

## 食品中の多成分同時検出技術の確立

仲島 日出男\* 成澤 朋之\*

### Simultaneous Measurement of Taste Ingredients in Food

NAKAJIMA Hideo\*, NARISAWA Tomoyuki\*

#### 抄録

食品中の味成分であるアミノ酸、有機酸および糖について、個別成分の定量分析に代わり、液体クロマトグラフ質量分析装置を活用した、前処理や分析操作を共通化した効率的な分析手法について検討した。さらに、決定した手法を原材料や製法の異なる市販味噌の味成分の差異解析に適用した。本研究で決定した手法により、市販味噌の味成分の違いの説明が可能であり、またそれらを「見える化」することができた。

キーワード：アミノ酸，糖，有機酸，液体クロマトグラフ質量分析装置，主成分分析

## 1 はじめに

食品の付加価値を高めるうえで、おいしさにつながる味成分の量やバランスを数値化し、客観的に評価することが求められている。食品中の味成分としては、うまみ成分であるアミノ酸や、甘み成分である糖、さらには有機酸などが挙げられる。これらの成分量を把握するためには、成分に応じた前処理や分析が必要であり、多大な手間と時間がかかっていた。

近年、質量分析装置の感度や分離能の向上に伴い、食品中の成分を網羅的に評価するフードオミクス解析が注目されている<sup>1)</sup>。フードオミクス解析では、成分の全体像を把握するため、成分の抽出操作を共通化したり、質量分析装置 (MS) を2台直列に接続した液体クロマトグラフタンデム型質量分析装置 (LC/MS/MS) を利用して多成分を同時に測定したりするなど、分析の効率化が図られている<sup>2)</sup>。この手法を用いて、アミノ酸などの食品成分について、分析を効率化する試みが行われているが<sup>3), 4)</sup>、LC/MS/MSは装置が高価であり、

製品開発現場への導入が極めて限られている。本研究では、より簡便な装置である液体クロマトグラフシングル四重極型質量分析装置 (LC/MS) を利用して、食品中のアミノ酸、有機酸および糖について、これらの味成分量のバランスを利用して、効率的に評価する手法について検討した。また、この手法を用いて、原料の異なる市販味噌の味成分比較を行うとともに、これらの成分の違いの「見える化」を試みた。

## 2 実験方法

### 2.1 LC/MS を使用した味成分分析

アジレント・テクノロジー製 1260 Infinity II HPLC および 6120 シングル四重極質量分析装置を使用して、味成分分析を実施した。測定対象とした成分および選択イオンモニタリング (SIM) モードによる成分検出に使用したイオンの  $m/z$  を表1に示した。各成分について、表1に示した測定対象成分のターゲットイオン面積について、標準試料のピーク面積との比較により、成分量を算出した。超純水、アセトニトリル、ギ酸溶液は、

\* 北部研究所 食品プロジェクト担当

表1 測定成分とSIMモニタリングイオン (m/z)

化合物名	m/z	化合物名	m/z
(a) アミノ酸 (ポジティブモード)		(b) 有機酸 (ネガティブモード)	
グリシン	76	乳酸	89
アラニン	90	フマル酸	115
GABA	104	コハク酸	117
セリン	106	リンゴ酸	133
プロリン	116	酒石酸	149
バリン	118	シキミ酸	173
トレオニン	120	クエン酸	191
イソロイシン	132	グルクロン酸	193
ロイシン	132	グルコン酸	195
アスパラギン	133		
アスパラギン酸	134	(c) 糖 (ネガティブモード)	
グルタミン	147	アラビノース	149
リシン	147	ラムノース	163
グルタミン酸	148	マンノース	179
メチオニン	150	フルクトース	179
ヒスチジン	156	ガラクトース	179
フェニルアラニン	166	グルコース	179
アルギニン	175	ソルビトール	180
チロシン	182	スクロース	341
トリプトファン	205	マルトース	341
シスチン	240	ラフィノース	503
		スタキオース	665

和光純薬製の LC/MS グレードの試薬を使用した。また、ギ酸アンモニウム水溶液は、和光純薬製の液体クロマトグラフ用のものを使用した。

## 2.2 味成分の抽出

市販の米味噌（淡色味噌、赤色味噌）、甘味噌（西京味噌）、豆味噌（八丁味噌）および麦味噌の合計5種類について、アミノ酸、有機酸および糖の分析を行い、これらの味成分量の比較を実施した。なお、味成分の抽出にあたっては、幅広い水溶性成分の抽出を行うことを目的として、超純水を使用した。

市販味噌試料 100mg に超純水 1ml を加え、試験管ミキサーを使用して 1 分間激しく攪拌後、65w で 1 分間超音波処理を行った。超音波処理溶液を 13,000 rpm で 20 分間遠心分離し、得られた上清に

ついて、分子量 3000 以上をカットする遠心式限外濾過フィルターユニットを使用して、4℃、14000×g で 30 分間遠心処理を行った。フィルター通過溶液を超純水で 1ml に定容し、試料抽出溶液とした。1 試料につき抽出操作を 2 回行い、それぞれを、以下のアミノ酸・有機酸分析および糖分析に供した。

## 2.3 アミノ酸および有機酸分析

得られた試料抽出溶液を超純水で段階的に希釈し、アミノ酸および有機酸分析用の試料溶液とした。分析条件を表 2 に示した。

## 2.4 糖分析

得られた試料抽出溶液について、超純水およびアセトニトリルを使用し、アセトニトリル濃度が 50% となるように段階的に希釈した。分析条件を

表2 アミノ酸および有機酸分析条件

カラム	Supelco Discovery HS-F5 (2.1×250mm, 5µm, Sigma-Aldrich 製)		
移動相	A: 0.1% ギ酸水溶液 B: アセトニトリル		
グラジエント条件	(min)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	3	100	0
	15	50	50
	17	5	95
	20	5	95
ポストタイム	15min		
注入量	5µL		
流速	0.3 mL / min		
カラム温度	40°C		
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 アミノ酸: ポジティブモード 有機酸: ネガティブモード		
乾燥ガス	N <sub>2</sub> 350°C, 10 L / min		
ネブライザーガス	N <sub>2</sub> 50psi		
キャピラリー電圧	2500 V		

表3 糖分析条件

カラム	Unison UK-Amino UKA35 (3.0×150mm, 3µm, Imtakt 製)		
移動相	A: 5mM ギ酸アンモニウム B: アセトニトリル		
グラジエント条件	(min)	A (%)	B (%)
	0	10	90
	10.5	10	90
	10.6	25	75
	20	25	75
	20.1	35	65
	30	35	65
ポストタイム	10min		
注入量	5µL		
流速	0.5mL / min		
カラム温度	60°C		
イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 ネガティブモード		
乾燥ガス	N <sub>2</sub> 350°C, 10 L / min		
ネブライザーガス	N <sub>2</sub> 50psi		
キャピラリー電圧	3000 V		

表3に示した。

## 2.5 統計解析

LC/MS 分析により得られたアミノ酸、有機酸、および糖の成分量について、「Statistical analysis tool for 64bit and Excel 2010」<sup>5)</sup>を用いて、統計解析を行った。

## 3 結果及び考察

### 3.1 市販みその味成分解析

市販味噌5種類について、LC/MSによりアミノ酸・有機酸分析および糖分析を行い、得られた成分値について主成分分析を実施した。結果を図1に示した。

図1(a)のスコアプロットは、各味噌の味成分量の類似性を示すものであり、成分含有量の傾向が近いものが近傍にプロットされる。今回の分析の結果では、原料の種類ごとに3つのクラスターに分かれていた。

図1(b)のローディングプロットでは、(a)のスコアプロットでの味噌の分類に影響を与えている

成分を示しており、両者の比較からそれぞれの味噌の味成分への寄与が大きい成分を解析することができる。

(a)のスコアプロットにおいて米味噌がプロットされていた第1主成分が正である領域には、グルコース、マルトース、スクロースなどの糖類がプロットされていた。一方、第1主成分が負の豆味噌の領域には、アミノ酸のほとんどがプロットされていた。豆味噌は、米を使用せずに大豆と塩を主原料として製造されるため、大豆タンパク質の酵素分解により生成するアミノ酸量が多い。一方、米味噌では、原料として使用している米のデンプンが、米麹中の酵素により分解され、マルトースやグルコースなどの糖類が多く生成する。これらのことから、第1主成分は原料や製造法に起因した味成分の差異、すなわち糖とアミノ酸の寄与の差異を反映していると考察された。また、第1主成分の寄与率は61.0%であり、市販味噌の味成分の差異において、この糖とアミノ酸の寄与が大きいことも示された。

麦味噌はスコアプロット上部の第2主成分軸付

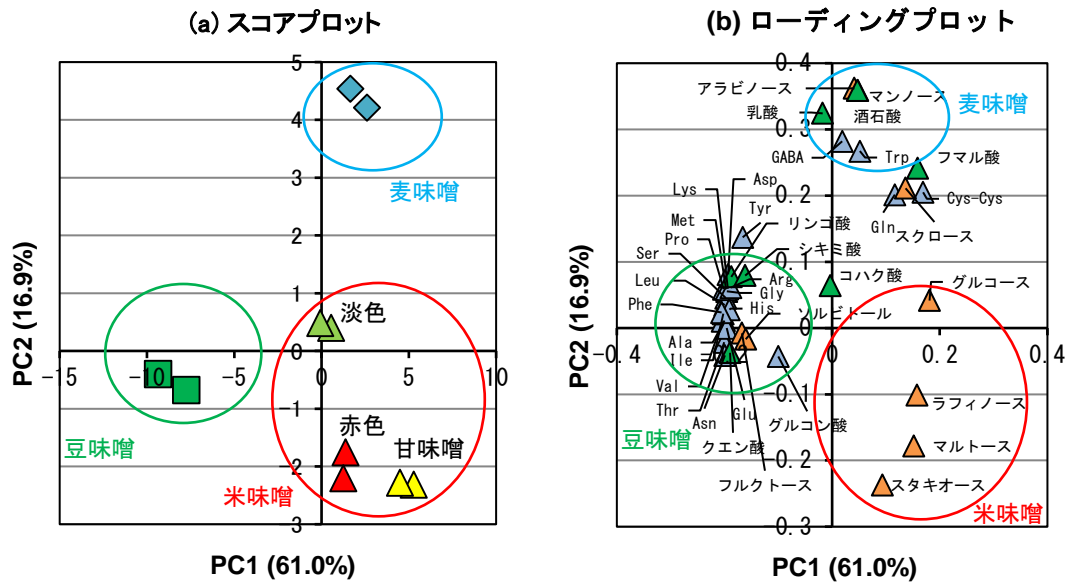


図1 市販みその味成分の主成分分析結果

軸の( )内は、それぞれの主成分の寄与率を示す。

近に位置していた。第2主成分方向では上部から麦味噌、豆味噌、米味噌の領域となっていた。ローディングプロットの麦味噌の領域には乳酸、酒石酸などの有機酸が、豆みその領域にはクエン酸、リンゴ酸、シキミ酸が位置していたが、米味噌については対応する領域の有機酸が少なく、米味噌の味成分への有機酸の寄与が小さいことを示していた。このように、第2主成分は、含まれる有機酸の種類を反映していると解釈できた。

このように、LC/MS 分析による味成分の網羅的な解析と統計解析を組み合わせることで、原料の異なる市販味噌の風味に影響を与えている味成分の差異の解析が可能であり、またスコアプロットおよびローディングプロットを活用したそれらの差異の「見える化」が可能であることがわかった。

### 3.2 糖含量の比較

米味噌中の遊離糖としては、グルコースがその主体をなしており、このほか醸造中に生成するマルトースや大豆由来のフルクトースなどが主な成分である<sup>9)</sup>。本研究で評価を行った味噌について、これらの糖の含量を図2に示した。

米味噌のグルコース含量は赤色味噌で6.9%、淡色みそで12.7%と、既報<sup>9)</sup>と同程度の値であった。

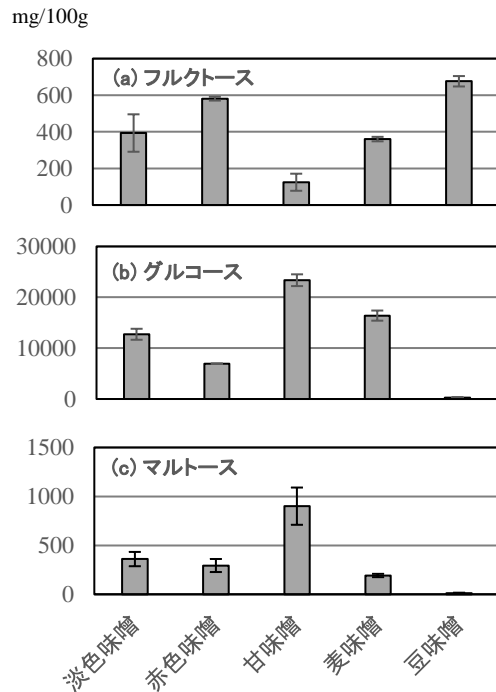


図2 糖含量の比較 (mg/100g)

また、グルコース含量は、フルクトースおよびマルトース含量の10倍以上の値となっており、今回の分析法は、味噌中の糖含量のバランスを反映していた。

糖含量は甘味噌で最も多く、豆みそで最も少な

かった。今回購入した甘味噌では、原材料に水飴を使用しており、この水飴添加により、グルコース含量やマルトース含量が高くなっていると考えられた。また、豆みそでは豆麴を使用するため、米味噌と比較して、大豆由来のフルクトースを除いた糖において、それらの含量が少なくなっていると考えられた。

このように、今回の分析法で得られた糖含量は、原料の違いを反映していた。

#### 4 まとめ

美味しさの向上した付加価値の高い製品開発を行ううえで必要となる味成分の量やバランスを効率的に評価するため、個別成分ごとの定量分析に代わる効率的な分析手法について検討した。液体クロマトグラフ質量分析装置を使用することにより、成分抽出や前処理の工程を簡略化することができ、分析時間や手間の効率化が可能であった。

決定した手法を用いて、市販味噌の味成分の差異解析を実施した。米味噌では糖の寄与が大きく、豆味噌では豆麴由来のアミノ酸の寄与が大きいことが確認された。麦味噌では、糖のほかに乳酸も寄与していると考えられた。また、試験に供した味噌の糖含量の比較から、本研究における糖含量は、原料の違いを反映していることが確認された。

本研究で決定した分析方法は、食品中の味成分等の効率的な評価が可能である。高付加価値食品製品開発現場において、原材料や製造条件の違いが味成分量やバランスにどのような影響を与えるかなど、食品製品開発現場における開発ツールとして活用可能であると考えられる。

#### 参考文献

- 1) 福崎英一郎:メタボロミクス (代謝物総体解析) の食品工学への応用, 生物工学, **85**, 11(2007) 488
- 2) 吉田欣史, 久原とみ子, 菊池淳:メタボロミクスとメタボノミクス, ぶんせき, **7**(2009) 371
- 3) 瀬戸山央, 橋本知子: LC/MS/MS を用いた食品

成分分析について, 神奈川県産業技術総合研究所研究報告, **23** (2017)48

- 4) 梅林志浩: LC/MS/MS による食品成分の一斉測定と差異分析, 鳥取県産業技術センター研究報告, **17** (2014) 37
- 5) Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O. and Arita, M.: MSDIAL: data independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis, Nature Methods, **12**, 6 (2015) 523,  
[http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/StatisticalAnalysisOnMicrosoftExcel/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/StatisticalAnalysisOnMicrosoftExcel/index.html), 2018.3.20
- 6) 本藤智: 味噌製造における糖類について (その1), 醸協, **84**, 7(1989) 453