

質量分析計を用いたメタボローム解析による
農畜産物食味特性評価法の開発

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物圏資源科学専攻
博士 (農学) 学位論文

田村 祥雄

略語リスト

FT-NIR: Fourier transform near infrared

GC-TOF-MS: Gas chromatography-time of flight-mass spectrometry

UPLC-qTOF-MS: Ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry

CE-MS: Capillary electrophoresis-mass spectrometry

NMR: Nuclear magnetic resonance

FW: Fresh weight

DW: Dry weight

RI: Retention index

PCA: Principle component analysis

OPLS-DA: Orthogonal projections to latent structures discriminant analysis

Log₂FC: Log₂ fold-change

FDR: false discovery rate

HxR: Inosine

Hx: Hypoxanthine

HS: Head space

SPME: Solid-phase micro-extraction

VOC: Volatile organic compound

目次

第1章 序章

1.1食物の味と香り	1
1.2農畜産物の食味特性評価	1
1.3農業および食品分野におけるメタボローム解析の活用	3
1.4本研究の目的	4

第2章 植物工場レタスにおける食味成分のメタボローム評価法の確立

2.1 緒言

2.1.1 植物工場の意義と役割	6
2.1.2 植物工場レタスの品質および食味特性	6
2.1.3 農産物のメタボローム解析	7
2.1.4 本研究の目的	8

2.2材料および方法

2.2.1 試薬	9
2.2.2 植物体および栽培条件	9
2.2.3 GC-TOF-MS を用いたメタボローム解析	10
2.2.4 UPLC-qTOF-MS を用いたメタボローム解析	11
2.2.5 データの前処理および統計解析	12

2.3結果

2.3.1 本研究の実験デザイン	13
2.3.2 水耕および土耕栽培レタスにおける代謝物組成の比較	14
2.3.3 栽培条件に寄与する代謝物群の探索	15

2.4 考察

2.4.1 栽培条件が表現型に及ぼす影響	16
2.4.2 植物工場レタスの品質および食味成分のメタボローム評価	17

第3章 加熱による豚肉中呈味成分変動パターンのメタボローム解析

3.1 緒言

3.1.1 豚肉について	30
3.1.2 豚肉の一般的品質評価法	31
3.1.3 本研究の目的	32

3.2 材料および方法

3.2.1 試薬	33
3.2.2 豚肉サンプルの調製	33
3.2.3 アミノ酸分析計による豚肉中遊離アミノ酸の分析	33
3.2.4 GC-MS を用いたメタボローム解析	34
3.2.5 GC-MS のデータ解析	35
3.2.6 統計解析	35

3.3 結果

3.3.1 焼成前後の豚肉における遊離アミノ酸組成分析の比較解析	36
3.3.2 メタボローム解析による豚肉に含まれる化合物群の同定およびアノテーション	36
3.3.3 遊離アミノ酸組成分析との比較によるメタボローム解析の精度評価	37
3.3.4 焼成前後で変動する豚肉中化合物群の抽出	37

3.4 考察

3.4.1 メタボローム解析による豚肉産地の違いに寄与する化合物群の抽出とその要因の検討	38
3.4.2 焼成前後の豚肉中呈味関連化合物の変動パターン解析	39

第4章 熟成に伴う豚肉の呈味および加熱香气成分変動の網羅的解析

4.1 緒言

4.1.1 豚肉の流通工程	53
4.1.2 保存に伴う豚肉の成分変動	53
4.1.3 豚肉の香气成分	55
4.1.4 本研究の目的	55

4.2 材料および方法

4.2.1 試薬	56
4.2.2 豚肉サンプルの調製	57
4.2.3 鮮度指標 K 値による豚肉の鮮度判別	57
4.2.4 GC-MS を用いた生肉中化合物の分析	58
4.2.5 HS-SPME 法を用いた焼成肉の加熱香气分析	59
4.2.6 データ前処理および解析	60

4.3 結果

4.3.1 従来法による生肉の鮮度評価	60
4.3.2 保存に伴い変動する呈味関連化合物プロファイリング	61
4.3.3 保存および焼成処理に伴う加熱香气成分変動パターンの解析	62

4.4 考察

4.4.1 熟成が豚肉の生肉中呈味関連化合物組成に及ぼす影響	64
4.4.2 焼成温度および熟成期間の違いに寄与する加熱香气成分	65

総括	83
Summary	87
謝辞	91
引用文献	92

第1章 序章

1.1 食物の味と香り

我々が食物を食べたときに感じる「味」や「香り」は、人の五感（味覚，嗅覚，視覚，聴覚，触覚）のなかでも味覚や嗅覚により知覚される。味覚は人の舌の味蕾と呼ばれる受容器に，唾液に溶解した食物中の低分子化合物が接触することにより，五味（甘味，酸味，塩味，苦味，旨味）を感知することである。また，嗅覚は食物中の揮発成分が鼻腔の嗅覚器を刺激することにより生じる感覚である。味覚と嗅覚は密接に関わっており，いずれが欠けても味を正しく判断することができない。例えば，鼻腔閉鎖条件において五味に対する感覚強度が減少することが明らかになっており（小早川および後藤，2015），鼻が詰まった状態で食品を口にしても味気なく感じるのはこのためである。また，Folta および Klee (2016) の総説ではトマトの品種別の食味評価において，糖含量が低い品種でも甘いと認識することは香氣成分の含量が関連しており，人間が経験則上甘いと感じる香氣成分が嗅覚を刺激することで脳が錯覚を起こすためだと解説している。このように，味や香りは密接に関わっており，食物の食味特性を決定するための重要な要素であると考えられる。

1.2 農畜産物の食味特性評価

昨今の健康志向の高まりとともに，消費者は農畜産物に対して価格だけでなく，食味性について高い関心を示している。さらに，国産農畜産物の輸出本格化に向け，これらの味や香りの評価は，より一層重要性が増している状況である。その理由のひとつとして，嗜好性は食文化や食習慣に影響されるものであり，輸出国の消費者が求める農畜産物の見た目，味および香りは様々であることが挙げられる。このため，我が国における農畜産物を輸出するにあたっては，

輸出先の消費者のニーズに合った味や香りを有する品質で提供していくことが重要である。

現在、消費者が食品のおいしさを判断する材料として、インターネットや SNS 等を通じた口コミによる情報やテレビや雑誌等を介した評論家の発言が挙げられるが、いずれも主観的で数値化できないため、こうした情報を技術開発や改良に転用することは容易ではない。このため、多くの食品に携わる企業や研究機関では、実際に食品を人が食べた上で客観的に評価する手法として官能評価が用いられる。官能評価は、訓練されたパネル（評価する人）により味および香りの強度を定量的に分析する分析型官能評価、幅広い年代の消費者を対象に食品の好ましさを調査する嗜好型官能評価に大別される（今村，2012）。しかし、官能評価はパネルの評価能力に依存する評価手法であるため、訓練に時間やコストが掛かり、人により熟練度にばらつきがあることから、効率的かつ高い再現性で食味特性を定量的に評価する手法の確立が望まれている。近年、ヒトの舌や鼻の感覚を数値化する味覚センサーや匂いセンサー等の装置も普及してきているものの（都甲，2014）、センサーの特性上対応できない食品もあり完全な置き換えはできていない。一方で、分析装置を用いた客観的な食味特性の評価方法として、糖、アミノ酸および有機酸等の呈味成分の化学分析が挙げられる。前処理方法、測定機器および測定条件が同じであり、かつ分析データの品質を保障できるのであれば、分析担当者や場所を問わず、定量値を出すことができる。また、同一サンプルについて官能評価も合わせて実施することによって、化学分析により得られた結果はそれら官能特性を科学的に解釈するための裏付けデータとなりうる。しかし、農畜産物は多種多様な化合物から構成されているため、1 つまたは少数の化合物を測定対象とし比較定量する既存の化学分析では、農畜産物の食味特性評価のためのデータの取りこぼしが問題となる（及川ら，2017）。また、前述のとおり食品のおいしさは、甘味、旨味、酸味等から

構成されるものであり、これらのバランスによって成り立っている。このことから、消費者に選ばれる農畜産物を開発するためには、食味関連成分のバランスにも着目する必要があると考える。

1.3 農業および食品分野におけるメタボローム解析の活用

現在、植物、動物および微生物で検出される代謝物数は、それぞれ 20 万種、3 千種および 1 千種とされている (Dixon ら, 2003; Foster ら, 2002; Rayls, 2004)。メタボローム解析は、これら生物内の多様な代謝物の変動を、高分解能を有する分析装置で一斉分析し、その増減の量的・質的変動と生命現象との関連性を解析技術であり、代謝物の同定およびアノテーションに必要なライブラリーも拡充されてきていることから、近年医療や植物生理等の様々な分野で活用されている (福崎, 2008)。農業・食品分野においても、メタボローム解析は栽培環境差による農産物の代謝変動の検出、農畜産物や食品における食味特性評価や品質評価のための指標探索に活用されている (Garcia ら, 2016; Kusano ら, 2011b; Sung ら, 2015; Ya-Qin ら, 2017; Zeng ら, 2014)。前述のように様々な研究目的に対しメタボローム解析を行うにあたり、これまで化合物の構造決定に用いられてきた分光法であるフーリエ変換-近赤外分光 (FT-NIR) や核磁気共鳴法 (NMR) および質量分析法 (MS) 等を駆使して代謝物解析が行われる (Cozzolino ら, 2006; Dettmer ら, 2007; Ramakrishnan および Luthria, 2017)。このうち、質量分析法については、ガスクロマトグラフィー (GC)、液体クロマトグラフィー (LC) およびキャピラリー電気泳動 (CE) と質量分析計 (MS) を接続した装置を用いることが主流である (Gowda および Djukovic, 2014)。例えば、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MSMS) および GC-MS を用いた醤油のメタボローム解析では、得られた代謝物データをもとに食味特性の予測モデル構築に成功し、モデル内における重要因子としてジペプチドの

寄与が大きかったことが報告されている (Yamamoto ら, 2014). ナチュラルチーズについても, GC-MS を用いた低分子化合物の一斉分析により, チーズのコクや酸味といったフレーバーの予測モデルを構築できることが明らかになっている (Ochi ら, 2012). また, 超高速液体クロマトグラフィー-飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOF-MS) を用いた緑茶中成分の分析結果を用いることで, 緑茶専門家による官能評価結果の予測可能性についての報告がある (Pongsuwan ら, 2008). また, CE-MS を用いた手法ではアミノ酸やカルボン酸等のイオン性化合物を対象とすることが多く, 豚肉, 日本酒, ダダチャ豆等の食品の品質評価に適用されている (Muroya ら, 2014; Sugimoto ら, 2010, 2012). 検出感度は質量分析計に劣るが, サンプル調製が比較的簡便な NMR を用いた手法は, 牛肉包装の際に染み出るドリップを測定対象とし, 肉の熟成度合の評価にも用いられている (Castejon ら, 2015). このように, 従来のターゲットを絞った化学分析と比較し, メタボローム解析はサンプル中の低分子化合物を半定量的かつ包括的に捉えることが可能であることから, 農畜産物における食味関連成分のバランスを捉え, 食味特性を多角的に評価するための強力なツールとなることが期待されている.

1.4 本研究の目的

今後も消費者に選ばれる魅力的で高品質な日本産農畜産物を提供していくことは, 国際競争力を高め, 持続可能な日本農業発展のために重要である. また, 前述のとおり農畜産物の輸出を見据えた場合, 各輸出国の要望に合わせて食味性を制御する必要があると考える. すなわち, 付加価値として特色ある食味性を有し, それを精密に制御できるような農畜産物の生産技術の開発や加工・流通プロセスの最適化が重要であり, その生産物の食味特性を客観的に評価するための指標探索が必要となる. これまで農畜産物の食味特性評価において, メ

メタボローム解析は人為的に生産条件を制御しやすい加工食品や遺伝的純系である品種の確立された農作物へ適用されてきた (Greibenstein ら, 2011; Miyauchi ら, 2017; Ochi ら, 2012; Okazaki ら, 2008; Yamamoto ら, 2014). また, 飼育条件や流通条件等の要因により特に代謝物の変化を捉えることが困難な変動しやすい畜産物の評価において, 遺伝的背景や飼育環境等の各種条件を一定に揃えた実験系が望ましい. しかし, このような実験系では市場流通している農畜産物の品質や食味特性を追跡するという目的において, 食味に与える因子の数を絞り込むことが困難なことから, データの解釈に大きな隔たりがあると考えられる. そこで, 本研究では実際に市場流通する農畜産物を材料として, これら材料間の成分変動の要因 (栽培環境, 保存条件, サンプルング方法等) をトレースできるような実験系を整備した上で, 数多くの研究実績のある質量分析計を用いたメタボローム解析を用いた食味特性評価法を確立することを目的とした. このような実践的かつ学術的な実験デザインを構築することにより, 農畜産物の市場流通品の食味特性を客観的に把握することが可能となり, 得られた知見の生産現場への展開がより円滑に進むことが期待できる. また, 本研究の材料として, 遺伝的背景が明確かつ栽培環境の厳密な制御が可能な植物工場栽培のサニーレタス, 原産地, 飼育環境および保存方法等, 品質に関与する要因をトレース可能な豚肉とした.

第2章 植物工場レタスにおける食味成分のメタボローム評価法の確立

2.1 緒言

2.1.1 植物工場の意義と役割

昨今、地球温暖化や集中豪雨等の自然災害による農産物生産への影響が問題となっており、安定的に営農するための技術開発が急務となっている。天候に左右されず安定的に農産物を生産できる技術の一つとして、植物工場が注目されている。植物工場は、開放型設備と閉鎖型設備に大別される。閉鎖型水耕栽培設備は開放型と比較し、植物の生育にとって重要な要素である光源、湿度、温度、栄養素等を人工的に制御したものが多く、主に人工光で栽培可能な葉物野菜やハーブ類等に用いられている (Kozai, 2013)。その理由として、これら葉物作物は、太陽光と比較して光強度が低い条件で栽培できるため、植物工場の主力光源である発光ダイオード (LED) のような光源にも適応できることが挙げられる。その反面、植物工場は企業による事業化が進んでいるものの、施設導入費や維持費が露地栽培と比較し高価であるため (Tokimasa および Nishiura, 2015)、今後これら設備の導入を拡大していくためには、食味の向上や機能性成分生産能を高める等、露地栽培では得ることのできない付加価値を高めた農作物の栽培技術の開発が必要不可欠である。

2.1.2 植物工場レタスの品質および食味特性

サニーレタスは、植物工場で栽培されている葉菜類の主流である。これまでには学術的な観点から、植物工場を模倣した条件においてサニーレタスの生産性向上や栄養素の蓄積等 (Miyagi ら, 2017; Touliatos ら, 2016) に着目した研究が行われてきた。例えば、ベビーリーフレタスは、異なる照射する光強度の違いによりアントシアニン類、クロロフィル類、フェノール類, ascorbic acid (vitamin

C) 等の含量が変動することが明らかになっている (Li および Kubota, 2009; Samuoliene ら, 2013). 水耕栽培レタスにおける栄養素の蓄積量は, 土耕のものと比較し液体肥料の組成による影響が大きいと報告されている (Palermo ら, 2012; Rouphael ら, 2004). また, 植物工場レタスの食味性は露地栽培のものと比較し, 一般的に葉が柔らかく, 苦味が少ないとされる. Lin ら (2013)は水耕栽培レタスにおいて, 赤色, 青色および白色 LED の組み合わせで照射することにより, 葉が柔らかく甘くなることを報告している. しかしながら, こうした植物工場を模したチャンバー内での実験系で栽培したレタスは, 市場流通しているものと品質が異なるケースが多い. 一方, 量販店等で購入したレタスでの評価では, 栽培や収穫時の条件を把握することができず, 仮にサンプル間で差異を見出したとしてもその要因を探索することは困難である. このように実際に流通および販売されている植物工場レタスの品質や食味特性, またそれに関連する成分組成を評価するための実験系が整備されていないのが現状である.

2.1.3 農産物のメタボローム解析

植物では, 品種や環境要因により生産される代謝物が増減することが知られており (Kusano ら, 2011b, 2014a, b; Sulpice ら, 2009), 我々が食す農産物においても同様にこうした要因により変動する代謝物組成が品質や食味特性に影響すると考えられる. そのため, メタボローム解析は農産物の代謝物変動を捉えるための手法として幅広く用いられる. 例えば, イネやトマトではメタボローム解析を含むマルチオミックス解析により品種特性に関連する代謝物の抽出に成功している (Kusano ら, 2007; Zhu ら, 2018). また, トマトやお茶等の農産物食味特性評価に適用した例では, 品種や栽培環境の差異で異なる官能評価の解釈にメタボローム解析で得られた一次代謝物または揮発性有機化合物のデータを用いている (D'Angelo ら, 2018; Miyauchi ら, 2017; Pongsuwan ら, 2008).

農産物の品質に関わる機能性成分や抗酸化物質等の植物が生産する二次代謝物をメタボローム解析した例では (Ma ら, 2013; Xie ら, 2008), これまでに栽培条件の差異が及ぼすお茶のフラボノイド蓄積の解析やアーティチョークの二次代謝物の網羅的解析による品質評価等に活用されている (Farag ら, 2013; Zhang ら, 2014). このようにメタボローム解析は, 農産物の品質や食味特性に関連する代謝物を精密かつ一斉に捉えることで精度の高い品質評価を可能とする.

2.1.4 本研究の目的

農産物の品質評価や食味特性の解析において, メタボローム解析は対象成分およびその類縁化合物のみを分析する既存の手法とは異なり, 非常に多くのサンプルの多種多様な成分を一斉に捉える画期的な分析手法である. また, 前述のとおり本解析法は栽培条件差で変動する食味性に関連した代謝物群の定量的な違いを検出できる. しかし, これまで農産物の栽培条件差による代謝物の変動を解析する場合, 実際の栽培条件に近似するよう光源や温度等を制御した実験系において実施されているが, 市場流通している農産物と品質が大きく異なり, 得られた解析データを実際の栽培技術に転用できないことが多いと考えられる. また, 市場流通している農産物は, 代謝物の変動要因 (栽培条件やサンプリング方法等) が多岐にわたるため, 評価自体が難しいのが現状である. そこで本研究では, 農産物の食味特性評価法を確立し, 一般的に露地栽培と比較し品質や食味性が異なるとされ, 水耕栽培での生育が主流である植物工場レタスについて, 共同研究者が実際に稼動・出荷している条件を可能な限り反映した実験系を整備した. また, 呈味性に関わる一次代謝物および機能性成分が属する二次代謝物について, 幅広い代謝物を検出可能な GC-MS および LC-MS の統合メタボローム解析 (Arbona ら, 2009; Lee ら, 2014; Sung ら, 2015) を行い, 栽培条件の差異と食味関連成分の変動との関連性を明らかにすることを目的と

した (図 2-1).

2.2 材料および方法

2.2.1 試薬

安定同位体ラベル化標準品およびシリル化試薬を除く試薬は Sigma Aldrich から購入した. 6 種の安定同位体ラベル化標準品 ($[^{13}\text{C}_5]$ -proline, $[^2\text{H}_4]$ -succinic acid, $[^2\text{H}_6]$ -2-hydroxybenzoic acid, $[^{13}\text{C}_3]$ -myristic acid, $[^{13}\text{C}_{12}]$ -sucrose, $[^2\text{H}_7]$ -cholesterol) は Cambridge Isotope Laboratories から購入した. また, $[^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}]$ glutamic acid および $[^{13}\text{C}_6]$ -glucose は Spectra Stable Isotopes, $[^2\text{H}_4]$ -1,4-diaminobutane は C/D/N ISOTOPES, $[^{13}\text{C}_4]$ -hexadecanoic acid は Icon から購入した. *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) with 1% of trimethylchlorosilane (TMCS) は, Pierce から購入した.

2.2.2 植物体および栽培条件

サニーレタスはブラックローズ (カネコ種苗) およびレッドファイヤー (タキイ種苗) の種子を購入し, 水耕栽培または土耕栽培で 33 日間栽培した. 両栽培方法の気温, 日照時間および光強度の条件は可能な限り揃えた. 水耕栽培では, 商用ベースの LED 植物工場 (キーストーンテクノロジー) に設置されているチャンバーを用い, 温度 22 °C, 日照時間 16 h 明所 / 8 h 暗所とし, 光合成光量子束密度 (PPFD) は $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に設定した. 光源には LED (波長: 青色 = 460 nm, 緑色 = 525 nm, 赤色 = 660 nm) を用いた. 一方, 土耕条件では, プランター (サイズ: 40×16×9 cm) に特選赤玉土 (加藤産業) を敷き詰め培養土 (フィジーミックス, サカタのタネ) を被せ播種した後, 人工気象器 (LPH-350S, 日本医化器械製作所) を用い, 温度 24 °C, 日照時間 16 h 明所 / 8 h 暗所の設定条件で土が乾燥しない程度に週 2 - 3 回水やりをし, 栽培した. また, ライト

メーター (LI-250A, メイワフィーシス)を用い, 白色 LED (波長 400 – 800 nm) の PPFd を $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に調整した (Tamoi ら, 2017). また, 植物体の大きさが代謝物組成にも影響することから, 予備実験にて各栽培条件での植物体の大きさが同等になるよう土耕の液肥濃度を最適化した. その結果, 土壌栽培の液肥濃度は, 水耕栽培に対し約 1/3 にすることで正常に生長し, 植物体の大きさも同等となることが明らかとなったため, 表 1 に示した濃度に設定した.

サンプリングについては, 葉の生育ステージ別に外葉, 内葉, 内葉と区別し (Kusano ら, 2011a), その外葉および内葉を 8 mm リーフパンチ (藤原製作所) でくり貫き, 直ちに液体窒素で凍結し, 分析まで $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した. サンプルの内訳は, 植物工場; 2 品種 \times 2 部位 \times 3 検体, 土耕栽培; 2 品種 \times 2 部位 \times 4 検体の計 28 検体であった.

2.2.3 GC-TOF-MS を用いたメタボローム解析

各サンプルは 25 mg FW/ml の抽出濃度になるようサンプリングし, 1 ml 抽出溶媒 (安定同位体ラベル化標準品 10 種を含むメタノール/クロロホルム/水 = 3:1:1) を添加し, ミキサーミル (MM301, レッチェ) を用いて 15 Hz , $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min で代謝物を抽出した (Kusano ら, 2007). その混合溶液を遠心分離し, 上清をガラスインサートバイアルに移した後, SpeedVac (SPD2010, Thermo Fisher Scientific) で濃縮乾固した. 窒素充填したチャンバー内 (VSC-1000, サンプラテック) で各バイアルに $30 \mu\text{l}$ メトキシアミン溶液 (20 mg/ml 脱水ピリジン) を添加し, 室温で 23 h 反応させた. さらに, その反応溶液に $30 \mu\text{l}$ の MSTFA を添加し, シリル化反応 ($37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h) させた後, $30 \mu\text{l}$ のヘプタンを添加したものを分析用サンプルとした.

分析用サンプル ($1 \mu\text{l}$) は, CTC CombiPAL オートサンプラー (CTC analytics) を用いて GC Agilent 6890N (Agilent) にインジェクションした. キャリアガスは

ヘリウムを用い、1 ml/min の流量とした。カラムは Rxi-5 Sil MS (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m; RESTEK) を用い、カラムの昇温プログラムは 80 °C (2 min) , 320 °C まで 30 °C/min で昇温した後、最終温度で 3.5 min 保持した。質量分析計には、Pegasus IV TOF MS (LECO) を用いた。マススペクトルは、30 スペクトル/sec で $m/z = 60-800$ の範囲を測定した。保持指標 (RI) を計算するため、*n*-アルカン混合標準試薬 (C8-20 および C21-C40) も合わせて測定した。なお、分析サンプル 6 本ごとにメチルステアリン酸を *n*-ヘプタンに溶解させた溶液 (50 ng/ml) を分析し、多検体を分析するときにかかるキャリーオーバーを回避した。

2.2.4 UPLC-qTOF-MS を用いたメタボローム解析

Nakabayashi ら (2014) の植物における二次代謝物の抽出方法に基づき、凍結乾燥したサンプル 1 mg DW に対して 150 μ l の抽出溶媒 (内部標準物質として 2.5 μ M の lidocaine および 10-camphour sulfonic acid を含む 80%メタノール) を添加し、ミキサーミル (18 Hz, 4°C, 7 min) を用いて代謝物を抽出した。抽出溶液は遠心分離し、その上清を Oasis HLB μ Elution plate (Waters) で精製した。得られた精製溶液は分析用サンプル (1 μ l) とし、Waters Acquity UPLC (Waters) にインジェクションした。UPLC の分析条件については、カラムは Acquity-bridged ethyl hybrid (BEH) C18 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.7 μ m; Waters) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相は、A: 0.1%ギ酸溶液, B: アセトニトリル-0.1%ギ酸溶液とし、グラジエント条件は、A: 99.5% (0 min), A: 99.5% (0.1 min), A: 20% (10 min), A: 0.5% (10.1 min), A: 0.5% (12.0 min), A: 99.5% (12.1 min), A: 99.5% (15.0 min) とし、流量は、0.3 ml/min (0 min), 0.3 ml/min (10 min), 0.4 ml/min (10.1 min), 0.4 ml/min (14.4 min), 0.3 ml/min (14.5 min) とした。質量分析計には Xevo G2 Q-TOF-MS (Waters) を用

い、MS の測定条件はイオン化モード：ESI のポジティブイオンモードおよびネガティブイオンモード、キャピラリー電圧：+3.0 keV、コーン電圧：25.0 V、イオンソース温度：120°C、脱溶媒温度：450°C、コーンガス流量：50 l/h、脱溶媒ガス流量：800 l/h、コリジョン電圧：6 V、 $m/z = 50-1500$ の範囲を測定した。また、MS/MS の測定条件は、コリジョン電圧：10–50 V とした。また、MS/MS データの取得は、MS スキャンにおける上位 10 イオンの検出強度が 1,000 カウント以上のピークのみとした。Progenesis CoMet (Nonlinear Dynamics) を用いて、各マススペクトルを取得した。得られたピークの標準化は、ポジティブイオンモードでは内部標準物質とした lidocaine を用い、ネガティブイオンモードでは 10-camphour sulfonic acid を用いて行った。

2.2.5 データの前処理および統計解析

GC-TOF-MS による測定から得られたマススペクトルでは ChromaTOF ソフトウェア (Ver. 4 LECO) を用いて Network Common Data Form (NetCDF) 形式で出力した。これら出力データは Umea 大学の Thomas Moritz 教授らとの共同研究により開発した MATLAB 2011b (Mathworks) プログラミング言語で記述されたカスタムスクリプトを用いて、high-throughput data analysis (HDA) 法によりデータの前処理およびピークアライメントを行った (Jonsson ら, 2005, 2006)。化合物ライブラリーは、PRIME (Platform for RIKEN Metabolomics, <http://prime.psc.riken.jp>) および Golm Metabolome Database (GMD) を用いた。また、行列データの標準化には、Cross-contribution compensating multiple standard normalization (CCMN) 法を用いた (Redestig ら, 2009)。また、UPLC-qTOF-MS より得られた代謝物のアノテーションは、文献上の MS または MS/MS 情報 (Abu-Reidah ら, 2013; Wu および Prior, 2005) や KNApSAcK データベース (keyword : *Lactuca sativa*) をもとに行った。

栽培条件で異なるサニーレタスの代謝物プロファイリングを行うため、データ行列は \log_{10} 変換および unit variance scaling の後、SIMCA-P+14 (Umetrics) を用いて主成分解析 (PCA) および直交部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) に供した。赤色サニーレタスの品質指標となる代謝物の抽出には、OPLS-DA より算出した変数重要度 (VIP) および多重検定法の一つである false discovery rate (FDR) を用いた (Benjamini および Hochberg, 1995)。また、栽培条件で異なる代謝物について、品種間で共通したものを視覚的に判断するため、VENNY ver.2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) によりベン図を作成した。

2.3 結果

2.3.1 本研究の実験デザイン

栽培条件、品種および葉の部位の違いによるサニーレタスの代謝物組成へ影響を解析するため、商用植物工場に準じた栽培条件 (比較区) を用い、対照区となる土耕栽培においても液体肥料組成や光強度等の諸条件は、比較区と可能な限り揃え栽培した (表 2-1; 図 2-1)。本研究の場合、予備実験として実際に稼働する植物工場で用いられている水耕栽培の液肥濃度を固定値とし、濃度を希釈した場合の土耕栽培における見た目の表現型観察を行った。その結果、水耕栽培の約 1/3 の濃度において両条件で生育したサニーレタスの生育ステージおよび見た目の表現型が類似することが明らかとなった。また、各栽培条件でのリーフレタスにおける葉の枚数およびバイオマス量は同等であった (表 2-1)。よって、本研究では表 2-1 に示す条件でサニーレタス 2 品種の栽培を行うこととした。水耕および土耕で栽培した両品種の表現型を比較した結果 (図 2-2)、水耕栽培レタスと土耕栽培レタスの大きさは同等であった。葉色については土耕栽培したブラックローズで葉先が濃赤色、レッドファイヤーで葉先が紅褐色となり、サニーレタス特有の着色がみられた。一方、水耕栽培したレタ

スでは紅褐色化が確認できなかった。また、Kusano ら (2011a) は、植物体の葉を生長ステージ毎に定義付けした上でメタボローム解析した結果、葉の生育段階に応じて代謝物組成が異なることを明らかにしている。本研究においても生長ステージの違いによる影響を加味したレタス中代謝物の解析を行うため、中心葉：最も内側の葉、内葉：中心葉と外葉の中間枚数の葉、外葉：子葉を除いて最も外側の葉と定義し、サンプリングした。本研究では栽培条件、品種および生育ステージの違いにより変動する代謝物を解析するため、各栽培条件および品種の異なるサニーレタスの外葉および内葉を対象に、呈味性に関連する一次代謝物をターゲットとした GC-MS および品質に関連する色素成分等をターゲットとした LC-MS を用いて分析することとした。

2.3.2 水耕および土耕栽培レタスにおける代謝物組成の比較

統合メタボローム解析の結果、GC-MS 分析では、223 ピークを検出し、そのうち 101 代謝物を同定またはアノテーションした (Viant ら, 2017)。LC-MS 分析では、ポジティブイオンモードで 30 ピークを検出し、そのうち 2 代謝物をアノテーションした。また、ネガティブイオンモードでは 65 ピークを検出し、そのうち 30 代謝物をアノテーションした。栽培条件、品種、葉の部位により変動する代謝物を視覚的に評価するため、GC-MS および LC-MS の検出ピーク強度から構成される行列データ (28 検体×317 ピーク) を教師なし多変量解析法である PCA に供した。その結果、第 1 主成分軸である PC1 (22.9%) 上で、栽培条件の違いで分類することが可能であり、軸の正の方向に土耕サンプル、軸の負の方向に水耕栽培サンプルが分布した。水耕栽培したサニーレタスの外葉サンプルを除いて、品種および葉の部位による違いは分類されなかった (図 2-3)。次に、栽培条件差で変動する代謝物の抽出するため、栽培条件を目的変数として直交部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) に供した。その結果、Predictive

component 1 (Pred Comp 1: 20.5%) 上で栽培条件の違いにより判別することが可能であった (図 4A). このモデルの判別性能を示す CV-ANOVA ($p < 0.05$), $R^2(Y)$ および $Q^2(\text{cum})$ は, それぞれ 0.00, 0.99% および 0.92% であり, 高い判別性能を有することが明らかになった (図 2-4B). これらの結果から, 品種や葉の部位よりも栽培条件の差異が代謝物群に対し影響が大きいと推察された.

2.3.3 栽培条件に寄与する代謝物群の探索

今回解析に供した全 318 ピークから栽培条件の違いに寄与する代謝物を抽出するため, OPLS-DA より算出した変数重要度 ($VIP > 1.0$) および多重検定の際に用いられる $FDR < 0.05$ を基準にした. また, 栽培条件の違いによるサニーレタスの代謝物組成の変動を調べるため, 行列データを \log_2 変換後, \log 比を算出し (\log_2FC), 水耕栽培レタスと土耕栽培レタスの二群間比較を行った. その結果, 土耕栽培したレタスはレタス特有のセスキテルペンや脂肪族アルコールを多く含有することが明らかになった. 一方, 水耕栽培したレタスはアミノ酸を多く含有することが判明した. さらに, このことが異なる品種間でも同様な傾向がみられるのか, ベン図を用いて視覚化した (図 2-5). 本解析に際して, LC-MS と GC-MS で同一の代謝物が検出された場合は変数重要度指数 (VIP) がより高い方を採用した. その結果, 共通して水耕栽培したレタスの両品種において多く含有する代謝物は, アミノ酸である Lys, Phe, pyroglutamic acid, Trp, Tyr であった (図 2-5A). 一方, 土耕の両品種においては, 糖類である arabinose, sucrose, myo-inositol, 有機酸である galacturonic acid, galacturonic acid, hydroxybenzoic acid, 脂肪族アルコールである 1-hexacosanol および 1-tetracosanol, ステロールである β -sitosterol を多く含有することが判明した (図 2-5B). さらに水耕栽培した各品種において多く蓄積した代謝物は, ブラックローズではアミノ酸である Ile, Leu および Val, caffeoylmalic acid や

coniferoside, レッドファイヤーでは 2-propionic acid や Glu であった。一方, 土耕栽培したブラックローズでは糖類である erythritol および raffinose, 有機酸である 2-oxoglutaric acid, glutaric acid および shikimic acid, セスキテルペンである lactucopicrin-15-oxalate および 15-deoxylactucin-8-sulfate が多く蓄積した。土耕栽培したレッドファイヤーで多く蓄積した代謝物は有機酸である glyceric acid および suberic acid, フェノール類である caffeoyltartaric-*p*-coumaroyl および caffeoyltartaric-*p*-coumaroyl であった。これら栽培条件の差異で変動する代謝物群のうち, シアニジン等の色素成分は栽培条件の差異で有意に変動しなかったが, いずれの栽培条件においてもブラックローズはレッドファイヤーと比較し, これら代謝物を多く蓄積する傾向が見受けられた (図 2-6)。食味特性に關与する Glu (旨味), sucrose (甘味), lactucopicrin-15-oxalate (苦味) 等の代謝物は, 栽培条件の違いにより有意に変動することが判明した (Halpern, 2000; Hounsome ら, 2008; Kurihara, 2009)。特に水耕栽培条件で生育したレッドファイヤーでは, 土耕と比較し Glu 含量が 2 倍増加した。逆に, sucrose や lactucopicrin-15-oxalate 含量は土耕レタスと比較し, 1/5 に減少した。

2.4 考察

2.4.1 栽培条件が表現型に及ぼす影響

水耕および土耕栽培条件下で 33 日間栽培したサニーレタスにおいて, 葉の枚数やバイオマス量は同等であった (表 2-1)。一方で, 視覚的にサニーレタスの表現型を比較した結果, 両栽培条件で植物体の大きさは同等であり, 葉色および形状は各条件下で異なった (図 2-2)。植物において, 代謝物群の組成は生育ステージや表現型の違いによる影響を大きく受けることが知られている (Kusano ら, 2011a; Li ら, 2016; Clevenger ら, 2015)。土耕レタスは, 水耕栽培のものより紅褐色が強く, 特にブラックローズはレッドファイヤーと比較し葉

先が濃褐色で、その他の部位は濃緑色であり、これは品種特性によるものだと考えられた (Caldwell および Britz 2006) . また, Stutte ら (2009) および Son ら (2013) は, 赤色および青色 LED の組み合わせでサニーレタスに照射した場合, 本研究と同様に紅褐色化がみられたが, 赤色 LED のみの照射では確認できなかったと報告している. こうしたサニーレタスの見た目の違いは, 消費者の購買意欲に対し影響を与えるかもしれない (McWatters ら, 2002). また, 植物における色素沈着はクロロフィル, カロテノイドおよびアントシアニン等二次代謝物の含有量が反映される. このため, 本研究では栽培条件や品種の差異による植物体の色味や形状の変化が様々な一次代および二次代謝物群の組成にも影響すると推察した (Caldwell および Britz, 2006; Sass-Kiss ら, 2005). そこで, 本研究では GC-MS および LC-MS を用いた統合メタボローム解析により, 見た目ではわからない各栽培条件で栽培したサニーレタスの違いに寄与する食味特性関連代謝物を包括的に探索した.

2.4.2 植物工場レタスの品質および食味成分のメタボローム評価

統合メタボローム解析の結果から, サニーレタスの代謝物組成の量的変動において, 栽培条件は品種や葉の部位の差異よりも影響が大きいことが示唆された. これまでに栽培条件がリーフレタス, ホウレンソウ, 小松菜等様々な農産物における品質や食味性に関連する代謝物の変動に影響するという報告がある (Ohashi-Kaneko ら, 2007; Zhang ら, 2014). しかし, 栽培条件の違いがターゲットとする農作物のバイオマスを大きく変化させてしまう場合, 生育段階のずれを補正することは非常に困難である. また, 同一の生育条件で生育した場合, 植物体の部位や葉の位置の違いによって代謝物群の組成が変化することも知られている (Kusano ら, 2011a). このように, 様々な要因から影響を受ける代謝物群の変動を捉え, その結果を評価するためには, 実験デザインの段階から代

代謝物群の変動に影響を与える因子を抽出し、それらの影響をできる限り抑えることで、偏った結果にならないようにすることが重要である (図 2-1)。本研究では、実際に植物工場で栽培されている生育条件を対照区とし、両栽培条件において生育ステージをできる限りそろえ、かつ見た目の表現型が大きく異なることがないように、十分に配慮した。例えば、従来の実験であれば液肥の濃度を水耕栽培および土耕栽培間で同一に揃えることが一般的である。本研究では、同一濃度を土耕栽培に適用した場合、サニーレタスの葉の大きさが小さくなる表現型が観察された。これは、無機栄養過多によるものと推測されたため、本研究では土耕栽培によるサニーレタスが健全に生育する条件について、液肥の段階希釈により決定した。このようなアプローチは、遺伝子組み換え大豆における代謝物群変化の解析のため、客観的評価法として適用された (Kusano ら, 2015)。客観的な評価法とは、代謝物の量的変動に影響を与えるそれぞれの因子の影響度を統計的に解析し、評価を行うものである。本研究においても、「栽培条件」、「品種」および「同程度に生育したサニーレタスからサンプリングした葉の位置」という変動因子があることをあらかじめ想定し、各因子が代謝物プロファイルに与える影響を多変量解析で評価している。

両栽培条件間において差異が認められたサニーレタスの葉色 (図 2-2) について、色素成分であるシアニジン²は両栽培条件間で統計的有意差は確認できなかった。その理由として、本研究では紅褐色化が観察されたレタスの葉先ではなく、分析の再現性が確保できる葉の中央部分をリーフパンチでくり貫いたことが有意差の認められなかった理由だと考えられた (図 2-3)。続いて、栽培条件の違いが食味性に関連する代謝物組成に及ぼす影響について解析した。Okazaki ら (2008) は、無機態窒素の硝酸を濃度勾配した条件下で栽培したハウレンソウについて、主要な代謝産物組成への影響を解析した結果、糖類は窒素濃度と負の相関があり、有機酸やアミノ酸は正の相関があることを明らかにし

た。また、Miyagi ら (2017) は、植物工場を模倣したチャンバー内での実験系において、二酸化炭素および液体肥料を高濃度に制御し、赤色 LED を照射した場合、バイオマスが増加し、アミノ酸類が増加することを報告している。このため、液体肥料の主成分である無機態窒素は、農産物の代謝物組成に影響を与える要因のひとつと考えられた。本研究で採用した水耕栽培条件は、共同研究者が所有する植物工場で用いられているものを採用し、前述の通り水耕栽培および土耕栽培による生育ステージをできるだけ揃えたうえで実験を行った。本研究において、アミノ酸である Leu, Ile, Trp, Thr および Phe の含量は、土耕と比較して植物工場レタスで有意に増加した。水耕栽培の液肥濃度が土耕と比較し高濃度であったことから (表 2-1)、無機態窒素濃度の違いにより、水耕栽培で生育したサニーレタスのアミノ酸含量が増加した可能性が示唆された。アミノ酸含量の増加は、旨味と正の相関を示すことが報告されている (Morris ら, 2007; Wang ら, 2016)。このことから、高アミノ酸含量が植物工場で生産されるレタスの旨味に寄与する可能性があると考えられる。また、水耕栽培条件で生育したレタスは、土耕栽培のものと比較して、糖類、脂肪族アルコールおよび β -sitosterol の含量が低下した。植物において糖の蓄積は、光源や栄養素等の栽培条件が影響することが知られている (Miyagi ら, 2017; Okazaki ら, 2008; Rosa ら, 2009)。表 2-1 に示す通り、水耕栽培条件、すなわち共同研究者の植物工場で利用されている LED 光源は赤色光、緑色光および青色光の単色 LED の組みあわせたものを採用した。一方、土耕栽培条件では、日本医化器械製作所が販売する白色 LED 光源搭載の人工気象器を用いた。これまでに赤色光のみならず緑色光照射により、sucrose 含量が増加するという報告がなされている (Kitazaki ら, 2018)。植物において、赤色光や緑色光はフィトクロムという光受容体で認識されることで光合成のためのエネルギー源となり、光合成産物である sucrose の含量にも影響を及ぼす。このことから、今回水耕栽培で用いた単

色 LED の組み合わせよりも土壌栽培で用いた幅広い波長域をカバーする白色 LED の方が、sucrose 含量を増加させる効果が高かったことが考えられた。本研究では植物のクチクラ層（表皮のワックス）を構成する主要な疎水物質である脂肪族アルコールおよび β -sitosterol 含量が、土耕栽培レタスと比較し水耕栽培品で低下した (Baker ら, 1979)。一般的に、植物におけるクチクラ層は体内の水分の蒸発を防ぎ、強光や病原菌から身を守るのために発達することが知られている。このことから、水耕栽培のようなクリーンかつ常に水に満たされている条件において、前述のようなストレスに対し防御する必要がないため、土耕栽培品と比較し、脂肪族アルコールおよび β -sitosterol 含量が低下したと推察した。また、Manzocco ら (2011) は、水耕栽培レタスと土耕栽培レタスにおける保存性を比較した結果、水耕栽培品は保存に伴う水分の損失が大きく、保存性が低いことが判明していることから、本研究データはこれを裏付ける知見となるかもしれない。葉のクチクラ層の厚さ、つまりはクチクラ層を形成する成分の含量は葉の硬さに影響すると考えられることから (Onoda ら, 2015)、植物工場で水耕栽培したリーフレタスが柔らかいと消費者から評価される所以ではないかと推測される。

レタス特有の成分であり、苦み成分として知られているセスキテルペン類の lactucopicrin とその類縁体およびフェノール類の含量は、土耕レタスで顕著に増加した。短波長光（紫外-青）LED による光照射は、レタス (Ouzounis ら, 2015) およびシロイヌナズナ (Kusano ら, 2011c) のフェノール類、フラボノイドおよび色素成分の蓄積を誘導していることが知られている。また、LED 光源をリーフレタスに照射する実験系において、セスキテルペンラクトン類の一種である lactucin が緑色光の照射で増加することが明らかになっている (Kitazaki ら, 2018)。本研究における土耕栽培の光条件は、400-800 nm の紫外に近い波長を含む可視光領域を採用した。短波長側の光エネルギーは長波長側と比較して

高く、植物にとって環境ストレスとなるため、赤色色素に関連するアントシアニンやフラボノイド等の成分増加に与える影響が大きいとされる。このため、土耕栽培したサニーレタスでは、葉色が赤色レタス特有の赤褐色であることが観測されており、フェノール類およびセスキテルペン類が高蓄積していたことから、短波長側を含めた光照射によるストレスに対して防御反応を示したのではないかと推察した。Caldwell と Britz (2006) は、光感受性の品種間差が葉物野菜の代謝物組成の差異にも影響することを報告しており、土耕栽培のレッドファイヤーでフェノール類の含量が高いことは、こうした光感受性の品種間差による要因だと推察した。また、フェノール類やセスキテルペンは高い抗酸化作用を示すが、味覚的な特徴として苦味を呈することが知られている (Altunkaya ら, 2016; Chadwick ら, 2016; Filippo D'Antuono ら, 2016; Ren ら, 2001; Seo ら, 2009)。今回水耕栽培したサニーレタス 2 品種では、土耕品と比較し、これら代謝物含量が低いことから、一般的に植物工場で水耕栽培されるレタスが露地栽培よりも苦味が少ないといわれる所以であるのかもしれない。

本研究の新規性は、一般的に植物工場栽培のサニーレタスとして市場流通する 2 品種に対して、共同研究者の商用植物工場で採用されている栽培条件 (水耕栽培・LED 光・液肥) を対照区とし、可能な限り植物工場の栽培条件に合わせた土耕栽培を比較区とした実験系を整備したことである。実験系の整備において、代謝物変動に大きく関与する因子をできるだけ除くため、植物体の大きさおよび生育ステージが植物工場栽培品と同等になるよう生育状態を加味した上で土耕栽培条件を最適化した。また、最適化した条件で収穫したサニーレタスの葉の位置による違いが代謝物プロファイルに与える影響を評価するため、内葉および外葉をサンプリングした。本条件で栽培し、本実験で決定した基準によりサンプリングしたサニーレタスに対してメタボローム解析を行った。その際、代謝物検出の網羅性を高めるため、2 種類の高性能質量分析装置を用い

ることとした。その結果、検出された 300 種以上の一次および二次代謝物からアミノ酸、フェノール類および lactucopicrin 等の代謝物群が水耕または土耕という栽培条件の差異によって大きく変動することを世界で初めて明らかにした。これら代謝物群がそれぞれの条件下で栽培したサニーレタスの品質や食味特性を反映するものだと考えられた (Mampholo ら, 2016; Manzocco ら, 2011)。また、レタスのメタボローム解析には、これまで GC-MS, LC-MS, CE-MS および NMR と様々な分析装置を用いて栄養素や色素等の代謝物群が検出されている (Garcia ら, 2016; Hurtado ら, 2017; Kitazaki ら, 2018; Miyagi ら, 2017; Pereira ら, 2014; Zhao ら, 2016)。本研究で行った統合メタボローム解析を拡張することで新たな栽培条件の検証精度の向上に寄与するものだと考えられた。

本研究で確立した評価系は、現在市販されている様々な植物工場で栽培される同一品種の成分比較等、様々な農産物の栽培条件を評価するための手法として活用できると考えられる。しかし、本評価系の実用化には、植物工場での詳細な栽培条件のトレースやこうした取り組みに対する協力企業の存在が必須である。今後は、協力企業参画の促進やメタボローム解析によるマーカーとなりうる代謝物の選抜・簡易測定法の開発を行っていくことで、食味の優れた農産物の生産技術の発展に繋がると考えられる。

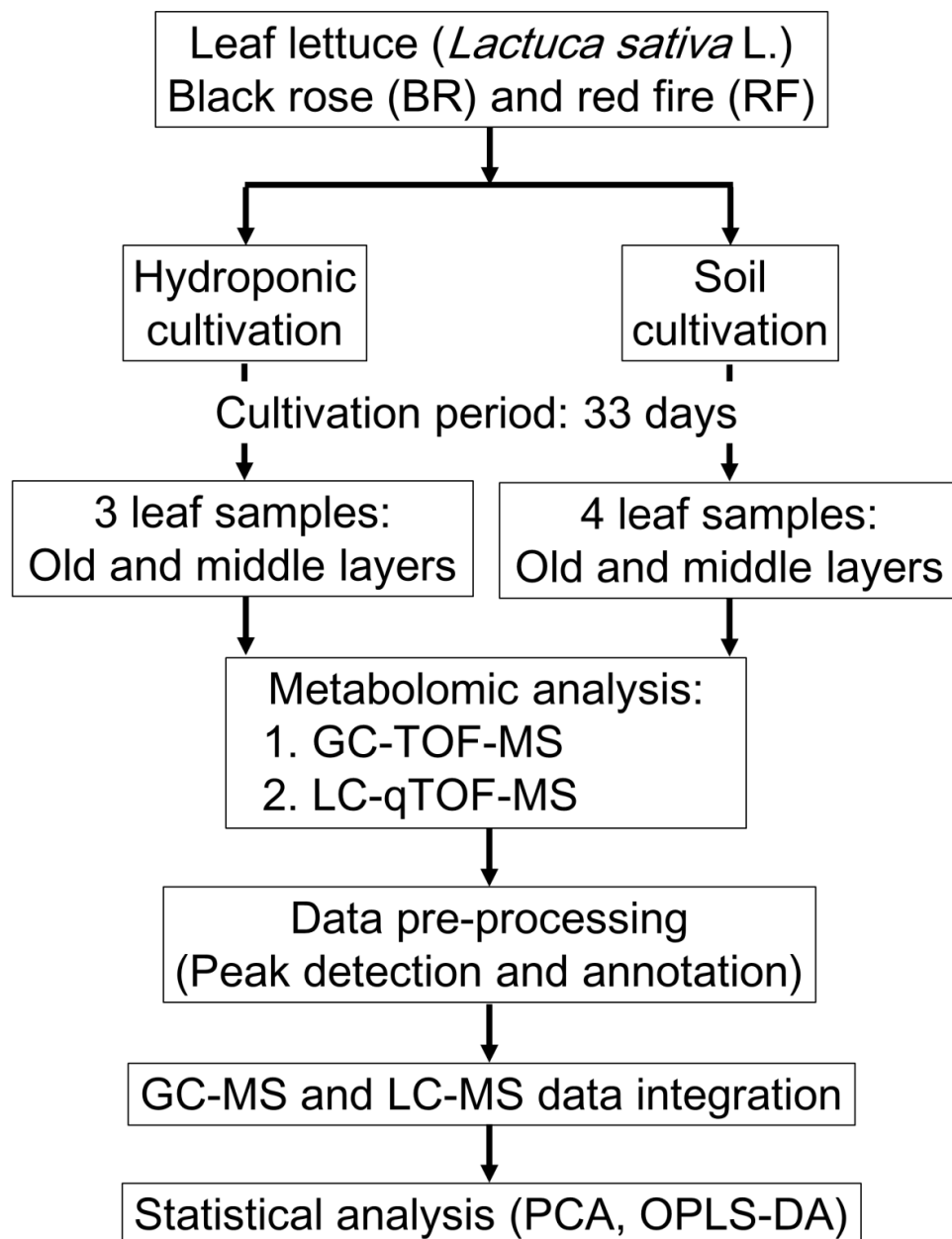


図 2-1 本研究の概略図

水耕および土壌栽培したサニーレタス 2 品種から葉の 2 部位 (外葉および内葉) をサンプリングし, GC-TOF-MS および LC-qTOF-MS で分析した. 各分析データは統合し, 多変量解析に供した.

BR, black rose; RF, red fire; PCA, 主成分解析; OPLS-DA, 直交部分最小二乗法-判別分析

表 2-1 本研究で採用した各栽培条件および栽培したリーフレタスの葉数とバイオマス量

Parameter	Soil (S)	Hydroponics (H)
LED light source wavelength (nm)	White (400-800)	Blue (460), green (525), red (660)
Light intensity (PPFD)*	140	150 (blue, 23%; green, 5%; red, 72%)
Liquid fertilizer (ppm)	NH ₃ -N, 0.50; NO ₃ -N, 25.00; P, 9.00; K, 56.00; Mg, 11.00; Mn, 0.05; B, 0.20; trace (Cu, Zn, Mo, Fe, Ca)	NH ₃ -N, 1.67; NO ₃ -N, 83.33; P, 30.00; K, 186.67; Mg, 36.67; Mn, 0.17; B, 0.67; trace (Cu, Zn, Mo, Fe, Ca)
Average number of leaves** S: <i>n</i> = 4 H: <i>n</i> = 3	Black rose, 8.3 (0.5) Red fire, 10.0 (0.8)	Black rose, 8.0 (1.0) Red fire, 11.0 (1.0)
Leaf biomass (mg FW)*** S: <i>n</i> = 4 H: <i>n</i> = 3	Black rose, 35.5 (6.0) Red fire, 28.4 (2.1)	Black rose, 35.5 (3.0) Red fire, 27.8 (3.7)

*PPFD, photosynthetic photon flux density ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$); **Average number of leaves, 平均葉数 (標準偏差);

***Leaf biomass, リーフディスクの新鮮重量 (標準偏差)

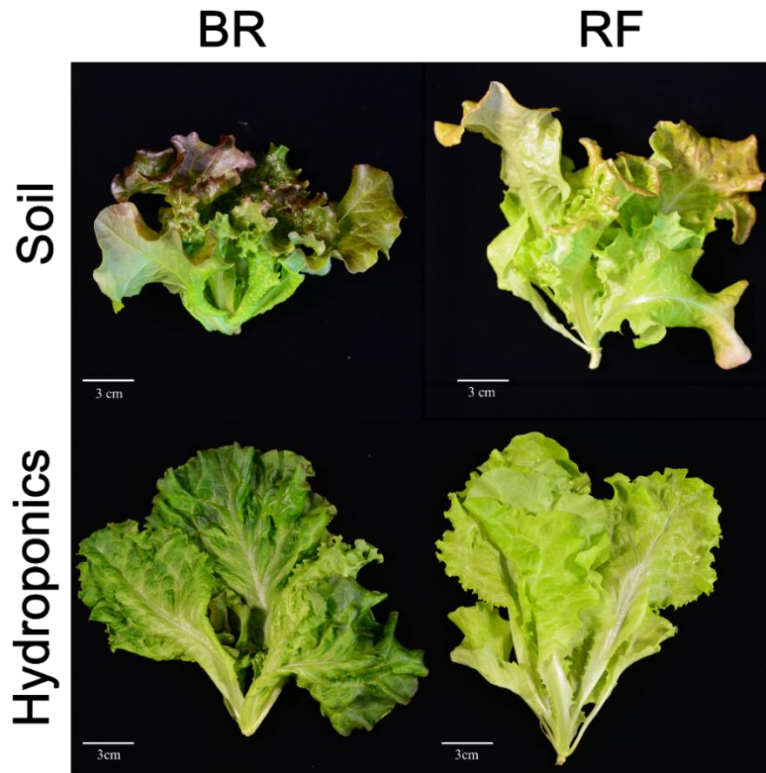


図 2-2 各栽培条件で生育したサニーレタスの表現型

BR, black rose; RF, red fire; 白線, 3 cm

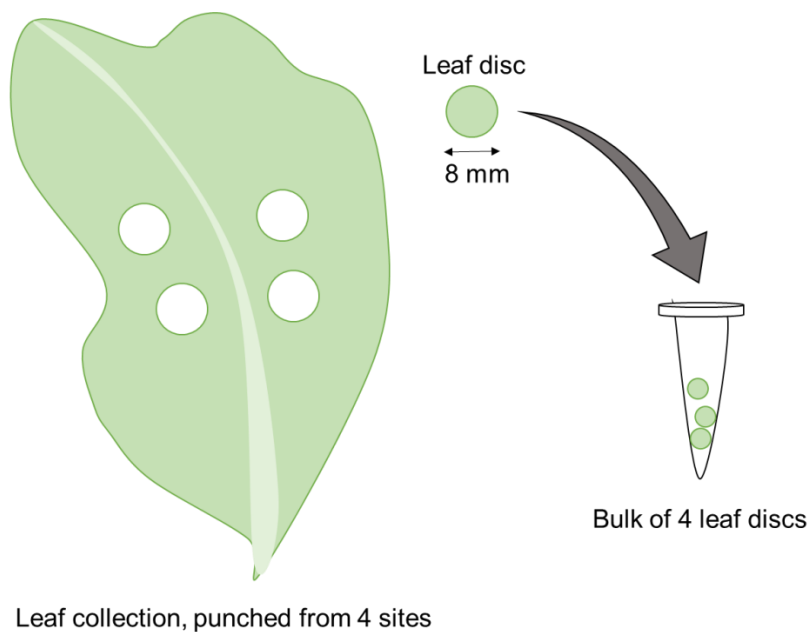


図 2-3 サンプリング方法概略図

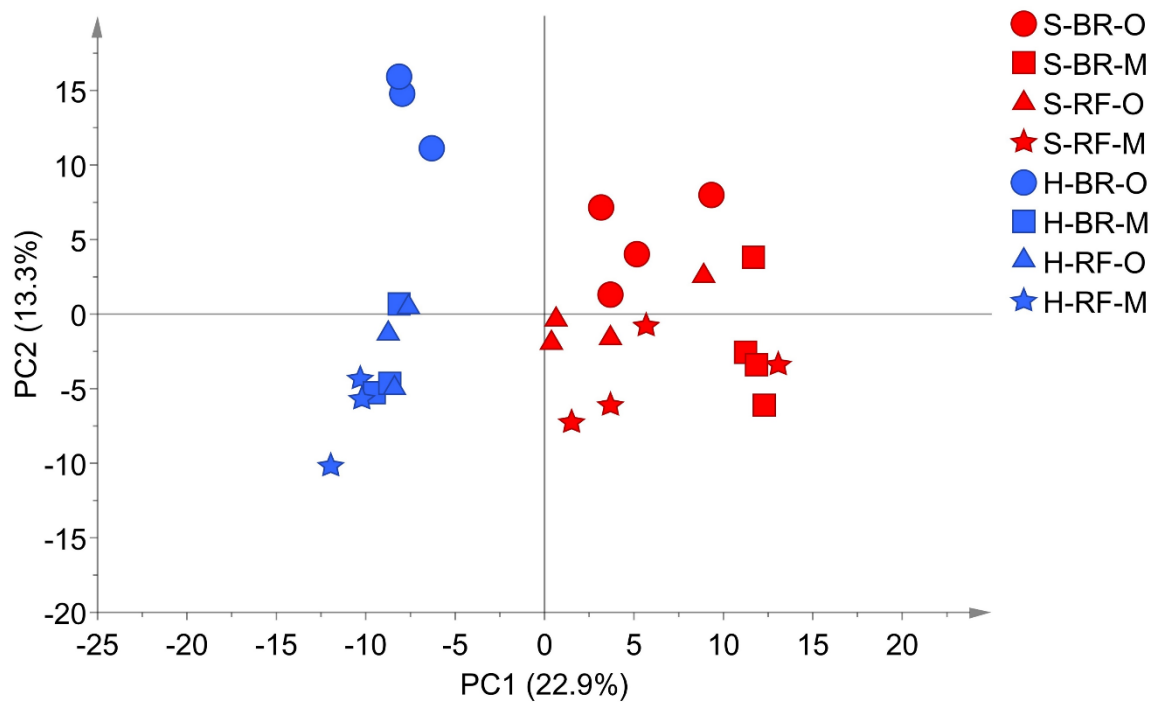


図 2-4 栽培条件の異なるサニーレタス中代謝物データの主成分解析より得られたスコアプロット

データサイズ：28 検体×318 ピーク

S, 土耕栽培; H, 水耕栽培; BR, black rose; RF, red fire; O, 外葉; M, 内葉

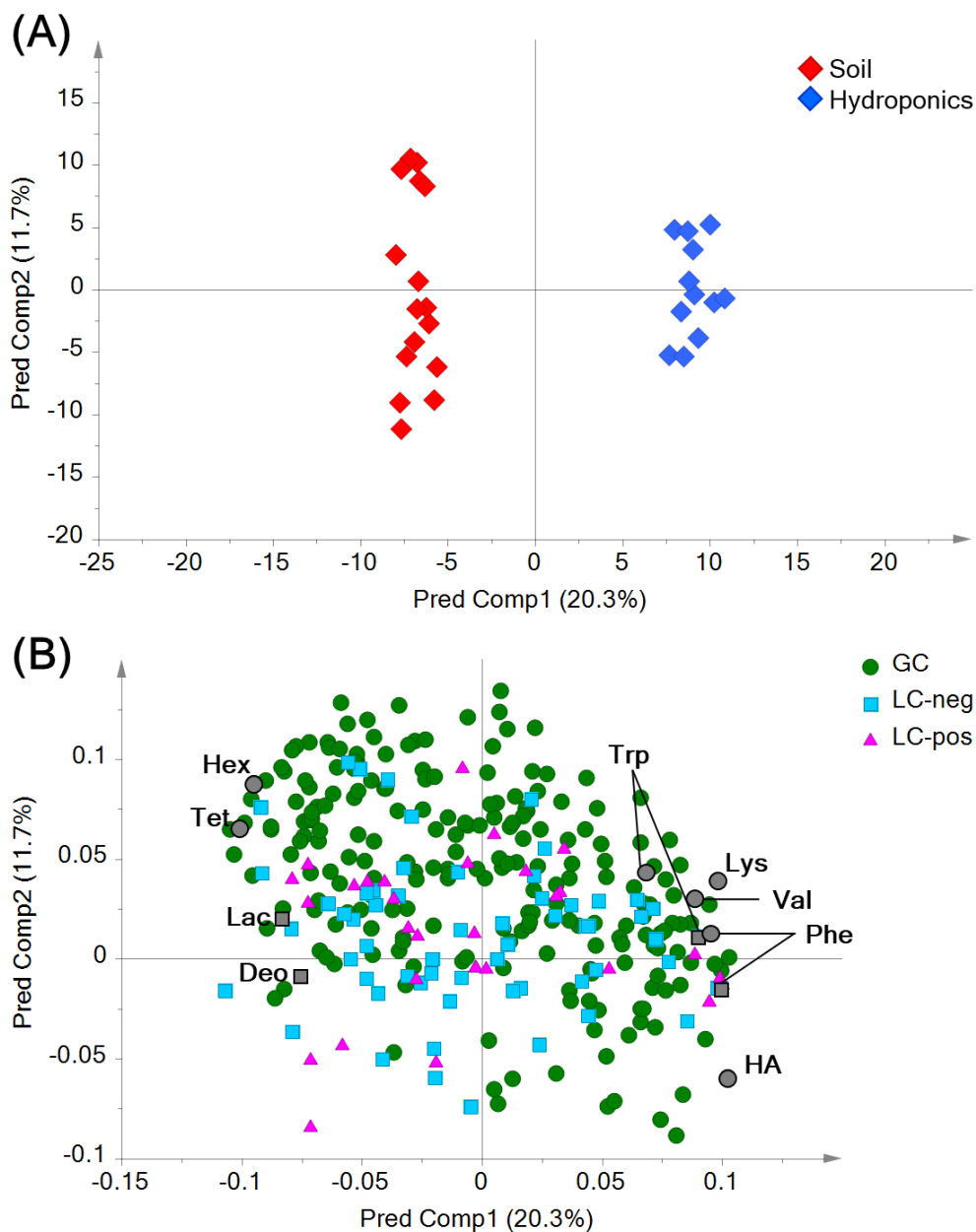


図 2-5 栽培条件の異なるサンニータス中代謝物データの OPLS-DA

データサイズ: 28 検体×318 ピーク (A) スコアプロット: 赤色, 土耕栽培; 青色, 水耕栽培. (B) ローディングプロット (●: GC-MS 分析で検出した代謝物, ■: LC-MS のネガティブモード分析で検出した代謝物, ▲: LC-MS のポジティブモード分析で検出した代謝物 (Compound name: Hex, 1-hexacosanol; Tet, 1-tetracosanol; Lac, lactucopicrin-15-oxalate; Deo, 15-deoxylactucin-8-sulfate, Trp, Tryptophan; Lys, lysine; Val, valine; Phe, phenylalanine; HA, Hydroxylamine).

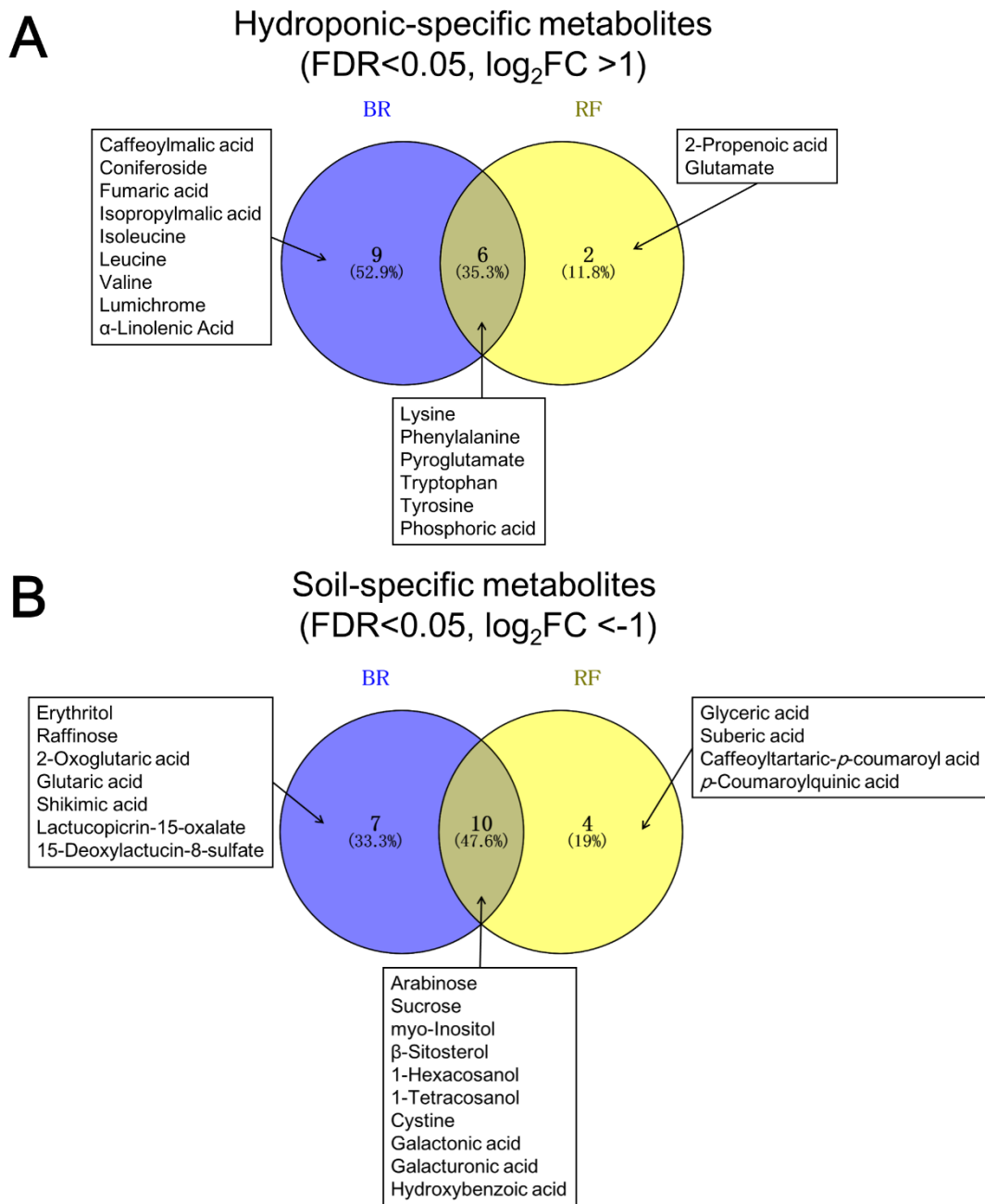


図 2-6 栽培条件の違いにより変動した各サニーレタス中代謝物のベン図

(A) 水耕栽培レタスに多く含有する代謝物.

(B) 土耕栽培レタスに多く含有する代謝物.

数値：保存に伴い増加した化合物数

()内：全 20 化合物中のパーセンテージを表記

BR, black rose; RF, red fire

Pigments

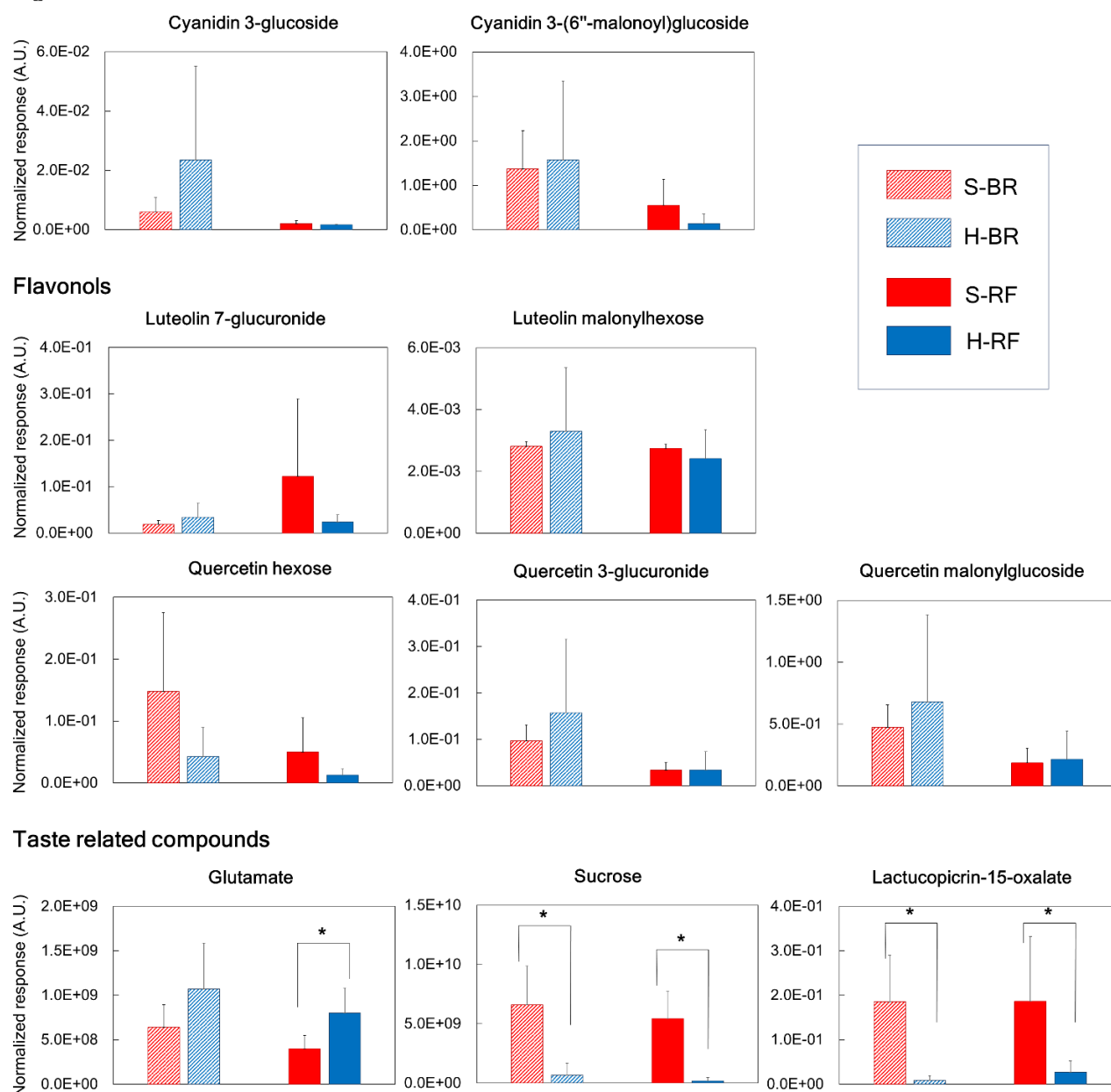


図 2-7 各栽培条件におけるサニーレタスの機能性および食味関連代謝物含量の比較。

S, 土耕栽培; H, 植物工場; BR, black rose; RF, red fire

N数: S-BR および S-RF, 各 4 検体; H-BR および H-RF, 各 3 検体

*: Student's *t*-test, $p < 0.05$

エラーバー: 標準偏差

第3章 加熱による豚肉中呈味成分変動パターンのメタボローム解析

3.1 緒言

3.1.1 豚肉について

豚肉は、おいしく価格が手頃なテーブルミートの一つであり、2016年における日本国内の食肉消費量は牛肉と比較し1.5倍以上と多い（農林水産省「食肉の消費構成割合」, 2016）。また、豚肉はビタミン B1 やアラキドン酸等の成分が豊富である栄養価の高い食品のとしても知られている（井上ら, 2000；西村ら, 2008）。日本で生産される豚肉の多くは、繁殖能力の優れるランドレース種および大ヨークシャー種と、肉質の優れるディロック種を掛け合わせた三元交雑種であり、これは雑種強勢効果による産子数や肉質の向上を狙ったものである（公益財団法人日本食肉消費センター「豚肉のチカラ」, 2011）。各地域の特色や特徴ある飼料での飼育を売りにした「銘柄豚」も年々増加しており、現在全国で400銘柄以上存在している（銘柄豚ハンドブック, 2018）。豚肉の銘柄化には、一定基準以上の飼育管理や配合飼料の品質が求められることから、これら取り組みは安心・安全で高品質な国産豚肉の安定供給に結び付くと考えられる。

昨今の消費者の低価格志向に伴い、カナダやアメリカ等の海外からの輸入量は増加傾向にある（独立行政法人農畜産業振興機構「国内統計資料」, 図 3-1）。2017年度では、部分肉ベースで国内生産量が890,000 tであるのに対し、輸入量が926,000 tと輸入量が国内生産量を上回っている。また、日本における配合飼料を構成する原料の大半は輸入に頼っている状況であり、これらの価格も高騰していることを鑑みると、今後さらに国内の養豚業を取り巻く情勢は厳しくなることが予想される。よって、我が国の豚肉市場における競争力強化のためには、生産物である豚肉の品質を向上させる技術開発のみならず、日本産豚肉の優位性や特色について、外国人を含めた消費者に分かりやすく伝える品質評

価指標の確立が必須である。

3.1.2 豚肉の一般的品質評価法

豚肉の品質は、品種、飼育環境、配合飼料組成および流通条件等の影響を受けることにより変動するとされている。現在、豚肉の品質は、格付員が豚枝肉取引規格に基づき 5 等級（極上，上，中，並および等外）で評価しており、枝肉重量，背脂肪厚，外観および肉質の評価スコアで価格が決定する仕組みである（公益社団法人日本格付協会 HP，2014）。この格付けは、目視による主観的評価であるのに対し、客観的評価法として豚肉の品質を特徴づける項目に着目した化学分析がある。この場合、豚肉ロース部について、肉色（PCS；豚標準肉色模型および色差計），筋肉内脂肪（ソックスレー抽出法），保水性（ドリップロスおよびクッキングロス），pH，軟らかさ（せん断力価）等の項目を測定することで肉質を評価することが一般的である（独立行政法人家畜改良センター「食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル」，2010）。このような豚肉の見た目，成分および物性評価に加え，実際に食した時の評価（官能評価）は，消費者のニーズや食味特性を把握するうえで重要である。豚肉は，生のまま食すると食中毒を起こす危険性が非常に高いため，一般的に焼く，茹でる，油で揚げるといった加熱調理して食する。よって，いずれかの調理法を選択後訓練されたパネルによる分析型官能評価が実施されている。豚肉の官能評価においては，ロース部を 170°C のオーブンで中心温度が 70°C になるまで焼成したものをサンプルとしている（山本ら，2016）。しかし，官能評価を行うには，パネルの訓練が必須であり，コストや手間がかかる。また，前述した化学分析は生肉をサンプルにするのに対し，官能評価は加熱調理したサンプルを用いるため，この両手法間のデータを単純に紐付けられるか疑問が残る。これまでの豚肉の化学分析による評価は限られた項目や遊離アミノ酸含量等，特定の項目に絞った断片

的な情報しか得られないため、複雑な食味性の説明には不十分だと考えられる。

近年、食品分野においてメタボローム解析は、調理の過程で生じる成分変動や加工条件の評価に用いられ始めている。例えば、異なる加熱調理（焼き、茹で、電子レンジ加熱）したブルーベリーについてメタボローム解析した結果 (Zhao ら, 2018)、ポリフェノールの加熱損失は電子レンジ加熱による影響が最も大きいことが明らかとなった。また、Lopez-Sanchez ら (2015) は、野菜ピューレの製造条件評価のためにメタボローム解析を適用し、加熱加工の工程でフライトケミカルの損失が大きいことを報告している。このように加工や調理前後のサンプルについてメタボローム解析を用いることにより、熱や酸化等の要因で生じる品質の変動を代謝物レベルで把握することが可能となる。豚肉においても本解析手法を適用することにより、生肉を対象として取得された成分データと加熱処理後の豚肉の官能評価データを結ぶ懸け橋になると期待される。さらに、生肉の段階から加熱処理後の豚肉の食味を評価することができれば、官能評価のための加熱処理工程を経ずに生肉から得たデータをそのまま食味評価指標として利用できると考えられる。

3.1.3 本研究の目的

豚肉の食味特性の評価は、前述で述べたとおり生肉の化学分析と加熱調理した肉の官能評価によって実施されており、加熱調理前後のサンプル中成分構成が変動する可能性がある。このため、両手法で得られたデータの紐付けには、豚肉の加熱成前後の成分変動を網羅的に捉えることが重要であると考えられる。ゆえに、豚肉の焼成前後における構成成分の変化を解析する手法の開発が求められる。そこで、本研究では飼育方法や保存方法を制御した豚肉（日本産）を対照区、一般流通している輸入豚肉を比較区として実際に官能評価で用いる焼成方法で処理した際の食味関連成分（アミノ酸、糖および有機酸等）の変動パ

ターンを GC-MS メタボローム解析により明らかにし、得られたデータをもとにした食味特性評価手法の開発を目的とした。

3.2 材料および方法

3.2.1 試薬

GC-MS 分析における誘導体化試薬や *n*-アルカン混合標準溶液以外は和光純薬工業より購入した。メトキシアミン塩酸塩、ピリジンおよび *n*-アルカン混合標準溶液 (C8-20 および C21-40) は Sigma Aldrich , *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) は東京化成工業から購入した。

3.2.2 豚肉サンプルの調製

全農飼料畜産中央研究所 (茨城県, つくば市) の試験豚舎で通常管理 (社外秘) した体重約 110 kg の肥育豚 3 頭を屠殺し、それぞれ第 6 胸椎以下のロース部を所内の冷蔵庫 (4°C) で 1 週間保存したものを本実験における対照区 (日本産) として用いた。アメリカ産およびカナダ産の輸入豚肉 (各 3 検体) は、全農ミートフーズ㈱からチルド状態で購入したロース部を対照区と同様に 1 週間保存した (4°C)。全てのサンプルは、調理当日まで -30°C で保存した。山本ら (2016) の方法に基づき、豚肉サンプルは、生肉および 170°C のオーブンで中心温度 70°C になるまで焼成したものを焼成肉として、それぞれチューブにサンプリングした (産地 3 × 頭数 3 × 焼成有無, 合計 18 検体)。分析フローの詳細は、図 3-2 に示した。

3.2.3 アミノ酸分析計による豚肉中遊離アミノ酸の分析

粉碎した凍結乾燥豚肉サンプルを 2 ml チューブに約 15mg 秤量し、蒸留水を

35 mg/ml の濃度になるよう添加した。遠心分離し (4°C , 13,000 rpm, 10 min), 上清 200 µl を別のチューブに移した。そこに, 5%トリクロロ酢酸を同量添加し, 除タンパク質処理したものを分析用サンプルとした。測定は高速アミノ酸分析計 L-8900 (日立ハイテクサイエンス) により実施し, 41 種類のアミノ酸標準物質から作成した検量線を用いて定量 (mg/100 g DW) した。また, 繰り返し分析は 2 回実施し, 2 回分の平均値を採用した。

3.2.4 GC-MS を用いたメタボローム解析

粉碎した凍結乾燥豚肉サンプルは, 約 10 mg を 2 ml チューブ (アシスト) に秤量し, φ5 mm ジルコニアビーズ (ニッカトー) を入れた後, 抽出溶媒 (内部標準物質 (IS) として 0.02 mg/ml のリビトールを含むメタノール/クロロホルム/水 = 3:1:1, v/v/v) を 10 mg/ml の濃度になるよう添加した。さらに, Tissuelyzer (Qiagen) を用いて振とう抽出し (15 Freq/sec, 10 min), 遠心分離後 (4°C, 13,000 rpm, 10 min), 上清をマイクロチューブ (マルエル) に移した。その上清 50 µl を微量ガラスインサートバイアル (Agilent) に移し, Speed Vac (Thermo Fisher Scientific) で遠心濃縮した後, 真空デシケーターで一晩乾固した。脱水ピリジンに溶解させた 20 mg/ml メトキシアミン溶液 30µl を各バイアルに添加し, 1 h 振とう後, 29 h 室温で放置した。次に MSTFA を 30 µl ずつ各バイアルに添加後, 37°C で 1 h 振とうした。最後に *n*-ヘプタン 30 µl を各バイアルに添加し, よく攪拌したものを測定用サンプルとした。

CTC CombiPAL オートサンプラー (CTC analytics) を用いて測定サンプル 1 µl をマイクロシリンジで採取し, スプリットレスモードで GC Agilent 6890N (Agilent) に注入した。カラムは, 内径にフューズドシリカを保持させた Rxi-5 Sil MS (長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 µm; RESTEK) キャピラリーカラムを使用した。温度・昇温条件は 80°C (2 min 保持) -30°C /min-320°C (3.5 min 保

持) に設定し測定した. MS トランスファーライン温度やイオン源温度はそれぞれ 250°C および 200°C に設定した. また, サンプル注入から 208 秒後に加速電圧をかけた. マススペクトルは質量電荷比 $m/z = 60-800$ の質量範囲を 30 スペクトル/sec で得た. また, 保持指標 (RI) を計算するため, *n*-アルカン混合標準溶液 (C10-34) も併せて分析した. 分析の順番は Microsoft Excel に搭載されている乱数関数を用いてランダム化した. また, 分析サンプル 6 本ごとにメチルステアリン酸を *n*-ヘプタンに溶解させた溶液 (50 ng/ml) を分析し, 多検体を分析するときにかかるキャリーオーバーを回避した. なお, GC-MS 分析条件の詳細は表 3-1 に示した.

3.2.5 GC-MS のデータ解析

GC-MS 分析で得られたマススペクトルデータは ChromaTOF version4.50 (LECO) を用いて NetCDF 形式で出力した. データの前処理およびピークアライメントは, 理化学研究所が配布するフリーソフト MS-DIAL Ver.3.12 を用いた (Tsubawa ら, 2015). 得られたデータ行列の標準化には, 内部標準物質として添加したリビトールのピーク強度値を用いた. 化合物ライブラリーは NIST/EPA/NIH library (NIST 14) を用い, 化合物同定もしくはアノテーションの基準は, RI の類似度およびライブラリー内の類似度の閾値 (80%) より判断した (Sumner, 2007).

3.2.6 統計解析

行列データは \log_{10} 変換し, unit variance scaling 後, SIMCA-P+15.0 (Umetrics) を用いて直交部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) に供した. 豚肉の品質指標となる代謝物の抽出は, R パッケージである limma (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>) による解析で算

出した false discovery rate (FDR) を用いた。

3.3 結果

3.3.1 焼成前後の豚肉における遊離アミノ酸組成分析の比較解析

加熱調理前後の産地が異なる豚肉を対象とし、アミノ酸分析計によるアミノ酸の組成分析を行った。測定可能な 41 分子種のうち、1-methyl histidine および 3-methyl histidine はいずれの豚肉サンプルにおいても検出できなかったため、39 種の遊離アミノ酸の定量データを用いて、主成分解析に供した。その結果、スコアプロットの Predictive component 1 (Pred Comp 1 ; 65.2%) は日本産と海外産を分類するものであり、Predictive component 2 (Pred Comp 2 ; 14.3%) は加熱の有無を分類するものであった (図 3-2)。ローディングプロットにおいて、海外産は対照区とした日本産と比較し、hydroxyproline を除く各遊離アミノ酸を多く含有する傾向が認められた。また、焼成前後間における遊離アミノ酸含量のピアソン相関は、Asp, Thr および Ser 等で高い相関を示し、今回検出した 39 種の遊離アミノ酸のうち、25 種類で有意な相関が確認された (表 3-2)。

3.3.2 メタボローム解析による豚肉に含まれる化合物群の同定およびアノテーション

GC-MS によるメタボローム解析は、3 反復実施し(豚肉サンプル 18 検体×3 反復)。計 138 のピークを検出した。トータルイオンクロマトグラム (TIC) を比較したところ、いずれのサンプルも lactic acid のピークが最も高く、その他 glycerol, creatinine および glucose 等が検出された (図 3-4)。代謝物プロファイルのうち、アミノ酸 18 種、核酸 2 種、糖類 7 種、有機酸 4 種、脂肪酸 5 種およびその他代謝物 12 種の計 48 代謝物を同定した (表 3-3)。

3.3.3 遊離アミノ酸組成分析との比較によるメタボローム解析の精度評価

GC-MS によるメタボローム解析の精度を確認するため、GC-MS で検出されたアミノ酸の相対強度値 (IS による標準化) とアミノ酸分析計を用いた従来法の定量値を比較した (表 3-4). その結果、ピアソン相関係数は、0.8 以上と高い正の相関を示した ($p < 0.05$). このことから、GC-MS によるメタボローム解析で検出された各アミノ酸類含量は、従来のアミノ酸分析で定量されたものと同等の精度を有することが明らかとなった.

3.3.4 焼成前後で変動する豚肉中化合物群の抽出

得られたデータ行列 (54 分析サンプル×138 ピーク) を PCA に供した結果について、PC 1 および PC 2 から成る散布図で示した (図 3-5). 抽出工程を含めた分析に対する繰り返し精度評価のために、同一の検体を 3 反復分析した. これらのサンプル群はプロット内で一グループとして集中していた. よって、本研究で行ったサンプルの抽出や誘導体化工程における代謝プロファイルの再現性が高いことが示唆された. また、PC 1 軸方向では、対照区 (日本産) と比較区 (アメリカ産およびカナダ産) に分類することができた. 一方、PC 2 は加熱処理前後、すなわち生肉と焼成を分類するものであった. 加えて、対照区の方が、生肉と焼成の化合物組成の違いが明確であった. これらの結果から、本研究で用いた豚肉中の化合物組成の変動は、焼成の有無よりも産地の違いによる影響が大きいことが明らかとなった.

産地の違いに寄与する化合物群を抽出するため、多重検定の際に用いられる $FDR < 0.05$ を基準にし、焼成前後における対照区と輸入豚肉サンプルの二群間比較を行った. その結果、生肉において対照区は、糖類である fructose 6-phosphate (F6P), glucose 6-phosphate (G6P), iditol および myo-inositol を多く含有するのに対し、比較区である輸入豚肉サンプルでは、アミノ酸である Ala,

Glu および Ile 等(14 種) , 糖である fructose, glucose および mannose, 脂肪酸である C16:0, C18:0 および C18:2 等(4 種), 核酸である inosine (HxR) および hypoxanthine (Hx), hypotaurine, niacinamide および urea を多く含有することが判明した (図 3-6).

一方, 焼成肉において対照区は, 糖類である F6P および G6P, 有機酸である succinic acid, glycerol 3-phosphate (G3P) を多く含有するのに対し, 比較区はアミノ酸である Ala, Glu および Ile 等の遊離アミノ酸 (14 種) , 糖類である fructose, glucose および mannose, 脂肪酸である C16:0, C18:0 および C18:1 等 (5 種), 核酸である HxR および Hx, glycerol, hypotaurine および niacinamide を多く含有することが明らかになった (図 3-6).

3.4 考察

3.4.1 メタボローム解析による豚肉産地の違いに寄与する化合物群の抽出とその要因の検討

生肉において対照区と比較区である輸入豚肉サンプルの化合物組成の差異を解析した結果 (図 3-6), 輸入豚肉サンプルは, アミノ酸および脂肪酸, 核酸である HxR や Hx を有意に蓄積していた. 食肉中のアミノ酸, IMP の分解産物である HxR および Hx の含量は, 熟成に伴うタンパク質分解や ATP 分解反応により増加することが報告されている (Nishimura ら, 1988; Watanabe ら, 1989), 本研究で用いた対照区の豚肉サンプルの保存日数が 7 日間であるのに対し, 比較区である輸入豚肉は, アメリカ産およびカナダ産ともに, 賞味期限から逆算した保存日数が 2 週間以上であると予測された (日本食肉輸出入協会, 輸入食肉の期限表示のためのガイドライン). このようなサンプルの状態から考えられる要因としては, 海外での屠殺条件および精肉される工程の違い, もしくはチルドされた状態で SHIPPING されたことによる熟成

の進行が挙げられる。輸入豚肉でこれらの化合物が蓄積した要因を探るためには、屠殺や精肉工程の条件をできるだけ揃えること、豚肉の熟成期間による組成変化をあらかじめ把握することが重要であると考えられる。また、生肉において輸入豚肉は、対照区と比較した結果、今回メタボローム解析により検出した4種の脂肪酸の含有量が増加した。これは、前述のアミノ酸や核酸といった熟成に伴い増加する化合物で考えられた要因と同様に、長期保存に伴い脂質酸化が進行し、トリグリセロールから脂肪酸が遊離したためだと考えられた (Alaral ら, 2018)。今回の実験デザインでは、対照区と輸入豚肉の生肉で見出された化合物の変動が他の要因でマスクされている可能性が高く、産地の違いによるものであるとは断定できなかった。第2章で述べたようなレタス等の農作物とは異なり、豚肉等の畜産物は雑種強勢効果を狙い複数の品種を掛け合わせ作出されるため、同一品種による産地別評価が困難である。本課題を解決するためには、モデル植物であるシロイヌナズナのエコタイプの代表を研究者間で決定し、本エコタイプをもとに研究を急速に発展させたような研究協力体制を、豚肉の評価方法確立のためにも構築する必要があると言える。一方で、屠殺条件、精肉化工程および流通工程における肉質に影響を与える要因を列挙し、その影響の度合いをメタボローム解析等で客観的に評価することも重要である。今後はこれらのデータをもとに、豚肉の保存期間の違いや配合組成の異なる飼料の給与による肉質への影響の解析に繋げる予定である。

3.4.2 焼成前後の豚肉中呈味関連化合物の変動パターン解析

メタボローム解析で同定またはアノテーションされた48化合物を対象に、焼成前後における対照区と比較区との量的比率を比較した結果、Ala, Glu および Ile 等のアミノ酸14種, fructose, F6P, glucose, G6P および mannose の糖類5

種, HxR および Hx の核酸 2 種, C16:0, C18:0, C18:2 および C18:3 の脂肪酸 4 種, hypotaurine および niacinamide の計 27 化合物の量的比率は加熱調理前後で一致していた. また, 焼成前後間の各化合物のピアソン相関を供した結果, Ala, Glu および Ile 等のアミノ酸 13 種, fructose, mannose, *myo*-inositol, F6P の糖類 4 種, 核酸である HxR, C16:0, C18:2, C20:4 の脂肪酸 3 種, niacinamide, 計 22 化合物で有意な相関がみられた ($p < 0.05$, 表 3-5). アミノ酸, 糖類および核酸は豚肉においても呈味性に寄与することが報告されている (川井田, 1982; Keska, 2017; 千国ら, 2013). 焼成前後間で有意に量的相関を示した化合物を照らし合わせると, 苦味: Phe, Pro および Trp, 甘味: Pro, 酸味: Glu, 旨味: Glu である. また, 糖類については, fructose, glucose および mannose が豚肉の甘味に寄与する化合物であるとされる (川井田, 1982). 核酸については, 旨味成分として知られる IMP の分解産物である Hx が苦味を呈すると報告されている (千国ら, 2013). 以上のことから, 焼成前後における食味関連成分のバランス, つまりは甘味, 酸味, 苦味および旨味の構成比は, 大きく変わらない可能性が見出された.

本研究では, 生肉について GC-MS を用いたメタボローム解析を行うことにより焼成後の豚肉の食味特性の予測に活用できる可能性を示した. これまで豚肉のメタボローム解析については, サンプル調製が簡便な NMR やイオン性化合物を分析対象とする CE-MS を用いた報告があるものの (Muroya ら, 2014; Straadt ら, 2014), GC-MS によるメタボローム解析は殆ど行われていないのが現状であった. しかしながら, GC-MS は, 汎用性が高く, 多くの研究機関で導入されていること, クロマトグラムのピーク分離能が高く, アノテーションに必要なライブラリーも整備されていること (Kopka ら, 2005), 様々な分野において GC-MS によるメタボローム解析が行われていることから, 本研究で示した通り, 豚肉の品質評価のために導入しやすい装置であると考えられた. ま

た、GC-MSは揮発性有機化合物(VOC)の分析が可能であるため、次章で示す香気成分も含めた評価法を構築するうえで、同一の装置で分析を行うことができるメリットは大きい。

以上のことから、本研究では実際の官能評価に用いる焼成方法にて処理した豚肉の食味関連成分について生肉の状態との比較解析を行った。今回GC-MSのメタボローム解析で検出した食味関連成分のうち、約50%の成分が焼成前後間で量的相関があることを明らかにし、生肉から焼成肉中の食味関連成分の含量を予測できる可能性があった。しかしながら、本実験系では捉えることのできなかつたペプチドは、甘味、酸味、苦味、旨味および塩味といった呈味性を示し、基本味の強さを変化させ別の味質に変える味覚変革作用があるとされる(西村, 2001)。こうしたペプチドによる影響も豚肉の食味性を把握するうえで無視できない。今後は第2章のサニーレタスの統合メタボローム解析のように、複数の装置を用いて多角的に食味関連成分を捉えること、それら成分データと官能評価を紐付けることが必要だと考えられた。

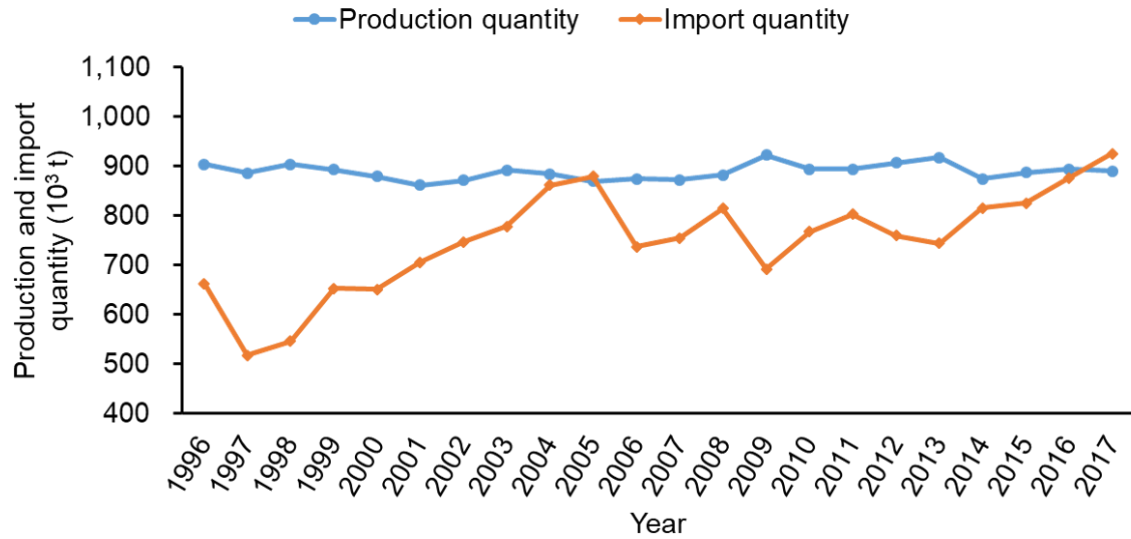


図 3-1 豚肉の国内生産量および輸入量 (千 t)

出典：農林水産省「食肉流通統計」および財務省「貿易統計」.

*部分肉ベース，輸入量はくず肉を含む.

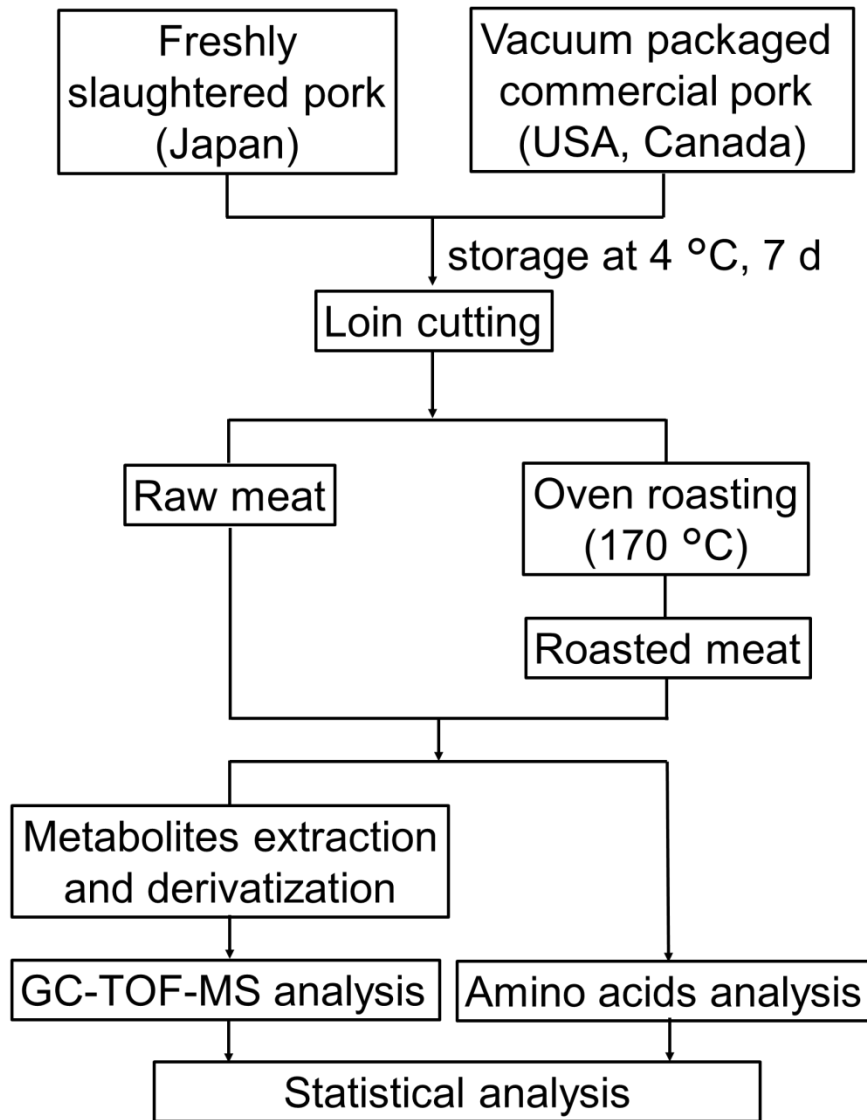


図 3-2 本研究の概略図.

豚肉サンプルは対照区として日本産, 比較区として輸入豚肉 (アメリカ産およびカナダ産) を用いた. 各豚肉サンプルは, 4°C の冷蔵庫で7日間保存し, 生または 170°C で焼成したものを GC-TOF-MS およびアミノ酸分析計で測定した. さらに各分析で得られたデータを多変量解析に供した.

表 3-1 豚肉中代謝物分析における GC-MS 条件

Gas Chromatograph	Agilent 6890N
Sample injection	1 μ l, splitless
Column	Rxi-5 Sil MS (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m)
Temperature program	80°C (2 min) \rightarrow 30°C/min \rightarrow 320°C (3.5 min)
Carrier gas	He; 1.0 ml/min, Constant Flow
Mass Spectrometer	LECO Pegasus HT-C
Ionization mode	EI, -70 eV
Ion source temperature	200°C
Transfer line temperature	250°C
Solvent delay time	208 sec
Acquisition rate	<i>m/z</i> 60-800 (30 spectra/sec)

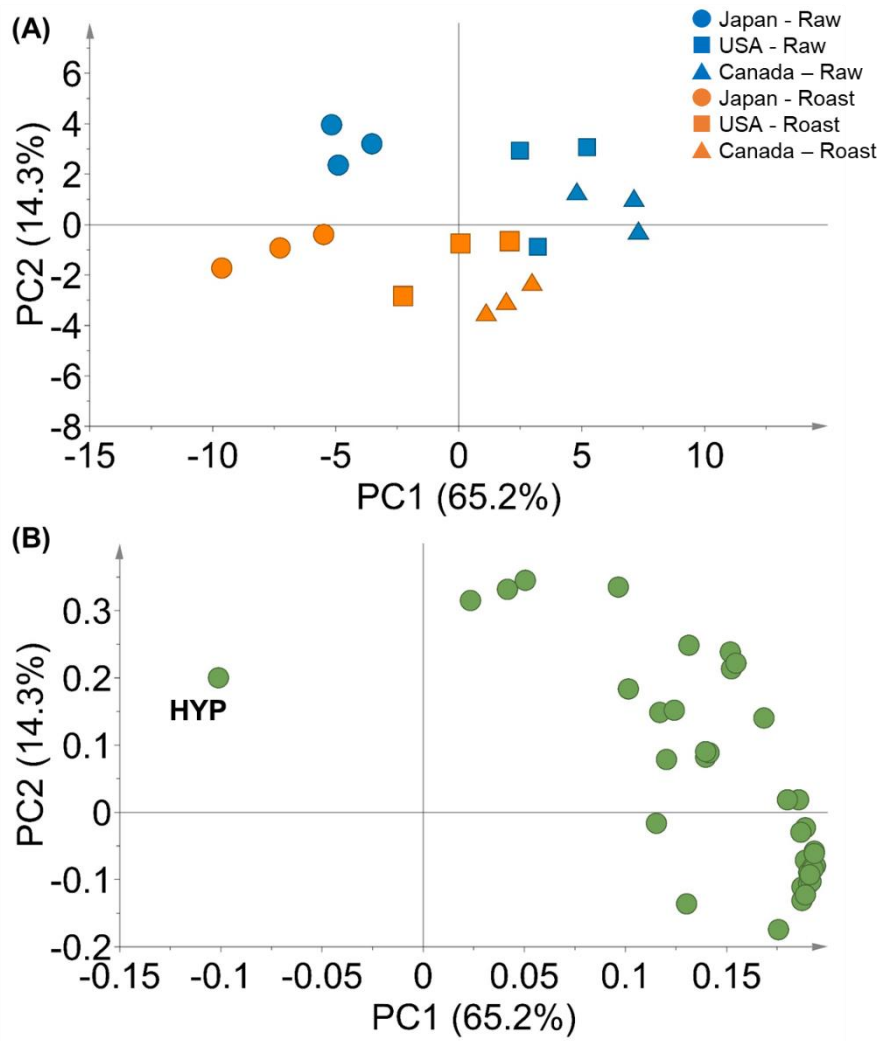


図 3-3 遊離アミノ酸定量値を用いた加熱調理前後の産地が異なる豚肉の主成分解析

データサイズ: 18 検体 × 39 化合物

(A) スコアプロット (青: 生肉, 橙色: 焼成肉, ●: 対照区 (日本産), ■: アメリカ産, ▲: カナダ産), (B) ローディングプロット (HYP: hydroxyproline).

表 3-2 豚肉中遊離アミノ酸含量の加熱調理前後間の相関解析

Compound name	Pearson's correlation coefficients	p -value*	Compound name	Pearson's correlation coefficients	p -value*
Pser	0.72	0.03	Ile	0.95	0.00
Taurine	0.71	0.03	Leu	0.94	0.00
PEA	0.39	0.30	Tyr	0.94	0.00
Urea	0.96	0.00	Phe	0.95	0.00
Asp	0.93	0.00	β -Ala	0.56	0.12
Thr	0.93	0.00	BAIA	0.13	0.73
Ser	0.94	0.00	GABA	0.12	0.76
Asn	0.92	0.00	Trp	0.95	0.00
Glu	0.89	0.00	Ethanolamine	0.45	0.22
Gln	0.19	0.62	Ammonia	0.29	0.45
Sarcosine	0.34	0.37	Hlys	0.95	0.00
AAA	0.64	0.06	Ornithine	0.44	0.23
Gly	0.88	0.00	Lys	0.96	0.00
Ala	0.90	0.00	His	0.96	0.00
Citrulline	0.83	0.01	Anserine	0.02	0.96
ABA	0.75	0.02	Carnosine	-0.56	0.12
Val	0.95	0.00	Arg	0.93	0.00
Cys	-0.06	0.87	HYP	0.19	0.62
Met	0.93	0.00	Pro	0.93	0.00
Cystathionine	0.91	0.00			

Pser, Phosphoserine; PEA, Phosphorylethanolamine; AAA, Amino adipic acid; ABA, Aminobutyric acid; BAIA, β -Amino-isobutyric acid; GABA, γ -Aminobutyric acid; Hlys, Hydroxylysine; HYP, Hydroxyproline

*有意検定: $P < 0.05$

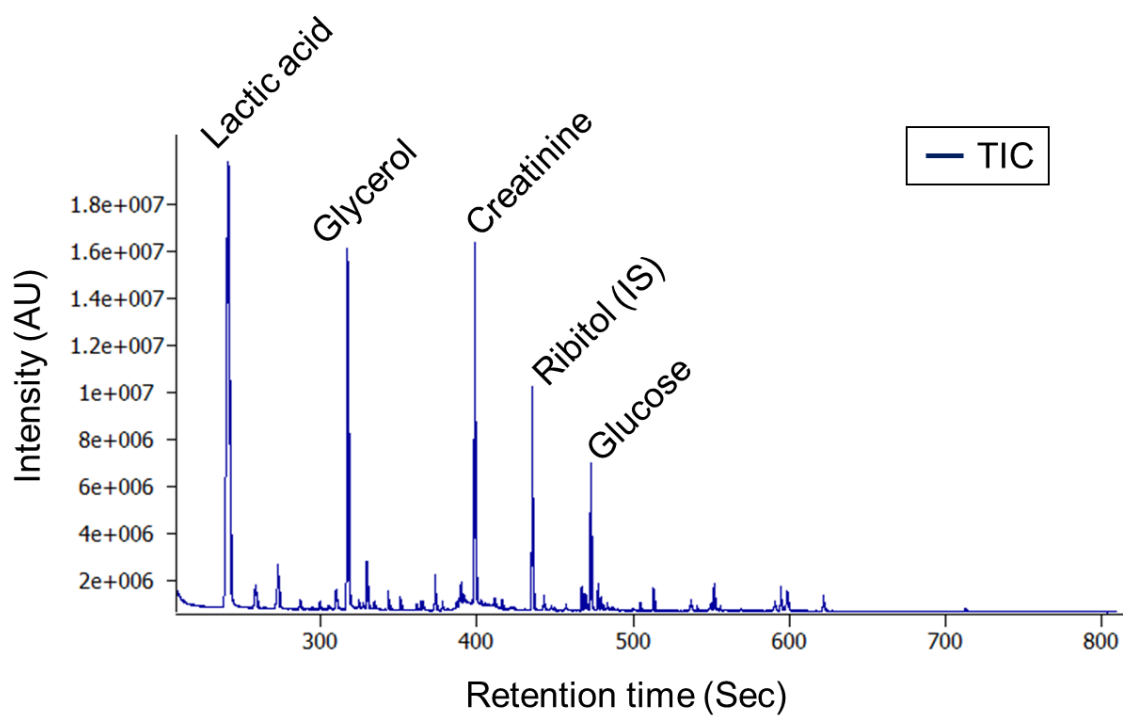


図 3-4 豚肉のトータルイオンカレント (TIC) クロマトグラム

X 軸: 保持時間, Y 軸: 検出強度値

表 3-3 GC-MS 分析で検出した加熱処理前後の豚肉に含まれる代謝物

Amino acid (18)	Ala	Nucleic acid (2)	Inosine	Others (12)	2-Hydroxypyridine
	Val		Hypoxanthine		Hydroxylamine
	Leu	Sugar (7)	Fructose		5,6-Dihydrouracil
	Ile		Mannose		Hydroxybutyric acid
	Pro		Glucose		Urea
	Gly		<i>myo</i> -Inositol		Glycerol
	Ser		F6P		Niacinamide
	Thr		G6P		Creatinine
	β -Ala		Iditol		Hypotaurine
	Asn	Organic acid (4)	Lactic acid		Taurine
	Asp		Pyrophosphoric acid		G3P
	Met		Succinic acid		Cholesterol
	PGA		Malic acid		
	Glu	Fatty acid (5)	C16:0		
	Phe		C18:0		
	Gln		C18:1		
	Tyr		C18:2		
	Trp		C20:4		

PGA: pyroglutamic acid, F6P: fructose-6 phosphate, G6P: glucose-6 phosphate,

G3P: glycerol-3 phosphate

表 3-4 GC-MS とアミノ酸分析計との精度比較

Compound name	Pearson's correlation coefficients	p -value*
Ala	0.98	0.00
Val	0.99	0.00
Leu	0.99	0.00
Ile	0.98	0.00
Pro	0.94	0.00
Gly	0.98	0.00
Ser	0.99	0.00
Thr	0.98	0.00
β -Ala	0.94	0.00
Asn	0.96	0.00
Asp	0.84	0.00
Met	0.97	0.00
Glu	0.92	0.00
Phe	0.99	0.00
Gln	0.90	0.00
Tyr	0.99	0.00
Trp	0.84	0.00

*有意検定: $p < 0.05$

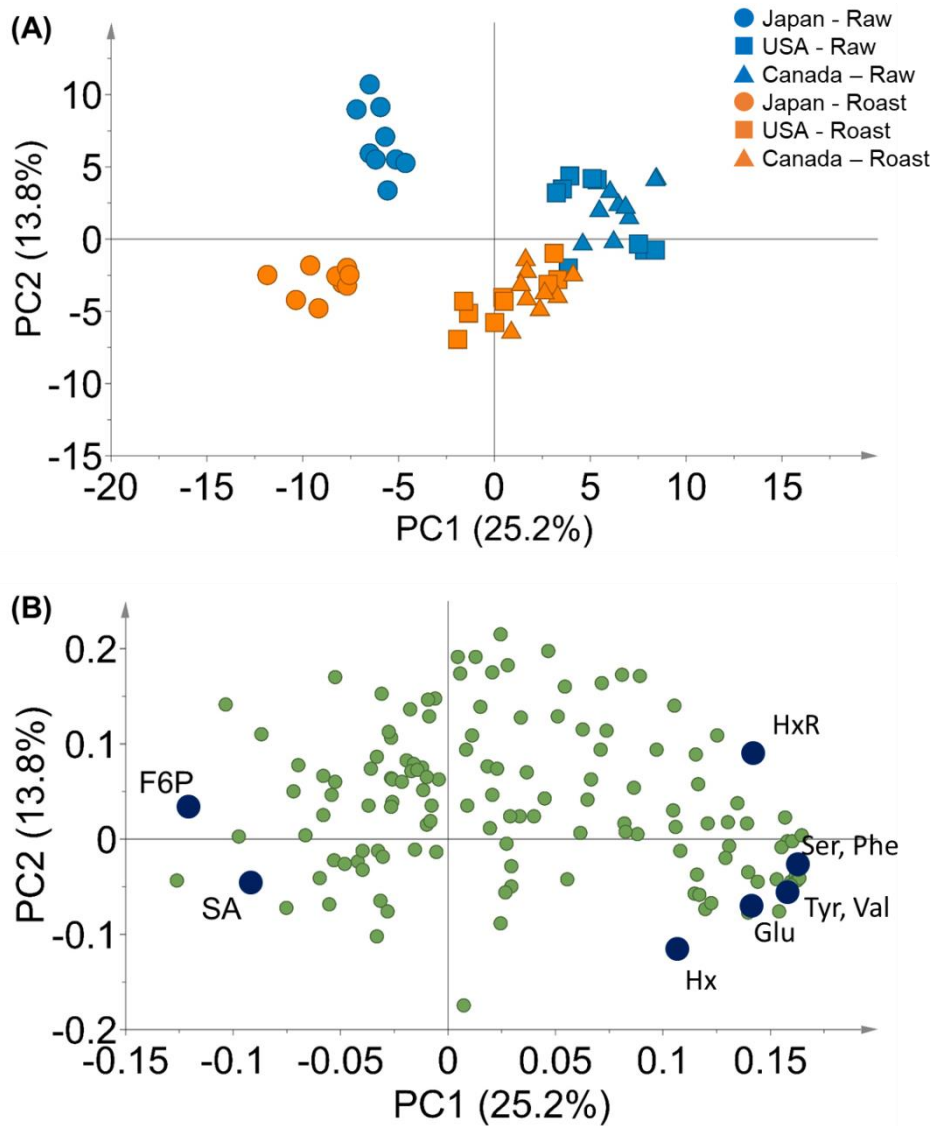


図 3-5 GC-MS 分析データによる産地の異なる豚肉の PCA

データサイズ: 54 検体×138 ピーク

(A) スコアプロット(青: 生肉, 橙色: 焼成肉, ●: 対照区 (日本産), ■: アメリカ産, ▲: カナダ産), (B) ローディングプロット (F6P: fructose-6 phosphate, SA: succinic acid, HxR: inosine, Hx: hypoxanthine, Ser: Serine, Phenylalanine, Tyr: Tyrosine, Val: Valine, Glu: Glutamic acid).

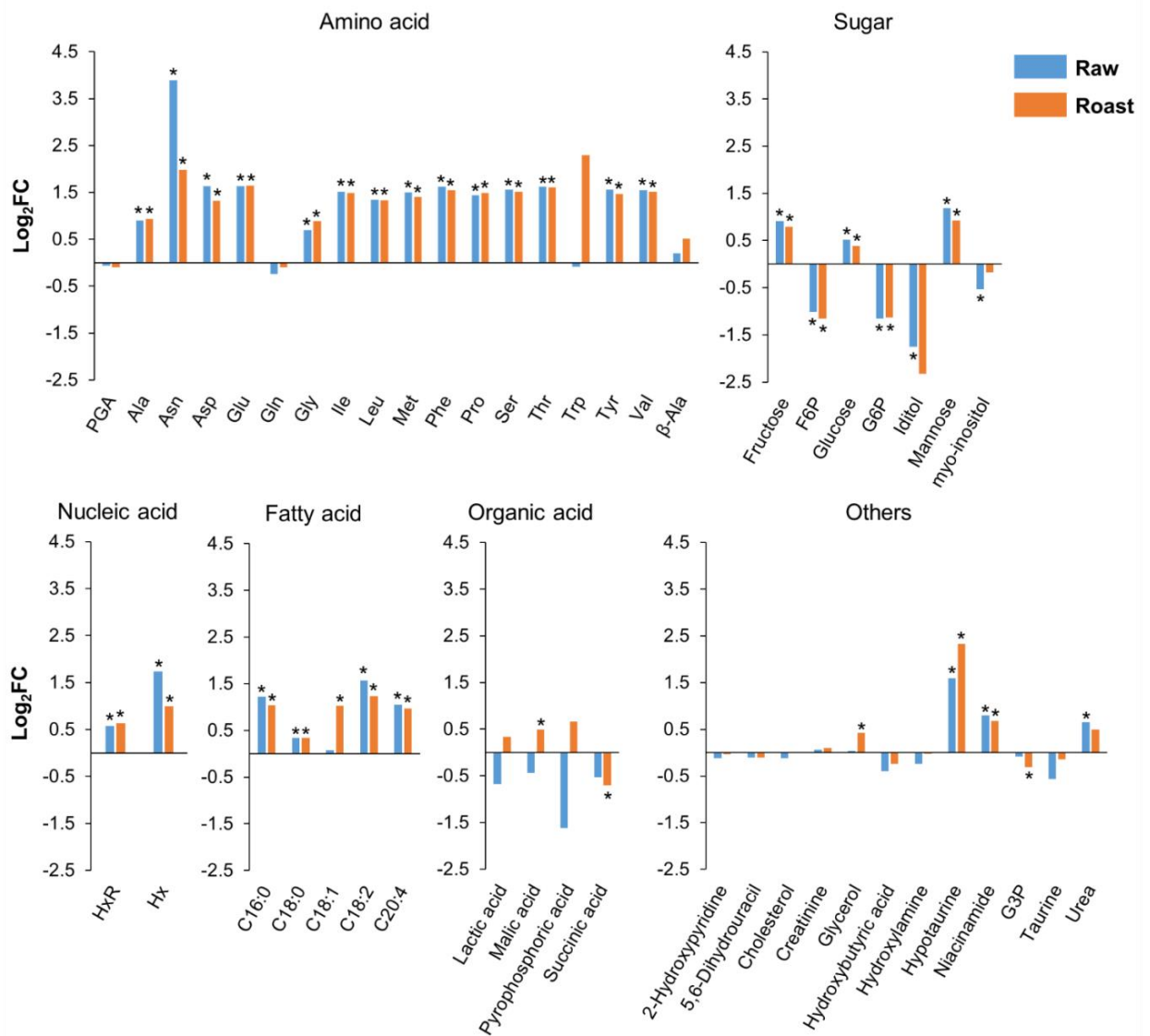


図 3-6 焼成前後における対照区と比較区の量的比率の比較

青: 生肉, 橙色: 焼成肉

N 数: 対照区 (日本産), 3 検体 × 3 analytical replicates; 比較区 (アメリカ産およびカナダ産), 6 検体 × 3 analytical replicates.

FDR < 0.05, log₂FC (比較区/対照区)

PGA: pyroglutamic acid, F6P: fructose-6 phosphate, G6P: glucose-6 phosphate,

HxR: inosine, Hx: hypoxanthine, G3P: glycerol-3 phosphate

表 3-5 焼成前後における食味関連成分の量的相関

Compound name		Pearson's correlation coefficients	p-value*	Compound name		Pearson's correlation coefficients	p-value*	Compound name		Pearson's correlation coefficients	p-value*
Amino acid	Ala	0.90	0.00	Nucleic acid	HxR	0.57	0.11	Others	2-Hydroxypyridine	-0.23	0.55
	Val	0.93	0.00		Hx	0.78	0.01		Hydroxylamine	0.13	0.75
	Leu	0.95	0.00	Sugar	Fructose	0.76	0.02		5,6-Dihydrouracil	0.38	0.31
	Ile	0.96	0.00		Mannose	0.82	0.01		Hydroxybutyric acid	0.51	0.16
	Pro	0.80	0.01		Glucose	0.60	0.09		Urea	0.62	0.08
	Gly	0.87	0.00	<i>myo</i> -inositol	0.85	0.00	Glycerol		0.19	0.62	
	Ser	0.94	0.00	F6P	0.71	0.03	Niacinamide		0.94	0.00	
	Thr	0.94	0.00	G6P	0.60	0.09	Creatinine		0.01	0.99	
	β-Ala	0.64	0.06	Iditol	0.68	0.05	Hypotaurine		0.16	0.69	
	Asn	0.95	0.00	Organic acid	Lactic acid	0.04	0.92		Taurine	0.40	0.28
	Asp	0.76	0.02		Pyrophosphoric	-0.25	0.52	G3P	0.15	0.70	
	Met	0.87	0.00		Succinic acid	0.29	0.44	Cholesterol	0.11	0.77	
	PGA	0.32	0.41	Fatty acid	Malic acid	0.50	0.17				
	Glu	0.85	0.00		C16:0	0.77	0.01				
Phe	0.96	0.00	C18:0		0.51	0.16					
Gln	0.32	0.41	C18:1		-0.20	0.60					
Tyr	0.96	0.00	C18:2		0.88	0.00					
Trp	0.66	0.06	C20:4	0.82	0.01						

PGA: pyroglutamic acid, F6P: fructose-6 phosphate, G6P: glucose-6 phosphate, G3P: glycerol-3 phosphate

*有意検定: $p < 0.05$

第4章 熟成に伴う豚肉の呈味および加熱香氣成分変動の網羅的解析

4.1 緒言

4.1.1 豚肉の流通工程

農家で肥育された豚は、屠場に運搬され、解体される。解体された枝肉は、一定時間冷却された後、卸売市場でセリにかけられ、豚枝肉取引規格を基づき格付けされる。さらに枝肉は分割され、成形され、プラスチックフィルム等に包装された後、スーパー等の小売業者や精肉店に流通しており、実際にその豚肉が店頭に並ぶまでには、2-3日かかるとされている(沖谷, 1996)。市販されている食肉は、品質維持のため低温流通が基本となっており、適正な管理温度は0~2°Cだといわれている。また、長期で保存する場合、低温で保持したとしても食肉の脂肪やタンパク質が変質し、おいしさや風味の良さが損なわれることから、海外からチルドで輸入されてくる畜肉の殆どは真空包装されたものである。近年、日本産豚肉は海外においても「日本ブランド」を支持する消費者から需要が高まっており、香港やシンガポール等の地域への輸出が拡大している状況である(石塚, 2014)。今後、さらに海外への日本産豚肉の販路を拡大していくため、安心安全といった品質維持だけでなく、「おいしさ」を維持したまま輸出国の食卓まで届けるという観点から、流通過程における品質の変動を評価するための新たな指標を確立することが求められている。

4.1.2 保存に伴う豚肉の成分変動

屠畜直後の食肉は、硬直により食感は硬く、おいしさにも欠ける。しかし、硬直した食肉をさらに放置しておくことで、硬直が解けて柔らかくなり(解硬)、食品的に好ましい味や香りを有するようになる。このような現象のことを熟成という。豚肉は牛肉と比較し元々硬くはないため、流通の時間が熟成期間とな

っており、店頭に並ぶ期間（賞味期限 2-3 日）も考慮するとおおよそ 7 日以下に消費されるのが一般的だと考えられる。官能評価による結果から、豚肉を含む食肉は熟成を経ることで呈味性が変化することが明らかになっている（Channon ら, 2003; Iida ら, 2016; Nishimura, 1998）。こうした食肉の呈味性の変化は、次のような成分変動が起因するとされている（図 4-1）。第一に、筋原繊維を構成するタンパク質は、カテプシンやカルパインといった筋肉内プロテアーゼの作用により分解され、呈味性や風味のもととなるペプチドや遊離アミノ酸が生成する（Nishimura ら, 1988 ; Toldra, 1998）。次に、エネルギー物質である ATP は、脱リン酸化により ADP となり、その ADP2 分子にミオキナーゼが作用することで 1 分子の ATP と AMP が生成される。AMP は脱アミノ化されることにより旨味を呈する inosine monophosphate (IMP) となり、さらに inosine (HxR), hypoxanthine (Hx) と変換される（Seewald, 1993 ; Watanabe ら, 1989）。また、筋肉中のグリコーゲンは、屠畜後も ATP 産生に供給されるため、無酸素下での解糖系を経ることになり、最終的に乳酸として蓄積される（Shen ら, 2006）。

これまでに熟成で生じる豚肉の成分変動をメタボローム解析により捉えた事例は、いくつか報告されている。Muroya ら (2014) は、CE-TOF-MS 分析により豚肉の部位の違いにより、熟成過程で生じる成分変動のパターンが異なることを明らかにしている。Welzenbach ら (2016) も GC-MS および LC-qTOF-MS を組み合わせた分析により熟成工程における豚肉の品質指標となりうるバイオマーカーの探索を行っている。しかしながら、いずれの報告も屠畜後 7 日以内と短期間での成分変動を追っているものであり、海外流通を視野に入れた場合、包装形態や長期保存による影響も考慮する必要があると考えた。

4.1.3 豚肉の香気成分

食肉の香りは、大きく分けて生鮮香気と加熱香気に分類することができる。生鮮香気は生肉のもつ香りであり、加熱香気は肉を焼いたり蒸したりした際に生じる香りのことである。豚肉の場合、生肉の状態では食中毒菌が付着している可能性があるため、基本的に加熱調理して食すことが必須である。このため、加熱調理により生じる香気は、豚肉の「おいしさ」を構成するうえで重要な要素となっていると考えられる。加熱香気は食肉の水溶性の透析性低分子区分の加熱で発生するとされている。すなわち、加熱肉特有の香りの生成には、赤身部分に含まれるグルコース等の還元糖と遊離アミノ酸との加熱反応であるアミノカルボニル反応の寄与が大きいとされているが、脂質、糖、アミノ酸自体の加熱分解やそれら反応中間物等も関係している (Aaslyng および Meinert, 2017)。これまでに食肉の加熱香気として報告されている揮発性有機化合物 (VOC) には、脂肪酸、アルコール、エステル、エーテル、アルデヒド、ケトン、フラン、ピラジンおよび芳香族化合物等がある (Aaslyng および Meinert, 2017; Jayasena, 2013; Mottram, 1985; Watanabe ら, 2015)。これら食肉中の VOC は、熟成や酸化による影響で変動することが報告されている。和牛では、熟成工程を経ることにより香気成分が変化し、和牛特有の香気成分であるラクトン類も産生されることが明らかになっている (Watanabe ら, 2010)。また、七面鳥の肉では、脂質酸化が進むにつれアルデヒド類である propanal および hexanal が増加することが報告されている (Nam, 2003)。

4.1.4 本研究の目的

前述のとおり、食肉流通において保存条件や期間は、呈味成分の変動や脂質酸化等、品質に重要な影響を及ぼす。今後、日本産豚肉の輸出を拡大していくうえで、輸出先での品質や食味性の変化を予測することは必要不可欠であると

いえる。また、豚肉は一般的に加熱調理し食すことため、味だけでなく香りも「おいしさ」を形成する重要な因子となる。現在、牛肉等食肉の香りに関する報告はあるものの、いずれも加熱処理した食肉の香気成分のみに着目した実験系が殆どであり、生肉中化合物との関連性を示したものは皆無である。さらに、豚肉の加熱香気成分の分析に関しては、調味料や調理用オイルを加味したサンプルに関するもの (Meinert ら, 2007; Xie ら, 2008) や豚肉のみを加熱処理した報告についてもオートクレーブによりボイル処理したものであり (Elmore ら, 2000), 実際の調理法に近い処理条件において純粋な豚肉の香気成分を分析するための手法は確立されていない。そこで本研究では、様々な成分の変動が予想される保存期間の異なる豚肉について、生肉中の呈味成分および焼成した肉の香気成分を対象とし、同一の装置で測定可能な GC-MS メタボローム解析を用いた食味特性の総合的評価手法の開発を目的とした。さらに、開発した手法を用いて生肉の呈味成分の変動パターンから焼成した豚肉の香気成分の量的変動の予測の可能性について、各種統計学手法を用いることにより解析した。

4.2 材料および方法

4.2.1 試薬

核酸関連物質である adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), inosine monophosphate (IMP), inosine (Hx) および hypoxanthine (HxR), 揮発性化合物の混合標準品である EPA 524.2 溶液は, Sigma Aldrich から購入した。GC-MS 分析で用いた試薬は第 3 章, 安定同位体ラベル化標準品は第 2 章で記述したメーカーのものを用いた。

4.2.2 豚肉サンプルの調製

全農飼料畜産中央研究所（茨城県，つくば市）の試験豚舎で通常管理（社外秘）した体重約 110 kg の三元交雑肥育豚（母豚：大ヨークシャー種×ランドレース種，父豚：ディロック種）6頭を屠殺し，第 6 胸椎以下のロース部を 2 cm ごとにスライスした．含気包装および真空包装の違いによる影響を評価するため，スライスした肉片はポリプロピレン製のジップロックコンテナ（サイズ 156 mm × 156 mm × 53 mm）または真空パック（ナイロンポリ製，サイズ 220 mm × 330 mm，福助工業）で包装し，4°C に設定した恒温恒湿器（PR-2KT，エスペック）で保存した．各保存形態の豚肉のサンプリングは，屠殺後から数えて 7 日目（7 d）および 14 日目（14 d）の保存日数で実施した．また，保存を経ない豚肉サンプルをコントロール（1d）とした．前処理として肉片からロース芯のみをくり抜き，調理用ミキサーミルでホモジナイズ後，マルチビーズショッカー用 50 ml チューブ（安井器械）に 10 g 程度採取し，直ちに -80°C で保存した．本研究のフローについては，図 4-2 に示した．

4.2.3 鮮度指標 *K* 値による豚肉の鮮度判別

マルチビーズショッカー（MB2000，安井器械）で凍結粉碎したサンプルは，凍結乾燥し粉末状に処理した．乾燥粉末サンプルは，約 50 mg を 2 ml チューブ（アシスト）に秤量し，10% 過塩素酸 1.5 ml を添加後，ボルテックスミキサー（Vortex-genie 2，Scientific industries）で 5 min 振とう抽出した．その抽出液を遠心分離（3,000 rpm，4°C，5 min）し，上清 1 ml を 1.5 ml チューブに採取した．1 M 炭酸水素カリウム溶液 1.8 ml で中和後，ボルテックスミキサーで 1 min 混合し，遠心分離（3,000 rpm，4°C，5 min）した．その上清を 0.45 μm メンブランフィルター（メルクミリポア，Millex-LH）で濾過したものを分析用サンプルとし，LC-2000 plus（日本分光）に 5 μl インジェクションした．HPLC の条件に

については、カラムは Capcell pak C18 AQ (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5.0 μm ; 大阪ソーダ) を用い、カラム温度は 40°C とした。移動相は、50 mM リン酸緩衝液 (リン酸二水素カリウム:リン酸水素二カリウム ; 1:1) とし、流量は 1.0 ml/min とした。検出器は、UV-2070 (日本分光) を用い、260 nm を検出波長とした。分析対象とした核酸関連物質は、ATP, ADP, AMP, IMP, Hx および HxR の 6 成分とし、以下の式より K 値を算出した (Watanabe ら, 1989)。

$$K \text{ value } (\%) = (Hx+HxR)/(ATP+ADP+AMP+IMP+Hx+HxR) \times 100 \quad \text{式 (4-1)}$$

4.2.4 GC-MS を用いた生肉中化合物の分析

生肉乾燥粉末サンプルは、約 10 mg を 2 ml チューブ (アシスト) に秤量し、 $\phi 5$ mm ジルコニアビーズ (ニッカトー) を入れた後、抽出溶媒 (安定同位体ラベル化標準品 10 種を含むメタノール/クロロホルム/水 = 3:1:1, v/v/v) を 10 mg/ml の濃度になるよう添加した (Kusano ら, 2007)。第 3 章と同様の方法で振とう抽出し、その上清 100 μl を微量ガラスインサートバイアル (Agilent) に移し、Speed Vac (Thermo Fisher Scientific) で遠心濃縮した後、真空デシケーター (内容量 9 l) で一晩乾固した。窒素充填したチャンバー内で各バイアルに 30 μl メトキシアミン溶液 (20 mg/ml 脱水ピリジン) を添加し、室温で 20 h 反応させた。さらに、その反応溶液に 30 μl の MSTFA を添加し、37°C で 1h 反応させた後、30 μl のヘプタンを添加したものを分析用サンプルとした。カラムの昇温プログラムは 80°C (2 min) , 320 °C まで 30°C/min で昇温した後、最終温度で 4.5 min 保持した。質量分析計には、Pegasus 4D TOF MS (LECO) を用いた。マススペクトルは、30 スペクトル/sec で $m/z = 60\text{--}800$ の範囲を測定した。保持指標 (RI) を計算するため、 n -アルカン混合標準溶液 (C10-34) も分析した。豚肉中代謝物分析における GC-MS 条件の詳細については、表 4-1 に示した。

4.2.5 HS-SPME 法を用いた焼成肉の加熱香り分析

マルチビーズショッカーで凍結粉碎した豚肉サンプルは、20 ml スクリューガラスバイアル (AMR) に 2 g ずつ秤量後、18 mm マグネットスクリューキャップ (AMR) でフタをし、分析まで -80°C で保存した。分析前に各バイアルは 30 min 水浴中に保持し融解した。その後、内部標準物質として 5 μ l の EPA524.2 溶液 (20 ng/ml メタノール) を添加し、再びスクリューキャップでフタをした。バイアルを均一に加熱するため、バイアルが熱源に密着するよう隙間をステンレスパイプ (ϕ 25 \times 6 cm) で埋めたアルミブロックヒーター (EYELA, MG-3000) を用いて 140°C または 180°C で 5 min 焼成処理した。処理したバイアルは 1min 水浴中に保持し、30 min 氷中で保持したものを分析用焼成肉サンプルとした。SPME ファイバーは、DVB/CAR/PDMS (膜厚 50/30 μ m, シグマアルドリッチ) を選択し、270°C で 1 h コンディショニングしたものを使用した。分析用サンプルは、80°C で 10 min 保持し、ヘッドスペース部を SPME で 20 min 吸着捕集した。SPME で捕集した VOCs は、スプリットレスモードでインジェクションポートに注入した (250°C, 12 sec)。その後、サンプル由来 VOCs のキャリーオーバーを防ぐため、ファイバーをコンディショニングした (270°C, 15 min)。カラムの昇温プログラムは 40°C (4 min), 200°C まで 10°C/min で昇温した後、最終温度で 4.0 min 保持した。質量分析計には、Pegasus III (LECO) を用いた。マススペクトルは、30 スペクトル/sec で m/z 29–350 の範囲を測定した。RI を計算するため、*n*-アルカン混合標準溶液 (C8-20) も分析した。豚肉加熱香り分析における GC-MS 条件の詳細および本研究で用いた焼成処理法の概略については、表 4-2 および図 4-3 に示した。

4.2.6 データ前処理および解析

GC-MS 分析で得られたマススペクトルデータは ChromaTOF version4.50 (LECO) を用いて NetCDF 形式で出力した。これら出力データは Umea 大学の Thomas Moritz 教授らとの共同研究により開発した MATLAB (Mathworks) プログラミング言語で記述されたカスタムスクリプトを用いて、high-throughput data analysis (HDA) 法によりデータの前処理およびピークアライメントを行った (Jonsson ら, 2005, 2006)。化合物ライブラリーは、一次代謝物の分析に PRIME (Platform for RIKEN Metabolomics, <http://prime.psc.riken.jp>) および Golm Metabolome Database (GMD) を用い、VOCs の分析に NIST/EPA/NIH library (NIST 14) および Adams library Ver.1 を用いた。また、データ行列の標準化には、一次代謝物および VOCs において、それぞれ Pyroglutamate [$^{13}\text{C}_5$, ^{15}N] および 1,2-dichlorobenzene- d_4 を用いた。各分析の行列データは \log_{10} 変換し、unit variance scaling 後、SIMCA-P+15.0 (Umetrics) を用いて直交部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) に供した。保存期間や加熱温度の違いにより変動した代謝物の抽出には、limma (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>) による解析で算出した FDR を用いた。各要因による代謝物の変動パターンを視覚的に評価するため、Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) により作成したベン図を用いた。

4.3 結果

4.3.1 従来法による生肉の鮮度評価

K 値は魚肉の鮮度を判定する生化学的指標として用いられており、食肉においても鮮度指標として活用されている (Watanabe ら, 1989)。図 4-1 で示したとおり、食肉中の ATP は分解され、最終的に HxR や Hx となる。 K 値は死後変動に伴い増加する HxR および Hx の割合を示すものであり、この値が高いほど

保存日数が経過していることを意味する。本研究で用いた保存日数の異なる豚肉の K 値を測定した結果、保存日数の経過に伴い K 値が上昇しており (t -test ; $p < 0.05$) , 熟成が進んでいることを確認できた (図 4-3). 一方で、含気包装サンプルおよび真空包装サンプルの K 値を比較した結果、両方法で差異がみられなかったことから、本研究の冷蔵条件および保存期間においては、包装方法の違いによる影響が殆どなかったことが示唆された。このため、以降の解析については、保存日数が同日 (7 および 14 日目) の含気および真空包装サンプルは同一グループとみなし、保存日数に着目した分析を実施することにした。

4.3.2 保存に伴い変動する呈味関連化合物プロファイリング

豚肉中の味関連代謝物を網羅的に解析するため、保存日数の異なる豚肉の生肉をサンプルとして GC-MS を用いたメタボローム解析を実施した結果、176 個のピークを検出し、そのうち 62 成分を同定およびアノテーションした。これら GC-MS の検出ピーク強度から構成される行列データ (30 検体×176 ピーク) を、教師あり多変量解析手法である直交部分最小二乗法-判別分析 (OPLS-DA) に供した。その結果、スコアプロットは Predictive component 1 (Pred Comp 1; 19.6%) 上で保存日数の違いを判別することが可能であり、判別性能を示す CV-ANOVA ($p < 0.05$), R^2 (Y) および Q^2 (cum) は、それぞれ 0.00, 0.90 および 0.64 であった (図 4-4). 次に、保存日数の違いにより変動した代謝物群について、limma による解析で算出した $FDR < 0.05$ および \log_2 -FC (7 or 14d の正規化後相対強度 / 1d の正規化後相対強度) > 1.0 を基準にし、コントロール (1d) に対する各保存期間のサンプルとの二群間比較解析を行った。これら代謝物の変動パターンはベン図により視覚化した (図 4-6). その結果、保存 1 日から 7 日のみで増加した代謝物は Met および Tyr, 保存 7 日から 14 日のみで増加する代謝物は Lys, Pro, Thr および Trp, 脂肪酸である C18:1 および C18:2, 有機酸類

(citric acid, gluconic acid および succinic acid), およびポリアミンの一種である spermidine であった. また, 両保存期間で共通して増加した代謝物は Cys, Glu, Phe および Ser, glyceric acid, fructose および xylose および核酸関連物質である HxR であった. さらに, 食味性に影響する化合物について保存期間に伴う変動を解析した結果, アミノ酸では Cys, Glu, Leu, PGA, Phe, Ser, Thr および Trp, 糖では fructose および xylose, 核酸では HxR, 脂肪酸では C16:0, C22:6 が有意に増加傾向を示した (FDR < 0.05, 図 4-7).

4.3.3 保存および焼成処理に伴う加熱香気成分変動パターンの解析

保存期間に加え, 焼成処理温度の違いにより変動する VOC を明らかにするため, 本研究では可能な限り香気成分の損失が少なく, 分析の再現性が高くなるようバイアル内で焼成する手法を確立し, 得られた香気成分を HS-SPME-GC-MS で網羅的に分析した. 過去にバイアル内で食肉を加熱処理し香気成分を分析した例として, オートクレーブ (140°C, 30 min) による豚肉ミンチのボイル処理 (Elmore ら, 2000) やヒートブロック (180°C, 5 min) による牛肉ミンチの焼成処理 (Watanabe ら, 2015) する方法が報告されていたが, こうしたバイアル内加熱処理において加熱温度条件を振った際の香気成分の変動を解析した例は殆どなかった. このため, 本研究では焼成処理温度を 140°C および 180°C に設定し, 加熱温度の差異による VOCs の変動を捉えることにした. VOC プロファイリングの結果, 289 ピークを検出し, そのうち 71 成分をアノテーションした. 今回検出されたピーク数は, 既存のオートクレーブ法 (95 ピーク) と比較し, 約 3 倍多かった. また, アノテーションされた VOCs は, ボイル処理した豚肉で検出されたアルデヒド類, アルコール類, フラン類およびピラジン類等の香気成分群と類似していることから (Elmore ら, 2000), 豚肉様香気を検出していることが裏付けられた. 得られた VOCs データを説明変数,

保存日数および焼成処理温度を目的変数とし、前述と同様に OPLS-DA に供した。その結果、CV-ANOVA ($p < 0.05$), R^2 (Y) および Q^2 (cum) は、それぞれ 0.00, 0.48 および 0.33 であった (図 4-6)。Pred Comp 1 (22.2%) 上において、140°C で加熱したサンプル群と 180°C で加熱したサンプル群が分類されたことから、Pred Comp 1 は焼成温度条件による違いを反映する軸と解釈した。一方、Pred Comp 2 (8.4%) 上において、保存 7 日と 14 日を明確に判別することはできなかったが、保存 1 日と保存 7 日以降では分類することができたことから、短期 (1 日) および中長期 (7 - 14 日) の保存日数を反映する軸であると推察した。

本データ行列の多変量解析において、スコアプロットの Pred Comp 1 (22.2%) 軸方向で判別可能であった焼成温度条件の違いに伴い変動する VOCs に着目し、この分離に寄与する化合物の抽出を行った ($FDR < 0.05$, \log_2 -fold change (180°C の正規化後相対強度 / 140°C の正規化後相対強度))。その結果、ID009: 1-penten-3-ol, ID046: 1-hexanol, ID081: 1-heptanol 等のアルコール類, ID014: pentanal, ID023: (*E*)-2-pentenal, ID042: 2-hexenal 等のアルデヒド類, 単素環式化合物の ID045: *p*-xylene, ケトン類の ID010: 2-pentanone, ID051: 3-heptanone および ID075: 6-methyl-2-heptanone が焼成処理温度の上昇に伴い減少することが明らかになった (図 4-9)。一方、アルデヒド類の ID294: hexadecanal, 単素環式化合物の VOC1: benzeneacetaldehyde, ケトン類の ID052: 2-becanone および ID061: butyrolactone, ピラジン類の ID062: 2,5-dimethylpyrazine および VOC2: 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine は焼成処理温度の上昇に伴い増加傾向を示した。また、この焼成温度間の VOCs 量的変動パターンを保存日数間で比較した結果、VOC1 および VOC2 を除いて大きな差異は確認できなかった (図 4-9)。このため、保存期間依存的に変動した VOCs は、OPLS-DA ローディングプロットと前述の量的変動パターンの解析結果から、単素環式化合物である

benzeneacetaldehyde およびピラジン類である 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine であることが判明した (図 4-8). これら化合物は、還元糖と遊離アミノ酸の加熱によるアミノカルボニル反応で生じることが報告されていることから、焼成前の生肉中アミノ酸と量的相関があるのかを解析した. benzeneacetaldehyde は, Cui ら (2017) により Phe と還元糖である xylose から合成されることが明らかにされていることため, benzeneacetaldehyde と Phe の量的相関を解析した結果, ピアソン相関係数は 0.743 と正の相関を示した ($p < 0.05$, 図 4-12 A, B). また, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine は, Lys および Leu を含むジペプチドが前駆物質となりアミノカルボニル反応により合成されることが知られているため (Lancker ら, 2010), これらアミノ酸 (Lys および Leu) と 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine の量的相関を解析した結果, 前述と同様にピアソン相関係数は 0.804 と正の相関を示した ($p < 0.05$, 図 4-12 C, D). さらに benzeneacetaldehyde および 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine の保存期間および焼成処理温度に伴う変動パターンは, いずれの化合物も温度上昇および保存期間に依存し増加する傾向がみられた.

4.4 考察

4.4.1 熟成が豚肉の生肉中呈味関連化合物組成に及ぼす影響

保存期間の進行に伴う豚肉の生肉含有化合物の変動捉えるため, GC-MS を用いたメタボローム解析を行った結果, アミノ酸 (12 種), 糖類 (2 種), 核酸 (2 種), 脂肪酸 (4 種) は保存日数に応じて増加した (図 4-6). ヒトや豚等の哺乳類にとって完全必須アミノ酸 9 種類の中で, 今回検出された Lys, Met, Phe, Thr, Trp および Val は, 飼料摂取の無い屠殺後の肉からは生合成されないと考えられる. 一方で, 準必須アミノ酸である Cys および Tyr, 非必須アミノ酸である Glu, Pro および Ser は, アミノ基転移等の代謝経路を経て合成されるが,

屠殺後こうした代謝系も変動しなくなる (Muroya ら, 2014). したがって, 本研究において増加したアミノ酸は, ペプチダーゼなどの酵素によるタンパク質分解で蓄積したものであると推察した. 単糖類である fructose は, 筋肉中グリコーゲンの分解により蓄積されたと考えられた (Tarr, 1966). IMP の分解産物である HxR および Hx は保存日数に伴い増加傾向にあり, この傾向は鮮度指標である *K* 値の変動パターンと一致した. 豚肉中脂質を構成する脂肪酸である C16:0, C18:1, C18:2 および C22:6 は, 本法において脂肪酸は遊離した形態で検出されることから, 脂質酸化による分解産物として蓄積したものと考えられた (Alaral ら, 2018). 食肉においてアミノ酸, 糖類および一部核酸は, 3.4.2 で述べたとおり呈味性を有することが知られていることから, これら化合物の保存期間に伴う増加により風味豊かな食味性を有する豚肉になることが推察された. さらに, 生肉においてタンパク質分解により生じるアミノ酸および還元糖の存在や脂質酸化により生じる脂肪酸等が肉様香気の前駆物質の生成に関連するとされている (Khan ら, 2015). このため, 本研究では生肉中の呈味化合物群の変動が焼成処理で生じる香気成分の組成と関連性があるかを明らかにすることとした.

4.4.2 焼成温度および熟成期間の違いに寄与する加熱香気成分

本研究では, 実際に家庭で豚肉を購入し加熱調理して食すことを念頭においた食味特性評価法の開発を目的とした. このため, 熟成期間だけでなく焼成温度の差異を香気成分の変動要因として設定し, 焼成肉の VOCs の網羅的解析を試みた. まず, 焼成温度による影響を解析した結果, 焼成処理温度 140°C ではアルコール類 (ID009: 1-penten-3-ol, ID046: 1-hexanol および ID082: 1-heptanol 等), 油脂由来アルデヒド類 (ID014: pentanal, ID023: (*E*)-2-pentenal および ID042: 2-hexenal), 単素環式化合物 (ID045: *p*-xylene) およびケトン類 (ID010:

2-pentanone, ID051: 3-heptanone および ID075: 6-methyl-2-heptanone) の存在量が高く, 180°C では油脂由来アルデヒド類 (ID294: hexadecanal), 単素環式化合物 (VOC1: benzeneacetaldehyde), ケトン類 (ID164: 2-becanone および ID061: butyrolactone), ピラジン類 (ID062: 2,5-dimethylpyrazine および VOC2: 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine) の存在量が高くなる傾向がみられた.

このような加熱処理温度の差による各種 VOC の存在比率の変動は, 油脂の熱酸化やアミノカルボニル反応により生じることが知られている. 例えば, 牛脂の加熱温度 (100-180°C) に伴う香気成分の量的変動では, 140°C で牛肉の香りの前駆物質になるようなアルデヒド類 (hexanal) およびアルコール類 (1-octen-3-ol) 等の VOCs の存在量が最大となり, 140°C 以上で加熱することによりこれら VOCs の存在量は減少することが明らかになっている (Song ら, 2011). また, グレープシードオイルを引いたフライパンで加熱 (150 および 250°C) した豚肉では, 高温処理 (250°C) においてアミノカルボニル反応で生じるアルデヒド類 (propanal, butanal, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal および benzaldehyde) やケトン類 (2-butanone, 2,3-pentanedione および octanedione) の存在量が増加し, 油脂の熱酸化により生じるアルデヒド類 (pentanal, hexanal, heptanal, nonanal および decanal) が減少することが判明している (Meinert ら, 2007). 本研究においても, 焼成温度の上昇に伴い hexadecanal を除く油脂の熱酸化に関連するアルデヒド類は減少する傾向を示し, アミノカルボニル反応で生じる VOCs (benzeneacetaldehyde やピラジン類) は増加する傾向であり (Cui ら, 2017; Van Lancker ら, 2010), これまでの知見を裏付ける結果であった. 特に 1-penten-3-ol (ID009), pentanal (ID014), 6-methyl 2-heptanone (ID075), (Z)-2-heptenal (ID077) および hexadecanal (ID294) は, いずれの熟成日数の豚肉サンプルにおいても焼成温度間で有意な差があることから, 豚肉の焼成具合を示す指標成分になりうることが考えられた (図 4-10).

次に熟成期間に違いによる影響を解析した結果、単素環式化合物である benzeneacetaldehyde およびピラジン類である 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine は熟成の進行に伴い増加傾向であった (図 4-11). また、これら VOCs は高温で加熱 (180°C) することで、より存在量が増加した (図 4-11). benzeneacetaldehyde は、牛肉、豚肉およびラム肉の畜肉 (Ramirez ら, 2004; Rochat および Chaintreau, 2005; Vasta ら, 2011, 2007), ライ麦パン, ビールおよびドライソーセージの加工品 (Dong ら, 2014; Kirchhoff ら, 2002; Sunesen ら, 2001) と幅広い食品に検出される香気成分であり、ハチミツやヒヤシンス様の香りを持つとされている。また、2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine はココア、焼成したチコリーおよび加熱した酵母エキスから検出されている (Alim ら, 2018; Beak ら, 1998; Khaily ら, 2001). このことから、熟成の進行かつ加熱処理温度の上昇に伴い焼成した豚肉の加熱香気は、香ばしさが増すことが推察された。さらに、これら VOCs が生肉中の前駆物質と量的相関があるのか解析した結果、benzeneacetaldehyde は、前駆体である Phe と正の相関を示し (Cui ら, 2017), 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine は Lys および Leu と正の相関を示した (Van Lancker ら, 2010; 図 4-12). このことは、生肉中化合物の量的変動パターンを GC-MS で捉えることによって、熟成した豚肉の加熱香気において重要な VOCs の存在量予測へ活用できる可能性があることを示唆している。

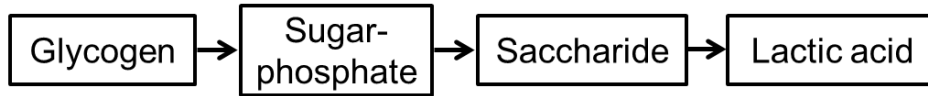
以上のように、本研究では豚肉の流通工程 (包装形態、保存期間および加熱調理) をイメージした実験系を立ち上げ、これら工程における化合物の変動パターンを GC-MS を用いたメタボローム解析で捉えた。今回の保存条件において包装形態 (含気包装および真空包装) による *K* 値および生肉中化合物の変動が殆どなかったことから、4°C 以下の冷蔵保存であれば包装形態が食味特性に大きく影響しないことが推察された。保存期間に伴い生肉中のアミノ酸、核酸

(HxR および Hx), 単糖および脂肪酸は増加した。また, 焼成肉では benzeneacetaldehyde および 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine が増加しており, 豚肉の熟成が進行することで呈味成分および香気成分が変動することが明らかになった。さらに焼成温度の差異による豚肉の加熱香気成分の変動パターンについては, 脂質由来アルデヒド類, アルコール類およびケトン類等は加熱温度の上昇に伴い減少傾向であり, ピラジン類は増加傾向であった。これら豚肉の加熱香気成分への影響が保存期間よりも加熱調理温度の違いによる影響が大きいことを踏まえると, 消費者のニーズに合った食味特性を有する豚肉の開発を検討する上で, 加熱調理方法の重要性も考慮すべきであると考えられる。このため, 今回開発した密閉したバイアル内での豚肉ミンチの焼成方法は既存のオートクレーブ法と比較し, ヒートブロックを用いるため温度制御が容易で, より多くのピークを検出することが可能であったことから, メタボローム解析を用いた食肉の加熱調理条件の検討へ活用できると考えられる。ただし, 密閉されたバイアル内での焼成であるため, 高圧調理 (圧力鍋による調理) のような状態になっている可能性があり, こうした条件下では食肉中のアミノ酸, ペプチドおよびイノシン酸等の加熱香気の前駆物質の増加が熟成以上に進行するとも言われていることから (池内ら, 2006), 本法と実際の調理方法とで生じる香気成分と差異について, 今後検討したいと思う。

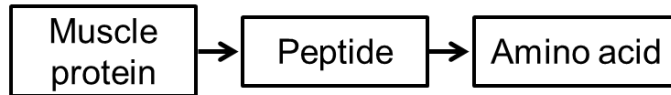
将来展望として, 生肉と香気成分をつなぐ指標になると期待されるこれらの化合物と豚肉の食味特性との関連性をより詳細に評価するため, 第3章で確立した焼成豚肉の呈味成分のメタボローム評価や分析型官能評価を統合し考察することで, 消費者が求める豚肉の品質を実現するための手法への発展に貢献できるものとする。

Aging of meat

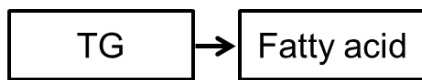
Glycolysis



Protein digestion



Lipid oxidation



Nucleic acid degradation

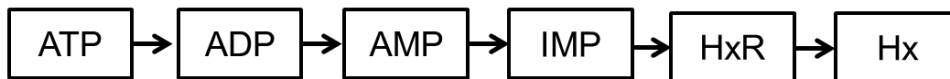


図 4-1 熟成で生じる食肉中成分変動の概略図

TG: トリグリセロール, IMP: inosine monophosphate, HxR: inosine, Hx: hypoxanthine

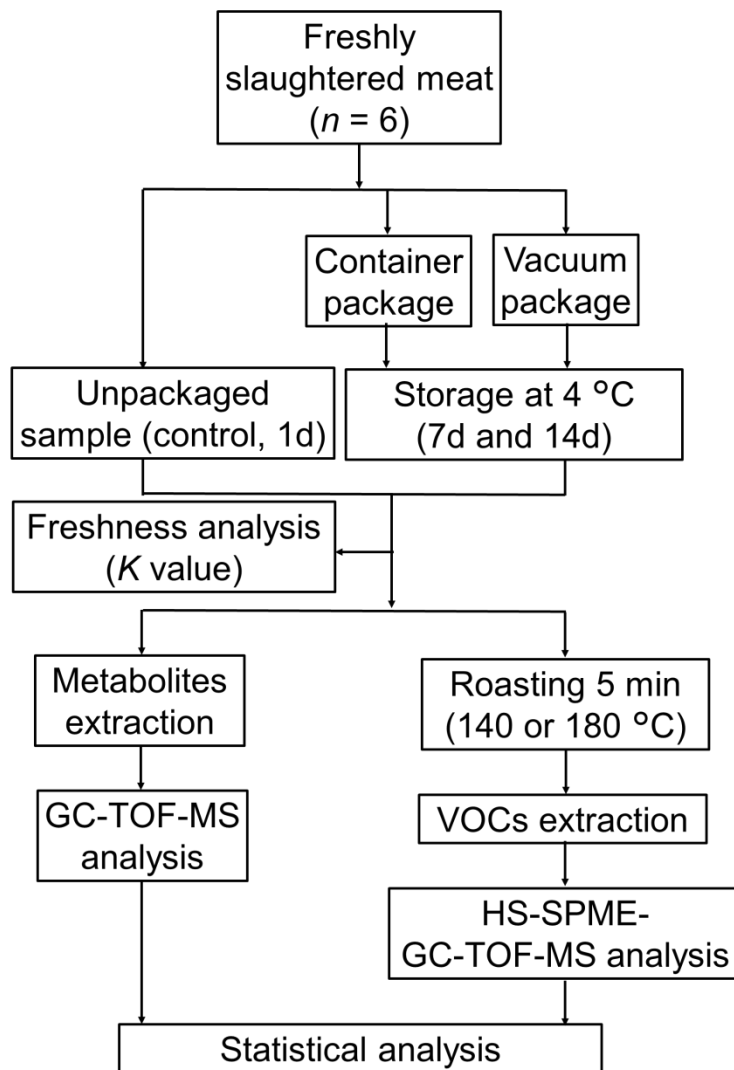


図 4-2 本研究の概略図

豚肉サンプルは、含気包装または真空包装で7日および14日保存した（温度4°C）。また、保存を経ない豚肉サンプルをコントロールとした。生肉サンプルは鮮度指標であるK値を測定した後、それらサンプル中化合物のメタボローム解析を行った。さらに同一サンプルの加熱香気成分は140または180°Cで焼成処理した後、HS-SPME-GC-TOF-MSで測定した。各分析で得られたデータは多変量解析に供した。

表 4-1 豚肉の生肉に対する代謝物分析における GC-MS 条件

Gas Chromatograph	Agilent 6890N
Sample injection	1 μ l, splitless
Column	Rxi-5 Sil MS (30 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.25 μ m)
Temperature program	80°C (2min) \rightarrow 30°C/min \rightarrow 320°C (4.5min)
Carrier gas	He; 1.0ml/min, Constant Flow
Mass Spectrometer	LECO Pegasus 4D
Ionization mode	EI, -70eV
Ion source temperature	200 °C
Transfer line temperature	250 °C
Solvent delay time	205 sec
Acquisition rate	<i>m/z</i> 60-800 (30 spectra/sec)

表 4-2 本法で開発した焼成肉の香气成分分析における GC-MS の条件

Gas Chromatograph	Agilent 6890N
Fiber type	DVB/CAR/PDMS (Gray)
Desorption	12 sec, splitless
Fiber conditioning	15 min
Column	Rxi-5 Sil MS (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm)
Temperature program	40°C (4min)→10°C/min→200°C (4.0min)
Carrier gas	He; 1.0ml/min, Constant Flow
Mass Spectrometer	LECO Pegasus III
Ionization mode	EI, -70eV
Ion source temperature	200 °C
Transfer line temperature	250 °C
Solvent delay time	140 sec
Acquisition rate	<i>m/z</i> 29-350 (30 spectra/sec)

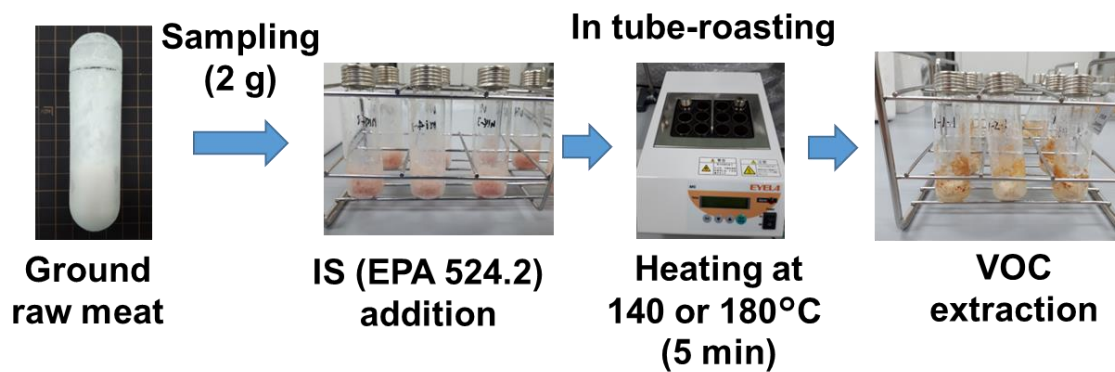


図 4-3 豚肉の焼成処理方法の概略

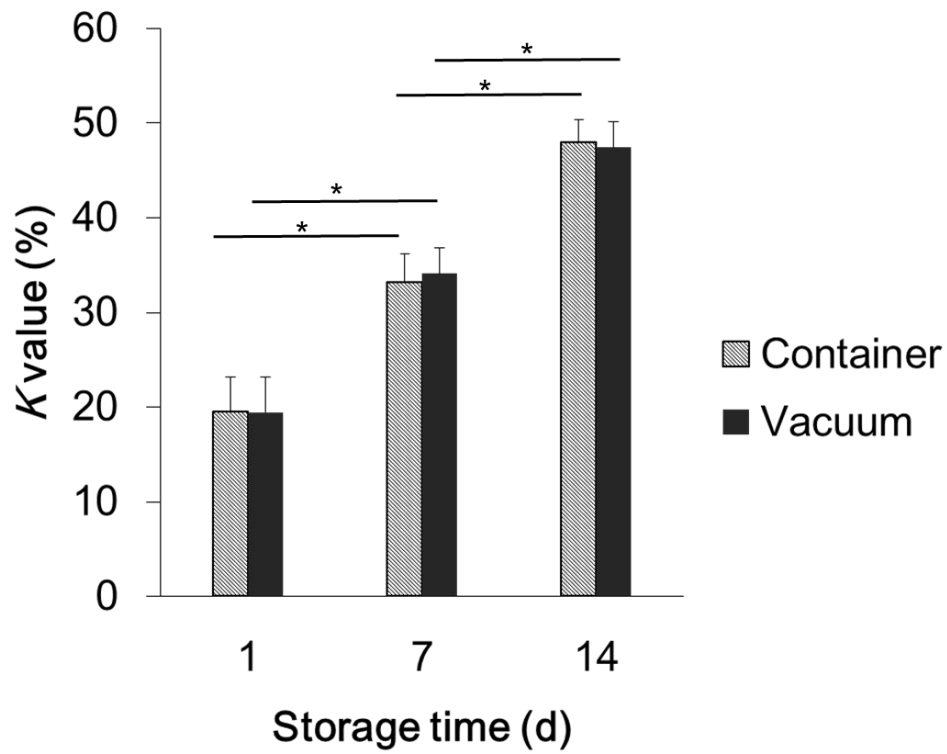


図 4-4 K 値による豚肉の鮮度評価

斜線: 含気包装豚肉の K 値の平均値.

塗潰し: 真空包装豚肉の K 値の平均値.

エラーバー: 標準偏差

*: Student's *t*-test, $p < 0.05$

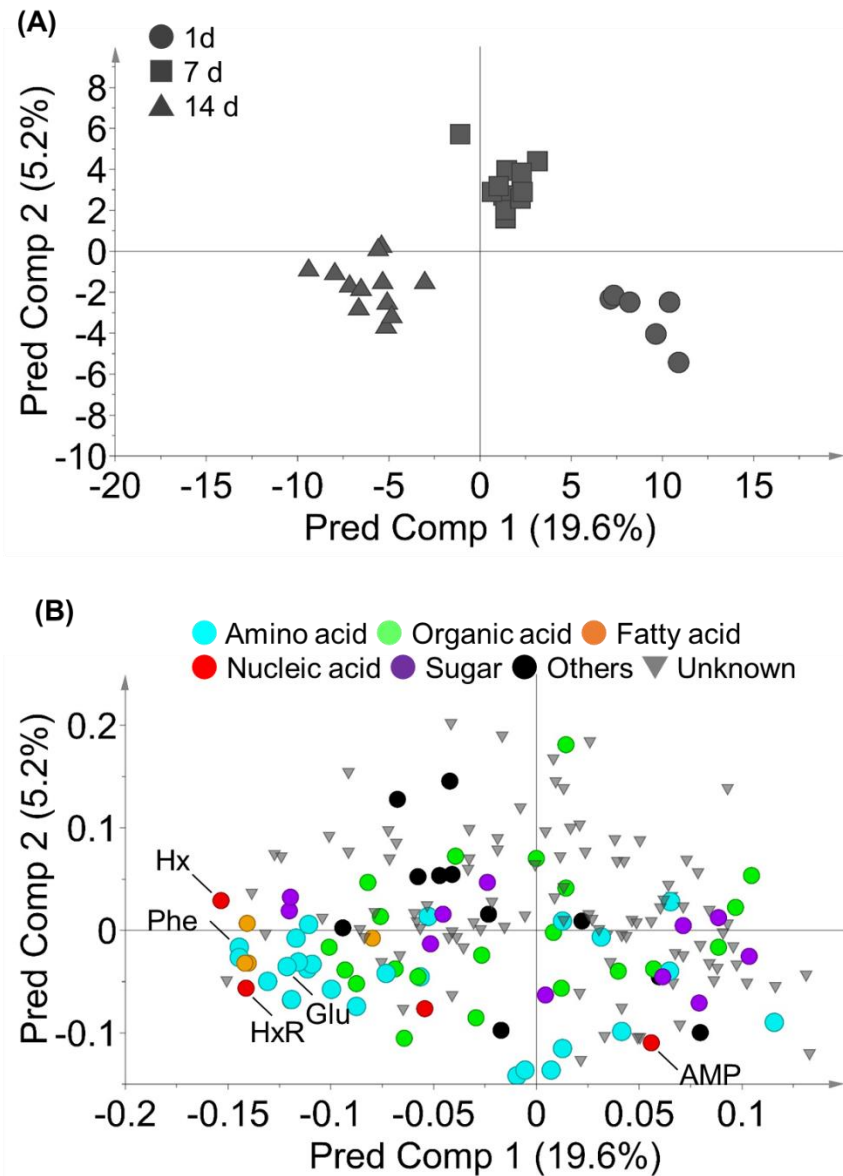


図 4-5 生肉中呈味成分データによる保存期間の異なる豚肉の判別分析 (OPLS-DA)

(A) スコアプロット (●: 1 d (control), ■: 7 d, ▲: 14 d), (B) ローディングプロット (水色: アミノ酸, 黄緑色: 有機酸, 橙色: 脂肪酸, 赤色: 核酸, 紫色: 糖, 黒色: その他化合物, 灰色: 未同定化合物, Phe: phenylalanine, Glu: Glutamate, AMP: adenosine monophosphate, HxR: inosine, Hx: hypoxanthine)

CV-ANOVA: $p < 0.05$

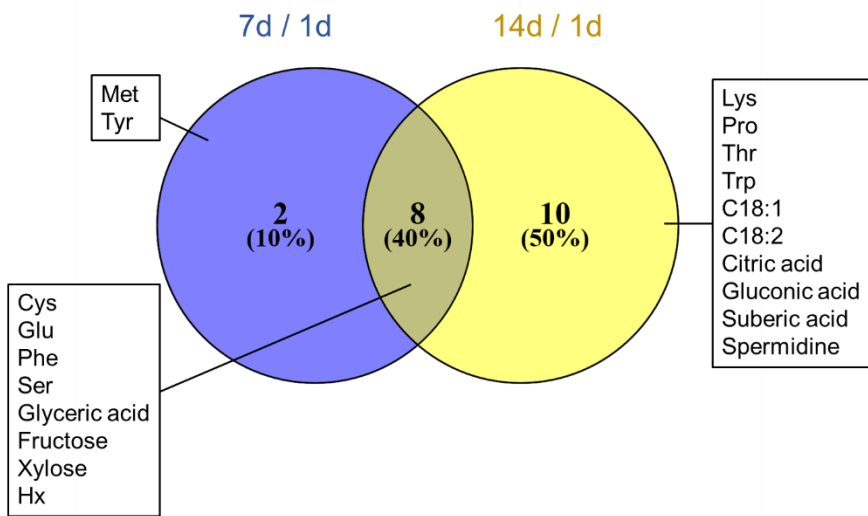


図 4-6 保存に伴い増加した豚肉中化合物のベン図

FDR < 0.05, \log_2FC (7 or 14d/1d) > 1.0

数値：保存に伴い増加した化合物数

()：全 20 化合物中のパーセンテージを表記

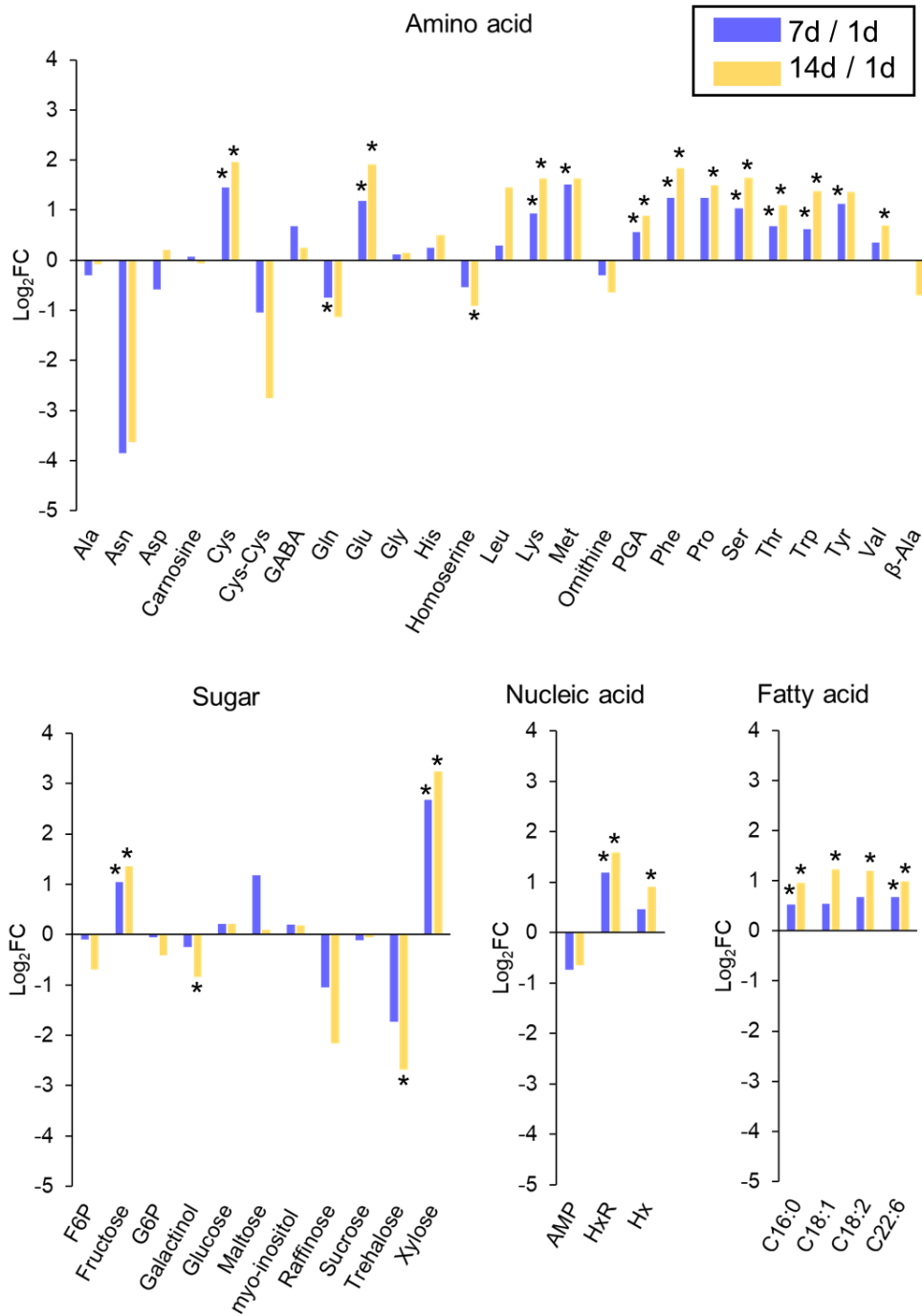


図 4-7 豚肉の食味性に関与する代謝物の熟成に伴う変動

log₂FC (7 or 14 d/1 d) > 1.0, * : FDR < 0.05

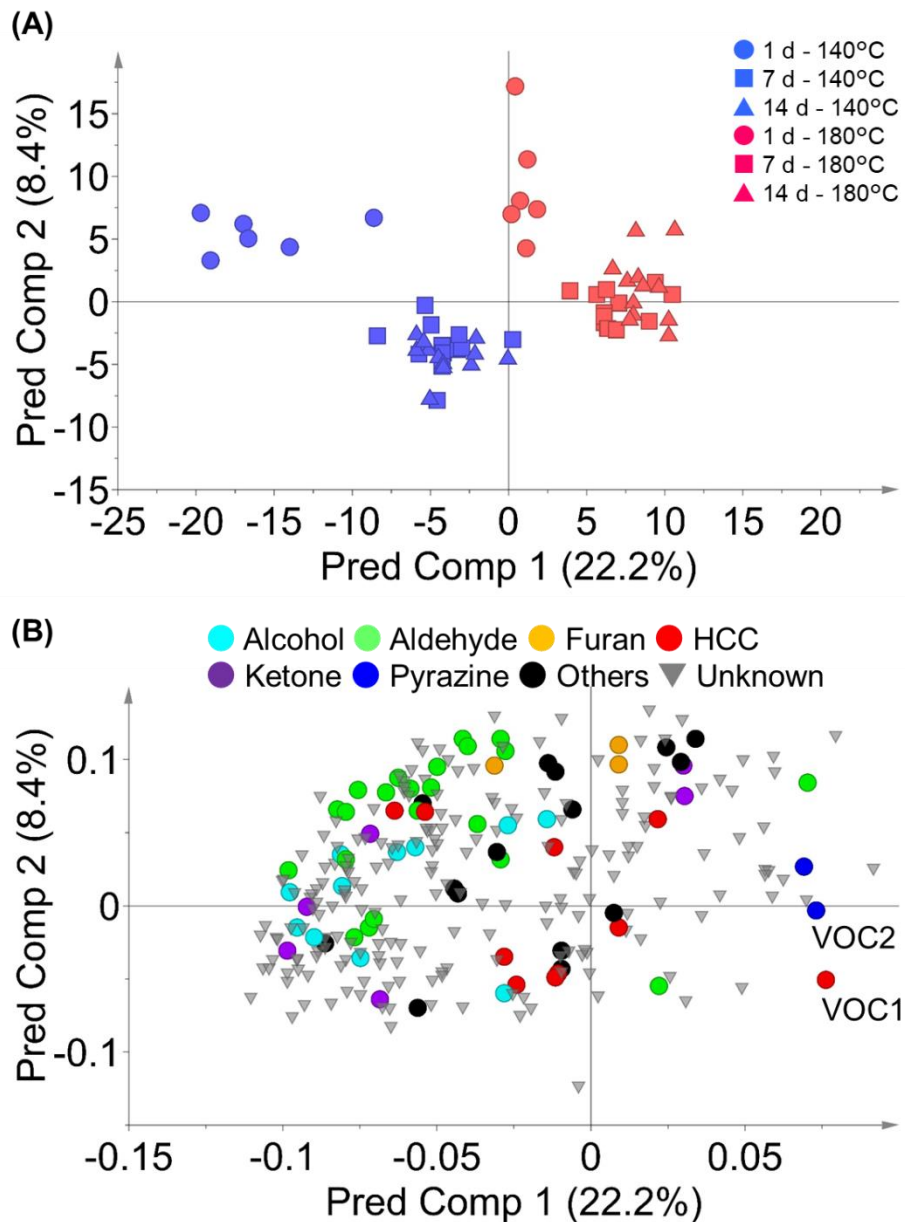


図 4-8 VOC 分析データによる加熱温度 (140°C と 180°C) および保存日数の異なる豚肉の判別分析 (OPLS-DA)

(A) スコアプロット (●: コントロール (1 d), ■: 7 d, ▲: 14 d, 青: 140°C, 赤: 180°C), (B) ローディングプロット (水色: アルコール, 黄緑色: アルデヒド, 橙色: フラン, 赤色: 単素環式化合物 (HCC), 紫色: ケトン, 青色: ピラジン, 黒色: その他化合物, 灰色: 未同定化合物, VOC 1:

2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine, VOC 2: benzeneacetaldehyde)

CV-ANOVA: $p < 0.05$

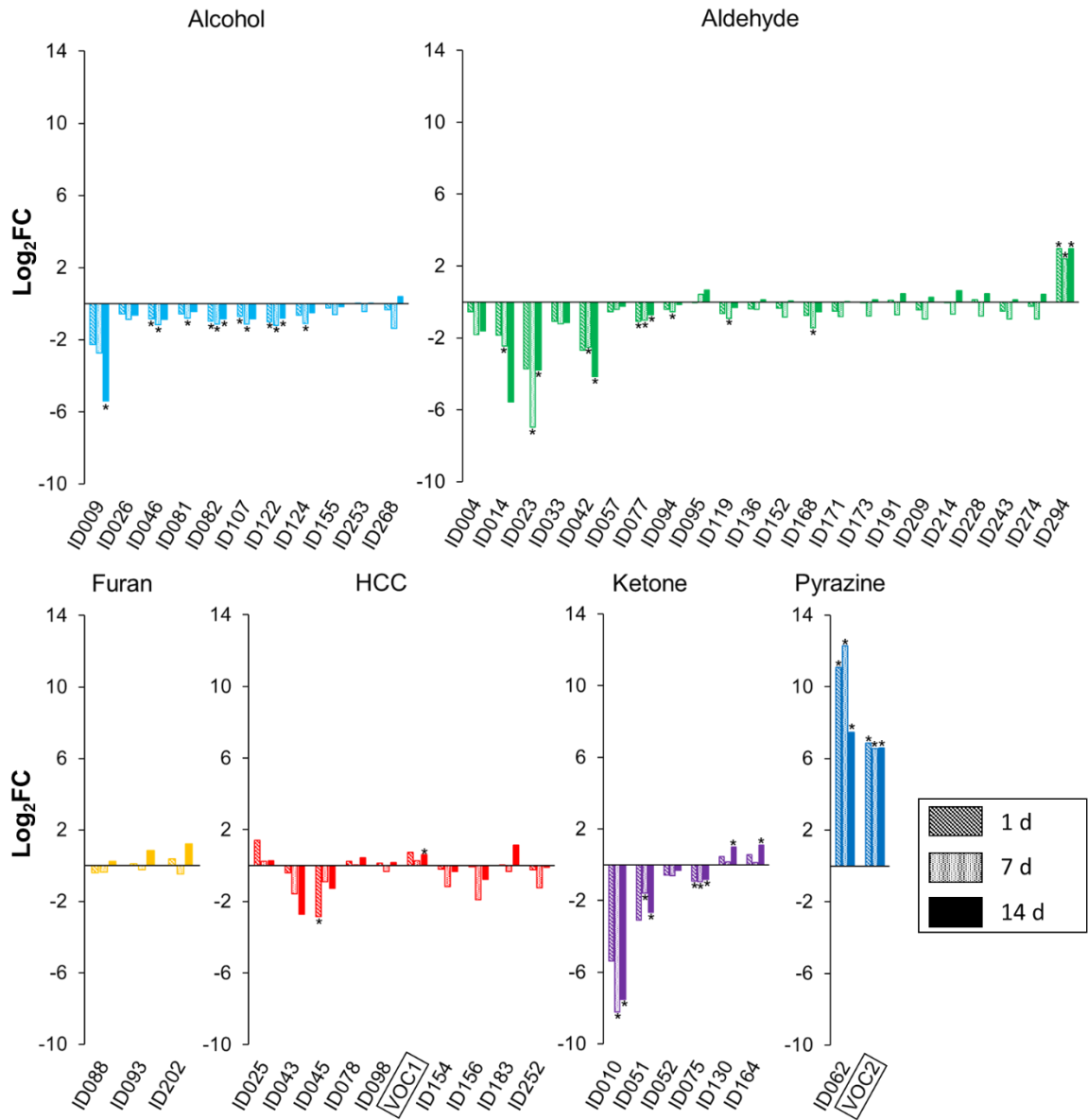


図 4-9 加熱温度に伴う豚肉中香気成分の量的変動パターン

*: Significant, FDR < 0.05, log₂-fold change (180°C /140°C)

斜線: コントロール (1 d), ドット: 7 d, 塗潰し: 14 d

水色: アルコール, 黄緑色: アルデヒド, 橙色: フラン, 赤色: 単素環式化合物 (HCC), 紫色: ケトン, 青色: ピラジン

Alcohol (ID009: 1-penten-3-ol, ID026: 1-pentanol, ID046: 1-hexanol, ID081: 1-heptanol, ID082: 1-octen-3-ol, ID107: 2-ethyl-1-hexanol, ID122: (*E*)-2-octen-1-ol, ID124: 1-octanol, ID155: 1-nonanol, ID253: 1-dodecanol, ID268: *n*-tridecan-1-ol)

Aldehyde (ID004: 3-methyl-butanal, ID014: pentanal, ID023: (*E*)-2-pentenal, ID033: hexanal, ID042: 2-hexenal, ID057: heptanal, ID077: (*Z*)-2-heptenal, ID094: octanal, ID095: 2-ethyl-2-hexenal, ID119: (*E*)-2-octenal, ID136: nonanal, ID152: (*E*)-2-nonenal, ID168: (*Z*)-4-decenal, ID171: decanal, ID173: (*E,E*)-2,4-nonadienal, ID191: (*E*)-2-decenal, ID209: undecanal, ID214: 2,4-decadienal, ID228: 2-undecenal, ID243: dodecanal, ID274: tetradecanal, ID294: hexadecanal)

Fran (ID093: (*E*)-2-(2-pentenyl)furan, ID202: 2-*n*-octylfuran)

HCC (ID025: toluene, ID043: ethylbenzene, ID045: *p*-xylene, ID078: benzaldehyde, ID098: 1,3-dichlorobenzene, **VOC1**: benzeneacetaldehyde, ID154: 3-ethylbenzaldehyde, ID156: benzeneacetic acid, methyl ester, ID183: benzeneacetic acid, ethyl ester, ID252: 4-pentylbenzaldehyde)

Ketone (ID010: 2-pentanone, ID051: 3-heptanone, ID052: 2-heptanone, ID075: 6-methyl-2-heptanone, ID130: 2-nonanone, ID164: 2-becanone, ID061: butyrolactone)

Pyrazine (ID062: 2,5-dimethylpyrazine, **VOC2**: 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine)

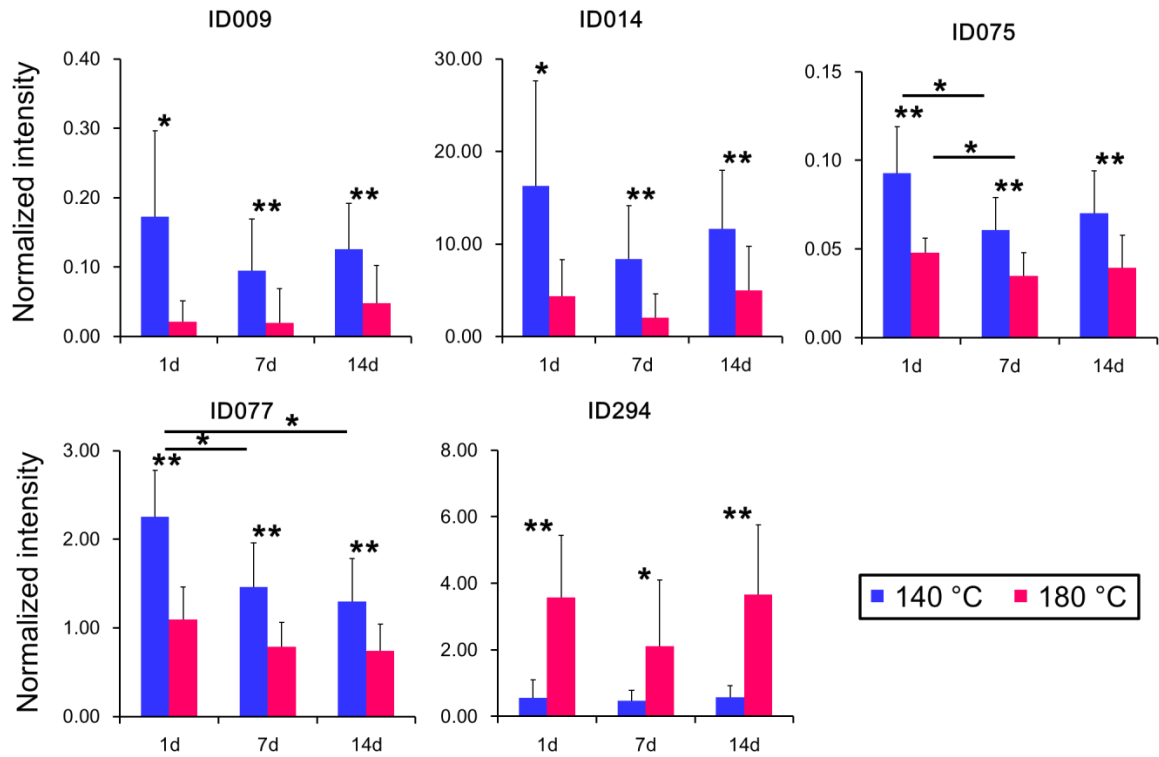


図 4-10 焼成温度の違いに寄与する豚肉加熱香り成分

ID009: 1-penten-3-ol, ID014: pentanal, ID075: 6-methyl-2-heptanone, ID077: (Z)-2-heptenal, ID294: hexadecanal

*: *t*-test, $p < 0.05$

** : *t*-test, $p < 0.01$

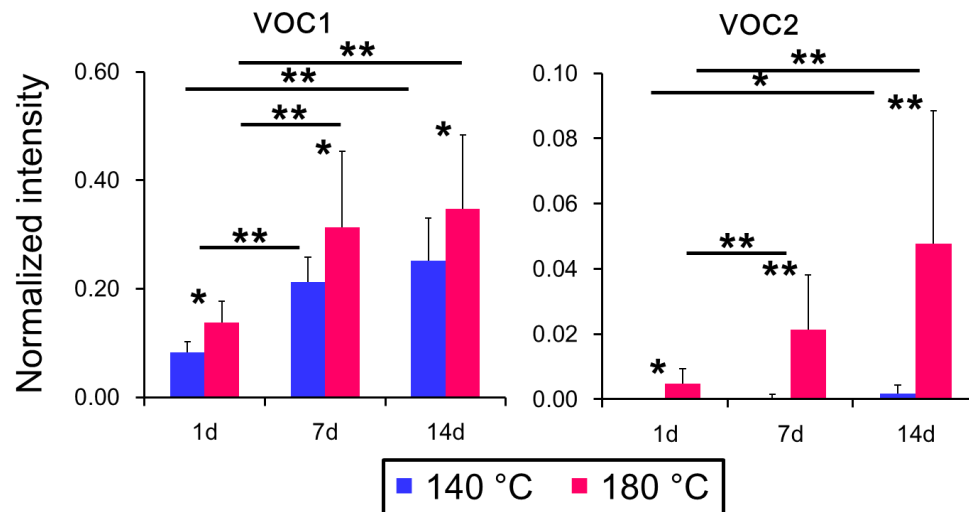


図 4-11 熟成期間の違いに寄与する豚肉加熱香気成分

VOC1: benzeneacetaldehyde, VOC2: 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine

*: *t*-test, $p < 0.05$

** : *t*-test, $p < 0.01$

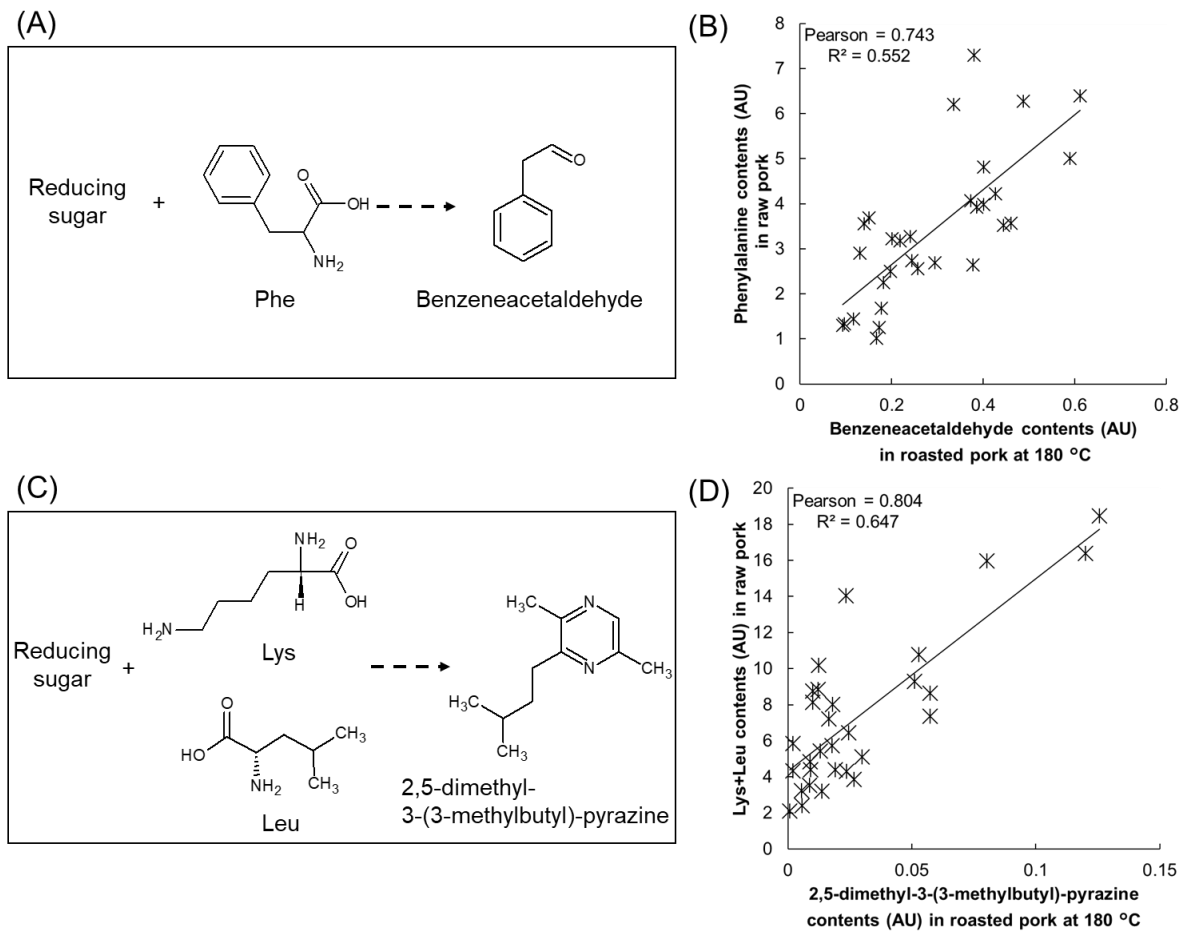


図 4-12 生肉中遊離アミノ酸および焼成肉で検出した benzeneacetaldehyde および 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine との量的相関解析

- (A) アミノカルボニル反応を介した benzeneacetaldehyde の合成フロー簡略図。
 (B) 生肉中前駆物質 (Phe) と 180 °C 焼成肉 (180 °C) の benzeneacetaldehyde の含量比較。
 (C) アミノカルボニル反応を介した 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine の合成フロー簡略図。
 (D) 生肉中前駆物質(Lys+Leu) と 180 °C で焼成肉 (180 °C) の 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazine の含量比較。

Pearson: ピアソン相関係数, R²: 決定係数, 有意検定, $p < 0.05$.

総括

昨今、消費者は健康志向の高まりとともに、農畜産物に対して価格だけでなく、品質や食味性について高い関心を示している。このため、今後も消費者に選ばれる魅力的な国産農畜産物を提供していくためには、味や機能性等の付加価値を付随できる生産技術の開発や加工・流通プロセスの最適化が重要である。しかし、こうした技術の評価において、これまでの実験室レベルで一定条件に揃えた実験系において生育させたモデル生物を含む植物および動物を用いて得た結果は、市場流通している農畜産物の品質や食味特性が大きく異なる可能性があり、現状では得られたデータの解釈に大きな隔たりがあると考えられる。一方、実際に流通している農畜産物を解析対象とした場合、見出された違いが何に起因するものなのか特定することは容易ではない。そこで、本研究では実際に市場に流通する植物工場レタスおよび豚肉を題材とし、呈味成分や香気成分等の低分子化合物の網羅的に解析できる手法であるメタボローム解析を行い、各農畜産物の食味特性評価へ展開できる可能性についてを検討した。

第2章では、商用植物工場で主に採用されている水耕栽培法のうち、実際に共同研究者により販売されている条件で生育したサニーレタス2品種を研究対象とした。露地栽培品をイメージした土耕栽培条件と比較し、見た目ではわからない代謝レベルで差異が認められるのかを解析するために、それぞれの化合物検出特性を活かしたGC-MSおよびLC-MS統合メタボローム解析を行った。その際、一般的に採用されている完全同一条件のもと、ある因子を変化させた際に観測される変化を捉えるのではなく、代謝物組成に影響する植物体の生育度合いが同等になるよう両栽培条件をできる限り揃えた実験系を構築した。本実験デザインの適用により、評価基準の要因として挙げられるレタスも品種、生育ステージ、および葉の位置の違いよりも栽培環境の違いが代謝物組成に大

大きく影響することを明らかにした。また、植物工場レタスは土耕栽培で栽培したものと比較し、旨味成分であるアミノ酸の含量が高く、レタス特有の苦味成分であるセスキテルペン類の含量が低いことが明らかとなった。本研究は、これまでの植物工場の栽培条件を実験室で模倣したものとは異なり、実際に稼働中の植物工場で採用されている栽培条件そのものを対照区とし、植物体の生育度合い（大きさ、生育ステージ等）が同等になるように最大限配慮した上で、代謝物群の量的変動を詳細に解析した初の試みである。本研究成果は、4社の新聞や雑誌に取り上げられており、社会的に関心が高い内容であったことが窺える。今後の展開としては、本研究で示唆された食味に関わる代謝物群の蓄積量を制御することで、レタスの品質や食味特性をデザインブルに制御する可能性について、より詳細に評価する必要がある。また、本研究で確立した評価基準は、将来的に様々な植物工場で栽培されている同一品種の成分比較等、様々な農産物の栽培条件を評価するための手法として活用できると考えられた。

第3章では、焼成後の豚肉中成分の変動を捉えることを目的に、実際の官能評価で使用する焼成方法により調製した豚肉を対象に、食味性に関わるアミノ酸や有機酸等の化合物を包括的に分析可能なGC-MSメタボローム解析による食味特性評価手法の開発を行った。GC-MSメタボローム解析の分析精度についてアミノ酸を対象に評価した結果、既存のアミノ酸分析計による定量値との相関は高かった。今回メタボローム解析より得られた約140化合物のデータ解析から、輸入豚肉と国産豚肉とで品質に違いがあることを客観的に判別することが可能であった。また、アノテーションまたは同定した48化合物について焼成前後間の量的相関を解析した結果、豚肉において甘味、酸味、苦味および旨味といった食味性に関連することが知られているアミノ酸、糖類および核酸が焼成前後間で相関関係にあることが明らかとなった。このため、焼成過程を経ない生肉のメタボローム解析の結果を加熱調理後の呈味性評価の代替として予備的

に適用である可能性が示唆された。

第4章では、豚肉の食味特性を把握する上で重要な因子となる香気成分も含めた総合的評価手法を開発することを目的に、呈味成分の変動が予想される熟成段階の異なる豚肉を対象とし、生肉の呈味成分についてはGC-MSを、焼成肉の香気成分についてはHS-SPME-GC-MSを用いたメタボローム解析を行った。品種、飼育条件および屠殺条件を自社で厳密に制御することにより、豚肉中化合物の変動要因はできる限り排除したうえで、熟成に寄与する豚肉の食味関連成分を探索した。生肉中化合物を分析した結果、約180個の成分を検出し、保存に伴いアミノ酸、糖類、核酸および脂肪酸が増加することが判明した。さらに、これら生肉中化合物の量的変動と加熱温度条件の違いが香気成分の組成へ影響するのかを解析するため、密閉条件で焼成する方法を開発し、得られた各豚肉サンプルの香気成分をHS-SPME-GC-MS分析に供した。その結果、保存期間よりも加熱調理温度の違いによる影響が香気成分の変動に影響することを明らかにした。また、保存期間の経過に伴い変動したbenzeneacetaldehydeおよび2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-pyrazineは増加傾向であり、これらの前駆物質であるアミノ酸の含量との間で有意な相関が認められた。以上のことから、生肉のメタボローム解析によって、加熱調理した肉中の呈味成分だけではなく、香気成分の変動を推測できる可能性が示された。今後は、本研究で得られたメタボロームデータと官能評価を照らし合わせることで、ヒトの感覚を模倣した食味特性の客観的評価手法として展開できると考える。

メタボローム解析は、データを得ること自体は現在の分析技術を駆使すれば難しくない。しかし、得られたデータをうまく活用できず、相関解析にのみ留まるケースが多いのが現状である。本研究では、実際に流通する農畜産物を材料にしても、科学的考察を含めて研究を行うことができた。将来的に、これら評価系は新たな栽培・飼育技術や流通システムを数値化して評価するためのツ

ールとして活用し，消費者のニーズに合った農畜産物生産に繋げることを目指したい。

Summary

Recently, consumers have become increasingly interested in higher-quality foods. In this context, agricultural and livestock products are evaluated on not only by price but also by quality and taste. Food price imported from abroad is getting cheaper than that of domestically produced. On the other hand, consumers prefer high quality food because of rising health consciousness. To meet the demands of food consumers, it is important to develop novel techniques which can provide superior tastes and enhance functionality without increasing price. To date, various efforts have been made to enhance qualities of various agricultural and livestock products via controlled experimental systems in laboratory. However, this laboratory-based product development typically provides agricultural and livestock products with much different taste qualities of those on the market. Hence, it seems that there is a big difference in the data interpretation of the developed technologies. In this study, commercially available leaf lettuce and pork meat were comprehensively evaluated using metabolomic analysis. On the other hand, application of metabolomic analysis on these "real" products may provide valuable data, but there is much less detailed informations, i.e., growth conditions and sampling times. Through the analysis, various metabolite indicators were extracted including low molecular compounds that are responsible for taste and flavor characteristics of those agricultural and livestock products. Therefore, the current study was aiming to evaluate taste and volatile flavor compounds of leaf lettuce and pork meat that could responsible for their overall quality traits with advanced metabolomic analytical techniques.

In Chapter 2, two leaf lettuce varieties that were cultivated in different growth conditions, i.e., commercial plant factory and soil cultivation, were analyzed by using integrated MS-based profiling techniques. In this study, the soil growing

condition was optimized to imitate hydroponic-based cultivation, including light intensity and fertilizer composition. The results showed that the metabolite composition of leaf lettuce was primarily affected by its cultivation condition than the cultivar type or the leaf position. In addition, the levels of umami-related amino acids were significantly increased in hydroponically-grown leaf lettuce, while soil-cultivation derived leaf lettuce contained significantly higher levels of lettuce-specific sesquiterpene lactones that may result in stronger bitter perception. The acquired metabolomic data can be used as an important basis for further detailed assessment of cultivations systems in plant factories such as light properties and liquid fertilizer concentrations that may lead to the development of stable production technology for high added value agricultural products with excellent taste and functionality.

In Chapter 3, to capture metabolome variations in pork meat, particularly taste-related compounds such as amino acids, that may be associated with sensory quality of their cooked meats, both raw and cooked meats of imported- and domestically-produced were analyzed by GC-MS-based metabolite profiling technique. The robustness of analytical accuracy of the presenting GC-MS technique was confirmed through the low values of the relative standard deviation (RSD) of normalized peak intensity (amino acids) in three analytical replacates, alongwith high correlation in acquired amino acids contents between metabolite profiling and conventional analytical method, suggesting that evaluation of the pork meat quality based on the metabolite profiling method could become an alternative for authentic amino acid analysis.

As the results, the quality difference between imported- and domestically produced-pork meat was objectively distinguished through data analysis of detected

140 metabolites. In addition, quantitative differences in the levels of taste-related metabolites such as amino acids, sugars, and nucleic acids were well discriminated among the evaluated pork meat, in which the ratio of metabolite levels between imported- and domestically produced–pork meat was consistently equivalent in both raw and cooked ones. Therefore, the metabolome analysis of raw pork meat could be potentially utilized as a preliminary test of sensory assessment of cooked meat.

In chapter 4, to develop comprehensive evaluation method that elucidate both taste and flavor of pork meat, taste-related compounds in raw meat and flavor compounds in roasted meat of different aging periods were analyzed using GC-MS and HS-SPME-GC-MS, respectively. The possible initial alteration in food components of pork meat was prevented by strictly controlling the breeds, in-house breeding conditions and slaughter conditions, so that changes of taste- and flavor-related compounds during aging could be comparatively evaluated. Metabolite profiling captured 180 metabolites including the taste-related compounds, wherein the levels of amino acids, sugars, fatty acids and nucleic acids tended to increase during the late aging stage. Furthermore, the effects of quantitative variations of taste-related compounds in raw meat and different roasting temperature conditions of pork meat were evaluated for its flavor composition, wherein in tube-roasting method under sealing condition for retaining volatile flavor compounds were applied, and the accumulating flavor compounds was then analyzed by using HS-SPME-GC-MS analysis. As the result, it was revealed that the variation in volatile flavor composition of roasted meat was much affected by roasting temperature than aging period. In addition, two discriminant VOCs, benzeneacetaldehyde and 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)- pyrazine, tended to increase over aging, and significant quantitative correlation between these two VOCs and their amino acid

precursors in raw meat was distinguished. Taken together, metabolomic analysis of raw meat could be potentially utilized for estimating quality profile of cooked pork meat, including its taste and volatile flavor characteristics. Along with sensory evaluation, the resulting data also can be used as the basis for developing an evaluation method of taste characteristics that could mimic human sense of taste for pork meat.

The present study demonstrated the capability of advanced metabolomic analytical techniques in elucidating taste and volatile flavor profiles of valuable commercially available agricultural and livestock products, i.e. leaf lettuce and pork meat, that can be used in revealing their comprehensive quality attributes. It implies that metabolomic approach may provide novel clues for development of “food” that may lead to the development of agricultural and livestock products.

謝辞

本研究の遂行および本論文をまとめるにあたり、懇切なるご指導、ご校閲を賜りました、筑波大学大学院続生命環境科学研究科 草野 都 教授に心より厚く御礼申し上げます。博士論文の審査に際し、ご校閲およびご指導をいただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科生命産業科学専攻 繁森 英幸 教授、同研究科生物圏資源科学専攻 菅谷 純子 教授、柴 博史 教授、王 寧 助教および Asikin Yonathan 助教に心から感謝を申し上げます。

全農飼料畜産中央研前々所長 種田 貴至氏、前所長 田野倉 忠之氏、現所長 米倉 浩司氏には、大学院での研究活動の機会を与えていただき、心より御礼申し上げます。

全農飼料畜産中央研究所品質管理研究室の皆様のご理解とご協力なしに日常業務と研究活動を両立することは、難しかったと感じております。改めて、ここに御礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、ご助言をいただきました同研究室 宮浦 一騰 室長、同研究所養豚研究室 野口 剛 博士に深く感謝いたします。また、励ましの言葉を掛けて気遣ってくれた同僚の有野 真弥さん、発表資料の構成等で相談に乗ってくれた同僚の岩藤 伸治さん、彼ら二人の業務での協力がなければ、大学での有意義な研究生活は送れませんでした。この場を借りて心から感謝いたします。

研究活動および研究室生活全般において大変お世話になりました筑波大学大学院生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻代謝ネットワーク研究室および植物遺伝情報解析学研究室の皆様心から感謝致します。

最後に、常に近くで励まし、支えてくれた妻の由香里に感謝の気持ちを伝えます。

引用文献

- Aaslyng, M. D., and Meinert, L. (2017). Meat flavour in pork and beef from animal to meal. *Meat Sci.*, 132, 112-117.
- Abu-Reidah, I. M., Contreras, M. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *J. Chromatogr. A*, 1313, 212–227.
- Alim, A., Song, H., Liu, Y., Zou, T., Zhang, Y., and Zhang, S. (2018). Flavour-active compounds in thermally treated yeast extracts. *J Sci Food Agric.*, 98-3774-3783.
- Altunkaya, A., Gökmen, V., and Skibsted, L. H. (2016). pH dependent antioxidant activity of lettuce (*L. sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chem.*, 190, 25–32.
- Amaral, A. B., Silva, M. V., and Lannes, S. C. S., (2018). Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. *Food Sci. Tech.*, 38, 1-15.
- Arbona, V., Iglesias, D. J., Talón, M., and Gómez-Cadenas, A. (2009). Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7338–7347.
- Baek, H. H., and Cadwallader, K. R. (1998). Roasted chicory aroma evaluation by gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry. *J. Food Sci.*, 63, 234-237.
- Baker, E. A., Bukovac, M. J., and Flore, J. A. (1979). Ontogenetic variations in the composition of peach leaf wax. *Phytochemistry*, 18, 781–784.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a

- practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.*, 57, 289–300.
- Caldwell, C. R., and Britz, S. J. (2006). Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *J. Food Compost. Anal.*, 19, 637–644.
- Castejón, D., García-Segura, J. M., Escudero, R., Herrera, A, and Cambero, M. I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Anal. Chim. Acta.*, 901, 1-11.
- Chadwick, M., Gawthrop, F., Michelmore, R. W., Wagstaff, C., and Methven, L. (2016). Perception of bitterness, sweetness and liking of different genotypes of lettuce. *Food Chem.*, 197, 66–74.
- Channon, H. A., Baud, S. R., Kerr, M. G., and Walker, P. J. (2003). Effect of low voltage electrical stimulation of pig carcasses and ageing on sensory attributes of fresh pork. *Meat Sci.*, 65, 1315-1324.
- Clevenger, J. P., Van Houten, J., Blackwood, M., Rodríguez, G. R., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., et al. (2015). Network analyses reveal shifts in transcript profiles and metabolites that accompany the expression of SUN and an elongated tomato fruit. *Plant Physiol.*, 168, 1164–1178.
- Cozzolino, D., Flood, L., Bellon, J., Gishen, M., and De Barros Lopes, M. (2006). *Yeast*, 23, 1089-1096.
- Cui, H., Jia, H., Hayat, K., Yu, J., Deng, S., Karangwa, E. (2017). Controlled formation of flavor compounds by preparation and application of Maillard reaction intermediate (MRI) derived from xylose and phenylalanine. *RSC Adv.*, 7, 45442-45451.
- Elmore, J. S., Mottram, D. S., and Hierro, E. (2000). Two-fibre solid-phase

- microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *J. Chromatogr. A.*, 905, 233-240.
- D'Angelo, M., Zanor, M. I., Sance, M, Cortina, P. R., Boggio, S. B., Asprelli, P., et al. (2018). Contrasting metabolic profiles of tasty Andean varieties of tomato fruit in comparison with commercial ones. *J. Sci. Food Agric.*, 98, 4128-4134.
- Dettmer, K., Aronov, P.A., and Hammock, B.D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.*, 26, 51-78.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., and Wang L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.*, 3, 371-390.
- 独立行政法人家畜改良センター：食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル (2010), <http://www.nlbc.go.jp/research/nikushitsuhyoka/technical.html>
- 独立行政法人農畜産業振興機構：国内統計資料 (2019年1月10日現在), https://www.alic.go.jp/joho-c/joho05_000073.html.
- Dong, L., Hou, Y., Li, F., Piao, Y., Zhang, X., Zhang, X., et al. (2015). Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, 95, 915-921.
- Farag, M. A., El-ahmady, S. H., Elian, F. S., and Wessjohann, L. A. (2013). Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC–q-TOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, 95, 177–187.
- Filippo D'Antuono, L., Ferioli, F., and Manco, M. A. (2016). The impact of sesquiterpene lactones and phenolics on sensory attributes: An investigation of a curly endive and escarole germplasm collection. *Food Chem.*, 199, 238–245.
- Folta K., and Klee H. (2016). Sensory sacrifices when we mass-produce mass

- produce. *Hortic Res.*, 3, 16032
- Förster, J., Gombert, A. K., and Nielsen, J. (2002). A functional genomics approach using metabolomics and in silico pathway analysis. *Biotechnol Bioeng.*, 79, 703-712.
- 福崎 英一郎 (2013) メタボロミクスの先端技術と応用 (普及版). シーエムシー出版, 5-10
- Garcia, C. J., García-Villalba, R., Garrido, Y., Gil, M. I., and Tomás-Barberán, F. A. (2016). Untargeted metabolomics approach using UPLC-ESI-QTOF-MS to explore the metabolome of fresh-cut iceberg lettuce. *Metabolomics*, 12, 1–13.
- Gowda, G. A. N., and Djukovic, D. (2014). Overview of Mass spectrometry-based metabolomics: opportunities and challenges. *Methods Mol Biol.*, 1198, 3–12.
- Grebenstein, C., Choi, Y. H., Rong, J., de Jong, T. J., and Tamis, W. L. (2011). Metabolic fingerprinting reveals differences between shoots of wild and cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and suggests maternal inheritance or wild trait dominance in hybrids. *Phytochemistry*, 72, 1341-1347.
- Halpern, B. P. (2000). Glutamate and the flavor of foods. *J. Nutr.*, 130, 921–926.
- Harrigan, G. G., Culler, A. H., Culler, M., Breeze, M. L., Berman, K. H., Halls, S. C., et al. Investigation of biochemical diversity in a soybean lineage representing 35 years of breeding. *J Agric Food Chem.*, 61, 10807-10815.
- Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., and Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J. Food Sci.*, 73, 48–65.
- Hurtado, C., Parastar, H., Matamoros, V., Piña, B., Tauler, R., and Bayona, J. M. (2017). Linking the morphological and metabolomic response of *Lactuca sativa* L exposed to emerging contaminants using GC × GC-MS and chemometric tools. *Sci Rep.*, 7, 18–26.

- 池内 義秀, 吉岡 慶子, 鈴木 敦士. (2006). 食肉加工分野への高圧利用をめぐる最近の情勢. *高圧力の科学と技術*, 16, 17-25
- Iida, F., Miyazaki, Y., Tsuyuki, R., Kato, K., Egusa, A., Ogoshi, H., Nishimura, T. (2015). Changes in taste compounds, breaking properties, and sensory attributes during dry aging of beef from Japanese black cattle. *Meat Sci.*, 112, 46-51.
- 今村 美穂 (2012). 記述型の官能評価／製品開発における QDA 法の活用. *化学と生物*, 50, 11.
- 井上 良計, 林 雅弘, 恒吉 雅治, 工藤 寛 (2000). 豚内臓に含まれるアラキドン酸含有リン脂質. *日本油化学会誌*, 49, 723-726.
- 石塚 哉史 (2014). 農業法人における豚肉輸出の現状と課題に関する一考察. *農林業問題研究*, 193, 542-547.
- Jayasena, D. D., Ahn, D. U., Nam, K. C., and Jo, C. (2013). Factors affecting cooked chicken meat flavour: a review. *World's Poult Sci J.*, 69, 515-526.
- Jonsson, P., Johansson, A. I., Gullberg, J., Trygg, J., A, J., Grung, B., et al. (2005). High-throughput data analysis for detecting and identifying differences between samples in GC/MS-based metabolomic analyses. *Anal. Chem.*, 77, 5635-5642.
- Jonsson, P., Johansson, E. S., Wuolikainen, A., Lindberg, J., Schuppe-Koistinen, I., Kusano, M., et al. (2006). Predictive metabolite profiling applying hierarchical multivariate curve resolution to GC-MS data - A potential tool for multi-parametric diagnosis. *J. Proteome Res.*, 5, 1407-1414.
- 川井田 博 (1982). バークシャー種の肉質に関する研究. *日豚研誌*, 19, 58-61.
- Keska, P., and Stadnik, J. (2017). Taste-active peptides and amino acids of pork meat as components of dry-cured meat products: An in-silico study. *J Sens Stud.*, 32: e12301.
- Khairy, H. L., Saadoona, A. F., Zzamana, W., Yanga, T. A., Easaa, M. A. (2018).

- Identification of flavor compounds in rambutan seed fat and its mixture with cocoa butter determined by SPME-GCMS. *J King Saud Univ Sci.*, 30, 316-323.
- Khan, M. I., Jo, C., and Tariq, M. R. (2015). Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors--A systematic review. *Meat Sci.*, 110, 278-284.
- Kirchhoff, E., Schieberle, P. (2002). Quantitation of odor-active compounds in rye flour and rye sourdough using stable isotope dilution assays. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5378-5385.
- Kitazaki, K., Fukushima A., Nakabayashi, R., Okazaki, Y., Kobayashi, M., Mori, T., et al. (2018). Metabolic reprogramming in leaf lettuce grown under different light quality and intensity conditions using narrow-band LEDs. *Sci. Rep.*, 8, 7914.
- 小早川 達, 後藤 なおみ (2015). 食品の味わいと味覚・嗅覚. *日本調理科学会誌*, 48, 175-179.
- Kopka, J., Schauer, N., Krueger, S., Birkemeyer, C., Usadel, B., Bergmüller, E., et al. (2005). GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics.*, 21, 1635-1638.
- 公益財団法人日本食肉格付協会：豚枝肉取引規格 (2014), <http://www.jmga.or.jp/standard/pork/>
- 公益財団法人日本食肉消費センター：豚肉のチカラ (2011), http://www.jmi.or.jp/publication/publication_detail.php?id=205
- Kozai, T. (2013). Resource use efficiency of closed plant production system with artificial light: concept, estimation and application to plant factory. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 89, 447-61.
- Kurihara, K. (2009). Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). *Am. J. Clin. Nutr.*, 90, 1-3.

- Kusano, M., Baxter, I., Fukushima, A., Oikawa, A., Okazaki, Y., Nakabayashi, R., et al. (2014a). Assessing metabolomic and chemical diversity of a soybean lineage representing 35 years of breeding. *Metabolomics*, 261–270.
- Kusano, M., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Jonsson, P., Moritz, T., et al. (2007). Application of a metabolomic method combining one-dimensional and two-dimensional gas chromatography-time-of-flight/mass spectrometry to metabolic phenotyping of natural variants in rice. *J. Chromatogr. B*, 855, 71–79.
- Kusano, M., Jonsson, P., Fukushima, A., Gullberg, J., Sjöström, M., Trygg, J., et al. (2011a). Metabolite signature during short-day induced growth cessation in populus. *Front. Plant Sci.*, 2, 1–11.
- Kusano, M., Redestig, H., Hirai, T., Oikawa, A., and Matsuda, F. (2011b). Covering chemical diversity of genetically-modified tomatoes using metabolomics for objective substantial equivalence assessment. *PLoS ONE.*, 6, e16989.
- Kusano, M., Tohge, T., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Otsuki, H., et al. (2011c). Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of Arabidopsis to UV-B light. *Plant J.*, 67, 354–369.
- Kusano, M., Yang, Z., Okazaki, Y., Nakabayashi, R., Fukushima, A., and Saito, K. (2014b). Using metabolomic approaches to explore chemical diversity in rice. *Mol. Plant*, 8, 58–67.
- Lee, J., Jung, Y., Shin, J. H., Kim, H. K., Moon, B. C., Ryu, D. H., and Hwang, G. S. (2014). Secondary metabolite profiling of curcuma species grown at different locations using GC/TOF and UPLC/Q-TOF MS. *Molecules*, 19, 9535–9551.
- Li, L., Zhao, J., Zhao, Y., Lu, X., Zhou, Z., Zhao, C., et al. (2016). Comprehensive investigation of tobacco leaves during natural early senescence via

- multi-platform metabolomics analyses. *Sci Rep.*, 6, 2–11.
- Lin, K. H., Huang, M. Y., Huang, D. W., Hsu, W. H., Yang, Z. W., and Yang, C. M. (2013). The effects of red, blue, and white light-emitting diodes on the growth, development, and edible quality of hydroponically grown lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). *Sci Hortic (Amsterdam)*., 150, 86-91.
- Li, Q., and Kubota, C. (2009). Effects of supplemental light quality on growth and phytochemicals of baby leaf lettuce. *Environ. Exp Bot.*, 67, 59–64.
- Lopez-Sanchez, P., de Vos, R. C., Jonker, H. H., Mumm, R., Hall, R. D., Bialek, L., et al. (2014). Comprehensive metabolomics to evaluate the impact of industrial processing on the phytochemical composition of vegetable purees. *Food Chem.*, 168, 348-355.
- Ma, C., Dastmalchi, K., Flores, G., Wu, S. B., Pedraza-Peñalosa, P., Long, C., et al. (2013). Antioxidant and metabolite profiling of north american and neotropical blueberries using LC-TOF-MS and multivariate analyses. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 3548–3559.
- Mampholo, B. M., Maboko, M. M., Soundy, P., and Sivakumar, D. (2016). Phytochemicals and overall quality of leafy lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties grown in closed hydroponic system. *J. Food Qual.*, 39, 805–815.
- Manzocco, L., Foschia, M., Tomasi, N., Maifreni, M., Dalla Costa, L., Marino, M., et al. (2011). Influence of hydroponic and soil cultivation on quality and shelf life of ready-to-eat lamb's lettuce (*Valerianella locusta* L. *Laterr*). *J. Sci. Food Agric.*, 91, 1373–1380.
- McWatters, L. H., Chinnan, M. S., Walker, S. L., Doyle, M. P., and Lin, C. M. (2002). Consumer acceptance of fresh-cut iceberg lettuce treated with 2% hydrogen peroxide and mild heat. *J. Food Prot.*, 65, 1221–1226.

- Meinert, L., Andersen, L. T., Bredie, W. L., Bjerregaard, C., and Aaslyng, M. D. (2007). Chemical and sensory characterisation of pan-fried pork flavour: Interactions between raw meat quality, ageing and frying temperature. *Meat Sci.*, 75, 229-242.
- Miyagi, A., Uchimiya, H., and Kawai-Yamada, M. (2017). Synergistic effects of light quality, carbon dioxide and nutrients on metabolite compositions of head lettuce under artificial growth conditions mimicking a plant factory. *Food Chem.*, 218, 561–568.
- Miyauchi, S., Yonetani, T., Yuki, T., Tomio, A., Bamba, T., and Fukusaki, E. (2017). Quality evaluation of green tea leaf cultured under artificial light condition using gas chromatography/mass spectrometry. *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 197–202.
- Morris, W. L., Ross, H. A., Ducreux, L. J. M., Bradshaw, J. E., Bryan, G. J., and Taylor, M. A. (2007). Umami compounds are a determinant of the flavor of potato (*Solanum tuberosum L.*). *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9627–9633.
- Mottram, D. S. (1985). The effect of cooking conditions on the formation of volatile heterocyclic compounds in pork. *J. Sci. Food Agric.*, 36, 377-382.
- Muroya, S., Oe, M., Nakajima, I., Ojima, K., and Chikuni, K. (2014). CE-TOF MS-based metabolomic profiling revealed characteristic metabolic pathways in postmortem porcine fast and slow type muscles. *Meat Sci.*, 98, 726–735.
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., et al. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J.*, 77, 367–379.
- Nam, K. C., and Ahn, D. U. (2003). Double-packaging is effective in reducing lipid oxidation and off-odor volatiles of irradiated raw turkey meat. *Poult Sci.*, 82,

1468-1474.

日本食肉輸出入協会：輸入食肉の期限表示ガイドライン，<http://www.jm-ta.jp/info/>.

Nishimura, T. (1998). Mechanism involved in the improvement of meat taste during postmortem aging. *Food Sci Technol Int Tokyo.*, 4, 241-249.

西村 敏英 (2008). 食肉・食肉製品のもつ生体調節機能. *日本調理科学会誌*, 41, 221-226.

西村 敏英 (2001). 食品の呈味形成におけるペプチドの役割を探る. *化学と生物*, 39, 177-183.

Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A., and Kato, H. (1988). Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agric Biol Chem.*, 52, 2323-2330.

農林水産省：食肉の消費構成割合（平成28年次），<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/>.

Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., and Fukusaki, E. (2012). Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. *J Biosci. Bioeng.*, 113, 751-758.

Ohashi-Kaneko, K., Takese, M., Kon, N., Fujiwara, K., and Kurata, K. (2007). Effect of light quality on growth and vegetable quality in leaf lettuce, spinach and komatsuna. *Environ. Control Biol.*, 45, 189-198.

及川 彰，松田 史生，三枝 大輔 (2017). メタボロミクスの応用研究. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 65, 220-222.

Okazaki, K., Oka, N., Shinano, T., Osaki, M., and Takebe, M. (2008). Differences in the metabolite profiles of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaf in different

concentrations of nitrate in the culture solution. *Plant Cell Physiol.*, 49, 170–177.

沖谷 明紘 (1996). 肉の科学 (シリーズ「食品の科学」), 朝倉書店.

Onoda, Y., Schieving, F., and Anten, N.P. (2015). A novel method of measuring leaf epidermis and mesophyll stiffness shows the ubiquitous nature of the sandwich structure of leaf laminas in broad-leaved angiosperm species. *J. Exp. Bot.*, 66, 2487-2499.

Ouzounis, T., Razi Parjikolaei, B., Frette, X., Rosenqvist, E., and Ottosen, C.O. (2015). Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PSII and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa*. *Front. Plant Sci.*, 6, 1–14.

Palermo, M., Paradiso, R., Pascale, S., and Fogliano, V. (2012). Hydroponic cultivation improves the nutritional quality of soybean and its products. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9627–9633.

Pereira, S. I., Figueiredo, P. I., Barros, A. S., Dias, M. C., Santos, C., Duarte, I. F., et al. (2014). Changes in the metabolome of lettuce leaves due to exposure to mancozeb pesticide. *Food Chem.*, 154, 291–298.

Pongsuwan, W., Bamba, T., Harada, K., Yonetani, T., Kobayashi, A., and Fukusaki, E. (2008). High-throughput technique for comprehensive analysis of Japanese green tea quality assessment using ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/TOF MS). *J. Agric. Food Chem.*, 56, 10705-10708.

Ramakrishnan, V., and Luthria, D. L. (2017). Recent applications of NMR in food and dietary studies. *J. Sci. Food Agric.*, 97, 33-42.

Ramírez, M. R., Estévez, M., Morcuende, D., and Cava, R. (2004). Effect of the type

- of frying culinary fat on volatile compounds isolated in fried pork loin chops by using SPME-GC-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 7637-7643.
- Rayls J. (2004). Metabolomics an important emerging science. *Business Briefing : Pharma Tech 2004*.
- Redestig, H., Fukushima, A., Stenlund, H., Moritz, T., Arita, M., Saito, K., et al. (2009). Compensation for systematic cross-contribution improves normalization of mass spectrometry based metabolomics data. *Anal. Chem.*, 81, 7974–7980.
- Ren, H., Endo, H., and Hayashi, T. (2001). Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated green vegetables using water-soluble chitosan as a soil modifier and leaf surface spray. *J. Sci. Food Agric.*, 81, 1426–1432.
- Rochat, S., and Chaintreau, A. (2005). Carbonyl odorants contributing to the in-oven roast beef top note. *J Agric Food Chem.*, 53, 9578-9585.
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J. A., Hilal, M., et al. (2009). Soluble sugars-metabolism, sensing and abiotic stress a complex network in the life of plants. *Plant Signal Behav.*, 4, 388–393.
- Rouphael, Y., Colla, G., Battistelli, A., Moscatello, S., Rea, E., Proietti, S., and Saccardo, F. (2004). Yield, water requirement, nutrient uptake and fruit quality of zucchini squash grown in soil and closed soilless culture. *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, 79, 423-431.
- Samuoliene, G., Brazaityte, A., Sirtautas, R., Viršile, A., Sakalauskaite, J., Sakalauskiene, S., et al. (2013). LED illumination affects bioactive compounds in romaine baby leaf lettuce. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 3286–3291.
- Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M., and Toth-Markus, M. (2005). Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food*

Res. Int., 38, 1023–1029.

- 千国 幸一，佐々木 啓介，本山 三知代，中島 郁世，尾嶋 孝一，大江 美香，室谷 進. (2013) ブタ肉中のイノシン酸含量におよぼす筋肉型の影響. 日豚会誌, 50, 8-14.
- Seewald, M. J., Iaizzo, P. A., Heisswolf, E., and Eichinger, H. M. (1993). Effects of meat quality and storage on the breakdown of adenosine triphosphate in muscle from swine. *Meat Sci.*, 35, 47-61.
- Seo, M. W., Yang, D. S., Kays, S. J., Lee, G. P., and Park, K. W. (2009). Sesquiterpene lactones and bitterness in Korean leaf lettuce cultivars. *HortScience*, 44, 246-249.
- Shen, Q. W., Means, W. J., Thompson, S. A., Underwood, K. R., Zhu, M. J., McCormick, R. J., et al. (2006). Pre-slaughter transport, AMP-activated protein kinase, glycolysis, and quality of pork loin. *Meat Sci.*, 74, 388-395.
- Son, K. H., and Oh, M. M. (2013). Leaf shape, growth, and antioxidant phenolic compounds of two lettuce cultivars grown under various combinations of blue and red light-emitting diodes. *HortScience*, 48, 988–995.
- Song, S., Zhang, X., Hayat, K., Liu, P., Jia, C., Xia, S., et al. (2011). Formation of the beef flavour precursors and their correlation with chemical parameters during the controlled thermal oxidation of tallow. *Food Chem.*, 124, 203-209.
- Stutte, G. W., Edney, S., and Skerritt, T. (2009). Photoregulation of bioprotectant content of red leaf lettuce with light-emitting diodes. *HortScience*, 44, 79–82.
- Straadt, I. K., Aaslyng, M. D., and Bertram H. C. (2014). An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. *Meat Sci.*, 96, 719-728.
- Sugimoto, M., Goto, H., Otomo, K., Ito, M., Onuma, H., Suzuki, A., et al. (2010).

- Metabolomic profiles and sensory attributes of edamame under various storage duration and temperature conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 8418–8425.
- Sugimoto, M., Kaneko, M., Onuma, H., Sakaguchi, Y., Mori, M., Abe, S., et al. (2012). Changes in the charged metabolite and sugar profiles of pasteurized and unpasteurized Japanese sake with storage. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 2586–2593.
- Sulpice, R., Pyl, E., Ishihara, H., Trenkamp, S., Steinfath, M., Witucka-wall, H., et al. (2009). Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 10348–10353.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger R., Daykin C. A., et al. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, 3, 211-221.
- Sunesen, L. O., Dorigoni, V., Zanardi, E., and Stahnke, L. (2001). Volatile compounds released during ripening in Italian dried sausage. *Meat Sci.*, 58, 93-97.
- Sung, J., Lee, S., Lee, Y., Ha, S., Song, B., Kim, T., et al. (2015). Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition. *Plant Sci.*, 241, 55–64.
- Tamoi, M., Ishida, K., Eguchi, M., Harada, K., Kijihana, I., and Shigeoka, S. (2017). Growth and photosynthetic characteristics of arabidopsis and tobacco plants grown under LED lights “PLANT FLEC” (in Japanese with English summary). *J.SHITA*, 29, 96–103.
- Tokimasa, M., and Nishiura, Y. (2015). Automation in plant factory with labor-saving conveyance system. *Environ. Control Biol.*, 53, 101–105.
- Toko K. (2014) Kansei biosensors to reproduce gustatory and olfactory senses.

- Yakugaku zasshi*, 134, 307-312.
- Toldra, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Sci.*, 49, 101-110.
- Touliatos, D., Dodd, I. C., and Mcainsh, M. (2016). Vertical farming increases lettuce yield per unit area compared to conventional horizontal hydroponics. *Food Energy Secur.*, 5, 184–191.
- Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., et al. (2015). MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.*, 12, 523-526.
- Van Lancker, F., Adams, A., De Kimpe, N. (2010). Formation of pyrazines in Maillard model systems of lysine-containing dipeptides. *J Agric Food Chem.*, 58, 2470-2478.
- Vasta, V., Luciano, G., Dimauro, C., Röhrle, F., Priolo, A., and Monahan, F. J. (2011). The volatile profile of longissimus dorsi muscle of heifers fed pasture, pasture silage or cereal concentrate: implication for dietary discrimination. *Meat Sci.*, 87, 282-289.
- Vasta, V., Ratel, J., Engel, E. (2007). Mass spectrometry analysis of volatile compounds in raw meat for the authentication of the feeding background of farm animals. *J Agric Food Chem.*, 55, 4630-4639.
- Viant, M. R., Kurland, I. J., Jones, M. R., and Dunn, W. B. (2017). How close are we to complete annotation of metabolomes? *Curr Opin Chem Biol.*, 36, 64-69.
- Wang, L., Xu, B., Li, L., Zhang, M., Feng, T., Wang, J., et al. (2016). Enhancement of umami taste of hydrolyzed protein from wheat gluten by β -cyclodextrin. *J. Sci. Food Agric.*, 96, 4499–4504.
- Watanabe, A., Kamada, G., Imanari, M., Shiba, N., Yonai, M., and Muramoto, T.

- (2015). Effect of aging on volatile compounds in cooked beef. *Meat Sci.*, 107, 12-19.
- Watanabe, A., Tsuneishi, E., and Takimoto, Y., (1989). Analysis of ATP and its breakdown products in beef. *J Food Sci.*, 54, 1169-1172.
- Welzenbach, J., Neuhoff, C., Looft, C., Schellander, K., Tholen, E., and Große-Brinkhaus, E. (2016). Different statistical approaches to investigate porcine muscle metabolome profiles to highlight new biomarkers for pork quality assessment. *PLoS One.*, 11(2): e0149758.
- Wu, X., and Prior, R. L. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3101–3113.
- Xie, G. X., Ni, Y., Su, M. M., Zhang, Y. Y., Zhao, A. H., Gao, X. F., et al. (2008). Application of ultra-performance LC-TOF MS metabolite profiling techniques to the analysis of medicinal Panax herbs. *Metabolomics*, 4, 248–260.
- Xie, J., Sun, B., Zheng, F., and Wang, S. (2008). Volatile flavor constituents in roasted pork of Mini-pig. *Food Chem.*, 109, 506-514.
- Yamamoto, S., Shiga, K., Kodama, Y., Imamura, M., Uchida, R., Obata, A., et al. (2014) Analysis of the correlation between dipeptides and taste differences among soy sauces by using metabolomics-based component profiling. *J Biosci Bioeng.*, 118, 56-63.
- Yamamoto, A., Katayama, M., Tsuyuki, R., and Iida, F. (2016). Consideration of rupture properties for determining the actual texture of pork. *Japanese Journal of Sensory Evaluation*, 20, 30-37.
- Ya-Qin, W., Li-Ping, H., Guang-Min, L., De-Shuang, Z., and Hong-Ju, H. (2017).

- Evaluation of the nutritional quality of chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) using UHPLC-quadrupole-orbitrap MS/MS-based metabolomics. *Molecules*, 22, 1262.
- Zeng, W., Hazebroek, J., Beatty, M., Hayes, K., Ponte, C., Maxwell, C., et al. (2014). Analytical method evaluation and discovery of variation within maize varieties in the context of food safety: transcript profiling and metabolomics. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 2997–3009.
- 全国官報販売協同組合：銘柄豚肉ハンドブック 2018.
- Zhang, Q., Shi, Y., Ma, L., Yi, X., and Ruan, J. (2014). Metabolomic analysis using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) uncovers the effects of light intensity and temperature under shading treatments on the metabolites in tea. *PLoS ONE.*, 9.
- Zhao, L., Ortiz, C., Adeleye, A. S., Hu, Q., Zhou, H., Huang, Y., et al. (2016). Metabolomics to detect response of lettuce (*Lactuca sativa*) to Cu(OH)₂ nanopesticides: Oxidative stress response and detoxification mechanisms. *Environ. Sci. Technol.*, 50, 9697–9707.
- Zhao, Y., Wuc, X., Yub, L., and Chena P. (2017). Retention of polyphenols in blueberries (*Vaccinium corymbosum*) after different cooking methods, using UHPLC–DAD–MS based metabolomics. *J. Food Compost. Anal.*, 56, 55-66.
- Zhu, G., Wang, S., Huang, Z., Zhang, S., Liao, Q., Zhang, C., et al. (2018). Rewiring of the fruit metabolome in tomato breeding. *Cell*, 172, 249-261.