



Title	メタボローム解析技術に基づく成分プロファイリングによるしょうゆ中親水性低分子化合物と呈味との相関性解析
Author(s)	山本, 慎也
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34485
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

メタボローム解析技術に基づく成分プロファイリングによる
しょうゆ中親水性低分子化合物と呈味との相関性解析

山 本 慎 也

2014年 1月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース
生物資源工学領域

目次

第1章 緒論	4
1-1 しょうゆの世界市場	4
1-2 しょうゆの醸造と呈味	5
1-3 しょうゆの成分と呈味	6
1-4 しょうゆの官能評価	7
1-5 メタボローム解析技術に基づく成分プロファイリングの食品研究への応用	9
1-6 呈味と成分の相関性の解析	10
1-7 本研究の目的	11
第2章 GC/MS に基づくしょうゆの成分データと呈味との相関性解析	13
2-1 緒言	13
2-2 実験方法	13
2-2-1 試薬とサンプル	13
2-2-2 官能評価	14
2-2-3 サンプル調製	15
2-2-4 GC/MS 条件	15
2-2-5 ピーク同定	16
2-2-6 統計処理	16
2-3 結果と考察	17
2-3-1 しょうゆの QDA データ	17
2-3-2 しょうゆの GC/MS データ	18
2-3-3 PCA による全体のデータ構造の把握	21
2-3-4 PLS による呈味の予測モデルの構築	23
2-3-5 PLS による呈味と相関の高い成分の特定	27
2-4 小括	29
第3章 LC/MS/MS に基づくしょうゆのジペプチドデータと呈味との相関性解析	31
3-1 緒言	31
3-2 実験方法	33
3-2-1 試薬とサンプル	33
3-2-3 GC/MS のためのサンプル調製	36
3-2-4 GC/MS 条件	36
3-2-5 LC/MS/MS のためのサンプル調製	36
3-2-6 LC/MS/MS 条件	37
3-2-7 統計処理	40
3-3 結果と考察	41
3-3-1 しょうゆの GC/MS データ	41
3-3-2 LC/MS/MS によるジペプチドの分析手法の構築	41

3-3-3 LC/MS/MS によるしょうゆ中ジペプチドの分析	46
3-3-4 PCA による全体のデータ構造の把握	50
3-3-5 PLS による呈味の予測モデルの構築	51
3-3-6 PLS による呈味と相関の高いジペプチドの特定	57
3-4 小括	61
第 4 章 総括	63
4-1 まとめ	63
4-2 今後の展望	66
謝辞	69
引用文献	71
発表論文	80
総説等	80
出願特許	81
学会発表	82

第1章 緒論

1-1 しょうゆの世界市場

しょうゆは世界中で消費されている醗酵調味料である。近年、日本国内の出荷量は減少気味ではあるが2011年で825,000kLが出荷されている。一方、国内の出荷量に比べると少量ではあるが、日本からの輸出量と世界各国での生産量は年々増加傾向にあり、それぞれ2011年で約17,000kLと198,000kLにまで及んでいる。しょうゆが世界中で消費されるようになった主な理由は先進国を中心とする世界各国での日本食ブームとその定着にあると考えられる。表1-1に日本から海外への輸出数量とその金額を示す(しょうゆ情報センター, 2011年)。輸出数量はアメリカで約2,600 kL, 香港で約1,900 kL, 大韓民国で約1,600 kL, 英国とオーストラリアはそれぞれ約1,300 kL, 中華人民共和国は約900 kL, オランダは約800 kLとなっている。輸出数量に対する金額はアメリカで約5億円, 香港とオーストラリアでは約4億円, 大韓民国と英国では約3億円, 中華人民共和国とオランダでは約2億円となっている。

このように、しょうゆは北米, アジア, ヨーロッパ等, 世界各地において大量に消費されており, 大きな市場を確立している。世界最大のしょうゆ会社である本国のキッコーマン株式会社は, 現在アメリカに2工場, シンガポール, 台湾, オランダ, 中国にそれぞれ1工場を有しており, 営業利益では海外のほうが多い(2013年3月期)。従って, しょうゆは世界中で嗜好されている醗酵調味料であり, 我が国にとって食品産業上重要なアイテムであるといえる。

表 1-1. 日本から海外への輸出数量と金額(2011 年).

国名	数量 / kL	金額 / 百万円
アメリカ合衆国	2,559	516
香港	1,918	417
大韓民国	1,585	339
英国	1,321	294
オーストラリア	1,272	374
中華人民共和国	891	161
オランダ	844	234
フランス	793	196
ドイツ	635	173
シンガポール	503	75
タイ	395	53
フィリピン	359	53
デンマーク	304	60
インドネシア	247	39
ニュージーランド	237	67
イスラエル	229	48
オーストリア	215	30
マレーシア	210	34
ウクライナ	206	24
ポルトガル	196	31
スウェーデン	188	40
ロシア	176	41
スペイン	167	50
台湾	158	37
イタリア	157	53
その他	833	212
合計	16,597	3,651

(しょうゆ情報センター, 2011)

1-2 しょうゆの醸造と呈味

しょうゆは世界中に様々な種類が存在しており, 原料や製造方法によって味が異なる. 例えば, 日本の典型的なしょうゆであるこいくちしょうゆは, 蒸した大豆と炒って割砕した小麦をほ

ぼ等量混合したものに食塩水を混合したものを原料とする。そして乳酸菌と酵母の醗酵後に圧搾され、火入されて製品となる(Sugiyama et al., 1984)。一方、中国の伝統的なしょうゆは、比較的少量の生の小麦を使用し、菌株や醸造期間もこいくちしょうゆとは異なる(Chou et al., 1998)。このように、しょうゆは原料、製造工程などの違いによって多くの種類があり、それぞれ呈味が異なる。醸造プロセスの結果生み出される成分としてアミノ酸、糖、有機酸、ペプチドなど実に多種多様な成分があるが、これら成分の種類や量が複雑に関与することでしょうゆの呈味が生まれ、製品間の呈味強度や質の違いに関わると考えられている(Fukushima et al., 1981)。

1-3 しょうゆの成分と呈味

しょうゆには基本五味である甘味、旨味、酸味、塩味、苦味がバランスよく含まれていると言われており、それぞれの味に関与すると考えられる主要成分が特定されている。例えば、旨味はたんぱく質の酵素分解によって生じる L-グルタミン酸のナトリウム塩であるグルタミン酸ナトリウム(monosodium glutamate: MSG)、甘味はでん粉の酵素分解によって生じるグルコース、酸味は乳酸醗酵によって生じる乳酸や各種微生物の代謝に基づいて生じる酢酸、塩味は原料由来の食塩、苦味はたんぱく質の酵素分解によって生じる苦味ペプチドがそれぞれ呈味の主要成分であると考えられている(中台忠信, 2005)。このようにしょうゆの呈味において重要な成分は、しょうゆの品質の指標として定められている。例えばこいくちしょうゆの一般社団法人日本農林規格(Japanese Agricultural Standard: JAS)の項目の1つとして、アミノ酸の含有量を反映する全窒素分が使用されている。表 1-2 にこいくちしょうゆの JAS 規格として全窒素分、色度、無塩可溶性固形分について各規格値の範囲を示した。しかし、同じ規格のしょうゆが全て同じ呈味になるとは限らないため、これらの指標は呈味の評価として完全ではない。平成 25 年度の“第 41 回 全国しょうゆ品評会”ではこいくちしょうゆ 180 点、うすくちしょうゆ 29 点、たまりしょうゆ 11 点、さいしこみしょうゆ 38 点、しろしょうゆ 5 点の中から農林水産大臣賞を 4 点、食品産業局長賞を 7 点、優秀賞を 30 品選定することで優劣を評

価している。また、前述のようにしょうゆの旨味の主要成分は MSG であるが(中台忠信, 2005), 水溶液中での MSG の閾値が 0.026 % (w/v)であるのに対して, しょうゆ中での MSG の閾値は 1.9 % (w/v)である(今村 et al., 2009). 一般的なしょうゆの MSG 濃度は約 1.2 % (w/v)であるため, 異なるしょうゆ間の旨味の違いを MSG のみで認識するためには, しょうゆ間の MSG 濃度差が2倍以上必要となる。この結果は, 呈味の主要成分が必ずしもサンプル間の呈味の差に寄与しているわけではなく, 呈味の主要成分以外の成分がサンプル間の呈味の差に重要な影響を及ぼす事を示唆するものである。従って, 限られた成分のみに着目していたのでは, 製品間の呈味強度の違いに関わる情報を得ることはできない。

しょうゆの呈味が複雑である理由の 1 つとして呈味成分同士が複雑に相互作用しているためだと考えられる(Keast et al., 2003). 例えば, 単独水溶液では苦味を呈する L-フェニルアラニン及び L-チロシンが, MSG 水溶液の旨味を増強する効果が報告されている(Lioe et al., 2004 and Lioe et al., 2007). このように, しょうゆ中では呈味成分の相互作用が存在するため, しょうゆの成分と呈味の関係の研究にはできるだけ多種多様な成分を用いて解析する必要がある。また, しょうゆの成分と呈味間の関係を明らかにすることは, 品質評価や品質改良などに有用であると考えられる。しかし, しょうゆにおいて製品間の味の違いに関連することが示された成分は限られている。

表 1-2. こいくちしょうゆの JAS 規格.

規格	全窒素分 / %	色度 ^a / 番	無塩可溶性固形分 ^b / %
特級	1.50 以上	18 未満	16 以上
上級	1.35 以上	〃	14 以上
標準	1.20 以上	〃	—

^a 色度の番数は「しょうゆの標準色」の番数。番数が小さくなるほど色が濃い。

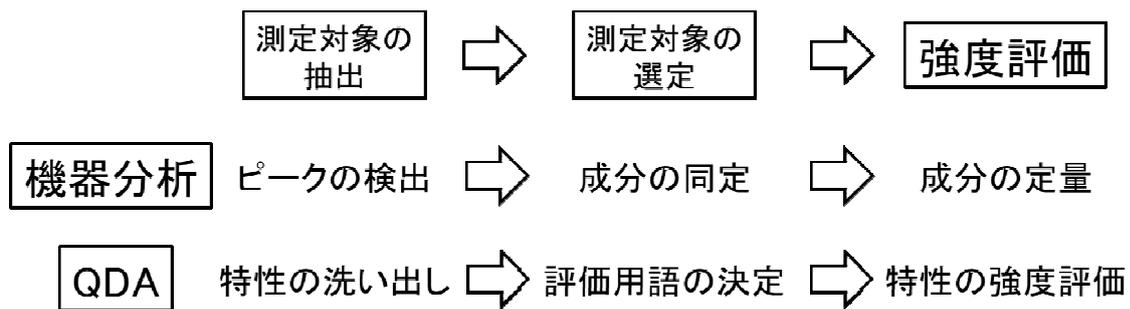
^b 成分が溶け込んでいる固形分(可溶性固形)から塩分を除いたもの。

1-4 しょうゆの官能評価

現在, しょうゆの呈味性に関する品質評価は主にヒトによる官能評価によって行われてい

る。官能評価は嗜好型と分析型の 2 つに大きく分けることができる。嗜好型がパネルの性質を知るために用いられるのに対して、分析型は試料の性質を知るために用いられる。しょうゆの呈味性を評価する方法としては分析型官能評価の一種である定量的記述分析法 (quantitative descriptive analysis: QDA) が使用されている(今村 *et al.*, 2009a and Gao *et al.*, 2011)。QDA は食品の性質を評価する“特性表現用語”をパネリスト自らが作成し、パネリスト全員で共有できる各特性の強度を評価する手法である。QDA はクロマトグラフィーなどによる成分分析と同様、定性的且つ定量的な評価手法である。1) 測定対象の抽出, 2) 測定対象の選定, 3) 強度評価の 3 つの観点から QDA とクロマトグラフィーを比較すると(図 1-1)、クロマトグラフィーでは 1) サンプルを成分毎に分離してピークを検出し, 2) そのピークの化合物同定を実施した後に, 3) そのピーク強度から各成分の含有量を算出する。一方, QDA では 1) 特性表現用語の候補を生み出すために, 特性の洗い出しを行い, 2) パネリスト間で話し合うことで特性表現用語を決定した後に, 3) パネリストの感覚器によって各特性表現用語の強度を決定する。ここで, クロマトグラフィーにおける分析機器と成分の関係が, QDA ではパネリストと特性表現用語に置き換えることができる。つまり, QDA ではパネリストが装置の代わりに務めることで食品の官能的性質を客観的かつ定量的に把握することが可能である。そのため, 定量値の日間誤差が生じにくく, 再現性が良い結果が得られる特徴を有する。しょうゆから抽出された官能特性表現用語の報告例としては旨味, 後味(旨味), 塩味, 甘味, 大豆の香ばしい風味, 昆布のにおい, ホコリっぽい香り, 香ばしい香り, まいたけの香り, 漬け物の醗酵した香り, 甘い香り, ムレた感じ, なめらかがある(今村 *et al.*, 2011)。

QDA の評価環境を整えるためにはパネリストの長期的な育成が必要となり, その環境を維持するために多大な労力とコストが必要であるという欠点があるが, QDA は食品の品質評価に有用な官能評価手法であり, しょうゆ以外にもチーズやヨーグルトなど, 様々な食品に応用されている(Ochi *et al.*, 2012, Bruzzone *et al.*, 2013)。しょうゆの成分と呈味の関係を解析する上で, QDA はしょうゆの呈味強度について最も信頼性の高いデータが取得できると考えられる。



パネル＝分析機器，特性＝成分に相当

図 1-1. 機器分析と QDA の比較.

1-5 メタボローム解析技術に基づく成分プロファイリングの食品研究への応用

近年、食品の研究にメタボローム解析に基づいた成分プロファイリングの応用が検討されている。メタボローム解析とは生体内の代謝物の網羅的な解析のことである。20 世紀後半に焦点が当てられたゲノム(遺伝子の総体)解析の次の解析として、mRNA の総体であるトランスクリプトーム、mRNA が翻訳されて生じるたんぱく質の総体であるプロテオームと共に、近年目覚ましい発展をしている学問である(福崎, 2008)。メタボローム解析の技術はこれまでに緑茶(Pongsuwan et al., 2007)、チーズ(Ochi et al., 2012)、トマト(Thissen et al., 2011)、だだちゃ豆(Arikrit et al., 2011)等の食品に適用されている。2000 年代に入ってからこれらメタボローム解析を用いた食品研究は徐々に増えてきている。図 1-2 には 2013 年 11 月 7 日現在の SciFinder によるキーワード“food”と“metabolomics”による文献の検索ヒット数を示した。

メタボローム解析では、代謝物の量と生物機能の関係を解析することによって、生物機能と関わりのある代謝物を推定することが可能である。そこで、メタボローム解析における生体サンプルの“代謝物”と“生物機能”を、機器分析で得られる食品の“成分”と QDA で得られる“呈味”に置き換えることによって、成分と呈味間の関係を解析することができる(Ali et al., 2011 and Ochi et al., 2012)。メタボロミクスで注目される中心代謝物は全ての生物が共通に有する糖、アミノ酸、有機酸などであるが、これらは食品の呈味においても重要な成分であ

る。そのため、メタボロミクスで用いられている分析手法、解析手法はそのまま食品の呈味解析に適用することが可能であると考えられる。さらに、成分と呈味間の関係を解析する際に、回帰式的一种である projection to latent structure (PLS)回帰や orthogonal PLS (OPLS)回帰を使用することによって、呈味と相関の高い成分の特定ができるため、呈味に関連する成分が特定できる可能性がある。また、成分データから呈味を予測するモデルを構築することで機器分析を用いて呈味を評価することが可能な技術を開発できる可能性がある。もし、しょうゆについて機器分析から呈味を評価することが可能な技術が確立できれば、評価環境を整えることが困難な QDA に取って代わる技術として期待できる。さらに、このようなメタボロミクス技術に基づく成分プロファイリングは、多成分について一度に適用することが可能な解析手法であるため、様々な成分から成り立つしょうゆの呈味解析の研究において重要な施行であると考えられる。

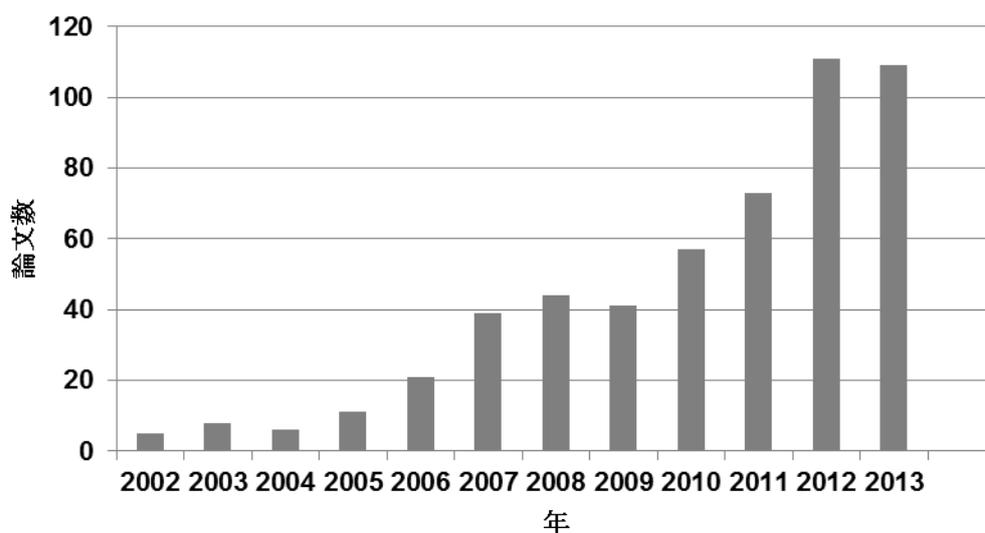


図 1-2. SciFinder によるキーワード“food”と“metabolomics”文献検索結果.

1-6 呈味と成分の相関性の解析

前述のように、メタボロミクス技術に基づく成分プロファイリングと QDA を組み合わせることで呈味と成分の相関性を解析することが可能である。具体的には、しょうゆの各製品の呈味強度のプロファイルと成分量のプロファイルの相関を解析することで、しょうゆの呈味の差に

相関の高い成分を特定することができる。例えば、しょうゆの呈味の差と正に高い相関を示す成分は、呈味強度の強いしょうゆに特徴的に多く存在することを示すため、この成分は何らかの作用によってしょうゆの呈味を増強している可能性がある。逆に、呈味の差と負に相関する成分は呈味強度の弱いしょうゆに特徴的に存在することを示すため、この成分は何らかの作用によってしょうゆの呈味を抑制している可能性がある。このように、これらしょうゆの呈味の差と相関の高い成分は、しょうゆ製品間の呈味の差に関与しうる実に重要な呈味成分候補である。例えその成分が呈味を増強している場合でも、抑制している場合であっても、しょうゆの呈味の差において重要な成分を特定することができれば、その情報はしょうゆの品質評価や品質向上において有用である。しかし、これまでに呈味と成分の詳細な相関性は解析されておらず、しょうゆの呈味の差と相関の高い成分は不明である。

1-7 本研究の目的

そこで、本研究では、しょうゆの呈味の差と相関の高い成分を特定することを目的として、QDA とメタボローム解析に基づく成分プロファイリングの技術を組み合わせてしょうゆに適用した。まず、QDA によるしょうゆの呈味の定量データと、機器分析による親水性低分子化合物の成分データをそれぞれ取得した。そして、呈味と成分の相関性の解析には多変量解析の一つであるPLS回帰を使用した。具体的には、各しょうゆについて成分データを説明変数、QDA データを応答変数とすることで、QDA データの予測モデルを構築し、variable importance in the projection(VIP)値を用いて、しょうゆの味の差と相関の高い成分を特定した。第 2 章ではまず、ガスクロマトグラフィー/質量分析(gas chromatography/mass spectrometry: GC/MS)を用いてこれまでに食品の呈味との関係が多く報告されているアミノ酸、糖、有機酸等の成分データを取得した。そして、呈味との相関性を解析することによって、しょうゆの呈味解析における成分プロファイリングの有用性について検討した。第 3 章ではしょうゆの呈味との関係が不明なジペプチドについて解析するために、まず、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析(LC/MS/MS)を用いてジペプチドの分析系を構築した。そして、し

しょうゆに適用することでしょうゆ中のジペプチドのデータを取得した。そして、第 2 章と同様の手法で、ジペプチドデータと QDA データとの相関性を解析し、しょうゆの呈味の差と相関の高いジペプチドを特定した。図 1-3 に本研究のスキームを示した。

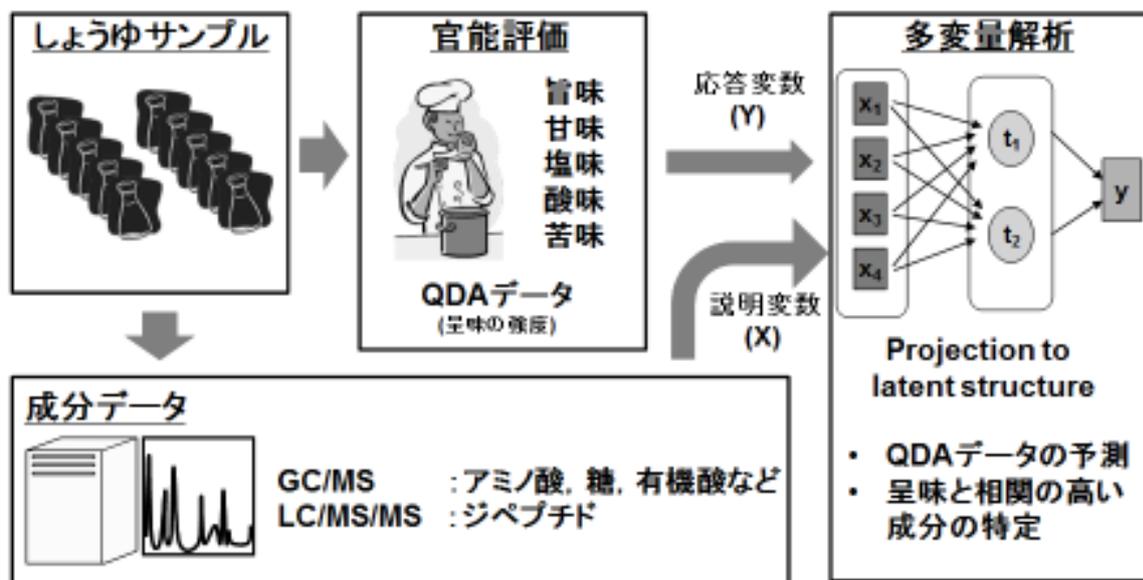


図 1-3. 本研究のスキーム.

第2章 GC/MS に基づくしょうゆの成分データと呈味との相関性解析

2-1 緒言

GC/MS は適切なサンプル調製法とカラムを選択することにより、アミノ酸、糖、有機酸などしょうゆの呈味性に関わると考えられる親水性低分子化合物の一斉分析が可能である (Pongsuwan et al., 2007, Tianniam et al., 2008 and Ochi et al., 2012). また、GC からの溶出時間と、電子イオン化(electron ionization: EI)法による化合物のフラグメント情報が再現性よく得られ、ライブラリーの情報も充実していることから、分析毎に標準品を用いずとも 100 種類以上の化合物の高精度な同定が一斉に可能である. 近年、自動ピーク同定システムが構築され、ピーク同定の精度と解析時間も向上した(Tsugawa et al., 2011). GC/MS で親水性低分子化合物を分析するには誘導体化試薬による処理が不可欠だが、以上の利点から GC/MS はしょうゆの呈味性に関わると考えられる成分を一斉に分析するのに有用な手法であると思われる.

そこで、本章では GC/MS に基づいて得られるアミノ酸、糖、有機酸等についてしょうゆの呈味の差と相関の高い成分を特定するとともに、しょうゆの呈味解析における成分プロファイリングの有用性を検討することを目的とした. そのために、QDA によるしょうゆの呈味性の定量データと GC/MS による親水性低分子化合物の成分データを取得し、その相関性を解析した. 相関性の解析には、多変量解析の一つである PLS を使用し、各しょうゆについて成分データを説明変数、QDA データを応答変数とすることで、QDA データの予測モデルを構築した. また、その予測性能を評価して呈味性評価法として使用できる可能性について検討した. さらに、予測モデルのデータ構造を解析することで、しょうゆ製品間の味の差に重要と考えられる成分を特定した.

2-2 実験方法

2-2-1 試薬とサンプル

用いた試薬はすべて分析グレードのものを用いた. 蒸留水、メタノール、クロロホルム、リ

ビトール, メトキシアミン塩酸塩, ピリジンは和光純薬工業株式会社より購入した. *N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドはジーエルサイエンス株式会社より購入した. 分析サンプルは日本, 中国, アメリカより購入したしょうゆ, 及びアミノ酸液 (HVP: Hydrolyzed Vegetable Protein)の合計 24 種類を用いた. 中国とアメリカのサンプルはそれぞれの国のメーカーが製造したものをを用いた. これらのサンプルはできる限り幅広い性質のしょうゆサンプルとなるように選抜した. HVP はしょうゆに似た調味料であり, しょうゆと同様の用途で使われる事があるためサンプルに加えた.

2-2-2 官能評価

QDAを用いて, 各サンプルの定性的・定量的評価を行った. 既報に準じて選抜したQDA 専門パネル 13 名によって行った(今村 *et al.*, 2008). サンプルは 3 桁の乱数を貼り付けたカップに 20 ml を注ぎ, シャーレで蓋をしてパネリストに提示した. 提示の順番はパネリスト毎にランダム化した. 香りはシャーレの蓋をとり評価した. 風味, 味および食感はサンプル 0.2 ml を食して感じた特性を評価させた. サンプルから感じる特性をパネリスト一人一人に記述させた後, 各人が感じた特性についてパネル全体での話し合いを行った. パネルが共通認識を持てること, および強度評価ができることを基準に特性表現用語を選定した. 定量評価にはソフトウェアである Compusense five 4.25 J (Guelph)を用いてパソコンのモニター上に表示させた線尺度 (10 cm の長さで, 両端から 1 cm のところにアンカーが付いている) を用いた. 各特性表現用語について“感じない”を線尺度の左端, “今まで感じた中で最も強い”を右端として, パネルは感じた特性の強度が当てはまるポイントを各自が選択し, 左端からの距離をその特性の強度値として用いた. 強度のスケールは左端を 0.0, 右端を 10.0 として 101 ポイントのスケールで実施した. 本評価では 1 セッションあたり 3 サンプルを評価し, 1 サンプルあたり 3 回の繰り返しデータを取った.

2-2-3 サンプル調製

各しょうゆサンプル 20 μl を 1.5 ml マイクロチューブに移し、メタノール/蒸留水/クロロホルム (5:2:2, v/v/v) の混合溶液 1 ml と内部標準物質として 0.2 mg/ml の濃度で蒸留水に溶解させたリビトールを 60 μl 加えてボルテックスで混合し、更に、ソニケーション を 1 分間行った。続いて遠心分離機 (Eppendorf model 5415 R, エッペンドルフ株式会社) により 13400 x g, 4°C の条件で 3 分間遠心分離を行った。その後、上澄み液 900 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、400 μl の蒸留水を加えてボルテックスした後に 13,400 x g, 4°C の条件で再び遠心分離を 3 分間行った。次いで、溶液は水層とクロロホルム層に分離した溶液の上層 900 μl を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。そして遠心濃縮機 (Taitec model VC-96R, タイテック株式会社) により 2 時間遠心濃縮を行った。その後、抽出液を液体窒素で凍結して、凍結乾燥機 (Taitec model VD-800F, タイテック株式会社) を用いて一晩凍結乾燥を行うことで溶媒を除去した。

乾燥後の抽出物に 20 mg/ml の濃度でピリジンに溶解させたメキシアミン塩酸塩を 100 μl 加えて 1 分間ソニケーションを行った。そしてサーモミキサー (Eppendorf AG model 5355, エッペンドルフ株式会社) を用いて 1,250 rpm, 30°C の条件を 90 分間保持してメキシ化を行った。その後、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを 50 μl 加え、サーモミキサーで 1250 rpm, 37°C の条件を 30 分間保持し、トリメチルシリル化処理を行った。その後、不溶物を除去するために、13,400 x g, 4°C の条件で 3 分間遠心分離を行い、上澄み液 100 μl を GC/MS 用バイアル瓶に移した。

2-2-4 GC/MS 条件

ガスクロマトグラフは 689 CN (Agilent technologies), オートサンプラーには Agilent 7683B オートサンプラー (Agilent technologies) を用いた。また、カラムは CP-SIL 8 CB-Low bleed 30 m x 0.25 mm i.d. フューズドシリカキャピラリーカラム (Agilent technologies) を用いた。質量分析計には Pegasus III TOF 質量分析計 (LECO) を用いた。スプリット比、インジェクション量、イ

ンジェクション部の温度はそれぞれ 1:35, 1 μ l, 230°C に設定した. カラムオーブンはサンプルのインジェクション後, 80°C を 2 分間保持した後に 15°C/min で 320°C まで昇温させ, その後 320°C を 6 分間保持した. カラム中のヘリウムガス流量, ガスクロマトグラフィーと質量分析をつなぐトランスファーラインの温度, イオン化部の温度はそれぞれ 1 ml/min, 250°C, 200°C に設定した. イオン化は 70 eV の電子ビームを用いた電子イオン化 (electron ionization: EI) 法を用い, スキャン範囲は m/z 50-500, 加速電圧は 1600 V, スキャンスピードは 20 s^{-1} に設定した. サンプルインジェクションの 250 秒後にデータの取得を開始した.

2-2-5 ピーク同定

ピークの検出とアライメントは MetAlign(Wageningen UR , <http://www.pri.wur.nl/UK/products/MetAlign/>)を用いた. ピーク同定はガスクロマトグラフでの保持時間と, 質量分析によって得られた EI マススペクトルを基準として半自動ピーク同定ソフトである AIoutput により行った(Tsugawa et al., 2012). また, 内部標準物質であるリビトールと, 擬似内部標準物質としてアラニン, アスパラギン, カダベリン, グルタミン酸, オルニチン, トリプトファン, チロシンを用いて保持時間の補正を行った. AIoutput によって同定されなかったピークは NIST ライブラリーのマススペクトルとの比較により化合物の同定を行った. ピーク同定の基準となるシミュラリティーの閾値は 80 %とした. NIST ライブラリー検索でも同定できなかった化合物については AIoutput を用いて, soft independent modeling of class analogy(SIMCA)法に基づいてマススペクトルを解析し, 化合物群の分類を行った.

2-2-6 統計処理

サンプル間の QDA データの有意差を検討するためにしょうゆの種類を因子として一元配置分散分析を行った. 主成分分析(principal component analysis: PCA)と PLS は SIMCA-P(Umetrics)を用いて行った. データは各説明変数を説明変数の平均で引き, 更に標準偏差の平方根で除すパレートスケールを用いた. PCA では GC/MS より取得した成分

データを用いた。PLS では GC/MS より取得した成分データを説明変数、QDA データを応答変数として使用した。オーバーフィッティングの評価には permutation test を用いた。

2-3 結果と考察

2-3-1 しょうゆの QDA データ

定性評価では、パネリスト一人一人にしょうゆサンプルから感じた特性を記述させた後、パネル全体で話し合って特性表現用語を選定した。その結果、味 10 種類、香り 27 種類、風味 15 種類、食感 4 種類の合計 56 種類の特性表現用語が選定された。各サンプルについてこれら 56 特性を定量評価した。サンプル間の違いを評価するために、各特性について得られた QDA データの一元配置分散分析を行った ($p < 0.01$)。検定統計量 F 値は以下の計算式で求められる値であり、群間平均平方 V_A と誤差平均平方 V_E の比である。

$$F = V_A / V_E = (S_A / \varphi_A) / (S_E / \varphi_E)$$

同様に S_A は群間平方和、 S_E は誤差平方和、 φ_A と φ_E は自由度をそれぞれ示す。一元配置分散分析における F 値は、サンプル間における QDA データの差が大きいほど V_A が V_E に比べてより大きくなるので F 値も大きくなる。有意差検定を行ったところ、サンプル間の QDA データの平均に違いがあった特性は 56 特性中、54 特性であり、評価に供したしょうゆには多くの特性について有意差が認められた。有意に差がない特性表現用語はしょうゆ間において品質の違いがないことを意味しているため、以降の解析ではサンプル間で有意差がある特性のみを用いて実施した。表 2-1 に基本五味の QDA データの一元配置分散分析の結果を示した。尚、過去に報告された、しょうゆから抽出された官能特性表現用語の例としては旨味、後味(旨味)、塩味、甘味、大豆の香ばしい風味、昆布のにおい、ホコリっぽい香り、香ばしい香り、まいたけの香り、漬け物の醗酵した香り、甘い香り、ムレた感じ、なめらかがある(今村, 2011)。

表 2-1. 基本五味における QDA データの一元配置分散分析結果.

呈味	F 値	有意確率(p 値)
旨味	5.56	0.000
甘味	18.6	0.000
塩味	4.59	0.000
酸味	4.66	0.000
苦味	14.2	0.000

2-3-2 しょうゆの GC/MS データ

GC/MS により, 全 24 種類のサンプルを 3 回ずつ分析した. 図 1 A, B, C, D はそれぞれ日本産サンプル, 中国産サンプル, アメリカ産サンプル, アミノ酸液の抽出物の全イオン電流クロマトグラム(TICC)を示す. 最も大きいピークはグリセロールであった. また, グリセロール以外にも乳酸, アラニン, グルコース, グルタミン酸, スクロース, ガラクトース, グリシン, アスパラギン酸, リシン等が検出された.

全 24 サンプルの GC/MS による成分分析により, 合計 289 個のピークが検出された. Aloutput と NIST ライブラリーを用いてピーク同定を行なった結果を表 2-2 に示した. 289 個のピークのうち 83 種類を同定した. また, 残りの未同定ピークのうち 63 個が有機酸, 25 個がアミン, 17 個が糖, 1 個を脂肪酸に分類し, 残りの 100 個については分類できなかった. 同定した 83 種類と各化合物群に分類した 106 種類の計 189 種類の成分データを用いてデータ行列を作成し, 多変量解析に供した.

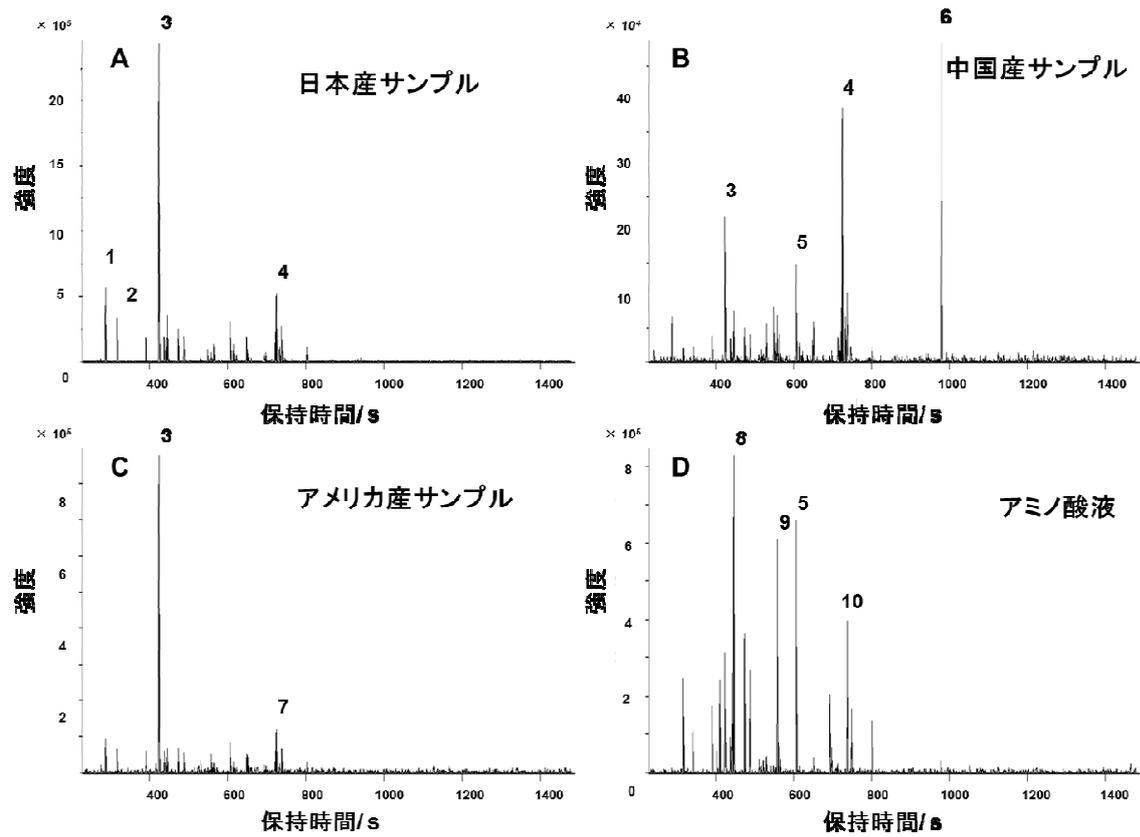


図 2-1. 日本産サンプル(A), 中国産サンプル(B), アメリカ産サンプル(C), アミノ酸液(D)の抽出物の GC/MS で取得した TICC:1, 乳酸;2, アラニン;3, グリセロール;4, グルコース;5, グルタミン酸;6, スクロース;7, ガラクトース;8, グリシン;9, アスパルギン酸;10, リシン.

表2-2. GC/MSにより同定した化合物の一覧と、分類可能な未同定化合物数.

糖類 34種類	1,5-アンヒドロ-D-グルシトール	リキソース
	1,6-アンヒドロ-β-D-グルコース	マルトース
	2-デヒドロ-D-グルコン酸	マンニトール
	アラビノース	マンノース
	アラビトール	メソ-エリトリトール
	α-ソルボピラノース	N-アセチルグルコサミン
	β-ラクトース	ブシコース
	D-マンノピラノース	リボース
	フルクトース	リブロース
	ガラクトクトール	ソルビトール
	ガラクトサミン	スクロース
	ガラクトース	タガトース
	ガラクトツロン酸	トレイトール
	グルコサミン	トレハロース
	グルコース	ツラノース
	イノシトール	キシリトール
	ラクチトール	キシロース
アミノ酸類 23種類	アラニン	オルニチン
	アスパラギン	フェニルアラニン
	アスパラギン酸	プロリン
	β-アラニン	ピログルタミン酸
	グルタミン酸	セリン
	グリシン	2-アミノ-3-ヒドロキシコハク酸
	ホモセリン	スレオニン
	イソロイシン	trans-4-ヒドロキシプロリン
	ロイシン	トリプトファン
	リシン	チロシン
	メチオニン	バリン
	N-アセチルグルタミン酸	
	有機酸類 15種類	2-アミノピメリン酸
2-メチル馬尿酸		馬尿酸
γ-アミノ酪酸		イソクエン酸
酢酸		キヌレン酸
アセト酢酸		乳酸
安息香酸		リンゴ酸
クエン酸		ペンタン酸
グルカル酸		
その他 11種類	2-アミノエタノール	ヒポキサンチン
	2'-デオキシウリジン	プトレシン
	2-ヒドロキシピリジン	チラミン
	カダベリン	ウラシル
	シトシン	キサンチン
	ヒスタミン	
分類可能な未同定化合物 106種類	有機酸類	63種類
	アミン類	25種類
	糖類	17種類
	脂肪酸類	1種類

2-3-3 PCA による全体のデータ構造の把握

メタボローム解析から得られるデータは膨大であることから、まずは PCA によって全体のデータ構造を把握する研究例が多い(Moco et al., 2006). そこで、GC/MS によって得たしょうゆの成分データを PCA に供した. 第 1 主成分(PC 1)と第 2 主成分(PC 2)を用いたスコアプロット(図 2-2 A)より、日本産、中国産、アメリカ産のしょうゆ、そしてアミノ酸液毎に分布の特徴を確認できた. しかし、日本産とアメリカ産に由来するそれぞれのサンプルは日本の 2 種類のサンプルを除いてほとんど同じ領域にプロットされた. また、ローディングは主成分分析によって抽出されたスコアと、生データ(X 変数)との相関係数として定義されており、つまり、スコアと X の相関を結果として見ることで、スコアと相関の高い変数(成分)を視覚的に容易に特定することができる. ローディングプロット(図 2-2 B)より、中国産のサンプルにはスクロースが多く含まれている傾向があることがわかった. これは中国のしょうゆの多くには添加物としてカラメル化した糖類が用いられているためだと考えられる. また、アミノ酸液はグリシン、アラニン、プロリンなどのアミノ酸が多く含まれていた. アミノ酸液は塩酸を用いてタンパク質を分解することによって製造されたものであるため、アミノ酸の含有量が他のしょうゆに比べて多い. このように、GC/MS で取得した成分データはしょうゆの種類の違いを反映していた.

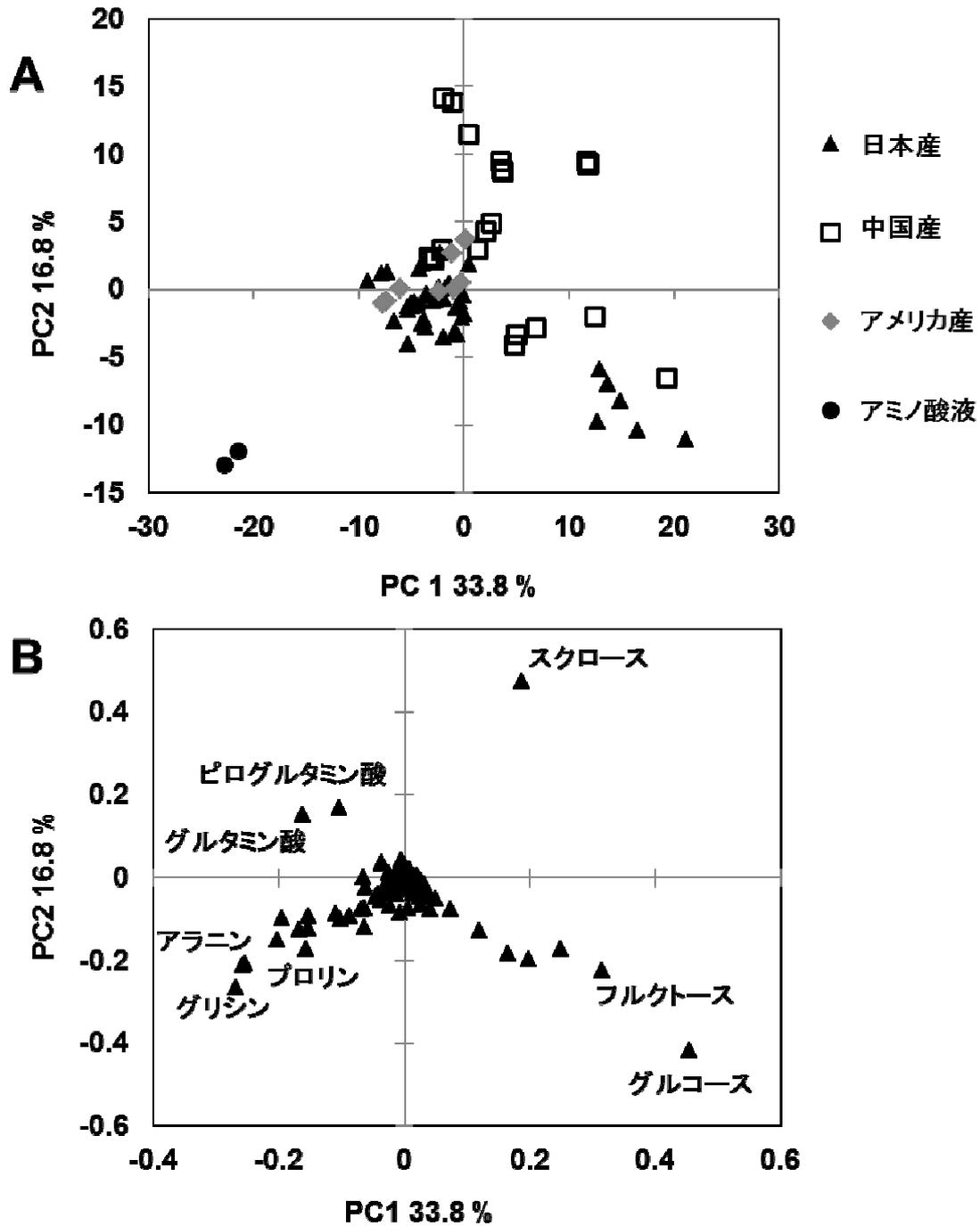


図 2-2. GC/MS に基づく親水性低分子化合物データを用いたしょうゆサンプル 24 種類の PCA スコアプロット(A)及び成分 199 種類のローディングプロット(B).

2-3-4 PLS による呈味の予測モデルの構築

回帰分析とは説明変数 X によって、応答変数 Y を予測・説明するための方法である。その一種である PLS 回帰分析は説明変数をそのまま用いずに、データが縮約された潜在変数を決定することにより変数を減少させることが可能である。例えば、重回帰分析の場合、説明変数間に強い相関がある場合には、ある変数で予測した部分を別の変数で打ち消すなど、変数同士が互いに影響を及ぼし合う可能性が高いため、信頼性の高い予測モデルを作成することができない。この現象を多重共線性というが、PLS 回帰分析では潜在変数を用いることによって回帰に用いる変数を減少させることが可能なため、多重共線性のリスクを減少することができる。そのため、より多くの説明変数を用いた良好な予測モデルを作成することが可能であり、多変量の相関の解析に有用である (Jonsson et al., 2004)。そこで、PLS 回帰分析を用いて 54 種類の特性表現用語についてそれぞれ QDA データの予測モデルを構築した。

図 2-3 に基本五味である旨味、甘味、塩味、酸味、苦味の予測モデルを示した。各マーカーが各サンプルを示し、横軸は PLS 回帰により予測した QDA データ、縦軸は実際の QDA データとしてプロットした。図中の対角線は実測値と予測値が等しい部分を示しており、各プロットがこの直線に近いほど予測能が高いことを意味している。図 2-3 より、各呈味について予測値が直線に対して近い部分にプロットされた。

客観的に予測モデルの質を評価するために、モデルの直線性の指標となる R^2 値と予測力の指標となる Q^2 値を用いて評価を行った。 R^2 値及び Q^2 値は 1 に近いほど良い予測モデルであり、具体的には R^2 値が 0.65 以上あればおおよそその定量的予測が可能で、 Q^2 値は 0.5 以上あれば良好な予測モデルとされている (Williams et al., 1987 and Eriksson et al., 2001)。表 2 に 6 種類の味の予測モデルの R^2 値と Q^2 値を示す。基本五味の予測モデルにおいて R^2 値は 0.88 以上、 Q^2 値は 0.6 以上であり、精度の高いモデルであった。また、その他の特性表現用語についても R^2 値が 0.65 以上、 Q^2 値が 0.5 以上となり、一元配置分散分析で有意差のあった 54 種類の官能特性全てについて良好な予測モデルを構築することができた。

続いて、予測モデルの信頼性を評価するために、モデルのオーバーフィッティングについて permutation test により検証した。オーバーフィッティングとは用いたサンプルに対して過剰にモデルを適合させてしまうことによって他のサンプルへの適用性が低くなってしまふことである。Permutation test では、まず、説明変数と応答変数の組み合わせをサンプル間でランダムに変化させたデータ行列で予測モデルを構築し R^2 値と Q^2 値を求める作業を 100 回繰り返した。また、その時の真の応答変数との相関係数も求めた。図 2-4 のグラフの縦軸は予測モデルの R^2 値と Q^2 値を、横軸はランダムに変化させた応答変数と真の応答変数との相関係数として、各予測モデルの結果をプロットした。また、元の応答変数の時(相関係数 1)の時の R^2 値と Q^2 値もプロットして線形近似式を作成した。オーバーフィッティングの評価基準としてはこの近似式の切片を用いた。 R^2 値と Q^2 値でそれぞれ 0.3 と 0.05 以下であればオーバーフィッティングはしていないとされる(Eriksson et al., 2001)。もし、オーバーフィッティングしている場合は、応答変数の組み合わせが変化したとしても、 R^2 値と Q^2 値の近似式の傾きは小さくなり切片は大きい値となる。各 PLS 予測モデルの応答変数を変化させた結果、 R^2 値と Q^2 値は顕著に減少していずれも評価基準値以下となった。そのため、これらの予測モデルはオーバーフィッティングしていない。

以上のことから、GC/MS によって得られた親水性低分子化合物にフォーカスした成分データはしょうゆの各 QDA データを高い精度で予測できた。これより、GC/MS を用いた成分プロファイリングの技術がしょうゆの呈味性評価法に応用できる可能性が示された。

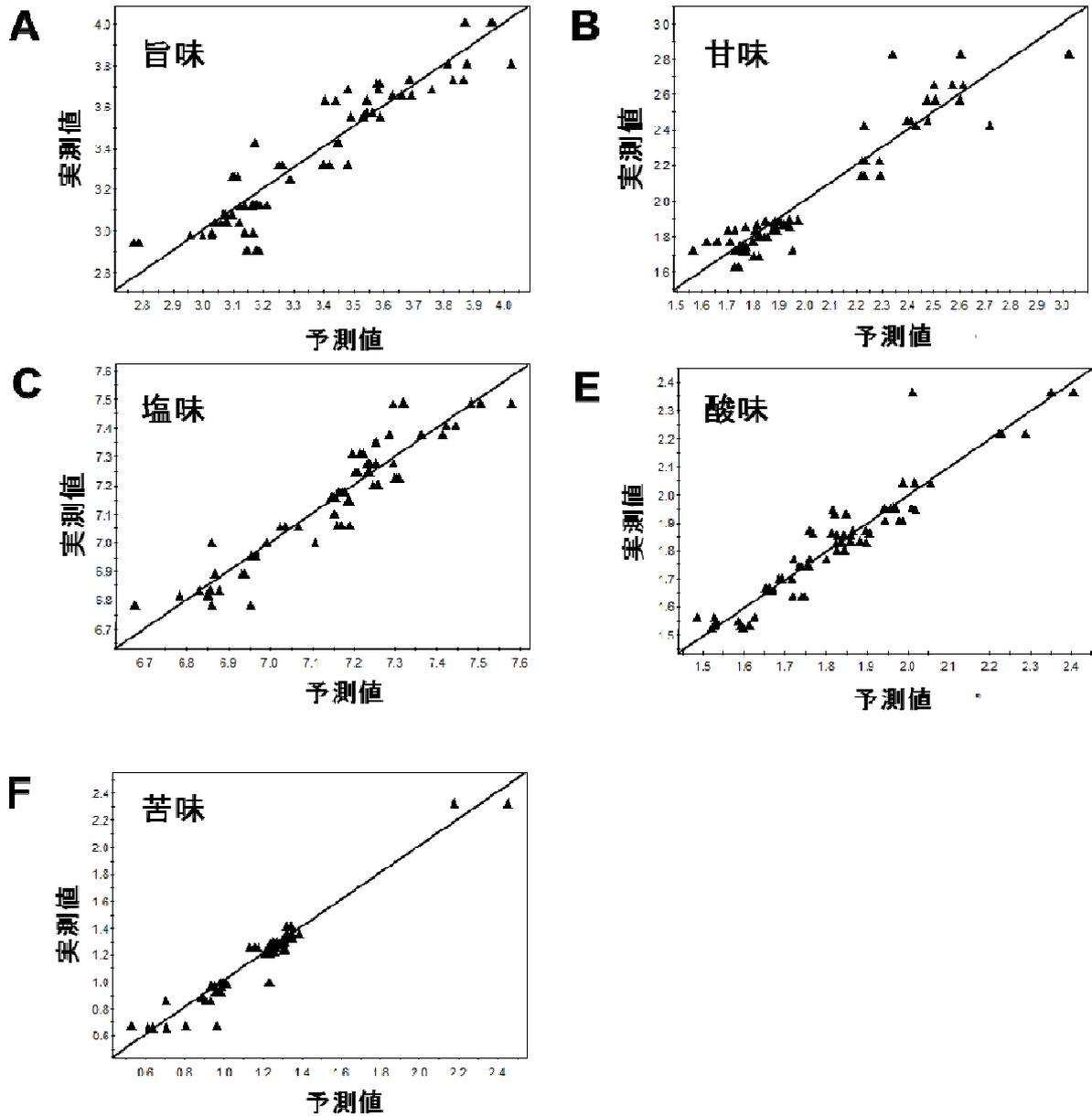


図 2-3. 旨味(A), 甘味(B), 塩味(C), 酸味(D), 苦味(E)の PLS 予測モデル. 各マーカーが各サンプルを示し, 横軸は PLS 回帰分析により予測した QDA データ, 縦軸が実際の QDA データを示す. 対角線は実測値と予測値が完全に一致している部分を示す.

表 2-3. 呈味の PLS 予測モデルにおける R^2 値と Q^2 値.

呈味性	R^2 値	Q^2 値
旨味	0.875	0.705
甘味	0.894	0.626
塩味	0.883	0.708
酸味	0.895	0.766
苦味	0.939	0.689

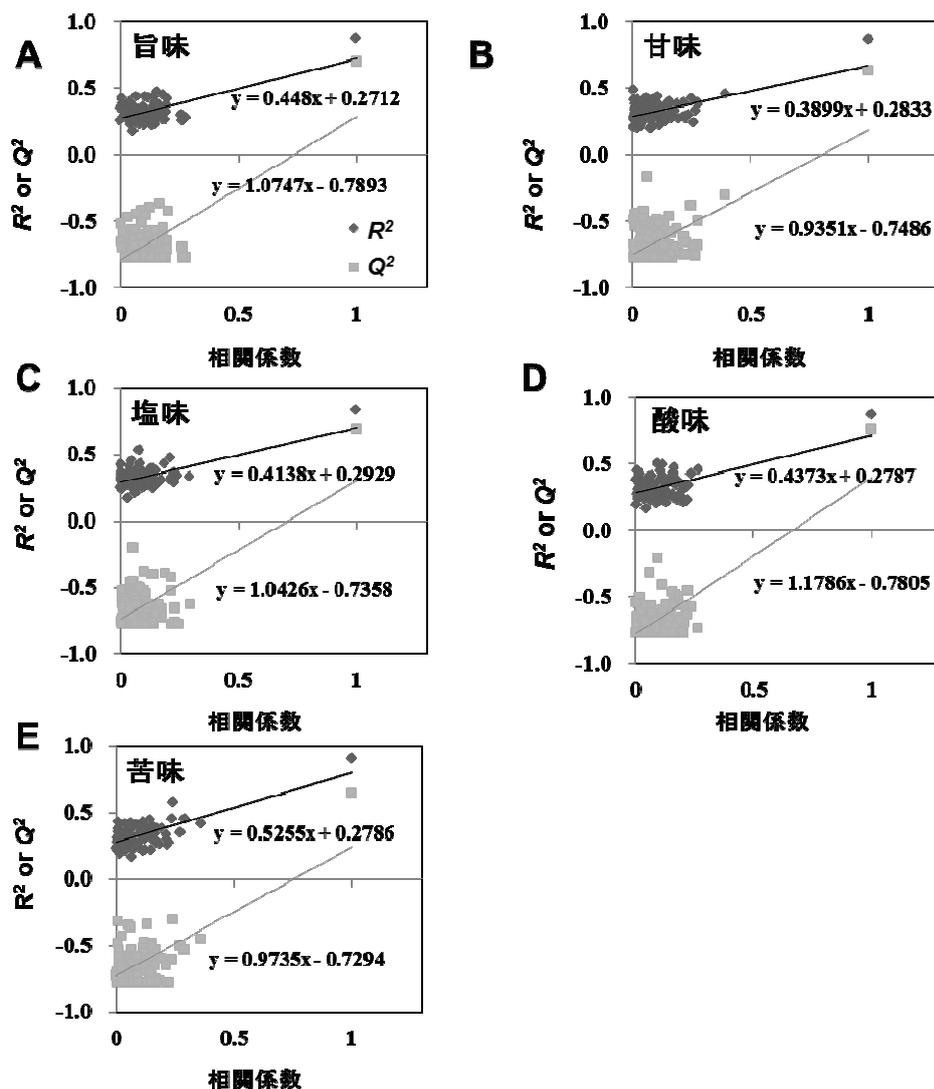


図 2-4 旨味(A), 甘味(B), 苦味(C), 塩味(D), 酸味(E), 渋味(F)のオーバーフィッティングの評価. 横軸は説明変数と応答変数の組み合わせをサンプル間でランダムに変化させた時の, 真の応答変数との相関係数を示し, 縦軸はその場合の R^2 と Q^2 の値を示している. 応答変数の組み合わせの変化は 100 回行い, それぞれの結果と真の応答変数の場合の結果をプロットした.

2-3-5 PLS による呈味と相関の高い成分の特定

PLS 回帰分析は応答変数の予測モデルを作成するだけでなく、VIP 値を用いることにより各説明変数の予測モデルの予測性能への貢献度を知ることが可能である(Eriksson and Johansson, 2001). 以下に VIP 値の計算式を示した.

$$VIP_j = \sqrt{\sum_{a=1}^A (W_{ak}^2 * (SSY_{a-1} - SSY_a)) * \frac{K}{SSY_0 - SSY_A}}$$

A は潜在変数の数, W は潜在変数における説明変数のウェイト, SSY は予測残差の分散, K は成分数をそれぞれ示す. VIP 値は各説明変数について計算され, 値が大きいほど予測モデルの予測性能に対する寄与が大きい. 特に, 予測性能への貢献度の高い説明変数の VIP 値は 1 以上となる (Eriksson and Johansson, 2001). また, 相関の正負は回帰式の係数を用いて評価した. VIP 値は単回帰分析における相関係数(R^2)のように, 相関性を示す指標であるため, 高い VIP 値が算出された成分は, しょうゆの QDA データの差に相関が高いことを示す. また, ここでの相関とはサンプル間における成分と QDA データ間を対象としているため, しょうゆ中に多量に含まれる成分であっても, サンプル間で違いが出なければ VIP 値は大きくならない. 従って, VIP 値を指標とすることで, しょうゆ間の味の差において重要と考えられる成分の特定が期待される.

各味の予測モデルにおける VIP 値のランキングを表 2-4 に示した. VIP 値の値がトップ 3 にランクインされた成分についてその成分名と VIP 値を示した. また, 寄与の正負を回帰係数の値で判断し, 負に相関する成分には記号“*”を記した. 旨味の予測モデルにおいて最も高い VIP 値を示した成分はグルタミン酸であった. グルタミン酸のナトリウム塩である MSG は, しょうゆの旨味成分の主要成分だと考えられているため, VIP 値も大きくなったのだと考えられる(Nishimura and Kato, 1988). また, 甘味の予測モデル性能に最も寄与していた 3 化合物はグルコース, スクロース, フルクトースであった. フルクトースは天然の糖類の中で最も甘味が強いことが知られているため, VIP 値が大きくなったのだと考えられる(Zittan, 1981). 酸味や苦味においては甘味成分であるグルコース, スクロース, そしてグリシンが最

も大きいVIP値を示した。また、この3つの化合物は全てQDAデータと負に相関していた。これは酸味や苦味は甘味成分により抑制されるためだと考えられる(Takagi et al., 1998 and Maria et al., 2006)。酸味では乳酸などの有機酸、苦味ではロイシンなどの疎水性アミノ酸がそれぞれ重要な成分だと考えられるが、甘味成分がより高いVIP値を示した。この結果は、苦味や酸味を呈する成分に比べて糖類を中心とする甘味成分による抑制効果がしょうゆ間の苦味や酸味の違いに重要な役割を果たしているのではないかと推察される。

このように、しょうゆ製品の呈味の差に相関の高い成分を特定することができ、VIP値の高い成分は各味において重要と考えられる成分であった。そのため、VIP値はモデルの予測性能に対する寄与だけでなく、サンプル間の味の差に影響する成分を評価する指標として使用できるということが示唆された。

表 2-4. VIP 値を指標に特定した呈味と相関の高い成分。

呈味	VIP ランキング	ジペプチド	VIP 値
旨味	1	グルタミン酸	5.15
	2	グルコース	3.91
	3	スクロース	3.62
甘味	1	グルコース	3.97
	2	スクロース	3.76
	3	フルクトース	3.74
塩味	1	グルコース *	4.56
	2	フルクトース*	3.39
	3	スクロース*	3.27
酸味	1	グルコース*	4.56
	2	グリシン*	3.77
	3	フルクトース*	3.56
苦味	1	グルコース*	4.48
	2	スクロース*	3.42
	3	グリシン*	3.19

*QDA データと負に相関している成分

2-4 小括

本章では、GC/MS に基づいて得られるアミノ酸、糖、有機酸等についてしょうゆの呈味の差と相関の高い成分を特定するとともに、しょうゆの呈味解析における成分プロファイリングの有用性を検討した。

まず、しょうゆの QDA により、56 種類の特性表現用語が同定され、そのうち 54 種類についてしょうゆのサンプル間で有意差が認められた。一方、GC/MS を用い、しょうゆ中の糖、アミノ酸、有機酸などの親水性低分子化合物をターゲットとした一斉成分分析を行った。その結果、289 個のピークを検出し、そのうち 83 種類を同定し、残りのうち 106 種類は化合物群に分類する事ができた。

メタボロミクスに基づく成分プロファイリングの技術を初めてしょうゆに適用した。GC/MS に基づくしょうゆの親水性低分子化合物の成分データを説明変数、しょうゆの QDA データを応答変数とした PLS 回帰により、54 種類の各官能特性の予測モデルを構築したところ、全ての官能特性について良好な QDA データ予測モデルを構築することができた。この結果は、GC/MS に基づくしょうゆの成分データからしょうゆの各 QDA データを高精度に予測することが可能であることを示す。これより、GC/MS を用いた成分プロファイリングの技術が、官能評価特性の評価法として使用できる可能性を示すことができた。

また、GC/MS に基づく親水性低分子化合物の成分データと基本五味の QDA データの相関性について PLS 回帰により解析した。VIP 値を指標として用いることによってしょうゆの呈味の差と相関の高い成分が特定したところ、特定された成分はしょうゆの味において重要と考えられるグルタミン酸や糖類であった。これより、VIP 値はサンプル間の味の差に影響する成分を評価する指標として使用できるということが示唆された。さらに、しょうゆ製品間の塩味、酸味、苦味の差には、糖類の抑制効果が大きく寄与する可能性を示した。

以上の通り、本章では、メタボロミクスに基づく成分プロファイリングの技術と QDA を組み合わせることで、QDA によって得られた呈味のデータと GC/MS に基づいて得られるアミノ酸、糖、有機酸等の成分データの相関性を解析した。成分データと呈味性には高い相関が

あり, 成分データから QDA データを高精度に予測することが可能であった. そして, しょうゆの呈味において重要と考えられる, しょうゆの呈味の差と相関の高い成分を特定することが可能であった. 本章での成果は, 成分プロファイリングがしょうゆの呈味解析において有用であることが提示されたことを意味する.

第3章 LC/MS/MSに基づくしょうゆのジペプチドデータと呈味との相関性解析

3-1 緒言

しょうゆの製造工程において、原料である大豆や小麦たんぱく質の70~90%は分解されて遊離のアミノ酸や可溶性ペプチドとなる(Chou and Ling, 1998). 平均アミノ酸残基数2~3のペプチドであるジペプチドやトリペプチドはこいくちしょうゆやたまりしょうゆに全窒素中10~20%含まれており、窒素化合物の中では遊離アミノ酸に次いで多く含まれる(Takeuchi et al., 1962). 一方、しょうゆ中の低分子ペプチドが呈味性への関与していることを示唆する研究論文が近年いくつか報告されている。例えば、インドネシアしょうゆにおいて、低分子ペプチドを含む分子量500以下の画分が、最も旨味が強いことが示された(Apriyantono et al., 2002 and Apriyantono et al., 2004). また、しょうゆの原料である小麦グルテンの酵素分解物から、N末端のグルタミン酸やグルタミンが化学的変換を受けてピログルタミン酸化したピログルタミルペプチドには呈味増強効果があることが報告されている(Schlichtherle-Cerny and Amado, 2002). さらに、旨味の強い関西風うどんだしにはピログルタミルペプチドが多く含まれるとの報告もある(Katsura et al., 2005). そこで、こいくちしょうゆとたまりしょうゆにおける低分子ペプチドの旨味への貢献度が、呈味を感じる最大希釈率(TD factor)を用いる taste dilution analysis(TDA)によって評価された。しかし、低分子ペプチド画分の旨味の TD factor は小さく、旨味への貢献度は低く見積もられた (Lioe et al., 2006). ところが、その後こいくちしょうゆからそれ自身は閾値以下且つ、単体では甘味を呈するにも関わらず旨味を増強する成分としてピログルタミルジペプチドが特定されている(Kaneko et al., 2011). この事実はピログルタミルジペプチドのように閾値以下の濃度であっても、相互作用により呈味に関与する成分があるため、閾値以下の低濃度成分にも着目する必要があることを示唆する。

このように、しょうゆ中の低分子ペプチドの中でも、特にジペプチドが呈味性に関与することを示唆する研究成果が報告されているが、ジペプチドと呈味の関係は以前と不明のままである。しょうゆ中の個々のジペプチドと呈味性との関係を明らかにすることはしょうゆの呈味

の解析において重要と考えられるが、ジペプチドは数が非常に多いため、ジペプチド一つ一つについて呈味性との関係を詳細に解析することは困難である。そこで、メタボローム解析に基づく成分プロファイリングのアプローチがジペプチドと呈味との関係の解析に有用であると思われる。

ジペプチドの一斉分析は、ターゲットとなる種類が多いことから困難ではあるが Takahashi らが 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate による誘導体化法と LC/MS/MS を用いた一斉分析の手法を報告している。しかし、実際にジペプチドの標準品を用いて検出を確認しているのはわずか 31 種類であり、包括的な分析手法であることの確認がなされていない(Takahashi, 2012)。より確実な分析系を構築するためには、ジペプチドの標準品をできる限り多く揃えて分析系の検証を行うべきである。一方、第 2 章では GC/MS により、成分データを取得したが、GC/MS で得られた親水性低分子プロファイルにジペプチドデータは含まれていなかった。これは、ライブラリーの中に含まれていなかったことが原因であると考えられる。また、ジペプチドの標準品を入手したとしても、メキシアミンと MSTFA でジペプチドを誘導体化すると、アミノ基が完全にトリメチルシリル化されずに複数の誘導体が生成されて、元々微量なジペプチドがさらに分離されて検出器に到達するために、実際の検出感度が高くなってしまふことが考えられる。そのため、しょうゆ中の微量なジペプチドの検出に GC/MS は不適切である。一方、LC/MS は近年、アミノ酸などの親水性成分を分析する手法がいくつか確立され始めている。特に、しょうゆについては固定相にペンタフルオロフェニルプロピル (PFPP) 基を導入したフッ素含有逆相カラムを用いたアミノ酸、有機酸、核酸などの一斉分析が報告されている(Yoshida et al., 2007)。PFPP カラムを用いることにより、親水性成分の分離能が改善され、誘導体化を用いずとも、アミノ酸等が分離できるようになった。そこで、PFPP カラムはジペプチド分析への応用が期待できる。また、近年、分析機器の発展により、三連四重極質量分析計を用いた MS/MS の1つである多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring: MRM) が高速化してきており、一度に百種類以上の成分について MRM を適用することが可能となってきた。三連四重極質量分析計における MRM は

一つ目の四重極で特定 m/z のイオンを単離し、二つ目の四重極で単離したイオンをフラグメント化する。生じたプロダクトイオンを三つ目の四重極で更に単離して検出器に到達するため、高感度、高選択的分析が可能な分析手法である。

そこで、本章の目的は、成分プロファイリングの技術によりしょうゆの呈味の違いと関連の高いジペプチドを特定することとした。ジペプチドのデータを取得するために、LC/MS/MS によるジペプチドの一斉分析法を構築した。LC では PFPP 基を導入したフッ素含有逆相カラムを、質量分析計の MS/MS では MRM を用いた。そして、構築した分析系をしょうゆに適用し、しょうゆ中のジペプチドデータを取得した。さらに、GC/MS によりその他の親水性低分子化合物の成分データについても取得した。呈味の定量的データとして、第 2 章と同じ QDA データを用いた。成分と QDA データの関連の解析には、多変量解析の一つである OPLS を使用した。成分データを説明変数、官能評価データを応答変数として QDA データの OPLS 予測モデルを構築した。そして、モデルの予測性能を評価したのちに、VIP 値を用いて、しょうゆ間の味の差に関連の高いジペプチドを特定した。

3-2 実験方法

3-2-1 試薬とサンプル

リビトール、LC/MS グレードの超純水とメタノール、分析グレードのクロロホルム、ピリジン及びギ酸は和光純薬より購入した。メキシアミン塩酸塩と MSTFA は Sigma とジーエルサイエンスよりそれぞれ購入した。LC/MS グレードのアセトニトリルは関東化学より購入した。

ジペプチドの標準品 337 種類は ANASPEC より購入した。ピログルタミルジペプチド (pGlu-X, X = amino acid) の 15 種類は L-ピログルタミン酸ペンタクロロフェニルエステルとトリエチルアミンとアミノ酸で conventional liquid-phase method で合成した (Davies and Donald, 2007)。入手した標準品の一覧を表 3-1 に示した。ジペプチド標準物質の溶媒には 0.1 % のギ酸を含むメタノール/超純水(1:1, v/v)の混合溶液を用いた。標準品混合物は 4 種類を作成した。標準品混合物 1 には Gln-X, Leu-X, Pro-X, Thr-X, Arg-X, His-X そして Gly-X を、

標準品混合物 2 には Glu-X, Met-X, Ile-X, Phe-X, Ser-X そして Asn-X を, 標準品混合物 3 には Asp-X, Lys-X, Val-X, Ala-X, Trp-X そして Tyr-X を, 標準品混合物 4 には pGlu-X をそれぞれ含む.

分析サンプルは第 2 章で使用したサンプルのうち, 日本産は 10 種類, 中国産は 6 種類, アメリカ産は 3 種類の合計 19 種類を用いた. 各サンプルはそれぞれの国のメーカーが製造したものをを用いた. これらのサンプルはできる限り幅広い性質のしょうゆサンプルとなるように選抜した.

表3-1. 本研究で使用したジペプチド標準品. 表に記載されているジペプチドを使用した.

	C-terminal		N-terminal																
	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	Ala-Ala	Ala-Arg	Ala-Asp	Ala-Gln	Ala-Glu	Ala-Gly	Ala-His	Ala-Ile	Ala-Leu	Ala-Lys	Ala-Met	Ala-Phe	Ala-Pro	Ala-Ser	Ala-Thr	Ala-Trp	Ala-Tyr	Ala-Val	
Arg	Arg-Ala	Arg-Arg	Arg-Asn	Arg-Asp	Arg-Glu	Arg-Gly	Arg-His	Arg-Ile	Arg-Leu	Arg-Lys	Arg-Met	Arg-Phe	Arg-Pro	Arg-Ser	Arg-Thr	Arg-Trp	Arg-Tyr	Arg-Val	
Asn	Asn-Ala	Asn-Arg	Asn-Asn	Asn-Asp	Asn-Gln	Asn-Gly	Asn-His	Asn-Ile	Asn-Leu	Asn-Lys	Asn-Met	Asn-Phe	Asn-Pro	Asn-Ser	Asn-Thr	Asn-Trp	Asn-Tyr	Asn-Val	
Asp	Asp-Ala	Asp-Arg	Asp-Asn	Asp-Asp	Asp-Gln	Asp-Gly	Asp-His		Asp-Leu	Asp-Lys	Asp-Met	Asp-Phe	Asp-Pro	Asp-Ser	Asp-Thr	Asp-Trp	Asp-Tyr	Asp-Val	
Gln	Gln-Ala		Gln-Asn	Gln-Asp	Gln-Gln	Gln-Gly	Gln-His	Gln-Ile	Gln-Leu	Gln-Lys	Gln-Met	Gln-Phe	Gln-Pro	Gln-Ser	Gln-Thr	Gln-Trp	Gln-Tyr	Gln-Val	
Glu	Glu-Ala	Glu-Arg	Glu-Asn	Glu-Asp	Glu-Gln	Glu-Gly	Glu-His	Glu-Ile	Glu-Leu	Glu-Lys	Glu-Met		Glu-Pro	Glu-Ser	Glu-Thr	Glu-Trp	Glu-Tyr	Glu-Val	
Gly	Gly-Ala	Gly-Arg	Gly-Asn	Gly-Asp	Gly-Gln	Gly-Gly	Gly-His	Gly-Ile	Gly-Leu	Gly-Lys	Gly-Met	Gly-Phe	Gly-Pro	Gly-Ser	Gly-Thr	Gly-Trp	Gly-Tyr	Gly-Val	
His	His-Ala	His-Arg	His-Asn	His-Asp	His-Gln	His-Gly	His-His	His-Ile	His-Leu	His-Lys	His-Met	His-Phe	His-Pro	His-Ser	His-Thr	His-Trp	His-Tyr	His-Val	
Ile	Ile-Ala	Ile-Arg	Ile-Asn	Ile-Asp	Ile-Gln	Ile-Glu	Ile-His	Ile-Ile	Ile-Leu	Ile-Lys	Ile-Met	Ile-Phe	Ile-Pro	Ile-Ser	Ile-Thr	Ile-Trp	Ile-Tyr	Ile-Val	
Leu	Leu-Ala		Leu-Asn	Leu-Asp	Leu-Glu	Leu-Gly	Leu-His	Leu-Ile	Leu-Leu	Leu-Lys	Leu-Met	Leu-Phe		Leu-Ser	Leu-Thr	Leu-Trp	Leu-Tyr	Leu-Val	
Lys	Lys-Ala	Lys-Arg	Lys-Asn	Lys-Asp	Lys-Gln	Lys-Gly	Lys-His	Lys-Ile	Lys-Leu	Lys-Lys	Lys-Met	Lys-Phe	Lys-Pro	Lys-Ser	Lys-Thr	Lys-Trp	Lys-Tyr	Lys-Val	
Met	Met-Ala	Met-Arg	Met-Asn	Met-Asp	Met-Gln	Met-Gly	Met-His	Met-Ile	Met-Leu	Met-Lys	Met-Met	Met-Phe	Met-Pro	Met-Ser	Met-Thr	Met-Trp	Met-Tyr	Met-Val	
Phe	Phe-Ala	Phe-Arg	Phe-Asn	Phe-Asp	Phe-Gln	Phe-Gly	Phe-His	Phe-Ile	Phe-Leu	Phe-Lys	Phe-Met	Phe-Phe	Phe-Pro	Phe-Ser	Phe-Thr	Phe-Trp	Phe-Tyr	Phe-Val	
Pro	Pro-Ala		Pro-Asn	Pro-Asp	Pro-Gln	Pro-Gly	Pro-His	Pro-Ile	Pro-Leu	Pro-Lys	Pro-Met	Pro-Phe	Pro-Pro	Pro-Ser	Pro-Thr	Pro-Trp	Pro-Tyr	Pro-Val	
Ser	Ser-Ala	Ser-Arg	Ser-Asn	Ser-Asp	Ser-Gln	Ser-Gly	Ser-His	Ser-Ile	Ser-Leu	Ser-Lys	Ser-Met	Ser-Phe	Ser-Pro	Ser-Ser	Ser-Thr	Ser-Trp	Ser-Tyr	Ser-Val	
Thr	Thr-Ala	Thr-Arg	Thr-Asn	Thr-Asp	Thr-Gln	Thr-Gly	Thr-His	Thr-Ile	Thr-Leu	Thr-Lys	Thr-Met	Thr-Phe	Thr-Pro	Thr-Ser	Thr-Thr	Thr-Trp	Thr-Tyr	Thr-Val	
Trp	Trp-Ala	Trp-Arg	Trp-Asn	Trp-Asp	Trp-Gln	Trp-Gly	Trp-His	Trp-Ile	Trp-Leu	Trp-Lys	Trp-Met	Trp-Phe	Trp-Pro	Trp-Ser	Trp-Thr	Trp-Trp	Trp-Tyr	Trp-Val	
Tyr	Tyr-Ala	Tyr-Arg	Tyr-Asn	Tyr-Asp	Tyr-Gln	Tyr-Gly	Tyr-His	Tyr-Ile	Tyr-Leu	Tyr-Lys	Tyr-Met	Tyr-Phe	Tyr-Pro	Tyr-Ser	Tyr-Thr	Tyr-Trp	Tyr-Tyr	Tyr-Val	
Val	Val-Ala	Val-Arg	Val-Asn	Val-Asp	Val-Gln	Val-Gly	Val-His	Val-Ile	Val-Leu	Val-Lys	Val-Met	Val-Phe	Val-Pro	Val-Ser	Val-Thr	Val-Trp	Val-Tyr	Val-Val	
pGlu	pGlu-Ala	pGlu-Arg	pGlu-Asn		pGlu-Gln	pGlu-Glu	pGlu-His	pGlu-Ile	pGlu-Leu	pGlu-Lys	pGlu-Met	pGlu-Phe		pGlu-Ser	pGlu-Thr	pGlu-Trp		pGlu-Val	

3-2-2 官能評価

官能評価データは第2章で取得した旨味, 甘味, 塩味, 酸味, 苦味のQDAデータを使用した。

3-2-3 GC/MS のためのサンプル調製

GC/MS のためのサンプル調製は第2章に準ずる。

3-2-4 GC/MS 条件

ガスクロマトグラフ-質量分析計は GCMS-QP2010 Ultra, オートサンプラーには AOC-20s(島津製作所)を用いた。また, カラムは CP-SIL 8 CB-Low bleed 30 m x 0.25 mm i.d. フューズドシリカキャピラリーカラム(Agilent technologies)を用いた。データの取得は GCMS solutions ver.2.7.1 で行った。キャリアガスにはヘリウムを用いて, カラム流量は 1.12 mL/minとした。スプリット比, インジェクション量, インジェクション部の温度はそれぞれ 1:25, 1 μ L, 230 $^{\circ}$ C に設定した。カラムオープンサンプルのインジェクション後, 80 $^{\circ}$ C を 2 分保持した後に 15 $^{\circ}$ C /min で 320 $^{\circ}$ C まで昇温させ, その後 320 $^{\circ}$ C を 6 分間保持した。イオンソースの温度は 200 $^{\circ}$ C に設定した。イオン化は 70 eV の電子ビームを用いた EI 法を用い, スキャン範囲は m/z 85-500, スキャンスピードは 20 scan/sec に設定した。サンプルインジェクションの 3 分 30 秒後にデータの取得を開始した。

ピーク検出, アライメント, 化合物同定は第2章に準ずる。

3-2-5 LC/MS/MS のためのサンプル調製

しょうゆサンプルはマイクロアシライザー S1 型電気透析装置(Asahi Chemical Industry Company)によって塩分濃度 1 %になるまで脱塩を行った。脱塩後のしょうゆを 0.1 %のギ酸を含むメタノール/蒸留水(1:1, v/v)で 100 倍に希釈した後, 0.2 μ m PTFE フィルタに通して LC/MS に供した。

3-2-6 LC/MS/MS 条件

LC/MS は LCMS-8030 plus (島津製作所)を使用した。データの取得は Lab solutions ver.5.53 SP3 で行った。カラムは Discovery HS F5, 2.1 x 150 mm, 3 μ m (Sigma-Aldrich)を用いた。移動相 A は 0.1 %のギ酸を含む超純水で、移動相 B は 0.1 %のギ酸を含むアセトニトリルとした。グラジエントは、0 分で%B = 2, 3 分で%B = 2, 10 分で%B = 30, 35 分で%B = 30, 40 分で%B = 50, 40.01 分で%B = 100, 45 分で%B = 100, 45.01 分で%B = 2, 55 分で%B = 2 と設定し、各時間の間は全て直線グラジエントとした。LC の移動相の流速, カラム温度, インジェクションボリュームはそれぞれ 40 $^{\circ}$ C, 0.35 mL/min, 1 μ L とした。MS の極性はポジティブモードに設定した。ネブライザーガス流量は 3.0 L/min, DL 温度は 250 $^{\circ}$ C, ヒートブロック温度は 400 $^{\circ}$ C, ドライガス流量は 15 L/min に設定した。

MS の分析モードは MRM を用いた。Q3 の m/z とコリジョンエネルギーは METLIN(<http://metlin.scripps.edu/>)の情報及び標準品を用いて設定した。METLIN 及び標準品から情報が得られなかったジペプチドの Q3 とコリジョンエネルギーは他のジペプチドの値を元に予測した。定性時には 1 つのジペプチドにつき 2 つのトランジションを設定した条件でサンプルを分析し、定量時には各トランジションの dwell time を増やすために 1 つのジペプチドにつき 1 つのみのトランジションを設定し、再度サンプルの分析を行なった。プロダクトイオンの選択は、他のジペプチドとできるだけ重ならないこと、感度が十分に得られることを条件に設定した。各ジペプチドの定量用の Q3 の m/z を表 3-2 に示した。各 MRM の Dwell Time は定性時には 2 msec, 定量時には 5.5 msec, pause time は 1 msec に設定した。ジペプチドの保持時間は標準品混合物によって確認した。ジペプチドの LC における保持時間を表 3-3 に示した。

得られた分析データをファイルフォーマットコンバーター(Reifycs)によって ABF 形式に変換後、化合物同定とデータマトリックスの作成を MRMPROBS(Tsugawa et al., 2013)によって行った。データマトリックスにおける各ジペプチドの定量値は強度値を用いた。

表3-2. 各ジペプチドのMRM分析におけるQ3のm/z.

	C-terminal																N-terminal		
	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.1	44.3	132.1	132.1	132.1	150.1	166.1	116.1	44.1	120.1	205.1	182.3	118.1
Arg	70.1	175.1	133.1	70.3	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.2	70.1	70.1	70.2	70.1	70.3	70.1	70.2	70.1
Asn	87.1	87.1	87.1	87.1	87.1	87.1	76.1	87.1	87.1	87.1	87.1	87.1	87.1	116.1	87.1	87.1	205.1	87.1	118.1
Asp	90.1	175.1	133.1	134.1	88.1	148.1	110.1	110.2	132.1	132.1	147.1	88.1	166.1	116.1	106.1	120.1	205.1	182.1	118.1
Gln	83.1	83.1	83.1	83.1	83.1	83.1	84.2	156.1	83.1	83.1	84.3	83.1	83.1	116.1	106.1	120.2	83.1	83.1	83.1
Glu	90.2	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1	84.2	156.1	84.1	84.1	84.2	84.1	84.1	116.1	106.1	120.1	84.1	84.1	84.1
Gly	90.1	175.1	133.1	134.1	147.1	148.1	76.1	156.1	86.1	86.1	147.1	150.1	120.1	116.1	106.1	120.1	205.1	182.1	72.1
His	110.2	110.1	110.1	110.3	110.1	83.1	83.1	110.1	110.2	110.2	110.1	110.1	110.1	110.1	110.1	110.2	110.1	110.1	110.1
Ile	86.1	86.1	133.1	86.1	147.1	86.1	86.1	156.1	86.1	86.1	86.1	86.1	86.1	86.2	86.1	86.1	86.2	86.1	86.2
Leu	86.1	86.1	133.1	86.1	147.1	86.1	86.1	156.1	86.1	86.1	86.1	86.1	86.1	86.2	86.1	86.1	86.2	86.1	86.2
Lys	84.1	84.1	84.1	84.1	84.3	84.1	84.1	156.1	84.1	84.1	84.1	84.1	84.1	84.2	84.1	84.2	84.2	84.1	84.1
Met	56.1	104.1	56.1	104.1	104.1	104.1	56.1	156.1	104.1	104.1	104.1	150.1	104.1	104.1	104.1	155.2	104.2	104.1	104.1
Phe	120.1	120.2	120.1	120.1	120.1	120.1	120.1	120.1	103.1	103.1	120.1	120.1	120.1	120.1	120.1	120.1	120.1	120.2	120.1
Pro	70.1	175.1	133.1	70.1	70.1	70.1	43.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1	70.1
Ser	60.1	60.1	60.1	134.1	130.1	60.1	60.1	156.1	60.1	60.1	60.1	60.1	60.1	116.1	60.1	120.1	205.1	182.1	60.1
Thr	74.1	70.3	74.1	134	147.1	74.1	74.2	74.1	74.1	74.1	84.2	74.1	74.1	116.1	106.1	74.1	74.1	74.1	74.1
Trp	159.1	175.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	159.1	116.1	144.1	159.1	205.1	159.1	204.1
Tyr	136.1	175.1	136.1	136.1	136.1	136.1	136.1	156.1	136.1	136.1	136.1	136.1	136.1	116.1	136.1	136.1	136.1	182.1	118.1
Val	72.1	72.1	72.3	72.1	147.1	72.1	72.1	156.1	72.1	72.1	72.1	72.1	166.1	72.2	72.1	72.1	72.1	72.1	72.1
pGlu	84.1	84.2	84.1	84.2	130	84.2	84.2	84.2	84.2	84.2	84.2	84.1	120.2	84.2	106.1	84.2	188.1	84.2	84.1

表 3-3. 各ジペプチドのLC/MS/MSにおける保持時間 (min).

	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala	2.14	2.81	1.72	1.76	2.12	1.80	2.22	8.83	9.56	2.39	6.58	10.87	4.32	1.59	1.88	12.46	7.82	5.66	
Arg	3.48	4.54	2.53	3.28	2.23	3.22	16.62	13.50	11.38	19.76	7.64	2.32	2.93	2.51	10.60				
Asn	1.94	10.14	1.51	1.64	1.60	2.06	8.47	9.02	2.20	5.84	10.20	9.87	1.77	11.85	5.32				
Asp	1.85	2.33	1.45	1.56	1.55	1.89	8.75	1.97	6.38	10.01	3.17	1.46	1.67	11.59	4.72				
Gln	2.24	1.58	1.72	1.74	2.12	1.91	2.70	8.57	9.18	2.33	6.39	10.31	3.71	1.59	1.90	11.89	7.75	5.74	
Glu	2.25	3.03	1.64	1.82	1.84	2.25	1.91	2.31	8.94	9.61	2.52	6.85	4.80	1.66	1.99	12.36	8.01	6.08	
Gly	2.03	2.49	1.50	1.62	1.93	1.58	1.99	7.44	6.09	10.43	2.99	1.49	1.92	12.08	7.65	5.80			
His	2.38	3.23	1.84	1.90	2.34	2.70	11.59	12.17	7.35	13.51	3.98	1.83	2.19	17.37	8.67	7.05			
Ile	7.11	10.18	4.38	4.95	5.34	6.68	5.40	12.50	13.33	8.83	10.79	14.92	9.86	4.43	5.58	16.36	10.61	10.19	
Leu	7.61	4.24	5.62	7.11	8.80	7.69	13.15	14.13	9.42	11.34	15.91	6.22	17.33	10.99	10.76				
Lys	2.87	3.68	2.06	2.22	2.28	2.76	2.85	14.84	16.34	3.08	9.75	18.10	5.80	2.07	2.59	9.54	10.75	8.98	
Met	5.78	8.27	2.86	3.60	3.85	5.46	5.01	5.20	11.99	12.63	6.70	10.11	14.11	9.71	2.18	15.58	10.13	9.69	
Phe	9.47	14.99	7.23	7.90	8.75	9.20	10.77	14.67	15.98	10.13	12.82	17.54	7.62	8.12	19.34	12.24	12.10		
Pro	2.92	1.93	1.93	2.25	2.26	2.88	2.35	3.03	3.42	8.12	11.95	2.03	2.53	13.49	8.65	7.52			
Ser	1.90	2.47	1.48	1.57	1.73	1.88	1.98	8.29	8.92	2.13	5.58	10.11	2.97	1.49	1.71	11.80	7.46	4.93	
Thr	2.19	2.94	1.59	1.74	1.77	2.16	1.82	2.22	8.87	9.45	2.42	6.63	10.64	4.80	1.60	1.91	12.24	7.88	6.00
Trp	11.25	18.86	9.17	9.73	9.54	10.41	10.83	13.91	17.27	18.95	17.34	14.74	20.79	13.22	9.44	9.88	22.74	13.87	14.28
Tyr	6.78	8.81	4.05	5.08	5.30	6.45	6.52	6.63	7.71	9.98	13.42	8.87	4.56	5.48	14.83	10.03	9.43		
Val	4.12	6.47	2.36	2.79	2.92	3.88	3.93	4.03	10.77	11.48	4.84	9.07	8.22	2.51	3.08	14.29	9.26		
pGlu	2.61	2.80	5.86	2.05	2.69	1.80	2.00	8.00	9.00	1.53	9.47	1.63	1.90	10.02	6.80				

3-2-7 統計処理

一元配置分散分析は Microsoft Excel 2010 を用いて行った。PCA と OPLS は SIMCA-P version 13.0(Umetrics)を用いて行った。分析装置から出力されるピーク強度は、装置やメーカー毎に基準が異なるため、本章の多変量解析におけるスケーリング方法は、各データをデータの平均で引き、更に標準偏差で除す unit variance (UV)を用いた。UVによって、全てのピークについて平均と分散がそれぞれ 0 と 1 になるため、異なるプラットフォームの装置のデータを結合させて解析することができる(Yoshida et al., 2010)。

PCA では GC/MS 及び LC/MS/MS で得た成分データをそれぞれ別々に用いた。

ジペプチドデータと呈味性との相関性を解析するために、3 種類のデータ行列をそれぞれ説明変数、基本五味の QDA データを応答変数に用いて OPLS 回帰を実施した。3 種類の説明変数とは、それぞれ GC/MS を用いて取得した成分データ、LC/MS/MS で取得したジペプチドデータ、そして GC/MS と LC/MS/MS で取得した成分の両方のデータ行列である。また、基本五味の QDA データを応答変数に用いて OPLS 回帰を実施した。また、精度の高い予測モデルにおいて高い VIP 値を示すジペプチドを呈味性の違いと相関の高いジペプチドとして特定した。モデル性能の評価として R^2 値、 Q^2 値を使用した。また、同じくモデル性能の評価に用いた Root Mean Square Error of the Estimation(RMSEE)及び Root Mean Square Error of Prediction(RMSEP)は、それぞれキャリブレーション残差及び予測誤差の標準偏差であるため、それぞれ内部バリデーションによる予測残差の評価と外部バリデーションによる予測残差評価の指標となる。これらの値が小さいほどモデルの精度が高いことを示している。RMSEP を求めるためのクロスバリデーションにおけるテストセットはサンプル 1 種類を使用して、トレーニングセットは残りの 18 種類のサンプルを用いた。全てのサンプルが一回ずつテストセットになるように 19 回クロスバリデーションを行い、モデルを評価する際の RMSEP はその平均値を算出した。

オーバーフィッティングの評価は第 2 章と準じて permutation test を用いた。

3-3 結果と考察

3-3-1 しょうゆの GC/MS データ

GC/MS により 19 種類のしょうゆサンプルを 3 回ずつ分析したところ、合計 138 個のピークを検出した。138 個のピークのうち 73 個を同定した。これら同定した化合物は、アミノ酸が 25 種類、糖及び糖アルコールが 24 種類、有機酸が 12 種類、アミンが 4 種類、その他は 8 種類で、残りの 65 ピークについては同定できなかった。

サンプル間の成分データの有意差を評価するために、各成分について一元配置分散分析を行った($p < 0.05$)。その結果、138 種類の成分全てについて有意差が認められたので、以降の解析にこれらの成分データを用いて解析することとした。

3-3-2 LC/MS/MS によるジペプチドの分析手法の構築

LC/MS/MS の MRM モードにおいて、ジペプチド標準品混合物を分析した。ジペプチド標準品混合物 No. 1, 2, 3, 4 の各 TICC を図 3-1 A, B, C, D にそれぞれ示した。最も保持時間が早い化合物は Asp-Asn, 最も遅い化合物は Arg-Trp で、保持時間はそれぞれ 1.45 min と 25.01 min であった。また、精密質量が同じになる Ile と Leu を含むジペプチドは LC 上で分離できた。例として、Glu-Ile と Glu-Leu が分離した例を図 3-2 A に示した。一方、いくつかのジペプチドについては保持時間が近くなり、共溶出した。これらのジペプチドはプリカーサーイオンやプロダクトイオンの違いに基づいてできる限り独立した情報を取得した。プリカーサーイオンとは、MRM において対象がフラグメンテーションを起こす前に一つ目の四重極で単離するイオンのことである。本分析系では各ジペプチドのプリカーサーイオンはプロトン付加イオン ($[M+H]^+$) を設定した。プリカーサーイオンは対象分子の質量に基づいて計算することができる。ジペプチドの逆配列同士のように、異性体のプリカーサーイオンは共に同じ値になる。一方、プロダクトイオンとは、フラグメンテーションによって生じるイオンのことであり、プリカーサーイオンの構造によってそれぞれ特異的なイオンを生じる。例として、Ala-Glu と Glu-Ala が、プロダクトイオンの違いによってそれぞれ独立した情報を取得するこ

とができることを図 3-2 B, C, D, E に示した. Ala-Glu と Glu-Ala は LC 上での保持時間が同じになり, 更に, 異性体の関係となるためにプリカーサーイオンの値も同じになる. しかし, 質量分析計の内部でイオンをフラグメンテーションさせる手法の 1 つである collision induced dissociation(CID)によってそれぞれ特異的なプロダクトイオンである m/z 148.1 と 90.2 をそれぞれ生じる. つまり, MRM のトランジション $219.1 > 148.1$ (プリカーサーイオン > プロダクトイオン) では Ala-Glu のみが(図 3-2 B, D), $219.1 > 90.2$ では Glu-Ala のみが(図 3-2 C, E)検出されるため, それぞれ独立した情報を取得できる. また, Arg-Thr と Thr-Arg のように, 保持時間, プリカーサーイオン, プロダクトイオンが全て同じになるジペプチドについては合算値を多変量解析に供することとした(図 3-2 F).

このように, N 末端が Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val 及び pGlu の 20 種類, C 末端が Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 及び Val の 19 種類, 計 380 種類のジペプチドについて MRM を構築した. 1 つのジペプチドにつき 2 つのトランジションを設定した. そのうち Arg-Thr と Thr-Arg のように逆配列のジペプチドと分離ができなかったジペプチドは 15 種類であった(表 3-4).

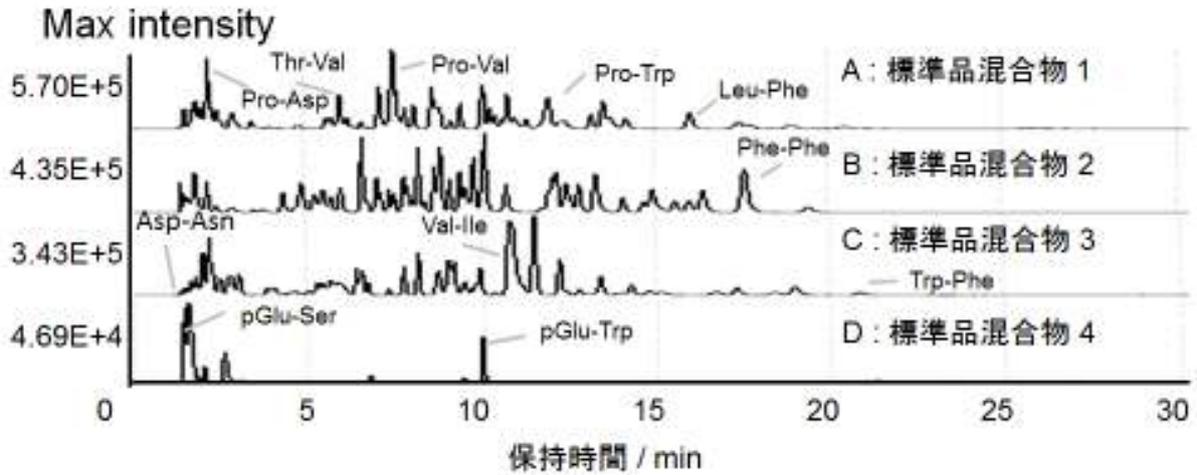


図 3-1. 標準品混合物 1(A), 標準品混合物 2(B), 標準品混合物 3(C), 標準品混合物 4(D)の LC/MS/MS で取得した全イオン電流クロマトグラム. 標準品混合物 1 には Gln-X, Leu-X, Pro-X, Thr-X, Arg-X, His-X そして Gly-X を, 標準品混合物 2 には Glu-X, Met-X, Ile-X, Phe-X, Ser-X そして Asn-X を, 標準品混合物 3 には Asp-X, Lys-X, Val-X, Ala-X, Trp-X そして Tyr-X を, 標準品混合物 4 には pGlu-X をそれぞれ含む.

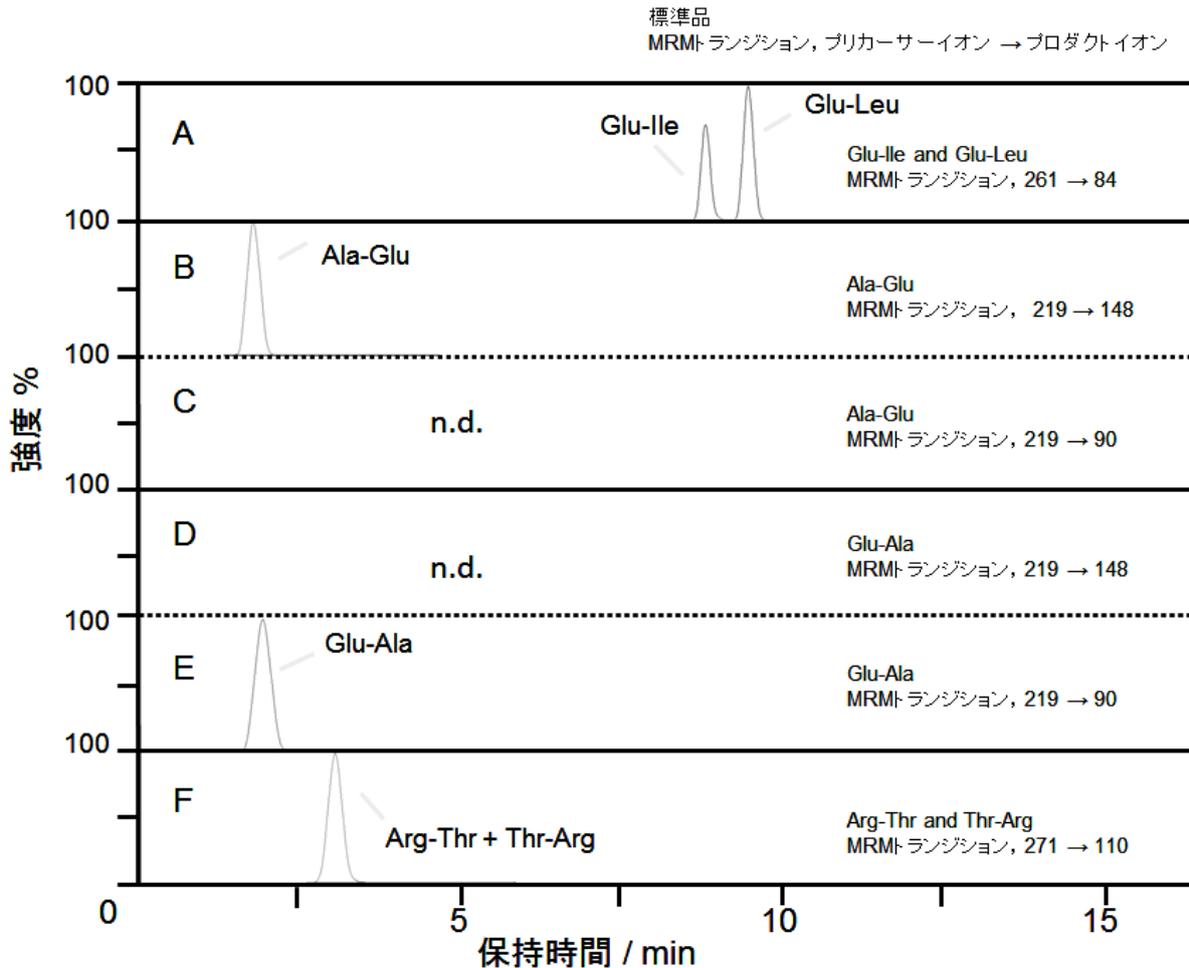


図 3-2. ジペプチドの標準品混合物中の MRM クロマトグラム. Glu-Ile と Glu-Leu の混合物の分析結果. LC における保持時間が異なるため, 分離が可能であった(A). Ala-Glu の分析結果. Ala-Glu は CID によって m/z 148.05 のプロダクトイオンを生じるため, 検出される(B). Ala-Glu の分析結果. Ala-Glu は CID によって m/z 90.15 のプロダクトイオンを生じないため, 検出されない(C). Glu-Ala の分析結果. Glu-Ala は CID によって m/z 148.05 のプロダクトイオンを生じないため, 検出されない(D). Glu-Ala の分析結果. Glu-Ala は CID によって m/z 90.15 のプロダクトイオンを生じるため, 検出される(E). Arg-Thr と Thr-Arg の混合物の分析結果, 両ジペプチドのピークは重なるため, 合算値が得られる(F).

表3-4. 逆配列のジペプチドと保持時間, プリカーサーイオン, 及びプロダクトイオンの全てが同じになるために分離が不完全なジペプチド.

	N-terminal	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	
Ala																					
Arg																	Arg-Thr				
Asn																					
Asp									Asp-His												
Gln												Gln-Lys									
Glu								Glu-Gly	Glu-His												
Gly																					
His		His-Ala			His-Asp		His-Glu										His-Thr				
Ile																					
Leu																					
Lys						Lys-Gln											Lys-Thr				
Met																					
Phe											Phe-Leu										
Pro																					
Ser																					
Thr		Thr-Arg						Thr-Gly				Thr-Lys									
Trp																					
Tyr																					
Val																					
pGlu																					

3-3-3 LC/MS/MS によるしょうゆ中ジペプチドの分析

構築した分析手法を用いて、19種類のしょうゆサンプルを3回ずつ分析した。図3-3 A, B, Cにそれぞれ、日本産、中国産、アメリカ産サンプルのTICCを1種類ずつ示した。日本産、中国産、アメリカ産のサンプルのジペプチドのTICCはほとんど同じパターンを示した。化合物同定の結果、しょうゆサンプル19種類より、これまでのしょうゆの報告の中で最も多い237種類のジペプチドを検出した。検出したジペプチドを表3-5に示した。アラニン、アスパラギン酸、グリシン、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、プロリン、セリンを含むジペプチドは多くの種類が検出された。また、アスパラギン、グルタミン、メチオニン、トリプトファンを含むジペプチドの検出数は少なかった。例えば、グルタミン酸を含むジペプチドは31種類が検出されたが、トリプトファンを含むジペプチドはPro-Trpのみであった。検出数の多いジペプチドを構成するアミノ酸は、しょうゆの原料である大豆タンパクや小麦タンパクに多く含まれている。一方、検出数の少なかったトリプトファンやメチオニンは大豆ペプチドと小麦タンパク共に含有量が少ない(Kovalenko et al., 2006 and Rombouts et al., 2009)。このように、検出したジペプチドの種類数はしょうゆの原材料中に含まれるアミノ酸組成を反映していた。

一方で、グルタミンは大豆タンパクに多く含まれているにも関わらず、Gln-Xの検出種類は少なかった。グルタミンの一部は麹菌のグルタミナーゼによってグルタミン酸に変換される(Yano et al., 1988)、残りは非酵素的反応でピログルタミン酸になる(Sugiyama, 1984)。そのためしょうゆ中のグルタミン濃度は低くなっているが、同様の理由でGln-Xもピログルタミン酸化してしまうために検出数が少なくなったのだと考えられる。一方、pGlu-Xは多くのジペプチドが検出されていた。

続いて、GC/MSデータと同様に、サンプル間における有意差を評価するために、検出した237種類のジペプチドのデータについて一元配置分散分析を行った($p < 0.05$)。その結果、228種類の成分について有意差が認められたので、以降の解析にこれら228種類のジペプチドデータを用いて解析することとした。一元配置分散分析によってサンプル間で有意差を示したジペプチドを表3-6に示した。

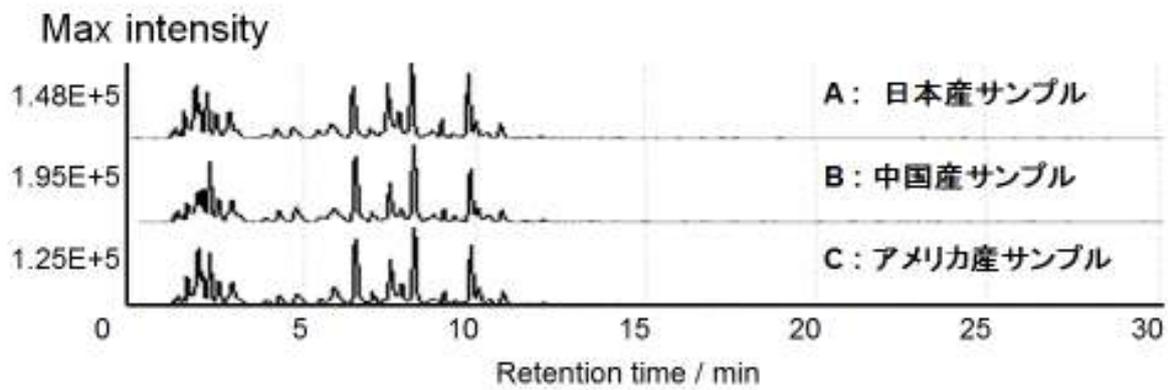


図 3-3. 日本産サンプル(A), 中国産サンプル(B), 欧米産サンプル(C)の LC/MS/MS で取得した全イオン電流クロマトグラム.

表3-5. LC/MS/MSIによってしゅうゆから検出したジペプチド。

	N-terminal	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala		Ala-Ala	Ala-Asp	Ala-Gln	Ala-Glu	Ala-Gln	Ala-Gly	Ala-His	Ala-Ile	Ala-Leu	Ala-Lys	Ala-Met	Ala-Phe	Ala-Pro	Ala-Ser	Ala-Thr			Ala-Tyr	
Arg		Arg-Ala	Arg-Asp		Arg-Glu	Arg-Gly	Arg-Ile	Arg-Leu		Arg-Pro	Arg-Ser	Arg-Thr			Arg-Tyr	Arg-Val				
Asn			Asn-Asp		Asn-Glu		Asn-Ile	Asn-Leu		Asn-Pro	Asn-Ser									
Asp		Asp-Ala	Asp-Asp	Asp-Gln	Asp-Glu	Asp-His	Asp-Ile	Asp-Lys		Asp-Phe	Asp-Pro	Asp-Ser	Asp-Thr							Asp-Val
Gln		Gln-Ala			Gln-Gly		Gln-Lys			Gln-Pro										
Glu		Glu-Ala	Glu-Arg	Glu-Asn	Glu-Gln	Glu-Glu	Glu-Gly	Glu-Ile	Glu-Leu	Glu-Lys	Glu-Phe	Glu-Pro	Glu-Ser						Glu-Tyr	Glu-Val
Gly		Gly-Ala	Gly-Arg		Gly-Glu	Gly-Gly	Gly-His	Gly-Ile	Gly-Leu	Gly-Lys	Gly-Met	Gly-Phe	Gly-Pro	Gly-Ser	Gly-Thr				Gly-Tyr	Gly-Val
His		His-Ala	His-Asp		His-Glu	His-Gly		His-Ile	His-Leu		His-Pro	His-Ser	His-Thr							His-Val
Ile		Ile-Ala	Ile-Asp	Ile-Gln	Ile-Glu	Ile-Gly	Ile-Ile	Ile-Lys		Ile-Phe	Ile-Pro	Ile-Ser	Ile-Thr						Ile-Tyr	Ile-Val
Leu		Leu-Ala	Leu-Arg	Leu-Gln	Leu-Glu	Leu-Gly	Leu-His	Leu-Ile	Leu-Leu	Leu-Lys	Leu-Met	Leu-Phe	Leu-Pro	Leu-Ser	Leu-Thr				Leu-Tyr	Leu-Val
Lys		Lys-Ala	Lys-Arg	Lys-Asn	Lys-Gln	Lys-Gly	Lys-Ile	Lys-Leu		Lys-Phe	Lys-Pro	Lys-Ser	Lys-Thr						Lys-Tyr	Lys-Val
Met					Met-Gly															
Phe			Phe-Asp		Phe-Glu	Phe-Gly	Phe-His	Phe-Ile	Phe-Leu		Phe-Phe			Phe-Ser	Phe-Thr					Phe-Val
Pro		Pro-Ala	Pro-Arg	Pro-Gln	Pro-Glu	Pro-Gly	Pro-His	Pro-Ile	Pro-Leu	Pro-Lys	Pro-Met	Pro-Phe	Pro-Pro	Pro-Ser	Pro-Thr	Pro-Trp			Pro-Tyr	Pro-Val
Ser		Ser-Ala	Ser-Arg	Ser-Gln	Ser-Glu	Ser-Gly	Ser-His	Ser-Ile	Ser-Leu	Ser-Lys	Ser-Met	Ser-Phe	Ser-Pro	Ser-Ser	Ser-Thr				Ser-Tyr	Ser-Val
Thr		Thr-Ala	Thr-Arg		Thr-Glu	Thr-Gly		Thr-Ile	Thr-Leu	Thr-Lys	Thr-Phe	Thr-Pro								Thr-Val
Trp																				
Tyr			Tyr-Asp		Tyr-Glu	Tyr-Gly		Tyr-Ile	Tyr-Leu	Tyr-Lys					Tyr-Pro	Tyr-Ser	Tyr-Thr			
Val		Val-Ala	Val-Arg	Val-Asn	Val-Glu	Val-Gly		Val-Ile	Val-Leu	Val-Lys	Val-Met	Val-Phe	Val-Pro	Val-Ser	Val-Thr				Val-Tyr	Val-Val
pGlu		pGlu-Ala	pGlu-Asp	pGlu-Gln	pGlu-Glu	pGlu-Gly	pGlu-His	pGlu-Ile	pGlu-Leu	pGlu-Lys	pGlu-Met	pGlu-Phe		pGlu-Ser	pGlu-Thr				pGlu-Tyr	pGlu-Val

表3-6. 一元配置分散分析によって、しょうゆサンプル間で強度に有意差が認められたジペプチド(p < 0.05).

	N-terminal	Ala	Arg	Asn	Asp	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
Ala		Ala-Ala		Ala-Asp	Ala-Gln	Ala-Glu	Ala-Gly	Ala-His	Ala-Ile	Ala-Leu	Ala-Lys	Ala-Met	Ala-Phe	Ala-Pro	Ala-Ser	Ala-Thr			Ala-Tyr	
Arg		Arg-Ala		Arg-Asp		Arg-Glu	Arg-Gly		Arg-Ile	Arg-Leu				Arg-Pro	Arg-Ser	Arg-Thr			Arg-Tyr	Arg-Val
Asn				Asn-Asp		Asn-Glu			Asn-Ile	Asn-Leu				Asn-Pro						
Asp		Asp-Ala		Asp-Asp	Asp-Gln	Asp-Glu		Asp-His	Asp-Ile	Asp-Leu		Asp-Phe	Asp-Pro	Asp-Ser	Asp-Thr					Asp-Val
Gln						Gln-Gly								Gln-Pro						
Glu		Glu-Ala	Glu-Arg	Glu-Asn	Glu-Asp	Glu-Gln	Glu-Glu	Glu-Gly	Glu-Ile	Glu-Leu	Glu-Lys		Glu-Phe	Glu-Pro	Glu-Ser				Glu-Tyr	Glu-Val
Gly				Gly-Asp	Gly-Gln	Gly-Glu	Gly-Gly	Gly-His	Gly-Ile	Gly-Leu	Gly-Lys	Gly-Met	Gly-Phe	Gly-Pro	Gly-Ser	Gly-Thr			Gly-Tyr	Gly-Val
His		His-Ala		His-Asp		His-Glu	His-Gly		His-Ile	His-Leu				His-Pro	His-Ser	His-Thr				His-Val
Ile		Ile-Ala	Ile-Arg	Ile-Asp	Ile-Gln	Ile-Glu	Ile-Gly	Ile-His	Ile-Ile	Ile-Leu	Ile-Lys		Ile-Phe	Ile-Pro	Ile-Ser	Ile-Thr			Ile-Tyr	Ile-Val
Leu		Leu-Ala	Leu-Arg	Leu-Asp	Leu-Gln	Leu-Glu	Leu-Gly	Leu-His	Leu-Ile	Leu-Leu	Leu-Lys	Leu-Met	Leu-Phe	Leu-Pro	Leu-Ser	Leu-Thr			Leu-Tyr	Leu-Val
Lys		Lys-Ala		Lys-Asn	Lys-Gln	Lys-Glu	Lys-Gly		Lys-Ile	Lys-Leu		Lys-Phe	Lys-Pro	Lys-Ser	Lys-Thr				Lys-Tyr	Lys-Val
Met						Met-Gly														
Phe				Phe-Asp		Phe-Glu	Phe-Gly	Phe-His	Phe-Ile	Phe-Leu				Phe-Ser						Phe-Val
Pro		Pro-Ala	Pro-Arg	Pro-Asp	Pro-Gln	Pro-Glu	Pro-Gly	Pro-His	Pro-Ile	Pro-Leu	Pro-Lys	Pro-Met	Pro-Phe	Pro-Pro	Pro-Ser	Pro-Thr	Pro-Trp	Pro-Tyr	Pro-Val	
Ser		Ser-Ala	Ser-Arg	Ser-Asp	Ser-Gln	Ser-Glu	Ser-Gly	Ser-His	Ser-Ile	Ser-Leu	Ser-Lys	Ser-Met	Ser-Phe	Ser-Pro	Ser-Ser	Ser-Thr			Ser-Tyr	Ser-Val
Thr		Thr-Ala	Thr-Arg	Thr-Asp		Thr-Glu	Thr-Gly		Thr-Ile	Thr-Leu	Thr-Lys		Thr-Phe	Thr-Pro		Thr-Thr				Thr-Val
Trp																				
Tyr				Tyr-Asp		Tyr-Glu	Tyr-Gly		Tyr-Ile	Tyr-Leu				Tyr-Pro	Tyr-Ser	Tyr-Thr				
Val		Val-Ala	Val-Arg	Val-Asn	Val-Asp	Val-Glu	Val-Gly		Val-Ile	Val-Leu	Val-Lys	Val-Met	Val-Phe	Val-Pro	Val-Ser	Val-Thr			Val-Tyr	Val-Val
pGlu		pGlu-Ala		pGlu-Asp	pGlu-Gln	pGlu-Glu	pGlu-Gly	pGlu-His	pGlu-Ile	pGlu-Leu	pGlu-Lys	pGlu-Met	pGlu-Phe		pGlu-Ser	pGlu-Thr			pGlu-Tyr	pGlu-Val

3-3-4 PCA による全体のデータ構造の把握

メタボローム解析から得られるデータは膨大であることから、まずは PCA によって全体のデータ構造を把握する研究例が多い(Yoshida et al., 2010, Ochi et al., 2012 and Tsugawa et al., 2013). そこで、GC/MS と LC/MS/MS から取得したデータをそれぞれ PCA に供した。

図 3-4 A, B は GC/MS に基づく成分データの PCA スコアプロットとローディングプロット、図 3-4 C, D は LC/MS/MS に基づくジペプチドデータの PCA スコアプロットとローディングプロットをそれぞれ示している。図 3-4 A の GC/MS データのスコアプロットでは、日本、中国産のしょうゆがそれぞれ近いところにプロットする傾向を示した。日本産は PC1 と PC2 両方において大きい値を示したために右上にプロットされ、中国産は PC1, PC2 両方において小さい値を示したために左下にプロットされる傾向があった。また、ローディングプロットでは、多くの化合物が PC1 において大きい値を示し右側にプロットされている。スコアプロットとローディングプロットを比較すると、日本産しょうゆの近くにより多くの成分がプロットされていることから、日本産しょうゆには他のしょうゆに比べて多くの成分について、その成分量が多く含まれている傾向があると考えられた。

一方、図 3-4 C の LC/MS/MS に基づくジペプチドデータの PCA スコアプロットでも、日本、中国産のサンプルがそれぞれ近い部分にプロットされる傾向を示したが、欧米産のうち 1 サンプルのみ PC1 で小さい値を、PC2 で大きい値を示して他のサンプルから大きく離れて左上にプロットされた。また、日本産が PC1 で大きい値を示して右側に、中国産が PC1 で小さい値を示して左側にそれぞれプロットされる傾向があった。ローディングプロットより、大きく離れてプロットされた欧米産の 1 サンプルには特定のジペプチドが多く含まれている傾向があった。特に Ile-His, Leu-His, Phe-Ile, Phe-Leu は、19 サンプル中この欧米産サンプルにしか含まれていなかった。このアメリカ産サンプルはアミノ酸液を用いて製造しているため、Ile-His, Leu-His, Phe-Ile, Phe-Leu は、醸造に基づいたものではなく、タンパク質の酸加水分解によって特徴的に生み出されるジペプチドであると考えられた。また、ローディングプロットでは、PC1 において高い値を示したジペプチドが多かった。スコアプロットとローディングプロ

ットを比較すると、日本産しょうゆの近くにより多くのジペプチドがプロットされていることから、日本産のしょうゆには他のしょうゆに比べて多くの種類のジペプチドにおいて、その量が多く含まれている傾向があると考えられた。

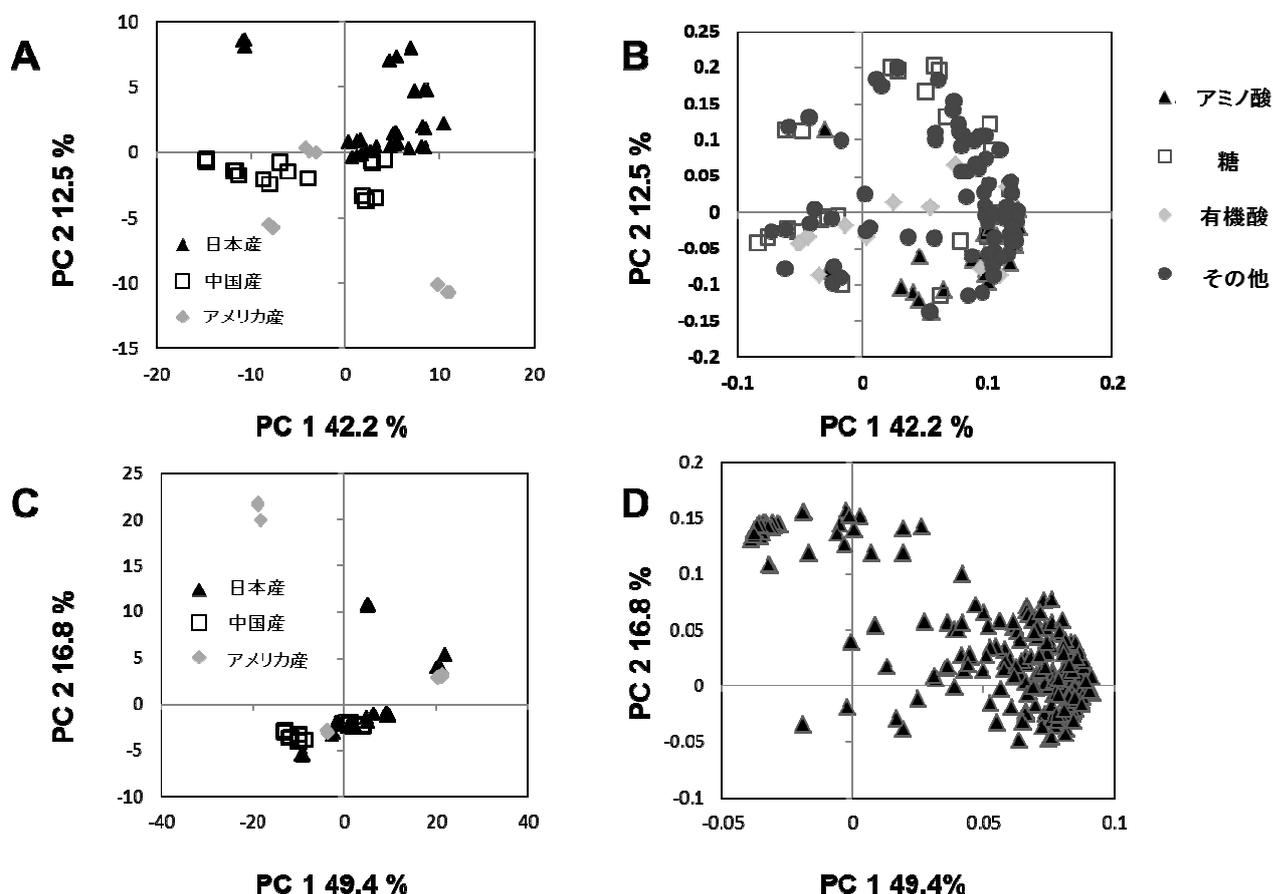


図 3-4. しょうゆサンプル 19 種類の PCA. GC/MS で取得した成分データのスコアプロット (A)とローディングプロット(B)及び LC/MS/MS で取得したジペプチドデータのスコアプロット (C)とローディングプロット(D).

3-3-5 PLS による呈味の予測モデルの構築

ジペプチドデータと呈味性との相関性を解析するために、3 種類のデータ行列をそれぞれ説明変数、基本五味の QDA データを応答変数に用いて OPLS 回帰を実施した. 3 種類の説明変数とは、それぞれGC/MSを用いて取得した成分データ、LC/MS/MSで取得したジペプチドデータ、そしてGC/MSとLC/MS/MSで取得した成分の両方のデータ行列である。

図 3-5 に例として GC/MS と LC/MS/MS で取得したデータの両方を説明変数として用いて構

築した旨味, 甘味, 塩味, 酸味, 苦味の予測モデルを示した. 第 2 章と同様, 各マーカーが各サンプルを示し, 横軸は OPLS 回帰により予測した QDA データ, 縦軸は実際の QDA データとしてプロットした. 図中の直線は実測値と予測値が等しい部分を示しており, 各プロットがこの直線に近いほど予測精度が高いことを意味している. 各味について予測値が直線に対して近い部分にプロットされた.

構築した予測モデルの, 応答変数に相関しない潜在変数の数を決めるために, 同じ数の潜在変数の PLS による permutation test によってモデルのオーバーフィッティングについて検証した. R^2 値と Q^2 値を縦軸, シャッフルした応答変数と真の応答変数との相関係数を横軸としてプロットした(図 3-6). R^2 値と Q^2 値で線形近似式の切片がそれぞれ 0.3 と 0.05 以下であればオーバーフィッティングはしていないとされる(Eriksson et al., 2001). もし, オーバーフィッティングしている場合は, 応答変数の組み合わせが変化すると, R^2 値と Q^2 値の近似式の傾きは小さくなり切片は大きい値となる. Permutation test の結果, PLS の潜在変数が 3 の時に, 全ての予測モデルにおいて R^2 値と Q^2 値の線形近似式の切片は評価基準値以下となった. そのため, OPLS における応答変数を予測するための変数は 1, 応答変数に直行する変数は 2 とした.

続いて, R^2 値, Q^2 値, RMSEE, RMSEP を用いて, モデルの精度を評価した. 表 3-7 に GC/MS を用いて取得した成分データ, LC/MS/MS で取得したジペプチドデータ, そして GC/MS と LC/MS/MS で取得した成分の両方を用いたをそれぞれ説明変数として用いた時の予測モデルの R^2 値, Q^2 値, RMSEE, RMSEP を示した. 表 3-7 より, LC/MS/MS で取得したジペプチドのデータのみを説明変数とした場合は, 良好な予測モデルを作成することができなかった. 特に, 旨味, 酸味, 苦味では良好な予測モデルの指標である $R^2 > 0.65$ と $Q^2 > 0.5$ (Williams et al., 1987 and Eriksson et al., 2001)を共に満たさなかった. VIP を元にして呈味性と相関の高いジペプチドを特定するためには, 良好な予測モデルを構築することが望ましい. そこで, より良い予測モデルを作成するために, 説明変数として GC/MS と LC/MS/MS で取得した成分データの両方を用いて予測モデルを構築した. しょうゆ中ジペ

プチドと呈味性間に相関がない場合は、モデルの精度は GC/MS データのみで構築したモデルに比べて顕著に悪くなると考えられる(Mahadevan et al., 2008). GC/MS と LC/MS/MS で取得したデータの両方を説明変数としてモデルを構築した結果、全ての味において R^2 と Q^2 が良好な予測モデルの指標である $R^2 > 0.65$ と $Q^2 > 0.5$ (Williams et al., 1987 and Eriksson et al., 2001)を共に満たし、さらに RMSEE と RMSEP においても LC/MS/MS で取得したジペプチドデータのみで構築した予測モデルに比べてより小さく、良好な値を示す予測モデルが構築できた。全ての味において、GC/MS データのみで構築した予測モデルと同等で精度の高い予測モデルを構築することができた。特に、甘味と塩味においては GC/MS データのみで構築した予測モデルに比べて RMSEE, RMSEP の両方がより小さく、良好な値を示した。これらの結果から、しょうゆ中ジペプチドに特に甘味及び塩味と相関の高いジペプチドが含まれていることが示唆された。

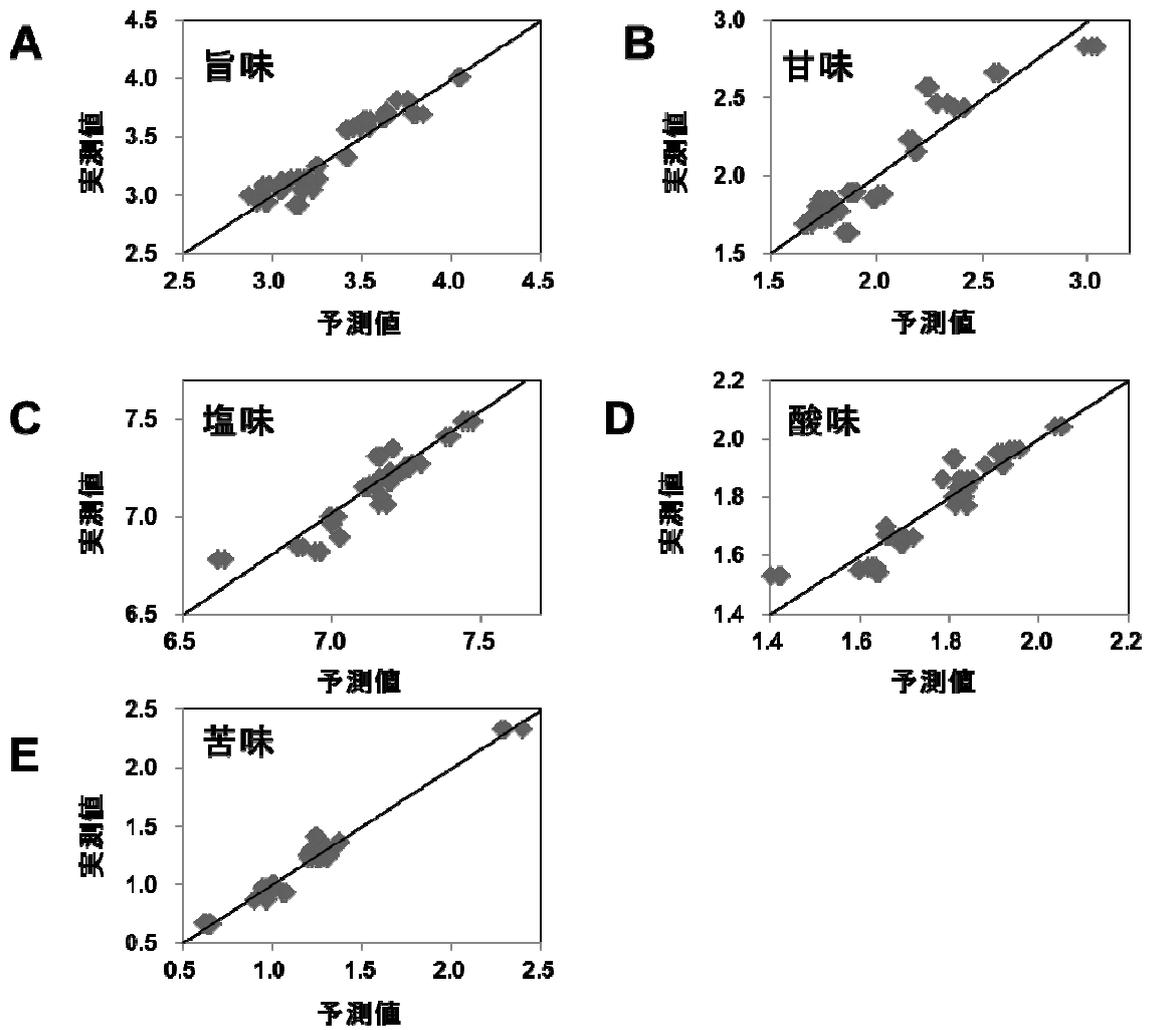


図 3-5 旨味(A), 甘味(B), 塩味(C), 酸味(D), 苦味(E)の予測モデル. 各マーカーが各サンプルを示し, 横軸はPLS回帰分析により予測した官能評価データ, 縦軸が実際の官能評価データを示す. 直線は実測値と予測値が完全に一致している部分を示す.

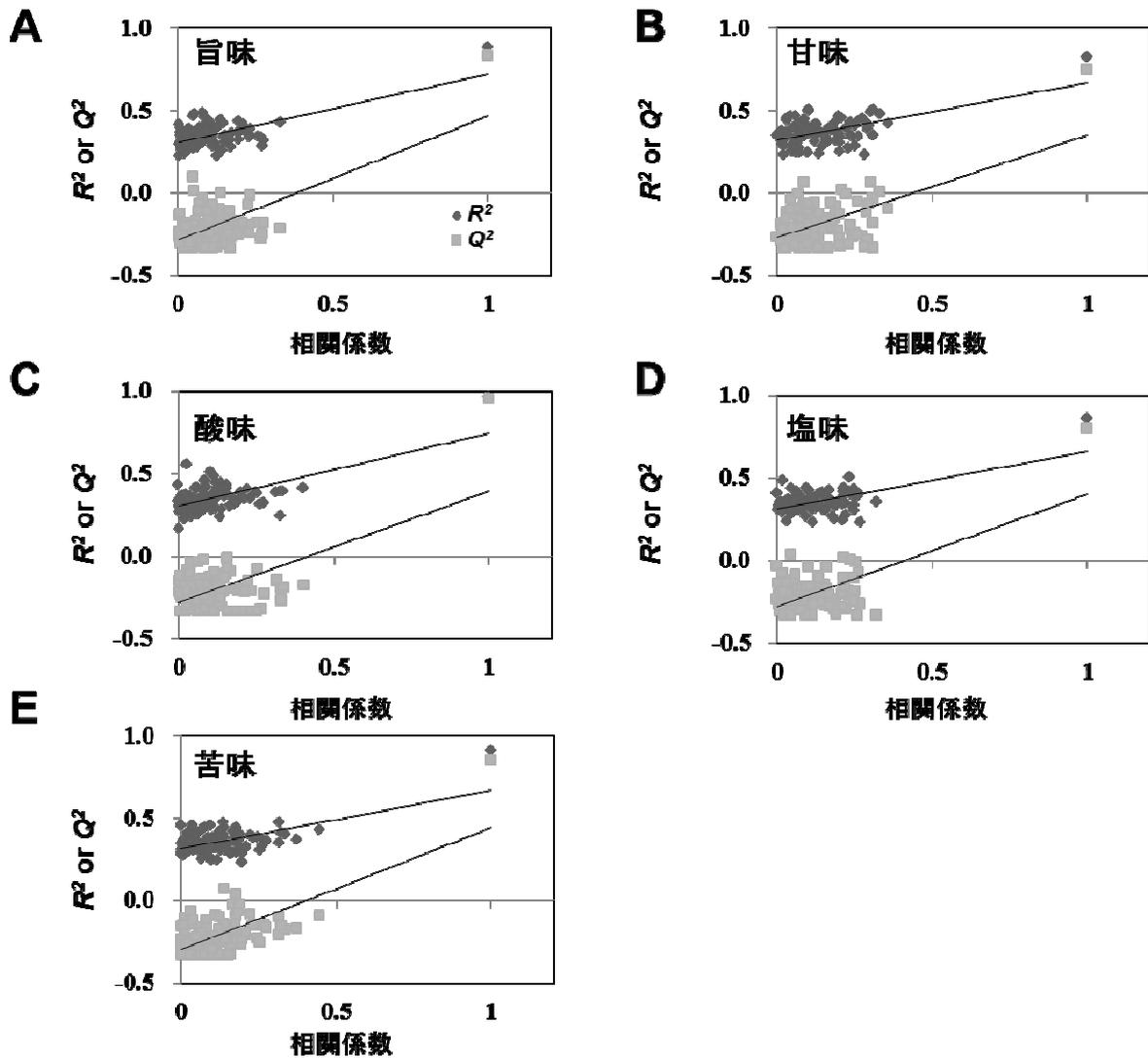


図 3-6 旨味(A), 甘味(B), 塩味(C), 酸味(D), 苦味(E)の OPLS 予測モデルにおける permutation test の結果. 横軸は説明変数と応答変数の組み合わせをサンプル間でランダムに変化させた時の真の応答変数との相関係数を示し, 縦軸はその場合の R^2 と Q^2 の値を示している. 応答変数の組み合わせの変化は 100 回行い, それぞれの結果をプロットした.

表 3-7. 各 OPLS 予測モデルの R^2 , Q^2 , RMSEE, RMSEP.

呈味	説明変数	R^2	Q^2	RMSEE	RMSEP
旨味	GC/MS	0.930	0.907	0.0911	0.272
	LC/MS/MS	0.621	0.486	0.212	0.391
	GC/MS + LC/MS/MS	0.913	0.862	0.102	0.326
甘味	GC/MS	0.861	0.801	0.141	0.591
	LC/MS/MS	0.666	0.602	0.227	0.503
	GC/MS + LC/MS/MS	0.885	0.808	0.128	0.531
塩味	GC/MS	0.846	0.777	0.0809	0.302
	LC/MS/MS	0.564	0.563	0.136	0.277
	GC/MS + LC/MS/MS	0.856	0.774	0.0783	0.277
酸味	GC/MS	0.890	0.857	0.0533	0.191
	LC/MS/MS	0.541	0.496	0.109	0.240
	GC/MS + LC/MS/MS	0.896	0.851	0.0518	0.193
苦味	GC/MS	0.943	0.921	0.0856	0.267
	LC/MS/MS	0.575	0.386	0.233	0.443
	GC/MS + LC/MS/MS	0.952	0.900	0.0785	0.314

3-3-6 PLS による呈味と相関の高いジペプチドの特定

GC/MS に基づく成分データにジペプチドデータを追加することによって、全ての味において良好な予測モデルを構築することができたので、VIP 値を元にしょうゆの呈味性の違いと高い相関を示すジペプチドを特定した。説明変数に GC/MS と LC/MS/MS の両方に基づく成分データを用いて構築した各呈味性の予測モデルにおいて、最も高い VIP 値を示したジペプチドを表 3-8 に示した。相関が正と負のジペプチドについてそれぞれトップ 5 を示した。また、ジペプチドとの比較のために、旨味におけるグルタミン酸、甘味におけるグルコース、スクロース、フルクトースの VIP 値とランキングについて示した。

表 3-8 で示したジペプチドと呈味との相関情報について、各味について以下の 3 つの項目に着目した。1) 正に相関しているジペプチドと、負に相関しているジペプチドについて VIP 値に差はないか、2) 第 2 章で呈味の差と相関の高い成分として特定され、旨味や甘味の主要呈味成分とされるグルタミン酸や糖とジペプチドの比較、3) 過去に呈味性が報告されているジペプチドがしょうゆの呈味の差とどのような相関を示しているか。特に、VIP 値の高いジペプチドのうち、過去に呈味性に関する報告はないか。さらに、甘味を呈するという報告のあるジペプチドは実際に甘味と正に相関しているのかなどについて着目した。

表 3-8 に示したジペプチドについて 1) 正に相関しているジペプチドと、負に相関しているジペプチドについて VIP 値を比べたところ、甘味と酸味は正負に相関するジペプチド間において VIP 値の大きさに違いはなかったが、旨味、塩味、苦味においては負に相関しているジペプチドのほうが、比較的高い VIP 値を示すジペプチドが多かった。これより、旨味、塩味、苦味においては負に相関しているジペプチドによる塩味、旨味、苦味への抑制が特に期待された。

次に、2) 第 2 章で呈味の差と相関の高い成分として特定され、旨味や甘味の主要呈味成分とされるグルタミン酸や糖とジペプチドの VIP 値を比較した。旨味と負に相関するジペプチドである Arg-Pro, Asp-Asp, Arg-Asp についてはグルタミン酸(VIP 値 = 1.65)よりも高い VIP 値を示した。また、甘味においては表 3-8 に示したジペプチド(正に相関した Ile-Gln,

Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Gln と、負に相関した His-Leu, Asp-Ala, pGlu-Gly, His-Gly, Ser-Ala)はいずれも Fructose(1.55), Glucose(1.43), Sucrose(1.31), よりも高い VIP 値を示した。これらのジペプチドは特に、しょうゆの呈味差に関与する成分として期待される。

最後に、3) 過去に呈味性が報告されているジペプチドがしょうゆの呈味の差とどのような相関を示しているかについて述べる。旨味と高い正の相関を示したジペプチドのうち Gly-Pro と Ala-Glu は旨味への関与の報告はないが、それぞれ苦味と酸味に関与する報告がある(Kirimura et al., 1969 and 岡井 et al., 1982)。また、負に相関するジペプチドの Arg-Pro は苦味や塩味に関わるとの報告がある(Kirimura et al., 1969 and Schindler et al., 2011)。そして、過去に旨味に関与するとの報告がある pGlu-Gln (0.0287), pGlu-Gly (0.831)(Kaneko et al., 2011), Val-Pro (0.683), Asp-Glu (0.131), Gly-Phe (0.948), Ala-Pro (1.01)(Park et al., 2002), Glu-Glu (0.810), Thr-Glu (0.101)(Noguchi et al., 1975)の VIP 値は Ala-Pro を除いて 1 以下であったが、いずれも正の相関を示した。甘味と負に高い相関を示した pGlu-Gly はしょうゆ中で甘味を抑制するとの報告はないが、旨味に関与する報告がある(Kaneko et al., 2011)。さらに、甘味に関与すると報告のある Asp-Glu (0.754)(Park et al., 2002)の VIP 値は 1 以下であったが、正の相関を示した。塩味を増強するジペプチドとして報告のあるジペプチドである Arg-Ala (0.223), Glu-Ala (0.34), Glu-Ser (0.234)(Shimono, M. and Sugiyama, K., Patent WO2009-119503, 2009), Arg-Ser (0.410), Arg-Val (0.184)(Schindler et al., 2011)の VIP 値は 1 以下であったが、正の相関を示していた。酸味においては、酸味に関与するとの報告がある Asp-Pro (0.0104)(Park et al., 2002), Asp-Ala (0.955), Asp-Asp (0.407), Glu-Ala (0.593), Glu-Phe (0.902), Glu-Tyr (0.434), Gly-Asp (0.0409), Gly-Glu (0.301)(Kirimura et al., 1969), Gly-Gly (0.223)(Toko et al., 2000)の VIP 値は 1 以下であったが、いずれも正の相関を示した。苦味においては負に相関したジペプチドのうち、Asp-Pro と Thr-Glu は苦味に関与するとの報告はないが、酸味に関与するとの報告がある(Noguchi et al., 1975 and Park et al., 2002)。苦味に関与する報告がある Gly-Phe (0.478), Gly-Pro (0.630), Pro-Gly (0.305)(岡井 et al., 1982), Ala-Phe (0.570),

Arg-Pro (0.620), Gly-Ile (0.081), Gly-Met (0.230)(Kirimura et al., 1969), Gly-Leu (0.486)(Toko et al., 2000)のVIP値は1以下であったが正の相関を示した。このように、過去に報告例のあるジペプチドの多くが、その呈味性に対して正に相関していた。VIP値は大きい値を示さなかったが、過去の知見と一致する結果が得られた。これらのジペプチドは、しょうゆ中で呈味成分として働いているが、しょうゆの呈味の差への関与は大きくないことを示唆していると考えられる。

表 3-8 より、VIP 値に基づいてしょうゆの呈味の差と相関の高いジペプチドが特定できた。VIP 値の高いジペプチドが多く存在したことから、様々なジペプチドが呈味に関与する可能性が示唆された。全体的に Phe, Tyr, Arg, Leu, Ile, Val, Met, His などの単独の水溶液では苦味を呈するアミノ酸残基を含むジペプチドが高い VIP 値を示した。特に、塩味と酸味で正に相関していたジペプチドはトップ 5 のうち全てが苦味を呈すると考えられるジペプチドであった。これらの結果より、苦味ジペプチドが様々な味に関与することが示唆された。単独水溶液では苦味を呈するフェニルアラニンやチロシンは旨味を増強することが報告されているが(Lioe et al., 2004 and Lioe et al., 2007), それと同様に、苦味を呈するジペプチドを塩味や酸味を増強する化合物の候補として提示した。

表3-8. VIP値を指標に特定した呈味と相関の高いジペプチド.

呈味	相関	VIPランキング ^a	成分	VIP値
旨味	正	23	グルタミン酸 ^c	1.65
		52	Ala-His	1.37
		101	Gly-Pro	1.13
		112	Ala-Glu	1.09
		113	Ile-Gln	1.09
		115	Pro-Thr	1.09
	負	9	Arg-Pro	1.83
		19	Asp-Asp	1.7
		21	Arg-Asp	1.68
		25	Asp-Ala	1.65
		27	Arg-Thr(+Thr-Arg)	1.64
		甘味	正	4
8	Pro-Lys			2.01
10	Ile-Glu			1.91
14	Thr-Phe			1.74
15	Leu-Gln ^b			1.74
26	フルクトース ^c			1.55
負	44		グルコース ^c	1.43
	66		スクロース ^c	1.31
	7		His-Leu	2.09
	12		Asp-Ala	1.77
	16		pGlu-Gly	1.72
	18		His-Gly ^b	1.71
塩味	正	20	Ser-Ala	1.68
		15	His-Leu	1.84
		35	Leu-Arg ^b	1.61
		52	Phe-His	1.51
		58	Phe-Ile	1.48
	負	82	His-Val	1.33
		4	Ala-Leu	2.23
		5	Ile-Glu	2.22
		8	Ala-Gln	2.06
		10	Arg-Gly	2.02
	11	Pro-Lys	2	

^a GC/MSで取得した成分も含めたVIPランキング.

^b 標準品を用いずに構造を推定したジペプチド.

^c 比較対象として記載.

表3-8. VIP値を指標に特定した呈味と相関の高いジペプチド(続き).

呈味	相関	VIPランキング ^a	成分	VIP値
酸味	正	5	His-Val	2.38
		7	His-Leu	2.26
		13	His-Ile	2.03
		17	Phe-Ile	1.9
		20	Arg-Ile	1.85
	負	15	Val-Glu	1.99
		16	Leu-Pro ^b	1.92
		22	Pro-Gln	1.84
		25	Val-Asp	1.8
		26	Pro-Lys	1.78
苦味	正	59	Leu-Ile	1.16
		62	Leu-Ala	1.15
		64	Lys-Thr(+Thr-Lys)	1.14
		78	pGlu-Tyr ^b	0.99
		89	pGlu-Leu	0.94
	負	13	Thr-Glu	2.45
		14	Asp-Pro	2.37
		16	Gly-Ser	2.24
		17	His-Gly ^b	2.2
		19	His-Asp(+Asp-His)	2.18

^a GC/MSで取得した成分も含めたVIP値のランキング.

^b 標準品を用いずに構造を推定したジペプチド.

3-4 小括

成分プロファイリングの技術によりしょうゆの呈味性の違いと相関の高いジペプチドを特定することを目的として、GC/MS 及び LC/MS/MS による成分プロファイリングを実施し、OPLS 回帰分析により官能評価データとの相関性を解析した。

まず、しょうゆ中のジペプチドをできる限り網羅的に分析するために、LC に PFPP カラム、MS/MS の分析モードとして MRM を用いた 380 種類のジペプチドを対象とした分析方法を新規構築した。本分析法は既存の分析法に比べて、用いた標準品の数が最も多く、分析対象とした 380 種類のジペプチドのうち 352 種類について標準品により検出できることを確認した。ジペプチドに限らずとも、これだけの標準品を用いた成分の一斉分析はこれまでに報告

されていない。さらに、構築した分析方法によって、これまでのしょうゆの報告の中で最も多い 237 種類のジペプチドの分析情報を取得した。

続いて、LC/MS/MS で取得したジペプチドデータと GC/MS によって得たその他の親水性低分子の合計 366 種類の成分データを説明変数、基本五味の QDA データを応答変数として OPLS 回帰分析により予測モデルを構築した。その結果、全ての味において良好な予測モデルを構築することができた。特に GC/MS データのみで構築したモデルに比べて、甘味と塩味の予測モデルの精度が向上したことより、しょうゆ中ジペプチドに特に甘味及び塩味に相関の高いジペプチドが含まれていることが示唆された。さらに、個々のジペプチドのプロファイルに着目して、VIP 値を元にしょうゆの呈味性と相関の高いジペプチドを特定した。特に、グルタミン酸よりもしょうゆの旨味の差に相関の高いジペプチドとして旨味と負に相関する Arg-Pro, Asp-Asp, Arg-Asp を特定した。また、糖類よりもしょうゆの甘味に相関の高いジペプチドは多く、特に正に相関したジペプチドとして Ile-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Gln を特定した。

このように、メタボロミクスに基づく成分プロファイリングの技術をしょうゆ中ジペプチドに応用することによってしょうゆの呈味の差と相関の高いジペプチドを特定した。

第4章 総括

4-1 まとめ

緒論で述べた通り、しょうゆの呈味の主要成分は既に明らかとなっているが、しょうゆ製品の呈味の差という観点では、成分と呈味の関係は未だ不明な点が多い。本研究は、メタボロミクスの技術をベースとしてこの分野にブレークスルーをもたらし、将来的には科学的かつ実用的な品質評価や品質向上の技術を確立することを目指したものである。当該博士論文において報告した研究はそのための端緒を切るものとして位置づけられる。

研究対象としては、これまでにしょうゆの呈味の主要成分として報告のある糖、アミノ酸、有機酸に加えて、これまで呈味との関係が重要視されながらも、解析が行われていなかったジペプチドを対象とした。分析機器としては糖、アミノ酸、有機酸などの一斉分析を GC/MS で実施し、ジペプチド分析には LC/MS/MS を使用した。呈味解析には客観的な定量データを取得できる QDA を使用した。成分と呈味間の関係の解析には、回帰式的一种である PLS 回帰を使用して呈味と相関の高い成分を特定することを当該博士論文の目的とした。

第2章では GC/MS に基づく糖、アミノ酸、有機酸等の成分データと QDA データを組み合わせた成分プロファイリングの技術を初めてしょうゆに適用した。しょうゆの QDA により、呈味、香り、風味、食感などの全 56 種類の特性表現用語が同定され、そのうち 54 種類についてしょうゆのサンプル間で有意差が認められた。一方、GC/MS を用い、しょうゆ中の糖、アミノ酸、有機酸などの親水性低分子化合物をターゲットとした一斉成分分析を行うことで、189 種類の成分データを取得することができた。続いて、GC/MS に基づくしょうゆの親水性低分子化合物の成分データを説明変数、しょうゆの QDA データを応答変数とした PLS 回帰により、54 種類の各官能特性の予測モデルを構築したところ、全ての官能特性について良好な QDA データ予測モデルを構築することができた。この結果は、GC/MS に基づくしょうゆの成分データからしょうゆの各 QDA データを高精度に予測することが可能であることを示す。これらの結果から、GC/MS を用いた成分プロファイリングの技術が、官能評価特性の評価法として使用できる可能性を示すことができた。続いて、GC/MS に基づく親水性低分子化合物

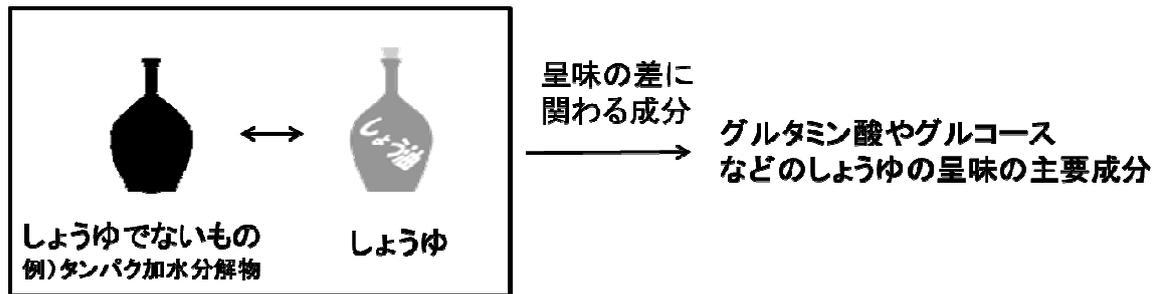
の成分データと基本五味の QDA データの相関性についても PLS 回帰により解析した。VIP 値を指標として用いることによってしょうゆの呈味の差と相関の高い成分が特定したところ、特定された成分はしょうゆの味において重要と考えられる成分であった。特に、旨味においてはグルタミン酸、甘味においては糖類が高い VIP 値を示した。これより、VIP 値はサンプル間の味の差に影響する成分を評価する指標として使用できるということが示唆された。さらに、糖類は甘味以外の呈味においても高い相関を示したことから、しょうゆの呈味の差への糖類の関与が示唆された。このように、第 2 章では、GC/MS に基づいて得られるアミノ酸、糖、有機酸等についてしょうゆの呈味の差と相関の高い成分を特定するとともに、しょうゆの呈味解析における成分プロファイリングの有用性を示した。

第 3 章ではしょうゆの呈味性においていくつか報告があるにも関わらず呈味との関係が不明なジペプチドに着目し、しょうゆの呈味性の違いと相関の高いジペプチドを特定することを目的とした。まず、しょうゆ中のジペプチドをできる限り網羅的に分析するために、LC に PFPP カラム、MS/MS のとして MRM を用いた 380 種類のジペプチドを分析対象とした分析系を構築した。構築した分析系によって、初めてしょうゆ中のジペプチドの一斉分析を行ったところ、これまでのしょうゆの報告の中で最も多い 237 種類のジペプチドの分析情報を取得した。続いて、LC/MS/MS で取得したジペプチドデータと GC/MS によって得たその他の親水性低分子の合計 366 種類の成分データを説明変数、基本五味の QDA データを応答変数として OPLS 回帰分析により予測モデルを構築したところ、全ての味において良好な予測モデルを構築することができた。特に GC/MS データのみで構築したモデルに比べて、甘味と塩味の予測モデルの精度が向上することができたことより、しょうゆ中ジペプチドに特に甘味及び塩味に相関の高いジペプチドが含まれていることが示唆された。さらに、個々のジペプチドのプロファイルに着目して、VIP 値を元にしょうゆの呈味性と相関の高いジペプチドを特定した。その結果、グルタミン酸よりもしょうゆの旨味の差に相関の高いジペプチドとして、旨味と負に相関する Arg-Pro, Asp-Asp, Arg-Asp を特定した。また、糖類よりもしょうゆの甘味に相関の高いジペプチドを特定した。特に Ile-Gln, Pro-Lys, Ile-Glu, Thr-Phe, Leu-Gln が正

に相関したジペプチドとして特定できた。さらに、単独水溶液では苦味を呈するアミノ酸を含むジペプチドが特に呈味と相関が高く、しょうゆの呈味の差に関わる成分として予想された。そして VIP 値の高いジペプチドが多く存在したことから、様々なジペプチドが呈味に關与する可能性が示唆された。このように、メタボロミクスに基づく成分プロファイリングの技術をしょうゆ中ジペプチドに応用することによってしょうゆの呈味の差と相関の高いジペプチドを特定した。

過去の知見から、しょうゆとしょうゆでないもの(タンパク加水分解物等)の呈味の差を決定づける成分、つまり、しょうゆであるために必要な成分は、グルタミン酸やグルコースなどのしょうゆの呈味の主要成分だと考えられる。しかし、緒論で述べたように、これらしょうゆの呈味の主要成分のみではしょうゆ製品間の呈味の差を完全に説明することはできない。一方、本研究では、メタボロミクスに基づく成分プロファイリングの技術をしょうゆ中親水性低分子化合物に応用し、さらに QDA と PLS 回帰を組み合わせることによってしょうゆの呈味の差と相関の高い成分を特定することができた。特に、しょうゆの呈味の主要成分であるグルタミン酸やグルコースに比べて、しょうゆの呈味の差に相関の高い成分としていくつかのジペプチドが特定できた。これらジペプチドのしょうゆの呈味の差への関与は実証されていない。しかし、これらのジペプチドは、しょうゆの呈味の違いへの関与が期待される重要な候補化合物である。これらのことから、しょうゆ製品間の呈味の違いにはジペプチドのような微量な呈味成分が重要な役割を担っていると考えている(図 4-1)。本研究で示したしょうゆの成分と呈味間の詳細な相関情報は、しょうゆの呈味解析の研究において、重要な情報になるであろう。

しょうゆとしょうゆでないものの呈味の差



しょうゆ製品間の呈味の差

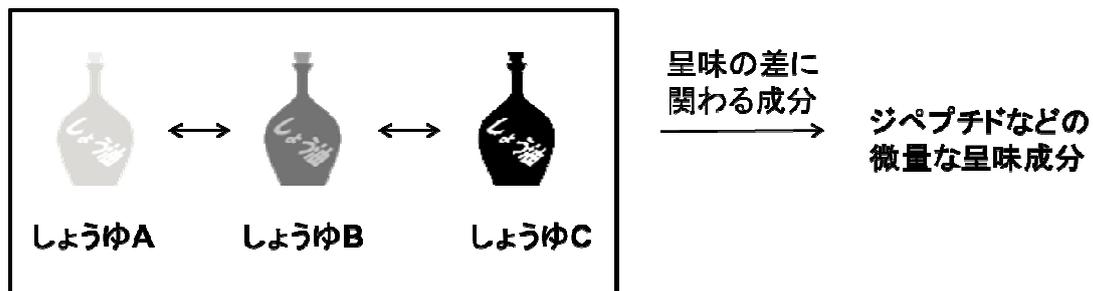


図 4-1 しょうゆとしょうゆでないものの呈味の差と成分の関係. 及び, しょうゆ製品間の呈味の差と成分との関係.

4-2 今後の展望

今後の展望として, 品質評価, 品質改善, 成分データの拡張を目指した研究への発展が考えられる.

まず, 品質評価に向けた展望について以下に述べる. 当該博士論文で特定した呈味に相関の高いジペプチド等の成分はしょうゆの呈味の指標として, 全窒素, グルタミン酸濃度, 食塩濃度などを補完することができる可能性があると考えている. 例えば, 全窒素分やグルタミン酸濃度は旨味の指標として重要ではあるが, 完全に旨味強度を表現することはできない. 既存の指標を補完する役割として働き, より高精度な品質評価が確立されることを望んでいる. そのためには当該博士論文で特定した呈味と相関の高い成分について, より多くのサンプルについて検証する必要があると考えている. また, しょうゆの品質評価の現場に応用するためには簡易な分析法が求められるため, よりスループットの高い分析法の構築にも取り組む必要があると考えている.

さらに、当該博士論文で得た相関情報と開発した解析手法を元に、しょうゆ工場で醸造中の成分変化をモニタリングすることで、品質を安定化させるための醸造期間や醸造状況の管理に応用したいと考えている。そのためには、当該博士論文で実施した GC/MS と LC/MS/MS による成分分析と、QDA による呈味評価をしょうゆの各醸造工程においてそれぞれ行い、醸造中の成分変化と呈味変化との関係を明らかにする必要があると考えている。呈味が形成される醸造期間や醸造条件に特徴的な成分を特定することができれば、その成分を醸造中にモニタリングすることでより品質が安定したしょうゆの生産に繋がるであろう。

次に、品質改善に向けた展望としてジペプチドの官能特性の解明に向けた方向性を述べる。例えば、当該博士論文で示した呈味の差と相関の高い成分をしょうゆに添加し、その前後におけるしょうゆの呈味変化を QDA により評価することによって、ジペプチドのしょうゆの呈味の差への寄与が明らかになると考えられる。しょうゆの品質改善に有用なジペプチドが特定できれば、安全性を評価して食品添加物としての認可を目指す。

また、醸造条件を検討することにより、呈味と相関の高いジペプチドの増減と、呈味のコントロールを目指したいと考えている。麹菌の種類、ペプチダーゼ比率の異なる麹菌の育種、原料の種類や配合、醸造期間の違いを検討することによりジペプチド量をコントロールしたいと考えている。おそらく醸造条件の違いで特定のジペプチドのみを増減することは非常に難しく、他の成分についても変動すると考えられる。しかし、それら他の成分の変動についても呈味をコントロールするために必要である可能性があると考えている。呈味と相関の高いジペプチドを増減することによって呈味をコントロールすることができれば、例えそのジペプチドが直接呈味に関与しておらず、原理がブラックボックスであっても有用な技術になりうる。

最後に、成分データの拡張に向けた展望について述べる。第3章で構築した LC/MS/MS によるジペプチドの一斉分析法は全てのジペプチドを完全に分離・検出するに至っておらず、380 種類の対象ジペプチドのうち 15 種類は他のジペプチドと分離できない。そこで、異なる LC 条件との組み合わせや、固定相を含めた新しい分離モードの開発によって、より多く

のジペプチドが一度に分離・検出できる手法に取り組みたい。また、しょうゆ中には当該博士論文で対象とした成分以外にも、トリペプチド以上のペプチド、ミネラル、香気成分、メイラード化合物そして多糖類など実に多種多様な成分が含まれていると考えられている。より多くの成分について分析データを取得して解析対象へと追加することで、しょうゆ呈味の差においてより相関の高い成分を特定できる可能性があると考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本論文作成に当り有益なご指導、ご助言、及びご校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科 村中俊哉 教授、大阪大学生物工学国際交流センター 藤山和仁 教授に厚く感謝申し上げます。

本研究に当り、ご指導ならびに日頃からの貴重なご助言と議論と励ましの言葉を頂きました大阪大学大学院工学研究科 馬場健史 准教授に心から感謝申し上げます。

また、日頃より励ましの言葉を頂きました大阪大学工学研究科 小野比佐好 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究に深いご理解と全面的なご支援を頂きましたキッコーマン株式会社研究開発本部長 松山旭博士 に深く感謝申し上げます。

本研究で使用したしょうゆサンプルと官能評価データの提供と日頃より有益なご助言を頂きましたキッコーマン株式会社 基盤研究第 2 部部長 小幡明雄博士 に感謝の意を表します。

また、本研究を進めるにあたり、細部に渡る懇切なるご指導を賜り、また日頃からご助言と励ましの言葉を頂きました大阪大学大学院工学研究科 キッコーマン株式会社基盤研究第 2 部研究員 志賀一樹氏 に深く感謝いたします。

また、本研究の推進に当り協力を頂いたキッコーマン株式会社基盤研究第 2 部諸氏に深く感謝の意を表します。

ドイツへの短期留学とシンポジウムに参加することで本研究への取り組む姿勢と精神的成長の機会をいただきました Japanese-German Graduate Externship Program の大阪大学大学院工学研究科 大竹久夫 教授及びアーヘン工科大学と大阪大学工学研究科のスタッフの皆様に感謝申し上げます。

本研究を行うに際し、多大なる協力を賜りました理化学研究所環境資源科学研究センタ

一特別研究員兼大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域招聘
研究員 津川裕司博士 に感謝します。また、大阪大学工学研究科生命先端工学専攻福
崎研の食品研究グループの Udi JUMUHAWAN 氏, 三村奈津紀氏, 原田里紗氏, 福田泰
弘氏および福崎研の諸先輩方, 学生諸氏, 研究員, 事務の方々に心から感謝の意を表し
ます。

最後に, これまで常に支え続けてくれた家族, 友人無くして本研究は成し得なかったこと
を付記致します。

引用文献

Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y., H., and Verpoorte, R.: Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses, *J. Biomol. NMR*, **49**, 255–266 (2011).

Apriyantono, A., Setyaningsih, D., Hariyadi, P., and Nuraida, L.: Sensory and peptides characteristics of soy sauce fractions obtained by ultrafiltration, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **542**, 213-226 (2004).

Arikrit, S., Yoshihashi, T., Wanchana, S., Uyen, T., T., Huong, N., T., Wongpornchai, S., and Vanavichit, A.: Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by GmAMADH2, the homologue of rice Os2AP, enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (*Glycine max* L.), *Plant Biotechnol. J.*, **9**, 75-87 (2011)

Chou, C.-C. and Ling, M.-Y.: Biochemical changes in soy sauce prepared with extruded and traditional raw materials, *Food Res. Int.*, **31**, 487–492 (1998).

Elmore, T., D.: Peptide Synthesis, Amino Acids, Peptides and Proteins, **35**, 74-128, (2006).

Eriksson, L. and Johansson, E.: Multi- and megavariate data analysis principles and applications, p. 43–70, 94-97, 105-107, 489-491, Umetrics AB, Umeå (2001).

Bruzzone, F., Ares, G., and Gimenez, A.: Temporal aspects of yoghurt texture perception, *Int.*

Dairy J., **29**, 124-134 (2013).

Fukushima, D.: Soy proteins for foods centering around soy sauce and tofu, J. Am. Oil Chem. Soc., **58**, 346–354 (1981).

Gao, X., Cui, C., Ren, J., Zhao, H., Zhao, Q., and Zhao, M.: Changes in the chemical composition of traditional Chinese-type soy sauce at different stages of manufacture and its relation to taste, J. Food Sci. Technol., **46**, 243-249 (2011).

Hashimoto, H., Kobayashi, K., Iizuka, K., and Okada, T.: Application of near infrared spectroscopy for soy sauce quality control, J. Japan Soy Sauce Res. Ins., **20**, 205-212 (1994). (in Japanese)

Jonsson, P., Gullberg, J., Nordström, A., Kusano, M., Kowalczyk, M., Sjöström, M., Moritz, T.: A strategy for identifying differences in large series of metabolomic samples analyzed by GC/MS, Anal. Chem., **76**, 1738-1745 (2004).

Kaneko, S., Kumazawa, K., and Nishimura, O.: Isolation and identification of the umami enhancing compounds in Japanese soy sauce, Biosci. Biotechnol. Biochem., **75**, 1275-1282 (2011).

Katsura, H., Okada, T., Miki, M., and Kobayashi, M.: Relationship between pyroglutamyl peptides and taste in soy sauce supplemented with wheat gluten, Seibutsu-Kogaku Kaishi, **83**, 2–6 (2005). (in Japanese)

Keast, R., S., J. and Breslin, P., A., S.: An overview of binary taste-taste interactions, *Food Qual. Prefer.*, **14**, 111-124 (2003).

Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T., and Katsuya., N.: Contribution of peptides and amino acids to the taste of foods, *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 689–695 (1969).

Koseko, S., Hisamatsu, M., and Yamada, T.: Studies on soy-sauce production by bioreactor : Part 2. Studies on fermentation condition with koji hydrolyzate, the bulletin of the faculty of bioresources, Mie University, **4**, 187-196 (1990). (in Japanese)

Kovalenko, I., V., Rippke, G., R., Hurburgh, C., R.: Determination of Amino Acid Composition of Soybeans (*Glycine max*) by Near-Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3485-3491 (2006).

Lioe, H., N., Apriyantono, A., Takara, K., Wada, K., Naoki, H., and Yasuda, M.: Low molecular weight compounds responsible for savory taste of Indonesian soy sauce, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5950-5956 (2004).

Lioe, H. N., Apriyantono. A., Takara, K., Wada, K., and Yasuda, M.: Umami Taste Enhancement of MSG/NaCl Mixtures by Subthreshold L- α -Aromatic Amino Acids, *J. Food Sci.*, **70**, 401-405 (2005).

Lioe, H., N., Takara, K., and Yasuda, M.: Evaluation of peptide contribution to the intense umami taste of Japanese soy sauces, *J. Food Sci.*, **71**, 277–283 (2006).

Lioe, H., N., Wada, K., Aoki, T., and 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.*, **100**, 1669-1677 (2007).

Lommen, A.: MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing, *Anal. Chem.*, **81**, 3079-3086 (2009).

Mahadevan, S., Shah, S., L., Marrie, T., J., and Slupsky, C., M.: Analysis of metabolomic data using support vector machines, *Anal. Chem.*, **80**, 7562-7570 (2008).

Maria, C. Z., Maria, C. G., and Mara, V. G.: Sourness-sweetness interactions in different media : White wine, ethanol and water, *J. Sens. Stud.*, **21**, 601-611 (2006).

Moco, S., Forshed, J., Vos, C., H., De, R., Bino, J., R., and Vervoort, J.: Intra- and inter-metabolite correlation spectroscopy of tomato metabolomics data obtained by liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance, *Metabolomics*, **4**, 202-215 (2008).

Nakahara, T., Sugimoto, K., Sano, A., Yamaguchi, H., Katayama, H., and Uchida, R.: Antihypertensive mechanism of a peptide-enriched soy sauce-like seasoning: the active constituents and its suppressive effect on renin-angiotensin-aldosterone system, *J. Food Sci.*, **76**, H201-H206 (2011).

Nishimura, T. and Kato, H.: Taste of free amino acids and peptides, *Food Rev. Int.*, **4**, 175–194 (1988).

Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., and Fujimaki, M.: Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor potentiating fraction from a fish protein hydrolysate, *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 49-53 (1975).

Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., and Fukusaki, E.: Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 751-758 (2012).

Park, J.-N., Ishida, K., Watanabe, T., Endoh, K.-I., Watanabe, K., Murakami, M., and Abe, H.: Taste effects of oligopeptides in a Vietnamese fish sauce, *Fisheries. Sci.*, **68**, 921–928 (2002).

Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., and Kobayashi, A.: Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 231-236 (2007).

Ritthiruangdej, P. and Suwonsichon, T.: Relationships between NIR spectra and sensory attributes of Thai commercial fish sauces, *Anal. Sci.*, **23**, 809-14 (2007).

Roling, W. F. M., Timotius, K. H., Prasetyo, A. B., Stouthamer, A. H., and Vereveld, H. W. V.: Changes in microflora and biochemical composition during the baceman stage of traditional Indonesian kecap (soy sauce) production, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 62–70 (1994).

Rombouts, I., Lamberts, L., Celus, I., Lagrain, B., Brijs, K., and Delcour, J., A.: Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection, *J. Chromatogr. A.*, **1216**, 5557-5562 (2009).

Schindler, A., Dunkel, A., Stähler, F., Backes, M., Ley, J., Meyerhof, W., and Hofmann, T.: Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 12578-12588 (2011).

Schlichtherle-Cerny, H. and Amado, R.: Analysis of taste-active compounds in an enzymatic hydrolysate of deamidated wheat gluten, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1515–1522 (2002).

Sugiyama, S.: Selection of micro-organisms for use in the fermentation of soy sauce, *Food Microbiol.*, **1**, 339-347 (1984).

Takahashi, K., Tokuoka, M., Kohno, H., Sawamura, N., Myoken, Y., and Mizuno, A.:Comprehensive analysis of dipeptides in alcoholic beverages by tag-based separation and determination using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **242**, 17–25 (2012).

Thissen, U., Coulier, L., Overkamp, K., M., Jetten, J., Werff, B.J.C. van de, Ven, T. van de, Werf and M.J. van der: A proper metabolomics strategy supports efficient food quality improvement: A case study on tomato sensory properties, *Food Qual. Prefer.*, **22**, 499–506 (2011).

Tianniam, S., Tarachiwin, L., Bamba, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E.: Metabolic profiling of *Angelica acutiloba* roots utilizing gas chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for quality assessment based on cultivation area and cultivar via multivariate pattern recognition, *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 655-659 (2008).

Trygg, J. and Wold, S.: Orthogonal projections to latent structures (O-PLS), *Journal of Chemometr.*, **16**, 119–128 (2002).

Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., and Fukusaki, E.: GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA), *BMC Bioinformatics*, **12**, 131 (2011).

Tsugawa, H., Arita, M., Kanazawa, M., Ogiwara, A., Bamba, T., and Fukusaki, E.: MRMPROBS: A data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics, *Anal. Chem.*, **85**, 5191-5199 (2013).

Takagi, S., Toko, K., Wada, K., Yamada, H., and Toyoshima, K.: Detection of suppression of bitterness by sweet substance using a multichannel taste sensor, *J. Pharm. Sci.* **87**, 552-555 (1998).

Takeuchi, T., Kato, H., and Yoshii, H.: Studies on the peptides in miso and soy sauce. (II) On the peptide composition of soy sauce, *Hakko Kogaku Zasshi*, **40**, 379–384 (1962). (in Japanese)

Toko, K.: Taste sensor, *Sensor. Actuat B-Chem.*, **64**, 205–215 (2000).

Williams, P. C.: Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis, p. 143-167, In Williams, P. and Norris, K. (ed.), *Near infrared technology in the agricultural and food industries*, Amer. Assn. of Cereal Chemists, MN (1987).

Yano, T., Ito, M., Tomita, K., and Kumagai, H.: Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*, *J. Ferment. Technol.*, **66**, 137–143 (1988).

Yokotsuka, T.: Soy sauces, p. 437–451. In Steinkraus, K. H. (ed.), *Handbook of indigenous fermented foods*, Vol. 9. Marcel Dekker, New York (1983).

Yoshida, H., Mizukoshi, T., Hirayama, K., and Miyano, H.: Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 551-560 (2007).

Yoshida, R., Tamura, T., Takaoka, C., Harada, K., Kobayashi, A., Mukai, Y., and Fukusaki, E.: Metabolomics-based systematic prediction of yeast lifespan and its application for semi-rational screening of ageing-related mutants, *Aging Cell*, **9**, 616–625 (2010).

Zittan, L.: Enzymatic Hydrolysis of Inulin - An Alternative Way to Fructose Production, *Starch*, **33**, 373-377 (1981).

今村美穂, 佐藤洋枝: 醤油および醤油関連調味料を対象とした記述分析型パネルの選抜, *食科工*, **55**, 468 (2008).

今村美穂, 佐藤常雄, 畑本修: 丸大豆しょうゆの「まろやかさ」の客観的評価, 日本味と匂学会誌, 16, 447-450 (2009a)

今村美穂, 佐藤常雄, 畑本修: 醤油中における呈味成分の閾値に関する検討, 日本食品科学工学会誌, 56, 384-393 (2009b)

今村美穂, 佐藤常雄, 畑本修: 丸大豆しょうゆと脱脂加工大豆しょうゆの差異に関する検討, 醤油の研究と技術, 38, 339-345, (2012).

大越ひろ, 神宮英夫: SD 方と QDA 法, pp88-95; 食の官能評価入門, 光生館 (2009).

岡井 秀雄, 三宅 一三: ペプチドの呈味と化学構造, 化学と生物, 20, 709-716 (1982).

中台忠信: やさしい醤油の技術, 醤油の味, 醬研, 31, 360-373 (2005).

福崎英一郎, 序論 メタボロミクスの現状と可能性, pp1-10; メタボロミクスの先端技術と応用, 福崎英一郎 監修, 株式会社シーエムシー出版 (2008).

しょうゆ情報センター, 醤油の統計資料 平成 25 年版.

しょうゆ情報センターホームページ, <https://www.soysauce.or.jp/>

発表論文

- 1) **Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A. and Fukusaki, E.:** Metabolite Profiling of Soy Sauce Using Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry and Analysis of Correlation with Quantitative Descriptive Analysis, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 170–175 (2012).

- 2) **Yamamoto, S., Shiga, K., Kodama, Y., Imamura, M., Uchida R, Obata, A., Bamba, T., and Fukusaki, E.:** Analysis of the Correlation between Dipeptides and Taste Differences among Soy Sauces by using Metabolomics-based Component Profiling, *J. Biosci. Bioeng.* (Accepted for publication)

総説等

- 1) **山本慎也, 津川裕司, 中山泰宗, 福崎英一郎:** 第2章 新規探索・機能解析・改変技術
4 メタボロミクス, 極限環境生物の産業展開, 株式会社シーエムシー出版編, 商品コード:T0869, 監修:今中忠行

- 2) **山本慎也, 福崎英一郎:** Q.42 オミクス研究って何ですか?, ひらく, ひらく「バイオの世界」:14 歳からの生物工学入門, 日本生物工学会編, ISBN: 9784759815382, (2012).

- 3) **山本慎也, 中山泰宗, 福崎英一郎:** 質量分析データの正しい見方を知っていますか?, 生物工学, **91**, 2, 101-104 (2013).

- 4) **山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎:**

GC/MS によるしょうゆ成分のプロファイリングおよび定量的記述分析法との相関性解析,
醤油の研究と技術, **39**, 3, 131-139 (2013).

5) Putri, P. S., Yamamoto, S., Tsugawa, H., Fukusaki E.: Current metabolomics:
Technological advances, *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 1, 9–16 (2013).

6) 福崎英一郎, 山本慎也: 特集 I 食のメタボロミクス解析応用の最新動向 4, メタボロミ
クス技術の食品機能解析への応用(Application of Metabolomics Technology to Analysis
of Food Function), *食品と開発*, **48**, 11, 13-15 (2013).

出願特許

1) 発明の名称:液体調味料

出願人:キッコーマン株式会社

発明者:志賀一樹, 中尾隆人, 大友裕絵, 仲原文晴, 内田理一郎, 福崎英一郎, 馬場
健史, 山本慎也

出願日:2013 年 8 月 20 日

出願番号:特願 2013-170040

2) 発明の名称:液体調味料

出願人:キッコーマン株式会社

発明者:志賀一樹, 中尾隆人, 大友裕絵, 仲原文晴, 内田理一郎, 福崎英一郎, 馬場
健史, 山本慎也

出願日:2013 年 8 月 20 日

出願番号:特願 2013-170039

学会発表

- 1) **○Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., Fukusaki, E.**: “Metabolite profiling of soy sauce using gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry and correlation analysis with quantitative descriptive analysis”, Metabolomics 2011 7th International Conference of the Metabolomics Society, abs#243, Cairns, Australia, June 2011 (Poster)

- 2) **○山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎**
「GC/MS による醤油の代謝物プロファイリング及び定量的記述分析法(QDA)との相関の解析」, 『フードサイエンスフォーラム第20回記念学術集会』, P-2, 宮崎, 2011年9月(口頭・ポスター)
ベストプレゼンテーション金賞を受賞

- 3) **○山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎**
「GC/MS による醤油の代謝物プロファイリングと定量的記述分析法(QDA)との相関解析」, 『第63回生物工学会大会』, 1Lp08, 東京, 2011年9月(口頭)

- 4) **○山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎**
「GC/MS による醤油の代謝物プロファイリング及び定量的記述分析法(QDA)との相関の解析」『第6回メタボロームシンポジウム』, P-03, 大阪, 2011年10月(ポスター)

- 5) **○Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., Fukusaki, E.**: “Metabolite Profiling of Soy Sauce Using Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry and Analysis of Correlation with Quantitative Descriptive Analysis”, The 11th Global COE International Symposium: Bio-Environmental Chemistry, P-57, Osaka, Japan, December 2011 (Poster)

- 6) ○Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., Fukusaki, E.: “Metabolite Profiling of Soy Sauce Using Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry and Analysis of Correlation with Quantitative Descriptive Analysis”, Osaka-Aachen Mini-symposium, Japanese-German Graduate Externship Program International Research Training Groups, Osaka, Japan, March 2012 (Oral)
- 7) ○山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎
「GC/MS による醤油の代謝物プロファイリング及び定量的記述分析法(QDA)との相関の解析」『第4回日本醸造学会若手シンポジウム』, P-25, 東京, 2012年9月(ポスター)
- 8) ○Yamamoto, S., Bamba, T., Sano, A., Kodama, Y., Imamura, M., Obata, A., Fukusaki, E.: “Metabolite Profiling of Soy Sauce Using Gas Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry and Analysis of Correlation with Quantitative Descriptive Analysis”, The Young Scientist Seminar 2012, O-22, Hanoi, Viet Nam, October 2012 (Oral)
ベストプレゼンテーション3位入賞
- 9) ○山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎
「LC/QqQ-MSを用いた predictive MRMによるしょうゆ中ジペプチドの網羅的探索」『第7回メタボロームシンポジウム』, P-08, 山形, 2012年10月(口頭・ポスター)
- 10) ○山本慎也, 馬場健史, 佐野敦志, 小玉侑加子, 今村美穂, 小幡明雄, 福崎英一郎
「GC/MS による醤油の代謝物プロファイリング及び定量的記述分析法(QDA)との相関の解析」『日本醤油技術センター 第75回研究発表会』, (3), 千葉, 2012年10月(口頭)

- 11) ○志賀一樹, 小玉侑加子, 今村美穂, 内田理一郎, 小幡明雄, 山本慎也, 馬場健史, 福崎英一郎 「しょうゆの旨味構成成分探索への GC/MS・LC/MS を併用したメタボリックプロファイリングの応用」, 『第 64 回日本生物工学会大会(平成 24 年度) 創立 90 周年記念大会』, 2012 年 10 月, 兵庫(口頭)
- 12) ○Yamamoto, S., Shiga, K., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., Fukusaki, E.: “Comprehensive Searching of Dipeptides in Soy Sauces using Predictive MRM with LC/QqQ-MS”, Biological and Chemical Methods for Selective Catalysis, Aachen, Germany, December 2012 (Oral)
- 13) ○志賀一樹, 山本慎也, 中島文子, 小玉 侑加子, 今村美穂, 馬場健史, 福崎英一郎 「GC/MS・LC/MS を用いたメタボリックプロファイリングによるしょうゆ旨味成分の探索」, 『日本農芸化学会 2013』, 仙台, 3A11p12, 2013 年 3 月(口頭)
- 14) ○山本慎也, 志賀一樹, 小玉侑加子, 今村美穂, 内田理一郎, 小幡明雄, 馬場健史, 福崎英一郎 「しょうゆに含まれるジペプチドの俯瞰と呈味性との相関性解析」, 『第 8 回メタボロームシンポジウム』, 福岡, P45, 2013 年 10 月(ポスター)
- 15) ○山本慎也, 志賀一樹, 小玉侑加子, 今村美穂, 内田理一郎, 小幡明雄, 馬場健史, 福崎英一郎 「メタボロミクス技術によるしょうゆに含まれるジペプチドの俯瞰と呈味性との相関性解析」, 『第 5 回日本醸造学会若手シンポジウム』, 東京, P16, 2013 年 10 月(ポスター)
- ベストポスター賞(醸造イノベーション賞)受賞