

博士論文

地域素材を活用した発酵調味料開発のための評価
方法の確立と醸造過程における微生物叢の解析

浅沼 宏一

目次

序 論.....	3
1 はじめに.....	3
2 醤油の歴史.....	4
3 現代における醤油の課題.....	6
4 本研究の目的.....	8
5 研究方法.....	8
第一章 雑穀類を使用した醤油の特徴.....	9
1.はじめに.....	9
2.材料と方法.....	10
2.1 試料調製.....	10
2.2 成分の基本的な化学組成の決定.....	11
2.3 醤油風調味料の化学成分測定.....	11
2.4 遊離アミノ酸の測定.....	12
2.5 ガスクロマトグラフ質量分析（GC-MS）分析と揮発性化合物の同定.....	12
2.6 官能評価.....	13
2.7 統計分析.....	15
3.結果と考察.....	16
3.1 基本的な化学組成.....	16
3.2 遊離アミノ酸.....	21
3.3 香気化合物の組成.....	27
3.4 官能評価.....	44
3.5 風味・アロマ成分化合物と官能特性との関係.....	49
4. 第一章のまとめ.....	55
第二章 醤油麴を使用したイワシ魚醤の微生物菌叢の特徴.....	57
1.はじめに.....	57
2.材料と方法.....	59
2.1.異なる工程による魚醤の調製とサンプリング.....	59
2.2.魚醤もろ味のアンプリコン分析.....	60
3.結果と考察.....	61
3.1 魚醤もろ味の微生物組成.....	61

3.2.魚醬もろ味試料中の微生物多様性の比較	65
第三章 総合考察	68
引用文献	72

序 論

1 はじめに

醤油は、日本の食文化において欠かせない調味料であり、伝統的な製造工程は、製麹、醸造、圧搾、加熱の 4 段階からなる。具体的なプロセスとして、蒸した脱脂大豆と炒った小麦をブレンドして、真菌株 (*Aspergillus oryzae* あるいは *Aspergillus sojae*) を培養して麹をつくる。こうしてできた麹を食塩水と合わせてもろみをつくる。もろみを 6~12 か月程度熟成させ圧搾する。圧搾後に加熱し、微生物と酵素を不活性化し、生醤油中の残留タンパク質を不溶化した後に取り除く¹⁾。

醤油の色は主に熟成中のメラノイジンと呼ばれる物質から生じる。この物質は、醤油の熟成中のアミノ・カルボニル反応により作り出され、火入(加熱)により促進され、特徴的な色である赤みのある明るい色調を形成する¹⁾。醤油の品質は、色の他に味と香りによって評価される。酸味、うま味、苦味、甘味などの風味は、遊離アミノ酸などの不揮発性化合物の含有量によって決まる。醤油の香りは、麦芽のような香りをもたらすアルデヒド、フルーティーで花のような香りをもたらすエステル、ロースト風味やナッツのような香りをもたらすピラジンなどの揮発性化合物に起因する^{2) 3) 4)}。発酵プロセスでは、グルコースとアミノ酸が酵母によって様々なアルコールに変換され、発酵中にストレッカー反応によってアルデヒドが生成される⁵⁾。醤油の風味や香りの違いは、原料やこうした発酵工程の違いに起因している^{6) 7)}。

現在日本では醤油は、こいくち、うすくち、たまり、さしみ、しろの 5 種類に分類され、日本農林規格⁸⁾に従って生産されている。現在のような原料や複雑な工程がどのように検討されてきたのかを振り返ってみる。

2 醤油の歴史

日本における醤油の起源については諸説ある。「醤」の字は、飛鳥時代のものと思われる木簡や藤原京から出土した木簡に見られ、「ひしほ（ひしお）」と読まれていた。木簡や古文書の表記に見られた調味料や加工食品を以下に挙げる。

木簡や古文書の表記に見られた調味料や加工食品⁹⁾

調味料	塩、醤、荒醤、醬滓、末醤、酢、緋、飴、甘葛煎、蜜
油	ゴマ、エゴマ
香辛料	辛子、しょうが、山椒、わさび、たで、陳皮、クルミ、はっか、コシ（コリアンダー）
魚介類	腊（干物）、背開き、素干し、ゆで干し、いりこ、頭打、火干し、塩煮、鮓、塩押、塩辛、醃、醬漬、酢漬
鳥獣肉類	脯穴、脯雉、塩漬、塩辛
野菜類	乾物（ズイキ）漬物（塩漬、醬漬、末醤漬、酢漬、糠漬）
穀類	糲、焼米、餅、炒大豆、煎餅、索餅、酒（清酒、白酒、濁酒、新酒、赤酒、黒酒、滓湯酒、古酒）
牛乳	蘇
果実	酒、搗栗

調味料としては、塩や塩漬けにした食材（魚介類や鳥獣類）から抽出した液体を塩味として使っており、それがひしお、あらびしほ、ひしおかす、まつしょうなどと表現されていた。酢はかんきつ類や米から作られ、酸味として用いられた。甘味としては豆や植物の汁を煮た甘葛煎（あまずらせん）や蜂蜜が使われていた。醤（ひしお）が日本に伝来した時期は明確ではないが、『正倉院文書』（686～780）では、醤が大豆、塩、米、酒等を発酵させたのち搾り取る液状の調味料として記されており、『万葉集』にも醤や酢が調味料として使用されていた記述もある¹⁰⁾。当時の「醤」は穀物に塩を加えて塩辛のように発酵させた調味料だったと推測される。701年の『大宝律令』には宮廷の料理を司る大膳職（だいぜんしき）が設置され、特に主醤（ひしおのつかさ）と呼ぶ役人が調味料の「醤」と「鼓」という発酵調味料を受け持っていたとされている。その後『養老令』（757（天平宝字元年）年）によると、醬院（ひしおいん）として大膳職から独立したと記録されている¹¹⁾。発酵食品である醤が、麴（こうじ）を用いた今のような形態になった起源としては鎌倉時代に遡り、1254年に信州の禅僧覚心が中国から径山寺（きんざんじ）味噌の製法を持ち帰り、その製造の過程で桶の底にたまった液体が、今の溜醤油に近いものであったと言

われている¹²⁾。室町時代に入ると、この調味料造りの伝統は主に寺院に受け継がれ、室町時代の中頃には、ほぼ現在の醤油に近いものが造られるようになった。江戸時代には各地で独自の製法が確立した。

麴を使用した醤油製法が確立するまでに、原材料である大豆、小麦や製塩技術、麴の製法などが入れ子状態で存在しており、人々は様々な食材を使用し、保存性の向上、味品質の向上、栄養価値の転換、醗酵分解や加工工程でペースト状や液状にすることによる利便性の向上などを経験的に試行錯誤し、醗酵技術として高めてきたと考えられる。醤油製法が確立されるに至るまでの歴史は「原料に関する試行錯誤」と「発酵方法に関する試行錯誤」の歴史であったと言える。

明治時代には大量生産体制が確立し、醤油の全国的な流通が始まった。タンパク質原料となる大豆は1905(明治38)年頃より満州、朝鮮より大量に輸入されるようになり、搾油した脱脂大豆も入るようになった。しかし満州事変後、大豆の高騰と品不足が起こり、1940(昭和15)年10月には日本大豆統制株式会社が設立され一元配給となった。また、1943(昭和17)年には醤油への小麦の使用が事実上禁止となったため、代替原料の研究が精力的に行われるようになった。検討されたのは裸麦、玄米、米糠、高粱、稗、粟、ライ麦、燕麦、コブラミール、トウモロコシ、甘藷、馬鈴薯、タピオカ等であった。キッコーマンの記録によると、1942(昭和17)年6月の諸味の種類は200種類に達していたとあり、当時の苦勞が伺える¹³⁾。

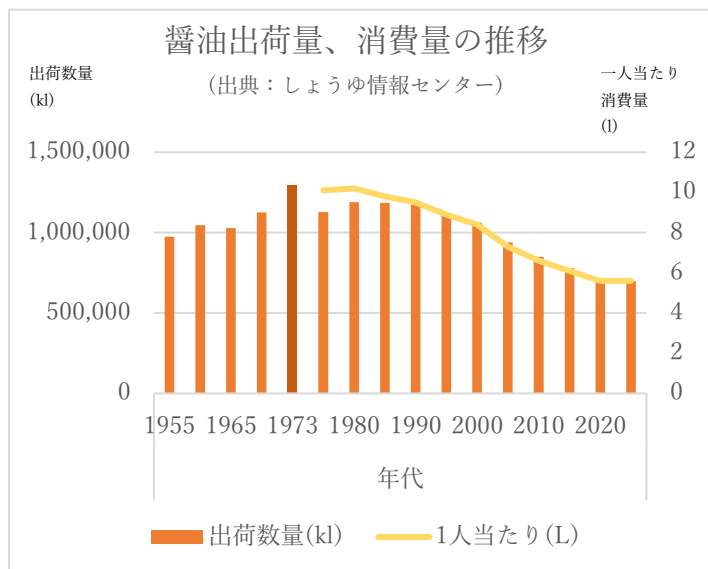
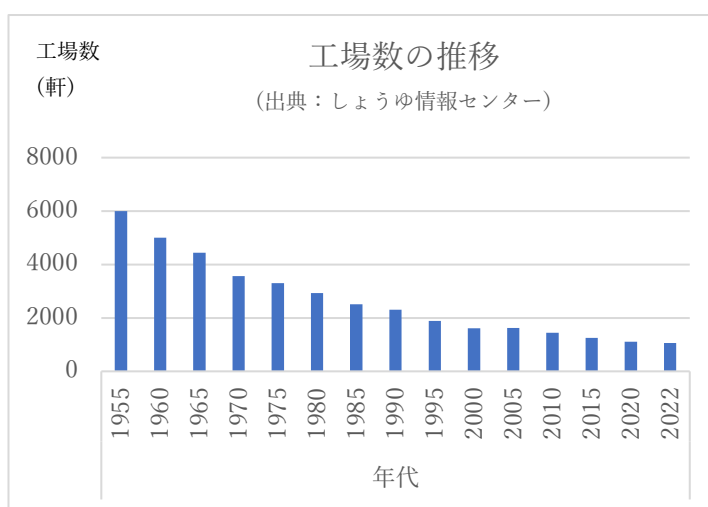
終戦後の食糧事情もさらに悪化し、満州大豆の輸入もなくなったため国内大豆の割り当てでも生産計画の20%前後と切迫する。GHQにより大豆ミール2万tが割り当てられる計画となったが、食糧不足下において醤油は製造期間が長く歩留まりが悪いという理由から、アミノ酸液業界へ供給が検討される流れとなった。醤油醸造業界は「日本人の食生活における重要性や品質の良さ」をGHQに訴えたが、利用率の悪さを理由に却下された。そこで、醤油醸造業界からはキッコーマンが、たんぱく質を弱酸でペプチド程度に分解した後、麴の酵素でアミノ酸にする半科学、半醸造の製法「新式2号」の製法を公開した。これは原料窒素の利用率がアミノ酸液と同等かそれ以上となるものであった。業界は新式2号の醤油を消費者に提供した調査結果を基に上申書を提出した。その結果、GHQからの大豆の割り当てが確保されることとなり、醸造醤油の危機は回避されることとなった¹³⁾。

戦中戦後の苦難の時代も、代替原料に関する試行錯誤と利用率の向上に関する発酵方法の試行錯誤があり、当時の工夫が現在につながっている。その後、1963(昭和38)年に発表された中小企業白書により中小企業と大企業が二重構造になっていることが公表され、「中小企業近代化促進法」が制定された。当時の醤油製造業の問題点は、「生産性が大メーカ

一の 1/2 以下であり原料利用率も要向上。設備の老朽化も著しく近代化が必要。売上純利益率は大手でも 5%程度、中小は 2~3%に過ぎなく問題が多い。設備の近代化に必要な資金の自己依存は困難であり長期資金の確保も十分ではない」とされた。醤油業界は 1970 年に国の「特定業種」に指定され、高度化融資や特例税制の対象となった。国は適正な生産規模の最低限度を年間生産量 500kl とし、企業の集約化や生揚の協業化を推進した。以降約 20 年続いた構造改善事業により企業数は集約しすることでコスト競争力、品質共に高い体質と生まれ変わってきた。

3 現代における醤油の課題

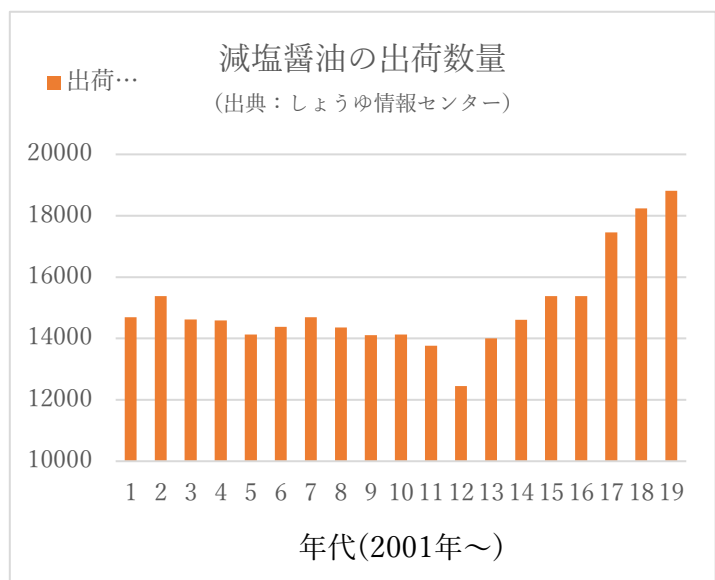
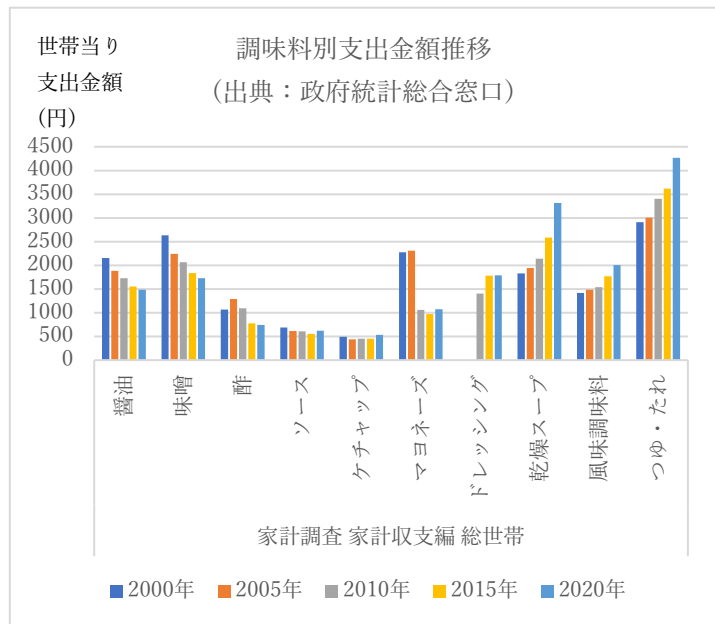
政府誘導の構造改革事業の影響もあり、構造改革事業終了の 1999(平成 11)年には醤油醸造工場軒数は 1955(昭和 30)年の 1/3 以下となった¹⁴⁾。その後醤油工場の数は減少傾向が続いている。生産能力は大幅に向上したが、醤油の出荷量は 1973 年にオイルショックの仮需要で伸びた 129 万 kl をピークに減少に転じ、2022 年には 69 万 kl にまで右肩下がり減少が続いている。一人当たりの消費量についても 1980 年の 10.2L から 2020 年には 5.6L にまで減少している¹⁴⁾。これは、人口減少と消費者の醤油離れによる影響で国内需要が減少傾向にあることを表している。



政府の家計調査によると、世帯当たりの醤油や味噌の支出金額が減少傾向にある一方で乾燥スープやつゆ・たれの支出金額が増えている¹⁵⁾。つゆ・たれはめんつゆや鍋つゆ、焼肉のタレなどであり、より簡便な調味料が選択され、醤油のみに頼らない多様な調味のライフスタイルが増加していることを表している。醤油メーカーは、醤油を原材料として使用したドレッシングやつゆ・たれの開発を進めることで市場ニーズに対応することを迫られている。

また、醤油全体の出荷量が減少傾向にある中、2013年あたりから減塩醤油の出荷量が増加傾向にある。こうした健康意識の高まりに合わせて、GABA 醤油、血圧抑制醤油などの機能性表示食品も開発されている¹⁶⁾。さらには、特定の宗教に対応したハラルやコーシャに対応した醤油、エンドウ豆やソラマメなどの豆

類、米やアワなどの穀類¹⁷⁾、油抽出後のクルミ粕などの副産物を利用したものも現れた¹⁸⁾¹⁹⁾。さらに、トマトも発酵・熟成後に醤油風調味料の原料として利用されている²⁰⁾。雑穀類を使用し、アレルギーに対応した醤油風調味料についても開発されている。色の透明な醤油やパンの耳、昆虫から醸造した醤油なども生まれている。出荷量全体の割合は多くないが醤油そのものの多様化が進んでいるといえる。



4 本研究の目的

本研究は、地域素材と微生物を活用した個性的な醤油の開発を目指したものである。個性的な醤油を開発するためには、地域特産の素材や有用な微生物を活用することが有効と考えられる。地域素材は、その地域の風土や環境によって生まれ、独特の風味を有している。また、微生物は、醤油の醸造過程において様々な香り成分や機能性物質を生み出す役割を担っている。そこで、1) 素材を変えることで醤油製品の風味にどのような影響を与えるのか、2) 個性的な醤油を比較するための評価方法の確立、3) 個性的な素材の発酵過程で微生物の菌叢はどのように変遷するのか、を明らかにすることにより、地域に根差した個性的な醤油の開発が可能となり、地域食産業の振興に貢献できると考えた。このような目的のもと、本論文では以下の2つの課題について研究を行った

5 研究方法

第一章 雑穀類を使用した醤油の特徴

岩手県は雑穀の生産量が日本一の県であるが、様々な種類の雑穀を同じ条件で醸造し、比較した研究はない。そこで、異なる原材料を同じ工程で醸造することによって、材料による遊離アミノ酸組成や香り成分のプロファイルにどのような特徴があるか解析を行った。また、醤油の官能評価として活用され始めた QDA 法を実施し²¹⁾、官能評価と理化学分析の関係性を評価することにより、それぞれの風味の違いに寄与する化学成分の同定を試みた。

第二章 醤油麴を使用したイワシ魚醤の微生物菌叢の特徴

岩手県の沿岸全域を抱える三陸地域は寒流の親潮と暖流の黒潮がぶつかる海域で世界四大漁場に数えられている。従来、鮭、サンマ、サバ等の漁獲が多かったが、近年大幅な漁獲減に苦しんでいる。一方、イワシは近年においても三陸沖で安定して漁獲されている。そこでイワシを材料として選び、魚醤の風味を大きく改善することが知られてきた醤油麴を添加する製造法において、醤油麴の添加が微生物菌叢に与える影響をアンプリコン解析により調べ、その機構について考察した。

第一章 雑穀類を使用した醤油の特徴

1.はじめに

本研究では、押麦、発芽玄米、赤たかきび、アマランサス、アワ、ヒエ、米ぬかの7種類の穀物、1種類の豆（ひよこ豆）、2種類の油抽出後の副産物（菜種搾りかす、エゴマ搾りかす）の計10種類の原料を選択し、醤油製造の可能性を探った。7種類の穀物系原料は、主要なアレルギー食品として記載が義務付けられているもの、または記載が推奨されているものには含まれていない。ひよこ豆は、高レベルのアミノ酸を示す豆類に分類される。菜種搾りかす（以下菜種かす）とエゴマ搾りかす（以下エゴマかす）は、油を抽出する際に残る副産物である。

醤油の品質を決定する風味成分については多くの研究がなされてきた。しかし、醤油風味調味料に関する研究はあまり行われていない。本研究では、小麦、大豆以外を材料として醤油の代替品として実用的な調味料となるような原料があるかどうか明らかにすることを目的とし、基本的な物理化学組成、遊離アミノ酸レベル、香り成分、官能評価などの包括的な分析を行った。

2.材料と方法

2.1 試料調製

2.1.1 原材料

押麦、発芽玄米、赤たかきび、アマランサス、アワ、ヒエ、米ぬかの 7 種類の穀物と、ひよこ豆の 1 種類、菜種かすとエゴマかすの 2 種類の副産物を使って醤油風調味料を調製した。比較のため、小麦と大豆を 1：1 の割合で使用し、通常の醤油を作った。

2.1.2 水分調整

合計 1000 g の各原料の水分含量を、水分含量を調整する前に、大気圧熱乾燥法（135°C、3 時間）を用いて最初に測定した。その後、5%ずつ水を加え、35%から 65%の範囲で水分を調整した。その後、サンプルを 8 時間浸漬させた。8 時間後の成分の吸水状態を目視と触感で評価した。

2.1.3 醸造と圧搾

各原料 1000 g 中の水分は、8 時間の浸漬の後、45%に調整した。最終的な加水重量は、押麦 707.7 g、発芽玄米 719.2 g、赤たかきび 720.0 g、アマランサス 715.9 g、アワ 714.3 g、ヒエ 801.0 g、米ぬか 733.1 g、ひよこ豆 757.0 g、菜種かす 768.3 g、エゴマかす 724.1 g であった。それぞれを 128°Cで 30 分間蒸した後、室温まで冷却した。その後、原料の成分（タンパク質、炭水化物、脂質、水分、灰分）を測定した。その後、この混合物に醤油種麹 *Aspergillus oryzae*（株式会社樋口松之助商店）を接種し、通常の醤油の標準製法に従って 39°C、湿度 100%の条件下で 48 時間静置し、麹を製造した。*Aspergillus oryzae* は *Aspergillus sojae* と同様のプロテアーゼ活性を示したが、より高い α -アミラーゼ活性を示したため、タンパク質だけでなく炭水化物に対しても幅広い酵素活性を示したのでこちらを採用とした²²⁾。得られた麹を食塩水と合わせもろみとした。もろみの塩分は 13.1~13.4%(w/w)に調整し、水分は 61~64%とした。3 L の混合物を 5 L の高密度ポリエチレン製円筒容器（直径 15 cm、高さ 30 cm）で培養した。発酵は 30°Cで 180 日間、定期的に攪拌しながら行い、その後 5C ろ紙でろ過してサンプルを得た。自然発酵の条件で素材の違いがどのように出るかを確認するため、乳酸菌や酵母の添加による微生物コントロールは行わなかった。試作品の製造工程はすべて、国際食品安全規格 FSSC22000 認証 Ver.6 に準拠している。

2.2 成分の基本的な化学組成の決定

2.2.1 全窒素

窒素含有量の分析はケルダール法で行った。各試料を硫酸を入れたケルダールフラスコに入れて酸化分解を行い、その後、水酸化ナトリウムを加えてアンモニアを遊離させ、水蒸気蒸留によりホウ酸に回収した。窒素含有量は、標準硫酸溶液で滴定して測定した。全窒素量は、滴定に必要な硫酸の量から計算した。

タンパク質含量は以下の式を用いて測定した：

$$\text{タンパク質含量(\%)} = \text{全窒素(\%)} \times 6.25$$

2.2.2 含水率

含水率は、2.1.2 に記載された方法で測定した。

2.2.3 脂質と灰分の含有量

脂質含量の測定では、サンプルをソックスレー管に入れ、ジエチルエーテルで抽出した。その後、抽出液を蒸発させ、脂質含量を計量した。灰分については、試料を灰皿に入れ、マッフル炉で 550~600°C に加熱した後、重量測定を行った。

2.2.4 炭水化物含有量

炭水化物含量は、水分、タンパク質、脂質、灰分含量を差し引いて算出した。

2.3 醤油風調味料の化学成分測定

2.3.1 グルコース含有量の測定

グルコース測定は、Merck Millipore RQ Flex 10 アナライザー（RQ Flex 10, 関東化学株式会社）と対応するグルコース測定用試薬を用い、以下の方法に従って実施した。サンプルを蒸留水で 10 倍に希釈し、テストストリップを希釈した検体に 15 秒間浸した後、RQ Flex アナライザーに挿入した。30 秒後、表示されるデータ（単位：mg/dl）を記録した。

2.3.2 乳酸含量の測定

乳酸の定量分析は、乳酸測定キット（株式会社同仁化学研究所）を用いて行った。サ

サンプルは精製水で 1000 倍に希釈したものをを用いた。

2.3.3 塩化ナトリウム (NaCl) 含有量

NaCl 含量は 100 倍希釈後、モール法に従って測定した(AOAC, 2007)。

2.3.4 全窒素の測定

全窒素含有量は、2.2.1 に記載した方法で測定した。

2.3.5 pH の測定

各醤油風調味料の pH 値は、HORIBA pH メーター (F-51 型；株式会社堀場製作所) を用いて測定した。

2.3.6 色の測定

醤油様調味料を 10 ml とり、シャーレに乗せた。各醤油様調味料の色は、NR-12 カラーチェッカー (日本電色工業株式会社) を用いて測定した。

また、醤油の JAS 公定法に従い、各醤油風調味料を直径 10 mm の試験管にとり、醤油の標準色と比較して色番手を求めた。褐色液体の色番手は、1 から 56 までの番号で表され、色が濃くなるにつれて番号は小さくなる (JAS, 2021)。

2.4 遊離アミノ酸の測定

遊離アミノ酸は、以下の手順に従い分析をした。各試料に等量の 3%スルホサリチル酸を加えた後、混合物を氷上で 1 時間静置した。その後、15,000 g、10 分間の遠心分離で得られた上清を pH2.2 のクエン酸ナトリウム緩衝液 (富士フィルム和光純薬) で 500 倍に希釈し、0.45 μm のフィルター膜でろ過した。アミノ酸分析は、ニンヒドリン法自動アミノ酸分析装置 (JLC-500/V 全自動高速アミノ酸分析装置、日本電子株式会社) を用いて行った。

2.5 ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) 分析と揮発性化合物の同定

揮発性化合物の分析は、Miyazaki らの方法に若干の修正を加えて行った²³⁾。試料 5 ml をバイアルに入れ、40°Cに保った。その後、窒素ガスを 50 ml/min の流速で流し、ヘッドスペースガスを Tenax TA チューブ (島津製作所) を用いて採取した。回収した Tenax TA チューブを熱脱着装置 (TD-20、島津製作所) に装填し、GC-MS (QP-

2010、株式会社島津製作所)で分析した。Stabliwax カラム (60 m x 0.32 mm) を使用し、温度プログラムは 40~250°C (20 分)。ピークの同定は NIST08 MS ライブラリーを用いて行った。

2.6 官能評価

官能評価は、定量的記述分析 (QDA) 法²¹⁾に基づいて実施した。パネリストは、味覚感応キット (株式会社デリコ) を用いた基本的な味覚識別テストで正答率 80%以上をクリアした者を対象に、「選択基準濃度セット」(第一薬品産業株式会社)を用いて 5 つの標準的なおいを識別できる能力を評価し、最終的に 8 名を選出した。パネリストの年齢は 20 代 2 名、30 代 1 名、40 代 3 名、50 代 2 名で、男女比は男性 5 名、女性 3 名であった。各セッションでサンプル数を変更することで、パネリストに偏った印象を与えないよう配慮した。第 1 段階では、各パネリストにサンプルの味と香りの特徴を自由に記述させ、記述用語をリストアップした。評価属性はパネリスト全員の合意に基づいて決定し、用語の説明は今村らの論文^{24) 25)}を参考に作成した。

第 2 段階では、パネリスト間で評価尺度を標準化するためのトレーニングセッションを実施した。一般的な醤油を基準とし、最も明確な官能特性を示す菜種かすと赤たかきびを標準トレーニングサンプルとした。各パネリストは、これらの属性を 1 から 10 までの 10 段階で評価した。パネリストの平均点をフィードバックし、結果を確認しながら議論と再評価のプロセスを繰り返し行った。

これらのトレーニングセッションの後、15 ml の無希釈サンプルを用いて実際の官能評価を行い、各評価の間には純水を用いて味覚のクレンジングを行った。1 種類ごとに官能評価の時間間隔を 1 時間以上あけ、1 日の最大評価数は 5 検体までとした。検体は、ポリエチレンの二重構造ボトルに -20°C で保管し、評価の際は前日までに検体を解凍し、約 30 ml の蓋付き PET 容器に 15 ml 移し替え、評価まで常温にて保管した。11 種類の調味料の官能評価における用語と特徴の定義を表 1-1 に示す。

表 1-1. 味と香りの用語と定義 官能評価における特徴

特性表現用語		用語の定義
味	甘味 塩味 酸味 旨味 苦味	シヨ糖 塩化ナトリウム 乳酸 グルタミン酸ナトリウムなどを味わった後に感じる味の余韻 後に舌に残る苦味
香り	刺激臭 甘い（わた菓子） 甘い（黒糖） エステル 渋い 酸っぱい すーっとする 青臭い 薬品臭 だし臭 穀物臭（米糠臭） 穀物臭（菜種臭） 穀物臭（エゴマ臭） 香ばしい コゲ臭 きのこ臭 生臭い 豆味噌 紅茶臭 家畜臭 いちご臭 （ストロベリーフレーバー）	ツンとする、鼻を刺す香り わた菓子のような軽い甘い香り 黒糖や紹興酒のような重厚な甘い香り 白ワインや梅の花のようなフルーティーな香り 苦渋さを感じる香り 食酢を感じさせる酸っぱい香り マジックや消毒用エタノールのような臭い 小松菜、チンゲン菜 うがい薬イソジンの香り 昆布そのものではなく、昆布だしの香り 発酵した米糠ではなく精米所の香り アブラナ科独特の青臭い香り 青草と青紫蘇と土の混じった臭い 軽く煎った穀物やトーストの香ばしい香り 焦げて炭化した臭い 舞茸やきのこの傘から感じる香り 磯臭い、時間が経った生魚の香り 八丁味噌の香り セイロン、ディンブラに代表される紅茶らしい香り 牛舎などに近づいた時に感じる臭い いちごらしいフレッシュな香り

2.7 統計分析

実験はすべて複数回行い、結果は平均値±標準偏差で示した。有意差はSPSSソフトウェア（バージョン 22.0, SPSS Inc.主成分分析（PCA）およびPLSRは、XLSTATソフトウェア（バージョン 2019.2.2, Addinsoft, New York, USA）を用いて行った。

3.結果と考察

3.1 基本的な化学組成

表 1-2 に示すように、11 種類の穀粒の吸水状態を評価した。水分含量が 45%であれば、水分が過剰に排出されることなく製麴しやすいことが示された。

表 1-2. 雑穀類の水分量による製麴適性

原材料	盛込時水分(重量%)						
	35	40	45	50	55	60	65
押麦	○	○	○	○	○	△	△
発芽玄米	○	○	○	○	○	△	△
赤たかきび	○	○	○	○	○	△	△
アマランサス	○	○	○	○	○	△	△
粟 (アワ)	○	○	○	○	○	△	△
稗 (ヒエ)	○	○	○	○	○	△	△
米ぬか	○	○	○	△	△	×	×
ひよこ豆	○	○	○	○	○	○	△
菜種かす	○	○	○	△	△	×	×
エゴマかす	○	○	○	△	△	×	×
通常醤油 (大豆+小麦)	○	○	○	○	○	○	△

○・・・離水がなく製麴しやすい

△・・・製麴は可能だが水分にムラがあり雑菌繁殖の可能性あり

×・・・水分が多すぎて吸水しきれずに離水する

醤油様調味料の原材料水分を 45%に調整した後の原材料の栄養成分組成及び醸造後のグルコース量、乳酸量、全窒素を表 1-3 に示す。

表 1-3. 醤油醸造前の各種穀物の栄養成分と醸造後のグルコース、乳酸、全窒素

原材料	タンパク質 (g/100 g)	炭水化物 (g/100 g)	脂質 (g/100 g)	水分 (g/100 g)	灰分 (g/100 g)	グルコース (mg/100 ml)	乳酸 (g/100 ml)	醤油中の全窒素 (g/100 ml)
押麦	3.90	45.40	0.90	49.30	0.50	62	1.80	0.35 ± 0.02 ^s
発芽玄米	4.10	43.10	3.10	48.90	0.80	845	1.80	0.29 ± 0.01 ^h
赤たかきび	6.20	43.20	1.60	48.80	0.20	8841	0.36	0.229 ± 0.02 ⁱ
アマランス	6.60	39.00	4.60	48.80	1.00	9139	0.92	0.38 ± 0.02 ^{fg}
粟 (アワ)	7.20	40.50	2.50	49.00	0.80	8869	0.54	0.39 ± 0.01 ^f
稗 (ヒエ)	7.40	41.90	1.10	49.10	0.50	7718	0.12	0.35 ± 0.00 ^s
米ぬか	9.80	30.30	10.90	45.60	3.40	2703	0.66	0.78 ± 0.01 ^e
ひよこ豆	11.50	35.500	3.00	48.30	1.70	4558	0.90	0.81 ± 0.01 ^d
菜種かす	18.00	23.80	6.70	47.40	4.10	8881	0.30	1.38 ± 0.01 ^b
エゴマかす	17.90	24.70	6.70	46.90	3.80	91	1.74	1.15 ± 0.02 ^c
通常醤油 (大豆・小麦)	18.20	28.40	3.20	48.70	1.50	387	1.92	1.62 ± 0.01 ^a

調製された醤油中の全窒素のデータを、標準偏差±平均として表示した。

同じ行の文字 a-d は、それらの間の有意差(p < 0.05)を示す。

また、発酵期間中の pH の変化を表 1-4 に示す。

表 1-4. 各種醤油風調味料の醸造直後（0 日）、醸造中（30 日後）、醸造終了（180 日後）の pH 値

原材料	pH		
	0 日後	30 日後	180 日後
押麦	5.17	4.96	4.15
発芽玄米	5.02	4.86	4.38
赤たかきび	5.28	5.05	3.95
アマランサス	5.01	4.80	4.30
粟(アワ)	5.31	5.14	4.58
稗(ヒエ)	5.12	4.98	4.57
米ぬか	5.66	5.45	4.90
ひよこ豆	5.58	5.40	4.23
菜種かす	5.61	5.40	4.39
エゴマかす	5.71	5.42	4.79
醤油（大豆・小麦）	5.84	5.38	4.81

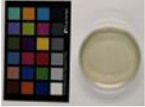
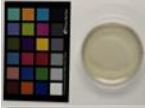





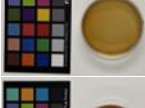


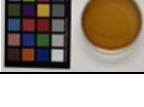
11 種類の調味料のうち、発酵菜種かす、エゴマかす、普通の醤油は、それぞれ 1.38、1.15、1.62 g/100 ml と有意に高い全窒素含量を示し、原料のタンパク質含量と相関していた。全窒素含量は醤油の品質を示す重要な指標である。JAS によると、こいくち醤油の窒素含量は 1.2%以上と定められている(JAS1073, 2021)。一般に、全窒素は原料中のタンパク質含量が高くなるほど高くなる。しかし、菜種かすやエゴマかすは、原料のタンパク質含量は醤油と同程度であるにもかかわらず、発酵液中の全窒素含量は醤油よりも低かった。これは、菜種かすやエゴマかすに含まれるタンパク質が、大豆や小麦のタンパク質に比べて麹菌の酵素による分解を受けにくいことが原因と考えられる。そのため、発酵液への溶出量が少なく、全窒素含量が低くなったと考えられる。*A.oryzae* によるプロテアーゼの生産は、基質や pH などの違いによって変化することが報告されており²⁶⁾、醤油の発酵において、微生物はタンパク質を加水分解して遊離アミノ酸を生成するプロテアーゼを分泌する。そのため、総タンパク質（窒素）含量は、風味の発現に重要な役割を果たす遊離アミノ酸の含量に影響を与えると考えられる⁶⁾。

乳酸含量は、11 種類の調味料間の値がさまざまであった。押麦、発芽玄米、エゴマ

かす、普通の醤油は比較的高いレベルを示し、1.74~1.92 g/100 ml であった。逆に、赤たかきび、アマランサス、アワ、ヒエ、米ぬか、ひよこ豆、菜種かすは、乳酸発酵が制限されるか遅延し、その含有量は 1 g/100 ml 以下であった。モロミに含まれる糖類（スクロース、グルコース、フルクトースなど）の組成と量は、発酵中の乳酸生成に影響を及ぼす²⁷⁾。発酵が不十分であったり、阻害化合物が存在したりすることが、乳酸菌の増殖を妨げているのではないかと推測された。さらに、乳酸菌の接種を行わず自然発酵に頼ったことが、乳酸含量の差の大きさにつながったと考えられる²⁸⁾。微生物接種および、または原料配合比の調整による風味向上の可能性を探るには、さらなる研究が必要である。

醤油の色は、一般消費者が醤油を選ぶ際の重要な基準である²⁹⁾。JAS によると、濃口醤油は色数が 18 以下と定義されている³⁰⁾。表 1-3 に示すように、通常の醤油、菜種かす、エゴマかすの色度は 15 であり、JAS 規格を満たしている。しかし、米ぬかとひよこ豆の色度はそれぞれ 25 と 31 であった。発酵段階でのメイラード反応生成物の蓄積が、通常の醤油製造工程における赤みや黄色みの一因となっている可能性がある³¹⁾。通常の醤油と同等の色で、色調調整のない代替品を実現するためには、米ぬか、ひよこ豆、菜種かす、エゴマかすから作られた発酵調味料が適していることが分かった。また、これらの原料の特性から、水分調整後のタンパク質含量が 10% に近いが、それ以上であることが望ましいことが明らかとなった。脂質は発酵醤油の風味に影響することも報告されている³²⁾。原料の場合、穀物ベースの原料は米ぬかを除き、脂質の含有量が比較的低い (0.90~4.60 g/100 g)。一方、油抽出工程後の植物性副産物である菜種かすとエゴマかすは、依然として比較的高い脂質含量 (6.70 g/100 g) を示した。

表 1-5. 各種原材料で醸造した醤油風調味料の色調

食材	写真	L*	a*	b*	JAS 色度
押麦		47.09 ± 1.23 ^b	0.80 ± 0.14 ^g	5.17 ± 0.13 ^e	53
発芽玄米		49.52 ± 0.18 ^a	0.82 ± 0.06 ^g	4.50 ± 0.10 ^{ef}	55
あかたかきび		46.88 ± 0.30 ^b	1.47 ± 0.10 ^f	-1.70 ± 0.10 ^f	56<
アマランサス		43.93 ± 0.09 ^c	1.05 ± 0.07 ^{fg}	8.47 ± 0.13 ^d	50
粟 (アワ)		48.44 ± 0.67 ^a	0.74 ± 0.12 ^g	5.97 ± 0.45 ^e	56
稗 (ヒエ)		46.50 ± 0.18 ^b	0.94 ± 0.02 ^g	3.11 ± 0.01 ^f	53
米ぬか		29.71 ± 0.54 ^g	14.20 ± 0.43 ^b	38.57 ± 1.70 ^a	25
ひよこ豆		37.27 ± 0.08 ^d	5.45 ± 0.10 ^e	22.97 ± 0.63 ^c	31
菜種かす		29.30 ± 0.25 ^g	14.85 ± 0.23 ^a	34.57 ± 1.45 ^b	15
エゴマかす		31.43 ± 0.17 ^f	11.17 ± 0.08 ^d	34.53 ± 0.76 ^b	15
醤油 (大豆・小麦)		33.37 ± 0.51 ^e	12.71 ± 0.27 ^c	36.15 ± 0.94 ^b	15

3.2 遊離アミノ酸

3.2.1 遊離アミノ酸の組成

微生物が放出するプロテアーゼは発酵中にタンパク質を加水分解し、醤油の風味と味を向上させる遊離アミノ酸を生成する。表 1-6 に示すように、通常の醤油 (3013.756±253.019 mg/100 ml) および菜種かす (2945.341±525.312 mg/100 ml) の総遊離アミノ酸含量は、他のサンプルと有意に異なっていた (表 4)。続いて、エゴマかす (1213.143 ± 66.117 mg /100 ml)、米ぬか (1018.648 ± 47.330 mg/100 ml)、ひよこ豆 (943.261 ± 85.421 mg/100 ml) で高い含有量が観察された。それ以外のサンプルの遊離アミノ酸含量は、すべて 800 mg/100 ml 以下であった。

一般的に、市販の醤油の遊離アミノ酸含量は 5000 mg/100 ml を超えることが知られている^{33) 34)}。今回、試験醸造した通常醤油の遊離アミノ酸含量が市販の醤油よりも低かった理由は、伝統的な醤油は通常約 1.5 年間発酵させるのに対し、本研究では発酵条件が 30°C で 180 日間であったためと考えられる。したがって、通常の醤油のタンパク質は遊離アミノ酸に完全に加水分解されていない可能性がある。さらに、遊離アミノ酸の量は、タンパク質含量と強い相関関係を示した。タンパク質含量の高い原料は、遊離アミノ酸のレベルが高いことを示し、相関係数は 0.93 であった。Liu らは、醤油発酵中にアミノ酸を産生する主要な細菌群集である *Lactococcus* の量が、遊離アミノ酸レベルの変化と正の相関関係があることを発見した³⁵⁾。本研究において試験に用いた原料穀物の栄養分の違いにより、*Lactococcus* や同様の性質を持つ微生物群の活性が異なることにより、遊離アミノ酸含量に違いが生じる可能性があると考えられる。

表 1-6. 各種穀物で発酵させた醤油中の遊離アミノ酸含有量(mg/100 ml)

アミノ酸	原材料										
	押麦	発芽玄米	赤たかきび	アマラ ンサス	粟 (アワ)	稗 (ヒエ)	米ぬか	ひよこ 豆	菜種 かす	エゴマ かす	通常 醤油
P-Ser	-	-	-	-	-	-	6.185 ±0.440 ^b	3.375 ±0.136 ^c	6.467 ±0.445 ^b	3.057 ±0.119 ^c	9.398 ±2.263 ^a
Tau	-	-	-	-	3.658 ±0.058 ^c	-	-	-	4.48 ±0.707 ^b	-	10.048 ±0.194 ^a
PEA	-	-	-	-	-	-	7.664 ±0.283 ^b	-	-	-	15.075 ±0.367 ^a
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	667.678 ±9.238	-	-
Asp	34.591 ±3.271 ^e	31.654 ±2.117 ^e	6.956 ±2.416 ^f	9.608 ±0.822 ^f	45.408 ±2.061 ^d	36.123 ±1.471 ^e	71.709 ±3.631 ^b	38.529 ±3.458 ^{de}	116.535 ±5.116 ^a	62.783 ±3.161 ^c	63.230 ±6.299 ^{bc}
Thr	24.022 ±3.798 ^{efg}	16.351 ±2.228 ^g	3.537 ±0.625 ^h	20.273 ±2.210 ^{fg}	32.714 ±1.239 ^{de}	23.729 ±2.545 ^{efg}	47.494 ±1.757 ^c	28.738 ±2.606 ^{def}	98.61 ±4.577 ^b	36.773 ±1.851 ^{cd}	119.956 ±11.890 ^a
Ser	33.003 ±4.944 ^{ef}	23.736 ±3.088 ^f	4.529 ±0.961 ^g	28.69 ±2.945 ^f	45.369 ±1.550 ^{de}	37.117 ±3.256 ^{ef}	63.568 ±2.658 ^c	54.056 ±5.075 ^{cd}	107.794 ±5.316 ^b	60.912 ±3.315 ^{cd}	188.418 ±18.625 ^a
Asn	-	-	-	-	-	-	-	6.731 ±0.216	-	-	-
Glu	51.913 ±4.789 ^f	40.319 ±1.143 ^f	8.488 ±1.866 ^g	66.078 ±2.515 ^{ef}	52.969 ±30314 ^f	48.981 ±2.515 ^f	124.770 ±2.962 ^{bc}	98.109 ±9.008 ^{cd}	143.399 ±7.106 ^b	90.471 ±9.637 ^{de}	369.752 ±36.718 ^a
Gln	10.489 ±0.528 ^c	-	-	-	27.346 ±1.111 ^b	27.008 ±1.177 ^b	-	5.989 ±0.087 ^d	2.723 ±0.179 ^d	45.958 ±4.596 ^a	30.024 ±1.139 ^b
Sar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59.711 ±2.016	-
AAA	-	-	-	-	-	-	-	-	7.966 ±0.174 ^b	10.202 ±0.302 ^a	7.979 ±1.671 ^b
Gly	32.325 ±2.511 ^{de}	27.196 ±1.409 ^{de}	5.241 ±1.987 ^f	41.699 ±1.420 ^{de}	33.165 ±0.833 ^{de}	26.685 ±1.464 ^e	64.829 ±3.978 ^c	42.188 ±4.392 ^d	105.01 ±4.698 ^b	35.199 ±2.992 ^{de}	162.566 ±18.068 ^a
Ala	44.262 ±3.453 ^{fg}	39.314 ±2.012 ^g	9.829 ±3.435 ^h	64.653 ±2.044 ^{ef}	100.504 ±1.428 ^{cd}	89.982 ±3.580 ^{cd}	108.506 ±4.873 ^c	64.292 ±6.228 ^{ef}	143.479 ±5.441 ^b	82.003 ±5.211 ^{de}	358.504 ±25.545 ^a
Cit	-	-	-	2.052 ±0.045 ^c	-	-	-	2.222 ±0.042 ^c	-	4.166 ±0.662 ^b	15.566 ±0.711 ^a
a-ABA	-	-	-	-	-	-	3.341 ±0.073 ^c	3.588 ±0.158 ^c	4.568 ±0.076 ^{bc}	6.081 ±0.161 ^{ab}	6.954 ±2.443 ^a
Val	37.184 ±4.380 ^e	29.805 ±1.461 ^c	4.930 ±1.446 ^f	29.823 ±1.834 ^c	43.638 ±1.683 ^{de}	44.853 ±2.200 ^{de}	69.969 ±2.524 ^c	54.319 ±4.581 ^{cd}	151.510 ±7.453 ^b	62.942 ±3.019 ^c	179.391 ±18.088 ^a
Cys	1.868 ±0.096	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Met	8.923 ±0.804 ^{de}	7.391 ±0.431 ^c	-	14.516 ±0.541 ^c	19.624 ±0.635 ^b	12.274 ±0.558 ^{cd}	11.943 ±2.229 ^{cd}	14.518 ±1.268 ^c	41.054 ±2.470 ^a	39.684 ±2.186 ^a	41.642 ±3.684 ^a

Cysta	1.483 ±0.037 ^f	1.870 ±0.035 ^{de}	1.549 ±0.030 ^f	-	2.661 ±0.150 ^a	2.075 ±0.063 ^c	1.958 ±0.001 ^{cd}	1.904 ±0.094 ^{cde}	1.762 ±0.033 ^c	-	2.416 ±0.130 ^b
Ile	24.796 ±2.355 ^{fg}	19.248 ±1.031 ^g	4.457 ±1.675 ^h	22.563 ±0.700 ^{fg}	33.814 ±1.663 ^{cf}	32.554 ±1.510 ^{ef}	48.450 ±2.678 ^{cd}	38.281 ±4.016 ^{de}	90.664 ±1.284 ^b	57.098 ±3.842 ^c	151.185 ±15.374 ^a
Leu	44.366 ±3.578 ^f	31.888 ±1.180 ^f	4.715 ±1.764 ^g	33.085 ±0.410 ^f	92.826 ±1.921 ^{cd}	67.12 ±3.143 ^c	76.473 ±4.315 ^{de}	75.887 ±6.645 ^{de}	176.616 ±9.184 ^b	97.214 ±5.219 ^c	240.452 ±22.390 ^a
Tyr	17.396 ±1.210 ^b	16.322 ±0.623 ^b	2.678 ±0.893 ^c	3.499 ±0.258 ^c	14.641 ±2.955 ^{bc}	12.783 ±0.626 ^c	25.843 ±0.368 ^a	8.685 ±0.966 ^d	27.500 ±0.443 ^a	24.780 ±1.457 ^a	17.495 ±2.345 ^b
Phe	20.064 ±1.312 ^{ef}	15.312 ±0.358 ^f	-	15.573 ±0.489 ^f	30.123 ±0.605 ^d	27.301 ±1.356 ^{de}	32.133 ±2.262 ^d	43.165 ±4.740 ^c	57.882 ±4.134 ^b	50.278 ±2.031 ^{bc}	107.655 ±10.010 ^a
GABA	8.388 ±0.593 ^c	4.764 ±0.162 ^f	-	6.330 ±0.132 ^c	6.178 ±0.150 ^c	4.762 ±0.274 ^f	7.186 ±0.147 ^d	-	10.308 ±0.157 ^b	6.326 ±0.198 ^c	14.752 ±0.406 ^a
MEA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28.831 ±0.604	-
NH₃	61.622 ±7.925 ^{fg}	41.062 ±6.875 ^{gh}	12.363 ±5.454 ^h	97.894 ±2.599 ^{de}	82.202 ±2.232 ^{cf}	76.369 ±2.147 ^{ef}	67.924 ±8.124 ^{fg}	170.973 ±14.469 ^c	228.910 ±5.441 ^b	127.150 ±3.769 ^d	454.552 ±14.410 ^a
Hylys-1	0.96 ±0.018 ^c	1.119 ±0.083 ^b	0.976 ±0.053 ^c	0.959 ±0.003 ^c	0.981 ±0.016 ^c	1.002 ±0.005 ^c	1.376 ±0.029 ^a	0.958 ±0.010 ^c	1.015 ±0.038 ^c	0.947 ±0.002 ^c	0.943 ±0.013 ^c
Orn	-	-	-	41.817 ±1.519 ^b	-	-	4.616±0.173 ^d	25.397±2.348 ^c	-	-	84.477±9.403 ^a
His	9.346 ±0.594 ^d	7.754 ±0.567 ^d	-	11.521 ±1.233 ^d	10.788 ±0.914 ^d	9.648 ±1.260 ^d	20.371 ±2.368 ^c	16.333 ±0.631 ^c	42.274 ±4.179 ^a	20.059 ±1.124 ^c	32.781 ±1.681 ^b
Lys	25.944 ±2.059 ^{ef}	20.432±1.141 ^{ef}	5.568 ±1.628 ^g	34.203 ±1.453 ^{de}	18.127 ±0.813 ^{fg}	15.990 ±0.798 ^{fg}	52.528 ±2.120 ^c	47.779 ±4.941 ^{cd}	140.073 ±5.346 ^b	51.626 ±3.678 ^c	165.887 ±16.501 ^a
3M-His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.479 ±0.118	-
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	16.260 ±0.585 ^a	-	13.005 ±0.414 ^b
Arg	25.204 ±1.922 ^{ef}	29.082 ±1.448 ^c	3.539 ±1.116 ⁱ	6.864 ±0.273 ^{hi}	21.921 ±0.623 ^{ef}	18.020 ±0.733 ^{fg}	60.680 ±2.518 ^c	43.399 ±3.955 ^d	112.811 ±4.694 ^b	130.971 ±7.044 ^a	13.211 ±1.371 ^{gh}
Pro	49.782 ±7.035 ^c	11.453 ±6.408 ^{fg}	-	20.497 ±4.141 ^{ef}	40.517 ±3.734 ^{cd}	29.686 ±3.264 ^{de}	39.133 ±1.205 ^{cd}	53.850 ±6.742 ^c	112.597 ±2.817 ^b	13.444 ±7.250 ^{efg}	136.445 ±16.938 ^a
Total	567.928 ±54.717 ^{cd}	416.072 ±31.671 ^{de}	79.354 ±20.500 ^c	572.196 ±18.790 ^{cd}	759.173 ±18.050 ^{cd}	644.061 ±26.801 ^{cd}	1018.648 ±47.330 ^{bc}	943.261 ±85.421 ^{bc}	2945.341 ±525.312 ^a	1213.143 ±66.117 ^b	3013.756 ±253.019 ^a

データは標準偏差±平均値として表示した。

同じ行の文字 a-d は、それらの間の有意差(p < 0.05)を示す。

甘味に起因する遊離アミノ酸は黒色の太字、うま味に寄与する遊離アミノ酸は青色の太字、苦味の原因となる遊離アミノ酸は茶色の太字で表示した。

3.2.2 遊離アミノ酸のクラスター分析

クラスター分析では、図 1-1 に示すように、さまざまなタイプの醤油風調味料をその特徴に基づいて区別することを目的とした。赤は高い値を、青は低い値を示す。驚くべきことに、通常の醤油は同定されたすべての遊離アミノ酸のレベルが高く、菜種かすと一緒にクラスター化した。また、豊富な Gln、Sar、MEA、3M-His を特徴とするエゴマかすは、米ぬかと同じ独立したグループを形成した。遊離アミノ酸が少ないものについてもグループ化できた。

風味に寄与する主な遊離アミノ酸を抽出し、甘味、うま味、苦味に分類した結果を図 1-2 に示す。遊離アミノ酸は味覚に大きく寄与することが知られている³⁶⁾。検出されたアミノ酸のうち、スレオニン (Thr)、セリン (Ser)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、プロリン (Pro) は甘味に寄与することが知られている。アスパラギン酸(Asp)とグルタミン酸(Glu)はうま味に寄与し、バリン(Val)、システイン(Cys)、メチオニン(Met)、システイン酸(Cysta)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)、チロシン(Tyr)、フェニルアラニン(Phe)、ヒスチジン(His)、リジン(Lys)、トリプトファン(Trp)、アルギニン(Arg)は苦味に寄与することが知られている³⁷⁾。11 種類の調味料において、呈味に關与する遊離アミノ酸の量に有意な差が認められた。一般的な醤油 (RSS) が最も旨味成分、特にうま味成分の濃度が高く、次いで暖色系の菜種かす (Ra)、エゴマかす (Pe) が続いた。一方、寒色系の食材は、旨味成分である遊離アミノ酸の濃度が低かった。苦味のある遊離アミノ酸は、すべてのサンプルでうま味や甘味のある遊離アミノ酸と同等かそれ以上であったことは注目に値する。食品に含まれる少量の苦味でさえ、味に深み、複雑さ、コクを与え、複雑性増強剤や風味増強剤として機能する可能性がある^{38) 39)}。さらに、日本の醤油の市場価格は、苦味由来の複雑さやうま味由来の複雑さと正の相関があることが報告されている²⁵⁾。しかし、うま味のある遊離アミノ酸の濃度は高級醤油の品質にとって重要であり、醤油の苦味は全体的な風味プロファイルを高めると考えられていた。さらに、醤油に含まれる Glu や Asp のようなうま味遊離アミノ酸は、ナトリウム塩や他の呈味物質と相互作用し、旨味に寄与することが知られている⁴⁰⁾。全体として、通常の醤油、菜種かす、エゴマかすのような、呈味に關与する遊離アミノ酸の量が多い調味料は、より豊かな風味を示すが、呈味成分が少ないものは単調な風味になる可能性がある。

図 1-1. 35 種の遊離アミノ酸のヒートマップクラスタリング

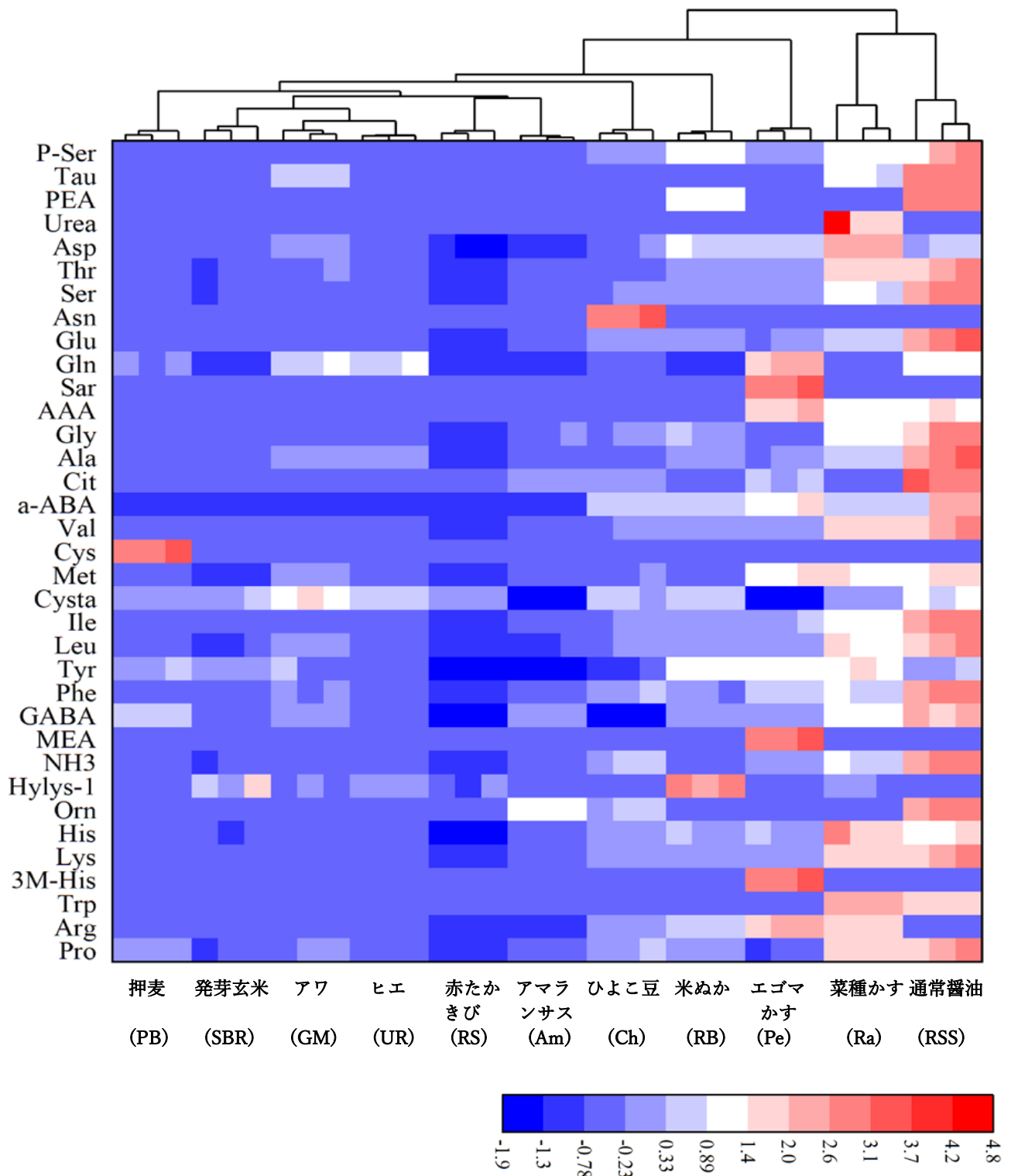


図 1-2. 11種の調味料のフレーバーマップ



PB: 押麦, SBR: 発芽玄米, RS: 赤たかきび, Am: アマランサス, GM: アワ, UR: ヒエ, RB: 米ぬか Ch: ひよこ豆
 Ra: 菜種かす Pe: エゴマかす, RSS: 通常醤油

3.3 香気化合物の組成

醤油の品質は、風味に寄与する遊離アミノ酸のほかに、香りに寄与する香気成分によって大きく左右される⁴¹⁾。GC-MSを用いて同定した11種の発酵調味料における合計87種類の主な香気化合物の詳細情報を表1-7に示した。これらの化合物は、アルコール21種、ケトン14種、エステル12種、酸11種、アルデヒド9種、フェノール6種、アルカン3種、エーテル2種、ニトリル2種、芳香族炭化水素2種、その他3種に分類された(図1-3)。フルフラール、2-メチル-プロパン酸、2-エチル-1-ヘキサノール、1-メチル-2-ピロリジノンは、すべての種類のサンプルで共通して検出された。対照的に、42種類のアロマ化合物がひとつのサンプルのみに存在し、特徴的なプロフィールを示した。特に、アルコール、酸、エステル、アルデヒドは、一般的な醤油に含まれる主な香気成分として同定されている⁴²⁾。

サンプルの分類にはクラスター分析を利用した。図1-4に示すように、各サンプルにおいて、特徴的な香気成分を識別することができ、異なる原料で発酵させた醤油様調味料を区別する特徴となっている。特に、米ぬかを原料として発酵させた調味料は、アルデヒドに分類されるブタナール、3-メチル-フルフラール、n-デカナールを含む揮発性成分の相対的含有量が最も豊富であった。アルデヒドは脂質の酸化によって生じる主な分解産物で、醤油にも多く含まれ、揮発性が高く、閾値が低いため、麦芽やナッツのような香りを与える^{43) 44) 45)}。米ぬかは脂質含量が最も高いため(表1-3)、アルデヒド含量も比較的高い。これとは別に、米ぬか発酵醤油様調味料は、2-メチル-プロパン酸、2-フランメタノール、フェネチルアルコール、2-メチル-プロパン酸、3-メチル-ブタン酸など、いくつかの酸によっても特徴付けられた。酸はサンプルに酸っぱい臭いを与え、中でも2-メチル-プロパン酸はすべてのサンプルに存在し、焦げ臭、バター臭、チーズ臭、汗臭い臭いに起因していた。一般的な醤油は、ヘキサン、トルエン、クロリウス、エチルヘキサノール、ベンゼンアセトアルデヒド、オクタン-3-オン、2-エチル-1-ヘキサノール、2-メチル-1-プロパノールなどが比較的多く含まれていた。これらのうち、2-メチル-1-プロパノール、3-メチル-1-ブタノール、オクタン-3-オン、ベンゼンアセトアルデヒドは、中国醤油からも検出されている⁶⁾。赤たかきびと、アワからは、2-メチル-1-プロパノール、3-メチル-1-ブタノール、1-ヘキサノール、3-エトキシ-1-プロパノール、1-ブタノール、2-フランメタノールなどのアルコールが検出された。アルコールは、メイラード型反応とStrecker分解によって生成され、発酵中に還元された⁴⁶⁾。アルコール化合物はサンプルの草葉の刺激臭に寄与している可能性が

ある。菜種かすには、ケトン、アルデヒド、酸が含まれていた。もうひとつの副産物であるエゴマかすには、酢酸 3-メチル-1-ブタノール、sec-ブチルエチルエーテル、安息香酸エチルエステル、マルトール、2-メトキシ-4-エチル-フェノール、4-エチル-フェノールなどのエステル類やフェノール類が含まれていた。エステル類はサンプルにフルーティーで甘い風味を与え、発酵中のアルコールとカルボン酸のエステル化プロセスによって生成される⁴⁵⁾。一方、フェノール類は苦味と刺激的な香りを付与し、主に糖代謝と酵母の脱炭酸に関与する⁴⁷⁾。残りの穀物系原料であるヒエ、アマランサス、発芽玄米、押麦、ひよこ豆には、1-ペンタノール、1-ヘプタノール、マルトール、n-デカン酸、2-ヘキセン-1-オールなどが特徴的な化合物で、発芽玄米と押麦はそのグループに属する。香気成分のばらつきはおそらく原料の違いに起因しており、その結果、香気付与化合物の生合成に関与する微生物の代謝経路が異なることによるものと示唆される^{48) 49) 50)}。

表 1-7. 11種の発酵調味料において検出された主な揮発性化合物

Materials	No.	Retention time	Compounds	Type	Description	CAS
押麦	1	6.673	Ethyl Acetate	Ester	Aromatic, brandy, grape ¹	141-78-6
	2	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
	3	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
	4	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
	5	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
	6	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
	7	15.548	1-Hexadecanol	Alcohol	Flower, wax ¹	36653-82-4
	8	15.03	Lactate <ethyl->	Ester	Cheese, floral, fruit, pungent, rubber ¹	97-61-3
	9	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
	10	15.716	1-Propanol, 3-ethoxy-	Alcohol	Fruit ²	111-35-3
	11	15.812	3-Hexen-1-ol, (Z)-	Alcohol	Grass, green fruit, green leaf, herb, unripe banana ¹	928-96-1
	12	16.112	2-Nonen-1-ol, (E)-	Alcohol	Savory ¹	31502-14-4
	13	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
	14	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	15	19.951	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate	Alcohol	Fruit ³	124-17-4
	16	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	17	21.29	Heptadecane	Alkane	Alkane ²	629-78-7
	18	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	19	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2

それぞれのサンプルに特有の化合物を太字で示す。

香りの表現は、¹ Flavor Ingredient Library (<http://www.femaflavor.org/flavor-library>);

² Flavournet (<http://www.flavournet.org/flavournet.html>); ³ ChemSpider (<http://www.chemspider.com>)による

1	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
2	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
3	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Burnt, cocoa, floral, malt ¹	123-51-3
4	13.514	Pyruvate <ethyl->	Ketone	Floral ¹	617-35-6
5	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
6	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
7	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
8	15.716	1-Propanol, 3-ethoxy-	Alcohol	Fruit ²	111-35-3
9	16.245	Pentadecane	Alkane	Alkane ²	629-62-9
10	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
11	17.71	Hexanol <2-ethyl->	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
12	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
13	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
14	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	503-74-2
15	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
16	24.767	Phenylethyl Alcohol	Alcohol	Fruit, honey, lilac, rose, wine ¹	60-12-8
17	25.913	Phenol	Phenol	Medicinal ²	108-95-2
18	27.121	Eicosane	Alkane	Fat, green, sour ¹	112-95-8

赤た=かきひ

1	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
2	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
3	13.514	Pyruvate <ethyl->	Ketone	Flora ¹	617-35-6
4	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
5	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
6	15.03	Lactate <ethyl->	Ester	Cheese, floral, fruit, pungent, rubber ¹	97-61-3
7	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
8	15.716	1-Propanol, 3-ethoxy-	Alcohol	Fruit ²	111-35-3
9	16.928	Acetic acid	Acid	Acid, fruit, pungent, sour, vinegar ¹	64-19-7
10	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
11	17.695	1-Hexanol, 2-ethyl-	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
12	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
13	19.951	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate	Alcohol	Fruit ³	124-17-4
14	20.236f	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	Lactone	Herb ¹	108-29-2
15	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	503-74-2
16	20.943	Butanedioic acid, diethyl ester	Ester	Cotton, fabric, floral, fruit, wine ¹	123-25-1
17	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
18	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
19	23.528	Hexanoic acid	Acid	Cheese, oil, pungent, sour ¹	142-62-1
20	24.767	Phenylethyl Alcohol	Alcohol	Fruit, honey, lilac, rose, wine ¹	60-12-8
21	25.913	Phenol	Phenol	Medicinal ²	108-95-2

アマランサス	1	6.795	Diethyl acetal	ether	Creamy, fruit, pleasant, tropical fruit ¹	105-57-7
	2	7.148	Isovaleric aldehyde	Aldehyde	Malt ²	590-86-3
	3	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
	4	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
	5	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
	6	13.514	Pyruvate <ethyl->	Ketone	Flora ¹	617-35-6
	7	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
	8	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
	9	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
	10	17.083	1-Heptanol	Alcohol	Chemical, green ²	111-70-6
	11	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
	12	17.695	1-Hexanol, 2-ethyl-	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
	13	17.71	Hexanol <2-ethyl->	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
	14	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	15	20.236	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	Lactone	Herb ¹	108-29-2
	16	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	17	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	123-25-1
	18	20.943	Butanedioic acid, diethyl ester	Ester	Cotton, fabric, floral, fruit, wine ¹	123-25-1
	19	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	20	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
	21	23.365	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	Ester	Flower, honey, rose ¹	103-45-7

77	1	7.556	1,3-Dioxolane, 2,4,5-trimethyl-	Ether	Alcohol ³	3299-32-9
	2	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
	3	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
	4	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
	5	13.17	1-Pentanol	Alcohol	Balsamic, fruit, green, pungent, yeast ¹	71-41-0
	6	13.33	Benzene, 1,3,5-trimethyl-	Aromatic hydrocarbon	Aromatic ³	108-67-8
	7	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
	8	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
	9	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
	10	15.716	1-Propanol, 3-ethoxy-	Alcohol	Fruit ²	111-35-3
	11	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
	12	17.71	Hexanol <2-ethyl->	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
	13	18.048	Decanal <n->	Aldehyde	Floral, fried, orange peel, penetrating, tallow ¹	112-31-2
	14	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	15	20.236	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	Ketone	Herb ¹	108-29-2
	16	20.343	Acetic acid, diethyl-	Acid	Fruit ¹	88-09-5
	17	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	18	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	123-25-1
	19	21.075	Benzoic acid, ethyl ester	Ester	Camomile, celery, fat, flower, fruit ¹	93-89-0
	20	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	21	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2

比工	1	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
	2	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
	3	11.799	3-Butenenitrile	Nitrile	Mustard oil ³	109-75-1
	4	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
	5	13.17	1-Pentanol	Alcohol	Balsamic, fruit, green, pungent, yeast ¹	71-41-0
	6	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
	7	15.018	5-Hepten-2-one, 6-methyl-	Ketone	Citrus, mushroom, pepper, rubber, strawberry ¹	110-93-0
	8	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
	9	15.716	1-Propanol, 3-ethoxy-	Alcohol	Fruit ²	111-35-3
	10	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
	11	18.048	Decanal <n>	Aldehyde	Floral, fried, orange peel, penetrating, tallow ¹	112-31-2
	12	18.654	Benzaldehyde	Aldehyde	Bitter almond, burnt sugar, cherry, malt, roasted pepper ¹	100-52-7
	13	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	14	20.512	Menthol	Alcohol	Mint, cool ¹	1490-04-6
	15	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	16	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	17	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
	18	23.528	Hexanoic acid	Acid	Cheese, oil, pungent, sour ¹	142-62-1
	19	24.755	Phenethyl alcohol	Alcohol	Fruit, honey, lilac, rose, wine ¹	60-12-8

1	6.763	Ethyl Acetate	Ester	Aromatic, brandy, grape ¹	141-78-6
2	7.168	Butanal, 3-methyl-	Aldehyde	Malt ²	590-86-3
3	7.868	Butanoic acid, ethyl ester	Ester	Apple, butter, cheese, pineapple, strawberry ¹	105-54-4
4	9.69	Isovalerate <ethyl->	Ester	Apple, fruit, pineapple, sour ¹	108-64-5
5	10.03	Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Apple, bitter, cocoa, wine ¹	78-83-1
6	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
7	11.357	1-Penten-3-ol	Alcohol	Butter, fish, green, oxidized, wet earth ¹	616-25-1
8	12.103	Pyridine	Other	Rancid ²	110-86-1
9	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
10	12.937	Hexanoate <ethyl->	Ester	Apple peel, brandy, fruit gum, overripe fruit, pineapple ¹	123-66-0
11	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
12	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
13	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
14	15.357	Pyrazine, 2,3-dimethyl-	Pyrazine	Caramel, cocoa, hazelnut, peanut butter, roasted ¹	5910-89-4
15	15.618	3-Hexanol, 2-methyl-	Alcohol	Fruit ³	617-29-8
16	15.787	1-Hydroxy-2-butanone	Aldehyde	Savory ¹	5077-67-8
17	16.245	Pentadecane	Alkane	Alkane ²	629-62-9
18	16.928	Acetic acid	Acid	Acid, fruit, pungent, sour, vinegar ¹	64-19-7
19	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
20	17.71	Hexanol <2-ethyl->	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7

米ぬか	21	18.048	Decanal <n>	Aldehyde	Floral, fried, orange peel, penetrating, tallow ¹	112-31-2
	22	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	23	20.343	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-	Ketone	Dried grass, tobacco ³	542-28-9
	24	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	25	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	123-25-1
	26	20.998	1,2-Butanediol , (+/-)-	Alcohol	Cheese, sweat ³	584-03-2
	27	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	28	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
	29	21.892	Pentanoic acid	Acid	Cheese, pungent ¹	109-52-4
	30	23.528	Hexanoic acid	Acid	Cheese, oil, pungent, sour ¹	142-62-1
	31	24.767	Phenylethyl Alcohol	Alcohol	Fruit, honey, lilac, rose, wine ¹	60-12-8
	32	25.13	Heptanoic acid	Acid	Apricot, floral, sour ¹	111-14-8
	33	25.913	Phenol	Phenol	Medicinal ²	108-95-2
	34	26.678	2(3H)-Furanone, dihydro-5-pentyl-	Ketone	Coconut, peach ²	104-61-0
	35	26.862	2-Pyrrolidinone	Ketone	Cheese, Sweat ³	616-45-5
	36	27.177	2-Ethyl-4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone, acetate	Ester	Caramel ²	27538-10-9
	37	28.193	Phenol, 4-ethyl-	Phenol	Leather, phenol, spice, stable ¹	123-07-9
	38	31.257	Mequinol	Phenol	Caramel, phenol ³	150-76-5
	39	36.535	Tetradecanoic acid	Acid	Wax, oil, coconut ³	544-63-8

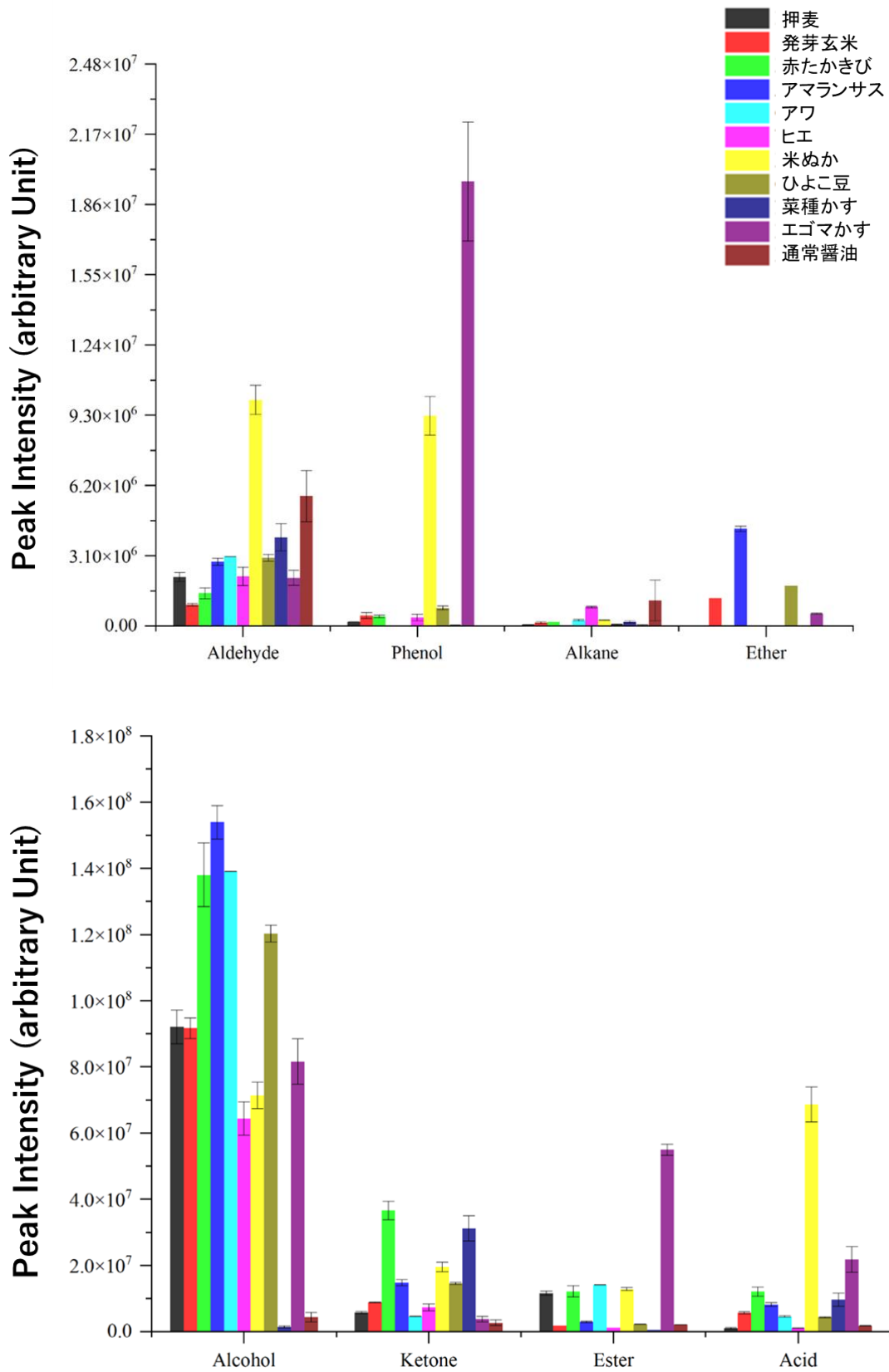
1	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
2	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
3	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
4	13.514	Pyruvate <ethyl->	Ketone	Flora ¹	617-35-6
5	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
6	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
7	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
8	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
9	17.695	1-Hexanol, 2-ethyl-	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
10	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
11	19.951	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-, acetate	Alcohol	Fruit ³	124-17-4
12	20.236	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	Lactone	Herb ¹	108-29-2
13	20.342	2H-Pyran-2-one, tetrahydro-	Ketone	Dried grass, tobacco ³	542-28-9
14	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	123-25-1
15	21.29	Heptadecane	Alkane	Alkane ²	629-78-7
16	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
17	23.528	Hexanoic acid	Acid	Cheese, oil, pungent, sour ¹	142-62-1
18	23.365	Acetic acid, 2-phenylethyl ester	Ester	Flower, honey, rose ¹	103-45-7
19	24.767	Phenylethyl Alcohol	Alcohol	Fruit, honey, lilac, rose, wine ¹	60-12-8
20	25.689	Maltol	Phenol	Caramel ²	118-71-8
21	25.913	Phenol	Phenol	Medicinal ²	108-95-2

菜種かす	1	11.799	Mustard oil ³	Nitrile	Mustard oil ³	109-75-1
	2	12.175	Cyclopentanone	Ketone	Mint, cool ¹	120-92-3
	3	15.289	Cyclopentanone	Ketone	Mint, cool ¹	120-92-3
	4	16.928	Acetic acid	Acid	Acid, fruit, pungent, sour, vinegar ¹	64-19-7
	5	17.275	Propionaldehyde <3-methylthio->	Aldehyde	Cooked potato, soy ¹	3268-49-3
	6	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
	7	17.695	1-Hexanol, 2-ethyl-	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
	8	18.048	Decanal <n->	Aldehyde	Floral, fried, orange peel, penetrating, tallow ¹	112-31-2
	9	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	10	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	11	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	123-25-1
	12	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
	13	21.892	Pentanoic acid	Acid	Cheese, pungent ¹	109-52-4
	14	22.267	1-Decanol	Alcohol	Fat, oil ¹	112-30-1
	15	23.528	Hexanoic acid	Acid	Cheese, oil, pungent, sour ¹	142-62-1
	16	26.798	Benzenepropanenitrile	Nitrile	Forest ³	645-59-0
	17	27.121	Eicosane	Alkane	Fat, green, sour ¹	112-95-8
	18	28.61	2-Methoxy-4-vinylphenol	Phenol	Clove, curry, spice ¹	7786-61-0

エゴマカサ	1	6.763	Ethyl Acetate	Ester	Aromatic, brandy, grape ¹	141-78-6
	2	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
	3	10.706	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	Ester	Apple, banana, pear ¹	123-92-2
	4	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
	5	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
	6	13.514	Pyruvate <ethyl->	Ketone	Flora ¹	617-35-6
	7	14.067	Acetoin	Ketone	Butter, creamy, green pepper ¹	513-86-0
	8	15.178	1-Hexanol	Alcohol	Banana, flower, grass, herb ¹	111-27-3
	9	15.812	3-Hexen-1-ol, (Z)-	Alcohol	Grass, green fruit, green leaf, herb, unripe banana ¹	928-96-1
	10	15.919	sec-Butyl ethyl ether	ether	Floral ¹	2679-87-0
	11	16.928	Acetic acid	Acid	Acid, fruit, pungent, sour, vinegar ¹	64-19-7
	12	17.37	Furfural	Aldehyde	Almond, baked potatoes, bread, burnt, spice ¹	98-01-1
	13	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	14	20.236	2(3H)-Furanone, dihydro-5-methyl-	Lactone	Herb ¹	108-29-2
	15	20.63	2-Furanmethanol	Alcohol	Burnt, caramel, cooked ¹	98-00-0
	16	20.742	Butanoic acid, 3-methyl-	Acid	Cheese, pungent ¹	123-25-1
	17	21.075	Benzoic acid, ethyl ester	Ester	Camomile, celery, fat, flower, fruit ¹	93-89-0
	18	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	19	21.718	1-Propanol, 3-(methylthio)-	Alcohol	Earth, garlic, potato, soy ¹	505-10-2
	20	23.528	Hexanoic acid	Acid	Cheese, oil, pungent, sour ¹	142-62-1

通常醬油	1	4.86	Hexane	Alkane	Alkane ²	110-54-3
	2	7.168	Butanal, 3-methyl-	Aldehyde	Malt ²	590-86-3
	3	9.228	Toluene	Aromatic hydrocarbon	Paint ²	108-88-3
	4	10.03	1-Propanol, 2-methyl-	Alcohol	Alcohol, candy, pungent ¹	78-83-1
	5	11.087	1-Butanol	Alcohol	Fruit ¹	71-36-3
	6	11.357	1-Penten-3-ol	Alcohol	Butter, fish, green, oxidized, wet earth ¹	616-25-1
	7	11.933	Octan-3-one	Ketones	Fruity, warm ³	106-88-3
	8	12.103	Pyridine	Other	Rancid ²	110-86-1
	9	12.413	1-Butanol, 3-methyl-	Alcohol	Fruit ¹	123-51-3
	10	14.347	2-Propanone, 1-hydroxy-	Ketone	Butter, herb, malt, pungent ¹	116-09-6
	11	15.289	Cyclopentanone	Ketone	Mint, cool ¹	120-92-3
	12	15.921	Hexanol <ethyl>	Alcohol	Green, rose ¹	104-76-7
	13	18.654	Benzaldehyde	Aldehyde	Bitter almond, burnt sugar, cherry, malt, roasted pepper ¹	100-52-7
	14	18.783	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	Ketone	Resin ³	15087-24-8
	15	18.983	Propanoic acid, 2-methyl-	Acid	Burnt, butter, cheese, sweat ¹	79-31-2
	16	19.878	Undecanal	Aldehyde	Oil, pungent, sweet ²	112-44-7
	17	20.642	Benzeneacetaldehyde	Aldehyde	Berry, geranium, honey, nut, pungent ¹	122-78-1
	18	21.29	Heptadecane	Alkane	Alkane ²	629-78-7
	19	21.573	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-	Ketone	Amine ³	872-50-4
	20	21.922	n-Decanoic acid	Acid	Rancid, fat ²	334-48-5

図 1-3. 検出された香気成分の分類



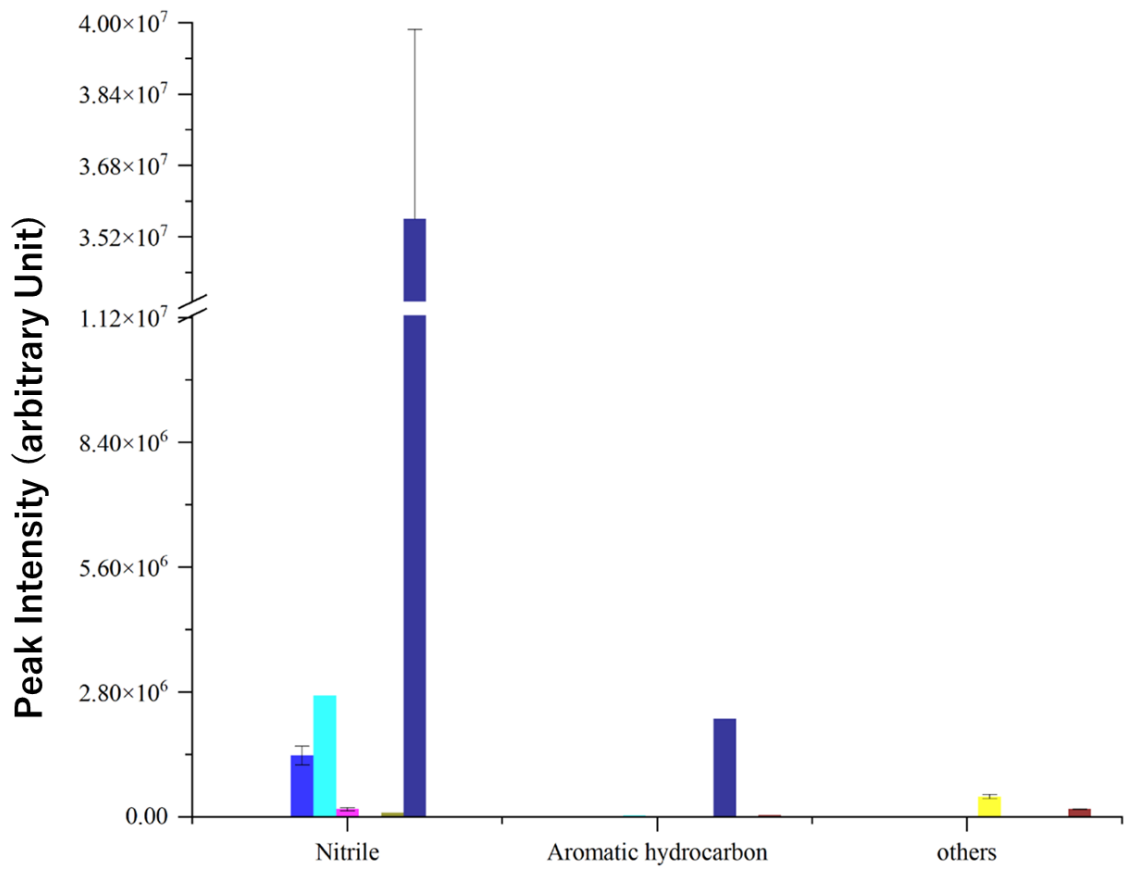


図 1-4. 香気成分のヒートマップ解析



3.4 官能評価

3.4.1 醤油風調味料の官能特性

異なる原料で発酵させた 11 種類の醤油風調味料の味と香りのプロファイルを、定量的記述分析 (QDA) 法を用いて評価した。QDA 法を用いた醤油の官能特性に関する研究は、十分に訓練されたパネルが、人種やサンプルへの慣れ (使用頻度や経験など) に関係なく、同じ特徴を確実に識別できることを示している^{51) 52) 24)}。表 1-7 に示すように、通常の醤油は甘味 (5.00 ± 0.71)、酸味 (5.00 ± 0.00)、うま味 (5.00 ± 0.00) のレベルが有意に高かった。最も低い値を示したのは甘味の赤たかきび (2.40 ± 0.97)、酸味のアワ (3.30 ± 0.36)、うま味の赤たかきび (1.13 ± 0.60) であった。また、塩味は赤たかきびが最も高く (7.65 ± 0.52)、通常の醤油が最も低かった。菜種かすはサンプルの中で最も苦味が高かった (8.10 ± 0.35)。

アロマ・プロファイルについては、普通の醤油が最も香ばしく (5.00 ± 0.87)、生臭い (5.00 ± 0.00)。しかし、菜種かすは、辛味 (7.00 ± 1.50)、渋味 (7.00 ± 0.50)、酸味 (7.00 ± 0.50)、青臭い (5.03 ± 1.20)、薬品臭 (5.10 ± 1.22)、スープ臭、穀物臭 (8.00 ± 0.00)、焦げ臭 (8.38 ± 0.83)、キノコ臭 (5.00 ± 1.00)、動物臭 (5.00 ± 1.00) であり、しっかりとした芳香特性を示した。ひよこ豆は、甘味 (黒糖、 7.00 ± 0.00)、豆味噌 (4.43 ± 0.52)、紅茶 (7.00 ± 0.87)、イチゴの香り (4.25 ± 0.44) で最も高い値を示した。発芽玄米、アワ、米ぬかはそれぞれ、甘い香り (綿あめ)、エステル香、薬品臭、穀物臭 (米ぬか) で最も強い香りを示した。11 種類のうち、赤たかきびの味と香りのプロファイルは全体的に比較的 low、通常醤油と菜種かすの味と香りのプロファイルが最も高かった。ブドウ糖含量と甘味、乳酸と酸味の相関は 0.29 未満と弱かった。さらに、Thr、Ser、Asn、Gly、Ala、Pro などの甘味アミノ酸と甘味の相関係数もそれぞれ 0.13、0.10、0.0、0.60、-0.064、0.22、0.29 と低かった。官能評価による醤油様発酵調味料の甘味の評価は、甘味の前に強い塩味や酸味を感じるため難しいことがわかった。さらに、酸味の官能評価はうま味や甘味に影響されることから、酸味の重要なファクターであると考えられている乳酸量は必ずしも官能評価と一致しないということが示唆された。

表 1-7. 各種穀物で発酵させた醤油の官能評価

味/香り	原材料										
	押麦	発芽 玄米	赤たか きび	アマラ ンサス	粟 (アワ)	稗 (ヒエ)	米ぬか	ひよこ 豆	菜種 かす	エゴマ かす	通常 醤油
甘味	4.00±	4.53±	2.40±	3.05±	5.48±	4.78±	2.75±	3.98±	2.43±	3.68±	5.00±
	0.74 ^{bcd} e	0.51 ^{abcd}	0.97 ^g	1.11 ^{efg}	0.90 ^a	0.59 ^{abc}	0.38 ^{fg}	0.77 ^{cde}	0.35 ^g	0.69 ^{def}	0.71 ^{ab}
塩味	6.13±	6.35±	7.65±	6.63±	6.25±	6.15±	6.08±	6.38±	6.28±	6.58±	5.00±
	1.51 ^{bc}	1.33 ^{abc}	0.52 ^a	0.64 ^{ab}	1.46 ^{abc}	2.03 ^{bc}	0.91 ^{bc}	0.44 ^{abc}	0.64 ^{abc}	0.97 ^{ab}	0.00 ^c
酸味	3.98±	3.95±	3.50±	3.50±	3.30±	3.95±	4.08±	3.93±	4.05±	4.30±	5.00±
	0.93 ^{bc}	0.61 ^{bc}	0.38 ^c	0.37 ^c	0.36 ^c	0.58 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.84 ^{bc}	0.58 ^{bc}	0.72 ^{ab}	0.00 ^a
旨味	2.36±	2.05±	1.13±	2.32±	2.37±	2.13±	2.91±	3.42±	3.06±	3.70±	5.00±
	0.62 ^{cd}	0.45 ^{de}	0.60 ^e	0.74 ^d	0.67 ^{cd}	0.56 ^{de}	0.48 ^{bcd}	1.01 ^{bc}	0.73 ^{bcd}	1.67 ^b	0.00 ^a
苦味	4.03±	3.90±	3.31±	3.93±	3.85±	3.78±	5.66±	4.15±	8.10±	4.84±	5.00±
	1.07 ^{cd}	1.19 ^{cd}	1.55 ^d	1.21 ^{cd}	0.97 ^{cd}	1.10 ^{cd}	1.44 ^b	0.77 ^{cd}	0.35 ^a	0.57 ^{bc}	0.00 ^{bc}
刺激臭	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.33±	0.00±	6.03±	0.00±	7.00±	0.11±	0.00±
	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.49 ^c	0.00 ^c	0.84 ^b	0.00 ^c	1.50 ^a	0.20 ^c	0.00 ^c
甘い (わた菓子)	6.20±	7.00±	4.63±	6.13±	6.53±	5.15±	4.20±	6.05±	4.05±	4.23±	5.00±
	0.88 ^{ab}	0.50 ^a	1.61 ^{de}	0.76 ^{ab}	0.73 ^a	0.87 ^{bcd}	0.21 ^{de}	0.80 ^{abc}	0.09 ^c	0.72 ^{de}	0.00 ^{cde}
甘い (黒糖)	4.45±	4.33±	2.90±	5.73±	4.65±	4.00±	2.75±	7.00±	3.13±	2.58±	5.00±
	1.24 ^{bcd}	0.82 ^{bcd} e	1.81 ^{ef}	0.51 ^{ab}	1.52 ^{bc}	0.74 ^{cdef}	1.20 ^f	0.00 ^a	1.19 ^{def}	1.40 ^f	0.00 ^{bc}
エステル	6.03±	6.30±	4.10±	5.65±	8.00±	6.00±	4.40±	7.60±	4.10±	3.00±	5.00±
	0.85 ^{bc}	0.33 ^b	1.09 ^{de}	0.67 ^{bc}	0.50 ^a	0.66 ^{bc}	1.13 ^d	0.99 ^a	1.70 ^{de}	0.71 ^c	0.00 ^{cd}
渋い	0.40±	0.43±	0.26±	0.53±	0.36±	0.35±	6.05±	0.68±	7.00±	1.13±	1.00±
	0.43 ^{cde}	0.45 ^{cde}	0.43 ^e	0.66 ^{cde}	0.41 ^{de}	0.41 ^{de}	0.54 ^b	0.41 ^{cde}	0.50 ^a	0.54 ^c	0.87 ^{cd}
酸っぱい	4.65±	5.38±	4.90±	5.05±	5.00±	4.48±	5.55±	4.80±	7.00±	4.00±	5.00±
	0.70 ^{de}	0.40 ^{bc}	0.53 ^{bcd}	0.79 ^{bcd}	0.00 ^{bcd}	0.60 ^{de}	0.54 ^b	0.29 ^{cd}	0.50 ^a	0.71 ^c	0.00 ^{bcd}
すーっと する	1.24±	3.38±	0.66±	1.28±	3.48±	2.55±	6.03±	1.35±	7.00±	0.63±	1.00±
	0.51 ^d	1.06 ^d	0.84 ^d	0.99 ^d	1.14 ^b	1.19 ^{bc}	1.24 ^a	0.71 ^{cd}	0.71 ^a	0.63 ^d	0.71 ^d
青臭い	0.38±	0.44±	0.31±	0.56±	0.38±	0.44±	1.70±	0.63±	5.40±	0.66±	0.88±
	0.41 ^c	0.46 ^c	0.43 ^c	0.68 ^c	0.41 ^c	0.46 ^c	0.99 ^b	0.41 ^c	1.22 ^a	1.01 ^c	1.05 ^{bc}
薬品臭	0.31±	0.31±	0.34±	1.08±	0.38±	0.31±	5.00±	2.03±	5.03±	0.44±	0.50±
	0.43 ^c	0.43 ^c	0.44 ^c	0.61 ^{bc}	0.48 ^c	0.43 ^c	1.12 ^a	1.14 ^b	1.20 ^a	0.47 ^c	0.50 ^c
だし臭	0.83±	0.69±	0.38±	0.88±	0.88±	0.53±	1.85±	3.00±	3.25±	2.08±	2.00±
	0.38 ^c	0.83 ^c	0.18 ^c	0.74 ^c	0.78 ^c	0.42 ^c	0.69 ^b	0.50 ^a	0.76 ^a	0.53 ^b	0.00 ^b
穀物臭 (米ぬか)	0.50±	0.50±	0.38±	0.78±	0.50±	0.38±	8.00±	0.55±	5.58±	0.99±	3.25±
	0.71 ^d	0.71 ^d	0.48 ^d	1.07 ^d	0.71 ^d	0.48 ^d	1.12 ^a	0.68 ^d	1.13 ^b	1.20 ^d	1.09 ^c
穀物臭 (菜種)	0.48±	0.54±	0.41±	0.59±	0.41±	0.29±	5.78±	0.79±	8.00±	0.60±	1.00±
	0.66 ^c	0.69 ^c	0.68 ^c	0.66 ^c	0.68 ^c	0.42 ^c	0.74 ^b	0.66 ^c	0.00 ^a	0.66 ^c	0.00 ^c
穀物臭 (エゴマ)	0.28±	0.28±	0.28±	0.28±	0.28±	0.28±	0.55±	0.28±	0.85±	5.00±	0.25±
	0.42 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.46 ^{bc}	0.42 ^{bc}	0.63 ^b	0.00 ^a	0.43 ^c

香ばしい	2.45±	2.15±	1.70±	3.00±	2.15±	1.75±	4.00±	4.50±	4.85±	3.35±	5.00±
	1.27 ^{cd}	1.57 ^d	1.26 ^d	2.00 ^{bcd}	1.57 ^d	0.94 ^d	1.13 ^{abc}	1.22 ^{ab}	1.03 ^a	0.58 ^{abcd}	0.87 ^a
コゲ臭	1.70±	2.35±	1.60±	2.83±	2.23±	2.06±	6.65±	4.38±	8.38±	3.70±	5.00±
	1.36 ^f	1.57 ^{ef}	1.49 ^f	1.63 ^{def}	1.63 ^{ef}	1.51 ^{ef}	0.98 ^b	1.00 ^{cd}	0.83 ^a	0.62 ^{cde}	0.00 ^{bc}
きのこ臭	1.38±	1.63±	0.75±	1.70±	1.85±	1.60±	3.00±	2.20±	5.00±	2.80±	3.25±
	0.99 ^{de}	0.99 ^{cde}	1.30 ^e	0.99 ^{bcd}	1.07 ^{bcd}	1.06 ^{cde}	1.50 ^{bc}	0.58 ^{bcd}	1.00 ^a	1.85 ^{bcd}	1.32 ^b
生臭い	1.75±	1.73±	1.50±	2.13±	1.73±	1.73±	2.90±	2.53±	3.13±	4.48±	5.00±
	1.06 ^{de}	0.95 ^{de}	1.12 ^e	1.02 ^{cde}	0.95 ^{de}	1.07 ^{de}	0.46 ^{cd}	1.05 ^{cde}	0.76 ^b	0.84 ^a	0.00 ^a
豆味噌	1.18±	1.40±	1.00±	1.78±	1.55±	1.25±	2.45±	4.43±	3.20±	2.13±	5.00±
	0.68 ^e	0.58 ^{de}	0.87 ^e	0.68 ^{cde}	0.70 ^{cde}	0.66 ^{de}	0.46 ^{bc}	0.52 ^a	1.01 ^b	0.69 ^{cd}	0.50 ^a
紅茶臭	4.00±	2.65±	0.25±	5.00±	2.70±	1.60±	2.75±	7.00±	3.25±	1.45±	5.00±
	1.13 ^c	0.54 ^d	0.43 ^f	0.87 ^b	0.78 ^d	0.40 ^e	0.63 ^d	0.87 ^a	0.62 ^{cd}	0.34 ^e	0.00 ^b
家畜臭	1.13±	1.25±	1.00±	1.25±	1.25±	1.25±	4.28±	1.25±	5.00±	3.08±	2.98±
	0.74 ^c	0.79 ^c	0.87 ^c	0.79 ^c	0.79 ^c	0.79 ^c	1.19 ^a	0.79 ^c	1.00 ^a	0.92 ^b	0.04 ^b
いちご臭	2.63±	3.50±	1.98±	3.60±	5.00±	3.03±	1.88±	4.25±	1.65±	1.78±	3.00±
	0.42 ^{cd}	0.93 ^{bc}	1.31 ^d	0.56 ^{bc}	1.00 ^a	0.76 ^c	0.23 ^d	0.44 ^{ab}	0.39 ^d	0.67 ^d	0.50 ^c

データは標準偏差±平均値

同じ行の文字 a-d は、それらの間の有意差(p < 0.05)を示す。

3.4.2 官能評価のクラスター分析と PCA 分析

図 1-5 に示すように、菜種かすと米ぬかは類似した特徴を示し、苦味、酸味、キノコ臭、辛味、渋味、穀物臭、薬品臭、清涼感、焦げ臭、動物臭、青臭さにおいて高い値を示し、グループ化された。これらの属性は、他の穀物と比較して有意に異なっていた。ひよこ豆は一般的な醤油と同様のプロファイルを示し、グループ分けされた。試料と官能特性の関係を示すために PCA 分析を実施した (図 1-6)。

その結果、菜種かすと米ぬかを除き、他のサンプルは PCA 分析で分離することが難しいことがわかった。PC1 は主に、ダシ、キノコ、酸味、動物性、薬効、青臭さ、粒々感、渋み、爽やかさ、刺激臭、酸味、苦味で説明され、菜種かすと米ぬかで発酵させた醤油風調味料は、これらの味と香りが強いことが示唆された。一方、PC2 は、甘味、いちご味、エステル味、茶味、豆みそ味、生臭さ、塩味、甘味、うま味を示し、塩味は他と方向性が異なることがわかった。ただし、PC1 と PC2 は全変分量の 56.1% しか説明していないことに注意すべきである。

図 1-5. 官能評価のヒートマップ解析

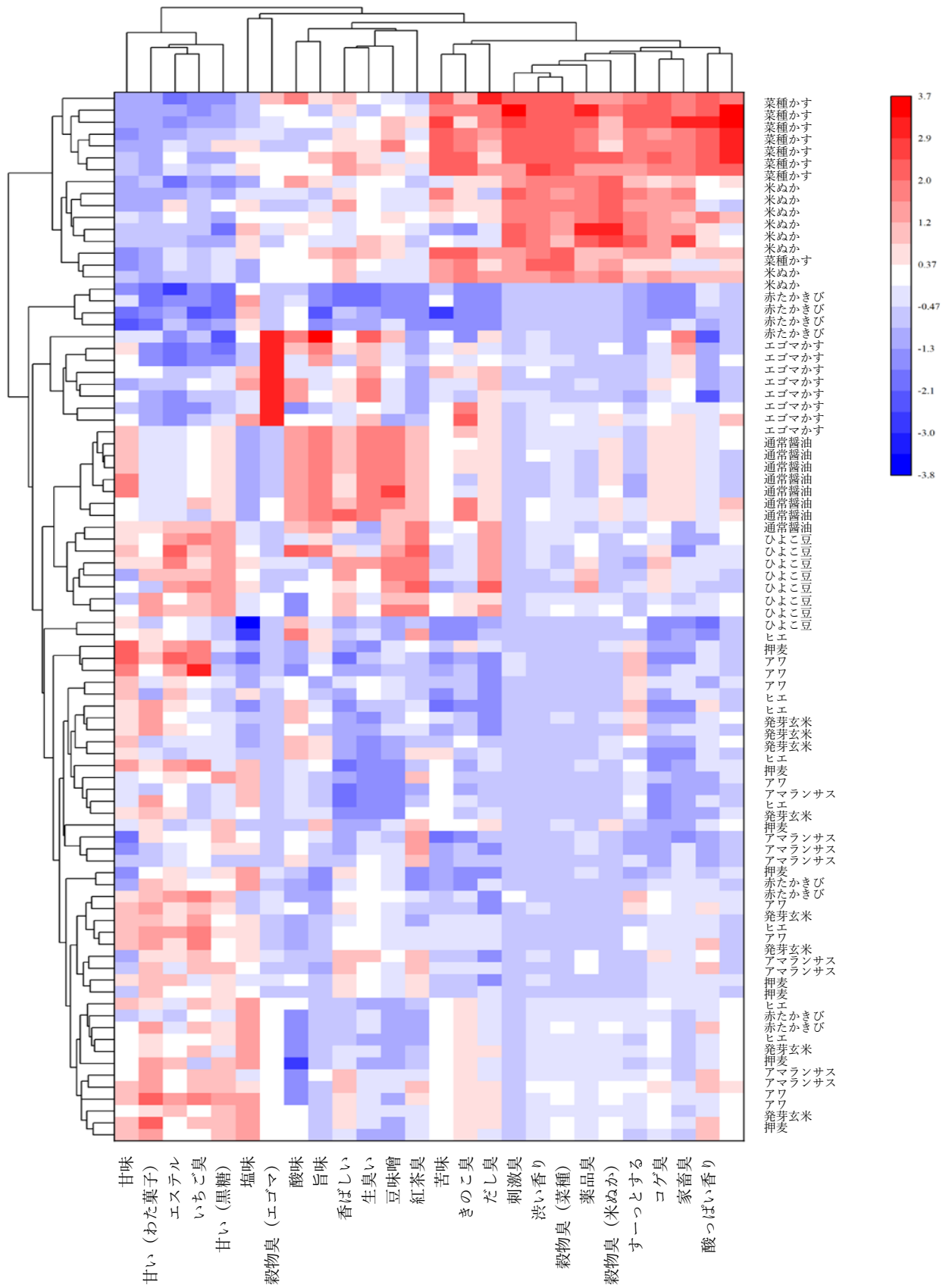
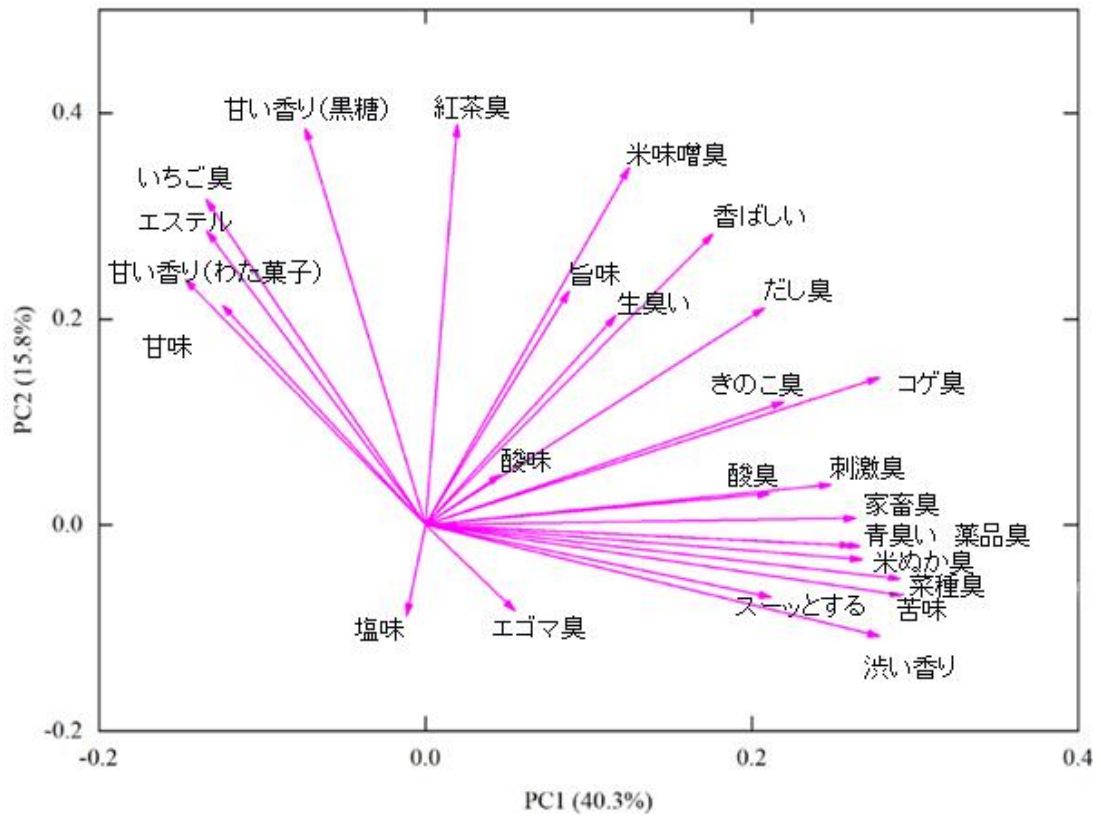
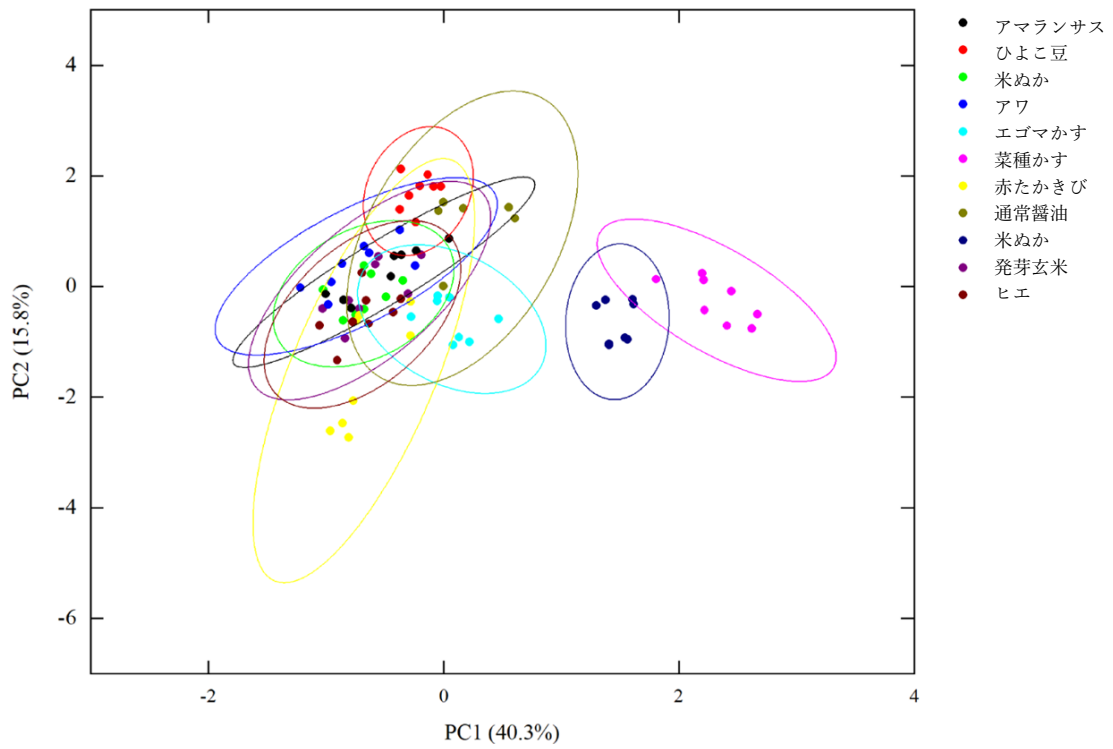


図 1-6. 官能評価の主成分分析

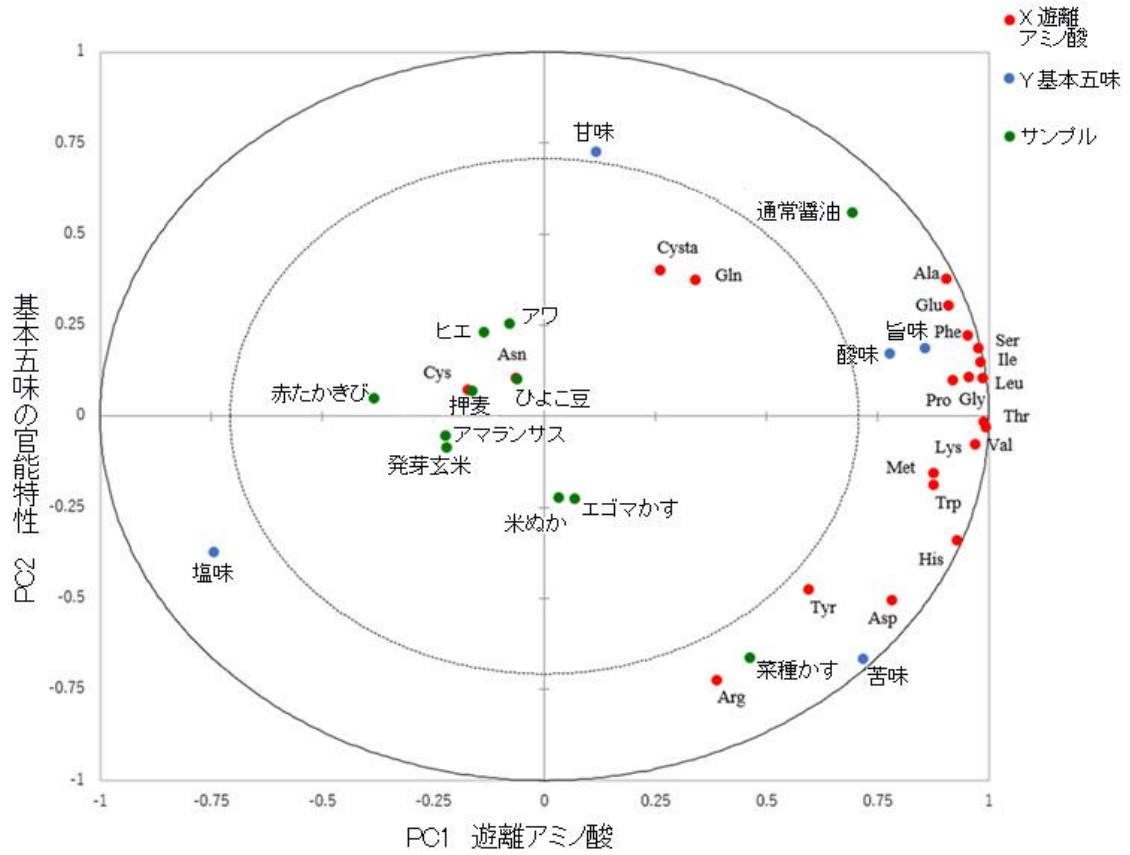


3.5 風味・アロマ成分化合物と官能特性との関係

3.5.1 風味に寄与する遊離アミノ酸と官能特性との相関性

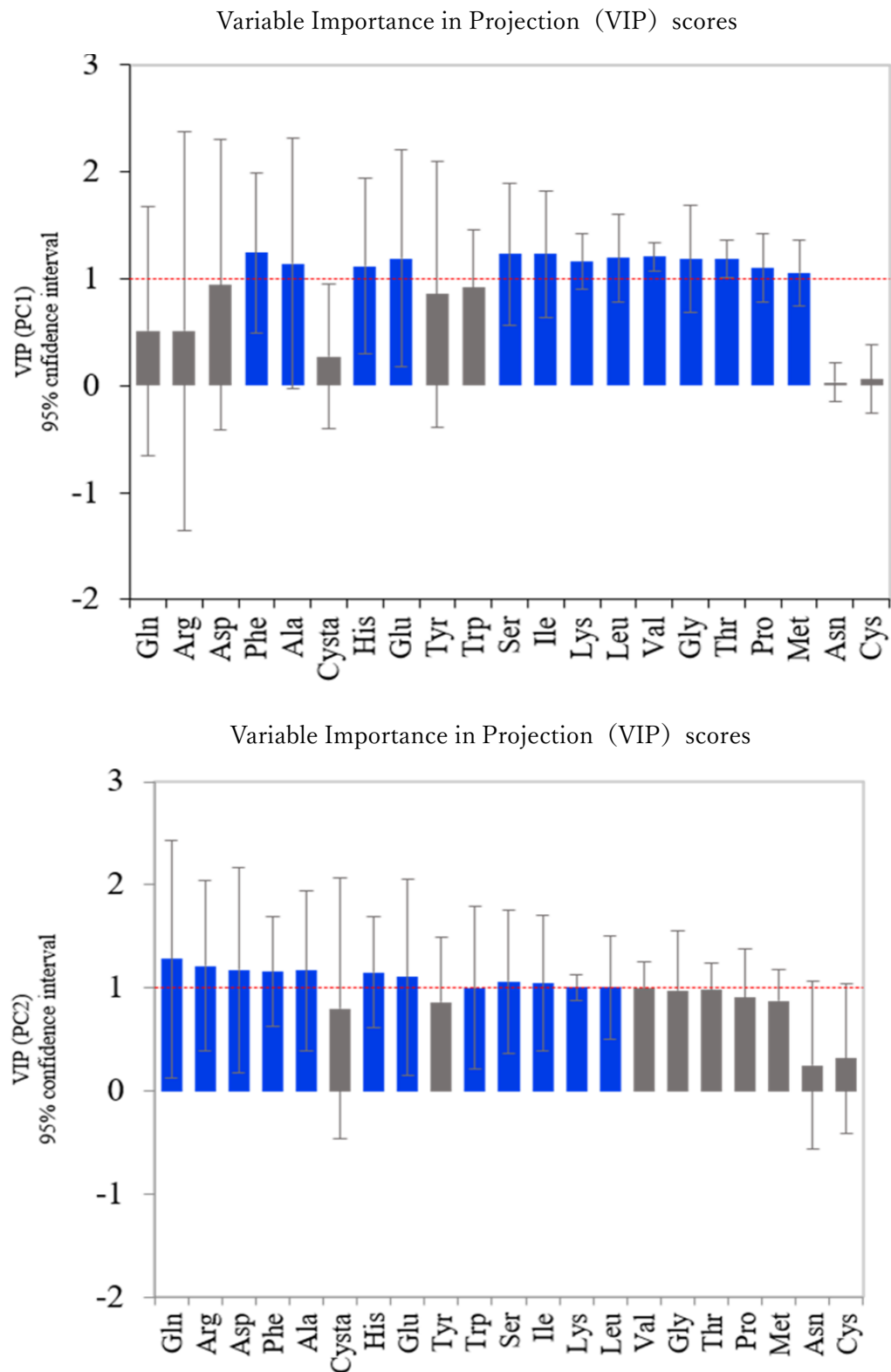
部分最小二乗回帰 (PLSR) を適用して、風味に寄与する遊離アミノ酸が官能評価に及ぼす影響を調査し、主要成分を特定した。21 種類の遊離アミノ酸 (Thr、Ser、Asn、Gln、Gly、Ala、Pro、Asp、Glu、Val、Cys、Met、Cysta、Ile、Leu、Tyr、Phe、His、Lys、Trp、Arg) を X 変数、基本 5 味の官能特性 (甘味、塩味、酸味、うま味、苦味) を Y 変数と定義した (図 1-7)。その結果、最初の 2 つの成分 (PC1 と PC2) は、X 変数 (RX2 cum = 0.720) と Y 変数 (RY2 cum = 0.749) の両方の分散を主に説明することが明らかになった。図 1-7 に示すように、菜種かすは Arg、Tyr、Asp の近くに位置し、苦味とよくモデル化された。したがって、苦味は菜種の特徴的な属性であると考えられた。アワ、ヒエ、赤たかきび、押麦、ひよこ豆、アマランサス、発芽玄米、エゴマかす、米ぬかなどは、Cys や Asn と近縁のグループとしてまとめることができたが、いずれの官能特性とも良い相関は見られなかった。これらの醤油類似調味料は、いずれも Cys と Asn の値が低いため、風味がマイルドになっている可能性がある。一般的な醤油は、Ala、Glu、Phe、Ser、Ile、Leu、Pro、Gly、Thr、Val、Lys の近傍に位置し、うま味と甘味の官能特性も高かった。味覚的特性の評価でも、通常の醤油は風味が豊かであることが示された。統計学用語では、絶対値が 0.5 以上であれば相関が強いとされる⁵³⁾。PLSR モデルの最初の 2 成分の活性化化合物の変数重要度 (VIP 値) が 1.0 を超えると影響力が強い変数とみなされる⁵⁴⁾。VIP スコアと 95%信頼区間を図 1-8 に示す。相関係数が 0.7 より大きく、VIP 値が 1 より大きいことに基づき、Arg、Asp、Phe、Ala、His、Glu、Trp、Ser、Ile、Lys、Leu、Val、Gly、Thr、Pro、Met. の合計 16 の香味化合物が主要な寄与因子として同定された。

図 1-7. PLSR モデルにおける官能特性と呈味遊離アミノ酸間の相関負荷量



内側と外側の楕円はそれぞれ 50%と 100%の相関円を表す。

図 1-8. PLSR モデルの最初の 2 成分の活性化化合物の変数重要度(VIP)スコアと 95%信頼区間 (ブートストラップ法)



青棒で表示された遊離アミノ酸は 1.0 以上の VIP を示す。

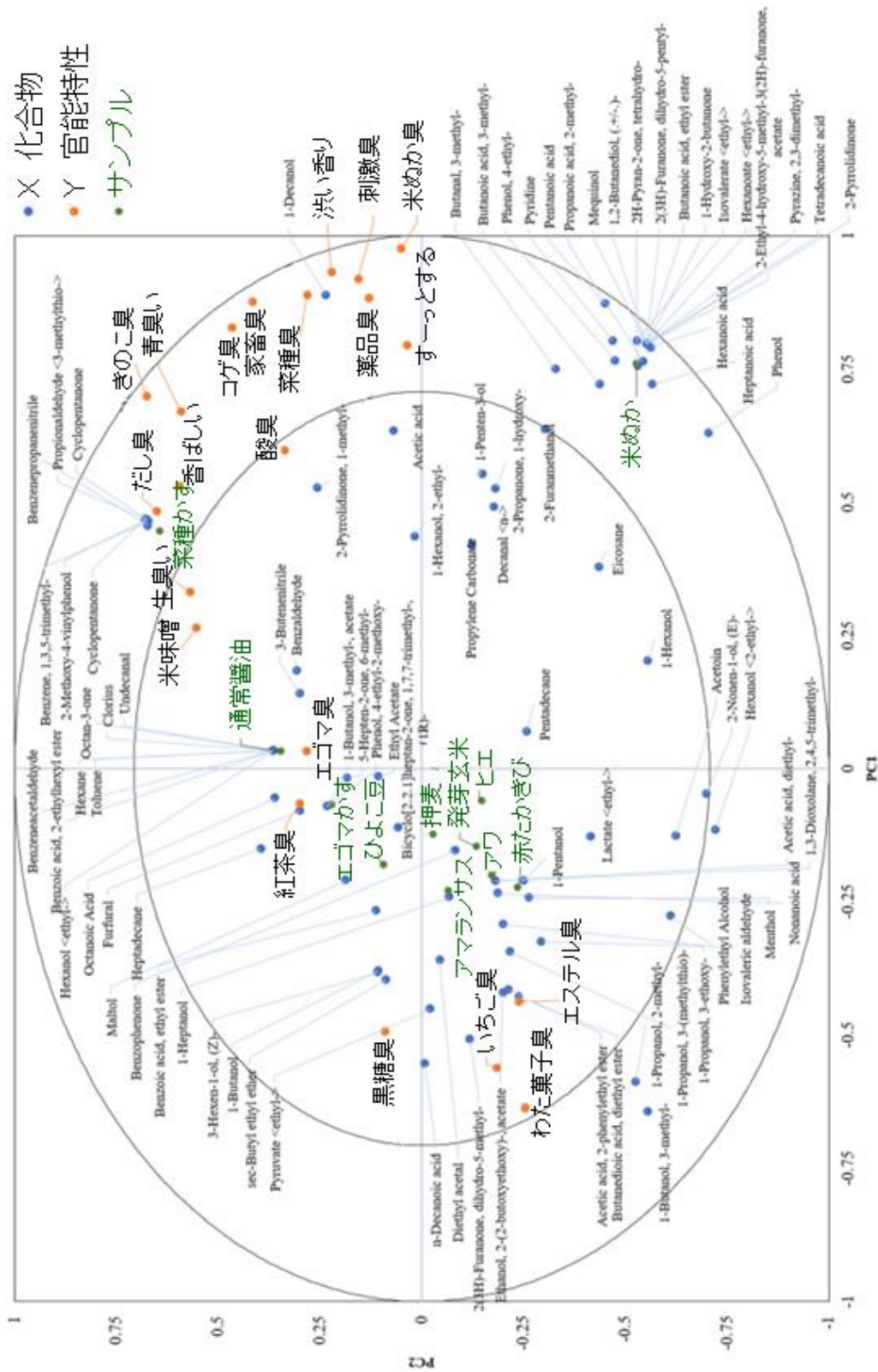
3.5.2 香り成分化合物と官能特性との相関性

PLSR により、アロマ化合物と味覚特性の相関と有意性を調べた。87 種類のアロマ化合物を X 変数、21 種類の味覚アロマの官能特性を Y 変数と定義した (図 1-9)。その結果、最初の 2 成分 (PC1 および PC2) が、X 変数 ($RX2 \text{ cum} = 0.419$) および Y 変数 ($RY2 \text{ cum} = 0.604$) の分散を主に説明することが明らかになった。菜種かすは、ダシ臭、キノコ臭、青臭さ、香ばしい臭いとよく相関し、シクロペンタノン、2-メトキシ-4-ビニルフェノール、1,3,5-トリメチル-ベンゼン、ベンゼンプロパネニトリル、2-メチルチオ-プロピオンアルデヒドの近くに位置していた。あるいは、米ぬかはヘプタン酸、ヘキサン酸、3-メチルブタン酸、ペンタン酸、2-メチルプロパン酸などの酸の近くに位置し、全体的に酸味のスコアが高かった。これは、米ぬかに含まれる酸の含有量が最も高いという結果と一致した。一般的な醤油は、紅茶臭や穀物臭(エゴマ)の特性とよく相関していた。これらの特性は、ベンゼンアセトアルデヒド、安息香酸、2-エチルヘキシルエステル、エチルヘキサノール、ヘキサン、トルエン、ウンデカナール、クロリウス、オクタン-3-オンと同じ領域に位置していた。残りのサンプルは、どの官能特性とも良い相関は見られなかった。

VIP スコアと 95%信頼区間を図 1-10 に示す。上記の結果から、相関係数が 0.7 以上、VIP 値が 1 以上であることを基準に、合計 25 の主要寄与物質が定義された(図 1-11)。

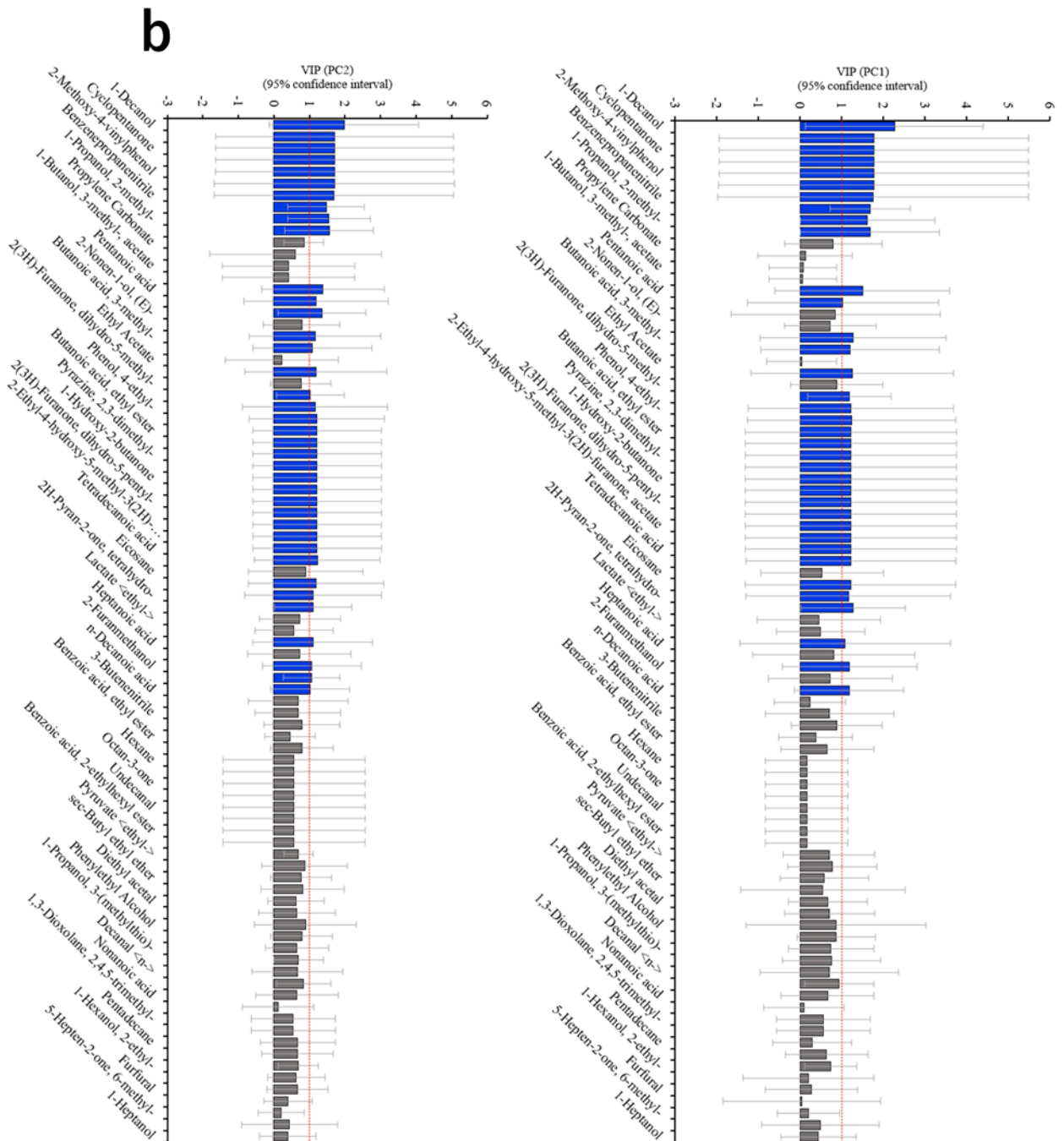
Correlations on axes PC1 and PC2

図 1-9. PLSR モデルにおける官能特性と揮発性化合物間の相関負荷量



内側と外側の楕円はそれぞれ50%と100%の相関円を表す

図 1-10. PLSR モデルの最初の 2 成分の活性化化合物の変数重要度(VIP)スコアと 95%信頼区間 (ブートストラップ法)



青棒で表示された揮発性化合物は 1.0 以上の VIP を示す。

図 1-11. 香り成分化合物と官能特性との関連性が高い 25 の主要寄与物質

化合物名	官能表現	化合物名	官能表現
3-メチル-ブタナール	(アルデヒド・モルト)	3-メチル-ブタン酸	(酸、チーズ臭、辛味)
エチル-イソバレレート	(エステル・フルーツ)	1,2-ブタンジオール	(アルコール、チーズ臭、汗)
シクロペンタノン	(ケトン・ミント・クール)	ペンタン酸	(酸、チーズ臭、刺激性)
ピリジン	(その他・腐敗臭)	1-デカノール	(アルコール、脂肪臭、油臭)
エチル-ヘキサン酸エステル	(エステル・フルーツ)	ヘキサン酸	(酸、チーズ臭)
1-ヒドロキシ-2-プロパノン	(ケトン・バター・辛味)	ヘプタン酸	(酸、アプリコット、フローラル)
2,3-ジメチル-ピラジン	(ピラジン・キャラメル)	ジヒドロ-5-ペンチル-2(3H)-フラノン	(ケトン、ココナッツピーク)
2-メチル-3-ヘキサノール	(アルコール・フルーツ)	ベンゼンプロパンニトリル	(ニトリル、森林)
1-ヒドロキシ-2-ブタノン	(アルデヒド、セイボリー)	2-ピロリジノン	(ケトン、チーズ臭、汗臭)
酢酸	(酸、果物、酢)	2-エチル-4-ヒドロキシ-5-メチル-3(2H)-フラノンアセテート	(エステル、キャラメル)
3-メチルチオ-プロピオンアルデヒド	(アルデヒド、調理したジャガイモ)	メキノール	(フェノール、キャラメル)
2-メチル-プロパン酸	(酸、焦げ臭、チーズ臭)	テトラデカン酸	(酸、ワックス、油臭)
テトラヒドロ-2H-ピラン-2-オン	(ケトン、乾燥草)		

4. 第一章のまとめ

本章では、10 種類の原料を用い、同じ発酵工程を経て醤油風調味料を製造し、通常の醤油と比較した。その結果、風味成分や香り活性成分はサンプルによって大きく異なり、その特徴的なスペクトルは製造に使用した原材料によって異なることがわかった。タンパク質含量の高い原料は、発酵後の調味料中の遊離アミノ酸濃度が高くなった。嗜好属性アミノ酸量のトップ 3 は、醤油、菜種搾りかす、エゴマ搾りかすであった。グルコースの量と官能評価の甘さや乳酸の量と官能評価の酸味との相関は取れなかった。揮発性臭気成分については、発芽玄米と押麦を除き、各原料がそれぞれ特徴的な香气成分を有していた。官能評価では、発芽玄米とひえを発酵させた調味料は同じグループに分類され、それ以外は別のグループとなった。味覚アミノ酸、香り、官能評価の関係を PLSR で分析した結果、通常の醤油は甘味とうま味が主な特徴であった。対照的に、菜種搾りかすから発酵させた調味料は苦味が主であった。通常の醤油の香りは主に穀物臭や紅茶臭に由来するものであったのに対し、菜種はダシ臭や香ばしい香りが特徴的であった。官能評価との相関が高い 25 種の化合物を特定することができた。今回の研究では、原料による特徴を比較するために、10 種類の原料を同じ条件で醸造し評価を行ったが、醗酵が微弱な原材料もあったため、今後はそれぞれの原材料に最適な発酵条件の決定や、*Tetragenococcus halophilus*、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Candida versatilis* などの風味生成微生物の添加効果などの研究が必要であると考えられる。

第二章 醤油麴を使用したイワシ魚醤の微生物菌

叢の特徴

1.はじめに

国内における醤油の出荷金額は毎年減少しつづけ、2022年には平成元年比で58.3%まで減少している(醤油情報センター)。国内の醤油事業者は新規市場を開拓するか、新たな商品価値を提供する必要に迫られている。魚醤は、沿岸地域で低価の魚から製造される伝統的な風味調味料である。東南アジア、中国沿岸部、韓国、日本、ヨーロッパなど、世界のさまざまな地域で消費・製造されている⁵⁵⁾。魚醤は遊離アミノ酸、ペプチド、タウリン、ビタミンなどを含む高い栄養価を持っているが⁵⁶⁾、その一方で、その強い風味はしばしば、他地域での消費拡大を制限する受け入れがたいマイナス要因とみなされる。

醤油麴は、大豆と粉碎小麦の混合物に麴菌を繁殖させることによって調製される発酵製品である。麴は日本では伝統的に醤油の製造工程に使われてきた。麴を魚醤の発酵プロセスに応用したのは日本の研究者が最初である⁵⁷⁾。麴の使用は、魚肉の酵素分解の促進、発酵期間の短縮、栄養成分の増加、不快な風味の減少といった利点があると報告されてお^{58) 59) 60) 61) 62)}、現在、麴の商業的利用は魚醤製造において一般的になりつつある。魚醤の発酵は高塩分の嫌気性条件下で行われ、独特の微生物群が形成される。この微生物群は、それぞれの魚醤製品に特有の味と風味を与えるために重要な役割を果たしている。したがって、魚醤の発酵過程における微生物相を理解することは、製品の品質と安全性を管理するための鍵となる。微生物群の調査には、従来培養法が用いられており、乳酸菌である *Tetragenococcus halophilus* に代表される耐塩性または好塩性微生物が、醤油発酵と同様に魚醤発酵における中心的な種の一つとして報告されている⁶³⁾。近年、次世代シーケンサーを用いた分子生物学的解析手法が新たに開発された⁶⁴⁾。この方法は、未培養菌を含む微生物叢の情報を得るのに強力であり、2010年代から普及しつつある。しかし、魚醤発酵中の麴添加が微生物組成に与える影響に関する知見は未だ限られている。微生物組成は発酵の過程で経時的に変化することが知られている。特に微生物組成は発酵1ヶ月以内の最初の段階で劇的に変化し、その後、微生物組成の変化は徐々に進行する⁶⁵⁾。したがって、魚醤の標準的な品質を

安定的に得るためには、第一段階における微生物叢の制御が重要であると考えられる。本研究では、イワシ魚醤発酵中の微生物群に対する麴菌使用の影響を調査した。優占種と多様性に焦点を当て、微生物叢をアンプリコン解析により調べた。微生物集団はこの初期段階で劇的に変化するため、仕込んでから 3 週間経過したもろ味をサンプルとして採取した。また、微生物集団の変化をより深く理解するために、イワシ魚醤の発酵を室温と 30°C の 2 つの温度条件で行い、醤油麴を添加しない試験群を対照群として比較することで、醤油麴添加の影響について考察した。

2.材料と方法

2.1.異なる工程による魚醤の調製とサンプリング

成魚の生イワシを岩手県の魚市場から入手し、原料とした。丸魚肉は塩揉み後、エラと粘液を除去して調製した。麴は、株式会社浅沼醤油店（岩手県盛岡市）で脱脂大豆と粉碎小麦（1：1の割合）に *Aspergillus oryzae* を増殖させて調製した伝統的な醤油麴を使用した。魚 400-404g と食塩 100g を混合し、合計 5 群の魚醤を調製した（表 1）。まずは、麴を添加せずに室温で培養した R(Room)と麴を添加せずに 30°Cで培養した R(T30)のグループを設定した。次に 160g の麴を添加し室温で培養した RKoji(Room)と 160g の麴を添加し 30°Cで培養した RKoji(30T)のグループを設定した。最後に丸肉の代わりにミンチ肉と 160g の麴を添加した MKoji(30T)を設定した。これらの 5 つの培養物をビニール袋に真空パックし、嫌気性条件下で培養した(以下魚醤もろ味という)。10°Cで1週間予備培養した後、2群を室温（実験室静置）、または3群を 30°C（恒温室静置）で2週間連続培養した。培養を行った期間（11/29-12/15）の盛岡市の平均気温は 0.4°Cから 7.9°Cであったが、実験室は平日昼間は空調が効いていたので、実際の室温は、夜間の最低温度が 0°C前後、昼間の温度が 25°C前後であったと考えられた。

表 2-1. 5 種類の魚醤の調製条件

試験区		R (Room)	R (T30)	RKoji (Room)	RKoji (T30)	MKoji (T30)
処理		丸肉	丸肉	丸肉	丸肉	ミンチ肉
配合比 (g)	魚肉	400	400	404	404	400
	食塩	100	100	100	100	100
	麴	0	0	160	160	160
発酵温度 (°C)		0°C→room	0°C→30°C	0°C→room	0°C→30°C	0°C→30°C

2.2.魚醤もろ味のアンプリコン分析

仕込み後3週間経過した魚醤もろ味を株式会社生物技研（神奈川県）に送付し、16S rRNA 遺伝子（16S rDNA）の V3-V4 領域をターゲットとしたアンプリコン解析を行った。微生物のメタゲノム DNA 抽出は、Lysis Solution F（株式会社ニッポンジ）と Lab-Aid824s DNA 抽出キット（Zeesan Biotech）を用いて、製造元の手順書に基づき行った。得られたゲノム DNA は、2-step tailed PCR 法⁶⁶⁾を用いてペアエンド (PE)ライブラリーを構築したまゝ抽出した DNA を鋳型として2つのプライマー341F (5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3') と 805R (13) (5'- GTCTCGTGGCTCGGAGATGTGTATAAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC - 3')を用いて、16S rDNA の V3-V4 領域 (469 bp) を増幅した。次に 2ndF (5'- AATGATACGGCGACCGAGATCTAC-Index2-ACACTCTTTCCTACGACGC-3') および 2ndR (5'- CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-Index1-GTGACTGGAGTTCAGACGTG-3') の2つのプライマーを用いて2回目の PCR 増幅を行った。増幅された DNA 断片は AMPure XP (Beckman coulter Inc)で精製し、Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies) を用いて、PE ライブラリーの品質を確認した。シーケンシングは、MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, Inc) を用いて Illumina MiSeq 300PE システムで行った。合計2プールのアンプリコンの塩基配列を決定し、適格性の判断を行った。さらなるシーケンスリードの処理は、QIIME2 (バージョン 2022.8) を用いて行った^{67) 68) 69)}。配列決定されたタグは、99%の類似度で operational taxonomic unit (OTU)としてグループ化し、SILVA rDNA データベース (ver.138) を用いて分類学的帰属を行った⁷⁰⁾。微生物組成は門 (QIIME2 のパラメータレベル 2)、科 (同レベル 5)、種 (同レベル 7) で比較した。5%未満の希少種はその他としてまとめ帯グラフで示した。各魚醤もろ味の α -微生物多様性を OTU および Shannon index⁷¹⁾から求め、 β -微生物多様性についても Bray Curtis plot⁷²⁾によって明らかにした。

3.結果と考察

3.1 魚醬もろ味の微生物組成

各サンプルについて、合計 37,336 から 50,620 個のアンプリコンの塩基配列が決定され、得られた高品質の 300bp PE は 23,758 から 28,234 個であった。アンプリコン解析の結果を図 2-1a (門レベル)、2-1b (科レベル)、2-1c (種レベル) に示す。非麴菌の R(Room)および R(30T)の場合、*Bacteroidota* (それぞれ 31.8%、39.9%)、*Actinobacteriota* (39.8%、6.2%)、*Cyanobacteria* (4.8%、24.9%) の 3 種類が優勢であった (図 2-1a)。麴菌添加サンプルでは、RKoji(Room)、RKoji(30T)、MKoji(30T)では、それぞれ 76.5%、75.9%、72.5%と、*Firmicutes* 属が顕著に優勢であった。さら科レベル (図 2-1b) では、非麴菌群では *Weeksellaceae* 38.0% (R(Room))、*Cardiobacteriaceae* 25.9%および *Cyanobacteriaceae* 24.8% (R(30T))、麴菌添加群の RKoji(Room)、RKoji(30T)、MKoji(30T)では *Enterococcaceae* が 41.0%から 55.8%と顕著な優占率を示した。さらに種レベル (図 2-1c) の帰属を行ったところ、R(Room)では *Weeksellaceae-related sp.*、*Cardiobacteriaceae-related sp.*、*Pasteurella sp.*が優勢であった。R(30T)は *Cardiobacteriaceae-related sp.*が 25.9%を占め、*Synechococcus sp.*と *Bifidobacterium breve* も一定数が検出された。3 種の麴菌添加サンプルでは、*Enterococcus sp. type A*、*Staphylococcus/Enterococcus sp. type B*、*Rothia kristinae* が優勢であった。全体として麴菌群では、非麴菌群に比べ、乳酸菌(*Enterococcus* 属細菌)の割合が高い傾向が認められた。また、非麴添加区で優占していることが観察された *Cardiobacteriaceae* 科の細菌は、伝統的発酵食品での知見が乏しい菌群であり、また同科内に感染症を引き起こす種も知られていることから、食品の安全性の面からはリスク要因と考えられた。上位 3 種の微生物 OTU の優占率は、非麴菌群 (56.1~56.3% (図 2-1c)) に比べて麴菌群 (74.6~89.1%) で高く、麴菌添加による微生物多様性の低下が示唆された。麴には小麦粉のデンプンが豊富に含まれており、このデンプン成分が麴カビの酵素活性によって分解され、グルコースを生成すると考えられる。耐塩性乳酸菌である *Enterococcaceae* が優勢なのは、乳酸発酵の基質としてグルコースが供給されたためと考えられる。乳酸などの有機酸の蓄積は培養液の pH を低下させるが、これも耐塩性乳酸菌の優占を促進する理由であると考えられた。本研究では、SILVA データベースの 16S rDNA V3/V4 領域の 427bp の塩基配列から、観察された優占乳酸菌を *Enterococcus sp.*と推定した。さらに、BLAST プログラムと

National Center for Biotechnology Information (NCBI)のサイト (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)の GenBank データベースを用いて詳細な検索を行った。100 の配列データが 100%の similarity でヒットした：*Enterococcus faecium* (66 件)、*Enterococcus durans* (14 件)、*Enterococcus lactis* (12 件)、*Enterococcus hirae* (4 件)、*Enterococcus faecalis* (1 件)、未同定株 (3 件) がヒットした。魚醤発酵工程における中核微生物は、酵母、乳酸菌 (LAB)、*Bacillus*、*Staphylococcus*、*Micrococcus* の耐塩性微生物として報告されている^{55) 65)}。耐塩性乳酸菌は、一般に生育速度が遅いため、その数は発酵の中盤以降に漸次的に増加することが知られている。この乳酸菌には、*Tetragenococcus*、*Leuconostoc*、*Lactobacillus*、*Enterococcus*、*Lactococcus*、*Pediococcus* が含まれる⁵⁵⁾。本研究では、*Enterococcus* 属、*Staphylococcus* 属、*Rothia* 属 (*Micrococcaceae*) が優勢な属として観察され、先行研究の結果と一致した。一方、魚醤の一般的な属として知られる *Tetragenococcus* 属⁶³⁾は、本研究では観察されなかった。微生物組成は発酵の過程で変化すると考えられるため、*Tetragenococcus* を含む他の種類の微生物群が発酵期間が長期化する過程で優占種として出現する可能性がある。したがって、より長い発酵期間を経た魚醤についても、アンプリコン分析を検討する価値があると考えられた。

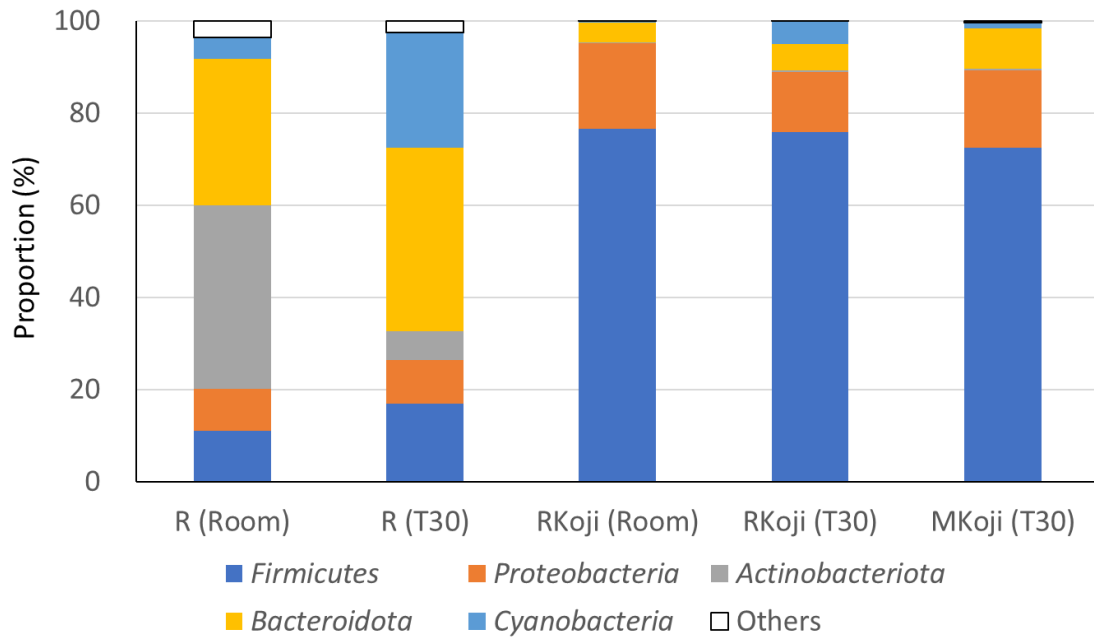


図 2-1a. 仕込後 3 週間の魚醬もろ味の門レベルでの微生物組成

Others : 5%未満の種

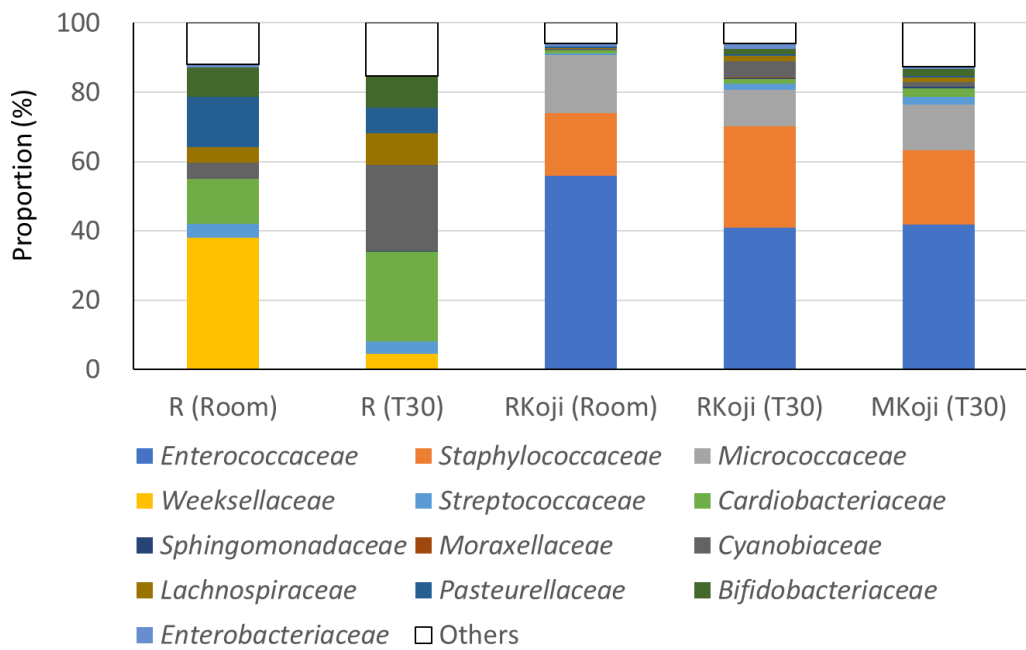


図 2-1b. 仕込後 3 週間の魚醬もろ味の属レベルでの微生物組成

Others : 5%未満の種

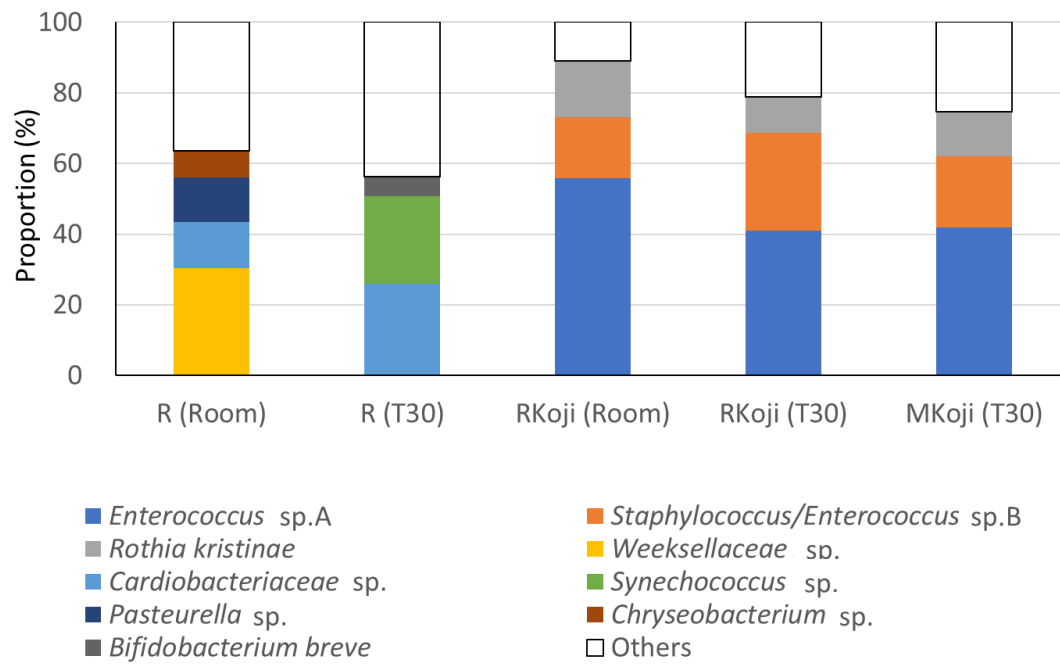


図 2-1c. 仕込後 3 週間の魚醤もろ味の種レベルでの微生物組成

Others : 5%未満の種

3.2.魚醤もろ味試料中の微生物多様性の比較

培養もろ味試料中の微生物多様性について、 α 多様性および β 多様性を比較した。 α 多様性は、観察された OTU 数およびシャノン指数で Rarefaction 曲線を描き比較した。OTU 数は、配列深度 21960s の 5 つのもろ味試料において、64 から 84 の範囲で観察されたが、麴菌群と非麴菌群間の差は明確ではなかった (図 2-2a)。一方、シャノン指数スコアでの比較では、配列深度 21960s において、非麴菌群 (4.21-4.91) に比べて麴菌群 (2.39-4.57) で小さかったことから、後者で発酵条件に適した微生物集団が麴菌添加もろ味試料中で早く形成されたことが示唆された (図 2-2b)。微生物集団の β 多様性は Bray-Curtis 非類似度プロットで 5 つのもろ味間で比較した (図 2-2c)。非麴菌群 (R(Room)、R(T30)) 及び麴菌群 (RKoji (Room)、RKoji (T30)、MKoji (T30)) とは、それぞれ明確にまとまって分布しており、麴菌の添加は、温度やラウンド (R) / 粉碎 (M) 条件の違いにかかわらず、同様の影響を与えることが示唆された。

以上の結果より、魚醤の製造工程における醤油麴の使用は、乳酸菌の優占化を促進し、微生物の多様性を低下させることがわかった。乳酸菌の優占化の促進は、未知の微生物の増殖による健康的被害のリスクを減少させることから、食品安全性の面から考えて好ましい効果と考えられた。一方、微生物多様性の減少については、菌叢の収束を意味し、発酵工程の再現性を促進し、発酵産物の品質の安定性につながることから同様に好ましい効果とみなされた。醤油麴の添加は、従来から知られていた魚醤の風味の改善効果だけでなく、もろ味中における微生物菌叢の形成の面からも好ましい効果を生み出すものと考えられた。

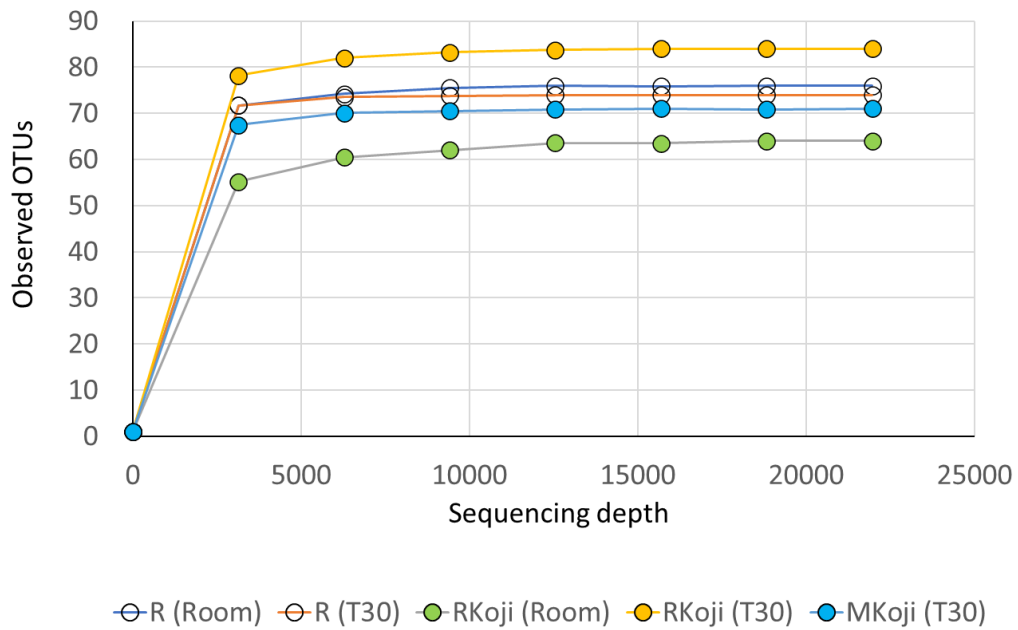


図 2-2a. 仕込 3 週間後の魚醤もろ味試料中の菌叢 OTU 数の Rarefaction 曲線による α -多様性比較

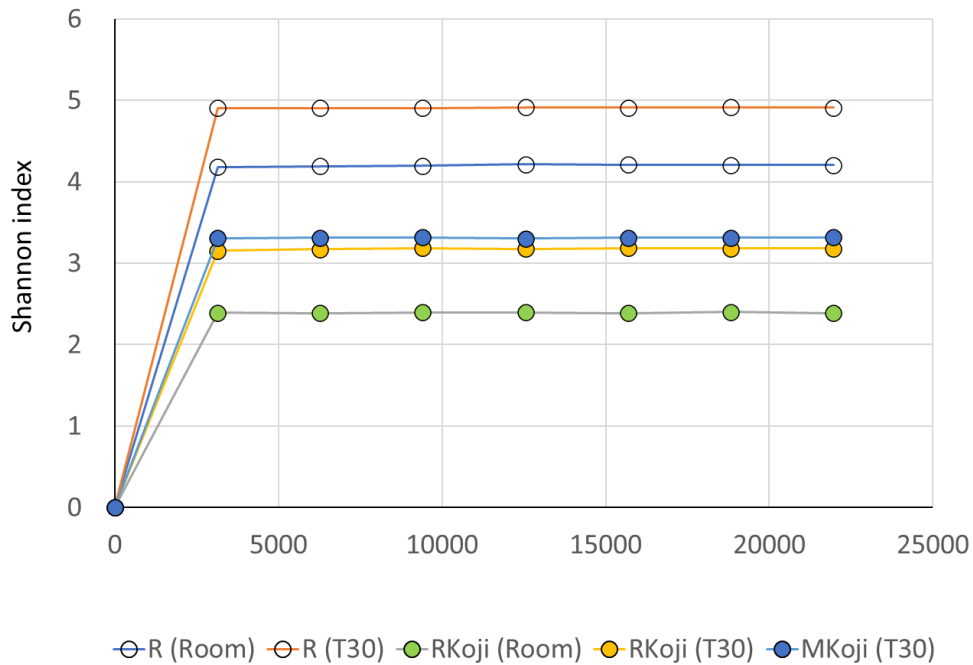


図 2-2 b. 仕込後 3 週間の魚醤もろ味試料中の菌叢 OTU 数の Shannon index による α 多様性比較

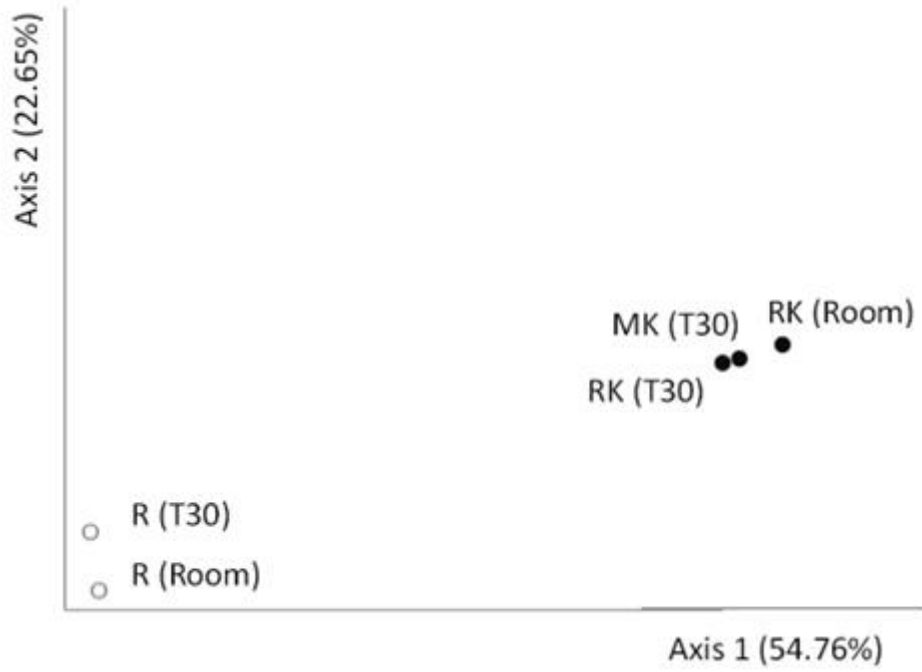


図 2-2c.仕込 3 週間後の魚醬もろ味試料中の菌叢 OTU 数の Bray-Curtis 非類似度プロットによる β 多様性比較

第三章 総合考察

第一章では 10 種類の原料を用い、同じ発酵工程を経て醤油風調味料を製造し、通常の醤油と比較した。その結果、風味成分や香り活性成分はサンプルによって大きく異なり、その特徴的なスペクトルは製造に使用した原材料によって異なることが分かった。米ぬかの穀物臭（米ぬか臭）や菜種かすの穀物臭（菜種臭）、エゴマかすの穀物臭（エゴマ臭）など原材料由来の特徴的な香りが発酵後にもそのまま残る醤油もあった。

第二章ではイワシの魚醤を用い、醤油麴を加えたものとそうではないものを製造し、その過程の菌叢を調べた。その結果、麴を加えたものの方が乳酸菌の増加により醗酵初期の微生物の多様性が減少することが示唆された。これは、麴由来のグルコースが乳酸発酵の基質として供給されたためと考えられた。乳酸などの有機酸の蓄積は培養液の pH を低下させ耐塩性乳酸菌の優占を促進し出来上がりのサンプルの風味にも影響を与える。

第一章では発酵素材が変わると製品である醤油の風味が変わることが明らかとなった。しかし、素材そのものの成分の違いがそのまま製品に移行するだけではない。タンパク質含有量の高い原料において遊離アミノ酸濃度が高くなる傾向や、乳酸菌が優勢になることで微生物の多様性が減少していることが確認できている。また、香気付与化合物の生合成に関与する微生物の経路が異なることから、微生物が理化学特性、香気成分、官能評価に与える影響も大きいと言える。製品の品質を安定させ、安全な製品を作るためにも微生物の制御が重要な役割を果たすと考えられる。

第二章では、原材料の組成を変え、発酵過程の微生物菌叢について、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域（16S rDNA）をターゲットとしたアンプリコン解析を行い、発酵過程での微生物の多様性を解析することによって、微生物制御の状況を確認することができた。

第一章の最終商品については全窒素、pH、乳酸量、遊離アミノ酸、色度、香気化合物、官能評価について実施し評価を行った。

微生物の発育に関わる要因をインプットとして置き、過程やアウトプットサンプルの評価について表 3-1 にまとめる。

表 3-1. 微生物の発育に関わる要因と評価方法

インプット	コントロールすべき要因	過程の評価	アウトプットの評価
①原材料組成 ・ブドウ糖濃度 ・発育阻害物質	培地としての原材料の特性を把握する	発酵過程における pH の変化を評価 発酵過程における菌叢の多様性を評価	製品特性の理化学分析 (pH、乳酸量、遊離アミノ酸、色度、香気化合物)、官能評価
②微生物添加の有無	乳酸菌、酵母をはじめとする微生物添加と結果		
③もろ味組成 ・もろ味の塩分濃度 ・もろ味の水分活性 ・もろ味の pH ・もろ味中のアルコール濃度 ・もろ味中の酢酸度	もろ味環境の調整による菌叢の変化		
④発酵条件 ・発酵温度 ・発酵期間 ・酸素	発酵温度、時間、攪拌頻度の違いによる菌叢の変化		

原材料以外の発酵条件を変えながらアウトプットとなる製品の特徴を、今回と同じ手法で評価することで、より精度の高い醸造方法を確立することができる。

②の微生物添加については多くの研究が紹介されており⁷³⁾、醤油の工業生産において一般的に採用されている。様々な原材料を発酵させて醤油風調味料を醸造する際も *Tetragenococcus halophilus*、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Candida versatilis* などの醤油醸造に使用される風味生成微生物の添加効果が最終サンプルにどのように表れるかについては調査が必要である。③については醤油関連調味料において組成として、食塩濃度(%)、水分活性、pH、アルコール度数(%)、酢酸酸度(%)による微生物学的な安全性を評価した報告がある⁷⁴⁾。この研究ではめんつゆなど醤油を主原料に各組成を変えたものが、酵母、乳酸菌、真菌、耐熱性芽胞菌の発育に及ぼす影響が示されている。微生物の添加だけでなく、もろみ中の環境調整を行うことで微生物菌叢や採取製品に影響を及ぼすと考えられる。④については通常の醤油において温度や攪拌頻度、時間の変化が微生物の発育や pH、乳酸、酢酸、クエン酸、グルタミン酸、ピログルタ

ミン酸等の生成に及ぼす影響が報告されている⁷⁵⁾。発酵条件の変化についても醤油と同じように製品に表れてくる可能性が考えられる。

今回の研究は微生物制御に関する項目については特に考慮せず、原材料を変え、伝統的な製法によって醸造することでどのような違いが表れるかを多角的に評価した。今後は②～④の要因を変化させることで製品にどのような影響を与えるかについて調査を行い、製品を安全で安定して作れる製法を確保していく必要がある。

また、評価方法として採用したQDA法は信頼性の高い情報が得られる一方、パネルの選抜と訓練に多大な労力がかかるとされている⁷⁶⁾。また、パネルの確保が難しく、開発に関わっている際は一般の消費者の評価に比べてバイアスがかかってしまう可能性がある。中小の醤油蔵では開発者とパネルを分けて育成するのには負担が大きい。

これらの課題を解決するためにCATA法(Check-All-That-Apply)を用いることでパネルの負担を軽減することができる。CATA法は、評価の際にパネルに官能特性用語のリストを提示し、サンプルの特性の強度ではなく、官能特性用語の有無(感じるか感じないか)を全てチェックさせてサンプルを評価する方法である。この方法ではパネルの数は必要になるが、訓練をしていない一般消費者でも評価を行うことが可能でありパネル訓練の負担を減らすことができる⁷⁶⁾。CATA法の場合サンプルの評価に適当と思われる用語のリストを20程度用意する必要がある。評価の前にパネルにサンプルの特性を属性毎に書き出させ、リストを作成するのが一般的だが、他のデータとの比較を行いやすいように用語の選定プロセスについて標準化を行うのが良いと考えられる。醤油に特徴的な用語の選定には今村らの研究「日本のしょうゆの特徴の体系化」によって体系化された記述が参考にできる。また、第一章で行ったようにGC-MSによる分析を行い、化合物について文献より言語表現を検索したものを参考にしながら用語を選定することが望ましいと考える。

本研究は地域資源を活用した特徴のある醤油風調味料の製法の確立について検討した。様々な雑穀を用いることで現れる特徴について調査を行い、素材が変わることで製品に様々な特徴をつけられることが分かった。このことから、その土地の特産品を生み出し、新たな食文化を形成していくためには、その土地に根付いた食材を利用することが有効な手段であることが示された。

本研究によって、醤油風発酵調味料に新規素材を検討する際に、製麹の前処理となる水分調整や加熱温度の条件に当たりをつけられるようになった。また、調整原材料の栄養成分から全窒素や色の傾向を推測することができるようになった。また、11種類の調味料から官能評価との相関が高い25種の化合物を特定することができた。さら

に本研究では、試作品の客観的な評価についても模索を行った。理化学分析に加えて、QDA法又はCATA法を取り入れ、通常の醤油と共通の言語を使用して比較を行うことで、試作品の価値を言語化することができ、製品の差別化に役立てることができる。

生産性の向上の恩恵を受けて醤油の品質は向上し、価格は身近なものとなった。一方で量産品との差別化が難しく、地方の中小醤油蔵は減少し続けている。廉価で高品質な商品を安定供給できるようになったのは業界の進歩だが、多様性が失われることになるのは業界の損失である。裾野に広がりがないと高い山はそびえることができない。本研究が、減少する醤油蔵にとって、製品の差別化や高付加価値化を進める一助となり、ひいては日本の醤油文化の裾野を広げていくことに少しでも貢献できるよう、中小醤油蔵担い手の一人として切に願う。

引用文献

- 1 Hideki Matumoto.(2000).The Useful Scientific Information of The Soy Sauce. The Japan Soysauce Inspection Institute(95),341-346
- 2 Feng, Y., Chen, Z., Liu, N., Zhao, H., Cui, C., & Zhao, M. (2014). Changes in fatty acid composition and lipid profile during koji fermentation and their relationships with soy sauce flavour. *Food Chemistry*, 158, 438-444.
- 3 Liu, B., Cao, Z., Qin, L., Li, J., Lian, R., & Wang, C. (2020). Investigation of the synthesis of biogenic amines and quality during high-salt liquid-state soy sauce fermentation. *LWT - Food.Science and Technology*, 133, 109835.
- 4 Wan, S., Wang, C., Hou, L., & Cao, X. (2011, 24-26 June 2011). Effect of adding salt tolerant microorganisms on the flavor of soy-sauce mash. Paper presented at the 2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering.
- 5 Gao, X., Feng, T., Sheng, M., Wang, B., Wang, Z., Shan, P., Zhang, Y., & Ma, H. (2021). Characterization of the aroma-active compounds in black soybean sauce, a distinctive soy sauce. *Food Chemistry*, 364, 130334.
- 6 Devanthi, P. V. P., & Gkatzionis, K. (2019). Soy sauce fermentation: microorganisms, aroma formation, and process modification. *Food Research International*, 120, 364-374.
- 7 Gao, X., Liu, E., Zhang, J., Yang, L., Huang, Q., Chen, S., Ma, H., Ho, C., & Liao, L. (2020). Accelerating aroma formation of raw soy sauce using low intensity sonication. *Food Chemistry*, 329, 127118.

- 8 JAS (Japanese Agricultural Standard) of Soy Sauce; Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Tokyo, Japan, 2021; Volume 38, pp. 1-10 (Japanese). Internet: https://www.maff.go.jp/j/jas/jas_standard/attach/pdf/index-39.pdf
- 9 Yoneda, Y.(2015). Socio-cultural Influences on Japanese Cuisine. Bulletin of Kyoto Notre Dame University,45,1-18,
- 10 Ikezoe, H.(1990). Food Culture in Manyoshu. ObihiroOhtaniJuniorCollege,No27,69
- 11 Kikuchi, Y.(1973). 醬と鼓 その時代的変遷.Japan Brewers Association,487-492
- 12 Uchida, R.(2022).Soy sauce and its functionality. Journal for the integrated study of dietary habits (33), 69-75
- 13 Oguri, T.(2008). Development of Soy sauce Manufacturing Technologies. National Museum of Nature and Science. Report on the Systematization of Technology, Vol. 10
- 14 しょうゆ情報センター,東京都中央区日本橋小網町 3-11,統計情報による
- 15 総務省統計局.政府統計総合窓口家計調査資料による
- 16 Yamakoshi, J., Shimojo, R., Nakagawa, S., & Izui,N.(2006).Hypotensive effects and safety of less-sodium soy sauce containing γ -aminobutyric acid (GABA) on high-normal blood pressure and mild hypertensive subjects. Japanese Pharmacology and Therapeutics 34(6),691-709
- 17 Yamana, T., Taniguchi, M., Nakahara, T., Ito, Y., Okochi, N., Putri, S. P., & Fukusaki,E. (2020). Component profiling of soy-sauce-like seasoning produced from different raw materials. Metabolites, 10(4), 137-146.

- 18 Ohnishi, S. (2006). Soy sauce-like seasoning made without wheat and/or soybean. *Journal of the Brewing Society of Japan*, 101(2), 88-93.
- 19 Xu, J., Jin, F., Hao, J., Regenstein, J. M., & Wang, F. (2020). Preparation of soy sauce by walnut meal fermentation: composition, antioxidant properties, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1665-1676.
- 20 Kikkoman Corporation. International Patent Number, WO2013/073249A1
SOY SAUCE-LIKE SEASONING
- 21 Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., & Fukusaki, E. (2012). Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and analysis of correlation with quantitative descriptive analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(2), 170-175.
- 22 Hatakeyama, M., & Kazuhiro, O. (2016). The Development of *Aspergillus* Fungus "Nanbu Moyashi" for Soy Sauce Brewing. *Journal of Local Independent Administrative Agency Iwate Industrial Research Institute* (18), 36-39.
- 23 Miyazaki, M., Miyazaki, T., Nishimura, T., Hojo, W., & Yamashita, T. (2018). The chemical basis of species, sex, and individual recognition using feces in the domestic cat. *Journal of Chemical Ecology*, 44(4), 364-373.
- 24 Imamura, M. (2016). Descriptive terminology for the sensory evaluation of soy sauce. *Journal of Sensory Studies*, 31(5), 393-407.
- 25 Imamura, M., & Katayama, H. (2017). Sensory differences between commercialized raw (unheated) - and heated-soy sauces: organization of sensory attributes to evaluate Japanese soy sauce. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 64(7), 343-354.

- 26 de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2014). Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 20-25.
- 27 Zhao, G., Feng, Y., Hadiatullah, H., Zheng, F., & Yao, Y. (2020). Chemical characteristics of three kinds of Japanese soy sauce based on electronic senses and GC-MS analyses. *Frontiers in Microbiology*, 11, 579808.35
- 28 Abedi, E., & Hashemi, S. M. B. (2020). Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10), e04974
- 29 Yu, Y., Chen, S., Liu, Z., Xu, T., Lin, H., Hu, F., Yu, Y., Huang, G., Lei, H., & Xu, Z.-L. (2023). Comparison of flavor profiles of Cantonese soy sauces obtained at different fermentation stages. *Process Biochemistry*, 130, 569-576.
- 30 JAS (Japanese Agricultural Standard) of Soy Sauce; Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Tokyo, Japan, 2021; Volume 38, pp. 1-10 (Japanese). Internet: https://www.maff.go.jp/j/jas/jas_standard/attach/pdf/index-39.pdf
- 31 Miyagi, A., Suzuki, T., Nabetani, H., & Nakajima, M. (2013). Color control of Japanese soy sauce (shoyu) using membrane technology. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 507-514.
- 32 Zou, M., Zhu, X., Li, X., & Zeng, X. (2019). Changes in lipids distribution and fatty acid composition during soy sauce production. *Food Science & Nutrition*, 7(2), 764-772.
- 33 Kaneko, K., Tsuji, K., Kim, C.-H., Otoguro, C., Sumino, T., Aida, K., Sahara, K., & Kanedo, T. (1994). Contents and compositions of free sugars, organic acids, free amino acids and oligopeptides in soy sauce and soy paste produced in Korea and Japan. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41(2), 148-156.

- 34 Kong, Y., Zhang, L.-L., Zhang, Y.-Y., Sun, B.-G., Sun, Y., Zhao, J., & Chen, H.-T. (2018). Evaluation of non-volatile taste components in commercial soy sauces. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1854-1866.
- 35 Liu, X., Qian, M., Shen, Y., Qin, X., Huang, H., Yang, H., He, Y., & Bai, W. (2021). An high throughput sequencing approach to the preliminary analysis of bacterial communities associated with changes in amino acid nitrogen, organic acid and reducing sugar contents during soy sauce fermentation. *Food Chemistry*, 349, 129131
- 36 Harada-Padermo, S. d. S., Dias-Faceto, L. S., Selani, M. M., Alvim, I. D., Floh, E. I. S., Macedo, A. F., Bogusz, S., Dias, C. T. S., Conti-Silva, A. C., & Vieira, T. M. F. d. S. (2020). Umami Ingredient: flavor enhancer from shiitake (*Lentinula edodes*) byproducts. *Food Research International*, 137, 109540.
- 37 Solms, J. (1969). Taste of amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 686-688.
- 38 Drewnowski, A. (2001). The Science and Complexity of Bitter Taste. *Nutrition Reviews*, 59(6), 163-169.
- 39 Zhou, W., Sun-Waterhouse, D., Xiong, J., Cui, C., Wang, W., & Dong, K. (2019). Desired soy sauce characteristics and autolysis of *Aspergillus oryzae* induced by low temperature conditions during initial moromi fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 56(6), 2888-2898.
- 40 Lioe, H. N., Selamat, J., & Yasuda, M. (2010). Soy sauce and its umami taste: a link from the past to current situation. *Journal of Food Science*, 75(3), 71-76.32
- 41 Gao, X., Zhang, J., Liu, E., Yang, M., Chen, S., Hu, F., Ma, H., Liu, Z., & Yu, X. (2019). Enhancing the taste of raw soy sauce using low intensity ultrasound treatment during moromi fermentation. *Food Chemistry*, 298, 124928.

- 42 Feng, Y., Cai, Y., Su, G., Zhao, H., Wang, C., & Zhao, M. (2014). Evaluation of aroma differences between high-salt liquid-state fermentation and low-salt solid-state fermentation soy sauces from China. *Food Chemistry*, 145, 126-134.
- 43 Devanthi, P. V. P., Linforth, R., Onyeaka, H., & Gkatzionis, K. (2018). Effects of cinoculation and sequential inoculation of *Tetragenococcus halophilus* and *Zygosaccharomyces rouxii* on soy sauce fermentation. *Food Chemistry*, 240, 1-8.
- 44 Feng, Y., Su, G., Zhao, H., Cai, Y., Cui, C., Sun-Waterhouse, D., & Zhao, M. (2015). Characterisation of aroma profiles of commercial soy sauce by odour activity value and omission test. *Food Chemistry*, 167, 220-228
- 45 Kuang, X., Su, H., Li, W., Lin, L., Lin, W., & Luo, L. (2022). Effects of microbial community structure and its co-occurrence on the dynamic changes of physicochemical properties and free amino acids in the Cantonese soy sauce fermentation process. *Food Research International*, 156, 111347.
- 46 Perez-Santaescolastica, C., Carballo, J., Fulladosa, E., Garcia-Perez, J. V., Benedito, J., & Lorenzo, J. M. (2018). Effect of proteolysis index level on instrumental adhesiveness, free amino acids content and volatile compounds profile of dry cured ham. *Food Research International*, 107, 559-566.
- 47 Liu, B., Li, Y., Cao, Z., & Wang, C. (2021). Effect of *Tetragenococcus halophilus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, and *Torulopsis versatilis* addition sequence on soy sauce fermentation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 69,102662.
- 48 Liang, R., Huang, J., Wu, X., Fan, J., Xu, Y., Wu, C., Jin, Y., & Zhou, R. (2019). Effect of raw material and starters on the metabolite constituents and microbial community diversity of fermented soy sauce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,99(13), 5687-5695.

- 49 Liu, H., Chen, X., Lu, J., & Wu, D. (2024). Evaluation of the differences between low salt solid-state fermented soy sauce and high-salt diluted-state fermented soy sauce in China: from taste-active compounds and aroma-active compounds to sensory characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(1),340-351.
- 50 Zhu, X., Sun-Waterhouse, D., Chen, J., Cui, C., & Wang, W. (2021). Comparative study on the novel umami-active peptides of the whole soybeans and the defatted soybeans fermented soy sauce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,101(1), 158-166.
- 51 Jeong, S.-Y., Chung, S.-J., Suh, D.-S., Suh, B.-C., & Kim, K. O. (2004). Developing a descriptive analysis procedure for evaluating the sensory characteristics of soy sauce. *Journal of Food Science*, 69(8), S319-S325.
- 52 Cherdchu, P., Chambers IV, E., & Suwonsichon, T. (2013). Sensory lexicon development using trained panelists in Thailand and the U.S.A.: soy sauce.*Journal of Sensory Studies*, 28(3), 248-255.
- 53 Zhang, K., Jia, M., Guo, Z., Li, Y., Li, B., & Li, X. (2021). Evaluation of bacterial diversity of traditional cheese in Tarbagatay Prefecture, China, and its correlation with cheese quality. *Food Science & Nutrition*, 9(6), 3155-3164.
- 54 Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., & Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118, 62-69.
- 55 Han, JR., Kong, T., Wang, Q., Jiang, JL., Zhou, QQ., Li, P., Zhu, B.& Gu, Q. (2022). Regulation of microbial metabolism on the formation of characteristic flavor and quality formation in traditional fish sauce during fermentation: a review. *Crit Rev Food Sci*. 1-20.
- 56 Ma, X, Bi, J, Li, X, Zhang, G, Hao, H, & Hou, H. (2021). Contribution of microorganisms to biogenic amine accumulation during fish sauce fermentation and screening of novel starters. *Foods*. 10, 2572–86.

- 57 Abe, K., Suzuki, K. & Hashimoto, K. (1979). Utilization of krill as a fish sauce material. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 45, 1013-1017.
- 58 Dohmoto, N., Wang, KC., Mori, T., kimura, I., Kouriyama T. & Abe, H. (2001). Development of a new type fish sauce using the soy sauce fermentation method. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 67, 1103-1109.
- 59 Kaneko, K., Tsuji, K., Kim, C.-H., Otoguro, C., Sumino, T., Aida, K., Sahara, K. O., & Kaned, T. (1994). Contents and Compositions of Free Sugars, Organic Acids, Free Amino Acids and Oligopeptides in Soy Sauce and Soy Paste Produced in Korea and Japan. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41 (2), 148-156.
- 60 Funatsu, Y. (2002). The taste and flavor of fish sauce prepared by the use of soy sauce koji. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 49, 1-11.
- 61 Funatsu, Y., Kawasaki, K., Yuan, C., Uchida, M., Satomi, M. & Fukuda, Y. (2002) Comparison of volatile compounds in fish sauces prepared from silver carp by use of soy sauce koji and lactic acid bacteria with those in Chinese commercial fish sauces. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 49, 106-118.
- 62 Uchida, M., Ou, J., Chen, BW., Yuan, C., Zhang, XH., Chen, SS., Funatsu, Y., Kawasaki, K., Satomi, M. & Fukuda, Y. (2005). Effects of soy sauce koji and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Fish Sci*, 71, 422- 430.
- 63 Dicks, L.M.T., Holzapfel, W.H., Satomi, M., Kimura, B. & Fujii, T. (2015). *Tetragenococcus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd.
- 64 Zang, JH., Xu, YS., Xia, WS., & Regenstein, JM. (2020). Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: a review. *Crit Rev Food Sci*, 60, 1228–42.

- 65 Shivanne G.S.G., Narayan, B. & Gopal, S. (2016). Bacteriological properties and health-related biochemical components of fermented fish sauce: An overview. *Food Reviews International*, 32, 203–29.
- 66 Han, J., Kong, T., Jiang, J., Zhao, Xin., Zhao, Xil., Li, P., Gu, Q.(2023). Characteristic flavor metabolic network of fish sauce microbiota with different fermentation process based on metagenomics. *Frontiers in nutrition*. 2023.1121310.
- 67 16. Edgar, R.C. & Horn, M.A. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460-2461.
- 68 Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C, Quince, C. & Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 27, 2194-2200.
- 69 Caporaso, JG, Kuczynski, J, Stombaugh, J, Bittinger, K, Bushman, FD, Costello, K, Fierer, N, Peña, AG, Goodrich, JK, Gordon, JI, and other 17 authors. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 7, 335-336.
- 70 Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. & Glöckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools opens external link in new window. *Nucl Acids Res*, 41 (D1), D590-D596.
- 71 Shannon, C.E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell Sys Tech J*, 27, 379–423 and 623–656.
- 72 Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27, 325-349.
- 73 Mizunuma, T. (1984) .The progress of microbiology in soy sauce making (2). *Nippon Jozo Kyokaishi*, 79, 802-810 .

- 74 Nakamura, N.(2001). A Method of Safety Assessment on Soy Sauce Like Seasonings Against Microbial Spoilage . Nippon Jozo Kyokaishi, 96 (8), 526-534.
- 75 Eguchi, U.(1985). Process control of mash for small-to-midium-sized soysauce manufacturing factories. Nippon Jozo Kyokaishi, 80 (11), 771-779.
- 76 Imamura, M.(2012). Descriptive sensory evaluation/use of QDA methods in product development. Chemistry and Biology, 50 (11), 818-824.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、山下哲郎先生、袁春紅先生、王卓琳氏には、試験方法、統計解析について終始温かいご指導、ご鞭撻を賜りました。内田基晴氏にはアンプリコン分析、統計解析についてご指導、ご鞭撻を賜りました。宮崎雅雄先生にはGC-MSを使用した分析手法についてご指導賜りました。ご指導ご助言に深く感謝申し上げます。

最後に博士課程の進学や研究に割く時間を許してくれた家族と社員に心より感謝致します。ご指導、ご協力いただいた皆様に報いるため努力して参ります。