

¹H NMR による日本酒（清酒）の成分分析の試み ～特徴的成分と含量バランスが一度にわかる

丸 山 穰
(キャリア開発総合学科)

I. 問題と目的

日本の「伝統的醸造」が、2024年にユネスコの無形文化遺産に記載された。酒造りは古くから日本に根ざしてきた食文化の一つであり、稲作と共にあった。古墳時代には酒造りに麴菌の利用が始まり、平安時代には宮内省造酒司がおかれ、宮廷行事に酒が使われている。室町時代には現在の酒造りの原型がうまれ、江戸時代を通して技術発展し、確立していった（一島、2007、2017）。米を蒸す、麴をつくる、もろみを発酵させる、等の技術が伝統的に磨かれ、日本各地でその地域の生活に応じて発展し、自然や気候と深く結び付きながら伝承された。こうした技術で製造される酒は、儀式や祭礼行事などで使われ、日本の文化で不可欠な役割を果たしている。以上が評価され、無形文化遺産としてふさわしいとされた。

アルコールは一般に、糖を酵母菌が分解して生成する。ビールの醸造では、大麦のデンプンを麦芽のアミラーゼにより分解、生成された糖を酵母菌が醗酵に使う。ワインの醸造では、ぶどう果実に含まれるブドウ糖が原料となる。日本酒の醸造では、米のデンプンが、麴菌により糖に変えられながら、酵母菌がアルコールに変えていく並行複醗酵という他に類をみない高度な技術を擁している。それゆえ、原料の微妙な違いや処理の違い等でさまざまな個性を持つ酒が生まれる。

清酒の味覚は、さまざまな言葉で表現され

ている。評価は官能検査が必要であるが、特徴を的確に表現するためには、特徴を網羅的かつ量的に評価する必要があり、評価に用いる用語には、統一され普遍的に情報交換を可能とする客観性が望まれる。独立行政法人酒類総合研究所は、清酒の特性を表す86の用語を16のクラスに分類、そして2階層化し、定義を行った（宇都宮、2006）。それら官能的特性を、対応する化学成分の分析値と結びつけ、客観的に評価する試みがなされている。佐藤は、変数の処理に多変量解析を導入し「甘辛、濃さ、きれいさ」の3次元に集約し表現されるとした（佐藤ら1967；佐藤ら1974）。糖と有機酸、アミノ酸類、揮発性分それらの種類と量とバランスで決まることを示した。

通常、成分分析の際は、注目する一つの成分を単体として精製して含量を測定する。複数の成分について、それぞれ適した方法で分析値を求め、含量比等を総合的に解釈することは可能であるが、特定せずに幅広く複数の成分の構成比を一度に測定する方法は極めて限られる。著者は先の報告において、核磁気共鳴（nuclear magnetic resonance；NMR）装置による測定で、清酒の個性が見分けられることを示した（丸山、2015）。多変量解析の手法を適用することで、NMR測定データを、特定の成分に注目することなく総合的に捉えることで、その清酒の醸造方法の違いや、それを反映した「味（官能検査的特徴）」の個性をグループ分けする事が可能であっ

た。そこで本研究では、それら試料において、NMR解析法により、その試料の個性を特徴付ける成分及びその含量バランスの分析が可能であることをあきらかにすることを目的とした。

II. 方法

1. ¹H NMR測定について

NMR解析法は、固体試料や溶液試料を測定し、測定した試料に含まれる化合物の化学構造や立体構造の解析、また、分子運動を解析する方法である。有機高分子化合物の立体構造の解析や組成分析に欠くことのできない手法であり、基礎研究から産業や医療の分野まで、広く用いられている。比較的穏やかな条件の下で、試料を破壊することなく測定できるので、その試料の本来の性質を知ることが可能となる。¹H NMR測定では、原理的には試料に含まれる全ての¹H（プロトン；水素原子）が測定され、¹Hの、その存在する環境・状態を反映した、総和として表わされる。¹Hが属する分子の構造と状態をそのまま反映した位置（ケミカルシフト）に現れるシグナルの総和として、スペクトルが得られる。つまり、同位体元素などで試料分子を標識する必要なしに、通常の水素原子（¹H）をもつすべての分子を同時に測定できる。シグナルの大きさから試料の構成成分の存在比がわかる。

通常NMRの利用方法は、精製された単一成分の試料について、構造やその物質を同定するものであるが、本研究の手法では、試料をそのまま、混合物のまま測定する。試料を、含まれる成分を分離することなく、そのまま測定することが可能であり、構成成分の量比や分子の会合などの状態を一度に見渡せるという利点がある。これから、分子の含まれる割合、バランスを客観的に表すことが可

能となる。

2. 試料の種類

日本酒（清酒）市販の日本酒は仙台市内食品販売店の酒類売り場で購入し、また2点は宮城県産業技術総合センターより譲渡を受けた（表1）。

表1 試料とした日本酒

- | |
|---------------------------|
| 1. 長者盛〈純米酒〉；新潟銘醸（株） |
| 2. ほまれ麒麟〈特別純米酒〉；下越酒造（株） |
| 3. 白龍〈純米酒〉；白龍酒造（株） |
| 4. 銀嶺月山〈純米原酒〉；月山酒造（株） |
| 5. 帝松〈純米吟醸〉；松岡醸造（株） |
| 6. 金紋ねのひ〈純米酒〉；盛田（株） |
| 7. 千歳鶴〈山廃純米酒〉；日本清酒（株） |
| 8. タカラ 料理のための清酒；宝酒造（株） |
| 9. 越後桜〈大吟醸〉；越後桜酒造（株） |
| 10. ひめぜん；（株）一ノ蔵 |
| 11. 溪流 どむろく；（株）遠藤酒造場 |
| 12. 勝山〈特別純米 縁〉；勝山酒造（株） |
| 13. 四季の松島〈純米〉非売品；阿部勘酒造（株） |
| 14. 一ノ蔵〈無鑑査辛口〉；（株）一ノ蔵 |
| 15. 天賞〈純米80〉；（株）中勇酒造店 |
| 16. 一ノ蔵〈杜氏の晩酌〉；（株）一ノ蔵 |
| 17. 宮寒梅；（合）寒梅酒造 |
| 18. 勝山 非売品；勝山酒造（株） |
| 19. 嘉泉；田村酒造場 |
| 20. 月桂冠〈糖質ゼロ〉；月桂冠（株） |
| 21. 松竹梅〈天〉；宝酒造（株） |

対照試料 マルトオリゴ糖類は林原生物化学研究所より譲渡を受けた。他は和光純薬（株）の製品を使用した。

3. 試料調製と測定方法

試料調製 試料550 μ lに重水（D₂O）を50 μ l加え、3-(Trimethylsilyl) propionic-2, 2, 3, 3-d₄ Acid, Sodium Salt（終濃度1mM）を加え、600 μ lにし、そのうち560 μ lを ϕ 5mmのNMR試料管に移し、測定に供した。

NMR測定は、JNM-ECA600（JEOL社）を使用し、25℃で、積算回数128回、軽水のシ

グナルを pre-saturation 法で減衰させ行った。これを標準系とし、対照試料の測定時は、対照試料を 1～10mg で測定した。

4. データ解析方法

主成分分析 得られた NMR スペクトルの各スペクトルの数値化と主成分分析は ALICE2 for Metabolome (JEOL DATUM社) を使用した。

シグナルの帰属は、主に Chenomx NMR Suite (Chenomx社) と HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) と SDBS (http://riodb01.libbase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi) を参考にした。必要に応じて標準試料より得られた測定データと比較した。すなわち同一条件で測定して得られたチャートは直接的に比較する事でシグナルの帰属が容易に行える。

Ⅲ. 結果

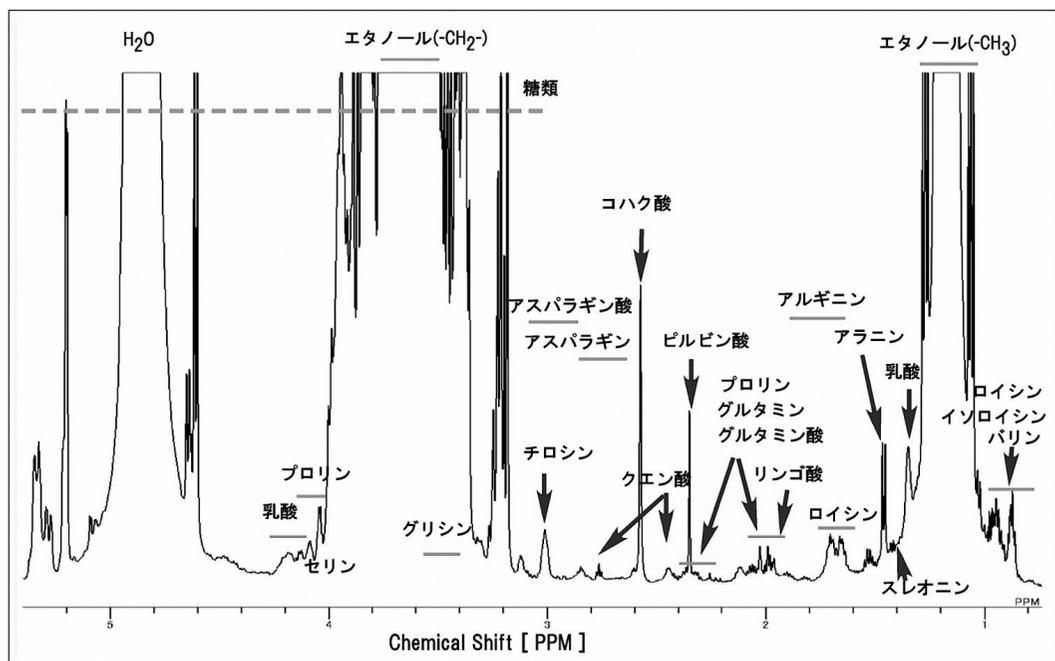
1. NMR スペクトルの概観

図 1 に日本酒試料の NMR スペクトル例を示した。試料中の各成分分子の水素原子が固有の位置 (ケミカルシフト) にシグナルとして表される。水、エタノール、糖の大きなシグナルの谷間に、他の成分のシグナルが観察された。

構成成分は、それぞれ純粋な単体としての固有のシグナルの形 (チャート図でたくさんのピークのある波線のようなもの) を示し、大きさ (ピークの面積) はその成分のプロトン原子の存在量を表す。資料が混合物の場合、それら成分の重ね合わせとして表される。

図 2、3 に示したように、各試料の個性を反映したシグナルの大きさの違いがみられた。軽水のシグナルは pre-saturation 法で減衰させているが、周辺の重要なシグナルが歪まない程度に減衰度を抑えたため、大きく残

図 1. 清酒の NMR スペクトル例とシグナル同定



存している。乳酸、コハク酸、リンゴ酸、クエン酸といった有機酸類、アラニン、グルタミン酸、ロイシンといったアミノ酸等、日本酒の重要な成分が観察された。

2. 試料のスペクトルの比較

図2は試料番号6番から11番の測定スペクトルを並べた（縦軸方向の拡大率があまり大きくないので小さなシグナルは図からは判断しにくい）。10番の試料は、乳酸に帰属されるシグナルがほかの試料と比べてかなり強く、また、コハク酸やピルビン酸、リンゴ酸のシグナルも強く、糖も多量に含まれることが示された。この10番は「甘さと酸味の新感覚の日本酒」をうたっている商品である（一ノ蔵（株）の「ひめぜん」）。8番は料理酒（宝

酒造（株）のタカラ「料理のための清酒」）で、糖の大きなシグナルに埋もれたグリシン、グルタミン酸などの他のアミノ酸が全体的に高く、また、乳酸も多い。11番は濁り酒で、上清を分取し測定したが、糖のシグナルが大きく観察された。9番（越後桜）は大吟醸系（安価なもの）であり、各成分のシグナルが小さかった。6番は濃厚をうたっているもので、スペクトルの形は7番の山廃のものによく似ている。

試料のpHの違いを反映して、コハク酸のシグナルの移動が表わされた。

図3に試料番号13番から19番のスペクトルを並べて示した。

15番の天賞「純米80」と16番の一の蔵「杜

図2. 日本酒試料のNMRスペクトル（試料JZ6～JZ11）

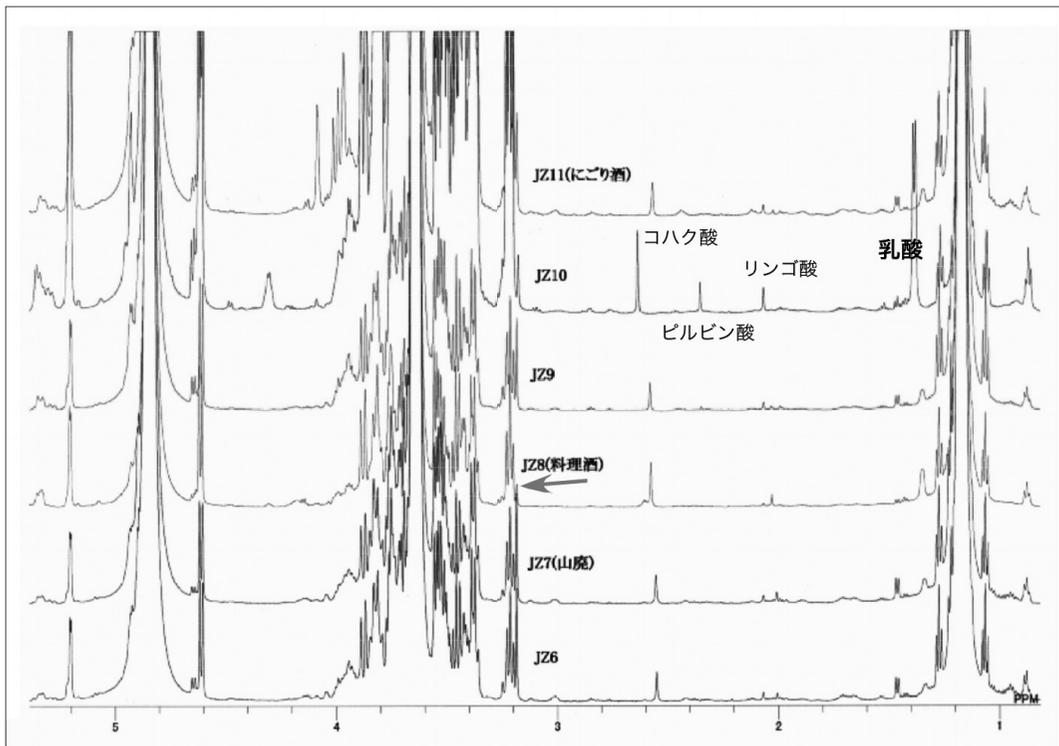
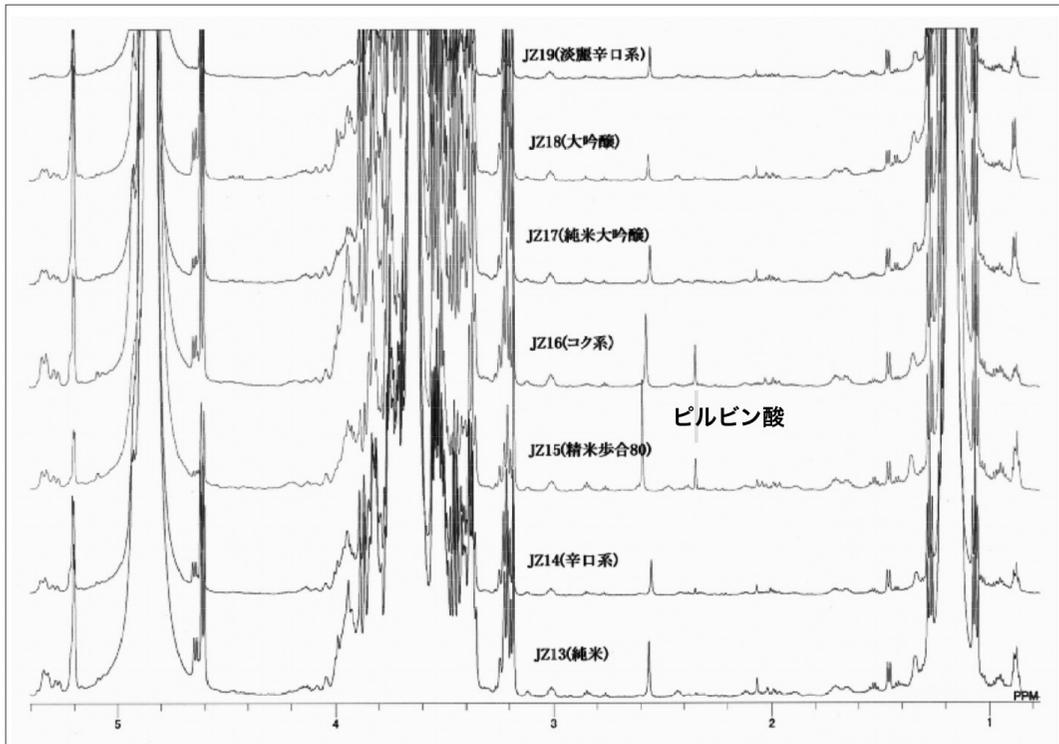


図3. 日本酒試料のNMRスペクトル (試料JZ13～JZ19)



氏の晩酌」は、コハク酸の量が多めでピルビン酸もみられ、个性的であることをうりにしている製品。また15番の「純米80」は糖も少ないことが表された。19番の「嘉泉」と14番の「無鑑査辛口」は本醸造の辛口系で、アミノ酸等成分濃度のスペクトルが低かった。

図4に「月桂冠 糖質ゼロ」のスペクトルを示した。糖質が十分に低くかった。図では糖質量の全体を把握できるように縦のメモリを圧縮して示した。

図4. 糖質ZEROのNMRスペクトル (注: 作図で縦のスケールが他と異なる)

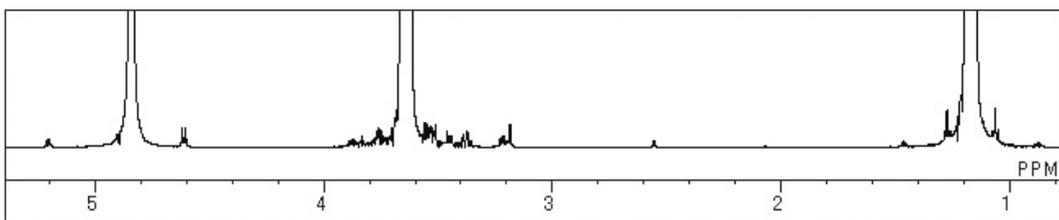


図5に月桂冠〈糖質ゼロ〉と、同グルコースを添加した試料、比較試料として松竹梅〈天〉のスペクトルを示した。試料Aにグルコースを加えると、試料Bのシグナルと非常に似たスペクトルが観察された。

図6に、試料AとBのアミノ酸、有機酸のシグナル領域を拡大して示した。

図7に、試料A、Bの、単糖・オリゴ糖のシグナル領域を拡大比較して示した。

図8に、日本酒試料に含まれるイソマルトースのシグナルの表れ方を示した。図中○を付したシグナルは結合していないグルコースの1位の炭素にあるプロトンを示し、☆を付したシグナルは、イソマルトースの1位の炭素にあるプロトン（分子図の☆の位置）に帰属できる。

図5. NMR スペクトル比較（試料A：月桂冠〈糖質ゼロ〉、B：松竹梅〈天〉）

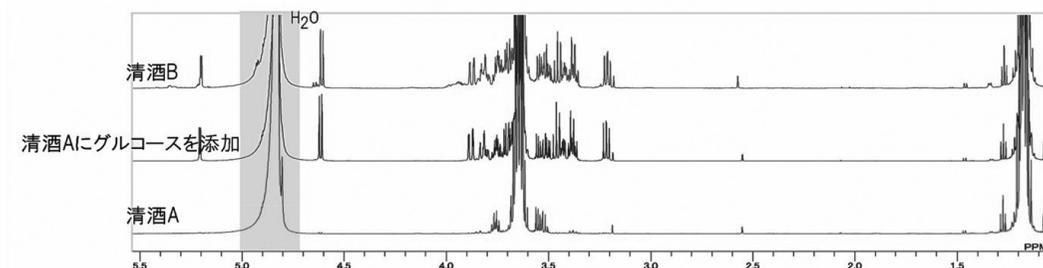


図6. NMR スペクトル比較（試料A：月桂冠〈糖質ゼロ〉、B：松竹梅〈天〉）

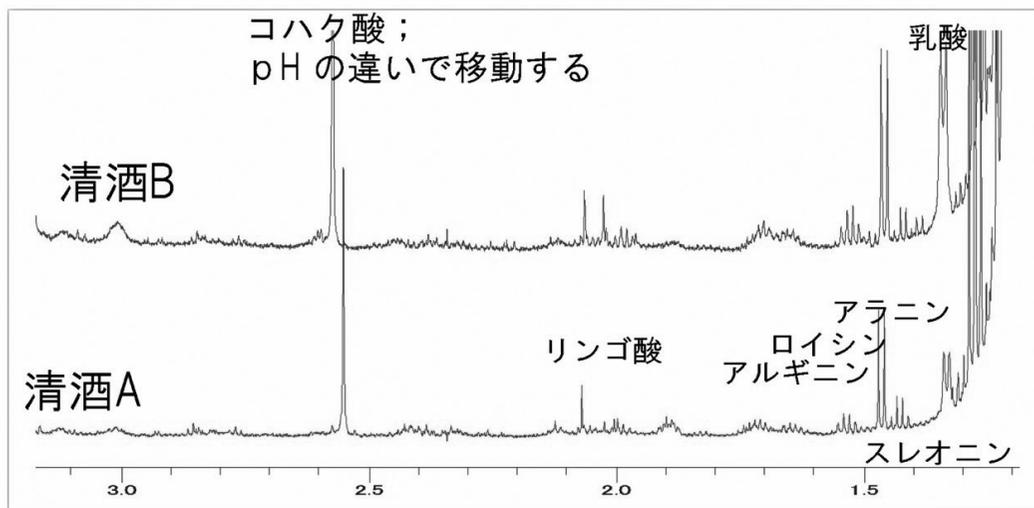


図7. 単糖・オリゴ糖領域の比較 (試料A: 月桂冠〈糖質ゼロ〉、B: 松竹梅〈天〉)

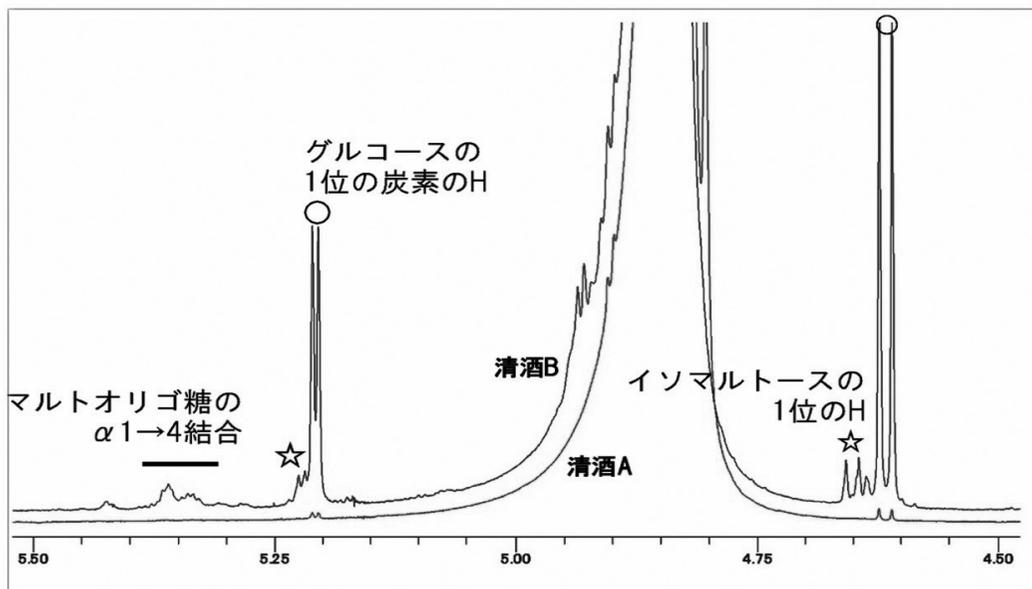


図9に、日本酒試料に含まれるグリセロールとエチル α グルコシドのシグナルを、試料Aと比較して示した。

図8. イソマルトースのシグナル (試料B: 松竹梅〈天〉)

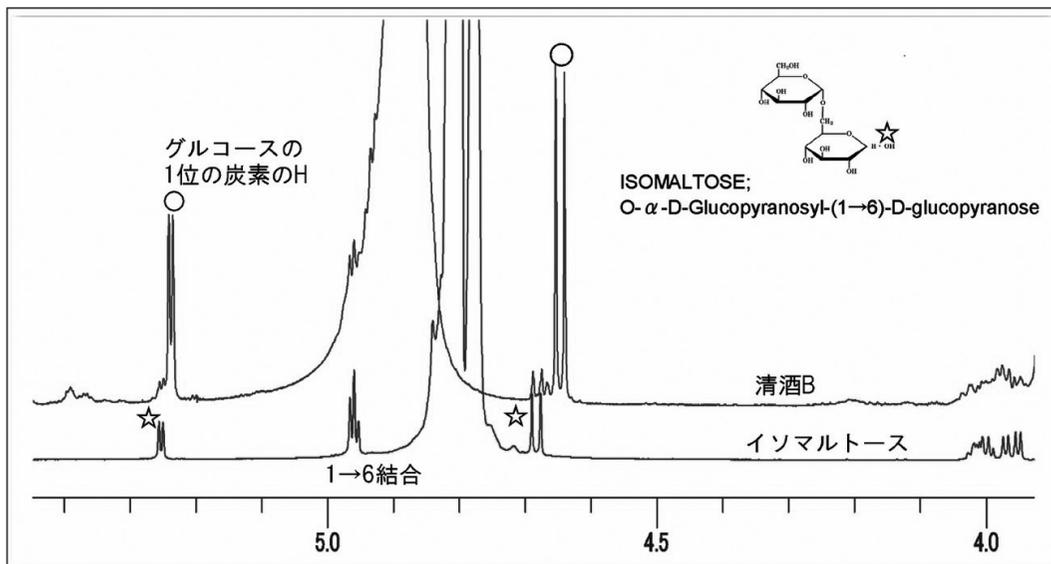
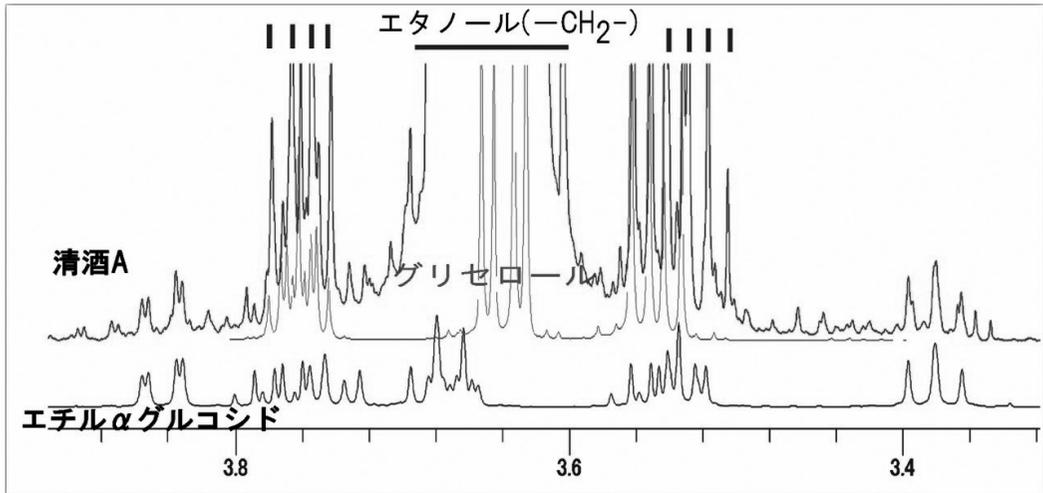


図9. NMR シグナル同定 (試料 A：月桂冠〈糖質ゼロ〉)



IV. 考察

前回の報告では、NMRの解析により、各成分を同定する手間をかける事なく、総合的にその試料（清酒）の個性を判定する事が可能であることを明らかにしたが、今回は、試料毎の性格の違いを特徴付ける成分を、明確に提示できる事が示せた。例えば、料理酒では旨味成分である各種アミノ酸が多く含まれ、吟醸系の試料では雑味につながる成分が少なく、山廃造りではこだわりを反映していると考えられる乳酸が多く、本醸造の清酒では、各種成分濃度が低いが醸造アルコールの添加が理由と考えられる（味の調整のためなので悪いことではない）。

糖質ゼロの清酒 近年の消費者の健康志向をうけ、酒類でもアルコール発酵後に残存する糖質を抑えた商品が開発されている。ビール業界が先行しているが、料理への合わせ易さ等の嗜好の変化に応える目的もあり、清酒も追隨した。

月桂冠（株）の「月桂冠〈糖質ゼロ〉」は、“開発した製法により、糖質を極限までカッ

トしながらも旨味成分をできるだけ残し”（月桂冠（株）の広報文章より引用。）た新製品である。醗酵の過程で、麹菌による糖化を強めるとともに、後半アルコール濃度が高くなってくると酵母の能力が低下し、糖質がアルコールへ変換されずに残存するが、この能力を持続させ、糖質を使い尽くすように工夫している。ゼロの表記は、法律に基づく栄養表示基準により、100mlあたり0.5g未満の含量の場合に認められる。通常、清酒には糖質として、(単糖である)グルコースや(グルコースの重合体である)マルトオリゴ糖類が数%含まれる。清酒をNMR測定すると、それら糖質に帰属されるシグナルが強く検出されるため、ケミカルシフト値がこの領域にある物質のシグナルは帰属する事が困難である。糖質の含量が少ない試料ではこの領域に重なるシグナルも帰属しやすくなる。「糖質ゼロ」にグルコースを添加しNMR測定を行うと、他の端麗辛口系清酒と酷似したスペクトルが得られた(図5)。端麗辛口と区別される両試料のNMRスペクトルの比較で、「月桂冠

「糖質ゼロ」は糖質がほとんど含まれないが、他の清酒の成分は残されているという、この製品の開発の目的が実現されていることが明確に示された(図5、図6)。

また、グルコース単位構造の一位の炭素に結合した水素原子のシグナル領域を比較したところ、「糖質ゼロ」では、他の清酒と比較して単糖であるグルコースが非常に少ないだけでなく、二糖であるイソマルトースやマルトオリゴ糖もほとんど見られなかった(図7、図8)。イソマルトースは α 1,6結合を持つため、通常清酒醸造では、醗酵過程の最後まで残存する。[デンプンは、グルコースが α 1,4結合で鎖状に結合し、それがあがる割合の α 1,6結合で橋渡しされた構造をもつ。デンプンのアミラーゼ消化で生じたイソマルトースは、通常酵母は利用できないため、清酒中に残る。]「糖質ゼロ」の特別な製法として、イソマルトースを資化できる改良型酵母を利用しているか、予め酵素処理等によって米のデンプンの α 1,6結合を消化している事が推測される。

通常清酒では、糖のシグナルが重なり解析が難しいシグナル領域が、「糖質ゼロ」では分かりやすく表せた。エチル α グルコシドは、清酒に特徴的に含まれる糖質成分で、コク味を与えるが、近年、皮膚への保湿効果も注目されている(Kitamura, et al (1997))。標準試料との比較により、容易に帰属が可能となった(図9)。また、NMRチャートの解析では、エタノールの-CH₂-由来のシグナルのサテライト(左右に4本ずつ)が妨害するが、グリセロールのシグナルも簡単に同定できた。アミノ酸や有機酸のシグナルの領域を比較しても、「糖質ゼロ」は、通常の標準的な清酒としての組成を維持していることがわかった。

試料中の各成分は、アミノ酸、有機酸、核

酸、糖類、脂質、エステル類、エーテル類、アルコール類など、多くの成分が含まれるため、各成分を個別に分離することを計画するとそれぞれの成分グループ毎に適した分離手法を用いなければならない。また、検出定量化度も成分グループにより大きく差がある。今回示した手法は、事前に試料を各成分に分離することなく、構成成分の同定とその含まれる量比の視覚化が行える。複雑な反応が進行する日本酒の醸造行程のモニタリングや品質管理、日本各地の蔵で造られる酒の個性を客観的に表わす手法としても非常に有利であると言える。

V. 文献

- 一島英治. (2007). ものと人間の文化史 138 麴 (こうじ). 法政大学出版局
- 一島英治. (2017). 日本の国菌-コウジキンが支える社会と文化-. 東北大学出版会
- 宇都宮仁. (2006). 清酒の官能評価分析における香味に関する品質評価用語及び標準見本. 日本醸造協会誌. 101. 730-739
- 佐藤信, 嶋田三夫, 矢原正. (1967). 清酒の味覚に関する研究(第1報) 因子分析法の適用. J. Soc. Brew. Japan. 62. 506-511
- 佐藤信, 蓼沼誠, 高橋康次郎, 東保和, 丹沢和仁, 枝村博典. (1974). 清酒の味覚に関する研究(第2報) 多次元尺度構成法の適用. J. Soc. Brew. Japan. 69. 771-773
- 丸山穰. (2015). ¹H NMRによる醸造プロファイリングの試み. 聖和学園短期大学紀要. 52. 91-96
- Nobuo Kitamura, Yukiko Ota, Akinori Haratake, Takeshi Ikemoto, Osamu Tanno, Toshio Horikoshi. (1997). Effects of Ethyl α -D-Glucoside on Skin Barrier Disruption. Skin Pharmacology. 10. 153-159.
- Godelmann, R., Kost, C., Patz, C.-D., Ristow, R., & Wachter, H. (2016). Quantitation of Compounds in Wine Using ¹H NMR Spectroscopy: Description of the Method and Collaborative Study. Journal of AOAC International. 99 (55). 1295-1304.
- Le Mao, I.; Martin-Pernier, J.; Bautista, C.;

Lacampagne, S.; Richard, T.; Da Costa, G. (2021).
¹H-NMR Metabolomics as a Tool for Winemaking
Monitoring. *Molecules*. 26 (22), 6771-6783