かつおだしの嗜好性に寄与する
香気成分の研究

斉藤　司

2015

目次

略語集 1

諸言 2

第一章
　かつおだしの嗜好性に寄与する香気の抽出検討 12

第二章
　かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の重要香気成分 30

第三章
　新規香気成分 TDD の効果検証 46

第四章
　香気成分がかつおだしのおいしさに与える影響 58

要約 77

謝辞 80

略語集

GC-O	Gas chromatography-olfactometry
AEDA	Aroma extract dilution analysis
CPP	Conditioned place preference
NIRS	Near-infrared right spectroscopy
TDD	(4*Z*,7*Z*)-Trideca-4,7-dienal
BD	Bonito broth flavored dextrin
AD	Mixed amino acids-nucleotides dextrin solution
IMP	Inosine 5'-monophosphate
GMP	Guanosine 5'-monophosphate
DT	Dashi taste solution
sCO_2	Supercritical carbon dioxide extraction
KI	Kovats Index
RT	Retention time
IS	Internal standard
FD	Flavor dilution
Ch	Channel
ANOVA	Analysis of variance

諸言

＜食品の香りについて＞

食品を食べた時、またスープやワインを口に含み飲み込んだ時に、喉もとから鼻に抜けて立ち上がって来る香りに心地よさを感じた時、我々はその飲食品をおいしいと体感する。食品は炭水化物、脂質、タンパク質等によって大部分が構成されており、香気成分は微量含まれるに過ぎないが、例えば鼻をつまんで飲食した時に味が何もわからなくなり、おいしさが半減するように、食品における香りはその存在量に比して極めて重要な構成要素である（表 1)。

香気成分は数十万種類あると言われ、それらは比較的簡単な化学構造であり分子量が約 300 以下の揮発性の化合物である。食品の香りは単一ではなく、様々な香気成分が、ある特定の割合で構成されており、例えばコーヒーでは約 800 種類、白ワインでは約 700 種類、紅茶では約 600 種類の香気成分の存在が報告されている[1]。

一方、これらの香気成分は、鼻腔内の嗅細胞中にある、約 400 種類の嗅覚受容体によって検出され香りの識別が行われる。各香気成分は特有の組み合わせの複数の嗅覚受容体で検出されることで、その組み合わせが無数となり、数十万種類あるとされる香気成分もそれぞれが識別可能とされている[2]。つまり、甘味、うま味、酸味、苦味、塩味の基本五味とされる限られた味覚情報に対し、嗅覚から入る情報量は極めて多く、これら香気成分は食品そのものが何であるかを知らしめ、また、しいてはその食品の価値を決めている大きな要因と言える。

＜食品の香りと重要香気成分＞

食品の香気成分の存在量は極めて微量であるが、近年の分析・同定技術は年々進歩しており、多成分であってもまた微量成分であっても香りを構成する香気成分の同定が可能となってきている。一方、食品の持つ香り特性を表現する上では、必ずしも同定した香気成分の種類、数が重要ということではない。数百ある香気成分の中から、その食品を特徴づけている香気成分は何かということが重要である。香気成分はそれぞれに香りの強さ（閾値[3]）があり、閾値の低い成分は微量の存在量であってもその食品全体の香気特性に与える寄与度は大きく、また反対に閾値の高い成分は含有量が多くても寄与度は低くなる。このように、食品の香りというのは、それぞれ閾値の異なる成分がそれぞれの濃度で混じり合った集合体であり、それをひとつの香りとして表現している。その混じり合った香り全体の中でも、全体をリードしているもの、あるいはまとめているもの、そして特徴づけているものがどの

ような香気成分であるのかということが重要である。例えば、グレープフルーツの揮発性成分においては、limonene が精油中の主成分であり約 90%を占めてはいるが[4]、香りへの貢献度は低く、むしろグレープフルーツの香りを特徴づけているのは、精油中に 0.02 ～ 0.74 % 含まれる nootkatone[5] や極微量含まれる thioterpineol[6]などによるところが大きい。このように食品の香り特徴を決定づけている香気成分のことを、その食品における香りのキー成分または重要香気成分と呼ぶ。これら重要香気成分は一般に、食品の香気成分中、非常に微量の存在である場合が多いが、これらを発見することは食品の香りを研究する上では重要な課題である。

＜GC-O による官能分析＞

食品の香気特性を特徴づけている重要香気成分の発見が求められるが、この発見には GC-O（GC- Olfactometry/官能（匂い嗅ぎ）分析）が最も有効な手段である。GC-O とは、GC カラムで分離された各ピークの香りを直接鼻で嗅ぎ、数百検出される香気成分の中から重要な香気成分、あるいは不必要な成分を見つけ出す、人間の鼻による匂い嗅ぎ分析手法である。その匂い嗅ぎによる重要香気成分を絞り込む方法として Aroma Extract Dilution Analysis（AEDA）法[7]が知られている。これは希釈法で、香気濃縮物を段階的に希釈していき、それぞれのサンプルについて匂い嗅ぎを行い、香りが感じなくなるまで希釈を繰り返し行うことで、最終的に香気貢献度の高い成分を絞り込んでいく官能的分析手法である。分析技術者とフレーバーリスト（食品香料を調香する香り専門家）の共同作業によってなされるが、特に、香りのエキスパートであるフレーバーリストによる官能的判断が大きく貢献し、今まで見出されていなかった重要香気成分の発見に繋がっている。近年では高知県産ゆず果皮から見つかった(*6Z,8E*)-undeca-6,8,10-trien-3-one（yuzunone®）[8]、また静岡県産わさびから見つかった *cis*-3-methyl-4-decanolide[9]などが報告されている。

＜かつお節について＞

かつお節は日本の伝統的な調味料である。かつお節からとったかつおだしは日本料理に幅広く使われ、日本料理の根幹とも言われている。「和食」がユネスコの無形文化遺産に登録され、今や世界中から健康食として注目を集める日本食であるが、あっさりした中に満足感を与えている大きな理由は、このかつおだしの風味にある

のではないだろうか。かつお節を熱水抽出したかつおだしは、かつお節の持つうま味、酸味、甘味といった味成分とその独特で複雑な香気成分が一体となって奥深い味わいを出しているが、我々はうま味はもとより、むしろこのかつお節の香りを通じて、だしのおいしさ、和食の基本を長い食経験の中で体感している。

我々日本人は古代からかつおを食しており、「古事記」にはかつおを干した「堅魚（かたうお)」、また奈良時代の「大宝律令賦役令」にはその煮汁である「堅魚煎汁（かたうおいろり)」が記述されている。堅魚煎汁とはかつおの煮熟液を煮詰めたものと推定され、遠い昔からかつおを調味料、だしとして使われていた歴史が伺える。現在のかつお節に近いものが出来上がったのは燻乾技術やカビ付け工程が出来た江戸時代中期以降と言われている[10-13]。かつお節は生切りに始まり、煮熟（1～2 時間)、焙乾（20～30 日)、カビ付け及び天日干し（60～70 日）と長い時間と工程をかけて作られる。煮る、燻す、発酵という独創的な製法で作られるかつお節は、その工程により独特で複雑な香りが生成している。

かつお節の香気成分についてはこれまで多くの研究報告がなされており、その数は 400 成分以上とも言われている[14-16]。矢島らは枕崎産のかつお節からとっただし汁を詳細に分析し計 252 成分を同定または推定している[17, 18]。魚体そのものから由来する香り、煮熟によるメイラード反応により生成する香り、焙乾により付与されるくん煙臭、またカビ付けによる発酵過程で熟成変化する香り[19]と、かつお節の香りは多くの香気成分が複雑に絡み合って構成しており、まだまだ香気的に重要な未知の成分が存在していると考えられる[20]。

＜かつおだしのおいしさ＞

伏木は、食品のおいしさは、その食品そのものにあるのではなく、食品に対する人それぞれの嗜好がすなわちその食品のおいしさであると述べている。その嗜好性をもたらすものとして、①生理的欲求に叶うもの、②食文化の経験から由来するもの、③情報によるおいしさ、④やみつきになる報酬の快感が及ぼすおいしさ、の 4 要因として分類している。この中で、特に④のやみつきになるものは、脳の報酬系を刺激し、快感をもたらすものであり、ほぼ万人に受け入れられるおいしさとして捉えられている[21]。

伏木らは、食品に対する強化効果を、マウスによる条件付け位置嗜好試験（Conditioned Place Preference test = CPP 法）にて検証している。CPP 法は元々、薬物の快感などに対する執着の強さを測定する方法で、明暗 2 つの箱を用意し、対象とするサンプルと場所を事前にマウスに覚えさせ（条件付け)、実験最終日にそ

のサンプルを取り除き、そのサンプルがあった場所にどれだけ長く滞在したかを測定するものである。おいしいという快感が高じて、もっと食べたいというやみつき（＝執着）になるかどうかを測る方法である。おいしいものには、油脂、砂糖（甘さ)、だしのうま味が組み合わされているという仮説のもとにおこなった実験から、油脂（コーン油)、砂糖には非常に高い強化効果があることが確認されている[22]。

この CPP 法を用いて、かつおだしを測定した結果、かつおだし単独では油脂よりは低いが、これにデキストリン（＝エネルギー）を加えると油脂に匹敵するほど強い執着がみられるという興味深い結果が得られた[23]。また、かつおだしの呈味分析をもとに再構成した香りのない人工だし味溶液（デキストリン入り）だけでは強化効果はみられず、また、嗅覚を遮断したマウスを用いた実験では、かつおだし（デキストリン入り）への執着が認められなかった[24-26]。このことから、かつおだしへの嗜好性は、だしの持つアミノ酸や核酸などうま味成分やエネルギー以外に「かつお節の香り」が重要な役割を果たしていることが示唆された。

＜香りと味の相互作用＞

梅干しの香りを嗅ぐと酸っぱい味を連想したり、またしょう油の香りが塩味を増強させたり、味と香りは密接な結びつきがあると我々は体感している。味と香りが強い結びつきがあると体感できるのは、口中で味と香りを同時に感じているためと推測される。我々ヒトは構造的に香りを感じ取る経路が 2 通り存在しており、一つは鼻から香りを吸い込んで感じる取る直接的な経路、一つは、飲食している際、口の中から喉の奥を通って鼻に通じて感じ取る経路の 2 通りがある。専門的用語で、前者はオルトネイザル経路、後者はレトロネイザル経路として区別されている。喉で気管と食道が交差していることで、口中での香りが味とともに同時に感じ取るため、味と香りが密接な結びつきになっていることを長い食経験を通して感じている。

黒林らは微量の香気成分が味覚刺激を変えることを示唆する報告をしている[27]。スープや煮込み料理にセロリを用いると「おいしさ」が向上するという感覚的な現象を、チキンブロスを用いた官能評価で検証した結果、セロリの重要香気成分であるフタライド類が、セロリと感じられない程度の濃度で、チキンブロスの好ましい風味である「こく」を増強し、味であるうま味、甘味も強化していることを見出している。このことは、香りが嗅覚だけでなく、味も含めた他の感覚と相互作用し、食品の風味全体に大きく影響を及ぼしうることを示唆している。

一方、近年の脳科学の発展に伴って、嗅覚情報や味覚情報などの感覚情報は、脳の様々な領域を経由して伝達され、最終的にそれらが統合しておいしい、おいしく

ないなどを判断していると考えられている。

筆者らは、脳活動を非侵襲的に計測できる光イメージング装置（NIRS）を用いて、食べ物を食べた時の脳表面の活動を計測する研究を行っている。この装置は、血液の中の色素であるヘモグロビンに吸収される性質を持つ近赤外光を頭表から脳に向けて照射し、脳の表面を通って戻ってきた光の強さを計測するという原理で、計測値から光が通ってきた脳の表面の血液量の変化を知ることが出来る。血液量が増加したということは、その脳の領域が活動したことを意味していると考えられることから、血液量の変化は脳の活動の程度を示していると考えられる。

最近になり、NIRS では味覚刺激に伴い、耳下腺からの唾液分泌に付随した頭蓋骨外の血流変化が計測されることが報告され、こめかみ部で計測される応答には、唾液腺活動が大きく反映されることが示されている[28]。この原理に基づき、味と香りの相互作用に基づく唾液腺血流変化が計測されており、綿あめ様の甘い香りを有し、砂糖水への添加により官能的な甘味の増強効果をもつ ethylmaltol の香りが砂糖に対する応答を増強することが計測されている[29]。このように香りが味を強く感じさせる現象や甘い香りが砂糖に対する摂食モチベーションを増強させる現象が NIRS により捉えられている。本研究では、この NIRS の特徴を生かし、NIRS を用いた唾液腺活動計測により、かつお節の香りがかつおだしの味に与える効果を評価した。

＜本研究の目的と意義＞

以上の背景から、マウスによる動物実験、分析・合成および調香の科学的手段、官能評価と生理応答測定の連携により、新規重要香気成分の解明及びその香料素材としての有用性の確認し、その香気成分がかつおだしのおいしさに与える影響を明らかにすることを目的に本研究を行った。

本論文は四章より成り立っている。

第一章では各種節類からの抽出検討及び動物実験について述べる。種々抽出物をマウスによる実験を試みたが、その中で、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物にマウスの嗜好性及び強化効果を引き出す成分が含まれていることを示唆する結果を得た[26]。

第二章ではかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香気分析、GC-O 及び新規香気成分の同定について述べる。この抽出物から新規重要香気成分として、(4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal（以下 TDD）を見出した[30]。

第三章では新規重要香気成分 TDD の添加効果の検証等、官能評価について述べ

る。和食の専門家である京都老舗料亭料理人により、TDD の添加はかつおだしをより好ましくすると評価された[30]。また TDD を食酢飲料に添加することを検討し、酢かどが取れることを見出した。

第四章では TDD の添加効果について、唾液腺活動に伴う血流変化を近赤外分光法（NIRS）によって計測した結果について述べる。TDD を加えたものが、摂食モチベーションを増強し、かつおだしの嗜好性に大きく寄与することが示唆された。

表 1 食品の一般的な構成成分[31]

成分	割合
水分	95%以上
炭水化物	1～80%
脂質	1～40%
タンパク質	1～25%
無機質	1～5%
ビタミン類	ppm
香気成分	ppb～ppm

参考文献

1. Nijssen, L. M., Ingen-Visscher, C. A. van, Donders, J. J. H. (Eds.) VCF Volatile Compound in Food：database Version 15.2-Zeist (TheNetherlands)：TNO Triskelion, 1963-2014.
2. 東原和成 香りで感じる食べ物の美味しさ－嗅覚のメカニズム. *FFI ジャーナル* **212**: 919-926, 2007.
3. 川崎通昭，堀内哲嗣郎 嗅覚とにおい物質，社団法人臭気対策研究会，8-10, 1998.
4. Dugo, G., Controneo, A., Verzera, A., Bonaccorsi, I. Composition of the volatile fraction of cold-pressed citrus peel oils, in Citrus: The Genus Citrus, G.Dugo and A. Di Giacomo (Eds.), New York: Taylor & Francis, 217-228, 2002.
5. MacLeod, W. D., Buigues, N. M. Sesquiterpenes, I. Nootkatone, a new grapefruit flavor constituent. *J Food Sci* **29**: 565-568, 1964.
6. Demole, E., Enggist, P. 1-*p*-Menthene-8-thiol: A powerful flavor impact constituent of grapefruit juice (Citrus parodisi MACFAYDEN). *Helvetica Chimica Acta* **65**: 1785–1794, 1982.
7. Grosch, W. Determination of potent oclourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragr J* **9**: 147-158, 1994.
8. Miyazawa, N., Tomita, N., Kurobayashi, Y., Nakanishi, A., Ohkubo, Y., Maeda, T., Fujita, A. Novel character impact compounds in Yuzu (Citrus junos Sieb.ex Tanaka) peel oil. *J Agric Food Chem* **57**: 1990-1996, 2009.
9. Nakanishi, A., Miyazawa, N., Haraguchi, K., Watanabe, H., Kurobayashi, Y., Nammoku, T. Determination of the absolute configuration of a novel odour-active lactone, *cis*-3-methyl-4-decanolide, in wasabi (*Wasabia japonica* Matsum.). *Flavour Fragr J* **29**: 220-227, 2014.
10. 山本高一 鰹節考. 筑摩書房，12-31，1987.
11. 宮下章 鰹節(かつおぶし). 法政大学出版局，138-233，2000.
12. 和田俊 かつお節－その伝統から EPA・DHA まで－. 幸書房，2-10，1999.
13. 熊倉功夫，伏木亨 だしとは何か. アイ・ケイコーポレーション，90-91，2012.
14. 榊原英公 水産物のにおい. 水産学シリーズ **74**（小泉千秋編）： 恒星社厚生閣，

72-82, 1989.
15. 榊原英公，林和夫 魚臭の分析．*油化学* **38**: 104-111, 1989.
16. 川口宏和 かつおだしのおいしさ解析と商品開発への応用～香りの解析からのアプローチを中心に～．*日本味と匂学会誌* **12**: 123-130, 2005.
17. Yajima, I., Nakamura, M., Sakakibara, M., Yanai, T., Hayashi, K. Volatile flavor components of dried bonito (Katsuobushi) I. On basic, acidic and weak acidic fractions. *Agric Biol Chem* **45**: 2761-2768, 1981.
18. Yajima, I., Nakamura, M., Sakakibara, H., Ide, J, Yanai, T., Hayashi, K. Volatile flavor components of dried bonito (Katsuobushi) II. From neutral fraction. *Agric Biol Chem* **47**: 1755-1760, 1983.
19. Doi, M., Ninomiya, M., Matsui, M., Shuto, Y., Kinoshitam, Y. Degradation and o-methylation of phenols among volatile flavor components of dried bonito (katsuobushi) by *Aspergillus* species. *Agric Biol Chem* **53**: 1051-1055, 1989.
20. 榊原英公，林和夫 魚臭の分析．*油化学* **38**: 848-855, 1989.
21. 伏木亨 味覚と嗜好のサイエンス．丸善出版，26-62, 2008.
22. 伏木亨，川崎寛也，鈴木綾子 おいしさと“こく”、だし、脂肪への嗜好性．*日本味と匂学会誌* **9**: 163-168, 2002.
23. 川崎寛也，山田章津子，布施領太，石原和可子，伏木亨 「鰹だし」への嗜好性と執着における味覚神経の関与．*日本味と匂学会誌* **10**: 781-784, 2003.
24. Kawasaki, H., Yamada, A., Fuse, R., Fushiki, T. Preference for dried bonito broth in olfactory-blocked or taste nerve-sectioned mice in the two-bottle choice test. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 2840-2846, 2008.
25. 山崎英恵，大関明日香，伏木亨 香りがもたらす鰹ダシのうま味．*Aroma Research* **12**: 222-225, 2011.
26. Amitsuka, T., Okamura, M., Shiibashi, H., Yamamoto, N., Saito, T., Nammoku, T., Tsuzuki, S., Inoue, K., Fushiki, T. A study of an aroma extraction method and evaluation of the aroma extract contribution to the palatability and reinforcement effect of dried bonito using mice. *J Nutr Sci Vitaminol* **60**: 329-334, 2014.
27. Kurobayashi, Y., Katsumi, Y., Fujita, A., Morimitsu, Y., Kubota, K. Flavor enhancement of chicken broth from boiled celery constituents. *J Agric Food Chem* **56**: 512-516, 2008.

28. Sato, H., Obata, A. N., Moda, I., Ozaki, K., Yasuhara, T., Yamamoto, Y., Kiguchi, M., Maki, A., Kubota, K., Koizumi, H. Application of near-infrared spectroscopy to measurement of hemodynamic signals accompanying stimulated saliva secretion. *J Biomed Opt* **16**: 047002, 2011.
29. Iizumi-Saito, K., Nakamura, A., Matsumoto, T., Yamamoto, N., Saito, T., Nammoku, T., Mori, K. Ethylmaltol odor enhances salivary hemodynamic responses to sucrose taste as detected by near-infrared spectroscopy. *Chemosens Percept* **6**: 92-100, 2013.
30. 斉藤司，椎橋裕子，明賀博樹，原口賢治，増田唯，黒林淑子，南木昂，山崎英恵，中村元計，伏木亨 かつお節の香気に寄与する重要香気成分．*日本食品科学工学会誌* **61**: 519-527，2014.
31. 長谷川香料編，においの化学，裳華房，1988.

第一章

かつおだしの嗜好性に寄与する香気の抽出検討

序

人は砂糖や油脂に対して強い嗜好性があり、それらをふんだんに使用した料理やお菓子はおいしいと感じる。砂糖や油脂に高い嗜好性を示すのは、マウスやラットなどのげっ歯類でも同様である。砂糖や油脂を 2 瓶選択試験に供すると高い嗜好性を示すだけではなく、強化効果の存在も報告されている[1, 2]。与えたサンプルの強化効果を測定するのには conditioned place preference test（CPP 法）が広く用いられている[3]。

人がおいしいと思うのは砂糖や油脂だけではない。動植物から抽出したうま味などの呈味成分や独特の香りを含むだしも、料理をおいしくするのには欠かせない。特にかつお節から得られるかつおだしは日本料理において最も基本要素であり、欠かすことができないものである。日本料理は砂糖や油を多量に使用しないにも関わらず、かつおだし独特の味と香りをうまく生かすことで、食べる者に満足感を与え続けてきた。よって、低カロリーにもかかわらず満足感を与える日本料理の価値を再認識することは大切なことである。

かつお節はかつお（Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*）から製造され、生のかつおを切り分け、煮熟、薪の火と煙で燻し乾燥させる焙乾、成型、カビ付け、天日干しという工程を経る。そのうち、焙乾を終えたものを荒節という。荒節表面には焙乾時にタール分などが付着しており、荒節を成型する際に表面を削るが、その削ったときに生じる粉を G 粉という。成型後の荒節にカビ付けと天日干しを繰り返したものを枯れ節と呼び、両者ともかつお節として広く流通している。荒節や枯れ節を削り、熱水で抽出したものがかつおだしと言われ、日本料理には欠かせない。かつお以外にもきはだまぐろ（Yellowfin tuna, *Thunnus Albacares*）やごまさば

（Spotted mackerel, *Scomber australasicus*）、宗田がつお（Bullet tuna, *Auxis rochei*）、かたくちいわし（Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*）など様々な魚を加工し、だしの原料として使用する。

川崎らおよび Ackroff らはマウスを使った 2 瓶選択試験において、かつおだしに嗜好性があることを明らかにしている[4, 5]。さらに川崎らは CPP 法により、デキストリン溶液には有意な強化効果が見られなかったものの、天然かつおだしを加えたデキストリン溶液（BD）で有意な強化効果が現れることを報告している[6]。また、天然かつおだしの呈味成分を分析し再現した NaCl・IMP・GMP・アミノ酸からなるだし味溶液を調製し、これにデキストリンを加えただし味＋デキストリン溶液（AD）だけでは有意な強化効果を確認できなかったが、AD にかつお節フレーバーを加えることで有意な強化効果を確認した。さらに嗅覚遮断したマウスでは BD への有意な強化効果が見られないことから、嗅覚が BD への強化効果に重要であると示唆している[6]。AD に citral、vaillin、menthol を加えても強化効果は現れないため、単純に香りがすることによる効果ではない[6]。以上のことから、かつおだしに含まれる香気の質が大事であると考えられるが、どのような香気に嗜好性があるのかは研究が進んでいない。

よって本研究では、どのような香りに嗜好性や強化効果があるのか絞り込むため、2 瓶選択試験および CPP 法を用いて、かつお節香気抽出方法の検討を行った。またかつお以外のだし原料の嗜好性についても動物行動学実験を用いて調査した。

実験材料と方法

実験動物

8 週齢の BALB/cCr 雄性マウスを日本 SLC 株式会社より購入し、それぞれの実験で使用した。マウスは気温 23 ± 2°C、12 時間サイクルで明暗が切り替わる飼育室でケージに個飼いした（明期 6:00-18:00）。水と餌（MF、オリエンタルイースト株式会社）は特に指示されていない限り、自由摂取とさせた。全ての実験は京都大学

動物実験委員会の倫理規定に則り、許可を得て行った。

だしサンプル

粉末化した天然かつおだしはシマヤ株式会社より提供を受けた。荒節・まぐろ節・煮干しは株式会社マルハチ村松、枯れ節は新東亜交易株式会社、G 粉（荒節を整形するため、表面のタール層をグラインドした際に発生する粉末）は日成共益株式会社よりそれぞれ購入した。

だし味溶液調製

だし味溶液（DT）は天然かつおだしの分析データに従って調製した[4]。内容成分及び濃度は表 1 にまとめた。アミノ酸、核酸及び塩化ナトリウムを表 1 の濃度になるよう脱イオン水で溶解して使用した。この濃度は粉末天然かつおだしを 1%に希釈した際の濃度と同等である。Inosine 5'-monophosphate（IMP）は株式会社エムピーバイオジャパン、guanosine 5'-monophosphate（GMP）、メチオニンは和光純薬工業株式会社、その他はナカライテスク株式会社から購入した。

香気抽出方法

水蒸気蒸留法

粉砕した荒節をフラスコに入れ、常圧下でウォーターバスを用いて水蒸気蒸留を行った。留出液を NaCl で飽和させ、香気成分を分離するために合成吸着剤（DIAION™ HP20、三菱化学）を充填したカラムに注いだ。合成吸着剤を水洗後、95%エタノールで香気成分を脱着した。荒節水蒸気蒸留物の収率は 5.0%であった。

含水エタノール抽出法

95%エタノールと水より約 75%エタノールを調製した。粉砕した荒節をフラスコ中でこの含水エタノールで抽出した（80±2℃、2 時間）。抽出後、抽出液を濾過し、濾液を使用した荒節の 80%重量になるまで減圧蒸留した。含水エタノール抽出物の収率は 65%であった。

超臨界二酸化炭素抽出法

一連の抽出は超臨界二酸化炭素抽出装置（日本分光株式会社）を用いて行った。粉砕したサンプル（荒節、枯れ節、G 粉、まぐろ節、煮干し）を抽出カラムに充填した。抽出温度は 40℃、二酸化炭素の流量は 10 ml/min、圧力は 25 MPa で抽出を行い、それぞれの香気抽出物を得た。抽出物の収率はそれぞれ 1.3、1.0、6.0、1.2、2.0%であった。

2 瓶選択試験手法

2 瓶選択試験は暗期に実施した。マウスは個飼いし、実験の 40 分前から絶水・絶食させた。50 ml のプラスチック遠沈管にステンレスの飲み口を付けた容器に溶液を入れ、マウスに呈示した。トレーニングとして、マウスには水及び 0.89%食塩水を 30 分間、3 回呈示した。トレーニング終了後、だし味溶液及びだし味溶液に香りを添加したものをマウスに呈示し、摂取量を比較することでそれぞれの溶液への嗜好性をテストした。絶水・絶食条件と呈示時間はトレーニング時と同じである。Preference value（%）はテスト溶液の摂取量を 2 つの溶液のトータル摂取量で割り、100 を掛けることで%として計算した（100×テスト溶液の摂取量／2 瓶の摂取量合計）。

CPP 試験手法

用いた CPP 測定機器および測定方法は既報[6]に従った。テストは連続 10 日間、明期に行った。1 日目～3 日目は条件付けする場所、つまり明・暗箱に対して、条件付け前の嗜好性を 20 分間測定した。4 日目～9 日目は条件付けを行った。明箱または暗箱に、効果を測定したい溶液または水を 30 分間呈示した。明箱に効果を測定したい溶液を呈示した次の日は暗箱に水を呈示し、これを 3 回繰り返した。最終日の 10 日目は位置嗜好性を測定した。明箱・暗箱に何も呈示せず、マウスが両場所に対してどの位の時間とどまっているのかを測定した。3 日目と 10 日目の明箱での滞在時間を比較し、10 日目の滞在時間が統計学的に有意に延長していれば、呈示

したサンプルに強化効果があると判断した。

嗅神経切断手法

マウスを偽手術群（Sham）及び手術群（ONX）の 2 群に分けた。篩板を通り嗅球まで投射している嗅糸を文献の方法に従い切断した[6-8]。Sham 群には同様の外科的処置を施したが、嗅糸切断だけは行わなかった。両群とも手術前にポテトチップ（カルビー株式会社）を与え、その香りを記憶させた。手術後 3～5 日の回復期間を与え、マウスの嗅覚機能テストを行った。ケージに新たに敷いた床敷きの下にポテトチップの小片を埋めた。20 時間絶食させたマウスをそのケージに入れ、3 分以内に埋めたポテトチップが見つけ出せるかどうか試験を行った。Sham 群では 3 分以内に探し出せたものを嗅覚正常とみなし、その後の実験に用いた。ONX 群は 3 分以内に探し出せなかったものを嗅覚破壊マウスとみなし、その後の実験に用いた。

統計処理

すべての実験において、$p<0.05$ を有意水準とした。データは *t*-test により解析した。種々のだしサンプルから得られた香りを添加しただし味溶液に対する preference value は one-way ANOVA にて解析し、post-hoc テストとして tukey の多重比較検定を行った。統計処理は Prism ver.5 for Mac（GraphPad Software 社）を用いて行った。

実験結果

実験 1. かつお節の抽出方法の違いによる嗜好性

かつお荒節から実験項に記載の方法で、水蒸気蒸留法、含水エタノール抽出法、超臨界二酸化炭素（sCO_2）抽出法により抽出物を調製した。だし味溶液（DT）にこれらの抽出物を添加し、実験方法に則り、だし味溶液対各抽出物を添加しただし味溶液で 2 瓶選択試験に供した（図 1）。抽出物の添加量はそれぞれ 0.05%、0.30%、

0.05%である。各香気抽出物を水に添加し、香気評価訓練を十分に積んだフレーバーリストがその香気の強さを判断し、各試料を添加した際に香気の強さが出来るだけ近いものになるよう、添加率を決定した。その結果、超臨界二酸化炭素抽出物を与えた群で有意に嗜好性が見られた。

実験 2. かつお節の原料別および他のだし原料の違いによる嗜好性

荒節以外にだし原料別（かつお枯れ節、G 粉、まぐろ節、煮干し）から超臨界二酸化炭素抽出法で抽出物を調製し、だし味溶液に添加して 2 瓶選択嗜好性試験を行った（図 2)。抽出物の添加量は全て 0.05％である。

その結果、G 粉を除いた全ての香気抽出物（かつお荒節、かつお枯れ節、まぐろ節、煮干し）により、有意な摂取量の増大が見られた（図 2a)。その中でもかつお荒節の preference value は、枯れ節、G 粉、まぐろ節と比較して有意に高かった（図 2b)。かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物は他の原料由来の抽出物と比べて最大摂取量を示し、高い嗜好性があることがわかった。

実験 *3. 嗅覚遮断マウスによる荒節超臨界二酸化炭素抽出物の嗜好性*

嗅糸を切断し嗅覚遮断したマウスと偽手術を施したマウスを用いて、DT vs DT＋荒節超臨界二酸化炭素抽出物の 2 瓶選択試験を行った。超臨界二酸化炭素抽出物の添加濃度は 0.05％である。結果、偽手術群は有意に抽出物入りを好むものの、嗅覚遮断群は摂取量に差が無かった（図 3)。

実験 *4. 荒節超臨界二酸化炭素抽出物の CPP テスト*

マウスを 3 群に分け、AD、BD、AD＋荒節超臨界二酸化炭素抽出物で条件付けを行った。デキストリン濃度は 21.9％、天然かつおだし濃度は 1％、荒節超臨界二酸化炭素抽出物濃度は 0.05％である。ポジティブコントロールとして用いた天然かつおだしを使用した BD 群、及び荒節超臨界二酸化炭素抽出物を与えた群（AD+sCO_2）は、条件付けしたボックス内に滞在する時間が有意に延長した（図 4)。

考察

実験 1 では、かつおだしのどのような成分に嗜好性を有するのか、だしの原料となるかつお荒節から 3 通りの方法で抽出物を調製した。得られた抽出物をだし味溶液（DT）に添加し、DT 対抽出物を加えた DT で短時間の 2 瓶選択試験を行うことで最適な抽出方法の検討を行った。結果、超臨界二酸化炭素抽出で得られた抽出物を添加したサンプルに有意な嗜好性が見られた（図 1)。同じ原料を用いて抽出を行っても、抽出方法によって得られる成分および量は異なる[9-12]。水蒸気蒸留法は水と試料を加熱し、水蒸気とともに蒸留された揮発成分を冷却し、水から分離することで揮発性成分を得る方法である。原理が単純であるが、加熱による熱分解や加水分解などのダメージがある[13, 14]。また沸点が低い高揮発性成分および水に溶けやすい揮発成分が得られにくい難点がある。だしは原料を熱水抽出したものだが、だし表面から揮発する香りとだしに溶け込んだ香りの両方を評価している。しかし水蒸気蒸留では水に溶け込んだ揮発成分が得られにくいため、成分バランスを崩し、嗜好性につながらなかったことが考えられる。アセトンやヘキサンなどの有機溶媒や含水アルコールなどを用いた溶媒抽出法も良く用いられる方法である。溶媒を多く使用するため、抽出物を濃縮する際に溶媒を揮発させる必要がある。今回使用した含水エタノールはアセトンやヘキサンと比較してやや高沸点のため、溶媒を揮発させる際に高揮発性成分を失いやすかったと考えられる。超臨界二酸化炭素抽出法は、高圧下で超臨界状態となった二酸化炭素を抽出溶剤として用いる方法である。二酸化炭素高圧下のため不活性雰囲気下での抽出となり、酸素による酸化が抑えられる。二酸化炭素の臨界温度は 31℃[15]、本実験の抽出温度は 40℃であり、プロセス中でこれ以上の熱はかからない。圧力を抜くことで溶媒の二酸化炭素を分離でき、水や有機溶剤の沸点より抽出温度が低いため熱劣化が相対的に少ない方法である。これらの特徴から超臨界二酸化炭素抽出は原料の香気の再現性に優れた方法である[11, 13, 14, 16-18]。このことから、かつお節に含まれている成分にダメージを与えず抽出できたことで、超臨界二酸化炭素抽出物に有意な嗜好性があったと

考えられる。

だしをとる原料は荒節以外にも存在する。実験 2 では、かつお荒節の超臨界抽出物だけに嗜好性があるのか、あるいは他の原料にも嗜好性が存在するのか、他のだし原料を調査した。荒節をさらに加工した枯れ節および加工時に生じる G 粉、まぐろ節、煮干しから超臨界二酸化炭素抽出物を調製し、2 瓶選択試験にて嗜好性を調べた（図 2)。 G 粉以外のサンプルで有意な嗜好性が見られたが、なかでも荒節を与えた群の preference value は、枯れ節、G 粉、まぐろ節と比較して有意に高かった。かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物には、高い嗜好性があることがわかった。

また実験 3 では嗅糸切断による嗅覚遮断試験を行って、短期間の 2 瓶選択試験における嗅覚の関与を調べた。嗅覚遮断を施したマウス群は抽出物の入った溶液に有意な嗜好性を示さなかったものの、嗅糸切断をしていない偽手術群は有意に嗜好性を示した（図 3)。試験に用いたマウスは、ポテトチップを用いた嗅覚機能試験後数日の休憩期間を経て、2 瓶選択嗜好性試験に供した。よって嗅覚機能試験が 2 瓶選択試験に与える影響は無視できると考えられる。

実験 2 および 3 の結果より、30 分の短時間の 2 瓶選択試験における超臨界二酸化炭素抽出物の嗜好性には嗅覚が主に関与しており、抽出物の香気の違いが嗜好性に影響を与えていることが示唆される。

煮干しは新鮮なかたくちいわしを茹でた後に乾燥させて作られ燻す工程が無いが、かつお節は前述の通り燻す工程がある。西堀らはかつお節及び煮干しの香気分析を行い、煮干しからはフェノール系化合物が検出されず、燻す工程で付着するフェノール系化合物がかつお節の香気を特徴付ける要素の一つであることを報告している[19]。G 粉は燻したかつお表面のタール部分を削ったものであり、フェノール系化合物が多く含まれると考えられる。G 粉の抽出物に有意な嗜好性が無く、かつお節・まぐろ節・煮干しの抽出物に有意な嗜好性を示していることから、マウスはフェノール系化合物が主体の香りには有意な嗜好性を示さない可能性が示唆された。矢島らはかつお節の香気を液性別に分画して分析を行った。中性画分には多数の脂肪族アルデヒド類やケトン類が検出され、塩基性画分からは多数の alkyl pyrazine

類などが検出されている。かつお節および煮干しには多量のたんぱく質と数%程度の脂質が含まれる[20]。かつお、まぐろ、いわしから得られる油にはeicosapentaenoic acid（EPA）やdocosahexaenoic acid（DHA）などの多価不飽和脂肪酸が多く含まれており[21, 22]、酸化が速いことが報告されている[22]。不飽和脂肪酸からは酸化により脂肪族アルデヒド類やケトン類が生成し[23]、アミノ酸からはメイラード反応により alkyl pyrazine 類などが生成する[24]。矢島らはかつお節の加工工程において脂質やアミノ酸が酸化や熱分解、メイラード反応などを起こし、これらの香気が発生したと推察している。谷本らは煮干しの香気分析を行い、煮干し香気には propanal や butanal、hexanal など、炭素数 3 から 6 の短鎖脂肪族アルデヒドの関与が大きいことを示唆している[25]。これらのことから、今回見出された荒節、枯れ節、まぐろ節、煮干しの超臨界二酸化炭素抽出物に対する嗜好性には、加工工程中における脂質やアミノ酸の酸化や熱分解、メイラード反応により生成した香気成分が関与している可能性が考えられるが、今後さらなる検討が必要である。

実験 4 では CPP 法により、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物に対する強化効果を調べた。CPP 法においては、BALB/cCr 系統のマウスでも天然かつおだしにデキストリンを添加した BD に強化効果が確認できた（図 4)。かつおだしの呈味成分を再現した DT にデキストリンを加えた AD には強化効果が観察されないものの、AD に荒節超臨界二酸化炭素抽出物を加えることで強化効果が見られた。このことから強化効果の発現には AD に加えて荒節超臨界二酸化炭素抽出物香気の存在が必要であることが示唆される。これは AD に強化効果が認められず、BD に強化効果を認めた川崎らの報告と合致する[6]。よって今回得られた荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香気には、かつおだし同様の嗜好性および強化効果を引き出す成分が含まれていることが示唆される。だしの嗜好性を高める香気成分が把握できれば、さらに満足感や嗜好性のある和食の提供につながることも期待される。風味のバランスが嗜好性に与える影響、つまりだし味溶液の呈味成分濃度と超臨界二酸化炭素抽出物の香気成分濃度の比が嗜好性に与える影響は、今後の検討課題である。

以上の結果より、各種だし原料と最適な香気抽出法をマウスの 2 瓶選択嗜好性試験及び CPP 法にて検討した。かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出法には高い嗜好性があり、かつおだしと同様の強化効果を示すこと、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出により得た香気には、マウスの嗜好性及び強化効果を引き出す成分が含まれていることを示す結果を得た。

表 1 だし味溶液の内容成分と濃度

遊離アミノ酸		核酸	
濃度 (ppm)		濃度 (ppm)	
Asp	14.6	IMP	152
Glu	56.9	GMP	52
Ser	8.7		
Gly	11.1		
His	123.7	塩分	
Arg	28.2	濃度 (ppm)	
Thr	7.7	NaCl	350
Ala	18.3		
Pro	13.9		
Tyr	6.8		
Val	7.9		
Met	7.7		
Ile	3.1		
Leu	9.3		

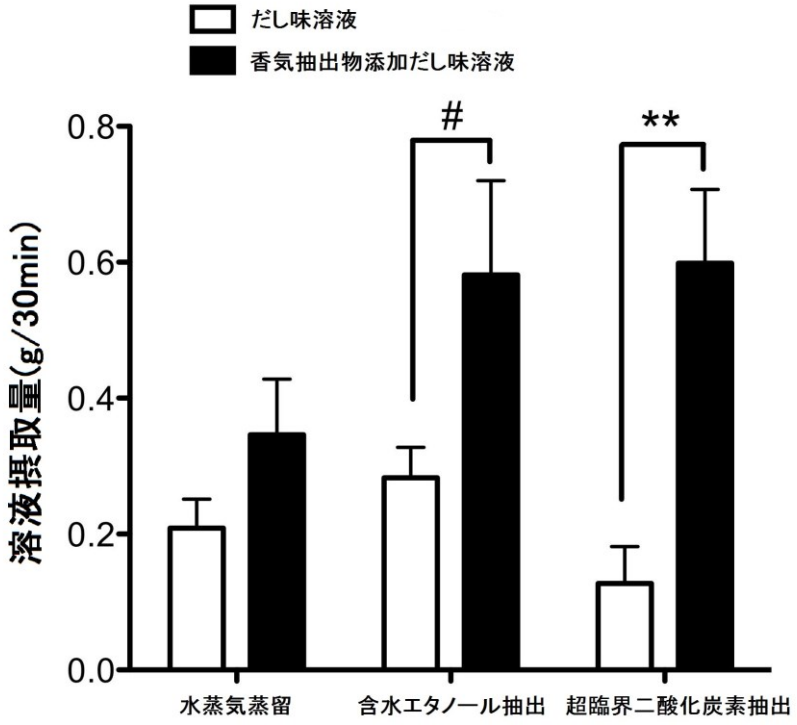


図 1　香気抽出法違いによるかつお荒節香気抽出物の嗜好性試験

だし味溶液と各香気抽出物を添加しただし味溶液の 2 瓶選択嗜好性試験結果。図中の値は溶液摂取量の平均値±SEM (n=7, 8)。#, $p<0.1$; **, $p<0.01$; paired t-test。

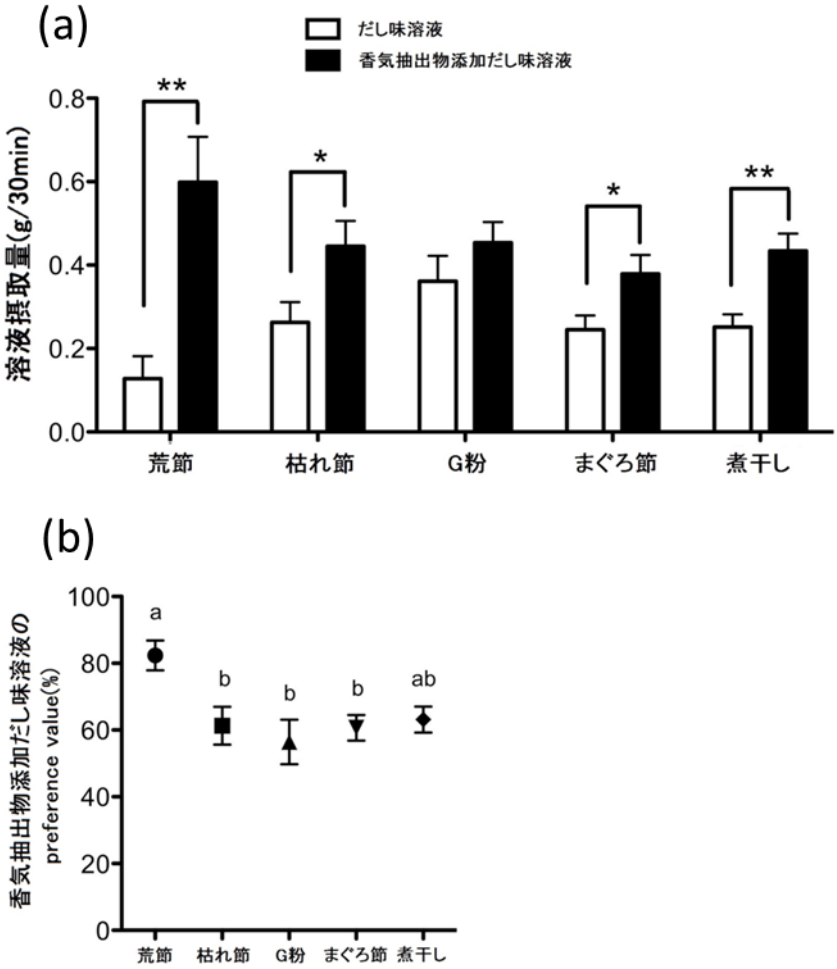


図 2 だし原料違いの超臨界二酸化炭素香気抽出物を添加した 2 瓶選択嗜好性試験

(a) だし味溶液と種々のだし原料から得られた超臨界二酸化炭素香気抽出物を添加しただし味溶液の 2 瓶選択試験結果。図中の値は溶液摂取量の平均値±SEM (n = 8)。*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; paired t-test。(b)各超臨界二酸化炭素抽出物を添加しただし味溶液の preference value(%)。記号の違いはそれぞれに対する有意差を示す($p<0.05$; one-way ANOVA followed by tukey's post-hoc test)。図中の値は溶液摂取量の平均値±SEM (n=8)。

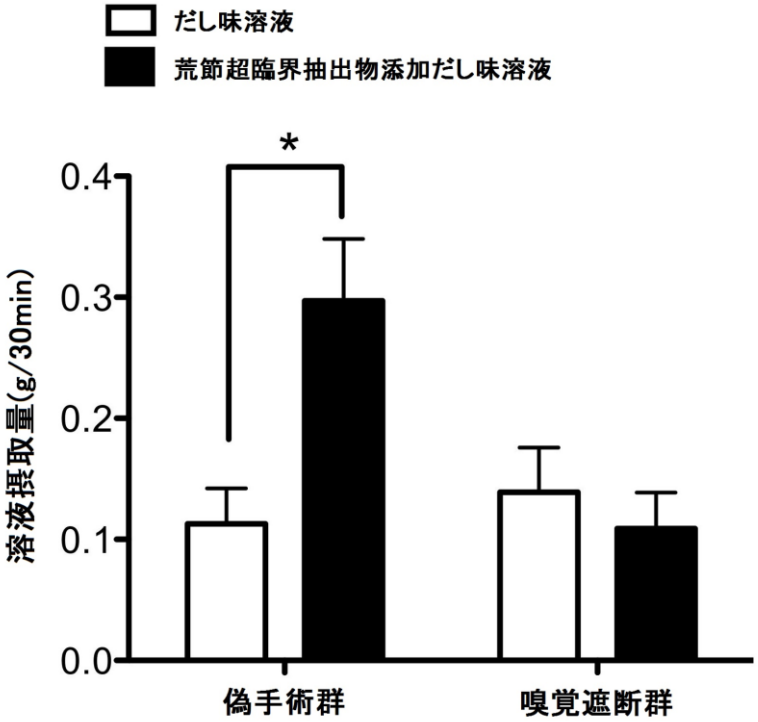


図 3 嗅覚遮断による荒節超臨界二酸化炭素抽出物添加だし味溶液への嗜好性試験

2 瓶選択試験による嗅覚遮断マウス(n = 9)および偽手術マウス(n = 7)を用いた荒節超臨界二酸化炭素抽出物添加だし味溶液の嗜好性試験。図中の値は溶液摂取量の平均値±SEM。*, $p<0.05$; paired *t*-test。

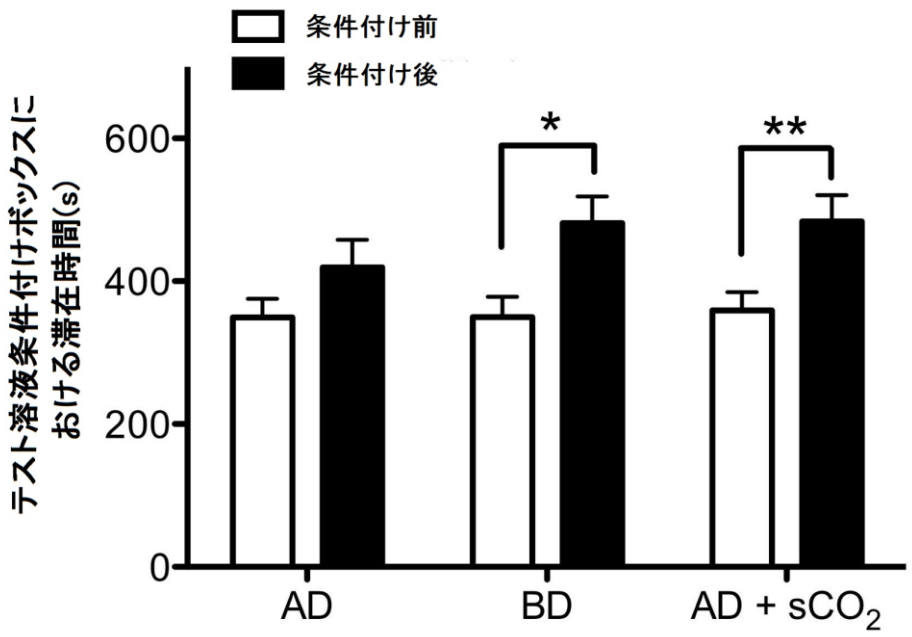


図 4 荒節超臨界二酸化炭素抽出物の CPP 試験結果

それぞれの群はだし味溶液とデキストリン溶液（AD）、天然かつおだしとデキストリン溶液（BD）、AD に荒節超臨界二酸化炭素抽出物を加えた溶液（AD + sCO_2）で条件付けした。図中の値は条件付けしたボックス内における滞在時間(s)の平均値±SEM (n=11)。*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; paired *t*-test。

参考文献

1. Manabe, Y., Matsumura, S., Fushiki, T. Preference for high-fat food in animals. Fat detection: taste, texture, and post ingestive effects. 243, 2010.
2. Ågmo, A., Galvan, A., Talamantes, B. Reward and reinforcement produced by drinking sucrose: Two processes that may depend on different neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav* **52**: 403-414, 1995.
3. Tzschentke, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* **12**: 227-462, 2007.
4. Kawasaki, H., Yamada, A., Fuse, R., Fushiki, T. Preference for dried bonito broth in olfactory-blocked or taste nerve-sectioned mice in the two-bottle choice test. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 2840-2846, 2008.
5. Ackroff, K., Kondoh, T., Sclafani, A. Dried bonito dashi: a preferred fish broth without postoral reward actions in mice. *Chem Senses* **39**: 159-166, 2014.
6. Kawasaki, H., Yamada, A., Fuse, R., Fushiki, T. Intake of dried bonito broth flavored with dextrin solution induced conditioned place preference in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 2288-2292, 2011.
7. Yee, K. K., Costanzo, R. M. Restoration of olfactory mediated behavior after olfactory bulb deafferentation. *Physiol Behav* **58**: 959-968, 1995.
8. Yee, K. K., Wysocki, C. J. Odorant exposure increases olfactory sensitivity: olfactory epithelium is implicated. *Physiol Behav* **72**: 705-711, 2001.
9. Díaz-Maroto, M. C., Pérez-Coello, M. S., Cabezudo M. D. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: comparison with simultaneous distillation–extraction. *J Chromatogr A* **947**: 23-29, 2002.
10. Richter, J., Schellenberg, I. Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic

plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Anal Bioanal Chem* **387**: 2207-2217, 2007.

11. Ramos, E., Valero, E., Ibanez, E., Reglero, G., Tabera, J. Obtention of a brewed coffee aroma extract by an optimized supercritical CO_2-based process. *J Agric Food Chem* **46**: 4011-4016, 1998.
12. Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Polissiou, M. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. *J Sci Food Agric* **85**: 91-97, 2005.
13. Barton, P., Hughes, R. E. Jr, Hussein, M. M. Supercritical carbon dioxide extraction of peppermint and spearmint. *J Supercrit Fluids* **5**: 157-162, 1992.
14. Donelian, A., Carlson, L. H. C., Lopes, T. J., Machado, R. A. F. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO_2 and by steam distillation. *J Supercrit Fluids* **48**: 15-20, 2009.
15. Hawthorne, S. B. Analytical-scale supercritical fluid extraction. *Anal Chem* **62**: 633A-642A, 1990.
16. Reverchon, E., Senatore, F. Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO_2 extraction. *Flavour Fragr J* **7**: 227-230, 1992.
17. Reis-Vasco, E., Coelho, J., Palavra, A. Comparison of pennyroyal oils obtained by supercritical CO_2 extraction and hydrodistillation. *Flavour Fragr J* **14**: 156-160, 1999.
18. Da Porto, C., Decorti, D., Kikic, I. Flavour compounds of Lavandula angustifolia L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chem* **112**: 1072-1078, 2009.
19. 西堀幸吉，岡本清美　鰹節香気成分－Ⅲ．鰹節，煮干し両臭気成分の比較．

日本水産学会誌 **37**: 156-162, 1971.

20. 文部科学省 五訂増補日本食品標準成分表. 2005.

21. Alkio, M., Gonzalez, C., Jäntti, M., Aaltonen, O. Purification of polyunsaturated fatty acid esters from tuna oil with supercritical fluid chromatography. *J Am Oil Chem Soc* **77**: 315-321, 2000.

22. Frankel, E. Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oilsvs. oxidized vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* **70**: 767-772, 1993.

23. Frankel, E. Lipid oxidation. *Prog Lipid Res* **19**: 1-22, 1980.

24. Amrani-Hemaimi, M., Cerny, C., Fay, L. B. Mechanisms of formation of alkylpyrazines in the Maillard reaction. *J Agric Food Chem* **43**: 2818-2822, 1995.

25. 谷本晶太，坂本宏司，守本京三　パージ・トラップ法による煮干イワシの臭気成分の分析. *日本水産学会誌* **71**: 215-217, 2005.

第二章

かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の重要香気成分

序

諸言でも述べたように、かつお節の香気成分については、これまで多くの研究報告がなされており、その数は 400 成分以上とも言われている。しかしながら、榊原らが総説でも記載しているように、かつお節の香気成分組成は非常に複雑で、まだまだ香気的に重要な未知の成分が存在している可能性が考えられる。昨今では、ガスクロマトグラフィ/オルファクトメトリー（GC/O）を活用した香気研究が活発に行われ、通常の機器分析では検出できない微量の重要香気成分が解明されている。かつお節の香気研究でも GC/O を利用した報告があり、石黒らは、かつお節の製造工程中における香気成分の変化について検討し、ピラジン類、フェノール類、含硫化合物がかつお節香の主要な寄与成分であると報告している[1]。古川らは、かつお節とそのだし汁の香気について検討を行い、香気寄与度の高い成分として、3-(methylthio)propanal がフェノール類とは異なる特徴を有していると報告している[2]。しかしながら、多くの成分が解明されてきてはいるが、我々はまだ、かつお節の香りを十分に再現できていない。

一方、伏木らは、 動物実験を用いてかつおだしの嗜好性について研究している。かつおだしにはマウスを執着させる効果があり、香りが重要な役割を果たしていると示唆している。第一章で述べたように、我々はかつお節から種々の方法で香気成分を抽出することを検討し、かつおだしの呈味分析を基に再構成しただし味溶液に各抽出物を添加した実験において、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を添加した味溶液に強化効果がみられることを確認した。超臨界二酸化炭素抽出は、一般的に香気成分の熱変化や酸化変質が少なく、香気成分の損失も少ないと言われている[3]。

そこで我々は、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香りにどのような香気成分

が寄与しているのかを解明するために、GC/O、AEDA 法により香気寄与度の高い成分を選定し、その濃度を調べた。

実験材料と方法

試料

かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を試料とした。原料として株式会社マルハチ村松より入手した焼津産かつお荒節粉末を使用し、日本分光株式会社製超臨界二酸化炭素流体抽出システムにて抽出を行った。200 ml 抽出カラムに試料を 120.0 g 入れ、抽出カラムオーブン 40℃、二酸化炭素圧力 25 MPa の条件下で、二酸化炭素 360 g （密度 0.83 g/ml、流量 10 ml/min）にて抽出を行った。この抽出操作を 10 回繰り返し、 試料 1200 g から超臨界二酸化炭素抽出物 21.27 g を得た。

標準試薬

2-*tert*-butylphenol（純度：＞99％ on GC）、4-*tert*-butylphenol（純度：＞99％）、2,6-dimethylphenol（純度：＞99％）、2,6-dimethoxyphenol（純度：＞99％）、2-methoxy-4-propylphenol（4-propylguaiacol）（純度：＞99％）、2-methoxyphenol（guaiacol）（純度：＞99％）は Sigma-Aldrich より購入した。Benzene（純度：＞99％）は純正化学株式会社より購入した。2-methoxy-5-methylphenol（5-methylguaiacol）（純度：＞99％）は東京化成工業株式会社より購入した。4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde（vanillin）（純度：＞99％）は Rhodia より購入した。4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone（furaneol®）（純度：＞99％）は Firmenich より購入した。(4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal（純度：＞99％）は Mo ら[4]の方法に従い、和光純薬株式会社から購入した 2-octyne-1-ol より全 6 工程、通算収率 19％で合成した。(4*Z*/*E*,7*E*)-trideca-4,7-dienal および (4*E*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal（純度：＞99％）は斉藤ら[5]の方法で合成した。(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal（純度：＞98％）は Miyazawa ら[6]の方

法に従い、Sigma-Aldrich より購入した 1-bromo-2-pentyne より全 7 工程、通算収率 9%で合成した。4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol（純度：＞94%）は Shu ら[7]の方法に従い、Sigma-Aldrich より購入した 3',5'-dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone より全 1 工程、通算収率 48%で合成した。溶媒は一般試薬グレード品を購入し、蒸留して使用した。

香気成分の捕集

かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物 5.0 g に中鎖脂肪酸トリグリセリドを 5.0 g 加え、外温 80℃にて減圧度を 250 Pa から 120 Pa まで徐々に上げ減圧蒸留を行い、26 mg の香気濃縮物を得た。

香気成分の分析

香気成分の分析には質量分析器に直結したガスクロマトグラフ（GC-MS）を使用した。

Agilent 6890N GC システムに Inert Cap WAX カラム（60 m×0.32 mm i.d.）（ジーエルサイエンス株式会社）を装着した。オーブン温度は 40℃、5 分保持し、3℃/min の速度で 230℃まで昇温した。ヘリウムガスをキャリアとし、流速は 1.8 ml/min、注入口温度は 250℃、スプリット比は 10：1 とした。検出器には Agilent 5975C 質量分析器（MSD）を用いた。イオン化電圧は 70 eV、トランスファーライン 250℃、イオン源 230℃、四重極 150℃に設定し、Scan 測定（m/z = 29~500）を行った。化合物の解析には Agilent ChemStation System を用いた。化合物の同定は、標準品との GC 保持指数 Kovats Index（KI）または GC 保持時間（RT）及びマススペクトルの一致により行った。

重要香気成分の抽出および同定

重要香気成分の絞込みのために、AEDA 法を用いた。調製した香気濃縮物を、塩化メチレンにより 5 倍希釈を繰り返し、一定量の試料を GC/O に供した。

装置は Agilent 7890A GC システムを使用した。窒素ガスをキャリアとして、カラム、オーブン昇温条件、流速、注入口温度、スプリット比は GC-MS に準じた。カラム出口を 1：1 に分岐し、250℃に設定した水素炎イオン検出器（FID）と Gerstel 製のにおい嗅ぎポート（ODP）に導いた。ODP は溶出する香気成分の滞留、残存を防ぐためにヒーターで 250℃に加温した。また鼻腔内の乾燥を防ぐために、蒸留水を通過させた加湿空気を 50 ml/min で流した。化合物の同定は、標準品との KI、および香調の一致により行った。

さらに、微量成分の分離のために Gerstel 製 1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システムを使用した。Agilent 7890A GC システムに 1st カラムとして DB-WAX LTM カラム（30 m×0.25 mm i.d.）、2nd カラムとして DB-1 LTM カラム（30 m×0.25 mm i.d.）（共に Agilent 製）を装着した。ヘリウムガスをキャリアとし、コンスタントプレッシャー （0.36 MPa）にてスプリットレスで注入した。注入口には Gerstel 製昇温式注入口（CIS）を使用し、10℃にて注入後、12℃/s で 240℃まで昇温後、5 min 保持した。1st カラムは 40℃から 3℃/min の条件で昇温し、ハートカット部分を－150℃でトラップした。トラップ部分は 10℃/s で 250℃まで昇温し 2nd カラムに導入した。2nd カラムは 40℃から 3℃/min の条件で昇温した。カラム出口は 1：1 に分岐し、MSD と ODP にそれぞれ導いた。MSD 条件は GC-MS に、ODP の設定は GC/O に準じた。化合物の同定は、標準品との KI、ススペクトルおよび香調の一致により行った。2nd カラムの KI は、試料が 2nd カラムに導入されてからの保持時間から算出した。

香気成分の定量

かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物 10.03 g に対し、内部標準として 2-*tert*-butylphenol 1.192 mg、4-*tert*-butylphenol 10.51 µg、benzene 164.7 ng を添加し、実験方法 3 と同様の減圧蒸留により香気濃縮物を得た。定量は GC-MS および 1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システムを使用し、選択イオン検出法（SIM）による測定（2- *tert*-butylphenol m/z = 135、4-*tert*-butylphenol m/z = 107、benzene m/z =

78、各化合物の *m/z* は表 3 参照）を行った。標準試薬を用いて、各化合物の内部標準物質に対する重量比と GC における面積比を基に検量線を作成した。内部標準（IS）の添加量と上記の検量線より各香気成分の絶対量を算出した。

実験結果

かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の特徴香に寄与する成分

減圧蒸留によりかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物から得られた香気濃縮物は、その特徴香をよく保持していた。AEDA 法により絞り込まれた特徴香気成分として FD（Flavor dilution）値の高かった 10 種の成分を表 1 に示した。FD 値の最も高かった成分は KI=1894（WAX）付近の薬品様香気で、guaiacol (1)と同定した。その他に、フェノール様の 2,6-dimethylphenol (3)、薬品様の 5-methylguaiacol (4)と 2,6-dimethoxyphenol (8)、甘い furaneol® (5)、木材・フェノール様の 4-propylguaiacol (7)と 4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol (9)、甘い・バニラ様の vanillin (10)をそれぞれ同定した。KI=1906（WAX）付近に木材・ダンボール紙様の香気（不明成分 A）と、KI=2097（WAX）付近に金属様の香気（不明成分 B）が検知されたものの、存在量が微量であり、他成分との重なりにより同定が困難であった。そこで 1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システムにて微量成分分析を行った。

不明成分の同定

1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システムを用いて 1st カラムにて GC/O を行った。1st カラムのトータルイオンクロマトグラムを図 1 に示した。1st カラムの KI=2097（WAX）付近（RT=45.85 min）に金属様の香気が感じられた（不明成分 B）。そこで 45.6～46.0 min のハートカットを行い、2nd カラムに導入し、再び GC/O を行った。同様の香気が KI=1340（DB-1）付近（1st カラム導入からの RT=72.17 min）に検知された（図 2a 中網掛け部分）。ここから図 2b のマススペクトルが得られた。これは Miyazawa ら[6]によって温州みかんの重要香気成分の一つ

として発見された(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal（図 2c）と一致した。標品を同様の条件で GC に導入し RT の一致も確認し、成分を同定した。

1st カラムの KI=1906（WAX）付近（RT=40.43 min）に木材・ダンボール紙様の香気が感じられた（不明成分 A)。40.1～41.1 min をハートカットして 2nd カラムに導入し、再び GC/O を行ったところ、同様の香気が KI=1461（DB-1）付近（RT=72.43 min）に検知され（図 3a 中網掛け部分)、図 3b のマススペクトルが得られた。マススペクトル中の *m*/*z*=194 を分子イオンと仮定すると、特徴的なフラグメントとして現れている *m*/*z*=150 は M－44 であり、McLafferty 開裂によってアセトアルデヒドが脱離したフラグメントであると類推できる。これは脂肪族アルデヒドに特徴的なフラグメントであることから[8]、分子量よりこの化合物は炭素数 13、不飽和度 2、$C_{13}H_{22}O$ のアルデヒドであると推定できる。さらに *m*/*z*=123 に着目すると、これは M－71 でありペンチル基（C_5H_{11}）であると考えられ、不飽和結合の位置は 7 位までに現れると推定される。また先に述べた M－44 の McLafferty 開裂によるアセトアルデヒドの脱離は 2 位に不飽和結合があると起こらないことを考慮すると、不飽和結合の位置は 3 位から 7 位の位置に 2 つ現れることが類推される。このアルデヒドが*ω*-6 脂肪酸に由来すると考えると、不飽和結合の位置が 4 位と 7 位のトリデカジエナールであると推定される。そこで幾何異性体 4 種類をそれぞれ合成した[5]。それぞれの化合物の WAX と DB-1 カラムにおける KI を表 2 に、マススペクトルを図 4 に示した。不明成分 A はマスパターン、KI、香調の一致により(4Z,7Z)-trideca-4,7-dienal（TDD）であることが判明した。

各成分の定量

AEDA 法にて絞り込まれた 10 成分について定量を行った。TDD と(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal 以外の 8 成分は、GC-MS による SIM 測定にて内部標準と各化合物のピーク面積比率から算出した。内部標準として、guaiacol (1)、5-methylguaiacol（4）、2,6-dimethoxyphenol（8）、4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol (9) は 2-*tert*-butylphenol を、2,6-dimethylphenol（3）、furaneol®（5）、4-

propylguaiacol (7)、vanillin (10)は 4-*tert*-butylphenol を使用した。各化合物のかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物中の濃度を表 3 に示した。

TDD と(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal は 1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システムを使用した。不明成分同定時と同じハートカット条件にて、SIM 測定を行った。内部標準として benzene を使用し、TDD (2)と((2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal (6)の定量を行った。2 成分のかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物中の濃度を表 3 に示した。

考察

CPP 試験によりマウスの強化効果が確認できた、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香りについて香気分析を行った。超臨界二酸化炭素抽出法は、熱による香気劣化が少ない香気抽出法として知られ、かつお荒節の香気を良く再現した抽出物であった。香気分析を行い、GC-O を用いた AEDA 法によって重要香気成分を 10 成分に絞り込んだ。同定された 8 成分については、すでにかつお節の香気成分として報告されている成分であり、かつお節の香りを再現する為に有効な成分として知られていた[1, 2, 9, 10]。しかしながら、残り 2 成分は通常の GC 分析では検出できない微量の成分であった。最近の香気研究では、非常に微量の香気成分が香りに重要な役割をしていることが示され、Miyazawa らはガルバナムの香気特徴成分として、ごく微量含まれる yuzunone®を初めて見出し[11]、さらに柚子の特徴成分であることを確認した。かつお節の香気成分の研究はこれまで多くの報告があり、多数の香気成分が同定されているが、通常の GC 分析で同定可能な成分についての言及が多く微量の香気成分については、まだまだ未知な化合物が存在している可能性があった。そのような中で、今回不明成分であった 2 成分は詳細な検討により(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal と TDD と同定され、かつお節の香気成分としては未報告の成分であった。特に TDD は、動物の分泌物中の香気成分として報告があ

るが[4]、食品中からは初めて同定された化合物であり、かつお節の香りへの影響に興味がもたれた。

表 1 AEDA 法によるかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の重要香気成分（FD ≥ 3125）

No.	compound[a]	KI[b]	FD factor	odor description[c]	identification mode[d]
1	2-methoxyphenol (guaiacol)	1894	15625	mediciny	M, K, O
2	unknown A	1906	3125	woody, cardboard-like	O
3	2,6-dimethylphenol	1940	3125	phenolic	M, K, O
4	2-methoxy-5-methylphenol (5-methylguaiacol)	1976	3125	mediciny	M, K, O
5	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (furaneol®)	2055	3125	sweet	M, K, O
6	unknown B	2097	3125	metalic	O
7	2-methoxy-4-propylphenol (4-propylguaiacol)	2144	3125	woody, phenolic	M, K, O
8	2,6-dimethoxyphenol	2302	3125	mediciny	M, K, O
9	4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol	2442	3125	woody, phenolic	M, K, O
10	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin)	2614	3125	sweet, vanilla-like	M, K, O

[a] 標準化合物と MS、KI、香気特性が一致したことにより同定した
[b] WAX カラムにおける Kovats Index
[c] GC/O にて感じられた香り特性
[d] M（MS）；マススペクトル、K（KI）；Kovats Index、O（GC/O）；GC/オルファクトメトリーでの香気特性

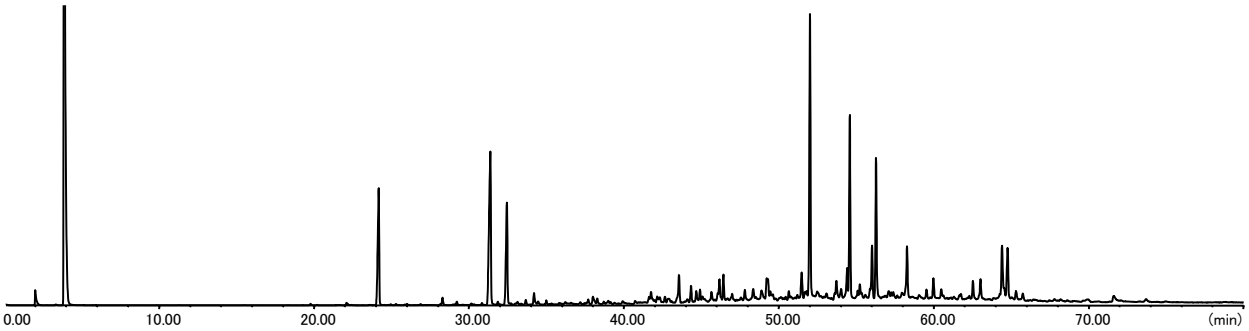


図 1 かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物香気濃縮物から得られたトータルイオンクロマトグラム（1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システム 1st カラム）

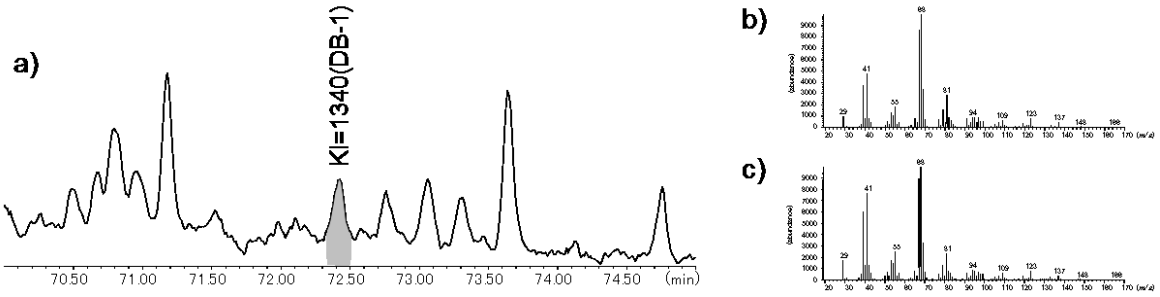


図 2 かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物香気濃縮物から得られたトータルイオンクロマトグラムとマススペクトル（1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システム 2nd カラム）

a) KI=2097（WAX）付近（45.6～46.0 min）ハートカットによるトータルイオンクロマトグラム
b) KI=1340（DB-1）付近のマススペクトル
c) (2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal のマススペクトル

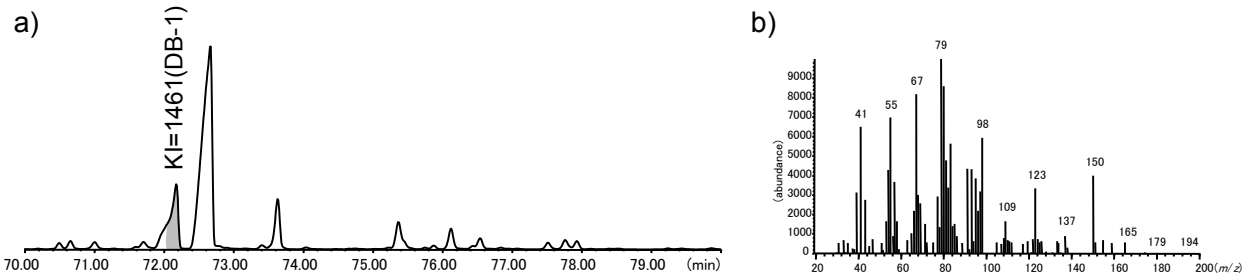


図 3 かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物香気濃縮物から得られたトータルイオンクロマトグラムとマススペクトル（1 次元 2 次元切替 GC-MS/O システム 2nd カラム）
a) 40.1～41.1 min ハートカットによるトータルイオンクロマトグラム
b) KI=1461（DB-1）付近のマススペクトル

表 2 unknown A と(4*E*/*Z*,7*E*/*Z*)-trideca-4,7-dienal の WAX および DB-1 カラムにおける KI[a] 及び香気特性

compound	WAX	DB-1	odor description[b]
unknown A	1906	1461	woody, cardboard-like
(4*E*,7*E*)-trideca-4,7-dienal	1906	1465	oily, weak
(4*E*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal	1912	1472	powdery, citrus-like
(4*Z*,7*E*)-trideca-4,7-dienal	1907	1465	oily, citrus-like
(4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal	1906	1461	woody, cardboard-like

[a] Kovats Index
[b] GC/O にて感じられた香り特性

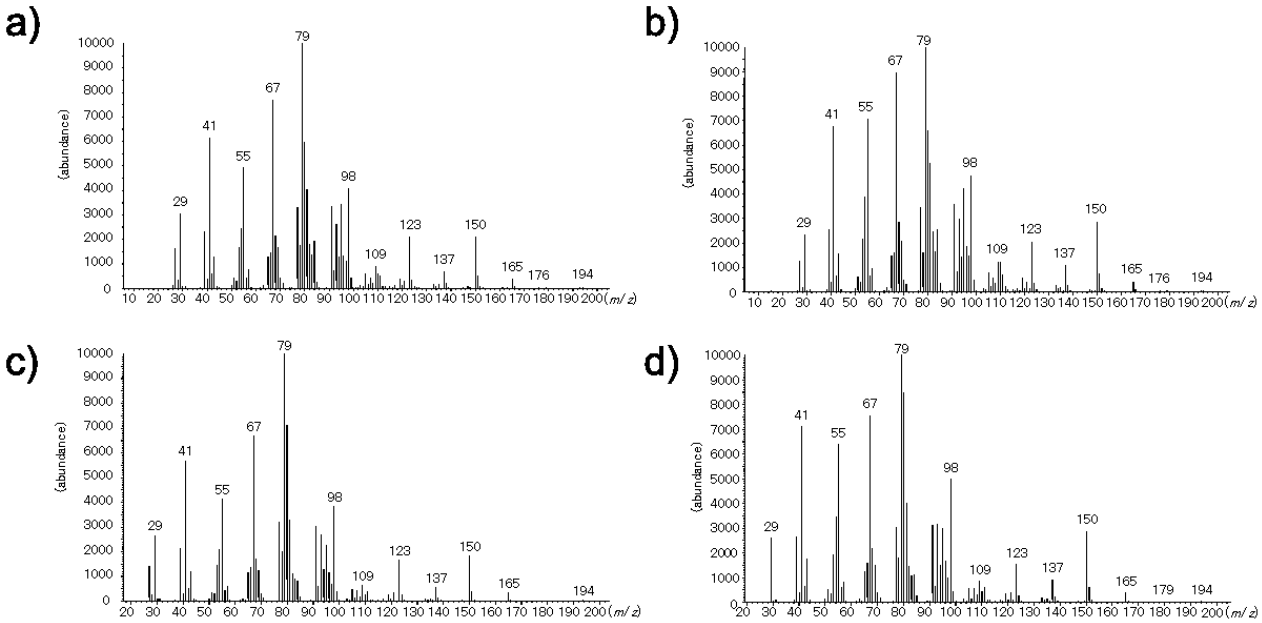


図 4 (4*E*/*Z*,7*E*/*Z*)-trideca-4,7-dienal のマススペクトル

a) (4*E*,7*E*)-trideca-4,7-dienal、b) (4*E*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal、c) (4*Z*,7*E*)-trideca-4,7-dienal、d) (4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal

表 3　かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の重要香気成分の含有値

No.	compound	IS compound	*m/z*[a]	concentration[b] (ppm)
1	2-methoxyphenol (guaiacol)	2-*tert*-butylphenol	124	9.12
2	(4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal (TDD)	benzene	150	0.00446
3	2,6-dimethylphenol	4-*tert*-butylphenol	122	1.21
4	2-methoxy-5-methylphenol (5-methylguaiacol)	2-*tert*-butylphenol	138	15.8
5	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (furaneol®)	4-*tert*-butylphenol	128	2.93
6	(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal	benzene	68	0.00113
7	2-methoxy-4-propylphenol (4-propylguaiacol)	4-*tert*-butylphenol	166	5.79
8	2,6-dimethoxyphenol	2-*tert*-butylphenol	154	256
9	4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol	2-*tert*-butylphenol	167	54.9
10	4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin)	4-*tert*-butylphenol	151	1.88

[a] 選択イオン検出法（SIM）による測定にて使用した各化合物の m/z
[b] かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物試料に対する各成分の濃度

参考文献

1. 石黒恭佑，若林秀彦，川口宏和 かつお節製造工程中における香気とその成分の変化．*日本食品科学工学会誌* **48**: 570-577，2001.
2. 古川瑞樹，中原一晃，馬野克己 鰹節及びそのだし汁の香気成分．*香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集* **48**: 16-18，2004.
3. 奥村烝司 超臨界二酸化炭素抽出法の香料分野への応用．*香料* **155**: 95-104，1987.
4. Mo, W.-P., Burger, B. V., LeRoux, M., Spies, H. S. C. Mammalian exocrine secretions: IX. Constituents of preorbital secretion of oribi, Ourebia, ourebi. *J Chem Ecol* **21**: 1191-1215, 1995.
5. 斉藤司，原口賢治，増田唯 香味改善剤．特開 2012-178984 (2012.9.20).
6. Miyazawa, N., Fujita, A., Kubota, K. Aroma character impact compounds in Kinokuni mandarin orange (*Citrus kinokuni*) compared with Satsuma mandarin orange (*Citrus unshiu*). *Biosci Biotechnol Biochem* **74**: 835-842, 2010.
7. Shu, C.-K., Mookherjee, B. D. Volatile components of phenolic fraction of cooked bacon. *J Agric Food Chem* **33**: 1107-1109, 1985.
8. Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D. H. Mass spectrometry of organic compounds. Holden-Day, San Francisco, 129-173, 1967.
9. 杉本小百合 カツオだし汁の香り．*香料* **256**: 51-56，2012.
10. 城口泰典，木下真玲央 魚節．特開 2011-217632 (2011.11.4)
11. Miyazawa, N., Nakanishi, A., Tomita, N., Okubo, Y., Maeda, T., Fujita, A. Novel key aroma components of galbanum oil. *J Agric Food Chem* **57**: 1433-1439, 2009.

第三章

新規香気成分 TDD の効果検証

序

食品の香りは多くの香気成分から成り立っている。多くの香気成分の中から、元の香りに寄与している成分を絞り込む手法として AEDA が開発され[1]、様々な香気分析に応用されている。しかしながら、AEDA 法は GC/O という特殊な状況下での評価であり、実際に有用な成分であるかを見極めるためには人間の感覚を用いた評価が必要と考えられる。今回は第二章で重要香気成分として選定された 10 成分の中で、食品から始めて見出された(4*Z*,7*Z*)- trideca-4,7-dienal（TDD）に着目し、官能的にかつお節の香りに有用な成分であるかを検証した。また昨今の研究では、香気成分が味に影響を与えることが報告されている[2-4]。黒林らはセロリの香気成分であるフタライド類が、セロリとわからない程度の微量添加によりチキンスープのうま味やコクを増強する効果があると報告している。一方、かつおだしには土佐酢の様に酸味を和らげる効果が知られている。山田らは、かつおだしの添加による酸味の抑制効果を検証し、その効果の原因をかつおだしの呈味成分だけでなくフレーバー成分の可能性も推察している[5]。そこで、今回新たに見出された TDD に酸味を和らげる効果があるかを検証した。

実験材料と方法

1．標準試薬

第二章と同様の方法で入手もしくは購入した。中鎖脂肪酸トリグリセリドは、花王株式会社の MT-N を購入した。

2. 香り再構成液を用いた官能評価

パネル

長谷川香料株式会社のフレーバーリスト 7 名（調香研究 10 年以上の経験を持つ男 4 名、女 3 名）で行った。

官能評価用語の選定

官能評価に使用する用語は、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を用いて設定した。30 ml のガラス容器に、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物 0.1 g を入れ、オルトネイザルにて香りを評価した。記述用紙を用意し、自由記述形式によりかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香気特徴を評価できる用語を収集した。用語収集には、有冨らが提唱している魚節だしの評価用語[6]を参考にし、パネル内で共有できる用語を選定した。

香り再構成液の調製

TDD 以外の重要香気成分として絞り込まれた 9 成分及び TDD を加えた 10 成分にて、第二章で確認したかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の濃度通りに再構成し、中鎖脂肪酸トリグリセリドを加え 100 g とした。各成分量は以下の通りである。guaiacol（910 µg）、5-methylguaiacol（1.6 mg）、2,6－dimethoxyphenol（26 mg）、4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol（5.5 mg）、2,6-dimethylphenol（120 µg）、4-propylguaiacol（580 µg）、vanillin（190 µg）、furaneol®（290 µg）、(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal（0.11 µg）、TDD（0.45 µg）。

評価方法

官能評価は 25℃に設定された換気システムのある官能評価室にて 1 名ずつ行った。試料は、3 桁のランダムコードを付した 30 ml のガラス容器に各香り再構成液を 0.1 g 入れ、蓋をした状態でパネルに同時に提供した。パネルは、容器の蓋をはずし、各試料を比較しながら順不同にオルトネイザルで香りを評価した。7 段階のカテゴリー尺度（感じない 1、かなり弱い 2、弱い 3、普通 4、やや強い 5、かなり強い 6、非常に強い 7）を用い、 各評価項目について評価した。パネルには、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を評価したときの各用語の尺度を 5 とするように訓練

し、パネル内での尺度をそろえた。9 成分と TDD を加えた 10 成分の香り再構成液の結果を *t* 検定により解析した。

3. TDD のかつおだしへの添加効果

パネル

日本料理ラボラトリー研究会 i)に所属する京都の老舗料亭の料理人 6 名

評価方法

官能評価は 25℃に設定された換気システムのある官能評価室にて、6 名全員で行った。市販だしの素（ヤマキ株式会社だしの素）を商品の推奨添加量のお湯にて希釈したかつおだしと、そこに一般的なかつお節フレーバー（長谷川香料株式会社かつお節フレーバー105229）を 20 ppm 添加したもの、かつお節フレーバー20 ppm とさらに TDD をかつおだし中に 0.2 ppb になるように添加したもの計 3 点の試料を用意した。パネルには事前に TDD がかつお節の香気成分として新しく同定された成分であることを説明した。ディスポーザブルのプラスチックカップに 60℃の各試料を 40 ml 入れて同時に提供した。パネルは各試料を比較しながら順不同に飲み、その風味について評価した。また、最も好ましい試料を選定した。なお、飲料水による口直しに関しては制限しなかった。

4. TDD の閾値測定

パネル

長谷川香料株式会社フレーバーリスト 20 名（男 13 名、女 7 名）で行った。

測定方法

Czerny らの方法[7]に従い、オルトネイザルにて TDD の水中での閾値を測定した。

5. TDD の酸味抑制効果

パネル

長谷川香料株式会社のフレーバーリスト 20 名（男 13 名、女 7 名）で行った。

評価方法

官能評価は25℃に設定された換気システムのある官能評価室にて1名ずつ行った。市販酢飲料(タマノイ酢株式会社はちみつ黒酢ダイエット)とこれに TDD を 0.05 ppb 添加したサンプルを用意した。各試料を、3 桁のランダムコードを付したディスポーザブルのプラスチックカップに 40 ml 入れて同時に提供した。パネルは各試料を比較しながら順不同に飲み、酸味の強度について 5 段階尺度で評価した。評価結果を *t* 検定により解析した。

実験結果

香り再構成液を用いた官能評価

第二章にて重要香気成分として絞り込まれた 10 成分の中で、TDD は食品の香気成分として初めて同定された化合物である。そこで、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香りに対してどのような効果をもたらすのか検討した。

重要香気成分として絞り込まれた TDD 以外の 9 成分と TDD を含む 10 成分の香り再構成液を比較する官能評価を行った。評価用語は、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を用いて選定した。パネル全員での数度にわたる検討により、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の特徴を表す 6 種の評価用語（くん液、木材、魚肉、金属、生臭い、カラメル）が選択された。官能評価は 7 段階のカテゴリー尺度を用いて行い、パネルにはかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の尺度を 5 と訓練し、 尺度をそろえた。

官能評価の結果を図 1 に示した。9 成分の香り再構成液では、「くん液」の項目は、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の基準尺度 5 に比較的近い値が示され、その他の評価項目では、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の尺度に比べ低い値を示した。一方、TDD を含む 10 成分の香り再構成液では、9 成分と比較し、「木材」の項目について有意に大きくなり、TDD の添加により、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の尺度に近づく改善効果が見られ、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香り特徴

に寄与していることが確認された。

TDD のかつおだしへの添加効果

TDD は、これまでかつお節フレーバーとしては使用されていないものであり、市販のかつおだしへの香気成分の添加効果を、日本料理ラボラトリー研究会に所属する京都の老舗料亭の料理人により官能的に評価した。かつおだしに、一般的なかつお節フレーバーを添加することで、味の広がり深みが出るとの評価であった。さらに TDD を加えたサンプルでは、かつお節フレーバー単体よりもバランスが良くなるとの評価であった。また、 最も好ましいかつおだしの風味を有する試料として TDD を添加した試料が選定された（表 1)。

TDD の閾値測定

フレーバーリスト 20 名により、水中での TDD の閾値をオルトネイザルで測定した結果、0.014 ppb であった。

TDD の酸味抑制効果

かつおだしが酸味を抑制すると報告されれている[5]。かつおだしは呈味成分、香気成分から形成されているが、どの成分が酸味を抑制する成分かは確認できていない。 そこで、かつお節の香気成分として初めて見出された TDD に着目し、酸味抑制効果があるかを検証した。 TDD の添加量は、水中閾値 0.014 ppb 以上であり、酢飲料においてオルトネイザルで TDD の添加の有無が確認できない量として 0.05 ppb を添加した。その結果、TDD を添加した試料は、添加されていない試料よりも酸味が有意に弱いと評価された（図 2)。

考察

TDD が、かつお節香気成分として重要であることを官能評価を用いて検証した。かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の濃度通りに再構成した香り再構成液中での TDD の添加効果は、官能評価により「木材」の項目を有意に増強するものであり、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香気特徴の一端を担う重要な成分であることが示された。

有冨らの報告によると、各種魚節だしの中でかつお節は「くん液」と「木材」の香りを特徴としている[6]。「くん液」を想起する香りは、フェノール類によって形成されており、かつお節の香りを再現する中で非常に重要な要素である。今回の実験結果でも、選定された 10 成分中 6 成分がフェノール類であり、官能評価の結果でも「くん液」の項目は、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の強度に近い評価であった。一方で、 もう一つ重要な項目である「木材」の香りを増強する成分として、今回新たに見出された TDD が有効であることが示され、かつお節の香り特徴を再現するために重要な成分の一つであることが示唆された。

今回の検討により、かつお節の香気に寄与する新しい成分として、TDD の有効性を確認することができた。AEDA 法によって選定した 10 成分のみではかつお節の香りを十分に再現することは困難であるが、今まで見出されている成分に、今回得られた知見を応用することで、よりかつお節らしい香りを再現することが可能になると思われる。

その効果検証の一端として、かつおだしを毎日作られている日本料理の料理人の方々を対象とした風味評価を行った。我々が今まで一般的に作ってきたかつお節フレーバーと、これに TDD を加えたかつお節フレーバーを市販のだしの素のかつおだしに添加し評価した。その結果、TDD を加えたかつお節フレーバーを添加したものが最も風味良好であると評価された。これは、TDD を含むかつお節フレーバーが、かつおだしに深みや丸みを付与し、バランスの良い風味にさせることで嗜好性を向上させたと考えられた。TDD の有無により風味の向上が示され、微量の香気成分がかつおだしの味わいに影響をもたらしていることが確認された。この結果より、

TDD 使用することで、より高品質で嗜好性の高いかつお節フレーバーを提供することが可能になると示唆された。

昨今の研究では香気成分が食品の味を変化させる報告がなされている[2-4]。山田らは、かつおだしの添加による酸味の抑制効果を検証し、その効果の原因をかつおだしの呈味成分だけでなくフレーバー成分の可能性も推察している[5]。そこで、TDD が酸味の抑制に効果があるかを検証した。市販酢飲料に TDD を添加することで酸味を抑制する効果があることが示され[8]、かつおだしの酸味抑制効果に寄与する成分の 1 つであることが示唆された。しかしながら、そのメカニズムに関しては今後の検討が必要である。酸味抑制効果のある香気成分として γ-nonalactone が有用であることが報告されている[9]。今回の TDD にも酸味抑制効果を確認することができたが、香気成分の味への影響は興味深い現象である。

香気成分が味覚受容体へ作用することが知られている。TDD にもそのような効果があるかもしれない。フレーバーリストとして感覚的に香気成分の味へ影響を感じていたが、さらなる研究が期待される分野である。

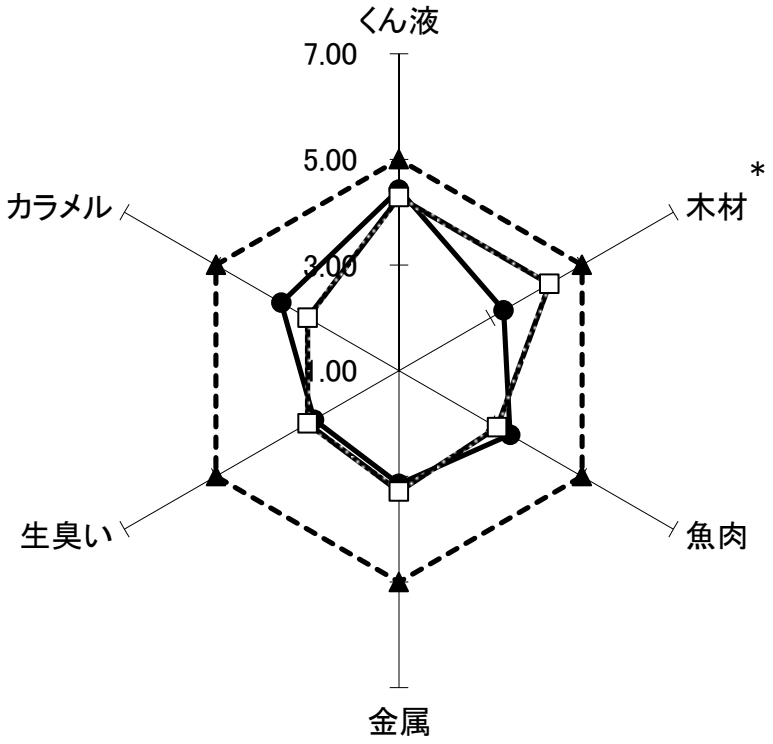


図 1 官能評価による 9 成分の香り再構成液（●）及び 9 成分+TDD の香り再構成液（□）のアロマプロファイル

参考としてかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の基準尺度 5（▲）。n＝7, ＊, $p<0.05$; t 検定。

表 1 京都の老舗料亭の料理人（6 名）の評価

試料	評価	最も好ましいと感じた人数
市販かつおだしのみ	コクがなく水くさい感じがする。	0
かつお節フレーバー添加品	風味が丸くなり深みがでる。	0
上記+TDD添加品	上記試料よりもさらにバランスが良くなる。	6

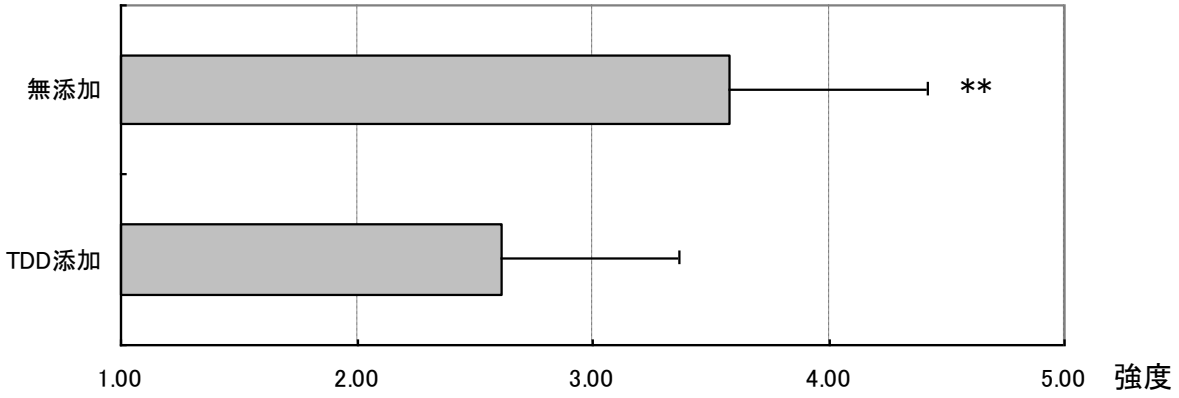


図 2 TDD 無添加品と添加品の酸味強度

n=20, **, $p<0.01$; t 検定

参考文献

1. Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In “Characterization of Food: Emerging Methods,” Gaonker, A.G., ed. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, 403-431, 1995.
2. Stevenson, R. J., Prescott, J., Boakes, R. A. Confusing tastes and smell: How odours can influence the perception of sweet and sour tastes. *Chem Senses* **24**: 627-635, 1999.
3. Yokomi, N., Ito, M. Influence of composition upon the variety of tastes in Cinnamomi cortex. *J Nat Med* **63**: 261-266, 2009.
4. Ito, M. Research and educational activities through perspective of pharmacognosy. *Yakugaku Zasshi* **130**: 687-695, 2010.
5. 山田潤，徳永智子，梨本亜希，稲森美奈子，松田秀樹 Inhibitory effect of *Katsuo-dashi* dried bonito stock on the taste and odor of lactic acid. *日本調理科学会誌* **44**: 122-127，2011.
6. 有冨菜穂子，東雅子，岸幹也，加太希哉，國枝里美 魚節だしおよび煮干しだしの官能評価用語の収集と整理. *日本官能評価学会誌* **14**: 34-39，2010.
7. Czerny, M., Christlbauer, M., Christlbauer, M., Fischer, A., Granvogl, M., Hammer, M., Hartl, C., Moran, N., Schieberle, P. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur Food Res Technol* **228**: 265-273, 2008.
8. 原口賢治，黒林淑子，増田唯　酸味・酸臭抑制剤. 特許第 4925488 号 (2012.4.25)
9. 日比徳浩 食酢および食酢含有飲食品の酸味抑制方法. 特許第 5511210 号 (2014.4.4)

引用 URL

i) http://culinary-academy.jp (2013.12.28)

第四章

香気成分がかつおだしのおいしさに与える影響

序

食品を口に入れると、味覚、嗅覚、体性感覚が同時に活性化され風味が知覚される。その中でもレトロネイザル経路を介した嗅覚刺激は食品の風味に対する寄与が非常に大きく、風味の特徴は典型的には特徴的な香りに由来する[1, 2]。知覚される味の強さは、香りの質が味と一致した時のみ香りによって増強されるが、食経験の裏付けがある調和した味と香りの組み合わせは効果的に味を増強することが示されている[3-6]。この知見は脳における味覚と嗅覚の統合様式が、各人の過去の味と香りの組合せに対する経験に依存することを示している[7]。

かつおだしは、かつお節を原料とする日本の伝統的な調味料であり、和食のだしに欠かせないものとなっている。かつお節や昆布などのうま味成分を含む材料を煮出したり水に浸したりしてうま味成分を抽出した汁がだしと呼ばれるが、かつおだしは和食における代表的なだしの一つといえよう。かつおだしの味を作り出すのに大切な役割を果たしているのは、うま味成分のグルタミン酸、イノシン酸である。それらうま味や塩味、また少しの酸味を持った味の中からかつお節の香りが立ち上ってくることで、日本人が懐かしさを思い起こす奥深い味わいが生まれる。第三章までに述べた通り、このようなかつお節の香りのかつおだし風味に対する寄与は大きく、更にかつおだしの味とも相互作用することにより、かつおだしを用いた料理の風味に大きく影響を与えるものと考えられる。

近赤外分光法（NIRS）は頭の表面に光照射プローブと光検出プローブを装着し、照射プローブから発せられた近赤外光が、組織内を進む途中で、ヘモグロビン分子が光を吸収するため、光検出プローブに達する光の量は減少するという原理に基づく、非侵襲の頭部血流変化計測装置である[8, 9]。NIRS では味覚刺激に伴い、耳下

腺からの唾液分泌に付随した頭蓋骨外の血流変化が計測されることが報告され、こめかみ部で計測される応答には、唾液腺活動が大きく反映されることが示されている。NIRS は飲用動作に対する制限が少なく、被験者が普段通り座って官能評価しながら、血流動態を計測することが可能という特徴を有している。本実験では、NIRS の特徴を生かし、官能評価ならびに NIRS を用いた唾液腺活動計測により、かつお節の香りがかつおだしの味に与える効果を評価した。被験者がだしの質やかつお節の香りの味への効果を官能的に評価している時の、かつおだしに対する唾液分泌に伴う血流変化を NIRS により計測し、こめかみ部の血流変化量に着目した。かつおだしのおいしさ・嗜好性に香りや味がどのくらい寄与しているのか調べるためには、かつおだしの香り刺激と味刺激を分ける手法が有効と考えられる。かつお節香気分析に基づいて構築した様々なかつお節香気由来の再構築フレーバーを香り刺激とし、かつおだしの呈味分析結果に基づいて再構築しただし味溶液を味刺激として、各種フレーバーをだし味溶液と組み合わせた試料に対する唾液腺活動を NIRS により計測し、だし味溶液と調和したかつお節フレーバーが唾液腺活動を修飾するか評価を行った。さらには、かつおだしの嗜好性にとっても重要な役割を果たすと考えた(4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal（TDD）の添加効果に着目した。TDD を添加したかつお節フレーバー賦香品が被験者にとってかつおだしを想起させるか、官能評価ならびに NIRS を用いた唾液腺活動計測により評価し、TDD がかつおだしの嗜好性に寄与するか解析した。

実験材料と方法

実験材料

第一章の表 1 に記載した香りのない人工だし味溶液（DT）とかつお節香気由来フレーバーを賦香しただし味溶液を呈示試料とした。かつお節フレーバーは第三章記載の長谷川香料株式会社かつお節フレーバー105229 を用いた。株式会社マルハチ村松より入手した焼津産かつお荒節粉末を使用し、日本分光株式会社製超臨界二酸

化炭素流体抽出システムを使用して抽出を行った超臨界二酸化炭素抽出物の香気分析した結果に基づき調整した。GC/O により、同定したかつお節香気成分から、かつお節香気に対する寄与が高いと判断した成分を選択し再構成したフレーバーである。10 ppm のかつお節フレーバーをだし味溶液に添加することで被験者がかつおだしを想起する試料となった。かつお節フレーバーは 2 つのパートからなり、スモーク臭を呈する 2,6-dimethoxyphenol、phenol、4-methylguaiacol、*m*-cresol、guaiacol、2,6-dimethoxy-4-methylphenol、*o*-cresol、4-ethylguaiacol からなる 5.6 ppm のスモークパートと、それ以外のパート（ノンスモークパート）である [10]。だし味溶液、かつお節フレーバーを 10 ppm だし味溶液に添加したかつお節フレーバー賦香品、かつお節フレーバー10 ppm とさらに TDD を 0.2 ppb になるように添加した TDD 添加かつお節フレーバー賦香品、4.4 ppm のノンスモークパートをだし味溶液に添加したノンスモークフレーバー賦香品の 4 品を呈示試料とした。

被験者

官能評価中の NIRS 計測は普段から官能評価に従事している長谷川香料株式会社の研究員 10 人（30.5±4.6 才、男 3 名、女 7 名）で行った。被験者には事前に、子供の頃からどういっただしを使っていたか、家庭で使うかつおだしはかつお節から抽出していたか、市販粉末だしを使っていたか聞き取りし、子供の頃からかつおだしになじみのある日本人であることを確認した。長谷川香料株式会社ヒト試験倫理委員会の審査・承認を得て、ヘルシンキ宣言の精神に則り、非侵襲計測の実験手順・方法について説明し、同意書を得て行った。

NIRS 計測

NIRS（近赤外分光法）測定は、光トポグラフィ装置 ETG-4000（株式会社日立メディコ）を用い、温度 24℃、湿度 55%、照度 50 lux にコントロールした人工気候室内で行った。今回計測には、3×11 の 52 チャンネル（以下、Ch）のプローブを使用した（図 1）。

NIRS 計測中に味や香りの強度や味と香りの組み合わせを評価する官能評価を行い、呈示した試料の香りの強さ、うま味の強さ、広がり、まとまり・調和、複雑さ、総合的なおいしさについて 7 段階評価で記入した。香りの強さとうま味は（-3：非常に弱い～3：非常に強い)、複雑さとまとまり・調和と広がりは（-3：非常にない～3：非常にある)、おいしさは（-3：非常においしくない～3：非常においしい）とし、数値化した。NIRS 計測中は、試料はいずれも 10 ml を蓋のないプラスチックカップに入れて、60℃で被験者に呈示し、指示に従い、1 回だけ飲用した。

試験手順は、だし味溶液と各フレーバー賦香品を対にして呈示し、10 名の被験者に各試料の風味評価をするタスクを課した（図 2)。各被験者は TDD 添加かつお節フレーバー賦香品とだし味溶液を試料として用いた 2 日間のセッション、（TDD 抜きの）かつお節フレーバー賦香品とだし味溶液を試料として用いた 2 日間のセッションの 2 つのセッション計 4 日間の実験に参加した。4 日間の実験とも 1 つ目の試料はだし味溶液であり、2 日間の各セッションのうち 1 日は、試料としてだし味溶液を 2 回呈示、もう 1 日は 2 つ目の試料としてフレーバー賦香品を呈示した。4 日間ともだし味溶液を呈示した約 5 分後に同じだし味溶液またはフレーバー賦香品を全ての試料を未知試料として呈示し、その際の官能評価中の血流変化を測定した。さらに 5 名の被験者はノンスモークフレーバー賦香品とだし味溶液を試料として用いた 2 日間のセッションにも参加した。NIRS 計測開始前に毎日測定のタイムスケジュールを説明した後、NIRS プローブを装着し、血流変化の計測を開始した。各測定は 60 秒間の安静、30 秒間の官能評価タスク、60 秒間の安静の 150 秒間からなり、測定終了後官能評価用紙に記入した。60 秒間の安静後、被験者に試料を手に取って味わうように指示をだし、被験者は自分で試料を手に取って味わった後、5 秒以内には飲み込み、その後タスク中の 30 秒まで味わった試料の官能評価に集中した。試料呈示の間となる官能評価用紙記入中に口ゆすぎ用の水を準備し、自由に飲用した。

NIRS 解析方法

NIRS によって記録される数値には、各 Ch において酸化ヘモグロビン（oxyHb)、還元化ヘモグロビン（deoxyHb)、総ヘモグロビン（totalHb）がある。本実験では、呈示した味質濃度や唾液分泌速度と相関が得られている oxyHb の変化量を唾液腺血流変化量として解析に使用した。タスク中 30 秒間に計測された血流変化量（ベースラインからの最大変化値から最小変化値を引いた 30 秒間の振幅値）を応答の大きさとして、各ピーク比（各試料に対する応答の大きさを、前に飲用しただし味溶液に対する応答の大きさで割った値）を用いてだし味溶液とフレーバー賦香品の応答を比較した。ベースライン区間はタスク直前の安静終了時 10 秒間とし、この 10 秒間の平均血流変化量を 0 としてタスク開始時の 0 点補正を行った。唾液腺活動に伴う血流変化が記録されるこめかみ部として右側 3 Ch（Ch 43, 44, 33)、左側 3 Ch（Ch 52, 51, 41）を定めた（図 1）が、被験者毎に味覚刺激に伴う最大血流変化を示す Ch は異なり、解析に用いたピーク比は、これら左右各 3 Ch から得られたピーク比の平均値とし、各々左こめかみ部、右こめかみ部から得られた唾液腺血流応答の値として、試料間の比較を行った。

統計解析方法

統計解析は SPSS 20.0J を用いて行った。官能評価の統計処理は、被験者内での試料間の数値差には意味があると考え、ノンパラメトリックな解析手法を用い、各試料間の差を検定した。NIRS 計測でのピーク比は各被験者内でだし味溶液に対する応答との相対値であり、二元配置分散分析を行い、交互作用、単純主効果の検定を行った。有意水準 5%未満をもって有意と判定した。

実験結果

官能評価

10 人の被験者はかつお節フレーバー賦香品の評価結果に基づき 2 群に分類された。1 群目はかつお節フレーバーとだし味溶液の組み合わせが調和していると答えた 5

人の被験者群（調和群）で 2 群目が調和を感じなかった残りの 5 人の被験者群（不調和群）である。同じかつお節フレーバー賦香だし味溶液を与えられているにもかかわらず、両群間ではおいしさの点数と調和の点数に有意な差があった（図 3)。調和群は不調和な組み合わせと考えたノンスモークフレーバー賦香品を用いたセッションにも参加した。スモークパートの有無で香りの強さは変わらなかったが、おいしさ、まとまり・調和はかつお節フレーバー賦香品の方が有意に高かった（図 4a)。よって、調和したフレーバーはだし味溶液にかつお節様の香りを付与するだけでなく、そのような調和を感じた被験者に対してだけ、全体的な風味を増強し、おいしく感じさせるにようにする効果があるものと考えられた。

次に TDD 添加有無のかつお節リコンストフレーバー賦香品に対する NIRS 計測中の官能評価結果に着目した。TDD 添加の有無で香りの強さに差異は認められず、またフレーバー賦香によるうま味の強さの変化も認められなかったが、まとまり・調和の点数は不調和群で TDD 添加により顕著に上昇し（図 4b)、TDD 添加かつお節フレーバー賦香品はだし味溶液との味と香りの調和が非常によく、かつおだしとして被験者がおいしく感じていることが示された。

NIRS 唾液腺活動記録法による評価

かつお節フレーバー賦香品やだし味溶液を 10 人の被験者に呈示したところ、左右こめかみ部を中心に試料呈示 30 秒付近にピークを持つ血流量変化が被験者間で共通して得られた（図 5)。またフレーバー添加の有無で応答領域に大きな差は認められなかった。最大変化量を示したのは右こめかみ付近の Ch 44 と左こめかみ付近の Ch 51 であり、タスク開始 25 秒後付近で最大変化量に達し、その後ゆっくりをベースラインに戻るこの応答パターンは、これまでに砂糖に対して検出された応答パターンと同様であり、唾液腺活動に伴う血流変化と考えられた。同じような変化は、こめかみ部（右側：Ch 43, 44, 33、左側：Ch 52, 51, 41）付近で一様に見られ、この後はこれらの左右こめかみ部 6 Ch の各種フレーバー添加による変化、被験者群毎の相違に着目した。

香りの効果を評価するために、こめかみ部の血流応答の大きさが香りの有無で変化するのか検証を行った。かつお節フレーバーがだし味溶液と調和していると答えた調和群でかつお節フレーバー賦香品とだし味溶液に対する左右こめかみ部におけるピーク比を算出し、だし味溶液とフレーバー賦香品の相対ピーク比を比較した（2（試料）×2（測定部位）ANOVA)。有意差は認められなかったが、かつお節フレーバー添加による主効果が検出された（$F(1, 4)=7.01$、 $p=0.057$)。測定部位の主効果も同様であった（$F(1, 4)=6.41$、 $p=0.065$）が、交互作用は検出されなかった（図 6a)。一方で、かつお節フレーバー添加による風味増強を感じず、だし味溶液との調和を感じなかった不調和群では測定部位の主効果、交互作用だけでなく、試料間の有意な主効果も検出されなかった（$F(1, 4)=0.24$、$p=0.65$）（図 6c)。

香りと味が調和していると答えた調和群において、かつお節フレーバーはだし味溶液と比較してより大きな唾液腺血流応答を引き起こしたが、このような血流増強は特徴的な香気成分、調和したフレーバーによって引き起こされるのか、かつお節香気にとって重要なスモーク様香気パートを除いたフレーバー（ノンスモークフレーバー）を用いた評価を行った。二次配置分散分析による解析を行った結果、フレーバー添加（$F(1, 4)=0.006$、$p=0.942$)、測定部位（$F(1, 4)=1.75$、$p=0.26$）いずれも統計的な差は検出されなかった（図 7)。だし味に対して特徴的な調和した香りが、個々人の食経験によるものと推定される味と香りの相互作用により調和を感じた被験者において唾液腺活動の増強を引き起こしたが、不調和な香りでは唾液腺活動を左右しなかったと考えた。

さらにかつお節フレーバーでは香りと味の調和を感じず、不調和と答えた被験者群でも、調和を感じた時には唾液腺血流の増強が生じるのか、TDD を添加したフレーバーを用いた検討を行った。新規に見いだされた重要香気成分 TDD は極微量の添加でも風味の感じ方を劇的に変化させる効果が前章までで示されており、かつお節香気中で TDD 有無によりかつお節香気の感じ方が変化するだけでなく、風味にも変化を及ぼすことが明らかにされている。ここでは TDD 有無での唾液腺血流の変化に着目し、両被験者群で TDD 有無での変化を計測した。被験者群毎にだし味

溶液とフレーバー賦香品の相対ピーク比を比較した（2（試料）×2（測定部位）ANOVA）結果、TDD 抜きかつお節フレーバー賦香では風味増強を感じず、TDD を添加することにより、明確に評価が向上した被験者群（不調和群）で、唾液腺活動の増強が明確であり、TDD を加えてないフレーバー賦香品では、だし味溶液との相違が検出されなかった（$F(1, 4)=0.24$、$p=0.65$）のに対し（図 6c）、TDD 添加フレーバー賦香品では、だし味溶液と比較してこめかみ部の血流変化量が有意に増強（$F(1, 4)=8.67$、$p=0.042$）するように変化することが示された（図 6d）。一方、TDD 抜きフレーバー賦香品でも風味増強を感じた被験者群では、TDD 添加かつお節フレーバー賦香によるこめかみ部の有意な血流変化量の増強が検出された（$F(1, 4)=14.5$、$p=0.019$）（図 6b）。TDD 添加かつお節フレーバー賦香品を使用したセッションでも、かつお節フレーバー賦香品を使用したセッションでも交互作用は検出されなかった。

以上の結果より、調和群、不調和群各々フレーバーを変えると唾液腺血流応答パターンは変化し、調和群では（TDD 無添加）かつお節フレーバーにより唾液腺活動が増強する傾向にあったが、不調和なノンスモークフレーバーは唾液腺活動は増強しなかった。一方不調和群では、（TDD 無添加）かつお節フレーバーは唾液腺活動を増強しなかったが、TDD 添加かつお節フレーバーは有意に唾液腺活動を増強した。いずれの被験者群でも、だし味溶液と調和していると被験者が評価したかつお節フレーバーにより唾液腺活動が増強することが示された。

考察

本研究では、かつお節の香りがかつおだしの風味に及ぼす風味増強効果、特に新規重要香気成分である TDD に着目し、香気成分の添加がかつおだしの嗜好性に及ぼす効果について、官能評価ならびに唾液腺活動計測を用いた評価を行った。

かつお節香気成分は香りの味の組み合わせに調和を感じた被験者群のみで、左右こめかみ部におけるだし味溶液に対する応答増強を明確に引き起こした。唾液腺の

活性化は脳において嗅覚や味覚の情報を統合することにより引き起こされると考えられるため[11-13]、NIRS による唾液腺活動の計測は食べ物の高次評価の有益な指標となりうる可能性を秘めている。興味深いことにかつお節香気成分は香りと味の調和を感じなかった被験者群に対しては、唾液腺活動にほとんど影響を及ぼさなかった。これらの結果はかつお節香気のだし味に対する主観的な官能評価と唾液分泌に伴う血流応答の変化として計測される客観的な評価に重要な相関があることを示している。

かつお節フレーバー賦香品では、被験者群毎に唾液腺活動増強パターンが大きく分かれ、かつお節フレーバーによる風味増強を感じた被験者群でのみ、だし味溶液に対する唾液腺活動がかつお節フレーバー賦香により増強した。このようなかつお節フレーバー賦香による唾液腺活動の増強が検出された被験者群でも、だし味溶液と調和しないノンスモークフレーバーでは唾液腺活動の増強は検出されなかった。かつお節フレーバーに TDD を加えると、かつお節フレーバーの賦香だけでは味とのまとまりが悪いと評価した被験者群も風味増強を感じるようになった。この時両群共に TDD 添加かつお節フレーバー賦香によりだし味溶液に対する唾液腺活動が増強し、TDD 添加による風味増強とこめかみ部の血流変化の増強には正の相関があることが NIRS により捉えられた（図 6）。

本研究で着目した NIRS で味刺激に伴ってこめかみ部で計測される血流変化は、唾液腺活動、特に耳下腺活動に伴う血流変化であることが示されている。味刺激に伴う血流変化は刺激に対して反射的に分泌される唾液腺活動と考えられる。一方で香り刺激によって引き起こされる唾液腺活動は、口に入れた試料を記憶に基づいて判断し、より食べたいと判断された試料に対して分泌される唾液腺活動ではないかと考えられる[10]。本研究では、特に TDD を含むかつお節フレーバー賦香品は被験者が慣れ親しんだかつおだしを想起させる効果を有し、重要香気成分は 1 成分でも唾液腺活動に大きく影響すると考えられた。

NIRS でこめかみ部で計測される血流変化は唾液腺活動に伴う血流変化だけに由来せず、皮膚血流変化、こめかみ部の下に位置する脳表面の血流変化、また口の中

やこめかみ部の筋肉の動き、体動など様々な要因によっても、引き起こされる信号を含んだ血流変化である。特に今回用いた官能評価中の計測といった手法では、味覚や嗅覚刺激以外の様々な要因の影響を受けやすい。本研究では、だし味溶液を飲み込んで官能評価を行うというタスクを行った時のこめかみ部の血流変化に着目し、相対的な血流変化量の比を算出することで、フレーバー賦香による変化を捉える試みを行った。だし味溶液を飲み込んで官能評価を行うというタスクを行った時のこめかみ部の血流変化には、唾液腺活動に伴う血流変化以外の要因に由来する信号が含まれていると考えられるが、一定の呈示条件で被験者に試料を呈示し、官能評価させることで、同じ試料を呈示した時の血流変化量の相対比の被験者毎の平均値は１に近づくもしくは１未満で一定化することがわかり、安定した反応を得ることができることがわかった。被験者毎に血流変化量の大きさも異なるが、相対比を比較することで、被験者間の比較も可能と考えられる。この相対比に着目することで、あるフレーバーを添加しただけでは相対比は変化しないが、より食べたいと被験者が感じる別のフレーバーを添加した時に相対比が大きく１を超える、つまりフレーバーにより血流変化が増強する現象を捉えることができた。この現象には唾液腺活動が大きく関与していると考えられ、本研究で得られた血流変化の増強は、かつお節香気による風味増強を感じ、唾液腺活動を活性化することで、こめかみ部の血流変化の増強が引き起こされたことが考えられる。この反応には摂食モチベーションが関わることが示唆され、TDD はもっと食べたいという満足感を与えるようなかつおだしの嗜好性、おいしさにも寄与する成分であると考えられる。

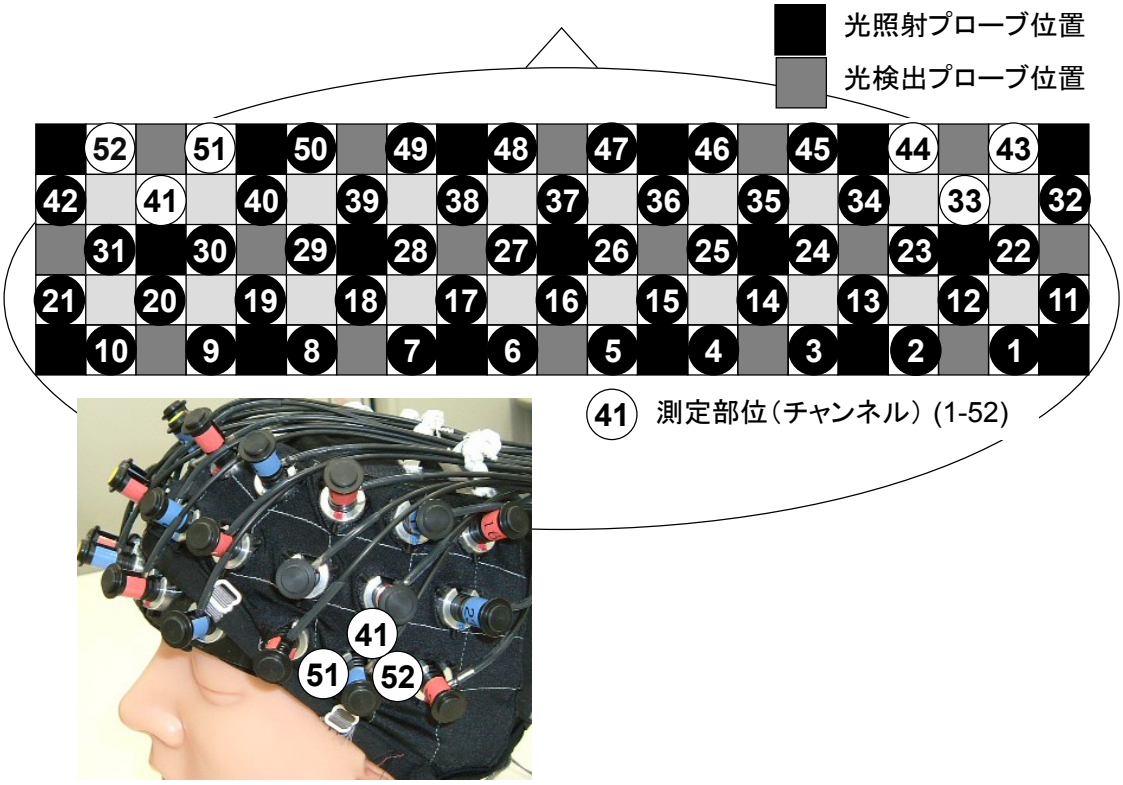


図 1 NIRS 計測部位（3×11 の 52 チャンネル）

着目したこめかみ部の左右 3 チャンネルを白丸数字で示した。

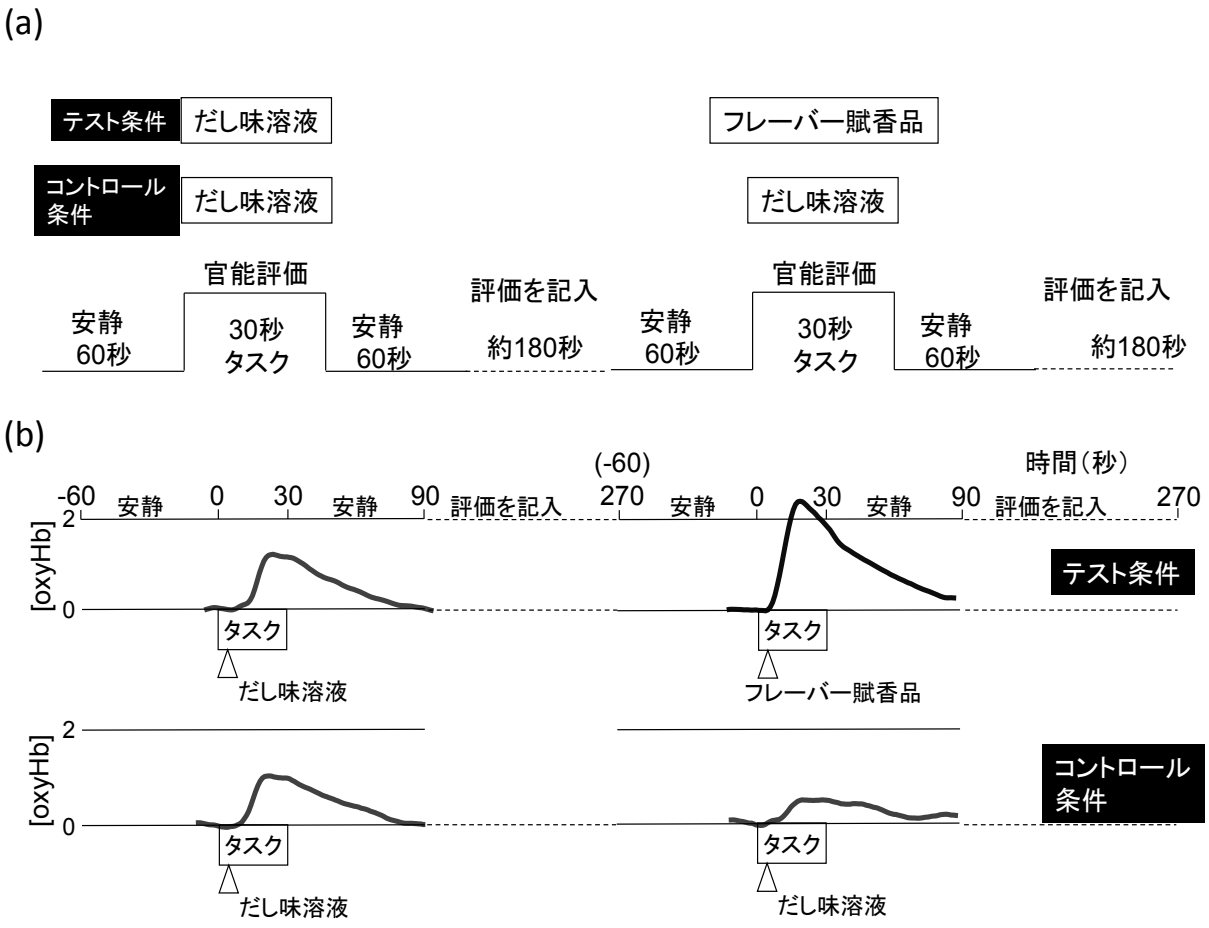


図 2（a）1 セッション（2 日間）の実験デザイン（b）テスト条件、コントロール条件において Ch 51 で記録された唾液腺血流応答例

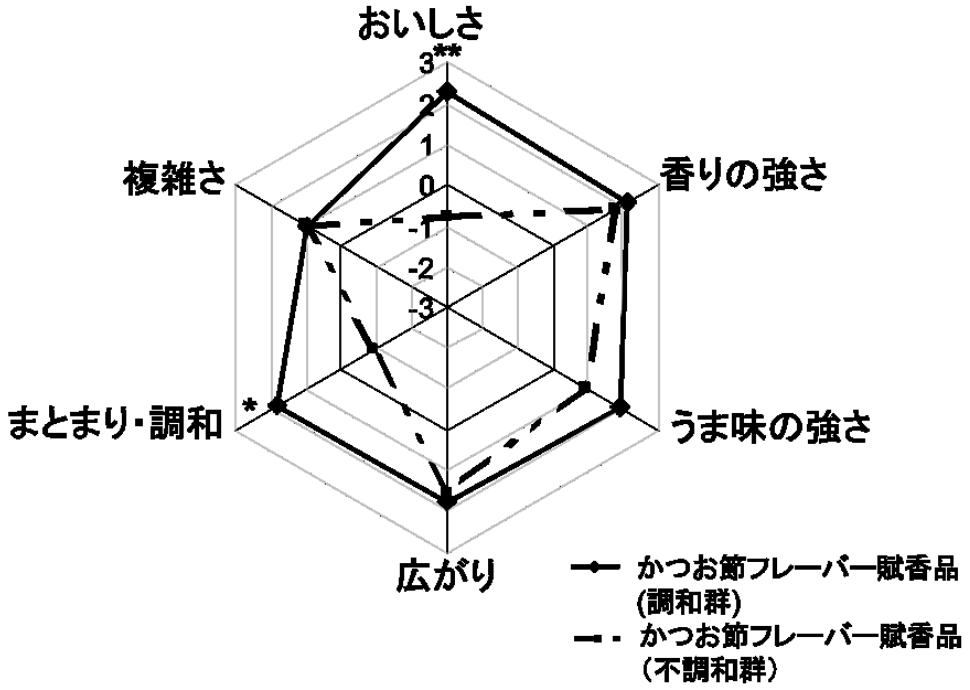
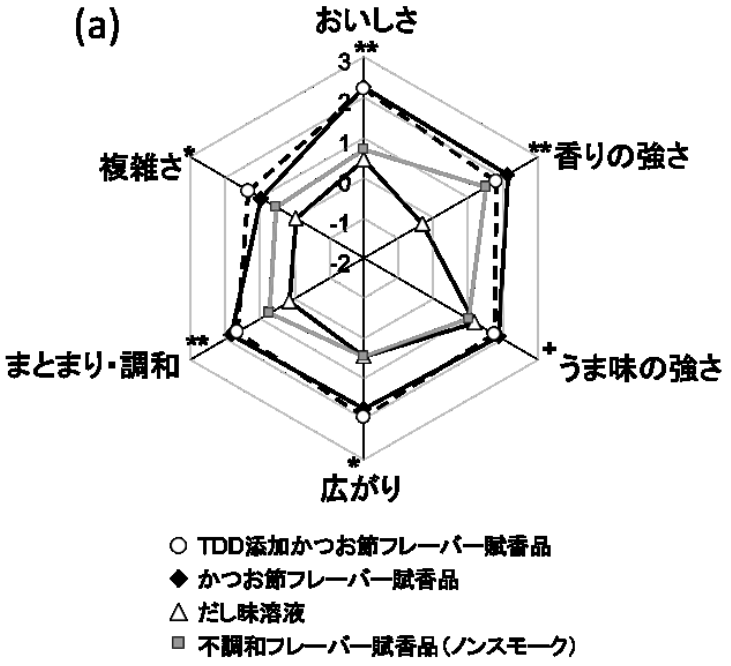


図 3 被験者群間での官能評価結果の相違

n=10, **, $p<0.01$; *, $p<0.05$; t 検定



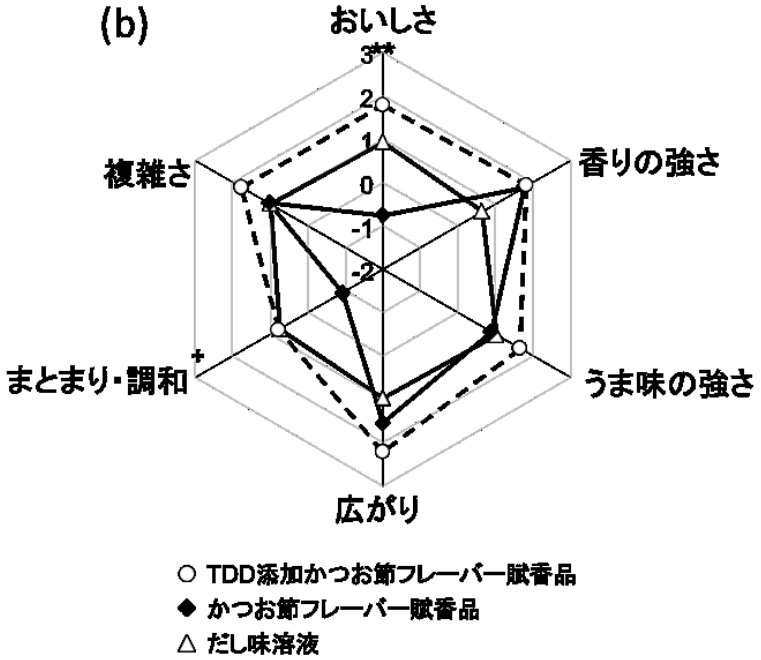


図 4 （a）調和群（b）不調和群におけるかつお節フレーバーとだし味溶液の組み合わせの官能評価

**, $p<0.01$; *, $p<0.05$; +, $p<0.1$; クラスカル・ウォリス検定

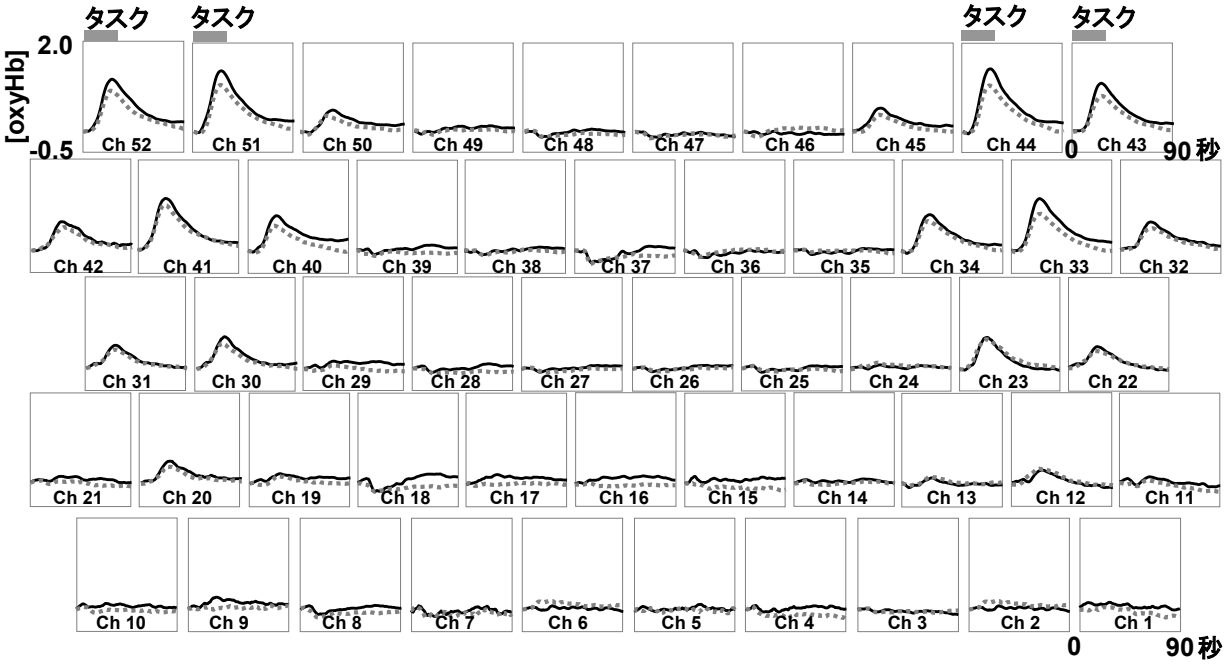


図 5 だし味溶液（点線）とかつお節フレーバー賦香品（実線）に対する被験者 10 人の平均酸化ヘモグロビン濃度変化

各 52 Ch の縦軸は酸化ヘモグロビン濃度変化（−0.5～2 mM･mm）、横軸はタスク開始時を 0 秒とした時の時間変化（0～90 秒）。タスク期間（30 秒）の位置は Ch 52, 51, 44, 43 上に示す。

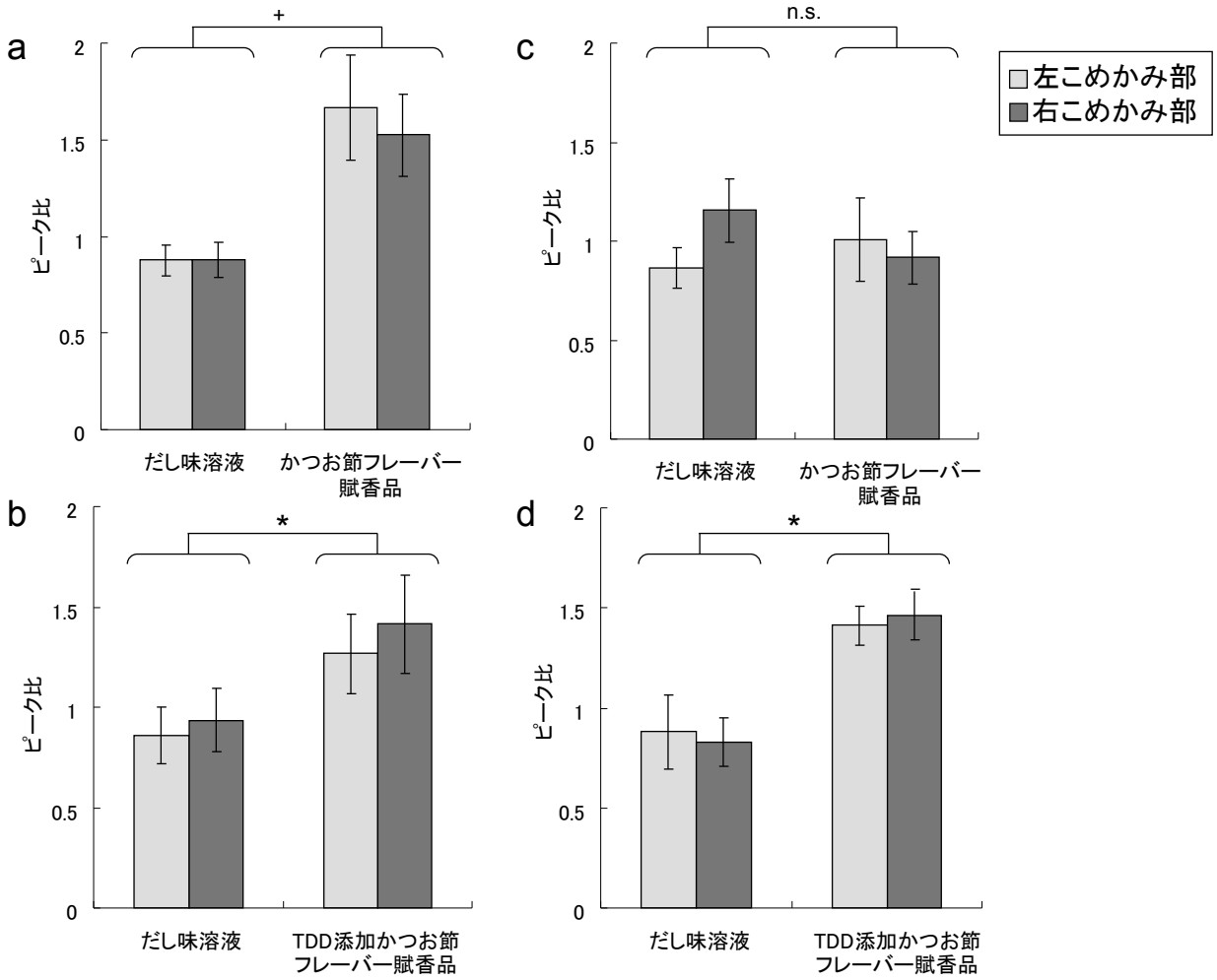


図 6　TDD 添加による左右こめかみ部血流変化量比の増強

TDD 抜きかつお節フレーバー賦香による風味増強を感じた被験者群でのだし味溶液と(a)かつお節フレーバー賦香品、または(b)TDD 添加かつお節フレーバー賦香品に対する左右こめかみ部血流変化量比の比較(5 人左右各 3 Ch)。TDD 抜きかつお節フレーバー賦香による風味増強を感じなかった被験者群でのだし味溶液と(c)かつお節フレーバー賦香品、または(d)TDD 添加かつお節フレーバー賦香品に対する左右こめかみ部血流変化量比の比較(5 人左右各 3 Ch)。*, $p<0.05$; +, $p<0.1$; n.s., not significant; 2(試料:だし味溶液とフレーバー賦香品)×2(測定部位:右こめかみ部と左こめかみ部)ANOVA。

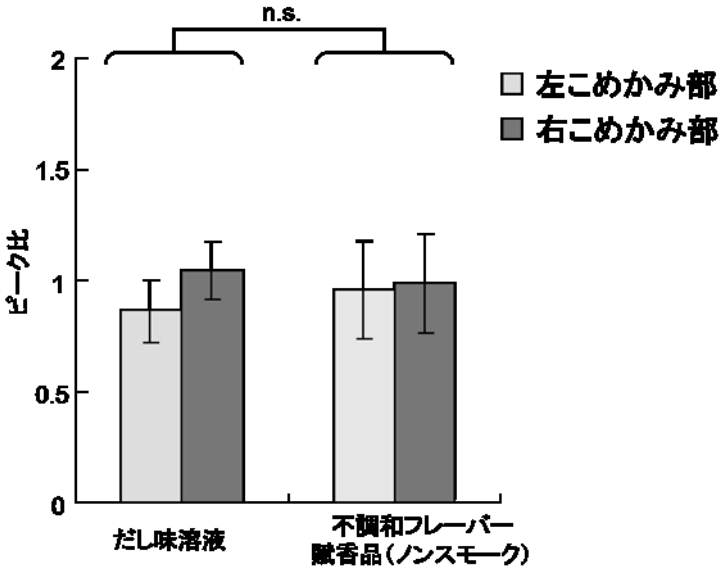


図 7　調和群（5 人）でのノンスモークフレーバー添加による左右こめかみ部血流変化量比の変化

n.s., not significant; 2（試料：だし味溶液とフレーバー賦香品）×2（測定部位：右こめかみ部と左こめかみ部）ANOVA

参考文献

1. Shephard, G. M. Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature* **444**: 316-321, 2006.
2. Verhagen, J. V., Engelen, L. The neurocognitive bases of human multimodal food perception: sensory integration. *Neurosci Biobehav Rev* **30**: 613-650, 2006.
3. Frank, R. A., Ducheny, K., Mize, S. S. Strawberry odor, but not red color, enhances the sweetness of sucrose solutions. *Chem Senses* **14**: 371–377, 1989.
4. Schifferstein, H. N., Verlegh, P. W. The role of congruency and pleasantness in odor-induced taste enhancement. *Acta Psychologica* **94**: 87–105, 1996.
5. Dalton, P., Doolittle, N., Nagata, H., Breslin, P. A. The merging of the senses: integration of subthreshold taste and smell. *Nat Neurosci* **3**: 431–432, 2003.
6. Stevenson, R. J., Prescott, J. The acquisition of taste properties by odors. *Learn Motiv* **26**: 433–455, 1995.
7. Small, D. M., Voss, J., Mak, Y. E., Simmons, K. B., Parrish, T., Gitelman, D. Experience-dependent neural integration of taste and smell in the human brain. *J Neurophysiol* **92**: 1892-1903, 2004.
8. Jobsis, F. F. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* **198**: 1264-1267, 1977.
9. Scholkmann, F., Kleiser, S., Metz, A. J., Zimmermann, R., Mata Pavia, J., Wolf, U., Wolf, M. A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology. *Neuroimage* **85**: 6-27, 2014.

10. Matsumoto, T., Saito, K., Nakamura, A., Saito, T., Nammoku, T., Ishikawa, M., Mori, K. Dried-bonito aroma components enhance salivary hemodynamic responses to broth tastes detected by near-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem* **60**: 805-811, 2012.
11. Garrett, J. R. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res* **66**: 387-397, 1987.
12. Yeomans, M. R. Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiol Behav* **89**: 10-14, 2006.
13. Bender, G., Hummel, T., Negoias, S., Small, D. M. Separate signals for orthonasal vs. retronasal perception of food but not nonfood odors. *Behav Neurosci* **123**: 481-489, 2009.

要約

第一章

和食はだしの風味をうまく利用することで、油脂や砂糖をふんだんに用いなくても満足のできる食を提供してきた。

和食の基本となるかつおだしは、かつお節を熱水抽出することで得られる。天然かつおだしにデキストリンを加えたものには有意な強化効果が見られ、嗅覚刺激が強化効果の発現に重要であることを示す報告がある。よって本研究ではだしの香気に着目した。

マウスを用いた 2 瓶選択試験により、かつお節や他の節類など複数のだし原料からの香気抽出物および最適な香気抽出法を調査した結果、超臨界二酸化炭素抽出法を用いて得られたかつお荒節の香気抽出物に、有意に高い嗜好性が見られた。嗅糸切断手術を施したマウスでは、有意差が認められなかったことから、香り情報が重要であることが分かった。条件付け位置嗜好試験から、かつおだしの呈味を再現した溶液にかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を添加したサンプルに強化効果が見られた。

これらの結果から、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物には、マウスの嗜好性と強化効果に寄与する成分が含まれていることが示唆された。かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物はかつおだしと同様の強化効果を示すこと、嗜好性には香りが寄与することを見出した。

第二章

かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物にマウスの強化効果が確認されたことから、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香気分析を行った。GC-MS 分析、AEDA 法によって重要香気成分を絞り込んだ結果、guaiacol、5-methylguaiacol、2,6-

dimethylphenol 、 4-ethyl-2,6-dimethoxyphenol 、 2,6-dimethoxyphenol 、 4-propylguaiacol、vanillin 、furaneol®、(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal、(4*Z*,7*Z*)-trideca-4,7-dienal（TDD）の 10 成分が同定された。この中で、(2*E*,7*Z*)-*trans*-4,5-epoxydeca-2,7-dienal と TDD は、かつお節の香気成分としては未報告の成分であり、特に TDD は、食品の香気成分として初めて同定された成分であった。さらに各成分のかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物中の濃度を明らかにした。

第三章

食品の香気成分として初めて同定された TDD が、かつお節の香りにどのような影響があるのか、官能評価を行った。 官能評価に用いる用語は、かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物を用いて 6 種（くん液、木材、魚肉、金属、生臭い、カラメル）を選定した。かつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物中の濃度を用いて、第二章で絞り込まれた成分で香り再構成液を作成した。TDD 以外の重要香気成分 9 成分と、TDD を加えた 10 成分の香り再構成液を作り、各風味項目ついて比較した。その結果、かつお節の香りを表現するために必須であるとフレーバーリストが感じていた「木材」の項目が、TDD の添加により有意に増強された。さらに、料理人の官能評価によって、TDD を含むかつお節フレーバーは、かつおだしをより好ましい風味にさせる効果があることが示された。また TDD の酸味抑制効果ついて市販の酢飲料を用いて検証した。酢飲料に TDD を添加したサンプルは、無添加のものに比べ有意に酸味が弱くなることが示された。このことから、TDD はかつお荒節超臨界二酸化炭素抽出物の香りを構成する新規重要香気成分であること、かつおだしの嗜好性を高める効果があることを明らかにした。

第四章

かつお節の香りがかつおだしの風味の及ぼす風味増強効果、特に TDD に着目し、

香気成分の添加がかつおだしの風味に及ぼす効果について、官能評価ならびに唾液腺活動計測を用いた評価を行った。

かつお節再構成フレーバーにTDDを極微量加えることで、だし味溶液とのまとまりがよくなり、なじみや満足感の評価点が有意に上昇した。風味全体の広がりや複雑さはかつお節再構成フレーバー添加により向上し、TDDを加えることによりさらに向上した。このようなTDDの添加効果はTDDを加える前のかつお節フレーバー賦香品に不調和さを感じた被験者群とTDDを加えていないかつお節フレーバーでも十分に香りによる風味増強を感じた被験者群では異なり、TDD有無で評価に差が表れたのは前者の被験者群であった。

これらの試料の官能評価中に近赤外分光法（NIRS）による唾液腺活動計測を行うと、TDD添加かつお節再構成フレーバー賦香品ではフレーバー賦香によるこめかみ部唾液腺活動の増強が計測された。TDDを添加していないかつお節フレーバー賦香品では、被験者群毎に血流増強パターンが大きく分かれ、かつお節フレーバーによる風味増強を感じた被験者群でのみ、だし溶液に対するこめかみ部唾液腺活動が増強した。

TDDは他のかつお節由来の香気成分やかつおだしの味成分と組み合わせることで、被験者のなじみのあるかつおだしの風味を形作るものと考えた。唾液腺活動の増強には、被験者の食経験に基づく摂食モチベーションの増強が反映されていると考えられる。よって本結果は、TDDを加えたかつお節の香りとかつおだしの味の調和する組み合わせが、より食べたいという摂食モチベーションを増強し、かつおだしの嗜好性に大きく寄与するものと考えられる。

謝辞

本研究は、多くの方々のご協力のもと、このように博士論文の形にすることが出来ました。紙面ではありますが、ここに謝意を述べさせていただきます。

本研究の完成にあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻、また暖かい励ましを賜り、発表の機会を与えて下さいました京都大学大学院農学研究科教授　伏木亨先生に心より感謝の意を表したいと思います。

また本研究にあたり暖かい励ましをいただきました龍谷大学法学部准教授　山崎英恵先生、京都大学大学院　中野久美子先生に感謝いたします。そして本研究にあたり、その礎を培っていただきました京都大学大学院農学研究科助教　松村成暢博士、同大学院農学研究科卒　岡村摩耶修士、同　向田恵修士、同　大関明日香修士に感謝申し上げます。

また本研究を進めるにあたり、有益なご助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科教授　森憲作先生に厚く御礼申し上げます。

更に、本研究に携わる機会を与えて下さり、また本研究遂行に際して深いご理解を頂きました長谷川香料株式会社相談役名誉会長　林良四郎氏、代表取締役社長　長谷川徳二郎氏、代表取締役副社長　近藤隆彦氏、取締役専務執行役員　南木昂氏、非常勤顧問　石川雅司博士（前相談役最高技術顧問）、非常勤参与　長谷川博氏（前常務執行役員）、非常勤参与　藤田明博士（前常務執行役員）に謹んで御礼申し上げます。

また本研究を遂行するにあたり、ご指導とご助言をいただきました長谷川香料株式会社総合研究所技術研究所第 2 部長　黒林淑子博士、同社総合研究所研究企画室長

天池正康博士、同社総合研究所技術研究所第 4 部長　山本直人氏、同総合研究所技術研究所第 1 部長　渡辺広幸博士、同社総合研究所フレーバー研究所第 5 部長　前田知子氏に深く御礼申し上げます。

また本研究の遂行に際して、共同研究者としてご協力をいただきました長谷川香料株式会社総合研究所フレーバー研究所第 3 部　高橋道長主任研究員、同総合研究所研究企画室 藤木文乃主任技術員、同総合研究所技術研究所第 4 部 椎橋裕子副主任研究員、同松本知奈副主任研究員、同飯泉佳奈副主任研究員、同第 2 部　増田唯主任研究員、同明賀博樹副主任研究員に深く感謝いたします。そして多くの総合研究所の皆様にもご協力いただきました。この場をお借りして深く感謝の意を表します。

また本研究を進めるにあたり、専門料理家として的確なご助言をいただきました菊乃井代表取締役　村田吉弘氏、一子相伝なかむら代表取締役　中村元計氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の推進および本論文をまとめるにあたり、多大なるご協力をいただき、最後まで情熱を持ってご指導、ご助言いただきました長谷川香料株式会社非常勤参与　岩本実博士（前執行役員）、同総合研究所フレーバー研究所第 5 部　原口賢治主任研究員、同網塚貴彦副主任研究員（現京都大学出向中）、同総合研究所技術研究所第 4 部　中村明朗博士に心より感謝の意を表します。

また私的ではありますが、本論文作成をはじめ、これまで仕事が出来る健康体でいられたのは、妻　マキ子がいつも食事と健康に気遣ってくれたからです。また子供たちの激励及び支えがあったからです。ここに記して謝意に代えます。

平成 26 年 11 月

斉藤　司