



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Enzymatic and Chemical Studies on Alcoholic Aroma Formation in Oolong Tea

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2014-01-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 郭, 雯☒ メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2381

氏名（国籍）	郭 雯 飞 （中華人民共和国）	
学位の種類	博士（農学）	
学位記番号	農博甲第40号	
学位授与年月日	平成7年3月14日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻	
研究指導を受けた大学	静岡大学	
学位論文題目	Enzymatic and Chemical Studies on Alcoholic Aroma Formation in Oolong Tea	
審査委員	主査 静岡大学教授	坂田完三
	副査 静岡大学教授	衛藤英男
	副査 信州大学助教授	唐澤傳英
	副査 静岡大学教授	碓氷泰市
	副査 岐阜大学教授	加藤宏治
	副査 静岡大学助教授	渡邊修治

論文の内容の要旨

植物性食品の花様の香気は主にテルペン系や芳香族系のアルコール系の香気成分に由来し、近年これらは自然の香気としてその生成機構が注目されている。茶の中でも烏龍茶はこれらのアルコール系香気を示す花様の香りが特徴で、茶の品質の決め手ともされているが、このような香気の生成機構は明らかにされていない。本研究は、烏龍茶のこの花様の香気成分であるアルコール系香気の生成機構を分子レベルで解明しようとした先駆的研究である。

以下のように独自に開発した香気前駆体検出法（SDE 酸加水分解法、より温和な“二層反応”酸加水分解法、および酵素加水分解法）を用いて、香気前駆体を明らかにし、ついでこれらの香気前駆体からの香気生成を指標にしてこの香気生成にかかわる主たる酵素を単離、同定した。

中国福建省産の烏龍茶品種である水仙種および毛蟹種の殺生葉を熱湯抽出し、活性炭に香気前駆体を含む成分を吸着させた。ついで Amberlite XAD-2, Sephadex

LH-20 (50% MeOH), ODS (H₂O-MeOH) カラムクロマトグラフィーおよびHPLC(ODS, H₂O-MeOH および H₂O-MeCN) により, 花様の香りを有する geraniol, (S)-linalool, 2-phenylethanol および benzyl alcohol の香気前駆体を単離し, その構造を各種機器分析により geranyl 6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside (geranyl β-primeveroside) (1), (S)-linalyl β-primeveroside (2), 2-phenylethyl β-primeveroside (3) および benzyl β-primeveroside (4) と決定した. そのうち, 1 および 2 は新規配糖体である. 3 および 4 は他の植物からも単離されているが香気前駆体としては初めての例である.

β-Glucosidase を作用させることにより, geraniol や linalool が生成したことから, 茶のモノテルペンアルコール系香気の前駆体が glucosides と推測されていたが, 本研究により烏龍茶の geraniol, linalool などのアルコール系香気の前駆体, は二糖配糖体である β-primeverosides であることが明らかにされた.

烏龍茶用のチャ新鮮葉の入手は困難なため, まず予備検討として, 緑茶用品種のヤブキタ種を用いて, これらの配糖体からの香気生成にかかわる酵素の単離, 同定が以下のようにして行われた.

ヤブキタ種の新鮮葉からアセトンパウダーを調製し, アセトン沈澱, 硫酸沈澱により, 茶から得たアルコール系香気前駆体から香気を生成する粗酵素を得た. 次に本粗酵素を CM-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィーにより分画した各画分を数種の pNP-Glycosides と反応させたところ, pNP-Glc に対する活性が最も高く, その活性画分が上記香気前駆体からの香気生成と最も良く対応していたので, pNP-Glc の加水分解活性を指標にして分画し, 3種の酵素画分 (Glucosidase I, II, III) を得た. このうち, Glucosidase II が烏龍茶から単離された各種 β-primeverosides に対して特異的に高い加水分解活性を示すことが明らかとなった. また Glucosidase II とアセトンパウダーの結果が類似していることから Glucosidase II が茶の香気生成に関与する主要な酵素であることが判明した. 反応生成物の TLC および MS 分析の結果から, primeverose だけが生成していることが確認され, Glucosidase II は primeverosidase であることが明らかとなった.

Glucosidase II を Mono S カラム を用いた FPLC により分画し, 二つの活性画分 (Glucosidase IIa, IIb) を得た. SDS PAGE 電気泳動分析の結果, Glucosidase IIa は単一バンドを示し, 分子量は約 61 kDaであった. ゲルろ過カラム分析の結果は電気泳動の結果と一致し, 本酵素は分子量が約 61 kDaのモノマーであることが明らかにされた.

次に中国で入手した烏龍茶水仙種の新鮮葉からも同様の方法により上記酵素の精製を試みた。ヤブキタ種の場合と同様にほとんど同じ溶出位置に、3種の酵素画分 (Glucosidase I, II, III) が得られた。この Glucosidase II の活性は 70% 以上を占め、ヤブキタ種の場合よりもはるかに高く、香気の生成が多い烏龍茶の遺伝的特性を分子レベルで解明する手掛かりを与えるものであり、今後の研究の発展につながる興味あることである。

本研究により烏龍茶における花様の香りを有する主なアルコール香気化合物はそれらの二糖の配糖体 (β -primeverosides) から、内生酵素 β -primeverosidase により加水分解されて生成することが明らかになった。本研究の成果は茶ばかりでなく、その他の植物の香気生成機構の解明にも重要な知見を与えるものがある。

烏龍茶は紅茶と異なり、発酵過程で茶葉の組織を破壊しないで製造される点を考えると、本研究の成果は単に食品の香気生成機構の解明という視点ばかりでなく、植物の各種ストレス (萎凋, 傷害など) に対する応答という視点からも大変興味深いものである。

審 査 結 果 の 要 旨

茶の中でも烏龍茶は花様の香りが特徴で、茶の品質の決め手ともされている。本研究は、烏龍茶のこの花様の主たる香気成分であるアルコール系香気の生成機構を分子レベルで解明しようとした先駆的研究である。

以下のように独自に開発した香気前駆体検出法を用いて、上記香気前駆体を明らかにし、ついでこれらの香気前駆体からの香気生成を指標にしてこの香気生成にかかわる主たる酵素を単離、同定した。

中国福建省産の烏龍茶品種である水仙種および毛蟹種の殺生葉を熱湯抽出し、活性炭ついで Amberlite XAD-2, Sephadex LH-20 (50% MeOH), ODS (H_2O -MeOH) カラムクロマトグラフィーおよび HPLC (ODS, H_2O -MeOH および H_2O -MeCN) により geraniol, (*S*)-linalool, 2-phenylethanol および benzyl alcohol の香気前駆体を単離し、その構造を各種機器分析により geranyl 6-*O*- β -D-xylopyranosyl- β -D-glucopyranoside (geranyl β -primeveroside) (1), (*S*)-linalyl β -primeveroside (2), 2-phenylethyl β -primeveroside (3) および benzyl β -primeveroside (4) と決定した。そのうち、1 および 2 は新規配糖体である。3 および 4 は他の植物からも単離されているが香気前駆体としては初めての例である。茶のアルコール系香気の前駆体が glucosides と推測されていたが、本研究により烏龍茶の geraniol, linalool などのアルコール系香気は二糖配糖体の β -primeverosides であることが明らかにされた。

烏龍茶用のチャ新鮮葉の入手は困難なため、まず予備検討として、緑茶用品種のヤブキタ種を用いて、これらの配糖体からの香気生成にかかわる酵素の単離、同定が以下のようにして行われた。

ヤブキタ種の新鮮葉からアセトンパウダーを調製し、アセトン沈澱、硫酸沈澱により酵素を分画した。次に CM-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィーにより分画した各画分を数種の *p*NP-Glycosides と反応させたところ、*p*NP-Glc に対する活性が最も高かったので、*p*NP-Glc の加水分解活性により 3 種の活性画分 (Glucosidase I, II, III) を得た。このうち、Glucosidase II が烏龍茶から単離された各種 β -primeverosides に対して特異的に高い加水分解活性を示すことが明らかとなった。また Glucosidase II とアセトンパウダーの結果が類似していることから Glucosidase II が茶の香気生成に関与する主要な酵素であることが判明した。反応生成物の TLC および MS 分析の結果から、primeverose だけが生成していることが確認され、Glucosidase II は primeverosidase であることが明らかとなった。

Glucosidase II を Mono S カラムを用いた FPLC により分画し、二つの活性画分 (Glucosidase IIa, IIb) を得た。SDS PAGE 電気泳動分析の結果、Glucosidase IIa は単一バンドを示し、分子量は約 61 kDa であった。ゲルろ過カラム分析の結果は電気泳動の結果と一致し、本酵素は分子量が約 61 kDa のモノマーであった。

次に中国で入手した烏龍茶水仙種の新鮮葉からも同様の方法により酵素を精製し、主たる香気生成酵素として上述の Glucosidase II と類似した酵素を得た。

本研究により烏龍茶における花様の香りを有する主なアルコール香気化合物はそれらの二糖の配糖体 (β -primeverosides) から、内生酵素 β -primeverosidase により加水分解されて生成することが明らかになった。本研究の成果は茶ばかりでなく、その他の植物の香気生成機構の解明にも重要な知見を与えるものがある。

烏龍茶は紅茶と異なり、発酵過程で茶葉の組織を破壊しないで製造される点を考えると、本研究の成果は単に食品の香気生成機構の解明という視点ばかりでなく、植物の各種ストレス (萎凋, 傷害など) に対する応答という視点からも大変興味深いものであり、本論文は学位論文として相応しいものであることを審査委員全員が異議なく認めた。