清酒の劣化の測定へのチオバルビツール酸 (TBA) 反応の利用 (第 3 報)

清酒中の 3-DG 濃度の測定と 3-DG 濃度の TBA 反応への影響

野村佳司・水野昭博・木曾邦明

(独立行政法人酒類総合研究所)

平成 16 年 9 月 27 日受理

The Use of a 2-Thiobarbituric Acid Reaction in the Measurement of Sake Staling (Part 3)
Measurement of Concentrations of 3-Deoxyglucosone in Sake, and Effects of the Concentra-
tion of 3-DG on the TBA reaction.

Yoshitsugu NOMURA, Akihiro MIZUNO, Kuniaki KISO

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046)

In our previous papers, we reported that the reaction mixture of sake stored at high temperatures with a TBA reagent produced a red pigment, which was similar to the product of the TBA reaction with malonaldehyde, and that the TBA reaction of sake was caused not by oxidized fat but partially by 3-Deoxyglucosone (3-DG). In this paper, we report the development of a measurement method for 3-DG concentration, which was not affected by pyruvic acid or other carbonyl compounds in sake. We confirmed that the 3-DG concentrations in commercial sake have a correlation with the degree of staleness from sensory tests. As a result of a multivariate analysis of the value of the TBA reaction, 3-DG concentration and sake coloring of commercial sake, and an irradiation experiment with sunlight, it was suggested that not only the 3-DG concentration but also melanoidin had an effect on the TBA reaction.

Key words : TBA 反応, 3-デオキシグルコソン, 清酒の劣化

緒 言

前々報¹⁾で、高温で貯蔵した清酒は TBA 反応により赤色色素を生成し、赤色色素量は反応液の 530 nm の吸光度を測ることで求められ、その赤色色素量は貯蔵温度が高いほど、貯蔵期間が長いほど増加することを報告した。さらに前報²⁾では TBA 反応における赤色色素は清酒中の高級脂肪酸が原因で生成するのではないことと、清酒中に存在が確認されているカルボニル化合物の中で、3-デオキシグルコソン (3-DG) のみが TBA と反応して赤色色素を生成することを報告

した。

今回、我々は HPLC を用いてピルビン酸の影響を受けない新しい 3-DG 分析法を開発した。この分析法によって、様々な市販清酒の 3-DG 濃度を測定し、官能評価での劣化の程度 (製成してからの経時変化として) との関係を調べた。さらに市販清酒の TBA 反応値も測定することによって、TBA 反応における 3-DG の寄与を求めたので報告する。

実験方法

1. 3-DG 濃度の測定

試料 0.5 ml に蒸留水 5 ml を加えて、2 N 塩酸酸性 0.2% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）溶液 1 ml 加え、30°C、30 分間反応をおこない、反応終了後 4.3 ml のアセトニトリルを加え、0.20 μ m の有機溶剤用フィルターで濾過した後、HPLC に供した。

HPLC の分析条件

カラム：ナカライテスク製 COSMOSIL 5 C 8-MS

4.6 mm $\times$ 250 mm

移動相：純水-アセトニトリル（5：5 v/v）

流速：1 ml/min

UV 計の検出波長：500 nm

カラム温度：室温

試料：30 μ l

装置には、ポンプに LC-10 AD、検出器（UV 計）には SPD-10 A（全て島津製作所）を用いた。

2. TBA 反応値の測定

前々報にしたがった。すなわち、清酒 5 ml に TBA 液（50% エタノール液に TBA を 0.5% 溶かしたもの）1 ml を加え、70°C で 40 分間反応させ、その後水冷した。その反応液の 530 nm の吸光度を分光光度計で測定した値から、TBA 液の代わりに 50% エ

Fig. 1 HPLC chromatogram of the reaction mixture with DNPH. The reactant is (A) 0.2 mM 3-DG solution, (B) 100 mg/l pyruvic acid solution, (C) sake stored at 60°C for 6 days, (D) sake in cool storage.

Fig. 2 Relationship between 3-DG concentration and area of peak at R.T.=11.0 min. of HPLC chromatogram of reaction mixture of 3-DG and 2,4-Dinitrophenylhydrazine.

Table 1 An analysis table of 3-Deoxyglucosone in commercial sake.

(unit mM)

Sake	Number of samples	Average	Standard deviation	Maximum	Minimum
Junmai-shu	7	0.039	0.026	0.095	0.016
Honjozo-shu	7	0.026	0.013	0.045	0.006
Futsu-shu	7	0.072	0.050	0.166	0.022
Total	21	0.045	0.038	0.166	0.006

タノール液 1 ml を加えて同様に処理して測定した吸光度をブランクとして差し引いた値を TBA 反応値とした。分光光度計には UV-2550（島津製作所）を用いた。

実験結果

1. 3-DG 濃度の測定

3-DG の標準物質を純水に溶かし 0.2 mM としたもの (A)、ピルビン酸を純水に溶かし 100 mg/l としたもの (B)、60°C で 6 日間高温貯蔵した清酒 (C) 及び 3°C で冷蔵貯蔵していた同じ清酒 (D) を実験方法 1 に従って分析したクロマトグラムを Fig. 1 に示す。A には保持時間 11.0 分に単一のピークが見られ、これが 3-DG が DNPH と反応してできた 3-DG の bis-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンである。B のクロマトグラムには 13.9 分付近にピルビン酸由来のピークが見られるが、保持時間 11.0 分あたりにピークが見

られないので、この分析法はピルビン酸の影響を受けないことがわかる。C には A と同じ保持時間にピークが検出され、C の反応液中に 3-DG の bis-2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの存在が認められ、高温貯蔵酒中に 3-DG の存在が確認されたのに対し、D には同じ保持時間にはピークが見られず、冷蔵貯蔵酒には 3-DG が存在しないことがうかがえる。また、D の冷蔵貯蔵酒のクロマトグラムには 3-DG 由来の保持時間にピークが見られないということよりピルビン酸以外のカルボニル化合物の影響もないと推測できる。Fig. 2 に純水に 3-DG の標準物質を溶かして試料とすることによって作成した検量線を示す。冷蔵貯蔵酒に 3-DG の標準物質を添加することによって得られた回収率は 98% であった。変動係数 CV は 0.13% であった。

2. 官能審査による劣化の程度と 3-DG 濃度

官能審査によって評価した劣化の程度と 3-DG 濃度との相関を調べた。なお、本報では清酒の劣化という

Fig. 3 Relationship between concentrations of 3-DG in commercial sake and degree of staleness by a sensory test of the sake.

Fig. 4 Effect of sunlight on the value of the TBA reaction, sake coloring, and 3-DG concentration of sake. Sunlight was irradiated for one day.

表現を尺度に用いたが、岩野らはアルカリ発色を利用した測定法⁴⁾での3-DG濃度と官能熟度との相関を求めており⁵⁾、熟度という用語を尺度に用いているが、清酒が製成されてから経時変化という意味で表現しており、本報では以下劣化と表現する。小売店の店頭で21点の清酒（純米酒7点・本醸造酒7点・普通酒7点）を買い上げて、実験方法1の方法で3-DGの分析を行った。その結果をTable 1に示す。官能審査は分

析に供した市販酒21点について、アンバーグラスを用い、審査員は当研究所の研究職員15名により5点法（1：若い・2：やや若い・3：普通・4：やや劣化・5：劣化）の基準で評価を行った。

二元配置法を用いて、検体の清酒間について、官能審査結果に有意差があるか検定した。不偏分散比が9.34となり、F分布表の値 $F_{0.05}^{20} = (0.05) = 1.57$ より大きいことから官能審査により清酒間の差があると認められた。官能審査評点の審査員平均と3-DG濃度との相関をFig. 3に示す。3-DG濃度と官能平均の相関係数は0.5196であった。このことから官能審査による経時変化としての劣化の程度と3-DG濃度の間には相関があると思われる（危険率5%）。

考 察

Table 2に実験に用いた市販酒21点のTBA反応値等を示す。ほぼ3-DG濃度と同様の傾向を示すことがわかった。

個々の清酒のTBA反応値、3-DG濃度及び着色度を比較すると3-DG濃度または着色度の大きいものにTBA反応値が大きいものが見られたので、TBA反応値を y （単位：吸光度）、3-DG濃度を x （mM）、着色度を u （単位：吸光度）として、次の回帰式を仮定した。

$$y = ax + bu + c \quad \cdots \cdots (1)$$

(1)式に実験に用いた市販酒21点の分析値を代入

Table 2 An analysis table of the value of the TBA reaction of commercial sake.

Sake	Number of samples	Average	Standard deviation	Maximum	Minimum
Junmai-shu	7	0.041	0.032	0.112	0.004
Honjozo-shu	7	0.019	0.008	0.030	0.005
Futsu-shu	7	0.055	0.044	0.148	0.020
Total	21	0.038	0.034	0.148	0.004

し、21個の式を作った。なお、着色度は国税庁所定分析法³⁾に従い分析した。y, x, u の分散、共分散等を求め、連立方程式を解くことにより、次式を得た。

$$y = 0.6629x + 0.1361u + 0.0062 \dots\dots (2)$$

(2)式に実際のTBA反応値、3-DG濃度、着色度を代入して求めた決定係数は0.5581である。偏差平方和、不偏分散などから分散比を求めると11.36となり、危険率5%でF分布の棄却域にはいるので、(2)式は有効といえる。

(2)式によりTBA反応値は、3-DG濃度と着色度の影響を受けることがわかる。3-DGとTBAが反応して赤色色素を生成することを前報で報告したが、この式により着色関連物質の関与も推定できることが示唆された。実際、清酒に日光をあてて、着色させると3-DG濃度は増加せずにTBA反応値は増加する(Fig. 4)。このことは、日光によって増加する着色物質がメラノイジンであるので⁶⁾、メラノイジンがTBAと反応することが示唆される。しかし、メラノイジンは種々の褐変物質の総称なので、具体的な反応物質名や反応機構は不明であり、さらなる検討は今後の課題としたい。

岩野らの報告⁶⁾では、3-DG濃度はアレニウス式に従って増加することになっている。TBA反応値も前々報で報告したとおりにアレニウス式に従って増加する。これは、前々報でアレニウス式を求めるために行った貯蔵実験では、貯蔵中は清酒は遮光されていたので着色度の増加は貯蔵温度のみの影響を受けることにより、3-DG濃度と着色度の影響を受けるTBA反応値がアレニウス式に従っても不思議はない。このことから遮光されている場合、どちらも貯蔵温度の影響を示す指標とすることができる。

ただし、本報の市販酒の分析実験ではTBA反応値と官能審査との間では有意な相関はなかった（データ

は省略）。これは、3-DG濃度とTBA反応値の間には、着色度の影響という要因が介在しているためであると考えられる。

TBA反応値は製成してからの経時変化としての劣化の指標として有意な関係を持つ3-DG濃度と、着色度との影響を反映した指標として有用なものであると推定できる。

要 約

1. ピルビン酸等の夾雑物の影響を受けない清酒中の3-DG濃度の分析法を開発した。
2. 3-DG濃度は、官能審査で得られた清酒の劣化の程度と相関があり、経時変化としての劣化の程度の指標としてみなせた。
3. TBA反応値は3-DG濃度のほかメラノイジンの影響も受けると推測される。

文 献

- 1) 野村佳司, 木曾邦明：醸協, **98**, 449-455 (2003)
- 2) 野村佳司, 水野昭博, 木曾邦明：醸協, **99**, 521-525 (2004)
- 3) 注解編集委員会編：第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
- 4) 岩野君夫, 来間健次, 衣山陽三, 中村伝市, 河地元彦：醸協, **65**, 59-62 (1970)
- 5) 岩野君夫, 衣山陽三, 中村伝市, 大町得蔵, 河地元彦：醸協, **65**, 63-65 (1970)
- 6) 岩野君夫：醸協, **67**, 552-555 (1972)