報 文

飲料香気成分のフレーバーリリース特性評価法の開発

糸部尊郁, 樋口可南子, 松田知子, 熊沢賢二*

小川香料株式会社

Development of a New Approach to Estimate the In-mouth Release Characteristics of Odorants in Drinks

Takafumi Itobe, Kanako Higuchi, Tomoko Matsuda and Kenji Kumazawa*

Ogawa & Co., Ltd., 15-7 Chidori Urayasushi, Chiba 279-0032

To easily evaluate the in-mouth release characteristics of beverage odorants from the viewpoint of release rate, the quantitative value ratio (dividing the quantitative value for 10 breaths by that for the first breath) was calculated using the Retronasal Flavor Impression Screening System (R-FISS) for odorants contained in retronasal aroma after drinking. It was expected that this ratio would be large for odorants released slowly and small for odorants released rapidly. The quantitative value ratio for odorants contained in the retronasal aroma when drinking a coffee beverage calculated by the R-FISS had a unique value for each odorant. Odorants with a small quantitative value ratio (sulfur-containing compounds with a roasty note) may be released in a short time, while odorants with a large quantitative value ratio (pyrazines with a nutty note, phenols with a smoky note) may be continuously released over a long period of time. Therefore, as a result of examining the relationship between the quantitative value ratio in the R-FISS and the time change of the retronasal aroma by real-time measurement, it was found that the concentration of odorants with a small quantitative value ratio decreased quickly after drinking and odorants with a large quantitative value ratio tended to maintain a constant concentration for a long time after drinking. Furthermore, a sensory evaluation by the Temporal Dominance of Sensations (TDS) method indicated that the retronasal aroma felt after drinking changed from a roasty note to a nutty, smoky note over time. These findings indicate that the quantitative ratio in the R-FISS can be applied to estimate the in-mouth release characteristics (release rate) for each odorant in beverages.

(Received Apr. 2, 2020; Accepted Jun. 5, 2020)

Keywords : Drink, Odorant, Flavor release, Retronasal aroma, Coffee

キーワード : 飲料, 香気成分, フレーバーリリース, レトロネーザルアロマ, コーヒー

飲食中に感じる香気は、口腔内で揮発した飲食品の香気成分がのどを通して鼻腔へ到達することにより感じられる。このような香気はレトロネーザルアロマと呼ばれ、その組成や成分量が飲食品の風味に大きく影響することが知られている¹⁾²⁾。これまでに我々は、多くの種類の香気成分が低濃度で含まれる実際の飲食品への応用に重点をおいたレトロネーザルアロマ測定法として、Retronasal Flavor Impression Screening System (R-FISS)を開発し、様々な飲食品への適用を進めてきた^{3)~6)}。この測定法は、飲食中に鼻より排出された香気成分を吸着管に捕集し、さらに、加熱脱着装置を用いて希釈することなく GC-MS へ導入するというものである。この測定法は、人が飲食中に感じている微量で複雑な組成の香気成分量を一度に把握できるという利点があり、実用性の高いレトロネーザルアロマの測定法である。

飲料の香気には、嗜好性の高い香調に加えて、飲用直後に速やかに広がる初発性や余韻（好ましい香りの持続性）が求められる。そのため、飲用時におけるレトロネーザルアロマに含まれる香気成分の発現速度（フレーバーリリース特性）を把握することは、風味に優れた飲料製品の開発にとって重要である。Linthorpe ら⁷⁾は、飲料に含まれる香気成分のレトロネーザルアロマにおけるフレーバーリリース特性が香気成分の種類によって異なり、その予測が可能であることを報告している。しかし、彼らの提案した予測式は複雑なうえに、香気成分の蒸気圧や分配係数などの物性値が必要なため、飲料に含まれる多数の香気成分について、初発性や持続性といったフレーバーリリース特性を簡便に評価することは依然として困難である。これまでに我々は、チューイングガムに含まれる香気成分について、R-FISS による簡便なフレーバーリリース特性評価法を開

発し、その予測への可能性も含めて報告している³⁾。しかし、口腔内に長時間留まるチューイングガムと異なり、瞬時に嚥下される飲料に対して、この方法を適用できるか否かは不明である。

そこで、本研究では、レトロネーザルアロマに含まれる香気成分のリリース速度に着目し、R-FISS による飲料香気成分のフレーバーリリース特性評価法を検討した。

実験方法

1. 実験材料

(1) コーヒー飲料の調製

焙煎コーヒー豆（アラビカ種、L 値 18 および 20、ユニカフェ製）50 g から、約 500 mL の熱水（約 90℃、蒸留水）でペーパードリップ法にて抽出して得たコーヒー抽出液は、氷水で冷却後に、イオン交換水と炭酸水素ナトリウムにて Bx.1.5, pH5.6 に調整し、コーヒー飲料とした。

(2) モデル飲料の調製

グラニュー糖を 8% 含むイオン交換水に香気成分（2-methylpyrazine, あるいは furfuryl acetate）を 50 ppm になるように添加し、モデル飲料とした。

2. Retronasal Flavor Impression Screening System (R-FISS)

コーヒー飲料（L 値 20 の焙煎コーヒー豆を使用）を飲用後のレトロネーザルアロマに含まれる香気成分（1 呼吸、1~10 呼吸の積算）を R-FISS にて定量し、その定量値から各香気成分の定量値比（10 呼吸分の定量値/1 呼吸目の定量値）を算出した。装置および条件は以下の通りである。

(1) レトロネーザルアロマに含まれる香気成分の捕集

コーヒー飲料（約 30 mL, 室温程度）を口に含んだ後、1~2 秒保持してから全量を一口で飲み込んだ。その後、1 呼吸目のみ、あるいは 1 呼吸目から 10 呼吸目までの 10 呼吸分の鼻から排出された香気成分は、Tenax TA（100 mg, 80/100 mesh）を充填したガラス製吸着管（280℃で 2 時間加熱後に使用）に捕集した（吸着管先端にシリコンチューブでポンプと接続し、約 1 L/min の流量で吸引しながら捕集）。次いで、吸着管に内部標準物質（25 ng の 2-octanol を含むエタノール溶液）を添加後、約 100 mL/min の乾燥窒素にて水分とエタノールを 30 分間除去した。被験者は 5 人とし、各被験者について 4 回繰り返して捕集した。

(2) 加熱脱着導入を用いた GC-MS 測定

吸着管に捕集した香気成分の GC への導入は、ゲステル社製 TDU と CIS-4 注入口を組み合わせて使用した。TDU /CIS-4 システム（TDU：20℃, CIS-4：-150℃）に吸着管を挿入後、TDU を急速に 280℃まで昇温して 3 分間保持した。次いで、CIS-4 を急速に 260℃まで昇温し、スプリットレスモードにて香気成分の全量を GC へ導入し、以下の条件で測定した。

装置：Agilent 社製 GC-MS（6890 N & 5975B）、カラム：

DB-WAX（30 m×0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm, Agilent 社製）、キャリアーガス：ヘリウム（流速 1.0 mL/min., 平均線速度 26.1 cm/sec.）、オープン温度：30℃~120℃（3℃/min.）~230℃（5℃/min.）、イオン化電圧：70 eV（EI）、イオン源温度：150℃。

(3) 香気寄与成分の同定および定量

香気成分は GC-MS における Kovats の保持指標（RI）、およびマススペクトルを標準物質のそれらと比較することにより同定し、2-octanol を内部標準物質とする内部標準法にて定量した。

3. イオン分子反応質量分析計によるリアルタイム測定

モデル飲料を飲用後に鼻から排出される香気成分（2-methylpyrazine, furfuryl acetate）をイオン分子反応質量分析計に直接導入することで、レトロネーザルアロマに含まれる香気成分の経時変化をリアルタイム測定した。被験者は 4 人とし、モデル飲料（30 mL, 室温）を口に含んだ後、1~2 秒保持してから全量を一口で飲み込むように指示した。測定時間は、被験者がモデル飲料を飲み込んだ直後から 60 秒間（データ取得は 2 秒間隔）とした。各香気成分の経時変化は、測定時間ごとのイオン強度を最大イオン強度で標準化した数値を算出し、測定時間に対して図示した。測定に使用した装置および条件は、以下の通りである。

装置：V&F Analyse-und Messtechnik 社製 IMR-MS（Airsense）、イオン化電圧：10.44 eV（水銀）、測定イオン：2-methylpyrazine（m/z=94）、furfuryl acetate（m/z=98）。

4. Temporal Dominance of Sensations（TDS）法によるコーヒーの官能評価

コーヒー飲料（L 値 18 の焙煎コーヒー豆を使用）風味の飲用後の経時変化は、TDS 法（Biosystemes 社製ソフトウェア FIZZ 使用）にて評価および解析した。評価は、5 種類の表現用語（ロースティー、ナッティー、スモーキー、グリーン、ハニー）に対して、十分にトレーニングした 15 名の評価者（香料開発に従事する社員：男性 10 名、女性 5 名）が、3 回繰り返して実施した。評価は、コーヒー飲料（30 mL, 室温程度）を飲み込んだ直後から 60 秒間について、最も印象的に感じた表現用語を連続的に評価者に選択させた。評価終了後、単位時間ごとに各表現用語を選択した評価者の割合（Dominance rate）を算出し、TDS カーブを得た。

実験結果および考察

飲料に含まれる香気成分のフレーバーリリース特性を初発性や持続性といった発現速度の視点で簡便に評価する方法として、R-FISS で得られるレトロネーザルアロマに含まれる香気成分の定量値を 10 呼吸分と最初の 1 呼吸目の比で表すことを考えた。例えば、1 から 10 呼吸目までの 10 呼吸分の定量値を最初の 1 呼吸目の定量値で除して得られる定量値比は、香気成分のリリース速度を示すことが

予想される。すなわち、緩やかにリリースされる持続性の香気成分は定量値比が大きくなるのに対して、短時間でリリースされる初発性の香気成分は定量値比が小さくなることを想定した。

まず、コーヒー飲料を題材として、主要な香気成分について、この分析法の再現性を 5 名の被験者によって調べた (Table 1)。個々の被験者ごとの場合、1 呼吸目と 1 から 10 呼吸目までの 10 呼吸分の各成分の定量値は、多くが 20 % 以内の RSD (%) となり、比較的良好な再現性を示した。しかし、5 名の被験者間の定量値の平均に再現性は認められなかった。一方、10 呼吸分の定量値を 1 呼吸目の定量値で除して得た比の RSD (%) は、5 名の被験者間の定量値のそれよりも大部分の成分が減少した。すなわち、飲用時のレトロネーザルアロマに含まれる香気成分量は個人差があるものの、飲料に含まれる香気成分の発現速度 (フレーバーリリース特性) は個人差が比較的小さい事がわかった。この結果は、R-FISS で得られる定量値比を比較することで、口腔における飲料香気成分のフレーバーリリース特性を評価できる可能性を示している。

次いで、R-FISS で得られる定量値比が、飲料に含まれる香気成分のフレーバーリリース特性の評価に適用できるか

否かを検討するために、コーヒー飲料の主要な香気成分について R-FISS による定量値比を算出した。その結果、R-FISS で得られた定量値比は香気成分ごとに大きく異なり、1.9 (1-methylpyrrole) から 9.2 (2,6-dimethylpyrazine) の幅広い範囲に分布することが明らかになった (Fig. 1)。当初の想定に従えば、この定量値比の大小は、口腔における飲料香気成分の発現速度に相当すると考えられ、例えば、定量値比の小さい furfuryl acetate は初発性、定量値比の大きい 2-methylpyrazine は持続性を有する香気成分と予想される。そこで、この 2 成分について、飲用時におけるレトロネーザルアロマの経時変化をイオン分子反応質量分析計にてリアルタイム測定し、上記の想定が正しいか否かを確認した。その結果、定量値比の小さい furfuryl acetate はレトロネーザルアロマに含まれる量が飲用直後に最大値を示し、その後速やかに減少したのに対して、定量値比の大きい 2-methylpyrazine はレトロネーザルアロマに含まれる成分量が長時間に亘って一定量が維持される傾向を認めた (Fig. 2)。つまり、furfuryl acetate と 2-methylpyrazine は、各々初発性と持続性を有する香気成分であり、R-FISS における各香気成分の定量値比の大小は、飲料に含まれる香気成分のフレーバーリリース特性と一致することがわ

Table 1 Comparison of the RSDs (%) of the quantitative values and quantitative value ratios of the major exhaled odorants in the coffee brew

No.	Compound	RSD (%) ^a				
		Amount ^b				Quantitative Value Ratio ^c
		Same Panel list ^d		Between Different Panelists		Between Different Panelists
		1 breath	1-10 breaths	1 breath	1-10 breaths	(1-10 breaths/1 breath)
1	2,3-pentanedione	18	14	63	63	31
2	1-methylpyrrole	24	15	76	60	61
3	furfuryl methyl ether	19	11	84	82	23
4	2-methyltetrahydrofuran-3-one	14	9	25	39	22
5	2-methylpyrazine	16	9	22	36	22
6	2,5-dimethylpyrazine	17	9	24	37	22
7	2,6-dimethylpyrazine	16	9	24	36	22
8	2-ethylpyrazine	15	9	30	45	21
9	2-ethyl-6-methylpyrazine	16	9	29	45	22
10	2-ethyl-5-methylpyrazine	17	9	29	44	22
11	acetox-2-propanone	20	13	19	40	32
12	furfuryl methyl sulfide	23	12	81	82	18
13	furfuryl acetate	17	13	43	47	24
14	5-methylfurfural	13	16	25	44	6
15	furfuryl pyrrole	16	10	56	72	20
16	2-methoxyphenol	38	15	47	40	17
17	2-methoxy-4-vinylphenol	27	17	32	45	41

^aEach RSD (%) was calculated based on the value from five panelists.

^bQuantitative value was the mean value of quadruplicate results.

^cQuantitative value ratio of each odorant was calculated by dividing the quantitative value for 10 breaths by that for the first breath (1-10 breaths/1 breath).

^dRSD (%) was the mean value obtained from five panelists.

Fig. 1 Average quantitative value ratios, which were calculated by comparing the quantitative value for 10 breaths by that for the first breath (1-10 breaths/1 breath) of the exhaled odorants in a coffee brew

Each average was the mean value of quadruple results from five panelists.

かった。

更に、R-FISS で得られた各香気成分の定量値比と香調との関係に着目すると、定量値比の小さい成分には 2-furfurylthiol (レトロネーザルアロマとして鼻から排出される 2-furfurylthiol の大部分は furfuryl methyl sulfide に変換されて検出⁴⁾) などフラン環を有するロースティーな香調の成分が多いのに対して、定量値比の大きい成分はナッティーな香調のピラジン類やスモーキーな香調のフェノール類の成分が多いことがわかった。そのため、人がコーヒー飲料を飲用している時に感じる風味は、まず飲用直後にロースティーを感じ、時間の経過とともにナッティーやスモーキーに変化することが R-FISS で得られた各香気成分の定量値比から予想される。そこで、コーヒー飲料飲用時の経時的な香味変化を TDS 法にて官能評価した結果 (Fig. 3)、飲用時に人が感じるコーヒー飲料の風味は、まずロースティーな風味を飲用直後に最も印象的に感じ、時間の経過とともに、ナッティー、スモーキーな風味の印象が高まるという変化が観測され、R-FISS で得られた各香気成分の定量値比から予測された風味変化と矛盾しないことがわかった。

このように、コーヒー飲料飲用時におけるレトロネーザルアロマのイオン分子反応質量分析計によるリアルタイム

測定と TDS 法による官能評価を用いた検証結果は、R-FISS により得られる定量値比を比較することで、飲料に含まれる多数の香気成分のフレーバーリリース特性をより簡便に評価できることを示している。

飲料香気成分のフレーバーリリース特性にとって、香気成分ごとに異なる蒸気圧 (沸点) や分配係数が重要な要因となりうることが指摘されている⁷⁾。一方、チューイングガムに含まれる香気成分を題材とした既報³⁾にて、香気成分の蒸気圧 (沸点) や分配係数 (極性) と密接に関わる無極性や極性の GC カラムにおける保持指標と ΔI (ΔI は極性カラムと無極性カラムにおける保持指標の差であり、各香気成分の極性に相当する) が、香気成分のフレーバーリリース特性の予測に有効であることを示した。しかし、コーヒー飲料を題材とした今回の結果では、R-FISS で得られた各香気成分の定量値比とそれらの GC カラムにおける保持指標や ΔI の間に相関は認められず、コーヒー飲料香気成分のフレーバーリリース特性を予測することは困難であった。これは、コーヒー飲料に含まれる主要な香気成分の構造や官能基の多様性が比較的小さいことに起因する可能性に加えて、飲料のフレーバーリリース特性には蒸気圧 (沸点) や分配係数以外の要因が関与する可能性も考えられる。今後、さらに多様な香気成分について、本評価法に

Fig. 2 Comparison of four panelist results of the time change in the retronasal aroma by a real-time measurement

Fig. 3 The sensory evaluation of the change in the retronasal aroma felt after drinking the coffee brew by the Temporal Dominance of Sensations (TDS) method

The level of significance (5%) on the dominance rate was 29.8.

よる定量値比を算出することで、飲料のフレーバーリリース特性の予測も可能になると考えられる。

要 約

R-FISS にて算出したコーヒー飲料飲用時のレトロネーザルアロマに含まれる香気成分の定量値比は、各香気成分が特有の値を示した。この定量値比は、10呼吸分の定量値

を最初の1呼吸目の定量値で除した値であることから、その大小は香気成分の発現速度（フレーバーリリース特性）を示すことが予想される。そこで、R-FISS における定量値比の大小と、レトロネーザルアロマの時間変化の関係をリアルタイム測定にて調べた結果、定量値比の小さい成分は飲用後速やかに減少し、定量値の大きい成分は飲用後長時間に亘って一定量が維持される傾向を認めた。さらに、

TDS 法による官能評価結果も、R-FISS で得られた各香気成分の定量値比から予測された風味変化と矛盾しないことがわかった。これらの結果は、F-FISS により得られる定量値比が、飲料における香気成分ごとのフレーバーリリース特性の評価に適用できることを示している。

文 献

- 1) Taylor, A.J. and Linforth, R.S.T. (1997). Relationship between sensory time-intensity measurements and in-nose concentration of volatiles, In "Flavours and Fragrances," ed. by K.A. D. Swift, Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 171-182.
- 2) Taylor, A.J. (1996). Volatile flavor release from foods during eating. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **36**, 765-784.
- 3) Kumazawa, K., Itobe, T., Nishimura, O., and Hamaguchi, T. (2008). A new approach to estimate the in-mouth release characteristics of odorants in chewing gum. *Food Sci. Technol. Res.*, **14** (3), 269-276.
- 4) Itobe, T., Kumazawa, K., and Nishimura, O. (2009). New factor characterizing the in-mouth release of odorants (Volatile Thiols): Compositional changes in odorants exhaled from the human nose during drinking. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 11297-11301.
- 5) Itobe, T., Nishimura, O., and Kumazawa, K. (2015). Influence of milk on aroma release and aroma perception during consumption of coffee beverages. *Food Sci. Technol. Res.*, **21** (4), 607-614.
- 6) Itobe, T. and Kumazawa, K. (2017). Taste-aroma interactions in lemon-flavored model beverages: Influence of sweeteners on aroma perception and in vivo aroma release. *Food Sci. Technol. Res.*, **23** (1), 51-56.
- 7) Linforth, R. and Taylor, A.J. (2000). Persistence of volatile compounds in the breath after their consumption in aqueous solutions. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5419-5423.

(令和2年4月2日受付, 令和2年6月5日受理)