[農化 第 41 卷, 第 8 号, p. 399~405, 1967]

茶のカテキンに関する研究 (第5報)

カテキンの酵素酸化物生成におよぼすアミノ酸類の影響

中 川 致 之

(農林省茶業試験場)

昭和 42 年 4 月 14 日 受 理

Studies on the Flavanols in Tea Part V. Effects of Amino Acids and Other Substances on the Enzymic Oxidation of Flavanols

By Muneyuki NAKAGAWA

Tea Research Station, Ministry of Agriculture and Forestry

Effects of amino acids and other several substances on the enzymic oxidations of flavanols were studied. With the enzymic oxidation of (+)-catechin alone, coexistence of arginine or aspartic acid accelerated the formation of colored substances and that of glutamic acid depressed them. It was supposed that the colored products involved the so-called head-to-tail polymer of catechin, and others. In the case of coupled oxidation of (–)-epicatechin and (–)-epigallocatechin, it was observed that addition of ascorbic acid, iso-ascorbic acid, glutathione (oxidized form) or aspartic acid elevated the production rate of theaflavin, while that of glutathione (reduced form), cysteine, arginine, lysine or glutamic acid reduced it. Neutral amide and amino acid such as theanine and alanine presented little effect on the pigment formation. These results showed the participation of various substances on the formation of color of black tea.

(Received April 14, 1967)

1. ま え が き

紅茶製造中のカテキン類の変化に関する Roberts らの研究⁽¹⁻³⁾, テアフラビンの生成経路と構造を確立した滝野らの研究⁽⁴⁻⁶⁾, および前報で述べた各種カテキン組合せの酵素酸化生成物の調査などによって⁽⁷⁾, 紅茶の水色, 滋味を左右する各種の酸化物が各種の経路で生成されることが明らかになってきたが, これらの実験の多くはポリフェノールだけの系で検討されたもので, 実際の紅茶製造時のように, アミノ酸など他の物質の共存下では, 状況の相違や異種の物質生成の可能性が考えられる。そこでカテキンの酵素酸化時に従来キノンとの反応が報告されているアミノ酸類と⁽⁸⁾数種の酸化還元性物質を添加して, テアフラビンなどの生成に及ぼす影響を調べた。

2. 実験方法および結果

2-1. 実験材料

この報告で使用したカテキン類は (–)-エピガロカテキンガレート (EGg), (–)-エピガロカテキン (EG),

(–)-エピカテキン (EC) と (+)-カテキン (C) の 4 種で, それらの純度などは前報で報告したとおりである⁽⁹⁾。またアミノ酸類 21 種 (L 型), アスコルビン酸, イソアスコルビン酸などは Tea ンを除きいずれも市販の特級あるいは一級試薬である。

つぎに酸化酵素としては, 茶の一心三葉芽から前報で報告した方法で調製したアセトンパウダーを使用した⁽⁷⁾。

2-2. 方法と結果

1) (+)-カテキンの酵素酸化に対するアミノ酸類の影響

(+)-カテキン 1/100 M 液 1 ml に, アスパラギン, アスパラギン酸, アラニン, アルギニン, グリシン, グルタミン酸, スレオニン, セリン, テアニン, トリプトファン, バリン, ヒスチジン塩酸塩, ヒドロキシプロリン, フェニルアラニン, メチオニン, リジン塩酸塩, ロイシンの 1/50 M 液 0.5 ml もしくは 1/100 M 液 1 ml, pH 5.75 の McIlvaine 緩衝液 0.5 ml, アセトンパウダー

10 mg (0.5 ml の水に懸濁) をそれぞれ加え, 室温 (約 25°) に放置したところ, 対照を含めた全試料に黄褐色の物質が徐々に形成されたが, その速度, 濃度などはアミノ酸の種類によってかなり異なっていた. そこで1時間後に水を加えて 10 ml とし, 濾過して直ちに可視部, 紫外部 (紫外部は 5 倍に希釈) のスペクトルを測定したところ, 全試料が可視部では 390~400 m μ に吸収の山と 440 m μ 近辺に肩もしくは山様の若干の吸収, 紫外部で

Fig. 1. Spectra of Colored Products derived from Enzymic Oxidation of (+)-Catechin.
+Arg : Arginine +Glu : Glutamic acid
Cont. : Control

Fig. 2. UV Spectra of (+)-Catechin Solutions after Enzymic Oxidation.

TABLE I. EFFECT OF AMINO ACIDS ON THE ENZYMIC OXIDATION OF (+)-CATECHIN

Amino acid	Absorbance of visible area		Absorbance of UV area
	390 m μ	440 m μ	280 m μ
Asparagine	0.350	0.280	0.546
Aspartic acid	0.598	0.545	0.562
Alanine	0.382	0.295	0.558
Arginine	0.606	0.575	0.602
Glycine	0.375	0.296	0.548
Glutamic acid	0.242	0.155	0.542
Threonine	0.376	0.288	0.592
Serine	0.369	0.295	0.562
Theanine	0.362	0.280	0.545
Tryptophane	0.383	0.300	1.540
Valine	0.363	0.285	0.558
Histidine·HCl	0.309	0.227	0.566
Hydroxyproline	0.375	0.290	0.577
Phenylalanine	0.356	0.278	0.553
Methionine	0.360	0.280	0.563
Lysine·HCl	0.360	0.280	0.585
Leucine	0.372	0.293	0.597
Control	0.360	0.280	0.572

は 280 m μ に山を持つきわめて類似した形状を示した. これらの試料のなかから可視部, 紫外部の吸光度が最高のアルギニン, 最低のグルタミン酸を選んで, その可視部, 紫外部スペクトルを対照と比較したものおよび全試料の可視部, 紫外部の特定波長の吸光度を示したものは, それぞれ Fig. 1, 2 および Table I のとおりである.

この結果, テアニンなど大部分のアミノ酸類は対照とほとんど変わらないが, アルギニン, アスパラギン酸は着色物の形成を促進し, グルタミン酸は抑制することが認められた. アルギニン, アスパラギン酸添加試料では, Fig. 1, 2 のように可視部, 紫外部全体の吸収が大きく, しかも, 可視部では 390 m μ 近辺のほかに 440 m μ 近辺にも吸収の山を持っていた. 他の試料では一般に 440 m μ 近辺の吸収ははっきりせず, グルタミン酸添加はとくに少ないようにみえた. また Table I に示すように, 可視部 390 m μ , 440 m μ 近辺の吸光度は試料によりそれぞれ異なっていたが, 550 m μ をこすと全試料ともほとんど 0 に近くなっていた. このことから, 着色物の形成が促進された試料では, 390 m μ 近辺に山を有する物質と同時に 440 m μ 近辺に吸収の山を持つ物質が形成されているが, グルタミン酸ではその量が少ないだけでなく, とくに 440 m μ に山を持つ物質はほとんど生成されないものと考えられた. これらの生成物は次報で述べる

ように、非酵素的に生成されるものと同一の物質であると考えられ、これらのアミノ酸添加の影響は酵素を除いた系で、さらに検討された。なお紫外部 280 m μ の吸収は、それ自身がこの位置に吸収のあるトリプトファンを除いてそれほど差がなかった。

2) カテキン組合せの酵素酸化に及ぼすアルギニン添加の影響

各種のアミノ酸類を添加して (+)-カテキンを酵素酸化した場合、アルギニンが最も酸化を促進したので、カテキンの組合せ、とくに紅茶の色素として重要視されているテアフラビン類を生成する系に添加した場合の影響をみるため、カテキン 1/100 M 液 2 ml ずつにアルギニン 1/50 M 液 1 ml、および前記緩衝液 1 ml とアセトンパウダー 25 mg (1 ml の水に懸濁) を添加し、ワールブルグ装置中 30° で酸化を行なった。酸素吸収量が 120~150 μ l に達したところで反応を打ち切り、濾過後水で 10 ml にしたもの、および濾液をブタノールで抽出し 10 ml にしたものについて、ペーパークロマトグラフィーによる反応生成物の検索と可視部、紫外部スペクトルの測定を行なった。

組合せは Table II のとおりで、アルギニンを添加した場合、反応液の黄褐色の呈色が濃くなり、原液をそのまま濾過して測定したもの、ブタノール抽出したもの、ともに可視部 380 m μ 近辺の吸光度が増大していることが示された。しかも添加による吸光度の増加は反応液 (濾液) をそのまま測定したときのほうが、ブタノール抽出液について測定したときよりも大きいことから、添加の結果、ブタノール抽出されにくい形の着色物が多

Fig. 3. Spectra of Oxidation Products from the Mixture of (-)-Epicatechin, (-)-Epigallocatechin gallate and Arginine.

I: Filtered solution II: Butanol extract of I

量に生成されているものと考えられた。Fig. 3 に示すように、(-)-エピカテキンと(-)-エピガロカテキンガレート (EGg) の組合せにアルギニンを添加した場合、反応液 (濾液) では 350~500 m μ の吸光度が高くなるとともに、通常認められる 380 m μ 近辺の山がはっきりしなくなり、ブタノールに抽出されない別種の色素が多量に生じているものと推定された。この物質は次報の非酵素酸化で述べるように、非酵素的に生成される 350 m μ 近辺から長波長側に漸次吸光度が減少していく褐色物と、440 m μ 近辺に山を有する黄色物質と推定され、これらの物質の生成が促進された結果、テアフラビンの生成が抑制されたものと考えられた。

ペーパークロマトグラフィーによる観察でも、アルギニンを添加した場合、原点近辺の有機溶媒に展開されないタイプの褐色物質は増加するが、テアフラビン類や未酸化の (-)-エピカテキンは減少することが認められた。

3) テアフラビン形成に対するアミノ酸類の影響

テアフラビン類を形成するカテキン組合せの酸化時にアルギニンを添加すると、テアフラビン類の形成が抑制されることがわかったので、各種アミノ酸類や酸化還元性物質を (-)-エピカテキンと (-)-エピガロカテキンの混合系に加え、2) と同様な方法で酸化を行なった。ただし添加物の量を半分の 0.5 ml とし、反応は全試料とも 30 分で打ち切り、濾過、洗浄して 5 ml にした濾

TABLE II. EFFECT OF ARGININE ON THE ENZYMIC FORMATION OF THEAFLAVINS

Combination	Test solution	Absorbance	
		280 m μ	380 m μ
EC+EG	Butanol extract (II)	0.520	0.330
EC+EG+Arginine	"	0.464	0.390
EC+EGg	"	0.716	0.535
EC+EGg+Arginine	"	0.686	0.585
EC+EG	Filtered solution (I)	0.588	0.465
EC+EG+Arginine	"	0.587	0.635
EC+EGg	"	0.612	0.582
EC+EGg+Arginine	"	0.680	0.665*

(I), (II): cf. Fig. 3.

* Spectrum of this Solution had not notable maxima in visible and ultra violet areas.

液と、これをさらにイソブチルメチルケトン（以下ケトンと略称）で抽出しケトン層と残留水層に分けたものについて可視部スペクトルをとり検討した。添加した物質

はアスパラギン酸、アラニン、アルギニン、グルタミン酸、テアニン、メチオニン、リジン、システイン、シスチン酸、グルタチオン（酸化型と還元型）、アスコルビン

酸、イソアスコルビン酸である。このなかから特色のあるもの 3 種を選出し、ケトン層と水層の可視部スペクトルについて対照と比較した結果は Fig. 4, 5 のとおりであった。ケトン層のスペクトルは Fig. 4 からわかるように、すべて 380 m μ と 460 m μ に吸収の山を有し、テアフラビンの純品溶液ときわめて類似の形状を呈したので、ケトン層に含有されるポリフェノールをペーパークロマトグラフィーで観察した結果、エピカテキンとテアフラビンが主成分で、テアルビジン様物質はほとんど認められず、ケトン層の 380 m μ と 460 m μ の吸光度は生成されたテアフラビンの量を示すものと考えられた。ケトンで抽出した残留水層のスペクトルは Fig. 5 に示したシステインと、もう一つの物質グルタチオンの還元型以外は、すべて 350 m μ から長波長側に漸次減少していく形状であった。またシステインだけは、ケトンに抽出されない赤桃色の色素を顕著に生成することが認められた。グルタチオンの還元型についても、いくぶん類似の傾向があるように思われたが量的に少なく、はっきりしなかった。

そこで全試料について、ケトン層の 380 m μ と 460 m μ の吸光度（テアフラビン含量を示す）、ケトン抽出残留水層の 380 m μ と 460 m μ の吸光度（ケトンに抽出されない水溶性色素の量を示す）、ケトン層と水層の 380 m μ と 460 m μ の吸光度の比（ケトン層ではテアフラビン以外、水層ではほとんどの試料に含有されている代表的な水溶性色素すなわち

Fig. 4. Spectra of *iso*-Butylmethylketone Extracts from Theaflavin Forming System.

Fig. 5. Spectra of Aqueous Layers Extracted with *iso*-Butylmethylketone from Theaflavin Forming System.

TABLE III. EFFECT OF SEVERAL SUBSTANCES ON THE FORMATION OF THEAFLAVIN

Substance	Ketone layer		Aqueous layer		E_{380}/E_{460}		Theaflavin production rate
	E_{380}	E_{460}	E_{380}	E_{460}	Ketone	Aqueous	
Aspartic acid	0.820	0.320	0.204	0.056	2.56	3.64	36.9%
Alanine	0.605	0.225	0.232	0.072	2.69	3.22	27.2
Arginine	0.380	0.130	0.296	0.102	2.92	2.90	17.1
Glutamic acid	0.440	0.230	0.256	0.072	1.91	3.56	19.8
Theanine	0.650	0.240	0.196	0.060	2.71	3.26	29.3
Methionine	0.710	0.291	0.194	0.060	2.44	3.24	32.0
Lysine	0.535	0.195	0.270	0.096	2.74	2.81	24.1
Cysteine	0.170	0.090	0.220	0.222	1.89	0.99	7.7
Cysteic acid	0.685	0.275	0.174	0.060	2.49	2.90	30.8
Glutathione (Ox)	0.805	0.305	0.180	0.050	2.64	3.60	36.2
" (Red)	0.205	0.075	0.168	0.052	2.73	3.23	9.2
Ascorbic acid	0.937	0.355	0.121	0.034	2.64	3.57	42.1
Isoascorbic acid	0.838	0.312	0.137	0.040	2.68	3.40	37.7
Control	0.668	0.250	0.207	0.062	2.68	3.34	30.0

E: Absorbance of each layer.

350 m μ から 550 m μ にかけて吸光度が漸減する色素以外の着色物共存の有無を示す) とテアフラビンの生成率 (Roberts の測定法⁽¹⁰⁾ を適用してケトン層のテアフラビンを定量し, 原料として使用したカテキン量に対する比率を計算したもの) を一括して Table III に示した。

この結果, アスパラギン酸, グルタチオン (酸化型), アスコルビン酸, イソアスコルビン酸はテアフラビンの生成を促進し, アルギニン, リジン, グルタミン酸, システイン, グルタチオン (還元型) は抑制するが, テアニンははじめとするその他の物質は, 対照とほとんど変わらないことが認められた。水層に残留する色素類は, 一般にテアフラビンの生成を促進するものではなく, 抑制するものでは逆に多い傾向があったが, アスパラギン酸, グルタチオン (還元型) は異なっていた。またケトン層の 460 m μ の吸光度に対する 380 m μ の比は, グルタミン酸とシステインを除き, テアフラビン混合物 (エステル型を多く含む) に対し, Roberts が与えている 2.98, また紅茶から分離したテアフラビン遊離型結晶についてわれわれが測定した 2.85 という数字に近い値を示し, 他の着色物質をほとんど含まないことが推定された。水層の比は大部分のものが対照に近かったが, アルギニンとリジンが若干低く, この場合次報に報告するように, 非酵素的に生成される 440 m μ 近辺に吸収を持つ物質の影響によるものと考えられた。システインは一つだけとくに低かったが, これは Fig. 5 に示した色素の形成によるものであった。

3. 考 察

(+)-カテキンの酸化は Hathway により研究されているが, その酵素酸化生成物も自働酸化生成物もほとんど同種の物質であって, カテキンからキノンの生成およびキノン縮合という二つの過程を経て生成されると報告している^(11,12)。このキノンの形成は酵素酸化の場合は酵素の作用, 自働酸化の場合は遊離基の機構によるものであって, たとえ生成されても共存する遊離フェノールなどの酸素受容体によって還元され, 一方的なキノン縮合へは進みにくいが, 解離

した媒体中などではある種のイオン反応の経過でキノンの親電的 (カチオニック) に活性化された 2', 5', 6' の位置の一つと, 他のキノン分子の親核的 (アニオニック) に活性化された 6, 8 もしくはカテキンの 6, 8, 2', 5', 6' の位置の一つの間に結合ができ, すなわち, head to tail の場合は 6' と他分子の 8 が結合して縮合の単位ができ, これが二官能性で順次, 直線的な重合物が形成されていくと考えられている (Fig. 6)。(+)-カテキンの酵素酸化時に各種のアミノ酸を添加した場合にみられたアルギニン, アスパラギン酸による着色物の生成促進, グルタミン酸の抑制は, どの機構にどのような作用をもたらした結果であるか, この実験のみをもっては明らかなでないが, 塩基性物質あるいは酸性物質としての作用がキノンの縮合に促進的な効果を与えたためではないかと推測された。

つぎに, テアフラビンを生成する機構については滝野の報告によると⁽⁵⁾, 酵素または酸化剤によって生じた

Fig. 6. Unit for a Linear Polymer Formation from (+)-Catechin.

Fig. 7. Scheme for the Formation of Theaflavin.

(-) -エピカテキンと, (-) -エピガロカテキンガレートのキノンの間に Fig. 7 に示すような結合を生じ, いわゆるテアフラビン (遊離型) ができると推定している。そこで, テアフラビンの生成に及ぼす各種物質の促進, あるいは抑制効果を考察してみると, まず, アスコルビン酸, イソアスコルビン酸による促進は (-) -エピカテキンと (-) -エピガロカテキンの系にさらに高い酸化還元電位を持つ物質が加わったことによって, (-) -エピカテキンや (-) -エピガロカテキンのキノ化や, これらの系の間における酸素の需給が促進されたためではないかと推定される。システイン, グルタチオン(還元型) による阻害と, システインに特異なケトン不溶の桃色物質の顕著な生成は, Roberts が (+) -カテキンとシステイン, グルタチオンなどの還元性 SH 基を持つ物質の反応のなかで類似の現象を観察しているように, カテキンのキノとこれらの物質の結合反応であると考えられる⁽¹³⁾。この場合, まず無色のシスティニルカテキンを生じ, これがさらにキノと反応して桃色の有機溶媒に不溶な重合物を形成するものと推定される。グルタチオン酸化型による促進は, その酸化作用がカテキンのキノ化を促進したためと考えられるが, 一方, 還元型がカテキンのキノと縮合する性質があるとする, カテキンを酸化してキノにしたものが還元型に復した場合は阻害的に働くことになるので, この実験で示されたような酸化型と還元型の相違は全く理由が不明であるが, Roberts はグルタチオンの場合, 高濃度ではキャリアーとしての機能を持ち, 低濃度では縮合すると推定しているので, この場合キャリアーとして働いたと考えることもできる。アルギニン, リジンによる抑制アスパラギン

酸による促進もその理由が明らかでないが, アルギニン, リジンの場合ケトン層に移るテアルビジンが減少し, 水層に残留する色素類が増加していることから, テアフラビンと別の経路の縮合が促進され, その結果, テアフラビンの生成が抑えられたと考えられる。

グルタミン酸は (+) -カテキンの場合もカテキン組合せの場合も色素類の生成を抑制したが, この理由も不明である。いずれにしてもアミノ酸の場合, アセトンパウダー中に含まれるデアミナーゼによる二次的な生成物が作用することも考えられるので, カテキン酸化の機構へアミノ酸, その他の物質がどのような状況で影響するかを明らかにするには系統的な詳細な検討が必要である。

しかしこの試験は, 従来, 主として試験管内のポリフェノールの系で調べられてきたカテキン類の酸化生成物の研究に, 実際の紅茶製造時のように各種の物質, とくに影響を持ちそうなアミノ酸類とか酸化還元性物質を添加して実験を行ない, その結果を観察するのが目的であるので, こうした物質のうちある種のものが酸化物の生成にかなりの影響を与えることが認められ, 紅茶の水性, 品質に関係してくることが判明したことでその目的は大体達せられたと考えてもよく, 今後, ここでは試験されなかったカフェインなどのカテキン酸化に対する影響の検討などが必要と思われる。

そのほか, 茶葉中には酸化酵素として, オルソジフェニルに作用するポリフェノールオキシダーゼ, メタ配置のポリフェノールを酸化するフロログルシノキシダーゼ, パーオキシダーゼの3種の酵素が共存するが, 新芽ではポリフェノールオキシダーゼの活性が他のものに比べはるかに高い⁽¹⁴⁾。しかし, その最適 pH などはそれぞれ異なっているので, 各種の物質がこの三つの酵素系にどのような影響を与えるかということも検討を要するものと考えられる。

4. 要 約

(1) 紅茶の水性に明かるさを与え, その含有比率の高いことが紅茶の品質に望ましいとされるテアフラビンの生成に関し, アスコルビン酸, イソアスコルビン酸, アスパラギン酸, グルタチオン(酸化型)の添加は促進効果を, グルタチオン(還元型), システイン, アルギニン, リジン, グルタミン酸は抑制効果を示した。

(2) 高次の重合物を形成していく一つの形式と考えられる (+) -カテキンのキノ重合時に, アルギニン, アスパラギン酸を添加すると, 着色物を対照よりもはる

かに多く生成し, グルタミン酸では逆の結果になることが認められたが, アルギニン添加などにより増加する着色物は, いわゆる (+)-カテキンの head to tail の縮合物だけでなく別種のものも含むと推定された。

(3) アルギニン, リジンをテアフラビン生成系に添加した場合, カテキンの他の重合系を促進して褐色物をつくるものと考えられた。

(4) システインはテアフラビン生成系に添加した場合, 特異的にケトンに不溶の桃色色素を形成するが, このものはカテキンのキノンとシステインの重合物と推定された。

(5) テアニン, アラニンのような中性アミド, アミノ酸は, カテキンの酵素酸化にあまり影響しないと考えられた。

-
- (1) E. A. H. Roberts : *J. Sci. Food Agric.*, **9**, 212 (1958).
(2) E. A. H. Roberts, M. Myers : *ibid.*, **10**, 167

(1959).

- (3) E. A. H. Roberts, M. Myers : *ibid.*, **11**, 158 (1960).
(4) Y. Takino, H. Imagawa : *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 319 (1963).
(5) Y. Takino, H. Imagawa, H. Horikawa, A. Tanaka : *ibid.*, **28**, 64 (1964).
(6) Y. Takino, H. Imagawa : *ibid.*, **28**, 255 (1964).
(7) M. Nakagawa, H. Torii : *ibid.*, **29**, 278 (1965).
(8) V. R. Popov : *Biokhimiya*, **21**, 380 (1956).
(9) M. Nakagawa, H. Torii : *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 160 (1964).
(10) E. A. H. Roberts : *Analyst*, **86**, 44 (1961).
(11) D. E. Hathway, J. W. T. Seakins : *Biochem. J.*, **67**, 239 (1957).
(12) D. E. Hathway, J. W. T. Seakins : *Nature*, **176**, 218 (1955).
(13) E. A. H. Roberts : *Chem. & Ind.*, **1959**, 995.
(14) V. R. Popov : *Biokhimiya*, **30**, 1137 (1965).