

## NATURAL ASTRINGENCY IN FOODSTUFFS — A MOLECULAR INTERPRETATION

Authors: Edwin Haslam  
Terence Henry Lilley  
Department of Chemistry  
University of Sheffield  
Sheffield, United Kingdom

Reference: Larry G. Butler  
Department of Biochemistry  
Purdue University  
West Lafayette, Indiana

"I myself started with the 'information' that tannins were waste products deposited in the wood of trees because the plants had nothing else they could do with them; a horrible thought! Convinced that they had a function, I set out to try and find it by way of their systematic distribution linked to the idea of their astringency."

E. C. Ruse-Smith

## I. INTRODUCTION

## A. Astringency and Astringents

The objective evaluation of the taste and flavor of foods and beverages still depends largely upon sensory perception. Although the methodology of testing has been greatly refined and systematized, a fundamental understanding of the physiology and chemistry underlying the sensation of taste is still lacking. This is certainly the case with respect to that quality of foods and drink generally referred to as astringency — this despite the fact that it has long been recognized that the acceptability of many fruits and fruit products (such as wines and fruit juices) is critically dependent on the type and concentration of astringent principles which are present.<sup>1</sup>

The word astringent is derived from the Latin *ad* (to) and *stringere* (bind); thus, astringency is properly defined as a binding reaction. Indeed, astringents in medicine and pharmacology are recognized as substances that bind to and precipitate proteins. They are used, for example, to control hemorrhage and diarrhea and to inhibit mucous secretions.<sup>2-4</sup> In this context, it is therefore of particular interest to note that many Japanese and Chinese folk medicines frequently employ, as antidiarrhetic and hemostatic agents, plants rich in that group of secondary metabolites known as polyphenols or vegetable tannins. Typical of the very many members of this group of herbal medicines are *Geranium Herba* (Japanese name — "Gen-no-shoko" — the herb of *Geranium thunbergii*) and the root of *Paeonia lactiflora*, which is one of the most important Chinese crude drugs.<sup>5,7</sup> The outer skin of the root of the tree paeony (*Mudan*) is used medicinally to cure disorders of the bloodstream, including high blood pressure. Its usage dates back some 2000 years and demand for "Dan pi", as its root bark is called, ensures that it is still planted by the acre in some Chinese states. Many herbal remedies likewise derive from plants of the family Rosaceae,<sup>8,9</sup> and in European culture today several remedies based on such plants persist. The astringent and stimulant character of raspberry (*Rubus idaeus*) leaf tea is well documented<sup>10</sup> as is its use as a medicament during parturition. Extracts of hawthorn (*Crataegus* sp.) find usage in Western medicine similarly in the treatment of heart disorders. Vegetable tannins (polyphenols) are generally regarded as the active principles of these herbal remedies.<sup>3,8</sup>

As a sensation of taste, that of astringency — generally recognized as a feeling of extreme

## I. Introduction

## (A)- Astringency and Astringents

- Astringency 定義：a binding reaction
- Astringents in medicine and pharmacology are recognized as substances that bind to and precipitate proteins.
- As sensation of taste, that of astringency - generally recognized as a feeling of extreme dryness or puckeriness - is not confined to a particular region of the mouth or tongue, but is experienced invariably as a diffuse stimuli.

□澀味感覺之產生需相當的時間。

2

- A mucous membrane covers all the exposed surfaces of the mouth which are moistened by secretions of the salivary glands. The primary reaction whereby astringency develops is via precipitation of proteins and mucopolysaccharides in the mucous secretions. This is believed to be caused by combination with the astringent principle(s).
- 這些物質包括：
  - ◎ multivalent cations (Al, Cr, Zn, Pb, Ca, B)
  - ◎ dehydrating agents (alcohol, dimehyl ketone)
  - ◎ mineral acids
  - ◎ naturally occurring vegetable tannins.
- Polyphenols (vegetable tannins) have a harsh (澀口的) astringent taste and produce in the palate a feeling of constriction (皺縮), dryness (乾澀), and roughness (粗糙).

3

- 早期，了解植物組織的 astringent response 機制的重點，僅止於多酚類物質與其和蛋白質、多醣類之間的相互作用。
- 多酚類物質的特殊性質與特性，不僅對於 taste 及 palatability 的影響甚大，也對營養價值（尤其豆科植物）、飼料等造成影響；
- 增加食道上皮組織受到carcinogens作用的風險。

4

## 狂吃軟柿子－小腸全塞住

記者張正莉／台北報導【2002-10-16/聯合報/8版/社會】

柿子挑軟的吃，有胃疾者，別吃太多，免得吃出大麻煩。一名卅多歲男性，日前一口氣狂吃七、八顆軟柿子，由於並未細細咀嚼，柿子的草率酸與胃酸作用後，在腸胃中凝結成一團堅硬的「糞石」，將小腸完全阻塞，造成腸壞死及腹膜炎，最後被迫開刀取出重達半公斤糞石，才救回一命。

三總一般外科主治醫師陳登偉說，這名吃柿子開刀的卅多歲男性，十年前曾經因為胃潰瘍開過胃部手術，因本身從事勞力工作，食量較大，吃東西又快，一口氣吞下七、八顆柿子。到醫院時，患者已經超過七天沒有排便，也沒有排氣，並出現腹脹、腹痛、嘔吐、發燒等症狀，經過理學檢查及X光檢查，發現患者的小腸已經從正常的三公分脹大為六公分，並且已有部分壞死，產生腹膜炎。

陳登偉表示，一般處理糞石，可以內視鏡伸入胃部夾碎後取出，或者先用藥物溶解糞石，再以鼻胃管抽吸出來；但因這位患者的糞石體積過大，質地堅硬，又有很多已進入小腸，再加上已有腹膜炎跡象，所以只能以開刀方式取出。由於取出的糞石還能隱約看出一團團柿子的外形，細問之下，才知道果然是柿子吃多惹的禍。

陳登偉指出，高纖的蔬菜、水果都可能在腸胃中形成糞石，但四分之三的案例是由柿子引起，柿子含有豐富草率酸，與胃酸混合後會更黏稠，再上纖維多，很容易結成塊狀，如果一次吃半公斤以上，就可能因無法消化而形成糞石。其次，曾經做過腸胃道手術者，因迷走神經受損，消化功能變差，比一般人更容易出現這種情形。

陳登偉提醒，老年人、長期臥床、脊髓損傷患者及曾做過腸胃道手術者，腸胃的消化及蠕動功能變差，吃東西要注意少量為宜，細嚼慢嚥；如果腹痛、腹脹情形超過四十八小時未改善，應及早就醫檢查。

5

## 男子狂吃柿子 糞石阻腸道

民視新聞更新日期:2006/11/02 01:09

- 現在正是秋柿的產期，但提醒您柿子不能一下吃太多，有人一連吃了好幾顆軟柿子，引發腸阻塞，造成糞石，痛不欲生，動手術才解決麻煩。營養師說，柿子表面有丹寧，會刺激腸胃，加上柿子纖維質高不易消化的，建議最好剝皮吃以免影響腸胃。天涼好個秋，正是吃柿子的好季節，但是別看這軟軟滑滑的柿子，一口一接一口，越吃越順口，別吃太多，樂極生悲。一名中年男子就因此造成腸結石，腹痛不得了，開刀才好。
- 柿子吃出問題，主要是因為柿子表面含有丹寧，本來防蟲蛀，人吃下肚就會刺激腸胃道，加上柿子也是一種纖維質過高的水果，很容易不消化。
- 從中醫角度來說，柿子性寒，所以最好不要和海鮮、酒類、以及其他寒性食物一起吃，而吃的時候，最好剝皮，還有空肚子別吃，開過刀、腸胃不好的人最好少。

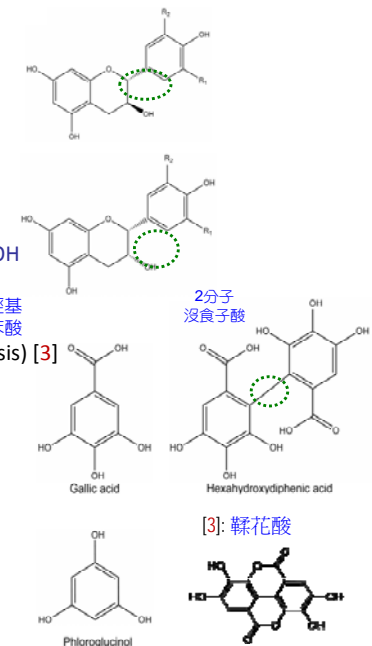
6

## B. Natural Plant Polyphenols: Vegetable Tannins

- 植物單寧類(vegetable tannins)是水溶性酚類化合物(分子量500-3000)，除了giving the usual phenolic reactions，它們具有special properties such as the ability to precipitate alkaloids, gelatin, and other proteins。
- Tannin (單寧)名稱 模糊 定義籠統？
- Plant polyphenols 粗略分為二大群：
  - Proanthocyanidins 原花色素類 (也稱 condensed tannins 縮合單寧類)
  - Polyesters of gallic acid and/or hexahydroxydiphenic acid and their derivatives (沒食子酸及/或六羥基聯苯甲酸的多酯類與其衍生物；也稱 hydrolyzable tannins 水解單寧類)

7

Group	Monomer
Proanthocyanidins 原花色素類/ 縮合單寧類	(+)-catechin R1=OH, R2=H (+)-afzelechin R1=H, R2=H (-)-gallocatechin R1=OH, R2=OH 右旋-兒茶素 右旋-阿夫兒茶素 右旋-沒食子兒茶素
	(-)-epicatechin R1=OH, R2=H (-)-epiafzelechin R1=H, R2=H (-)-epigallocatechin R1=OH, R2=OH
Hydrolysable tannins 水解單寧類	Gallic acid [1] 沒食子酸 Hexahydroxydiphenic acid [2] 聯苯酸 Ellagic acid (formed after hydrolysis) [3] 鞣花酸(水解後生成；六羥基聯苯酸的雙內酯 dilactone)
Phlorotannins 褐藻多酚類	Phloroglucinol 間苯三酚(藤黃酚、根皮酚)
Complex tannins 複合單寧類	Complex structures which contain structural elements of different tannin groups and other macromolecules



8

Table 1

## SOME “TANNIN”-CONTAINING PLANTS THAT (AS LEAF, FRUIT, BARK, ROOT, ETC.) HAVE BEEN USED AS FOODSTUFFS, FORAGE CROPS, LIVESTOCK FEEDS, AND IN BEVERAGES AND HERBAL PREPARATIONS

## Proanthocyanidins

Apple (*Malus* sp.); persimmon (*Diospyros kaki*); grape (*Vinus vinifera*); strawberry (*Fragaria* sp.); blackberry, dewberry, raspberry (*Rubus* sp.); plum, cherry (*Prunus* sp.); bilberry, cranberry (*Vaccinium* sp.); gooseberry, black and red currant (*Ribes* sp.); quince (*Cydonia* sp., *Chaenomeles chinensis*); cocoa bean (*Theobroma cacao*); kola nut (*Cola acuminata*); pear (*Pyrus* sp.); hawthorn (*Crataegus* sp.); rose hip (*Rosa* sp.); Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*); yam (*Dioscorea alata*); sorghum (*Sorghum* sp.); barley (*Hordeum vulgare*); sainfoin (*Onobrychis viciifolia*); herbaceous legumes (*Lotus* sp., *Trifolium* sp., *Coronilla varia*, *Lespedeza cuneata*, *Lathyrus pratense*); heather (*Calluna vulgaris*); wattle (*Acacia* sp.); rhubarb (*Rhei rhizoma*); Myricaceae bark (*Myrica rubra*); *Polygonum multiflorum* root

## Galloyl and Hexahydroxydiphenyl Esters

Blackberry, dewberry, raspberry (*Rubus* sp.); walnut (*Juglans* sp.); strawberry (*Fragaria* sp.); carob pods (*Ceratonlia siliqua*); rose flower, hip (*Rosa* sp.); pomegranate (*Punica granatum*); acorn (*Quercus* sp.); tea (*Camellia sinensis*); Uva-ursi (*Arctostaphylos uva ursi*); paeony root (*Paenonia* sp.); geranium root — geranii Herba (*Geranium* sp.); smoke-tree (*Cotinus coggyria*); cloves-flower buds (*Eugenia caryophyllata*); witch hazel (*Hamamelis* sp.); kinimizuhi (*Agrimonia japonica*); ohebi-ichigo (*Potentilla kleiniana*); kibushi-leaves, fruit (*Stachyrys praecox*); rhubarb (*Rhei rhizoma*); *Casuarina* (*Casuarina stricta*); sweet gum-leaves (*Liquidambar* sp.); Pistacio (*Pistacia vera*, *P. chinensis*); guava (*Psidium guava*); Nupharis Rhizoma (*Nuphar japonicum*); *Acacia* leaves (*Acacia milotica*); *Bergenia* leaves, roots (*Bergenia crassifolia*, *B. cordifolia*, *B. purpurascens*); Myricaceae bark (*Myrica rubra*); persimmon (*Diospyros kaki*)

Table 1 Common tannin-containing plants used as foodstuffs, forage crops, livestock feeds, beverages, and herbal preparations. Adapted from Haslam and Lilley (1988).

Proanthocyanidins (Condensed tannins)		Galloyl and hexahydroxydiphenyl esters (Hydrolysable tannins)	
Common name	Species name	Common name	Species name
Apple	蘋果 柿子 <i>Malus</i> sp.	Blackberry, Dewberry, Raspberry	<i>Rubus</i> sp.
Persimmon	葡萄 莓類 <i>Diospyros kaki</i>	Walnut	<i>Juglans</i> sp.
Grape	<i>Vinus vinifera</i>	Strawberry	<i>Fragaria</i> sp.
Strawberry	<i>Fragaria</i> sp.	Carob pods	<i>Ceratonlia siliqua</i>
Blackberry, Dewberry, Raspberry	<i>Rubus</i> sp.	Rose hip flower	<i>Rosa</i> sp.
		Pomegranate	<i>Punica granatum</i>
		Acorn	<i>Quercus</i> sp.
Plum, Cherry	桃 覆盆子 <i>Prunus</i> sp.	Tea	<i>Camellia sinensis</i>
Bilberry, Cranberry	蔓越莓 醋 <i>Vaccinium</i> sp.	Uva-ursi	<i>Arctostaphylos uva ursi</i>
Gooseberry, Black and red currant	果 黑/紅 <i>Ribes</i> sp.	Paeony root	<i>Paenonia</i> sp.
	醋栗		
Quince	<i>Cydonia</i> sp., <i>Chaenomeles chinensis</i>	Geranium root — geranii Herba	<i>Geranium</i> sp.
		Smoke-tree	<i>Cotinus coggyria</i>
Cocoa bean	可可豆 <i>Theobroma cacao</i>	Cloves-flower buds	<i>Eugenia caryophyllata</i>
Kola nut	可樂果 <i>Cola acuminata</i>	Witch hazel	<i>Hamamelis</i> sp.
Pear	梨 山楂 <i>Pyrus</i> sp.	Kinimizuhi	<i>Agrimonia japonica</i>
Hawthorn	玫瑰果 <i>Crataegus</i> sp.	Ohebi-ichigo	<i>Potentilla kleiniana</i>
Rose hip	<i>Rosa</i> sp.	Kibushi-leaves & fruit	<i>Stachyrys praecox</i>
Chinese gooseberry	中國醋栗 <i>Actinidia chinensis</i>	Rhubarb	<i>Rhei rhizoma</i>
Yam	山藥 <i>Dioscorea alata</i>	Casuarina	<i>Casuarina stricta</i>
Sorghum	高粱 <i>Sorghum</i> sp.	Sweet gum leaves	<i>Liquidambar</i> sp.
Barley	梁 大麥 <i>Hordeum vulgare</i>	Pistacio	<i>Pistacia vera</i> , <i>P. chinensis</i>
Sainfoin	紅豆草 <i>Onobrychis viciifolia</i>	Guava	<i>Psidium guava</i>
Herbaceous legumes	草本豆類 <i>Lotus</i> sp., <i>Trifolium</i> sp., <i>Coronilla varia</i> , <i>Lespedeza cuneata</i> , <i>Lathyrus pratense</i>	Nupharis rhizoma	<i>Nuphar japonicum</i>
		Bergenia leaves & roots	<i>Bergenia crassifolia</i> , <i>B. cordifolia</i> , <i>B. purpurascens</i>
Heather	石南 金合歡 <i>Calluna vulgaris</i>	Acacia leaves	<i>Acacia milotica</i>
Wattle	大黃 ? 樹皮 <i>Acacia</i> sp.	Myricaceae bark	<i>Myrica rubra</i>
Rhubarb		Persimmon	<i>Diospyros kaki</i>
Polygonum multiflorum root		Myricaceae bark	<i>Myrica rubra</i>
Myricaceae bark			

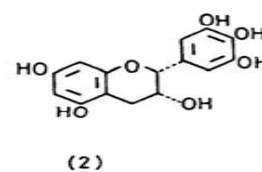
## Plant polyphenols:

- 通常歸屬於二級代謝物 (secondary metabolites)
- 具有一些與眾不同的分子特性
- 帶有 a multiplicity of phenolic groups
- 分子量範圍廣，如原花色素類(proanthocyanidins) 達20,000，沒食子酸酯與其衍生物類(galloyl esters and their derivatives) 約3,000。
- 在許多例中，植物的澀味或相關性質是直接來自本身的 polyphenol metabolites，但有些則和 the presence of postharvest transformation products of the original polyphenols 有關（例如紅茶）。

☐ 紅茶: 重要的發酵由萎凋與揉捻處理開始，引起 phenolic flavan-3-ol metabolites (1-3) 和 catechol oxidase 接觸，此完全的生化變化貢獻大部分的成品風味。

☐ “Tea flush”含 caffeine (3-4%)、polyphenols (最高達30%；主要成分為 flavan-3-ols: (-)-epicatechin gallate (1)、(-)-epigallocatechin (2)及(-)-epigallocatechin gallate (3)。

發酵過程中，最明顯的變化乃這些 flavan-3-ol substrates 的酵素性氧化，貢獻於賦予紅茶色澤及風味(包括澀味)之 characteristic pigments形成。



2: (-)-epigallocatechin

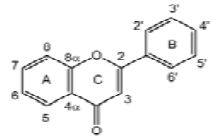


1: (-)-epicatechin gallate

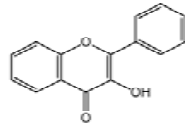
3: (-)-epigallocatechin gallate



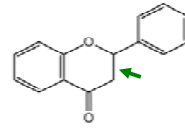
**Flavone 黃酮**



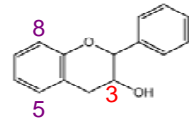
**Flavonol 黃酮醇**



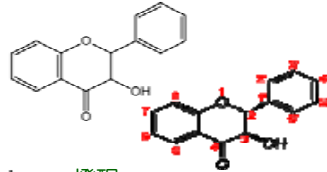
**Flavanone 黃烷酮**



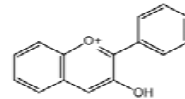
**Flavan-3-ol 黃烷-3-醇**



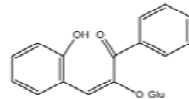
**Flavanonol 黃烷酮醇**



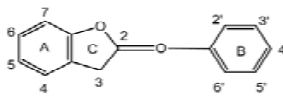
**花色素 Anthocyanidin**



**Chalcone 查耳酮**



**Aurone 橙酮**

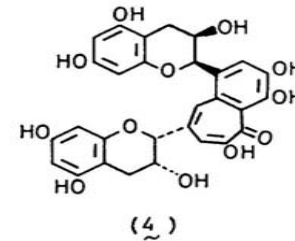


◆類黃酮次分類 Flavonoid subclasses (the 2-phenylbenzopyrans). 13

紅茶中的兩色素主群：

◎ **theaflavins 茶黃素類** (與其相關的gallate esters, (4)) -- the primary oxidation products

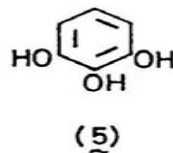
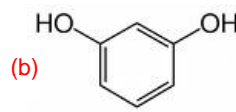
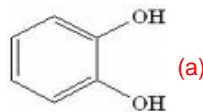
◎ **heterogenous polymeric thearubigins 茶紅素類** (有些的化學構造未定) -- the secondary oxidation products, 部分來自 theaflavins



4: theaflavins

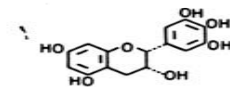
**Simple phenols (MW ≤ 200)**

- 以往的植物單寧類定義，有些忽略 simple phenols 會造成的一些現象，如對astringency之貢獻，此乃 phenol binding to protein 的機制未被證實而誤解。
- Polyphenols of the vegetable tannin class不僅具有立即結合蛋白質的不同地點之性質，也可cross-link不同的蛋白質分子，此一特殊的性質—結合蛋白質的能力，乃源自本身的phenolic nucleus的化學與物理性質。
- 最簡單的phenols – catechol (a)、resorcinol (b)、pyrogallol (5) 也可以自溶液介質中將蛋白質沈澱。此情形下，一些植物如含有特別高量的simple phenols，很可能澀味之產生係來自這些simple phenolic metabolites。

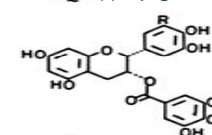
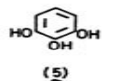


舉例：

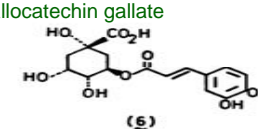
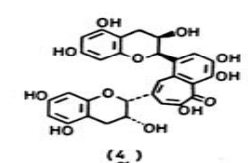
- 綠茶：含相當量的 flavan-3-ols: (-)-epicatechin gallate (1), (-)-epigallocatechin (2), and (-)-epigallocatechin gallate (3).
- 咖啡：一杯約含250 mg chlorogenic acid (6)
- Neither green tea nor coffee contains polyphenolic metabolites of the vegetable tannin class.



(2) (-)-epigallocatechin



(1, R=H) (-)-epicatechin gallate  
(2, R=OH) (-)-epigallocatechin gallate



Chlorogenic acid 綠原酸

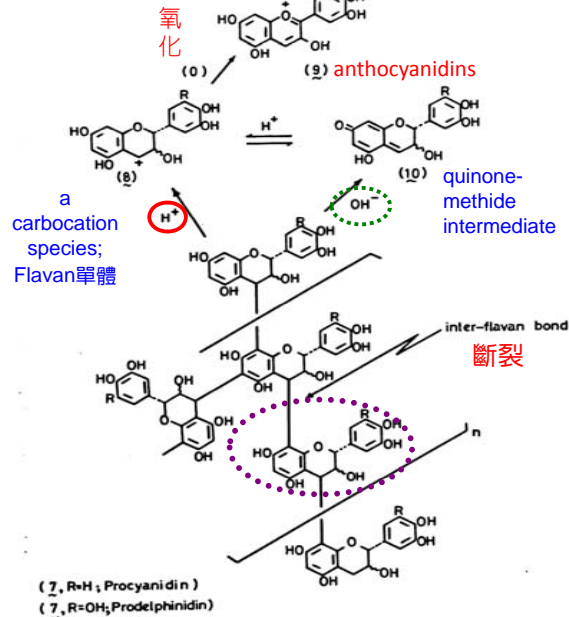
## 1. Proanthocyanidins

原花色(青)素類

植物原花色素類的基本構造為 polyflavan-3-ol (7)

Heating with acid or base：連結單元體之間的 interflavan bond 打斷，釋出碳陽離子型式的黃烷單元體，受大氣的氧化而轉變為特徵的花色素類。

如此的性質對植物組織(尤其水果及葡萄酒)之澀味變化是重要的。



圖一：原花色素類是母體黃烷-3-醇類(11, 12)在植物組織中生合成過程中的副產物。一主要步驟為carbocation中間產物(8)或其質子化對等物(10)的形成。可溶性二、三量體至寡聚原花色素類的衍生，受到(8)轉變為黃烷-3-醇所需生物還原劑(NADPH)的供應所支配。如還原劑供應成速率限制的，過渡的(8)會脫離酵素活性部位，而和終產物黃烷-3-醇(11, 12)反應生成先是二量體然後更高寡聚的型式。任何植物組織中原花色素類的合成，就出現如此範圍的分子種類，從單元體黃烷-3-醇類(catechins 及 gallocatechins)至多聚體型式。

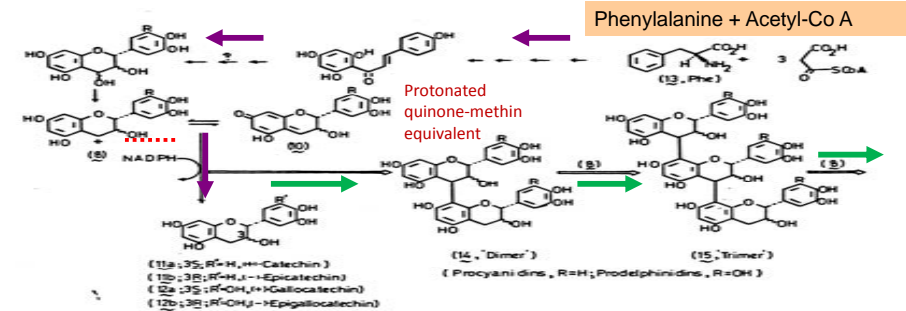


FIGURE 1. Biosynthesis of proanthocyanidins — an outline.

對每種植物組織，這些各種分子種類之間的平衡可能受到代謝流動(metabolic flux)至8、10與NADPH供應速率之間的平衡所決定；代謝流動低而還原劑供應大之組織→含所有分子大小的各種原花色素類；反之，組織中NADPH供應受限而代謝流動高→含較高寡聚體型式為主。重合度的增加，原花色素類變成愈難溶於水及醇溶液。能慢慢溶入溶液者其分子量可達7000附近，相當於聚合物中達20個黃烷-3-醇單位。

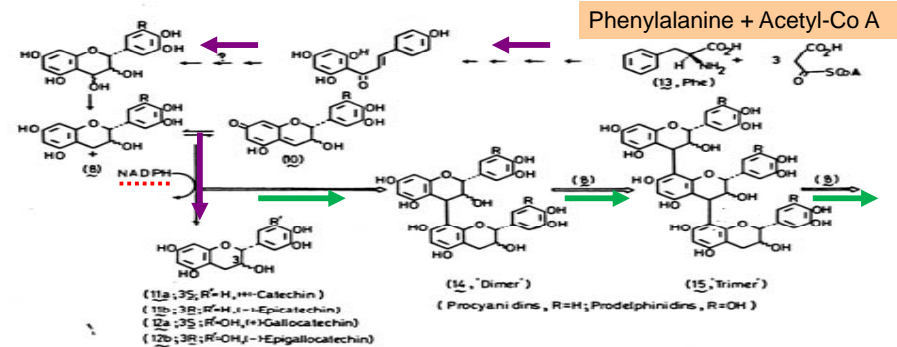


FIGURE 1. Biosynthesis of proanthocyanidins — an outline.

原花色素類除了各種的可溶性型式，植物組織中尚存在 insoluble polymeric forms。存在量遠高於可溶性型式，通常為5或20：1比率，如柿子則佔絕大部分。

- Proanthocyanidins are covalently bound to a carbohydrate matrix within the plant cells. 這些原花色素類乃在生合成過程中，結構8或10被植物細胞中醣構造的OH基抓住。

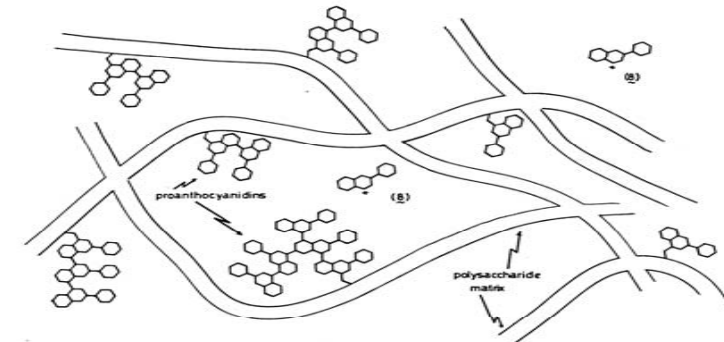
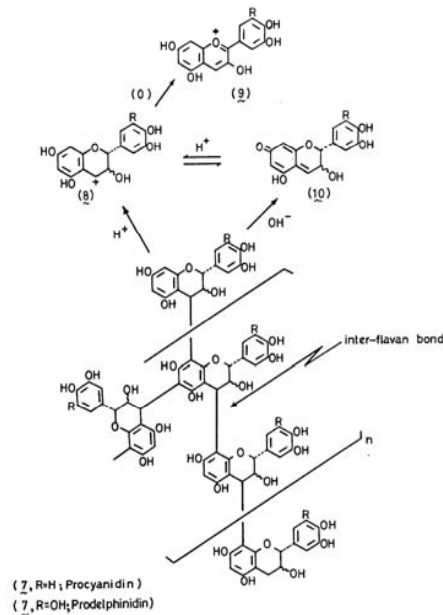


FIGURE 2. Proanthocyanidins bound within a cellular matrix.

- 植物中最常見原花色素類的一群：**原矢車菊素類 procyanidins (7, R=H)**，其存在和 (+)-catechin、(-)-epicatechin 的代謝有關。

- 結構 **7** 之**原飛燕草素類 prodelphinidins (7, R=OH)**：其化學及生化學的了解有限，分布於特定的植物種類，和 (+)-gallocatechin and/or (-)-epigallocatechin 同時存在。

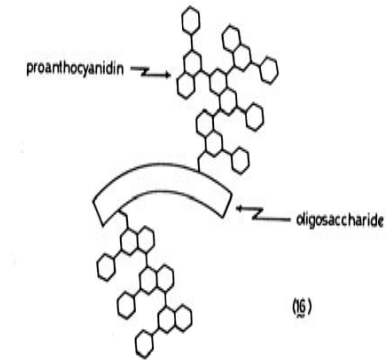


Proanthocyanidins are essentially polymers based on a small number of closely related flavan-3-ol "monomer" units.

The proanthocyanidin content of a particular plant tissue may comprise a range of molecular forms from the soluble dimeric and oligomeric species to various polymers, many of which are rendered insoluble because of their molecular size or because they are bound to an insoluble polysaccharide matrix.

▣ **可溶型式類**：對澀味的發生極為重要

▣ **不可溶型式類**：仍不明；但一些證據(如柿子)指出，仍有某程度的意義。當植物組織被萃取至水溶液介質，經長久時間(紅酒、啤酒製造)會發生部分斷裂而產生可溶性產物(較低的聚合型式或自多醣類基質斷裂但仍保留醣基之片段16)，但仍是有待探討的問題。

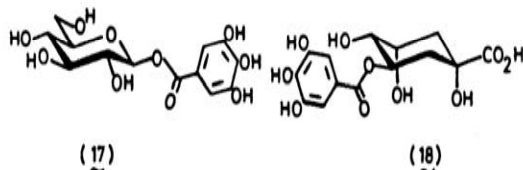


## 2. Esters of Gallic Acid and Hexahydrodiphenic Acid

雖然**C6-C1酚酸**發現於植物及微生物，但僅偶發的；常與分類特異性有關，最熟悉例即柳木(willow family)中的水楊酸(salicylic acid)衍生物。

**經基苯甲酸類**(hydroxybenzoic acids)及**苯甲酸**(benzoic acid)本身共同存在整個植物門，和**terpenoid** (類萜烯)及**alkaloid** (生物鹼)兩者結構酯化。

同樣地，**經基肉桂酸類**(*p*-coumaric, caffeic, ferulic, and sinapic acid)普遍存在高等植物，但通常僅發現為和多醇類(polyols)形成的單酯，與有時雙酯(綠原酸 chlorogenic acid, 6)。



**沒食子酸** (gallic acid) 與生合成衍生的**六經基聯苯酸** (hexahydroxydiphenic acid)：不同於前述兩類，從很簡單的單酯如  $\beta$ -D-glucogallin (17)、theogallin (18)、及 flavan-3-ol gallates (構造1, 3)如在嫩綠茶，以至和葡萄糖形成分子量500-3000複雜的多酯類。

這些的多酚類構成植物單寧—水解單寧類之第二大類，且，幾乎局限於雙子葉植物；

- 通常為 **freely soluble** plant metabolites
- 存在於(表一) 飼料作物、牲畜飼料、一些水果、飲料及草藥偏方。
- 不同於一些原花色素類，通常完全可溶的植物代謝物，預期會貢獻 taste and palatability

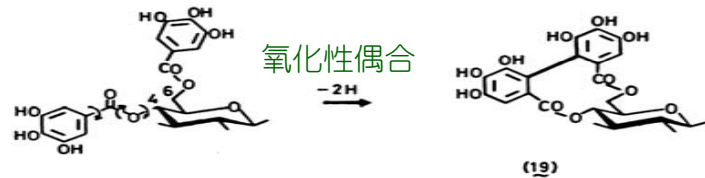
Gallic acid: 3,4,5-trihydroxybenzoic acid

Hydroxybenzoic acids 發現於各種水果，大部分以酯類型式存在。包括：salicylic acid、4-hydroxybenzoic acid、gentisic acid、protocatechuic acid、gallic acid、vanillic acid、ellagic acid等。



- 在非常多植物，沒食子酸代謝的慣常方式為和一特定代謝物中合適位向的沒食子酯基團作**氧化性耦合(oxidative coupling)**，而生成**六羥基聯苯酸(19)的衍生物** – 通常統稱之鞣花單寧類(**ellagitannins**)。這種分子內共價結合使構形上**易變形及移動性的沒食子酯前驅物質**，產生更剛性及緻密的分子構造。

此作用的奇特處，從櫟屬(*Quercus* spp.)及栗屬(*Castanea* spp.)的非鏡像異構的酚類代謝物 **vescalagin (21)**及 **castalagin (22)**來歷可看出，重要的生合成中間產物  **$\beta$ -pentagalloyl-D-glucose (20)**作氧化性轉變。



- $\beta$ -pentagalloyl-D-glucose** 為一柔性盤狀構造，沒食子酯基團位於分子表面的四周；難溶於水，特定濃度下的溶液會**凝膠**。而 **Vescalagin** 及 **castalagin** 為螺旋槳狀構形，緊密且剛性；水溶性較高。

發生沒食子酯基團的分子內氧化性耦合之處，這也使酚代謝物的**分子變大**(二量體、三量體等)。

這或許有意義的，植物中主要的生合成推力是朝向這些高度捲旋狀構造(例如圖3之vescalagin、castalagin及geraniin)的形成。因而在**薔薇科植物家族的葉子**，含主要酚代謝物的 **mgosin-D (23)**，同樣在懸鉤子屬(黑莓及覆盆子)、路邊青屬及委陵菜屬，構造**24**之二量體佔多數。

同樣，常見的 **Polygalloyl ester tannic acid (25)**：更多的沒食子酯基團連結至 **$\beta$ -pentagalloyl-D-glucose (20)**；在漆樹屬(*Rhus* sp.)、黃櫨屬(*Cotinus* sp.)及槭樹屬(*Acer* sp.)為主要成分。

所有上述植物的澀味，被認為有很大部分係來自這些**多酚沒食子酯類(polyphenolic galloyl esters)**的貢獻。

## II. Physicochemical studies of polyphenol oplexation

### A. Proteins

#### With Proteins

多酚類和蛋白質之間的交互作用(interaction)，通常被認為用來說明澀味的現象，可以可逆的或不可逆的。

#### Protein precipitation :

- The primary reaction whereby astringency develops in the palate is by precipitation of glycoproteins in the mucous secretions of salivary glands.
- The efficiency of polyphenol binding to proteins derives from the fact that **polyphenols are multidentate ligands** able to bind simultaneously (via different phenolic groups) at more than one points to the protein surface.
- The reversible complex of protein and polyphenol：主要方式為**氫鍵與疏水性(為主)交互作用**。

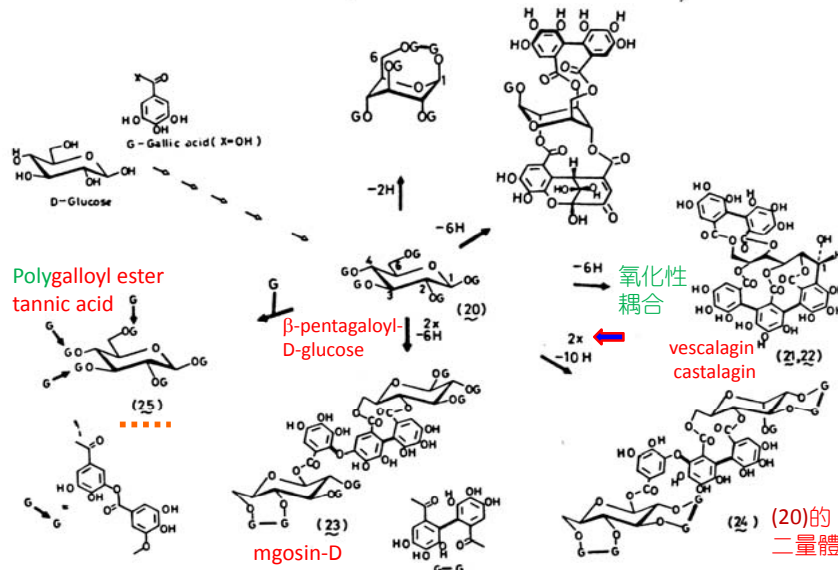


FIGURE 3. Pathways of metabolism of gallic acid — galloyl esters biosynthetically related to  $\beta$ -pentagalloyl-D-glucose.

The precipitation of protein by polyphenols may be **reversed** by the addition of further protein solution.

Protein-polyphenol complexes may be **dissociated** by treatment with solvents such as acetone and with caffeine, urea, polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycols, and detergents.

如果溶液中的濃度足夠高而使平衡有利於protein-phenol complex，在蛋白質分子表面形成simple phenol的一疏水性層。

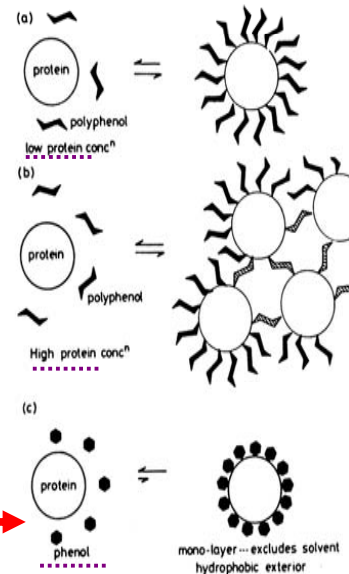


FIGURE 5. Protein-phenol, protein-polyphenol precipitation.

## Enzyme inhibition

植物原料中多酚類(polyphenols; tannins)存在對農業的影響：

- 降低牲畜飼料用農作物的營養價值
- 抑制植物材料在形成土壤時微生物的分解速率

包括不同的作用方式，其中可確定的是酵素抑制。

- 富含單寧飼料的可消化性降低（部分歸因於對消化酵素的抑制）
- 酚類化合物可經由下列方式：
  - ◎ 沉澱酵素蛋白質而抑制酵素作用
  - ◎ 形成可溶性但無活性的enzyme-inhibitor complexes
  - ◎ 和基質複合而使之在酵素反應中的反應性減少

□ Tannic acid 的酵素抑制：非競爭性(noncompetitive)抑制

- 包括β-glucosidase、trypsin、amylase、lipase等

Proteases；和基質蛋白質或者酵素本身形成複合物而抑制酵素水解；例如casein和oak leaf tannin作用後，即無法被trypsin水解

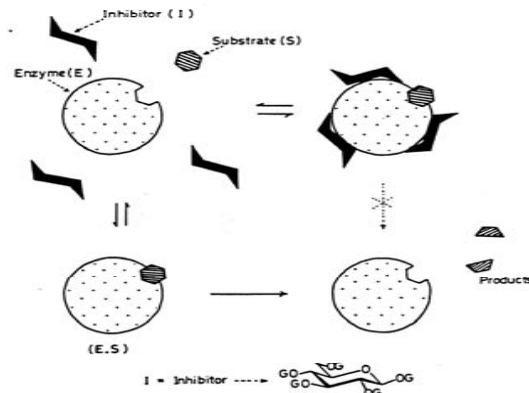


FIGURE 6. Enzyme inhibition by polyphenols.

## B. Caffeine

- *H-bonding, apolar hydrophobic interactions and coordination around a metal ion as the primary intermolecular forces in caffeine-polyphenol complexation are important. Caffeine has structural elements which resemble a peptide-like structure.*

X-ray 結晶繞射分析咖啡因和酚類基質的複合物，得知：固態下常存在幾近平行的 a layer-lattice structure，各平面間間隔3.3-3.4 Å°

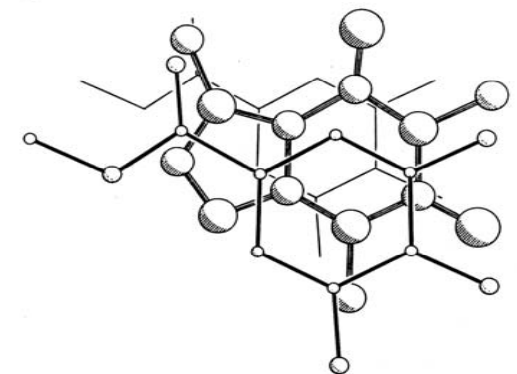


FIGURE 8. Crystal structure of the caffeine-methyl gallate complex — apolar hydrophobic interactions, vertical stacking.



Methyl gallate為例，  
這種重疊構造再被  
許多平面化的**氬鍵**  
補強：  
methyl gallate的3個  
phenolic groups +  
咖啡因的2個 keto-  
amide groups及1個  
basic N-9

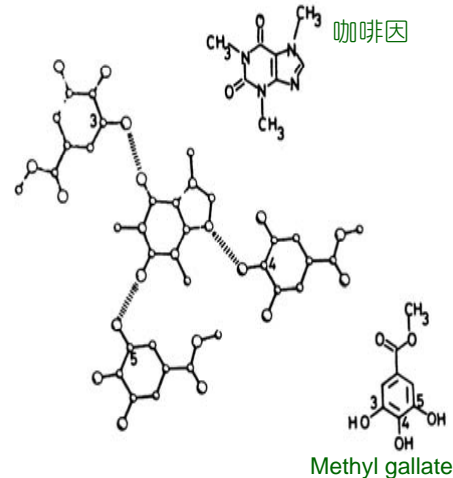


FIGURE 9. Crystal structure of the caffeine-methyl gallate complex — in plane hydrogen bonding.

和potassium chlorogenate (6)  
形成的結晶構造，亦是類似的  
樣式。

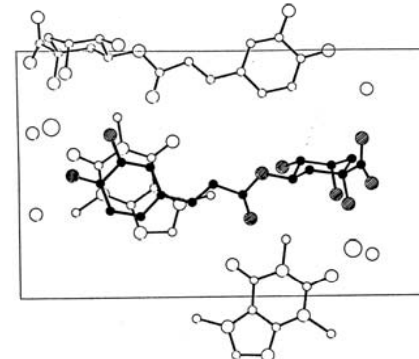


FIGURE 10. Crystal structure of the caffeine-potassium chlorogenate complex — apolar hydrophobic interactions, vertical stacking.

另一項重要的安定因子：環繞  $K^+$   
離子而與之配位結合之7個氧原子。

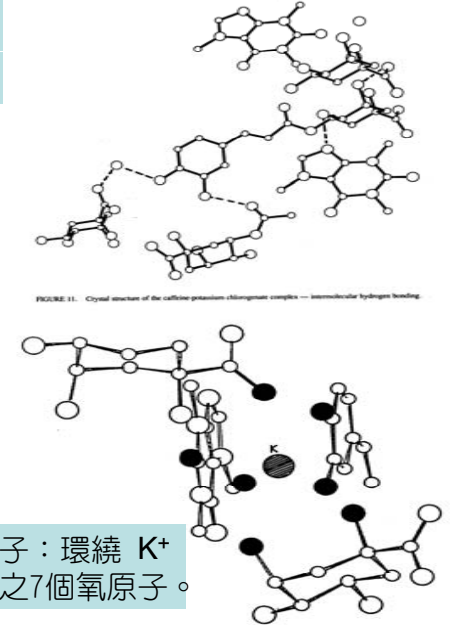


FIGURE 12. Crystal structure of the caffeine-potassium chlorogenate complex — coordination around a central metal ion ( $K^+$ ).

• 在各種的**酚-咖啡因複合物**(phenol-caffeine complexes)  
酚基團(phenolic groups)與關  
聯的核(nuclei)通常堆疊在  
咖啡因分子的六員環的上方。

咖啡因有效地同多酚物質一  
起競爭蛋白質。

咖啡因連結個別的多酚分子  
而不只是類似的蛋白質-  
多酚沉澱過程中的交聯蛋  
白質(cross-link proteins)。

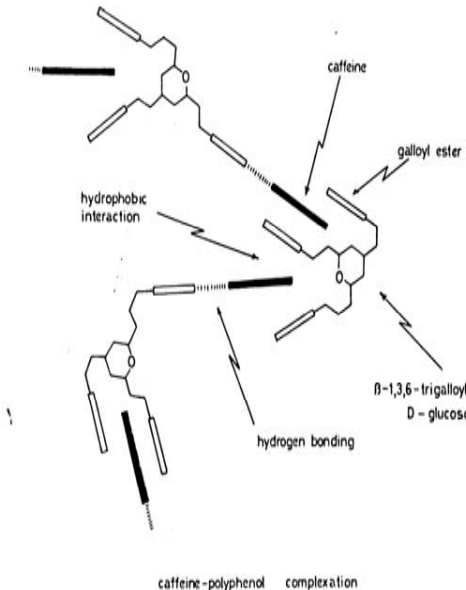


FIGURE 14. Caffeine-polyphenol precipitation.

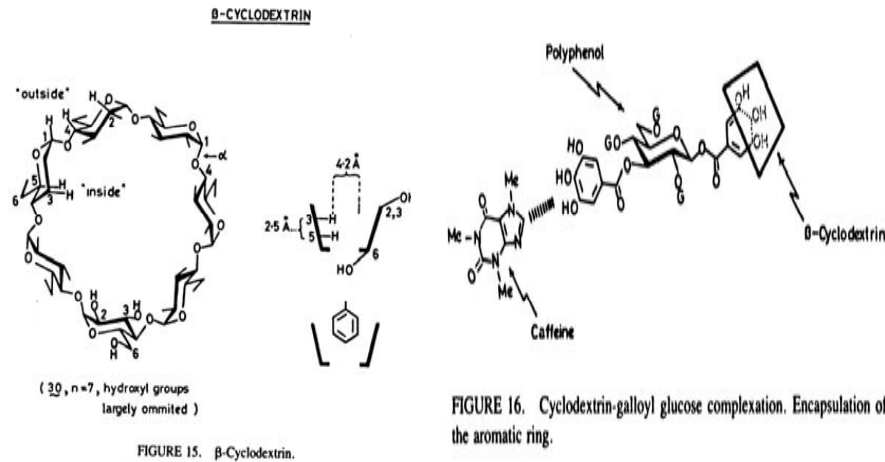
### C. Polysaccharides

• 和多醣類結合之結合力大小，同時受到**分子大小**及**構形伸縮性**(conformational flexibility)的影響，但和纖維素(cellulose)之間的聚集則分子形狀及流動性(mobility)更為重要。

可能的作用方式：H-bond、cavity (apolar)

• 麥芽糊精 **Cyclodextrins**: inclusion complex formation — 將受質包含在cavity內。作用方式可能包括：

- ◎ van der Waals interactions
- ◎ H-bonding
- ◎ release of solvent water molecule(s) from the cavity during complexation
- ◎ the release of strain energy in the macrocycle



- Caffeine-β-cyclodextrin-polyphenol model。多酚與基質例如蛋白質之聚集程度，很可能受到多醣類的存在而大幅度修改，特別在水溶液介質中的這些，展現含殊水性空腔(hydrophobic cavities)之二級結構。

37

### III. Astringency: Food and Food Products

- The perception of astringency in the mouth is not instantaneously but rather requires time to develop and then the primary reaction is the precipitation of proteins and glycoproteins in the mucous secretions induced by complexation with the astringent principles.
- 對水果、酒及茶(葉)而言，這些 **principles** 為 **natural polyphenols** 及其反應所衍生之 **second products**。
- 水果成熟、葡萄酒及啤酒經貯存而熟成：澀味逐漸減弱。

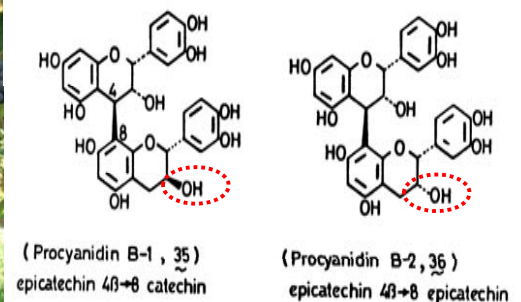
38

### A. Aging of Red Wines

- 任何葡萄酒含一定量的單寧，是必要的，賦予wind body、longevity及backbone。
- The processes involved in the **aging** of red wines: *oligomeric and polymeric procyanidins (condensed tannins)* probably play in the aging process.

39

- 釀酒葡萄(*Vitis vinifera*)的梗、皮、籽及量較少的葉，除了各種關聯的**黃酮類**(flavonols)及**羥基二苯乙烯類**(hydroxystibenes)，多酚類的組成如何，以主要的**寡聚及多聚型原花色色素類**為重點(左右顏色及風味)，有些可溶的，其它則不可溶的。
- 主要的**黃烷-3-醇類**為兒茶素(+)-catechin (**11a**)、量較少些的表兒茶素(-)-epicatechin (**11b**)；主要非鏡像異構物之原矢車菊素二量體類(procyanidin dimers)：Procyanidin B-1 (cat-4-β-8-epicat; **35**)及B-2 (epicat-4-β-8-epicat; **36**)。

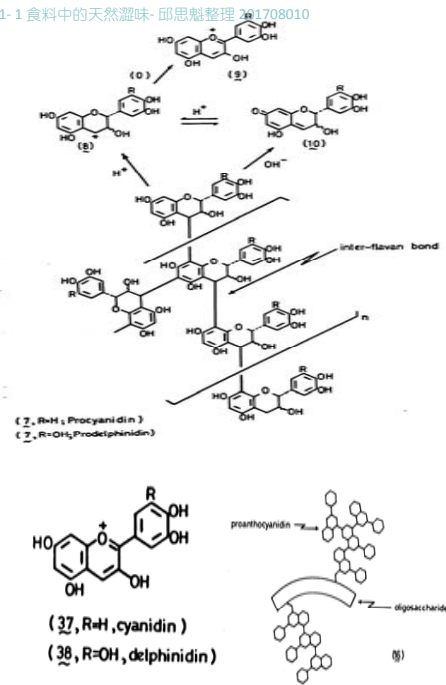


多聚型原矢車菊素類(polymeric procyanidins) 以酸處理  $\Rightarrow$  同時生成矢車菊素(cyanidin) (37) 及花翠素/飛燕草素(delphinidin) (38)

此證據表示：在紅酒釀造時，會含有黃烷-3-醇類、一些原矢車菊素二量體，以及取決於溶解性，分子大小及組成不同的各種寡聚型原花色素類。

這些成分可能存在的種類：

- 如結構 7 (procyanidin、prodelphinidin) 全由黃烷-3-醇結構單位組成。
- 如結構 16，和醣類結構結合之黃烷-3-醇寡聚物類。



The characteristic chemical reactions during the aging of red wines

簡單化，分為兩大類的反應：

1. The acid-catalyzed rupture of the interflavan bonds of pro(antho)cyanidins
2. The facile electrophilic substitution of the phloroglucinol "A" ring of the flavan-3-ol units which comprise the oligomeric structures.

反應(1)前已述及；結構 7 (procyanidin or prodelphinidin)  $\rightarrow$  8 (a carbocation species)

反應(2)：

◎和 醛類 反應  $\rightarrow$  酸催化時，生成 縮合產物類，(右圖所示香草醛與黃烷-3-醇之反應，是黃烷-3-醇代謝物行類似顏色反應之基礎，其中紅顏色很可能經醌類(quinonoid)中間產物39而形成。

◎和 黃烷碳陽離子(flavan carbocation)反應，生成原矢車菊素二量體類(procyanidin dimers)及更大的寡聚體。

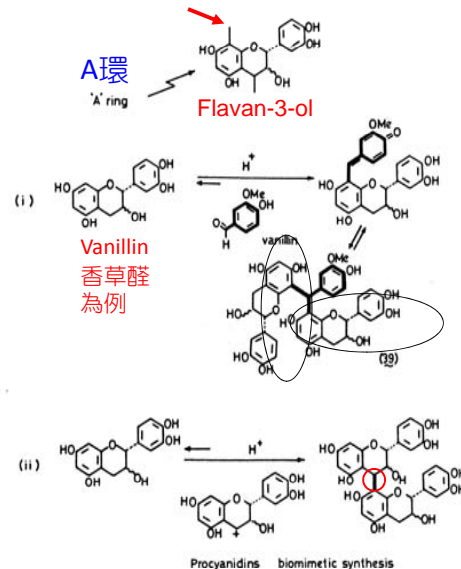


FIGURE 18. Electrophilic substitution of flavan-3-ols.

在略酸性(pH 3-4)條件，紅酒的大致酸鹼值範圍，這兩種熟悉且特點的類型 carbon-carbon bond-breaking 與 bone-making processes 會發生。

- 各種原矢車菊素類(procyanidins)的水解反應：為一特定的酸催化反應，和  $[H^+]$  濃度之間為一次反應關係，瓶頸步驟為 黃烷-3-醇寡聚體中 phloroglucinol type "A" ring之質子化(變成 carbocation 8)。



- Procyanidin B-2之**酸催化**水解，在pH 4.1 (醋酸鹽緩衝液；紅酒、啤酒釀造時的pH範圍)及25 °C → **C-C bond breaking**。

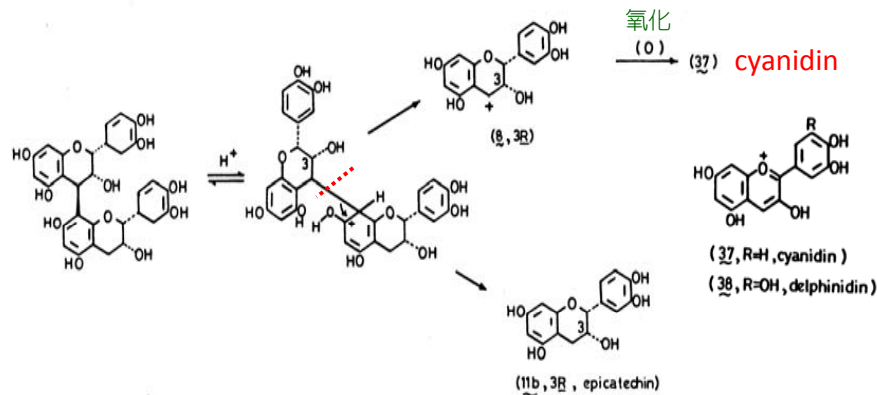


FIGURE 19. Procyanidin B-2 — acid-catalyzed breakdown.

45

酸催化之**重合反應(C-C bond making)**：在紅酒之例，當高分子量寡聚物(oligomers)生成並沉澱，原引起的澀味即消失。

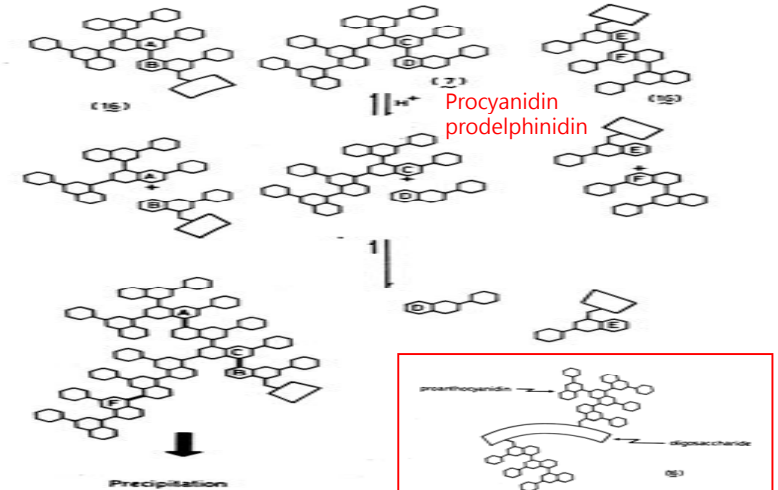


FIGURE 20. Proanthocyanidin oligomers — acid-catalyzed polymerization.

46

Aging of red wines in **oak barrels** and then in **corked glass bottles** produces other desirable effects on quality, taste, and flavor which may also lead to the loss of the astringent polyphenols from the wines. (軟木塞：吸收O<sub>2</sub>)

顏色為例：

Purplish-red (young wine)

↓

More fiery amber **琥珀色** (mature wine)

↓

Tawny hue **茶、黃褐色** (long-aged wine)

紅酒熟成中：

the grape **anthocyanins**：負責最初顏色的來源

↓

逐漸且不可逆地為更穩定的多聚型色素(polymeric pigments)所取代；第一年內可達色度的50%，新生成的色素對pH愈不敏感；anthocyanins容易被包括如(+)-catechin之酚類基質的親核性反應物(nucleophilic reagents)攻擊。

47

紅酒熟成過程中，young wine 的顏色改變與穩定化之反應程序

- Anthocyanin 分子進行對 oligomeric flavan-3-ol 構造的親核性取代反應  
包含經由 a red-ox reaction 產生 the condensed anthocyanin species (40)
- 這些色素的穩定性提昇 ← 花色素甘核在第4位置的芳香族羥基取代
- 進一步的取代，也可能和另外的 oligomeric procyanidin (16) 反應

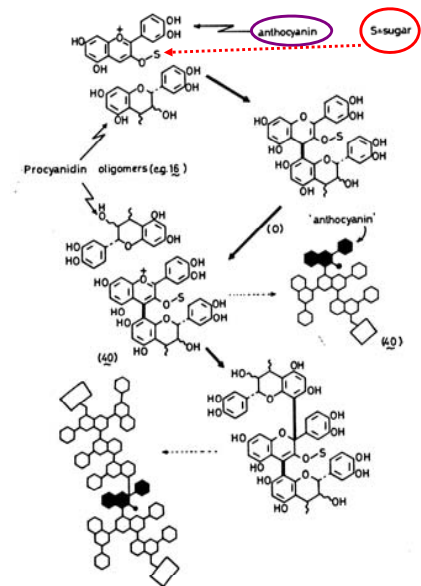


FIGURE 21. Proanthocyanidins — electrophilic substitution and polymerization. Reaction with anthocyanins in red wines.

- 另一方面，**重合反應**(圖20，**酸催化bond-making 或 bond-breaking 程序**)也進行，最終使 **polymeric pigmented species** 沉澱，同時澀味減少

- 紅酒熟成中的澀味降低，有**關連的另一項也可能是重要的反應**— **親核性縮合反應**(electrophilic condensation reaction)

與**乙醛 acetaldehyde 反應** ⇒ 和個別的寡聚型黃烷-3-醇分子的交聯(cross-linking) ⇒ 最後相當大分子的產物沉澱(此和圖18所示之和vanillin反應基幾乎一樣)

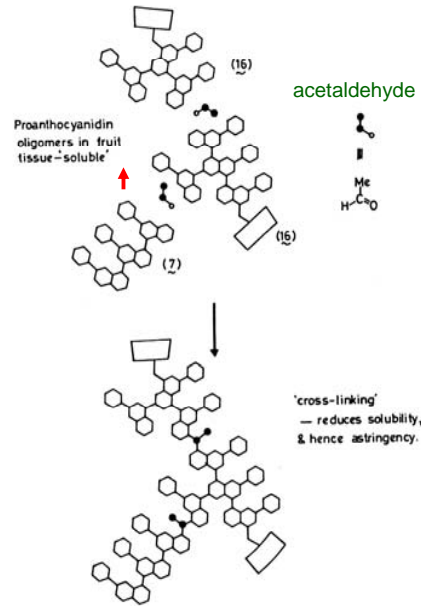


FIGURE 22. Proanthocyanidins — electrophilic substitution and polymerization. Reaction with acetaldehyde in red wines and fruit.

- **氧化(oxidation)**及其控制無論在紅酒的製造與熟成，已超過一世紀被視為首要的考慮。貯存橡木桶中的紅酒，每年每公升吸收約30毫克氧，瓶裝者氧氣亦會進入瓶中。

紅酒熟成中acetaldehyde生成：來自**乙醇的氧化**

橡木桶中熟成，反應方式：

electrophilic substitution and polymerization

acetaldehyde + tannins, pigments, polyphenols

## B. Nonbiological Hazes in Beers

Polyphenols 在啤酒及lagers (淡啤酒)之重要性：

- chill and permanent haze形成
- **The principle components of hazes:** 蛋白質、多酚類 (proanthocyanidin type)、碳水化合物、無機物質(微量)
- 啤酒及淡啤酒含相當量的蛋白質，大麥產生一些可溶性寡聚型原花色素類。多酚類與蛋白質在一起就連合形成一系列的可溶性複合物(圖4及5)。

### Chill haze:

- Association of proteins + polyphenols (soluble oligomeric proanthocyanidins) → products of a series of soluble complexes。當冷卻啤酒，降低這些複合物的溶解度而聚集，使得混濁生成。加溫溶液提高蛋白質-多酚複合物的溶解度，使混濁重新溶解。

### Permanent haze:

一段時間後始發生；包括 the slow acid-catalyzed (pH 4 左右) bond-breaking and bond-forming reactions

⇒ 酸性狀態下，原先形成的 protein-polyphenol complexes，其 proanthocyanidin 構造分解生成 the characteristic flavan-3-ol base carbocation (41)

⇒ 取代polymerization，這些reactive species被蛋白質之 nucleophilic (-SH) groups (42)捕捉

⇒ 使蛋白質表面更具疏水性

⇒ 聚集

⇒ 變成 insoluble haze

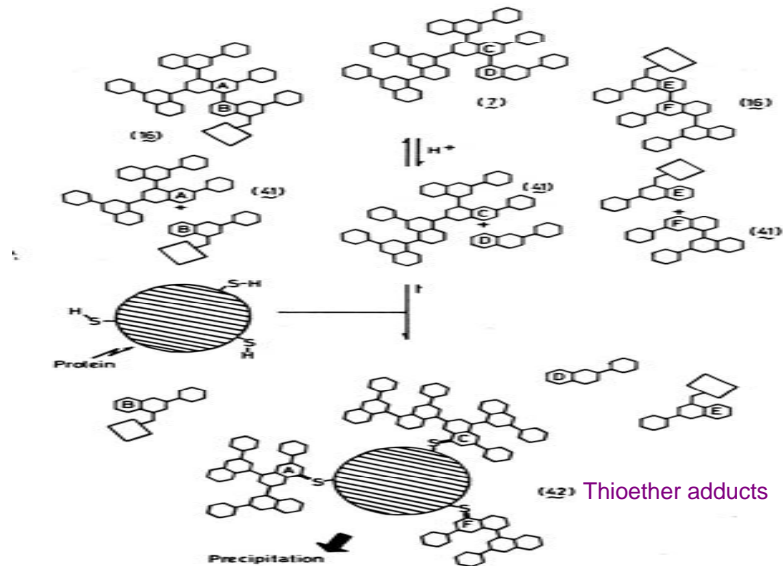


FIGURE 23. Proanthocyanidins — acid-catalyzed reaction with —SH groups in protein. Permanent haze in beers.

### C. Fruit Ripening

許多水果的熟成過程中，澀味消失是一項主要的變化。

❑ 此屬性是由於單寧類(tannins)的存在，但雖然有些帶澀味水果熟成時其單寧類減少，其餘者則否。

In several fruits, the loss of astringency which occurs on ripening is most probably connected with the increase of polymerization (and hence decreased solubility) of tannins.

#### 1. 柿子 Persimmon

- 其澀味來自原花色素類型式之單寧類。

可溶寡聚型原花色素類的基本構造是一黃烷-3-醇單元體單位(+)-catechin、(+)-catechin-3-gallate、(+)-gallocatechin、(+)-gallocatechin-3-gallate，當受酸處理，他們會同時釋出矢車菊素(cyanidin)及花翠素(delphinidin)。

- 單寧具有很強的蛋白質親和性(affinity)，此一屬性譬如已成功地利用在日本酒與漁網的製造。但水果中單寧的存在也可能造成醫療問題，在胃中常造成不溶性團塊的生成，須手術移除。

54

#### Kaki tannin 對蛋白質有強親合力

- CO<sub>2</sub>充氣環境處理可除去相當程度的澀味；充N<sub>2</sub>效果稍差。
- 天然無澀味柿子中的乙醛(乙醇)含量高出有澀味者數十倍；以CO<sub>2</sub>處理未成熟柿子，同樣地可提高乙醛含量。
- 模式試驗，在pH 6-8時，乙醛在相當短時間內就和 kaki tannin 反應產生凝膠。

從上述研究，結論：乙醛存在下，發生原花色素類寡聚物的交聯(cross-linking)，這連帶使溶解度下降，澀味減少，如前面所述(圖22)。

同樣含有原花色素類之蘋果、蔓越莓等其它水果的熟成中，是否發生類似的反應仍不清楚；一些實驗數據顯示，許多這類水果在熟成過程，可溶性多酚含量並未明顯減少。

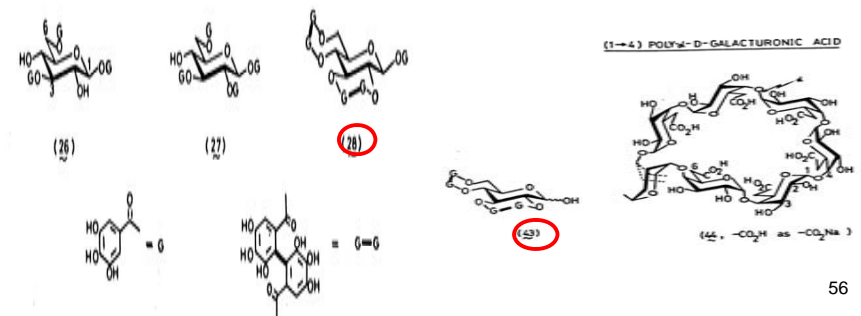
55

#### 2. 覆盆子與黑莓

懸鉤子屬水果如覆盆子與黑莓的主要多酚類是沒食子酸及六羥基聯苯酸為基本構造，主要的酚類代謝物pedunculagin (43)、casuarictin (28)及其二量體(24) (圖3)。

在熟成過程與成熟水果中，水果的酚含量類並無大量或顯著的定量或定性的變化。

已瞭解：許多水果的熟成中，細胞構造改變、軟化，並釋出較小的果膠碎片，其中半乳糖醛酸甲基酯單位存在。



56



分子如植物鹼類、可溶性多醣類和 $\alpha$ -及 $\beta$ -環狀糊精破壞多酚類與蛋白質複合之能力，採酵素抑制法來測定。多酚類以非競爭方式抑制 $\beta$ -葡萄糖苷酶，可測抑制常數 $K_i$ 。加入其他蛋白質(溶菌酶、BSA)、植物鹼如咖啡因、 $\alpha$ -及 $\beta$ -環狀糊精，以及明顯地聚半乳糖醛酸(polygalacturonate, 44)等基質，全都以特定方式和多酚類複合，解除多酚對 $\beta$ -葡萄糖苷酶之抑制。

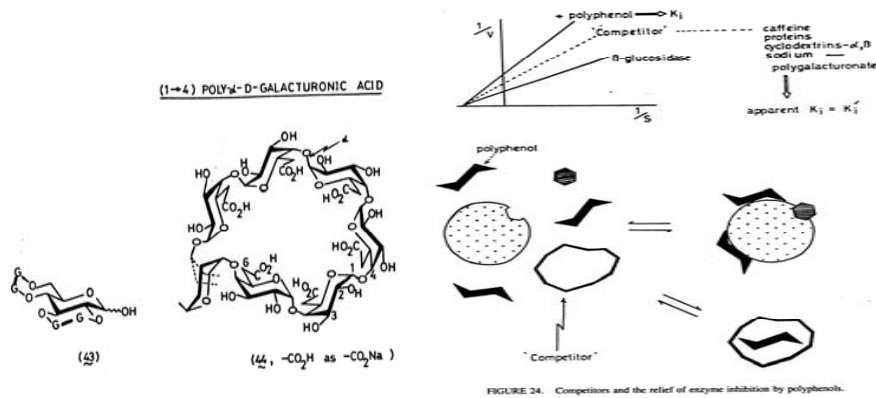
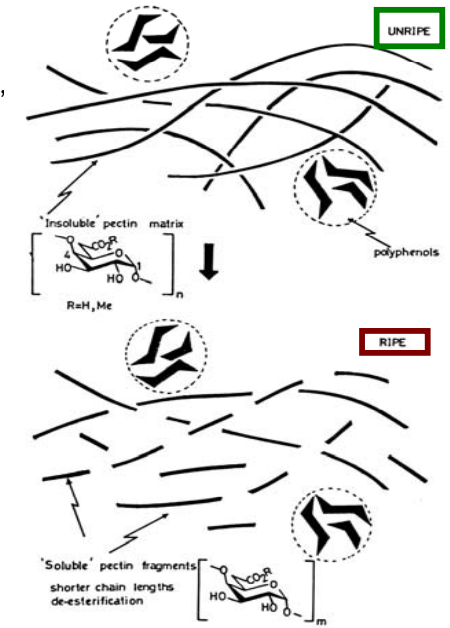


FIGURE 24. Competitors and the relief of enzyme inhibition by polyphenols.

是故，似可能的：在許多的水果熟成期間，澀味降低的起因，不是可溶性多酚含量(定性或定量)的任何大改變，而是果膠結構的水溶性碎片生成達相當含量(圖25)，當食用水果，其含量足以有效地同黏質醣蛋白(mucal glycoproteins)一起競爭多酚基質，亦即致使修飾及破壞多酚類結合至口腔中醣蛋白質的能力，當吃水果時。

FIGURE 25. Fruit ripening — loss of astringency in blackberry (*Rubus* sp.).