

佐賀県産清酒の市場競争力向上を目指した評価技術の開発

食品工業部
澤田和敬

佐賀県産酒の香味を特徴づける成分の探索及び評価技術の開発を目的として、清酒の有機酸、香気成分に加え、清酒中の不揮発性代謝成分を対象にメタボローム解析を行った。その結果、佐賀県産酒と佐賀県外酒で製造された純米吟醸酒の有機酸に有意差はなかったが、吟醸香の特徴的成分のひとつである酢酸イソアミルに県産酒と県外酒で有意差があった。しかし、今回実施した不揮発性成分を対象にしたメタボローム解析では、佐賀県産酒に含まれる特徴的成分を見出すことはできず、代謝成分の対象をさらに増やす必要があることが示された。

1. はじめに

近年、消費者が購入できる酒類は多様化しており、清酒業界では、低アルコール清酒や発泡性清酒といった今までにないジャンルの商品を上市し、新たな消費者の取り込みを図っている。

全国各地の蔵元はリンゴ酸高生産酵母やワイン酵母を使用した清酒造りや精米歩合を低く抑えた原料米の味わいを活かした清酒造りなど、訴求性の高い高品質の商品開発に取り組んでいる一方、地元根付いた地酒の製造を行っている¹⁾。

佐賀県では、県内の蔵元が県産の原料米、水を原料として造られた酒を対象に「原産地呼称管理制度」により、消費者により高品質な酒類を提供する取り組みを行っている。

各県の清酒の味の特徴は、日本酒度と総酸度から算出される濃淡度及び甘辛度を指標に用い、佐賀県産の一般酒の特徴は濃醇・甘口とされている²⁾ (図 1)。しかし、清酒全体の製成数量のうち、特定名称酒の製造比率は増加しており、佐賀県は特定名称酒の伸び率が全国トップクラスである。

そのため、特定名称酒を対象とした産地間の特徴的成分を抽出し、県産酒の特徴を表現することが県内の蔵元から求められている。

本研究では、市販吟醸酒の一般成分分析を行い、官能評価との相関性を把握することで、県産酒の特徴を明らかにすることを試みた³⁾。その結果、プロファイル法の指摘項目と一般成分の関連性について一定の知見を得ることができたが、地域間の特徴を明らかにすることはできなかった。そこで、代謝に関与する低分子化合物をターゲットにしたメタボローム解析によって、使用された酵母の特徴の区分が可能かどうかについて、不揮発性代謝物の抽出の条

件を中心に検討した。その結果、GC/MS を用いた不揮発性成分をターゲットとして行った主成分分析によって協会 7 号系酵母と協会 9 号系酵母を区別することができた⁴⁾。

以上の結果をもとに、本年度は佐賀県産純米吟醸酒（以下、県産酒）と佐賀県外産純米吟醸酒（以下、県外酒）を用い、香気成分分析、有機酸分析、官能評価及びメタボローム解析を行い、県産酒の特徴的成分の探索及び香味の特徴を明らかにすることを目的に実施した。

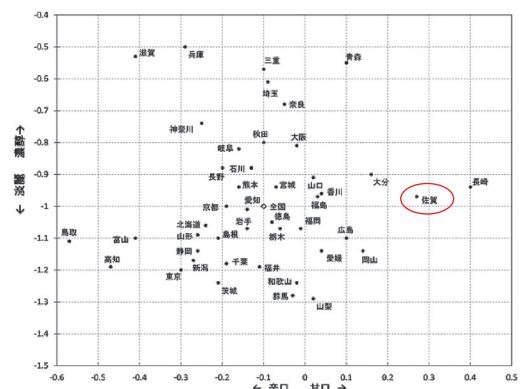
2. 実験方法

2.1 実験材料

本報告に用いた分析試料は、平成 26 醸造年度に製造された純米吟醸酒 49 点（県産酒 19 点、県外酒 30 点）である。

2.2 一般成分分析

製成酒の香気成分はガスクロマトグラフ直結型質量分析計（株式会社島津製作所製、GCMS-QP2010）を



用いて測定した。分析に供したカラムは、DB-WAX (アジレント・テクノロジー株式会社, 60 m×0.25 mm×0.5 μm) を用いた。

分析条件は以下のとおり。カラム温度は40 °Cを5分間保持し, 5°C/min で200 °Cまで上昇させ, 200°C 達温後, 5分間保持した。MS部はインターフェイス温度を230 °C, イオン源温度を200 °Cとした。試料の加温と注入は, AOC-5000オートインジェクター (株式会社島津製作所製) を用い, 試料0.9mL に内部標準0.1mLを加え, 50°C, 1分間攪拌しながら加温した後, ヘッドスペースガスを1mL注入した。キャリアガスはヘリウムガスを用い, その流速は1.12mL/minとした。製成酒の有機酸組成分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたpH緩衝化ポストカラム電気伝導度法により測定した。有機酸分析には, 株式会社島津製作所製NexeraXRを用いた。分析に供したカラムは, Shim-pack SCR-102H(株式会社島津製作所製, 300mmL×8.0mmI. D)を2本直列で用いた。移動相は5 mM p-トルエンスルホン酸 (和光純薬株式会社) 水溶液, 流量を0.8mL/minとした。カラム温度は40°Cとした。

検出条件として, 緩衝相に5 mM p-トルエンスルホン酸及び100 μM EDTA(株式会社同仁化学研究所) を含む20mM Bis-tris (株式会社同仁化学研究所) 水溶液, 流量を0.8mLとした。検出器は電気伝導度検出器CDD-10(株式会社島津製作所製)を用いた。

2.3 純米吟醸酒のメタボローム解析

試料中の不揮発性代謝物の抽出, 誘導体化は川瀬らの方法⁵⁾ に準じて行った。

試料 20 μL にメタノール (和光純薬株式会社) /Milli-Q/クロロホルム (和光純薬株式会社) の混合溶液(2.5:1:1=v/v/v) 1000 μl を加えて 1 分間激しく攪拌した。その後, 内部標準として Ribitol (和光純薬株式会社) 水溶液(0.2mg/ml)を 60 μl 加え, 20 秒間激しく攪拌し, 37 °C, 1500 r.p.m, 30 min の条件下で代謝物の抽出を行った。次に 16,000×g, 4°C で 3 分間遠心分離を行い, 上清 900 μl を 1.5 ml チューブに移した。次いで, 400 μl の Milli-Q を加え, 16000×g, 4°C で 3 分間遠心分離を行い, 上清 800 μl を回収した。遠心濃縮機を用い, 減圧下で, 3 時間, 50°C でメタノールを除去した後, -80°C で凍結し, 凍結乾燥に供した。

乾燥後の抽出物に Methoxyamine hydrochloride-pyridine(和光純薬株式会社, 20 mg/ml) 100 μl を加え, 1 分間激しく攪拌を行った後, 90 分間, 30°C, 1500 r.p.m 条件下でメトキシ化を行った。その後,

N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide(GL Sciences, Tokyo, Japan) を 50 μl を加え, 1 分間激しく攪拌した後, 30 分間, 37 °C, 1500 r.p.m で TMS 誘導体化反応を行った。

GC/MS 分析にはガスクロマトグラフ直結型質量分析計 (株式会社島津製作所製 GC/MS-QP2010) を用いた。分析に供したカラムは CP-Sil 8CB (アジレント・テクノロジー株式会社, 30 m×0.25 mm×0.25 μm) を用いた。

分析条件は以下のとおり。カラム温度は 60 °C から 10°C/min で 325 °C まで上昇させた。インターフェイス温度は 290 °C, 検出はポジティブモードとし, イオン源温度は 230 °C とした。試料はスプリットレスで 1 μl を注入した。キャリアガスはヘリウムガスを用い, その流速は 1ml/min とした。

2.4 データの加工

GC/MS で取得した分析データファイルを GC/MS 用デコンボリューション用ソフトウェア AMDIS を用い, データのデコンボリューションを行った。

デコンボリューションによって取得した ELU ファイルを読み込み, Agilent LC/MS GC/MS システム多変量解析ソフトウェア Agilent Mass Profiler Professional (アジレント・テクノロジー株式会社) を用い, 統計処理を行い, 主成分分析 (PCA) を行った。

3. 結果及び考察

3.1 一般成分分析

図 2 に県産酒と県外酒の酢酸イソアミル及びカプロン酸エチルを, 図 3 に有機酸の分析結果を示した (図中のエラーバーは最大値と最小値を示す)。

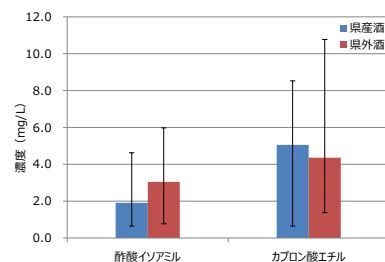


図 2 酢酸イソアミル及びカプロン酸エチルの分析結果

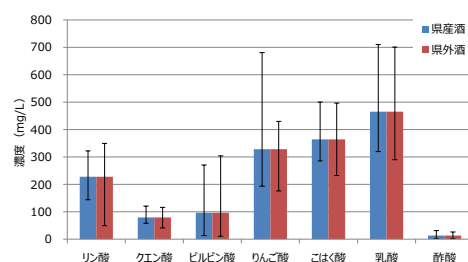


図 3 有機酸の分析結果

一般成分で県産酒と県外酒に有意差があるかどうか香気成分及び有機酸を用いた t 検定を行った。その結果、酢酸イソアミルは有意差があった (p 値 < 0.01)。しかし、その他分析項目であるカプロン酸エチル、リン酸、クエン酸、ピルビン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸及び酢酸有意差はなかった (p 値 > 0.05)。

酢酸イソアミルに有意差があった原因として、県産酒ではきょうかい 1801 号などのカプロン酸エチル高生産酵母を用いて純米吟醸酒が製造されているが、今回選抜した県外酒には酢酸イソアミル高生産酵母などを用いた純米吟醸酒が含まれていることに起因していると考えた。

3.2 メタボローム解析

図 4 に県産酒と県外酒に含まれる不揮発代謝成分を対象にした主成分分析の結果を示した。

清酒に含まれる不揮発性代謝成分を対象にメタボローム解析を行った結果、県産酒と県外酒の違いを表すことができなかった。これは、各県で開発された酵母の違いを表すことができなかったことに起因すると考えた。現在、市場に流通している清酒のカプロン酸エチル濃度は増加傾向にある²⁾。また、多くの公設試ではセルレニン耐性を指標にカプロン酸エチル高生産酵母の開発が盛んに行われており、市販されている純米吟醸酒にもカプロン酸エチル高生産酵母が使用されていると推定される。そのため、不揮発性成分のみをターゲットに行った本報では県産酒及び県外酒に区分することができなかったと推測した。

4. おわりに

本研究では、各地域の清酒の特徴成分の探索を目的に市販されている純米吟醸酒に含まれる不揮発性代謝成分を対象にメタボローム解析を行った。

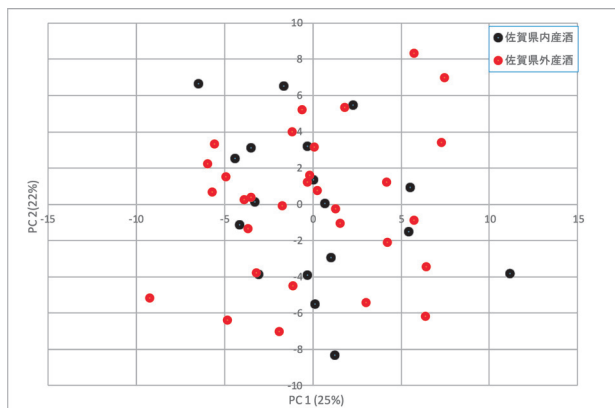


図 4 主成分分析結果

しかし、清酒中に含まれる不揮発性代謝成分だけでは地域ごとの清酒の特徴的成分を見出すことができず、県産酒の特徴を表すことができなかった。

樋口らは不揮発性成分に加え、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法 (HS-SPME) を用いて揮発性成分を含めたデータマトリックスを作成し、メタボローム解析を行った結果、酒質の違いの客観的な判別及びその判別に寄与する化合物を探索可能であり、官能評価と組み合わせることで定量的な酒質の評価法を構築することができる可能性について報告した⁶⁾。

さらに、メタボローム解析技術は酵母だけでなく、原料米や麹菌などの違いを明らかにする技術として活用する試みがされている⁷⁾。

今回、取得したデータでは県産酒と県外酒を区分することができなかったが、各種機器分析を用いた分析系を構築することで、清酒に使用されている原料米、麹菌、酵母の代謝物の違いを検出し、県産酒と県外酒の区分を明らかにすることができる可能性がある。

今後、メタボローム解析技術は清酒の品質評価に限らず、佐賀県独自の酵母の育種に活用する予定である。

また、メタボローム解析技術は、醸造分野だけでなく食品加工や機能性食品など、様々な分野に応用可能な技術である。そのためには、各種機器分析を用いたメタボローム解析技術を活用するためには、分析系の構築だけでなく、データ処理の効率化についても検討する必要がある。

本研究で使用したガスクロマトグラフ直結型質量分析計、有機酸分析システムは電源立地地域対策交付金により導入した。

参考文献

- 1) 大場孝宏, 末永光, 一松時生, 羽田野雄大, 満生慎二, 鈴木正何. (2008). 清酒もろみからの多酸性清酒酵母の分離とその特性. *日本醸造協会誌*, 103(12), 949-953.
- 2) 国税庁, 全国市販酒類調査の結果について, 平成 27 年度調査分
<https://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/seibun/2016/pdf/01.pdf>
- 3) 澤田和敬: 佐賀県産清酒の市場競争力向上を目指した評価技術の開発, 平成 26 年度佐賀県工業技術センター研究報告書, No. 22, p. 5-9
- 4) 澤田和敬: 佐賀県産清酒の市場競争力向上を目

指した評価技術の開発, 平成 27 年度佐賀県工業技術センター研究報告書, No. 22, p. 5-9

- 5) Kawase, Naoki, et al. "Different-batch metabolome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* based on gas chromatography/mass spectrometry." *Journal of bioscience and bioengineering* 117.2 (2014): 248-255.
- 6) 樋口誠一, 横堀正敏, 仲島日出男: 県産食品の網羅的成分分析と品質管理への利用ー清酒をモデルとしてー, 埼玉県産業技術総合センター研究報告第 14 巻(2016)
- 7) 小里孟, 森雄太郎, 織田健, 福田央, 岩下和裕. (2015). 2P-133 醸造工程・原料と清酒メタボロームの相関解析 (醸造学, 醸造工学, 一般講演). 日本生物工学会大会講演要旨集, 67, 208.