

グリセリン等を指標とした丸大豆しょうゆの判別法の検討

諸橋 保, 木村康晴

Tamotsu Morohashi, Yasuhare Kimura

要 約

本研究は、「丸大豆しょうゆ」の表示が行われた製品に表示と異なって脱脂加工大豆が使用されていること等を判別する為の検査技術を開発することを目的に行った。この結果、丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆのグリセリン含有量や多環ピラジンの含有量に、片側検定1%未満の危険率で有意な差が認められたが、両成分を用いた線形判別では、丸大豆しょうゆの誤判別率を実用的な5%以下と設定した場合に脱脂大豆しょうゆの検出率は約30%となり、「丸大豆しょうゆ」と「脱脂大豆しょうゆ」を確実に判別することができなかった。

1. はじめに

市販されるしょうゆの中で、原材料に使用する大豆の全てを丸大豆で製造したしょうゆ（以下「丸大豆しょうゆ」という。）は、付加価値のある商品として市場で扱われている。この丸大豆しょうゆの香味の官能的特徴は、原材料として使用する原料大豆の全量、又はほぼ全量に脱脂加工大豆を使用したしょうゆ（以下「脱脂大豆しょうゆ」という。）に比べて「まるやか」であること等が言われている。一方、丸大豆しょうゆの品質上の特徴については、丸大豆に多く含まれている油分から分解して生成するグリセリン等の含有量に差があること^{1)~3)}やフェルラ酸等の香気成分に違いがあること⁴⁾などが報告されている。

一方、しょうゆの品質表示のルールは、加工食品品質表示基準及びしょうゆ品質表示基準に定められており、この基準に基づいた原材料名の記載方法は、使用した原材料を最も一般的な名称により表記することが義務付けられている。丸大豆を使用して製造したしょうゆには「大豆」と、脱脂加工大豆を使用して製造したしょうゆには、「脱脂加工大豆」と表示することとなっている。また、一括表示の原材料名以外の表示についても、事実と異なる表示を行うことは禁止されており、原材料に脱脂加工大豆を使用したしょうゆに「丸大豆しょうゆ」等の商品名等を記載することは、これに該当するため不適切な表示と判断される。一般に、「丸大豆しょうゆ」等の特徴を示した表示や、原材料名としての「丸大豆」の表示は、購入する消費者等に商品に付加価値があることをアピールするものである。本研究は、丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆの有効な判別法の開発を目的に行った。

2. 実験方法

2. 1 試料

試料は、原材料にアミノ酸液等を含まない本醸造のこいくちしょうゆを対象とし、国内41カ所のしょうゆ製造工場から、使用した原材料等の情報や醸造方法を併せて収集した56点の丸大豆しょうゆ及び33点の脱脂大豆しょうゆを用いた。

2. 2 分析項目

グリセリン、脂肪酸エチルエステル類、フェルラ酸、多環ピラジン及び全窒素分の分析を行った。

なお、グリセリン等の分析結果を、各製品の原料配合割合及び成分調製にともなう濃度変動の影響を回避するため、原料濃度の指標となりうる全窒素分との比を取ることで補正を施した。¹⁾

2. 3. 1 グリセリン含有量

柿本らが調査研究報告で報告した¹⁾ガスクロマトグラフ法を用いてグリセリンの含有量を算出した。

試料1 mLをメスフラスコに採取し、これに内部標準として4%トリエチレングリコール溶液1 mLを加えた後、蒸留水で25 mLに定容して測定溶液とした。

ガスクロマトグラフ分析条件は表1のとおり。

なお、分析値は、以下2. 3. 5の方法で測定した全窒素分を除いて全窒素分に対する比として算出した。

表1. ガスクロマトグラフ条件(グリセリン)

装置名	島津 GC-14B
カラム	TENAX-TA (3.2 mmID×60 cm)
カラム温度	初期温度：170 °C(2分) 昇温速度：15 °C/ min 最終温度：240 °C(4分)
注入口温度	250 °C
検出器温度	250 °C
キャリアーガス	窒素
流圧	N ₂ : 0.5 kg/cm ² H ₂ : 0.5 kg/cm ² Air : 0.5 kg/cm ²
検出器	FID
注入量	2 µL

2. 3. 2 脂肪酸エチルエステル類

基準みそ分析法⁹⁾に従ってガスクロマトグラフ法を用いて分析を行った。

試料 50 mL をソックスレー液体抽出装置を用いてジエチルエーテルで 10 時間抽出を行い、ジエチルエーテルを除去した後、トルエン・ヘキサン(7:3)混液を 2 mL 加え溶解し、測定試料とした。ガスクロマトグラフ分析条件は表 2 のとおり。

表 2. ガスクロマトグラフ条件(脂肪酸エチルエステル類)

装置名	島津 GC-2010
カラム	DB-WAX (0.25 mmID×30.0 m)
	液相の膜厚：0.25 μm
カラム温度	初期温度：130 °C(0分)
	昇温速度：4 °C/ min
	最終温度：230 °C(20分)
注入口温度	250 °C
検出器温度	250 °C
注入方法	スプリット
注入量	1 μL

2. 3. 3 フェルラ酸

木下らが日本醤油研究所雑誌報告している方法⁹⁾に従って分析を行った。

試料 5 mL を共栓付き試験管に採取した後、酢酸エチル 2 mL を加えて、10 分間激しく振とうし、3,000 rpm 10 分の遠心分離を行い、上層の酢酸エチルをパスツールピペットで採取し、試験溶液とした。ガスクロマトグラフ条件は表 3 のとおり。

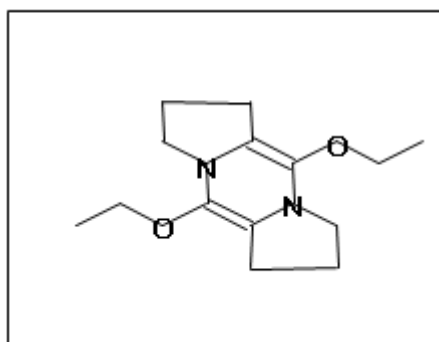
表 3. ガスクロマトグラフ条件(フェルラ酸)

装置名	島津 GC-2010
カラム	FFAP (0.32 mmID×25.0 m)
	液相の膜厚：0.50 μm
カラム温度	初期温度：140 °C(0分)
	昇温速度：3 °C/ min
	最終温度：230 °C(40分)
注入口温度	250 °C
検出器温度	300 °C
注入方法	スプリット
注入量	1 μL

2. 3. 4 多環ピラジン含有量

フェルラ酸の分析結果を解析した際に、得られたチャートの 45.9 分付近に出現するピークの大きさが脱脂大豆しょうゆと丸大豆しょうゆで異なり、また丸大豆しょうゆの方が大きいことが認められたことから、試験液の作成はフェルラ酸と同様に行った後、ガスクロマトグラフの条件を表3の「昇温速度を 6 °C/min」、「最終温度 230 °Cの保持時間を 15 分」に変更して実施した。

なお、当該ピークの物質の同定を GC-MS(アジレント社製の 6890N)を用いて行ったところ、ライブラリー一致率 91 %で、5,10-ジエトキシ-2,3,7,8,-テトラヒドロ-1H,6H-ジピロロ-[1,2-a:1'2'-d]ピラジン(以下、「多環ピラジン」という)と推測された(図1)。



ライブラリで示された構造式

図1 多環ピラジンの推定構造式

また、同定の際の GC-MS 条件は表4のとおり。

なお、該当多環ピラジンは試薬の入手が困難であったことから、本報告においては、ピーク面積をもって多環ピラジン量として算出を行い、グリセリンと同様、測定した値は、2. 3. 5の方法で測定した全窒素分で除してしょうゆ中に含まれる全窒素分に対する比の量で表した。

表4. GC-MS条件(多環ピラジン)

GC部	アジレント 6890N
カラム	FFAP (0.32 mmID×25.0 m)
	液相の膜厚：0.50 μm
カラム温度	初期温度：140 °C(0分)
	昇温速度：6 °C/min
	最終温度：230 °C(20分)
注入口温度	250 °C
検出器温度	300 °C
注入方法	パルスド スプリットレス
注入量	1 μL
MS部	アジレント MSD 5973
インターフェイス部温度	240°C
イオン化条件	イオン化電圧：70 eV(EI)
	イオン化電流：34.6 μA
	イオン源温度：230 °C
測定法	スキャン法
スキャン範囲	10-500(m/z)

2. 3. 5 全窒素分

JAS分析試験ハンドブック食品編⁹⁾のしょうゆの全窒素分の方法に従って分析を行った。

しょうゆ 1 mL をケルダールフラスコに正確に採取し、これに分解促進剤(硫酸カリウム：りん酸第二カリウム：硫酸銅=10：10：2) 2 g、硫酸 5 mL を加えて加熱して分解を行った。この分解液をフォス・ジャパン株式会社の Kjeltec2200 を用いて蒸留を行い、4 %ホウ酸溶液 20 mL に捕集させ、捕集した留液を 0.05 mol/L の硫酸溶液で滴定を行い全窒素分を算出した。

3. 結果及び考察

3. 1 グリセリン含有量

丸大豆しょうゆのグリセリン含有量の平均は、全窒素分 1 % 当たり 1.33 % (標準偏差 0.35 %)、脱脂大豆しょうゆの含有量の平均は、全窒素分 1 % 当たり 0.93 % (標準偏差 0.24 %) であった。

グリセリン含有量の分布は図 2 のとおりであった。

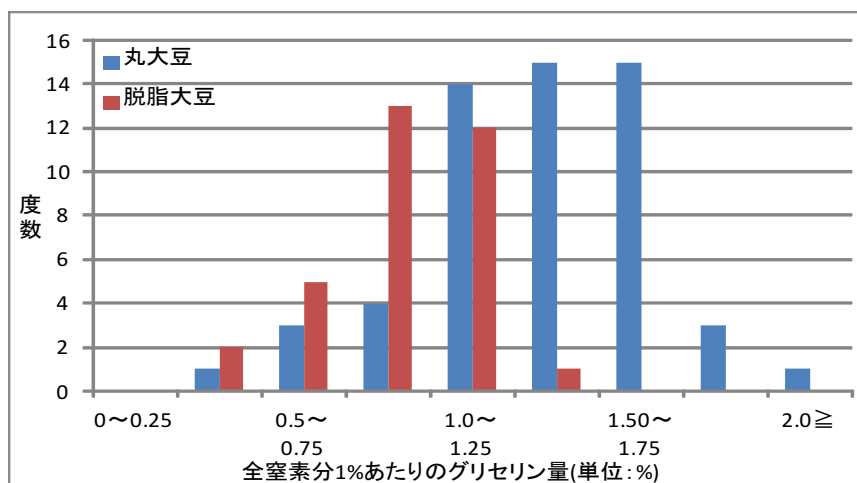


図2 丸大豆しょうゆ、脱脂大豆しょうゆのグリセリン含有量分布

丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆのグリセリン含有量は、平均値の差の検定を行ったところ、片側検定1%未満の危険率で丸大豆しょうゆにグリセリンが多く含まれることの有意な差が認められた($t=6.42$ (境界値: 2.37))。

しかし、丸大豆しょうゆの約4割の製品のグリセリン含有量は脱脂大豆しょうゆに含まれるグリセリン含有量の濃度範囲と重なる結果となり、このことから、グリセリン含有量は判別の為の指標の一つにはなりうるが、このグリセリン含有量だけで丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆを区分することは難しいことが明らかとなった。

なお、今回測定されたグリセリン量は、原料大豆由来の理論上のグリセリン量よりも多かった。これは、醸造期間中に酵母がグルコースからグリセリンを生成することが知られており⁷⁾、脱脂大豆しょうゆにもグリセリンが相当程度含まれることから、このことがグリセリンを指標とした判別を困難にしている原因と推定された。

3. 2 多環ピラジン含有量

丸大豆しょうゆの多環ピラジン含有量の平均は、全窒素分1%当たり19,500(標準偏差7,900)、脱脂大豆しょうゆの含有量の平均は、全窒素分1%当たり11,000(標準偏差5,000)であった。

多環ピラジン含有量の分布は図3のとおりであった。

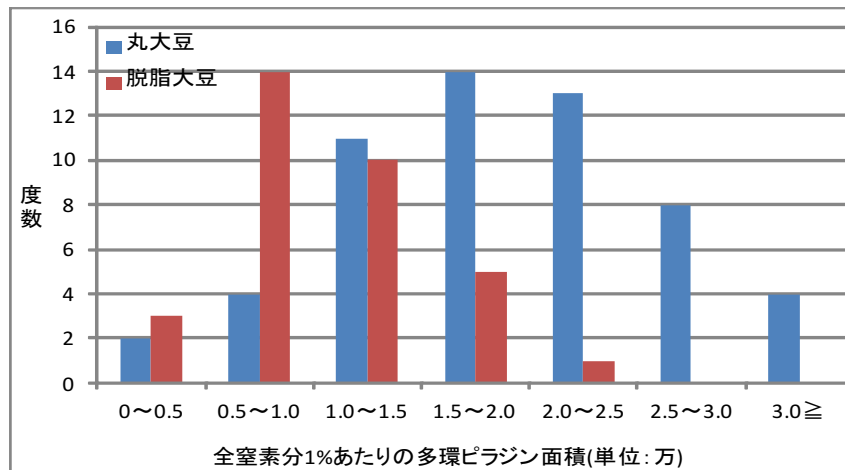


図3 丸大豆しょうゆ、脱脂大豆しょうゆの多環ピラジン含有量分布

丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆの多環ピラジン含有量は、平均値の差の検定を行ったところ、片側検定1%未満の危険率で有意な差が認められた($t=6.23$ (境界値: 2.37))。

しかし、丸大豆しょうゆの約7割の製品の多環ピラジン含有量は脱脂大豆しょうゆに含まれる多環ピラジン含有量の範囲と重なる結果となり、判別法の為の指標の一つにはなりうるが、この多環ピラジン含有量だけで丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆを区分することは難しいことが明らかとなった。

ピラジン類は多様な食品(しょうゆ、炒りアーモンド、納豆、ココア、パン、ポテトチップ、味噌等)に含まれていて、香ばしい香りの原因物質と考えられている。また、新版醸造成分一覧表⁸⁾において、しょうゆ中のピラジン類は18種の存在が確認されている。図4の上図は、しょうゆ抽出物のマスクロマトグラムであるが、これをGC-MSのライブラリーから検索したところ、図4の下図が選択され、ライブラリー一致率91%で、図1に示した構造式の多環ピラジンと推測された。

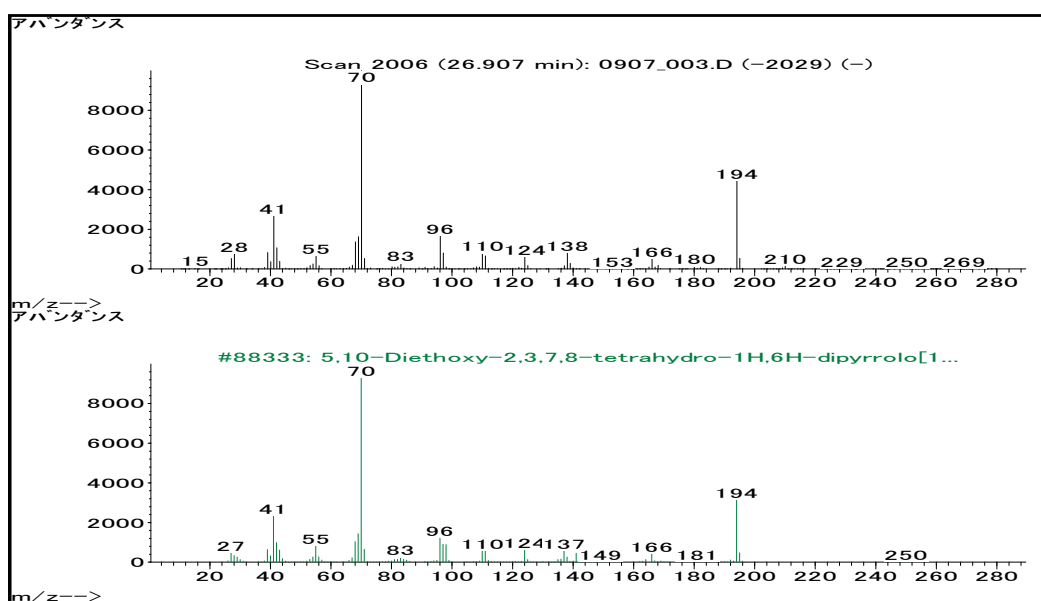


図4 多環ピラジンのマスクロマトグラム

また、脱脂大豆しょうゆと比較して丸大豆しょうゆの方が多環ピラジン含有量が多かったことは、丸大豆しょうゆの香味優位性を裏付ける材料の一つと考えられた。

3. 3 グリセリン含有量と多環ピラジン含有量

グリセリン含有量と多環ピラジン含有量関係は、図5に示すとおりであった。

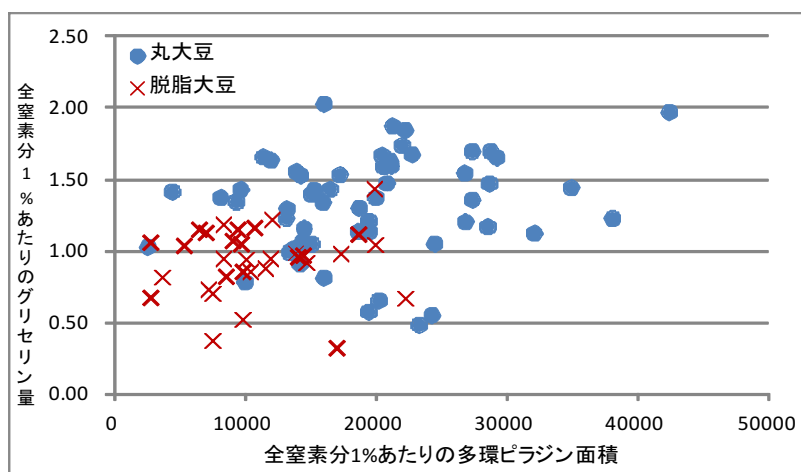


図5 丸大豆しょうゆ、脱脂大豆しょうゆの「グリセリン含有量ー多環ピラジン含有量」の相関

相関図からも、丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆのグリセリンと多環ピラジン含有量の分布に差が認められ、丸大豆しょうゆはグリセリンと多環ピラジン含有量の両成分を多く含む傾向を示していることが判る。

グリセリンと多環ピラジン含有量の分析結果から株式会社エスミ製の EXCEL 多変量解

析 Ver.5.0 を用いて判別のための線形判別を行ったところ、

判別関数 $Z = 0.00015[X1] + 3.5193[X2] - 6.2556$ が得られた。

(ただし、 Z : 判別得点、 $[X1]$: ピラジン含有量、 $[X2]$: グリセリン含有量で、 $Z > 0$ の場合は丸大豆しょうゆ、 $Z < 0$ の場合は脱脂大豆しょうゆと判定する。)

この判別式を用いて、収集した試料の、丸大豆しょうゆを脱脂大豆しょうゆとして間違っ
て判別する確率（以下、「誤判別率」という。）は 56 点中の 16 点で 28.6 %、脱脂大豆し
ょうゆを正しく脱脂大豆しょうゆと判別する確率（以下、「検出率」という。）が 33 点中
の 30 点で 90.9 %となった。

丸大豆しょうゆの誤判別率を小さくするため、判別に用いる得点を丸大豆しょうゆが示
す正の得点側にシフトさせると誤判別率の減少に伴って、検出率が減少した。実用で許容
される最大の誤判別率を 5 %以下と設定すると、この際の検出率は約 30 %以下となる。
得られた判別式を用いると、丸大豆しょうゆを脱脂大豆しょうゆと誤判別する確率を 5 %
以下に設定した場合に、脱脂大豆しょうゆでありながら丸大豆しょうゆと表示されたもの
の約 7 割を見逃すこととなることを意味し、丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆを判別す
ることは困難であると推察された(表 5)。

表 5 判別に用いる得点を正の得点側にシフトした場合の誤判別率及び検出率

判別得点	0点	1点	2点	3点
誤判別率(%)	28.6	7.1	3.6	0.0
検出率(%)	90.9	60.6	27.3	6.1

3. 4 脂肪酸エチルエステル類、フェルラ酸

脂肪酸エチルエステル類及びフェルラ酸について、収集した試料の一部について分析
を実施した結果、丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆのいずれにおいても、これらを含む
する製品としない製品が混在していた。また、含む製品の含有量に傾向を認めること
ができなかった。

4. まとめ

丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆの有効な判別法の開発を目的に本研究を実施した。

その結果、丸大豆しょうゆと脱脂大豆しょうゆの間で、グリセリン含有量及び多環ピラ
ジン含有量に、片側検定 1 %未満の危険率で有意な差が認められ、両成分を用いた線形判
別では、丸大豆しょうゆの誤判別率を実用的な 5 %以下と設定した場合に脱脂大豆しょう
ゆの検出率は約 30 %となり、「丸大豆しょうゆ」と「脱脂大豆しょうゆ」を確実に判別す
ることができなかった。

5. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、試料収集や分析上の助言等のご協力をいただきました全国のしょうゆ製造者の皆様、関係団体各位の皆様に深謝致します。

6. 文 献

- 1) 柿本芳久、他：農林水産消費技術センター調査研究報告, No.21, 41-47 (1997)
- 2) 鳥越久司、他：農林水産消費技術センター調査研究報告, No.29, 43-49 (2005)
- 3) 鳥越久司、他：農林水産消費技術センター調査研究報告, No.29, 50-56 (2005)
- 4) 木下恵美子、小澤善徳、相馬鐵郎：醤油研究所雑誌 Vol.24, No.6, 333～340 (1998)
- 5) J A S分析試験ハンドブック 食品編：農林水産省農林水産消費技術センター発行 (1999)
- 6) 基準みそ分析法：全国味噌技術会発行 (1968)
- 7) 今村美穂、佐藤常雄、畑本修：醤油の研究と技術, Vol.37, No.1, 49-55 (2011)
- 8) 新版醸造成分一覧表：日本醸造協会発行 (1977)