

研究論文

しょうゆの保存による風味劣化に伴う

成分増減の GC/MS による評価

舟橋里帆^{*1}、船越吾郎^{*1}、間野博信^{*2}、小野奈津子^{*2}

Evaluation of the Concurrent Increase or Decrease of Components in Soy Sauce with Flavor Deterioration Due to Storage Using GC/MS

Riho FUNAHASHI^{*1}, Goro FUNAKOSHI^{*1}, Hironobu MANO^{*2} and Natsuko ONO^{*2}Technical Support Department^{*1} Food Research Center^{*2}

しょうゆには多種多様な成分が含まれており、生産過程や保存条件により、その成分量が変化する。本研究では、加温して保存したしょうゆを試料とし、官能試験の結果と GC/MS で得られる成分量の増減に着目することにより、しょうゆの風味劣化に寄与しうる成分を見出すことを目的として実験を行った。その結果、官能試験の点数と相関があり増減する 10 種類以上の成分を見出し、その成分名を推定することができた。

1. はじめに

しょうゆには、原材料中に元々存在する成分のみでなく、発酵などの生産過程で発生する多種多様な成分が含まれ、それらの成分が風味に寄与する。また、しょうゆは保存によって風味が劣化することが知られており、風味の劣化は成分の変化・増減に起因する。そのため、生産企業においては、生産・保存による食品の成分の変化を把握することが重要である。

先行研究として、しょうゆの加熱または酸化による風味成分の変化や、劣化の無いしょうゆを出汁や砂糖で調味した場合の風味成分については様々な報告がある^{1)~3)}。一方、多様な生産・保存条件による、成分の経時的な変化についての技術情報は未だ少ない。

そこで本研究では、ガスクロマトグラフ質量分析装置(以下 GC/MS)を用いて、しょうゆの香りに関わる揮発性の成分について、風味劣化に寄与し得る成分の増減を明らかにすることを目標とした。具体的には、生産企業で課題となっていたしょうゆの保存による風味の劣化、特に保存したしょうゆを出汁で割った際の風味の劣化に関連し得る成分を見出すことを目的とした。

2. 実験方法

2.1 試料

試料としてうすくちしょうゆ、こいくちしょうゆ、さいしこみしょうゆ、たまりしょうゆを用いた。こいくち

しょうゆは 3 つの製造ロットから各 3 試料ずつ計 9 試料、他のしょうゆは 2 つの製造ロットから各 3 試料ずつ計 6 試料を分析した。

保存中の温度に起因する劣化を加速させた試料を得るため、各しょうゆを 40℃で 1~4 週間保存した。各試料は保存試験の後、測定するまで温度による劣化の少ない低温(4~5℃)で保管した。対照試料として、4~5℃で保管した試料を用いた。

なお試料はあらかじめイチビキ(株)にて官能試験を実施している。対照及び保存試験後のしょうゆを鰹節・宗田鰹節と昆布の混合出汁で割り、その際の風味の評価を 12 点を最高点として 1 点から 12 点で表している。その結果、それぞれの試料に表 1 のとおり官能評価の点数が付与されている。留意点として、しょうゆと出汁の相性による影響があり、出汁で割る使用方法にあまり適さないたまりしょうゆは点数が全体的に低かった。

表 1 各しょうゆの官能評価点数

サンプル	対照	40℃保存期間			
		1 週間	2 週間	3 週間	4 週間
A うすくちしょうゆ	12	11	10	9	8
B こいくちしょうゆ	9	8	7	6	5
C さいしこみしょうゆ	8	7	6	5	4
D たまりしょうゆ	5	4	3	2	1

^{*1} 技術支援部 計測分析室 ^{*2} 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室

2.2 GC/MS による測定

しょうゆ中の微量な揮発性成分について測定を行うため、GC/MS((株)島津製作所製 GCMS-TQ8040)を用いて測定を行った。

前処理として固相マイクロ抽出(Solid phase microextraction : SPME)法を用いた。具体的には、しょうゆの原液 1ml をバイアルに入れ、バイアルを 80℃ で 2 分間 250 rpm で攪拌しつつ予熱した。次に DVB/CAR/PDMS ファイバー(Supelco 社製、50/30 μ m、Stableflex(2 cm))をバイアルの気相へ挿入し、80℃で攪拌しながら 45 分間、気相中の揮発性成分をファイバーへ吸着させた。吸着させた成分を 2 分間 250℃で脱着し、GC/MS へ導入した。

その他の GC/MS の分析条件を表 2 に示す。

表 2 分析条件

オートサンプラー:	AOC-6000
[GC]	
分離カラム:	VF-WAXms (長さ 60 m, 膜厚 0.5 μ m, 内径 0.25 mmID)
カラムオープン温度:	35℃ (4 min) -5℃/min-220℃ (19 min)
気化室温度:	250℃
注入モード:	スプリット (スプリット比 5)
[MS]	
イオン源温度:	200℃
インタフェース温度:	250℃
イオン化法:	EI
質量範囲:	29-350m/z (0.1-60.0min)

2.3 多変量解析を利用したデータ解析

データの解析は、メタボローム解析用ソフトウェア MS-DIAL 5⁴⁾ と、ウェブベースのプラットフォーム MetaboAnalyst 6.0⁵⁾を利用して行った。

MS-DIAL では、後の多変量解析に GC/MS のデータを使用するためのデータ処理を行った。具体的には、質量スペクトルと保持時間によるピーク検出、並びに、試料間で同一成分を判別し補正するアライメントを行った。

MetaboAnalyst 6.0 では、多変量解析の一種である PLS-DA(部分的最小二乗判別分析)⁶⁾を、同じ種類のしょうゆの測定結果に対してそれぞれ行った。

MetaboAnalyst での具体的なデータ処理内容としては、MS-DIAL での処理を経た、しょうゆで検出された多数の成分の強度を説明変数とし、官能評価の点数を群情報とし、PLS-DA に供した。データスケリングは Auto Scaling を採用した。PLS-DA により得られたスコアプロットでは、官能評価の点数の高低順に試料の測定結果が分けられたため、その分離に強く寄与している成分をローディングプロットから見出した。

2.4 成分名の推定

GC/MS で検出された成分の名称を推定するために、

各成分の質量スペクトルを GC/MS 付属の NIST ライブラリで検索した。得られた複数の成分名の中から、最も一致度が高かったものを推定成分名として採用した。

3. 実験結果及び考察

3.1 GC/MS によるしょうゆの測定

各しょうゆを GC/MS で測定し、保持時間に対する質量スペクトルの情報を得た。図 1 にこいくちしょうゆ(対照試料)のトータルイオンクロマトグラム(TIC)、質量スペクトルの例を示す。

条件検討の際、2.2 の条件にてエタノール以外の成分は飽和せずに検出でき、また比較的揮発性が低く保持時間の長い成分も、SPME 法の抽出温度がより低い場合に比べ、感度よく検出できた。そのため 2.2 の条件で他の試料も測定したところ、100 個以上の成分が確認されたため、多変量解析を行った。

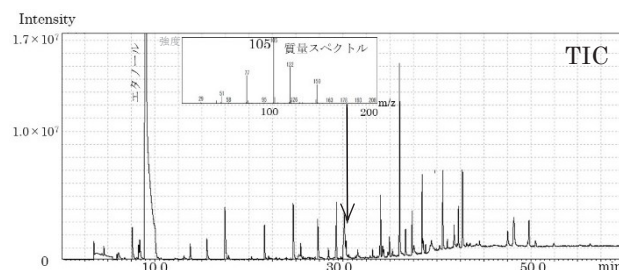


図 1 こいくちしょうゆの GC/MS 測定結果例

3.2 多変量解析によるデータ処理

多変量解析の例として、こいくちしょうゆの PLS-DA によって得られたスコアプロットとローディングプロットを図 2 に示す。スコアプロットの各点は試料を、ローディングプロットの各点は成分を表す。

解析の結果、スコアプロットの Component1 に沿って、官能評価の高低順に群が分けられた。そこで、官能評価の点数の高低と相関がある成分を見出すために、Component1 に正または負の相関が強い成分(図 2(b)で橙色または青色で示す成分)をローディングプロットから、Component1 への寄与度が高い成分から順に抜き出した。

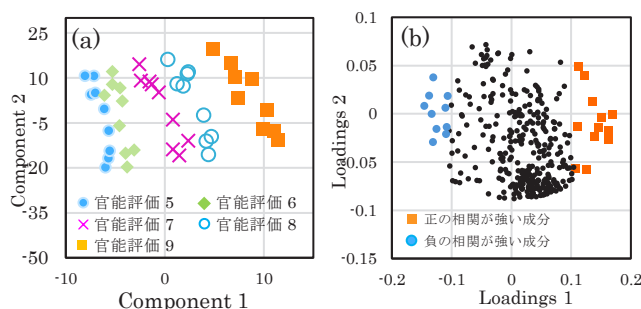


図 2 こいくちしょうゆの PLS-DA の結果

(a) スコアプロット

(b) ローディングプロット

表 3~4 に、こいくちしょうゆで見いだされた成分のうち、官能評価点数との正または負の相関が高く、上位 10 位以内だった成分を示す。成分名はライブラリ検索による推定である。ライブラリ検索の一致度のスコアは 100 が最高であり、高いほど推定された成分名である可能性が高い。スコアが 90 以上の成分名には、表中に印を付記せず、90 未満 80 以上の成分には表 3~4 の成分名の右に(†)を、80 未満 75 以上の成分には(‡)を付記し、75 未満の成分は「不明」と記載した。

表 3 こいくちしょうゆに含まれる、
官能評価点数と正の相関があった成分

官能評価点数と正の相関	
1	安息香酸エチル
2	フェニル酢酸エチル
3	Acetic acid, 2-phenylethyl ester (†)
4	2,2-Dimethylpropanoic acid, nonyl ester (†)
5	不明
6	4-vinyl guaiacol
7	不明
8	不明
9	Furan-3-one <4-hydroxy-,5-methyl-, 2-ethyl-, 2,3-dihydro-> (= HEMF) (‡)
10	Propanoic acid, 1-methylpropyl ester または 2-Isobutoxyethyl propionate (†)

表 4 こいくちしょうゆに含まれる、
官能評価点数と負の相関があった成分

官能評価点数と負の相関	
1	不明
2	2-Isoamyl-6-methylpyrazine
3	Furan, tetrahydro-2,5-dipropyl- (†)
4	5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナール
5	3-メチル吉草酸またはイソ吉草酸 (†)
6	不明
7	Pentanoic acid, 4-methyl- (†)
8	Pentanoic acid, 4-methyl-2-oxo-, methyl ester (†)
9	Pyrazine, 2-methyl-5-propyl- (‡)
10	Imidazole-4-acetic acid (†)

3.3 保存期間による風味劣化に伴って増減した成分

多変量解析を経た結果、各しょうゆで、官能評価点数と相関がある成分を見出すことができた。代表的なものを表 5~6 に示す。各しょうゆを、表 1 に記載した A~D で表記している。なお、一致度のスコアが 80 以上の成分を記載しており、90 未満 80 以上の成分には、しょうゆの名称の右に印(†)を記載した。しょうゆの種類が異なると、見いだされる成分や寄与度の高低順は異なった。

見いだされた成分は、図 1 のような TIC にて手作業で見つける方法では見つからないような、強度の小さな成分や、他の成分と半ば重複して検出されているものがあつた。

得られた成分の推定成分名について、先行研究を確認すると、しょうゆの風味成分として既知のものが含まれ

ていた。表 5~6 の右端の列に、今回見いだされた成分をしょうゆの風味成分として報告した先行研究の文献 1),2),7)~14)を示す。風味成分として既報の成分を複数検出できており、今回の測定方法及び分析方法で、風味に寄与する成分を見出せる可能性が示された。なお一致度のスコアが低い成分にも、HEMF¹⁵⁾など、しょうゆの風味成分として広く知られている成分があつた。

先行研究で、しょうゆの風味成分として報告が見つからなかった成分については、風味への影響を論じるにはさらなる検討が必要である。

表 5 官能評価点数と正の相関のあつた代表的な成分

官能評価点数と正の相関がみられた成分	しょうゆ	先行研究
安息香酸エチル	A, B, C, D	7)
フェニル酢酸エチル	A, B, D	8)
Acetic acid, 2-phenylethyl ester	A (†), B (†), D (†)	9)
2,2-Dimethylpropanoic acid, nonyl ester	B (†)	
4-vinyl guaiacol	A, B, C, D	10)
Propanoic acid, 1-methylpropyl ester または 2-Isobutoxyethyl propionate	B (†)	
1-Octen-3-ol	A, C, D (†)	11)
Furfural	C, D	7)
Octanoic acid	D	
Maltol	D	12)
Decanoic acid, ethyl ester	C (†)	
4-ethyl guaiacol	A, C	13)
Dodecanoic acid, ethyl ester	C	

A:うすくちしょうゆ, B:こいくちしょうゆ, C:さいしこみしょうゆ,
D:たまりしょうゆ

表 6 官能評価点数と負の相関のあつた代表的な成分

官能評価点数と負の相関がみられた成分	しょうゆ	先行研究
Furan, tetrahydro-2,5-dipropyl-	B (†)	
2-acetyl pyrrole (別名: Ethanone, 1-(1H-pyrrol-2-yl)-)	A (†), C, D	11)
5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナール	B	
3-メチル吉草酸またはイソ吉草酸	B (†)	イソ吉草酸 1),2)
Pentanoic acid, 4-methyl-	B (†)	
Pentanoic acid, 4-methyl-2-oxo-, methyl ester	B (†), C	
Imidazole-4-acetic acid	B (†)	
3-Furanmethanol	D	
1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde, 1-methyl-	D (†)	
n-Caproic acid vinyl ester	A (†), C (†)	
2,2-Dimethylpropanoic acid, nonyl ester	C (†)	
Hexanethioic acid, S-propyl ester	A (†)	
Benzeneacetaldehyde, .alpha.- ethylidene-	A	
種々の Pyrazine 類 (一致度は成分による)	A, B, C, D	1),14)

A:うすくちしょうゆ, B:こいくちしょうゆ, C:さいしこみしょうゆ,
D:たまりしょうゆ

以上より、生産企業が着目していた風味の劣化について GC/MS で検出した多数の成分の中から、官能評価の点数へ寄与し得る成分を見出すことができた。

官能評価点数に正の相関があつた成分の推定成分名として、フローラル様の香気を示す成分(フェニル酢酸エ

チル、Acetic acid, 2-phenylethyl ester)⁸⁾や、しょうゆの特徴香を示す 4-ethyl guaiacol 及びその前駆体 4-vinyl guaiacol¹⁰⁾が挙げられた。また、同様に挙げられた 1-Octen-3-ol は、しょうゆを含む調味液では、コクの増強に寄与するとされている³⁾。各成分が今回のしょうゆの濃度で、実際にどのような風味を呈しているかは未確認ではあるが、今回のしょうゆについては、これらの成分の減少によって、官能評価が低下したと考えられる。

また、官能評価点数と負の相関があった成分として、しょうゆの異臭原因物質として知られているイソ吉草酸²⁾や、重要な香氣成分として知られるピラジン類^{1),14)}、硫黄臭を有する物質である Hexanethioic acid, S-propyl ester などが挙げられていた。こちらも、今回のしょうゆ中の濃度で、実際にどのような風味を呈しているかは未確認であるが、今回のしょうゆではこれらの成分が保存によって増加することで、官能評価が低下したと考えられる。

なお、成分の有無のみではしょうゆの風味の良し悪しを判別できないことに留意が必要である。例えば、官能評価に正の相関があった 4-ethyl guaiacol は、過多になると薬品臭などオフフレーバーとなり¹⁰⁾、反対に負の相関があった 2-acetyl pyrrole やピラジン類は、しょうゆの香氣の重要な構成成分である^{1),11),14)}ことが知られており、濃度によって香りの快不快は大きく異なる。

また、PLS-DA の性質として、群間の差に直接寄与していない成分であっても、群情報と疑似的に相関があると、その成分を相関がある成分として挙げてしまう場合がある。

今後、表 3~6 に示された成分の増減が真に風味の変化に寄与しているのか、または保存期間の長短といった官能評価点数とは別の変数と相関があるのか、見いだされた成分のみ濃度が異なるしょうゆを作製し官能評価を行うなどのさらなる検証が必要である。

4. 結び

本研究では、風味劣化に伴って増減する成分を、加速試験を行ったしょうゆの GC/MS 測定と解析により見出し、成分名を推定できた。しょうゆの成分は生産企業や商品ごとに異なり、今回提供された各種しょうゆについて、風味劣化に寄与し得る成分を見出すことができたのは有意義な結果であった。先行研究にて報告のあった成分(安息香酸エチル、1-Octen-3-ol など)と、報告の見つからなかった成分(5-メチル-2-フェニル-2-ヘキセナールなど)の両方が推定成分として見つかった。

生産企業においては、成分名が明らかであることと、確実に風味に影響があるか否かは重要であるため、今回見いだされた成分が、風味劣化に真に寄与するのかの検証と、推定成分名について同定を進めたい。

謝辞

本研究の実施に当たって、試料の提供と官能評価を実施いただき、成分名について知見をいただきましたイチビキ(株)に、深くお礼申し上げます。

文献

- 1) 金子秀: 日本醸造協会誌, **110**(1), 20(2015)
- 2) 中台忠信: におい・かおり環境学会誌, **44**(1) 21(2013)
- 3) 早瀬文孝, 渡辺寛人: 日本醸造協会誌, **109**(3) 161(2014)
- 4) Hiroshi Tsugawa, Tomas Cajka, Tobias Kind, Yan Ma, Brendan Higgins, Kazutaka Ikeda, Mitsuhiro Kanazawa, Jean VanderGheynst, Oliver Fiehn, Masanori Arita: *Nat Methods.*, **12**(6), 523 (2015)
- 5) Xia Lab: Metaboanalyst 6.0, <https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml> (2025/09/03)
- 6) Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS.: *Nucleic Acids Res*: 37, W652(2009)
- 7) 浅尾保夫, 横塚保: 日本醸造協会雑誌, **62**(10), 1106(1967)
- 8) 菊地伸広, 松本大志, 齋藤啓太, 渋川幸恵: 県産醤油の香氣成分の調査, <https://www.pref.fukushima.lg.jp/uploaded/attachment/638000.pdf>, (2025/7/30)
- 9) 笹木哲也, 龍崎博, 松浦靖典, 前田和彦, 岩切拓美, 山崎裕也, 道島俊英, 榎本俊樹: 日本食品科学工学会誌, **68**(7), 306(2021)
- 10) 末澤保彦, 吉岡直美, 森治彦: 日本農芸化学会誌, **72**(1), 43(1998)
- 11) 後藤シゲミ: 栄養と食糧, **26**(2) 135(1973)
- 12) 木原 清: 工業化学雑誌, **43**(11) 876(1940)
- 13) 横塚保: 日本農芸化学会誌, **27**(5), 276(1953)
- 14) Nobutake Nunomura, Masaoki Sasaki, Yasuo Asao and Tamotsu Yokotsuka: *Agric. Biol. Client.* **42**(11), 2123(1978)
- 15) 菅原悦子: 日本醸造協会誌, **108**(12), 863(2013)