

チャ生葉保管処理による indole 蓄積に関する研究*

Studies on Indole Accumulation in Green Tea
with a Low Temperature Storage Process

勝野 剛
Tsuyoshi Katsuno

* 静岡大学大学院自然科学系教育部審査論文 2014 年（平成 26 年）

目 次

第1章	序 論	1
1.1	茶飲用の現状	1
1.2	茶製造の変遷と課題	1
1.3	茶の香気分析法	2
1.4	チャ香気成分の生合成	3
1.5	食品における代謝物の網羅解析（メタボロミクス）	6
1.6	Indole の生合成・代謝経路	6
1.7	本研究の目的及び構成	7
	参考文献	7
第2章	緑茶・紅茶・烏龍茶の香り	10
2.1	茶の製造法と香り	10
2.2	日本・中国・台湾・インド・スリランカの各種茶の香気特性	11
	参考文献	15
第3章	チャ生葉保管処理による荒茶香気の特徴	16
3.1	官能評価による香気特性	16
3.2	香気成分の特徴	19
3.3	香気寄与成分の探索	23
3.4	総合考察	25
	参考文献	26
第4章	生葉低温保管処理工程における indole 蓄積機構の解明	28
4.1	生葉保管処理中の indole 蓄積，発散量の変化	28
4.2	Indole 前駆物質，代謝物の探索	30
4.3	Indole から L-tryptophan および OX-indoles への変換	33
4.4	生葉保管中の indole 関連物質の変動	35
4.5	総合考察	38
	参考文献	39
第5章	総 括	41
	参考文献	42
	摘 要	44
	Summary	46
	謝 辞	47

第1章 序 論

1. 1 茶飲用の現状

茶はコーヒー、ココアと並ぶ3大非アルコール系飲料の一つとして世界中で飲用されている。その生産量は、国連食糧農業機関の2011年報告によると世界で450万トンであり、上位4か国の中国、インド、ケニヤ、スリランカで7割以上を占め、日本における生産量は2%、9.5万トンである。

茶のうち世界で最も飲用されているものは紅茶であり、ミルクや砂糖、フレーバーの添加等、各地で様々な手法で飲用されている。最近では、RTD (Ready To Drink) 茶飲料が広く普及している。かつて、清涼飲料の多くは炭酸飲料、コーヒー飲料、果実系飲料が主流であった。その後、ペットボトルの普及、抽出・保存技術の向上と合わせて、健康志向の高まりから無糖飲料への関心が高くなってきたこともあり、茶系飲料の占める割合が高くなっている。日本において清涼飲料における茶系飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、ブレンド茶）の生産量について、社団法人全国清涼飲料工業会の報告によると、2012年で全体の25%を超えている。さらに、茶は飲用のみならず料理や製菓の素材として、さらに香料や栄養補助食品等の抽出原料としても利用されている。

西洋諸国、アメリカを中心として、健康志向による日本食への関心が高まり、それと合わせ緑茶にも注目が集まっている。茶は明治期に、生糸と並ぶ日本の輸出産物であり、技術の発展とともに生産量の増加が進み、昭和初期には2万トンを超える輸出量であった。その後、先の大戦や海外との価格競争の影響から減少がすすみ、現在はわずかである。現在、西洋諸国、アメリカ等で飲用される緑茶の多くは中国で生産されたものであるが、日本の緑茶にも注目が集まっており、海外での飲用形態に即した茶の生産販売の必要性がうたわれている。

1. 2 茶製造の変遷と課題

日本での茶に関する記述は、古くは平安時代にさかのぼり、8〜9世紀頃に中国から伝わったとされているが、現在の煎茶とは異なる製法、飲用形態であったと推察されている（古田紹欽 2000）。現在の煎茶製造法の原型は、江戸時代中期にそれまで各地で行われていたさまざまな製法を元に京都で考案されたとされている。その後、江戸時代後期から明治期にわたって各地にこの製法が広まり、手揉み製造用具の一つである「ほいろ」の改良と共に

に手揉み技術として完成されていった。さらに、明治以降、製茶の各工程の機械化が進み昭和初期には現在の一連の機械の原型が完成された（窪川雄介ら 1991）。現在では、さらに機械の大型化、自動化が進み煎茶の高品質大量生産技術が確立している。

日本におけるチャの栽培は、明治期の輸出品として位置づけられたことから、製茶技術の進歩と合わせて技術が向上し、栽培面積も増加した。チャの増殖はもっぱら実生によるものであったため、同一茶園においても多様性に富んでいた。その後、取り木、挿し木による増殖法が確立されるとともに、品種の統一が進み、現在では、「やぶきた」が主流品種として普及している。さらに収穫も、手摘みからはさみ刈りへ、その後動力式摘採機、乗用型摘採機が開発され、現在の主流となり、その生産性の向上が図られた（窪川雄介ら 1991）。

現在の日本茶の品質は、江戸後期以降の製造、栽培面での技術向上とともに、高いレベルでの統一がなされてきている。煎茶の評価は、もっぱら人による官能審査によって行われ、外観（形状、色沢）と内質（水色、香気、滋味）に大きく分けられる。特に内質では香気、滋味が重要とされ、若葉を連想する香り（新鮮香、みる芽香）と旨味・苦渋味のバランスが重要視される。さらに、滋味においては旨味・苦渋味のみならず、口腔内からの香りも評価されることから、香りの重要性がうかがわれる。煎茶における評価では、茶の栽培、製造技術の高さを評価する側面もあることから、紅茶や烏龍茶を連想する甘い香りは「萎凋香」として製造上の欠点とされる。萎凋香は製造上発生する香りで、煎茶では新鮮さを追及したことから評価上は欠点とされている（高橋 1999）。

かつて、山間地の茶は香り豊かで高品質な茶として高価格で取引されていた。現在の大量生産技術が確立する以前の茶を知る生産者や取引業者からは、近年の茶は香りが弱くなったと評されることもある。現在では、その理由を証明することはできないが、前述のとおり、かつては同一茶園内に多様な茶樹があり、園ごとに異なる原料生葉が集められていたことから、原料に由来する香りの多様性があったものと推察できる。さらに最近では摘採機の発展とともに、製造工場での原料の鮮度保持技術が向上したこともあり、原料生葉が新鮮な状態で製造することができる。手摘みやさはみ刈り期には、摘採から製造までに時間を必要とし、さらには昼間に摘採を行い、

夜間あるいは次の日の早朝に製造するということが行われていた（飯田辰彦 2012）。摘採から製造までに時間がかかっていたということ、さらに鮮度保持技術が未熟であったことに加え、この間の環境条件が山間地の気候と相まって、かつて香り高い山間地の茶が製造されていたことが推察される。それは、この間の環境条件と時間が、紅茶や烏龍茶における香氣発揚工程の1つである「萎凋工程」の一部と類似しているからと考えられる。

現在、煎茶、特にリーフ茶での需要が低迷している。この一因として、生活様式の変化とともに、急須を使用した茶の飲用法からの敬遠が考えられている一方、食の多様化とともに、品質の画一化が進んだ煎茶からの敬遠も考察されている。海外でも受け入れられ、食の多様化に対応した新たな茶生産の取り組み、すなわち、現在の茶にはない新たな香りを付加した煎茶を製造すること、さらには、国内でもあらためて取り組まれ始めた紅茶や烏龍茶を安定して生産することは、今後の茶業発展には欠かせないものである（静岡県経済産業部、平成 23 年）。

先にも触れた山間地の茶の製造の取り組み、あるいは紅茶、烏龍茶製造の取り組みにおいて、現状は試行錯誤の域を脱していない。萎凋工程では温度、湿度等の環境要因が大きく影響する。さらに烏龍茶製造における萎凋では、数十分から 1 時間程度日光にさらす「日干萎凋」の工程がある。これらの工程では、生葉の萎れ具合、色、香りを熟練者の経験に基づいて判断し、次工程へと進んでいく。環境要因が異なるために、その判断技術が茶の品質に大きく影響し、さらに同一の人物であっても安定的に製造することが困難な状況にある。製造のマニュアル化、機械化が進まない一つの要因として、萎凋工程における科学的な知見が不足していることにある。品質の安定した製品を作る上では、さまざまな環境要因と香りの発揚程度との関係を明らかにし、人為的に制御することを可能とする必要がある。

1. 3 茶の香氣分析法

先に述べたとおり、茶における香氣はその品質を決定づける重要な要因の一つであることから、多くの研究者により各種茶の香氣成分が探索されている。抽出方法、分析機器の発展とともに数多くの茶の香氣成分が同定されている。それぞれ分析法には利点、欠点があり、その目的に応じた実験法の選択が必要である（表 1. 1）。これまでの茶における香氣抽出、分析法について、川上（2000）によってその方法と利点・欠点がまとめられている。

Likens-Nickerson ら（1966）により開発された連続蒸留抽出法（SDE 法：Simultaneous Distillation and Extraction）は茶に含まれる香氣成分を探索する上で古くから用いられてきた手法である。この方法は茶試料に蒸留水を加え、100℃に熱するとともに、60℃程度に加温した溶媒としてエーテル、ジクロロメタン等を用い 30-60 分加熱還流することで、香氣抽出物を得る。多くの香氣成分を得ることができるため茶の香氣成分の解明に貢献してきた。一方で、抽出時の加熱による変化が生じるという欠点を持つ。そこで、この加熱による変化を低く抑えるため、山西ら（1970）は減圧水蒸気蒸留法（SDR 法：Steamed Distillation under Reduced Pressure）を開発した。この方法では、茶試料に蒸留水を加え 50-60℃程度で加熱しながら 30 mmHg で減圧蒸留し、冷却トラップすることで留出液を得る。この留出液からエーテル、ジクロロメタン等の有機溶媒で香氣成分を抽出する。

これら香氣抽出法は、茶等の飲料分析に一般的に用いられている方法であるが、抽出時の加熱、長時間の抽出が必要であることから、実際に飲用する時の香りを表していないことが考えられる。川上ら（1993, 1995）は BE（Brewed Extraction）法を開発した。この方法では、茶の熱水抽出液をジクロロメタン等の有機溶媒で抽出する。抽出時に加熱処理しないため、茶本来の香りを正確に再現している。一方で茶に多く含まれるカフェインが同時に抽出されるという欠点がある。

同じように、液体試料からの香氣成分抽出方法として、ポラスポリマーカラムを利用したカラム濃縮法があり、ビールや清酒のアルコール飲料での適用が報告されている（下田ら 1987, 坂本ら 1993）。この方法では吸着材としてポラパック Q が主に使用され、吸着材を充填したカラムに液体試料を通し、香氣成分を吸着させた後、エーテル等の有機溶媒で溶出、香氣抽出物を得る。しかし、この方法には、茶に多量に含まれるポリフェノールも同時に溶出するという欠点があった。のちの研究によって、溶媒の選択により、ポリフェノールの溶出を抑え、良好な香氣抽出物を得ることが明らかとなった（重松ら 1994, Shimoda et. al. 1995）。本研究では、ポラパック Q を吸着材として使用した手法が茶浸出液中の香氣の特徴を捉えるうえで有効な手法であると考え、茶の香氣成分分析手法として使用した。

これらの抽出方法は、茶あるいは茶熱水抽出液中に含まれる香氣成分を測定するうえでは有効な方法である。一方で、人が飲用時に感じる香りは飲料から揮発した成分であることから、実際の感覚との違いが懸念される。そこで用いられるのが、ヘッドスペースガスの香氣成分

分析である。その手法としては、茶を熱水とともに封入し、一定時間抽出後、容器内部のガスをシリンジで回収し直接ガスクロマトグラフに導入し分析する（川上 2000）。この方法は簡便である一方、成分が微量であるため、その検出が困難な一面を持っている。この欠点を補う手法として、吸着材による香氣成分を捕集することで成分を濃縮し、感度を高める手法がある。その一つとして、固相マイクロ抽出法（SPME: Solid Phase Microextraction）がある（樋口ら 2004）。この手法では、上記と同様に茶と熱水を容器に封入し、そのガス部分に液相をコーティングしたファイバーを一定時間直接接接触させることで、香氣成分を吸着させ GC へ導入する。この手法は簡易的である反面、目的成分に適した液相の選択、試料量、捕集時間の検討を必要とする。

同様にヘッドスペースガスを分析する手法として、試料を封入した容器に不活性ガス、あるいは有機物除去カラムを通した空気を送り込み、出口に吸着材を封入したカラムを取り付け香氣成分を捕集する方法がある（Yang et. al. 2013）。この手法は茶浸出液のヘッドスペースガスの分析の他、一定時間ごとに吸着カラムを交換することで、植物の発散する香氣成分の変化をとらえることができるが、捕集システムの構築が必要なほか、吸着カラムを GC へ導入するうえで、試料導入装置として加熱脱着装置を必要とする。これらの手法には、それぞれメリット、デメリットがあるため、茶の香氣成分を分析するうえで目的とする成分等を考慮した手法の選択、改良が必要である。

本研究においては、チャ生葉からの発散香氣の変化をとらえるうえで、試料へ空気を送り込み、試料容器出口で吸着材を封入したカラムによる香氣捕集法を使用した。

1. 4 チャ香氣成分の生合成

これまでの茶の香氣に関する研究は、含まれる香氣成分の探索が主なものであった。その香氣成分が植物としてのチャにおいてどのように作られるのか、加工時にどのように変化しているか、については不明な点が多い。畑中ら（1993）によって発見され、チャにおける生合成が明らかにされているみどりの香りを紹介する。みどりの香りは、*Z*3-hexenol（青葉アルコール）、*E*3-hexenal（青葉アルデヒド）等が主体であり、これらは、 α -linolenic acid を出発物質として 13-*S*-hydroperoxylinolenic acid を経て合成される。 α -Linolenic acid を起源とする香氣成分としては、植物ホルモンの一つである jasmonic acid, methyl jasmonate も知られている。その他、茶に含まれる主要香氣成分として、linalool, geraniol などのモノ

テルペンアルコール類、2-phenylethanol, benzyl alcohol などのフェニルプロパノイド、ベンゼノイド、および、カロテノイドを起源とする β -ionone, damascenone などが知られている（Yang et. al. 2013, ）（図 1. 1）。

Linalool, geraniol 等のモノテルペン類はメバロン酸経路あるいは非メバロン酸経路から生合成される IPP（isopentenyl pyrophosphate）、GPP（geranyl pyrophosphate）から生合成される。2-phenylethanol, benzyl alcohol は phenylalanine から生合成され、チャの花においても acetophenone, 1-phenylethanol が L-phenylalanine を起源としていることが示唆されている（Dong et. al. 2012）。

Linalool や geraniol などのモノテルペン類をはじめとするアルコール系香氣のチャにおける発揚機構については、多くの知見が得られている（小林 1993, 坂田ら 2003）。これらはチャ内部に β -D-glucopyranoside（Yano et. al. 1991, Kobayashi et.al. 1994）、 β -acuminoside（Moon et. al. 1996, Ma et. al. 2001）、 β -vicianoside（Nishikitani et. al. 1996）、 β -primeveroside（Guo et. al. 1993）の形で存在し、茶製造工程中にそれぞれの酵素によって加水分解され生成することが知られている（図 1. 2）。なかでも、茶においては β -primeveroside の形での存在量が多い。チャ葉細胞内で、これらの配糖体は液胞に存在し、配糖体の加水分解酵素は細胞壁に存在する（Ogawa et. al. 1995, Mizutani et. al. 2002）。虫などによる食害や、茶製造工程における切断、しおれ等の物理的要因、各種ストレス応答がきっかけとなり、細胞傷害にともなって配糖体が液胞膜、細胞膜を通過して漏出し、加水分解酵素と出会い、加水分解後に香氣として発揚すると考えられている。チャ樹における基質と酵素の分布（Ogawa et. al. 1995, Mizutani et. al. 2002）や、烏龍茶や紅茶の製造工程における基質量と酵素活性の変化も確認されている（坂田ら 2003, Wang et. al. 2000, 2001a,b）。

チャのみならず、多くの植物における香氣成分の生合成、代謝については不明な点が多く、その解明が多くの研究者によって行われている。チャにおいて、これら香氣成分生成メカニズムを明らかにすることで、香氣に特徴のある茶を作る上での育種、栽培法、加工法の技術開発をさらに発展させる。

表1. 1 主な茶香気成分抽出法

	方 法	欠 点
連続蒸留抽出法 (SDE: Simultaneous Distillation and Extraction)	茶に蒸留水を加え 100℃に加熱するとともに、加熱した抽出溶媒とともに 30-60 分加熱還流する。	抽出時の加熱、抽出時間の長さによる香気成分の変化が生じる。
減圧水蒸気蒸留法 (SDR: Steamed Distillation under Reduced Pressure)	茶に蒸留水を加え 50-60℃に加熱しながら減圧条件で蒸留する。流出液を有機溶媒で抽出する。	抽出時間の長さによる香気成分の変化が生じる。
Brewed Extraction(BE)法	茶を飲用に用いる条件で熱水抽出した後、有機溶媒で抽出する。	茶に多量に含まれるカフェインが同時に抽出される。
カラム濃縮法	茶を飲用に用いる条件で熱水抽出した後、ポラパック Q を充填したカラムに通す。吸着した香気成分を有機溶媒で溶出する。	有機溶媒の選択により、茶に含まれる多量のポリフェノールが溶出する場合がある。
ヘッドスペースガス直接分析	茶及び熱水を一定時間封入し、ヘッドスペースガスをシリンジで回収し、直接 GC に導入する。	微量成分の検出が困難
固相マイクロ抽出	茶及び熱水を一定時間封入し、ヘッドスペース部分の香気成分を液相をコーティングしたファイバーに吸着させ、GC に導入する。	目的成分に適した液相の選択、試料量、捕集時間の検討が必要。
ダイナミックヘッドスペース分析法	茶及び熱水を封入し、ヘッドスペースガスを吸着材を封入したカラムに導入し香気成分を吸着させる。吸着カラムを加熱脱着装置により GC へ導入する。	専用の試料導入装置を必要とする。

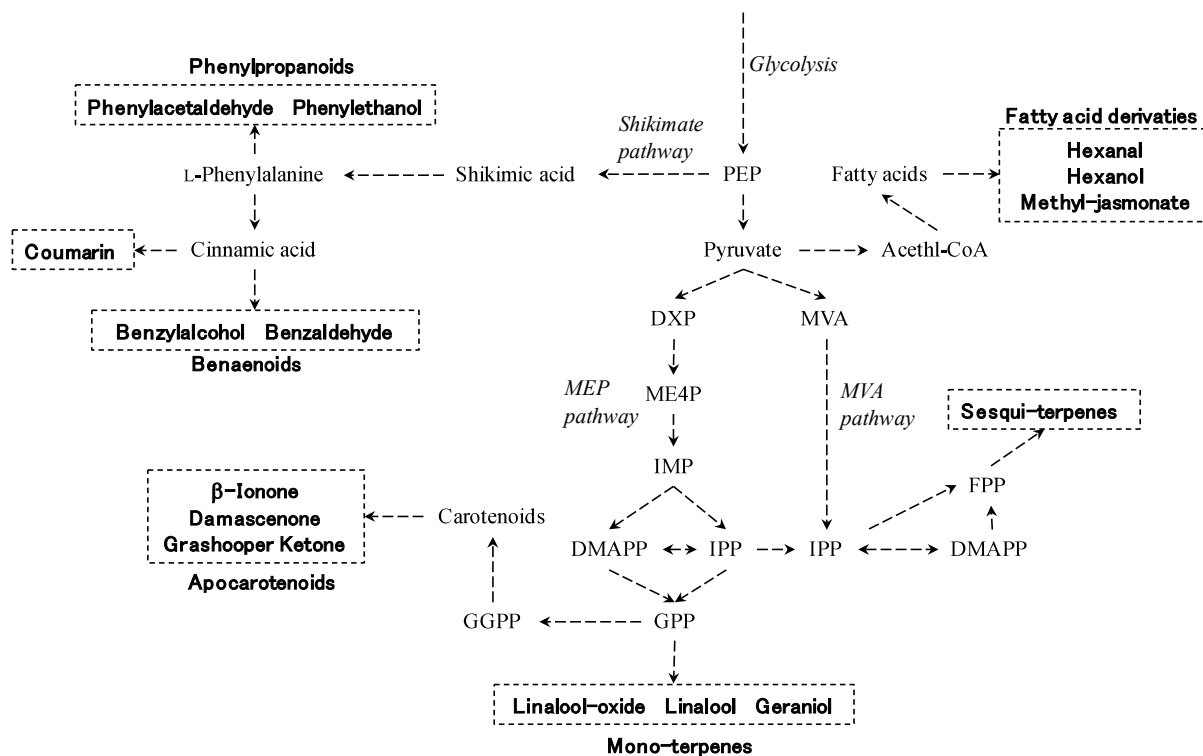
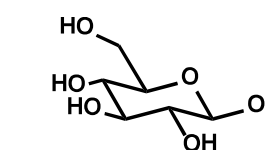
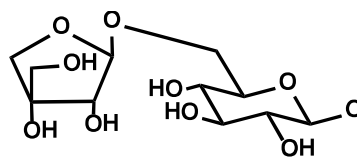


図1. 1 香気生成経路概略 (Yang et. al. 2013)

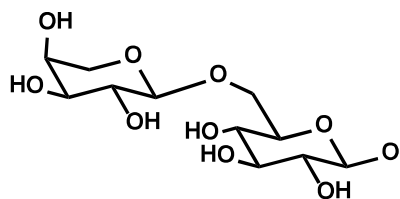
A: Sugar residues



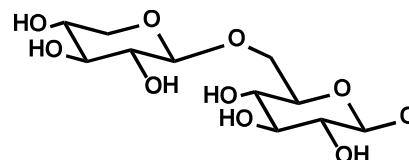
R_1 β -D-Glucopyranoside



R_2 β -Acuminoside

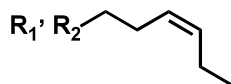


R_3 β -Vicianoside

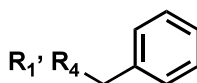


R_4 β -Primeveroside

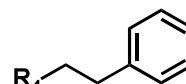
B: Aglycone



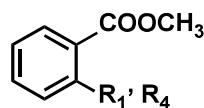
(Z)-3-Hexenol



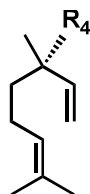
Benzyl alcohol



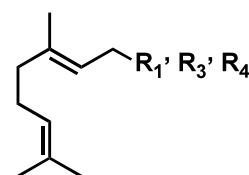
2-Phenylethanol



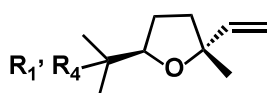
Methyl salicylate



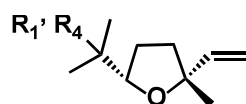
(S)-Linalool



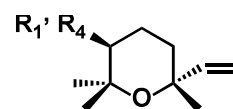
Geraniol



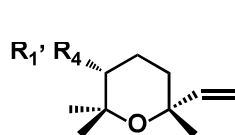
trans-Linalool 3,6-oxide



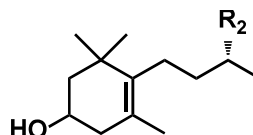
cis-Linalool 3,6-oxide



trans-Linalool 3,7-oxide



cis-Linalool 3,7-oxide



(3*S*, 9*R*)-3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol

図1. 2 チャから単離された香気前駆体としての配糖体 (坂田ら 2003、Yang et al. 2013)

1. 5 食品における代謝物の網羅解析（メタボロミクス）

香気成分の生合成、代謝の解明に大きく貢献すると考えられる手法として、メタボロミクスがある。この手法は比較的新しいアプローチであり、2000年代から多くの研究者により取り組まれてきており、今後多くの新たな知見から様々な研究への発展が期待されている（及川 2013a,b）。メタボロミクスでの機器分析では主に質量分析装置（MS）を用い、前段の分離装置として、キャピラリー電気泳動（CE）、液体クロマトグラフ（LC）が利用され、対象とする代謝物に応じて選択する。得られるメタボロームデータも大きく、複雑であることから、データ解析には特別のソフトウェアが利用され、メタボローム解析を専門に扱う業者では自作のソフトウェアを用いることもある。

メタボロミクスの応用研究では、医療分野においてさまざまな疾患のバイオマーカーの解明に利用され、今日では農業、食品分野への応用が期待されている。これまで農業分野では、外的形質（収量性、病害抵抗性など）を主体に新品種開発、栽培技術開発がすすめられているが、メタボローム解析の導入によって、機能性成分など別の視点からの品種改良や、成分変化からの収穫期の判別、流通・保存・加工技術の確立等に期待されている。

農業分野の例として、ダダチャマメ（エダマメの一品種群）ではメタボローム解析によって、これまで注目していなかった成分に、他との明確な差を見出し、それら成分による商品の差別化への利用や、それら成分を指標とした将来的な栽培条件、気象条件等との関係性の解明が期待されている（及川 2013b）。トマトでは、成熟ステージにおいて、色素成分のリコペンとその酸化分解物である香気成分の生成パターンの類似性が明らかになり、その代謝解明の一端が明らかになりつつある（Iijima et. al. 2008, 飯島 2013）。

加工分野では、加熱トマト特有の成分の探索（飯島 2013）や、メタボローム解析と官能評価との相関性について、チーズ（Ochi et. al. 2012a,b, 越智 2013）、醤油（Yamamoto et. al. 2012）、茶（Pongsuwan et. al. 2008）においての報告がある。これら報告にあるように、メタボロミクスは、食品分野において新たな成分の探索、あるいは成分を特定せず官能評価に代わる評価法への応用を目的として進められ、さらに加工方法との比較検討が進むことにより、その技術開発への貢献が期待されている。

茶の香気成分は、さまざまな物質変化の最終産物だけでなく、それぞれの中間体である可能性がある。実際に、

茶製造工程中では様々な香りの変化が起こるため、現在は作り手の勘と経験に基づいて行われている。製造技術を構築するうえではその変化の指標となる成分の特定と変動を明らかにする必要があり、さらに、香気成分の生合成、代謝経路が明らかとなれば、その変動要因から技術開発に発展することが期待でき、メタボロミクスは有効な技術であると考えられる。

1. 6 Indole の生合成・代謝経路

本研究では、香りに特徴のある茶の、将来的な製造技術への発展への貢献を目指し、茶の香気成分のうち、その量的変化が大きく香りへの貢献度が高いことが明らかとなった indole の、生合成、代謝経路を検討した。Indole の生合成、代謝経路はモデル植物であるシロイヌナズナ等で明らかとなっている（Radwanski et. al. 1995）（図1. 3）。その前駆物質としてはシキミ酸経路をへて生成する shikimic acid であり、shikimic acid を分岐点として、L-phenylalanine, L-tyrosine, L-tryptophan が生合成される。Indole は L-tryptophan 生合成の中間体であり、shikimic acid から anthranilic acid を経て生合成され、L-tryptophan に至る。Indole は L-tryptophan への変換の他、微生物における各種 indole 酸化物への変換、indigo 植物における indoxyl への変換、非 indigo 植物における hydroxyindoles への変換が確認されている（Yuan L. J. et. al. 2011）。また、シロイヌナズナでは、tryptophan による shikimic acid から anthranilic acid への変換を抑制するフィードバック機構が確認されている（Li, J. et. al. 1996）。

茶において、indole はその香気を強めることが確認されており（Hattori, S. et. al. 2003）、さらに、烏龍茶では緑茶や紅茶に比べ、多く蓄積していることが知られている（Yamanishi et. al. 1980）。しかし、チャにおけるその生合成および加工工程における変動については明らかとなっていない。

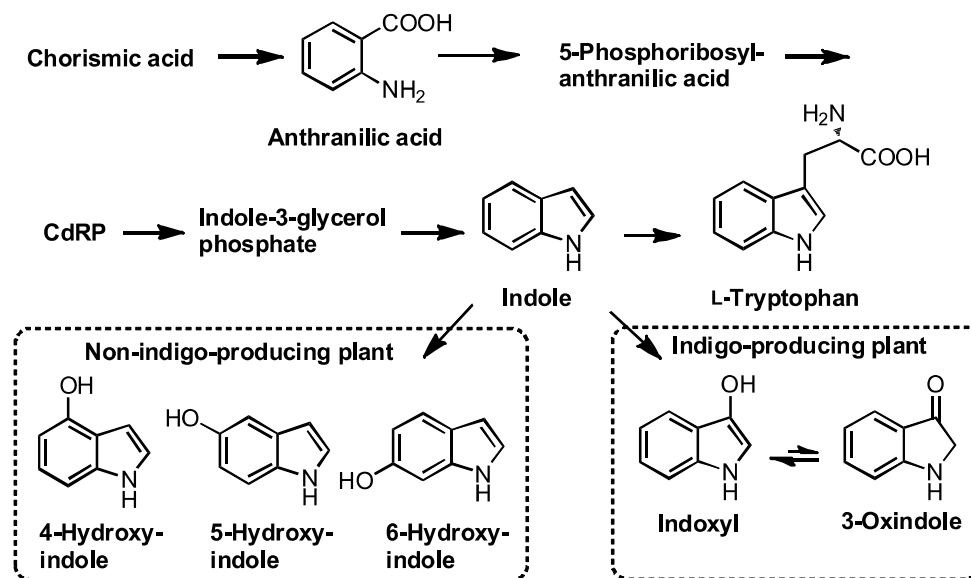


図1. 3 *Arabidopsis* における L-tryptophan 生合成経路 (Radwanski et. al. 1995) および indigo 生産、非生産植物における indole 酸化物 (Yuan et. al. 2011)

1. 7 本研究の目的及び構成

以上の茶飲用の現状，加工技術の変遷，香氣に関する既往の研究を踏まえ，特色ある茶製造技術の開発に必要な，科学的知見を得ることを目的に，①加工工程における香氣変化の指標となる成分の特定，②生葉萎凋工程における indole の生合成，代謝機構，に焦点を絞り本研究に取り組んだ。

まず，次章（第2章）では，茶主産国である中国（緑茶，紅茶，烏龍茶），インド（紅茶），スリランカ（紅茶），台湾（紅茶，烏龍茶）産の茶と，日本（緑茶，紅茶，烏龍茶）産のそれとの香氣成分比較を行い，その類似あるいは相違点，およびそれぞれの特徴を考察した。続く第3章では本研究の中心となる生葉低温保管処理技術を用いて製造した茶の香氣特性を，官能審査を用いて評価するとともに，香氣成分分析による科学的特徴を示した。さらに，AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) 法を用いて香氣に強く影響を与える香氣成分の特定を試みた。

第4章では，質的に香氣への影響力が強く，量的変化の大きい indole に注目し，その生合成，代謝経路を中心とした蓄積機構の解明を試みた。

最後に第5章では，本研究を総括するとともに，新たな茶の製造法の確立に向けた礎を示す。

参考文献

- Dong, F., Yang, Z., Baldermann, S., Kajitani, Y., Ota, S., Kasuga, H., Imazeki, Y., Ohnishi, T., Watanabe, N. (2012). Characterization of L-phenylalanine metabolism to acetophenone and 1-phenylethanol in the folwers of *Camellia Sinensis* using stable isotope labeling, *Journal of Plant Physiology*, 169, 217-225
- 古田紹欽 (2000) . 栄西 喫茶養生記, 講談社
- Guo, Wenfei., Sakata, K., Watanabe, N., Nakajima, R., Yagi, A., Ina, K. and Luo, S. (1993). Geramui: 6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside isolated as an aroma precursor from tea leaves for oolong tea, *Phytochemistry*, 33, 1373-1375
- 畑中頤和 (1993) . 植物起源の“みどりの香り”の発現と生理的意義の解明に関する研究, *日本農芸化学会誌*, 67, 1391-1398
- Hattori, S., Tagagaki H. and Fujimori, T. (2003). Evaluation of Japanese Green Tea Extract Using GC/O with Original Aroma Simultaneously Input to the Shiffing Port Method (ASIS), *Food Sci. Technol. Res.*, 9, 350-352
- 飯田辰彦 (2012) . 日本茶の「勘所」, 鮎脈社
- Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K., Sakurai, N., Suda, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Okazaki, K., Kitayama, M., Kanaya, S., Aoki, K. and Shibata, D. (2008). Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information, *The Plant Journal*, 54, 949-962

- 飯島陽子 (2013) . メタボロミクスに基づく多成分解析の食品の質的評価に対する有用性, 食品と開発, 48, 7-9
- Kawakami, M., Kobayashi, A. and Kator K. (1993). Volatile Constituents of Rooibos Tea (*Aspalathus Linearis*) As Affected by Extraction Process, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 633-636
- Kawakami, M., Ganguly, S. N., Banerjee, J. and Kobayashi, A. (1995). Volatile Composition of Oolong Tea and Black Tea by Brewed Extraction Method and Characterizing Compounds of Darjeeling Tea Aroma, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 200-207
- 川上美智子 (2000) . 茶の香り研究ノート, 光生館, 7-16
- 小林彰夫 (1993) . 香りの前駆物質—フレーバー研究の新しい動向—, 香料, 180, 69-76
- Kobayashi, A., Kubota, K., Joki, Y., Wada, E. and Wakabayashi, M. (1994). (Z)-3-Hexenyl-β-D-glucopyranoside in Fresh Tea Leaves as a Precursor of Green Odor, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 592-593
- 窪川雄介、福島敬一、編 (1991) . 茶の大辞典, 「お茶の大辞典」刊行会
- Moon, J. H., Watanabe, N., Ijima, Y., Yagi, A. and Sakata, K. (1996). cis- and trans-Linalool 3,7-Oxides and Methyl Salicylate Glycosides and (Z)-3-Hexenyl β-D-Glucopyranoside as Aroma Precursors from Tea Leaves for Oolong Tea, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1815-1819
- Mizutani, M., Nakanishi, H., Ema, J., Ma, S. J., Noguchi, E., Ochiai I. M., Mizutani, F. M., Nakao, M. and Sakata K. (2002). Cloning of β-Primeverosidase from Tea Leaves, Key Enzyme in Tea Aroma Formation, *Plant Physiology*, 130, 2164-2176
- Nickerson, G. B. and Likens, S. T. (1966). Gas Chromatography evidence for the occurrence of hop oil components in beer, *J. Chromatography A*, 21, 1-5
- Nishikitani, M., Kubota, K., Kobayashi, A. and Sugawara, F. (1996). Geranyl 6-O-α-L-Arabinopyranosyl-β-D-glucopyranoside Isolated as an Aroma Precursor from Leaves of a Green Tea Cultivar, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 929-931
- Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T. and Fukusaki, E. (2012a). Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 751-758
- Ochi, H., Bamba, T., Naito, H., Iwatsuki, K. and Fukusaki E. (2012b). Metabolic fingerprinting of hard and semi-hard natural cheeses using gas chromatography with flame ionization detector for practical sensory prediction modeling, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 506-511
- Ogawa, K., Moon, J. H., Guo, W., Yagi, A., Watanabe, N. and Sakata, K. (1995). A Study on Tea Aroma Formation Mechanism: Alcoholic Aroma Precursor Amounts and Glycosidase Activity in Parts of the Tea Plant, *Z. Naturforsch.*, 50c, 493-498
- 及川彰 (2013a) . メタボロミクスの農業・食品分野への応用, 化学と生物, 51, 615-621
- 及川彰 (2013b) . 食品のメタボローム解析動向, 食品と開発, 48, 4-6
- Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A. and Fukusaki, E. (2008). Quality Prediction of Japanese Green Tea Using Pyrolyzer Coupled GC/MS Based Metabolic Fingerprinting, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 744-750
- Radwanski E. R. and Last R. L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism : Biochemical and molecular Genetics. *The Plant Cell*, 7, 921-934.
- 坂本宏司、下田満哉、笈島豊 (1993) . 清酒香気成分のポラパック Q カラムによる濃縮, 日本農芸化学会誌, 67, 685-692
- 坂田完三、水谷正治 (2003) . 茶の香気生成とβ-プリーメベロシダーゼ, *FFI ジャーナル*, 208, 991-1003
- 重松洋子、下田満哉、笈島豊 (1994) . 紅茶香気成分の比較分析, 日本食品工業学会誌, 41, 768-777
- 下田満哉、平野好司、笈島豊 (1987) . ポーラスポリマーカラムによる食品香気成分の濃縮, 分析化学, 36, 792-798
- Shimoda, M., Shigematsu, H., Shiratsuchi, H. and Osajima, Y. (1995). Comparison of the Odor Concentrates by SDE and Adsorptive Column Method from Green Tea Infusion, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1616-1620
- 静岡県経済産業部 (平成 23 年) . 静岡県茶業振興基本計画 (H23-25 年)
- 高橋宇正 (1999) . 茶の品質鑑別方法 (茶の品質評価), 香料, 204, 41-47
- Wang, D., Yoshimura, T., Kubota, K. and Kobayashi, A. (2000). Analysis of Glycosidically Bound Aroma

- Precursors in Tea Leaves. 1. Qualitative and Quantitative Analyses of Glycosides with Agrycons as Aroma Compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5411-5418
- Wang, D., Kubota, K. Kobayashi, A. and Juan I. M.(2001b). Analysis of Glycosidically Bound Aroma Precursors in Tea Leaves. 3. Change in the Glycoside Content of Tea Leaves during the Oolong Tea Manufacturing Process, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5391-5396
- Wang, D., Kubota, K. Kobayashi, A. and Juan I. M.(2001a). Analysis of Glycosidically Bound Aroma Precursors in Tea Leaves. 2. Change in the Glycoside Contents and Glycosidase Activities in Tea Leaves during the Black Tea Manufacturing Process, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1900-1903
- Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A. and Fukusaki, E (2012). Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and analysis of correlation with quantitative descriptive analysis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 170-175
- Yamanishi, T., Nose, M. and Nakatani, Y. (1970). Studies on the Flavor of Green Tea Part VIII. Further Investigation of Flavor Constituents in Manufactured Green Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 44, 599-608
- Yamanishi, T., Kosuge, M., Tokitomo Y. and Maeda R. (1980). Flavor Constituents of Pouchong Tea and a Comparison of the Aroma Pattern with Jasmine Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 44, 2139-2142
- Yang, Z., Baldermann, S., Watanabe, N. (2013). Recent studiws of the volatile compounds in tea, *Food Research International*, 53, 585-599
- Yano, M., Joki, Y., Mutoh, H., Kubota, K. and Kobayashi, A. (1991). Benzyl Glucoside from Tea Leaves, *Agri. Biol. Chem.*, 55, 1205-1206
- Yuan L. J., Liu J. B., and Xiao X. G. (2011). Biooxidation of indole and characteristics of the responsible enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 10, 19855-19863.

第2章 緑茶・紅茶・烏龍茶の香り

2. 1 茶の製造法と香り

茶は *Camellia sinensis* (L.) から作られ、その製造方法から大きく 6 種に分けられる (図 2. 1-1, 村松ら 2002)。このうち世界的に主に生産されているものは緑茶 (不発酵茶)、紅茶 (発酵茶)、烏龍茶 (青茶、半発酵茶) である。白茶は半発酵茶に分類されることもあるが、微発酵茶と表現されることもある。黄茶、黒茶は後発酵茶に分類され、微生物による発酵によって作られる。白茶、黄茶、黒茶は中国が主産地であり、その他の国ではほとんど作られていない。黒茶に分類される茶は、日本において限られた地域で昔から作られているものがある (碁石茶：高知県、阿波晩茶：香川県など)。この他にも世界各地で、少量ではあるがその土地独特の茶が作られている (ミアン：タイ、ラペソー：ミャンマー)。

紅茶は広く作られ世界で最も多く飲用されている。茶の香り研究は昭和初期にさかのぼり、緑茶のみどりの香りをはじめ、多くの研究者により、緑茶、紅茶、烏龍茶の香りに関する研究が行われ、その成分は 500 種以上あるといわれている。これらの研究については畑中 (1996)、山西 (1996)、竹尾 (1996)、川上 (2002) によってまとめられており、茶の香りに関する研究の歴史、香りとその成分、茶種、生産地、品種と香りとの関係についてわかりやすく示されている。各種茶の香り成分の構成はそれぞれ異なる特徴を示し、緑茶ではテルペン系香り成分 (Yamanishi et. al. 1970, Nose et. al. 1971) と青葉アルコールのエステル類 (Takei et. al. 1976) の貢献度が高い。紅茶では 2-phenylethanol, benzyl alcohol, geraniol, linalool, linalool oxide が特徴的な成分として知られている (Yamanishi et. al. 1968, 1972, Aisaka et. al., 1978)。

烏龍茶は独特の花様の香りを持ち、この香りに貢献する物質として、jasmine lactone, methyl jasmonate, indole, などが挙げられている (Yamanishi et. al. 1980)。

図 2. 1-2 に各茶の製造方法を示した。緑茶は摘採した生葉を速やかに蒸熱することで酵素の活性を止め、揉みながら乾燥する。半発酵茶では、まず生葉を日光にさらし日干萎凋を行う。その後室内に置き数時間かけて萎凋をすすめ、その間数回の攪拌を行う。萎凋の終了した生葉は釜炒りによって酵素の活性を止め、乾燥する。紅茶は温風等により数時間かけ萎凋し、萎凋の終了した生葉を揉捻する。揉捻後、多湿条件下で発酵し、その後乾燥させる。

緑茶、紅茶、烏龍茶の中では緑茶が最も香り成分、量とも少ない (竹尾 1982)。緑茶は摘採後の生葉を速やかに、蒸熱または釜炒りによって加熱することで、チャ内部の酵素を失活させる。この工程が紅茶、烏龍茶との大きな違いである。深津ら (1978) が、煎茶製造工程中の精油量は製造工程が進むほど減少し、粗揉工程での減少が大きかったと報告しているように、緑茶は摘採後の製造工程における香り生成が少なく、生葉本来の持つ香りを利用し、緑の香りを主とした香りを形成している。一方紅茶、烏龍茶は摘採後の生葉を数時間かけて萎凋させ、香気の発揚を促す。さらに紅茶では萎凋後の生葉を揉捻したのち発酵させ、さらに香気の発揚を促す。烏龍茶では紅茶に比べて多くの jasmine lactone, methyl jasmonate, indole が検出され、これには萎凋方法の違い、発酵の有無が大きく影響していると考えられている (竹尾 1983)。

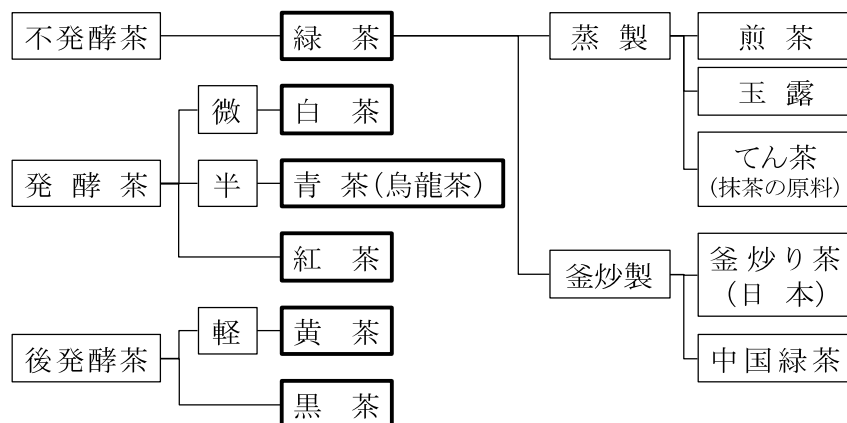


図 2.1-1 製造法による茶の分類 (村松ら 2002)

【緑茶(煎茶)】

蒸 熱 — 粗 揉 — 揉 捻 — 中 揉 — 精 揉 — 乾 燥

↑ 酵素失活

【烏 龍 茶】

日干萎凋 — 室内萎凋・攪拌 — 炒 葉 — 揉 捻 — 玉 解 — 乾 燥

↑ 酵素失活

【 紅 茶 】

萎 凋 — 揉 捻 — 玉 解・篩 分 — 発 酵 — 乾 燥

↑ 酵素失活

図 2.1-2 茶の製造工程

紅茶製造では、萎凋工程、発酵工程で著しく各種香気成分の増加が確認されている (Yamanishi et. al. 1966, Saijo et. al 1967) .

烏龍茶製造では、日干萎凋の効果は小さく、室内萎凋における攪拌が香気成分の発揚に大きく影響を及ぼし、特に aromatic alcohols, cis-jasmone, jasmine lactone, indole 等多くの香気成分が増加する (Tokitomo et. al. 1984, Kobayashi et. al 1985) .

このように、緑茶、紅茶、烏龍茶は同一の植物から作られるものであるが、その製造方法によりその特徴、特に香りの特徴は大きく異なるものとなっている。また同一の茶種であっても品種、栽培環境、製造条件によってもその特徴は異なることがわかる。

2. 2 日本・中国・台湾・インド・スリランカの各種茶の香気特性

2. 2. 1 目的

茶主要産出国、地域の茶の香気については、多くの研究者によって報告されている。緑茶のうち日本の煎茶は新鮮な緑の香りが特徴的である。特に新茶の主要な香気成分としては Z-3-hexenylhexanoate, Z-3-hexenyl-E-2-hexenoate の貢献度が高いとの報告もあり、さらにその他にも紅茶と共通する成分が多数存在する (Takei et. al. 1976) . 加えて、新芽が伸長する時期に被覆を行い栽培する玉露は、煎茶の香気に加え dimethyl sulfide (Ohtsuki et. al. 1987) やヨノン系化合物が多い (川上ら 1981) . さらに、釜炒製玉緑茶やほうじ茶では、ピラジン類が特徴香気成分としてあげられている (川上ら 1999) .

一方、中国の緑茶に代表される龍井茶は linalool oxides, 2-phenylethanol 等を多く含み、加えて焙煎による pyrazines が多く日本緑茶と特徴を異にする (Kawakami et. al. 1983) .

三大紅茶を産出する中国、インド、スリランカの紅茶は共通的に前述の成分を多く含んでいるが、その構成比の違いによって、それぞれの特徴を形成していると考えられている。特にダージリンは独特のマスカットフレーバーが特徴的であり、3,7-dimethylocta-1,5,7-trien-3-ol, 2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol が寄与している (Kawakami et. al. 1995) .

烏龍茶は、産地、品種、製造法によって変異に富むが、紅茶と同様に上記香気成分を含み、さらに jasmine lactone, methy jasmonate, indole が特徴成分としてあげられ、台湾で作られている特殊な烏龍茶である東方美人は、ダージリンのマスカットフレーバーと類似した香りを持ち、その 2 種の特徴成分も多く含んでいる (Kawakami et. al. 1995) .

これら報告では、主として各種茶の香気成分の探索が行われ、機器の発展とともに多くの新規化合物が同定されてきた。そのため、単一の茶の産地の比較、数種の茶での比較は、成分量からみた相違点に重きが置かれている。煎茶において、新たな香りを付加した茶の製造方法を検討する上で、日本で育成、栽培されているチャにおいても、香りの増強に向いているのか否かを判断する必要がある。

そこで、茶主要産地である中国、台湾、インド、スリランカ産の緑茶、紅茶、烏龍茶と日本の煎茶並びに、近年増加しつつある日本産の紅茶、烏龍茶の香気成分を比較し、主成分分析による解析を試み、日本産茶、特に紅茶、烏龍茶の香気における海外との違いを明らかにした。

2. 2. 2 材料及び方法

2. 2. 2. 1 茶サンプル

分析に供した茶は 38 点で、緑茶が 7 点、烏龍茶が 13 点、紅茶が 18 点である (表 2. 2-1) . 中国、台湾、

インド、スリランカ産のものは、2010 年産のもので、それぞれの国で上級として販売されているものを収集した。日本産のものは、2010 年産のもので、静岡県内の篤農家

が生産したものを収集した。No.16, 17, 18 は静岡県農林技術研究所茶業研究センターで 2010 年に製造した一番茶を使用した。

表 2. 2-1 サンプル茶の茶種と産地

No	Commercial name	Tea type	Origin	Others characteristics
1	Dahongpao	oolong	China	roasted
2	Buzhichun	oolong	China	roasted
3	Rougui	oolong	China	roasted
4	Yunxiang 999	oolong	China	pellet type
5	Tieguanyin AAA	oolong	China	pellet type
6	Nashiyama	oolong	Taiwan	roast, high mountain,, pellet type
7	Nashiyama	oolong	Taiwan	high mountain, pellet type
8	Kouzancha	oolong	Taiwan	high mountain, organic,, pellet type
9	Bunzanhoushycha	oolong	Taiwan	
10	Oriental Beauty	oolong	Taiwan	
11	Shikicha	oolong	Taiwan	pellet type
12	Shizu 7132	oolong	Japan	
13	Benifuuki	oolong	Japan	
14	Zhuangyuanhong	green	China	
15	Baichazu	green	China	
16	Yabukita	green	Japan	
17	Kousyun	green	Japan	
18	Tsuyuhikari	green	Japan	
19	Okuhikari	green	Japan	
20	Fujiedakaori	green	Japan	
21	Benifuuki	black	Japan	placked by hand
22	Yabukita	black	Japan	organic
23	Benifuuki	black	Japan	
24	Lapsang Souchong	black	China	
25	Bainianlaoshu	black	China	
26	Jinjunmei	black	China	
27	Mitsukoukoucha	black	Taiwan	
28	Tokutou	black	Taiwan	
29	FbobjExtra Special New Vithanakande Tea Factory	black	Sri Lanka	
30	FbobjSpecial New Vithanakande Tea Factory	black	Sri Lanka	
31	Ruhunu B.O.P.I	black	Sri Lanka	
32	A Fine Uva Tea	black	Sri Lanka	
33	A Fine Dimbula tea	black	Sri Lanka	
34	Rubi—Bio—Organic	black	India	organic
35	Puttabong	black	India	2nd flush
36	2010 Thurbo	black	India	2nd flush
37	Jungpana	black	India	1st flush
38	Rohini	black	India	2nd flush

2. 2. 2. 2 香気成分の抽出

各茶 2 g に沸騰した蒸留水 40 mL を加え 5 分静置後ナイロンフィルターでろ過した。ろ液を遠心分離 (3000×g, 10 min) 後, 上清 30 mL を Porapak Q (50-80 mesh; Waters Corporation) 2 mL を充填したガラスカラム (内径 14.9 mm, GL Sciences Inc.) に通し, 香気成分を吸着させた。2 mL の蒸留水でカラムを洗浄後, 内部標準としてエチルデカノエート 10 µg を含む酢酸エチル溶液 10 µL を加えた, ジエチルエーテル:イソペンタン (2:1) の混合溶媒 3 mL で香気成分を溶出した。香気抽出液は無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 窒素気流にて濃縮することにより, 香気濃縮物 100 µL を得た。

2. 2. 2. 3 ガスクロマトグラフィー——マススペクトロメトリー(GCMS)

GC-MS 分析条件は以下のとおりである。

装置: 島津製作所製 GC-17A (GC), QP-5000 (MS), 注入方法: スプリットレス (1分, 注入口温度 230℃), キャリアガス: ヘリウム (流速: 1.7 mL/min.), カラム: SULECOWAX™ 10 (30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 µm), オープン温度: 50℃ (3 min 保持) -150℃ (3℃/min) -240℃ (20℃/min, 20 min 保持), MS: フルスキャンモード (m/z 50-300)

2. 2. 2. 4 主成分分析

同定した香気成分のトータルイオンピークの内部標準とのピーク面積比を用いて, SPSS (IBM, Ver1.9) ソフトウェアで主成分分析を行った。

2. 2. 3 結果

検出した香気成分の数は烏龍茶の 3 点 (No. 1, 2, 10), 紅茶 1 点 (No. 36), がやや多かったが緑茶, 烏龍茶, 紅茶で大きな差は見られなかった (図 2. 2-1)。緑茶では, 日本産は No. 16 を除き少ない傾向を示した。烏龍茶, 紅茶では, 日本産のものはそれぞれの中で多い位置に属していた。

各香気成分のピーク面積比の合計値は緑茶で小さく, 半発酵茶, 紅茶の順であった。緑茶では, 日本産が小さい傾向を示し, 中国産がやや大きかった。烏龍茶では, もっとも大きい No. 10 を除くと, 日本産は中間に位置していた。紅茶ではばらつきが大きく, 日本産のものもばらつきが大きかった (図 2. 2-2)。

ピークエリア面積比を用いて主成分分析を行ったところ, 第 3 主成分までの寄与率は 45%であった (図 2. 2-3)。烏龍茶, 紅茶はばらつきが大きく, 特に No. 1,

2, 3, 21, 36 がやや離れた位置であった。緑茶はばらつきが小さくまとまっていた。日本産の烏龍茶 (No. 12, 13) は緑茶に近く, 紅茶 (No. 21, 22, 23) は No. 21 を除きその他の紅茶と同じ位置であった。

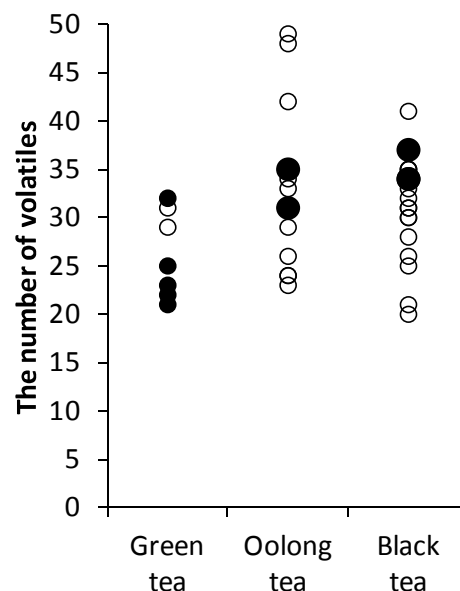


図 2.2-1 各茶における香気成分数*

●: 日本産茶 ○: 海外産茶

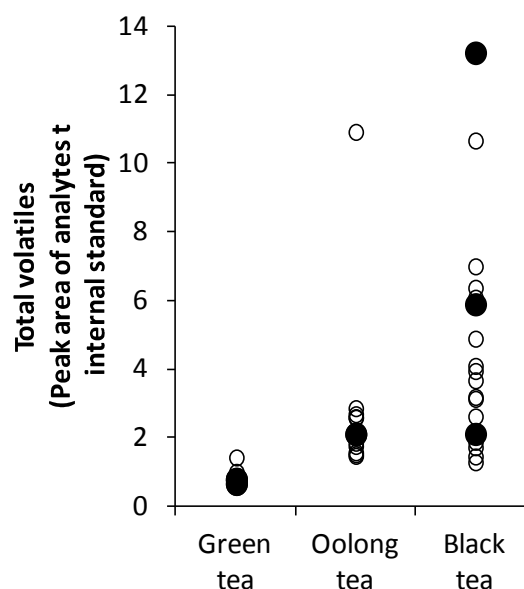


図 2.2-2 各茶における香気成分総量*

●: 日本産茶 ○: 海外産茶

2. 2. 4 考察

香気成分の数、量ともに、先に述べたこれまでの報告と類似し、数は緑茶、烏龍茶、紅茶とも大きな差は無いが、量は緑茶が少なかった。発酵程度の差は香気成分を増やすことに大きく関係し、緑茶、烏龍茶、紅茶の香りの差は、香気成分の数よりもその量によるバランスの差に起因している。と考えられ紅茶で特にばらつきが大きいのは、産地による差のほか、生産者の方針による発酵程度の差が大きいことが考えられる。

日本産の烏龍茶は、香気成分の数、量では海外産と遜色なく、主成分分析の結果では、日本産烏龍茶は緑茶に近く、海外産のものでも同様のものがあり、烏龍茶として特別劣るものではないと考えられる。海外産の No. 1, 2, 3, 6 が他の烏龍茶よりも離れた位置であったが、これら茶は焙煎を特徴としているため、焙煎香が影響したものと考えられる。焙煎香には pyrazine 類が大きく関係していると報告されており (Yamanishi et. al. 1973, 水

上ら 2008, 水上 2012), これらからも他の茶に比べ多くの pyrazine 類が検出されている。

日本産の紅茶は香気成分の数、量とも海外産と遜色ないものであり、特に No.21 は紅茶の中で最も香気成分が多かった。主成分分析においても、香気成分の多かった No.21 と 36 が他の紅茶と離れていたことから、発酵度が高い紅茶であったことが推察される。その他の日本産紅茶は、紅茶のグループの中に位置し、主成分分析からも海外産のものと遜色ないことがうかがわれる。

日本において、チャ品種は煎茶製造を前提に育成、栽培され、旨みを重視したもので、香りについて海外のものとの差が大きいと予想されたが、日本産のものでも篤農家が生産したものは、海外のものと遜色なく、品種や栽培法による不利は小さい。このことから、製造技術を確認し安定生産出来ることが重要な課題であり、香気発揚技術を確認する上での科学的データの蓄積の重要性が明らかとなった。

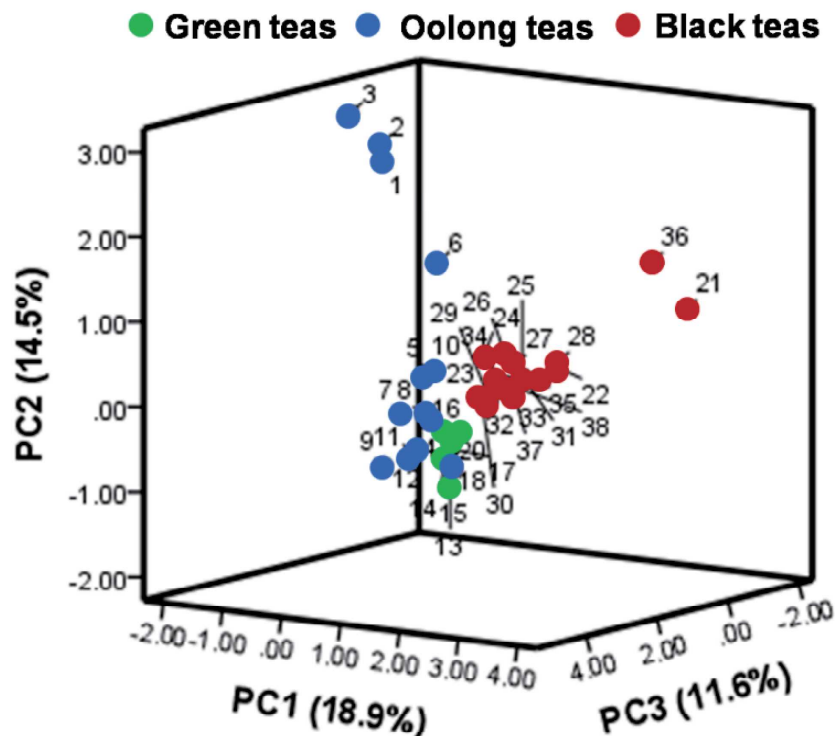


図 2.2-3 各茶の香気成分量による主成分分析結果*

*Balderman et. al., in preparation

参考文献

- Aisaka, H., Kosuge M. and Yamanishi T. (1978). Comparison of the Flavors of Chinese 'Keemun' Black Tea and Ceylon Black Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 42, 2157-2159
- 深津修一, 岩浅潔 (1978). 煎茶製造工程における香気成分の変化, *茶業研究報告*, 48, 68-76
- 畑中颯和 (1996). 植物起源の香り, *FFI ジャーナル*, 168 : 5-22
- 川上美智子, 山西貞 (1981). かぶせ茶の香りの特徴, *日本農芸化学会誌*, 55, 117-123
- Kawakami, M. and Yamanishi, T. (1983). Flavor Constituents of Longjing Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 47, 2077-2083
- Kawakami, M., Ganguly, N. S., Banerjee J. and Kobayashi A. (1995). Aroma Composition of Oolong tea and Black Tea by Brewed Extraction Method and Characterizing Compounds of Darjeeling Tea Aroma, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 200-207
- 川上美智子, 山西貞 (1999). 焙焼、釜炒り操作による茶香気の形成, *日本農芸化学会誌*, 73, 893-906
- 川上美智子 (2002). 茶の香り研究—その歩みと最新情報—, *FFI ジャーナル*, 197, 13-27
- Kobayashi, A., Tachiyama, K., Kawakami, M., yamanishi, T., Juan, T.-M. and Chiu, T.-F. (1985). Effects of Solar-withering and Turn Over Treatment during Indoor-withering on the Formation of Pouchong Tea Aroma, *Agri. Biol. Chem.*, 49, 1655-1660
- 水上裕造, 澤井祐典, 山口優一 (2008). ほうじ茶の香気に関与する成分の分析, *茶業研究報告*, 105, 43-46
- 水上裕造 (2012). ほうじ茶のヘッドスペースと浸出液に含まれる香気寄与成分, *茶業研究報告*, 114, 65-72
- 村松敬一郎, 小國伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本 (前田) 万里, 編 (2002). 茶の機能, 17-23, 学会出版センター
- Nose, M., Nakatani, Y. and Yamanishi T. (1971). Studies on the Flavor of Green Tea Part IX. Identification and Composition of Intermediate and High Boiling Constituents in Green Tea Flavor, *Agri. Biol. Chem.*, 35, 261-271
- Ohtsuki, K., Kawabata, M., Kokura H. and Taguchi K. (1987). Simultaneous Determination of S-Methylmethionine, Vitamin U and Free Amino Acids in Extracts of Green Tea with an HPLC-Amino Acid Analyzer, *Agri. Biol. Chem.*, 51, 2479-2484
- Saijo, R. and Kuwabara, Y. (1967). Volatile Flavor of Black Tea Part I. Formation of Volatile Components during Black Tea Manufacture, *Agri. Biol. Chem.*, 31, 389-396
- Takei, Y., Ishiwata, K. and Yamanishi T. (1976). Aroma Components Characteristic of Spring Green Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 40, 2151-2157
- 竹尾忠一 (1983). 香気成分組成からみた半発酵茶と紅茶の香気特性の解析, *日本農芸化学会誌*, 57, 457-459
- 竹尾忠一 (1982). 不発酵茶と半発酵茶にみられる香気成分の変化, *日本農芸化学会誌*, 56, 799-801
- 竹尾忠一 (1996). チャの香りと品種, *FFI ジャーナル*, 168, 35-45
- Tokitomo, Y., Ikegami, M., Yamanishi, T., Juan, I.-M. and Chiu, T.-F. (1984). Effects of Withering and Mass-Rolling Process on the Formation of Aroma Components in Pouchong Type Semi-fermented Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 49, 1655-1660
- Yamanishi, T., Kobayashi, A., Sato, H., Nakamura, H., Osawa, K., Uchida, A., Mori, S. and Saijo, R. (1966). Flavor of Black Tea Part IV. Changes in Flavor Constituents during the Manufacture of Black Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 30, 784-792
- Yamanishi, T., Kobayashi, A., Nakamura, H., Uchida, A., Mori, S., Ohsawa, K. and Sasakura, S. (1968). Flavor of Black Tea Part V Comparison of Aroma of Various Types of Black Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 32, 379-386
- Yamanishi, T., Nose, M. and Nakatani, Y. (1970). Studies on the Flavor of Green Tea Part VIII. Further Investigation of Flavor Constituents in Manufactured Green Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 34, 599-608
- Yamanishi, T., Kita, Y., Watanabe K. and Nakatani Y. (1972). Constituents and Composition of Steam Volatile Aroma from Ceylon tea, *Agri. Biol. Chem.*, 36, 1153-1158
- Yamanishi, T., Shimojo, S., Ukita, M., Kawashima, K. and Nakatani, Y. (1973). Aroma of Roasted Green Tea (Hojicha), *Agri. Biol. Chem.*, 37, 2147-2153
- Yamanishi, T., Kosuge, M., Tokitomo Y. and Maeda R. (1980). Flavor Constituents of Pouchong Tea and a Comparison of the Aroma Pattern with Jasmine Tea, *Agri. Biol. Chem.*, 44, 2139-2142
- 山西貞 (1996). チャの香り, *FFI ジャーナル*, 168, 23-34

第3章 チャ生葉保管処理による荒茶香気の特徴

3. 1 官能評価による香気特性

3. 1. 1 目的

これまでの茶香気に関する報告は、その成分の探索が中心で、実際に人が感じる香りとの比較を行ったものは少ない。Shimoda ら (1995) はグレードの異なる煎茶について、浸出液の香気成分の香調を GC-sniffing により煎茶の官能評価で用いられる言語のうち 10 種にあてはめ、それぞれの成分が貢献している香り特性を示している。水上 (2012) は、ほうじ茶浸出液ヘッドスペース香気成分を分析し、その成分の香調と FD ファクターから 10 種に分類し、香り特性を視覚的に示している。Lee ら (2007) は日本を含めた 9 か国産の緑茶の香気評価を試み、緑茶を広範囲に評価できる評価言語の抽出と分類を行っている。言語表現による官能評価は、豆乳 (Torres-Penaranda et. al. 2001)、ワイン (Gutierrez Afonso 2002)、等の飲料でも試みられ、日本酒 (宇都宮 2003、

宇都宮ら 2004a,b) では審査のための手法についての報告がある。

全国茶品評会の審査で用いられる評価基準のうち、香りに関するものを表 3. 1-1 に示した。本品評会は、製造にかかわる技術の向上を目的の一つにしており、専らいかに欠点のない茶を作ることができるかに重きを置いている。そのため、高評価に値する用語がなく、欠点用語が用いられていることから、本研究で目的とする香りを評価、特に良い香りとしての評価に用いることができない。さらに、本研究で対象としている香りは、煎茶官能評価において欠点とされる萎凋香に当たる香りであることから、香りの性質が不明確な状態である。

そこで、低温保管処理の香りに対する影響を評価するうえで、茶の香り特性を視覚的に示すことを目的として、言語の抽出、点数化を試みた。

表 3.1-1 全国茶品評会で用いられる香気に関する評価基準

茶種	評 価 基 準	チ ェ ッ ク 項 目
普通煎茶	①爽快な若芽の香のあるもの ②新鮮味のある香りのあるもの	◎減点項目 ・かぶせ香 ・青臭 ・硬葉臭 ・茎臭 ・火香 ・こげ臭 ・むれ臭 ・萎凋臭 ・葉傷み臭 ・湿り臭 ・変質臭 ・煙臭 ・油臭 ・移り臭 ・異臭
深蒸し煎茶	①青臭が完全に抜けたもの ②深みのある芳香をもつもの	◎減点項目 ・かぶせ香 ・青臭 ・硬葉臭 ・茎臭 ・火香 ・こげ臭 ・むれ臭 ・萎凋臭 ・葉傷み臭 ・湿り臭 ・変質臭 ・煙臭 ・油臭 ・移り臭 ・異臭
玉露	①覆い香 (海苔様の香り) があり、新鮮み (煎茶、かぶせ茶のミル芽香でなく覆い香と一体のもの) と良く調和したもの ②温和な甘い香りが豊かで持続性のあるもの	◎減点項目 ・覆い香不足 ・青臭 ・硬葉臭 ・茎臭 ・火香 ・こげ臭 ・むれ臭 ・萎凋臭 ・葉傷み臭 ・湿り臭 ・変質臭 ・煙臭 ・油臭 ・移り臭 ・異臭 ・普通煎茶風 ・かぶせ茶風
かまいり製玉緑茶	①釜炒り茶特有の爽快感を伴う香り (釜香) があるもの ②若芽の香りのあるもの	◎減点項目 ・釜香不足 ・かぶせ香 ・青臭 ・硬葉臭 ・茎臭 ・火香 ・こげ臭 ・むれ臭 ・萎凋臭 ・葉傷み臭 ・湿り臭 ・変質臭 ・煙臭 ・油臭 ・移り臭 ・いぶり臭 ・えび臭 ・異臭

3. 1. 2 材料及び方法

3. 1. 2. 1 茶試料

静岡県農林技術研究所茶業研究センターで慣行栽培されている「さやまかおり」を使用した。2012 年 5 月（一番茶）に一心三～四の新芽を摘み取り、2 kg を竹製の平かご（90 W × 60 L × 20 H cm）に厚さ約 10 cm で広げ、25 °C および 15 °C（相対湿度 70%）の暗室に 16 時間保管処理した。その後、それぞれ煎茶製造法により荒茶を製造し、茶試料とした。上記保管処理を行わない煎茶も併せて製造し茶試料とした。以下、15 °C で 16 時間保管処理した生葉で製造した荒茶を LTPGT（Low Temperature Processed Green Tea）、25 °C で 16 時間保管処理した生葉で製造した荒茶を NTPGT（Normal Temperature Processed Green Tea）と記す。

3. 1. 2. 2 パネリスト

言語抽出は 8 名のパネリスト（静岡県農林技術研究所茶業研究センター研究員：4 名、高砂香料工業株式会社研究員：4 名）が行い、茶の評価は 15 名のパネリスト（上記所属の各 9 名、および 6 名）が行った。

3. 1. 2. 3 茶提供方法

茶サンプル 3 g に熱湯 150 mL を加え 5 分静置後、抽出した。抽出液 25 mL をプラスチック容器（90 mL、旭化成パックス®）に入れ、各パネリストへ提供した。パネリストは容器から立ち上る香りをかぎ、言語の書き出し又は評価項目の点数記入を行った。

3. 1. 2. 4 言語の抽出

言語の抽出は、パネリストが香りからイメージする物、味、情景などを自由に記述する方式をとり、制限時間を設けず行った。制限事項として、全国茶品評会で使用する評価言語を極力使用しないこととした。

3. 1. 2. 4 茶の評価

あらかじめ設定された評価項目 7 項目（結果：表 3. 1-3 参照）について、5 段階（0：感じない、1：わずかに感じる、2：やや感じる、3：かなり感じる、4：非常に感じる）で評価した。

3. 1. 3 結果

3. 1. 3. 1 言語の抽出

パネリストから出された言語を表 3. 1-2 に示した。抽出した言語は具体的なもの、イメージする情景、香りから連想される他の感覚、具体的な物質名と多岐にわた

った。抽出した言語はその特徴から大きく 6 種に分類し、どれにも分類できないものをその他とした。

グリーンは植物をイメージするもの、乾燥した植物を連想するもの、花は具体的な花の名称、甘い香り、香水の香りに関するもの、甘さはフルーツ的な甘さを連想するもの、焙煎は火を通した穀物を連想するもの、味は苦味や酸味を連想させるもの、感覚はさわやかさなど、その他は茶そのものを表現するものや、上記に分類できないものとした。

抽出された言語数は緑茶では、焙煎に分類されるものが最も多く 9 種であり、LTPGT では花で 18 種、NTPGT ではグリーンで 11 種、感覚で 10 種であった。

煎茶の焙煎は穀物をイメージする言語が多く、いわゆる茶の焙煎香だけではなく、うまみを連想するものが多い。グリーンが強く感じられるものの言語数は少なく、花に関する言語も少なかった。

LTPGT は花に関する言語が最も多く、具体的な花ではジャスミン、クチナシ、ラン、ゆりなど甘さを伴う重厚な花の香が多い。加えて果実をイメージする甘さを連想させる言語が多かった。

NTPGT はグリーンに関する言語が多く、特に生きている植物をイメージさせるものが多かった。さらに、感覚的な言語として、さわやか、つんとくる、シャープなど爽快感を連想させるものが多かった。加えて花の言語は少なかったが、LTPGT と異なりさわやかさを備えている言語が見られた。

これら抽出された言語を基に、官能評価で使用する評価項目として、7 種に整理した（表 3. 1-3）。

3. 1. 3. 2 緑茶、LTPGT、NTPGT の官能評価

官能評価の結果を図 3. 1-1 に示した。Roast は煎茶がやや高く、LTPGT と NTPGT は同程度で低かった。Green, fresh green は煎茶、NTPGT で高く、LTPGT で低かった。Sweet は煎茶と LTPGT は同程度で NTPGT はやや低かった。Fruity は LTPGT と NTPGT は同程度で煎茶で低かった。Floral, fresh floral は煎茶と NTPGT は同程度で低く、LTPGT で高かく、特に floral で顕著だった。

煎茶の評価は green が最も高く、続いて fresh green, sweet および roast の順であった。一方 fresh floral, floral, fruity は 3 種の中で最も低かった。

LTPGT は floral が最も高く、続いて fresh floral であった。Green, fresh green は 3 種の中で最も低かった。

NTPGT は green と fresh green が同程度で高かった。Fresh floral, floral, fruity は煎茶より高かった。

表 3.1-2 抽出された言語

分類	煎茶	LTPGT	NTPGT
グリーン感	1 草むら 2 わずかに青葉 3 やや磯臭さを伴った青香 4C-3Hexenol	1 わずかに青茎のにおい 2 硬葉っぽい 3 青香 4c-3Hexenal	1 青竹 2 万緑の香り 3 硬い緑葉 4 青いトウモロコシ 5 生葉のかおり 6 草のにおい 7 瑞々しいグリーン感 8 広がりのあるグリーン香 9c-3hexenol 10Linalool oxide 11 野菜的な青香
花	1 かすかに杉の花の香り 2 かすかに東洋ラン 3 わずかにヨロ 4 アルコール系	1 ジャスミン 2 クチナシ 3 ラン 4 ゆりの花 5 パラのような 6 白またはピンクの花の香り 7 花の香り 8 トイレの芳香剤 9 消臭剤のような 10 芳香剤 (エスエル?) 11 化粧品っぽい香り 12 日本の美しい女性を連想 13 華やか 14 イドル 15methyl jasmonate 16phenylethyl alc 17McAnth 18Benzyl ace	1 香辛料 (シナモン?) のような 2 ハーブ 3 化粧品のにおい 4 アルコール系のにおい 5 華やか 6Linalool
甘さ	1 甘いお湯のにおい 2 甘いにおい 3 重い甘さ 4 ラズベリーガム	1 ココナッツのような 2 バニラのような 3 果実臭 4 熱帯果実の後熟の始まり 5 椿の花の落下して腐りかけたにおい 6 乾燥した竹の皮のやや甘ったるいにおい 7 椿の花の蜜にカビが出て腐りかけたにおい	1 少し甘い 2 熟したトマトのような甘さ 3 甘い香り
焙煎	1 ゆでた豆のにおい 2 ゆでとうもろこし 3 わずかにピラジン 4 ふかした芋 5 大豆様のふくよかな甘さ 6 穀物様 7 栗っぽい香り 8 芋をふかした様な軽いトッポ 9 燻し感を有する茶葉感	1 わずかに粉が焦げたにおい 2 芋のような 3 栗様の旨み感	1 えだまめ 2 茶粉が焦げた香り 3 栗様の旨み感 4 木の実様
味	1 少し渋み味のある香り 2 少しすっぱいような 3 旨み感 4 苦渋味感	1 少しにがい 2 カテキン 3 旨み香が強そうなイメージ	1 カテキンのにおい 2 渋み感
感覚	1 さわやかな 2 あきの来ないかおり	1 ふくよかな香り 2 広がりが弱い 3 ふくらみ感(ボリューム感)に富む 4 少しスーとするような 5 埃っぽさ	1 爽やか 2 ツンととがった感 3 少し品のないかおり 4 雑な香り 5 あきのくるかおり 6 うすい 7 清涼感 8menthol 9 シャープな香氣 10 やや厚みのあるボデー感
その他	1 熱湯のにおい (やかん?) 2 やや埃っぽい 3 普通のお茶に近い 4 卵のようなにおい 5 のり 6 むれ臭 7 玉露的 8 ジェルラフィド	1 濃茶的 2 磯臭さ 3 アニマルノト	1 紅茶系のかおり 2iso-butyl aldehyde 3 発酵感 4c-4Heptenal のような aldehyde 臭 5 新茶のような 6 海苔様の香氣 7 生臭さ 8 昆布と煮しめた筍

表 3.1-3 評価に用いた評価軸の名称とその特徴

評価項目	香りのイメージ
1. Roast	焙煎香、火の通った穀物のような
2. Green	海苔のような、干し草のような
3. Fresh green	新鮮な葉のような、森のような、草原のような
4. Sweet	砂糖を連想するような、旨みを連想するような
5. Fruity	リンゴのような、桃のような
6. Floral	くちなしの花のような、ジャスミンの花のような
7. Fresh Floral	バラの花のような、柑橘のような

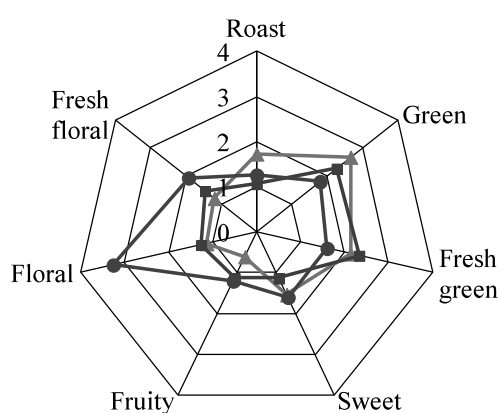


図 3.1-1 官能評価による LTPGT、NTPGT、煎茶の特徴*

(●) LTPGT (■) NTPGT (▲) Sencha

3. 1. 4 考察

言語の抽出では、3種の茶の特徴が明らかに異なることが示された。すなわち、煎茶はうまみを連想する焙煎香、LTPGTは甘さを伴う花、NTPGTは爽快感のある香りである。この3種の茶を中心に評価軸を決定することで、点数化による評価と香りの特徴を詳細に分類できる可能性が考えられた。

グリーンは生きている植物と乾燥した植物の香りの2つに分けることでグリーン感の違いを表すことができ、greenとfresh greenに分類した。花は重厚感のあるものと、さわやかな花の2つに分けることで花のイメージを分類できfloralとfresh floralに分類した。甘さはフルーツをイメージするものが多く、表現としてfruityを当てはめることにした。ほうじ茶のような焙煎香の香りと火を通した穀物を連想する香りをroastとし、うまみを連想する香りと砂糖のような甘さを連想する香りをsweetとした。さらにfruityは甘さを伴う果実の香りとし、かんきつをイメージする香りはfresh floralに含めることとした。

評価軸は、数が少なすぎるとその香りを表現できなくなり、多すぎると評価が困難になるため、6程度程度を目標に整理を試みたが、最終的にgreen, fresh green, floral, fresh floral, fruity, sweet, roastの7種とした(表3. 1-3)。茶の評価や、香りの評価に精通している者であれば、7種の分類は可能と考えられるが、商品などに香りのイメージとして表示する場合や、一般消費者のアンケート調査を行う場合には再考の必要があると考えられる。

7種の評価軸を利用し3種の茶について点数化を試みた。7種の評価軸をもって、特徴の異なる茶を分類することができ、そのバランスから茶の特徴を見出すことができた。煎茶はgreen, fresh greenが強く、そこに焙煎香であるroastと、旨みを連想するsweetに、わずかなfloral, fresh floralが加わることで全体の煎茶らしさを表すことができる。生葉を保管することで変化する香りは、保管温度が低いとLTPGTに見られるように、floral, fresh floralが強くなり、保管温度が高いとgreen, sweetがやや弱くなり、fresh greenがやや増加する。温度による大小はあるが、生葉を保管することでfloral, fresh floral, fruityが増加することから、温度管理や処理時間によって、これらの香りの強弱をコントロールできる可能性が示唆された。

本研究で使った荒茶は焙煎工程を経っていないことから、焙煎の度合いがroastに影響を与えた可能性は小さく、LTPGTとNTPGTでは香りのバランスの変化としてroastが感じにくくなっていることが考えられる。つまり、LTPGTはfloralが、NTPGTでは複数の香りの増減による爽快感の増加がそれぞれroastをマスキングしている可能性がある。

3. 2 香気成分の特徴

3. 2. 1 目的

官能評価の結果、生葉を低温保管処理することによって、煎茶と香りの特性が大きく異なること、および、生

葉処理温度によって香り特性が変化することが明らかとなった。そこで、香气成分を GCMS で分析し、これらの茶の成分特性を把握することとした。さらに、生葉低温保管処理することによって量的差の大きかった成分について、処理時間の違いが成分量に与える影響を明らかにした。

3. 2. 2 材料及び方法

3. 2. 2. 1 茶試料

3. 1 で使用した茶試料を用いた。

3. 2. 2. 2 香气成分の抽出

茶試料をイワタニ製ミルで粉碎し粉末とした。茶粉末 2 g に沸騰した蒸留水 40 mL を加え 5 分静置し、遠心分離 (3000×g, 10 min) 後、上清 25 mL を Porapak Q (50-80 mesh; Waters Corporation) 2 mL を充填したガラスカラム (内径 14.9 mm, GL Sciences Inc.) に通し、香气成分を吸着させた。2 mL の蒸留水でカラムを洗浄後、内部標準としてエチルデカノエート 10 µg を含む酢酸エチル溶液 10 µL を加えた、ジエチルエーテル：イソペンタン (2 : 1) の混合溶媒 3 mL で香气成分を溶出した。香气抽出液は無水硫酸ナトリウムで乾燥後、窒素気流にて濃縮することにより、香气濃縮物 100 µL を得た。

3. 2. 2. 3 GC-MS

下記条件とした GC-MS で香气成分分析を行った。

装置：アジレントテクノロジー社製 GC/MSD5975C,
注入方法：スプリットレス (1 min, 注入口温度 240 °C),
キャリアガス：ヘリウム (流速：2 mL/min.), カラム：
DB-WAX (60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 µm), オーブ

ン温度：40 °C (2 min 保持) -240 °C (5 °C/min, 25 min 保持), EI-MS：フルスキャンモード (m/z 30-280)

3. 2. 3 結果

3. 2. 3. 1 煎茶, LTPGT, NTPGT の香气成分

3 種の茶から検出されたイオンピークを NIST のライブラリー (一部標品との比較) と比較し 45 成分を同定した (表 3. 2-1)。LTPGT で検出された成分は 3 種のうちでもっとも多く、43 種であった。続いて煎茶が 42 種、NTPGT が 35 種であった。内部標準 (ethyl decanoic acid) とのピーク面積比の合計は煎茶と比べて LTPGT が約 4.6 倍、NTPGT が約 1.4 倍であった。LTPGT で最も多かったのは indole で全体の 60% を占めており、その他で 10% を超える成分はなかったが、続いて、jasmine lactone 約 8%, cis-linalool oxide (pyranoid) 約 6% だった。NTPGT では cis-linalool oxide (pyranoid), indole, trans-linalool oxide (pyranoid) の順で多くそれぞれ約 26%, 15%, 14% だった。煎茶は 2-(2-butoxyethoxy)-ethanol, cis-linalool oxide (pyranoid) の順で多くそれぞれ約 23%, 12% だった。

LTPGT と煎茶の成分数はほぼ同程度であるがそのバランスは大きく異なり、LTPGT では indole が顕著に増加している。NTPGT は 35 種と成分量は少ないが、ピーク面積比合計は煎茶よりも多かった。

生葉保管処理をしている LTPGT, NTPGT では上記成分のほか cis-jasmone や linalool, geraniol 等のアルコール系香气成分の割合がやや増加した。

表 3.2-1 LTPGT、NTPGT、煎茶で検出された香气成分*

Volatile compounds	LTPGT		NTPGT		Sencha	
	peak area ratio ^a	GC(%)	peak area ratio ^a	GC(%)	peak area ratio ^a	GC(%)
1-Hexanal	0.04	0.21	0.04	0.81	0.04	0.96
1,2-Dimethylbenzene	0.01	0.06	n.d.		0.02	0.41
1-Penten-3-ol	0.01	0.08	n.d.		0.02	0.42
Heptanal	0.03	0.15	0.03	0.66	0.02	0.48
1,3-Diethylbenzene	0.02	0.09	0.03	0.53	0.04	0.95
4-Hydroxy-4-methyl-2-pentanone	0.05	0.31	n.d.		0.13	3.41
(Z)-3-Hexen-1-ol ^b	0.03	0.19	0.07	1.31	0.04	0.96
Nonanal ^b	0.02	0.10	n.d.		0.02	0.46
trans-Linalool oxide (furanoid) ^b	0.10	0.57	0.12	2.35	0.04	1.06
cis-Linalool oxide (furanoid) ^b	0.15	0.87	0.14	2.72	0.04	1.10

表 3.2-1 LTPGT、NTPGT、煎茶で検出された香気成分（つづき）

Volatile compounds	LTPGT		NTPGT		Sencha	
	peak area ratio ^a	GC(%)	peak area ratio ^a	GC(%)	peak area ratio ^a	GC(%)
2-Ethyl-1-hexanol	0.04	0.26	0.03	0.54	0.04	1.08
Benzaldehyde	0.03	0.17	n.d.		n.d.	
Linalool ^b	0.18	1.05	0.08	1.52	0.02	0.57
Hotrienol	0.02	0.09	0.02	0.30	n.d.	
(Z)-3-Hexenyl hexanoate	0.03	0.17	0.01	0.28	0.04	1.12
Acetophenone ^b	0.02	0.12	n.d.		0.03	0.68
γ-Caprolactone	0.03	0.15	n.d.		0.02	0.58
4-Ethyl-benzaldehyde	0.03	0.18	0.03	0.52	0.03	0.89
3-Methylnonane-2,4-dion	0.03	0.17	0.02	0.42	0.03	0.78
<i>trans</i> -Linalool oxide (pyranoid) ^b	0.39	2.21	0.77	14.98	0.10	2.54
<i>cis</i> -Linalool oxide (pyranoid) ^b	1.18	6.74	1.35	26.21	0.47	12.49
2-(2-Butoxyethoxy)-ethanol	0.59	3.36	n.d.		0.88	23.20
Geraniol ^b	0.10	0.58	0.12	2.38	0.11	2.79
Benzyl alcohol ^b	0.09	0.49	0.10	2.02	0.07	1.91
2-Phenylethanol ^b	0.05	0.28	0.06	1.09	0.04	0.98
β-Ionone ^b	0.01	0.05	n.d.		0.02	0.44
Heptanoic acid	0.03	0.17	n.d.		0.06	1.63
<i>cis</i> -Jasmone ^b	0.60	3.40	0.18	3.58	0.03	0.74
(Z)-3-Hexenoic acid	n.d.		0.05	1.06	0.09	2.24
Phenol	0.02	0.14	0.02	0.36	0.04	0.95
Nerolidol ^b	0.24	1.36	0.02	0.45	0.02	0.42
Octanoic acid	0.09	0.53	0.03	0.58	0.15	4.01
Bovolide ^b	0.16	0.91	0.11	2.11	0.13	3.39
Nonanoic acid	n.d.		0.09	1.79	n.d.	
δ-Decalactone ^b	0.04	0.21	0.02	0.32	0.01	0.17
Methylanthranilate ^b	0.12	0.66	0.04	0.85	0.08	2.05
Jasmine lactone ^b	1.45	8.24	0.15	2.83	0.14	3.64
Methyl jasmonate ^b	0.22	1.26	0.07	1.37	0.06	1.47
4-Vinylphenol	0.07	0.42	0.04	0.77	0.05	1.23
Methyl epijasmonate ^b	0.09	0.54	0.02	0.39	0.02	0.52
Indole ^b	10.35	59.01	0.82	15.81	0.12	3.11
Coumarin ^b	0.24	1.39	0.10	1.96	0.10	2.73
Vanillin ^b	0.04	0.22	0.03	0.63	0.04	1.02
7-Methoxy-coumarin ^b	0.46	2.62	0.32	6.18	0.36	9.49
Raspberry ketone ^b	0.03	0.20	0.02	0.29	0.04	0.93
	17.54	100	5.17	100	3.80	100

^a内部標準に対するピーク面積比 ^b標準物質と比較し同定した

*Katsuno et. al. (2014) *Food Chemistry*, **148**, 388-395

3. 2. 3. 2 生葉保管時間が荒茶香氣成分に及ぼす影響

NTPGT で量的な変化の大きかった indole, jasmine lactone, linalool および傷害ストレスに反応する植物ホルモンの一つでもある cis-jasmone, methyl jasmonate (Blee 1998 松井 2000) に注目し, 24 時間まで 15 °C, 25 °C で保管した生葉から製造した荒茶の香氣成分量の変動を調査した (図 3. 2-1 (a)~(e)).

15 °C 保管では, indole, jasmine lactone, cis-jasmone は保管時間とともに増加し, 保管時間 16 時間で最大を示した後減少した. 一方 25 °C 保管では 4-8 時間で最大を示し, その最大値は 15 °C よりも小さくその後減少した.

Linalool, methyl jasmonate 量は 15 °C, 25 °C 保管とも 4 時間までは増加したが, それ以後の変化は小さくほぼ一定で, 保管温度による差は見られなかった.

3. 2. 4 考察

茶の香氣成分は 500 種以上とも言われているが, 本研究では 45 種の同定にとどまった. 同定できていないピークはこのほかに多数あり, 試料量が 2 g と少ない手法をとったが, 処理の違いを香氣成分量に求める上では十分であった. 特に, 官能評価からも, 生葉保管によっていわゆる萎凋香に分類される花様の甘い香りが, 特徴的に増加することが明らかとなり, 紅茶や烏龍茶の主要香氣成分といわれているアルコール系香氣や, jasmine lactone, indole も十分に検出することができた.

LTPGT では烏龍茶の特徴香氣成分である jasmine lactone, indole の増加が顕著で, 蒸製製造ではあるものの, 香りの特徴は烏龍茶に近い方向へ動いているものと考えられる. NTPGT においてもその量的変化は LTPGT と比べ小さいものの, indole の増加が認められた. 全体として検出される香氣成分の数が減少したことは, 生葉保管処理イコール香氣増強のための処理という認識からは意外な結果であったが, 全体総量では煎茶よりも増加していた.

特徴的な香氣成分の経時的変化を確認したところ, 15 °C 保管処理では 16 時間で indole, jasmine lactone, cis-jasmone が最大値を示したことから, 山間地の茶がかつて, 一晚生葉を保管した後製造をしたことで, 香り高かったと言われていることの裏付けの一つとなると考えられる.

官能評価では同一保管時間のものを比べる目的があったことから 25 °C 保管も 16 時間のものを利用した. 経時的変化を確認すると 4 時間に最大値を示すものが多く, 温度が高いことで最大値が 15 °C に比べ早いことから, 16

時間よりも 4 時間のほうが香りが強い可能性が示唆された. しかし, その最大値は 15 °C 処理よりも小さく, 香りの強い茶を作るという点では高すぎる温度はむしろマイナス効果であることが示唆された.

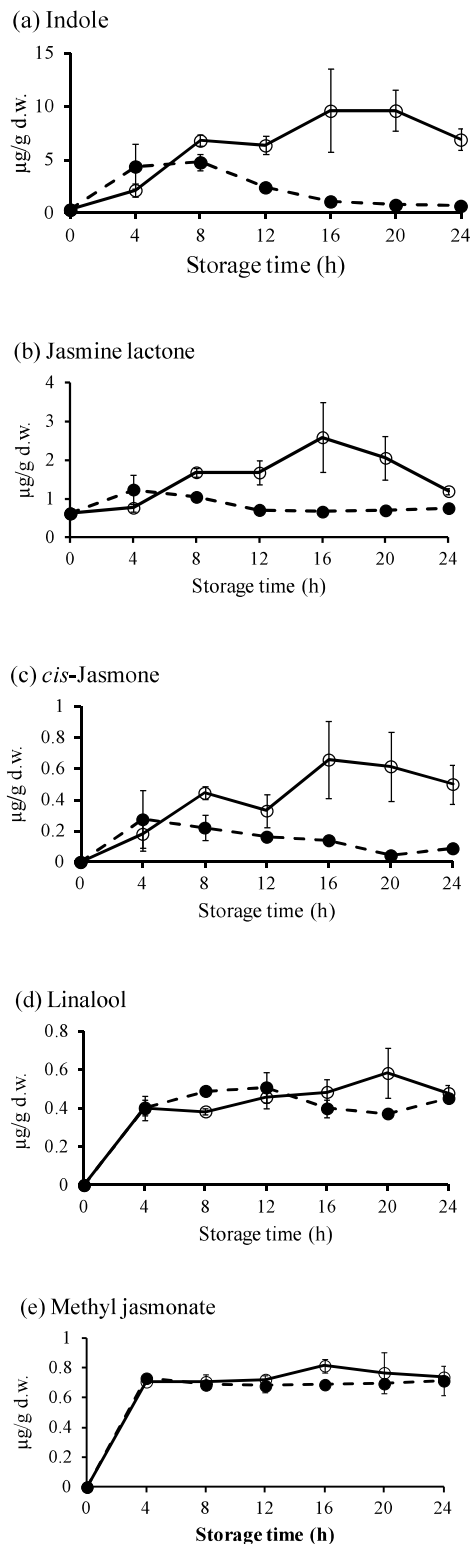


図 3.2-1 生葉保管処理時間が荒茶香氣に及ぼす影響*
生葉保管温度 (○)15°C (●)25°C

3. 3 香気寄与成分の探索

3. 3. 1 目的

前節により、生葉低温保管処理によって、花様の甘い香り特性が強化されることが明らかとなり、香気成分の増加も確認することができた。しかし、人間の鼻が感じるにおいと量的な関係は一致せず、量的に多くても人間の感度の低いもの、あるいは量的に少なくとも感度の高いものがあるため、成分量のみで、香りへの貢献度を評価することはできない。また、機器分析では検知できない微量成分が、香りへの貢献度が高い可能性があり、生葉低温処理が影響を与える重要成分の特定に至っていない。

この問題を解決するにあたり、GC においかぎシステムを利用した AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) 法が有効であり、寄与度を考慮し食品の香りを評価できる (Grosch 1993, 1994, Guth 1997)。茶では Guth ら (1993) が緑茶、紅茶粉末のヘッドスペースの香気について調査している。緑茶では熊沢ら (1999, 2002) が AEDA 法により貢献度の高い成分として 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone 等を新たな香気成分として報告している。

そこで、GC においかぎシステムを利用した AEDA 法により、生葉低温保管処理によって強化される花様香気に寄与する成分の特定を試みた。

3. 3. 2 材料及び方法

3. 3. 2. 1 茶試料

3. 1 で使用した茶試料を用いた。

3. 3. 2. 2 香気成分の抽出

3. 2 と同様の方法で抽出した。

3. 3. 2. 3 GC-MS オルファクトメトリ (GC-MS/O)

カラム出口で MS とにおいかぎ装置 (ゲステル社製) に分岐させ、においかぎと MS 分析を同時に行った。においかぎを行い、においの有無及びその香調を記録した。においかぎ装置はカラムから溶出する成分の滞留を防ぐために 280 °C に加熱し、さらに窒素を通じた。GC-MS は 3. 2 と同条件で使用した。

3. 3. 2. 4 香気成分希釈分析法 AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis)

3. 3. 2. 2 で調製したそれぞれの香気抽出物を、ジエチルエーテル : イソペンタン (2 : 1) の混合溶媒

で 4 倍希釈系列の希釈液を作成し、その 2 μ L を 3. 3. 2. 3 に示した GC-MS/O に注入し、各成分の FD (Flavor Dilution) ファクターと香調を測定した。

3. 3. 2. 5 物質の同定

各成分を標準物質の Kovats インデックス、マススペクトル、香調と比較して同定を行った。

3. 3. 3 結果

GC においかぎおよび AEDA により FD ファクター $4^2 \sim 4^5$ と貢献度の高いピークを LTPGT で 20 ピーク、NTPGT で 18 ピーク、煎茶で 9 ピークを検出した。3 種の茶から合計で貢献度の高いピークを 22 ピーク検出した (表 3. 3-1)。

これら成分のうち 13 ピーク (5, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23) は標準品とのコバッツインデックス、マススペクトル (図 3. 3-1)、香調を比較し決定した。6 ピーク (1, 2, 4, 6, 12, 14) は GCMS のイオンピークが小さくマススペクトルを標準品と比較することはできなかったが、コバッツインデックス、香調を比較し決定した。3 ピーク (3, 9, 20) は成分の特定に至らなかった。

LTPGT では特に 12 ピーク (No.2, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22) の FD ファクターが 4^3 以上と大きかった。

一方、NTPGT、煎茶で FD ファクター 4^3 以上を示したピークはそれぞれ、わずか 6 および 3 ピークだった。

これら貢献度の高い成分はフローラル、フレッシュフローラル、ゲラニウム様の香調を示した。

3. 3. 4 考察

LTPGT で貢献度の高かった 12 成分は、LTPGT のフローラル感に大きく貢献していると考えられる。

ピーク 7 および 22 はそれぞれ 3-methylnonane-2,4-dione, coumarin と同定した。3-methylnonane-2,4-dione の香調は、果実様あるいはグリーンを示すこと (Guth et al. 1993, Kumazawa et al. 1999, Hattori et al. 2003, 2005) が報告されており、クマリンは、桜の花様の香調を示すと報告されている (Yang et al. 2009a, b)。

加えて、(5Z-Octa-1,5-dien-3-one (No.2) の FD ファクターは 4^4 と大きくゲラニウム様、金属様の香調を示すと報告されている (Guth et al. 1993, Kumazawa et al. 1999, Hattori et al. 2003, 2005)。(5Z-Octa-1,5-dien-3-one はグリーンの香に貢献している可能性があるが、官能評価においてグリーンの評価は LTPGT では小さかったことから、ほかの成分の増加によってマスキングされていることが考えられる。

表 3.3-1 LTPGT、NTPGT、煎茶の香りに寄与する香気成分*

No.	RI	compound	odor quality	FD factor			peak area ratio		
				LTPGT	NTPGT	Sencha	LTPGT	NTPGT	Sencha
1	1307	1-Octen-3-one ^b	mushroom-like	<16	16	<16	nd	nd	nd
2	1380	(5Z)-Octa-1,5-dien-3-one ^b	geranium-like	256	16	16	nd	nd	nd
3	1395	unknown	geranium-like	16	64	16	nd	nd	nd
4	1463	Methional ^b	fruity	16	<16	<16	nd	nd	nd
5	1550	Linalool ^a	fresh floral	64	16	<16	1.125	0.468	0.135
6	1594	(2E,6Z)-Nona-2,6-dienal ^b	fresh green	16	16	16	nd	nd	nd
7	1726	3-Methylnonano-2,4-dione ^a	floral	1024	64	64	0.297	0.238	0.310
8	1854	Geraniol ^a	fresh floral	16	64	<16	0.200	0.645	0.232
9	1874	unknown	minty	16	nd	<16	nd	nd	nd
10	1957	β -Ionone ^a	floral	64	16	64	0.059	0.031	0.043
11	1965	cis-Jasmone ^a	floral	16	nd	<16	2.193	0.558	0.074
12	2051	Furaneol ^b	sweet	16	<16	<16	nd	nd	nd
13	2180	Bovolide ^a	fresh floral	64	16	<16	1.201	0.623	0.931
14	2184	Sotolon ^b	spicy	<16	16	<16	nd	nd	nd
15	2222	δ -Decalactone ^a	floral, sweet	64	16	16	0.282	0.055	0.026
16	2262	Methyl anthranilate ^a	fruity	16	<16	<16	0.160	0.126	0.033
17	2291	Jasmine lactone ^a	floral, sweet	256	16	<16	12.646	0.792	0.527
18	2359	Methyl jasmonate ^a	floral	64	16	<16	0.672	0.224	0.152
19	2417	Methyl epijasmonate ^a	fresh floral	256	256	16	0.380	0.110	0.104
20	2435	unknown	fresh floral	256	256	16	nd	nd	nd
21	2470	Indole ^a	floral	1024	16	<16	204.894	15.078	2.210
22	2489	Coumarin ^a	floral	1024	256	64	2.152	1.019	1.050
23	2589	Vanillin ^a	sweet	<16	16	<16	0.369	0.197	0.290

^a標準物質の Kovats インデックス、マススペクトル、香調と比較し同定した。^b十分なマススペクトルが得られなかったため、標準物質の Kovats インデックス、香調と比較し同定した。

*Katsuno et. al. (2014) Food Chemistry, 148, 388-395

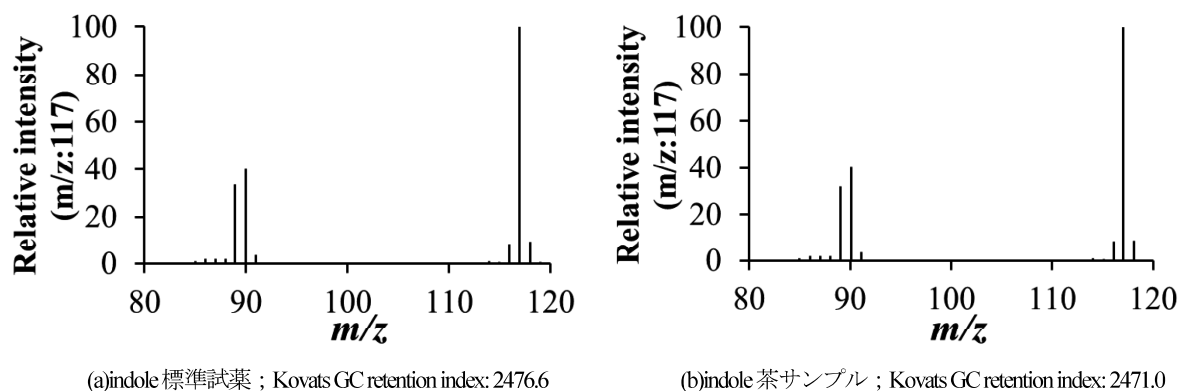


図 3.3-1 成分同定に用いたマススペクトルの一例

Geraniol (No.8, FDF=4³, 花様) と未同定成分 (No.3, FDF=4³, ゼラニウム様) は, NTPGT で最も貢献度が高かった。

(*2*-Methyl epirjasmonate (No.19, FDF=4⁴) は LTPGT, NTPGT で高く, 煎茶で低かった。この成分は植物の傷害応答物質として知られており (Creelman et. al. 1992), 摘採とその後の保管によって増加したと考えられる。

LTPGT, NTPGT の香りに貢献していると考えられる未同定成分 (No.20, FDF=4⁴) は, その香調からフレッシュフローラルに貢献していると考えられる。

Indole (No.21) は花様の香調を示すほか, 他の香りを強調することも知られている (Hattori et al. 2003, 2005)。さらに前節で示したとおり, LTPGT と NTPGT で蓄積量が大きく異なった。

Jasmine lactone (No.17) の FD ファクターは 4⁴ で, LTPGT のフローラルに貢献していると考えられる。

Indole 量はウーロン茶の製造工程中に増加することが知られている (Tokitomo et. al. 1984)。ウーロン茶製造工程では indole 量が増加するとともに, linalool, geraniol, (*2*-3-hexenol, benzyl alcohol, 2-phenylalcohol 等のアルコール系香気)の配糖体の加水分解が促進される (Wang et al. 2001)。

日本および中国の緑茶に貢献度の高い香りは, meaty, metallic, fatty, honey-like, floral, animal-like との報告もある (Guth et al., 1993; Kumazawa et al. 1999, Hattori et al. 2003, 2005)。本研究では, 煎茶の主要な香りはグリーンであった。4-Methoxy-2-methyl-2-butanethiol, 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone が緑茶の香りに重要な物質であるとの報告 (Kumazawa et al. 1999) もあるが, 本研究ではこれら成分を確認することはできなかった。これら成分は roast の香調を持つと報告されたい。Kumazawa らの報告で用いた茶は市販茶であり, 通常市販されている煎茶は荒茶製造後に火入と呼ばれる焙煎工程を経ているため, 焙煎様の香を持つ 4-methoxy-2-methyl-2-butanethiol, 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone が主要成分として検出されたと考えられる。本研究で使った茶サンプルは, 焙煎工程を経る前の荒茶であるため検出されなかったことが考えられる。

3. 4 総合考察

官能評価および, 香気成分組成の分析の結果, 生葉を保管処理することで, 茶の香気成分特性が大きく変化することが明らかになった。さらに保管処理温度により香気特性が異なることが明らかとなった。

烏龍茶に見られる製造工程の複雑さは第 2 章で簡単に触れたが, それぞれの工程の有無が香気に及ぼす影響について竹尾ら (1985) の報告がある。しかし最も時間を要する室内萎凋における室温の影響についての言及は見られない。

製造工程に加え, 茶の香り特性は, 品種やその摘採芽の成熟度によって大きく異なることが報告されている。竹尾ら (1985) はモノテルペンアルコール組成からみた品種間の特徴をテルペンインデックス ($TI = (\text{linalool} + \text{linalool oxide}) / (\text{linalool} + \text{linalool oxide} + \text{geraniol})$) を用いて表現している。また, 小柳津ら (2002) は同一品種から採取した, 成熟度の異なる原料を用いて煎茶を製造し, 茶審査で用いられる, みる芽香, こわ葉臭等原料の成熟度に由来する評価用語と香気成分の関係を示している。

上記のような条件を排除し, 保管温度の影響を反映できるようにするため, 本研究では, 同一圃場から同一品種 (「さやまかおり」) の新芽を摘採し, 同時に処理した。

官能評価における評価用語を以下の方法で抽出, 選定し, 官能評価軸を決定した。すなわち, 茶の評価やイメージにとらわれず, 香りから連想する物, 情景, 物質など多種の用語を茶の香りを嗅ぎながら抽出し, その特性から 7 種の評価用語に分類, 選定することができた。従来の日本茶の評価法は, その欠点を中心とした用語が多く, どのようなイメージの香りがどれくらい強い (弱い) のかを評価できない。したがって, 本官能評価ではできるだけ少ない評価軸で, 簡単に表せることを目標としたことから, 新たに評価軸を検討した。

その結果, 抽出された言語は多岐に富んでいたが, 詳細に整理すると一定の傾向が見られ, 煎茶, NTPGT, LTPGT のそれぞれを表現する特徴的な香りに関する言語が多く抽出されていた。Green, floral にはそれぞれ, さらに質の違うものがあることがうかがえる言語が含まれていた。Floral では花の種類によって, 軽やかな花, あるいは重厚感のある花が特徴的な言葉として抽出され, それを分けてとらえていることがうかがわれた。

整理した 7 つの評価軸は少なくとも, 生葉保管処理条件の違いと香気特性を評価する上では十分な表現と考えられる。

上記により作成した 7 種の評価軸を基に煎茶, LTPGT, NTPGT を評価することで, それぞれの特徴を端的に表すことができ, 処理方法, 処理時間による香りの相違, 変化を推察することができる。緑茶は, これまでに評価されたように green を主体としている。その中には爽快感を伴うものもあり, 爽快感は NTPGT でやや増加してい

る fresh green で表現可能であり、25℃という条件が爽快感を強めるものと考えられる。LTPGT は floral が大勢を占めており、15℃という条件で floral 香調を高める。すなわち、摘採後保管処理時の温度条件を検討することで、目的とする香りのイメージに適した茶の製造方法を提案可能である。

保管処理条件の相違により香りの質が官能評価結果で異なること、その相違が個々の香気成分の量的相違、香気特性によって裏付けられた。例えば、LTPGT では floral が顕著に強まっていることから、成分的にも大きな変化が生じていることが予想された。成分量の増加と物質の香調から、indole, jasmine lactone, methyl jasmonate の関与の高さがうかがえた。加えて生葉保管処理によって、紅茶での増加が顕著であるアルコール系香気 (linalool, linalool oxides, geraniol 等) も 15℃, 25℃保管処理において、共に多いことから、その関与の高さも想定された。

そこで、これら成分の時間的な変動を確認することで、生葉保管処理が香気増加にどう影響を与えているのかについて調査したところ、indole, jasmine lactone, cis-jasmone に特徴的な変動をみることができた。15℃条件 (LTPGT 保管処理条件) では、これら成分の増加は緩やかではあるものの、16 時間にピークを迎え、その後減少するという特徴があり、25℃条件 (NTPGT 保管処理条件) では、4 時間にピークを迎え、その後減少する特徴がみられた。生葉処理温度が高いほど香気成分量の蓄積ピークが早く、処理温度が低いほど香気成分蓄積ピークが遅いことから、その生合成に温度が影響を与えていることが示唆される。しかし、温度が高くても最大値が低温より低く、さらにどちらの温度でも減少に転じることから、これら成分は最終産物ではなく、何らかの成分の間物質であることが想定される。

より香りの強い茶を製造する上では、最大値を示すところ (官能的にも特定可能) で次の工程に移行し、最終製品である茶に香気成分をより多く残すことが重要になることから、香気成分の生合成、代謝機構を解明することが重要であることが明らかとなった。

一方、これら成分は量的な変動は大きいものの、香りに対する寄与が低い物質であった場合、その変動をとらえる重要性は低い。茶の香気に関する多くの報文においても、その成分量に言及し成分の重要度を示しており、分析法、官能試験の進歩により、最近の研究では、寄与の高い成分の同定が進んでいる。

本研究では、GC におおきシステムを利用した AEDA 法により、それぞれの香気成分とその香調と貢献

度を解析した。その結果 FD ファクター 4³以上を示す貢献度の高い成分は、NTPGT で 12 成分、LTPGT で 6 成分、煎茶で 3 成分であった。したがって、生葉保管処理によって製造される LTPGT, NTPGT においては、煎茶に比べ香りが強化され、その寄与成分も増加していることが明らかとなった。

LTPGT では、FD ファクター 4⁴の物質のうち、3 化合物を (5 β -octa-1,5-dien-3-one : geranium-like, jasmine lactone : floral, methyl epijasmone : fresh floral と同定した。FD ファクター 4⁵の物質のうち 3 化合物を 3-methylnonane-2,4-dione : floral, indole : floral, coumarin : floral と同定した。上記のうち (5 β -octa-1,5-dien-3-one, methyl epijasmone, 3-methylnonane-2,4-dione, coumarin の 4 化合物は GCMS のピーク面積から判断すると、含有量が極めて小さいにもかかわらず香りに対する影響力が大きいと考えられる。一方 jasmine lactone, indole は煎茶、NTPGT と比べて LTPGT でその含有量が大きく、物質としての香りの強さに加え、量的増加が香りに影響を与えていると考えられる。特に後者の 2 化合物は、香りへの貢献度に加え、成分量として変動をとらえやすく、製茶方法の検討のための指標とする物質として有効であると考えられる。しかしながら、前者 4 化合物は含有量が小さいことから、現在の手法の範囲では、製茶工程中の変動をとらえることは難しい。

さらに、indole はその物質特有の香調のみならず、茶の香気を強化する特性を持つことが報告されている (Hattori et al. 2005) ことから、その生合成、代謝経路を明らかにすることが重要と考えられた。

参考文献

- Blee, E. (1998): Phytooxylipins and Plant Defense Reactions, *Progress in Lipid Research*, 37: 33-72
- Creelman, R. A., Tierney, M. L. and Mullet J. E. (1992): Jasmonic acid / methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 4938-4941
- Grosch, W. (1993): Detection of Potent Odorants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis, *Trends in Food Science and Technology*, 4: 68-73
- Grosch, W. (1994): Determination of Potent Odourants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) and Calculation of Odour Activity Values (OAVs), *Flavour and Fragrance Journal*, 9: 147-158

- Guth, H. and Grosch, W. (1993): Identification of Potent Odourants in Static Headspace Samples of Green and Black Tea Powders on the Basis of Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA), *Flavour and Fragrance Journal*, 8: 173-178
- Guth, H. (1997): Identification of Character Impact Odorants of Different White Wine Varieties, *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3022-3026
- Gutierrez Afonso V. L. (2002): Sensory Descriptive Analysis Between Wite Wines Fermented with Oak Chips and in Barrels, *J. Food Science*, 67: 2415-2419
- Hattori, S., Tagagaki H. and Fujimori, T. (2003): Evaluation of Japanese Green Tea Extract Using GC/O with Original Aroma Simultaneously Input to the Shiffing Port Method (ASIS), *Food Sci. Technol. Res.*, 9: 350-352
- Hattori, S., Tagagaki H. and Fujimori, T. (2005): Identification of Volatile Compounds which Enhance Odor Notes in Japanese Green Tea using the OASIS (Original Aroma Simultaneously Input to the Sniffing port) method, *Food Sci. Technol. Res.*, 11: 171-174
- Kumazawa, K. and Masuda, H. (1999): Identification of Potent Odorants in Japanese Green Tea (Sencha), *J. Agric. Food Chem.*, 47: 5169-5172
- Kumazawa, K. and Masuda, H. (2002): Identification of Potent Odorants in Different Green Tea Varieties Using Flavor Dilution Technique, *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5660-5663
- Lee, J. and Chambers, D. H. (2007): A Lexicon for Flavor Descriptive Analysis of Green Tea, *J. Sensory Studies*, 22: 256-272
- 松井健二 (2000) : 植物生理活性短鎖アルデヒド生合成系の生理・生化学的研究, *日本農芸化学会誌*, 74:1319-1328
- 水上裕造 (2012) : ほうじ茶のヘッドスペースと浸出液に含まれる香気寄与成分, *茶業研究報告*, 114 : 65-72
- 小柳津勤、下田満哉、松本清、後藤正 (2002) : 茶芽の熟度による緑茶香気成分の変化, *日本食品科学工学会誌*, 49: 327-334
- Shimoda, M., Shigematsu, H., Shiratsuchi, H. and Osajima, Y. (1995): Comparison of Volatile Compounds among different Grades of Green Tea and Their Relations to Odor Attributes, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1621-1625
- 竹尾忠一、津志田藤二郎、P. K. マハンタ、田代正樹、今村義成 (1985) : 烏龍茶と紅茶の香気に関する食品科学的研究, *茶業試験場研究報告*, 20: 91-180
- Tokitomo, Y., Ikegami, M., Yamanishi, T., Juan, I.-M. and Chiu, T.-F. (1984): Effects of Withering and Mass-Rolling Processes on the Formation of Aroma Components in Pouchong Type Semi-fermented Tea, *Agric. Biol. Chem.*, 48: 87-91
- Torres-Penaranda, A. V. and Reitmeier, C. A. (2001): Sensory Descriptive Analysis of Soymilk, *J. Food Science*, 66: 352-356
- 宇都宮仁 (2003) : 清酒官能評価パネルの選抜・訓練法, *日本醸造協会誌*, 98: 312-321
- 宇都宮仁、磯谷敦子、岩田博 (2004a) : 清酒に添加した匂い物質の閾値 (第1報), 99: 652-658
- 宇都宮仁、磯谷敦子、岩田博 (2004b) : 清酒に添加した匂い物質の閾値 (第2報), 99: 729-734
- Yang, Z., Dong, F., Shimizu, K., Kinoshita T., Kanamori, M., Morita, A. and Watanabe, N. (2009a): Identification of coumarin-enriched Japanese green teas and their particular flavor using electronic nose, *J. Food Engineering*, 92: 312-316
- Yang, Z., Kinoshita, T., Tanida, A., Sayama, H., Morita, A. and Watanabe, N. (2009b): Analysis of coumarin and its glycosidically bound precursor in Japanese green tea having sweet-herbaceous odour, *Food Chemistry*, 114: 289-294

第4章 生葉低温保管処理工程における indole 蓄積機構の解明

4. 1 生葉保管処理中の indole 蓄積, 発散量の変化

4. 1. 1. 目的

前章までに、生葉低温保管処理により花様の香りが強化され、その寄与成分として(5Z)-octa-1,5-dien-3-one : geranium-like, jasmine lactone : floral, methyl epijasmone : fresh floral, 3-methylnonane-2,4-dione : floral, indole : floral, coumarin : floral が重要であることを明らかにした。摘採直後のチャ生葉は青いにおいが主流で、甘い花の香りは感じられない。したがって、摘採直後のチャ新芽を原料とする煎茶においては上記成分は存在するものの、煎茶香氣に対するこれら成分の貢献度は低い。

紅茶「ダージリン」や烏龍茶「東方美人」の特徴的な香り成分はチャノミドリヒメヨコバイ (*Empoasca onukii* Matsuda) の食害ストレスにより増加することが知られている (Kawakami et. al. 1995, Ozawa et. al. 2013, Kinoshita et. al. 2013)。また、香氣成分の一つであるジャスモン酸は傷害応答物質として知られている (Christensen, S. A. et. al. 2013)。これらのことから、摘採後の生葉低温保管処理によって増加する成分についても、低温ストレスを受けたことによる応答反応であることが示唆され、葉内における物質代謝の変化によることが考えられる。

低温保管処理による成分の蓄積, 変化量が大きく、香りへの貢献度も高い indole は植物ホルモンの一つである IAA(indole-3-acetic acid) をはじめとした、種々のアルカロイドの骨格を形成している物質であること (船山 1998) から、その蓄積機構を明らかにすることは、茶の香氣発揚技術の確立とともに、植物のストレス応答を解明するうえでも有意義である。

前章において、保管処理した生葉から製造した荒茶の indole 量について明らかにしたが、茶製造工程には蒸熱、温風乾燥の工程があり、その間に多くの香氣成分が揮散 (発散) する。Indole の生合成、代謝経路を明らかにする上では乾燥工程前の原料である生葉における量的な変動をとらえ、荒茶に蓄積した indole が生葉処理段階で蓄積されることを確認する必要がある。そこで、本節では生葉保管処理中のインドールの蓄積量, 及び発散量の変化を明らかにする。

4. 1. 2 材料及び方法

4. 1. 2. 1 チャ試料

4. 1. 2. 1. 1 蓄積量

静岡県農林技術研究所茶業研究センターで慣行栽培されている「さやまかおり」を使用した。2012年5月 (一番茶) に一心三〜四葉の新芽を摘み取り、10 g をステンレス製バット (115 W × 85 L × 59 H mm) に入れ、25 °C 及び 15 °C (相対湿度 70%) のインキュベーターで最長 24 時間保管処理した。チャ試料は 4 時間毎に取り出し、液体窒素で速やかに凍結後 -80 °C で分析に供するまで保管した。

4. 1. 2. 1. 2 発散量 (図 4.1-1)

静岡県農林技術研究所茶業研究センターで慣行栽培されている「さやまかおり」を使用した。2013年5月 (一番茶) に一心三〜四の新芽を摘み取り、20 g をサンプルバッグ (Tedlar™ bag, GL Sciences Inc.) に入れ、25 °C および 15 °C (相対湿度 70%) の暗室で最長 24 時間保管処理した。サンプルバッグへ、活性炭フィルター (GL Sciences Inc.) を通した空気を毎分 300 mL で送りこみ、サンプルバッグの出口に Tenax TATM カラム (Gerstel K. K.) を装着し、発散香氣成分を吸着させた。カラムは 4 時間毎に取り換えた。吸着した香氣成分は GC-MS で分析した。

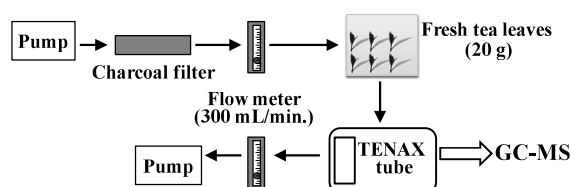


図 4.1-1 生葉からの発散香氣回収方法

矢印は空気の流れを示す

4. 1. 2. 2 生葉香氣成分の抽出

凍結チャ試料を液体窒素とともに乳鉢で粉碎し、その 2 g にジエチルエーテル 5 mL と内部標準としてエチルデカノエート 10 µg を含む酢酸エチル溶液 10 µL を加え、15 °C で 16 時間振とう抽出した。香氣抽出液をグラファイトカーボンカラム (InertSepGC : GL Sciences Inc.) を用いてクロロフィルを除去した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、窒素気流にて濃縮することにより、香氣濃縮物 100 µL を得た。

4. 1. 2. 3 GC-MS

4. 1. 2. 3. 1 生葉香氣成分の分析

下記条件とした GC-MS で香氣成分分析を行った。

装置：アジレントテクノロジー社製 GC/MSD5975C,
注入方法：スプリットレス（1分，注入口温度 240℃），
キャリアガス：ヘリウム（流速：2 mL/min.），カラム：
DB-WAX(60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, オープン温
度：40℃(2 min 保持)-240℃(5℃/min, 25 min 保持),
MS：フルスキャンモード(m/z 30-280)

4. 1. 2. 3. 2 発散香氣成分の分析

Tenax TA™ カラムに吸着した香氣成分を TDU (Twister
Desorption Unit, Gerstel K. K.) 及び CIS4 (Cooled Injection
System, Gerstel K.K.) 試料導入装置により脱着させ，GC-
MS へ導入した．試料導入装置の条件は以下のとおりとし，
GC-MS 条件は 4. 1. 2. 3. 1 と同様とした．

TDU 温度：40-250℃（720℃/min, 2 min 保持），
CIS4：60℃-250℃（720℃/min, 5 min 保持），ガス流
量 20 mL/min

4. 1. 3 結果

4. 1. 3. 1 生葉における indole 蓄積量

生葉における indole 蓄積の変化を図 4. 1—2 に示し
た．また，荒茶における indole 蓄積量と比較するため，
前章の図 3. 2—1 (a) を参照した．

保管工程における生葉中の indole 量の変化は荒茶中の
indole 量に類似していた．荒茶 1 g は，およそその 5 倍量
の原料生葉に相当するため，それを考慮すると生葉で蓄
積された indole 量の半分以上は蒸熱，乾燥工程で失われ
ていることが分かる．15℃において，荒茶では 16 時間で
最大値を示したが，生葉では 12 から 20 時間での蓄積量
が大きく，24 時間で減少した．25℃ではその変化は生葉
と荒茶で同様の傾向を示し，4 から 8 時間で最大を示し，
12 時間以降減少した．

4. 1. 3. 2 生葉からの indole 発散量

生葉保管処理各時間毎の生葉からの indole 発散量を図
4. 1—3 に示した．

15℃保管では 12 時間までは増加し，それ以後減少した
ものの，比較的高い値を維持した．一方，25℃保管では
4 時間までが最も高い値を示したが 4-8 時間からは減少
傾向を示した．特に 8 時間以降で小さく，この変動傾向
は生葉における蓄積量と類似し，生葉における蓄積量が
大きくなると発散量も大きくなることが明らかとなった．

生葉から発散する indole の 24 時間までの総量は 15℃
で約 0.5 nmol/g f.w., 25℃で約 0.3 nmol/g f.w.である一方，

生葉蓄積量の最大値は 15℃で約 50 nmol/g f.w., 25℃で
約 40 nmol/g f.w. と蓄積量と比べ微量であった．

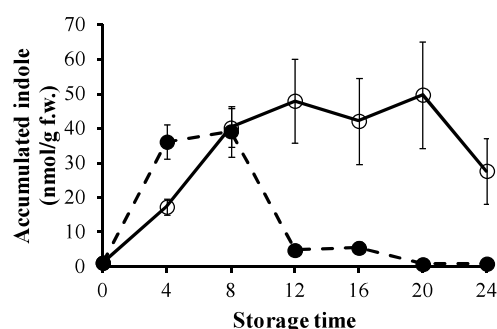


図 4.1-2 保管処理生葉の indole 蓄積量*
(○) 15℃, (●) 25℃

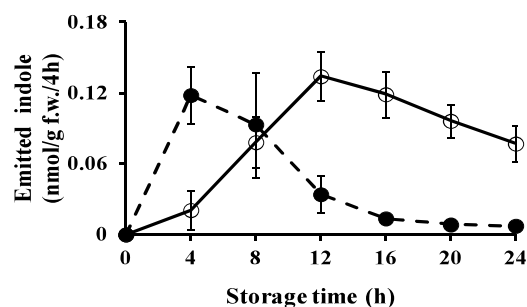


図 4.1-3 保管処理生葉からの indole 発散量*
(○) 15℃, (●) 25℃

4. 1. 4 考察

Indole 蓄積量の変動は荒茶と生葉で類似し，荒茶で蓄
積した indole は生葉保管処理により生葉で蓄積したもの
であることが明らかとなった．生葉で蓄積した indole の
半分以上は蒸熱，乾燥工程を経ることによって減少して
いるが，荒茶の香り特性に影響するに十分な量が残って
いることも明らかとなった．荒茶に多くの香氣成分を残
すためには，蒸熱，乾燥工程で減少させないこと，生葉
段階でいかに多くの成分を蓄積させるかの 2 点が重要で
ある．

生葉における indole 発散量の変動は蓄積量と類似し，
15℃, 25℃いずれも生葉での蓄積量の増加とともに発散
量が増加する．15℃において，12-20 時間の蓄積量に有
意な差は見られないが，その間の発散量が減少した．し
たがって，indole の発散量は蓄積量に依存するだけでな
く，低温による葉からの水分の発散量の抑制も考えられ
る．

発散量は蓄積量の 1%程度と微量であり，萎凋温度によ
る indole 蓄積量の相違は発散量に起因するものではない

ことが明らかになった。また、温度による indole 蓄積量の相違は、indole の生合成・代謝速度の相違によってもたらされていることが示唆された。

4. 2 Indole 前駆物質、代謝物の探索

4. 2. 1 目的

前節において、チャ生葉低温保管時の indole 高蓄積が、その発散量によるものでは無いことが明らかとなったことから、チャ生葉の低温保管時における indole の生合成、代謝が indole の高蓄積に関係することが示唆された。

シロイヌナズナにおいて indole は chorismic acid, anthranilic acid を前駆物質として 1-(O-carboxyphenylamino)-1-deoxy-ribose-5-phosphate, indole-3-glycerol phosphate を經由して生合成される。また、indole は L-tryptophan の生合成経路の中間体としても知られている (Radwanski et. al. 1995)。微生物においては各種 indole 酸化物が生産されることが知られている (Yuan et. al. 2011)。また、インディゴ生産植物は indole を 3-hydroxy-indole (indoxyl), 3-oxindole へと代謝することが知られている (Horvath, 1977a,b, Medvedev et. al. 1977)。さらに、エンドウマメ種子において indole から 3-hydroxy-indole, 3-oxindole へ変換されていると報告されている (Ishimaru et. al. 1977)。加えて、indole の酸化には cytochrome P450 酵素が関与している (Gillam, 2000)。

チャにおける indole は香気成分の1つとして知られているが、その生合成、代謝に関する報告はなく不明な点が多く、低温保管による indole 高蓄積メカニズムを解明する上で、チャにおける indole の生合成、代謝経路を明らかにする必要がある。

そこで、安定性同位体元素 (^{15}N あるいは ^2H) で標識した化合物 (anthranilic acid, L-tryptophan) の投与試験、メタボローム解析により indole の前駆物質、代謝物の探索を行った。

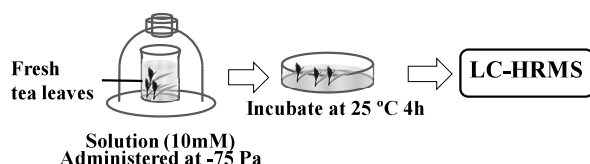


図 4.2-1 生葉への ^{15}N anthranilic acid, L- $^2\text{H}_5$ Tryptophan 投与方法

4. 2. 2 材料及び方法

4. 2. 2. 1 チャ生葉試料

静岡県農林技術研究所茶業研究センターで慣行栽培されている「さやまかおり」を使用した。2012年5月(一番茶)に一心三葉の新芽を手摘みし、葉と茎に分け、葉を試料として使用した。

4. 2. 2. 2 ^{15}N Anthranilic acid および L- $^2\text{H}_5$ tryptophan 投与方法

^{15}N Anthranilic acid 水溶液 (10 mM), L- $^2\text{H}_5$ tryptophan 水溶液 (10 mM), あるいは、両者の混合水溶液 (各 10 mM) を準備した。葉 1 g を各溶液 (50 mL) に浸し、 -75 Pa で1分間吸引することで葉に溶液を浸み込ませたのち、表面の溶液をふき取り、ガラス製ペトリシャーレ内に静置した (図 4. 2-1)。ペトリシャーレを $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相対湿度 70% のインキュベーターで4時間処理後、液体窒素で速やかに凍結させ、分析時まで $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管した。

4. 2. 2. 3 ^{15}N Indole および $^2\text{H}_5$ indole の分析

凍結保管試料を液体窒素とともに乳鉢で粉碎し、その 1 g にジエチルエーテル 3 mL と内部標準としてエチルデカノエート 10 μg を含む酢酸エチル溶液 10 μL を加え、 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ で16時間振とう抽出した。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加え脱水後窒素気流にて濃縮することにより、濃縮物 100 μL を得た。

4. 1. 2. 3. 1 の条件で GC-MS 分析を行い、同定は indole 標準品の保持時間と比較して行い、定量は ^{15}N indole についてはイオンピーク m/z 118 $[\text{M}]^+$, $^2\text{H}_5$ indole については m/z 122 $[\text{M}]^+$, 非標識体 indole については m/z 117 $[\text{M}]^+$ のイオンピークエリア面積値を基に、indole 標準品の m/z 117 のイオンピークにより作成した検量線から算出した。

4. 2. 2. 4 indole 関連代謝物の分析

凍結保管試料を液体窒素とともに乳鉢で粉碎し、その 100 mg に内部標準としてホルモノネチン (20 $\mu\text{g/mL}$) を含む 3 倍量のメタノールを加えホモジナイズした。懸濁液を遠心分離 (12,000 $\times g$, 10 min) したのちその上清を下記条件の LC-Orbitrap-MS 分析に供した。

装置 LC-Orbitrap-MS : Finnigan LTQ-Orbitrap XL (サーモフィッシャー製) を備えたアジレントテクノロジー社製 1200 システム, カラム : TSKgel カラム ODS-100V (3 $\times$ 50 mm, 5 μm ; TOSOH), 移動相 : 水 (A 液) ; アセト

ニトリル (B 液) ; 両液とも 0.1% (v/v) ギ酸を含む, グラジエント: B 液 3% (5 min 保持) –97% (5 min 保持), 流速: 0.5 mL/min, カラム温度: 40 °C, イオン化モード: ESI (+), イオン源温度: 300 °C, MS: フルスキャンモード (m/z 100-600)

物質の同定は保持時間と HRMS を基に行い, 定量は各物質のイオンピークエリア値とした.

4. 2. 3 結果

4. 2. 3. 1 $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid および $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与による indole の生成

m/z 117 (非標識 indole $[\text{M}]^+$) でのイオントレース上で検出されたピークを基に算出した indole の定量値, および m/z 117 のクロマトグラムを図 4. 2-2 に示した. $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区, 無投与区で indole 量は大きかった. 一方 $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与区および $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan+ $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区での増加は $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区, 無投与区に比べ小さかった.

m/z 118 ($[^{15}\text{N}]$ indole $[\text{M}]^+$) でのイオントレース上で検出されたピークを基に算出した $[^{15}\text{N}]$ indole の定量値, および m/z 118 のクロマトグラムを図 4. 2-3 に示した. 0h, $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与区, 無投与区ではほとんど検知されず, $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区, $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan+ $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区で大きかった.

m/z 122 ($[^2\text{H}_5]$ indole $[\text{M}]^+$) でのイオントレース上で検出されたピークを基に算出した $[^2\text{H}_5]$ indole 定量値, および m/z 122 のクロマトグラムを図 4. 2-4 に示した. $[^2\text{H}_5]$ indole は $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与区, および, $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan+ $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区でのみ検出されたが, その量は, $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区における $[^{15}\text{N}]$ indole 量の 20 分の 1 以下であった.

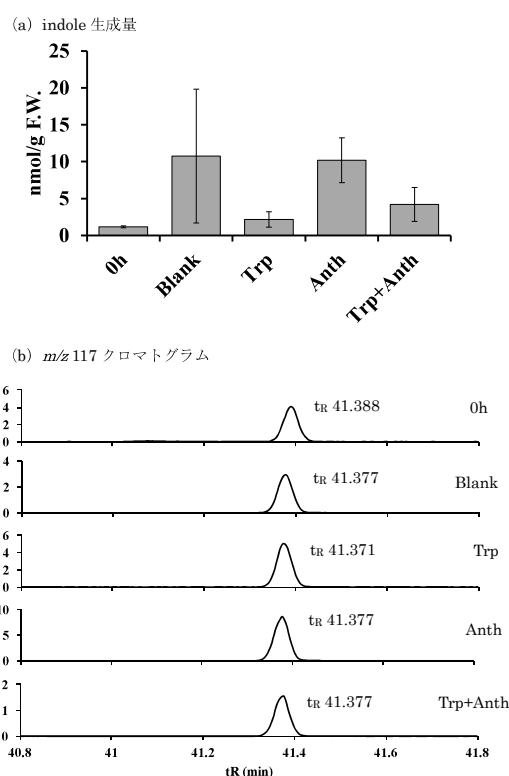


図 4.2-2 $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ Tryptophan および $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与による indole (m/z 117) 生成量 (a) および m/z 117 のクロマトグラム (b)

0h ; 摘採直後の生葉, Blank ; 水投与区,
Trp ; $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与区,
Anth ; $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区,
Trp+Anth ; $\text{L-}[^2\text{H}_5]$ tryptophan および
 $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区

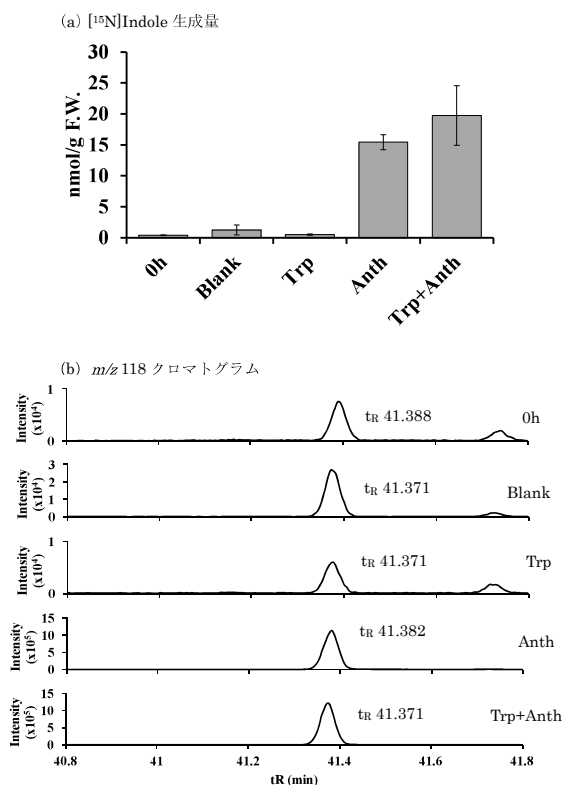


図 4.2-3 L- $[^2\text{H}_5]$ Tryptophan および $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与による $[^{15}\text{N}]$ indole (m/z 118) 生成量 (a) および m/z 118 のクロマトグラム (b)

0h ; 摘採直後の生葉, Blank ; 水投与区,
Trp ; L- $[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与区,
Anth; $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区,
Trp+Anth ; L- $[^2\text{H}_5]$ tryptophan および
 $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区

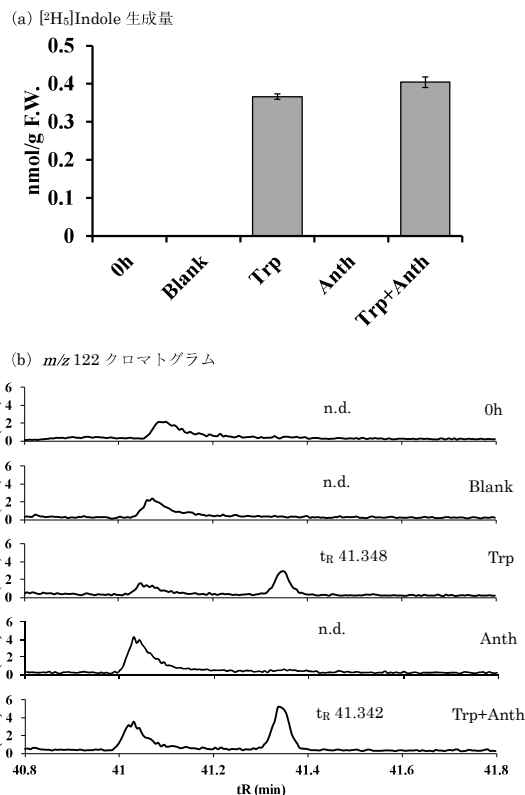


図 4.2-4 L- $[^2\text{H}_5]$ Tryptophan および $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与による $[^2\text{H}_5]$ indole (m/z 122) 生成量 (a) および m/z 122 のクロマトグラム (b)

0h ; 摘採直後の生葉, Blank ; 水投与区,
Trp ; L- $[^2\text{H}_5]$ tryptophan 投与区,
Anth ; $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区,
Trp+Anth ; L- $[^2\text{H}_5]$ tryptophan および
 $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid 投与区

4. 2. 3. 2 $[^{15}\text{N}]$ Anthranilic acid 投与による indole 関連物質の探索

$[^{15}\text{N}]$ Anthranilic acid 投与区について, ^{15}N を指標にその代謝物を網羅的に検索したところ, $[^{15}\text{N}]$ indole (図 4. 2-5) のほか, L- $[^{15}\text{N}]$ tryptophan (図 4. 2-6) が検出され, 加えて分子量が indole より O 原子が 1 つ多い $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$ と推定される化合物が異なる保持時間で 2 種 (t_R 4.41 及び 3.88) 検出された (図 4. 2-7, 4. 2-8). その分子式と anthranilic acid を前駆物質としていることから, この物質を indole 酸化物である hydroxy-indoles, oxindoles (以下 OX-indoles と表記する) と推定した. 一方その他多くのアルカロイドと考えられる分子量の大きい物質が検出された (図 4. 2-9) が, 非投与区から検出されていないものも多く, anthranilic acid の過剰投与による影響と考えられ, 正常な indole 代謝物の可能性は低いと考えられる.

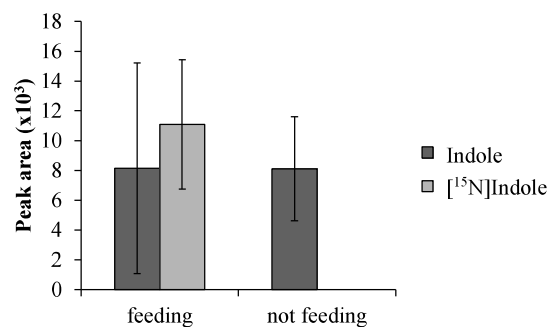


図 4.2-5 $[^{15}\text{N}]$ Anthranilic acid 投与による indole 生成量

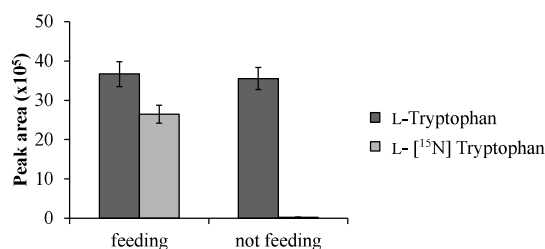


図 4.2-6 [¹⁵N]Anthranilic acid 投与による L-tryptophan 生成量

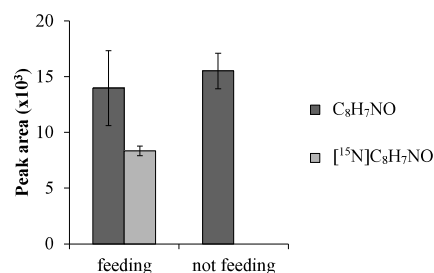


図 4.2-8 [¹⁵N]Anthranilic acid 投与による C₈H₇NO(tr. 3.88)生成量

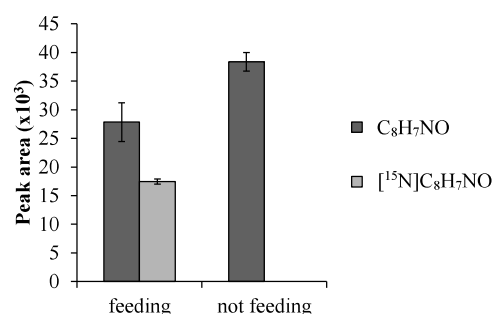


図 4.2-7 [¹⁵N]Anthranilic acid 投与による C₈H₇NO(tr. 4.41)生成量

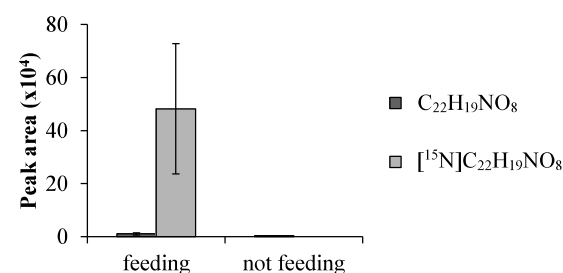


図 4.2-9 [¹⁵N]Anthranilic acid 投与によるアルカロイド (推定) 生成量 (一例)

4. 2. 4 考察

[¹⁵N]anthranilic acid および L-[²H₅]tryptophan 投与試験により、それぞれを起源とする indole が検出された。Indole の検出量は [¹⁵N]anthranilic acid を起源とするものが多く、L-[²H₅]tryptophan 起源のものが少ないことから、チャ生葉低温保管時に蓄積される indole は anthranilic acid を前駆物質としていと考えられる。また、 [¹⁵N]anthranilic acid 投与区において L-[¹⁵N]tryptophan が検出されたことから、L-tryptophan が indole 代謝物であることが示唆され、チャにおいて、シロイヌナズナと同様 anthranilic acid から 1-(O-carboxyphenylamino)-1-deoxy-ribose-5-phosphate, indole-3-glycerol phosphate を経由し、L-tryptophan となる生合成経路が存在し、indole がその中間物質である。

また、L-tryptophan 生合成経路には、chorismic acid から anthranilic acid への変換を抑制するフィードバック制御機構の存在が知られている (Caligiuri et.al. 1991, Graf et. al. 1993, Li, J. et. al. 1996) 。 L-[²H₅]tryptophan 投与区において、非ラベル体 indole 生成が抑えられ、L-[²H₅]tryptophan + [¹⁵N]anthranilic acid 投与区から [¹⁵N]indole が検出されたことから、チャにおいてもこのフィードバック機構が存在することが示唆された。

さらに [¹⁵N]anthranilic acid 投与区のメタボローム解析によって、OX-indoles と推定される物質の存在が明らかとなり、indole 蓄積への関与の可能性が考えられる。

4. 3 Indole から L-tryptophan および OX-indoles への変換

4. 3. 1 目的

前節における [¹⁵N]anthranilic acid 投与試験から、チャ生葉低温保管時に蓄積する indole の前駆体は anthranilic acid であり、シロイヌナズナと同様 L-tryptophan 生合成の中間体であることが示唆された。また、anthranilic acid の代謝物として、L-tryptophan, OX-indoles が検出され、indole の代謝物の可能性が示唆された。

そこで L-tryptophan, OX-indoles が indole 代謝物であることを確認するため、 [¹⁵N]indole の投与試験を行った。あわせて、OX-indoles の同定を行うため、その候補物質として、標準物質として入手した 2-oxindole, 4-hydroxyindole, 5-hydroxyindole, 6-hydroxyindole との比較を行った。

4. 3. 2 材料及び方法

4. 3. 2. 1 チャ生葉試料

静岡県農林技術研究所茶葉研究センターで慣行栽培されている「さやまかおり」を使用した。2013年6月（二番茶）に一心三葉の新芽を手摘みし、葉と茎に分け、葉を試料として使用した。

4. 3. 2. 2 [¹⁵N]Indole 投与方法

[¹⁵N]Indole 水溶液（10 mM）を用い前節4. 2. 2. 2と同様の方法で試料を調製した。試料のインキュベーター処理は25℃、相対湿度70%で行い、処理時間は4時間および8時間とした。

4. 3. 2. 3 L-[¹⁵N]Tryptophan および [¹⁵N]OX-indoles の分析

前節4. 2. 2. 4と同様の抽出方法、分析機器、条件で分析を行った。なおLC-MS分析条件について、下記の部分のみ変更しておこなった。

移動相：水（A液）；アセトニトリル（B液）；両液とも0.1%（w/v）ギ酸を含む、グラジエント：B液3%（15 min保持）→97%（5 min保持）→3%（5 min保持）

4. 3. 3 結果

今回の分析条件では、標準品4種（2-oxindole, 4-hydroxyindole, 5-hydroxyindole, 6-hydroxyindole）（図4. 3-1）を完全に分離することが出来ず、 t_R 6.12 min および t_R 7.34 min に検出された。表4. 3-1に示したとおり、標準品、4-hydroxyindole と 5-hydroxyindole が m/z 134.0601[M+H]⁺（理論値 m/z 134.0600[M+H]⁺ for C₈H₇NO）のイオントレース上いずれも t_R 6.12 min に検出され、お互いに全く分離できなかった。また、標準品、2-oxindole と 6-hydroxyindole は m/z 134.0600[M+H]⁺（理論値 m/z 134.0600[M+H]⁺ for C₈H₇NO）イオントレース上いずれも t_R 7.34 min に検出された。チャ試料においても、これら indole 酸化物に帰属できる2つのピークが検出された。

表4. 3-1に示したとおり、[¹⁵N]indole を投与し25℃で4時間および8時間インキュベートしたチャ試料から m/z 135.0571[M+H]⁺のイオントレース上 t_R 6.13 min にピークが検出され、C₈H₇¹⁵NO の理論値 m/z 135.0571[M+H]⁺および標準品の t_R 6.12 min と比較し、このピークが[¹⁵N]-4-hydroxyindole あるいは／および[¹⁵N]-5-hydroxyindole であると推定した。同様に、[¹⁵N]indole 投与後のチャ試料から t_R 7.32 min に m/z 135.0571[M+H]⁺のイオンピークが検出され、C₈H₇¹⁵NO の理論値 m/z

135.0571[M+H]⁺および標準品の t_R 7.34 min と比較し、このピークが[¹⁵N]-2-oxindole あるいは／および[¹⁵N]-6-hydroxyindole であると推定した。以上から、前節において推定した OX-indoles は 2-oxindole あるいは／および 4-hydroxyindole, および、5-hydroxyindole あるいは／および 6-hydroxyindole である。分析条件次第でより詳細な同定は可能であるが、少なくともチャ葉内で indole は4種の OX-indoles の内2種の OX-indoles に変換されることを確認できた。

[¹⁵N]Indole から L-[¹⁵N]tryptophan への変換を確認したところ、L-tryptophan が t_R 5.46 min に m/z 205.0971[M+H]⁺のイオンピークとして検出された。チャ試料から m/z 206.0942[M+H]⁺のイオントレース上 t_R 5.46 min にピークが検出され、C₁₁H₁₂¹⁵NiNO の理論値 m/z 206.0941[M+H]⁺と 比較し、このピークが L-[¹⁵N]tryptophan であると推定した。

リテンションタイム及び HRMS により同定した L-[¹⁵N]tryptophan および[¹⁵N] OX-indoles 量（ピークエリア面積値）と処理時間の関係について、図4. 3-2から4に示した。

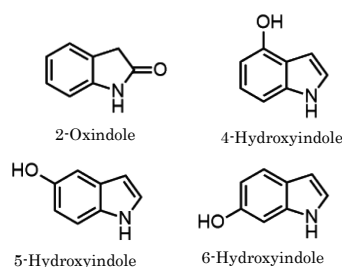


図 4.3-1 Indole 代謝物と推定される indole 酸化物(OX-indoles)

表 4.3-1 標準品及び試料から検出された OX-indole のリテンションタイムおよび HRMS

Formula	Name	RT	m/z [M+H] ⁺	
			actual	detected
C ₈ H ₇ NO	4-Hydroxyindole(standard)	6.12	134.0600	134.0601
C ₈ H ₇ ¹⁵ NO	5-Hydroxyindole(standard) (sample)	6.13	135.0571	135.0571
C ₈ H ₇ NO	Oxindole (standard)	7.34	134.0600	134.0600
C ₈ H ₇ ¹⁵ NO	6-Hydroxyindole(standard) (sample)	7.32	135.0571	135.0571

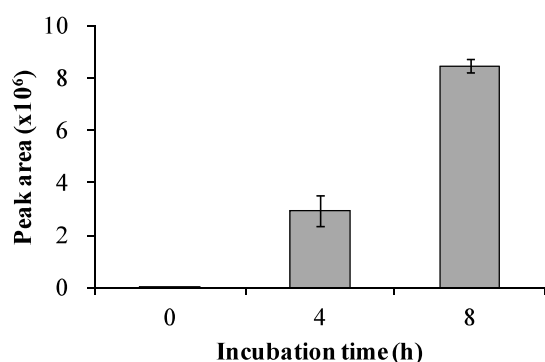


図 4.3-2 $[^{15}\text{N}]$ Indole 投与による L- $[^{15}\text{N}]$ tryptophan 生成量

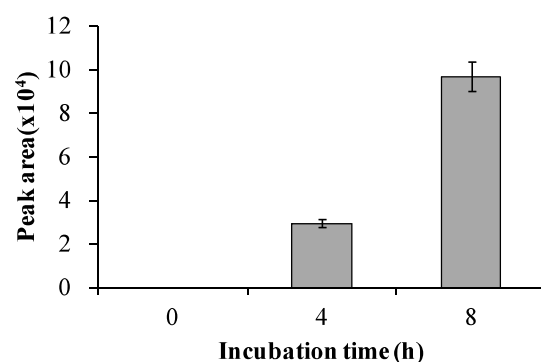


図 4.3-3 $[^{15}\text{N}]$ Indole 投与による $[^{15}\text{N}]$ 4-hydroxyindole または $[^{15}\text{N}]$ 5-hydroxyindole 生成量

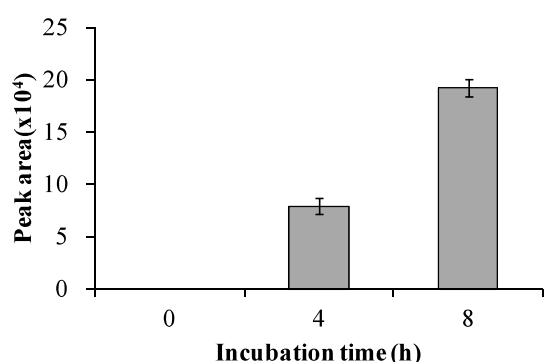


図 4.3-4 $[^{15}\text{N}]$ Indole 投与による $[^{15}\text{N}]$ oxindole または $[^{15}\text{N}]$ 6-hydroxyindole 生成量

4. 3. 4 考察

前節において、L-tryptophan 及び OX-indoles と推定される物質が anthranilic acid の代謝物であることが明らかになり、indole の代謝物の可能性が示唆されたことから、indole からの変換を確認するため $[^{15}\text{N}]$ indole 投与試験をおこなった。さらに、OX-indoles の同定を試みた。

標準品として入手可能であった 4 種の indole 酸化物 (2-oxindole, 4-hydroxyindole, 5-hydroxyindole, 6-hydroxyindole) を OX-indoles の候補物質とし、分析を試みた。本実験条件において 4 種を完全に分離することが出来ず、4-hydroxyindole と 5-hydroxyindole および 2-oxindole と 6-hydroxyindole が同一リテンションタイムで検出されたが、 $[^{15}\text{N}]$ indole を投与したチャ試料から、標準品と同一のリテンションタイムで $\text{C}_8\text{H}_7^{15}\text{NO}$ と推定される物質が検出され、indole 酸化物である 2-oxindole, 4-hydroxyindole, 5-hydroxyindole, 6-hydroxyindole のいずれか、あるいはすべてであることが示唆された。

同様に L- $[^{15}\text{N}]$ tryptophan も検出され、OX-indoles とあわせて、25℃において、チャ試料の保管時間とともに増

加していることから、いずれも indole の代謝物であることが確認でき、チャ生葉保管時の indole 蓄積、特に生葉保管時間の経過とともに減少することに indole から L-tryptophan および indole 酸化物への変換が関わっている可能性が考えられる。

4. 4 生葉保管処理中の indole 関連物質の変動

4. 4. 1 目的

前節までにおいて、チャ生葉保管時の indole 蓄積にその発散量が関係無いことから、その生合成、代謝が関わっていることが示唆された。また、indole が anthranilic acid を前駆物質とし、L-tryptophan 生合成経路の中間物質であることが示唆された。さらに、indole の代謝物としてその酸化物である OX-indoles の存在が明らかとなった。

そこで、保管処理中生葉内の indole およびその生合成、代謝に関わる anthranilic acid, L-tryptophan, OX-indoles の変動を解析し、蓄積メカニズムの解明を試みた。

4. 4. 2 材料及び方法

4. 4. 2. 1 チャ生葉試料

4. 4. 2. 1. 1 生葉保管中の indole 関連物質の変動

4. 1. 2. 1. 1 で調製した試料を使用した。

4. 4. 2. 1. 2 $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid を投与した生葉保管中の $[^{15}\text{N}]$ indole および L- $[^{15}\text{N}]$ tryptophan の変動

静岡県農林技術研究所茶業研究センターで慣行栽培されている「さやまかおり」を使用した。2013 年 5 月 (一番茶) に一心三葉の新芽を手摘みし、葉と茎に分け、葉

を試料として使用した。[¹⁵N]anthranilic acid の投与および保管条件は4. 2. 2. 2と同様の手法で行い、投与後15℃及び25℃で最大24時間まで保管処理を行った。

4. 4. 2. 2 indole 関連代謝物の分析

4. 2. 2. 4と同様の方法で分析した。

4. 4. 2. 3 [¹⁵N]indole の分析

4. 2. 2. 3と同様の方法で分析した。

4. 4. 2. 4 L-[¹⁵N]tryptophan の分析

凍結保管試料を液体窒素とともに乳鉢で粉碎し、その100 mgに80% (v/v) MeOH溶液1 mLと内部標準としてL-[²H₅]Phenylalanine (10 mM, 5 μL)を加え、ホモジナイズ、超音波抽出(冷水中、10 min)した。遠心分離(4℃, 10 min, 2,880×g)後上清を回収し、本操作を3回繰り返し抽出液を得た。抽出液をhexane (3 ml)で3回洗浄後、ロータリーエバポレーターで乾固し、蒸留水5 mLに再溶解したものをOASIS HLB cartridge(60 mg, 3 mL, Waters)に通し、蒸留水5 mLで洗浄し、ろ液10 mLを得た。MeOH:MeCN=1:3(v/v)で10倍希釈後下記条件のUPLC-TOFMS分析に供した。

装置 UPLC-TOFMS: LCT premia XE(Waters 製)を備えたAcquity UPLC system (Waters 製), カラム: Acquity BEH Amide (2.1×100 mm, 1.7 μm; Waters), 移動相: 水(A液); アセトニトリル(B液); 両液とも0.2%(v/v)ギ酸を含む, グラジエント: B液80%(2min 保持)→20%(3.5 min 保持), 流速: 0.3 mL/min, カラム温度: 40℃, イオン化モード: ESI (+), MS: フルスキャンモード(*m/z*50-700)

L-[¹⁵N]tryptophan の同定は標準品の保持時間と[M+H]⁺理論値(*m/z* 206.0947)を比較し行い、定量は標準品 L-tryptophan 分析値から作成した検量線により計算した。

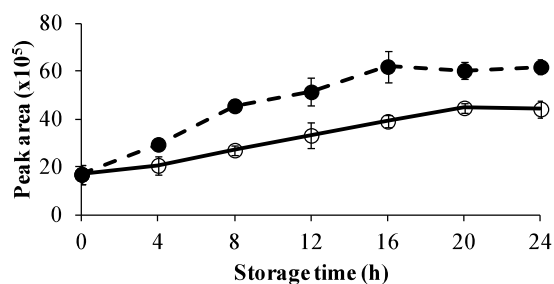


図 4.4-2 保管処理中生葉の L-tryptophan 量の変化*
(○) 15℃, (●) 25℃

4. 4. 3 結果

4. 4. 3. 1 生葉保管中の indole 関連物質の変動

前述の, [¹⁵N]anthranilic acid 投与試験により, indole が L-tryptophan 生合成経路の中間体であることが示唆され, 加えて indole 代謝物として indole 酸化物である OX-indoles が検出されたことから, これら物質の生葉保管中の変動について調査した。

Indole は前述と同様 15℃で保管16時間まで増加を示しその後減少し, 25℃で保管4時間まで増加を示し, その後減少した(図4. 4-1)。

L-Tryptophan は15℃保管, 25℃保管ともに16時間まで増加し, 25℃保管のほうが量的に大きかった(図4. 4-2)。Anthranilic acid は15℃保管では12時間まで増加し, その後やや減少した(図4. 4-3)。25℃保管では8時間まで増加し, その後やや減少したが16時間以降再び増加した。量的には15℃保管のほうが大きかった。

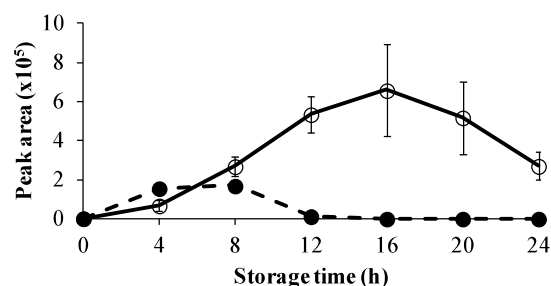


図 4.4-1 保管処理中生葉の indole 量の変化*
(○) 15℃, (●) 25℃

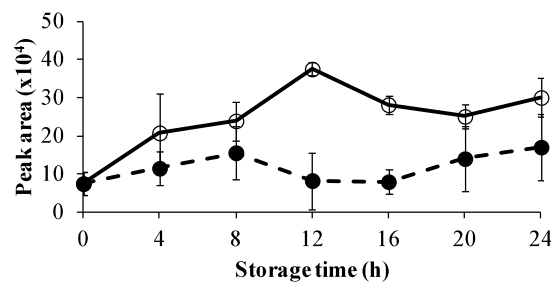


図 4.4-3 保管処理中生葉の anthranilic acid 量の変化*
(○) 15℃, (●) 25℃

OX-indoles は前述の 2 物質 (t_R : 4.41 min, 3.88 min) のほか保持時間 3.7 分に m/z 134.0604 $[M+H]^+$ のイオンが検出され OX-indoles (C_8H_8NO) と推定される物質が 3 種検出された (以下便宜上 t_R : 4.41 = OX-indoles1, 3.88 = 同 2, 3.7 = 同 3 とする)。

OX-indole3 は 15 °C 保管, 25 °C 保管とも, 処理期間中低い水準であった。OX-indoles 1 と 2 は 25 °C 保管で, 4 時間以降 12 時間まで増加し OX-indole1 の 24h を除き, その後ほぼ一定であった。一方 15 °C 保管では 20 時間が最も大きく 16 時間までは 25 °C 保管の 3 分の 2 程度であった。(図 4. 4-4 a, b)

4. 4. 3. 2 $[^{15}N]$ anthranilic acid を投与した生葉保管中の $[^{15}N]$ indole および L- $[^{15}N]$ tryptophan の変動

生葉保管中の L-tryptophan 量は anthranilic acid, indole 由来の他, タンパク質分解物由来のものが考えられ, indole 蓄積との関係について不明であるため, $[^{15}N]$ anthranilic acid 投与生葉保管中の $[^{15}N]$ indole および L- $[^{15}N]$ tryptophan の変動を確認した (図 4. 4-5, 6)。

L- $[^{15}N]$ tryptophan 量は保管 16h まで 15 °C と 25 °C の間に大きな差が見られず, 時間経過とともに増加した。15 °C では 16 時間以後も増加したが, 25 °C では減少した。

$[^{15}N]$ indole 量の変動は前述の標識体物質無投与時の非ラベル体 indole と同様の傾向を示した。

4. 4. 4 考察

L-tryptophan は生葉保管期間中 15 °C, 25 °C とも増加傾向を示し, 25 °C が 15 °C と比べ多かったが, $[^{15}N]$ anthranilic acid 投与試験における L- $[^{15}N]$ tryptophan 量の温度による差が小さいことから, indole から L-tryptophan への変換は 15 °C から 25 °C の範囲において温度への依存が小さく, チャ生葉中の L-tryptophan は indole 由来のものに加え, タンパク質など indole 以外の物質由来のものと考えられる。また, indole の増減と L-tryptophan の変動とを比較すると両者の変動の関連性は小さく, indole から L-tryptophan 変換の indole 蓄積に対する影響力は小さいと考えられる。

Anthranilic acid は 15 °C 保管が保管期間中を通じて 25 °C 保管より多くやや増加傾向を示していることから, 常に indole 等への変換基質として供給可能な水準であり, 25 °C 保管では L-tryptophan の増加が anthranilic acid の増加を抑制する結果, indole への供給が断たれ, この差が 15 °C 保管と 25 °C 保管の indole 蓄積量の差に影響していることが考えられる。

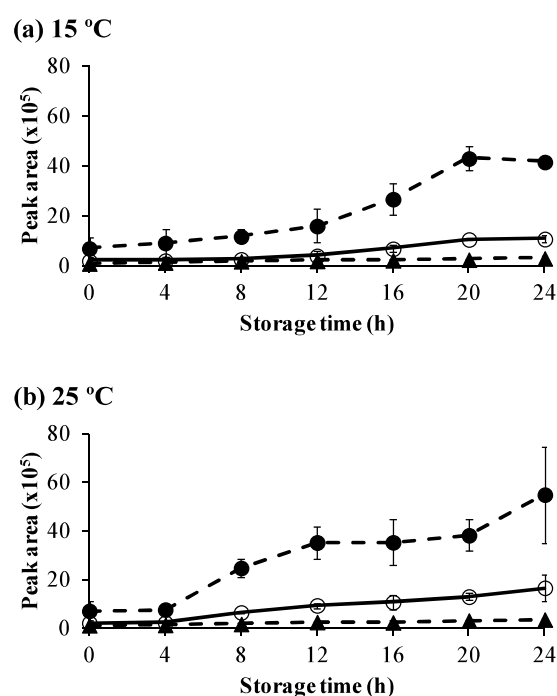


図 4.4-4 保管処理中生葉の OX-indoles 量の変化*
OX-indoles-1 (●), -2 (○), -3 (▲)

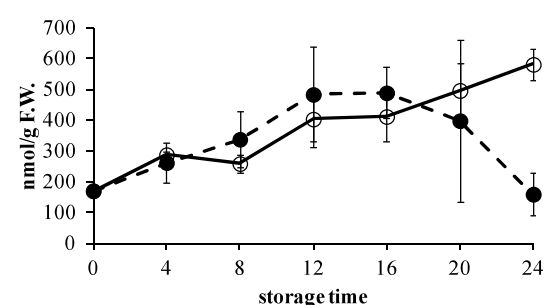


図 4.4-5 $[^{15}N]$ anthranilic acid 投与による保管処理中生葉の L- $[^{15}N]$ tryptophan 量の変化*
(○) 15 °C, (●) 25 °C

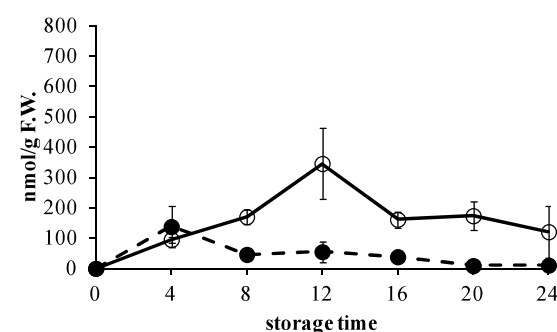


図 4.4-6 $[^{15}N]$ anthranilic acid 投与による保管処理中生葉の $[^{15}N]$ indole 量の変化*
(○) 15 °C, (●) 25 °C

検出された3種のOX-indolesのうち2種(OX-indole1, 2)は indole の変動との関係性が見られた。すなわち、25℃保管では8時間以降に増加し、15℃保管では、20時間以降に増加しており、どちらの温度においても indole が減少するとともに増加している。このことから、indole 減少の要因として indole から OX-indoles への変換が関係していることが考えられる。

以上から、生葉保管中の indole 生合成、代謝経路について、図4. 4-7のように推定した。

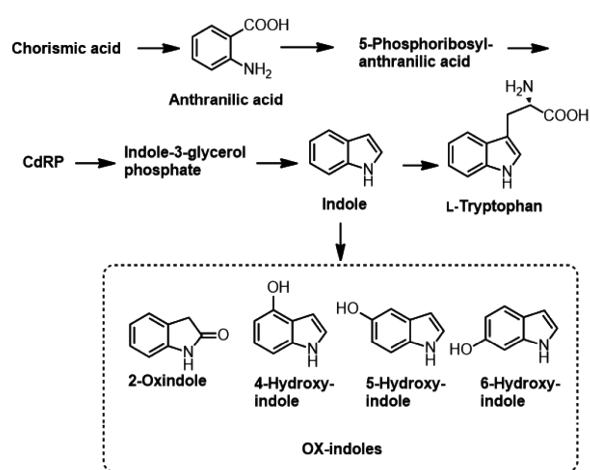


図4.4-7 チャにおける推定 indole 生合成、代謝経路*

4. 5 総合考察

前章において、LTPGT が NTPGT や煎茶とくらべ、多量の indole を含んでおり、生葉保管処理温度が大きく影響を与えていることが明らかとなった。

本研究における茶製造法は煎茶製造法に準じている。この製法は、はじめ生葉を蒸熱し、その後力を加えて揉みながら 100℃前後の熱風で乾燥させる。製茶機周辺では葉由来の香りが充満し蒸熱、乾燥工程で多量の香氣成分が揮発していることが良くわかる。Indole 蓄積に関しては、生葉段階で増加していることが予想されるが、保管処理によって葉が萎れていることから、その物理性の変化も大きく、原料生葉での蓄積よりも物理性の変化により、製茶工程中の揮発の様態が変化していることも考えられる。

そこでまず、保管処理中の生葉における indole の変動をとらえることとした。生葉における indole 量の変動は荒茶に類似し、その蓄積量は荒茶の倍以上であることが明らかとなった。このことから、LTPGT における indole は、生葉保管処理によって原料生葉中の indole が増加したことに由来することが明らかとなり、保管処理中の

indole の蓄積機構を明らかにすることが重要であると考えられた。

生葉における indole 量の変化は保管温度による差はあるが、増加したのち減少に転じるため、その蓄積の原理は indole の増加に関わることで、減少に関わることに分けて考える必要がある。そこで、まず保管処理中の生葉からの発散量を測定し、温度、時間によりその発散量変化の indole 蓄積に対する関与の程度を検討した。処理温度による差はあるものの、発散量の変化は蓄積量の変化と類似し、生葉中の indole 量が多いとき発散量も多く、蓄積量が少なく発散量も少なかった。しかし、発散量は蓄積量の1%にも満たない量であり、発散量の変化が indole 蓄積に与える影響が小さいことが明らかとなり、indole 量の減少は代謝物への変換が関与していると想定された。

以上から indole の蓄積には、生葉における indole の生合成、代謝が大きく関わり、そのメカニズムの解明の重要性が示唆された。そこで、Indole の前駆物質、代謝物を探索するため、L-[$^2\text{H}_5$]tryptophan, [^{15}N]anthranilic acid, の生葉投与試験を行った。L-[$^2\text{H}_5$]tryptophan, [^{15}N]anthranilic acid 投与試験からその代謝物として、 $^2\text{H}_5$ indole, [^{15}N]indole が検出され、indole の前駆物質が L-tryptophan, および anthranilic acid であることが明らかとなった。しかし、L-tryptophan から indole への変換量は anthranilic acid からの変換量に比べ20分の1以下と極わずかであり、チャ生葉に蓄積する indole の前駆物質の主流は anthranilic acid であることが明らかとなった。加えて、L-[$^2\text{H}_5$]tryptophan 投与によって indole の生成が抑制され、L-[$^2\text{H}_5$]tryptophan および [^{15}N]anthranilic acid 同時投与区において [^{15}N]indole が検出されたことから、L-tryptophan が anthranilic acid 生成を抑制するフィードバック制御がチャにおいて存在することが示唆された。さらに、[^{15}N]anthranilic acid 投与試験において、その代謝物として、L-[^{15}N]tryptophan および、indole より O 原子1つ多い分子式 $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$ 化合物が2種検出され、その分子式および anthranilic acid の代謝物であることから、indole 酸化物 (OX-indoles) と推定した。これら化合物が indole 代謝物であることを確認するため、[^{15}N]indole の生葉投与試験を行い indole からの変換を確認した。さらに、OX-indoles の同定を試み、indole 酸化物である 2-oxindole, 4-hydroxyindole, 5-hydroxyindole, 6-hydroxyindole のいずれか、あるいはそのすべてであることが強く示唆された。

Indole の前駆物質、代謝物の探索により、チャにおいて、生葉保管時に蓄積する indole はシロイヌナズナで解

明されているように (Radwanski et. al. 1995), chorismic acid, anthranilic acid から 1-(O-carboxyphenylamino)-1-deoxy-ribose-5-phosphate, indole-3-glycerol phosphate を經由し, L-tryptophan となる生合成経路の中間体であることが強く示唆され, さらに代謝物として L-tryptophan に加え, indole 酸化物の存在が明らかとなった。

Indole の前駆物質, 代謝物が明らかになったことから, チャ生葉保管時におけるその動態を調査することで, 生葉低温保管時における indole 高蓄積メカニズムの解明を試み, 以下のように推察した。

15℃保管処理における indole 高蓄積

①温度が低いために, 保管初期の L-tryptophan 生成が緩やかで, フィードバック制御の影響が小さく, anthranilic acid の生成が 25℃に比べて大きい。

②前駆物質である anthranilic acid から indole の生成が進む。

③Indole は L-tryptophan および indole 酸化物へ代謝されるが, その減少に対して, L-tryptophan への変換の影響は小さく, 温度が低いことによる, indole 酸化物への変換が小さい。

以上によって, 最大量となる時間は 16 時間と遅いがその蓄積量は 25℃に比べて高くなる。

25℃保管処理における indole 蓄積

①温度が高いために保管初期に L-tryptophan が増加し, フィードバック制御により, anthranilic acid の生成が抑制される。

②anthranilic acid 生成の抑制に伴い indole 生成が抑制される。

③Indole は L-tryptophan および indole 酸化物へ代謝されるが, その減少に対して, L-tryptophan への変換の影響は小さく, 温度が高いことによる, indole 酸化物への変換が大きい。

以上によって, 最大量となる時間は 4 時間と早いものの, その蓄積量は 15℃に比べて低くなる。

本研究の中では, 以上を一つの仮説として提唱したい。

参考文献

Caligiuri, M. G. and Bauerle R. (1991). Identification of Amino Acid Residues Involved in Feedback Regulation of the Anthranilate Synthase Complex from *Salmonella typhimurium*, *J. Biological Chemistry*, 266, 8328-8335.

Christensen, S. A., Nemchenko, A., Borrego, E., Murray, I., Sobhy, I.S., Bosak, L., DeBlasio, S., Erb, M., Robert, C.A.M., Vaughn, K.A., Herrfurth, C., Tumilinson, J., Feussner, I., Jackson, D., Turlings, T.C.J., Engelberth, J., Nansen, C., Meeley, R., & Kolomiets, M.V. (2013): The maize lipoxygenase, ZmLOX10, mediates green leaf volatile, jasmonate and herbivore-induced plant volatile production for defense against insect attack. *The Plant J.*, 74, 59-73.

船山信次 (1998) アルカロイド毒と薬の宝庫, 共立出版, 73-118

Gillam, E.M.J., Notley, L.M., Cai, H., De Voss, J.J., Guengerich, F.P. (2000). Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. *Biochemistry*, 39, 13817-13824.

Graf, R., Mehmman, B. and Braus G. H. (1993). Analysis of Feedback-resistant Anthranilate Synthases from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriology*, 175, 1061-1068.

Horvath, M.M. (1977a). Indole hydroxylation in germinating plants pumpkin. *Botanikai közlemények*, 64, 117-119.

Horvath, M.M. (1977b). Indole hydroxylation of the members of the Commelinaceae family. *Acta Biologica Szegediensis*, 23, 69-71.

Ishimaru, A., & Yamazaki, I. (1977). Hydroperoxide-dependent hydroxylation involving "H₂O₂-reducible hemoprotein" in mirosomes of pea seeds. A new type enzyme acting on hydroperoxide and a physiological role of seed lipoxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 252, 6118-6124.

Kawakami, M., Ganguly, N. S., Banerjee J. and Kobayashi A. (1995): Aroma Composition of Oolong tea and Black Tea by Brewed Extraction Method and Characterizing Compounds of Darjeeling Tea Aroma, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 200-207

Kinoshita, T. Ozawa A., and Uchiyama T. (2013): Factors affecting the production of diol (2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol) induced by the infestation of the tea green leafhopper, *Empoasca onukii* Matsuda, in new shoots of tea plants in Japan -2, *Proceedings of 5th International Conference on O-Cha Culture and Science*, in press

Li, J. and Last, R. L. (1996). The *Arabidopsis thaliana* trp5 Mutant Has a Feedback-Resistant Anthranilate Synthase and Elevated Soluble Tryptophan, *Plant Physiol.*, 110, 51-59.

-
- Medvedev, V.A., Korshikov, I.I., Bashkatov, V.G., Tarabrin, V.P. (1977). Oxidation of exogenous indole in isolated plant leaves. *Fiziologiya Rastenii* (Moscow), 24, 858-860.
- Ozawa A., Uchiyama T. and Kinoshita T. (2013): Factors affecting the production of diol (2,6-dimethylocta-3,7-diene-2,6-diol) induced by the infestation of the tea green leafhopper, *Empoasca onukii* Matsuda, in new shoots of tea plants in Japan -1, Proceedings of 5th International Conference on O-Cha Culture and Science, in press
- Radwinski E. R. and Last R. L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism : Biochemical and molecular Genetics. *The Plant Cell*, 7, 921-934.
- Yuan L. J., Liu J. B., and Xiao X. G. (2011). Biooxidation of indole and characteristics of the responsible enzymes. *African Journal of Biotechnology*, 10, 19855-19863.

第5章 総括

現在確立されている煎茶製造法は、江戸時代にその原型が確立されたとされる。明治以降、茶は日本の主要輸出品として位置づけられ、品種育成、栽培技術、加工技術の目覚ましい発展を遂げ、現在では機械による、人為的制御、省力化が進み、高品質安定生産を達成している。

先人の努力により達成した品質の画一化は、国内外ともに食の多様化が進み、変化を求める時代となった現在、特徴の無いものとして扱われる半面もある。生産現場でも海外の紅茶、烏龍茶の製法を取り入れたり、過去の製造法に求めたりと様々な取り組みを行い、消費者ニーズにこたえる努力を行っている。

かつての山間茶産地では、その冷涼な気候と相まって香り高い茶が生産されていた。その条件は烏龍茶における室内萎凋に類似し、その効果がうたわれているが、その要因には不明な点が多いため、目的とした香りの茶を安定的に製造できる技術になっていない。

そこで、本研究では、近年緑茶製造に取り入れられ、紅茶や烏龍茶で用いられている生葉萎凋に注目し、特に人為制御が安易である温度制御に焦点を置き、山間地の気候に近い 15°C 程度の条件で生葉保管処理を行うことで高まる香りについて、官能評価、化学成分分析を駆使して、その特徴の明確化を試み、さらに、特徴香氣成分の蓄積機構について明らかにした。

煎茶は強い旨味を特徴とし、紅茶や烏龍茶に比べ香りが弱いとされる。そのため、煎茶用に育成、栽培された生葉を原料とすることが香氣発揚に対して、有効であるかが不明であったため、まず、日本で生産された、緑茶、紅茶、烏龍茶と中国、インド、スリランカ、台湾で生産された各種茶との香氣を比較しその可能性について考察した。

香氣成分の数、量を比較したところ、海外産の茶でも烏龍茶、紅茶は、その産地、製法によってばらつき、多様性に富んでいた。日本で生産された烏龍茶、紅茶はこの点において、海外産のものと同程度で、遜色の無いものであった。さらに、香氣成分の分析データの主成分分析による解析結果からも、日本産の烏龍茶、紅茶は海外産のものと大きな差は無く、茶の多様性を求める上で、日本で育成、栽培されているチャでも十分香氣発揚が期待できることが明らかとなった。

生葉低温保管処理によって変化する香りについて、官能評価を行う上で、煎茶評価にはない新たな評価項目を、茶の特徴から抽出し作成した。その評価項目に沿って点数化したところ、低温保管処理によって、甘い花様の香りが特異的に増加していることが明らかとなった。さらに、香氣成分分析からも花様の香りに関係する成分が、増加していることを確認し、その特徴を見出すことができた。加えて、香りに貢献する成分を AEDA 法を用いて探索し、生葉低温保管処理によって変化する香りに対して、特に貢献度の高い成分として、(5Z)-octa-1,5-dien-3-one : geranium-like、jasmine lactone : floral、methyl epijasmone : fresh floral、3-methylnonane-2,4-dione : floral、indole : floral、coumarin : floral の 6 成分を特定した。このうちの 4 成分は貢献度は高いが、含有量は少ないものであった。Jasmine lactone、indole は甘い花の香りへの貢献度が高く、低温保管処理によって特異的に増加した。これら成分はこれまでも、烏龍茶の特徴成分として報告されていたが、その香りへの貢献度について詳しく報告されたものは少ない。今後の製造法の開発を念頭に置くと、量的変化がとらえやすく、香氣増加の指標と出ることが重要であることから、これら成分は有効であることが明らかとなった。さらに、indole は IAA をはじめとする多くの物質の骨格を形成し、植物の物質代謝、ストレス応答を解明する上で重要である。

保管処理中の生葉における indole の蓄積、発散量を調査し、その要因を明らかにした。保管処理中に生葉から indole が発散されているが、その量は蓄積量の 1 % にも満たず、保管中の indole 変動、特に蓄積量の減少に対して、発散量が影響しないことが明らかとなった。このことから、生葉における indole 蓄積には indole の生合成及び代謝の双方が関係していることが明らかとなった。

Indole の前駆物質、代謝物を探索することを目的に、L-[2H₃]tryptophan、[15N]anthranilic acid、[15N]indole の生葉への投与試験を行った。[15N]anthranilic acid 投与区から [15N]indole、L-[15N]tryptophan が検出され、indole からの変換についても確認できたことから、indole が L-tryptophan 生合成の中間体であることが示唆された。さらに indole 代謝物として、indole 酸化物が 2 種検出され同定を試みたが特定には至らなかったものの、2-oxindole、4-hydroxyindole、5-hydroxyindole、6-hydroxyindole のいずれかであることが示唆された。さら

に L-[²H₅]tryptophan 投与区において、indole 生成が抑制され、[¹⁵N]anthranilic acid + L-[²H₅]tryptophan 投与区において、[¹⁵N]indole 生成が確認されたことから、L-tryptophan による anthranilic acid 生成に対するフィードバック制御機構が存在することが示唆された。

保管中生葉における indole 蓄積機構を明らかにする目的で、その関連物質の変動を明らかにした。

保管中の indole 量の変動と、anthranilic acid、OX-indole2 種の変動に関連性が見られたことから、生葉保管中の indole 蓄積機構を以下のように推察した。

15℃保管処理における indole 高蓄積

① 度が低いために、保管初期の L-tryptophan 生成が緩やかで、フィードバック制御の影響が小さく、anthranilic acid の生成が 25℃に比べて大きい。

②前駆物質である anthranilic acid から indole の生成が進む。

③Indole は L-tryptophan および indole 酸化物へ代謝されるが、その減少に対して、L-tryptophan への変換の影響は小さく、温度が低いことによる、indole 酸化物への変換が小さい。

以上によって、最大量となる時間は 16 時間と遅いがその蓄積量は 25℃に比べて高くなる。

25℃保管処理における indole 蓄積

①温度が高いために保管初期に L-tryptophan が増加し、フィードバック制御により、anthranilic acid の生成が抑制される。

②anthranilic acid 生成の抑制に伴い indole 生成が抑制される。

③Indole は L-tryptophan および indole 酸化物へ代謝されるが、その減少に対して、L-tryptophan への変換の影響は小さく、温度が高いことによる、indole 酸化物への変換が大きい。

以上によって、最大量となる時間は 4 時間と早いものの、その蓄積量は 15℃に比べて低くなる。

茶の製造工程において、linalool、geraniol 等のアルコール系香気に関する生成機構についてその前駆体が 2 糖配当体であること (Yano et. al. 1990, Guo et.al. 1993, 1994, Moon et. al. 1996)、紅茶 (Wang et. al. 2001a)、烏龍茶 (Wang et. al. 2001b) での変動が明らかとなっていること、加水分解酵素プリメペロシダーゼの特性 (Guo et. al. 1995, 1996, Ma et. al. 2001, Mizutani et. al. 2002) 等、多くの知見が報告されている。しかし、チャの香気成分の多

くは、その生合成、代謝経路について不明である。本研究において、香気成分の一つである indole の前駆物質、代謝物質が明らかになったことは今後のチャにおける香気生成機構の解明において有意義なものであると考える。

茶の香気発揚のための萎凋処理では静置のみならず、攪拌処理、それに先立つ日干萎凋処理と茶生葉に多くのストレスを与える。これによって、より多くの香気成分の発揚を促し、香りの強い茶の製造を行うが、その機械化、安定生産化には多くの課題が残されている。

Indole についても、これらストレスと生合成、代謝の変化について、多くの知見を積み上げる必要があると考えられる。

参考文献

- Guo, W., Sakata, K., Watanabe, N., Nakajima, R., Yagi, A., Ina, K. and Luo, S. (1993). Geranyl 6-O-β-D-Xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside Isolated as an Aroma Precursor from Tea Leaves for Oolong Tea. *Phytochemistry*, 33, 1373-1375.
- Guo, W., Hosoi, R., Sakata, K., Watanabe, N., Yagi, A., Ina K. and Luo, S. (1994). (S)-Linalyl, 2-Phenylethyl, and Benzyl Disaccharide Glycosides Isolated as Aroma Precursors from Oolong Tea Leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1532-1534
- Guo, W., Yamauchi, K., Watanabe, N., Usui, T., Luo, S. and Sakata, K. (1995). A primeverosidase as a Main Glycosidase Concerned with the Alcoholic Aroma Formation in Tea Leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 962-964
- Guo, W., Ogawa, K., Yamauchi, K., Watanabe, N., Usui, T., Luo, S. and Sakata, K. (1996). Isolation and Characterization of a β-Primeverosidase Concerned with alcoholic Aroma Formation in Tea Leaves. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1810-1814
- Ma, S. J., Mizutani, M., Hiratake, J., Hayashi, K., Yagi, K., Watanabe, N. and Sakata, K. (2001). Substrate Specificity of β-Primeverosidase, A Key Enzyme in Aroma Formation during Oolong Tea and Black Tea Manufacturing. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 65, 2719-2729
- Mizutani, M., Nakanishi, H., Ema, J., Ma, S. J., Noguchi, E., Inohara-Ochiai, N., Fukuchi-Mizutani, M., Nakao, M. and Sakata, K. (2002). Cloning of β-Primeverosidase from Tea Leaves, a Key Enzyme in Tea Aroma Formation. *Plant Physiol.*, 130, 2164-2176

-
- Moon, J. H., Watanabe, N., Ijima, Y., Yagi, A. and Sakata, K. (1996). cis-and trans-Linalool 3,7-Oxides and Methyl Salicylate Glycosides and (Z)-3-Hexenyl β -D-Glucopyranoside as Aroma Precursors from Tea Leaves for Oolong Tea, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 1815-1819
- Wang, D., Kurasawa, E., Yamaguchi, Y., Kubota, K. and Kobayashi, A. (2001a). Analysis of Glycosidically Bound Aroma Precursors in Tea Leaves. 2. Change in the Glycoside Contents and Glycosidase Activities in Tea Leaves during the Black Tea Manufacturing Process, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1900-1903
- Wang, D., Kubota, K., Kobayashi, A. and Juan, I. M. (2001b). Analysis of Glycosidically Bound Aroma Precursors in Tea Leaves. 3. Change in the Glycoside Content of Tea Leaves during the Oolong tea Manufacturing Process, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5391-5396
- Yano, M., Okada, K., Kubota K. and Kobayashi A. (1990). Studies on the Precursors of Monoterpene Alcohols in Tea Leaves. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 1023-1028.

摘 要

日本における茶の歴史は古く、平安時代にまでさかのぼるが、現在主流となっている煎茶の原型は江戸時代に確立されたものである。その後明治に入り、日本の主要輸産物であったこともあり、育種、栽培、製造の各分野での技術進歩は目覚ましいものであった。

先人の努力のもと、日本の煎茶の品質は高い水準での均一化が進んできたが、昨今の食の多様化、あるいは海外で、日本食ブームによる茶の飲用等が進みつつある。そのような中、煎茶の香りは同じ植物であるチャを原料とする烏龍茶や紅茶と比較し、その変異の少なさ、香りの弱さが指摘されている。さらに緑茶において過去には、山間地の茶は香り豊かで独特の風味があったといわれ、その復活を望む声も聞かれる。

現在の茶製造は機械化が進み、そのほとんどが人為的管理可能な条件で行われている。しかし、香りの増強について、海外の製法、過去の山間地の条件をかんがみると今後の多様性に対応した茶を造る上で多くのヒントが見られるものの、生産者の経験と感性を必要とする部分が多い。

そこで、本研究では香りの増強に半発酵茶の室内萎凋、過去の山間地で行われていた冷涼な条件での生葉保管をヒントに、人為的な制御が可能な新たな製造法を確立するための技術開発を目的に、生葉低温保管処理に注目しその香気特性と成分の蓄積について明らかにした。

まず初めに、日本で現在造られている緑茶、紅茶、烏龍茶と海外産のものとを比較しその香りの特性について考察した。日本を含めた5カ国の各種茶の香気成分を分析し、その成分数、量を比較するとともに、PCA解析をおこなったところ、緑茶の香気はこれまでの報告にあるように香りの数、量ともに低いものであるが、紅茶、烏龍茶については、海外産のものと傾向が類似していた。日本の緑茶用品種は緑茶製造に特化して育成されてきたものであるが、紅茶、烏龍茶として製造しても、遜色ないものであり、現在栽培されている緑茶用品種を原料として香りを増強した新たな茶を製造できる可能性が明らかとなった。

続いて、本研究で中心となる生葉低温処理によって作成した茶の香気特性を、官能評価、香気成分分析により評価しさらにその寄与の高い成分の特定を試みた。官能評価により、低温保管処理によって甘い花様の香りが強調され、香気成分でも紅茶で多い *linalooloxides* や半発酵

茶で多い *jasmine lactone*、*indole* の増加を確認した。さらに AEDA 法により特に寄与程度の大きい成分として (*5Z*-*octa-1,5-dien-3-one* : *geranium-like*、*jasmine lactone* : *floral*、*methyl epijasmionate* : *fresh floral*、*3-methylnonane-2,4-dione* : *floral*、*indole* : *floral*、*coumarin* : *floral* の6種を同定した。さらに、このうち、*indole*、*jasmine lactone* は保管温度、時間により、蓄積量の変化が大きく、特に *indole* の蓄積量は他の成分と比べて非常に大きいことから、製造工程の検討を行う上での指標物質として有効であり、その生合成、代謝メカニズムの解明を試みた。

生葉保管中の *indole* 発散量の変化を調査したところ、発散量は蓄積量に比べ量的に少なく、温度による発散の違いが、蓄積量に与える影響は小さく、*indole* 蓄積にはその生合成、代謝が関わっていることが示唆された。

Indole の前駆物質、代謝物を探索するため、*L*- $[^2\text{H}_5]$ tryptophan、 $[^{15}\text{N}]$ anthranilic acid の投与試験を行った。これにより、*indole* の前駆物質が *anthranilic acid* であること、代謝物は *L*-tryptophan であり、さらに *OX-indoles* の存在を明らかにした。加えて、*L*-tryptophan による *anthranilic acid* 生合成を抑制する、フィードバック制御が働いていることが示唆された。これらのことから、チャにおいて、アラビドプシスで確認されている、*chorismic acid*、*anthranilic acid* から *indole* を経る *tryptophan* 生合成経路が存在し、チャにおける *indole* 蓄積に大きく関わっていることが明らかとなった。

Anthranilic acid、*indole*、*L*-tryptophan、*OX-indoles* の生葉保管処理中の変動を解析することで、生葉保管処理による *indole* 蓄積機構を以下のように結論付けた。

15℃保管処理における *indole* 高蓄積

①温度が低いために、初期の *tryptophan* 生成が緩やかで、フィードバック制御の影響が小さく、*anthranilic acid* の生成が 25℃に比べて大きい。

②前駆体である *anthranilic acid* から *indole* の生成が進む。

③温度が低いため、*OX-indoles* への変換が小さい。

以上によって、最大量となる時間は16時間と遅いがその蓄積量は25℃に比べて多くなる。

25℃保管処理における *indole* 蓄積

①温度が高いため保管初期に **tryptophan** が増加し、フィードバック制御により、**anthranilic acid** の生成が抑制される。

②**anthranilic acid** 生成の抑制に伴い **indole** 生成が抑制される。

③温度が高いため、**OX-indoles** への変換が大きい。

以上によって、最大量となる時間は 4 時間と早いものの、その蓄積量は 15°C に比べて少なくなる。

本研究により、生葉保管処理による **indole** 蓄積機構と、その処理温度、処理時間との関係を明らかにした。茶製造工程において、香気発揚のための処理の基本となる保管処理の温度が明らかとなったことで、今後の製造技術開発における一つの道筋をつけることができた。今後、さらなる香気発揚を促すうえでの摘採後チャ生葉への各種処理と香気成分、特に **indole** との関係を明らかにすることで、人為制御可能な処理技術が確立できるものと期待する。

Summary

Fresh tea leaves are steamed immediately after plucking to produce Japanese green tea (Sencha). Endogenous enzymes involved in aroma formation are inactivated by this treatment, producing low aroma contents. To enrich green tea with more aroma attributes, modification of the manufacturing process is one approach.

We produced low temperature (15 °C) processed green tea (LTPGT) with higher aroma contents than normal green tea (Sencha). Normal temperature processed green tea (NTPGT), involved storing at 25 °C, and Sencha had no storing process. Sensory evaluation showed LTPGT had higher levels of floral and sweet odorants than NTPGT and Sencha. Aroma extract dilution analysis and gas chromatography / mass spectrometry - olfactometry indicated that LTPGT had 12 aroma compounds with high factor dilution values (FD). Among LTPGT's 12 compounds, indole, jasmine lactone, cis-jasmone, coumarin, and methyl epijasmone contributed to floral, fruity and sweet characters. In particular, indole increased initially, peaking at 16 h, then gradually decreased. Total amounts of indole emitted from green tea leaves were less than 1% for 15 °C, suggesting that the emission does not influence the amounts of indole accumulated in green tea, and that indole biosynthesis and the catabolism must be dependent on the temperature during the storing process.

Feeding experiments with [^{15}N]anthranilic acid or [^{15}N]indole suggested that [^{15}N]indole, [^{15}N]oxygenated indoles (OX-indoles) and L-[^{15}N]tryptophan were produced from [^{15}N]anthranilic acid and that L-[^{15}N]tryptophan and [^{15}N]OX-indoles were produced from [^{15}N]indole. Therefore we estimated that anthranilic acid was the precursor of indole and that L-tryptophan and OX-indoles were metabolites of indole.

Moreover feeding experiments with [^{15}N]anthranilic acid and(or) L-[$^2\text{H}_5$]tryptophan suggested that tea plant had tryptophan feedback inhibition of conversion of shikimic acid to anthranilic acid.

We proposed the increase in indole was due to transformation of anthranilic acid during the 16 h storage and the subsequent decline in indole level was due to its conversion to OX-indoles and L-tryptophan.

謝辞

本研究の遂行ならびに取りまとめに当たり、終始懇切な御指導を頂きました静岡大学大学院自然科学系教育部渡辺修治教授に深く感謝いたします。また、取りまとめに際し、有益な御助言と御指導を賜った静岡大学大学院自然科学系教育部昆野昭則教授、原正和教授、轟泰司教授、並びに大西利幸准教授に深く感謝いたします。実験に関する指導並びに有益な助言を賜った、Susanne Baldermann 博士、並びに楊子銀博士に深く感謝いたします。茶の官能審査、並びに香気成分の同定に関して、有益な助言と多大なる支援を賜った、高砂香料工業株式会社春日久栄氏、矢口善博氏、並びに草野友実氏に深く感謝いたします。代謝物の網羅解析に関して、有益な助言と多大なる支援を賜った、公益財団法人かずさ DNA 研究所岡崎孝映博士に深く感謝いたします。LCMS、GCMS 分析に関して協力を賜った、静岡県工業技術研究所浅沼俊倫氏、池ヶ谷篤氏に深く感謝いたします。実験を共に行っていただいた静岡大学大学院農学研究科友村美穂氏に深く感謝いたします。実験並びに調査に協力いただいた天然物有機化学研究室内の諸氏に深く感謝いたします。茶の香気に関する研究に携わるきっかけを与えてくださった、元静岡県農林技術研究所茶業研究センター長中村順行博士、静岡県農林技術研究所茶業研究センター商品開発科長後藤正博士、並びに鹿児島県立短期大学生活化学科助教木下朋美博士に深く感謝いたします。