清酒に添加した匂い物質の閾値 (第2報)

宇都宮 仁・磯谷敦子・岩田 博

(独立行政法人酒類総合研究所)

平成 15 年 12 月 13 日受理

Measurement of thresholds for reference compounds for the sensory profiling of *Sake* (Part 2)

Hitoshi UTSUNOMIYA, Atsuko ISOGAI and Hiroshi IWATA

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

The sensory profiling of *sake* is very important for research and product analysis. However a systematic flavor terminology for *sake* has not been defined yet. Objective reference standards are a prerequisite for improved sensory profiling. Thus, we selected 20 compounds as potential reference standards for *sake* aroma characteristics. In these studies reported here, a panel from our institute determined detection and recognition thresholds for 10 compounds -- ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, isoamyl alcohol, 2-phenylethanol, acetic acid, butyric acid, isovaleric acid, hexanoic acid and octanoic acid -- dissolved in *sake* using a forced - choice ascending concentration series method of limits (ASTM, E 679-91). Recognition thresholds of 90% were calculated for evaluation of the perception of reference compounds.

In comparison with beer, detection threshold values of isoamyl acetate, 2-phenylethanol, isovaleraldehyde, methyl sulfide, 2,4,6-trichloroanisole, acetic acid, hexanoic acid and octanoic acid were lower than beer's. Threshold values of the rest 10 of the compounds (except sotolon, furfural) were not different from beer's.

Key words: 官能評価, 参照標準物質, 閾値

緒 言

清酒の官能評価法を改良することを目的に、清酒の香味特性評価用語の整理を行うとともに、香味特性に対応する参照標準物質を定める研究を行っている。パネリストの訓練のため参照標準物質を清酒に添加する際に香味特性が表れる標準添加量についても定めたいと考えており、そのためには添加する物質の閾値（弁別閾値）を把握する必要がある。しかし、清酒中の香味物質の閾値は、著書「醸造物の成分」¹⁾に主な物質について掲載されているもののビールやワインに比べ

報告例が少ない。そこで、20種類の参照標準候補物質を清酒に添加し、16名以上のパネリストを用いて検知閾値、認知閾値及び90%認知閾値（各弁別閾値）を統一した手法で測定した。前報²⁾に続き今回は、エステル（酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル）、アルコール（イソアミルアルコール、フェニチルアルコール）及び有機酸（酢酸、酪酸、イソ吉草酸、カプロン酸、カプリル酸）の10種類について報告する。

また、前報及び本報告の試験では、溶媒に清酒を使用しており、15%エタノール水溶液と比べ匂い物質の

相互作用が大きい状態で測定している。弁別閾値は清酒の成分組成により値が変化することが考えられるため、市販清酒にソトロンを添加した試験及び吟醸酒にソトロンとカブロン酸エチルを添加した試験を実施した。

実験方法

1. 測定方法、パネル、器具、提示法及び環境

測定方法等については、前報に従った。

2. 添加した匂い物質及び溶媒

今回報告する10種類の匂い物質として使用した試薬については、Table 1に示した。

溶媒には、当所製本醸造酒を用いた。当清酒の成分は前報に示した。

また、異なる溶媒を用いた試験には、市販清酒として（株）月桂冠製の上撰清酒、アルコール15.6%、日本酒度-1.0、酸度1.3、アミノ酸度1.3、酢酸エチル34mg/l、イソアミルアルコール112mg/l、酢酸イソアミル0.7mg/l、カブロン酸エチル0.1mg/l未満を用い、吟醸酒として当所製吟醸酒、アルコール17.9%、日本酒度5.1、酸度1.3、アミノ酸度1.2、酢酸エチル43mg/l、イソアミルアルコール122mg/l、酢酸イソアミル2.0mg/l、カブロン酸エチル4.8mg/lを用いた。

3. 閾値の計算方法

前報と同様に、最良推定閾値及びプロビット回帰分析による50%推定閾値、90%推定閾値を求め、回帰式の評価のためカイ2乗検定を行った。

実験結果及び考察

実験結果は、Table 2に検知閾値として、最良推定閾値、プロビット回帰分析による50%推定閾値及び95%信頼区間、傾き、切片、P値を示した。Table 3には認知閾値として、同項目に加え90%認知閾値を含めて示した。また、プロビット回帰分析の結果をFig. 1に図示した。各添加物質について2回の試験で、のべ4人以上が指摘した特性とともに、既報の閾値や清酒中の含有量に基づき考察を行った結果を以下に示した。さらに異なる溶媒による閾値の変化及びビールに添加した匂い物質の閾値との比較した結果について考察した。

1. エステル

酢酸エチルの検知閾値24mg/lは、清酒の既報告閾値¹⁾25mg/l、ビールでの閾値³⁾20~40mg/lと同様であった。溶媒中の量を考慮すると約80mg/lの含有量で「酢酸エチル」、「エステル」、「セメダイン（ポンドを含む）」として認知された。

酢酸イソアミルの検知閾値270μg/lは、清酒の既報告閾値¹⁾1600μg/lに比べ約1/5、ビールでの閾値³⁾500~1700μg/lに比べ半分以下であった。溶媒中の量を考慮すると約900μg/lの含有量で「エステル」、「酢酸イソアミル」として認知された。

カブロン酸エチルの検知閾値120μg/lは、既報告閾値¹⁾200μg/l、ビールでの閾値³⁾150~250μg/lと同様であった。溶媒中の量を考慮すると約300~400μg/lの含有量で「エステル」、「カブロン酸エチル」、「吟醸香」として認知されており、酢酸イソアミルよ

Table 1 Flavor compounds

Compounds	Sources
Ethyl acetate	WAKO Infinity Pure 99.8+%
Isoamyl acetate (3-Methylbutyl acetate)	TCI GR 98.0+%
Ethyl n-caproate (Ethyl hexanoate)	TCI GR 99.0+%
Isoamyl alcohol (3-Methyl-1-butanol)	ALDRICH 98.5+% A. C. S. Reagent
2-Phenylethanol	ALDRICH 99+%
Acetic acid	WAKO S. S. G. 99.9+%
Butyric acid	ALDRICH 99+%
Isovaleric acid (3-methyl butyric acid)	WAKO S 98.0+%
n-Caproic acid (Hexanoic acid)	TCI GR 98.0+%
n-Caprylic acid (Octanoic acid)	ALDRICH 99.5+%

Table 2 Detection threshold values

Compounds	BET ($\mu\text{g/l}$)	50% DT ($\mu\text{g/l}$)	95% Confidence Interval	Slope (b)	Intercept (a)	P
Ethyl acetate	24000	24000	20000-29000	2.64	-11.56	0.890
Isoamyl acetate	270	270	220-330	2.48	-6.03	0.896
Ethyl n-caproate	120	120	97-140	3.01	-6.24	0.735
Isoamyl alcohol	68000	67000	53000-83000	2.13	-10.29	0.344
2-Phenylethanol	29000	29000	24000-34000	3.65	-16.27	0.929
Acetic acid	37000	36000	29000-45000	2.07	-9.45	0.835
Butyric acid	4300	4300	3400-5500	1.96	-7.12	0.964
Isovaleric acid	410	400	320-500	2.37	-6.18	0.762
n-Caproic acid	2300	2200	1800-2800	2.42	-8.11	0.940
n-Caprylic acid	1800	1700	1400-2200	2.25	-7.28	0.795

BET = Best Estimate Threshold

50% DT = Detection threshold values were calculated by probit analysis : $\text{Probit} = a + b \log_{10} (\text{Conc.})$

Table 3 Recognition threshold values

Compounds	BET ($\mu\text{g/l}$)	50% RT ($\mu\text{g/l}$)	95% Confidence Interval	90% RT ($\mu\text{g/l}$)	Slope (b)	Intercept (a)	P
Ethyl acetate	46000	45000	38000-55000	110000	3.23	-15.02	0.794
Isoamyl acetate	520	520	430-640	1500	2.73	-7.43	0.860
Ethyl n-caproate	270	270	230-320	630	3.52	-8.55	0.944
Isoamyl alcohol	140000	140000	120000-170000	320000	3.56	-18.31	0.954
2-Phenylethanol	56000	57000	48000-67000	130000	3.43	-16.31	0.976
Acetic acid	59000	59000	48000-71000	190000	2.50	-11.92	0.991
Butyric acid	7900	8000	6400-10000	29000	2.29	-8.93	0.790
Isovaleric acid	810	800	680-950	1700	3.87	-11.23	0.788
n-Caproic acid	4300	4300	3600-5100	10000	3.40	-12.35	0.853
n-Caprylic acid	4100	4000	3300-4900	11000	2.88	-10.40	0.851

BET = Best Estimate Threshold

“50% RT, 90% RT = Recognition threshold values were calculated by probit analysis : $\text{Probit} = a + b \log_{10} (\text{Conc.})$ ”

り閾値が低いことから吟醸香への寄与が大きいのと考えられる。

2. アルコール

イソアミルアルコールの検知閾値 68 mg/l は、既報告閾値¹⁾50~70 mg/l、ビールでの閾値 70 mg/l¹⁾と同様であった。溶媒中の量を考慮すると約 250 mg/l の含有量で「イソアミルアルコール」、「薬品臭」、「アルコール（高級アルコールを含む）」と認知された。イソアミルアルコールは清酒の基調香であり、精米歩合の高い純米酒やイソアミルアルコールを高生産する酵

母²⁾を使用した場合には閾値を超え特性として認知されと考えられる。

フェネチルアルコールの検知閾値 29 mg/l は、既報告閾値¹⁾40~75 mg/l と同程度であり、ビールでの閾値¹⁾125 mg/l の 1/4 以下であった。溶媒中の量を考慮すると約 130 mg/l の含有量で「花様（バラ等を含む）」、「草様（青臭い・ハーブを含む）」、「溶剤様」と認知された。フェネチルアルコールを高生産する酵母³⁾を使用した場合も閾値を超え特性として認知されと考えられる。

Fig. 1 Probit analysis

—◆—Detection threshold—○—Recognition threshold

3. 有機酸

酢酸の検知閾値 37 mg/l は、山根ら⁶⁾が 15% エタノール水溶液中の値と報告している 39 mg/l と同様であり、ビールでの閾値³⁾60~120 mg/l の約半分であった。溶媒中の量を考慮すると約 110 mg/l の含有量で「酢酸」、「酸臭」と認知された。また、前報で報告したソ

トロンと同様検知閾値と認知閾値の差が小さく、認知されやすい匂いであると考えられる。

酪酸の閾値 4.3 mg/l は、山根ら⁶⁾の報告値 2.7 mg/l、ビールでの閾値³⁾2~3 mg/l と同程度であった。酪酸は、清酒をジクロロメタンで抽出し GC-olfactometry を行った場合に検出されるが、含有量に

については報告がない。認知特性は「酸臭」,「乳製品（ミルク・バター・チーズを含む）」であった。

イソ吉草酸の検知閾値 $410 \mu\text{g/l}$ は,ビールでの閾値⁹⁾ $500 \sim 1500 \mu\text{g/l}$ と同程度であった。イソ吉草酸についても,GC-olfactometryでは検出されるが含有量については報告がない。しかし,イソ吉草酸は,醤油では製麹中の細菌汚染により見られること⁷⁾から,清酒で「酸臭」を指摘されるものの中にはイソ吉草酸が原因のものが存在すると考えられる。認知特性は,「イソ吉草酸」,「酸臭」であった。

カブロン酸とカプリル酸は,検知閾値 $2300, 1800 \mu\text{g/l}$, 認知閾値 $4300, 4100 \mu\text{g/l}$ とも同程度の値であり,その認知特性も「油」,「樹脂（プラスチック消しゴム様の「ゴム」も含む）」という同様の特性であった。また,検知閾値は山根ら⁶⁾の報告値 $2300, 2400 \mu\text{g/l}$ と同様であり,ビールでの閾値¹³⁾ 8mg/l , $5 \sim 10 \text{mg/l}$ に比べると半分以下であった。カブロン酸は溶媒中の量を考慮すると約 10mg/l で認知されるが,現在の吟醸酒では 20mg/l を超えるカブロン酸を含むもの⁸⁾があり,吟醸香に影響を与えていると考えられる。

4. 溶媒による影響

市販の上撰清酒へのソトロンの添加では,検知閾値が $2.0 \mu\text{g/l}$ (当所本醸造酒 $2.3 \mu\text{g/l}$), 認知閾値が $3.3 \mu\text{g/l}$ ($3.1 \mu\text{g/l}$)と同様の値が得られた。また,吟醸酒に添加した試験においては,2回行った結果が安定していないが検知閾値 $5.2, 3.2 \mu\text{g/l}$ と2倍以内の変化であり,ソトロンを含まない清酒間では大きな変化とはならなかった。このことから匂い物質の含有量が大きく変わらなければ閾値の変化は小さいと考えられる。

これに対し,吟醸酒にカブロン酸エチルを添加した場合の検知閾値については,吟醸酒のカブロン酸エチル 4.8mg/l は当所本醸造酒中のカブロン酸エチル量の50倍を超えており,ウェーバの法則⁹⁾によれば弁別閾値と基準刺激の物理量の比(ウェーバ比)は一定になるため50倍強の変化が考えられるが, $2.2, 1.0 \text{mg/l}$ と20倍以内の変化であった。ウェーバの法則は刺激強度が大きく異なるものについては適応できないため,吟醸酒中のカブロン酸エチルのように,匂い物質が閾値を大きく超えて存在する場合には今回測定した閾値を目安にすることはできないと考えられる。

5. ビールに添加した匂い物質の弁別閾値との比較

前報で報告した物質も含め清酒へ添加した20種類の匂い物質の弁別閾値を,ビールに添加した匂い物質の弁別閾値¹³⁾と比較すると,清酒の方が酢酸イソアミル,フェネチルアルコール,イソバレルアルデヒド,DMS,TCA,酢酸,カブロン酸及びカプリル酸では低めになったが,他の10化合物は(ビール中にほとんど含まれないソトロン,フルフラールは除く)大きく異なるものではなかった。また,ビールの匂い成分の閾値は炭酸ガスが失われると弁別閾が小さくなること¹⁰⁾が報告されており,炭酸ガスを含まない状態では,穀類を原料とする醸造酒である清酒とビールで匂い物質の弁別閾は大差ないと考えられる。

今後,これらの参照標準候補物質について,測定した90%認知閾値を標準添加量として市販清酒に添加し100名程度のパネリストでどのような特性として認知されるか確認の調査を行う予定である。

要 約

清酒の香味特性の参照標準とする物質及びその添加量を定めるため,エステル(酢酸エチル,酢酸イソアミル,カブロン酸エチル),アルコール(イソアミルアルコール,フェネチルアルコール)及び有機酸(酢酸,酪酸,イソ吉草酸,カブロン酸,カプリル酸)について検知閾値,認知閾値及び90%認知閾値を求めた。前報で報告したものも含め清酒へ添加した20種類の匂い物質の閾値を,ビールに添加した匂い物質の閾値と比較すると酢酸イソアミル,フェネチルアルコール,イソバレルアルデヒド,DMS,TCA,酢酸,カブロン酸及びカプリル酸では低かったが,他10成分(ソトロン,フルフラールを除く)は大きく異なるものではなかった。

謝 辞

パネリストとしてご協力いただいた多くの方々及び試料の調整・提供にご協力いただいた神田涼子氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 日本醸造協会編：醸造物の成分,日本醸造協会,東京(1999)

- 2) 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田 博：醸協, **99**, 652-658 (2004)
 - 3) ビール酒造組合国際技術委員会（分析委員会）
編：BCOJ 官能評価法, 日本醸造協会, 東京 (2002)
 - 4) ASHIDA S, ICHIKAWA E, SUGINAMI K, IMAYASU S : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2061-2065 (1987)
 - 5) 秋田 修, 井田哲朗, 小幡孝之, 原 昌道：醸協, **85**, 501-505 (1990)
 - 6) 山根善治, 武宮重人, 川瀬直樹, 佐伯 宏：醸協, **92**, 224-227 (1990)
 - 7) 中台忠信：香料, **200**, 69-80 (1998)
 - 8) 宇都宮仁, 山田 修, 橋口知一：醸協, **95**, 214-218 (2000)
 - 9) 日本認知科学会編：認知科学辞典, 共立出版, 東京 (2002)
 - 10) HARRISON G. A. F, COLLINS E : *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.*, 83-87 (1968)
-