

Technical Report

味わいに影響を与える成分の探索および違いの見える化

Investigation and visualization of taste differences by the multiple compound classes in food

松本 恵子¹

Abstract:

食品の官能評価は、味覚、嗅覚、触覚、視覚、聴覚という五感を使って行います。近年、評価者の感覚に依存した官能評価に追加して、機器分析により味わいに影響を与える成分の探索や違いの見える化したいというニーズが高まっています。しかしながら、味わいに関与する成分の探索は容易ではなく、そのワークフローは十分に確立されていません。五味以外の曖昧な味わいの指標については、尚更困難です。

本レポートでは、食品開発において、味わいの特徴や差異を科学的に示すワークフローの確立を目的に、日本酒について曖昧な味わい「ふくらみ」に関与する成分の探索と違いの見える化を試行しました。部分的最小二乗判別分析 (PLS-DA) により、特定の糖、有機酸類や香気成分が「ふくらみ」有無で差異のある成分として抽出されました。

Keywords: フードミクス、官能評価、味覚、嗅覚、風味、香り、香気成分、多変量解析、主成分分析、判別分析、液体クロマトグラフィー質量分析法、LCMS、ガスクロマトグラフィー質量分析法、GCMS

1. 背景

食品メーカーにおいて製品の味わいの調査に、主に複数の訓練された専門パネルによる品質管理型の評価¹⁾や個人の好き嫌いを知るために行われる消費者パネルによる評価、あるいは企業内で試作品の評価を行なうためのパネル (通称: 企業内パネル)²⁾ による官能評価が用いられています。味わいに関する官能評価は、味は味覚 (甘味、塩味、酸味、苦味、うま味)、嗅覚 (香り)、触覚 (テクスチャー、温度)、視覚 (外観 (色、形、つや、大きさ)、聴覚 (音) という五感を使って行います。味覚はアミノ酸や有機酸、糖類、核酸などの化学物質、嗅覚はエステルやカルボン酸など揮発性物質による芳香の相互作用によってもたらされています。味わい毎に化合物が異なり、多岐に亘ります。

近年、評価者の感覚に依存した官能評価に追加して、機器分析により味わいに影響を与える成分の探索や定量を行い、違いの見える化や品質管理に利用したいというニーズが高まっています。しかしながら、食品を構成する成分が多数あり探索は容易ではありません。また、そのワークフローは十分に確立されていません。五味以外の曖昧な味わいについては尚更困難です。

本レポートでは、食品開発において、味わいの特徴や差異を科学的に示すワークフローの確立を目的に、日本酒について曖昧な味わい「ふくらみ」に関与する成分の探索と違いの見える化を試行しました。相互に作用する複数の成分の影響を考慮して、「ふくらみ」の識別候補マーカーを使って判別モデルを作成し、未知試料の官能評価予測も行いましたので合わせて報告します。

2. 試料と官能評価

日本酒はアルコール度数が高い酒程、アルコール香の影響により香気へのマスク効果が報告されており³⁾、分析試料は全てアルコール度数が15%になるよう調整しました。精米歩合、酵母の種類異なる8種の試料 (Table 1) について、味関連成分は液体クロ

マトグラフ質量分析計、香気成分はガスクロマトグラフ質量分析計を用いて機器分析を実施し、官能評価の結果を裏付ける差異の有無を検討しました。

曖昧な味わい「ふくらみ」について、甘味や酸味のバランスや香りなどパネル間の評価基準を統一した後、官能評価を実施しました。各評価者が8種の日本酒試料に「ふくらみ」が大きいものから順に1~8位の順位付けをし、それらの評価者平均値に基づいた順位をTable 1に示します。また、ふくらみ順位1~4位を「ふくらみ」あり、5~8位を「ふくらみ」なしとグルーピングして、統計解析に用いました。No.3と6は酒質が特殊で官能評価が難しかったため、分析データとの統合解析から除外しました。統合解析データをもとに判別モデルを作成し、官能評価が難しかった2サンプルについて科学的に説明可能か検討しました。

Table 1 日本酒試料の醸造条件と官能評価結果

| サンプルNo. | 醸造条件 | | 官能評価「ふくらみ」 | | |
|---------|------|----|------------|--------|------|
| | 精米歩合 | 酵母 | 順位 | 評価の一致性 | グループ |
| 1 | A | X | 8 | ◎ | なし |
| 2 | A | Y | 3 | ○ | あり |
| 3 | B | Y | 6 | △ | なし |
| 4 | B | Z | 7 | ○ | なし |
| 5 | A | X | 2 | ○ | あり |
| 6 | C | X | 4 | △ | あり |
| 7 | C | X | 1 | ◎ | あり |
| 8 | A | Y | 5 | ○ | なし |

◎: 全員一致 ○: ほぼ一致 △: 評価者間で差異あり

3. 分析条件

日本酒試料を水で10倍希釈し、「LC/MS/MSメソッドパッケージ一次代謝物 Ver. 3」に含まれるイオンペアフリー LC/MS/MS法を用いて、ライフサイエンス分野のメタボローム解析において重要となるアミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の親水性代謝物に糖類を追加して全153成分を対象に一斉分析し、同定しました。Table 2にHPLCおよびMSの分析条件を示します。

Table 2 分析条件 (味関連成分)

| | |
|-----------------------------|---|
| [HPLC conditions] (Nexera™) | |
| Column | : Discovery HS F5-3 (2.1 mmI.D. x 150 mmL, 3 μm), |
| Mobile phases | : A) 0.1 % Formic acid in water B) 0.1 % Formic acid in acetonitrile |
| Gradient | : 0%(0-2min)-25%(5min)-35%(11min)-50%(12.5-16min)- 95%(16.01-19min)-0% (19.01-30min) |
| Flow rate | : 0.25 mL/min (0-17min, 19.01-30min), 0.5 mL/min (17.01-19min) |
| Injection volume | : 1 μL |
| [MS conditions] (LCMS-8060) | |
| Ionization | : ESI (Positive and negative mode) |
| Mode | : MRM |
| Nebulizing gas flow | : 3.0 L/min |
| Drying gas flow | : 10.0 L/min |
| Heating gas flow | : 10.0 L/min |
| DL temp. | : 250 °C |
| Block heater temp. | : 400 °C |
| Interface temp. | : 300 °C |

日本酒試料1mLを20mL HSバイアルに充填し、テフロンコート・シリコンゴムセパタムで密閉したものを分析試料としました。50°Cで30分間加熱後、ヘッドスペース1mLをGCに導入し、国税庁所定分析法やBCOJビール分析法において分析対象とされている香氣成分21成分を「NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 20)」と「Wiley Registry of Mass Spectral Data (11th Edition)」を使用して、検出および同定しました。分析条件をTable 3に示します。

Table 3 分析条件 (香氣成分)

| | |
|--------------------------|--|
| [HS] (HS-20) | |
| Mode | : Loop (1 mL) |
| Oven Temp. | : 50 °C |
| Sample Line temp. | : 120 °C |
| Transfer Line temp. | : 150 °C |
| Vial Stirring | : OFF |
| Multi-injection | : 1 |
| Vial Pressure | : 50 kPa |
| Vial Pressurization Time | : 1 min |
| Equilibration Time | : 0.1 min |
| Loading Time | : 0.5 min |
| Load Equilib. Time | : 0 min |
| Injection time | : 1 min |
| Needle Flush Time | : 5 min |
| [GC] (GC-2010 Plus) | |
| Column | : Rxi-624Sil MS (60 m × 0.32 mm I.D., 1.8 μm) |
| Carrier gas | : He |
| Control mode | : Linear Velocity (30.0 cm/s) |
| Injection mode | : Split (Split ratio : 20) |
| Oven Temp. | : 40 °C (5 min) → (10 °C /min) → 250 °C (10 min) |
| [MS] (GCMS-QP2020) | |
| Ionization mode | : EI |
| Ion Source temp. | : 230 °C |
| Interface temp. | : 230 °C |
| Ionization Voltage | : 70 V |
| Emission current | : 60 μA |
| Tuning mode | : Standard |
| Measurement Mode | : Scan (m/z 29 ~ 400) |
| Event time | : 0.3 sec |

4. 味わい関連成分の解析

各試料を特徴付けている成分を探索するために、ひとつひとつの測定値を独立して解析するのではなく、全ての測定値を総合的に取り扱い、その中にある違いを視覚化する主成分分析 (PCA) を行いました。LC/MS分析により得られた味関連成分の面積比 (内部標準物質 2-Morpholinoethanesulfonic acid) を統計解析ソフトウェア eMSTAT Solution™により主成分分析した結果をFig. 1、Fig. 2に示します。日本酒試料は、酵母の種類により大きく分類されました。第2象限は単糖や二糖、第1、4象限はleucineやvalineなどアミノ酸により特徴づけられました。アミノ酸であるleucineやvalineは酵母に取り込まれ、それぞれ前者はisomyl alcohol、後者はisobutanolという香氣成分の高級アルコールの生成に関与する

ことが知られています⁴⁾。

これらの結果から、スコアプロット上のグループは、醸造条件の違いにより分かれていることが示されましたが、「ふくらみ」の官能評価結果との関連性は見られませんでした。

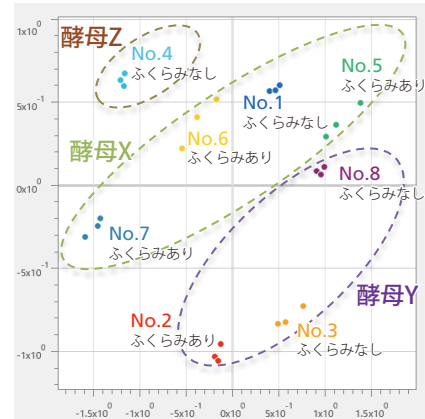


Fig. 1 味関連成分のスコアプロット (PCA)

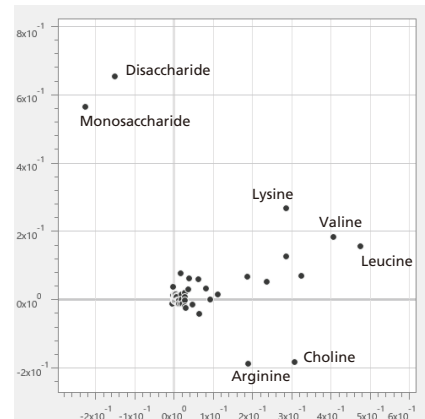


Fig. 2 味関連成分のローディングプロット (PCA)

同様にGC/MS分析により得られた香氣成分の面積を用いて、主成分分析を行いました。スコアプロットをFig. 3、ローディングプロットをFig. 4に示します。味関連成分と同じく、酵母の種類に応じたグループ分けとなりました。酵母Xはisobutanolやethyl acetateなど様々なエステル類や高級アルコールで特徴付けられました。一方、酵母Yは1-propanolにより特徴づけられていました。しかしながら、味関連成分と同じく、スコアプロット上のグループは、「ふくらみ」の官能評価結果との関連性は見られませんでした。

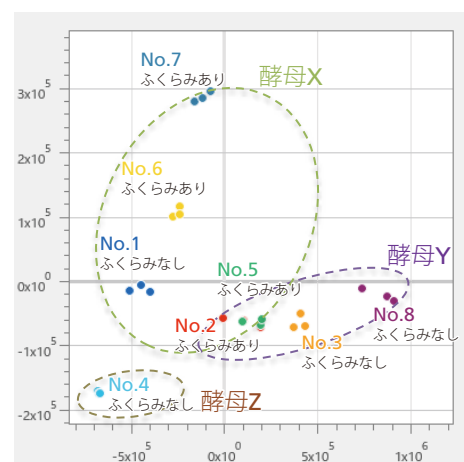


Fig. 3 香氣成分のスコアプロット (PCA)

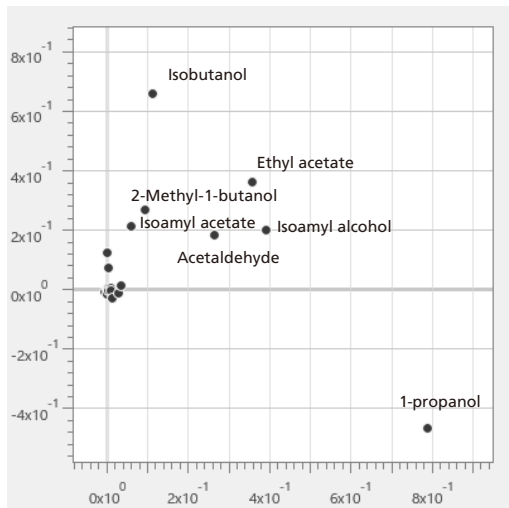


Fig. 4 香気成分のローディングプロット (PCA)

5. 官能評価結果との統合解析および判別モデルによる評価

官能評価結果（「ふくらみ」あり、なし）と味関連成分の分析データを用いて、グループ間の差異が大きい方向を選択し、射影して解析する部分的最小二乗判別分析 (PLS-DA) により統合的に解析しました。スコアプロットを Fig. 5、ローディングプロットを Fig. 6 に示します。「ふくらみ」なしのグループはスコアプロット (Fig. 5) 上で第一主成分が負の領域にグループを形成しました。ローディングプロット (Fig. 6) においてはその領域にはアミノ酸類や糖類が見られ、それらが「ふくらみ」なしに多い傾向があることが分かりました。

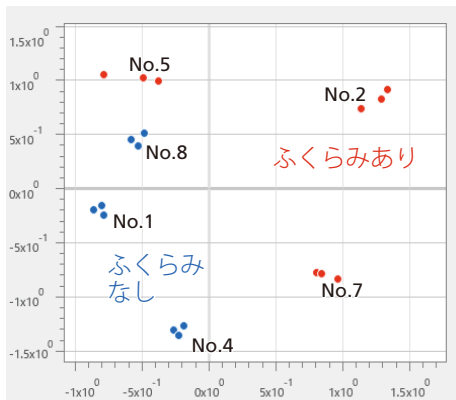


Fig. 5 味関連成分のスコアプロット (PLS-DA)

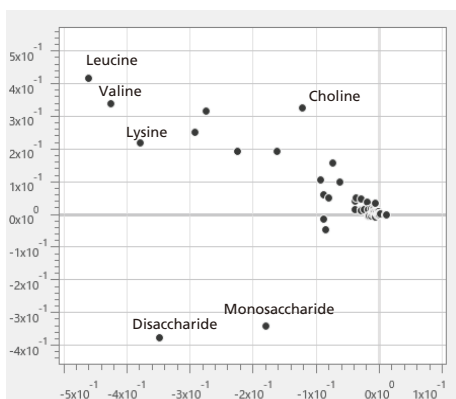


Fig. 6 味関連成分のローディングプロット (PLS-DA)

2グループ間の差異を解析する *t*-検定と *u*-検定を行いました。*p*-value(0.05以下) を Table 4 に示します。2グループ間に差異がある成分として、Malic acid など有機酸類が多く見られ、次いで糖、核酸塩基、アミノ酸が含まれていました。核酸塩基の cytidine、有機酸の malic acid、糖の disaccharide、アミノ酸の ornithine の箱ひげ図を Fig. 7 に示します。

いずれも、「ふくらみ」ありより、なし試料に多く含まれていることが分かりました。単一成分の多い少ないではなく、有機酸(酸味)と糖(甘味)などの成分間のバランスがグループ間の差異に影響していると推察されました。Table 4 の識別候補マーカーの全面積値を 100 とした場合の各成分の構成比率を Fig. 8 に示します。「ふくらみ」ありの方が、disaccharide の比率が高く、malic acid の比率が低い、つまり甘味成分の割合が多く酸味成分の割合が少ない傾向が見られました。また、核酸塩基 cytidine の割合が低いことが確認できました。

Table 4 味関連成分の *P*-Value

| Compound (LC/MS 一次代謝 MP Ver.3) | <i>P</i> -value | | 味の特徴 |
|-----------------------------------|-----------------|----------------|------|
| | <i>t</i> -test | <i>u</i> -test | |
| Cytidine | 0.000001 | 0.000041 | |
| Histamine | 0.000055 | 0.000288 | |
| Adenosine | 0.001317 | 0.000494 | |
| Disaccharide | 0.002557 | 0.002756 | 甘味 |
| Ornithine | 0.005324 | 0.007775 | |
| Adenine | 0.0062322 | 0.010407 | |
| Malic acid | 0.007597 | 0.024434 | 酸味 |
| Citric acid | 0.031563 | 0.190250 | 酸味 |
| Isocitric acid | 0.036889 | 0.093912 | |
| Glyoxylic acid | 0.048956 | 0.113490 | |

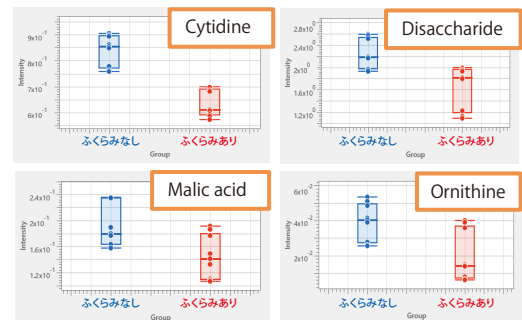


Fig. 7 味関連成分の箱ひげ図 (PLS-DA)

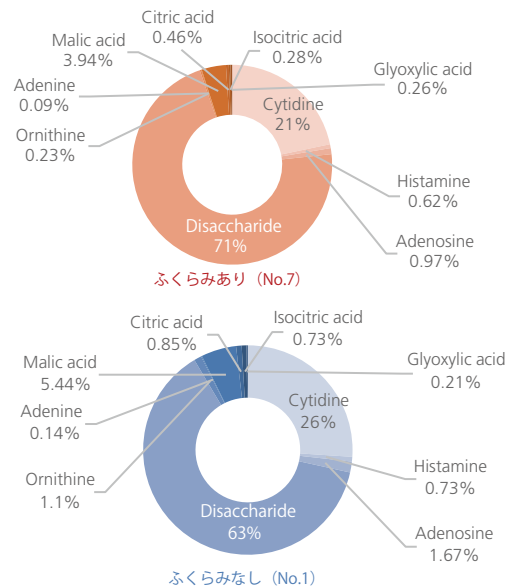


Fig. 8 「ふくらみ」識別候補マーカーの構成比率

次に、味関連成分間のバランスを考慮した「ふくらみ」有無の判別可否を検討しました。既知の試料のデータ（教師データ）を用いてモデルを作成し、未知試料の属するグループを判別する判別分析を行いました。説明変数が多いとオーバーフィッティングする可能性があるため、識別候補マーカー（Table 4）のみ用いて、eMSTAT Solutionにより判別モデル（アルゴリズム：Support Vector Machine）を作成しました。官能評価が難しかったNo.3とNo.6は除外して、No.1、4、8（ふくらみなし）No.2、5、7（ふくらみあり）を教師データとして用いました。作成した判別モデルを用いて、No.3（ふくらみなし）、No.6（ふくらみあり）の判別分析を行ったところ、グループを区別することができました（Table 5）。

Table 5 未知試料の判定結果

| Sample | サンプル No.3 | | | サンプル No.6 | | |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Repeat No. 1 | Repeat No. 2 | Repeat No. 3 | Repeat No. 1 | Repeat No. 2 | Repeat No. 3 |
| Group (判別結果) | ふくらみなし | ふくらみなし | ふくらみなし | ふくらみあり | ふくらみあり | ふくらみあり |
| Score | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Cytidine | 14439502 | 14281103 | 14691370 | 7713973 | 7717597 | 8282329 |
| Histamine | 407178 | 413855 | 400957 | 210084 | 212920 | 232184 |
| Adenosine | --- | --- | --- | 346401 | 366569 | 368241 |
| Disaccharide | 34008084 | 34718275 | 35002609 | 48041752 | 48676300 | 47720288 |
| Ornithine | 477553 | 509141 | 505657 | 334852 | 317064 | 328420 |
| Adenine | 370565 | 354402 | 339789 | 334590 | 353056 | 391475 |
| Malic acid | 5106722 | 5013678 | 5126396 | 2097430 | 2207456 | 2129184 |
| Citric acid | 1748690 | 1870895 | 1795181 | 177285 | 202658 | 183412 |
| Isocitric acid | 1415712 | 1570172 | 1412197 | 112938 | 112667 | 112690 |
| Glyoxylic acid | 126021 | 110586 | 144080 | 200200 | 199104 | 218363 |

味関連成分と同様に香気成分の分析データを用いて、PLS-DAにより統合的に解析しました。スコアプロットをFig.9、ローディングプロットをFig.10に示します。「ふくらみ」ありは主に第1象限付近に分類され、ローディングプロットからisobutanol、isobutyl acetateやethyl acetateにより特徴づけられていることが分かりました。

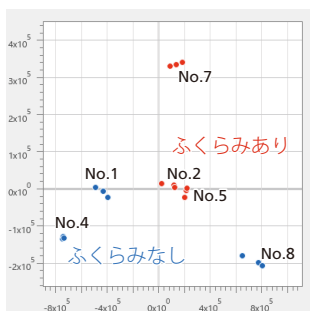


Fig. 9 香気成分のローディングプロット (PLS-DA)

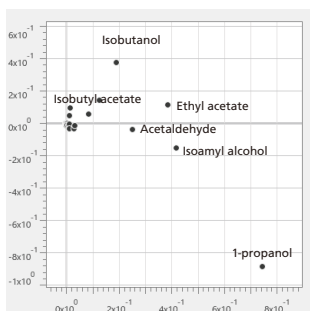


Fig. 10 香気成分のローディングプロット (PLS-DA)

t-検定とu-検定で解析したP-value（0.05以下では該当成分が1成分のみだったため、t-testについて0.2以下と指定）の識別候補マーカーをTable 6に示します。isobutanol、isobutyl acetateは箱ひげ図（Fig. 11）において「ふくらみ」ありで多い傾向にあり、特徴づける成分候補になりうることを確認できました。

Table 6 香気成分のP-value

| Compound (GC/MS NIST 20, 11th Edition) | P-value | | 香気成分の特徴 |
|---|----------|----------|---------|
| | t-test | u-test | |
| Isobutanol | 0.043052 | 0.050309 | |
| Isobutyl acetate | 0.1046 | 0.60481 | バナナ様吟醸香 |

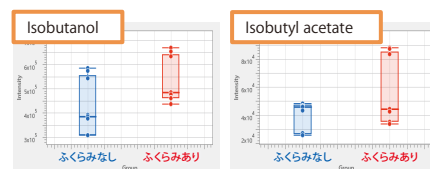


Fig. 11 香気成分の箱ひげ図 (PLS-DA)

香気成分についてTable 6の成分を用いて判別モデルを生成しました。作成した判別モデルを用いて、No.3（ふくらみなし）、No.6（ふくらみあり）の判別分析を行ったところ、区別することができました（Table 7）。

Table 7 未知試料の判定結果

| Sample | サンプル No.3 | | | サンプル No.6 | | |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Repeat No. 1 | Repeat No. 2 | Repeat No. 3 | Repeat No. 1 | Repeat No. 2 | Repeat No. 3 |
| Group (判別結果) | ふくらみなし | ふくらみなし | ふくらみなし | ふくらみあり | ふくらみあり | ふくらみあり |
| Score | 53 | 50 | 51 | 71 | 73 | 74 |
| Isobutanol | 459354 | 471397 | 467961 | 561832 | 572163 | 577937 |
| Isobutyl acetate | 43286 | 43744 | 45125 | 55372 | 51578 | 53556 |

6. 結論

- 日本酒の味わいと構成成分の関係性を調査しました。味関連成分である糖、アミノ酸、有機酸や発酵代謝成分はLC/MS、香気成分はGC/MSを用いて分析しました。
- 官能評価結果と「ふくらみ」に影響を与える成分との統合的な解析は、eMSTAT Solutionを使用して多変量解析（PCA、PLS-DA）を行いました。
- PLS-DAにより、味関連成分としてはdisaccharide（甘味）やmalic acid（酸味）など特定の糖や有機酸類が「ふくらみ」有無で差異のある成分として抽出できました。香気成分としては、isobutanol、isobutyl acetateが「ふくらみ」ありの試料に多く含まれる傾向が見られました。
- 甘味や甘い香りが感じられ、一定の余韻が残る味わい「ふくらみ」に甘味と酸味のバランス、特定のアミノ酸や核酸塩基の存在、フルーティーでバナナ様吟醸香の香気成分であるisobutyl acetateが関与していることが示唆されました。
- さらに、それらの成分を用いて生成した判別モデルによる判定結果が、官能評価が難しい試料の判断の一助となると考えられます。

参考文献

- 尾崎一隆ら，醸協，103，3，p.150-162(2008)
- 古川秀子ら，醸協，78，6，p.419-422（1983）
- 吉沢淑，小泉武夫ら，醸協，92，3，p.217-223（1997）
- 吉沢淑，醸協，75，6，p.451-457（1980）

謝辞 白鶴酒造株式会社の久保田 健斗様に、試料や試料データ（Table 1）をご提供頂きました。

分析協力（GC/MS）株式会社島津テクノロジー

株式会社 島津製作所
分析計測事業部 <https://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行：2022年3月
© Shimadzu Corporation, 2022