清酒熟度の迅速評価法と新規な劣化防止技術の開発

近年、食材や健康食品などの機能性の指標として抗酸化能が取り上げられ、酒類や発酵食品の抗酸化性を目、耳にする機会が増えています。これまで抗酸化能の測定は化学的な分析手法によることが一般的でしたが、熟成・劣化過程で生ずる微弱な発光を高感度な光電法によって測定する方法が開発され、公的機関でも採用されつつあるようです。この手法をいち早く酒類の熟成・劣化の評価に取り入れ、応用への道を開いた著者に解説をいただきました。

岡本竹己・渡邊英憲・齋藤高弘

1. はじめに

最近の清酒の品質向上は著しいものがあり、特に各鑑評会の一般公開や製造技術研究会においてきき酒する出品酒は、入賞の有無に関わらずすばらしい酒質のものばかりである。これは各蔵元において清酒製造に関わる方々の酒造りにかける熱意、努力と、それを支える酵母を中心とする酒造関連微生物開発や装置の進歩が大きく貢献している。一方、市販酒に目を向けると、貯蔵時あるいは流通時の管理に起因すると考えられる品質変化（劣化）が生じてしまったと感じられる高級酒が見受けられ、残念に感じるものが少なくない。

清酒上槽後の貯蔵中の変化のメカニズムに関してはこれまで多くの研究が行われてきているが、醸造酒である清酒中には数百種類の成分が含まれていると考えられており、これらが複雑に関与する熟成、劣化に関しては明らかになっていないことが多く、その評価のほとんどは、最終的に熟練した人の官能による判断に依存しているのが現状である。

我々は、これらの多くの成分を含む清酒の熟成や劣化の変化を、網羅的、客観的に、そして簡易、かつ迅

速に評価する方法として、食品の酸化劣化や抗酸化能を総量で捉える手法としての化学発光法に着目し検討を行ってきた。本手法は、物質が励起状態から基底状態に移行する際に光を放つ現象を応用しており、微量な測定対象物を光量として測定できることが報告されており¹⁻²⁾、酸化劣化と強い関連のある食品、生体組織、無機・有機化合物、そして高分子材料の劣化・老化の測定など、幅広い分野で利用、検討が行われている。食品分野に関しては、焙煎ゴマ油の保存に伴う品質劣化判定³⁾、米の品質劣化の評価⁴⁾などがあり、それぞれ既存の手法に比べ簡便で迅速な測定を可能としている。

本文では、筆者らが取り組んできた「清酒の熟成・抗酸化特性の把握と迅速評価技術の開発」、および本手法により確認した生醗系清酒の抗酸化性の高さを利用した「新規な清酒劣化防止技術の開発」について解説する。

2. 化学発光による清酒の劣化、抗酸化性の評価

化学発光による酸化劣化の測定原理概略を第1図に示す。本測定法は、酸化生成物であるヒドロペルオキ

Developments of Rapid Analysis of Sake Maturation and a New Prevention Method for Deterioration
Takemi OKAMOTO (Industrial Technology Center of Tochigi Prefecture, Food Technology Division)
Hidenori WATANABE (Watanabe Sake Brewing Co., Ltd)
Takahiro SAITO (Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

シドの分解により発生する極めて微弱な発光を、高感度の光電子増倍管を用いて検出、計測することにより、酸化劣化度を定量的に評価する方法である。酸化反応を網羅的に捉える手法であり、清酒の劣化は酸化に起因する部分も多く含まれると考えられることから、本方法による劣化度評価が可能ではないかと考え検討を行った。

第 1 図 化学発光による酸化物の測定原理

現在我々が測定に用いている装置の操作手順を写真に示す。マイクロチューブに入れた試料を装置にセット後、完全に遮光した装置内（浜松ホトニクス C9692）で試薬を混合し、発生した微弱な発光を PC に取り込むものであり、簡便な操作性と短時間で測定が行える事が大きな長所と考えている。ここで用いた発光系は、汎用的な 3 種類の試薬を用い、常温において非常に高い発光強度を持つものであり、Trautz-Schorign 反応を応用したものである。

本手法の劣化度評価法としての有効性確認のため、純米酒を透明瓶に入れ蛍光灯照射下 50℃ にて強制劣化させた場合の経時変化について、XYZ 系微弱発光の X 発光（過酸化性）⁵⁾ と劣化度評価法である TBA 法⁶⁻⁸⁾ との比較を行った（第 2 図）。試験には製造ロットの異なる 2 種類の純米酒を供した（純米吟醸酒，精米歩合 55%，セルレニン耐性酵母使用）（特別純米酒，精米歩合 60%，K1001 使用）。TBA 法はアミノカルボニル反応中間生成物である 3DG と反応し赤色素を生成する TBA（2 チオバルビツール酸）を利用した清酒劣化指標である。

本結果より、TBA 法との間には高い相関関係が認められ、化学発光法が清酒の劣化度測定法として有効

①マイクロチューブに試料を入れる

②測定機器にマイクロチューブを設置する

③測定機器上部からピペットを挿入し試薬を分注する

④測定機器に接続したPCから発光量を測定する

写真 化学発光測定操作の流れ

であることが確認できた。また、私共はセルレニン耐性を付与したカブロン酸エチル高生産酵母による清酒の酸化由来と考えられる特異的な劣化を、化学発光法で捉えられることを確認しており⁹⁻¹¹⁾、今回の結果で純米吟醸酒のX発光値が純米酒と比較し高くなった要因と考えている。

本装置は、試薬を選択することにより簡易かつ迅速に抗酸化性の評価を行うことが可能であることから、次に化学発光の熟度評価法への利用の可能性について確認を行うため、XYZ系微弱発光のY発光（抗酸化性¹²⁾と、清酒の熟度指標であるDPPH消去能による抗酸化性測定法¹³⁾との比較を行った。

第2図 化学発光(X発光)とTBA測定値の関係
試料は透明瓶に入れ蛍光灯照射下50℃にて強制劣化させた
各数字は保存日数

第3図 DPPH消去能(抗酸化性)と化学発光(Y発光)の関係
初呑み切り検酒時の清酒(23企業, 101点)

上槽後、貯蔵途中での熟度評価を行う機会である初呑み切り検酒時（平成19年8月実施）に、栃木県内の酒造メーカー23社から集められたH18BY産の清酒試料101点（吟醸酒系、生酒は除く）について、Y発光法とDPPH消去能の比較を行った結果を第3図に示す。

ばらつきはあるものの、両測定法には相関関係が見いだされ、化学発光法の熟度評価法としての有効性が示唆された。また、第3図の右上に生醗系酒母の抗酸化性が高いことが示されており興味深い。

以上から、同一装置で簡易に複数の情報を得ることが出来ることが明らかとなり、化学発光法が製造現場における熟成、出荷管理において、人の官能を補完する有効なツールになり得ると考えられる。

3. 新規な劣化防止技術の開発

第3図の考察で述べたとおり、興味ある結果として生醗系（山麴も含む）が高い抗酸化性を示す傾向があることが明らかとなった。生醗系酒母による清酒は、幅のある味や押し味を特徴としている。その複雑な香味は、乳酸菌などの生醗系独特の微生物の働きにより造り出されていると考えられ、その特異的な特性については溝口ら¹⁴⁾により多くの部分が明らかにされている。また、生醗系清酒は貯蔵、流通時に酒質が崩れ難い、ある程度熟成させたもののおいしい等、速醸系清酒と熟成経過が異なるとの話を酒造関係者から聞くことも多い。

そこで筆者らは、生醗の抗酸化性の高さに着目し、本特性の劣化防止技術への応用の可能性について引き

続き検討を行った。

乳酸菌による発酵生産物が抗酸化能力を持つことは広く知られており、生醗系清酒の抗酸化性には乳酸菌の代謝が関与しているものと推察し、第4図の方法により醸造用乳酸を用いず培養乳酸菌添加により製造した酒母を使用した清酒（五百万石、精米歩合60%、9号系酵母使用）を小仕込により製造した。同一原料により速醸酒母で製造したものを比較対照とし、30℃暗所において保存試験を行い、NaClO発光法を用い過酸化物質増加量による劣化の進み方の比較を行い第5図に示した。本発光は、過酸化物質にNaClOを添加することにより一重項酸素を主体とする発光種が生まれることに基づいており、X発光と同様に酸化により生じる多種のヒドロペルオキシドを捉えており、X発光の数十倍の発光量があり、かつ短時間（1分以内）での測定が可能である。我々は、本発光が清酒の劣化に伴い増加する3-DG、熟成に伴い減少するDPPH法による抗酸化性と高い相関を持つことを確認している¹⁵⁾。

なお、本試験では市販の*Lactobacillus Sakei*を麴エキス（精米歩合95%）で培養した乳酸菌培養液を、高温糖化液に対し0.5%添加し、対照は通常通り醸造用乳酸添加（乳酸菌無添加）仕込みとしたが、得られた清酒の一般成分は第5図のとおりほぼ同じであった。

本結果より、培養乳酸菌添加により製造した清酒は、速醸酒母による清酒と比較し、酸化に由来すると考えられる発光量増加が抑えられる傾向が示され、実験室レベルの小仕込において、生醗系清酒は酸化劣化し難い可能性があることを確認することができた。

第4図 高温糖化乳酸菌添加酒母の製造方法

第5図 試作清酒の加速劣化試験結果

一般成分(日本酒度, アルコール分, 酸度, アミノ酸度)は次のとおり

培養乳酸菌添加: + 2, 17.6%, 2.7, 2.2

比較(速醸) : + 1, 17.9%, 2.5, 2.0

4. 実地製造試験

製造現場における同様の清酒製造の可能性について、渡邊酒造(株) (酒銘: 旭興) にて実地製造試験を実施した。

まず、過去にこのような手法がなかったか調べた結果、明治後期に発案された「醴配 (あまざけもと)」という方法が存在した¹⁶⁾。本法は55℃で糖化した糖化液に乳酸菌を添加し、乳酸が十分生成された後、酵母を添加し酒母として用いる方法であり、我々が試みようとしていた手法とはほぼ同様であった。それらの中の「二段式酸基醴配」を参考にしたが、文献通りでは乳酸生成までに時間がかかり過ぎるので、雑菌汚染のリスク回避のため速やかな乳酸菌増殖による酸の生成、pH低下を目的として第6図に示した手順で実施した。乳酸菌 (*Lactobacillus Sakei*) の培養条件予備試験により、高温糖化後のポーメが11～13、麴歩合50%程度が速やかな酸度上昇と官能的にも満足ゆく品質のものが得られることを確認した¹⁷⁾。仕込配合を第1表、酒母経過を第7図、醪経過を第8図に示した。

酒母、醪とも経過は順調であり上槽時の酒質も満足

のゆくものであった。ORAC法¹⁸⁾による上槽酒の抗酸化性は、Trolox換算で3.45mg/100mlで、同社の同規格生酛酒(3.30mg/100ml)と同様の数値であり、同規格速醸清酒(2.68mg/100ml)よりも高い数値となった¹⁹⁾。ORAC法は活性酸素種を発生させ、それによって分解される蛍光物質の蛍光強度を測定し、この反応系に抗酸化物質が共存すると蛍光強度の減少速度が遅延する原理を用いたものである。

上槽酒は生酛系の特徴を弱く感じるものの、暗番にてきき酒を行ったところ生酛系と速醸系の間程度度の酒質との評価が多かった。速醸酒母により製造したほぼ同規格のものを比較対照とし、30℃暗所にて保存し、経時的にNaClO法により劣化度の測定を行った結果を第9図に示す。比較用速醸酒の試験開始時の発光値は、乳酸菌添加酒母に比べ低いものの、保存中に経時的に発光値が増加し、25日保存後では試験開始時の1.57倍の数値を示した。一方、乳酸菌添加酒母のものは、25日保存後においても発光量の増加は起らず、酸化劣化がほとんど生じていないと考えられ、蔵における実地スケールの製造においても、乳酸菌添加による本法により製造された清酒は酸化劣化が起こりにく

		添	踊	(水麴)	仲	(水麴)	留	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
品温	11.9	11.7	12.1	8.4	9.3	8.5	6.6	7.5	9.6	8.9	9.7	9.7	11.0	10.8	11.6	11.7	12.2	12.0	12.1	11.8	11.5	10.8	10.7	9.5	8.6	8.1	7.8	7.7	7.2	6.8	6.5	6.4
アルコール																		12.6	13.9		14.4		15.5		16.2		16.9		16.8		17.3	17.3
日本酒度			10.8							7.3		6.5		5.2		4		3.1	-24		-17		-12		-7.5		-3.5		-2.2		+1	+3.3
酸			2.2							9.5		1.3		1.5		1.7		1.7	1.6		1.65		1.7		1.6		1.6		1.55		1.55	1.5
アミノ酸											0.2		0.3		0.35		0.4		0.6	0.65		0.75		0.85		1		1		1		1.15

第8図 醪経過

第9図 保存試験結果

()内の数字は各酒の保存試験開始時を100とした相対値
一般成分(日本酒度, アルコール分, 酸度, アミノ酸度)は
次のとおり

速醸酒(比較用) : + 1.9, 17.7%, 1.3, 1.1

乳酸菌添加酒 : + 3.3, 17.3%, 1.5, 1.2

いことを確認できた。なお、NaClO 発光値にはpHが大きく影響するため¹⁵⁾、製造履歴の異なる清酒の比較には予め補正が必要であると考えており、今回一般成分に大きな差がないにも関わらず製造時の両酒間の発光値に大きな違いがみられた要因について、本発光が捉えている成分の絞り込みにより、今後検討の必

要があると考えている。

常温にて蔵内で約半年貯蔵後、H22 秋の栃木県清酒鑑評会「純米酒の部」に出品し、暗番審査にて鑑定官を含む専門家の方々からも良好な評価を受けることができた。また老香の発生も全くなく「味広がりあり」「旨味あり」「やわらかい」「若い」「きれい」の好まし

いコメントの一方「苦い」「生酏?」「木香様」などの厳しいコメントもいただき、今後の造りや貯蔵熟成、出荷流通管理に反映させていくつもりである。

5. おわりに

本研究を始めたきっかけは、清酒の製造技術レベル向上に貯蔵出荷管理技術が追いつけず、せっかく良質の清酒が製造されたにも関わらず、最終の消費者に満足ゆく品質レベルの製品が提供できていないものが多くなってきているのではないかと疑問が出発点であり、小規模の清酒製造メーカーにおいておそろけになりがちな貯蔵出荷管理に、客観的で簡易な評価法を提案したいというものであった。その後、化学発光という計測技術を用い研究を進めるに従い、生酏系清酒の抗酸化性の高さや、酸化し難い特性が徐々に見え始め、これを何とか積極的に製造に取り入れることを考え、今回紹介したように酸化劣化が生じ難いと考えられる清酒製造法の提案にまで繋がったものである。

熟成と劣化は、生理的に受け入れられない香味を除き、そのほとんどが同一の変化を表と裏から捕らえていると考えることができる。最終的に消費者が付加価値を認めれば熟成であり、認めてもらえなければそれは単なる劣化でしかなく客観的な数値での線引きが困難である。しかし、清酒が国際的にも認められつつある中、貯蔵や流通中の変化の度合いについての客観的な判断基準の構築は必要であると考えており、最も優れた検出器としての人間の官能評価を補完するため、特定の熟成、劣化成分を測定する手法とともに、化学発光法が網羅的な貯蔵出荷管理の一助になれば幸いと考えている。

今回、酸化劣化を生じ難くする要因として考えられた抗酸化性の評価法については、現在、測定原理の異なる多種多様な測定法が用いられている。それらの中で、光検出法である ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 法¹⁸⁾は国際的に最も広く用いられ標準法として期待されており²⁰⁾、米国農務省ではこの方法で測定した多くの食品の抗酸化能データベースが公開され、目標摂取単位も具体的数値で推奨されている。我々は、清酒の ORAC 値についても測定を行っており、予想通り生酏系清酒の数値が高い傾向を示すことを確認し平成 22 年の醸造学会大会にて報告した¹⁹⁾。平成 22 年 12 月には栃木の蔵元である宇都宮酒造

(株) (酒銘：四季桜) の生酏酒 (新製品) のラベルに、清酒としては初めて ORAC 値表示が行なわれ販売が開始された。我々は、本数値が食品としての ORAC 値とともに、製品が酸化劣化に対してどの程度の酒質安定性が担保できるのかの基準として発信できるのではないかと期待している。

乳酸菌添加による清酒製造法は、決して新しい技術ではないが、「酒質安定性」と「醸造用乳酸菌無添加」という大きな特徴を有しており、今後の清酒販路のさらなるグローバル化や有機表示への対応も可能であり、今後、幅広い展開が期待できると考えている。また、今回の実地試験で用いた乳酸菌添加酒母育成法は、過去の製造法を参考にした特殊な手法であるが、現在複数の酒造メーカーにおいて、通常の高温糖化後に培養乳酸菌を添加し酸を生成させた後酵母を添加する簡易で汎用性が期待できる育成法について検討を行っており、同様に抗酸化性の高い清酒が得られることを確認している。

今後は、製造ロットによる抗酸化性や酒質のばらつき、高い抗酸化性の要因の解明など、残された課題の解決、汎用性の高い製造法の確立に向け検討を加えていきたいと考えている。

〈栃木県産業技術センター〉

参考文献

- 1) 大澤善次郎：ケミルミネッセンス - 化学発光の基礎・応用事例 (丸善株式会社, 東京), (2003)
- 2) 丹羽一樹：産総研計量標準報告, **6**(1), 53-59 (2007)
- 3) 菰原昌司, 兀下伸二, 関圭吾, 齋藤高弘, 志賀徹, 大谷敏郎：日食科工誌, **50**(7), 303-309 (2003)
- 4) 齋藤高弘, 菰原昌司, 野口良造, 志賀徹：生態工学, **19**(2), 103-109 (2007)
- 5) 吉城由美子：農化, **73**(12), 1283-1288 (1999)
- 6) 野村佳司, 木曾邦明：醸協, **98**(6), 449-455 (2003)
- 7) 野村佳司, 水野昭博, 木曾邦明：醸協, **99**(7), 521-525 (2004)
- 8) 野村佳司, 水野昭博, 木曾邦明：醸協, **100**(2), 141-145 (2005)
- 9) 岡本竹己, 佐々木隆宏：栃木県産業技術センター研究報告, **6**, 56-58 (2009)

- 10) 岡本竹己：第 95 回清酒製造技術セミナーテキスト，日本醸造協会，46-51（2009）
 - 11) 岡本竹己，小坂忠之，齋藤高弘：平成 18 年度日本醸造学会大会講演要旨集，p16（2006）
 - 12) 齋藤高弘，高橋大輔，菰原昌司，大谷敏郎，志賀徹：生態工学，**18**(**3**)，125-130（2006）
 - 13) H.Kitagaki, M.Tsugawa：J.Biosci.Bioeng., **87**(**3**)，328-332（1999）
 - 14) 溝口晴彦，原昌道：醸協 105(3)，124-138（2010）
 - 15) 山口貴之，齋藤高弘，岡本竹己，佐々木隆浩，杉江正美，菰原昌司，志賀徹：醸協，**104**，(**4**)，303-311（2009）
 - 16) 江田鎌次郎：乳酸馴養最新清酒連醸法，菊姫ライブラリー 3（日本評論社），311-323（2006）
 - 17) 第 16 回（社）日本醸友会関東信越支部講演会プログラム（2010）
 - 18) 沖智之：食品機能性評価マニュアル集第Ⅱ集，食品機能性評価支援センター編，79-86（2008）
 - 19) 星佳宏，岡本竹己，伊藤和子，佐々木隆宏，阿部恭幸，齋藤高弘：平成 22 年度日本醸造学会大会講演要旨集，p14（2010）
 - 20) 渡辺純，沖智之，竹林純，山崎光司，津志田藤二郎：化学と生物，**47**(**4**)，237-243（2009）
-