

学位論文

大豆食品の香味寄与成分に関する研究

金子 秀

## 目次

1.1	食品の香りと味 .....	1
1.2	食品の香味成分の研究手法.....	2
1.2.1	香気成分の分析法.....	2
1.2.2	呈味成分の分析法.....	3
1.2.3	食品の成分と香味の関係 .....	4
1.3	大豆及び大豆食品（豆乳、醤油） .....	8
1.3.1	大豆.....	8
1.3.2	豆乳.....	8
1.3.3	醤油.....	11
1.4	本研究の目的と意義 .....	19
<b>第2章</b>	<b>大豆食品の香気寄与成分に関する研究 .....</b>	<b>23</b>
2.1	豆乳 .....	23
2.1.1	豆乳の香気寄与成分の解明.....	23
2.1.2	生大豆から豆乳を調製する際に変化 する豆乳香気寄与成分の解明と生成機 構の推定 .....	28
2.1.3	3品種の大豆から調製した豆乳の香気寄与成分の比較.....	39
2.1.4	結論.....	43
2.2	醤油 .....	48
2.2.1	生醤油の香気寄与成分の解明と火入れ加熱による変化 .....	48
2.2.2	生醤油の火入れ時に増加するフェノール化合物の生成機構の推定.....	60

2.2.3	JAS 規格で分類される 5 種類の醤油の香り寄与成分の解明 .....	67
2.2.4	結論 .....	72
<b>第 3 章</b>	<b>大豆食品の呈味寄与成分に関する研究 .....</b>	<b>76</b>
3.1	呈味寄与成分探索手法の開発 .....	76
3.1.1	食品中のうま味寄与成分のスクリーニング手法の開発 .....	76
3.1.2	結論 .....	86
3.2	醤油 .....	88
3.2.1	醤油のうま味寄与成分の解明 .....	88
3.2.3	結論 .....	110
<b>第 4 章</b>	<b>総括 .....</b>	<b>112</b>
	<b>参考文献 .....</b>	<b>115</b>

## 本文中で用いた主な略号

AEDA	Aroma Extract Dilution Analysis
COSY	Correlation Spectroscopy
FD-factor	Flavor Dilution factor
Fru-Met	<i>N</i> -(1-deoxy- <i>D</i> -fructos-1-yl)-methionine
Fru- <i>p</i> Glu	<i>N</i> -(1-deoxy- <i>D</i> -fructos-1-yl)-pyroglutamic acid
Fru-Val	<i>N</i> -(1-deoxy- <i>D</i> -fructos-1-yl)-valine
GC	Gas Chromatography／ガスクロマトグラフィー
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GC-O	Gas Chromatography-Olfactometry
GPC	Gel Permeation Chromatography
HDMF	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i> )-furanone
HEMF	5(or 2)-ethyl-4-hydroxy-2(or 5)-methyl-3(2 <i>H</i> )-furanone
HILIC	Hydrophilic Interaction Chromatography
HMBC	Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity
HMF	4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i> )-furanone
HMQC	Heter-nuclear Multiple Quantum Coherence
JAS	Japan Agricultural Standard／日本農林規格
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry／液体クロマトグラフ質量分析計
maltol	3-hydroxy-2-methyl-4-pyranone
methional	3-(methylthio)propanal
methionol	3-(methylthio)propanol
MSG	mono sodium L-glutamate／グルタミン酸ナトリウム
NMR	Nuclear Magnetic Resonance／核磁気共鳴
ODS	octadecylsilyl
PDA	Photo Diode Array
<i>p</i> Glu-Gln	pyroglutamylglutamine
<i>p</i> Glu-Gly	pyroglutamylglycine

RI	Retention Index
RP-HPLC	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography／逆相高速液体クロマトグラフィー
SAFE	Solvent Assisted Flavor Evaporation
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SIM	Selected Ion Monitoring
sotolon	3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i> )-furanone
SPME	solid phase microextraction
TCD	Thermal Conductivity Detector／熱伝導度検出器
TDA	Taste Dilution Analysis
TD-factor	Taste Dilution factor
Theogallin	(1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 5 <i>S</i> )-5-carboxy-2,3,5-trihydroxycyclohexyl 3,4,5-trihydroxybenzoate
TOF-MS	Time of Flight-Mass Spectrometry
vanillin	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde

# 第1章 緒言

## 1.1 食品の香りと味

食品の香りと味は、食品のおいしさを左右する最も重要な要素であり、質と共にバランスも重要である (Figure 1-1) <sup>1)</sup>。

香りは鼻腔内の受容体によって認知される嗅覚刺激であり、その感じ方は2通りある。1つは鼻孔から直接感じられる香気 (オルトネイザルアロマ) であり、もう1つは、食品を口に入れて咀嚼し、嚥下した後に喉から鼻腔に抜ける香気 (レトロネイザルアロマ) である。一方、味は、基本5味 (塩味、甘味、酸味、苦味、うま味) から成り立っており、いずれも舌の表面に存在する味細胞の受容体によって認知される味覚刺激である。食品のおいしさは、これらの感覚に加えて、食品を喫食した際に感じられる食感 (テクスチャー)、温度、色、音などのさまざまな感覚が一体化されて評価される。従って、食品のおいしさを理解するには、香りと味に関与する成分の定性的、定量的な知見を得ることが最も重要な要素の1つである。

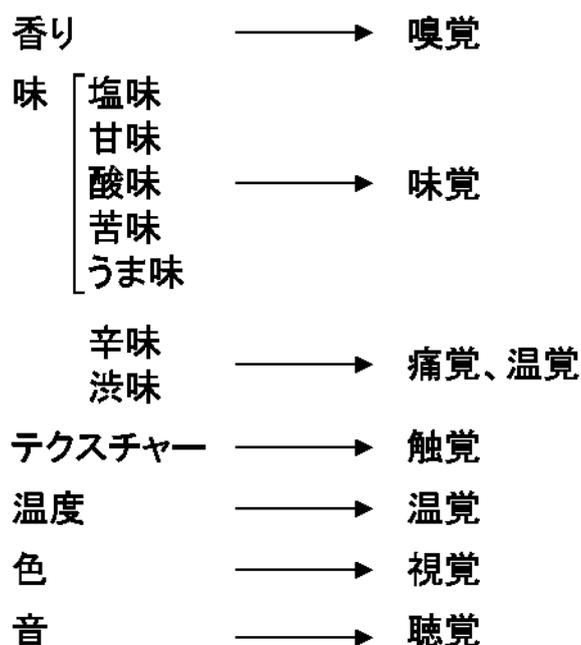


Figure 1-1 Factors for palatability of food

## 1.2 食品の香味成分の研究手法

### 1.2.1 香気成分の分析法

食品中にはタンパク質、脂質、糖質をはじめとして、色素成分、香気成分など、多岐にわたる成分が含まれている。中でも香気成分は、嗅覚刺激を通して食品の重要な特徴付けを行っているにも関わらず、その含有量は非常に少ない。香気成分の分析は、一般にガスクロマトグラフィー (GC) を用いて行われるが、食品中の揮発性成分を直接あるいは水などの溶剤に溶解・懸濁させて分析するヘッドスペース分析<sup>2)</sup>を除き、通常は GC 分析の前処理として、蒸留法、抽出法、分配法などの分離精製<sup>3)</sup>を単独又は組み合わせて行い、GC 分析に適さない夾雑成分を除去して行われる。

本研究では、吸着樹脂を用いる固相抽出法<sup>4)</sup>及び低温下で蒸留可能な Solvent Assisted Flavor Evaporation 法 (SAFE)<sup>5)</sup>を用いた。

吸着樹脂を用いた固相抽出法は、食品中の香気成分を吸着樹脂の担体に吸着・脱着させて分離精製する方法であり、一般的に、担体には非極性合成ポリマーが用いられる。この手法は、液液分配のような分配法に比べて使用する抽出溶媒の量が少ないため、スケールアップが非常に容易である。また、熱がかからない手法であるため、蒸留法に比べて香気成分の変化が少ない。一方、この手法では吸着樹脂に対する親和性が弱いアルコールや酸などの高極性成分の回収率がやや低くなる傾向がある。

SAFE は、蒸留法の 1 つであり、高真空下、40~50℃程度の比較的低温下で香気成分を揮発させることができる装置である。前述の固相抽出法を用いて調製した香気抽出物は、香気成分と共に不揮発性成分も含有している場合が多いため、そのまま GC 分析に供するのは好ましくない。そこで、得られた香気抽出物をさらに SAFE で蒸留することにより、不揮発性成分を含まない香気抽出物が得られる。SAFE は現在、香気分析に最も広く適用されている手法の 1 つである。

## 1.2.2 呈味成分の分析法

食品の呈味は基本 5 味（塩味、甘味、酸味、苦味、うま味）から成り立っており、それらのバランスの違いによって多種多様な食品の呈味が特徴づけられている<sup>6)</sup>。これらの成分のうち、酸味成分である有機酸などを除き、多くの成分は不揮発性である。そのため、呈味成分の分析は、揮発性成分から成る香気成分の分析法と異なり、主に高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography (HPLC)）が用いられる<sup>7)</sup>。HPLC は、GC に比べて分析試料の制約が少なく、試料中に水が多量に含まれていても問題ないため、不溶性固形分を除去する程度の簡便な前処理のみで分析可能である場合が多い。しかしながら、HPLC カラムは、GC カラムに比べて成分の分離能が高くないことや呈味成分の化学構造が多岐にわたることから、分析対象に応じて分離方法や検出方法の工夫が必要となる。最も汎用的に用いられる逆相液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）の他、甘味に関与する糖類の分析には順相液体クロマトグラフィー<sup>7)</sup>が、酸味に関与する有機酸、塩味に関与するミネラル類の分析にはイオン排除クロマトグラフィー<sup>8,9)</sup>が、うま味、甘味、苦味に関与するアミノ酸・ペプチドにはイオン交換クロマトグラフィー<sup>10)</sup>が用いられる。また、液体クロマトグラフィー以外の分析手法として、ミネラル類には原子吸光分析<sup>11)</sup>が用いられ、また、塩素イオンなどのアニオン類には古典的な電位差測定が用いられる<sup>12)</sup>。

しかしながら前述のように、食品の呈味成分は非常に多岐に亘る化学的性質を有するため、未知の呈味成分を明らかにする場合は、その化学的特性を考慮しながら、効率のよい分離精製を組み合わせを行い、活性成分を単離し、同定する必要がある。塩味を呈する NaCl のようなミネラル類や酸味を呈する無機酸や有機酸類は、それぞれ化学的性質が類似していることから、複雑な食品の成分中から分離精製することが比較的容易である<sup>13)</sup>。一方、甘味、苦味、うま味は既に多くの活性成分が明らかにされているが、必ずしもそれらの構造と活性の相関は明らかになっていない<sup>13)</sup>。例えば、甘味成分はスクロースをはじめとする糖類が最もよく知られているが、それら以外にも、天然物に含まれるアミノ酸、ステビア類、ソーマチンのようなタンパク質や人工甘味料であるアスパ

ルテームのようなペプチド、アセスルファミウムのような複素環化合物の塩なども知られている。そこで、食品の呈味寄与成分を明らかにするために、複数の分離精製を組み合わせを行い、活性成分を単離し、核磁気共鳴（NMR）や液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）などの機器分析手法を用いて同定する手法が用いられる。

### 1.2.3 食品の成分と香味の関係

一般に嗅覚で検知する香気成分や味覚で検知する呈味成分は検知閾値を有しており、検知閾値以下の濃度では香味を感じない。検知閾値は化合物により大きく異なり、数%～数 ppt レベルまで非常に広範囲に及ぶ。そのため、含有量の多い成分が必ずしも香味にとって重要な成分ではなく、また通常の分析では検出できないほど微量な成分が重要な香味成分である可能性もある。

そこで本研究では、**Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)**<sup>14)</sup>及び **Taste Dilution Analysis (TDA)**<sup>15)</sup>を用いて重要な香味成分の探索を行った。

**AEDA** は、段階的に希釈した香気濃縮物を順次 **Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O)** にて分析し、成分の検出を行う方法であり、各成分の重要性は含有量ではなく、検知閾値の何倍含まれているか (**Flavor Dilution-factor (FD-factor)**) によって判断される (**Figure 1-2**)。本研究では、この **FD-factor** の高い成分を香気寄与成分と定義することとした。

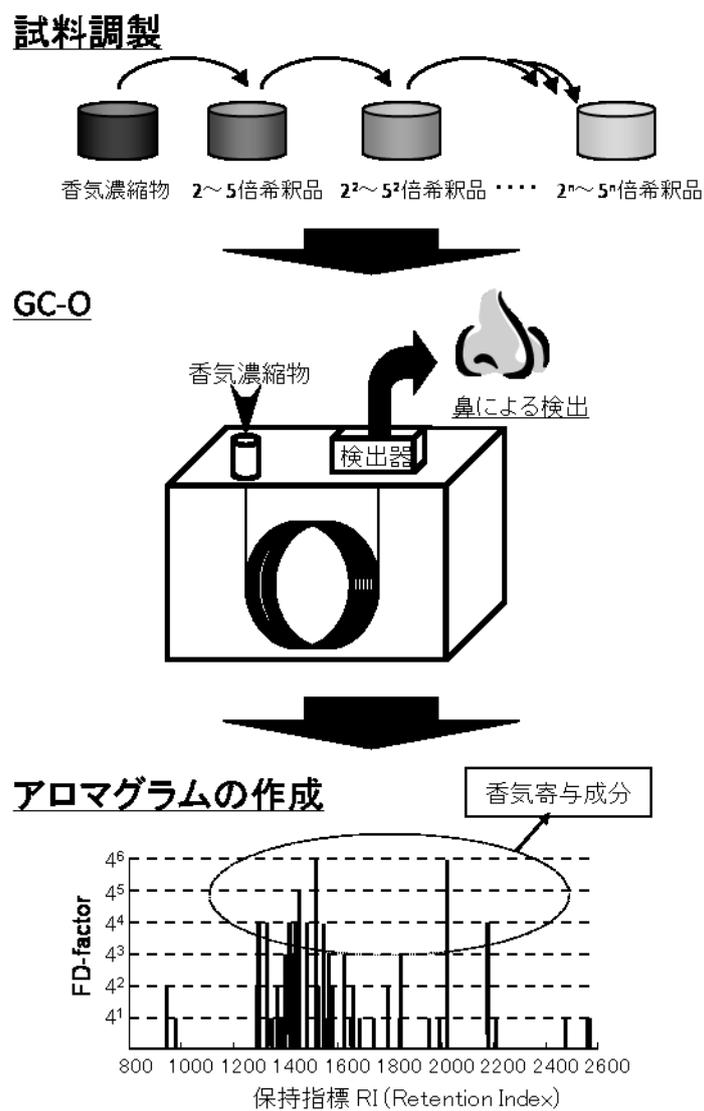
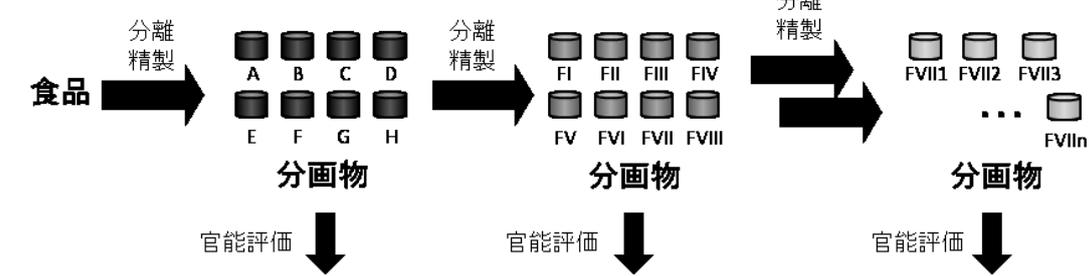


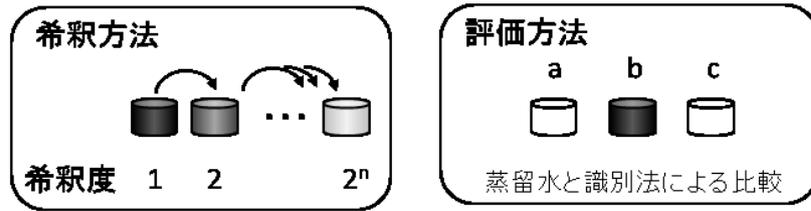
Figure 1-2 Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)

一方、TDA は、食品の不揮発性成分を異なる分離手段を用いて、分離精製を繰り返し、得られた各画分の希釈液の閾値測定 (Taste Dilution factor (TD-factor)) によって重要性を判断する方法である (Figure 1-3)。

## 成分の分離・精製



## 官能評価



- ①各画分の凍結乾燥品を収率に応じて蒸留水で希釈(TDファクター(希釈度) = 1)
- ②それぞれの画分をブラインド下での識別法による官能評価試験を行う。
- ③有意差が認められた画分はさらに希釈し、再び識別法による官能評価試験を行う。有意差が認められなくなった希釈倍率をその画分のTDファクターとする。

## TDクロマトグラムの作成

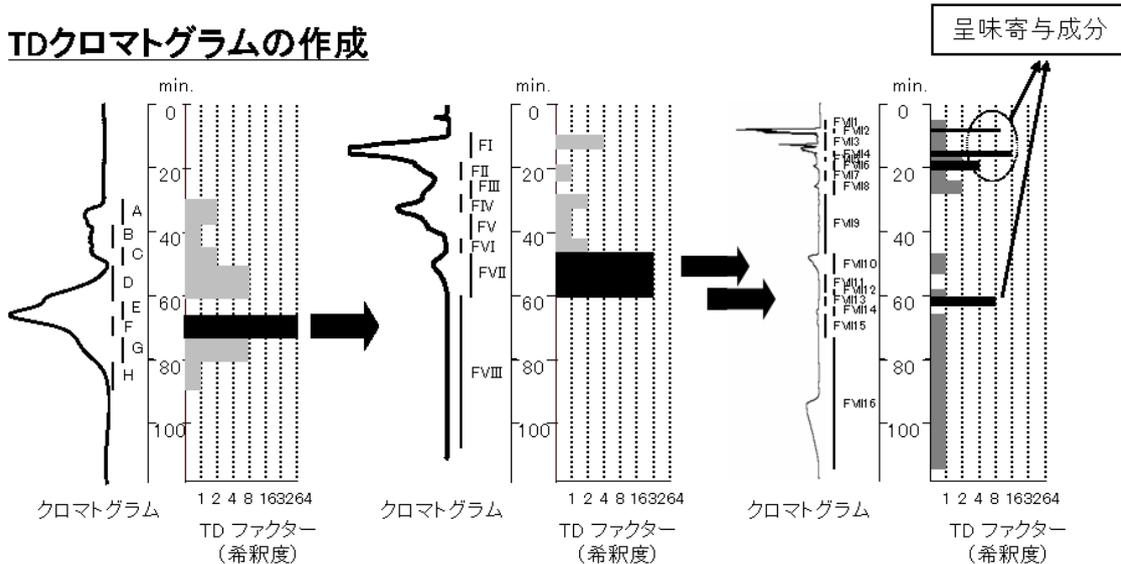


Figure 1-3 Taste Dilution Analysis (TDA)

しかしながら TDA は、分離精製した画分の呈味閾値試験に基づいてそれらの重要性を判断するため、うま味の相乗作用のような成分間の効果を検証することができない。そこで、本研究では、TDA を応用し、官能評価を識別法による閾値測定ではなく、評点法によるうま味強度の測定（モデルうま味溶液（グル

タミン酸ナトリウム (MSG) 水溶液) への画分の添加効果) で評価した (Figure 1-4)。本研究では、この評点法で高い評価点を示した成分を呈味寄与成分と定義することとした。

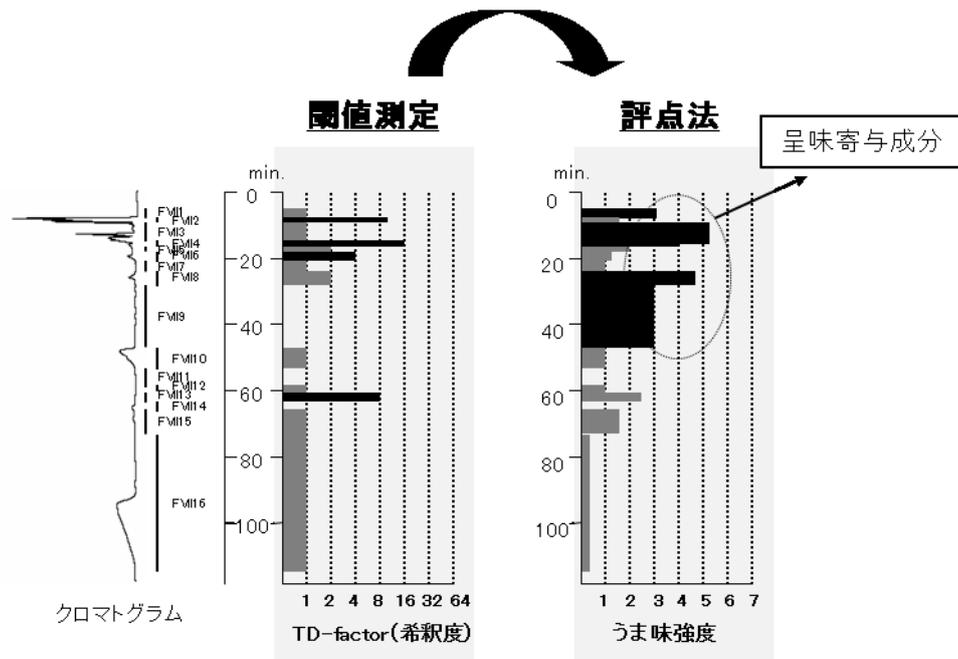


Table 1-4 Revised TDA method by using scoring method instead of threshold measurement in sensory evaluation

## 1.3 大豆及び大豆食品（豆乳、醤油）

### 1.3.1 大豆

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) はアジア原産のマメ科作物であり、古来より日本をはじめとするアジア地域で広く利用されてきた。世界における大豆の主な用途は大豆消費量全体の約 **90%**を占める食用油加工用であり、食品用途はわずか **5%**に過ぎない<sup>16)</sup>。しかしながら、日本では古来より大豆を味噌、醤油、豆乳・豆腐などの食用として利用しているため、日本国内の大豆消費割合は世界の状況とはかなり異なり、食品用途の割合が消費量全体の約 **30%**と相対的にかなり高い<sup>16)</sup>。また、その用途は豆乳・豆腐が最も多く、次いで味噌、納豆、醤油となっている。

日本で消費されるほとんどの大豆は、アメリカ、ブラジル、カナダ、中国からの輸入品であり、国産大豆の比率はわずかに **6.4%**である。国産大豆品種は、国の研究機関による育成種が多く、これまでに約 **140** 品種が登録されている<sup>17)</sup>。それらは、農家の生産性向上や製造メーカーの加工適性向上を目的に、耐病虫害抵抗性の向上、多収性、タンパク質含量の向上（豆腐用）、外観の改良（煮豆用）などがなされている。また、国産大豆はほぼ食品用（豆腐・豆乳又は煮豆）に栽培されているため、食品用途の大豆に占める国産大豆の割合は約 **20%**であると概算される。すなわち、我々が消費している大豆食品の約 **80%**は外国産大豆、約 **20%**は国産大豆を使用して製造されている。

### 1.3.2 豆乳

豆乳は最も摂取容易な大豆食品の1つであり、さらに凝固剤（にがりなど）を加えて製造される豆腐の原料でもある。豆乳、豆腐は古くより重要な植物タンパク源として安価で手軽に入手できる伝統食品であり、諸説あるが、奈良時代、あるいは鎌倉時代に僧侶によって中国より伝えられたと言われている<sup>17)</sup>。

### 1.3.2.1 豆乳の種類

豆乳は、豆腐製造の原料となるほかに、日本農林規格（Japan Agricultural Standard (JAS)）により大きく3つの製品（豆乳、調整豆乳、豆乳飲料）に分類されている（Table 1-1）

Table 1-1 Varieties of soymilks classified according to JAS

製品	大豆固形分	タンパク質濃度
豆乳	8%以上	3.8%以上
調整豆乳	6%以上	3.0%以上
豆乳飲料	果汁入り	2%以上
	その他	4%以上

### 1.3.2.2 豆乳の製造方法<sup>18)</sup>

豆乳は、大豆を水に半日浸した後、6～8倍量の水とともに細かく摩砕することにより得られる生呉を数分間煮沸、ろ過して得られる白色の乳化された液体である（Figure 1-5）。品質のよい豆乳を製造するために、豆乳用の大豆品種は一般的に高いタンパク質含量、最適な $\beta$ -コングリシニンとグリシニンの比、高い糖含量などが要求される<sup>19-24)</sup>。

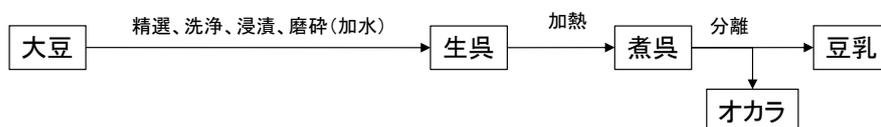


Figure 1-5 Manufacturing process of soymilk

### 1.3.2.3 豆乳の香気成分に関する知見と現状の課題

豆乳の特徴的な香気は、一般的にオフフレーバーと認識されるグリーン、ファッティ様であるとされている<sup>18)</sup>。これらの香気については、古くから研究報告がなされており、脂質の自動酸化、光酸化、酵素反応、とりわけリポキシゲナーゼによる分解物に起因すると考えられている (Figure 1-6)<sup>25,26)</sup>。最近では、これらの香気成分量の品種間差異や加熱殺菌条件の違いによる変化についても報告がなされている<sup>27-30)</sup>。また、近年これらのオフフレーバー成分を減らすために、リポキシゲナーゼを欠損させた大豆品種が開発されているが<sup>31)</sup>、それらから調製した豆腐は、通常の大豆品種から調製した豆腐に比べて、グリーン、ファッティ香気は少ないが、甘味が弱く、こくが足りないために、全体の風味は劣っているとの報告もある<sup>32,33)</sup>。

このように、脂質由来のオフフレーバー成分以外にも豆乳や豆腐の風味に影響を与える成分が存在する可能性が示唆されているが、良質な豆乳の香気に与する成分は、未だ十分に明らかにされていない。

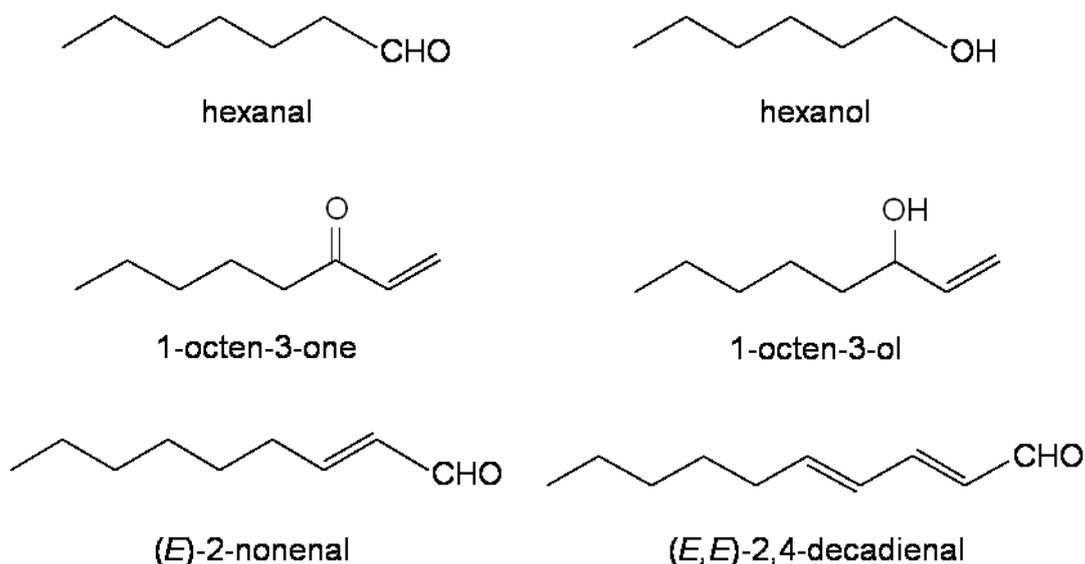


Figure 1-6 Typical green and fatty odor compounds in soymilk

### 1.3.3 醤油

醤油は大豆を原料とする発酵食品の1つであり、中国より伝来した「醬」が由来であるとされている<sup>17)</sup>。当初は魚や肉を原料としていたが、16世紀になり、大豆や大麦など、穀物を原料とする醤油が製造されるようになり、18世紀には現代同様、大豆と小麦を原料とする製法が一般的になった。

#### 1.3.3.1 醤油の種類

日本の醤油は JAS により、濃口、淡口、溜、再仕込み、白の5種類に分類されている (Table 1-2)<sup>34)</sup>。

Table 1-2 Varieties of Japanese soy sauces classified according to JAS

種別	原料	主な産地	用途
濃口	大豆 50%、小麦 50%	全国	つけ醤油、かけ醤油、煮物などの調味料、ソース
淡口	大豆 50%、小麦 50%	全国	料理の素材の風味を生かす料理
溜	大豆>80%、小麦<20%	東海地方	佃煮、せんべいなどの加工品、刺身のつけ醤油
再仕込み	大豆 50%、小麦 50%	九州、山陰地方	甘露煮、刺身のつけ醤油
白	大豆<10%、小麦>90%	愛知県	うどんのつゆ、鍋料理、素材の風味を生かす料理

濃口は、日本の醤油の全生産量の約 85%を占める最も一般的な濃紅色の醤油であり、つけ醤油、かけ醤油のようにソースとして、また煮物などの調味料として幅広く利用されている。淡口は、主に関西地方で消費されており、素材の色を生かす料理に利用される着色が抑えられた淡褐色の醤油である。溜は、ほぼ大豆を原料とする濃褐色の醤油であり、主に刺身用のつけ醤油や佃煮、せんべいなどの色の濃い煮物や焼き物に用いられる。再仕込みは、日本の西部（山口県）で主に製造・消費されている醤油で、製法は濃口と同じだが、食塩水の代わりに生揚げ醤油（火入れを行う前の濃口醤油）を用いる。再仕込み醤油は、主に甘露煮用の調味料や刺身用のソースとして利用されている。白はごく薄い

琥珀色の醤油で、主に日本の中部で製造されている。溜とは対照的に、原料がほぼ小麦であり、淡口と同様に、主に素材の色を生かしたい料理に用いられる。

### 1.3.3.2 JASにより分類される5種類の醤油の製造方法<sup>18,35)</sup>

#### 1.3.3.2.1 濃口醤油

濃口醤油の製造方法は本醸造方式、新式醸造方式、アミノ酸混合方式があるが、最も一般的な製造方法は本醸造方式である（Figure 1-7）。

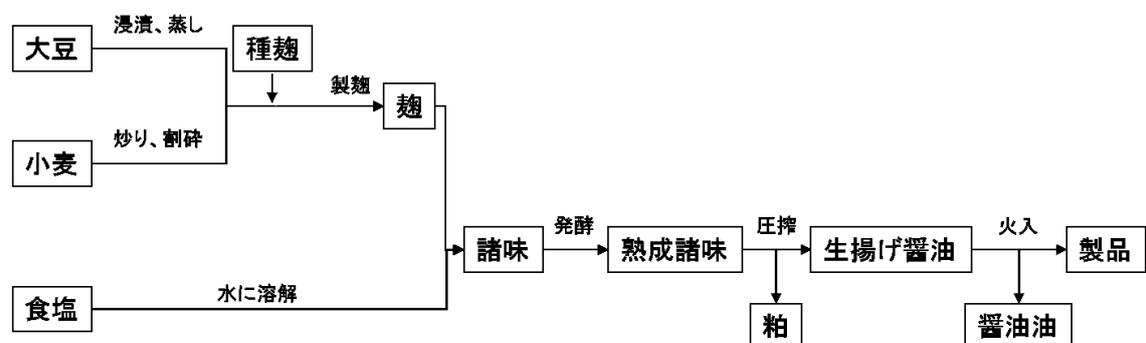


Figure 1-7 Brewing process of Koikuchi-type soy sauce

煮沸によりタンパク変性させた大豆と焙煎後粉砕した小麦をほぼ同量使用し、種麴 (*Aspergillus oryzae* 又は *Aspergillus sojae*) を添加して高湿下数日間培養することにより、麴が生産される (製麴)。諸味は、麴に約 20%の食塩水を添加することにより得られ、その後発酵・熟成される。醤油乳酸菌 (*Tetragenococcus halophilus*) や耐塩性熟成酵母 (*Candida versatilis* や *Candida etchellsii* など) などが諸味中で最初に生育し、次いで耐塩性の主発酵酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) が生育する。諸味に含まれるタンパク質、糖質、脂質は、麴菌の酵素による分解や耐塩性の乳酸菌、酵母の発酵により徐々に熟成されていく。熟成された諸味は、その後圧搾され、ろ液 (生揚げ醤油) と沈殿 (粕) に分けられる。得られた生揚げ醤油を、殺菌及び火入れ香 (火香) 生成のために行われる加熱処理 (火入れ) を経て醤油となる。

### 1.3.3.2.2 淡口醤油

淡口醤油は、濃口醤油と同様に大豆と小麦を約 50%ずつ使用して醸造されるが、食塩濃度を濃口醤油よりもやや高くし、発酵と熟成を緩やかにしている。また、味をまろやかにするために米を糖化した甘酒を使用することもある (Figure 1-8)。

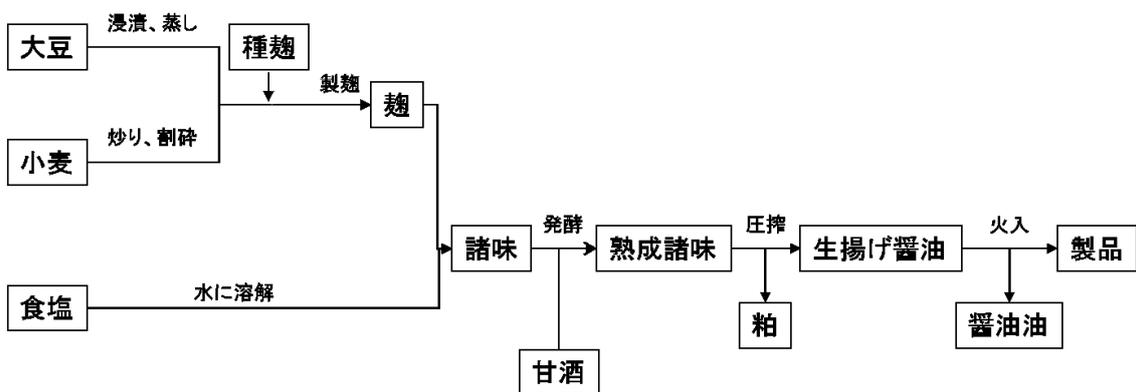


Figure 1-8 Brewing process of Usukuchi-type soy sauce

### 1.3.3.2.3 溜醤油

溜醤油は、原料がほぼ大豆 (80~100%) であり、小麦はほとんど使用されない (Figure 1-9)。蒸煮された大豆を小さな塊にした後、麴と混合し、高湿下 3~4 日間培養することにより、味噌玉麴が生産される。諸味は、麴に高濃度の食塩水を添加することにより得られ、その後 1~3 年間発酵・熟成される。この間、底に溜まった溜醤油を汲み出して循環させる「汲みかけ」を行う。熟成された諸味は、自然に分離される醤油 (生引き溜り) と溜味噌に分離され、溜味噌を圧搾して得られるろ液が溜醤油となる。また、一般的に火入れは行われな

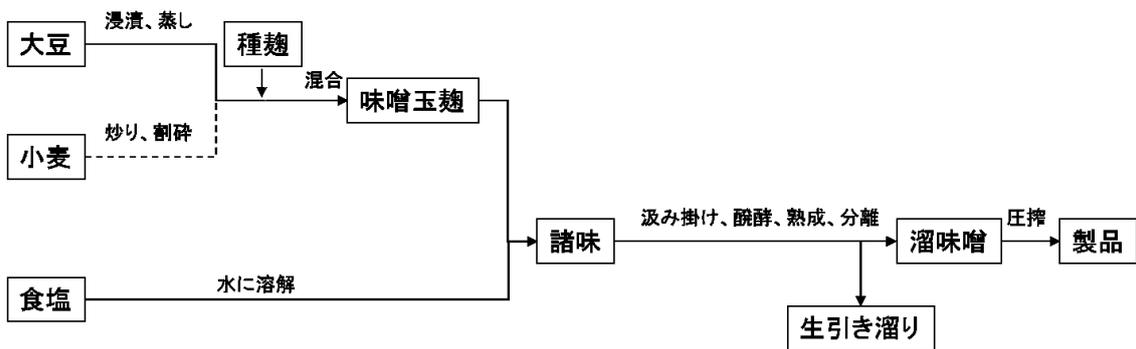


Figure 1-9 Brewing process of Tamari-type soy sauce

#### 1.3.3.2.4 再仕込み醤油

再仕込み醤油は、濃口醤油と同様の製法で醸造されるが、食塩水の代わりに生揚げ醤油が用いられる（Figure 1-10）。

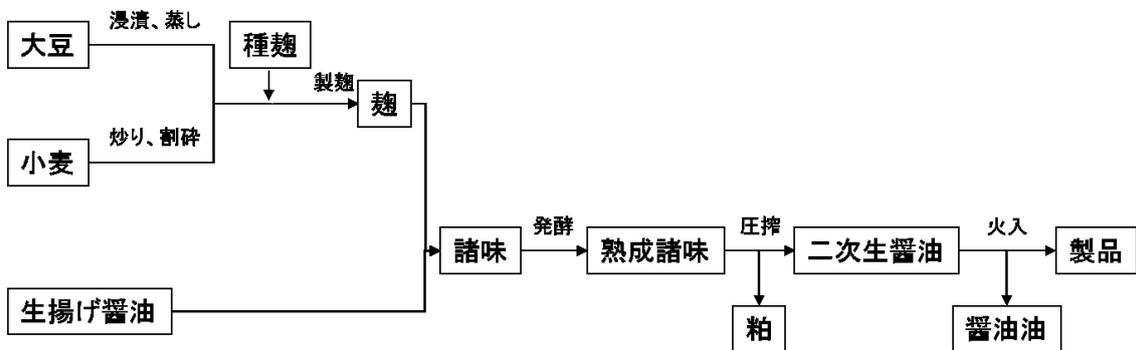


Figure 1-10 Brewing process of Saishikomi-type soy sauce

#### 1.3.3.2.5 白醤油

白醤油は、溜醤油とは対照的に原料がほぼ小麦である。精白、洗浄された小麦と焙煎後粉砕された大豆を少量使用し、蒸煮後に種麴を添加して高湿下数日間培養することにより、麴が生産される。その後、低温・短期間（約 3 カ月）熟成により製品となる（Figure 1-11）。また、溜醤油と同様に、一般的に火入れは行われない。

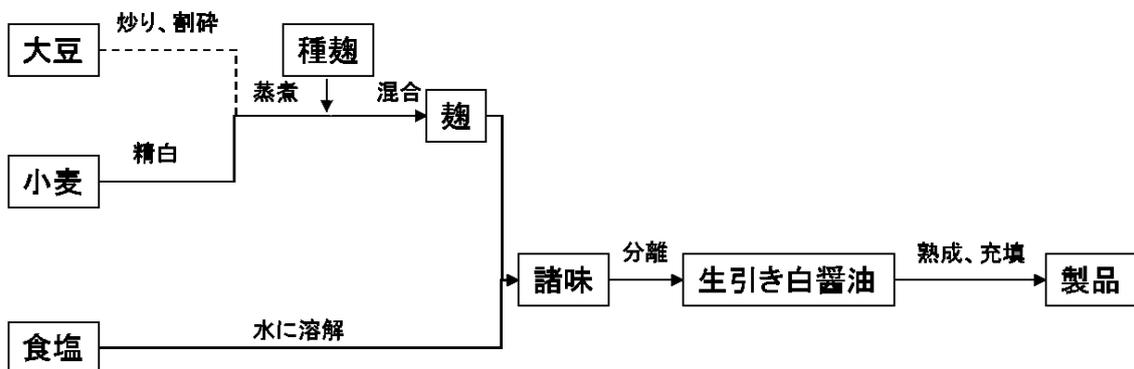


Figure 1-11 Brewing process of Shiro-type soy sause

#### 1.3.3.4 醤油の香気成分に関する知見と現状の課題

醤油の香りに関与する揮発性成分は、フラノン化合物の 5(or 2)-ethyl-4-hydroxy-2(or 5)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)、4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone (HMF)、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) やフェノール化合物の 4-ethyl-2-methoxyphenol をはじめとしてエステル類、炭化水素、含硫化合物、アルコール類、ピラジン類、酸類など、既に 300 種以上の成分が報告されている<sup>36)</sup>。さらに、それらの成分の香調や生成機構（麴菌・酵母・乳酸菌による発酵、火入れ工程による加熱など）に関する数多くの報告がなされている<sup>37-43)</sup>。

さらに、濃口醤油については、AEDA を用いて香気寄与成分が見出されており<sup>44)</sup>、3-methylbutanal、3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (sotolon)、HEMF、2-methylbutanal、3-(methylthio)propanal (methional)が重要な成分であると報告されている。

一方、1.3.3.1 で述べたように、日本の醤油は JAS により、濃口、淡口、溜、再仕込み、白の 5 種類に分類されており、各醤油は、原料である大豆と小麦の比率や醸造の条件が異なることから、それらの香気寄与成分も異なっている可能性が高い。しかしながら、濃口醤油以外の醤油については、揮発性成分に関する報告がわずかになされているが<sup>45,46)</sup>、AEDA を用いて香気寄与成分を明ら

かにした研究報告はなく、それらの香気特徴は化合物レベルで十分に明らかにされていない。

また、生揚げ醤油をそのまま、あるいは限外ろ過などの熱のかからない方法で殺菌を行った火入れ工程を経ていない醤油（生醤油）がフレッシュで軽い香気特徴を有する新しいタイプの製品として開発され、近年普及しつつある。一般に、火入れは 80～85℃で 10～30 分或いは 110～130℃で数秒加熱後 60～65℃で数日間静置して行われ、酵素の失活とともに、香り付けの目的で行われる醤油製造工程の 1 つである<sup>36,47)</sup>。この火入れ工程で濃度が増加する成分として、HDMF や HMF などのフラノン類、ストレッカーアルデヒド類、 $\alpha$ -ジケトン化合物、ピラジン類、dimethyl disulfide、dimethyl trisulfide などの含硫化合物などが報告されている (Figure 1-12)<sup>47-51)</sup>。

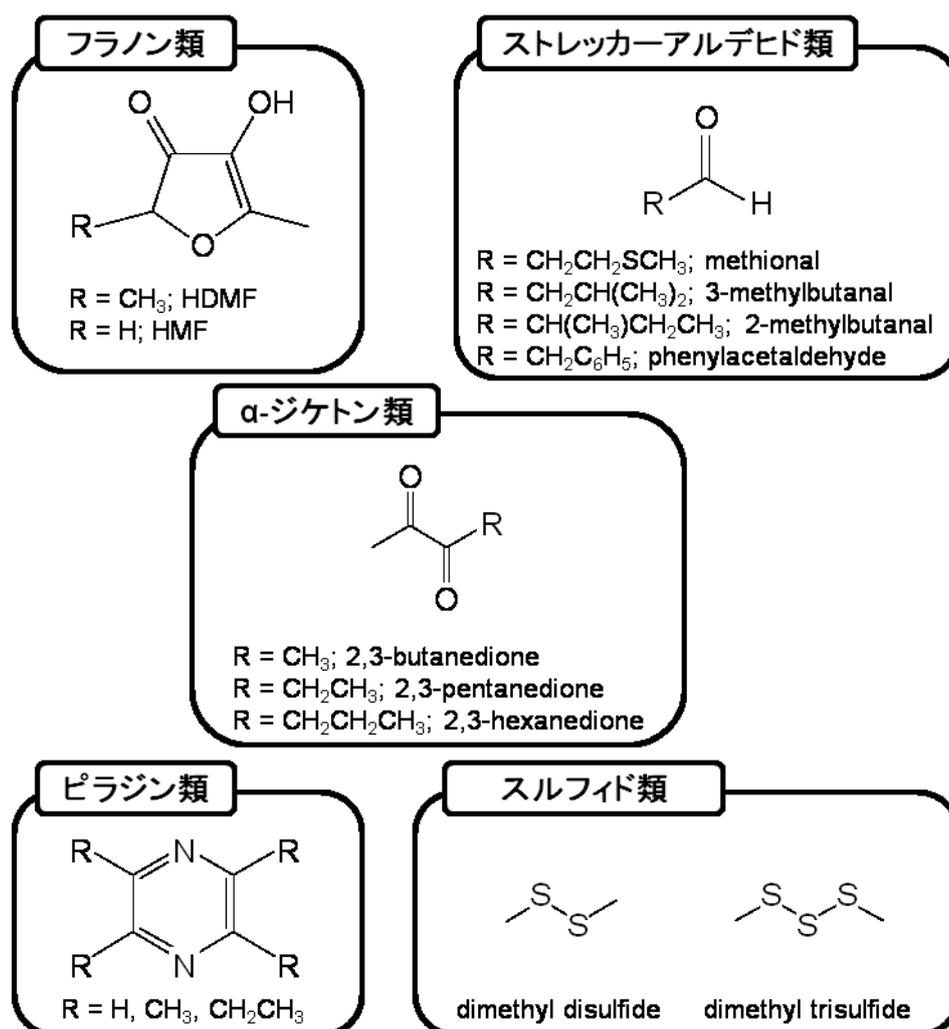


Figure 1-12 Increasing compounds in raw soy sauce during heating

さらに近年、2-furfurylthiol、benzenmethanethiol、ethyl 2-mercaptopropanoate が火入れ加熱によって増加することが報告されている<sup>52)</sup>。これらの成分は官能評価によって、火入れ前後の香気変化に影響を与えていることが確認されている。しかしながら、AEDA を用いて生醤油の香気寄与成分を明らかにした研究報告はなく、未だ多くの不明点がある。

### 1.3.3.5 醤油の呈味成分に関する知見と現状の課題

醤油は基本5味をバランスよく有する調味料であるといわれている。

濃口醤油の約60%は水あるいは醸造中に生成するエタノールであり、残りの約40%が不揮発性成分である (Figure 1-13)<sup>53)</sup>。呈味に関与すると考えられる不揮発性成分のうち、最も多い成分は、ミネラル類であり、その他アミノ酸、有機酸、糖などが含まれている。

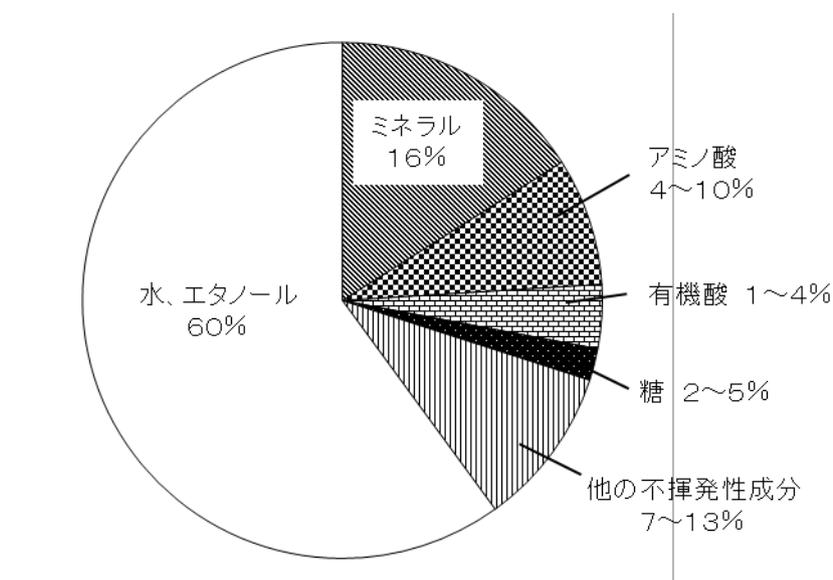


Figure 1-13 Chemical components in Koikuchi-type soy sauce

醤油の品質は JAS 規格により、色度、全窒素、無塩可溶性固形分、アルコール分、直接還元糖などの成分組成から特級、上級、標準の3階級に分類されており<sup>53)</sup>、全窒素及び無塩可溶性固形分が多いほどうま味が強く、品質が高いとされる。しかしながら、これらは大豆及び小麦タンパク質由来の遊離グルタミ

ン酸の含有量を概算する間接的な指標であり、醤油のうま味に関与する化合物を直接的に明らかにした研究報告はほとんどない<sup>54)</sup>。グルタミン酸以外のうま味成分として、酸性ペプチドの1つであるグルタミルグルタミン酸の存在が報告されているが<sup>55)</sup>、醤油中の含有量が低いため、うま味への寄与に否定的な報告もある<sup>56)</sup>。さらに、醤油中の低分子化合物が塩味、うま味に寄与しているとの報告もある<sup>57)</sup>。しかしながら、いずれの報告も分子レベルで醤油のうま味への寄与が明らかにされておらず、検討が十分ではない。

## 1.4 本研究の目的と意義

多くの大豆食品は日本の伝統食品であり、含有成分に関する研究報告は、それぞれ専門的な視点から既に数多くなされている。例えば、醤油の揮発性成分は既に 300 以上の化合物が<sup>36)</sup>、味噌の揮発性成分は 200 以上の化合物が検出されている<sup>58)</sup>。しかしながら、1.2.3 で述べたように、食品中の量的な主要成分が必ずしも香味に重要な成分とはいえず、また通常分析では検出できないほど微量な成分が重要な香味成分である可能性もある。したがって、これまでの研究報告によって、大豆食品の香味特徴に寄与している成分が十分に明らかにされているとはいえない。

大豆食品の香味寄与成分は、これまでに AEDA、TDA を活用した報告（濃口醤油<sup>44,57)</sup>、豆乳<sup>27,31)</sup>、味噌<sup>59)</sup>）が幾つかなされている。しかしながら、例えば、醤油の香気寄与成分に関する報告は、これまで濃口醤油のみであり、近年普及しつつある生醤油や濃口醤油以外の JAS 規格の醤油については全く報告がない。また、醤油の呈味寄与成分は、TDA を用いた研究報告<sup>57)</sup>がなされているものの、化合物レベルの検証が十分になされていない。そこで、本研究では、次に挙げる 2 つの課題を解決することを目的とした。第一に、大豆食品の香味寄与成分を AEDA、TDA によって明らかにする。研究対象として、日本の主要な大豆食品である豆乳（豆腐）と伝統的な大豆発酵食品である醤油を選択した。第二に、明らかになった香味寄与成分の存在要因を明らかにする。そのために、豆乳調製過程での香気寄与成分の変化と異なる品種から調製した豆乳の香気寄与成分の比較について研究することとした。さらに、生醤油の火入れによる香気変化に着目した。

以下に、より具体的にそれぞれの研究の目的と意義を説明する。

第 2 章では、大豆食品の香気寄与成分について述べる。2.1 では、豆乳の香気に注目した。豆乳香気は、1.3.2.3 で述べたようにグリーンでファッティなオフフレーバーが特徴的とされていたが、豆乳のおいしさに関与する良質な香気成分は、ほとんど明らかにされていない。そこで、主要な豆乳・豆腐用の国産大豆品種であるフクユタカから調製した豆乳の香気寄与成分を AEDA により明らかにした。このことにより、香りの観点から豆乳のおいしさを理解することが

可能になるとともに、豆乳を取り扱うメーカーにとって、それらの見出された成分を製品の品質管理の指標や購買の規格とすることが可能となり、消費者に風味のより好ましい豆乳が提供できる。

さらに、豆乳の香気寄与成分の豆乳調製過程での変化を明らかにするために、生大豆及び加熱前の豆乳（生呉）の **AEDA** を行い、豆乳の **AEDA** と比較した。このことにより、おいしさに関わる豆乳の香気寄与成分の生成要因を推定することができ、より好ましい風味を有する豆乳の調製方法を見出すことが可能となる。また、豆乳製造メーカーにとって、製造工程の指標とすることが可能となり、豆乳製品の品質の安定化や向上などの産業上の有益性も期待できる。

また、1.3.1 で述べたように、原料大豆は、生産者の生産性向上や加工業者の加工適性の向上を目的に改良された育成種がほとんどであり、それらから調製・製造される豆乳の風味が必ずしも好ましいとは限らない。そこで、豆乳の香気寄与成分の品種の違いによる質的、量的な差を明らかにするために、フクユタカに加えて、主に煮豆用に用いられる主要国産大豆品種の1つであるミヤギシロメ、日本国内で最も利用されている豆腐・豆乳用の輸入大豆品種の1つである **VINTON81** から作成した豆乳の **AEDA** 及び官能評価の比較を行った。このことにより、これまで十分に明らかでなかった香りの観点から、大豆品種と豆乳への用途適性の関係を明らかにすることが可能となる。

2.2 では醤油の香気に注目した。醤油は、最も汎用的な日本の伝統的な調味料であり、さまざまな用途に利用されている。例えば、濃口醤油はつけ醤油やかけ醤油として、淡口醤油は関西地方の煮物やうどんなどの出汁として、溜醤油は甘露煮用の調味料としてそれぞれ利用されている。しかしながら、前述のように濃口醤油以外の香気寄与成分は全く報告されておらず、それらの香気特徴はほとんど明らかにされていない。そこで、**JAS** 規格の5種類の醤油に加えて、近年普及しつつある生醤油の香気寄与成分を **AEDA** により明らかにした。このことにより、各醤油の香気特徴を理解することが可能となり、各醤油の適切で有効な用途を新たに見出すことが可能になる。また、醤油製造メーカーにとっては、製品の品質管理の指標とすることが可能となり、醤油を利用する食品メーカーにとっては、醤油の購買規格を詳細に設定することが可能となるなど産業上の有益性も期待できる。

さらに、生醤油の火入れ時の香気寄与成分の変化を明らかにするために、生醤油と火入れ相当の加熱を行った生醤油（本論文では、「火入れ醤油」と記載する）の AEDA、定量分析、官能評価による比較を行った。このことにより、濃口醤油の火入れ加熱による香気寄与成分の変化がより詳細に理解できるようになるとともに、近年製品としても普及しつつある生醤油と一般的な火入れ醤油の風味の差異が明らかとなり、生醤油独特の風味を生かした新たな用途開発が可能になる。

また、生醤油は火入れ加熱によって **spicy/burnt** 香気が顕著に強まったにもかかわらず、その香気に寄与するフェノール化合物の増加は一部の成分のみであった。そこで、その要因を明らかにするために対応するフェノール酸からのモデル脱炭酸反応を検討した。このことにより、濃口醤油の香気寄与成分である複数のフェノール化合物の生成要因の差異についての有用な知見が得られるとともに、製造メーカーには、製品の品質管理を行う上で重要な知見を提供できると考えられる。

第3章では、呈味寄与成分について述べる。3.1 では、はじめに醤油のうま味寄与成分を探索するため、スクリーニング手法の開発を行った。うま味は基本5味の1つであり、酸性アミノ酸や核酸などの成分が知られているが<sup>6)</sup>、近年では、これら以外にもグアニル酸類縁体、グルタミン酸のアマドリ化合物、酸性ペプチド類やピログルタミルペプチド類、有機酸グルコシドなど、さまざまなうま味化合物が同定されている<sup>60-66)</sup>。さらに、グルタミン酸とイノシン酸やグアニル酸のような核酸にはうま味の相乗効果があることも知られている<sup>6)</sup>。これに関しても近年、核酸類以外にもグアニル酸誘導体、ベタイン、ピログルタミルペプチド、有機酸アミド、芳香族アミノ酸など、さまざまなうま味増強化合物が報告されている<sup>67-71)</sup>。このように、食品のうま味は、うま味化合物以外にもうま味増強化合物によって形成されている可能性があるため、1.2.3 で述べた従来の TDA 法ではうま味の相乗作用のような成分間の効果を検証することができない。そこで、本研究では、うま味成分と共いうま味増強成分を見出すために、TDA を応用し、識別法を用いた閾値測定ではなく、モデルうま味溶液（MSG 水溶液）へ添加し、評点法を用いたうま味強度測定によって有効成分を評価する手法の有効性を確認した。本手法の開発により、成分間の相互作用に着目した

活性成分の探索手法として、うま味増強成分のような成分間相互作用を有する成分の探索が可能になる。

3.2 では、醤油のうま味に注目した。醤油のうま味は醤油の品質に影響を与える重要な構成要素の1つであるにもかかわらず、うま味寄与成分は十分に明らかにされていない。そこで、3.1 で開発した手法を用いて、濃口醤油のうま味寄与成分を単離し、同定を行った。さらに、それらの化合物の醤油のうま味への寄与度を検証するためにモデル醤油を調製し、官能評価によって醤油のうま味と比較した。醤油のうま味寄与成分を明らかにすることにより、見出された成分を醤油の品質管理の指標とすることが可能となり、さらに多岐に亘る食品にうま味を付与・増強する食品素材の開発が可能になるなど、産業上の有用性も期待できる。

本研究により、大豆食品のおいしさをより深く理解することにより、我々の食生活を豊かにし、さらには産業上にも広く役立つ。

## 第2章 大豆食品の香気寄与成分に関する研究

### 2.1 豆乳

#### 2.1.1 豆乳の香気寄与成分の解明

豆乳は牛乳に似た外観を有しているが、オフフレーバーと認識されるグリーン、ファッティ香気が特徴的であり<sup>18)</sup>、これらの成分の生成機構や品種間の量的な差異、殺菌による変化などさまざまな研究報告が既になされている<sup>25-30)</sup>。一方、これらのオフフレーバー成分を減らすために開発されたりポキシゲナーゼ欠損大豆からは、風味の好ましい豆腐が調製できなかつたとの報告もあり<sup>32,33)</sup>、脂質由来のオフフレーバー成分以外にも豆乳・豆腐の風味に影響を与える成分が存在する可能性が示唆されている。

そこで、良質な豆乳の香味に関与する成分を明らかにするために、主要な豆乳・豆腐用の国産品種であるフクユタカから調製した豆乳の香気寄与成分をAEDAにより明らかにした。

##### 2.1.1.1 実験方法

###### 2.1.1.1.1 実験材料

実験材料として2009年度産のフクユタカ（佐賀産）を使用した。同定に使用した標準化合物のうち、2-acetyl-1-pyrroline、3-methyl-2,4-nonanedione、cis-4,5-epoxy-(E)-2-decenal、trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal はそれぞれ文献に従って合成した<sup>72-74)</sup>。その他の化合物は試薬会社より購入した。

###### 2.1.1.1.2 豆乳香気濃縮物の調製

生呉は、大豆40gを12時間蒸留水に浸漬し、洗浄した後、蒸留水200 mLを加えてミキサーで粉砕することにより得た。豆乳は、生呉に蒸留水200 mLを加

えて3分間煮沸した後、急冷、ろ過、遠心分離(3,000 rpm、10分、5°C)することにより調製した。豆乳香気抽出物は、豆乳を吸着樹脂 (SP700 (三菱化学社製)) 5 mLに通液し、次いで蒸留水合わせて50 mL (20 mL x 2、10 mL x 1) で洗浄し、ジクロロメタン 20 mL で脱着させた後、ジクロロメタン層に無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥し、SAFE ( $<5.0 \times 10^{-3}$  Pa、40°C) を用いて蒸留することによって調製した。豆乳香気濃縮物は、豆乳香気抽出物をロータリーエバポレーション(550 mmHg、35°C)し、窒素気流下で約 100 $\mu$ L まで濃縮することにより調製した。

#### 2.1.1.1.3 GC-O

GC-O 分析には熱伝導度検出器 (Thermal Conductivity Detector (TCD)) を装備した Agilent 社製 6850 シリーズガスクロマトグラフを使用した。分離カラムは J & W Scientific 社製 DB-WAX カラム(30 m x 0.25 mm i.d.、膜厚 0.25  $\mu$ m) 又は DB-1 カラム(30 m x 0.25 mm i.d.、膜厚 0.25  $\mu$ m)を用い、1  $\mu$ L をスプリットレスで注入した。キャリアーガスにはヘリウム 1 mL/min を用いた。注入口の温度は 250°C、パージタイムは 60 秒に設定した。クロマトグラフィーのカラム温度は 40°C から始め、210°C まで 5°C/min で昇温した。検出器の温度は 230°C に設定した。ガラス製の匂い嗅ぎポートを TCD の出口に繋げ、リボンヒーターで 210°C 以上に温めた。匂い嗅ぎポートから出る匂い成分をすばやく除くために、100 mL/min の水蒸気を含む空気を匂い嗅ぎポートに流した。3 人の被験者によりそれぞれ 3 回ずつ香気濃縮物の GC-O 測定を行った。各香気ピークの検出は、各被験者によるそれぞれ少なくとも 2 回の検出と定義した。

#### 2.1.1.1.4 AEDA

2.1.1.1.2 で調製した各香気濃縮物をジクロロメタンで 1:4~1:4096 まで順次希釈し、AEDA の分析に用いた。希釈度の低い試料から順次 2.1.1.1.3 に記載した方法で、3 名の被験者によりそれぞれ 3 回ずつ GC-O を行った。各香気成分

の検出は、各被験者がそれぞれ 2 回以上感知できた場合を「香気成分が検知できた」と定義し、最大希釈度を **FD-factor** とした。

#### 2.1.1.1.5 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

GC-MS 分析には Agilent 5975C inert XL シリーズ MS 検出器を装備した Agilent 社製 7890A ガスクロマトグラフを使用した。分離カラムは、J & W Scientific 社製 DB-WAX カラム(60 m x 0.25 mm i.d.、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ )又は DB-1 カラム(60 m x 0.25 mm i.d.、膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ )を用い、1  $\mu\text{L}$  をスプリットレスで注入した。ヘリウム 1 mL/min をキャリアーガスに用い、注入口の温度は 250°C に設定した。香気濃縮物 1  $\mu\text{L}$  をスプリット比 1:30 又はスプリットレスで注入した。スプリット注入の場合は、カラム温度 80°C から 210°C まで 3°C/min で昇温し、スプリットレス注入では 40°C から 210°C まで 3°C/min で昇温した。MS 検出器のイオン化電圧は 70 eV、イオン源温度は 150°C に設定した。

#### 2.1.1.1.6 成分の同定

各香気濃縮物中の香気寄与成分の同定は、GC-MS による標準物質の Retention Index (RI) と MS の一致、及び GC-O による標準物質の RI と匂いの特徴の一致により行った。

#### 2.1.1.2 結果と考察

##### 2.1.1.2.1 フクユタカから調製した豆乳香気濃縮物の AEDA による香気寄与成分の解明

豆乳の香気寄与成分を明らかにするために、フクユタカから調製した香気濃縮物の AEDA を行い、FD-factor が 16 以上の成分を 36 種検出した (Table 2-1)。

Table 2-1 Key aroma compounds in soymilk made from Fukuyutaka

no.	RI		odor qualities	compound	FD-factor	ref <sup>*1</sup>
	DB-WAX	DB-1				
1	990		fruity	unknown	16	
2	1052		leafy, green	hexanal	1024	25
3	1113		green, sweet	unknown	16	
4	1137		green	( <i>Z</i> )-3-hexenal	16	
5	1297		mushroom-like	1-octen-3-one	64	31
6	1336		popcorn-like	2-acetyl-1-pyrroline	64	27
7	1352		green	hexanol	16	25
8	1431	1075	pea-like, earthy	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>*2</sup>	64	
9	1446		mushroom-like	1-octen-3-ol	64	26
10	1449		cooked potato-like	methional	256	27
11	1464		nutty	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	16	
12	1502		green, fatty	( <i>E,E</i> )-2,4-heptadienal	16	27
13	1532		sweet, fruity	( <i>E</i> )-2-nonenal	1024	25
14	1584		cucumber-like	( <i>E,Z</i> )-2,6-nonadienal	16	27
15	1652		green	unknown	64	
16	1668		sour	3-methylbutanoic acid	16	75
17	1698		fatty	( <i>E,E</i> )-2,4-nonadienal	1024	25
18	1723		green	3-methylnonane-2,4-dione	16	
19	1757		meaty	2-acetyl-2-thiazoline	16	27
20	1763		green, fatty	( <i>E,Z</i> )-2,4-decadienal	256	25
21	1807		fatty	( <i>E,E</i> )-2,4-decadienal	4096	25
22	1844		sour	hexanoic acid	16	25
23	1857		burnt	2-methoxyphenol	16	27
24	1964		caramel-like	maltol	256	27
25	1986		metallic	<i>cis</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	64	
26	2000		metallic	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	4096	
27	2024		cherry-like	unknown	16	
28	2029		fatty, milky	4-nonanolide	64	25
29	2029		caramel-like	HDMF	64	75
30	2043		sour, powdery	octanoic acid	16	27
31	2075		sweet, fatty	unknown	64	
32	2162		spicy	4-allyl-2-methoxyphenol	16	75
33	2191		spicy	2-methoxy-4-vinylphenol	256	27
34	2191		caramel-like, seasoning-like	sotolon	256	
35	2218		grape-like	2'-aminoacetophenone	64	
36	2565		vanilla-like	vanillin	16	75

<sup>\*1</sup> Previous reports identified as volatile components in soymilk.

<sup>\*2</sup> The compound was tentatively identified by GC-O analysis using DB-WAX and DB-1 columns by comparison to the authentic compound, but no unequivocal mass spectrum was available by GC-MS.

このうち 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)、*cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (25)、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (26)、sotolon (34)、2'-aminoacetophenone (35) は、豆乳から新規に同定又は推定された成分である (Figure 2-1)。

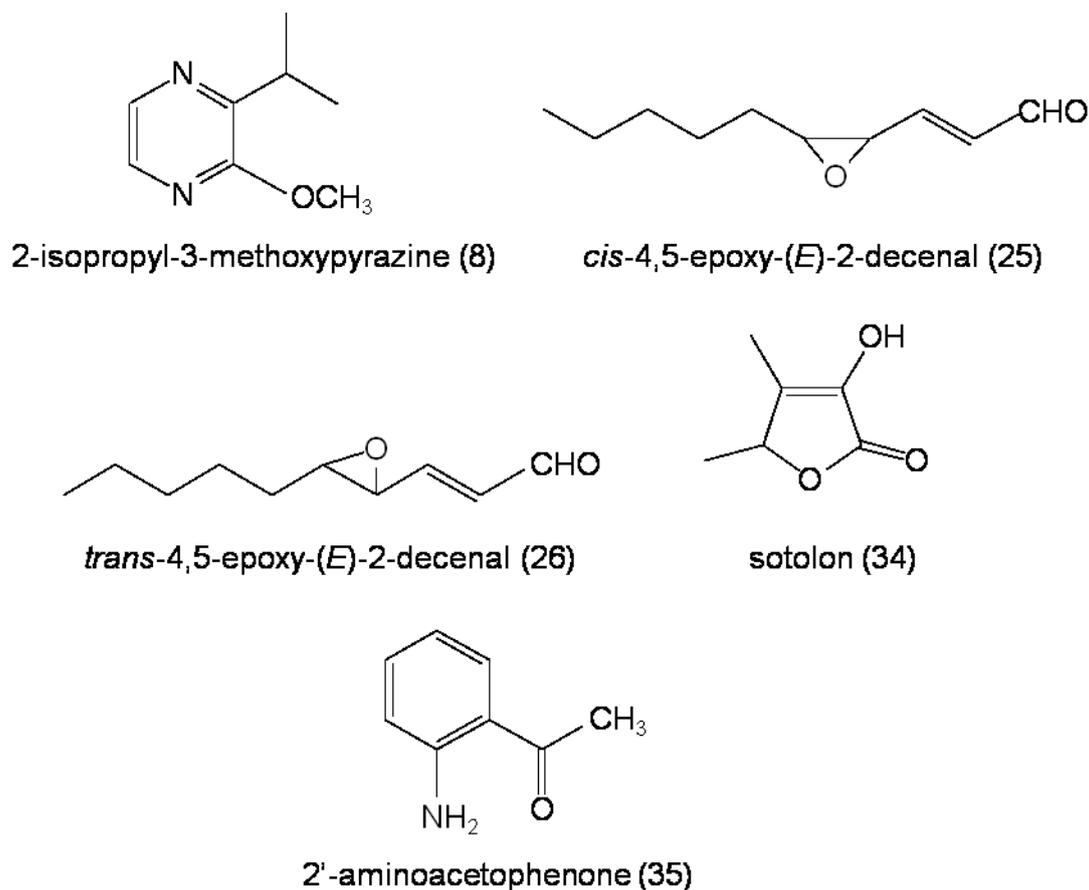


Figure 2-1 Key aroma compounds newly identified or tentatively-identified from soymilk

また、FD-factor 4096 で最も高い寄与度を示した成分は、fatty な香調の (*E,E*)-2,4-decadienal (21) 及び metallic な香調を有する *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (26)であった。次いで FD-factor 1024 で検出された成分は、hexanal (2) (green)、(*E*)-2-nonenal (13) (fatty)、(*E,E*)-2,4-nonadienal (17) (fatty)であった。さらに、FD-factor が 64 以上の成分では、豆乳の特徴香とされている green、fatty、sweet な香調を有する成分の他に、methional (10) (cooked potato-like)、2-methoxy-4-vinylphenol (33) (spicy)、sotolon (34)

(caramel-like, seasoning-like)、1-octen-3-one (5) (mushroom-like)、1-octen-3-ol (9) (mushroom-like) 、 2-acetyl-1-pyrroline (6) (popcorn-like) 、 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8) (pea-like, earthy)、2'-aminoacetophenone (grape-like) (35)などが検出された。多くの過去の報告では、豆乳香気は green、fatty な香調に着目されてきたが、フクユタカから調製した豆乳の香気は green、fatty 以外にもさまざまな香調の成分から成り立っていることが明らかになった。

## 2.1.2 生大豆から豆乳を調製する際に変化する豆乳香気寄与成分の解明と生成機構の推定

2.1.1 で明らかとなったフクユタカから調製した豆乳の香気寄与成分には、新規な成分も含まれ、それらの成分がどのように生成しているのかは不明である。豆乳調製過程におけるこれらの香気寄与成分の生成要因を明らかにすることは、好ましい豆乳の風味について理解を深めるために重要である。

そこで、フクユタカから調製した生大豆及び加熱前の豆乳（生呉）の AEDA を行い、豆乳の AEDA と比較し、豆乳香気寄与成分の生成機構の推定を行った。

### 2.1.2.1 実験方法

#### 2.1.2.1.1 実験材料

実験材料は 2.1.1.1.1 と同様の方法で入手した。

#### 2.1.2.1.2 生大豆、生呉、及び豆乳からの香気濃縮物調製

生呉香気濃縮物は、生呉を 2.1.1.1.2 と同様の方法で濃縮することにより得た。生大豆香気濃縮物は、大豆 40 g を用い、ジクロロメタン 400 mL で 4 時間 Soxhlet 抽出を行い、得られた抽出物を SAFE ( $<5.0 \times 10^{-3}$  Pa、40°C) にて蒸留し、さらにロータリーエバポレーション(550 mmHg、35°C)し、窒素気流により約 100  $\mu$ L まで濃縮することにより得た。

### 2.1.2.1.3 GC-O、AEDA、GC-MS

GC-O、AEDA、GC-MS は 2.1.1.1.3、2.1.1.1.4、2.1.1.1.5 と同様の方法で行った。

### 2.1.2.1.4 成分の同定

成分の同定は、2.1.1.1.6 と同様の方法で行った。

### 2.1.2.2 結果と考察

#### 2.1.2.2.2 生大豆、生呉、及び豆乳香気濃縮物の AEDA 比較

2.1.1.2.1 にてフクユタカから調製した豆乳の香気成分の生成機構を推定するために、FD-factor 64 以上を示した香気寄与成分について、生大豆、生呉及び豆乳から香気濃縮物を調製し、AEDA で比較した (Table 2-2)。

生大豆から生呉を調製した際に FD-factor において大きな変化が認められた成分は、hexanal (2)、1-octen-3-ol (9)、methional (10)、(E)-2-nonenal (13)、(E,E)-2,4-nonadienal (17)、(E,Z)-2,4-decadienal (20)、(E,E)-2,4-decadienal (21) であった。

また、生呉から豆乳を調製した際に FD-factor が大きく増加した成分は、2-acetyl-1-pyrroline (6)、methional (10)、maltol (24)、HDMF (29)、2-methoxy-4-vinylphenol (33) であった。

一方、1-octen-3-one (5) は生呉から豆乳を調製した際に大きく減少した。

Table 2-2 Changes of the key aroma compounds of the soymilk made from Fukuyutaka during the manufacturing process

no.	RI <sup>*1</sup>	compound	FD-factor		
			raw soy bean	soymilk before heating	soymilk
2	1052	hexanal	4	1024	1024
5	1297	1-octen-3-one	256	1024	64
6	1336	2-acetyl-1-pyrroline	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	64
8	1431	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>*2</sup>	64	64	64
9	1446	1-octen-3-ol	nd <sup>*3</sup>	16	64
10	1449	methional	nd <sup>*3</sup>	4	256
13	1532	( <i>E</i> )-2-nonenal	64	1024	1024
17	1698	( <i>E,E</i> )-2,4-nonadienal	64	1024	1024
20	1763	( <i>E,Z</i> )-2,4-decadienal	4	64	64
21	1807	( <i>E,E</i> )-2,4-decadienal	64	1024	4096
24	1964	maltol	16	16	256
25	1986	<i>cis</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	4	16	64
26	2000	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	256	1024	4096
28	2029	4-nonanolide	64	64	64
29	2029	HDMF	4	4	64
33	2192	2-methoxy-4-vinylphenol	4	4	256
34	2191	sotolon	1024	256	256
35	2218	2'-aminoacetophenone	64	64	64

<sup>\*1</sup> RI; Retention index on DB-WAX column.

<sup>\*2</sup> The compound was tentatively identified by GC-O analysis using DB-WAX and DB-1 columns by comparison to the authentic compound, but no unequivocal mass spectrum was available by GC-MS.

<sup>\*3</sup> nd, not detected.

### 2.1.2.2.3 豆乳香気寄与成分の生成機構の推定

2.1.2.2.2 で明らかになった生大豆から豆乳を調製した際に変化のあった成分の生成機構を推定した。hexanal (2)、1-octen-3-ol (9)、(*E*)-2-nonenal (13)、(*E,E*)-2,4-nonadienal (17)、(*E,Z*)-2,4-decadienal (20)、(*E,E*)-2,4-decadienal (21) は過去の知見を踏まえると<sup>76-78)</sup>、脂質（リノール酸及びリノレン酸）由来の反応生成物であると考えられる（Figure 2-2、Figure 2-3）。また、*cis*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (25)及び*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (26)は、リノール酸の自動酸化生成物と考えられ（Figure 2-2）<sup>79)</sup>、生大豆から豆乳を調製

する過程で徐々に増加する傾向が認められたが、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (26)は、生大豆でも高い寄与度を示していたことから、生大豆の浸漬や生呉の加熱以外に、収穫後の乾燥工程中にも生成している可能性が高い。

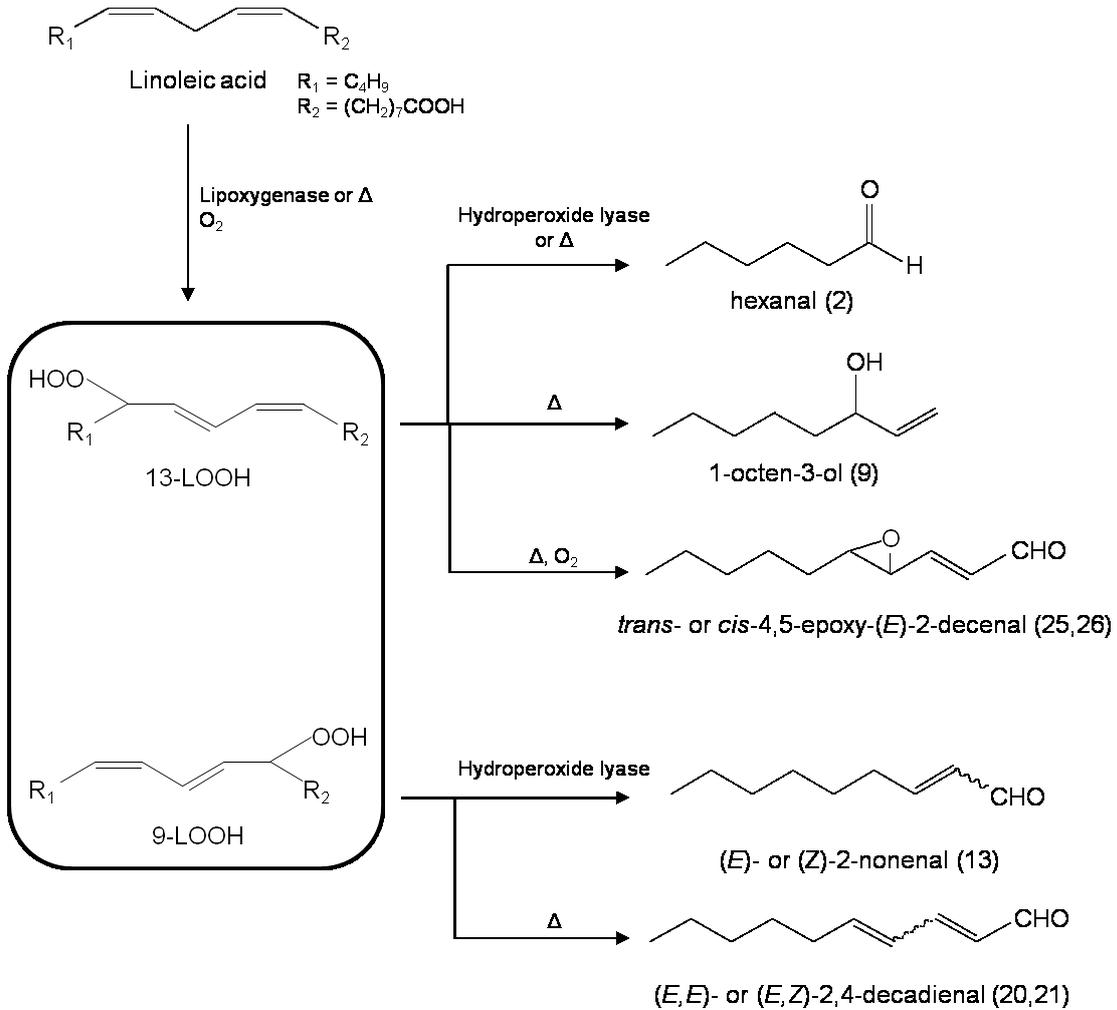


Figure 2-2 Proposed formation mechanisms of the key aroma compounds from linoleic acid<sup>76-79)</sup>

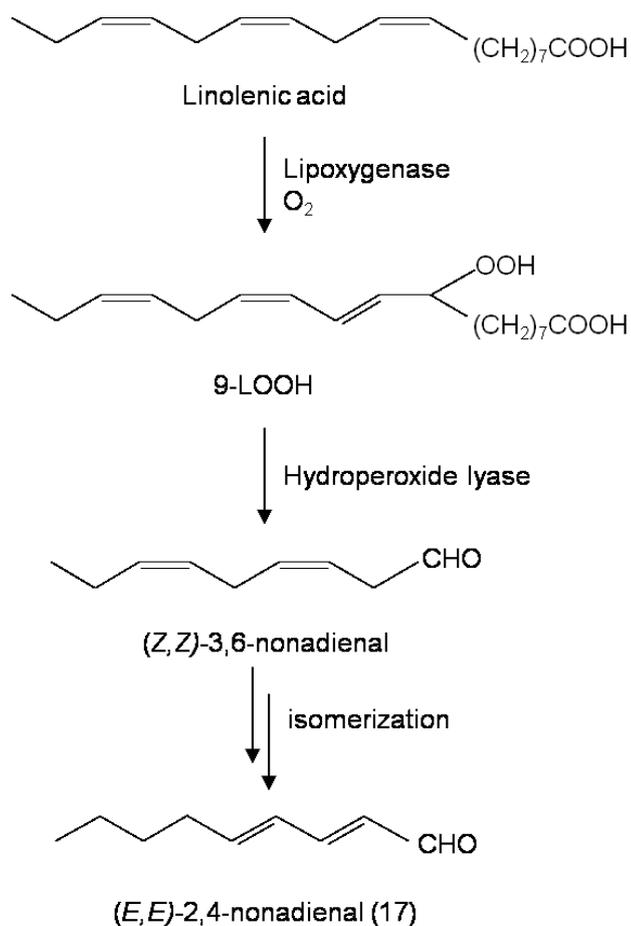


Figure 2-3 Proposed formation mechanism of (E,E)-2,4-nonadienal from linolenic acid<sup>78)</sup>

2-acetyl-1-pyrroline (6)は、生臭から豆乳調製時に顕著に増加したことから、過去の知見を考慮すると、浸漬によって増加した大豆中の遊離の L-proline<sup>80)</sup>から Maillard 反応により生成したと考えられる (Figure 2-4)<sup>81)</sup>。

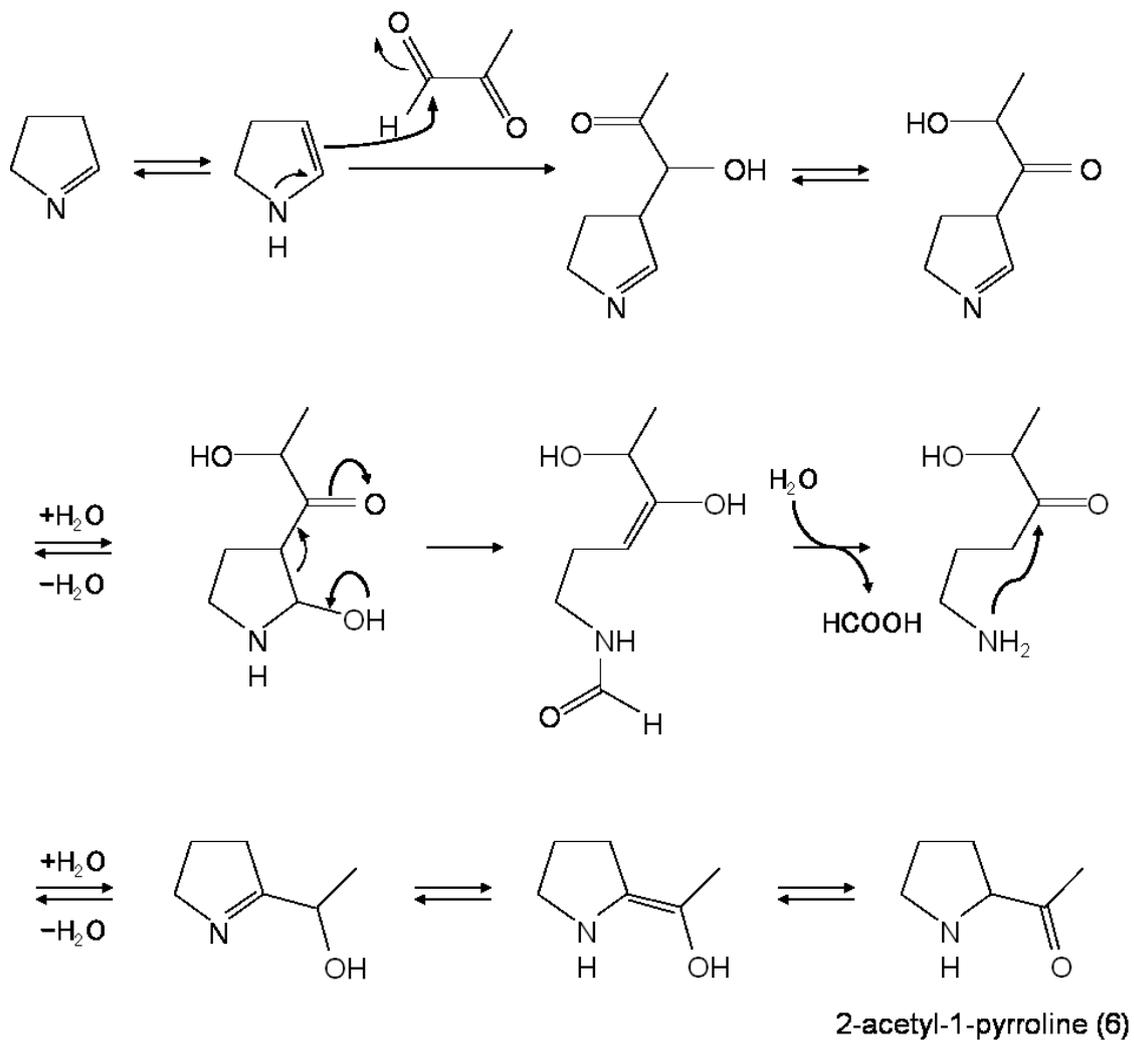


Figure 2-4 Proposed formation mechanism of 2-acetyl-1-pyrroline by Maillard reaction<sup>81)</sup>

また、同様に methional (10)は、生臭加熱時の Maillard 反応及び引き続いて起こる Strecker 分解により、浸漬によって増加した大豆中の遊離の L-methionine<sup>80)</sup> から生成したと考えられる (Figure 2-5)<sup>82)</sup>。

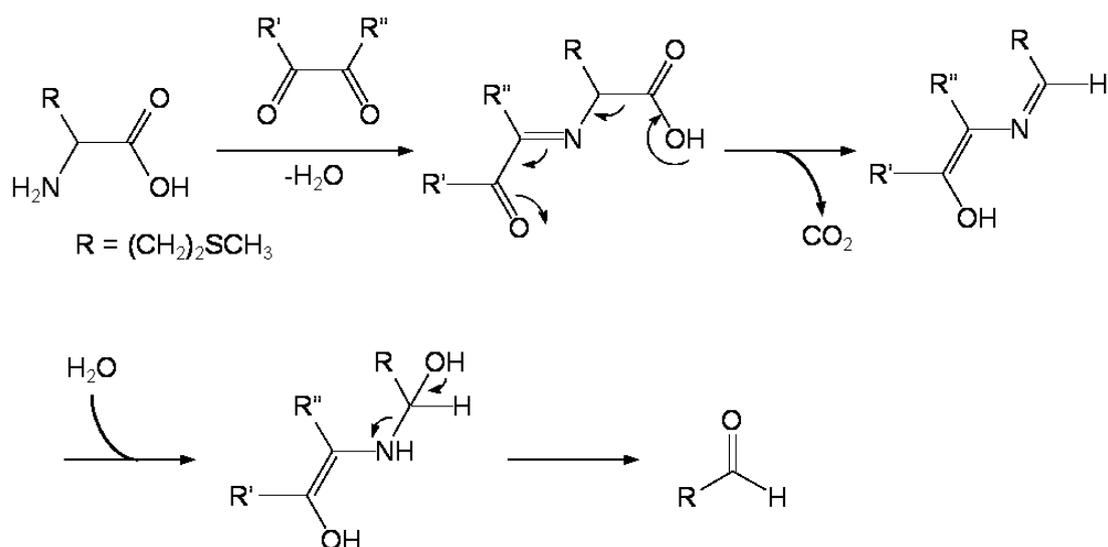


Figure 2-5 Proposed formation mechanism of methional by Maillard reaction<sup>82)</sup>

Maltol (24)は、大豆中にサポニン誘導体として存在することが報告されており<sup>83)</sup>、生乳から豆乳を調製する際の加熱により、生成したと考えられる。(Figure 2-6)。

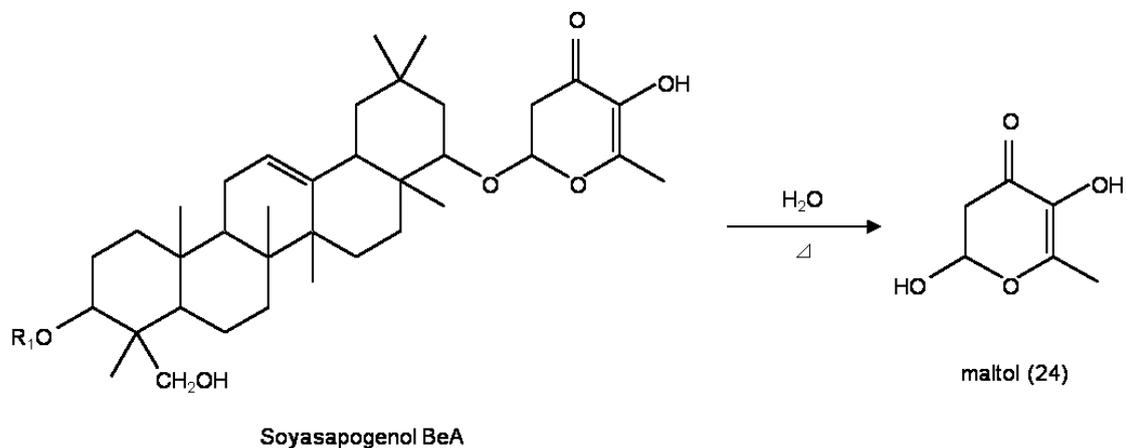


Figure 2-6 Proposed formation mechanism of maltol from saponin derivative

さらに、HDMF (29)も 2-acetyl-1-pyrroline (6)、methional (10)と同様に、Maillard 反応による加熱反応生成物であると考えられる (Figure 2-7)<sup>84,85)</sup>。

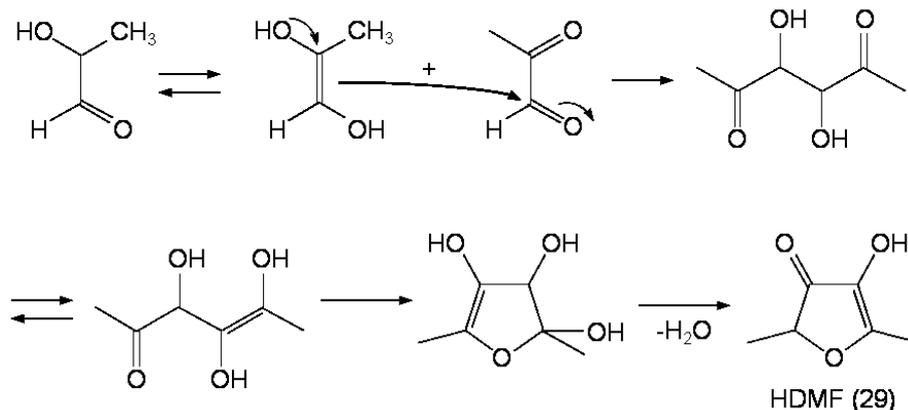


Figure 2-7 Proposed formation mechanism of HDMF by Maillard reaction<sup>84)</sup>

2-methoxy-4-vinylphenol (33)は、2.2.2 で詳しく考察するが、大豆中に存在する ferulic acid などからの脱炭酸生成物であると考えられる<sup>86)</sup>。

生大豆、生呉で高い FD-factor を示した 1-octen-3-one (5)は、脂質の酸化によって生成することが報告されており<sup>87)</sup>、また、生大豆中から高い FD-factor で検出されたことから、大豆収穫後の乾燥時に生成している可能性が高い。また、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和ケトンであることから、加熱によって分解しやすいため、生呉に比べて豆乳の FD-factor が顕著に低かったと考えられる。

Table 2-2 で示されている他の豆乳香気寄与成分はいずれも生大豆から豆乳調製までの過程で顕著な差が認められなかった。それらの中で、いずれの試料からも高い FD-factor で検出された sotolon (34)は、さまざまな生成経路が示唆されており、L-threonine からの生成 (Figure 2-8) や<sup>88,89)</sup>、pyruvic acid と  $\alpha$ -ketoglutaric acid の縮合反応による生成などが報告されている (Figure 2-9)<sup>90)</sup>。豆乳においては、いずれの反応生成経路も考えられる。

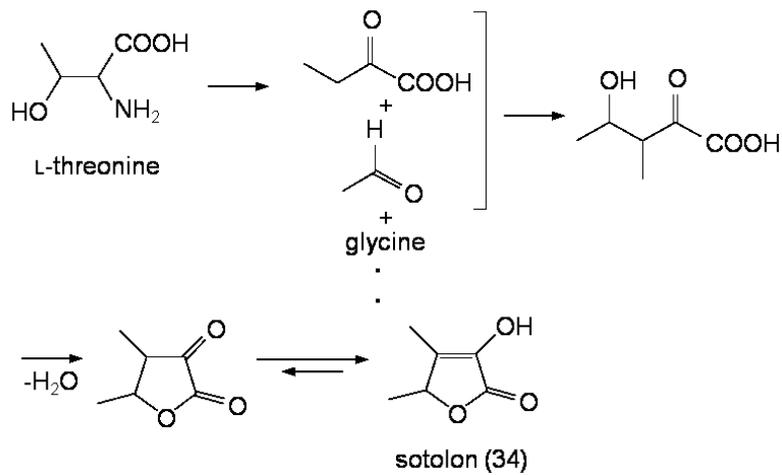


Figure 2-8 Proposed formation mechanism of sotolon from L-threonine<sup>88,89)</sup>

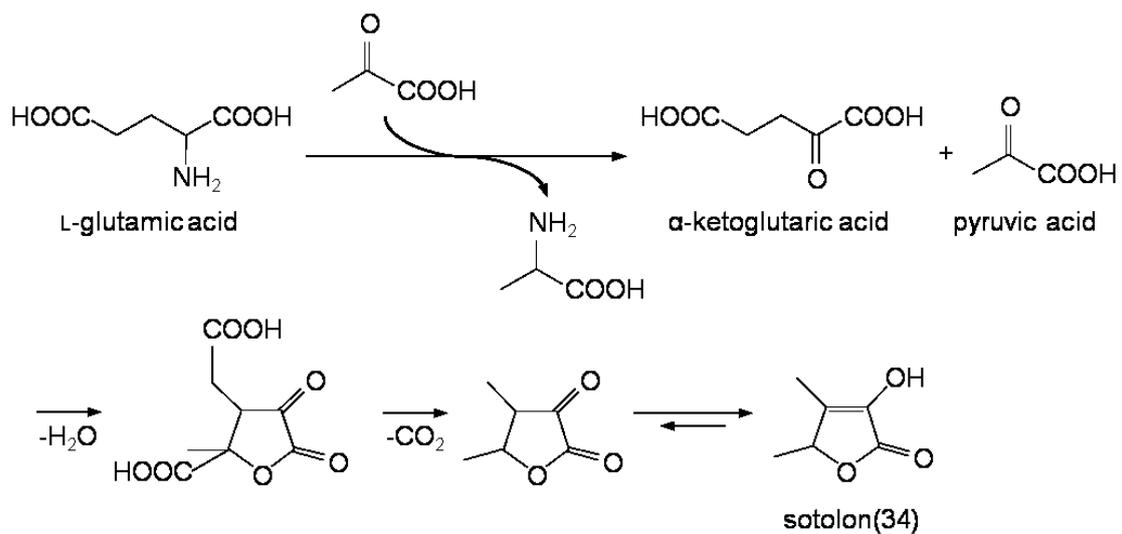


Figure 2-9 Proposed formation mechanism of sotolon from  $\alpha$ -ketoglutaric acid and pyruvic acid<sup>90)</sup>

また同様に、2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)は、ワイン用ブドウにおいて、生合成経路にて L-valine より生成するとの報告があり (Figure 2-10)<sup>91)</sup>、大豆中においても 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)は生大豆中において生合成経路で生成している可能性が高い。

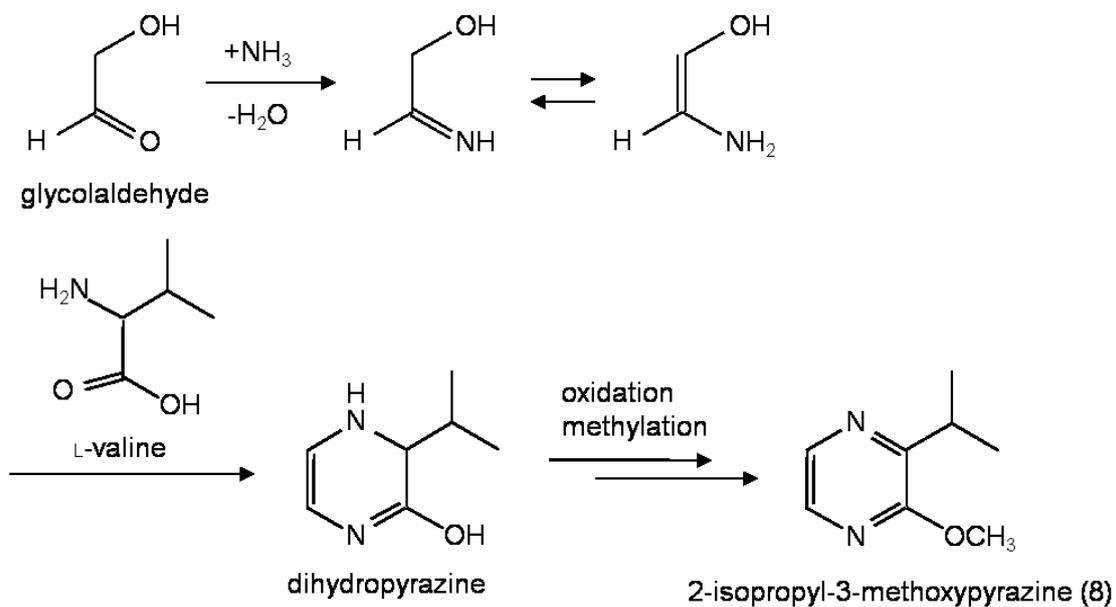


Figure 2-10 Proposed mechanism of 2-isopropyl-3-methoxypyrazine through biosynthetic pathway<sup>91)</sup>

4-nonanolide (28)は linoleic acid より生成すると考えられるが、生大豆、生呉、豆乳いずれの試料からも同等の FD-factor で検出されたことから、生大豆から豆乳を調製する過程では生成せず、乾燥中又は生合成によって生大豆中で生成している可能性が考えられる (Figure 2-11)。

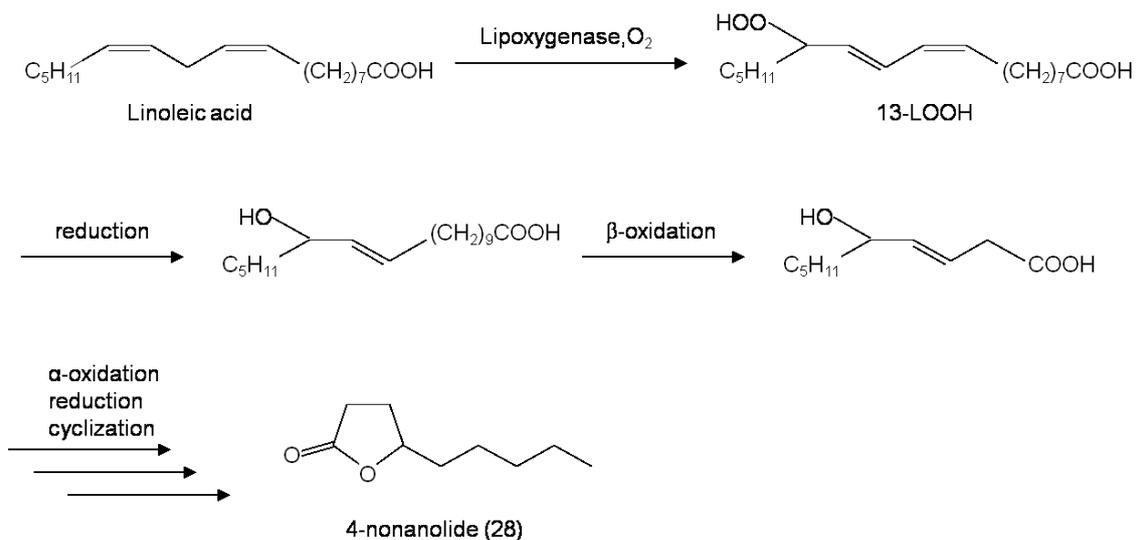


Figure 2-11 Proposed formation mechanism of 4-nonanolide through biosynthetic pathway

2'-aminoacetophenone (35)は、L-tryptophan から熱分解反応により生成することが知られているが (Figure 2-12)<sup>92)</sup>、生大豆中からも検出されており、その後の加工によって FD-factor に変化が認められなかったことから、生大豆乾燥時の加熱によって生成した可能性が考えられる。

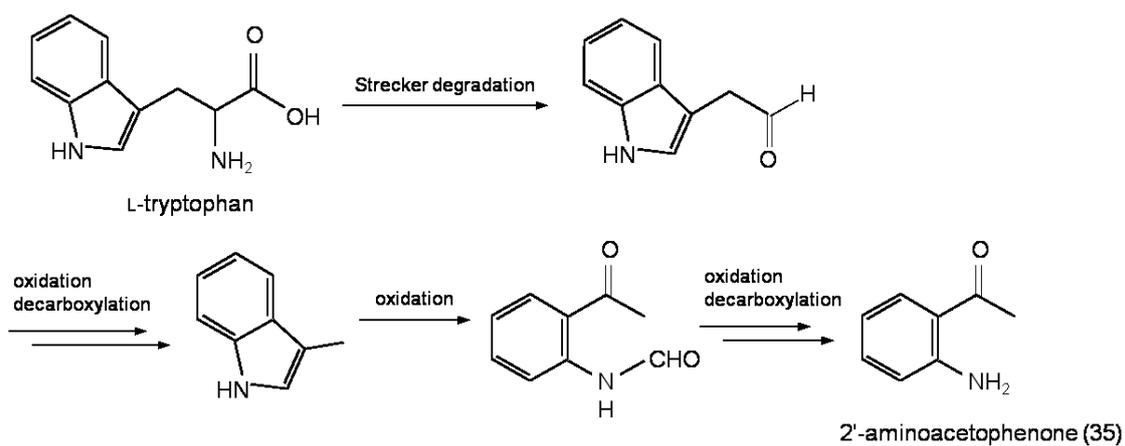


Figure 2-12 Proposed formation mechanism of 2'-aminoacetophenone by the heat treatment<sup>92)</sup>

### 2.1.3 3品種の大豆から調製した豆乳の香気寄与成分の比較

1.3.1 で述べたように、日本では食品用途で消費される大豆の割合が高く、中でも豆乳・豆腐用の用途が最も多い。日本国内で販売されている豆乳は主に輸入大豆から製造されているが、一部ではフクユタカのような国産品種から製造した豆乳も販売されている。また、大豆品種のほとんどは、生産性向上や製品加工適性の改善を目的に育種されているため、これらの品種から調製された豆乳がどのような香味特性を有しているかについては、不明である。

そこで、2.1.1 で検討したフクユタカに加えて、主に煮豆用に用いられる主要国産大豆品種の1つであるミヤギシロメ、日本国内で最も利用されている豆腐・豆乳用の輸入大豆品種の1つである VINTON81 から作成した豆乳の AEDA 及び官能評価の比較を行った。

#### 2.1.3.1 実験方法

##### 2.1.3.1.1 実験材料

実験材料として 2009 年度産の国産大豆（フクユタカ（佐賀産）、ミヤギシロメ（宮城産））、外国産大豆（VINTON 81（アメリカ産））を使用した。同定に使用した標準化合物は、2.1.1.1.1 と同様の方法で入手した。

##### 2.1.3.1.2 各豆乳香気濃縮物の調製

各豆乳香気濃縮物は 2.1.1.1.2 と同様の方法で得た。

##### 2.1.3.1.3 GC-O、AEDA、GC-MS

GC-O、AEDA、GC-MS は 2.1.1.1.3、2.1.1.1.4、2.1.1.1.5 と同様の方法で行った。

#### 2.1.3.1.4 成分の同定

成分の同定は 2.1.1.1.6 と同様の方法で行った。

#### 2.1.3.1.5 官能評価

官能評価者は 6 カ月の官能評価訓練（300 以上の香気成分の認識・官能表現の記憶）を受けた小川香料（株）の 17 名の社員を選抜した。官能評価試験は、25°C に調節された専用官能評価ブースにて、プラスチックカップに入れた 2.1.3.1.2 に記載の方法で調整した豆乳 20 mL のヘッドスペース香気の評価を行った。評価は 1（弱い）～7（強い）の尺度で行った。官能評価ワードは以下の化合物の香調として定義した。pea-like/earthy (2-isopropyl-3-methoxypyrazine)、metallic (*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal)、caramel-like/seasoning-like (sotolon)、green (hexanal)、fatty ((*E,E*)-2,4-decadienal)、cooked potato-like (methional)。官能評価結果は繰り返しのない二元配置分散分析を用いて統計処理を行った。

#### 2.1.3.2 結果と考察

##### 2.1.3.2.1 3 品種の大豆から調製した豆乳の AEDA 比較

豆乳の香気寄与成分の大豆品種による差異を明らかにするために、フクユタカ、ミヤギシロメ、及び VINTON 81 の 3 品種からそれぞれ調製した豆乳香気濃縮物の AEDA を比較した（Table 2-3）。

Table 2-3 Key aroma compounds in the soymilks made from three different cultivars

no.	RI		odor qualities	compound	FD-factor		
	DB-WAX	DB-1			Fuku yutaka	Miyagi shirome	VINTON 81
2	1052		leafy, green	hexanal	1024	64	256
5	1297		mushroom-like	1-octen-3-one	64	64	16
6	1336		popcorn-like	2-acetyl-1-pyrroline	64	16	16
8	1431	1075	pea-like, eathy	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>*1</sup>	64	nd <sup>*2</sup>	16
9	1446		mushroom-like	1-octen-3-ol	64	16	64
10	1449		cooked potato-like	methional	256	256	1024
13	1532		sweet, fruity	( <i>E</i> )-2-nonenal	1024	64	256
15	1652		green	unknown	64	16	16
17	1698		fatty	( <i>E,E</i> )-2,4-nonadienal	1024	4096	4096
18	1723		green	3-methylnonane-2,4-dione	16	64	64
20	1763		green, fatty	( <i>E,Z</i> )-2,4-decadienal	256	256	16
21	1807		fatty	( <i>E,E</i> )-2,4-decadienal	4096	4096	4096
24	1964		caramel-like	maltol	256	16	16
25	1986		metallic	<i>cis</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	64	16	64
26	2000		metallic	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	4096	256	1024
28	2029		fatty, milky	4-nonanolide	64	16	256
29	2029		caramel-like	HDMF	64	16	256
31	2075		sweet, fatty	unknown	64	64	64
33	2191		spicy	2-methoxy-4-vinylphenol	256	256	1024
34	2191		caramel-like, seasoning-like	sotolon	256	256	1024
35	2218		grape-like	2'-aminoacetophenone	64	64	16
36	2565		vanilla-like	vanillin	16	16	64

<sup>\*1</sup> The compound was tentatively identified by GC-O analysis using DB-WAX and DB-1 columns by comparison to the authentic compound, but no unequivocal mass spectrum was available by GC-MS.

<sup>\*2</sup> nd, not detected.

FD-factor  $\geq 64$  の高い寄与度を示した香気成分は3品種間でほとんど共通していたが、ミヤギシロメでの hexanal (2)、(*E*)-2-nonenal (13)、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (26)のFD-factorは64~256であり、フクユタカの1024~4096に比べて低かった (Table 2-3)。ミヤギシロメは、他の国産大豆品種に比べて、水浸漬時の hexanal 生成量が少ないことが報告されており<sup>93)</sup>、本研究の AEDA でも同様の傾向が認められたと考えられる。

一方、2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)の FD-factor は、フクユタカでは 64、VINTON81 では 16 で、ミヤギシロメからは検出されず、3 品種において最も顕著な差が認められた。2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)は、主に豆乳・豆腐に用いられるフクユタカ及び VINTON81 においてのみ検出されたことから、豆乳香気の特徴成分の 1 つであることが推察された。アルキルメトキシピラジン類の含有量の変動は、ワイン用ブドウ品種で詳細に報告されており<sup>94)</sup>、品種・産地・天候などさまざまな要因によって左右されることが明らかとなっており、大豆においても同様の要因が考えられる。

### 2.1.3.2.2 3 品種の大豆から調製した豆乳の官能評価

3 品種の大豆から調製した豆乳の香気特徴の差異を明らかにするために、Table 2-3 でいずれかの試料で FD-factor が 64 以上を示した成分の香調を評価ワードとして選択し、官能評価を行った(Table 2-4)。

Table 2-4 Sensory evaluation of the soymilks made from three different cultivars

cultivar	sensory score (SD) <sup>*1</sup>					
	pea-like earthy	metallic	caramel-like	green	fatty	cooked potato-like
Fukuyutaka	4.9 <sup>a</sup> (± 1.2)	4.0 (± 1.8)	4.3 (± 1.3)	4.2 (± 1.2)	5.0 (± 1.0)	4.2 <sup>cd</sup> (± 1.1)
Miyagishirome	3.9 <sup>b</sup> (± 1.1)	3.6 (± 1.3)	4.0 (± 0.9)	4.1 (± 1.0)	4.4 (± 1.0)	3.9 <sup>c</sup> (± 1.2)
VINTON 81	5.4 <sup>a</sup> (± 1.2)	3.8 (± 1.4)	4.9 (± 1.4)	3.9 (± 1.2)	5.4 (± 0.5)	4.9 <sup>d</sup> (± 0.6)

\*1 Different letters showed significant differences within the column ( $p < 0.05$ ).

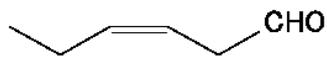
フクユタカと VINTON 81 はいずれの評価ワードにおいても有意差は認めらず、いずれの試料も fatty、pea-like/earthy の評価点が高かった。また、VINTON 81 では fatty、pea-like/earthy に加えて、caramel-like、cooked potato-like の評価点も高かった。さらに、これらとミヤギシロメの間には pea-like/earthy 香気に有意な差が認められた。また、官能評価パネルの嗜好性を自由記述で回答させたところ、フクユタカの嗜好性が最も高く、好ましい風味の豆乳であると評価された。一方、ミヤギシロメは香りが弱く、ボリュームに欠けるため、嗜好性が低かった。VINTON 81 は脂っぽい、沈んだ、重たいなどの評価が多く、Table 2-4

では全体的に評価点が高かったが、その嗜好性はフクユタカに劣っていた。このことから、豆乳の香りは、香気寄与成分の香調が強いほど好ましいとはいえ、それらの香気寄与度のバランスも重要であることが判明した。

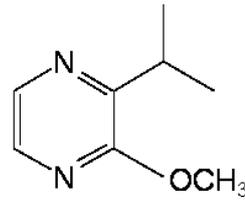
さらに、官能評価結果と FD-factor の結果から、**pea-like/earthy** な香調の **2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)** は、フクユタカ及び VINTON 81 から調製された豆乳の香気にとって、最も重要な香気成分の 1 つであると考えられた。**2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)** は、食品としては、ピーマン、ワイン用のブドウ、にんじん、コーヒーの生豆で同定されている。その **pea-like/earthy** と表現される香調は、微量に存在すれば全体の風味により影響を与えるが、存在量が多いとその **earthy** な香調が沈んだ重たい印象を与え、ネガティブな香調として認識される成分である<sup>94)</sup>。豆乳香気においても、**pea-like/earthy** の官能評価点が高かった VINTON 81 の風味はフクユタカよりも劣っていたことから、**2-isopropyl-3-methoxypyrazine (8)** は、豆乳香気にとって重要な役割を果たしている香気成分の 1 つであるが、その風味向上には適切な量が必要であることが推察された。

#### 2.1.4 結論

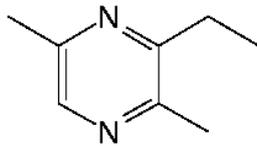
近年新たな香気寄与成分探索手法として広く適用されるようになってきた AEDA を用いて日本の代表的な豆乳・豆腐用大豆品種であるフクユタカから調製した豆乳の香気寄与成分を探索し、新規な成分を含む多数の香気寄与成分を明らかにすることができた (Figure 2-13、Figure 2-14)。



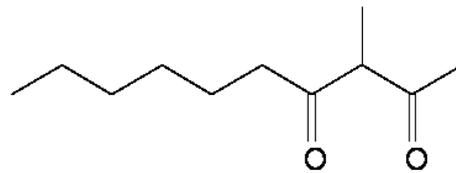
(Z)-3-hexenal



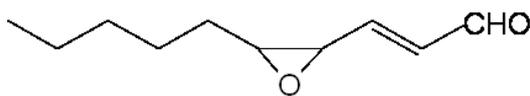
2-isopropyl-3-methoxypyrazine



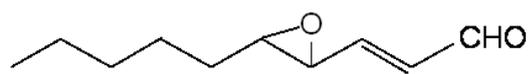
2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine



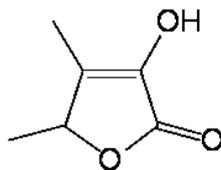
3-methyl-2,4-nonanedione



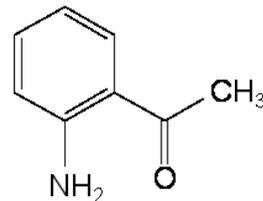
cis-4,5-epoxy-(E)-2-decenal



trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal



sotolon



2'-aminoacetophenone

Figure 2-13 Key aroma compounds newly identified or tentatively identified in soymilk

特に、FD-factor の高かった香気寄与成分には、豆乳香気として一般的な green、fatty な香調の成分に加えて、さまざまな香気特徴の成分が含まれていることが明らかとなった (Figure 2-14)。

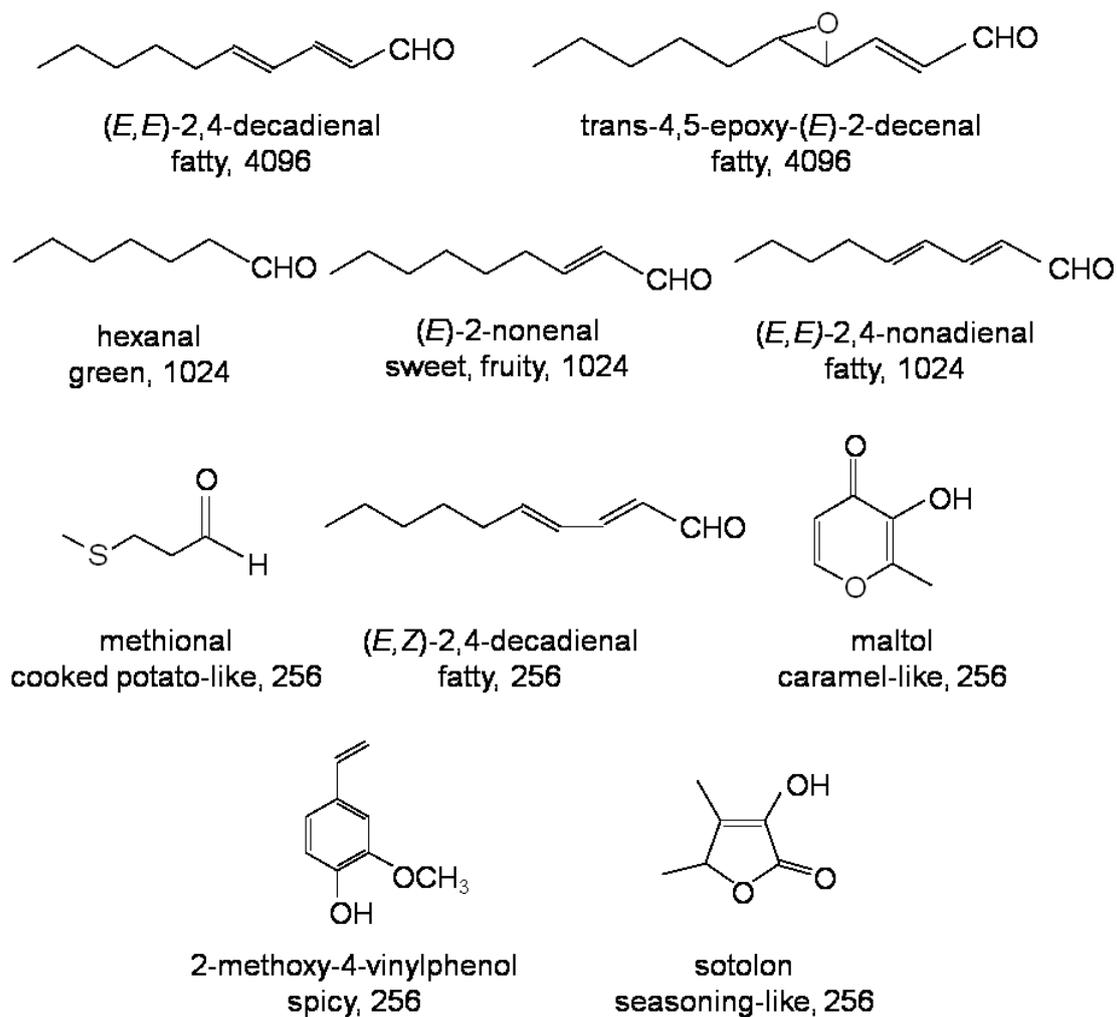


Figure 2-14 Key aroma compounds as having high FD-factors in soymilk

さらに、これらの成分の生成機構を考察することにより、豆乳調製中の香気寄与成分の生成要因を推定することができた (Figure 2-15)。多くの香気寄与成分は豆乳調製過程において、熱又は酵素反応によって生成していると考えられたが、2-isopropyl-3-methoxypyrazine は生大豆中からも検出され、大豆自身が生合成によって作り出している成分であると考えられた。

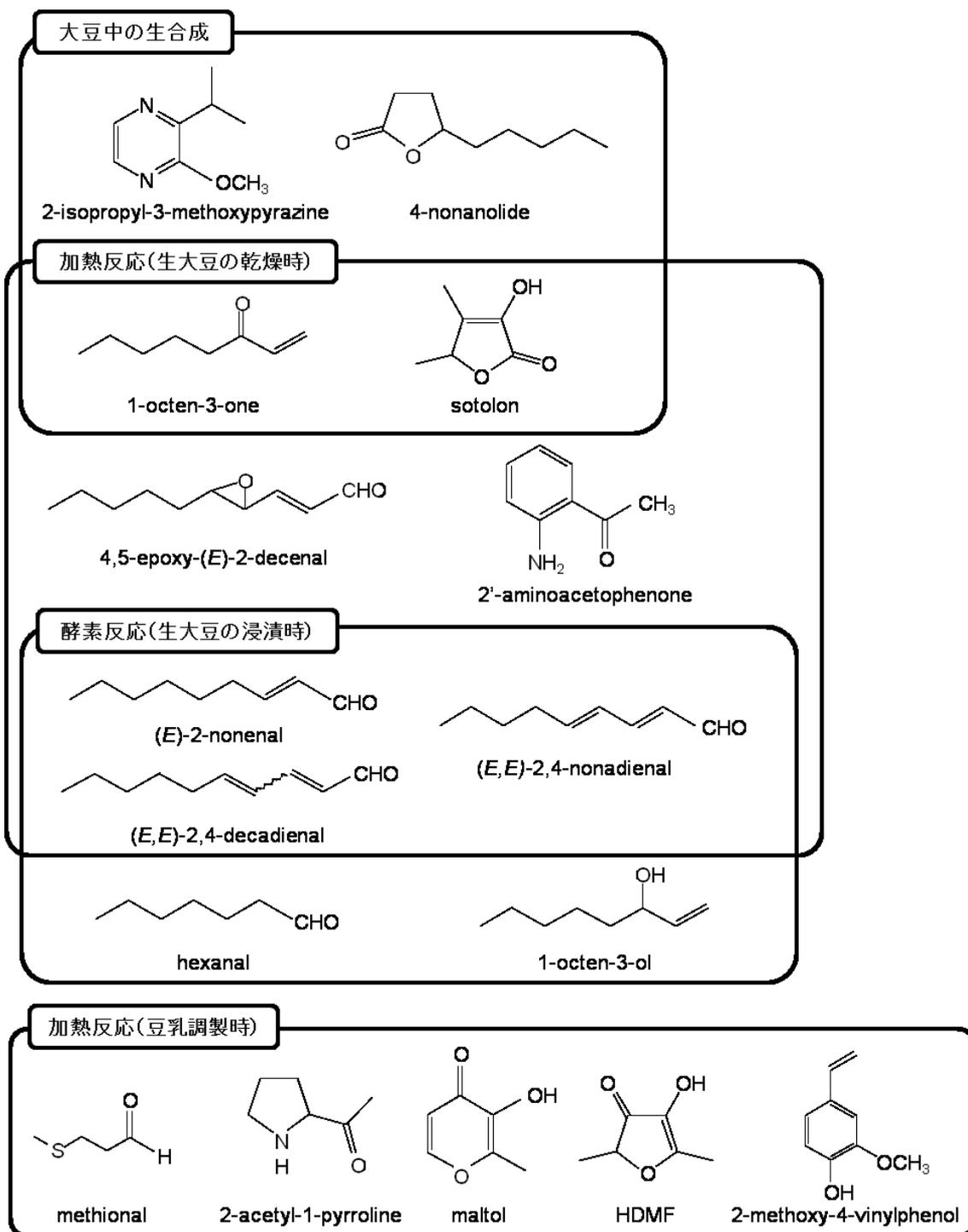


Figure 2-15 Classification of the key aroma compounds by proposed formation mechanisms

また、官能評価より、豆乳の香気は、green、fatty 以外にも pea-like/earthy、caramel-like、cooked potato-like などの特徴を有していることが判明した。加え

て、豆乳の風味の好ましさは香気寄与成分のバランスも重要であることが明らかとなった。とりわけ、**pea-like/earthy** な香調を有する **2-isopropyl-3-methoxypyrazine** は、豆乳中に適切な量存在することが重要であり、豆乳香気を特徴づける香気寄与成分の中で、数少ない大豆品種に起因する成分の1つであることが明らかとなった。

## 2.2 醤油

### 2.2.1 生醤油の香気寄与成分の解明と火入れ加熱による変化

生醤油は、通常の濃口醤油と異なり火入れ工程を経ていない新しいタイプの製品として普及しつつある。一般に火入れによって付与される火香と呼ばれる成分は既に幾つか報告されているが<sup>47-52)</sup>、**AEDA** を利用した生醤油の香気寄与成分に関する研究報告は全くなく、未だ不明点が多い。従って、その香気寄与成分を **AEDA** により明らかにすることは、生醤油の香気特徴を理解するために非常に重要である。さらに、生醤油の火入れ加熱による香気寄与成分の変化を明らかにすることは、生醤油と火入れ醤油の香気特徴の差を把握するために重要である。

そこで、はじめに生醤油の香気寄与成分を **AEDA** により明らかにした。次に、生醤油の火入れ加熱による香気寄与成分の量の変化及び香気特徴の変化を明らかにするために、生醤油と火入れ醤油の **AEDA**、定量分析、及び官能評価を行った。

#### 2.2.1.1 実験方法

##### 2.2.1.1.1 実験材料

実験材料として、市販の濃口タイプの生醤油（キッコーマン（株）、千葉）を使用した。火入れ醤油は、生醤油を未開封のまま、**80°C**の水浴に**30**分間保温することにより得た。同定に使用した標準化合物は**2,6-dimethoxy-4-vinylphenol**を除き、**2.1.1.1.1**と同様の方法で入手した。

**2,6-Dimethoxy-4-vinylphenol** は文献の方法に若干の修正を加え、以下のように合成した<sup>95)</sup> (Figure 2-16)。

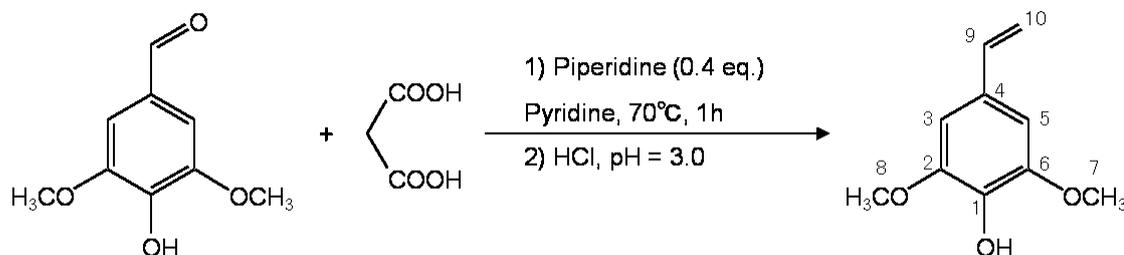


Figure 2-16 Synthetic pathway of 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol

Malonic acid (2.00 g, 19.2 mmol)を 50-mL ニロフラスコに入れ、ピリジン 20 mL に溶解した。3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde (2.34 g, 12.8 mmol)及び piperidine (0.48 mL, 4.8 mmol)を加え、70°C下、60 分撹拌した。反応液を室温まで冷却後、pH=3.0 に調整した冷水中に加えた。混合液を酢酸エチル (20 mL x 5) で抽出し、過剰量の無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒をヘキサン/酢酸エチル (8:2) で置換した後、得られた溶液をヘキサンで懸濁させた 50 g のシリカゲル (ワコーゲル C-300 (和光純薬工業 (株))) が充てんされたガラスカラムで分画した。分画は、ヘキサン/酢酸エチル (8:2、画分 I-V) 500 mL で行い、画分 III、IV を回収し、減圧乾固した。収率は 19%であった。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>; COSY) : δ 3.91 [s, 6H, H-C(7), H-C(8)], 5.15 [dd, 1H, <sup>3</sup>J = 10.9 Hz, <sup>2</sup>J = 0.7 Hz, H<sub>a</sub>-C(10)], 5.55 [s, 1H, HO-C(1)], 5.60 [dd, 1H, <sup>3</sup>J = 17.5 Hz, <sup>2</sup>J = 0.7 Hz, H<sub>b</sub>-C(10)], 6.62 [dd, 1H, <sup>3</sup>J = 17.2 Hz, <sup>3</sup>J = 10.9 Hz, H-C(9)], 6.65 [s, 2H, H-C(3), H-C(5)]. <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>; HMQC, HMBC): δ 56.4 [C(7), C(8)], 103.2 [C(3), C(5)], 112.0 [C(10)], 129.4 [C(9)], 135.0 [C(1)], 137.0 [C(4)], 147.2 [C(2), C(6)]. MS-EI. *m/z*(%) 180 (100), 165 (40), 137 (27), 77 (15), 122 (12), 91 (12).

#### 2.2.1.1.2 醤油香気濃縮物の調製

生醤油及び火入れ醤油香気抽出物は、各試料 5 g を 2.1.1.1.2 と同様の吸着樹脂 (SP 700) 5 mL に通液し、続いて蒸留水 (5 mL x 4)、ジクロロメタン (20 mL) を通液して得られたジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、SAFE (40°C、<math>5.0 \times 10^{-3}</math> Pa) を行うことにより得た。各醤油香気濃縮物は、

醤油香気抽出液をロータリーエバポレーション(550 mmHg, 35°C)後、窒素気流により約 100  $\mu$ L まで濃縮することにより得た。

#### 2.2.1.1.3 GC-O、AEDA 及び GC-MS 測定

GC-O、AEDA 及び GC-MS 測定は、それぞれ 2.1.1.1.3、2.1.1.1.4、2.1.1.1.5 に記載の方法に従って行った。

#### 2.2.1.1.4 成分の同定

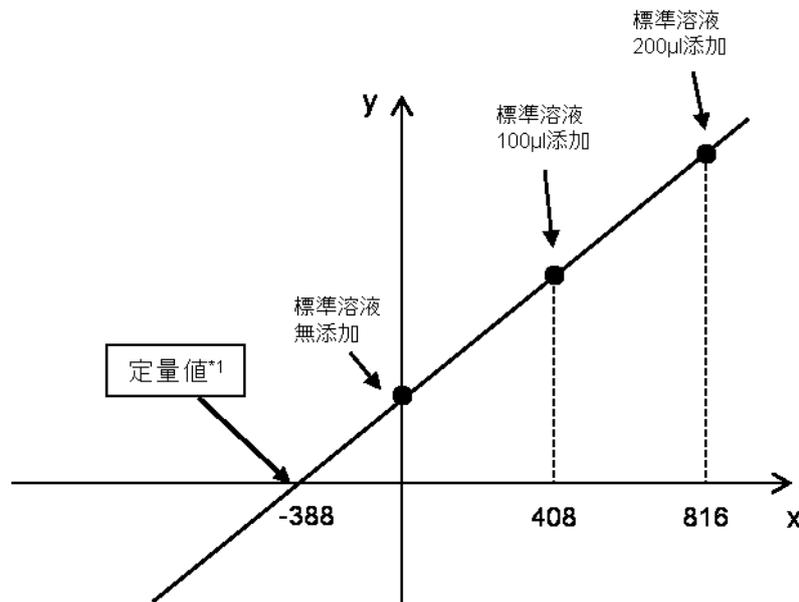
成分の同定は、2.1.1.1.6 に記載の方法に従って行った。

#### 2.2.1.1.5 生醤油及び火入れ醤油の香気寄与成分の標準添加法による定量

内部標準物質として 2-octanol (4150  $\mu$ g/L) 及び Table 2-5 に示した標準溶液をそれぞれ無添加、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L 添加した醤油 5 mL より 2.1.1.1.2 記載方法に従って各香気濃縮物を調製した。各香気濃縮物は GC-MS の SIM/scan モードで分析した。各成分の定量は、各成分の選択イオンの面積値を 2-octanol の  $m/z=45$  の面積値で除した値と添加した各成分濃度の関係式を最小二乗法によって求めることにより行った。各定量値は3回の測定値を平均することにより決定した。本手法の計算例を Figure 2-17 に示した。

Table 2-5 Selected ions and the concentration of the standard solution of the key aroma compounds for quantitative analysis by standard addition method

compound	selected ion m/z	concentration of the standard solution (mg/L)	
		for the raw soy sauce	for the heated soy sauce
3-methylbutanal	44	94.6	94.6
2-methylbutanal	57	92.8	92.8
methional	48	20.4	20.4
2-ethyl-3,5-dimethylpyraizine	135	0.602	0.602
phenylacetaldehyde	91	479	479
3-methylbutanoic acid	60	97.4	97.4
methionol	106	101	101
2-methoxyphenol	109	1.91	1.91
4-ethyl-2-methoxyphenol	137	5.32	5.32
HDMF	128	103	103
HEMF	142	1370	1370
2-methoxy-4-vinylphenol	150	3.37	40.4
sotolon	83	4.02	4.02
2,6-dimethoxyphenol	154	3.06	3.06
phenylacetic acid	91	98.1	98.1
2,6-dimethoxy-4-vinylphenol	180	0.511	9.30



$y$  = methionalの $m/z=48$ の面積値／内部標準物質(2-octanol)の $m/z=45$ の面積値  
 $x$  = methionalの濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )

\*1 絶対値が定量値となる。

Figure 2-17 Quantitative analysis of methional by standard addition method

#### 2.2.1.1.6 官能評価

官能評価者は6カ月の官能評価訓練(300以上の香気成分の認識・官能表現の記憶)を受けた小川香料(株)の18名の社員を選抜した。官能評価試験は、25°Cに調節された専用官能評価ブースにて、プラスチックカップに入れた醤油5 mLのヘッドスペース香気の評価を行った。評価は1(弱い)~7(強い)の尺度で行った。官能評価ワードは以下の化合物の香調として定義した。caramel-like/seasoning-like (sotolon)、cooked potato-like (methional)、spicy/burnt (4-ethyl-2-methoxyphenol)、fruity (ethyl 2-methylbutanoate)、sour (3-methylbutanoic acid)。官能評価結果の統計処理は繰り返しのない二元配置分散分析を用いて行った。

## 2.2.1.2 結果と考察

### 2.2.1.2.1 生醤油の香気寄与成分の解明

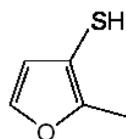
生醤油の香気寄与成分を明らかにするために、生醤油香気濃縮物へ AEDA を適用し、FD-factor が 1 以上の香気寄与成分を 37 成分検出した (Table 2-6)。これらの中で、2-methyl-3-furanthiol (9)、2-isopropyl-3-methoxypyrazine (11)、2-isobutyl-3-methoxypyrazine (14)、3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentanone (21)、5-decanolide (31)、2'-aminoacetophenone (32)、3-methylindole (34)、2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37) を醤油の香気寄与成分として初めて同定又は推定した (Figure 2-18)。

Table 2-6 Key aroma compounds in raw soy sauce

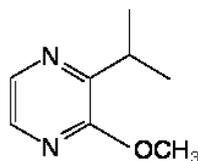
No	RI		odor qualities	compound	FD-factor	ref <sup>*1</sup>
	DB-WAX	DB-1				
1	937		stimulus	ethyl acetate	1	96
2	947		malty	2 and 3-methylbutanal	16	96,97
3	975		fruity	ethyl 2-methylpropanoate	4	44
4	979		milky	2,3-butanedione	4	98
5	1045		fruity	ethyl 2-methylbutanoate	4	99
6	1061		fruity	ethyl 3-methylbutanoate	4	100
7	1074		rancid	dimethyl disulfide	1	101
8	1278		milky	3-hydroxy-2-butanone	8	96
9	1295	849	roasty	2-methyl-3-furanthiol <sup>*2</sup>	4	
10	1352		rancid	dimethyl trisulfide	1	102
11	1428	1078	earthy, pea-like	2-isopropyl-3-methoxypyrazine <sup>*2</sup>	1	
12	1449		cooked potato-like	methional	512	103
13	1463		nutty, roasty	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	64	103
14	1515	1158	earthy	2-isobutyl-3-methoxypyrazine <sup>*2</sup>	1	
15	1631		honey-like	phenylacetaldehyde	32	97
16	1657		sour, cheese-like	3-methylbutanoic acid	64	104
17	1709		cooked potato-like	methionol	32	105
18	1718		floral	unknown	4	
19	1831		caramel-like	2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone	8	101
20	1851		burnt	2-methoxyphenol	64	106
21	1877		caramel-like	3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentenone	8	
22	1960		caramel-like	maltol	16	107
23	1995	1342	metallic	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal <sup>*2</sup>	8	44
24	2016		spicy, burnt	4-ethyl-2-methoxyphenol	256	108
25	2024		caramel-like	HDMF	128	101
26	2053		caramel-like	HEMF	2048	42
27	2123		caramel-like	HMF	4	109
28	2123		fatty, milky	4-decanolide	1	110
29	2181		spicy, burnt	2-methoxy-4-vinylphenol	16	111
30	2182		caramel-like, seasoning-like	sotolon	2048	112
31	2190		milky	5-decanolide	8	
32	2223	1276	grape-like	2'-aminoacetophenone <sup>*2</sup>	8	
33	2257		spicy, burnt	2,6-dimethoxyphenol	64	97
34	2471		animal-like	3-methylindole	1	
35	2546		honey-like	phenylacetic acid	32	101
36	2560		vanilla-like	vanillin	16	113
37	2569		spicy	2,6-dimethoxy-4-vinylphenol	4	

<sup>\*1</sup> Previous reports identified as volatile components in soy sauce.

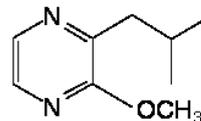
<sup>\*2</sup> The compound was tentatively identified by GC-O analysis using DB-WAX and DB-1 columns by comparison to the authentic compound, but no unequivocal mass spectrum was available by GC-MS.



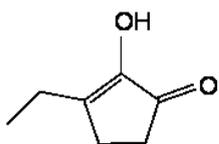
2-methyl-3-furanthiol (9)



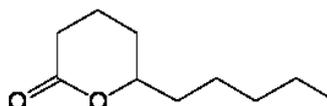
2-isopropyl-3-methoxypyrazine (11)



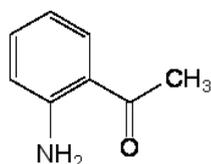
2-isobutyl-3-methoxypyrazine (14)



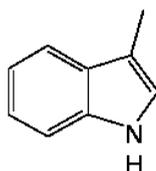
3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentenone (21)



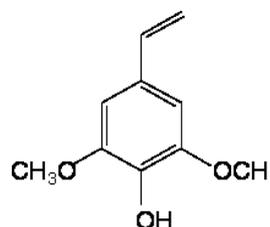
5-decanolide (31)



2'-aminoacetophenone (32)



3-methylindole (34)



2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)

Figure 2-18 Key aroma compounds newly identified or tentatively-identified from raw soy sauce

また、caramel-like/sweet な香調の HEMF (26)、caramel-like/seasoning-like な香調の sotolon (30)が最も高い FD-factor 2048 として検出され、続いて methional (12) (cooked potato-like)、4-ethyl-2-methoxyphenol (24) (spicy, burnt)、HDMF (25) (caramel-like)、2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine (13) (nutty, roasty)、3-methylbutanoic acid (16) (sour, cheese-like)、2-methoxyphenol (20) (burnt)、2,6-dimethoxyphenol (33) (spicy, burnt)が FD-factor 64~512 で検出された。これらの化合物の大部分は、過去の火入れされた濃口醤油中の香气寄与成分として報告されており、これらの成分は生醤油香气においても重要であると考えられる<sup>44)</sup>。

### 2.2.1.2.2 生醤油の香気寄与成分の生成機構の推定

最も FD-factor の高かった HEMF (26)は、味噌中で詳細に報告されている生成機構と同様の経路で生成していると考えられ、Maillard 反応とそれに引き続いて起こる酵母の代謝によって生成すると考えられる (Figure 2-19) <sup>114,115</sup>。

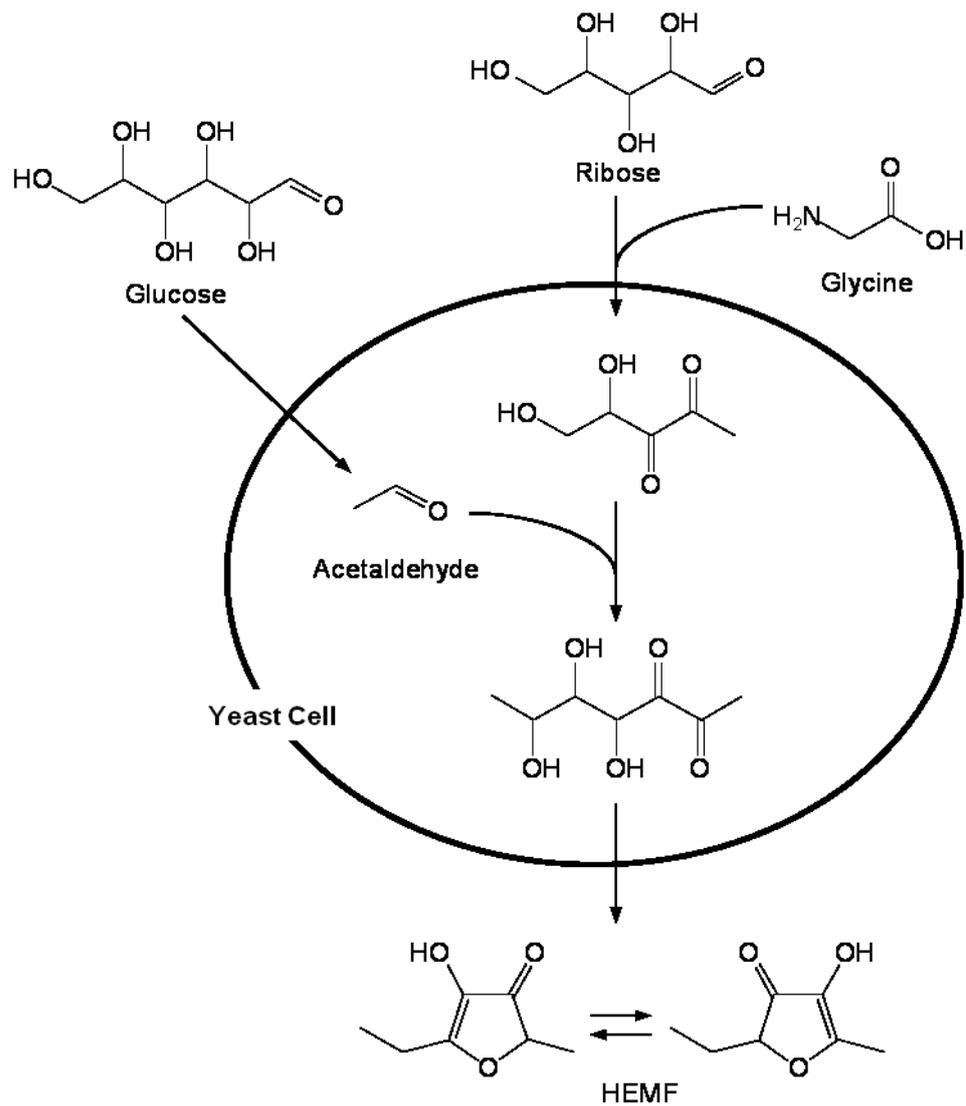


Figure 2-19 Proposed formation mechanism of HEMF in fermented soybean paste (miso)<sup>114)</sup>

HEMF と同様に最も FD-factor の高かった sotolon (30) の生成機構は、2.1.2.2.3 で推察した通り、幾つかの経路が示唆されている<sup>88-90</sup>。特に pyruvic acid と  $\alpha$ -ketoglutaric acid の縮合反応による推定生成経路は、クエン酸回路における成分同士の反応であり、醤油醸造中の生成経路として十分に可能性が高いと推察される。

次いで FD-factor の高かった methional (12) は、2.1.2.2.3 で推察したように、Maillard 反応及び引き続いて起こるストレッカー分解によって L-methionine から生成したと考えられる。

さらに、4-ethyl-2-methoxyphenol (24) は、shakuchirin、coniferyl alcohol などから生成する ferulic acid から酵素的あるいは熱的に生成することが報告されている 2-methoxy-4-vinylphenol (29) より、熟成酵母の 1 つである *C.versatilis* が生成するリダクターゼによって還元され生成することが知られている (Figure 2-20)<sup>39,40</sup>。

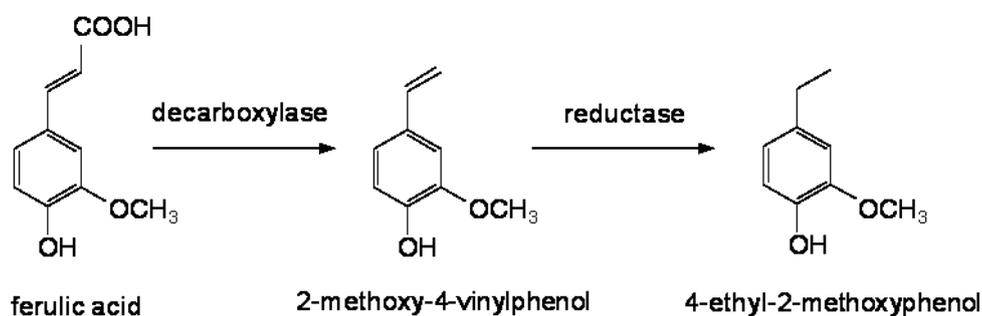


Figure 2-20 Proposed formation mechanism of 4-ethyl-2-methoxyphenol in soy sauce<sup>39,40</sup>

HDMF (25) は、2.1.2.2.3 で推察したように糖の熱分解や Maillard 反応によって生成したと考えられるが、醤油においては酵母の発酵によっても生成することが推察されている<sup>116</sup>。また、火入れによって有意に増加した 3-methylbutanal (2a)、2-methylbutanal (2b)、phenylacetaldehyde (15) はそれぞれ L-leucine、L-isoleucine、L-phenylalanine からストレッカー分解によって生成したと考えられる<sup>82</sup>。

### 2.2.1.2.3 生醤油及び火入れ醤油の香気寄与成分の比較

生醤油香気寄与成分の火入れによる変化を明らかにするために、生醤油及び火入れ醤油いずれかにおいて **FD-factor 32** 以上を示した成分の比較を行った (Table 2-7)。

Table 2-7 Key aroma compounds in raw soy sauce and heated soy sauce

no.	RI <sup>*1</sup>	odor qualities	compound	FD-factor	
				raw soy sauce	heated soy sauce
2	947	malty	2 and 3-methylbutanal	16	32
12	1449	cooked potato-like	methional	512	1024
13	1463	nutty, roasty	2-ethyl-3,5-dimethylpyraizine	64	64
15	1631	honey-like	phenylacetaldehyde	32	32
16	1657	sour, cheese-like	3-methylbutanoic acid	64	64
17	1709	cooked potato-like	methionol	32	32
20	1851	burnt	2-methoxyphenol	64	64
24	2016	spicy, burnt	4-ethyl-2-methoxyphenol	256	256
25	2024	caramel-like	HDMF	128	256
26	2053	caramel-like	HEMF	2048	2048
29	2181	spicy, burnt	2-methoxy-4-vinylphenol	16	128
30	2182	caramel-like, seasoning-like	sotolon	2048	2048
33	2257	spicy, burnt	2,6-dimethoxyphenol	64	64
35	2546	honey-like	phenylacetic acid	32	32
37	2569	spicy	2,6-dimethoxy-4-vinylphenol	4	64

\*1 RI, Retention Index on DB-WAX column.

生醤油と火入れ醤油の AEDA を比較すると、火入れ前後で **FD-factor** が顕著に増加した成分は **2-methoxy-4-vinylphenol (29)**及び **2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)**のみであった。そこで、より詳細な変化についての知見を得るために、Table 2-7 で示した香気寄与成分を標準添加法にて定量し、濃度の変化を明らかにした (Table 2-8)。生醤油と火入れ醤油の香気寄与成分の定量値を比較したところ、**3-methylbutanal (2a)**、**2-methylbutanal (2b)**、**methional (12)**、**phenylacetaldehyde (15)**、**HDMF (25)**、**2-methoxy-4-vinylphenol (29)**及び **2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)**が有意に増加していた。1.3.3.4 で示した通り、いくつかの揮発性成分が生

醤油の火入れ加熱によって増加することは既に知られているが、その中で醤油の香気に影響を与える成分はごく一部であることが明らかとなった。また、フェノール化合物の 2-methoxy-4-vinylphenol (29)と 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)の顕著な増加は新しい知見であり 2.2.1.2.5 で詳しく考察する。

Table 2-8 Quantitative analysis of the key aroma compounds in raw soy sauce and heated soy sauce by standard addition method

no.	compound	raw soy sauce		heated soy sauce		ratio
		concentration <sup>*1</sup> µg/L	SD µg/L	concentration <sup>*1</sup> µg/L	SD µg/L	
2a	3-methylbutanal	2640	20	3220	60	1.22 <sup>*2</sup>
2b	2-methylbutanal	2670	70	3160	200	1.1 <sup>*2</sup>
12	methional	388	4	513	16	1.32 <sup>*2</sup>
13	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	15.2	0.7	16.4	0.6	1.08
15	phenylacetaldehyde	10000	700	13100	600	1.31 <sup>*2</sup>
16	3-methylbutanoic acid	2340	120	2300	120	0.98
17	methionol	3390	120	3690	140	1.09
20	2-methoxyphenol	51.9	1.6	52.6	3.0	1.02
24	4-ethyl-2-methoxyphenol	280	31	266	12	0.95
25	HDMF	1650	60	2440	160	1.48 <sup>*2</sup>
26	HEMF	42800	1700	40400	2400	0.94
29	2-methoxy-4-vinylphenol	98.6	7.5	1120	62	11.3 <sup>*2</sup>
30	sotolon	105	4	113	6	1.08
33	2,6-dimethoxyphenol	104	6	114	10	1.09
35	phenylacetic acid	2480	100	2520	120	1.02
37	2,6-dimethoxy-4-vinylphenol	13.6	0.8	235	11	17.2 <sup>*2</sup>

<sup>\*1</sup> Mean value in triplicate experiments.

<sup>\*2</sup> There were significant differences between the raw soy sauce and the heated soy sauce by two-sample t-test ( $p < 0.05$ ).

#### 2.2.1.2.4 アディクションテストによる生醤油及び火入れ醤油香気と比較

生醤油と火入れ醤油の香気特徴の差異を官能的に把握するために、Table 2-8 で示した成分のうち、火入れ加熱によって有意に増加した成分を生醤油に添加し、官能評価を行った。評価ワードは生醤油又は火入れ醤油のいずれかの試料で FD-factor が 32 以上を示した成分の香調を選択した(Table 2-9)。

Table 2-9 Sensory evaluation of raw soy sauce and heated soy sauce

sample	sensory score <sup>*1</sup> (SD)						
	malty	cooked potato-like	nutty	honey-like	sour	caramel-like	spicy/burnt
raw soy sauce	3.6a (0.9)	4.0c (0.7)	3.1 (1.0)	3.7 (1.0)	3.2 (1.0)	3.8 (0.9)	3.6e (0.7)
heated soy sauce	4.8b (0.9)	4.7d (1.0)	3.4 (0.7)	3.8 (1.1)	3.6 (1.1)	4.4 (0.8)	4.8f (0.6)
raw soy sauce + increased components <sup>*2</sup>	4.8b (1.0)	4.7d (0.9)	3.7 (0.9)	4.3 (1.3)	3.6 (1.0)	4.7 (1.0)	5.3f (1.0)

<sup>\*1</sup> Different letters indicate significant differences within the column ( $p < 0.05$ ).

<sup>\*2</sup> 3-Methylbutanal (580 µg/L), 2-methylbutanal (490 µg/L), methional (125 µg/L), phenylacetaldehyde (3100 µg/L), HDMF (790 µg/L), 2-methoxy-4-vinylphenol (1020 µg/L), and 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (221 µg/L) were added to the raw soy sauce.

malty、cooked potato-like、spicy/burnt の香調は、生醤油に比べて火入れ醤油及び生醤油に増加した成分を添加した試料が有意に強かった。この結果は、AEDA により火入れ時に増加することが判明し、添加した成分 (3-methylbutanal (2a) (malty)、2-methylbutanal (2b) (malty)、methional (12) (cooked potato-like)、2-methoxy-4-vinylphenol (29) (spicy, burnt)、2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37) (spicy)) が生醤油と火入れ醤油の香気特徴の差異に大きな影響を与えていることを示している。一方、HDMF (25) (caramel-like)は、火入れ時に大きく増加していたにも関わらず、caramel-like の香気強度に有意な差が認められなかった。この結果は、他の caramel-like な香調を有する HEMF (26)や sotolon (30)などの非常に高いFD-factorを示した成分が火入れ時に変化しなかったことによると推察された。また、honey-like な香調も試料間で有意差が認められなかった。これは honey-like な香調の phenylacetaldehyde (15)は、火入れによって大きく増加していたものの、FD-factor は 32 と寄与度があまり高くないことが原因であると考えられる。

## 2.2.2 生醤油の火入れ時に増加するフェノール化合物の生成機構の推定

Table 2-9 の官能評価結果で示したように、フェノール化合物の香気特徴である spicy/burnt な香調は火入れ加熱により有意な増加が認められ、火入れ醤油において 4.8 と最も高い評価点を示したことから、火入れ醤油の香気特徴の1つであると考えられる。しかしながら、Table 2-8 で示したように、フェノール化合

物のうち 2-methoxy-4-vinylphenol (29)と 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)は生醤油の火入れ時に大きく増加したが、2-methoxyphenol (20)と 2,6-dimethoxyphenol (33)は増加しなかった。この反応性の違いを明らかにするために、前駆体の1つと考えられるフェノール酸の脱炭酸モデル反応を検討し、醤油の火入れによるフェノール化合物の生成経路を明らかにした (Figure 2-21)。

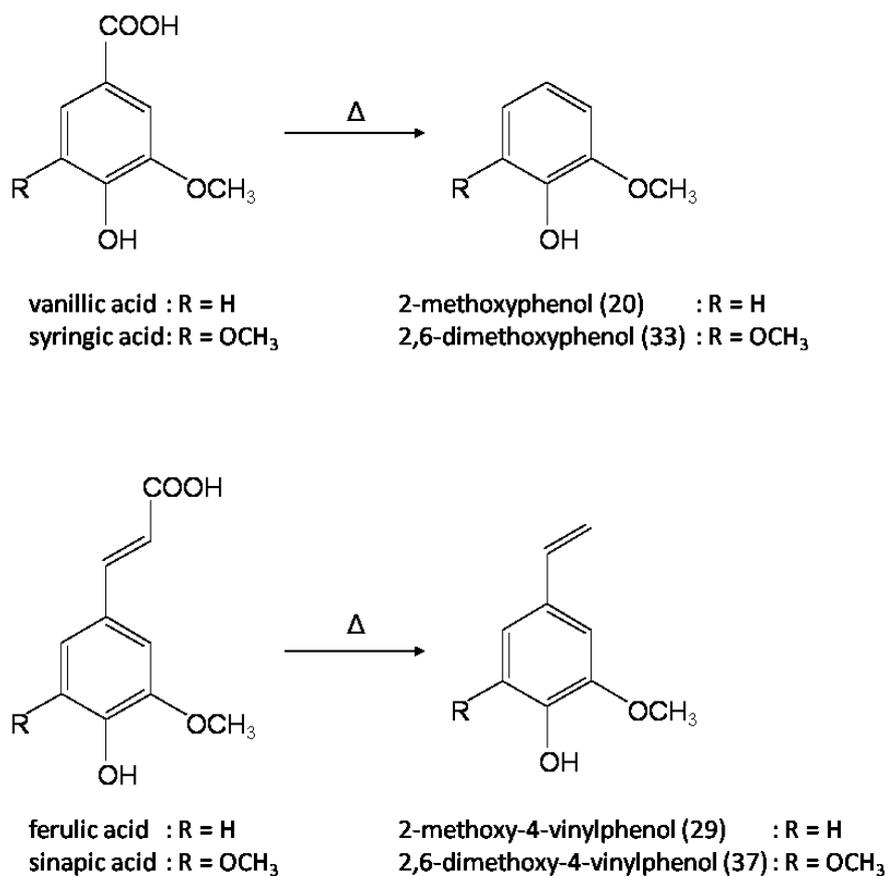


Figure 2-21 Model decarboxylation reactions of phenolic acids by a thermal treatment

## 2.2.2.1 実験方法

### 2.2.2.1.1 実験材料

生醤油と火入れ醤油は、2.1.1.1.1 と同様の方法で得た。フェノール酸とフェノール化合物は試薬会社より購入した。

### 2.2.2.1.2 フェノール酸の火入れモデル反応

クエン酸バッファで pH を 4.7 に調製した各フェノール酸 (vanillic acid、syringic acid、ferulic acid、synapic acid) 100 ppm 水溶液を窒素気流中でガラス瓶に封入し、80°C、30 分間水浴で加熱した。加熱後、各水溶液を室温まで急冷した。

### 2.2.2.1.3 フェノール酸とフェノール酸脱炭酸生成物の RP-HPLC による定量

Photo diode array (PDA) 検出器を備えた Agilent 1200 シリーズ HPLC を使用し、分離カラムは資生堂社製 ODS RP18 (10 µm, 250 mm x 4.6 mm i.d.) を用いた。Vanillic acid、syringic acid は 280 nm の吸光度にて、ferulic acid、synapic acid は 324 nm の吸光度にて定量を行った。クロマトグラフィーは 0.1%リン酸を含む 3%アセトニトリル溶液を 1.0 mL/min の流速で行い、その後 29 分かけてアセトニトリル含量を 25%まで増やした。その後、さらに 1 分でアセトニトリル含量を 100%まで増やした。フェノール酸脱炭酸生成物の 2-methoxyphenol、2-methoxy-4-vinylphenol、2,6-dimethoxyphenol 及び 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol は同じ分離カラムを用い、以下の条件で分析を行った。280 nm でモニターしながら、クロマトグラフィーは 0.1%リン酸を含む 10%アセトニトリル溶液を 1.0 mL/分の流速で行い、その後 25 分かけてアセトニトリル含量を 100%まで増やした。各成分の定量は絶対検量線法により 3 回の測定値を平均することにより行った。

## 2.2.2.2 結果と考察

### 2.2.2.2.1 フェノール酸のモデル火入れ反応

100ppm の各フェノール酸 (vanillic acid、syringic acid、ferulic acid、sinapic acid) を pH=4.7 に調整した蒸留水に溶解し、80°C 下 30 分加熱したところ、sinapic acid から最も高い収率 1.656% で対応する 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37) が生成し、次いで ferulic acid から 0.758% で 2-methoxy-4-vinylphenol (29) が生成した (Table 2-10)。一方、vanillic acid と syringic acid からの対応するフェノール化合物の生成量は極めて低収率であった (0.010%、0.023%)。

Table 2-10 Yields of the model decarboxylation reaction of phenolic acids by a thermal treatment<sup>\*1</sup>

compound	product	yield <sup>*2</sup> (%)	SD (%)
vanillic acid	2-methoxyphenol (20)	0.010	0.000
syringic acid	2,6-dimethoxyphenol (33)	0.023	0.001
ferulic acid	2-methoxy-4-vinylphenol (29)	0.758	0.019
sinapic acid	2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)	1.656	0.033

<sup>\*1</sup> 80°C x 30 min., pH = 4.7.

<sup>\*2</sup> Mean value in triplicate experiments.

Table 2-10 に示したように、全反応とも低収率ではあったが、醤油の火入れ条件でフェノール酸の脱炭酸反応が進行することが明らかとなった。また、ferulic acid や sinapic acid のような桂皮酸誘導体が vanillic acid や syringic acid の安息香酸誘導体よりも反応性が高かった。桂皮酸誘導体はより安定な  $\beta$ -カルボニルイオン (オレフィンへのプロトンの付加) を経由して脱炭酸反応が進行するのに対し (Figure 2-22)<sup>117)</sup>、安息香酸誘導体は不安定なカルボアニオンを經由して反応が進行することに起因すると考えられる (Figure 2-23)<sup>118)</sup>。

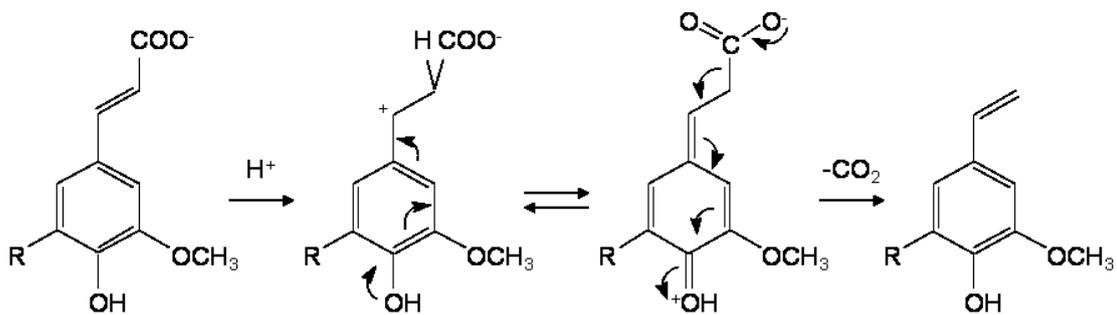


Figure 2-22 Proposed mechanism of the decarboxylation reaction of hydroxycinnamic acid derivatives<sup>117)</sup>

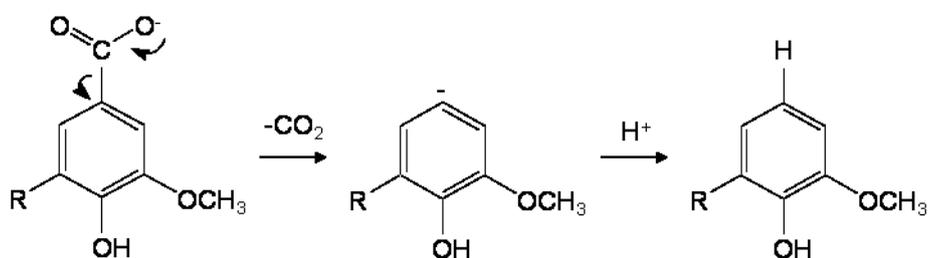


Figure 2-23 Proposed mechanism of the decarboxylation reaction of hydroxybenzoic acid derivatives<sup>118)</sup>

また、*sinapic acid* や *syringic acid* のような 2, 6-ジメトキシ体は *ferulic acid* や *vanillic acid* のような 2-メトキシ体よりも反応性が高いことが判明した。脱炭酸の反応性は、一般にカルボアニオン中間体が安定なほど高いことが知られており、カルボン酸の *m*-位にメトキシ基が存在すると、その電子吸引効果 (I 効果) によって、カルボアニオン中間体がより安定化するため、2-メトキシ体よりも 2, 6-ジメトキシ体の方が高い反応性を示したと考えられる<sup>118)</sup>。

#### 2.2.2.2.2 生醤油の火入れによるフェノール化合物の生成機構の推定.

さらに、生醤油の火入れによるフェノール化合物増加の要因を検証するため、反応前駆体の 1 つであると考えられるフェノール酸の生醤油中の含有量を RP-HPLC により定量した (Table 2-11)。生醤油中には *syringic acid* が最も多

く (36.1 µg/L)、次いで ferulic acid (19.7 µg/L)、vanillic acid (6.1 µg/L)、sinapic acid (3.8 µg/L)であった。

Table 2-11 Quantitative analysis of phenolic acids in raw soy sauce

compound	concentration <sup>*1</sup> (mg/L)	SD (mg/L)
vanillic acid	6.1	0.2
syringic acid	36.1	0.1
ferulic acid	19.7	0.1
sinapic acid	3.8	0.1

<sup>\*1</sup> Mean value in triplicate experiments.

次に、Table 2-10 で得られたフェノール酸のモデル脱炭酸反応の収率を元に、生醤油の火入れによるフェノール酸からのフェノール化合物の生成量を概算した(Table 2-12)。2-methoxyphenol (20)と 2,6-dimethoxyphenol (33)の概算生成量は、かなり低かった(それぞれ 0.6, 8.3 µg/L)が、2-methoxy-4-vinylphenol (29)と 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)は比較的高かった(それぞれ 150 µg/L、62.9 µg/L)。

Table 2-12 Estimated yields of phenols formed from phenolic acids by a thermal treatment in the raw soy sauce

compound	concentration (µg/L)		ratio <sup>*3</sup> (%)
	increase during heating <sup>*1</sup>	estimated yield formed from phenolic acid <sup>*2</sup>	
2-methoxyphenol (20)	0.7	0.6	84
2,6-dimethoxyphenol (33)	9	8.3	89
2-methoxy-4-vinylphenol (29)	1020	150	15
2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)	221	62.9	28

<sup>\*1</sup> Difference between the raw soy sauce and the heated soy sauce calculated from Table 2-8.

<sup>\*2</sup> The multiplication of the concentration of the corresponding precursor in the raw soy sauce showed in Table 2-11 and the yield of the corresponding phenolic compound by the thermal treatment showed in Table 2-10.

<sup>\*3</sup> The ratio of the estimated yield to the increased amount during heating of the raw soy sauce.

これらの結果より、2-methoxyphenol (20)と 2,6-dimethoxyphenol (33)は生醤油の火入れ条件ではほとんど生成しないことが判明した。他方、2-methoxy-4-vinylphenol (29)と 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)は生醤油の火入れ条件で生成すると考えられたが、実際の火入れ工程でははるかに多くの量（それぞれ 1020 µg/L、221 µg/L）の生成が認められた。このことから、2-methoxy-4-vinylphenol (29)と 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol (37)の火入れ時の増加には、ヒドロキシ桂皮酸からの生成だけではなく、shakuchirin や細胞壁結合型のフェルラ酸エステルなどの他の前駆体からの生成も大きく関与している可能性が高い (Figure 2-24)。

一方、火入れ時には増加しなかった 2-methoxyphenol (20)と 2,6-dimethoxyphenol (33)を含めたこれらの4成分は、生醤油中でも比較的高いFD-factorを示していた。従って、これらの成分は大豆の蒸煮や小麦の焙煎、あるいは醸造時の酵素反応による生成の可能性も考えられるが<sup>39,86)</sup>、今後詳細な検討が必要である。

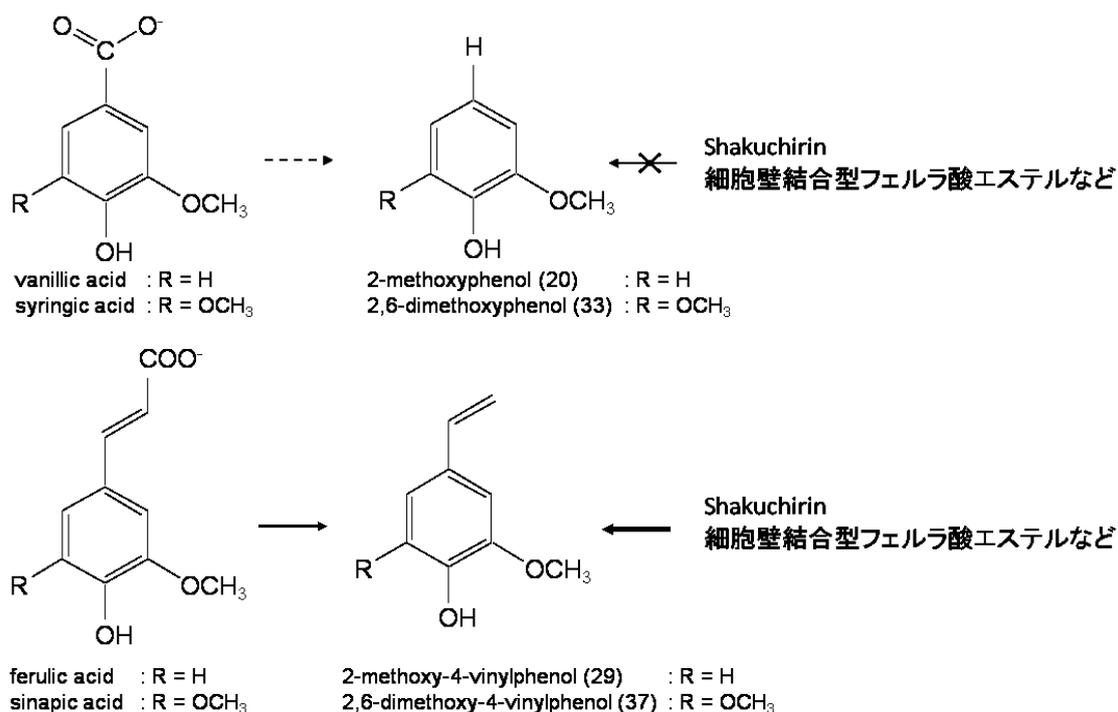


Figure 2-24 Proposed formation mechanisms of phenol compounds by a thermal treatment

### 2.2.3 JAS 規格で分類される 5 種類の醤油の香気寄与成分の解明

日本の醤油は JAS により、濃口、淡口、溜、再仕込み、白の 5 種類に分類されており<sup>34)</sup>、各醤油は、原料である大豆と小麦の比率や醸造の条件が異なることから、それらの風味も異なっている。しかしながら、濃口醤油以外の醤油は、揮発性成分に関する報告がわずかになされているが<sup>45,46)</sup>、AEDA を用いて香気寄与成分を明らかにした研究報告は全くなく、未だ多くの不明点がある。

そこで、JAS で分類されている 5 種類の醤油について、AEDA を用いて香気寄与成分を明らかにし、官能特徴との関係を明らかにした。

#### 2.2.3.1 実験方法

##### 2.2.3.1.1 実験材料

実験材料として、市販の 5 種類の醤油（小原久吉商店、湯浅）を使用した。同定に使用した標準化合物は、2.1.1.1.1 と同様の方法で入手した。

##### 2.2.3.1.2 醤油香気濃縮物の調製

各醤油香気濃縮物は、2.2.1.1.2 と同様の方法で得た。

##### 2.2.3.1.3 GC-O、AEDA 及び GC-MS 測定

GC-O、AEDA 及び GC-MS 測定は、それぞれ 2.1.1.1.3、2.1.1.1.4、2.1.1.1.5 に記載の方法に従って行った。

##### 2.2.3.1.4 成分の同定

成分の同定は、2.1.1.1.6 に記載の方法に従って行った。

### 2.2.3.1.5 官能評価

官能評価は、2.2.1.1.6 と同様の方法で行った。

### 2.2.3.2 結果と考察

#### 2.2.3.2.1 JAS 規格の 5 種類の醤油の AEDA の比較

各醤油の香気寄与成分を同定するために、それぞれの醤油香気濃縮物へ AEDA を適用し、FD-factor 4 以上の香気寄与成分を 25 成分検出した (Table 2-13)。濃口醤油では、4-ethyl-2-methoxyphenol (16) (spicy, burnt) と sotolon (22) (caramel-like, seasoning-like) が最も高い FD-factor 1024 として検出され、続いて methional (6) (cooked potato-like)、HEMF (18) (caramel-like)、HDMF (17) (caramel-like)、2-methoxy-4-vinylphenol (21) (spicy, burnt) が FD-factor 64~256 で検出された。これらの化合物の大部分は、過去の報告と共通して高い寄与度を示しており、濃口醤油香気 of 重要な構成要素と考えられる<sup>44)</sup>。

また、濃口醤油の AEDA と他の 4 種類の醤油の AEDA を比較すると、methional (6) 及び sotolon (22) はいずれの試料からも高い FD-factor で検出されたため、5 種類の醤油共通の香気寄与成分であると考えられた。また、白醤油以外の醤油にて高い FD-factor 256~1024 を示した 4-ethyl-2-methoxyphenol (16) は、2.2.1.2.4 で考察したように、熟成酵母の 1 つである *C. versatilis* により生成すると考えられる。一方、白醤油は、1.3.3.2.5 で述べたように、低温短期間の発酵で製造されるため、4-ethyl-2-methoxyphenol (16) が生成しなかったと考えられる<sup>39,40)</sup>。

Table 2-13 Key aroma compounds in five different types of Japanese soy sauces

no.	RI <sup>*1</sup>	odor qualities	compound	FD-factor					ref <sup>*2</sup>
				koi kuchi	usu kuchi	tamar i	sai shiko mi	shiro	
1	937	stimulus	ethyl acetate	4	4	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	96
2	950	malty	2 and 3-methylbutanal	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	4	4	nd <sup>*3</sup>	96,97
3	975	fruity	ethyl methylpropanoate	4	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	44
4	1005	fruity	ethyl 2-methylbutanoate	16	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	4	nd <sup>*3</sup>	99
5	1030	fruity	ethyl 3-methylbutanoate	4	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	4	nd <sup>*3</sup>	100
6	1449	cooked potato-like	methional	256	64	256	256	256	103
7	1463	roasty	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	4	nd <sup>*3</sup>	4	4	nd <sup>*3</sup>	103
8	1533	fruity	unknown	64	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	
9	1638	honey-like	phenylacetaldehyde	4	16	16	16	nd <sup>*3</sup>	97
10	1664	sour, cheese-like	3-methylbutanoic acid	16	4	64	16	nd <sup>*3</sup>	104
11	1837	caramel-like	2-hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone	16	4	16	16	nd <sup>*3</sup>	101
12	1855	burnt	2-methoxyphenol	16	4	64	16	nd <sup>*3</sup>	106
13	1883	caramel-like	3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentenone	4	nd <sup>*3</sup>	4	4	nd <sup>*3</sup>	
14	1964	caramel-like	maltol	4	nd <sup>*3</sup>	16	4	nd <sup>*3</sup>	107
15	2000	sweet, metallic	<i>trans</i> -4,5-epoxy-( <i>E</i> )-2-decenal	16	nd <sup>*3</sup>	4	16	16	44
16	2025	spicy, burnt	4-ethyl-2-methoxyphenol	1024	256	256	1024	nd <sup>*3</sup>	108
17	2033	caramel-like	HDMF	64	4	256	16	nd <sup>*3</sup>	101
18	2059	caramel-like	HEMF	256	16	4	64	nd <sup>*3</sup>	40
19	2129	caramel-like	HMF	16	4	nd <sup>*3</sup>	4	nd <sup>*3</sup>	109
20	2178	sweet, spicy	4-ethylphenol	16	16	16	16	nd <sup>*3</sup>	39
21	2191	spicy, burnt	2-methoxy-4-vinylphenol	64	16	16	16	nd <sup>*3</sup>	111
22	2198	caramel-like, seasoning-like	sotolon	1024	1024	256	1024	1024	112
23	2218	grape-like	2'-aminoacetophenone	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	nd <sup>*3</sup>	4	nd <sup>*3</sup>	
24	2265	spicy, burnt	2,6-dimethoxyphenol	16	nd <sup>*3</sup>	16	4	nd <sup>*3</sup>	97
25	2553	honey-like	phenylacetic acid	16	nd <sup>*3</sup>	16	4	nd <sup>*3</sup>	101

<sup>\*1</sup> Retention Index on DB-wax column.

<sup>\*2</sup> Previous reports identified as volatile components in soy sauce.

<sup>\*3</sup> nd, not detected.

さらに、各醤油の香気寄与成分を詳細に比較すると、淡口醤油の香気寄与成分は、全て濃口にも含まれていたが、HDMF (17) (64→4)と HEMF (18) (256→16)

の FD-factor は低かった。また、ethyl methylpropanoate (3)、ethyl 2-methylbutanoate (4)、ethyl 3-methylbutanoate (5)、2-ethyl-3,5-dimethylpyraizine (7)、3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentenone (13)、maltol (14)、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (15)、2,6-dimethoxyphenol (24)、phenylacetic acid (25)は検出されなかった。これらの要因は、1.3.3.2.2 で述べたように、濃口醤油に比べて、淡口醤油は醸造期間が短く、塩分濃度が高いために酵母による発酵の際に生成する香り成分の濃度が低かったと考えられる<sup>37)</sup>。

溜醤油の香り寄与成分は、濃口醤油とほぼ同じであったが、揮発性が高い成分(ethyl acetate (1)、ethyl methylpropanoate (3)、ethyl 2-methylbutanoate (4)、ethyl 3-methylbutanoate (5))がほとんど検出されなかった。一方、濃口醤油で検出されなかった 2-methylbutanal 及び 3-methylbutanal (2)が検出された。また、HEMF (18) の FD-factor が低く(256→4)、HMF (19)は検出されなかった。味噌の香気の報告では、HEMF (18)の生成量は、出発原料の加熱条件、諸味中のグルコース含量、乳酸菌の種類、発酵温度、発酵期間によって大きく異なることが明らかにされているため、醤油中の HEMF 量もこれらの要因に影響され、生成量に差があったと考えられる<sup>114,115)</sup>。1.3.3.2.3 で述べたように、溜醤油は原料がほぼ大豆であること、また、醸造中諸味の攪拌を行わずに製造されることなど、他の醤油と製造方法が異なり酵母による発酵が弱く、HEMF の FD-factor が低かったと考えられる。HMF (19)は火入れによって大幅に増加するため<sup>37)</sup>、一般に火入れを行わない溜醤油では検出されなかったと考えられる。

再仕込み醤油の香り寄与成分は、ほぼ濃口醤油と同じであったが、揮発性が高い成分(ethyl acetate (1)、ethyl methylpropanoate (3))は検出されなかった。一方、濃口醤油では検出されなかった 2-methylbutanal 及び 3-methylbutanal (2)、2'-aminoacetophenone (23)が検出された。これらはいずれも熱により揮発又は生成すると考えられる成分であるため、本研究で用いた再仕込み醤油は、濃口醤油に比べて醸造期間が長かったか火入れ加熱が強かったことが推察される。

白醤油は、ほとんど香り成分が検出されず、methional (6)、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (15)、sotolon (22)のみ検出された。これは1.3.3.2.5 で述べたように、白醤油は発酵期間が短く、低温で醸造されること、また火入れが行われないことが要因であると考えられる。

### 2.2.3.2.2 JAS 規格の 5 種類の醤油の官能評価

GC-O で検出された成分の醤油香気への寄与度を検証するために、5 種類の醤油のいずれかの試料で FD-factor 64 以上検出された成分の香調について、各醤油の官能評価を行った(Table 2-14)。

Table 2-14 Sensory evaluation of five different types of Japanese soy sauces

variety	sensory score* <sup>1</sup> (SD)				
	caramel-like	cooked potato-like	spicy/burnt	fruity	sour
koikuchi	4.0 (0.7)	4.1 (0.9)	4.9ac (1.1)	3.6 (1.4)	4.3d (1.2)
usukuchi	3.6 (1.0)	4.3 (1.0)	3.9ab (1.1)	3.0 (1.3)	3.4de (0.8)
tamari	4.2 (1.3)	4.8 (1.3)	4.7ac (1.2)	2.9 (1.3)	4.3d (1.7)
saishikomi	4.0 (1.0)	4.4 (1.3)	5.1c (1.3)	3.3 (0.8)	3.9de (1.2)
shiro	3.9 (1.3)	5.1 (1.4)	3.1b (1.4)	3.1 (1.0)	2.9e (0.9)

\*<sup>1</sup> Different letters indicate significant differences within the column ( $p < 0.05$ ).

濃口、溜、再仕込み醤油は **fruity** を除き全体的に評価点が高く、特に **spicy/burnt**、**cooked potato-like** が高かった。一方、淡口、白醤油は **cooked potato-like** の評価点は高かったが、他の香調はいずれも低かった。

5 種類の醤油において **caramel-like** と **cooked potato-like** に大きな差異が認められなかった結果は、AEDA において **sotolon (22)** 及び **methional (6)** の FD-factor が高かった結果とよく相関した。また、**spicy/burnt** な香調は濃口、溜、再仕込み醤油が強く、白醤油が弱かった。これは濃口、溜、再仕込み醤油で FD-factor が高かった **2-methoxyphenol (12)**、**4-ethyl-2-methoxyphenol (16)**、**4-ethylphenol (20)**、**2-methoxy-4-vinylphenol (21)** の影響であると考えられた。Sour な香調は濃口、溜醤油と白醤油の間で有意差が認められた。これは **3-methylbutyric acid (10)** の影響であると考えられる。また、**fruity** な香調はいずれの試料においても官能強度が低かった (2.9~3.6) ため、試料間の有意差が認められなかったと考えられる。

## 2.2.4 結論

本研究により生醤油及び JAS 規格の 5 種類の醤油の香気寄与成分を探索し、新規な成分を含む多数の香気寄与成分を明らかにすることができた (Figure 2-25)。

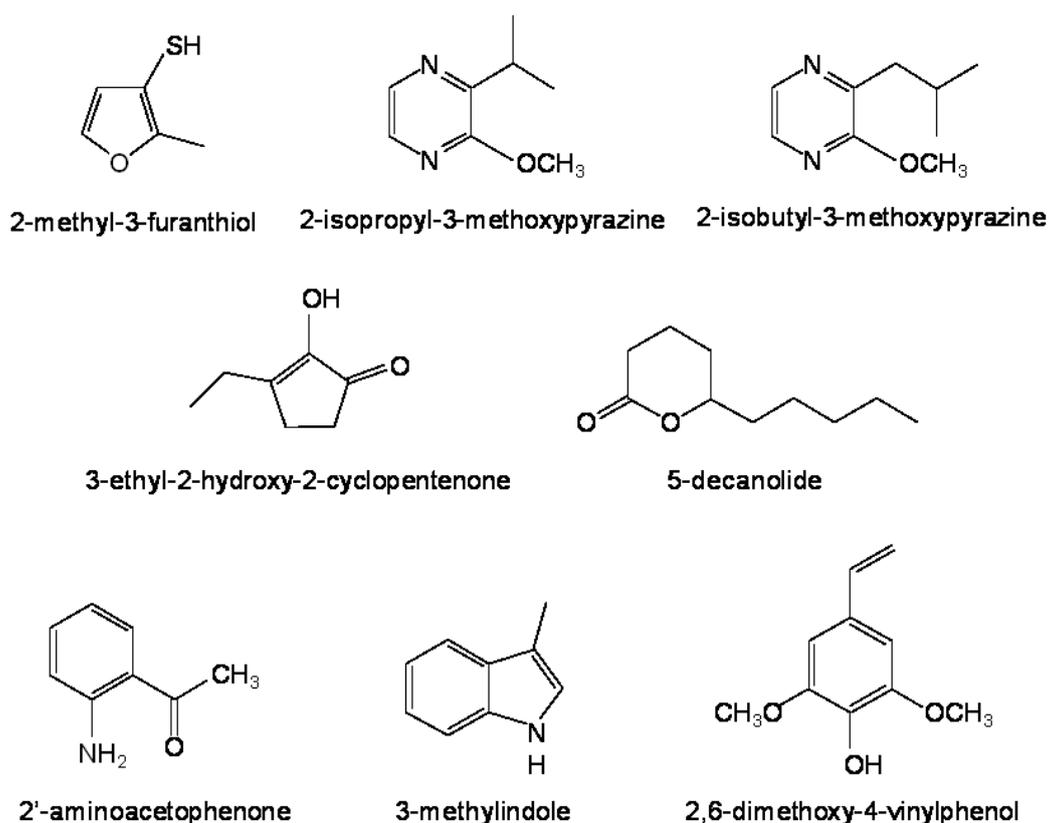


Figure 2-25 Key aroma compounds newly identified or tentatively-identified in Japanese soy sauce

生醤油の香気寄与成分の大部分は既に報告されている濃口醤油の香気寄与成分と共通していたが、Figure 2-25 に示す 8 成分を醤油中の香気寄与成分として初めて同定又は推定した。とりわけ、2-methyl-3-furanthiol や 5-decanolide は熱に対して不安定なため、一般的な火入れ醤油では検出しにくい化合物であると考えられ、生醤油独特の香気特徴を構成する成分の一部である可能性がある。

さらに、生醤油香気寄与成分の定量分析より、一部の成分が火入れ工程中に有意に増加していることが判明した (Figure 2-26)。過去の報告では、本研究でも高い寄与度を示した多くの香気成分が熱によって生成する可能性が示唆されていたが、実際には、火入れ相当の加熱条件下での香気寄与成分の増加は Figure 2-25 に示した 7 成分に限られることが明らかになった。

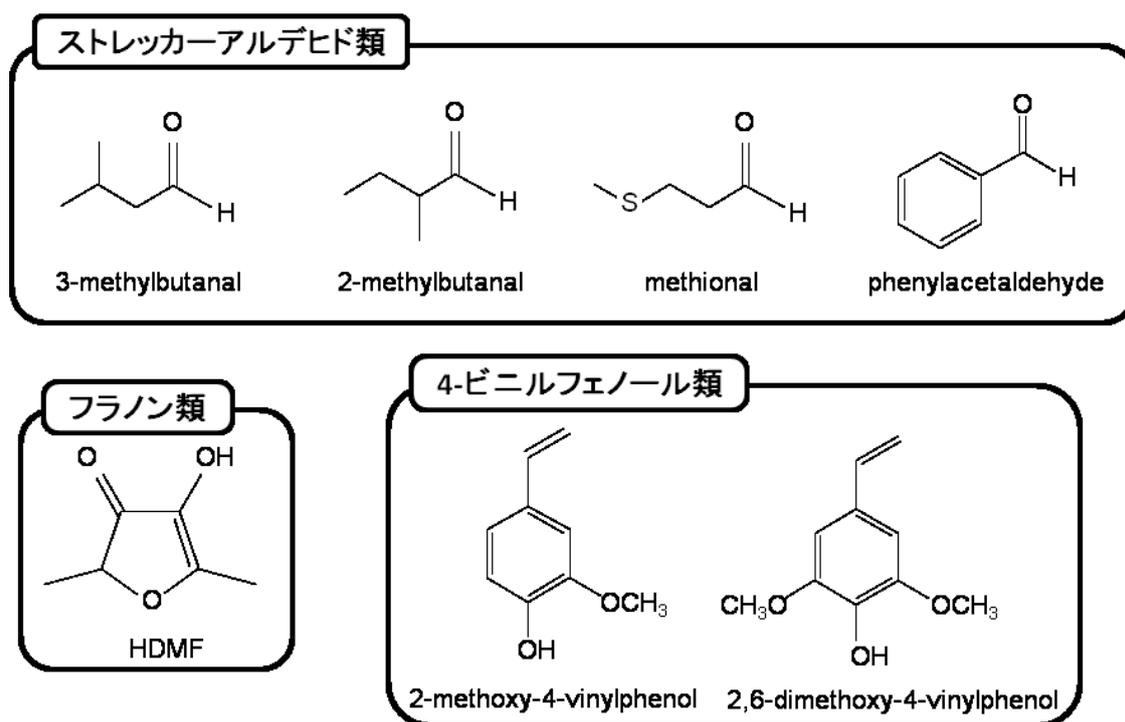


Figure 2-26 Increased compounds in raw soy sauce during a heating process

また、火入れ時に増加した成分の生醤油への添加による官能評価試験から、官能的に変化が認められた香調はさらに限定的であり、malty、cooked potato-like、spicy/burnt 香気のみであることが明らかとなった。

これらの結果を総合的に判断すると、malty 香気を有する 2-methylbutanal 及び 3-methylbutanal、cooked potato-like 香気を有する methional、spicy/burnt 香気を有する 2-methoxy-4-vinylphenol 及び 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol の増加が生醤油と火入れ醤油の香気特徴の差に大きく関与していると考えられる (Figure 2-27)。

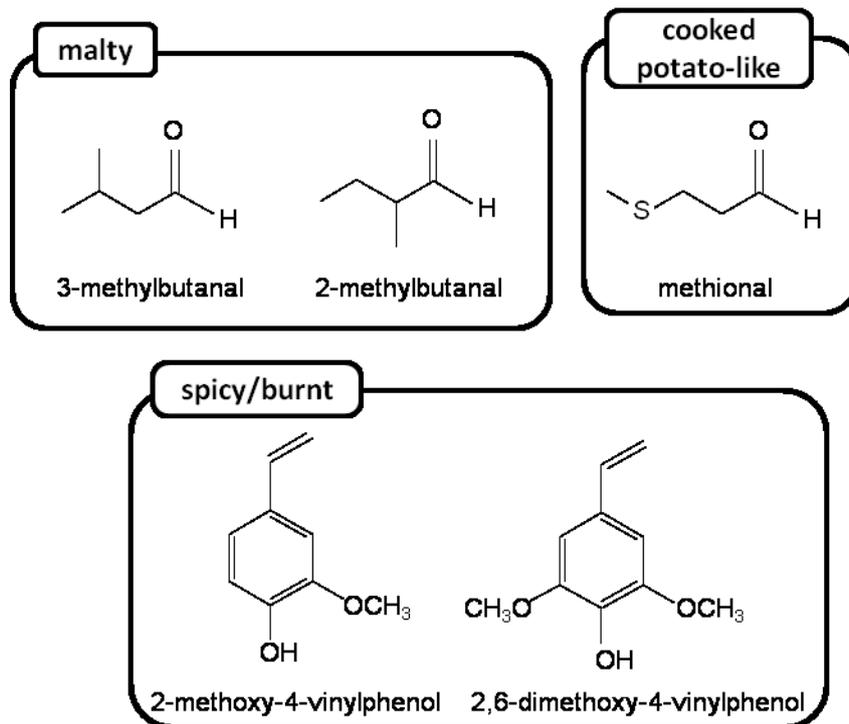


Figure 2-27 Key aroma compounds contributing a change of aroma profile during a heating process of raw soy sauce

さらに、生醤油と火入れ醤油の間で顕著な差が認められた **spicy, burnt** 香気に寄与するフェノール化合物の増加は一部の成分のみであった。その要因を明らかにするために対応するフェノール酸からのモデル脱炭酸反応を検討した結果、ヒドロキシ桂皮酸の脱炭酸反応は低収率ではあるが進行したが、ヒドロキシ安息香酸の脱炭酸反応はほとんど反応しなかった。このことから、ヒドロキシ安息香酸から生成する **2-methoxyphenol** と **2,6-dimethoxyphenol** は生醤油の火入れ加熱では生成しにくい、ヒドロキシ桂皮酸から生成する **2-methoxy-4-vinylphenol** と **2,6-dimethoxy-4-vinylphenol** は生醤油の火入れ加熱で生成することが明らかとなった。しかしながら、**2-methoxy-4-vinylphenol** と **2,6-dimethoxy-4-vinylphenol** は、実際の火入れ過程ではるかに多くの量の増加が認められたことから、これらの成分の火入れ加熱時の増加は、ヒドロキシ桂皮酸だけではなく、**shakuchirin** や細胞壁結合型のフェルラ酸エステルなどの他の前駆体からの生成も大きく関与している可能性が高い。

また、JAS 規格で分類される 5 種類の醤油に AEDA を適用し、25 の香気寄与成分を明らかにした。さらに、AEDA 及び官能評価結果から、cooked potato-like な香調の methional や seasoning-like/caramel-like な香調の sotolon のように、これらの醤油に共通して高い寄与度を示す成分と、HDMF、HEMF、4-ethyl-2-methoxyphenol のように、醤油の種類によって寄与度が大きく異なる成分が存在することが判明した (Figure 2-28)。

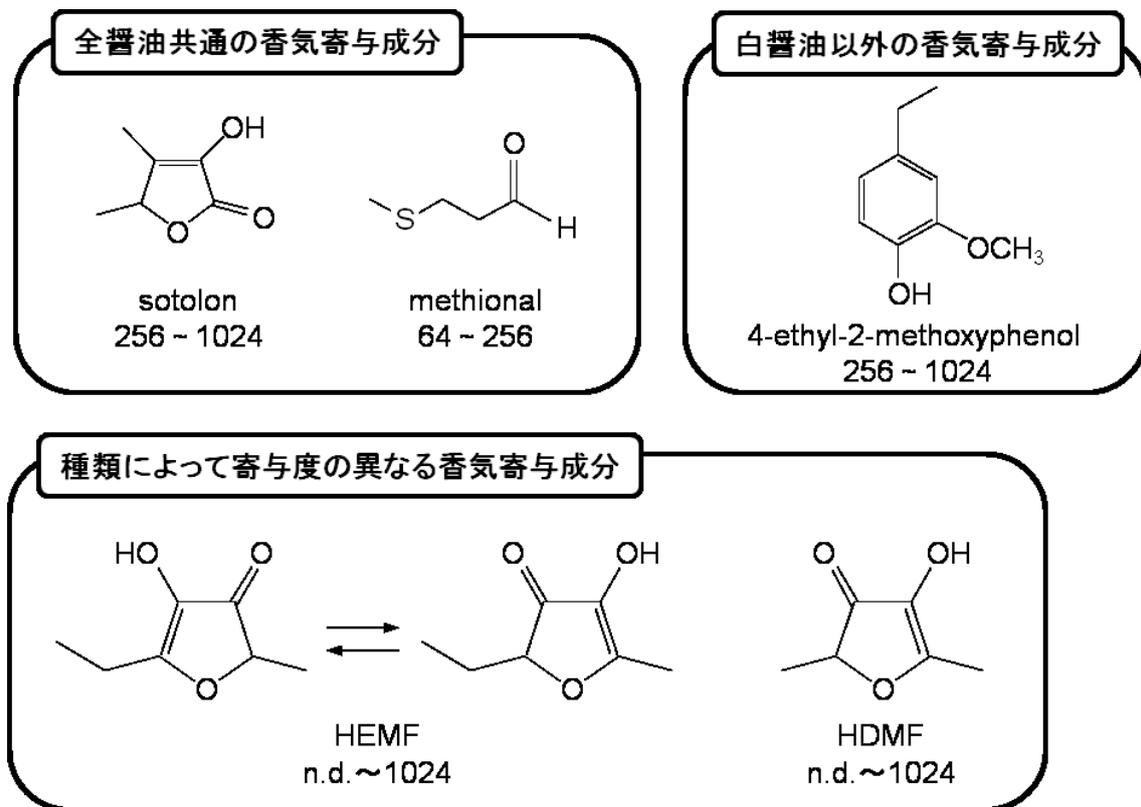


Figure 2-28 Key aroma compounds in five different types of Japanese soy sauce

## 第3章 大豆食品の呈味寄与成分に関する研究

### 3.1 呈味寄与成分探索手法の開発

食品の呈味は基本 5 味（塩味、甘味、酸味、苦味、うま味）から成り立っており、それらのバランスの違いによって多種多様な食品の呈味が特徴づけられている<sup>6)</sup>。また、1.2.2 で述べたように、食品の呈味寄与成分は多岐に亘り、その構造活性相関はいまだ十分に明らかにされていない。そのため、食品中の複雑な構成成分の中からその食品の呈味に寄与する成分を明らかにするためには、活性成分の化学的特性を考慮しながら、複数の分離精製手法を組み合わせる単離し、NMR や MS などの複数の分析手法を用いて同定を行う必要がある。

#### 3.1.1 食品中のうま味寄与成分のスクリーニング手法の開発

我々の食生活は、うま味を有する食品やそれらを利用した料理に囲まれている。とりわけ、日本ではうま味を特徴とする和風出汁の素材として、鰹節、昆布をはじめとし、野菜や魚などさまざまな食品が利用されている。また、それ以外にも、緑茶のような飲料やトマトのような野菜、チーズのような発酵食品など、うま味を特徴とする食品は多岐に亘り、我々の食生活を豊かにしている。

1.4 で述べたように、基本 5 味の 1 つであるうま味は、古くより知られている酸性アミノ酸や核酸以外にも、近年グアニル酸類縁体、グルタミン酸のアマドリ化合物、酸性ペプチド類やピログルタミルペプチド類、有機酸グルコシドなど、さまざまな化合物がうま味成分として同定されている（Figure 3-1）<sup>60-66)</sup>。

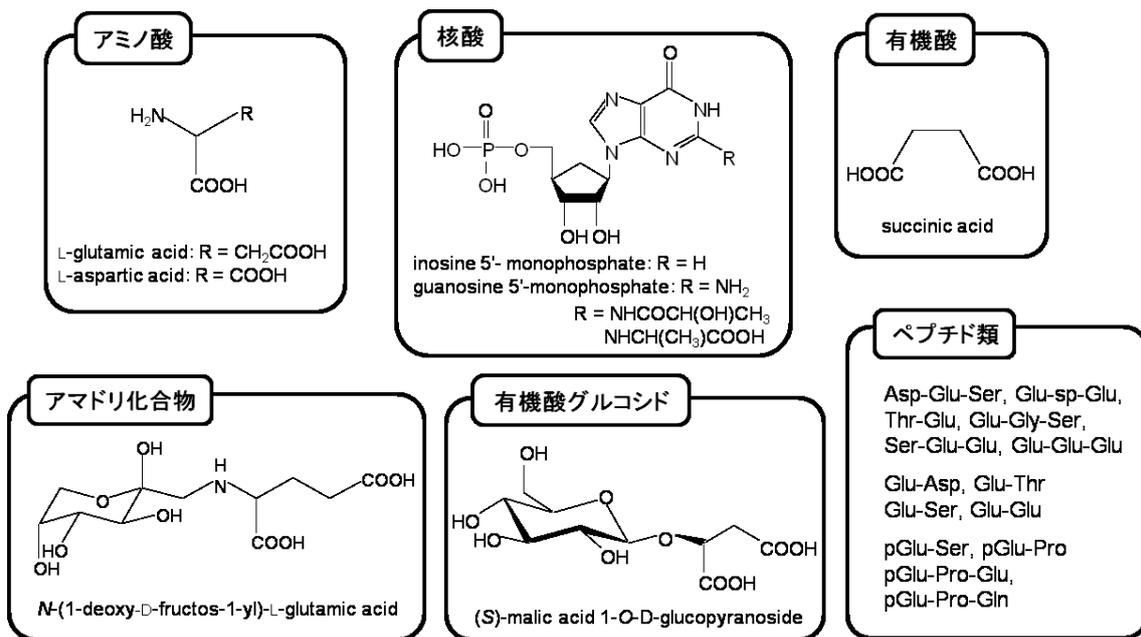


Figure 3-1 Umami compounds

また、うま味の相乗作用が知られているグルタミン酸と核酸類以外にも、さまざまな化合物がグルタミン酸のうま味を増強する成分として報告されている (Figure 3-2) <sup>67-71)</sup>

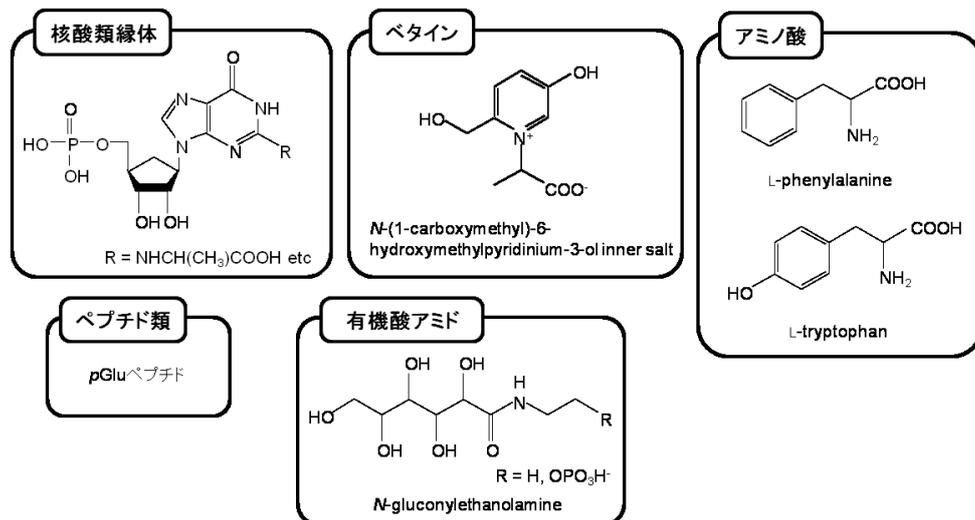


Figure 3-2 Umami enhancing compounds

このように、食品のうま味は、うま味成分とうま味増強成分によって構成されている可能性があるため、1.4 で述べたように、TDA を応用し、うま味成分とうま味増強成分を評価する手法の有効性を検証した。

研究対象として、日本の緑茶の 1 種である抹茶を使用した。抹茶は緑茶独特の苦味と渋味に加えて、うま味が特徴的な日本で古くから親しまれている食材の 1 つである。抹茶のうま味はグルタミン酸以外に緑茶特有のアミノ酸であるテアニンの関与が指摘されているが<sup>6)</sup>、テアニンは閾値が非常に高く、うま味への関与に否定的な報告もある<sup>119,120)</sup>。そのため、テアニンのうま味への関与の有無とともに、未知のうま味寄与成分の解明が期待される。

### 3.1.1.1 実験方法

#### 3.1.1.1.1 実験材料

市販の抹茶を使用した（（株）あいや、愛知）。同定に使用した標準化合物は (1S, 3R, 4R, 5R)-1,3,4-trihydroxy-5-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)oxycyclohexane-1-carboxylic acid (theogallin)を除き、試薬会社より購入した。

Theogallin は文献<sup>121)</sup>に従って合成した 3,4-O-isopropylidenequinic acid と gallic acid とのエステル化により行った (Figure 3-3)。

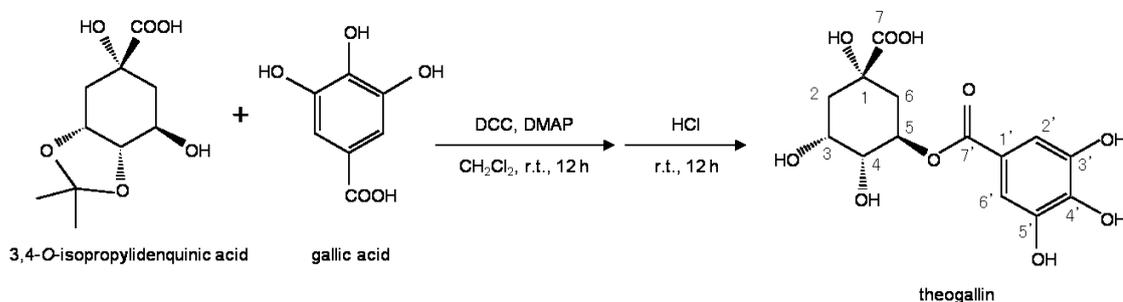


Figure 3-3 Synthetic pathway of theogallin

Gallic acid (1.2 g, 7.1 mmol)、*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (2.0 g, 9.7 mmol) をジクロロメタン 20 mL に溶解した後、3,4-*O*-isopropylidenequinic acid (1.0 g, 4.3 mmol) *N,N*-dimethylamino pyridine (0.2 g, 1.6 mmol) を加え、室温下 12 時間攪拌した。生成した白色沈殿をろ過により除去した後、1N 塩酸 5 mL を加え室温下、12 時間攪拌した。反応後、水層をジクロロメタンで分液し (20 mL x 4)、得られたジクロロメタン層を水 (20 mL x 1)、飽和食塩水 (20 mL x 1) で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒留去後、RP-HPLC で精製した。収率は 42% であった。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; COSY): δ 1.80 [dd, 1H, <sup>2</sup>J = 13.0 Hz, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, H<sub>ax</sub>-C(6)], 1.95 [dd, 1H, <sup>2</sup>J = 13.3 Hz, <sup>3</sup>J = 3.7 Hz, H<sub>ax</sub>-C(2)], 2.06 [m, 2H, H<sub>eq</sub>-C(2), H<sub>eq</sub>-C(6)], 3.59 [m, 1H, H-C(4)], 3.96 [m, 1H, H-C(3)], 4.77 [d, 1H, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, HO-C(3)], 4.93 [d, 1H, <sup>3</sup>J = 5.2 Hz, HO-C(4)], 5.10 [ddd, 1H, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz, <sup>3</sup>J = 4.1 Hz, H-C(5)], 5.55 [s, 1H, HO-C(1)], 6.91 [s, 2H, H-C(2'), H-C(6')], 8.93 [s, 1, HO-C(4')], 9.19 [s, 2H, HO-C(3'), HO-C(5')]; <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>; HMQC, HMBC): δ 36.1 [C(6)], 37.0 [C(2)], 68.1 [C(3)], 70.5 [C(4)], 71.1 ([C(5)]), 73.4 [C(1)], 108.7 [C(2'), C(6')], 119.7 [C(1')], 138.3 [C(4')], 145.3 [C(3'), C(5')], 165.1 [C(7')], 174.7 [C(7)]. LC-MS/MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* 345 (72), 327 (40), 153 (100).

#### 3.1.1.1.2 抹茶うま味画分の調製

抹茶うま味画分調製は Figure 3-4 のフローチャートに従って行った。

抹茶 100g を 80°C の蒸留水 1L で 4 分間抽出した後、得られた濃緑色懸濁液を室温まで急冷した。得られた懸濁液を遠心分離 (3,000 rpm、10 分) した後、上清をろ過、凍結乾燥することにより、抹茶不揮発性画分を得た。さらに、得られた抹茶不揮発性画分を蒸留水 500 mL に溶解し、ジクロロメタン (500 mL x 2)、酢酸エチル (500 mL x 2) で順次抽出した。得られた水層を 2 回凍結乾燥した後、50 v/v% メタノール水溶液 500 mL に懸濁させ、10 分間室温で静置した後、ろ過して沈殿とろ液に分離した。得られたろ液をエバポレーション後、蒸留水に溶解させ、2 回凍結乾燥した後、ギ酸で pH 4.0 に調整した蒸留水 50 mL に溶解し、Phenomenex 社製 ODS RP18 充填ガラスカラム (25-40 μm、100 mm x 40

mm) に 1.1 mL/min の流速で通液した。さらに、pH 4.0 に調整した蒸留水 (50 mL x 10) を通液し、得られた水層を 2 回凍結乾燥することにより抹茶うま味画分を得た。収率は 8% であった。

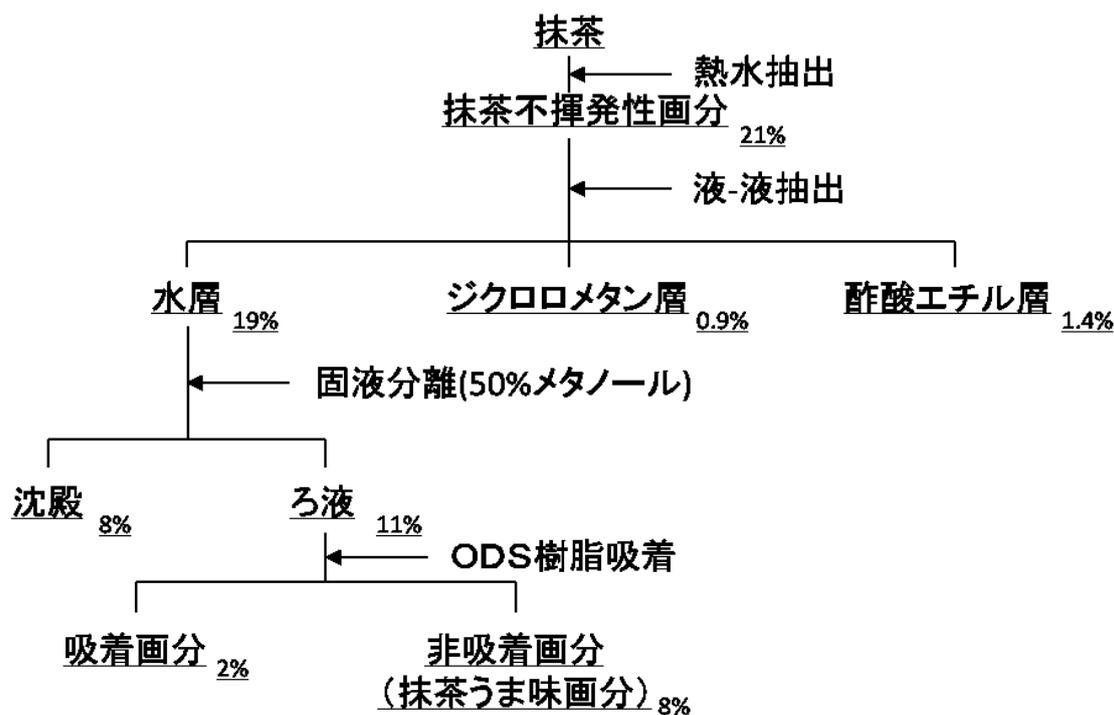


Figure 3-4 Preparation of the mat-cha umami fraction

### 3.1.1.1.3 RP-HPLC 分画

分離精製は、PDA 検出器を備えた BIOTEK 社製 HPLC を用いた。カラムは、Thermo 社製 ODS-Hypersil 100-5C18 (5  $\mu$ m、250 mm x 20 mm i.d.) を用いた。分析は、UV 220nm でモニターしながら、0.1%ギ酸水溶液を 18.0 mL/min の流速で行い、50 分間保持後、10 分間かけてメタノール含量を 100%まで増やした。

試料は、抹茶うま味画分 117 mg を 0.1%ギ酸水溶液 0.8 mL に溶解させ、メンブランろ過後、分取 HPLC に注入した。この測定を 10 回繰り返して 22 画分とし、各画分はエバポレーターで濃縮後、蒸留水を加えて凍結乾燥を 2 回繰り返すことにより各 RP-HPLC 分画画分の凍結乾燥粉末を得た。

#### 3.1.1.1.4 LC-MS/MS

HPLC は、Agilent 社製 Agilent 1100 シリーズを用い、カラムは、Phenomenex 社製 Synerge Fusion-RP (4  $\mu$ m、150 mm x 2.0 mm i.d.) を用いた。クロマトグラフィーは、0.1%ギ酸を含む 98%メタノール水溶液を 1.0 mL/分の流速で行った。MS 部は Applied Biosystems 社 API 4000 Q-Trap を用いた。スプレー電圧は 5500V、クラスタ分離電位 30V、イオン化は ESI<sup>+</sup>モードで行った。

#### 3.1.1.1.5 NMR

Bruker 社製 DMX-400 を用いた。DMSO-*d*<sub>6</sub> を重溶媒に用い、化学シフトは trimethylsilane を内部標準物質に使用して測定した。

#### 3.1.1.1.6 官能評価

官能評価者は小川香料 (株) の 12 名の社員を選抜した。基本 5 味及び渋味識別の官能評価訓練は pH を 6.0 に調整した蒸留水 2 mL を用い、3 点識別法により行った。各呈味標準物質としては、以下の化合物を用いた。甘味 (50 mmol/L sucrose)、酸味 (20 mmol/L lactic acid)、塩味 (20 mmol/L NaCl)、苦味 (1 mmol/L caffeine)、うま味 (8 mmol/L MSG)、渋味 (0.01 mmol/L quercetin-3-rutinoside)。官能評価試験は、19~22°C に調節された専用官能評価ブースにて行った。評価試料はそれぞれ抽出・分画の収率を元に抹茶浸出液中の濃度相当に希釈して用いた。希釈は pH=6.0 に調製した蒸留水を用いた。評価は 0 (弱い) ~5 (強い) の尺度で行った。

各 RP-HPLC 画分の MSG 水溶液に対するうま味増強効果の評価は、3 mM MSG 水溶液に各 HPLC 画分をそれぞれの収率を元に抹茶浸出液中の濃度相当加えた試料を 3 mM MSG 水溶液と比較することにより行った。評価は 3 mM MSG 水溶液のうま味強度を 1 とし、0 (弱い) ~5 (強い) の尺度で行った。

### 3.1.1.2 結果と考察

#### 3.1.1.2.1 抹茶うま味画分の回収

抹茶浸出液からうま味画分を回収するために、まず、有機溶媒との液液分配により、色素成分及び香気成分の分離を行った（Figure 3-4）。続いて、多糖を分離するために、50%メタノール水溶液に懸濁させて固液分離を行った。さらに、得られたろ液に多量に含まれるカテキン類を除去するために、ODS樹脂吸着を行い、非吸着画分を回収した。

このようにして得られた非吸着画分（抹茶うま味画分）と抹茶浸出液の官能評価を行った（Figure 3-5）。抹茶浸出液は苦味（3.8）、渋味（3.2）とともに強いうま味（3.2）を有しており、うま味は抹茶の呈味の重要な構成要素であることが確認できた。一方、抹茶うま味画分は抹茶浸出液とほぼ同等の強いうま味（2.8）を有していたが、他の呈味はわずかな甘味（0.4）以外認められなかった。このことから、抹茶浸出液の液液分配、沈殿分離、逆相系固相カラム抽出を連続的に行うことにより、効率的に抹茶のうま味に関与する成分を回収することができたといえる。

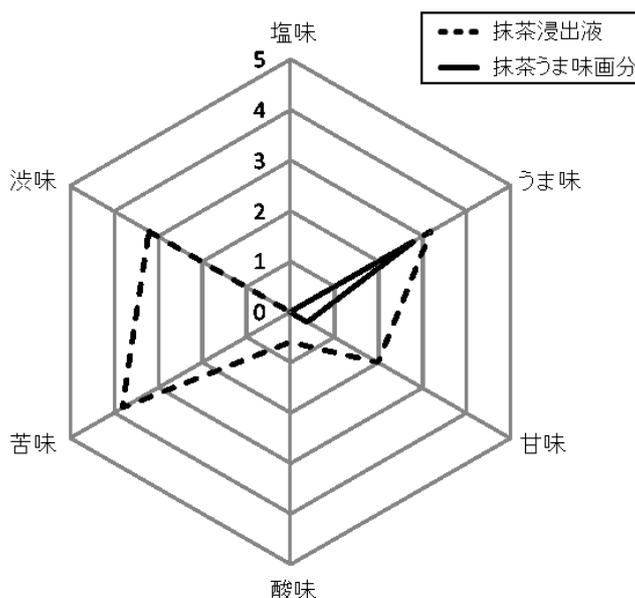


Figure 3-5 Taste profile of the mat-cha infusion and the mat-cha umami fraction

### 3.1.1.2.2 抹茶うま味画分の RP-HPLC 分画によるうま味寄与画分の特定

抹茶のうま味寄与成分を特定するために、抹茶うま味画分を RP-HPLC にて分離・精製し、Figure 3-6 に示す 22 の画分に分画した。

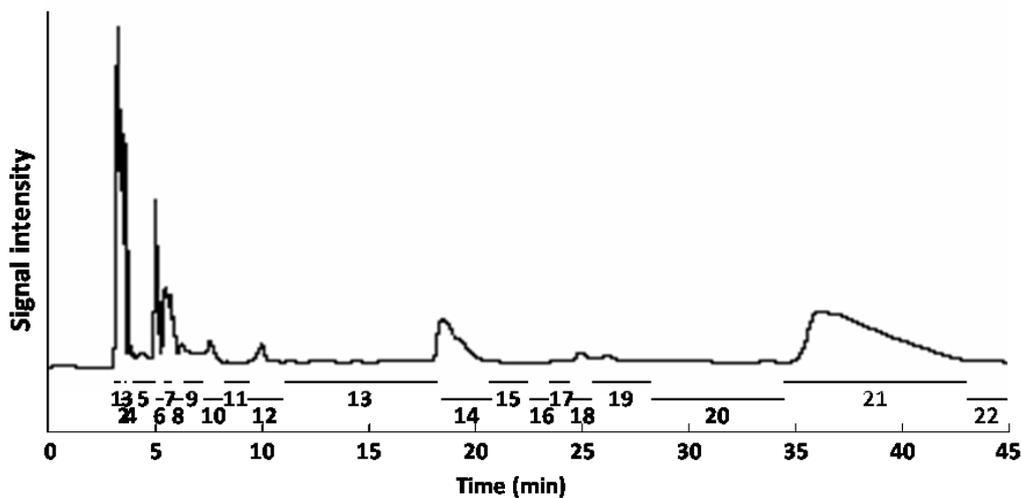


Figure 3-6 Preparative RP-HPLC chromatogram of the mat-cha umami fraction (UV = 220 nm)

得られた各画分をエバポレーション及び 2 回の凍結乾燥後、それぞれ収率に応じて濃度調製した各画分を 3 mM MSG 水溶液に添加し、うま味の強さを評価したところ (Figure 3-7)、第 3、第 4、第 8、第 13、第 14、第 21 画分にうま味強度を強める効果が認められた。

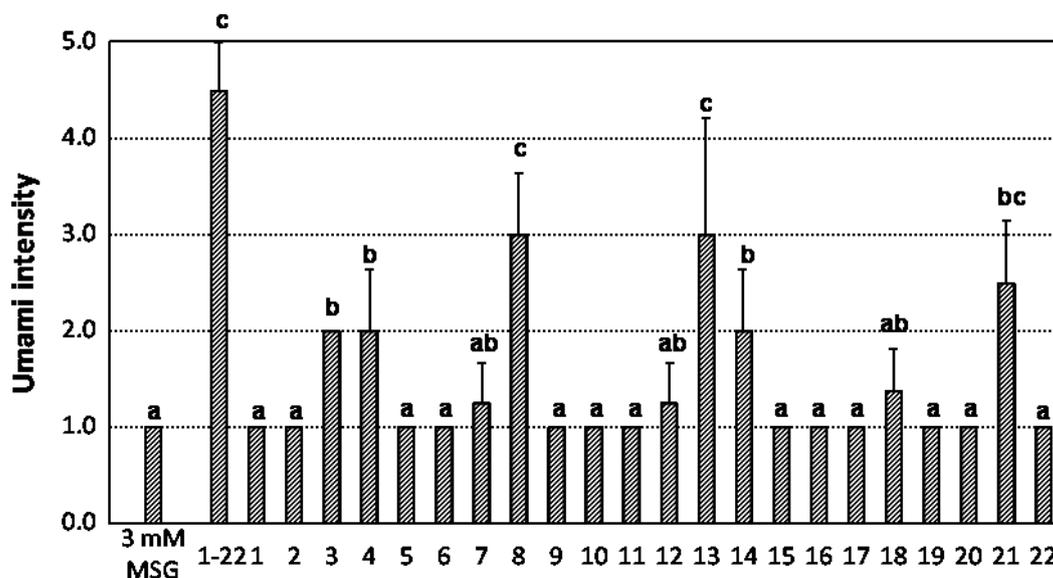


Figure 3-7 Umami enhancement activity of the RP-HPLC fractions to a 3 mM MSG solution (a,b,c: different letters show significant differences ( $p < 0.05$ ))

### 3.1.1.2.3 うま味寄与化合物の同定又は推定

第3、第4画分は未だ複数の成分を含んでいたが、アミノ酸分析より L-glutamic acid (1)が検出されたため、第3、第4画分のうま味寄与成分は L-glutamic acid (1)であると推察された (Figure 3-8)。

他の画分は、LC-MS/MS、NMR 分析により同定を行った。第8、第14、及び第21画分はそれぞれほぼ単一成分から成り立っており、第8画分より L-theanine (2)、第14画分より gallic acid (3)、第21画分より theogallin (4)をそれぞれ同定した。

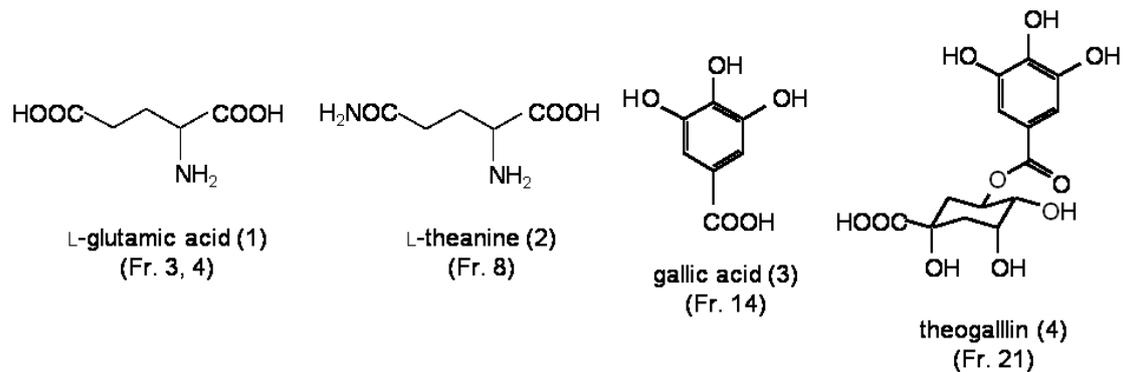


Figure 3-8 Umami and umami enhancing compounds in mat-cha

本研究にてうま味寄与成分として同定した L-theanine (2)は、L-glutamic acid (1)のエチルアミドであり、その構造上の類似性から抹茶を含む緑茶のうま味成分として一般的に認知されている(Figure 3-8)。しかしながら、L-theanine (2)のうま味の検知閾値 (24.0 mmol/L) は抹茶浸出液中の濃度 (3.4 mmol/L) よりもはるかに高く、L-theanine (2)が抹茶のうま味に直接的に関与しているとは考えにくい。一方、L-theanine (2)は 3.0 mM MSG 水溶液のうま味を強めたことから、抹茶中では、うま味増強化合物として呈味に関与している可能性が高い。

また、gallic acid (3)及び theogallin (4)は緑茶に含まれるポリフェノールとしてよく知られているが、それらの緑茶の呈味への関与はこれまで不明であった。これらの成分はいずれも単独では、渋味を有しているが、本研究により抹茶浸出液中の濃度で 3.0 mM MSG 水溶液のうま味を増強することが明らかとなった。とりわけ theogallin (4)は、その構造に関する報告はなく、本研究で初めて NMR 及び LC-MS を測定し、化学構造を明らかにすることができた (Figure 3-9)。

また、第 13 画分は未だ多くの化合物を含有していたため、主要成分の単離は出来なかった。

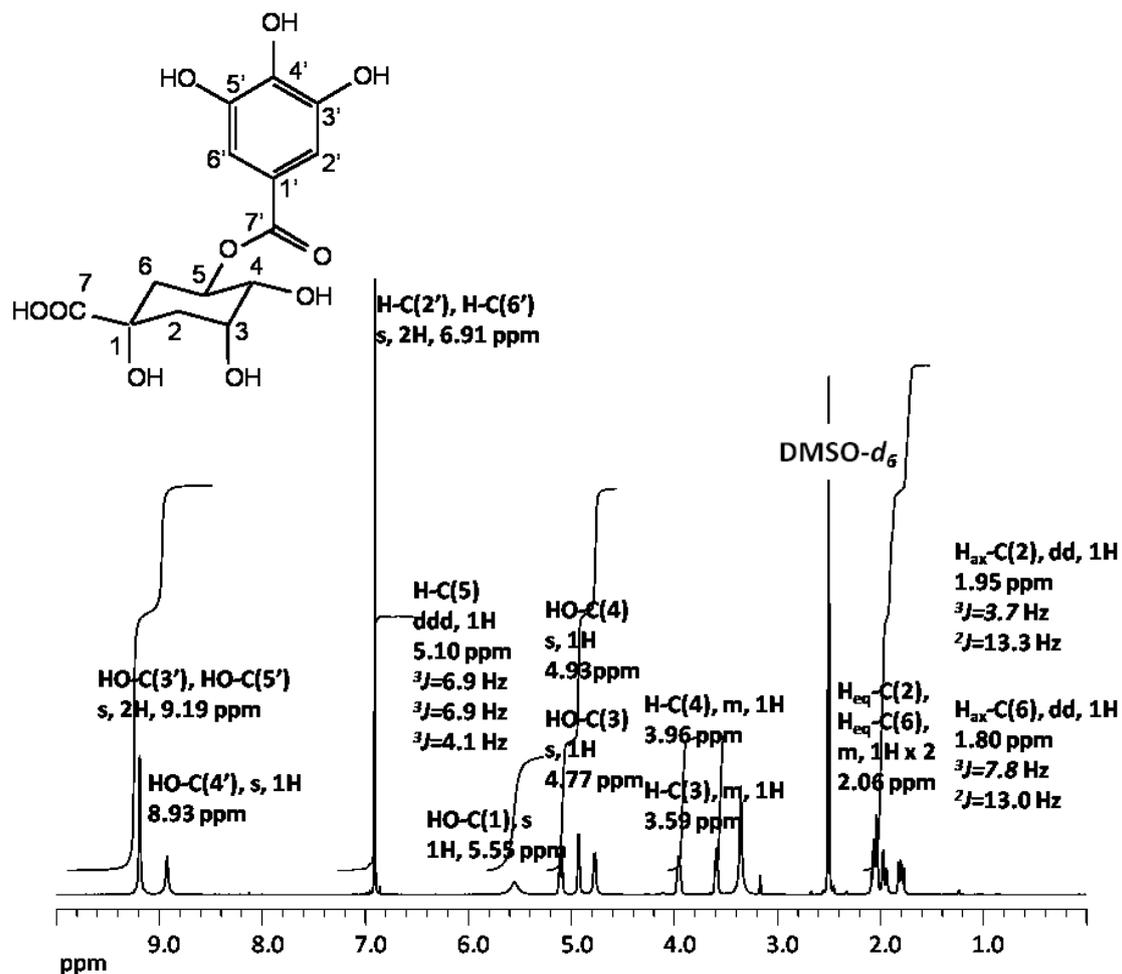


Figure 3-9 NMR spectrum of theogallin isolated from the fraction 21

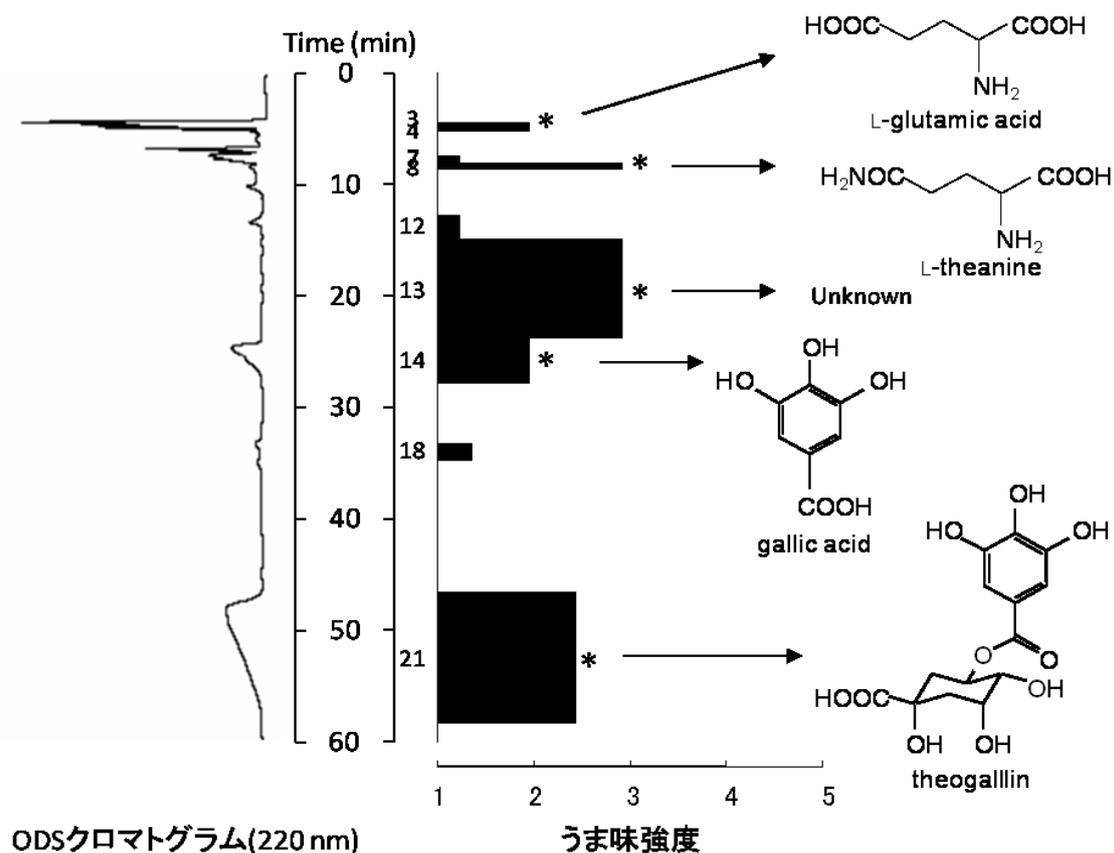
### 3.1.2 結論

呈味寄与成分探索手法として有効性が提唱されている TDA を応用し、分画した食品の呈味成分を MSG 水溶液に添加し、評点法の官能評価を行うことにより、効率的にうま味寄与成分をスクリーニングすることができた (Figure 3-10)。

抹茶では従来知られていた L-glutamic acid に加えて、L-theanine や gallic acid、theogallin がうま味増強効果を有することが明らかになった。中でも、L-theanine は一般に抹茶を含む緑茶のうま味成分として知られている成分であるが、抹茶浸出液中の L-theanine 濃度は検知閾値の 1/7 程度であり、直接的にはうま味に関与していないことが明らかとなった。また、茶ポリフェノールの 1 つとして

知られている theogallin は、呈味効果に関する報告が全くなかった成分であり、非常に興味深い知見である。

一般に、食品中に含まれる不揮発性成分は非常に多岐に亘る構造を有するため、網羅的に分析を行うことは困難である。また、それら個々の成分の呈味の質、強度を推察することはさらに困難である。したがって、本章で述べたように官能評価と成分分離、成分分析を組み合わせるスクリーニングを行う手法は、食品のうま味に關与する成分を効率的に見出す手法として非常に有用であることが判明し、さまざまな食品への適用が可能である。



\* : 3 mM MSG水溶液と有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた画分

Figure 3-10 Screening methodology for umami contributing compounds in mat-cha

## 3.2 醤油

醤油は基本5味をバランスよく有する調味料であるといわれている。

濃口醤油の呈味成分と考えられる不揮発性成分の主要成分は、ミネラル、アミノ酸、有機酸、糖であるが、これらの成分と醤油の呈味の間関係を明らかにした研究報告はほとんどない<sup>54)</sup>。また、醤油の呈味に関わる品質は、全窒素分や無塩可溶性固形分などの間接的な規格で評価されているため、醤油の呈味寄与成分を化合物レベルで明らかにすることは、醤油の風味をより深く理解する上で重要であるばかりでなく、産業上も非常に役立つ知見となる。

### 3.2.1 醤油のうま味寄与成分の解明

1.3.3.5 で述べたように、醤油のうま味は醤油の品質に影響を与える重要な構成要素の1つであるにもかかわらず、うま味寄与成分は十分に明らかにされていない。

そこで、3.1.1 でうま味寄与成分の探索手法として有効性が確認された TDA を応用した手法を濃口醤油に適用し、うま味寄与成分のスクリーニング及び単離、同定を行うことにした。さらに、それらの化合物の醤油のうま味への関与を検証するためにモデル醤油を作成し、官能評価を行った。

#### 3.2.1.1 実験方法

##### 3.2.1.1.1 実験材料

実験材料として、市販の濃口醤油（丸新本家（株）、和歌山）を使用した。同定に使用した標準化合物は、*N*-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-pyroglutamic acid (Fru-pGlu)、*N*-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-valine (Fru-Val)、*N*-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-methionine (Fru-Met)、を除き、試薬会社より購入した。Fru-pGlu、Fru-Val、Fru-Met は文献に従って合成した(Figure 3-11)<sup>122)</sup>。

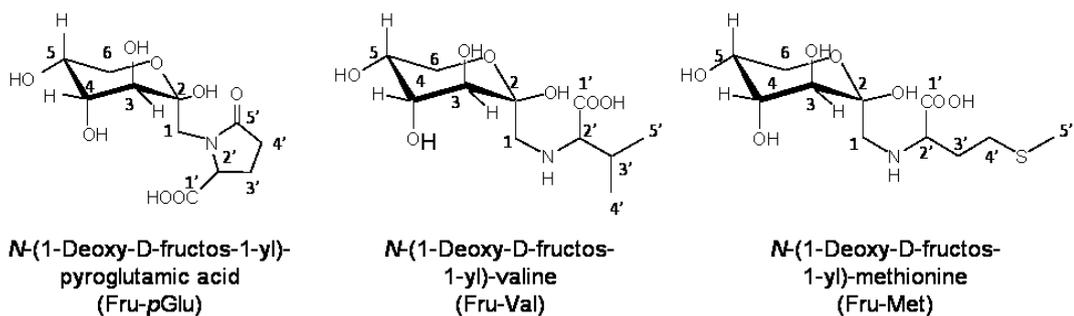


Figure 3-11 Chemical structure of synthesized amadori compounds of Fru-pGlu, Fru-Val, and Fru-Met

Fru-pGlu :  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $D_2O$ ; COSY) :  $\delta$  2.13 [m, 1H, H-C(3')], 2.43-2.62 [m, 3H, H-C(3'), H-C(4')], 3.18-4.11 [7H, H-C(1), H-C(3), H-C(4), H-C(5), H-C(6)], 4.56 [dd, 0.24H,  $^3J = 8.70$  Hz,  $^3J = 2.70$  Hz, H-C(2') in  $\alpha$ -furanose], 4.61 [d, 0.12H,  $^3J = 8.25$  Hz, H-C(2') in  $\beta$ -furanose], 4.67 [dd, 0.64H,  $^3J = 9.15$  Hz,  $^3J = 2.75$  Hz, H-C(2') in  $\beta$ -pyranose].  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  23.1 [C(3) in  $\beta$ -pyranose], 23.2 [C(3) in  $\alpha$ -pyranose], 23.7 [C(3) in  $\beta$ -furanose], 29.5 [C(4') in  $\beta$ -pyranose], 46.1 [C(1) in  $\alpha$ -furanose], 48.0 [C(1) in  $\beta$ -furanose], 48.1 [C(1) in  $\beta$ -pyranose], 61.2 [C(6) in  $\alpha$ -furanose], 61.9 [C(2') in  $\alpha$ -furanose], 62.4 [C(2') in  $\beta$ -furanose], 62.6 [C(2') in  $\beta$ -pyranose], 62.9 [C(6) in  $\beta$ -furanose], 63.7 [C(6) in  $\beta$ -pyranose], 69.5 [C(5) in  $\beta$ -pyranose], 69.9 [C(3), C(4) in  $\beta$ -pyranose], 75.0 [C(4) in  $\beta$ -furanose], 76.5 [C(4) in  $\alpha$ -furanose], 77.8 [C(3) in  $\beta$ -furanose], 80.7 [C(5) in  $\beta$ -furanose], 82.3 [C(5) in  $\alpha$ -furanose], 82.5 [C(3) in  $\alpha$ -furanose], 98.6 [C(2) in  $\beta$ -furanose], 101.4 [C(2) in  $\beta$ -furanose], 104.8 [C(2) in  $\alpha$ -furanose], 176.4 [C(1') in  $\beta$ -furanose], 176.8 [C(1') in  $\alpha$ -furanose], 177.0 [C(1') in  $\beta$ -pyranose], 180.4 [C(5') in  $\beta$ -furanose], 180.6 [C(5') in  $\beta$ -pyranose].

Fru-Val :  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $D_2O$ ; COSY) :  $\delta$  0.96 [3H, H-C(4')], 1.04 [3H, H-C(5')], 2.20 [1H, H-C(3')], 3.23-3.36 [2H, H-C(1)], 3.47-4.18 [6H, H-C(3), H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(2')].  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  16.8 [C(5') in  $\alpha$ -pyranose], 17.1 [C(5') in  $\beta$ -pyranose], 17.2 [C(5') in  $\beta$ -furanose], 17.3 [C(5') in  $\alpha$ -furanose], 18.3 [C(4') in  $\alpha$ -furanose], 18.5 [C(4') in  $\beta$ -furanose], 18.6 [C(4') in  $\alpha$ -pyranose and  $\beta$ -pyranose], 29.0 [C(3') in  $\beta$ -furanose,  $\alpha$ -furanose,

and  $\alpha$ -pyranose], 29.1 [C(3') in  $\beta$ -pyranose], 49.1 [C(1) in  $\alpha$ -pyranose], 51.4 [C(1) in  $\beta$ -furanose], 52.4 [C(1) in  $\alpha$ -furanose], 53.4 [C(1) in  $\beta$ -pyranose], 60.9 [C(6) in  $\alpha$ -furanose], 62.0 [C(6) in  $\beta$ -furanose], 62.9 [C(6) in  $\alpha$ -pyranose], 64.0 [C(6) in  $\beta$ -pyranose], 65.8 [C(5) in  $\alpha$ -pyranose], 68.7 [C(2') in  $\beta$ -furanose], 68.9 [C(2') in  $\alpha$ -furanose], 69.0 [C(2') in  $\beta$ -pyranose], 69.0 [C(5) in  $\beta$ -pyranose], 69.4 [C(4) in  $\beta$ -pyranose], 70.3 [C(3) in  $\beta$ -pyranose], 70.4 [C(3) in  $\alpha$ -pyranose], 72.2 [C(4) in  $\alpha$ -pyranose], 74.0 [C(4) in  $\beta$ -furanose], 76.0 [C(4) in  $\alpha$ -furanose], 78.2 [C(3) in  $\beta$ -furanose], 81.1 [C(5) in  $\beta$ -furanose], 82.6 [C(5) in  $\alpha$ -furanose], 82.7 [C(3) in  $\alpha$ -furanose], 95.4 [C(2) in  $\beta$ -pyranose], 96.1 [C(2) in  $\alpha$ -pyranose], 98.9 [C(2) in  $\beta$ -furanose], 101.6 [C(2) in  $\alpha$ -furanose], 167.8 [C(1') in  $\alpha$ -pyranose], 172.3 [C(1') in  $\beta$ -pyranose], 172.4 [C(1') in  $\beta$ -furanose], 172.4 [C(1') in  $\alpha$ -furanose].

Fru-Met :  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $D_2\text{O}$ ; COSY) :  $\delta$  2.12 [3H, H-C(5')], 2.17-2.22 [2H, H-C(4')], 2.61-2.65 [2H, H-C(3')], 3.27-3.33 [1H, H-C(1)], 3.63-4.20 [6H, H-C(3), H-C(4), H-C(5), H-C(6), H-C(2')].  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (100 MHz,  $D_2\text{O}$ ; HMQC, HMBC):  $\delta$  14.2 [C(5')], 28.6 [C(4') in  $\beta$ -furanose], 28.7 [C(4') in  $\alpha$ -furanose], 28.8 [C(4') in  $\beta$ -pyranose], 29.0 [C(4') in  $\alpha$ -pyranose], 29.2 [C(3') in  $\beta$ -pyranose], 29.2 [C(3') in  $\alpha$ -furanose], 29.3 [C(3') in  $\beta$ -furanose], 29.4 [C(3') in  $\alpha$ -pyranose], 48.2 [C(1) in  $\alpha$ -pyranose], 50.7 [C(1) in  $\beta$ -furanose], 51.8 [C(1) in  $\alpha$ -furanose], 52.8 [C(1) in  $\beta$ -pyranose], 61.0 [C(6) in  $\alpha$ -furanose], 62.0 [C(2') in  $\beta$ -furanose], 62.2 [C(6) in  $\beta$ -furanose], 62.5 [C(2') in  $\beta$ -pyranose], 63.2 [C(6) in  $\alpha$ -pyranose], 64.0 [C(6) in  $\beta$ -pyranose], 66.1 [C(5) in  $\alpha$ -pyranose], 69.0 [C(5) in  $\beta$ -pyranose], 69.5 [C(4) in  $\beta$ -pyranose], 70.0 [C(3) in  $\beta$ -pyranose], 70.4 [C(3) in  $\alpha$ -pyranose], 72.2 [C(4) in  $\alpha$ -pyranose], 74.2 [C(4) in  $\beta$ -furanose], 76.2 [C(4) in  $\alpha$ -furanose], 78.1 [C(3) in  $\beta$ -furanose], 81.0 [C(5) in  $\beta$ -furanose], 82.6 [C(5) in  $\alpha$ -furanose], 82.8 [C(3) in  $\alpha$ -furanose], 95.4 [C(2) in  $\beta$ -pyranose], 96.3 [C(2) in  $\alpha$ -pyranose], 98.9 [C(2) in  $\beta$ -furanose], 101.8 [C(2) in  $\alpha$ -furanose], 168.1 [C(1') in  $\alpha$ -pyranose], 172.8 [C(1') in  $\beta$ -pyranose], 172.9 [C(1') in  $\beta$ -furanose and  $\alpha$ -furanose].

### 3.2.1.1.2 濃口醤油うま味寄与成分の分離・精製

Figure 3-12 に示す方法に従って、濃口醤油うま味寄与成分の分離・精製を行った。

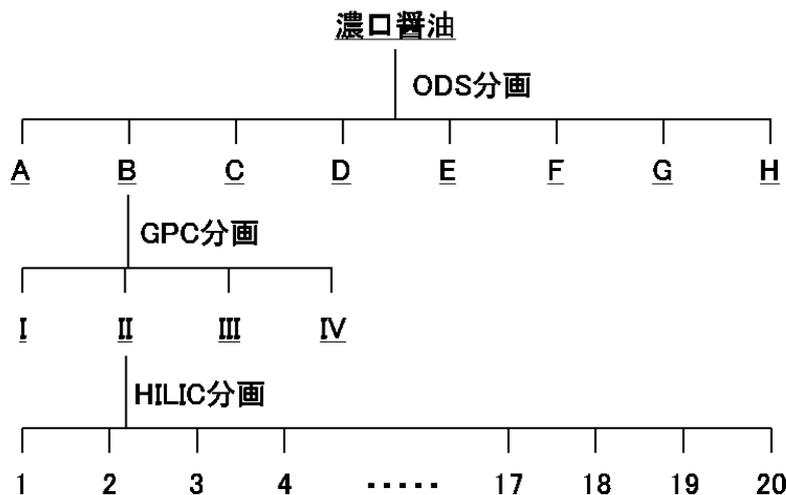


Figure 3-12 Separation flow chart of umami compounds in soy sauce

#### 3.2.1.1.2.1 RP-HPLC による濃口醤油の不揮発性成分の分離精製

濃口醤油不揮発性成分の分離精製は、PDA 検出器を備えた島津社製 LC-10Avp シリーズを用いて行った。カラムは、富士シリシア社製 ODS RP18 (10  $\mu$ m, 250 mm x 20 mm i.d.) を用いた。分析は、UV 214nm でモニターしながら、0.1%ギ酸を含む 3%メタノール溶液を 12.0 mL/min の流速で行い、5 分間保持後、15 分間かけてメタノール含量を 15%まで増やした。その後 10 分間かけてメタノール含量を 100%まで増やした。

試料は、1 回の分析で濃口醤油を 2 mL 注入し、計 100 回繰り返し実験を行った。画分は A~H の 8 つに分け、各画分はエバポレーターで濃縮後、蒸留水を加えて凍結乾燥を 2 回繰り返し行うことにより得た。

#### 3.2.1.1.2.2 GPCによる画分 B の分離精製

画分 B の精製は、3.2.1.1.2 と同様に島津社製 LC-10Avp シリーズを用いて行った。カラムは、GE ヘルスケア社製 Sephadex G-10 (55-165  $\mu\text{m}$ ) をスチール製カラム (500 mm x 22 mm i.d.) に充填したものを用いた。分析は、示差屈折検出器でモニターしながら、0.1%ギ酸水溶液を 0.5 mL/min の流速で行った。

試料は、1 回の分析で凍結乾燥した画分 B 5%水溶液を 2 mL 注入し、計 10 回繰り返し実験を行った。画分は B-I~B-IV の 4 つに分け、各画分は凍結乾燥を 2 回繰り返し行うことにより得た。

#### 3.2.1.1.2.3 HILICによる画分 B-II の分離精製

画分 B-II の精製は、3.2.1.1.2 と同様に島津社製 LC-10Avp シリーズを用いて行った。カラムは、日本ウォーターズ社製 Atlantis HILIC Silica (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.d.) を用いた。分析は、UV 214 nm でモニターしながら、0.1%ギ酸を含む 95%アセトニトリル水溶液を 1.0 mL/min の流速で行い、16.7 分間かけてアセトニトリル含量を 91.5%まで減らした。その後 1.3 分で急速にアセトニトリル含量を 70%まで減らし、15 分間保持した。

試料は、1 回の分析で凍結乾燥した画分 B 5%水溶液を 0.5 mL 注入し、計 32 回繰り返し実験を行った。画分は B-II-1~B-II-20 の 20 画分に分け、各画分は凍結乾燥を 2 回繰り返し行うことにより得た。

#### 3.2.1.1.3.4 B-II-6 画分中の Fru-pGlu 及び pGlu-Gly の単離

画分 B-II-6 の分離精製は、3.2.1.2 と同様に島津社製 LC-10Avp シリーズを用いて行った。カラムは、日本ウォーターズ社製 Atlantis HILIC Silica (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm i.d.) を用いた。分析は、UV 214 nm でモニターしながら、0.1%ギ酸を含む 98%アセトニトリル水溶液を 1.0 mL/min の流速で行い、20 分間保持後、

40 分間かけてアセトニトリル含量を 86%まで減らした。Fru-pGlu と pGlu-Gly はそれぞれ 46-48.4 分、48.4-52 分の画分から得られた。

試料は、1 回の分析で凍結乾燥した画分 B-II-6 1%水溶液を 50  $\mu$ L 注入し、計 10 回繰り返し実験を行った。各画分は凍結乾燥を 2 回繰り返し行うことにより得た。

#### 3.2.1.1.2.5 B-II-19 画分中の Fru-Val 及び Fru-Met の単離

画分 B-II-19 の分離精製は、3.2.1.2 と同様に島津社製 LC-10Avp シリーズを用いて行った。カラムは、野村化学社製 Develosil C30-UG (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm i.d.) を用いた。分析は、UV 214nm でモニターしながら、0.1%ギ酸水溶液を 1.0 mL/min の流速でアイソクラティック条件にて行った。Fru-Val と Fru-Met はそれぞれ 6.8-7.6 分、11.0-11.8 分の画分から得られた

試料は、1 回の分析で凍結乾燥した画分 B-II-19 1%水溶液を 50  $\mu$ L 注入し、計 20 回繰り返し実験を行った。各画分は凍結乾燥を 2 回繰り返し行うことにより得た。

#### 3.2.1.1.3 定量分析

アミノ酸の定量は、日立ハイテック社製 L-8500A アミノ酸分析計を用いて行った<sup>20)</sup>。有機酸の定量は、島津社製 LC-10Avp シリーズを用い、カラムは島津社製 Shim-pack SCR-102H (7  $\mu$ m, 300 x 8.0 mm i.d., 2 本)、検出器は電気伝導度検出器を用いた<sup>8)</sup>。ミネラル類の定量は、島津社製 LC-10Avp シリーズを用い、カラムは島津社製 Shim-pack IC-C3 (7  $\mu$ m, 100 x 4.6 mm i.d.)、検出器は電気伝導度検出器を用いた<sup>9)</sup>。塩素の定量は、電位差測定法を用いた<sup>12)</sup>。糖類の定量は、Agilent 1200 シリーズを用い、カラムは、昭和電工社製 Asahipak NH2P-50 4E (5  $\mu$ m, 250 mm x 4.6 mm i.d.) を用い、検出器は示差屈折検出器を用いた。分析は、示差屈折検出器でモニターしながら、アイソクラティック条件で 80% アセトニトリル水溶液を 1.0 mL/min の流速で 40 分間行った。pGlu-Gln、pGlu-Gly、Fru-pGlu、Fru-Val、Fru-Met の定量は日本ウォーターズ社製 Micromass

LCT premier system (LC-TOFMS)を用いて行った。カラムは、日本ウォーターズ社製 Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 2.1 mm i.d.) を用いた。

#### 3.2.1.1.4 LC-TOF-MS 測定

日本ウォーターズ社製 Micromass LCT premier system を用いた。カラムは、日本ウォーターズ社製 Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 2.1 mm i.d.) を用いた。イオン化は ESI<sup>+</sup>モードを用い、分析は 0.1%ギ酸を含む 97%メタノール水溶液を 0.5 mL/min の流速で行い、2 分間保持後、3 分間かけてメタノール含量を 100%まで増やし、5 分間保持した。

TOF-MS はギ酸ナトリウムで校正した後、以下の条件で分析を行った。Electrospray: positive mode、MS capillary voltage: 3000 V、sample cone: 50 V、source temperature: 100、cone gas flow: 50 L/h、desolvation gas temperature: 350°C、desolvation gas flow: 800 L/h、internal reference: leucine enkephalin、protonated peak: 556.2771、scan: m/z 100 - 1000、scan speed: 0.5 s/scan。

#### 3.2.1.1.5 NMR

Bruker 社製 AVANCE-400 を用いた。 $\text{D}_2\text{O}$  を重溶媒に用い、化学シフトはメタノールを内部標準物質に使用して測定した。

#### 3.2.1.1.6 官能評価

基本 5 味及び渋味の官能評価は 3.1.1.1.6 に記載の方法で行った。醤油の官能評価は、醤油を蒸留水で 5 倍に希釈して用いた。醤油の RP-HPLC 分画面分は pH=4.5 に調製した蒸留水でそれぞれの収率に応じて醤油の 1/5 濃度相当に希釈して評価に用いた。評価は 0 (弱い) ~5 (強い) の尺度で行った。

各 HPLC 分画面分の MSG に対するうま味増強効果の評価は、3.1.1.1.6 に記載の方法で行った。標準溶液には 6.0 mM MSG 水溶液を用いた。

#### 3.2.1.1.7 閾値測定

ピログルタミンペプチド及びアマドリ化合物の呈味閾値は3点識別法により行った。蒸留水に化合物を溶解させた試料と無添加の蒸留水2試料を用い、ブラインド条件下、異なる呈味を有する試料を選択させた。濃度は1/2ずつ希釈し、判別できた濃度と判別できなかった濃度の平均値を各パネリストの検知閾値とした。各化合物の検知閾値は全パネリストの閾値の平均値とした。呈味質の評価は閾値濃度の4倍濃度にて行った。

#### 3.2.1.1.8 うま味再構築実験

5倍に希釈した醤油とTable 3-1に示す成分分析結果から再構成した再構築溶液の呈味を評価した。評価は0（弱い）～5（強い）の尺度で行った。

Table 3-1 Concentration of minerals, organic acids, amino acids, and sugars in Japanese Koikuchi-type soy sauce

compound	concentration <sup>*1</sup> (mmol/L)	one-fifth concentration <sup>*1</sup> (mmol/L)	RSD <sup>*2</sup> (%)
Minerals			
Na	2723.0	544.7	0.1
K	103.3	20.7	0.2
Mg	36.6	7.3	0.5
Ca	8.8	1.8	1.0
Cl	2576.7	515.3	1.0
Organic acids			
phosphoric acid	61.6	12.3	0.6
malic acid	5.5	1.1	0.8
succinic acid	1.4	0.3	3.9
lactic acid	257.7	51.5	0.3
acetic acid	30.5	6.1	0.8
pyroglutamic acid	45.6	9.1	1.0
Sugars			
glucose	85.9	17.2	1.7
fructose	10.6	2.1	5.4
Amino acids			
L-aspartic acid	30.8	6.2	0.2
L-threonine	29.2	5.8	0.2
L-serine	52.9	10.6	0.3
L-glutamic acid	104.0	20.8	0.1
glycine	36.0	7.2	0.3
L-alanine	74.1	14.8	0.3
L-valine	45.3	9.1	0.4
L-methionine	7.7	1.5	0.3
L-isoleucine	36.2	7.2	0.1
L-leucine	58.0	11.6	0.2
L-phenylalanine	28.2	5.6	0.2
L-lysine	26.0	5.2	0.2
L-histidine	10.6	2.1	0.2
L-arginine	8.1	1.6	0.3
L-proline	71.4	14.3	0.3

<sup>\*1</sup> Mean value in triplicate measurements.

<sup>\*2</sup> RSD, relative standard deviation.

### 3.2.1.2 結果と考察

#### 3.2.1.2.1 醤油の官能評価と再構築実験

醤油の主要な不揮発性成分であるミネラル、アミノ酸、有機酸、糖の醤油の呈味への寄与を明らかにするために、5倍希釈した醤油と Table 3-1 で示した定量値を元に再構築したモデル醤油溶液の官能評価を行った (Figure 3-13)。醤油で最も呈味強度が高かったのは塩味であり(4.0)、続いてうま味(3.3)、酸味(2.1)、渋味(1.8)、苦味(1.4)であった。また、甘味が最も弱く 1.3 であった。うま味は、塩味に続いて強く、濃口醤油の呈味の中で非常に重要であることが判明した。

また、醤油と再構築溶液の基本 5 味と渋味を比較すると、うま味のみ有意差が認められた。このことは、醤油のうま味にこれらの再構成した成分以外の成分も関与していることを示唆している。

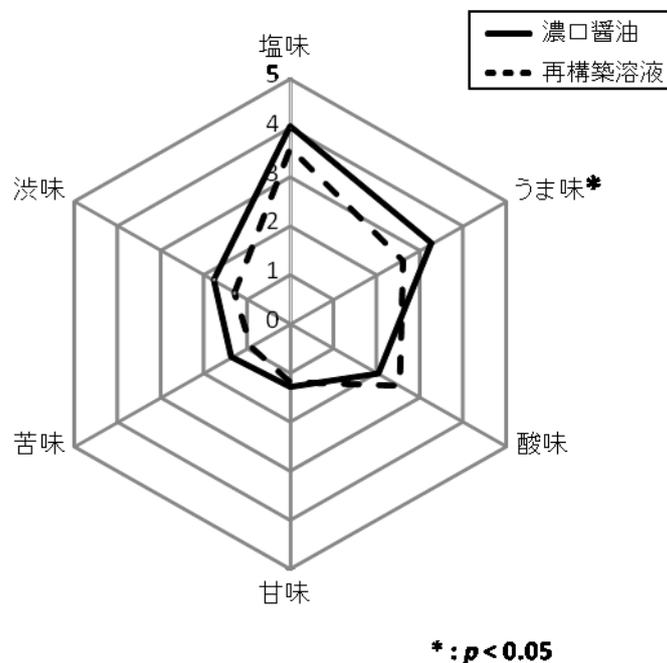


Figure 3-13 Taste profiles of koikuchi-type soy sauce and its reconstituted solution

### 3.2.1.2.2 醤油の RP-HPLC 分画によるうま味寄与画分の特定

醤油は抹茶と異なり、比較的極性の低いクロロフィルのような色素成分やカテキン類のようなポリフェノールをあまり含有していないことが予想されたため、Figure 3-4 で行った分離精製を行わずに、直接分取 RP-HPLC を用いて A~H の 8 画分に分画した (Figure 3-14)。

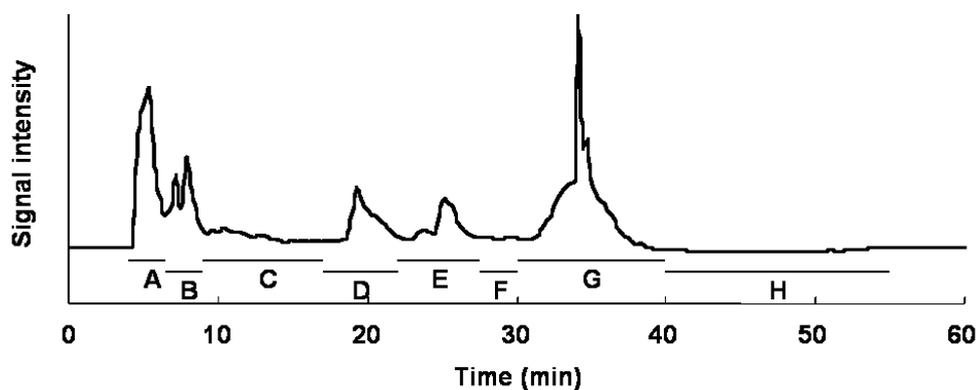


Figure 3-14 Preparative RP-HPLC chromatogram of soy sauce (UV = 214 nm)

凍結乾燥後、個々の画分を水に溶解し、呈味評価を行った (Figure 3-15)。8 画分のうち、画分 A が最も強いうま味強度(1.9)を示したのに対し、他の 7 画分はほとんどうま味を示さなかった。また、醤油そのもののうま味スコアは 3.3 であり、唯一うま味を示した画分 A を含めたすべての画分と有意差が認められた。しかしながら、醤油と画分 A~H までを再構築した溶液とは有意差が認められなかったことから、単独ではうま味を呈さなかった画分 B~H には、画分 A のうま味を増強する化合物が存在する可能性が示唆された。

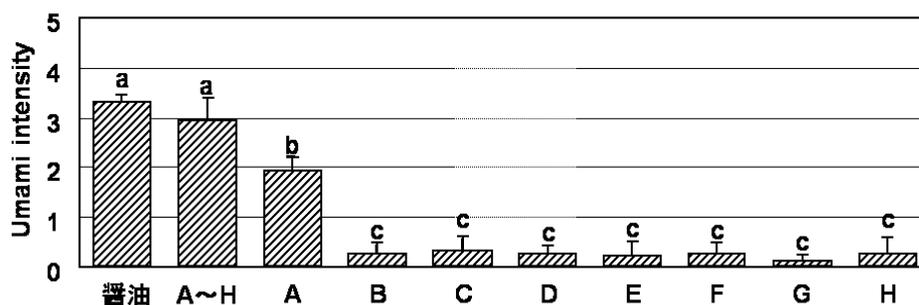


Figure 3-15 Umami intensities of soy sauce and the RP-HPLC fractions (a,b,c: different letters show significant differences ( $p<0.05$ ))

そこで、醤油中のうま味増強化合物を特定するために、画分 A~H を 6.0 mM MSG 溶液に添加し、6.0 mM MSG 溶液のうま味強度を基準にスクリーニングを行った。Figure 3-16 に示すように、単独でうま味を示した画分 A 以外に、それ自身うま味を示さなかった画分 B を添加することにより、MSG 溶液のうま味強度が有意に増加した。このことから、画分 B に MSG のうま味を強めることによって醤油のうま味を強める化合物が含まれていることが示唆された。

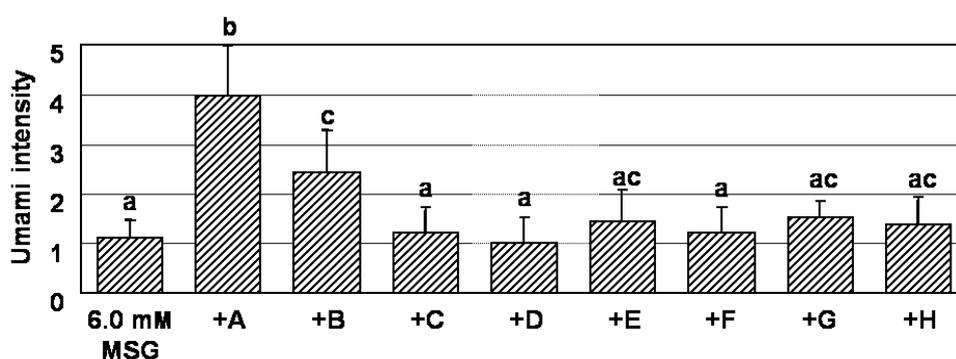


Figure 3-16 Umami enhancement activity of the RP-HPLC fractions to a 6.0 mM MSG solution (a,b,c: different letters show significant differences ( $p<0.05$ ))

また、各画分の収率を Table 3-2 に示した。画分 A の収率が他の画分に比べて圧倒的に高く、濃口醤油の不揮発性成分の大部分は高極性成分で成り立っていることが明らかとなった。

Table 3-2 Yields of the RP-HPLC fractions from the soy sauce

fraction	yield (%)
A	30.5
B	1.9
C	1.8
D	0.7
E	0.9
F	0.2
G	1.9
H	<0.1

さらに、MSG水溶液のうま味を増強した画分A及びB中のミネラル、有機酸、アミノ酸分析を行った (Table 3-3)。醤油中の L-aspartic acid や L-glutamic acid はほぼ画分Aに回収されており、これらの成分が画分Aのうま味を形成していると考えられた。一方、MSG水溶液のうま味を増強させた画分Bには lactic acid、L-isoleucine、L-leucine などが含まれていたが、うま味を形成する酸性アミノ酸やミネラル類はほとんど含まれていなかった。

Table 3-3 Concentrations of minerals, organic acids, and amino acids in the fraction A and B

compound	fraction A		fraction B	
	concentration <sup>*1*2*3</sup> (mmol/L)	RSD <sup>*4</sup> (%)	concentration <sup>*1*2*3</sup> (mmol/L)	RSD <sup>*4</sup> (%)
Minerals				
Na	2639.4	0.1	tr.	-
K	95.0	0.1	tr.	-
Mg	33.6	0.7	tr.	-
Ca	7.7	1.4	tr.	-
Organic acids				
phosphoric acid	56.7	0.9	tr.	-
malic acid	4.1	3.4	tr.	-
succinic acid	-	-	tr.	-
lactic acid	182.4	0.5	31.8	0.1
pyroglutamic acid	29.6	2.2	12.0	0.1
Amino acids				
L-aspartic acid	30.6	0.2	tr.	-
L-threonine	27.1	0.1	tr.	-
L-serine	42.7	0.2	tr.	-
L-glutamic acid	100.6	0.1	tr.	-
glycine	31.8	0.1	tr.	-
L-alanine	70.7	0.1	tr.	-
L-valine	35.3	0.2	1.2	0.2
L-methionine	tr.	-	6.9	0.3
L-isoleucine	1.0	2.6	25.4	0.3
L-leucine	3.7	0.2	12.3	0.2
L-phenylalanine	tr.	-	tr.	-
L-lysine	24.5	0.2	tr.	-
L-histidine	9.7	0.3	tr.	-
L-arginine	7.1	0.2	-	-
L-proline	60.3	0.2	tr.	-

<sup>\*1</sup> Mean value in triplicate measurements.

<sup>\*2</sup> Data were calculated as the concentration in the soy sauce based on the yields summarized in Table 3-2.

<sup>\*3</sup> tr., trace; -, not detected.

<sup>\*4</sup> RSD, relative standard deviation

### 3.2.1.2.3 うま味増強画分 B の GPC、HILIC 分画によるうま味寄与画分の特定

画分 B には未だ多数の成分を含有していたため、まず多糖のような高分子を分離するために、MSG のうま味を増強させた画分 B を分取 GPC によりさらに 4 つの画分に分画した (Figure 3-17)。凍結乾燥後、個々の画分を MSG 水溶液に添加し、うま味強度を評価したところ、Figure 3-18 に示すように、B-II 画分に MSG のうま味を有意に強める効果が認められた。

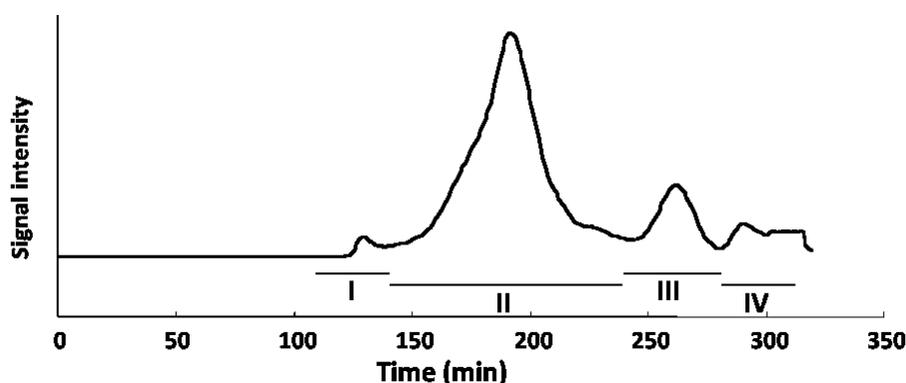


Figure 3-17 GPC chromatogram of the fraction B monitored by a Reflective Index (RI) Detector

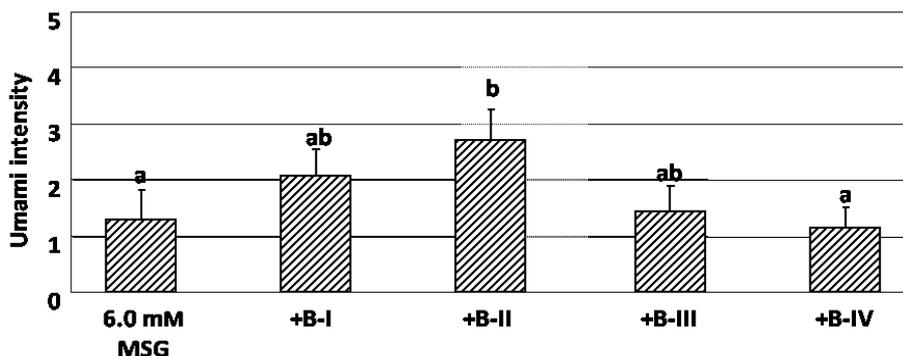


Figure 3-18 Umami enhancement activity of the GPC fractions to a 6.0 mM MSG solution (a,b: different letters show significant differences ( $p < 0.05$ ))

しかしながら、B-II 画分には未だ多数の成分を含有していたため、RP-HPLC、GPC と分離手法の異なる HILIC を用いてさらに 20 画分に分画した (Figure 3-19)。

凍結乾燥後、各画分の MSG のうま味増強効果を再度評価したところ、Figure 3-20 に示すように、B-II-6、B-II-11、B-II-13、B-II-18、B-II-19 画分に MSG のうま味を有意に強める効果が認められた。

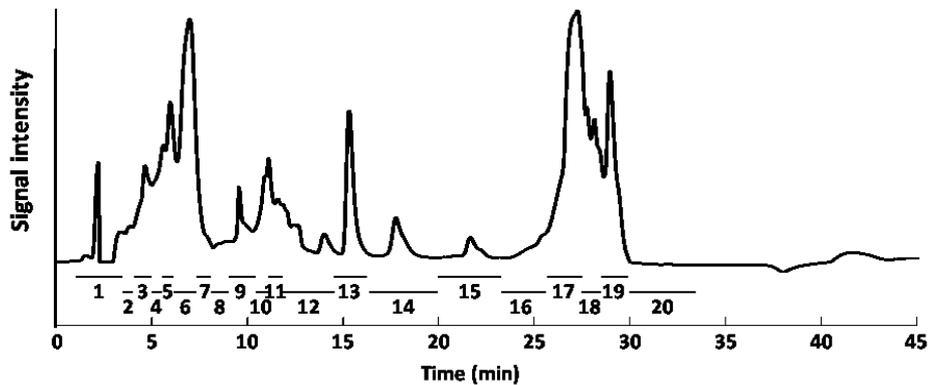


Figure 3-19 HILIC chromatogram of the fraction B-II (UV = 214 nm)

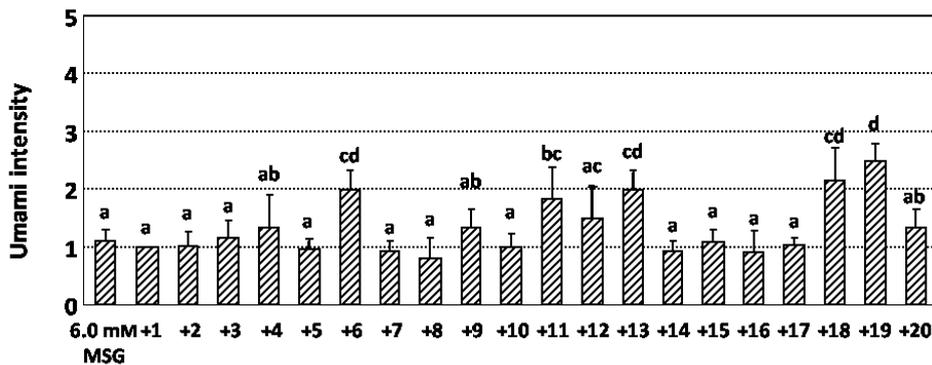


Figure 3-20 Umami enhancement activity of the HILIC fractions to a 6.0 mM MSG solution (a,b,c,d: different letters show significant differences ( $p < 0.05$ ))

#### 3.2.1.2.4 うま味増強化合物の同定

MSG のうま味増強効果を示した画分 B-II-6 から、RP-HPLC による再精製により、Fru-pGlu (1)と pGlu-Gly (2)をそれぞれ単離した(Figure 3-21)。

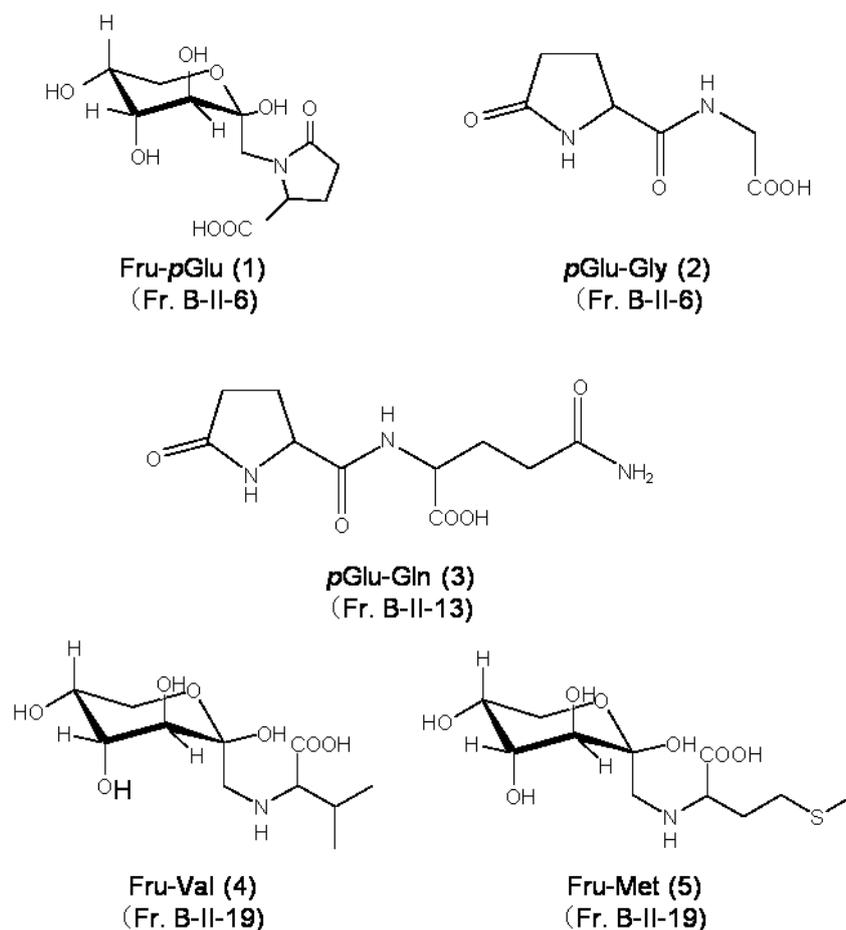


Figure 3-21 Chemical structures of pyroglutamylpeptides and amadori compounds ( $\beta$ -pyranose form)

各化合物の同定は  $1D/2D$  NMR 及び LC-TOF-MS 測定により達成した。Fru-pGlu (1)のようなアマドリ化合物は、水中では  $\alpha$ -又は  $\beta$ -ピラノース及びフラノースの4種の異性体の平衡状態で存在するため、NMRの同定は非常に複雑となるが、単離化合物と合成品との比較、及び文献データとの比較により、 $^{13}C\{^1H\}$ NMR スペクトルの一致を確認することができた(Figure 3-22)<sup>122</sup>。また、4種の環状化合物の異性体の存在比は、 $^1H$  NMR の H-C(2')プロトンを示す 4.56ppm、4.61ppm、4.67ppm のシグナル強度から算出することができ、 $\beta$ -ピラノース、 $\beta$ -フラノース、 $\alpha$ -フラノースがそれぞれ 64%、24%、12%で存在していることが明らかとなった (Figure 3-23)。

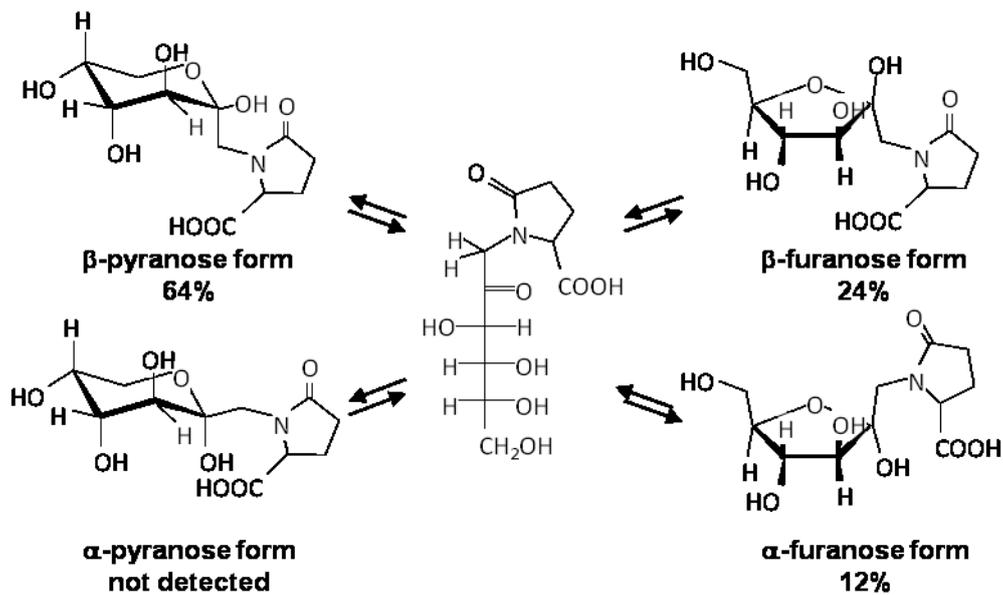


Figure 3-22 Cyclic structures of Fru-*p*Glu in aqueous solution

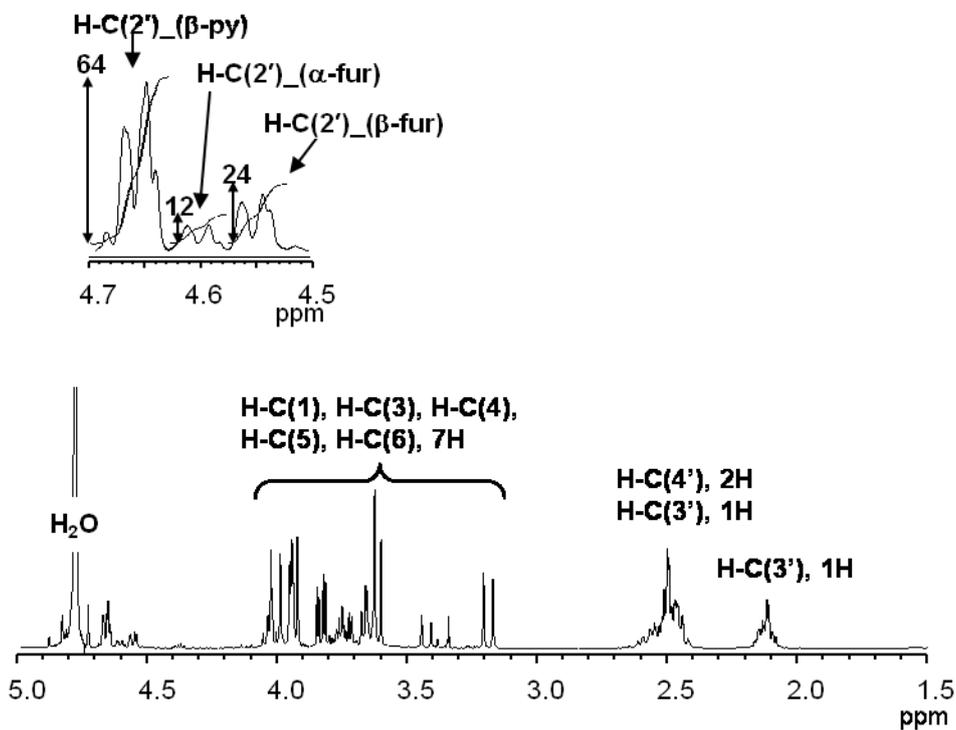


Figure 3-23 <sup>1</sup>H NMR spectrum of Fru-*p*Glu (400 MHz, D<sub>2</sub>O)

さらに、LC-TOF-MS 測定により、精密分子量 292.1028 (理論値 292.1032) が擬似イオンピーク  $[M+H]^+$  として検出され、擬似イオンピークから  $H_2O$  が 1~3 分子脱離したピークも娘イオンピークとして検出された (Table 3-4)。Fru-*p*Glu (1)は、天然物からの単離の報告ははじめてである。

Table 3-4 LC-TOF-MS spectra of amadori compounds and pyroglutamylpeptides isolated from the soy sauce

fraction	compound	exact mass (m/z)		ions
		measured	calculated	
B-II-6	Fru- <i>p</i> Glu	292.1028	292.1032	$[M+H]^+$
		274.0913	274.0927	$[M+H-H_2O]^+$
		256.0826	256.0821	$[M+H-2H_2O]^+$
		238.0708	238.0715	$[M+H-3H_2O]^+$
B-II-6	<i>p</i> Glu-Gly	187.0712	187.0719	$[M+H]^+$
B-II-13	<i>p</i> Glu-Gln	258.1097	258.1090	$[M+H]^+$
B-II-19	Fru-Val	280.1397	280.1396	$[M+H]^+$
		262.1274	262.1291	$[M+H-H_2O]^+$
		244.1182	244.1185	$[M+H-2H_2O]^+$
		234.1372	234.1341	$[M+H-H_2O-CO]^+$
B-II-19	Fru-Met	312.1123	312.1117	$[M+H]^+$
		294.0998	294.1011	$[M+H-H_2O]^+$
		276.0907	276.0906	$[M+H-2H_2O]^+$

B-II-6 中のもう一つの化合物は *p*Glu-Gly (2) であると同定した (Figure 3-21)。単離化合物と購入試薬との比較により、 $^1H$  及び  $^{13}C\{^1H\}$ NMR スペクトルの一致を確認した。また、各ピークの帰属は、 $^1H$  及び  $^{13}C\{^1H\}$ NMR 分析に加え、COSY、HMQC、HMBC 分析も行い、確定した。LC-TOF-MS 測定により、擬似イオンピーク 187.0712 (理論値 187.0719) が *p*Glu-Gly (2) の構造を示唆するメインピークとして検出された (Table 3-4)。

B-II-13 画分は UV 214nm では単一ピークとして検出されたため、さらなる精製操作を行わずに 1D/2D NMR、LC-TOF-MS 測定により *p*Glu-Gln (3) であると同定した (Figure 3-21)。同定と NMR の帰属は *p*Glu-Gly (2) と同様の方法で行うことにより達成した。また、LC-TOF-MS 測定により、擬似イオンピーク

258.1097 (理論値 258.1090) が *p*Glu-Gln (3)の構造を示唆するメインピークとして検出された (Table 3-4)。この化合物は小麦グルテンの酵素加水分解物より FAB-MS/MS とピログルタミンアミノペプチダーゼによる分解物のアミノ酸分析により構造が推定されていたが<sup>123)</sup>、NMR 及び TOF-MS による同定は初めてである。

B-II-19 画分からは、RP-HPLC による精製後、1D/2D NMR、LC-TOF-MS 測定によって、Fru-Val (4)と Fru-Met (5)を主要成分として同定した (Figure 3-21)。Fru-Val (4)の NMR の帰属は単離化合物と合成品の NMR 比較、及び NMR の文献データとの比較により達成した<sup>122)</sup>。また、LC-TOF-MS 測定により、擬似イオンピーク 280.1390 (理論値 280.1396) がメインピークとして検出され、さらに H<sub>2</sub>O が 1~2 分子脱離したピーク、及び H<sub>2</sub>O とカルボニル基(CO)が脱離したピークが娘イオンとして検出された (Table 3-4)。

B-II-19 中のもう一つの主要化合物である Fru-Met (5)も Fru-*p*Glu (1)及び Fru-Val (4)と同様の方法で行うことにより達成した (Figure 3-21)。また、LC-TOF-MS 測定により、擬似イオンピーク 312.1123 (理論値 312.1117) がメインピークとして検出され、さらに H<sub>2</sub>O が 1~2 分子脱離したピークが娘イオン 294.0998 (理論値 294.1011) 及び 276.0907 (理論値 276.0906) としてそれぞれ検出された (Table 3-4)。Fru-Val (4)及び Fru-Met (5)は脱アミド化した小麦グルテンの加水分解物中から HILIC-ESI-MS により構造が推定されていたが<sup>124,125)</sup>、NMR 及び TOF-MS による同定は初めてである。また、これらの化合物は画分 B-II-18 にも含まれていた。

画分 B-II-11 は未だ多くの化合物を含有していたため、主要成分の単離は出来なかった。

### 3.2.1.2.5 単離化合物の定量と閾値の決定

単離・同定したアマドリ化合物、ピログルタミルペプチドの醤油の呈味への寄与を検討するために、それぞれの化合物の醤油中の含有量を定量し、閾値測定、及び呈味の質の評価を行った (Table 3-5)。醤油中の濃度は Fru-*p*Glu (1)、Fru-Val (4)、*p*Glu-Gln (3)が、それぞれ 1.6 mmol/L、1.6 mmol/L、1.5 mmol/L で

あった。また、Fru-Met (5)は 1.0 mmol/L、pGlu-Gly (2)は 0.2 mmol/L であった。また、それぞれの化合物の検知閾値と呈味の質を評価したところ、Fru-pGlu (1)と Fru-Met (5)は、それぞれ 2.6 mmol/L、1.6 mmol/L 以上の濃度で渋味を呈し、Fru-Val (4)は 1.8 mmol/L 以上の濃度で苦味を呈した。pGlu-Gln (3)と pGlu-Gly (2)は、それぞれ 1.9 mmol/L、2.2 mmol/L 以上の濃度で甘味を呈した。

これらの結果から、いずれの化合物も醤油中には閾値以下の濃度の含有であるため、それぞれ単独では呈味を示していないことが推察された。

Table 3-5 Taste qualities, concentrations, and taste thresholds of amadori compounds and pyroglutamylpeptides in the soy sauce

compound	taste quality	concentration <sup>*1*2*3</sup> (mmol/L)	taste threshold (mmol/L)	concentration/ taste threshold
Fru-pGlu	astringent	1.6	2.6	0.6
Fru-Val	bitter	1.5	1.8	0.8
Fru-Met	astringent	1.0	1.6	0.6
pGlu-Gln	sweet	1.6	1.9	0.8
pGlu-Gly	sweet	0.2	2.2	>0.1

<sup>\*1</sup> Mean values in triplicate measurements.

<sup>\*2</sup> The fraction B was used for quantitative analysis.

<sup>\*3</sup> Data were calculated as the concentration in the soy sauce based on the yield of fraction B, as described in Table 3-2.

### 3.2.1.2.6 単離化合物の官能評価によるうま味増強効果の検証

醤油から単離したアマドリ化合物、ピログルタミルペプチドの醤油のうま味への寄与を検討するために、Table 3-1 に示す成分分析結果から再構成した再構築溶液 A、再構築溶液 A にさらに Table 3-5 に示す 5 種類の単離化合物を加えた再構築溶液 B、醤油 5 倍希釈溶液を調製し、うま味強度の比較を行った。Figure 3-24 に示すように、再構築溶液 A のうま味は 2.8 であったが、再構築溶液 B は 3.2 を示し、これらの間には有意差が認められた。また、醤油は 3.4 を示し、再構築溶液 A と有意差が認められたが、再構築溶液 B とは有意差が認められなかった。この結果は、本研究で単離、同定した 5 化合物が醤油のうま味に寄与していることを示している。

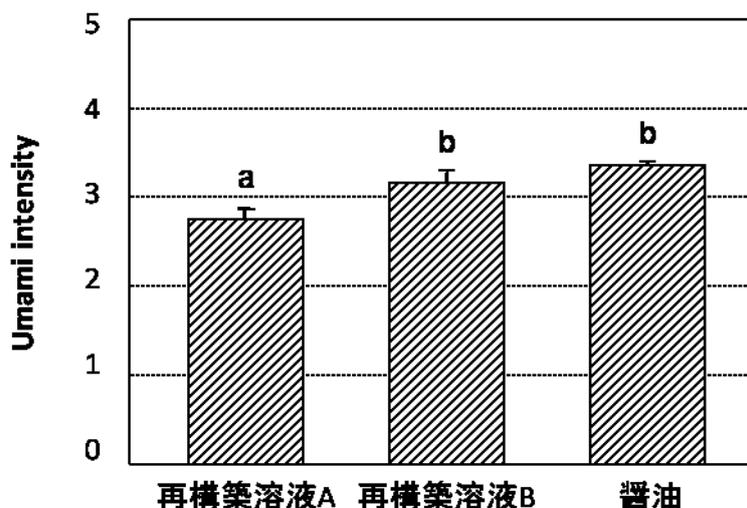


Figure 3-24 Umami taste intensities of the reconstituted soy sauce A, the reconstituted soy sauce B, and the soy sauce (a,b: different letters show significant differences ( $p<0.05$ ))

さらに、個々の化合物のうま味増強効果を検討するために、各化合物を再構築溶液 B から 1 つずつ除いたオMISSIONテストや再構築溶液 A に各化合物を単独で添加するアディッションテストを行ったが、いずれも有意な差が認められなかった（データ示さず）。一方、スクリーニング時に用いた醤油中のグルタミン酸濃度（104.0 mmol/L（5 倍希釈溶液中には 20.8 mmol/L））よりも低濃度の 6.0 mM MSG 水溶液では *p*Glu-Gln (3)のみを含有していた B-II-13 画分とうま味増強効果が認められたことから、効果の発現にはうま味化合物とうま味増強化合物のバランスも非常に重要であることが推察された。以上の結果より、醤油においては、個々の化合物のうま味増強効果は大きくはないが、5 化合物全体として醤油のうま味増強に寄与していると考えられた。

### 3.2.3 結論

醤油のうま味はこれまで、グルタミン酸のような酸性アミノ酸や酸性ペプチドなどによる寄与が推察されていたが、分子レベルでのうま味への寄与は明らかにされておらず検討が不十分であった。3.1 で開発した TDA を応用したスクリーニング手法を適用することにより、濃口醤油のうま味寄与成分を初めて明らかにすることができた (Figure 3-25)。

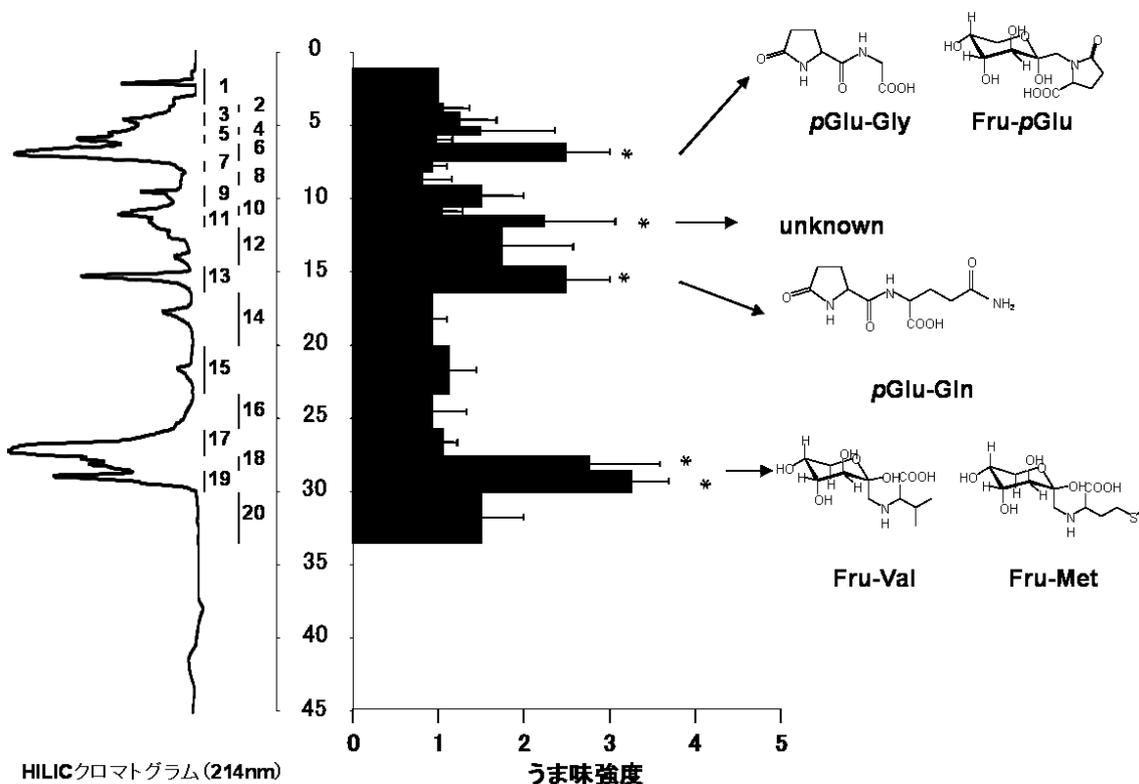


Figure 3-25 HILIC chromatogram and sensory results of the umami enhancing fractions of the Koikuchi-type soy sauce

また、醤油のうま味再構築溶液の官能評価試験により、醤油のうま味はグルタミン酸のようなうま味成分を主体とし、アマドリ化合物やピログルタミルペプチドのような成分がうま味増強作用を示すことによって成り立っていることが判明した。

特にピログルタミルペプチド類は、低分子ペプチド群として小麦グルテン中から分離され、そのうま味への関与が示唆されていたが、本研究により、その

一部である *p*Glu-Gly (2)と *p*Glu-Gln (3)が具体的なうま味寄与化合物として明らかになったことは非常に価値があると考えられる。

また、アマドリ化合物の Fru-*p*Glu (1)、Fru-Val (4)、Fru-Met (5)は、いずれも初めて食品中から単離され、学術上非常に有益な知見である。さらに、これらの成分は、**Maillard** 反応の初期生成物であるため、醤油の醸造条件によって、その含有量を増加させることが可能であると考えられ、これらの成分量を指標に醤油の風味のさらなる向上が期待できる。

## 第4章 総括

本研究は、大豆食品の香味寄与成分の解明を目的に行った。香味寄与成分の探索を行うためには効果的で効率的な分析手法の選択が非常に重要である。大豆食品は多様な成分から構成されているが、本研究では、含有量ではなく閾値を元に重要性を判断する手法である AEDA や TDA を用いることによって、香味に關与する重要成分を効率的に見出すことが可能となった。

第2章では、はじめに最も摂取容易な大豆食品の1つである豆乳に着目し、新規な成分を含む多数の香気寄与成分を AEDA にて明らかにした。豆乳香気は、従来から報告されているグリーンやファッティなオフフレーバー成分に加え、**cooked potato-like** な香調の **methional**、**metallic** な香調の **trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal**、**spicy** な香調の **2-methoxy-4-vinylphenol**、**caramel-like/seasoning-like** な香調の **sotolon** など、さまざまな香調の成分によって特徴づけられていることが判明した。さらに、豆乳の調製過程で得られる生呉や生大豆の香気寄与成分を AEDA により明らかにし、豆乳の香気寄与成分の一部の生成機構を明らかにした。多くの香気寄与成分は豆乳調製過程の酵素反応や加熱反応によって生成していると推察されたが、**pea-like/earthy** な香調を有する **2-isopropyl-3-methoxypyrazine** は、大豆中の生合成による数少ない香気寄与成分である可能性が高いことが判明した。また、この化合物は、豆乳、豆腐用大豆品種において高い寄与度で検出されたことから、豆乳香気に不可欠な成分の1つであると考えられたが、官能評価により、豆乳中の含有量が高いほど風味が好ましいとは言えなかった。従って、好ましい風味の豆乳を得るには適切な量の **2-isopropyl-3-methoxypyrazine** を含有する大豆を原料に用いる必要があると考えられる。これらの知見は、香気寄与成分の含有量を制御し、好ましい風味の豆乳を製造する上で、非常に有用である。

次に、伝統的な大豆醗酵食品の1つである醤油の香気寄与成分の探索を行った。対象は、近年普及しつつある生醤油と JAS 規格の 5 種類の醤油とし、AEDA を行った。生醤油の香気寄与成分は多くが通常の火入れ醤油と共通していたが、**2-methyl-3-furanthiol**、**2-isopropyl-3-methoxypyrazine**、**2-isobutyl-3-methoxypyrazine**、**3-ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentanone**、

5-decanolide 、 2'-aminoacetophenone 、 3-methylindole 、 2,6-dimethoxy-4-vinylphenol を、醤油中の香気寄与成分として初めて同定又は推定し、通常の火入れ醤油とは異なる香気特徴を有していることを明らかにした。

さらに、生醤油は、官能的に **cooked potato-like** や **spicy/burnt** な香調が火入れ醤油よりも弱く、通常の火入れ醤油に比べて、加熱された香りが弱く、より新鮮な香調を有する醤油であることが明らかとなった。また、生醤油と火入れ醤油の香気寄与成分の比較から、既に報告されている火入れ加熱によって増加するさまざまな揮発性成分の香気への寄与は極めて限定的であり、一部のストレッカーアルデヒドやフェノール化合物のみが火入れ時の香気変化に寄与していることが明らかとなった。さらに、火入れ加熱により **spicy/burnt** な香気に寄与している一部のフェノール化合物が顕著に増加した要因をモデル脱炭酸反応によって明らかにした。その結果、火入れ加熱ではヒドロキシ安息香酸類縁体から **2-methoxyphenol** と **2,6-dimethoxyphenol** はほとんど生成しないが、ヒドロキシ桂皮酸類縁体から **2-methoxy-4-vinylphenol** と **2,6-dimethoxy-4-vinylphenol** は生成することが判明した。しかしながら、火入れ醤油と生醤油の **2-methoxy-4-vinylphenol** と **2,6-dimethoxy-4-vinylphenol** の含有量の差（増加量）は、モデル反応から算出した火入れ時の生成量よりも約3～7倍多いことが判明した。従って、これらの成分の火入れ加熱時の増加の主要因は、ヒドロキシ桂皮酸類縁体だけではなく、**shakuchirin** や細胞壁結合型のフェルラ酸エステルなどの他の前駆体からの生成も関与している可能性が高い。

また、JAS規格の5種類の醤油の香気寄与成分を AEDA により探索したところ、これらの醤油には、**cooked potato-like** な香調の **methional** や **caramel-like/seasoning-like** な香調の **sotolon** のような共通して高い寄与度を示す成分と **caramel-like** な香調の **HDMF** や **HEMF**、**spicy/burnt** な香調の **4-ethyl-2-methoxyphenol** のような醤油の種類によって寄与度が大きく異なる成分が存在することが判明し、その要因は主に醸造条件の違いによることが推察された。これらの知見は、香気寄与成分を製品の品質管理の指標や購買の規格とすることが可能となるため、産業上非常に有用である。さらに、明らかになった各醤油の官能的特徴に適した新たな用途の開発を行うことも可能である。

第3章では、食品中のうま味寄与成分を効率的にスクリーニングする手法として、TDA を応用した手法を開発した。本手法を適用することにより、うま味成分とともに、それ自身はうま味を示さないが、MSG のうま味を増強する成分を同時に見出すことが可能になった。本手法を用いることにより、成分間の相互作用に着目した活性成分を探索することが可能であり、うま味増強成分以外にもさまざまな応用が期待できる。

さらに、開発したうま味探索手法を濃口醤油に適用し、そのうま味寄与成分として、*p*Glu-Gln、*p*Glu-Gly、Fru-*p*Glu、Fru-Met、Fru-Val を新たに明らかにした。これまで、醤油のうま味は、L-glutamic acid のような酸性アミノ酸のみと考えられていたが、本研究により、L-glutamic acid のようなうま味成分に前述のアマドリ化合物やピログルタミルペプチドのようなうま味増強成分が加わって成り立っていることが新たに判明した。特にピログルタミルペプチド類は、低分子ペプチド群として小麦グルテン中から分離され、そのうま味への関与が示唆されていたが、本研究により、その一部である *p*Glu-Gln と *p*Glu-Gly が具体的なうま味寄与化合物として明らかになったことは非常に価値があると考えられる。また、アマドリ化合物の Fru-*p*Glu、Fru-Met、Fru-Val は、いずれも食品中から初めて単離され、学術上非常に有益な知見である。これらの寄与成分の解明は醤油のうま味を理解する上で重要な知見となることに加え、産業上有用なうま味素材の開発が期待できる。すなわち、醸造条件の最適化によって醤油中のこれらの成分量を最大化し、品質の向上に貢献できる。さらに、醤油を他の食品と調理することによって、これらのうま味増強化合物の含有量の高められた新しい醤油加工品を開発したり、他の食品からこれらのうま味増強成分を有効成分とする食品や食品添加物を開発するなど、さまざまな可能性が期待できる。

本研究により、豆乳の香気寄与成分及び醤油の香味寄与成分について、その一部を解明することができた。本研究で得られた知見は、我々の食生活を豊かにする一助となり、また産業上においても、豆乳、醤油を利用した製品の品質向上に役立つ。

## 参考文献

- 1) 久保田紀久枝、森光康次郎 編、食品学 第2版補訂 第10章 嗜好成分、東京化学同人（東京）、2011、pp. 76.
- 2) 小林彰夫、食品香気研究法、日本食品科学工学会誌、44、169-176（1997）.
- 3) Teranishi, R.; Hornstein, I.; Issenberg, P.; Wick, E. L.: 杉澤博、小林彰夫訳、フレーバー研究法 その原理と応用、南江堂（東京）、1974.
- 4) 下田満哉、平野好司、箆島豊、ポーラスポリマーカラムによる食品香気成分の濃縮、分析化学、36、792-798（1987）.
- 5) Engel, W.; Bahr, W.; Shieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237-241.
- 6) 小原正美著、食品の味、光琳（東京）、1966.
- 7) 日本分析化学会関東支部編、高速液体クロマトグラフィーハンドブック、丸善（東京）、1985.
- 8) Hayashi, M. Determination of organic acids in foods by HPLC with postcolumn pH buffered electric conductivity detection. *GIT Speaz. Chromatogr.* **1995**, *15*, 64-67.
- 9) Small, H.; Stevens, T.; Bauman, W. C. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1801-1809.
- 10) Moore, S.; Stein, W. H. Photomeric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* **1948**, *176*, 367-388.
- 11) Slavin, W.: 下村滋、保田和雄、長谷川敬彦、須見泰子訳、原子吸光分析、廣川書店、1970.
- 12) Kolthoff, I. M.; van Berk, L. H. The accuracy of the halide and thiocyanate titration according to Fajans and according to the usual methods compared to the results of potentiometric determinations. *Z. Anal. Chem.* **1927**, *70*, 369-394.

- 13)久保田紀久枝、森光康次郎 編、食品学 第2版補訂 第10章 嗜好成分、東京化学同人（東京）、2011、pp. 86-95.
- 14)Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In *Characterization of Food: Emerging Methods*; Goankar, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1995; pp 403-431.
- 15)Frank, O.; Ottinger, H.; Hofmann, T. Characterization of an intense bitter-tasting 1*H*, 4*H*-quinolizinium-7-olate by application of the taste dilution analysis, a novel bioassay for the screening and identification of taste-active compounds in foods. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 231-238.
- 16)農林水産省ホームページ,  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d\\_data/pdf/016\\_jukyuu\\_world.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/pdf/016_jukyuu_world.pdf)
- 17)喜多村啓介 編、大豆のすべて、サイエンスフォーラム（東京）、2010.
- 18)山内文男、大久保一良 編、大豆の科学、朝倉書店（東京）、1992.
- 19)Nakamura, T. S.; Utsumi, T. S.; Kitamura, K.; Harada, K.; Mori, T. Cultivar differences in gelling characteristics of soybean glycinin. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 647-651.
- 20)Evans, B. E.; Tsukamoto, C.; Neilsen, N. C. A small scale method for the production of soymilk and silken tofu. *Crop Sci.* **1997**, *37*, 1463-1471.
- 21)Cai, T.; Chang, K. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 720-727.
- 22)Yagasaki, K.; Kousaka, F.; Kitamura, K. Potential improvement of soymilk gelation properties by using soybeans with modified protein subunit compositions. *Breed. Sci.* **2000**, *50*, 101-107.
- 23)Tezuka, M.; Taira, H.; Igarashi, Y.; Yagasaki, K.; Ono, T. Properties of tofus and soymilks prepared from soybeans having different subunits of glycinin. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1111-1117.
- 24)Poysa, V.; Woodrow, L. Stability of soybean seed composition and its effect on soymilk and tofu yield and quality. *Food Res. Int.* **2002**, *35*, 337-345.

- 25) Wilkens, W. F.; Lin, F. M.; Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. *Food Technol.* **1970**, *18*, 333-336.
- 26) Badenhop, A. F.; Wilkens, W. F. The formation of 1-octen-3-ol in soybeans during soaking. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1969**, *46*, 868-873.
- 27) Lazano, P. R.; Drake, M.; Benitez, D.; Cadwallader, K. R. Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3018-3026.
- 28) Yuan, S.; Chang, S. K. C. Selected odor compounds in soymilk as affected by chemical composition and lipoxygenases in five soybean materials. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 426-431.
- 29) Min, S.; Yu, Y.; Yoo, S.; St. Martin, S. Effect of soybean varieties and growing locations on the flavor of soymilk. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, C1-C7.
- 30) 小林彰夫、王冬梅、山崎美保、巽規子、久保田紀久枝、豆腐の風味形成に関与する香氣成分、日本食品科学工学会誌、*47*、613-618(2000)。
- 31) Kobayashi, A.; Tsuda, Y.; Hirata, N.; Kubota, K.; Kitamura, K. Aroma constituents of soybean milk lacking lipoxygenase isozymes. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2449-2452.
- 32) 島田和子、野村寛美、原由美、藤本房江、喜多村啓介、豆腐の食味に及ぼす大豆リポキシゲナーゼの影響、日本食品科学工学会誌、*45*、122-128(1998)。
- 33) 島田和子、犬山有紀子、森下昌美、高橋良二、喜多村啓介、豆腐の食味に及ぼす脂質酸化生成物の影響、日本食品科学工学会誌、*48*、253-262(2001)。
- 34) 久保田紀久枝、森光康次郎 編、食品学 第2版補訂 第24章 調味料、東京化学同人(東京)、2011、pp. 250-251。
- 35) しょうゆ情報センターホームページ  
<https://www.soy sauce.or.jp/koutei/index.html>
- 36) 日本醸造協会 編、醸造物の成分、日本醸造協会(東京)、1999。pp. 476-501。

- 37) Yokotsuka, T.; Sasaki, M. Fermented protein foods in the Orient: shoyu and miso in Japan, In *Microbiology of Fermented Foods Volumes 1 and 2*, Wood, B. J., Eds.; Blackie and Academic and Professional, London, UK, 1998; pp. 351-415.
- 38) 中台忠信、醤油の香りと味、香料、200、69-80 (1998) .
- 39) 浅尾保夫、逆井利夫、横塚保、醤油香味成分に関する研究 (第26報) 醤油酵母による香味の生成 (その2)、日本農芸化学会誌、41、434-441 (1967) .
- 40) 横塚保、浅尾保夫、逆井利夫、醤油香味成分に関する研究 (第25報) 醤油酵母による香味の生成 (その1)、日本農芸化学会誌、41、428-422 (1967) .
- 41) Nunomura, N.; Sasaki, M.; Asao, Y.; Yokotsuka, T. Isolation and identification of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a flavor component in shoyu (soy sauce). *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 491-495.
- 42) Monde, K.; Nakahashi, A.; Miura, N.; Yasuchi, Y.; Sugimoto, D.; Emura, M. Stereochemical study of a novel tautomeric Furanone, Homofuraneol. *Chirality* **2009**, *21*, E110-E115.
- 43) 山田勝彦、稲生正雄、ガスクロマトグラフィーによるしょうゆ香気の研究 (第2報) 雑菌の生成する香気成分、調味科学、16、15-20 (1969) .
- 44) Steinhaus, P.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in soy sauce using approaches of molecular sensory science. *J. Agric Food Chem.* **2007**, *55*, 6262-6269.
- 45) 天野武雄、豆みそ、たまりしょう油の香気に関する研究 (第5報) 各種しょう油の発生する気相中の香気成分組成について、愛知県食品工業試験所年報、15、20-28 (1974) .
- 46) 天野武雄、工藤日出男、豆みそ、たまりしょう油の香気に関する研究 (第6報) 加熱によるしょう油の成分変化について、愛知県食品工業試験所年報、17、79-85 (1976) .

- 47)中台忠信、醤油の火入れ、醤油の研究と技術、34、274-282 (2008)。
- 48)山田正一、醸造物中に於ける Aldehyde 類の成因に就て (第二報)、日本農芸化学会誌、4、1-15 (1928)。
- 49)浅尾保夫、横塚保、醤油香味成分に関する研究 (第24報)  $\alpha$ -ジケトン化合物 (その4)、日本農芸化学会誌、37、569-575 (1963)。
- 50)横塚保、醤油香味成分に関する研究 (第15報) 火入醤油の香気成分 (その2)、日本農芸化学会誌、32、23-26 (1958)。
- 51)Nunomura, N.; Sasaki, M.; Asao, Y.; Yokotsuka, T. Shoyu (soy sauce) volatile flavor components: basic fraction. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 2123-2128.
- 52)Meng, Q.; Kakuta, T.; Sugawara, E. Quantification and odor contribution of volatile thiols in Japanese soy sauce. *Food Sci. Technol. Res.*, **2012**, *18*, 429-436.
- 53)日本醸造協会 編、醸造物の成分、日本醸造協会 (東京)、1999、pp. 449-475。
- 54)中台忠信、醤油の味、日本醤油研究所雑誌、31、360-372 (2005)。
- 55)Oka, S.; Nagata, K. Isolation and characterization of acidic peptides in soy sauce. *Agr. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1195-1202.
- 56)Lioe, H. N.; Takara, K.; Yasuda, M. Evaluation of peptide contribution to the intense umami taste of Japanese soy sauces. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, S277-S283.
- 57)Lioe, H. N.; Wada, K.; Aoki, T.; Yasuda, M. Chemical and sensory characteristics of low molecular weight fractions obtained from three types of Japanese soy sauce (shoyu) – koikuchi, tamari and shiro shoyu. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1669-1677.
- 58)本間伸夫、味噌の香気と香気成分について (その2)、日本醸造協会誌、82、547-553 (1987)。

- 59)菅原悦子、保坂由貴子、加熱による味噌汁の香気成分の変化、日本家政学会誌、60、453-459 (2009)。
- 60)de Rijke, E.; Ruisch, B.; Bakker, J.; Visser, J.; Leenen, J.; Haiber, S.; de Klerk, A.; Winkel, C.; Koenig, T. LC-MS study to reduce ion suppression and to identify *N*-lactoylguanosine 5'-monophosphate in bonito: a new umami molecule? *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6417-6423.
- 61)Festring, D.; Hofmann, T. Discovery of *N*<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)guanosine 5'-monophosphate as an umami-enhancing maillard-modified nucleotide in yeast extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10614-10622.
- 62)Beksan, E.; Schieberle, P.; Robert, F.; Blank, I.; Fay, L. B.; Schlichtherle-Cerny, H.; Hofmann, T. Synthesis and sensory characterization of novel umami-tasting glutamate glycoconjugates. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5428-5436.
- 63)Noguchi, M; Arai, S.; Yamashita, M.; Kato, H.; Fujimaki, M. Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23*, 49-53.
- 64)Arai, S.; Yamashita, M.; Noguchi, M.; Fujimaki, M. Tastes of L-glutamyl oligopeptides in relation to their chromatographic properties. *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 151-156.
- 65)Schlichtherle-Cerny, H.; Amado, R. Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1515-1522.
- 66)Rotzoll, N.; Dunkel, A.; Hofmann, T. Activity-guided identification of (S)-malic acid 1-O-D-glucopyranoside (morelid) and  $\gamma$ -aminobutyric acid as contributors to umami taste and mouth-drying oral sensation of morel mushrooms (*Morchella deliciosa* Fr.) *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4149-4156.
- 67)Soldo, T.; Blank, I.; Hofmann, T. (+)-(S)-Alapyridaine – a general taste enhancer? *Chem. Sense* **2003**, *28*, 371-379.

- 68)岡田崇、桂晴美、古林万木夫、小麦たんぱく（グルテン）を配合した醤油の味と色、日本醸造協会誌、100、478-483（2005）。
- 69)Lioe, H. N.; Apriyantono, A.; Takara, K.; Wada, K.; Yasuda, M. Umami taste enhancement of MSG/NaCl mixtures by subthreshold L- $\alpha$ -aromatic amino acids. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, S401-S405.
- 70)Winkel, C.; de Klerk, A.; Visser, J.; de Rijke, E.; Bakker, J.; Koenig, T.; Renes, H. New developments in umami (enhancing) molecules. *Chem. Biodiversity* **2008**, *5*, 1195-1203.
- 71)Festring, D.; Hofmann, T. Systematic studies on the chemical structure and umami enhancing activity of Maillard-modified guanosine 5'-monophosphates. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 665-676.
- 72)Kumazawa, K.; Wada, Y.; Masuda, H. Characterization of epoxydecenal isomers as potent odorants in black tea (*Dimbula*) infusion. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4795-4801.
- 73)Buttery, R. G.; Ling, L. C.; Juliano, B. O.; Turnbaugh, J. G. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 823-826.
- 74)Guth, H.; Grosch, W. 3-Methylnonane-2,4-dione - an intense odour compound formed during flavour reversion of soya-bean oil. *Fat Sci. Technol.* **1989**, *93*, 225-230.
- 75)Kim, H.; Cadwallader, K. R.; Jeong, E. J.; Cha, Y. J. Effect of refrigerated and thermal storage on the volatile profile of commercial aseptic Korean soymilk. *J. Food Sci. Nutr.* **2009**, *14*, 76-85.
- 76)Matoba, T.; Hidaka, H.; Kitamura, K.; Kaizuma, N.; Kito, M. Lipoxygenase-2 isozyme is responsible for generation of n-hexanal in soybean homogenate. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 852-855.
- 77)Zhuang, H.; Hildebrand, D. F.; Andersen, R. A.; Hamilton-Kemp, T. R. Effects of polyunsaturated free fatty acids and esterified linoleoyl derivatives on oxygen consumption and C6 aldehyde formation with soybean homogenates. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1357-1364.

- 78) Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Aroma compounds. In Food Chemistry 4th revised and extended edition, Belitz, H. D., Grosch, W.; Schieberle, P., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2009; pp 191–211.
- 79) Buettner, A.; Schieberle, P. Aroma properties of a homologous series of 2,3-epoxyalkenals and *trans*-4,5-epoxyalk-2-enals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3881-3884.
- 80) 水野時子、島田信二、丹治克男、山田幸二、大豆の水浸漬による遊離アミノ酸の変動、日本家政学会誌、53、1197–1202 (2002)。
- 81) Hofmann, T.; Schieberle, P. 2-Oxopropanal, hydroxyl-2-propanone, and 1-pyrroline-important intermediates in the generation of the roast-smelling food flavor compounds 2-acetyl-1-pyrroline and 2-acetyltetrahydropyridine. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2270-2277.
- 82) Pripis-Nicolau, L.; de Revel, G.; Bertrand, A.; Maujean, A. Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3761–3766.
- 83) Kudou, S.; Tonomura, M.; Tsukamoto, C.; Shimoyamada, M.; Uchida, T.; Okubo, K. Isolation and structural elucidation of the major genuine soybean saponin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1992**, *56*, 142-143.
- 84) Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Aroma compounds. In Food Chemistry 4th revised and extended edition, Belitz, H. D., Grosch, W.; Schieberle, P., Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 2009; pp 248–339.
- 85) Shaw, P. E.; Berry, R. E. Hexose-amino acid degradation studies involving formation of pyrrole, furans, and other low molecular weight products. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 641-644.
- 86) Fiddler, W.; Parker, W. E.; Wasserman, A. E.; Doerr, R. C. Thermal decomposition of ferulic acid. *J. Agric. Food Chem.* **1967**, *15*, 757–761.
- 87) Wilkinson, R. A.; Stark, W. A compound responsible for metallic flavour in dairy products. II. Theoretical consideration of the mechanism of formation of oct-1-en-3-one. *J. Dairy Res.*, **1967**, *34*, 89-102.

- 88)Takahashi, K.; Tadenuma, M.; Sato, S.  
3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone, a burnt flavoring compound from aged sake. *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 325–330.
- 89)Pham T. T.; Guichard, E.; Schlich, P.; Charpentier, C. Optimal conditions for the formation of sotolon from  $\alpha$ -ketobutyric acid in the French “Vin Jaune”. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2616–2619.
- 90)Kobayashi, A. Sotolon: identification, formation and effect on flavor. In *Flavor Chemistry: Trends and Developments*; Teranishi, R., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1989; pp 49–59.
- 91)Murray, K. E.; Whitfield, F. B. The occurrence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in raw vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **1975**, *26*, 973–986.
- 92)Buttery, R. G.; Ling, L. C. Additional studies on flavor components of corn tortilla chips. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2764–2769.
- 93)大村芳正、秋山美展、斎尾恭子、大豆リポキシゲナーゼの品質並びに種実の部位別変化、日本食品科学工学会誌、*33*、653–658（1986）。
- 94)Allen, M. S.; Lacey, M. J.; Boyd, S. J. Existence of different origins for methoxypyrazines of grapes and wines. In *Biotechnology for Improved Foods and Flavors*; Takeoka, G. R., Teranishi, R., Williams, P. J., Kobayashi, A., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1996; pp 220–227.
- 95)Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz-Mendez, P. Organocatalyzed decarboxylation of naturally occurring cinnamic acids: Potential role in flavoring chemicals production. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85–93.
- 96)赤堀四郎、醤油の香気成分に就て（第一報）、日本化学会誌、*57*、828–831（1936）。
- 97)Nunomura, N.; Sasaki, M.; Asao, Y.; Yokotsuka, T. Identification of volatile components in shoyu (soy sauce) by gas chromatography-mass spectrometry. *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 485–490.

- 98)横塚保、浅尾保夫、醤油香味成分に関する研究（第19報）C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>の構造（その2）並びに醤油中の $\alpha$ -ジケトン化合物（その1）、日本農芸化学会誌、35、837-845（1961）。
- 99)佐々木正興、布村伸武、醤油の香り立ち（Top Note）を構成する成分、日本化学会誌、5、736-745（1981）。
- 100) 横塚保、醤油香気成分に関する研究（第8報）高沸点部の香気成分（その3）benzaldehyde と benzoic acid ethyl ester、日本農芸化学会誌、25、446-450（1951）。
- 101) Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T. Shoyu (soy sauce) flavor components: acidic fractions and the characteristic flavor component. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 339-351.
- 102) Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T. Shoyu (soy sauce) flavor components: neutral fraction. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 1753-1762.
- 103) Ishihara, K.; Honma, N.; Matsumoto, I.; Imai, S.; Nakazawa, S.; Iwafuchi, H. Comparison of volatile components in soy sauce (koikuchi shoyu) produced using *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **1996**, *43*, 1063-1074.
- 104) 山田勝彦、稲生正雄、ガスクロマトグラフィーによるしょうゆ香気の研究（第2報）雑菌の生成する香気成分、16、15-20（1969）。
- 105) 赤堀四郎、金子武夫、醤油の香気成分に就て（第二報）醤油中の含硫香気物質の分離及び合成、日本化学会誌、57、832-837（1936）。
- 106) 浅尾保夫、横塚保、醤油香味成分に関する研究（第16報）生揚げ醤油の香味成分（その2）、日本農芸化学会誌、32、617-622（1958）。
- 107) Kihara, K. Untersuchungen ueber den Geruch von Syoyu. *J. Soc. Chem. Ind. Jpn.* **1940**, *43(suppl. binding)*, 403.
- 108) 横塚保、醤油香気成分に関する研究（第9報）高沸点部の香気成分（その4）Phenol 性香気成分の分離、日本農芸化学会誌、27、276-281（1953）。

- 109) Nunomura, N.; Sasaki, M.; Yokotsuka, T. Isolation of 4-hydroxy-5-methyl-3(2*H*)-furanone, a flavor component in shoyu (soy sauce). *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*, 1361–1363.
- 110) Kim, H. J.; Lee, E. J.; Shin, O. S.; Ji, W. D.; Choi, M. R.; Kim, J. K. Volatile components in the soy sauce manufactured by *Bacillus* species and fused yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *6*, 194-201.
- 111) 菅原悦子、酵母がつくる味噌、醤油の特徴的な香気成分、FFI ジャーナル、*193*、57–65 (2001)。
- 112) 木原清、キャピラリー・ガスクロマトフラフィーによる醤油揮発成分のルーチン・パターンと品質判定 (その1) 予備実験と GC-MS、醤油研究所雑誌、*12*、12–19 (1986)。
- 113) 横塚保、醤油香気成分に関する研究 (第13報) 醸造醤油の防黴成分並に醤油火入による防黴性の増加に就て、*28*、114–118 (1954)。
- 114) Ohata, M.; Kohama, K.; Morimitsu, T.; Kubota, K.; Sugawara, E. The formation mechanism by yeast of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone in Miso. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 407-413.
- 115) 林田安生、西村賢了、J. コリンスローター、麦味噌におけるフラノン化合物、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (4-HDMF)及び4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2*H*)-furanone (4-HEMF)の生成機構、日本醸造協会誌、*93*、730–738 (1998)。
- 116) Dahlen, T.; Hauck, T.; Wein, M.; Schwab, W. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone as a secondary metabolite from D-fructose-1,6-diphosphate metabolism by *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91*, 352-358.
- 117) Cohen, L. A.; Jones, W. M. A study of pH dependence in the decarboxylation of p-Hydroxycinnamic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1907-1911.

- 118) Sykes, P. Carbanions and their reactions. In Mechanism in Organic Chemistry sixth edition, Sykes, P., Ed; Longman Group Ltd.: London, UK, 1986; pp 270-298.
- 119) 中川致之、田村真八郎、石間紀男、緑茶の呈味構造とし好性に関する研究、日本食品工業学会誌、19、475-480 (1972)。
- 120) 静岡県お茶と水研究 編、お茶と水、静岡県お茶と水研究会 (静岡)、2001、pp. 73-91.
- 121) ユイン バツオング、キナ酸誘導体およびその製造方法、特開平6-166682公報 (1994. 6. 14)
- 122) Roeper, H.; Roeper, S.; Heyns, K. NMR spectroscopy of *N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-amino acids ("fructose-amino acids"). *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 183-195.
- 123) Higaki-Sato, N.; Sato, K.; Esumi, Y.; Okumura, T.; Yoshikawa, H.; Tanaka-Kuwajima, C.; Kurata, A.; Kotaru, M.; Kuwabata, M.; Nakamura, Y.; Ohtsuki, K. Isolation and identification of indigestible pyroglutamyl peptides in an enzymatic wheat gluten prepared on an industrial scale. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 8-13.
- 124) Hashiba, H. Isolation and identification of amadori compounds from soy sauce. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 763-768.
- 125) Schlichtherle-Cerny, H.; Affolter, M.; Cerny, C. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray mass spectrometry of small polar compounds in food analysis. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2349-2354.

## 謝辞

本研究は、岩手大学 教育学部 菅原 悦子教授のご指導のもとに行ったものである。本研究を行うにあたり、懇切な御指導御鞭撻を賜りました菅原教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

本論文執筆にあたり、適切な御助言を賜りました山形大学 農学部 貫名 学教授、帯広畜産大学 小嶋 道之准教授、岩手大学 農学部 塚本 知玄准教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、有益なご教授を頂きました小川香料 株式会社 熊沢 賢二博士、増田 秀樹博士、西村 修博士、ミュンヘン工科大学 生命・食品科学センター **Thomas Hofmann** 教授に深く感謝申し上げます。

本研究は、小川香料株式会社で行ったものをまとめたものであり、終始ご理解を賜りました小川 裕取締役社長、作田 圭亮取締役をはじめとし、社員の皆様並びに本研究にご協力を頂きました舞浜研究所の皆様から心から御礼申し上げます。