

博 士 論 文

グルタミン酸ナトリウムの
由来判別に関する研究

平成 31 年 2 月

小林 和浩

目次

主要略記一覧	1
第1章 序論	
1. グルタミン酸及びグルタミン酸ナトリウム	3
2. 安定同位体	5-8
1) 安定同位体比	
2) 炭素同位体	
3) 窒素同位体	
4) 酸素・水素同位体	
5) 同位体分別	
3. 本研究の目的	9-10
第2章 炭素安定同位体比測定のための食材中グルタミン酸の単離法の検討	
1. 序	12-13
2. 材料及び方法	14-17
1) 試料	
2) 試薬等	
3) $\delta^{13}\text{C}$ 測定のためのグルタミン酸抽出	
4) 分取 HPLC によるグルタミン酸の単離	
5) EA/IRMS 測定	
6) 安定同位体比分析	

3. 結果	18-19
1) 同位体分別の確認	
2) 実試料を用いた分析法の評価	
4. 小括	20-21
5. 図表	22-24

第3章 炭素及び窒素安定同位体比に基づく調味料グルタミン酸ナトリウム 及び食材中グルタミン酸の判別

1. 序	26
2. 材料及び方法	27-33
1) 試料	
2) 試薬等	
3) グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 分析	
4) グルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ 分析	
5) 安定同位体比分析	
6) 正準判別分析	
3. 結果	34-36
1) 食材中グルタミン酸及び調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$	
2) 食材中のグルタミン酸と調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ を用いた正準判別 分析	
4. 小括	37-38
5. 図表	39-44

第4章	グルタミン酸判別法の加工食品への応用	
1.	序	46
2.	材料及び方法	47-53
1)	試料	
2)	試薬等	
3)	グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 分析	
4)	グルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ 分析	
5)	安定同位体比分析	
6)	判別分析	
3.	結果	54-58
1)	加工食品の前処理における同位体分別の確認	
2)	判別分析法の加工食品への適用	
3)	調味料グループ及び食材グループ間の判別分析による MSG 使用の有無の判定	
4.	小括	59-61
5.	図表	62-68
第5章	総合討論（総括と今後の展望）	
1.	総括	70-73
2.	今後の展望	74-75
	引用文献	76-81
	謝辞	82

主要略記一覧

本論文に用いた略語を以下に示す。

$\delta^{13}\text{C}$: carbon stable isotope ratio (炭素安定同位体比)

δD : hydrogen stable isotope ratio (水素安定同位体比)

$\delta^{15}\text{N}$: nitrogen stable isotope ratio (窒素安定同位体比)

$\delta^{18}\text{O}$: oxygen stable isotope ratio (酸素安定同位体比)

EA: elemental analyzer (元素分析計)

GC: gas chromatograph (ガスクロマトグラフ)

HAP: hydrolyzed animal protein (動物タンパク加水分解物)

HVP: hydrolyzed vegetable protein (植物タンパク加水分解物)

HPLC: high performance liquid chromatograph (高速液体クロマトグラフ)

IRMS: isotope-ratio mass spectrometry (同位体比質量分析計)

MSG: monosodium glutamate (グルタミン酸ナトリウム)

PVDB: Vienna PeeDee Belemnite (PeeDee 層のヤイシ類化石)

SD: standard deviation (標準偏差)

UV: ultraviolet (紫外線)

第 1 章

序論

はじめに

1. グルタミン酸及びグルタミン酸ナトリウム

生物のアミノ酸代謝において、グルタミン酸は重要な役割を果たしている (Forde & Lea, 2007)。グルタミン酸はグルタミン酸合成酵素により、グルタミンと 2-オキシグルタル酸から生成し、グルタミン酸の α -アミノ基は、アミノトランスフェラーゼの作用によって他のアミノ酸に転移する。また、グルタミン酸の炭素骨格は、 γ -アミノ酪酸、アルギニン、プロリンの合成の基礎となり、グルタミン酸デヒドロゲナーゼによって脱アミノ化されてアンモニア及び 2-オキシグルタル酸を形成する。このような理由のため、グルタミン酸は食物源に多く存在し、特に昆布、チーズ、シイタケ、トマト、魚介類などに比較的多く含まれる。

1907 年に、池田菊苗が、ヒトの味覚には「酸味・甘味・塩味・苦味」の 4 つに加えて「旨味」が存在すると提唱し、その後、昆布に由来する「旨味」の主成分が「グルタミン酸」であることを発見した。グルタミン酸そのものは酸味も持ち併せているため、そのナトリウム塩であるグルタミン酸ナトリウム (Monosodium Glutamate; MSG) が調味料として利用されるようになり、日本では、味の素などがよく知られている。MSG は、歴史的な経緯から長らく化学調味料と称されていたが、現在では旨味調味料と呼ばれ、家庭で広く常用される調味料の一つとして、あるいは加工食品の製造に欠かせないものとなっている。

MSG は、当初小麦などのグルテンを加水分解することによって生産していたが、グルタミン酸生産菌 (*Corynebacterium glutamicum*) が発見され、これに廃糖蜜 (サトウキビなどから砂糖を搾り取った残滓) などをエネルギー源として与え発酵させてグルタミン酸を産生する手法が主流となっている。発酵過程でビオ

チン制限を阻害するなどの、グルタミン酸生産菌のグルタミン酸生産を活性化
する添加剤や、窒素源（硫酸アンモニウム、抗生物質、界面活性剤など）、発泡
を調整する薬剤、添加剤が加えられる。生成したグルタミン酸を酸性下で晶析に
よって回収した後、精製、水酸化ナトリウムによる中和、脱色などの工程を経て、
結晶として MSG が得られる。

現在、MSG は、世界各国で製造されているが、原材料となる糖は、世界各国、
各地域でとれるさまざまな農産物を使用している。アジアではサトウキビ、キャ
ッサバが多く、米国ではトウモロコシ、南米ではサトウキビが主流となっている
ほか、一部の地域では甜菜、小麦なども使われている。（Kinoshita *et al.*, 1957;
Kumagai, 2006）

1968 年、アメリカで中華料理店症候群（CRS; Chinese Restaurant Syndrome）と
呼ばれる症状の原因が、大量に使用された MSG にあるとされ、これ以降 MSG
の安全性を巡る論争がはじまった。その後の研究から 1987 年には FAO/WHO 合
同食品添加物専門家会議（JECFA; Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Ad-
ditives）が安全であると認め、EU やアメリカ食品医薬品局（FDA）なども同様
の結論を出した。しかしながら、依然として根強い MSG の安全性への不安は大
きく、近年の天然志向の風潮もあり、工業的に製造された調味料としての MSG
摂取をできるだけ避けたいという消費者は多く存在する。

そのため、特にアメリカなどでは“**No MSG**”や“**MSG free**”などと表示された加
工食品が数多く流通しており、消費者の需要・関心を集めている。

しかしながら、前述の通り、多くの食材にはアミノ酸としてのグルタミン酸が
含まれている。これまで、消費者が口にする食品に含まれるグルタミン酸が「食
材に元々含まれるグルタミン酸」と「旨味調味料として添加されている MSG」

のどちらに由来するかを客観的に判別することは困難であると考えられていた。

(“Questions and Answers on Monosodium glutamate (MSG)”, FDA)

*本研究は、あくまで食品のトレーサビリティー（追跡可能性）の観点から、MSGの由来を判別するための研究であり、その安全性に関し論ずるものではない。

2. 安定同位体

元素の性質を決める「陽子」の数は同じであるが、「中性子」の数が異なるため、同じ性質を有する原子でありながら、質量が異なる原子が存在し、これを「同位体」という。

この同位体には、不安定で時間が経つと放射能を発生して、中性子を放ち、原子番号が変わっていく「放射性同位体」と、安定して存在する「安定同位体」の2種類が存在する。例えば窒素を例にすると大気中の窒素の中で、 ^{14}N は、99.635%を占め、 ^{14}N より中性子が1つ多く、重い ^{15}N は、0.365%存在する。

安定同位体は、土壌や大気、水から生物に取り込まれ、生物の組織を構成する分子の一部となる。その後、自然界に戻る一連の過程毎に、安定同位体を測定しその組成を比較することにより、様々な生命活動や生物の履歴が明らかになることから、生態系や地球科学の上で、非常に重要な指標として使用されてきた。

1) 安定同位体比

異なる試料の安定同位体組成の違いは、安定同位体比で表される。これは、標準物質の安定同位体存在比と分析サンプルの安定同位体存在比がどれくらい隔たっているか（ずれ）を千分率（1/1000：パーミル）で示したものである。

例えば、標準となる物質の炭素安定同位体の ^{12}C に対する ^{13}C の存在割合と、分析するサンプルの炭素安定同位体の ^{12}C に対する ^{13}C の存在割合が、どの程度ずれているかを示す値を、炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) という。

同様に窒素安定同位体 ^{14}N と ^{15}N の窒素安定同位体比を $\delta^{15}\text{N}$ 、酸素安定同位体の ^{16}O と ^{18}O の酸素安定同位体比を $\delta^{18}\text{O}$ 、水素安定同位体の ^1H と ^2H の水素安定同位体比を $\delta^2\text{H}$ 、または δD という。

2) 炭素同位体

植物の炭素同位体比は、空気中の二酸化炭素を光合成により植物体内に取り込む際の光合成の回路により決まる。陸上植物の多くは C3 植物といわれ、炭素安定同位体比は、平均で -27‰ ($-30\sim-25\text{‰}$ 程度) である。一方、乾燥、高温の環境で生育するイネ科植物であるサトウキビや、トウモロコシは C4 植物といわれ、C3 植物と光合成回路が異なる。C4 植物の炭素安定同位体比は、平均 -12‰ ($-15\sim-10\text{‰}$ 程度) である。C3 及び C4 植物以外に C3 と C4 の中間の値を持つ CAM 植物があり、パイナップルなどが属する。

炭素同位体比は、動物の食物の履歴としても重要である。例えば牛や、家畜動物が食べた餌 (牧草、穀物飼料等) は、動物の組織を構成する分子に取り込まれる。このため、動物の組織の炭素安定同位体比は食性を示す。炭素同位対比を分析すれば、例えば糖類の由来 (異性化糖か、はちみつ等の C3 植物由来の糖かといった由来の違い) や動物の飼料 (トウモロコシ、牧草) の履歴などが判別可能となる。

3) 窒素同位体

窒素安定同位体は、土壌中の窒素の由来を示し、植物の窒素安定同位体比は、土壌窒素の由来を示す指標となる。空気中の窒素を基準とした場合、土壌の窒素安定同位体比は、ゼロに近くなる。化学肥料中の窒素は、大気中の窒素を使用しているため、化学肥料を用いた土壌の窒素安定同位体比の値も同様にゼロ%に近くなる。一方、有機農法に使用される堆肥（特に動物性堆肥）などの有機質が土壌の窒素源である場合には、動物の食物連鎖の過程で窒素同位体が濃縮されるため、 $\delta^{15}\text{N}$ の値は大きくなる。

4) 酸素・水素同位体

酸素・水素の安定同位体比は、産地や原産国といった地理的要因に左右される。同じ動植物でも育った地域の水の安定同位体比の特徴が残るため、その生育地域（産地）を知る上で非常に重要なものとなる。水素安定同位体比は、自然界でも非常に変動が大きく、雨水の水素安定同位体比は、 $-10\sim-400\%$ になる。これは、水が蒸発する時には、軽い安定同位体から気化し、残った水には、重い安定同位体が多く、雨が降る場合には、重い安定同位体が先に凝固することによる。また、気温が高いほど安定同位体比はプラスになる。

酸素、水素安定同位体比については、世界各位の降水、河川、湖水の分析データがあり、その分布も明らかにされている。

一般的に、植物では、水素 (δD) や酸素 ($\delta^{18}\text{O}$) の同位体組成は、吸収した水の同位体組成を強く反映し、窒素 ($\delta^{15}\text{N}$) やは、土壌に含まれている窒素化合物、

炭素 ($\delta^{13}\text{C}$) の同位体組成は、光合成によって取り込まれた二酸化炭素の同位体組成をそれぞれ反映しているものと考えられる。

5) 同位体分別

同じ原子番号を持ち、質量数が異なる安定同位体の拡散速度や化学反応速度は質量数の影響を受けるため、物理学的・化学的・生物学的プロセスを経ることにより、同位体比はわずかに変動する。この現象を同位体分別と呼ぶ。例えば、光合成において植物が炭素を固定するために様々なプロセスを経る中でも同位体分別は起こり、その結果として取り込まれた大気中の二酸化炭素と植物に固定された炭素とでは $\delta^{13}\text{C}$ の値が異なる (Ogawa *et al.*, 1997)。

同位体分別は自然界だけではなく、安定同位体比測定のための前処理操作や測定装置内部においても起こり得る。特に、前処理操作において対象化合物の回収率が低い場合やクロマトグラフィーによる精製、誘導体化反応などは同位体分別の原因になることが多い。また、対象化合物の測定装置内部での移動やガス化 (燃焼・還元、熱分解反応) の影響も無視できない。そのため、試料の安定同位体比を真度・精度良く測定するためには、対象化合物の種類や構造に応じて前処理操作や測定条件を最適化し、同位体分別が起こらないようにすることが必須となる (Chikaraishi & Ohba, 2008; Macko *et al.*, 1987; Silfer *et al.*, 1991)。

3. 本研究の目的

MSG は、旨味調味料として加工食品の製造において欠かせないものである。一方で、工業的に製造された調味料としての MSG 摂取をできるだけ避けたいという消費者は多く存在し、“No MSG”や“MSG free”などと表示された加工食品も数多く流通しているが、本当に調味料としての MSG を使用していないことを保証するすべはない。

我々は、これを解決する手段として安定同位体比分析に着目した。安定同位体比分析は水素、炭素、窒素、酸素及び硫黄の安定同位体比を測定し地球科学や環境科学の分野で発展してきた分析手法である。食品科学の分野においても原材料証明や産地判別などに応用されてきた (Manca *et al.*, 2001; Padovan *et al.*, 2003; Raco *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2008)。これは、対象となる食品の同位体比が、その食品を構成する原材料によって固定または消費された元素の同位体比を反映するという原理に基づいている。

前述のとおり、現在 MSG は微生物発酵による酵素法によって製造されている。炭素源としてはサトウキビやテンサイの廃糖蜜やトウモロコシやキャッサバ、タピオカの澱粉などが、窒素源としては化学的に製造された気体アンモニアやその塩が使用される。

したがって、MSG は 4 種類の元素、すなわち水素、炭素、酸素及び窒素から構成されている。これらのうち、水素の安定同位体である δD や酸素の安定同位体 $\delta^{18}O$ は地理的な要因により潜在的な差が生じると考えられるため、今回の検討対象からは除外し、グルタミン酸の由来となる畜水産物や作物が吸収した物質の同位体比を直接反映する $\delta^{13}C$ と $\delta^{15}N$ 測定による判別の検討を行った。

食物中のグルタミン酸の正確な $\delta^{15}\text{N}$ の分析手法については既に報告されているため、予備的検討として、それに基づいて $\delta^{15}\text{N}$ による判別を試みたが、判別が困難である場合が生じたことから、グルタミン酸の最も主要な構成元素であり、食材中のグルタミン酸を判別する上で重要であると考えられる炭素に焦点を当てた。

しかしながら、炭素安定同位体比測定におけるクロマトグラフィーにおいて、1つのピークの初めと終わりで同位体比が大きく異なる現象が、クロマトグラフィック同位体効果として広く知られている。そのため、正確に $\delta^{13}\text{C}$ 値を決定するには、分取 HPLC の分析対象成分のピーク全体を集めて単離する必要があるが、様々な食材に含まれているグルタミン酸を、同位体の比が変わる（同位体分別）ことなく単離する方法は知られていない。

第2章は、食材より同位体分別を起こすことなくグルタミン酸を単離し、正確な炭素安定同位体比を測定するための手法に関するものである。

第3章は、窒素安定同位体比及び第2章で開発した手法を用いて測定した炭素安定同位体比を用いて食材中のグルタミン酸の由来について判別を試みた結果である。

第4章は、加工食品に含まれるグルタミン酸の由来について判別を試みた結果である。加工食品の場合は、複雑なマトリックスからの単離となるため、第3章で用いた手法を基に改良を加えた。また、加熱等の加工処理が施された加工食品で実際に適用できることを証明するため、50点以上の様々な実試料を用いて実証している。

第2章

炭素安定同位体比測定のための 食材中グルタミン酸の単離法の検討

1. 序

本章では、「食材に元々含まれるグルタミン酸」と「旨味調味料として添加されている MSG」を判別するための指標として、地球科学や環境科学の分野で発展し、食品科学の分野においても原材料証明や産地判別などに応用されている安定同位体比に着目し、まずは必要な分析法の開発を行った。

グルタミン酸分子は炭素、窒素、酸素及び水素により構成されているが、その中でも基本骨格となる主要な元素であり、食材中のグルタミン酸の由来を判別する上で重要であると考えられた炭素について分析法を検討することとした。

一般的に、グルタミン酸を含むアミノ酸は揮発性が低く、GC/C/IRMS で $\delta^{13}\text{C}$ を測定するには誘導体化して揮発性を高める必要がある (Chikaraishi & Ohkouchi, 2010)。これまで、トリフルオロアセチル/イソプロピル (TFA/iPr) (Docherty *et al.*, 2001; Silber *et al.*, 1991)、ピバロイル/イソプロピル (Pv/iPr) (Metges & Daenzer, 2000)、アセチル/プロピル (Ac/Pr) (Merritt & Hayes, 1994)、メトキシカルボニル/メチル (MeOCO/Me) (Walsh *et al.*, 2014)、tert-ブチルジメチルシリル (TBDMS) (Shinebarger *et al.*, 2000) 及びトリメチルシリル (TMS) (Rubino *et al.*, 2000) など様々な誘導体化の手法が用いられてきた。これらの手法を用いることにより、複数のアミノ酸について $\delta^{13}\text{C}$ だけではなく $\delta^{15}\text{N}$ も同時に測定できるメリットがある。しかしながら、アミノ酸分子中のアミノ基及びカルボキシル基の誘導体化を行うと、誘導体化剤の炭素が余分に付加されるため、得られた $\delta^{13}\text{C}$ 値の補正計算が必要となり、この計算が分析誤差を生む可能性がある。例えば Metges & Daenzer (2000) による研究では、個々のアミノ酸の炭素同位体比を Pv/iPr 誘導体化した後に $\delta^{13}\text{C}$ を GC/C/IRMS で測

定しており、新たに 8 個もの炭素が付加されることになるため、その分を補正しなければならない。

このような分析誤差に繋がる可能性のある補正を避けるために、本章では誘導体化-GC/C/IRMS 法ではなく、食材から高純度のグルタミン酸を単離し、誘導体化することなく、つまりは補正計算することなく、EA/IRMS により $\delta^{13}\text{C}$ 測定を行う分析法を新規に開発することとした。

2. 材料及び方法

1) 試料

東京都内で購入した静岡県産のトマト (*Solanum lycopersicum*)、北海道産のトウモロコシ (*Zea mays*) 及び北海道産の昆布 (羅臼昆布、*Laminaria diabolica*) を試料とし、いずれも可食部 (トマトは蒂を除いた果実部分、トウモロコシは子実部分、昆布は葉及び茎を乾燥したもの) を用いた。これら試料は高濃度のグルタミン酸を含んでおり、トマト、トウモロコシ及び昆布はそれぞれ C3 植物、C4 植物、海藻類の代表として選択した。なお、欧米ではトマト及びトウモロコシは料理の食材として非常に多く消費され、日本では昆布の出汁が好まれている。

2) 試薬等

L-アラニン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-19.6\text{‰} \pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $26.1\text{‰} \pm 0.2$)、2 種類のグリシン (A, $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-32.3\text{‰} \pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $1.12\text{‰} \pm 0.2$; B, $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-60.02\text{‰} \pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-26.63\text{‰} \pm 0.02$)、L-ヒスチジン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-11.4\text{‰} \pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-7.6\text{‰} \pm 0.2$) のアミノスタンダードを Shoko Scientific Corporation (Saitama, Japan) から購入し、 $\delta^{13}\text{C}$ または $\delta^{15}\text{N}$ 測定用の標準品として使用した。

蒸留水 (HPLC grade)、塩酸 (precision analysis grade)、水酸化ナトリウム (special grade)、*n*-ヘキサン (pesticide residue and polychlorinated biphenyl analysis grade)、ジクロロメタン (HPLC grade)、メタノール (HPLC grade)、25%アンモニア水 (special grade)、炭酸水素アンモニウム (first grade)、活性炭素

(for chromatography)、グルタミン酸 (special grade)、アスパラギン酸 (special grade) 及び L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 (special grade; MSG reagent, $\delta^{13}\text{C} = -14.7\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 5.6\text{‰}$) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) 製を使用した。オクタデシルシリル化シリカゲル (C18) カラム樹脂は ODS-A-HG (50 μm particle size, 12 nm pore size; YMC, Kyoto, Japan) を、強酸性陽イオン交換樹脂は Amberlite® IR120B (hydrogen form; Organo Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。Millex®-LH syringe driven filter unit (hydrophilic PTFE membrane, 0.45 μm pore size) は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) 製を使用した。

3) $\delta^{13}\text{C}$ 測定のためのグルタミン酸抽出

トマト及びトウモロコシは 6 g、羅臼昆布は 3 g を採取し、塩酸 20 mL を加えて窒素ガス置換した後、110°C で 20 時間加熱した。放冷後、遠心分離 (2,140×g, 3 min) し、上澄み液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した。蒸留水 30 mL 及び 1 mol L⁻¹ 塩酸 10 mL を加えて残渣を溶解させた後、*n*-ヘキサン 15 mL 及びジクロロメタン 10 mL を加えて 30 分間振とうした。遠心分離 (2,140×g, 3 min) 後、上層を除去し、あらかじめメタノール及び蒸留水各 30 mL でコンディショニングした活性炭素 (3 g) 及び C18 カラム樹脂 (3 g) 積層カラムに下層を全量負荷し、さらに蒸留水 10 mL をカラムに通した。カラムからの流出液を全量回収し、あらかじめ蒸留水、1 mol L⁻¹ 塩酸及び蒸留水各 300 mL でコンディショニングした強酸性陽イオン交換樹脂 (100 g, Amberlite® IR120B) カラムに負荷した。蒸留水 400 mL で洗浄後、10 vol%(v/v) アンモニア水 200 mL で溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した後、残留物を 65 vol%(v/v) メタノール 3 mL で溶解し、

Millex[®]-LH syringe driven filter unit でろ過した。ろ過液を分取 HPLC に注入し、保持時間 27 分付近に溶出したグルタミン酸のピーク全体を分取した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した。得られたグルタミン酸の結晶を EA/IRMS 測定に供した。

4) 分取 HPLC によるグルタミン酸の単離

$\delta^{13}\text{C}$ 測定の前処理のため、コントローラー (CBM-20A)、送液ポンプ (LC-20AP)、オートサンプラー (SIL-10AP)、UV 検出器 (SPD-20A) 及びフラクションコレクター (FRC-10A) から成る Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) 製の分取 HPLC システムを使用した。分取用カラム及びガードカラムはそれぞれ Showa Denko (Tokyo, Japan) 製の Shodex Asahipak NH2P-90 20F (300 mm × 20 mm i.d., 9 μm particle size)、Shodex Asahipak NH2P-130G 7B (50 mm × 7.5 mm i.d., 13 μm particle size) を使用した。移動相には 100 mmol L⁻¹ 炭酸水素アンモニウム溶液及びメタノール (35 : 65) 混液を使用し、流速は 7 mL min⁻¹ とした。カラム温度は室温とし、グルタミン酸ピークの検出には UV 検出器 (波長 210 nm) を使用した。

5) EA/IRMS 測定

$\delta^{13}\text{C}$ は Flash 2000 electron analyzer、ConFlo IV interface 及び Delta V Advantage isotope-ratio mass spectrometer から成る Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) 製のオンライン EA/IRMS システムで測定した。測定条件は第 3 章に準じた。EA の酸化炉温度、還元炉温度及びカラム温度はそれぞれ 1,000°C、680°C、50°C とし、キャリアガス (ヘリウム) 及び燃焼用ガス (酸素) の流速

は、それぞれ 100 mL min^{-1} 、 175 mL min^{-1} とした。なお、標準品 4 種類（L-アラニン、2 種類のグリシン（A, B）及び L-ヒスチジン）及び試料はそれぞれ約 0.3 mg を錫カプセルに秤量して包み込み、測定に供した。

6) 安定同位体比分析

炭素の同位体組成は国際標準物質 [PeeDee 層のベルムナイト炭酸塩 (VPDB)] に対して従来の δ 表記法で表した (Gonfiantini *et al.*, 1995)。

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Sample}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} \right) / \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{VPDB}}} \right) \right] \times 1000$$

EA/IRMS による同位体測定の再現性を確認するために、検量線用の 4 種類の $\delta^{13}\text{C}$ 既知のアミノ酸標準（L-アラニン、2 種類のグリシン（A, B）及び L-ヒスチジン）を 4 または 5 試料測定毎に分析した。標準の分析誤差 (1σ) は最少炭素量 $100 \mu\text{g}$ で 0.1‰ 以内であった。

3. 結果

1) 同位体分別の確認

クロマトグラフィーにおいて1つのピークの初めと終わりで同位体比が大きく異なるクロマトグラフィック同位体効果は、カラム担体表面における分析対象成分の吸着や脱着に伴うものである (Hare *et al.*, 1991; Macko *et al.*, 1987; Smitenberg & Sachs 2007)。そのため、正確に $\delta^{13}\text{C}$ 値を決定するには、分取 HPLC の分析対象成分のピーク全体を集めて単離する必要がある。Figure 2-1 は、グルタミン酸及びアスパラギン酸試薬及び3種類の試料 (トマト、トウモロコシ及び昆布) の分取 HPLC クロマトグラムを示す。これらクロマトグラムから分かるように、グルタミン酸ピークと近接するアスパラギン酸ピークをベースライン上で完全分離することが可能だった。さらに、グルタミン酸の保持時間付近で妨害ピークは観察されなかった。トマト、トウモロコシ及び昆布より得られたグルタミン酸結晶の純度は、それぞれ 99%、97%、99%であった。

コンタミネーションとして HPLC カラムから溶出する成分 (カラムブリード) を評価した (Takano *et al.*, 2010)。分取 HPLC 法のブランク (保持時間 24~29 分の 5 分間の画分) において、0.23 μg の残留物を得た。これは、一般的に分取 HPLC で単離される対象成分の 0.7% にすぎない。 $\delta^{13}\text{C}$ におけるカラムブリードの影響を調べるため、ブランクから得た残留物にグリシン標準品 10 mg を混合し、 $\delta^{13}\text{C}$ を測定した。その結果、元々の $\delta^{13}\text{C}$ (-32.3‰) との差が最大 0.3‰ で測定誤差 (<0.1‰) よりも大きかった。これは、カラムブリードによる影響であるかもしれない。ただし、カラムブリードは量的に少ないので、実試料の測定への影響は小さいと考えられた。

次に、6つの工程（B；加水分解、C；溶解、D；脱脂、E；活性炭素／C18 カラム、F；強陽イオン交換カラム、G；分取 HPLC）における MSG 標準試薬の $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化を評価した（Table 2-1）。6つの工程の中では、陽イオン交換（F）における MSG の $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化が、MSG 試薬の $\delta^{13}\text{C}$ 値よりも、最大で 0.5‰低い側にあることを示した。測定誤差と比較してこの工程の $\delta^{13}\text{C}$ の差が大きいのは、陽イオン交換樹脂のカラムブリードに起因するかもしれない（Shah & Pearson, 2007）。

2）実試料を用いた分析法の評価

1）で評価した分析法により 3 種類の食品（トマト、トウモロコシ、昆布）及び MSG 試薬について $\delta^{13}\text{C}$ 値を求めた（Table 2-2）。各試料は同日に N=5 で前処理を行い、EA/IRMS 測定を行った。その結果、MSG 試薬の $\delta^{13}\text{C}$ 値は -14.1‰となり、前処理せずにそのまま EA/IRMS 測定を行った時の値（-14.0‰）からのずれはわずかに 0.1‰であった。また、トマト、トウモロコシ及び昆布の $\delta^{13}\text{C}$ は、それぞれ -27.1‰、-10.5‰、-10.0‰であった。なお、N=5 での標準偏差は昆布以外の試料が 0.1‰以下、昆布は 0.5‰であった。

4. 小括

食品に含まれるグルタミン酸の炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) 分析法として、高い信頼性を担保するために、食品からグルタミン酸を単離し、EA/IRMS 測定することとした。まずは試料を塩酸で加水分解し、*n*-ヘキサン及びジクロロメタンの混液により脱脂した後、活性炭素/C18 積層カラムを通過させた。カラム流出液を強酸性陽イオン交換樹脂カラムによりさらに精製し、分取 HPLC によりグルタミン酸ピークのみを分取した。分取液を濃縮乾固させ、得られた高純度のグルタミン酸結晶を EA/IRMS 測定に供した。本分析法の各工程において同位体分別の有無を確認したところ、最大で強酸性陽イオン交換樹脂カラム精製において 0.5% の同位体比のずれが観測されたが、問題となるレベルではなかった。

トマト、トウモロコシ及び昆布に含まれるグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 分析を実施したところ、C3 植物に該当するトマトは -27.1% で C3 植物の領域 (-24 ~ -34%) に、C4 植物に該当するトウモロコシは -10.5% で C4 植物の領域 (-9 ~ -16%) (Deines, 1980) にそれぞれ該当し、想定通りの結果となった。昆布の $\delta^{13}\text{C}$ 値は -10.0% であり、C4 植物の領域の値となった。昆布は C4 植物に帰属していないが、得られた $\delta^{13}\text{C}$ の結果は、昆布がカルビン-ベンソンサイクルにおいて、ルビスコによって触媒されて 3-ホスホグリセリン酸を形成する以前に、 CO_2 濃縮機構を持っていることを強く示唆している (Badger *et al.*, 1980)。昆布中グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 値の N=5 での標準偏差は 0.5% と、実用上問題とはならないものの、他の試料よりもやや大きかった。Figure 2-1 の UV 波長 210 nm の分取 HPLC クロマトグラム上では明確ではなかったが、昆布に含まれるわずかな量の有機化合物が分析値に影響を与えたのかもしれない。

以上により、食品に含まれるグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ を精度よく測定可能な分析法が構築された。

5. 图表

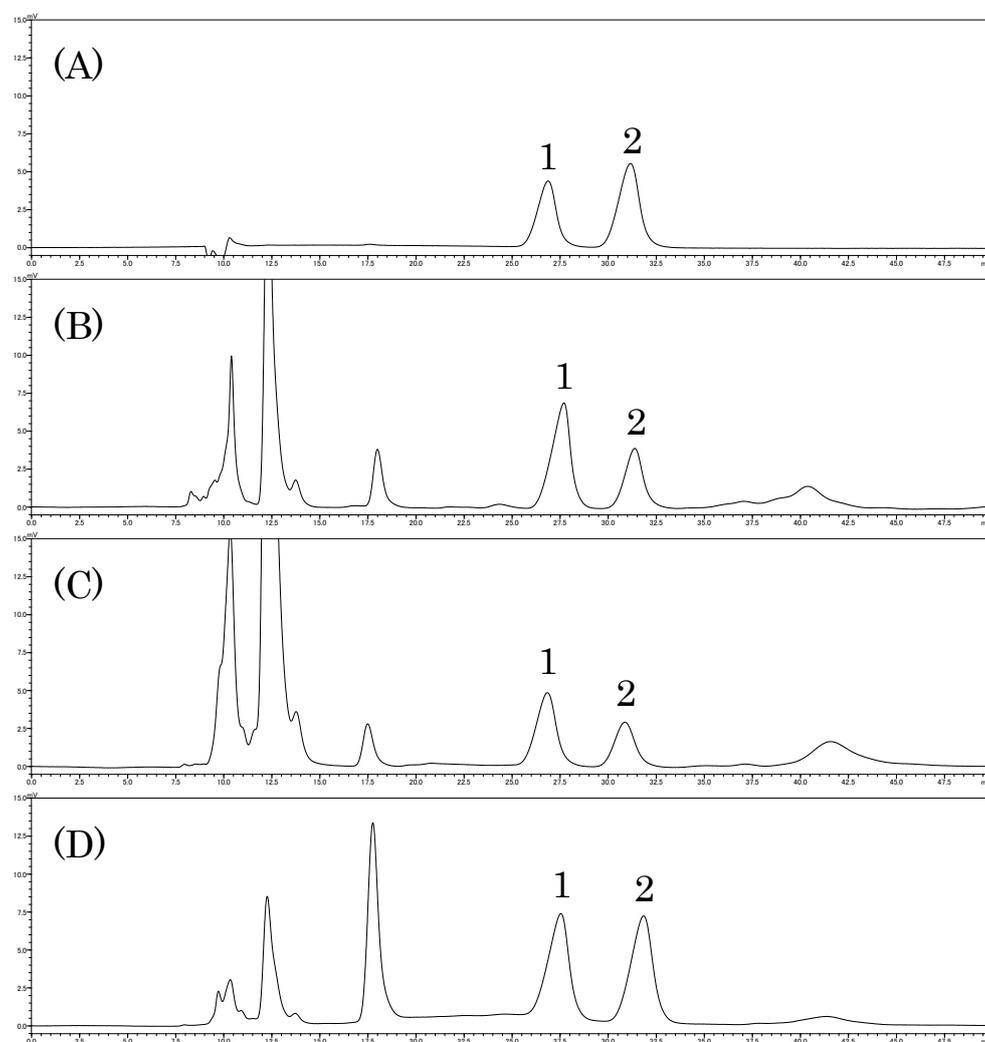


Figure 2-1. Preparative HPLC chromatograms for (A) glutamic acid and aspartic acid standard solution (each 3 mg mL^{-1}), (B) tomato, (C) corn, and (D) kelp. Peak 1, glutamic acid; Peak 2, aspartic acid. The peaks in the first half of each chromatogram (retention times of up to 15 minutes) are mainly due to neutral and basic amino acids, such as glycine, alanine, proline and lysine.

Table 2-1. Verification of isotopic fractionation in each pretreatment procedure

Procedure	$\delta^{13}\text{C}$	Deviation from A	SD
	[‰]PVDB	[‰]PVDB	[‰]PVDB
A. Untreated	-14.0	-	0.1
B. Hydrolysis	-14.1	-0.1	0.1
C. Dissolution	-14.2	-0.2	< 0.1
D. Defatting	-14.2	-0.2	0.1
E. Activated carbon/C18 column	-14.2	-0.2	0.2
F. Strong cation exchange column	-14.5	-0.5	0.1
G. Preparative HPLC	-14.1	-0.1	< 0.1

N=5.

Table 2-2. $\delta^{13}\text{C}$ values of glutamic acid in foodstuffs

Sample	$\delta^{13}\text{C}$ [‰]PVDB	SD [‰]PVDB
Tomato (C3 plants)	-27.1	0.1
Corn (C4 plants)	-10.5	0.1
Kelp (Marine products)	-10.0	0.5
MSG reagent	-14.1	< 0.1

N=5.

第3章

炭素及び窒素安定同位体比に基づく
調味料グルタミン酸ナトリウム及び
食材中グルタミン酸の判別

1. 序

本章は、安定同位体比を測定することにより、食材中に存在しているグルタミン酸と調味料 MSG を判別に関するものである。

グルタミン酸は 4 種類の元素、すなわち水素、炭素、酸素及び窒素から構成されている。これらのうち、グルタミン酸の由来となる畜水産物や作物が吸収した物質の同位体比を直接反映する $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ の組み合わせを使用することを選択した。 δD や $\delta^{18}\text{O}$ は地理的な要因により、潜在的な差が生じるので、今回の測定対象からは除外した。

第 2 章で $\delta^{13}\text{C}$ を正確に測定するために様々な食材に含まれているグルタミン酸を単離する方法を開発したが、本章では、それを用いて様々な食材の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を測定し、得られたデータを統計的に解析するために正準判別分析を用い、食材中に存在するグルタミン酸と調味料 MSG の判別を試みた。

2. 材料及び方法

1) 試料

様々な食材（大豆やトマトなど C3 植物、トウモロコシなど C4 植物、昆布、エビやマグロなど海産物、キノコ類、豚や鶏など畜産物、合計 53 試料）及び由来植物既知の C3 植物由来の調味料 MSG（6 試料）、C4 植物由来の調味料 MSG（31 試料）を入手し、試料として使用した（Table 3-1）。食材については、高濃度のグルタミン酸を含んでおり、日本や欧米各国で多く消費されているものを試料として選択した。

2) 試薬等

L-アラニン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-19.6\text{‰}\pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $26.1\text{‰}\pm 0.2$)、L-アスパラギン酸 ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-23.95\text{‰}\pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $35.20\text{‰}\pm 0.05$)、2 種類のグリシン (A, $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-32.3\text{‰}\pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $1.12\text{‰}\pm 0.2$; B, $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-60.02\text{‰}\pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-26.63\text{‰}\pm 0.02$)、L-ヒスチジン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-11.4\text{‰}\pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-7.6\text{‰}\pm 0.2$)、L-フェニルアラニン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-11.20\text{‰}\pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $1.70\text{‰}\pm 0.06$)、L-ヒドロキシプロリン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-12.66\text{‰}\pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-9.17\text{‰}\pm 0.07$) 及び L-ノルロイシン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-28.85\text{‰}\pm 0.03$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $18.96\text{‰}\pm 0.11$) のアミノスタンダードを Shoko Scientific Corporation (Saitama, Japan) から購入し、 $\delta^{13}\text{C}$ または $\delta^{15}\text{N}$ 測定用の標準品として使用した。

蒸留水 (HPLC grade)、塩酸 (precision analysis grade)、水酸化ナトリウム (special grade)、*n*-ヘキサン (pesticide residue and polychlorinated biphenyl

analysis grade)、ジクロロメタン (HPLC grade)、メタノール (HPLC grade)、2-プロパノール (HPLC grade)、25%アンモニア水 (special grade)、炭酸水素アンモニウム (first grade)、活性炭素 (for chromatography)、塩化チオニル (Wako special grade)、塩化ピバロイル (practical grade)、無水硫酸マグネシウム (practical grade) 及び L-グルタミン酸ナトリウム一水和物 (special grade; MSG reagent, $\delta^{13}\text{C} = -14.7\%$, $\delta^{15}\text{N} = 5.6\%$) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) 製を使用した。オクタデシルシリル化シリカゲル (C18) カラム樹脂は ODS-A-HG (50 μm particle size, 12 nm pore size; YMC, Kyoto, Japan) を、強酸性陽イオン交換樹脂は Amberlite[®] IR120B (hydrogen form; Organo Corporation, Tokyo, Japan) 及び AG[®] 50W-X8 (200-400 mesh, hydrogen form; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US) を使用した。Millex[®]-LH syringe driven filter unit (hydrophilic PTFE membrane, 0.45 μm pore size) 及び Ultrafree[®]-MC GV centrifugal filter unit (PVDF membrane, 0.22 μm pore size) は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) 製を使用した。

3) グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 分析

$\delta^{13}\text{C}$ 測定のためのグルタミン酸抽出

EA/IRMS により $\delta^{13}\text{C}$ 測定のため、第 2 章に準じた方法で試料からグルタミン酸を単離した。

C3 植物、C4 植物及びキノコ類は 6 g、昆布、海産物及び畜産物は 3 g を採取し、塩酸 20 mL を加えて窒素ガス置換した後、110°C で 20 時間加熱した。放冷後、遠心分離 (2,140 \times g, 3 min) し、上澄み液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した。蒸留水 30 mL 及び 1 mol L⁻¹ 塩酸 10 mL を加えて残渣を溶解させた後、*n*-ヘキサン 15 mL 及びジクロロメタン 10 mL を加えて 30 分

間振とうした。遠心分離 (2,140×g, 3 min) 後、上層を除去し、あらかじめメタノール及び蒸留水各 30 mL でコンディショニングした活性炭素 (3 g) 及び C18 カラム樹脂 (3 g) 積層カラムに下層を全量負荷し、さらに蒸留水 10 mL をカラムに通した。カラムからの流出液を全量回収し、あらかじめ蒸留水、1 mol L⁻¹ 塩酸及び蒸留水各 300 mL でコンディショニングした強酸性陽イオン交換樹脂 (100 g, Amberlite® IR120B) カラムに負荷した。蒸留水 400 mL で洗浄後、10 vol%(v/v) アンモニア水 200 mL で溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した後、残留物を 65 vol%(v/v) メタノール 3 mL で溶解し、Millex®-LH syringe driven filter unit でろ過した。ろ過液を分取 HPLC に注入し、保持時間 27 分付近に溶出したグルタミン酸のピーク全体を分取した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した。得られたグルタミン酸の結晶を EA/IRMS 測定に供した。

なお、調味料 MSG については、粉末状の試料をそのまま EA/IRMS に供し、 $\delta^{13}\text{C}$ 値 ($\delta^{15}\text{N}$ 値も同時に) を得た。

分取 HPLC によるグルタミン酸の単離

$\delta^{13}\text{C}$ 測定の前処理のため、コントローラー (CBM-20A)、送液ポンプ (LC-20AP)、オートサンプラー (SIL-10AP)、UV 検出器 (SPD-20A) 及びフラクションコレクター (FRC-10A) から成る Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) 製の分取 HPLC システムを使用した。分取用カラム及びガードカラムはそれぞれ Showa Denko (Tokyo, Japan) 製の Shodex Asahipak NH2P-90 20F (300 mm × 20 mm i.d., 9 μm particle size)、Shodex Asahipak NH2P-130G 7B (50 mm × 7.5 mm i.d., 13 μm particle size) を使用した。移動相には 100 mmol L⁻¹ 炭酸水素アンモニウム溶液及びメタノール (35 : 65) 混液を使用し、流速は 7 mL min⁻¹ とした。カラム温度は室温とし、グルタミン酸ピークの検出には UV 検出器 (波長

210 nm) を使用した。分取 HPLC により単離されたグルタミン酸中のアンモニウム塩を除くことは難しかったため、 $\delta^{15}\text{N}$ は EA/IRMS により $\delta^{13}\text{C}$ と同時に分析することはできなかった。

EA/IRMS 測定

$\delta^{13}\text{C}$ は Flash 2000 electron analyzer、ConFlo IV interface 及び Delta V Advantage isotope-ratio mass spectrometer から成る Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) 製のオンライン EA/IRMS システムで測定した。測定条件は第 3 章に準じた。EA の酸化炉温度、還元炉温度及びカラム温度はそれぞれ 1,000°C、680°C、50°C とし、キャリアガス (ヘリウム) 及び燃焼用ガス (酸素) の流速は、それぞれ 100 mL min⁻¹、175 mL min⁻¹ とした。なお、標準品 4 種類 (L-アラニン、2 種類のグリシン (A, B) 及び L-ヒスチジン) 及び試料はそれぞれ約 0.3 mg を錫カプセルに秤量して包み込み、測定に供した。

4) グルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ 分析

$\delta^{15}\text{N}$ 測定のためのグルタミン抽出

GC/C/IRMS により $\delta^{15}\text{N}$ を測定するため、Chikaraishi らの方法 (2009) を元に最適化し、試料からグルタミン酸を抽出し、誘導体化を行った。

遊離グルタミン酸量が 0.2 mg 以上になるように食材試料を採取し、塩酸 0.7 mL を加えて窒素ガス置換した後、110°C で 20 時間加熱した。放冷後、遠心分離 (2,140×g, 3 min) し、上澄み液を窒素ガス気流下で乾固させた。蒸留水 0.6 mL 及び 1 mol L⁻¹ 塩酸 0.2 mL を加えて残渣を溶解させた後、*n*-ヘキサン 0.3 mL 及びジクロロメタン 0.2 mL を加えて 10 分間振とうした。遠心分離 (2,140×g, 3 min) 後、上層を除去し、あらかじめ蒸留水、1 mol L⁻¹ 塩酸、蒸留水、1 mol

L⁻¹水酸化ナトリウム溶液、蒸留水及び1 mol L⁻¹塩酸各15 mLでコンディショニングした強酸性陽イオン交換樹脂(10 mL, AG[®] 50W-X8)に下層を全量負荷した。さらに蒸留水40 mLをカラムに通した。蒸留水40 mLで洗浄後、10 vol%アンモニア水20 mLで溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮(60°C)した後、窒素ガス気流下で乾固させた。残留物に塩化チオニル及び2-プロパノール(4:1)混液0.5 mLを添加し、110°Cで2時間反応させた。放冷後、窒素ガス気流下で乾固させ、塩化ピバロイル0.1 mL及びジクロロメタン0.4 mLを添加し、110°Cで2時間反応させた。放冷後、窒素ガス気流下で乾固させ、蒸留水0.3 mL、*n*-ヘキサン0.3 mL及びジクロロメタン0.2 mLを加えて振とうし、上層を無水硫酸マグネシウムが詰められた Ultrafree[®]-MC GV centrifugal filter unit でろ過した。この操作をさらに2回行い、ろ液を集めた。窒素ガス気流下で乾固させ、ジクロロメタン0.5 mLに溶解し、GC/IRMS測定に供した。

なお、調味料MSGについては、粉末状の試料をそのままEA/IRMSに供し、 $\delta^{15}\text{N}$ 値($\delta^{13}\text{C}$ 値も同時に)を得た。

GC/C/IRMS 測定

$\delta^{15}\text{N}$ はGC装置(Trace 1310)、GC IsolinkII、ConFlo IV interface及びDelta V Advantage isotope-ratio mass spectrometerから成るThermo Fisher Scientific製のオンラインGC/C/IRMSシステムで測定した。GC IsolinkIIの高温型酸化炉の温度は1,000°Cとし、標準品及び試料の測定溶液それぞれ1 μL を注入口温度270°CでスプリットレスモードによりGCに導入した。GCカラムにはUltra 2(50 m \times 0.32 mm i.d., 0.54 μm film; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)を使用し、カラムオープンの昇温条件を40°C(2.5分保持)、20°C min⁻¹で110°C(保持なし)、3.2°C min⁻¹で150°C(保持なし)、9°C min⁻¹で220°C(10分保持)、30°C

min⁻¹で250°C（5分保持）とし、キャリアガスにヘリウムガス（流速1.4 mL min⁻¹）を使用した。なお、標準品の測定溶液は標準品5種類（L-アスパラギン酸、グリシン（B）、L-フェニルアラニン、L-ヒドロキシプロリン及びL-ノルロイシン）を各1 mg 秤量・混合したものを、試料と同様に誘導体化して調製した。

5) 安定同位体比分析

炭素及び窒素の同位体組成は国際標準物質 [$\delta^{13}\text{C}$ は PeeDee 層のベルムナイト炭酸塩 (VPDB)、 $\delta^{15}\text{N}$ は大気中の窒素 (Air)] に対して従来の δ 表記法で表した (Gonfiantini *et al.*, 1995)。

$$\delta^i\text{E} = [({}^i\text{R}_{\text{Sample}} / {}^i\text{R}_{\text{Standard}}) / {}^i\text{R}_{\text{Standard}}] \times 1000$$

ここで i は元素 E のより重い同位体の質量数 (^{13}C 及び ^{15}N) であり、 R_{sample} は試料の安定同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 及び $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)、 $\text{R}_{\text{standard}}$ は国際標準物質の安定同位体比を示す。

EA/IRMS による同位体測定の再現性を確認するために、検量線用の4種類の $\delta^{13}\text{C}$ 既知のアミノ酸標準 (L-アラニン、2種類のグリシン (A, B) 及び L-ヒスチジン) を4または5試料測定毎に分析した。標準の分析誤差 (1σ) は最少炭素量 100 μg で 0.1%以内であった。GC/C/IRMS による同位体測定の再現性を確認するために、検量線用の $\delta^{15}\text{N}$ 既知のアミノ酸混合標準 (L-アスパラギン酸、グリシン (B)、L-フェニルアラニン、L-ヒドロキシプロリン及び L-ノルロイシン) を4または5試料測定毎に分析した。標準の分析誤差 (1σ) は最少窒素量 800 ng で 0.5%以内であった。グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ はこの方法を用いて測定した。

6) 正準判別分析

由来既知の試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値及び $\delta^{15}\text{N}$ 値に基づき、JMP12.1.0 ソフトウェア (SAS Institute, NC, US) を使用して 2 次の正準判別分析を行った (Piasentier *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008)。

3. 結果

1) 食材中グルタミン酸及び調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$

食材中のグルタミン酸及び調味料 MSG について $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を測定した結果を Figure 3-2 及び Table 3-1 に示した。なお、 $\delta^{13}\text{C}$ 分析のために単離したグルタミン酸の純度は 96~100%であった。調味料 MSG 以外の、食材中のグルタミン酸では、 $\delta^{13}\text{C}$ が比較的高い (-18.1~-9.6‰) ものと低い (-27.3~-21.5‰) ものとは分かれて分布した。前者のグループはさらに、 $\delta^{15}\text{N}$ が低い順にトウモロコシ (C4 植物、-3.2~3.7‰)、昆布 (4.0~8.8‰)、魚介類 (11.2~29.0‰) に分けられた。後者のグループの $\delta^{15}\text{N}$ は、野菜/豆 (C3 植物、-6.4‰~2.4‰) の範囲にあった。野菜/豆において $\delta^{15}\text{N}$ 値がやや広く分布している理由は、肥料 (化学肥料/動物性有機肥料) 中の窒素化合物が土壤に使用され、 $\delta^{15}\text{N}$ に影響を与える (Bateman *et al.*, 2007) ためであると考えられる。

生態学的な研究において、魚介類の $\delta^{15}\text{N}$ がよく調査されており、食物連鎖の上位にいくほど $\delta^{15}\text{N}$ が同位体的に高くなる傾向のあることが知られている

(Chikaraishi *et al.*, 2007)。本研究で、グルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ が、メバチマグロでは 29.0‰、ブリで 23.8‰、カツオでは 23.5‰、スルメイカでは 22.1‰、イワシでは 12.6‰、ホタテでは 11.2‰、昆布では 4.0~8.8‰となり、おおよそ食物連鎖の順番に沿っていたが、バナメイエビ (養殖) は 14.6‰、アルゼンチンアカエビ (天然) は 26.4‰となり、必ずしも食物連鎖の順番通りでないところも見られた。

きのこ類のグルタミン酸は他の食材とは一部異なる $\delta^{15}\text{N}$ 及び $\delta^{13}\text{C}$ を示した。きのこ類は光合成をせず、他の生物から養分を摂取することによって生息しており、炭素源や窒素源の違いが同位体比に大きな影響を与えたと考えられ

る。肉やチーズなどの畜産物についてもグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ が幅広く分布しており、おそらく、家畜に与えられた餌が多岐に渡っているためと考えられる。

調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ については、 $-29.1\sim-26.1\%$ と $-19.6\sim-10.1\%$ の 2 つの明確な分布パターンを示した。前者がタピオカ、キャッサバ、テンサイを含む C3 植物由来で、後者がサトウキビやトウモロコシを含む C4 植物由来と考えられた (Deines, 1980)。調味料 MSG のうち、C3 植物由来の $\delta^{15}\text{N}$ は $-6.6\sim-2.5\%$ 、C4 植物由来の $\delta^{15}\text{N}$ は $-9.9\sim-3.9\%$ に分布した。

調味料 MSG については、C3 植物由来調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ は -29.1 から -26.1% 、 $\delta^{15}\text{N}$ は -6.6 から -2.5% 、C4 植物由来調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ は -16.7 から -10.1% 、 $\delta^{15}\text{N}$ は -9.9 から -3.9% の範囲内であり、両者は明確に分かれた。

2) 食材中のグルタミン酸と調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ を用いた正準判別分析

由来既知の全 90 検体を以下の 3 グループ、I) 食材 (53 試料)、II) C3 植物由来調味料 MSG (6 試料) 及び III) C4 植物由来 MSG (31 試料) に分割した。これらの試料中のグルタミン酸の同位体データについて正準判別分析を実行した。得られた判別関数は以下の通りとなった。

$$\text{関数 1 : } 0.154 [\delta^{15}\text{N}] + 0.141 [\delta^{13}\text{C}] - 2.744$$

$$\text{関数 2 : } 0.165 [\delta^{15}\text{N}] + 0.073 [\delta^{13}\text{C}] + 2.688$$

Table 3-2 に判別分析から得られた固有値、寄与率、累積寄与率及び正準相関を示した。関数 1 及び関数 2 の固有値はそれぞれ 1.587 (寄与率として 80.2%)、0.392 (寄与率として 19.8%) であり、関数 1 の方が判別するための情報をより多く含むことを示した。関数 1 の正準相関は 0.783 とグループの判別のために

は十分に高かった。続いて判別関数に各試料の測定データを代入して、関数 1 及び関数 2 の変数に対する判別得点を算出した。関数 1 を横軸（正準 1）に、関数 2 を縦軸（正準 2）にとって判別得点をプロットした散布図を作成した（Figure 3-3）。

この図で、内側の円は各グループ平均に対する 95%信頼領域を示し、外側の円は各グループの母集団の 50%を含むと推定される領域を示している。矢印の方向は 2 つの正準変数との相関の程度を示す。食材中のグルタミン酸、調味料 MSG（C3 植物）及び調味料 MSG（C4 植物）のグループ平均の座標（正準 1、正準 2）は、それぞれ (0.898, 0.256)、(0.897, 2.26) 及び (-1.709, 0.000) であり、プラス("+")の印で示されている。

この方法によって、全 90 試料中 87 試料（正答率：96.7%）が正しく判別された。このように、本方法は、食材由来のグルタミン酸と調味料 MSG を判別するために有効である。

4. 小括

食材中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 測定には第2章で開発した EA/IRMS を用いた分析法、 $\delta^{15}\text{N}$ 測定には GC/C/IRMS を用いた $\delta^{15}\text{N}$ 分析法を適用した。まず、様々な食材（大豆やトマトなど C3 植物、トウモロコシなど C4 植物、昆布、エビやマグロなど魚介類、キノコ類、豚や鶏など畜産物、合計 53 試料）及びタピオカやテンサイなどの C3 植物を原料として製造された調味料 MSG（6 試料）、トウモロコシやサトウキビなどの C4 植物を原料として製造された調味料 MSG（31 試料）を入手し、 $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 値を得た。その結果、グループ毎に安定同位体比の違いが観察された。その理由については以下のようなことが考えられる。

大豆やトマトなどの C3 植物において $\delta^{15}\text{N}$ 値が幅広く分布しているのは、肥料（化学肥料／有機肥料）中の窒素化合物が土壤に使用され、 $\delta^{15}\text{N}$ に影響を与える（Bateman *et al.*, 2007）ためであると考えられる。生態学的な研究において、魚介類の $\delta^{15}\text{N}$ がよく調査されており、食物連鎖の上位にいくほど $\delta^{15}\text{N}$ が同位体的に高くなる傾向のあることが知られている（Chikaraishi *et al.*, 2007）。本研究で、グルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ が、メバチマグロでは 29.0‰、ブリで 23.8‰、カツオでは 23.5‰、スルメイカでは 22.1‰、イワシでは 12.6‰、ホタテでは 11.2‰、昆布では 4.0～8.8‰となり、おおよそ食物連鎖の順番に沿っていたが、バナメイエビ（養殖）は 14.6‰、アルゼンチンアカエビ（天然）は 26.4‰となり、必ずしも食物連鎖の順番通りでないところも見られた。キノコ類のグルタミン酸は他の食材とは一部異なる $\delta^{15}\text{N}$ 及び $\delta^{13}\text{C}$ を示した。キノコ類は光合成をせず、他の生物から養分を摂取することによって生息しており、炭素源や窒素源の違いが同位体比に大きな影響を与えたと考えられる。肉やチーズなどの畜産物についてもグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ が幅広く分布しており、家畜に与えられた餌が多岐に渡っているためと考えられる。

食材に含まれるグルタミン酸と調味料 MSG の $\delta^{15}\text{N}$ の比較において、調味料 MSG の $\delta^{15}\text{N}$ 値は食材に含まれるグルタミン酸よりも低い傾向があった。調味料 MSG は、酵素的な微生物発酵法によって製造される際、多くの場合、その窒素源はアンモニアである (Kinoshita *et al.*, 1957; Kumagai, 2006)。調味料 MSG の窒素源であるアンモニアの同位体比は 0‰ 付近であるため、調味料 MSG の同位体比もそれを反映して 0‰ 付近であることが予想された。しかしながら、実際には調味料 MSG の窒素同位体比は 0‰ よりも明らかに低く、その多くは -4‰ 以下であった。この理由として、調味料 MSG を製造時の脱色や再結晶などを含む精製工程において窒素の同位体分別が起こったため、同位体比がマイナス側にシフトした可能性が考えられた (Saito *et al.*, 2003)。

得られたデータを判別分析により統計学的に解析したところ、食材、C3 植物由来 MSG 及び C4 植物由来 MSG の 3 グループ間において極めて高い正答率 (96.7%) で判別することが可能であった。一方で、C3 植物、C4 植物、昆布、魚介類、キノコ類、畜産物、C3 植物由来調味料 MSG 及び C4 植物由来調味料 MSG の 8 グループ間で同様に判別分析を試みたところ、正答率は 90.0% となった。正答率が 3 グループ間の場合より低くなった理由は、キノコ類及び畜産物の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 値が広範囲に広がり、他の C3 植物、C4 植物、昆布及び魚介類と重複しているためと考えている。これらの各食材グループをより高い正答率で判別するためには、グルタミン酸分子を構成する他の元素 (例えば水素及び酸素) の安定同位体比など、判別に有効な新たな指標を追加する必要があると考えられる。

以上より、「食材中のグルタミン酸」及び「調味料 MSG」を高い正答率で判別可能なモデル系が構築された。

5. 図表

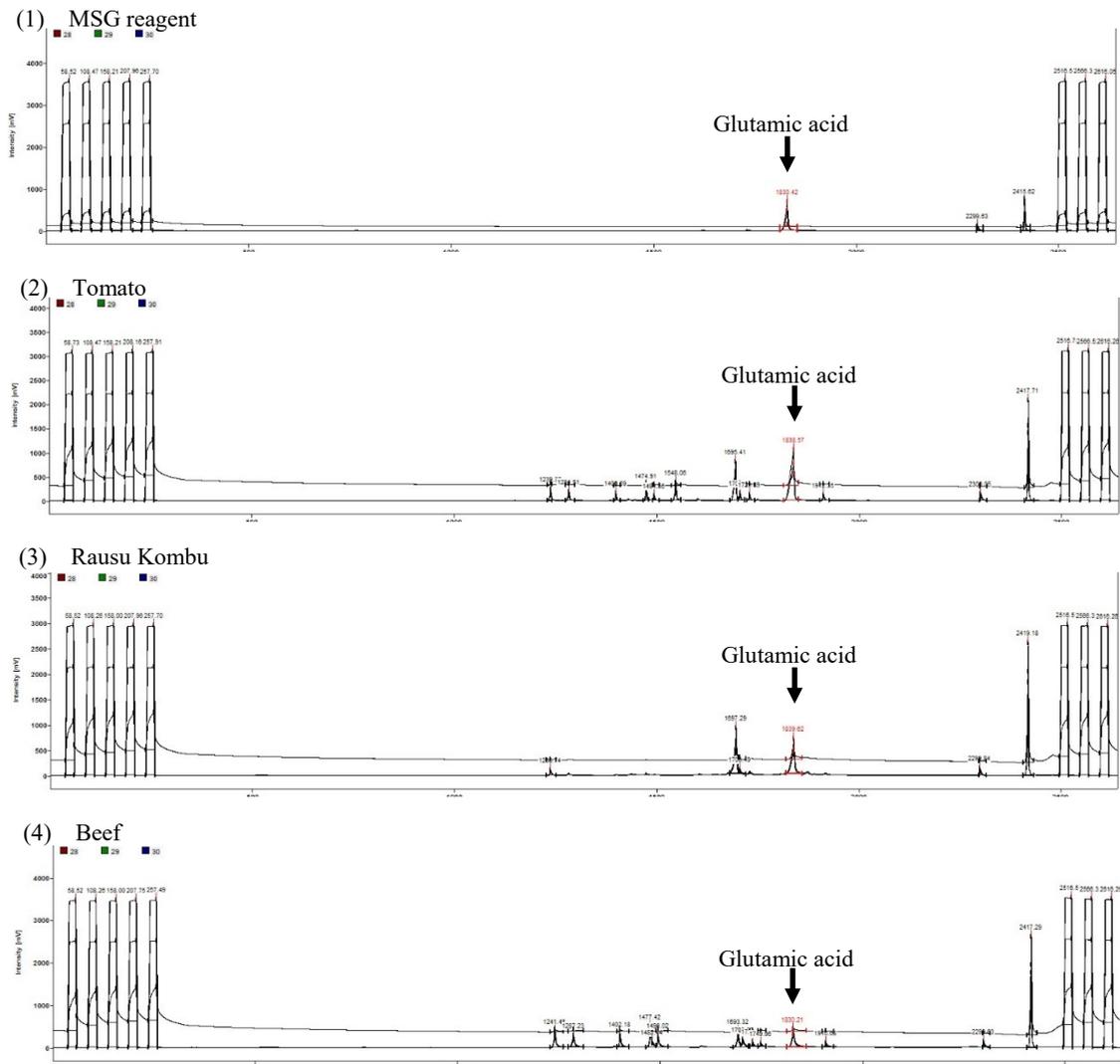


Figure 3-1. GC/C/IRMS chromatograms on nitrogen isotope analysis of amino acid solution extracted from MSG reagent and foodstuff samples: (1) MSG reagent, (2) Tomato, (3) Rausu kombu, and (4) Beef.

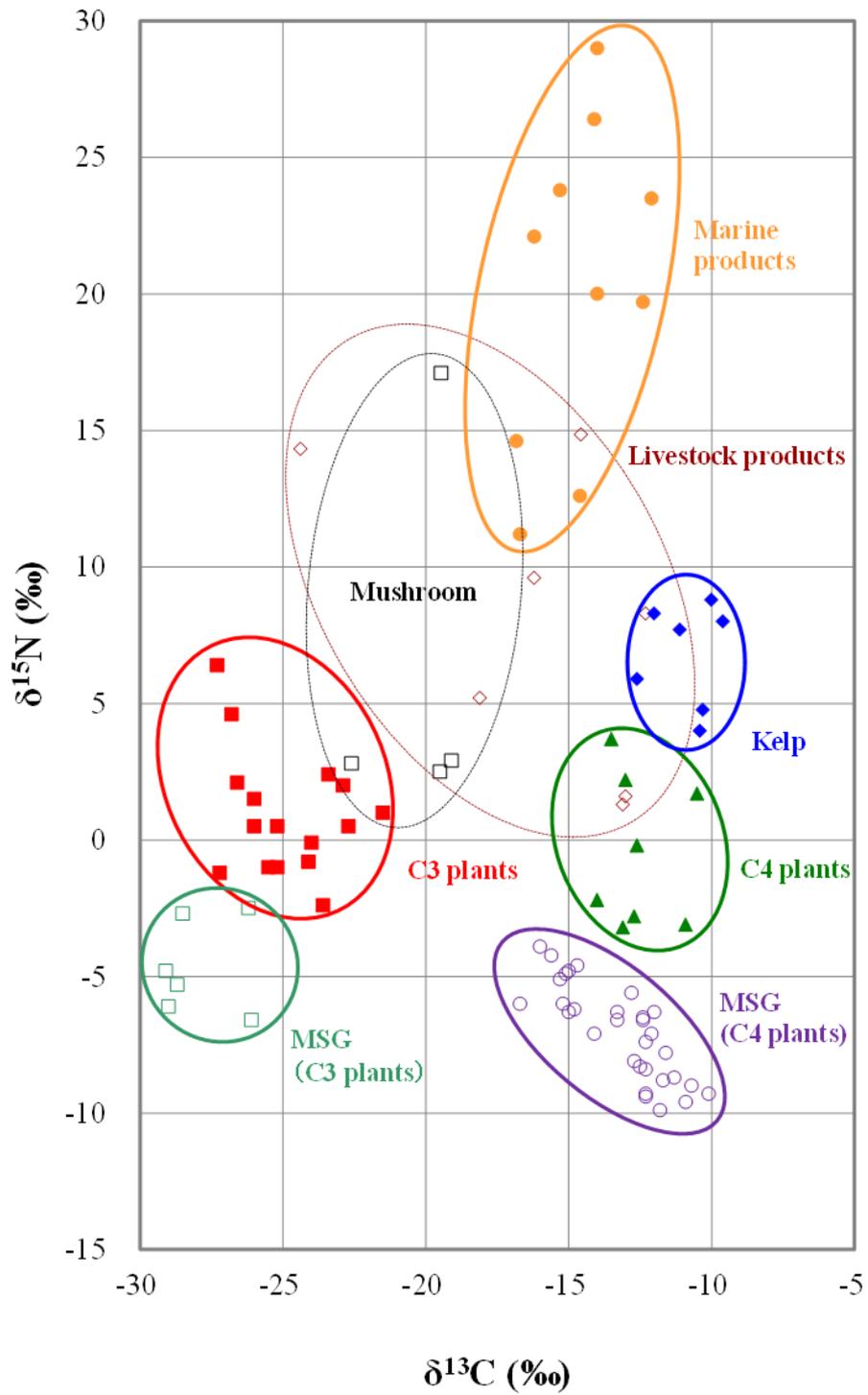


Figure 3-2. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ value from glutamic acid in foodstuffs and seasoning MSG.

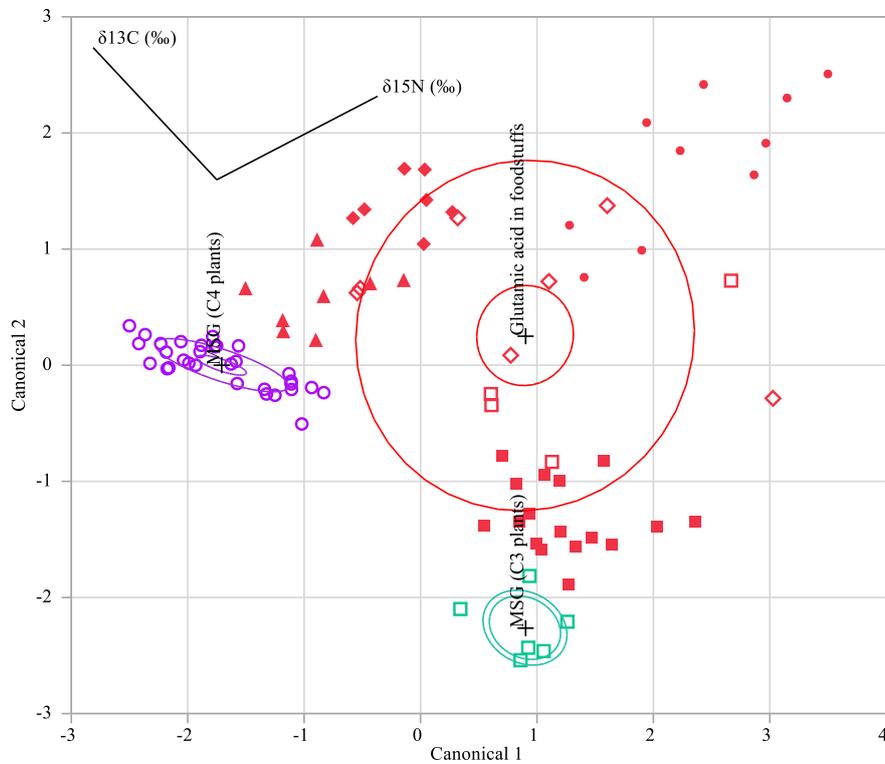


Figure 3-3. Canonical discriminant plot using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values from glutamic acid in foodstuffs and seasoning MSG. Eigenvalue, contribution, cumulative contribution and canonical correlations in Function 1 and 2 are shown. More details are provided in the results section.

Table 3-1. ^{13}C and $\delta^{15}\text{N}$ of glutamic acid in foodstuff and seasoning MSG. All isotopic data are averages of repeated measurements (n=3). The HVP (hydrolyzed vegetable protein) and HAP (hydrolyzed animal protein) samples were hydrolyzed in advance.

Group	Sample	Country of purchase	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
C3 plants	Soy bean No. 1 (HVP)	Japan	-24.1	-0.8
	Soy bean No. 2 (HVP)	Japan	-22.9	2.0
	Soy bean No. 3 (HVP)	Japan	-24.0	-0.1
	Soy bean No. 4 (HVP)	the United States	-21.5	1.0
	Soy bean No. 5	Japan	-25.2	-1.0
	Tomato No. 1	Japan	-27.3	6.4
	Tomato No. 2	Japan	-27.2	-1.2
	Tomato No. 3	Japan	-26.8	4.6
	Potato, beet No. 1 (HVP)	Japan	-26.0	1.5
	Potato, beet No. 2 (HVP)	Japan	-26.0	0.5
	Wheat flour No. 1 (HVP)	Japan	-23.4	2.4
	Wheat flour No. 2	Japan	-25.2	0.5
	Broccoli	Japan	-26.6	2.1
	Chinese cabbage	Japan	-23.6	-2.4
Soy bean, wheat flour (HVP)	the United States	-25.5	-1.0	
Spinach	Japan	-23.5	5.0	
Tea leaf	Japan	-22.7	0.5	
C4 plants	Corn No. 1 (HVP)	Japan	-12.7	-2.8
	Corn No. 2 (HVP)	Japan	-13.1	-3.2
	Corn No. 3 (HVP)	Japan	-12.6	-0.2
	Corn No. 4 (HVP)	Japan	-13.5	3.7
	Corn No. 5 (HVP)	Japan	-13.0	2.2
	Corn No. 6 (HVP)	the United States	-14.0	-2.2
	Corn No. 7	Japan	-10.5	1.7
	Corn No. 8	Japan	-10.9	-3.1
Kelp	Makombu (<i>Laminaria Japonica</i>) No. 1	Japan	-10.3	4.8
	Makombu (<i>Laminaria Japonica</i>) No. 2	Japan	-12.6	5.9
	Rausu kombu (<i>Laminaria diabolica</i>) No. 1	Japan	-10.0	8.8
	Rausu kombu (<i>Laminaria diabolica</i>) No. 2	Japan	-11.1	7.7
	Rishiri kombu (<i>Laminaria ochotensis</i>) No. 1	Japan	-9.6	8.0
	Rishiri kombu (<i>Laminaria ochotensis</i>) No. 2	Japan	-10.4	4.0
Hidaka kombu (<i>Laminaria angustata</i>)	Japan	-12.0	8.3	
Marine products	Argentine red shrimp (<i>Pleoticus muelleri</i>)	Japan	-14.1	26.4
	Sakura shrimp (<i>Lucensosergia lucens</i>)	Japan	-14.0	20.0
	Whiteleg shrimp (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Japan	-16.8	14.6
	Big-eyed tuna (<i>Thunnus obesus</i>)	Japan	-14.0	29.0
	Pacific flying squid (<i>Todaradodes pacificus</i>)	Japan	-16.2	22.1
	Sardine	Japan	-14.6	12.6
	Sardine, skip jack, tuna (HAP)	Japan	-12.4	19.7
	Scallop	Japan	-16.7	11.2
	Skip jack (HAP)	Japan	-12.1	23.5
Yellow tail	Japan	-15.3	23.8	

Mushrooms	Brown mushroom (<i>Agaricus bisporus</i>)	Japan	-19.5	17.1
	Elingi mushroom (<i>Pleurotus eryngii</i>)	Japan	-19.5	2.5
	Shiitake mushroom (<i>Lentinula edodes</i>)	Japan	-22.6	2.8
	Shimeji mushroom (<i>Hypsizygos marmoreus</i>)	Japan	-19.1	2.9
Livestock products	Beef	Japan	-14.6	14.9
	Chicken	Japan	-13.1	1.3
	Lamb meat	Japan	-24.4	14.3
	Pork	Japan	-13.0	1.6
	Cheddar cheese	Japan	-12.3	8.3
	Gouda cheese	Japan	-16.2	9.6
	Processed cheese	Japan	-18.1	5.2
MSG (C3 plants)	MSG No. 1	Hungary	-28.5	-2.7
	MSG No. 2	India	-29.1	-4.8
	MSG No. 3	India	-28.7	-5.3
	MSG No. 4	Thailand	-26.1	-6.6
	MSG No. 5	Thailand	-29.0	-6.1
	MSG No. 6	Vietnam	-26.2	-2.5
MSG (C4 plants)	MSG No. 7	Brazil	-13.3	-6.3
	MSG No. 8	Brazil	-12.4	-6.6
	MSG No. 9	China	-11.7	-8.8
	MSG No. 10	China	-12.3	-7.4
	MSG No. 11	China	-12.3	-8.4
	MSG No. 12	China	-12.5	-8.3
	MSG No. 13	China	-12.4	-6.5
	MSG No. 14	China	-12.8	-5.6
	MSG No. 15	China	-12.3	-9.3
	MSG No. 16	China	-11.8	-9.9
	MSG No. 17	China	-12.0	-6.3
	MSG No. 18	Japan	-15.6	-4.2
	MSG No. 19	Japan	-16.0	-3.9
	MSG No. 20	Japan	-10.9	-9.6
	MSG No. 21	Japan	-10.1	-9.3
	MSG No. 22	Japan	-10.7	-9.0
	MSG No. 23	Japan	-15.0	-6.3
	MSG No. 24	Japan	-15.2	-6.0
	MSG No. 25	Japan	-13.3	-6.6
	MSG No. 26	Japan	-14.7	-4.6
	MSG No. 27	Mexico	-11.3	-8.7
	MSG No. 28	Thailand	-12.7	-8.1
	MSG No. 29	Thailand	-12.3	-9.4
	MSG No. 30	Thailand	-11.6	-7.8
	MSG No. 31	Thailand	-12.1	-7.1
	MSG No. 32	the United States	-15.3	-5.1
	MSG No. 33	the United States	-14.1	-7.1
	MSG No. 34	Vietnam	-16.7	-6.0
	MSG No. 35	Vietnam	-14.8	-6.2
	MSG No. 36	Vietnam	-15.1	-4.9
	MSG No. 37	Vietnam	-15.0	-4.8

Table 3-2. Canonical discriminant analysis details using the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values from glutamic acid in foodstuffs and seasoning MSG. Eigenvalue, contribution, cumulative contribution and canonical correlations in Function 1 and 2 are shown. More details are provided in the results section.

	Function1	Function 2
Eigenvalue	1.587	0.392
Contribution (%)	80.2	19.8
Cumulative contribution (%)	80.2	100.0
Canonical correlations	0.783	0.531

第4章

グルタミン酸判別法の加工食品への応用

1. 序

第2章では、食品試料からグルタミン酸を単離し、EA/IRMSで $\delta^{13}\text{C}$ を測定する新しい方法を開発した。続く第3章では、第2章で開発した $\delta^{13}\text{C}$ 測定法に加え、誘導体化-GC/C/IRMSによる $\delta^{15}\text{N}$ 測定法にて、由来の分かっている調味料としてのMSG（C3植物由来6試料、C4植物由来31試料）及び様々な食材（53試料）に含まれるグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ をそれぞれ測定した。これらの結果を用いて2次判別分析（QDA）を行うことにより、C3植物由来の調味料MSG、C4植物由来の調味料MSG及び食材中のグルタミン酸の3グループへの分類を試みたところ、高い確率（正答率96.7%）で分類可能であった。

本章ではこれを応用することで、市販されている加工食品に含まれるグルタミン酸が調味料MSGと食材中に元々含まれているグルタミン酸のどちらに由来するのか、つまり加工食品に調味料MSGが使用されているかどうかを判定することができるかの検証を行ったものである。

加工食品は様々な食材を原材料としており、複雑なマトリックスからの単離となるため、第2章で用いた手法を基に改良を加えている。

2. 材料及び方法

1) 試料

代表的な加工食品として、パッケージの表示（例えば、“No MSG”や“MSG free”）や原材料表示などから調味料 MSG の使用・不使用が明らかな即席麺（19 試料）、即席スープ（7 試料）、ポテトチップス（5 試料）、レトルトカレー（4 試料）、チーズ（3 試料）、ドレッシング（2 試料）、ハンバーグ（2 試料）、チキンナゲット（2 試料）、ハム（2 試料）、ソーセージ（2 試料）、ベーコン（2 試料）及び魚の缶詰（2 試料）を入手し、試料として使用した（Table 4-1 (A)）。なお、各試料についてニンヒドリン発色法（Deines, 1980）により予めグルタミン酸含量を測定した（Table 4-1 (B)）。

2) 試薬等

L-アラニン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-19.6\text{‰} \pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $26.1\text{‰} \pm 0.2$)、L-アスパラギン酸 ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-23.95\text{‰} \pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $35.20\text{‰} \pm 0.05$)、2 種類のグリシン (A, $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-32.3\text{‰} \pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $1.12\text{‰} \pm 0.2$; B, $\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-60.02\text{‰} \pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-26.63\text{‰} \pm 0.02$)、L-ヒスチジン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-11.4\text{‰} \pm 0.2$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-7.6\text{‰} \pm 0.2$)、L-フェニルアラニン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-11.20\text{‰} \pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $1.70\text{‰} \pm 0.06$)、L-ヒドロキシプロリン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-12.66\text{‰} \pm 0.02$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $-9.17\text{‰} \pm 0.07$) 及び L-ノルロイシン ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB = $-28.85\text{‰} \pm 0.03$, $\delta^{15}\text{N}$ vs. AIR = $18.96\text{‰} \pm 0.11$) のアミノスタンダードを Shoko Scientific Corporation (Saitama, Japan) から購入し、 $\delta^{13}\text{C}$ または $\delta^{15}\text{N}$ 測定用の標準品として使用した。

蒸留水 (HPLC grade)、塩酸 (precision analysis grade)、水酸化ナトリウム (special grade)、*n*-ヘキサン (pesticide residue and polychlorinated biphenyl analysis grade)、ジクロロメタン (HPLC grade)、メタノール (HPLC grade)、2-プロパノール (HPLC grade)、25%アンモニア水 (special grade)、炭酸水素アンモニウム (first grade)、活性炭素 (for chromatography)、塩化チオニル (Wako special grade)、塩化ピバロイル (practical grade)、無水硫酸マグネシウム (practical grade) 及び *L*-グルタミン酸ナトリウム一水和物 (special grade; MSG reagent, $\delta^{13}\text{C} = -14.7\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 5.6\text{‰}$) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) 製を使用した。オクタデシルシリル化シリカゲル (C18) カラム樹脂は ODS-A-HG (50 μm particle size, 12 nm pore size; YMC, Kyoto, Japan) を、強酸性陽イオン交換樹脂は Amberlite[®] IR120B (hydrogen form; Organo Corporation, Tokyo, Japan) 及び AG[®] 50W-X8 (200-400 mesh, hydrogen form; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, US) を使用した。Millex[®]-LH syringe driven filter unit (hydrophilic PTFE membrane, 0.45 μm pore size) 及び Ultrafree[®]-MC GV centrifugal filter unit (PVDF membrane, 0.22 μm pore size) は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) 製を使用した。

3) グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 分析

$\delta^{13}\text{C}$ 測定のためのグルタミン酸抽出

EA/IRMS により $\delta^{13}\text{C}$ を測定するため、第2章で開発した方法に一部修正を加えた方法で試料からグルタミン酸を単離した。

遊離グルタミン酸量が 10 mg 以上になるように試料を採取し、蒸留水 30 mL、1 mol L⁻¹ 塩酸 10 mL、*n*-ヘキサン 15 mL 及びジクロロメタン 10 mL を加えて 30 分間振とうした (ただし、試料採取量が 10 g 以上となる場合は各試薬量

を3倍とした)。遠心分離 (2,140×g, 3 min) 後、上層を除去し、あらかじめメタノール及び蒸留水各 30 mL でコンディショニングした活性炭素 (3 g) 及び C18 カラム樹脂 (3 g) 積層カラムに下層を全量負荷し、さらに蒸留水 10 mL をカラムに通した。カラムからの流出液を全量回収し、あらかじめ蒸留水、1 mol L⁻¹ 塩酸及び蒸留水各 300 mL でコンディショニングした強酸性陽イオン交換樹脂 (100 g, Amberlite® IR120B) カラムに負荷した。蒸留水 400 mL で洗浄後、10 vol%(v/v) アンモニア水 200 mL で溶出した。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した後、残留物を 65 vol%(v/v) メタノール 3 mL で溶解し、Millex®-LH syringe driven filter unit でろ過した。ろ過液を分取 HPLC に注入し、保持時間 27 分付近に溶出したグルタミン酸のピーク全体を分取した後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固 (60°C) した。得られたグルタミン酸の結晶を EA/IRMS 測定に供した。

分取 HPLC によるグルタミン酸の単離

$\delta^{13}\text{C}$ 測定の前処理のため、コントローラー (CBM-20A)、送液ポンプ (LC-20AP)、オートサンプラー (SIL-10AP)、UV 検出器 (SPD-20A) 及びフラクションコレクター (FRC-10A) から成る Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan) 製の分取 HPLC システムを使用した。分取用カラム及びガードカラムはそれぞれ Showa Denko (Tokyo, Japan) 製の Shodex Asahipak NH2P-90 20F (300 mm × 20 mm i.d., 9 μm particle size)、Shodex Asahipak NH2P-130G 7B (50 mm × 7.5 mm i.d., 13 μm particle size) を使用した。移動相には 100 mmol L⁻¹ 炭酸水素アンモニウム溶液及びメタノール (35 : 65) 混液を使用し、流速は 7 mL min⁻¹ とした。カラム温度は室温とし、グルタミン酸ピークの検出には UV 検出器 (波長 210 nm) を使用した。分取 HPLC により単離されたグルタミン酸中のアンモニ

ウム塩を除くことは難しかったため、 $\delta^{15}\text{N}$ は EA/IRMS により $\delta^{13}\text{C}$ と同時に分析することはできなかった。

EA/IRMS 測定

$\delta^{13}\text{C}$ は Flash 2000 electron analyzer、ConFlo IV interface 及び Delta V Advantage isotope-ratio mass spectrometer から成る Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany) 製のオンライン EA/IRMS システムで測定した。測定条件は第 3 章に準じた。EA の酸化炉温度、還元炉温度及びカラム温度はそれぞれ $1,000^\circ\text{C}$ 、 680°C 、 50°C とし、キャリアガス (ヘリウム) 及び燃焼用ガス (酸素) の流速は、それぞれ 100 mL min^{-1} 、 175 mL min^{-1} とした。なお、標準品 4 種類 (L-アラニン、2 種類のグリシン (A, B) 及び L-ヒスチジン) 及び試料はそれぞれ約 0.3 mg を錫カプセルに秤量して包み込み、測定に供した。

4) グルタミン酸の $\delta^{15}\text{N}$ 分析

$\delta^{15}\text{N}$ 測定のためのグルタミン抽出

GC/C/IRMS により $\delta^{15}\text{N}$ を測定するため、第 3 章の方法に一部修正を加えた方法で試料からグルタミン酸を抽出し、誘導体化を行った。

遊離グルタミン酸量が 0.2 mg 以上になるように試料を採取し、蒸留水 6 mL 、 1 mol L^{-1} 塩酸 2 mL 、*n*-ヘキサン 3 mL 及びジクロロメタン 2 mL を加えて 10 分間振とうした。遠心分離 ($2,140\times g$, 3 min) 後、上層を除去し、あらかじめ蒸留水、 1 mol L^{-1} 塩酸、蒸留水、 1 mol L^{-1} 水酸化ナトリウム溶液、蒸留水及び 1 mol L^{-1} 塩酸各 15 mL でコンディショニングした強酸性陽イオン交換樹脂 (10 mL , AG[®] 50W-X8) に下層を全量負荷した。さらに蒸留水 40 mL をカラムに通した。蒸留水 40 mL で洗浄後、 $10\text{ vol}\%$ アンモニア水 20 mL で溶出した。溶出

液をロータリーエバポレーターで減圧濃縮（60°C）した後、窒素ガス気流下で乾固させた。残留物に塩化チオニル及び2-プロパノール（4：1）混液 0.5 mL を添加し、110°Cで2時間反応させた。放冷後、窒素ガス気流下で乾固させ、塩化ピバロイル 0.1 mL 及びジクロロメタン 0.4 mL を添加し、110°Cで2時間反応させた。放冷後、窒素ガス気流下で乾固させ、蒸留水 0.3 mL、*n*-ヘキサン 0.3 mL 及びジクロロメタン 0.2 mL を加えて振とうし、上層を無水硫酸マグネシウムが詰められた Ultrafree[®]-MC GV centrifugal filter unit でろ過した。この操作をさらに2回行い、ろ液を集めた。窒素ガス気流下で乾固させ、ジクロロメタン 0.5 mL に溶解し、GC/IRMS 測定に供した。

GC/C/IRMS 測定

$\delta^{15}\text{N}$ は GC 装置 (Trace 1310)、GC IsolinkII、ConFlo IV interface 及び Delta V Advantage isotope-ratio mass spectrometer から成る Thermo Fisher Scientific 製のオンライン GC/C/IRMS システムで測定した。GC IsolinkIIの高温型酸化炉の温度は 1,000°Cとし、標準品及び試料の測定溶液それぞれ 1 μL を注入口温度 270°C でスプリットレスモードにより GC に導入した。GC カラムには Ultra 2 (50 m \times 0.32 mm i.d., 0.54 μm film; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) を使用し、カラムオープンの昇温条件を 40°C (2.5 分保持)、20°C min^{-1} で 110°C (保持なし)、3.2°C min^{-1} で 150°C (保持なし)、9°C min^{-1} で 220°C (10 分保持)、30°C min^{-1} で 250°C (5 分保持) とし、キャリアガスにヘリウムガス (流速 1.4 mL min^{-1}) を使用した。なお、標準品の測定溶液は標準品 5 種類 (L-アスパラギン酸、グリシン (B)、L-フェニルアラニン、L-ヒドロキシプロリン及び L-ノルロイシン) を各 1 mg 秤量・混合したものを、試料と同様に誘導体化して調製した。

5) 安定同位体比分析

炭素及び窒素の同位体組成は国際標準物質 [$\delta^{13}\text{C}$ は PeeDee 層のベルムナイト炭酸塩 (VPDB)、 $\delta^{15}\text{N}$ は大気中の窒素 (Air)] に対して従来の δ 表記法で表した (Gonfiantini *et al.*, 1995)。

$$\delta^i\text{E} = [({}^i\text{R}_{\text{Sample}} / {}^i\text{R}_{\text{Standard}}) / {}^i\text{R}_{\text{Standard}}] \times 1000$$

ここで i は元素 E のより重い同位体の質量数 (^{13}C 及び ^{15}N) であり、 R_{sample} は試料の安定同位体比 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 及び $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)、 $\text{R}_{\text{standard}}$ は国際標準物質の安定同位体比を示す。

EA/IRMS による同位体測定の実現性を確認するために、検量線用の 4 種類の $\delta^{13}\text{C}$ 既知のアミノ酸標準 (L-アラニン、2 種類のグリシン (A, B) 及び L-ヒスチジン) を 4 または 5 試料測定毎に分析した。標準の分析誤差 (1σ) は最少炭素量 100 μg で 0.1‰以内であった。GC/C/IRMS による同位体測定の実現性を確認するために、検量線用の $\delta^{15}\text{N}$ 既知のアミノ酸混合標準 (L-アスパラギン酸、グリシン (B)、L-フェニルアラニン、L-ヒドロキシプロリン及び L-ノルロイシン) を 4 または 5 試料測定毎に分析した。標準の分析誤差 (1σ) は最少窒素量 800 ng で 0.5‰以内であった。グルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ はこの方法を用いて測定した。

加工食品中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ は同日に繰り返し (3 または 5 回) 測定した。すべての結果は平均 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。グルタミン酸の同位体比値の平均標準偏差 (1σ) は EA/IRMS による $\delta^{13}\text{C}$ 測定では $\pm 0.3\%$ 以内、GC/C/IRMS による $\delta^{15}\text{N}$ 測定では $\pm 0.6\%$ 以内であった。

6) 判別分析

JMP 14.0.0 ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, US) を使用して判別分析を行った (Piasentier *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2008)。第 3 章で取得した由来既知の C3 植物由来の調味料 MSG (6 試料)、C4 植物由来の調味料 MSG (31 試料) 及び様々な食材 (大豆やトマトなど C3 植物、トウモロコシなど C4 植物、昆布、エビやマグロなど海産物、キノコ類、豚や鶏など畜産物、合計 53 試料) 中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 値に基づいて、3 グループ (C3 植物由来調味料グループ、C4 植物由来調味料 MSG グループ及び食材グループ) 及び 2 グループ (調味料グループ及び食材グループ) 間で解析を行った。

3. 結果

1) 加工食品の前処理における同位体分別の確認

第2章及び第3章ではたんぱく質を構成するグルタミン酸も回収するために、まず初めに試料の酸加水分解を行った。しかし、本報告では遊離のグルタミン酸についてのみ $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を測定することが必要なため、加水分解処理は行わなかった。また、測定に必要なグルタミン酸量を得るため、特にグルタミン酸含量の少ない試料については必要試料量を多くし、操作性を確保するため抽出時に使用する試薬量も増やした。

まず初めに、前処理操作において同位体分別が起こらないことを確認した。試料由来のグルタミン酸の影響を最小限とするため、グルタミン酸含量のなるべく少ない加工食品試料に、 $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 値をあらかじめ EA/IRMS により測定しておいた MSG reagent ($\delta^{13}\text{C} = -14.7\text{‰}$, $\delta^{15}\text{N} = 5.6\text{‰}$) を MSG reagent 由来のグルタミン酸の割合が 95%以上になるように過剰量添加した。代表的な加工食品試料として、炭水化物、脂質及びナトリウムの多い即席麺、炭水化物や脂質の多いポテトチップス、脂質及びナトリウムの多いドレッシング、脂質及びたんぱく質の多いベーコンを使用した。これらの MSG が添加された試料について $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 測定のための前処理をそれぞれ行った後、安定同位体比を測定した (Table 4-2)。その結果、 $\delta^{13}\text{C}$ の N=5 の標準偏差は 0.1‰以下、添加した MSG reagent の $\delta^{13}\text{C}$ 値 -14.7‰ に対するずれは $-0.4 \sim 0.3\text{‰}$ の範囲内であった。また、 $\delta^{15}\text{N}$ は、N=5 の標準偏差が 0.4‰以下、添加した MSG reagent の $\delta^{15}\text{N}$ 値 -5.6‰ に対するずれは $-0.3 \sim 0.5\text{‰}$ の範囲内であった。以上より、 $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ とも前処理及び測定を通じての同位体比のずれは $\pm 0.5\text{‰}$ の範囲に収まっている

ことから、前処理法を加工食品に適用しても同位体分別はほとんど起きず、本報告の目的を果たすためには十分な真度及び精度を有していると判断した。

2) 判別分析法の加工食品への適用

第3章では、C3植物由来の調味料MSG（6試料）、C4植物由来の調味料MSG（31試料）及び様々な食材（C3植物、C4植物、昆布、海産物、キノコ類及び畜産物の合計53試料）の安定同位体比データを判別分析により統計解析し、C3植物由来調味料MSG、C4植物由来調味料MSG及び様々な食材中のグルタミン酸を96.7%の正答率で判別可能であった。このようにして得られた判別関数は以下の通りである。

$$\text{関数 1: } 0.154 [\delta^{15}\text{N}] + 0.141 [\delta^{13}\text{C}] - 2.744$$

$$\text{関数 2: } 0.165 [\delta^{15}\text{N}] + 0.073 [\delta^{13}\text{C}] + 2.688$$

そこで、加熱・乾燥等のプロセスを経た加工食品の場合でもこれらの判別関数を用いた判別分析法がそのまま適用可能であるか評価を行った。

まず始めに、パッケージの表示（例えば、“No MSG”や“MSG free”）や原材料表示などから調味料MSGの使用・不使用が明らか（C3及びC4植物のどちらに由来するかは不明）な様々な加工食品全52試料について含有するグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 値を求めた。結果はTable 4-1 (B)にまとめ、 $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の2次元プロット図をFigure 4-1に示した。

調味料MSGが使用された加工食品の $\delta^{13}\text{C}$ は-27.8から-11.1‰、 $\delta^{15}\text{N}$ は-6.9から-2.6‰の範囲内であり、そのほとんどはC3植物由来調味料MSG（ $\delta^{13}\text{C}$ ：-29.1から-26.1‰、 $\delta^{15}\text{N}$ ：-6.6から-2.5‰、第3章のデータより）またはC4植物由来調味料MSG（ $\delta^{13}\text{C}$ ：-16.7から-10.1‰、 $\delta^{15}\text{N}$ ：-9.9から-3.9‰、第3章のデータより）の範囲内であった。さらに、調味料MSGが使用されていない

加工食品の $\delta^{13}\text{C}$ は-26.2 から-13.6‰、 $\delta^{15}\text{N}$ は-4.9 から+18.7‰の範囲内であり、そのほとんどは様々な食材 ($\delta^{13}\text{C}$: -27.3 から-9.6‰、 $\delta^{15}\text{N}$: -3.2 から+29.0‰、第3章のデータより) の範囲内であった。

調味料 MSG が使用された加工食品の $\delta^{13}\text{C}$ は調味料 MSG の製造に用いられた原料 (C4 植物のサトウキビ糖蜜やトウモロコシ、C3 植物のキャッサバやタピオカ澱粉) の同位体組成を、調味料 MSG が使用されていない加工食品の $\delta^{13}\text{C}$ は主原料または食品添加物 (肉や野菜のたん白加水分解物など) の同位体組成をそれぞれ反映している。

調味料 MSG が使用されていない加工食品の $\delta^{15}\text{N}$ と比較して、調味料 MSG が使用された加工食品の $\delta^{15}\text{N}$ はわずかに低い値であった。調味料 MSG が酵素微生物発酵により製造される時、共通の窒素源は培養液中のアンモニアガスである (Kumagai, 2006; Kinoshita *et al.*, 1957)。アンモニア原料の $\delta^{15}\text{N}$ は 0‰であるため、調味料 MSG の $\delta^{15}\text{N}$ も 0‰であると予想される。にも関わらず、調味料 MSG がわずかに低い $\delta^{15}\text{N}$ 値を示すのは、MSG 製造における脱色や再結晶のような精製過程の間に窒素の同位体分別が起こっているためと推測される (第3章)。

次に、得られた結果を上記の判別関数に当てはめ、判別得点を算出し、各試料がどのグループに分類されるか解析を行った (Table 4-1 (C))。判別得点の2次元プロット図は Figure 4-2 に示した。その結果、調味料 MSG が添加された22 試料中 16 試料は C4 植物由来調味料グループ、2 試料は C3 植物由来調味料グループ、残りの 4 試料は食材グループに分類された。また、調味料 MSG が添加されていない30 試料中 29 試料は食材グループ、残りの 1 試料は C4 植物由来調味料グループに分類された。合計すると全 52 試料中 47 試料は正しく分類され、正答率は 90.4%となった。

5 試料が誤ったグループに分類された原因として2つ（①原料に含まれる遊離グルタミン酸の影響、②調味料 MSG のコンタミネーション）考えられた。1つ目は添加された調味料 MSG 以外にも加工食品を製造するために使用された原材料にグルタミン酸が含まれており、それが $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ 値に影響した場合である。顕著な例として、試料 No. 51 の魚（マグロ）の缶詰が挙げられる。この缶詰には調味料 MSG が添加されていたが、誤って食材グループに分類された。一般に生のマグロには遊離のグルタミン酸が 1~10 mg/100g 程度含まれており（“Umami information by food (Seafood)”, Umami Information Center）、さらに海産物の中でも特にマグロの様な大型魚は $\delta^{15}\text{N}$ の値が大きい（20%以上）ことが知られている（Chikaraishi *et al.*, 2009; Popp *et al.*, 2007）。このことから、マグロ由来の遊離のグルタミン酸によって、添加された調味料 MSG 本来の $\delta^{15}\text{N}$ 値がプラス側にずれたと考えられた。2つ目の原因として、製造時の意図しない調味料 MSG の混入が挙げられる。加工食品の最終製造者自身が調味料 MSG を添加していないにも関わらず、調味料 MSG が使用された原材料を意図せず使用したことにより、その影響を受けて調味料グループに分類されてしまうケースであり、試料 No. 22 の即席スープはそれに当たる可能性がある。

3) 調味料グループ及び食材グループ間の判別分析による MSG 使用の有無の判定

3. の2) の判別分析法では、調味料 MSG の由来植物（C3 または C4 植物）を区別できるように、C3 植物由来調味料グループ、C4 植物由来調味料グループ及び食材グループの3グループへ分類した。しかし、実用上最も知りたい情報は調味料 MSG 使用の有無であり、それを少しでも高確率で判別することの方が優先される。そこで、C3 及び C4 植物由来調味料グループをまとめて

1つの調味料グループとし、2グループ間での判別分析を試み、検証を行った。

まずは第3章で取得したC3及びC4植物由来の調味料MSG及び食材中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ データを使用し、2グループ間での判別分析を行った。得られた判別関数は以下の通りとなった。

$$\text{関数 3: } 0.153 [\delta^{15}\text{N}] - 0.057 [\delta^{13}\text{C}] - 1.125$$

次に、得られた判別関数3に加工食品に含まれるグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の測定結果を当てはめて判別得点を求め、各試料がいずれのグループに分類されるか解析を行った (Table 4-1 (C))。判別得点のプロット図は Figure 4-3 に示した。その結果、調味料MSGが添加された22試料中21試料は調味料グループに、残りの1試料は食材グループに分類された。また、調味料MSGが添加されていない30試料中29試料は食材グループに、残りの1試料は調味料グループに分類された。合計すると全52試料中49試料は正しく分類され、正答率は96.2%で、IIの2) で得られた結果 (正答率90.4%) よりも良好な結果となった。判別得点のプロット図上で食材グループの領域に対して相対的に小さかった調味料グループの領域が (Figure 4-2)、C3及びC4植物由来の調味料MSGを1つにまとめることで相対的に大きくなった (Figure 4-3)。これにより、プロット図上において各グループの境界付近に位置することで食材グループに誤って分類された試料が、調味料グループとして正しく分類されたためであると考えられる。

以上の結果より、対象の加工食品に含まれるグルタミン酸が調味料MSG及び食材中のグルタミン酸のいずれに由来するか、つまりは調味料MSGが使用されているかどうかを高確率で判定できることが示された。

4. 小括

本章では調味料 MSG が加工食品に使用されているかどうかを判定する方法を開発した。加工食品中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を測定するために、 $\delta^{13}\text{C}$ についてはグルタミン酸結晶を高純度に単離して EA/IRMS 測定、 $\delta^{15}\text{N}$ については精製・誘導體化して GC/C/IRMS 測定する方法を採用した。これらの方法は、第 3 章で用いた方法に一部修正を加えたものであり、その妥当性を評価したところ、十分に信頼性の高い方法であることが確認された。

これら方法により、様々な種類の加工食品中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の値を得た。その結果、調味料 MSG が使用された加工食品の $\delta^{13}\text{C}$ は調味料 MSG の製造に用いられた原料（C4 植物のサトウキビ糖蜜やトウモロコシ、C3 植物のキャッサバやタピオカ澱粉）の同位体組成を、調味料 MSG が使用されていない加工食品の $\delta^{13}\text{C}$ は主原料または食品添加物（肉や野菜のたん白加水分解物など）の同位体組成をそれぞれ反映していると考えられた。また、調味料 MSG が使用されていない加工食品の $\delta^{15}\text{N}$ と比較して、調味料 MSG が使用された加工食品の $\delta^{15}\text{N}$ はわずかに低い値であった。調味料 MSG が酵素微生物発酵により製造されるとき、共通の窒素源は培養液中のアンモニアガスである（Kumagai, 2006; Kinoshita *et al.*, 1957）。アンモニア原料の $\delta^{15}\text{N}$ は 0‰ であるため、調味料 MSG の $\delta^{15}\text{N}$ も 0‰ であると予想される。それにも関わらず、調味料 MSG がわずかに低い $\delta^{15}\text{N}$ 値を示すのは、MSG 製造における脱色や再結晶のような精製過程の間に窒素の同位体分別が起こっているためと推測された（第 3 章）。

得られた様々な種類の加工食品中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の値を判別式に代入して判別分析を行うことにより、その正答率を評価した。第 3 章で導いた確立した C3 植物由来の調味料 MSG、C4 植物由来の調味料 MSG 及び食

材中のグルタミン酸の3グループに分類するための判別分析法をそのまま適用した用いた場合、その正答率は90.4%であった。5試料が誤ったグループに分類された原因として2つ（①原料に含まれる遊離グルタミン酸の影響、②調味料MSGのコンタミネーション）考えられた。1つ目は添加された調味料MSG以外にも加工食品を製造するために使用された原材料にグルタミン酸が含まれており、それが $\delta^{13}\text{C}$ や $\delta^{15}\text{N}$ 値に影響した場合である。顕著な例として、試料No. 51の魚（マグロ）の缶詰が挙げられる。この缶詰には調味料MSGが添加されていたが、誤って食材グループに分類された。一般に生のマグロには遊離のグルタミン酸が1~10 mg/100g程度含まれており（“Umami information by food (Seafood)”, Umami Information Center）、さらに魚介類の中でも特にマグロの様な大型魚は $\delta^{15}\text{N}$ の値が大きい（20%以上）ことが知られている

（Chikaraishi *et al.*, 2009; Popp *et al.*, 2007）。このことから、マグロ由来の遊離のグルタミン酸によって、添加された調味料MSG本来の $\delta^{15}\text{N}$ 値がプラス側にずれたと考えられた。2つ目の原因として、製造時の意図しない調味料MSGの混入が挙げられる。加工食品の最終製造者自身が調味料MSGを添加していないに関わらず、調味料MSGが使用された原材料を意図せず使用したことにより、その影響を受けて調味料グループに分類されてしまうケースであり、試料No. 22の即席スープはそれに当たる可能性がある。

さらに調味料MSG及び食材中のグルタミン酸の2グループ間で新たに判別分析を行い同様に評価したところ、正答率は3グループの場合よりも上昇し、96.2%と非常に良好な結果となった。これは加工食品中のグルタミン酸が調味料MSG及び食材のいずれに由来するのかを高い確率で判別できることを示しており、つまりは対象となる加工食品に調味料MSGが使用されているかどうか判断できることを意味している。判別得点のプロット図上で食材グループの領域に対して相対的に小さかった調味料グループの領域が（Figure 4-2）、C3及

び C4 植物由来の調味料 MSG を 1 つにまとめることで相対的に大きくなった (Figure 4-3)。これにより、プロット図上において各グループの境界付近に位置することで食材グループに誤って分類された試料が、調味料グループとして正しく分類されたためであると考えられる。

5. 图表

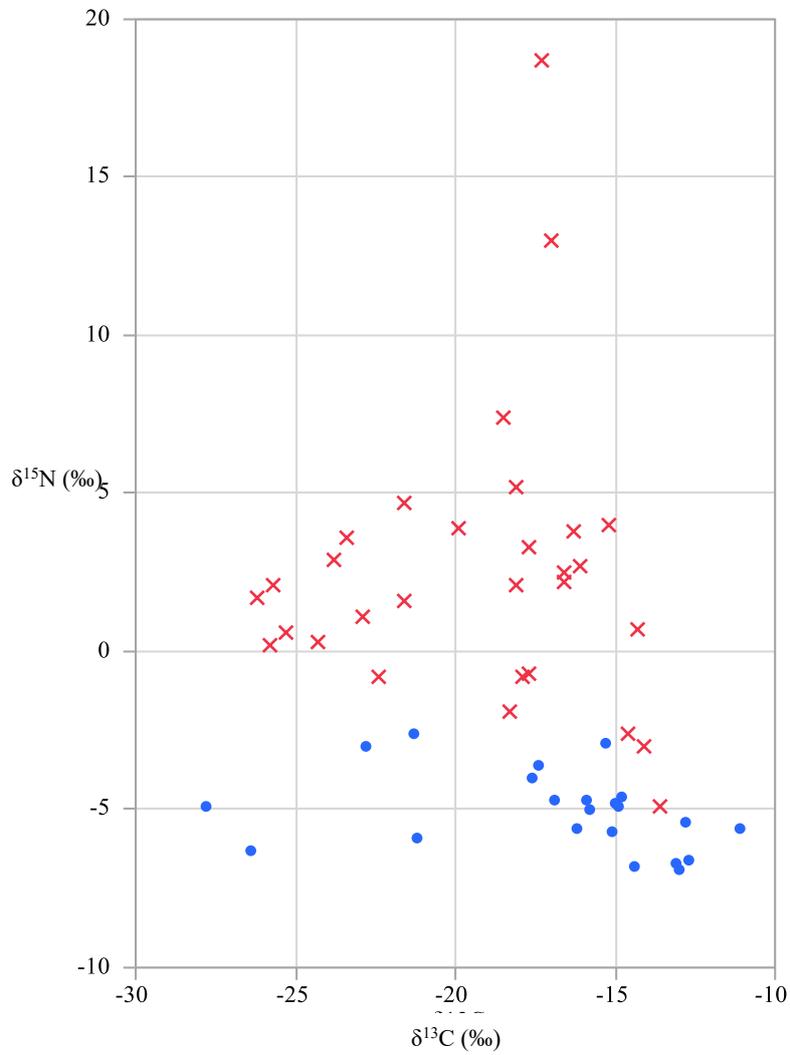


Figure 4-1. Two-dimensional plot of the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of glutamic acid contained in processed foods. Blue “●” and red “×” show samples to which seasoning MSG was added and samples to which seasoning MSG was not added, respectively.

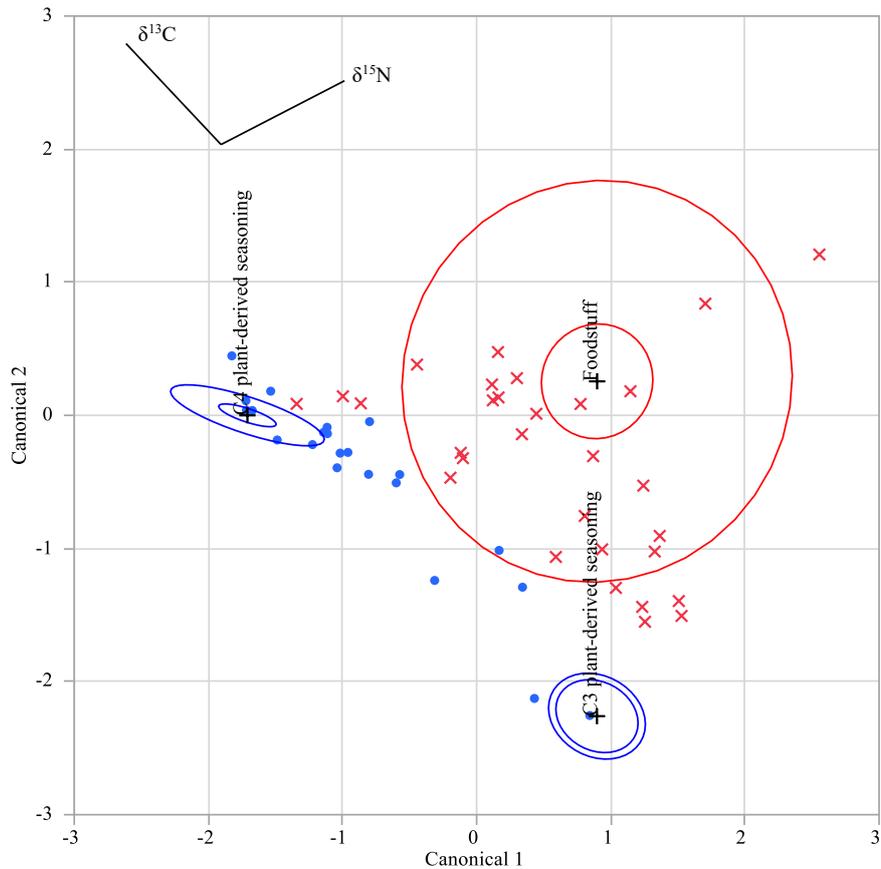


Figure 4-2. Two-dimensional plot of the discriminant scores calculated using discriminant functions 1 and 2. The discriminant scores obtained using functions 1 and 2 are shown on the horizontal and vertical axes, respectively. Blue “●” and red “×” show samples to which seasoning MSG was added and samples to which seasoning MSG was not added, respectively. The other symbols in the figure show the information obtained by discriminant analysis for the three groups (the C3 plant-derived seasoning group, the C4 plant-derived seasoning group, and the foodstuff group) using statistical analysis software for the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the 90 samples discussed in the chapter 3. The inner ellipses indicate the 95% confidence interval for each group mean, and the outer ellipses indicate the region estimated to contain 50% of the population of each group. The set of rays indicates the degree of association for a covariate with the two variables. The coordinate points are denoted by “+” signs.

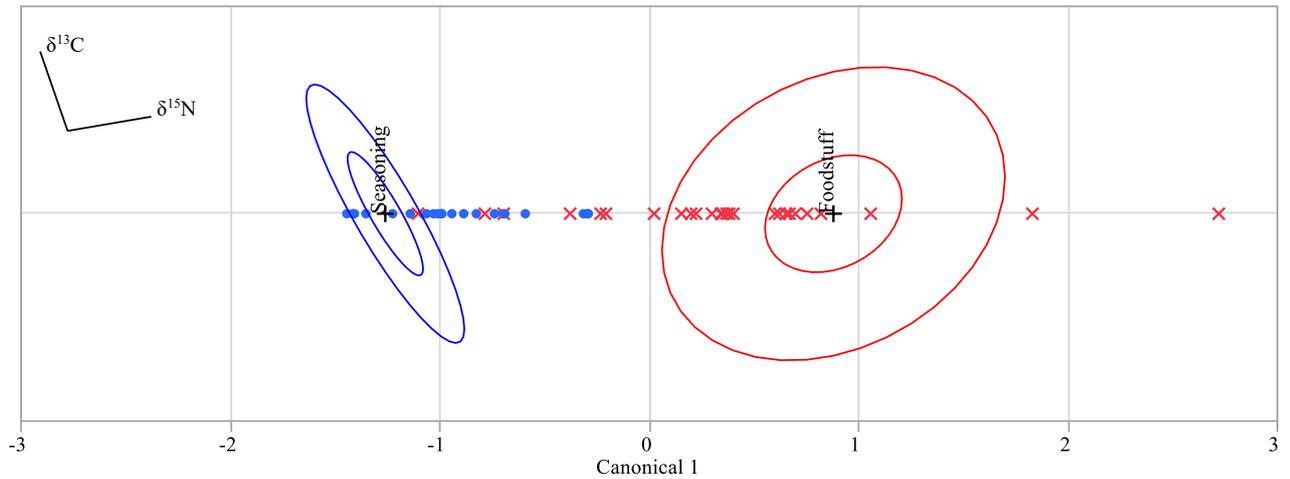


Figure 4-3. Plot of the discriminant scores calculated using discriminant function 3.

Blue “●” and red “×” show samples to which seasoning MSG was added and samples to which seasoning MSG was not added, respectively. The other symbols in the figure show the information obtained by discriminant analysis using statistical analysis software between the two groups (the seasoning group and the foodstuff group) for the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of the 90 samples discussed in the chapter 3. The inner ellipses indicate the 95% confidence interval for each group mean, and the outer ellipses indicate the region estimated to contain 50% of the population of each group. The set of rays indicates the degree of association for a covariate with the two variables. The coordinate points are denoted by “+” signs.

Table 4-1. List of basic information, stable isotope ratios and discrimination results for the processed foods used in this study.

No.	Samples	(A)		(B)				(C)		
		Country of Manufacture	Addition of seasoning MSG	Glutamic acid content [g/100 g]	$\delta^{13}\text{C}$ [‰] _{VPDB} *1		$\delta^{15}\text{N}$ [‰] _{AIR} *1		Three-group discrimination analysis *2,4	Two-group discrimination analysis *3,4
					Mean	SD	Mean	SD		
1	Instant noodles No.1	Japan	Yes	1.00	-15.9	0.1	-4.7	0.3	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
2	Instant noodles No.2	Japan	Yes	1.17	-14.4	0.1	-6.8	0.3	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
3	Instant noodles No.3	Japan	Yes	1.33	-16.9	0.1	-4.7	0.4	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
4	Instant noodles No.4	United States	Yes	0.67	-15.8	<0.1	-5.0	0.1	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
5	Instant noodles No.5	United States	Yes	0.87	-15.1	0.1	-5.7	0.2	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
6	Instant noodles No.6	United States	Yes	1.20	-14.9	0.1	-4.9	0.1	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
7	Instant noodles No.7	Japan	No	0.07	-17.9	0.1	-0.8	0.5	Foodstuff	Foodstuff
8	Instant noodles No.8	Japan	No	0.06	-22.4	<0.1	-0.8	0.1	Foodstuff	Foodstuff
9	Instant noodles No.9	Japan	No	0.23	-24.3	<0.1	0.3	0.3	Foodstuff	Foodstuff
10	Instant noodles No.10	Japan	No	0.13	-21.6	<0.1	4.7	0.4	Foodstuff	Foodstuff
11	Instant noodles No.11	Japan	No	0.04	-17.0	0.1	13.0	0.6	Foodstuff	Foodstuff
12	Instant noodles No.12	United States	No	0.18	-14.3	0.1	0.7	0.4	Foodstuff	Foodstuff
13	Instant noodles No.13	United States	No	0.19	-18.3	0.1	-1.9	0.2	Foodstuff	Foodstuff
14	Instant noodles No.14	United States	No	0.19	-17.7	0.3	-0.7	0.3	Foodstuff	Foodstuff
15	Instant noodles No.15	United States	No	0.05	-16.6	0.1	2.5	0.4	Foodstuff	Foodstuff
16	Instant noodles No.16	United States	No	0.05	-25.3	0.1	0.6	0.2	Foodstuff	Foodstuff

17	Instant noodles No.17	United States	No	0.10	-26.2	<0.1	1.7	0.3	Foodstuff	Foodstuff
18	Instant noodles No.18	India	No	0.16	-22.9	<0.1	1.1	0.2	Foodstuff	Foodstuff
19	Instant noodles No.19	India	No	0.02	-21.6	0.1	1.6	0.1	Foodstuff	Foodstuff
20	Instant soup No.1	Japan	Yes	4.98	-13.1	<0.1	-6.7	0.4	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
21	Instant soup No.2	Japan	Yes	1.69	-13.0	<0.1	-6.9	0.1	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
22	Instant soup No.3	Japan	No	0.20	-13.6	0.1	-4.9	0.6	C4 plant-derived season-	Seasoning
23	Instant soup No.4	Japan	No	0.21	-18.1	0.1	2.1	0.1	Foodstuff	Foodstuff
24	Instant soup No.5	India	Yes	5.24	-27.8	0.1	-4.9	0.3	C3 plant-derived seasoning	Seasoning
25	Instant soup No.6	Japan	No	0.24	-14.6	0.2	-2.6	0.1	Foodstuff	Foodstuff
26	Instant soup No.7	Japan	No	0.60	-16.6	0.1	2.2	0.1	Foodstuff	Foodstuff
27	Potato chips No.1	Japan	Yes	1.07	-17.6	0.0	-4.0	0.3	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
28	Potato chips No.2	Thailand	Yes	1.63	-26.4	0.1	-6.3	0.3	C3 plant-derived seasoning	Seasoning
29	Potato chips No.3	Thailand	Yes	0.87	-16.2	0.1	-5.6	0.3	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
30	Potato chips No.4	Japan	No	0.13	-25.8	0.1	0.2	0.5	Foodstuff	Foodstuff
31	Potato chips No.5	United States	No	0.24	-25.7	0.1	2.1	0.6	Foodstuff	Foodstuff
32	Retort pouched curry No.1	Japan	Yes	0.61	-15.3	0.2	-2.9	0.5	C4 plant-derived seasoning	Foodstuff
33	Retort pouched curry No.2	Japan	Yes	1.82	-22.8	<0.1	-3.0	0.3	Foodstuff	Seasoning
34	Retort pouched curry No.3	Japan	No	0.05	-16.3	<0.1	3.8	0.2	Foodstuff	Foodstuff
35	Retort pouched curry No.4	Japan	No	0.12	-23.4	<0.1	3.6	0.6	Foodstuff	Foodstuff
36	Cheese No.1	Japan	Yes	0.11	-21.2	<0.1	-5.9	0.3	Foodstuff	Seasoning

37	Cheese No.2	Japan	No	0.15	-15.2	0.1	4.0	0.2	Foodstuff	Foodstuff
38	Cheese No.3	Japan	No	0.15	-18.1	0.1	5.2	0.1	Foodstuff	Foodstuff
39	Dressing No.1	United States	Yes	0.27	-11.1	<0.1	-5.6	0.4	Foodstuff	Seasoning
40	Dressing No.2	Japan	No	0.06	-19.9	<0.1	3.9	0.4	Foodstuff	Foodstuff
41	Hamburger steak No.1	Japan	Yes	0.15	-17.4	0.3	-3.6	0.4	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
42	Hamburger steak No.2	Japan	No	0.04	-23.8	<0.1	2.9	0.2	Foodstuff	Foodstuff
43	Chicken nugget No.1	Japan	Yes	0.19	-14.8	0.1	-4.6	0.2	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
44	Chicken nugget No.2	Japan	No	0.06	-17.7	0.1	3.3	0.4	Foodstuff	Foodstuff
45	Ham No.1	Japan	Yes	0.26	-12.7	0.1	-6.6	0.4	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
46	Ham No.2	Spain	No	0.23	-18.5	<0.1	7.4	0.1	Foodstuff	Foodstuff
47	Sausage No.1	Japan	Yes	0.22	-15.0	0.2	-4.8	0.4	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
48	Sausage No.2	Japan	No	0.25	-14.1	0.3	-3.0	0.4	Foodstuff	Foodstuff
49	Bacon No.1	Japan	Yes	0.39	-12.8	<0.1	-5.4	0.4	C4 plant-derived seasoning	Seasoning
50	Bacon No.2	Japan	No	0.03	-16.1	<0.1	2.7	0.4	Foodstuff	Foodstuff
51	Canned fish No.1	Japan	Yes	0.30	-21.3	0.1	-2.6	0.4	Foodstuff	Seasoning
52	Canned fish No.2	Japan	No	0.01	-17.3	<0.1	18.7	0.6	Foodstuff	Foodstuff

*¹ N=3.

*² Results of the three-group discriminant analysis (C3 plant-derived seasoning group, C4 plant-derived seasoning group, Foodstuff group) based on functions 1 and 2.

*³ Results of the two-group discriminant analysis (Seasoning group, Foodstuff group) based on function 3.

*⁴ Samples that were erroneously classified are represented in bold.

Table 4-2. Confirmation of isotopic fractionation in the measurement of the $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of glutamic acid in the processed foods.

Samples	Main ingredients [weight per 100 g] * ¹	Measurement method of $\delta^{13}\text{C}$ [‰] _{VPDB} * ²			Measurement method of $\delta^{15}\text{N}$ [‰] _{AIR} * ²		
		Mean	SD	Difference from MSG reagent	Mean	SD	Difference from MSG reagent
MSG reagent	–	-14.7	–	–	-5.6	–	–
Instant noodles	Protein (9.0 g) Fat (19.0 g) Carbohydrate (62.4 g) Sodium (1,451 mg)	-15.1	0.1	-0.4	-5.1	0.1	0.5
Potato chips	Protein (4.7 g) Fat (33.3 g) Carbohydrate (55.7 g) Sodium (197 mg)	-14.9	0.1	-0.2	-5.3	0.3	0.3
Dressing	Protein (2.7 g) Fat (47.3 g) Carbohydrate (7.3 g) Sodium (1,280 mg)	-14.7	0.1	0.0	-5.3	0.4	0.3
Bacon	Protein (14.5 g) Fat (28.3 g) Carbohydrate (2.4 g) Sodium (472 mg)	-14.4	0.0	0.3	-5.9	0.4	-0.3

*¹ Value indicated in the nutritional ingredients list.

*² N = 5.

第5章

総合討論 (総括と今後の展望)

1. 総括

MSG は、食品添加物と広く使用され、その安全性についても一定の評価がなされている。にもかかわらず、過去の経緯から、未だ敬遠する消費者は多く、NoMSG を謳う製品も多く存在する。消費者の安心という観点から、そういった選択肢があることは至極当然のことであるが、MSG を使用していないと謳う以上、本当に使用されていないと証明することは食品メーカーとしての責務である。

前述の通り、本研究はあくまで食品のトレーサビリティー（追跡可能性）の観点から、MSG の由来を判別するための研究であり、その安全性に関し論ずるものではない。食品メーカーにおける原材料の透明性の確保の重要性が増してきている中で、「NoMSG」と表示された食品・食材が、本当に調味料としてのMSGを添加していないかを確認する手法に関するものである。

MSG は、工業的に製造されたものとはいえ、植物を主たる原材料とし微生物発酵により製造されるため天然由来のグルタミン酸と区別がつかないと考えられてきた。我々は製造工程においていわゆる天然物とは異なるものが使用される点に着目し、安定同位体比により判別の可能性があると考えた。

まず、正確な安定同位体比を測定する分析系を立ち上げた上で、食物及び加工食品での判別の可能性を検討し、いずれも高い確率で判別が可能であることをつきとめた。

具体的には、第2章では、食品に含まれるグルタミン酸の炭素安定同位体比 ($\delta^{13}\text{C}$) 分析法として、高い信頼性を担保するために、食品からグルタミン酸を単離し、EA/IRMS 測定することとした。まずは試料を塩酸で加水分解し、*n*-ヘキサン及びジクロロメタンの混液により脱脂した後、活性炭素/C18 積層カ

ラムを通過させた。カラム流出液を強酸性陽イオン交換樹脂カラムによりさらに精製し、分取 HPLC によりグルタミン酸ピークのみを分取した。分取液を濃縮乾固させ、得られた高純度のグルタミン酸結晶を EA/IRMS 測定に供した。本分析法の各工程において同位体分別の有無を確認したところ、最大で強酸性陽イオン交換樹脂カラム精製において 0.5% の同位体比のずれが観測されたが、問題となるレベルではなかった。また、グルタミン試薬及び実試料（トマト、トウモロコシ及び昆布）に含まれるグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ を同日に N=5 で繰り返し分析したところ、全試料とも想定された $\delta^{13}\text{C}$ 値が得られ、標準偏差は $\pm 0.1\sim 0.5\%$ と良好であった。以上により、食品に含まれるグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ を精度よく測定可能な分析法が構築された。

食材中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 測定には第 2 章で開発した分析法、 $\delta^{15}\text{N}$ 測定には誘導体化-GC/C/IRMS を用いた $\delta^{15}\text{N}$ 分析法を適用した。

まずは、様々な食材（大豆やトマトなど C3 植物、トウモロコシなど C4 植物、昆布、エビやマグロなど海産物、キノコ類、豚や鶏など畜産物、合計 53 試料）及びタピオカやテンサイなどの C3 植物を原料として製造された調味料 MSG（6 試料）、トウモロコシやサトウキビなどの C4 植物を原料として製造された調味料 MSG（31 試料）を入手し、上述の分析法により $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ 値を得た。その結果、食材の $\delta^{13}\text{C}$ は -27.3 から -9.6% 、 $\delta^{15}\text{N}$ は -3.2 から $+29.0\%$ 、C3 植物由来調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ は -29.1 から -26.1% 、 $\delta^{15}\text{N}$ は -6.6 から -2.5% 、C4 植物由来調味料 MSG の $\delta^{13}\text{C}$ は -16.7 から -10.1% 、 $\delta^{15}\text{N}$ は -9.9 から -3.9% の範囲内であり、各グループで異なる安定同位体比を示すことが分かった。さらに、得られたデータを判別分析により統計学的に解析したところ、食材、C3 植物由来 MSG 及び C4 植物由来 MSG の 3 グループ間において正答率 96.7% で判別することが可能であった。これにより、「食材中のグルタミン酸」及び「調味料 MSG」を高い正答率で判別可能なモデル系が構築された。

第3章では調味料 MSG が加工食品に使用されているかどうかを判定する方法を開発した。加工食品中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を測定するために、 $\delta^{13}\text{C}$ についてはグルタミン酸結晶を高純度に単離して EA/IRMS 測定、 $\delta^{15}\text{N}$ については精製・誘導體化して GC/C/IRMS 測定する方法を採用した。これらの方法は、第3章で用いた方法を元に一部修正を加えたものであり、その妥当性を評価したところ、十分に信頼性の高い方法であることが確認された。

この方法により得られた様々な種類の加工食品中のグルタミン酸の $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の値を判別式に代入して判別分析を行うことにより、その正答率を評価した。第3章で導いた確立した C3 植物由来の調味料 MSG、C4 植物由来の調味料 MSG 及び食材中のグルタミン酸の3グループに分類するための判別分析法式をそのまま適用した用いた場合、その正答率は 90.4%であった。さらに調味料 MSG 及び食材中のグルタミン酸の2グループ間で新たに判別分析を行い同様に評価したところ、正答率は3グループの場合よりも上昇し、96.2%と非常に良好な結果となった。これは加工食品中のグルタミン酸が調味料 MSG 及び食材のいずれに由来するのかを高い確率で判別できることを示しており、つまりは対象となる加工食品に調味料 MSG が使用されているかどうか判断できることを意味している。

本法を用いることで、市販されている“**No MSG**”や“**MSG free**”などと表記された加工食品を科学的かつ客観的に評価することが可能となり、製品の信頼性向上や消費者への正確な情報を提供し、消費者の安心につながることを期待される。

また、加工食品は様々な原材料を用いて生産されるものであるが、原材料の確認は書面上で使用していないことを確認するしかないことが現状であり、非意図的、意図的にかかわらず MSG が入っている可能性はなくなる。そう

いった原材料を納入するメーカーに対する一定の抑止力も持つと期待している。

我々食品メーカーにとって、安全を担保することは当たりまえの時代になっている。今後は、本研究のような原材料の透明性確保など重要性が高まり、これらに対する企業姿勢が、食品メーカーに対する消費者の安心に繋がるものと感じている。

2. 今後の展望

本研究において、 $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を用いることで食材に元々含まれるグルタミン酸と調味料 MSG を 95%以上の高い正答率で判別可能であることが示された。同時に、本法は植物や畜産物、水産物などといった由来まで遡れる可能性も示したが、高い正答率でその違いまでを判別するためには、 $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ だけでは不十分であり、グルタミン酸分子を構成する他の元素（水素及び酸素）の安定同位体比などの新たな指標を追加する必要があると考えられる。このような取り組みにより、食品に含まれるグルタミン酸の由来をより詳細に明らかにすることが可能となり、本研究で開発した判別法の適用範囲がさらに向上することが期待される。

また、本研究成果の効率的な運用のためには、EA/IRMS または GC/C/IRMS のいずれかによる $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ の同時分析法の開発が必要であると考えている。例えば、次のいずれかにより分析法を改良できるかもしれない。

- (1) 移動相条件を最適化して EA/IRMS で $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を同時測定
- (2) 付加される炭素数が少ない誘導体化法を用いて GC/C/IRMS で $\delta^{13}\text{C}$ 及び $\delta^{15}\text{N}$ を同時測定

本研究は、グルタミン酸に関するものであるが、様々なアミノ酸や核酸類、有機酸類に応用可能と考えられる。工業的に生産されている調味料は、MSG 以外にもイノシン酸など多数存在する。いずれも旨味に関して重要な成分であり、調味料としても有用なものである。

その多くは工業的、化学合成品として生産されているが、まだ、MSGと比較して消費者が関心を寄せているものではないが、天然志向が拡大している現状では、今後の研究余地はあると考えている。

また、安定同位体比の分析技術は、食品・食材の原産地判別や真贋判定に使用されている。近年、いわゆる偽物あるいは偽装される食品も増えてきており、これらに対する技術としてさらなる研究を進めていきたい。

引用文献

- Badger, M. R., Kaplan, A., & Berry, J. A. (1980). Internal Inorganic Carbon Pool of *Chlamydomonas reinhardtii*: EVIDENCE FOR A CARBON DIOXIDE-CONCENTRATING MECHANISM. *Plant Physiology*, 66, 407-413. DOI: 10.1104/pp.66.3.407.
- Badia-Meils, R., Mishra, P., & Ruiz-García, L. (2015). Food traceability: New trends and recent advances. A review. *Food Control*, 57, 393-401. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.05.005.
- Bandara, B. E. S., De Silva, D. A. M., Maduwanthi, B. C. H., & Warunasinghe, W. A. A. I. (2016). Impact of food labeling information on consumer purchasing decision: with special reference to faculty of agricultural sciences. *Procedia Food Science*, 6, 309-313. DOI: 10.1016/j.profoo.2016.02.061.
- Bateman, A. S., Kelly, S. D., & Woolfe, M. (2007). Nitrogen isotope composition of organically grown crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2664-2670. DOI: 10.1021/jf0627726.
- Bonne, K., Vermeir, I., Bergeaud-Blackler, F., & Verbeke, W. (2007). Determinants of halal meat consumption in France. *British Food Journal*, 109, 367-386. DOI:10.1108/0070700710746786.
- Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., & Ohkouchi, N. (2007). Metabolic control of nitrogen isotope composition of amino acids in macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. *Marine Ecology Progress Series*, 342, 85-90. DOI: 10.3354/meps342085.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H., & Ohkouchi, N. (2009). Determination of aquatic

- food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 740-750, DOI: 10.4319/lom.2009.7.740.
- Chikaraishi, Y., & Ohkouchi, N. (2010). *Earth, Life, and Isotopes*, Ohkouchi, N., Tayasu, I., & Koba, K. (Eds.), Kyoto University Press, Kyoto, chapter. 22, 355.
- Deines, P. (1980). The isotopic composition of reduced organic carbon. *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry* vol. 1, In Fritz, P., & Fontes, J. Ch. (Eds.), Amsterdam: Elsevier, chapter 9, 329-406.
- Docherty, G., Jones, V., & Evershed, R. P. (2001). Practical and theoretical considerations in the gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry $\delta^{13}\text{C}$ analysis of small polyfunctional compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15, 730-738. DOI: 10.1002/rcm.270.
- Filer, C. N. (1999). *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 42, 169-197. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1344(199902)42:2<169::AID-JLCR178>3.0.CO;2-0.
- Forde, B. G., & Lea, P. J. (2007). Glutamate in Plants: Metabolism, regulation, and signaling. *Journal of Experimental Botany*, 58, 2339-2358. DOI: 10.1093/jxb/erm121.
- Friedman, M. (2004). Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 385-406. DOI: 10.1021/jf030490p.
- Gonfiantini, R., Stichler, W., & Rozanski, K. (1995). Standards and intercomparison materials distributed by the International Atomic Energy Agency for stable isotope measurements, Proceedings of a consultants meeting held in Vienna. Vienna: IAEA, IAEA-TECDOC-825, 13-29.

- Hare, P. E., Fogel, M. L., Stafford, T. W., Mitchell, A. D., & Hoering, T. C. (1991). The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *Journal of Archaeological Science*, 18, 277-292. DOI: 10.1016/0305-4403(91)90066-X.
- Hobson, K. A., & Welch, H. E. (1992). Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 84, 9-18. DOI: 10.3354/meps084009.
- Hoefs, J. (1996). Variations of stable isotope ratios in nature. *Stable Isotope Geochemistry* 4th ed., Berlin: Springer, chapter 3, 135.
- Kinoshita, S., Udaka, S., & Shimono, M. (1957). Studies on amino acid fermentation PART I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 3, 193-205. DOI: 10.2323/jgam.3.193.
- Kumagai, H. (2006). Amino acid production, *The Prokaryotes* vol. 1, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E (Eds.), New York: Springer, chapter 3.2, 756-765. DOI: 10.1007/0-387-30741-9_20.
- Lawrence, R. J., & Gedzelman, D. S. (1996). Low stable isotope ratios of tropical cyclone rains. *Geophysical Research Letters*, 23, 527-530. DOI: 10.1029/96GL00425.
- Macko, S. A., Fogel, M. L., Hare, P. E., & Hoering, T. C. (1987). Isotopic fractionation of nitrogen and carbon in synthesis of amino acids by microorganisms. *Chemical Geology: Isotope Geoscience section*, 65, 79-92. DOI: 10.1016/0168-9622(87)90064-9.
- Manca, G., Camin, F., Coloru, G. C., Del Caro, A., Depentori, D., Franco, M. A., & Verini, G. (2001). Characterization of the geographical origin of Pecorino Sardo cheese by casein stable isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) ratios and free amino acid

- ratios. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 1404-1409. DOI: 10.1021/jf000706c.
- Merritt, D. A., & Hayes, J. M. (1994). Nitrogen isotopic analyses by isotope-ratio-monitoring gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5, 387-397. DOI: 10.1016/1044-0305(94)85054-2.
- Metges C. C., & Daenzer, M. (2000). ^{13}C gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry analysis of N-pivaloyl amino acid esters of tissue and plasma samples. *Analytical Biochemistry*, 278, 156-164. DOI: 10.1006/abio.1999.4426.
- Ohkouchi, N., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y., Tanaka, H., & Wada, E. (2015). Biochemical and physiological bases for the use of carbon and nitrogen isotopes in environmental and ecological studies. *Progress in Earth and Planetary Science*, 2:1. DOI: 10.1186/s40645-015-0032-y.
- Ohkouchi, N., & Takano, Y. (2014). Organic nitrogen: sources, fates, and chemistry, *Treatise on Geochemistry*, Amsterdam: Elsevier, chapter 12.10, 251-289. DOI: 10.1016/B978-0-08-095975-7.01015-9.
- Osorio, M. T, Moloney, A. P., Schmidt, O., & Monahan, F. J. (2011). Beef authentication and retrospective dietary verification using stable isotope ratio analysis of bovine muscle and tail hair. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 59, 3295-3305. DOI: 10.1021/jf1040959.
- Padovan, G. J., De Jone, D., Rodoligues, L. P., & Marchini, J. S. (2003). Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. *Food Chemistry*, 82, 633-636. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00504-6.
- Piasentier, E., Valusso, R., Camin, F., & Versini, G. (2003). Stable isotope ratio analysis for authentication of lamb meat. *Meat Science*, 64, 239-247. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00183-3.

- Popp, B. N., Graham, B. S., Olson, R. J., Hannides, C. C. S., Lott, M. J., López-Ibarra, G. A., Galván-Magaña, F., & Fry, B. (2007). Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. *Terrestrial Ecology*, 1, 173-190. DOI: 10.1016/S1936-7961(07)01012-3.
- Raco, B., Dotsika, E., Poutoukis, D., Battaglini, R., & Chantzi, P. (2015). O-H-C isotope ratio determination in wine in order to be used as a fingerprint of its regional origin. *Food Chemistry*, 168, 588-594. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.043.
- Royal, C. (1945). Manufacture of glutamic acid. US patent, US 2373342.
- Rubino, M., Milin, S., D'Onofrio, A., Signoret, P., Hatte, C., & Balesdent, J. (2014). Measurement of $\delta^{13}\text{C}$ values of soil amino acids by GC-C-IRMS using trimethylsilylation: a critical assessment. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 50, 516-530. DOI: 10.1080/10256016.2014.959444.
- Saito, Y., Koda, T., Ueda, H., & Sato, K. (2003). Method of purifying glutamic acid through transitional recrystallization. International patent, WO/2003/011813A1.
- Shah, S. R., & Pearson, A. (2007). Ultra-Microscale (5-25 $\mu\text{g C}$) analysis of individual lipids by ^{14}C AMS: Assessment and correction for sample processing blanks. *Radiocarbon*, 49, 69-82. DOI: 10.1017/S0033822200041904.
- Shinebarger, S. R., Haisch, M., & Matthews, D. E. (2002). Retention of carbon and alteration of expected ^{13}C -tracer enrichments by silylated derivatives using continuous-flow combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74, 6244-6251. DOI: 10.1021/ac026061s.
- Silfer, J. A., Engel, M. H., Macko, S. A., & Jumeau, E. J. (1991). Stable carbon analysis of amino acid enantiomers by conventional isotope ratio mass spectrometry and

- combined gas chromatography. *Analytical Chemistry*, 63, 370-374. DOI: 10.1021/ac00004a014.
- Smittenberg R. H., & Sachs, J. P. (2007). Purification of dinosterol for hydrogen isotopic analysis using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1169, 70-76. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.018.
- Suzuki, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N., & Korenaga, T. (2008). Geographical origin of polished rice based on multiple element and stable isotope analyses. *Food Chemistry*, 109, 470-475. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.12.063.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., & Ohkouchi, N. (2010). Quality control by wet chemical pre-treatment for precise compound-specific isotope analysis. *Researches in Organic Geochemistry*, 26, 81-93. DOI: 10.20612/rog.26.0_81.
- Takano, Y., Kashiya, Y., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y., & Ohkouchi, N. (2010). Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids: application to biochemical samples. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 24, 2317-2323. DOI: 10.1002/rcm.4651.
- Umami information by food (Seafood), Umami Information Center, <https://www.umamiinfo.com/richfood/foodstuff/seafood.php>, (accessed 2018-07-20).
- Questions and Answers on Monosodium glutamate (MSG), U.S. Food and Drug Administration (FDA), <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm328728.htm>, (accessed 2018-07-20).
- Walsh, R. G., He, S., & Yarnes, C. T., (2014). Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis of amino acids: a rapid, chloroformate-based method for ecological studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28, 96-108. DOI: 10.1002/rcm.6761

謝辞

本学位論文の作成において、ご指導、ご鞭撻頂きました広島大学大学院 生物圏科学研究科 動物資源化学研究室 教授 鈴木卓弥先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究において、多くの有益なるご助言とご指導を頂きました海洋研究開発機構 (JAMSTEC) 大河内直彦博士、日清食品ホールディングス株式会社 グローバルイノベーション研究センター 所長 兼 グローバル食品安全研究所長 田中充博士、グローバルイノベーション研究センター 健康科学研究部 部長 田辺創一博士に深く感謝の意を表します。

本研究は、日清食品ホールディングス株式会社 グローバル食品安全研究所において行われたものです。本研究を遂行するにあたり研究所員の皆様には多大なご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。