

# 日本の伝統的な調味料におけるメイラード反応と風味修飾成分の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-16 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井上, 裕 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/19707">http://hdl.handle.net/10291/19707</a>

明治大学大学院農学研究科

2016年度

博士学位請求論文

日本の伝統的な調味料における  
メイラード反応と風味修飾成分の解析

Analysis of flavor-modulating  
Maillard reaction products  
in traditional Japanese seasonings

学位請求者 農芸化学専攻

井上 裕

# 日本の伝統的な調味料におけるメイラード反応と風味修飾成分の解析

## 目次

略語一覧	7
序論	9
第1章 豆味噌における加熱香気成分と風味修飾効果	30
諸言	31
第1節 豆味噌の加熱香気の影響	33
1. 実験材料および方法	33
1.1. 試料・試薬	33
1.2. 揮発性成分の分析	34
1.2.1. 固形分	
1.2.2. NaCl	
1.2.3. MSG	
1.2.4. 核酸	
1.3. 官能評価	36
1.3.1. パネルトレーニングおよびパネルの選定	
1.3.2. 加熱味噌溶液(米味噌、豆味噌)の評価	
1.3.3. 豆味噌溶液(未加熱、加熱)の評価	
2. 結果および考察	39
2.1. 味噌溶液の成分組成	39
2.2. 味噌の種類の違いによる後味のうま味への影響	39
2.3. 豆味噌の加熱の有無による後味のうま味への影響	40
第2節 SDEを用いた加熱香気成分の解析	41
1. 実験材料および方法	41
1.1. 試料・試薬	41
1.2. SDEによる揮発性化合物の抽出	41

1.3. 揮発性化合物の分析	43
1.3.1. GC 分析条件	
1.3.2. GC-O/AEDA	
2. 結果および考察	46
2.1. SDE による揮発性化合物分析	46
2.2. 豆味噌の鍵香気化合物	47
第3節 鍵香気化合物の風味修飾効果の解析	54
1. 実験材料および方法	54
1.1. 試料・試薬	54
1.2. SPME による揮発性化合物分析	54
1.3. dimethyl trisulfide の定量分析	56
1.4. 官能評価	57
1.4.1. 鍵香気化合物の最小検知濃度	
1.4.2. 鍵香気化合物のうま味溶液添加試験	
1.4.3. 鍵香気化合物の豆味噌溶液添加試験	
2. 結果および考察	59
2.1. 鍵香気化合物の最小検知濃度	59
2.2. 鍵香気化合物の後味のうま味への寄与	60
第1章まとめ	63
参考文献(第1章)	64

第2章 豆味噌における高分子画分と風味修飾効果	67
諸言	68
第1節 豆味噌の高分子画分の風味への影響と成分組成	70
1. 実験材料および方法	70
1.1. 試料・試薬	70
1.2. 味噌高分子画分の調製	71
1.3. モデルメイラードペプチドの調製	71
1.4. モデルメラノイジンの調製	71
1.5. 官能評価	72
1.5.1. パネルトレーニングおよびパネルの選定	
1.5.2. 高分子画分の評価	
1.6. 高分子画分の成分分析	76
1.6.1. 固形分	
1.6.2. 全窒素	
1.6.3. 褐色度	
1.6.4. 構成アミノ酸	
1.6.5. 分子量分布	
2. 結果および考察	79
2.1. 豆味噌の高分子画分の「こく」への影響	79
2.2. 豆味噌高分子画分の成分組成	82
2.3. 豆味噌におけるメラノイジンの「こく」への寄与	88
第2節 メイラードペプチドの風味修飾効果と構造解析	89
1. 実験材料および方法	89
1.1. 試料・試薬	89
1.2. モデルメイラードペプチドの調製	89
1.2.1. glucose 型メイラードペプチド	
1.2.2. 化学修飾型メイラードペプチド	
1.2.3. メイラード反応後期生成物抑制メイラードペプチド	
1.2.4. xylose 型メイラードペプチド	
1.3. 官能評価	91

1.4. メイラードペプチドの構造解析	92
1.4.1. 分子量分布	
1.4.2. FT-IR	
1.4.3. 構成アミノ酸	
1.4.4. glucose	
1.4.5. 褐色度	
1.4.6. $\alpha$ -ジカルボニル化合物	
1.4.7. FMAA (2-furoylmethyl amino acid)	
1.4.8. Fluorescamine assay	
1.4.9. CD	
2. 結果および考察	99
2.1. glucose 型メイラードペプチドの風味修飾効果	99
2.2. glucose 型メイラードペプチドの構造解析	101
2.3. 風味修飾効果に必要な修飾基の決定	107
第3節 豆味噌におけるメイラードペプチドの風味修飾効果	114
1. 実験材料および方法	114
1.1. 試料・試薬	114
1.2. 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの調製	114
1.3. 成分分析	115
1.3.1. 構成アミノ酸	
1.3.2. FMAA (2-furoylmethyl amino acid)	
1.3.3. 褐色度	
1.4. 官能評価	116
2. 結果および考察	118
2.1. 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの構造解析	118
2.2. 豆味噌の高分子画分における glucose 型メイラードペプチド含有量	120
2.3. 豆味噌における glucose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与	123
2.4. 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの「こく」増強効果の比較	125
第2章まとめ	127
参考文献(第2章)	128

第 3 章 熟成本みりんにおける風味修飾成分の解析	130
諸言	131
第 1 節 熟成本みりんの風味特性と風味修飾成分の探索	132
1. 実験材料および方法	132
1.1. 試料・試薬	132
1.2. 成分分析	133
1.2.1. L、D-遊離アミノ酸(OPA/IBLC 法)	
1.2.2. glucose	
1.2.3. $\alpha$ -ジカルボニル化合物	
1.2.4. 一般分析(着色度、pH)	
1.3. fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid 分析	136
1.3.1. 合成検討(陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC 分析)	
1.3.2. LC-ESI-Q-TOF-MS によるスペクトル測定	
1.3.3. fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid の定量	
1.4. 官能評価	140
1.4.1. 熟成本みりんの風味特性	
1.4.2. 添加試験	
2. 結果および考察	142
2.1. 熟成による成分変化	142
2.1.1. 一般成分	
2.1.2. L、D-アミノ酸	
2.1.3. fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid	
2.2. 熟成本みりんの味質特性	155
2.3. D-アミノ酸およびメイラード反応生成物の風味への寄与	156
第 2 節 本みりんの熟成における D-アミノ酸生成機構	158
1. 実験材料および方法	158
1.1. 試料・試薬	158
1.2. fructosyl amino acid 分析	158
1.3. 加熱試験	160

2. 結果および考察	161
2.1. fructosyl amino acid 含有量と D 体存在比の相関性	161
2.2. 加熱試験	167
第 3 節 その他熟成食品の D-アミノ酸の含有量および基本味への影響	171
1. 実験材料および方法	172
1.1. 試料・試薬	172
1.2. L、D-遊離アミノ酸分析 (FLEC 法)	173
1.3. 官能評価	175
1.3.1. 恒常刺激法	
1.3.2. Time Intensity 法	
2. 結果および考察	176
2.1. 熟成食品における D-アミノ酸含有量	176
2.2. D-アミノ酸の基本味への寄与	177
第 3 章まとめ	182
参考文献(第 3 章)	183
総合討論	186
謝辞	192



## 略語一覧

本論文で用いた略語を以下に示す。

### <各章共通>

Ala	: Alanine
Arg	: Arginine
Asn	: Asparagine
Asp	: Aspartic acid
Gln	: Glutamine
Glu	: Glutamic acid
Gly	: Glycine
His	: Histidine
Ile	: Isoleucine
Leu	: Leucine
Lys	: Lysine
Met	: Methionine
Phe	: Phenylalanine
Pro	: Proline
Ser	: Serine
Thr	: Threonine
Trp	: Tryptophan
Tyr	: Tyrosine
Val	: Valine
ESI	: Electrospray Ionization
GMP	: 5'-Guanosine Monophosphate (グアニル酸ナトリウム)
IMP	: 5'-Inosine Monophosphate (イノシン酸ナトリウム)
MSG	: Monosodium Glutamate (グルタミン酸ナトリウム)
NaCl	: Sodium Chloride (塩化ナトリウム)
RO	: Reverse Osmosis
UPW	: Ultra Pure Water

### <序論>

CaSR	: Calcium Sensing Receptor (カルシウム感知受容体)
fMRI	: functional Magnetic Resonance Imaging
GPCR	: G Protein Coupled Receptor (Gタンパク質共役型受容体)
ISO	: International Organization for Standardization (国際標準化機構)

<第1章>

AEDA	: Aroma Extract Dilution Analysis
BHT	: Butylated Hydroxytoluene
FD factor	: Flavor Dilution factor
FID	: Flame Ionization Detector
GC	: Gas Chromatography
GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GC-O	: Gas Chromatography-Olfactometry
HDMF	: 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone
HEMF	: 4-Hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone
I.S.	: Internal Standard
K.I.	: Kovats Index
MDC	: Minimum Detection Concentration (最小検知濃度)
SAFE	: Solvent Assisted Flavor Evaporation
SDE	: Simultaneous Distillation Extraction (連続水蒸気蒸留)
SPME	: Solid Phase Microextraction

<第2章>

MEL	: Melanoidin (メラノイジン)
SP	: Soy Peptide (大豆ペプチド)
4hr-heated SP	: Soy Peptide heated for 4 hours
MPs	: Maillard Reacted Peptides (メイラードペプチド)
Glc-1MPs	: Maillard Reacted Peptides by glucose for 1 hour
Glc-4MPs	: Maillard Reacted Peptides by glucose for 4 hours
Glc-7MPs	: Maillard Reacted Peptides by glucose for 7 hours
Ace-MPs	: Maillard Reacted "Acetylated Peptides" by glucose for 1 hour
GO-MPs	: Maillard Reacted Peptides by glyoxal
AG-MPs	: Maillard Reacted Peptides by glucose for 4 hours with aminoguanidine
Xyl-0.3MPs	: Maillard Reacted Peptides by xylose for 20 min
CD	: Circular Dichroism (円偏光二色性)
DAN	: 2,3-Diaminonaphthalene
DETAPAC	: Diethylenetriaminepentaacetic Acid
FM-	: 2-Furoylmethyl-
FMAA	: 2-Furoylmethyl Amino Acid
FT-IR	: Fourier Transform Infrared spectrometer (フーリエ変換赤外分光光度計)
OD	: Optical Density
RI	: Refractive Index

<第3章>

NRM	: Non-Ripened Mirin (未熟成本みりん)
NRMT	: Non-Ripened Mirin for thermal test (加熱試験用未熟成本みりん)
RM	: Ripened Mirin (熟成本みりん)
ARPs	: Amadori Rearrangement Products
DAA	: D-Amino Acid
%D	: The relative quantities of D-enantiomers (D体存在比)
FLEC	: (+)-1-(9-Fluorenyl)-ethyl chloroformate
Fru-	: Fructosyl-
IBLC	: <i>N</i> -isobutyryl-L-cysteine
LAA	: L-Amino Acid
OPA	: <i>o</i> -Phthalaldehyde
PSE	: Point of Subjective Equality (主観的等価濃度)
PTFE	: polytetrafluoroethylene

## 序論

食は生理学的には栄養補給行動であるが、ヒトは他の動物と異なり、食行動そのものを生活様式に組み込み、文化として昇華している。この食文化は、それぞれの地域や民族において独自に培われたものであるため、食嗜好はその地域ごとに大きく異なっていることが多い<sup>1)</sup>。

日本の和食文化は、2013年に「和食;日本人の伝統的な食文化」としてユネスコ無形文化遺産に登録された際の登録理由に挙げられたように、①多様で新鮮な食材とその持ち味を尊重する調理技術が発達していること、②健康的な食生活を支える栄養バランスがよい一汁三菜を基本としていること、③食事の場において器などで自然の美しさや四季の移ろいを表現すること、④年中行事と密接に関わっていること、これら4つの特徴を有している<sup>2)</sup>。この中で「おいしさ」に関わる点は「食材の持ち味の尊重」であり、これは和食が「だし」や味噌、みりん、醤油などの伝統的な調味料をベースに素材の「うま味」を引き出し、繊細で上品な味と香りを楽しむことを大切にしてきたことを示している<sup>1)</sup>。この繊細な風味を表現するため、和食文化では、「こく」や「厚み」、「持続性」や「味の広がり」といった基本5味以外の感覚を表現することが多くなったものと思われる。

この和食に広く用いられる味噌、みりん、醤油などの発酵・熟成した調味料は、食文化の中で最初から存在していたわけではなく、保存目的で作られていたものが独自の風味を有し、その結果、調味目的で使用されるようになったものと考えられる<sup>3)</sup>。そのため、それらの製法や調理法は、長年培われた多くの人々の経験から生まれたものであり、未だにそのおいしさに関わるメカニズムが不明な場合も多い。食文化が豊かになっている現代において、人々のおいしさに対する欲求は膨らみ続けており、熟成は本物の味を求める手段として重要な役割を担っている。そのため、熟成におけるおいしさに関わるメカニズムの解明は、より質の高い食品の加工・調理技術の確立に大きな役割を果たすものと考えられる<sup>4)</sup>。

そこで本研究は和食に用いられる長期熟成した調味料である「豆味噌」と「熟成本みりん」に着目し、その熟成工程や調理工程で生成する成分が風味に及ぼす影響について解明することを目的に行った。以下にその背景について概説する。

## 1. 食品のおいしさ

食品において「おいしさ」は非常に重要な問題であるため、ヒトが食品を摂取する際に感じている「おいしさ」に影響を及ぼす要因について、様々な分類がなされている。Fushiki は、栄養素の欠乏に起因する「生理的欲求からくるおいしさ」、各地域における同一嗜好の安心感に起因する「文化的合致からくるおいしさ」、高級志向などの「情報がリードするおいしさ」、脳内の報酬系に起因する「薬理的おいしさ」の4つに分類している<sup>5)</sup>。また Sagara は食品の有する外観、成分、構造に由来する外的刺激である「知覚的要因」、ヒトの有する心理的・生理的条件に由来する内的刺激である「要求的要因」、食品について認知される付加情報に由来する外的刺激である「認知的要因」の3つに分類している<sup>6)</sup>。他にも Nakajima が食行動から見た分類などを行っているが<sup>7)</sup>、いずれの分類においても、ヒトの生理状態、感覚器官による知覚、脳による情報処理がおいしさを決定する上で重要な項目であることを示している。これら3項目の中で最も個々の影響が低く、普遍的であるのは、感覚器官による知覚である。

ヒトは食品を摂取する際に、五感を総動員して味わっている(**Fig. P-1.1.**)。食材の色や料理の盛り付けなどには視覚を、咀嚼したときの咀嚼音や飲み込んだときの嚥下音などには聴覚を、料理の温かさや舌触りなどには触覚を働かせている。そして、最もおいしさを判断する上で働かせている器官が味覚と嗅覚である。この味覚と嗅覚は本来区別されるべき感覚であるが、食品を摂取した際には舌や口腔内で味覚を感じるのと同時に、食品中の香気の中咽頭から鼻道を経て鼻腔内に抜けるため、ヒトは味と香りの複合感覚である風味として感知しており、この風味が食品のおいしさを決定する因子として重要な地位を占めている<sup>1)</sup>。この風味はフレーバーとも呼ばれ、近年では味覚、嗅覚だけでなく、「味わっている間に感じられる嗅覚、味覚、体性感覚からなる複合的な感覚」と触覚も含めた複合感覚として International Organization for Standardization (ISO) にて定義がなされ、その範囲が広がり始めている<sup>8)</sup>。

感覚器と脳の研究の進歩に従い風味の定義は少しずつ変化しているが、風味の付与に特化した食品が調味料であり、伝統的な調味料には長い歴史の中で培われた人々の嗜好を満足させる複雑な風味が含まれており、様々な料理のおいしさに寄与している<sup>3)</sup>。

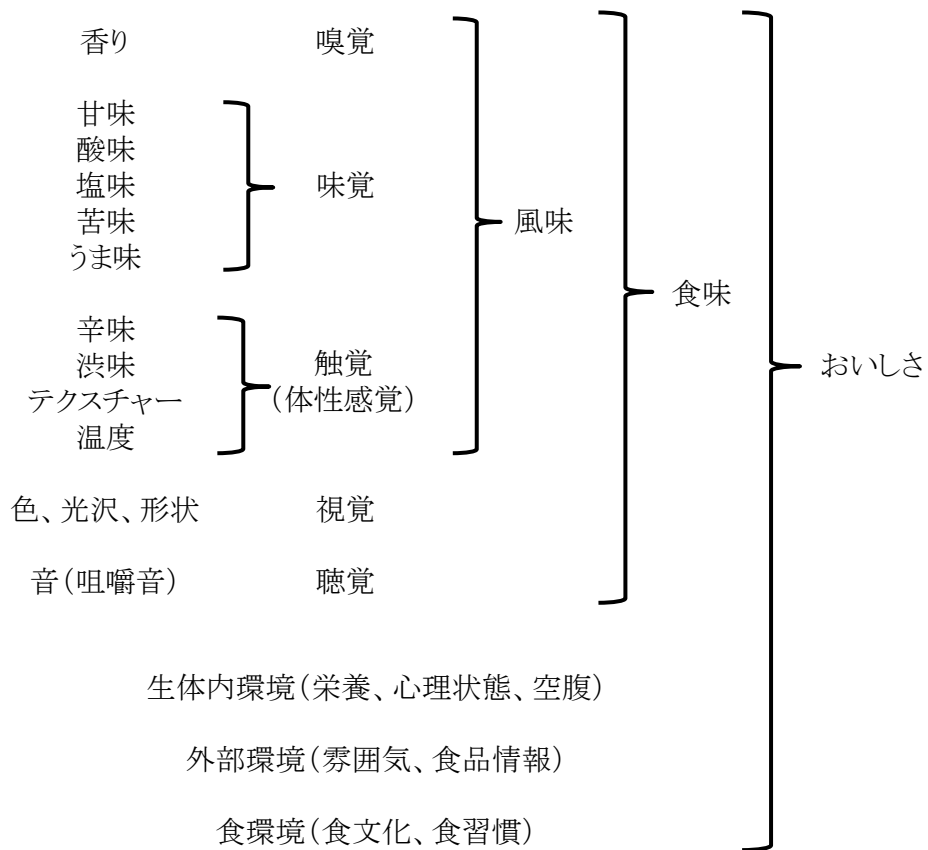


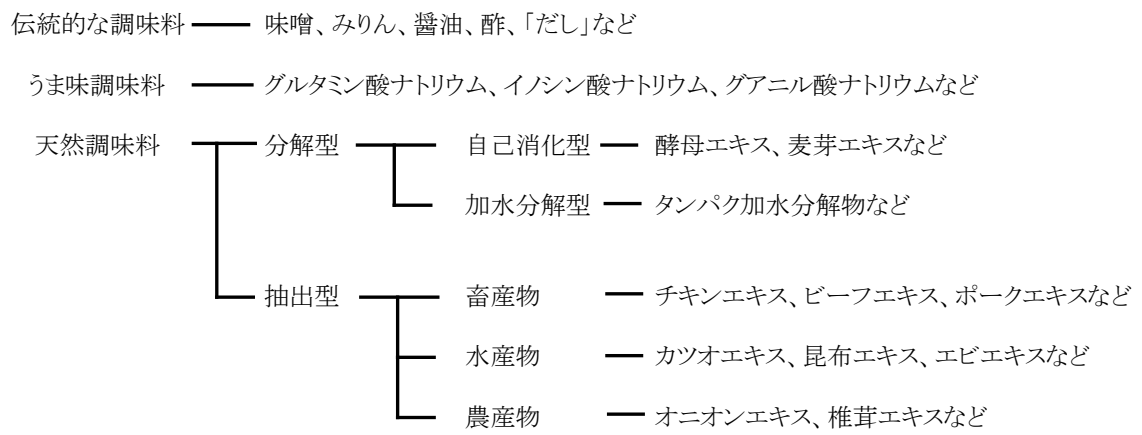
Fig. P-1.1. 食べ物のおいしさと五感(文献 1)より改変)

## 2. 調味料の役割

日本では古くから食品をおいしく食べるために、味噌やみりん、醤油や「だし」などを用いて調味を行ってきた。調味の重要な役割は、食品素材の持ち味を生かしながら、風味をバランスよく整えることであり、食品の品質保存、安定供給を目的として製造されている現代の加工食品、調理食品においても調味料に求められる役割は変化していない<sup>3)</sup>。現代においては、味噌やみりんのような伝統的な調味料の他に、発酵法により工業化されたうま味化合物であるグルタミン酸ナトリウム(MSG)や5'-ヌクレオチドのイノシン酸、グアニル酸(IMP、GMP)、天然原料を酸や酵素で分解したタンパク加水分解物や酵母エキス、天然原料から風味成分を抽出した畜肉エキスや水産エキスなどがあり、いずれも加工食品において欠かせない存在となっている(Fig. P-1.2.)<sup>1,9)</sup>。

これらの天然原料から分解・抽出した調味料(天然調味料)は、食品において①呈味の増強及び改良効果、②香り付与及び改良効果、③うま味増強効果、④特徴づけ効果、⑤コストダウン効果(経済性)が期待され、幅広く使用されている<sup>3)</sup>。しかしこれらの天然調味料が加工食品に広く使用されている一方で、本格、高級を求める現在の食の志向においては、より複雑な呈味や香気の付与(増強)へのニーズは年々増しており、伝統的な調味料の複雑な風味に寄与している化合物の解明に向けた研究は現在も進んでいる。

伝統的な調味料が複雑な風味を持つ理由としては、「原料がもともと有している風味成分」に加え、「発酵・熟成中に微生物や酵素の関与により生成する風味成分」と「発酵・熟成中に非酵素的反応により生成する風味成分」、「調理工程中に非酵素的反応により新たに生成する風味成分」と、計4種の経路で風味成分が生成し、数千にも及ぶ化合物が存在するためである<sup>1)</sup>。そしてこれらの化合物が各感覚器官(味覚、嗅覚)に対し単独の作用だけでなく、同一感覚器内の相互作用(インターモーダル相互作用)や、味覚と嗅覚という感覚器を跨いだ相互作用(クロスモーダル相互作用)を生じさせることから、我々は伝統的な調味料に非常に深い味わいを感じるものと考えられる<sup>10)</sup>。



**Fig. P-1.2. 調味料の分類(文献 3)より改変)**

### 3. 食品とメイラード反応

食品の製造工程において、非酵素的反応(加熱反応)により生成される風味成分は最も大きなグループを占めており、およそ 3500-4500 の成分が存在すると言われている<sup>11)</sup>。非酵素的反応には、脂質の酸化反応や糖のカラメル化反応などがあるが、風味形成に最も重要な反応と言われるのがメイラード反応である。

メイラード反応は、アミノ化合物とカルボニル化合物の化学反応であるアミノカルボニル反応全体のことを指し、食品の熟成工程や調理工程に限らず、生体や土壌においても生じている反応である。食品においては、アミノ化合物としてアミノ酸が、カルボニル化合物として還元糖が出発物質となることが多く、風味形成だけでなく褐変(着色)にも関わっている。アミノ酸と還元糖のメイラード反応の概要を **Fig. P-1.3.** に示した<sup>12)</sup>。メイラード反応の初期段階では、アミノ酸のアミノ基の窒素原子が糖のカルボニル基の炭素へ求核的に反応してイミンを生成し、さらにアマドリ転位により安定なアマドリ化合物となる(**Fig. P-1.4.**)<sup>8)</sup>。このアマドリ化合物がさらに加熱されることで 1-deoxyosone や 3-deoxyosone といった  $\alpha$ -ジカルボニル化合物に分解される。これらの  $\alpha$ -ジカルボニル化合物が環化することにより、前者からは maltol など、後者からは 5-(hydroxymethyl)-2-furfural など、pyran 類、furan 類を主とした含酸素複素環化合物が生成する(**Fig. P-1.5.**)<sup>13)</sup>。これらの化合物は香気化合物であり、甘い香り様やカラメル様と言われる香気特性を持つものが多い。一方、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物はアミノ酸と反応し、元のアミノ酸よりも炭素が 1 つ少ないアルデヒドとアミノケトンを生産する(**Fig. P-1.6.**)。これはストレッカー分解反応と呼ばれ、生成するアルデヒドはストレッカーアルデヒドと呼ばれる<sup>13)</sup>。例えば leucine から 3-methylbutanal、phenylalanine から phenylacetaldehyde が生成される。ストレッカーアルデヒドはその種類により香気特性がそれぞれ異なるが(3-methylbutanal: 麦芽様、phenylacetaldehyde: 甘い香り様 など)、閾値が比較的低いものも多く、食品の加熱香気として重要であることが知られている。

もう一方の生成物であるアミノケトンは、2 分子が縮合し、含窒素複素環化合物である alkylpyrazine 類を生産する。alkylpyrazine 類はコーヒーやココアの香気成分として広く知られ、ロースト様やチョコレート様、ナッツ様と言われる香気特性を有するものが多い。alkylpyrazine 類を含む pyrazine 類は、加熱した肉類やじゃがいも加工品などからも検出が報告されており、幅広く食品に存在している香気化合物である<sup>13)</sup>。

また食品において重要な香気化合物が、硫黄原子を有する含硫化合物である。ストレッカー分解において、含硫アミノ酸である methionine からは methional が生成し(**Fig. P-1.7.**)、cysteine からは様々な含硫化合物の生成に関わる硫化水素( $H_2S$ )が生成する。硫化水素は、



含酸素複素環化合物である furfural や 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone から 2-furfurylthiol や 2-methyl-3-furanthiol といった thiol 類を生成すること (Fig. P-1.8.)<sup>14)</sup> や、含硫複素環化合物である 2-acetyl-5-methylthiophene などの thiophene 類の生成に関与していることなどが報告されている (Fig. P-1.9.)<sup>15)</sup>。含硫化合物は閾値が非常に低く、特異な香気を有していることが多いため、調理食品の香気に大きく寄与していることが多い (methional : 硫黄様 (加熱したじゃがいも様)、2-furfurylthiol : コーヒー様、2-methyl-3-furanthiol : ローストミート様、2-acetyl-5-methylthiophene : 硫黄様、甘い香り様 など)。以上のように、メイラード反応においては香気化合物として含酸素複素環化合物、含窒素複素環化合物、含硫化合物、アルデヒドなど多数の化合物が生成し、反応の後期段階では、香気化合物の生成にも関与した様々な中間化合物の重合が進み、不揮発性の褐色物質メラノイジンが生成する。

メラノイジンは主に食品の着色に寄与しているが、その他にも機能性を有することが知られ、「脂質過酸化反応に対する抗酸化活性」<sup>16)</sup>、「変異原抑制作用」<sup>16)</sup>、「金属キレート作用や食物繊維様作用による腸内菌叢改善作用」<sup>17)</sup>などが知られている。また低分子の不揮発性成分はアマドリ化合物が醤油製造時の色素形成の指標として、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物の1つである 3-deoxyglucosone が清酒製造時の熟成香発現の指標として用いられており、食品製造における品質制御に関わりが深い<sup>16)</sup>。一方で、これら不揮発性成分の風味への寄与については、揮発性成分 (香気成分) に比べて研究が遅れていたが、分析技術の発展に伴い、近年少しずつ解明されてきている (詳細は次項)。

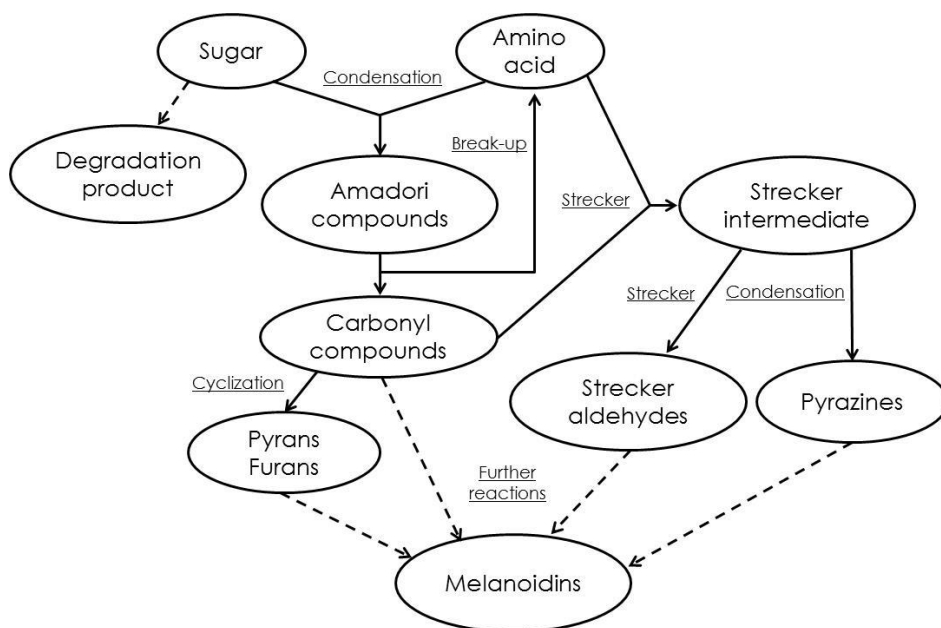


Fig. P-1.3. メイラード反応による香気化合物の生成 (文献 12) より改変)

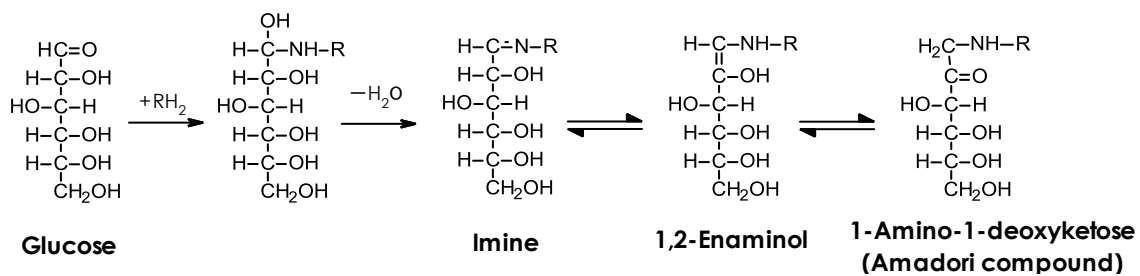


Fig. P-1.4. メイラード反応の初期段階<sup>8)</sup>

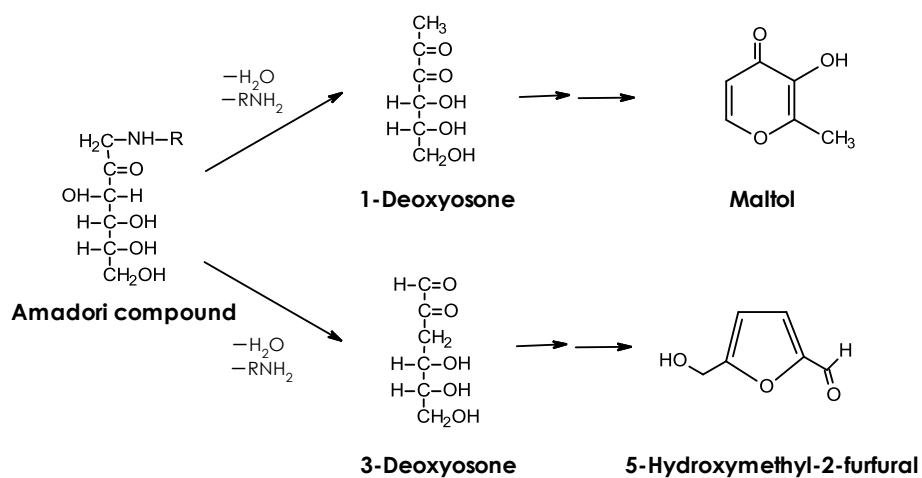


Fig. P-1.5. Pyran 類、Furan 類の生成<sup>13)</sup>

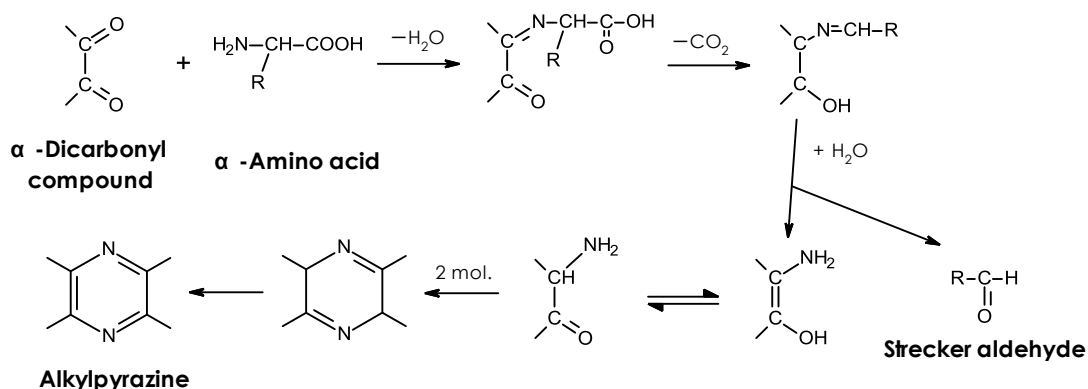


Fig. P-1.6. ストレッカー分解によるストレッカーアルデヒド、Pyrazine 類の生成<sup>13)</sup>

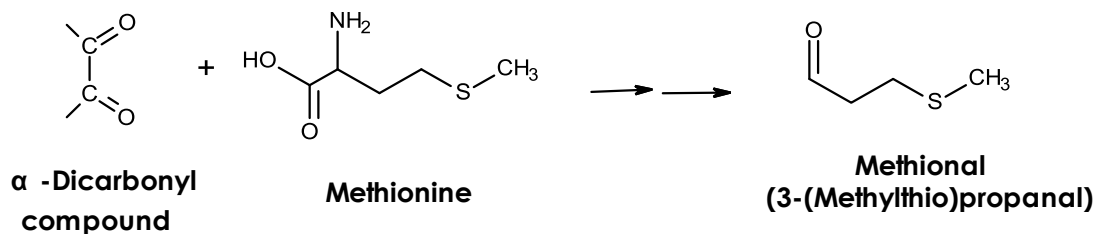


Fig. P-1.7. Methional の生成<sup>8)</sup>

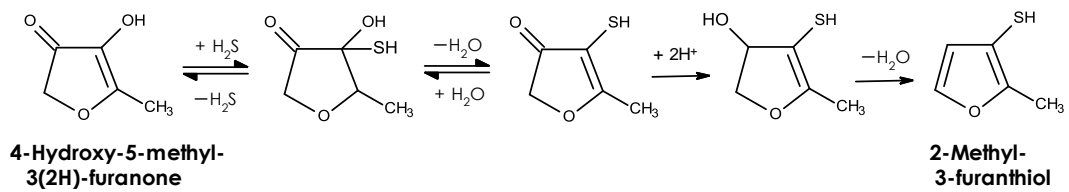


Fig. P-1.8. 2-Methyl-3-furanthiol の生成<sup>14)</sup>

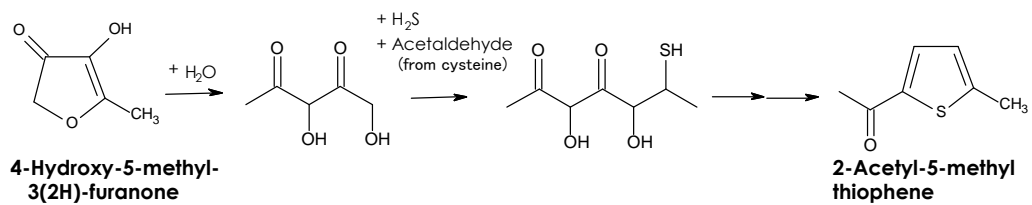


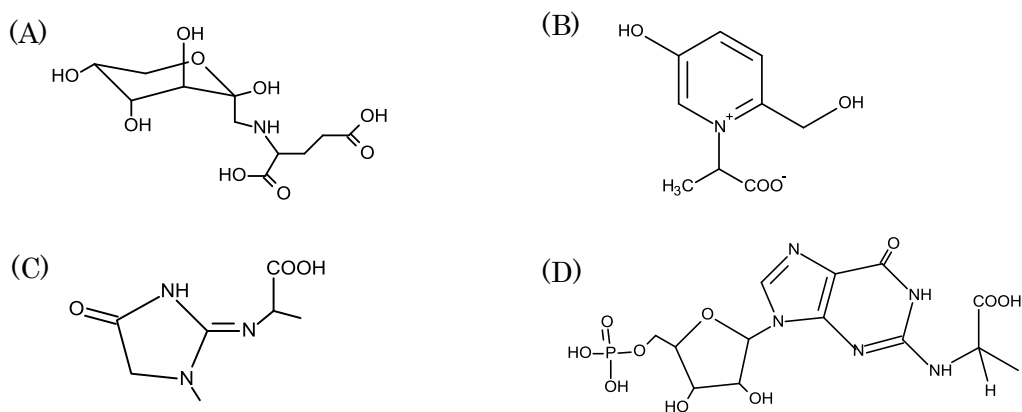
Fig. P-1.9. 2-Acetyl-5-methylthiophene の生成<sup>15)</sup>

#### 4. メイラード反応の関与する風味修飾成分

近年、分析技術や分画技術の発展に伴い、様々な調味料から風味に寄与する不揮発性のメイラード反応生成物が複数報告されている。メイラード反応の初期反応生成物であるアマドリ化合物においては、Shiga らが 25 種類の醤油についてメタボローム解析を行い、うま味の評価結果との主成分分析の結果から D-glucose と L-glutamic acid のアマドリ化合物である fructosyl glutamic acid (**Fig. P-1.10.(A)**) がうま味に寄与しており、5mM において glutamic acid よりも fructosyl glutamic acid のほうが、うま味が強いことを報告している<sup>18)</sup>。また Ottinger らは、逆相クロマトグラフィーによる分画などにより beef broth (牛肉エキス) 中に D-glucose と L-alanine のメイラード反応生成物である N-(1-carboxyethyl)-6-(hydroxymethyl)pyridinium-3-ol (alapyridaine) (**Fig. P-1.10.(B)**) を見出し、この化合物が甘味とうま味に寄与していることを報告している<sup>19)</sup>。同様に、煮込んだ牛肉エキス (stewed beef juice) からは Sonntag らにより親水性相互作用クロマトグラフィーにて creatinine と単糖のメイラード反応生成物である N-(1-methyl-4-oxoimidazolidin-2-ylidene)aminopropionic acid (**Fig. P-1.10.(C)**) が見出され、官能評価によりこの化合物が牛肉エキスの mouthdryness (口腔内が乾いた感覚) と mouthfulness に寄与していることが報告されている<sup>20)</sup>。一方で酵母の抽出物である酵母エキスからは、Festring らによりうま味増強作用を有した核酸のメイラード反応物である N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)guanosine 5'-monophosphate (**Fig. P-1.10.(D)**) が見出されている<sup>21)</sup>。

また複合物としては、Ogasawara らが大豆ペプチド (1-5 kDa) と単糖のメイラード反応生成物であるメイラードペプチドに mouthfulness と continuity の増強効果があり、長期熟成米味噌の風味に寄与している可能性を報告している<sup>22,23)</sup>。

以上のように調味料の中にはメイラード反応の関与する不揮発性の風味修飾成分が多く存在し、調味料のもつ複雑な風味の一部を構成しているものと考えられる。



**Fig. P-1.10** メイラード反応の関与する風味修飾成分<sup>18,19,20,21)</sup>

## 5. 風味の感知機構

風味(フレーバー)は、「味わっている間に感じられる嗅覚、味覚、体性感覚からなる複合的な感覚」と定義されているが<sup>8)</sup>、それぞれの感覚器官での受容経路は大きく異なる。

嗅覚は、香気化合物により鼻の嗅上皮の嗅細胞が化学的に刺激され、発生した電気信号が嗅神経を経て、脳内の前梨状皮質や扁桃体などに伝達される。この嗅細胞の嗅覚受容体は、1つの受容体で類似した複数の化合物を受容することができ、また香気化合物は数種から数十種の受容体と結合できることが知られている。嗅上皮には約 1000 種の嗅覚受容体があり、それぞれが複数の化合物に結合できることから、一つの香りで活性化される受容体の種類は特定のパターンを示し、このパターンを脳が識別することで、多種多様な香りの組み合わせを識別していると考えられている<sup>10,24)</sup>。

味覚は舌や軟口蓋、咽頭部に存在している味蕾の味細胞が化学的に刺激され、発生した電気信号が味神経を経て、脳内の第一次味覚野に伝達される。細かくは、舌の茸状乳頭の味蕾は鼓索神経、有郭乳頭、葉状乳頭、咽頭部の味蕾は舌咽神経、軟口蓋の味蕾は大錐体神経に繋がり、味情報を脳に送っている。嗅覚と異なり、味覚は基本味と呼ばれる 5 種類の決まった味(甘味、うま味、苦味、酸味、塩味)から構成されており、それぞれが異なる受容体で感知している。現在では、主に甘味、うま味、苦味はそれぞれ G タンパク質共役型受容体(GPCR)の T1R2/T1R3、T1R1/T1R3、T2Rs で受容されており、酸味と塩味は味細胞膜のイオンチャンネルの PKD2L1/PKD1L3、ENaC で受容されていると考えられているが、それぞれの基本味において他の受容体候補もあり、まだ全容は解明されていない。また味神経が脳にどのように味質を伝えているかについても、「特定の味神経の活動が特定の味質を伝達している」というラベルドライン説と、嗅神経と同様に「複数の味神経の活動パターンにより特定の味質を識別している」というアクロスファイバーパターン説と、2つの説が唱えられており、未だ結論は出していない<sup>10,25)</sup>。

体性感覚には、主に TRP スーパーファミリーと呼ばれるチャンネルが関与しており、辛味や温度による刺激で開口する TRPV1(カプサイシン/温度刺激)や TRPA1(アリルイソチアシネート/冷温刺激)、TRPM8(メントール/冷温刺激)や TRPM5(温度により他受容体の受容に影響)がある。これらで受容した信号は三叉神経を経て脳に伝達される<sup>10,26)</sup>。また TRPV1 は体性感覚だけでなく、塩味の受容にも寄与していることが近年報告されている<sup>27)</sup>。

このように各感覚器官から脳内に送られた情報は前頭眼窩野で統合され、特定の風味として感知される。このことは、実際にヒトが風味として感知しているレトロネーザル経路(摂食した際に口腔内から鼻腔に到達する経路)の香気の知覚のほうが、オルソネーザル経路(摂食す

る前に鼻先から鼻腔に到達する経路)の香気の知覚よりも前頭眼窩野の内側の活動が高くなるという脳内のfMRIの研究から確認されている<sup>28)</sup>。このように感知された風味は、最終的に海馬などに記憶されている過去の食体験や先入観などの情報と照らしあわせながら、扁桃体で好悪(好き、嫌い)の判断がなされる<sup>10)</sup>。

各感覚器官の情報は前頭眼窩野で統合されるため、異種感覚器官の相互作用が生じる(クロスモーダル相互作用)<sup>10)</sup>。たとえば、イチゴの香りによる甘味の増強作用や醤油の香りによる塩味の増強作用といった「香り成分による味覚への影響」<sup>29)</sup>、また反対にうま味物質(mono sodium glutamate)によるレトロネーザルアロマの増強作用<sup>30)</sup>といった「味質成分による嗅覚への影響」が報告されている。このクロスモーダル相互作用は、ヒトだけでなくラットにおいても見られることから、生物が生存競争を生き抜くためにもともと備えている学習の1つであると考えられている<sup>31,32)</sup>。

またこの前頭眼窩野における各感覚情報の統合により、基本味だけでは表現できない「こく」や「厚み」、「持続性」や「味の広がり」といった感覚が生じ、和食などにおける繊細な風味の表現が可能となっているものと考えられる。

## 6. 「こく」の定義

「こく」という言葉は、味噌汁や煮物、最近ではカレーやビールなど様々な飲食品で用いられる風味表現である<sup>33)</sup>。「こく」と「おいしさ」は混同されることが多いが、「こく」は日本人が共通した概念を持っている感覚であることが報告されている<sup>34)</sup>。Yamaguchiらは、食品開発従事者に対し、「こく」に対する認識を調べ、「こく」のある状態を表す言葉は、濃厚感、深み、連続的広がり、持続性、力強さ、まろやかさ、うま味、動物性の味、快さに集約されたと報告している<sup>35)</sup>。また Yamamoto は、「こく」は、厚み(thickness)、広がり(mouthfulness)、芳醇性(richness)、立ち上がりの速さ(punch)、奥深さ(depth)、増幅感(amplitude)、重厚感(weightiness)、持続性(continuity)、後味(aftertaste)、まろやかさ(mildness)であり、食品従事者でない者でも共通した感覚を持っていると述べている<sup>36)</sup>。このことから、「おいしさ」は前述のように過去の食経験や生理状態に左右される主観的な評価であるが、「こく」は味覚、嗅覚、体性感覚(触覚)の複数の刺激により引き起こされた統合感覚から生じる客観的な評価表現であると考えられる<sup>34)</sup>。

これまで「こく」について明確な定義はなされていなかったが、近年 Nishimura らが「こく」の定義を「味、香り、食感に関する複数の刺激で生ずるものであり、それらがバランスよく与えられ、濃厚感(複雑さ、厚み)、持続性、および広がりがあるときに感じられる味わい」と提案している<sup>34,37)</sup>。この定義から鑑みると、古くからワインやコーヒーの評価用語として用いられている body<sup>38,39)</sup>やチーズの評価用語である rich<sup>40)</sup>も「こく」と考えられ、「こく」は日本人だけが有する統合感覚ではないと言える。

また Nishimura らは「こく」付与物質について、以下の5つに分類している<sup>34)</sup>。

### ① 「こく」付与呈味物質

料理において隠し味に用いられる苦味物質や酸味物質、味全体の調和と持続に用いられるうま味物質など、それ自身味を有し、その味で各食品の味質を変化させ、「こく」を付与する物質。

### ② 「こく」付与味修飾物質

それ自身は味を有さないが、うま味溶液や各食品において味質を変化させ、「こく」を付与する物質。

### ③ 「こく」付与香気物質

それ自身の香気により、食品全体の風味の濃厚感、持続性を増強する香気物質。

### ④ 「こく」付与香気修飾物質

それ自身は香りを有さないが、香気物質の保持などに寄与する物質。

#### ⑤ 「こく」付与物理刺激物質

デキストリンなどの高分子物質や油脂など、食感の刺激で「こく」を付与している物質。

「こく」付与物質の分類については、別の研究者により異なる分類もなされている。例えば Saito は、「持続性があり、厚みのあるフレーバー」を「こく味」と定義しており、これは Nishimura らの分類における②③の物質による「こく」にあたると考えられる<sup>33)</sup>。また、Miyamura らは、Nishimura らの分類における②の物質による「こく」を「コク味」と定義し、特にカルシウム感知受容体 (CaSR; Calcium Sensing Receptor) に受容する化合物を「コク味」物質と呼んでいる<sup>41)</sup>。

これらのような日本の研究者の様々な提唱もあり、ここ数年、海外の複数の研究においても a *koku* attribute、*kokumi* という表現を用いた報告が増えている。Hofmann らは Gouda Cheese やアボカドから *kokumi* に寄与する物質を探索、同定し<sup>42) 43)</sup>、また Liu らは酵母エキスから *kokumi* に寄与する物質を探索、同定している<sup>44)</sup>。umami が日本発信の基本味として長い時間をかけて世界で認められたように<sup>45)</sup>、様々な食品における「こく」(a *koku* attribute、*kokumi*) という表現も今後少しずつ世界に広まっていくものと推測される。



## 7. 「こく」に寄与する成分

これまでに報告されている食品の「こく」に寄与する成分について、Nishimura らの「こく」付与物質の分類<sup>34)</sup>②-⑤に従い、以下にまとめる。

### ② 「こく」付与味修飾物質

「4. メイラード反応の関与する風味修飾成分」で述べた creatinine と単糖のメイラード反応生成物である N-(1-methyl-4-oxoimidazolidin-2-ylidene)aminopropionic acid (mouthfulness)<sup>20)</sup>とメイラードペプチド (mouthfulness/thickness、continuity)<sup>22)</sup>は、この分類に入る。またカルシウム感受受容体 (Calcium Sensing Receptor) に受容する化合物である  $\gamma$ -グルタミルペプチドである  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (glutathione) や  $\gamma$ -Glu-Val-Gly<sup>41)</sup>、Hofmann らが Gouda Cheese から見出した  $\gamma$ -Glu-Glu、 $\gamma$ -Glu-Gly、 $\gamma$ -Glu-Gln、 $\gamma$ -Glu-Met、 $\gamma$ -Glu-Leu、 $\gamma$ -Glu-His<sup>42)</sup>もこの分類である (*kokumi* (mouthfulness、long-lasting))。

その他にも、Ueda らがニンニクの中から見出した alliin や (+)-S-methyl-l-cysteine sulfoxide、 $\gamma$ -l-glutamyl-S-allyl-l-cysteine といった含硫化合物<sup>46)</sup>、Hofmann らがアボカドから見出した oxylipin 類 (mouthfulness)<sup>43)</sup>、Liu らが酵母エキスから見出した leucyl dipeptides (*kokumi* ((complex、long-lasting))<sup>44)</sup>などが「こく」付与味修飾物質として報告されている。

また、Yasuda らが glucose と glutamic acid のモデル反応から得たメラノイジンも「こく」付与効果が確認されており (thickness、continuity)<sup>47)</sup>、メラノイジンを含む食品において「こく」に寄与している可能性が考えられる。

### ③ 「こく」付与香気物質

Saito は肉エキスの調理フレーバーに含まれる pyrazine 類が「こく」に寄与することを報告している<sup>33)</sup>。また、Kurobayashi らはセロリの香気成分の解析から、3 種類の phthalide (sedanenolide、3-n-butylphthalide、sedanolide) が、chicken broth に風味の複雑さ (complex) を付与することを見出し<sup>48)</sup>、同様に当研究室では、調味液 (めんつゆ) の加熱香気の解析から、2-acetylfuran、2-ethylhexanol、1-octen-3-ol が調味液の「こく」 (mouthfulness、continuity) に寄与していることを見出している<sup>49)</sup>。

### ④ 「こく」付与香気修飾物質

Nishimura らはタマネギの加熱濃縮物の解析から、phytosterol にタマネギの香気含硫化合物を保持する効果があり、この香りの持続から「こく」 (lingering sensation of aroma) がもたらされることを報告している<sup>34,37)</sup>。

⑤ 「こく」付与物理刺激物質

この分類の「こく」付与物質は高分子物質や油脂などが含まれる。高分子物質の例としては、Watanabe らがホタテガイにおいて glycogen がとろみとともに「こく」(continuity、complexity、fullness、mildness、thickness)に寄与していることを報告しており<sup>50)</sup>、また Tanimura はビールにおいてデキストリンなどの高分子が「こく」に寄与していると推察している<sup>51)</sup>。

## 9. 本研究の目的

本研究は、和食のおいしさに関わる繊細な風味の寄与因子を明らかにすることで、より質の高い食品の加工・調理技術の確立に貢献することを目的に、和食に用いられる長期熟成調味料である「豆味噌」と「熟成本みりん」に着目し、熟成食品特有の風味である「こく」に寄与する成分の解析を行った。

前述のとおり「こく」の定義は幅広いため、本研究では、「6.「こく」の定義」で述べた Saito<sup>33)</sup>および Nishimura<sup>34)</sup>らの定義・分類を踏まえ、「こく」付与香気物質および「こく」付与味修飾物質について、評価・解析を行った。

第1章では、豆味噌の加熱香気化合物の解析から、豆味噌の「後味のうま味(うま味の持続性)」(umami aftertaste (continuity))に関わる「こく」付与香気物質を探索した。

第2章では、豆味噌の不揮発性成分の高分子画分の解析から、豆味噌の「厚み」(thickness)および「持続性」(continuity)に関わる「こく」付与味修飾物質を探索した。また「こく」付与味修飾物質の1つであるメイラードペプチドに着目し、風味修飾に重要な構造を決定した。

第3章では、熟成本みりんの不揮発性成分の解析から、熟成本みりんの「厚み」(thickness)や「まろやかさ」(mildness)に関わる「こく」付与味修飾物質を探索した。また本研究内で「まろやかさ」への寄与が確認されたD-アミノ酸に着目し、本みりんの熟成工程中のD-アミノ酸の生成経路の解析およびD-アミノ酸の基本味への影響について検証した。

なお、本研究では明治大学農学部およびMCフードスペシャリティーズ社にて官能評価試験を実施した。明治大学農学部で実施した全ての官能評価試験は、ヘルシンキ宣言に則り、明治大学農学部の「人を対象とする食品科学および関連諸科学の研究実験に関する倫理委員会」の承認を得たうえで実施した。またMCフードスペシャリティーズ社で実施した全ての官能評価試験については、ヘルシンキ宣言に則りパネルには事前に研究内容について十分に説明し、試験に対する同意を確認したうえで、社内関係部署で稟議し、承認を得て適切に履行した。

## 参考文献(序論)

- 1) Abe K.(2008) *Shoku to mikaku* (p.99-136). Japan: Kenpakusya
- 2) Ehara, A.(2015). Washoku Culture inscribed on the UNESCO's Intangible Cultural Heritage List, and the Way of the Protection and Promotion. *Nippon Chori Kagaku Kaishi*, 48, 320–324.
- 3) Ochi H.(1993) *Tennenomiryō* (p.1-6). Japan: Korin
- 4) Ishitani T.(2011) *Oishisa no kagaku* vol.2 (p.42-50). Japan: NTS
- 5) Fushiki T.(2003) Mechanism for palatability, its components and generation of the sensation. *Eiyogaku Zasshi*, 61, 1-7
- 6) Sagara Y.(2009) Evaluation methodology for palatability based on food *Kansei* model. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 56, 317–325.
- 7) Nakajima Y.(1996) *Taberu* (p.1-8). Japan: Asakura
- 8) Majcher, M.(2012) Food flavors (p.95-119). USA: CRC press.
- 9) Ohta S.(1992) *Kakushiaji no kagaku* (p.132-141). Japan: Saiwai
- 10) Kusakabe Y.(2011) *Ajiwai no ninchikagaku* (p.1-95). Japan: Keisoshobo
- 11) Jelen, H.(2012) Food flavors (p.1-18). USA: CRC press.
- 12) Jousse, F., Jongen, T., Agterof, W., Russell, S. and Braat, P.(2002) Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction, *Journal of Food Science*, 67, 2534-2542.
- 13) Namiki, M.(1988) *Saishin flavor gijyutsu* (p.94-116). Japan: Kougyogijyutsukai
- 14) Hofmann, T. and Schieberle, P. (1998) Quantitative model studies on the effectiveness of different precursor systems in the formation of the intense food odorants 2-furfurylthiol and 2-methyl-3-furanthiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 235-241,.
- 15) Whitfield, F. B. and Mottram, D. S. (1999) Investigation of the reaction between 4-hydroxy-5-methyl-3 (2 H)-furanone and cysteine or hydrogen sulfide at pH 4.5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1626-1634,.
- 16) Hayse, F. (1993). Maillard reaction products in foods and the physiological function. *Nippon Jozokyo Kaishi*, 88, 421–425.
- 17) Homma, S. (2005). Food chemical study on melanoidin. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*, 58, 85–98.
- 18) Shiga, K., Yamamoto, S., Nakajima, A., Kodama, Y., Imamura, M., Sato, T., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2014). Metabolic profiling approach to explore compounds related to the umami intensity of soy sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7317-7322.

- 19) Ottinger, H., & Hofmann, T. (2003). Identification of the taste enhancer alapyridaine in beef broth and evaluation of its sensory impact by taste reconstitution experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6791-6796.
- 20) Sonntag, T., Kunert, C., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2010). Sensory-guided identification of N-(1-methyl-4-oxoimidazolidin-2-ylidene)- $\alpha$ -amino acids as contributors to the thick-sour and mouth-drying orosensation of stewed beef juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6341-6350.
- 21) Festring, D., & Hofmann, T. (2010). Discovery of N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl) guanosine 5'-monophosphate as an umami-enhancing Maillard-modified nucleotide in yeast extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10614-10622.
- 22) Ogasawara, M., Katsumata, T., & Egi, M. (2006). Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000Da peptide. *Food Chemistry*, 99, 600-604.
- 23) Ogasawara, M., Yamada, Y., & Egi, M. (2006). Taste enhancer from the long-term ripening of miso (soybean paste). *Food Chemistry*, 99, 736-741.
- 24) Tohara, K. (2015). Food chemical study on melanoidin. *Nippon Jibiinkouka Gakkai Kaihou*, 8, 1072-1075.
- 25) Kusakabe, Y. (2012). *Ajijyuyou no gensyou wo bunshi de setsumeisuru. Iden*, 66, 614-619.
- 26) Komai, M., Inoue, T., & Osada, K. (2006). Reception mechanism for irritation sensation in the mouth or nasal cavity. *Journal of Japan Association on Odor Environment*, 37, 408-416.
- 27) Katsumata, T., Nakakuki, H., Tokunaga, C., Fujii, N., Egi, M., Phan, T. H. T., & Lyall, V. (2008). Effect of Maillard reacted peptides on human salt taste and the amiloride-insensitive salt taste receptor (TRPV1t). *Chemical Senses*, 33, 665-680.
- 28) Small, D. M., Gerber, J. C., Mak, Y. E., & Hummel, T. (2005). Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron*, 47, 593-605.
- 29) Djordjevic, J., Zatorre, R. J., & Jones-Gotman, M. (2004). Odor-induced changes in taste perception. *Experimental Brain Research*, 159, 405-408.
- 30) Nishimura, T., Goto, S., Miura, K., Takakura, Y., Egusa, A. S., & Wakabayashi, H. (2016). Umami compounds enhance the intensity of retronasal sensation of aromas from model chicken soups. *Food Chemistry*, 196, 577-583.
- 31) Sakai, N., & Imada, S. (2003). Bilateral lesions of the insular cortex or of the prefrontal cortex block the association between taste and odor in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 24-31.

- 32) Koga Y.(2013) *Gokan to kaori no shinri mechanism* (p.145-154). Japan: NTS
- 33) Saito,C. (2004). Koku and Kokumi in foods. *The Journal of the Japan Association for the Study of Taste and Smell*, 11, 165–174.
- 34) Nishimura,T., & Egusa, A.(2012). Classification of compounds enhancing “koku” to foods and the discovery of a novel “koku” enhancing compounds. *The Journal of the Japan Association for the Study of Taste and Smell*, 19, 167–176.
- 35) Yamagichi, S.(1997). Analysis of the concept of koku-flavor from the viewpoint of evaluation terms. *The Journal of the Japan Association for the Study of Taste and Smell*, 4, 515–518.
- 36) Yamamoto, T.(2010). Oishisa to Koku no kagaku. *Nippon Chori Gakkaishi*, 43, 327–332.
- 37) Nishimura, T., Egusa, A. S., Nagao, A., Odahara, T., Sugise, T., Mizoguchi, N., & Noshio, Y. (2016). Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute. *Food Chemistry*, 192, 724-728.
- 38) Gawel, R., SLUYTER, S. V., & Waters, E. J. (2007). The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13, 38-45.
- 39) Morales, A. F. (1989). Effect of holding-time on sensory quality of brewed coffee. *Food Quality and Preference*, 1, 87-89.
- 40) Delahunty, C. M., & Drake, M. A. (2004). Sensory character of cheese and its evaluation. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*, 1, 455-487.
- 41) Miyamura, N., & Maruyama, Y.(2012). Flavor character of CaSR agonists (*kokumi* substances). *The Journal of the Japan Association for the Study of Taste and Smell*, 19, 205-213.
- 42) Toelstede, S., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2009). A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1440-1448.
- 43) Degenhardt, A. G., & Hofmann, T. (2010). Bitter-tasting and kokumi-enhancing molecules in thermally processed avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12906-12915.
- 44) Liu, J., Song, H., Liu, Y., Li, P., Yao, J., & Xiong, J. (2015). Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC - Q - TOF - MS/MS and sensomics approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(15), 3183-3194.
- 45) Kondoh, T. & Torii, K. (2001). Mechanism of umami taste transduction and umami preference. *Nippon Jozokyoikaishi*, 96, 829-847.
- 46) Ueda, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R., & Kimizuka, A. (1990).

- Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 163-169.
- 47) Yasuda, K., Matsumoto, T., Watanabe, H., & Hayase, H. (2012). Contribution of melanoidins to *kokumi* taste. *the 2012 Annual Meeting Proceedings of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 2J15p18.
- 48) Kurobayashi, Y., Katsumi, Y., Fujita, A., Morimitsu, Y., & Kubota, K. (2007). Flavor enhancement of chicken broth from boiled celery constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 512-516.
- 49) Hayase, F., Takahagi, Y., & Watanabe, H. (2013). Analysis of cooked flavor and odorants contributing to the Koku taste of seasoning soy sauce. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 60, 59–71.
- 50) Watanabe, K., Lan, H., Yamaguchi, K., & Konosu, S. (1990). Role of extractive components of scallop in its characteristic taste development. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 439-445.
- 51) Tanimura, S. (2002). Fullness of beer. *The Journal of the Japan Association for the Study of Taste and Smell*, 9, 143–146.

## 第 1 章

# 豆味噌における加熱香気成分と風味修飾効果



## 緒言

味噌は日本の伝統的な大豆発酵食品であり、古くから日本人の食生活に欠かせないものとされてきた。味噌の主原料は大豆であり、麴、食塩を混ぜ合わせ、発酵・熟成させて造られる。味噌は原料麴の違いや熟成期間の違いにより様々な種類がある。たとえば、米麴を用いたものが「米味噌」、麦麴を用いたものが「麦味噌」、豆麴を用いたものが「豆味噌」であり、約 6 か月熟成させた米味噌が「淡色米味噌」、約 1 年熟成させた味噌が「赤色米味噌」と分類される。また八丁味噌に代表される豆味噌は約 2 年間熟成させて作られる<sup>1~3)</sup>。これらの味噌は、醸造中に麴や酵母などの微生物による原料の分解・発酵作用と、貯蔵中に進行するメイラード反応などによる熟成作用が働き、それぞれ特有の香りや味が醸成される<sup>4)</sup>。

味噌の香気に関する研究では、Sugawara らが GC (Gas Chromatography) にてカラム濃縮法を用いた生味噌の香気分析を行っており、醤油様香気化合物である HEMF (4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone)、methionol、4-ethylguaiacol の含有量が米味噌、麦味噌、豆味噌で異なることを報告している<sup>5)</sup>。また Sugawara らは 34 種類の生の米味噌の各香気化合物量と香気の好ましさの相関性から、HEMF、HDMF (4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone)、2-methyl-1-propanol などが、好ましさに寄与する重要な香気化合物であることを報告している<sup>6)</sup>。また Ohata らは米味噌の香気モデル溶液に 2-furanmethanethiol を加えると、香りの複雑さ、甘い香り、コーヒー様の好ましい香りが強くなることを報告している<sup>7)</sup>。最近では Kumazawa らが高真空蒸留法である SAFE (Solvent-Assisted Flavor Evaporation) 法による米味噌の香気成分分析により、HEMF、HDMF、maltol などが高い香気寄与度 (FD factor (Flavor Dilution factor)) を有していることを報告している<sup>8)</sup>。

一方で味噌は、加熱による風味の変化が大きい食材として知られ、ヘッドスペース-GC<sup>9)</sup>、SPME (マイクロ固相抽出: Solid Phase Micro Extraction) -GC<sup>10)</sup>、SAFE-GC<sup>8)</sup> にて米味噌の味噌汁の加熱による風味変化に関する研究もおこなわれている。

しかし味噌は味噌汁のように生味噌の香気を味わうだけでなく、味噌煮込みや味噌炒め、焼き味噌など幅広く加熱調理に用いられ、様々な加熱調理食品の「こく」の付与に活用されている<sup>3)</sup>。特に豆味噌はその目的で使用されることが多い<sup>11)</sup>。

一方で、イチゴの香気による甘味の増強作用や、醤油の香気による塩味の増強作用の報告<sup>12)</sup> などがあるように、嗅覚と味覚に相互作用があることはよく知られている。うま味においても、garlic 様の香気を有する methylfuryl disulfide がうま味を増強する作用を有することが報告されている<sup>13)</sup>。このように特定の香気が味覚の増強や抑制を生じさせる作用を有する現象は、脳内の「味覚と嗅覚のクロスモーダル相互作用」による効果によるものと考えられている<sup>14,15)</sup>。

これまでに当研究室では、調味料として日本で古くから用いられる調味液(めんつゆ)の加熱香気において、「こく」に寄与する香気化合物を同定している<sup>16)</sup>。豆味噌も調味液と同様、日本で古くから加熱調理に用いられる基礎調味料であり、豆味噌の加熱香気と「こく」の関係を明らかにすることは、より嗜好性の高い豆味噌の調理食品や加工食品を提供するうえで、非常に重要である。

そこで本章では、序論に示した「こく」の定義の中から、香気による「こく」の増強作用が客観的に評価しやすい「後味のうま味(うま味の持続性)」(umami aftertaste (continuity))に着目し、豆味噌の加熱香気が後味のうま味および嗜好性に与える影響について検証した。第1節では、官能評価にて豆味噌の加熱香気が後味のうま味に与える影響について評価を実施した。第2節では、SDE(連続水蒸気蒸留: Simultaneous Distillation Extraction)法により豆味噌および米味噌 2 種(淡色米味噌、赤色米味噌)の加熱香気成分を抽出し、GC-MS (GC-Mass spectrometry) およびGC-O (GC-Olfactometry) /AEDA (Aroma extract dilution analysis) 法にて香気化合物を同定し、味噌間の比較から豆味噌の鍵香気化合物を決定した。第3節では、同定した鍵香気化合物が豆味噌の後味のうま味に与える影響について検証を行った。

## 第 1 節 豆味噌の加熱香気の風味への影響

### 1. 実験材料および方法

#### 1.1. 試料・試薬

味噌試料には特徴の異なる味噌として、淡色系辛口米味噌である信州味噌(以降、淡色米味噌、表中では white miso と表記)、赤色系辛口米味噌である仙台味噌(以降、赤色米味噌、表中では red miso と表記)、豆味噌である八丁味噌(表中では soy miso と表記)を用いた。味噌試料は、食品添加物を使用していないものを選択し、以下の市販品を用いた。味噌試料は同じ生産ロットのものを実験に用いた。

淡色米味噌：白山吹(信州味噌株式会社)

赤色米味噌：本場仙台味噌(仙台味噌醤油株式会社)

豆味噌：カクキュー八丁味噌(株式会社カクキュー八丁味噌)

用いた豆味噌の製造方法は次のとおりである。

1. 蒸した大豆を潰して丸め、その周りに麹菌をまぶす(味噌玉)。
2. 室(むろ)にて味噌玉の麹菌を繁殖させ、豆麹を作る。
3. 豆麹に塩と水を混ぜ、木樽に仕込む。
4. 木樽の上に大量の石を乗せ、高圧下で2年以上熟成させる。

試薬は以下の特級試薬を使用した。

tartaric acid、caffeine、IMP (5'-inosine monophosphate)、GMP(5'-guanosine monophosphate) (以上、和光純薬工業株式会社から購入)、MSG(mono sodium glutamate monohydrate)、NaCl(sodium chloride)、sucrose (以上、関東化学株式会社から購入)、2,5-dimethylpyrazine (東京化成株式会社から購入)、陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC 分析用バッファーPF-1 (三菱化学株式会社から購入)。

また、本研究で使用した水は特に注釈の無い限り、逆浸透純粋製造装置 (Milli RO 10 Plus; Millipore) で逆浸透膜法により精製した後、さらに超純水製造装置 (MP-650; IWAKI) にてシンパック処理により精製したものをを用いた。

## 1.2. 不揮発性成分の分析

官能評価にて味噌の種類の違いが後味のうま味強度に与える影響を評価するにあたり、淡色米味噌、赤色米味噌、豆味噌のうま味に関わる不揮発性成分 (NaCl、MSG、核酸 (IMP、GMP)) を分析した。分析にはそれぞれの 5% 味噌溶液を用いた。5% 味噌溶液は、味噌試料 (5 g) と RO 水 (95 ml) を混合し、No.2 濾紙 (ADVANTEC) で不溶性固形分を除去し調製した。

### 1.2.1. 固形分

5% 味噌溶液の固形分は、赤外線水分計 (HG53 Halogen Moisture Analyzer ; METTLER TOLEDO) 赤外線を用いて測定した。海砂 (10 g) を敷いたアルミ皿に 5% 味噌溶液を 1 ml 滴下し、170 °C で加熱した。質量変化がなくなった時点の重量にて固形分を算出するモードを用いた。海砂は加熱による被膜化防止および蒸発速度促進のため使用した。

### 1.2.2. NaCl

5% 味噌溶液の NaCl 含有量は、モール法により求めた。5% 味噌溶液 (10 ml) に指示薬として 0.5% クロム酸カリウム (2 ml) を加え、これを 0.1 mol/L 硝酸銀水溶液で滴定した。振り混ぜても赤褐色が消失しなくなった時を終点とし、以下の計算式に基づいて、味噌溶液の塩分濃度を算出した。滴定は 3 回実施した。

$$\text{NaCl 含有量 \%} = 5.85 \times \text{滴下量 ml} \times 10 \div \text{味噌溶液 10 ml の重量 g}$$

### 1.2.3. MSG

5% 味噌溶液の MSG 含有量は、アミノ酸アナライザー (日立ハイテック L-8800A) による HPLC 分析により glutamic acid の定量分析を行い、その定量値から以下の式で MSG 含有量を算出した。

$$\text{MSG 含有量 (\%)} = \text{glutamic acid 含有量 (\%)} \times 187.13 [\text{MSG の分子量}] \\ \div 147.13 [\text{glutamic acid の分子量}]$$

サンプルは 0.45 μm のフィルターにて濾過を行い、HPLC に供した。定量には外部標準法を用いた。以下に HPLC 条件を示す。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi L-8800A amino acid analyzer (post-column method)
Column	: Cation exchange column for L-8800A Twin#2622PF ( $\phi$ 6.0 mm $\times$ 25 mm(twin),Hitachi)
Column temp.	: 32°C
Reaction column	: Reaction column for L-8800A (Hitachi)
Reaction temp.	: 135°C
Ammonia trap column	: #2650 ( $\phi$ 4.6 mm $\times$ 60 mm, Hitachi)
Detector	: VIS (Wavelength:570 nm)
Flow Rate	: 0.51 ml/min (Eluent), 0.41 ml/min (Reagent)
Eluent	: PF-1 (Hitachi)
Reagent	: Ninhydrin solution (Hitachi)
Injection volume	: 20 $\mu$ L

#### 1.2.4 核酸

5%味噌溶液における、うま味を呈する核酸(5'-inosine monophosphate (IMP) および 5'-guanosine monophosphate (GMP))の含有量は、HPLC 分析により定量分析を行った。サンプルは0.45  $\mu$ mのフィルターにて濾過を行い、HPLCに供した。定量には外部標準法を用いた。以下に HPLC 条件を示す。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi HPLC L-2000 series (Hitachi)
Detector	: L-2455 Diode Array detector (Hitachi) (Wavelength:254 nm)
Column	: MCI GEL CDR-10 (250 mm $\times$ 4.6 mm ; Mitsubishi Chemical)
Column temp.	: 50°C
Flow Rate	: 1.5 ml/min
Eluent	: Acetate buffer (pH 3.4)
Injection volume	: 20 $\mu$ L

### 1.3. 官能評価

官能評価は、食後 3 時間以上経過した状態で午前中に実施し、試料の調製には RO 水を用いた。全ての評価において、パネルは提示された試料を 5 秒間口に含み、その後吐き出した。試料間では RO 水で口をゆすぎ、口腔内に試料が残らないように洗浄した。香気の影響を排除する場合にはノーズクリップを、視覚による影響を排除する場合にはアイマスクを使用して評価を実施した。

#### 1.3.1 パネルトレーニングおよびパネルの選定

食品機能化学研究室に所属する学生を対象に、以下の基本味識別テスト、基本味濃度差識別テスト、「こく」識別テストのトレーニングを行い、分析型評価パネルを選定した。

##### (a) 基本味識別テスト

パネルが基本味(甘味、塩味、酸味、苦味、うま味)を正しく認識できるようになるためのトレーニングとして基本味識別テストを行った。テストには、甘味溶液(0.4% sucrose 溶液)、塩味溶液(0.13% NaCl 溶液)、酸味溶液(0.005% tartaric acid 溶液)、苦味溶液(0.025% caffeine 溶液)、うま味溶液(0.025% MSG 溶液)を用いた。各溶液の濃度は文献<sup>17)</sup>に準じた。

評価は、パネルに各味溶液を入れたコップ(5 個)と、RO 水を入れたコップ(3 個)をランダムに与え、計 8 個のコップの中からそれぞれの五味を感じたコップを選択させた。テストは日を変えて 3 回以上繰り返し実施した。

##### (b) 基本味濃度差識別テスト

パネルが基本味(甘味、塩味、酸味、うま味)の強度の差を正しく認識できるようになるためのトレーニングとして、基本味濃度差識別テストを行った。テストには、甘味溶液(5.0%/5.5% sucrose 溶液)、塩味溶液(1.00/1.06% NaCl 溶液)、酸味溶液(0.02/0.024% tartaric acid 溶液)、うま味溶液(0.200/0.266% MSG 溶液)と濃度の異なる 2 つの溶液を用いた。各溶液の濃度は文献<sup>17)</sup>に準じた。

評価は、パネルに基本味ごとに 2 つの溶液を比較させ、味の強度が高いコップを選択させた。甘味、塩味、酸味、うま味の提示順序はランダムに行った。テスト中はノーズクリップを着用し、香気を感じられない状態で行った。テストは日を変えて 3 回以上繰り返し実施した。

### (c) 「こく」識別テスト

パネルが「こく」の強度を正しく認識できるようになるためのトレーニングとして、「こく」識別テストを行った。テストには、既知の「こく」付与香気化合物である 2,5-dimethylpyrazine を用いた<sup>16)</sup>。0.5% NaCl と 0.3% MSG からなる「うま味溶液」をコントロールとし、「うま味溶液」に 2,5-dimethylpyrazine を 100 ppb 添加したものを「こく」付与サンプルとした。サンプルは 5 ml とし、いずれも 50°C に加温したものをを用いた。

本章では、「こく」の定義の中から「後味のうま味(うま味の持続性)」に着目し、パネルには各サンプルを5秒間口に含み吐き出した後に残るうま味を「後味のうま味」として評価させ、強く感じたコップを選択させた。テストは日を変えて3回以上繰り返し実施した。

### (d) 分析型官能評価パネルの選定

基本味識別テストは5味中の4味以上の正答を合格とし、基本味濃度差識別テストは4味中の3味以上の正答を合格とした。「こく」識別テストは3回連続の正答を合格とした。これら全てのテストに合格したパネルを分析型官能評価パネルとして選定し、以降の官能評価の評価者とした。

### 1.3.2. 加熱味噌溶液(米味噌、豆味噌)の評価(順位法)

味噌の種類の違いが後味のうま味強度に与える影響を評価するにあたり、加熱香気を生成した5%加熱味噌溶液を調製した。5%加熱味噌溶液は、淡色米味噌、赤色米味噌、豆味噌の3種の試料について、それぞれの5%味噌溶液を耐圧密閉容器で100℃、20分間加熱することにより得た。

3種の5%加熱味噌溶液間の後味のうま味強度の違いの評価には、順位法を用いた。具体的には、パネルに3種の評価サンプル(20 ml づつ)をランダムに提示し、パネルは後味のうま味が強いと感じたサンプルから順に3点、2点、1点とつけた。全てのパネルの合計値を算出し、Newell & MacFalan<sup>18)</sup>による順位法の検定により有意差の有無を検定した。後味のうま味に香気成分が寄与しているかどうかを確認するため、評価は香気が感じられない状態(ノーズクリップ着用)と香気が感じられる状態(ノーズクリップ未着用)でそれぞれ実施した。サンプルはいずれも50℃に加温したものをを用いた。

### 1.3.3 豆味噌溶液(未加熱、加熱)の評価(二点試験法)

豆味噌の加熱香気が後味のうま味に影響を与えているか、二点試験法にて評価を行った。評価サンプルは、豆味噌の5%味噌溶液(未加熱)と5%加熱味噌溶液とした。

パネルに2種の評価サンプル(20 ml づつ)の後味のうま味を評価させ、強く感じたコップを選択させた。また、後味のうま味に香気成分が寄与しているかどうかを確認するため、評価は香気が感じられない状態(ノーズクリップ着用)と香気が感じられる状態(ノーズクリップ未着用)でそれぞれ実施した。サンプルはいずれも50℃に加温したものをを用いた。



## 2. 結果および考察

### 2.1. 味噌溶液の成分組成

3種の5%味噌溶液について、固形分、NaCl含有量、MSG含有量、IMP含有量、GMP含有量の測定結果を**Table I-1.1**に示す。それぞれの含有量に大きな差は見られず、これらのうま味に関わる成分による後味へのうま味への影響は小さいと推察された。

**Table I-1.1 5%味噌溶液の成分組成**

Sample	Solid %	NaCl%	MSG%	IMP%	GMP%
5% Red miso solution	1.60	0.66	0.02	n.d.	n.d.
5% White miso solution	1.63	0.64	0.02	n.d.	n.d.
5% Soy miso solution	1.70	0.58	0.02	n.d.	n.d.

### 2.2. 味噌の種類の違いによる後味のうま味への影響

3種の加熱味噌溶液について、順位法にて後味のうま味の強度を評価した結果を**Table I-1.2**に示す。その結果、香気が感じられる状態において、豆味噌の後味のうま味が、淡色米味噌や赤色米味噌よりも有意に強いことが確認された。一方で、香気が感じられない状態ではその差は縮まり、豆味噌と赤色米味噌の間で有意な差が認められなくなった。このことから、豆味噌の加熱香気が後味のうま味に寄与している可能性が示唆された。

また、豆味噌と淡色米味噌の間にはノーズクリップの有無にかかわらず有意な差が認められたことから、豆味噌の後味のうま味には、加熱香気だけでなく**Table I-1.1**に示した成分以外の不揮発性成分の関与が推察された(この不揮発性成分の後味のうま味(持続性)への寄与については、第2章で検討することとした)。

**Table I-1.2 3種の加熱味噌溶液における後味のうま味の評価(順位法)**

Sample	Sum of score	
	without the use of a nose clip	with the use of a nose clip
Red miso	21	25
White miso	20	20
Soy miso	37	33

n=13

ranking test : Score 3 (strongest), Score 2 (middle), Score 1 (weakest)

\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

### 2.3. 豆味噌の加熱の有無による後味のうま味への影響

豆味噌の 5% 味噌溶液(未加熱溶液)と 5% 加熱味噌溶液について、二点試験法にて後味のうま味の強度を評価した結果を **Table I-1.3** に示す。その結果、香気が感じられる状態において、5% 加熱味噌溶液の後味のうま味が 5% 味噌溶液よりも有意に強く感じられた。一方で、香気が感じられない状態で同様の評価を行ったところ、2つの溶液の後味のうま味の強度に有意な差は見られなかった。このことから、豆味噌において加熱処理により新たに増加、生成した香気が後味のうま味に寄与していることが明らかとなった。

**Table I-1.3** 未加熱豆味噌溶液と加熱豆味噌溶液の後味のうま味の評価(二点試験法)

Evaluation method	Number of panelists		Significant
	Raw soy miso solution	Cooked soy miso solution	
With noseclip	5	9	
Without noseclip	1	13	**
** significantly different at $p < 0.01$			

## 第 2 節 SDE を用いた加熱香氣成分の解析

### 1. 実験材料および方法

#### 1.1. 試料・試薬

味噌試料には第 1 節と同じものを用いた。

試薬は以下の特級試薬を使用した。

2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol(以上、東京化成株式会社から購入)、diethyl ether (BHT 3 mg/L 含有)、anhydrous sodium sulfate(以上、関東化学株式会社から購入)。その他の alkane、揮発性成分は東京化成株式会社、関東化学株式会社、和光純薬工業株式会社、Sigma-aldrich Co.のいずれかより購入した。

#### 1.2. SDE による揮発性化合物の抽出

SDE 法は、一方のフラスコ内で試料と水を共沸させた香氣化合物を、もう一方のフラスコから揮発させた有機溶媒と装置の中心部で接触させ冷却することで、香氣化合物を有機溶媒中に抽出する手法である。液化した水と有機溶媒はその比重差により、再びもとのフラスコ内に戻り、循環を繰り返すため、試料を交換することで香氣化合物を容易に濃縮できることが本法の利点である。装置の概略を Fig. I-2.1. に示す。

また Sugawara らは、米味噌にて真空蒸留法、SDE 法、固相カラム吸着法のそれぞれにおいて抽出される香氣成分を比較しており、SDE 法の香氣濃縮物にはアルデヒドが多く含まれ、蒸留中に生成する加熱香氣が効率よく抽出されていることを報告している<sup>19)</sup>。そこで本研究では、SDE 法を用いて味噌の加熱香氣に含まれる揮発性化合物を抽出することとした。

抽出する試料は、淡色米味噌、赤色米味噌、豆味噌とし、SDE の抽出条件は、過去の報告<sup>16,19)</sup>を参考に、次のように設定した。味噌 20 g を 100 ml の水に溶かした味噌懸濁液に、diethyl ether を溶媒とした tetracosane 溶液 100  $\mu$ L を内部標準として添加した(米味噌:0.5 mg/mL、豆味噌 2.0 mg/mL)。抽出溶媒は diethyl ether (80 ml) を使用し、溶媒の蒸留温度を 42°C、試料の蒸留温度を 130°C とした。抽出時間は 20 分間とし、この操作を 20 回繰り返した。得られたエーテル溶液に無水硫酸ナトリウムを加えて 4°C で脱水を行い、脱水後 38°C、常圧下で 1mL 程度まで濃縮し、最終的に窒素ガスのふきつけにより、50  $\mu$ L まで濃縮し、加熱香氣濃縮物を得た。

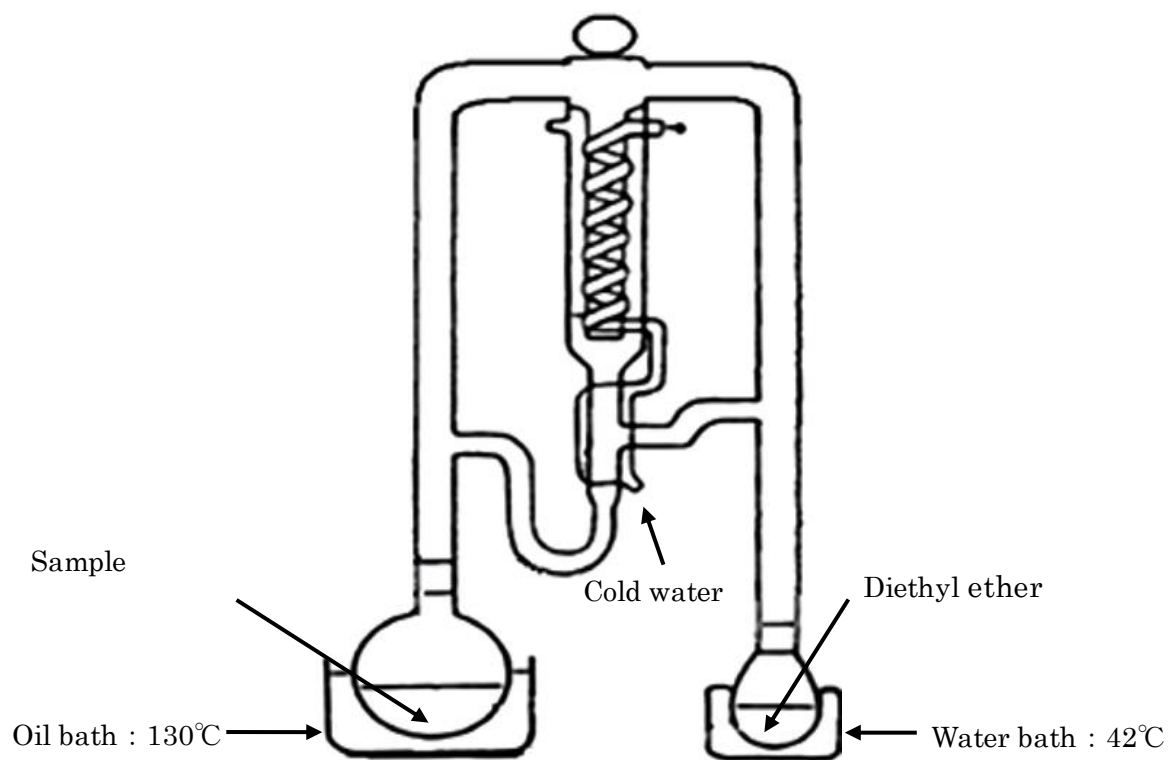


Fig. I-2.1. SDE 装置

### 1.3. 揮発性化合物の分析

各味噌サンプルの加熱香気濃縮物中の揮発性成分は、GC、GC-MS、GC-O による機器分析を行った。注入量はいずれも 1  $\mu$ l とした。

分析カラムには、幅広い化合物種を検出することができ、K.I. (Kovats Index) 値の既知情報も豊富な強極性カラムを選択し、GC および GC-MS では TC-WAX (GL-Science Co.)、GC-O では InertCap-WAX (GL-Science Co.) を用いた。

GC の昇温条件は、低沸点化合物から高沸点化合物まで検出できるよう、40°C から 200°C の昇温条件を設定した。GC-MS、GC-O の昇温条件等も GC と同様とした。

定量は、GC 分析で得られた各成分のピーク面積を用い、内部標準物質 (tetracosane) のピーク面積を 1 としたときの相対値で算出した (1 サンプルにつき 3 回分析を実施)。

定性は、GC-MS 分析で得られたマススペクトルの NIST (National Institute of Standards and Technology) ライブラリーと標準試薬とのマススペクトルの一致、K.I. (Kovats Index) 値の一致および GC-O 分析の際の香気特性の一致によって行った。

K.I. は n-alkane (C6 ~ 26) の標品の各炭素数 n におけるリテンションタイムを  $n \times 100$  とし、各検出ピークをその比で表すことで求めた。

### 1.3.1. GC 分析条件

各 GC 分析に用いた条件を以下に示す。

#### 【 GC 】

Instrument	: GC-2014 (Shimadzu Co.)
Detector	: Flame Ionization Detector (FID)
Column	: TC-WAX (60 m ×0.25 mm i.d×0.25 μm.d.f)
Column temperature	
Initial	: 40°C (5 min hold)
Rate	: 2°C/min
Final	: 200°C (35 min hold)
Injection temperature	: 200°C
Career gas	: Nitrogen
Split	
SDE sample	: Split 1:5

#### 【 GC-MS 】

Instrument	: GC-2014 (Shimadzu Co.)
GC	: 7890A GC (Agilent Co.)
MS	: JMS-Q1050GC (JEOL Co.)
Ionization	: Electron Ionization mode (70 eV)
Library research	: NIST
Column	: TC-WAX (60 m ×0.25 mm i.d×0.25 μm.d.f)
Column temperature	
Initial	: 40°C (5 min hold)
Rate	: 2°C/min
Final	: 200°C (35 min hold)
Injection temperature	: 250°C
Career gas	: Helium
Split	
SDE sample	: Split 1:5

#### 【 GC-O 】

Instrument	: GC353B (GL-Science Co.)
Detector	: Flame Ionization Detector (FID)
Column	: InertCap-WAX (30 m ×0.53 mm i.d×2 μm.d.f)
Column temperature	
Initial	: 40°C (5 min hold)
Rate	: 2°C/min
Final	: 200°C (35 min hold)
Injection temperature	: 250°C
Career gas	: Helium
Make up gas	: Nitrogen

### 1.3.2. GC-O/AEDA

GC 分析によって検出された揮発性化合物から、実際に食品の香気に寄与している化合物を絞り込むため、AEDA 法を用いて香気寄与成分の検索を行った<sup>16)</sup>。

SDE で得た加熱香気濃縮物を diethyl ether で 4 倍率で段階的に希釈し( $4^0=1$ 、 $4^1=4$ 、 $4^2=16$ 、 $4^3=64$ 、 $4^3=256$ 、 $4^4=1024$ 、 $4^5=4096$ )、GC-O に注入した。GC-O 分析時は、キャピラリーカラムの出口を 1 対 1 に分岐させ、一方を FID 検出器に接続し、他方の出口で各ピークについての匂い嗅ぎを行い、香気の有無と香気特性を記録した。匂い嗅ぎを行う出口は加湿空気を流した。低倍率順に希釈したサンプルの GC-O 分析を行い、各ピークに対し香気を感じられなくなる手前の希釈率である FD factor を決定した。サンプル全体への香気寄与度が高い化合物ほど FD factor は高く、サンプル全体の香気の質を決める「鍵香気化合物」と言える。

## 2. 結果および考察

### 2.1. SDE による揮発性化合物分析

GC、GC-MS、GC-O 分析の結果、赤色米味噌、淡色米味噌、豆味噌の加熱香气濃縮物から、それぞれ 58 種、60 種、66 種の化合物を同定した。赤色米味噌、淡色米味噌の結果を **Table I-2.1** に、豆味噌の結果を **Table I-2.2** に示した。同定した化合物の多くは、生味噌の香气化合物として既に報告されている化合物であった。

赤色米味噌、淡色米味噌の加熱香气ともに、ester 類の同定された化合物数、総量が最も多く、その中では、ethyl acetate の定量値が特に高かった。また次いで aldehyde 類の同定された化合物数、総量が多く、2-methylpropanal や benzaldehyde の定量値が比較的高く、主要な揮発性化合物であった。

一方で豆味噌の加熱香气では、aldehyde 類の同定された化合物数、総量が最も多く、その中では、2-methylbutanal、3-methylbutanal、phenylacetaldehyde の定量値が特に高かった。

味噌間で共通している化合物を見ると、26 種の化合物が 3 種の味噌で共通して検出され、またその他に 27 種の化合物が豆味噌以外の 2 種の米味噌で共通して検出されている。一方で、36 種類の化合物が豆味噌のみで検出された。これらのことから、米味噌と豆味噌では加熱香气に含まれる化合物に大きな違いがあることが示唆された。



## 2.2. 豆味噌の鍵香気化合物

GC-O/AEDA により、赤色米味噌、淡色米味噌、豆味噌の加熱香気濃縮物から、それぞれ 55 種、60 種、41 種の香気に寄与している化合物(FD factor=1 以上の化合物)を同定した。赤色米味噌、淡色米味噌における各化合物の FD factor を **Table I-2.1** に、豆味噌における各化合物の FD factor を **Table I-2.2** に示した。

赤色米味噌には、果実様、甘い香り様のいずれかの香気特性を有する化合物が多く検出された。この中では果実様の香気を有する化合物が最も多く検出され、それらは低、中級脂肪酸エチルエステル類であった。特に ethyl 2-methylpropanoate の香気寄与度が高く、FD factor 1024 を示した。また、その他の脂肪酸エステル類も FD factor 1~256 と比較的高い寄与度を示し、果実様の香気特性は赤色米味噌の加熱香気に重要な役割を果たしていることが示唆された。甘い香気特性を有する 2-phenylethyl acetate、furfural、HEMF は最も高い FD factor 4096 を示した。その他にフローラル様の香気特性を有する 1-hexanol(FD factor 1024)、ポテト様の香気を有する methional(FD factor 4096)が高い寄与度を示した。

淡色米味噌も同様に、果実様、甘い香り様のいずれかの香気特性を有する化合物が多く検出された。果実様の香気を有する化合物は ethyl 2-methylpropanoate、ethyl 2-methylbutanoate、ethyl pentanoate の香気寄与度が高く FD factor 4096 を示し、果実様の香気特性は淡色米味噌の香気に重要な役割を果たしていることが示唆された。甘い香気特性を有する化合物については、furfural が FD factor 4096、HEMF が FD factor 1024 と高い寄与度を示した。また赤色米味噌同様、1-hexanol(FD factor 1024)と methional(FD factor 4096)も高い寄与度を示した。

一方で豆味噌の加熱香気は主に、麦芽様、グリーン様、甘い香り様、ロースト様、硫黄様の香気特性を示す 5 つの香気群から形成されていた。麦芽様の香気特性を示すのは、主に aldehyde 類に属する化合物の 2-methylbutanal(FD factor 4096)、3-methylbutanal(FD factor 4096)であった。グリーン様の香気特性を示すのは、(E,E)- 2,4-decadienal(FD factor 4096)、(E)-2-octenal(FD factor 1024)、nonanal(FD factor 1024)などの aldehyde 類、マツシユルム様とも言われる香気を有する 1-octen-3-one(FD factor 4096)といった ketone 類であった。甘い香り様を示すのは、phenylacetaldehyde(FD factor 4096)や米味噌にも検出された HEMF(FD factor 4096)であった。ロースト様の香気特性を示す化合物にはスモーク様の 2-methoxyphenol(FD factor 4096)があり、また米味噌では検出されなかった pyrazine 類の 4 化合物が、FD factor 1~256 で検出され、ナッツ様の香気特性を有する 2,3,5-trimethylpyrazine が FD factor 256 で検出された。硫黄様の香気特性を示す成分として

は、dimethyl trisulfide が高い香気寄与度(FD factor 4096)を示した。またその他では、米味噌と同様に methional が高い香気寄与度(FD factor 4096)を示した。

以上より、豆味噌の加熱香気の中で、最も高い香気寄与度(FD factor 4096)を示した鍵香気化合物は 2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol、1-octen-3-one、phenylacetaldehyde、methional の 9 化合物であった。

米味噌との比較においては、米味噌と豆味噌ともに香気形成に甘い香り(HEMF、phenylacetaldehyde)、ポテト様の香り(methional)が共通しており、豆味噌の特有の香気としては、6 種の香気化合物(2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol)が、米味噌とは異なる香気特性を有し、FD factor が高い化合物であった。

米味噌と豆味噌の加熱香気においてともに検出された HEMF は、生の米味噌で重要な香気成分であることが報告されている<sup>5)20)</sup>。一方で、Sugawara らの固相吸着を用いた生の豆味噌の香気分析では HEMF が検出されておらず、これは HEMF の生成に関与している酵母の代謝が豆味噌では弱いと推察されている<sup>21)</sup>。しかし、HEMF は酵母の代謝が関与した生成経路以外に、pentose のアマドリ化合物と aldehyde 類のメイラード反応による生成も報告されており<sup>22)</sup>、豆味噌の加熱香気に含まれる HEMF は、SDE による加熱工程中にメイラード反応により生成したものと推測される。また phenylacetaldehyde、methional は、ともにメイラード反応の中間体として生じた  $\alpha$ -ジカルボニル化合物とアミノ酸が反応して生じるストレッカーアルデヒドであり、phenylalanine、methionine から生成することが知られている。

一方で、豆味噌特有の香気特性である麦芽様の香気を示す 2-methylbutanal、3-methylbutanal もストレッカーアルデヒドであり、それぞれ isoleucine、leucine のストレッカー分解により生成したものと考えられる<sup>23)</sup>。2-methylbutanal、3-methylbutanal は生豆味噌中にもその存在は確認されているが<sup>24)</sup>、加熱工程中においても増加したものと推察される。また豆味噌が米味噌よりもストレッカーアルデヒドを多く含んでいる理由としては、米味噌と異なる豆味噌特有の製造方法が影響しているものと推察される。豆味噌は大豆単用という原料配合の特殊性から酵母による発酵は微弱で、熟成期間を長期化することにより特有の香味生成と品質の安定化が図られている。そのため、米味噌よりもアミノ酸含有量が高い。また Hondo は米味噌に含まれる遊離の糖は glucose であるが、豆味噌はヘミセルラーゼ活性の強い大豆麴が用いられることから、arabinose、xylose などの pentose 含有量が多く、この味噌中に存在する pentose の反応性(褐変度)が glucose よりも高いと報告している<sup>25)</sup>。糖の種類とストレッカーアルデヒド

の生成についての関係は Fujimaki らが leucine をアミノ酸源に、pentose である xylose と hexose である glucose の加熱反応時の 3-methylbutanal 生成量を比較しており、xylose を用いた系の生成量が多かったという結果を得ている<sup>26)</sup>。このことから、豆味噌の有する「アミノ酸含有量の高さ」および、「pentose による反応性」、これら2つの特長により、加熱した豆味噌にストレッカーアルデヒドが多く含まれていると推察される。

同じく豆味噌特有の香気特性であるグリーン様の香気特性を示す(*E,E*)-2,4-decadienal や 1-octen-3-one は、大豆の脂質に由来する不飽和脂肪酸の酸化により生成することが知られており、熟成工程および加熱工程での増加が推察される<sup>4)</sup>。

ロースト様の香気特性である 2-methoxyphenol は ferulic acid の加熱分解で生成することが知られていることから、大豆中のリグニン由来の ferulic acid から生成されたものと思われる<sup>27)</sup>。また FD factor はやや低いが、同じくロースト様の香気特性を有する pyrazine 類もストレッカー分解から生成する代表的な食品の加熱香気として知られている<sup>28)</sup>。

硫黄様の香気特性を示す dimethyl trisulfide は、これまでチーズやビール<sup>29)</sup>、近年では醤油中<sup>30)</sup>において存在が確認されているが、米味噌も含め、味噌から検出された報告はこれまでになく、本研究が初めての報告である。その生成経路は他の食品と同様、ストレッカーアルデヒドである methional を出発物質として、加熱により、methanethiol、dimethyl disulfide を経由して、dimethyl trisulfide が生成したものと推察される<sup>29)</sup>。

これらの経路による生成が推測される6種の香気化合物(2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(*E,E*)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol)は、米味噌とは異なる香気特性を有し、かつ FD factor が高い化合物であるため、豆味噌特有の鍵香気化合物であると言える。

Table I-2.1 米味噌の SDE 香気濃縮物から検出された香気化合物

K.I.	compound	aroma quality	FD factor		relative amount <sup>a</sup>	
			Red	White	Red miso	White miso
<u>Acids</u>						
1555	Propanoic acid	roasty	n.d.	4	n.d.	0.12 ± 0.02
1962	2-Ethylhexanoic acid	soapy	4	16	0.52 ± 0.02	0.58 ± 0.06
1966	Heptanoic acid	roasty	4	1	0.09 ± 0.00	0.14 ± 0.01
2072	Octanoic acid	soapy,fatty	n.d.	1	n.d.	0.24 ± 0.02
2283	Decanoic acid	soapy	64	16	0.11 ± 0.01	0.25 ± 0.01
2494	Dodecanoic acid	soapy	4	1	0.27 ± 0.01	0.36 ± 0.05
<u>Alcohols</u>						
1362	1-Hexanol	floral	1024	1024	0.26 ± 0.01	2.03 ± 0.28
1398	3-Octanol	sour	4	n.d.	0.19 ± 0.01	n.d.
1459	1-Octen-3-ol	mushroom like	16	4	1.66 ± 0.07	1.20 ± 0.16
1463	1-Heptanol	nutty	4	16	0.17 ± 0.01	0.30 ± 0.04
1496	2-Ethyl-1-hexanol	roasty	4	4	0.29 ± 0.01	0.37 ± 0.04
1565	1-Octanol	fatty	4	16	0.10 ± 0.00	0.21 ± 0.02
1624	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol*	sweet	1	1	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.02
1801	2-(2-Butoxyethoxy)ethanol *	fruity	4	4	0.55 ± 0.02	0.61 ± 0.07
<u>Aldehydes</u>						
825	2-Methylpropanal	malty	64	64	31.42 ± 15.19	11.75 ± 6.95
1054	(E)-2-Butenal	pungent	n.d.	1	n.d.	3.06 ± 0.43
1093	Hexanal	sweet	64	4	0.74 ± 0.03	1.12 ± 0.12
1213	3-Methyl-2-butenal*	sweet	1	1	0.43 ± 0.02	0.34 ± 0.04
1336	(E)-2-Heptenal	fruity	n.d.	4	0.36 ± 0.01	0.44 ± 0.06
1482	Furfural	sweet	4096	4096	1.01 ± 0.06	0.29 ± 0.03
1507	(E,E)-2,4-Heptadienal	fatty	16	16	0.11 ± 0.00	0.16 ± 0.01
1514	Decanal	sweet	n.d.	16	n.d.	0.09 ± 0.01
1541	Benzaldehyde	green	4	16	8.80 ± 0.49	13.44 ± 1.75
1592	5-Methyl-2-furaldehyde	burnt	64	4	0.30 ± 0.02	0.04 ± 0.07
1662	Phenylacetaldehyde	floral	256	256	10.10 ± 0.48	4.60 ± 0.85
1822	(E,E)-2,4-Decadienal	fatty	64	16	0.27 ± 0.01	0.13 ± 0.01
1950	2-Phenyl-2-butenal	floral	16	64	1.18 ± 0.03	1.50 ± 0.13
<u>Ketones</u>						
1142	2,3-Hexanedione	sweet	4	1	0.65 ± 0.03	0.64 ± 0.07
1151	3,4-Hexanedione	cheesy	64	16	0.22 ± 0.01	0.48 ± 0.07
1263	3-Octanone	fruity	4	4	0.59 ± 0.03	0.22 ± 0.03
1311	1-Octen-3-one	mushroom like	64	64	0.43 ± 0.02	0.16 ± 0.02

Compounds identified via GC/MS analysis based on comparison with the K.I. (Kovats Index) and the mass spectra of standard compounds and via GC/O analysis based on comparison with the K.I. and the aroma quality of the standard compounds

<sup>a</sup> : Relative GC peak area of each compound when the value of the I.S. (n-Tetracosane) is regarded as 1 (Mean ± standard deviation, n=3)

\* : Newly identified compounds in miso

K.I. : Kovats Index I.S. : Internal Standard n.d. : Not detected. tr : Trace amount.

Table I-2.1 米味噌の SDE 香気濃縮物から検出された香気化合物(続き)

K.I.	compound	aroma quality	FD factor		relative amount <sup>a</sup>	
			Red	White	Red miso	White miso
<u>Esters</u>						
894	Ethyl acetate	fruity	1	4	80.46 ± 3.93	82.77 ± 14.41
993	Ethyl-2-methyl propanoate	fruity	1024	4096	0.41 ± 0.24	1.97 ± 0.15
1030	2-Methylpropyl acetate	fruity	256	4	2.50 ± 0.12	2.76 ± 1.35
1048	Ethyl butanoate	fruity	256	64	1.06 ± 0.09	0.34 ± 0.03
1065	Ethyl-2-methyl butanoate*	fruity	256	4096	0.15 ± 0.00	0.57 ± 0.19
1079	Ethyl-3-methyl butanoate*	fruity	4	16	0.18 ± 0.01	0.39 ± 0.05
1084	Butyl acetate	fruity	256	4	1.29 ± 0.07	4.49 ± 0.57
1098	2-Methylpropyl 2-methyl propanoate	fruity	n.d.	4	n.d.	0.20 ± 0.03
1132	3-Methylbutyl acetate	banana like	64	16	7.34 ± 0.37	7.33 ± 0.94
1144	Ethyl pentanoate	fruity	64	4096	0.15 ± 0.00	1.33 ± 0.17
1175	Ethyl-(Z)-2-butenolate*	fruity	64	64	0.17 ± 0.01	0.81 ± 0.08
1243	Ethyl hexanoate	fruity	64	4	0.34 ± 0.03	0.91 ± 0.16
1342	Ethyl heptanoate	fruity	4	16	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.02
1442	Ethyl octanoate	fruity	256	16	0.89 ± 0.04	1.81 ± 0.23
1638	Methyl benzoate*	sweet	4	n.d.	0.09 ± 0.00	n.d.
1645	Ethyl decanoate	fruity	4	1	0.17 ± 0.00	0.45 ± 0.05
1681	Ethyl benzoate	camomile like	64	4	4.87 ± 0.19	11.23 ± 1.53
1699	Diethyl butanedioate	woody	n.d.	16	0.08 ± 0.00	0.09 ± 0.00
1713	Dimethyl pentanedioate*	fatty	4	n.d.	0.09 ± 0.00	n.d.
1798	Ethyl phenylacetate	floral	256	64	0.45 ± 0.01	0.65 ± 0.07
1829	2-Phenylethyl acetate	apple like	4096	256	1.76 ± 0.07	1.41 ± 0.18
1848	Ethyl dodecanoate	sweet	1	1	0.07 ± 0.00	0.17 ± 0.04
1857	2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate*	sweet, woody	16	16	5.19 ± 0.17	5.59 ± 0.62
2053	Ethyl tetradecanoate	fatty	256	64	0.37 ± 0.01	0.52 ± 0.01
2256	Ethyl hexadecanoate	smoky	16	16	0.68 ± 0.02	3.60 ± 0.05
2481	Ethyl-(Z)-9-octadecenoate	sweet	1	4	0.21 ± 0.01	1.34 ± 0.03
2529	Ethyl-(Z,Z)-9,12-octadecadienoate	sweet	1	4	0.46 ± 0.02	1.42 ± 0.02
<u>Furans</u>						
1240	2-Pentylfuran *	sweet	4	1	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02
<u>Sulfur-containing compounds</u>						
1472	Methional	potato like	4096	4096	tr	tr
<u>Others</u>						
1192	Pyridine	fermented	256	1024	0.14 ± 0.01	0.06 ± 0.05
1264	Styrene		n.d.	n.d.	0.16 ± 0.01	n.d.
1390	3-Ethylpyridine*	metallic	n.d.	16	n.d.	0.11 ± 0.02
2098	HEMF	sweet	4096	1024	tr	tr
2400	n-Tetracosane (I.S.)				1.000	1.000

Compounds identified via GC/MS analysis based on comparison with the K.I. (Kovats Index) and the mass spectra of standard compounds and via GC/O analysis based on comparison with the K.I. and the aroma quality of the standard compounds

<sup>a</sup> : Relative GC peak area of each compound when the value of the I.S. (n-Tetracosane) is regarded as 1 (Mean ± standard deviation, n=3)

\* : Newly identified compounds in miso

K.I. : Kovats Index I.S. : Internal Standard n.d. : Not detected. tr : Trace amount.

HEMF : 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone

Table I-2.2 豆味噌の SDE 香気濃縮物から検出された香気化合物

K.I.	compound	aroma quality	FD factor	relative amount <sup>a</sup>	not detected in the rice misos
<u>Acids</u>					
1460	Acetic acid	sour	64	28.83 ± 2.76	○
1555	Propanoic acid	cheesy	1	1.18 ± 0.02	
1684	3-Methylbutanoic acid	sweaty	256	9.78 ± 0.51	○
1753	Pentanoic acid		n.d.	0.46 ± 0.04	○
1804	3-Methylvaleric acid *	sweaty	16	2.41 ± 0.10	○
1816	4-Methylvaleric acid	sweaty	4	2.20 ± 0.08	○
2072	Octanoic acid		n.d.	4.00 ± 0.17	
<u>Alcohols</u>					
939	2-Propanol		n.d.	2.75 ± 0.25	○
1098	2-Methyl-1-propanol	fermented	64	8.16 ± 0.23	○
1153	1-Butanol		n.d.	14.82 ± 0.01	○
1215	3-Methyl-1-butanol	fermented	4	0.41 ± 0.53	○
1257	1-Pentanol		n.d.	0.53 ± 0.10	○
1362	1-Hexanol		n.d.	0.73 ± 0.02	
1496	2-Ethyl-1-hexanol	minty	1	0.64 ± 0.03	
<u>Aldehydes</u>					
825	2-Methylpropanal	malty	64	15.62 ± 0.32	
929	2-Methylbutanal	malty	4096	314.32 ± 9.43	○
934	3-Methylbutanal	malty	4096	264.53 ± 49.46	○
1093	Hexanal	green	16	2.03 ± 0.06	
1194	Heptanal		n.d.	1.06 ± 0.03	○
1213	3-Methyl-2-butenal*	metallic	1	1.30 ± 0.03	
1293	Octanal	citrus	64	1.27 ± 0.04	○
1400	Nonanal	soapy	1024	1.04 ± 0.23	○
1442	(E)-2-Octenal	minty, fatty	1024	0.92 ± 0.03	○
1482	Furfural		n.d.	10.45 ± 0.34	
1541	Benzaldehyde		n.d.	25.85 ± 0.74	
1592	5-Methyl-2-furaldehyde	sweet	1	2.25 ± 0.08	
1662	Phenylacetaldehyde	floral	4096	117.92 ± 4.26	
1822	(E,E)-2,4-Decadienal	green	4096	1.11 ± 0.04	
1950	2-Phenyl-2-butenal	green	1	1.87 ± 0.10	
<u>Ketones</u>					
991	2,3-Butanedione	caramel like	256	2.74 ± 0.09	○
1016	4-Methyl-2-pentanone *		n.d.	1.97 ± 0.04	○
1190	2-Heptanone		n.d.	1.52 ± 0.05	○
1263	3-Octanone	metallic	16	0.70 ± 0.02	
1289	2-Octanone		n.d.	0.88 ± 0.03	○
1311	1-Octen-3-one	mushroom like	4096	0.53 ± 0.02	

Compounds identified via GC/MS analysis based on comparison with the K.I. (Kovats Index) and the mass spectra of standard compounds and via GC/O analysis based on comparison with the K.I. and the aroma quality of the standard compounds

a : Relative GC peak area of each compound when the value of the I.S. (n-Tetracosane) is regarded as 1 (Mean ± standard deviation, n=3)

\* : Newly identified compounds in miso

K.I. : Kovats Index I.S. : Internal Standard n.d. : Not detected. tr : Trace amount.

Table I-2.2 豆味噌の SDE 香気濃縮物から検出された香気化合物(続き)

K.I.	compound	aroma quality	FD factor	relative amount <sup>a</sup>	not detected in the rice misos
<u>Esters</u>					
894	Ethyl acetate		n.d.	62.71 ± 1.13	
993	Ethyl-2-methyl propanoate	fruity	256	3.46 ± 0.09	
1030	2-Methylpropyl acetate		n.d.	1.00 ± 0.02	
1079	Ethyl-3-methyl butanoate*	fruity	256	0.53 ± 0.01	
1132	3-Methylbutyl acetate	fruity	1	2.46 ± 0.06	
1144	Ethyl pentanoate	fruity	1	0.31 ± 0.01	
1243	Ethyl hexanoate		n.d.	0.74 ± 0.03	
1355	Ethyl lactate	sweet	1	0.44 ± 0.02	○
1552	Furfuryl acetate *		n.d.	1.23 ± 0.03	○
1638	Methyl benzoate*	sweet	64	0.74 ± 0.03	
1681	Ethyl benzoate	sweet	4	3.18 ± 1.30	
1798	Ethyl phenylacetate		n.d.	0.77 ± 0.03	
1857	2-(2-Butoxyethoxy)ethyl acetate*		n.d.	6.40 ± 0.25	
2053	Ethyl tetradecanoate	sweet	256	10.29 ± 0.41	
<u>Phenols</u>					
1880	2-Methoxyphenol	smoky	4096	1.72 ± 0.07	○
<u>Furans</u>					
881	2-Methylfuran *		n.d.	2.06 ± 0.03	○
964	2,5-Dimethylfuran *		n.d.	19.11 ± 0.33	○
1240	2-Pentylfuran *	green	4	4.26 ± 0.14	
1523	2-Acetylfuran		n.d.	1.48 ± 0.04	○
<u>Pyrazines</u>					
1224	Pyrazine		n.d.	0.47 ± 0.06	○
1277	Methylpyrazine	earthy	n.d.	4.72 ± 0.12	○
1333	2,5-Dimethylpyrazine	roasty	1	2.44 ± 0.08	○
1340	2,6-Dimethylpyrazine	roasty, bitter	1	8.44 ± 0.29	○
1346	Ethylpyrazine	sweet	1	0.77 ± 0.17	○
1414	2,3,5-Trimethylpyrazine	nutty	256	0.85 ± 0.02	○
<u>Sulfur-containing compounds</u>					
1083	Dimethyl disulfide		n.d.	1.66 ± 0.03	○
1392	Dimethyl trisulfide *	sulfury	4096	0.93 ± 0.03	○
1472	Methional	potato like	4096	3.32 ± 0.76	
<u>Others</u>					
1050	Toluene	metallic	1	8.07 ± 0.21	○
1993	2-Acetylpyrrole		n.d.	1.92 ± 0.18	○
2098	HEMF	sweet	4096	0.21 ± 0.02	
2400	n-Tetracosane (I.S.)			1.000	

Compounds identified via GC/MS analysis based on comparison with the K.I. (Kovats Index) and the mass spectra of standard compounds and via GC/O analysis based on comparison with the K.I. and the aroma quality of the standard compounds

a : Relative GC peak area of each compound when the value of the I.S. (n-Tetracosane) is regarded as 1 (Mean ± standard deviation, n=3)

\* : Newly identified compounds in miso

K.I. : Kovats Index I.S. : Internal Standard n.d. : Not detected. tr : Trace amount.

HEMF : 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone

### 第 3 節 鍵香気化合物の風味修飾効果の解析

#### 1. 実験材料および方法

##### 1.1. 試料・試薬

味噌試料および試薬には第 1 節、第 2 節と同じものを用いた。

##### 1.2. SPME による揮発性化合物分析

未加熱の豆味噌溶液における 2-methylbutanal、3-methylbutanal、dimethyl trisulfide の存在の有無を確認するため、SPME 法による香気化合物の分析を行った。装置の概略を Fig. I-3.1.に示す。

SPME 法は、細いニードルの先にコーティングされたファイバーに試料中の香気化合物を吸着させ、そのニードルを直接 GC 注入口に挿入し、吸着成分を加熱脱着させることにより測定を行う方法である。本手法は SDE 法と異なり、試料の長時間の加熱操作を行わずに香気化合物を吸着(抽出)できるため、未加熱の味噌溶液の分析に含まれている揮発性化合物の分析に適していると判断し、分析に用いた。またファイバーの種類により、吸着される化合物の親和性が異なることや、吸着時間や試料の温度によりファイバーに吸着される化合物が変化するため、本研究では Sugawara らが味噌汁にて詳細に条件検討した結果を参考に<sup>31)</sup>、SPME の抽出条件を次のように設定した。

豆味噌を RO 水に溶解して調製した 20 % 豆味噌懸濁液 15 mL を 20 mL 容のバイアルに入れ、セプタム付きの蓋で閉めた。このバイアルをウォーターバスに入れ、バイアル内のサンプルをスターラーで攪拌しながら、SPME ファイバーをヘッドスペースに露出させたのち、80°C、30 分間の抽出を行った。ファイバーは Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco 社)を使用した。抽出後は直ちに GC の注入口に挿入し、ファイバーを露出させて吸着成分を 280°Cにて加熱脱着し、GC 分析を行った。GC 分析条件は SDE 香気濃縮物の分析条件と同条件とし、split 条件のみ splitless に変更した。また 100°C、20 分間加熱した 20 % 豆味噌懸濁液についても同様の分析を実施した。



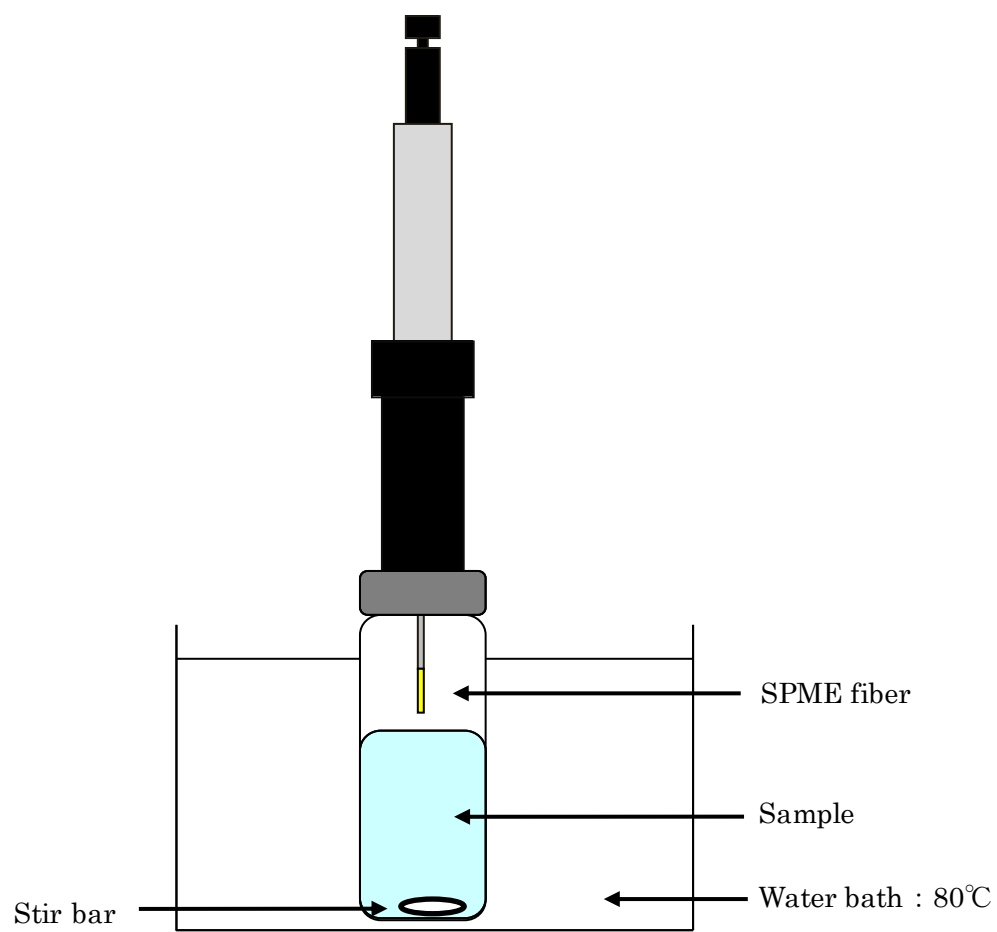


Fig. I-3.1. SPME 装置

### 1.3. dimethyl trisulfide の定量分析

第1節 1.3.3 の官能評価に用いた 5% 加熱豆味噌溶液に含まれる dimethyl trisulfide の含有量を推算するため、豆味噌の SDE 香気濃縮物を用いて、絶対検量線法による定量を行った。検量線の作成には、dimethyl trisulfide の標準品を 3 点濃度で diethyl ether に溶解したサンプルを GC 分析して得たピーク面積を用い、試料には SDE 法により得た加熱香気濃縮物を diethyl ether に 4 倍希釈したサンプルを調製し、GC 分析により各ピーク面積を得た。GC 分析条件は、SDE 加熱香気濃縮物の分析条件と同条件とした。香気濃縮物の分析は 3 回行い、その平均値を用いた。以下の式により、5% 加熱豆味噌溶液中の dimethyl trisulfide の含有量を算出した。

5% 加熱豆味噌溶液中の含有量 ppb

$$= x \text{ ppm} \times 0.05 \text{ mL} \div (100 \text{ mL} \times 20 \text{ 回}) \times 5 \% \div 20 \% \times 10^3$$

x: 検量線より求めた SDE 香気濃縮物中の含有量

0.05 mL: SDE 香気濃縮物の濃縮後液量 (50  $\mu$ L)

100 mL: 1 回の SDE で処理した 20% 豆味噌溶液の液量

20 回: SDE で 20% 豆味噌溶液を処理した回数

## 1.4. 官能評価

豆味噌の加熱香気の中で、米味噌とは異なる香気特性を持ち、最も高い香気寄与度 (FD factor 4096) を示した 6 種の香気化合物 (2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol) について後味のうま味への寄与を評価した。

### 1.4.1 鍵香気化合物の最小検知濃度

6 種の香気化合物について、パネルの最小検知濃度 (MDC; Minimum Detection Concentration) を三点識別法により求めた。具体的には RO 水に化合物を添加した溶液 (10 mL) (香気添加サンプル) 1 つと RO 水 (10 mL) 2 つの計 3 サンプルをパネルに提示し、他と異なると感じたものを 1 つ選択させた。サンプルはいずれも 50°C に加温したものをを用いた。各サンプルの評価濃度は担当者間のプレテストの結果を踏まえ、2-methylbutanal (0.5、1、5 ppb)、3-methylbutanal (0.1、0.5、1 ppb)、1-octen-3-one (0.05、0.5、5 ppb)、dimethyl trisulfide (0.15、0.3、1.5 ppb)、(E,E)-2,4-decadienal (1、10、20 ppb)、2-methoxyphenol (1、10、100 ppb) とした。各評価濃度の三点識別法の結果について二項検定により有意差検定を行い、5% 有意が見られた最小濃度を MDC と決定した。

### 1.4.2 鍵香気化合物のうま味溶液添加試験

うま味溶液を用いて、6 種の香気化合物 (2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol) の後味のうま味への寄与を評価した。官能評価は早瀬らの方法を参考に設定した<sup>16)</sup>。具体的にはうま味溶液 (0.5% 塩化ナトリウムと 0.3% グルタミン酸ナトリウムを含む RO 水) に前述で求めた MDC およびその 1/10、10 倍の濃度になるよう各化合物を添加したものを香気添加サンプルとし、50°C に加温した無添加のサンプル (コントロール) と香気添加サンプル (各 10 ml) を、パネルにランダムに提示し、後味のうま味が強く感じられた方を選択させた (二点試験法)。各評価濃度の二点試験法の結果について二項検定により有意差検定を行った。

### 1.4.3 鍵香気化合物の豆味噌溶液添加試験

未加熱の豆味噌溶液を用いて、dimethyl trisulfide の後味のうま味および嗜好性への寄与を 7 段階評価尺度法にて評価した。官能評価は未加熱の 5% 豆味噌溶液に dimethyl trisulfide を 3、30、300 ppb になるよう添加したものを香気添加サンプルとし、50℃に加熱した無添加のサンプル(コントロール)と香気添加サンプル(各 10 ml)をパネルに提示し、コントロールを4点として、後味のうま味および嗜好性について評価させた。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J (SPSS 社)を用い、Dunnett 検定にて有意差検定を行った。

## 2. 結果および考察

### 2.1. 鍵香気化合物の最小検知濃度

6種の香気化合物について、MDCを求めるために実施した三点識別法の官能評価結果をTable I-3.1に示す。この結果より、5%有意が見られた最小濃度である、2-methylbutanal (1 ppb)、3-methylbutanal (0.5 ppb)、1-octen-3-one (0.5 ppb)、dimethyl trisulfide (0.3 ppb)、(E,E)-2,4-decadienal (10 ppb)、2-methoxyphenol (10 ppb)を各化合物のMDCと決定した。これらの化合物の検知閾値は、それぞれ4.4、0.4、0.06-0.13、0.2、0.2、10 ppbと報告されており<sup>32~35)</sup>、(E,E)-2,4-decadienal以外、今回のパネルのMDCは、報告値と近い値を示した。(E,E)-2,4-decadienalについては、今回得られたMDCのほうが報告値よりも高い濃度であり、これは、(E,E)-2,4-decadienalの香気がパネルの嗅ぎ慣れない香気(グリーン様の香気)であったためと推察された。

Table I-3.1 鍵香気化合物添加時の識別評価(三点識別法)

Compounds	Concentration ppb	Number of panelists		Significant
		Control	Odorant solution	
2-Methylbutanal	0.5	9	2	
	1	9	16	**
	5	4	7	*
3-Methylbutanal	0.1	9	8	
	0.5	6	14	**
	1	0	7	**
1-Octen-3-one	0.05	6	3	
	0.5	2	7	*
	5	1	8	**
Dimethyl trisulfide	0.15	5	4	
	0.3	1	8	**
	1.5	1	8	**
(E,E)-2,4-Decadienal	1	4	5	
	10	1	8	**
	20	0	9	**
2-Methoxyphenol	1	6	3	
	10	1	8	**
	100	1	8	**
* significantly different at $p < 0.05$				
** significantly different at $p < 0.01$				

## 2.2. 鍵香気化合物の後味のうま味への寄与

6種の香気化合物について、うま味溶液における後味のうま味強度を二点試験法で評価した結果を **Table I-3.2** に示す。評価の結果、MDC において 2-methylbutanal が、10×MDC において、2-methylbutanal、3-methylbutanal、dimethyl trisulfide が、後味のうま味を増強する効果が見られた。

次に、うま味溶液において後味のうま味への寄与が確認された鍵香気化合物について、豆味噌溶液において後味のうま味に寄与するか評価を行うこととした。後味のうま味への寄与の有無およびその有効濃度を評価するにあたり、未加熱の豆味噌溶液が添加試験を行う上で適切かを判断するため、未加熱および加熱した豆味噌溶液の 2-methylbutanal、3-methylbutanal、dimethyl trisulfide の有無を SPME 法にて分析した。その結果、加熱した豆味噌溶液からは 3 化合物ともに検出されたが、未加熱の豆味噌溶液からは dimethyl trisulfide は検出されず、2-methylbutanal、3-methylbutanal のみが検出された。この結果より、未加熱の豆味噌溶液を用いて、dimethyl trisulfide の後味のうま味への寄与およびその有効濃度を評価することが可能であると判断し、添加試験を実施した。

うま味溶液での評価濃度を踏まえ、未加熱の豆味噌溶液に濃度が 3-300 ppb になるように dimethyl trisulfide を添加し、後味のうま味の強さと嗜好性を 7 段階評価尺度法で評価した。その結果、dimethyl trisulfide の濃度が 3-30 ppb において、後味のうま味の強さと嗜好性のスコアがともに有意に高くなることが示された (**Fig. I-3.2.**)。一方で、300 ppb においては、後味のうま味の強さは有意に高くなったが、嗜好性のスコアが低下した。これは、300 ppb において、複数名のパネルが、硫黄臭が強くガス様の香気に感じられ不快であると評価したためである。

実際の加熱した豆味噌溶液に、後味のうま味に寄与する有効濃度の dimethyl trisulfide が含まれているかを確認するため、SDE 法により得た香気濃縮物を用いて、5% 加熱豆味噌溶液中の dimethyl trisulfide の含有量を算出した。その結果、dimethyl trisulfide の含有量は 10.5 ± 1.3 ppb であった。これより、加熱した豆味噌溶液には後味のうま味に寄与する有効濃度の dimethyl trisulfide が含まれており、dimethyl trisulfide が後味のうま味に寄与していることが示唆された。

香りによるうま味を増強については、過去の研究においてグルタミン酸ナトリウムのうま味を感じた時と、Savory foods (onion や garlic など) の香りを感じた時に、脳の前頭前皮質内の同じ神経領域が活性化し、garlic 様の香気特性を有する methylfuryl disulfide がうま味を増強する効果があることが報告されている<sup>13)</sup>。dimethyl trisulfide も適度な濃度で garlic 様の香気特性を有していることから<sup>29)</sup>、うま味を増強する上で、この香気特性が重要であることが推測される。

また、香気が「後味」に寄与する要因としては、香気の口腔内の残存が考えられる。牛乳やワインにおいて、飲み込んだ(吐き出した)後に、その食品の一部が口腔内に残り香気を放出し続けることが報告されており<sup>36,37)</sup>、口腔内の香気化合物の残存をリアルタイムで分析することができる Proton-Transfer-Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS) の分析では、化合物の種類によって口腔内の残存時間(減衰速度)が大きく異なっていることが報告されている<sup>37)</sup>。

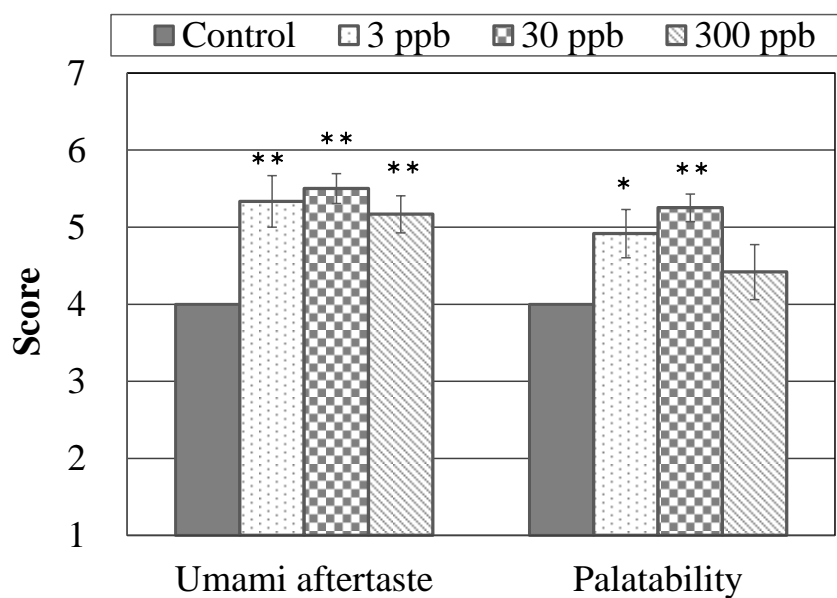
このことから、加熱した豆味噌溶液においても、試料を飲み込んだ(吐き出した)後に口腔内に溶液の一部が残存し、そこから garlic flavor を感じる適度な濃度の dimethyl trisulfide の香気の放出が続くことで、パネルはその香気をレトロネーザルアロマとして鼻腔内で感知し、後味のうま味が増強されているのではないかと考えられる。

一方で、2-methylbutanal、3-methylbutanalもうま味溶液において、MDC以上の濃度で後味のうま味を増強する効果が見られた。SPME 分析より、両化合物ともに未加熱の豆味噌溶液、加熱した豆味噌溶液から検出されたことから、それぞれの後味のうま味に寄与している可能性がある。未加熱の豆味噌溶液に含まれているため、添加試験による有効濃度の決定が難しく、本試験では有効濃度の決定は行わなかったが、両化合物とも麦芽様という共通の香気特性を有しており、香気特性とうま味の増強という観点から非常に興味深い。2-methylbutanal と 3-methylbutanal は、複数のパネルが納豆などを連想させる発酵臭と感じており、発酵食品のうま味を広く用いる日本の食文化の中で習得された「味覚と嗅覚のクロスモーダル相互作用」による効果の可能性も考えられる。

Table I-3.2 うま味溶液における鍵香気化合物添加時の後味のうま味の評価(二点試験法)

Compounds	Concentration ppb	Number of panelists		Significant
		Control	Odorant solution	
2-Methylbutanal	0.1	6	14	
	1 <sup>a</sup>	5	15	*
	10	5	15	*
3-Methylbutanal	0.05	6	14	
	0.5 <sup>a</sup>	7	13	
	5	5	15	*
1-Octen-3-one	0.05	5	5	
	0.5 <sup>a</sup>	9	1	
	5	5	5	
Dimethyl trisulfide	0.03	5	5	
	0.3 <sup>a</sup>	3	7	
	3	1	9	*
<i>(E,E)</i> -2,4-Decadienal	1	8	4	
	10 <sup>a</sup>	6	6	
	100	6	6	
2-Methoxyphenol	1	8	3	
	10 <sup>a</sup>	6	5	
	100	7	4	

<sup>a</sup> minimum detection concentration  
\* significantly different at  $p < 0.05$



\* significantly different at  $p < 0.05$   
\*\* significantly different at  $p < 0.01$

Fig. I-3.2. 未加熱豆味噌溶液における dimethyl trisulfide 添加時の後味のうま味と嗜好性の評価(7段階評価尺度法、n=12)



## 第 1 章 まとめ

本章では、豆味噌が加熱調理食品の「こく」の付与に使用されていることから、「こく」の定義の中から香気による増強作用が客観的に評価しやすい「後味のうま味(うま味の持続性)」に着目し、豆味噌の加熱香気の後味のうま味および嗜好性に与える影響について検証した。

第 1 節では、香気を感じられる条件の官能評価において、加熱した豆味噌の後味のうま味が、加熱した米味噌や未加熱の豆味噌よりも有意に強いことが確認された。香気を感じられない条件では、それぞれ有意な差は認められなかったことから(加熱した豆味噌と淡色米味噌間は除く)、豆味噌の加熱香気の後味のうま味に寄与している可能性が示唆された。

第 2 節では、SDE 法により豆味噌、米味噌の加熱香気成分を抽出し、GC-MS および GC-O/AEDA 法にて香気化合物を同定したところ、豆味噌の加熱香気は主に、麦芽様、グリーン様、甘い香り様、ロースト様、硫黄様の香気特性を示す 5 つの香気群から形成されており、最も高い香気寄与度(FD factor 4096)を示した鍵香気化合物は 2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol、1-octen-3-one、phenylacetaldehyde、methional であった。

第 3 節では、米味噌とは異なる豆味噌特有の香気特性を持つ 6 種の鍵香気化合物(2-methylbutanal、3-methylbutanal、1-octen-3-one、dimethyl trisulfide、(E,E)-2,4-decadienal、2-methoxyphenol)について、うま味溶液における後味のうま味への寄与を評価した結果、2-methylbutanal、3-methylbutanal、dimethyl trisulfide が MDC 以上の濃度で、後味のうま味を増強する効果が見られた。また未加熱の豆味噌溶液への添加試験にて、dimethyl trisulfide の濃度が 3-30 ppb において、後味のうま味の強さと嗜好性がともに有意に高くなることが示された。

本研究により、日本の古くから用いられる基礎調味料である豆味噌において、その加熱香気「こく」(後味のうま味)に寄与し、寄与成分の一つが dimethyl trisulfide であることが示された。この得られた知見から、調理や加工工程において dimethyl trisulfide の含有量を指標に加熱条件を制御することにより、後味のうま味や嗜好性を高めた豆味噌の調理食品や加工食品の提供が可能となると考えられる。

## 参考文献(第 1 章)

- 1) Fukushima, D., Shibasaki, K., Wang, H., & Wu-leung, W. (1987) Fermented foods of the world. (p. 130-131). UK: Butterworths.
- 2) Nakano M. (1982) *Miso no jyoze gijyutsu* (p. 1-11). Japan: Brewing society of Japan
- 3) Kashiwai K.(1999) *Miso* (p.8-15). Japan: Shibata
- 4) Ishikawa T. (1999) Components of fermented foods (p.409-448). Japan: Brewing society of Japan
- 5) Sugawara, E., & Yonekura, Y. (1998). Comparison of aroma components in five types of miso. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 45, 323–329.
- 6) Sugawara, E., Suguru, S., & Kobayashi, A. (1994). Multiple regression analysis of aroma components and sensory evaluation of miso. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 41, 844–846.
- 7) Ohata M, Tominaga T, Dubourdieu D, Kubota K, & Sugawara E. (2009). Quantification and odor contribution of 2-furanmethanethiol in different types of fermented soybean paste miso. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2481-2485.
- 8) Kumazawa, K., Kaneko, S., & Nishimura, O. (2013). Identification and characterization of volatile components causing the characteristic flavor in miso (Japanese fermented soybean paste) and heat-processed miso products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 11968–11973.
- 9) Honma N. Flavor and odorants of Miso (1987). *Nippon Jozokyokaishi*, 82, 480-488
- 10) Sugawara, E., & Hosaka, Y. (2009). Solid-phase microextraction analysis of the headspace volatiles from heated miso soup. *Nihon Kasei Gakkaishi*, 60, 545–552.
- 11) Ito, A. (2005). Manufacturing process of mixed-miso. *Miso no kagaku to gijyutu*, 53, 117–120.
- 12) Djordjevic, J., Zatorre, R. J., & Jones-Gotman, M. (2004). Odor-induced changes in taste perception. *Experimental Brain Research*, 159, 405-408
- 13) Rolls, E. T. (2000). The representation of umami taste in the taste cortex. *The Journal of Nutrition*, 130, 960-965.
- 14) Sakai, N. & Imada, S. (2003). Bilateral lesions of the insular cortex or of the prefrontal cortex block the association between taste and odor in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80, 24–31.
- 15) Stevenson, R., & Case, T. (2003). Preexposure to the stimulus elements, but not training to detect them, retards human odor-taste learning. *Behavioural Processes*, 28, 13–25.

- 16) Hayase, F., Takahagi, Y., & Watanabe, H. (2013). Analysis of cooked flavor and odorants contributing to the Koku taste of seasoning soy sauce. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 60, 59–71.
- 17) Furukawa H.(1994) *Oishisa wo hakaru* (p.5-18). Japan: Saiwai
- 18) Newell, G. J., & MacFarlane, J. D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food Science*, 52, 1721-1725.
- 19) Sugawara, E. (1990). Comparison of miso aroma components in preparations by different methods. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 64, 171–176.
- 20) Sugawara, E. (1991). Identification of 4-Hydroxy- 2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone as a flavor component in miso. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 38, 491–493.
- 21) Sugawara, E., & Hosaka, Y. (2009). Effect of heating on the aroma components of miso soup. *Nihon Kasei Gakkaishi*, 60, 453–459.
- 22) Blank, I., & Fay, L. (1996). Formation of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone and 4- hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone through Maillard reaction based on pentose sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 531-536.
- 23) Cremer, D. R., & Eichner K. (2000). The reaction kinetics for the formation of Strecker aldehydes in low moisture model systems and in plant powders. *Food Chemistry*, 71, 37–43.
- 24) Takeuchi, T. (1988). Manufacturing process of soybean miso. *Nippon Jozokyoikaishi*, 83, 105–111.
- 25) Hondo, S. (1989). Saccharides of miso during manufacturing. *Nippon Jozokyoikaishi*, 84, 594–599.
- 26) Fujimaki, M., Kobayashi, N., Kurata, T., & Kato, S. (1968). Reactivities of some carbonyl compounds in Strecker degradation. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32, 46–50.
- 27) Fiddler, W., Parker, W. E., Wasserman, A. E., & Doerr, R. C. (1967). Thermal decomposition of ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 757–761.
- 28) Namiki, M.(1988) *Saishin flavor gijyutsu* (p.94-116). Japan: Kougyogijyutsukai
- 29) Landaud, S., Helinck, S., & Bonnarme, P. (2008). Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1191–1205.
- 30) Kaneko, S., Kumazawa, K., & Nishimura, O. (2013). Studies on the key aroma

- compounds in raw (unheated) and heated Japanese soy sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3396–3402.
- 31) Sugawara, E., & Hosaka, Y. (2009). Solid-phase microextraction analysis of the headspace volatiles from heated miso soup. *Nihon Kasei Gakkaishi*, 60, 545–552.
  - 32) Guth, H. (1997). Quantitation and sensory studies of character impact odorants in different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3027-3032.
  - 33) Kirchoff, E., & Schieberle, P. (2001). Determination of key aroma compounds in the crumb of a three-stage sourdough rye bread by stable isotope dilution assays and sensory studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4304–4311.
  - 34) Lubran, M., Lawless, H., Lavin, E., & Acree, T. (2005). Identification of metallic-smelling 1-octen-3-one and 1-nonen-3-one from solutions of ferrous sulfate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8325-8327.
  - 35) Steinhaus, P., & Schieberle, P. (2007). Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6262–6269.
  - 36) Kühn, J., Delahunty, C. M., Considine, T., & Singh, H. (2009). In-mouth flavour release from milk proteins. *International dairy journal*, 19, 307-313.
  - 37) Onishi, M. (2014). Instrumental analysis of volatile compounds in wine. *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi*, 15, 199-202

## 第 2 章

### 豆味噌における高分子画分と風味修飾効果

## 緒言

味噌の呈味成分は、麴の酵素による原料成分の分解作用と、酵母と乳酸菌による発酵作用により生成され、それらの生成物が更に非酵素的反応により新たな化合物を生成し、味噌らしい深い風味が醸成される<sup>1~3)</sup>。糖類による甘味、アミノ酸によるうま味、食塩による塩味が味噌の呈味の基本となる。

第1章において、豆味噌における加熱香気が後味のうま味(持続性)および嗜好性に影響を与えることを明らかにした。一方で、香気を感じない状態においても豆味噌は淡色米味噌よりも後味のうま味(持続性)が有意に強いという結果が得られ(第1章第1節)、豆味噌の呈味成分(不揮発性成分)においても、「こく」に寄与する成分があることが示唆された。味噌の「こく」に寄与する不揮発性成分として、低分子成分においては酵母由来の核酸から分解された無機リン酸が報告されている<sup>1)</sup>。また高分子成分では、Ogasawaraらが米味噌の解析から、分子量1-5 kDaの高分子画分が「こく」に寄与していること、またこの高分子画分を糖と加熱すると「こく」が更に増強されることを報告している<sup>4)</sup>。精製した大豆ペプチドの分子量1-5 kDaの高分子画分も糖と加熱すると「こく」が増強されることから<sup>5)</sup>、長期間熟成した米味噌の「こく」には糖と大豆ペプチドの加熱反応物(メイラードペプチド)が寄与していると推察している<sup>4)</sup>。

一方、当研究室では、Yasudaらは「メラノイジンの風味修飾効果」について研究を行い、glucoseとglutamic acidのモデル反応から得られるメラノイジンが、うま味溶液やブイヨンスープにおいて「こく」を増強する作用を有することを明らかにしている<sup>6)</sup>。

一方で、豆味噌の呈味成分としては、アミノ酸やジペプチドなどの低分子成分が報告されており、ジペプチドが塩なれ効果(塩カド抑制効果)や苦味抑制効果に寄与している可能性が示唆されているが<sup>7)</sup>、豆味噌の高分子成分が「こく」に与える影響についての報告はなされていない。また豆味噌は長期熟成食品であるためメイラードペプチドやメラノイジンを高濃度で含有していることが推測されるが、その含有比率やそれぞれの成分の「こく」への寄与について明らかにされていない。その要因の一つに、メイラードペプチドはその化学構造が不明で、定量方法が確立されていないことが挙げられる。

そこで本章では、豆味噌の高分子画分における「こく」付与味修飾物質に着目し、豆味噌に含まれるペプチド、メイラードペプチドおよびメラノイジンが「こく」に与える影響について検証した。本章では、メイラードペプチド<sup>4,5)</sup>やメラノイジン<sup>6)</sup>の「こく」増強効果で報告されている厚み(thickness)と持続性(continuity)を「こく」として評価することとした。

第1節では、官能評価にて豆味噌の高分子画分が厚みと持続性に与える影響について評価し、各高分子画分の構成成分について解析を実施した。またメラノイジンが豆味噌の「こく」

に与える影響について検証を行った。第 2 節では、メイラードペプチドに焦点を当て、モデル反応により各種メイラードペプチドを調製し、その構造と風味修飾効果の関係について解析を行い、風味修飾に重要な構造の決定を行った。第 3 節では、豆味噌におけるメイラードペプチドの存在の有無を検証し、高分子画分に含まれるペプチドおよびメイラードペプチドが豆味噌の「こく」に与える影響を評価した。

## 第 1 節 豆味噌の高分子画分の風味への影響と成分組成

### 1. 実験材料および方法

#### 1.1. 試料・試薬

味噌試料は、第 1 章と同じく以下のものを用いた。

豆味噌：カクキュー八丁味噌(株式会社カクキュー八丁味噌)

赤色米味噌：本場仙台味噌(仙台味噌醤油株式会社)

淡色米味噌：白山吹(信州味噌株式会社)

またモデルメイラードペプチドの調製には、精製大豆タンパク フジプロ ME(不二製油社、ペプチド含有量 約 90%)と食品用プロテアーゼ Alcalase(ノボザイム社)を使用した。

試薬は以下の特級試薬を使用した。

MSG(関東化学株式会社から購入)、D-glucose(キシダ化学株式会社から購入)、glutathione(和光純薬工業株式会社)、ケルダール用分解促進剤ケルタブ(ACTAC 社から購入)、陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC 分析用バッファー-PF-1、PF-2(三菱化学株式会社から購入)。その他の分析試薬は、和光純薬工業株式会社、Sigma-aldrich Co.のいずれかより購入した。

また、本研究で使用した水は特に注釈の無い限り、逆浸透純粋製造装置 (Milli RO 10 Plus; Millipore) で逆浸透膜法により精製した後、さらに超純水製造装置 (MP-650; IWAKI) にてシンパック処理により精製したものを用いた。



## 1.2. 味噌高分子画分の調製

豆味噌、赤色米味噌、淡色米味噌について、低分子画分(3 kDa 以下。以下、[-3 kDa]と表記)および3種の高分子画分(3-5 kDa ([3-5 kDa])、5-10 kDa ([5-10 kDa])、10 kDa 以上 ([10 kDa-]))に分画した。調製方法は次の通り。

各味噌(40 g)を沸騰水(200 ml)に溶解し、酵素失活のため、沸騰浴で10分間攪拌加熱し、20%味噌懸濁液を調製した。その後、4000 rpm で5分間遠心分離し、上清を回収した。残渣に対して20 mlのRO水を加えて再び懸濁し、同様に遠心分離する動作を6回繰り返す、全ての上清を混合した。混合した上清はNo.2濾紙(ADVANTEC製)にて吸引濾過し、20%味噌溶液を得た。

20%味噌溶液を3 kDa、5 kDa、10 kDaの限外濾過ユニット(CORNING製 Spin-X UF、MILLIPORE製 Amicon Ultra)にて濾過し、[-3 kDa]、[3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-]の4つの画分を得た。各画分は凍結乾燥し、デンケーター中で保存した。

## 1.3. モデルメイラードペプチドの調製

メイラードペプチドの成分特徴を評価するために、モデルメイラードペプチド(Glc-4MPs)を調製した。Glc-4MPsはOgasawaraらの方法<sup>4)</sup>に準じて調製した。

精製大豆タンパク フジプロ ME 15 g を 100 ml の超純水に溶解し、0.14 g の Alcalase を添加し、50°C、24 時間酵素分解を実施した。得られた分解液を 95 °C、10 分で失活させ、5000 ×g で 20 分間遠心分離を行った。得られた上清から TFF 限外濾過カプセル(日本ポール製)にて 1-5 kDa 画分を取得し、凍結乾燥した。この乾燥物 1 g に 0.16 g の glucose を添加し、固形分 24% になるように超純水を加え、95°C、4 時間加熱した。この加熱物について再度、限外濾過膜にて 1-5 kDa 画分を取得し、凍結乾燥したものを Glc-4MPs とした。

## 1.4. モデルメラノイジンの調製

メラノイジンの成分特徴を評価するために、モデルメラノイジン(MEL)を調製した。反応基質には大豆に最も多く含まれる構成アミノ酸である glutamic acid と、最も多く含まれる構成糖である glucose を選択し<sup>8)</sup>、Yasuda らの方法<sup>6)</sup>に準じ、以下の方法で調製した。

2.0 M MSG、2.0 M glucose、および 0.2 M sodium hydrogen carbonate を含む水溶液を、7 時間加熱還流した(95°C)。得られた反応生成物を 5 kDa の限外濾過ユニット(1.2.と同品)にて濾過し 5 kDa 以上画分を得た。この画分を凍結乾燥し、MEL とした。

## 1.5. 官能評価

官能評価は、食後 3 時間以上経過した状態で午前中に実施した。官能評価に用いた試料の調製には、RO 水を用いた。全ての官能評価において、パネルは提示された試料を 5 秒間口に含み、その後吐き出した。試料間では RO 水で口をゆすぎ、口腔内に試料が残らないように洗浄した。香気の影響を排除するため、全てノーズクリップを着用した。

### 1.5.1 パネルトレーニングおよびパネルの選定

食品機能化学研究室に所属する学生を対象に、第 1 章 1.3 の基本味識別テスト、基本味濃度差識別テストおよび以下の「こく」付与味修飾物質の識別を目的とした「こく」識別テストのトレーニングを行い、分析型評価パネルを選定した。

#### (1) 「こく」識別テスト

パネルが「こく」の強度を正しく認識できるようになるためのトレーニングとして、「こく」識別テストを行った。テストには、既知の「こく」付与味修飾物質である xylose 型メイラードペプチド (4 時間加熱品、以下、Xyl-4MPs)<sup>4)</sup> および glutathione<sup>9)</sup>を用いた。0.5% NaCl と 0.3% MSG からなる「うま味溶液」をコントロールとし、「うま味溶液」に Xyl-4MPs を 0.025% 添加したもの、および glutathione を 0.1% 添加したものを「こく」付与サンプルとした。サンプルは 5ml とし、いずれも 50°C に加温したものをを用いた。

本章では、「こく」の定義の中から「厚み」と「持続性」に着目した。パネルには各サンプルを 5 秒間口に含んだ後に吐き出すよう指示し、口に含んでいる際に感じる濃厚感、深み、複雑さを「厚み」として、吐き出した後に残る味の余韻を「持続性」として評価させ、強く感じたコップを選ばせた。テストは日を変えて 3 回以上繰り返し実施した。

#### (2) 分析型官能評価パネルの選定

第 1 章 1.3 と同様、基本味識別テストは 5 味中の 4 味以上、基本味濃度差識別テストは 4 味中の 3 味以上の正答を合格とし、「こく」識別テストは 2 回連続の正答を合格とした。これら全てのテストに合格したパネルを分析型官能評価パネルとして選定し、以降の官能評価の評価者とした。

### 1.5.2. 高分子画分の評価

豆味噌の各分子量画分の「こく」への寄与を明らかにするため、**1.2.**で得た各画分を用いて官能評価を行った。官能評価は全て、パネルが「こく」を明確に評価できるよう、「こく」識別テストと同様に「うま味溶液」をベースとして実施した。

#### (a) 豆味噌における高分子画分の「こく」への寄与(二点試験法)

豆味噌の高分子画分が「こく」に影響を与えているか、二点試験法にて評価を行った。評価サンプルは、「うま味溶液」に豆味噌の全ての水溶性画分([-3 kDa]、[3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-])を添加した溶液(再構成溶液)と、再構成溶液から3種の高分子画分([3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-])を除いた溶液(高分子画分非添加溶液)とした。各画分の添加量は、**1.2.**の各画分の取得量から算出された存在比(**Table II-1.5** 参照)から決定し、添加量の合計が**第1章 2.1.**の5%豆味噌溶液の固形分濃度(1.7%)になるように設定した。評価溶液の組成を**Table II-1.1**に示す。

パネルに50°Cに加温した2種の評価サンプル(10 ml づつ)の厚みおよび持続性を評価させ、強く感じたコップを選択させた。評価結果は二項検定により有意差検定を行った。

#### (b) 味噌の種類と高分子画分の「こく」への寄与(順位法)

味噌の種類による高分子画分の厚みおよび持続性への寄与の違いについて、順位法により評価を行った。評価サンプルは、「うま味溶液」に豆味噌、赤色米味噌、淡色米味噌の各味噌の高分子画分([3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-])をそれぞれ添加した3種の溶液とした。各画分の添加量は、(1)と同様に決定し、添加量の合計が**第1章 2.1.**の5%味噌溶液の固形分濃度(豆味噌:1.7%、赤色米味噌:1.6%、淡色米味噌 1.6%)になるように設定した。評価溶液の組成を**Table II-1.2**に示す。

パネルに3種の評価サンプル(10 ml づつ)をランダムに提示し、パネルは厚みおよび持続性が強いと感じたサンプルから順に3点、2点、1点とつけた。全てのパネルの合計値を算出し、Newell & MacFalane<sup>10)</sup>による順位法の検定により有意差の有無を検定した。

**(c) 豆味噌における各分子量画分と「こく」への寄与(オMISSIONテスト/7段階評価尺度法)**

豆味噌の高分子画分について、「こく」に寄与している分子量画分を明確にするため、各画分のオMISSIONテストを実施した。「うま味溶液」に豆味噌の全ての水溶性画分([-3 kDa]、[3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-])を添加した溶液(再構成溶液)をコントロールとし、評価溶液には[3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-]をそれぞれ除いた溶液(オMISSION溶液)を用いた。

再構成溶液における4画分の添加量の比は、(1)と同様に決定した。再構成溶液およびオMISSION溶液の組成を **Table II-1.3** に示す。

官能評価には、7段階評価尺度法を用い、50°Cに加温した豆味噌再構成溶液(コントロール)とオMISSION溶液(各 10 ml)をパネルに提示し、コントロールを4点として、厚みと持続性について評価をさせた。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J(SPSS 社)を用い、Dunnet 検定にて有意差検定を行った。

**(d) 豆味噌におけるメラノイジンの「こく」への寄与(アディクションテスト/7段階評価尺度法)**

豆味噌の高分子画分の「こく」に寄与している成分がメラノイジンであるかを確認するため、アディクションテストを実施した。コントロールとして「うま味溶液」に豆味噌低分子画分([-3 kDa])のみを添加した溶液(豆味噌低分子うま味溶液=高分子画分非添加溶液)、評価溶液には「豆味噌低分子うま味溶液」に豆味噌の 5-10 kDa 画分([5-10 kDa]) およびモデルメラノイジン(MEL)をそれぞれ添加した溶液(アディクション溶液)を用いた。[5-10 kDa]の添加量は(3)と同じく 0.08%とし、MEL の添加量は [5-10 kDa]中のペプチド含有量を差し引き(**Table II-1.10** 参照)、 $0.08 \times (100 - 26[\text{ペプチド含有量}]) / 100 = 0.06\%$ とした(**Table II-1.4**)。

官能評価には、7段階評価尺度法を用い、50°Cに加温した豆味噌低分子うま味溶液(コントロール)とアディクション溶液(各 10 ml)をパネルに提示し、コントロールを4点として、厚みと持続性について評価をさせた。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J(SPSS 社)を用い、Dunnet 検定にて有意差検定を行った。

**Table II-1.1** 豆味噌における高分子画分の「こく」への寄与の評価に用いた試料溶液の組成

Sample	NaCl	MSG	RO water	[-3kDa]	[3-5kDa]	[5-10kDa]	[10kDa-]
	g	g	g	g	g	g	g
Control (reconstituted soln.)	0.5	0.3	98	1.50	0.01	0.08	0.14
om.[3-5 kDa][5-10 kDa][10 kDa-]	0.5	0.3	98	1.50	-	-	-

**Table II-1.2** 味噌の種類と高分子画分の「こく」への寄与の評価に用いた試料溶液の組成

Sample	NaCl	MSG	RO water	[3-5kDa]*	[5-10kDa]*	[10kDa-]*
	g	g	g	g	g	g
soy miso soln.	0.5	0.3	98	0.01	0.08	0.14
red miso soln.	0.5	0.3	98	-**	0.01	0.18
white miso soln.	0.5	0.3	98	-**	-**	0.27

\* each miso fraction

\*\* non-addition because of very small amount

**Table II-1.3** 豆味噌における各分子量画分と「こく」への寄与に用いた試料溶液の組成

Sample	NaCl	MSG	RO water	[-3kDa]	[3-5kDa]	[5-10kDa]	[10kDa-]
	g	g	g	g	g	g	g
Control (reconstituted soln.)	0.5	0.3	98	1.50	0.01	0.08	0.14
omission soln. [3-5kDa]	0.5	0.3	98	1.50	-	0.08	0.14
omission soln. [5-10kDa]	0.5	0.3	98	1.50	0.01	-	0.14
omission soln. [10kDa- ]	0.5	0.3	98	1.50	0.01	0.08	-

**Table II-1.4** 豆味噌におけるメラノイジンの「こく」への寄与に用いた試料溶液の組成

Sample	NaCl	MSG	RO water	soy miso [-3kDa]	soy miso [5-10kDa]	MEL
	g	g	g	g	g	g
Control	0.5	0.3	98	1.5	-	-
addition soln. [5-10kDa]	0.5	0.3	98	1.5	0.08	-
addition soln. MEL	0.5	0.3	98	1.5	-	0.06

## 1.6 高分子画分の成分分析

1.2. で得た各味噌高分子画分および Glc-4MPs、MEL について、以下の成分分析を実施した。

### 1.6.1. 固形分

第 1 章 1.2.1. と同方法を用いた。

### 1.6.2. 全窒素

各試料の全窒素含有量は、ケルダール法にて測定した。ケルダールチューブに試料 50 mg、ケルダール用分解促進剤ケルタブ (ACTAC 社)、sulfuric acid 10 ml を加え、分解機にて 2 時間分解した。得られた分解液をケルダール蒸留機 B-324 (Buchi 社) にセットし、蒸留で得られたアンモニアを硫酸で滴定することにより、全窒素含有量を算出した。滴定は 2 回行った。

### 1.6.3. 褐色度

分光光度計 (日立 U-3310) にて波長 420 nm の吸光度を測定した。試料は 1% 溶液で測定を行い、褐色度に応じて、適宜 RO 水で 10 倍および 100 倍に希釈し測定した。

#### 1.6.4. 構成アミノ酸

各試料の構成アミノ酸含有量は、陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC の測定結果から算出した。試料 10 mg を 8N hydrochloric acid 2.4 ml に溶解し、110°C、23 時間、加水分解を行った。得られた分解液をエバポレーターで乾固し、RO 水 800  $\mu$ l に溶解した。この溶解液 40  $\mu$ l に RO 水 710  $\mu$ l および 10% trichloroacetic acid 250  $\mu$ l を加え、一晩静置保管後、0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターで濾過したものを検液とし、以下の HPLC の分析条件で測定を行った。

測定対象は 15 種のアミノ酸 (Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg, Pro) とし、塩酸分解で得られた各アミノ酸含有量を求めた。各アミノ酸含有量の総和をペプチド含有量として、アミノ酸毎に各アミノ酸の全窒素含有率を乗じ合計したものを構成アミノ酸窒素含有量とした。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi L-8800A amino acid analyzer (post-column method)
Column	: Cation exchange column for L-8800A Twin#2622PF ( $\phi$ 6.0 mm $\times$ 25 mm(twin), Hitachi)
Column temp.	: 38°C (0.0 $\rightarrow$ 11.5 min), 45°C (11.5 $\rightarrow$ 25.0 min), 70°C (25.0 $\rightarrow$ 67.0 min)
Reaction column	: Reaction column for L-8800A (Hitachi)
Reaction temp.	: 135°C
Ammonia trap column	: #2650( $\phi$ 4.6 mm $\times$ 60 mm, Hitachi)
Detector	: VIS(Wavelength:570 nm)
Flow Rate	: 0.51 ml/min(Eluent), 0.41 ml/min(Reagent)
Eluent	: (A) PF-1(Hitachi), (B) PF-2(Hitachi), (C) PF-4 (Hitachi)
Reagent	: ninhydrin solution(Hitachi)
	: A/B/C = 80/20/0 (0.0 $\rightarrow$ 4.0 min) = 42/58/0 (4.0 $\rightarrow$ 11.5 min)
Gradient(Eluent)	= 10/90/0 (11.5 $\rightarrow$ 15.0 min) = 0/100/0 (15.0 $\rightarrow$ 21.0 min) = 0/0/100 (21.0 $\rightarrow$ 67.0 min)
Injection volume	: 20 $\mu$ L

### 1.6.5. 分子量分布

豆味噌の分画面分の分子量分布は、ゲルろ過クロマトグラフィーカラム Superdex Peptide HR 10/30 を用いて、HPLC にて測定した。本カラムの排除限界が 20 kDa であるため、試料には、排除限界を超える画分を有する[10 kDa-]を除いた[5-10 kDa]、[3-5 kDa]、[-3 kDa]および分画面前の溶液を用い、ペプチドの測定波長はペプチド結合および芳香環を検出する 220 nm および 280 nm、メラノイジンの測定波長は褐色成分を検出する 420 nm を用いた。

各試料は超純水にて固形分 0.4% に調整し、0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターにて濾過し、以下の HPLC の分析条件で測定を行った。また分子量が既知のペプチドおよびタンパク質を用いて校正曲線を作成し、各画分の平均分子量を決定した (albumin: 66 kDa、cytochrome c: 12 kDa、aprotinin: 6.5 kDa、angiotensin: 1.3 kDa)。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi HPLC L-2000 series (Hitachi)
Detector	L-2455 Diode Array detector (Hitachi) (Wavelength:220、280、420 nm)
Column	: Superdex Peptide HR 10/30 (GL Science)
Column temp.	: 40°C
Flow Rate	: 0.5 ml/min
Eluent	: 0.25 M NaCl + 0.02 M phosphate buffer (pH7.2)
Injection volume	: 50 $\mu$ L



## 2. 結果および考察

### 2.1. 豆味噌の高分子画分の「こく」への影響

各味噌溶液について分画を行い、各画分の固形分から取得量を算出することにより、各画分の存在比を決定した (Table II-1.5)。その結果、各味噌ともに[-3 kDa]が 80% 以上と大部分を占めた。第 1 章 Table I-1.1 で示したように、各味噌溶液の固形分の約 1/3 が NaCl であることから、[-3 kDa]の半分近くが NaCl であることが推測された。またその他に、[-3 kDa]には、アミノ酸、オリゴペプチド、単糖、オリゴ糖などが多く含まれることが推測される。3 kDa 以上の高分子画分については、メイラードペプチドを含むペプチド、メラノイジン、多糖などが主成分と考えられ、2.2.にて詳細な成分分析を実施した。

Table II-1.5 各味噌における分子量画分の存在比

fraction	ratio %		
	soy miso	red miso	white miso
[-3kDa]	86.8	87.9	83.1
[3-5kDa]	0.75	0.13	0.03
[5-10kDa]	4.4	0.66	0.18
[10kDa- ]	8.1	11.3	16.7

#### (a) 豆味噌高分子画分の「こく」への寄与

豆味噌溶液における、高分子画分の「こく」への寄与の有無を明らかにするために再構成溶液 (Cont.) と高分子画分を除いたオMISSION溶液 (omission soln. [3-5 kDa][5-10 kDa][10 kDa-]) にて二点試験法を実施した。その結果、再構成溶液は高分子画分非添加溶液よりも厚みおよび持続性ともに強いことが示され、豆味噌の「こく」に 3 kDa 以上の高分子画分が寄与していることが示唆された (Table II-1.6)。

Table II-1.6 豆味噌における高分子画分の「こく」への寄与の評価 (二点試験法)

<i>koku</i> attribute	Number of panelists			Significant
	Cont.	om.[3-5 kDa]	[5-10kDa][10kDa-]	
thickness	15		2	**
continuity	13		4	*
* significantly different at $p < 0.05$				
** significantly different at $p < 0.01$				

## (b) 味噌の種類と高分子画分の「こく」への寄与

味噌の種類による高分子画分の「こく」への寄与の違いを明らかにするために3種の味噌の各高分子画分添加溶液について順位法にて評価を実施した(**Table II-1.7**)。その結果、豆味噌溶液が淡色米味噌溶液よりも厚み、持続性ともに有意に強いことが示唆された。また味噌の種類による厚み、持続性の強さは豆味噌>赤色米味噌>淡色米味噌の順に強い結果となった。持続性については、**第1章**において豆味噌、赤色米味噌、淡色米味噌の加熱味噌溶液のうま味の持続性(後味のうま味)を評価したが、その際の結果と同等の結果が得られた(**第1章第1節2.2. 味噌の種類の違いによる後味のうま味への影響 [ノーズクリップあり]**を参照)。

このことから、豆味噌の高分子画分は他の米味噌、特に淡色米味噌の高分子画分よりも「こく」に寄与していることが確認された。

**Table II-1.7** 味噌の種類と高分子画分の「こく」への寄与の評価(順位法)

Sample	Sum of score	
	thickness	continuity
soy miso soln.	43	41
red miso soln.	34	36
white miso soln.	25	25

n=17

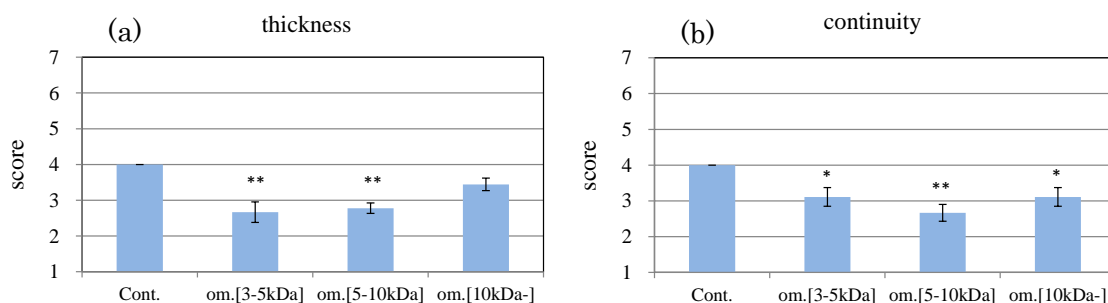
ranking test : Score 3 (strongest), Score 2 (middle), Score 1 (weakest)

\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

### (c) 豆味噌における各分子量画分の「こく」への寄与

豆味噌の高分子画分について、「こく」に寄与している分子量画分を明確にするため、各画分のオMISSIONテストを実施した。その結果、再構成溶液(コントロール)に対し、[3-5 kDa]および[5-10 kDa]を除いたオMISSION溶液は厚みと持続性のスコアが有意に低下することが確認された。また、[10 kDa-]を除いたオMISSION溶液は厚みのスコアへの影響は見られなかったが、持続性のスコアが有意に低下した(**Fig. II-1.1.**)。このことから、厚みには[3-5 kDa]、[5-10 kDa]が、持続性には[3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-]が寄与していることが示唆された。



\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. II-1.1.** 豆味噌再構成溶液におけるオMISSIONテスト(7段階評価尺度法、n=9)

((a) 厚み、(b) 持続性)

## 2.2. 豆味噌高分子画分の成分組成

### (a) 褐色度

豆味噌高分子画分におけるメラノイジンを含む褐色成分含有量を明らかにするため、各高分子画分([3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-])の褐色度を測定した。比較のため、赤色米味噌と淡色米味噌の各高分子画分についても同様に測定した。

その結果、褐色度はどの分子量画分においても、豆味噌>赤色米味噌>淡色米味噌の順に高いことが確認された(**Fig. II-1.2.**)。これは熟成期間の違い(豆味噌(約2年)、赤色米味噌(約1年)、淡色米味噌(約半年))や原料の違いによる組成の違い(豆味噌(原料が大豆のみ)、米味噌(原料が米と大豆。米由来の糖類を多く含有))などが原因と考えられた<sup>8)</sup>。

また、分子量画分で比較すると、豆味噌および赤色米味噌の褐色度は[3-5 kDa]>[5-10 kDa]>[10 kDa-]の順に減少した。この理由として、味噌の熟成中のメイラード反応は緩慢であり、遊離アミノ酸などの低分子化合物から形成される褐色成分がまだ重合の途中段階にあるため、[3-5 kDa]の褐色度が最も高いことが考えられた。また、味噌にはペクチンを主とした大豆由来の水溶性多糖が含まれていることが報告されており<sup>8)</sup>、高分子画分ほど水溶性多糖の存在量が多くなり相対的に褐色成分が少ないという要因も推測された。

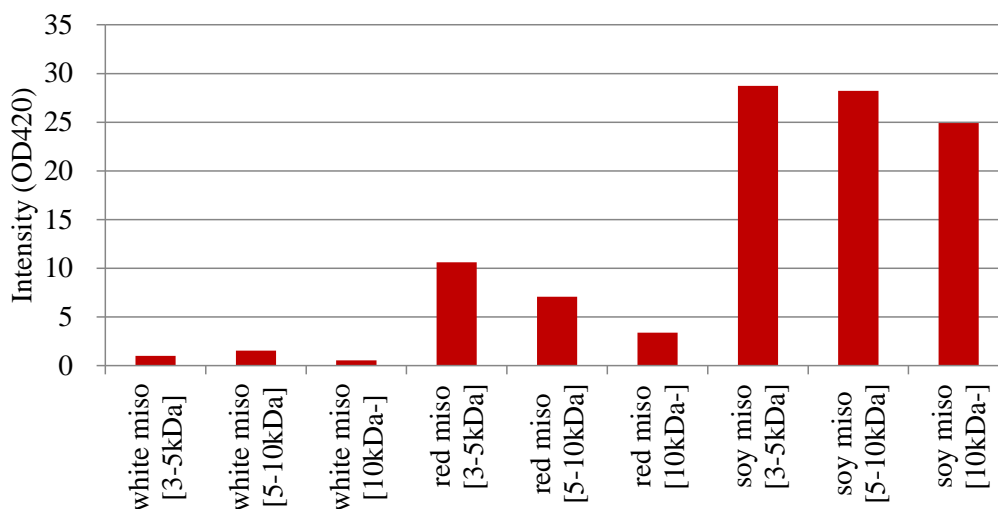


Fig. II-1.2. 各味噌高分子画分における褐色度

## (b) 含窒素成分の組成比

窒素成分の分析から豆味噌高分子画分の成分組成を明らかにするため、各高分子画分 ([3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-]) およびモデルメイラードペプチド(Glc-4MPs)、モデルメラノイジン(MEL)の全窒素含有量、構成アミノ酸窒素含有量を測定し、構成アミノ酸窒素と非構成アミノ酸窒素の組成比を算出した(Table II-1.8、Table II-1.9)。また比較のため、赤色米味噌と淡色米味噌の各高分子画分についても同様に分析を行い、組成比を算出した(Table II-1.8)。

Glc-4MPs は、全窒素含有量が高く(12.4%)、また構成アミノ酸窒素比が高い(83.8%)。これは、Glc-4MPs は大豆ペプチドと glucose の加熱反応物であるが、ペプチドのアミノ酸残基の修飾や重合などは一部しか生じておらず、そのアミノ酸残基の大部分は反応前から変化していないためペプチド(構成アミノ酸)として検出されたためと思われる。

一方で、MEL は全窒素含有量が低い(3.8%)。これは、MEL は glutamic acid と glucose のメイラード反応による重合体であり、両化合物の等モル重合を仮定すると全窒素含有量は 4.3% であるため、糖分解物の占める割合がやや高い重合体であると推測される。またメラノイジンは重合体であり、反応基質のアミノ酸の大部分はその構造が維持されていないため構成アミノ酸窒素比が低いこと(14.5%)が確認された。これにより、メイラードペプチドを含めペプチドは構成アミノ酸窒素比が高く、メラノイジンは構成アミノ酸窒素比が低いことが確認された。

豆味噌高分子画分の構成アミノ酸窒素比は、[3-5 kDa]が 42.9%、[5-10 kDa]が 47.5%、[10 kDa-]が 31.5% であり、構成アミノ酸窒素比および前項の褐色度より、ペプチド(メイラードペプチド含む)とメラノイジンがともに含まれる可能性が示唆された(ペプチド含有比は [5-10 kDa] > [3-5 kDa] > [10 kDa-])。ペプチドの含有を確認するため、各豆味噌高分子画分と大豆ペプチドから調製したメイラードペプチドである Glc-4MPs の構成アミノ酸組成を比較した。その結果、豆味噌高分子画分は Glc-4MPs と近似していることが確認され、組成比からも各高分子画分にペプチドが含まれることが確認された(Fig. II-1.3)。また、豆味噌の各高分子画分の全窒素含有量および構成アミノ酸含有量は[3-5 kDa] > [5-10 kDa] > [10 kDa-]の順に減少した。前項と同様、高分子画分ほど水溶性多糖の存在量が多いためと考えられた。

一方で、豆味噌と米味噌の高分子画分を比較すると、どの分子量画分においても全窒素含有量は豆味噌が最も高い。豆味噌のペプチド含有量(構成アミノ酸窒素含有量)は米味噌と大きな差がないことから(Table II-1.10)、豆味噌の全窒素含有量の高さはメラノイジンを多く含むことに起因しているものと推察される。

**Table II-1.8 各味噌の高分子画分における含窒素成分**  
 ((A) 試料あたりの含有量、(B) 全窒素含有量あたりの存在比)

(A)									
fraction	soy miso			red miso			white miso		
	TN%*	AA%**	NAA%***	TN%*	AA%**	NAA%***	TN%*	AA%**	NAA%***
[3-5kDa]	9.0	3.8	5.1	6.5	4.0	2.5	4.2	3.6	0.6
[5-10kDa]	7.3	3.5	3.8	5.5	3.5	2.0	5.0	4.2	0.8
[10kDa- ]	5.1	1.6	3.5	2.9	2.1	0.8	2.8	2.3	0.5
(B)									
fraction	soy miso			red miso			white miso		
	TN%*	AA%**	NAA%***	TN%*	AA%**	NAA%***	TN%*	AA%**	NAA%***
[3-5kDa]	100.0	42.9	57.1	100.0	61.7	38.3	100.0	85.1	14.9
[5-10kDa]	100.0	47.5	52.5	100.0	63.7	36.3	100.0	83.7	16.3
[10kDa- ]	100.0	31.5	68.5	100.0	73.7	26.3	100.0	82.1	17.9
*TN% : Total nitrogen %									
**AA% : Nitrogen derived amino acid %									
***NAA% : Nitrogen non-derived amino acid %									

**Table II-1.9 モデルメイラードペプチドおよびモデルメラノイジンにおける含窒素成分**  
 ((A) 試料あたりの含有量、(B) 全窒素含有量あたりの存在比)

(A)			
sample	TN%*	AA%**	NAA%***
Glc-4MPs	12.4	10.4	2.0
MEL	3.8	0.5	3.2
(B)			
sample	TN%*	AA%**	NAA%***
Glc-4MPs	100.0	83.8	16.2
MEL	100.0	14.5	85.5
*TN% : Total nitrogen %			
**AA% : Nitrogen derived amino acid %			
***NAA% : Nitrogen non-derived amino acid %			

**Table II-1.10 各味噌の高分子画分におけるペプチド含有量**

fraction	content of peptide % (fraction)		
	soy miso	red miso	white miso
[3-5kDa]	27	29	26
[5-10kDa]	26	27	32
[10kDa- ]	12	16	17

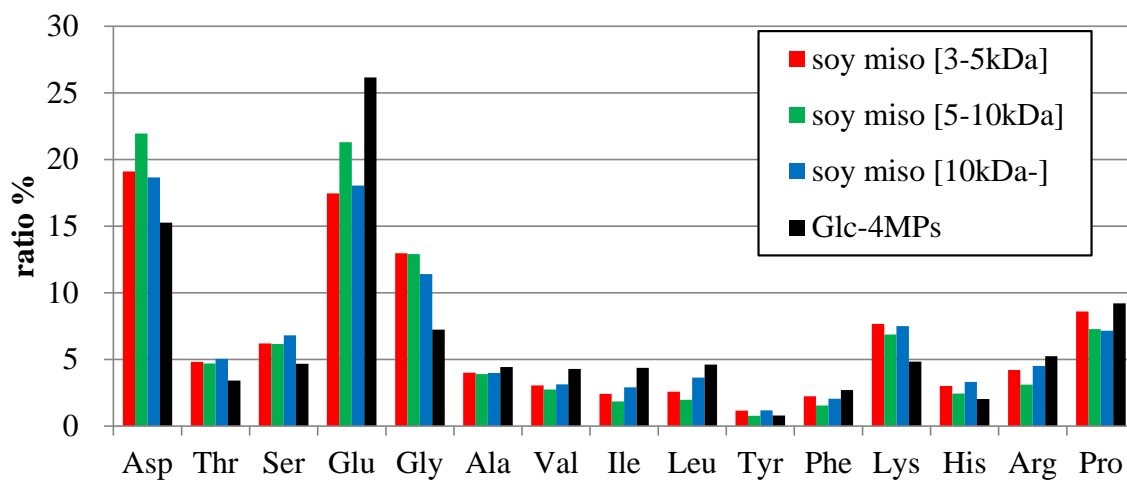
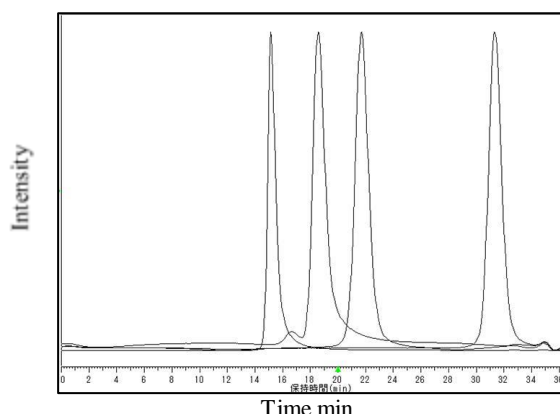


Fig. II-1.3.豆味噌高分子画分および Glc-4MPs における構成アミノ酸組成

### (c) 分子量分布

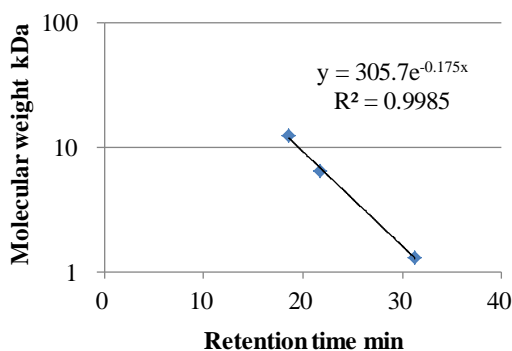
豆味噌高分子画分のペプチド(メイラードペプチド含む)およびメラノイジンの平均分子量と分子量分布を明らかにするため、ゲル濾過クロマトグラフィーによる HPLC 分析を行った。実施にあたり、分子量が既知のペプチドおよびタンパク質(albumin、cytochrome c、aprotinin、angiotensin)を用いて較正曲線の作成を試みた。その結果、それらのクロマトグラムおよび保持時間は、**Fig. II-1.4.**および**Table II-1.11**となり、較正曲線は排除限界以下の cytochrome c、aprotinin、angiotensin で高い相関が得られた(**Fig. II-1.5.**)。よって、未知試料の平均分子量はこの較正曲線から算出した。



**Fig. II-1.4.** 標準物質のゲル濾過クロマトグラフィー分析結果  
(保持時間が短い順に albumin、cytochrome c、aprotinin、angiotensin)

**Table II-1.11** ゲル濾過クロマトグラフィーによる標準物質の保持時間

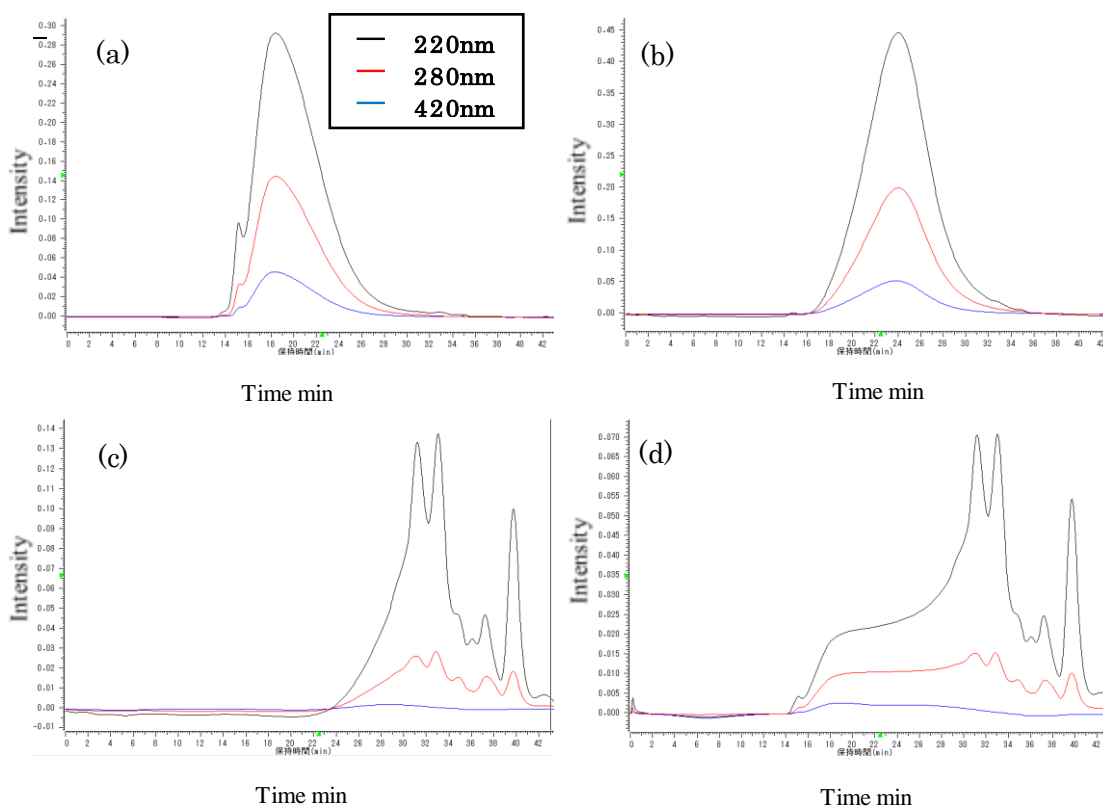
Sample	Retention time min	Molecular weight kDa
Albumin	15.2	66.0
Cytochrome c	18.6	12.3
Aprotinin	21.7	6.5
Angiotensin	31.3	1.3



**Fig. II-1.5.** 較正曲線



次に、豆味噌の[5-10 kDa]、[3-5 kDa]、[-3 kDa]および分画前の溶液について同様に測定した。各クロマトグラムを **Fig. II-1.6.**に、[5-10 kDa]、[3-5 kDa]についてピーク位置から算出した平均分子量を **Table II-1.12** に示す。**Fig. II-1.6.**、**Table II-1.12** より限外濾過による分画は達成されており、[5-10 kDa]、[3-5 kDa]はそれぞれ褐色成分(メラノイジン; 420 nm)を有し、その平均分子量はそれぞれ 12.3 kD と 4.7 kDa と、ペプチド(220 nm、280 nm)の平均分子量([5-10 kDa]: 12.2 kDa、[3-5 kDa]: 4.5 kDa)とほぼ同等であることが確認された。



**Fig. II-1.6.** 豆味噌試料のゲル濾過クロマトグラフィー分析結果  
((a) [5-10 kDa]、(b) [3-5 kDa]、(c) [-3 kDa]、(d) 分画前溶液)

**Table II-1.12** 各波長のピークから算出された各高分子画分の平均分子量

	OD220	OD280	OD420
[3-5kDa]	4.5 kDa	4.5 kDa	4.7 kDa
[5-10kDa]	12.2 kDa	12.2 kDa	12.3 kDa

### 2.3. 豆味噌におけるメラノイジンの「こく」への寄与

豆味噌の高分子画分における「こく」に寄与している成分がメラノイジンであるかを検証するため、モデルメラノイジンを用いたアディクションテストを実施した。2.1.のオMISSIONテストより、5-10kDa 画分が厚み、持続性ともに大きく寄与していることが確認されたため、「豆味噌低分子うま味溶液」に 5-10kDa 画分およびモデルメラノイジンを添加し評価した。

その結果、コントロール(「豆味噌低分子うま味溶液」)に対し、5-10kDa 画分添加溶液は厚み、持続性ともに有意に増強されたが、モデルメラノイジン添加溶液は厚みのみが有意に増強され、持続性には有意な差が見られなかった (Fig. II-1.7)。

Yasudaらの報告<sup>6)</sup>では、ブイヨンスープにおいてモデルメラノイジンによる厚みと持続性の有意な増強効果が確認されている。パネルへの官能評価後のインタビューの結果、今回コントロールに設定した「豆味噌低分子うま味溶液」は酸味が強く、5-10 kDa 画分添加溶液は酸味が抑えられバランスのよい後味が感じられたが、モデルメラノイジン添加区は後味の酸味が抑えられておらず後味の評価である持続性のスコアが低いことが確認された。このことからブイヨンスープは酸味が強くないためメラノイジンの「こく」を感じやすく、豆味噌は乳酸を約 0.5% 含有していること<sup>8)</sup>から酸味が強く、メラノイジンの「こく」を感じにくかったものと思われる。しかしながら、高分子画分のオMISSION試験 (2.1.(a)) において、乳酸も含有している 3 kDa 以下の豆味噌画分の存在下で高分子画分添加区(再構成溶液)に「こく」が強く感じられたことから、豆味噌の高分子画分には、メラノイジン以外の成分が「こく」、特に持続性に寄与している可能性が示唆された。

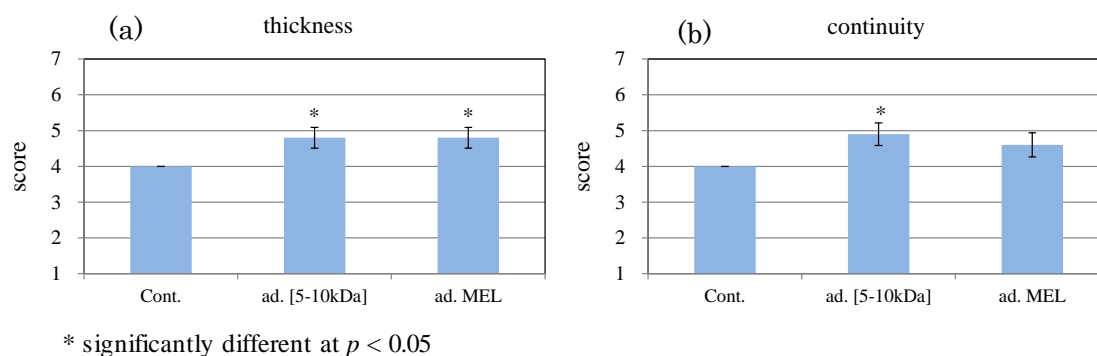


Fig. II-1.7. 豆味噌低分子うま味溶液におけるアディクションテスト(7段階評価尺度法、n=10)  
( (a) 厚み、(b) 持続性 )

## 第 2 節 メイラードペプチドの風味修飾効果と構造解析

前節の結果から、豆味噌の高分子画分においてメラノイジン以外の「こく」への寄与が示唆された。その他の「こく」に寄与する候補成分として、長期熟成米味噌に「こく」への寄与が示唆されているメイラードペプチドが挙げられる<sup>5)</sup>。メイラードペプチドは分子量 1-5 kDa の大豆ペプチドと糖の加熱反応により生成される物質であり、厚みと持続性の増強効果が報告されている<sup>4)</sup>。しかしながら、メイラード反応によりペプチドにどのような変化が生じ、どのような変化が風味修飾効果をもたらしている主要因なのか、未だ報告されていない。そこで本節では加熱時間の異なる glucose 型メイラードペプチドを調製し、その風味修飾効果と化学的構造の関係を解析することにより、その効果の主要因の解明を検討した。

### 1. 実験材料および方法

#### 1.1. 試料・試薬

メイラードペプチド調製用の大豆タンパクおよび酵素には第 1 節と同じものを用いた。また、コンソメスープには、食品原料として用いられる素材を使用した。

試薬は以下の特級試薬を使用した。

glyoxal、2,3-diaminonaphthalene、diethylenetriaminepentaacetic acid、aminoguanidine (Sigma-aldrich Co.より購入)、acetic anhydride (和光純薬工業株式会社より購入)、furosine (フナコシ株式会社より購入)。その他の分析試薬は、和光純薬工業株式会社、Sigma-aldrich Co.のいずれかより購入した。

#### 1.2. モデルメイラードペプチドの調製

メイラードペプチドの成分評価および構造解析を行うために、以下の各種モデルメイラードペプチドを調製した。全てのメイラードペプチドは、第 1 節 1.3.と同様の手順で Alcalase 処理した精製大豆タンパクから 1-5 kDa 画分を取得し凍結乾燥した大豆ペプチド(SP)を用いた。

##### 1.2.1. glucose 型メイラードペプチド

調製した大豆ペプチド(SP) 1 g に 0.16 g の glucose を添加し、固形分 24% になるように超純水を加え、95°C、1~7 時間(1、4、7 時間)加熱した。この加熱物について再度、限外濾過膜にて 1-5 kDa 画分を取得し、凍結乾燥したものを、それぞれ Glc-1MPs、Glc-4MPs、Glc-7MPs とした。また、比較として、glucose を添加せずに 95°C、4 時間加熱した大豆ペプチド(4hr-heated SP)も調製した。

## 1.2.2. 化学修飾型メイラードペプチド

### (a) アセチル化処理メイラードペプチド

既報のアセチル化タンパク質の調製法に従い<sup>11,12)</sup>、調製した大豆ペプチド(SP) 0.4 gを40 mlの超純水に溶解し、飽和 sodium acetate 溶液40 mlを加え、氷冷しながら acetic anhydride 8 mlを少しずつ添加し、添加後 4°C、12 時間静置した(アセチル化処理)。その後、未反応の acetic anhydride や sodium acetate などの除去を目的に、限外濾過膜にて 1-5 kDa 画分を取得し、凍結乾燥した。この乾燥物に対し、重量比が 1:0.16 になるよう glucose を添加し、固形分 24% になるように超純水を加えて 95°C、1 時間加熱し、再度、限外濾過膜にて 1-5 kDa 画分を取得し、凍結乾燥したものを、Ace-MPs とした。

### (b) glyoxal 処理メイラードペプチド

既報の glyoxal 処理タンパク質の調製法に従い<sup>13)</sup>、調製した大豆ペプチド(SP) 0.4 gを40 mlの超純水に溶解し、145 mM glyoxal 溶液 8 mlと 0.5 M sodium hydrogen carbonate 緩衝液 (pH8.6) 120 mlを加え、添加後 1 時間室温で静置した。その後、未反応の glyoxal などの除去を目的に限外濾過膜にて 1-5kDa 画分を取得し、凍結乾燥したものを、GO-MPs を取得した。

## 1.2.3. メイラード反応後期生成物抑制メイラードペプチド

ジカルボニル化合物のトラップ剤として働くことが報告されている aminoguanidine<sup>14)</sup>を用いて「ペプチド由来のメイラード反応後期生成物」である褐色物質の生成を抑制したメイラードペプチドを調製した。調製した大豆ペプチド(SP) 1 g に 0.16 g の glucose と glucose と等モルの aminoguanidine (0.1 g) を添加し、固形分 24% になるように超純水を加え、95°C、4 時間加熱した。その後、aminoguanidine の除去を目的に限外濾過膜にて 1-5kDa 画分を取得し、凍結乾燥したものを、AG-MPs を取得した。

## 1.2.4. xylose 型メイラードペプチド

調製した大豆ペプチド(SP) 1 g に 0.16 g の xylose を添加し、固形分 24% になるように超純水を加え、95°C、20 分間加熱した。この加熱物について再度、限外濾過膜にて 1-5kDa 画分を取得し、凍結乾燥したものを、Xyl-0.3MPs とした。

### 1.3. 官能評価

Ogasawara のメイラードペプチドの評価法<sup>4)</sup>に準じ、コンソメスープ溶液にて、各モデルメイラードペプチドの厚みと持続性への寄与を7段階評価尺度法にて評価した。評価はすべてコントロールと評価溶液を10 ml ずつパネルに提示し、コントロールを4点として、厚みおよび持続性について評価させた。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J (SPSS 社)を用い、Dunnett 検定にて有意差検定を行った。コンソメスープ溶液は Table II-2.1 に示す配合で調製した。パネルは MC フードスペシャリティーズ社にて調味料の開発に従事する研究員(基本味識別テスト、基本味濃度差識別テスト、「こく」識別テスト合格者15名)から試験ごとに選抜した。

Table II-2.1 コンソメスープ配合

ingredients	ratio%
salt	0.8
sugar	0.1
onion powder	0.05
chicken powder	0.05
MSG	0.02
lactate	0.5
UPW	98.5

#### (a) 加熱時間の異なる glucose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与

糖と加熱反応する前の大豆ペプチド(SP)を0.025%添加したコンソメスープをコントロールとし、加熱時間の異なる glucose 型メイラードペプチド(Glc-1MPs、Glc-4MPs、Glc-7MPs)および糖を添加せずに4時間加熱した大豆ペプチド(4hr-heated SP)を0.025%添加したコンソメスープを評価溶液として、官能評価を実施した。

#### (b) glucose 型メイラードペプチドの添加濃度が「こく」に与える影響

糖と加熱反応する前の大豆ペプチド(SP)を0.05%添加したコンソメスープをコントロールとし、Glc-1MPsを0.05%添加したコンソメスープを評価溶液として、官能評価を実施した。

#### (c) メイラードペプチドの化学修飾が「こく」に与える影響

糖と加熱反応する前の大豆ペプチド(SP)を0.05%添加したコンソメスープをコントロールとし、Ace-MPs および GO-MPs を0.05%添加したコンソメスープを評価溶液として、官能評価を実施した。

**(d) メイラードペプチドのメイラード反応後期生成物の抑制が「こく」に与える影響**

糖と加熱反応する前的大豆ペプチド(SP)を 0.025% 添加したコンソメスープをコントロールとし、AG-MPs を 0.025% 添加したコンソメスープを評価溶液として、官能評価を実施した。

**(e) xylose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与**

糖と加熱反応する前的大豆ペプチド(SP)を 0.025% 添加したコンソメスープをコントロールとし、Xyl-0.3MPs を 0.025% 添加したコンソメスープを評価溶液として、官能評価を実施した。

## 1.4. メイラードペプチドの構造解析

### 1.4.1. 分子量分布

glucose 型メイラードペプチドについて、第 1 節 1.6.4. と同様の方法でゲル濾過クロマトグラフィーを行った。測定に際し、測定波長はペプチド(220 nm、280 nm)、ペプチド由来の褐色成分(420 nm)に加え、Ogasawara のメイラードペプチドの評価法に準じ<sup>4)</sup>、蛍光検出器 (Shimazu RF-20Ax) によるメイラード反応後期生成物の検出(励起波長: 350 nm、蛍光波長: 440 nm)を行った。

### 1.4.2. FT-IR

glucose 型メイラードペプチドの官能基の変化を解析するため、フーリエ変換赤外分光光度計 FT-IR 6100v (日本分光社)を用いて分析を行った。測定は PR0450-S(日本分光社)を用い ATR 法(全反射測定法)で行った。分解能は  $2\text{ cm}^{-1}$  とし、測定の繰り返し数は 16 とした。

### 1.4.3. 構成アミノ酸

各モデルメイラードペプチドの構成アミノ酸の分析は、第 1 節 1.6.3.の方法で行った。

### 1.4.4. glucose

RI 検出器による HPLC 分析により、glucose 型メイラードペプチドを調製した際の加熱溶液(95°C、1~7 時間(1、4、7 時間))および加熱前の溶液の glucose の定量分析を行った。試料は 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにて濾過を行い、HPLC に供した。定量には外部標準法を用いた。以下に HPLC 条件を示す。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi HPLC L-2000 series (Hitachi)
Detector	: L-2490 RI detector (Hitachi)
Column	: Asahipak NH2P-50 4E (Shodex)
Column temp.	: 40°C
Flow Rate	: 1 ml/min
Eluent	: 75% Acetonitrile
Injection volume	: 20 $\mu\text{L}$

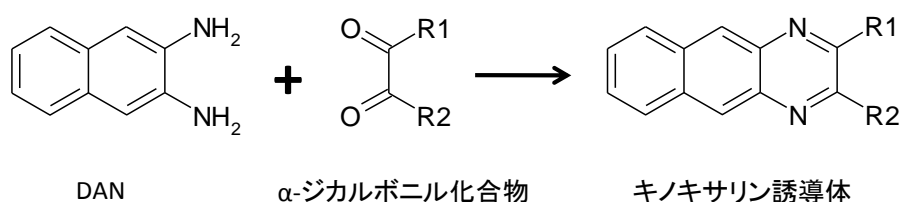
### 1.4.5. 褐色度

褐色度は、分光光度計 (日立 U-2900) にて波長 420 nm の吸光度を測定した。試料は RO 水で 1%溶液になるように希釈し測定した。

#### 1.4.6. $\alpha$ -ジカルボニル化合物

$\alpha$ -ジカルボニル化合物はUV検出を可能とするために2,3-diaminonaphthalene (DAN)を誘導体化試薬として用い、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物をキノキサリン誘導体とするプレカラム誘導体化法が確立されている<sup>15)</sup>。キノキサリン誘導体は268 nmに極大吸収を有する化合物である。

本研究では glucose 型メイラードペプチドを調製した際の加熱溶液(95°C、1~7 時間)および加熱前の溶液を測定試料とし、本法を用いて 3-deoxyglucosone、methylglyoxal、glyoxal の定量分析を実施した。**Fig. II-2.1.**に DAN による $\alpha$ -ジカルボニル化合物の誘導体化反応を示した。



**Fig. II-2.1.** DAN による  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の誘導体化

#### [誘導体化試薬の調製]

DANは5 mMになるように超純水を加え、80°Cで1時間攪拌することによって完全に溶解させた。溶解後は使用するまで80°Cの恒温槽で保存した。また、誘導体化中の酸化的な反応を防ぐため、金属キレート剤として5.5 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC) 含有0.2 M phosphate buffer (pH7.4)を調製した。

#### [試料の誘導体化]

DAN 溶液、DETAPAC 含有 phosphate buffer、試料をそれぞれ、400  $\mu$ L、200  $\mu$ L、200  $\mu$ L ずつ混合し、暗所にて50°Cで1時間インキュベートすることにより誘導体化を行った。誘導体化後、直ちにHPLCにより分析した。以下にHPLCの分析条件を示した。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi HPLC L-2000 series (Hitachi)
Detector	: L-2455 Diode Array detector (Hitachi) (Wavelength:268nm)
Column	: Inertsil ODS-2 (GL Science)
Column temp.	: 40°C
Flow Rate	: 1 ml/min
Eluent	: (A)5% Acetonitrile , (B) 100% Acetonitrile
Gradient	: B 10% $\rightarrow$ B 41.4% (0-55 min)
Injection volume	: 20 $\mu$ L



#### 1.4.7. FMAA (2-furoylmethyl amino acid)

glucose や結合末端が glucose である二糖類 (lactose など) がアミノ基に結合しているタンパク質 (アマドリ化合物) は、hydrochloric acid で分解することにより、結合している glucose が 2-furoylmethyl 基に変換されたアミノ酸 (2-furoylmethyl amino acid; FMAA) が生成する。この生成した FMAA を HPLC で測定することにより、glucose が結合しているアミノ酸残基の特定と定量ができることが報告されている<sup>16,17)</sup> (Fig. II-2.2.)。

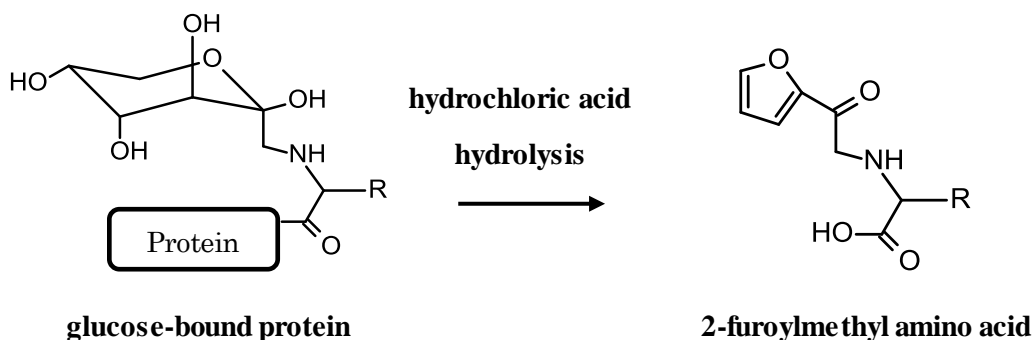


Fig. II-2.2. glucose 結合型タンパク質からの 2-furoylmethyl amino acid の生成

そこで Penndorf<sup>16)</sup>および Schwietzke<sup>17)</sup>らの方法に準じ、glucose 型メイラードペプチドにおける FMAA 分析を行った。測定する FMAA は、構成アミノ酸分析にて加熱 1 時間でアミノ酸残基残存率が 97% 以下であった 9 種のアミノ酸 (Lys, Ala, Arg, Asp, Thr, Phe, Ser, Tyr, Val) を選択した。各 glucose 型メイラードペプチド 40 mg を 8 N hydrochloric acid 2.4 ml に溶解し、110°C、23 時間、加水分解を行った。得られた分解液をエバポレーターで乾固し、RO 水 800  $\mu$ l に溶解した。この溶解液 100  $\mu$ l に 1 N hydrochloric acid 25  $\mu$ l を加え、0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターで濾過したものを検液とした。

また各標準品として FM-Lys は市販の FM-Lys (furosine) を用い、その他の FMAA は Penndorf<sup>16)</sup>らの方法に準じて次のように得た。0.2 mmol の各 L-アミノ酸 (L-Ala, L-Arg, L-Asp, L-Thr, L-Phe, L-Ser, L-Tyr, L-Val) について、1.2 mmol の D-glucose とともに 8.4 ml の methanol に加え 90°C、9 時間還流し、エバポレーターにて乾固した。この乾固物を 2 ml の RO 水に溶解して 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過した試料を未反応のアミノ酸を含むアマドリ化合物標準品として取得し、これを上記と同条件で加水分解を行うことで、未反応のアミノ酸を含む FMAA 標準品として取得した。

各標準品について LC-ESI-Q-TOF-MS にて分析し、Castillo らによる各 FMAA の m/z 値の報告値<sup>18)</sup>および 2-furoylmethyl 基が有する 280 nm の吸収波長の検出から、各標準品における FMAA の m/z 値を決定した (Table II-2.2)。次に試料について、決定した m/z 値を用いて

同様に分析を行い、定性分析とした。また定量分析は、全ての FMAA において 280nm のピーク面積を用いて行い、FM-Lys の 280 nm のピーク面積から作成した検量線から FM-Lys 換算として算出した。

#### 【LC-ESI-Q-TOF-MS 条件】

(LC 部 測定条件)

LC system	: Agilent Technologies, Inc. 1200series
UV-Detector	: G 1315 C DAD SL
Binary Pump	: G 1312 B
Column oven	: G 1316 B TCC SL
Auto sampler	: G 1367 D HiP ALS SL (Agilent Technologies)
Column Temperature	: 40°C
Column	: ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Inc. 3.0×100 mm ,1.8 μm)
Eluent	: A) 2% formic acid (UPW) : B) 2% formic acid (MeOH)
Flow rate	: 0.2 ml/min
Gradient	: B 0% → B 30% (0-20 min)
Injection	: 2 μl
Detector	: UV 280 nm

(MS 部 測定条件)

MS system	: G 6520 A Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system (Agilent Technologies, Inc.)
Ion Source Type	: Dual ESI (positive)
Acquisition mass range	: 25-500
Gas Temperature	: 325°C
Drying Gas	: N <sub>2</sub> (10 L / min)
Nebulizer	: N <sub>2</sub> (40 psi)
Fragmentor	: 100 V
Capillary voltage	: 4000 V

その他パラメーターは初期設定値で行った。

**Table II-2.2 各 FMAA の m/z 値 ([M+H]<sup>+</sup>)**

compound	[M+H] <sup>+</sup>
FM-Lys	255.1541
FM-Ala	198.1058
FM-Arg	283.1407
FM-Asp	242.0658
FM-Phe	274.1263
FM-Ser	214.0716
FM-Thr	228.0879
FM-Tyr	290.1021
FM-Val	226.1343

#### 1.4.8. fluorescamine assay

アセチル化処理メイラードペプチド (Ace-MPs) 調製時のアセチル化反応の妥当性を評価するため、アセチル化前およびアセチル化後の大豆ペプチド (glucose との加熱反応前) のアミノ基量を fluorescamine assay にて分析した。分析法は Ogasawara の評価法に準じた<sup>4)</sup>。各試料 2.5 mg を 10 ml の超純水に溶解し、溶解液 200  $\mu$ l に 0.2 M potassium borate buffer (pH8.5) 4 ml および 0.015% fluorescamine アセトン溶液 1 ml を加え、0.45  $\mu$ m メンブレンフィルターで濾過したものを検液とした。検液について、蛍光分光光度計 (日本分光 FP-8500) にて励起波長 390 nm、蛍光波長 475 nm の蛍光強度を測定し、アセチル化後の大豆ペプチドの蛍光強度をアセチル化前の大豆ペプチドの蛍光強度で除し、アミノ基残存率%とした。

#### 1.4.9. CD(Circular Dichroism)

各モデルメイラードペプチドの二次構造の変化を解析するため、円二色性(CD)スペクトル分析計 J-805 (日本分光社)を用いて CD スペクトル測定を行った。CD スペクトルは二次構造が  $\alpha$ -Helix 型、 $\beta$ -Sheet 型、Turn 型、Random coil 型の場合、それぞれ異なる波長に正および負の極大を有することを利用して、未知試料の各構造の存在比を算出することが可能であるため、各モデルメイラードペプチドの二次構造の存在比を算出した。

測定は、官能評価で用いたコンソメスープと同等の pH になるよう 50 mM sodium phosphate buffer (pH5.5)を用い、各試料をそれぞれ 0.1 mg/mlになるよう溶解後、角型セルに充填して測定した。測定条件は下記に示す。

##### 【CD スペクトル条件】

Cell length	: 1 mm
Light source	: 150w Xe lamp
Sensitivity	: standard (100 mdeg)
Measurement range	: 190-240 nm
Data interval	: 0.5 nm
Scanning speed	: 100 nm/min
Response	: 2 sec
revolution counter	: 4

## 2. 結果および考察

### 2.1. glucose 型メイラードペプチドの風味修飾効果

得られた加熱時間の異なる glucose 型メイラードペプチド (Glc-1MPs、Glc-4MPs、Glc-7MPs) について、メイラード反応の進行を確認するため褐色度 (OD420) を測定した。その結果、加熱 1 時間では褐色度は増加していないが、加熱 4 時間以降に褐色度が増加しており、メイラード反応が進行していることが確認された (Table II-2.3)。

メイラード反応の進行が確認できたため、各 glucose 型メイラードペプチドについて、「こく」への寄与を明らかにするために 7 段階評価尺度法による官能評価を実施した。

添加量を 0.025% とした評価においては、Glc-1MPs、Glc-4MPs、Glc-7MPs を添加したコンソメスープはいずれもコントロールよりも有意に厚みが増強され、Glc-4MPs 添加区は持続性も有意に増強された (Fig. II-2.3)。

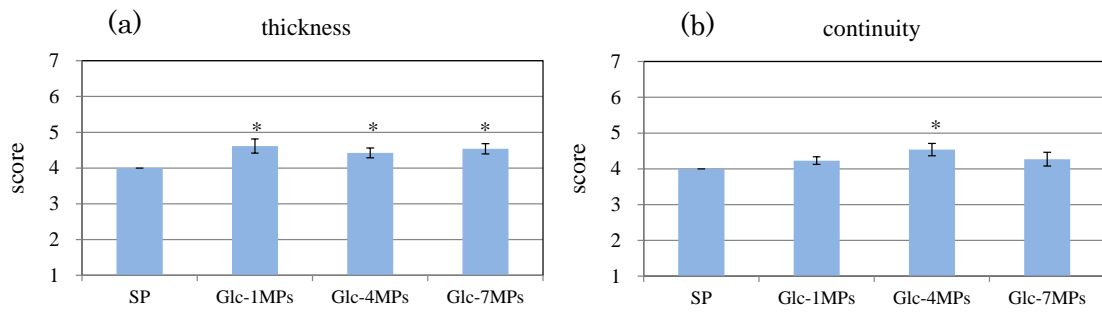
添加量による「こく」への影響を確認するため、添加量 0.025% では持続性の有意な増強が見られなかった Glc-1MPs について、添加量 0.05% における「こく」への寄与を評価した結果、本添加量においては厚み、持続性ともに有意に増強されることが確認された (Fig. II-2.4)。

一方で、メイラード反応の関与の有無を検証するため、glucose を添加せずに 4 時間加熱した大豆ペプチド (4hr-heated SP) についても同様な評価を実施した結果、厚み、持続性ともに有意な増加は見られなかった (Fig. II-2.5)。

このことから、glucose 型メイラードペプチドにおいて、厚みおよび持続性の増強に関わる構造の変化は glucose が関与しており、その変化は 1 時間の加熱反応で既に生じていることが示唆された。また、加熱 1 時間の glucose 型メイラードペプチドは持続性よりも厚みの増強に効果が見られる傾向が示唆された。

Table II-2.3 glucose 型メイラードペプチドの褐色度

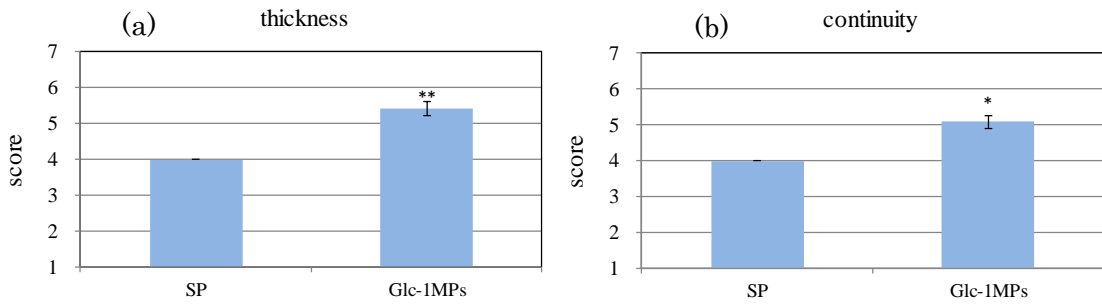
Sample	OD420 (1% soln.)
SP	0.19
Glc-1MPs	0.20
Glc-4MPs	0.38
Glc-7MPs	0.56



\* significantly different at  $p < 0.05$

**Fig. II-2.3. glucose 型メイラードペプチドの「こく」付与評価 (添加量 0.025%)**

(7 段階評価尺度法、n=13; (a) 厚み、(b) 持続性)

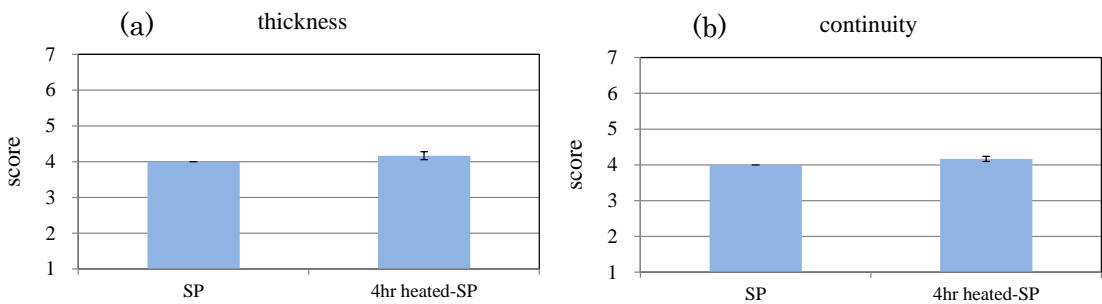


\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. II-2.4. glucose 型メイラードペプチドの「こく」付与評価 (添加量 0.05%)**

(7 段階評価尺度法、n=12; (a) 厚み、(b) 持続性)



**Fig. II-2.5. 加熱大豆ペプチドの「こく」付与評価 (添加量 0.025%)**

(7 段階評価尺度法、n=10; (a) 厚み、(b) 持続性)

## 2.2. glucose 型メイラードペプチドの構造解析

### (a) 分子量分布

各波長における未加熱の大豆ペプチド(SP) および Glc-1MPs、Glc-4MPs、Glc-7MPs のクロマトグラムを Fig. II-2.6. に、ピーク位置から算出した 420 nm および蛍光検出の平均分子量を Table II-2.4 に示す。この結果より、420 nm と蛍光検出は加熱 4 時間目以降大幅に増加しているが、加熱 1 時間では未加熱の大豆ペプチドとほぼ同等であり、メイラード反応後期生成物がほとんど生成していないことが確認された。また平均分子量の算出結果より、蛍光検出は 4 時間目以降分子量の大きな変化はないが、420 nm は経時的に分子量が大きくなっている。これは 420 nm で検出される褐色を有するペプチド由来のメイラード反応後期生成物には重合が生じていることが推測される。

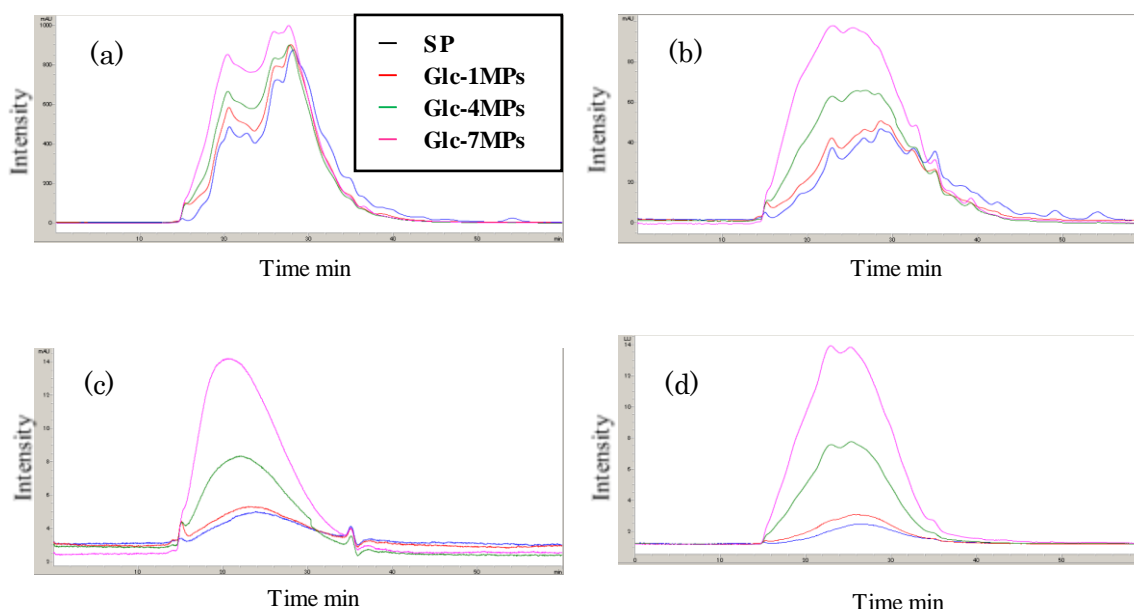


Fig. II-2.6. glucose 型メイラードペプチドのゲル濾過クロマトグラフィー分析結果  
((a) 220 nm、(b) 280 nm、(c) 420 nm、(d) 蛍光検出)

Table II-2.4 各波長のピークから算出される各メイラードペプチドの平均分子量

	OD420	fluorescence
PP	3.6 kDa	2.4 kDa
Glc-1MPs	4.2 kDa	2.4 kDa
Glc-4MPs	5.0 kDa	5.0 kDa
Glc-7MPs	6.2 kDa	5.0 kDa

## (b)FT-IR

各 glucose 型メイラードペプチドの FT-IR 分析結果を Fig. II-2.7.に示す。いずれの試料も、ペプチドの「C=O 伸縮振動」に特有のバンドである  $1640\text{ cm}^{-1}$  およびペプチドの「N-H 変角振動」に特有のバンドである  $1540\text{ cm}^{-1}$  のバンドが見られ、ペプチド構造が消失していないことが示唆された<sup>19,20</sup>。しかしながら、 $1540\text{ cm}^{-1}$  のバンドは加熱時間とともに減少しているため、ペプチドのアミノ基に変化が生じていることが考えられた。一方で、 $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$  は指紋領域と呼ばれ糖が特有のバンドを有することが知られており<sup>21</sup>、 $1040\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$  に見られる加熱時間とともに増加しているバンドは「C-OH 伸縮振動」に特有の、glucose も有するバンドであることから (Fig. II-2.8.)、glucose 型メイラードペプチドは glucose が結合しており、加熱とともに結合量が増加している可能性が示唆された。

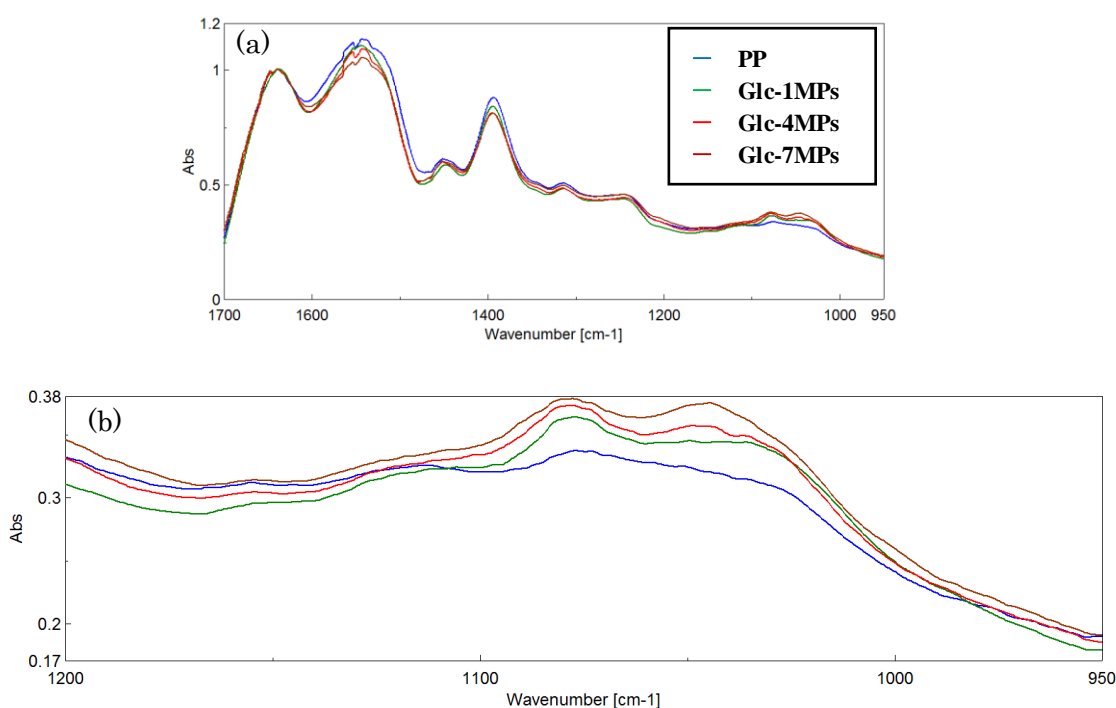


Fig. II-2.7. glucose 型メイラードペプチドの FT-IR 分析結果 ((b) : (a) の拡大)

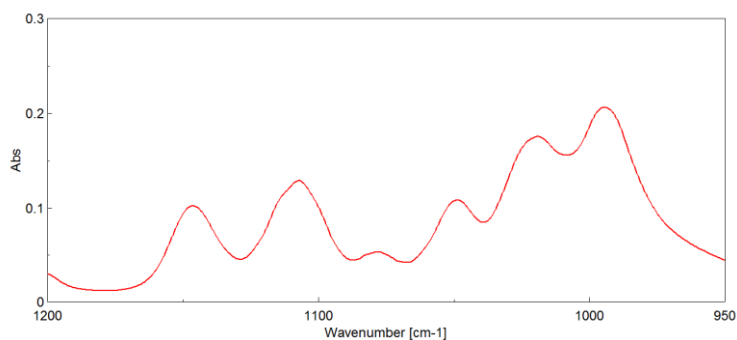


Fig. II-2.8. glucose の FT-IR 分析結果



### (c) 構成アミノ酸

各 glucose 型メイラードペプチドの構成アミノ酸含有量を分析し、その分析値からアミノ酸残基残存率を算出した (Fig. II-2.9)。その結果、7 時間の反応において、いずれのアミノ酸残基も減少が見られ、特に Lys および Arg の残存率が低かった。これは糖との加熱反応によって、各アミノ酸残基の官能基に変化が生じたことが推測される。また加熱 1 時間においては、Lys、Ala、Arg、Asp、Thr、Phe、Ser、Tyr、Val の 9 種類のアミノ酸が、アミノ酸残基残存率が低い傾向が確認された (残存率 97% 以下)。

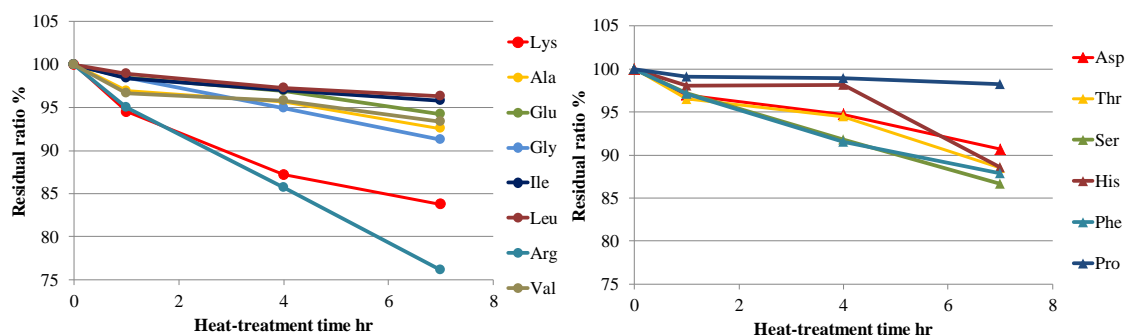


Fig. II-2.9. glucose 型メイラードペプチドのアミノ酸残基残存率の経時変化  
(2つのグラフに分けて表示)

#### (d)FMAA

各 glucose 型メイラードペプチドについて、FMAA 分析を行った結果を Fig. II-2.10. に示す。いずれの試料も FM-Lys と FM-Arg のみ検出され、その他 7 種の FMAA は検出されなかった。FM-Lys の検出濃度は高く、Lys の  $\epsilon$  位もしくは  $\alpha$  位のアミノ基に glucose の結合が生じていることが確認された。また加熱 4 時間までは増加し、その後減少していることから、結合した glucose は加熱とともに分解され、別の化合物に変化したものと推測される。一方で、FM-Arg は検出されたが濃度は極めて低く (FM-Lys の約 1/50)、glucose は Arg のアミノ基に結合しているがその量は極めて少ないと考えられた。

一般に生体内において、タンパク質中の Lys 残基と Arg 残基は糖により修飾されやすく、また Lys のアミノ基と Arg のグアニジノ基は、メイラード反応により glucose から生成するジカルボニル化合物からの修飾も受けやすい<sup>22)</sup>。glucose 型メイラードペプチドの調製時に glucose からジカルボニル化合物が生成しているかを確認するため、調製時の加熱溶液 (95°C、1~7 時間) の glucose、および既報<sup>15)</sup>により glucose からの生成が推測されたジカルボニル化合物 (3-deoxyglucosone、methylglyoxal、glyoxal) の定量分析を行った。この結果、加熱 1 時間の時点で、3 種のジカルボニル化合物ともに生成していることが確認された (Fig. II-2.11.、Fig. II-2.12.)。

以上より、前項で確認された加熱による Arg 残基の減少はグアニジノ基へのジカルボニル化合物の結合が主であると推測された。

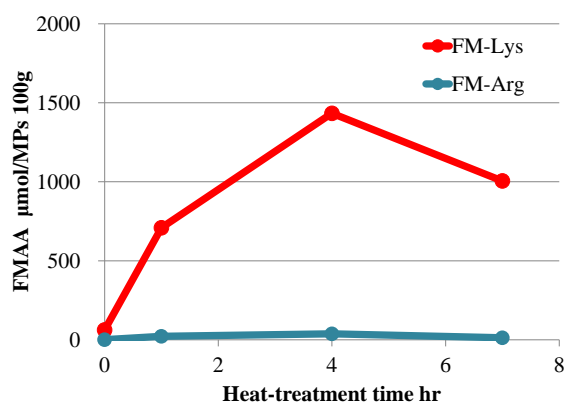


Fig. II-2.10. glucose 型メイラードペプチドの FMAA の経時変化

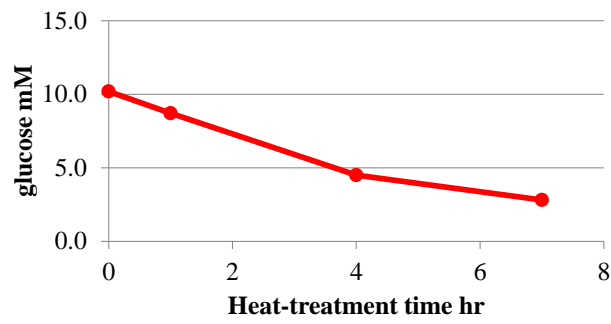


Fig. II-2.11. glucose 型メイラードペプチド調製時の glucose 濃度経時変化

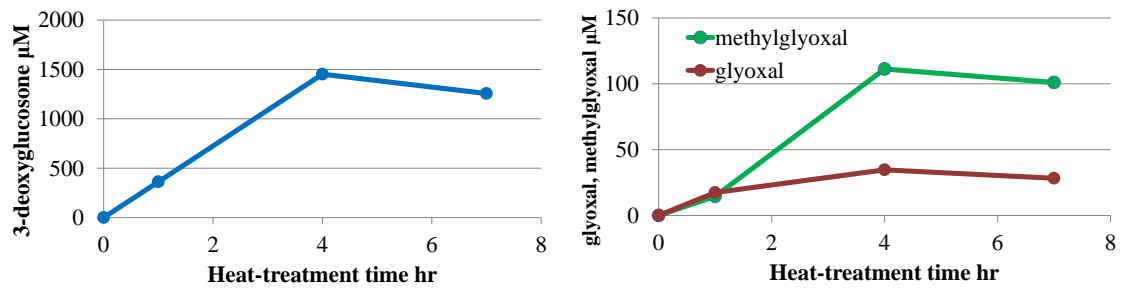


Fig. II-2.12. glucose 型メイラードペプチド調製時のジカルボニル化合物濃度経時変化  
((a) 3-deoxyglucosone、(b) methylglyoxal、glyoxal)

### (e) CD

各 glucose 型メイラードペプチドの CD スペクトルを Fig. II-2.13.に、スペクトルから二次構造の存在比を算出した結果を Table. II-2.5 に示す。

未加熱の大豆ペプチド(SP)は  $\alpha$ -Helix 構造を含んでいないが、既報において大豆の主要なタンパク質であるグリシニンおよび  $\beta$ コングリニンは  $\alpha$ -Helix 構造をほとんど含まないことが報告されており(CD スペクトルからの算出値:3%)<sup>23)</sup>、今回用いた大豆ペプチドも同様であることが確認された。また加熱時間による変化をみると、加熱 4 時間以降に  $\beta$ -Sheet 構造の若干の増加は見られるが変化としては小さく、加熱 1 時間では 2 次構造に大きな変化は生じていなかった。このことから、「こく」の付与効果には 2 次構造の変化は関与していないことが示唆された。

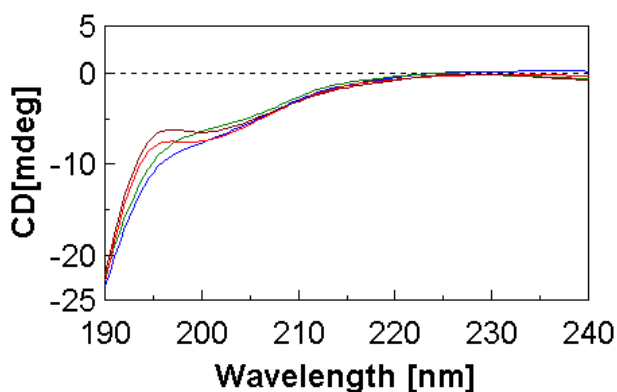


Fig. II-2.13. glucose 型メイラードペプチドの CD スペクトル

Table II-2.5 glucose 型メイラードペプチドの二次構造の存在比

	0hr	1hr	4hr	7hr
$\alpha$ -Helix	0.0	0.0	0.0	0.0
$\beta$ -Sheet	44.2	44.7	47.8	50.9
Turn	22.5	22.2	19.4	18.1
Random Coil	33.3	33.1	32.8	31.0

### 2.3. 風味修飾効果に必要な修飾基の決定

#### (a) 化学修飾型メイラードペプチドを用いた評価

風味修飾効果(厚み、持続性)を発現する上で重要な構造変化が、タンパク質中の「Lys 残基のアミノ基への glucose の結合」か、「Arg 残基のグアニジノ基へのジカルボニル化合物の結合」かを検証するため、「アミノ基への glucose の結合」を抑制したメイラードペプチドおよび「Arg 残基のグアニジノ基へのジカルボニル化合物の結合」のみを生じさせたメイラードペプチドを調製し、Glc-1MPs との風味修飾効果の比較を実施した。前者は、大豆ペプチド(SP)をアセチル化することによりアミノ基の水素をアセチル基に置換し、その後 glucose との加熱反応を行うことで、アミノ基への glucose の結合は抑制されているが、「Arg 残基のグアニジノ基へのジカルボニル化合物の結合」は生じていると考えられるメイラードペプチドを調製した(アセチル化処理メイラードペプチド(Ace-MPs))。後者のメイラードペプチドは glucose の代わりに反応性の高いジカルボニル化合物である glyoxal を用い、「Arg 残基のグアニジノ基へのジカルボニル化合物の結合」のみが生じていると考えられるメイラードペプチドを調製した(ジカルボニル化処理メイラードペプチド(GO-MPs))。

修飾反応の妥当性を評価するにあたり、水素をアセチル基に置換したアセチル化大豆ペプチドのアミノ基は、酸処理により再度アミノ基に置換される。そのため、構成アミノ酸分析によるアミノ酸残基量の測定では、アセチル化率は確認できない。そこで、fluorescamine assay 法により、アセチル化後の大豆ペプチド(glucose との加熱反応前)のアミノ基残存率を測定した。その結果、アミノ基残存率は約 10%であり、アセチル化処理が達成できたことを確認した(**Table II-2.6**)。次に、Ace-MPs、GO-MPs の構成アミノ酸含有量(アミノ酸残基量)と FM-Lys 量を測定した(**Fig. II-2.14.**、**Fig. II-2.15.**)。その結果、Ace-MPs は glucose と加熱反応を行っているにもかかわらず、FM-Lys 量は Glc-1MPs よりも非常に低い値であった。これは想定したように、Lys 残基のアミノ基がアセチル化され、glucose が結合されていないMPs が調製できたものと判断された。また Ace-MPs は Glc-1MPs よりも Arg 残基がやや減少したが、これは glucose 由来のジカルボニル化合物のグアニジノ基への結合以外に、アセチル化処理の際にグアニジノ基の一部が修飾されたものと思われる。一方で、他のアミノ酸残基量に変化は見られなかった。

GO-MPs は Arg 残基が減少し、FM-Lys は検出されなかった。GO-MPs も想定したように、Arg 残基に glyoxal が結合した MPs が調製できたものと判断された。また GO-MPs は Arg 残基以外に Lys 残基も減少しており、他のアミノ酸残基の変化は見られなかった。このことから、今回の glyoxal 処理は Arg のグアニジノ基と Lys のアミノ基の一部が glyoxal により修飾され、他のアミノ酸の官能基には影響を与えていないものと推測された。

次に、調製したメイラードペプチドを用いて、厚みと持続性の増強効果の有無を評価した。評価濃度は Glc-1MPs が厚み、持続性ともに有意に増強できる 0.05% とし、コンソメスープで評価を行った。その結果、Ace-MPs および GO-MPs を添加したコンソメスープでは、厚み、持続性ともに有意な増強効果は見られなかった (Fig. II-2.16.)。このことから、glucose 型メイラードペプチドにおいて、厚み、持続性ともに増強効果を発現する上で、大豆ペプチドにおける Lys 残基のアミノ基への glucose の結合が重要であることが示唆された。

Table II-2.6 アセチル化した大豆ペプチドのアミノ基残存率

	amino group residual ratio %
SP	100
acetylated SP	10.2

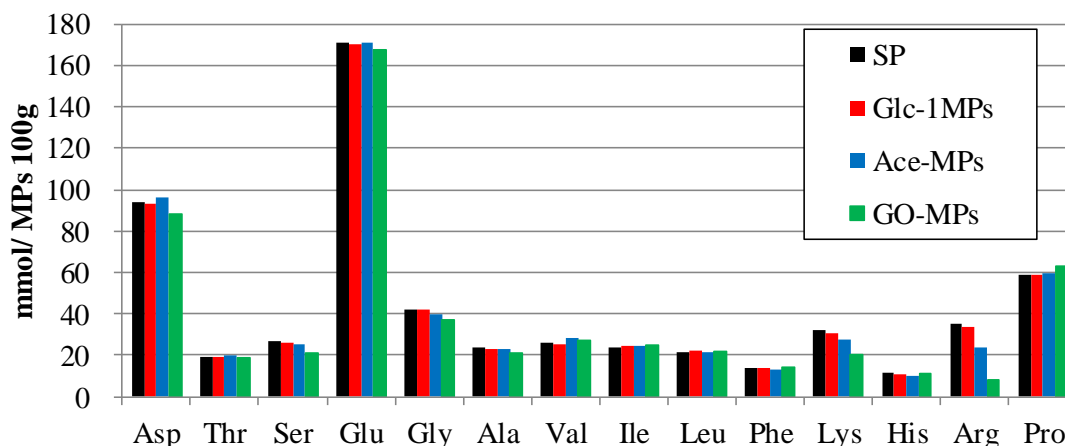


Fig. II-2.14. 化学修飾型メイラードペプチドの構成アミノ酸量 (アミノ酸残基量)

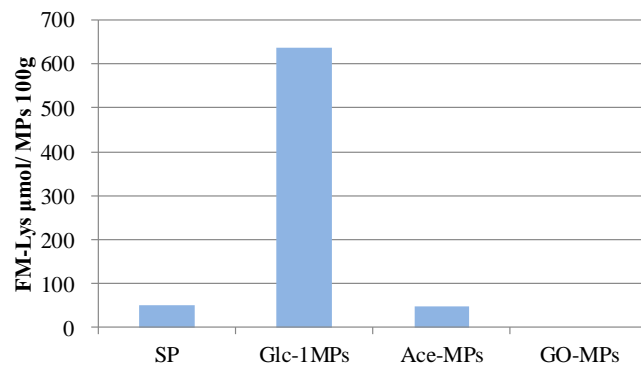
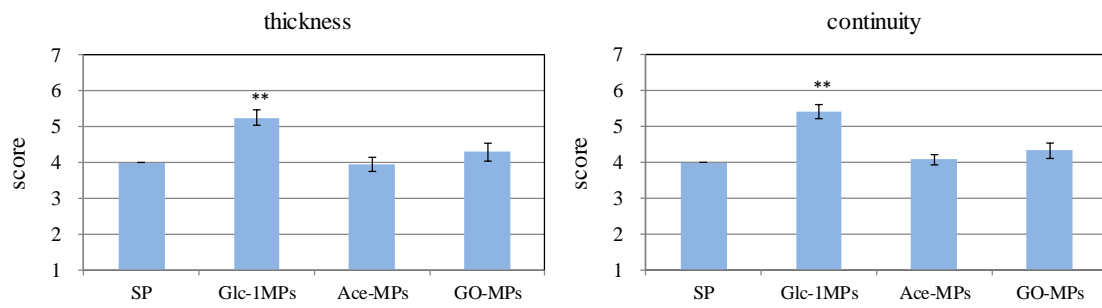


Fig. II-2.15. 化学修飾型メイラードペプチドの FM-Lys 量



\*\* significantly different at  $p < 0.01$

Fig. II-2.16. 化学修飾型メイラードペプチドの「こく」付与評価(添加量 0.05%)  
(7 段階評価尺度法、n=12; (a) 厚み、(b) 持続性)

## (b) メイラード反応後期生成物の生成を抑制したメイラードペプチドを用いた評価

前項より、メイラードペプチドが風味修飾効果(厚み、持続性)を発現する上で、Lys 残基のアミノ基への glucose の結合が重要であることが示唆されたが、**Table II-2.3** に示したように、加熱時間が4時間以降では OD420 で検出される「ペプチド由来の褐色のメイラード反応後期生成物」が含まれる。そこでこのメイラード反応後期生成物が風味修飾効果に影響を与えるか検証するため、ジカルボニル化合物のトラップ剤である aminoguanidine を用いて褐色物質の含有量を抑制したメイラードペプチドを調製した (AG-MPs)。AG-MPs および比較のために aminoguanidine を添加せずに調製した Glc-4MPs の OD420(褐色度)、FM-Lys 量(glucose 結合量)、Lys 残基残存率(大豆ペプチド(SP)を100としたときの残存率)を **Table II-2.7** に示す。AG-MPs は Glc-4MPs と同様、glucose を添加し4時間加熱したが、褐色度が抑制されていることが確認された。また Glc-4MPs と比較すると glucose 結合量は8割ほどであるが、**Fig. II-2.10.**に示した Glc-1MPs (710  $\mu\text{mol}/\text{MPs}$  100 g) より多くの glucose が結合されていることが確認された。

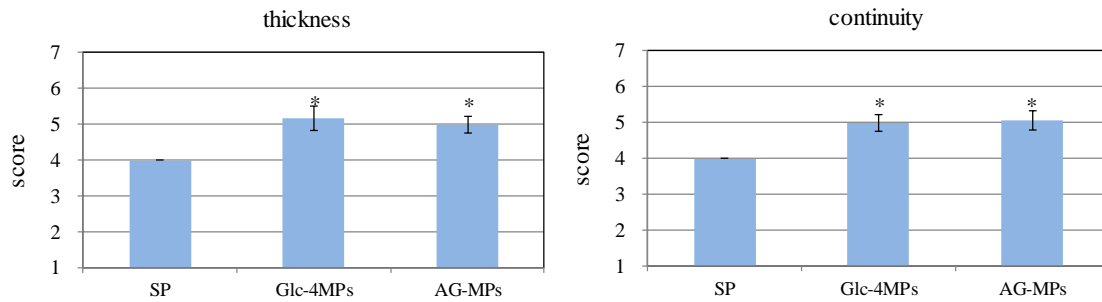
次に、調製した AG-MPs を用いて、厚みと持続性の増強効果の有無を評価した。評価濃度は Glc-4MPs が厚み、持続性ともに有意に増強できる 0.025%とし、コンソメスープで評価を行った。その結果、AG-MPs を添加したコンソメスープは、Glc-4MPs と同様、厚み、持続性ともに有意な増強効果が見られ、また AG-MPs 添加区と Glc-4MPs 添加区の間には有意な差は見られなかった (**Fig. II-2.17.**)。このことから、厚みおよび持続性を発現する上で、「ペプチド由来の褐色のメイラード反応後期生成物」は重要ではないことが示唆された。

以上より、メイラードペプチドの風味修飾効果は、ペプチドの Lys 残基のアミノ基に糖が結合し、アマドリ化合物として存在していることが重要であり、「メイラード反応後期生成物」や立体構造の変化が影響している可能性は低いと考えられた。コンソメスープへの 0.025% 添加系において(2.1. (**Fig. II-2.3.**))、Glc-4MPs が Glc-1MPs よりも味覚修飾効果が強く得られたのは「ペプチド由来の褐色のメイラード反応後期生成物」による影響ではなく、**Fig. II-2.10.**に示すように Glc-4MPs が Glc-1MPs よりも glucose の結合量が高いこと(約2倍)に起因していると考えられた。



**Table II-2.7 AG-MPs の褐色度、FM-Lys 量、Lys 残存率**

	OD420 (1% soln.)	FM-Lys $\mu$ mol/MPs100g	Lys residual ratio %
SP	0.19	12	100
Glc-4MPs	0.38	1599	81.8
AG-MPs	0.23	1189	86.1



\* significantly different at  $p < 0.05$

**Fig. II-2.17. メイラード反応後期生成物抑制メイラードペプチドの「こく」付与評価  
(添加量 0.025%)**

(7 段階評価尺度法、n=9; (a) 厚み、(b) 持続性)

#### (d) xylose 型メイラードペプチドを用いた評価

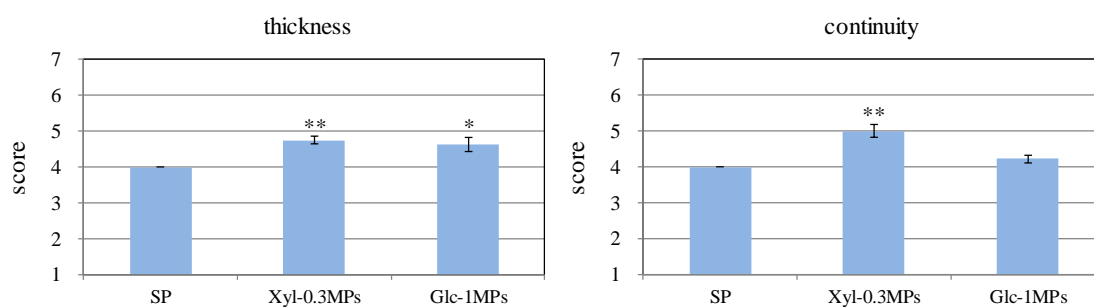
メイラードペプチドが風味修飾効果を発現する上で、Lys 残基のアミノ基への glucose の結合が重要であることが示唆されたため、結合する糖の種類による風味修飾効果への影響を検証した。糖として豆味噌中にも含まれることが報告<sup>24)</sup>されている xylose を用い、Glc-1MPs と同様、メイラード反応後期生成物を含まないメイラードペプチドを得るため、加熱条件を 95°C、20 分間に設定し、Xyl-0.3MPs を得た。xylose は glucose よりもメイラード反応が進行しやすいため<sup>25)</sup>、反応時間は glucose 反応時よりも短く設定した。Xyl-0.3MPs の OD420 (褐色度)、Lys 残基残存率(大豆ペプチド(SP)を 100 としたときの残存率)を **Table II-2.8** に示す。Xyl-0.3MPs は Glc-1MPs と同様、Lys 残基が減少しており、褐色度はほとんど増加していないことが確認された(xylose は酸分解による 2-furoylmethyl 基への変換がなされないため、Lys のアミノ基への xylose の結合は Lys 残基の減少からのみの判断とした)。

次に、調製した Xyl-0.3MPs を用いて、厚みと持続性の増強効果の有無を評価した。評価濃度は Glc-1MPs が厚みのみ有意に増強した 0.025% とし、コンソメスープで評価を行った。その結果、Xyl-0.3MPs を添加したコンソメスープは、厚みだけでなく、持続性にも有意な増強効果が見られた(**Fig. II-2.18.**)。このことから、ペプチドに結合する糖の種類は風味修飾効果の質に影響を与えることが示唆された。

メイラードペプチドに結合している糖の種類が風味修飾効果の質に影響を与えることから、結合している糖自体の味覚受容体へのアフィニティが風味修飾効果の発現に関与している可能性が考えられる。

**Table II-2.8 Xyl-0.3MPs の褐色度、Lys 残存率**

	OD420 (1% soln.)	Lys residual ratio %
SP	0.19	100
Glc-1MPs	0.20	94.5
Xyl-0.3MPs	0.21	96.3



\* significantly different at  $p < 0.05$   
 \*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. II-2.18. xylose 型メイラードペプチドの「こく」付与評価**  
 (添加量 0.025%)  
 (7 段階評価尺度法、n=12; (a) 厚み、(b) 持続性)

### 第 3 節 豆味噌におけるメイラードペプチドの風味修飾効果

前節の結果より、分子量 1-5 kDa のメイラードペプチドの「こく」の発現には、ペプチドの Lys 残基のアミノ基に糖が結合し、アマドリ化合物として存在していることが重要であることが示唆された。豆味噌および米味噌の高分子画分において、glucose 結合型のアマドリ化合物の定量に関する報告はこれまでにない。

そこで、本節においては、豆味噌および赤色米味噌、淡色米味噌の高分子画分中に glucose 結合型のアマドリ化合物が存在しているか、また豆味噌の「こく」に各分子量における glucose 結合型アマドリ化合物 (glucose 型メイラードペプチド) が寄与しているかを検証した。

#### 1. 実験材料および方法

##### 1.1. 試料・試薬

試料および試薬は第 1 節、第 2 節と同じものを用いた。

##### 1.2. 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの調製

豆味噌の「こく」に各分子量における glucose 型メイラードペプチドが寄与しているかを検証するため、分子量の異なるモデルメイラードペプチドを調製した。第 1 節 1.3.と同様の手順で Alcalase 処理した精製大豆タンパクから、第 1 節 1.2.と同様に 3 kDa、5 kDa、10 kDa の限外濾過ユニットを用いて 3-5kDa、5-10kDa、10kDa 以上の画分の大豆ペプチド (SP(3-5kDa)、SP(5-10kDa)、SP(10kDa-)) を取得し、凍結乾燥を行った。調製した各大豆ペプチド 1 g に 0.16 g の glucose を添加し、固形分 24% になるように超純水を加え、95°C、4 時間の加熱を行った。この加熱物について再度、3 kDa の限外濾過ユニットにて低分子画分を除去し、凍結乾燥したものを、それぞれ Glc-4MPs (3-5 kDa)、Glc-4MPs (5-10 kDa)、Glc-4MPs (10 kDa-) とした。

### 1.3. 成分分析

#### 1.3.1 構成アミノ酸

各大豆ペプチド(SP(3-5 kDa)、SP(5-10 kDa)、SP(10 kDa-))の構成アミノ酸の分析は、**第1節 1.6.3.**の方法で実施した。

#### 1.3.2. FMAA(2-furoylmethyl amino acid)

**第1節 1.2.**の豆味噌、赤色米味噌、淡色米味噌の高分子画分([3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-])、各分子量の大豆ペプチド(SP(3-5 kDa)、SP(5-10 kDa)、SP(10 kDa-))、各分子量の glucose 型メイラードペプチド(Glc-4MPs(3-5 kDa)、Glc-4MPs(5-10 kDa)、Glc-4MPs(10 kDa-))について、**第2節 1.4.7.**の方法により 2-furoylmethyl lysine (FM-Lys)の分析を実施した。

また、各味噌の高分子画分における(a)glucose 型メイラードペプチド含有量および(b)ペプチドあたりの glucose 型メイラードペプチドの存在比を以下のように算出した。

(a)各画分における glucose 型メイラードペプチド含有量% =

$$\frac{\text{各画分における FM-Lys 量 } \mu\text{mol}/100\text{g}}{\div \text{各分子量のモデルメイラードペプチドの FM-Lys 量 } \mu\text{mol}/100\text{g}} \times 100$$

(b)各画分におけるペプチドあたりの glucose 型メイラードペプチドの存在比% =

$$\frac{\text{各画分における glucose 型メイラードペプチド含有量\%}}{\div \text{各画分におけるペプチド含有量\%}} \times 100$$

#### 1.3.3. 褐色度

各モデルメイラードペプチドの褐色度は、**第2節 1.4.5.**の方法で実施した。

#### 1.4. 官能評価

分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与を評価するため、以下の2種類の官能評価を実施した。評価は、ともに MC フードスペシャリティーズ社にて調味料の開発に従事する研究員（基本味識別テスト、基本味濃度差識別テスト、「こく」識別テスト合格者 15 名）から試験ごとにパネルを選抜し、7 段階評価尺度法にてコントロールを 4 点として、厚みと持続性について評価をさせた。評価はすべて、50°C 溶液で行い、パネルに 10 ml ずつ提示した。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J (SPSS 社) を用い、Dunnet 検定にて有意差検定を行った。

##### (a) 豆味噌の高分子画分における glucose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与

豆味噌の高分子画分の「こく」に glucose 型メイラードペプチドが寄与しているかを確認するため、アディクションテストを実施した。評価方法は第 1 節 1.5.2.(4) と同様、コントロールに「うま味溶液」に豆味噌低分子画分 ([-3 kDa]) を加えた「豆味噌低分子うま味溶液」を用い、評価溶液には「豆味噌低分子うま味溶液」に各分子量の大豆ペプチド (SP (3-5 kDa)、SP (5-10 kDa)、SP (10 kDa-)) および各分子量の glucose 型メイラードペプチド (Glc-4MPs (3-5 kDa)、Glc-4MPs (5-10 kDa)、Glc-4MPs (10 kDa-)) をそれぞれ添加した溶液 (アディクション溶液) を用いた。

5% 豆味噌溶液における「こく」への寄与を評価するため、各大豆ペプチドおよびメイラードペプチドの添加量は、5% 豆味噌溶液における各高分子画分中に存在するペプチド量に設定した。具体的には、5% 豆味噌溶液の固形分濃度 (1.7%) における豆味噌の各高分子画分に各画分のペプチド含有量 (第 1 節 Table II-1.10 参照) を乗じた値から、Table II-3.1 のように設定した。

Table II-3.1 豆味噌における glucose 型メイラードペプチドの「こく」への

##### 寄与の評価に用いた各試料溶液の組成

Sample	added fraction	NaCl	MSG	RO	soy miso	SP	Glc-4MPs	SP	Glc-4MPs	SP	Glc-4MPs
		g	g	water	[-3kDa]	(3-5kDa)	(3-5kDa)	(5-10kDa)	(5-10kDa)	(10kDa-)	(10kDa-)
Control		0.5	0.3	98	1.5	-	-	-	-	-	-
	SP (3-5kDa)	0.5	0.3	98	1.5	0.01	-	-	-	-	-
	Glc-4MPs (3-5kDa)	0.5	0.3	98	1.5	-	0.01	-	-	-	-
addition	SP (5-10kDa)	0.5	0.3	98	1.5	-	-	0.02	-	-	-
sohn.	Glc-4MPs (5-10kDa)	0.5	0.3	98	1.5	-	-	-	0.02	-	-
	SP (10kDa-)	0.5	0.3	98	1.5	-	-	-	-	0.02	-
	Glc-4MPs (10kDa-)	0.5	0.3	98	1.5	-	-	-	-	-	0.02

## (b) 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの「こく」の増強効果の比較

glucose 型メイラードペプチドの分子量の違いが「こく」の増強効果に与える影響を評価するため、アディクションテストを実施した。「こく」の効果をより明確に比較できるよう、第 2 節と同様、コンソメスープへの添加効果を評価した。何も添加していないコンソメスープ(配合は **Table II-2.1** 参照)をコントロールとし、分子量の異なる glucose 型メイラードペプチド(Glc-4MPs (3-5 kDa)、Glc-4MPs (5-10 kDa)、Glc-4MPs (10 kDa-))を 0.05% 添加したコンソメスープを評価溶液として、官能評価を実施した。

## 2. 結果および考察

### 2.1. 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの構造解析

調製した分子量の異なる 3 種類の大豆ペプチド (SP (3-5 kDa)、SP (5-10 kDa)、SP (10 kDa-)) の構成アミノ酸量から組成比を算出した結果、3 種類とも Glu、Asp、Pro、Arg、Lys が高く、Phe、His、Tyr が低いという似た組成を示し、分子量が高いほど塩基性アミノ酸 (Lys、Arg) がやや低く、酸性アミノ酸 (Glu、Asp) がやや高い傾向が見られた (Fig. II-3.1.)。

またそれぞれの大豆ペプチドから得た glucose 型メイラードペプチド (Glc-4MPs (3-5 kDa)、Glc-4MPs (5-10 kDa)、Glc-4MPs (10 kDa-)) の、OD420 (褐色度)、FM-Lys 量を Table II-3.2、Table II-3.3 に示す。各メイラードペプチドともに、第 2 節の 1-5kDa の大豆ペプチドから得た glucose 型メイラードペプチド (Glc-4MPs) と同様 (Fig. II-2.10.)、約  $1500 \mu\text{mol}/\text{MPs } 100 \text{ g}$  の FM-Lys が検出され、Lys 残基に glucose が結合されていることが確認された。しかしながら、分子量が大きくなるほど FM-Lys 含有量はやや減少した。分子量の大きさに関わらず加熱により褐色度は増加していることから (Table II-3.2)、Lys 残基への glucose 結合量の減少はメイラード反応の進行度の差ではなく、分子量が高いほど Lys 含有量が低いことが要因 (Fig. II-3.1.) と推測された。

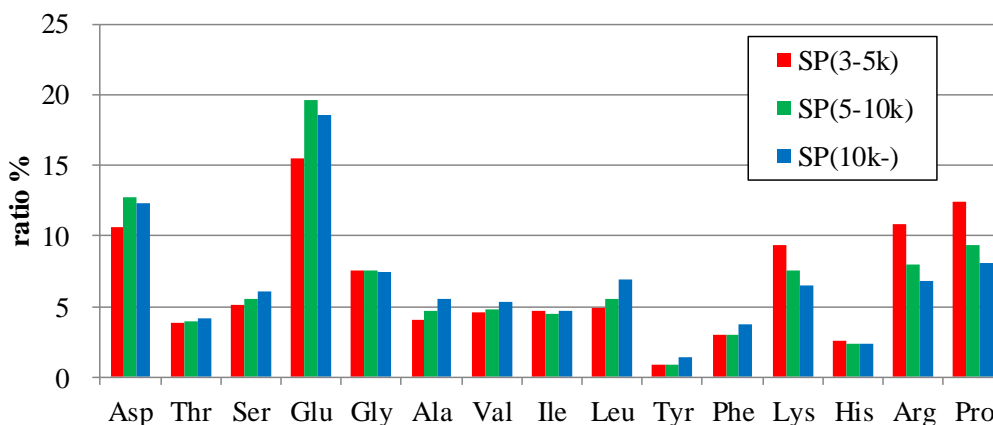


Fig. II-3.1 分子量の異なる 3 種類の大豆ペプチドにおける構成アミノ酸組成比



**Table II-3.2** 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの褐色度

Sample	OD420 (1% soln.)
SP (3-5k)	0.12
Glc-4MPs (3-5k)	0.39
SP (5-10k)	0.18
Glc-4MPs (5-10k)	0.59
SP (10k-)	0.21
Glc-4MPs (10k-)	0.76

**Table II-3.3** 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの FM-Lys 量

Sample	FM-Lys $\mu$ mol/100g
SP (3-5k)	35
Glc-4MPs (3-5k)	1601
SP (5-10k)	0
Glc-4MPs (5-10k)	1542
SP (10k-)	0
Glc-4MPs (10k-)	1474

## 2.2. 豆味噌の高分子画分における glucose 型メイラードペプチド含有量

豆味噌の高分子画分における glucose 型メイラードペプチド含有量を明らかにするため、各画分 ([3-5 kDa]、[5-10 kDa]、[10 kDa-]) の FM-Lys 量を測定した。また比較のため、赤色米味噌と淡色米味噌の各高分子画分についても同様に分析を行った。その結果、各味噌ともに FM-Lys が検出され glucose 型メイラードペプチドが含まれていることが確認された (Table II-3.4)。また豆味噌においては、分子量が低いほど FM-Lys 含有量が高い傾向が見られた。

そこで、各モデルメイラードペプチドの FM-Lys 量 (Table II-3.3) を基準に用いて、各画分の glucose 型メイラードペプチド含有量を算出し (Table II-3.5)、算出した含有量と各画分のペプチド含有量 (第 1 節 Table II-1.10) から、各画分におけるペプチドあたりの glucose 型メイラードペプチドの存在比を算出した (Table II-3.6)。

その結果、豆味噌のペプチドあたりの glucose 型メイラードペプチドの存在比は、[3-5 kDa] が 30%、[5-10 kDa] が 29%、[10 kDa-] が 35% と、分子量による大きな差は見られなかった。

また味噌の種類による違いを比較すると、各画分におけるペプチド存在比の差はあまり見られないが (第 1 節 Table II-1.10)、各画分におけるペプチドあたりの glucose 型メイラードペプチドの存在比は豆味噌よりも赤色米味噌が高いことが示唆された (Table II-3.6)。この要因としては、豆味噌は他の米味噌と異なり glucose より反応性の高い xylose などの pentose を含有していること<sup>24)</sup>から、glucose 以外のメイラードペプチドが含まれることや、熟成年数が長いために glucose 型アムドリ化合物の生成量のピークを過ぎていることが考えられた (モデル glucose 型メイラードペプチドにおいて、加熱時間が長くなると FM-Lys 量は減少した (第 2 節 Fig. II-2.10))。

次に、各味噌における分子量画分の存在比 (第 1 節 Table II-1.5) を用いて、味噌あたりの各画分のペプチド含有量、glucose 型メイラードペプチド含有量を算出した (Table II-3.7、Table II-3.8)。その結果、ペプチド含有量、glucose 型メイラードペプチド含有量ともに、[3-5 kDa]、[5-10 kDa]において豆味噌 > 赤色米味噌 > 淡色米味噌の順に含有量が高く、豆味噌は赤色米味噌の約 3-4 倍であった。一方で、[10kDa-]のペプチド含有量、glucose 型メイラードペプチド含有量はともに豆味噌が最も低かった。このことから、豆味噌は画分あたりの glucose 型メイラードペプチドの存在比は赤色米味噌より低いが、熟成年数が長いためにタンパク質の分解 (低分子化) が他の味噌より進んでおり、味噌あたりの [3-5 kDa] および [5-10 kDa] のペプチドおよび glucose 型メイラードペプチドの含量が多いことが示唆された。

**Table II-3.4** 3種の味噌における FM-Lys 量(各画分あたり)

fraction	FM-Lys $\mu\text{mol}/100\text{g}$		
	soy miso	red miso	white miso
[3-5kDa]	133	279	169
[5-10kDa]	117	212	104
[10kDa- ]	62	142	130

**Table II-3.5** 3種の味噌における glucose 型メイラードペプチド含有量(各画分あたり)

fraction	content of MPs %		
	soy miso	red miso	white miso
[3-5kDa]	8	17	11
[5-10kDa]	8	14	7
[10kDa- ]	4	10	9

**Table II-3.6** 3種の味噌における glucose 型メイラードペプチド存在比(各画分あたり)

fraction	MPs ratio %		
	soy miso	red miso	white miso
[3-5kDa]	30	60	40
[5-10kDa]	29	51	21
[10kDa- ]	35	59	52

**Table II-3.7** 3種の味噌におけるペプチド含有量(味噌ペーストあたり)

fraction	content of peptide % (whole miso paste)		
	soy miso	red miso	white miso
[3-5kDa]	0.21	0.04	0.01
[5-10kDa]	1.14	0.18	0.06
[10kDa- ]	0.96	1.85	2.86

**Table II-3.8** 3種の味噌における glucose 型メイラードペプチド含有量(味噌ペーストあたり)

fraction	content of MPs % (whole miso paste)		
	soy miso	red miso	white miso
[3-5kDa]	0.06	0.02	0.01
[5-10kDa]	0.33	0.09	0.01
[10kDa- ]	0.34	1.09	1.48

### 2.3. 豆味噌における glucose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与

豆味噌の高分子画分の「こく」に glucose 型メイラードペプチドが寄与しているかを確認するため、調製した各分子量の大豆ペプチドおよび glucose 型メイラードペプチドを用い、豆味噌中の各ペプチド存在量における厚みと持続性の増強効果の有無を評価した。評価は glucose が結合していることによるペプチドの厚み、持続性の増強効果の変化を確認するため、大豆ペプチドのみの添加および glucose 型メイラードペプチドのみの添加で比較を行った。

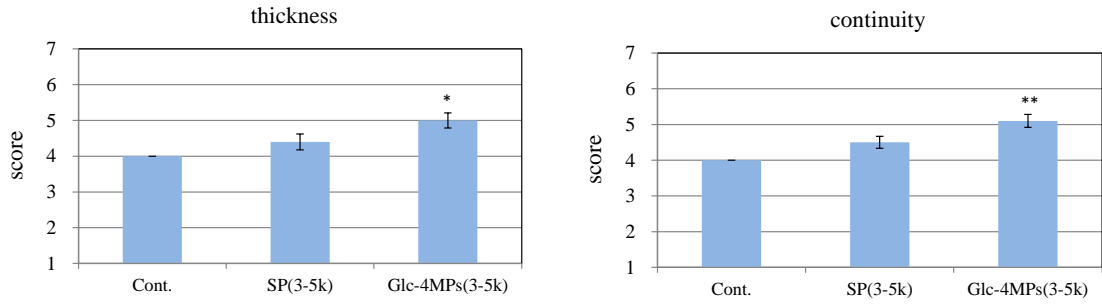
3-5 kDa の画分においては、大豆ペプチド(SP(3-5 kDa))では厚み、持続性の増強効果は見られなかったが、glucose 型メイラードペプチド(Glc-4MPs(3-5 kDa))では厚み、持続性の増強効果が見られた(**Fig. II-3.2.**)。

5-10 kDa の画分においては、大豆ペプチド(SP(5-10 kDa))、glucose 型メイラードペプチド(Glc-4MPs(5-10 kDa))ともに厚み、持続性の増強効果が見られた。また両者間の有意差も確認された(**Fig. II-3.3.**)。

10 kDa-の画分においては、大豆ペプチド(SP(10 kDa-))、glucose 型メイラードペプチド(Glc-4MPs(10 kDa-))ともに持続性のみ増強効果が見られ、メイラード反応による効果の向上は見られなかった(**Fig. II-3.4.**)。

以上より、豆味噌の厚みには 3-5 kDa および 5-10 kDa の glucose 型メイラードペプチドおよび 5-10 kDa のペプチドが寄与していることが示唆された。また、豆味噌の持続性には 3-5 kDa、5-10 kDa、10kDa-の glucose 型メイラードペプチドおよび 5-10 kDa、10kDa-のペプチドが寄与していることが示唆された。

しかしながら、10kDa-の画分に関してはメイラード反応による持続性の向上は見られないことからペプチドそのものの効果と考えられる。このことから、glucose との反応による「こく」の増強は 3-5 kDa および 5-10 kDa にしか見られず、メイラードペプチドの「こく」の発現には、糖の結合だけでなく、大豆ペプチドの分子量も重要であることが示された。

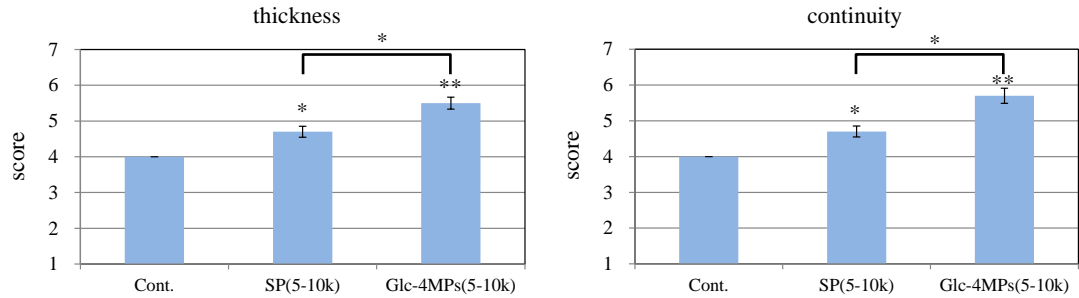


\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. II-3.2.** 豆味噌における SP(3-5kDa) および Glc-4MPs (3-5kDa) の「こく」付与評価  
(添加量 0.01%)

(7 段階評価尺度法、n=10; (a) 厚み、(b) 持続性)

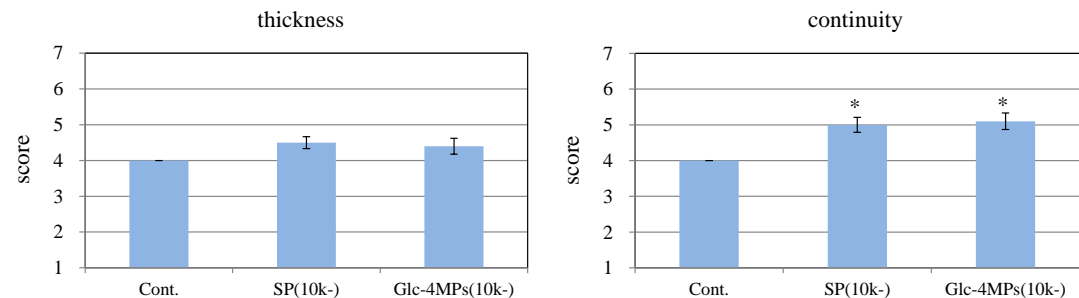


\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. II-3.3.** 豆味噌における SP(5-10kDa) および Glc-4MPs (5-10kDa) の「こく」付与評価  
(添加量 0.02%)

(7 段階評価尺度法、n=10; (a) 厚み、(b) 持続性)



\* significantly different at  $p < 0.05$

**Fig. II-3.4.** 豆味噌における SP(10kDa-) および Glc-4MPs (10kDa-) の「こく」付与評価  
(添加量 0.02%)

(7 段階評価尺度法、n=10; (a) 厚み、(b) 持続性)

#### 2.4. 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの「こく」増強効果の比較

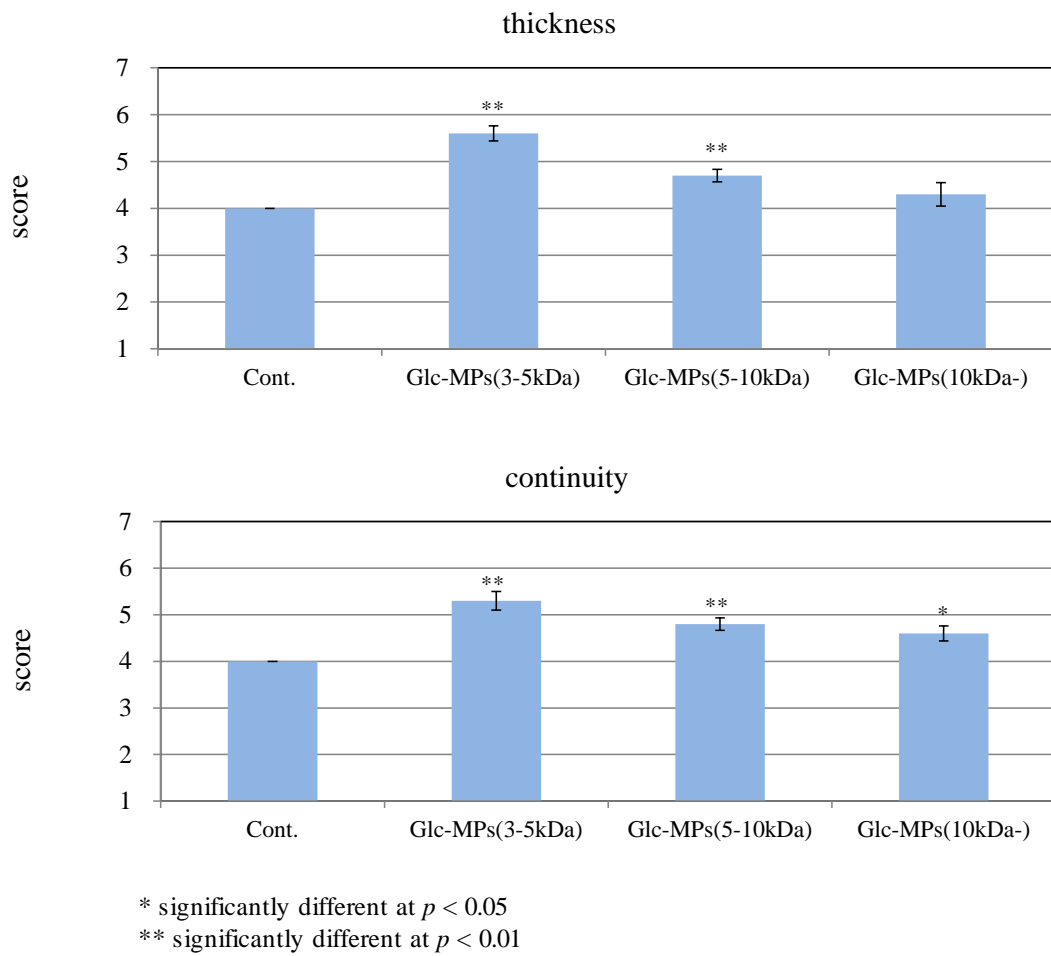
前項では、豆味噌中の存在量において各分子量の glucose 型メイラードペプチドの「こく」への寄与を評価した。本項では、同じ添加量において glucose 型メイラードペプチドの分子量の違いが「こく」の増強効果に与える影響を確認することを目的とし、より効果が明確に比較できるコンソメスープにて評価を行った。

その結果、厚みは Glc-4MPs (3-5 kDa) > Glc-4MPs (5-10 kDa) の順に、持続性は Glc-4MPs (3-5 kDa) > Glc-4MPs (5-10 kDa) > Glc-4MPs (10 kDa-) の順に有意な増強が確認された。一方で、Glc-4MPs (10 kDa-) は厚みには効果が見られなかった (Fig. II-3.5.)。

以上より、低分子量ほど「こく」の増強効果が大きいことが確認された。前項においても、glucose との反応による「こく」の増強は 3-5 kDa および 5-10 kDa にしか見られておらず、改めて「こく」の発現には、大豆ペプチドの分子量が重要であることが示唆された。

ペプチドによる味覚受容体への作用機序については、N 末端に Glu が存在する一部のジペプチドやトリペプチドはうま味物質として報告されており、官能評価の際の pH (弱酸性) において、その末端の Glu がうま味受容体に作用しやすい電荷状態 (アミノ基が正、側鎖のカルボキシル基が負) になっているアミノ酸配列のペプチドがうま味として感知されていると報告されている<sup>26)</sup>。それよりも分子量の大きいペプチドについては、牛肉エキスにおける分子量 2 kDa 程度のペプチドによる酸味抑制機能や小麦グルテンにおける分子量 0.5-10 kDa 程度のペプチドのうま味増強機能などの風味修飾効果が報告されているが、その作用機序は明らかとなっていない<sup>27)</sup>。

一方で Katsumata らは味覚受容体のノックアウトマウスを用いた神経応答評価により、糖種の異なるメイラードペプチド (1-5 kDa) が体性感覚に關与する TRPV1 を介して異なる神経応答を示すことや、甘味およびうま味受容体のサブユニットである T1R3 に作用していることを報告している<sup>27)</sup>。このことから、メイラードペプチドは TRPV1 (体性感覚) や T1R1/T1R3 (うま味受容体/L-アミノ酸受容体)、T1R2/T1R3 (甘味受容体/糖受容体) と複数の受容体に影響を与えるため、基本味だけでは表現できない厚みや持続性といった感覚として感じられているものと推測される。メイラードペプチドの構造と作用機序の関係としては、①結合している糖種により TRPV1 (体性感覚) や T1R2/T1R3 へのアフィニティが変化すること、②大豆ペプチドの分子量により、各画分の含有しているペプチドのアミノ酸配列が異なり T1R1/T1R3 へのアフィニティが変化すること、③ ①②により風味修飾効果に違いが生じることが推測されるが、本研究からは明確な関係は決定できない。今後、作用機序の詳細を解明することにより、メイラードペプチドを用いた更なる食品の「こく」の制御が可能になると考えられる。



**Fig. II-3.5.** 分子量の異なる glucose 型メイラードペプチドの「こく」増強効果の比較  
 (添加量 0.025%)  
 (7 段階評価尺度法、n=10; (a) 厚み、(b) 持続性)



## 第 2 章まとめ

本章では、豆味噌の高分子画分における「こく」付与味修飾物質に着目し、豆味噌に含まれるペプチド、メイラードペプチドおよびメラノイジンが厚みと持続性に与える影響について検証した。

第 1 節では、香気を感じられない条件の官能評価において、豆味噌の高分子画分(3-5 kDa、5-10 kDa、10 kDa-)がそれぞれ「こく」に影響を与えていることが確認された。また高分子画分の成分分析より、豆味噌は赤色米味噌や淡色米味噌よりも全窒素含有量が高い一方で構成アミノ酸窒素比が低く、メラノイジン含有量が高いことが示唆された。モデルメラノイジンの添加試験より、豆味噌中のメラノイジンは厚みに寄与している可能性が示唆されたが、持続性への寄与は見られなかった。このことから、豆味噌においてはメラノイジン以外にも「こく」に寄与している成分が存在していることが示唆された。

第 2 節では、メイラードペプチドに焦点を当て、加熱時間の異なる glucose 型メイラードペプチドを対象として、構造と風味修飾効果の関係について解析を行った。各種構造解析および化学修飾型メイラードペプチドの官能評価の結果、大豆ペプチドにおける Lys 残基のアミノ基への glucose の結合が「こく」の発現に重要であることが示唆された。

第 3 節では、Lys 残基のアミノ基への glucose の結合量の測定から、豆味噌の各高分子画分に glucose 型メイラードペプチドが存在していることを確認した。また、モデル系で調製した各分子量の大豆ペプチドおよび glucose 型メイラードペプチドの添加試験より、ペプチドおよび glucose 型メイラードペプチドの豆味噌の厚み、持続性への寄与が示唆された。一方で glucose の結合による「こく」の増強は 3-5 kDa および 5-10 kDa の大豆ペプチド画分にしか見られず、メイラードペプチドの「こく」の発現には糖の結合だけでなく、大豆ペプチドの分子量も重要であることが示された。

本研究により、メイラードペプチドの「こく」の発現に重要な構造が明らかとなり、大豆食品中での検出が可能となった。またその検出法を適用した結果、豆味噌の「こく」(厚み、持続性)の寄与成分は単一成分ではなく、メラノイジン、ペプチド、メイラードペプチドと複数の成分が関与していることが示唆された。

## 参考文献(第2章)

- 1) Ito, H. (1980). Miso no aji. *Nippon Jozokiyokai shi*, 75, 881-884.
- 2) Ishitani T.(2008) *Shokuhin to jyakusei*(p.73-84). Japan: Korin
- 3) Kikuchi S.(2011) *Oishisa no kagaku* vol.2 (p.68-73). Japan: NTS
- 4) Ogasawara, M., Yamada, Y., & Egi, M. (2006). Taste enhancer from the long-term ripening of miso (soybean paste). *Food Chemistry*, 99, 736-741.
- 5) Ogasawara, M., Katsumata, T., & Egi, M. (2006). Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000Da peptide. *Food Chemistry*, 99, 600-604.
- 6) Yasuda, K., Matsumoto, T., Watanabe, H., & Hayase, H. (2012). Contribution of melanoidins to kokumi taste. *the 2012 Annual Meeting Proceedings of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 2J15p18.
- 7) Takeuchi, T. (1976). Peptide of soybean miso. *Nippon Jozokiyokai shi*, 71, 431-436.
- 8) Ishikawa T. (1999) Components of fermented foods (p.409-448). Japan: Brewing society of Japan.
- 9) Miyamura, N., & Maruyama, Y.(2012). Flavor character of CaSR agonists (kokumi substances). *The Journal of the Japan Association for the Study of Taste and Smell*, 19, 205-213.
- 10) Newell, G. J., & MacFarlane, J. D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food Science*, 52, 1721-1725.
- 11) Miyoshi, M., Ibuki, F., Maki, Z., & Kanamori, M. (1971). Chemical modification of casein. *Journal of Japan Society Food and Nutrition*, 24, 235-241.
- 12) Otani, H., & Tokita, F. (1983). Antigenic reactivity of chemically modified lactoglobulins with antiserum to native lactoglobulin. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 59, 699-705.
- 13) Nakaya, K., Horinishi, H., & Shibata, K. (1967). States of Amino Acid Residues in Proteins XIV. Glyoxal as a Reagent for Discrimination of Arginine Residues. *Journal of biochemistry*, 61, 345-351.
- 14) Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., & Cerami, A. (1986). Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, 232, 1629-1632.
- 15) Usui T., Yanagisawa S., Ohguchi M., Yoshino M., Kawabata R., Kishimoto J., Arai Y., Aida K., Watanabe H., & Hayase F. (2007). Identification and determination of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds formed in the degradation of sugars. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2465-2472.

- 16) Penndorf, I., Biedermann, D., Maurer, S. V., & Henle, T. (2007). Studies on N-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant formulas: quantification of  $\alpha$ -N-(2-furoylmethyl) amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 723-727.
- 17) Schwietzke, U., Malinowski, J., Zerge, K., & Henle, T. (2011). Quantification of Amadori products in cheese. *European Food Research and Technology*, 233, 243-251.
- 18) Del Castillo, M. D., Sanz, M. L., Vicente-Arana, M. J., & Corzo, N. (2002). Study of 2-furoylmethyl amino acids in processed foods by HPLC–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 79, 261-266.
- 19) Kitade, K., Katayama, N., & Kuwae, A. (2010). FT-IR/ATR Spectral Analysis of Black Sesame Constituents. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 57, 215–219.
- 20) Hisamatsu, H. (2009). Secondary structure analysis of proteins using infrared absorption spectroscopy. *Protein Science Society of Japan Archive*. 2, e054
- 21) Kameoka, T., Okoda, T., Hashimoto, A., Noro, A., Shiinoki, Y., & Ito, K. (1998). FT-IR Analysis of Sugars in Aqueous Solution Using ATR Method. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 45, 192–198.
- 22) Imaizumi, T. (2004). *AGEs kenkyu no saizensen* . (p.15-25). Japan: Medical review
- 23) Yamagishi, T., Furukawa, Y., & Harada, I. (2004). Secondary structure of Soybean Protein (II). *Journal of Hachinohe National College of Technology*, 39, 49-56.
- 24) Hondo, S. (1989). Saccharides of miso during manufacturing. *Nippon Jozokyoikaishi*, 84, 594–599.
- 25) Hashiba, H. (1982). The browning reaction of Amadori compounds derived from various sugars. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 547-548.
- 26) van den Oord, A. H., & van Wassenaar, P. D. (1997). Umami peptides: assessment of their alleged taste properties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205, 125-130.
- 27) Nishimura, T. (2003). The role of peptide for the taste in foods. *Nippon Chori Kagaku kaishi*, 36, 55–62.
- 28) Katsumata, T., Nakakuki, H., Tokunaga, C., Fujii, N., Egi, M., Phan, T. H. T., ... & Lyall, V. (2008). Effect of Maillard reacted peptides on human salt taste and the amiloride-insensitive salt taste receptor (TRPV1t). *Chemical Senses*, 33, 665-680.

## 第 3 章

### 熟成本みりんにおける風味修飾成分の解析

## 緒言

日本で古くから用いられる本みりんは、糖とアルコールを高濃度で含有することを特徴とした酒類調味料であり、数年間熟成させた本みりんは特有の味と香りを有する調味料として日本料理に使われている。本みりんの製造工程は、蒸したうるち米に *Aspergillus oryzae* を植菌した米麴と、蒸したもち米とアルコールを混合し、約 2 か月間室温で貯蔵することででんぷんを glucose に変換(糖化反応)させる。標準的な本みりんは、糖化後濾過を行い、多くは液糖が加えられて製品となる。一方で、熟成を行う本みりんは濾過後そのまま室温で 1 年以上貯蔵されてから製品となる<sup>1)</sup>。この貯蔵は、高糖、高アルコール下で実施されるため、メイラード反応が非常に進行しやすい環境である。実際、長期貯蔵した本みりんにおいて、メイラード反応が進行していることを示す  $\alpha$ -ジカルボニル化合物やメラノイジン(褐色度)の増加が確認されている<sup>2)</sup>。またアマドリ化合物(fructosyl histidine、fructosyl methionine)も、ラジカル消去活性が強い成分として、未熟成の本みりん中から同定されている<sup>3)</sup>。このような、本みりん中に含まれるメイラード反応生成物は、食品機能として  $\alpha$ -ジカルボニル化合物のアミン消臭作用<sup>1)</sup>や、メラノイジンの抗酸化作用<sup>4)</sup>、香気や焼き色付与のための前駆体としての作用<sup>4)</sup>が報告されているが、本みりんの風味にどのような影響を与えているか研究されている例はほとんどない。

また近年、本みりんと同様に米を主原料とする酒類である清酒に微量の D-アミノ酸が含まれ、風味に寄与していることが報告されている<sup>5)</sup>。D-アミノ酸は L-アミノ酸の鏡像異性体であり、清酒においては乳酸菌のラセマーゼにより L-アミノ酸が D 体に変換されている<sup>6)</sup>。一方で、メープルシロップ<sup>7)</sup>や加熱された蜂蜜<sup>8)</sup>といった糖を高含有する食品においても、L-アミノ酸に対する D-アミノ酸の比率が高い食品があることが報告されており、Brückner らはメイラード反応によるラセミ化機構を提唱している<sup>9)</sup>。

本みりんも豆味噌と同様、古くから用いられる基礎調味料であり、本みりんの熟成と風味との関係を明らかにすることは、より嗜好性の高い酒類調味料を提供する上で非常に重要である。

そこで本章では、本みりんの熟成工程におけるメイラード反応に着目し、D-アミノ酸とメイラード反応の関係、およびそれらが風味に与える影響について検証した。第 1 節では、熟成期間の異なる本みりんのメイラード反応生成物および D-アミノ酸の定量分析を行い、長期熟成した本みりんが含む成分含有量において、それらが風味に与える影響を評価した。第 2 節では、本みりんの熟成におけるメイラード反応のアミノ酸のラセミ化への寄与を検証した。第 3 節では、本みりん以外の熟成食品において D-アミノ酸が風味に寄与する可能性を検証するため、本みりん以外の熟成食品における D-アミノ酸の定量分析を行い、その成分含有量における基本味への影響について評価を行った。

## 第 1 節 熟成本みりんの風味特性と風味修飾成分の探索

### 1. 実験材料および方法

#### 1.1. 試料・試薬

本みりん試料には、市場から無作為に購入した未熟成本みりん 3 種(NRM1-NRM3)と、熟成本みりん 8 種(RM1-RM8)を用いた。未熟成本みりんには、原料にもち米、米麴、醸造アルコール、液糖を用いているもの、熟成本みりんには、原料にもち米、米麴、醸造アルコールを用いているものを選択した。いずれもアルコール分は約 14% である。用いた試料の熟成年数や原材料は下表に示す。

No.	熟成年数	原材料
NRM1	-	もち米、米麴、醸造アルコール、糖類
NRM2	-	もち米、米麴、醸造アルコール、糖類
NRM3	-	もち米、米麴、醸造アルコール、糖類
RM1	1年	もち米、米麴、米焼酎
RM2	1年	もち米、米麴、米焼酎
RM3	3年	もち米、米麴、米焼酎
RM4	3年	もち米、米麴、米焼酎
RM5	3年	もち米、米麴、米焼酎
RM6	7年	もち米、米麴、米焼酎
RM7	10年	もち米、米麴、米焼酎
RM8	13年	もち米、米麴、米焼酎

試薬は以下の特級試薬を使用した。

L-Ala、D-Ala (以上、株式会社ペプチド研究所から購入)、L-Asp、D-Asp、陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC 分析用 ninhydrin solution (以上、和光純薬工業株式会社から購入)、D-glucose (キンダ化学株式会社から購入)、pentafluoropropionic acid、*o*-phthalaldehyde (以上、東京化成株式会社から購入)、*N*-isobutyryl-L-cysteine (Sigma-aldrich Co.から購入)、陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC 分析用バッファーPF-1、PF-2 (三菱化学株式会社から購入)。その他の L、D-アミノ酸や分析試薬は東京化成株式会社、関東化学株式会社、和光純薬工業株式会社、Sigma-aldrich Co.のいずれかより購入した。

また、本研究で使用した水は特に注釈の無い限り、逆浸透純粋製造装置 (Milli RO 10 Plus; Millipore) で逆浸透膜法により精製した後、さらに超純水製造装置 (MP-650; IWAKI) にてシンパック処理により精製したものをを用いた。

## 1.2. 成分分析

未熟成本みりんと、熟成本みりんについて、メイラード反応および D-アミノ酸に関連する成分である、L、D-遊離アミノ酸含有量、glucose 含有量、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物含有量、アマドリ化合物含有量、pH および着色度を測定した。アマドリ化合物については、合成品を調製し標品として用いた。

### 1.2.1. L、D-遊離アミノ酸分析(OPA/IBLC 法)

本みりん中の D-アミノ酸を分析するためには、試料中のアミノ酸のピークを L 体と D 体に分離する必要がある。*o*-phthalaldehyde (OPA) と *N*-isobutyryl-L-cysteine (IBLC) を用いた誘導体化反応は L-アミノ酸および D-アミノ酸をそれぞれジアステレオマー化することにより、ピークの分離を可能とする (Fig. III-1.1.)<sup>10)</sup>。また、誘導体化されたアミノ酸の検出には分光蛍光光度計を使用するため、良好な検出感度のピークが得られるのが本法の特徴である (本法は 1 級アミンしか誘導体化することができないため、2 級アミンのプロリンは分析することができない)。

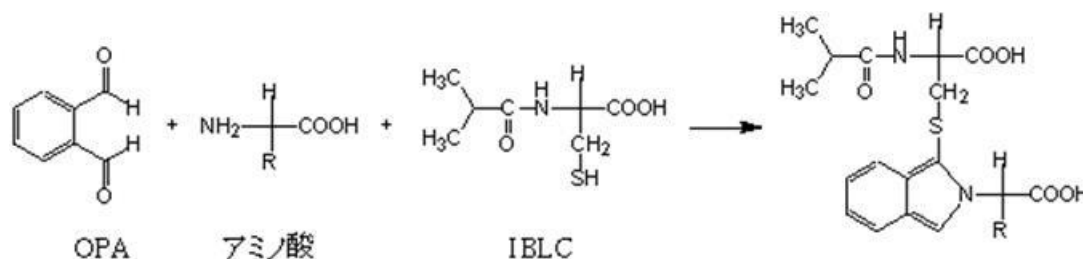


Fig. III-1.1. OPA と IBLC による D、L-遊離アミノ酸の誘導体化

そこで本研究では L、D-アミノ酸の定量分析に本法を採用し、詳細な誘導体化条件については Brückner らの方法に従い、誘導体化した各アミノ酸を HPLC により分析した<sup>10)</sup>。本法を用いて、標品にて 16 種のアミノ酸 (Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val) の L 体、D 体の良好な分離が確認された (Fig. III-1.2.)。本研究においては、過去の報告において本みりん中の L-体の含有量が低いアミノ酸および再現性の低いアミノ酸を除き、12 種のアミノ酸 (Ala、Asp、Glu、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Trp、Tyr、Val) を測定対象とした。また鏡像異性体を有さないアミノ酸である Gly の測定も行った。実施した誘導体化の手順は、次の通り。

2% sulfosalicylic acid 水溶液を適量混合し一晩静置した各本みりん試料を、100 mM borate buffer (pH9.5) で希釈し、その希釈液 900  $\mu$ l と誘導体化試薬である *o*-phthalaldehyde 2 mg と *N*-isobutyryl-L-cysteine 3 mg を溶解した methanol 100  $\mu$ l を混合した。その後 2 分間室温で反応させ、HPLC に供した。定量には外部標準法を用いた。以下に HPLC 条件を示す。

【分析条件】

System	: Shimadzu HPLC 20A series (Shimadzu)
Detector	: RF-20A XS fluorescence detector (Shimadzu) (Ex.:230 nm, Em.:445 nm)
Column	: Inertsil ODS-4 (4.6 φ mm×250 mm, GL Science)
Column temp.	: 40°C
Flow Rate	: 0.8 ml/min
Eluent	: (A) 30mM Sodium acetate (pH6.0), (B) Methanol/Acetonitrile=12/1
Gradient	: (B) 0.5→60% (0 →75 min)
Injection volume	: 5 μL

得られた L-アミノ酸および D-アミノ酸の定量値から、以下の式を用いて D 体存在比(%D)を算出した。

$\%D \% = \text{D-アミノ酸含有量 mM} \div$

$((\text{L-アミノ酸含有量 mM}) + (\text{D-アミノ酸含有量 mM})) \times 100$

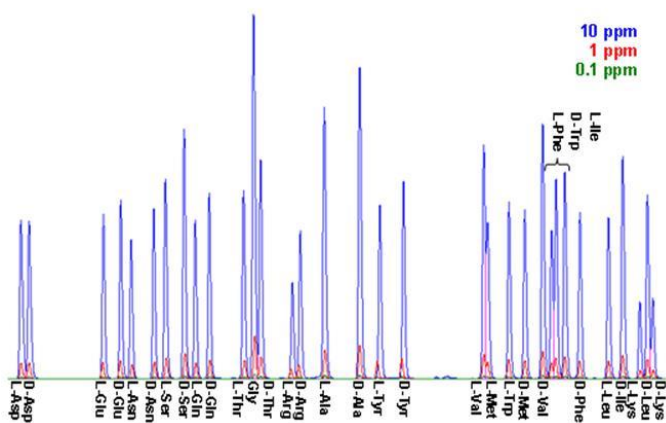


Fig. III-1.2. OPA/IBLC 法による L、D-遊離アミノ酸の HPLC クロマトグラム (標品)



### 1.2.2. glucose

第2章 第2節 1.4.4.と同様に RI 検出器による HPLC 分析により、本みりん中の glucose の定量分析を行った(予備分析にて fructose、sucrose の定量を実施したが、glucose 以外は検出されなかったため、測定対象から除外した)。各本みりん試料は 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにて濾過を行い、HPLC に供し、分析を行った。

### 1.2.3. $\alpha$ -ジカルボニル化合物

第2章 第2節 1.4.6.と同様に 2,3-diaminonaphthalene (DAN) による誘導体化により HPLC 法にて<sup>11)</sup>、本みりん中の 3-deoxyglucosone、methylglyoxal の定量分析を実施した。

### 1.2.4. 一般分析(着色度、pH)

pH は、pH 電極(堀場製作所 F-52)にて測定を行った。試料は原液を用いた。

着色度は、分光光度計(日立 U-2900)にて波長 430 nm の吸光度を測定した(本みりんは一般的に波長 430 nm の吸光度を「着色度」として品質の指標にしている)。試料は着色度に応じ、RO 水で 10 倍および 100 倍に希釈し測定した。

### 1.3. fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid 分析

アマドリ化合物は、還元糖とアミノ酸の反応物であるが、今回使用した本みりん試料の主要還元糖はD-glucoseである。D-glucoseとL-アミノ酸を出発物質とするアマドリ化合物は glucose が異性化し、N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-amino acid (fructosyl L-amino acid)となる。そこで、本研究では、fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid の定量分析を行うこととした。定量に際し、fructosyl L-alanine、fructosyl L-aspartic acid を合成した。

#### 1.3.1. 合成検討(陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC 分析)

fructosyl L-alanine、fructosyl L-aspartic acid について、Anetらの fructosyl glycine の合成方法を改良し、調製した<sup>12)</sup>。4 つロフラスコに、L-alanine または L-aspartic acid 0.05 mol、D-glucose 0.2 mol、10M Sodium pyrosulphite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) を 5 ml 加え、100°Cのオイルバスにセットした後、スリーワンモータ(新東科学 FBL600)にて 100 rpm で攪拌した。粉体がよく混合された後、攪拌しながら RO 水を 10 ml 加え、密閉状態で加熱した。加熱時間は、異なる時間加熱した還流物のアマドリ化合物含有量を陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC にて分析し、アマドリ化合物含有量が最も多くなる時間とした(L-alanine: 1.5 hr、L-aspartic acid: 40 min)。還流後、RO 水を加え 50 ml とした。陽イオン交換樹脂 IR120BH (Organo Corp.) を 1 N hydrochloric acid および RO 水で平衡化させ、そのスラリー 100 mL をガラスカラム(φ 18×300 mm)に充填した。調製した溶液 50 ml に RO 水 125 ml、99% エタノール 345 ml を混合し、脱気したものを分画原液とし、IR120BH カラムに供し、アマドリ化合物を吸着させた。続けて脱気した 70% ethanol 700 ml および RO 水 200 ml を通液することによって、未反応の糖や非イオン性物質などを除去した。その後、0.5 M ammonium を通液し、20 mL ずつに分画した。得られた各画分を 0.02 N hydrochloric acid にて 10 倍希釈し、陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC にて未反応の alanine およびアマドリ化合物の有無を確認し、アマドリ化合物のピークのみを含む画分をアマドリ化合物画分とした。集めたアマドリ化合物画分についてロータリーエバポレーターにより乾固した。得られた乾固物が完全に溶解する最低量の 75% ethanol を加え、溶解液に 100% ethanol を滴下して白い結晶が見られたところで、冷蔵庫で一晩放置した。一晩放置後に得られた結晶物を再度 RO 水に溶解し、同様の操作を更に 2 回繰り返し、得られた結晶を凍結乾燥した。

陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC の分析条件はそれぞれ以下の通り。測定時、各試料は 0.02N hydrochloric acid で希釈し、分析を行った。

【分析条件】

System	: Hitachi L-8800A amino acid analyzer (post-column method)
Column	: Cation exchange column for L-8800A Twin#2622PF ( $\phi$ 6.0 mm $\times$ 25 mm (twin), Hitachi)
Column temp.	: 38°C (0.0 $\rightarrow$ 11.5 min), 45°C (11.5 $\rightarrow$ 30.0 min)
Reaction column	: Reaction column for L-8800A (Hitachi)
Reaction temp.	: 135°C
Ammonia trap column	: #2650 ( $\phi$ 4.6 mm $\times$ 60 mm, Hitachi)
Detector	: VIS (Wavelength: 570 nm)
Flow Rate	: 0.51 ml/min (Eluent), 0.41ml/min (Reagent)
Eluent	: (A) PF-1, (B) PF-2
Reagent	: ninhydrin solution
Gradient (Eluent)	: (B) 20% (0.0 $\rightarrow$ 4.0 min), 58% (4.0 $\rightarrow$ 11.5 min)、 90% (11.5 $\rightarrow$ 15.0 min), 100% (11.5 $\rightarrow$ 30.0 min)
Injection volume	: 20 $\mu$ L

### 1.3.2. LC-ESI-Q-TOF-MS によるスペクトル測定

1.3.1 の精製物を LC-ESI-Q-TOF-MS に供し、高分解能測定を行った。試料は 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにて濾過を行い、測定に供した。以下に LC 部及び MS 部の測定条件を示す。

#### 【LC-ESI-Q-TOF-MS 条件】

(LC 部 測定条件)

LC system	: Agilent Technologies, Inc. 1200series
UV-Detector	: G 1315 C DAD SL
Binary Pump	: G 1312 B
Column oven	: G 1316 B TCC SL
Auto sampler	: G 1367 D HiP ALS SL (Agilent Technologies)
Column Temperature	: 40°C
Column	: ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Inc. 3.0 $\times$ 100 mm ,1.8 $\mu\text{m}$ )
Eluent	: A) 10mM ammonium acetate : B) 50% acetonitrile
Flow rate	: 0.2 ml/min
Gradient	: B 0% $\rightarrow$ B 50% (0-30min)
Injection	: 2 $\mu\text{l}$

(MS 部 測定条件)

MS system	: G 6520 A Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system (Agilent Technologies, Inc. )
Ion Source Type	: Dual ESI (positive)
Acquisition mass range	: 50-500
Gas Temperature	: 325°C
Drying Gas	: N <sub>2</sub> (10 L / min)
Nebulizer	: N <sub>2</sub> (40 psi)
Fragmentor	: 100 V
Capillary voltage	: 4000 V

その他パラメーターは初期設定値で行った。

### 1.3.3. fuructosyl alanine、fructosyl aspartic acid の定量

1.3.2 で精製されていることが確認できた各アマドリ化合物を用いて、陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC にて、各本みりん中の fuructosyl alanine、fructosyl aspartic acid の定量分析を行った。各試料は 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにて濾過を行い、0.02N hydrochloric acid で適宜希釈し測定に供した。陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC の分析条件は、本みりん中に含まれる他成分との分離能を高める検討を行い、最終的に以下の条件で実施した。

#### 【分析条件】

System	: Hitachi L-8800A amino acid analyzer (post-column method)
Column	: Cation exchange column for L-8800A Twin#2622PF ( $\phi$ 6.0 mm $\times$ 25 mm (twin), Hitachi)
Column temp.	: 30°C
Reaction column	: Reaction column for L-8800A (Hitachi)
Reaction temp.	: 135°C
Ammonia trap column	: #2650 ( $\phi$ 4.6 mm $\times$ 60 mm, Hitachi)
Detector	: VIS (Wavelength: 570 nm)
Flow Rate	: <Ala> 0.51 ml/min (Eluent), 0.41 ml/min (Reagent) <Asp> 0.48 ml/min (Eluent), 0.41 ml/min (Reagent)
Eluent	: <Ala> PF-1 <Asp> PF-1 / UPW=70/30
Reagent	: ninhydrin solution (Hitachi)
Injection volume	: 20 $\mu\text{L}$

## 1.4. 官能評価

### 1.4.1. 熟成本みりんの風味特性

未熟成本みりんと熟成本みりんの風味の違いを確認するため、未熟成本みりん2種(NRM1、NRM2)と長期熟成本みりん3種(RM6、RM7、RM8)の官能評価を実施した。パネルにはMCフードスペシャリティーズ社にて調味料の開発に従事する研究員(基本味識別テスト、基本味濃度差識別テスト合格者)4名を選抜した。

最初に、熟成本みりんの評価に適した評価項目の決定を行った。5種の本みりんを4名のパネルに提示し、Tsubakurashoujiらが本みりんを用いた食品の官能評価において選抜した項目<sup>13)</sup>である「甘味の強さ」「甘味の質」「塩味の強さ」「酸味の強さ」「うま味の強さ」「苦味の強さ」「こく」について、試料間の違いが確認できるか、評価用語として具体的なイメージが湧くかを質問した。この評価を2回繰り返して、最終的に試料間の違いとパネル間で共通したイメージを持つことができた「甘味の強さ」「甘味の質(すっきりさ)」、および「こく」の表現から更に絞り込んだ「厚み」「まるやかさ(カドのなさ)」を評価項目に決定した。

次に、5種の本みりんについて5mlずつパネルに提示し、NRM1を4点として(コントロール)上記4項目について7段階評価尺度法にて評価させた。評価は日にちを変えて2回行った。統計解析には統計解析ソフトSPSS 7.5.1J(SPSS社)を用い、Dunnett検定にて有意差検定を行った。

#### 1.4.2. 添加試験

未熟成の本みりんを用いて、D-アミノ酸、アマドリ化合物、メラノイジンの「甘味の強さ」「甘味の質(すっきりさ)」「厚み」「まろやかさ(カドのなさ)」への寄与を7段階評価尺度法にて評価した。

官能評価は、未熟成本みりん(NRM1)に7年熟成本みりん(RM6)の成分組成と同様になるようそれぞれの成分を添加したものを添加サンプルとし、常温の無添加のサンプル(コントロール)と各添加サンプル(各5ml)をパネルに提示し、コントロールを4点として、各項目について評価させた。「D-アミノ酸添加サンプル」は清酒で風味への寄与が報告されている<sup>5)</sup>D-Ala、D-Asp、D-Glu含有量がRM6と同量になるように試薬のD-アミノ酸を、「アマドリ化合物添加サンプル」は fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid 含有量がRM6と同量になるように合成したアマドリ化合物を、「メラノイジン添加サンプル」は RM6 と同じ着色度になるようにモデルメラノイジン(第2章第1節1.4.調整品)を添加した(Table III-1.1)。評価は日にちを変え2回行った。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J(SPSS 社)を用い、Dunnet 検定にて有意差検定を行った。

Table III-1.1 各成分を添加した未熟成本みりんの配合組成

	Cont.	DAA	ARPs	MEL
NRM1 (ml)	100	100	100	100
D-Ala (mg)		1.3		
D-Asp (mg)		1.0		
D-Glu (mg)		0.4		
Fru-Ala (mg)			28.4	
Fru-Asp (mg)			6.7	
MEL* (mg)				200
*MEL: Glc-Glu MEL				

## 2. 結果および考察

### 2.1. 熟成による成分変化

#### 2.1.1. 一般成分

各本みりんの pH、着色度(OD430)、glucose 含有量を **Table III-1.2** に示す。熟成本みりん (RM1-RM8) は、未熟成本みりん (NRM1-NRM3) よりも着色度が高く、熟成年数が長いほど pH が低い傾向が見られた。

次に、標品が入手できた 3-deoxyglucosone、methylglyoxal の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物について各試料中の含有量を測定した (NRM2、RM1、RM3 は、試料量が少なく未実施)。その結果、**Fig. III-1.3.** に示すクロマトグラムが得られ (図は NRM1 の結果)、R.T.14min に 3-deoxyglucosone、R.T.34min に methylglyoxal のピークが確認できた。R.T.11min の大きなピークは glucosone と推測されたが、標品が入手できず同定、定量には至らなかった。定量した 3-deoxyglucosone、methylglyoxal は、熟成本みりんにおいて未熟成本みりんよりも両化合物の含有量が高いことが確認され (**Fig. III-1.4.**、**Fig. III-1.5.**)、熟成中に糖が分解されていることが示唆された。メイラード反応において、糖は酸性物質である有機酸や  $\alpha$ -ジカルボニル化合物に分解される<sup>14)</sup>。熟成本みりんにおいて pH の低下や着色度が上昇した要因は、メイラード反応による糖の分解、メラノイジンの生成によるものと推測され、本みりんの熟成中にメイラード反応が進行していることが確認された。

**Table III-1.2** 各試料の一般成分

Sample	Aging Period	pH	OD430	Glucose%
NRM1	-	5.4	0.01	34.1
NRM2	-	5.6	0.01	39.3
NRM3	-	5.6	0.02	29.5
RM1	1year	5.0	0.27	42.1
RM2	1year	4.9	0.49	37.4
RM3	3years	4.7	0.71	39.5
RM4	3years	4.9	0.38	36.5
RM5	3years	4.9	0.15	45.8
RM6	7years	4.5	0.66	33.1
RM7	10years	4.5	0.66	35.6
RM8	13years	3.9	4.90	31.0



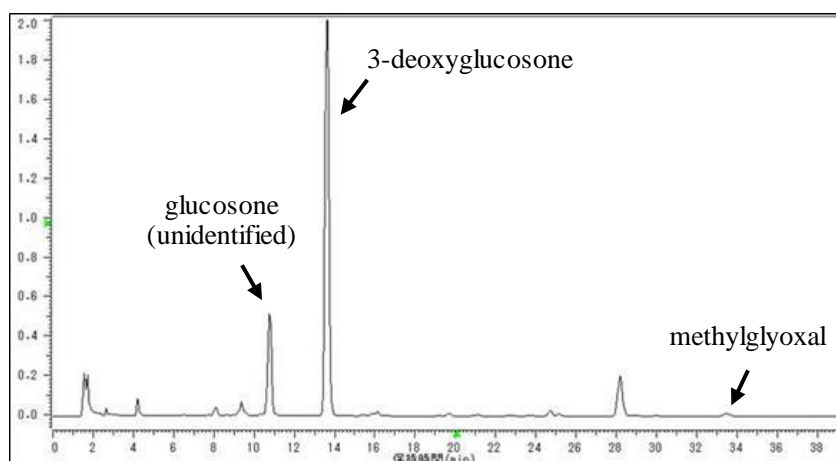


Fig. III-1.3.  $\alpha$ -ジカルボニル化合物測定におけるクロマトグラム (NRM1)

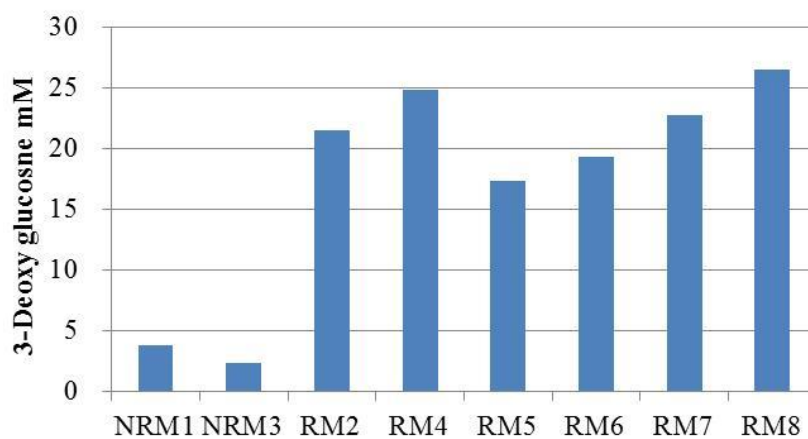


Fig. III-1.4. 各本みりんの 3-deoxyglucosone 含有量

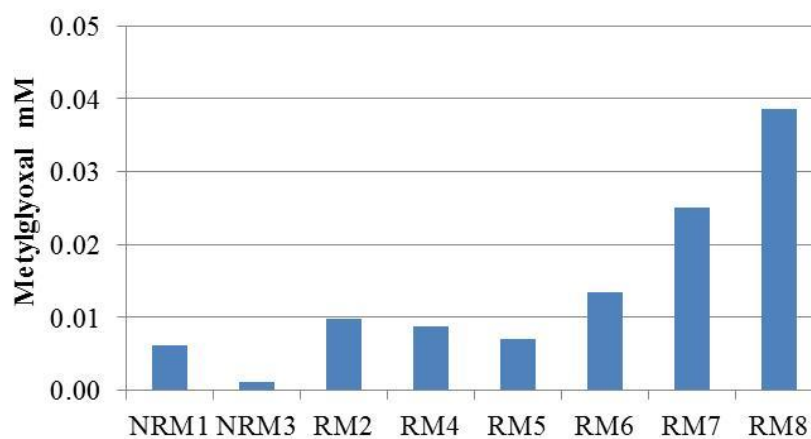


Fig. III-1.5. 各本みりんの methylglyoxal 含有量

### 2.1.2. L、D-アミノ酸

L、D-アミノ酸の定量結果および算出した%Dの値を **Table III-1.3** および **Table III-1.4** に示す。全ての本みりんで測定した 12 種の L-アミノ酸が検出され、L-Ala (510-2200  $\mu\text{M}$ )、L-Leu (410-2200  $\mu\text{M}$ )、L-Ser (390-2800  $\mu\text{M}$ )、L-Asp (350-3500  $\mu\text{M}$ ) が他の L-アミノ酸よりも含有量が高い結果となった。

一方で L-Glu は熟成年数 5 年以下の本みりん (NRM1-NRM3、RM1-RM5) では含有量が高かったが、熟成期間 7 年以上の長期熟成本みりん (RM6-RM8) では含有量が低く (NRM1-NRM3: 450-1900  $\mu\text{M}$ 、RM1-RM5: 2000-4600  $\mu\text{M}$ 、RM6-RM8: 51-630  $\mu\text{M}$ )、他の L-アミノ酸とは異なる傾向であった。Morita らは、未熟成本みりんの高温保管中の消失速度は各アミノ酸の中で Glu が最も速いことを報告しており<sup>15)</sup>、長期熟成本みりんにおいて L-Glu 含有量が低い要因は Glu の pyroglutamic acid への変換やメイラード反応の進行が早いためと推測される。

L-Glu を除いて、熟成本みりんは未熟成本みりんよりの各 L-アミノ酸含有量を上回った。これは、今回評価に用いた未熟成本みりんが全て液糖を副原料に使用している本みりんであり、未熟成本みりんのアミノ酸含有量が液糖によって希釈されていることが要因と考えられる。

D-アミノ酸については、D-Ala、D-Asp、D-Leu、D-Phe が全ての本みりんで検出された。本みりんの原料である米に D-アミノ酸が含まれていることが報告されており<sup>16)</sup>、原料からの移行が未熟成本みりんも含めて全ての本みりんで D-アミノ酸が検出された要因と考えられる。一方で、D-Lys、D-Thr、D-Trp はいずれの試料からも検出されなかった。未熟成本みりんにおいては D-Ala (12-50  $\mu\text{M}$ ) と D-Asp (8-30  $\mu\text{M}$ ) が、熟成本みりんにおいては D-Ala (30-390  $\mu\text{M}$ )、D-Asp (9-220  $\mu\text{M}$ )、D-Ser (8-89  $\mu\text{M}$ ) が他の D-アミノ酸含有量よりも高い傾向が見られた。

%D は、長期熟成本みりん (RM6-RM8) の Asp、Glu、Ser が未熟成本みりんの値を上回っており、それぞれ各 L、D-アミノ酸含有量を見ると、Asp と Ser は D-アミノ酸含有量が高いこと、Glu は L-アミノ酸含有量が低いことに起因していることが確認された ([NRM1-NRM3] Asp: 2.3-2.5%、Glu: n.d.-1.4%、Ser: n.d.-1.6%、[RM1-RM8] Asp: 4.0-10.6%、Glu: 4.3-54.2%、Ser: 4.1-8.5%)。一方で、Ala の%D は未熟成本みりんと熟成期間 10 年の本みりんの値が同等であることや (NRM1-NRM3: 2.4-3.8%、RM7: 3.3%)、熟成期間 1 年の本みりんの値が非常に高いことから (RM2: 15.1%)、試料により大きく異なることが確認された。

**Table III-1.3 各本みりんの L-アミノ酸含有量**

L-AA ( $\mu\text{M}$ )	NRM1	NRM2	NRM3	RM1	RM2	RM3
Ala	880	510	1800	1600	2200	1900
Asp	560	350	1200	1900	3500	2700
Glu	800	450	1900	2400	4600	2700
Ile	270	160	760	790	1600	1000
Leu	750	410	1600	1300	2200	1600
Lys	120	91	280	800	1400	1100
Phe	310	210	870	370	700	430
Ser	600	390	1400	1900	2800	2400
Thr	330	180	750	740	1200	960
Trp	26	39	160	8	17	n.d.
Tyr	280	220	780	1200	1600	1500
Val	440	270	1200	1400	2200	1800
Gly*	530	1800	1400	1600	2700	2000

\*Non-chiral amino acid

**Table III-1.3 各本みりんの L-アミノ酸含有量(続き)**

L-AA ( $\mu\text{M}$ )	RM4	RM5	RM6	RM7	RM8
Ala	2000	1800	1400	880	1800
Asp	3000	1600	1200	750	1800
Glu	3900	2000	630	51	89
Ile	1200	510	500	340	1100
Leu	1800	1200	910	580	1500
Lys	1100	44	110	140	860
Phe	530	510	380	240	440
Ser	2300	1200	870	470	960
Thr	990	510	410	280	700
Trp	5	16	n.d.	n.d.	n.d.
Tyr	1400	630	480	390	1200
Val	1900	870	830	580	1600
Gly*	2100	1100	1500	830	1000

\*Non-chiral amino acid

**Table III-1.4 各本みりんの D-アミノ酸含有量および%D**

	NRM1		NRM2		NRM3		RM1		RM2		RM3	
	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)
Ala	35	3.8	12	2.4	50	2.7	35	2.1	390	15.1	75	3.8
Asp	14	2.4	8	2.3	30	2.5	12	0.6	21	0.6	22	0.8
Glu	n.d.	-	4	1.0	26	1.4	17	0.7	30	0.6	37	1.4
Ile	n.d.	-	n.d.	-	26	3.3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Leu	5	0.6	3	0.6	29	1.8	5	0.4	9	0.4	8	0.5
Lys	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Phe	9	2.7	10	4.5	17	1.9	5	1.3	13	1.9	7	1.7
Ser	6	1.0	n.d.	-	22	1.6	21	1.1	18	0.6	53	2.2
Thr	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Trp	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tyr	n.d.	-	n.d.	-	13	1.6	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Val	n.d.	-	n.d.	-	35	2.8	3	0.2	5	0.2	4	0.2

**Table III-1.4 各本みりんの D-アミノ酸含有量および%D(続き)**

	RM4		RM5		RM6		RM7		RM8	
	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)	D-AA ( $\mu$ M)	%D (%)
Ala	43	2.1	120	6.3	180	11.4	30	3.3	180	9.1
Asp	9	0.3	21	1.3	91	7.0	32	4.0	220	10.9
Glu	14	0.4	27	1.3	29	4.3	60	54.2	33	27.1
Ile	n.d.	-	2	0.4	n.d.	-	n.d.	-	9	0.8
Leu	4	0.2	7	0.6	8	0.9	8	1.3	55	3.5
Lys	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Phe	4	0.7	4	0.8	12	2.9	10	3.9	62	12.4
Ser	8	0.3	15	1.3	37	4.1	26	5.2	89	8.5
Thr	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Trp	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Tyr	n.d.	-	n.d.	-	15	3.0	n.d.	-	49	3.9
Val	n.d.	-	4	0.5	3	0.4	3	0.6	8	0.5

### 2.1.3. fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid

メイラード反応の中間生成物は不安定な化合物が多いが、アマドリ化合物は未熟成の本みりん<sup>3)</sup>の他、醤油<sup>17)</sup>やトマト加工品<sup>18)</sup>などの食品中からも検出されている比較的安定な化合物である。また醤油においては fructosyl glutamic acid が醤油のうま味に寄与していることが報告されている<sup>17)</sup>。そこで、本研究においても熟成本みりん中に存在している可能性が高く、風味に寄与する可能性が高いアマドリ化合物に着目することとした。

本みりん中に存在している可能性があるアマドリ化合物は、D-glucose と各 L-アミノ酸を出発物質とするため、検出された L-アミノ酸の種類だけ存在している可能性があるが、本研究では本みりん中の L-アミノ酸含有量の高さやアミノ酸としての風味の重要性を鑑み、fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid の定量分析を行うこととした (L-Ala:甘味、L-Asp (Na):うま味、L-Leu:苦味、L-Ser:甘苦味)。定量に際し、Anet らの fructosyl glycine の合成条件を参考に、fructosyl L-alanine、fructosyl L-aspartic acid を合成した<sup>12)</sup>。

#### (e) 最適反応時間の検討

アミノ酸の種類ごとにアマドリ化合物の最適加熱時間が異なることが推測された。そこで、L-alanine について、加熱温度 100°C、加熱時間 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0 時間の反応液を調製し、陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC にて、ニンヒドリンに反応する化合物の分析を行った。その結果、Fig. III-1.6. に示すように、R.T.6 min、R.T.22 min にピークが確認できた (図は 1.5 時間反応液の結果)。そこで、各反応液について、この 2 種のピークの面積を測定し、経時変化を確認した (Fig. III-1.7.)。またメラノイジンは精製時に純度を低下させる要因になることが推測されたため、同サンプルの褐色度 (OD420) も測定した。その結果、R.T.22 min のピークが時間とともに減少し、R.T.6 min のピークが 1.5 時間まで増加し、その後、ほぼ一定となることが確認された。一方で褐色化は 1.5 時間から見られ、その後 4 時間まで増加が継続した (Fig. III-1.8)。

アマドリ化合物はニンヒドリンに発色することが知られ、また Anet らの結果<sup>12)</sup>より陽イオン交換クロマトグラフィーでは、アマドリ化合物、未反応のアミノ酸の順に溶出することから、R.T.6min のピークがアマドリ化合物のピークであると考えられた (標品を用いて、R.T.22 min のピークは未反応の L-alanine であることを確認)。反応時間 1.5 時間において、R.T.6 min のピークはほぼ最大値であり、また褐色度も低いことから、アマドリ化合物の生成条件を「100°C、1.5 時間加熱」と決定した。

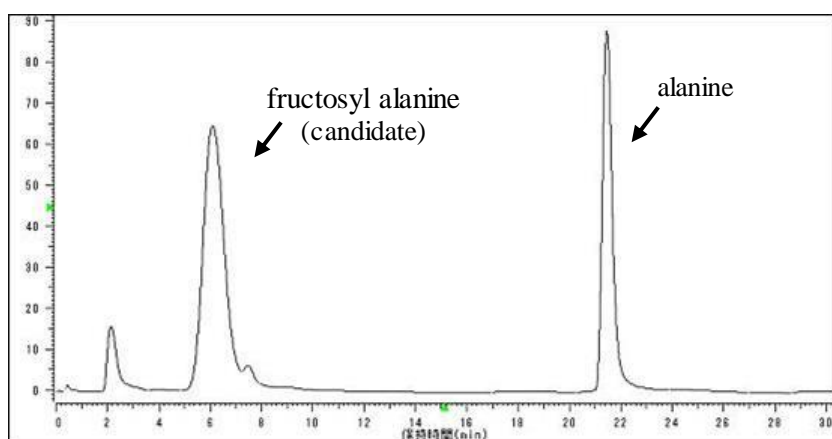


Fig. III-1.6. glucose×L-alanine 反応 (1.5 時間) の陽イオン交換 HPLC クロマトグラム

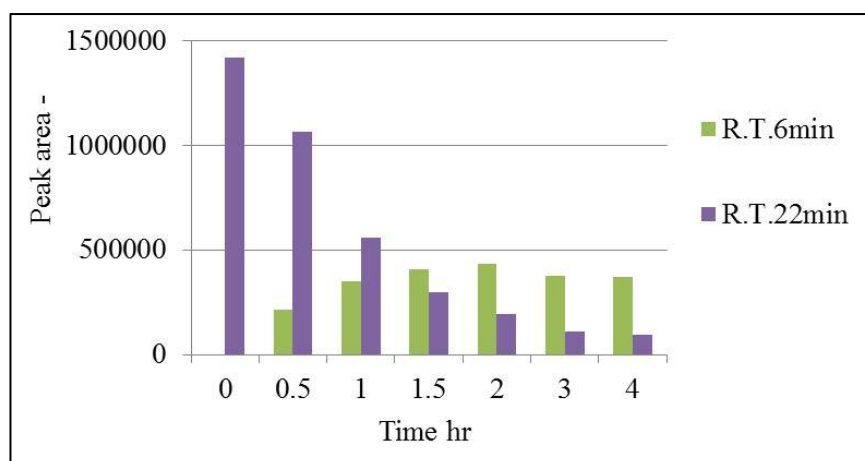


Fig. III-1.7. glucose×L-alanine 反応における各ピーク面積の経時変化

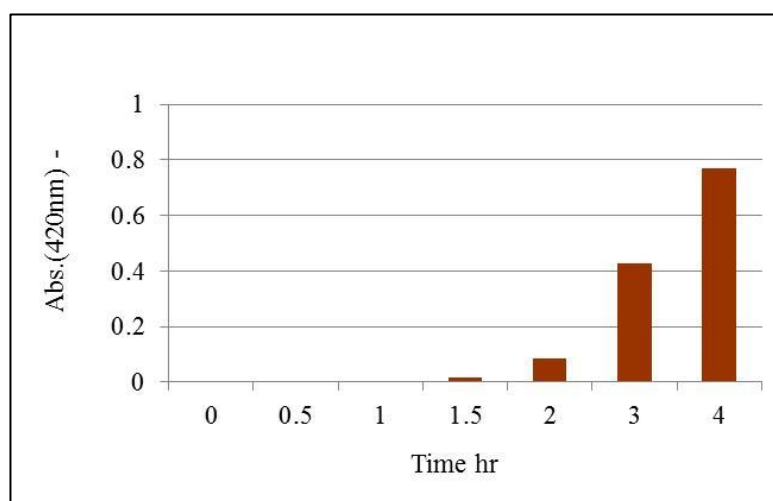


Fig. III-1.8. glucose×L-alanine 反応における着色度の経時変化

L-aspartic acid についても同様に、加熱温度 100°C、加熱時間 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 分間の反応液を調製し、最適な加熱時間を検討した。陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC にて **Fig. III-1.9.**に示すように、R.T.3 min、R.T.15 min にピークが確認でき(図は 20 分間反応液の結果)、R.T.3 min のピークがアマドリ化合物のピークであると考えられた(標品を用いて、R.T.15 min のピークは未反応の L-aspartic acid であることを確認)。各ピーク面積(**Fig. III-1.10.**)および褐色度(**Fig. III-1.11.**)の経時変化より、反応 40 分において、R.T.3 min のピークが最大であり、また褐色度も低いことから、アマドリ化合物の生成条件を「100°C、40 分間加熱」と決定した。

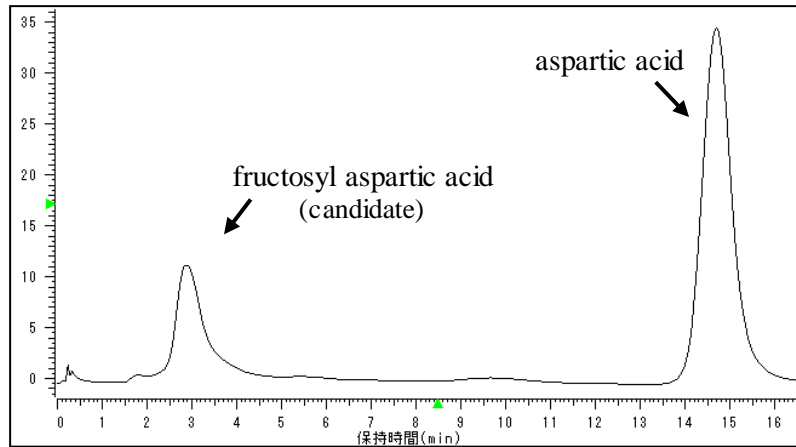


Fig. III-1.9. glucose × L-aspartic acid 反応 (20 分間) の陽イオン交換 HPLC クロマトグラム

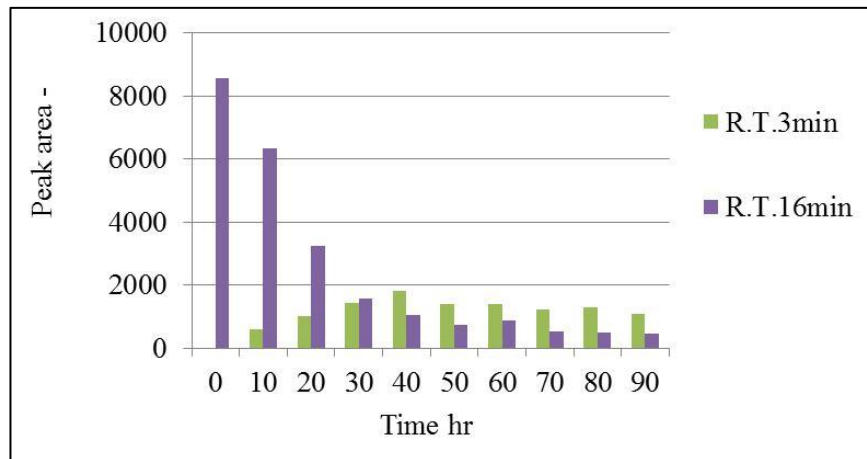


Fig. III-1.10. glucose × L-aspartic acid 反応における各ピーク面積の経時変化

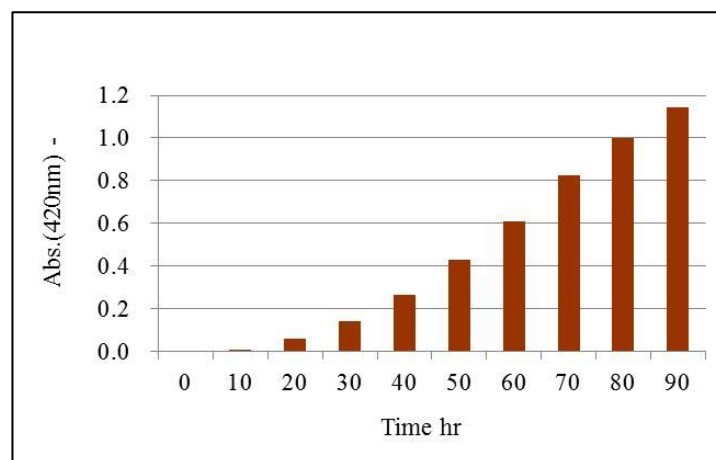


Fig. III-1.11. glucose × L-aspartic acid 反応における着色度の経時変化

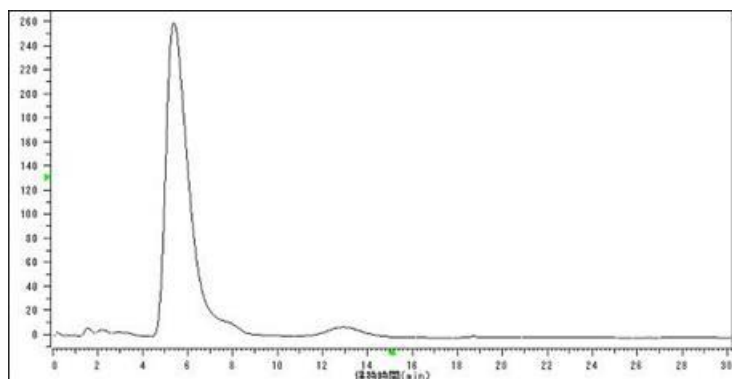


**(b) 反応液の分画および精製**

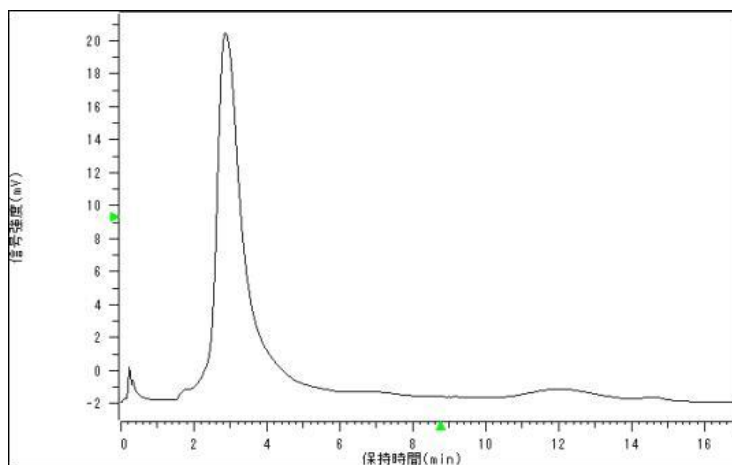
L-alanine および L-aspartic acid について、それぞれの最適時間加熱した反応液を用いて陽イオン交換樹脂にて分画し、アマドリ化合物と推測されたピークのみが検出された画分を集め、再結晶化処理および凍結乾燥処理を行った。それぞれの凍結乾燥物の陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC のクロマトグラムを示す (Fig. III-1.12、Fig. III-1.13.)。

L-alanine 反応系凍結乾燥物は、陽イオン交換 HPLC において R.T.6 min のピークだけを持つ精製物を取得した (未反応の L-alanine (R.T.22 min) を含まないことを確認)。

L-aspartic acid 反応系凍結乾燥物は、陽イオン交換 HPLC において R.T.3 min のピークだけを持つ精製物を取得した (未反応の L-aspartic acid (R.T.15 min) を含まないことを確認)。



**Fig. III-1.12. glucose × L-alanine 反応系精製物の陽イオン交換 HPLC クロマトグラム**



**Fig. III-1.13. glucose × L-aspartic acid 反応系精製物の陽イオン交換 HPLC クロマトグラム**

### (c) LC-ESI-Q-TOF-MS によるスペクトルの確認

凍結乾燥で得られた各精製物を LC-ESI-Q-TOF-MS に供し、目的物であるかどうかを確認した。L-alanine 反応系の精製物の TIC クロマトグラフおよび MS スペクトル (R.T. 2.4min) の結果を Fig. III-1.14. および Fig. III-1.15. に、L-aspartic acid の反応系の精製物の TIC クロマトグラフおよび MS スペクトルの結果 (R.T. 2.6min) を Fig. III-1.16. および Fig. III-1.17. に示す。

L-alanine 反応系で得られた精製物のピークにおける MS スペクトルは、 $m/z$  252.1 および  $m/z$  234.1 を示し、これは fructosylL-alanine の  $[M+H]^+$  および  $[M+H-H_2O]^+$  の既往文献<sup>18~20)</sup> の値と同一であることから、目的物であることが確認された。

また L-aspartic acid 反応系で得られた精製物のピークにおける MS スペクトルは、 $m/z$  296.1、 $m/z$  278.1 および  $m/z$  318.1 を示し、これは fructosylL-aspartic acid の  $[M+H]^+$ 、 $[M+H-H_2O]^+$  および  $[M+Na]^+$  の既往文献<sup>18~20)</sup> の値と同一であることから、目的物であることが確認された。

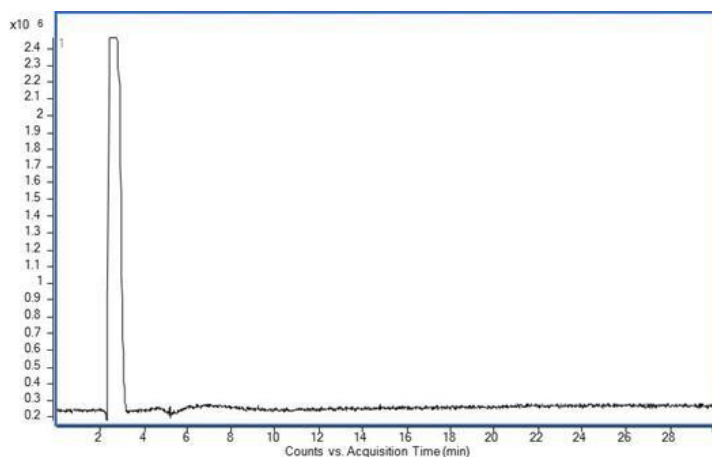


Fig. III-1.14. glucose × L-alanine 反応系精製物の LCMS クロマトグラム (TIC)

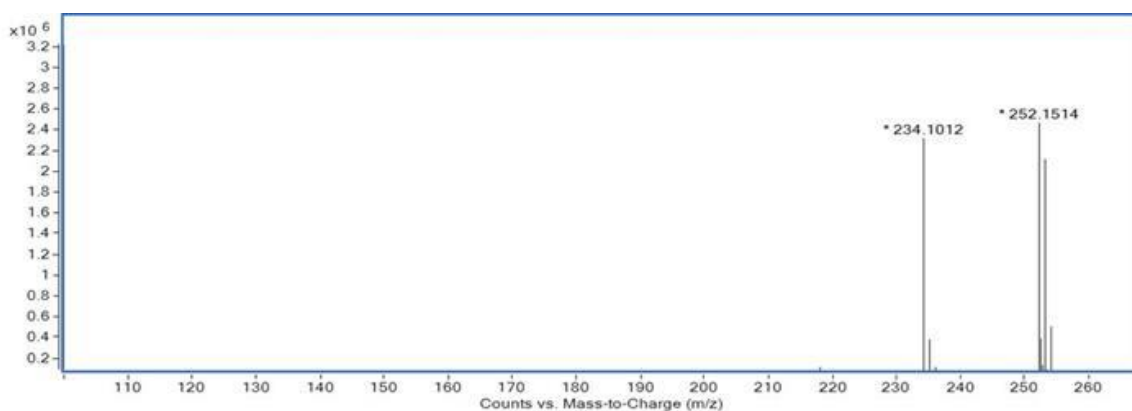
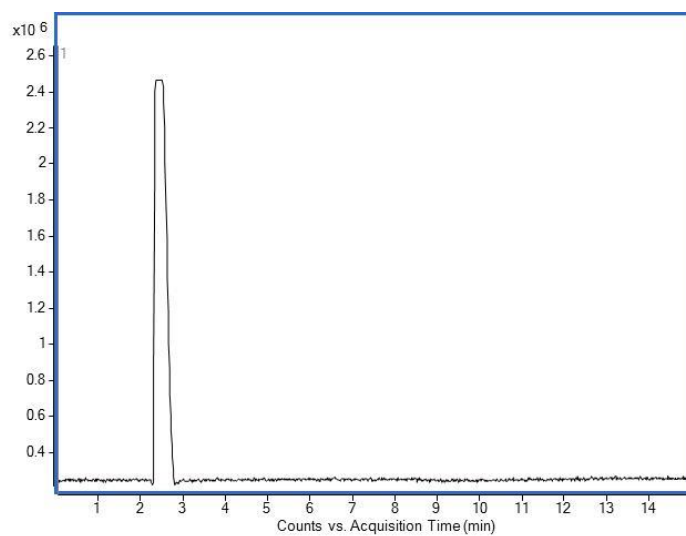
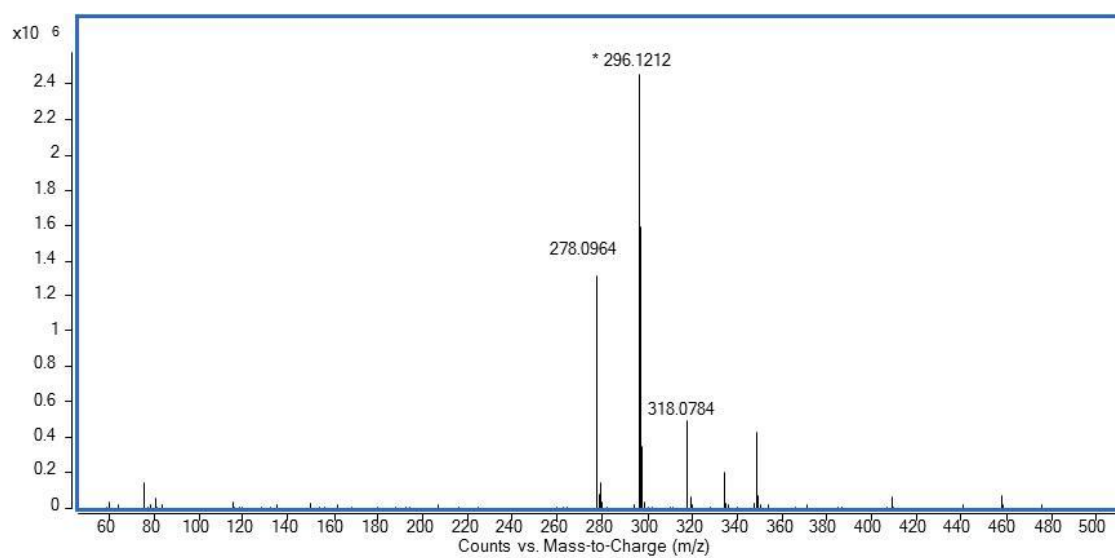


Fig. III-1.15. glucose × L-alanine 反応系精製物の MS スペクトル (R.T.2.5 min)



**Fig. III-1.16. glucose × L-aspartic acid 反応系精製物の LCMS クロマトグラム (TIC)**



**Fig. III-1.17. glucose × L-aspartic acid 反応系精製物の MS スペクトル (R.T.2.4 min)**

**(d) 陽イオン交換 HPLC による fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid の定量**

各本みりんに含まれる fructosyl alanine (表中は Fru-Ala と表記) および fructosyl aspartic acid (表中は Fru-Asp と表記) の含有量について、陽イオン交換-ninhydrin 発色 HPLC にて定量分析を行った。標品には前項で取得した合成品を用い、外部標準法にて定量を行った。

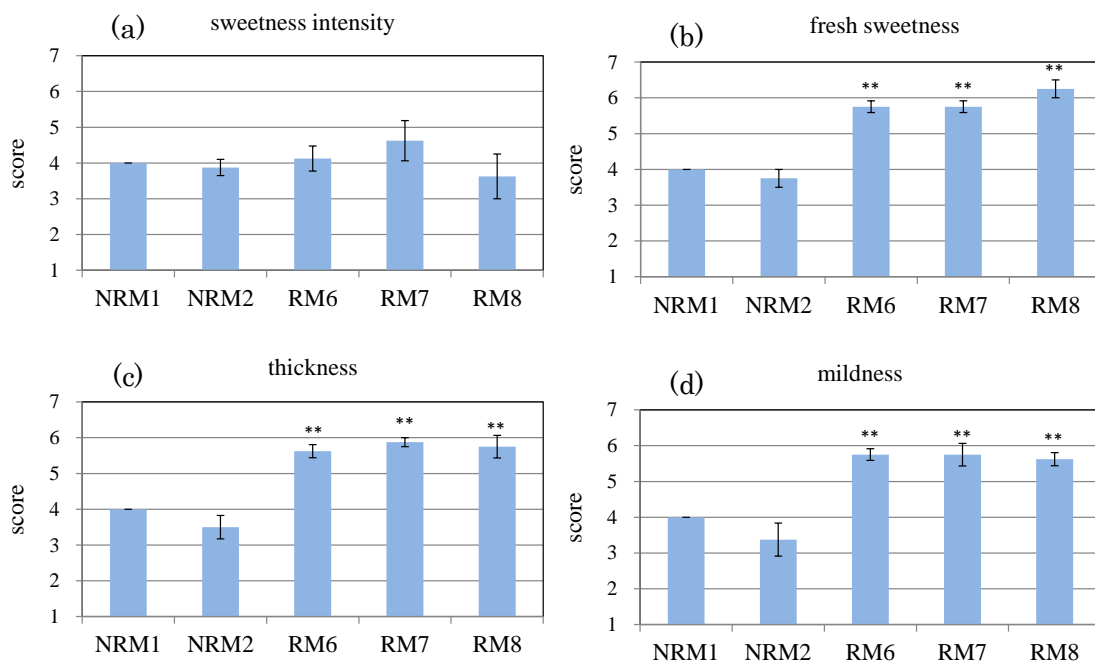
その結果、NRM2 の fructosyl aspartic acid を除き、全ての本みりんでは fructosyl alanine、fructosyl aspartic acid が検出され (Table III-1.5)、また熟成本みりん (RM1-RM8) は、未熟成本みりん (NRM1-NRM3) よりも両アマドリ化合物ともに含有量が高いことが確認された。また熟成本みりんの中では熟成年数が長いほど含有量が高い傾向が見られるが、RM5 は同じ熟成年数である RM3、RM4 と比べて fructosyl alanine 含有量、fructosyl aspartic acid 含有量が低い。Table III-1.2 で示したように、RM5 は RM3、RM4 と比べて着色度も低く、同じ熟成年数でも製品により、メイラード反応の進行の程度に差があることが示唆された。

**Table III-1.5 各本みりんの fructosyl alanine 含有量、fructosyl aspartic acid 含有量**

	NRM1	NRM2	NRM3	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RM6	RM7	RM8
Fru-Ala (mM)	0.08	0.01	0.10	0.84	0.82	1.59	1.02	0.55	1.21	1.26	2.43
Fru-Asp (mM)	0.01	n.d.	0.02	0.06	0.17	0.13	0.20	0.10	0.24	0.37	0.72

## 2.2. 熟成本みりんの風味特性

未熟成本みりんと熟成本みりんの風味の違いについて、第1次評価により決定した4つの評価項目(「甘味の強さ[sweetness intensity]」「甘味の質(すっきりさ)[fresh sweetness]」「厚み[thickness]」「まろやかさ(カドのなさ)[mildness]」)について、7段階評価尺度法で評価を行った。未熟成本みりんの間では大きな違いは見られなかったが、熟成本みりんは未熟成本みりんと比較して、共通して甘味がすっきりしており、濃厚で、カドが弱いとの評価結果が得られた。一方で、甘味強度には差は見られなかった(**Fig. III-1.18.**)。



\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. III-1.18.** 長期熟成本みりんの風味特性評価(7段階評価尺度法、 $n=8$ )

((a) 甘味強度、(b) 甘味の質(すっきりさ)、(c) 厚み、(d) まろやかさ)

### 2.3. D-アミノ酸およびメイラード反応生成物の風味への寄与

前項で確認された長期熟成本みりんの風味特性に、D-アミノ酸およびメイラード反応生成物(アマドリ化合物、メラノイジン)が寄与しているかどうかを評価するため、未熟成本みりん(RM1)に7年熟成した本みりん(RM6)と同様になるように、D-アミノ酸(表中、DAAと表記)、アマドリ化合物(表中、ARPsと表記)、モデルメラノイジン(表中、MELと表記)をTable III-1.1に示す量でそれぞれ添加し、前項と同じ評価方法で官能評価を実施した。

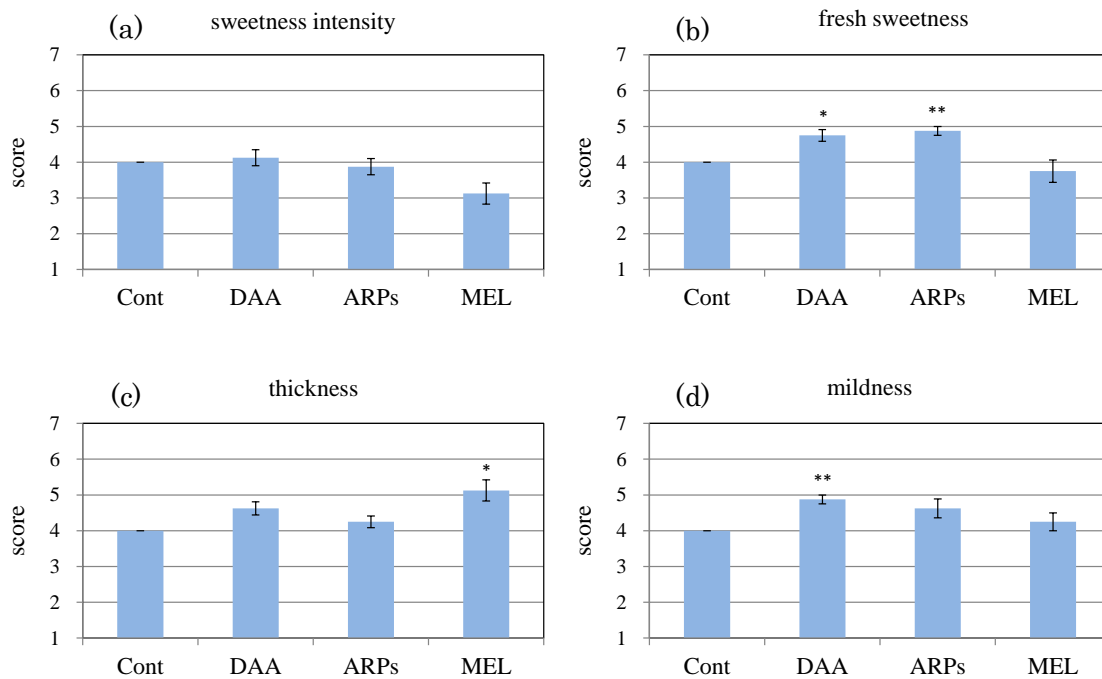
その結果、D-アミノ酸は「甘味の質(すっきりさ)」と「まろやかさ」に、アマドリ化合物は「甘味の質(すっきりさ)」に、メラノイジンは「厚み」に寄与していることが示唆された(Fig. III-1.19)。また有意差は見られなかったが、メラノイジンは甘味強度を抑制する傾向が見られた。

Okadaらは、清酒において141種類の製品の利き酒師の官能評価結果と各D-アミノ酸含有量の主成分分析から、D-Ala(100 μM)、D-Asp(34 μM)、D-Glu(34 μM)以上のD-アミノ酸が清酒の「strong taste」に寄与していることを報告している<sup>5)</sup>。今回調製したD-アミノ酸添加区は、それぞれの濃度がD-Ala(180 μM)、D-Asp(91 μM)、D-Glu(29 μM)であり、D-Glu以外は清酒で効果が確認された濃度より高い濃度である。しかしながら、本みりんは清酒と違いglucose濃度が非常に高く、甘味が中心の酒類であることから、清酒とはベースの味が大きく異なり、評価する視点も評価用語も異なる。そのため両者間の効果の比較は難しいが、本みりんにおいてもD-アミノ酸は風味に寄与しており、質の変化(「甘味の質(すっきりさ)」と「まろやかさ」)に寄与しているものと推測された。

アマドリ化合物においては、Shigaらが25種類の醤油についてメタボローム解析を行い、うま味の評価結果との主成分分析の結果からfructosyl glutamic acidがうま味に寄与しており、5mMにおいてglutamic acidよりもfructosyl glutamic acidのほうが、うま味が強いことを報告している<sup>17)</sup>。また、Kanekoらは、醤油のうま味にアマドリ化合物であるfructosyl pyroglutamic acid、fructosyl valine、fructosyl methionineとジペプチドであるpyroglutamylglutamine、pyroglutamylglycineが寄与しており、醤油中ではそれぞれが閾値以下であるが、その混合物はうま味に寄与することを報告している(fructosyl pyroglutamic acid(閾値2.6mM、評価時含有量0.3mM)、fructosyl valine(1.8mM、0.3mM)、fructosyl methionine(1.6mM、0.2mM)、pyroglutamylglutamine(1.9mM、0.3mM)、pyroglutamylglycine(2.2mM、0.05mM))<sup>19)</sup>。今回の本みりんの評価では、既に風味修飾効果が報告されているアマドリ化合物とは異なる化合物であるfructosyl alanineおよびfructosyl aspartic acidが「甘味の質(すっきりさ)」と「まろやかさ」に影響を与えるとの結果が得られた。

本みりん中のメラノイジンについては、アミノ酸の消失速度の速さと本みりん中の含有量から

L-glutamic acidと glucose からなるメラノイジンが主であると考え、それらからなるモデルメラノイジンを調製し、本みりに添加した。その結果、第 2 章で豆味噌で得られた結果と同様、メラノイジンは「厚み」に寄与することが示唆され、豆味噌と本みりんという異なる食品でありながら、共通の効果を発現することが確認された。



\* significantly different at  $p < 0.05$

\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. III-1.19.** 各成分を添加した未熟成本みりんの風味特性評価(7段階評価尺度法、n=8)

((a) 甘味強度、(b) 甘味の質(すっきりさ)、(c) 厚み、(d) まろやかさ)

## 第 2 節 本みりんの熟成における D-アミノ酸生成機構

### 1. 実験材料および方法

#### 1.1. 試料・試薬

分析用の本みりん試料および試薬には、第 1 節と同じものを用いた。また、加熱試験には、市場から購入した副原料に液糖を用いていない本みりん(NRMT)を使用した。

<NRMT の Asp および Ala の分析値>

L-Asp:640  $\mu$ M、D-Asp:39  $\mu$ M(%D(Asp):5.8%)。

L-Ala:800  $\mu$ M、D-Ala:40  $\mu$ M(%D(Ala):4.8%)。

#### 1.2. fructosyl amino acid 分析

本みりんの熟成において、各アミノ酸がアマドリ化合物経由のラセミ化を生じているか検証するため、熟成本みりん中の各アミノ酸のアマドリ化合物含有量を算出した。測定するアマドリ化合物は、D-アミノ酸が検出された 9 種のアミノ酸(Ala、Asp、Glu、Ile、Leu、Phe、Ser、Tyr、Val)のアマドリ化合物とした。分析方法には、Ishizaki ら<sup>3)</sup>、Troise ら<sup>18)</sup>のアマドリ化合物分析法を参考に、イオンペア試薬を用いた LC-ESI-Q-TOF-MS による分析を選択した。分析には 10 倍量の RO 水で希釈し、0.45  $\mu$ m フィルターでろ過した試料を供した。

それぞれのアマドリ化合物の標品は Penndorf らの方法に準じて次のように得た<sup>20)</sup>。0.2 mmol の各アミノ酸(L-Ala、L-Asp、L-Glu、L-Ile、L-Leu、L-Phe、L-Ser、L-Tyr、L-Val)について、1.2 mmol の D-glucose とともに 8.4 ml の methanol に加え、90°C にて 9 時間還流し、エバポレーターにて乾固後、2 ml の RO 水に溶解して 0.45  $\mu$ m フィルターで濾過した試料を未反応のアミノ酸を含むアマドリ化合物標準品として取得した。これらの試料を LC-ESI-Q-TOF-MS にて分析し、Troise らの報告している m/z 値<sup>18)</sup>をもとに、各アマドリ化合物の m/z 値および retention time を決定した。本みりんについては、決定した m/z 値を用いて EIC mode で各アマドリ化合物の面積を取得し、NRM1 に対する面積比として算出した。各分析は 2 回実施し、平均値を算出した。LC-ESI-Q-TOF-MS の測定条件は以下の通り。

次に、各アミノ酸がアマドリ化合物経由のラセミ化を生じているか検証するため、全ての熟成本みりん D-アミノ酸が検出された各アミノ酸(Ala、Asp、Glu、Leu、Phe、Ser)について、8 種の熟成本みりんのアマドリ化合物含有量と D 体存在比(%D)の相関性をピアソンの相関係数の検定にて有意差検定を行った。統計解析には統計解析ソフト SPSS 7.5.1J(SPSS 社)を用いた。



## 【LC-ESI-Q-TOF-MS 条件】

(LC 部 測定条件)

LC system	: Agilent Technologies, Inc. 1200series
UV-Detector	: G 1315 C DAD SL
Binary Pump	: G 1312 B
Column oven	: G 1316 B TCC SL
Auto sampler	: G 1367 D HiP ALS SL (Agilent Technologies)
Column Temperature	: 40°C
Column	: ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Inc. 3.0×100 mm, 1.8 μm)
Eluent	: A) 5mM Pentafluoropropionic acid : B) 100% Acetonitrile
Flow rate	: 0.2 ml/min
Gradient	: B 0% → B 20% (0-30 min)
Injection	: 2 μl

(MS 部 測定条件)

MS system	: G 6520 A Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system (Agilent Technologies, Inc.)
Ion Source Type	: Dual ESI (positive)
Acquisition mass range	: 25-500
Gas Temperature	: 325°C
Drying Gas	: N <sub>2</sub> (10 L / min)
Nebulizer	: N <sub>2</sub> (40 psi)
Fragmentor	: 100 V
Capillary voltage	: 4000 V

その他パラメーターは初期設定値で行った。

### 1.3. 加熱試験

本みりんの熟成工程は本来常温で数年かけておこなわれるが、今回はメイラード反応のラセミ化への関与を明らかにすることを目的に、60°Cでの加熱試験を行った。加熱試験には合成した各アミノ化合物(fructosyl L-aspartic acid, fructosyl L-alanine)を用い、また未熟成みりんには熟成本みりんと同様、副原料に液糖を用いていない本みりん(NRMT)を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過したしたものを用いた。試験は以下の3種類の加熱試験を実施し、加熱後の各サンプルについて、OPA/IBLCの誘導体化によるL、D-アミノ酸分析を実施し、%Dを算出した。各加熱試験は2回ずつ実施した。

#### •Experiment 1

NRMTにFru-L-AspおよびL-Aspを2.5mMになるように添加した溶液900  $\mu\text{l}$ を、1ml容ガラスバイアルに分注し、PTFEの内蓋をしてアルミキャップで密閉した状態にて、乾熱式オープンにて8、16、24日間60°Cで加熱した。

#### •Experiment 2

NRMTにFru-L-Alaを2.5mMになるように添加した溶液900  $\mu\text{l}$ を、1ml容ガラスバイアルに分注し、PTFEの内蓋をしてアルミキャップで密閉した状態にて、乾熱式オープンにて24日間60°Cで加熱した。

#### •Experiment 3

各1M sodium acetate buffer(pH4.0, pH5.6)にFru-L-Aspを2.5mMになるように添加した溶液900  $\mu\text{l}$ を、1ml容ガラスバイアルに分注し、PTFEの内蓋をしてアルミキャップで密閉した状態にて、乾熱式オープンにて24日間60°Cで加熱した。統計解析には統計解析ソフトSPSS 7.5.1J(SPSS社)を用い、Dunnett検定にて有意差検定を行った。

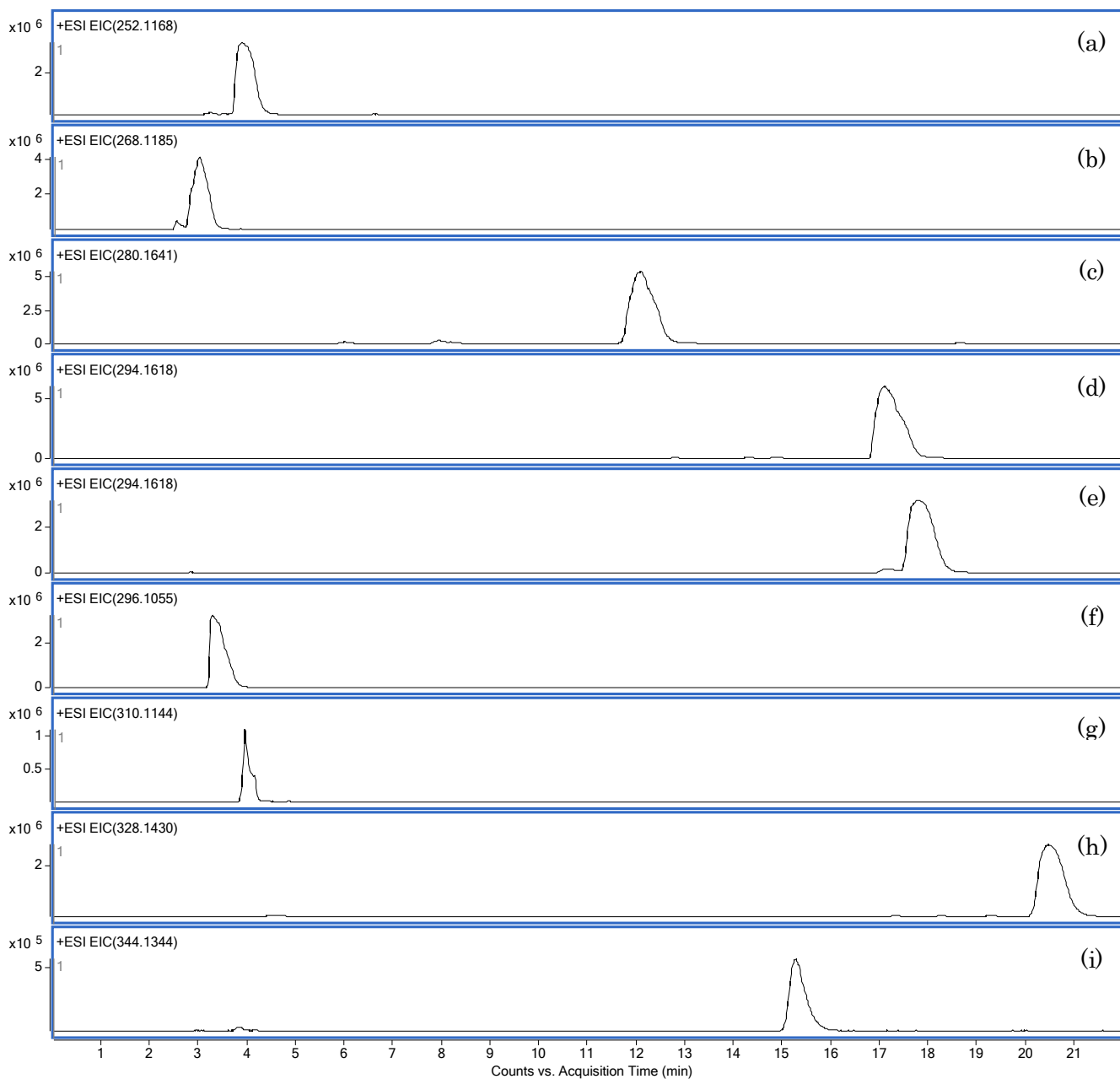
## 2. 結果および考察

### 2.1. fructosyl amino acid 含有量と D 体存在比の相関性

#### (a) fructosyl amino acid 含有量の測定

調製した各アマドリ化合物を含む標準品について、LC-ESI-Q-TOF-MS 測定で得られた各イオンクロマトグラムを **Fig. III-2.1.**に、MS スペクトルを **Fig. III-2.2.**示す。この結果より、各アマドリ化合物の  $m/z$  値 ( $[M+H]^+$ ) は、それぞれ 252.1168 (Fru-Ala)、296.1055 (Fru-Asp)、310.1144 (Fru-Glu)、294.1618 (Fru-Ile)、294.1618 (Fru-Leu)、328.1430 (Fru-Phe)、268.1185 (Fru-Ser)、344.1344 (Fru-Tyr)、280.1641 (Fru-Val) と決定した。

各本みりんについても、同様に分析を行い、決定した各アマドリ化合物の  $m/z$  値を用いて、イオンクロマトグラムのピーク面積を算出し (NRM1 のクロマトグラムを **Fig. III-2.3.**に示す)、NRM1 に対するピーク面積比から各アマドリ化合物の相対含有量値を算出した。Fru-Ile と Fru-Leu は同じ  $m/z$  値であるため、リテンションタイムから識別した。



**Fig. III-2.1** 調製した各標準品のイオンクロマトグラム

((a) Fru-Ala、(b) Fru-Ser、(c) Fru-Val、(d) Fru-Ile、(e) Fru-Leu、(f) Fru-Asp  
(g) Fru-Glu、(h) Fru-Phe、(i) Fru-Tyr)

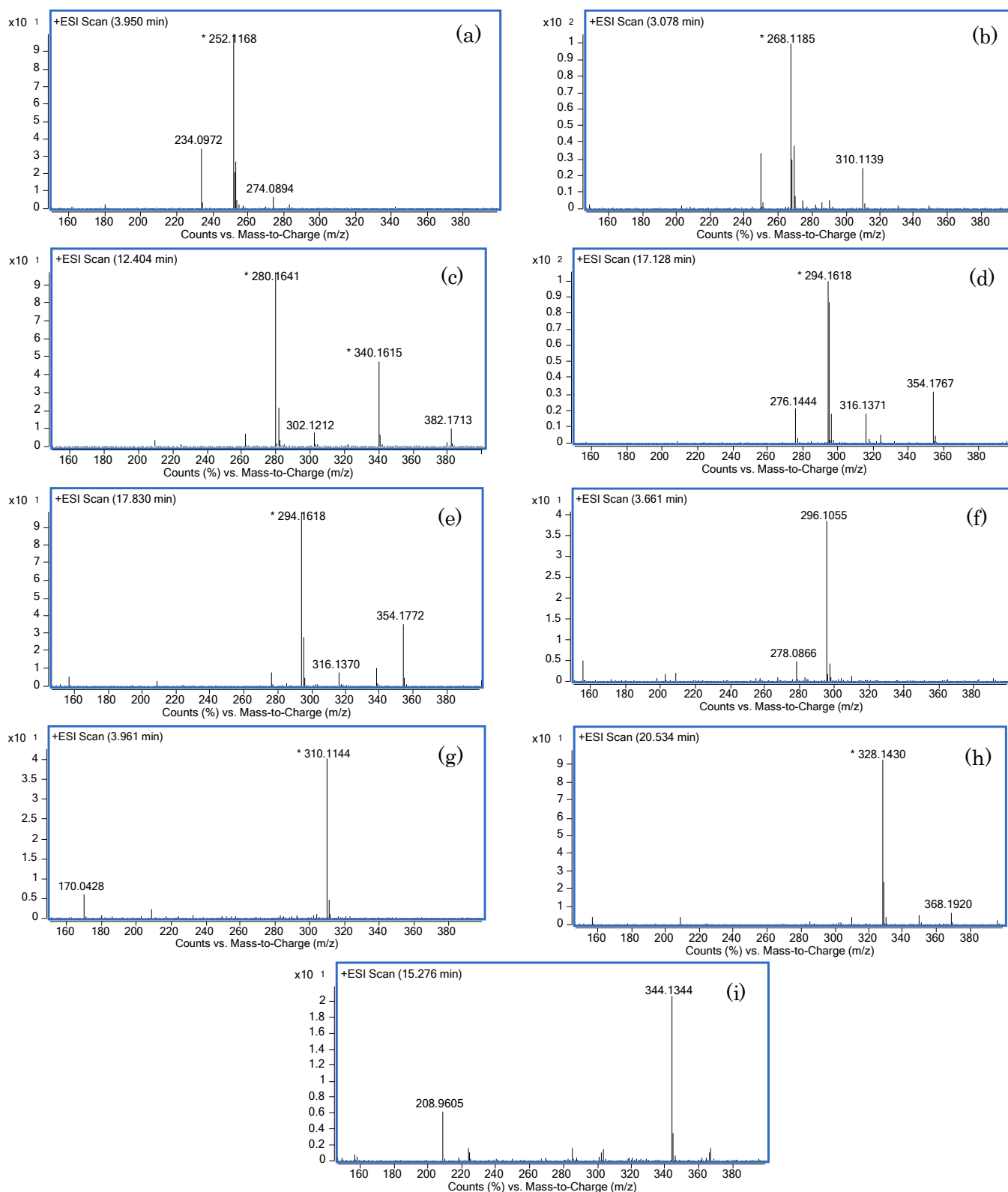
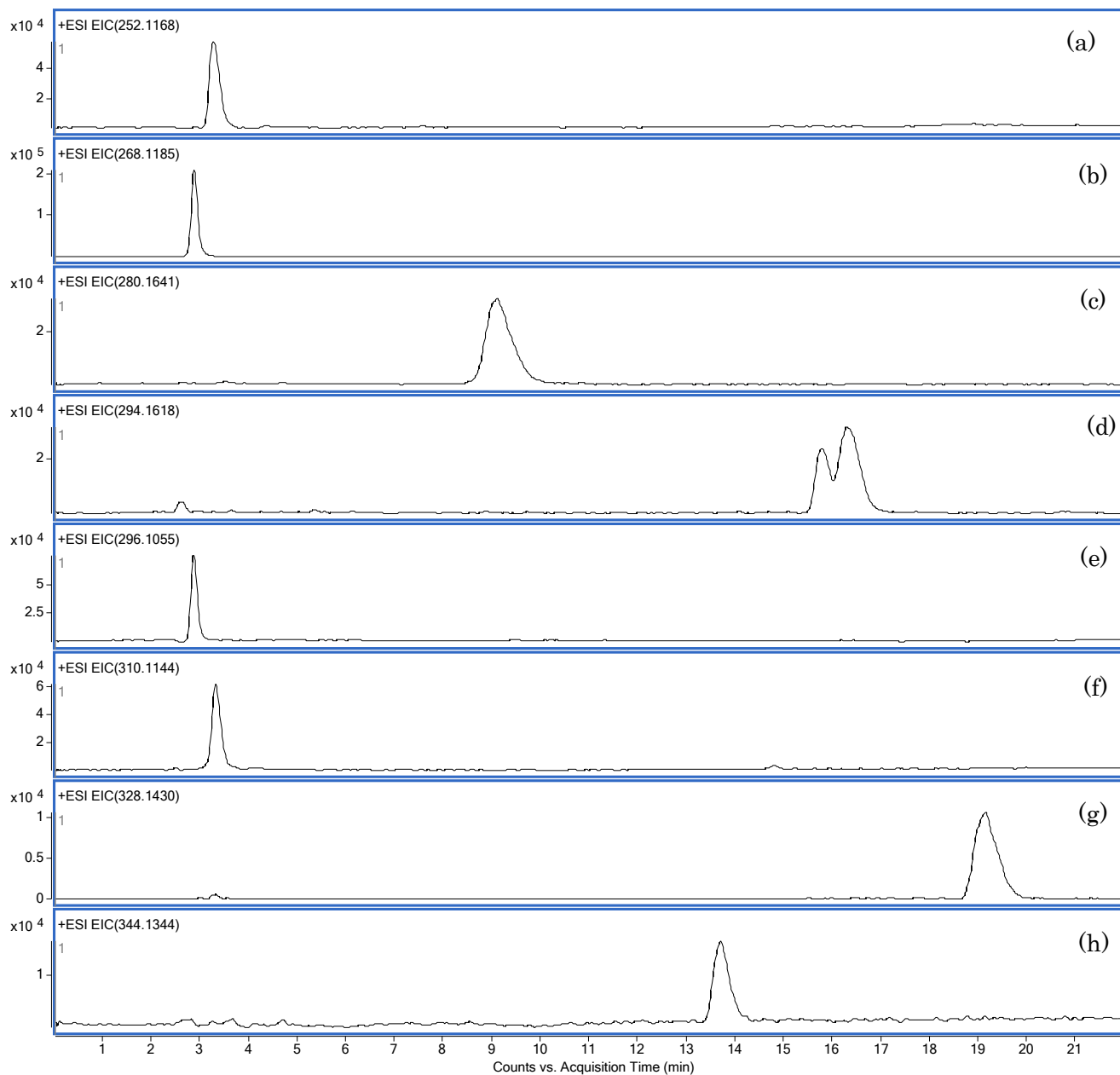


Fig. III-2.2 調製した各標準品の MS スペクトル ((a) Fru-Ala、(b) Fru-Ser、(c) Fru-Val、(d) Fru-Ile、(e) Fru-Leu、(f) Fru-Asp、(g) Fru-Glu、(h) Fru-Phe、(i) Fru-Tyr)



**Fig. III-2.3 NRM1 のイオンクロマトグラム**  
 ( $m/z =$  (a) 252.1168 (Fru-Ala)、(b) 268.1185 (Fru-Ser)、(c) 280.1641 (Fru-Val)、  
 (d) 294.1618 (Fru-Ile、Fru-Leu)、(e) 296.1055 (Fru-Asp)、  
 (f) 310.1144 (Fru-Glu)、(g) 328.1430 (Fru-Phe)、(h) 344.1344 (Fru-Tyr))

次に、本測定法における算出値の精度を確認するため、Fru-Ala および Fru-Asp について、各本みりんの本測定法による算出値と陽イオン交換-ニンヒドリン発色 HPLC で得られた値との相関を確認した (Fig. III-2.4)。その結果、Fru-Ala、Fru-Asp ともに高い相関が見られ、本測定法は本みりんにおいて適用可能と判断した。

続いて、他の各アマドリ化合物についても同様に分析を実施した (Table III-2.1)。測定した9種のアマドリ化合物は全ての本みりんから検出され、Fru-Glu を除く8種のアマドリ化合物は、全ての熟成本みりんが未熟成本みりん (NRM1) よりも多く含んでいることが示唆された (Fru-Ala (2.0–6.5)、Fru-Asp (2.0–8.8)、Fru-Ile (3.2–12.2)、Fru-Leu (3.4–12.6)、Fru-Phe (2.2–5.7)、Fru-Ser (2.4–4.7)、Fru-Tyr (5.7–14.3)、Fru-Val (2.7–7.9))。一方で、Fru-Glu は RM3 を除き、全ての熟成本みりんが NRM1 の含有量を下回った。これは第1節の L-Glu 測定結果の考察と同様、Glu は pyroglutamic acid や melanoidin への変換が早いと推測される。

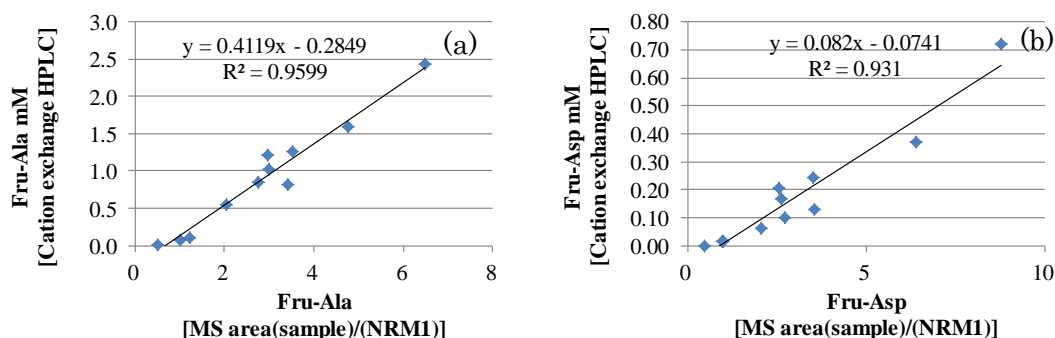


Fig. III-2.4 LCMS 測定値と陽イオン交換 HPLC 測定値の相関  
((a) (Fru-Ala)、(b) (Fru-Asp))

Table III-2.1 各本みりんのアマドリ化合物の相対含有量

	NRM1	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RM6	RM7	RM8
Fru-Ala	1.0	2.7	3.4	4.8	3.0	2.0	3.0	3.5	6.5
Fru-Asp	1.0	2.0	2.6	3.5	2.6	2.7	3.5	6.4	8.8
Fru-Glu	1.0	0.7	0.9	1.2	0.4	0.4	0.2	0.2	0.3
Fru-Ile	1.0	5.0	6.7	7.8	5.3	3.2	5.7	6.6	12.2
Fru-Leu	1.0	5.3	7.7	9.3	6.7	3.4	7.0	6.7	12.6
Fru-Phe	1.0	2.2	2.6	3.8	3.7	2.9	5.0	4.8	5.7
Fru-Ser	1.0	2.4	3.3	4.7	3.4	3.4	3.0	3.5	3.0
Fru-Tyr	1.0	14.3	10.3	14.0	9.5	5.7	8.7	9.1	11.1
Fru-Val	1.0	4.3	4.8	7.2	4.8	2.7	4.8	4.9	7.9

\* Relative peak area of each compound when the value of the NRM1 is regarded as 1

### (b) ピアソンの相関係数の検定

各アミノ酸がアマドリ化合物経由のラセミ化を生じているか検証するため、測定で得られた8種の熟成本みりんのアマドリ化合物含有量とD体存在比(%D)について、アミノ酸(Ala、Asp、Glu、Leu、Phe、Ser)毎にピアソンの相関係数の検定にて有意差検定を行った(Table III-2.2)。その結果、Aspは高い相関係数( $r=0.84$ )が得られた。一方で、熟成本みりん中のD-アミノ酸含有量は高い傾向であったSerとAlaについては、相関係数が低く、相関性が見られなかった( $r=-0.10$ (Ser)、 $0.15$ (Ala))。またLeuとPheについては、有意な相関が確認された。

Table III-2.2 熟成本みりんにおけるアマドリ化合物含有量と%Dの相関係数

Amino acid	<i>r</i>	<i>P</i>
Ala	0.15	
Asp	0.84	**
Glu	-0.52	
Leu	0.75	*
Phe	0.74	*
Ser	-0.10	

\*significant correlation  $P < 0.05$ ; \*\*significant correlation  $P < 0.01$   
(Pearson's correlation coefficient test; n=8)



## 2.2. 加熱試験

本みりんの熟成工程におけるメイラード反応の進行の際に、アミノ酸化合物経由のラセミ化が生じているかを検証するため、前項よりアミノ酸含有量と D 体存在比(%D)の相関性が高いアミノ酸として Asp を、低いアミノ酸として Ala に着目し、合成した Fru-L-Asp および Fru-L-Ala をそれぞれ添加した未熟成本みりん(NRMT)の加熱試験(60°C)を行った。

その結果、Fru-L-Asp 添加区において加熱による L-Asp、D-Asp の増加が確認され(24 日目:2.0 mM(L-Asp)、0.4 mM(D-Asp))、%D も増加した(Fig. III-2.5.(a)、0 日目:5.8%、24 日目:10.6%)。一方で比較のために実施した L-Asp 添加区では、D-Asp の増加は確認されなかった(Fig. III-2.5.(b))。以上より、本みりんの熟成において、D-Asp はアミノ酸化合物経由で生成している可能性が示唆された(Experiment 1)。一方で、Fru-L-Ala 添加区では、加熱による L-Ala の増加は見られたが、D-Ala の増加は見られなかった(Experiment 2)。

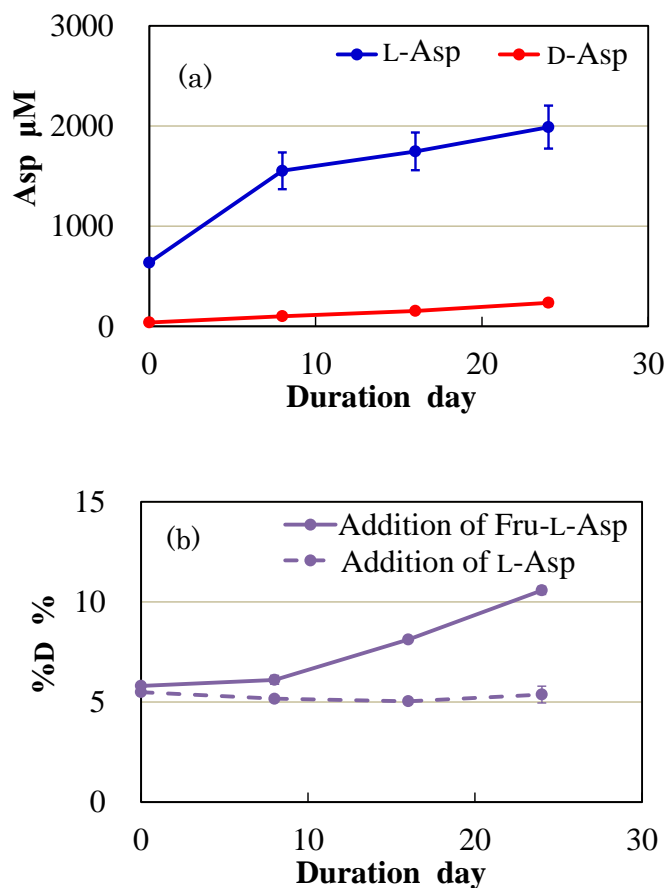
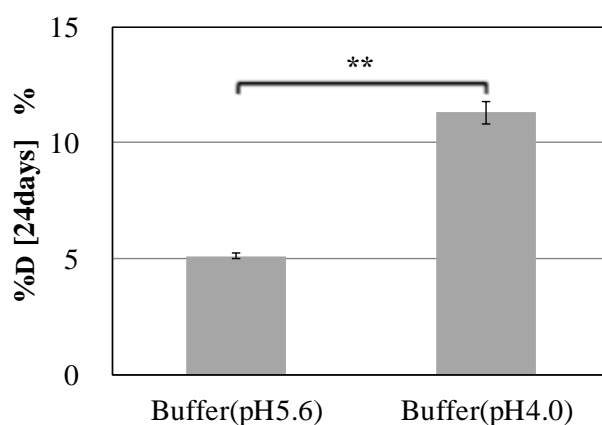


Fig. III-2.5 Fru-L-Asp および L-Asp を添加した未熟成本みりんの加熱試験における経時変化 ((a) (L、D-Asp 含有量)、(b) (%D))

また **Table III-1.2** に示したように、本みりんは熟成年数が長いほど pH が低くなる傾向が見られる。今回、Fru-L-Asp を添加した NRMT の加熱試験においても加熱による pH の低下が確認された (0 日目: pH 5.1、24 日目: pH 3.9)。そこで、溶媒の pH がアマドリ化合物経由のラセミ化に与える影響を確認するため、pH 4.0 および pH 5.6 の酢酸ナトリウム緩衝液にて同様の加熱試験を実施した。その結果、pH 5.6 よりも pH 4.0 のほうがラセミ化率が高くなることが確認された (**Fig. III-2.6**)。このことから、本みりんの熟成において pH が Fru-Asp 経由のラセミ化率に影響を与えている可能性が示唆された。

以上より、アマドリ化合物含有量と %D との相関性および加熱試験により、本みりんの熟成中に Asp がアマドリ化合物経由でラセミ化している可能性が示唆された。



\*\* significantly different at  $p < 0.01$

**Fig. III-2.6. Fru-L-Asp を添加した各緩衝液の加熱試験後の %D (24 日目)**

Brückner らの glucose と L-アミノ酸のモデル反応試験 (pH7、100°C、96hr) では、12 種類のアミノ酸のうち glucose の存在によりラセミ化が最も強く促進されるアミノ酸として L-Asp が報告されている (glucose 無添加時の %D: 3.0、glucose 添加時の %D: 21.2%)<sup>9)</sup>。今回の本みりんにおける結果は、Brückner らのモデル系の結果を支持した結果となった。

Brückner らのモデル反応試験では L-Asp の他に L-Phe、L-Leu、L-Ala も glucose の存在によりラセミ化が促進されることが報告されているが、Asp と比較するとラセミ化率は非常に低い (Asp の約 1/10)<sup>9)</sup>。Brückner らが提唱しているラセミ化機構は、最初にアマドリ化合物のアミノ酸の炭素のプロトンが引き抜かれ、共役系により電子が非局在化することによって安定化した「平面型の carbanion」が生じ、この carbanion に再度両側からプロトンが結合するため、一部にラセミ化が生じるという機構である (**Fig. III-2.7**)。そのため、ラセミ化のなりやすさは、

carbanion 形成時の平面構造のとりやすさに依存し、これはアミノ酸側鎖の立体障害性や電子特性の影響を受けるものと推測されている<sup>89)</sup>。

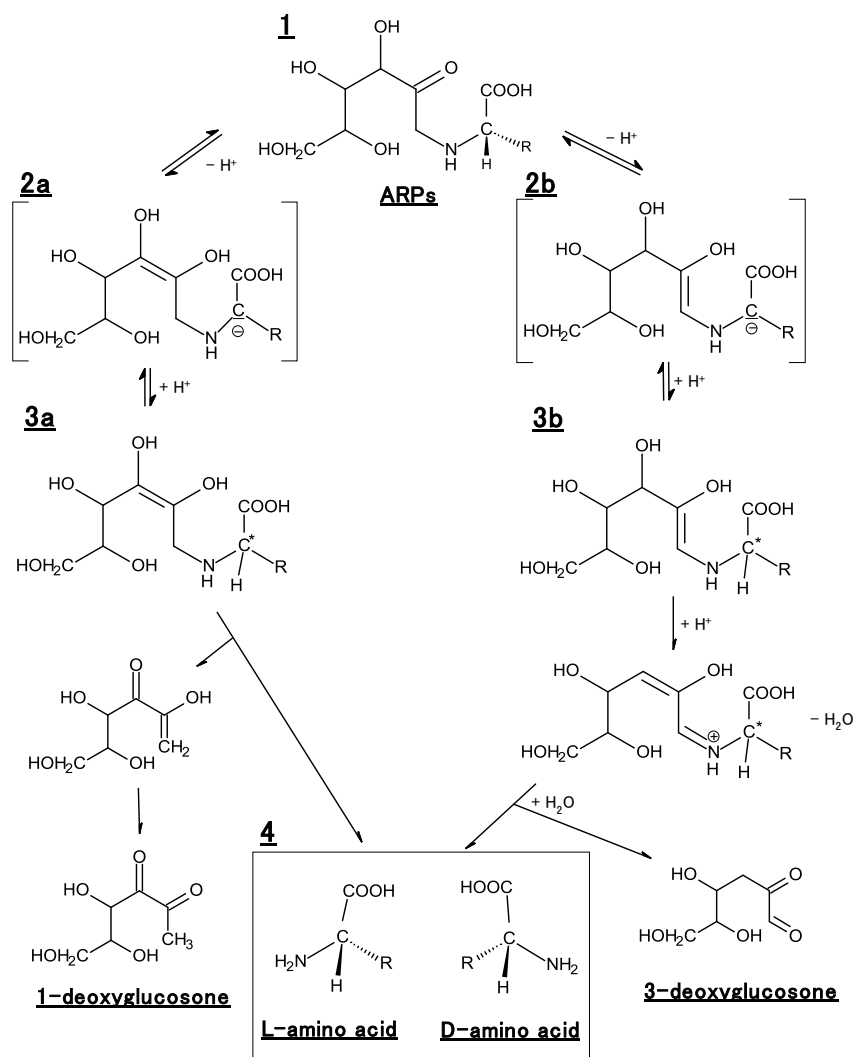
一方で、遊離アミノ酸を用いたモデル試験にて pH によりラセミ化率の変動することは報告されているが<sup>92)</sup>、アマドリ化合物の生成量の違いによる影響なのか、アマドリ化合物からの D-アミノ酸生成率による影響なのかは不明であった。

本研究では合成した Fru-L-Asp を添加した sodium acetate buffer の加熱試験により、pH 4.0 と pH 5.6 では Asp のラセミ化率が異なることが確認された。このことから、本研究により pH が Fru-L-Asp からの D-Asp の生成率に影響を与えることが初めて示された。pH がアマドリ化合物からの D-アミノ酸生成率に影響を与える要因は、アマドリ化合物が酸性であるほど 1,2-enol 体を経由して、中性であるほど 2,3-enol 体を経由して分解されるという特性によるものと考えられる<sup>21,22)</sup>。それぞれの enol 体が carbanion を生成するが、各 carbanion の構造上の違いが D-アミノ酸生成率に影響を及ぼしているのではないかと推測される。そして本みりんにおいては、7 年以上熟成した本みりんにおいて Asp の %D が高くなる傾向が見られたが、これは長期間の熟成により pH が低下したことにより、Fru-L-Asp からの D-Asp の生成率が高くなったためではないかと考えられる。

熟成本みりんのアマドリ化合物含有量と %D (D 体存在比) に高い相関が見られた L-Asp において、アマドリ化合物経由のラセミ化が生じている可能性が示唆された。L-Leu や L-Phe は L-Asp と同様に有意な相関が見られ、また Brückner らのモデル反応試験にて glucose の存在によりラセミ化が促進されることが報告されていることから<sup>9)</sup>、本みりんの熟成において、L-Asp と同様のラセミ化が生じている可能性がある。

一方で、熟成本みりんにおいて D-アミノ酸含有量が高い傾向が見られたにもかかわらず、アマドリ化合物含有量と相関が見られなかったアミノ酸が、Ser と Ala である。これらのアミノ酸にはアマドリ化合物経由(メイラード反応)以外のラセミ化機構が働いているものと推測される。L-Ser は糖の関与なく自身が環化しラセミ化しやすい性質を有していることが知られており、本みりんの熟成においてもこの化学的な反応でラセミ化したものと考えられる<sup>23)</sup>。また Ala は、D 体の存在比率が各本みりん毎に大きく異なり、アマドリ化合物含有量と相関が見られていない。L-Ala を酵素反応によりラセミ化させる働きを持つアラニンラセマーゼは、微生物にもっとも普遍的に存在しているラセマーゼであることから、一部の本みりんの熟成中に生化学的ラセミ化が生じている可能性が考えられる<sup>24)</sup>。

以上より、本みりんの熟成において、Asp はアマドリ化合物経由のラセミ化機構が関与している可能性があることを初めて明らかにした。



R: アミノ酸側鎖

Fig. III-2.7. アマドリ化合物経由の D-アミノ酸生成機構<sup>8)</sup>

((1)アマドリ化合物(ARPs)、(2a) (3a) 2,3-enol 体の carbanion および再プロトン結合、  
(2b) (3b) 1,2-enol 体の carbanion および再プロトン結合、(4) L、D-アミノ酸)

### 第3節 その他熟成食品のD-アミノ酸の含有量および基本味への影響

前節までに、本みりんにおけるD-アミノ酸の含有量、風味修飾効果およびラセミ化機構について述べてきたが、D-アミノ酸は本みりんや前述の清酒以外の発酵食品、熟成食品においてもその存在が報告されている。例えば、エメンタールチーズではD-Ala, D-Gln(Glu) (各 31.5 mg/100g (3.53 mM), 31.9 mg/100g (2.17 mM[Glu 換算]))<sup>25)</sup>、発酵黒豆ではD-Ala, D-Asn (Asp) (各 75.5 mg/100g (8.47 mM), 65.5 mg/100g (4.92 mM[Asp 換算]))が検出され<sup>25)</sup>、25年熟成させたバルサミコ酢においてはD-Proが191.9 mg/l (1.67 mM) 検出されている<sup>26)</sup>。この他、ヨーグルト<sup>25)</sup>、赤ワイン<sup>25,26)</sup>、ビール<sup>25)</sup>、黒酢<sup>27)</sup>においてもD-アミノ酸の存在が報告されており、これらの発酵食品、熟成食品にD-アミノ酸が多い要因は清酒と同様、乳酸菌などの微生物の関与が推測される。

一方で、D-アミノ酸の味質に関しては、Shiffmanらが閾値について、詳しく報告している<sup>28)</sup>。pH 無調整の系において、D-Ser が最も閾値が高く(64.8 mM)、次いでD-Pro (60.4 mM)、D-Thr (33.7 mM)、D-Ile (12.5 mM)、D-Ala (11.2 mM)と続いている。また、Kawaiらは閾値以上の各D-アミノ酸の味質について報告しており、例えば閾値以上の濃度域においてD-Ser、D-Thr、D-Ala は甘味を呈し、D-Pro は甘味と苦味を呈すると報告している<sup>29)</sup>。

このようにD-アミノ酸単独の味質に関する報告はあるが、実際に食品中に存在している濃度のD-アミノ酸が他の味質に与える影響について調べた報告は、前述の清酒の報告<sup>5)</sup>および本研究の本みりんの評価結果(第3章第1節)以外にはない。

そこで第3節では、D-アミノ酸が清酒、本みりん以外の食品の味質に及ぼす影響について考察するため、食品中に存在する濃度においてD-アミノ酸が基本味に与える影響を検証することとした。はじめに、味質修飾効果を確認するための試験濃度を決定するため、身近に用いる調味料であり、D-Ala およびD-Glu の存在が報告されている、醤油<sup>30)</sup>、味噌<sup>30)</sup>およびチーズ<sup>25)</sup>について、市販品に含まれる15種のL、D-アミノ酸の含有量を分析し、その含有量の実態を調べた。次に含有量の測定結果から決定したD-アミノ酸濃度において、D-アミノ酸が各基本味に与える影響について、基本味溶液を用いた官能評価試験により検証した。

## 1. 実験材料および方法

### 1.1. 試料・試薬

醤油、味噌およびチーズは、以下の条件を満たしているものを市場から無作為に 8 種類ずつ選択し、分析試料として用いた。

醤油 : 原材料に脱脂加工大豆、小麦、食塩、アルコールのみを使用している国産濃口醤油

味噌 : 原材料に大豆、米、食塩のみを使用している国産米味噌

チーズ : 原材料に生乳と食塩のみを使用しているオランダ産ゴーダチーズ

試薬は以下の特級試薬を使用した。

(+)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate、amantadine chloride (Sigma-aldrich Co.から購入)、MSG、NaCl、sucrose (以上、関東化学株式会社から購入)、citric acid、caffeine (以上、関東化学株式会社から購入)。その他の分析用試薬は、和光純薬工業株式会社より購入した。

## 1.2. L、D-遊離アミノ酸分析 (FLEC 法)

前節では、*o*-phthalaldehyde (OPA) と *N*-isobutyryl-L-cysteine (IBLC) を用いた誘導体化法にて 12 種類の L、D-アミノ酸の分析を行ったが、本節では長期熟成したバルサミコ酢において含有量が高いことが報告されている D-Pro にも着目することとし<sup>25)</sup>、2 級アミンの D-体アミノ酸分析を可能にする、(+)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate (FLEC) を用いた L、D-アミノ酸分析も実施した。OPA/IBLC 法と同様、FLEC を用いた誘導体化法も L-アミノ酸および D-アミノ酸をそれぞれジアステレオマー化することによりピークの分離を可能とする方法であり、誘導体化されたアミノ酸の検出には分光蛍光光度計を使用した (Fig. III-3.1、Fig. III-3.2.)<sup>31)</sup>。

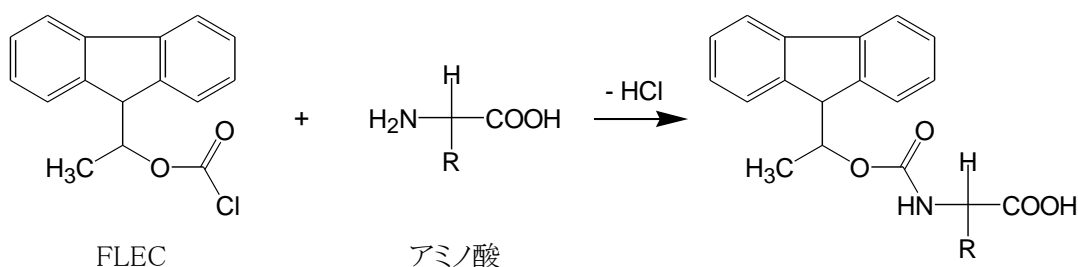


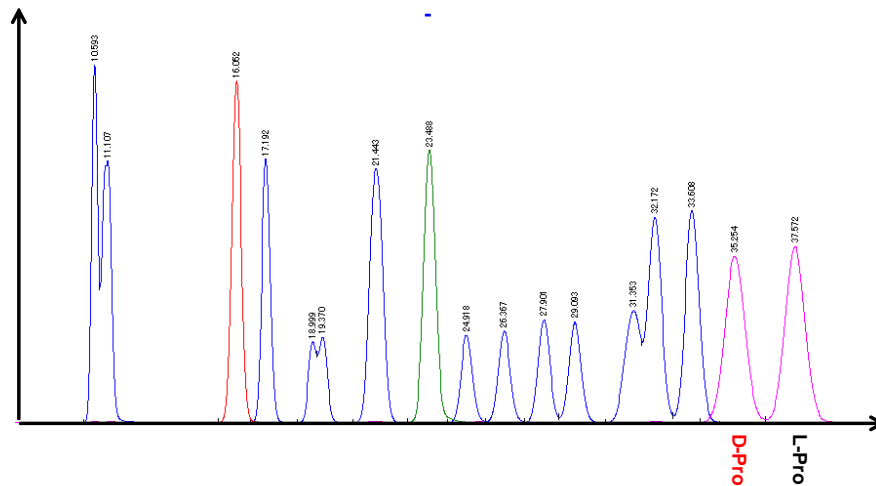
Fig. III-3.1. FLEC による D、L-遊離アミノ酸の誘導体化

本節では、各食品試料中の L、D-アミノ酸含有量について、14 種のアミノ酸 (Ala、Arg、Asn、Asp、Gln、Glu、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、Thr、Tyr、Val) は OPA/IBLC 法で、Pro は FLEC 法にて測定を行った。FLEC 法の誘導体化の手順は、以下のように行った。

2% sulfosalicylic acid 水溶液を適量混合し一晩静置した各本みりん試料を、100mM borate buffer (pH9.5) で希釈し、その希釈液 200  $\mu$ l と 1mM FLEC acetone 溶液 200  $\mu$ l を 40  $^{\circ}$ C で 30 分間混合し反応させた後、40 mM amantadine chloride 250  $\mu$ L と室温にて 10 分間混合し反応させ、最後に 30mM sodium acetate buffer (pH6.0) 350  $\mu$ L と混合し、HPLC に供した。定量には外部標準法を用いた。以下に HPLC 条件を示す。

【分析条件】

System : Shimazu HPLC 20A series (Shimadzu)  
Detector : RF-20A XS fluorescence detector (Shimadzu)  
(Ex.:263nm, Em.:313nm)  
Column : Inertsil ODS-4 (4.6 φ × 250mm, GL Science)  
Column temp. : 40°C  
Flow Rate : 0.7 ml/min  
Eluent : (A) 30mM Sodium acetate (pH6.0),  
(B) Methanol/Acetonitrile=12/1  
Gradient : (B) 52.5% (40min) → 52.5→100% (5min) → 100% (10min)  
Injection volume : 5 μL



\*L-Pro、D-Pro 以外も含まれるアミノ酸混合液を測定した際のクロマトグラムであるため、  
L-Pro、D-Pro 以外のピークも検出されているが、本章では FLEC 法による定量は L-Pro、D-Pro のみ実施した。

**Fig. III-3.2. FLEC 法による L、D-Pro の HPLC クロマトグラム (標品)**



### 1.3. 官能評価

#### 1.3.1. 恒常刺激法

D-アミノ酸が酸味、苦味、塩味に及ぼす効果の評価は、恒常刺激法<sup>32)</sup>による官能評価を行い、Probit 分析<sup>33)</sup>による解析から等価濃度 (PSE; Point of Subjective Equality) を算出した。評価する D-アミノ酸の濃度は、食品中の D-アミノ酸含有量の分析結果から 1mM と設定した。たとえば酸味溶液の場合、0.025 % citric acid 溶液を基準として等比で差をつけた酸味強度の異なる 5 種類の citric acid 標準溶液 (0.019 %、0.021 %、0.023 %、0.025 %、0.028 %) を作成し、0.025 % citric acid 溶液に 1 mM になるように D-Asp を添加した試験溶液と各標準溶液をパネルに比較させ、酸味を強く感じる溶液を選ばせた。Probit 分析には統計解析ソフト SPSS 17.0 (SPSS 社) を用い、パネルの 50 % が酸味を強く感じた標準溶液の濃度を 1 mM の D-Asp を添加した 0.025 % citric acid 溶液の等価濃度とした。同様に苦味溶液では、0.075 % caffeine 溶液を基準とした際の 1 mM の D-Asp の添加効果を、塩味溶液では、1 % NaCl 溶液を基準とした際の 1 mM の D-Glu の添加効果を評価した。各試験ともに比較のために L-アミノ酸を用いて、同様の評価を実施した。各試験の評価は、パネルには MC フードスペシャリティーズ社にて調味料の開発に従事する研究員 (基本味識別テストおよび酸味、苦味、塩味における標準溶液の濃度差識別テストの合格者) 13 名から試験毎に無作為に 8 名ずつ選び (男性 5 名、女性 3 名)、当該 8 名が日にちを変え 2 回ずつ実施した。

#### 1.3.2. Time Intensity 法

D-アミノ酸が各基本味に及ぼす効果の評価として、Ishii らの官能評価法<sup>34)</sup>に準じ、官能評価ソフト Compusense five J (Compusense 社) を用いて、Time Intensity Curve を測定した。具体的には、パネルに 20 ml の検液を一度に口に含ませ 5 秒間口に含んだ後、全て吐き出させ、口に含んでから特定の呈味が消えるまでの呈味強度の変化を PC 画面上のカーソルを動かして測定した。検液には酸味溶液 (0.025% citric acid 溶液)、苦味溶液 (0.075% caffeine 溶液)、塩味溶液 (1% NaCl 溶液)、甘味溶液 (4% sucrose 溶液)、うま味溶液 (4% MSG 溶液) を基準溶液として用い、酸味および苦味は基準溶液に 1 mM の D-Asp を、塩味は基準溶液に 1 mM の D-Glu を、甘味およびうま味は基準溶液に 1 mM の D-Pro を添加し、評価した。各試験の評価は、上記と同じ 13 名のパネルから試験毎に無作為に 5 名ずつ選び (男性 3 名、女性 2 名)、当該 5 名が日にちを変え 2 回ずつ実施した。比較のために L-アミノ酸を用いて同様の評価を実施した。

## 2. 結果および考察

### 2.1. 熟成食品における D-アミノ酸含有量

醤油、味噌、チーズについて D-アミノ酸含有量を測定し、食品毎に各アミノ酸の平均値、標準偏差、最大値、最小値を算出した (Table III-3.1)。測定した 24 品目全てにおいて D-アミノ酸が検出され、食品別では醤油から D-Ile、D-Phe、D-Thr、D-Tyr、D-Pro を除く 10 種類の D-アミノ酸が、味噌から D-Arg、D-Gln、D-Lys、D-Thr、D-Pro を除く 10 種類の D-アミノ酸が、チーズから D-Phe、D-Thr、D-Tyr を除く 12 種類の D-アミノ酸が検出された。15 種類の D-アミノ酸の総含有量は醤油が 3.2 mM-7.2 mM、味噌が 1.3 mM-2.7 mM、チーズが 2.4 mM-32.5 mM であり、各食品ともに含有量の平均値は D-Ala、D-Glu、D-Asp が高い結果となった。

醤油や味噌における D-アミノ酸の存在については Mori らが D-Ala、D-Glu の存在を報告しているが<sup>30)</sup>、その他の D-アミノ酸については、分析の報告がないため、本研究により新たに醤油、味噌中に D-Ala、D-Glu 以外の多種類の D-アミノ酸が存在していることが確認された。醤油、味噌、チーズともに発酵工程中に乳酸菌が働くことが知られているため、これらの D-アミノ酸の生成は主に微生物のラセミ化によるものと思われるが、Asp などは本みりんの熟成と同様、メイラード反応からの生成も推測される。一方で醤油、味噌、チーズは共通して L-Thr が存在しているが D-Thr が検出されていない。本みりんにおいても D-Thr は検出されず (Table III-3.1)、また過去の報告でも D-Thr の分析を実施している赤ワイン<sup>25)</sup>、バルサミコ酢<sup>26)</sup>、黒酢<sup>27)</sup>、清酒<sup>5)</sup>やメープルシロップなどの加熱工程のある食品<sup>7)</sup>、全てで検出されておらず、Thr は発酵や熟成工程においてラセマーゼの関与がほとんどなく、またメイラード反応経由のラセミ化も生じにくいアミノ酸であることが示唆された。

Table III-3.1 醤油、味噌、チーズにおける D-アミノ酸含有量

Sample	No.	Value	D-amino acid concentration (mM)															
			Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Ile	Leu	Lys	Phe	Ser	Val	Thr	Tyr	Pro	Total
Soy sauce	8	Ave.	1.6	0.3	0.0	0.9	0.4	1.0	-	0.1	0.3	-	0.1	0.1	-	-	-	4.9
		SD	0.7	0.2	0.0	0.3	0.2	0.2	-	0.1	0.2	-	0.1	0.2	-	-	-	1.3
		Max.	2.5	0.7	0.1	1.4	0.9	1.4	n.d.	0.3	0.5	n.d.	0.3	0.5	n.d.	n.d.	n.d.	7.2
		Min.	0.7	n.d.	n.d.	0.5	n.d.	0.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Soybean paste	8	Ave.	0.7	-	0.1	0.2	-	0.2	0.1	0.1	-	0.1	0.1	0.0	-	0.1	-	1.7
		SD	0.6	-	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	0.1	-	0.0	-	0.6
		Max.	1.8	n.d.	0.1	0.3	n.d.	0.2	0.1	0.2	n.d.	0.2	0.2	0.1	n.d.	0.2	n.d.	2.7
		Min.	0.1	n.d.	0.0	0.2	n.d.	0.2	0.0	0.1	n.d.	0.1	0.1	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	1.3
Cheese	8	Ave.	5.8	0.4	0.0	4.4	0.0	4.8	0.1	0.1	0.3	-	0.2	0.1	-	-	0.3	15.8
		SD	3.7	0.3	0.1	3.1	0.0	3.2	0.1	0.1	0.5	-	0.3	0.1	-	-	0.3	10.8
		Max.	12.6	1.0	0.2	9.8	0.1	9.8	0.2	0.4	1.1	n.d.	0.7	0.3	n.d.	n.d.	1.0	32.5
		Min.	0.9	0.1	n.d.	0.1	n.d.	0.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.4

## 2.2. D-アミノ酸の基本味への寄与

分析した食品の中で D-アミノ酸の総含有量が最も低かった試料は味噌のうちの 1 品目で、1.3 mM であった。そこで今回測定した食品試料における D-アミノ酸の味質への影響を確認するため、1 mM の D-アミノ酸が各基本味溶液の味質に与える影響を検証することとした。

### (a) 酸味

今回測定した 15 種類の D-アミノ酸について、含有量が 1 mM になるように D-アミノ酸を添加した 0.025% citric acid 溶液を用意し、プレテストとして担当者 3 名で添加前との味質の変化を評価した。その結果、15 種類の D-アミノ酸の中で D-Asp を添加した際の味質の変化が最も大きいとの評価結果が得られた。そこで 0.025% citric acid 溶液に、D-Asp および L-Asp を添加した際の等価濃度と Time Intensity Curve を評価した (Table III-3.2, Fig. III-3.3.)。その結果、D-Asp を添加した際の等価濃度は 0.0213% となり、95% 信頼限界範囲が 0.0207-0.0219% であることから酸味を抑制する作用が認められた。また L-Asp を添加した際の等価濃度は 0.0227% であり、95% 信頼限界範囲が 0.0222-0.0233% であることから、D-Asp を添加した際の酸味抑制作用のほうが大きいことが示された。また Time Intensity Curve では D-Asp および L-Asp の添加により、無添加時よりも酸味の最大強度(ピークの高さ)が抑制され、D-Asp 添加時のほうが L-Asp の添加時よりも酸味の最大強度が抑制されることが認められた。

Table III-3.2 D-Asp および L-Asp を添加した酸味溶液における PSE 濃度

Sample [A]	Conc. of pure citric acid sample [B] (%)	The number of total test (n)	The number of test [B>A] (r)	r/n(%)	regression line <sup>1)</sup>	PSE (%)	Confidence interval(%)
Citric acid soln.(0.025%) +1mM D-Asp	0.019	16	0	0.0	Y=975X-20.7	0.0213	0.0207 - 0.0219
	0.021	16	7	43.8			
	0.023	16	15	93.8			
	0.025	16	16	100.0			
	0.028	16	16	100.0			
Citric acid soln.(0.025%) +1mM L-Asp	0.019	16	0	0.0	Y=975X-22.2	0.0227	0.0222 - 0.0233
	0.021	16	1	6.3			
	0.023	16	9	56.3			
	0.025	16	16	100.0			
	0.028	16	16	100.0			

<sup>1)</sup>Y=Probit, X=Conc. of pure citric acid sample (%)

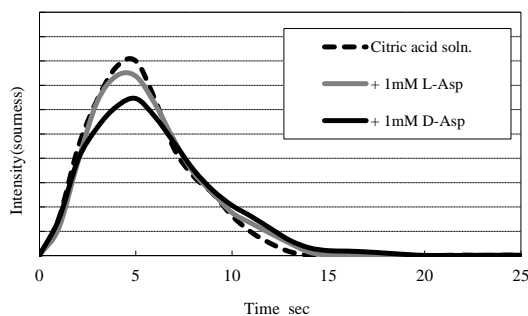


Fig. III-3.3 D-Asp および L-Asp を添加した酸味溶液における Time Intensity Curve

(f) 苦味

苦味溶液(0.075% caffeine 溶液)を用意し、酸味溶液と同様 15 種類の D-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-Asp を添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで 0.075% caffeine 溶液に、D-Asp および L-Asp を添加した際の等価濃度と Time Intensity Curve を評価した (Table III-3.3, Fig. III-3.4.)。D-Asp を添加した際の等価濃度は 0.0635% となり、95% 信頼限界範囲が 0.0618-0.0652% であることから苦味を抑制する作用が認められた。また L-Asp を添加した際の等価濃度は 0.0686% であり、95% 信頼限界範囲が 0.0668-0.0709% であることから、D-Asp を添加した際の苦味抑制作用のほうが大きいことが示された。また Time Intensity Curve では D-Asp および L-Asp の添加により、無添加時よりも苦味の最大強度が抑制され、D-Asp 添加時のほうが L-Asp 添加時よりも苦味の最大強度が抑制されることが認められた。

Table III-3.3 D-Asp および L-Asp を添加した苦味溶液における PSE 濃度

Sample [A]	Conc. of pure caffeine sample [B] (%)	The number of total test (n)	The number of test [B>A] (r)	r/n(%)	regression line <sup>1)</sup>	PSE (%)	Confidence interval(%)
Caffeine soln.(0.075%) +1mM D-Asp	0.056	16	0	0.0	Y=352X-22.4	0.0635	0.0618 - 0.0652
	0.062	16	5	31.3			
	0.068	16	15	93.8			
	0.075	16	16	100.0			
	0.083	16	16	100.0			
Caffeine soln.(0.075%) +1mM L-Asp	0.056	16	0	0.0	Y=292X-20.1	0.0686	0.0668 - 0.0709
	0.062	16	1	6.3			
	0.068	16	5	31.3			
	0.075	16	16	100.0			
	0.083	16	16	100.0			

<sup>1)</sup>Y=Probit, X=Conc. of pure caffeine sample (%)

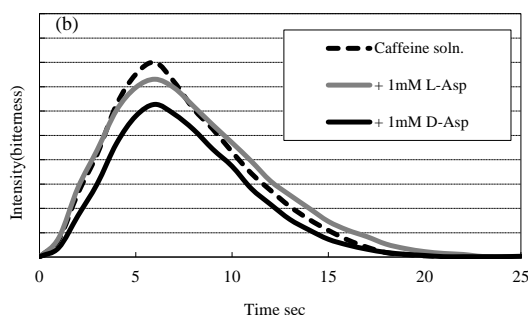


Fig. III-3.4 D-Asp および L-Asp を添加した苦味溶液における Time Intensity Curve

(c) 塩味

塩味溶液(1% NaCl溶液)を用意し、酸味溶液と同様 15種類のD-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-Gluを添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで塩味溶液に、D-Glu および L-Glu を添加した際の等価濃度と Time Intensity Curve を評価した (Table III-3.4, Fig. III-3.5.)。D-Glu を添加した際の等価濃度は 0.940 %となり、95%信頼限界範囲が 0.929-0.953 %であることから塩味を抑制する作用が認められた。また L-Glu を添加した際の等価濃度は 0.955 %であり、95%信頼限界範囲が 0.943-0.971 %であることから、D-Glu 添加時と L-Glu 添加時の等価濃度には有意な差は認められなかった。また Time Intensity Curve ではD-Glu および L-Glu の添加により、無添加時よりも塩味の最大強度が抑制され、D-Glu 添加時のほうが L-Glu 添加時よりもやや塩味の最大強度が抑制される傾向が認められた。

Table III-3.4 D-Glu および L-Glu を添加した塩味溶液における PSE 濃度

Sample [A]	Conc. of pure NaCl sample [B] (%)	The number of total test (n)	The number of test [B>A] (r)	r/n(%)	regression line <sup>1)</sup>	PSE (%)	Confidence interval(%)
NaCl soln.(1.0%) +1mM D-Glu	0.86	16	0	0.0	Y=51.4X-48.3	0.940	0.929 - 0.953
	0.91	16	1	6.3			
	0.95	16	11	68.8			
	1.00	16	16	100.0			
	1.05	16	16	100.0			
NaCl soln.(1.0%) +1mM L-Glu	0.86	16	0	0.0	Y=42.5X-40.7	0.955	0.943 - 0.971
	0.91	16	1	6.3			
	0.95	16	5	31.3			
	1.00	16	16	100.0			
	1.05	16	16	100.0			

<sup>1)</sup>Y=Probit, X=Conc. of pure NaCl sample (%)

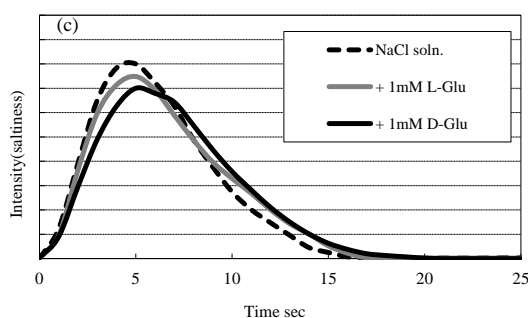


Fig. III-3.5. D-Glu および L-Glu を添加した塩味溶液における Time Intensity Curve

#### (d) 甘味

甘味溶液(4% sucrose 溶液)を用意し、酸味溶液と同様 15 種類の D-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-Proを添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこで甘味溶液に、D-Pro および L-Pro を添加した際の Time Intensity Curve を評価したところ、D-Pro 添加時には無添加時と大きな違いは見られなかったが、D-Pro の添加により最大強度以降の甘味の低下が緩やかとなる傾向が認められ、甘味の持続時間が長くなることが確認された (Fig. III-3.6。D-Pro 添加時の甘味の最大強度から甘味が感じられなくなるまでの Time Intensity Curve の面積は L-Pro 添加時の 1.30 倍)。

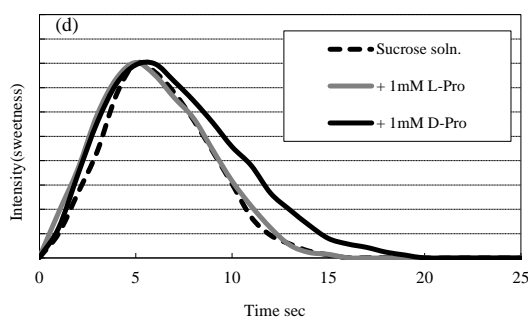


Fig. III-3.6. D-Pro および L-Pro を添加した甘味溶液における Time Intensity Curve

#### (e) うま味

うま味溶液(0.05% MSG 溶液)を用意し、酸味溶液と同様 15 種類の D-アミノ酸を添加し味質の変化を評価した結果、D-Pro を添加した際の味質の変化が最も大きかった。そこでうま味溶液に、D-Pro および L-Pro を添加した際の Time Intensity Curve を評価したところ、D-Pro の添加により最大強度以降のうま味の低下が緩やかとなる傾向が認められた (Fig. III-3.7。D-Pro 添加時のうま味の最大強度からうま味が感じられなくなるまでの Time Intensity Curve の面積は L-Pro 添加時の 1.44 倍)。

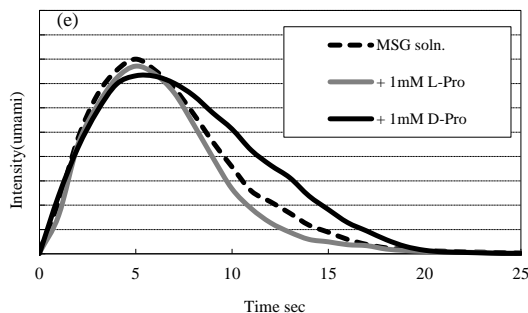


Fig. III-3.7. D-Pro および L-Pro を添加した甘味溶液における Time Intensity Curve

以上より、1 mM の D-Asp が酸味と苦味に、D-Glu が塩味に、D-Pro が甘味とうま味に対し味質修飾効果を有することが確認された。酸味溶液および苦味溶液における D-Asp 添加時と L-Asp 添加時の等価濃度の差異は 0.0014% と 0.0051% であり、それぞれ基準溶液の濃度差を下回ったが (citric acid 溶液: 0.002-0.003%、caffeine 溶液: 0.006-0.008%)、専門パネルにより各添加区の味質強度の差が認識される程度の違いが見られた。また Pro 添加時の Time Intensity Curve より、D-Pro において確認された甘味およびうま味の持続は、最大強度(ピークの高さ) への影響が小さいことから、D-Pro の添加には sucrose や MSG の濃度を上げた際の味の変化とは異なる効果があることが示唆された。

また本研究の基本味溶液における官能評価と Okada らの清酒における官能評価<sup>5)</sup>とは対象食品が異なるため単純な比較はできないが、D-Asp および D-Glu が味質修飾効果を有している結果が得られた点では、本研究は Okada らの研究結果を支持する結果となっている。一方で食品中に存在する濃度における D-Pro の味質修飾効果に関する報告はこれまでになく、本研究が初めてである。Shiffman らの報告では D-Pro の閾値は 60.4 mM であることから<sup>28)</sup>、今回確認された D-Pro の味質修飾効果は閾下での効果を示唆した。

今回測定した醤油、味噌、チーズ(各 8 種)において、D-Asp の含有量が 1 mM を超えている試料が 10 種(醤油 3 種、チーズ 7 種)、D-Glu の含有量が 1 mM を超えている試料が 12 種(醤油 6 種、チーズ 6 種)、D-Pro の含有量が 1 mM を超えている試料が 1 種(チーズ)あった。今回分析した醤油、味噌、チーズ以外にも、発酵黒豆(Asp)<sup>25)</sup>やバルサミコ酢(Pro)<sup>26)</sup>など様々な発酵食品、熟成食品で 1 mM を超える D-アミノ酸が検出されている。

一方で、第 1 節の本みりんへの添加試験や Okada らの清酒における主成分解析の結果では、1mM 以下の D-Ala、D-Asp、D-Glu が風味に寄与することが確認されており、複数の D-アミノ酸による相加効果も鑑みると、D-アミノ酸は本みりんや清酒以外にも、幅広く発酵食品、熟成食品の風味に影響している可能性が示された。

### 第 3 章まとめ

本章では、本みりんの熟成工程におけるメイラード反応に着目し、D-アミノ酸とメイラード反応の関係、およびそれらが風味に与える影響について検証した。

第 1 節では、アマドリ化合物 (Fru-L-Ala、Fru-L-Asp) を合成し、熟成期間の異なる本みりんのアマドリ化合物と D-アミノ酸の定量分析を行った。その結果、未熟成本みりんと比べ、熟成本みりんはアマドリ化合物含有量が高いこと、また 7 年以上熟成した本みりんは Asp、Glu、Ser の D-アミノ酸存在比が高いことが確認された。次に、アマドリ化合物、メラノイジン、D-アミノ酸が本みりんの風味に与える影響を評価した結果、D-アミノ酸は「甘味の質」と「まろやかさ」に、アマドリ化合物は「甘味の質」に、メラノイジンは「厚み」への寄与が確認され、これらが熟成みりん特有の風味の一端を担っている可能性が示唆された。

第 2 節では、本みりんの熟成におけるメイラード反応のアミノ酸のラセミ化への寄与を検証した。熟成本みりんにおける各アミノ酸のアマドリ化合物含有量と D-アミノ酸存在比の相関性を解析した結果、Asp に高い相関性が確認された。そこで、合成した Fru-L-Asp を用いた加熱試験を行い、本みりんの熟成において、Asp はアマドリ化合物経由のラセミ化機構が関与している可能性があること、また pH がそのラセミ化率 (D-アミノ酸生成率) に影響を与えることが初めて示された。

第 3 節では、D-アミノ酸が本みりん以外の食品の味質に及ぼす影響について考察するため、代表的な発酵熟成食品 (醤油、味噌、チーズ) 中に存在する D-アミノ酸濃度を調査し、その濃度において D-アミノ酸が基本味に与える影響を検証した。その結果、1 mM の D-Asp が酸味と苦味に、D-Glu が塩味に、D-Pro が甘味とうま味に対し味質修飾効果を有し、D-Asp および D-Pro は各 L 体のアミノ酸添加時と差異があることを確認した。

本研究により、日本の古くから用いられる基礎調味料である本みりんにおいて、D-アミノ酸 (D-Asp) も含めた各メイラード反応物が熟成過程において増加し、熟成みりん特有の風味に寄与していることが示され、また醤油や味噌などの他の基礎調味料においても D-アミノ酸が風味 (味質) に寄与している可能性があることが示唆された。



### 参考文献(第3章)

- 1) Kawabe, T. & Morita, H. (1998). Mirin (1). *Nippon Jozokiyokai shi*, 93, 799-806.
- 2) Takahashi, K., & Takemura T. (2011). Effect of color substances of stored Hon-mirin on its physiological function. *Nippon Jozokyaishii*, 106, 578-586.
- 3) Ishizaki, T., Yoshihama, Y., Hiramatsu, J., & Takahashi, K. (2006). On antioxidative activities of Hon-mirin. *Nippon Jozokyaishii*, 101, 839-849.
- 4) Morita H.(2003) *Mirin no chishiki* (p.119-156). Japan: Saiwai
- 5) Okada, K., Gogami, Y., & Oikawa, T. (2013). Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids*, 44, 489-498.
- 6) Gogami, Y., Okada, K., Moriyama, M., Mizoguchi, H., & Oikawa, T. (2012). Quantitative analysis of D-amino acids in sake brewing processes of Kimoto, Kimoto adding starter lactic acid bacteria, and Sokujomoto. *Trace Nutrients Research*, 29, 1-6.
- 7) Pätzold, R., & Brückner, H. (2005). Mass spectrometric detection and formation of D-amino acids in processed plant saps, syrups, and fruit juice concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9722-9729.
- 8) Pätzold, R., & Brückner, H. (2006). Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. *European Food Research and Technology*, 223, 347-354.
- 9) Brückner, H., Justus, J., & Kirschbaum, J. (2001). Saccharide induced racemization of amino acids in the course of the Maillard reaction. *Amino Acids*, 21, 429-433.
- 10) Brückner, H., Haasmann, S., Langer, M., Westhauser, T., Wittner, R., & Godel, H. (1994). Liquid chromatographic determination of d-and l-amino acids by derivatization with  $\alpha$ -phthalaldehyde and chiral thiols: Applications with reference to biosciences. *Journal of Chromatography A*, 666, 259-273.
- 11) Usui T., Yanagisawa S., Ohguchi M., Yoshino M., Kawabata R., Kishimoto J., Arai Y., Aida K., Watanabe H., & Hayase F. (2007). Identification and determination of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds formed in the degradation of sugars. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 2465-2472.
- 12) Anet E. (1959). Chemistry of non-enzymatic browning. VII. Crystalline Di-D-fructose-glycine and some related compounds. *Australian Journal of Chemistry*, 12, 429-433.
- 13) Tsubakurashouji E., Nakagawa H., Masuda T., & Ishiguro T. (1998). Definitions of

- “body” and “mildness” in the noodle-dip using “Mirin”. *Journal of Cookery Science of Japan*, 31, 117-122.
- 14) Parker, J. K. (2013). The kinetics of thermal generation of flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 93, 197-208.
  - 15) Morita, H., & Tanabe, O. (1970). Mirin and cookery. *Chorikagaku*, 3, 135-139.
  - 16) Gogami, Y., Ito K., Kamitani Y., Matsushima Y., & Oikawa T. (2009). Occurrence of D-serine in rice and characterization of rice serine racemase. *Phytochemistry*, 70, 380-387.
  - 17) Shiga, K., Yamamoto, S., Nakajima, A., Kodama, Y., Imamura, M., Sato, T., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2014). Metabolic profiling approach to explore compounds related to the umami intensity of soy sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7317-7322.
  - 18) Troise, A. D., Fiore, A., Roviello, G., Monti, S. M., & Fogliano, V. (2015). Simultaneous quantification of amino acids and Amadori products in foods through ion-pairing liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Amino Acids*, 47, 111-124.
  - 19) Kaneko, S., Kumazawa, K., & Nishimura, O. (2011). Isolation and identification of the umami enhancing compounds in Japanese soy sauce. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75, 1275-1282.
  - 20) Penndorf, I., Biedermann, D., Maurer, S. V., & Henle, T. (2007). Studies on N-terminal glycation of peptides in hypoallergenic infant formulas: quantification of  $\alpha$ -N-(2-furoylmethyl) amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 723-727.
  - 21) Pätzold, R., & Brückner, H. (2006). Gas chromatographic determination and mechanism of formation of D-amino acids occurring in fermented and roasted cocoa beans, cocoa powder, chocolate and cocoa shell. *Amino acids*, 31, 63-72.
  - 22) Henryk, J. (2012). Food flavors (p. 95-119). U.S.A.:CRC press
  - 23) Erbe, T., & Brückner, H. (2000). Studies on the optical isomerization of dietary amino acids in vinegar and aqueous acetic acid. *European Food Research and Technology*, 211, 6-12.
  - 24) Yoshimura, T. (2008). Structure and function of amino acid racemases. *Seikagaku*, 80, 324-330.
  - 25) Brückner, H., & Hausch, M. (1989). Gas chromatographic detection of D-amino acids as common constituents of fermented foods. *Chromatographia*, 28, 487-492.
  - 26) Erbe, T., & Brückner, H. (1998). Chiral amino acid analysis of vinegars using gas chromatography–selected ion monitoring mass spectrometry. *Zeitschrift für*

- Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 207, 400-409.
- 27) Okada, K., Gogami, Y., Takeshita, Y., & Oikawa, T. (2012). Quantitative analysis of D- and L-amino acids in black vinegar (Kurozu) and rice vinegar (Komezu). *Trace Nutrients Research*, 29, 62-66.
  - 28) Schiffman, S. S., Sennewald, K., & Gagnon, J. (1981). Comparison of taste qualities and thresholds of D-and L-amino acids. *Physiology & Behavior*, 27, 51-59.
  - 29) Kawai, M., Sekine-Hayakawa, Y., Okiyama, A., & Ninomiya, Y. (2012). Gustatory sensation of L-and D-amino acids in humans. *Amino Acids*, 43, 2349-2358.
  - 30) Mori, M., Ito, Y., & Nagasawa, T. (2010). Content of free D-Ala and D-Glu in traditional Asian fermented seasonings. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 56, 428-435.
  - 31) Einarsson, S., Josefsson, B., Moeller, P., & Sanchez, D. (1987). Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl) ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 59, 1191-1195.
  - 32) Kobayashi, N., Kamimura, M., & Yamane, T. (1974). On aspartame, a new sweetner, *Showajyoshidaigaku Gakuen*, 418, 8-21
  - 33) Furukawa H.(1994) *Oishisa wo hakaru* (p.69-71). Japan: Saiwai
  - 34) Ishi, K., Nishimura, T., Hatae, K., & Shimada, A. (1994). Effect of peptide in wheat gluten hydrolyzate on basic tastes. *Nihon Kasei Gakkaishi*, 45, 797-801.

## 総合討論

本研究では、和食に用いられる日本の伝統的な調味料である豆味噌と熟成本みりんに着目し、「こく」に寄与するメイラード反応生成物を同定した。

第1章では、豆味噌の加熱香気化合物の解析から、methionine からメイラード反応を経由して生成していることが推測された dimethyl trisulfide が、豆味噌の「後味のうま味(うま味の持続性)」(umami aftertaste (continuity)) に関わる「こく」付与香気物質であることを明らかにした。加熱した豆味噌における dimethyl trisulfide の「こく」の認知機構は、うま味を想起させる香気特性を有する dimethyl trisulfide がレトロネーザルアロマとして鼻腔内で感知され、この嗅覚情報が脳内の前頭眼窩野で味覚情報(うま味)と統合された際にクロスモーダル相互作用が生じ、「後味のうま味」として認知されたものと考えられる。

第2章では、「こく」付与味修飾物質の1つであるメイラードペプチドに着目し、大豆ペプチドにおいて Lys 残基のアミノ基への glucose の結合が「こく」の発現に重要であることを明らかにした。また、豆味噌の高分子画分の解析からメイラードペプチドが豆味噌の「厚み」(thickness) および「持続性」(continuity) に、同じくメイラード反応生成物であるメラノイジンが「厚み」に関わる「こく」付与味修飾物質であることを明らかにした。メイラードペプチドの「こく」の認知機構は、メイラードペプチドが TRPV1(体性感覚)、T1R1/T1R3(うま味受容体/L-アミノ酸受容体)、T1R2/T1R3(甘味受容体/糖受容体)と3種類の受容体に影響を与えている可能性が示唆されており<sup>1)</sup>、脳内における各味覚情報の統合時にインターモーダル相互作用が生じ、「厚み」や「持続性」として認知されたものと考えられる。一方で、メラノイジンは Yasuda らがカルシウム感知受容体(Calcium Sensing Receptor)に受容する可能性を報告しており<sup>2)</sup>、メラノイジンによる「こく」の発現は、カルシウム感知受容体アゴニストである glutathione による「こく」の発現と同機構であると考えられる<sup>3)</sup>。カルシウム感知受容体への受容が「こく」として認知される詳細な作用機序はまだ明確ではない。しかしながら、glutathione が基本味溶液において甘味、塩味、うま味を増強することが確認されていることから<sup>3)</sup>、カルシウム感知受容体にアゴニストが結合することにより各基本味の味覚受容体から脳内に伝達される信号が増幅されている可能性が考えられる。

第3章では、熟成本みりんの不揮発性成分の解析から、D-アミノ酸が熟成本みりんの「まろやかさ」(mildness) に関わる「こく」付与味修飾物質であることを明らかにし、D-アミノ酸の1つである D-Asp は本みりんの熟成工程中にメイラード反応を経由して生成していることを明らかにした。本みりんにおける D-アミノ酸の「こく」の認知機構は、D-アミノ酸は T1R1/T1R3(うま味受容体)で受容される L-アミノ酸と異なり、T1R2/T1R3(甘味受容体)で受容されることから<sup>4)</sup>、本みりんの主要な含有糖であり、渋みや「くせ」のある甘味を有することが報告されている

glucose<sup>5)</sup>が、T1R2/T1R3 への結合において D-アミノ酸と競合していることが推測され、この競合により glucose と D-アミノ酸のそれぞれの味覚情報が脳内で統合した際にインターモーダル相互作用が生じ、glucose の「くせ」が抑制され、「まろやかさ」として認知されている可能性が考えられる。基本味溶液において、D-Asp による酸味、苦味の抑制効果が見られたが、この効果も脳内で D-アミノ酸の味覚情報と統合した際に、酸味や苦味の情報が抑制されたことによるものと考えられる。

以上のように、それぞれの「こく」の認知には複数の感覚器や受容体による風味物質の感知および脳内の情報の統合が関与していることが推測される。

ヒトは進化の過程で、甘味をエネルギー源、塩味を電解質、うま味をタンパク質源のシグナルとして知覚することにより、消化吸収や代謝調節を円滑に行う能力を身につけたと言われて<sup>6)</sup>、「こく」も同様にヒトが生理的、能動的に認知しているシグナルである可能性が考えられる。その可能性の一つとして、「こく」は「味、香り、食感に関する複数の刺激がバランスよく与えられたときに感じられる味わい」であることから<sup>7,8)</sup>、「複数の栄養成分がバランスよく存在している状態を示すシグナル」であることが考えられる。

また本研究および序論で示したように、メイラード反応生成物には「こく」に寄与する成分が多く存在する。メイラード反応は還元糖とアミノ酸という「複数の栄養成分が存在している状態」で生じる現象であるが、それに加え、調理によるメイラード反応の進行は「加熱による殺菌および消化性向上」が期待され、熟成によるメイラード反応の進行は多糖やタンパク質が低分子になるほど反応が促進されることから「熟成工程における低分子化による消化性向上」が期待される。このことから、ヒトはメイラード反応による「殺菌」や「易消化性」といった食品情報を、「こく」の認知を通して認識している可能性が考えられる。

たとえば、調理食品の加熱香りにおいては、本研究の豆味噌における dimethyl trisulfide 以外にも、肉エキスにおける pyrazine 類<sup>7)</sup>、調味液(めんつゆ)における 2-acetylfuran など<sup>8)</sup>の鍵香気化合物が、「こく」に寄与するメイラード反応生成物であることが報告されている。一方で、Zhouらは Glucose-Glycine のモデル反応系にてメイラード反応から得られた加熱香気がヒトの脳波に影響を与え、その鍵香気化合物である pyrazine 類(2,3-dimethylpyrazine)に  $\alpha$  波を増加させ  $\beta$  波を減少させる作用(リラックスさせる作用、緊張を抑制する作用)があることを報告している<sup>9)</sup>。このことから、ヒトは食品を加熱した際に新たに生成した香気を「こく」として認知し、その食品が十分に加熱された「殺菌や易消化性が期待できる、リスクの少ない有益な食品」と認識しているのではないかと推測される。

一方でメイラードペプチドは、本研究において豆味噌における大豆ペプチドの解析を行ったが、味噌以外に、熟成とともに「こく」が強くなるゴーダチーズにも存在していることが報告されている<sup>10,12)</sup>。このことから、ヒトは熟成食品において熟成中に生成したメイラードペプチドを「こく」として認知することで、その食品が十分に分解が進んでいる「易消化性が期待できる有益な食品」と認識している可能性が考えられる。第2章において、大豆ペプチドの高分子画分の中で最も分子量の低い3-5kDa画分が最も「こく」が強いという結果が得られたことも、「易消化性」と「こく」の認知に関連している可能性が考えられる。これまでに乳ペプチドを用いたモデル試験の報告はないが、Schwietzkeらはゴーダチーズの熟成におけるタンパク質の糖化の進行を測定し、熟成とともにLysのアミノ基( $\epsilon$ 位)の糖化が進行していることを報告している<sup>13)</sup>。Schwietzkeらの報告では分子量による比較や味質の評価などは行われていないが、ゴーダチーズのメイラードペプチドにおいてもLysのアミノ基の糖化と「こく」が関与している可能性が考えられる。

この他にも本研究では、第2章、第3章においてメラノイジン、第3章においてD-アミノ酸、アマドリ化合物(Fru-Ala, Fru-Asp)が「こく」への寄与を示唆したが、これらの成分もメイラードペプチドと同様、熟成の進行度を示す重要な成分であると考えられる。

このように、ヒトは「こく」の認知を通して、「有益な食品」であるという情報を獲得し、「好ましい(おいしい)」と感じていることが推測される。「こく」(a *koku* attribute, *kokumi*)は当初日本でのみ使用される風味表現であったが、近年では海外でも認知されるようになってきている<sup>14~16)</sup>。これは食品から得られる情報のシグナルとして「こく」が重要であるため、「こく」を認知する能力が脳の学習によって容易に得られるためだと思われる。

グローバル化の進展に伴い、各国間の食品が行きかう現代において、メイラード反応生成物による「こく」は、我が国以外の人々にも受け入れられやすい食品の提供を可能にする手段として、重要な風味特性である。現在、和食はユネスコ無形文化遺産にも登録され世界的に認知されつつあるが<sup>17)</sup>、和食が円滑に受け入れられている背景には、味噌や本みりんなどの日本の伝統的な調味料の「こく」も貢献しているものと推測される。

今後も各国における食品や調味料の「こく」の研究が進展し、食品の「おいしさ」に貢献することで、世界の食文化がより一層発展することを期待したい。

## 参考文献(総合討論)

- 1) Katsumata, T., Nakakuki, H., Tokunaga, C., Fujii, N., Egi, M., Phan, T. H. T., & Lyall, V. (2008). Effect of Maillard reacted peptides on human salt taste and the amiloride-insensitive salt taste receptor (TRPV1t). *Chemical senses*, 33, 665-680.
- 2) Yasuda, K., Matsumoto, T., Watanabe, H., & Hayase, H. (2012). Contribution of melanoidins to *kokumi* taste. *the 2012 Annual Meeting Proceedings of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 2J15p18.
- 3) Miyamura, N., & Maruyama, Y.(2012). Flavor character of CaSR agonists (*kokumi* substances). *The Journal of the Japan association for the study of taste and smell*, 19, 205-213.
- 4) Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2002). An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416, 199-202.
- 5) Toyama Y.(2005) Text of food additives (p.215-244). Japan: Japan food additives association.
- 6) Kondoh, T. & Torii, K. (2001). Mechanism of umami taste transduction and umami preference. *Nippon Jozokiyokai shi*, 96, 829-847.
- 7) Nishimura, T., & Egusa, A.(2012). Classification of compounds enhancing “koku” to foods and the discovery of a novel “koku” enhancing compounds. *The Journal of the Japan association for the study of taste and smell*, 19, 167–176.
- 8) Nishimura, T., Egusa, A. S., Nagao, A., Odahara, T., Sugise, T., Mizoguchi, N., & Noshio, Y. (2016). Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute. *Food chemistry*, 192, 724-728.
- 9) Zhou, L., Ohata, M., & Arihara, K. (2016). Effects of odor generated from the glycine/glucose Maillard reaction on human mood and brainwaves. *Food & function*, 7, 2574-2581
- 10) Saito, C. (2004). Koku and Kokumi in foods. *The Journal of the Japan association for the study of taste and smell*, 11, 165–174.
- 11) Hayase, F., Takahagi, Y., & Watanabe, H. (2013). Analysis of cooked flavor and odorants contributing to the Koku taste of seasoning soy sauce. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 60, 59–71.
- 12) Ogasawara, M., Yamada, Y., Saito, C., & Egi, M. (2004). Taste properties of peptide maillard products from aged cheese. *the 2004 Annual Meeting Proceedings of IFT*
- 13) Schwietzke, U., Malinowski, J., Zerge, K., & Henle, T. (2011). Quantification of Amadori products in cheese. *European Food Research and Technology*, 233, 243-251.



- 14) Toelstede, S., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2009). A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured Gouda cheese. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 1440-1448.
- 15) Degenhardt, A. G., & Hofmann, T. (2010). Bitter-tasting and kokumi-enhancing molecules in thermally processed avocado (*Persea americana* Mill.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 12906-12915.
- 16) Liu, J., Song, H., Liu, Y., Li, P., Yao, J., & Xiong, J. (2015). Discovery of kokumi peptide from yeast extract by LC - Q - TOF - MS/MS and sensomics approach. *Journal of the science of food and agriculture*, 95(15), 3183-3194.
- 17) Ehara, A.(2015). Washoku Culture inscribed on the UNESCO's Intangible Cultural Heritage List, and the Way of the Protection and Promotion. *Nippon Chori Kagaku Kaishi*, 48, 320-324.

## 謝辭

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇意なるご指導を賜りました明治大学農学部、早瀬文孝教授に深く御礼申し上げます。また、研究の進め方について貴重なご意見を賜りました明治大学農学部、渡辺寛人教授に心より御礼申し上げます。

学会発表等の英文について、丁寧なアドバイスを賜りました明治大学農学部、McTaggart Peter Iain 特任准教授および明治大学大学院、Naoumi Joyce Evelyn 特任教授に心より御礼申し上げます。

また本研究にご協力頂きました明治大学農学部、食品機能化学研究室の大学院生および学部学生に心から感謝致します。特に、食品解析班で共同研究者としてご協力頂きました、加藤祥恵さん、三枝弥由さん、鈴木千尋さん、田中悠太郎さん、辻川丈さん、山本江里菜さん、菊地智子さん、佐治明歩さんに深く感謝致します。

大学院への進学にあたり、各種調整や研究への助言を賜りました MC フードスペシャリティーズ株式会社 江木衷開発本部長、河田省三開発本部長、等々力博志所長、井村聡明所長、宗哲治所長、木田隆生主任研究員、宇野和孝主任研究員、小笠原正志主任研究員、勝又忠与次主任研究員に深謝します。

研究データは、明治大学農学部および MC フードスペシャリティーズ株式会社の実験機器、設備を利用して得られたものであり、実験環境を整えて頂きました、多くの教職員の皆様、学生の皆様、MC フードスペシャリティーズ株式会社食品開発研究所の所員の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に研究活動に関し深い理解を示してくれた家族に感謝致します。

2016年12月20日

井上 裕