

小葉系茶葉を用いた伝統茶の  
特徴香気寄与成分の解明と香料開発への応用

2018 年

馬場(本間) 良子



## 目次

第1章 緒言 .....	1
1.1 食品における香料の役割 .....	1
1.1.1 食品香料.....	1
1.1.2 加工食品の発展と食品香料.....	2
1.1.3 茶の利用と茶加工食品の生産 .....	4
1.1.4 茶加工食品における香料の役割 .....	6
1.2 茶および茶加工品の香りの多様性 .....	8
1.2.1 茶の香りを構成する要素.....	8
1.2.2 茶の香りに影響する要素 .....	9
1.2.3 茶加工食品の製造と品質 .....	18
1.3 茶の香気成分.....	20
1.3.1 茶の香気研究法.....	20
1.3.2 茶香気研究のあゆみ.....	23
1.4 茶加工食品向け食品香料の問題点 .....	25
1.5 本研究の目的と意義 .....	26
第2章 高品質な煎茶の香りに関する研究 .....	29
2.1 蒸熱条件の異なる煎茶の MMP 定量.....	29
2.1.1 固相マイクロ抽出 (SPME) –GC-MS 法による煎茶中 MMP 定量法の検討.....	29
2.1.2 SPME –GC-MS (SIM) 法による煎茶における蒸熱条件と MMP 含有量の関係の 検討 .....	36
2.2 煎茶における MMP 生成機構の検討.....	39
2.2.1 実験方法.....	40
2.2.2 結果および考察 .....	43
2.3 要約 .....	48
第3章 高品質な抹茶の香りに関する研究 .....	50

3.1 品質の異なる抹茶の香りに寄与する成分の解明 .....	52
3.1.1 実験方法.....	52
3.1.2 結果および考察 .....	56
3.2 抹茶における <i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal 生成機構の推定 .....	69
3.2.1 実験方法.....	69
3.2.2 結果および考察 .....	70
3.3 要約 .....	72
第4章 中国緑茶の特徴的な香りに関する研究 .....	74
4.1 中国緑茶(西湖龍井, 黄山毛峰, 碧螺春)の香気寄与成分の解明.....	76
4.1.1 実験方法 .....	76
4.1.2 結果および考察 .....	78
4.2 中国緑茶における( <i>E</i> )-isoeugenol 生成機構の推定 .....	85
4.2.1 実験方法 .....	85
4.2.2 結果および考察 .....	87
4.3 要約 .....	93
第5章 ダージリン紅茶の特徴的な香りに関する研究 .....	95
5.1 ダージリン紅茶に特徴的な香気寄与成分の解明 .....	97
5.1.1 実験方法.....	97
5.1.2 結果および考察 .....	102
5.2 要約 .....	117
第6章 総括.....	118
Summary .....	124
参考文献.....	129
本研究に関する出版物.....	141

本文中で用いた主な略号

AEDA	aroma extract dilution analysis
CAR	carboxene
CTC	crushing-tearing-curing
DVB	divinylbenzene
DMS	dimethyl sulfide
ee	enantiomeric excess
EI	electron ionization
GC	gas chromatography
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
GC-O	gas chromatography-olfactometry
MMP	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
NPD	Nitrogen Phosphorus Detector
OAV	odor activity value
PDMS	polydimethylsiloxane
RF	response factor
RI	retention index
SAFE	solvent assisted flavor evaporation
SDE	simultaneous distillation extraction
SCD	Sulfur Chemiluminescence Detector
SPME	solid phase micro extraction



## 第1章 緒言

### 1.1 食品における香料の役割

#### 1.1.1 食品香料

食品の香りは、その品質を決定づける重要な要素のひとつであり、嗜好性に優れた良質な香りを賦与し、作りたて、淹れたての新鮮な香りを保持することは、食品、特に加工食品の品質向上のための重要な課題である。食品香料は、このような課題を解決するために主に着香の目的で使用される食品添加物であり、食品での香料の使用目的は、①香りを補うこと、②好ましい香りをつけること、③不快な香りをマスキングすること、の3つに大別される。

①は、加工食品の製造工程にて失われる香りを補うために、できるだけそれに近い香りを再現した香料を添加することである。例えば、濃縮還元果汁飲料の製造では、果汁の濃縮工程で水分と共に揮発して失われてしまう香気成分を香料にて補うことが一般的である。

②は、加工食品の嗜好性を高めるため、理想とする生鮮食品(ここでは、生の食材や、それを調理したもの全般を指す)の香りを再現した香料を添加することである。加工食品は、同一の品質のものを大量に製造し、低価格にて提供する必要があるため、供給量やコストの面から、使用できる原料が制限される。さらに、原料は天候や季節に左右されるため、常に同じ品質とは限らない。そこで、香料によって理想の香りを賦与することで、製品の価値を高めると同時に、品質の維持にも役立てている。加工食品に使用することの難しい高級食材、希少食材の香味を模した香料の使用は、安価に本格的な味を楽しむことも可能にする。さらに、カニ風味かまぼこやワサビ風味チーズ等のように、もとの食品にはない風味を賦与することで、全く新しい食品を創出することも可能である。

③は、加工食品の製造工程中や保存中に生じる不快臭(オフフレーバー)を低減するために、香料を添加することである。加工食品は、その保存性を高めるため、加熱殺菌されることが多い。殺菌目的の加熱条件はきわめて厳しいため、通常の調理では生じないような不快臭を生じることがある。茶飲料においても、缶入り煎茶の高温高压殺菌(レトルト殺菌)により、いわゆるレトルト臭と呼ばれる不快臭が生じることが知られ、その生成機構や対策も研究されて

いる<sup>1),2)</sup>.

食品香料の原料は、合成香料と天然香料に大別され、それらを組み合わせて調合香料を製造するのが一般的である。合成香料は、食品中に存在する個々の香気成分、あるいは、食品中の存在は確認されていないが、香調が望ましく、安全性も多様な試験により確認された香気成分を合成したものである<sup>3)</sup>。合成香料を配合し、目的とする香りの食品香料を作製するためには、目的とする香りを形成する香気成分およびその組成を明らかにする必要がある。天然香料は、天然物、あるいは、天然物を加熱処理や酵素処理することで香気成分を生成させたものから、香気成分を抽出、蒸留などにより採取し濃縮したものである。目的とする香りの天然香料を作製するためには、天然物中における香気成分の特性を把握し、最適な抽出条件や反応条件を設定する必要がある。

#### 1.1.2 加工食品の発展と食品香料

日本人の生活様式は、ここ数十年の間に大きく変化し、核家族化、共働き世帯の増加が加速している(図 1.1-1)。仕事と家事、子育てを両立する女性が増え、必然的に、料理にかけられる時間も短くなっている。とはいえ、子供に栄養バランスの整ったおいしい食事を摂らせたい、おかずは最低でも 3 品はほしいといった気持ちは、昔も今も変化していない。したがって、いかに時間をかけずに、バランスの良い食事を用意するかということが、多くの女性の悩みの種となっており、時短調理器具や時短調理家電、時短レシピ本等、それらを解決するためのグッズがもてはやされている。

一方で、電子レンジや熱湯で数分加熱するだけですぐに飲食できる冷凍食品やレトルト食品といった加工食品も重要な補助アイテムであることより、その需要はますます高まり、生産量も増大している(図 1.1-2)<sup>4)</sup>。このような加工食品は、生産量が増大しているだけでなく、品質も日々向上しており、低価格であるにもかかわらず、高いクオリティで、人々の日々の食卓を彩っている。加工食品は、多忙な現代人にとっての必需品であり、今後も生産量の増大が予想される。

このような加工食品の発展と普及を支えたものには、食品加工・保存技術の向上と、食品

香料の存在が挙げられる。食品にとって、香りは品質を決定づける重要な因子であるが、加工食品の保存性を高めるために行われる殺菌処理は、食品の香りを大幅に変化させることが知られている。食品香料は、加工食品の製造工程中に失われる香りを補い、殺菌工程で生じる不快な香りをマスキングし、品質を向上させ嗜好性を高めるための香りを賦与することができる最上の手段であり、加工食品には欠かせない要素である。ゆえに、食品香料は、多忙な現代人の豊かな食生活の一端を担っていると言える。

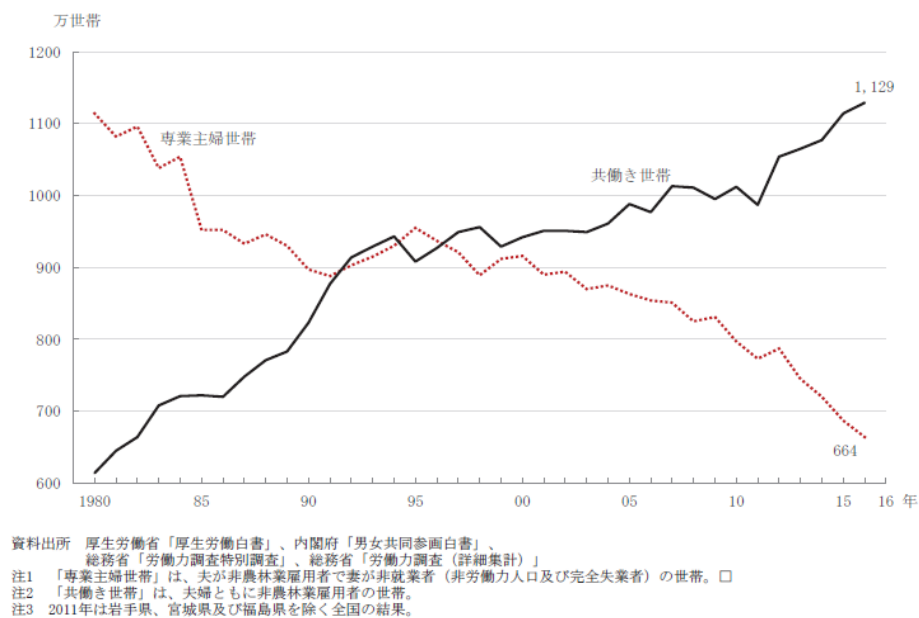


図 1.1-1 専業主婦世帯数と共働き世帯数の推移（出典 労働政策研究・研修機構 HP）

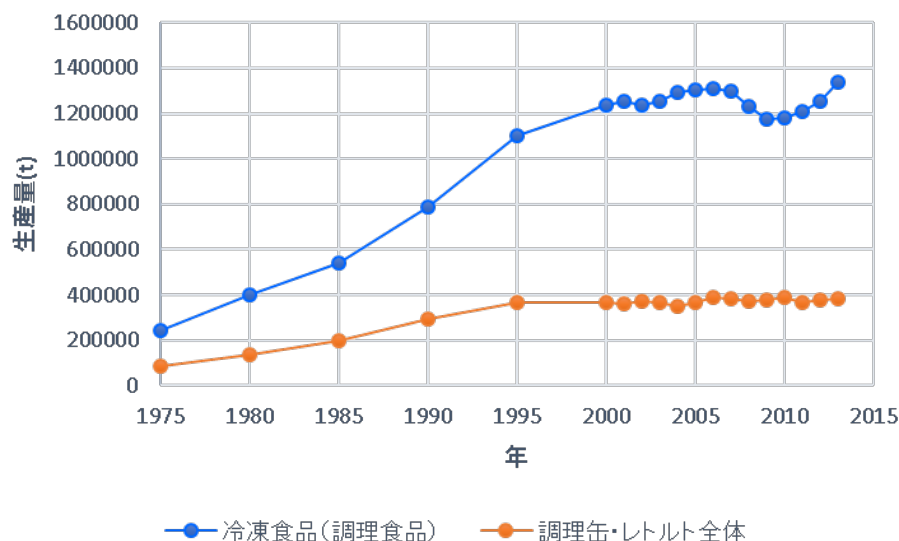


図 1.1-2 日本における加工食品生産量の推移

(出典 食品産業統計年報 平成 26 年度版(一般財団法人 食品産業センター))

### 1.1.3 茶の利用と茶加工食品の生産

加工食品の役割が増大している現象は、われわれが日常的に飲用している茶にもあてはまる。

茶は、世界中で最も多く飲まれている嗜好飲料である。飲茶の起源はきわめて古く、その詳細は明らかにされていないが、中国(前漢)の史料に、紀元前 59 年に茶に関する記録があることより、その頃にはすでに茶が飲用されていたと考えられている<sup>5)</sup>。

日本における茶の利用は、8 世紀頃より始まったとされる。当初は、餅茶として飲用されていたが、13 世紀には抹茶の飲用、次いで、散茶(釜炒り茶)浸出液の飲用が始まり、18 世紀に煎茶、玉露が考案され急速に普及した。その後、茶が重要な輸出品目となり、大規模な茶産地が形成され生産量も増大すると、「急須で淹れて飲むお茶」は、日本人にとってなくてはならない嗜好飲料として定着した。しかしながら、1975 年以降、コーヒーをはじめとする多様

な嗜好飲料が進出し、手軽に飲用できる炭酸飲料や缶コーヒーが登場すると、急須で淹れる葉茶の消費量は減少し、生産量も減少傾向となった(図 1.1-3(a)).

その後の日本における茶の消費を支えたのが、加工食品として誕生した茶系飲料である。1980 年に発売された缶入り烏龍茶が、手軽に飲用できる健康的な飲料として消費者の心をつかむと、多忙かつ健康を気にする現代人の需要にマッチした茶系飲料の生産量は急速に増大し、またたく間に清涼飲料全体の 3 割強を占めるまでになった(図 1.1-4)。現在では、中国をはじめ東南アジアの国々でも、緑茶を中心に、茶系飲料の需要は拡大している。さらに、日本の代表的な伝統文化である茶道で利用される抹茶も、1996 年に登場した抹茶アイスクリームの大ヒットを契機に、菓子や冷菓などの加工食品に幅広く利用されるようになり、生産量が増大している(図 1.1-3(b))。現在では、手軽に購入できる抹茶チョコレートが海外からの旅行客からも絶大な人気を誇り、日本の食文化を代表する食品として海外に広く普及している。

このように、茶加工食品は、飲料を中心にさまざまな食品に拡がり、その役割もより重要となっている。

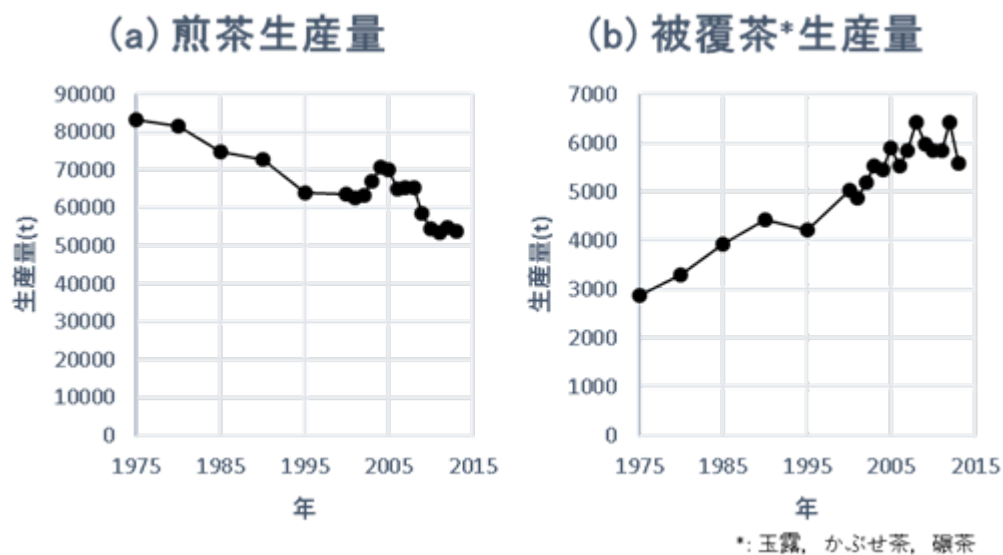


図 1.1-3 日本における茶生産量の推移

(出典 食品産業統計年報 平成 26 年度版(一般財団法人 食品産業センター))

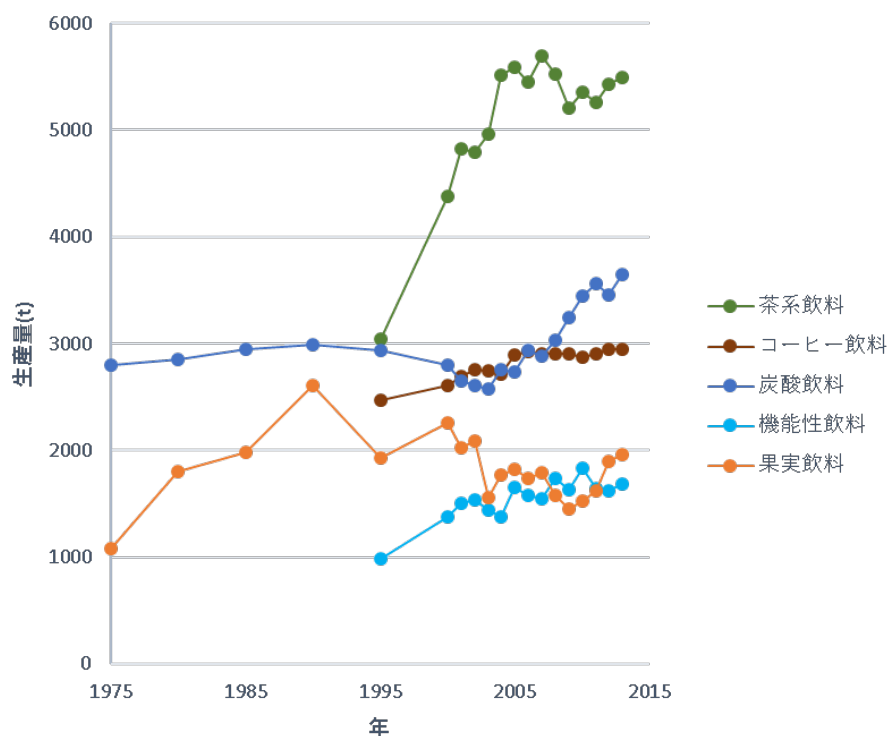


図 1.1-4 日本における各種飲料生産量の推移

(出典 食品産業統計年報 平成 26 年度版(一般財団法人 食品産業センター))

#### 1.1.4 茶加工食品における香料の役割

茶加工食品(飲料, 冷菓, 菓子)の生産量は, 年々増加しており, スーパーマーケットには多種多様な茶飲料や, さまざまな形態の抹茶風味の菓子が並んでいる. 今では, いつでもどこでも, 飲みたい茶を手軽に飲むことができ, 気軽に抹茶の風味を楽しむことができる. また, ペットボトル緑茶を常備する家庭も多い. しかし一方で, 街では紅茶専門店や中国茶専門店併設のカフェや, 抹茶スイーツ専門店が人気であり, 高級和食店では, 急須で淹れた煎茶が提供される. 家庭においても, 来客時には急須で淹れた茶を出すことが多い. これらのことは, 多くの人々が, 日常的には手軽で低価格な飲料や菓子を飲食しているものの, 潜在的には, 高級で高品質な茶や, 葉茶を急須で淹れた茶を好み, 理想的な茶と位置付けていることを示している. 実際, 加工食品である飲料や菓子の香味と, 高品質な茶, 急須で淹れた茶の香

味の間には、埋めることのできないギャップがあることは周知の通りである。

このようなギャップが生じる原因には、原料の問題と製造工程による香味の劣化が挙げられる。一般に、製品を低価格で提供するためには、安価な原料を使う必要があるが、茶は特に価格と品質に高い相関があり、安価な原料は品質が劣る。さらに、1.1.2 にて述べた通り、製造工程における香味の劣化も生じる。

この問題を解決するため、香味の劣化を抑制する食品加工技術に加えて、品質、嗜好性を向上させるための食品香料も大きな役割を担っている。

## 1.2 茶および茶加工品の香りの多様性

### 1.2.1 茶の香りを構成する要素

茶は、基本的にすべて同じ原料(*Camellia sinensis*)から作られるが、産地や製法の違いにより多くの種類があり、その香りもさわめて多彩である。茶の香りは、各々の茶を特徴づけ、おいしさを決定づける重要な品質要素である。

図 1.2-1 は、さまざまな茶の香りを構成する要素を、参考文献<sup>9)</sup>や弊社研究所の過去の研究より得られた知見をもとにまとめたものである。茶の香りは、図 1.2-1 に示すような多様な香りの要素が異なるバランスで混ざり合って形成され、そのバランスが茶のおいしさにとって非常に重要である。すなわち、緑茶はグリーン香を主体にフローラル香やロースト香、紅茶はフローラル香を主体にグリーン香、ロースト香、フルーティー香、というように、さまざまな香りの要素が最適なバランスで混ざり合ってはじめて、各々の茶に特有の芳香が生まれる。

このように多彩な茶の香りを構成する、図 1.2-1 に示した各要素に関与する香気成分の多くが、これまでの多くの研究により明らかにされるとともに、生成機構および製法との関連も解明が進められている<sup>15),18),20),27),39),40),68)</sup>。しかし、市場の需要が大きい茶であっても、その特徴的な香りを構成する成分が不明であるために、良質な香料の開発が困難であるものも存在する。たとえば、抹茶の自然な甘さのある香ばしい香り、ダージリン紅茶のマスカットを想起させるフルーティーな香り、中国緑茶特有のフローラルな香りなどの要素を構成する香気成分は未だ明らかになっていない。

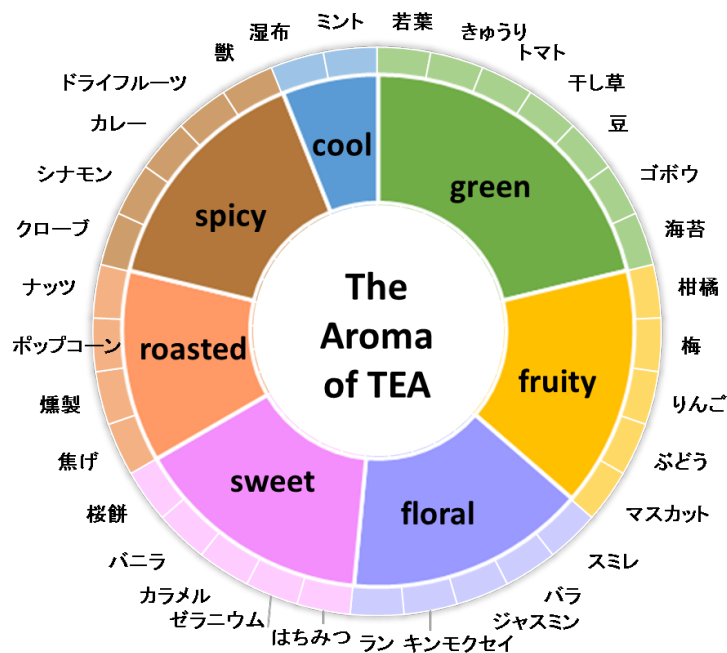


図 1.2-1 茶の香りを構成する香り

## 1.2.2 茶の香りに影響する要素

### 1.2.2.1 茶葉のポテンシャル(品種, 栽培条件, 摘採時期)と香り<sup>5),7),8),9)</sup>

#### (1) 品種と香り

茶は、ツバキ科(Theaceae)ツバキ属(*Camellia*)のチャ節(*Sect. Thea*)に分類されるチャ(*Camellia sinensis*)の葉より作られる。茶樹は、東南部アジアが原産と考えられており、現在では、中国、インド、日本などのアジアの温暖地帯を中心に、世界中で広く生産されている。

チャは形態学上、いくつかの変種が見られるが、その起源はひとつであるという説が有力であり、主なものは、小葉系の中国種(*Camellia sinensis* var. *sinensis*)と、大葉系のアッサム種(*Camellia sinensis* var. *assamica*)である。小葉系は、灌木で、葉は小さく先端が丸く、耐寒性が強く、中国や日本を中心に栽培されている。大葉系は、樹高が 15 m 以上にもなる喬木で、葉は大きく先端が尖っており、耐寒性は弱く、インドやアフリカを中心に栽培されている。

茶葉には、カフェイン、アミノ酸類、カテキン類等の化学成分が多く含まれ、大葉系茶葉は小葉系茶葉に比べてカテキン類が多いことが知られている。表 1.2-1 に、日本で登録されて

いるアッサム(大葉系)雑種(紅茶用品種)および中国種(小葉系)系品種(煎茶用品種)のカテキン含量を示す<sup>10)</sup>。カテキン類は、酸化重合により、紅茶の赤褐色を呈する色素であるテアフラビンおよびテアルビジンを形成することより、紅茶の品質に重要な成分である。しかし一方で、カテキン類は強い苦渋味を有するため、それらが製造工程中でほとんど変化することなく製茶に移行する緑茶や低発酵の烏龍茶の原料に、カテキン類を多く含む大葉系茶葉は適さない。したがって、大葉系茶葉は用途が限られ、紅茶の原料として使用されるのが主である。それに対し、カテキン類の少ない小葉系茶葉は、苦渋味が弱いため原料としての利用範囲が広く、緑茶をはじめ、烏龍茶、紅茶など、多彩な香りを有するさまざまな茶へと加工されている。

香気成分の比較では、アッサム種は linalool(L)、中国種は geraniol(G)の多いことが報告されており、竹尾らは、LとGの組成比(L/L+G)をテルペンインデックス(TI)と定義し、その値が茶の種間で大きく異なることを見出している。

これらのことは、茶の品種の違いが、その香味に影響をおよぼすことを示している<sup>11)</sup>。

表 1.2-1 品種の異なる茶葉のカテキン含量<sup>10)</sup>

品種		カテキン類(%)*
アッサム雑種	あかね	21.7
	はつもみじ	21.5
	さつまべに	19.3
中国種系	やぶきた	14.2
	あさつゆ	11.4
	みよし	16.8

\*: epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate の合計

## (2) 栽培条件と香り

茶は、亜熱帯性の作物であり、その産地は、中国、インド、日本などのアジアの温暖地帯を中心に、世界中に広く分布している。日本において栽培されている中国種は、耐寒性が強く、栽培適地の気候条件は、年平均気温 12.5～13℃以上、年間降水量 1500 mm 程度かつ 4～10 月の降水量 1000 mm 以上とされている<sup>8)</sup>。

茶の栽培条件は、香りに大きな影響を及ぼすことが知られており、一般に、標高が高く朝霧のたつような地域で生産される茶は、平坦部の茶に比べて香りが優れていると言われている。また、玉露や抹茶の原料となる茶に適用される、摘採前の一定期間、被覆により遮光する栽培法(被覆栽培)は、“覆い香”と呼ばれる特有の香りを生み出す。川上らは、被覆茶と煎茶の香気組成を比較し、被覆茶では、海苔様の香調を有する dimethyl sulfide や、 $\beta$ -ionone をはじめとするカロテノイド由来の、フローラルな香調のヨノン系化合物が多いことを明らかにし、被覆によりアミノ酸やカロテノイドを多く含有することが原因であると推察している<sup>12)</sup>。

また、昆虫による茶葉の食害が香りに影響することも知られている。特に香りの優れている茶として有名な、インドで生産されるダージリン紅茶や、台湾で生産される東方美人茶(香嬪烏龍茶)は、その特有の香りの生成に、チャノミドリヒメヨコバイの食害の関与が示唆されている<sup>13),14)</sup>。

このように、茶樹の栽培条件は、茶の香りに大きく影響する要因のひとつである。

### (3) 摘採時期と香り

茶は、年に 3~4 回生育する新芽を収穫して作られる。一番目の新芽から作られる茶が一番茶(新茶)であり、日本や中国では、一番茶の香りがそれ以降の二番茶、三番茶に比べて格段に良いと言われている。Kumazawa らは、新茶の香気に寄与する成分の解明に取り組み、最も重要な成分のひとつとして、特有のグリーン感を有する 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP)を煎茶から初めて見出し<sup>15)</sup>、さらに、本成分が一番茶に最も多く含まれ、二番茶以降では大幅に含有量が低下することより、煎茶の品質に関与する重要な成分であると推察している<sup>16)</sup>。

また、同じ一番茶であっても、その摘採時期が香りに大きく影響することが知られ、摘採時期の早いものは、若芽の新鮮な香りを有するのに対し、摘採時期の遅いものはこわ葉臭や木茎臭が強くなり品質が低下する。小柳津らは、茶芽の熟度による香気成分の変化について研究を行い、熟度が進むほど、2,4-heptadienal 等のリノレン酸由来の油臭を有する成分が増加することを報告している<sup>17)</sup>。

このように、茶期(一番茶、二番茶などの収穫期)および摘採時期は、茶の香りに影響する要因のひとつである。

#### 1.2.2.2 茶の加工と香り

図 1.2-2 に、代表的な茶の種類と製法を示す。茶の製法は、殺青、萎凋(揺青)、揉捻、乾燥に大別され、これらの製造工程の組み合わせやその順番が香気生成にとって非常に重要な意味を持つ。ここでは、各工程と順番が茶の香気生成に与える影響について述べる。

殺青は、加熱により内生酵素を失活させる工程である。この工程が最初にある茶は、内生酵素の作用による香気生成がほとんどない不発酵茶に分類され、新鮮さやグリーンな香りが重視される緑茶が該当する。殺青方法には、日本で主流の蒸熱法と中国で主流の釜炒り法があり、この方法の違いによって茶の香りが異なることが知られている。すなわち、釜炒り法で作られる中国緑茶は、茶葉の温度が不均一で内生酵素の失活に時間がかかるため、内生酵素の作用を受け、ややフローラルな香りをともなう<sup>124)</sup>。Kumazawa らは、煎茶と日本産釜炒り茶、龍井茶について、AEDA による香気寄与成分の比較を行い、煎茶に比べ、釜炒り茶では、ピラジン類をはじめとする香ばしい香りの加熱香気成分が顕著に多く、龍井茶ではさらに、linalool, geraniol といったフローラルな香調の成分の寄与度が顕著に高いことを報告している<sup>18)</sup>。また、日本においては、蒸熱時間の短い浅蒸しの煎茶は、蒸熱時間の長い深蒸し煎茶に比べ、香りの強さ、質ともに優れていると言われており、蒸熱条件が煎茶の香りに影響することが示唆されている。一方、殺青工程がない紅茶や、萎凋、揺青後に殺青する烏龍茶は、内生酵素の作用による香気生成がある発酵茶に分類され、フローラルな香りを強く有するという特徴がある。

萎凋は、摘採後の茶葉を室内あるいは露天にて風を当てたりして萎れさせる工程である。この工程では、茶葉中の水分が減少すると同時に、タンパク質が減少しアミノ酸が増加することや、総炭水化物量が減少し単糖が増加すること、また、不飽和脂肪酸やカロテノイドが分解することが報告されており、萎凋の有無が、その後の発酵工程での香気生成に影響すると言われている<sup>40)</sup>。攪拌を伴う萎凋は、揺青と呼ばれ、烏龍茶に特有の工程である。竹尾らは、包種茶に、テルペンアルコール類や, 2-phenylethyl alcohol, jasmine lactone, indole 等のフローラルな香調の芳香成分が多く含まれ、それらが揺青により増加することを見出し、烏龍茶の香りの形成にとって、揺青が重要な工程であることを推察している<sup>19)</sup>。烏龍茶の香りに重要

な香気成分は、長い間、主に製造工程中の酵素反応により生成する配糖体由来の化合物で  
あると考えられてきた。しかしながら、Wang らが、烏龍茶製造工程中の茶葉における配糖体  
含有量が、全製造工程を通して増加することを見出したことより、烏龍茶の香りにおいては、  
配糖体由来するアルコール類よりも、製造工程中に顕著な増加が認められた jasmine  
lactone や indole がより重要である可能性が示唆された<sup>20)</sup>。2015 年、Gui らは、この仮説を検  
証するため、烏龍茶製造工程中の配糖体含有量および  $\beta$ -グリコシダーゼ活性を測定し、全  
製造工程を通して配糖体含有量が減少せず、 $\beta$ -グリコシダーゼも活性化されないことを明ら  
かにした。さらに、配糖体由来化合物の含有量は、全製造工程を通じて顕著な変化が見られ  
なかった一方、indole, jasmine lactone, (*E*)-nerolidol が、揉青工程中に顕著に増加し、さらに、  
jasmine lactone や indole が摘採後の茶葉の低温保存により増加することから<sup>21)</sup>、揉青工程に  
おけるこれらの成分の増加に、茶葉の傷害ストレス応答が関与する可能性を推察している<sup>22)</sup>。

揉捻は、茶葉を揉むことで組織を破壊する工程である。揉捻時に内生酵素が既に失活し  
ている緑茶、烏龍茶では、茶葉の水分含量を均一にし、また、含有成分を浸出しやすくする  
ための工程である。一方、内生酵素が活きている紅茶では、茶葉中の酵素を絞り出すことで、  
成分の強制的な酸化(発酵)を進ませる工程であり、揉捻後の茶葉を広げて数時間放置する  
ことで、さらに発酵させる。紅茶においては、揉捻とそれに続く発酵で、配糖体から多くのアル  
コール系香気成分が生成することが報告されており<sup>23)</sup>、紅茶の香りの主体となるフローラルな  
香りの形成に重要な工程であることが知られている。一方、揉捻ではなく茶葉を磨砕する  
Crushing-Tearing-Curling (CTC) 法では、オーソドックス法に比べて配糖体由来成分の生成  
が少なく、香りも弱いことが知られている<sup>24)</sup>。

乾燥は、茶葉を加熱し、茶葉の水分含量を減らす工程である。乾燥は、茶葉の保存性を  
高めるだけでなく、茶の香りの形成にも重要であることが知られ、方法や温度、時間が香りに  
影響することが示されている<sup>25),26)</sup>。煎茶においては、アミノ酸と糖の加熱反応によりピラジン  
類をはじめとする香ばしい香りの加熱香気成分が増加することや<sup>27)</sup>、新茶特有のグリーンな  
香りへの寄与が推察される MMP の生成にも関与することが明らかにされている<sup>15),16)</sup>。また、

抹茶の原料である碾茶は、被覆茶を、揉捻せず専用の炉(碾茶炉)にて高温で乾燥する独特の製法にて作られ、煎茶や玉露に比べてピラジン類の含量が多いことが報告されている<sup>12)</sup>。中国緑茶は、乾燥方法が3種類(釜炒り乾燥、熱風乾燥、天日干し乾燥)あり、それぞれが茶の形状のみならず香りにも影響すると考えられる。

乾燥により、茶葉の水分含量はおよそ4~6%となり、茶葉の保存性が向上するが、茶葉の香りは、貯蔵中にも変化することが知られている。原らは、煎茶の貯蔵による、1-penten-3-ol, (Z)-2-penten-1-ol, (E,E)-および(E,Z)-2,4-heptadienalの経時的な増加を確認し、その生成量は貯蔵温度が高いほど多いこと、また、摘採時期の遅い下級煎茶に顕著に多いことを報告し、これらの成分の生成に茶葉中のリノレン酸含有量が関与していることを推察している<sup>28)</sup>。

製法の異なる茶の香気組成の多様性を示す一例として、各種茶の浸出液より、吸着樹脂SP700を充填したカラムによる香気濃縮法にて得た香気濃縮物のGC-MS分析結果を表1.2-2に示す(筆者実験データ)。茶の香気を構成する主要な成分は、製法の違いに関わらず共通しており、それらの含有量の違いが香気の違いを生み出している可能性を示している。これらの成分を以下の4つのグループに大別し、グループごとの含有量をグラフ化したものが図1.2-3である:①生葉中にもともと存在している、あるいは摘採前および摘採後の茶葉の生体反応(ストレス応答)により生成する、主にグリーン、フローラルな香りの成分、②製造工程中に配糖体より生成するフローラルな香りの成分、③製造工程中に脂質より生成するグリーン、ファッティーな香りの成分、④茶葉の加熱により糖、アミノ酸などから生成する香ばしい香りの成分。図1.2-3より、製法の異なる茶は、茶の種類ごとに特徴的な香気組成を有していることがわかる。

以上のように、多彩な茶の香気を構成する各成分の生成には、製造における各工程が密接に関与している。

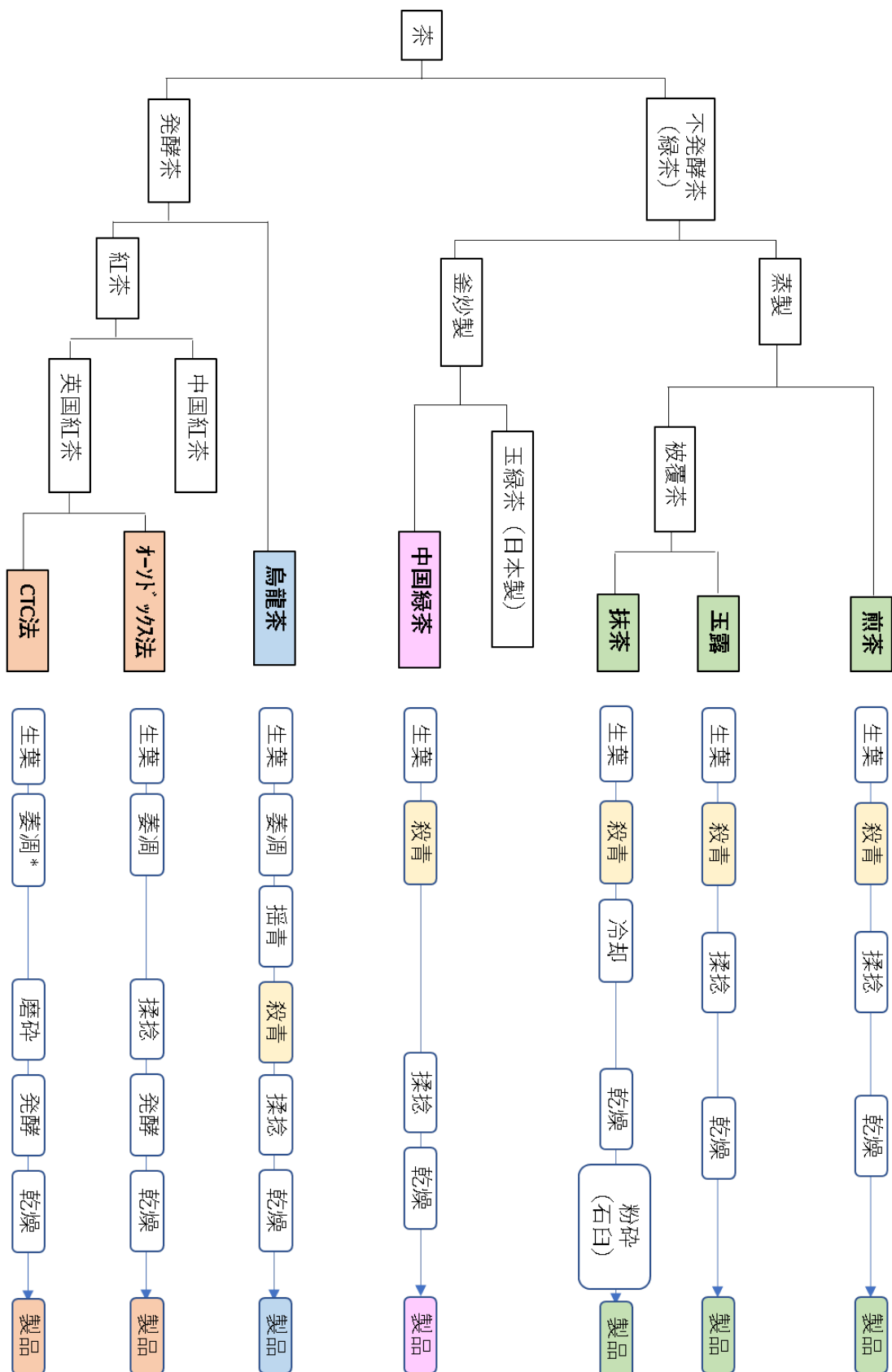


表1.2-2 各種茶の香気分析結果

RI(DB-WAX)	Compounds	香調	分類*	煎茶			中国緑茶				烏龍茶			紅茶			ppb
				天竜	初倉	藤枝	碧螺春	黄山毛峰	西湖龍井	鉄観音	凍頂烏龍	文山包種	デンプアラ	アッサム	ケニヤ		
1081	hexanal	green	①	-	-	3	2	9	6	103	72	31	54	73	129		
1140	1-penten-3-ol	green	③	-	-	10	-	-	-	103	69	34	28	28	31		
1219	(E)-2-hexenal	green	①	-	-	-	-	-	-	22	-	-	109	48	108		
1440	cis-linalool oxide	floral	②	3	2	6	18	15	10	43	37	21	61	102	36		
1456	(E,Z)-2,4-heptadienal	fatty, green	③	-	-	8	-	-	-	204	130	18	61	36	38		
1468	trans-linalool oxide	floral	②	4	2	5	34	14	11	32	19	9	162	335	95		
1487	(E,E)-2,4-heptadienal	fatty, green	③	-	-	26	-	-	3	195	128	33	71	60	66		
1535	linalool	floral	②	5	3	6	134	12	8	24	33	31	114	146	79		
1597	(5E)-3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol	floral	④	-	-	-	-	-	-	168	-	-	-	-	-		
1626	phenylacetaldehyde	floral	④	-	-	-	6	-	-	62	74	84	73	152	127		
1750	trans-linalool oxide pyranoid	floral	②	22	13	-	34	35	23	-	-	16	66	141	54		
1761	methyl salicylate	minty, cooling	②	-	-	-	2	4	4	-	-	-	140	129	53		
1827	hexanoic acid	sweaty	③	6	5	18	2	10	25	365	157	207	285	392	479		
1833	geraniol	floral	②	-	-	4	6	39	16	-	-	63	90	71	145		
1856	benzyl alcohol		②	8	13	20	30	54	33	137	158	128	111	128	73		
1892	2-phenylethyl alcohol	floral	②	2	3	6	103	58	43	659	480	484	115	160	24		
1903	benzylcyanide		①	-	-	-	-	-	-	153	117	239	-	-	-		
1930	2,6-dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol		①	5	2	4	4	36	-	105	316	221	-	63	41		
1948	2-acetylpyrrole	roasty	④	4	1	2	4	26	21	187	-	-	-	17	-		
1950	(E)-2-hexenoic acid	fatty	③	-	-	-	-	-	-	-	-	25	66	169	44		
2241	(Z)-7-decen-5-olide	sweet	①	19	7	7	-	-	-	1327	614	543	-	17	-		
2321	geranic acid		②*2	-	-	4	-	18	12	-	-	-	27	26	201		
2330	dihydroactinidiolide	roasty	④	16	16	52	-	11	20	545	403	279	363	300	263		
2409	indole	floral	①	166	207	335	15	26	14	620	3474	1558	22	-	-		
2425	coumarin	sweet	②	44	21	40	8	25	35	55	-	129	-	-	-		
2465	5-hydroxymethylfurfural	sweet	④	-	-	-	-	13	-	107	-	-	-	-	-		
2540	phenylacetic acid		②*2	-	-	-	-	-	-	117	-	-	-	130	46		
2906	p-hydroxybenzaldehyde		①*2	77	76	53	75	82	105	125	167	112	56	75	52		

-: 20ppb未満(煎茶), 200ppb未満(烏龍茶, 紅茶)

\*1: ①: 生葉中に存在する,あるいはストロシス応答などの生体反応により生成する成分, ②: 製造工程中に配糖体より生成する成分, ③: 製造工程中に脂質より生成する成分, ④: 加熱反応により生成する成分

\*2: 推定

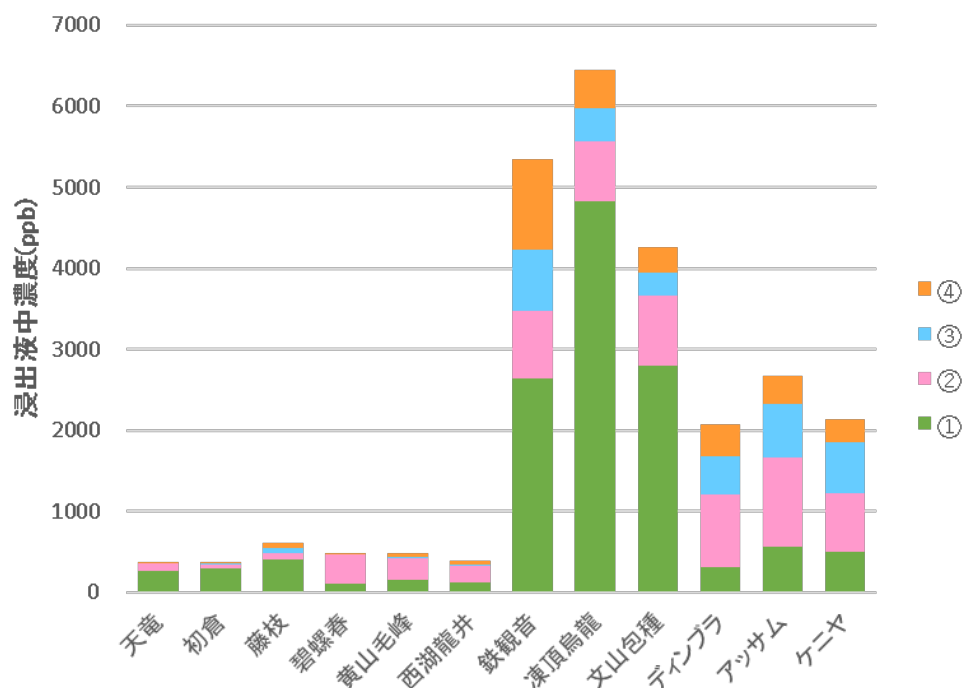


図 1.2-3 各種茶の香気組成

- (①: 生葉中に存在する, あるいはストレス応答などの生体反応により生成する成分,  
 ②: 製造工程中に配糖体より生成する成分, ③: 製造工程中に脂質より生成する成分,  
 ④: 加熱反応により生成する成分)

### 1.2.2.3 伝統茶について

世界における茶の生産量は, この 70 年あまりで約 10 倍に増大し<sup>29),30)</sup>, 現在は約 500 万トンで年々増加する傾向にあり, 生産されている茶の内訳は, 紅茶が 6 割, 緑茶が 3 割, その他が 1 割である. このような茶の生産・消費の増大を支えるため, 茶の産地では, 製造の機械化, 効率化が行われてきた. 紅茶では, 従来法(オーソドックス法)よりも短時間で製造できる CTC 法が開発され, 煎茶では, 従来法をほぼ忠実に機械化した自動連続製茶機が普及した. また, 抹茶は, 増大する加工用抹茶の需要に応えるため, 被覆茶ではなく露地栽培の茶を原料にする, あるいは, 碾茶炉を使わず, 煎茶のように揉捻した茶葉(モガ)を使用する, また, 石臼ではなく粉砕機で粉砕する, 等の方法が導入され, そのようにして製造された粉末が, 加工用抹茶あるいは食品用抹茶として流通している<sup>31)</sup>.

しかしながら、このような効率化した方法で作られた茶は、昔ながらの伝統的な製法に則して作られたものに比べ、香りが劣っていることが指摘されている。すなわち、CTC 法により作られた紅茶は、オーソドックス法により作られた紅茶に比べて香りが弱く、香気成分量も少ないことが報告されており<sup>24)</sup>、加工用抹茶も、被覆茶を碾茶炉にて乾燥し石臼で挽いて製造した本来の抹茶に比べて香りが劣ることが知られている。また、煎茶は、伝統的な製法に則した機械化ではあるものの、旨味を追求するあまり、1960 年頃から窒素施肥量が急速に増加し<sup>32)</sup>、また、茶の成分が浸出されやすい深蒸しが主流になった結果、それ以前の煎茶に比べて香りが弱くなったと言われている。

これらのことより、食品香料に求められる、嗜好性に優れた良質な茶の香りの分析にあたっては、伝統的な栽培・製造方法にて作られた茶(伝統茶)こそが、最良のサンプルであると考えられる。

### 1.2.3 茶加工食品の製造と品質

茶飲料の一般的な製造方法は、製茶加工された原料茶葉に加温した水を加え抽出したのち、濾過、殺菌(缶製品ではレトルト殺菌(121℃, 11 分など)、紙および PET 製品では UHT 殺菌(140℃, 10 秒など))を経て容器に充填する<sup>33)</sup>。加熱殺菌は、加工食品の腐敗を防ぎ、保存性を高めるために必要不可欠な工程であるが、緑茶の香気に大きな変化をもたらす、いわゆる殺菌臭を生じることが知られている。熊沢らは、緑茶のレトルト殺菌および UHT 殺菌後の香気を AEDA にて分析し、レトルト殺菌後はフローラルな香調の linalool, geraniol, スイートな香調の  $\beta$ -damascenone, スパイシーな香調の 2-methoxy-4-vinylphenol, UHT 殺菌後は、トマトやジャガイモ様の香調の methional が最も高い寄与度を示し、その結果が官能評価結果とも一致したことを報告している<sup>1)</sup>。また、レトルト殺菌後の紅茶では、 $\beta$ -damascenone, methional, 2-methoxy-4-vinylphenol に加え、刺激臭を有する 3-methylbutanal, 腐敗臭を有する dimethyl trisulfide が高い寄与度を示したことを報告している<sup>34)</sup>。このような、茶飲料の加熱殺菌による香気の変化は、繊細な香りを楽しむ茶にとって重大な問題である。

一方、近年生産量が増大している抹茶加工品に使われる抹茶は、主に前述した加工用抹

茶である。加工用抹茶は、香りが弱いだけでなく苦渋味が強いので、使用量が限られ、それだけでは抹茶の風味はほとんど感じられない。したがって、抹茶加工品の製造においては、その風味の強化が必要である。

これらのことより、茶加工食品の品質、嗜好性向上のためには、良質な茶の香りの賦与が必要であり、食品香料は、それを実現するために現在考え得る最上の手段である。

### 1.3 茶の香気成分

#### 1.3.1 茶の香気研究法

##### 1.3.1.1 前処理法について

茶に限らず食品の香気分析においては、食品のまわりに漂う、あるいは、複雑なマトリックス中に含まれる微量の香気成分を回収、濃縮する必要がある。しかしながら、香気は、多様な化学的、物理的性質を有する化合物の集合体であるため、その方法(前処理法)によって各々の化合物の回収率が異なり、得られる結果も大きく異なる。したがって、香気分析においては、目的に応じた適切な前処理法の選択が重要な課題となる。たとえば、食品のまわりに漂う香気を分析するには、静的(static)あるいは動的(dynamic)ヘッドスペース(HS)分析法や Solid Phase Micro Extraction (SPME)分析法、食品に含まれる香気成分を分析するには、溶剤抽出法、蒸留抽出法、ポーラスポリマービーズを充填したカラムによる香気濃縮法(樹脂吸着法)、Solvent Assisted Flavor Evapolution (SAFE) 法等があり、目的に合わせて選択する。あるいは、複数の方法を組み合わせる場合もある。香りが穏やかかつ繊細で、熱により変化しやすい茶の香気分析においては、極力熱をかけずに、もとの香りを保持したまま高度に濃縮できる手法の選択が必要である。

ヘッドスペース分析法は、主に、試料を入れ密閉した容器中のヘッドスペースガスをガスタイトシリンジにて吸引し、Gas Chromatography (GC) に直接注入する方法(static HS 法)と、ヘッドスペースガス中の香気成分を一旦吸着剤に吸着後、溶剤等にて脱着し、必要に応じて濃縮後 GC に注入する方法(static あるいは dynamic HS 法)がある。前者は、操作が簡便で、抽出、濃縮等の操作もないため不純物の混入や高揮発性成分の減耗もなく、食品の周りに漂う香りそのものを分析することができるが、空気中の香気成分濃度はきわめて低いため、感度が低い。一方、吸着剤を使用する方法では、吸着時間を長くしたり、脱着後に濃縮することで感度を上げることが可能であるが、吸着剤に対する各化合物の吸脱着効率の違いや濃縮による高揮発性成分の減耗等により、香気組成が変化する可能性がある。

溶剤抽出法では、抽出溶剤の種類により各化合物の回収率が大きく異なるため、目的に応じた抽出溶剤の検討が必要である。蒸留抽出法は、減圧下における水蒸気蒸留で精油を

得る方法であり、かつて茶の香気分析法の主流であったが、長時間にわたり茶葉が加温されるため、熱による香気の変化が問題であった。そのような蒸留抽出法の欠点を克服するために開発された樹脂吸着法<sup>35)</sup>は、香気を含む水溶液サンプルを、吸着樹脂を充填したカラムに通液し、吸着した香気成分を有機溶剤にて脱着、濃縮する方法であり、吸着効率による組成の変化はあるものの、過度な加熱操作が無いため、もとのサンプルの香気をよく保持した濃縮物を得ることができる。SAFE 法<sup>36)</sup>は、有機溶剤中の揮発性成分を、きわめて高い減圧下で蒸留する方法であり、過度に加熱することなく揮発性成分と不揮発性成分を分離することが可能である。溶剤抽出や樹脂吸着により得られた、大量の不揮発性成分を含む香気抽出液は、そのままでは高度な濃縮が困難であるが、本法にて処理することで不揮発性成分が除去され、高度な濃縮が可能となる。

#### 1.3.1.2 機器分析について

このように種々の前処理法により得られた香気濃縮物には、膨大な数の揮発性化合物が含まれている。したがって、それらを網羅的に分析するためには、ほとんどの場合、分離に優れる GC が用いられる。GC は、内側に液相を塗布した細く長いキャピラリカラムを用い、揮発性化合物を、沸点および液相との親和性で分離する。液相には、極性の異なるさまざまなものがあり、目的とする成分を分離するのに最適な液相を選択する。しかしながら、最適な条件にて分離を行ったとしても、その香気成分数の多さゆえに、目的成分をきれいに分離できない場合も多い。そこで、1 本目のカラムにて目的成分を含むピークを分取し、分取したサンプルを別の液相のカラムにて分析することで、内容成分の溶出パターンを変化させ、分離を向上させる手法が利用される。このように、液相の異なる 2 つのカラムを用いて分離能を上げる手法は、多次元 GC と呼ばれ、複雑な混合物中の成分の分離にきわめて有用である。

GC にて分離した化合物は、種々の検出器にて検出し、検出結果は、時間軸に沿って検出された濃度を記録したクロマトグラムとして保存される。GC では、溶出位置から、カラムの液相に依存する化合物ごとの固有値である保持指標が得られ、検出されたピークの面積値から存在比を算出できる。

検出器として最も多く用いられるのは、化合物固有のマスペクトル情報を得ることができ、定性に優れる Mass Spectrometry (MS) である。GC-MS を用いることで、保持指標 (RI) とマスペクトルの照合による化合物の同定に加え、ピーク面積値から組成比、存在量を得ることが可能であり、香気濃縮物に含まれる膨大な数の成分を網羅的に分析するのに最適な方法である。

一方、含硫化合物や含窒素化合物を選択的かつ高感度に検出できる検出器として、Nitrogen Phosphorus Detector (NPD: 窒素リン検出器), Sulfur Chemiluminescence Detector (SCD: 化学発光硫黄検出器) がある。これらの化合物は、一般に閾値が低く、食品の重要な香気寄与成分であることが多い。したがって、NPD, SCD は、食品の香りの分析においてきわめて有用な検出器である。さらに、GC-MS とこれらの検出器を組み合わせることで、微量に含まれる含硫化合物、含窒素化合物の効率的な検出、同定が可能となる。

さらに、GC にて分離された各化合物の香調や強度に着目した手法として考案されたのが、GC-Olfactometry (GC-O) である。GC-O では、人間の嗅覚を検出器として用いる、すなわち、GC によって分離された化合物を人間の鼻で検知するため、香調を確認できるだけでなく、通常の検出器では検出されない、閾値の低い微量成分も検出することができる。GC-O のみで検出された微量成分は、その保持指標と香調を標品と比較することで、化合物を推定できることもあるが、同定するためには、目的成分を高度に濃縮、精製し、MS あるいは nuclear magnetic resonance (NMR) を用いて構造決定する必要がある。目的成分を高度に精製、濃縮するためには、シリカゲルカラムによる分画や、GC により分離された目的成分を繰り返し分取し、濃縮する方法がある。

#### 1.3.1.3 データの解釈と香りの関連

茶の香気分析では、前述した種々の手法により得られたデータを適切に解釈する必要がある。すなわち、香気化合物のにおい閾値は化合物によってまちまちであるため、その存在量と香りへの寄与度は一致しないことを念頭に置く必要がある。

GC-MS により得られる結果は、香気濃縮物における各化合物の存在比である。一般に、膨

大な数の成分が検出される GC 分析における各成分の定量は、内部標準物質に対する応答強度比を一律で 1 と仮定した内部標準法によることが多く、正確な意味での定量値ではないが、さまざまな茶の GC-MS 分析結果を比較することは、各茶葉中の揮発性化合物の組成の違いや、各化合物の生成と製造工程や原料茶葉中の成分、品質との関連を把握するうえで有用であり、官能評価結果と照合することで、香りの違いに関与する成分を推定することもできる。しかしながら、前述のとおり、香気化合物の香りへの寄与を明らかにするためには、含有量に加え、におい閾値を考慮する必要がある。したがって、ここで得られる結果から、香りの違いに関与する成分を明らかにすることはできない。そこで、各化合物の含有量をにおい閾値で除した値 (Odor Unit) を算出し、香りへの寄与度の指標とする考え方が提唱されている。この手法により、GC-MS 分析により得られた定量値から、香りへの寄与度を明らかにすることができる。しかしながら、閾値が明らかにされている化合物は限られていることや、正確な定量値を算出するためには、個々の成分の内部標準物質に対する応答強度比 (Response Factor: RF) を求める必要があることより、茶から検出される膨大な数の香気化合物すべてについて、Odor Unit を算出することは困難である。さらに、GC-MS において検出されない成分は対象外となるため、微量で閾値の低い重要香気寄与成分は考慮されないというきわめて重大な問題がある。

この問題を解決する手法が、検出器として人間の嗅覚を用いる GC-O であり、GC-O を用いて全体の香りへの寄与度を評価する手段として提唱された手法が Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) である<sup>37)</sup>。AEDA では、香気濃縮物を段階的に希釈して GC-O 分析に供し、各化合物を検出できる最大希釈率 (Flavor Dilution factor: FD ファクター) を全体の香りへの寄与度の指標とする。AEDA を用いることで、香りに寄与する成分の把握が可能となり、茶に関しても、煎茶、紅茶を中心に、多くの香気寄与成分が明らかにされている<sup>15),18),68)</sup>。

### 1.3.2 茶香気研究のあゆみ

茶の香気に関する研究の始まりは、1916 年の Deuss による紅茶精油からの methyl salicylate、茶葉からの methanol の単離と言われている。日本における研究は、1930 年代に

始まり、当初はペーパークロマトグラフィーにより香気成分を分離していたという。

1960 年代に GC、次いで GC-MS が登場すると、香気分析の効率が飛躍的に上がり、煎茶、紅茶をはじめさまざまな茶の香気成分が、多くの研究者によって多数解明され、品種や製法の異なる茶の成分バランスの違いも明らかにされた。その一方で、多くの研究が行われたにも関わらず、緑茶の香気特徴成分の解明にはいたらなかった。

香気研究において最も重要なことは、香気濃縮物が元の香りを再現していることであるが、それまでの香気濃縮物の調製方法は、減圧連続蒸留抽出 (Simultaneous Distillation Extraction: SDE) 法が主であり、茶葉に水を加え、50℃～70℃程度の湯浴にて 60 分もの間加温して香気を捕集するというものであった。これに対し、重松らは、吸着樹脂 Porapak Q を用いた樹脂吸着法を紅茶に適用した結果、SDE 法で得られる濃縮物とは全く異なる、飲用時の香りを忠実に再現した香気濃縮物が得られたことを報告した<sup>38)</sup>。また、ヘッドスペース中の香気を高感度に分析する手法である、SPME 法も活用されるようになった。

機器分析技術の向上により、1990 年頃までには茶から約 600 あまりの香気成分が解明された。しかしながら、茶の香気特徴成分の解明には及ばず、これまでの分析法のみでは香りの分析として不十分であることが明らかとなり、嗅覚を取り入れた分析手法として GC-O が行われるようになった。さらに、Grosch によって提唱された AEDA<sup>37)</sup>は、各成分の香りへの寄与度を明らかにすることを可能にし、茶の香気研究の発展に大きく貢献した。この手法により、各種茶の香りに寄与する多数の成分が、新たに見出された<sup>15),18),68)</sup>。

一方、茶の香気生成機構に関する研究も進められ、各香気成分の前駆体や、製造工程にともなう前駆体量、香気生成量の変化などが明らかにされている<sup>20),27),39),40)</sup>。近年では、遺伝子レベルでの香気生成の解析も進められている<sup>22)</sup>。

#### 1.4 茶加工食品向け食品香料の問題点

前述のとおり、茶を利用した加工食品（飲料、菓子）の生産量は年々増加傾向にあり、それらに使用する食品香料の需要も増大している。特に、日本では、煎茶、抹茶、紅茶が、中国や東南アジアでは、中国緑茶の加工食品生産量が多く、それらの品質向上に向けた香料開発が必要である。

食品香料には、消費者が理想とする茶、すなわち、高品質な茶や、急須で淹れた茶の香りを再現することが求められる。しかしながら、高品質な茶の特徴的な香りに寄与する成分やその特性については不明な点が多く、求められるレベルの香料の作製にはいたっていない。たとえば、近年冷菓や菓子への利用が急増している抹茶は、香料の需要が大きいにも関わらず、これまで香気寄与成分に関する研究例がほとんどなく、抹茶フレーバーとして使用されている食品香料の多くが、デフォルメされたフローラルな香調のものであり、実際の抹茶の、自然な甘さ、香ばしさを有する香りとは大きく異なるものであった。また、ダージリン紅茶は、その香気寄与成分の大部分が解明されているものの、最大の特徴であるマスカット様香気の形成については不明な点が多く、その香りを再現する香料の作製にはいたっていない。中国や東南アジアにおける主要な飲料である中国緑茶についても、香気に関するいくつかの報告はあるものの、その中国茶特有のフローラルな香りの再現にはいたっていない。

したがって、これらの茶加工食品向け食品香料の開発においては、高品質で嗜好性に優れた良質な茶の香りをより忠実に再現することが大きな課題であり、そのための基となる知見を得ることが必要である。

## 1.5 本研究の目的と意義

上述の通り、茶は古くから日本人にとって最も身近な嗜好飲料であるが、近年その利用形態は、急須で淹れる葉茶から、手軽に飲食できる加工食品(飲料、冷菓、菓子)へとシフトしており、茶加工食品の生産量が増大している。そのような茶加工食品にとって、香りはおいしさを決定づけ、嗜好性に大きく影響する重要な品質因子である。したがって、茶加工食品の品質および嗜好性向上のためには、消費者が理想とする良質な茶の香り、すなわち高品質な茶や、急須で淹れた茶の香りを再現することが重要である。

消費者が理想とする良質な茶の香りを再現した嗜好性の高い茶加工食品の開発においては、そのような茶の特徴的な香りを効果的に賦与できる食品香料が期待されており、食品香料の開発には、目的とする茶の特徴的な香りに寄与する成分およびその特性に関する知見が必要である。しかしながら、良質な茶の特徴的な香りについては不明な点が多く、茶加工食品に求められる良質な茶の香りを効果的に賦与できる食品香料の開発にはいたっていない。

そこで本研究では、茶加工食品において良質な茶の香りを再現するための食品香料開発の基となる知見を得ることを目的に、加工食品の生産量が多く、食品香料に大きな需要が見込まれる、小葉系茶葉から作られる4種の茶(煎茶、抹茶、中国緑茶、紅茶)について実験を行った。すなわち、これら4つの茶について、伝統的な製法に則して製造され、良質な香りを強く有する高品質なサンプルを対象に、嗅覚を利用した手法であるGC-O(AEDA)による香気寄与成分探索を行い、その特徴的な香りに寄与する成分を検討した。さらに、それらの成分の生成機構を検討し、良質な茶の香りの形成について、原料茶葉のポテンシャル(品種、栽培条件、摘採時期等の影響を受けて獲得した生葉の特性)および製造工程との関係を考察した。

本論文は6章からなる。

2章では、良質な煎茶特有のグリーンな香りの形成に関わる要因を明らかにすることを目的に、すでに良質な煎茶の香りへの寄与が示唆されているMMPに着目して実験を行った。一般に煎茶は、昔ながらの伝統的な製法による、蒸熱時間が短い浅蒸しの方が、近年主流

となっている深蒸しに比べて香りの強さ、質ともに優れていると言われているが、その違いに関与している成分は明らかになっていない。そこで本研究では、浅蒸し煎茶の優れた香りに MMP が関与していることを想定し、蒸熱条件の異なる複数の一番茶の MMP 含有量および浸出液の香りを比較することで、煎茶の香りと MMP の関係を検討した。

3 章では、良質な抹茶の香りに寄与する成分を明らかにすることを目的に、実験を行った。抹茶は、近年冷菓や菓子への利用が急増しており、食品香料の需要も増大しているにも関わらず、その香気に関する研究はほとんど見当たらない。そこで、抹茶の香りの主体となっている成分および特に良質な抹茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにするため、品質の異なる 3 種の抹茶(高級、並、低級)の香気寄与成分を比較した。さらに、見出された成分の生成機構を検討し、抹茶香気の主体となる香りおよび高級抹茶特有の香りの形成に関与する要因を考察した。

4 章では、良質な中国緑茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにすることを目的に、実験を行った。中国緑茶は、世界最大の茶生産・消費量を誇る中国をはじめ東南アジア全域において最もポピュラーな茶であり、近年ペットボトル飲料の生産も増大していることより、食品香料の需要も大きい。煎茶とは異なる特有のフローラル感を有する中国緑茶の香りについては、多数の香気成分が解明されるとともに、殺青方法が特徴的な香りの形成に関与していることも示唆されている。しかしながら、中国緑茶特有のフローラルな香りに寄与する成分は明らかになっておらず、いわゆる“中国茶らしい香り”を再現できる食品香料を作ることは困難である。そこで、中国緑茶の中でも代表的な 3 銘柄(西湖龍井, 黄山毛峰, 碧螺春)の春および秋収穫品の香気寄与成分を比較し、6 品に共通して寄与度の高い成分を探索した。さらに、見出された成分の生成機構を検討し、中国緑茶の特徴的な香りの形成に関与する要因を考察した。

5 章では、紅茶の中でも世界的に有名な高級紅茶、ダージリン紅茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにすることを目的に、実験を行った。ダージリン紅茶は、マスケットフレーバーと言われるフルーティーでグリーンな特有の香りを有することより“紅茶のシャンパン”とも称され、日本のみならず、世界中で人気の高い紅茶である。したがって、飲料製品の需要も大きく、その特徴的な香りを賦与できる食品香料が求められている。しかしながら、マスケットフレーバーに寄与する成分は解明されておらず、その香りを再現できる食品香料の開発にはいたっていない。そこで本

研究では、ダージリン紅茶と、産地の異なる 7 種の紅茶の香気寄与成分を比較し、ダージリン紅茶に特徴的な成分を探索した。さらに、見出された成分の生成機構を検討し、マスカットフレーバーの形成要因について考察した。

6 章では、2 章から 5 章で得られた結果を総括した。

## 第2章 高品質な煎茶の香りに関する研究

### 2.1 蒸熱条件の異なる煎茶のMMP 定量

煎茶は、日本における茶生産量の8割強、茶系飲料市場のおよそ4割を占め<sup>41),42)</sup>、日本人にとって最も馴染み深く、多く飲用されている茶である。煎茶の品質は、摘採時期により大きく異なることが知られており、春先に収穫される一番茶が最も品質が良いとされ、余韻の残る特有のグリーンな香りは、新茶の香りとして珍重されている。したがって、一番茶の香りこそが、緑茶飲料に求められる、高品質で嗜好性の高い煎茶の香りであると言える。

Kumazawaらは、この一番茶特有の香りに寄与する成分の解明に取り組み、最も重要な成分のひとつとして、硫黄化合物である4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP)を見出し、本成分が微量ながら極めて閾値が低く、かつ特有のグリーン感を有することから、良質な煎茶香気への関与を推察している<sup>15)</sup>。さらに、煎茶におけるMMPが、一番茶に最も多く含まれ二番茶以降では大幅に含有量が低下すること、また、火入れにより生成し、生成には最適な火入れ条件があることを明らかにし、MMPが、煎茶の品質に関与する重要な香気成分である可能性を報告している<sup>16)</sup>。一方、煎茶の香りに関して、一般に、昔ながらの伝統的な製法、すなわち蒸熱時間が短い浅蒸しの方が、近年主流となっている深蒸しに比べて香りの強さ、質ともに優れていると言われ、蒸熱工程の煎茶香気への影響が指摘されているが<sup>43)</sup>、その違いに関与している成分は明らかになっていない。そこで本研究では、浅蒸し煎茶の香りの強さおよび質にMMPが関与していることを想定し、蒸熱条件の異なる複数の一番茶のMMP含有量および浸出液の香りを比較することで、煎茶の香りとMMPの関係を検討した。

#### 2.1.1 固相マイクロ抽出(SPME)－GC-MS法による煎茶中MMP定量法の検討

煎茶に含まれるMMPはごく微量であるため、従来法にてMMPを定量するには、本成分を多量の茶葉から煩雑な前処理(抽出、蒸留)にて分離し、高度に濃縮する必要がある。そのため、何種類もの煎茶に含まれるMMPを定量し、その結果を上述のような特性評価に利用することは容易ではない。食品に微量含まれるMMPを定量するための方法は、すでにいくつかが提案されて

いる<sup>44),45),46),47)</sup>. それらの中でも, 固相マイクロ抽出 (Solid-Phase Micro Extraction: SPME) 法と 2,3,4,5-pentafluorobenzyl bromide (PFBBR) による誘導体化を組み合わせた方法は, PFBBR の強力な電子捕獲性により選択性や検出感度に優れ, さらに, 測定の自動化も達成されている<sup>45),46)</sup>. しかしながら, PFBBR 誘導体を高感度で検出するためには, 負イオンモードでの化学イオン化による質量分析器 (Negative ion Chemical Ionization Mass Spectrometry: NCI-MS) のような特殊な検出器が必要であり, この方法は, 必ずしも汎用性に優れた方法ではない.

そこで, 一般的な GC-MS (Electron Ionization: EI) と SPME 法を用いて, 煎茶に微量含まれる MMP を簡便かつ迅速に定量する方法の開発を検討した.

#### 2.1.1.1 実験方法

##### (1) 実験材料

蒸熱条件の異なる市販の静岡県産荒茶 (浅蒸し, 中蒸し, 深蒸し) 35 種を購入して使用した. 茶葉はいずれも, 2004 年から 2008 年に製造された一番茶であり, 実験に使用するまで -80℃ の冷凍庫に保管した. 荒茶の火入れは, 乾熱オーブンにて 110℃, 15 分間加熱した. MMP は, 文献<sup>48)</sup>にしたがい合成し, DB-WAX カラムにおける保持指標 (RI) およびマススペクトルの一致を確認した (RI<sub>DB-WAX</sub>: 1391, MS (EI):  $m/z$  (%) 43 (100), 55 (10), 75 (9), 99 (4), 132 ( $M^+$ , 8)). SPME ファイバー (Polydimethylsiloxane: PDMS, 100  $\mu\text{m}$ ; PDMS/Divinylbenzene: PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ; Carboxane/PDMS: CAR/PDMS, 75  $\mu\text{m}$ ; DVB/CAR/PDMS, 50/30  $\mu\text{m}$ ) は, Supelco (Bellefonte, PA, USA) より購入した.

##### (2) 測定条件

粗く粉碎した茶葉 1.0 g を 20 mL 容ガラスバイアルにはかり取り, 飽和食塩水 (200  $\mu\text{L}$ ) および methanol (5  $\mu\text{L}$ ) を添加した. 標準添加法にて定量するサンプルには, 既知濃度の MMP メタノール溶液 (0-400 ppb; 終濃度 0-2.0 ppb) を添加した. 溶液添加後のサンプルは, テフロン棒にて均一に混合したのち, シリコンセプタム付キャップにて密栓し, オートサンプラーによる SPME 分析 (表 2.1.1-1) に供した.

##### (3) GC-MS

Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-WAX(30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。キャリアーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min)。注入口温度: 250°C。注入法:スプリットレス注入(SPME 用インレットライナー使用)。オーブン温度は 40°C (1 分間保持)~150°C (20°C/min)とした。質量検出器(MS)は, Agilent 社製 5975B MSD を使用した。イオン化電圧:70 eV(EI), イオン源温度:150°C。検出は, Selected Ion Monitoring (SIM)モード( $m/z$  132, 75)にて行った。

#### 2.1.1.2 結果および考察

##### (1) 前処理法および測定条件の検討

MMP を簡便かつ迅速に定量する方法として, 比較的少量の茶葉から, 溶媒抽出することなく MMP を分離し, 分離した MMP を高感度で検出可能, かつ, それら一連の操作を自動化できる SPME-GC-MS (SIM) 法を検討した。試料には, ミキサーにて粉末化した煎茶を用い, 一定濃度に希釈した MMP, もしくはその溶媒とともに, バイアル中で均一に攪拌後, 密栓した。次いで, バイアル中で平衡化したヘッドスペースから, SPME 法により抽出した MMP を, GC-MS (SIM) で測定し, 標準添加法にて定量した。このような大幅な前処理の簡略化と, オートサンプラーによる抽出から測定までの一連の操作の自動化により, 簡便かつ迅速な MMP の連続測定の達成を目指した。しかしながら, 煎茶に含まれる MMP は極めて微量であるため, 前処理法と測定条件の最適化が必要であった。

市販されている SPME ファイバーには多くの種類があり, 測定の対象となる化合物の性質に応じて使い分けるのが一般的である。そこで, 香気分析で一般的に使用されている 4 種のファイバーを用い, 同一条件にて MMP を測定したところ, 微極性を有するファイバーが高い抽出効率を示し, 中でも, DVB/CAR/PDMS は抽出効率と再現性の両方に優れていることが明らかとなった。そこで, このファイバーを用いて, 抽出温度と時間, さらに試料量を検討したところ, MMP のピーク面積値は, 抽出温度が高いほど, また, 抽出時間が長いほど増加する傾向が認められた(図 2.1.1-1)。しかしながら, MMP が火入れにより形成される点を考慮すると, より低温, 短時間での抽出が望ましく, ある程度のピーク強度が確保できる, 60°C, 30 分間の抽出条件が適当と判

断した。また、試料量は、ピーク面積値の増加が頭打ちになる 1 g が適当と判断した。

今回、定量には、溶媒で希釈した既知濃度の MMP を分析試料に添加して検量線を作成する標準添加法の適用を想定した。しかしながら、MMP を希釈する溶媒の種類と量は、SPME の抽出効率に影響を与える可能性がある。そこで、メタノール、エタノール、蒸留水、飽和食塩水について、それぞれを茶葉に対して 1%、あるいは、10%添加し、MMP のピーク面積値を比較したところ、溶媒の種類の影響は、1%と少量であれば、比較的小さいことが明らかとなった(図 2.1.1-2)。一般に、チオール類は、水溶液中での安定性が低いことが知られている。そのため、希釈溶液の保存性と抽出効率への影響を考慮し、メタノールを選択した。

一方、茶葉に対して溶媒を 10%添加した場合、有機溶媒ではピーク面積値が減少したのに対し、蒸留水や飽和食塩水では大幅に増加した。この結果は、水は MMP の希釈溶媒としては好ましくないものの、前処理の段階で添加すると、MMP の抽出効率の向上に役立つ可能性を示している。そこで、より詳細に水の添加効果を調べるため、蒸留水と飽和食塩水の添加量を茶葉に対して 40%まで段階的に増やした場合のピーク面積値の変化を測定した。その結果、MMP のピーク面積値は、添加量が茶葉の 10%から 20%の範囲で最大となり、さらに添加量を増すと、減少する傾向が認められた。また、最適な添加量の範囲が蒸留水では狭いのに対し、飽和食塩水では比較的広く、再現性も、より良好であった(図 2.1.1-3)。そこで、より安定した抽出効率の向上が期待できる飽和食塩水を、茶葉に対して 20%添加することとした。このように、粉末試料にごく少量の水を添加することで、SPME の抽出効率が向上する現象は、香り米におけるアセチルピロリンでも観測されている<sup>49),50)</sup>。この現象のメカニズムとしては、試料中の香気成分と水が微粒子を形成することで、香気成分の拡散性を増している可能性が考えられる。しかしながら、観測例も少なく、蒸留水と飽和食塩水との違いを説明することもできないことから、今後詳細な検討が必要と思われる。

ここまでの検討により、煎茶に含まれる MMP の最適な抽出条件を決定した。さらに、GC-MS の測定に、スプリットレス注入法、高速昇温、SIM などを採用し、各々を最適化した結果、煎茶中 MMP のマスクロマトグラムは、MMP の含有量が極めて少ないにもかかわらず、十分に定量可能なピーク強度と良好な再現性を示した。

## (2) 煎茶中 MMP 定量法の検討

次いで、この測定条件を用いて、煎茶に含まれる MMP の標準添加法による定量を試みた。煎茶に 0–2 ppb までの MMP を添加して得られたピーク面積値は、MMP の添加量に応じて増加し、この濃度範囲の検量線は良好な直線性を示した(相関係数 0.99)。このことより、煎茶に含まれる MMP は、標準添加法にて定量可能であると判断した。さらに、1 ppb の MMP を添加することにより増加したピーク面積値は、煎茶の産地や火入れ条件によらずほぼ一定であり、その相対標準偏差は、同じ煎茶を繰り返し測定した場合に近い値となった。この結果は、本測定法におけるマトリックスの影響が比較的小さいことを示すものである。したがって、煎茶の種類ごとに検量線を作成する必要は無く、同一の検量線の傾きを多くの種類の煎茶に適用できるため、検量線の作成に必要な測定回数を大幅に少なくすることが可能である。さらに、任意の煎茶に 1ppb の MMP を添加し、そこで増加するピーク面積値を求めるだけで、多点検量線を作成することなく、1点検量線にて多数の煎茶の MMP 含有量を定量することも可能である。

この新しい測定法により、煎茶に含まれる微量の MMP を簡便、かつ迅速に定量することが可能となり、従来法では難しかった多数の煎茶の MMP 含有量の比較が可能となった。

表 2.1.1-1 オートサンプラーメソッドパラメータ

Parameter	Value
Agitator temperature	60 °C
Pre-extraction equilibration time in agitator	10 min
Agitator speed	250 rpm
Extraction time	30 min
Desorption time	2 min
Fiber conditioning temperature	270 °C
Bake-out time in conditioning unit	10 min

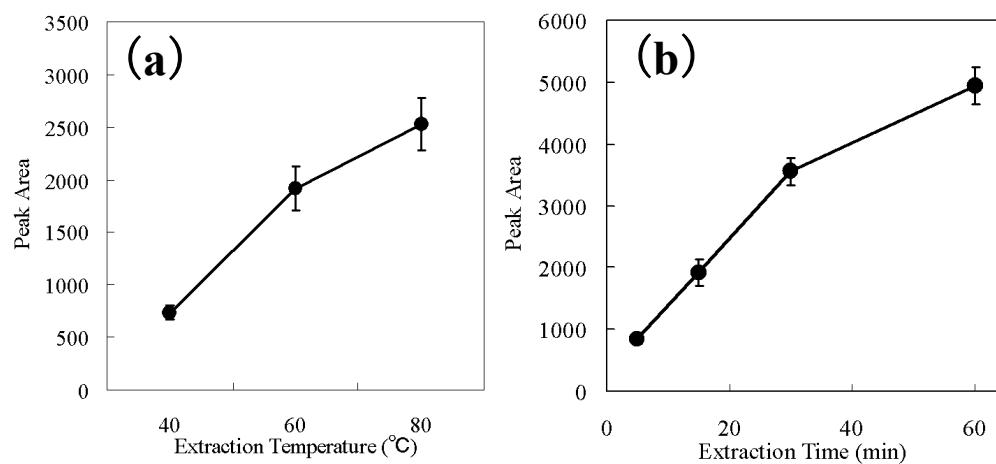


図2.1.1-1 煎茶粉碎品ヘッドスペースにおけるMMP含有量に対する抽出温度 (a) および抽出時間 (b) の影響

(煎茶粉碎品0.5 g, (a)における抽出時間: 15分, (b)における抽出温度: 60°C)

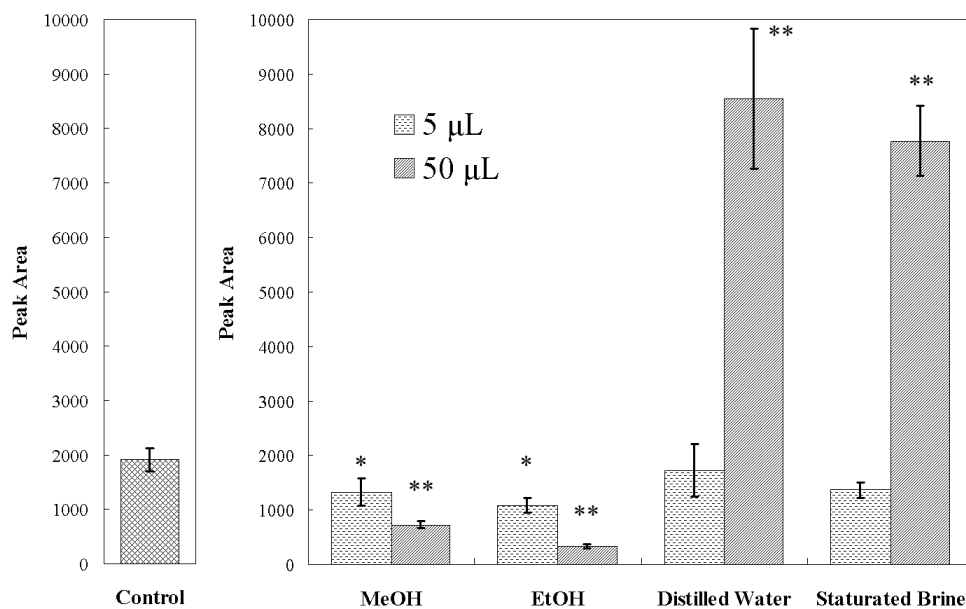


図2.1.1-2 煎茶粉碎品ヘッドスペースにおけるMMP含有量に対する添加溶剤の影響

(\*: コントロールに対して危険率5%で有意差あり, \*\*: コントロールに対して危険率1%で有意差あり)

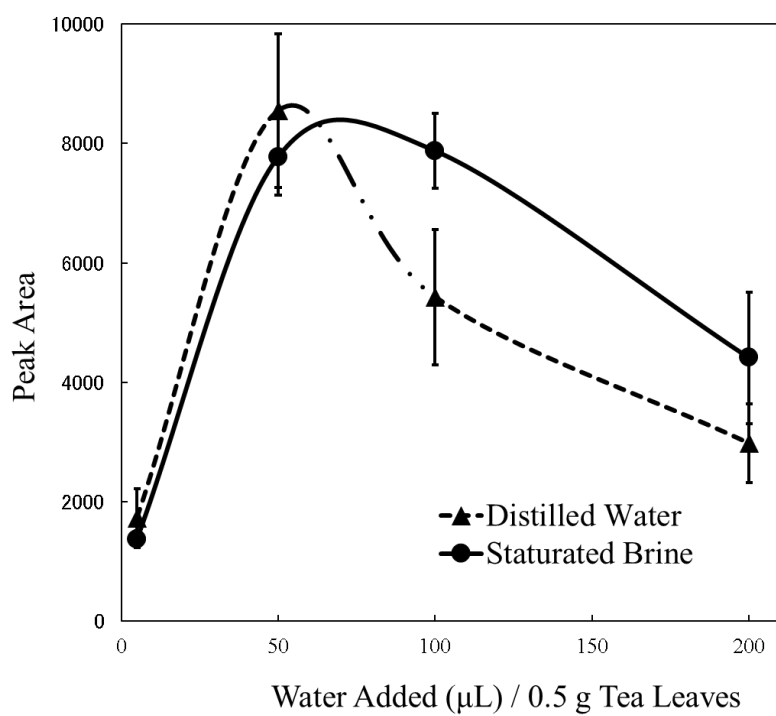


図2.1.1-3 煎茶粉碎品ヘッドスペースにおけるMMP含有量に対する蒸留水および飽和食塩水の添加効果

## 2.1.2 SPME-GC-MS (SIM) 法による煎茶における蒸熱条件と MMP 含有量の関係の検討

### 2.1.2.1 実験方法

#### (1) 蒸熱条件の異なる煎茶および荒茶の MMP 含有量測定

2.1.1 にて開発した手法にて, 2.1.1.1 (1) に記載の荒茶および煎茶 (計 70 種) の MMP を定量した.

#### (2) 官能評価

蒸熱条件の異なる茶葉 8 種の煎茶および荒茶を用いた. 茶葉 5 g に熱水 500 mL (70~75°C) を加え, 5 分間浸出後, ペーパーフィルターにて茶葉を濾別した. 得られた浸出液は直ちに氷水にて 20°C 以下に冷却した. 浸出液 (約 20°C) は, 30 mL ずつガラスビーカーに注ぎ, 直ちに, 訓練されたパネル 12 名による評価を行った. 煎茶浸出液の各々の香気特性は, コントロールと設定した荒茶浸出液の得点を 2 として, 1 (弱い) から 7 (強い) の間で採点した. 得られた全員の結果を平均化し, 標準誤差を算出した.

### 2.1.2.2 結果および考察

蒸熱条件 (浅蒸し, 中蒸し, 深蒸し), 産地, 生産年度の異なる一番茶の荒茶およびそれらを火入れした仕上げ茶に含まれる MMP を測定し, その含有量に対する蒸熱条件の影響を検討した. 市販荒茶の詳細な蒸熱条件を把握することは困難であったため, より多くの種類の煎茶における MMP の測定結果から, MMP 含有量に及ぼす蒸熱条件の影響を傾向として把握することとした. すなわち, 35 種の荒茶と, それらを同一条件にて火入れして得た仕上げ茶, 計 70 種に含まれる MMP について, 先に開発した迅速かつ簡便な定量法を適用した. その結果, 浅蒸し煎茶と中蒸し煎茶の MMP の含有量と生成量は, 広範囲にわたりながらも比較的高い傾向を示したのに対し, 深蒸し煎茶では, いずれの茶葉においても低いことが明らかとなった (図 2.1.2-1). この結果は, 蒸熱条件が煎茶の MMP 含有量に関与する可能性を示唆しており, 特に深蒸し煎茶では, その影響が顕著であることが推察された.

つぎに, MMP 含有量と新茶特有のグリーンな香り, 煎茶全体の香りとの相関を, 官能評価にて検討した. その結果, MMP 含有量が多いほど特有のグリーンな香りは強く, さらに, 特有のグリー

ンな香りと煎茶全体の香りの強さは高い相関を示した(図 2.1.2-2). これらの結果は, 煎茶(一番茶)における香りの強さと特有のグリーンな香り, そしてMMP含有量の高い相関があることを示しており, 蒸熱条件とMMP含有量の関係も考え合わせると, 煎茶の香りの強さと蒸熱条件は, MMPを介して密接に関わっている可能性が示唆された. このことは, 伝統的な浅蒸しの製法にて製造される煎茶が, 現在主流となっている深蒸し煎茶に比べて香りが良いと言われていることと無関係ではないと思われる.

以上の結果より, MMPは, 良質な煎茶特有のグリーンな香りおよび煎茶全体の香りの強さに関与し, 煎茶の品質を左右する重要な香気寄与成分であり, その含有量には, 茶期, 火入れ条件に加え, 蒸熱条件が影響する可能性が明らかとなった.

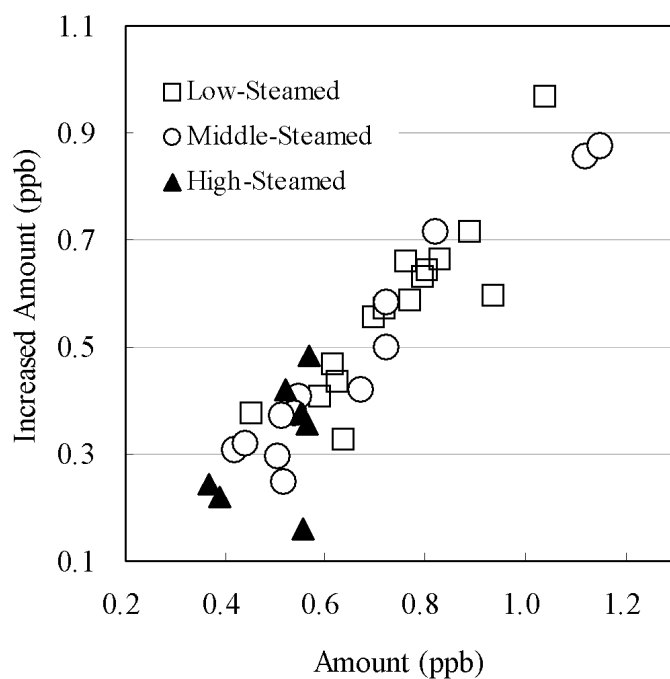


図2.1.2-1 蒸熱条件の異なる煎茶中のMMP含有量および火入れによるMMP増加量

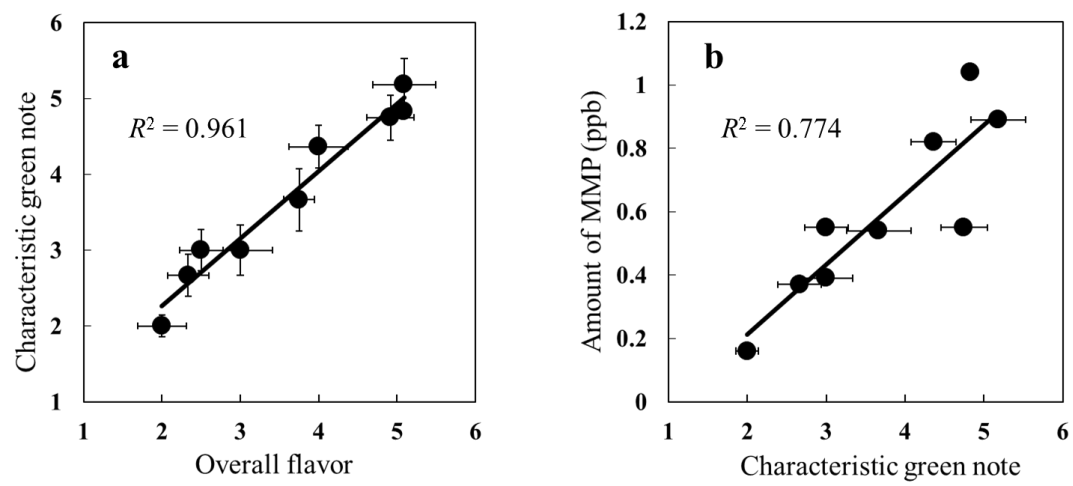


図2.1.2-2 新茶特有のグリーンな香りと浸出液全体の香りの強さおよびMMP含有量の相関

## 2.2 煎茶におけるMMP 生成機構の検討

前節にて、煎茶における MMP 含有量に、蒸熱条件が影響する可能性が明らかとなった。食品における MMP の生成機構としては、主に 2 つの経路、すなわち、①4-methyl-3-penten-2-one (MP) に硫化水素が付加することにより生成する可能性<sup>51)</sup>と、②システイン結合体あるいはグルタチオン結合体から酵素反応により生成する可能性<sup>52),53),54)</sup>が知られている(図 2.2-1)。熊沢は、①の経路に着目し、MP とシステインを用いたモデル実験にて MMP の生成を確認し、煎茶の MMP が、茶葉の火入れにより生成する MP と、茶葉に含まれるシステインやグルタチオンより生成する硫化水素が反応することで生成する可能性を報告している<sup>55)</sup>。しかしながら、②の経路については検討されておらず、煎茶の MMP が②の経路にて生成する可能性も残されている。そこで本研究では、②の経路に着目し、煎茶における MMP がシステイン結合体あるいはグルタチオン結合体より生成する可能性を検討した。

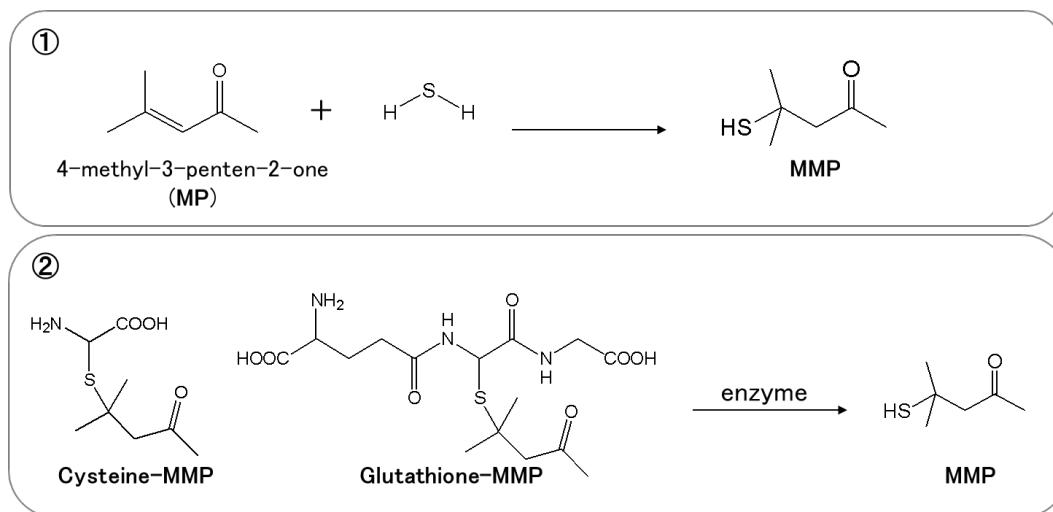


図 2.2-1 食品における MMP の生成機構<sup>51),52),53),54)</sup>

## 2.2.1 実験方法

### (1) cysteine-MMP および glutathione-MMP の合成 <sup>56)</sup>

#### (a) cysteine-MMP の合成

cysteine (0.44 g; 3.6 mmol), MP (0.35 g; 3.6 mmol), pyridine (0.54 g; 6.7 mmol) に, 蒸留水 8 mL を加え, 室温にて 48 時間攪拌した. 得られた反応液を脱脂綿にて濾過し, 蒸留水約 20 mL を添加したのち, ジクロロメタン 5 mL にて振とう抽出を 2 回行った. 水層をエバポレーター (10 mmHg, 50°C) にて乾固させ, 残渣に少量の混合溶媒 (エタノール/蒸留水 = 80/6) を加え, 50°C にて溶解させた. 完全に溶解させたのち, 室温, 次いで冷蔵庫 (5°C) にて再結晶させた. 得られた結晶を, 桐山ロートにてろ別後, デシケーター (減圧条件下) にて乾燥させた. <sup>1</sup>H-NMR データが文献値 <sup>125)</sup> と一致することを確認した.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 3.85 (1H, dd, H<sub>1</sub>), 3.11 (1H, dd,  $J = 12$  and 4.4 Hz, H<sub>2a</sub>), 3.01 (1H, dd,  $J = 14$  and 5.6 Hz, H<sub>2b</sub>), 2.96 (2H, d, H<sub>2</sub>), 2.18 (3H, s, H<sub>4</sub>), 1.35 (6H, s, H<sub>5,5'</sub>)

#### (b) glutathione-MMP の合成

glutathione (1.0 g; 3.3 mmol), MP (0.33 g; 3.4 mmol), pyridine (0.52 g; 6.6 mmol) に, 蒸留水 8 mL を加え, 室温にて 48 時間攪拌した. 得られた反応液に, 蒸留水約 20 mL を添加したのち, ジクロロメタン 5 mL にて振とう抽出を 2 回行った. 水層をエバポレーター (10 mmHg, 50°C) にて乾固させ, 残渣に少量の混合溶媒 (エタノール/蒸留水 = 80/6) を加え, 50°C にて溶解させた. 完全に溶解させたのち, 室温, 次いで冷蔵庫 (5°C) にて再結晶させた. 得られた結晶を, 桐山ロートにてろ別後, デシケーター (減圧条件下) にて乾燥させた. <sup>1</sup>H-NMR データが文献値 <sup>53)</sup> と一致することを確認した.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O,  $\delta$  ppm): 4.61 (1H, dd, H<sub>5</sub>), 4.00 (2H, s, H<sub>2</sub>), 3.85 (1H, t, H<sub>10</sub>), 3.13 (1H, dd,  $J = 13.2$  and 5.4 Hz, H<sub>12a</sub>), 2.98 (1H, dd,  $J = 13.2$  and 8.4 Hz, H<sub>12b</sub>), 2.57 - 2.43 (2H, m, H<sub>8</sub>), 2.27 (3H, s, H<sub>4</sub>), 2.19 (2H, dd, or app. q, H<sub>9</sub>), 1.43 (6H, s, H<sub>5,5'</sub>)

### (2) cysteine-MMP および glutathione-MMP の特性評価

#### (a) 火入れモデルにおける MMP 生成

セルロース 1.0 g を 20 mL 容ガラスバイアルにはかり取り, 0.1% cysteine-MMP 水溶液ある

いは 0.1% glutathione-MMP 水溶液 50  $\mu$ L を添加し、攪拌により均一化した。密栓後、GC オープンにて 110°C、15 分間加熱し、2.1.1.1 (3) に記載の条件にて SPME-GC-MS 分析に供した。

(b) 酵素反応による MMP 生成<sup>122),123)</sup>

0.1% glutathione-MMP 水溶液 0.2 mL を反応溶液 (20 mM Histidine 0.1 mL, 7.86 U/mL  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT, Sigma-Aldrich 製) 0.4 mL を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0)) 1.26 mL に添加し、常温水浴 (24~25°C) 中にて 1.5 時間反応させたのち、0.1% S-benzyl-L-cysteine (酵素活性確認用) 0.04 mL, 1 mM pyridoxal phosphate 0.2 mL, 64.2 U/mL apotryptophanase (Sigma-Aldrich 製, 0.5 mL) を添加し、軽く攪拌後、湯浴 (37°C) にて 2 時間反応させた。反応後の溶液にジエチルエーテル 2 mL を添加し、振とう抽出後、遠心 (1811 G, 5 分, 20°C) し、上清を回収した。同じ操作を再度行い、上清を合わせて窒素気流にて約 50  $\mu$ L まで濃縮した。得られた濃縮物を GC-MS 分析に供した。

(3) 荒茶の分画と加熱による MMP 生成確認

(a) 水抽出による分画

検体として、市販の静岡県産荒茶 (浅蒸し, 2005 年製造品) を使用した。粗く粉碎した茶葉 8 g を蒸留水 200 mL にて攪拌抽出 (5°C, 2 時間) したのち、遠心 (1811 G, 10 分, 5°C) し、上清を回収した。茶葉残渣に対し、同様の操作 (ただし蒸留水は 160 mL とした) をさらに 2 回繰り返す、得られた上清の全量および茶葉残渣を凍結乾燥に供した。

荒茶粉碎品 1.0 g および前述の方法にて得た上清の凍結乾燥品 (水溶性画分) 0.3 g, 茶葉残渣の凍結乾燥品 (不溶性画分) 0.6 g を、それぞれ 20 mL 容ガラスバイアルにはかり取り、密栓後、GC オープンにて 110°C、15 分間加熱した。加熱後のサンプルを、2.1.1 にて開発した手法にて測定し、MMP を定量した。

(b) 吸着樹脂による分画

茶葉は (a) と同じものを用いた。粗く粉碎した茶葉 20 g を、蒸留水 400 mL にて攪拌抽出 (5°C, 2 時間) したのち、遠心 (1811 G, 10 分, 5°C) し、上清を回収した。抽出残渣は、再度蒸留水 400 mL にて攪拌抽出 (5°C, 2.5 時間) し、同様に上清を回収した。得られた水溶性画分を、コ

ーヒーフィルターにて濾過したのち、吸着樹脂 Porapak Q(日本ウォーターズ株式会社, 80/100 mesh, 50 mL)を充填したカラム(内径 2.5 cm)に通液し、溶出液を 200 mL ずつ回収した(FT 画分 fr. 1~4). 次いで、蒸留水 200mL を通液し、溶出液を回収した(Wash 画分). 分画前の水溶性画分およびFT 画分 fr. 2, fr. 4, Wash 画分の一部を、メンブランフィルターDISMIC-25HP PTFE 0.45  $\mu$ m(ADVANTEC 製)にて濾過したのち、High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 分析に供し、カテキン類を定量した. 得られた画分は凍結乾燥に供し、FT 画分 fr.1~4 の凍結乾燥品は、乳鉢にて均一になるよう粉碎、混合した. FT 画分および Wash 画分の凍結乾燥品 0.2 g を、それぞれ 20 mL 容ガラスバイアルにはかり取り、密栓後、GC オーブンにて 110°C, 5 分間加熱し、2.1.1.1 (3)に記載の条件にて SPME-GC-MS (SIM) 分析に供した.

#### (4) FT 画分の酵素反応による MMP 生成の確認

(3)にて得た FT 画分 0.02 g を酵素反応溶液(20 mM histidine 0.1 mL, 7.86 U/mL  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) 0.4 mL を含む 100 mM リン酸緩衝液(pH 8.0)) 1.26 mL 中にて常温水浴(24~25°C)中にて 1.5 時間反応させたのち、0.1% S-benzyl-L-cysteine(酵素活性確認用) 0.04 mL, 1 mM pyridoxal phosphate 0.2 mL, 64.2 U/mL apotryptophanase 0.5 mL を添加し、軽く攪拌後、湯浴(37°C)にて 2 時間反応させた. 酵素活性確認用に、0.1% glutathione-MMP 0.2 mL を添加した反応液も同様に調製し、反応させた. 反応後の溶液にジエチルエーテル 2 mL を添加し、振とう抽出後、遠心(1811 G, 5 分, 20°C)し、上清を回収した. 同じ操作を再度行い、上清を合わせて窒素気流にて約 50  $\mu$ L まで濃縮した. 得られた濃縮物を GC-MS 分析に供した.

#### (5) GC-MS

Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフを使用した. カラム:DB-1 (50 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製). キャリヤーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min). 注入口温度:250°C. 注入法:スプリット注入(スプリット比: 1/30), 試料注入量は 1  $\mu$ L, オーブン温度は 80°C~230°C (3°C/分)とした. 質量検出器(MS)は、Agilent 社製 5973N MSD を使用した. イオン化電圧: 70 eV (EI), イオン源温度:150°C.

#### (6) HPLC

Agilent 社製 Agilent1100series 液体クロマトグラフを使用した。カラム: CAPCELL Pak C18 MG (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, 資生堂製), カラム温度: 40°C. 溶離液: (A) アセトニトリル/蒸留水 (10/90, pH 2.5 (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)) (B) アセトニトリル, グラジエントは, 表 2.2-1 に示す. 流量: 1 mL/min. 検出器: Photo Diode Array (PDA) 検出器 (280 nm), 注入量: 10 μL.

表 2.2-1 HPLC 溶離液グラジエント

Time (min.)	A : B
0-10	100 : 0
25	85 : 15
35	0 : 100

## 2.2.2 結果および考察

茶葉における MMP の生成に cysteine-MMP および glutathione-MMP が関与している可能性を検討するため, まずこれらの結合体を合成し, 特性を評価した.

cysteine-MMP および glutathione-MMP の火入れモデル実験の結果, いずれからでも MMP の生成が確認されたことより, これらの結合体は, 茶葉の火入れ程度の加熱により分解し, MMP を生成することが明らかとなった. このことより, cysteine-MMP および glutathione-MMP は, 茶葉の火入れにより生成する MMP の前駆体となり得ることが示唆された. 一方, これらの結合体は, 酵素反応にて分解し MMP を生成することが報告されている. そこで, 文献を参考に, 酵素反応を検討した結果, これらの結合体に, γ-GT, 次いで apotriptophanase を作用させることで, MMP が生成することが明らかとなった.

次に, 茶葉に cysteine-MMP および glutathione-MMP が含まれる可能性を検討するため, 荒茶に酵素を作用させ, MMP が生成するか否かを確認することとした. 荒茶 8 g を蒸留水にて抽出し, 水溶性画分 2.5 g (収率約 30%), 不溶性画分 5 g (収率約 60%) を得た. 得られた画分を火入れモデル実験に供したところ, 水溶性画分より MMP の生成が確認されたことより, MMP 前駆体は水溶性画分に含まれることが明らかとなった (表 2.2-2). しかしながら, 水溶性画分に対し酵素を作用させたところ, 水溶性画分に含有されるカテキン類が酵素作用を阻害することが示唆された. そこで, 水溶性画分を吸着樹脂 Porapak Q にて分画した結果, カテキ

ン類をほとんど含有しない FT 画分と、カテキン類を多く含有する Wash 画分を得た(図 2.2-2)。これらの画分を加熱した結果, FT 画分より MMP の生成が確認されたことより, MMP 前駆体は, FT 画分に含まれることが明らかとなった(図 2.2-3)。そこで, FT 画分に酵素を作用させたところ, glutathione-MMP 添加サンプルでは MMP および MP の生成が確認されたのに対し, FT 画分のみサンプルではいずれの化合物の生成も確認されなかった(図 2.2-4)。この結果は, 煎茶の MMP 前駆体が, cysteine-MMP , glutathione-MMP とは異なる物質であることを示唆している。

したがって, 煎茶における MMP は, 4-methyl-3-penten-2-one (MP) に, アミノ酸の加熱により生成する硫化水素が付加することにより生成する可能性が高いと考えられ, アミノ酸含有量と茶期の関係や, 煎茶製造工程における蒸熱時間が長いほど茶葉中の硫化水素が減少することを考え合わせると<sup>57)</sup>, 製造工程中の茶葉における硫化水素量が MMP 生成量に影響を及ぼすことが推察された。

**表 2.2-2** 荒茶分画物の火入れモデル実験後の MMP 定量結果

検体	MMP 濃度 (ppb)	MMP 濃度 (茶葉 1 g あたり, ppb)
荒茶粉碎品 (1.0 g)	1.27	1.27
水溶性画分 (0.3 g)	4.20	1.34
不溶性画分 (0.6 g)	-	-

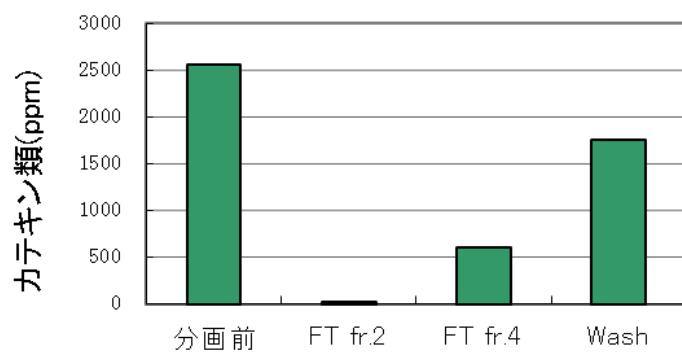


図 2.2-2 HPLC 分析による各画分のカテキン類定量結果

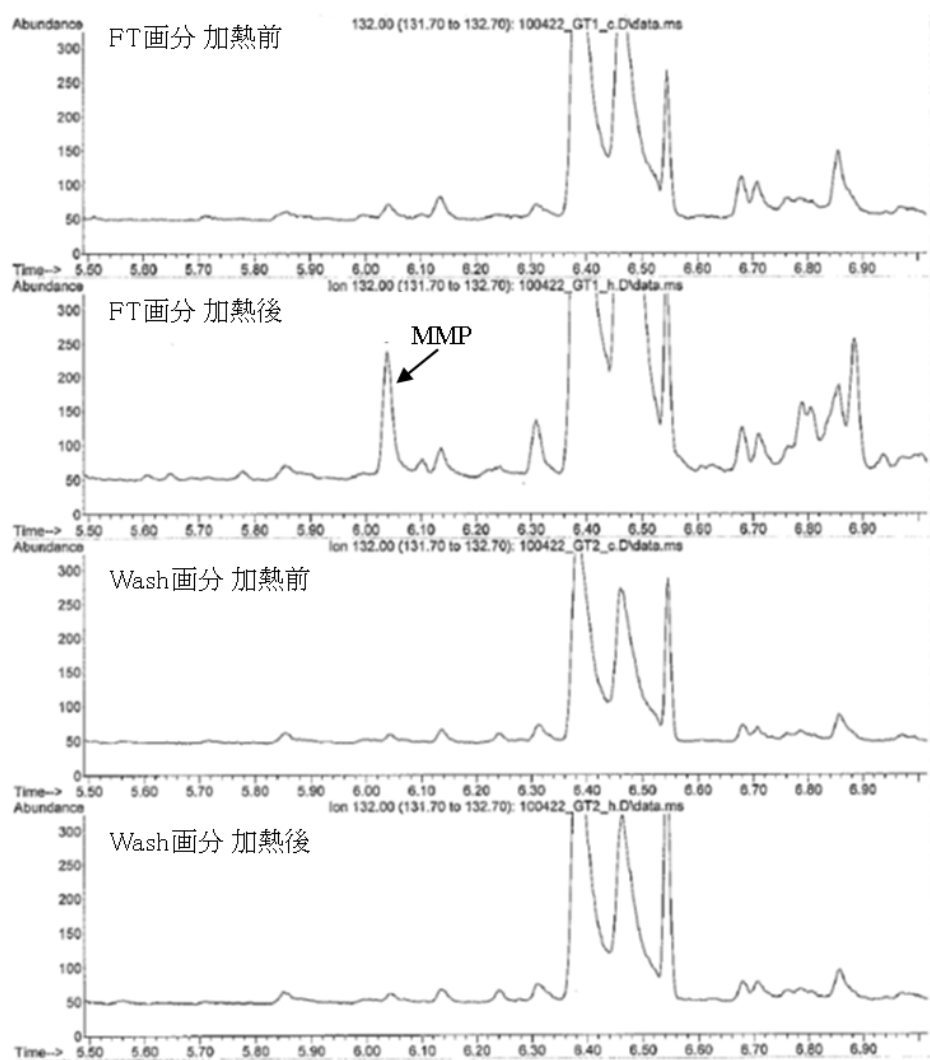


図 2.2-3 FT 画分および Wash 画分の火入れモデル実験前後の GC-MS クロマトグラム  
( $m/z$ : 132)

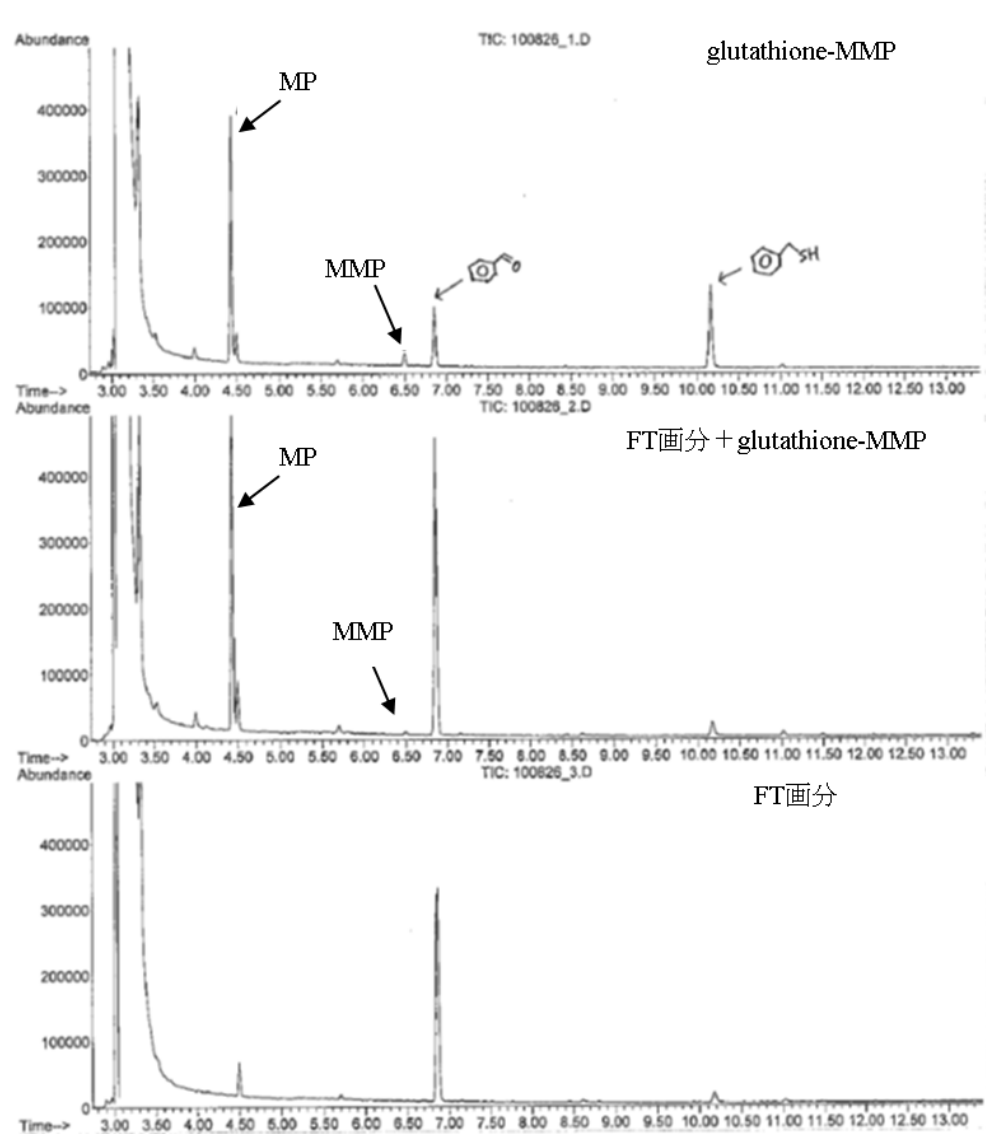


図 2.2-4 酵素反応後の GC-MS クロマトグラム

以上の結果より、良質な煎茶特有のグリーン感および煎茶全体の香りの強さに関与し、煎茶の品質を左右する重要な香気寄与成分である MMP の含有量には、茶期、火入れ条件に加え、蒸熱条件が影響し、そこには、アミノ酸より生成する硫化水素量が密接に関与していることが示唆された。すなわち、煎茶の良質な香気は、一番茶を伝統的な浅蒸し製法にて殺青し、適切な条件にて火入れすることで形成されることが推察された。

## 2.3 要約

本章では、良質で嗜好性の高い煎茶の香りの形成に関わる要因を明らかにするため、良質な煎茶特有のグリーンな香りへの寄与が示唆されている MMP に着目して実験を行った。MMP は、一番茶の重要な香気寄与成分として見出され、一番茶に最も多く含まれ、二番茶以降では含有量が大幅に低下することより、品質への関与が示唆されている。一方、一般に煎茶は、昔ながらの伝統的な製法である浅蒸しの方が、近年主流となっている深蒸しに比べて香りの強さ、質ともに優れていると言われているが、その違いに関与している成分は明らかになっていない。そこで本研究では、浅蒸し煎茶の優れた香りに MMP が関与していることを想定し、蒸熱条件の異なる複数の一番茶の MMP 含有量および浸出液の香りを比較することで、煎茶の香りと MMP の関係を検討した。

新たに開発した、SPME による迅速かつ簡便な煎茶中 MMP 定量法を用いて、35 種の荒茶およびそれらを火入れした煎茶の MMP を定量した結果、浅蒸しおよび中蒸しの煎茶では、MMP 含有量が広範囲にわたりながらも比較的多い傾向を示したのに対し、深蒸し煎茶では、いずれの茶葉においても少ないことが明らかとなった。一方、MMP 含有量と新茶特有のグリーンな香り、煎茶全体の香りとの相関を官能評価にて検討した結果、MMP は、新茶に代表される良質な煎茶特有のグリーンな香りおよび煎茶全体の香りの強さに関与することが明らかとなった。

食品中の MMP の生成機構としては、①火入れにより生成する MP に、アミノ酸より生成する硫化水素が付加することで生成する可能性と、②システイン結合体あるいはグルタチオン結合体から酵素反応により生成する可能性が知られており、煎茶中の MMP が、①の経路で生成することは、すでに火入れモデルにより検証されているが、②の経路については検証されていない。そこで本研究では、煎茶中の MMP が、システイン結合体あるいはグルタチオン結合体から生成する可能性を検討した。cysteine-MMP, glutathione-MMP を合成し、火入れモデル反応および酵素反応に供した結果、いずれの反応においても MMP が生成した。一方、MMP の前駆体を含む荒茶分画物を同様の反応に供した結果、火入れモデル反応では MMP の生成が確認されたが、酵素反応では MMP は生成しなかった。この結果は、煎茶中の MMP は、②の経路ではなく、①の経路にて生成することを示唆している。さらに、茶葉中の硫化水素量は、蒸熱時間が長くなるほど減

少することより、煎茶中の MMP 生成量には、アミノ酸より生成する硫化水素量が影響する可能性が推察された。

以上の結果より、MMP は、良質な煎茶特有の香りに寄与する重要な香気成分であり、その含有量には、茶期、火入れ条件に加え、蒸熱条件が密接に関わっていることが示唆された。すなわち、良質で嗜好性の高い煎茶の香気は、MMP を主体として構成され、一番茶を伝統的な浅蒸し製法にて殺青し、適切な条件にて火入れすることで形成されることが明らかとなった。

### 第3章 高品質な抹茶の香りに関する研究

抹茶は、日本の伝統的な茶の儀式(茶道)にて用いられる、微細な粉末状の緑茶である。もともとは、茶道において少量の湯に懸濁して飲用されるのが主であったが、近年、菓子や冷菓等、さまざまな食品での利用が拡大しており、その特有の香味は日本文化を代表する緑茶として全世界に広がりつつある。さらに、抹茶は、茶葉に含まれる成分を余すところなく摂取できることから、健康的な食材としても注目されている。

抹茶は、煎茶と同じく、摘採した生葉の内生酵素を蒸気で失活させる蒸製緑茶である。しかし、抹茶の原料と製法は、煎茶とは若干異なり、摘採前の数週間被覆栽培した茶葉を原料として用い、伝統的な特有の製法(蒸熱後、葉を揉まずに乾燥し、茶臼にて挽く)にて製造される。このような製法の違いは、香りにも影響を及ぼし、新鮮ですっきりとしたグリーン感を有する煎茶に対し、抹茶は甘さと香ばしさを併せ持つユニークなグリーン感を有する。特に、高級な抹茶の上品でふくよかな甘い香りは嗜好性が高く、良質な抹茶の香りの代表と言える。したがってその香りこそが、抹茶を利用した菓子や冷菓に求められる香りである。しかしながら、一般に加工食品に使用される抹茶は加工用抹茶であり、香りが弱だけでなく苦渋味が強いいため、使用量が限られ、それだけでは抹茶の風味を感じられる製品にはならない。そこで、抹茶の風味を強化するために、良質な抹茶の香りを再現できる香料が求められる。

良質な抹茶の香りを再現できる香料の開発には、その香りに寄与する成分の解明が必要である。しかしながら、抹茶の香気成分を扱った研究例は、紅茶や煎茶と比べて極めて少なく、抹茶香気を構成する成分や、それらの生成機構と特有の製茶法との関係は、ほとんど明らかにされていない。これは、微細な粉末である抹茶の実験操作性が悪く、極めて繊細で変化しやすいその香気を損なうことなく分析することが困難であったためと考えられる。そこで本研究では、抹茶香気のアナリ法を工夫し、抹茶の香りの主体となっている成分および特に良質な抹茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにすることを目的に実験を行った。さらに、抹茶香気的重要な構成要素のひとつとして見出した、特有のスイート、メタリックな香調を有する *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の生成機構に着目し、抹茶の香気形成と製茶工程の関連性を

検討した.

### 3.1 品質の異なる抹茶の香りに寄与する成分の解明

#### 3.1.1 実験方法

##### (1) 実験材料

品質の異なる3種の抹茶(高級, 並, 低級)は, 株式会社あいやより購入した. 高級抹茶は, 品評会受賞品相当の品質であった. 抹茶は, 実験に使用するまで-20℃の冷凍庫に保管した. (Z)-1,5-octadien-3-one<sup>58)</sup>, (Z,Z)-3,6-nonadienal<sup>59)</sup>, 3-methyl-2,4-nonanedione<sup>60)</sup>, 2-acetyl-2-thiazoline<sup>61)</sup>, *cis*- および *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal<sup>62)</sup>, *trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienal<sup>63)</sup>は, 文献にしたがい合成し, 保持指標(RI)<sup>69)</sup>およびマススペクトルの一致を確認した. 実測データを以下に示す.

##### (Z)-1,5-octadien-3-one

RI<sub>DB-WAX</sub>:1379, MS(EI): *m/z*(%) 39(14), 41(26), 55(100), 95(3), 124(M<sup>+</sup>, 0.2)

##### (Z,Z)-3,6-nonadienal

RI<sub>DB-1</sub>:1073, MS(EI): *m/z*(%) 41(25), 55(31), 67(100), 79(33), 95(16), 109(31), 123(8), 138(M<sup>+</sup>, 1)

##### 3-methyl-2,4-nonanedione

RI<sub>DB-WAX</sub>:1728, MS(EI): *m/z*(%) 27(14), 41(16), 43(100), 55(11), 71(30), 72(17), 99(66), 170(M<sup>+</sup>, 4)

##### 2-acetyl-2-thiazoline

RI<sub>DB-WAX</sub>:1772, MS(EI): *m/z*(%) 43(100), 59(27), 60(83), 87(15), 101(16), 129(M<sup>+</sup>, 89)

##### *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal

RI<sub>DB-WAX</sub>:1984, MS(EI): *m/z*(%) 39(16), 41(17), 55(14), 68(100), 69(12), 81(14), 168(M<sup>+</sup>, not detected)

##### *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal

RI<sub>DB-WAX</sub>:1995, MS(EI): *m/z*(%) 39(14), 41(15), 55(13), 68(100), 69(11), 168(M<sup>+</sup>, not detected)

*trans*-4,5-epoxy -(*E,Z*)-2,7-decadienal

RI<sub>DB-WAX</sub>:2059, MS(EI):  $m/z$ (%) 39(46), 41(64), 53(21), 67(95), 68(100), 79(33), 81(54), 82(16), 91(16), 137(4), 150(2), 166( $M^+$ , not detected)

化合物2, 5, 6, 8-13, 15, 17, 20, 21, 23, 26, 28-30, 34-37, 39 (表3.1-2)およびII, IV, VI, VII, VIII (表3.1-3)は, 東京化成工業株式会社より購入し, 1, 4, 18, 32, 38 (表3.1-2)および I, V (表3.1-3)は, シグマアルドリッチジャパンより購入した. 31は, 和光純薬工業株式会社より購入した. 2-octanolは, ナカライテスク株式会社より購入した.

## (2) 香気濃縮物の調製

抹茶 8 g に 5%含水ジエチルエーテル 80 mL および内部標準物質として 0.1% 2-octanol (ジクロロメタン溶液) 20  $\mu$ L を加え, 室温にて 2 時間攪拌抽出後, 遠心 (1811 G, 15 分, 5°C) により固液分離した. 得られた抽出液は濾紙濾過後, 硫酸ナトリウムにより脱水し, SAFE ( $<5.0 \times 10^{-3}$  Pa, 40°C) により蒸留し, 不揮発性成分を除いた<sup>36)</sup>. 得られた留分は, エバポレーション (35°C, 550 mmHg) により溶剤を留去し, 約 5 mL まで濃縮後, 窒素気流下で約 100  $\mu$ L まで濃縮した. 得られた香気濃縮物は, GC-MS 分析 (a) および AEDA に使用した. 各成分は, 保持指標 (RI), マススペクトルおよび香調を標品と比較することにより同定し, 内部標準物質 (2-octanol) に対するレスポンスファクター (RF) を 1 として定量した.

## (3) Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O)

Agilent 社製 6850 ガスクロマトグラフを使用した. カラム: DB-WAX (30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製). オープン温度: 40°C $\sim$ 210°C (5°C/min). キャリヤーガス: ヘリウム (流速 1.0 mL/min). 注入法: スプリットレス注入. 注入口温度: 250°C. 試料注入量: 1  $\mu$ L. 検出器: 熱伝導度検出器 (TCD, 230°C). TCD の出口ににおい嗅ぎ装置を接続し, 溶出された香気成分を評価した. におい嗅ぎ装置は, 検出器から溶出する香気成分の滞留を防ぐため, リボンヒーターで加温し, さらに約 100 mL/min の空気を通じた.

## (4) Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)

(2) にて得た香気濃縮物を, ジクロロメタンにて段階的に 4 倍ずつ希釈し, (3) に記載した GC-O の条件にて測定し, 各成分の香気を検出できる希釈倍率 (Flavor Dilution (FD) ファクタ

一)を求めた<sup>64)</sup>。AEDAに先立ち、2名のパネリストが希釈倍率 $4^0$ および $4^1$ のサンプルを用いて繰り返しGC-Oを行い、保持時間と香調を確定した。FDファクターは、3名のパネリストのうち、2名以上が検出した値を採用した。FDファクターの信頼性は、内部標準物質(2-octanol)のにおい強度を確認することで担保した。

#### (5) アミノ酸の分析

(1)に記載の3種の抹茶を使用した。抹茶0.4 gに蒸留水20 mLを添加し、室温にて30分間攪拌抽出した。遠心(1811 G, 15分, 5°C)後の上清を濾紙にて濾過し、得られた濾液を固相カラムNOBIAS RP-OD1L(日立ハイテックフィールドینگ, 東京)に通液したのちに、アミノ酸分析に供した。

#### (6) Gas Chromatography–Olfactometry of Headspace Samples (GCO-H)

Gerstel社製TDU加熱脱着装置およびCIS4インジェクター搭載かつGerstel社製ODP3に嗅ぎ装置を装備した、Agilent社製7890Bガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-WAX (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚0.25  $\mu$ m, Agilent社製)。オープン温度:40°C~210°C (5°C/min)。キャリアーガス:ヘリウム(流速1.0 mL/min)。注入法:スプリットレス注入。注入口温度:250°C。試料注入量:1 $\mu$ L。検出器:水素炎イオン化検出器(FID, 250°C)。カラムより溶出した香気成分は、スプリッターにて1:10の比率で分け、それぞれFIDおよびODP3へ導いた。抹茶1 gを50 mL容ガラスバイアルに入れ、セプタムにて密閉後、40°Cにて30分間平衡化した。平衡化後のヘッドスペースガス(10~0.25 mL, FDファクター1~40に対応<sup>65),66)</sup>を、ガスタイトシリンジにて抜き取り、TDU加熱脱着装置(250°C, 脱着時間2.5分)に注入した。クライオフォーカスは、液体窒素にて冷却したCIS4(-100°C)にて実施し、CIS4を急速に260°Cに加熱(5分間保持)し、スプリットレスモードによるGC分析をスタートした。FDファクターの測定に先立ち、2名のパネリストが希釈倍率 $4^0$ および $4^1$ のサンプルを用いて繰り返しGC-Oを行い、保持時間と香調を確定した。FDファクターは、3名のパネリストのうち、2名以上が検出した値を採用した。

#### (7) エポキシデセナール、エポキシデカジエナールの同定

エポキシデセナールおよびエポキシデカジエナールの異性体を同定するため、多量の高級抹茶の香気濃縮物を調製した。抹茶40 gに400 mLの5%含水ジエチルエーテルを加え、室

温にて2時間振抽出後、遠心(1811 G, 15分, 5°C)により固液分離した。得られた抽出液は濾紙濾過後、硫酸ナトリウムにより脱水し, SAFE( $<5.0 \times 10^{-3}$  Pa, 40°C)により蒸留し, 不揮発性成分を除いた<sup>36)</sup>。得られた留分は, エバポレーション(35°C, 550 mmHg)により溶剤を留去し, 約5 mLまで濃縮後, 窒素気流下で約1 mLまで濃縮した。得られた香気濃縮物0.5 mLは, シリカゲル(Wakogel C-200, 5 g)をペンタンにて充填したガラスカラム(15°C, 20 cm×0.7 cm i.d.)にて, 以下のFr. A~Cに分画した。A:*n*-pentane(30mL), B:*n*-pentane/diethyl ether(10:1, v/v, 30 mL), C:*n*-pentane/diethyl ether (10:2, v/v, 30 mL)。各画分は, 前述の方法にて約50 µLまで濃縮し, GC-MS分析(b)に供した。さらに精製するため, Fr. Cを再度シリカゲルカラムにて分画し, 以下のFr. D~Fを得た。D:*n*-pentane/diethyl ether (10:1, v/v, 30 mL), E:*n*-pentane/diethyl ether(10:1.1, v/v, 30 mL), F:*n*-pentane/diethyl ether(10:1.2, v/v, 30 mL)。各画分は, 前述の方法にて約50 µLまで濃縮し, GC-MS分析(b,c)に供した。

#### (8) GC-Mass Spectrometry (GC-MS)

(a) Agilent社製7890Bガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d., 膜厚0.25 µm, Agilent社製)。キャリアーガス:ヘリウム(流速1.0 mL/min)。注入口温度:250°C。注入法:スプリット注入(スプリット比: 1/30), 試料注入量は1 µL, オープン温度は80°C~230°C(3°C/min)とした。質量検出器(MS)は, Agilent社製5977A MSDを使用した。イオン化電圧:70 eV(EI), イオン源温度:150°C。

(b) GC-MS装置およびカラムは(a)と同じものを使用した。キャリアーガス:ヘリウム(流速1.0 mL/min)。注入口温度:250°C。注入法:スプリットレス注入。試料注入量は0.2 µL, オープン温度は40°C(1分間保持)~230°C(3°C/min)とした。

(c) Agilent社製7890Aガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-1(30 m×0.25 mm i.d., 膜厚0.25 µm, Agilent社製)。キャリアーガス:ヘリウム(流速1.0 mL/min)。注入口温度:250°C。注入法:スプリットレス注入。試料注入量は0.2 µL, オープン温度は40°C(1分間保持)~230°C(3°C/min)とした。質量検出器(MS)は, Agilent社製5975C inert XL MSDを使用した。イオン化電圧:70 eV(EI), イオン源温度:150°C。

#### (9) アミノ酸分析

アミノ酸分析計日立ハイテックフィールドディング社製HITACHI L-8900を使用した。カラム: Ion-Exchange Column #2623PF (25 mm × 5.4 mm i.d. × 2本, 日立ハイテックフィールドディング社製)。溶離液:L-8900 PFS-KIT。流量:0.56 mL/min。検出器:UV検出器 (570 nm, 440 nm)。反応液:ニンヒドリン。注入量:20 µL。

#### (10) エポキシデセナール添加効果の官能評価

市販緑茶飲料300 gに, 4,5-epoxy-(*E*)-2-decenalの2 ppmエタノール溶液を30 µL添加した。対照品は, エタノールのみを30 µL添加した。調製した緑茶飲料について, 抹茶の甘い香気を訓練されたパネル8名で評価した。香気の強さは, 1(弱い)から7(強い)の間で採点し, 得られた全員の結果を平均化し, 標準誤差を算出した。

### 3.1.2 結果および考察

実験材料として, 価格の異なる抹茶市場品 3 品(高級, 並, 低級)を用いた。高級抹茶は, 青みが強く鮮やかな緑色を呈し, 甘さと香ばしさを併せ持つ濃厚なグリーン感を極めて強く有していた。一方, 並, 低級の抹茶は, ややくすんだ黄緑色を呈し, 高級抹茶に認められた濃厚なグリーン感は弱く, 特に低級品は, 若干の油臭を含む青臭さ(グラッシー), 枯草様, ファッティーな香調を強く有していた。抹茶の利用形態は独特であり, 紅茶や煎茶のように浸出液を飲用するのではなく, 粉末そのものを利用し, 食することがほとんどである。したがって, 抹茶の香気を理解するために, 抹茶から漂う香気成分と抹茶自体に含まれる香気成分を, ヘッドスペースガスに対する GCO (GCO-H)と香気濃縮物に対する AEDA にてそれぞれ探索した。

#### (1) 抹茶に含まれる香気成分

##### (a) 主要香気成分の分析と香気寄与成分の探索

抹茶自体に含まれる香気成分を分析するため, 3 種の抹茶の香気濃縮物を, 溶剤抽出法と SAFE を組み合わせた方法により調製した。抹茶本来の香気は, 抽出溶媒であるジエチルエーテルに対して, 少量の水を添加することで抽出することが可能となった<sup>67)</sup>。さらに, 抽出残渣を遠心にて分離して得た清澄な抽出液は, SAFE での操作性を大幅に改善することを

可能とした. このように, 過度な加熱のない一連の操作で得られた香気濃縮物は, それぞれの抹茶の特徴的な香気をよく保持しており, GC-O による香気寄与成分の探索に最も適した分析サンプルであった. 3 種の抹茶から調製した香気濃縮物を GC-MS 分析および GC-O (AEDA) に供し, 香気寄与成分を探索した. GC-MS 分析の結果, 120 成分以上が検出され, その多くが品質によらずすべてのサンプルに共通し, また, 緑茶の香気成分としてすでに報告されている化合物であった(表 3.1-1). しかしながら, 香気成分のバランスは品質ごとに大きく異なり, 高級抹茶では, 被覆茶に多く含まれることが知られているヨノン類や, アミノ酸と糖の加熱反応により生成するピラジン類<sup>12),118)</sup>, フラノン類が多く検出された(図 3.1-1). これは, 前駆体であるカロテノイドおよびアミノ酸の含有量が, 高級抹茶において特に多いためと考えられる. 実際, 高級抹茶の総アミノ酸量は, 並および低級抹茶のおよそ 4~6 倍と顕著に多かった(図 3.1-2). アミノ酸量は, 一番茶に最も多く, 茶期が遅くなるにつれ減少することや, 遮光栽培により減少が抑えられること, カロテノイド量は, 被覆茶に多いことより, 茶期や被覆条件等の違いが, 抹茶の香気組成に影響しているものと考えられる. 一方, 低級抹茶では, 茶葉の貯蔵により増加し, リノレン酸より生成することが推察されている<sup>28)</sup> 2,4-heptadienal, 1-penten-3-ol, (Z)-2-pentenol の含有量が顕著に多かったほか, hexanal をはじめとするアルデヒド類, hexanoic acid をはじめとする酸類が多く検出された. 2,4-heptadienal, (Z)-2-pentenol, hexanal は, 摘採時期の遅い茶葉に多く, 低品質な茶のこわ葉臭への関与も推察されている成分である<sup>17)</sup>. したがって, 低級抹茶にこれらの成分が多く含まれることは, 抹茶においても, 煎茶と同様に, 摘採時期が品質を左右する可能性を示している.

表 3.1-1 品質の異なる抹茶の主要香気成分

		(ppb)		
No.	Compounds	分類*	高級	並 低級
1	2,3-butanedione		11	8 11
2	pentanal	③	55	69 99
3	1-penten-3-one	③	12	44 57
4	$\alpha$ -pinene		-	14 -
5	2,3-pentanedione		27	37 18
6	hexanal	③	77	105 267
7	( <i>E</i> )-2-penten-1-al	③	12	34 69
8	4-methyl-3-penten-2-one		13	18 4
9	1-penten-3-ol	③	113	292 504
10	4-methyl-2-pentenal	③	-	- 22
11	heptanal	③	48	41 45
12	limonene		13	23 -
13	( <i>E</i> )-2-hexenal	③	17	25 71
14	2-pentylfuran	③	-	10 6
15	( <i>Z</i> )-4-heptenal	③	16	24 38
16	amyl alcohol		151	143 169
17	( <i>E</i> )-ocimene		4	10 8
18	acetoin		22	24 16
19	octanal	③	15	16 23
20	1-hydroxy-2-propanone		32	39 20
21	( <i>Z</i> )-2-pentenol	③	90	234 413
22	2,3-octanedione		16	18 17
23	( <i>E</i> )-2-heptenal	③	6	8 20
24	1-octen-3-one		3	2 4
25	2,6,6-trimethylcyclohexanone	①	6	21 10
26	2,5-dimethylpyrazine	②	31	21 -
27	6-methyl-5-hepten-2-one		15	49 79
28	3-hydroxy-2-pentanone		16	14 21
29	( <i>Z</i> )-3-hexenol	③	31	43 51
30	( <i>E,Z</i> )-2,4-hexadienal	③	13	22 16
31	1-octen-3-ol		9	- 14
32	acetic acid		915	1665 1407
33	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	②	12	3 -
34	furfural	②	10	15 -
35	( <i>E,Z</i> )-2,4-heptadienal	③	275	504 698
36	<i>trans</i> -linalool oxide		6	17 19
37	( <i>Z</i> )-1,5-octadien-3-ol		8	11 11
38	2-ethylhexanol		30	21 19
39	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal	③	131	285 647
40	decanal	③	15	13 18
41	( <i>E,Z</i> )-3,5-octadien-2-one (tentative)		141	119 155
42	benzaldehyde		106	114 57
43	camphor		-	4 11
44	propionic acid		36	46 209

(表 3.1-1 つづき)

45	linalool		43	54	49
46	octanol		38	32	32
47	( <i>E,E</i> )-3,5-octadien-2-one		36	27	22
48	( <i>E,Z</i> )-2,6-nonadienal	③	15	13	30
49	( <i>E,E</i> )-2,4-octadienal	③	3	11	16
50	6-methyl-3,5-heptadien-2-one		-	7	11
51	hotrienol		-	28	-
52	2-hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone	①	349	197	175
53	1-ethyl-2-formylpyrrole (tentative)	②	27	23	17
54	4-butanolide		-	45	-
55	$\beta$ -cyclocitral		71	90	79
56	phenylacetaldehyde		117	131	70
57	2-formyl-1,1,3-trimethyl-2,4-cyclohexadiene		-	21	13
58	( <i>Z</i> )-3-hexenyl hexanoate		36	37	20
59	isovaleric acid		17	22	13
60	2-methylbutyric acid		17	22	13
61	4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-heptenal (tentative)	③	88	206	304
62	viridiflorene (tentative)		-	19	-
63	3-methyl-2,4-nonanedione	③	49	66	57
64	4-hexanolide		17	21	19
65	( <i>Z</i> )-3-hexenyl ( <i>Z</i> )-3-hexenoate		20	28	30
66	2,3-dimethylmaleic anhydride		-	17	37
67	geranial		-	-	12
68	$\beta$ -bisabolene		15	-	-
69	$\alpha$ -muurolene		30	50	12
70	2,5-dimethylbenzaldehyde		-	13	-
71	<i>cis</i> -linalool oxide pyranoid		-	22	21
72	pentanoic acid		14	23	80
73	( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farnesene		17	71	72
74	$\gamma$ -crotonolactone		21	15	19
75	<i>trans</i> -linalool oxide pyranoid		5	8	54
76	( <i>E,Z</i> )-2,4-decadienal	③	-	-	20
77	$\delta$ -cadinene		20	75	20
78	methyl salicylate		4	11	14
79	( <i>E,E</i> )-2,4-decadienal	③	-	10	29
80	calamenene		16	32	14
81	geraniol		45	12	11
82	hexanoic acid	③	76	114	214
83	geranylacetone	①	-	89	195
84	$\alpha$ -ionone	①	396	133	65
85	benzyl alcohol		288	138	123
86	( <i>E,E,Z</i> )-2,4,6-nonatrienal (tentative)	③	-	17	31
87	N-ethylsuccinimide		123	32	19
88	( <i>E,E,E</i> )-2,4,6-nonatrienal	③	21	27	56
89	benzylcyanide		30	79	24
90	2,6-dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol (tentative)		14	21	28

(表 3.1-1 つづき)

91	$\beta$ -ionone	①	722	468	418
92	<i>cis</i> -jasmone		15	22	10
93	heptanoic acid		111	22	-
94	dodecanol		-	-	21
95	( <i>Z</i> )-3-hexenoic acid	③	489	436	402
96	2-acetylpyrrole	②	70	43	-
97	5,6-epoxy- $\beta$ -ionone	①	215	131	184
98	3-hydroxy-2-pyrone	②	-	-	15
99	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	③	3	4	8
100	dihydro-3-hydroxy-4,4-dimethyl-2(3 <i>H</i> )-furanone	②	25	12	-
101	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanone	②	185	52	-
102	( <i>E</i> )-nerolidol		311	467	529
103	4-nonanolide		6	-	-
104	cubenol		42	34	-
105	epi-cubenol		45	58	63
106	<i>p</i> -cresol		22	19	13
107	$\beta$ -elemol		39	53	45
108	4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i> )-furanone	②	141	48	-
109	6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone		44	16	23
110	2,3-dimethylnona-2,4-dien-4-olide		55	48	42
111	2-aminobenzaldehyde		23	16	-
112	tetradecanol		24	12	7
113	T-cadinol (tentative)		125	130	90
114	T-muurolol		117	158	118
115	$\delta$ -cadinol		50	64	40
116	methyl hexadecanoate		42	9	-
117	$\alpha$ -cadinol		215	294	201
118	( <i>Z</i> )-7-decen-5-olide		31	-	-
119	3-hydroxy-2,3-dihydromaltol	②	42	140	32
120	dihydroactinidiolide	②	675	350	332
121	4-vinylphenol		26	43	26
122	indole		135	427	421
123	coumarin		6	11	9
124	skatole		2	2	-
125	vanillin		50	69	53
126	phytol		116	49	-
127	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde		91	75	30

\* 分類: ①カロテノイドより生成する成分, ②アミノ酸, 糖より生成する成分,  
③脂質より生成する成分

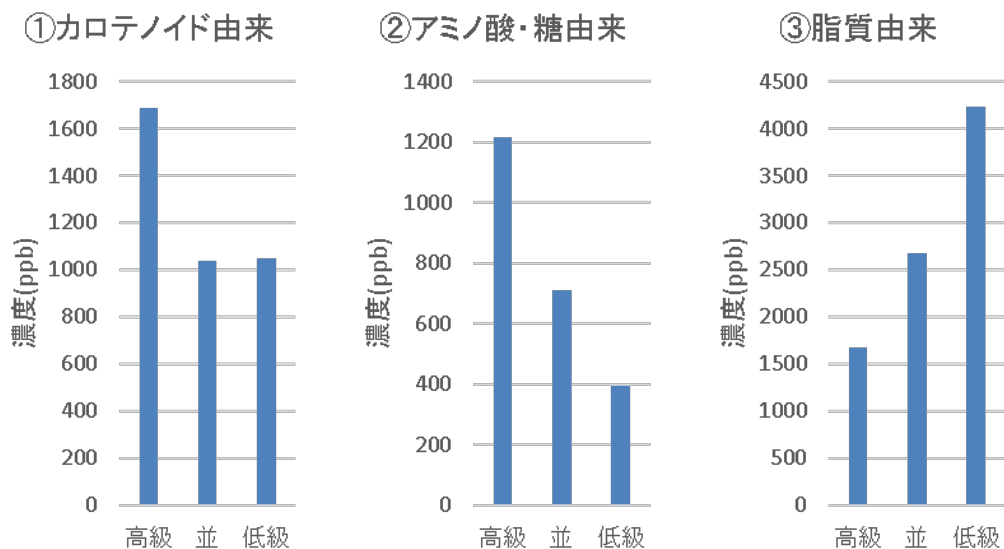


図3.1-1 品質の異なる抹茶の前駆体別香気含有量

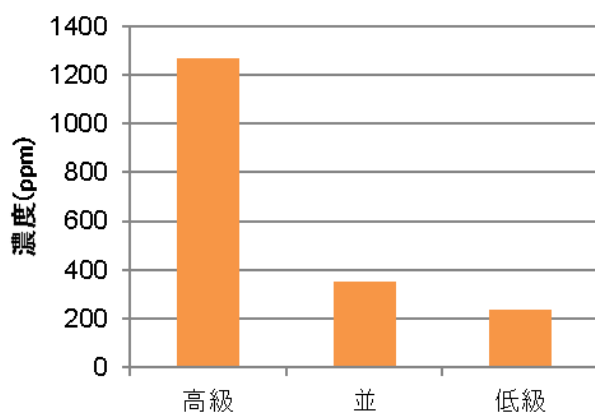


図3.1-2 品質の異なる抹茶のアミノ酸含有量

一方, GC-O(AEDA)の結果, 4<sup>3</sup>から4<sup>7</sup>のFDファクターを有する39ピークを検出し, 緑茶における新規化合物6成分を含む36成分を同定あるいは推定した(表3.1-2). これらの成分のほとんどが抹茶からは初めて検出された成分であるが, その多くは, 紅茶や煎茶に含まれていることが報告されている成分である<sup>18),68)</sup>. したがって, 抹茶特有の香気は, これらの成分量のバランスが紅茶や煎茶とは大きく異なるために生じることが推察される. これらの寄与成

分の比較から、抹茶に含まれる香気は、いずれの品質でも高い FD ファクターを示したスイート、グリーン、メタリック、フローラルな香調の成分 (FD ファクターの平均値  $\geq 4^4$ , RSD  $< 20\%$ : 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone , *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal , coumarin , 3-methyl-2,4-nonanedione , (*E,Z*)-2,6-nonadienal , (*Z*)-1,5-octadien-3-one ,  $\alpha$ -ionone , (*E*)-isoeugenol ) を主体として、高級抹茶ではロースト香を有する成分 (2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine), 低級抹茶ではファッティーな香調の成分 ((*Z,Z*)-3,6-nonadienal, (*E,E*)-2,4-decadienal) の FD ファクターが高いことが明らかになった。この結果は、前述の GC-MS 分析より得られた結果、すなわち、高級抹茶ではピラジン類、フラン類が多く、低級抹茶ではアルデヒド類が多いことと矛盾せず、原料茶葉のアミノ酸や脂質の含有量が、品質を左右する香気に影響していることを示している。

一方、高級抹茶の特徴的な香気に寄与する成分を明らかにするため、煎茶の香りとの違いに着目すると、AEDA にて高い寄与度を示した成分のうち、グリーン、メタリックな香調を有する、(*Z*)-1,5-octadien-3-one, 3-methyl-2,4-nonanedione, (*E,Z*)-2,6-nonadienal は、Kumazawa による緑茶の香気寄与成分に関する研究<sup>18)</sup>において、煎茶で高い FD ファクターを示すことが報告されているが、その他の、スイート、フローラルな香調を有する 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, coumarin,  $\alpha$ -ionone, (*E*)-isoeugenol および高級抹茶に特徴的なピラジン類は、煎茶では非検出あるいは寄与度が低いことが明らかとなった。このことより、スイート、フローラルな香調の成分とロースト香を有するピラジン類が、煎茶とは特徴を異にする“高級な抹茶らしさ”に重要であることが推察された。煎茶と抹茶の香気寄与成分にこのような違いが生じる要因としては、原料の違いと製造工程の違いが考えられる。すなわち、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone , 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine は、糖とアミノ酸の加熱反応で生じることより、被覆栽培による原料茶葉のアミノ酸含量の違いがその生成量に影響している可能性がある。また、碾茶は、碾茶炉という専用の炉で高温、長時間 (180~200℃, 30 分) 加熱されるため、それがこれらの成分の生成効率に影響している可能性もある。良質な煎茶の重要な香気寄与成分である MMP が抹茶からは検出されなかったことも、火入れ条件の違いが影響してい

ると推察される。すなわち、MMP は、120℃以上の火入れ条件下では、含有量が減少することより<sup>16)</sup>、碾茶炉のような高温、長時間の火入れ条件下では、一旦生成した MMP が分解することが考えられる。 $\alpha$ -ionone は、前述のとおり、被覆栽培によるカロテノイドの増加が、生成量に影響していると考えられる<sup>70)</sup>。*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、紅茶の発酵工程にてリノール酸より生成する特徴香気成分であることが報告されている<sup>62)</sup>が、抹茶には発酵工程が無いことより、紅茶とは異なる機構にて生成すると考えられる。*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の生成機構の検討結果については、次節にて述べる。

#### (b) *trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienal の同定

抹茶香気の主体となるスイートな香調を構成する成分として、特徴的な香調(sweet, juicy, metallic)を有する3成分を検出した。これらの中で、含有量が多かった2成分は、比較的容易にマススペクトルを得ることができ、それらを *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal , *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal と同定した。しかし、残る1成分は微量であったため、AEDA に使用した分析サンプルから、この成分を同定することはできなかった。そこで、スケールアップして得た香気濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した結果、本成分のマススペクトルを得ることができた。この香気成分は、エポキシデセナールに類似した香調とマススペクトルを有することから、その類縁体を予想した。さらに、文献情報<sup>63)</sup>を基に、この成分を *trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienal と推定し、合成標品と比較した結果、香調、マススペクトル、保持指標が完全に一致した。

エポキシデカジエナールは、エポキシデセナールと同様に、不飽和脂肪酸から生成することが知られている。すなわち、エポキシデセナールがリノール酸より生じるのに対し、エポキシデカジエナールはリノレン酸や高度不飽和脂肪酸より生じる<sup>71)</sup>。リノレン酸は、リノール酸と同様に茶葉の脂質を構成する主要な脂肪酸であることから<sup>72)</sup>、エポキシデカジエナールは、抹茶の製茶中にエポキシデセナールとともに生成したと考えられる。

#### (2) 抹茶から漂う香気成分

3種の抹茶から漂う香気成分を GCO-H にて分析し、それらの FD ファクターを比較した(表 3.1-3)。抹茶の香りは穏やかであるため、この方法で検出された成分は少なく、多くの成分は

3種の抹茶に共通していた。しかし、いくつかの成分は、抹茶の品質によってFDファクターに差異が認められ、抹茶の品質に関与することが明らかとなった。すなわち、高級抹茶においては、海苔様の香調を有する dimethyl sulfide (DMS) が高い FD ファクターを示したのに対し、低級抹茶においては、メタリック、グリーンな香調を有する 1-penten-3-one, hexanal, (Z)-4-heptenal が高い FD ファクターを示した。DMS は、被覆茶に多く含まれ、被覆栽培により増加したアミノ酸の加熱反応により生成すると考えられている<sup>12)</sup>。

以上の結果より、良質で嗜好性の高い抹茶の香気は、品質に関わらず高い寄与度を示したスイート、グリーン、メタリック、フローラルな香調の成分を主体に、DMS とロースト香を有する成分が組み合わさって形成されていると考えられ、その特有の香りの形成には、摘採時期のみならず、摘採前の被覆栽培や専用の炉による高温かつ長時間の火入れといった、抹茶特有の伝統的な製法が密接に関与していることが推察された。

### (3) 官能評価によるエポキシデセナールの添加効果確認

エポキシデセナールは、スイートな中に若干のメタリックな香りのある特徴的な香調を有しており、煎茶にはほとんど含まれないことから、抹茶特有の香気に強く影響している可能性が推察された。そこで、緑茶飲料におけるこれらの成分の添加効果を確認した。その結果、4,5-epoxy-(E)-2-decenal を 0.2 ppb 添加したサンプルでは、抹茶特有の甘い香味が強く感じられることが明らかとなり、これらの成分が、抹茶特有の甘い香味に寄与する重要な成分であることが示された(図 3.1-3)。

表3.1-2 抹茶香気濃縮物の香気寄与成分 (FD factor  $\geq 4^3$ )

no.	RI <sup>a</sup>	compound <sup>b</sup>	odor quality <sup>f</sup>	log <sub>4</sub> (FD factor)		
				高級	並	低級
1	1150	(Z)-3-hexenal	green	1	2	3
2	1308	1-octen-3-one	mushroom-like	3	3	3
3	1379	(Z)-1,5-octadien-3-one	metallic	4	4	4
4	1473	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	nutty	4	2	<1
5	1498	(E,E)-2,4-heptadienal	fatty	<1	1	3
6	1502	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	nutty	4	2	<1
7	1511	(Z,Z)-3,6-nonadienal <sup>c,d</sup>	green, melon-like	1	3	4
8	1529	2-isobutyl-3-methoxypyrazine <sup>c</sup>	earthy, musty	3	4	4
9	1542	(E)-2-nonenal	fatty, sweet	3	3	3
10	1555	linalool	floral	2	3	3
11	1590	(E,Z)-2,6-nonadienal	green, cucumber-like	4	4	5
12	1681	3-methylbutanoic acid	sweaty, rancid	3	3	2
13	1709	(E,E)-2,4-nonadienal	fatty	3	3	4
14	1728	3-methyl-2,4-nonanedione	green	5	4	5
15	1761	(E,Z)-2,4-decadienal <sup>c,d</sup>	fatty, green	1	1	3
16	1766	2-acetyl-2-thiazoline <sup>c</sup>	roasty	3	2	1
17	1819	(E,E)-2,4-decadienal	fatty	1	3	4
18	1824	$\beta$ -damascenone <sup>c</sup>	sweet, honey-like	2	3	3
19	1829	unknown	sweet, spicy	3	3	3
20	1858	$\alpha$ -ionone	floral, cosmetic	5	5	4
21	1868	2-methoxyphenol	burnt	2	3	1
22	1883	(E,E,Z)-2,4,6-nonatrienal <sup>d,e</sup>	sweet	4	3	4
23	1976	$\beta$ -ionone	floral, fruity	3	2	2
24	2002	cis-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	sweet, juicy, metallic	3	3	3
25	2018	trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	sweet, juicy, metallic	5	4	5
26	2055	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	sweet	7	6	6
27	2072	trans-4,5-epoxy-(E,Z)-2,7-decadienal	sweet, juicy, metallic	3	3	4
28	2093	p-cresol	phenolic	3	1	1
29	2143	ethyl cinnamate <sup>c,d</sup>	sweet, fruity	3	2	2
30	2177	eugenol <sup>c</sup>	spicy	3	2	3
31	2205	2-methoxy-4-vinylphenol <sup>f</sup>	spicy, clove-like	2	3	3
32	2217	3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone <sup>c</sup>	caramel-like, spicy, seasoning-like	3	3	3
33	2322	unknown	sweet, powdery	4	1	2
34	2358	(E)-isoeugenol	floral, spicy	5	5	5
35	2449	indole	floral, animal-like	3	3	4

(表3.1-2 つづき)

36	2467	coumarin	sweet	4	4	4
37	2498	skatole	floral, animal-like	3	3	2
38	2567	phenylacetic acid <sup>c</sup>	sweet	3	3	3
39	2578	vanillin	sweet, vanilla-like	4	3	3

<sup>a</sup> Retention index on DB-Wax column (30 m × 0.25 mm i. d.; coated with a 0.25 μm film) observed for GC-O.

<sup>b</sup> The compound was identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax, mass spectrum, and odor quality.

<sup>c</sup> The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax and odor quality.

<sup>d</sup> The compound has not been reported in the literature in green tea.

<sup>e</sup> The compound was tentatively identified by matching its mass spectrum and retention index (RI) on stationary phase DB-Wax with those of literature data<sup>(67), (75)</sup>. <sup>f</sup> Odor quality assigned during AEDA.

表3.1-3 抹茶ヘッドスペース中の香気寄与成分 (FD factor  $\geq 1$ )

no.	RI <sup>a</sup>	compound <sup>b</sup>	odor quality <sup>e</sup>	FD factor		
				高級	並	低級
I	704	methanethiol <sup>c,d</sup>	sulfury	1	<1	<1
II	729	dimethyl sulfide	green, deied laver-like	10	1	<1
III	769	unknown	stimulus	<1	<1	1
IV	914	2-methylbutanal	stimulus	2	1	<1
V	1044	1-penten-3-one	metallic	<1	2	4
VI	1097	hexanal	green	1	1	4
1	1145	(Z)-3-hexenal	green	<1	1	2
VII	1240	(Z)-4-heptenal <sup>f</sup>	hay-like	1	1	4
2	1300	1-octen-3-one	mushroom-like	1	1	2
VIII	1363	dimethyl trisulfide <sup>c,d</sup>	putrid	1	1	<1
3	1375	(Z)-1,5-octadien-3-one	metallic	1	1	1
9	1533	(E)-2-nonenal	fatty, sweet	1	1	2
11	1586	(E,Z)-2,6-nonadienal	green, cucumber-like	1	1	1
13	1704	(E,E)-2,4-nonadienal	fatty	<1	1	1
19	1824	unknown	sweet, spicy	2	1	1
20	1849	$\alpha$ -ionone	floral	1	<1	<1

<sup>a</sup> Retention index on DB-Wax column (30 m  $\times$  0.25 mm i. d.; coated with a 0.25  $\mu$ m film) observed for G

<sup>b</sup> The compound was identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax, mass spectrum, and odor quality.

<sup>c</sup> The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax and odor quality. <sup>d</sup> The compound has not been reported in the literature in green tea. <sup>e</sup> Odor quality assigned during AEDA.

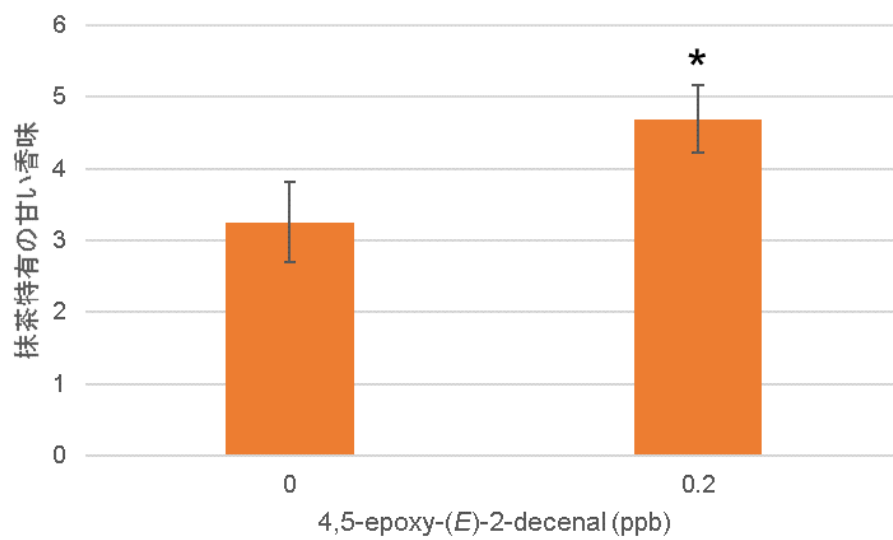
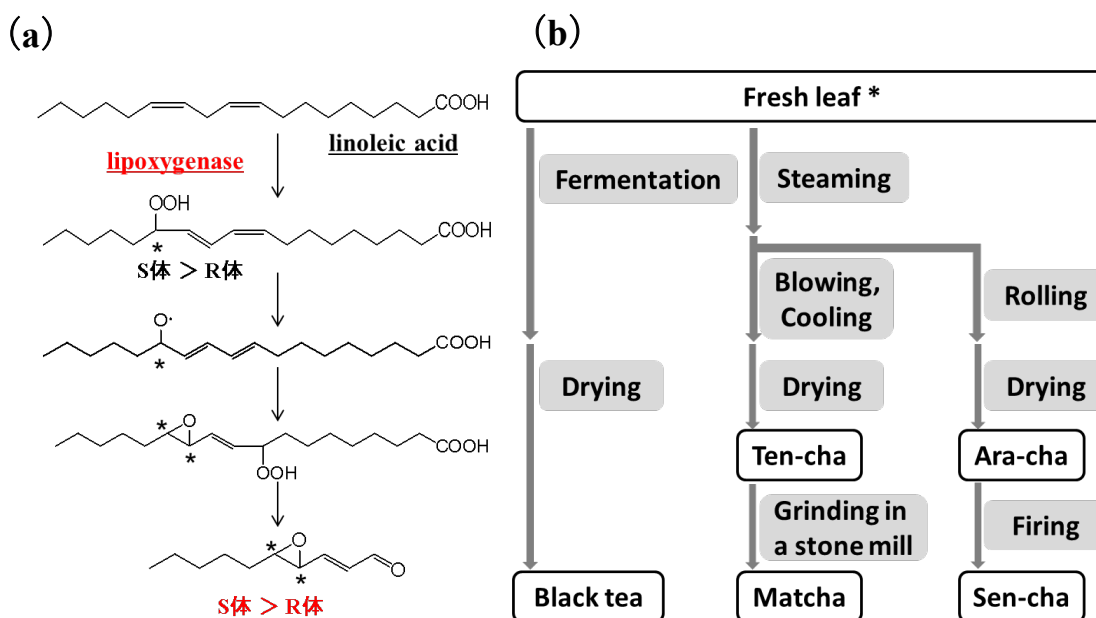


図3.1-3 抹茶入り煎茶飲料におけるエポキシデセナールの添加効果

(\*: 無添加品に対して危険率5%で有意差あり)

### 3.2 抹茶における*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal 生成機構の推定

抹茶の主要な香気寄与成分のひとつであるエポキシデセナールは、紅茶の特徴香気成分であり、煎茶にはほとんど含まれないことが報告されている<sup>62)</sup>。すなわち、紅茶のエポキシデセナールは、茶葉に含まれるリノール酸から、発酵中にリポキシゲナーゼの作用を受けて生じるため(図 3.2-1 (a))<sup>62)</sup>、発酵工程の無い煎茶では、エポキシデセナールがほとんど生成しない(図 3.2-1 (b))。一方、抹茶の製茶工程は、煎茶と同様に発酵工程が無いにも関わらず、エポキシデセナールは高い寄与度を示した。したがって、抹茶に含まれるエポキシデセナールの生成機構は、紅茶とは異なることが予想された。そこで、茶葉リポキシゲナーゼの立体選択性を利用し、抹茶におけるエポキシデセナールの特徴の解明を試みた。



(\*: 抹茶用生葉は、摘採前に数週間被覆栽培される)

図3.2-1 紅茶における*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の推定生成機構(a)<sup>62)</sup>および 抹茶, 煎茶, 紅茶の製造工程(b)

#### 3.2.1 実験方法

*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の光学異性体比を調べるため, 3.1.1 (7)にて調製した Fr. F

(抹茶分画物)および合成標品を、キラルカラムによる GC-MS 分析に供した。Agilent 社製 7890B ガスクロマトグラフを使用した。カラム:InertCap CHIRAMIX (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。キャリアーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min)。注入口温度:200°C。注入法:スプリットレス注入。試料注入量は 1.0  $\mu$ L, オープン温度は 120°C~140°C (0.1°C/min) とした。質量検出器(MS)は, Agilent 社製 5977A XL MSD を使用した。イオン化電圧:70 eV (EI), イオン源温度:150°C。

### 3.2.2 結果および考察

抹茶におけるエポキシデセナールの特徴を調べるために、茶葉リポキシゲナーゼの立体選択性を利用した。すなわち、茶葉のリポキシゲナーゼは、リノール酸を立体選択的に酸化し *S* 体の中間体を形成する<sup>73),74)</sup>ことより、発酵工程を経て生じる紅茶のエポキシデセナールは *S* 体が多いのに対し、発酵工程のない抹茶のエポキシデセナールはラセミ体になることが予想された<sup>62)</sup>。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した抹茶のエポキシデセナールを、キラルカラムにて分析した結果、抹茶のエポキシデセナールは、予想通りラセミ体(鏡像体過剰率:2.78 % ee)であり、その生成にはリポキシゲナーゼが関与しないことが明らかになった(図 3.2-2)。この結果は、抹茶のエポキシデセナールが、紅茶とは異なる生成機構で生じる可能性を示唆している。一方、Kumazawa らは、リノール酸およびそのヒドロペルオキシドを加熱し、いずれからもエポキシデセナールが生成すること、その生成量は、リノール酸に比べてヒドロペルオキシドの方が顕著に多いことを報告している<sup>62)</sup>。このことより、抹茶におけるエポキシデセナールの形成には、蒸熱以降の、煎茶とは異なる抹茶特有の加熱工程である、高温の碾茶炉による長時間の乾燥(180~200°C, 30 分)に加え、広げた状態の茶葉に風をあてる冷却や、石臼での粉末化などの工程が関与すると考えられる。

以上の結果より、エポキシデセナールをはじめとする抹茶特有の香気の形成には、その特有の製茶工程が深く関与していることが示唆された。

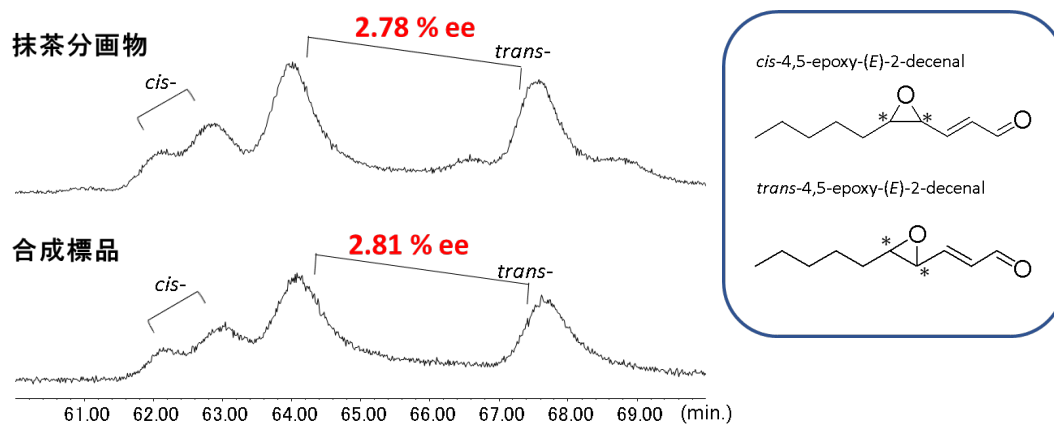


図 3.2-2 抹茶分画物のキラルカラム分析結果

### 3.3 要約

本章では、良質な抹茶の香りに寄与する成分を明らかにするため、品質の異なる3種の抹茶について香気寄与成分を探索した。抹茶は、茶葉の浸出液を飲用する一般的な茶と異なり、茶そのものを飲用あるいは食するという点で特殊である。そこで、抹茶の周りに漂う香気と、抹茶に含有される香気の両方を分析対象とし、抹茶のヘッドスペースガスおよび抹茶の溶剤抽出物をSAFE(Solvent Assisted Flavor Evaporation)法にて蒸留して調製した香気濃縮物の各々について香気寄与成分を探索した。

香気濃縮物のGC-MS分析の結果、検出された成分の多くが、品質によらずすべてのサンプルに共通し、また、緑茶の香気成分としてすでに報告されている化合物であったが、その組成はサンプルごとに大きく異なり、高級抹茶では、カロテノイドより生成するヨノン類や、アミノ酸と糖の加熱反応により生成するピラジン類<sup>12),118)</sup>、フラノン類、低級抹茶では、脂質より生成する2,4-heptadienalをはじめとするアルデヒド類が多く検出された。

香気寄与成分の探索においては、香気濃縮物のAEDA(Aroma Extract Dilution Analysis)より39ピーク(FD factor  $\geq 4^3$ )、ヘッドスペースガスのGC-O(GCO-H)より16ピーク(FD factor  $\geq 1$ )を検出し、多くの新規成分を含む36成分および16成分を同定あるいは推定した。これらの寄与成分の比較から、抹茶の香気は、いずれの品質でも高いFDファクターを示したスイート、グリーン、メタリック、フローラルな香調の成分(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal, coumarin, 3-methyl-2,4-nonanedione, (E,Z)-2,6-nonadienal, (Z)-1,5-octadien-3-one,  $\alpha$ -ionone, (E)-isoeugenol)を主体として、高級抹茶では海苔様の香調を有するDMS, ロースト香を有する成分(2-methyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine), 低級抹茶では、若干の油臭を含む青臭さ(グラッシー), 枯草様, ファッティーな香調の成分(1-penten-3-one, hexanal, (Z)-4-heptenal, (Z,Z)-3,6-nonadienal, (E,E)-2,4-decadienal)が加わり構成されていることが明らかとなった。以上の結果は、GC-MS分析により得られた主要香気成分の成分組成とも矛盾せず、茶期や摘採時期、被覆条件等の違いが、抹茶の品質に関わる香気組成に影響する可能性を示している。

さらに、煎茶とは異なる、高級抹茶の特徴的な香気に寄与する成分を明らかにするため、高級抹茶と煎茶の香気寄与成分を比較した。その結果、スイート、フローラルな香調を有する 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, coumarin,  $\alpha$ -ionone, (*E*)-isoeugenol およびロースト香を有するピラジン類が、煎茶とは特徴を異にする高級抹茶の香りに重要であることが推察された。

これらの成分のうち、スイート、メタリックな香りを有する *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、紅茶の重要な香気寄与成分として知られ、発酵工程中の酵素作用により立体選択的に生成する可能性が指摘されていると同時に、抹茶と同じ蒸製緑茶である煎茶ではほとんど生成しないことが知られている。そこで、抹茶入り煎茶飲料における本成分の添加効果を官能評価により確認したところ、本成分の抹茶特有の甘い香味への高い寄与が確認された。さらに、抹茶における本成分の生成機構を検討するため、キラルカラムにより分析した結果、抹茶における本成分はラセミ体であることが明らかとなり、その生成には酵素が関与しないことが示唆された。この結果より、抹茶の *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、紅茶とは異なる非酵素的な機構で生成し、さらに、煎茶とは異なる抹茶特有の製造工程、例えば、揉捻せず、広げた状態の茶葉に風をあてる冷却、高温の碾茶炉による長時間の乾燥(180~200℃, 30 分)、石臼での粉末化などが関与する可能性が推察された。以上の結果は、高級抹茶特有の香気形成に、被覆栽培や抹茶特有の製造工程が密接に関与する可能性を示している。

以上の結果より、良質で嗜好性の高い抹茶の香気は、おもにスイート、グリーン、メタリック、フローラルな香調の成分(4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, coumarin, 3-methyl-2,4-nonanedione, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, (*Z*)-1,5-octadien-3-one,  $\alpha$ -ionone, (*E*)-isoeugenol)と、DMS およびロースト香を有する成分(2-methyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine)からなり、摘採前に被覆栽培した一番茶を、揉捻せず碾茶炉にて火入れし、石臼で挽く、抹茶特有の伝統的な製法により形成される可能性が明らかとなった。

## 第4章 中国緑茶の特徴的な香りに関する研究

緑茶は、日本のみならず、世界最大の茶生産国である中国においても最もポピュラーな茶であり、中国における茶生産量の約7割を緑茶が占める。中国にて生産される緑茶は、日本の煎茶と同じ緑茶であるが、その香りは大きく異なり、グリーンな香りが特徴的な煎茶に対し、中国緑茶は、一般に、発酵茶を想起させるような華やかで甘い香りと香ばしい香りが特徴的である。このような違いは、日本と中国における製法の違いに由来するところが大きく、特に殺青方法の違いによる影響が大きいと考えられている。すなわち、日本において主流の蒸熱法にて作られる煎茶は、酵素が瞬時に失活するため香気成分の変化が少なく、爽快でグリーンな香りとなるのに対し、中国において主流の釜炒り法にて作られる中国緑茶は、茶葉の温度が上がりにくく酵素の失活に時間がかかるため、茶葉が酵素の作用を若干受け、釜炒り特有の香ばしさに加え、発酵茶のような華やかで甘い香りを有すると考えられている<sup>124)</sup>。さらに、中国では、釜炒り前の茶葉を萎凋させることが多く、この工程も香気生成に影響することが知られている。このような酵素反応の関与が香気形成をより複雑なものとするため、中国緑茶には、産地や製法の微妙な違いにより膨大な数の銘柄が存在し、その香りも多彩である。しかしそのような多彩な香りを有する一方で、中国緑茶の多くが、銘柄によらず共通して感じられる特有のフローラルな香りを有しており、その香りは、中国緑茶に欠くことのできない要素と言える。

中国では、緑茶は茶葉に湯を注いで温かい状態で飲用するスタイルが主流であるが、近年ペットボトル飲料の生産も増大していることより、良質で嗜好性の高い中国緑茶の香りを付与できる香料が求められている。中国緑茶の香気に関しては、これまでに多くの研究がなされ、多数の香気成分が同定されている<sup>18),76),77),78),79),80)</sup>。しかしながら、香気寄与成分に関する報告はわずかに3報であり、いずれも1品の中国緑茶を取り上げているに過ぎない<sup>18),79),80)</sup>。したがって、多様な中国緑茶に共通する香りを説明できるものとは言えず、良質で嗜好性の高い中国緑茶特有の華やかな香りを構成する成分は明らかになっていない。

そこで本研究では、中国緑茶の多くに共通する特有のフローラルな香りに寄与する成分を

明らかにするため、銘柄および収穫時期の異なる中国緑茶 6 品の香気寄与成分を探索した。さらに、中国緑茶より初めて見出され、中国緑茶特有の香りに重要な役割を果たしていると予想される(*E*)-isoeugenol に関して、製茶工程中の茶葉における生成機構を検討した。

## 4.1 中国緑茶(西湖龍井, 黄山毛峰, 碧螺春)の香気寄与成分の解明

### 4.1.1. 実験方法

#### (1) 実験材料

銘柄の異なる 3 種の中国産緑茶(西湖龍井, 黄山毛峰, 碧螺春)の, 2012 年春および夏収穫品は, 日本緑茶センター株式会社より購入した. 茶葉はすべて, 品質が良いとされる特級品であり, 実験に使用するまで -80℃ の冷凍庫に保管した. 2-acetyl-1-pyrroline<sup>81)</sup>, (Z)-1,5-octadien-3-one<sup>58)</sup>, 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone<sup>48)</sup>, 3-methyl-2,4-nonanedione<sup>60)</sup>, 2-acetyl-2-thiazoline<sup>61)</sup>, *cis*-および *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal<sup>62)</sup>は, 文献にしたがい合成し, 保持指標 (RI)<sup>69)</sup>およびマススペクトルの一致を確認した. 実測データを以下に示す.

(2-acetyl-1-pyrroline 以外の成分の実測データは, 2.1.1.1 および 3.1.1 に記載した.)

#### 2-acetyl-1-pyrroline

RI<sub>DB-WAX</sub>: 1318, MS (EI):  $m/z$  (%) 41 (44), 43 (100), 68 (19), 69 (17), 83 (41), 111 ( $M^+$ , 25)

表 4.1-3 に記載の化合物 3, 6, 12, 14, 16-19, 21, 23-26, 29, 32, 33, 35, 38, 40, 41, 43, 47, 48, 52-55, 57, 58 は, 東京化成工業株式会社, 4, 15, 30, 45, 46, 56 は, シグマアルドリッチジャパン, 39, 44 は和光純薬工業株式会社, 50 は, 日本ゼオン株式会社よりそれぞれ購入した. 2-octanol は, ナカライテスク株式会社より購入した.

#### (2) 香気濃縮物の調製

中国緑茶浸出液は, 茶葉 (75 g) に対して 1500 g の熱水 (90℃) を加え, 5 分間抽出後, 濾過, さらに急冷 (20℃ 以下) することにより得た. 得られた浸出液 (1000 g) に含まれる香気成分は, カラムに充填した吸着樹脂 SP700 (三菱化学株式会社, 20 mL) に吸着させたのち, 100 mL のジクロロメタンにて溶出し, 内部標準物質 (2-octanol, 100  $\mu$ g) 添加後, Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE, 40℃,  $5 \times 10^{-3}$  Pa) により不揮発性成分を除いた. 得られたジクロロメタン溶液は, 無水硫酸ナトリウムにて脱水後, エバポレーター (35℃, 550 mmHg), 次いで窒素気流により約 100  $\mu$ L まで濃縮した. 得られた香気濃縮物は, GC-MS 分析 (測定条件: 3.1.1 (8) (a) と同じ) および AEDA に使用した. 各成分は, 保持指標 (RI), マススペクトル

ルおよび香調を標品と比較することにより同定し、GC-MS 分析結果より、内部標準物質 (2-octanol) に対するレスポンスファクター (RF) を 1 として定量した。

### (3) Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O)

Agilent 社製 6850 ガスクロマトグラフを使用した。カラム: DB-WAX (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。オーブン温度: 40°C~210°C (5°C/min)。キャリアーガス: ヘリウム (流速 1.0 mL/min)。注入法: スプリットレス注入。注入口温度: 250°C。試料注入量: 1  $\mu$ L。検出器: 熱伝導度検出器 (TCD, 230°C)。TCD の出口ににおい嗅ぎ装置を接続し、溶出された香気成分を評価した。におい嗅ぎ装置は、検出器から溶出する香気成分の滞留を防ぐためにリボンヒーターで加温し、さらに約 100 mL/min の空気を通じた。

### (4) Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)

(2)にて得た香気濃縮物を、ジクロロメタンにて段階的に4倍ずつ希釈し、(3)に記載した GC-Oの条件にて測定し、各成分の香気を検出できる希釈倍率 (Flavor Dilution (FD) ファクター) を求めた<sup>64)</sup>。AEDAに先立ち、2名のパネリストが希釈倍率 $4^0$ および $4^1$ のサンプルを用いて繰り返しGC-Oを行い、保持時間と香調を確定した。FDファクターは、3名のパネリストのうち、2名以上が検出した値を採用した。FDファクターの信頼性は、内部標準物質 (2-octanol) のにおい強度を確認することで担保した。

すべての中国緑茶に共通して高い寄与度を有する香気成分および各銘柄に特徴的な香気寄与成分を選出するため、すべてのサンプルの香気寄与成分について、FD ファクターの指数の平均値と相対標準偏差 (RSD) を算出した。すなわち、平均値が高く RSD の低い成分は、すべての銘柄に共通して高い寄与度を有すると判断した。

### (5) (*E*)-isoeugenol 添加効果の官能評価

市販緑茶飲料 300 g に、(*E*)-isoeugenol (純度 90%以上) 20 ppm および 200 ppm エタノール溶液を 30  $\mu$ L 添加した。対照品は、エタノールのみを 30  $\mu$ L 添加した。調製した緑茶飲料について、中国茶特有のフローラルな香りを訓練されたパネル 8 名で評価した。香味の強さは、1 (弱い) から 7 (強い) の間で採点し、得られた全員の結果を平均化し、標準誤差を算出した。

#### 4.1.2 結果および考察

実験材料として、中国緑茶の中でも代表的な銘柄である、西湖龍井、黄山毛峰、碧螺春（春および夏収穫品）を用いた。茶葉の外見は、その釜炒りや乾燥工程の違いにより異なっており、西湖龍井は、釜に押しつけて乾燥されるため平らな形、黄山毛峰は、籠に入れて炭火の輻射熱で乾燥されるため大きくよれた形をしていた。碧螺春は、新芽の若いうちに摘採され、釜でよるようにして乾燥されるため、細かくよれた形で白毛を有していた。これらの浸出液の香気の特徴を表 4.1-1 に示す。いずれの銘柄においても、春収穫品は夏収穫品に比べ良質な香りを有し、銘柄ごとの特徴的な香りも強く感じられた。

表4.1-1 中国緑茶浸出液の香気の特徴

cultivar	crop	characteristic aroma of infusion
Longjing	spring	roast, green sweet
Longjing	summer	roast, green
Maofeng	spring	roast, metallic
Maofeng	summer	soybean-like
Biluochun	spring	floral, japanese apricot-like
Biluochun	summer	roast

これら6種の浸出液の香気濃縮物を、樹脂吸着法とSAFEを組み合わせた方法により調製した。過度の加熱操作を伴わないこの方法により調製した香気濃縮物は、中国緑茶浸出液の特徴的な香気をよく保持しており、GC-O による香気寄与成分の探索にとって最も好ましい分析サンプルであった<sup>96)</sup>。6種の中国緑茶から調製した各々の香気濃縮物のGC-MS分析の結果、80成分以上を検出し、その多くはすべての銘柄に共通していた(表 4.1-2)。さらに、検出された個々の香気成分に着目すると、銘柄や収穫時期による変動はあるものの、benzyl alcohol, 2-phenylethyl alcohol, linalool oxideなどの製造工程中の酵素反応によって配糖体から生成する成分、indole, coumarin, cis-jasmoneなどの茶葉のストレス応答により生成する成分および4-vinylphenol, 2-acetylpyrrole, phenylacetic acid, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanoneなどの茶葉の加熱により糖やアミノ酸などから生成する成分が、多く含まれて

いることが明らかとなった。このような香気組成には、茶葉の萎凋や釜炒り殺青が密接に関与している可能性が考えられる。すなわち、萎凋においては、茶葉中のアミノ酸や糖が増加することが報告されており<sup>40)</sup>、それらを前駆物質とする香気生成に影響すると考えられている<sup>83)</sup>。また、indole, *cis*-jasmone, jasmine lactone 等、一部の香気成分が増加することも確認されている<sup>83)</sup>。釜炒り殺青では、高温の釜に茶葉を入れ、攪拌しながら加熱するため、釜の表面から離れている茶葉は、烏龍茶における揺青工程と類似した状況におかれ、ストレス応答反応による香気生成が起こり、同時に、揉捻による茶葉組織の破壊による配糖体の分解も起こる可能性が考えられる。以上のことは、中国緑茶の製造工程において、ごく軽度の、烏龍茶あるいは紅茶の製造工程と同様の酵素反応が起こる可能性を示唆しており、中国緑茶が、烏龍茶や紅茶を想起させる華やかな香りを有することとも矛盾しない。

続いて、香気濃縮物を AEDA に供し、香気寄与成分を探索した結果、4<sup>1</sup>から4<sup>7</sup>の FD ファクターを有する 58 ピークを検出し、中国緑茶における新規化合物 6 成分を含む 46 成分を同定あるいは推定(保持指標(R.I.)と香調により)した(表 4.1-3)。新規化合物が検出された理由としては、実験試料の違いや分析法の違いが考えられる。検出された成分の多くは、すべての検体に共通しており、その含有量の違いが浸出液の香りの違いに影響していることが推察された。一方、銘柄や収穫時期に関係なく共通して高い FD ファクターを示した成分(FD ファクターの平均値  $\geq 4^4$ , RSD < 20%)は、中国緑茶全般に共通する香りの主体を形成していると考えられ、スイートな香調の 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone, coumarin, vanillin, フローラルな香調の geraniol, (*E*)-isoeugenol, 焼けたような香調の 2-methoxyphenol が該当した。これらの成分の多くは、中国緑茶香気的主要成分と同様に、配糖体の分解や、糖とアミノ酸の加熱反応、茶葉のストレス応答により生成する成分である。したがって、この結果は、前述の主要香気組成からの推察、すなわち、中国緑茶特有のフローラルな香りの形成に対する、萎凋や釜炒り殺青の密接な関与を裏付けるものと言える。

表4.1-2 中国緑茶の主要香気成分

No.	compound	(ppb)					
		西湖龍井		黄山毛峰		碧螺春	
		春	夏	春	夏	春	夏
1	isobutanal	5	3	3	-	4	-
2	3-pentanone	3	4	4	5	-	3
3	methyl propyl ketone	3	4	4	5	-	3
4	2-methyl-2-butanol	4	-	-	-	4	-
5	hexanal	9	12	12	17	3	9
6	4-methyl-3-penten-2-one	5	8	7	4	-	4
7	1-penten-3-ol	3	5	4	7	-	9
8	heptanal	2	-	5	3	4	-
9	amyl alcohol	10	11	8	11	3	7
10	2-methylpyrazine	-	-	4	-	-	3
11	2-heptanol	-	-	-	-	3	-
12	(Z)-2-pentenol	2	4	4	6	-	9
13	2,5-dimethylpyrazine	8	5	8	-	-	7
14	2,6-dimethylpyrazine	-	-	3	-	-	-
15	hexanol	3	3	3	4	3	3
16	(Z)-3-hexenol	13	22	8	10	13	15
17	nonanal	-	-	3	2	2	-
18	2-ethyl-6-methylpyrazine	-	-	3	-	-	-
19	cis-linalool oxide	3	12	13	7	13	5
20	acetic acid	-	-	-	-	2	-
21	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	-	3	-	-	-	-
22	acetoxy-2-propanone	-	-	-	-	-	2
23	furfural	3	-	7	2	-	3
24	(E,Z)-2,4-heptadienal	-	-	2	2	-	-
25	trans-linalool oxide	7	18	15	9	35	7
26	2-ethylhexanol	-	-	-	3	-	3
27	(E,E)-2,4-heptadienal	2	3	6	5	-	5
28	2-acetylfuran	-	-	3	-	-	2
29	(E,Z)-3,5-octadien-2-one (tentative)	-	3	-	2	-	5
30	benzaldehyde	5	7	5	6	5	6
31	linalool	8	12	15	9	161	6
32	octanol	2	3	3	3	-	-
33	5-methylfurfural	-	-	3	-	-	2
34	hotrienol	3	-	10	6	-	-
35	1-ethyl-2-formylpyrrole (tentative)	6	4	10	3	-	10
36	phenylacetaldehyde	12	8	8	3	16	5
37	furfuryl alcohol	-	-	3	-	-	2
38	acetophenone	2	2	3	-	2	2
39	$\alpha$ -terpineol	-	-	-	-	3	-
40	4-hexanolide	3	5	3	5	-	3
41	cis-linalool oxide pyranoid	3	7	9	14	4	16
42	trans-linalool oxide pyranoid	23	50	41	56	45	41
43	methyl salicylate	2	3	5	-	2	-

(表4.1-2 つづき)

44	geraniol	8	35	37	20	18	34
45	hexanoic acid	25	50	14	42	5	32
46	benzyl alcohol	32	46	71	93	46	221
47	2-methoxyphenol	-	-	-	-	-	2
48	N-ethyl succinimide	3	5	7	6	3	14
49	2-phenylethyl alcohol	33	48	66	55	126	149
50	2,6-dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol (tentative)	8	5	37	62	10	45
51	<i>cis</i> -jasmone	8	12	16	29	5	48
52	heptanoic acid	12	11	14	18	10	16
53	2-acetylpyrrole	19	25	32	7	5	27
54	dodecanol	-	-	-	6	-	5
55	maltol	23	14	24	16	11	18
56	( <i>E</i> )-2-hexenoic acid	7	18	-	-	-	-
57	5,6-epoxy- $\beta$ -ionone	2	-	-	-	-	5
58	phenol	-	-	7	5	4	19
59	2-formylpyrrole	-	-	5	-	-	9
60	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanone	24	31	24	8	4	12
61	methyl <i>o</i> -methoxybenzoate	-	-	-	4	-	-
62	octanoic acid	4	4	4	4	-	3
63	<i>p</i> -cresol	-	-	-	-	2	5
64	<i>epi</i> -cubenol	-	-	-	-	-	3
65	2-formyl-5-methylpyrrole	2	-	4	-	-	4
66	4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i> )-furanone	-	3	-	-	-	-
67	2,3-dimethylnona-2,4-dien-4-olide (reference)	5	5	12	7	-	-
68	2-aminobenzaldehyde	3	-	5	5	4	5
69	nonanoic acid	11	11	10	10	12	22
70	2-methoxy-4-vinylphenol	3	-	3	-	2	4
71	$\delta$ -cadinol	-	4	-	4	-	4
72	methyl anthranilate	4	-	3	-	-	-
73	( <i>Z</i> )-7-decen-5-olide	6	9	5	11	3	15
74	3-hydroxy-2,3-dihydromaltol	3	-	4	-	-	-
75	( <i>E</i> )-8-hydroxylinalool (citation)	-	-	3	-	-	-
76	methyl (2-pent-2-enyl-3-oxocyclopentyl)acetate	4	9	-	7	3	11
77	geranic acid	7	10	15	-	-	-
78	dihydroactinidiolide	7	19	7	16	-	19
79	4-vinylphenol	26	27	30	19	16	50
80	indole	10	8	29	99	19	98
81	coumarin	28	60	25	40	8	25
82	3-hydroxy- $\beta$ -damascone	2	2	-	-	-	-
83	vanillin	35	31	62	55	47	59
84	3,5-diethyl-2,3-dimethyl-5-cyclohexen-1-one	-	-	-	-	12	-
85	phenylacetic acid	24	23	13	4	33	13
86	acetovanillone	3	-	4	-	2	-
87	7-methoxycoumarin	13	11	-	10	-	-
88	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde	40	63	42	46	60	45

表4.1-3 中国緑茶の香気寄与成分 (FD factor  $\geq 4^1$ )

no.	R.I. <sup>a</sup>	compound <sup>b</sup>	odor quality <sup>e</sup>	log <sub>4</sub> (FD factor)					
				西湖龍井		黄山毛峰		碧螺春	
				春	夏	春	夏	春	夏
1	946	unknown	stimulus	2	1	2	1	2	1
2	1009	unknown	fruity, green				1		
3	1076	hexanal	green, grassy	1	1	1	1	1	1
4	1132	(Z)-3-hexenal <sup>c</sup>	green			2	2	1	
5	1189	unknown	nutty						1
6	1294	1-octen-3-one	mushroom-like			1		1	1
7	1334	2-acetyl-1-pyrroline	roasty	2	2	3	2		1
8	1366	(Z)-1,5-octadien-3-one <sup>c</sup>	metallic	1	1	3	1	2	1
9	1374	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone <sup>c</sup>	green, meaty	1					
10	1380	unknown	green		1		1		1
11	1407	unknown	nutty, green			2			1
12	1422	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>c,d</sup>	pea-like	3	2	3	2	1	3
13	1447	unknown	nutty				1		
14	1449	methional	potato-like	3	2	3	3	3	2
15	1459	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	nutty	3	2	3	2	2	2
16	1492	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	nutty	3	1	3	1	2	2
17	1521	2-isobutyl-3-methoxypyrazine <sup>c</sup>	earthy, musty	2	2	3	2	1	2
18	1530	(E)-2-nonenal	green, sweet	2	2	1	2	1	2
19	1538	linalool	floral	2	1	3	1	4	1
20	1551	2-ethenyl-3,5-dimethylpyrazine <sup>d,f</sup>	nutty	3		2		1	1
21	1581	(E,Z)-2,6-nonadienal	green, cucumber-like		1		2	2	2
22	1674	unknown	roasty, sour, smoky				2		
23	1625	2-acetylpyrazine	nutty						1
24	1633	phenylacetaldehyde	sweet, honey-like	2	1		1		1
25	1660	isovaleric acid	sweaty, rancid			2			1
26	1698	(E,E)-2,4-nonadienal	fatty	1	2	4	2		2
27	1700	3-methyl-2,4-nonanedione	green	4	4	4	3	2	3
28	1756	2-acetyl-2-thiazoline <sup>c</sup>	roasty		2	2	1		1
29	1807	(E,E)-2,4-decadienal	fatty	1	1	1	1		2
30	1817	$\beta$ -damascenone <sup>c</sup>	sweet, honey-like	2	1	2	1		1
31	1842	unknown	sweaty, green						1
32	1842	geraniol	floral, green	4	5	4	4	5	5
33	1851	2-methoxyphenol	burnt, rubber-like	6	5	7	5	5	4
34	1940	unknown	green, sweaty						1
35	1961	maltol	sweet	1	2	2	2	2	2
36	1981	cis-4,5-epoxy-(E)-2-decenal <sup>d</sup>	sweet, juicy			1			
37	1996	trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	sweet, juicy, metallic			3	2		
38	2020	4-ethylguaiaicol <sup>d</sup>	spicy						4
39	2023	4-nonanolide	sweet		1	3		2	

(表4.1-3 つづき)

40	2025	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanone	sweet, caramel-like	7	6	7	5	7	5
41	2075	<i>p</i> -cresol	phenolic						2
42	2146	unknown	sweet, green, floral				2		2
43	2157	eugenol	spicy	4	3	5	4	3	4
44	2174	2-methoxy-4-vinylphenol	spicy			2			
45	2190	3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i> )-furanone <sup>c</sup>	seasoning-like, caramel-like	5	5	5	4	3	4
46	2196	5-decanolide <sup>c</sup>	lactone-like		2		1		2
47	2213	<i>o</i> -aminoacetophenone	grape-like	1		3	2	2	
48	2236	methyl anthranilate	grape-like	1		1	1	1	1
49	2253	unknown	phenolic		1				1
50	2259	jasmin lactone	sweet, burnt	2	1	2	2	2	3
51	2299	unknown	green		2		1		
52	2338	( <i>E</i> )-isoeugenol <sup>d</sup>	floral, spicy	5	5	4	5	4	5
53	2389	( <i>Z</i> )-methyl jasmonate	floral	2	2	2	2	3	3
54	2432	indole	animal-like	1		3	3	2	4
55	2446	coumarin	sweet	6	5	5	5	4	4
56	2540	phenylacetic acid	sweet	4	4	3	3	4	3
57	2551	vanillin	vanilla-like	5	4	5	5	5	5
58	2610	3-phenylpropionic acid <sup>c,d</sup>	animal-like	3	2	3	2	3	2

<sup>a</sup> Retention index on DB-Wax column (30 m × 0.25 mm i. d.; coated with a 0.25 μm film) observed for GC-O.

<sup>b</sup> The compound was identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (R.I.) on stationary phase DB-Wax, mass spectra, and odor quality.

<sup>c</sup> The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (R.I.) on stationary phase DB-Wax and odor quality.

<sup>d</sup> The compound has not been reported in the literature in the Chinese green tea.

<sup>e</sup> Odor quality assigned during AEDA.

<sup>f</sup> The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by matching the retention index (R.I.) on stationary phase DB-Wax and odor quality with those of literature data<sup>82)</sup>.

以上の結果より、中国緑茶特有のフローラルな香りは、スイート、フローラルな香調の成分および焼けたような香調の成分を主体として形成され、その形成には、中国緑茶特有の製造工程(萎凋、釜炒り殺青)が影響していることが推察された。

検出された成分の中でも、中国緑茶より初めて見出された(*E*)-isoeugenol(52)は、フローラルな中に若干のスパイシーさを併せ持つ独特の香調を有し、中国緑茶の特徴的な香りに、

特に重要な役割を果たしていることが推察された。そこで、52 の中国緑茶の香りに対する影響を調べるため、官能評価を実施した。その結果、52を2 ppb, 20 ppb 添加した緑茶飲料は、中国緑茶特有のフローラルな香りが強いことが明らかとなった(図 4.1-1)。この結果より、52 は、中国緑茶特有のフローラルな香りに強く寄与していることが明らかとなった。

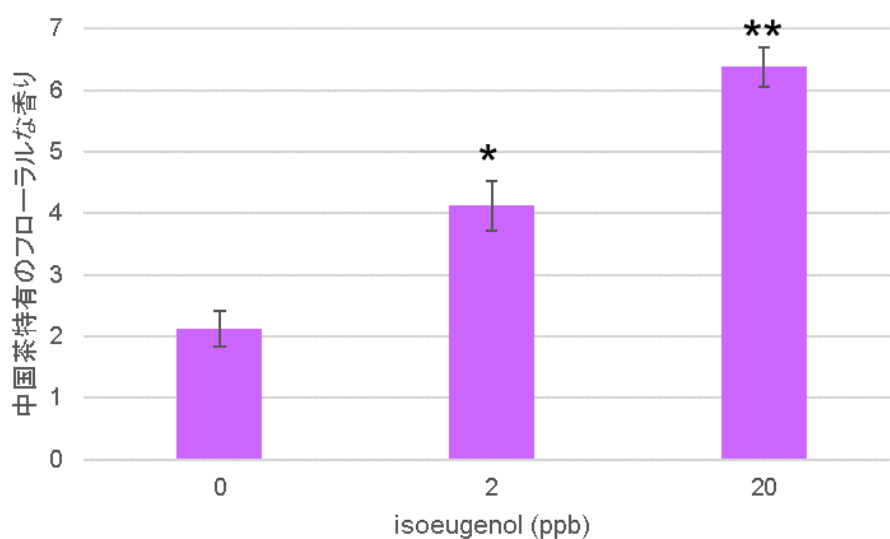


図 4.1-1 緑茶飲料におけるイソオイゲノールの添加効果

(\*: 無添加品に対して危険率 5%で有意差あり, \*\*: 無添加品に対して危険率 1%で有意差あり)

## 4.2 中国緑茶における(*E*)-isoeugenol 生成機構の推定

今回、中国緑茶より初めて見出された(*E*)-isoeugenol (52) は、中国緑茶特有のフローラルな香りの形成に、特に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。52 は、半発酵茶である包種茶において、攪拌を伴う萎凋(揺青)によって増加することが報告されており<sup>83)</sup>、その生成に酵素反応が関与している可能性が示唆されているが、詳細な生成機構は解明されていない。そこで、中国緑茶における 52 の生成機構を明らかにするための実験を行った。

### 4.2.1 実験方法

#### (1) 実験材料

中国緑茶は、4.1.1 と同じものを使用した。煎茶は、2008 年および 2012 年に静岡県にて製造されたものを使用した。烏龍茶(文山包種、凍頂烏龍、黄金桂、鉄観音、大紅袍)は、2001 年に台湾あるいは中国にて製造されたものを使用した。紅茶(ディンブラ(スリランカ)、ジャワ、ケニア、アッサム)は、2005 年に製造されたものを使用した。烏龍茶および紅茶は、いずれも特級品を三井農林株式会社より購入した。茶葉はすべて、実験に使用するまで-80℃の冷凍庫に保管した。coniferyl alcohol は、和光純薬工業株式会社、セルロースと cinnamyl alcohol、2-octanol は、ナカライテスク株式会社、ペクトリアーゼは、新日本化学工業株式会社より購入した。

#### (2) 製法の異なる茶の(*E*)-isoeugenol および coniferyl alcohol の定量

製法の異なる茶(日本緑茶 3 品、中国緑茶 6 品、烏龍茶 6 品、紅茶 4 品)の浸出液は、4.1.1 に記載の方法にて調製した。得られた浸出液(200 g)中の香気成分は、カラムに充填した SP700(三菱化学株式会社, 5 mL)に吸着させたのちに、50 mL のジエチルエーテル/*n*-ペンタン(8:2)混合溶液にて溶出し、内部標準物質(2-octanol, 20 μg)添加後、無水硫酸ナトリウムにて脱水し、エバポレーター(35℃, 550 mmHg)、次いで窒素気流により約 100 μL まで濃縮した。得られた香気濃縮物を、3.1.1 (8) (a) に記載の GC-MS を用いて、選択イオン/スキャン(SIM-Scan)モードにて測定した。選択イオンは、*m/z* 115 (2-octanol) および 164 ((*E*)-isoeugenol)とした。(*E*)-isoeugenol および coniferyl alcohol の定量値は、選択イオンのピ

ーク面積値をトータルイオンのピーク面積値に換算し、内部標準物質 (2-octanol) のピーク面積値との比から、RF を1として算出した。

### (3) 加熱による(*E*)-isoeugenol 生成のモデル実験

coniferyl alcohol (0.005g)あるいは cinnamyl alcohol にセルロース (1g) および蒸留水 (10g) を添加し、よく混合したのち、凍結乾燥した。得られた凍結乾燥品 0.1g を 20mL 容 HS バイアルにはかり取り、密栓後、GC オープンにて 150℃、30 分加熱した。加熱後のサンプルを HS-SPME 法による GC-MS 分析に供した。対照品として、加熱前のサンプルも同様に測定した。

### (4) 酵素反応による coniferyl alcohol 生成のモデル実験

3.1.1 に記載の方法にて調製した日本緑茶の浸出液を、SP700 (三菱化学株式会社, 5mL) を充填したカラムに通液した。吸着した香気成分を 50mL のジエチルエーテル/*n*-ペンタン (8:2) 混合溶液にて溶出したのち、不揮発性成分をメタノール (50mL) にて溶出した。溶出液は、メタノールをエバポレーター (35℃, 120 mmHg) にて留去したのち、凍結乾燥した。得られた不揮発性成分の凍結乾燥品 0.4g を 10mL 容ガラスバイアルにはかり取り、クエン酸リン酸緩衝液 (pH 4.5, 7mL) に溶解したのち、ペクトリアーゼ (新日本化学工業, 2mg) を添加し、水浴 (40℃) にて 3 時間加温した。反応後の溶液は、ジエチルエーテル/*n*-ペンタン (8:2) 混合溶液 2mL にて振とう抽出し、得られた抽出液を窒素気流下にて約 100μL まで濃縮したのち、GC-MS 分析 (測定条件: 3.1.1 (8) (a) と同じ) に使用した。

### (5) GC-MS

ヘッドスペース中の揮発性成分を、SPME ファイバー (50/30μm StableFlex DVB/Carboxen/PDMS, Sigma-Aldrich) にて抽出し、Cycle composer オートサンプラー (AMR) Agilent 社製 6850N ガスクロマトグラフにて分析した。カラム: DB-WAX (60m×0.25mm i.d., 膜厚 0.25μm, Agilent 社製)。キャリアーガス: ヘリウム (流速 1.0mL/min)。注入口温度: 250℃。注入法: スプリット注入 (スプリット比: 1/30), オープン温度: 80℃～230℃ (3℃/min) とした。質量検出器 (MS) は、Agilent 社製 5973N MSD を使用した。イオン化電圧: 70eV (EI), イオン源温度: 150℃。

#### 4.2.2 結果および考察

製茶工程における酵素作用と, (*E*)-isoeugenol (52) 含有量の関係を明らかにするため, 製法の異なるさまざまな茶における 52 含有量を調べた. まず, 萎凋工程の無い煎茶と, 一般に萎凋工程を含む中国緑茶における 52 含有量を測定したところ, 中国緑茶の方が, 52 を多く含む傾向が見られた(図 4.2-1A). さらに, 発酵茶である烏龍茶 6 銘柄(鉄観音, 黄金桂, 文山包種, 大紅袍, 凍頂烏龍, 香嶺烏龍)と, 紅茶 4 銘柄(ディンブラ, アッサム, ケニア, ジャワ)について, 52 含有量を測定した結果, これらは, 緑茶に比べ 52 含有量がきわめて高く, 特に烏龍茶における含有量の多さは顕著であった(図 4.2-1B). これらの結果は, 52 の生成に製茶工程における酵素反応が関与する可能性を強く示唆している.

植物における 52 の生成に関しては, いくつかの報告がある. ペチュニアの花では, 酵素反応によって, coniferyl alcohol から, coniferyl acetate を経由して 52 が生合成されることが報告されており<sup>84)</sup>, 木材のパルプ化(脱リグニン)では, coniferyl alcohol から, 加熱により 52 が生成することが報告されている<sup>85)</sup>. このことより, coniferyl alcohol は, 植物における 52 の生成にとって重要な中間体であると推察された. そこで, 茶浸出液中の coniferyl alcohol を分析したところ, 緑茶, 烏龍茶, 紅茶のいずれの茶にも coniferyl alcohol が含まれ, その含有量と 52 含有量の間には正の相関が認められた(図 4.2-2). 前述のように, coniferyl alcohol は, 加熱により 52 を生じることが報告されており, さらに, 茶浸出液中に coniferyl acetate は認められなかったことから, coniferyl alcohol から 52 の生成は, 酵素による生合成ではなく, 茶葉加工における加熱反応によることが予想された. そこで, 茶葉の釜炒りおよび乾燥工程を想定し, coniferyl alcohol をセルロース中にて 150°C, 30 分間加熱した. その結果, 52 と eugenol (43) の生成が確認され(図 4.2-3), 52 は, coniferyl alcohol の加熱により生成することが示された. coniferyl alcohol からの 52 の生成は, 還元的脱水反応により生じると予想される. この反応が, 比較的穏やかな加熱条件でも進行した理由として, coniferyl alcohol が 4 位にフェノール系水酸基を有することに着目した. すなわち, この反応における中間体が, 比較的安定なキノン構造をとっていることを推定した. これを確認するため, coniferyl alcohol に類似の構造を有し, かつ 4 位に水酸基を有さない cinnamyl alcohol の加熱を試みた. その結果, 3-phenylpropene

は生成せず、この穏やかな加熱条件における脱水反応の進行には、中間体として比較的安定なキノン構造を形成する必要があることが示唆された。(図 4.2-4)。

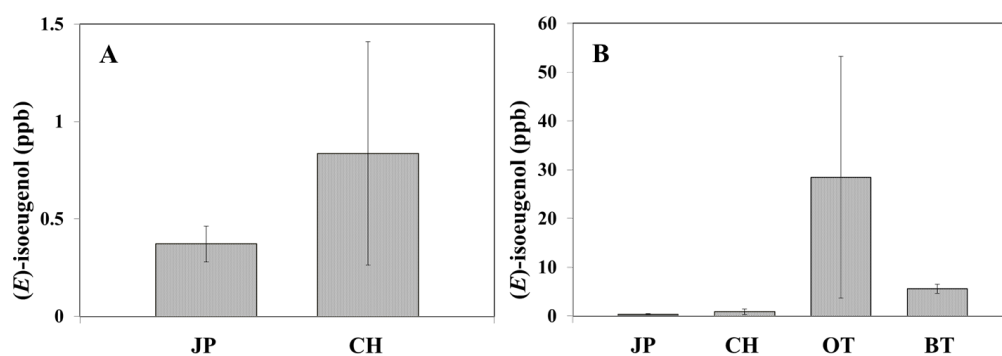


図4.2-1 製法の異なるさまざまな茶の(*E*)-isoeugenol含有量

(JP: Japanese green tea (Sen-cha), CH: Chinese green tea, OT: oolong tea, BT: black tea)

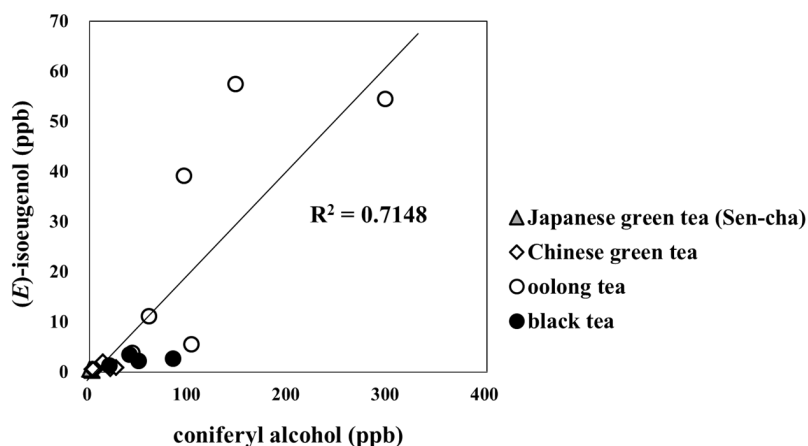


図4.2-2 製法の異なるさまざまな茶の(*E*)-isoeugenolとconiferyl alcohol含有量の相関

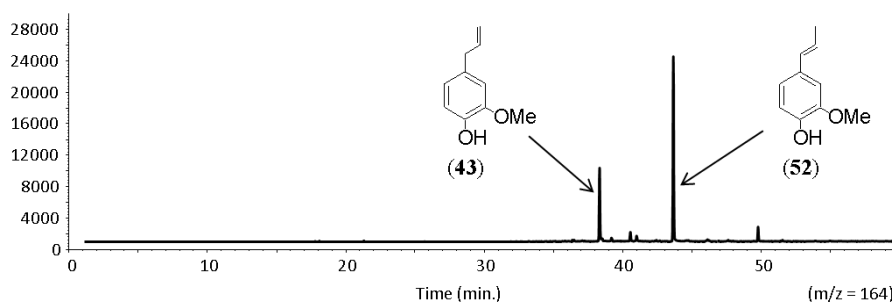


図4.2-3 coniferyl alcoholの加熱(150 °C, 30 分)による (*E*)-isoeugenol生成の確認

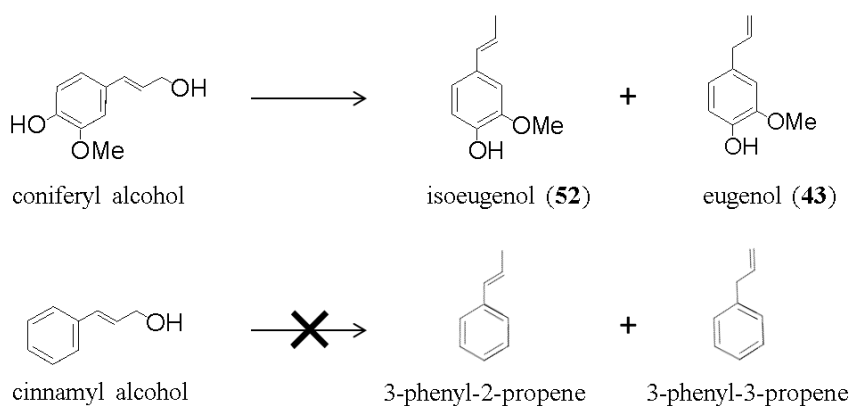


図4.2-4 coniferyl alcoholおよびcinnamyl alcoholの加熱反応

coniferyl alcohol は、植物体内において phenylalanine より生合成されること<sup>84)</sup>、植物の生長に欠かせない生体高分子リグニンの前駆体であり、不安定な化合物であるため、一般的に、植物体内においては coniferin という配糖体として蓄積されていること<sup>86)</sup>が知られている。また、coniferin は、茶 (*Camellia sinensis*) の近縁種である *Camellia taliensis* からも見出されていることより<sup>87)</sup>、*Camellia sinensis* にも coniferin が存在する可能性が高い。これに加えて、茶の香気に含まれる多くのアルコール類が、製茶工程中の酵素反応によって配糖体から生成することより、coniferyl alcohol の生成にも、coniferin のような配糖体が関与していることを推測し、煎茶浸出液の配糖体画分に加水分解酵素ペクチナーゼを作用させた。その結果、coniferyl alcohol の生成が確認され、配糖体の関与が示唆された(図 4.2-5)。

以上の結果より、製茶工程中の茶葉においては、coniferin のような前駆体から、加水分解酵素の作用により coniferyl alcohol が生じ、それが加熱されることで、52 が生成することが示唆された。すなわち、萎凋および釜炒り工程中の内生酵素の作用により、coniferin のような前駆体より coniferyl alcohol が生成し、続く釜炒り、乾燥工程中の加熱反応により、coniferyl alcohol からキノンを經由して 52 が生成することが推察された(図 4.2-6)。

一方、52 および coniferyl alcohol が、紅茶よりも烏龍茶に多く含まれる傾向が見られた(図 4.2-2)ことは、中国緑茶および烏龍茶が、紅茶とは質の異なる華やかな香りを有することと密接に関連していると考えられる。すなわち、coniferyl alcohol と同様に phenylalanine より生合成される benzyl alcohol や 2-phenylethyl alcohol などのフェニルプロパノイド類は、烏龍茶に特有の工程である揺青により増加することが知られていることより、coniferyl alcohol もまた揺青により増加することが推測される。したがって、烏龍茶においては、茶葉に蓄積している配糖体の分解だけでなく、揺青によっても coniferyl alcohol が生成する可能性がある。さらに、前述したように、52 自体が揺青により増加することも、烏龍茶がより多くの 52 を含有する一因と考えられる。中国緑茶の製造においても、釜炒り殺青時、釜の表面から離れている茶葉は揺青と類似した状況にあると考えられ、同様のことが起こっている可能性もある。このことより、中国緑茶の重要な香気寄与成分である 52 の含有量には、配糖体の分解に始まる経路(図 4.2-6)による生成のみならず、萎凋、殺青中に生成する coniferyl alcohol の加熱による生成や、萎凋中の 52 自体の生成も寄与している可能性が考えられる。

興味深いことに、52 は、蒸製緑茶であり萎凋工程も無い抹茶においても、重要な香気寄与成分のひとつとして検出されている。このことには、抹茶の原料となる碾茶特有の栽培方法である被覆栽培が関与していると推察される。すなわち、茶葉の遮光栽培により、アミノ酸である phenylalanine およびそれに由来するフェニルプロパノイド類が増加することが報告されていることより、被覆栽培によって茶葉中の coniferyl alcohol が増加している可能性がある。中国緑茶と抹茶に共通する重要香気寄与成分は 52 以外にもあり、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, coumarin が該当する。いずれの成分も、52 と同様に、アミノ酸がその生成に関わっていることより、これらの香気寄与成分が中国緑茶と抹茶に共通する要因としては、製

造工程中に茶葉のストレス(抹茶では遮光, 中国緑茶では萎凋)応答によるアミノ酸の増加が起こることであると推測される。

以上の結果より, 52 を主体とする中国緑茶特有のフローラルな香りの形成には, 茶葉のストレス応答を利用した, 中国緑茶特有の製造工程(萎凋や釜炒り殺青)が重要であることが示唆された。

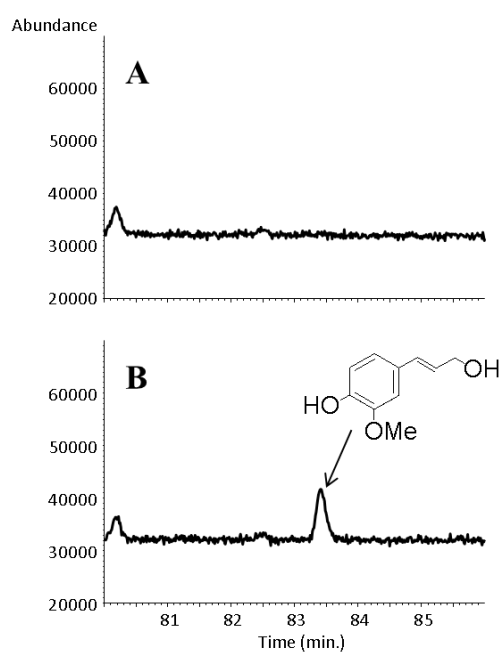


図4.2-5 酵素反応による煎茶浸出液配糖体画分からのconiferyl alcohol生成

(A: 酵素なし, B: 酵素あり)

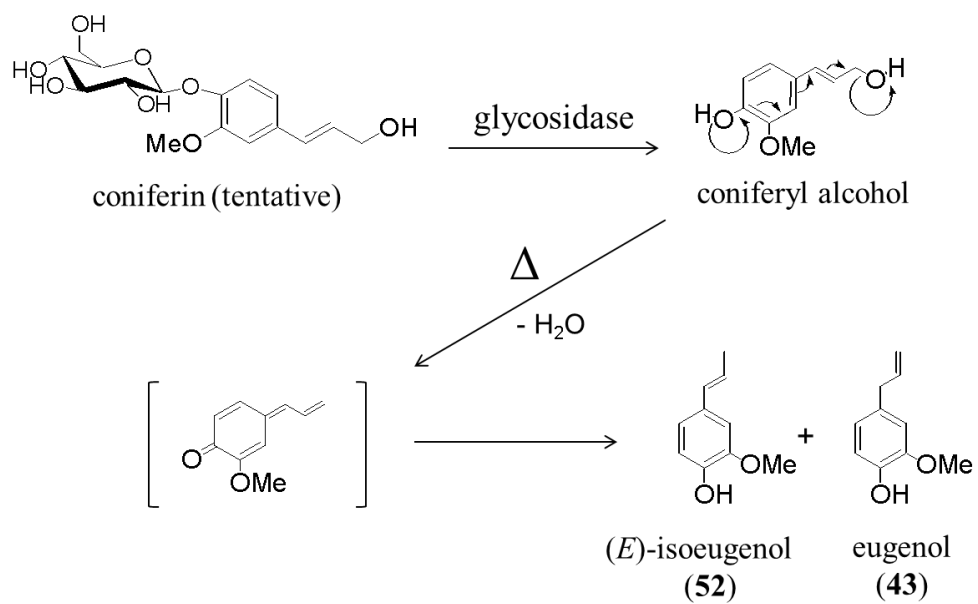


図 4.2-6 中国緑茶製造工程中の茶葉における(*E*)-isoeugenol の推定生成経路

### 4.3 要約

本章では、中国緑茶の多くに共通する特有のフローラルな香りに寄与する成分を明らかにするため、銘柄および収穫時期の異なる中国緑茶 6 品の香気寄与成分を探索した。中国緑茶の代表的な 3 銘柄(西湖龍井, 黄山毛峰, 碧螺春)の春および夏収穫品の浸出液の香気濃縮物を、樹脂吸着法と SAFE を組み合わせた方法により調製し、AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) 法により、香気寄与成分を探索した。

香気濃縮物の GC-MS 分析により検出された成分の多くは、銘柄や収穫時期に関わらず共通しており、主に、配糖体の分解、茶葉のストレス応答、糖とアミノ酸の加熱反応により生成する成分が多く含まれていたことより、その香気組成に、中国緑茶特有の製造工程である、萎凋や釜炒り殺青が密接に関与する可能性を推察した。一方、AEDA の結果、 $4^1$  から  $4^7$  の FD ファクターを有する 58 ピークを検出し、中国緑茶における新規化合物 6 成分を含む 46 成分を同定した。これらのうち、スイートな香調の 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone, coumarin, vanillin, フローラルな香調の geraniol, (E)-isoeugenol, 焼けたような香調の 2-methoxyphenol の 7 成分は、銘柄および収穫時期によらず、すべての浸出液において高い FD ファクターを示したことから、中国緑茶全般に共通する香りに寄与する成分である可能性が示唆された。さらに、これらの多くが、主要成分と同様に、配糖体の分解や、糖とアミノ酸の加熱反応、茶葉のストレス応答により生成することより、中国緑茶特有の華やかな香りの形成においても、萎凋や釜炒り殺青が重要であることを推察した。

すべての浸出液に共通して高い FD ファクターを示した成分のうち、中国緑茶より初めて見出された(E)-isoeugenol は、フローラルな中にスパイシーな香調を併せ持ち、中国緑茶特有のフローラルな香りの形成に特に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで、(E)-isoeugenol の茶における生成機構を検討したところ、その生成には、中国緑茶特有の製造工程(萎凋, 釜炒り殺青)が密接に関与していることが示唆された。

以上の結果より、中国緑茶に共通する特有の華やかな香気は、ややスパイシーでフローラルな香調を有する(E)-isoeugenol を主体とし、スイート、フローラルな香調の成分と、焼けたよ

うな香調の成分が組み合わさり形成されていることが推察され、その形成には、中国緑茶特有の製造工程(萎凋や釜炒り殺青)が密接に関与している可能性が明らかとなった。

## 第5章 ダージリン紅茶の特徴的な香りに関する研究

紅茶は、世界で最も多く生産、消費されている茶であり、発酵茶ならではの華やかな香りと奥深い味わいが、人々を魅了している。また、紅茶には多くの銘柄があり、産地ごとの気候風土や茶葉の生育条件、製造方法等の違いにより、多彩な香りを有することが知られている。日本においても、近年、本格志向の高級なリーフティーや紅茶専門店の人気上昇し、銘柄ごとの香りの違いを楽しむ人が増えている。このことは、香りが紅茶の特徴やおいしさを決定づける重要な品質因子であることを示しているにほかならない。このように、香りが重要な要素である紅茶の香気成分に関しては、すでに多くの研究があり、多数の成分が明らかにされるとともに、その生成機構の解明も進められている<sup>27)</sup>。さらに、いくつかの銘柄については、Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) による香気寄与成分の探索が行われ、紅茶の重要な香気寄与成分の多くが解明され<sup>62),68),88),89)</sup>、銘柄ごとの特有の香調が、香気寄与成分の含有量の違いに起因することも示唆されている<sup>89)</sup>。

ダージリン紅茶は、インド北東部に位置するダージリン地方の山岳地帯で生産され、数ある紅茶の中でも、優れた香味を有することから世界三大紅茶のひとつにも数えられている高級紅茶である。マスカットを想起させる甘くフルーティーな特有の香調(マスカットフレーバー)を有することから、「紅茶のシャンパン」とも称され、他の銘柄とは一線を画し、世界的に高い人気を誇る。また、ダージリン紅茶は、一般に紅茶の原料として用いられる大葉系のアッサム種ではなく、緑茶と同じ小葉系の中国種を原料として用いている点も特徴である。小葉系茶葉はカテキン類が少ないため、水色は明るいオレンジ色、飲み口は苦渋味が少なくすっきりしており、フルーティーな香調と合わさることで、全体にすっきりとさわやかな紅茶となっている。

小葉系茶葉を原料とする紅茶には、ダージリンのほかに、中国で生産されるキーマン紅茶がある。キーマン紅茶もまた、世界三大紅茶のひとつであり、長い時間を要する特有の製法により作られ、ランの花や糖蜜を想起させる東洋的な香りと、スモーキーな香りが特徴と言われている。キーマン紅茶は、品質ごとにランク付けされ、最も品質の良い特級品では甘く華やかな香り、その下の一級品ではスモーキーな香りを有するが、流通品の多くが一級品である

ために、スモーキーな香りが特徴であるという認識が定着している<sup>90)</sup>。しかしながら、スモーキーな香りは、特級品には無いことから推測されるように、紅茶の香りにとって必ずしも良い影響を与えるものではない。したがって、「香り高い紅茶」としての一般的な知名度および嗜好性は、ダージリン紅茶の方が優れていると考えられる。

このように、嗜好性に優れた特徴的な香味を有するダージリン紅茶は、飲料をはじめとする加工製品の需要も大きく、その特徴的な香りを賦与できる良質な香料が求められている。しかしながら、ダージリン紅茶のマスカットフレーバーを再現できる香料の作製は達成されておらず、良質なダージリン紅茶の風味を感じられる加工製品の開発にはいたっていない。

そこで本研究では、マスカットフレーバーを含む、ダージリン紅茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにするため、ダージリン紅茶と産地(銘柄)の異なる7種の紅茶について、主要香気組成およびAEDAによる香気寄与成分を比較した。さらに、ダージリン紅茶の特徴的な香りの形成に関与する要因について、茶葉の品種や生育環境、製法に着目し、考察した。

## 5.1 ダージリン紅茶に特徴的な香気寄与成分の解明

ダージリン紅茶の格別な香りは、多くの研究者の研究対象となり、これまでに多数の香気成分が明らかにされてきた<sup>68),89),91)</sup>。それらの中でも、Schuh と Schieberle の、Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) と Stable Isotope Dilution Assay を駆使した研究では、ダージリン紅茶の香気に寄与する多数の成分が明らかになり、さらにこれらの香気成分による再構成試験にて、ダージリン浸出液とほぼ同等の香気を得られたことが報告されている<sup>68)</sup>。しかし一方で、彼らはダージリン紅茶のマスカットフレーバーには言及しておらず、再構成試験においても、一部の香調については浸出液との間に差異があったことを認めている。したがって、ダージリン紅茶香気に寄与する成分の概要はほぼ明らかとなっているものの、最大の特徴であるマスカットフレーバーに寄与する成分は依然不明であり、未だ見出されていない成分の存在が予想された。

そこで今回、産地(銘柄)の異なる複数の紅茶の香気寄与成分を比較することで、ダージリン紅茶に特徴的な成分を探索するとともに、マスカットフレーバーに寄与する成分の解明を試みた。

### 5.1.1 実験方法

#### (1) 実験材料

産地の異なる 11 種の紅茶(ダージリン, アッサム, ニルギリ, ディンブラ, ウバ, スワラエリア, ケニア, ジャワ, キーマン, 坦洋工夫, 滇紅工夫)を用いた。茶葉はすべて三井農林株式会社より購入し、実験に使用するまで-80℃の冷凍庫に保管した。紅茶浸出液は、茶葉(150 g)に対して 3 L の熱水(85-90℃)を加え、5 分間抽出後、濾過、さらに急冷(20℃以下)することにより得た。2-acetyl-1-pyrroline<sup>81)</sup>, (Z)-1,5-octadien-3-one<sup>58)</sup>, 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone<sup>48)</sup>, 3-mercaptohexanal<sup>92)</sup>, 3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol<sup>93)</sup>, 3-methyl-2,4-nonanedione<sup>60)</sup>, 3-mercapto-1-hexanol<sup>94)</sup>, *cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal<sup>62)</sup>, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal<sup>62)</sup>は、文献にしたがい合成し、保持指標(RI)<sup>69)</sup>およびマススペクトルの一致を確認した。実測データを以下に示す。(下記以外の 6 成分の実測データは、2.1.1.1 および 3.1.1 に記載した。)

### 3-mercaptohexanal

RI<sub>DB-WAX</sub>: 1553, MS (EI):  $m/z$  (%) 39 (25), 41 (55), 42 (52), 55 (100), 61 (33), 69 (25), 70 (63), 80 (23), 81 (34), 99 (25), 114 (22), 132 ( $M^+$ , 29)

### 3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol

RI<sub>DB-WAX</sub>: 1613, MS (EI):  $m/z$  (%) 39 (20), 41 (23), 43 (80), 67 (35), 71 (100), 82 (66), 152 ( $M^+$ , not detected)

### 3-mercapto-1-hexanol

RI<sub>DB-WAX</sub>: 1851, MS (EI):  $m/z$  (%) 39 (29), 41 (67), 55 (100), 57 (64), 61 (41), 67 (40), 82 (37), 83 (27), 100 (32), 134 ( $M^+$ , 24)

表 5-1-3 に記載の化合物 4, 18, 38 は, シグマアルドリッチジャパン, 51, 60 は和光純薬工業株式会社, 64 は日本ゼオン株式会社より購入し, それ以外の化合物および methyl undecanoate は, 東京化成工業株式会社より購入した. 2-octanol は, ナカライテスク株式会社より購入した.

#### (2) 香気濃縮物の調製

(a) 紅茶浸出液 (50 g) に含まれる香気成分は, カラムに充填した SP700 (三菱化学株式会社, 5 mL) に吸着させたのちに, 20 mL のジエチルエーテル/*n*-ペンタン (8:2) 溶液にて溶出し, 内部標準物質 (2-octanol, 10  $\mu$ g) 添加後, 無水硫酸ナトリウムにて脱水した. その後, エバポレーター (35°C, 550 mmHg), 次いで窒素気流により約 100  $\mu$ L まで濃縮し, GC-MS 分析 (a) に使用した. 各成分は, 保持指標 (RI) およびマススペクトルを標品と比較することにより同定し, 内部標準物質 (2-octanol) に対するレスポンスファクター (RF) を 1 として定量した.

(b) 紅茶浸出液 (2L) に含まれる香気成分は, カラムに充填した Porapak Q (日本ウォーターズ株式会社, 80/100 mesh, 10 g) に吸着させたのちに, 100 mL のジクロロメタンにて溶出し, 内部標準物質 (methyl undecanoate, 50  $\mu$ g) 添加後, Solvent Assisted Flavor Evaporation (SAFE, 40°C,  $5 \times 10^{-3}$  Pa) により不揮発性成分を除いた. 得られたジクロロメタン溶液は, 無水硫酸ナトリウムにて脱水後, エバポレーター (35°C, 550 mmHg), 次いで窒素気流により約 150  $\mu$ L まで濃縮し, GC-MS 分析 (b) および AEDA に使用した.

各成分は、保持指標(RI)、マススペクトルおよび香調を標品と比較することにより同定した。

### (3) Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O)

Agilent 社製 6850 ガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-WAX(30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。オープン温度:40℃~210℃(5℃/min)。キャリアーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min)。注入法:スプリットレス注入。注入口温度:250℃。試料注入量:1  $\mu$ L。検出器:熱伝導度検出器(TCD, 230℃)。TCD の出口ににおい嗅ぎ装置を接続し、溶出された香気成分を評価した。におい嗅ぎ装置は、検出器から溶出する香気成分の滞留を防ぐためにリボンヒーターで加温し、さらに約 100 mL/min の空気を通じた。

### (4) Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)

(2)にて得た香気濃縮物を、ジクロロメタンにて段階的に 4 倍ずつ希釈し、(3)に記載した GC-O の条件にて測定し、各成分の香気を検出できる希釈倍率(Flavor Dilution(FD)ファクター)を求めた。FD ファクターは、3 人のパネリストのうち、2 名以上が検出した値を採用した。

### (5) GC-Mass Spectrometry (GC-MS)

(a) Agilent 社製 7890B ガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。オープン温度:80℃~230℃(3℃/min)。キャリアーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min)。注入法:スプリット注入(スプリット比: 1/30)。注入口温度:250℃。試料注入量:1 $\mu$ L。検出器:5977A MSD(イオン化電圧:70 eV(EI), イオン源温度:150℃)。

(b) Agilent 社製 7890A ガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。キャリアーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min)。注入口温度:250℃。注入法:スプリット注入(スプリット比:1/30)またはスプリットレス注入。スプリット注入での試料注入量は 1  $\mu$ L, オープン温度は 80℃~230℃(3℃/min), スプリットレス注入での試料注入量は 0.2  $\mu$ L, オープン温度は 40℃~230℃(3℃/min)とした。質量検出器(MS)は、Agilent 社製 5975C inert XL MSD を使用した。イオン化電圧:70 eV(EI), イオン源温度:150℃。

### (6) 主成分分析

(a) (2)(a)にて得られた 11 種および 8 種の紅茶における各香気成分の定量値を説明変数

とし、統計解析ソフト SPSS 6.1J(エス・ピー・エス・エス株式会社, 東京)を用いて主成分分析を行った。

(b) AEDA にて得られた 8 種の紅茶における各香気成分の FD ファクターの指数(4<sup>th</sup>)を説明変数とし、統計解析ソフト SPSS 6.1J(エス・ピー・エス・エス株式会社, 東京)を用いて主成分分析を行った。

#### (7) 未知成分の同定

##### ① 香気濃縮物の調製

ダージリン茶葉(50 g)に熱水(約 1 L)を加え、連続水蒸気蒸留抽出(SDE)装置に接続後、30 分間還流し、香気成分をジクロロメタン(50 mL)に抽出した。抽出に用いたジクロロメタンは、2 ないし 3 回ごとに入れ換え、同様の操作を 11 回繰り返すことで、最終的に、茶葉 550 g の香気成分を 150 mL のジクロロメタンに抽出した。得られた香気抽出液は、無水硫酸ナトリウムにて脱水後、エバポレーター(35℃, 550 mmHg), 次いで窒素気流により約 1 mL まで濃縮した。得られた香気濃縮物(約 500  $\mu$ L)を、*n*-ペンタンにて Wakogel C-200(和光純薬工業株式会社製, 5 g)を充填したカラム(内径 1 cm, 長さ 20 cm ジャケット付カラム, 15℃)に通液し、*n*-ペンタン(30 mL), *n*-ペンタン-ジクロロメタン(20:1, 10:1, 10:1.2, 1:1)混合溶液(各 30 mL), ジクロロメタン(30 mL $\times$ 2 回), ジエチルエーテル(30 mL)にて順次溶出し、Fr.1~8 とした。溶出液は、エバポレーター(35℃, 550 mmHg), 次いで窒素気流により約 100  $\mu$ L まで濃縮した。得られた各画分を、(5) (a)に記載の方法にて GC-MS 分析を行い、GC-O 分析により目的成分が溶出する画分を確認した。

##### ② 香気濃縮物分画物の GC-O 分析

におい嗅ぎ装置 ODP3(GERSTEL 社製)を装備した Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフを使用した。カラム:DB-1(30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製)。オーブン温度:40℃~210℃(5℃/min)。キャリアーガス:ヘリウム(流速: 1.0 mL/min)。注入法:スプリットレス注入。注入口温度:250℃。試料注入量:1  $\mu$ L。検出器:水素炎イオン化検出器(FID, 250℃)。ODP3(250℃)は、カラム出口にて FID と分岐した(FID:ODP3 = 1:10)。

##### ③ GC-MS/Sulfur Chemiluminescence Detector/Nitrogen Phosphorus Detector (GC-MS/

SCD/NPD)

(1)にて得られた Fr.6 を, GC-MS/SCD/NPD 分析に供した. 1 台の GC に MS および化学発光硫黄検出器(SCD), 窒素リン検出器(NPD)の 3 種類の検出器を装備した本システムは, 選択性と感度に優れた検出器によるスクリーニング能力と, MS による定性能力を併せ持ち, 一般に食品の香気に微量で大きな影響を与えることで知られる含硫化合物, 含窒素化合物の効率的な測定が可能である. ガスクロマトグラフは, Agilent 社製 7890A を使用した. カラム:DB-WAX (60 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製). オープン温度:80℃~230℃(3℃/min). キャリヤーガス:ヘリウム(流速 2.0 mL/min). 注入法:スプリット注入(スプリット比: 1/10). 注入口温度:250℃. 試料注入量:1  $\mu$ L. 検出器:5975C inert XL MSD(イオン化電圧:70 eV(EI), イオン源温度:150℃), SCD(250℃), NPD(320℃, 水素流速:3 mL/min, 空気流速:120 mL/min). カラム出口にて流路を 3 つに分岐し, 3 検出器にて同時に検出した.

#### ④ オフライン二次元 GC-MS

Fr. 6 に含まれる微量の目的成分を, さらに高度に精製, 濃縮するため, オフラインでの二次元 GC-MS<sup>89),95)</sup>を適用した. 本システムは, 分取用 GC(DB-1 カラムによる GC-O)と, 分析用 GC-MS(加熱脱着装置を搭載した GC-MS)から成る. すなわち, 分取用 GC のスニッフィングポートから溶出する目的成分を, 吸着樹脂 Tenax TA が充填された CIS4 ライナー(GERSTEL 社製)に 10 回繰り返し分取し, 捕集した香氣成分を, GC-MS にて分析した. 分取用 GC には, (3)に記載の装置およびカラムを使用した. オープン温度:40℃~280℃(10℃/min). キャリヤーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min). 注入法:スプリットレス注入. 注入口温度:250℃. 試料注入量:2  $\mu$ L. 分析用 GC には, オートサンプラーMPS-2(GERSTEL 社製)および加熱脱着装置 TDU-CIS4(GERSTEL 社製)を搭載した Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフ, 検出器には, Agilent 社製 5975B inert XL MSDを使用した. カラム:DB-WAX (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25  $\mu$ m, Agilent 社製). オープン温度:30℃~120℃ (3℃/min), 120℃~230℃(5℃/min). キャリヤーガス:ヘリウム(流速 1.0 mL/min). 注入方法:スプリットレス注入. TDU 温度:20℃~280℃(12℃/sec, 3 分間保持). CIS 予備冷却温度:-180℃. 脱

着温度: -150°C ~ 260°C (12°C/sec, 3 分間保持).

#### (7) 官能評価

市販のダージリン紅茶飲料 300 g に, MMP(純度 90%以上) 1 ppm エタノール溶液 150  $\mu$ L を添加した. 対照品は, エタノールのみを 150  $\mu$ L 添加した. 調製した紅茶飲料について, マスカット様の香りを, 訓練されたパネル 7 名で評価した. 香りの強さは, 1(弱い)から 7(強い)の間で採点し, 得られた全員の結果を平均化し, 標準誤差を求めた.

### 5.1.2 結果および考察

#### (1) ダージリン紅茶の特徴成分

産地の異なる 11 種の紅茶浸出液は, 各々が特有の香味を有していたが, その多くは, ファッティー, グラッシー, スイートなどの香調を共通して有していた. その中で, ダージリン紅茶の香りは, 他の紅茶とは大きく異なり, マスカット様, フルーティーな香調が特徴的であった. また, 中国紅茶(キーマン, 坦洋工夫, 滇紅工夫)は, スモーキーな香りが特徴的であり(表 5.1-1), その他のイギリス紅茶とは顕著に異なる独特の香りを有していた. これは, 中国紅茶が, イギリス紅茶とは異なる中国独自の伝統的な製法にて作られるためと考えられる.

11 種の紅茶の主要香氣成分を分析するため, 各紅茶の浸出液から樹脂吸着法にて香氣濃縮物を調製した. 過度な加熱の無い本法にて得られた香氣濃縮物の香調をよく再現していた<sup>96)</sup>. 得られた 11 種の紅茶の香氣濃縮物を GC-MS 分析に供した結果, いずれの紅茶からも, 100 成分以上が検出され, その多くが, 含有量に違いはあるものの, すべての紅茶に共通していた.

表5.1-1 銘柄の異なる紅茶浸出液の香味

Variety	Country	Flavor of infusion
Darjeeling	India	Muscat-like, Fruity, Green
Assam	India	Caramel-like, Smoky, Sour
Nilgiri	India	Grassy, Mild Citrus-like, Fatty
Dimbula	Sri Lanka	Sweet, Floral, Fatty
Uva	Sri Lanka	Mint-like, Sweet, Fatty
Nuwara Eliya	Sri Lanka	Grassy, Green, Lemon-like
Kenya	Kenya	Fatty, Green, Caramel-like
Java	Indonesia	Grassy, Sweet, Green
Keemun	China	Smoky, Floral
坦洋工夫	China	Smoky, Bean-like, Sweet
滇紅工夫	China	Floral, Cosmetic, Peach-like, Smoky

続いて、ダーズリン紅茶の特徴成分を検討するため、11 種の紅茶の香気組成を比較した。比較には、検出された成分のうち、少なくとも 1 種の紅茶で 20 ppb 以上検出され、かつ同定あるいは推定可能であった香気成分 (46 成分) の定量値を用い、これらを効率的かつ客観的に比較することが可能な手法として、主成分分析を採用した。主成分分析の結果、ダーズリン紅茶は、散布図上で他の 10 種の紅茶から離れた位置にプロットされたことから、その主要な香気成分組成は、他の紅茶と大きく異なることが明らかとなった (図 5.1-1 (a))。また、中国紅茶であるキーマン紅茶と坦洋工夫紅茶もまた、ダーズリン紅茶およびその他の紅茶とは離れた位置にプロットされ、特異的な香気成分組成を有することが示唆された。したがって、中国紅茶は、ダーズリン紅茶の特徴を明らかにするための比較対照として適していないと判断し、対照から除外することとし、これらを除いた 8 種の紅茶について、再度主成分分析を行った。その結果、やはりダーズリン紅茶は、他の 7 種の紅茶から離れた位置にプロットされた (図 5.1-1 (b))。さらに、第一主成分の累積寄与率が 84.7% と極めて高いことより、ダーズリン紅茶香気の特異性は、第一主成分で十分に説明できると考えた。そこで、特異性への影響が特に大きいと予想される、第一主成分の因子負荷量 0.8 以上の化合物を選出した (表 5.1-2)。ここで選出された成分は、いずれもダーズリン紅茶における含有量が他の紅茶に比べて顕著

に多かった。

主成分分析の結果より選出された成分(表 5.1-2)を, 推定される生成経路に基づいて分類すると, その多くは 3 つのグループ, すなわち, ①配糖体より生成する成分, ②加熱により生成する成分, ③脂質より生成する成分, のいずれかに分類することが可能である。

①に分類した成分は, linalool(11), linalool oxide 類(4-7), geraniol(8), benzyl alcohol(1), 2-phenylethyl alcohol(19), benzaldehyde(12), nerolidol(2)である。これらは, 茶葉中に配糖体として存在し<sup>97)</sup>, 紅茶製造における揉捻工程で, 糖加水分解酵素の作用により生成することが報告されている<sup>23),27)</sup>。茶において, 配糖体より生成する主要な成分は, テルペン類である。Takeoらは, その中でも含有量の多い linalool と geraniol の組成比(テルペンインデックス: TI)が茶葉の品種間で大きく異なることを見出し, 銘柄ごとの香りの違いが原料茶葉の品種に由来すると推測している<sup>98),99)</sup>。このことは, 茶葉に含まれるテルペン類配糖体の組成が, 品種により異なることを示唆している。しかしながら, TI は組成の違いを示すものであるため, ダージリン紅茶における配糖体由来成分の含有量の多さを十分に説明することはできない。

一般に植物は, 昆虫などによる食害ストレスを受けた際にテルペン類を中心とする香気を生成し, それらを配糖化して蓄積することが知られている<sup>100),101)</sup>。さらに, 生成する香気の組成や量は, 植物の種類や日照量の減少, 渇水等の環境要因の影響も受けることが報告されている<sup>100)</sup>。茶においても, 食害により linalool, linalool oxide 類, nerolidol 等が増加することや, 茶葉の摘採時期によって製造された紅茶の香気組成が異なることが報告されており<sup>13),102),103),104)</sup>, それらを配糖化する酵素も明らかになっている<sup>105)</sup>。さらに, ダージリン紅茶の特徴香(マスカットフレーバー)が最も強いとされる収穫時期(セカンドフラッシュ)は, チャノミドリヒメヨコバイの発生時期にあたり<sup>14)</sup>, ダージリン紅茶の特徴成分(9)の前駆体(3)は, この虫の食害により増加することが報告されている<sup>13)</sup>。以上のことより, ダージリン紅茶の原料茶葉は, 品種のみならず, 生育時期やヨコバイによる食害という環境要因によって, テルペン類の配糖体を多く含む可能性が推察される。

一方, 配糖体から生じる香気成分の生成効率に影響を与える要因のひとつとして, 製法が

挙げられる。紅茶には大きく分けて 2 つの製法すなわちオーソドックス製法と CTC (Crushing-Tearing-Curing) 製法があり(図 5.1-2), CTC 製法により作られた紅茶は、オーソドックス製法により作られた紅茶と比べて, linalool, linalool oxide 等の香気量が顕著に少ないことが知られている<sup>24),99)</sup>。さらに、紅茶の製造工程における配糖体の加水分解は、主に揉捻工程にて起こる<sup>23)</sup>ことから、丁寧に揉捻するダージリン紅茶の伝統的な製法が、配糖体由来の香気生成に有利に働いている可能性が推察される。

②に分類した成分は, hotrienol (9), 3-hydroxy-2,3-dihydromaltol (10), 2-acetylpyrrole (16) である。これらは、茶葉の加熱により生成することが報告されている。すなわち, 9 は, 2,6-dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol (3) の加熱反応<sup>106)</sup>, 10, 16 は糖とアミノ酸のメイラード反応により生成する<sup>107),108)</sup>。ダージリン紅茶の原料となる茶葉は、紅茶としては珍しい中国種であり、そのアミノ酸含有量は、一般的な紅茶の原料であるアッサム種よりも多い<sup>109)</sup>。したがって、糖とアミノ酸のメイラード反応により生成することが知られている 10, 16 の含有量には<sup>107),108)</sup>、品種の違いによる原料茶葉のアミノ酸含有量が影響している可能性が推察される。また、ダージリン紅茶は、萎凋時間の長いオーソドックス製法にて作られるため、萎凋によるアミノ酸含有量の増加も予想される。さらに、9, 10, 16 は茶葉の加熱により生成することより、ダージリン紅茶の乾燥工程における加熱条件が他の紅茶と異なり、これら成分の生成に有利に働いている可能性も考えられる。

③に分類した成分は, hexanol (13), (E)-2-hexenoic acid (14), hexanoic acid (17) である。13 は, (E)-2-hexenol や (Z)-3-hexenol と同様に、茶葉が傷害や気候変動などのストレス条件下におかれた際に脂質の構成脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸から生成する「みどりの香り」と呼ばれる C6-化合物群のひとつである<sup>110)</sup>。これらの酸化物である 14, 17 も、脂質から生成すると推測される。茶葉の脂質含有量やその組成は摘採時期によって変化することから<sup>111)</sup>, 13 の生成量には摘採時期が影響する可能性がある。さらに、茶葉における 13 の生成に関与する酵素(脂質加水分解酵素やリポキシゲナーゼ)の活性は季節により変化し、特に気温と昼夜の気温差の大きさが影響する<sup>112),113)</sup>ことや、遮光条件下で生育した茶葉では、脂質由来成分の含有量が増加する<sup>114)</sup>ことから、昼夜の気温差が大きく頻繁に霧

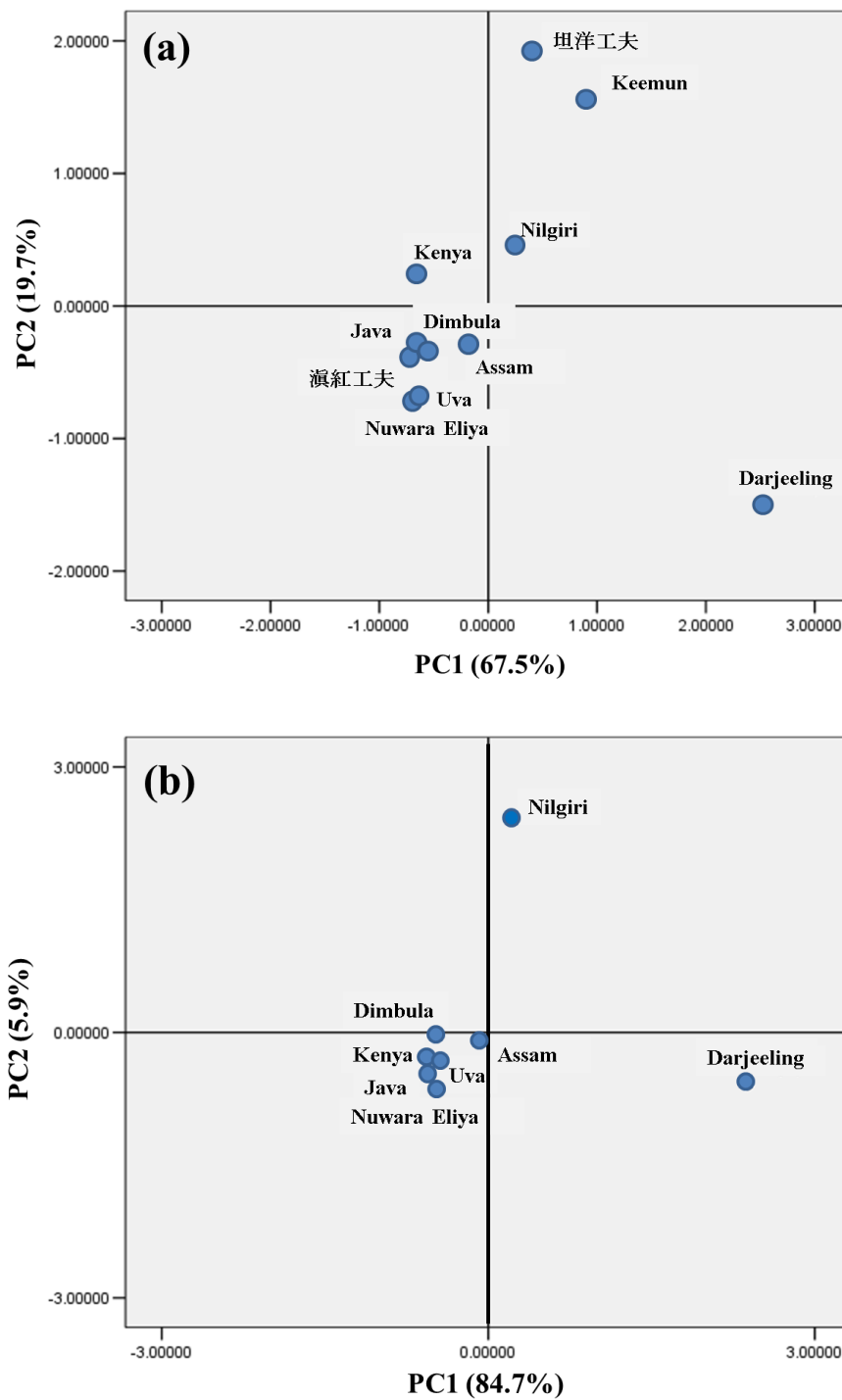


図 5.1-1 銘柄の異なる紅茶の主要香気分析結果の主成分分析による主成分スコアの散布図 (a) 11 種, (b) 8 種 ((a)より中国紅茶を除外)

表 5.1-2 ダージリン紅茶の特異的な香気組成への寄与が推定された成分

No.	PC1 <sup>a</sup>	Compounds	(ppb)							
			Da	As	Ni	Di	Uv	Nu	Ke	Ja
1	0.995	benzyl alcohol	467	79	165	58	40	39	40	39
2	0.990	( <i>E</i> )-nerolidol	24	10	13	9	10	9	10	9
3	0.981	2,6-dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol <sup>b</sup>	150	32	26	12	9	7	19	18
4	0.974	<i>cis</i> -linalool oxide	242	42	26	21	24	26	14	21
5	0.974	<i>cis</i> -linalool oxide pyranoid	121	22	11	9	8	6	7	9
6	0.973	<i>trans</i> -linalool oxide	451	140	80	59	72	85	34	64
7	0.973	<i>trans</i> -linalool oxide pyranoid	200	72	40	29	30	22	24	31
8	0.968	geraniol	167	19	46	14	4	33	22	29
9	0.962	hotrienol	58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	0.962	3-hydroxy-2,3-dihydromaltol	20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
11	0.950	linalool	133	57	58	40	48	67	31	38
12	0.948	benzaldehyde	52	23	16	13	12	8	19	12
13	0.940	hexanol	22	8	8	6	6	6	n.d.	n.d.
14	0.930	( <i>E</i> )-2-hexenoic acid	59	26	12	11	14	15	n.d.	12
15	0.913	amyl alcohol	23	16	15	11	10	10	13	8
16	0.877	2-acetylpyrrole	23	11	n.d.	n.d.	2	n.d.	5	n.d.
17	0.875	hexanoic acid	373	192	262	123	158	128	236	118
18	0.867	4-vinylphenol	20	10	6	8	8	7	11	6
19	0.849	2-phenylethyl alcohol	348	193	318	149	120	122	93	118
20	0.848	hexadecanol	20	13	15	15	14	10	10	12

(Da: Darjeeling; As: Assam; Ni: Nilgiri; Di: Dimbula; Uv: Uva; Nu: Nuwara Eliya; Ke: Kenya; Ja: Java, n.d.: not detected)

<sup>a</sup>: 第一主成分の因子負荷量

<sup>b</sup>: 文献<sup>106)</sup>データより推定

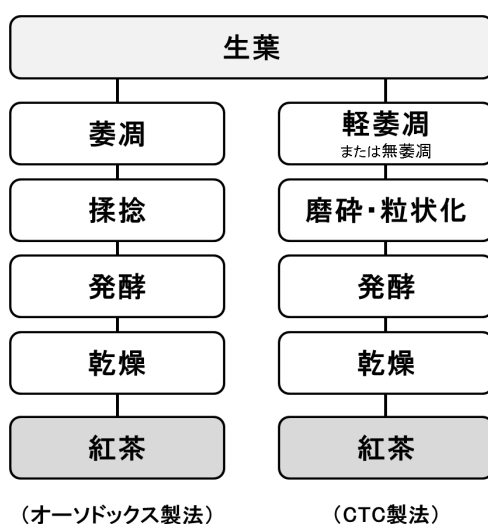


図 5.1-2 紅茶の製法

が発生する、標高 2000 m の山岳地帯というダージリン紅茶の生育環境が、茶葉における 13 の生成量に影響している可能性がある。また、13 および(Z)-3-hexenol, (E)-2-hexenal は紅茶製造中の萎凋工程にて生成することが確認されており、茶葉中に(Z)-3-hexenol 配糖体も見つかっている<sup>27)</sup>。したがって、小林らが推察しているように、茶葉で生成した C6-アルコール類が、いったん配糖体のような形で茶葉に蓄積し、萎凋工程中の酵素反応により香気成分が遊離する可能性もある<sup>115)</sup>。

一方、14, 17 は、発酵工程中に増加することが報告されており<sup>116)</sup>、萎凋工程にて生成した C6-アルコール ((E)-2-hexenol, hexanol) の酸化により生成する可能性が考えられる。以上のことより、①の成分群と同様に、萎凋時間が長く、丁寧に揉捻するダージリン紅茶の伝統的な製法が、これら成分の生成に有利に働いている可能性が推察される。

以上の結果より、ダージリン紅茶の特異的な香気成分組成は、茶葉の品種や特有の生育環境による香気前駆体量の多さや、特有の製法による香気成分の生成効率のよさの影響を受けて形成される可能性が示唆された。

## (2) ダージリン紅茶の特徴香に関与する成分の探索

続いて、8 種の紅茶の香気寄与成分を探索するため、各紅茶の浸出液 (2 L) から樹脂吸着法と SAFE を組み合わせた方法にて香気濃縮物を調製した。過度な加熱の無い本法にて得られた香気濃縮物は、それぞれの紅茶の特徴的な香気をよく再現しており、GC-O による香気寄与成分の探索にとって好ましい分析サンプルであった。得られた 8 種の紅茶の香気濃縮物を GC-MS 分析および AEDA に供し、香気寄与成分を探索した結果、4<sup>1</sup> から 4<sup>7</sup> の FD ファクターを有する約 70 成分が検出された。そして、これらの成分の多くがすべての銘柄に検出されたことから、産地 (銘柄) ごとに異なる香調は、香気寄与成分の含有量の違いにより形成されることを推察した (表 5.1-3)。

続いて、ダージリン紅茶の特徴香に関与する成分を明らかにするため、8 種の紅茶から検出されたすべての香気寄与成分の FD ファクターを、銘柄ごとに比較した。しかし、検体数および成分数の多さゆえに、該当成分を絞り込むことは極めて困難であった。そこで、8 種の紅茶に観測された各成分の FD ファクターの指数を説明変数として、主成分分析を試みた。FD ファ

クターの指数を用いた理由は、人間の嗅覚における感覚強度が、ウェーバー・フェヒナーの法則に従い物質量の対数に比例することより、指数がより人間の感度に合致する値と考えたためである。主成分スコアの散布図(図5.1-3(a))より、ダーズリン紅茶は、他の7銘柄とは離れた位置にプロットされ、特異的な香気組成を有していることが示唆された。さらに、因子負荷量の散布図(図5.1-3(b))より、その特異性に強く影響する因子を探索した結果、3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol) (28, FD factor: 4<sup>3</sup>, floral, fruity, RI= 1608), 2,3-diethyl-5-methylpyrazine (20, FD factor: 4<sup>5</sup>, roasty, nutty, RI= 1499) および未知成分 (10, FD factor: 4<sup>6</sup>, green, meaty, RI= 1383) が見出された。これらのうち、hotrienolは、ダーズリン紅茶の特徴成分であることが既に報告されている<sup>91)</sup>。一方、最も高いFDファクター(4<sup>6</sup>)を有していた成分10は、極めて微量のため同定できなかったものの、ダーズリン紅茶の特徴香に強く影響していることが予想された。さらに、グリーンかつミーティーという極めて特徴的な香調を有する微量成分であることから、含硫化合物を想定し、同定を試みた。

ダーズリン紅茶の特徴香への関与が予想される微量の成分10を同定するため、高度に濃縮、精製した分析試料を調製した。すなわち、550 gの茶葉に含まれる香気成分をSDE法によりジクロロメタンに抽出し、得られた濃厚な香気濃縮物に含まれる目的成分を、GC-Oによる特徴的な香調を指標として、シリカゲルカラムにて分画、精製した。続いて、目的成分が濃縮された画分(Fr.6)から、微量の含硫化合物と予想された目的成分を効率的に同定するため、新しく構築したGC-MS/NPD/SCDシステムを適用した。本システムにて、Fr.6を測定したところ、GC-Oにおける目的成分のRI付近に、小さいながらもピークが検出されたことより、本成分が予想通り含硫化合物であることが確認された。しかしながら、本成分は、微量であることに加え、複数の成分と混在していたため、同定には至らなかった。

そこで、目的成分をさらに高度に濃縮、精製するとともに、ピークの分離を向上させるため、オフラインでの二次元GC-MS<sup>88),94)</sup>を適用した。すなわち、DB-1カラムによるGC-Oを用いて、Fr.6から目的成分をピンポイントで分取、濃縮したのち、加熱脱着装置を搭載したGC-MSを用い、DB-WAXカラムにて分析した。その結果、目的成分のマスペクトルが得られ、マスペクトルと2種類のカラム(DB-WAX, DB-1)におけるRIおよび香調が合成標品と一致したこ

とから、本成分を 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP) と同定した(図 5.1-4)。

MMP は、ダーズリン紅茶において高い FD ファクター (4<sup>6</sup>) を有するだけでなく、ブドウ果実であるマスカット・オブ・アレキサンドリアの特徴的な香りに寄与する成分として報告されている<sup>117)</sup>。このことは、MMP が、ダーズリン紅茶のマスカットフレーバーにも寄与している可能性を強く示唆するものと考えられた。しかしながら、MMP のグリーンかつミーティーな独特の香調から、マスカットの香りを想像することは難しく、マスカットフレーバーの形成には、ダーズリン紅茶に含まれる他の香気成分との組み合わせが重要であることが推測された。

そこで、ダーズリン紅茶と、マスカット果実にて高い寄与度を有する香気寄与成分<sup>117)</sup>を比較した結果、MMP に加え、フローラルな香調の linalool, geraniol, スイートな香調の  $\beta$ -damascenone が、両者に共通することが明らかとなった(図 5.1-5)。これらの 3 成分は、銘柄によらずすべての紅茶に共通する香気寄与成分である。したがってこの結果は、紅茶のマスカットフレーバーが、上述の 3 成分と MMP より形成される可能性を示しており、MMP の含有量が、紅茶におけるマスカットフレーバーの発現を左右する重要なファクターになり得ることを強く示唆している。

そこで、紅茶における MMP の添加効果を確認するため官能評価を実施した。官能評価の結果、MMP はダーズリン紅茶におけるマスカットフレーバーの発現に重要な役割を果たすことが明らかとなった(図 5.1-6)。

表5.1-3 産地の異なる紅茶の香気寄与成分 (FD factor >4<sup>1</sup>)

No.	RI <sup>a</sup>	Compound <sup>b</sup>	Odor quality	FD factor(4 <sup>b</sup> ) <sup>c</sup>		
				DA	Ave. <sup>e</sup>	RSD(%)
1	<1000	3-methylbutanal	stimulus	3	3.3	14.2
2	1000	unknown	fruity, green	3	3.5	15.3
3	1090	hexanal	green	4	4.0	13.4
4	1127	(Z)-3-hexenal	green	4	4.5	11.9
5	1212	(E)-2-hexenal	green	2	2.8	16.8
6	1237	(Z)-4-heptenal	green, metallic	4	4.3	16.6
7	1301	1-octen-3-one	mushroom-like	4	3.8	12.3
8	1338	2-acetyl-1-pyrroline	roasty	3	2.4	21.8
9	1375	(Z)-1,5-octadien-3-one <sup>d</sup>	green, metallic	4	4.3	10.9
10	1383	4-mercapto-4-methyl-2-pentanone	green, meaty	6	3.9	25.6
11	1387	(Z)-3-hexenol	green	4	3.5	15.3
12	1395	nonanal	fruity	3	3.3	21.8
13	1428	unknown	fatty, sweet	3	2.9	12.3
14	1436	unknown	roasty	3	3.0	30.9
15	1449	2,4-heptadienal	nutty	2	2.5	30.2
16	1453	methional	potato-like	4	3.5	26.5
17	1461	unknown	grapefruit-like	5	4.1	15.5
18	1470	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	nutty	4	1.9	52.9
19	1495	(E,E)-2,4-heptadienal	fatty, sweet	3	3.4	15.3
20	1499	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	nutty	5	1.8	79.4
21	1507	decanal	fatty, green	4	3.8	12.3
22	1529	2-isobutyl-3-methoxypyrazine <sup>d</sup>	earthy	4	3.0	50.4
23	1537	(E)-2-nonenal	sweet	5	4.8	9.7
24	1550	linalool	floral	7	6.4	8.1
25	1554	3-mercaptohexanal <sup>d</sup>	grapefruit-like	5	4.3	16.6
26	1563	tetrahydrothiophen-3-one	roasty	3	1.9	44.5
27	1593	(E,Z)-2,6-nonadienal	green	5	5.0	0.0
28	1615	3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol	floral, green	3	1.3	56.6
29	1632	2-acetylpyrazine, butyric acid <sup>d</sup>	roasty, sweaty	3	2.4	21.8
30	1646	phenylacetaldehyde	honey-like	5	4.9	13.1
31	1672	3-methylbutanoic acid	sweaty	5	4.3	10.9
32	1703	(E,E)-2,4-nonadienal	fatty, sweet	5	4.8	14.9
33	1722	3-methyl-2,4-nonanedione	green	5	5.0	10.7
34	1736	pentanoic acid	sweaty	3	2.8	16.8
35	1768	(E,Z)-2,4-decadienal	green, fatty, sweet	4	3.5	15.3
36	1782	methyl salicylate	green, minty	5	4.1	20.2
37	1815	(E,E)-2,4-decadienal	fatty, sweet	5	4.9	17.1
38	1825	$\beta$ -damascenone	honey-like	6	5.4	17.0
39	1844	3-mercapto-1-hexanol	grapefruit-like, burnt	5	4.4	17.0
40	1849	hexanoic acid	sweaty, green	6	4.6	16.1
41	1852	geraniol	floral	6	4.8	14.9
42	1854	geranylacetone	floral, sweet	3	3.6	14.3
43	1864	2-methoxyphenol	burnt	5	5.1	6.9
44	1878	unknown	sweet	5	4.0	13.4
45	1923	4-octanolide	sweet, burnt	4	3.5	15.3

(表5.1-3 つづき)

46	1943	unknown	green, sweaty	4	3.9	16.5
47	1953	(Z)-jasmone, (Z)-3-hexenoic acid	green, sweaty	3	3.1	11.3
48	1968	unknown	sweet	4	4.0	0.0
49	1989	cis -4,5-epoxy-(E)-2-decenal	sweet, juicy	4	4.9	17.1
50	2004	trans -4,5-epoxy-(E)-2-decenal	sweet, juicy	6	5.6	13.2
51	2031	4-nonanolide	sweet	5	4.8	9.7
52	2036	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	caramel-like	5	4.4	20.9
53	2041	unknown	sweaty	2	1.8	40.4
54	2057	unknown	juicy	3	3.1	20.5
55	2078	unknown	sweet	4	3.5	15.3
56	2083	p-cresol	phenolic	4	3.5	21.6
57	2154	unknown	sweet, green	5	4.0	13.4
58	2171	eugenol	spicy	6	5.5	9.7
59	2187	unknown	spicy	4	3.3	27.3
60	2198	2-methoxy-4-vinylphenol	spicy	6	5.0	18.5
61	2227	2-aminoacetophenone	grape-like	5	3.9	16.5
62	2238	methyl anthranilate	grape-like	4	2.6	34.9
63	2256	unknown	phenolic	2	3.0	17.8
64	2267	jasmine lactone	sweet, fatty	4	4.1	20.2
65	2273	unknown	spicy	1	0.1	282.8
66	2399	(Z)-methyl jasmonate	floral	6	5.0	18.5
67	2448	indole	animal-like	4	4.0	13.4
68	2458	coumarin	sweet	5	4.5	20.6
69	2491	skatole	animal-like	3	2.9	22.3
70	2578	vanillin	vanilla-like	6	5.8	8.1
71	2600<	unknown	spicy	3	3.4	15.3

DA: Darjeeling

*a* : Retention Index (RI) on DB-WAX column.*b* : The compound was identified by comparison with the authentic compound on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phases given in DB-WAX, mass spectra, and odorquality.*c* : The exponent of flavor dilution (FD) factor.*d* : The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparison with the authentic compound on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phases given in DB-WAX and odor quality.*e* : Mean value of the FD factors in the eight samples.

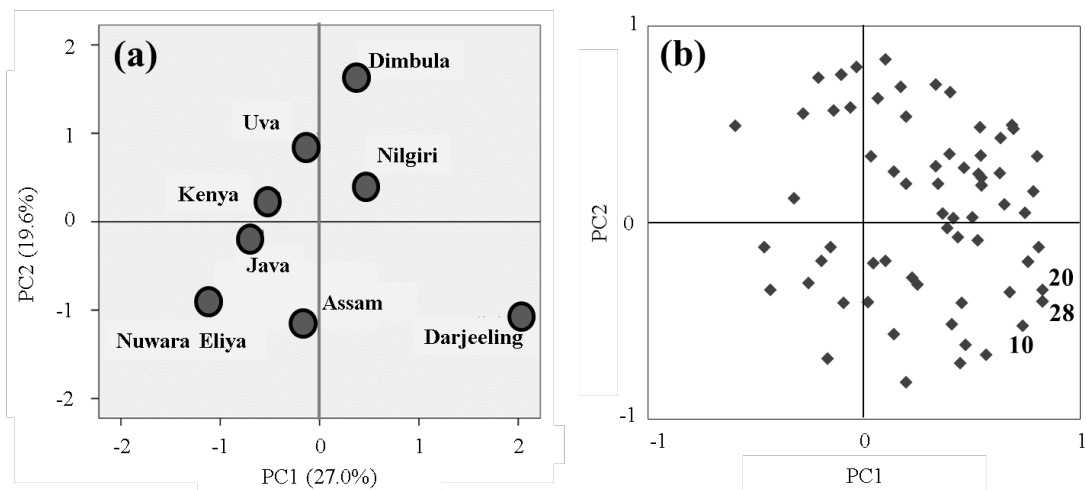


図5.1-3 8種の紅茶浸出液のAEDAにて検出された成分のFDファクターの主成分分析による主成分スコアの散布図(a)および因子負荷量のプロット図(b)

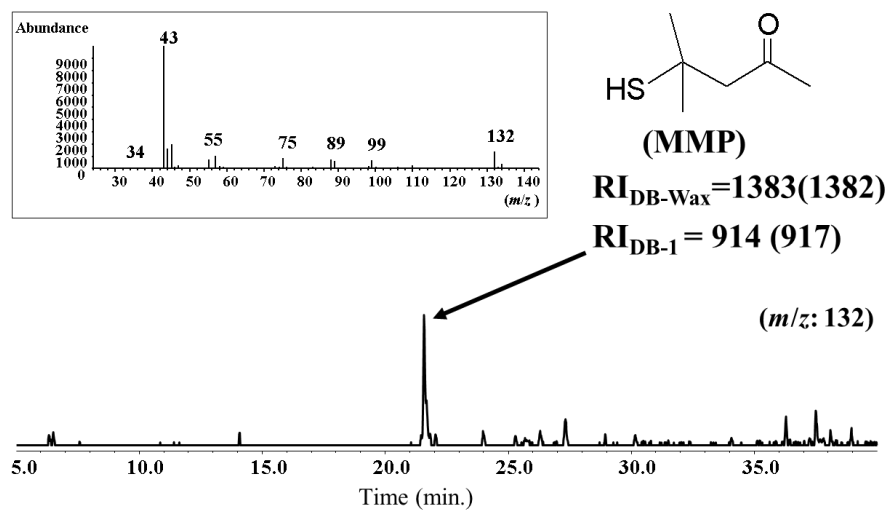


図5.1-4 ダージリン紅茶のマスキロマトグラム(m/z: 132)および  
4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP) のマススペクトル

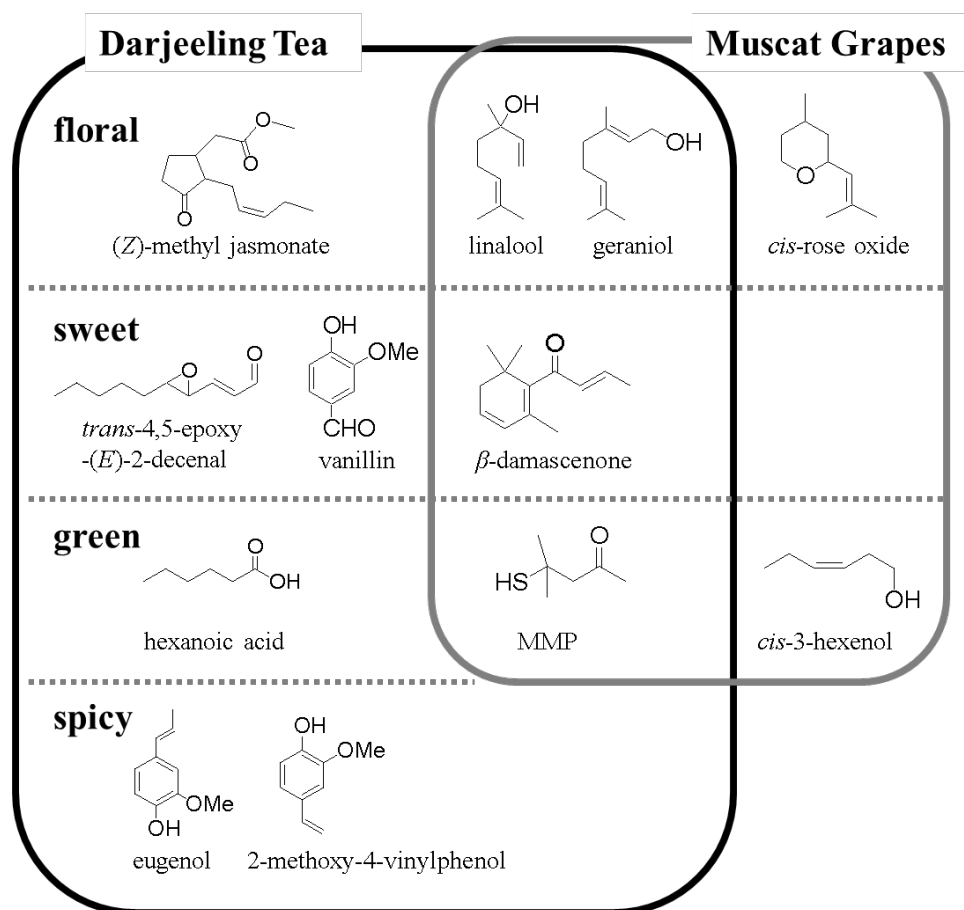


図5.1-5 ダージリン紅茶とマスカット果実<sup>17)</sup>の重要香気寄与成分

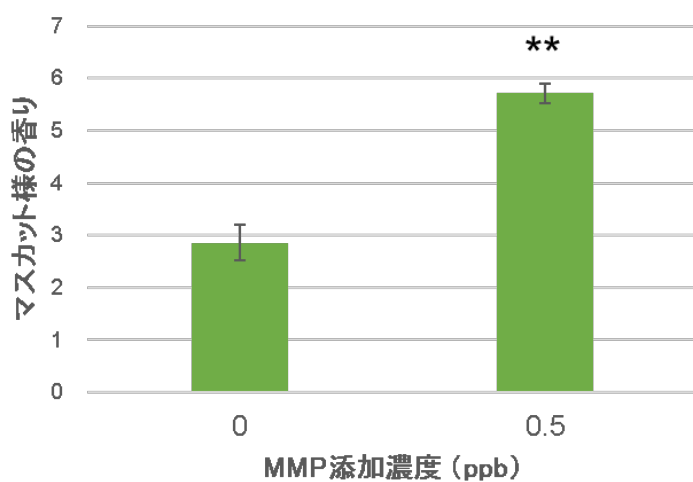


図5.1-6 紅茶飲料における4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP) の添加効果

(\*\*: 無添加品に対して危険率1%で有意差あり)

### (3) ダージリン紅茶の特徴成分の生成に関わる要因

主成分分析によりダージリン紅茶の特徴成分として見出した 3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol), 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, MMP の 3 成分は, 茶葉の加熱により生成するという共通点を有する. すなわち, hotrienol は, 前述したように, 3,7-dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol の加熱による脱水反応<sup>106)</sup>, pyrazine は, アミノ酸と糖のメイラード反応<sup>118)</sup>, MMP は, 前駆物質は明らかになっていないものの, 緑茶の火入れ工程により生じることが報告されている<sup>16)</sup>. したがって, これらの成分が, 他の紅茶に比べてダージリン紅茶に多く含まれることは, 主要香気成分分析結果と矛盾せず, その含有量には, 品種や, ヨコバイによる食害などの環境要因, オーソドックス製法による萎凋や乾燥工程の加熱条件が影響している可能性が推察される.

2.2 にて述べたとおり, MMP は, 煎茶においては, 4-methyl-3-penten-2-one (MP) に硫化水素が付加することにより生成し, その生成量に, アミノ酸の加熱により生成する硫化水素量が影響する可能性が示唆されている<sup>55)</sup>. ダージリン紅茶は, アッサム種に比べるとアミノ酸含有量の多い中国種を原料とし, 長時間の萎凋によるアミノ酸の増加も予想されることより, 加熱による硫化水素生成量の多さが MMP 生成量に影響している可能性がある. 一方, ブドウの果実や葉における MMP 前駆体は, ストレス応答に関与する因子であるグルタチオンの抱合体であることが知られており, 類縁体である 3-mercaptohexanol のグルタチオン抱合体は, 環境ストレス(紫外線, 低温, 高温, 渇水, 微生物の感染等)を受けることで増加することが報告されている<sup>119)</sup>. 2.2 にて述べたとおり, 煎茶においては, このような抱合体の存在が確認されなかったが, ダージリンにおいては, 最もマスカットフレーバーが強いとされるセカンドフラッシュの収穫時期にこの種の虫が多く発生すると言われていることや<sup>14)</sup>, 長時間の萎凋工程があることより<sup>120)</sup>, 食害や渇水によるストレス応答で, グルタチオン抱合体が生成している可能性がある.

以上の結果より, MMP を主体とするマスカットフレーバーを含む, ダージリン紅茶の特徴的な香気の形成には, 品種(紅茶には珍しい小葉系茶葉を原料としている)や, 生育環境(標高 2000 メートルの山岳地帯という厳しい生育環境, ヨコバイによる食害), 伝統的な製法

(長時間の萎凋, 丁寧な揉捻など)が密接に関与している可能性が推察された.

## 5.2 要約

本章では、ダーズリン紅茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにするため、産地(銘柄)の異なる8種の紅茶浸出液の香気寄与成分を比較検討した。

はじめに、ダーズリン紅茶の香気成分組成の特徴を明らかにするため、8種の紅茶浸出液の主要香気成分含有量を比較した結果、ダーズリン紅茶の香気組成は、他の紅茶と大きく異なり、配糖体より生成する成分、糖やアミノ酸の加熱により生成する成分、脂質より生成する成分が他の銘柄に比べて顕著に多いことが明らかとなった。このことより、ダーズリン紅茶の特異的な香気組成の形成には、茶葉の品種や生育環境に起因する前駆体量の違いや伝統的な製法が関与する可能性を推察した。

次に、AEDA 法により、8種の紅茶浸出液の香気寄与成分を比較した結果、ダーズリン紅茶に特徴的な成分として、3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol) (floral, fruity), 2,3-diethyl-5-methylpyrazine (roasty, nutty) および未知成分 (green, meaty) を見出した。未知成分は、ダーズリン茶葉の SDE 抽出物より、シリカゲルカラム、次いで、オフライン 2 次元 GC にて高度に精製し、最終的に、マスカット果実の重要香気寄与成分である 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP) と同定した。さらに、ダーズリン紅茶とマスカット果実にて高い寄与度を有する香気成分を比較した結果、MMP に加え、linalool, geraniol,  $\beta$ -damascenone の 3 成分が両者に共通することが明らかとなり、紅茶のマスカットフレーバーが、紅茶全般に共通するこれらの 3 成分と MMP より形成されることが推察され、その発現には MMP が深く関与していることを確認した。さらに、ダーズリン紅茶の特徴成分として見出された 3 成分の生成に関わる要因を検討し、特異的な主要香気成分組成への影響が推察された要因(品種, 生育環境, 製法)が、特徴的な香気の形成にも関与していることを推察した。

以上の結果より、ダーズリン紅茶に特徴的なマスカットフレーバーを含む香気は、グリーン、ミーティーな香調を有する MMP と、紅茶全般に共通するフローラル、スイートな香調の成分、ロースト香を有する成分を主体として形成され、その形成には、茶葉の品種や生育環境に起因する前駆体量の違いや伝統的な製法が関与する可能性が明らかとなった。

## 第 6 章 総括

本論文は、飲料をはじめとする茶加工食品において、嗜好性の高い良質な茶の香りを再現するための食品香料開発の基となる知見を得ることを目的に、小葉系茶葉から作られる 4 種の茶(煎茶, 抹茶, 中国緑茶, 紅茶)の特徴的な香りに寄与する成分および特徴的な香りの形成に関与する要因を検討した結果をまとめたものである。本論文の特徴は、各種茶の特徴的な香りに寄与する成分を解明するために、嗅覚を利用して香気への寄与度を評価する手法である GC-O (AEDA) を用いたこと、さらに、見出された香気寄与成分と GC-MS 分析より明らかにした主要香気成分の生成機構を併せて検討し、各種茶の特徴的な香気形成に関与する要因を考察し、特徴的な香気と茶葉のポテンシャル(品種, 栽培条件, 摘採時期)および製造方法とを関連づけたことにある。

世界中で最も多く飲用されている嗜好飲料である茶は、近年の生活様式の変化を受け、飲料製品をはじめとする加工食品としての利用が増大している。そのような茶加工食品にとって、香りはおいしさを決定づける重要な要素であり、嗜好性の高い茶加工食品の製造においては、良質な茶の香りの再現が求められるが、原料の制約や、殺菌処理による香味変化は不可避であり、それは容易なことではない。食品香料は、そのような茶加工食品に、嗜好性の高い良質な茶の香りを賦与するための、現在考え得る最上の手段であり、高品質な食品香料の開発が求められている。

そのような食品香料を開発するためには、良質な茶の特徴的な香りに寄与する成分を明らかにし、さらに、茶葉におけるそれらの成分の特性を明らかにする必要がある。茶は、基本的にすべて同じ原料(*Camellia sinensis*)から作られるが、産地や製法の違いによりさまざまな種類があり、香りも多彩である。そこで、本研究では、食品香料の需要の大きさを考慮して対象とする茶を選出した。すなわち、加工食品としての利用が多い、小葉系茶葉から作られる 4 種の茶(煎茶, 抹茶, 中国緑茶, 紅茶)を対象とし、各々について、伝統的な製法に則して製造され、良質な香りを強く有する高品質なサンプルの香気寄与成分を探索した。さらに、見出された成分のうち、特に特徴的な香気に重要と考えられた成分の生成機構を検討し、主要香

気成分の生成機構と併せて、原料茶葉のポテンシャル(品種, 栽培条件, 摘採時期)および製法との関係を考察した。以下にその結果を総括する。

第 2 章では、良質な煎茶特有のグリーンな香りへの寄与が示唆されている 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP) の、煎茶における特性と生成機構に着目し、煎茶の MMP 含有量と、煎茶浸出液の香りおよび煎茶の香りとの関連性が指摘されている蒸熱条件との関係を検討した。その結果、MMP は良質な煎茶特有のグリーンな香りおよび煎茶の香りの強さと密接に関わっており、その含有量は、蒸熱時間の長い深蒸し煎茶では、顕著に少ない傾向のあることが明らかとなった。さらに、煎茶における MMP の生成に、システインあるいはグルタチオン結合体が関与している可能性を酵素反応により検討した結果、その可能性は低いことが示唆された。この結果より、煎茶における MMP は、すでに検証されている生成経路、すなわち、MP (4-methyl-3-penten-2-one) への硫化水素の付加により生成する可能性が高いこと、また、蒸熱条件の違いによる硫化水素含量の変動が、MMP 生成量に影響する可能性を推察した。以上の結果より、MMP は、良質な煎茶特有の香りに寄与する重要な香気成分であり、その含有量には、茶期や火入れ条件に加え、蒸熱条件が密接に関与することが示唆された。すなわち、良質で嗜好性の高い煎茶の香気は、一番茶を伝統的な浅蒸し製法にて殺青し、最適な火入れ条件にて仕上げることで形成されることが明らかとなった。

第 3 章では、抹茶の特徴的な香り、特に嗜好性の高い、高級抹茶の甘く香ばしい香りに寄与する成分を明らかにするため、品質の異なる 3 種(高級, 並, 低級)の香気寄与成分を比較した。その結果、抹茶の香気は、いずれの品質でも高い FD ファクターを示した、スイート, グリーン, メタリック, フローラルな香調を有する 8 成分 (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, coumarin, 3-methyl-2,4-nonanedione, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, (*Z*)-1,5-octadien-3-one,  $\alpha$ -ionone, (*E*)-isoeugenol) を主体とし、高級抹茶では DMS, ピラジン類, 低級抹茶では、脂質由来のアルデヒド類が加わり構成されていることが明らかとなり、この結果は、主要香気成分組成とも矛盾しなかった。さらに、高級抹茶の香気寄与成分と、煎茶で報告されている香気寄与成分と比較した結果、高級抹茶に特徴的な成分は、スイート, フローラルな香調の成分 (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, *trans*-4,5-epoxy-

(*E*)-2-decenal, coumarin,  $\alpha$ -ionone, (*E*)-isoeugenol)とロースト香を有するピラジン類であること、良質な煎茶の重要香気寄与成分である MMP は、抹茶では検出されていないことが明らかとなった。さらに、スイート、メタリックな特有の香調を有し、煎茶にほとんど含まれない一方で、紅茶の重要香気寄与成分として知られている *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal について、抹茶入り煎茶飲料における添加効果および抹茶における生成機構を検討した。その結果、本成分は、紅茶とは異なる非酵素的な反応にて生成し、良質な抹茶特有の甘い香りに特に重要であることが示された。以上の結果は、高級抹茶の特徴的な香気の形成に、被覆栽培による前駆物質(カロテノイドやアミノ酸)の増加や、抹茶特有の製法(揉捻せず、碾茶炉にて高温、長時間加熱、石臼挽き)が関与する可能性を示すものであり、嗜好性の高い良質な抹茶の香気は、適切な被覆栽培を施した一番茶を、伝統的な製法にて抹茶に加工することで形成される可能性が明らかとなった。

第4章では、中国緑茶特有のフローラルな香りに寄与する成分を明らかにするため、中国緑茶の中でも代表的な3銘柄(西湖龍井, 黄山毛峰, 碧螺春, すべて特級品)の春および秋収穫品の香気寄与成分を比較した。その結果、スイートな香調の 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone, coumarin, vanillin, フローラルな香調の geraniol, (*E*)-isoeugenol, 焼けたような香調の 2-methoxyphenol の7成分が、中国緑茶全般に共通する香気寄与成分として見出され、主要成分分析結果と合わせて考察した結果、中国緑茶特有の製造工程(萎凋や釜炒り殺青)がその含有量に影響することが推察された。これらの中でも、中国緑茶より初めて見出した(*E*)-isoeugenol は、フローラルな中に若干のスパイシーな香りを併せ持ち、“中国茶らしい香り”に寄与することが明らかとなった。さらに、この成分の生成に茶葉の内生酵素が関与することが示唆されたことより、良質な中国緑茶特有の香気は、茶葉の内生酵素の働きを利用した、伝統的な釜炒り製法にて形成されることを推察した。さらに、(*E*)-isoeugenol は、烏龍茶に多く含まれ、蒸製緑茶である抹茶においても高い寄与度を示したことより、烏龍茶に特有の揉青工程や、抹茶に特有の被覆栽培による前駆物質(アミノ酸)の増加が関与している可能性も推察された。

第5章では、ダーズリン紅茶特有のマスカットフレーバーに寄与する成分を明らかにするた

め、ダーズリン紅茶と、産地(銘柄)の異なる 7 種の紅茶の主要香気成分および香気寄与成分を比較した。主要香気成分を比較した結果、ダーズリン紅茶の主要香気成分組成は、他の 7 銘柄とは大きく異なり、配糖体より生成する成分、糖とアミノ酸の加熱により生成する成分、脂質より生成する成分が顕著に多いことが明らかとなった。一方、香気寄与成分を比較した結果、ダーズリンの特徴的な香りに、フローラルな香調の 3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol, ロースト香を有する 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, グリーン, ミーティーな香調を有する MMP が関与していることが示唆された。その中でも最も高い FD ファクターを示した MMP は、ブドウ果実であるマスカット・オブ・アレキサンドリアの主要香気成分として報告されており、紅茶におけるマスカットフレーバーの発現にも、深く関与していることが明らかとなった。さらに、特徴的な香りへの関与が示唆された前述の 3 成分の生成機構と、ダーズリン紅茶の特異的な香気組成を併せて考察し、ダーズリン紅茶のマスカットフレーバーが、ダーズリンにて栽培され、ヨコバイの食害を受けた二番茶期の小葉系茶葉を、伝統的なオーソドックス製法にて丁寧に加工することで形成されることを推察した。

本研究にて得られた、各種茶の良質な香りへの高い寄与が見出された成分を比較すると、これらの香気寄与成分の多くが、主要香気成分と同様に、すべての茶に共通していることがわかる(表 6.1-1)。このことは、同じ原料から作られる茶の香りの多様性が、茶葉のポテンシャル(品種, 栽培条件, 摘採時期)および製造工程の違いにより生じる、香気成分バランスの違いに由来することを示している。さらに、煎茶においては余韻の残る特有のグリーンな香りに寄与する MMP が、ダーズリン紅茶のマスカットフレーバーを形成するキー成分であることをはじめ、中国茶特有のフローラルな香りに寄与する(*E*)-isoeugenol が、抹茶においても高い寄与度を示すこと、紅茶のキー成分である *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal が、抹茶特有の甘い香りにも寄与することは、各種茶の特徴的な香りが、寄与度の高いキー成分のみから成り立つものではなく、キー成分と、それを取り囲む他の香気成分との組み合わせやバランスが整ってはじめて発現することを意味するものである。

香料についても同様のことが言える。すなわち、良質な香料を開発するためには、目標とする香りのキー成分やその特性を解明したうえで、これまでに蓄積されてきた膨大な知見を

駆使し、その成分を最も効果的に活用できる環境(香気バランス)を整える必要がある。弊社では、本論文にて得られた知見を活用した種々の茶香料を開発しており、それらは、飲料製品をはじめ、菓子(チョコレート、キャンディ、クッキーなど)、冷菓(プリン、アイスなど)に幅広く利用されている。

以上、本論文では、小葉系茶葉を用いて異なる製法にて作られる4種の茶(煎茶、抹茶、中国緑茶、紅茶)について、良質な茶の有する特徴的な香りに寄与する成分を明らかにし、茶加工食品に嗜好性の高い良質な香気を賦与するための食品香料開発に役立つ知見を得た。さらに、各種茶の特徴的な香りの形成と、原料茶葉のポテンシャル(品種、栽培条件、摘採時期)および製造工程の間に、密接かつ複雑な関係があり、良質な茶の特徴的な香りの形成には、伝統に則した方法にて栽培し、最適な時期に摘採した茶葉を、伝統的な製法にて加工することが必要であることを推察した。このことは、良質な香りを有する茶の生産の難しさを示すと同時に、ポテンシャルの低い茶葉も、適切な加工を施すことで、ある程度の良質な香りを引き出すことができる可能性を示唆している。本研究にて得られた知見は、良質な食品香料の開発のみならず、近年盛んに行われている、香りの優れた新しい茶を作り出す試みや、輸出拡大を見据えた、香りの強い茶を製造する取り組みにも、役立つものと考ええる。

表 6.1-1 各種茶において良質な香りへの寄与が見出された成分

compound	odor quality	煎茶*	高級抹茶	中国緑茶	ダージリン
linalool	floral	△	△	△	○
geraniol	floral	△		○	○
(Z)-methyl jasmonate	floral	○		△	○
indole	floral	○	△	△	△
α-ionone	floral		○		
(E)-isoeugenol	floral,spicy		○	●	
hexanoic acid	green				○
(E,Z)-2,6-nonadienal	green	○	○	△	△
3-methyl-2,4-nonanedione	green	○	○	△	△
4-mercapto-4-methyl-2-pentanone	green, meaty	●		△	●
β-damascenone	sweet	△	△	△	○
trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	sweet		●	△	○
vanillin	sweet	△	○	○	○
4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone	sweet	△	○	○	
3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone	sweet		△	○	
coumarin	sweet	△	○	○	△
(Z)-1,5-octadien-3-one	metallic	○	○	△	△
methional	potato-like	○		△	△
2-methoxy-4-vinylphenol	spicy	△	△	△	○
eugenol	spicy	△	△	△	○
2-methoxyphenol	burnt	△	△	○	△

○: 高い寄与度(煎茶, 抹茶, 中国緑茶:FD 4<sup>4</sup>以上, ダージリン:FD 4<sup>6</sup>以上)

●: 高い寄与度(煎茶, 抹茶, 中国緑茶:FD 4<sup>4</sup>以上, ダージリン:FD 4<sup>7</sup>以上)かつ特徴香における重要性を確認

△: 低い寄与度だが検出あり

\*: 文献<sup>18)</sup>を参照した

## Summary

**Characterization and application to the flavor development of the potent odorants contributing to the characteristic aroma of traditional teas made from *Camellia sinensis* var. *sinensis*.**

**Ryoko (Homma) Baba**

Tea, the most popular beverage in the world, has been increasingly used in a wide variety of bottled drinks. It has also been used in processed foods, such as ice cream, chocolates, and many sweets. This is due to the changing lifestyles of the modern world. The acceptability of teas and their processed products depends on many factors, one of the most important of which is aroma. Therefore, high-quality tea processed products need to have superior aroma. At present, to achieve this objective, addition of high-quality flavorings to the tea processed products is one of the most effective means. To develop high-quality flavorings, knowledge of the potent odorants contributing to the characteristic aromas in these high-quality teas and their properties are required. However, little has been revealed about them and the development of such high-quality flavorings has not been achieved.

Therefore, in this study, the potent odorants contributing to the characteristic aromas and their formation mechanisms in four teas made from *Camellia sinensis* var. *sinensis* (sen-cha, matcha, Chinese green tea, and Darjeeling black tea), flavorings of which are expected to be in great demand, were investigated. For determining the potency of the odorants in the high-quality traditional teas with strong characteristic aromas, the Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) technique based on gas chromatography-olfactometry (GC-O) was applied. In addition, the factors affecting the formation of the aroma of each tea were discussed from the point of view of the formation mechanisms of the potent odorants and the major volatile compounds.

## Chapter 2 Study of the aroma of the high-quality sen-cha

In this chapter, the correlation among the content of 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone (MMP), the aroma of the infusions of sen-cha, and the steaming conditions of fresh leaves was investigated. MMP is expected to be related to the characteristic aroma of high-quality green tea, such as spring green tea (first crop). On the other hand, the steaming conditions are generally considered to be related to the aroma of sen-cha. Quantitative analysis of MMP in various sen-cha (first crop) leaves and sensory evaluation of their infusions revealed that the content of MMP and the aroma of the infusions closely correlate to each other. In addition, the content of MMP showed a tendency to be significantly small in high-steamed teas. Furthermore, model reactions demonstrated that MMP in sen-cha is most likely formed by a previously proposed mechanism; i.e., it is formed from 4-methyl-3-penten-2-one (MP), being added with hydrogen sulfide, and not from the cysteine or glutathione conjugates of MMP, by enzymatic reaction. As the content of hydrogen sulfide decreases in proportion to the length of the steaming time of the fresh leaves, it is considered to affect the content of MMP.

Based on these results, MMP was revealed to be a potent odorant contributing to the aroma of high-quality sen-cha, content of which is closely related to the steaming conditions. Therefore, it is considered that the fine and highly palatable aroma of sen-cha is more efficiently formed in the traditional manufacturing process; i.e., low-steaming process, than in the high-steaming process.

## Chapter 3 Study of the aroma of high-quality matcha

In this chapter, the potent odorants contributing to the characteristic sweet, roasted aroma of high-quality matcha were investigated. AEDA was applied to the headspace samples and the volatile fractions prepared by solvent extraction of three matcha powders of different grades (high, medium, and low). The results showed that eight odorants with sweet, green, metallic, and floral notes (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, coumarin, *trans*-4,5-

epoxy-(*E*)-2-decenal, 3-methyl-2,4-nonanedione, (*E,Z*)-2,6-nonadienal, (*Z*)-1,5-octadien-3-one,  $\alpha$ -ionone, and (*E*)-isoeugenol) are essential for the aroma of matcha, and some odorants contribute to the characteristic aroma of each grade. Namely, dimethyl sulfide (DMS, dried laver like) and pyrazines with a roasted note are predominant in the high grade, and aldehydes with a fatty note derived from lipids are predominant in the low grade. As *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal is reported to be the characteristic odorant of black tea, whereas it is hardly contained in sen-cha, its role in the aroma of matcha was verified by a sensory evaluation. As a result, it was revealed to contribute to the characteristic sweet flavor of matcha. In addition, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal was revealed to be a racemic mixture (2.78 % enantiomeric excess) in matcha, different from black tea, in which it is suggested to be rich in the (*S*)-form. This result suggests that lipoxygenase is not involved in its formation in matcha, and the formation mechanism of epoxydecenals in matcha is different from that in black tea.

Based on these results, the potent odorants contributing to the characteristic aroma of high-grade matcha were identified. In addition, the formation of the characteristic aroma was suggested to be closely related to the traditional manufacturing process of matcha; i.e., using the first crop leaves properly cultivated in the shade, drying at a high temperature for a long time in a tencha-ro (a special furnace for tencha), *etc.*

#### Chapter 4 Study of the characteristic aroma of Chinese green tea

In this chapter, the potent odorants contributing to the characteristic floral aroma of Chinese green tea were investigated. The major volatile compounds and potent odorants in the spring and summer crops of three famous Chinese green tea infusions (Longjing, Maofeng, and Biluochun) were compared. The results revealed that all the samples contained a large amount of the compounds derived from glycosides, the stress-response of leaves, and the heating reactions of sugars and amino acids. In addition, seven odorants with sweet, floral, and burnt notes (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone,

coumarin, vanillin, geraniol, (*E*)-isoeugenol, 2-methoxyphenol) were shown to be essential for the aroma of these Chinese green teas. Among these odorants, (*E*)-isoeugenol, which has a floral and spicy aroma, was revealed to be a key odorant for the characteristic “Chinese tea-like” aroma. In addition, investigation of the formation mechanism of (*E*)-isoeugenol suggested that it is formed from coniferyl alcohol generated from a precursor, such as coniferin, by the endogenous enzymatic reaction during the withering and pan-firing processes, by heating during the pan-firing and drying processes via the quinone methide intermediate.

Based on these results, the potent odorants contributing to the characteristic aroma of Chinese green tea were identified. In addition, it was suggested that the traditional manufacturing process including the endogenous enzymatic reaction, such as withering and pan-firing, is closely related to the formation of the characteristic aroma.

## Chapter 5 Study of the characteristic aroma of Darjeeling black tea

In this chapter, the odorants contributing to the characteristic aroma of Darjeeling black tea with a muscat-like note was investigated. The major volatile compounds and potent odorants in eight black teas containing Darjeeling tea were compared. The results indicated that the flavor composition of the Darjeeling tea is significantly different from that of the others. Namely, Darjeeling tea contains a large amount of the compounds derived from glycosides, lipids, and the heating reactions of sugars and amino acids. In addition, the principal component analysis (PCA) of the flavor dilution (FD) factors of all the detected odorants in AEDA suggested that three odorants (3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol), 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, and MMP) are related to the characteristic aroma of the Darjeeling tea. Among these odorants, MMP, which showed the highest FD factor, is reported to be a key odorant of muscat grapes. Therefore, the result indicated that MMP is closely related to not only the formation of the aroma of muscat grapes, but also that of the muscat-like note of Darjeeling tea. Furthermore, these three odorants are all known to be formed by heating

of the tea leaves. Namely, hotrienol is formed by dehydration caused by heating of 3,7-dimethyl-1,5-octadien-3,7-diol, the pyrazines are formed in Maillard reaction of amino acids and sugars, and MMP is formed during the parching process in the green tea manufacturing.

Based on these results, it was suggested that not only the breed (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) and the growing environment of the leaves (high mountain area, feeding damage from *Jacobiasca*, etc.), but also the traditional, orthodox manufacturing process including the careful and long-time withering and rolling of the tea leaves are closely related to the formation of the characteristic aroma of the Darjeeling black tea.

In this study, the potent odorants contributing to the characteristic aromas of four high-quality teas made from *Camellia sinensis* var. *sinensis* (sen-cha, matcha, Chinese green tea, and Darjeeling black tea) were identified. In addition, the factors closely related to the formation of the aromas were suggested; i.e., the potential of the leaves (properties obtained under the influence of breeds, growing environments, timing of plucking, etc.) and the manufacturing processes. The knowledge obtained in this study would be useful not only in the development of high-quality flavorings, but also in the attempts to produce new types of teas.

## 参考文献

- 1) 熊沢賢二, 増田秀樹: 緑茶飲料の香気に及ぼす加熱条件の影響. *日本食品科学工学会誌*, 52, 34-40 (2005)
- 2) 衣笠仁, 竹尾忠一: 缶煎茶の殺菌中に生成するレトルト臭の生成機構とその防臭対策. *日本農芸化学会誌*, 63, 29-35 (1989)
- 3) 長谷川香料株式会社: 香料の科学, 講談社, pp.53-59 (2013)
- 4) 食品産業統計年報 蔵 26 年度版, 一般財団法人 食品産業センター, pp.32-34 (2014)
- 5) 中林敏郎: I 茶の歴史, 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, 弘学出版, 神奈川. pp. 1-9 (1991)
- 6) 長谷川香料株式会社: 香料の科学, 講談社, pp.77-79 (2013)
- 7) 大石貞男: 1. 茶の科学史, シリーズ<食品の科学> 茶の科学, 村松敬一郎編, 朝倉書店, 東京. pp. 1-10 (1991)
- 8) 小泊重洋: 2. 茶の栽培とバイオテクノロジー, シリーズ<食品の科学> 茶の科学, 村松敬一郎編, 朝倉書店, 東京. pp. 11-12 (1991)
- 9) 川上美智子: 第 I 章 人間と茶樹の関わり, 茶の香り研究ノート-製造にみる多様性の視点から-, 光生館, 東京. pp.1-6 (2000)
- 10) 中林敏郎, 伊那和夫, 坂田完三: 付録, 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, 弘学出版, 神奈川. pp. 156 (1991)
- 11) Takeo, T. and Mahanta, P.: Comparison of Black Tea Aromas of Orthodox and CTC Tea and Black Teas Made from Different Varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 307-310 (1983)
- 12) 川上美智子: 第IV章 被覆茶の香気, 茶の香り研究ノート-製造にみる多様性の視点から-, 光生館, 東京. pp.49-66 (2000)
- 13) 木下朋美, 坂田完三: 東方美人茶の香りの秘密. *香料*, 229, 113-120 (2006)
- 14) 山西貞: ポピュラー・サイエンス お茶の科学, 裳華房, 東京, pp.108-110 (1992)

- 15) Kumazawa, K. and Masuda, H.: Identification of potent odorants in Japanese green tea (Sen-cha). *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5169-5172 (1999)
- 16) Kumazawa, K., Kubota, K., and Masuda, H.: Influence of manufacturing conditions and crop season on the formation of 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone in Japanese green tea (Sen-cha). *J. Agric. Food Chem.*, 53, 5390-5396 (2005)
- 17) 小柳津勤, 下田満哉, 松本清, 後藤正: 茶芽の熟度による緑茶香気成分の変化. *日本食品工学会誌*, 49, 327-334 (2002)
- 18) Kumazawa, K. and Masuda, H.: Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5660-5663 (2002)
- 19) 竹尾忠一: 烏龍茶の香りとその特徴. *茶業技術研究*, 65, 1-12 (1983)
- 20) Wang, D., Kubota, K., Kobayashi, A., and Juan, I. M.: 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 (2001)
- 21) Katsuno, T., Kasuga, H., Kusano, Y., Yaguchi, Y., Tomomura, M. *et al.*: Characterization of odorant compounds and their biochemical formation in green tea with a low temperature storage process. *Food Chem.*, 148, 388-395 (2014)
- 22) Gui, J., Fu, X., Zhou, Y., Katsuno, T., Mei, X. *et al.*: Does enzymatic hydrolysis of glycosidically bound volatile compounds really contribute to the formation of volatile compounds during the oolong tea manufacturing process? *J. Agric. Food Chem.*, 63, 6905-6914 (2015)
- 23) Wang D., Kurasawa E., Yamaguchi Y., Kubota K. *et al.*: Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 1900-1903 (2001)
- 24) 堀田博, フィリップ・オーワ: ケニア産品種紅茶および世界各産地の紅茶の香気成分の比較とその特徴について. *野菜・茶業試験場研究報告*.B(金谷), 1, 55-65 (1987)

- 25) 久保田悦郎, 原利男: 火入れ条件が茶の品質に及ぼす影響. *日本食品工業学会誌*, 17, 69-72 (1970)
- 26) 久保田紀久枝, 糸内智美, 小林彰夫, 大澤芳夫, 中嶋年朗, 岡本義明: 火入れ工程におけるマイクロ波加熱処理の製茶風味成分への関与. *日本食品科学工学会誌*, 43, 1197-1204 (1996)
- 27) 坂田完三: 香気成分[1], 香気成分[2], 新版 緑茶・中国茶・紅茶の化学と機能, 伊那和夫, 坂田完三編, アイ・ケイ・コーポレーション, 神奈川, pp. 107-166 (2007)
- 28) 原利男, 久保田悦郎: 緑茶貯蔵中の香気成分の変化. *日本食品工学会誌*, 56, 625-630 (1982)
- 29) 中林敏郎, 伊那和夫, 坂田完三: 付録, 緑茶・紅茶・烏龍茶の化学と機能, 弘学出版, 神奈川. pp. 156 (1991)
- 30) FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- 31) 桑原秀樹: 第1章 抹茶の基本, お抹茶のすべて, 誠文堂新光社, 東京. pp.8-19 (2015)
- 32) 農林水産省資料: 茶生産における施肥の現状と課題 (2009)
- 33) 清涼飲料の常識, 社団法人 全国清涼飲料工業会, 東京. pp.67-69 (2002)
- 34) Masuda, H. and Kumazawa, K.: ACS Symposium Series 754 "Caffeinated Beverages: Health Benefits, Physiological Effects, and Chemistry", 337-346 (2000)
- 35) 下田満哉, 平野好司, 箴島豊: 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 (1987)
- 36) Engel, W., Bahr, W., and Schieberle, P.: Solvent assisted flavor evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 237–241 (1999)
- 37) Grosch, W.: Detection of Potent Odorants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis, *Trends in Food Science & Technology*, 4, 68–73 (1993)

- 38) 重松洋子, 下田満哉: 紅茶香気成分の比較分析. *日本食品工業学会誌*, 41, 768-777 (1994)
- 39) 小林彰夫, 久保田紀久枝: 2)香りの前駆体としての配糖体. *化学と生物*, 32, 185-189 (1994)
- 40) Tomlins, K.I. and Mashingaidze, A.: Influence of withering, including leaf handling, on the manufacturing and quality of black teas – a review. *Food Chem.*, 60, 573-580 (1997)
- 41) 食品産業統計年報 平成26年度版, 一般財団法人 食品産業センター, pp.35 (2014)
- 42) 2016年 飲料総市場マーケティングデータ, 株式会社 総合企画センター大阪, pp.33 (2016)
- 43) Ohmori, K., Nakamura, S., Watanabe, T., and Katsuki, K.: Effect of steaming conditions on tea quality in the manufacturing of green tea (Sen-cha). *Tea Research J.*, 65, 73-80 (1987)
- 44) Tominaga, T., Murat, M. L., and Dubourdieu, D.: Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1044-1048 (1998)
- 45) Vivaracho, L. M., Ferreira, V., and Cacho, J. F.: Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptopentyl acetate at ng L<sup>-1</sup> level by headspace solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation and gas chromatography -negative chemical ionization mass spectrometric determination. *J. Chromatogr. A*, 1121, 1-9 (2006)
- 46) Vivaracho, L. M., Cacho, J. F., and Ferreira, V.: Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography-negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *J. Chromatogr. A*, 75 1146, 2421-250 (2007)
- 47) Ferreira, V., Ortin, N., and Cacho, J. F.: Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful thiols Development and validation of a quantitative method for their determination in wine. *J. Chromatogr. A*, 1143, 190-198 (2007)

- 48) Guth, H.: Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3022-3026 (1997)
- 49) Grimm, C. C., Bergman, C., Delgado, J. T., and Bryant, R.: Screening for 2-acetyl-1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 245-249 (2001)
- 50) Ghiasvand, A. R., Setkova, L., and Pawliszyn, J.: Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME-GC-TOF-MS. *Flavour and Fragrance J.*, 22, 377-391 (2007)
- 51) Farmer, L. J., Mottram, D.S., and Whitfield, F. B.: Volatile compounds produced in maillard reactions involving cysteine, ribose and phospholipid. *J. Sci. Food Agric.*, 49, 347-368 (1989)
- 52) Tominaga, T., Gachons, C. P., and Dubourdieu, D.: A new type of flavor precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc: S-cysteine conjugates. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5215-5219 (1998)
- 53) Fedrizzi, B., Pardon, K. H., Sefton, M. A., Elsey, G. M., and Jeffery, D. W.: First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon Blanc juice. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 991-995 (2009)
- 54) Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., Guerneve, C., and Cavelier, F.: Straightforward synthesis of deuterated precursors to demonstrate the biogenesis of aromatic thiols in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 10684-10689 (2010)
- 55) 熊沢賢二: 嗜好飲料の香気成分に関する化学的研究. 博士学位論文, お茶の水女子大学 (2005)
- 56) Howell, K. S., Swiegers, J. H., Elsey, G. M., Siebert, T. E., Bartowsky, E. J. *et al.*: Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiology Letters*, 240, 125-129 (2004)

- 57) 深津修一, 岩浅潔: 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 (1978)
- 58) Swoboda, P. A. T. and Peers, K. E.: Metallic odour caused by vinyl ketones formed in the oxidation of butterfat. The identification of octa-1, *cis*-5-dien-3-one. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 1019–1024, (1977)
- 59) Milo, C. and Grosch, W.: Changes in the odorants of boiled trout (*Salmo fario*) as affected by the storage of the raw material. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2076–2081 (1993)
- 60) Guth, H. and Grosch, W.: 3-Methylnonane-2,4-dione – an intense odour compound formed during flavour reversion of soya-bean oil. *Fat Sci. Technol.*, 93, 225–230 (1989)
- 61) Cerny, C. and Grosch, W.: Evaluation of potent odorants in roasted beef by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.*, 194, 322–325 (1992)
- 62) Kumazawa, K., Wada, Y., and Masuda, H.: Characterization of epoxydecenal isomers as potent odorants in black tea (*Dimbula*) infusion. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4795–4801 (2006)
- 63) Miyazato, H., Hashimoto, S., and Hayashi, S.: Identification of the odor-active aldehyde *trans*-4,5-epoxy-(*E,Z*)-2,7-decadienal in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Eur. Food Res. Technol.*, 235, 881–891 (2012)
- 64) Schieberle, P.: New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In *Characterization of Food: Emerging Methods*, Goankar, A., Ed., Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995, pp 403–431.
- 65) Semmelroch, P. and Grosch, W.: Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 310–313 (1995)
- 66) Kumazawa, K. and Masuda, H.: Investigation of the change in the flavor of a coffee drink during heat processing. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2674–2678 (2003)
- 67) Kumazawa, K., Sakai, N., Amma, H., Sakamoto, S., Kodama, M., Wada, Y., and

- Nishimura, O: Identification and formation of volatile components responsible for the characteristic aroma of mat rush (igusa). *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 74, 1231–1236 (2010)
- 68) Schuh, C. and Schieberle, P.: Characterization of the key aroma compounds in the beverage prepared from Darjeeling black tea: quantitative differences between tea leaves and infusion. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 916–924 (2006)
- 69) PubChem: National Center for Biotechnology Information,  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 70) 川上美智子, 山西貞: かぶせ茶の香りの特徴. *日本農芸化学会誌*, 55, 117-123 (1981)
- 71) Miyazato, H., Hashimoto, S., and Hayashi, S.: Enantiomeric distribution of odor-active epoxyaldehydes in yuzu (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka). *Eur. Food Res. Technol.*, 237, 933–942 (2013)
- 72) 阿南豊正, 中川致之: 茶葉の脂質に関する研究 (第1報) 茶期・熟度による脂質含量および脂肪酸組成の変化. *日本食品工業学会誌*, 24, 305–310 (1977)
- 73) Hatanaka, A., Kajiware, T., Sekiya, J., and Fujimura, K.: Participation of 13-hydroperoxide in the formation of *n*-hexanal from linoleic acid in tea chloroplasts. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 175–176 (1979)
- 74) Kajiware, T., Nagata, N., Hatanaka, A., and Naoshima, Y.: Stereoselective oxygenation of 13-hydroperoxide in chloroplasts from *Thea sinensis*. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 437–438 (1980)
- 75) Schuh, C. and Schieberle, P.: Characterization of (*E,E,Z*)-2,4,6-nonatrienal as a character impact aroma compound of oat flakes. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8699–8705 (2005)
- 76) 小菅充子, 相坂浩子: 中国緑茶の香気の特徴. *栄養と食糧*, 33, 101–104 (1980)
- 77) 小菅充子, 相坂浩子, 山西貞: 中国産および日本産かまいたち茶の香気成分. *栄養と食糧*, 34, 545–549 (1981)
- 78) Kawakami, M. and Yamanishi, T.: Flavor constituents of Longing tea. *Agric. Biol. Chem.*,

47, 2077–2083 (1983)

- 79) Guth, H. and Grosh, W.: 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 J.*, 8, 173–178 (1993)
- 80) Cheng, Y., Huynh-Ba, T., Blank, I., and Robert, F.: Temporal changes in aroma release of Longjing tea infusion: interaction of volatile and nonvolatile tea components and formation of 2-butyl-2-octenal upon aging. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2160–2169 (2008)
- 81) Buttery, R. G., Ling, L. C., Juliano, B. O., and Turnbaugh, J. G.: Cooked rice aroma and 2-acetylpyrroline. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 823–826 (1983)
- 82) Rychlik, M., Schieberle, P., and Grosch, W.: Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants, Lichtenbergstraße, Germany, pp.16-17 (1998)
- 83) Kobayashi, A., Tachiyama, K., Kawakami, M., Yamanishi, T., Juan, I., and Chiu, W. T.: Effects of solar-withering and turn over treatment during indoor-withering on the formation of pouchong tea aroma. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1655–1660 (1985)
- 84) 肥塚崇男: スパイス香気物質の生成機構を紐解く—フェニルプロペン類生合成酵素の分子進化—. *AROMA RESEARCH*, 11, 132-137 (2010)
- 85) 坂井克己: オルガノソルブ脱リグニン. *紙パ技協誌*, 48, 1003-1012 (1994)
- 86) Whetten, R. and Sederoff, R.: Lignin Biosynthesis. *The Plant Cell*, 7, 1001-1013 (1995)
- 87) Gao, D. F., Zhang Y. J., Yang, C. R., Chen, K. K., and Jiang, H. J.: Phenolic antioxidants from green tea produced from *Camellia taliensis*. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7517–7521 (2008)
- 88) Guth, H. and Grosch, W.: 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 J.*, 8, 173-178 (1993)
- 89) 熊沢賢二, 増田秀樹, 西村修, 加藤龍夫.: 熱水より抽出した紅茶香気に寄与する成分. *日本食品科学工学会誌*, 45, 728-735 (1998)

- 90) 磯淵猛: 紅茶の教科書 改訂第二版, 新星出版社, 東京, pp.70 (2016)
- 91) Kawakami, M., Ganguly, S., Banerjee, J., and Kobayashi, A: 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 (1995)
- 92) Wakabayashi, H., Wakabayashi, M., Eisenreich, W., and Engel, K. H.: Stereoselectivity of the generation of 3-mercaptophexanal and 3-mercaptophexanol by lipase-catalyzed hydrolysis of 3-acetylthioesters. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4349-4355 (2003)
- 93) Yuasa, Y. and Kato, Y.: A practical and convenient synthesis of hotrienol, an excellent fruity smelling compound. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4036-4039 (2003)
- 94) Winter, M., Furrer, A., Willhalm, B., and Thommen, W.: Identification and synthesis of two new organic sulfur compounds from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Helv. Chim. Acta*, 59, 1613-1620 (1976)
- 95) Nishimura, O.: Application of a thermal desorption cold trap injector to multidimensional GC and GC-MS. *J. High Resol. Chromatogr.*, 18, 699-704 (1995)
- 96) Kaneko S., Kumazawa K., and Nishimura O.: Studies on the key aroma compounds in raw (unheated) and heated Japanese soy sauce. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 3396- 3402 (2013)
- 97) Rawat R. and Gulati A.: Seasonal and clonal variations in some major glycosidic bound volatiles in Kangra tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1241-1249 (2008)
- 98) 竹尾忠一: 茶の香りと茶樹の種間特性—モノテルペンアルコールと茶樹の系統—. *化学と生物*, 22, 129-133 (1984)
- 99) Takeo, T. and Mahanta, P. K.: Comparison of black tea aromas of orthodox and CTC tea and of black teas made from different varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 307 -310 (1983)
- 100) Paré, P. W. and Tumlinson, J. H.: Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121, 325-331 (1999)

- 101)Lücker, J., Bouwmeester, H. J., Schwab, W., Blaas J. *et al.*: Expression of *Clarkia* *S*-linalool synthase in transgenic petunia plants results in the accumulation of *S*-linalyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. *The Plant Journal*, 27, 315-324 (2001)
- 102)Dong, F., Yang, Z., Baldermann, S., Sato, Y. *et al.*: Herbivore-induced volatiles from tea (*Camellia sinensis*) plants and their involvement in intraplant communication and changes in endogenous nonvolatile metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 13131 -13135 (2011)
- 103)Gohain, B., Borchetia, S., Bhorali, P., Agarwal N. *et al.*: Understanding Darjeeling tea flavour on a molecular basis. *Plant Mol. Biol.*, 78, 577-597 (2012)
- 104)Hazarika, M., Mahanta, P. K., and Takeo, T.: Studies on some volatile flavour constituents in orthodox black teas of various clones and flushes in north-east India. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 1201-1207 (1984)
- 105)Ohgami, S., Ono, E., Horikawa, M., Murata, J. *et al.*: Volatile glycosylation in tea plants: sequential glycosylations for the biosynthesis of aroma  $\beta$ -primeverosides are catalyzed by two *Camallia sinensis* glycosyltransferases. *Plant Physiology*, 168, 464-477 (2015)
- 106)原利男, 堀田博: 緑茶火入れ中に生成する 3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol とその前駆物質. *日本農芸化学会誌*, 61, 353-356 (1987)
- 107)小林彰夫, 久保田紀久枝: 調理と加熱香気. *調理科学*, 22, 156-163 (1989)
- 108)Hayase, F., Kim, S. B., and Kato, H.: Maillard reaction products formed from D-glucose and glycine and the formation mechanisms of amides as major components. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2337-2341 (1985)
- 109)池田奈実子, 堀江秀樹, 向井俊博, 後藤哲久: 各茶種用チャ品種の一番茶及び秋芽の個別アミノ酸含量の特徴. *茶業研究報告*, 78, 67-75 (1993)
- 110)畑中颯和: 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 (1993)
- 111)阿南豊正, 中川致之: 茶葉の脂質に関する研究(第1報)茶期・熟度による脂質含量および脂肪酸組成の変化. *日本食品工業学会誌*, 24, 305-310 (1977)

- 112)関谷次郎: 高等植物の茎葉器官分化と緑葉における香気成分生成に関する研究. *日本農芸化学会誌*, 59, 1161-1169 (1985)
- 113)畑中顕和: 香り選書② 進化する“みどりの香り”, フレグランスジャーナル社, 東京. pp.18-20 (2008)
- 114)Yang, Z., Kobayashi, E., Katsuno, T., Asanuma, T. *et al.*: Characterization of volatile and non-volatile metabolites in etiolated leaves of tea (*Camellia sinensis*) plants in the dark. *Food Chemistry*, 135, 2268-2276 (2012)
- 115)小林彰夫, 久保田紀久枝: 2) 香りの前駆体としての配糖体. *化学と生物*, 32, 185-189 (1994)
- 116)Yamanishi, T., Kobayashi, A., Sato, H., Nakamura, H. *et al.*: Flavor of black tea Part IV. Changes in flavor constituents during the manufacture of black tea. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 784-792 (1966)
- 117)今吉有利子, 尾本峰子, 岩淵久克: マスカット・オブ・アレキサンドリアの香気成分. 北海道, 第44回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 講演要旨集, pp. 19-21 (2000)
- 118)Amrani-Hemaimi, M., Cerny, C., and Fay, L.: Mechanisms of formation of alkylpyrazines in the maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2818-2822 (1995)
- 119)Kobayashi, H., Takase, H., Suzuki, Y., Tanzawa, F. *et al.*: Environmental stress enhances biosynthesis of flavor precursors, S-3-(hexan-1-ol)-glutathione and S-3-(hexan-1-ol)-L-cysteine, in grapevine through glutathione S-transferase activation. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1325-1336 (2011)
- 120)山西貞: ポピュラー・サイエンス お茶の科学, 裳華房, 東京, pp.87-91 (1992)
- 121)伊那和夫, 坂田完三, 郭雯飛: II 茶の種類と製法, 新版 緑茶・中国茶・紅茶の化学と機能, 伊那和夫, 坂田完三編, アイ・ケイ・コーポレーション, 神奈川. pp. 11-25 (2007)
- 122)Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. and Dubourdieu, D.: Measuring the aromatic potential of *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc grapes by assaying S-cysteine

- conjugates, precursors of the volatile thiols responsible for their varietal aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3387-3391 (2000)
- 123) Peyrot des Gachons, C., Tominaga, T. and Dubourdieu, D.: Sulfur aroma precursor present in *S*-glutathione conjugate form: Identification of *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4076- 4079 (2002)
- 124) 川上美智子: 第Ⅲ章 釜炒り茶と焙じ茶の香気, 茶の香り研究ノート-製造にみる多様性の視点から-, 光生館, 東京. pp.20-25 (2000)
- 125) Grant-Preece, P. A., Pardon, K. H., Capone, D. L., Cordente, A. G., Sefton, M. A. *et al.*: Synthesis of wine thiol conjugates and labeled analogues: Fermentation of the glutathione conjugate of 3-mercaptohexan-1-ol yields the corresponding cysteine conjugate and free thiol. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 1383-1389 (2010)

## 本研究に関する出版物

### 第2章の研究に関する出版物

- Kenji Kumazawa, Ryoko Baba and Osamu Nishimura: Automated analysis of 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone in Japanese green tea (Sen-cha) by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric determination. *Food Science and Technology Research*, 16, 59-64 (2010)

### 第3章の研究に関する出版物

- Ryoko Baba, Yohei Amano, Yoshiyuki Wada and Kenji Kumazawa: Characterization of the potent odorants contributing to the characteristic aroma of matcha by gas chromatography-olfactometry techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2984-2989 (2017)

### 第4章の研究に関する出版物

- Ryoko Baba and Kenji Kumazawa: Characterization of the potent odorants contributing to the characteristic aroma of Chinese green tea infusions by Aroma Extract Dilution Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8308-8313 (2014)

### 第5章の研究に関する出版物

- 馬場良子, 中村后希, 熊沢賢二: ダージリン紅茶の特徴的な香気に寄与する成分の探索. *日本食品科学工学会誌*, 64, 294-301 (2017)
- 馬場良子, 熊沢賢二: ダージリン紅茶における特徴香形成要因の探索～8 銘柄の主要香気成分の比較によるアプローチ～. *AROMA RESEARCH*, 18, 280-285 (2017)

## 謝 辞

本論文の作成にあたり、終始あたたかく懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました 東京農業大学 大学院生物産業学研究科 久保田紀久枝教授に、心より感謝申し上げます。

本論文の執筆にあたり、適切なご助言を賜りました 東京農業大学 生物産業学部 戸枝一喜教授、東京農業大学 生物産業学部 佐藤広顕教授、神奈川工科大学 応用バイオ科学部 飯島陽子教授に、厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、有益なご教示、ご助言ならびに激励を賜りました 小川香料株式会社 解析研究所 所長 熊沢賢二博士に、深く感謝いたします。

なお、本研究は小川香料株式会社にて行ったものをまとめたものであり、終始ご理解を賜りました 小川裕 代表取締役社長、作田圭亮 取締役、片田純 取締役ならびに村西修一 研究統括部長をはじめとする社員の皆様に感謝いたします。また、本研究にご協力いただきました、解析研究所ならびにマテリアル開発センターの皆様に、心より感謝申し上げます。

最後に、本論文の執筆を見守り応援してくれた家族に、感謝いたします。