

# 熟成年数の異なる市販清酒の成分比較及びHS-SPME-GC/MSによる熟成清酒の微量香気成分分析

バイオ系チーム 清野 珠美, 廣岡 青央

## 要 旨

清酒の熟成による成分変化を明らかにするため、長期保管している製造年度の異なる清酒の分析を行った。香味成分について、糖や有機酸には熟成年数に伴う一定の増減傾向は見られなかったが、一部のアミノ酸で、熟成年数が長いほど濃度が高くなる傾向が見られた。また、ヘッドスペース-固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(HS-SPME-GC/MS)による熟成清酒中の微量香気成分の定性分析を行った。通常のHS法では10種類程度の検出しかできないところ、この装置により60から70種類のピークを検出し、成分を推定することができた。新酒との比較を行ったところ、新酒では華やかな果実様香を持つ多種の脂肪酸エステルが検出されたが、これらは熟成清酒では検出されなかった。一方で、熟成清酒ではフルフラールなどのメイラード反応生成物や、コハク酸ジエチルなどの有機酸エチルエステルが顕著に検出され、他に多種のアルコールやアルデヒド、エステル類も検出された。

## 1. はじめに

国内の清酒製造量は年々減少傾向にあり、平成18から26酒造年度の9年間では全体で16%減少している<sup>1)</sup>。しかし近年、消費者の間では、華やかな香りが特徴の高精白米を使用した吟醸酒や、原料が米と米麴のみの純米酒といった特定名称酒の人気の高まっている。特定名称酒の製造量は、清酒全体とは逆に前出の9年間で15%増加、中でも平成22年からの5年間で37%も増加している<sup>1)</sup>。このように、清酒業界の中で高付加価値製品の需要が高まっている。

更に和食のユネスコ無形文化遺産登録に伴い、海外での清酒需要も高まっており、特定名称酒を中心に、海外への輸出が盛んになっている。一方で、ワイン・ウイスキー圏である西欧では、酒を「熟成」という文化があり、熟成するほど、その価値も高いという認識がある。日本人の価値観のみでなく、このような外国人の価値観を考慮した清酒を提供することで、海外での清酒の認知拡大を後押しできる可能性がある。ゆえに、今後の清酒市場の高付加価値製品分野を拡大するためには、「熟成」という考え方が重要になると考えられる。

しかし、国内の熟成清酒製造への意識はそれほど高いとは言えないのが現状である。それは、清酒に含まれる多種多様な成分が、熟成の間に複雑に変化するため、熟成させる前の段階では、熟成後の味や香りの品質を予測判断することが困難であるためと考えられる。

現在、製造された清酒の熟成の適否は、製造者の官能的判断にゆだねられている。この熟成の適否を判断する指標を確立できれば、より高度に品質管理された熟成清酒製造が行える可能性があり、清酒業界に対する大きな技術支援になると考えられる。

そこでまず、長期熟成清酒の香味成分を分析し、熟成による成分経過を明らかにすることを目的として、当チームで長期保管している市販清酒の糖、アミノ酸、有機酸及び清酒の基本的な香気成分を分析した。更に、微量の香気成分を分析するため、平成27年度に導入したヘッドスペース-固相マイクロ抽出-ガスクロマトグラフィー-質量分析装置(HS-SPME-GC/MS)を用いて、新酒と熟成清酒の香気成分を定性分析し、その比較を行ったので、本報にて報告する。

## 2. 実験方法

### 2. 1 分析試料

分析に使用した熟成清酒は、製造年の異なる市販清酒5点である。試料の詳細を表1に示す。No.1は製造年月日が不明瞭であったため表のように判断した。No.2は製品ラベルがなく、製造年のみの情報しかなかったため表のように不明とした。また、定性分析に使用した新酒は、平成27酒造年度に製造・火入れ処理されたものである。

表1 分析に使用した清酒試料詳細

試料No.	製造酒造年度 (平成)	特定名称	精米歩合 (%)	アルコール 度
1	25 or 26	純米大吟醸	49	14.5
2	23	不明	不明	不明
3	23	特別純米原酒	60	18.8
4	18	特別純米	60	15
5	2	純米大吟醸	50	16

## 2. 2 糖, アミノ酸及び有機酸分析

糖分析は, Hondaらによる3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP) プレラベル化法による逆相液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)<sup>2)</sup> を改変して行った。試料 20  $\mu$ L に, 40  $\mu$ L の 0.3mol/L NaOH 及び 0.5mol/L PMP-メタノール溶液を加え, 70°C で 30 分, 糖の誘導体化反応を行った。反応後, 120  $\mu$ L の 0.1mol/L HCl を加えて中和し, そこに 200  $\mu$ L のクロロホルムを加えて過剰の PMP をクロロホルム層に移行させた後, クロロホルム層を除去して水層を回収した。クロロホルムを添加・除去する操作は計 2 回繰り返した。水層は HPLC に用いる溶媒で適宜希釈し, 0.45  $\mu$ m フィルターでろ過後, 分析に供した。分析カラムは Unison UK-C18 (3 x 150 mm, 3  $\mu$ m, インタクト) を用い, カラム温度は 40°C とした。溶出は, 移動相 A: 0.1% ギ酸, B: 0.1% ギ酸-80% アセトニトリルを用い, 流速 0.6 mL/分で行った。溶出グラジエントは 0-3 分で B 10-15%, 3-16 分で B 25-28%, 16-21 分で 100%, 21-30 分で 10% とし, 溶出液を 254 nm でモニタリングした。また, アミノ酸<sup>3)</sup> 及び有機酸分析<sup>4)</sup> は, 既報に準じて行った。

## 2. 3 香気成分分析

各熟成清酒の酢酸エチル, イソアミルアルコール, 酢酸イソアミル, カプロン酸エチルについては, 国税庁所定分析法に準じて GC による定量分析を行った。

HS-SPME-GC/MS による定性分析には, (株) 島津製作所製 AOC-6000 搭載 GCMS-TQ8040 を使用し, 熟成清酒 No. 4 と, 平成 27 酒造年度製造の新酒 (火入れ処理済) 10mL を試料として用いた。SPME には PAL SPME Acrylate Fiber (Polyacrylate, 85 $\mu$ m, CTC Analytics) を用いた。分析条件は表 2 に示す。分離された各ピークのマススペクトルからの成分推定には, (株) 島津製作

所製ソフトウェア GC solution のシミラリティ検索を用いた。

表2 HS-SPME-GC/MS分析条件

HS-SPME部	試料保温温度/時間	50°C/15分
	抽出時間	15分
	脱着時間	15分
GC部	気化室温度	230°C
	カラム	DB-Wax (60 m x 0.25 mm i.d., 0.25 $\mu$ m film)
	カラムオープン温度	50°C (5分) → (3°C/分) → 230°C (40分)
	キャリアガス	ヘリウム, 1 mL/分 (カラム流量)
	注入モード	スプリットレス (サンプリング時間 1分)
MS部	インターフェイス温度	240°C
	イオン源温度	200°C
	測定モード	Q3 スキャン (m/z 20-500)

## 3. 結果と考察

### 3. 1 市販熟成清酒の香味成分の比較

表 3 に市販熟成清酒 5 点の糖, 有機酸, 香気成分の分析結果を示す。糖, 有機酸及び国税庁所定法で分析できる香気成分には, 熟成年度に伴う一定の増減変動は見られなかった。

表3 熟成清酒の糖, 有機酸, 香気成分分析結果

		試料 No./製造酒造年度 (平成)				
		1 25 or 26	2 23	3 23	4 18	5 2
糖 (mg/mL)	グルコース	10	21	24	16	22
	イソマルトース	3.9	1.2	3.0	1.3	4.0
有機酸 (mg/mL)	乳酸	427	531	606	507	404
	コハク酸	473	756	999	882	710
	リンゴ酸	235	323	362	517	344
	クエン酸	45	63	58	61	62
香気成分 (ppm)	酢酸エチル	17	46	52	21	19
	酢酸イソアミル	0.3	1.0	1.0	0.3	0.4
	イソアミルアルコール	109	174	184	206	152
	カプロン酸エチル	0.8	0.9	0.8	0.5	0.8

市販熟成清酒 5 点の遊離アミノ酸分析により, 熟成年数が長いほど高くなる傾向が見られたのがアスパラギン酸, アラニン, バリン, ロイシン, イソロイシン, セリン, スレオニン, フェニルアラニン, チロシン, メチオニン, ヒスチジンの 11 種類, 逆に低くなる傾向が見られたのがグルタミン, トリプトファン の 2 種類であった。これらのグラフを図 1 に示す。その他のアミノ酸では, 熟成年数による一定の増減変動は見られなかった。また, 同じ純米大吟醸酒で精米歩合も近い No. 1 と No. 5 に着目すると, グルタミン, トリプトファン

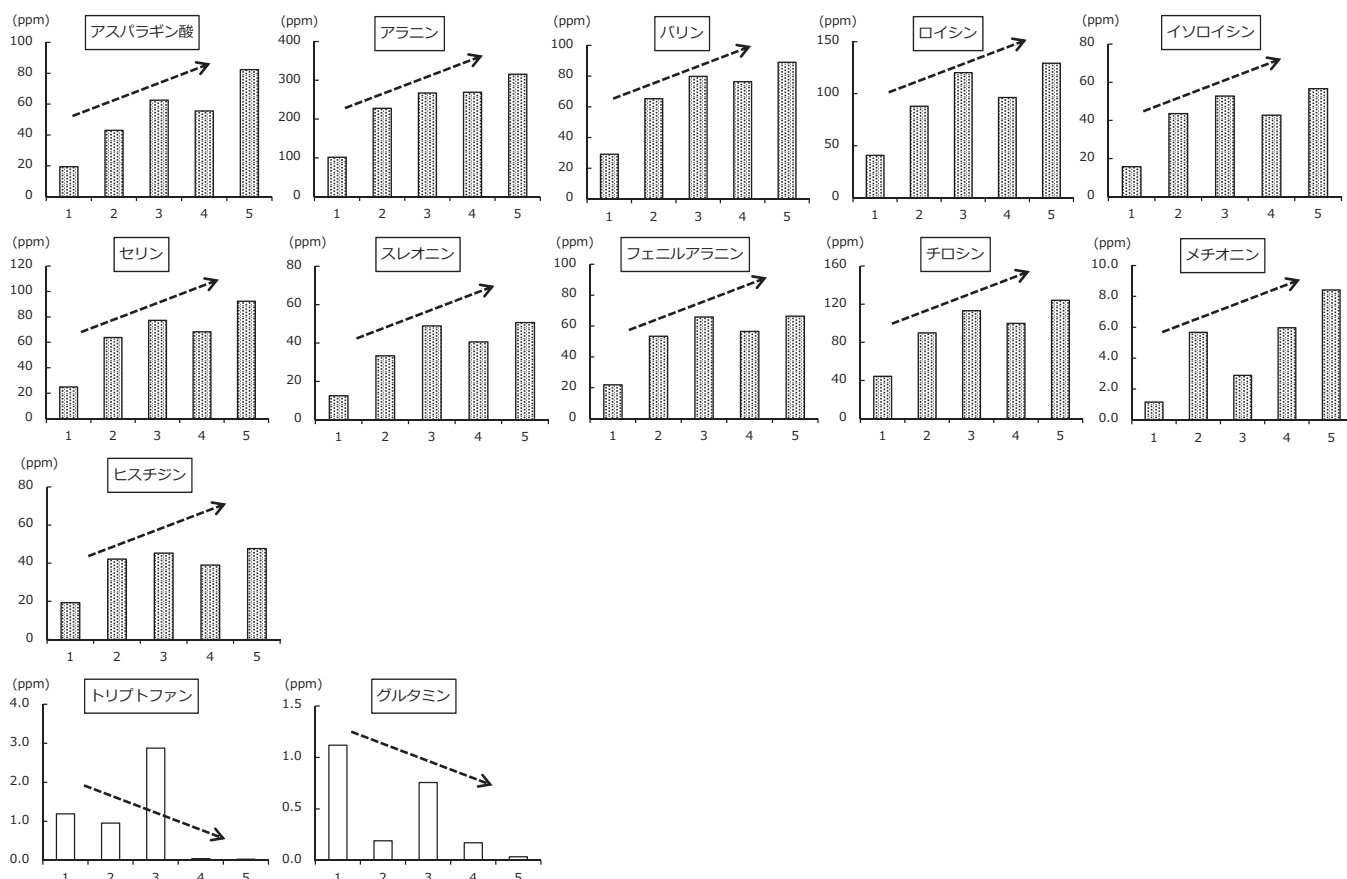


図1 市販熟成清酒の遊離アミノ酸濃度  
グラフ横軸の数値は表1の試料No.を示す。

ン、アルギニンを除いた17種類のアミノ酸が熟成年数の長いNo. 5 で高かった。

清酒中のアミノ酸は、熟成中に分解して、アルデヒドやピルビン酸になるといわれている<sup>5)</sup>。他にも糖と反応して着色物質や香り成分を生成するメイラード反応にも関与する。そのため、清酒中のアミノ酸は熟成中に減少すると考えられているが、今回分析に用いた清酒5点全体の結果では、アミノ酸20種類のうち11種類が熟成年数とともに高くなる傾向であった。酒類総合研究所の磯谷ら<sup>6)</sup>は、自所で製造・貯蔵している清酒の分析を行っているが、12種類のアミノ酸が熟成年数とともに増加する傾向を示していた。そのうち9種類が本報で示したアミノ酸と一致していた。熟成中にアミノ酸が増加する原因の1つとして、残存していたペプチドの分解が考えられるが、清酒の殺菌工程である火入れ処理により分解酵素は失活しているため、酵素以外の要因で分解が起きている可能性がある。一方、減少した2つのアミノ酸について、グルタミンは非酵

素的反応によるピログルタミン酸への変化が減少の一因であると思われる。トリプトファンは、貯蔵中にアセトアルデヒドと反応し、苦み成分である1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid (MTCA)に変化する。実際に火入れ・活性炭処理清酒の貯蔵により、MTCAの増加とトリプトファンの減少が確認されており<sup>7)</sup>、減少の一因であると考えられる。

### 3. 2 HS-SPME-GC/MSによる新酒と熟成清酒の微量香り成分の比較

HS-SPME法は、試料を封入した容器を加熱しながら、表面に吸着剤が塗布された針状のファイバーを容器のヘッドスペース部分に差し込むことで、加熱により試料から揮発した微量成分を効率的に吸着剤へ濃縮させる方法である。通常のHS法によるGC分析では10種類ほどしか香り成分を検出できないが、今回HS-SPME法を導入することでGCクロマトグラム上での検出ピーク数は格段に増加し、各ピークのマススペクトルを用

いたシミラリティ検索によって60から70の種類の香气成分を推定することができた。新酒と熟成清酒のGCクロマトグラムを比較し、新酒のみ、あるいは熟成清酒のみで検出された成分、そして新酒と比較して熟成清酒でピーク面積が2倍以上増加している成分を表4にまとめた。新酒のみで検出された成分はほとんどが華やかな果物様香を持つ脂肪酸エステルであった。一方で、熟成清酒のみで検出された成分はアルコールやエステル等々であったが、メイラード反応生成物であるフルフラール（アーモンド様香）やフェニル酢酸エチル（蜂蜜様香）が顕著に検出された。

表4 HS-SPME-GC/MS定性分析による新酒と熟成清酒の比較

新酒→熟成清酒で2倍以上増加*	2-エトキシテトラヒドロフラン、イソブチルアルコール、イソアミルアルコール、3-メチル-1-ペンタノール、乳酸エチル、3-エトキシ-1-プロパノール、2-プロピル-1-ペンタノール、3-ヒドロキシ酪酸エチル、ベンズアルデヒド、1-オクタノール、4-イソプロポキシ-1-ブタノール、γ-ブチロラクトン、コハク酸ジエチル、1,4-ブタンジオール
新酒のみ検出	酢酸ブチル、吉草酸エチル、プロピオン酸イソアミル、酢酸ヘキシル、カプロン酸プロピル、ヘプタン酸エチル、酢酸ヘプチル、2-ノナン、カプロン酸ブチル、オクタノ酸プロピル、3-(メチルチオ)-1-プロパノール、カプリン酸イソブチル、ミリスチン酸エチル、カプロン酸フェニルエチル、オクタノ酸フェニルエチル、リノレン酸エチル
熟成清酒のみ検出	インパレルアルデヒドジエチルアセタール、β-エトキシエタノール、ビルビン酸エチル、アセトール、ノナール、2-ヒドロキシ-3-メチル酪酸エチル、フルフラール、2-ノナノール、2-ヒドロキシカプロン酸エチル、乳酸イソアミル、1,3-プロパンジオール、フェニル酢酸エチル、ラウリン酸メチル、

\*GC/MS TICクロマトグラムのピーク面積の比較による。

また、新酒と比較して熟成清酒で2倍以上増加している成分は表4に示すようにアルコール類が多かったが、他に乳酸エチル（弱いナッツまたは乳製品様香）は約13倍、ベンズアルデヒド（アーモンド様香）は約95倍、コハク酸ジエチル（果実様香）は約105倍と大きく増加していた（図2）。更に、データは示していないが、清酒の吟醸香の主成分である酢酸イソアミル（バナナ様香）やカプロン酸エチル（リンゴ様香）は、熟成清酒では新酒の約1/10と大きく減少していた。

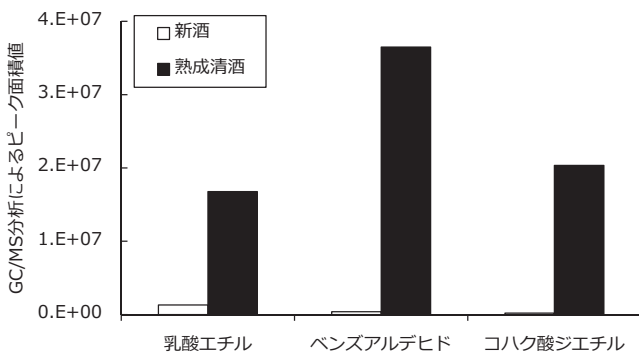


図2 HS-SPME-GC/MSによる新酒および熟成清酒中の乳酸エチル、ベンズアルデヒド、コハク酸ジエチルのピーク面積値の比較

HS-SPME-GC/MSによる清酒の微量香气成分分析により、新酒のみで検出された多種の脂肪酸エステルは、熟成清酒では検出されず、また熟成清酒の吟醸香成分は新酒と比較して大きく減少していた。一方で、熟成清酒ではメイラード反応生成物や多種のアルコール、アルデヒド、エステル類が検出された。加えて有機酸のエチルエステルが顕著に増加していた。メイラード反応生成物や有機酸エチルエステルは華やかな香りとは異なり、カラメルやナッツに似た甘く重厚な香りを持つ。以上のことから、新酒の華やかな香りに寄与する多種の脂肪酸エステルが熟成により減少または消失し、代わりにメイラード反応生成物や有機酸のエチルエステルが増加するため、清酒は熟成が進むと、華やかな香りから甘く重厚な香りに変化することが示唆される。

熟成清酒に特有の焦臭成分として、ソトロンという成分が高橋ら<sup>8)</sup>によって同定されている。また磯谷ら<sup>6)</sup>により、ジクロロメタン抽出法による熟成清酒中ソトロンの定量分析が行われ、6年以上貯蔵された清酒には検知閾値の2 μg/Lを大きく上回る量のソトロンが含まれており、ソトロンが清酒の熟成香に大きく寄与すると考察している。そこで今回のHS-SPME-GC/MS分析条件により、他成分と同時にソトロンの分析が可能か検討した結果、検出感度とピーク形状が非常に悪く、定性分析は不可能であった。今回GCカラムとして用いた高極性のDB-WAXでは、ピークの溶出時間も遅く、ピーク形状が大きく広がってしまったため、極性の異なるカラムを用いた分析を今後検討している。

#### 4. まとめ

今回分析に用いた試料は、すべて異なる酒蔵で製造されており、使用された米や酵母の種類も様々であると予想されるため、熟成による清酒成分変化の考察としては十分ではない可能性がある。しかし、その中でも製造条件の近いNo.1とNo.5の比較により、一部のアミノ酸の増加が確認できた。さらに、本報で使用したHS-SPME法による分析は、通常のHS法では検出できないフルフラールやコハク酸ジエチルなど、熟成により増加する微量香气成分の検出を可能とすることが分かった。糖、有機酸、アミノ酸分析と合わせることで、熟成による多種多様な成分の変化及びそれらの関連性を調べることができると考えられる。今後は、清酒の熟成による成分変化について、より正確に把握するため

に、同一ロットあるいは製造条件が同じで、熟成年数の異なる清酒を入手し、熟成に伴う成分変化の分析を検討している。

#### 文 献

- 1) 国税庁:平成22～26酒造年度における清酒の製造状況等について.
- 2) S. Honda. 他: Anal. Biochem., 180, 351(1989).
- 3) 清野珠美:酒研会報, No.55, p.20(2016).
- 4) 高阪千尋 他:京都市産業技術研究所研究報告, No.1, p.86(2011).
- 5) 高橋康次郎:日本醸造協会誌, 72, 839(1977).
- 6) 磯谷敦子 他:日本醸造協会誌, 99, 374(2004).
- 7) 近藤洋大 他:日本醸造協会誌, 91, 64(1996).
- 8) 高橋康次郎 他: Agr. Biol. Chem., 40, 325(1976)