ノ ー ト

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 58, No. 11, pp. 1131~1133, 1984]

チャの葯および茎のカルスのカフェイン、
テアニン、カテキン含量

津志田藤二郎, 土井芳憲*
(農林水産省茶業試験場, *現在, 四国農業試験場)

昭和 59 年 5 月 29 日 受 理

Caffeine, Theanine and Catechin Content in
Calluses of Tea Stem and Anther

Tojiro TSUSHIDA and Yoshinori DOI
National Research Institute of Tea, 2769,
Kanaya, Haibara, Shizuoka 428

The caffeine content of anther callus was 0.05 mg/g and that of stem callus, 0.64±0.13 mg/g. In stem callus 83.7% of the produced caffeine was released into the medium. Theobromine was also released and its content was 0.36 µg/ml. This value corresponds to 0.015 of caffeine concentration in the medium. Catechin content in the stem callus and anther callus was very low, and only (–)-epicatechin and (–)-epigallocatechingallate were detected in the stem callus. Theanine content in the anther callus was about 1.6~2.9%. This value was almost the same as that of tea anther. Theanine content in stem calluses was extremely low and was about 1% of theanine content in tea stems.
(Received May 29, 1984)

組織培養による有用物質の生産に関する研究は、近年盛んに行われている⁽¹⁾。チャにおける組織培養の研究はまだ少ないが⁽²⁻⁶⁾、チャはカフェイン、テアニン、カテキンなどの二次代謝産物を多量に含んでおり、とくにカフェインは清涼飲料や薬品などに利用されることから、その生産に関する研究は重要である。また他の二次代謝産物についても、チャにおける役割とその代謝機構を明らかにするうえで、組織培養細胞を用いることは有用であると考えられる⁽²⁻⁴⁾。

本実験には葯培養カルスと茎培養カルスを用いた。葯は 8 月下旬に採取したもの、茎は一番茶期の茶芽の第 1 葉から第 3 葉までの間を 3 mm に切断したものをを用い

た。培地はカイネチン 10^{-5} M, ナフタレン酢酸 10^{-4} M, チアミン塩酸塩 1.3 ppm, 蔗糖 3%, 寒天 0.8% を含む ムランゲ, スクーグ培地である。この培地を葯培養では 100 ml の三角フラスコに 50 ml 取り、茎培養では試験管 (径 1 cm×10 cm) に 10 ml 取り、それぞれ 3000 ルクスの光を 1 日に 12 時間照射し、28°C で 6 カ月間培養した。葯培養カルスは再び同培地で 3 カ月間継代培養し、さらにナフタレン酢酸濃度を 10^{-5} M にした同培地に移し、1 年間生育させたものである。茎培養カルスの分析には、カルス化した部分だけを取り用いた。葯培養カルスでは継代培養後 1.6% の割合で不定根が発生した。不定根の発生には品種間差異があることがすでに明らかになっている⁽⁶⁾。この不定根の成分についても同時に分析した。

分析用カルスは 45 秒間蒸熱した後、凍結乾燥粉末にした。この粉末 30~600 mg に 50 倍量の蒸留水を加え、100°C で 5 分間保った後、室温で時々攪拌しながら、1 時間抽出し、8000×g で 5 分間遠心分離して得られた上清液を分析用試料溶液とした。この溶液を、1 g のポリビニルポリピロリドン (ポリクラー AT) を詰めた内径 1 cm のカラムにかけ、除タンニンした後濃縮し、カフェイン、テオブロミンを測定した。カテキンの分析には、この溶液を等容量の酢酸エチルで 3 回抽出し、濃縮乾固した後一定量の蒸留水に溶解したものをを用いた。カフェイン、テオブロミン、カテキンともに高速液体クロマトグラフィーで分離定量した。用いたカラムはファインジル C₁₈ (4.6×250 mm, 日本分光製) であり、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) 中のアセトニトリル濃度を、32 分間で 10% から 15% まで直線的に増加させる条件で、それぞれを分析した。なお測定波長は、カフェイン、テオブロミンの分析では 272 nm, カテキンの分析では 280 nm を用いた。またアミノ酸は、測定用試料溶液中のカテキンを等量の酢酸エチルで 2 回抽出し除いた後、常法⁽⁸⁾どおりアミノ酸アナライザー (JEOL-6AH) を用いて定量した。カフェイン、テオブロミン、カテキン、アミノ酸とともに、既知濃度の標準溶液をそれぞれの条件で分析し、その面積を比較し試料中の含量を算出した。

Table I に葯およびそのカルスと茎およびそのカルスのカフェイン含量と、茎のカルスの培地中のカフェインおよびテオブロミン含量を示した。葯には 6.77 mg/g のカフェインが含有されているが、カルス化し脱分化が

Table I. Content of Caffeine and Theobromine in the Stem Callus and Anther Callus

Sample	Caffeine (mg/g)		Theobromine (mg/g)
	Average	Range	Average
Stem	13.17 ^a		trace
Stem callus	0.642±0.139	0.578—0.823	n. d.
medium	3.208 ^b		0.052
Anther	6.769 ^a		trace
Anther callus	0.050 ^b		n. d.

^a Average of two samples.^b Five samples were combined and analyzed.
n. d.: not detected.

Table II. Content of Theanine in the Stem Callus, Anther Callus and Its Adventitious Root

Sample	Theanine (mg/g)	
	Average	Range
Stem	34.90 ^a	
Stem callus	0.371±0.243 ^b	0.233—0.804
Anther	17.45 ^a	
Anther callus	20.89 ± 5.75 ^b	15.64—29.08
adventitious root	198.6 ^a	

^a Average of two samples. ^b Five samples.

進むとカフェインが非常に少なくなり, 0.05 mg/g となった。また同培地中のカフェインも非常に少なく 0.01 mg/g 以下の濃度であり定量できなかった。他方茎のカルスはまだ十分脱分化が進んでいないが, カフェインが5点の平均で 0.64 ± 0.14 mg/g 存在していた。また同培地中にはカフェインが $23.3 \mu\text{g/ml}$, テオブロミンが $0.36 \mu\text{g/ml}$ 存在しており, カルスの重量当りに換算すると, それぞれ 3.20 mg/g, 0.05 mg/g となった。したがってカルスで生産されたカフェインの約 83.7% が培地中に存在していることになる。この培地におけるカフェインの濃度は, カルス中のカフェイン濃度の約 1/20 であった。カフェインの培地への放出は, コーヒー幼苗のカルスでも認められている⁽⁹⁻¹²⁾。カフェインが培地に放出されることは, カフェインの生産を目的にした場合, かなり有利な点であろう。

茎のカルスのカテキンの高速液体クロマトグラフィーによる分離パターンを Fig. 1 に示した。茎のカルスのカテキン含量は非常に少なく, (−)-エピカテキンが 0.07 mg/g, (−)-エピカテキンガレートが 0.02 mg/g であった。茎には (−)-エピガロカテキン, (−)-エピカ

Fig. 1. HPLC Linear Gradient Separation of Catechins in the Ethyl Acetate Extract of the Tea Stem Callus and of Authentic Six Catechins. —, ethyl acetate extract of the stem callus (0.02 AUFS); ·····, authentic catechins (0.04 AUFS). Peaks are; a, (+)-epigallocatechin; b, (−)-epigallocatechin; c, (+)-catechin; d, (−)-epicatechin; e, (−)-epigallocatechingallate; f, (−)-epicatechingallate; g, caffeine. Analytical conditions were shown in the text.

キンガレートが存在するが, カルスではその存在を確認できなかった。葯のカルスではさらに含量が少なく, カテキン類は検出できなかった。Forrest ら⁽⁴⁾ はチャの茎のカルスのカテキンを分析しているが, (−)-エピカテキン, (+)-カテキンを検出し, カテキン含量が非常に少ないことを報告している。

Table II にはテアニンの分析結果を示した。葯カルスにはテアニンが, 5点の平均で 20.90 mg/g 存在していた。葯にはもともと 17.45 mg/g のテアニンが存在していたが, カルス化しても同程度のテアニンを含有することがわかった。一方不良根2点についても同様にテアニン含量を測定したところ, 平均で 19.86% であった。チャのシードリングの根には約 10% のテアニンが存在するが, 不定根のテアニン含量はこのシードリングの根の含量以上であった。茎のカルスのテアニン含量は, 葯のカルスのテアニン含量に比べて少なく, 5点の平均で 0.37 ± 0.24 mg/g であった。この値はカルス化する前の茎のテアニン含量の約 1% である。

このように脱分化の進んだ葯のカルスと脱分化のあまり進んでいない茎のカルスではチャの代表的な成分であるカフェイン, カテキン, テアニンの含量が著しく異なっていた。

-
- (1) Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, ed. by A. Fujiwara, Maruzen, 1982, p. 269.
- (2) D. B. A. Ogutsuga and D. H. Northcote : *J. Exp. Botany*, **21**, 258 (1970).
- (3) D. B. A. Ogutsuga and D. H. Northcote : *Biochem. J.*, **117**, 715 (1970).
- (4) G. I. Forrest : *Biochem. J.*, **113**, 765 (1969).
- (5) 土井芳憲 : 茶業技術研究, No. 58, 1 (1983).
- (6) 土井芳憲 : 茶業研究報告, No. 57, 13 (1983).
- (7) T. Murashige and F. Skoog : *Physiol. Planta*, **15**, 473 (1962).
- (7) 竹尾忠一 : 茶業技術研究, No. 56, 70 (1979).
- (9) P. M. Frischknecht, T. W. Baumann and H. Wanner : *Planta Medica*, **31**, 343 (1977).
- (10) P. M. Frischknecht and T. W. Baumann : *Planta Medica*, **40**, 245 (1980).
- (11) T. W. Baumann and P. M. Frischknecht : Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, ed. by A. Fujiwara, Maruzen, 1982, p. 365.
- (12) T. Suzuki and G. R. Waller : Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, ed. by A. Fujiwara, Maruzen, 1982, p. 385.
-