

後発酵茶・碁石茶の特徴香気成分とその生成に関与する微生物の解析

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	小山,翔大 小泉,香菜 妙田,貴生 内野,昌孝 藤森,嶺 高野,克己
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	45巻3号
掲載ページ	p. 119-127
発行年月	2019年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



後発酵茶・碁石茶の特徴香気成分と その生成に関与する微生物の解析

小山翔大*¹・小泉香菜*²・妙田貴生*²
内野昌孝*^{3§}・藤森 嶺*²・高野克己*⁴

- * 1 東京農業大学大学院農学研究科農芸化学専攻
- * 2 東京農業大学生産学部食香粧化学科
- * 3 東京農業大学生命科学部分子微生物学科
- * 4 東京農業大学応用生物科学部農芸化学科

Key Odorants and the Role of Microorganisms on Aroma Formation of Post-Fermented Tea, Goishi Tea

KOYAMA Shota*¹, KOIZUMI Kana*², MYODA Takao*²,
UCHINO Masataka*^{3§}, FUJIMORI Takane*² and TAKANO Katsumi*⁴

- * 1 *Department of Agricultural Chemistry, Graduate school of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502*
- * 2 *Department of Food, Aroma and Cosmetic Chemistry, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, 196 Yasaka, Abashiri, Hokkaido 099-2493*
- * 3 *Department of Molecular Microbiology, Faculty of Life Science, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502*
- * 4 *Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya, Tokyo 156-8502*

Goishi tea, a post fermented tea, is produced in Otoyo town, Kochi Prefecture, Japan. The aim of the present study was to elucidate the aroma-active components in Goishi tea by aroma extract dilution analysis (AEDA) using gas chromatography-olfactometry (GC-O) and identify the microorganisms involved in the fermentation process to further understand the aroma formation. Based on AEDA in GC-O, profiles of various aromatic compounds in Goishi tea were analyzed. Hexanoic acid had the highest flavor dilution (FD) value, followed by furfural, furaneol, and ethyl furaneol. Three microorganisms, namely, *Aspergillus niger*, *Pichia manshurica*, and *Lactobacillus plantarum* were isolated and identified based on their rDNA sequences. We prepared post fermented tea using these microorganisms, and the aromatic extract from each tea was investigated to assess the relationship between aroma formation and the microorganism. Ethyl furaneol and thiazoline compounds produced by *A. niger* were detected in post fermented tea. Ester, alcohol, and phenolic compounds including 4-ethylphenol and 4-ethyl-2-methoxyphenol were detected in the tea with *P. manshurica*. *L. plantarum* produced organic acids such as hexanoic and butanoic acids and lactone. Thus, all the three strains, *A. niger*, *P. manshurica*, and *L. plantarum* contributed considerably to aroma formation in Goishi tea.

(Received Oct. 22, 2018 ; Accepted Feb. 4, 2019)

Key words : *post-fermented tea, Goishi tea, aroma, microorganisms*

後発酵茶, 碁石茶, 香気, 微生物

* 1 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1
* 2 〒099-2493 北海道網走市八坂196
* 3 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1
§ Corresponding author, E-mail : muchino@nodai.ac.jp
* 4 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

茶はその製造法の違いから、不発酵茶（緑茶）、半発酵茶（ウーロン茶など）、発酵茶（紅茶）および後発酵茶の4種類に大別される。半発酵茶および発酵茶は茶葉中の酵素の作用による成分の変化を経て形成され、一般に微生物は関与しないとされる。一方、後発酵茶は微生物の発酵作用が関与し、主として好気性発酵による富山黒茶およびプーアル茶（熟茶）など、嫌気性発酵による阿波晩茶など、好気性発酵後さらに嫌気性発酵させた碁石茶および石槌黒茶などに分類される¹⁾。

碁石茶は後発酵茶のひとつで、高知県長岡郡大豊町にて伝統的に生産され、様々な生体調節機能を有することが近年報告されている^{2)~4)}。その製法は、枝ごと刈り取った茶葉を桶に詰めて1~2時間蒸す。枝を取り除いてからむしろをかけて1週間ほど置き好気性発酵を促す。その後茶葉を桶に詰め込み、これに発酵時の蒸し汁を注ぎ、重石を乗せ1週間程度漬け込む（嫌気性発酵）。発酵後、茶葉を裁断して天日干しすることで碁石茶が完成する⁴⁾。従来の研究によって、発酵過程に存在する微生物⁵⁾、および発酵による茶成分の変化⁶⁾が報告されている。発酵過程中の成分変化は、茶の香味を特徴付ける香気成分の変化に大きな影響を及ぼすと考えられるが、香気成分に関しては何れもGC-MSによる揮発性化合物量の分析^{7),8)}のみで、香気成分の閾値や匂いの特徴を反映した評価はなく、碁石茶香気形成に微生物がどのように関与するかについても定かでない。

そこで本研究では、ガスクロマトグラフィーと匂い嗅ぎ装置を組み合わせたGC-Olfactometry (GC-O)にて碁石茶の特徴香気成分を分析した。さらに発酵に関与する微生物を添加した後発酵茶を調製して、発酵過程における香気形成と微生物との関係を解析した。

実験方法

1. 試料

碁石茶および好気性発酵過程の茶葉、嫌気性発酵過程の漬け汁は生産者の小笠原氏（高知県大豊町）から分与を受けた。碁石茶はマルチピーズショッカー（安井器械）にて120メッシュ以下に粉末化し、試験に用いた。粉末緑茶は市販品（蒸煮により殺青したもの）を用いた。

2. 茶浸出液および香気濃縮物の調製

粉末緑茶および碁石茶粉末を2.0gとり、90℃の熱水100mlにて15分間抽出後、遠心分離（15,660×g, 10min, トミー精工社製）し、茶浸出液を得た。これら茶浸出液の匂いの特徴をGC-Oのパネルにより確認した。次に本茶浸出液200mlに内部標準物質として2-オクタノールを10μg添加後、PorapakQ（50~80mesh, Waters社製）カラムに流し、吸着した成分を100mlのジクロロメタンにて溶出後、Solvent Assisted Flavor Evaporation装置（40℃, 3.0×10⁻⁴mmHg, Bahr社製）により不揮発性成分を除去した。得られた香気抽出液は無水硫酸ナトリウムにて脱水後、Vigreuxカラム（50×1cm, 48℃, SIGMA-

ALDRICH社製）にて200μlまで濃縮した。

3. Gas chromatography-olfactometry (GC-O)

Agilent7890Aガスクロマトグラフ、分析用カラムDB-FFAP（30m×0.32mm×0.25μm, Agilent technologies社製）およびDB-5（30m×0.32mm×0.25μm, Agilent technologies社製）を使用した。分析条件はSteinhaus⁹⁾の方法に準じた。すなわち、オープン温度は40℃にて2min保持し、6℃/minの速度で230℃まで昇温し3min保持した。ヘリウムガスをキャリアとし、流速は2.0ml/min、試料1μlをオンカラム注入した。カラム出口を1:1に分岐し、注入口温度を250℃に設定した水素炎イオン検出器（FID）および匂い嗅ぎポートOP275（GLサイエンス社製）へ溶出した化合物を導入した。OP275は香気成分の滞留および残存を防ぐため220℃に加温した。

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2倍ずつ希釈して3.に記載したGC-Oに供した。希釈倍率の低い試料から3名のパネルで匂い嗅ぎを行い、各成分の匂いを検出できる最大希釈倍率（Flavor dilution (FD) ファクター）を求めた¹⁰⁾。なお、FDファクターは希釈回数をnとして2ⁿで算出した。

5. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

ガスクロマトグラフ、分析用カラム、キャリアガスおよびその流速、注入口温度、試料注入量はGC-Oに準じた。オープン温度は60℃にて2min保持し、3℃/minの速度で230℃まで昇温し5min保持した。検出器にはAgilent5975C質量分析器（MSD）を用いた。イオン化電圧は70eV、トランスファーラインは250℃、イオン源230℃で測定を行った。

6. 特徴香気成分の同定および定量

検出された香気成分はRetention Index¹¹⁾（RI:n-alkane類および検出成分の保持時間より算出）およびマススペクトルを質量スペクトルデータベース（NIST）との比較および香気特徴の比較により同定した。なお、各香気成分の定量値はGC-MSにより得られた内部標準とのピーク面積比から算出した。

7. 発酵過程に存在する微生物の単離および同定

選択培地を用いて碁石茶発酵過程より糸状菌、酵母および乳酸菌を以下のように単離した。碁石茶発酵サンプル（好気性発酵時の茶葉および嫌気性発酵中の上澄み液）を生理的食塩水にて希釈し、各選択培地に平板塗抹したのち、30℃で72時間培養後に形成されたコロニーを単離した。糸状菌および酵母の分離にはPDA培地、乳酸菌の分離にはMRS白亜寒天培地を用いた。乳酸菌は16S rDNAの塩基配列の相同性およびrecA遺伝子領域をターゲットとしたMultiplex-PCR法により¹²⁾、酵母および糸状菌は26S rDNA-D1/D2領域の塩基配列の相同性により同定した¹³⁾。

8. 微生物添加後発酵茶の調製および香気成分の分析

粉末緑茶浸出液200mlに単離した微生物を1白金耳分植菌し、21日間、30℃で発酵させた。この後発酵茶は単離した各微生物を単体または複合して植菌し、0日目(0)、糸状菌単独(A)、酵母単独(P)、乳酸菌単独(L)、糸状菌・酵母(AP)、糸状菌・乳酸菌(AL)酵母・乳酸菌(LP)、3菌種複合(ALP)の9種類を調製した。これらを2.の操作にしたがって香気濃縮物を調製後、GC-OおよびGC-MSにて香気成分を分析した。同時に、これら茶浸出液の匂いの特徴をGC-Oのパネルにより確認した。

実験結果

1. 碁石茶の特徴香気成分

まず、熱水抽出した緑茶および碁石茶の官能的な香気の特徴をGC-Oのパネルによって確認した。緑茶は茶葉やグリーン様の匂いを呈したが、碁石茶はこれに加えて酸臭、刺激臭、焙煎香およびプルーン様の甘い匂いを含む多様な香調であった。そこで、緑茶および碁石茶の香気寄与成分を探索するため、各茶浸出液から香気濃縮物を調製し、AEDA法を用いたGC-OおよびGC-MSに供した(Table 1, Fig.1)。まず、緑茶より、茶葉、グリーン、バニラおよび柑橘様などの香調を示す20の化合物が検出され、(E, E)-2,4-デカジエナール(炒った茶葉)およびバニリン(バニラ)のFD値が高く256であった。次いで、エチル-3-メチルピラジン(ナッツ)、フラネオール(カラメル)およびクマリン(桜餅)が128のFD値を示した。一方、碁石茶では緑茶で確認された茶葉、グリーン様の香調を示す化合物に加えて酸臭、カラメル、アーモンド、柑橘、スパイシーおよび薬品様など多様な香調を呈する45の化合物が検出され、そのうち29成分が碁石茶特有の化合物であった。FD値をみると、カプロン酸(酸臭)の1,024が最も高く、フルフラール(アーモンド)、エチルフラネオール(甘い焦げ)、フラネオール(カラメル)など香ばしさに寄与する成分がこれに続いた(いずれもFD値512)。その他、酪酸といったカルボン酸やエチルシクロヘキサノエートなどのエステル類、アルコールやアルデヒド、4-エチルグアヤコールなどのフェノール性化合物が碁石茶香気として検出された。

2. 微生物の単離および同定

碁石茶発酵過程より微生物を単離した。MRS寒天培地には明瞭なクリアゾーンを形成する乳酸菌が優勢で、PDA培地には白色のコロニーを形成する酵母が優勢であった。堆積中の茶葉を生理的食塩水にて懸濁・希釈し、平板塗抹後培養したところ、黒色の胞子を形成する糸状菌が確認された。これらの微生物を単離しDNAを抽出後、PCRに供した反応液をアガロースゲル電気泳動に供した。その結果、酵母および糸状菌の26S D1/D2領域では約600bp、乳酸菌の16S rDNAでは約1,500bpの断片の増幅が確認された。rDNAの断片をシークエンスに

供し、得られた塩基配列をNCBI BLASTにて相同性検索したところ、単離された乳酸菌は*Lactobacillus plantarum*と100.0%の相同性を示した。加えてrecA領域を用いたMultiplex-PCRにより約320bpのバンドが得られた(Fig.2)。TORRIANIら¹²⁾はこの方法における318bpの断片は*L. plantarum*により得られることを報告している。また、単離された酵母および糸状菌は*Pichia manshurica*と100.0%および糸状菌は*Aspergillus niger*と99.6%の相同性を示した¹³⁾。以上の結果より、糸状菌は*A. niger*、酵母は*P. manshurica*、乳酸菌は*L. plantarum*と同定された。

3. 単離微生物による後発酵茶の香気成分への影響

単離した微生物により形成される香気寄与成分を明確にするため、粉末緑茶浸出液に前項で単離した各微生物を単体あるいは2、3種組み合わせで茶浸出液に植菌し、発酵させた後発酵茶を調製した。調製した後発酵茶の官能的な香気の特徴をGC-Oのパネルによって確認したところ、単独植菌では、乳酸菌(L)は酸臭やフローラル様、酵母(P)は甘いココナッツ様、糸状菌(A)はグリーン様の匂いが強く感じられた。複合植菌では、単独植菌のそれに加えてアニマル様およびメタリックな匂いも感じられた。

これらの後発酵試料液から香気濃縮物を調製してGC-Oに供し、その結果をTable 2に示した。各サンプルにおいて匂いが検出された香気成分のうち、緑茶には含まれない碁石茶特有の29化合物の有無を評価した(Table 2)。まず、単独植菌発酵試料で検出された香気成分より、各微生物単独で生産された香気成分を確認した。糸状菌の*A. niger*(A)は碁石茶でFDファクター512を示したエチルフラネオールを生成し、ポップコーン様および焙煎様など香ばしさに寄与するチアゾリン骨格をもつ化合物の産生が認められた。

酵母である*P. manshurica*(P)は、柑橘、蜂蜜様、薬品様の香調を示すエステル類、フェノール性化合物およびアルコールを生成した。乳酸菌の*L. plantarum*(L)は、酸臭および発酵様の香調を示すカルボン酸、ココナッツおよび花様の香調を示す炭素数10または12のラクトン類およびアセトインを生成した。2種の菌を植菌した試料では、糸状菌を含む後発酵でポップコーン様の香調を示すプロピオニル-2-チアゾリンが検出された。APで12-メチルトリデカノール、ALで2,6-ジメトキシフェノールが確認され、これらの化合物はスモーキー、スパイシーな香気を示した。APで12、ALで9、PLで12化合物が検出された。なお、PLでは単体植菌で検出された化合物以外は認められなかった。

3種の菌を植菌した発酵試料APLでは単独または2種植菌において検出された成分に加えてγ-デカラクトンの生成が認められた。なお、3種植菌発酵試料では20化合物が検出され、碁石茶に特有の香気成分のうち69.0%が生成された。碁石茶でFDファクターが高かった化合

Table 1 Potent odorants of Goishi tea and Green tea

No.	RI ^a		Compounds name ^b	Odor quality	FD factor ^c		Peak area ^d
	DB-FFAP	DB-5			Green tea	Goishi tea	
1	1,252	1,203	(E)-6-decenal	Matcha	4	8	<0.10
2	1,260	1,100	2-methyloctan-2-thiol	Mushroom	-	16	<0.10
3	1,279	821	3-hydroxy-2-butanone	Cheese	-	4	0.65
4	1,317	881	2-heptanol	Coconut	-	4	<0.10
5	1,375	998	ethyl-3-methylpyrazine	Nuts	128	-	-
6	1,382	858	(Z)-3-hexenol	Lush green	16	32	<0.10
7	1,395	880	(E)-2-hexenol	Damp grass	16	64	<0.10
8	1,415	1,134	ethyl cyclo hexanoate	Fruity	-	8	<0.10
9	1,457	-	furfural	Almond	8	512	<0.10
10	1,478	1,011	2,4-heptadienal	Floral	-	8	<0.10
11	1,499	965	benzaldehyde	Almond	-	16	<0.10
12	1,536	1,103	linalool	Citrus	32	256	<0.10
13	1,595	1,251	(Z)-2-decenal	Stinky	4	16	<0.10
14	1,625	820	butanoic acid	Putrid smell	-	128	0.53
15	1,717	980	3-methyl nonane-2,4-dione	Matcha	32	-	-
16	1,722	1,361	(E)-2-undecenal	Roasted tea leave	16	16	<0.10
17	1,739	1,295	decadienal	Roasted tea leave	256	128	<0.10
18	1,752	1,105	acetyl-2-thiazolin	Popcorn	-	2	<0.10
19	1,829	1,196	propionyl-2-thiazolin	Popcorn	-	4	<0.10
20	1,834	1,474	ethyl-2,4-decadienoate	Citrus	-	16	<0.10
21	1,836	1,018	hexanoic acid	Fermented	-	1,024	<0.10
22	1,867	1,418	ethyl-3-phenyl propanoate	Citrus	16	32	0.3
23	1,869	1,579	12-methyl tridecanal	Animalic	-	2	<0.10
24	1,871	1,036	benzyl alcohol	Black tea	2	64	<0.10
25	1,894	1,200	2-mercapto heptanol	Roast	-	16	<0.10
26	1,905	1,116	2-phenyl ethanol	Honey	8	128	<0.10
27	1,910	-	trimethyl-4-phenyltetrahydropyran	Citrus	8	8	0.29
28	1,974	1,110	maltol	Caramel	16	128	<0.10
29	1,994	1,113	3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone	Sweet burnt	-	2	0.16
30	2,025	1,286	4-ethyl-2-methoxy phenol	Smokey	-	128	<0.10
31	2,030	1,075	furaneol	Caramel	128	512	<0.10
32	2,035	-	N-(2-mercapto ethyl)-1,3-thiazolinin	Burnt	-	4	0.22
33	2,060	1,380	ethyl furaneol	Sweet burnt	-	512	<0.10
34	2,081	1,074	4-ethyl phenol	Medical box	-	128	<0.10
35	2,086	1,079	4-methoxy phenol	Phenol	-	2	<0.10
36	2,153	1,476	γ -decalactone	Peach	-	2	<0.10
37	2,167	1,359	eugenol	Clove	2	128	<0.10
38	2,193	1,496	δ -decalactone	Coconut	-	8	1.13
39	2,234	1,330	piperonal	Spicy	-	256	<0.10
40	2,244	1,290	3-propyl phenol	Spicy	-	16	<0.10
41	2,267	1,534	myristicin	Nutmeg	-	64	<0.10
42	2,271	1,347	2,6-dimethoxy phenol	Smokey	-	2	0.34
43	2,300	-	unidentified	Smokey	-	2	<0.10
44	2,386	1,680	γ -dodecalactone	Floral	-	4	<0.10
45	2,456	1,442	cumarin	Sakura-mochi	128	-	-
46	2,508	-	unidentified	Cinnamon	16	32	<0.10
47	2,554	1,266	2-phenyl acetate	Pollen	-	32	0.28
48	2,570	1,405	vanillin	Vanilla	256	-	-
49	2,460	1,337	3-phenyl propionic acid	Floral	-	8	<0.10

^aRetention index(RI)calculated using n-alkanes. ^bEach odorant was identified by comparing its RI and mass spectrum obtained by GC-MS, as well as its odor quality as perceived during GC-O. ^cDilution factor of the highest dilution of the aroma extract in which the odorant was detected during GC-O. ^dThe quantitative value of each compound was calculated from the peak area ratio with the internal standard obtained by GC-MS.

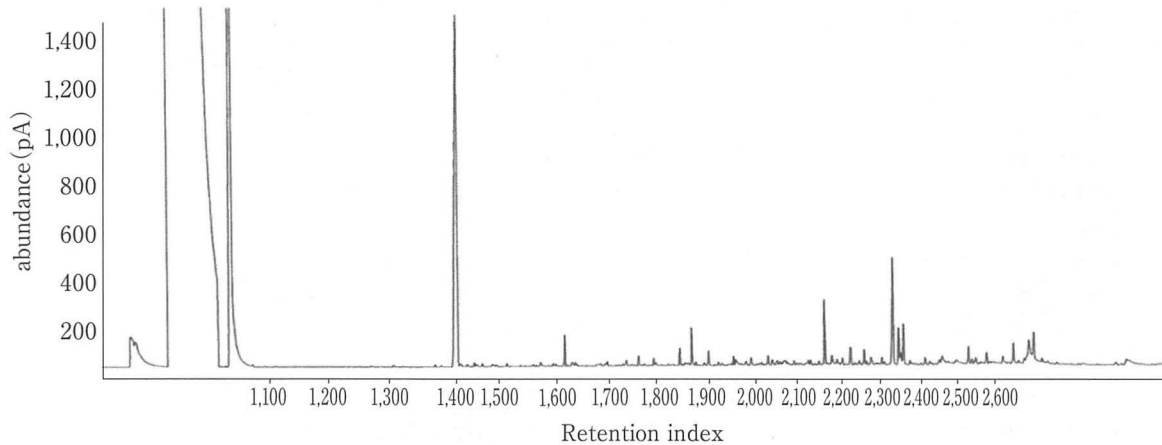


Fig. 1 GC-MS total ion chromatogram on aroma extract of Goishi tea analysed by DB-FFAP column

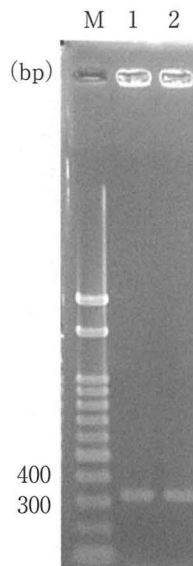


Fig. 2 Amplification product obtained from the multiplex PCR assay

Lane M contained Gene Ladder 100 (Nippon Gene co.). Lane 1 and 2. PCR amplification products from isolated lactic acid bacteria.

物のうち、*P. manshurica*は4-エチルグアヤコール（スモーク）、2-フェニル酢酸（花粉様）および4-エチルフェノール（薬品箱様）、*L. plantarum*はカプロン酸（発酵臭）および酪酸（腐敗臭）、*A. niger*はエチルフラネオール（甘い焦げ様）を特異的に生産した。

考 察

本研究は、碁石茶の特徴香気成分およびその形成における微生物の作用について評価することを目的とした。はじめに、緑茶および碁石茶を熱水抽出し香気成分を精製・濃縮後、AEDA法にて香気寄与成分を分析した。その結果、FDファクターが2以上の成分は緑茶では20成分、碁石茶では45成分が確認された。碁石茶にはフラ

ネオールやリナロールなど緑茶にも含有される成分の他、酸臭を示す脂肪酸、香ばしさに寄与するフラノンやチアゾリン類、薬品やスモーキーな香調を示すフェノール性化合物、花や果物様の香調を示すエステル類を中心とした多様な香気寄与成分が存在することを確認した。中でも、カプロン酸（酸臭）、フルフラール（アーモンド）、エチルフラネオール（甘い焦げ）、フラネオール（カaramel）が特に高いFDファクターを示した。これらのうち、エチルフラネオールは碁石茶での報告がなく^{6)~8)}、本研究で新規に見出された。また、FDファクターが高かった化合物はGCのピーク面積が比較的小さかったことから、微量にも関わらず碁石茶香気に大きく寄与することが示唆された。なお、加藤ら⁹⁾および川上ら⁷⁾は碁石茶中に酢酸、リナロール、リナロールオキサイド、サリチル酸メチル、ベンジルアルコールが高い割合で含有されると報告しているが、本研究ではこれらの化合物は未検出またはピーク面積が小さく、本報告では δ -デカラクトンおよびアセトインのピーク面積が大きかった。両者は香気成分の精製法に差異があり、既報では減圧連続蒸留抽出（SDE）法で試験しているのに対して、本試験ではPorapakQカラム法を用いている。重松ら¹⁴⁾は紅茶の香気分析で両方法を比較し、カラム法ではラクトン類および有機酸の回収率が大きくなることを明らかにしていることから、香気成分の精製法により化合物の組成に差異が生じたと考えられた。次に、碁石茶特徴香気の生成と微生物の関係を評価した。まず、碁石茶発酵過程より糸状菌*A. niger*、酵母*P. manshurica*および乳酸菌*L. plantarum*を分離した。岡田ら⁵⁾は碁石茶発酵過程に*A. niger*および*L. plantarum*の存在を報告しているが、*P. manshurica*は本研究で初めて確認された。続いて単離した微生物が産生する香気成分を分析するため、茶浸出液に単離した微生物を植菌後、静置培養し香気寄与成分を分析した。茶葉を直接発酵させる場合、植物細胞壁の分解活性をもたない微生物は発酵による成分変化がほとんど生じないことが予想された。そこで、茶中の成分を含

Table 2 Aroma compounds presence in Goishi tea produced by each microbe during fermentation

No.	Compound ^a	Odor quality	Post fermented tea ^b						
			A	P	L	AP	AL	LP	APL
2	2-methyloctan-2-thiol	Mushroom	-	-	-	-	-	-	-
3	3-hydroxy-2-butanone	Cheese	-	-	○	-	○	○	-
4	2-heptanol	Coconut	-	○	-	○	-	○	○
8	ethyl cyclo hexanoate	Fruity	-	○	-	○	-	○	○
10	2,4-heptadienal	Floral	-	○	-	○	-	○	○
11	benzaldehyde	Almond	-	-	-	-	-	-	-
14	butanoic acid	Putrid smell	-	-	○	-	○	○	○
18	acetyl-2-thiazolin	Popcorn	○	-	-	○	○	-	○
19	propionyl-2-thiazolin	Popcorn	-	-	-	○	○	-	○
20	ethyl-2,4-decadienoate	Citrus	-	○	-	-	-	○	○
21	hexanoic acid	Fermented	-	-	○	-	○	○	○
23	12-methyl tridecanal	Animalic	-	-	-	○	-	-	○
25	2-mercapto heptanol	Roast	○	-	-	○	-	-	○
29	3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone	Sweet burnt	-	-	-	-	-	-	-
30	4-ethyl-2-methoxy phenol	Smokey	-	○	-	○	-	○	○
32	N-(2-mercapto ethyl)-1,3-thiazolinin	Burnt	○	-	-	○	-	-	○
33	ethyl furaneol	Sweet burnt	○	-	-	○	-	-	○
34	4-ethyl phenol	Medical box	-	○	-	○	-	○	○
35	4-methoxy phenol	Phenol	-	-	-	-	-	-	-
36	γ-decalactone	Peach	-	-	-	-	-	-	○
38	δ-decalactone	Coconut	-	-	○	-	○	○	○
39	piperonal	Spicy	-	-	-	-	-	-	-
40	3-propyl phenol	Spicy	-	-	-	-	-	-	-
41	myristicin	Nutmeg	-	-	-	-	-	-	-
42	2,6-dimethoxy phenol	Smokey	-	-	-	-	○	-	○
43	unidentified	Smokey	-	-	-	-	-	-	-
44	γ-dodecalactone	Floral	-	-	○	-	○	○	○
47	2-phenyl acetate	Pollen	-	○	-	○	-	○	○
49	3-phenyl propionic acid	Floral	-	-	○	-	○	-	-

^aEach odorant was identified by comparing its RI on and mass spectrum obtained by GC-MS, as well as its odor quality as perceived during GC-O. ^bPresence or absence of compound at green tea extract fermented by isolated strains from Goishi tea. The abbreviations for inoculated strains into post-fermented tea were as follows, A: *Aspergillus niger*, P: *Pichia manshurica*, L: *Lactobacillus plantarum*, AP: *A. niger* and *P. manshurica*, AL: *A. niger* and *L. plantarum*, LP: *L. plantarum* and *P. manshurica* APL: three all isolated strains.

有し、均質な条件での試験が可能な茶浸出液を用いた。その結果、どのサンプルも茶浸出液とは特徴の異なる匂いを呈したため、微生物由来の香气成分の分析に支障がないと判断した。これらの試料より香气成分を抽出してGC-Oに供し、碁石茶にてFDファクターが2以上の寄与度を示した成分の有無について評価した。その結果、*A. niger*はエチルフラネオールおよびチアゾリン類を生産し、焦げやポップコーン様の香ばしさに関わる化合物の生成に寄与する傾向が確認された。エチルフラネオールは醤油や味噌の特徴香气成分として知られ、UEHARAら¹⁵⁾により*Aspergillus*属の発酵を経て、*Zygosaccharomyces rouxii*の産生するエノンオキシダーゼの作用により生成することが見出されている。そこで、*A. niger*が*Z. rouxii*のエノンオキシダーゼと相同性の高い酵素を生産する可

能性をNCBI Blastの情報にて検証したところ、*A. niger*は40.3%の相同性を示すタンパク質を分泌することが確認され^{15),16)}、碁石茶発酵過程において*A. niger*の分泌酵素によるエチルフラネオールの生成が推察された。

*P. manshurica*は主に4-エチルグアヤコールや4-エチルフェノールなどのフェノール性化合物、2-フェニル酢酸などエステル類およびアルコールを生産し、薬品様やスモーキー、フルーツ様、花様な香気に寄与する傾向が確認された。*P. manshurica*は中国山西省における酢の生産¹⁷⁾やワインへの混入菌¹⁸⁾として分離され、フェノール性化合物およびエステル類の生産能が高いと報告されている。また、茶葉中に存在する*p*-クマル酸およびフェルラ酸¹⁹⁾は耐塩性酵母のキナ酸デカルボキシラーゼおよびビニルフェノールレダクターゼの作用で4-エチルグア

ヤコールや4-エチルフェノールが形成される²⁰⁾ことが報告されている。

*L. plantarum*はカプロン酸など酸臭を呈する揮発性脂肪酸、 δ -デカラクトンなど甘い植物様の香調を示すラクトン類およびアセトインを特異的に生成した。カプロン酸など揮発性脂肪酸は紅茶にも含有され²¹⁾, *Lactobacillus*属乳酸菌はアミノ酸より揮発性脂肪酸を生産する²²⁾。一方、紅茶では脂肪酸合成または茶葉に含有されるヘキサナールやヘキサノールの酸化により生成される²³⁾ことから、同化合物群は両経路により複合的に生成されると考えられる。ラクトン類の生成についてみると、*L. plantarum*は β -酸化の関連遺伝子をもたない²⁴⁾ことから、不飽和脂肪酸が酵母などの β -酸化により短鎖化し、自身の産生する脂肪酸ヒドラーゼによりヒドロキシ脂肪酸が生産され、分子内エステル結合が形成されたと推測される^{25), 26)}。しかし、WILLIAMら²⁷⁾により*L. plantarum*はデセン酸およびドデセン酸などを生合成することが報告されており、碁石茶中のラクトン類は酵母による β -酸化依存的な経路および β -酸化を介さない*L. plantarum*単独の経路の両者によりにより生産されると考えられた。

2種以上の微生物を組み合わせる植菌した場合にのみ形成された香気成分は、いずれもFDファクターが4以下であった。このうち、GC-MSのピーク強度が大きかった2,6-ジメトキシフェノールは*L. plantarum*および*A. niger*の共存時に生産が認められた。島村ら⁴⁾は、碁石茶の発酵過程においてピロガロールが蓄積することを報告しており、2,6-ジメトキシフェノールはそのO-メチル化により生成したものと考えられた。プーアル茶(熟茶)は主要香気成分として類似構造の1,2,3-トリメトキシベンゼン含有²⁸⁾, その発酵過程では*A. niger*および*L. plantarum*が存在する碁石茶と類似の菌叢にて生産されることから²⁹⁾, 両者が発酵に関与する後発酵茶の特徴香気成分であると考えられる。

碁石茶の香気寄与成分のうち、緑茶と比較して香気寄与度が高かった(Z)-3-ヘキセノール, リナロール, ベンジルアルコールおよび2-フェニルエタノールは茶葉においてグルコースまたはプリメベロース配糖体として存在することが報告されている³⁰⁾。なお、これらの香気成分は阿波晩茶の製造工程において嫌氣的発酵後に顕著に増加することも報告されている⁹⁾。したがって、これらの香気成分は発酵過程において微生物の産生するグルコシダーゼによる加水分解により増加し、緑茶よりも高いFDファクターを示したと考えられた。高い香気寄与度を示した化合物のうち、フルフラール, フラネオールおよびマルトールは一般に単糖とタンパク質またはアミノ酸のメイラード反応により生成される³¹⁾。茶葉中には遊離アミノ酸および多糖類は豊富に含有されるが、低分子量の糖類は1から3.5%しか含まれない¹⁾。*A. niger*はセルロース, ヘミセルロースおよびペクチンなどの植物細胞壁の分解酵素を分泌し^{32), 33)}, その作用により発酵過

程に単糖を供給することで、メイラード反応を促進するものと考えられた。加えて*L. plantarum*は多種類の単糖および少糖類を、*P. manshurica*は主にグルコースを資化し増殖することから、*A. niger*による単糖などの生産は他の微生物の生育にも影響を与えると考えられた。

以上より、碁石茶の香気は発酵前の茶葉と各々の微生物の生産する香気成分により構成されることが明らかとなった。本研究における碁石茶の特徴香気成分の分析結果が、品質評価の指標としての役割を果たし、伝統的製法の維持・保存の一助となることが期待される。

要 約

本研究では、碁石茶の特徴香気成分とその形成に及ぼす微生物の作用について調査した。AEDA法による香気成分分析により、碁石茶の特徴香気成分は緑茶に含有された成分に加えて、酸臭を呈するカプロン酸および甘く香ばしい匂いを示すフルフラール, フラネオール, エチルフラネオールをはじめとした多様な香気を示す化合物により構成されることを明らかとした。さらに、発酵過程より単離した糸状菌*A. niger*, 酵母*P. manshurica*および乳酸菌*L. plantarum*によるエチルフラネオールおよびチアゾリン類, 4-エチルフェノールをはじめとするフェノール性化合物, アルデヒドおよびアルコール類およびカプロン酸や δ -デカラクトンなどカルボン酸やラクトン類の生産が認められた。以上より、碁石茶の特徴香気成分およびその生成において、*A. niger*, *P. manshurica*, *L. plantarum*の作用が重要であることを明らかとした。

謝 辞 本研究に試料提供のご協力をいただきました高知県長岡郡大豊町の小笠原章富氏および碁石茶協同組合の皆様にご心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 大森正司・阿南豊正・伊勢村護・加藤みゆき・滝口明子・中村羊一郎: 茶の事典 (朝倉書店, 東京), pp. 312~314 (2017)
- 2) YOKOTA, J., JOBU, K., YOSHIOKA, S., KASHIWAGI, T., SHIMAMURA, T., MORIYAMA, H., MURATA, S., OHISHI, M., UKEDA, H. and MIYAMURA, M.: The influence of Goishi tea on adipocytokines in obese mice, *Food Chem.*, **138**, 2210~2218 (2013)
- 3) ISHIDA, N., IZUKA, M., KATAOKA, K., OKAZAKI, M., SHIRAIISHI, K., YAGI, Y., JOBU, K., YOKOTA, J., OISHI, M., MORIYAMA, H., SHIMAMURA, T., MATSUMURA, M., UKEDA, H. and MIYAMURA, M.: Improvement of blood lipid profiles by Goishi tea polyphenols in a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical study, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **69**, 1465~3478 (2017)
- 4) 島村智子・柏木丈弘・松本結香・吉次香葉子・平岡あゆみ・山添智香子・森山洋憲・大石雅夫・宮村彦彦

- ・受田浩之：碁石茶に含まれる抗酸化成分の解明，日食保蔵誌，**43**，103~110 (2017)
- 5) 岡田早苗・高橋尚人・小原直弘・内村 泰・小崎道雄：碁石茶の発酵に関する微生物，日食科工，**43**，1019~1027 (1996)
- 6) 加藤みゆき・田村朝子・大森正司・難波敦子・宮川金二郎・西村 修・亀田 弥：碁石茶製造工程における風味成分の変化とその特徴，家政誌，**45**，527~532 (1994)
- 7) 川上美智子・小林彰夫・山西 貞：漬物茶碁石茶と阿波晩茶の香気特性，日農化誌，**61**，345~352 (1987)
- 8) 川上美智子・高梨豊明・桑原隆明：SPME法による後発酵茶の香気解明，香料，**261**，21~29 (2014)
- 9) STEINHAUS, M.: Characterization of the Major Odor-Active Compounds in the Leaves of the Curry Tree *Bergera koenigii* L. by Aroma Extract Dilution Analysis, *J. Agr. Food Chem.*, **63**, 4060~4067 (2015)
- 10) GROSCH, W.: Detection of potent odorants in foods by aroma extract dilution analysis, *Trends Food Sci. Technol.*, **4**, 68~73 (1993)
- 11) KOVÁTS, E.: Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Adv. Chromatogr.*, **1**, 229~247 (1965)
- 12) TORRIANI, S., FELIS, G. E. and DELLAGLIO, F.: Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 3450~3454 (2001)
- 13) KURTZMAN, C. P. and ROBNETT, C. J.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26 S) ribosomal DNA partial sequences, *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**, 331~371 (1998)
- 14) 重松洋子・下田満哉・箴島 豊：紅茶香気の比較分析，日食科工，**41**，768~777 (1994)
- 15) UEHARA, K., WATANABE, J., MOGI, Y. and TSUKIOKA, Y.: Identification and characterization of an enzyme involved in the biosynthesis of the 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone in yeast, *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 333~341 (2017)
- 16) RAAB, T. T., LÓPEZ-RÁEZ, J. A., KLEIN, D., CABALLERO, J. L., MOYANO, E., SCHWAB, W. and LÓPEZ-RÁEZ, J.: FaQR, Required for the Biosynthesis of the Strawberry Flavor Compound 4-Hydroxy-2, 5-Dimethyl-3(2H)-Furanone, Encodes an Enone Oxidoreductase, *Plant Cell*, **18**, 1023~1037 (2006)
- 17) ZHANG, Q., HUO, N., WANG, Y., ZHANG, Y., WANG, R. and HOU, H.: Aroma-enhancing role of *Pichia manshurica* isolated from Daqu in the brewing of Shanxi Aged Vinegar, *Int. J. Food Prop.*, **20**, 2169~2179 (2017)
- 18) SAEZ, J. S., LOPES, C. A., KIRS, V. E. and SANGORRÍN, M.: Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia, *Food Microbiol.*, **28**, 503~509 (2011)
- 19) JESZKA-SKOWRON, M. and ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, M.: Analysis of Antioxidant Activity, Chlorogenic Acid, and Rutin Content of *Camellia sinensis* Infusions Using Response Surface Methodology Optimization, *Food Anal. Methods*, **7**, 2033~2041 (2014)
- 20) 末沢保彦：耐塩性酵母によるフェルラ酸及び*p*-クマール酸の揮発性フェノール類への変換，日農化誌，**69**，1587~1596 (1995)
- 21) 熊沢賢二・増田秀樹・西村 修・加藤龍夫：熱水により抽出した紅茶香気に寄与する成分，日食科工，**45**，728~735 (1998)
- 22) NAKAE, T. and ELLIOTT, J. A.: Production of Volatile Fatty Acids by Some Lactic Acid Bacteria. II. Selective Formation of Volatile Fatty Acids by Degradation of Amino Acids, *J. Dairy Sci.*, **48**, 287~292 (1965)
- 23) KAMBA, A. G. S., RAMOS, C. L., FOKOU, E., DUARTE, W. F., MERCY, A., GERMAIN, K., DIAS, D. R. and SCHWAN, R. F.: In vitro determination of volatile compound development during starter culture-controlled fermentation of Cucurbitaceae cotyledons, *Int. J. Food Microbiol.*, **192**, 58~65 (2015)
- 24) WANIKAWA, A., HOSOI, K. and KATO, T.: Conversion of Unsaturated Fatty Acids to Precursors of γ -Lactones by Lactic Acid Bacteria during the Production of Malt Whisky, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **58**, 51~56 (2000)
- 25) KISHINO, S., PARK, S., TAKEUCHI, M., YOKOZEKI, K., SHIMIZU, S. and OGAWA, J.: Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing C=C double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **416**, 188~193 (2011)
- 26) FISHER, L. F. and FISHER, M.: Introduction of Organic Chemistry (MARUZEN CO. LTD., Tokyo), pp. 254~255 (1957)
- 27) O'LEARY, W. M.: Decenoic, Dodecenoic, and Tetradecenoic Acids in the Lactobacteriaceae, *Biochem.*, **8**, 1621~1627 (1965)
- 28) XU, Y., WANG, C., LI, S., LIU, S., ZHANG, C., LI, L.

- and JIANG, D.: Characterization of Aroma-Active Compounds of Pu-erh Tea by Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) and Simultaneous Distillation-Extraction (SDE) Coupled with GC-Olfactometry and GC-MS, *Food Anal. Methods*, **9**, 1188~1198 (2016)
- 29) SU, X., ZHANG, G., MA, Y., CHEN, M., CHEN, S., DUAN, S., WAN, J., HASHIMOTO, F., Lv, H., Li, J., Lin, Z. and Zhao, M.: Isolation, Identification and Biotransformation of Teadenol A from Solid State Fermentation of Pu-erh Tea and In Vitro Antioxidant Activity, *Appl. Sci.*, doi: 10.3390/app6060161 (2016)
- 30) WANG, D., YOSHIMURA, T., KUBOTA, K. and KOBAYASHI, A.: Analysis of Glycosidically Bound Aroma Precursors in Tea Leaves. 1. Qualitative and Quantitative Analyses of Glycosides with Aglycons as Aroma Compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5411~5418 (2000)
- 31) 宮澤陽夫:メイラード反応の機構・制御・利用 (シーエムシー出版, 東京), pp.169~175 (2016)
- 32) KANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. S., HONG, S. I. and KIM, S. W.: Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.*, **91**, 153~156 (2004)
- 33) COOKE, R. D., FERBER, E. M. and KANAGASABAPATHY, L.: Purification and characterisation of polygalacturonases from a commercial *Aspergillus niger* preparation, *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 440~451 (1976)
- (平成30年10月22日受付, 平成31年2月4日受理)
-