

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：83303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K13510

研究課題名（和文）自然乳酸発酵による伝統技術が醸し出す「生もと系清酒」の特異的香気成分の解明

研究課題名（英文）Characterization of aroma compounds of Kimoto-brewed sake produced by traditional brewing technique using natural lactic acid fermentation

研究代表者

笹木 哲也（Sasaki, Tetsuya）

石川県工業試験場・化学食品部・研究主幹

研究者番号：00504846

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：自然由来乳酸菌で発酵させる生もと系清酒について、特徴的な香気成分の解明を試みた。SA-SBSE-GC-0/MSを活用し、清酒中の極性香気成分を高感度検出し、ヒトの鼻で匂いを嗅ぎ取ることで、清酒の香気形成への寄与度が高い45の香気成分ピークを特定した。続いて、同じ酒蔵由来の生もと系と速醸系の清酒ペア3組（全6試料）を分析した結果、生もと系清酒は速醸系清酒よりも香気成分の種類が多い傾向であり、特に極性/親水性香気成分が多くを占めていた。さらに、11の特徴成分の定量分析を行った結果、ロイシン酸エチルなどの極性香気成分や -6-(Z)-ドデセノラクトンが生もと系清酒に多く含まれていることが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で生もと系清酒に特徴的な香気成分を複数特定した。生もと系清酒は乳酸菌の自然発酵による伝統的製造技術であり、テロワールやクラフト技術、個性が求められる世界酒類市場において注目が高まっている。本研究成果は、生もと系清酒の品質向上と新たな価値創造、その地が醸し出す特有の清酒の香りを解明することでの魅力発信に貢献するものである。本研究は、極性香気成分の高感度分析を可能とするSA-SBSEが、GC-0(匂い嗅ぎ評価)にも有効であること、特定成分のターゲット分析が有効であることを示した。フレーバーサイエンスにおいて、新たな研究手法の可能性と有効性を提案する成果である。

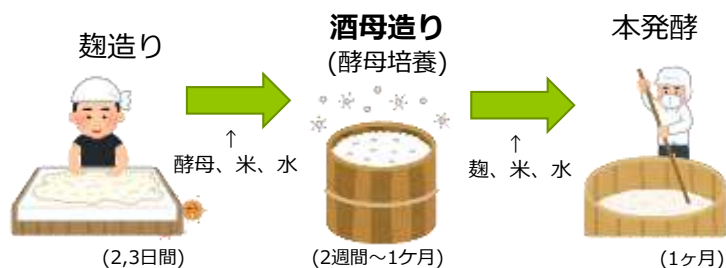
研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to characterize aroma compounds of Kimoto-brewed sake fermented with natural lactic acid bacteria. Utilizing SA-SBSE-GC-0/MS, polar aroma compounds in sake were detected with high sensitivity, and 45 aroma compound peaks with high contribution to sake aroma formation were found. Next, SA-SBSE-GC-MS analysis of three pairs of Kimoto- and Sokujo-brewed sake (six samples in total), from the same brewery, showed that Kimoto-brewed sake tended to have a greater variety of aroma compounds than Sokujo-brewed sake, with polar/hydrophilic aroma compounds in particular. Furthermore, quantitative analysis of 11 characteristic compounds showed that -6-(Z)-dodecenolactone and polar aroma compounds such as ethyl leucinate were found to be more abundant in Kimoto-brewed sake.

研究分野：食品化学、分析化学

キーワード：GC-MS SA-SBSE 極性香気成分 伝統技術 乳酸発酵

1. 研究開始当初の背景

「生酏(きもと)系清酒」とは、伝統的な清酒醸造技術「生酏系酒母造り」で醸造した清酒であり、製法の特異性と複雑で濃醇な味わいから、近年注目を集めている。速醸系酒母は乳酸を添加するのに対し、生もと系酒母は乳酸を添加せず天然由来乳酸菌の自然発酵により雑菌を抑えている(図1)。生酏系酒母造りは、米や米麴をすり潰さない山麴仕込み、すり潰す工程のある生酏造りの2種類に大別されるが、その酒質は似ており、速醸系よりも複雑で濃醇な味わいとされている。生酏系酒母造りの学術的研究は酒母の微生物叢、成分変化など多くなされてきたが、酒質についての研究例は極端に少なく、香気成分の報告はほとんどなかった。



	速醸系	生酏系 (生酏・山麴)
雑菌抑制方法	乳酸の添加	自然発生の乳酸菌で発酵
発酵期間	2週間	1ヶ月 (熟練技術, 手間)
清酒の香味	淡麗	複雑, 濃醇

図1 清酒醸造のイメージ図 (上段) と酒母造りの特徴 (下段)

2. 研究の目的

本研究では、生酏系清酒の複雑で濃醇な香味の原因を解明するため、生酏系清酒に特徴的な香気成分を明らかにする。特に、従来の香気成分分析技術では困難であった極性香気成分を、高感度に分析する手法を活用し、研究課題を解決する。

3. 研究の方法

(1) SA-SBSE-GC-O/MS による清酒中の極性香気成分の高感度検出

極性/親水性成分を効率よく抽出できる Solvent Assisted-Stir Bar Sorptive Extraction (SA-SBSE 法) を本研究に活用した。SA-SBSE 法は、スターバー抽出法(SBSE 法)を改良したもので、極性有機溶媒で Polydimethylsiloxane 被覆攪拌子を膨潤させた後、SBSE 法と同様に水系試料内で攪拌させて、香気成分を吸着抽出する方法である(図2)。なお、本研究では、攪拌子に吸着した香気成分をアセトンに逆抽出させて、得られたアセトン抽出液をガスクロマトグラフ質量分析(GC-MS)に供した。

生酏系清酒を SA-SBSE-GC-MS で評価すると、数百ものピークが検出された。匂いの強い香気成分をスクリーニングするため、成分分離した各香気成分の匂いを鼻で嗅ぎ取り、匂いの特性と強さを評価するガスクロマトグラム・匂い嗅ぎ評価(GC-O)を行った(図3)。匂いの強さの指標として、感知できる最大希釈倍率を示す FD-factor を求めた。香気成分の同定は、MS ライブラリ、Retention Index データベース、標品との比較により行った。



図2 SA-SBSE 法のイメージ図

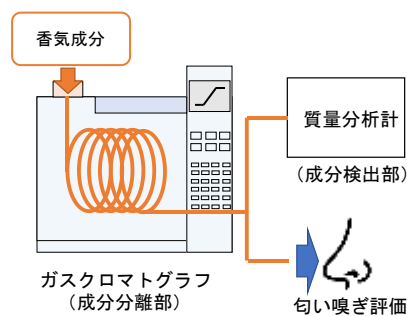


図3 GC-O/MS のイメージ図

## (2) SA-SBSE-GC-MS による生醗系に特徴的な香气成分の解明

生醗系と速醸系の清酒ペア（同じ酒蔵、同一精米歩合の酒米で醸造されたもの）を3組（全6試料）準備し、供試試料とした。GC-O で匂いを検知し、GC-MS で特定した45の香气成分をターゲット成分として、香气成分を比較した。主成分分析等で見出された特徴的な11の香气成分については、標準添加法による定量分析を行った。

## (3) Target profiling による複数酒蔵の清酒および醸造中清酒の香气成分評価

7つの酒蔵で醸造された生醗系清酒と速醸系清酒(7酒蔵、14試料)を対象に、SA-SBSE-GC-O で特定した45の重要香气成分について、SA-SBSE-GC-MS で評価した。さらに、生醗系清酒と速醸系清酒の醸造中の酒母、醪を SA-SBSE-GC-MS で評価した。

## 4. 研究成果

### (1) SA-SBSE-GC-O/MS による清酒中の極性香气成分の高感度検出

予備試験において、ヘッドスペース法、固相マイクロ抽出法、SBSE 法などいくつかの分析前処理法を試した中で、SA-SBSE 法が生醗系清酒の特徴的香气成分の分析に有効であることが分かった。SA-SBSE 法と、従来法である SBSE 法の GC-MS で得られた生醗系清酒のガスクロマトグラムを図4に示す。SA-SBSE 法のクロマトグラムは、SBSE 法よりも検出ピーク数が多く、感度も高かった。SBSE 法は低極性から中極性成分の抽出が可能であり、ほかの固相抽出法よりも抽出成分の範囲が広いものの、SA-SBSE 法はさらに高極性の抽出が可能である。ここでは示していないが、SA-SBSE 法にて生醗系と速醸系清酒のクロマトグラムに差異が現れたことから、生醗系清酒には親水性成分を多く含むことが予想された。

続いて、SA-SBSE 法と SBSE 法の GC-O で得られた各化合物の FD-factor を図5に示す(Food Chem, 2023 より引用)。横軸は各化合物の  $\log K_{ow}$ (極性の指標)の順に並べた。SA-SBSE の FD-factor は、SBSE よりも高くなっており、低極性(左側)で差が顕著であった。さらに、 $\log K_{ow}$  1以下の成分では、10成分中5成分が SA-SBSE でのみ検出されていた。SA-SBSE-GC-O は清酒中の香气成分、特に極性香气成分を高感度に分析していることが分かる。

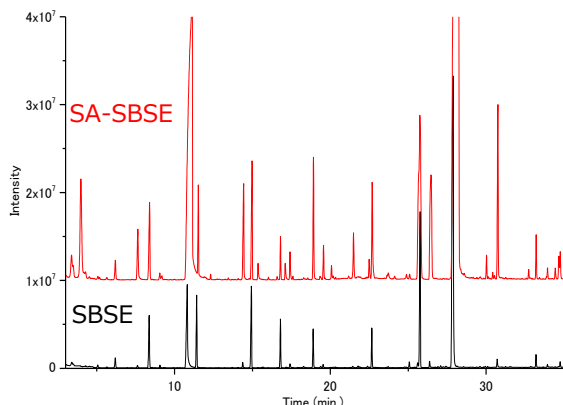


図4 SA-SBSE と SBSE のガスクロマトグラム比較

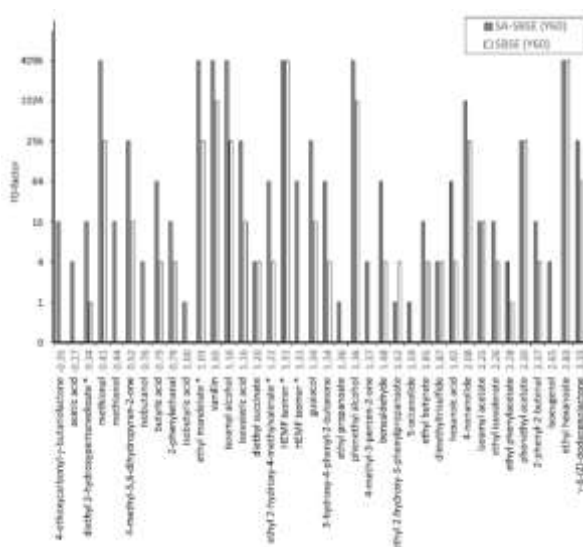


図5 SA-SBSE と SBSE の FD-Factor 比較

## (2) SA-SBSE-GC-MS による生酏系に特徴的な香气成分の解明

SA-SBSE-CG-O/MS で特定した重要香气成分について、SA-SBSE-CG-MS により、生酏系と速醸系の清酒ペア 3 組 (全 6 試料) を分析した。取得データを主成分分析、判別分析 (OPLS-DA) した結果、生酏系清酒は速醸系清酒よりも香气成分の種類が多い傾向であり、特に極性/親水性香气成分が多くを占めていた。

生酏系もしくは速醸系の清酒に多く含まれ、FD-factor の高かった 11 の特徴成分について、標準添加法による定量分析を行った。そのうちのロイシン酸エチルと  $\gamma$ -6-(Z)-ドデセノラク톤の結果を図 6 に示す。ロイシン酸エチルは極性/親水性香气成分で、アミノ酸から生成するフルーティーな香气成分であり、精米歩合の高い山麩仕込み清酒に多く含まれていた。なお、ほかにも複数の極性/親水性香气成分が山麩仕込み清酒に多く含まれていた。ヒトが香りを感じる際には、清酒から立ち上がる香气成分を鼻で直接嗅ぎ取るたち香、清酒を口の中に入れた後に喉を通じて鼻に届く口中香が知られている。極性/親水性香气成分は口中香に寄与し、風味形成に影響するとされている。山麩仕込み清酒の極性/親水性香气成分も、その風味、味わい形成に寄与しているものと考えられる。

$\gamma$ -6-(Z)-ドデセノラク톤は、全 3 組の清酒で山麩仕込み清酒に多く含まれていた。この成分は極性成分ではないものの発酵感を高める香气成分として報告されており、発酵感を有するとされる山麩仕込み清酒の香味形成にも寄与しているものと考えられる。

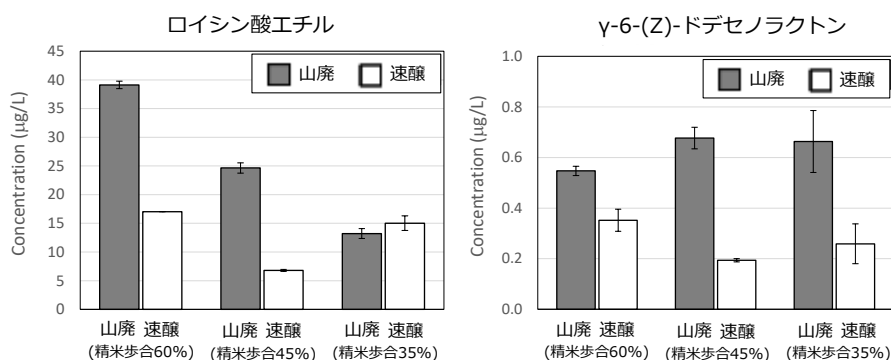


図 6 ロイシン酸エチルと  $\gamma$ -6-(Z)-ドデセノラク톤の定量分析結果

## (3) Target profiling による複数酒蔵の清酒および醸造中清酒の香气成分評価

45 の重要香气成分をターゲット化合物として、7 酒蔵の生酏系と速醸系清酒 (全 14 試料) について、SA-SBSE-CG-MS により香气成分を分析した。その結果、生酏系清酒に ethyl mandelate、ethyl 2-hydroxy-4-methylvalerate などの極性香气成分や  $\gamma$ -6-(Z)-dodecenolactone が多く含まれていた。即ち、(2) で明らかにした同一酒蔵と同様に、複数酒蔵においても、生酏系清酒にはこれら香气成分が多く含まれることが明らかとなった。また、本研究において、SA-SBSE-GC-MS による多検体試料 (14 試料、n=3) の target profiling が、清酒の香气特性把握に有効であることも示された。さらに、清酒醸造中の酒母、醪を香气成分分析した結果、生酏の酒母発酵工程において、 $\gamma$ -6-(Z)-dodecenolactone が急激に増加していることが明らかとなった。

## (4) まとめ

生酏系清酒に特徴的に含まれる成分を複数特定した。山麩仕込み清酒は複雑で濃醇な味わいと表現されるが、これら成分が山麩仕込み清酒の香味を形成していることが示された。本研究成果による、生酏系清酒、およびテロワール(地域特性)やクラフト(職人)技術の新たな価値創造や品質向上に貢献することを期待している。

## 4. 謝辞

本研究の遂行にあたり、清酒試料をご提供頂きました(株)車多酒造の徳田耕二様、分析方法をご指導頂きました(株)ゲステルの落合伸夫様、笹本喜久男様に感謝いたします。

## <引用文献>

Sasaki, T., Ochiai, N., Yamazaki, Y., Sasamoto, K. (2023). Solvent-assisted stir bar sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry with simultaneous olfactometry for the characterization of aroma compounds in Japanese *Yamahai* brewed sake. *Food Chemistry*, **405**, 134640. open access under the CC BY license, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134640>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasaki T., Ochiai N., Yamazaki Y., Sasamoto K.	4. 巻 405
2. 論文標題 Solvent-assisted stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry with simultaneous olfactometry for the characterization of aroma compounds in Japanese Yamahai-brewed sake	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 134640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2022.134640	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Y., Sasaki T., Ochiai N., Sasamoto K., Michihata T., Koyanagi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Target profiling of aroma compounds in three types of Japanese sake using solvent-assisted stir bar sorptive extraction with gas chromatography-mass spectrometry	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Food Composition and Analysis	6. 最初と最後の頁 106441
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jfca.2024.106441	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笹木哲也
2. 発表標題 石川の地域に根ざした嗜好飲料の香り成分 加賀棒茶と山廃仕込み清酒
3. 学会等名 第37回日本香辛料研究会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹木哲也
2. 発表標題 石川の地酒のデータサイエンス
3. 学会等名 東京農業大学総合研究所研究会 食・農データサイエンス部会 第3回公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------