報 文

煎茶用品種の個体選抜のためのアミノ酸類 含有量の簡易検定法

増田 清志・鈴木 由恵

Simple Testing Method of Amino Acid Content in Tea Leaf for Individual Selection Work of Green Tea Variety

By Kiyoshi MASUDA and Yoshie SUZUKI

National Research Institute of Tea

1 ま え が き

煎茶用品種の育成において、品質の早期検定法として考えられることは、一つはチャの葉に含まれる化学成分の種類と多少から間接的に検定する方法、いま一つは小型製茶機によって製茶し、官能審査により直接的に検定する方法の二通りである。

後者については、著者らによって小型製茶機を利用した煎茶品質の早期検定法が確立され、現在個体および系統選抜の品質検定に有効に利用されている。

前者は交配実生個体の極めて早い時点で検定できる利点があり、個体選抜の省力化と合わせて育種年限の短縮を図る上には必要な検定法である。しかし、今までに煎茶の育種材料の化学成分による早期選抜に関連する研究としては、嶽崎のニンヒドリンテスト¹⁾、酒井らのタンニン簡易検定法²⁾、著者らの茶葉の全窒素の変異ならびに全窒素およびアミノ酸類含有量と小型製茶機による製茶品質³⁾の関係および安間の新芽に発現するアントシアニンについて報告されている程度で研究例はあまり多くない。

煎茶品質と密接な関係をもつアミノ酸類について、この含有量の多少により、間接的な品質評価法として、育成初期の個体の比較検定に利用できれば選抜に大きく貢献し、早期育種が達成されよう。

そこで、筆者らは茶葉のアミノ酸類の含有量を的確に、しかも簡易に定量あるいは検定し得る方法を見いだ

すために次の試験を行った。

まず最初は、アミノ酸の分析に用いる試料の簡易な調製法の検討である。現在アミノ酸の簡易定量法や自動分析を行うための試料は蒸熱、乾燥し、粉末にしなければならぬ。これでは育成のように多数の個体を取り扱うには不便である。そこで簡単な試料の調製法を検討した。

次に嶽崎の開発したろ紙によるニンヒドリンテストは操作が簡単ですぐれた方法ではあるが、ろ紙に押し染めた茶葉汁液中のポリフェノール類の影響のためアミノ酸の正確な評価ができない懸念があった。そこで除タンニンした茶葉浸出液を用いてろ紙によるニンヒドリンテストを試み、アミノ酸含量との関係を検討した。

育成材料を多数取り扱う場合、蒸熱し、乾燥して粉末にすることは労力と時間を要するため、生葉を低温に貯蔵し、必要に応じてとり出し、ニンヒドリンテストが行えれば都合がよい。そこで低温貯蔵された生葉を用いて簡易定量法によりアミノ酸含量を測定し、慣行の蒸熱、乾燥を行い、粉末にした試料との比較を行った。

これらについての検討結果をここに報告する。

2 試験材料および方法

2.1 試料の調製法試験 (1976年三番茶, 1977年二番茶)

材料には1976年は日本種8系統, 1977年には24系

† 嶽崎 亮: 茶技協講要, March 1969 [茶研報, No. 31. 56 (1969)]

統を用い、いずれも各茶期の摘採適期に一心三葉に摘芽したものを用いた。

測定用試料の調製方法は次のとおりである。

生葉試料：摘芽を1芽用いた区と2～3芽を混合して用いた区（以下生葉混合法と呼ぶ）を設けた。分析には摘芽を2～3mm幅にステンレスのはさみで切断して供試した。

乾燥試料：2～3本の摘芽を直接80℃の熱風で6時間乾燥し、粉末にした（以下生乾粉末法と呼ぶ）ものと粗大に砕いた（以下生乾破砕法と呼ぶ）区を設けた。

慣行法：2～3本の摘芽を蒸熱、乾燥し、粉末に調製した（以下慣行法と呼ぶ）。

アミノ酸の測定方法はグルタミン酸を基準物質としたニンヒドリン発色法による簡易検定法⁴⁾によった。

また1977年の対照としたアミノ酸合計値は摘芽20芽を蒸熱、乾燥し、粉末にしたものを茶のアミノ酸類の自動分析法⁵⁾に従い、日本電子のJLC-5AHを用いて測定した。

2.2 ろ紙によるニンヒドリン発色法試験（1978年一、二番茶）

嶺崎の開発したろ紙によるニンヒドリンテスト法の精度を向上するため、茶葉浸出液を脱タンニンしてろ紙にスポットし、その呈色度とアミノ酸含量の関係を調査した。

一、二番茶とも10系統を用い、各茶期の摘採適期の一、二葉芽を用い、生葉は2.1の生葉混合法に、粉末は同じく2.1の慣行法に準じて調製したものを試料とした。

また従来の生葉を直接使用するパンチテスト法には、摘芽の上部から第2葉目を用いた。

生葉1g（粉末の場合は200mg）を共栓試験管に入れ、熱湯10mlを加えてよく振り、25分間放置後、不溶性ポリビニルピロリドン粉末（ポリクレーAT）を300mg加えてよく振とうし、15分間放置し、ろ過した。ろ液0.005ml（ウルトラPA型マイクロピペット使用）をニンヒドリンテスト用ろ紙にスポットし、自然乾燥後の発色度を評定した。発色度の評点基準色としてはグルタミン酸液（グルタミン酸1mg/水1ml）を4, 3, 2, 1, 0.5mlを含む全容5mlの水溶液から0.005mlを採取し、ニンヒドリンテスト用ろ紙にスポットして5段階の基準を作成し、これを基準として従来のパンチテストおよびスポットテストの発色度を評定した。

対照として摘芽を蒸熱、乾燥し、粉末にした材料をアミノ酸簡易検定法により測定し、パンチテストやスポットテストの結果との相関を調査した。

2.3 材料の貯蔵試験（1978年一番茶）

低温貯蔵した生葉を直接利用してアミノ酸が分析できるかどうかを調査した。

やぶきた、たまみどり、おくみどりを用い、一心三葉

の摘芽をビニル袋に入れ、さらにアルミ箔で包み、これをポリ製ふたつきバットに入れて密封し、1℃と-40℃に貯蔵し、30日と60日後に取り出して分析した。

貯蔵終了後試料は一心二葉とし、2～3芽をステンレスのはさみで2～3mm幅に切断し、混合して試料とした。対照区は一心二葉芽を摘採期に20芽ほどとり、蒸熱、乾燥して粉末とし、生葉と同様の方法で貯蔵したものを使用した。アミノ酸の分析は簡易検定法によった。試料は生葉の場合は500mg、乾燥粉末の場合は100mgを用いた。

3 試験結果および考察

3.1 試料の調製法試験

生葉1芽法、生葉混合法、生乾破砕法、生乾粉末法および慣行法に従って調製した試料についてアミノ酸簡易定量法で分析を行った。

分析は2～3回反復して行い、得られた分析値の反復間の相関係数から、調製方法による測定値の再現性を比較した結果は表1のとおりである。

1976年の生葉1芽法は1本ごとの芽による変異のためか再現性は低かった。しかしそのほかの調製法による試料はいずれも0.1%水準で有意性が認められ、慣行法の試料に劣らない高い再現性を示した。

1977年は慣行法および生乾粉末法など粉末に調製した試料の再現性が高く、生乾破砕法や生葉混合法のように粗大に調製した試料は前者に比しやや低かった。

兩年度を通じての各調製法の再現性をみると、比較的手軽に調製し得る生乾粉末法が慣行法に劣らない再現性を示すことが確かめられた。

最も簡易で生葉を直接に利用できる生葉混合法は慣行法に比しやや再現性が劣った。

次に、調製法別の分析測定値を図1および表2に示す。

表1 調製法の再現性

年度 項目 調製法	1976年 n=8		1977年 n=24		
	反復	相関係数	反復	反復間の相関	
生葉1芽法	2	0.736			
生葉混合法	2	0.966***	2		0.772***
生乾破砕法	2	0.925***	3	1・2	0.706***
				1・3	0.834***
				2・3	0.806***
生乾粉末法	2	0.988***	3	1・2	0.847***
				1・3	0.936***
				2・3	0.825***
慣行法	2	0.952***	2		0.928***

*** は0.1%水準で有意

図1 アミノ酸簡易定量法による測定値 (1976年三番茶)

表2 アミノ酸分析法とアミノ酸簡易定量法の測定値 (1977・二番茶)

品 種 (系 統)	簡 易 定 量 法 %				自動分 析法%
	生 葉 混合法	生 乾 破砕法	生 乾 粉末法	慣行法	アミノ酸 合計値
NG—1	2.26	1.54	1.72	2.11	1.05
“ 4	1.58	1.46	1.36	1.53	0.63
“ 6	1.82	1.34	1.53	1.65	0.79
“ 8	2.50	2.02	1.97	2.14	1.09
“ 10	1.97	1.66	1.64	1.57	0.59
“ 20	2.78	1.80	1.87	1.81	0.83
“ 22	2.59	2.06	2.07	2.38	1.27
“ 24	1.85	1.70	1.69	1.60	0.72
ゆたかみどり	2.55	2.20	1.96	1.98	1.14
あさつゆ	2.15	1.41	1.87	2.07	0.99
やぶきた	1.76	1.46	1.57	1.51	0.62
みよし	2.06	1.72	1.80	1.78	0.88
Z 1	1.58	1.21	1.31	1.37	0.61
おくみどり	2.12	1.91	1.57	2.10	1.00
U 4	1.80	1.37	1.44	1.56	0.72
U 13	2.10	1.35	1.68	1.80	0.79
F ₁ —NN44	1.44	1.44	1.31	1.28	0.46
F ₁ —NN50	2.56	1.70	2.08	2.16	1.07
たまみどり	1.52	1.27	1.50	1.45	0.52
U 9	2.23	1.50	1.76	1.95	1.03
いずみ	1.81	1.51	1.33	1.55	0.58
かなやみどり	1.80	1.72	1.72	1.57	0.58
ふじみどり	2.26	1.42	1.62	1.79	1.08
はつともじ	1.20	1.13	1.23	1.76	0.73

1976年は図1のように生葉混合法の測定値がその他の調製法の測定値より高く、材料によってはかなり高い数値がみられた。また生乾粉末法も慣行法より全体に高く現われる傾向があった。

1977年の結果は表2のように、アミノ酸簡易定量法による測定値は自動分析法によるアミノ酸類合計値よりかなり高い数値を示した。このような結果は中川らの報告にも認められている。なお、簡易定量法による各調製法の測定値については1976年と同様に生葉混合法の測定値がそのほかの調製法の測定値より高い数値を示した。

このように、両年度とも生葉混合法の測定値が高かったことは、分析供試量が生葉の場合は500mgを用い、乾燥試料は100mgを用いるので、この供試量差のためか、あるいはその他に原因があったものか明らかではない。

各調製法間の相関関係は表3に示すとおりである。1976年は慣行法に対して生乾粉末法と生乾破砕法が高

表3 各調製法間および対照区との相関係数

	生 葉 混合法	生 乾 破砕法	生 乾 粉末法	慣行法
1 芽 法	0.485	0.510	0.326	0.376
生葉混合法	—	0.808*	0.908**	0.871**
生乾破砕法	0.729***	—	0.854**	0.959***
生乾粉末法	0.887***	0.731***	—	0.923***
慣 行 法	0.771***	0.585**	0.772***	—
自動分析法	0.801***	0.573**	0.753***	0.934***

注：斜線より上は1976年，下は1977年。

*は5%，**は1%，***は0.1%水準で有意。

く、生葉混合法がやや低かった。しかし、これらはいずれも有意な相関が認められた。生葉1芽法は慣行法に対して有意な相関は認められなかった。

1977年は慣行法の試料が自動分析法に対して最も高く、次いで生葉混合法、生乾粉末法が高かった。前年高かった生乾破砕法はやや低かった。

この結果、多数の材料を限られた期間内に集中的に取り扱う育成試験の場合には、生葉を直接に利用する生葉混合法は試料の調製は簡単であるが、簡易定量法の1日の分析能力に限度があるため、1日あたりの点数に制限がある。そこでどうしても最盛期の材料は貯蔵する必要があると考えられる。後述のようにまだ生葉の貯蔵問題は未解決の部分が多いので、現段階においては、乾燥操作の簡単な生乾粉末法や生乾破砕法が、保存材料を必要に応じて分析することが可能であるため、適当な調製法と思われる。

なお、少数個体のアミノ酸含有量を比較する場合は慣行法あるいは生葉混合法も有効と考えられる。

3.2 ろ紙によるニンヒドリン発色法

いままで、交配実生の幼苗期に生葉を直接ろ紙にパンチするニンヒドリンテスト法が利用され、この発色度合によってアミノ酸含有量が評価され、個体の間接的な品質評価として個体選抜が行われてきた。

しかし、本法はアミノ酸類以外の成分例えばポリフェノールなどの影響により、検定の精度が低くなる可能性

が考えられた。そこで精度向上を図るため著者らは2.2の方法を試み、この発色評点と従来のパンチテスト法評点ならびに慣行法による試料を用いてのアミノ酸簡易定量法による測定値との関係について調査した。その結果は表4のとおりである。

一番茶葉を用いて行ったスポット法およびパンチテスト法の評点とアミノ酸簡易定量法の測定値との相関関係は、スポット法とは有意な相関が認められたが、パンチテスト法とは相関が低く、前者のほうがアミノ酸含量を正確に評価していると思われる。

次に、二番茶の生葉および粉末を用いて行ったスポット法の評点とアミノ酸簡易定量法の測定値との相関係数は、生葉のスポット法とは0.87の高い相関が得られ、一番茶の場合より相関は高かった。

さらに粉末のスポット法は0.90で著しく高い相関であった。

なお、粉末の浸出液を用いて、ポリクラーATの添加、無添加の調製液をスポットした結果、無添加のものはスポットした中心部が発色せず、その周囲のみ発色を呈した。両スポット法の発色評点とアミノ酸簡易定量法の測定値との相関関係は、ポリクラーAT添加に比べ無添加のほうが低かった。

これらの結果から、生葉あるいは粉末の材料を用いて、ろ紙によるニンヒドリン発色法を行う場合は、ポリクラーATを使用して除タンニンを行った後に、ろ紙上にス

表4 ろ紙呈色評点と簡易定量測定値との関係 (1978)

茶 期 品 種(系統)	一 番 茶			二 番 茶			
	ろ 紙 呈 色 評 点		ア ミ ノ 酸 簡 易 定 量 法	ス ポ ッ ト テ ス ト ろ 紙 呈 色 評 点			ア ミ 酸 ノ 簡 易 定 量 法
	パ ン チ テ ス ト	ス ポ ッ ト テ ス ト		生 葉	粉 末	粉 末 [△]	
やぶきた	3	3	0.99%	3	3	3	1.59%
あさつゆ	4	5	1.30	3	3	3	1.63
ふじみどり	5	5	1.19	3	3	3	1.65
いずみ	2	2	1.22				
Z 1	3	3	1.03				
はつともじ	3	2	0.83	2	2	2	1.12
F ₁ -NN44	4	3	0.95	3	3	2	1.58
F ₁ -NN50	5	5	1.36	4	4	3	2.13
NG ₁ -10	4	4	1.12				
NG ₁ -21	5	5	1.62				
おくみどり				3	4	3	1.69
たまみどり				2	2	2	1.17
さやまかおり				4	5	4	2.11
ゆたかみどり				3	4	3	2.20
評点と測定値の 相 関 係 数	0.562	0.726*		0.871***	0.907***	0.760*	

注：*は5%，**は1%，***は0.1%水準で有意。

△はポリクラーATの無添加。

表5 貯蔵試料の測定値 % (1978・一番茶)

貯蔵温度	貯蔵日数	品種 試料		やぶきた		たみどり		おくみどり	
		生葉	粉末	生葉	粉末	生葉	粉末	生葉	粉末
	0日	1.65	1.47	1.17	1.37	1.60	2.05		
1°C	30	1.63	1.68	1.24	1.60	2.11	2.19		
	60	1.33	1.58	1.25	1.47	1.91	2.30		
-40°C	30	1.38	1.54	1.24	1.41	1.74	1.92		
	60	1.20	1.54	1.14	1.52	1.70	2.37		

注：貯蔵開始日 1978. 5. 23.

ポットすれば茶葉のアミノ酸含有量をかなり正確に評価できることが確かめられた。

3.3 材料の貯蔵試験

1°Cに貯蔵した摘芽は葉色の変化が著しく、30日後には心、第1葉、第2葉とも、60日後には摘芽全体が茶褐色を呈した。

一方、-40°Cに凍結貯蔵した摘芽は60日後でも葉色は正常であったが、分析試料として調製する時点で氷がとけ始め調製ににくい場合があり、とり出してから供試するまでの時間が試料によって異なったため、試料によって水分に差が生じる懸念もあった。

これらの貯蔵試料ならびに、同時に貯蔵した蒸熱、乾燥、粉末試料をアミノ酸簡易定量法で分析した測定値は表5のとおりである。

生葉試料の測定値は粉末試料の測定値よりいくぶん低い数値を示す場合が多かった。このことは3.1の試料調製法試験の場合と異なった結果を示している。この原因については生葉を500mg、乾燥粉末を100mg使用したためか、貯蔵した摘芽の水分含量の違いか、あるいは試料間のばらつきによるものか明らかでない。

また、同じ品種の生葉あるいは粉末の項は、材料が同じであるからアミノ酸含量はあまり変わらないはずであるが、測定値はかなりばらついている。

このことから摘芽をいきなり貯蔵してアミノ酸含有量の定量を行うと、貯蔵温度や日数によってはかなりばらつき、試料調製の操作上からもまだ問題が残されており、凍結貯蔵については今後十分検討する必要があると思われる。

4 摘 要

煎茶用品種の個体選抜時に茶葉のアミノ酸含有量を簡

易に検定する方法として、アミノ酸簡易定量法とろ紙を用いてのニンヒドリン発色法の二つの方法がある。この二つの方法について、前者においては分析に用いる試料の簡易な調製法の検策、後者については除タンニンを行った試料の浸出液を用いて、ろ紙を用いたスポット法を試み、それぞれについて検定精度を調べた。

また、低温貯蔵された生葉によるアミノ酸含有量の測定の可能性についても検討した。その結果次のことが確かめられた。

1 アミノ酸簡易定量法に用いる試料については、生葉混合法および生乾粉末法により調製した試料を用いれば分析の再現性も高く、分析測定値はアミノ酸自動分析法によるアミノ酸合計値との相関も高いことが確かめられた。しかし育成の現場で実際に応用できるのは、貯蔵できるという点から生乾粉末法が現段階では最も適用しやすい方法と考えられた。

2 チャ葉のアミノ酸含有量の簡易検定法として、ろ紙によるニンヒドリン発色法を利用する場合は、生葉および粉末試料の浸出液にポリクラーATを加えて、除タンニンを行ってろ紙上にスポットすれば、茶葉のアミノ酸含有量がかなり正確に評価できることが確かめられた。

3 摘芽を1°C、-40°Cに30日と60日間貯蔵した試料を、アミノ酸簡易定量法で分析するにはまだ問題があることがわかった。

終わりに本試験を遂行するに当たり、ご便宜とご指導をいただいた当場製茶部の化学研究室長中川致之博士と有益な助言をいただいた栽培部茶樹第2研究室長安間舜氏に厚くお礼申し上げる。また、分析を担当された酒井静子氏に深謝する。

5 文 献

- 1) 勝尾 清, 渡辺 明, 増田清志: 木本作物の育種, pp. 149~171 (1973).
- 2) 酒井慎介, 羽場 雍, 土井芳憲, 加納照崇, 中山 仰: 木本作物の育種, pp. 191~204 (1973).
- 3) 安間 舜: 茶研報, No. 45, 13~16 (1977).
- 4) 中川致之, 天野いね, 阿南豊正, 小野田恭久, 向笠芳郎, 大森 薫, 太田勇夫: 茶研報, No. 46, 66~73 (1977).
- 5) 久保田悦郎, 中川致之: 茶技研, No. 45, 51~57 (1973).

(Apr. 19, 1979)