緑茶の蒸熱に伴うクロロフィラーゼ活性の変化と フェオホルビド *a* の生成

木幡勝則*・山下陽市*・山内雄二**・堀江秀樹*

Changes in Chlorophyllase Activity and Production of Pheophorbide *a* during Steaming of Green Teas

Katsunori KOHATA*, Youichi YAMASHITA*, Yuji YAMAUCHI** and Hideki HORIE*

* National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea (NIVOT),
2769 Kanaya, Shizuoka 428-8501

** Faculty of Pharmaceutical Science, Osaka University, 1-6
Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871

A relationship between manufacturing processes, namely steaming time, and chlorophyllase activity has been studied. Furthermore, the degree of residual chlorophyllase activity in commercially available green teas was evaluated by measuring the total pheophorbide *a* (PB *a*) as an indicator of chlorophyllase activity. The chlorophyllase activity in fresh tea leaves decreased rapidly during steaming and almost disappeared when treated for more than 120 sec. The chlorophyllase activity was scarcely changed during further manufacturing processes. On the other hand, chlorophyllase activity was detected in commercially available green teas. The total PB *a* content decreased in the order Gyokuro > Matcha > Sencha > Fukamushi sencha and was beyond the standard limit established for chlorophyllase in Gyokuro and some of Matcha and Sencha analyzed. Commercially available green teas contain a relatively low percentage of water and are usually kept in cold, suggesting that chlorophyllase activity would probably be minimal and PB *a* would not be produced under cold storage conditions. Even though the total PB *a* content was found in relatively high concentration in commercial samples, this parameter need not be taken into consideration while evaluating the safety of green teas. The PB *a* content significantly increased by leaving green teas (specially lightly steamed green teas) in water for a long time. Attention to the total PB *a* content should be paid when using green teas as a food stuff.

(Received May 11, 1999 ; Accepted Jul. 19, 1999)

緑茶製造において生葉は摘採後直ちに蒸熱されるため、酵素活性はほとんど残存しないとされており、従って、これまで蒸熱時間が酵素活性に与える影響についてはほとんど検討されていない。先に、著者らは緑茶（荒茶）を pH 8.0 の緩衝溶液中、37℃ で 3 時間インキュベートすることよりフェオホルビド *a* (PB *a*) が急増することを見出し（この新たに生成する PB *a* 量と既存の PB *a* 量との和を総 PB *a* 含有量とする）、クロロフィラーゼ活性が生葉と比較してかなり低下するもののまだ

残存していることを明らかにした¹⁾。

一方、緑茶は色沢・香味に悪い変化が起らないように、あるいは色や味を濃厚にする目的で、茶種に応じてまた生葉の原葉特性に応じて蒸熱時間を調整して製造されている。例えば、抹茶や玉露では蒸熱時間を短く（浅蒸し）することで、色沢や香味に悪い変化が起らないようにしているし、深蒸し煎茶では蒸熱時間を長くし（深蒸し）、茶葉の細胞組織を破壊することで組織内成分を溶出しやすくし、色や味が濃厚になるようにしてい

* 野菜・茶業試験場（〒428-8051 静岡県榛原郡金谷町金谷 2769）

** 大阪大学大学院薬学研究科（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6）

る。即ち、蒸熱時間の短い抹茶や玉露ではかなりの酵素活性が残存していること、反対に蒸熱時間の長い深蒸し煎茶では酵素活性はほとんど残存していないことが推察される。

これらの背景のもと、本論文では蒸熱時間が茶葉中クロロフィラーゼ活性に及ぼす影響について及び蒸熱後の製茶工程におけるクロロフィラーゼ活性変化について検討した。併せて、各種市販緑茶の総 PB *a* 含有量を測定し、含有量から見た緑茶中のクロロフィラーゼ活性の残存の程度及び残存活性と品質との関係についても検討を加えた。

実 験 方 法

1. 緑茶試料

蒸熱時間及び製茶工程におけるクロロフィラーゼ活性変化の検討には、1997 年野菜・茶業試験場（静岡県金谷町）で生産された一番茶適期の生葉（‘やぶきた’）を用いた。市販煎茶は 1997 年に東京、静岡、愛知、京都の 7 業者から、等級別に購入した抹茶 19 点、玉露 17 点、煎茶 25 点及び深蒸し煎茶 17 点を用いた。価格は高い順に上級、中級、下級とし、その内訳を表 1 に示した。

2. 緑茶製造条件

蒸熱は送带式蒸し機を用い、時間を 25, 40, 60, 120, 300 秒の 5 段階に変えて行った。製茶工程におけるクロロフィラーゼ活性変化の検討においては、蒸熱時間を 50 秒に設定し、荒茶製造（粗揉→揉捻→中揉→精揉→乾燥）は 2 kg 機を用いて行った。

表 1 市販緑茶の価格と格付け

茶 種	級	試料点数	価格帯 (円)*
抹 茶	上	6	1500-3000
	中	6	900-1300
	下	7	400- 700
玉 露	上	5	5000-8000
	中	7	2000-3400
	下	5	1000-1500
煎 茶	上	7	2000-3000
	中	10	600-1000
	下	8	300- 500
深蒸し煎茶	上	5	1500-2000
	中	6	800-1000
	下	6	300- 600

*: 100 g 当たりの単価、ただし抹茶は 20 g 当たり

3. 総 PB *a* 含有量の測定

クロレラで採用されている観らの方法²⁾を一部改良した著者らの既存の方法に従った¹⁾³⁾。本測定法では、PB *a* 生成量をクロロフィラーゼ活性度測定のための指標値として使用しており、クロロフィリド *a* から PB *a* 生成に関与する Mg-デキレターゼの作用⁴⁾⁵⁾等は考慮していない。従って、PB *a* 生成量が全クロロフィラーゼ活性に相当しているとはいえないが、クロレラでの安全基準値との比較もあり、本論文では本法を採用した。即ち、市販緑茶の総 PB *a* 含有量（既存 PB *a* 含有量と新たに生成した PB *a* 量の和、なお、インキュベート中にクロロフィリド *a* と PB *a* の双方が生成するが、クロロフィリド *a* 量を PB *a* 量に換算し、PB *a* 量に加えた量を新たに生成した PB *a* 量とした）は、茶粉末試料（100 mg）を 1/15 M リン酸緩衝液（pH 8.0）-アセトン（7:3, v/v）溶液中、37℃ で 3 時間インキュベートした後、反応液を遠心分離し、上清を 50 ml にメスアップ定容、次いでろ過した後 HPLC 法より求めた。各製茶工程後の PB *a* 生成量（既存 PB *a* 含有量を含まない）は、茶粉末試料の代わりに茶葉から調製したアセトンパウダーを用い、また、アセトン溶液の代わりに基質として標準クロロフィル *a* を含むアセトン溶液（10⁻⁴ M）を用いて、同様に求めてきた。ただし、緑茶を食品素材として利用する際の食品製造条件を仮定しての PB *a* 生成量の測定は、緩衝液の代わりに蒸留水を用いて行った。温度による影響は反応時間を 3 時間に設定し、温度を 5, 20, 37, 50, 60, 85℃ に変えて検討した。また、反応時間の影響は温度を 37℃ に設定し、時間を 15, 30, 60, 180, 240, 420 分と変えて検討した。なお、この際用いた緑茶試料は、市販上級玉露である。

実験結果及び考察

1. クロロフィラーゼ活性に及ぼす蒸熱時間の影響

図 1 には、生葉の酵素活性を 100% とした時の蒸熱時間によるクロロフィラーゼ活性の変化について示した。蒸熱により酵素活性が激減することがわかる。酵素活性は、蒸熱 25 秒で生葉の約 6 分の 1、40 秒で約 12 分の 1、60 秒で 20 分の 1 に減少し、120 秒ではほとんど活性がなくなっていることがわかった。このことから、通常 20 ~ 30 秒と蒸熱時間の短い抹茶や玉露の浅蒸しの茶ではかなりの酵素活性が残存していることが示された。反対に、2 分以上の深蒸しの茶ではほとんど酵素活性が残存していなかった。

2. 製茶工程におけるクロロフィラーゼ活性の変化

図2には、生葉の酵素活性を100%とした時の荒茶製造工程(蒸熱(50秒)→粗揉→揉捻→中揉→精揉→乾燥)におけるクロロフィラーゼ活性の変化について示した。酵素活性は蒸熱工程で急減したが、その後の工程ではほとんど変化しなかった。製茶工程では、成分変化をできるだけ少なくする目的で、茶葉温度を40℃以下に保つよう細心の注意が払われている。このことが酵素活性の変化を少なくさせたものと思われる。乾燥は熱風温度80~90℃と高温で行われるため、活性の低下が予測されたが、今回の試験ではほとんど認められなかった。これは茶葉の水分含有量に依るところが大きいのと思われる。精揉後の茶葉の水分含有量が通常十数%と低いことに起因しているものと推察された。一方、市販緑茶は荒茶を再製して製造されたものであるが、再製工程では火入れが重要な役割を担っている。以前著者らは荒茶を120℃で

20分火入れしたところ、クロロフィラーゼ活性が約20%程度低下するものの、120℃で20分という比較的過激な条件下でも残存することを報告した¹⁾。

3. 市販緑茶の総PBa含有量

上述の結果から、蒸熱時間の短い茶ではかなりの酵素活性が残存していること、反対に蒸熱時間の長い茶では酵素活性はほとんど残存していないことが推察された。そこで、各種市販緑茶の既存PBa含有量を測定した上で、総PBa含有量を測定し、含有量から見た緑茶中のクロロフィラーゼ活性の残存の程度及び残存活性と品質との関係について検討した。

表2には市販緑茶中の既存PBa含有量を示した。既存PBa含有量は玉露で100g中8mg、煎茶で3mg前後であり、蒸熱時間の短い玉露でやや多い傾向にあったが、級間の差は認められなかった。一方、抹茶及び深蒸し煎茶にはほとんど含まれていなかった。PBはクロロ

図1 蒸熱時間がクロロフィラーゼ活性に及ぼす影響

生葉(蒸熱時間0秒)の酵素活性を100%とした。試料として蒸熱直後の茶葉より調製したアセトンパウダーを用いた。

図2 製茶工程におけるクロロフィラーゼ活性の変化

生葉(蒸熱時間0秒)の酵素活性を100%とした。試料として各製造工程における茶葉より調製したアセトンパウダーを用いた。

表2 玉露及び煎茶中の既存フェオホルビドa含有量(mg/100g)

試料	玉 露			煎 茶		
	平均値	標準偏差	範 囲	平均値	標準偏差	範 囲
上	8.35 ^a	1.70	7.06-10.39	3.66 ^a	2.15	0.00-6.79
中	9.73 ^a	2.45	6.35-13.16	3.37 ^a	2.06	0.00-6.79
下	5.99 ^b	1.19	4.83- 7.97	2.93 ^a	0.73	1.59-3.91

平均値の差を級間ごとにダンカンの多重比較により検定した。平均値の肩のアルファベットが同一であれば、1%水準で有意差がないことを示す。

フィラーゼの作用により、クロロフィリドあるいはフェオフィチンを介してクロロフィルより生成するが、摘採後直ちに蒸熱される緑茶ではクロロフィラーゼがほとんど失活するため、PB はわずかししか含まれていないことが報告されている⁶⁾⁷⁾。今回得られた結果も同様であった。ところで、PB はヒトに対して光過敏毒性を示すことが知られており、クロレラでは 100 g 中 100 mg 以下という安全基準が設けられている²⁾。今回得られた結果から、市販緑茶中の既存 PB *a* 含有量は安全性という観点からは全く問題にならない量であることがわかった。

表 3 には市販緑茶中の総 PB *a* 含有量を示した。その結果、検討した 4 茶種全てにおいて既存 PB *a* 含有量と比較して急増していることが示され、市販緑茶中にはクロロフィラーゼ活性が残存していることが明らかとなった。総 PB *a* 含有量は、玉露 (約 260 mg/100 g) > 抹茶 (約 128 mg/100 g) > 煎茶 (約 105 mg/100 g) > 深蒸し煎茶 (約 20 mg/100 g) の順に少なくなっており、この結果は製茶工程における蒸熱時間をよく反映しているといえる。玉露と比較して抹茶で生成量が少ないのは、原料となるてん茶製造工程での火炉における火入れ加熱によるクロロフィラーゼの活性低下が原因と推察されるが、実証するまでには至っておらず、今後検討を加えたいと考えている。

抹茶を除く茶種での総 PB *a* 含有量においては、弱いながら、上、中、下の級間差違が認められ、上級のものの程生成量が多い傾向にあった。特に、上級と下級との間には有意差が認められ、ある程度総 PB *a* 含有量から品質評価のことができることが示唆された。著者らは若い葉程クロロフィラーゼ活性の高いことを報告している⁸⁾。また、上述したように蒸熱時間が短い程クロロフィラーゼ活性はより残存する。即ち、上級のものの程若い葉を使用し、蒸熱時間を短くするため酵素残存活性が高く総 PB *a* 含有量が多くなるものと推察される。

総 PB *a* 含有量は、全ての玉露及び抹茶と煎茶の一部

でクロレラでの基準値 (160 mg/100 g)²⁾ を超えていた。しかし、通常緑茶は低温で貯蔵されるし、水分含有量も約 5% と低いことから、保存中にクロロフィラーゼが作用して PB *a* が急増するとは考えにくい。また、PB *a* は脂溶性であることからほとんど茶浸出液には溶出されない。従って、飲料としてはもちろんのこと、たとえ抹茶のように食べたとしても現状で特に問題になることはないと思われるが、クロレラでの基準値が緑茶では適用されていないとはいえ、緑茶の一部に基準値を越えるものが存在することを常に念頭に入れて緑茶を利用していく必要がある。

4. 蒸留水中での PB *a* 生成量

上述した様に、既存 PB *a* 含有量を基にした緑茶の安全性は問題ないことが判明したが、総 PB *a* 含有量に関しては、緑茶の一部にクロレラでの基準値を超えるものがあることが判明した。近年食品素材としての茶の需要が増加しており、その際長時間茶葉を高湿度下にあるいは水中に放置して置くことにより、クロロフィラーゼが作用し PB *a* が急増してしまうことも想定される。そこで、緩衝液の代わりに蒸留水を用い、温度と反応時間を変えたときの総 PB *a* 生成量変化について検討を加えた。なお、茶試料としてはクロロフィラーゼ残存活性の高い上級玉露を用いた。

図 3 には、反応時間を 3 時間に設定し、温度を 5~85℃ まで変化させたときの PB *a* 生成量の変化を示した。PB *a* 生成量は温度の上昇と共に増加し、60℃ で最高値を示した後減少した。緩衝液中程ではないまでも、蒸留水中でもクロロフィラーゼが作用し PB *a* が急増することが明らかとなった。茶のクロロフィラーゼは 90℃ 以上で失活することが報告されており⁹⁾、比較的熱に弱いとされていたが、酵素にとって 60℃ という高温で最高活性を示したことは注目に値する。また、冷蔵温度である 5℃ でも既存 PB *a* 含有量の約 3 倍に増加していたことも重要な知見である。

図 4 には、温度を 37℃ に設定し、反応時間を 15~420

表 3 市販緑茶中の総フェオホ

試 料	玉 露			抹 茶		
	平 均 値	標準偏差	範 囲	平 均 値	標準偏差	範 囲
上	308.41 ^a	20.26	291.36-342.33	119.32 ^a	62.13	49.63-226.44
中	287.91 ^a	52.61	206.16-336.81	149.36 ^a	52.32	93.04-228.39
下	190.39 ^b	25.99	162.18-219.68	116.45 ^a	62.59	43.54-199.60

平均値の差を級間ごとにダンカンの多重比較により検定した。平均値の肩のアルファベットが同一であれば、1%

分まで変えたときのPB *a* 生成量の変化を示した。PB *a* 生成量は3時間頃まで急激に増加し、その後も割合は減少するものの増加し続ける。この傾向は緩衝液中での傾向と類似しており¹⁾、基質であるクロロフィル *a* が分解されずに残存する限り増加し続けるものと思われる。

図3 フェオホルビド *a* 生成量に及ぼす温度の影響
上級玉露粉末試料を蒸留水中3時間インキュベートした。

図4 フェオホルビド *a* 生成量に及ぼす反応時間の影響

上級玉露粉末試料を蒸留水中37°Cでインキュベートした。

以上、緩衝液中程でないまでも蒸留水中でも、クロレラでの基準値を上回るほどのPB *a* が生成することが明らかとなった。これらの結果は、茶葉、特に蒸しの浅い茶葉の温水中への長時間放置に警鐘を鳴らすものであり、茶を食品素材として利用していく上で、留意しなければならない問題点を提起している。

要 約

蒸熱時間が茶葉中クロロフィラーゼ活性に及ぼす影響について及び蒸熱後の製茶工程におけるクロロフィラーゼ活性変化について検討した。併せて、各種市販緑茶の総PB *a* 含有量を測定し、含有量から見た緑茶中のクロロフィラーゼ活性の残存の程度及び残存活性と品質との関係についても検討を加えた。

(1) クロロフィラーゼ活性は、蒸熱により急激に低下し、蒸熱25秒で生葉の約6分の1、40秒で約12分の1、60秒で約20分の1であった。120秒ではほとんど活性がなくなっていることがわかった。

(2) クロロフィラーゼ活性は、蒸熱により急減したが、その後の製茶工程ではほとんど変化しなかった。

(3) (i) 市販緑茶中にはクロロフィラーゼ活性が残存していることが明らかとなった。総PB *a* 含有量は玉露>抹茶>煎茶>深蒸し煎茶の順に少なくなっていた。

(ii) 抹茶を除く茶種での総PB *a* 含有量においては、上級と下級との間には有意差が認められ、ある程度総PB *a* 生成量から品質評価のできることが示唆された。

(iii) 総PB *a* 含有量は、全ての玉露及び抹茶と煎茶の一部でクロレラでの基準値を超えていが、貯蔵温度、水分含有量から考えて、保存中にPB *a* が急増するとは考えにくい。従って、現状で直ちに問題になることはないが、緑茶を食べる茶として利用していく上で常に留意すべき点である。

(iv) 緑茶を蒸留水中に長時間放置することよりPB *a* 量が急増することが明らかとなった。この結果は、緑茶、特に蒸しの浅い緑茶を食品素材として利用していく上で、留意すべき点である。

ルビド *a* 含有量 (mg/100 g)

煎 茶			深蒸し煎茶		
平均値	標準偏差	範 囲	平均値	標準偏差	範 囲
149.18 ^a	64.05	24.37-250.15	37.86 ^a	27.40	12.40-69.39
93.94 ^{ab}	35.44	32.41-139.44	13.20 ^a	9.57	1.88-23.88
74.14 ^b	36.65	4.52-137.37	7.95 ^b	5.70	1.72-15.71

水準で有意差がないことを示す。

文 献

- 1) KOHATA, K., HANADA, K., YAMAUCHI, Y. and HORIE, H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1600 (1998).
 - 2) 舘 公子・田村行弘・真木俊夫・小関正道・直井家壽太 : 東京衛生年報, **33**, 208 (1982).
 - 3) KOHATA, K., HANADA, K. and HORIE, H. : *Food Sci. Tech. Int. Tokyo*, **4**, 80 (1998).
 - 4) SHIOI, Y., TATSUMI, Y. and SHIMOKAWA, K. : *Plant Cell Physiol.*, **32**, 87 (1991).
 - 5) LANGMEIER, M., GINSBURG, S. and MATILE, P. : *Physiol. Plant.*, **89**, 347 (1993).
 - 6) 西条了康 : 茶業技術研究, **40**, 66 (1970).
 - 7) 木幡勝則・山下陽市・山内雄二・堀江秀樹 : 茶業研究報告, **87**, 13 (1999).
 - 8) 木幡勝則・山下陽市・山内雄二・堀江秀樹・田中伸三 : 茶業研究発表会講演要旨, **87** (別), 122 (1998).
 - 9) OGURA, N. : *Plant Cell Physiol.*, **13**, 971 (1972).
- (平成 11 年 5 月 11 日受付. 平成 11 年 7 月 19 日受理)
-