報 文

緑茶加熱におけるアスパラギン酸, スレオニン, セリン, アラニンと糖の化合物の生成と変化†

阿南豊正*・高柳博次*・池ヶ谷賢次郎*・中川致之**

Changes of Sugar Compounds of Aspartic acid, Threonine, Serine and Alanine during Heating of Green Tea

(Relation between Changes of Chemical Compositions and Taste
of Green Tea, Part II)

Toyomasa ANAN*, Hirotugu TAKAYANAGI*, Kenjiro Ikegaya*
and Muneyuki NAKAGAWA**

* National Research Institute of Tea, 2769, Kanaya-cho, Haibara-gun, Shizuoka-ken, 428

** National Research Institute of Tea, Makurazaki Branch Station,
14041, Makurazaki-shi, Kagoshima-ken, 898

As the results of a further investigation of amino acid-sugar compounds in green tea, 1-deoxy-1 (L-aspartic acid)-D-fructose, 1-deoxy-1-L-threonine-D-fructose, 1-deoxy-1-L-serine-D-fructose and 1-deoxy-1-L-alanine-D-fructose were newly identified. The process for production of Japanese green tea includes the heat treatment of crude green tea at temperatures above 100°C (hi-ire) to gain its characteristic flavor. Therefore, the changes in the amounts of the amino acid-sugar compounds above-mentioned during heating of crude green tea at 110°C, 130°C and 150°C for 10, 30 and 50 min were investigated. The results indicated that their amounts increased continuously on heating at 110°C, but on heating at 130°C or 150°C they increased to a maximum and then decreased. The sensory evaluation of these green teas for estimating the intensity of hi-ire revealed that the amino acid-sugar compound contents were at a maximum at slightly excessive intensity of hi-ire.

(Received May 11, 1981)

食品加工においては、貯蔵性の増加や香味の発揚を目的として加熱操作がしばしばほどこされる。緑茶においても、一般に市販されている製品は、半製品である「荒茶」に「火入れ」という加熱操作をほどこして製造したもので、この操作により貯蔵性が高まり、加熱香味もかわるといわれている。

この加熱操作に関する研究としては、品質との関係^{1)~3)}、香気成分の変化⁴⁾⁵⁾、不揮発成分の変化⁶⁾⁷⁾などが報

告されているが、化学成分の変化が緑茶の味に及ぼす影響については、まだ十分明らかにされているとはいえない。そこで、著者らは化学成分の加熱中の変化と味との関係を明らかにする目的で、先に加熱による化学成分の変化について報告した⁸⁾。さらに、アミノカルボニル反応の中でアマドリ転位によって生成するアミノ酸-糖化合物について検討し、緑茶には 1-deoxy-1-L-theanine-D-fructopyranose (以下 Theanine-F と略す) が存在

† 緑茶の加熱による化学成分変化と味との関係 (第2報) (前報, 文献8))

* 農林水産省茶業試験場 (〒428 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769)

** 農林水産省茶業試験場枕崎支場 (〒898 鹿児島県枕崎市別府 14041)

することを報告した⁹⁾。

アミノ酸-糖化合物については、すでにタバコ^{10)~12)}、しょうゆ¹³⁾、ココア¹⁴⁾、みそおよび清酒¹⁵⁾などで数種類の存在が報告されているが、緑茶においてもその後の検討でさらにいくつかの類似物質の存在が認められた。そこで、これらの物質について定性および定量を行ない若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 化学成分の分析

水分は公定分析法¹⁶⁾により、遊離還元糖は HANES 法¹⁷⁾により、アミノ酸類はアミノ酸自動分析機 (日本電子製 JLC-6 AH) による自動分析法¹⁸⁾で測定した。

2. アミノ酸-糖化合物の調製

緑茶に存在する主要なアミノ酸と D-グルコースを出発材料とし、マロン酸をアマドリ転位の触媒とする HooGE らの方法¹⁹⁾に準じて調製した。さらに富田の方法²⁰⁾に準じてイオン交換クロマトグラフィー、セルロースカラムクロマトグラフィーで精製した。なお、調製した物質が各アミノ酸-糖化合物であるという確認は、各物質の加水分解物の検討、ペーパークロマトグラフィー上のスポットの呈色テストなどにより行なった。

3. アミノ酸-糖化合物の分析条件の検討

アミノ酸自動分析機 (日本電子製 JLC-6 AH) を用いて、カラム温度や溶出液の条件を変えて合成品の分析条件を検討した。

4. 緑茶中のアミノ酸-糖化合物の定性および定量

緑茶を熱水で抽出後、酢酸エチルでポリフェノール類を除いたものを試料とし、今回検討して得られた分析条件で分析し、合成品の溶出時間と比較して各ピークの定性を行なった。さらに、合成品を標品として各物質の定量を行なった。

5. 荒茶の加熱条件

荒茶を加熱した場合のアミノ酸-糖化合物の含量変化を調べるため、熱風循環式電気恒温器を用いて荒茶を加熱した。すなわち、器内温度が 110°C, 130°C, 150°C で、加熱時間が 10 分, 30 分, 50 分でそれぞれ加熱し、加熱程度が異なる 9 種類の試料を調製した。

6. 官能検査による火入れ度の判定

加熱程度が異なる 9 種類の試料と荒茶の合計 10 点について、官能検査により火入れ度を判定した。なお、パネルは当試験場製茶部の職員 18 名を用い、尺度は Table 1 のように 9 段階のカテゴリー尺度を用いた。さらに、得られた火入れ度を、火入れ適度を 5 点、非常に不足お

Table 1 Scale and definitions used in scoring

Score of intensity of hiire	Term	Evaluation score of hiire
9	Extremely excessive	1
8	Very excessive	2
7	Moderately excessive	3
6	Slightly excessive	4
5	Optimum	5
4	Slightly deficient	4
3	Moderately deficient	3
2	Very deficient	2
1	Extremely deficient	1

よび非常に過度を 1 点とする Table 1 のような尺度で換算し、これを火入れ評点とした。そして、各アミノ酸-糖化合物の含量と火入れ評点の相関を調べた。

実験結果および考察

1. アミノ酸-糖化合物の調製

緑茶に存在する主なアミノ酸類の中で、チアニンについては前報⁹⁾で報告したが、今回はその他にアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、スレオニン、セリン、アラニン、アルギニンと D-グルコースを用いて各アミノ酸-糖化合物の調製を試みた。しかし、グルタミン酸、グルタミン、アルギニンの各糖化合物は合成できなかったため、これらについては今回は検討しなかった。なお、調製した各化合物は、ペーパークロマトグラム上でニンヒドリン試薬、フタル酸-アニリン試薬による発色テストで陽性を示し、加水分解によりそれぞれの構成成分であるアミノ酸 (但し、アスパラギン-糖化合物からはアスパラギン酸とアンモニア) と 5-ハイドロキシメチル-2-フルフルアルを生成することがアミノ酸自動分析機およびペーパークロマトグラフィーで確認された。これらの結果から、今回調製したものは求めるアミノ酸-糖化合物であることが確認されたため、以後の実験に標品として使用した。但し、1-deoxy-1-L-serino-D-fructose (以下 Ser-F と略す) は若干着色していたが、ペーパークロマトグラム上で単一スポットを示し、アミノ酸自動分析機でも単一ピークを示したため、同様に標品として使用した。

2. アミノ酸-糖化合物の分析条件の検討

1-deoxy-1-(L-aspartic acid)-D-fructose (以下 Asp-F と略す), 1-deoxy-1-L-threonino-D-fructose (以下 Thr-F と略す), 1-deoxy-1-L-asparagino-D-fructose (以下 AspNH₂-F と略す), 1-deoxy-1-L-alanino-D-fructose (以下 Ala-F と略す), Ser-F, Theanine-F

の混合液について、通常、緑茶のアミノ酸分析に用いるクエン酸ナトリウム緩衝液を溶出液としてアミノ酸自動分析機で分析した場合は、酸性アミノ酸より若干早く溶出したが各化合物の分離は悪かった。それに対し、クエン酸リチウム緩衝液を用いた場合はより良い分離結果が得られた。

そこで、この緩衝液で分析することとし、まず緩衝液の pH を 1.34 と一定にしてカラム温度を 30°C と 68°C の 2 条件で分析した結果、Fig. 1 のとおり 68°C では溶

Fig. 1 Ion-exchange chromatograms of amino acid-sugar compounds

- (A): effluent solvent: Li-citrate buffer (pH 1.34), column temperature: 68°C
 (B): effluent solvent: Li-citrate buffer (pH 1.34), column temperature: 30°C
 (1): Asp-F, (2): Thr-F+Ser-F, (3): AspNH₂-F, (4): Theanine-F, (5): Ala-F

出時間は早いですが各物質の分離が悪く 30°C の方が良好であった。次に、カラム温度を 30°C と一定にし緩衝液の pH を 1.34, 1.45, 1.70 の 3 条件で検討した結果、Fig. 2 のとおり pH 1.34 では Thr-F が Ser-F と完全に重なって溶出したが、pH 1.55 では若干分離し、pH 1.70 ではかなり良好に分離して溶出した。これらの結果から、緑茶のアミノ酸-糖化合物の分析は、カラム温度 30°C で pH 1.70 のクエン酸リチウム緩衝液を用いて行なうこととした。なお、この条件で緑茶に存在するアミノ酸類を分析した結果、アスパラギン酸の溶出時間が 225 分で、その他のアミノ酸類はいずれもそれより遅く溶出することがわかった。このことから、今回検討したアミノ酸-糖化合物とアミノ酸類は、上記条件で分析した場合、同一位置に溶出することはないと考えられた。

3. 緑茶のアミノ酸-糖化合物の定性

緑茶から熱水抽出により調製された試料液を、アミノ

Fig. 2 Ion exchange chromatograms of amino acid-sugar compounds

- Column temperature; 30°C
 Effluent solvent; Li-citrate buffer, (A): pH 1.34, (B): pH 1.55, (C): pH 1.70
 (1): Asp-F, (2): Thr-F, (3): Ser-F, (4): AspNH₂-F, (5): Theanine-F, (6): Ala-F

酸自動分析機を用いてカラム温度 30°C で pH 1.70 のクエン酸リチウム緩衝液で分析し、合成品と溶出時間を比較して定性を行なった。その結果、Fig. 3 に示したように各ピークが同定され、緑茶には既報⁹⁾の Theanine-F の他に Asp-F, Thr-F, Ser-F, Ala-F が存在することが明らかとなった。その他に AspNH₂-F と溶出時間が似ている不明物質が存在したが、緑茶にはアスパラギン

Fig. 3 Ion-exchange chromatogram of amino acid-sugar compounds of green tea

- Sample was prepared by heating crude green tea at 130°C for 30 min
 (1): Asp-F, (2): Thr-F, (3): Ser-F, (4): unknown, (5): Theanine-F, (6): Ala-F

非常に少ないため、このピークは他の物質と考えられたが、今回の物質の同定はできなかった。

4. 荒茶加熱中のアミノ酸-糖化合物の変化

今回緑茶に新たに存在が確認された4種のアミノ酸-糖化合物の含量が、荒茶の加熱によってどのように変化するかを調べた結果は Table 2 のとおりであった。一方、アミノ酸-糖化合物の前駆物質であるアミノ酸と、グルコースを含む遊離還元糖の加熱による含量変化は Table 3 のとおりであった。

アミノ酸および遊離還元糖は前報⁸⁾の結果と同様、加熱程度が増すにつれて減少した。それに対し、アミノ酸-糖化合物は、110°C で加熱した場合はいずれも加熱時間の増加とともに増加し、130°C で加熱した場合は 30 分までは増加しそれ以上の加熱では減少した。一方、150°C で加熱した場合は、Thr-F と Ser-F は 10 分加熱した場合がもっとも多くそれ以上加熱した場合は減少した

が、Asp-F と Ala-F は 30 分加熱した場合がもっとも多く、50 分加熱した場合は減少した。150°C の加熱結果から、Thr-F と Ser-F は Asp-F と Ala-F より若干容易に加熱により生成され、さらに過度の加熱による分解も前 2 者の方が後 2 者より起こりやすいと考えられた。

5. アミノ酸-糖化合物含量と火入れ度、火入れ評点との関係

加熱程度の異なる 9 種の試料と荒茶について Table 1 の尺度を用いて官能検査により火入れ度を調べ、火入れ度とアミノ酸-糖化合物含量の関係およびそれより求めた回帰曲線を示したのが Fig. 4 である。各アミノ酸-糖化合物含量は荒茶の加熱程度の増加とともにある点まで増加し、それ以上の加熱では逆に減少することはすでに述べたとおりだが、Fig. 4 からいずれもやや火入れ過度で含量が最高となることがわかった。

次に、官能検査で得られた火入れ度を Table 1 に従

Table 2 Changes in the contents of amino acid-sugar compounds during heating of green tea
(mean value±standard deviation, mg%)

Samples		Asp-F	Thr-F	Ser-F	Ala-F
Heat temperature	Heat time (min)				
Crude green tea		6.80±0.65	3.20±0.02	7.04±1.70	3.84±1.05
110°C	10	9.71±1.83	4.29±0.73	8.37±1.05	4.02±1.03
	30	17.00±3.44	6.02±0.83	13.04±0.35	5.62±0.74
	50	30.86±7.31	9.03±2.09	20.14±1.27	9.94±1.77
130°C	10	18.98±0.36	7.15±0.56	12.89±0.13	5.05±1.26
	30	53.87±0.86	12.72±0.62	28.38±0.44	15.22±0.31
	50	52.77±0.61	9.53±0.94	20.75±0.48	12.52±2.23
150°C	10	32.48±0.63	8.70±0.23	17.65±1.53	9.23±0.62
	30	38.45±1.03	5.80±0.19	13.68±0.52	10.88±0.41
	50	16.21±0.74	1.74±0.25	3.59±0.19	3.56±0.25

Table 3 Changes in the contents of some amino acids and reducing sugars during heating of green tea

(mean value±standard deviation)

Samples		Reducing sugars (%)	Amino acids (mg%)			
Heat temperature	Heat time (min)		Asp	Thr	Ser	Ala
Crude green tea		2.50±0.10	288.7±16.8	50.2±1.4	116.6±19.3	25.2±1.4
110°C	10	2.33±0.08	288.8± 7.8	50.3±1.7	125.7± 7.0	25.0±4.1
	30	2.32±0.04	284.8±23.3	50.2±4.5	113.8± 6.1	25.3±3.3
	50	2.11±0.01	265.0±21.9	48.7±5.8	102.0±11.9	24.3±5.9
130°C	10	2.40±0.02	233.1±38.4	47.7±1.1	126.4±19.5	24.0±1.6
	30	1.98±0.11	213.1±11.0	42.9±4.0	108.5± 6.6	21.7±2.6
	50	1.78±0.14	231.0±27.8	41.7±1.3	88.5± 6.8	21.7±3.4
150°C	10	2.10±0.14	243.5±35.8	43.7±0.7	104.7± 2.4	21.6±3.8
	30	1.70±0.03	190.0±35.6	33.3±3.2	79.0±22.3	21.2±2.2
	50	1.21±0.07	139.2±15.8	23.1±2.1	46.9± 5.3	16.4±2.3

Fig. 4 The relations between the contents of amino acid-sugar compounds and the scores of intensity of hiire

(A); Asp-F: $y = -4.36x^2 + 58.23x - 148.67^*$, $r^2 = 0.816$

(B); Thr-F: $y = -1.09x^2 + 13.42x - 30.81$, $r^2 = 0.807$

(C); Ser-F: $y = -17.64x^2 + 212.58x - 466.36$, $r^2 = 0.828$

(D); Ala-F: $y = -1.10x^2 + 14.36x - 34.59$, $r^2 = 0.718$

* Regression equation

Table 4 Correlation between the contents of amino acid-sugar compounds and the evaluation scores of hiire

Amino acid-sugar compounds	Coefficients of correlation
Asp-F	-0.1380
Thr-F	0.4187
Ser-F	0.3413
Ala-F	-0.0180

って換算し火入れ評点を求め、各アミノ酸-糖化合物と評点の相関係数を求めた結果、Table 4 のとおりいずれもあまり高い値を示さなかった。このように加熱の程度とアミノ酸-糖化合物含量の間には関連性があるが、火入れ評点と含量の間にはあまり相関が認められないのは、アミノ酸-糖化合物の含量が最大となる加熱程度と火入れ評点が最高となる加熱程度が幾分ずれているためと考えられる。

要 約

アマドリ転位によって生成するアミノ酸-糖化合物で緑茶中に存在し未同定のものについて定性を行なった。その結果、緑茶にはすでに存在が報告されている Theanine-F の他に、新たに Asp-F, Thr-F, Ser-F, Ala-F

が存在することが明らかとなった。

さらに、これらの含量が、荒茶を加熱する際にどう変化するかを調べるために、荒茶を 110°C, 130°C, 150°C で 10, 30, 50 分加熱した試料について各アミノ酸-糖化合物含量を調べた。その結果、いずれもある程度の加熱程度まで増加し、それ以上過度の加熱では減少することがわかった。次に、これらの試料の火入れ度を官能検査により調べ、各アミノ酸-糖化合物含量と火入れ度の関係を検討した結果、いずれもやや火入れ過度の付近で含量が最大となった。

終わりに、本実験を行なうにあたり御指導をいただいた当試験場古谷弘三場長、坂本裕製茶部長に深く感謝いたします。

文 献

- 久保田悦郎・原 利男：日食工誌，17，69(1970)。
- 塩野輝雄：茶業研究報告，No. 41，59 (1974)。
- 岩堀源五郎・原 利男：茶業研究報告，No. 43，39 (1975)。
- 原 利男・久保田悦郎：日食工誌，20，311(1973)。
- 原 利男・久保田悦郎：日食工誌，21，495(1974)。
- NAKAGAWA, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 31, 1283 (1967)。
- 中川致之：日食工誌，23，415 (1976)。
- 阿南豊正・天野いね・中川致之：日食工誌，28，74 (1981)。
- ANAN, T.: *J. Sci. Food Agric.*, 30, 906(1979)。
- TOMITA, H., NOGUCHI, M. and TAMAKI, E.: *Agric. Biol. Chem.*, 29, 515 (1965)。
- TOMITA, H., NOGUCHI, M. and TAMAKI, E.: *Agric. Biol. Chem.*, 29, 959 (1965)。
- YAMAMOTO, K. and NOGUCHI, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2185 (1973)。
- HASHIBA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 763 (1978)。
- 高原広康・新開孝哉・熊谷和子・森下 功：日食工誌，17，151 (1970)。
- HASHIBA, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1727 (1978)。
- 茶試化学研究室：茶業試験場報告，No. 6，167 (1970)。
- HANES, C.S.: *Biochem. J.*, 23, 99 (1929)。
- 久保田悦郎・中川致之：茶業技術研究，No. 45，51 (1973)。
- HODGE, J.E. and RIST, C.E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 316 (1953)。
- 富田英夫：日本専売公社盛岡たばこ試験場報告，3，149 (1968)。

(昭和56年5月11日受理)