

氏名	中西啓
学位(専攻分野の名称)	博士(生物産業学)
学位記番号	乙第934号
学位授与の日付	平成30年3月17日
学位論文題目	天然感を増強させる微量重要香気成分の解明とその有用性に関する研究
論文審査委員	主査 教授・学術博士 久保田 紀久枝 教授・農学博士 戸枝 一喜 准教授・博士(農学) 妙田 貴生 教授・博士(農学) 石神 健

論文内容の要旨

日本政策金融公庫農林水産事業が実施した消費者動向調査によると、消費者の現在の食の志向は「健康志向」が最も高く、さらに今後の食の志向は「健康志向」および「安全志向」が高まる可能性があることが報告されている。世界的に見ても「健康」と「安全」は加工食品市場のトレンドであり、飲食品メーカーではこれらを意識して、「天然」を訴求した加工食品の開発が盛んに行われ、香料業界へは近年特に、実際の食品の香気を再現したような「天然感」のある高品質なフレーバーが求められるようになった。また、フレーバーの種類として、飲料や菓子などで広く使用される定番の果物のフレーバーはもとより、昨今では「健康志向」に由来した世界的な日本食ブームにより日本食材のフレーバーの需要も大きくなっている。「天然感」のあるフレーバーの開発を行うに当たっては、実際の食品について詳細な香気分析を行い、その食品の香気に寄与する重要香気成分を解明することが必須である。

そこで本研究では日本食材として特に人気のある柚子とワサビ、また、定番の果物であるグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーに着目した。これらの香気成分についてはすでに多くの研究があるが、十分満足できる天然感のあるフレーバーの開発には至っておらず、天然感の再現において更なる重要香気成分の探索が必要であると考えた。まず、柚子に関して香気成分の探索を行い、peely, balsamic な香気を有する微量重要香気成分として (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one (YUZUNONE[®]) および (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-4-ol (YUZUOL[®]) を見出した。更に、それらが柚子の特徴的な要素である balsamic 香気を増強するだけでなく、その他の複数の要素を増強させることから、天然の柚子らしさを表現するのに有用な香気成分であることを明らかにした。YUZUNONE[®] や YUZUOL[®] のような微量重要香気成分は極微量であるがために構造解明に必要な分析データを得ることが難しく同定するのが非常に困難であったが、一方で、食品の香気の再現において鍵となる重要な成分であり、天然感のある高品質のフレーバーの創成には欠かせない成分の一つとして活用されて

いる。

本研究では、柚子の香気成分の探索で得られた研究手法の知見を活用し、ワサビや果物 4 種について、微量でありながら食品香料として重要な香気成分を解明し、香料としての有用性を評価することを目的に研究を行った。

ワサビの新規微量重要香気成分の解明とワサビ香気への有用性評価

ワサビの最高品種の一つである「真妻」を分析試料として、すりおろしたてのワサビの香気に寄与する微量重要香気成分の探索を行った。ワサビ香気濃縮物の Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O) および Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) を行い、すりおろしワサビの香気に寄与する 9 種の重要香気成分を同定した。9 成分の内, allyl isothiocyanate, 4-pentenyl isothiocyanate, 5-hexenyl isothiocyanate, 6-(methylthio)hexyl isothiocyanate, vanillin は容易に同定することができたが, 2-isopropyl-3-methoxypyrazine, 3-methyl-2,4-nonanedione, (Z)-1,5-octadien-3-one, cis-3-methyl-4-decanolide はワサビ香気濃縮物中での存在量が微量であったため, シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる濃縮・精製を駆使し単独のマスペクトル (MS) を得て同定した。なお, 後者の 2 成分はワサビ中から初めて見出した成分である。これまで天然物中での cis-3-methyl-4-decanolide の絶対立体配置に関する報告がなかったことから, trans-体を含め 4 種の立体異性体を合成し, ワサビ中の絶対立体配置を調べた。全立体異性体とワサビ香気濃縮物についてキラル GC-Mass Spectrometry 分析を行い, ワサビ中には(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide (cis-体) および(3*S*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide (trans-体) が優先的に存在していることを明らかにした。(3*R*,4*R*)-3-Methyl-4-decanolide が天然物から同定されたのは, 本研究が初めてである。さらに, 合成した立体異性体の香気を比較したところ, それぞれ異なる香気を有していたが, 特に(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide は他の立体異性体と比較して特有な香気特徴 (creamy, celery-like) を有していた。同定した上述の 8 種の重要香気成分から調製したワサビ香気再構築液 A, ワサビ香気再構築液 A に(3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide を添加したワサビ香気再構築液 B, およびワサビ香気濃縮物を用いて官能評価を行った。その結果, ワサビ香気再構築液 B はワサビ香気再構築液 A と比較し「creamy」のスコアが向上し, 「pungent」のスコアの減少が見られ, いずれの評価用語においても, ワサビ香気濃縮物のスコアと有意な差が無くなった。すなわち, (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide は, 再構築液の香気特性を天然のワサビの香気濃縮物の香気特性に近づける効果を有することが示された。以上のことから, (3*R*,4*R*)-3-methyl-4-decanolide がワサビをすりおろした時に立ち上がる特有の香りの再現に非常に有用な成分であることが明らかとなった。

果物の新規微量重要香気成分の解明と果物香味への有用性評価

本研究では、グレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーの香気濃縮物の GC-O において共通して強く検知される woody 香を有する不明成分の解明を行った。本不明成分は各果物中で極微量であったため市販のオレンジ精油の高沸点留分 約 800 g を使用し、減圧蒸留、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (3 回) および分取 HPLC (2 回) を行い、純度 36.7% で目的の成分 1.7 mg を単離した。高分解能 MS および 1D, 2D NMR から構造解析を行い、不明成分を rotundone と推定した。市販の(-)-guaiol より文献を参考に rotundone を合成し、合成標品と不明成分の各種分析データが一致したことから、オレンジ中の不明成分の構造を rotundone と決定した。グレープフルーツ、リンゴ、マンゴー中の不明成分に関しては、各香気濃縮物に対し分取 HPLC による分画を行うことにより、MS を得ることに成功し、MS, 2 種のカラムでの retention index および匂いの質の全てが rotundone と同一であったことから rotundone と同定した。文献記載の定量値からグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーのモデル飲料を調製し、rotundone を添加し官能評価を行ったところ、rotundone は閾値付近の微量な添加であっても各果物モデル飲料の風味に大きく影響を及ぼし、いずれのモデル飲料においても「complex flavor of natural fruits」と定義した「complex」のスコアが向上し、「unpleasant taste or artificial flavor (unnatural)」と定義した「discordant」のスコアが減少したことから、果物飲料の風味を天然の果物の風味に近づける効果があることが示された。Rotundone はパチョリ精油やシラズワイン、シラズブドウ (シラズワインの原料のブドウ)、各種スパイス、樽熟成されたスピリッツ、乳香、cypriol 精油などの重要香気成分として知られているが、一般的な果物の重要香気成分として rotundone を同定したのは今回の研究が初めてである。以上のことから、rotundone をフルーツフレーバーへ使用することにより、より天然感のあるフルーツフレーバーおよび果物飲料の開発が可能となった。

グレープフルーツ中の rotundone の定量とグレープフルーツ香気への有用性評価

本研究では、香料産業的に需要が多いグレープフルーツに着目し、ホワイトグレープフルーツおよびピンクグレープフルーツの果皮、果汁の香気における rotundone の貢献度や存在量を詳細に調べた。各グレープフルーツの果皮の香気濃縮物の極性画分および果汁の香気濃縮物の GC-O および AEDA を行ったところ、rotundone はいずれにおいても高い香気貢献度を示した。定量を行うにあたり果汁のような比較的酸性が強い条件下でもプロトン化が起こらないような安定同位体標識化合物として rotundone- $d_{2,3}$ を合成した。Rotundone- $d_{2,3}$ を内部標準物質として用いて Stable Isotope Dilution Assay により各グレープフルーツの果皮、果汁中の rotundone の存在量を測定したところ、ホワイトグレープフルーツ果皮: 2180 ng/kg, および果汁: 29.6 ng/kg, ピンクグレープフルーツ果皮: 1920 ng/kg, および果汁: 49.8 ng/kg となり、果汁より果皮の方が高いことが分かった。一般的に柑橘類の香気量は果汁よりも果皮

の方が多く知られており、今回の定量結果と相関があった。また、存在量を文献記載の閾値（8 ng/kg）で除した値である Odor Activity Value は果汁であっても 1 以上を示すことから、rotundone が香気的に貢献していることが証明された。グレープフルーツの香気において rotundone が大きく寄与していることを明らかにしたのは、本研究が初めてである。グレープフルーツ香気における rotundone の効果を検証するために、搾りたてのホワイトグレープフルーツ果汁と文献記載の定量値から調製したホワイトグレープフルーツ香気再構築液の rotundone 無添加品（香気再構築液 A）と添加品（29.6 ng/kg 添加，香気再構築液 B）を用いて官能評価を行った。その結果，香気再構築液 B は香気再構築液 A に比べ、「fresh」「juicy」「peely」「harmonious」の項目が有意に向上し，ホワイトグレープフルーツ果汁のスコアに近づくことが分かった。以上のことから，rotundone はグレープフルーツ香気の再現に効果的な重要香気成分であり，rotundone を用いることによって，より天然感のある新規なグレープフルーツフレーバーの創生が可能となった。

果物の新規香気成分としての rotundone 立体異性体の解明とその有用性評価

本研究では，rotundone の立体異性体と推測される不明成分の構造および香気特性の解明を行った。(3*S*,5*R*,8*S*)-体である rotundone には 8 つの立体異性体が存在するが，rotundone 以外の立体異性体に関しては，未だ天然からの同定や有機合成などの報告はない。これまでの研究からグレープフルーツ，オレンジ，リンゴ，マンゴーの GC-MS 分析において，rotundone の立体異性体と推測される極微量の不明成分の存在が確認されていた。目的の不明成分は各果物香気中では極微量のため単離することは困難であると思われたが，rotundone を 1M NaOEt/EtOH 溶液で処理すると生成することを見出し，分取 HPLC により単離した。1D, 2D NMR および NOESY の rotundone との比較により目的の不明成分を，(3*R*,5*R*,8*S*)-体である 3-*epi*-rotundone であると決定した。水中での閾値を測定したところ 19.1 μg/kg であり，rotundone に比べ高い値を有しているが，食品中に含まれる一般的な香気成分である 2-acetylpyridine (19 μg/kg) や *trans*-2-hexenal (17 μg/kg) などと同程度であり香気成分としては比較的低い部類の閾値であった。また，3-*epi*-rotundone は rotundone と比べ「citrus, grapefruit-like」の香調も有していることから，シトラスフレーバーにおいて高い天然感増強効果が期待される。本研究は rotundone の立体異性体に関する初めての研究であり，今後より効率的に調製できる方法を開発し，様々なフレーバーへの応用を検討して，研究を進めていきたいと考えている。

本研究において，柚子，ワサビおよび果物 4 種より見出した微量重要香気成分は，「食品の香気を再現したような天然感のあるフレーバー」の開発に有用な素材であり，いずれの成分も各食品中では新規の香気成分であるため，特許を出願し，権利化を行っている。これら

の成分を実際の香料に使用することにより、これまでにないオリジナルの天然感のある高品質なフレーバーを創生することが可能となり、「天然」を訴求した加工食品の開発に大きく貢献するものと考えられる。

審査報告概要

消費者の食に対する健康や安全志向の高まりから、「天然」を訴求した加工食品の開発が増大し、「天然感」のある高品質なフレーバーの開発が囑望されている。本研究では、和食食材として世界的に人気のある柚子とワサビ、定番の果物であるグレープフルーツ、オレンジ、リンゴ、マンゴーに着目し、天然感のあるフレーバー開発に寄与する重要香気成分の探索に取り組んだ。その結果、ごく微量しか含まれない (6Z,8E)-undeca-6,8,10-trien-3-one, *cis*-3-methyl-4-decanolide, rotundone などの成分を検出し、その絶対配置を決定した。さらに、rotundone については安定同位体標識化合物を合成し、微量含有量の定量に成功した。いずれも新規成分であり、かつ香料として有用な成分であったことより、これらは高品質な食品香料の開発という産業界への貢献だけでなく、香料化学の発展にもつながる成果であり、学術的および産業学的意義は高いと評価される。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査員一同は博士（生物産業学）の学位を授与する価値があると判断した。