

チーズおよび牛肉における香気寄与成分である
分岐鎖アルデヒド類の特性に関する研究

稲垣（小川） さつき

2018年1月

目次

第1章 緒言.....	5
1.1 チーズや牛肉を調理した加工食品の多様化と食品香料の役割.....	5
1.1.1 チーズや牛肉を調理した加工食品の多様化.....	5
1.1.2 加工食品原料としての牛（肉，乳）生産の現状と見通し.....	5
1.1.3 食品のおいしさを構成する要素とそこでの食品香料の役割.....	7
1.2 チーズについて.....	9
1.2.1 日本におけるチーズの嗜好性.....	9
1.2.2 チーズの熟成と風味形成.....	12
1.3 牛肉について.....	13
1.3.1 日本における牛肉の嗜好性.....	13
1.3.2 牛肉の調理と風味形成.....	15
1.4 香気分析について.....	16
1.4.1 香気捕集法.....	17
1.4.2 油脂を含む固形食品の香気捕集法.....	19
1.4.3 機器分析法.....	20
1.4.4 分析結果の解析.....	22
1.5 チーズおよび牛肉の香気研究の現状.....	23
1.5.1 チーズの香気研究の現状.....	23
1.5.2 牛肉の香気研究の現状.....	24
1.6 本研究の目的と意義.....	25
第2章 熟成したナチュラルチーズ香気における分岐鎖アルデヒドの特性に関する研究	27

2.1 熟成したゴーダチーズに含まれる新しい香気寄与成分“12-methyltridecanal とその類縁体”の同定	29
2.1.1 実験方法	29
2.1.2 結果および考察	37
2.2 ナチュラルチーズにおける分岐鎖アルデヒド類の香気特性	48
2.2.1 実験方法	48
2.2.2 結果および考察	53
2.3 要約	61
第3章 加熱牛肉の香りと分岐鎖アルデヒドの特性に関する研究	63
3.1 和牛の香気寄与成分の同定および和牛香気における 12-methyltridecanal の役割	65
3.1.1 実験方法	65
3.1.2 結果と考察	68
3.2 分岐鎖アルデヒドの生成量と牛肉調理条件の関係	78
3.2.1 実験方法	79
3.2.2 結果と考察	82
3.3 要約	90
第4章 胡椒の香気と分岐鎖アルデヒドの香気の相互作用	92
4.1 実験方法	94
4.2 結果および考察	99
4.3 要約	106
第5章 総括	107
Summary	113
参考文献	118

本論文で用いた略号

AEDA	Aroma Extract Dilution Analysis
A.O.P.	Appellation d'Origine Protégée
DMS	dimethyl sulfide
ee	enantiomer excess
FD	Flavor Dilution
FID	Flame Ionization Detector
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GC-O	Gas Chromatography-Olfactometry
GCO-H	Gas Chromatography-Olfactometry of Headspace Sample
HDMF	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
HEMF	5-ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanone
HS	Head Space
IR	Infrared Spectroscopy
LOD	Limit of Detection
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OAV	Odor Activity Value
RI	Retention Index
SAFE	Solvent Assisted Flavor Evaporation
SDE	Simultaneous Distillation Extraction
SIDA	Stable Isotope Dilution Analysis

SIM	Selected Ion Monitoring
SPME	Solid Phase Microextraction
TCD	Thermal Conductivity Detector
TPP	Trans-Pacific Partnership
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
TEMPO	2,2,6,6,-tetramethylpiperidine- <i>N</i> -oxide
BzOTEMPO	4-benzoyloxy-2,2,6,6,-tetramethylpiperidine- <i>N</i> -oxide
SMEAH	Sodium Bis(2-methoxyethoxy)aluminum Hydride
THF	tetrahydrofuran
NMP	N-methylpyrrolidone
8-HPETE	8-hydroxyperoxy-5,9,11,14-eicosapentanoic acid
10-HPETE	10-hydroxyperoxy-5,7,11,14-eicosapentanoic acid

第1章 緒言

1.1 チーズや牛肉を調理した加工食品の多様化と食品香料の役割

1.1.1 チーズや牛肉を調理した加工食品の多様化

日本における加工食品のバラエティーは、世界でもまれに見る豊富さであり、チーズや牛肉などの畜産物を調理した加工食品も例外ではない。チーズや牛肉を調理した加工食品には様々な製品があり、煮る、焼く、蒸す、揚げるなどの調理法の違いに加えて、常温流通が可能な缶詰やレトルト食品、あるいは冷凍食品、さらに近年ではチルド流通に対応した食品も増加しており、その製法や流通形態も多彩である。

これらのチーズや牛肉を調理した加工食品に求められる重要な要素のひとつとして、簡単に“おいしく”を実現することがあり、これは調理時間の軽減や製品開発と製造の簡素化を進める上で重要な課題である。

一方、食品の消費動向は、近年、希少価値やブランド化による差別化された高級志向も顕著であり、本格的な熟成チーズの普及やブランド和牛の認知度も急速に増している。このような消費動向の変化は、チーズや牛肉を調理した加工食品についても例外ではなく、高級志向で差別化された様々な製品が開発されている。

この様に、多様化するチーズや牛肉を調理した加工食品の品質を向上する重要な方向性として、簡単に“おいしく”と高級志向の比重が高まり、これらを如何に工業的に両立させるかという課題の解決が望まれている。

1.1.2 加工食品原料としての牛（肉、乳）生産の現状と見通し

牛は、人の食料と競合しない牧草を与えることが可能な点では、世界の食料問題を考えると優れた食糧と言える。しかし、和牛などの良質な牛肉の生産や、乳の産出量や質を改善する目的で、草だけでなく人が食する穀物を飼料として与える場合もあり、

この傾向は日本において顕著である。牛の飼育は、豚や鶏に比べて飼育期間が長く、飼料要求率(1 kgの肉を生産するのに必要な飼料kg)も高くコストがかかるため(**Table 1.1-1**)、一般に牛肉の価格は高価である。さらに、日本における牛(肉、乳)生産は、飼料や資材費用の増加、輸入品との価格競争、さらに後継者不足による廃業など多くの問題を抱えており、牛肉や生乳の生産量は縮小傾向が続いている(**Figure 1.1-1**)。

これらの理由から、日本国内における牛(肉、乳)生産量の飛躍的な増加を安易には望めず、加工食品原料として重要な牛肉や乳製品であるが、将来的に良質な原料を十分に確保することは困難になりつつある。

Table 1.1-1 牛、豚、鶏の飼育期間と飼料要求率

	牛	豚	鶏
飼育期間	20ヵ月以上	6ヵ月	2ヵ月
飼料要求率*	8 kg	3 kg	2 kg

*) 1 kgの肉を生産するのに必要な飼料量

(「最新畜産学」朝倉書店(2004年)¹⁾のデータより作成)

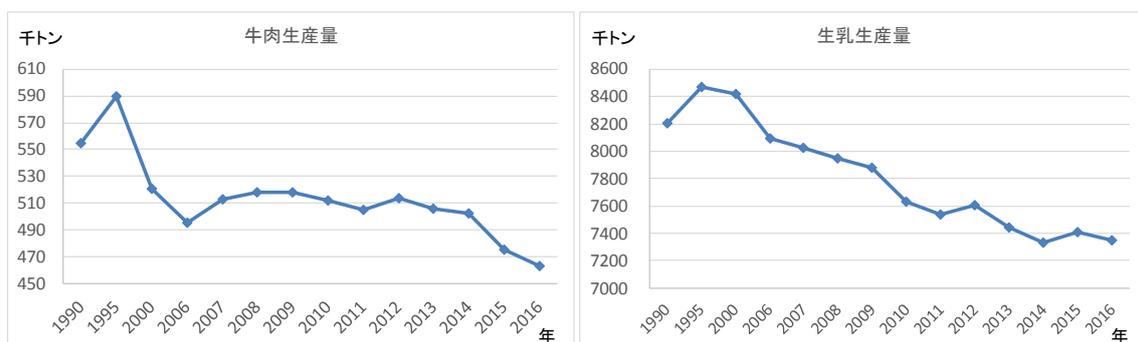


Figure 1.1-1 牛肉と生乳の国内生産量の動向

(農林水産省 食糧需給表より作成)

1.1.3 食品のおいしさを構成する要素とそこでの食品香料の役割

食品のおいしさは、味覚や嗅覚で受容する風味と、触覚、視覚、聴覚で受容する感覚に加え、雰囲気や食習慣など、様々な要因が組み合わさって生じる複合的な感覚である (Figure 1.1-2).

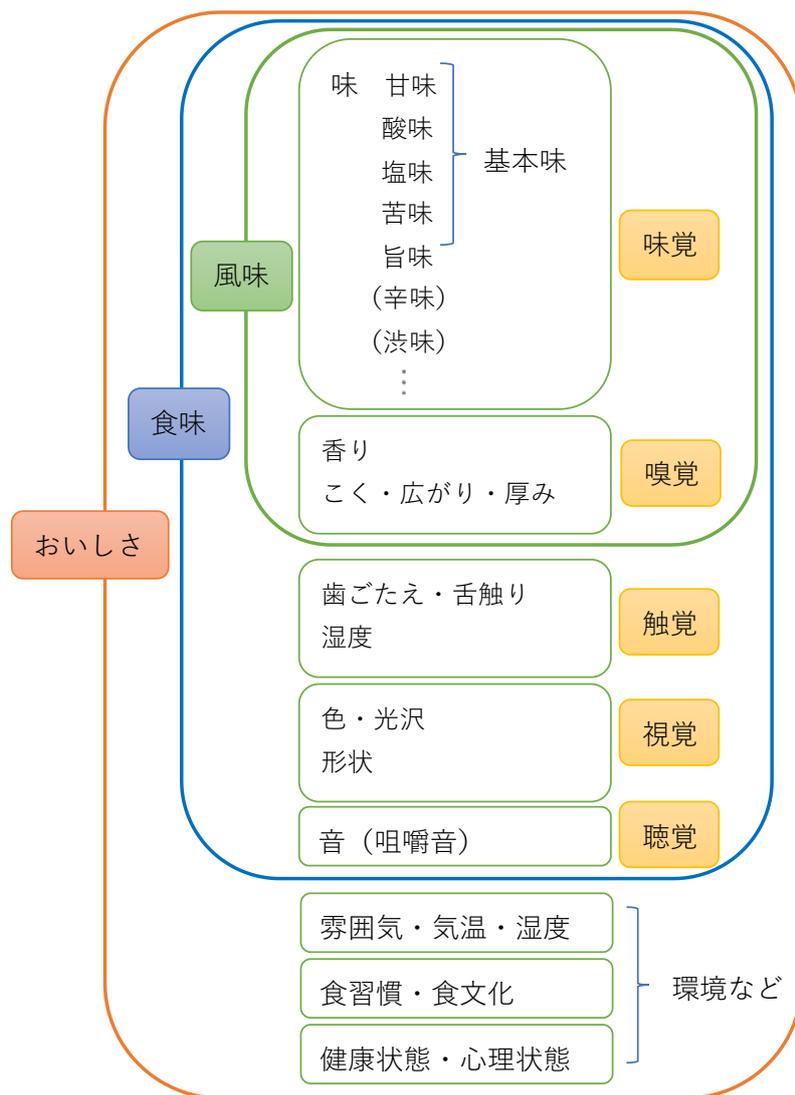


Figure 1.1-2 食物のおいしさを決定する要因

(「味覚・嗅覚」化学同人 (1990年)²⁾より作成)

おいしさに関わる風味成分の研究も盛んに進められており、味覚で受容する呈味成

分として、チーズや牛肉では遊離アミノ酸や様々なペプチド、核酸の重要性が指摘されている。例えば、チーズでは、遊離アミノ酸とジペプチドは甘味や旨味に寄与し、トリペプチドより大きなペプチドがチーズの苦味形成に関わっている³⁾。また、加熱牛肉の分子量1,000~10,000のペプチド画分が、酸味を抑制しまろやかさを増強することが報告されている⁴⁾。一方、近年、嗅覚で受容する香気成分が食品のおいしさに極めて大きな影響を与える事例についての報告が増加しており^{5,6)}、嗜好性の高い香りを食品に賦与し、おいしさを向上させる技術の重要性が高まっている。

食品に香りを賦与する方法のひとつとして、食品香料の使用がある。食品香料は、飲料や菓子、インスタント食品、加工食品など様々な商品に着香する目的で使用されている。食品香料の役割は、対象とする食品が持ちあわせていた本来の香りの補強や、製造工程などで生成したオフフレーバー（好ましくない香り）のマスキング、そして本来持ちあわせていないが嗜好性の高い香りの賦与などがある。例えば、加工食品の製造では保存性を高めるために施される加熱殺菌により変化する、もしくは失われる食品の香りを補強する目的で食品香料が使われることが多い。また、加熱殺菌や保存時に加わる熱の影響によって本来は感じられない香りが生成することもあり、生じる香りが好ましくない（オフフレーバー）場合は、嗜好性が低下し加工食品の品質の低下を引き起こす事もある。そこで、オフフレーバーを感じにくくする（マスキング）ために、食品香料を賦与することも広く行われている。さらに、均質で大量生産が前提となる加工食品は、量の確保が容易でコスト的に有利な安価で品質の劣る原料や代替素材を使用せざるを得ない場合も多く、良質な香りを食品香料として賦与することで、コストを抑えて差別化やおいしさの実現が試みられることも一般的である。このように、食品香料の使用は、加工食品の品質向上や差別化にとって重要な役割を果たしている。

食品香料の原料には、天然物に由来する天然香料と、有機合成によりつくられた合

成香料がある⁷⁾。天然香料は、動植物に含まれている香気成分や、それらを加熱処理や酵素処理して発生した香気成分を、水蒸気蒸留や抽出、圧搾して得たものである。合成香料は、香気成分として有用な化合物を有機合成により作られたものである。一般に天然香料は多量の原料を必要とし、それらは希少な場合も多く高価なものが多い。それゆえに、それらの香気に寄与する成分を解明し、合成香料に置き換える試みも精力的に進められている。しかしながら、複雑で自然な香気である天然香料の全てを合成香料のみで再現することは困難なことも多く、現時点では食品香料の大部分は合成香料と天然香料を目的に合わせて適宜組み合わせる製造することが一般的である。

1.2 チーズについて

1.2.1 日本におけるチーズの嗜好性

チーズには、生乳を原料に製造したナチュラルチーズと、ナチュラルチーズを原料に加工したプロセスチーズがある。一般に、ナチュラルチーズは原料の生乳を乳酸菌やレンネット（凝乳酵素）で凝固させ、水分（ホエー、乳清）の一部を除去した後、熟成させて製造する。ナチュラルチーズの中には熟成させないものもあり、原料や製法の違いで世界には約 1000 種類ものナチュラルチーズがある。大きく分類すると、熟成をさせないフレッシュタイプ、カビをつけて熟成させる白カビタイプと青カビタイプ、山羊の乳から作製するシェブールタイプ、熟成中に表面をワインやシェリー酒などで洗うウォッシュタイプ、熟成によって水分を飛ばして硬くなったハード・セミハードタイプがある。ナチュラルチーズは、直接消費されているほか、プロセスチーズの原料としても使用されている。

プロセスチーズはナチュラルチーズに乳化剤を加え、加熱して溶かしたものを再び成形したものであり、加熱によって酵素活性を失活させているため、酵素反応による成分変化が進むことはなく、保存性に優れるという利点がある。また、プロセスチー

ズは、様々な形態（スライス、ベビー（角型）、ポーション（扇形）など）に加工でき、調理に利用しやすく、気軽にいろいろな味を楽しめるという利点もある。その一方、プロセスチーズの風味の良否は、原料であるナチュラルチーズに依存し、良質な原料を安価、かつ安定的に確保しなければならないという問題がある。

1980年代前半までの日本におけるチーズの消費量はプロセスチーズが主体であったが、1986年以降はナチュラルチーズの消費量がプロセスチーズを上回り、その差は年々拡大傾向にある。さらに、日本人一人あたりのチーズ消費量は、欧米のそれと比べるとまだ少ないものの増加傾向にあり、その増加分の多くはナチュラルチーズであることから、ナチュラルチーズは日本人に身近な食品になりつつある（Table 1.2-1, Figure 1.2-1）。

日本で製造されているナチュラルチーズは、ハード・セミハードタイプであるゴーダチーズとチェダーチーズで全体の 2/3 を占め、プロセスチーズの原料としての使用する他、直接ナチュラルチーズとして消費をされている。中でもゴーダチーズの生産量が一番多く、ゴーダチーズのクセの少ないマイルドな風味が日本人に最も好まれていると言える（Figure 1.2-2）。

Table 1.2-1 国民 1 人あたりのチーズ消費量（2016 年）

国	kg/年
デンマーク	28.1
フランス	27.2
オランダ	21.6
イタリア	21.5
ドイツ	24.7
アメリカ	16.7
日本	2.2

（Canadian Dairy Information Centre“Global cheese consumption”より作成）

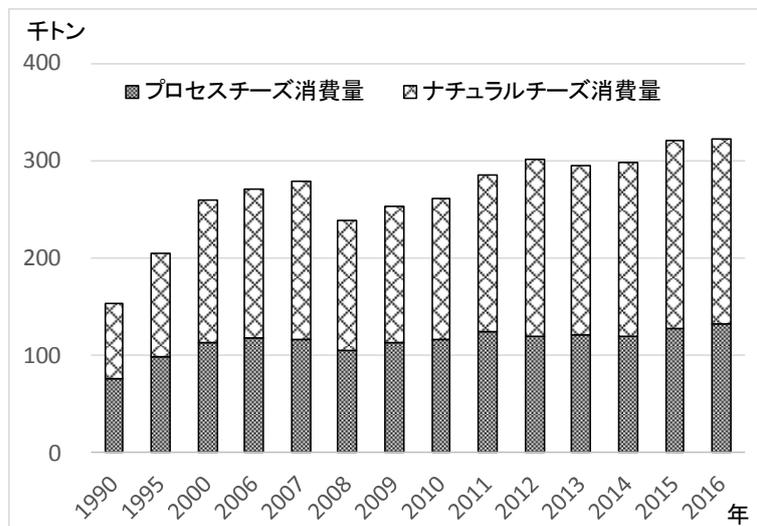


Figure 1.2-1 チーズの消費量の動向

(農林水産省「チーズ需給表」より作成)

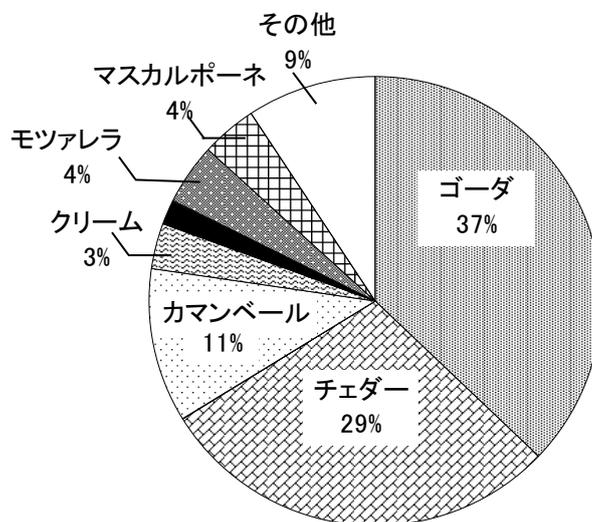


Figure 1.2-2 国産ナチュラルチーズ製造量の種類別割合 (43,216 トン, 2007 年)

(農林水産省 畜産局 牛乳乳製品課, 農畜産業振興事業団調べ

「畜産の情報 国内編」より作成)

ナチュラルチーズは、原料や製法により様々な種類があり、それらの風味もプロセスチーズよりも多彩である。この様なナチュラルチーズ消費量の増加傾向は、日本人のチーズに対する本物志向や高級志向を反映していると考えられ、チーズを調理した加工食品に求められる要素の変化にも深く関与している。

1.2.2 チーズの熟成と風味形成

ハード・セミハードタイプのナチュラルチーズの製造には、風味を向上させるための熟成工程がある。一般に、チーズは低温および高湿度の室内で熟成され、その期間は数週間から1年以上に亘るものもある。チーズの主要成分はたんぱく質と脂質であり、一般に、熟成前のチーズは、たんぱく質（約26%）、脂質（約34%）、水分（約35%）で約95%を占め（残りの約5%はビタミン、ミネラル、糖質）、この段階の風味は乏しいものの、たんぱく質や脂質から熟成により生じる呈味成分や揮発性成分により風味が向上する。すなわち、たんぱく質からは遊離アミノ酸やペプチドなどが生成し、脂質からは有機酸などが生成し、これらが熟成したナチュラルチーズの風味の形成に関与する。チーズの呈味成分として知られる遊離アミノ酸やペプチドの増加は、熟成により強まるチーズの旨味やまろやかさ、あるいは苦味の形成に深く関与する事が報告されている³⁾。一方、熟成により生じるチーズの香気成分は、アミノ酸から生成したアンモニア、アミン、メタンチオール、アルデヒド類、脂肪酸からはケトン、アルコール、ラクトン等がある。さらに、チーズに微量含まれる糖質やクエン酸などの有機酸から生じる乳酸、アセトイン、ジアセチルなども加わり、複雑で芳醇な香気が形成される⁸⁾。

この様に、熟成により形成されるチーズの芳醇な風味にとって、香気も重要な要素でのひとつであり、熟成により形成される香気とそこに関わる成分の特性を把握することは、チーズを調理した加工食品の好ましい風味を制御する技術の開発にとって重

要な課題である。

1.3 牛肉について

1.3.1 日本における牛肉の嗜好性

日本国内で流通する牛肉には国産牛肉と輸入牛肉があり，1990年代前半までは国産牛肉が需給量の約8割を占めていた。しかし，牛肉消費量の増加にともない輸入牛肉のみが増加し，現在では需給量の約6割が輸入牛肉であり，国産牛肉のそれは約4割にまで落ち込んでいる（**Figure 1.3-1**）。Trans-pacific Partnership（TPP，環太平洋パートナーシップ）協定が合意された今日，日本国内における牛肉需給量は，今後さらにこの傾向が強まる可能性がある。

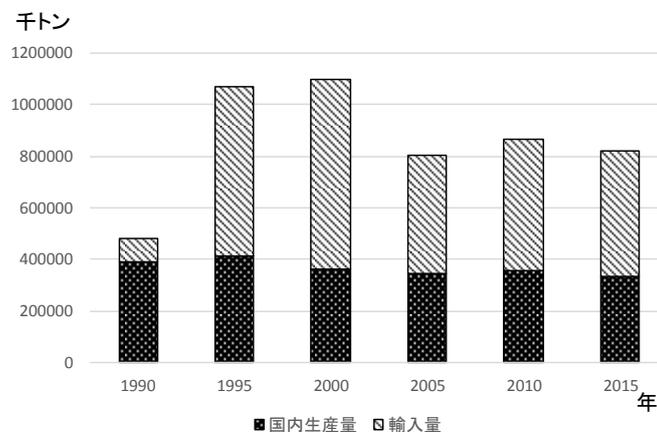


Figure 1.3-1 牛肉需給量

（農林水産省「畜産統計調査」より作成）

一方，日本食肉消費総合センターが2001年に2000世帯に対して実施した牛肉の嗜好調査⁹⁾では，85%が国産牛肉を好むと回答し，輸入牛肉の2%を大きく上回ったことから，日本における国産牛肉の嗜好性が極めて高いことが指摘されている。

国産牛肉には、和牛、乳用牛、交雑種がある。和牛とは血統や生産地などが管理され、それぞれが固有の番号を持つ登録された牛で、黒毛和種、褐色和種、無角和種、日本短角種の4種類だけが認められている。中でも95%が黒毛和種であり、赤身に脂肪が多く入り込んだ「霜降り」と呼ばれる脂肪交雑のため柔らかさと特有の風味を持つ肉が特徴である。乳用種とは、主にホルスタイン種であり、去勢雄が食肉用となる。交雑種は、牛肉の食感を改善するために雄の和牛と雌のホルスタイン種などを掛け合わせた牛のことである。

さらに、別の牛肉の嗜好調査¹⁰⁾では、和牛、和牛以外の国産牛、輸入牛を食べる理由について、**Figure 1.3-2**の結果を報告している。

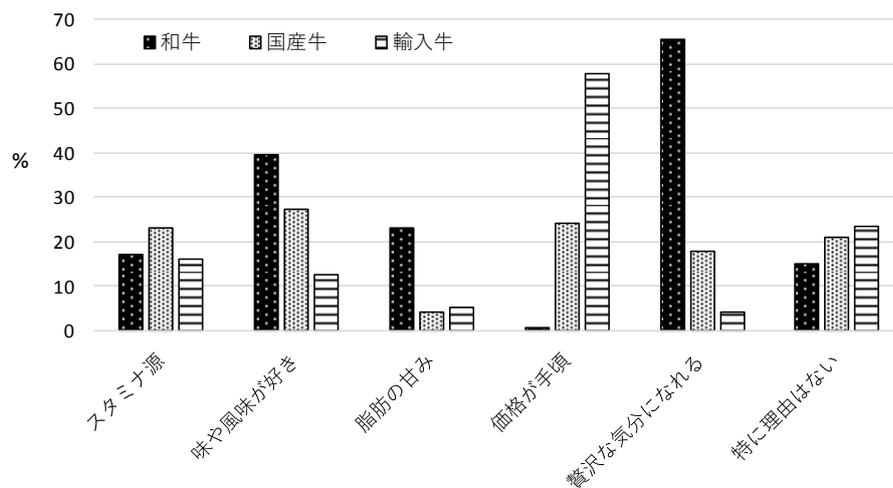


Figure 1.3-2 牛肉に対するイメージ

(神奈川県農業技術センター畜産技術所 「25～35歳の牛肉に対する嗜好、
購買行動に関する実態調査」平成23年度¹⁰⁾より作成)

すなわち和牛は「贅沢な気分になれる」を65%の人が選び(複数回答)、次いで「味や風味が好き」40%、「脂肪の甘み」23%であった。国産牛では「味や風味が好き」40%、「価格が手頃」24%、「スタミナ源」23%であった。輸入牛では「価格が手頃」58%を多

くの人を選び、さらに「特に理由はない」23%が次に選ばれる割合が高かった。

この結果から、輸入牛肉は価格の安さが重視され、風味に対する期待が低いのに対して、国産牛肉は風味の良さ、すなわち“おいしさ”が重視される傾向が強く、とりわけこの傾向は和牛において顕著である。しかし、一般に和牛は価格が高く、その需要は高まっているものの供給量も減少傾向である（Figure 1.3-3）。それゆえに、おいしさで好まれる和牛であるが、価格面、供給面のいずれも需要に応えることは困難な状況である。

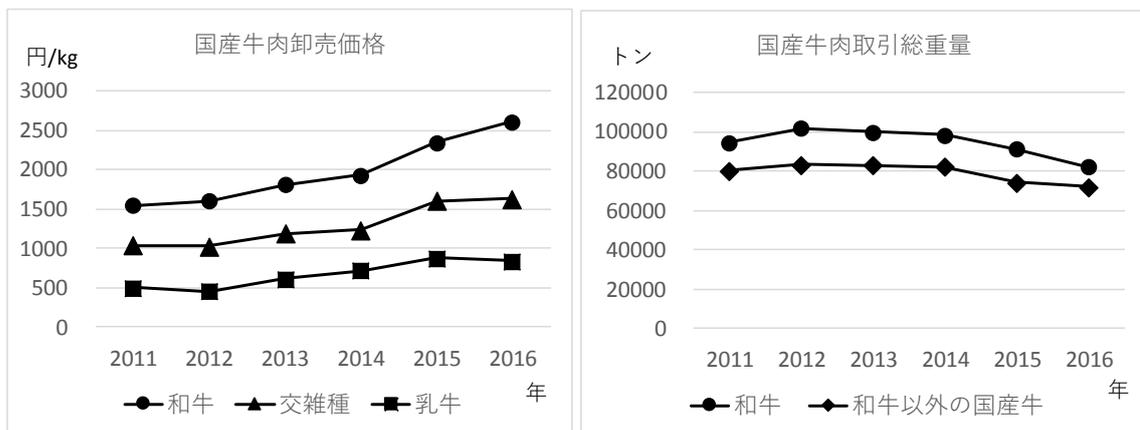


Figure 1.3-3 国産牛肉の卸売価格と取引量の動向

(農林水産省「畜産物流通統計」より作成)

1.3.2 牛肉の調理と風味形成

生の牛肉は風味に乏しく、香りも弱く血なまぐさい獣臭があるのみである。一般に、牛肉は加熱調理することにより、食欲をそそる美味しさを感じさせる風味が形成される。加熱調理により牛肉の呈味成分は、アミノ酸や5'-イノシン酸よりもペプチドの増加が著しく、加熱調理で強まった“まろやかさ”に關与する可能性が指摘されている¹⁾。一方、加熱調理により形成される香気成分の多くは、不揮発性の前駆体より生じると考えられている。加熱調理により生じる香気成分は、牛肉の種類や質、調理方法（煮

る、焼く、蒸す、揚げるなど)、加熱温度や時間などの条件により生じる成分やそれらのバランスが異なり、これらの組み合わせにより、それぞれの料理に特有の香りが形成されると考えられている。

牛肉、豚肉、鶏肉の風味を有するスープの識別試験では、鼻孔を閉じるとそれぞれの肉の種類を識別することができなかったのに対し、鼻孔を開放するとそれぞれの肉の識別率が大きく上昇したことから、牛肉の風味にとって香気成分は呈味成分よりも極めて重要な役割を果たす可能性が指摘されている¹¹⁾。それゆえに、牛肉の加熱調理により形成される食欲をそそる美味しさを感じさせる風味にとって香りは重要であり、調理条件による香気成分の形成やその特性を理解することは、加工食品の好ましい風味を制御する技術の開発にとって重要な課題である。

さらに、牛肉料理をおいしく食すうえで、香辛料や調味料は重要な役割を果たしていると言われている。例えば、牛肉料理では調理法や材料の質の違いにより、好ましい香気だけでなく特有の臭みを生じる場合がある。古くから香辛料や調味料は、このような牛肉特有の臭みを緩和し、おいしく食する調理技術として利用されている。とりわけ胡椒は、牛肉料理に好まれて使用される香辛料のひとつであり、その特有の香気は牛肉の臭みと良く調和し、牛肉料理の風味を良くする効果があると言われている。

1.4 香気分析について

目的とする食品の香りを再現する食品香料を作製するには、その食品の香りを構成する香気成分を詳細に把握することが有用である。しかしながら、食品は多種多様な成分の混合物から構成されており、香気成分はその中の極一部に過ぎない。さらに、香気成分は極めて微量かつ複雑な組成のうえ、容易に変化する成分も多く、その組成や含有量を明らかにするための様々な方法が提案、応用されてきた。これはチーズや牛肉についても例外ではなく、研究の目的に応じて様々な方法による香気分析が行わ

れてきた。それらの方法を香気捕集法，油脂を含む固形食品の香気捕集法，機器分析法，分析結果の解析に分けて特徴を述べる。

1.4.1 香気捕集法

食品の香気は単一成分から成り立っていることはなく，複数の香気成分がそれぞれの濃度で存在することで，その食品の香りを形成している。一般に，食品の香気分量は極めて微量であり，パーセント (%) ～ppt (一兆分の一)，あるいはそれ未満のことが多い。そのため，香気成分を解明するためには，香気成分を取り出して濃縮する必要がある。香気成分の捕集法は，その目的に合わせて様々な方法が開発されてきた。これは，香気成分の物理的，化学的性質が幅広いという点に起因する。すなわち，香気成分は幅広い沸点を有する物質や，反応性の異なる様々な官能基を持つ化合物から成り立つという特徴がある。従って，同じ食品試料であっても，香気捕集法が異なると得られる結果が異なるため，香気分析における香気捕集方法は分析の目的により選択されている。

ヘッドスペース (HS) 法は，気相に漂う香気を捕集する方法である。Static-HS 法は密閉容器に食品を入れ，食品より気相に移行した香気成分をガスタイトシリンジで採取し，そのまま GC へ導入する方法である。この方法は，特別な装置を必要としないうえに香気成分の損失も少なく再現性に優れる利点があるものの，一般に気相に移行する香気分量は少ないため，GC 分析で十分な感度が得られないという問題がある。Dynamic-HS 法は食品より気相に移行した香気成分を連続的に多孔性の吸着剤に捕集する方法であり，捕集時間を延ばすことなどにより，GC 分析における感度は Static-HS 法と比べて大幅に向上することが可能である。しかし，選択する吸着剤の種類により香気成分の吸着特性が異なる点，実験に特殊な設備を必要とし，それらの操作も煩雑なため再現性を得にくいという欠点がある。Solid Phase Micro Extraction (SPME) 法

は、シリンジニードル先端部のファイバー表面にコーティングした抽出相（固相）に、気相の香気成分を濃縮する方法であり、極めて簡便な操作で再現性良く、かつ高感度でGC分析することが可能である。しかし、選択する抽出相（固相）の種類により香気成分との親和性が異なるうえ、捕集した香気の質を確認することができないなど、香気分析を実施するうえでの問題点も多い。

さらに、いずれのHS法も捕集される香気成分は、食品から気相に移行した揮発性の高い極一部の成分のみであるため、食品に含まれる様々な香気成分を網羅することが困難である。

ポーラスポリマービーズを充填したカラムのよる香気濃縮法（樹脂吸着法）は、カラムに香気成分を含む水溶液を流して香気成分を吸着させ、吸着した香気成分を溶剤で回収する方法であり、飲料などに含まれる香気成分を捕集するのに優れた方法である¹²⁾。樹脂吸着法は、加熱することなく香気成分捕集することができる利点があるものの、固体や油脂を多く含むサンプルには適用できないなど、その適用範囲には限界がある。

溶剤抽出法は、食品に含まれる香気成分を溶剤にて抽出する方法であり、簡便な操作で食品に含まれる香気成分を網羅的に捕集できるうえに、加熱をとまなわないため、香気成分の変化が少ないという利点がある。さらに、固体や油脂を多く含む食品の香気成分の捕集も可能であり、その利用範囲は幅広く多岐に亘っている。しかし、微量の香気を濃縮する場合、揮発性の高い低沸点の香気成分の損失を抑えるために、沸点の低い溶剤を用いる必要があり、使用できる溶剤の種類には限界がある。また、様々な官能基を持つ香気成分の極性は多様であり、各々の抽出効率も異なるため、抽出溶剤の選択も重要である。さらに、溶剤抽出法では、油脂や色素などの不揮発性成分も香気成分とともに抽出されるため、これらが微量の香気成分の濃縮を困難にする場合も多く、以降のGC分析でも支障となる。そのため、溶剤抽出の利点を生かしつつ、蒸

留法など他の香気捕集法と組みあわせて利用されることが多い。

香気捕集に使われる蒸留法には、水蒸気蒸留法、連続蒸留抽出法（Simultaneous Distillation Extraction, SDE）、減圧連続蒸留抽出法、Solvent Assisted Flavor Evaporation（SAFE）法などがある。水蒸気蒸留法は水蒸気とともに高沸点化合物も留出できる点で優れているが、検体に 100°C 近い温度がかかるため、本来は含まれない香気成分が生じる場合もある。連続蒸留抽出（SDE）法は Likens-Nickerson¹³⁾の抽出装置で水蒸気蒸留と溶剤抽出を組み合わせた方法で、簡便に回収率も良く幅広く香気成分を捕集できる利点があるため、香気分析に多用されてきた。しかし、水蒸気蒸留法と同様の問題があるため、近年の香気分析における利用は限定されている。減圧 SDE 法は、減圧条件下 100°C より低い温度で香気回収ができるため、SDE の問題点は緩和されているが、沸点の高い溶剤を使用せざるを得ず、濃縮操作時の低沸点成分の損失が著しくその利用範囲は限定される。Engel ら¹⁴⁾によって開発された SAFE 法は、高真空下でわずかに加熱をすることで溶剤とともに香気成分を蒸留し、不揮発性成分から分離する手法である。保温された流路をコンパクトに収めたガラス器具を用いるこの方法は、従来の高真空下での蒸留法に比べて高沸点成分の回収率が向上し、従来困難であった油脂を多量に食品から網羅的に香気成分を捕集することも可能となった。現在、その利用範囲は広範囲に亘っており、様々な食品の香気捕集に活用されている。

1.4.2 油脂を含む固形食品の香気捕集法

牛肉やチーズのような油脂を多量に含む固形食品から、香気を捕集することは、油脂の少ない食品よりも更に困難である。これは、液体と違って対象とする食品の成分や性状が不均一であることや、香気成分と油脂の親和性が高いため、香気成分のみを選択的に捕集することが難しいためである。油脂を多く含む固形食品から水蒸気蒸留抽出（SDE）法にて香気成分を捕集する方法が報告されている¹⁵⁾。この方法は、食品

に 100℃近い温度がかかるため、本来は含まれない香気成分が生じる場合もあり、特に油脂を多く含む検体では重大な問題となる。また、ヘッドスペースガスに含まれる香気成分を捕集し、加熱脱着（パージアンドトラップ法）を行う方法も報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。この方法は、気相に漂う香りをそのまま捕集できる利点があるものの、牛肉やチーズなどの油脂を多く含む固形食品に含まれる香気成分を網羅的に捕集することは困難である。チーズや牛肉からの香気を捕集する方法として、細かく（切る、あるいは挽く）した食品から、溶剤抽出によって香気を油脂とともに抽出後、その抽出液を高真空下で蒸留する方法が開発されている^{16,20-26)}。チーズや牛肉の溶剤抽出では、抽出効率の向上が重要であり、溶剤との接触面積を増やし、固体内部への溶剤浸透を容易にするために、食品は細かいほうが望ましい。蒸留では回収効率の向上が重要であり、1999年以降では、Solvent Assisted Flavor Evaporation（SAFE）法が応用され、蒸留における回収率の問題は改善されている²⁷⁻³⁰⁾。

このように、油脂を多く含む固形食品の香気の捕集は、元の香りを再現した香気の抽出と、香気成分と油脂の分離、という二段階が必要であり、それぞれの段階の前後で香りの質が変わらない方法を用いることが課題である。

1.4.3 機器分析法

食品より抽出した香気濃縮物には、多数の香気成分が含まれるため、それらを同定するために、個々の成分に分離する必要がある。香気成分は揮発性成分であるため、気体を分析対象とするガスクロマトグラフィー（Gas Chromatography, GC）は、香気分析に多用されている。GCに装着した高分解能キャピラリーカラムにより、沸点や極性の違いを利用して分離した香気成分は、様々な検出器を用いて測定する。香気分析で多用される質量分析計（Mass Spectrometry, MS）は、各成分のマスペクトルを得ることができ、このマスペクトルは各成分に固有のパターンを有しているため、予め

標品のマススペクトルを測定しておくことで、実測スペクトルとの一致から成分を同定することも可能である。さらに、GC で分離した成分が検出される保持時間から換算した保持指標も各成分に固有の値である。様々な保持指標が提案されているが、鎖状炭化水素を用いる Kovats Index³¹⁾が一般的である。Kovats Index はカラムの液相の種類が同じであれば化合物ごとにほぼ同じ値をとり、温度条件やカラムの長さに影響されないため、化合物を特定するのに有用である。この様に GC-MS は、一度の測定で香気成分のマススペクトルと Kovats Index という 2 つの情報を得ることができるため、香気成分の同定に有用な分析手法である。さらに、GC-MS で得られるイオンクロマトグラムから算出されるピーク面積値を用いて、香気成分を定量することも可能である。

香気成分の定量法あるいは半定量法として、標準添加法や内部標準法が広く活用されている。標準添加法は、既知濃度の定量対象成分を添加した際に増加するピーク面積値から、食品に含有していた成分量を算出する方法である。この定量法は、比較的正確に定量値を求めることができるが、数十あるいは数百種類の香気成分から構成されることが多い食品の香気分析に適用することは困難である。内部標準法は、食品中に存在しない既知量の内部標準物質を添加し、内部標準物質と定量したい成分のピーク面積値の比から各成分を定量する方法である。内部標準法では、各香気成分の検出器に対する応答や香気捕集での回収率を内部標準物質と同じと仮定して定量値を算出する場合と補正係数を用いて定量値を算出する場合がある。前者は正確な含有量が得にくいという欠点があるものの、多くの食品に含まれる多数の香気成分の定量値を簡便に比較できる利点がある。

より正確な定量値を求める方法として、安定同位体 (²H や ¹³C) でラベル化をした目的成分を内部標準物質として用いる Stable Isotope Dilution Analysis (SIDA) が開発された^{32,33)}。これは測定対象に選択した香気成分の安定同位体でラベルした既知濃度の標品を分析対象の食品に予め添加した後、香気捕集、機器分析する手法である。安定

同位体でラベルをした標品は、測定対象の香気成分と物性が同じであるため、香気捕集時の抽出効率が同じであり、そこでの誤差を含まないという利点がある。さらに GC での検出器として MS を使用することで、安定同位体でラベルした標品と測定対象の香気成分は、分子量の違いを利用して容易に識別することが可能である。この様に SIDA は画期的な定量方法であるが、一般に定量する成分の安定同位体の入手は困難なため、その利用範囲は限定される。

1.4.4 分析結果の解析

GC-MS は多数の香気成分を比較的簡便に定性・定量することが可能である。しかし、香気成分の閾値はそれぞれ異なるため、香気成分の定量値と各食品における寄与度は必ずしも一致しない。食品における寄与度を見積もる方法として、各成分の定量値をそれぞれの閾値で割った値 (Odor Activity Value : OAV) が提案されている³⁴⁾。OAV が ≥ 1 であれば、その香気成分は食品に閾値以上含まれ、香気へ寄与していると判断し、OAV が高い香気成分ほど、食品への寄与度が高いと判断される。これまでに、食品から 10,000 成分が香気として同定されているが、OAV ≥ 1 となる成分は、そのうちの 3% 程度であると予想されている³⁵⁾。しかし、この手法は、各香気成分の定量値と閾値を必要とするため、閾値が不明な成分には適用することが困難である。さらに、含有量が少なく検出できない微量の重要成分を全く考慮できないという問題がある。

食品に対する寄与度を定量的に表す方法として Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) が開発された³⁶⁾。AEDA は GC で分離した香気成分を鼻で嗅いで検出する GC-Olfactometry (GC-O) の一手法であり、溶剤などで段階的に希釈した分析試料 (香気濃縮物など) を GC-O でおおいが感じ取れなくなるまで繰り返し測定し、においを感取れなくなる直前の希釈倍率を Flavor Dilution (FD) -ファクターとして求める手法である。この手法は OAV の問題点が考慮された方法であり、GC で検出されないよ

うな低濃度の成分であっても香気への寄与度を測定することができ、その寄与度の算出に閾値を必要としない。また、香気濃縮物を調製する条件を一定にすれば複数の試料を比較することも可能である³³⁾。これらは GC による機器分析と官能評価を組み合わせた方法であり、香気そのものに対する各成分の寄与度を比較的容易に判定することが可能である。そのため、香気に寄与する成分の探索、あるいは各成分の寄与度を複数の試料の間で比較するための実用的な手法と言える。さらに、様々な食品から新たな微量の香気寄与成分が数多く見出されていることから、研究例の多いチーズや牛肉であっても香気寄与成分がまだ見出されていない可能性もある。

1.5 チーズおよび牛肉の香気研究の現状

1.5.1 チーズの香気研究の現状

ナチュラルチーズの香気成分については、これまでに多くの研究がされており、600種類以上の香気成分が見出されている³⁷⁾。一方、AEDA などの食品における寄与度を考慮した手法による様々な種類のチーズの香気分析で検出された成分に着目すると、アルコール類 16 種、アルデヒド類 21 種、ケトン類 18 種、エステル類 15 種、ラクトン類 7 種、フラン類 7 種、含窒素および含硫化合物類 21 種、テルペン類とその他 6 種、酸類 24 種の 135 成分が香気寄与成分として報告されている³⁸⁾。これまでに 600 種類以上の香気成分がチーズから報告されていることから、香気寄与成分はその中の 1/5 程度である。

ナチュラルチーズには、原料や製法、産地の違いで多くの種類が存在する。それらの中で代表的なナチュラルチーズの多くは特徴香が明らかにされている。例えば、世界で最も製造、および消費されているチェダーチーズは多くの研究が報告されており、butyric acid や acetic acid など酸や methional, (Z)-6-dodecen-4-olide, 2-acetyl-2-thiazoline などが香気に高い寄与度を示すことが報告されている^{16,23,24,27,28,39)}。Preininger らはエメ

ンターチーズ寄与成分として methional, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF), 5-ethyl-4-hydroxy-2-methyl-3(2*H*)-furanone (HEMF) を見出し, 2 つの furanone 類がエメンタールの甘さに寄与していると報告している²⁵⁾. Qian らは, パルミジャーノレッジャーノの香気寄与成分として acetic acid, octanoic acid などの酸や ethyl butyrate などを見出し, pyrazine 類がこのチーズの香りを特徴づけていると報告している¹⁷⁻¹⁹⁾.

さらに, 熟成中に起こる香気変化やそこに関与する成分についても多くの研究がある^{8,39)}. 例えば, たんぱく質の分解により生じたアミノ酸は, さらに分解して揮発性の methanethiol, methional, dimethyl sulfide (DMS) などの含硫化合物, 3-methylbutanal などアルデヒド類, isovaleric acid などの酸類を形成することが知られている. 一方, 脂質の加水分解により生じた短鎖で揮発性の高い butyric acid, hexanoic acid などは熟成により顕著に増加する香気成分である. これらの短鎖や長鎖の脂肪酸類がさらに反応し, ethyl butyrate などのエステル類, 2-undecanone などメチルケトン類, 4-decanolide などのラクトン類, 1-octen-3-ol や 1-octen-3-one が生成し, 熟成したチーズの風味を構成する重要な香気成分を形成することも報告されている.

この様に様々なナチュラルチーズの香気成分やそれらの熟成中の成分変化は多くの研究例がある. しかし, その多くは海外の研究例であり, 日本で嗜好性の高いナチュラルチーズや熟成中の香気寄与成分の変化を詳細に研究した例は見当たらず, 香気寄与成分の寄与度と熟成期間の関係には不明な点が残されている.

1.5.2 牛肉の香気研究の現状

牛肉の香気成分として 800 種類以上の香気成分が見出されており³⁷⁾, 牛肉の加熱により生成する香気寄与成分の研究例は極めて多い⁴⁰⁻⁴²⁾. Cerny らは, ローストした牛肉の香気寄与成分として, 2-acetyl-2-thiazoline, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF), 2-methoxyphenol, 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine を

検出し、これらの成分がロースト香や甘さ、焼いた香りを形成していることを明らかにした^{20,21)}。Specht らは、揚げた牛肉の香気寄与成分として、香ばしく好ましい香りに寄与している成分として 2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2-propyl-3-methylpyrazine を報告している⁴³⁾。

一方、Guth らは、煮込んだ牛肉から 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF) と 12-methyltridecanal を重要な香気寄与成分として見出した²²⁾。単独で獣脂様 (tallowy)、牛肉様 (beef-like) の香調を呈する 12-methyltridecanal は、他の肉種 (鹿, 豚, 鶏) からはほとんど検出されないことから、牛肉の重要な特徴香気成分と考えられている。一方、日本人に嗜好性の高い和牛の香気研究は比較的少ないが、これまでに幾つかの研究例がある。これまでの研究から、和牛のおいしさを認識するためには香気が必要であり、その香気は特定の条件 (肉の熟成条件, 調理での温度条件など) で形成されることが明らかになった^{15,40,44-46)}。しかし、その特徴を有する香気成分は不明な部分が多く、未だそのおいしさに関与する香気成分の特定には至っていない。

1.6 本研究の目的と意義

上述のようにチーズや牛肉を調理した加工食品は、消費動向の影響を受けて急激に多様化が進んでおり、簡単に“おいしく”と高級志向の両立が求められている。これらの課題の解決において、チーズや牛肉の香気は製品の価値を左右する重要な要因であり、嗜好性が高く、かつ高級志向を満たす香気を賦与することは製品の品質向上のための最も重要な要素である。嗜好性が高く高級志向を満たす香気を賦与した製品を開発するためには、希少価値やブランド化により差別化された高級な原料の有する特徴的な香気をより効果的に表現する方法の開発が必要であり、その裏づけとなる高級な原料の香気寄与成分とそれらの特性を明らかにする必要がある。しかし、香気寄与成分とそれらの特性には不明な部分が多いため、チーズや牛肉を調理した加工食品に求

められる，嗜好性が高く，かつ高級志向を満たす香気の賦与が効果的に行われている
とは言い難い。

そこで，本研究では，より香気の優れたチーズや牛肉を調理した加工食品を作り出すための基礎的な知見を得るために，希少価値やブランド化により差別化された高級な原料の代表として，熟成されたチーズや和牛の香気寄与成分を探索し，それらから見出した特徴的な香気成分である分岐鎖アルデヒド類について，香気特性と調理・加工特性の解明を試みた。

本論文は5章からなっている。2章では希少価値の高い高級食材である熟成チーズに着目し，まず熟成度の異なるゴーダチーズの香気成分を比較し，熟成による香気変化に関する成分の解明を試みた。次いで，熟成により増加することを確認した分岐鎖アルデヒド類について，様々な種類のナチュラルチーズを用いて，ナチュラルチーズにおけるその普遍性を検討した。

3章では嗜好性が高い高級食材である和牛に着目した。和牛にはおいしさに重要な特有の香りがあり，その香りが生成する条件は解明されているものの，香気寄与成分については不明な点が多い。そこで，和牛と輸入牛の香気を比較することで，和牛の特徴香の解明を試みた。さらに，Guthら²²⁾によって熟した牛肉より見出され，単独で牛肉様の香気を持つ12-methyltridecanalについて，和牛香気における役割の解明を試みた。

4章では，牛肉料理に用いられる身近な香辛料である胡椒をとりあげ，胡椒が牛肉の風味に及ぼす影響を，それぞれの香気に含まれるキー成分同士に着目して実験を行った。まず種類の異なる胡椒（完熟，黒，赤）を用いて特徴香気成分を解明した。次いで，その特徴成分と，牛肉の特徴香成分である12-methyltridecanalの相互作用を，香りの増強，抑制，修飾の観点で検討した。

5章では2章，3章および4章で得られた結果を総括した。

第2章 熟成したナチュラルチーズ香气における分岐鎖アルデヒドの特性に関する研究

近年の日本におけるチーズの消費量は、ナチュラルチーズがプロセスチーズを上回っており、ナチュラルチーズは日本人に身近な食品になりつつある。ナチュラルチーズは原料や製法により様々な種類があり、それらの風味も多彩である。ハード・セミハードタイプに分類されるゴーダチーズとチェダーチーズは、日本におけるナチュラルチーズの主体であり、その中でもクセの少ないマイルドな風味を有するゴーダチーズは、最も生産量が多く日本人に最も親しまれているナチュラルチーズと言える (Figure 1.2-2)。

ゴーダチーズは、熟成工程を経て製造される代表的なチーズである。熟成はゴーダチーズの風味形成にとって極めて重要な製造工程であり、芳醇な味や香りなど特有の風味が形成され、その品質は向上する。一般に、ゴーダチーズの熟成期間は数週間から1年以上に亘るものもあり、適切な条件で長期熟成された風味豊かなゴーダチーズは希少価値の高い高級食材である。

ナチュラルチーズの風味を形成する香气成分については、多くの研究があり、これまでに AEDA など GC-O の手法を用いて様々なチーズの香气寄与成分が検討され、多くの重要な成分が明らかになっている^{16-19,23-25,27,28,38,39)}。しかし、ゴーダチーズに関する研究例は少なく、呈味の寄与成分についての報告⁴⁷⁻⁴⁹⁾はあるが、風味を形成するもう一つの重要な要素である香气寄与成分は不明である。さらに、チーズの熟成によって生成する香气成分については、酸類やケトン類、アルデヒド類、エステル類、ラクトン類、アルコール類、含硫黄化合物、フラン類、ピラジン類など多くの成分が報告されている^{8,39,50)}。しかし、熟成によるチーズ香气成分の変化を GC-O で詳細に検討した例はほとんどなく、ゴーダチーズもその例外ではない。

本章では、熟成したゴータチーズの香気に寄与する成分の探索に AEDA の手法を用い、そこで明らかとなったユニークな香調を有する分岐鎖アルデヒド類の“12-methyltridecanal とその類縁体”について、ナチュラルチーズの熟成度と含有量の関係、分岐鎖アルデヒド類の構造と閾値の関係、さらに前駆体について検討した。

2.1 熟成したゴーダチーズに含まれる新しい香気寄与成分“12-methyltridecanal とその類縁体”の同定

先述したように、ゴーダチーズは熟成中に特有の香気が形成され風味が変化するがそこに寄与する香気成分についてはわかっていない。本節では、熟成度の異なるゴーダチーズを用いて AEDA 法により、熟成による香気変化に関与する成分を解明するとともに、その過程で見出した分岐鎖アルデヒド類“12-methyltridecanal とその類縁体”について、ゴーダチーズにおける風味特性について検討した。

2.1.1 実験方法

2.1.1.1 チーズ試料

3種類の熟成段階の異なるゴーダタイプチーズを使用した。室温 10℃、湿度 80～90%の熟成庫で短期（4-5 カ月）熟成、中期（12-13 カ月）熟成、長期（22-23 カ月）熟成したチーズを有限会社富田ファームより購入した。

2.1.1.2 試薬

ethyl butyrate, ethyl isovalerate, ethyl valerate, ethyl hexanoate, diethyl trisulfide, acetic acid, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, methional, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, butyric acid, isovaleric acid, pentanoic acid, hexanoic acid, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2*H*)-furanone (HDMF), octanoic acid, ethyl cinnamate, 4-decanolide, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone, 5-decanolide, decanoic acid, 4-dodecanolide, dodecanoic acid, methyl nonanoate, undecanal, dodecanal, tridecanal, tetradecanal は東京化成株式会社より購入した。pentadecanal, hexadecanal はナカライテスク株式会社より購入した。2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, methyl 2-methyl-3-furyl disulfide, 4-hydroxy-

2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2*H*)-furanone (HEMF), phenylacetic acid, 3-phenylpropionic acid はシグマアルドリッチジャパンより購入した。(Z)-6-dodecen-4-olide は R.C.Treatt より購入した。

3-methyl-2,4-nonanedione⁵¹⁾と 8-methyldecanal⁵²⁾は文献記載の方法で合成した。合成した標品はマススペクトルと RI⁵³⁾により同定した。

3-methyl-2,4-nonanedione. MS/EI m/z (%): 170 (4, M+), 152 (1), 114 (5), 99 (66), 72 (16), 71 (30), 57 (8), 55 (11), 43 (100); RI_{DB-WAX}=1728, RI_{DB-1}=1217.

8-methyldecanal. MS/EI m/z (%): 123 (52), 97 (35), 95 (47), 81 (87), 70 (76), 67 (49), 57 (100), 55 (90), 41 (80); RI_{DB-1}=1258.

10-methylundecanal, 11-methyldodecanal, 12-methyltridecanal, 13-methyltetradecanal, 14-methylpentadecanal, 10-methyldodecanal, および 12-methyltetradecanal, は、文献記載⁵⁴⁾の方法を参考に合成した。ただし、最終工程の酸化反応は 4-benzoyloxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxide (BzOTEMPO) の代わりに、2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxide (TEMPO) を用いて合成した。すなわち、対応する ω-ブロモアルカン酸エチルを原料に用い、グリニャール試薬とカップリングさせてイソアルカン酸エチルまたはアンテイソアルカン酸エチルを得た後、水素化ビス(2-メトキシエトキシ)アルミニウムナトリウムによるアルコール体へ還元、次いで TEMPO 酸化により目的とするアルデヒドを合成した (Figure 2.1-1, Figure 2.1-2)。合成した標品はマススペクトルと核磁気共鳴スペクトル (NMR) で同定した。

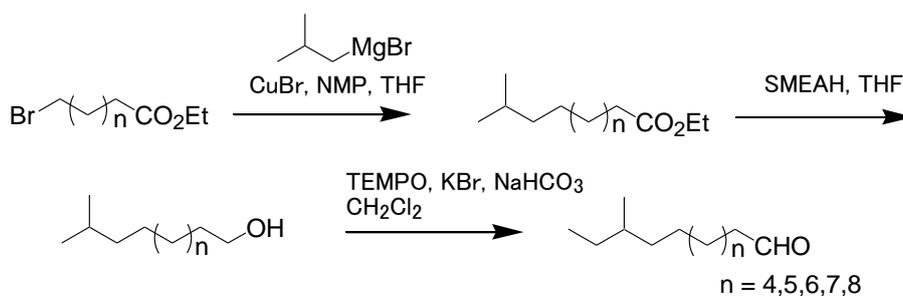


Figure 2.1-1 Synthesis of *iso*-methyl branched aldehydes.

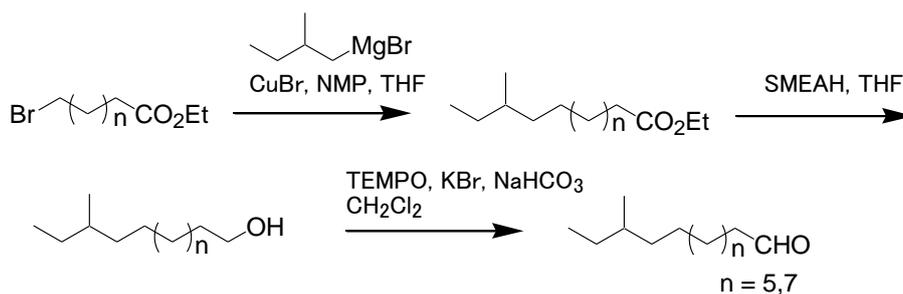


Figure 2.1-2 Synthesis of *anteiso*-methyl branched aldehydes.

10-methylundecanal. MS/EI m/z (%): 184 (0.1, M+), 95 (48), 82 (78), 81 (48), 69 (58), 57 (100), 56 (59), 55 (63), 43 (79), 41 (68); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 22.09, 22.63 \times 2, 27.35, 27.95, 29.17, 29.34, 29.44, 29.82, 39.01, 43.91, 202.93; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (6H, d, $J=6.8$ Hz), 1.08-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (10H, m), 1.44-1.54 (1H, m), 1.56-1.66 (2H, m), 2.40 (2H, dt, $J=7.4$ Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, $J=2.0$ Hz).

11-methyldodecanal. MS/EI m/z (%): 198 (0.1, M+), 96 (51), 95 (51), 82 (78), 69 (60), 57 (100), 56 (54), 55 (63), 43 (78), 41 (65); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 22.09, 22.64 \times 2, 27.37, 27.96, 29.16, 29.35, 29.42, 29.56, 29.88, 39.03, 43.91, 202.95; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (6H, d, $J=6.8$ Hz), 1.08-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (12H, m), 1.44-1.54 (1H, m), 1.56-1.66 (2H, m), 2.40 (2H, dt, $J=7.4$ Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, $J=2.0$ Hz).

12-methyltridecanal. MS/EI m/z (%): 212 (0.2, M+), 96 (51), 95 (54), 82 (87), 69 (61), 57 (100), 56 (53), 55 (64), 43 (82), 41 (66); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 22.10, 22.65 \times 2, 27.39, 27.96, 29.17, 29.34, 29.42, 29.57, 29.65, 29.91, 39.05, 43.91, 202.91; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.84 (6H, d, $J=6.8$ Hz), 1.07-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (12H, m), 1.45-1.54 (1H, m), 1.56-1.66 (2H, m), 2.40 (2H, dt, $J=7.4$ Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, $J=2.0$ Hz).

13-methyltetradecanal. MS/EI m/z (%): 226 (0.2, M+), 96 (58), 95 (53), 82 (89), 69 (60), 57 (100), 56 (51), 55 (65), 43 (84), 41 (65); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 22.10, 2.65 \times 2, 27.40, 27.97, 29.17, 29.35, 29.42, 29.58, 29.63, 29.68, 29.92, 39.06, 43.92, 202.92; ^1H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 (6H, d, *J*=6.8 Hz), 1.08-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (16H, m), 1.44-1.54 (1H, m), 1.56-1.66 (2H, m), 2.40 (2H, dt, *J*=7.4 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, *J*=2.0 Hz).

14-methylpentadecanal. MS/EI *m/z* (%): 240 (0.3, M⁺), 96 (60), 95 (52), 83 (53), 82 (93), 69 (59), 57 (100), 55 (65), 43 (82), 41 (65); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 22.10, 2.65×2, 27.41, 27.97, 29.17, 29.35, 29.42, 29.57, 29.63, 29.65, 29.70, 29.93, 39.06, 43.92, 202.92; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 (6H, d, *J*=6.6 Hz), 1.08-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (18H, m), 1.44-1.54 (1H, m), 1.56-1.66 (2H, m), 2.40 (2H, dt, *J*=7.4 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, *J*=2.0 Hz).

10-methyldodecanal. MS/EI *m/z* (%): 198 (0.2, M⁺), 95 (85), 83 (53), 82 (57), 81 (57), 70 (82), 69 (57), 57 (100), 55 (71), 41 (72); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.39, 19.21, 22.09, 27.05, 29.17, 29.35, 29.45, 29.48, 29.91, 34.39, 36.60, 43.92, 202.93; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.82 (3H, d, *J*=6.4 Hz), 0.83 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.01-1.14 (2H, m), 1.16-1.35 (13H, m), 1.55-1.65 (2H, m), 2.40 (2H, dt, *J*=7.2 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, *J*=2.0 Hz).

12-methyltetradecanal. MS/EI *m/z* (%): 226 (0.3, M⁺), 95 (72), 83 (58), 82 (64), 81 (55), 70 (83), 57 (100), 55 (75), 43 (56), 41 (68); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.40, 19.22, 20.92, 27.09, 29.17, 29.35, 29.42, 29.49, 29.58, 29.66, 29.99, 34.40, 36.63, 43.92, 202.95; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.83 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.01-1.14 (2H, m), 1.16-1.36 (17H, m), 1.53-1.65 (2H, m), 2.40 (2H, dt, *J*=7.2 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, *J*=2.0 Hz).

2.1.1.3 香気濃縮物の調製

チーズの香気抽出液は、おろし金でおろしたチーズに少量の蒸留水を加え全体を湿らせてスラリー状にした後に、溶剤と混和し香気を抽出した。おろしたチーズ (20 g) に蒸留水 (6 mL) を加えてよく混ぜてスラリー状にしたチーズにジエチルエーテル (50 mL) を加え、激しく振とうして香気成分を抽出した後、遠心分離 (1811 G, 15 min, 5°C) にて固形分を除いてジエチルエーテル抽出液を得た。無水硫酸ナトリウムで脱水

し、内部標準物質 (methyl nonanoate, 50 ng) を添加後, SAFE¹⁴⁾ (5×10^{-3} Pa, 40°C) にて不揮発性成分を除き, ジエチルエーテル香気抽出液を分離した. 香気成分を含む留分は, ロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35°C), 次いで窒素気流で濃縮した (約 100 μ L).

2.1.1.4 成分同定のための香気成分の濃縮

微量香気成分の同定のため, 長期 (22-24 カ月) 熟成したチーズ (240 g) を用いて, 2.1.1.3 で示した方法を繰り返し, 香気濃縮物 (約 150 μ L) を得た. この濃縮物 (50 μ L) をジクロロメタン (40 mL) で希釈し, 飽和炭酸水素ナトリウム (50 mL \times 2 回) で酸を除いた後, 飽和食塩水 (30 mL \times 2 回) で洗浄した. ジクロロメタン層 (中性・基性画分) は無水硫酸ナトリウムで脱水後, ロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35°C), 窒素気流で濃縮した (約 100 μ L). 得られた中性・塩基性画分 (約 50 μ L) はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (15°C, 20 cm \times 0.7 cm i.d., Wakogel C-200, 5 g, 和光純薬製) に供し. *n*-ペンタン (30 mL, 画分 A), *n*-ペンタン/ジエチルエーテル (30 mL, 10 + 1, v/v, 画分 B), *n*-ペンタン/ジエチルエーテル (30 mL, 10 + 2, v/v, 画分 C), *n*-ペンタン/ジエチルエーテル (30 mL, 1 + 1, v/v, 画分 D), およびジエチルエーテル (30 mL, 画分 E) で順次展開した. それぞれの画分はロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35°C), 次いで窒素気流で濃縮した (約 100 μ L).

2.1.1.5 長鎖および分岐鎖アルデヒド類の定量用香気濃縮物の調製

各熟成期間のチーズ中の分岐鎖アルデヒドを定量するために, チーズ (20 g), 蒸留水 (6 mL), ジエチルエーテル (50 mL) および内部標準物質 (methyl nonanoate, 50 ng) を用いて 2.1.1.3 の方法で調製した香気濃縮物 (約 100 μ L) をジクロロメタン (20 mL) で希釈し, 2.1.1.4 の方法で中性・塩基性画分を得た (約 100 μ L). 得られた中性・塩基

性画分は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（15℃，20 cm×0.7 cm i.d.，Wakogel C-200，5 g，和光純薬製）にて分画・精製した。n-ペンタン（30 mL）を流した後，アルデヒド類を含む画分を n-ペンタン/ジエチルエーテル（30 mL，10+1，v/v）にて溶出し，ロータリーエバポレーター（550 mmHg，35℃），次いで窒素気流で濃縮した（約 100 μL）。

2.1.1.6 Gas Chromatography-Olfactometry（GC-O）

DB-WAX カラムでの条件；GC 検出器の出口ににおいかぎ装置を接続し，溶出された香気成分を評価した。においかぎ装置は検出器から溶出する香気成分の滞留を防ぐためリボンヒーターで加温し，さらに約 100 mL/min の加湿した空気を通じた。装置および条件は以下の通りである。装置：Agilent 社製 6850 ガスクロマトグラフを使用した。カラム：DB-WAX（30 m×0.25 mm i.d.，膜厚 0.25 μm，Agilent 社製）。オープン温度：40℃～210℃（5℃/min）。キャリアーガス：ヘリウム（流速：0.9 mL/min）。注入法：スプリットレス注入。注入口温度：250℃。試料注入量：1 μL。検出器：熱電導度検出器（TCD，230℃）。

DB-1 カラムでの条件；装置：においかぎシステム（ODP3，Gerstel 社製）を装備した Agilent 社製 6890N ガスクロマトグラフを使用した。カラム：DB-1（30 m×0.25 mm i.d.，膜厚 0.25 μm，Agilent 社製）。オープン温度：40℃～210℃（5℃/min）。キャリアーガス：ヘリウム（流速：1.0 mL/min）。注入法：スプリットレス注入。注入口温度：250℃。試料注入量：1 μL。検出器：水素炎イオン検出器（FID，250℃）。ODP3 は 250℃ で使用し，カラム出口にて FID と分岐した（FID：ODP3=1：10）。

2.1.1.7 Gas Chromatography-Mass Spectrometry（GC-MS）

GC-MS は以下の装置および条件で行った。

装置：ガスクロマトグラフは Agilent 社製 7890N，質量検出器は Agilent 社製 5975C を使用した。カラム：DB-WAX（60 m × 0.25 mm i.d.，膜厚 0.25 μm，Agilent 社製）および DB-1（30 m × 0.25 mm i.d.，膜厚 0.25 μm，Agilent 社製）。オープン温度：パルスドスプリットレス注入時は 40°C（hold time：1 min）～230°C（3°C/min）。スプリット注入時は 80°C～230°C（3°C/min）。キャリアーガス：ヘリウム（流速：1 mL/min）。注入法：パルスドスプリットレス注入あるいはスプリット注入。注入口温度：250°C。試料注入量：パルスドスプリットレス注入時は 5 μL。スプリット注入時は 1 μL（スプリット比 30:1）。質量検出器：イオン化電圧 70 eV，イオン源温度 150°C。

2.1.1.8 主要香気成分の定性と定量

2.1.1.3 で調製したチーズの香気濃縮物に含まれる主要香気成分は，マススペクトル，GC における保持指標 (RI) を標品のそれらと比較することにより同定した。定量値は，methyl nonanoate を用いた内部標準法にて，各成分と内部標準物質のレスポンスファクターを 1 として算出し，Total Ion Chromatogram (TIC) のピーク面積値を用いた。

2.1.1.9 Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)

2.1.1.3 で調製したチーズの香気濃縮物は，ジクロロメタンにより段階的に希釈した（4 倍，16 倍，64 倍，...4⁸ 倍）。これらの希釈液（1 μL）を GC-O に注入し，香気寄与成分の FD-ファクターを AEDA の手法で決定した。各香気成分の FD-ファクターは 3 名の評価者のうち 2 名以上が検出した値を採用した。

2.1.1.10 香気寄与成分の同定

香気寄与成分の同定はマススペクトル，GC における保持指標 (RI) および香調を，標準物質のそれらと比較することにより行った。

2.1.1.11 分岐鎖および長鎖アルデヒド類の定性定量

炭素数 11～16 の長鎖および分岐鎖アルデヒド類は、マススペクトル、GC における保持指標 (RI) を標品のそれらと比較することにより同定した。定量値は、methyl nonanoate を用いた内部標準法にて算出し、Selected Ion Monitoring (SIM) にて測定した GC-MS のマスクロマトグラムのピーク面積値を用いた。内部標準物質に対する各成分のレスポンスファクターは、等重量に混合した各標品と内部標準物質を GC-MS 測定し、該当する質量数にてイオン抽出したクロマトグラムの面積値より決定した。定量に用いたイオンの質量数とレスポンスファクターは、Table 2.1-1 に示したとおりである。

Table 2.1-1 Selected ions and calibration factors used for quantification by SIM

No.	Compound	RI		Selected ion	Calibrartion factor
		DB-Wax	DB-1		
N11	undecanal	1605	1283	126	17.8
N12	dodecanal	1710	1285	82	5.5
N13	tridecanal	1815	1287	82	4.2
N14	tetradecanal	1921	1589	82	3.9
N15	pentadecanal	2027	1691	82	2.8
N16	hexadecanal	2141	1794	82	2.5
I12	10-methylundecanal	1662	1350	82	4.5
I13	11-methyldodecanal	1767	1452	82	4.3
I14	12-methyltridecanal	1872	1558	82	3.4
I15	13-methyltetradecanal	1978	1656	82	2.8
I16	14-methylpentadecanal	2084	1757	82	2.3
A11	8-methyldecanal	1574	1258	81	4.9
A13	10-methyldodecanal	1781	1458	70	4.2
A15	12-methyltetradecanal	1992	1663	70	3.1
	methyl nonanoate ^a	1501	1207	74	1.0

^a Internal standard

2.1.2 結果および考察

2.1.2.1 熟成によるゴーダチーズの主要香気成分の変化

ナチュラルチーズは日持ちせず、その風味は日々変化する。そのため、実験材料として、熟成度の異なる試料を容易に入手できる国産（日本産）のゴーダタイプチーズを選択した。油脂やたんぱく質を多く含む固体であるチーズの香気濃縮物は、ペースト状にしたチーズからジエチルエーテルによる溶剤抽出と、SAFE を組み合わせた方法で調製した。本抽出法は、過度の加熱操作を伴わないため、調製した香気濃縮物は、熟成度の異なる各ゴーダチーズの特徴的な香気を良く保持しており、香気成分の探索に適した分析試料と判断した。

Table 2.1-2 Quantitative amount in different ripe stages of the Gouda cheeses

RI ^a	Compound	Quantitation amount (mg/kg) ^b		
		4-5 months	12-13 months	22-23 months
986	2-pentanone	—	0.2	0.3
1033	ethyl butyrate	—	—	0.8
1112	2-pentanol	—	—	0.2
1191	2-heptanone	—	0.1	1.9
1235	ethyl hexanoate	—	0.2	2.3
1296	acetoin	1.1	1.3	0.4
1316	2-heptanol	—	0.1	0.2
1400	nonanal	—	—	0.1
1437	ethyl octanoate	—	0.1	4.1
1443	acetic acid	16.7	28.1	20.3
1503	tetramethylpyrazine	—	—	0.3
1536	3,5-diethyl-2-methylpyrazine	—	—	0.4
1540	2,3-butanediol diastereomer 1	6.2	5.2	6.2
1545	propionic acid	—	—	0.9
1572	isobutyric acid	0.2	0.1	0.9
1576	2,3-butanediol diastereomer 2	6.1	4.1	7.0
1603	2-undecanone	—	—	0.7
1616	butyric acid	10.8	17.0	351.5

(Table 2.1-2 continued)

1640	ethyl decanoate	—	0.4	4.7
1673	isovaleric acid	0.4	—	4.2
1694	ethyl 9-decenoate	—	—	0.3
1740	pentanoic acid	—	—	5.5
1812	2-tridecanone	—	—	0.3
1846	hexanoic acid	2.6	5.9	258.0
1936	2-phenyl-2-butenal	—	—	0.3
1961	heptanoic acid	—	—	3.7
1977	5-octanolide	0.1	—	—
2023	2-pentadecanone	—	—	0.1
2050	ethyl tetradecanoate	—	0.2	0.6
2061	octanoic acid	0.9	1.7	113.2
2118	4-hydroxy-5-methyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	0.2	0.1	—
2181	nonanoic acid	—	—	1.5
2204	5-decanolide	0.4	0.4	0.4
2258	ethyl hexadecanoate	—	—	0.1
2269	lactic acid	—	0.1	2.3
2274	decanoic acid	1.0	1.7	69.5
2339	9-decenoic acid	—	0.1	6.8
2383	4-dodecanolide	—	—	0.2
2389	undecanoic acid	—	—	0.4
2438	5-dodecanolide	0.2	0.3	0.2
2482	ethyl (<i>Z</i>)-9-octadecenoate	—	—	0.2
2489	dodecanoic acid	0.4	0.5	16.2
2627	phenylacetic acid	—	—	0.3
2668	5-tetradecanolide	—	—	0.2
2709	tetradecanoic acid	0.1	0.3	8.0
2932	hexadecanoic acid	—	—	2.4
TOTAL		47.3	68.6	898.4

— : < 0.1 mg/kg

^a Retention index on DB-WAX column (60 m × 0.25 mm i.d., coated with a 0.25 μm film) observed from GC-MS.

^b Quantitation amounts are calculated by using 1 as calibration factor.

熟成期間の異なるゴーダチーズに含まれる主要な香気成分を GC-MS で比較した結果、香気成分の総量は熟成期間が長いほど増加し、とりわけ長期（22-23 カ月）熟成品の総香気量は極めて多いことがわかった（Table 2.1-2）。しかし、全ての香気成分が一

様に増加するわけではなく、ラクトン類 (5-octanolide, 5-decanolide, 5-dodecanolide) や 2,3-butanediol 類は含有量の変動が小さく、4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone は熟成期間が長くなると減少する傾向が認められた。これらは原料である乳に含まれていた成分と考えられ、熟成の影響を受けないと推定される。

一方、トリグリセライドの加水分解により生じたと考えられる脂肪酸類 (butyric acid, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, tetradecanoic acid) やそれらのエステル化により生じたと考えられるエステル類 (ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate) に加え、メチルケトン類 (2-pentanone, 2-heptanone, 2-undecanone, 2-tridecanone) やピラジン類 (tetramethylpyrazine, 3,5-diethyl-2-methylpyrazine) などの香気成分は、熟成期間が長いほど含有量が増加する傾向が認められた。これらの結果は、ゴータチーズの熟成による香気成分の変化が原料乳に由来する成分と熟成中に生じる成分に大別でき、後者の影響がより大きいことを示している。

熟成前のチーズの香りはほとんど感じられないか、あるいは非常に弱いものであるが、熟成が進むほど強い香りを有する。これは、チーズを構成する脂質やたんぱく質、糖質、クエン酸などが、酵素や微生物、あるいは熱により変化し、香気成分が生成するためであることが知られている (Table 2.1-3)³⁹⁾。すなわち、乳のたんぱく質であるカゼインは、プロテアーゼなどの酵素や乳酸菌などの微生物によって、ペプチドやアミノ酸に分解され、さらに微生物や熱によって含硫化合物や、揮発性有機酸へと分解される。脂質はリパーゼなどの酵素によって脂肪酸、ケト酸、などに分解され、さらに熱や微生物によってメチルケトン、ラクトンが生成する。チーズ中の構成成分としては少ないものの (数 %~1%未満)、乳糖やクエン酸は乳酸菌などの微生物によって乳酸や diacetyl, acetoin, ethanol などが生成する。さらに、アミノ酸と糖質から熱によってメイラード反応が起こりピラジン類やフラン類が生成し、脂肪酸と ethanol から

エステル類が生成することが知られている^{8,39,50}。

Table 2.1-3 Flavor compounds generated from the 3 principal milk constituents during ripening of cheese³⁹⁾

Casein	Milk fat	Lactose & Citrate
Peptides	Fatty acids	Lactate
Amino acids	Keto acids	Pyruvate
Acetic acid	Methyl ketones	CO ₂
Ammonia	Lactones	Diacetyl
Pyruvate		Acetoin
Aldehydes		2,3-butandiol
Alcohols		Acetaldehyde
Carboxylic acid		Acetic acid
Sulfur compounds		Ethanol

また、ゴーダチーズの製造工程は、殺菌乳に乳酸菌スターター、次いで凝乳酵素を添加して形成した凝乳を切断して沈殿（カード）を生成させた後、乳清（ホエー）を排除し、圧搾、加塩、熟成を経る⁵⁵。乳酸菌の添加は、乳酸の生成により pH を低下させ、雑菌生育の抑制や凝乳を促進させる目的で行われる。さらに、乳酸菌由来のたんぱく質分解酵素が、熟成においてカゼインを分解し、ペプチドやアミノ酸が生成するため、これらが風味成分となる⁵⁶。一方、乳酸菌スターターによる脂肪分解性を調べた研究では、スターターに用いられる乳酸菌に脂質分解酵素の働きは見られなかった⁵⁷。しかしながら、チーズ製造における乳酸菌は、乳酸生成により pH を低下させるため、酸性条件になることで脂質の分解に影響する可能性も考えられる。

主要香気成分の中で認められた、熟成の度合いが進むほど増加した脂肪酸類、エステル類、ケトン類、ピラジン類は、いずれもチーズの熟成により生成することが知ら

れた成分であった^{8,39,50}。しかし、香気化合物には閾値があるため、検出された主要香気成分のみがチーズの香気に寄与しているとは限らない。すなわち、GC-MSでは検出できない微量な成分であっても、閾値の低さからチーズの香気に重要な役割を果たすことが指摘されている³⁸。そこで、主要な香気成分の比較に用いた香気濃縮物を用いAEDAによる比較を試みた。

2.1.2.2 熟成によるゴータチーズの香気寄与成分の変化

熟成期間の異なるゴータタイプチーズの香気濃縮物にAEDAを適用した結果、FDファクター64以上の38ピークを検出し、ゴータチーズの香りが多くの香気寄与成分から成ることを確認した(**Table 2.1-4**)。これら38ピークのうち、含有量の多い10成分についてはマススペクトルおよびRIより容易にその構造を同定することができたが、残る同定にいたらなかった成分は微量かつ複雑な混合物なため、AEDAに用いた香気濃縮物のGC-MS分析による同定は困難であった。そこで、試料の量(約240g)を増やして香気濃縮物を調製し、さらに多量に含まれるカルボン酸を炭酸水素ナトリウムで除き、次いで、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画・精製して得た画分をGC-OおよびGC-MSで香気寄与成分を探索した。その結果、画分B~Eからさらに20成分(12-methyltridecanal : **20**を除く)を同定、もしくは推定することができた。比較的極性の低い画分Bからはエステル類(ethyl butyrate : **1**, ethyl isovalerate : **2**, ethyl valerate : **3**, ethyl hexanoate : **4**, ethyl cinnamate : **25**)を主体としてケトンやジスルフィド、画分Cからは2種のメトキシピラジン類、画分Dからはラクトン類(4-decanolide : **26**, 5-decanoide : **28**, 4-dodecanolide : **31**, (Z)-6-dodecen-4-olide : **32**)を主体としてアルキルピラジン類(2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine : **10**, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine : **11**)やフラノン類が同定された。これらのうち、methyl 2-methyl-3-furyl disulfide (**16**), 3-methyl-2,4-nonanedine (**17**), ethyl cinnamate (**25**)は、本研究でチーズ

から初めて見出された香気成分であった。 methyl 2-methyl-3-furyl disulfide (16) の香調であるビタミン様 (vitamine-like) とは、ビタミン剤を想起させる、主にビタミン B1 であるチアミンの分解物である含硫成分様の香りを表す。

さらに、熟成期間の異なる 3 種のゴーダチーズについて、各々の香気寄与成分の FD-ファクターを比較したところ、フルーティーな香調を有するエステル類 (ethyl butyrate : 1, ethyl hexanoate : 4), 豆様, ナッツ様, 土様の香調を有するピラジン類 (2-isopropyl-3-methoxypyrazine : 8, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine : 11, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine : 12), 酸臭を有するカルボン酸類 (butyric acid : 14, pentanoic acid : 18, hexanoic acid : 19, octanoic acid : 23, decanoic acid : 29, dodecanoic acid : 34), キャラメル様の香調を有する 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (27), 甘い香りを有する 4-dodecanolide (31) と phenylacetic acid (37), そして牛肉様の香気を有する同定にいたらなかった成分 (20) とグリーンな香調を有する同定にいたらなかった成分 (30) の 16 成分は、熟成期間が長くなるに従い FD-ファクターが顕著に増加した。成分 (20) の香調である牛肉様 (beef-like) とは、煮熟した牛肉のにおいを表す。これらの成分が熟成したゴーダチーズの豊かで芳醇な香気に深く関与していると考えられる。そこで同定にいたらなかった成分についてさらに詳細に検討することにした。

Table 2.1-4 Potent odorants showing FD-factors ($FD \geq 64$) in the different ripe stages of the Gouda-type cheeses

No.	RI ^a	Fraction ^b	Compound ^c	Odor quality ^f	log ₄ (FD factor)		
					4-5 months	12-13 months	22-23 months
1	1030	B	ethyl butyrate	fruity	1	3	6
2	1058	B	ethyl isovalerate ^d	fruity	1	<1	3
3	1129	B	ethyl valerate	fruity	<1	1	3
4	1233	B	ethyl hexanoate	fruity, sweet	<1	3	5
5	1376	OA	dimethyl trisulfide	putrid	1	<1	3
6	1417	OA	acetic acid	sour	3	4	4
7	1429	B		pea-like, bean sprout-like	3	<1	<1
8	1433	C	2-isopropyl-3-methoxypyrazine ^d	pea-like	2	4	7
9	1450	OA	methional	green, potato-like	<1	4	<1
10	1467	D	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	nutty	1	1	3
11	1496	D	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	nutty	<1	1	4
12	1526	C	2-isobutyl-3-methoxypyrazine ^d	earthy, musty	2	2	5
13	1573	D		green, mushroom-like	<1	2	3
14	1616	OA	butyric acid	sour	5	6	8
15	1666	OA	isovaleric acid	sweaty, rancid	4	3	5
16	1666	B	methyl 2-methyl-3-furyl disulfide ^{de}	meaty, vitamine-like	2	<1	4
17	1720	B	3-methyl-2,4-nonanedione ^{de}	green, fatty	2	1	3
18	1734	OA	pentanoic acid	sweaty, rancid	1	2	4
19	1843	OA	hexanoic acid	sweaty, rancid	2	4	6
20	1867	B	12-methyltridecanal ^e	beef-like	1	2	4
21	2030	D	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone ^d	sweet, caramel-like	3	5	2
22	2046	OA		sweaty, rancid	3	3	4
23	2056	OA	octanoic acid	sweaty, rancid	<1	1	4
24	2062	D	4-hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone	sweet, caramel-like	2	5	<1
25	2132	B	ethyl cinnamate ^{de}	sweet, cinnamon-like	<1	3	<1

(Table 2.1-4 continued)

26	2149	D	4-decanolide	sweet, peach-like	<1	3	1
27	2193	D	3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone ^d	sweet, caramel-like	1	3	5
28	2198	D	5-decanolide	sweet, lactone-like	4	5	4
29	2267	OA	decanoic acid	sweaty, rancid	3	3	5
30	2330	D		green, cucumber-like	<1	1	4
31	2377	D	4-dodecanolide	sweet, lactone-like	3	4	5
32	2400	D	(Z)-6-dodecen-4-olide	sweet, lactone-like	4	5	5
33	2470	D		sweet, lactone-like	<1	3	3
34	2480	OA	dodecanoic acid	sweaty, soapy	<1	2	4
35	2523	D		floral, sweet, powdery, green, cherry-like	<1	1	3
36	2543	D		sweet, green, fatty, lactone-like	<1	1	3
37	2559	OA	phenylacetic acid	sweet, honey-like	1	1	4
38	2624	OA	3-phenylpropionic acid ^d	sweet, cinnamon-like	1	3	3

^a Retention index on DB-Wax column (30 m × 0.25 mm i.d.; coated with a 0.25 μm film) observed for GC-O.

^b Fraction in which most of the compound appeared. A-E, these fractions were obtained by silica gel column chromatography; OA, overall volatile concentrate.

^c The compound was identified by comparing with the reference substance on the basis of the following criteria : retention index (RI) on stationary phases given in DB-Wax, mass spectra, and odor quality.

^d The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparing with the reference substance on the basis of the following criteria : retention index (RI) on stationary phases given in DB-Wax and odor quality.

^e Newly identified compounds in cheese.

^f Odor quality assigned during AEDA.

2.1.2.3 ゴーダタイプチーズにおける分岐鎖飽和アルデヒド類の特性

2.1.2.3.1 チーズにおける新規香気成分として分岐鎖アルデヒド類の同定

長期熟成したゴーダチーズの香気に深く関与すると考えられる同定にいたらなかった成分の中で、ピーク **20** の成分は、牛肉様というユニークな香調を有していたことにより詳細に構造を調べることにした。この成分を同定するために、目的とする牛肉様の成分を極性および非極性カラムによる GC-O で追跡したところ、目的成分は画分 B

に濃縮されており ($RI_{DB-Wax}=1867$, $RI_{DB-1}=1554$), GC-MS によりそのマススペクトルを得ることができた. さらに, ΔI 値 (極性カラムと非極性カラムの保持指標の差) およびシリカゲルカラムにおける溶出画分の情報から, この成分は長鎖の飽和アルデヒドと予想された. さらに, 文献に記載されている保持指標²⁶⁾を基に, この成分をチーズからは新規成分である 12-methyltridecanal (**20**) と推定し, 文献²²⁾を参考に標品物質を合成し, RI (DB-Wax, DB-1), マススペクトル, 香調が合成標品と一致したことにより同定した.

さらに, この画分 B の GC-MS データを詳細に調べた結果, 12-methyltridecanal と類似したマススペクトルを有する成分が多数含まれることを見出した (Figure 2.1-3).

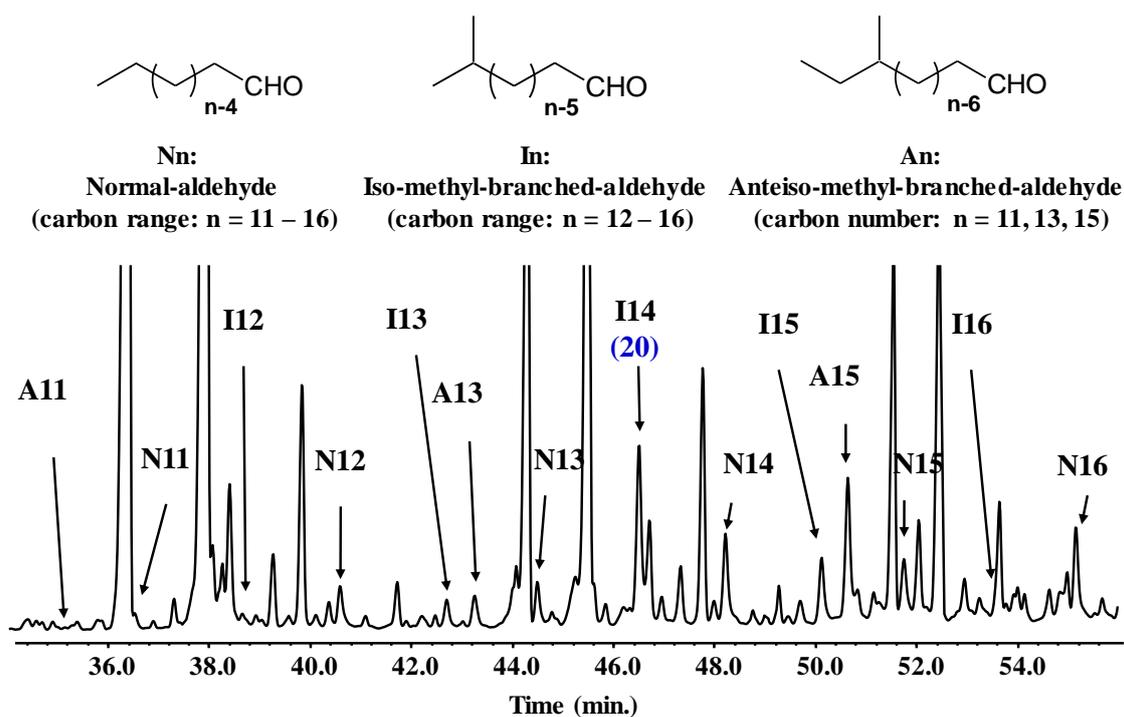


Figure 2.1-3 Mass chromatogram of the volatile concentrate (fraction B) of the Gouda cheese.

Nn: normal aldehyde (carbon range: $n=11-16$), **In:** *iso*-methyl branched aldehyde (carbon range: $n=12-16$), **An:** *anteiso*-methyl branched aldehyde (the number of carbon is 11, 13, and 15).

これらの成分は、そのマススペクトルから、直鎖および分岐鎖飽和アルデヒドが予想された。すなわち、N11～N16は炭素数が11～16の直鎖飽和アルデヒド類、I12～16は炭素数が12～16のイソメチルアルデヒド類、A11, A13, A15は炭素数が11, 13, 15のアンテイソメチルアルデヒド類を推定し、それぞれのRIとマススペクトルが合成標品と一致することを確認した。これらの分岐鎖飽和アルデヒド類は、牛肉からの報告⁵⁸⁾があるもののチーズからは全て新規な成分であった。

2.1.2.3.2 ゴーダチーズにおける分岐鎖アルデヒド類組成の熟成中の変化

12-methyltridecanal (**20**) のFD-ファクターは、熟成期間が長くなるにしたがって増加したことから、これらの直鎖および分岐鎖飽和アルデヒド類も同様に熟成期間が長くなるにしたがって増加することが推定された。そこで、熟成期間の異なるゴーダチーズ中のアルデヒド類の含有量を定量し、その結果を **Table 2.1-5** にまとめて示した。量的に多いのは直鎖アルデヒド類で、特にC12, C14, C16のアルデヒドの量は、分岐鎖アルデヒドで多い12-methyltridecanalの含有量と同等かそれ以上であった。また、分岐鎖アルデヒドでは、イソメチルアルデヒドの12-methyltridecanalに加え、アンテイソメチルアルデヒドの12-methyltetraecanalの含有量が多いことが示された。このように、各々の含有量は異なるものの、8-methyldecanalを除くいずれのアルデヒドも熟成期間が長くなるに従って含有量が増加した。しかし、AEDAでは12-methyltridecanal (**20**)以外は検出されなかった。その要因として、僅かな構造の違いによりそれぞれの閾値が異なる可能性が示唆された。そこで、各アルデヒド類の閾値について検討した。

Table 2.1-5 Quantitative amount of normal and branched long-chain aliphatic aldehydes in different stages of maturation of the Gouda cheeses

No.	Compound	Quantitation amount ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a		
		4-5 months	12-13 months	22-23 months
N11	undecanal	2.7	2.9	3.6
N12	dodecanal	6.5	6.9	20.1
N13	tridecanal	3.3	4.0	15.0
N14	tetradecanal	7.3	9.5	30.5
N15	pentadecanal	4.5	6.1	11.9
N16	hexadecanal	9.2	13.9	23.6
I12	10-methylundecanal	0.4	0.5	1.0
I13	11-methyldodecanal	0.5	0.5	12.3
I14	12-methyltridecanal (20)	6.8	10.3	49.5
I15	13-methyltetradecanal	3.2	5.5	18.5
I16	14-methylpentadecanal	0.8	2.0	3.2
A11	8-methyldecanal	0.9	0.9	0.8
A13	10-methyldodecanal	1.7	2.2	11.2
A15	12-methyltetradecanal	7.8	12.0	38.3

^a These amounts are the average of the triplicate results in the different cheese samples.

2.2 ナチュラルチーズにおける分岐鎖アルデヒド類の香気特性

前節では、日本人に最も親しまれているナチュラルチーズであるゴーダチーズの熟成香に寄与する成分を探索し、熟成により増加する成分として、12-methyltridecanal とその類縁体である、多数の分岐鎖アルデヒド類（イソメチルおよびアンテイソメチルの分岐鎖を有するアルデヒド）を見出した。これらの成分は、牛肉の香気成分として報告⁵⁸⁾はあるものの、チーズからは新規に見出された成分であり、また、チーズの中ではゴーダチーズに特有の成分か、あるいはナチュラルチーズにも広く存在するのか、さらに、熟成が進むにしたがって多数の分岐鎖アルデヒド類の含有量が増加するという現象が、広くナチュラルチーズ一般に適用されるかどうかなど不明であった。

そこで本節では、ゴーダチーズより新たに見出した分岐鎖アルデヒド類の、ナチュラルチーズ香気における特性を明らかにすることを目的に、①分岐鎖アルデヒド類の構造と閾値や香調の関係、②他のナチュラルチーズの長期熟成と分岐鎖アルデヒド類の含有量との関係、③ナチュラルチーズにおける分岐鎖アルデヒド類の前駆体、から検討した。

2.2.1 実験方法

2.2.1.1 チーズ試料

国産ゴーダチーズ：4-5 カ月熟成品、12-13 カ月熟成品、22-23 カ月熟成品を有限会社 富田ファームより購入した。国産ミモレットチーズ：4 カ月熟成品、24 カ月熟成品をニセコチーズ工房有限会社より購入した。国産チェダーチーズ：5 カ月熟成品、15 カ月熟成品を鹿追チーズ工房（有限会社 MC コーポレーション）より購入した。オランダ産ゴーダチーズ：2 カ月熟成品、5 年熟成品、フランス産コンテ A.O.P.：熟成期間不明のもの、24 カ月熟成品を株式会社オーダーチーズより購入した。熟成期間が不明な

コンテ A.O.P.は、色調や香調から、その熟成期間を 24 カ月未満と推定した。

2.2.1.2 試薬

undecanal, deodecanal, tridecanal, tetradecanal, methyl nonanoate は東京化成株式会社より購入した。pentadecanal, hexadecanal はナカライテスク株式会社より購入した。

8-methyldecanal は 2.1.1.2 で合成したものをを用いた。

10-methylundecanal, 11-methyldodecanal, 12-methyltridecanal , 13-methyltetradecanal, 14-methylpentadecanal, 10-methyldodecanal, 12-methyltetradecanal は 2.1.1.2 で合成したものをを用いた。同様に 9-methyldecanal , 9-methylundecanal, 11-methyltridecanal, 13-methylpentadecanal も文献記載⁵⁴⁾の方法を参考に、2.1.1.2 に記載した方法で合成した。合成したアルデヒドはマススペクトルと核磁気共鳴スペクトルで同定した。

9-methyldecanal. MS/EI m/z (%): 170 (0.1, M+), 82 (60), 81 (46), 69 (68), 57 (100), 56 (64), 55 (62), 43 (89), 41 (75) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 22.10, 22.63×2, 27.30, 27.94, 29.17, 29.37, 29.67, 38.98, 43.91, 202.91; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.84 (6H, d, J=6.8 Hz), 1.08-1.17 (2H, m), 1.21-1.34 (8H, m), 1.44-1.54 (1H, m), 1.56-1.66 (2H, m), 2.40 (2H, dt, J=7.4 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, J=2.0 Hz).

9-methylundecanal. MS/EI m/z (%): 184 (0.1, M+), 95 (72), 81 (68), 70 (74), 69 (63), 67 (45), 57 (100), 55 (69), 43 (50), 41 (73) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.38, 19.20, 22.10, 27.00, 29.17, 29.38, 29.47, 29.76, 34.37, 36.57, 43.91, 202.91; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.82 (3H, d, J=6.4 Hz), 0.83 (3H, t, J=7.2 Hz), 1.01-1.14 (2H, m), 1.16-1.35 (11H, m), 1.55-1.65 (2H, m), 2.40 (2H, dt, J=7.2 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, J=2.0 Hz).

11-methyltridecanal. MS/EI m/z (%): 212 (0.3, M+), 95 (74), 83 (65), 82 (61), 81 (57), 70 (81), 57 (100), 55 (76), 43 (53), 41 (79) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.40, 19.22, 22.09, 27.07, 29.16, 29.35, 29.43, 29.49, 29.61, 29.97, 34.39, 36.62, 43.92, 202.96; ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.82 (3H, d, *J*=6.4 Hz), 0.83 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.01-1.14 (2H, m), 1.16-1.35 (15H, m), 1.55-1.65 (2H, m), 2.40 (2H, dt, *J*=7.2 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, *J*=2.0 Hz).

13-methylpentadecanal. MS/EI *m/z* (%): 240 (0.4, M⁺), 95 (69), 83 (59), 82 (68), 70 (84), 69 (59), 57 (100), 55 (72), 43 (57), 41 (66); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 11.40, 19.22, 22.09, 27.10, 29.17, 29.35, 29.42, 29.49, 29.58, 29.63, 29.69, 30.01, 34.40, 36.64, 43.92, 202.96; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.8 (3H, d, *J*=6.4 Hz), 0.83 (3H, t, *J*=7.2 Hz), 1.01-1.14 (2H, m), 1.16-1.35 (19H, m), 1.54-1.65 (2H, m), 2.40 (2H, dt, *J*=7.2 Hz, 2.0 Hz), 9.74 (1H, t, *J*=2.0 Hz).

2.2.1.3 チーズ香気に含まれるアルデヒド類の分画

チーズ香気に含まれるアルデヒド類の画分は、2.1.1.5 と同じ方法で調製した。

2.2.1.4 チーズ脂質抽出と分画

国産ゴーダチーズ (12-13 カ月熟成) の全脂質画分は、文献記載の方法を参考に抽出した⁵⁹⁾。すなわち、おろしたチーズ (10.07 g) にジクロロメタン/メタノール混合溶液 (96 mL, 1+2, v/v) を加え、ボルテックスミキサーで2分間処理し、チーズ溶媒懸濁液を調製した。これに、ジクロロメタン (32 mL) と蒸留水 (32 mL) を順次加えた後 (それぞれを添加した時点でボルテックスミキサーを2分間処理)、遠心分離 (1811 G, 15 min, 5°C) にて不溶部を除き脂質抽出液を得た。さらに、無水硫酸ナトリウムにて脱水した脂質抽出液の溶媒をロータリーエバポレーター、次いでデシケーターにて留去し全脂質画分 (3.70 g) を得た。

得られた全脂質画分は、実験書に記載された方法を参考に、アセトン可溶画分 (単純脂質) とアセトン不溶画分 (複合脂質) に分画した⁶⁰⁾。すなわち、氷浴中にて全脂質画分 (3.70g) にアセトン (40 mL) を加え、30分静置した後、0.45 μm メンブラン

フィルターにて、アセトン可溶画分とアセトン不溶画分に分画した。さらに、アセトン可溶画分はロータリーエバポレーター、次いで窒素気流にて溶媒を留去した。以上の操作により、アセトン可溶画分 (3.12 g) とアセトン不溶画分 (0.50 g) を得た (Figure 2.2-1)。

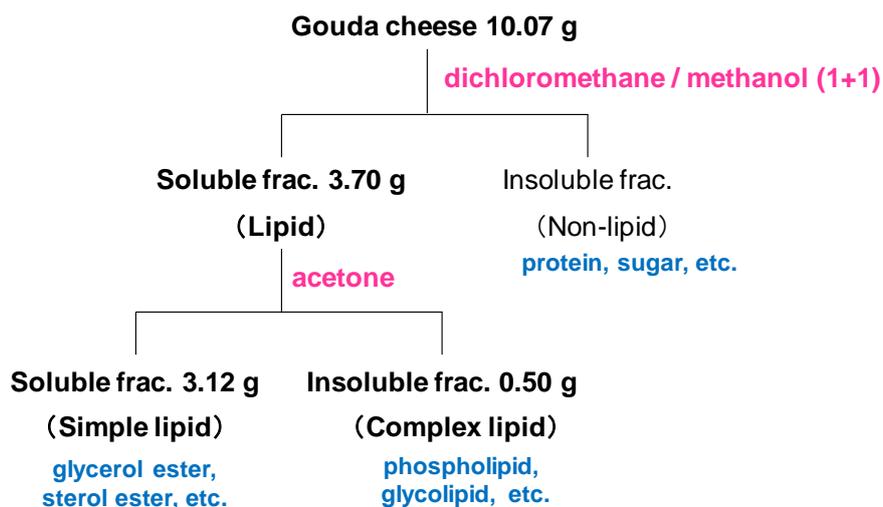


Figure 2.2-1 Fractionation of Gouda cheese and its lipid.

2.2.1.5 酸加水分解による遊離分岐鎖アルデヒド類の調製

牛肉における長鎖の分岐鎖アルデヒドの前駆体は、プラズマローゲンであり、希塩酸の処理で分岐鎖アルデヒド類が生じる^{22,59)}。そこで、チーズの前駆体も牛肉と同様にプラズマローゲンであると想定し、以下の方法で酸加水分解した。

チーズ (1.0 g) と、チーズ 1.0 g 相当の各脂質画分、すなわち、全脂質画分 (0.37 g)、全脂質のアセトン可溶画分 (0.32 g)、および不溶画分 (0.05 g) をそれぞれ酸加水分解し、遊離する分岐鎖アルデヒド類を回収した。1N-HCl (50 mL) に分散または溶解したチーズおよび各画分を、加熱還流 (約 100℃にて 1 時間反応後に、氷浴にて冷却) 後、少量の 10N-NaOH を加えてアルカリ性とした反応液から、遊離したアルデヒド類を *n*-ペンタンで抽出した (20 mL×2 回)。次いで、分岐鎖アルデヒド類を含む抽出液に

内部標準物質 (methyl nonanoate, 5 μg) を添加し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, ロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35 $^{\circ}\text{C}$), さらに窒素気流にて溶媒を留去し, 約 200 μL まで濃縮した.

2.2.1.6 GC-O

GC-O は 2.1.1.6 に記載した DB-1 カラムでの条件で測定した.

2.2.1.7 GC-MS

装置: ガスクロマトグラフは Agilent 社製 7890N, 質量検出器は Agilent 社製 5975C を使用した. カラム: DB-WAX (60 m \times 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm , Agilent 社製) および DB-1 (30 m \times 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm , Agilent 社製). オープン温度: パルスドスプリットレス注入時は 40 $^{\circ}\text{C}$ (hold time: 1 min) \sim 230 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$). スプリット注入時は 80 $^{\circ}\text{C}$ \sim 230 $^{\circ}\text{C}$ (3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$). キャリアーガス: ヘリウム (流速: 1 mL/min). 注入法: パルスドスプリットレス注入あるいはスプリット注入. 注入口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$. 試料注入量: パルスドスプリットレス注入時は 5 μL . スプリット注入時は 1 μL (スプリット比 30:1). 質量検出器: イオン化電圧 70 eV, イオン源温度 150 $^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.8 閾値の測定方法

分岐鎖アルデヒド類の気相における閾値は, Ullrich らの方法⁶¹⁾を参考に測定した. すなわち, 濃度既知の内部標準物質 (気相の閾値が 2.7 ng/L である (*E*)-2-decenal⁶²⁾) と分岐鎖アルデヒド類を含むジクロロメタン溶液を, 段階的に 2 倍ずつ希釈し, 順次, 2.2.1.6 に記載した GC-O の条件にて測定し, 各成分の香気を検出できる希釈倍率を求めた (希釈倍率は, 3 人のパネリストのうち, 2 人以上が香気を感じた値を採用した). ジクロロメタン溶液における各成分の濃度と希釈倍率から, 次式にて各成分の閾値を

求めた. 各成分の閾値=(内部標準物質の閾値×各成分の濃度×内部標準物質の希釈倍率)
/ (内部標準物質の濃度×各成分の希釈倍率).

2.2.1.9 分岐鎖アルデヒド類の定性定量

分岐鎖アルデヒド類は 2.1.1.11 と同じ方法で定性定量を行った.

2.2.2 結果および考察

2.2.2.1 分岐鎖アルデヒド類の構造と閾値や香調の関係

ゴータチーズより, 炭素数 12~16 のイソメチルアルデヒド, および炭素数 11, 13, 15 のアンテイソメチルアルデヒドを見出した. しかし, これらの分岐鎖アルデヒド類の中で, ゴータチーズにて高い寄与度を示した成分が炭素数 14 のイソメチルアルデヒドである 12-methyltridecanal のみであったことから, 各々の分岐鎖アルデヒドは類似した構造を持つ同族体であるにも関わらず, それらの閾値は大きく異なる可能性が考えられた. そこで, 炭素数 11 から 16 のイソメチルアルデヒド, アンテイソメチルアルデヒド, および直鎖飽和アルデヒドの気相における閾値を測定し, 分岐鎖アルデヒド類の構造と閾値の関係を明らかにした.

興味深いことに, 分岐鎖アルデヒド類の閾値の挙動は, 直鎖アルデヒド類とは全く異なるパターンを示した (**Figure 2.2-2**). 直鎖アルデヒド類の閾値は炭素数の増加とともに上昇したのに対し, イソメチルおよびアンテイソメチルアルデヒドの閾値はともに炭素数 14 で最も低い値を示し, その閾値は炭素数が 1 つ異なると約 10 倍上昇した. さらに, 炭素数 12~14 の範囲では, 分岐鎖の位置も閾値に大きく影響し, イソメチルアルデヒドの閾値は, 対応する炭素数のアンテイソメチルアルデヒドのそれと比べて約 10 倍低い値であった. この結果から, 分岐鎖アルデヒドの閾値は, 特定の炭素数で最小となり, さらに, 分岐鎖の位置にも大きな影響を受けるという特徴を有すること

がわかった。

このように類似した構造を有する同族体でありながら、炭素数の変化によって閾値が大きく変化し、特定の炭素数で最小値となる化合物群については、既に幾つかの報告例がある。例えば、光学活性を有する 4-mercapto-2-alkanone と 4-acetylthio-2-alkanone の閾値は、(R)-体と(S)-体のいずれも、前者が炭素鎖 8、後者が炭素鎖 7 で最も低い値を示すことが報告されている⁶³⁾。さらに、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-alkenal の閾値は、炭素数 10 で最も低い値を示すことが報告されている⁶⁴⁾。Polster らの研究では、44 成分のアルカンチオール類の 3 次元構造と、閾値に相関があることを導き出し、分子の電子密度よりも立体効果が閾値に影響していると推定している⁶⁵⁾。今回の分岐鎖アルデヒド類においても、炭素鎖の長さや、メチル基の位置の違いで閾値が大きく異なることから、分子の立体構造が閾値に影響しているとする説にあてはまると考えられる。

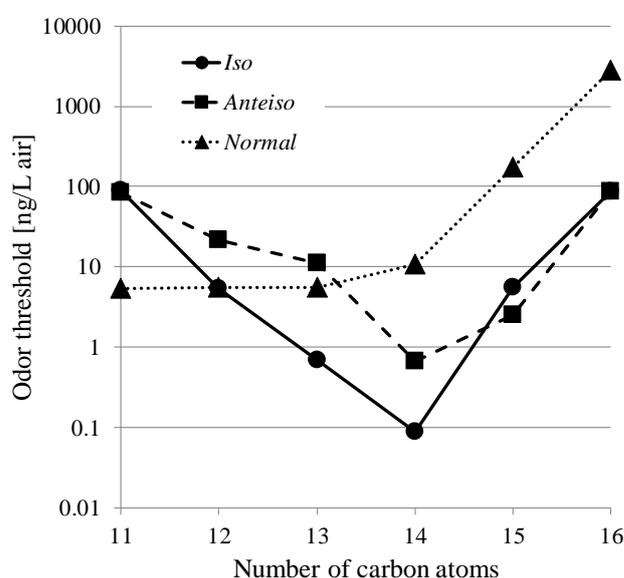


Figure 2.2-2 Comparison of odor thresholds of homologous *iso*-methyl-(●), *anteiso*-methyl-(■), and *normal*-aldehydes(▲).

さらに、一連の分岐鎖アルデヒド類は、炭素数によって閾値だけでなく香調も大きく変化した (Table 2.2-1)。イソメチルアルデヒド、アンテイソメチルアルデヒド、いずれの分岐鎖アルデヒド類も、気相における香調は、炭素数の増加にともない、シトラス様から、牛肉様を経て、ほこり様に変化した。すなわち、気相における閾値が低くなる炭素数では、一連の分岐鎖アルデヒド類は、牛肉様の香調を有することが明らかになった。また、アンテイソメチルアルデヒドの最も閾値の低い C14 の 11-methyltridecanal はチーズ香気中に検出されず、そのため AEDA で 12-methyltridecanal のみが重要香気成分として検出されたことがわかった。

以上の結果より、複数の分岐鎖アルデヒドが存在する長期に熟成の進んだゴードチーズの香気にとって、12-methyltridecanal は、その特異的に低い閾値と牛肉様というユニークな香調により非常に重要な役割を果たすと考察された。

Table 2.2-1 Retention Index (RI) and odor quality of *iso*- and *anteiso*-methyl-branched aldehydes

Number of carbon atoms	Compound	RI	Odor quality
		DB-1	
11	9-methyldecanal	1251	citrus-like
12	10-methylundecanal	1350	citrus, beef-like
13	11-methyldodecanal	1452	beef-like
14	12-methyltridecanal	1558	beef-like
15	13-methyltetradecanal	1656	beef-like
16	14-methylpentadecanal	1757	dusty
11	8-methyldecanal	1257	citrus-like
12	9-methylundecanal	1359	citrus, beef-like
13	10-methyldodecanal	1460	citrus, beef-like
14	11-methyltridecanal	1561	beef-like
15	12-methyltetradecanal	1665	beef, corn soup-like
16	13-methylpentadecanal	1766	dusty

2.2.2.2 ナチュラルチーズにおける分岐鎖アルデヒド類の含有量と長期熟成の関係

ゴーダチーズ香気において、熟成が進むにしたがって分岐鎖アルデヒド類の含有量が増加したが、長期熟成を経て作られる他のナチュラルチーズについても同様の現象が見られるか調べた。香気成分探索に用いた国産ゴーダチーズに加えて、同じく熟成を行うミモレットチーズ、チェダーチーズおよびオランダ産ゴーダチーズ、フランス産コンテ A.O.P.など産地や工場の異なる4種類のナチュラルチーズ（セミハード・ハードタイプ）の分岐鎖アルデヒド類量を測定した。その結果、いずれのチーズでも、分岐鎖アルデヒド類は、より長期に熟成したものに多く含まれることがわかった

(Figure 2.2-3).

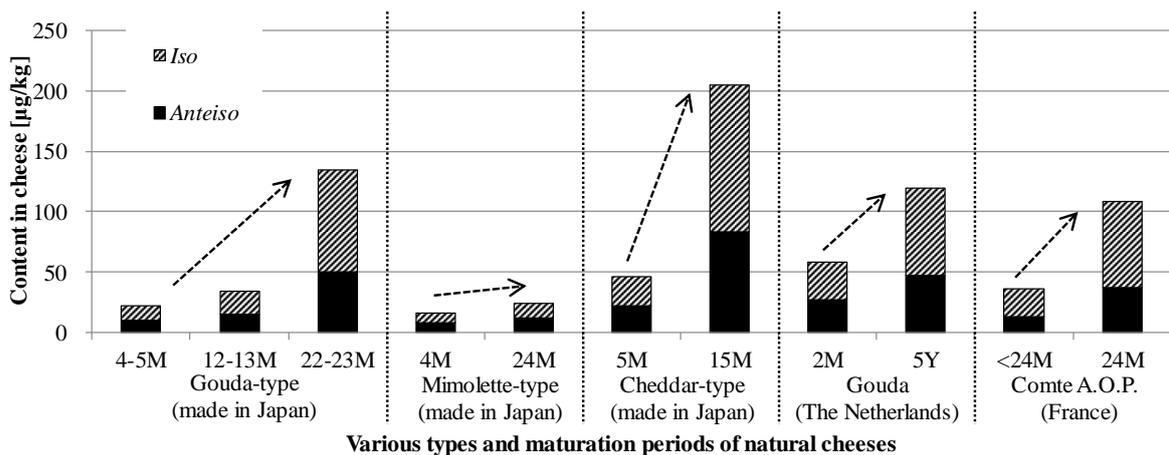


Figure 2.2-3 Contents of methyl-branched-aldehydes in various types and maturation periods of the natural cheeses. (M : months, Y : years)

この結果は、長期熟成工程を経て作られるチーズでは、いずれも分岐鎖アルデヒド類が存在し、かつ長期熟成によりその含有量が増加するという可能性を示唆している。しかし、チーズの種類によって、あるいは同じ種類であっても、分岐鎖アルデヒド類の含有量やその増加率には、違いが認められた。例えば、同じゴーダチーズであっても、国産とオランダ産では、熟成期間と分岐鎖アルデヒド類の含有量やその増加率は

異なっていた。これらの結果は、原乳組成や製造条件がチーズにおける分岐鎖アルデヒド類の形成に大きく影響する可能性を示しており、例えば、牛乳に含まれる前駆体量や、スターターの種類、熟成環境などの差異が、分岐鎖アルデヒド類の生成量に影響すると考えられる。そこで分岐鎖アルデヒド類の前駆体について検討した。

2.2.2.3 ナチュラルチーズにおける分岐鎖アルデヒドの前駆体について

12-methyltridecanal は、牛肉における詳細な研究から、特殊なリン脂質であるプラズマローゲンより生じることが報告されている^{22,59)}。sn-1 位にビニルエーテル結合を有するプラズマローゲンは、加水分解により容易にアルデヒドを遊離することが知られている⁶⁶⁾ (**Figure 2.2-4**)。

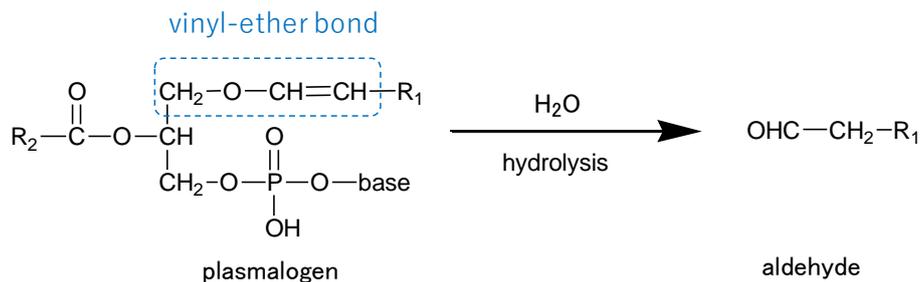


Figure 2.2-4 Hydrolysis of plasmalogen.

一方、牛乳に含まれる全脂質の約 1 %がリン脂質であり、そのリン脂質組成の 3 mol%がプラズマローゲンであることが知られている⁶⁷⁾。そのため、牛乳を原料とするチーズにも、分岐鎖アルデヒド類の前駆体となり得るプラズマローゲンが存在することが予想される。実際に、ゴータチーズ（12-13 ヶ月熟成品）を希塩酸で加水分解したところ、複数の分岐鎖アルデヒド類が生じ、その生成量は加水分解前の含有量よりもはるかに多かった (**Table 2.2-2**)。

Table 2.2-2 Amounts of methyl branched aldehydes generated by hydrolysis of cheese

No.	Compound	μg/kg
I13	11-methyldodecanal	132
I14	12-methyltridecanal	1631
I15	13-methyltetradecanal	1507
I16	14-methylpentadecanal	813
A13	10-methyldodecanal	122
A15	12-methyltetradecanal	3823

そこで、チーズにおける分岐鎖アルデヒド類の前駆体を牛肉と同様にプラズマローゲンであると仮定し、加水分解により容易にアルデヒドを遊離するというプラズマローゲンの性質を利用して前駆体の探索を試みた。すなわち、分画したゴータチーズ（12-13カ月熟成品）を希塩酸にて加水分解し、分岐鎖アルデヒド類を生じる画分を探索した。実験は、チーズから生成し得る分岐鎖アルデヒド量を指標にするために、おろしたチーズ（1.0 g）と、全脂質画分（0.37 g）、グリセロールエステルやステロールエステルなどの単純脂質が含まれるアセトン可溶画分（0.32 g）、リン脂質や糖脂質などの複合脂質が含まれるアセトン不溶画分（0.05 g）を希塩酸で加水分解し⁶⁰、各々の画分における分岐鎖アルデヒド類の生成量を比較した。分岐鎖アルデヒド類の前駆体が牛肉と同じプラズマローゲン（リン脂質）であれば、アセトン不溶画分より分岐鎖アルデヒド類が生成することが予測される。

チーズおよび各脂質画分を酸加水分解した結果、チーズにおける分岐鎖アルデヒド類の生成量は、原料であるゴータチーズ自体に香気成分として含まれる量の100倍以上が観測された（**Figure 2.2-5**）。さらに、チーズの分岐鎖アルデヒド類の前駆体は、脂質の中でもアセトン可溶画分に集中していた。

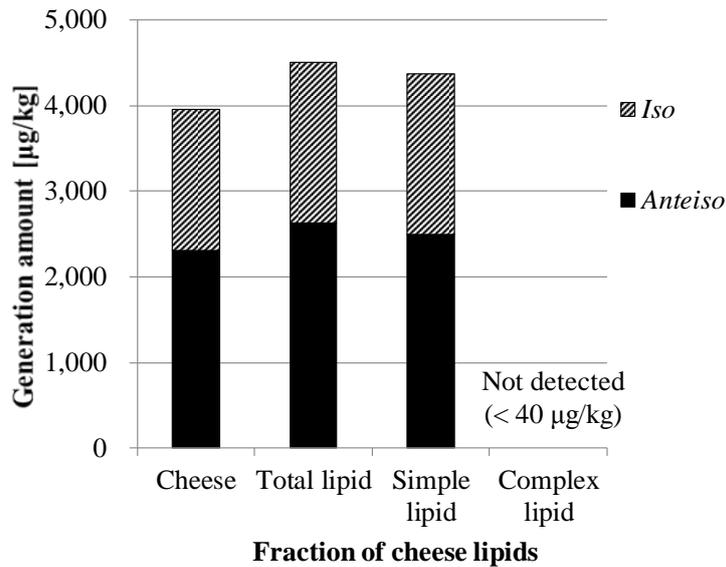


Figure 2.2-5 Amounts of methyl-branched-aldehydes generated from whole cheese or each lipid fraction for 1g of cheese

分岐鎖アルデヒド類が複合脂質を含むアセトン不溶画分から生成しなかったことから、当初の想定とは異なり、チーズにおける分岐鎖アルデヒド類の前駆体は、牛肉における前駆体（プラズマローゲン）とは異なる構造を有することが示された。しかしながら、分岐鎖アルデヒド類が、単純脂質を含むアセトン可溶画分からほぼ定量的に生成したことから、チーズにおける前駆体は、グリセロールエステルのような極性の低い脂質であると推定された。また、酸加水分解によって分岐鎖アルデヒド類が生成したことから、その反応性が知られている⁶⁶⁾ビニルエーテル結合の存在が考えられた。

また、チーズと牛肉で脂質の組成が異なることは、脂肪酸組成の違いからも知られている。牛乳とゴダチーズ、および和牛と輸入牛の脂質における脂肪酸組成について、日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）⁶⁸⁾から抜粋し、**Table 2.2-3** に示した。それによると、牛乳やチーズにはイソメチルやアンティソメチルの分岐鎖を持つ脂肪酸が含まれるのに対し、牛肉（和牛、輸入牛）には分岐鎖を持つ脂肪酸の報告例はなかつ

た. 従って, チーズの単純脂質中には, 牛肉とは異なり, イソメチル基やアンテイソメチル基を有する側鎖を持つ脂質の存在の可能性も考えられる.

Table 2.2-3 Fatty acid composition of lipid in various foods⁶⁸⁾

Foods	Fatty acid composition [w/w %]								
	14:0	15:0	15:0ANT	16:0	16:0ISO	17:0	17:0ANT	18:0	18:1
milk	10.9	1.1	0.5	30.0	0.3	0.6	0.5	12.0	23.0
Gouda cheese	11.7	1.1	0.5	30.7	0.2	0.5	0.5	10.9	22.2
Wagyu beef	2.4	0.3	-	24.3	-	0.8	-	19.9	51.8
imported beef	3.6	0.7	-	25.9	-	2.0	-	20.3	40.6

(X : 0 means saturated acid of carbon number X. X : 1 means monounsaturated acid of carbon number X. ISO means iso-methyl branched acid. ANT means anteiso-methyl branched acid. - means unmeasured.)

これらの結果は, チーズにおける分岐鎖アルデヒド類生成のポテンシャルが極めて大きい, すなわち, 分岐鎖アルデヒドは大部分が未だ前駆体として存在していることに加えて, 当初の想定とは異なり, チーズにおける分岐鎖アルデヒド類の前駆体は, 牛肉における前駆体 (プラズマローゲン) とは異なる構造を有する可能性を示している. すなわち, 熟成が高度に進んだチーズの場合, 香気に対する分岐鎖アルデヒド類の重要性が更に増す可能性に加え, 新しいタイプの分岐鎖アルデヒド類前駆体が存在する可能性を示すものである.

2.3 要約

本章では、熟成したナチュラルチーズの香気に寄与する成分を明らかにするために、熟成度の異なるゴーダチーズの香気寄与成分を比較し、熟成が進むに従って寄与度が増加した香気成分を明らかにした。それらの中で、12-methyltridecanal と一連の分岐鎖アルデヒドである類縁体をチーズより初めて見出し、それらのナチュラルチーズにおける香気特性を詳細に検討した。

日本人に嗜好性の高いゴーダチーズに着目し、まず熟成度の異なるゴーダチーズの香気寄与成分を AEDA にて比較したところ、フルーティーな香調を有するエステル類 (ethyl butyrate, ethyl hexanoate)、豆様、ナッツ様、土様の香調を有するピラジン類 (2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine)、酸臭を有するカルボン酸類 (butyric acid, pentanoic acid, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid)、キャラメル様の香調を有する 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone、甘い香りを有する 4-dodecanolide と phenylacetic acid、そして牛肉様の香気を有する 12-methyltridecanal とグリーンな香調を有する同定にいたらなかった成分の 14 成分は熟成期間が長くなるに従い FD-ファクターが顕著に増加した。これらの成分が熟成したゴーダチーズの豊かで芳醇な香気に深く関与していると考えられる。

熟成に伴い寄与度の増加した香気成分として見出した 12-methyltridecanal は、煮込んだ牛肉香気の特徴成分として知られているが、チーズより初めて見出された成分であった。さらに、ゴーダチーズには 12-methyltridecanal の類縁体として 7 種の分岐鎖飽和アルデヒド類 (イソメチル基を有する 10-methylundecanal, 11-methyldodecanal, 13-methyltetradecanal, 14-methylpentadecanal, アンテイソメチル基を有する 8-methyldecanal, 10-methyldodecanal, 12-methyltetradecanal) が含まれ、8-methyldecanal を除くいずれの成分も、熟成期間が長くなるほど増加した。

次いで、これらの分岐鎖アルデヒド類のナチュラルチーズにおける特性を理解するために、ゴードチーズ以外のナチュラルチーズにおける含有量、構造と閾値や香調、前駆体と生成機構を検討した。その結果、ゴードチーズで認めた分岐鎖アルデヒド類は他のナチュラルチーズにも含まれ、熟成期間が長いほどそれらの含有量は増加することを確認した。さらに、合成した分岐鎖アルデヒド類を用い閾値や香調を調べた結果、閾値は特定の炭素数 14 で最小となり、分岐鎖の位置にも大きな影響を受けるといふ特徴を有することがわかった。また、一連の分岐鎖アルデヒド類は、炭素数によって閾値だけでなく香調も大きく変化し、炭素数の増加にともないシトラス様から牛肉様を経てほこり様に変化した。すなわち、閾値が低くなる炭素数では分岐鎖アルデヒド類は、牛肉様の香調を有することが明らかになった。この結果は、複数の分岐鎖アルデヒドが存在する熟成したゴードチーズの香気にとって、12-methyltridecanal が重要な役割を果たす理由が、その特異的に低い閾値と牛肉様というユニークな香調によることを示すものである。さらに、ナチュラルチーズにおける分岐鎖アルデヒド類の前駆体は、酸加水分解によりアルデヒドを生成する構造を持つものの牛肉における前駆体（プラズマローゲン）とは異なる構造を有する可能性を認め、この前駆体量はチーズで検出された分岐鎖アルデヒド量よりも大幅に多いことも確認した。すなわち、熟成が高度に進んだチーズ香気では 12-methyltridecanal をはじめとする一連の分岐鎖アルデヒド類の重要性が更に増す可能性がある。

以上の結果から、希少価値の高い高級食材である熟成したゴードチーズにとって、12-methyltridecanal は重要な香気成分のひとつであり、その重要性は熟成期間が長くなるほど高まることを明らかにした。さらに、類縁体である一連の分岐鎖アルデヒド類も、熟成期間が長くなると増加したことから、高度な熟成によって閾値以上の含有量となり、熟成したチーズの香気に影響する可能性を見出した。

第3章 加熱牛肉の香りと分岐鎖アルデヒドの特性に関する研究

牛肉のおいしさは、主に「香り」「味」「食感」から成り立っており、中でも「香り」はおいしさの要因として重要である^{5,6)}。一般に、牛肉は生の状態で食べられることは少なく、加熱調理されることにより食欲をそそる牛肉の香りが生成し、嗜好性が向上する。これまでに加熱した牛肉の香気については、多くの研究^{15,20-,22,26,29,30,40-43,58,69)}があり、多数の香気成分が見出され、それぞれの成分が様々なバランスで存在することで、多彩な牛肉の香りが形成されると考えられている。前章において、12-methyltridecanalをはじめとする一連の分岐鎖アルデヒド類をチーズより初めて見出した。これらの分岐鎖アルデヒド類の多くは牛肉の香気成分としてすでに報告されている⁵⁸⁾。Guthらは、煮込んだ牛肉香気の中で高い寄与度を示したことや単独で牛肉様 (beef-like) という極めて特徴的な香調を有すること、さらに、他の獣肉 (鹿, 豚, 鶏) からほとんど検出されず、牛肉に特異的に多く含有することなどから、12-methyltridecanal を加熱 (煮込み) 調理した牛肉香気 of 重要な特徴成分と結論している²²⁾。

一方、牛肉の中でも和牛は、日本のみならず海外においても嗜好性が高く、ブランド化により差別化された希少価値の高い高級食材であるにも関わらず、そのおいしさゆえに需要は年々高まっている。和牛のおいしさは、やわらかい食感と特有の好ましい風味に由来し、その風味を知覚するためには「香り」が重要であることが既に明らかにされている^{40,44-46)}。しかし、おいしさに関与する和牛特有の好ましい香りに寄与する重要香気成分には不明な点が多く残されている。

さらに、加熱 (煮込み) 調理した牛肉香気 of 重要な特徴成分である 12-methyltridecanal はこれまでに和牛の香気成分としての報告はなく、和牛の香りを構成する成分としての重要性も不明である。

本章では、まず和牛特有の好ましい香気に寄与する成分を AEDA の手法を用いて探

索し，加熱（煮込み）調理した牛肉香気の特徴成分である 12-methyltridecanal の和牛香気における役割を検討した．次いで，牛肉の調理条件（肉種や加熱条件）と 12-methyltridecanal 含有量の間関係を調べ，さらに前駆体についても検討した．

3.1 和牛の香気寄与成分の同定および和牛香気における 12-methyltridecanal の役割

和牛の好ましい風味を知覚するためには、甘く脂っばいコクのある特有の香りが重要であり、この特有の香りを「和牛香」という^{15,40,44)}。これまでの研究により、和牛香は適切な条件でのみ形成されることがわかっている^{40,44-46)}。それは、高度な脂肪交雑の牛肉を、酸素存在下で熟成し、最適な温度で調理するという3つの要件であり、和牛香を解明するためには、この様な香りの繊細さに配慮した分析方法の選定が重要であると考える。

和牛の香気寄与成分については松石らの研究^{15,40)}があり、ラクトン類が和牛香に最も重要であると指摘されている。しかし、ラクトン類だけでは和牛香の特性を再現するには十分とは言えず和牛香の解明にはまだ研究の余地が残されていると考えられた。

そこで、本研究では、要件を満たす牛肉試料を用い、最適な温度で加熱し、生成した和牛香を変化させることなく忠実に保持した香気濃縮物を調製し、香気寄与成分を分析した。さらに、輸入牛肉についても同様の方法で香気濃縮物を調製し、香気寄与成分について AEDA を用いて比較することにより和牛香の特性解明を試みた。また、加熱（煮込み）調理した牛肉香気の特徴成分である 12-methyltridecanal の和牛香における存在と役割についても検討した。

3.1.1 実験方法

3.1.1.1 牛肉試料

牛肉は、和牛として三重県産松阪牛（31ヶ月齢の雌、リブローズ、A5等級）、輸入牛肉としてグラスフェッドのオーストラリア産牛（ローズ）およびアメリカ産牛（サーロイン）を株式会社マルヨシ商事より購入した。オーストラリア産牛とアメリカ産牛は共に品種や月齢、雌雄は不明の肉専用種である。これらの牛肉は食べるのに適し

た状態になるまで熟成されたものを、薄切りにした状態（2-3mmの厚さに加工）で購入し、実験に使用するまで-25℃で保管し、使用する前日に一晚5℃で保管して解凍した。厚さ2-3mmの薄切り肉はなるべく重ならないようにボイル用パック（藤森工業株式会社）に入れて真空包装し、80℃のウォーターバス中で2分間加熱した。松坂牛と輸入牛（オーストラリア産）はAEDAによる比較実験に用い、輸入牛（アメリカ産）は未同定成分の同定に用いた。

3.1.1.2 試薬

2,3-butanedione, hexanal, acetoin, 1-octen-3-one, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, methional, butyric acid, isovaleric acid, (E,E)-2,4-nonadienal, (E,E)-2,4-decadienal, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF), methyl nonanoate は東京化成株式会社より購入した。(E)-2-nonenal はシグマアルドリッチジャパンより購入した。

trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal⁷⁰⁾, (E,Z,Z)-2,4-7-tridecatrienal⁷¹⁾は文献記載の方法で合成した。合成した標品はマススペクトルとRIより同定した。

trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal. MS/EI m/z(%): 168 (0.05, M+), 93 (26), 83 (6), 81 (28), 69 (12), 68 (100), 57 (7), 55 (15), 43 (11), 41 (16); RI_{DB-WAX}=1995.

(E,Z,Z)-2,4-7-tridecatrienal. MS/EI m/z(%): 192 (5, M+), 92 (43), 91 (50), 81 (100), 80 (26), 79 (76), 77 (38), 67 (36), 41 (31), 39 (13); RI_{DB-WAX}=2117.

12-methyltridecanal は2.1.1.2で合成したものをを用いた。

3.1.1.3 香気濃縮物の調製

牛肉の香気抽出液は、加熱した牛肉15gを約1cm四方に切り、同量の蒸留水を添加してミキサーで1分間混合しペースト状にしたものを調製し、ジエチルエーテル（20mL）を加え、激しく振とうして抽出した後、遠心分離（1811 G, 15 min, 20℃）にて

固形分を除いて調製した。次いで、無水硫酸ナトリウムで脱水した香気抽出液は、内部標準物質 (methyl nonanoate, 1500 ng) を添加後、SAFE (5×10^{-3} Pa, 40°C) にて不揮発性成分を除き、香気成分を含む留分を得た。香気成分を含む留分は、ロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35°C), 次いで窒素気流で濃縮した (約 100 μ L)。

3.1.1.4 成分同定のための香気成分の濃縮

微量香気成分の同定のため、加熱した輸入牛 (アメリカ産) から調製したペースト (270 g, 肉 135 g 分) から、3.1.1.3 で示した方法を繰り返し、溶剤抽出と SAFE を組み合わせた方法で香気を抽出し、150 μ L まで濃縮した。この濃縮物 (50 μ L) について 2.1.1.4 に記載したシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、画分 A~E を得た。

3.1.1.5 GC-O

GC-O は 2.1.1.6 に記載の方法で測定した。

3.1.1.6 GC-MS

GC-MS は 2.1.1.7 に記載の方法で測定した。

3.1.1.7 主要香気成分の定性と定量

3.1.1.3 で調製した牛肉の香気濃縮物に含まれる主要香気成分は、マススペクトル、GC における保持指標 (RI) を標品のそれらと比較することにより同定した。定量値は、methyl nonanoate を用いた内部標準法にて、各成分と内部標準物質のレスポンスファクターを 1 として算出し、Total Ion Chromatogram (TIC) のピーク面積値を用いた。

3.1.1.8 AEDA

3.1.1.3 で調製した牛肉の香気濃縮物はジクロロメタンにより段階的に希釈した(4倍, 16倍, 64倍). これらの希釈液(1 μ L)をGC-Oに注入し, 香気寄与成分のFD-ファクターをAEDAの手法で決定した. 各香気成分のFD-ファクターは3名の評価者のうち2名以上が検出した値を採用した.

3.1.1.9 香気寄与成分の同定

香気寄与成分の同定はマススペクトル, GCにおける保持指標(RI)および香調を, 標準物質のそれらと比較することにより行った.

3.1.2 結果と考察

3.1.2.1 和牛の主要香気成分

和牛香を最も強く生じる加熱温度は80 $^{\circ}$ Cであることが報告されている^{40,44}). しかし, 最適な加熱時間については報告がなかった. そこで, 和牛香が最も強くなる加熱時間を検討したところ, 和牛香は80 $^{\circ}$ Cで2分間加熱することにより最も強く感じられることを確認した.

次に, 香気成分の抽出法を検討した. 牛肉は, 油脂を多く含む不均一な固体であるため, 油脂を含まない食品や飲料のような液体に比べ, 香気成分の捕集が困難であった. そこで, 加熱した牛肉に同重量の水を加えて均質なペースト状にしたものから, ジエチルエーテルにて香気成分の抽出を試みた. さらに, 固形分を遠心分離で除去して得たジエチルエーテル層をSAFEに供し, 多量に含まれる油脂を除去し, 香気濃縮物を得た. 得られた香気濃縮物は, 元の牛肉の香りを良く保持しており, 香気成分の探索に適した分析試料と判断した.

80 $^{\circ}$ Cで2分間加熱した和牛と輸入牛(オーストラリア産)に含まれる主要な香気成

分を GC-MS で分析し、比較した。主要香気成分の種類および総量は、いずれも輸入牛（オーストラリア産）よりも和牛の方が多かった（Table 3.1-1）。

Table 3.1-1 Quantitative amount in different kind of beefs

RI ^a	Compounds	Quantitation amount (μ g/kg) ^b	
		Wagyu	Australia beef
1084	hexanal	364	37
1130	1-butanol	463	—
1186	heptanal	28	—
1239	amyl alcohol	108	32
1284	acetoin	948	949
1290	octanal	24	—
1315	2,3-octanedione	74	—
1393	nonanal	84	—
1435	acetic acid	290	209
1440	1-octen-3-ol	109	—
1524	propionic acid	39	22
1531	2,3-butanediol diastereomer 1	40	—
1554	isobutyric acid	15	29
1566	2,3-butanediol diastereomer 2	130	20
1614	butyric acid	286	99
1621	4-butanolide	51	24
1723	pentanoic acid	65	—
1868	1-phytene	—	355
2045	octanoic acid	102	62
TOTAL		3220	1838

— : < 20 μ g/kg

^a Retention index on DB-WAX column (60m \times 0.25mm i.d., coated with a 0.25 μ m film) observed from GC-MS.

^b Quantitation amounts are calculated by using 1 as calibration factor.

この結果は、和牛と輸入牛（オーストラリア産）の香気を比較した佐藤らの研究とも一致した⁶⁹⁾。和牛香気には、アルデヒド類（hexanal, heptanal, octanal, nonanal）、ケトン類（2,3-octanedione）、脂肪酸類（butyric acid, pentanoic acid, octanoic acid）が多

く含まれ、1-octen-3-ol は和牛にのみ検出された。これらは脂質由来の成分として知られており⁶¹⁾、和牛香の形成には脂質が関わる可能性が考えられた。一方、1-phytene は、輸入牛（オーストラリア産）にのみ検出された。1-phytene は牧草に含まれる葉緑体由来と考えられ、飼料の違いが関与していると考察された。

主要な成分として確認したこれらの香気成分はいずれも牛肉の香気成分としてすでに報告^{15,37,69)}のあるものであり、特に和牛香に寄与すると特定できる成分は見つからなかった。一方多くの香気研究において、含有量の多い主要香気成分だけでなく、閾値が低い微量な香気成分がそれぞれの香気に重要な役割を果たすことが指摘されている^{41,42)}。そこで、主要な香気成分の比較に用いた香気濃縮物を用い AEDA により和牛および輸入牛（オーストラリア産）の重要香気寄与成分を解析し、比較した。

3.1.2.2 和牛の香気寄与成分の解明

和牛および輸入牛（オーストラリア産）の香気について AEDA の結果、いずれかで FD ファクター4 以上を示した香気寄与成分 20 ピークを **Table 3.1-2** に示した。MS と RI から 16 成分を同定、もしくは推定することができたが ピーク 19 は微量で MS が得られなかったため別途同定を行った。これらの成分中 10 成分（1-octen-3-one : 4, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine : 5, methional : 6, (Z)-2-nonenal : 7, butyric acid : 9, isovaleric acid : 10, (E,Z)-2,4-decadienal : 13, 12-methyltridecanal : 15, trans-4,5, epoxy-(E)-2-decenal : 17, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone : 18) は、和牛香気として新規成分であった。

さらに、和牛において高い寄与度（FD ファクター4 以上）を示した 18 成分は、その半数が fatty, green, juicy な香調を有するアルデヒド類やケトン類（hexanal : 2, 1-octen-3-one : 4, (Z)-2-nonenal : 7, (E)-2-nonenal : 8, (E,E)-2,4-nonadienal : 11, (E,Z)-2,4-decadienal : 13, (E,E)-2,4-decadienal : 14, trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal : 17) であった。中でも最も高い寄与度を示した trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal (17) は、sweet, juicy, metallic な香

調を有し、様々な食品のコクやボリュームに関与することが知られていることから、和牛香の甘い脂っぽいコクのある香りに強く関与すると考えられる。これらのアルデヒド類、ケトン類は、食品の脂質を構成するリノール酸、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸の酸化により生成することが知られている^{61,71-73}。

一方、輸入牛（オーストラリア産）ではFD-ファクター4以上の高い寄与度を示す成分は8ピークと少なく、最も高いFDファクターを示したのは、green, potato-likeな香調のmethional（6）であった。methionalは、たんぱく質を構成するアミノ酸であるmethionineのストレッカー分解により生成することが知られている⁷⁴。

これらの結果は、和牛香が脂質に由来する香気成分の影響を強く受けるのに対して、輸入牛（オーストラリア産）の香気が脂質よりもたんぱく質に由来する香気成分の影響を強く受けることを示しており、牛肉を構成する脂質やたんぱく質の割合、あるいはそれらの構成成分の違いが、牛肉香気の特徴に強く関与する可能性を示している。

Table 3.1-2 Potent odorants showing FD factors ($FD \geq 4$) in the different kind of beefs.

No.	RI ^a	Compound ^b	Odor quality ^g	FD factor	
				Wagyu	Australia beef
1	<1000	2,3-butanedione ^c	milky	1	4
2	1076	hexanal	green	16	4
3	1285	acetoin	milky	4	4
4	1302	1-octen-3-one ^d	mushroom-like	16	4
5	1441	2-isopropyl-3-methoxypyrazine ^{cd}	pea-like	4	1
6	1453	methional ^d	green, potato-like	4	64
7	1507	(Z)-2-nonenal ^{de}	fatty, green, melon-like	4	1
8	1537	(E)-2-nonenal	fatty, green, sweet	16	4
9	1628	butyric acid ^d	sour	16	4
10	1668	isovaleric acid ^d	sour	4	1
11	1704	(E,E)-2,4-nonadienal	fatty	4	<1
12	1756		fatty, green	4	1
13	1770	(E,Z)-2,4-decadienal ^{de}	soapy	4	<1
14	1817	(E,E)-2,4-decadienal	fatty	4	1
15	1876	12-methyltridecanal ^{cd}	beef-like	4	1
16	1885		fatty	4	<1
17	2007	<i>trans</i> -4,5-epoxy-(E)-2-decenal ^d	sweet, juicy, metallic	64	1
18	2039	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone ^d	sweet, caramel-like	16	1
19	2120	(E,Z,Z)-2,4,7-tridecatrienal ^{df}	egg white-like, marine	4	1
20	2283		woody	1	4

^a Retention index on DB-Wax column (30 m × 0.25 mm i.d.; coated with a 0.25 μm film) observed for GC-O.

^b The compound was identified by comparison to the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phases given in DB-Wax, mass spectra, and odor quality.

^c The MS signals were too weak for an unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparing with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phases given in DB-Wax and odor quality.

^d Newly identified compounds in Wagyu beef.

^e Tentatively identified because there is no reference substance.

^f Newly identified compounds in beef.

^g Odor quality assigned during AEDA.

3.1.2.3 (*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal (19) の同定

和牛においてFDファクター4と寄与度が高いが微量でマススペクトルが得られず同定にいたらなかった成分の中で、ピーク19はegg white-likeという極めてユニークな香調を有したことから同定を試みた。牛肉試料を増やし、135gの牛肉から香気濃縮物を調製し、次いでシリカゲルカラムクロマトグラフィーによりAからEの5画分に分画した。目的とするegg white-likeの成分を極性および非極性カラムによるGC-Oで追跡したところ、目的成分は多くのアルデヒドとともに画分Bに濃縮されており($RI_{DB-wax}=2120$, $RI_{DB-1}=1552$), GC-MSによりマススペクトルを得ることができた(**Figure 3.1-1, B**)。さらに、文献情報⁷¹⁾における保持指標(極性カラム, 非極性カラム), マススペクトル, 香調, シリカゲルカラムにおける溶出画分の情報から、この成分を(*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienalと推定し、標品を合成して同定した。本成分は、鶏肉やアラキドン酸の酸化により生じる香気成分として報告^{71,73,75)}があるが、和牛だけでなく牛肉の香気成分として初めて見出された成分である。文献によると気相における閾値が極めて低い(1L中0.07 ng)ことから⁷¹⁾, 極微量で和牛を含む牛肉の香気に大きな影響を与えることが推察される。

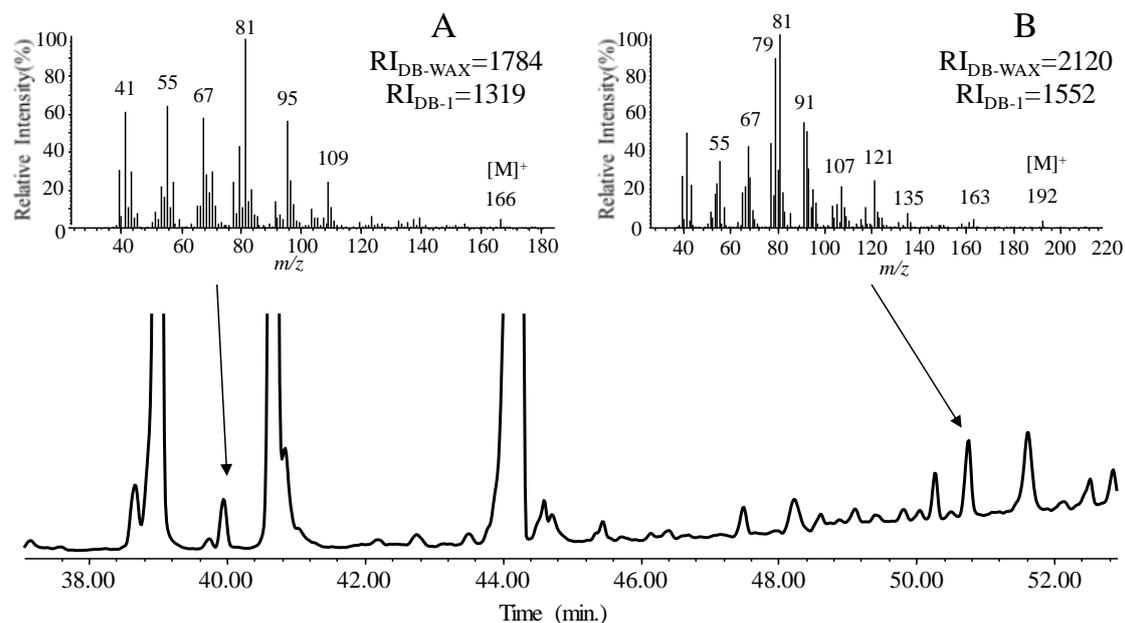


Figure 3.1-1 Extracted ion chromatogram ($m/z=81$) on DB-WAX of the volatile concentrate (fraction B) and mass spectra of (*Z,Z*)-2,5-undecadienal (A) and (*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal (19, B).

(*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal はモデル実験から、アラキドン酸の自動酸化により生成することが報告されている (Figure 3.1-2)⁷¹⁾。すなわち、アラキドン酸の10位の活性メチレンからラジカルが抜け、その後8位に酸素が付加し、中間体である 8-hydroxyperoxy-5,9,11,14-eicosapentanoic acid (8-HPETE) を経て、(*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal が生成する。一方、10位に酸素が付加した場合は、中間体として 10-hydroxyperoxy-5,7,11,14-eicosapentanoic acid (10-HPETE) が生じ、(*Z,Z*)-2,5-undecadienal が生成することも報告されている。したがって、もし、牛肉の(*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal が、アラキドン酸の自動酸化により生じたのであれば、(*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal だけでなく、(*Z,Z*)-2,5-undecadienal も生成していることが予想される。

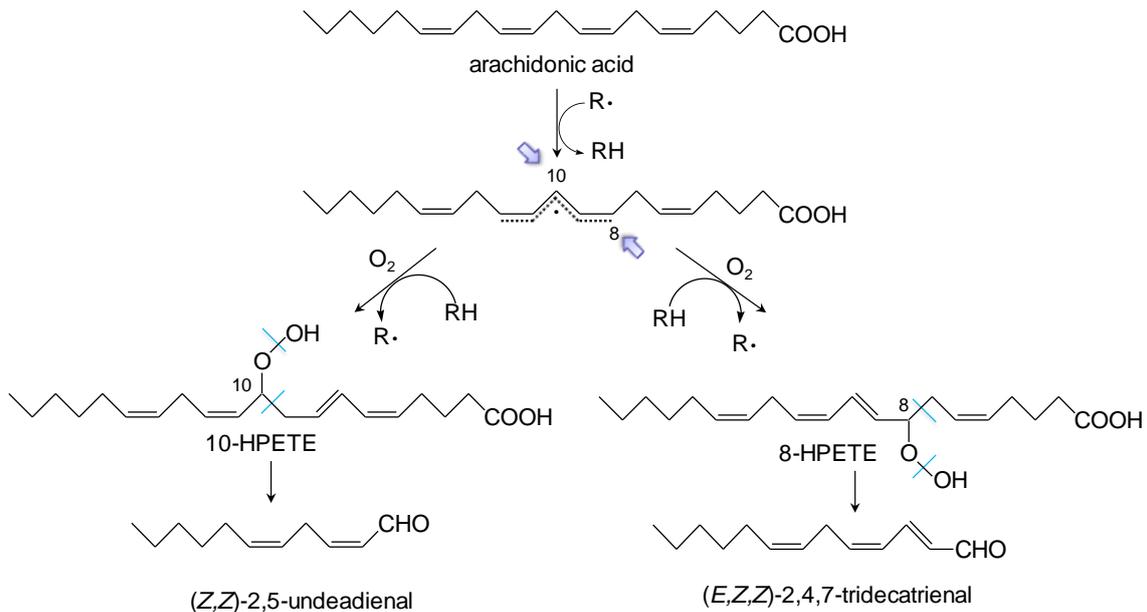


Figure 3.1-2 Formation of (*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal and (*Z,Z*)-2,5-undecadienal by autoxidation of arachidonic acid via the intermediates 8-hydroperoxy-5,9,11,14-eicosatetraenoic acid (8-HPETE, right) and 10-hydroperoxy-5,7,11,14-eicosatetraenoic acid (10-HPETE, left), respectively.⁷¹⁾

そこで、牛肉における(*Z,Z*)-2,5-undecadienalを確認するために、牛肉のシリカゲル分画で得た画分 B を GC-MS で精査した。その結果、保持指標 ($RI_{DB-wax}=1784$, $RI_{DB-i}=1319$) の位置に文献記載のマススペクトル⁷¹⁾が検出された (**Figure 3.1-1, A**)。この結果は、牛肉香気の形成にアラキドン酸の自動酸化が深く関与していることを示唆している。

以上の結果より、和牛香の形成には脂質の関与が大きいことがわかった。一般に、和牛の脂質を構成する脂肪酸は、輸入牛 (オーストラリア産) に比べて不飽和脂肪酸、中でもオレイン酸やリノール酸を多く含む傾向がある⁷⁶⁾。このことは、品種よりも飼料の影響が大きいことが Frank らにより報告されている⁷⁷⁾。それゆえに、和牛の脂質は融点が低く、このことがやわらかい食感を生み出していると言われている。

一方、今回の結果から、和牛香を形成する成分の主体が、高度不飽和脂肪酸であるリノール酸、アラキドン酸から生じるアルデヒド類、ケトン類であることがわかった。さらに、和牛香の生成には、高度な脂肪交雑や酸素の存在下での熟成が必要である^{40,44-46}ことも考え合わせると、高度不飽和脂肪酸、特にリノール酸を多く含むという和牛の特徴は、やわらかい食感だけでなく、和牛香の形成にも重要な役割を果たしていると推察された。

3.1.2.4 和牛香における 12-methyltridecanal (15) の役割

前述したように、Guth らによる煮込んだ牛肉香気に寄与する成分の探索研究²²⁾では、牛肉様の香りを有する 12-methyltridecanal が、4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF) に次いで高い寄与度を示した (Table 3.1-3)²²⁾。さらに、単独で牛肉様 (beef-like) という非常に特徴的な香調を有する点や、他の獣肉 (鹿, 豚, 鶏) からほとんど検出されず、牛肉が特異的に多く含有する点から、12-methyltridecanal を加熱 (煮込み) 調理した牛肉香気 of 重要な特徴成分と結論している²²⁾。

本研究においても、和牛の香気を構成する成分でも 12-methyltridecanal (15) は検出されており、この成分が和牛香の重要な構成成分の一つであることを確認した (Table 3.1-2)。しかし、和牛香における寄与度は Guth ら²²⁾の実験結果ほど高くはなく、和牛香には 12-methyltridecanal (15) に加えて、さらに *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (17) を始めとする、不飽和脂肪酸の酸化により生成するアルデヒド類やケトン類などの香気成分が必要であることが明らかになった。

Table 3.1-3 Result of AEDA of volatile fraction isolated from stewed beef (FD \geq 2).²²⁾

RI ^a	Compound	FD factor
1078	hexanal	4
1290	1-octen-3-one	4
1346	3-mercapto-2-pentanone	2
1378	nonanal	4
1428	2-furfurylthiol	16
1435	acetic acid	8
1443	2-ethyl-3,5-dimethylpyrazine	2
1445	methional	32
1520	(<i>E</i>)-2-nonenal	4
1613	butyric acid	64
1657	2-/3-methylbutyric acid	8
1686	(<i>E,E</i>)-2,4-nonadienal	2
1741	2-acetylthiazoline	8
1793	(<i>E,E</i>)-2,4-decadienal	8
1863	12-methyltridecanal	128
1988	<i>trans</i> -4,5-epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	2
2025	4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2 <i>H</i>)-furanone	1024
2192	3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5 <i>H</i>)-furanone	32

^a Retention index on FFAP column.

3.2 分岐鎖アルデヒドの生成量と牛肉調理条件の関係

和牛香気では, 煮込んだ牛肉香気の特徴成分である 12-methyltridecanal (**15**) は, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal (**17**) よりも寄与度がかなり低かった (Figure 3.2-1)²²⁾. このような差異を生じた原因として, 実験に用いた牛肉の種類や加熱条件の違いが影響している可能性が考えられる.

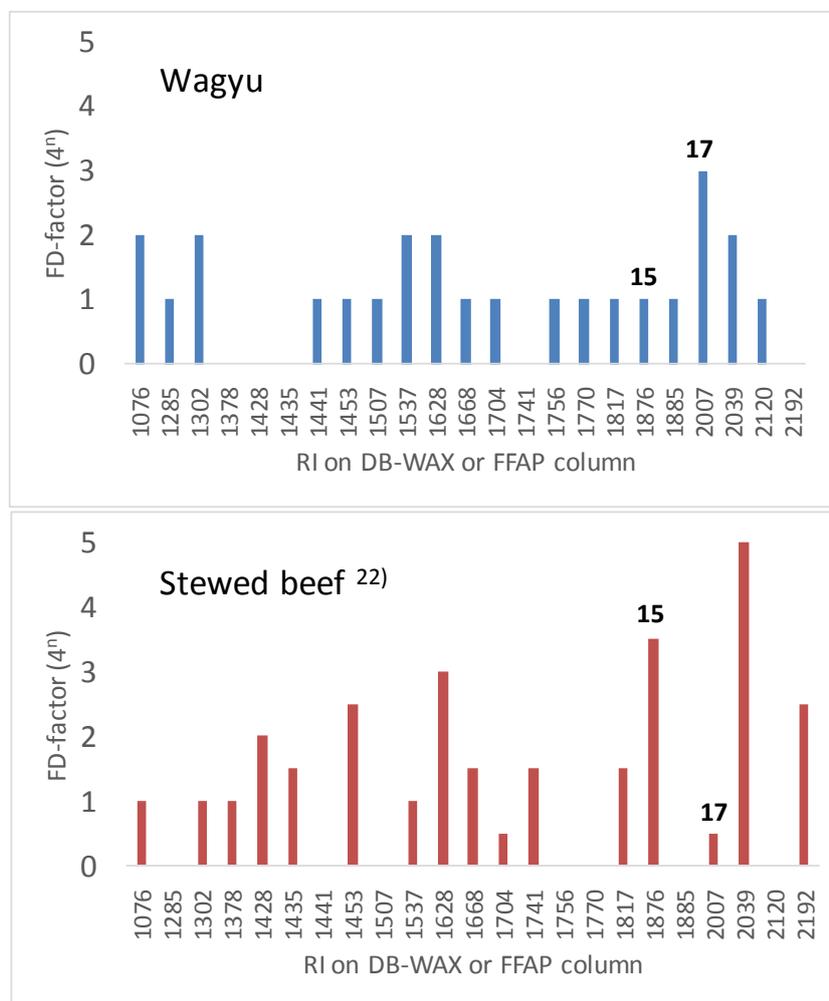


Figure 3.2-1 Aromagrams of Wagyu (upper) and Stewed beef²²⁾ (bottom).

(**15**: 12-methyltridecanal, **17**: *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal)

Guth らの煮込んだ牛肉香気の研究は、ドイツ牛肉の赤身部分を水とともに密封容器にて 200°Cのオーブンで4時間加熱した結果であり²²⁾、上述の脂肪交雑の多い和牛を80°Cで2分間湯煎した際に生じる和牛香の探索で採用した条件とは大きく異なる。このような調理条件（牛肉の種類や加熱条件）の違いが生成する香気成分の違いに影響していると推察した。

そこで、本項では牛肉香気に及ぼす調理条件の影響を、しゃぶしゃぶのように穏やかに加熱をした和牛とシチューのように煮込んだ牛肉、それぞれの牛肉料理香気の特徴成分である *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal と 12-methyltridecanal に着目し、牛肉の種類と加熱条件の関係について検討した。

3.2.1 実験方法

3.2.1.1 牛肉試料

和牛は、三重県産松阪牛（31ヶ月齢の雌，リブローズ，A5等級），東京都産黒毛和種（27ヶ月齢の雌，リブローズ），群馬県産黒毛和種（30ヶ月齢の雌，リブローズ）を株式会社マルヨシ商事より購入した。輸入牛は，グラスフェッドのオーストラリア産牛肉3種類（キューブロール2種，ストリップロイン1種）を株式会社マルヨシ商事より購入した。オーストラリア産牛肉は品種や月齢，雌雄は不明の肉専用種であり，本項ではこの試料をオーストラリア牛と定義する。これらの牛肉は食べるのに適した状態になるまで熟成されたものを，薄切りにした状態（2-3 mmの厚さに加工）で購入し，実験に使用するまでは-25°Cで冷凍保管し，使用する前日に一晚5°Cで保管し解凍した。

3.2.1.2 試薬

methyl nonanoate は東京化成株式会社より購入した。

trans-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は 3.1.1.2 で合成したもの、12-methyltridecanal は 2.1.1.2 で合成したものをを用いた。

3.2.1.3 牛肉の加熱

牛肉を 3 通りの条件 (80°C2 分間, 80°C60 分間, 121°C20 分間) で加熱した。すなわち、厚さ 2-3 mm の薄切り肉を重ねないようにボイル用パック (藤森工業株式会社) に入れて真空包装し、80°C のウォーターバス中で 2 分間あるいは 60 分間加熱した。また、薄切り肉を耐熱性のレトルト用パック (藤森工業株式会社) に入れて真空包装し、レトルト殺菌機 (ニッセン社製 PRS-02-II-VC) にて 121°C20 分間加熱した。

3.2.1.4 香気濃縮物の調製

牛肉の香気抽出液は、3.1.1.3 に記載した方法で、加熱した牛肉から調製したペースト (120 g, 肉 60 g 分) からジエチルエーテル 160 mL で香気を抽出し、内部標準物質 (methyl nonanoate 50 ng) を添加後、SAFE を行い濃縮した (約 100 μ L)。

3.2.1.5 官能評価

和牛とオーストラリア牛の 2 種類の牛肉について、3.2.1.3 の 3 通りの加熱をした 6 種類の牛肉について、食べたときの鼻から抜ける香気を 7 名 (20 代から 40 代の男性 4 名と女性 3 名) で評価した。評価用語は「まろやかな脂の甘さ」と「煮込んだ牛肉様」を設定し、香気の強度を 1 (きわめて弱い, ない), 2 (弱い), 3 (やや弱い), 4 (普通), 5 (やや強い), 6 (強い), 7 (きわめて強い) の 7 段階尺度で評価した。コントロールとして、和牛を 80°C2 分間加熱したものを「まろやかな脂の甘さ」が 7 点、オーストラリア牛を 121°C20 分間加熱したものを「煮込んだ牛肉様」が 7 点と定義し、6 種類の検体を同時に提示した。得られた結果は平均値で示し、Tukey の多重比較検定

を行った。

3.2.1.6 酸加水分解による遊離アルデヒド類の調製

牛肉における 12-methyltridecanal の前駆体はプラズマローゲンであり、希塩酸の処理でアルデヒド類が生じると報告されている²²⁾。そこで、オーストラリア牛を赤身と脂身に分け、それぞれ 0.2 g を以下の方法で酸加水分解し、遊離するアルデヒド類を回収した。4N-HCl (20 mL) を加え、加熱還流 (約 100°C にて 1.5 時間反応後に、氷浴にて冷却) 後、遊離したアルデヒド類をジエチルエーテルで抽出した (10 mL×2 回)。次いで、アルデヒド類を含む抽出液に内部標準物質 (methyl nonanoate, 500 ng) を添加し、1N-Na₂CO₃ 水溶液で洗浄して酸を除き (10 mL×2 回)、飽和食塩水で洗浄した (10 mL×2 回)。無水硫酸ナトリウムで乾燥後、SAFE (5×10⁻³ pa, 40°C) にて不揮発性成分を除き、アルデヒド類を含む留分を得た。この留分は、ロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35 °C)、次いで窒素気流で濃縮した (約 100 μL)。

3.2.1.7 GC-MS

ガスクロマトグラフは Agilent 社製 7890B、質量検出器は Agilent 社製 5977A を使用し、以下の条件で分析した。カラム：DB-WAX (60 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm) および DB-1 (30 m×0.25 mm i.d. 膜厚 0.25 μm, とともに Agilent 社製)。二種のアルデヒドは、夾雑ピークとの分離やピーク形状の良好さから、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal を DB-WAX カラム、12-methyltridecanal を DB-1 カラムで定量した。オープン温度：35°C (1 min ホールド) ~230°C (3°C/min) および 80°C~260°C (3°C/min) ~300°C (20°C/min)。キャリアーガス：ヘリウム (流速：1.0 mL/min)。注入法：パルスドスプリットレス注入およびスプリットレス注入。注入口温度：250°C。試料注入量：パルスドスプリットレス注入 (5 μL)、スプリットレス注入 (2 μL)。質量検出器：イオン化電圧 70 eV

(EI), イオン源温度 150°C.

3.2.1.8 アルデヒドの定性定量

2種のアルデヒド (*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, 12-methyltridecanal) は, マススペクトル, GC における保持指標 (RI) を標品のそれらと比較することにより同定した. これらアルデヒドの定量値は, methyl nonanoate を用いた内部標準法にて算出し, Selected Ion Monitoring (SIM) にて測定した GC-MS のマスクロマトグラム のピーク面積値を用いた. 定量に用いたイオンの質量数とレスポンスファクターは, **Table 3.2-1** に示したとおりである. 内部標準物質に対する各成分のレスポンスファクターは, 等重量に混合した各標品と内部標準物質を GC-MS 測定し, 該当する質量数にてイオン抽出したクロマトグラムの面積値より決定した.

Table 3.2-1 Selected ions and calibration factors used for quantification by SIM

Compound	RI		Selected ion (m/z)	Calibration factor
	DB-Wax	DB-1		
<i>trans</i> -4,5-epoxy-(<i>E</i>)-2-decenal	1995		68	0.682
12-methyltridecanal		1872	82	2.693
methyl nonanoate ^a	1501	1207	74	1.000

^a Internal standard

3.2.2 結果と考察

3.2.2.1 調理条件の異なる牛肉に含まれる特徴香成分量

煮込んだ牛肉の特徴香として beef-like な香調を有する 12-methyltridecanal が報告されている²²⁾. 一方, 前節において, 穏やかに加熱した和牛の特徴香に最も寄与する香気成分として sweet な香調の *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal を見出した. この様な差異が牛肉の種類や加熱条件といった調理条件の違いによって生じることを想定し, 異なる

調理条件で調製した牛肉に含まれる 12-methyltridecanal と *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal を定量した。すなわち、牛肉は穀物で肥育された和牛（松阪牛）と牧草で飼育された輸入牛（オーストラリア産，グラスフェッド）を用い，加熱条件は 80°C2 分間（和牛の特徴香を生じる条件），80°C60 分， 121°C20 分間（レトルト条件）の 3 条件である（Figure 3.2-2）。

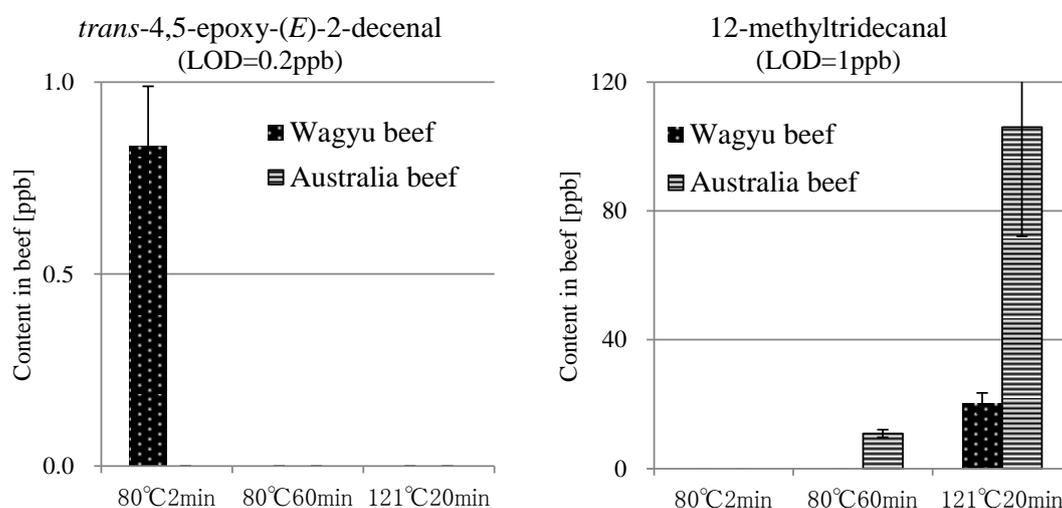


Figure 3.2-2 Amounts of *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal and 12-methyltridecanal in Wagyu beef and Australia beef.

その結果，*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は，オーストラリア牛からは検出されず，穏やかな加熱条件の和牛のみに検出され，さらに高温，あるいは加熱時間の長い条件では，和牛であっても検出することはできなかった。ただし，この成分の検出限界は 0.2 ppb であるため，80°C2 分間加熱した和牛以外の牛肉の含有量は検出限界に至らなかった可能性がある。一方，12-methyltridecanal は，穏やかな加熱条件ではいずれの牛肉からも検出されず（この成分の検出限界は 1 ppb である），高温で加熱したオーストラリア牛では含有量が増加した。さらに，最も加熱の程度が高い条件では，オーストラリア

ア牛は和牛の約 5 倍量の 12-methyltridecanal が検出された。

このように、この 2 種類のアルデヒドの含有量は、調理条件により大きく変化した。さらに、この現象の普遍性を調べるために、複数個体の和牛およびオーストラリア牛（各々 3 個体）について、80°C2 分間と 121°C20 分間の加熱における 2 種類のアルデヒドの含有量を調べた (Figure 3.2-3)。その結果、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、オーストラリア牛からは検出されず、穏やかに加熱した和牛のみから検出された。一方、12-methyltridecanal は穏やかな加熱条件では、いずれの牛肉からも検出されず、121°C20 分間の加熱では、和牛よりもオーストラリア牛から多く検出された。この結果は、この 2 種類のアルデヒドの含有量が、牛肉の種類や加熱条件といった調理条件の影響を強く受けることを示しており、シチューなどの煮込んだ牛肉の特徴香²²⁾と、しゃぶしゃぶなどの穏やかな加熱条件における和牛の特徴香が異なったという 3.1.2.4 の結果と一致している。

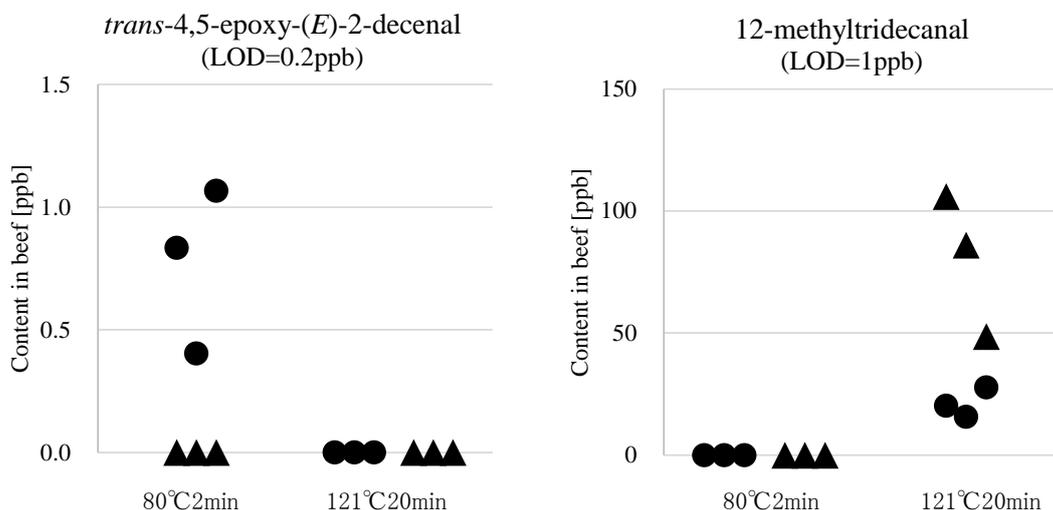


Figure 3.2-3 Amounts of *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal and 12-methyltridecanal

in other Wagyu beefs and Australia beefs

(●: Wagyu beef, ▲: Australia beef).

3.2.2.2 調理条件の異なる牛肉の官能評価

各調理条件の牛肉中の 2 種類のアルデヒド含有量の変化が、牛肉の風味に与える影響を官能評価で確認した。官能評価に用いた検体は、定量値を算出した時と同様に、和牛とオーストラリア牛を、3 つの条件（和牛の特徴香を生じる 80°C2 分間、さらに加熱をした 80°C60 分、極力煮込んだ状態を想定したレトルト条件 121°C20 分間）で加熱した 6 種類（①～⑥）を準備した（Table 3.2-2）。評価用語として、「まろやかな脂の甘さ」と「煮込んだ牛肉様」を設定し、検体を食べた際の強度を、7 段階の尺度で評価した。なお、「まろやかな脂の甘さ」は *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の特徴を、「煮込んだ牛肉様」は 12-methyltridecanal の特徴を、それぞれを表現した評価用語である。さらに、Control A として、和牛を 80°C2 分間加熱した①と同じものを用意し「まろやかな脂の甘さ」が 7 点、一方、Control B として、オーストラリア牛を 121°C20 分間加熱した⑥と同じものを用意し「煮込んだ牛肉様」が 7 点と定義し、検体と同時に提示した。

Table 3.2-2 Samples of sensory evaluation.

	Heating conditions		
	80°C2min	80°C60min	121°C20min
Wagyu beef	①	②	③
Australia beef	④	⑤	⑥

評価者 7 名の結果を Figure 3.2-4 に示した。「まろやかな脂の甘さ」は、オーストラリア牛よりも和牛で強く感じられ、特に、80°C2 分間の加熱条件が最も強く、加熱が強まるにしたがって、その強度は弱まった。上述の定量実験では、80°C2 分間加熱した和牛以外の牛肉に *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は検出できなかったものの、この成分の閾値（水中 0.015ppb）⁷⁸⁾が検出限界（0.2ppb）よりもかなり低いことから、検出限界以下で含まれるこの成分を官能評価では捉えることができた可能性がある。一方、「煮込

んだ牛肉様」は、和牛よりもオーストラリア牛で強く感じられ、加熱が強まるに従って強まった。上述の定量実験で 12-methyltridecanal が検出されなかった牛肉であっても官能評価で捉えられた理由として、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal と同様にこの成分の閾値（水中 0.1ppb）²²⁾が検出限界（1ppb）よりも低いことが影響している可能性がある。

「まろやかな脂の甘さ」が *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の特徴を、「煮込んだ牛肉様」が 12-methyltridecanal の特徴を、それぞれを表現した評価用語であることを考え合わせると、この官能評価結果は各アルデヒド含有量の挙動と概ね一致していると思われる。さらに、合わせて収集した評価コメントによると、121°C20 分間（レトルト条件）加熱したオーストラリア牛は、「ビーフジャーキー様」や「レトルト臭」といった牛肉料理としては好ましくないコメントが見受けられた。この評価コメントは、121°C20 分間（レトルト条件）加熱した和牛では認められなかったことから、牛肉料理における 12-methyltridecanal の含有量には適正な範囲があり、その範囲を超えた場合は牛肉料理の嗜好性の向上には繋がらない可能性がある。

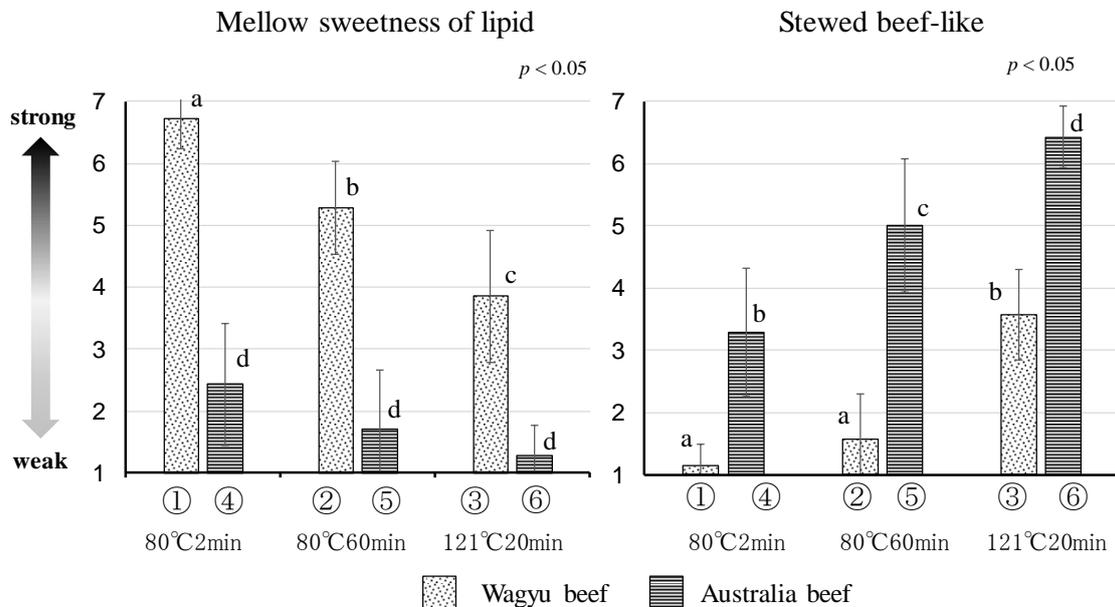


Figure 3.2-4 Sensory evaluation of cooked beef by various heating conditions.

(The different alphabet shows significant difference.)

3.2.2.3 牛肉特徴香成分の調理特性

スイートな香調を有する *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、穏やかな加熱条件の和牛に多く含まれることから、しゃぶしゃぶの様な料理で感じられる和牛の特徴香に強く関与していると言える。一方、牛肉様の香調を有する 12-methyltridecanal は、和牛よりもオーストラリア牛に多く含まれ、さらに加熱が強まるにしたがって含有量が増すことから、シチューなどの煮込み調理が重要な牛肉料理の特徴香に強く関与していると言える。このように、それぞれのアルデヒドの含有量は、牛肉の種類や加熱条件といった調理条件の影響を強く受けることを明らかにしたが、この調理特性を生じる要因には、これらのアルデヒドの生成機構や熱安定性、あるいは前駆体の含有量の違いが影響することが推察される。

trans-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal は、和牛に多く含まれるリノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸より生じることが報告されている⁷¹⁻⁷³⁾。さらに、この香気成分の熱安定性はアミノ酸などの求核試薬が共存すると著しく低下することが報告されている⁷⁹⁾。穏やかに加熱した和牛のみに検出され、高温あるいは長時間の加熱条件で検出されなかった今回の結果は、上記の知見とは矛盾しない。また、和牛香の生成に必要なとされる3つの条件は、高度な脂肪交雑、酸素存在下での熟成、そして最適な加熱温度であることが報告されており^{40,44-46)}、これらも *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal の生成に必要な、脂質（特に不飽和脂肪酸）の存在とその酸化、さらに穏やかな加熱条件（温度、時間）に適うため、和牛香の形成に *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal が関与していると考えられる。

一方、12-methyltridecanal は、牛肉の種類と含有量の関係は不明であるが、特殊なリン脂質であるプラズマローゲンの加水分解により生成し²²⁾、その熱安定性は比較的高いことが予想される。従って、前駆体を多く含有する牛肉ほど、あるいは加熱をするほど、牛肉中の 12-methyltridecanal は増加することが示された。

このような、それぞれのアルデヒドの調理特性の違い、すなわち生成機構や熱安定性、あるいは前駆体量の違いを巧みに利用することで、我々は、様々な牛肉料理の嗜好性を経験的に高めてきたと考えられる。

3.2.2.4 牛肉における 12-methyltridecanal の前駆体の分布

2-Methyltridecanal は、和牛よりもオーストラリア牛に多く含まれていた。また、その前駆体であるプラズマローゲンは、牛肉の場合、運動量の多い筋肉に多く含まれていることが報告されている⁸⁰⁾。つまり、和牛よりもオーストラリア牛に 12-methyltridecanal が多かった原因として、筋肉（赤身）の割合の高さが影響していることが予想される。しかし、プラズマローゲンから加水分解により生じるアルデヒドは、12-methyltridecanal だけではなく、多くの種類から構成されており、その主成分は hexadecanal などの直鎖アルデヒドである^{76,80)}。そのため、加水分解で生じた主成分の量に基づいた、牛肉におけるプラズマローゲンの分布に関する過去の知見⁸⁰⁾を、12-methyltridecanal の分布にも適用できるかどうかは不明である。そこで、オーストラリア牛の赤身（筋肉）および脂身（脂肪）から、塩酸加水分解にて生じる分岐鎖および直鎖アルデヒド類の量を比較した（**Figure 3.2-5**）。

加水分解にて生じたアルデヒド量は、直鎖アルデヒドの場合、過去の知見と同様に、筋肉である赤身から多く検出された（赤身： 71.5 mg/g, 脂身： 13.3 mg/g）。一方、検出されたアルデヒドの総量は、赤身と脂身との差は大幅に縮まり（赤身： 81.2 mg/g, 脂身： 53.3 mg/g）、煮込んだ牛肉の特徴香である 12-methyltridecanal に限定すると、その含有量は赤身よりも、むしろ脂身に多く含まれる結果となった（赤身： 0.7 mg/g, 脂身： 18.7 mg/g）。すなわち、赤身の割合が高いオーストラリア牛に 12-methyltridecanal の前駆体が多いという仮説は可能性が低く、例えば、品種の違いや肥育に用いた飼料の違いなどが、12-methyltridecanal の前駆体量により影響している可

能性がある.

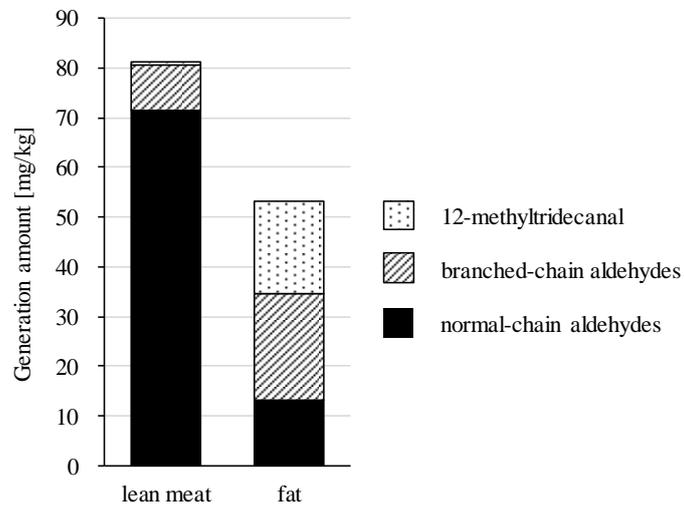


Figure 3.2-5 Amounts of aldehydes that were generated by the hydrolysis of Australia beef

3.3 要約

本章では、日本のみならず海外においても嗜好性が高い和牛特有の好ましい香気に寄与する成分を、和牛と輸入牛（オーストラリア産）の比較により明らかにした。さらに、加熱（煮込み）調理した牛肉香気の特徴成分である 12-methyltridecanal に着目し、和牛香気における役割、牛肉の調理条件（肉種や加熱条件）と含有量の関係、さらに前駆体について検討した。

まず、嗜好性の高い高級食材である和牛の特徴香（和牛香）に着目し、和牛と輸入牛（オーストラリア産）の香気寄与成分を AEDA にて比較したところ、和牛香気として新規な 11 成分 (1-octen-3-one, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, methional, (Z)-2-nonenal, butyric acid, isovaleric acid, (E,Z)-2,4-decadienal, 12-methyltridecanal, *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, (E,Z,Z)-2,4,7-tridecatrienal) を認めた。また、和牛において高い寄与度を示した成分の半数が脂質に由来するアルデヒド類やケトン類 (hexanal, 1-octen-3-one, (Z)-2-nonenal, (E)-2-nonenal, (E,E)-2,4-nonadienal, (E,Z)-2,4-decadienal, (E,E)-2,4-decadienal, *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal, (E,Z,Z)-2,4,7-tridecatrienal) であり、中でも最も高い寄与度を示した sweet, juicy, metallic な香調を有する *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal が、リノール酸やアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸の酸化により生成する成分であったことから、和牛香が脂質に由来する香気成分の影響を強く受けることが明らかになった。

次いで、牛肉香気に及ぼす調理条件の影響を、和牛で最も高い寄与度を示した *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal と煮込んだ牛肉の特徴成分である 12-methyltridecanal に着目し、牛肉の種類や加熱条件との関係について検討した。その結果、スイートな香調を有する *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal は、穏やかな加熱条件の和牛に多く含まれ、しゃぶしゃぶの様な料理で感じられる和牛の特徴香に強く関与した点と一致した。一方、牛肉様

の香調を有する 12-methyltridecanal は、和牛よりもオーストラリア牛に多く含まれ、さらに加熱が強まるにしたがって含有量が増加したことから、シチューなどの煮込み調理が重要な牛肉料理の特徴香に強く関与する点と一致した。このように、それぞれのアルデヒドの含有量は、牛肉の種類や加熱条件といった調理条件の影響を強く受けることを明らかにし、この様な調理特性を生じる要因として、これらのアルデヒドの生成機構や熱安定性、あるいは前駆体の含有量の違いが影響する可能性を推察した。さらに、官能評価において牛肉料理における 12-methyltridecanal の含有量には適正な範囲があり、その範囲を超えた場合は牛肉料理の嗜好性の向上には繋がらない可能性を認めた。

以上の結果から、12-methyltridecanal は、*trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal を始めとする不飽和脂肪酸の酸化により生じるアルデヒド類やケトン類などの香気成分とともに、嗜好性の高い高級食材である和牛香気 of 重要な構成成分のひとつであり、牛肉の種類や加熱条件といった調理条件の影響を強く受けることを明らかにした。

第4章 胡椒の香気と分岐鎖アルデヒドの香気の相互作用

ここまでの研究結果から、12-methyltridecanalをはじめとする一連の分岐鎖アルデヒド類は、希少価値の高い高級食材である熟成したゴーダチーズや和牛にとって重要な香気成分であり、その香気に対する寄与度は、チーズにおける熟成期間や牛肉料理における調理条件の影響を受けて大きく変動することを明らかにした。さらに、牛肉料理の場合、これらの含有量には適正な範囲がある可能性を認めた。一方、ナチュラルチーズや牛肉には、一連の分岐鎖アルデヒド類の前駆体が大量含まれており、香気成分として発現する分岐鎖アルデヒド量は、その一部分であることも明らかになった。したがって、簡単に“おいしく”の実現が求められる加工食品の工業的な製造にとって、一連の分岐鎖アルデヒド類量を適正範囲で賦与するとともに、適正範囲を超えた場合であっても嗜好性を保つことが重要である。

ここでは後者について、牛肉料理の香気との相性が良いとされる胡椒の香気に着目し、それぞれの香気に含まれる特徴成分間の相互作用に関する検討を試みた。多くの研究例がある香気成分間の相互作用は、香りの強度を変化させる作用（香気増強や抑制）と香りの質を変化させる作用（香気修飾）に大別され、これらの作用は食品の“おいしさ”と密接に関係すると言われている⁸¹⁻⁸⁴。

一方、胡椒は、一般に収穫時期や製法の違いにより大別され、黒胡椒（未熟果を乾燥）や白胡椒（表皮を除いた完熟果を乾燥）について、それらの精油成分を中心に多くの研究がある⁸⁵。さらに、AEDA や Gas Chromatography-Olfactometry of Headspace sample (GCO-H) により、胡椒に含まれる香りに寄与する成分に加えて、拡散性のある挽きたての香りに寄与する成分を探索した結果も報告されている⁸⁶⁻⁸⁸。近年、胡椒の香気に重要な役割を果たす可能性のある成分として、セスキテルペンの一種である rotundone が新たに見出された⁸⁹。しかし、この成分の胡椒香気における寄与度は、先

の黒胡椒と白胡椒における探索研究では明らかにされておらず、胡椒香氣における rotundone の重要性には、未だ不明な点が残されている。一方、近年、広まりつつある完熟胡椒（完熟果を乾燥）は、胡椒特有のスパイシーな香調に加え、フルーティーですっきりとした香調をとめない、その良質な香氣は様々な食品への応用が期待されている。

本章では、まず同一産地で収穫された 3 種の胡椒（完熟胡椒、黒胡椒、白胡椒）について、各々の香氣濃縮物とヘッドスペースガスに含まれる香氣成分を探索し、その比較を通して胡椒の特徴的な香氣に寄与する成分の解明を試み、次いで、その特徴成分と牛肉の特徴香氣成分のひとつである 12-methyltridecanal の相互作用を香氣増強や抑制、香氣修飾の観点から検討した。

4.1 実験方法

4.1.1 胡椒試料

黒胡椒，白胡椒および完熟胡椒は，市販品を日本スパイス株式会社より購入し，実験に使用するまで $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保管した．これらの胡椒は，いずれもカムポット州（カンボジア）の同じ地域にて，ほぼ同一時期（2015年，5月）に収穫された果実から現地にて製造されたものである．

4.1.2 試薬

3-methylbutanal, 2,3-butanedione, limonene, 1,8-cineole, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, acetic acid, methional, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, isovaleric acid, geraniol, 2-methoxyphenol, *p*-cresol, carvacrol, piperonal, vanillin は東京化成株式会社から購入した． α -pinene, myrcene, (\pm)-linalool, (*R*)-(-)-linalool, (*S*)-(+)-linalool はシグマアルドリッチジャパン合同会社より購入した． β -damascenone は日本フィルムニッヒ株式会社より，(*Z*)-methyl jasmonate は日本ゼオン株式会社より，(*Z*)-6-dodecen-4-olide は R.C.Treath より購入した．

rotudone は文献記載の方法で合成した⁹⁰⁾．合成した標品はマススペクトルと RI⁸⁹⁾により同定した．

rotundone. MS/EI *m/z* (%): 218 (100, M⁺), 203 (83), 163 (40), 161 (53), 147 (42), 137 (31), 119 (46), 105 (44), 91 (51); RI_{DB-WAX}=2276, RI_{DB-1}=1693.

12-methyltridecanal は 2.1.1.2 の方法で合成したものをを用いた．

4.1.3 香気濃縮物の調製

液体窒素中で冷却した粒胡椒を専用のミルで細挽きに粉碎し，胡椒粉末を得た．得

られた胡椒粉末 (5 g) に, 5% (v/v) の蒸留水を含むジエチルエーテル (20 mL) と内部標準 (2-octanol, 100 µg) を加え, 30°Cの水浴中で 10 分間, 超音波を照射し, 胡椒に含まれる香気成分を抽出した. ろ紙ろ過により固形物を除いた香気抽出液(約 15 mL) は, 無水硫酸ナトリウムにて脱水後, SAFE (5×10⁻³ Pa, 40°C) にて不揮発性成分を除去し, 香気成分を含む留分を得た. 香気成分を含む留分は, ロータリーエバポレーター (550 mmHg, 35°C), 次いで窒素気流で濃縮した (約 150 µL).

4.1.4 成分同定のための香気成分の濃縮

胡椒の香気成分は, 専用のミルで粉碎した胡椒 (20 g) から溶媒抽出と SAFE を組み合わせた 4.1.3 の方法で抽出し, さらに約 2 mL まで濃縮した. この香気濃縮物の半量について, 2.1.1.4 に記載したシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画を行い, 画分 A~E を得た.

4.1.5 GC-O

においかぎシステム (ODP3, Gerstel 社製) を装備した Agilent 社製 7890N ガスクロマトグラフを使用し, 以下の条件で GC-O を行った. カラム: DB-WAX (30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 µm, Agilent 社製). オープン温度: 40°C~210°C (5°C/min). キャリアーガス: ヘリウム (流速: 1.0 mL/min). 注入法: スプリットレス注入. 注入口温度: 250°C. 試料注入量: 1 µL. 検出器: 水素炎イオン検出器 (FID, 250°C). ODP3 は 250°C で使用し, カラム出口にて FID と分岐した (FID : ODP3=1 : 10).

4.1.6 AEDA

4.1.3 で調製した胡椒の香気濃縮物はジクロロメタンにより段階的に希釈した (4 倍, 16 倍, 64 倍, ... 4⁸ 倍). これらの希釈液 (1 µL) を GC-O に注入し, AEDA の手法で

香気寄与成分の FD-ファクターを決定した。各香気寄与成分の FD-ファクターは 4 名の評価者のうち 3 名以上が検出した値を採用した。

4.1.7 Gas chromatography-olfactometry of headspace samples (GCO-H)

GCO-H⁹¹⁻⁹³)は 4.1.5 で使用した装置を用い、試料導入にはゲステル社製 TDU と CIS-4 注入口を組み合わせて使用した。ミルで粉碎して得た胡椒粉末 (0.1 g) は、50mL 容のガラスバイアルに入れて密栓した後、ヘッドスペースを 40°C の水浴中で 30 分間平衡化した。平衡化したヘッドスペースガスは、ガスタイトシリンジにて一定容量を採取した。採取したヘッドスペースガスと FD-ファクターの関係は、1 mL = FD1, 0.5 mL = FD2, 0.25 mL = FD4, 0.1 mL = FD10 である。次いで、ガスタイトシリンジで採取したヘッドスペースガスは、2.5 分間かけて加熱脱着モードの TDU/CIS-4 システム (TDU: 250°C, CIS-4: -100°C) に注入後、CIS-4 を急速に 260°C まで昇温し、香気成分の全量をスプリットレスモードで GC へ導入した。各香気成分の FD-ファクターは 4.1.6 と同様に 4 名の評価者のうち 3 名以上が検出した値を採用した。

4.1.8 GC-MS

ガスクロマトグラフは Agilent 社製 7890N, 質量検出器は Agilent 社製 5975C を使用した。カラム: DB-WAX (60 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 社製) および DB-1 (30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 社製)。オープン温度: スプリットレス注入時は 40°C ~ 230°C (3°C/min)。スプリット注入時は 80°C ~ 230°C (3°C/min)。キャリアーガス: ヘリウム (流速: 1 mL/min)。注入法: スプリットレス注入あるいはスプリット注入。注入口温度: 250°C。試料注入量: スプリットレス注入時は 0.2 μL。スプリット注入時は 1 μL (スプリット比 30:1)。質量検出器: イオン化電圧 70 eV, イオン源温度 150°C。

4.1.9 成分の同定

香気寄与成分の同定はマススペクトル，GCにおける保持指標（RI）および香調を，標準物質のそれらと比較することにより行った。

4.1.10 linalool の光学異性体分析

各胡椒に含まれる linalool の鏡像体過剰率（enantiomer excess, ee）は，キラルキャピラリーカラムを装備した GC における 4.1.4 で調製した画分 C に含まれる linalool のピーク面積値より算出した。装置および条件は以下の通りである。

装置：Agilent 社製 6890 N series ガスクロマトグラフ。カラム：InertCap CHIRAMICS (30 m×0.25 mm i.d. 膜厚 0.25 μm, GL Science 社製)。オープン温度：60℃～180℃ (0.7℃/min)。キャリアーガス：窒素（流速：0.7 ml/min）。注入口：スプリット注入（スプリット比：1/50），温度（250℃）。試料注入量：1μl。検出器：水素炎イオン化検出器（FID）（250℃）。

4.1.11 官能評価

過度に加熱（レトルト条件）したオーストラリア牛肉一口分（20g）に胡椒（0.008g）をかけた状態を想定し，各化合物（12-methyltridecanal, rotundone, (R)-linalool）の濃度を調整した水溶液を調製した（Table 4.1-1）。コントロールとして 12-methyltridecanal のみの水溶液を提示し，rotundone と共存したとき（Sample A）と，(R)-linalool と共存したとき（Sample B），および両方と共存したとき（Sample C）における，コントロールと比較して感じる香りの質と強さを比較し 15 名（20 代から 40 代の男性 9 名と女性 6 名）で評価した。すなわち，コントロールと同じを 4，コントロールより若干弱い（強い）を 3（5），コントロールより弱い（強い）を 2（6），コントロールより極めて弱いまたはない（きわめて強い）を 1（7）とし，かいだときの香り（Orthonasal aroma）

と、飲んだときの香り (Retronasal aroma) を評価した。得られた結果は平均値で示し、Tukey の多重比較検定を行った。さらに、各サンプルにおいてコントロール (12-methyltridecanal) の香りが増加したと感じた場合は、コメントを記述するよう指示した。

Table 4.1-1 Samples of sensory evaluation

	Control	Sample A	Sample B	Sample C
12-methyltridecanal	100 ppb	100 ppb	100 ppb	100 ppb
rotundone	—	0.05 ppb	—	0.05 ppb
(<i>R</i>)-linalool	—	—	8 ppb	8 ppb

4.2 結果および考察

4.2.1 胡椒の香気寄与成分

各胡椒の香気濃縮物は、溶媒抽出法と SAFE を組み合わせて調製した。胡椒香気の抽出は、抽出溶媒の極性が低すぎても、高すぎても良い結果は得られず、ジエチルエーテルが比較的適していることがわかった。しかし、ジエチルエーテルでも、抽出液の香りは弱く、胡椒本来の香調を再現することはできなかった。そこで、過去の研究例⁹⁴⁻⁹⁶⁾を参考に、ジエチルエーテルに対して少量の蒸留水を添加した抽出溶媒を使用したところ、香りの強度、香調ともに大幅に改善され、特に、5%の蒸留水を添加した場合に、最も良好な香気抽出液が得られることが明らかとなった。この結果を基に、成分探索に用いる香気濃縮物の調製法を決定した。すなわち、液体窒素にて十分に冷却した粒胡椒を細挽きして得た胡椒粉末から、5%の蒸留水を含むジエチルエーテルで香気成分を抽出し、次いで、SAFE にて不揮発性の成分を除去した香気濃縮物を調製した。このようにして得られた香気濃縮物は、胡椒本来の香りを良く保持しており、GC-O による香気寄与成分の探索に適した試料と判断した。

3種の胡椒の香気寄与成分を AEDA にて探索したところ、FD-ファクターが 4³ から 4⁸ の範囲に 23 ピークが検出され、胡椒の香気が spicy な香調を中心に、多彩な香調の寄与成分から成り立っていることが確認された (Table 4.2-1)。これらの 23 ピークに相当する香気寄与成分の多くは含有量が少ないため、構造決定には GC-O に用いた香気濃縮物の他に、約 20 g の各胡椒から得た香気濃縮物も用いた。得られた香気濃縮物は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製後、得られた各画分を極性および非極性カラムによる GC-O と GC-MS にて詳細に分析した。その結果、同定にいたらなかった成分 (ピーク 13 と後述の rotundone : 20) を除く 21 成分を同定、もしくは推定することができた。それらの中で acetic acid : 8, (Z)-methyl jasmonate : 21, (Z)-6-dodecen-4-

olide : **22** の 3 成分は胡椒の香気成分としては新規成分であった。

次いで、各胡椒における香気寄与成分の FD-ファクターを比較したところ、最も高い FD-ファクターを示した(*R*)-linalool (**11** : floral) をはじめ、多くの成分の FD-ファクターは各胡椒で共通であったが、一部の成分に明確な違いが認められた。完熟胡椒の香気は、他の胡椒よりも同定にいたらなかった成分 (**20**), β -damascenone (**14** : sweet, fruity) の FD-ファクターが高く、2,3-butanedione (**2** : milky), methional (**9** : green, potato-like), geraniol (**15** : floral, rose-like), 2-methoxyphenol (**16** : smoky, burnt) の FD-ファクターが低かった。この結果は、完熟胡椒香気の特徴が、黒胡椒や白胡椒と大きくかけ離れたものではなく、一部の成分量の違いより形成される可能性を示唆しており、胡椒特有のスパイシーな香調に加え、フルーティーですっきりとした香調をともなう完熟胡椒の特徴と良く対応している。

さらに、挽きたての胡椒から漂う香気成分について、GCO-H を用いて 3 種の胡椒の比較を試みた (**Table 4.2-2**)。挽きたての胡椒は、いずれの胡椒も拡散性のある強い芳香を放っていたものの、1 mL 以下のヘッドスペースガス注入量で検出した成分数は、12 成分と意外に少なく、いずれの胡椒にも共通する揮発性の高いテルペン類やメトキシピラジン類が主体であった。しかし、この方法による比較では、FD-ファクターが 2 段階以上の明確な差異が認められないことから、挽きたての各胡椒から拡散する香りで感じる差異は、抽出物よりも小さいことが推察される。

Table 4.2-1 Potent odorants showing FD factors ($FD \geq 64$) in pepper extracts

No.	RI ^a	Compound ^b	Odor quality ^e	log ₄ (FD factor)		
				Ripe	Black	White
1	945	3-methylbutanal	stimulus	4	4	3
2	991	2,3-butanedione	milky	<3	5	<3
3	1032	α -pinene	bitter, pepper-like	4	4	4
4	1173	myrcene	bitter, pepper-like	4	5	4
5	1210	limonene	citrus-like	4	4	3
6	1223	1,8-cineole	camphorous	6	5	5
7	1434	2-isopropyl-3-methoxypyrazine	earthy, pea-like	5	5	4
8	1456	acetic acid ^d	sour	<3	3	3
9	1460	methional	green, potato-like	<3	4	<3
10	1529	2-isobutyl-3-methoxypyrazine	earthy	5	5	5
11	1551	(<i>R</i>)-linalool ^f	floral	8	8	8
12	1681	isovaleric acid	sweaty	3	4	3
13	1723	unknown	citrus-like, spicy	4	3	3
14	1824	β -damascenone ^c	sweet, fruity	4	<3	<3
15	1858	geraniol	floral	3	3	5
16	1863	2-methoxyphenol	burnt	3	5	5
17	2088	<i>p</i> -cresol	phenolic	3	<3	4
18	2217	carvacrol	spicy	4	5	4
19	2234	piperonal	sweet	5	5	6
20	2281	rotundone ^g	spicy, woody	7	5	6
21	2407	(<i>Z</i>)-methyl jasmonate ^{c,d}	floral, jasmine-like	3	3	<3
22	2413	(<i>Z</i>)-6-dodecen-4-olide ^{c,d}	sweet	3	3	<3
23	2572	vanillin	sweet	4	4	4

^a Retention index on DB-Wax column (30 m \times 0.25 mm i.d.; coated with a 0.25 μ m film) observed for GC-O.

^b The compound was identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax, mass spectra, and odor quality.

^c The MS signals were too weak for unequivocal interpretation. The compound was tentatively identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax and odor quality.

^d Newly identified compounds in pepper.

^e Odor quality assigned during AEDA.

^f The enantiomeric excess percentage of (*R*)-linalool in the pepper extract; ripe pepper: 75.3 %, black pepper: 73.2 %, white pepper: 84.3 %.

^g The stereochemistry was not determined.

Table 4.2-2 Potent odorants showing FD factor ($FD \geq 1$) in ground pepper headspace

No.	RI ^a	Compound ^b	Odor quality ^d	FD factor ^e		
				Ripe	Black	White
2	991	2,3-butanedione	milky	<1	4	<1
3	1032	α -pinene	bitter, pepper-like	2	1	1
4	1173	myrcene	bitter, pepper-like	4	4	2
5	1210	limonene	citrus-like	1	1	2
6	1223	1,8-cineole	camphorous	2	2	2
7	1434	2-isopropyl-3-methoxypyrazine	earthy, pea-like	1	2	1
10	1529	2-isobutyl-3-methoxypyrazine	earthy	2	4	1
11	1551	(<i>R</i>)-linalool	floral	10	10	10
a	1829	calamenene ^c	spicy, herbal	1	2	<1
15	1858	geraniol	floral	<1	<1	1
18	2217	carvacrol	spicy	<1	1	<1
20	2281	rotundone ^g	spicy, woody	4	2	2

^a Retention index on DB-Wax column (30 m \times 0.25 mm i. d.; coated with a 0.25 μ m film) observed for GC-O.

^b The compound was identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax, mass spectra, and odor quality.

^c The compound was tentatively identified by comparison with the reference substance on the basis of the following criteria: retention index (RI) on stationary phase DB-Wax and odor quality.

^d Odor quality assigned during AEDA.

^e The relationship between FD factor and headspace volume is follows: FD 1 = HS (1 mL), FD 2 = HS (0.5 mL), FD 4 = HS (0.25 mL), FD 10 = HS (0.1 mL).

4.2.3 rotundone (**20**) の同定

完熟胡椒において、(*R*)-linalool に次いで高い FD-ファクターを示した同定にいたらなかった成分 (**20** : spicy, woody) は、GC のクロマトグラム上で複数の成分が重なる上に、微量成分であった。そこで、この成分を同定するために、完熟胡椒試料の量を増やし、香気濃縮物を調製した。得られた香気濃縮物をシリカゲルカラムにより分画し

た結果、目的成分は画分 D に含まれることを、極性、非極性の 2 種類のカラム (DB-WAX, DB-1) による GC-O にて確認した。GC-O における保持指標 ($RI_{DB-WAX} = 2281$, $RI_{DB-1} = 1676$) に該当する成分を、GC-MS にて詳細に検討したところ、画分 D より目的とする成分のマススペクトルが得られ、文献情報⁸⁹⁾から、この成分をセスキテルペンである rotundone と推定した。文献を参考に rotundone を合成し、胡椒に含まれる同定にいたらなかった成分と比較した結果、香調、マススペクトル、2 種類のカラム (DB-WAX, DB-1) における保持指標が一致したことから、ピーク 20 の成分を rotundone と同定した。既に、rotundone は胡椒に含まれ、その含有量と閾値の低さから、胡椒香気への関与が予想⁸⁸⁾されていたが、完熟胡椒のみならず、胡椒香気全体において寄与度については言及されていなかった。したがって、今回の結果は、この成分が胡椒の香気にとって極めて重要な成分であること客観的に示した初めての報告である。

rotundone は、ワインやその原料であるブドウ果実に含まれ、ブドウ果皮中に局在しており赤ワインに多く含まれることや、果実の成熟にともない含有量が増加することが報告されている^{89,97,98)}。一方、今回の実験結果では、rotundone は黒胡椒 (未熟果) よりも白胡椒や完熟胡椒 (完熟果) の方が高い FD-ファクターを示し、さらに、同じ完熟果であっても、果皮の無い白胡椒 (果皮無) よりも、赤胡椒 (果皮有) の FD-ファクターが高い傾向が認められた。これらの知見を考慮すると、胡椒における rotundone 含有量も、ブドウ果実と同様に、果実の成熟度や果皮の有無の影響を受けることが予想され、果皮のある完熟果から作られる完熟胡椒の特徴的な香気に、この成分が深く関与する可能性が推察される。

4.2.4 胡椒の特徴香気成分の 12-methyltridecanal の相互作用

胡椒の香気に最も寄与する成分は、完熟胡椒、白胡椒、黒胡椒ともフローラルな香調を持つ(*R*)-linalool であることが明らかになった。各胡椒とも(*R*)-linalool の鏡像異性

体過剰率は 73~84%^{ee} と高く (Table 4.2-1, footnote: f), また, (S)-体の閾値 (水中 7.4 ppb) は, (R)-体の閾値 (水中 0.8 ppb) よりも約 10 倍高い⁹⁹⁾ことから, 胡椒に含まれる linalool の 8~13%を占める(S)-linalool の香気の影響は少ないと言える. さらに, 今回寄与度が明らかになった, スパイシー, ウッディーな香調を持つ rotundone も, 香気抽出物とヘッドスペース香気 of AEDA において, とともに高い FD-ファクターが観測されたことから, 胡椒の香気に寄与する重要な香気成分と言える. そこで, 胡椒の特徴香気成分として rotundone と(R)-linalool を取り上げ, この 2 成分が, 煮込んだ牛肉や熟成したチーズの香気寄与成分である 12-methyltridecanal に及ぼす影響を官能評価で確認した.

過度に加熱(レトルト条件)したオーストラリア牛肉に胡椒をかけた状態を想定し, 各化合物 (12-methyltridecanal, rotundone, (R)-linalool) の濃度を調整した Sample A~C の水溶液を調製した (Table 4.1-1). コントロールとして, 12-methyltridecanal のみの水溶液を提示し, rotundone と共存したとき (Sample A) と, (R)-linalool と共存したとき (Sample B), および両方と共存したとき (Sample C) における, コントロールと比較して感じる香りの質と強さを比較評価した. 強さは, 同等を 4 としたときの 7 段階で評価した. 各サンプルにおいてコントロール (12-methyltridecanal) の香りが変化しと感じた場合は, コメントを記述するよう指示した.

Sample A~C をコントロールと比較した結果を多重比較検定したところ, 12-methyltridecanal の強度は, (R)-linalool, rotundone では有意な変化は認められなかった (Figure 4.2-1). しかし, (R)-linalool は 12-methyltridecanal の香りを弱める傾向がみられ (Sample B), これは, さらに rotundone が加わっても同じ傾向であった (Sample C). これらの傾向は, かいだときの香り (Orthonasal aroma) と飲んだときの香り (Retronasal aroma) のいずれも同様であった. 一方, rotundone には 12-methyltridecanal の香気強度を変化させる傾向は認められなかったが (Sample A), 過剰に存在する 12-methyltridecanal の

ビーフジャーキー様の香気をまとまった調味感に変化させ、調和を促す傾向が認められた。
すなわち、(R)-linalool は香気抑制効果、rotundone は香気修飾効果を有する可能性がある。

Table 4.1-1 Samples of sensory evaluation

	Control	Sample A	Sample B	Sample C
12-methyltridecanal	100 ppb	100 ppb	100 ppb	100 ppb
rotundone	—	0.05 ppb	—	0.05 ppb
(R)-linalool	—	—	8 ppb	8 ppb

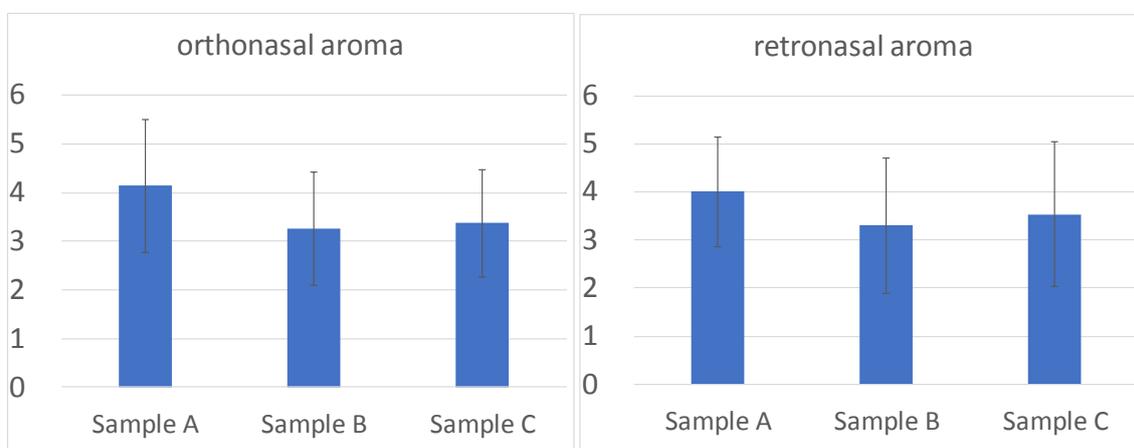


Figure 4.2-1 The influence of potent odorants of pepper to 12-methyltridecanal.

以上の結果から、胡椒香気の特徴成分である(R)-linalool と rotundone は、牛肉の特徴香気成分のひとつである 12-methyltridecanal と相互作用する可能性があり、レトルト殺菌など工業的な加工食品の製造工程で適正範囲を 12-methyltridecanal が超えた場合であっても、これらの香気成分を組み合わせることで、牛肉を調理した加工食品の嗜好性を保ちうる可能性がある。

4.3 要約

本章では、ナチュラルチーズや牛肉に大量含まれる分岐鎖アルデヒド類の前駆体から、加工食品の工業的な製造段階で過剰に生成することで問題となりうる 12-methyltridecanal をはじめとする一連の分岐鎖アルデヒド類について、適正範囲を超えた場合であっても嗜好性を保つ方法を、牛肉料理の香気との相性が良いとされる胡椒の香気に着目し、それぞれの香気に含まれる特徴成分間の相互作用に関する検討を試みた。

3種の胡椒（完熟胡椒，黒胡椒，白胡椒）に含まれる香気寄与成分を AEDA や GCO-H にて探索したところ、いずれの胡椒の香気抽出物，あるいは粉碎時に拡散する香気であっても，floral な香調を有する(*R*)-linalool が最も高い寄与度を示すことが明らかになった。さらに，spicy, woody な香調を有する rotundone も(*R*)-linalool に次いで高い寄与度を示し，とりわけ完熟胡椒にて高い傾向を示した。

次いで，胡椒の特徴的な香気成分である(*R*)-linalool と rotundone を用いて，牛肉の特徴香気成分のひとつである 12-methyltridecanal との相互作用を検討した結果，12-methyltridecanal の香気強度は(*R*)-linalool により抑えられる傾向が認められ，この効果はオルソネイザルアラロマとレトロネイザルで同じ傾向が見られた。一方，rotundone では 12-methyltridecanal の香気強度を変化させる効果は認められなかったものの，ビーフジャーキー様の香気がまとまった調味感に変化し調和を促す傾向が認められた。すなわち，(*R*)-linalool は香気抑制効果を，rotundone は香気修飾効果を有する可能性を見出した。

以上の結果から，胡椒香気の特徴成分である(*R*)-linalool と rotundone は，牛肉の特徴香気成分のひとつである 12-methyltridecanal と相互作用する可能性があり，適正範囲を 12-methyltridecanal が超えた場合であっても，これらの香気成分を組み合わせることで，例えば香料として賦与することで，牛肉を調理した加工食品の嗜好性を保ちうる可能性を見出した。

第5章 総括

本論文は、嗜好性が高く、かつ高級志向を満たす加工食品を作り出すための基礎的な知見を得るために、希少価値やブランド化により差別化された高級な原料の代表として、熟成されたチーズや和牛の香気寄与成分を探索し、それらから見出した特徴的な香気成分である分岐鎖アルデヒド類について、香気特性と調理・加工特性の解明を検討した結果をまとめたものである。本論文の特徴は、チーズや和牛の香気寄与成分の探索に香気への寄与度を考慮した方法論を適用し、そこで見出された成分の特性を原料であるチーズや牛肉の品質や調理・加工における成分変化に関連づけたところにある。

日本における加工食品のバラエティーは、世界でもまれにみる豊富さであり、チーズや牛肉などの畜産物を調理した加工食品も例外ではない。加工食品に求められる重要な要素のひとつとして、簡単に“おいしく”を実現することがあり、これは調理時間の軽減や製品開発と製造の簡素化を進める上で重要な課題である。一方、食品の消費動向は、近年、希少価値やブランド化により差別化された高級志向も顕著であり、チーズや牛肉を調理した加工食品についても様々な製品が開発されている。このように、多様化するチーズや牛肉を調理した加工食品の品質を向上する方向性として、簡単に“おいしく”と高級志向の比重が高まり、これらを如何に工業的に両立させるかという課題の解決が望まれている。この課題にとって、嗜好性が高く、かつ高級志向を満たす香りを簡便に賦与することは解決手段であり、食品香料の使用は効果的である。しかし、良質なチーズや牛肉の香りに寄与する成分とそれらの特性に関する知見には不明な点が多く、効果的な香料の開発にいたっていない。

そこで本研究では、希少価値やブランド化により差別化され、かつ日本での嗜好性が高い高級原料の代表として、熟成されたゴーダチーズや和牛の香気寄与成分を探索

し、それらから見出した特徴的な香気成分である 12-methyltridecanal をはじめとする一連の分岐鎖アルデヒド類について、香気特性と調理・加工特性について研究を行った。

最初に、熟成したナチュラルチーズの香気寄与成分のひとつである 12-methyltridecanal と一連の分岐鎖アルデヒドである類縁体をチーズより初めて見出し、それらのナチュラルチーズにおける香気特性を詳細に検討した。

日本人に嗜好性の高いゴータチーズに着目し、まず熟成度の異なるゴータチーズの香気寄与成分を AEDA にて比較したところ、熟成期間が長くなるほど寄与度が高くなる香気成分として、フルーティーな香調を有するエステル類 (ethyl butyrate, ethyl hexanoate), 豆様, ナッツ様, 土様の香調を有するピラジン類 (2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine), 酸臭を有するカルボン酸類 (butyric acid, pentanoic acid, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid), キャラメル様の香調を有する 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone, 甘い香りを有する 4-dodecanolide と phenylacetic acid, そして牛肉様の香気を有する 12-methyltridecanal と同定にはいたらなかったグリーンな香調を有する成分を見出した。いずれの香気成分も熟成期間が長くなるにしたがって寄与度が増すことから、これらの成分が熟成したゴータチーズの豊かで芳醇な香気に深く関与していると考えられる。熟成したゴータチーズの重要な香気成分のひとつとして見出した 12-methyltridecanal は、チーズからは新規成分であった。

さらに、高い寄与度は示さなかったものの、ゴータチーズには 12-methyltridecanal の類縁体として7種の分岐鎖飽和アルデヒド類(イソメチル基を有する 10-methylundecanal, 11-methyldodecanal, 13-methyltetradecanal, 14-methylpentadecanal, アンテイソメチル基を有する 8-methyldecanal, 10-methyldodecanal, 12-methyltetradecanal) が含まれ、8-methyldecanal を除くいずれの成分も熟成期間が長くなるほど増加した。12-methyltridecanal を含むこれらの分岐鎖アルデヒドは、ゴータチーズ以外のナチュラルチ

ーズにも含まれ、熟成期間が長くなるほど増加した。さらに、合成した分岐鎖アルデヒドを用い閾値や香調を調べた結果、閾値は炭素数 14 のイソメチル基を有する 12-methyltridecanal で最小となり、香調は炭素数の増加にともないシトラス様から牛肉様を経てほこり様に変化するなど、分岐鎖アルデヒドの閾値や香調は炭素数と分岐鎖の位置の影響を受けることが分かった。これらの結果は、複数の分岐鎖アルデヒドが存在する熟成したゴータチーズの香気にとって、12-methyltridecanal のみが高い寄与度を示した理由が、その特異的に低い閾値と牛肉様というユニークな香調によることを示すものである。さらに、酸加水分解により生じる分岐鎖アルデヒド類は、チーズで検出された分岐鎖アルデヒド量よりも大幅に多いことが示され、分岐鎖アルデヒド類は大部分が前駆体として存在し、熟成中に徐々に遊離されることが推定された。

以上の結果から、嗜好性の高い高級食材である熟成したゴータチーズにとって、12-methyltridecanal は重要な香気成分のひとつであり、その重要性は、熟成期間が長くなるほど高まることを明らかにした。さらに、類縁体である一連の分岐鎖アルデヒド類も同様に、熟成期間が長くなるほど重要性が高まる可能性を見出した。

続いて、日本のみならず海外においても嗜好性が高い和牛を取り上げ、その好ましい香気に寄与する成分を、和牛と輸入牛肉（オーストラリア産）の比較により明らかにし、さらに、加熱（煮込み）調理した牛肉香気の特徴成分である 12-methyltridecanal に着目し、和牛香気における役割、さらに牛肉の調理条件と含有量の関係について検討した。

まず、嗜好性の高い高級食材である和牛の特徴香（和牛香）に着目し、和牛と輸入牛肉の香気寄与成分を AEDA にて比較したところ、和牛にて高い寄与度を示す成分として、12-methyltridecanal を含む 18 成分を見出した。これらのうち 11 成分（1-octen-3-one, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, methional, (Z)-2-nonenal, butyric acid, isovaleric acid, (E,Z)-2,4-decadienal, 12-methyltridecanal, *trans*-4,5,epoxy-(E)-2-decenal, 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone, (E,Z,Z)-2,4,7-tridecatrienal）は和牛より新規に見出された成

分であった。また、和牛において高い寄与度を示した成分の半数が、リノール酸やアラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸に由来するアルデヒド類とケトン類 (hexanal, 1-octen-3-one, (Z)-2-nonenal, (E)-2-nonenal, (E,E)-2,4-nonadienal, (E,Z)-2,4-decadienal, (E,E)-2,4-decadienal, *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal, (E,Z,Z)-2,4,7-tridecatrienal) であることから、和牛香が脂質に由来する香気成分の影響を強く受けることが明らかになった。今回は和牛として三重県産松阪牛 (A5 等級) を用いてその香気を明らかにしたが、等級の異なる和牛香気との比較も必要であり、今後の課題と考える。

次いで、牛肉香気に及ぼす調理条件の影響を、和牛で最も高い寄与度を示した *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal と煮込んだ牛肉の特徴成分である 12-methyltridecanal に着目し、牛肉の種類や加熱条件との関係について検討した。その結果、スイートな香調を有する *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal が、穏やかな加熱条件の和牛に多く含まれるのに対して、牛肉様の香調を有する 12-methyltridecanal は、和牛よりも輸入牛肉に多く含まれ、さらに加熱が強まるほど含有量が増加することを確認した。なお、今回用いた輸入牛肉は、品種や性別、月齢が不明であったため、それらと香気の関係については、今後の課題である。このような調理特性を生じる要因として、これらのアルデヒドの生成機構や熱安定性、あるいは前駆体量の違いが影響する可能性を推察した。さらに、官能評価において牛肉料理における 12-methyltridecanal の含有量には適正な範囲があり、その範囲を超えた場合は牛肉料理の嗜好性の向上には繋がらない可能性を認めた。

以上の結果から、嗜好性の高い高級食材である和牛香気にとって、12-methyltridecanal は、不飽和脂肪酸の酸化により生じるアルデヒド類やケトン類などの香気成分とともに重要な構成成分のひとつであり、その含有量は牛肉の種類や加熱条件といった調理条件の影響を強く受けることを明らかにした。

続いて、ナチュラルチーズや牛肉に大量に含まれる分岐鎖アルデヒド類の前駆体から、加工食品の工業的な製造段階で過剰に生成することで問題となりうる 12-methyltridecanal

について、適正範囲を超えた場合であっても嗜好性を保つ方法を、牛肉料理の香気との相性が良いとされる胡椒の香気に着目し、それぞれの香気に含まれる特徴成分間の相互作用から検討した。

3種の胡椒（完熟胡椒，黒胡椒，白胡椒）に含まれる香気寄与成分を AEDA や GCO-H にて探索したところ，いずれの胡椒の香気抽出物，あるいは粉碎時に拡散する香気であっても，フローラルな香調を有する(*R*)-linalool が最も高い寄与度を示すことが明らかになった。さらに，スパイシー，ウッディーな香調を有する rotundone も(*R*)-linalool に次いで高い寄与度を示し，とりわけ完熟胡椒にて高い傾向を示した。

次いで，胡椒の特徴的な香気成分である(*R*)-linalool と rotundone を用いて，牛肉の特徴香気成分のひとつである 12-methyltridecanal との相互作用を検討した結果，12-methyltridecanal の香気強度は(*R*)-linalool により抑えられる傾向が認められた。一方，rotundone は 12-methyltridecanal の香気強度を変化させる効果は認められなかったものの，ビーフジャーキー様の香気がまとまった調味感に変化し，調和を促す効果が認められた。すなわち，(*R*)-linalool は香気抑制効果を，rotundone は香気修飾効果を有する可能性を見出した。

以上の結果から，胡椒香気の特徴成分である(*R*)-linalool と rotundone は，牛肉の特徴香気成分のひとつである 12-methyltridecanal と相互作用する可能性があり，適正範囲を超えた場合であっても，これらの香気成分を組み合わせることで，牛肉を調理した加工食品の嗜好性を保ちうる可能性を見出した。

本研究の結果より，嗜好性が高く高級な食材である熟成されたチーズや和牛の香気寄与成分が明らかになるとともに，それらから見出した特徴的な香気成分である分岐鎖アルデヒド類について，香気特性や原料であるチーズや牛肉の調理・加工における特性を系統的に検討し，その一端を解明することができた。これらの明らかになった知見に基づく食品香料は，チーズや牛肉を調理した冷凍食品やレトルト食品などの加工食品や，中食・外食産業などで使用される業務用の半調理品など，様々な食品に求

められるおいしさと高級志向の実現に貢献すると考える.

Summary

Title: Study about the characteristics of branched chain aldehydes which are the potent odorants of cheese and beef.

There is a wide variety of processed foods in Japan, and livestock foods made from cheese or beef are no exceptions. Processed foods are required to be delicious and easy to eat, and these are important both to shorten the cooking time and to simplify the product development and manufacturing. On the other hand, modern consumers have desired high-end foods which are differentiated by branding, thus various processed foods made from cheese or beef have been developed. Therefore, to improve the quality of the diversified processed foods, it is also required for processed foods to satisfy high-end flavor, including both deliciousness and simplicity to eat. The acceptability of processed products made from cheese or beef depends on many factors, one of the most important of which is aroma. Therefore, processed foods need to have an aroma which satisfies both a high palatability and quality. At present, to achieve this objective, the addition of superior flavorings to the processed foods is one of the most effective means. To develop a high palatability and quality flavorings, knowledge of potent odorants contributing to the characteristic aromas of high-quality cheese and beef is required along with their properties.

The objective of this study was to elucidate the potent odorants of highly-ripened Gouda cheese and Wagyu beef (Japanese black cattle) by using the Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) which is a technique to evaluate the contribution degree of the flavor compounds by using gas chromatography-olfactometry (GC-O). These samples are considered as high-end foods that are differentiated by their scarcity value and branding, and both samples are preferred by the Japanese. In addition, some methyl-branched aldehydes, such as 12-methyltridecanal, could be identified as

the characteristic odorants of Gouda cheese and Wagyu beef, and their odor properties and cooking behaviors were investigated.

Chapter 2. The study of the aroma of ripened Gouda cheese and odor properties of methyl-branched aldehydes.

In this chapter, the characteristic aroma of highly-ripened Gouda cheese, which is appreciated by the Japanese was clarified, then the investigation was carried out about the odor properties of 12-methyltridecanal and its analogs. The AEDA was applied to the volatile fractions of the three maturation stages of Gouda cheese. By comparison of the FD factors, 15 odorants (ethyl butyrate, ethyl hexanoate, 2-isopropyl-3-methoxypyrazin, 2,3-diethyl-5-methylpyrazin, 2-isobutyl-3-methoxypyrazine, butyric acid, pentanoic acid, hexanoic acid, octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, phenylacetic acid, 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5*H*)-furanone, 4-dodecanolide, 12-methyltridecanal) increased with the increasing maturation stages of the cheese. In these compounds, 12-methyltridecanal was a newly identified odorant from the cheese. Furthermore, although the contributions to the aroma of cheese were not high, seven methyl-branched aldehydes (10-methylundecanal, 11-methyldodecanal, 13-methyltetradecanal and 14-methylpentadecanal as *iso*-methyl-branched aldehydes, 8-methyldecanal, 10-methyldodecanal and 12-methyltetradecanal as *anteiso*-methyl-branched aldehydes) could be identified as the analogs of 12-methyltridecanal. All of the methyl-branched aldehydes, except for 8-methyldecanal, also increased their amounts with the increasing maturation stages of the cheese. Furthermore, the odor thresholds and odor qualities of them were investigated using the synthesized methyl-branched aldehydes. The odor thresholds gave a minimum value of 14 carbon atoms with the *iso*-methyl group, and 12-methyltridecanal had the lowest threshold. The odor qualities changed from citrus-like to dusty via beef-like with the increasing carbon number. These results suggest that the reason that only

12-methyltridecanal contributed to the aroma of Gouda cheese among the other methyl-branched aldehydes was the specifically low threshold and the unique odor such as beef-like.

As a result, it was revealed that 12-methyltridecanal as the methyl-branched aldehyde was one of the important odorants in the highly-ripened Gouda cheese of high palatability, and it will become more important with the increasing maturation period.

Chapter 3. The study of aroma of heated beef and property of methyl-branched aldehydes.

In this chapter, the potent odorants of Wagyu beef were revealed by comparison between Wagyu beef and imported (Australia) beef. Wagyu beef is preferred not only in Japan, but also overseas in recent years. In addition, 12-methyltridecanal known for the potent odorant of stewed beef was focused on, and the investigations were carried out concerning the role of 12-methyltridecanal in the Wagyu beef aroma and about the relation between the cooking conditions and the amount of 12-methyltridecanal in the beef.

To clarify the potent odorants of the characteristic Wagyu beef aroma, the AEDA was used to compare the Wagyu beef and imported beef. Eighteen peaks that included 12-methyltridecanal were detected as the odor-active peaks, and about half of them were aldehydes or ketones (hexanal, 1-octen-3-one, (*Z*)-2-nonenal, (*E*)-2-nonenal, (*E,E*)-2,4-nonadienal, (*E,Z*)-2,4-decadienal, *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal, (*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal) which are well-known to be generated from unsaturated fatty acids. This result suggests that the Wagyu beef aroma was affected by odorants which were derived from lipids.

Next, to clarify the effect of the cooking conditions on the beef aroma, two aldehydes were quantified in the Wagyu and imported beef that were heated under various conditions. One of the aldehydes was *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal that showed the highest FD factor in the Wagyu beef aroma, and another was 12-methyltridecanal that was known for the characteristic odorant of stewed

beef. *Trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal with a sweet note was detected only from the mildly-heated Wagyu beef, and 12-methyltridecanal with a beef-like note was detected more from the imported beef than the Wagyu beef, and it increased as the degree of heating increased. As the factor that these two aldehydes have such cooking properties, it was considered a possibility that the differences in the formation mechanism, the thermal stability, and the amount of precursor influenced their properties. Furthermore, after sensory evaluation, it was found that 12-methyltridecanal has a proper range in amount, because the excess amount does not improve the palatability of the cooked beef. Therefore, it was revealed that 12-methyltridecanal was one of the potent odorants of Wagyu beef aroma, along with aldehydes and ketones which were generated from unsaturated acids. It was also confirmed that the amount of 12-methyltridecanal was strongly affected by the cooking conditions such as the type of beef and heating conditions.

Chapter 4. The interaction between pepper aroma and 12-methyltridecanal.

The interaction between the potent odorants of pepper and cooked beef was studied due to for maintaining the palatability when a large amount of 12-methyltridecanal is present. High amounts of precursors in the beef, the excess amounts of 12-methyltridecanal may be generated during the manufacturing stage. The pepper aroma was focused on because it was known to be compatible with a beef dish.

The AEDA and the GC-olfactometry of headspace samples (GCO-H) applied to the volatile fractions of three types of peppers (ripe, black, and white) revealed that (*R*)-linalool (floral) and rotundone (spicy, woody) showed high contributions to the pepper aroma. As the result of the investigation about the influence of these compounds to 12-methyltridecanal, (*R*)-linalool had a tendency to reduce the odor of 12-methyltridecanal. On the other hand, although rotundone did not have the effect to reduce the odor intensity of 12-methyltridecanal, it had a tendency to modify the beef jerky-like odor

of 12-methyltridecanal to the complemented seasoning odor. Therefore, the possibility was that (*R*)-linalool had the effect of reducing the odor, and rotundone had the effect of modifying the odor.

These results suggest the possibility that (*R*)-linalool and rotundone, which are the potent odorants of pepper, interact with 12-methyltridecanal. Even with an excessive amount of 12-methyltridecanal, it was found possible to preserve the palatability of processed food, such as cooked beef, by combining these aroma components.

The results of this study clarified the potent odorants contributing to the characteristic aroma of the ripened Gouda cheese and Wagyu beef. Moreover, it could reveal some of the odor properties of methyl-branched aldehydes which were found in cheese and beef by the systematic investigation of the cooking characteristics. The knowledge obtained in this study would be useful for effective flavorings that satisfy both the high palatability and quality of processed foods made from cheese or beef, and these processed foods will accommodate the diverse needs of consumers.

参考文献

- 1) 水間豊, 上原孝吉, 萬田正治, 矢野秀雄 編, 「最新畜産学」(朝倉書店, 東京) pp131-161 (2004).
- 2) 栗原堅三, 「味覚・嗅覚」(化学同人, 東京) pp29-31 (1990).
- 3) 西村敏英, 食品の呈味形成におけるペプチドの役割を探る—ペプチドの呈味性および味覚変革作用—, *化学と生物*, **2001**, *39*, 177-183.
- 4) 石井克枝, 西村敏英, 沖谷明紘, 田村由紀子, 畑江敬子, 島田淳子, 加熱牛肉の呈味形成におけるペプチドの役割, *日本家政学会誌*, **1995**, *46*, 307-312.
- 5) 東原和成, 香りとおいしさ: 食品科学のなかの嗅覚研究, *化学と生物*, **2007**, *45*, 564-569.
- 6) 久保田紀久枝, 食品のおいしさと香り成分—機器分析と官能評価の融合研究から見えてくる多様な働き—, *香料*, **2017**, *275*, 33-41.
- 7) 長谷川香料株式会社, 「香料の科学」(講談社, 東京), pp45-59 (2013).
- 8) NPO 法人チーズプロフェッショナル協会, 「チーズを科学する」(幸書房, 東京), pp97-127 (2016).
- 9) <http://www.jmi.or.jp/info/survey.php?id=15> (益財団法人 日本食肉消費総合センター, 消費動向調査 [平成 13 年 6 月])
- 10) <https://www.alic.go.jp/content/000101072.pdf> (神奈川県農業技術センター畜産技術所, 25~35歳の牛肉に対する嗜好, 購買行動に関する実態調査)
- 11) 沖谷明紘, 「肉の科学」(朝倉書店, 東京) pp64-68 (1996).
- 12) 下田満哉, 平野好司, 箆島豊, ポーラスポリマーカラムによる食品香気成分の濃縮, *分析化学*, **1987**, *36*, 792-798.
- 13) Nickerson, G. B.; Likens, S. T. Gas chromatography evidence for the occurrence of hop oil

- components in beer. *J. Chromatogr. A* **1966**, *21*, 1-5.
- 14) Engel, W.; Bahr, W.; Shieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, *209*, 237-241.
- 15) 松石昌典, 久米淳一, 伊藤友己, 高橋道長, 荒井正純, 永富宏, 渡邊佳奈, 早瀬文孝, 沖谷明紘, 和牛肉と輸入牛肉の香気成分, *日本畜産学会報*, **2004**, *75*, 409-415.
- 16) Zehentbauer, G.; Reineccius, G. A. Determination of key aroma components of Cheddar cheese using dynamic headspace dilution assay. *Flavour Fragr. J.* **2002**, *17*, 300-305.
- 17) Qian, M.; Reineccius, G. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 252-259.
- 18) Qian, M.; Reineccius, G. A. Quantification of aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese by a dynamic headspace gas chromatography-mass spectrometry technique and calculation of odor activity value. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 770-776.
- 19) Qian, M.; Reineccius, G. Static headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 794-798.
- 20) Cerny, C.; Grosch, W. Evaluation of potent odorants in roasted beef by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Untrs. Frosch.* **1992**, *194*, 322-325.
- 21) Cerny, C.; Grosch, W. Quantification of character-impact odour compounds of roasted beef. *Z. Lebensm. Untrs. Frosch.* **1993**, *196*, 417-422.
- 22) Guth, H.; Grosch, W. 12-Methyltridecanal, a species-specific odorant of stewed beef. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1993**, *26*, 171-177.
- 23) Milo, C.; Reineccius, G. A. Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3590-3594.

- 24) Avsar, Y. K.; Karagul-Yuceer, Y.; Drake, M. A. Characterization of nutty flavor in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1999-2010.
- 25) Preininger, M.; Grosch, W. Evaluation of key odorants of the neutral volatiles of Emmentaler cheese by the calculation of odour activity values. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1994**, *27*, 237-244.
- 26) Kerschler, R.; Grosch, W. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis. *Z. Lebensm. Untrs. Frosch. A* **1997**, *204*, 3-6.
- 27) Whetstone, M. E. C.; Cadwallader, K. R.; Drake, M. A. Characterization of aroma compounds responsible for the rosy/floral flavor in Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3126-3132.
- 28) Drake, M. A.; Miracle, R. E.; McMahon, D. J. Impact of fat reduction on flavor and flavor chemistry of Cheddar cheeses. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 5069-5081.
- 29) Christlbauer, M.; Schieberle, P. Characterization of the key aroma compounds in beef and pork vegetable gravies a la chef by application of the aroma extract dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9114-9122.
- 30) Christlbauer, M.; Schieberle, P. Evaluation of key aroma compounds in beef and pork vegetable gravies a la chef by stable isotope dilution assays and aroma recombination experiments. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 13122-13130.
- 31) 杉沢博, ガスクロマトグラフィー 特にフレーバー分析, *日本食品工業学会誌*, **1988**, *35*, 564-572.
- 32) Schieberle, P.; Hofmann, T. Evaluation of character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 227-232.
- 33) Kiefl, J.; Pollner, G.; Schieberle, P. Sensomics analysis of key hazelnut odorants (*Corylus*

- avellane* L. ‘Tonda Gentile’) using comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5226-5235.
- 34) Grosch, W. Determination of potent odorants in food by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour Fragr. J.* **1994**, *9*, 147-158.
- 35) Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Shieberle, P.; Hofmann, T. Nature’s chemical signatures in human olfaction: A foodborne perceptible for future biotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7124-7143.
- 36) Schieberle, P. New developments in methods for analysis of volatile flavor compounds and their precursors. In *Characterization of food: emerging methods*; Goankar, A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1995**, 403-431.
- 37) Nijssen, L.M.; Ingen-Visscher, C.A. van; Donders, J.J.H. VCF Volatile Compounds in Food : database– Version 16.4– Zeist (The Netherlands): Triskelion B.V. 1963-2017.
- 38) Curioi, P.M.G.; Bosset, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 959-984.
- 39) Singh, G. H.; Drake, M. A.; Cadwallader, K. R. Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* **2003**, *2*, 139-162.
- 40) 松石昌典, 食肉の美味しさ—香りがもたらす豊かな味わい, *Foods Food Ingredients J. Jpn.* **2007**, *212*, 929-940.
- 41) Mottram, D. S. Flavor formation in meat and meat products: a review. *Food Chem.* **1998**, *62*, 415-424.
- 42) Calkins, C.R.; Hodgen, J.M. A fresh look at meat favor. *Meat Sci.* **2007**, *77*, 63-80.

- 43) Specht, K.; Baltes, W. Identification of volatile flavor compounds with high aroma values from shallow-fried beef. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2246-2253.
- 44) Matsuishi, M; Fujimori, M; Okitani, A. Wagyu beef aroma in Wagyu (Japanese black Cattle) beef preferred by Japanese over imported beef. *Anim. Sci. J.* **2001**, *72*, 498-504.
- 45) 沖谷明紘, 牛肉の熟成条件とフレーバーの生成, *日本食品工業学会誌*, **1993**, *40*, 535-541.
- 46) 沖谷明紘, 牛肉熟成香とその生成機構, *酪農科学・食品の研究*, **1995**, *44*, A-53-A-62.
- 47) Toelstede, S.; Hofmann, T. Sensomics mapping and identification of the key bitter metabolite in Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2795-2804.
- 48) Toelstede, S.; Hofmann, T. Quantitative studies and taste re-engineering experiments toward the decoding of the nonvolatile sensometabolome of Gouda cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5299-5307.
- 49) Toelstede, S. A series of Kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1440-1448.
- 50) 江本英司, 乳酸菌が生み出す香気とその活用, *日本乳酸菌学会誌*, **2013**, *24*, 71-78.
- 51) Guth, H.; Grosch, W. 3-Methylnonane-2,4-dione – An intense odour compound formed during flavour reversion of soya-bean oil. *Fat Sci. Technol.* **1989**, *93*, 225-230.
- 52) Tajima, K.; Tanaka, S.; Yamaguchi, T.; Fujita, M. Analysis of green and yellow yuzu peel oils (*Citrus junos* Tanaka). Novel aldehyde components with remarkably low odor thresholds. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1544-1548.
- 53) Delort, E.; Jaquier, A. Novel terpenyl esters from Australian finger lime (*Citrus australasica*) peel extract. *Flavour Fragr. J.* **2009**, *24*, 123-132.

- 54) Yuasa, Y.; Tsuruta, H. Convenient syntheses of iso-methyl-branched long-chain aliphatic aldehydes, known to contribute significantly to meat flavor. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 199-204.
- 55) 川井泰, チーズの多様性を決めるタンパク質分解, *化学と生物*, **2002**, *40*, 318-319.
- 56) 三浦孝之, 阿久澤良造, 乳酸菌がチーズの製造と品質に及ぼす影響, *日本乳酸菌学会誌*, **2011**, *22*, 93-99.
- 57) 中西武雄, 足立達, 中江利孝, 乳酸菌により揮発性脂肪酸の生成, *日本畜産学会報*, **1964**, *35*, 173-177.
- 58) Werkhoff, P.; Bruning, J.; Emberger, R.; Guntert, M.; Hopp, R. Flavor chemistry of meat volatiles: new results on flavor components from beef, pork, and chicken. In Hopp, R.; Mori, K. *Recent developments in flavor and fragrance chemistry*. New York: VCH publishers. **1993**, 183-213.
- 59) Guth, H.; Grosch, W. Dependence of the 12-methyltridecanal concentration in beef on the age of the animal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *201*, 25-26.
- 60) 菅原龍幸, 前川昭男, 「新食品分析ハンドブック」, (建帛社, 東京), pp.62-63 (2000).
- 61) Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of most intense volatile flavor compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277-282.
- 62) Teranishi, R.; Buttery, R. G; Guadagni, D. G. Odor quality and chemical structure in fruit and vegetable flavors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1974**, *237*, 209-216.
- 63) Wakabayashi, M.; Wakabayashi, H.; Nörenberg, S.; Kubota, K.; Engel, K.H. Comparison of odour thresholds and odour qualities the enantiomers of 4-mercapto-2-alkanones and 4-acetylthio-2-alkanones. *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 171-178.
- 64) Buettner, A.; Schieberle, P. Aroma properties of a homologous series of 2,3-epoxyalkanals and *trans*-4,5-epoxyalk-2-enals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3881-3884.

- 65) Polster, J.; Shieberle, P. Structure-odor correlations in homologous series of alkanethiols and attempts to predict odor thresholds by 3D-QSAR studies. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1419-1432.
- 66) 向山光昭, ビニルエーテルおよびアセチレンエーテルの反応, *有機合成化学*, **1961**, *19*, 29-46.
- 67) 上野川修一, 「乳の科学」(朝倉書店, 東京) pp19-27 (1996).
- 68) <https://fooddb.mext.go.jp/whats.html> (日本食品表示成分表 2015 年版 (七訂))
- 69) 佐藤雅彦, 中村豊郎, 本間清一, 阿部宏喜, 佐藤朗好, 藤巻正生, 和牛, 乳牛および輸入牛肉の香気と呈味成分について, *日本畜産学会報*, **1994**, *65*, 142-148.
- 70) Kumazawa, K.; Wada, Y.; Masuda, H. Characterization of epoxydecenal isomers as potent odorants in black tea (*Dimbula*) infusion. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4795-4801.
- 71) Blank, I.; Lin, J.; Vera, F. A.; Welti, D. H.; Fay, L.B. Identification of potent odorants formed by autoxidation of arachidonic acid: Structure elucidation and synthesis of (*E,Z,Z*)-2,4,7-tridecatrienal. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2959-2965.
- 72) Gassenmeier, K.; Schieberle, P. Formation of the intense flavor compound *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal in thermally treated fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71*, 1315-1319.
- 73) Lin, J.; Fay, L.B.; Welti, D. H.; Blank, I. Quantification of key odorants formed by autoxidation of arachidonic acid using isotope dilution assay. *Lipids* **2001**, *36*, 749-756.
- 74) 小林彰夫, 久保田紀久枝, 調理と加熱香気, *調理科学*, **1989**, *22*, 156-163.
- 75) Harkes, P. D.; Begemann, W. J. Identification of some previously unknown aldehydes in cooked chicken. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51*, 356-359.
- 76) Boylston, T. D.; Morgan, S. A.; Johnson, K. A.; Busboom, J. R.; Wright Jr. R. W.; Reeves, J. J. Lipid content and composition of Wagyu and domestic breeds of beef. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1202-1207.

- 77) Frank, D.; Ball, A.; Hughes, J.; Krishnamuthy, R.; Piyasiri, U.; Stark, J.; Watkins, P.; Warner, R. Sensory and flavor chemistry characteristics of Australian beef: influence of intramuscular fat, feed, breed. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 4299-4311.
- 78) Lin, J.; Fay, L. B.; Welti, D. H.; Blank, I. Synthesis of *trans*-4,5-epoxy-(*E*)-2-decenal and its deuterated analog used for the development of a sensitive and selective quantification method based on isotope dilution assay with negative chemical ionization. *Lipids* **1999**, *34*, 1117-1126.
- 79) Kumazawa, K.; Kaneko, S.; Nishimura, O. Identification and characterization of volatile components causing the characteristic flavor in Miso (Japanese fermented soybean paste) and heat-processed Miso products. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11968-11973.
- 80) 中西武雄, 須山亨三, 食肉の磷脂質に関する研究, *日本畜産学会報*, **1966**, *38*, 262-268.
- 81) 伊藤百合子, 久保田紀久枝, においの自己順応における閾値濃度の 4-hexanolide 添加の影響, *日本味と匂学会誌*, **2003**, *10*, 273-278.
- 82) Kurobayashi, Y.; Kouno, E.; Fujita, A.; Motimitsu, Y.; Kubota, K. Potent odorants characterize the aroma quality of leaves and stalks in raw and boiled celery *Biosci. Biotechno. Biochem.*, **2006**, *70*, 958-965.
- 83) Kurobayashi, Y.; Katsumi, Y.; Fujita, A.; Motimitsu, Y.; Kubota, K. Flavor enhancement of chicken broth from boiled celery constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 512-516.
- 84) Miyazawa, T.; Gallagher, M.; Preti, G.; Wise, P. M. Odor detection of mixtures of homologous carboxylic acids and coffee aroma compounds by humans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9895-9901.
- 85) Anne, O.; Irina, S.; Kailas, T.; Müürisepp, M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *J. Agric. Food Chem.*

- 2004**, 52, 2582-2586.
- 86) Jagella, T; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum L.*) I. Evaluation of potent odorants of black pepper by dilution and concentration techniques. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 209, 16-21.
- 87) Jagella, T; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum L.*) II. Odour activity values of desirable and undesirable odorants of black pepper. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 209, 22-26.
- 88) Jagella, T; Grosch, W. Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum L.*) III. Desirable and undesirable odorants of white pepper. *Eur. Food Res. Technol.* **1999**, 209, 27-31.
- 89) Wood, C.; Siebert, T.E.; Parker, M.; Capone, D.L.; Elsey, G.M.; Pollnitz, A.P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; Krammer, G.; Sefton, M.A.; Herderich, M.J. From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 3738-3744.
- 90) Huang, A.C.; Burrett, S.; Sefton, M.A.; Taylor, D.K. Production of the pepper aroma compound, (-)-rotundone, by aerial oxidation of α -guaiene. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 10809–10815.
- 91) Semmelroch, P.; Grosch, W. Analysis of roasted coffee powders and brews by gas chromatography-olfactometry of headspace samples *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **1995**, 28, 310-313.
- 92) Kumazawa, K.; Masuda, H. Investigation of the change in the flavor of a coffee drink during heat processing. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 2674-2678.
- 93) Baba, R.; Amano, Y.; Wada, Y.; Kumazawa, K. Characterization of the potent odorants contributing to the characteristic aroma of Matcha by gas chromatography-olfactometry

- techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 2984–2989.
- 94) Kumazawa, K.; Sakai, N.; Amma, H.; Sakamoto, S.; Kodama, M.; Wada, Y.; Nishimura, O. Identification and formation of the volatile components responsible for the characteristic Aroma in Mat Rush (Igusa). *Biosci. Biotech. Biochem.* **2010**, *74*, 1231-1236.
- 95) Shigeto, A.; Hachisuka, S.; Kumazawa, K. Characterization of Potent Odorants of Vanilla Beans in Three Different Cultivars (Madagascar, Comoro and Tahiti) by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). *Food Sci. Technol. Res.* **2016**, *22*, 811-816.
- 96) 重藤敦嗣, Erinna Nindi Nurasti, Anton Sugiarto, 戸川真, 熊沢賢二, 収穫時の熟度がバニラ豆の香気に及ぼす影響, *日本食品科学工学会誌*, **2017**, *64*, 502-506.
- 97) Caputi, L.; Carlin, S.; Ghiglieno, I.; Stefanini, M.; Valenti, L.; Vrhovsek, U.; Mattivi, F. Relationship of changes in rotundone content during grape ripening and winemaking to manipulation of the ‘peppery’ character of wine. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5565-5571.
- 98) Takase, H.; Sasaki, K.; Shinmori, H.; Shinohara, A.; Mochizuki, C.; Kobayashi, H.; Saito, H.; Matsuo, H.; Suzuki, S.; Takata, R. Analysis of rotundone in Japanese Syrah grapes and wines using stir bar sorptive extraction (SBSE) with heart-cutting two-dimensional GC-MS. *Am. J. Enol. Vitic.* **2011**, *66*, 398-402.
- 99) Padrayuttawat, A.; Yoshizawa, T.; Tamura, H.; Tokunaga, T. Optical isomers and odor thresholds of volatile constituents in *Citrus sudachi*. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo* **1997**, *3*, 402-408.

本研究に関する出版物

2章の研究に関する出版物

Inagaki, S.; Fujikawa, S.; Wada, Y.; Kumazawa, K. Identification of the possible new odor-active compounds “12-methyltridecanal and its analogs” responsible for the characteristic aroma of ripe Gouda-type cheese. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2015**, *79*, 2050-2056.

稲垣さつき, 藤川誠二, 和田善行, 熊沢賢二, ナチュラルチーズ香気における分岐鎖アルデヒド類の特性, *日本食品科学工学会誌*, **2016**, *63*, 388-393.

3章の研究に関する出版物

Inagaki, S.; Amano, Y.; Kumazawa, K. Identification and characterization of volatile components causing the characteristic flavor of Wagyu beef (Japanese black cattle). *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 8691-8695.

稲垣さつき, 落合秀美, 熊沢賢二, 牛肉特徴香の調理特性, *AROMA RESEARCH*, **2018**, 掲載予定

4章の研究に関する出版物

藤田孝, 橋本吾香里, 落合秀美, 川端暁之, 稲垣さつき, 安間裕子, 熊沢賢二, 完熟胡椒(赤胡椒)の特徴的な香気に寄与する成分の探索, *AROMA RESEARCH*, **2018**, 掲載予定

謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導いただきました 東京農業大学 大学院生物産業学研究科 久保田紀久枝教授に心より感謝いたします。精力的に活動され非常にお忙しい中、丁寧に見ていただき、懇切なご指導ご鞭撻を賜り、本当にありがとうございました。

本論文を作成するにあたり適切なお助言をいただきました、東京農業大学 生物産業学部 戸枝一喜教授、東京農業大学 生物産業学部 佐藤広顕教授、神奈川工科大学 応用バイオ科学部 飯島陽子准教授に心より厚くお礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究の進め方や考え方を示していただきました 小川香料株式会社 熊沢賢二博士 に心より感謝いたします。

本研究を進め、このようにまとめることができたのは、小川香料株式会社 小川裕代表取締役社長、作田圭亮取締役、片田純取締役、村西修一統括部長のご理解の上であったことを、心よりお礼申しあげます。また、小川香料株式会社 解析研究所、マテリアル開発の皆様や、社員の皆様にご協力をいただきましたことを深く感謝いたします。

最後に、いつも近くで励まし、サポートをしてくれた家族にも感謝の気持ちを伝えます。