

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4495968号
(P4495968)

(45) 発行日 平成22年7月7日 (2010.7.7)

(24) 登録日 平成22年4月16日 (2010.4.16)

(51) Int. Cl.

F I

A 2 3 F 3/06 (2006.01)
A 2 3 F 3/16 (2006.01)A 2 3 F 3/06 S
A 2 3 F 3/06 T
A 2 3 F 3/16

請求項の数 9 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2003-557303 (P2003-557303)
 (86) (22) 出願日 平成14年12月25日 (2002.12.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2002/013560
 (87) 国際公開番号 W02003/056930
 (87) 国際公開日 平成15年7月17日 (2003.7.17)
 審査請求日 平成17年7月21日 (2005.7.21)
 (31) 優先権主張番号 特願2001-400731 (P2001-400731)
 (32) 優先日 平成13年12月28日 (2001.12.28)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

前置審査

(73) 特許権者 000216162
 天野エンザイム株式会社
 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 鶴喰 寿孝
 岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35
 号 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所
 内
 (72) 発明者 森 茂治
 岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35
 号 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所
 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 茶飲料の製造方法、及び茶飲料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

茶飲料用茶葉の製造工程である粗揉工程、揉捻工程、中揉工程、及び精揉工程の中から選択される一又は二以上の製造工程を、ペニシリウム・マルチカラー (Penicillium multicolor) 由来のジグリコシダーゼを添加して行う、ことを特徴とする茶飲料の製造方法。

【請求項 2】

茶飲料用茶葉より茶を抽出する際に又は抽出した茶に対して、ペニシリウム・マルチカラー (Penicillium multicolor) 由来のジグリコシダーゼを添加して酵素反応させる酵素処理工程、を含んでなる茶飲料の製造方法。

【請求項 3】

揉捻工程において、ペニシリウム・マルチカラー (Penicillium multicolor) 由来のジグリコシダーゼを添加する、ことを特徴とする茶飲料の製造方法。

【請求項 4】

前記茶飲料が、不発酵茶、半発酵茶、完全発酵茶、後発酵茶、又はこれら二以上のブレンド茶である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の茶飲料の製造方法。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の製造方法により製造された茶飲料。

【請求項 6】

10

20

茶飲料用茶葉の製造工程である粗揉工程、揉捻工程、中揉工程、及び精揉工程の中から選択される一又は二以上の製造工程を、ペニシリウム・マルチカラー (Penicillium multicolor) 由来のジグリコシダーゼを添加して行う、ことを特徴とする茶飲料用茶葉の製造方法。

【請求項 7】

揉捻工程において、ペニシリウム・マルチカラー (Penicillium multicolor) 由来のジグリコシダーゼを添加する、ことを特徴とする茶飲料用茶葉の製造方法。

【請求項 8】

前記茶飲料用茶葉が、不発酵茶、半発酵茶、発酵茶、後発酵茶、又はこれら二以上のブレンド茶用の茶葉である、請求項 6 又は 7 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 9】

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の製造方法により製造された茶飲料用茶葉。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、茶飲料及び茶飲料用茶葉の製造方法に関する。詳しくは、風味の改善された茶飲料及び該茶飲料用茶葉の製造方法に関する。本発明を緑茶、烏龍茶、紅茶など茶飲料の製造に適用することにより、優れたフレーバーの茶飲料を提供することができる。

背景技術

緑茶、烏龍茶等の原料茶葉には、種々の香気成分が含まれており、これらの香気成分が製造過程において抽出されることにより、原料茶葉及び加工処理の方法に応じた特有のフレーバーを有する茶飲料が得られる。茶の香気成分の中で、ゲラニオール、リナロール等、主としてアルコール系香気成分は前駆体である二糖配糖体のかたちで茶葉中に存在することが知られている（応用糖質科学 (J. Appl. Glycosci.) 第 45 巻 第 2 号 p. 123 - 129 (1998)）。一方で、茶葉にはこれらの二糖配糖体に作用して香気成分を遊離させる酵素である β - プリメベロシダーゼの存在が確認されており、茶の製造工程においてこの酵素が作用する環境がつくられることが、茶特有のフレーバー形成に重要な役割を果たしていると考えられている。茶葉由来の β - プリメベロシダーゼについては、その抽出・精製方法及び理化学的性質が報告されている（特開平 8 - 1460675）。

発明の開示

昨今のブームに象徴されるように、茶飲料に対する消費者ニーズは高く、特に、香りの豊富な、高品質の茶飲料を提供することが求められている。

ところで、茶飲料の製造過程において上記茶葉由来の β - プリメベロシダーゼを別途添加することにより、茶葉中に存在する香気成分の前駆体から香気成分を遊離させて茶飲料の風味改善を試みることも可能と考えられる。

しかしながら、茶葉由来の β - プリメベロシダーゼの作用できる基質の幅は狭く、当該酵素を別途添加したとしても一部の香気成分の前駆体に作用し得るのみで効果的あるいは効率的な香気の改善は期待できない。また、茶飲料の製造過程においては、もともと原料茶葉に内在する β - プリメベロシダーゼが作用することから、改めて茶葉由来の β - プリメベロシダーゼを添加、作用させたとしても、香気成分を効率的に引き出すことは望めない。例えば、紅茶の製造においては、当該酵素を失活する程の熱処理工程を経ることなく、萎凋、揉捻、発酵、乾燥といった一連の工程が行われる。従って、当該酵素が十分に作用する環境が製造過程中に存在することから、改めて茶葉由来の同種の酵素を添加したとしても風味の改善はほとんど望めないものと考えられる。

一方、茶葉由来の β - プリメベロシダーゼを調製するためには、生茶葉を出発原料とし、粉碎工程、各種抽出工程、精製工程などを行う必要があることから、調製にかかる工程が煩雑であることはもとより、大量に調製することが困難である。また、出発原料となる生茶葉の種類によって含まれる酵素量、酵素活性などが異なることから、均質な酵素を安定して供給することは難しい。

10

20

30

40

50

本発明は以上の課題に鑑みなされたものであり、その目的とするところは、より一層の風味の改善がなされた茶飲料の製造方法を提供することである。特に、茶葉由来のβ-プリメペロシダーゼでは引き出すことができない香気成分を引き出し、もって優れた風味を有する茶飲料を製造する方法を提供することを目的とする。また、風味の改善がなされた茶飲料を、生産性良く、かつ安定した品質で製造する方法を提供することを目的とする。更には、これらの茶飲料の製造に利用できる茶飲料用茶葉を提供することを目的とする。

以上の目的の下、本発明者らは鋭意検討を重ねた。その結果、微生物由来のジグリコシダーゼを茶飲料の製造工程において添加、作用させることにより、茶の香気成分を効率的に引き出すことができ、極めて優れたフレーバーの茶飲料を製造できることがわかった。本発明はかかる知見に基づくものであり、その構成は次の通りである。

10

〔１〕 微生物由来のジグリコシダーゼを作用させる酵素処理工程、を含んでなる茶飲料の製造方法。

〔２〕 前記酵素処理工程が、茶飲料用茶葉の製造工程の一部に微生物由来のジグリコシダーゼを添加して行うことからなる、〔１〕に記載の製造方法。

〔３〕 前記製造工程の一部が、粗揉工程、揉捻工程、中揉工程、及び精揉工程の中から選択される一又は二以上の工程である、〔２〕に記載の製造方法。

〔４〕 前記酵素処理工程が、茶飲料用茶葉より茶を抽出する際に又は抽出した茶に対して、微生物由来のジグリコシダーゼを添加して酵素反応させることからなる〔１〕に記載の製造方法。

〔５〕 揉捻工程において、微生物由来のジグリコシダーゼを添加する、ことを特徴とする茶飲料の製造方法。

20

〔６〕 前記ジグリコシダーゼがペニシリウム・マルチカラー（*Penicillium multicolor*）由来である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の製造方法。

〔７〕 前記ジグリコシダーゼがアスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）由来である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の製造方法。

〔８〕 前記茶飲料が、不発酵茶、半発酵茶、完全発酵茶、後発酵茶、又はこれら二以上のブレンド茶である、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の茶飲料の製造方法。

〔９〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の製造方法により製造された茶飲料。〔１０〕 微生物由来のジグリコシダーゼの作用により風味が改善された茶飲料。

〔１１〕 微生物由来のジグリコシダーゼを茶葉に作用させる酵素処理工程、を含んでなる茶飲料用茶葉の製造方法。

30

〔１２〕 前記酵素処理工程が、茶飲料用茶葉の製造工程の一部に微生物由来のジグリコシダーゼを添加して行うことからなる、〔１１〕に記載の製造方法。

〔１３〕 前記製造工程の一部が、粗揉工程、揉捻工程、中揉工程、及び精揉工程の中から選択される一又は二以上の工程である、〔１２〕に記載の製造方法。

〔１４〕 揉捻工程において、微生物由来のジグリコシダーゼを添加する、ことを特徴とする茶飲料用茶葉の製造方法。

〔１５〕 前記ジグリコシダーゼがペニシリウム・マルチカラー（*Penicillium multicolor*）由来である〔１１〕～〔１４〕のいずれかに記載の製造方法。

40

〔１６〕 ジグリコシダーゼがアスペルギルス・フミガタス（*Aspergillus fumigatus*）由来である〔１１〕～〔１４〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１７〕 前記茶飲料用茶葉が、不発酵茶、半発酵茶、発酵茶、後発酵茶、又はこれら二以上のブレンド茶用の茶葉である、〔１１〕～〔１６〕のいずれかに記載の製造方法。

〔１８〕 〔１１〕～〔１７〕のいずれかに記載の製造方法により製造された茶飲料用茶葉。

〔１９〕 微生物由来のジグリコシダーゼの作用により風味が改善された茶飲料用茶葉。

〔２０〕 微生物由来のジグリコシダーゼが添加されてなる茶飲料用茶葉。

〔２１〕 茶飲料を濃縮した液状又は粉状組成物と、微生物由来のジグリコシダーゼと、を含むインスタント茶。

50

以上の製造方法では、製造過程において微生物由来のジグリコシダーゼが茶葉に含まれる香気成分の前駆体（二糖配糖体）に作用することにより、香気成分が引き出され、風味が改善された、換言すれば風味豊かな茶飲料或いはその製造に利用できる茶飲料用茶葉を得ることができる。また、本発明で用いられる微生物由来のジグリコシダーゼは、茶葉に含まれる同種の酵素（ β -プリメベロシダーゼ）に比較して作用できる基質の幅が広く、即ち当該酵素（ β -プリメベロシダーゼ）が作用できない基質である香気成分の前駆体（二糖配糖体）に対しても作用できる。従って、このような香気成分の前駆体から香気成分を引き出し、以って効果的かつ効率的な風味の改善を行うことができる。

また、微生物由来の酵素を採用することにより、均質な酵素を大量に調製することが可能となるから、酵素反応を再現性良く行うことができる。したがって、製造ロットによって風味にばらつきが生ずることを防止でき、より品質の安定した茶飲料の製造が可能となる。

10

さらに、微生物由来のジグリコシダーゼは熱安定性に優れるため、作用可能な温度帯が広く、製造工程上有利なものとなる。

本明細書において、「風味の改善」は風味の増強を含む用語として用いられ、茶飲料中に存在する香気成分の量が増え、風味が豊かなものになることをいう。例えば、新鮮香や甘い香りが増強された状態になることが含まれる。尚、本明細書における「風味の改善」には、ある特定の香気成分の量が増強されることによって間接的に他の香気成分の感じられ方が変化し、以って全体から受ける香気の影響が変化することとも含まれる。

一方、本明細書において「通常の製造工程」といった場合には、本発明における酵素処理工程が含まれない製造工程を意味する。従って、一般的に行われている茶飲料用茶葉又は茶飲料の製造工程に限らず、特定の茶飲料用茶葉又は茶飲料（例えば、フレーバーを添加した茶飲料など）を製造するために行われている製造工程も通常の製造工程の概念に含まれる。同様に、本明細書において「通常の製造方法」といった場合には、一般的に行われている茶飲料用茶葉又は茶飲料の製造方法に限らず、特定の茶飲料用茶葉又は茶飲料を製造するために行われている製造方法も含まれる。尚、本明細書では、水ないしは熱湯による抽出によって茶飲料を提供できる茶葉のことを茶飲料用茶葉と呼び、摘採されたのみで未加工の茶葉や加工途中の茶葉などと区別する。

20

尚、本明細書において単にジグリコシダーゼと表記した場合には、微生物由来のジグリコシダーゼを意味する。また、本明細書において特に記載のない場合には、パーセント（％）は％（W/V）を意味する。

30

発明を実施するための最良の形態

本発明の一つは茶飲料の製造方法に関し、微生物由来のジグリコシダーゼを作用させる酵素処理工程（以下、略称して「酵素処理工程」ともいう）、を含んでなることを特徴とする。

本発明が適用される茶飲料の種類は特に限定されず、本発明の茶飲料には煎茶、玉露、抹茶、番茶、焙じ茶、及び玄米茶等の不発酵茶（緑茶）、烏龍茶、及び包種茶等の半発酵茶、紅茶等の完全発酵茶、並びに阿波番茶、だん茶、黒茶、碁石茶、及びプーアル茶等の後発酵茶が含まれる。また、これらの中から任意に選択される二つ以上の茶を混合して得られるブレンド茶（即ち、原料茶葉及び／又は製造工程が異なる茶飲料をブレンドして得られる茶）も本発明における茶飲料に含まれる。最終製品（茶飲料）をブレンドして得られるものに限らず、原料茶葉を混合することにより、或いは製造途中の中間品をブレンドすることにより得られるものも、ここでのブレンド茶に包含される。更には、香料や果汁、乳製品などを別途に添加したフレーバーティー、フルーツティーなども本発明における茶飲料に含まれる。

40

本発明においてジグリコシダーゼとは、糖鎖加水分解酵素に分類される酵素であって、配糖体を構成している糖以外の化合物（以下「アグリコン」という。）と単一あるいは複数の種類の糖類より構成された直鎖および分岐糖鎖とが糖鎖の水酸基を介して結合したいわゆる配糖体を基質とする事ができ、二糖単位で基質を認識して切断しアグリコンを生成する酵素をいう。

50

本発明で使用可能な微生物由来のジグリコシダーゼとしては、例えば、ジグリコシダーゼ活性が確認されているアスペルギルス (*Aspergillus*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、リゾプス (*Rhizopus*) 属、リゾムコール (*Rhizomucor*) 属、タラロマイセス (*Talaromyces*) 属、モルチエレラ (*Mortierella*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、アクチノプラネス (*Actinoplanes*) 属等の様々な微生物が生産するジグリコシダーゼを挙げることができる。

より好適な微生物由来のジグリコシダーゼとしては、ジグリコシダーゼ生産能が確認されているアスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IFO 4407 (入手先 財団法人 発酵研究所 大阪市淀川区十三本町2-17-85)、アスペルギルス ニガー (*Aspergillus niger*) IAM 2020、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) IAM 2046、ペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM 7153 (入手先 東京大学分子細胞生物学研究所 東京都文京区弥生1-1-1) が生産するジグリコシダーゼが挙げられる。

特に好ましい微生物由来のジグリコシダーゼとしては、ペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM 7153 株が生産するジグリコシダーゼである。ペニシリウム・マルチカラー由来の β -ガラクトシダーゼは食品添加物リストに掲載されている安全性の認められている酵素であり、かかる安全性の高い菌から生産されるジグリコシダーゼについても高い安全性が推測される。

上述した各種微生物などを用いてジグリコシダーゼを製造するためには、当該微生物の培養に適合した方法や条件を適宜設定できる。例えば、上述した各種菌株の培養法としては液体培養法、固体培養法の何れも採用できるが、液体培養法が好適である。液体培養は、例えば、以下のように行うことができる。

培地としては、ジグリコシダーゼを生産する微生物が生育可能な培地であれば、如何なるものでも良い。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、あるいは、ペプトン、酵母エキス、コーンステイープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものをを用いることができる。

更に、ジグリコシダーゼを生産蓄積せしめるために培地に各種の誘導物質を添加することができる。誘導物質としては例えば糖類が使用でき、好ましくはゲントース (例えば、ゲントース # 80、日本食品化工株式会社)、ゲンチオビオース、ゲンチオオリゴ糖 (例えば、ゲンチオオリゴ糖、和光純薬工業株式会社)、ガラクトマンナン等が利用できる。これらの誘導物質の添加量は目的とするジグリコシダーゼの生産能が増大される量であれば特に限定されないが、好ましくは 0.01 ~ 10 % が添加される。

培地の pH は例えば約 3 ~ 8、好ましくは約 5 ~ 6 程度に調整し、培養温度は通常約 10 ~ 50、好ましくは約 25 ~ 30 程度で、1 ~ 15 日間、好ましくは 4 ~ 7 日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターによる好氣的深部培養法が利用できる。しかしながら、上述した各種の培養条件などは培養する対象である微生物や細胞により適宜変更され、本発明のジグリコシダーゼが生産される条件であれば、その条件等は限定されない。

得られた培養液からジグリコシダーゼを単離精製するには、ジグリコシダーゼ活性を指標として、遠心分離、UF 濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを組み合わせ、常法により処理して、精製したジグリコシダーゼを得ることができる (参考文献 蛋白質・酵素の基礎実験法、堀尾 武一著、南江堂)。本発明において、微生物由来のジグリコシダーゼは上述のジグリコシダーゼを生産する微生物を培養した培養液そのままでも利用できる。もちろん本培養液は本発明の使用目的に応じてその精製度合いを適宜変

10

20

30

40

50

更することができ、例えば、後記の実施例 1 に記載の粗ジグリコシダーゼも精製ジグリコシダーゼと同等の効力あるものとして本発明に用いることができる。

以上の方法によって得られる微生物由来のジグリコシダーゼは、茶葉由来の β - プリメベロシダーゼが作用することができない二糖配糖体からも香気成分を引き出すことができ、優れた風味改善効果が期待できる。

本発明の酵素処理工程を、通常茶飲料の製造工程の一部と同時に行うことが好ましい。別途酵素処理工程を設ける必要がなく、製造効率の向上が図られるからである。例えば、緑茶飲料の一般的な製造工程は摘採、蒸熱、粗揉、揉捻、中揉、精揉、乾燥（以上、茶飲料用茶葉の製造工程）及び抽出の各工程からなり、これらのいずれか又は複数の工程をジグリコシダーゼを添加した状態で行うことができる。また、烏龍茶などの半発酵茶の一般的な製造工程は、摘採、日干萎凋、室内萎凋・攪拌、炒葉、揉捻、玉解、乾燥（以上、茶飲料用茶葉の製造工程）及び抽出の各工程からなり、これらのいずれか又は複数の工程をジグリコシダーゼを添加した状態で行うことができる。同様に、紅茶などの完全発酵茶の一般的な製造工程は、摘採、萎凋、揉捻、発酵、乾燥（以上、茶飲料用茶葉の製造工程）及び抽出の各工程からなり、これらのいずれか又は複数の工程をジグリコシダーゼを添加した状態で行うことができる。

以上のように茶飲料の製造工程の一部を、ジグリコシダーゼを添加した状態で行うことにより、当該工程において本来の加工処理とジグリコシダーゼによる酵素処理が同時に行われる。

ここで、酵素処理に供する工程として、緑茶の場合には粗揉、揉捻、中揉、及び粗揉のいずれか（又は複数）を選択することが好ましい。中でも、茶葉組織の一部が破砕されて酵素が作用しやすい状態であること、加工温度が酵素処理に適していること、及び工程中は常に攪拌された状態であってジグリコシダーゼが均等に分散しやすいことなどの理由から、揉捻工程及び／又は中揉工程においてジグリコシダーゼを添加して酵素処理を行うことが好ましい。特に好ましくは、揉捻工程においてジグリコシダーゼを添加して酵素処理を行う。同様の理由から、烏龍茶などの半発酵茶の場合には日干萎凋、室内萎凋・攪拌、揉捻、玉解のいずれか（又は複数）を酵素処理に供する工程として選択することが好ましく、揉捻工程及び／又は玉解工程を選択することがさらに好ましい。中でも揉捻工程を選択することが特に好ましい。同様に、紅茶などの前発酵茶の場合には揉捻工程及び／又は発酵工程を酵素処理に供する工程として選択することが好ましい。

尚、上記のように通常茶飲料の製造工程の一部を、ジグリコシダーゼを添加した状態で行う場合には、当該工程の最初にジグリコシダーゼを添加する必要は必ずしもなく、当該工程中の適当な時期にジグリコシダーゼを添加しても良い。このようにすれば酵素の作用時間を調節でき、所望の風味改善を行うことが可能となる。尚、酵素処理を行う際には、酵素反応が良好に行われるように当該工程における加工温度を調整することができる。

一方、本発明における酵素処理工程を独立した工程として行うこともできる。他の工程と同時に酵素処理工程を行う場合には、酵素の添加が当該他の工程の加工処理効率などを与える影響を場合によって考慮する必要があるが、酵素処理工程を独立させることにより、このような影響を考慮する必要がなくなる。このことは、酵素処理工程において好ましい温度条件、pH 条件などを自由に設定できることを意味し、効率的な酵素処理を可能とする。

酵素処理工程を独立した工程として行う場合には、例えば、上記の一般的な製造工程の（緑茶の場合は摘採、蒸熱、粗揉、揉捻、中揉、精揉、乾燥及び抽出の各工程、烏龍茶などの半発酵茶の場合は、摘採、日干萎凋、室内萎凋・攪拌、炒葉、揉捻、玉解、乾燥及び抽出の各工程、紅茶などの完全発酵茶の一般的な製造工程は、摘採、揉捻、発酵、乾燥及び抽出の各工程）のいずれか又は複数の工程の前あるいは後に酵素処理工程を行うことができる。

加工処理した茶葉（茶飲料用茶葉）より茶を抽出する工程（抽出工程）においてジグリコシダーゼを添加して酵素処理を行うことができる。ここで、抽出工程を高温の湯を用いて行う場合には、酵素の失活を防いで良好な酵素反応を進めるように、抽出液の温度がジグ

10

20

30

40

50

リコシダーゼの失活する温度より低くなった後にジグリコシダーゼを添加して酵素反応を行うことが好ましい。例えば、抽出液の温度が約60以下になった後にジグリコシダーゼを添加して酵素反応（酵素処理工程）を行うことが好ましい。また、酵素処理が効率的に行われるように、ジグリコシダーゼを添加した抽出液を、酵素反応に適した温度に所定時間維持することが好ましい。一方、一連の茶飲料の製造工程（例えば、緑茶の場合には摘採、蒸熱、粗揉、揉捻、中揉、精揉、乾燥及び抽出工程）の結果得られる抽出液（茶飲料）をスプレイドライやフリーズドライなどによって一旦乾燥処理したものを、水などの溶媒に溶解して得られる溶液にジグリコシダーゼを添加して酵素処理を行うこともできる。

また、例えば市販の茶葉（ティーバッグを含む）などの抽出液にジグリコシダーゼを添加して本発明における酵素処理を行い、風味の改善を行うこともできる。

酵素処理工程の後の適当な時期に、添加したジグリコシダーゼの作用を停止させるべく熱処理を行うことが好ましい。例えば、70で30分加熱処理することにより、ジグリコシダーゼを失活させることができる。かかる熱処理は、通常の茶飲料の製造過程における乾燥工程などで代替することができる。尚、酸又はアルカリを添加してpHを変化させることによってジグリコシダーゼの作用を停止させることができる。

ジグリコシダーゼの添加は、液状又は粉体状に調製した上述のジグリコシダーゼ粗酵素又は精製酵素を茶葉に直接添加することにより行うことができる。茶葉の加工処理工程において添加する場合には、茶葉全体にムラなく添加して効率的な酵素反応が行われるように、例えば液状のジグリコシダーゼ粗酵素又は精製酵素を噴霧によって添加することが好ましい。

本発明の酵素処理工程における、微生物由来のジグリコシダーゼの使用量は、必要とされる風味改善の程度、酵素処理工程における茶葉の状態などを考慮して適宜定めることができる。茶葉の加工過程（茶飲料用茶葉の製造過程）において酵素処理を行う場合には、例えば茶葉100gに対して0.01～100000単位、好ましくは2.0～10000単位、更に好ましくは15～3000単位のジグリコシダーゼを使用することができる。また、茶飲料用茶葉より茶を抽出する際、或いは抽出した茶に対して酵素処理を行う場合には、使用する茶飲料用茶葉の量によっても変動するが、例えば抽出する茶100mlに対して0.01～50000単位、好ましくは1.0～5000単位、更に好ましくは5.0～1000単位のジグリコシダーゼを使用することができる。尚、この場合においても、抽出に供する茶飲料用茶葉の量を基準として酵素の使用量を設定することもできる。尚、ジグリコシダーゼの使用量が少な過ぎる場合には、目的とする風味改善効果が十分に得られない恐れがあり、逆に多すぎる場合には製造コストが上昇することはもとより、ジグリコシダーゼ中に存在する夾雑物の作用および味によって却って風味を損なう恐れがあるため好ましいものとはいえない。

ジグリコシダーゼを添加して作用させる場合の温度は、通常20～70、好ましくは30～65、より好ましくは40～60、特に好ましくは50～55である。作用させる温度が前記の通常の範囲より低い場合にはジグリコシダーゼの作用が十分発揮されず風味改善効果が得られにくく、前記の通常の範囲より高い場合には、ジグリコシダーゼの失活が生じ易くなると共に茶葉中の成分が熱変性を受けて変性し、これに起因して風味が劣化する可能性がある。

一方、ジグリコシダーゼを作用させるpHは、通常2.0～8.0、好ましくは3.0～7.0、より好ましくは4.0～6.0、特に好ましくは4.5～5.5である。作用させるpHが前記の通常の範囲より低い場合或いは高い場合にはジグリコシダーゼの作用が十分発揮されず風味改善効果が得られにくく、また茶葉中の成分が変性を受けやすくなり、これに起因して風味が劣化する可能性がある。

以上では、微生物由来のジグリコシダーゼによる酵素処理工程を行うことを特徴とする茶飲料の製造方法について説明したが、上記の製造方法において、抽出工程前までの工程（ジグリコシダーゼによる酵素処理工程を含む）によれば、抽出した際に風味の改善された茶飲料が得られる茶飲料用茶葉の製造方法（本発明の他の局面）が提供されることとなる

10

20

30

40

50

。

一方、通常の製造工程に従って加工処理された茶飲料用茶葉に、上記の微生物由来ジグリコシダーゼを添加したものを、風味が改善された茶飲料用茶葉として利用することができる。例えば、上述の一般的な製造方法に従って製造された、緑茶、烏龍茶、又は紅茶などの茶葉にジグリコシダーゼを含む溶液を添加し、必要に応じて乾燥させる。このような加工処理がされた茶葉を用いて、酵素が失活しない条件で抽出操作を行えば、抽出の際にジグリコシダーゼが茶葉中又は茶葉から抽出された香気成分の前駆体に作用し、抽出液（茶飲料）中に香気成分を生成させることができる。

また、通常の製造方法によって製造された茶飲料を濃縮して得られる液状又は粉状組成物に、上記微生物由来のジグリコシダーゼを添加することにより、希釈又は溶解したときに風味が改善された茶飲料が得られる、いわゆるインスタント茶を構成することもできる。以下に、本発明を、実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例のみに限定されるものではない。

[実施例 1] 微生物由来ジグリコシダーゼの調製

(1 - 1) ペニシリウム・マルチカラー (*Penicillium multicolor*) IAM 7153 株を用いたジグリコシダーゼの培養

2.0 % の脱脂大豆、3.0 % ブドウ糖、0.5 % リン酸二水素カリウム、0.4 % 硫酸アンモニウム、0.3 % 乾燥酵母を含む生育培地 (pH 5.6) を 121 で 20 分間殺菌した。殺菌した培地 100 mL に対して生産菌を 1 エーゼ接種し、27、140 min⁻¹ の振とう速度で前培養を行った。5 日後、1.0 % サンファイバー R、2.0 % リン酸二水素カリウム、1.0 % 硫酸アンモニウム、3.13 % ミースト P1G を含む pH 4.9 の本培地 20 L を 30 L 容のジャーファーマンターにて、150 min⁻¹ で攪拌しながら 121 で 20 分間殺菌した。この本培養培地に前記の前培養の培地を 1.5 % (v / v) で接種し、攪拌数 250 min⁻¹、通気量 0.75 vvm (15 L / min)、内圧 0.5 Kg / cm² (48 kPa)、27 ± 1 で 8 日間培養した。

(1 - 2) ジグリコシダーゼの精製

培養ブロスに濾過助材としてゼムライトスーパー 56 M とファインフロー A をそれぞれ全液量の 2 % を添加し、珪藻土ろ過を行った。限外濾過膜 UF AIP - 2020 (MW 6,000) で 20 倍濃縮を行うとともに、pH 4.7 の 20 mM 酢酸緩衝液で置換した。これを無菌ろ過し、凍結乾燥したものを粗ジグリコシダーゼとした。上記限外濾過濃縮液に硫酸アンモニウムを添加し、50 % 飽和硫酸塩析を行った。得られた沈殿を除去し、上清に更に硫酸を添加して 80 % 飽和硫酸塩析を行った。沈殿を回収し、pH 4.7 の 20 mM 酢酸緩衝液に溶解した。溶解液を 10 - DG カラム (BioRad Co.) に通し、緩衝液を 30 % 飽和硫酸アンモニウムを含む pH 4.7 の 20 mM 酢酸緩衝液に交換した。この溶液を疎水クロマトグラフィー (Hi Load 16 / 10 Phenyl Sepharose High Performance (Pharmacia)) にアプライし、ジグリコシダーゼ活性を示す画分を β - グリコシダーゼおよび β - キシロシダーゼ活性の画分と分離させた。室温にて、2 mL / min の流速で 30 % 飽和硫酸を含む 20 mM 酢酸緩衝液で溶出を開始し、30 - 0 % 飽和硫酸の直線勾配によって溶出した。10 - 12.5 % 飽和硫酸濃度でジグリコシダーゼ活性を示す画分が溶出された。回収したジグリコシダーゼ画分を濃縮し、遠心分離した上清を 10 - DG カラムにかけて溶解液を pH 7.1 の 25 mM トリス塩酸緩衝液に交換した。この液を等電点クロマトグラフィー (Mono - P HR 5 / 20 (Pharmacia)) にアプライし、pH 5.0 のポリバッファー 74 で 1 mL / min、室温で溶出を開始した。目的のジグリコシダーゼ活性は、pH 6.2 から pH 6.3 で溶出した。この画分の SDS 電気泳動でシングルバンドが得られたことから、ジグリコシダーゼが精製できたことが示された。以下、該ジグリコシダーゼを精製ジグリコシダーゼともいう。

(1 - 3) ジグリコシダーゼ活性測定法

自動化学分析装置 (東芝社製、TBA - 30R) を用い、ジグリコシダーゼサンプル 30 μL をパラニトロフェニル (pNP) プリメベロシドを 2 mM となるように酢酸緩衝液 (

10

20

30

40

50

pH 5.5) に溶解せしめたもの 200 μ L と混合し、40 、サイクルタイム 22.5 秒で 9.75 分間反応させた後、炭酸ナトリウム 250 μ L を加え 412 nm の吸光度を測定する。サンプル由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) を用いて同様に測定する。この条件下で吸光度を 1 上昇させる酵素量を 1 単位とする。

上記 pNP - プリメベロシドは、pNP - グルコシド (メルク社製) とキシロオリゴ糖 (和光純薬社製) を酵素キシロシダーゼ (シグマ社製) を用いて反応させ、pNP - グルコシドにキシロースを β - 1, 6 結合で 1 残基転移させることにより合成した。

【実施例 2】緑茶に対する風味改善効果の評価

(2 - 1) 機器分析による評価

10

(1) 緑茶抽出液の調製

茶葉 (おーいお茶 (商品名、釜煎り緑茶、伊藤園株式会社製)) 2 g に沸騰水 50 mL を添加し、1 分間煮出した。これをろ過 (No. 2 の濾紙) して不溶性成分を除去し、得られたる液を緑茶葉抽出液とした。

一方、煎茶ティーバッグ (日本茶販売株式会社製)、1 パック (2 g) に沸騰水 50 mL を添加し、30 秒間煮出した。これをろ過 (No. 2 の濾紙) して不溶性成分を除去し、得られたる液をインスタント緑茶抽出液とした。

(2) 緑茶抽出液 (緑茶葉抽出液、インスタント緑茶抽出液) の酵素処理

緑茶葉抽出液 20 mL に対し、実施例 1 で調製したジグリコシダーゼを添加して酵素処理を行った。処理条件は 55 、3 時間とした。粗ジグリコシダーゼを添加する群及び精製ジグリコシダーゼを添加する群を設けた。粗ジグリコシダーゼ群は添加量の違いによって 4 区分 (添加量 5.2 ~ 1040 単位) とし、精製ジグリコシダーゼ群は 1 区分 (添加量 52 単位) とした。また、ジグリコシダーゼを添加しない群 (無添加) を対照として用いた。

20

(3) 香気成分の測定、評価

酵素処理後、各抽出液中における香気成分の同定をガスクロマトグラフィー / マススペクトロメトリー (GC / MS、製品番号「HP6890 GC / HP5973 MSD」、Agilent Technologies 社製) により行った。測定結果を以下の表 1、2 に示す。

(緑茶葉抽出液)

30

【表 1】

緑茶葉抽出液

ジグリコシダーゼ活性(単位)						化合物名
粗酵素			精製酵素		無添加	
1040	520	52	5.2	52		
167414	135694	61920	N.D.	60284	N.D.	Limonene
∞	∞	∞	-	∞	-	
2053147	2328978	1204867	1255739	1227035	268396	(Z)-3-Hexenol
7.6	8.7	4.5	4.7	4.6	1.0	
142494	155832	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(Z)-Linalool oxide
∞	∞	-	-	-	-	
212238	187823	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(E)-Linalool oxide
∞	∞	-	-	-	-	
2918597	3044243	3083261	2902877	2918035	682886	Benzaldehyde
4.3	4.5	4.5	4.3	4.3	1.0	
5539577	3807528	736214	428046	730894	311131	Linalool
17.8	12.2	2.4	1.4	2.3	1.0	
323270	289633	87635	67537	84923	44893	Geranial
7.2	6.5	2.0	1.5	1.9	1.0	
423636	595017	284143	N.D.	277301	N.D.	Geraniol
∞	∞	∞	-	∞	-	
223523	265916	126717	77061	126230	N.D.	Methyl salicylate
∞	∞	∞	∞	∞	-	
927722	986077	720496	277357	700835	N.D.	Benzyl alcohol
∞	∞	∞	∞	∞	-	
274011	247049	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Phenyl ethyl alcohol
∞	∞	-	-	-	-	

表中の数値は、上段がピーク面積、下段が無添加に対する比率を示す。N . D . は検出限界以下を表す。

表1に示されるように、粗ジグリコシダーゼ群、精製ジグリコシダーゼ群ともに各香気成分量が上昇している。従って、ジグリコシダーゼの添加によって緑茶抽出液中の香気成分を引き出し、風味の改善を行えることがわかる。尚、精製ジグリコシダーゼで処理した場合と、同活性のジグリコシダーゼを含む粗ジグリコシダーゼで処理した場合において、各香気成分の増加量がほぼ同等であり、ジグリコシダーゼが香気成分の増加作用の中心的役割を果たしていることが示される。尚、ジグリコシダーゼの添加量によって香気成分の増加量が異なることから（粗ジグリコシダーゼ群）、ジグリコシダーゼの添加量を調節すれば各香気成分量を変化させることができ、もって様々な香気バランスを有する緑茶飲料を製造可能なことが示唆される。

尚、(Z)-3-Hexenolは青葉アルコールと呼ばれ、若葉のさわやかな青香をイメージさせるものである。Linalool oxideは、さわやかなみつ葉をイメージさせる。Linalool、Geraniol、Benzyl alcohol、及びPhenyl ethyl alcoholは、いずれも花の香りをイメージさせる化合物であり、Linaloolはスズラン系の花香、GeraniolおよびPhenyl ethyl alcoholはバラの花香、Benzyl alcoholはヒヤシンス様・ジャスミン様の香りをイメージさせることが知られている。Methyl salicylateは、紅茶の主要香気成分の一つである。Geranialは、グレープフルーツやオレンジ、レモンなどの柑橘系果実の香気成分として知られている。

(インスタント緑茶抽出液)

【表2】

インスタント緑茶抽出液における効果

ジグリコシダーゼ活性(単位)					化合物名
粗酵素		精製酵素		無添加	
260	52	5.2	52	無添加	
189147	74826	N.D.	25865	N.D.	Limonene
∞	∞	—	∞	—	
196777	149273	88587	145590	129312	(Z)-Ocimene
1.5	1.2	0.7	1.1	1.0	
256343	126500	N.D.	112054	N.D.	(E)-Ocimene
∞	∞	—	∞	—	
98707	50486	44987	24376	N.D.	Terpinene
∞	∞	∞	∞	—	
1240725	805631	647029	81013	131150	(Z)-3-Hexenol
9.5	6.1	4.9	0.6	1.0	
92179	88041	77512	66032	N.D.	(Z)-Linalool oxide
∞	∞	∞	∞	—	
125566	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	(E)-Linalool oxide
∞	—	—	—	—	
1110157	948648	809582	935422	73453	Benzaldehyde
15.1	12.9	11.0	12.7	1.0	
3273642	586348	120651	505246	44905	Linalool
72.9	13.1	2.7	11.3	1.0	
419112	306721	36569	215301	33502	Geranial
12.5	9.2	1.1	6.4	1.0	
150382	243367	46020	220124	24142	Methyl salicylate
6.2	10.1	1.9	9.1	1.0	
474802	611881	73458	574231	59488	Geraniol
8.0	10.3	1.2	9.7	1.0	
433322	334208	214609	328145	N.D.	Benzyl alcohol
∞	∞	∞	∞	—	

表中の数値は、上段がピーク面積、下段が無添加に対する比率を示す。N . D . は検出限界以下を表す。

表2に示されるように、インスタント緑茶抽出液においても、ジグリコシダーゼの添加によって多くの香気成分の量が増加した。従って、ジグリコシダーゼによる酵素処理はインスタント緑茶抽出液に対しても有効であり、即ちジグリコシダーゼの添加によって効果的な風味の改善を行えることがわかる。ここで、一般に、本実施例で用いたティーバッグ等のインスタント緑茶は香りに乏しいことが指摘されている。従って、上記の風味改善効果はこのようなインスタント緑茶に対して極めて有効なものであり、インスタント緑茶において緑茶の主要香気を増強させることでその風味を改善し、ひいては茶葉製品の香気品質に近づけることが可能となる。

(2-2) パネラーによる官能評価

(1) 緑茶抽出液の調製

茶葉(おーいお茶(商品名、釜煎り緑茶、伊藤園株式会社製))4gを急須にいれ、約400mLの熱水(約90℃)を注いだ。そして、約40秒間(2、3回まわしつつ)浸出させて得られたものを緑茶葉抽出液とした。

一方、煎茶ティーバッグ(日本茶販売株式会社製)、1パック(2g)を容器に入れ、約200mLの熱水(約90℃)を注いだ。そして、約40秒間(2、3回まわしつつ)浸出させて得られたものをインスタント緑茶抽出液とした。

(2) 緑茶抽出液(緑茶葉抽出液、インスタント緑茶抽出液)の酵素処理

緑茶葉抽出液20mLに対し、実施例1で調製したジグリコシダーゼを添加して酵素処理を行った。処理条件は55℃、3時間とした。粗ジグリコシダーゼを添加する群及び精製

ジグリコシダーゼを添加する群を設けた。粗ジグリコシダーゼ群は添加量の違いによって2区分（添加量5.2又は52単位）とし、精製ジグリコシダーゼ群は1区分（添加量52単位）とした。また、ジグリコシダーゼを添加しない群（無添加）を対照として用いた。

（3）官能評価

酵素処理後の各緑茶抽出液を用いて、5人のパネラーによる官能検査（味、香り）を行った。尚、5点評価法（評点5：強い、評点4：やや強い、評点3：普通、評点2：やや弱い、評点1：弱い）を採用した。官能検査の結果を以下の表3～10に示す。

（緑茶葉抽出液）

【表3】

酵素処理した緑茶葉抽出液の官能試験

パネラー	酵素無添加					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2
パネラーB	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3
パネラーC	1.0	1.0	2.0	1.0	3.0	2
パネラーD	1.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1
パネラーE	2.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2
平均点	1.4	1.2	1.4	1.0	2.0	2.0

【表4】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5.2単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	4.0	2.0	2.0	4.0	3.0	3
パネラーB	3.0	2.0	1.0	3.0	3.0	3
パネラーC	3.0	3.0	1.0	3.0	3.0	2
パネラーD	4.0	2.0	2.0	4.0	2.0	3
パネラーE	2.0	2.0	1.0	2.0	3.0	4
平均点	3.2	2.2	1.4	3.2	2.8	3.0

【表5】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	4.0	2.0	2.0	5.0	3.0	5
パネラーB	5.0	2.0	2.0	3.0	4.0	4
パネラーC	5.0	2.0	1.0	5.0	4.0	5
パネラーD	4.0	3.0	2.0	4.0	2.0	3
パネラーE	3.0	3.0	2.0	3.0	3.0	5
平均点	4.2	2.4	1.8	4.0	3.2	4.4

【表6】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	4.0	3.0	1.0	4.0	3.0	4
パネラーB	4.0	2.0	2.0	4.0	3.0	4
パネラーC	5.0	2.0	1.0	4.0	3.0	4
パネラーD	4.0	2.0	2.0	3.0	3.0	4
パネラーE	3.0	3.0	2.0	4.0	3.0	4
平均点	4.0	2.4	1.6	3.8	3.0	4.0

10

以上の表に示されるように、ジグリコシダーゼの処理の有無によって味及び香りが増強される。特に、すっきり感（のどごし）、甘い香り、新鮮香についての効果的な増強が行われたことを確認できる。上記の機器分析（GC/MSの分析）において増加が確認された香気成分（LinaloolやBenzyl alcoholなど）が、花様の甘い香りの増強に大きく関与し、新鮮香の増強は（Z）-3-Hexenolの増加が関わっているものと考えられる。尚、苦味および渋みが僅かに強くなったが、上記のようにすっきり感（のどごし）が大幅に改善されることが示された。

（インスタント緑茶抽出液）

【表7】

酵素処理したインスタント緑茶抽出液の官能評価結果

20

パネラー	酵素無添加					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1
パネラーB	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2
パネラーC	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2
パネラーD	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	1
パネラーE	2.0	1.0	1.0	2.0	1.0	1
平均点	1.2	1.0	1.4	1.2	1.4	1.4

30

【表8】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5.2単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2
パネラーB	1.0	3.0	1.0	3.0	1.0	3
パネラーC	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3
パネラーD	3.0	1.0	2.0	4.0	2.0	3
パネラーE	2.0	2.0	1.0	2.0	3.0	2
平均点	2.0	2.0	1.6	2.8	2.2	2.6

40

【表9】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	4
パネラーB	2.0	3.0	1.0	3.0	3.0	4
パネラーC	3.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4
パネラーD	4.0	2.0	2.0	5.0	4.0	4
パネラーE	3.0	3.0	2.0	4.0	4.0	5
平均点	2.8	2.4	1.8	3.8	3.6	4.2

10

【表 10】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	3.0	2.0	3.0	4.0	4
パネラーB	2.0	3.0	1.0	4.0	3.0	4
パネラーC	3.0	2.0	2.0	4.0	4.0	3
パネラーD	3.0	2.0	1.0	4.0	3.0	4
パネラーE	2.0	2.0	2.0	3.0	4.0	4
平均点	2.4	2.4	1.6	3.6	3.6	3.8

20

以上の表に示されるように、インスタント緑茶抽出液においても同様に、ジグリコシダーゼ処理によって花様の甘い香りと新鮮香の増加が確認された。従って、これまで香氣に乏しいとされるインスタント製品の香氣増強・風味改善が可能となることが考えられる。味に関しては、苦味・渋みが増加しているが、すっきり感（のどごし）も併せて増加していることから、味全体のバランスは大きく変化せず、味質が劣化することはほとんどないと考えられる。

【実施例 3】烏龍茶に対する風味改善効果の評価

（3 - 1）機器分析による評価

（1）烏龍茶抽出液の調製

茶葉（中国名茶烏龍茶（商品名、日本茶販売株式会社製））2 g に沸騰水 50 mL を添加し、1 分間煮出した。これをろ過（No. 2 の濾紙）して不溶性成分を除去し、得られたる液を烏龍茶葉抽出液とした。

一方、烏龍茶ティーバッグ（中国名茶烏龍茶、日本茶販売株式会社製）、1 パック（2 g）に沸騰水 50 mL を添加し、30 秒間煮出した。これをろ過（No. 2 の濾紙）して不溶性成分を除去し、得られたる液をインスタント烏龍茶抽出液とした。

（2）烏龍茶抽出液（烏龍茶葉抽出液、インスタント烏龍茶抽出液）の酵素処理 烏龍茶抽出液を上記（2 - 1）（2）と同様の方法で酵素処理した。粗ジグリコシダーゼ群を添加量の違いによって 4 区分（添加量 5.2 ~ 520 単位）、精製ジグリコシダーゼ群を 1 区分（添加量 52 単位）用意した。また、ジグリコシダーゼを添加しない群（無添加）を対照として用いた。

40

（3）香氣成分の測定、評価

酵素処理後、各抽出液中における香氣成分の同定をガスクロマトグラフィー / マススペクトロメトリー（GC / MS、製品番号「HP 6890 GC / HP 5973 MSD」、Agilent Technologies 社製）により行った。測定結果を以下の表 11、12 に示す。

（烏龍茶葉抽出液）

【表 11】

烏龍茶葉抽出液

ジグリコシダーゼ活性 (単位)					無添加	化合物名
粗酵素			精製酵素			
520	260	52	5.2	52		
125167	66479	75329	40355	46347	N.D.	1-Hexanol
∞	∞	∞	∞	∞	—	
1006705	1007092	884746	736947	55704	162867	(Z)-3-Hexenol
6.2	6.2	5.4	4.5	0.3	1.0	
125428	124821	65263	62901	38574	31079	(Z)-Linalool oxide
4.0	4.0	2.1	2.0	1.2	1.0	
116712	114358	132593	60857	N.D.	N.D.	(E)-Linalool oxide
∞	∞	∞	∞	—	—	
1051770	915185	855279	709228	856045	330603	Benzaldehyde
3.2	2.8	2.6	2.1	2.6	1.0	
1431863	1437442	842582	407919	445794	232822	Linalool
6.2	6.2	3.6	1.8	1.9	1.0	
189137	140649	119751	N.D.	605378	N.D.	Geranial
∞	∞	∞	—	∞	—	
270514	229313	104672	76108	599560	N.D.	Geraniol
∞	∞	∞	∞	∞	—	
86204	64863	105956	71932	327410	53322	Methyl salicylate
1.6	1.2	2.0	1.3	6.1	1.0	
384199	418023	237450	150958	228162	N.D.	Benzyl alcohol
∞	∞	∞	∞	∞	—	

表中の数値は、上段がピーク面積、下段が無添加に対する比率を示す。N . D . は検出限界以下を表す。

表 1 1 に示されるように、各香気成分の増加割合は異なるものの、ジグリコシダーゼの添加によって上記緑茶抽出液の場合に観察されたのと同様の香気成分が増加している。従って、ジグリコシダーゼの添加によって烏龍茶抽出液中の香気成分を引き出し、風味の改善を行えることがわかる。尚、精製ジグリコシダーゼで処理した場合と、同活性のジグリコシダーゼを含む粗ジグリコシダーゼで処理した場合において、各香気成分の増加量がほぼ同等であり、ジグリコシダーゼが香気成分の増加作用の中心的役割を果たしていることが示される。尚、ジグリコシダーゼの添加量によって香気成分の増加量が異なることから（粗ジグリコシダーゼ群）、ジグリコシダーゼの添加量を調節すれば各香気成分量を変化させることができ、もって様々な香気バランスを有する烏龍茶飲料を製造可能なことが示唆される。

（インスタント烏龍茶抽出液）

【表 1 2】

10

20

30

インスタント烏龍茶抽出液

ジグリコシダーゼ活性(単位)					化合物名
粗酵素		精製酵素		無添加	
260	52	5.2	52		
1304285	766467	600471	449350	206098	(Z)-3-Hexenol
6.3	3.7	2.9	2.2	1.0	
211086	131708	52904	60511	N.D.	(Z)-Linalool oxide
∞	∞	∞	∞	-	
137521	67305	17642	28843	22151	(E)-Linalool oxide
6.2	3.0	0.8	1.3	1.0	
1214152	991581	832062	957736	329105	Benzaldehyde
3.7	3.0	2.5	2.9	1.0	
617863	365279	229910	194358	118184	Linalool
5.2	3.1	1.9	1.6	1.0	
249488	81070	N.D.	77360	N.D.	Terpineol
∞	∞	-	∞	-	
418448	197851	N.D.	74225	N.D.	Geraniol
∞	∞	-	∞	-	
119403	87782	N.D.	66803	N.D.	delta-Cadinene
∞	∞	-	∞	-	
177674	143386	53776	95048	N.D.	Methyl salicylate
∞	∞	∞	∞	-	
284081	509534	281640	158641	83073	Geraniol
3.4	6.1	3.4	1.9	1.0	
297712	362078	166192	338274	N.D.	Benzyl alcohol
∞	∞	∞	∞	-	

表中の数値は、上段がピーク面積、下段が無添加に対する比率を示す。N . D . は検出限界以下を表す。

表12に示されるように、インスタント烏龍茶抽出液においても、ジグリコシダーゼの添加によってLinalool, Geraniol, Benzyl alcoholなどの成分が増強された。これらの成分はインスタント烏龍茶で特に乏しい香気成分であり、このような変化が香気の改善に大きく貢献することが示唆される。このことから、ジグリコシダーゼによる酵素処理はインスタント烏龍茶抽出液の風味を改善する手段として極めて有効なものと考えられる。

(3-2) パネラーによる官能評価

(1) 烏龍茶抽出液の調製

茶葉(中国名茶烏龍茶(商品名、日本茶販売株式会社製))4gを急須にいれ、約400mLの熱水(約90℃)を注いだ。そして、約1分間(2、3回まわしつつ)浸出させて得られたものを烏龍茶葉抽出液とした。

一方、烏龍茶ティーバッグ(中国名茶烏龍茶、日本茶販売株式会社製)、1パック(2g)を容器に入れ、約200mLの熱水(約90℃)を注いだ。そして、約40秒間(2、3回まわしつつ)浸出させて得られたものをインスタント烏龍茶抽出液とした。

(2) 烏龍茶抽出液(烏龍茶葉抽出液、インスタント烏龍茶抽出液)の酵素処理 上記(2-2)(2)と同様の方法で烏龍茶抽出液をジグリコシダーゼにより酵素処理した。粗ジグリコシダーゼ群を添加量の違いによって2区分(添加量5.2又は52単位)、精製ジグリコシダーゼ群を1区分(添加量52単位)用意した。また、ジグリコシダーゼを添加しない群(無添加)を対照として用いた。(3) 官能評価

酵素処理後の各烏龍茶抽出液を用いて、5人のパネラーによる官能検査(味、香り)を行った。尚、5点評価法(評点5:強い、評点4:やや強い、評点3:普通、評点2:やや弱い、評点1:弱い)を採用した。官能検査の結果を以下の表13~20に示す。

(烏龍茶葉抽出液)

10

20

30

40

50

【表 1 3】

酵素処理した烏龍茶葉抽出液の官能評価

パネラー	酵素無添加					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	2.0	1.0	3.0	2
パネラーB	2.0	1.0	1.0	2.0	1.0	3
パネラーC	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	3
パネラーD	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	2
パネラーE	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2
平均点	1.6	1.2	1.6	1.4	1.8	2.8

10

【表 1 4】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5.2単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	3.0	2.0	1.0	4.0	4.0	4
パネラーB	2.0	1.0	2.0	3.0	3.0	4
パネラーC	2.0	3.0	3.0	5.0	2.0	3
パネラーD	3.0	2.0	2.0	4.0	3.0	4
パネラーE	3.0	2.0	2.0	4.0	3.0	3
平均点	2.6	2.0	2.0	4.0	3.0	3.6

20

【表 1 5】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	3.0	1.0	5.0	4.0	4
パネラーB	3.0	2.0	2.0	4.0	4.0	5
パネラーC	2.0	2.0	2.0	5.0	3.0	5
パネラーD	3.0	3.0	3.0	5.0	5.0	4
パネラーE	3.0	2.0	2.0	5.0	4.0	4
平均点	2.6	2.4	2.0	4.8	4.0	4.4

30

【表 1 6】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	3.0	2.0	1.0	5.0	5.0	4
パネラーB	3.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4
パネラーC	2.0	2.0	2.0	5.0	3.0	3
パネラーD	2.0	3.0	2.0	4.0	4.0	4
パネラーE	3.0	2.0	2.0	5.0	4.0	5
平均点	2.6	2.2	1.8	4.6	4.0	4.0

40

以上の表に示されるように、ジグリコシダーゼの処理の有無によって味及び香りの全ての項目において増強が認められる。精製ジグリコシダーゼを用いた群では、渋みについての評価はほとんど変化せず、したがってジグリコシダーゼ自体はこれらの風味にほとんど関与しないことが示唆される。また、ジグリコシダーゼ処理によって、紅茶様の香りが強くなることも明らかとなった。

50

(インスタント烏龍茶抽出液)

【表 17】

酵素処理したインスタント烏龍茶抽出液の官能評価

粗酵素無添加						
パネラー	味			香り		総合評価
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	2.0	1.0	2.0	1
パネラーB	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2
パネラーC	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2
パネラーD	2.0	2.0	1.0	2.0	2.0	2
パネラーE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1
平均点	1.4	1.4	1.4	1.2	1.8	1.6

10

【表 18】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5.2単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2
パネラーB	2.0	1.0	3.0	2.0	1.0	2
パネラーC	1.0	3.0	1.0	3.0	3.0	3
パネラーD	2.0	1.0	1.0	4.0	2.0	3
パネラーE	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2
平均点	1.8	1.8	1.8	2.8	2.0	2.4

20

【表 19】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	3.0	2.0	2.0	4.0	2.0	3
パネラーB	2.0	2.0	2.0	3.0	1.0	4
パネラーC	1.0	3.0	2.0	4.0	2.0	4
パネラーD	3.0	2.0	3.0	4.0	3.0	5
パネラーE	3.0	2.0	1.0	5.0	3.0	4
平均点	2.4	2.2	2.0	4.0	2.2	4.0

30

【表 20】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	4
パネラーB	2.0	2.0	1.0	4.0	2.0	4
パネラーC	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	3
パネラーD	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0	3
パネラーE	2.0	2.0	2.0	4.0	2.0	4
平均点	2.2	2.0	1.8	3.6	2.0	3.6

40

以上の表に示されるように、インスタント烏龍茶抽出液においても同様に、ジグリコシダーゼ処理によって特に甘い香りの増加が確認された。従って、これまで香氣に乏しいとされるインスタント製品の香氣増強・風味改善が可能となることが考えられる。

[実施例 4] 紅茶に対する風味改善効果の評価

50

(4-1) 機器分析による評価

(1) 紅茶抽出液の調製

茶葉（ブルックボンドホテル&レストランブレンドダージリン紅茶（商品名、BBLジャパン株式会社製））2gに沸騰水50mLを添加し、1分間煮出した。これをろ過（No. 2の濾紙）して不溶性成分を除去し、得られたる液を紅茶葉抽出液とした。

一方、紅茶ティーバッグ（ダージリン紅茶（商品名、アイク株式会社））、1パック（2g）に沸騰水50mLを添加し、45秒間煮出した。これをろ過（No. 2の濾紙）して不溶性成分を除去し、得られたる液をインスタント紅茶抽出液とした。

(2) 紅茶抽出液（紅茶葉抽出液、インスタント紅茶抽出液）の酵素処理

紅茶抽出液を上記（2-1）（2）と同様の方法で酵素処理した。粗ジグリコシダーゼ群を添加量の違いによって4区分（添加量5.2～520単位）、精製ジグリコシダーゼ群を1区分（添加量52単位）用意した。また、ジグリコシダーゼを添加しない群（無添加）を対照として用いた。

(3) 香気成分の測定、評価

酵素処理後、各抽出液中における香気成分の同定をガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー（GC/MS、製品番号「HP6890 GC/HP5973MSD」、Agilent Technologies社製）により行った。測定結果を以下の表21、22に示す。

(紅茶葉抽出液)

【表21】

紅茶葉抽出液

ジグリコシダーゼ活性(単位)					無添加	化合物名
粗酵素		精製酵素				
520	260	52	5.2	52		
396067	182776	169409	N.D.	154420	N.D.	1-Hexanol
∞	∞	∞	—	∞	—	
1560554	1059009	840112	831310	1403752	474847	(Z)-3-Hexenol
3.3	2.2	1.8	1.8	3.0	1.0	
1562811	1386873	1017438	815849	1008654	556643	Benzaldehyde
2.8	2.5	1.8	1.5	1.8	1.0	
2610268	2648097	1667423	1395337	1984231	1690567	Linalool
1.5	1.6	1.0	0.8	1.2	1.0	
94750	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	Hotrienol
∞	—	—	—	—	—	
180499	110123	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	beta-Sesquiphellandrene
∞	∞	—	—	—	—	
412753	295552	50057	N.D.	46257	N.D.	Geranial
∞	∞	∞	—	∞	—	
187738	222627	144507	80570	90124	89334	Methyl salicylate
2.1	2.5	1.6	0.9	1.0	1.0	
668273	587961	428682	159633	263321	82720	Geraniol
8.1	7.1	5.2	1.9	3.2	1.0	

表中の数値は、上段がピーク面積、下段が無添加に対する比率を示す。N.D.は検出限界以下を表す。

表21に示されるように、ジグリコシダーゼの添加によって、紅茶の主要香気成分である geraniol, linalool, (Z)-3-Hexenol, 1-hexanol などが増加した。従って、ジグリコシダーゼの添加によって紅茶の主要香気成分を引き出し、よりフレーバーリッチな紅茶飲料を製造することが可能であるといえる。

紅茶（茶葉）の製造工程は、茶葉の内在性酵素を失活させないで製造することの特徴とする。このため、茶葉の製造過程において内在性酵素の一つであるβ-プリメペロシダーゼが十分に作用でき、茶葉中に存在する香気前駆体としての配糖体は完全に加水分解され、もはや茶葉には存在しないと考えられていた。しかし以上の結果から、配糖体の一部が茶

葉自体の β -プリメペロシダーゼによる加水分解を受けずに残存していることが明らかとなった。そして、ジグリコシダーゼによってこの残存する配糖体を加水分解し、香気を改善できる可能性が示された。

尚、精製ジグリコシダーゼで処理した場合と、同活性のジグリコシダーゼを含む粗ジグリコシダーゼで処理した場合において、各香気成分の増加量がほぼ同等であり、ジグリコシダーゼが香気成分の増加作用の中心的役割を果たしていることが示される。尚、ジグリコシダーゼの添加量によって香気成分の増加量が異なることから（粗ジグリコシダーゼ群）、ジグリコシダーゼの添加量を調節すれば各香気成分量を変化させることができ、もって様々な香気バランスを有する紅茶飲料を製造可能なことが示唆される。

（インスタント紅茶抽出液）

【表 2 2】

インスタント紅茶抽出液

ジグリコシダーゼ活性(単位)					化合物名
粗酵素		精製酵素		無添加	
260	52	5.2	52		
1147607	924520	793825	915620	442849	Benzaldehyde
2.6	2.1	1.8	2.1	1.0	
2480792	2076575	1634839	2102747	1641185	Linalool
1.5	1.3	1.0	1.3	1.0	
149607	82382	74805	71852	72487	Terpineol
2.1	1.1	1.0	1.0	1.0	
226966	68515	74343	64037	60969	Geranial
3.7	1.1	1.2	1.1	1.0	
167332	121086	37322	31058	29973	Methyl salicylate
5.6	4.0	1.2	1.0	1.0	
431856	372951	189388	218354	65909	Geraniol
6.6	5.7	2.9	3.3	1.0	
359911	282244	192181	158801	N.D.	Benzyl alcohol
∞	∞	∞	∞	-	

表中の数値は、上段がピーク面積、下段が無添加に対する比率を示す。N . D . は検出限界以下を表す。

表 2 2 に示されるように、インスタント紅茶抽出液においても、紅茶の主要香気成分のいくつかが増強された。このことから、ジグリコシダーゼによる酵素処理はインスタント紅茶抽出液の風味を改善する手段として有効なものと考えられる。

（ 4 - 2 ） パネラーによる官能評価

（ 1 ） 紅茶抽出液の調製

茶葉（ブルックボンドホテル&レストランブレンドダージリン紅茶（商品名、B B L ジャパン株式会社製））8 g をティーポットにいれ、約 4 0 0 m L の熱水（約 9 0 ）を注いだ。そして、約 2 分間（2、3 回まわしつつ）浸出させて得られたものを紅茶葉抽出液とした。

一方、紅茶ティーバッグ（ダージリン紅茶（商品名、アイク株式会社製））、1 パック（2 g ）を容器に入れ、約 1 5 0 m L の熱水（約 9 0 ）を注いだ。そして、約 1 分間（2、3 回まわしつつ）浸出させて得られたものをインスタント紅茶抽出液とした。

（ 2 ） 紅茶抽出液（紅茶葉抽出液、インスタント紅茶抽出液）の酵素処理

上記（ 2 - 2 ）（ 2 ）と同様の方法で紅茶抽出液をジグリコシダーゼにより酵素処理した。粗ジグリコシダーゼ群を添加量の違いによって 2 区分（添加量 5 . 2 又は 5 2 単位）、精製ジグリコシダーゼ群を 1 区分（添加量 5 2 単位）用意した。また、ジグリコシダーゼを添加しない群（無添加）を対照として用いた。

（ 3 ） 官能評価

酵素処理後の各紅茶抽出液を用いて、5 人のパネラーによる官能検査（味、香り）を行った。尚、5 点評価法（評点 5 ：強い、評点 4 ：やや強い、評点 3 ：普通、評点 2 ：やや弱

10

20

30

40

50

い、評点 1 : 弱い) を採用した。官能検査の結果を以下の表 2 3 ~ 3 0 に示す。
(紅茶葉抽出液)

【表 2 3】

酵素処理した紅茶葉抽出液の官能評価

パネラー	酵素無添加					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2
パネラーB	2.0	2.0	3.0	2.0	1.0	2
パネラーC	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	1
パネラーD	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	2
パネラーE	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	1
平均点	1.8	1.6	2.4	2.4	1.6	1.6

【表 2 4】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5.2単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	3
パネラーB	2.0	1.0	3.0	3.0	3.0	2
パネラーC	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	2
パネラーD	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3
パネラーE	2.0	1.0	2.0	2.0	3.0	3
平均点	2.2	1.6	2.6	2.8	2.6	2.6

【表 2 5】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	3.0	4.0	2.0	4
パネラーB	2.0	2.0	3.0	3.0	4.0	3
パネラーC	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	4
パネラーD	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0	4
パネラーE	3.0	2.0	2.0	2.0	4.0	3
平均点	2.2	2.2	2.8	3.0	3.2	3.6

【表 2 6】

精製ジグリコシダーゼ 52単位						
パネラー	味			香り		総合評価
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	3.0	3.0	4.0	3
パネラーB	3.0	2.0	2.0	3.0	3.0	4
パネラーC	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3
パネラーD	2.0	2.0	1.0	3.0	3.0	5
パネラーE	3.0	1.0	2.0	2.0	3.0	3
平均点	2.4	1.8	2.2	2.8	3.2	3.6

以上の表に示されるように、味については、ジグリコシダーゼの処理の有無によって若干の変化はあるものの、大きな変化は観察されなかった。他方香りについては、新鮮香が特に増強しているのが認められる。これは、上記の機器分析 (G C / M S 分析) で確認され

10

20

30

40

50

た 1 - hexanol、(Z) - 3 - hexenol、geraniol、linalool などの香気成分の増加が関与していると考えられる。

(インスタント紅茶抽出液)

【表 27】

酵素処理したインスタント紅茶抽出液の官能評価

パネラー	酵素無添加					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1
パネラーB	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	2
パネラーC	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2
パネラーD	1.0	1.0	3.0	1.0	2.0	3
パネラーE	1.0	1.0	2.0	2.0	1.0	1
平均点	1.2	1.6	2.2	1.6	1.2	1.8

【表 28】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5.2単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	3.0	2.0	2.0	3
パネラーB	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	3
パネラーC	2.0	2.0	2.0	3.0	2.0	3
パネラーD	1.0	2.0	3.0	2.0	3.0	3
パネラーE	1.0	1.0	3.0	2.0	3.0	2
平均点	1.4	1.6	2.6	2.2	2.4	2.8

【表 29】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0	3
パネラーB	1.0	2.0	2.0	2.0	3.0	4
パネラーC	1.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3
パネラーD	1.0	3.0	3.0	3.0	3.0	4
パネラーE	1.0	1.0	3.0	3.0	3.0	3
平均点	1.2	2.0	2.8	2.8	2.8	3.4

【表 30】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 52単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	4
パネラーB	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3
パネラーC	1.0	2.0	2.0	3.0	2.0	3
パネラーD	1.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3
パネラーE	1.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3
平均点	1.4	2.0	2.2	2.6	2.6	3.2

以上の表に示されるように、インスタント紅茶抽出液においても同様に、ジグリコシダーゼ処理によって甘い香り、新鮮香の増加が確認された。

現在、ティーパック紅茶の消費が世界的に増加している。ティーパック用にはCTC紅茶が用いられている。CTC紅茶は、内在性酵素による香気前駆体の加水分解が十分に行われないうちに細かく碎かれるので、酸化反応が急速に進み、香気アルコールの量が少なく、(E)-2-hexenalが多量に生成する。

ジグリコシダーゼ処理によって、CTC紅茶に不足しがちなアルコール系香気成分を増加させることができるため、オーソドックスな紅茶の香気に近づけることが可能であることが示唆された。また、ジグリコシダーゼの添加量を調節することによって、このような香気成分の量を調節することができるので、様々な香りの強さの紅茶飲料を製造することが可能となると考えられる。

以上の実施例では、茶葉（緑茶、烏龍茶、紅茶）の抽出液をジグリコシダーゼ処理し、その場合の風味改善効果を検討した。以下では、茶葉の製造工程においてジグリコシダーゼを作用させ、風味の改善効果を検討した実施例を示す。

〔実施例5〕緑茶の製造工程における風味改善の検討

（5-1）茶葉の加工方法、及び酵素処理方法

緑茶（緑茶飲料用茶葉）の製造を摘採、蒸熱、粗揉、揉捻、中揉、精揉、及び乾燥の一連の工程により行った。各工程における加工条件は以下の通りである。尚、約2kgの原料茶葉を処理した。

（1）蒸熱：茶葉中の酵素を失活させるとともに、茶葉の柔軟性を高め、揉捻を容易にしたり、青臭さを除去することなどを目的として行われる。摘採した茶葉を蒸熱機に移した後、蒸気を蒸熱機内へと導き、茶葉が蒸気とよく接触した状態で95℃、20分間処理した。

（2）粗揉：茶葉を熱風中で攪拌、揉圧することにより、茶葉各部分の水分を均一にし、能率良く乾燥する工程である。茶葉の温度を34～36℃に保ち、30分間処理した。

（3）揉捻（酵素処理）：粗揉でのみ不足を補い、茶葉の水分むらをなくすために行う。揉捻開始10分後にジグリコシダーゼの水溶液を霧吹きで噴霧し、さらに30分間揉捻した。尚、粗ジグリコシダーゼを用いて2ロット（添加量が260単位のものとは5200単位のもの）、精製ジグリコシダーゼを用いて1ロット（添加量260単位）製造した。また、酵素を添加しないで製造したロット（無添加）を対照とした。

（4）中揉：粗揉と同様に熱風に当てながら揉む工程である。茶葉の温度を34～36℃に保ち、30～40分間処理した。

（5）精揉：煎茶の形状であるまっすぐに伸びた形を作る工程である。50分間処理した。

（6）乾燥：熱風が送られている乾燥室の中で含水率が5%程度になるまで乾燥させる。約60分間処理した。

以上のようにして加工処理した茶葉に熱湯を加えて緑茶抽出液を得た。抽出液をGC/MSによる機器分析および官能評価に供した。

（5-2）機器分析による評価

ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー（GC/MS、製品番号「HP6890 GC/HP5973MSD」、Agilent Technologies社製）を用いて、各ロットの茶葉の抽出液に含まれる香気成分の同定を行った結果を表31に示す。

【表31】

10

20

30

40

GC/MS分析結果

ジグリコシダーゼ活性(単位)				
粗酵素		精製酵素	無添加	化合物名
5200	260	260		
210456	155023	60284	N.D.	Limonene
∞	∞	∞	-	
867207	368792.0	330261	125465	(E)-2-Hexenal
6.9	2.9	2.6	1.0	
1047265	620475	478525	305424	1-Hexanol
3.4	2.0	1.6	1.0	
4456735	2245750	1458325	458361	(Z)-3-Hexenol
9.7	4.9	3.2	1.0	
302548	285463	175215	N.D.	(Z)-Linalool oxide
∞	∞	∞	-	
421347	187823	182020	N.D.	(E)-Linalool oxide
∞	∞	∞	-	
6937784	4858846	4426070	1425687	Benzaldehyde
4.9	3.4	3.1	1.0	
11079542	7515056	5654178	622250	Linalool
17.8	12.1	9.1	1.0	
223523	265916	126230	N.D.	Methyl salicylate
∞	∞	∞	-	
665244	582054	165863	85485	Geraniol
7.8	6.8	1.9	1.0	
1874544	1842154	1431607	N.D.	Benzyl alcohol
∞	∞	∞	-	
580242	404989	388241	N.D.	Phenyl ethyl alcohol
∞	∞	∞	-	

(5 - 3) パネラーによる官能評価

官能検査の結果を表 3 2 ~ 3 5 に示す。尚、5 人のパネラーを用いて、味、香りについて 5 点評価（評点 5：強い、評点 4：やや強い、評点 3：普通、評点 2：やや弱い、評点 1：弱い）を行った。

【表 3 2】

揉捻工程中に酵素添加して製造した緑茶の官能評価

パネラー	酵素無添加						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	3.0	1.0	4.0	2.0	2
パネラーB	2.0	1.0	2.0	1.0	3.0	1.0	1
パネラーC	2.0	1.0	1.0	1.0	4.0	1.0	1
パネラーD	1.0	2.0	1.0	1.0	3.0	2.0	1
パネラーE	2.0	1.0	1.0	1.0	3.0	2.0	1
平均点	1.6	1.2	1.6	1.0	3.4	1.6	1.2

【表 3 3】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 260単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	4.0	2.0	2.0	4.0	1.0	3.0	4
パネラーB	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0	3.0	3
パネラーC	4.0	3.0	2.0	3.0	1.0	4.0	4
パネラーD	4.0	3.0	3.0	4.0	1.0	3.0	4
パネラーE	3.0	2.0	1.0	3.0	2.0	3.0	5
平均点	3.6	2.4	2.0	3.4	1.4	3.2	4.0

【表 3 4】

10

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5200単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	3.0	3.0	2.0	2.0	1.0	3.0	4
パネラーB	4.0	2.0	3.0	3.0	1.0	4.0	3
パネラーC	3.0	4.0	4.0	2.0	1.0	4.0	3
パネラーD	3.0	3.0	3.0	2.0	1.0	3.0	4
パネラーE	3.0	3.0	4.0	3.0	2.0	2.0	4
平均点	3.2	3.0	3.2	2.4	1.2	3.2	3.6

【表 3 5】

20

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 260単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	4.0	2.0	2.0	4.0	1.0	4.0	5
パネラーB	5.0	3.0	2.0	4.0	1.0	3.0	4
パネラーC	4.0	3.0	2.0	3.0	1.0	4.0	4
パネラーD	4.0	2.0	2.0	4.0	1.0	3.0	4
パネラーE	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0	3.0	4
平均点	4.0	2.4	2.0	3.6	1.2	3.4	4.2

以上の香気成分の同定結果から、実施例 2 の場合（茶葉抽出液を酵素処理した場合）と同様に、ジグリコシダーゼの添加によって香気成分が引き出されていることがわかる。また、官能評価からは、甘い香及び新鮮香が増加し、さらに番茶臭が低減されたことがわかる。このように、製造工程の中にジグリコシダーゼ処理の工程を組込むことにより、風味が改善された緑茶飲料（又は抽出した際に風味が改善された緑茶飲料を提供できる緑茶飲料用茶葉）の製造が可能であることが示された。

30

ここで、新茶には香気成分として Linalool、Geraniol、(Z)-3-Hexenol などが含まれ、良好な風味を有する。一方、いわゆる番茶は 2 番茶や 3 番茶を用いたのもで、葉も堅くなり、新茶に含まれる上記のような香気も乏しく、番茶臭と呼ばれる独特な不快香を有する。従って、等級の低い茶葉を加工する過程においてジグリコシダーゼによる酵素処理工程を行うことにより、品質の高い、即ち風味の改善された茶飲料を提供できる茶飲料用茶葉を製造することが可能である。また、長期間放置して古くなった茶葉の香気も改善できる可能性がある。勿論、新茶のごとき香気に富む茶においても、さらなる香気成分の増強、香気バランスの改善ないしは改変のために、ジグリコシダーゼ処理を製造工程に組込むことができる。

40

〔実施例 6〕烏龍茶の製造工程における風味改善の検討

（6-1）茶葉の加工方法、及び酵素処理方法

烏龍茶（烏龍茶用茶葉）の製造を摘採、日光萎凋、室内萎凋、釜炒り、揉捻、及び乾燥の一連の工程により行った。各工程における加工条件は以下の通りである。尚、約 2 kg の原料茶葉を処理した。

（1）日光萎凋：茶葉の温度が 30～40 になるように調整しながら、30 分間処理し

50

た。

(2) 室内萎凋：1～2時間ごとに撈拌した。これを5回繰り返した。1回目の撈拌は約1分間きわめて軽く行い、5回目の撈拌から2時間静置後、次の操作に移ることとした。

(3) 釜炒り：茶葉を円筒型炒り葉機に投入し、140～160 で2～3分処理した。

(4) 揉捻(酵素処理)・乾燥：10分間揉捻した後、茶葉の固まりをほぐして乾燥機にかけた。揉捻開始直後にジグリコシダーゼの水溶液を霧吹きで噴霧した。尚、粗ジグリコシダーゼを用いて2ロット(添加量520単位のもの、5200単位のもの)、精製ジグリコシダーゼを用いて1ロット(添加量520単位)製造した。また、酵素を添加しないで製造したロット(無添加)を対照とした。

以上のようにして加工処理した茶葉に熱湯を加えて烏龍茶抽出液を得た。抽出液をGC/MSによる機器分析および官能評価に供した。

(6-2) 機器分析による評価

ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(GC/MS、製品番号「HP6890 GC/HP5973MSD」、Agilent Technologies社製)を用いて、各ロットの茶葉の抽出液に含まれる香気成分の同定を行った結果を表36に示す。

【表36】

GC/MSによる分析結果

無添加	粗ジグリコシダーゼ(単位)		精製酵素(単位)	化合物名
	520	5200	520	
420847	696897	531740	576061	Hexanal
1.0	1.7	1.3	1.4	
221358	282406	236735	311087	1-Hexanol
1.0	1.3	1.1	1.4	
274238	492148	455800	427895	(Z)-3-Hexenol
1.0	1.8	1.7	1.6	
193291	266598	296172	296860	2-Hexenal
1.0	1.4	1.5	1.5	
462753	538533	467101	658283	(Z)-Pentenol
1.0	1.2	1.0	1.4	
N.D.	220887	260996	294126	(Z)-Linalool oxide
-	∞	∞	∞	
36146	60742	84451	46077	(E)-Linalool oxide
1.0	1.7	2.3	1.3	
161568	226320	320156	286788	Benzaldehyde
1.0	1.4	2.0	1.8	
74885	111798	134785	128883	Linalool
1.0	1.5	1.8	1.7	
154024	457602	957502	399821	Methyl salicylate
1.0	3.0	6.2	2.6	
438750	557602	678195	502593	Geraniol
1.0	1.3	1.5	1.1	
649244	1620380	1810367	1375125	Benzyl alcohol
1.0	2.5	2.8	2.1	
507163	941025	1428901	886723	Phenyl ethyl alcohol
1.0	1.9	2.8	1.7	

(6-3) パネラーによる官能評価

官能検査の結果を表37～40に示す。尚、5人のパネラーを用いて、味、香りについて5点評価(評点5：強い、評点4：やや強い、評点3：普通、評点2：やや弱い、評点1：弱い)を行った。

【表37】

10

20

30

40

50

揉捻工程中に酵素添加して製造した烏龍茶の官能評価

パネラー	酵素無添加					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	1.0	2.0	2.0	3.0	2.0	1
パネラーB	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1
パネラーC	1.0	3.0	2.0	1.0	1.0	2
パネラーD	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	1
パネラーE	2.0	2.0	3.0	2.0	1.0	3
平均点	1.4	2.2	2.2	1.8	1.4	1.6

10

【表 3 8】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 520単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	3.0	3.0	4.0	3.0	3
パネラーB	3.0	3.0	2.0	3.0	3.0	4
パネラーC	3.0	3.0	3.0	4.0	4.0	4
パネラーD	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	4
パネラーE	3.0	2.0	2.0	4.0	3.0	3
平均点	2.8	2.8	2.6	3.8	3.2	3.6

20

【表 3 9】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 5200単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	3.0	3.0	3.0	4.0	3.0	2
パネラーB	3.0	4.0	3.0	5.0	4.0	3
パネラーC	4.0	3.0	3.0	5.0	3.0	4
パネラーD	3.0	4.0	3.0	4.0	3.0	3
パネラーE	3.0	3.0	4.0	5.0	4.0	3
平均点	3.2	3.4	3.2	4.6	3.4	3.0

30

【表 4 0】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 520単位					総合評価
	味			香り		
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	新鮮香	
パネラーA	2.0	3.0	2.0	3.0	2.0	3
パネラーB	3.0	2.0	3.0	4.0	4.0	4
パネラーC	3.0	3.0	2.0	4.0	3.0	3
パネラーD	3.0	2.0	3.0	4.0	4.0	4
パネラーE	3.0	3.0	2.0	3.0	3.0	4
平均点	2.8	2.6	2.4	3.6	3.2	3.6

40

以上の香気成分の同定結果から、実施例3の場合（茶葉抽出液を酵素処理した場合）と同様に、ジグリコシダーゼの添加によって香気成分が引き出されていることがわかる。また、官能評価からは、すっきり感や甘い香り、新鮮香などが増加しており、風味の改善が行われていることが分る。このように、製造工程の中にジグリコシダーゼ処理の工程を組込むことにより、風味が改善された烏龍茶飲料（又は抽出した際に風味が改善された烏龍茶飲料を提供できる烏龍茶飲料用茶葉）の製造が可能であることが示された。

50

【実施例 7】紅茶の製造工程における風味改善の検討

(7-1) 茶葉の加工方法及び酵素処理方法

紅茶（紅茶用茶葉）の製造を摘採、萎凋、揉捻、発酵、及び乾燥の一連の工程により行った。各工程における加工条件は以下の通りである。尚、約 2 kg の原料茶葉を処理した。

(1) 萎凋：摘採（べにほまれ種）した茶葉を 500 グラムずつに分けて、室温で一晩（16～19 時間）処理した。

(2) 揉捻（酵素処理）：萎凋した茶葉を揉捻機（伊達式製茶機器）で揉捻処理した。揉捻条件は次の通りである。まず、重りを載せてすり潰す工程（5 分間）、蓋を上げて攪拌する工程（5 分間）を交互に 4 回ずつ行った。サイクル数の増加とともに重りを徐々に増やした（1200 g、1800 g、2400 g、2700 g）。3 サイクル目において実施例 1 で調製したジグリコシダーゼの添加を行った。ジグリコシダーゼの添加は、所定の単位数が添加されるように調製した酵素溶液（5 ml）を霧吹きで噴霧することにより行った。

続いて、重りの量をそのままにして、すり潰す工程（10 分間）と蓋を上げて攪拌する工程を 1 サイクル行った。

尚、使用する酵素の違い、及び酵素添加量の違いで 4 ロットと、酵素を添加しない無添加（対照）の合計 5 ロットを製造した。各ロットに使用した酵素剤の種類、添加量を表 4 1 に示す。

【表 4 1】

茶葉 500 g あたりの酵素添加量と活性

	酵素剤	添加量 (mg/5 mL)	活性 (単位)			
			β -Pri	β -Glc	β -Xyl	α -Rhm
①	粗ジグリコシダーゼ	5.3	10	6	1	194
②		52.6	100	58	13	1937
③		526.3	1000	579	132	19368
④	精製ジグリコシダーゼ	6.8	100	13	7	17
⑤	無添加（水添加）	-	-	-	-	-

以上のようにして加工処理した茶葉に熱湯を加えて紅茶抽出液を得た。抽出液を GC / MS による機器分析および官能評価に供した。

(7-2) 機器分析による評価

ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー（GC / MS、製品番号「HP 6890 GC / HP 5973 MSD」、Agilent Technologies 社製）を用いて、各ロットの茶葉の抽出液に含まれる香気成分の同定を行った結果を表 4 2 に示す。

【表 4 2】

ジグリコンダーゼ添加量 (単位)					化合物名
	粗酵素		精製酵素		
無添加	10	100	1000	100	
1357103	1028298	1943140	2218127	1277388	(E)-2-Hexenal
1.0	0.8	1.4	1.6	0.9	
91473	146357	182946	210388	164651	(E)-Linalool oxide
1.0	1.6	2.0	2.3	1.8	
88737	106484	133106	133106	124232	(Z)-Linalool oxide
1.0	1.2	1.5	1.5	1.4	
1111136	1444477	1777818	1914506	1333363	Benzaldehyde
1.0	1.3	1.6	1.7	1.2	
612145	918218	1163076	1163076	1101861	Linalool
1.0	1.5	1.9	1.9	1.8	
ND	304744	439958	358174	204617	Naphtalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,6-dimethyl-1-4-
-	∞	∞	∞	∞	(1-methylethyl)-
ND	421365	260552	183489	131735	alpha-Farnescene
-	∞	∞	∞	∞	
931276	1388005	2291391	1822184	1067267	delta-Cadinene
1.0	1.5	2.5	2.0	1.1	
261155	325140	377667	225027	204646	Methyl salicylate
1.0	1.2	1.4	0.9	0.8	
179967	251954	251954	323941	233957	Benzyl alcohol
1.0	1.4	1.4	1.8	1.3	
174113	278581	400460	365637	348226	Phenyl ethyl alcohol
1.0	1.6	2.3	2.1	2.0	

(6-3) パネラーによる官能評価

官能検査の結果を表43～47に示す。尚、5人のパネラーを用いて、味、香りについて5点評価(評点5:強い、評点4:やや強い、評点3:普通、評点2:やや弱い、評点1:弱い)を行った。

【表43】

揉捻工程中に酵素添加して製造した紅茶の官能評価

パネラー	酵素無添加						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	2.0	2
パネラーB	1.0	2.0	2.0	1.0	1.0	3.0	1
パネラーC	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0	1
パネラーD	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1
パネラーE	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	2.0	2
平均点	1.2	1.2	1.6	1.0	1.0	2.0	1.4

【表44】

パネラー	粗ジグリコンダーゼ 10単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	2.0	2.0	2.0	3.0	1.0	3.0	5
パネラーB	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	3.0	4
パネラーC	1.0	1.0	3.0	2.0	1.0	3.0	3
パネラーD	2.0	1.0	2.0	2.0	1.0	3.0	3
パネラーE	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	3.0	4
平均点	1.6	1.4	2.2	1.8	1.0	3.0	3.8

【表45】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 100単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	2.0	3.0	2.0	3.0	1.0	3.0	4
パネラーB	2.0	3.0	3.0	2.0	1.0	2.0	4
パネラーC	1.0	2.0	3.0	2.0	1.0	3.0	3
パネラーD	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2
パネラーE	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	3.0	3
平均点	1.6	2.4	2.4	2.2	1.0	2.6	3.2

10

【表 4 6】

パネラー	粗ジグリコシダーゼ 1000単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	2.0	3.0	2.0	3.0	1.0	1.0	3
パネラーB	2.0	4.0	3.0	3.0	1.0	2.0	4
パネラーC	1.0	3.0	2.0	2.0	1.0	1.0	2
パネラーD	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	2.0	2
パネラーE	2.0	3.0	2.0	3.0	1.0	2.0	2
平均点	1.6	3.0	2.2	2.6	1.0	1.6	2.6

20

【表 4 7】

パネラー	精製ジグリコシダーゼ 100単位						総合評価
	味			香り			
	すっきり	苦み	渋み	甘い香り	番茶臭	新鮮香	
パネラーA	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	3.0	5
パネラーB	2.0	1.0	1.0	3.0	1.0	3.0	4
パネラーC	1.0	2.0	2.0	2.0	1.0	3.0	4
パネラーD	2.0	2.0	1.0	2.0	1.0	3.0	3
パネラーE	1.0	2.0	2.0	3.0	1.0	2.0	4
平均点	1.4	1.8	1.6	2.4	1.0	2.8	4.0

30

以上の香気成分の同定結果から、実施例 4 の場合（茶葉抽出液を酵素処理した場合）と同様に、ジグリコシダーゼの添加によって香気成分の増強が行われていることが分る。また、官能評価からは、甘い香りや新鮮香などが増加しており、風味の改善が行われていることが分る。このように、製造工程の中にジグリコシダーゼ処理の工程を組込むことにより、風味が改善された紅茶飲料（又は抽出した際に風味が改善された紅茶飲料を提供できる紅茶飲料用茶葉）の製造が可能であることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、香気成分が増強されることによって風味が改善された茶飲料、或はその製造に利用できる茶飲料用茶葉を提供できる。本発明で用いられる微生物由来のジグリコシダーゼは、茶葉に含まれる同種の酵素（ β -プリメペロシダーゼ）が作用できない基質である香気成分の前駆体（二糖配糖体）に対しても作用できることから、この前駆体から香気成分を引き出し、以って風味の改善を行うことができる。

40

また、微生物由来の酵素（ジグリコシダーゼ）を用いることにより、製造ロットによって風味にばらつきが少ない、香気に関して品質の安定した茶飲料の製造が可能となる。

さらに、酵素の使用量によって香気成分の増強の程度を調整でき、様々な香気バランスを有する茶飲料或はその製造に利用できる茶飲料用茶葉を提供することが可能となる。

特に、ティーバッグ等に使用される茶葉のように、等級の低い茶葉に対して本発明を適用すれば、効果的な香気成分の増強が期待できる。

50

フロントページの続き

(72)発明者 坂田 完三
京都府宇治市五ヶ庄 京都大学化学研究所内

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 国際公開第00/018931(WO, A1)
国際公開第01/073102(WO, A1)
Biosci. Biotechnol. Biochem., 2001年12月23日, Vol.65, No.12, p.2719-2729

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A23F 3/00-3/42
C12N 9/24
JSTPlus/JST7580(JDreamII)