

# GC-0 を使用した清酒のオフフレーバー成分の推定 ～「焦げ臭」と「硫黄臭」～

種場 理絵\*

## Estimation of Off-Flavor Components in Sake Using GC-0 ～Burnt Smell and Sulphur Smell～ Rie Taneba

### 1. 緒 言

清酒の官能評価は、清酒業界ならではの評価用語を用いて行っているが、評価者によって感じ方(表現)や閾値が異なるため、評価者の結果を第三者(酒造関係者等)に的確に伝えることは難しい。例えば、アルデヒド臭、脂肪酸臭(吟老、吟醸香変化)、酵母臭、硫化物様臭などの評価用語は、抽象的な官能表現であるが故に、評価用語と物質名が一致していないものも多い。その結果、成分の推定が困難であり、オフフレーバーの発生原因を特定できないため、製造工程の改善に繋げにくいのが現状である。

そこで本研究では、酒造現場におけるオフフレーバー発生抑制のための具体的な技術的フィードバックを目的として、官能評価と機器分析結果を関連づけて解析できるにおい嗅ぎシステム(GC-0)を用い、オフフレーバー成分を特定するとともに、香り表現と原因成分との関係を明確にすることとした。

### 2. 実験方法

#### 2・1 清酒試料

山口県新酒鑑評会にて「焦げ臭」及び「硫黄臭」の指摘を受けた清酒 5 点を選定した(表 1)。なお、指摘事項「きのこ」は、硫黄様としても表現されることがあり、本研究では「硫黄臭」に分類した。

表 1 選定した清酒と指摘事項

番号	種類	指摘事項
1	大吟醸	袋香、粕臭、樹脂臭、カビ、きのこ
2	大吟醸	焦げ臭、硫黄臭、きのこ
3	純米吟醸	焦げ臭、硫黄臭、コーンスープ、グアイアコロール臭
4	純米吟醸	焦げ臭、硫黄臭、粕臭、老香
5	純米吟醸	硫黄臭、粕臭、老香 (DMTS)

#### 2・2 におい成分の抽出方法の検討

本研究では、官能評価の指摘の原因となった成分を同定するために、既知のオフフレーバー成分に限定することなく分析する必要がある。そこで、清酒のにおい成分を幅広く抽出及び濃縮するための条件検討を行った。また、清酒のにおい成分の抽出は、一般的に溶媒又は捕集剤を用いて行われることから、溶媒と捕集剤の抽出効率を比較した。

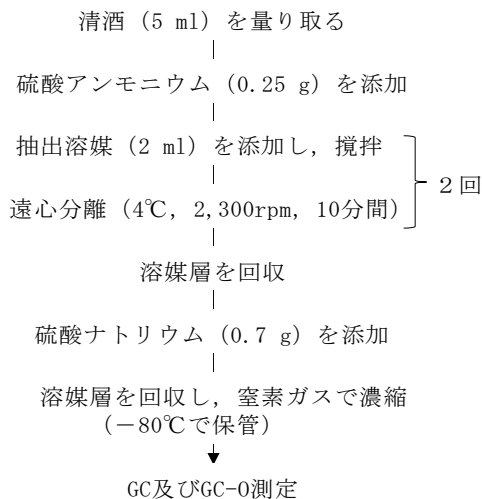


図 1 溶媒抽出法

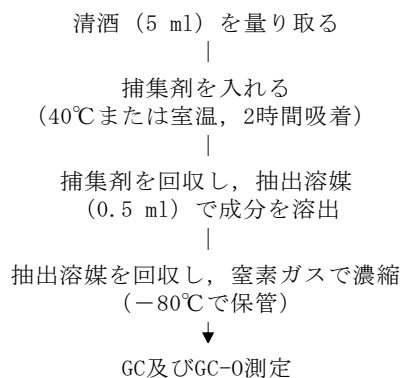


図 2 捕集剤を用いた抽出法

#### 2・2・1 溶媒を用いた抽出及び濃縮

抽出溶媒には、におい成分の抽出に一般的に用いられるジクロロメタン、ジエチルエーテル、またはペンタンを使用した(図 1)。まず清酒 5ml に硫酸アンモニウム 0.25g 及び抽出溶媒 2ml をそれぞれ添加し、3 分間攪拌した。遠心分離機(ベックマン・コールター製, Avanti J26S XP)を用いて 2,300rpm で 10 分間処理し、分離した溶媒層を回収した。残りの水層に再度同量の溶媒を添加し、同じ作業を 2 回繰り返した。回収した溶媒に、無水硫酸ナトリウム

\* 技術支援部

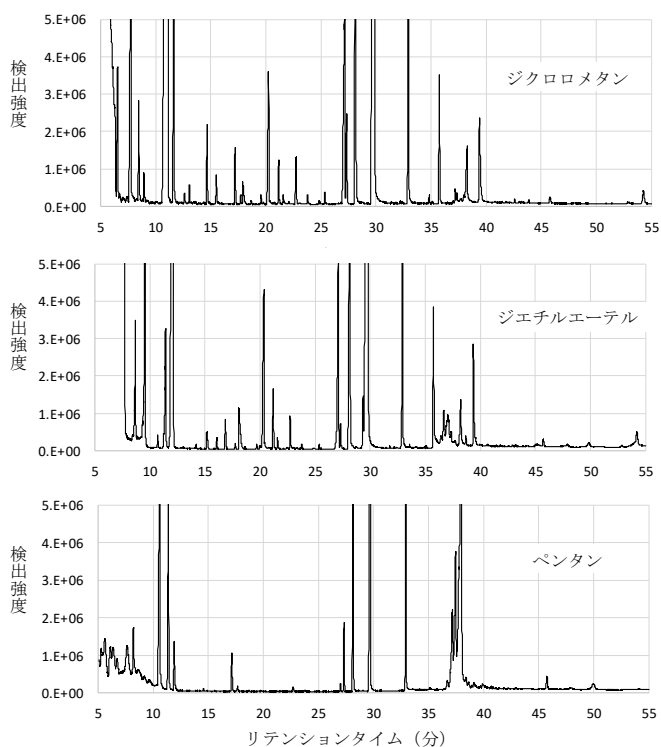


図3 抽出溶媒の検討

0.7g を添加して脱水処理し、窒素ガスを用いて溶媒層を約 30 $\mu$ l になるまで濃縮し、測定用サンプルを調製した。測定用サンプルは-80 $^{\circ}$ C で保管し、香りの変質が少ないとされる 1 カ月以内に使用した。

### 2・2・2 捕集剤を用いた濃縮

捕集剤として、清酒等のにおい嗅ぎ分析を行った報告等で使用される機会が多い MonoTrap (GL サイエンス製, DCC 18) 及び Twister (ゲステル製, 長さ 10 mm 膜厚 0.5mm) を検討した (図 2)。抽出溶媒には、ジクロロメタンを使用した。MonoTrap について、10ml 容量ガラスバイアルに清酒 5ml と MonoTrap を 1 枚入れ、40 $^{\circ}$ C で 2 時間攪拌し、成分を吸着させた。次に、MonoTrap の水分をふき取り、抽出用容器に MonoTrap と溶媒 0.5ml を入れ、超音波で 5 分間溶出させた。Twister について、10ml 容量ガラスバイアルに清酒 5ml と Twister を 1 個入れ、室温で 2 時間攪拌し、成分を吸着させた。超純水で軽く洗浄した Twister の水分をふき取り、10ml 容量ガラスバイアルに Twister と溶媒を 0.5ml 入れ、室温で 30 分間攪拌し成分を溶出させた。抽出溶媒は、バイアルに移し約 30 $\mu$ l になるまで窒素ガスで濃縮した。

### 2・3 におい嗅ぎ分析

におい嗅ぎ分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置 (以下, GC/MS) (日本電子製, JMS-Q1600GC) ににおい嗅ぎ装置 (GL サイエンス製, OP275Pro II) を接続して行った。分析条件として、InertCap Pre-WAX カラム (GL サイエンス製, 0.25mm $\times$ 30m $\times$ 0.25 $\mu$ m) を使い、キャリアガスとしてヘリウムを 2.0ml/分 で流した。注入口の温度は 230 $^{\circ}$ C、カラム温度は 40 $^{\circ}$ C で 0.5 分間保持後 5 $^{\circ}$ C/分 で昇温し 240 $^{\circ}$ C に達したところで 15 分間保持した。試料 2 $\mu$ l をスプリットレスで

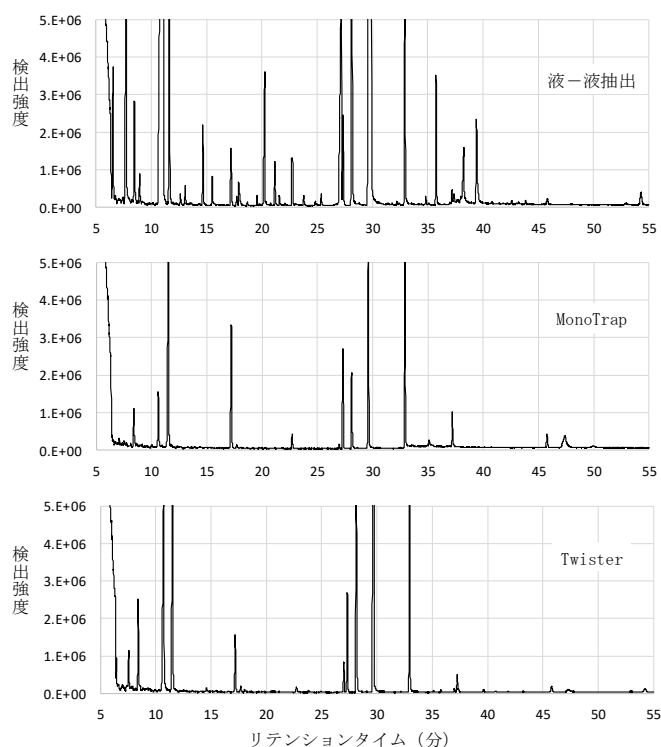


図4 捕集剤の検討

注入し分析した。

におい嗅ぎは、新酒鑑評会にて審査に関わった職員 3 名で実施した。解析における保持指標 (以下, RI) には、混合アルカン (レステック製 Qualitative Retention Time Index Standard) を測定し算出した。におい成分の推定は、ライブラリー (日本電子製, Escripme) 及び NIST を用いて行った。なお、官能表現と成分のすり合わせは、においライブラリ (アルファモス製, AroChemBase) で官能記述子を確認した。

## 3. 実験結果

### 3・1 におい成分抽出条件の検討

#### 3・1・1 におい成分抽出効率に及ぼす抽出溶媒の影響

選定した清酒を用いて、抽出溶媒の違いが及ぼすにおいの検出強度への影響をガスクロマトグラム (以下, GC) にて比較した。その結果、ジクロロメタンを使用した抽出液は、ジエチルエーテル及びペンタンに比べ、多数のにおい成分が高い強度で検出できることが確認できた (図 3)。また、ペンタンは清酒に添加すると粘性が高くなり、ガラス器具等に付着し操作性が悪くなる場合があるため、溶媒回収時等でサンプルのロスが発生しやすく、抽出成分にも影響していると推察された。

#### 3・1・2 におい成分抽出効率に及ぼす捕集剤の影響

捕集剤を用いて濃縮した溶液について、GC/MS 分析によるクロマトグラムのピーク数及び検出強度を比較した (図 2)。その結果、捕集剤を使用した場合、何れも溶媒抽出と比べ、検出される成分数が少なかった (図 4)。その理由として、捕集剤の性質により吸着される成分に偏りがあることや、捕集量が限られるためと考えられた。本研究では、

表2 におい嗅ぎ分析の結果

官能的特徴に対するコメント 【焦げ臭】	RI	化合物名	ArochemBase
ナッツ	1338	Methyl 2-hydroxypropanoate	官能記述子無し
ポップコーン、ナッツ様、 スナック菓子	1370	Ethyl 2-hydroxypropanate	エーテル、バター様、 バタースコッチ、フルーティ
ナッツ、ポップコーン、 スナック菓子	1373	Ethyl(L)-(-)-lactate	官能記述子無し
珈琲様、焙煎臭	1457	1-Hydroxy-4-methylpentan-2-one (若しくは不検出)	官能記述子無し
焙煎臭、カラメル、綿菓子	1614	Propylene glycol	アルコール、カラメル様
溶剤、甘い、ナッツ、 古い木、カフェオレ、焙煎臭	1649	Butyrolactone	甘い、カラメル様、クリーム様、 脂肪、芳香、油脂様
焦げ臭、甘い、綿菓子	1981	Heptanoic acid	脂肪、酸っぱい、チーズ、腐敗臭、
甘い、綿菓子、溶剤	1986	$\delta$ -Octalactone	甘い、ココナッツ、脂肪、乳製品、 トロピカル、トンカラマメ、ピーチ
綿菓子、甘い、焦げた砂糖	2048	Dihydro-3-hydroxy-4,4-dimethyl- 2(3H)-furanone	官能記述子無し
甘い、黒糖、綿菓子、カラメル	2054	N-Acetyl-DL-valine ethyl ester	化合物登録なし
綿菓子、甘い、カラメル	2092	n-Caprylic acid	汗臭い、コケ臭、脂肪、脂肪酸、 石鹸、チーズ、腐敗臭、フルーティ、フ レッシュ、野菜、油脂、ワックス様
キャラメル、カレー、スパイシー、 芳香剤	2215	$\delta$ -Nonalactone	甘い、クマリン、クリーム様、 ココナッツ、ミルク様
キャラメル味のスナック菓子、 ローストナッツ	2219	S-Methyl 3-methylbutanethioate	えぐい、刺激的な、チーズ、トマト、 発酵、マッシュルーム
甘い、フルーティ、古い木、 チョコレート、ユリの花粉、 甘いシチュー、ハチミツ	2582	Benzeneacetic acid	甘い、花粉、キャンディ、酸っぱい、 尿、ハチミツ様、バニラ、バラ、 フローラル、ワックス様
焦げた砂糖、綿菓子	-	不検出	-
焦げ臭、古い木引き出し	-	不検出	-
チョコレート	-	不検出	-
官能的特徴に対するコメント 【硫黄臭】	RI	化合物名	ArochemBase
硫化物様臭、酵母エキス	1338	Methyl 2-hydroxypropanoate	官能記述子無し
コーンスープ	1370	Ethyl 2-hydroxypropanate	エーテル、バター様、 バタースコッチ、フルーティ
薄い醤油、味噌、乾いた匂い、 漬物（酸っぱい古漬け）	1740	Methionol	甘い、硫黄臭、オニオン、肉の様な、 ニンニク、ポテト、野菜（調理）
スープ	2215	$\delta$ -Nonalactone	甘い、クマリン、クリーム様、 ココナッツ、ミルク様

上段:におい嗅ぎ分析において、評価者のコメントから判断し「焦げ臭」と分類した成分の一覧

下段:におい嗅ぎ分析において、評価者のコメントから判断し「硫黄臭」と分類した成分の一覧

官能評価の指摘の原因となった成分を、既知のオフフレーバー成分に限定することなく分析する必要があることから、以下の実験に用いる試料のにおい成分の抽出及び濃縮には、捕集剤は用いずにジクロロメタンを用いて行った。

### 3・2 清酒の「焦げ臭」及び「硫黄臭」の検出

清酒からのにおい成分の抽出液について GC-0 分析を行い、「焦げ臭」及び「硫黄臭」に着目し解析を行った。それぞれのおいを表現する官能コメントは広義に解釈し、「焦げ臭」は、砂糖が焦げたような甘いにおい、ローストナツ

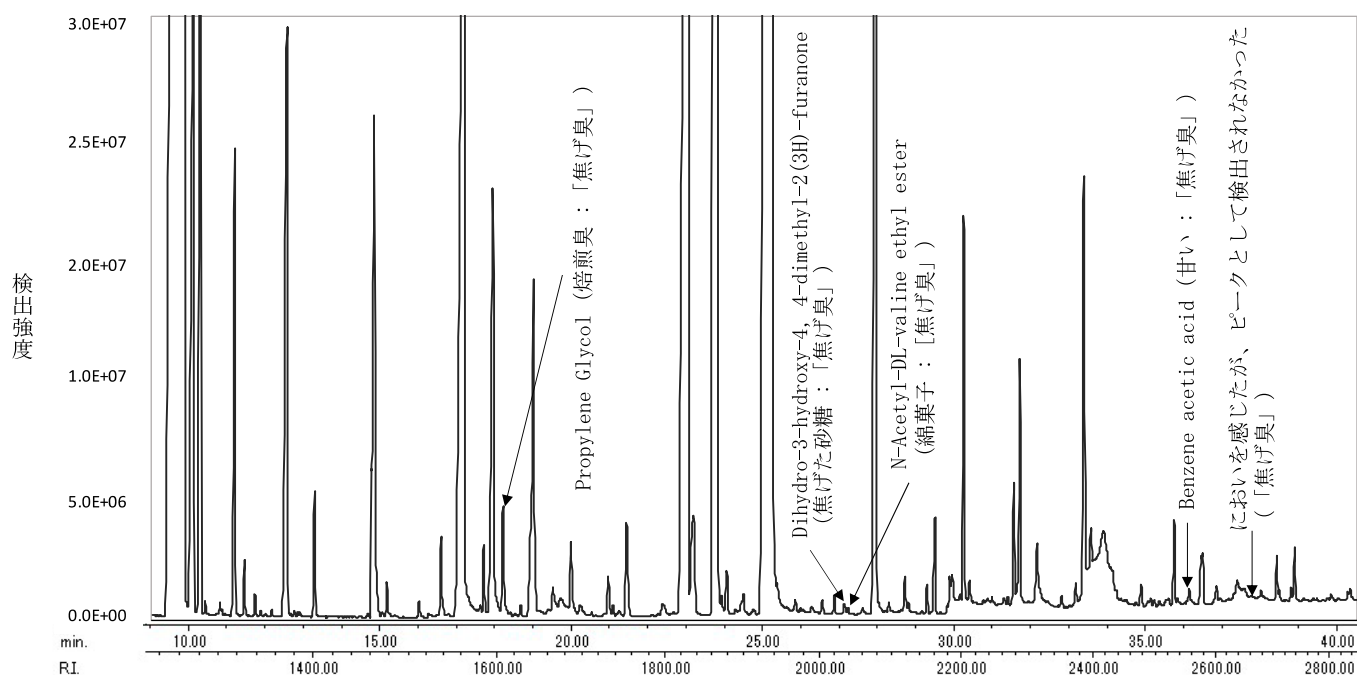


図5 におい嗅ぎクロマトグラムの例(清酒 3)

ツ様の香ばしいにおい及び単純に「甘い」と表現するコメントを採用した。一方、「硫黄臭」は、「酵母エキス」や「漬物」のような硫化物を含むガスの様なイメージを持たせるコメントを採用した。複数の評価者が同じタイミングで「焦げ臭」や「硫黄臭」を感じたピークについてMSで同定し、ライブラリーで照合した。その結果、「焦げ臭」を呈する成分として、いずれの評価者も類似した表現(甘い, 綿菓子, 又は焦げた砂糖)をしていた Dihydro-3-hydroxy-4, 4-dimethyl-2 (3H)-furanone を確認した(表 2, 図 5)。この成分は, 清酒の「甘臭」や「焦げ臭」として知られる Sotolon や Homofuraneol<sup>1)</sup>にもあるフラン構造を持っている。その他にもカラメル様として感じられた Propylene glycol, 甘い香りとして  $\delta$ -Octa lactone, 黒糖として N-Acetyl-DL-valine ethyl ester, ハチミツ様として Benzene acetic acid を確認した。また, Benzene acetic acid は, 同じ成分に対する評価者の表現(甘い, フルーティー, 古い木, チョコレート, ユリの花粉, 甘いシチュー, 又はハチミツ)が異なっており, においに対する官能表現に評価者の個性があることを確認した。本研究で確認した「焦げ臭」を呈する成分は, 清酒官能評価における代表的な「焦げ臭」の成分ではないが, 清酒の甘臭や焦げ臭として複合的に評価を下げる要因になり得る成分であると考えられる。次に「硫黄臭」を呈する成分として, Methionol を確認した。Methionol は一般に醤油等に含まれ, 硫黄臭を呈する代表的な成分である。

さらに「焦げ臭」と「硫黄臭」のどちらにも捉えられた成分として, Ethyl 2-hydroxypropanoate 及び  $\delta$ -Nona lactone が確認された。Ethyl 2-hydroxypropanoate について, ポップコーン, ナッツ様, 及びスナック菓子と表現されたものを「焦げ臭」, コーンスープと表現されたものを「硫

黄臭」として定義した。コーンスープを「硫黄臭」に定義した理由は, 清酒評価において, コーンスープを連想させるにおい成分として「硫黄臭」の標準成分である Dimethyl sulfide が知られている<sup>2)</sup>からである。一方官能記述子では, エーテル, バター様, バタースコッチ, 及びフルーティーと表現されており, 本研究で定義した「焦げ臭」と解釈される内容であった。

次に  $\delta$ -Nona lactone について, キャラメル, カレー, スパイシー, 及び芳香剤と表現されたものを「焦げ臭」, スープを「硫黄臭」として定義した。一方, 官能記述子は甘い, クマリン, ココナッツ, 及びミルク様であり, 評価者のコメントとは異なる性質のにおいを表現するものであった。このように官能記述子とにおい嗅ぎの評価コメントの性質が異なる成分が確認された理由として, においは感じるがクロマトグラム上にピークとして現れない香りと偶然に別のにおい成分のピークが出るタイミングが重なった可能性が考えられた。実際に, におい嗅ぎでは「焦げ臭」又は「硫黄臭」として感じるが, クロマトグラム上にピークとして現れず, 成分を推定できないものがあった。その原因として, 成分の閾値が低いため官能では確認できても, ピークとして検出できるほど成分が濃縮できていないことが推察された。このような成分については, その成分に適した捕集剤等を使用し, 抽出・濃縮方法を更に検討する必要がある。

今後も継続的に, におい嗅ぎによるオフフレーバー等の解析結果をライブラリーに追加しデータ数を増やすことが, 清酒の品質向上に向けた工程改善の糸口になると考える。

#### 4. 結 言

官能評価と機器分析結果を擦り合わせるができる

GC-0 分析を行い、清酒における「焦げ臭」と「硫黄臭」を呈する成分を推定した。その結果、甘い、綿菓子、又は焦げた砂糖と表現された「焦げ臭」として、Dihydro-3-hydroxy-4, 4-dimethyl-2(3H)-furanone やカラメル様として感じられた Propylene glycol, 甘い香りとして  $\delta$ -Octalactone, 黒糖として N-Acetyl-DL-valine ethyl ester, ハチミツ様として Benzene acetic acid を確認した。また、「硫黄臭」として、一般に硫黄臭の要因として知られる Methionol を確認した。

一方、におい嗅ぎでは「焦げ臭」又は「硫黄臭」として検出するが、クロマトグラム上にピークとして現れず、成分を推定できないものがあった。このような成分については、冒頭で行ったように捕集剤を使用し、個別に捕集剤による抽出法を検討する必要がある。

本研究で着目した「焦げ臭」及び「硫黄臭」の様に、成分から鑑みたさまざまな官能表現をまとめたライブラリー

を持つことは、感覚を共有する上で重要であると考えられる。官能評価者による多様な(個性や癖)官能表現と成分をライブラリーとして蓄積することにより、オフフレーバーに対する互いの認識を一致させることができる。この認識の一致がオフフレーバー発生原因究明の糸口になると考える。

#### 参考文献

- 1) 磯谷敦子, 横野瑞希, 他: 全国新酒鑑評会出品酒の「甘臭・カラメル様」「焦臭」指摘に関与する成分とその生成要因の解析, 日本醸造協会誌, **117**(9), p.657-667(2022), DOI:<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan.117.657>.
- 2) 独立行政法人酒類総合研究所, 清酒のにおいとその由来について, <https://www.nrib.go.jp/data/pdf/seikoumisan.pdf>(参照日 2024年3月25日).