられた。当該画分に含まれる成分はカテキン類重合物のプロアントシアニジンであることが示唆され、ポリフェノール除去剤のポリビニルポリピロリドン (PVPP) の添加により苦味の程度も低下することが明らかとなった (図6)。以上の結果より、碁石茶の苦味にはアミノ酸、DKP、ペプチドに加えて、カテキン類重合物であるプロアントシアニジンの関与があると結論付けた。

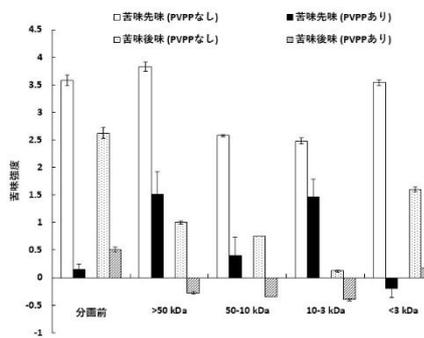


図6 碁石茶分画物の苦味強度に対するPVPPの影響

本研究では、碁石茶の味に大きな影響を与える苦味因子、及びその他の味関与物質の解明を目的とした研究を実施し、碁石茶をはじめとする発酵食品中でのDKPの生成機構の解明、食品中に豊富に含まれるPro含有DKPの一斉定量法の開発、ならびに味覚センサーを用いた味関連物質の解明を行った。最終的に碁石茶の苦味の発現機構は緑茶と異なり、アミノ酸、DKP、ペプチドに加えて、カテキン類重合物であるプロアントシアニジンの関与があると結論付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuuki OTSUKA, Tomoko SHIMAMURA, Michio SAKAJI, Hikaru ARITA, Takehiro KASHIWAGI, Hiroyuki UKEDA	4. 巻 36
2. 論文標題 Quantification of Proline-containing Cyclic Dipeptides by LC-MS/MS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 977-980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka Yuuki, Arita Hikaru, Sakaji Michio, Yamamoto Kenji, Kashiwagi Takehiro, Shimamura Tomoko, Ukeda Hiroyuki	4. 巻 83
2. 論文標題 Investigation of the formation mechanism of proline-containing cyclic dipeptide from the linear peptide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2355-2363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1659718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阪地満帆、大塚祐季、柏木丈弘、島村智子、受田浩之
2. 発表標題 日本の伝統的後発酵茶，碁石茶の特徴的な味の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚祐季，有田光，阪地満帆，松神麻美，樺島文恵，柏木丈弘，島村智子，森山洋憲，下藤悟，受田浩之
2. 発表標題 GC×GC-TOFMSによる碁石茶中香氣成分特性の解明
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第65回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚祐季、有田光、阪地満帆、山本憲司、柏木丈弘、島村智子、受田浩之
2. 発表標題 直鎖ペプチドからのプロリン含有環状ジペプチド生成機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩出亜美、大塚祐季、松神麻美、樺島文恵、森山洋恵、下藤悟、柏木丈弘、島村智子、受田浩之
2. 発表標題 GC×GC-TOFMSを用いた後発酵茶の香気特性の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	島村 智子  (Shimamura Tomoko)  (50350179)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授    (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------