

# ソバ焼酎の揮発性成分に関する研究

境田 博至

2 0 0 5

# 目次

目次.....	I
略語.....	VI
緒論.....	1
第1章 本格焼酎の醸造に適したソバの検討.....	9
第1節 序章.....	9
第2節 実験方法.....	10
第1項 実験試薬.....	10
第2項 ソバの産地および収穫時期.....	10
第3項 ソバ分画製粉処理.....	11
第4項 水分測定.....	13
第5項 澱粉価.....	13
第6項 粗タンパク質.....	13
第7項 粗脂肪.....	14
第8項 遊離アミノ酸.....	14
第9項 タンパク質構成アミノ酸の測定.....	14
第10項 ルチンおよびケルセチンの測定.....	15
第11項 脂肪酸度.....	15
第12項 アミロースおよびアミロペクチンの含有率測定.....	15
第13項 遊離糖の分析.....	16
第3節 実験結果.....	16
第1項 品種および収穫年度の異なるソバの一般成分分析結果.....	16
第2項 分画製粉したソバ粉の成分分析.....	17

第3項	遊離アミノ酸分析 .....	20
第4項	タンパク質の構成アミノ酸分析 .....	20
第5項	ルチン含有量とアミロース、アミロペクチン含有率 .....	22
第6項	分画製粉したソバ粉のアミロペクチン含有率 .....	23
第7項	遊離糖の分析 .....	24
第4節	考察 .....	25
第5節	小括 .....	27
第2章	ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分の同定 .....	28
第1節	序論 .....	28
第2節	実験方法 .....	28
第1項	本格焼酎原料および実験試薬 .....	28
第2項	製麴 .....	29
第3項	仕込み .....	29
第4項	蒸留 .....	30
第5項	固相抽出法 .....	30
第6項	pHによる溶媒抽出法 .....	31
第7項	GCおよびGC/MS分析条件 .....	32
第8項	揮発性成分の同定および定量 .....	33
第3節	実験結果 .....	33
第1項	ソバ、米および麦焼酎の小仕込み試験 .....	33
第2項	ソバ、米および麦焼酎サンプルのGC分析 .....	34
第3項	ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分 .....	41
第4項	各焼酎に含まれる中級脂肪酸 (C <sub>6</sub> 、C <sub>8</sub> 、C <sub>10</sub> ) および中級脂肪酸 エチルエステル類の含量の相関性 .....	43
第5項	低沸点高級アルコール類の比較 .....	43

第4節 考察.....	45
第5節 小括.....	47
第3章 臭い嗅ぎ GC (GC-O) を用いた穀類本格焼酎の香気寄与成分の検討 とソバ焼酎の特徴香の探索 .....	48
第1節 序論.....	48
第2節 実験方法 .....	49
第1項 試料調製および試薬 .....	49
第2項 Gas chromatography-Olfactometry (GC-O) 法.....	49
第3項 香気寄与成分分析 .....	51
第4項 極性の異なるカラムを用いたソバ焼酎特徴香の分析.....	51
第5項 Aroma extract dilution analysis (AEDA) 法 .....	51
第6項 GC-Sulfur chemiluminescence detector (GC-SCD) .....	52
第7項 GC- Atomic emission detector (GC-AED) .....	52
第3節 結果.....	52
第1項 香気寄与成分と AEDA 法の分析.....	52
第2項 GC-SCD を用いた香気寄与成分の分析 .....	55
第3項 ソバ焼酎の特徴香の検討 .....	57
第4項 GC/MS を用いた特徴香の分析.....	59
第5項 極性の異なるカラムを用いた特徴香の分析.....	62
第6項 GC-SCD を用いた特徴香の分析 .....	62
第7項 GC-AED を用いた特徴香の分析.....	63
第4節 考察.....	65
第5節 小括.....	66
第4章 含み香測定装置 (RAS) を用いた穀類本格焼酎の含み香と立ち香分 析.....	68

第1節	序論	68
第2節	実験方法	70
第1項	実験試薬及び材料	70
第2項	ソバ、米および麦焼酎の調製	70
第3項	Retronasal aroma simulator (RAS) の作成	71
第4項	人工唾液の調製	72
第5項	Solid phase micro extraction (SPME) ファイバーの検討	73
第6項	RAS を用いた本格焼酎の揮発性成分分析	73
第7項	中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液と高級脂肪酸エチルエステル溶液の調製	74
第8項	RAS による中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液の分析	74
第9項	GC および GC/MS の分析条件	75
第3節	結果	75
第1項	SPME ファイバーの検討	75
第2項	RAS を用いたソバ、米および麦焼酎の含み香測定	81
第3項	高級脂肪酸エチルエステルが中級脂肪酸エチルエステルの含み香および立ち香に与える影響	82
第4節	考察	85
第5節	小括	87
第5章	ソバ焼酎に含まれる揮発性成分の機能性試験	88
第1節	序論	88
第2節	実験方法	89
第1項	試薬および菌株	89
第2項	Ames 法	89
第3項	リコンビナント硫酸転移酵素の調製	90

第4項	リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法 .....	90
第5項	DPPH ラジカル消去能測定 .....	91
第3節	結果.....	92
第1項	Ames 法およびリコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法 による抗変異原性試験 .....	92
第2項	DPPH ラジカル消去能測定 .....	96
第4節	考察.....	97
第5節	小括.....	98
総括	.....	99
謝辞	.....	101
参考文献	.....	102

## 略語

a-AAA	$\alpha$ -Amino adipic acid
AED	Atomic emission detector
AEDA	Aroma extraction dilution analysis
$\alpha$ -ABA	$\alpha$ -Amino <i>n</i> -butyric acid
ATP	Adenosine 5'-triphosphate
BHT	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylphenol
b.p.	Boiling point
CAR	Carboxen
CI-MS	Chemical ionization-mass spectrometry
CW	Carbowax
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DVB	Divinylbenzene
D.W.	Distilled water
EGCG	(-)-Epigallocatechin gallate
EI-MS	Electron impact-mass spectrometry
FD	Flavor dilution
FID	Flame ionization detector
FPD	Flame photometric detector
$\gamma$ -ABA	$\gamma$ -Amino <i>n</i> -butyric acid
GC	Gas chromatography
GC/MS	Gas chromatography/mass spectrometry
GC-O	Gas chromatography-olfactometry
hDHEA ST	Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase
HEME	4-Hydroxy-2(5)-ethyl-5(2)-methyl-3-furanone
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
LDL	Low-density lipoprotein
MRI	Magnetic resonance imaging
NADH	Nicotinamide-adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

NIST	National institute of standards and technology
ORF	Open reading frame
PAC	Polyacrylate
RAS	Retronasal aroma simulator
PAPS	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate
PDMS	Polydimethyl siloxane
PTV	Programmable temperature vaporization
SCD	Sulfur chemiluminescence detector
SPME	Solid phase micro extraction
TLC	Thin layer chromatography
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido (4,3- <i>b</i> ) indol
u-PA	Urokinase



## 緒論

本格焼酎の製造は13～14世紀の中国大陸や東南アジアが起源とされている。日本へは、14世紀頃に琉球王国と交易が盛んであったシャム国（現在のタイ国）からの伝来説が有力である<sup>1)</sup>。その後、南九州には16世紀に伝播したといわれている。本格焼酎は様々な原料で醸造される。鹿児島島の甘藷焼酎、球磨地方の米焼酎、壱岐の麦焼酎、奄美諸島の黒糖焼酎そして沖縄の泡盛などがある。宮崎県は主に甘藷焼酎を飲用するがソバ焼酎発祥の地であり、県北の五ヶ瀬町を含む西臼杵郡に製造場が点在する<sup>2)</sup>。本格焼酎製造法の確立は他の酒類と比較すると浅く、大正時代初めである<sup>3)</sup>。本格焼酎はこれまで主に南九州で生産、消費されているに過ぎなかった。しかし、近年、本格焼酎が全国で認められ、その生産量は380,000klまで拡大し、南九州の重要な産業に成長している<sup>4)</sup>。

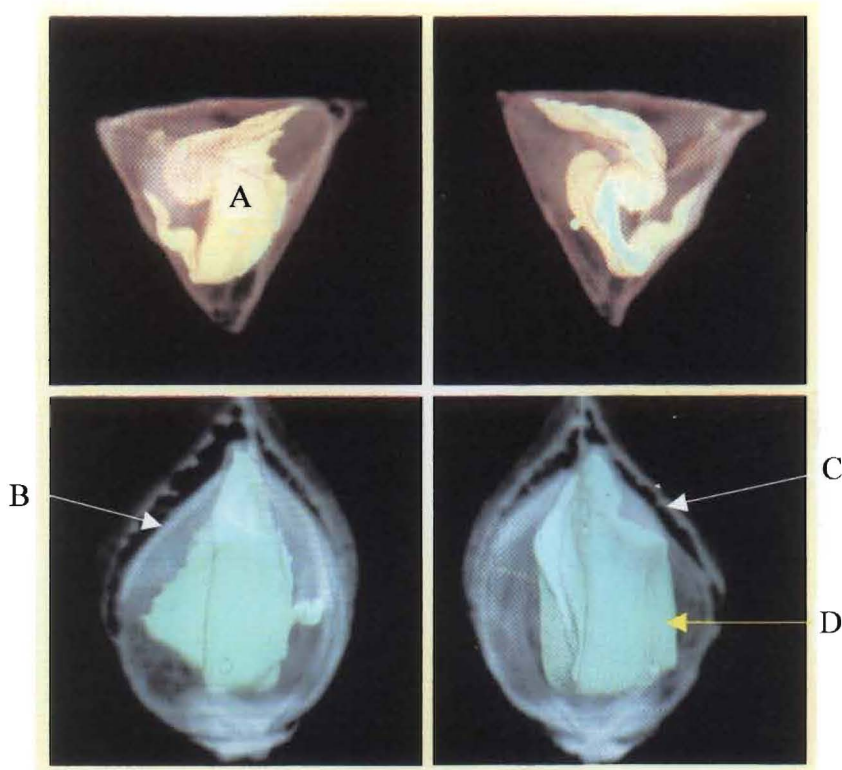


Fig. 1 Three dimension picture of buckwheat by MRI<sup>5)</sup>

A : embryo. B : skin. C : hull. D : endosperm

ソバ (*Fagopyrum* spp) はタデ科の一年草の草本作物で、イネ科の作物とは形態が異なるが用途を同じくするため雑穀として取り扱われている。外側は繊維質のがっちりした殻 (果皮) で保護されている。その中に種皮 (甘皮) に密着して胚乳があり、またその中に胚芽 (子葉) が存在する (Fig. 1) ソバは通常食されている普通ソバ種 (*Fagopyrum esculentum* Moench)、苦味を有するダツタン種 (*Fagopyrum tataricum* Gaertner)、野生種の宿根ソバ種 (*Fagopyrum cymosum* Meissn ) がある。普通種のソバは異型花柱性に起因する自家不和合性のため他家受粉をする<sup>6)</sup>。この影響で固有の性質が維持され難く、固有形質を持つソバ品種は少ない。そのため、同一品種においても、収穫年度、産地で成分含量が大きく異なる。特に本格焼酎原料の成分として重要な澱粉価は醸造用の米、麦と比較してソバの澱粉価の変動が大きい。ソバの起源は野生祖先種の発見により中国南部雲南省であることが明らかとなった<sup>7)</sup>。日本に伝来したのは約 3000 年前の縄文時代晩期と推測されている。日本のソバの生産量は大正時代におよそ 130,000t であったが減少傾向をたどり、平成 14 年度は 25,000t であった。都道府県別には、北海道 (10,500t)、福島県 (2,550t)、長野県 (2,210t) の順となり、宮崎県は 10 位 (534t) である<sup>8)</sup>。

ソバ焼酎の製造は、蒸煮した米や麦に黒麹菌 (*Aspergillus awamori*) や白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) 等の麹菌を接種し、2 日間かけて製麹を行う。製麹ではアミラーゼやプロテアーゼ等の酵素とクエン酸生産を目的としている。この麹に焼酎酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と水を加え一次醪 (酒母) を造り 5 日間発酵を行う。さらに、蒸煮したソバ、米又は麦を掛け原料として一次醪に水とともに加え二次醪とし、約 10 日間発酵を行う。発酵終了後、単式蒸留機 (ポットスチル) による蒸留を経てエタノール濃度 45% (v/v) 以下の蒸留液 (原酒) を得る。この原酒はろ過を経て通常エタノール濃度 20~25% (v/v) に希釈した後、製品化される。

本格焼酎の研究は、酵母のスクリーニングおよび改良、製麹時の酵素生産条件や、様々な原料に適した醸造条件に関する報告が多く、香味に関する官能評価を活用した報告は少ない<sup>9-11)</sup>。これまで、isoamyl acetate、ethyl caprylate および ethyl caproate などのエステル類や、*n*-propyl alcohol、isobutyl alcohol、isoamyl alcohol および phenethyl alcohol などの

アルコール類が芳香を有することから、これらの揮発性成分を効率的に生成することを目的に研究がなされてきた。代表的なものとして、焼酎酵母と清酒吟醸酵母で細胞融合をおこない、得られた吟醸香生成能の高い焼酎酵母で、ethyl caproate、ethyl caprylate などの中級脂肪酸エチルエステル類含量の多い焼酎製造が試みられている<sup>12)</sup>。しかし、参考にしてしている揮発性成分は含有量の多い低沸点揮発性成分に偏っている。また、これら揮発性成分は官能的に芳香ではあるが、それぞれの本格焼酎に必要な芳香成分であるか科学的に解明されていない。本格焼酎に含まれる揮発性成分の同定を目的とした詳細な報告は少ない<sup>13)14)</sup>。唯一、甘藷焼酎については太田らにより報告されている<sup>15)</sup>。甘藷焼酎は蒸留方式が常圧蒸留法であるのに対し、ソバ、米および麦焼酎は減圧蒸留法である。常圧蒸留法は多様な揮発性成分を多量に回収できる。その結果、甘藷焼酎は他の穀類本格焼酎より揮発性成分分析が容易なため香りの解明が進んでいる<sup>11)</sup>。ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分は、低沸点揮発性成分をヘッドスペース Gas chromatography (GC) 法で分析し、得られた *n*-propyl alcohol、isobutyl alcohol および isoamyl alcohol などのアルコール類の濃度比率で、ソバ、米および麦焼酎を大まかに分類できる。しかし、各々の穀類本格焼酎の特徴的な香りの解明には至っていない<sup>16)</sup>。

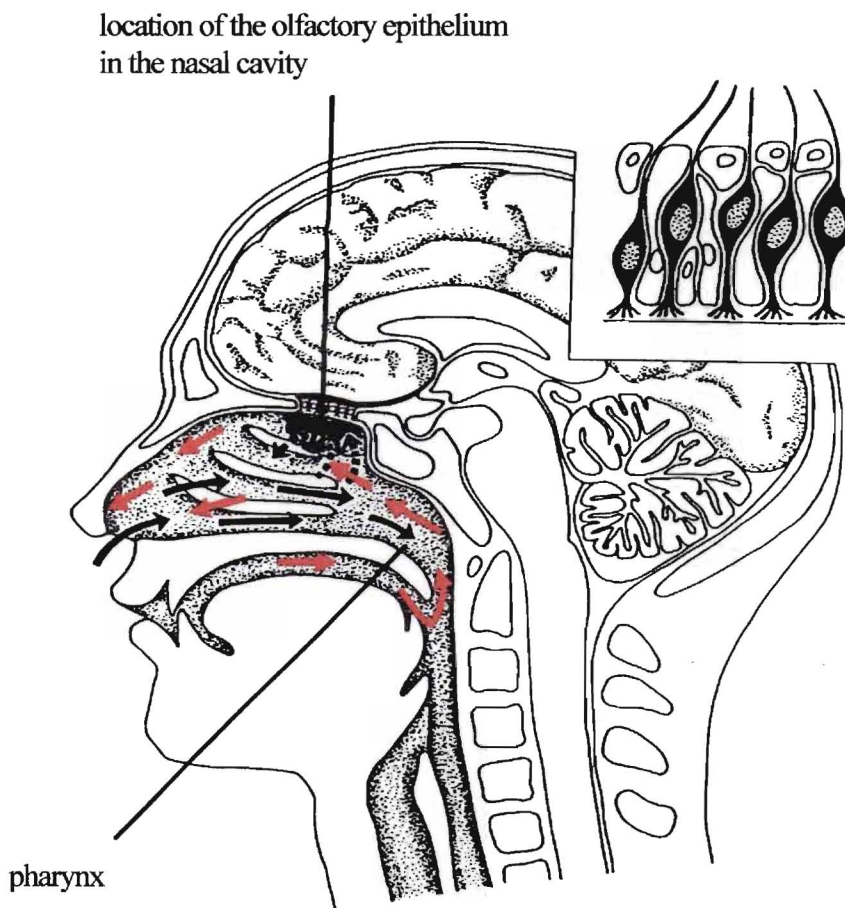
本格焼酎は様々な揮発性成分から成り立つ。しかし、必ずしも GC クロマトグラム上に現れた全てのピーク（揮発性成分）を匂いとして認識しているわけではない。また、匂いのある全ての揮発性成分（香気寄与成分）は本格焼酎を表す代表的な香り（特徴香）として関与しているわけではない。本格焼酎の特徴香の解明は、特定の揮発性成分のみを選択的に生成する醸造工程の検討を可能とし、原料特徴を生かした本格焼酎の製品化に繋がると考えられる。太田らは  $\alpha$ -terpineol、citronellol、nerol および geraniol 等のモノテルペンアルコール類が甘藷焼酎の特徴香であることを報告した<sup>15)</sup>。この報告をもとに、甘藷焼酎の特徴香はイモ表層部や先端部にモノテルペンアルコールが  $\beta$ -グリコシド結合で存在し、*Aspergillus kawachii*（白麹）由来の  $\beta$ -glucosidase により加水分解されることを解明した。さらに nerol、geraniol は醪中で酵母の代謝を受け citronellol に、さらに蒸留時の熱と醪中のクエン酸の影響で  $\alpha$ -terpineol、linalool にそれぞれ変換されることが明ら

かとなった<sup>17)</sup>。また、製麹時の $\beta$ -glucosidase 生成メカニズム等についても研究が進んでいる<sup>18-20)</sup>。このように、甘藷焼酎の特徴香を解明したことで、研究目的が明確となり現在の製造技術に活用されている。昨今、本格焼酎特に甘藷焼酎が全国的なブームとなっている<sup>4)</sup>。消費者に甘藷焼酎の味が受け入れられたことは勿論であるが、上記のような醸造技術のレベルアップによる酒質（品質）も貢献していると考えられる。

香りには閾値が存在するので、単純に含有量の差で香気寄与成分の香りへの貢献度を決定することは出来ない<sup>21)</sup>。すなわち、香りへの重要度は分析機器のデータのみで結論づけるのは早急であり、官能試験の評価を含めて判断する必要がある。近年、GC に匂い嗅ぎ装置を接続した GC 匂い嗅ぎ（Gas chromatography-olfactometry (GC-O)）法が開発された。この方法で分離した揮発性成分は直接嗅覚で強さ、匂いの質を評価できるため、含有量だけではなく実際に香りに貢献している揮発性成分の解明が可能になった。

ヒトは食物の香り（風味）を、まず外部から直接鼻腔の嗅上皮細胞で感じる香り（*orthonasal aroma*）、次に食物を口腔内に含んだ際に喉から鼻腔の嗅上皮細胞に抜けて感じる香り（*retronasal aroma*）で評価している（Fig. 2）。本格焼酎も清酒と同様に、官能試験およびきき酒では、*orthonasal aroma* であるグラス上での香り（立ち香または上立ち香）と、*retronasal aroma* である口に含んだ香り（含み香）についてそれぞれ評価を行っている。揮発性の高い化合物を多く含む本格焼酎は、含み香と立ち香に官能的な差が認められることから、このような評価項目が必要となる。しかし、含み香と立ち香が異なる原因については解明されていない。その理由として、口腔内の食物から発生する揮発性成分の再現方法が困難であることが挙げられる。1995 年、Roberts らは口腔内を模した *Retronasal aroma simulator* (RAS) を作成し、唾液成分、温度および咀嚼と揮発性成分の放散との関係について報告した<sup>22)</sup>。この方法を用いて、ラズベリーやスコッチウイスキーの揮発性成分の放散について報告された<sup>23)24)</sup>。一般に本格焼酎の香りの分析は、GC、*Gas chromatography/mass spectrometry* (CG/MS) による揮発性成分の含量を測定しているが<sup>25)26)</sup>、口腔内の揮発性成分の放散量、すなわち含み香分析についての報告は極めて少ない。口腔内の揮発性成分の放散に、最も影響を与える因子としてタンパク質が報告

されている<sup>27)</sup>。タンパク質は揮発性成分と結合し放散を抑制している。ヒト唾液成分では $\alpha$ -アミラーゼと糖タンパク質であるムチンが該当する。タンパク質が原因と考えられる揮発性成分の放散抑制は、それぞれの種類により異なる。そのため、ソバ、米および麦焼酎に含まれる様々な揮発性成分、特に香気寄与成分がどのような放散を示すのか検討する必要がある。蒸留直後の本格焼酎は多量の高級脂肪酸エチルエステル類を含む<sup>28)</sup>。この高級脂肪酸エチルエステルは本格焼酎の酒質に好ましくない影響を与えるので、製造工程で除去されるのが一般的である。



**Fig. 2 Cross-section of human head showing locations of the olfactory epithelium in the nasal cavity and the pharynx<sup>29)</sup>**

Black arrows indicated the route of orthonasal aroma. Red arrows indicated the route of retronasal aroma.

一方で、疎水性化合物である高級脂肪酸エチルエステル類は、同じ疎水性化合物である本格焼酎の揮発性成分の放散に影響を与えることが考えられる。すなわち、本格焼酎に含まれる高級脂肪酸エチルエステル類の含有量が、本格焼酎の立ち香や含み香の放散如何に影響されるかを、検討する必要がある。

機能性成分は、食物繊維、含硫化合物、テルペノイド、カロテノイド、最近では、茶のカテキン、赤ワイン、ムラサキイモのアントシアニンなどのポリフェノール類が報告されている<sup>30)31)</sup>。アルコール飲料においても、上記した赤ワイン以外に清酒、ビールで数多くが報告されている<sup>32-36)</sup>。本格焼酎については、沖縄でかつて天然痘などの伝染病が周期的に発生していた時代、泡盛は「風気返し（フウキカエシ）」の薬として重宝された。このように本格焼酎も機能性を有する可能性を秘めているが、それに関する研究報告は赤ワイン、ビール、清酒に比べて極めて少ない<sup>37)</sup>。

機能性評価法は様々な手法が確立されているが、その中に抗変異原試験と抗酸化測定法がある<sup>38)</sup>。変異原物質は自然突然変異よりも高い頻度で突然変異を誘発（発ガン）する化学物質のことで、食品、大気などの自然界から見出されている。この変異原物質が体細胞遺伝子に損傷を与えることでガンが発生すると考えられている。この変異原物質を検出する方法として1971年、Amesらがサルモネラ菌 *Salmonella typhimurium* TA シリーズを用いた発ガン性を予測する方法を開発した<sup>39)</sup>。これまでに、*Salmonella typhimurium* TA シリーズは検出感度を高めるために様々な改良がおこなわれ、薬剤耐性因子プラスミドの pKM101 の導入により開発された TA98 が Ames 法で使用されている。この *Salmonella typhimurium* TA98 はヒスチジン生合成系遺伝子にフレームシフト型の変異が起きた株であり、フレームシフト型変異を起こす変異原物質によりヒスチジン要求性 (his<sup>-</sup>) からヒスチジン非要求性 (his<sup>+</sup>) となり、ヒスチジンを含まない寒天培地上に復帰突然変異体としてコロニーを作る。このように Ames 法はヒスチジン非要求性の復帰変異の頻度を指標として、試料の変異原性の有無を判定する方法である。

Ames 法は実験の容易さ、費用等の点で優れていることから、抗変異原物質の第一次スクリーニング法として広く用いられている<sup>40)41)</sup>。しかし、Ames 法は、ほ乳類の薬物

代謝経路についてはラット肝臓由来 S-9 の第一相反応のみの対応となる。ほ乳動物は酸化還元反応の第一相反応の他に、グルクロン酸抱合、グリコシド抱合、硫酸抱合およびメチル抱合などの第二相反応がある。水光らは長年にわたり硫酸化の研究をしていることから、前駆変異原物質の硫酸化による代謝活性化を特異的に検出できる抗変異原試験法を考案した<sup>42)43)</sup>。これまでの Ames 試験を改良し、S-9mix の代わりにリコンビナント硫酸転移酵素であるヒト肝臓由来の Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hDHEAST (SULT2A1)) を使用している。前駆変異原物質には硫酸化により代謝が活性化されることが報告されている 9-hydroxymethylanthracene を使用した<sup>43)</sup>。

活性酸素（フリーラジカル）とは、三重項酸素分子 ( $^3\text{O}_2$ ) より反応性が大きく活性に富む酸素種のことであり、三重項酸素分子が生体内で電子供与体として作用する。代表的な活性酸素であるヒドロキシラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{OH}\cdot$ )、スーパーオキシド ( $\text{O}_2^-$ )、一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ )、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) は、段階的に還元されていく過程で生成する。薬物、ストレス等が引き金となり生成した活性酸素が、生体内の脂質、糖質、タンパク質および DNA などを攻撃し、脂質、糖質の酸化、タンパク質の変性、酵素の不活性化、DNA の主鎖切断、塩基の修飾を誘発する。その結果、種々の疾病をはじめ、発ガン、老化を助長するというものである<sup>44)</sup>。しかし、生体は様々な抗酸化物が、活性酸素の発生するラジカルを速やかに捕捉することで守られている。そこで、ソバ焼酎の揮発性成分について抗酸化活性の可能性を探るために検討を行った。方法は、安定ラジカルな 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) が抗酸化物質から水素をもらうことにより、その可視領域の強い吸収が消えるという簡易な方法であることから広く活用されている DPPH ラジカル消去能測定法を用いた。

第 1 章では品種、収穫年度の異なるソバの焼酎原料適性のために原料分析を行った。第 2 章では、ソバ、米および麦焼酎を固相抽出法、pH による溶媒抽出法で濃縮し、GC、GC/MS で揮発性成分の分離・同定を行った。第 3 章では、匂い嗅ぎ装置を装着した GC-O、Aroma extraction dilution analysis (AEDA) 法でソバ、米および麦焼酎の個々のピークの匂いの質、強度を分析し、それぞれの本格焼酎の香気寄与成分を同定した。また、ソバ

焼酎の特徴香についても検討した。第4章ではソバ焼酎の含み香について含み香測定装置 (Retronasal aroma simulator (RAS)) を用いて測定した。さらに、高級脂肪酸エチルエステル類が中級脂肪酸エステルの含み香および立ち香に与える影響を調べた。第5章ではソバ焼酎で同定した揮発性成分の機能性評価を、抗変異原性試験と抗酸化活性測定法で試みた。

以下に本論で得られたこれらの次第を詳細に論述する。



# 第1章 本格焼酎の醸造に適したソバの検討

## 第1節 序章

本格焼酎で原料となるソバの90%以上は、生産量世界第二位の中国産が占めている。これは原料の安定供給や価格の面で国内産ソバより優れているためである。ソバは気候により収穫量が大きく変動し、また成分への影響も大きい。従って収穫年度によって成分にバラツキが発生しやすい。また、ソバは他家受粉のために、品種でも性質保持が難しく、成分含量が栽培地域ごとで若干性質が異なる<sup>6)</sup>。本格焼酎の原料は澱粉含量の高いものが醸造効率も良く、採用されている。米、麦はそれぞれ、近代的な生産方式<sup>45)</sup>で栽培されるため成分のバラツキは少ない。一方、ソバは主要作物の収穫後に栽培する裏作のため、栽培管理が不十分である。以上述べたように、醸造に適するソバを安定的に確保することは非常に重要である。米、麦は外層に存在する粗タンパク質、粗脂肪等の不純物を取り除くために、精米、精麦工程で外層を削っている。一方、ソバは澱粉質がもろいことや、粗タンパク質および粗脂肪の主成分である子葉が中心部に存在するため磨くことが出来ない。現在使用しているソバは澱粉以外の成分も醸造工程に持ち込むことになり発酵効率への影響が懸念される。また、ソバ表面の甘皮の影響で麹菌が着生しにくく製麹技術が確立されてない。ソバの澱粉糖化率が低いのは、このように原料処理方法が米、麦ほど整備されてないことが一因と推測される<sup>46)</sup>。醸造に適した原料を得る方法として製粉処理したソバ粉の造粒化が考えられる。そのためには、必要成分を採取可能な製粉化技術が必要である。ソバは澱粉価を調整して製粉処理することが可能とされている。しかし、醸造に適したソバ粉を得ることが出来るのか不明である。米や麦は搗精で醸造に適した原料を得ることが可能であるのに対し、ソバは物理特性が異なり未解明な点が多い。これまでソバについては製麺の視点から、風味、テクスチャー等について研究されてきた<sup>47)</sup>。一方、本格焼酎用としてのソバは澱粉含量が高いほど優れていると評価され、粗タンパク質や脂質等の成分については発酵阻害や雑味の原因であるこ

とから、低含量が求められている。さらに、醸造原料としては、米、麦に関する研究は報告<sup>48-50)</sup>されているが、ソバに関する報告は極めて少ない。

本論文は、ソバ焼酎の揮発性成分について研究を行うため、高品質のソバ焼酎を必要としている。そのためには、澱粉含量が高く、粗タンパク質含量の低いソバが必要である。そこで、まず初めにソバ焼酎作成に最適なソバ原料を明らかにするために、原産地、品種および収穫年度の異なるソバ6品種について、原料分析（澱粉価、水分、粗タンパク質、粗脂肪）を実施した。さらに、最適な醸造原料を得る方法の一つとしてソバの分画製粉化が考えられる。そこで、16画分に分画製粉処理したソバ粉について醸造適性分析を行った。

## 第2節 実験方法

### 第1項 実験試薬

原料分析に使用した試薬（和光純薬工業（株）、Aldrich Chem. Co.、Research Chemicals Ltd.、ICN Biomedicals Inc.、東京化成工業（株））は特級またはそれに準ずる試薬を用いた。その他特に言及しない限り特級試薬を用いた。

### 第2項 ソバの産地および収穫時期

本実験で使用したソバを Table 1 に示した。ソバは丸実をブラベンダー粉砕器 (TF17、wonderblender（社）製）で粉末処理したものを以下の実験に供した。

**Table 1 Harvest of buckwheat**

No.	The country of origin	Region	Variety	Crop year
1	China	Inner Mongolia	Native species	1999/Sep.-Oct.
2	China	Inner Mongolia	Native species	2000/Sep.-Oct.
3	China	Inner Mongolia	Native species	2001/Sep.-Oct.
4	China	Jilin Province	Mankan	2000/Sep.-Oct.
5	New Zealand	Christchurch	<i>Kitawase</i>	2001/Apr.-Mar.
6	Japan	Hokkaido	<i>Kitawase</i>	2001/Aug.

### 第3項 ソバ分画製粉処理

各産地および各収穫年のソバは収穫後、玄ソバで保存した。玄ソバは脱穀後の丸実33kgを10日以内にブレーキロール式粉砕機で各ロール圧を調製しながら粉砕した。得られた粉は132 $\mu$ mのフルイで異物を除去したものを1番粉とした。フルイに残ったソバは再び粉砕したものを以下の実験に供した。この作業を15回繰り返し15番粉まで調整した。16回目でフルイに残ったものを残ヌキ粉とした。粉末試料はガラス製密閉容器に入れ15°Cで保存した。



**Fig. 3 Buckwheat**

A : Buckwheat seed. B : Buckwheat groats. C : Buckwheat grits

#### 第4項 水分測定

試料約 2g は予め 135°C、3 時間乾燥させ恒量したフタ付き秤量瓶に精秤し、135°C、3 時間乾燥したのち、デシケーターで放冷後、瓶を秤量し水分%を算出した。

#### 第5項 澱粉価

澱粉価は国税庁所定分析法注解を一部改変して行った<sup>51)</sup>。すなわち、試料約 1.2 g を精秤し、三角フラスコに採取し蒸留水 (D.W.) 200 ml、25% HCl 20 ml を加え、空気冷却管で密栓し、沸騰水浴中にて 3 時間加水分解した。加熱終了後、冷却し得られた試料は D.W. で 500 ml に定容した。最後に 5A ろ紙 (東洋濾紙 (株) 製) でろ過した試料を糖化液とした。この糖化液は Glucose C-test (和光純薬工業 (株) 製) を用いて還元糖を求め次式より澱粉価を算出した。

$$\text{澱粉価} = \frac{\text{還元糖 (mg/100ml)} \times 5 \times 0.9}{\text{試料重量 (g)} \times 1000} \times 100$$

#### 第6項 粗タンパク質

国税庁所定分析法注解を一部改変して行った<sup>51)</sup>。すなわち、分解にケルダール法窒素迅速分解装置 (QDS-20M、MRK-NAKAYAMARIKA 製)、滴定に自動式窒素 タンパク質迅速定量装置 (KJEL-AUTO DTP-4、MRK-NAKAYAMARIKA 製) を用いてケルダール法で測定した。得られた窒素量 (N %) より次式にて粗タンパク質量を求めた。

$$\text{粗タンパク質 (\%)} = \frac{(\text{滴下量} - \text{ブランク}) \times F \times 14.007 \times NP \times 0.5 M}{\text{試料重量 (g)}}$$

- F : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液のファクター  
NP : NP 換算係数 (6.31)  
M : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液のモル濃度

## 第7項 粗脂肪

国税庁所定分析法注解のソックスレー抽出測定法を一部改変して行った<sup>51)</sup>。すなわち、受器（丸型フラスコ）は予め 105°C、1 時間乾燥させ恒量を測定した。試料 5 g を円筒ろ紙（Thimble filter、No.84、25×90 mm、東洋濾紙（株）製）に精秤し、105°C、1 時間乾燥した。抽出溶媒にはジエチルエーテルを用いた。試料（円筒ろ紙）は脂質迅速抽出装置（FATEX-S、038560/FE-6S）で分析を行った。分析終了後、受器は再び 105°C、1 時間乾燥した。その後デシケーターで放冷し次式で粗脂肪を算出した。

$$\text{粗脂肪 (\%)} = \frac{\text{抽出後乾燥受器量 (g)} - \text{抽出前乾燥受器量 (g)}}{\text{試料重量 (g)}} \times 100$$

## 第8項 遊離アミノ酸

共栓付試験管に試料約 1g を精秤し、10%トリクロロ酢酸 6 ml を加え攪拌後、遠心分離（4,000×g、10 min）した。得られた上清をエバポレーターで減圧乾固し、D.W.15 ml を加え再び減圧乾固の作業を 4 回繰り返した。得られた試料は 0.02 M HCl で 10 ml に定容し、0.2 μm フィルターろ過したものをアミノ酸測定用試料とした。得られた試料はアミノ酸分析計（高速アミノ酸分析計 L-8800、日立製作所（株）製）で測定した。

## 第9項 タンパク質構成アミノ酸の測定

タンパク質の分解は塩酸加水分解法で行った。すなわち、試料を加水分解チューブに 10 mg 秤量し、6 M HCl 1ml を加えた。減圧下で封管し加水分解炉で 110°C、36 時間加熱分解した。分解終了後、D.W.で溶解し減圧乾固を 3 回繰り返し HCl を除去した。得られた試料は 0.02 M HCl で 10 ml に定容し、0.2 μm フィルターでろ過したものをアミノ酸測定用試料とした。分析は第 8 項で使用したアミノ酸分析計で行った。

#### 第10項 ルチンおよびケルセチンの測定

試料2gを精秤しメタノール20mlを加え攪拌後、遠心分離(1,500×g、5min.)で得た上清を0.45μmのフィルターろ過したものを試料とした。試料中のルチンおよびケルセチン含量は高速液体クロマトグラフィー(DP-L910W、日本分光(株))を用い、カラムオーブン40°C、検出波長360nm、移動相0.1%リン酸:MeOH=50:50、流速1.0ml/min、分析カラムODS(φ4.0×150mm)の条件で測定した<sup>52)</sup>。

#### 第11項 脂肪酸度

脂肪酸度は大坪らの方法を一部改変して行った<sup>53)</sup>。すなわち、試料0.3gを精秤しトルエン10ml添加後、30°Cで30分間抽出した。No.2ろ紙でろ過した試料1mlにクロロホルム4ml、銅試薬(1Mトリエタノールアミン:1M酢酸:6.45%硝酸銀水溶液=9:1:10)2.5mlを加え攪拌した。攪拌後遠心分離を行い、無色のクロロホルム層3mlを試験管に採取し、発色液(0.1%ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウムのイソブタノール溶液)を添加した。440nmの吸光度を分光光度計(UV-1600、(株)島津製作所製)で測定し、検量線を用いて脂肪酸度を算出した。

#### 第12項 アミロースおよびアミロペクチンの含有率測定

ヨウ素呈色比色法で測定した<sup>54)</sup>。第7項の粗脂肪測定で得た試料を105°C、2時間乾燥した。得られた脱脂試料約200mgを精秤し、エタノール1ml、D.W.10mlを加え攪拌後、10%NaOH2ml添加し2°Cで一晩放置した。試料にD.W.を加え0.25MHClを用いて中和(pH7.0)した。D.W.で100mlに定容し、5Aろ紙でろ過した。ろ液5ml、ヨウ素溶液(I<sub>2</sub>0.2%、KI2.0%)1mlをD.W.で100mlに定容し、660nmの吸光度を分光光度計で測定した。試料中のアミロースおよびアミロペクチン含有率は、市販アミロースおよびアミロペクチンを用いた検量線から算出した。

### 第13項 遊離糖の分析

試料 1g、D.W. 9 ml、酵素反応阻害剤として 100 mM HgCl<sub>2</sub> 1ml を加え、4°C、6 時間抽出した。終了後、遠心分離し (1,500×g、10 min.)、ろ過した。TLC プレート (LK5D、SILICA GEL 150A、Whatman 社製) にろ液をスポットし展開した。展開溶媒は、クロロホルム：酢酸：D.W.=36：120：12 で行った。展開終了後、十分に乾燥させ発色液 (ジフェニルアミン：アニリン：アセトン：80%リン酸=2：2：100：5) を散布後再び 110°C、10 min. で加熱乾燥を行った。遊離糖同定のためにスタンダードとして S1 (グルコース、スクロース、5%)、S2 (マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース 5%) も試料と同条件で分析に供した。

### 第3節 実験結果

**Table 2 Comparison with components of variety buckwheats**

	1	2	3	4	5	6
	(%)					
Moisture	12.4	13.8	14.3	13.1	13.6	14.5
Starch	63.1 (72.0)	64.2 (74.5)	67.0 (77.9)	64.8 (74.6)	66.9 (77.5)	64.5 (75.5)
Protein	2.5 (2.9)	2.2 (2.5)	1.7 (2.0)	2.5 (2.9)	2.1 (2.4)	2.5 (2.9)
Fatty acid	11.9 (13.6)	11.6 (13.5)	8.4 (9.8)	12.7 (14.6)	10.7 (12.4)	11.4 (13.3)
Others	10.1 (11.5)	8.2 (9.5)	8.6 (10.3)	6.9 (8.0)	6.6 (7.7)	7.1 (8.3)

( ): dry percentage. 1: 1999, Inner Mongolia, China. 2: 2000, Inner Mongolia, China. 3: 2001, Inner Mongolia, China. 4: 2000, Mankan, China. 5: 2001, *Kitawase*, New Zealand. 6: 2001, *Kitawase*, Japan.

#### 第1項 品種および収穫年度の異なるソバの一般成分分析結果

品種、収穫年度の異なるソバの一般成分分析結果 (水分、澱粉価、粗タンパク質、粗脂肪) を Table 2 に示した。水分含量は収穫年度が新しくなるにつれて増加傾向にあった。

1999 年収穫の No.1 (1999 年、中国) は 12% 台、2000 年収穫の No.2、No.4 は 13% 台、



2001年収穫のNo.3(2001年、中国)およびNo.6(2001年、北海道)は14%台であった。No.5(2001年、ニュージーランド)は中国の収穫時期より約半年早いため13%台になると推測した。以上の結果より、水分には収穫年度が新しいほど水分が高いという傾向が認められた。澱粉価はNo.3(2001年、中国)が最も高い値を示した(67.0%)。最も低い値はNo.3と同品種(内蒙古在来種)のNo.1(1999年、中国)であった(63.1%)。このNo.1とNo.3の澱粉価の間に、北海道産(No.6)、ニュージーランド産(No.5)のキタワセ種の澱粉価が収まるので、内蒙古在来種とキタワセ種に澱粉価による差異は無いと考えられた。粗タンパク質、粗脂肪はNo.3(2001年、中国)で最も低い値を示した。製麺用として評価の高いNo.6(2001年、北海道)は粗タンパク質、粗脂肪が共に高い値を示した。

## 第2項 分画製粉したソバ粉の成分分析

一番粉は収量が最も多く(6.32 kg)澱粉価も高い値(72.9%)を示した。収量、澱粉価は共に番粉数を重ねるごとに、最後まで減少傾向であった(Table 3)。対照的に粗タンパク質、粗脂肪は番粉数を重ねるごとに上昇傾向にあった。澱粉は柔らかく粉末化しやすいので速やかに製粉化されたと推測される。対照的に、粗タンパク質および粗脂肪等は澱粉より粉末化しにくいため後半部で製粉されることを示している。澱粉価が高いほど水分含量も高い傾向を示した。澱粉は吸湿性が高いためこのような傾向を示したと考えられた。残抜き粉(other flour)には甘皮部が多く含まれていることから、粗タンパク質、粗脂肪は主に甘皮部に存在すると考えられる。なお、全試料は同様に分画製粉処理を行い、それらについて一般成分分析を実施したが、傾向、値が類似することからNo.3(2001年、中国)の結果のみ示した。

**Table 3 Characterization of fractions of buckwheat with milling machine**

	Recovery (kg)	Roll presser	Ratio	Moisture	Starch (%)	Protein	Fatty acid	Others
1st flour	6.32	5.5	21.1	14.7	72.9 (85.4)	6.1 (7.1)	1.0 (1.1)	5.4 (6.3)
2nd flour	4.50	5.5	15.0	13.6	72.9 (84.4)	6.9 (8.0)	1.1 (1.3)	5.4 (6.3)
3rd flour	3.10	5.5	10.3	14.4	72.2 (84.4)	7.2 (8.4)	1.2 (1.5)	5.0 (5.8)
4th flour	2.40	5.5	8.0	14.4	71.7 (83.7)	6.9 (8.1)	1.3 (1.5)	5.7 (6.7)
5th flour	2.00	1.5	6.7	14.4	70.9 (82.8)	7.7 (9.0)	1.4 (1.7)	5.6 (6.6)
6th flour	1.50	1.5	5.0	14.2	67.4 (78.5)	9.8 (11.4)	2.0 (2.3)	6.7 (7.8)
7th flour	1.30	1.5	4.3	14.0	63.1 (73.4)	11.5 (13.4)	2.5 (2.9)	8.8 (10.2)
8th flour	1.00	1.5	3.3	14.0	59.5 (69.2)	14.0 (16.2)	3.0 (3.4)	9.6 (11.2)
9th flour	0.70	1.0	2.3	14.1	55.8 (64.9)	16.2 (18.9)	3.5 (4.1)	10.4 (12.1)
10th flour	0.50	1.0	1.7	13.8	54.6 (63.3)	18.1 (21.0)	3.9 (4.5)	9.6 (11.1)
11th flour	0.45	1.0	1.5	13.7	50.8 (58.9)	19.9 (23.0)	4.6 (5.4)	11.0 (12.7)
12th flour	0.29	0.5	1.0	13.8	49.4 (57.3)	20.8 (24.1)	4.8 (5.6)	11.3 (13.1)
13th flour	0.22	0.5	0.7	13.8	47.8 (55.5)	21.4 (24.8)	4.7 (5.5)	12.2 (14.2)
14th flour	0.20	0.5	0.7	13.8	46.4 (53.8)	22.0 (25.5)	5.0 (5.8)	12.9 (14.9)
15th flour	0.13	0.5	0.4	13.9	47.9 (55.5)	22.0 (25.5)	5.0 (5.8)	11.4 (13.2)
other flour	3.20	-	10.7	13.3	37.8 (43.9)	27.0 (31.3)	5.7 (6.7)	16.2 (18.1)
loss	2.19	-	7.3					
Total	27.81	-	92.7					

( ): Dry percentage

**Table 4 Comparison with free amino acid composition in buckwheat**

	1	2	3	4	5	6
	mg/100g-wet					
P-Ser	3.1	3.4	2.0	2.4	2.2	2.3
Asp	14.3	20.1	11.5	14.6	12.3	10.2
Thr	3.3	7.8	3.4	5.0	5.4	5.3
Ser	3.4	5.7	2.4	3.7	2.8	3.2
Glu	39.5	59.7	28.2	42.9	31.0	32.1
$\alpha$ -AAA	4.0	1.7	1.2	1.5	3.1	3.9
Gly	3.9	8.2	3.7	3.8	3.2	3.8
Ala	5.8	9.4	4.7	4.1	3.8	4.5
$\alpha$ -ABA	0.0	8.5	7.5	0.0	0.2	0.1
Val	13.1	10.6	9.1	13.2	11.2	10.4
Cys	4.4	5.3	5.1	6.7	7.9	4.9
Met	35.3	58.5	28.3	46.9	30.3	31.5
Ile	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tyr	1.6	3.2	1.2	1.3	1.5	2.0
Phe	1.6	3.0	1.3	2.2	1.1	2.6
$\beta$ -Ala	0.8	1.1	0.4	0.6	0.7	0.6
$\gamma$ -ABA	3.4	4.4	2.4	2.7	1.1	2.0
Trp	17.4	13.8	18.4	16.9	20.7	n.d.
Orn	1.4	2.4	0.9	1.4	0.8	0.8
Lys	2.6	4.3	2.1	2.4	2.7	2.8
His	2.2	4.2	1.6	2.2	1.8	2.0
Car	2.9	1.8	4.4	3.0	6.5	7.2
Arg	22.1	58.1	18.2	27.8	31.9	24.6
Pro	1.2	1.6	0.9	1.2	0.8	0.0

1 : 1999, Inner Mongolia, China. 2 : 2000, Inner Mongolia, China. 3 : 2001, Inner Mongolia, China. 4 : 2000, Mankan, China. 5 : 2001, *Kitawase*, New Zealand. 6 : 2001, *Kitawase*, Japan..  
n.d. : no data

### 第3項 遊離アミノ酸分析

遊離アミノ酸の分析結果を Table 4 に示した。全ての試料において、10 mg/100g-wet 以上の遊離アミノ酸は、Asp、Glu、Met および Arg であった。No.6 (2001年、北海道) の Trp はピークが重なるため定量出来なかった。No.1-3 (1999年、2000年、2001年、いずれも中国) は、収穫年度で Glu、Met および Arg 含量が大きく異なる結果となった。No.2 (2000年、中国) は No.1 (1999年、中国)、No.3 (2001年、中国) より Glu、Met および Arg の含有量が約2倍であった。必須アミノ酸の Leu は検出されなかった。また、Ile および Met は No.1 (1999年、中国) のみで検出された。機能性成分の  $\gamma$ -ABA は全てのサンプルで検出された。

### 第4項 タンパク質の構成アミノ酸分析

Glu、Arg、Asp の順でアミノ酸含有量が多い結果となった (Table 5)。この傾向は遊離アミノ酸の結果 (Table 4) と類似していた。No.2 (2000年、中国) の Glu 含有量は、No.3 (2001年、中国) より約 600 mg/100g-wet 多かった。同様に No.2 の Asp 含有量は No.3 より約 300 mg/100g-wet 多かった。この様に No.2 (2000年、中国) の遊離アミノ酸含有量が、No.3 (2001年、中国) のそれより多い傾向は他のアミノ酸でも認められた。これは No.2 (2000年、中国) の粗タンパク質含有量 (Table 2) が No.3 (2000年、中国) より多いことが起因していると推察した。必須アミノ酸は9種類のうち8種類検出した。遊離アミノ酸で未検出だった Leu はタンパク質の構成アミノ酸で約 600 mg/100g-wet 検出した。

アミノ酸含有量は試料で異なるが、各アミノ酸の構成比は同じであった。これはアミノ酸の含有量は変動するが、構成比は収穫年度や品種 (内モン古在来種、マンカン種およびキタワセ種) で変化しないことを示唆する結果となった。

**Table 5 Comparison with amino acid composition from protein in buckwheat**

	1	2	3	4	5	6
	mg/100g-wet					
Asp	1030	1122	823	1038	904	993
Thr	424	459	352	432	386	418
Ser	562	603	465	574	511	551
Glu	2072	2268	1612	2073	1800	2000
Gly	643	690	524	654	585	639
Ala	473	508	396	492	431	462
Cys	198	198	188	207	182	187
Val	530	587	410	511	483	509
Met	220	233	175	210	199	213
Ile	356	397	266	356	310	346
Leu	671	738	527	701	577	648
Tyr	323	345	249	319	290	313
Phe	455	502	354	465	386	435
Lys	638	696	519	652	573	634
His	295	320	233	285	269	289
Arg	1108	1216	845	1115	950	1067
Pro	428	468	277	438	317	414

1 : 1999, Inner Mongolia, China. 2 : 2000, Inner Mongolia, China. 3 : 2001, Inner Mongolia, China. 4 : 2000, Mankan, China. 5 : 2001, *Kitawase*, New Zealand. 6 : 2001, *Kitawase*, Japan.

**Table 6 Comparison with rutin, amylose and amylopectin in variety buckwheat**

	1	2	3	4	5	6
Rutin ( $\mu\text{g/g}$ )	39.5	54.9	23.1	45.6	60.1	88.8
Amylose (%)	16.6	16.8	27.4	7.8	24.2	19.7
Amylopectin	83.4	83.2	72.6	92.2	75.8	80.3

1 : 1999, Inner Mongolia, China. 2 : 2000, Inner Mongolia, China. 3 : 2001, Inner Mongolia, China.  
4 : 2000, Mankan, China. 5 : 2001, Kitawase, New Zealand. 6 : 2001, Kitawase, Japan.

#### 第5項 ルチン含有量とアミロース、アミロペクチン含有率

丸実のルチン含有量とアミロース、アミロペクチン含量率の結果を Table 6 に示した。No.6 (2001 年、北海道) はルチン含有量が最も多く、No.1-4 の中国産と比較して2から4倍多いことが認められた。また、No.6 (2001 年、北海道) と同じキタワセ種である No.5 (2001 年、ニュージーランド) もルチン含量が多かった。No.2 (2000 年、中国) と No.3 (2001 年、中国) は同じ品種でありながら、ルチン含量はそれぞれ、 $54.9\mu\text{g/g}$  と  $23.2\mu\text{g/g}$  と約2倍も差が認められた。なお、ケルセチンの測定も行ったが、全ての試料において認められなかった。

マンカン種の No.4 (2000 年、中国) は高いアミロペクチン含有率を示した。しかし、No.2 (2000 年、中国) と No.3 (2001 年、中国) のアミロペクチン含有率は、同じ品種でありながら収穫年度の違いで約10%異なった。この結果を考慮すると No.4 (2000 年、中国) のアミロペクチン含有率は高い値を示しているが、収穫年度で大きく変動する可能性があり、他の試料と同程度のアミロペクチン含有率になることも示唆された。内蒙古在来種 (No.1-3) とキタワセ種 (No.5、No.6) のアミロペクチン含有率は、平均でそれぞれ 79.8%と 78.1%となり類似値を示した。

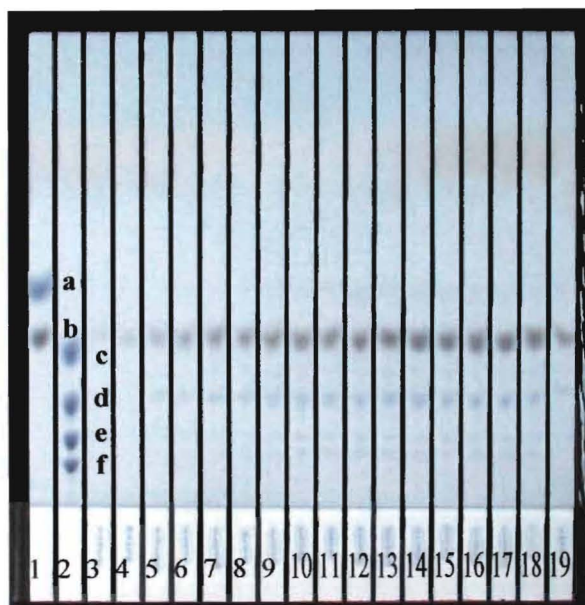
**Table 7 Comparison of amylopectin of fractions**

	1	2	3	4	5	6
	(%)					
1st flour	74.5	73.0	72.2	83.6	72.9	72.5
2nd flour	77.6	76.7	73.3	82.7	77.9	73.3
3rd flour	75.6	79.2	73.0	87.0	73.3	72.0
4th flour	80.8	83.9	72.4	89.6	75.4	76.3
5th flour	83.7	89.5	78.3	93.8	75.7	75.8
6th flour	87.3	90.8	83.0	95.6	83.9	77.5
7th flour	92.6	89.9	86.9	96.3	87.6	78.8
8th flour	93.6	94.3	89.8	98.4	93.6	81.7
9th flour	97.7	94.2	91.7	97.8	91.5	88.7
10th flour	97.8	93.7	93.9	98.7	96.1	84.5
11th flour	97.8	88.5	97.0	96.7	90.9	84.7
12th flour	97.3	91.1	96.1	96.4	86.7	89.1
13th flour	95.6	92.0	97.8	94.8	91.6	95.8
14th flour	93.6	90.8	98.0	97.3	93.5	95.5
15th flour	91.7	92.0	98.5	93.6	93.9	96.3
other flour	97.0	92.4	99.1	93.8	98.6	95.1
Whole flour	83.4	83.2	72.6	92.2	75.8	80.3

1 : 1999, Inner Mongolia, China. 2 : 2000, Inner Mongolia, China. 3 : 2001, Inner Mongolia, China. 4 : 2000, Mnkkan, China. 5 : 2001, *Kitawase*, New Zealand. 6 : 2001, *Kitawase*, Japan.

#### 第6項 分画製粉したソバ粉のアミロペクチン含有率

分画製粉した時のアミロペクチン含有率を Table 7 に示した。1 番粉が最も少なく、9 番粉から 15 番粉にかけて含有率が高い結果となった。特に残抜き粉 (other flour) は 90% 以上の澱粉がアミロペクチンであることが認められた。Table 3 の No.3 (2001 年、中国) の結果より、残抜き粉を除き、澱粉価は番粉数が増加するほど低い値を示した。一方、アミロペクチン含有率は番粉数が多いほど高い値を示した。このように、澱粉価とアミロペクチン含有率が反比例する傾向はすべての試料で認められた。以上の結果より、アミロースおよびアミロペクチンと澱粉価には相関性が認められた。マンカン種である No.4 (2000 年、中国) は全ての画分において、高いアミロペクチン含有率を示した。No.4 (2000 年、中国) の全層粉 (Whole flour) はアミロペクチン含有率が他の試料より 10% 以上高い結果と関連していると考えられる。



**Fig. 4 Free suger analysis of flour from buckwheat**

1,2: standard 3: 1st flour 4: 2nd flour 5: 3rd flour 6: 4th flour 7: 5th flour 8: 6th flour 9: 7th flour  
 10: 8th flour 11: 9th flour 12: 10th flour 13: 11th flour 14: 12th flour 15: 13th flour 16: 14th flour  
 17: 15th flour 18: other flour 19: whole flour (a): glucose. (b): sucrose (c): maltose (d): maltotriose  
 (e): maltotetraose (f): maltopentaose

#### 第7項 遊離糖の分析

分画製粉毎の遊離糖を薄層クロマトグラフィーで展開した結果を Fig. 4 に示した。どの画分においても、スクロースの割合が多いことが認められた。次いでマルトトリオース、グルコースの順であった。それ以外の遊離糖については未検出であった。分画数が増加するほど各スポットが明確に確認できた。対照的に澱粉価の高いレーン3（一番粉）は明確にスポットを検出できなかった。Table 3 の No.3（2001 年、中国）の結果より、澱粉価の高い画分ほど遊離糖が少ない傾向を示した。



## 第4節 考察

澱粉含量の高い原料は酒化率や酒質が優れていることから、澱粉価の高い原料を得るために、清酒では精米方法や品種改良の研究が進められてきた<sup>55)</sup>。試料No.3 (2001年、中国)は最も高い澱粉価を示した。マンカン種 (No.4)、キタワセ種 (No.5、No.6)の澱粉価は、内蒙古在来種 (No.1-3)のそれとの差異は認められなかった。タンパク質は発酵に関わる酵素の阻害剤であることが多く、醸造用原料では不要とされ精米段階で除去される<sup>56)</sup>。No.3 (2001年、中国)の粗タンパク質は最も低い値を示した。また、内蒙古在来種 (No.1-3)の粗タンパク質含量はマンカン種 (No.4)、キタワセ種 (No.5、No.6)より低い値を示した。以上の結果より、現在、本格焼酎原料として広く使用されている内蒙古在来種 (No.1-3)は、醸造用原料として最も優れていることが分かった。また、マンカン種 (No.4)、キタワセ種 (No.5、No.6)についても醸造用原料として十分に利用可能と考えられる。品種間よりも収穫年度の成分格差の方が大きかった。この原因は気候の影響が推測される。高品質のソバ焼酎を安定的に供給する観点からは、原料成分の変動はマイナス要因である。米、麦のように毎年、安定した品質の原料を入手することは現状では難しい。ソバの成分にはある程度の変動があることを考慮したうえで生産計画を構築する必要がある。

ソバ澱粉は非常にもろいため、甘皮を削ると中の澱粉が形を維持することが出来ない。丸実の分画製粉を実施したが、丸実に物理的圧力を加えると、胚乳部の柔らかい澱粉質から回収されるというソバ特有の現象が認められた (Table 3)。1番粉は最も澱粉価が高く、画分を重ねるごとに低下した。ソバの成分をコントロールすることは、同じ品種でも限界がある。分画製粉処理を行うことでソバ粉の澱粉価、粗タンパク質量を任意に調節することが可能であることが明らかとなった。造粒技術を活用して澱粉価が高く、粗タンパク質が低いソバ粉を加工できれば、安定した品質のソバ焼酎が製造可能である。中原らは、この分画製粉技術を活用して造粒化ソバの開発に成功した。さらに、造粒化ソバによるソバ焼酎の製造に成功している<sup>57)</sup>。

ソバの澱粉価は米 (74.1%)、麦 (71.6%) より低く、粗タンパク質の割合が多かった (Table 2)。この粗タンパク質は酵素阻害などに関与し醸造に悪影響を与える。一方で、遊離アミノ酸は酵母の代謝促進のために微量ではあるが必要である<sup>58)</sup>。タンパク質のアミノ酸含量は Glu、Asp および Arg が多く、遊離アミノ酸も同様に Glu、Asp および Arg の含有量が多い (Table 4)。ソバタンパク質の特徴として Lys 含量が高いことが報告されている<sup>59)</sup>。遊離アミノ酸の Lys については、ソバは 2 mg/100g-wet 以上の値を示し、米 (0.32 mg/100g-wet)、麦 (1.02 mg/100g-wet) の値より高かった。タンパク質の構成アミノ酸の Lys についても、ソバは 500 mg/100g-wet 以上と、米 (250 mg/100g-wet)、麦 (220 mg/100g-wet) より高い値を示した。

ソバはポリフェノール化合物であるルチンを含む。しかしルチンはソバの果皮、殻および外層に存在するため、原料処理で除去される。また、揮発性成分ではないため、本格焼酎に含まれる可能性は極めて低い。キタワセ種 (No.5、No.6) と内蒙古在来種 (No.1-3) のルチン含有量に差が認められた。約 3 倍の差が認められるので品種間格差が推測された。ダツタンソバのルチン含量は 970  $\mu$ g/g となり Table 6 の全試料より 10 から 30 倍多くこれまでの報告と一致した<sup>60)</sup>。

井上らは、アジア地域のソバのアミロース含量は 23%以下、ヨーロッパ、中東地域のソバのアミロース含量は 23%以上であると報告している<sup>61)62)</sup>。Table 6 の結果より、No.3 (2001 年、中国) の 27.4%、No.5 (2001 年、ニュージーランド) の 24.2%以外は全て低い値であった。特に No.4 (2001 年、中国) は 7.8%と非常に低い値を示した。No.5 はニュージーランド産であるが、日本の品種を栽培しているためアミロース含量はアジア地域の傾向を示すと推測した。アミロペクチンはアミロースより老化性が遅い<sup>63)</sup>。また、アミロペクチン含量が高いほど発酵初期の酵素活性が高くなると報告されている<sup>64)</sup>。しかし、酒化率への影響については報告がないので今後検討が必要である。

## 第5節 小括

一般成分分析の澱粉価、粗タンパク質の結果より、内蒙古在来種 (No.1-3) は、醸造用原料として最も優れていた。また、マンカン種 (No.4)、キタワセ種 (No.5、No.6) についても醸造用原料として十分に利用可能と考えられる。

一般成分分析値が最も優れていた内蒙古在来種 (No.1-3) は2001年度産であった。このソバは本研究のソバ焼酎原料として以下の実験に使用した。また、一般成分分析値は収穫年度による変動が大きいことが明らかとなった。これは、気象が影響しているためと推察された。

ソバを16画分に分画製粉した結果、醸造に最適な高澱粉含量、低粗タンパク質量のソバ粉を分画可能であることが示唆された。

## 第2章 ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分の同定

### 第1節 序論

穀類本格焼酎は減圧蒸留法で製造するため、常圧蒸留法で製造する甘藷焼酎より揮発性成分の含有量が少ない。この少ない含量の揮発性成分の同定法については、濃縮法も含めて確立されていなかった<sup>65)</sup>。一方で、ヘッドスペース GC 法のように容易な操作法で分析できる低沸点揮発性成分については数多く報告されている<sup>25)66)67)</sup>。清酒吟醸香の重要な揮発性成分として低沸点揮発性成分の ethyl caproate が報告<sup>68)69)</sup>されて以降、ethyl caproate を指標として酵母育種や代謝系の解明が進んだが、本格焼酎ではこのような研究の報告が少ない。これは、本格焼酎の重要な香りが特定されてないためと考えられる。

以上のように、本格焼酎の品質向上や商品開発のために研究を進めるには、穀類本格焼酎についても低沸点揮発性成分のみではなく、中高沸点揮発性成分の詳細な解明が必要である。近年、揮発性成分の濃縮技術や装置改良が進み、優れた分析方法が確立され始めた<sup>70)71)</sup>。本章では果汁飲料、緑茶やビール、清酒、ワインおよび泡盛等のアルコール飲料揮発性成分の濃縮に利用されているポーラスポリマービーズの一つである porapak Q 樹脂を用いた固相抽出法で、ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分を濃縮した<sup>72-75)</sup>。さらに、pH による溶媒抽出法を用いてそれぞれの本格焼酎を塩基性画分、フェノール性画分、中性画分および酸性画分に分画した。得られた濃縮サンプルは GC および GC/MS を用いて揮発性成分の同定、定量を行った。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 本格焼酎原料および実験試薬

ソバは第1章の結果より、最も醸造に適していた中国内蒙古自治区産 2001 年収穫の丸実 (Table1、No.3) をグリッツ処理して用いた。グリッツは Fig. 3、C に示すように圧力

を加え破碎したものである。麦はオーストラリア産 2001 年収穫精麦大麦(アラポリス種)、米は 2001 年収穫国内産破碎精米をそれぞれ、精麦、精米処理したものをを用いた。

揮発性成分同定に使用した試薬(和光純薬工業(株)、Aldrich Chem. Co.、Research Chemicals Ltd.、ICN Biomedicals Inc.、東京化成工業(株))は特級またはそれに準ずる試薬を用いた。その他特に言及しない限り特級試薬を用いた。

## 第2項 製麴

製麴はふた麴法で行った<sup>76)</sup>。すなわち、ソバ、麦焼酎仕込みで用いる麦麴は洗麦、浸漬、水切り後、約1時間蒸きょうした。麦の蒸し後水分は40%に調整した。蒸麦を放冷後、種付け時の揉み上げ温度は32°Cで行った。その後恒温恒湿庫(SANYO(株)製)を用いて、温度40°C、湿度95%の条件で30時間製麴後、引き続き温度を30°Cに落とし湿度95%で15時間製麴を行った。米焼酎仕込みに用いる米麴も同様に製麴を実施した。米の蒸し後水分は35%に調整した。種付け時の揉み上げ温度は36°Cで行った。種麴は河内菌白麴(*Aspergillus kawachii*、河内源一郎商店製)を原料1kg当たり1.3g使用した。得られた麴は以下の仕込みに用いた。

## 第3項 仕込み

ソバ焼酎の仕込みは次のように行った。酵母は協会酵母2号(SH-2)を予めYM培地(1% D-glucose、0.5% pepton、0.3% yeast extract、0.3% molt extract)で30°C、24時間前培養した。前培養した酵母 $1 \times 10^6$  cells/ml、第2項で得た麦麴原料800gと汲み水(D.W.)960mlを25°C、6日間発酵を行った培養液を一次醪(もろみ)とした。二次仕込みで使用するソバグリッツは、水分含量が40%になるように蒸留水(D.W.)で散水後、約60分放置した。その後60分蒸きょうして30°Cに放冷したソバグリッツ原料1600gと汲み水2880ml、そして一次醪を加えたものを二次醪とした。発酵は30°Cで14日間行った。米焼酎の一次仕込みは、麴に米麴を用いた以外は全てソバ焼酎と同条件で仕込みを行った。二次仕込みで使用する掛け原料(米)は洗米、浸漬に15分、水切りに60分、その

後 60 分蒸きょうした。その後放冷したものを蒸し後水分 36%に調整し二次醪に使用した。麦焼酎の二次仕込みで使用する掛け原料（麦）は洗麦、浸漬に 60 分、水切りに 60 分、その後 60 分蒸きょうした。その後放冷したものを蒸し後水分 38%に調整し二次醪に使用した。米焼酎、麦焼酎の二次仕込みの発酵温度、期間はソバ焼酎と同条件で実施した。

#### 第4項 蒸留

蒸留は真空制御装置（V-800 型、柴田科学（株）製）を接続したロータリーエバポレーター（RE-10E-100、柴田科学（株）製）を用いて減圧蒸留法で実施した。丸底フラスコに第3項で得た醪 3000ml を加え、ウォーターバスで加温（70℃）し、圧力 80 mmHg、冷却水温 6℃で行った。蒸留液（本格焼酎原酒）は次式を用いて、蒸留歩合 95%、蒸留液のエタノール濃度が 44%（v/v）になるように蒸留を行った。蒸留歩合は、弊社工場で通常用いる値を参考にした。蒸留歩合で必要となる醪のエタノール濃度は、簡易アルコール分析器（理研計器（株）製）で測定した。

$$\text{蒸留液（l）} = \frac{\text{蒸留歩合（\%）} \times \text{醪容量（l）} \times \text{醪アルコール濃度（\%）}}{\text{蒸留液アルコール濃度（\%）} \times 100}$$

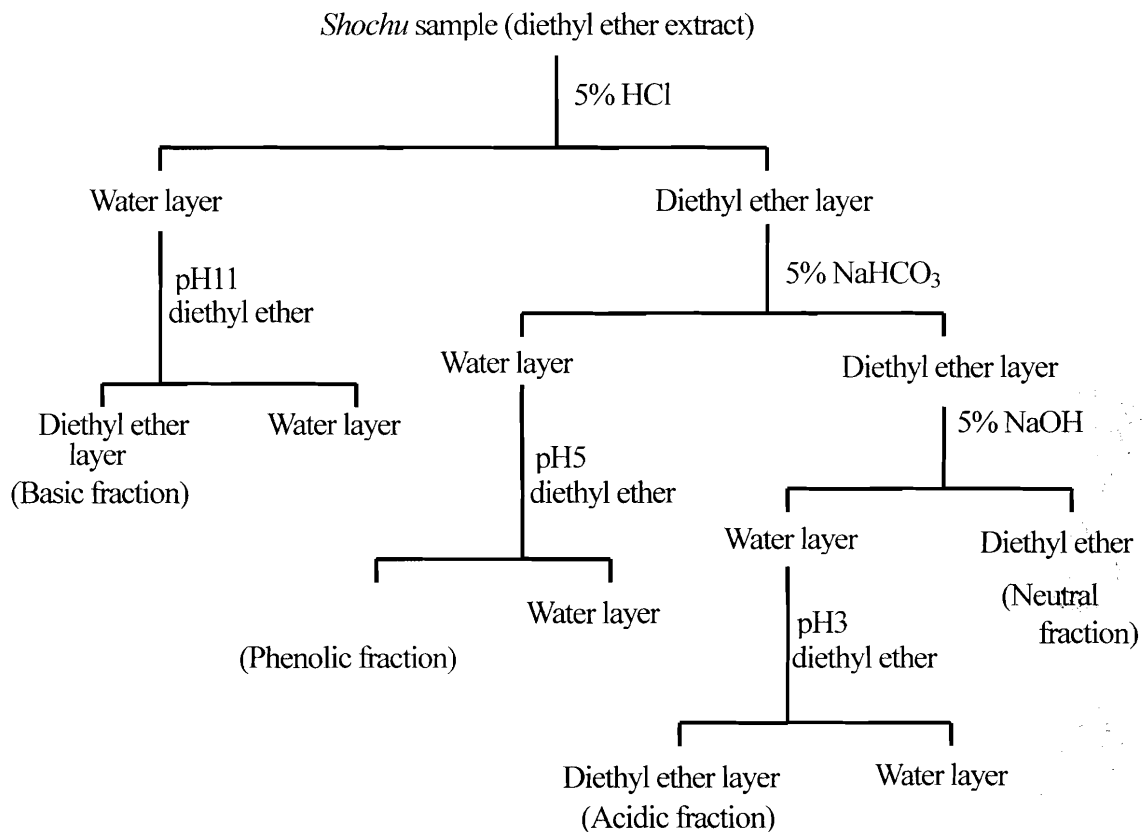
#### 第5項 固相抽出法

固相抽出法は Manerat らの方法を一部改変して行った<sup>7)</sup>。すなわち、Porapak Q 樹脂（50-80 メッシュ Waters Co.製）50 ml をガラスフィルター付きのガラスカラム（3cm×20cm）に充填し、ジエチルエーテル 150 ml、メタノール 150 ml、引き続き脱イオン水 150 ml でコンディショニングを行った。第4項で得た本格焼酎原酒は脱イオン水でエタノール濃度が 10%（v/v）460 ml になるよう希釈し、カラムに流して揮発性成分を樹脂に吸着させたのち、脱イオン水 50 ml でカラムを洗浄した。次にジエチルエーテル 180ml でカラムに吸着している揮発性成分を抽出した。得られたジエチルエーテル抽出物は無

水硫酸ナトリウム 20 % (W/V) で一晩脱水し、エバポレーターで 10 ml まで濃縮後、再度窒素気流下で 3.0 ml まで濃縮し得られたサンプルを本格焼酎濃縮サンプルとした。エバポレーターは減圧度 80 mmHg、ウォーターバス 28°C の条件で濃縮を行った。この本格焼酎濃縮サンプルは内部標準物質として cyclohexanol を 240 ppm になるように加え GC 分析に供した。カラムの再生はメタノール 100 ml、ジエチルエーテル 100 ml および脱イオン水 150 ml の順で洗い再使用した。吸着、抽出および再生の操作はいずれも窒素ガスで加圧しながら迅速に行った。

#### 第 6 項 pH による溶媒抽出法

木原らの方法<sup>78)</sup>を一部改変して行った。すなわち、第 5 項で得たジエチルエーテル抽出物 200 ml と 5% HCl 70 ml は分液ロートを用いた溶媒抽出法で抽出を行った。得られた水層画分は、pH を 5% NaOH で強アルカリ側 (pH 12) にした。pH 処理した水層画分 150 ml は、ジエチルエーテル 50 ml を用いて再び溶媒抽出を行い、得られた有機層を塩基性画分とした。5% HCl による溶媒抽出工程で残った有機層画分は、5% NaHCO<sub>3</sub> で溶媒抽出を行った。得られた水層画分は 5% NaOH で pH 5 に調整後、再び溶媒抽出を行い有機層画分をフェノール性画分とした。5% NaHCO<sub>3</sub> の溶媒抽出で得た有機層画分は、5% NaOH で溶媒抽出を行い得られた有機層画分を中性画分とした。水層画分は 5% HCl で pH 3 に調整し再度溶媒抽出して得た有機層画分を酸性画分とした (Fig. 5)。それぞれの画分は 20% 無水硫酸ナトリウム (w/v) で一晩脱水後、エバポレーターと窒素気流下で 1.5 ml まで濃縮し、内部標準物質として cyclohexanol を 240 ppm になるように加え以下の分析に供した。全ての溶媒抽出はそれぞれ 3 回実施した。



**Fig. 5 Fractionation of diethyl ether extract of *Shochu***

#### 第7項 GCおよびGC/MS分析条件

水素炎イオン化検出器 (Flame ionization detector (FID)) を搭載した GC (GC2010、(株) 島津製作所製) を用いて同定、定量分析を行った。低沸点揮発性成分の分析条件は、キャリアガス圧 (He) 50kpa、カラム温度は 40°C で 3 分間保持したのち 160°C まで 2.5°C/min で昇温した。中高沸点揮発性成分の分析条件はキャリアガス圧 150 kpa、カラム温度を 70°C から 240°C まで 3°C/min で昇温後 34 分間保持した。分離カラムは DB-WAXetr (60 m × 0.32 mm.i.d.、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific 社製) を使用した。インジェクションポート、検出器の温度は 260°C、スプリット比は 10:1 で行った。GC/MS (QP5050A、(株) 島津製作所製) はイオン化電圧 70eV で測定した。分離カラムは DB-WAXetr (60 m × 0.25 mm.i.d.、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific 社製) を使用した。またスプリットレスで実施した以外は全て GC 分析と同一条件で行った。



## 第8項 揮発性成分の同定および定量

揮発性成分の同定はGCによるRetention Index (RI 値) およびGC/MS のマススペクトルを標準物質のそれらと比較することによって決定した。RI 値は、標準試料として *n*-パラフィン (直鎖飽和炭化水素キット、島津製作所 (株) 製) をジエチルエーテルに 100 mg/l 溶解し GC で測定した。RI 値は次式を用いて算出した。 $t_{Ra}$ 、 $t_{Rn}$ 、 $t_{Rn+1}$  は、目的の揮発性成分 *a* とその前後に流出する直鎖飽和炭化水素の保持時間である。得られたマススペクトルは National institute of standards and technology (NIST) ライブラリーを用いて解析を行った。定量分析は内部標準物質として cyclohexanol を用いて GC による内部標準法で測定した。GC 条件は第7項と同様に低沸点、中高沸点揮発性成分の分析条件で実施した。なお、第7項のGC分析で、溶出順が isoamyl alcohol (No.15) までの揮発性成分を低沸点揮発性成分、それ以降を中高沸点揮発性成分として以下論じた。

$$R.I. = 100 \times \frac{(t_{Ra} - t_{Rn})}{(t_{Rn+1} - t_{Rn})} + 100n$$

## 第3節 実験結果

### 第1項 ソバ、米および麦焼酎の小仕込み試験

Table 8 には、ソバ、米および麦焼酎の最終醪の数量とエタノール濃度および蒸留結果を示した。蒸留歩合 (Ratio) はいずれの本格焼酎も第2節4項の予定値 (95%) より高い値を示した。ソバ焼酎醪のエタノール濃度は米および麦焼酎に比べて低い値 (15.0%) を示した。

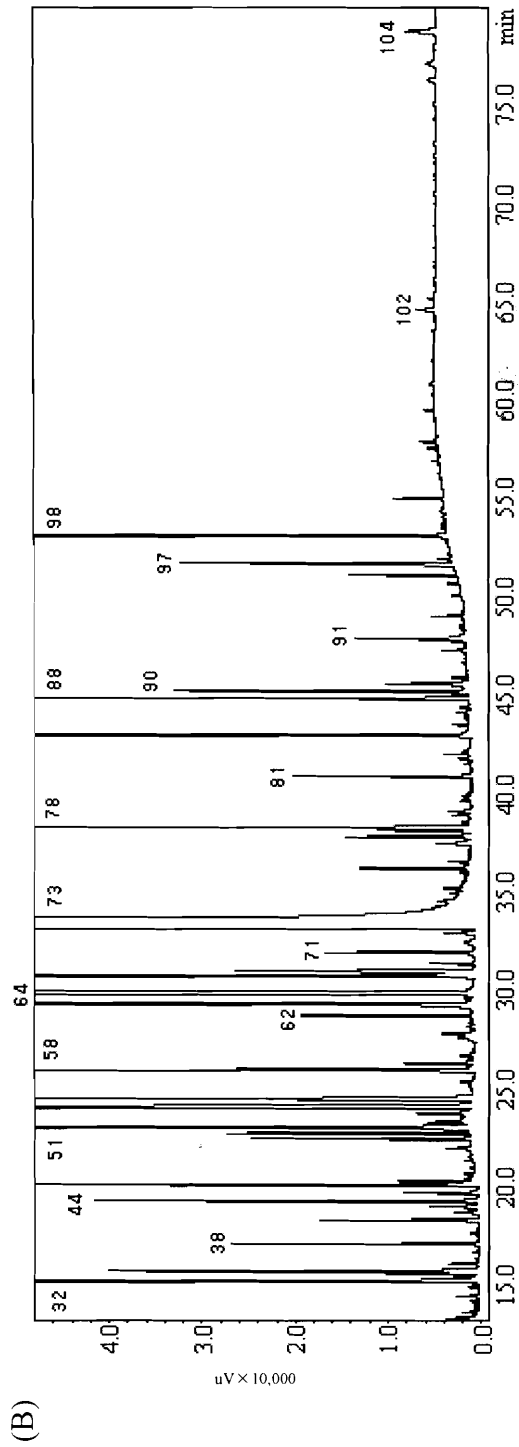
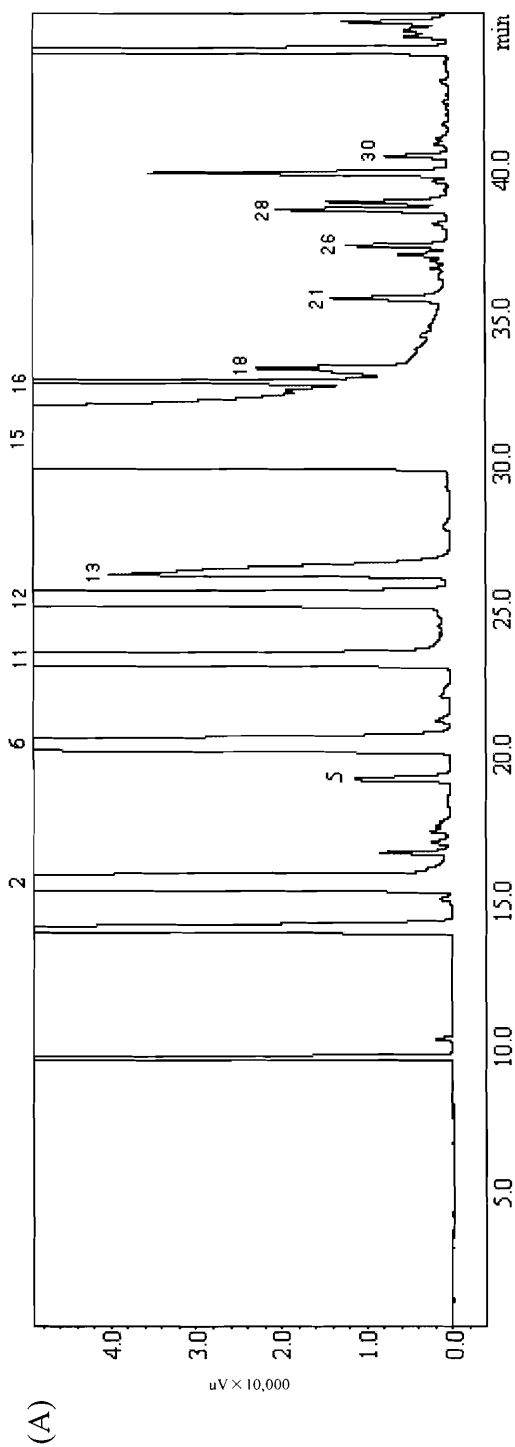
**Table 8 Comparison of fermentation test of cereal *Shochu***

	<i>Moromi</i>		<i>Shochu</i>		Ratio*
	Volume <sup>a)</sup> (ml)	Ethyl alcohol <sup>b)</sup> (%)	Volume <sup>c)</sup> (ml)	Ethyl alcohol <sup>d)</sup> (%)	
Buckwheat	6000	15.0	2130	43.5	97.1
Rice	5900	17.5	2178	47.8	99.1
Barley	6000	17.6	2326	44.4	98.1

\*Ratio=cd/ab×100

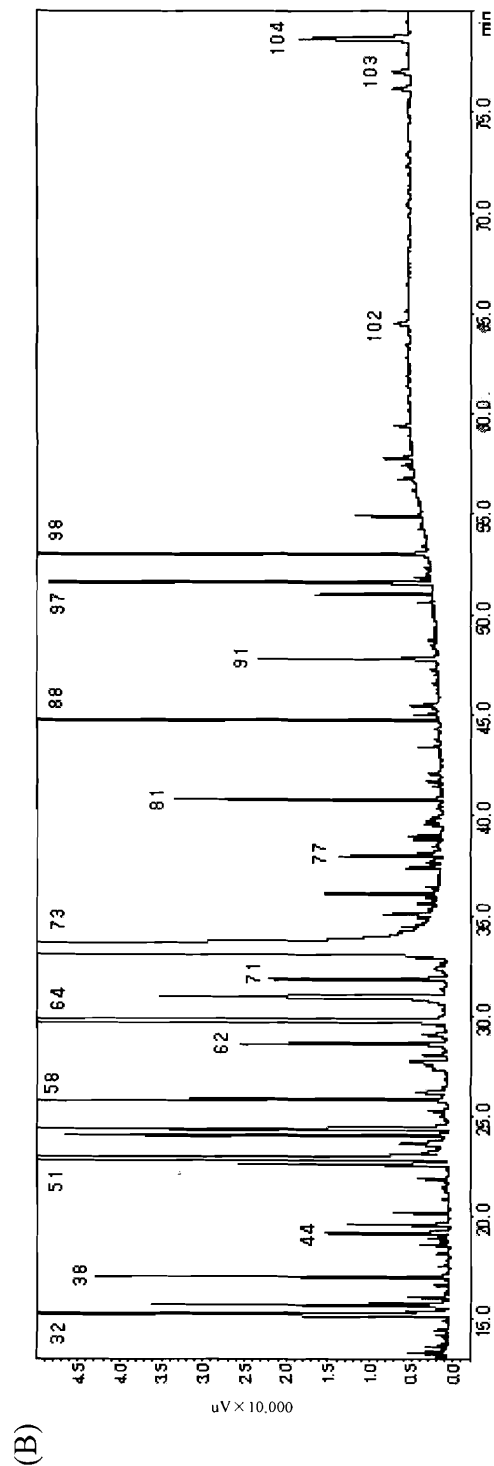
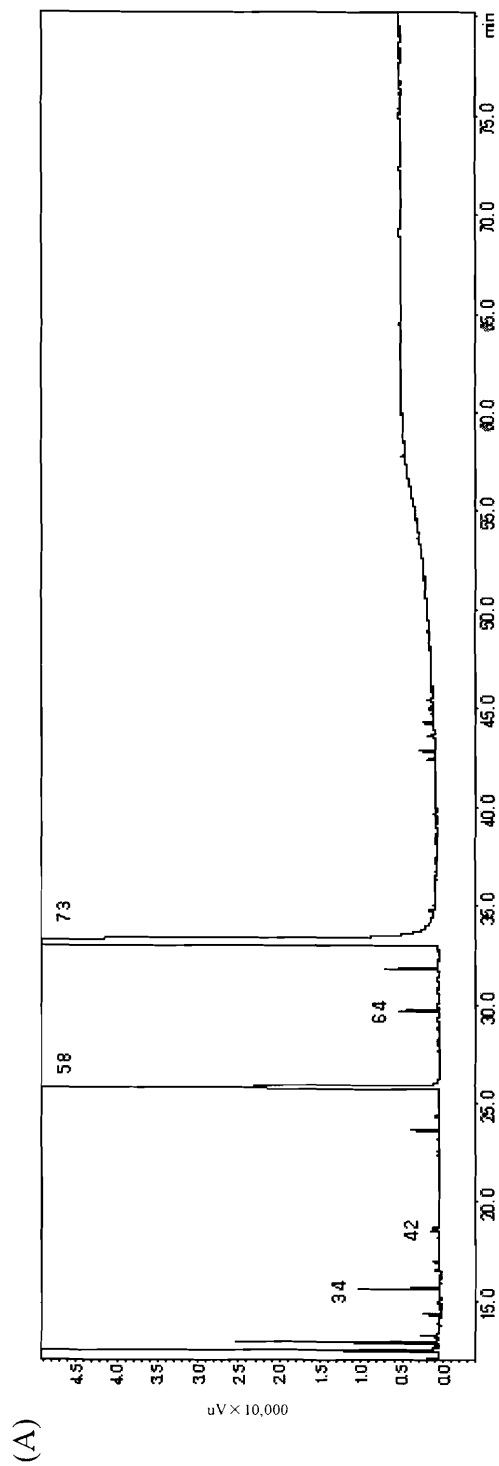
## 第2項 ソバ、米および麦焼酎サンプルの GC 分析

ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分の分析は、低沸点揮発性成分および中高沸点揮発性成分の分析条件でそれぞれ GC、GC/MS 分析を行い、そのクロマトグラムの結果を Fig. 6 に示した。3-ethoxy-1-propanol (No.30) までの揮発性成分については低沸点揮発性成分の GC 分析条件で分析した。2-ethylhexyl acetate (No.31) 以降の揮発性成分については、中高沸点揮発性成分の GC 分析条件で分析した (Fig. 6B)。さらに pH による溶媒抽出法を用いて、塩基性画分、フェノール性画分、中性画分および酸性画分にそれぞれ分画し GC 分析を行った (Fig. 7,8)。中性画分で最も多くのピークが認められた (Fig. 8B)。次いで酸性画分で多くのピークが認められた。フェノール性画分のピーク数はソバ焼酎が最も多く、順に米、麦焼酎であった。フェノール性画分と酸性画分のピークは同じ揮発性成分が多く同定された。フェノール性画分も酸性画分と見なすと、酸性化合物の揮発性成分が多いことが分かった。塩基性画分では 35 min.以降の揮発性成分が認められなかった (Fig. 7A)。本格焼酎の 35 min.以降の揮発性成分は高級脂肪酸とそのエチルエステル体で構成されるため塩基性化合物は少ないと考えられた。米および麦焼酎の GC 分析結果は、ソバ焼酎の分析結果と同様の傾向が認められた。

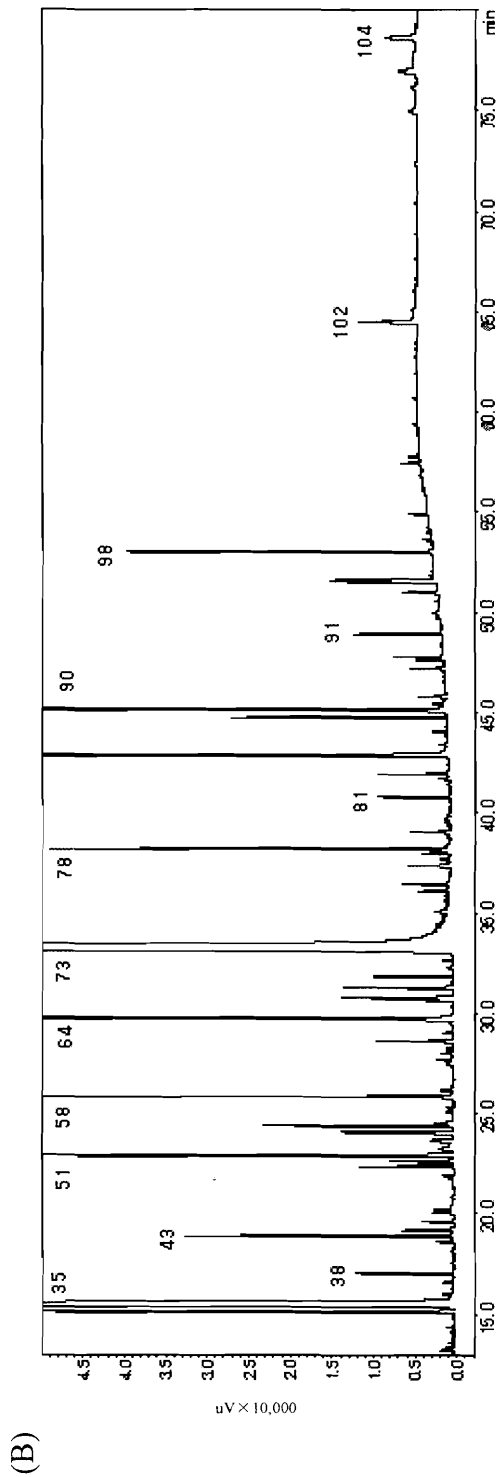
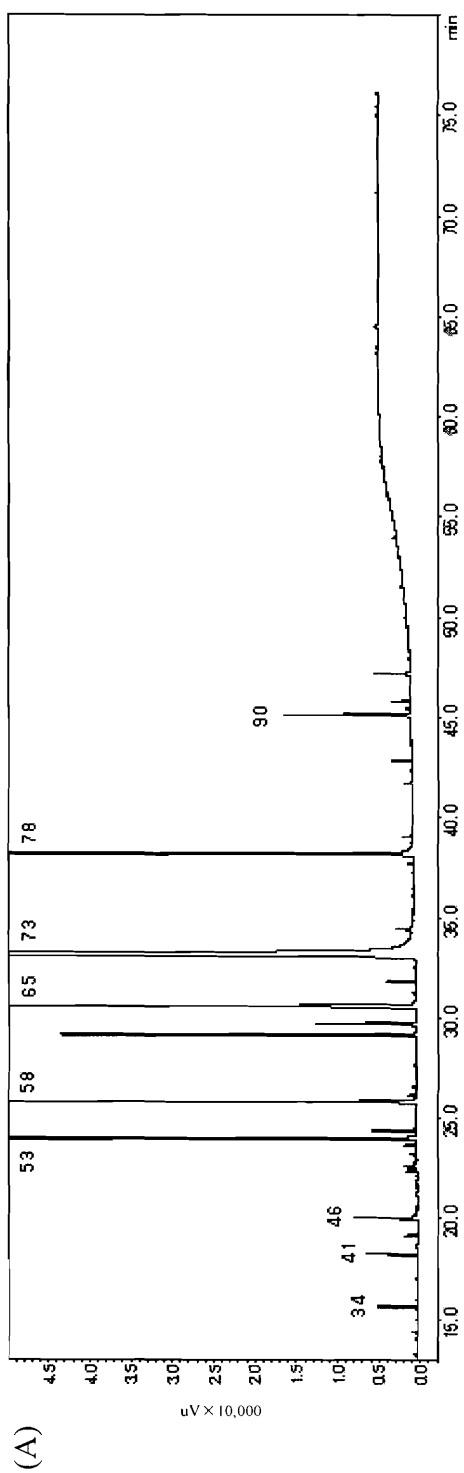


**Fig. 7 Chromatograms of concentrated buckwheat *Shochu* by Solid Phase Extraction method**

(A) : Chromatogram of low boiling point volatile compound. (B) : Chromatogram of middle and high boiling point volatile compound.



**Fig. 8 Gas chromatograms of basic and neutral fraction isolated from the buckwheat *Shochu* by pH fractionation method**  
 (A) : Chromatogram of basic fraction. (B) : Chromatogram of neutral fraction.



**Fig.9 Gas chromatograms of phenolic and acidic fraction isolated from the buckwheat *Shochu* by pH fractionation method**  
 (A) : Chromatogram of phenolic fraction. (B) : Chromatogram of acidic fraction.

**Table 9 Identified volatile compounds from cereal *Shochu***

Peak no.	Compounds name	Retention index	Concentration (mg/l)		
			Buckwheat	Rice	Barley
1	isopropyl alcohol	923	0.02*	nd	0.03*
2	ethyl alcohol	930	a)	a)	a)
3	ethyl isobutyrate	967	0.01*	n.d.	0.01*
4	allyl formate	982	0.01*	n.d.	0.02*
5	isobutyl acetate	1016	0.09*	0.06*	0.13*
6	<i>n</i> -propyl alcohol	1035	1.58	2.45	2.53
7	ethyl butyrate	1040	0.98*	0.48*	1.05*
9	ethyl isovalerate	1073	n.d.	n.d.	tr*
10	butyl acetate	1076	0.01*	n.d.	0.01*
11	isobutyl alcohol	1088	32.70	41.00	39.40
12	isoamyl acetate	1127	10.66	9.19	11.91
13	1-butanol	1142	0.62	2.13	1.55
14	1-ethoxy-2-propanol	1166	0.01*	0.02*	0.02*
15	isoamyl alcohol	1216	551.83	651.18	610.27
16	ethyl caproate	1241	0.61	0.85	0.84
17	1-pentanol	1250	tr*	tr*	tr*
18	3-methyl-3-buten-1-ol	1251	0.02*	n.d.	n.d.
19	isoamyl <i>n</i> -butyrate	1272	tr*	tr*	tr*
20	hexyl acetate	1278	n.d.	tr	n.d.
21	3-hydroxy-2-butanone	1295	0.13*	0.16*	0.01*
22	ethyl 3-hexanoate	1309	n.d.	0.02*	n.d.
23	4-methyl-1-pentanol	1314	0.01*	nd	n.d.
24	2-heptanol	1318	0.01	0.01	0.01
25	3-methyl-2-buten-1-ol	1322	0.03*	n.d.	0.03*
26	3-methyl-1-pentanol	1327	0.05	0.05	0.05
27	ethyl heptanoate	1340	0.01*	0.03*	0.02*
28	ethyl lactate	1348	tr	tr	tr
29	1-hexanol	1352	0.07	0.19	0.20
30	3-ethoxy-1-propanol	1379	0.03*	0.03*	0.06*
31	2-ethylhexyl acetate	1389	0.01*	0.02*	n.d.
32	ethyl caprylate	1438	1.20	2.03	2.15
33	1-octen-3-ol	1350	0.02	0.01	0.04
34	1-heptanol	1454	0.07	0.03	0.04
35	acetic acid	1451	0.10	0.10	0.23
36	3-ethyl-2-heptanol	1465	0.01*	0.03*	0.02*

**Table 9 (continued)**

Peak no.	Compounds name	Retention index	Concentration (mg/l)		
			Buckwheat	Rice	Barley
37	octyl acetate	1479	tr	tr	n.d.
38	ethylhexanol	1490	0.05	0.10	0.03
39	decanal	1504	n.d.	n.d.	tr*
40	2-nonanol	1519	n.d.	n.d.	0.01
41	ethyl DL-3-hydroxybutyrate	1522	0.07*	0.12*	0.07*
42	benzaldehyde	1531	0.01	tr	0.01
43	ethyl <i>n</i> -nonanoate	1540	0.01*	0.03*	0.04*
44	linalool	1549	0.09	0.10	0.15
45	<i>n</i> -octanol	1557	0.02	0.04	0.04
46	isobutyric acid	1568	0.45*	0.82*	0.37*
47	ethyl methylthiopropanoate	1572	0.02	0.10	0.02
48	2,3-dihydrobenzofuran	1600	tr*	tr*	tr*
49	butanoic acid	1628	0.13	0.16	0.08
51	ethyl caprate	1642	0.41	1.10	1.60
52	1-nonanal	1660	0.02	0.03	0.04
53	isovaleric acid	1669	1.35	1.53	0.82
54	ethyl benzoate	1672	tr	n.d.	n.d.
55	diethyl succinate	1680	0.51	1.14	0.88
56	$\alpha$ -terpineol	1699	n.d.	0.01	n.d.
57	2-dodecanone	1707	tr*	n.d.	n.d.
58	methionol	1717	0.48	0.54	0.36
59	valeric acid	1737	0.01	0.03	0.01
60	2-ethylbutyric acid	1759	0.01*	0.02*	0.01*
61	citoronerol	1766	0.02	0.02	0.02
62	ethyl phenylacetate	1790	0.05	0.06	0.04
63	nerol	1801	0.01	0.01	0.01
64	$\beta$ -phenethyl acetate	1821	5.77	6.21	5.25
65	caproic acid	1844	0.37	0.54	0.55
67	ethyl laurate	1846	tr	tr	tr
68	geraniol	1847	n.d.	tr	tr
70	2-methyl-hexanoic acid	1867	0.01*	0.01*	0.01*
71	benzyl alcohol	1877	0.04	nd	0.01
73	phenethyl alcohol	1912	103.32	108.10	96.78
74	isoamyl phenylacetate	2001	tr*	tr*	n.d.
76	nerolidol(cis- & trans- mixture)	2000/2011	tr	tr	tr

**Table 9 (continued)**

Peak no.	Compounds name	Retention index	Concentration (mg/l)		
			Buckwheat	Rice	Barley
77	ethyl myristate	2013	0.02	0.23	0.07
78	caprylic acid	2015	0.30	0.42	0.24
79	isoamyl laurate	2018	nd	tr	nd
80	1-methyl-4-hydroxybenzene	2022	0.01	0.01	0.01
81	ethyl cinnamate	2035	0.05	0.01	nd
82	ethyl pentadecanoate	2037	0.01	0.01	0.03
83	2-phenoxy ethanol	2040	tr*	tr*	0.03*
84	1-tetradecanol	2045	tr	tr	n.d.
87	bisabolol	2056	0.01*	0.03*	0.02*
88	ethyl palmitate	2066	0.11	0.23	0.49
89	trans,trans-farnesylacetate	2068	tr	0.01	tr
90	capric acid	2069	0.10	0.15	0.07
91	trans,trans-farnesol	2089	0.04	0.07	0.02
92	undecylic acid	2094	n.d.	0.07*	tr*
93	indole	2424	tr*	nd	0.03*
94	1-hexadecanol	2095	n.d.	tr	n.d.
95	ethyl stearate	2432	0.01	n.d.	0.07
96	lauric acid	2440	tr	tr	0.02
97	ethyl oleate	2442	0.12	0.10	0.13
98	ethyl linoleate	2467	0.21	0.18	0.33
99	ethyl nonadecanoate	2483	0.01*	0.01*	0.02*
100	myristic acid	2643	0.01	0.02	0.01
101	dibutyl phthalate	2648	0.01	0.01	0.01
102	palmitic acid	2846	0.03	0.06	0.05
103	oleic acid	3067	0.01	0.08	0.01
104	bis(2-methoxyethyl)phthalate	3081	0.02*	0.06*	0.04*
105	linoleic acid	3098	0.02	0.03	0.03

n.d. : not detected. a) : Concentrations of ethanol was adjusted to 10% by material method. tr : less than 0.01mg/l. \* : newly identified.



### 第3項 ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分

Fig. 6 で示したクロマトグラムの分析結果をもとに、ソバ焼酎で 86 種類、米焼酎で 81 種類、麦焼酎で 84 種類の揮発性成分をそれぞれ同定および定量した (Table 9)。また、表中のアスタリスク (\*) を施した成分は今回新たに本格焼酎の揮発性成分として同定されたものであり、ソバ焼酎で 29 種類、米焼酎で 23 種類および麦焼酎で 29 種類であった。すなわち、新規低沸点揮発性成分として isopropyl alcohol (No.1)、ethyl isobutyrate (No.3)、allyl formate (No.4)、isobutyl acetate (No.5)、ethyl butyrate (No.7)、ethyl isovalerate (No.9)、butyl acetate (No.10) および 1-ethoxy-2-propanol (No.14) の 8 種類が同定された。ethyl butyrate (No.7) を除くこれらの揮発性成分の含有量は、0.1mg/l 以下であった。acetaldehyde (b.p. 21°C) および ethyl acetate (b.p. 77°C) の低沸点揮発性成分についても同定したが、定量が困難であったので Table 9 のリストから省略した。これは沸点が低くサンプル濃縮工程で気化したことが原因と考えられた。米焼酎の ethyl butyrate (No.7) の含有量はソバ、麦焼酎の約半分であった。ソバ焼酎の *n*-propyl alcohol (No.6)、1-butanol (No.13) 含有量は米および麦焼酎より少なかった。

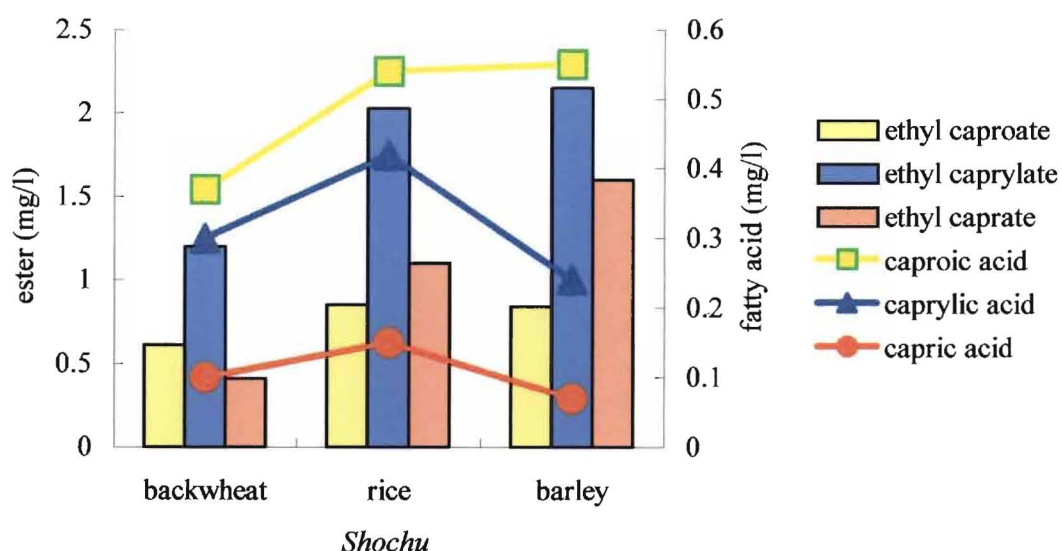
新規の揮発性成分として ethyl isobutyrate (No.3)、isobutyl acetate (No.5) および isobutyric acid (No.46) のイソ酪酸化合物を同定した。構造異性体であるが新規の揮発性成分の ethyl butyrate (No.7)、butyl acetate (No.10)、isoamyl *n*-butyrate (No.19) および ethyl DL-3-hydroxybutyrate (No.41)、既に報告されている 1-butanol (No.13) および isobutyl alcohol (No.11) を含めると酪酸に関する化合物は計 9 種類であった。

モノテルペンアルコール類として、linalool (No.44)、citronerol (No.61)、nerol (No.63)、nerolidol (No.76) および trans,trans-farnesol (No.91) を同定した。また、ソバ焼酎以外で geraniol (No.68) を、米焼酎のみで  $\alpha$ -terpineol (No.56) を同定した。これらモノテルペンアルコール類はワインの主要な香気寄与成分であることや、甘藷焼酎の特徴香であることが報告されている<sup>79)80)</sup>。

10mg/l 以上含まれる揮発性成分は含有量順に isoamyl alcohol (No.15)、phenethyl alcohol (No.73)、isobutyl alcohol (No.11) および isoamyl acetate (No.12) と高級アルコールが占

めた。isoamyl acetate (No.12) は isoamyl alcohol (No.15) のエステル化反応で生成量が多くなると推察される。 $\beta$ -phenethyl acetate (No.64) の含有量の多さも、phenethylalcohol (No.73) のエステル反応の影響と推察される。なお、phenethyl alcohol (No.73) は、固相抽出法で使用するジエチルエーテルに含まれる酸化防止剤 BHT とリテンションタイムが重なることから、焼酎を濃縮する以前のサンプルをヘッドスペース GC 法で分析を行った。

C16 以上の高級脂肪酸およびエステル体は 12 種類 (ethyl pentadecanoate (No.82)、ethyl palmitate (No.88)、undecylic acid (No.92)、ethyl stearate (No.95)、lauric acid (No.96)、ethyl oleate (No.97)、ethyl linoleate (No.98)、ethyl nonadecanoate (No.99)、myristic acid (No.100)、palmitic acid (No.102)、oleic acid (No.103)、linoleic acid (No.105)) を同定した。その中で undecylic acid (No.92)、ethyl nonadecanoate (No.99) は初めて同定した。また ethyl linoleate (No.98) の含有量はソバ焼酎で 0.2mg/l 認められた。



**Fig. 9 Comparison of middle chain fatty acid (C6, C8, C10) and ester from cereal Shochu**

第4項 各焼酎に含まれる中級脂肪酸 (C<sub>6</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>10</sub>) および中級脂肪酸エチルエステル類の含量の相関性

各焼酎に含まれる中級脂肪酸 (C<sub>6</sub>、C<sub>8</sub>、C<sub>10</sub>) と、その中級脂肪酸エチルエステル含量の相関性の結果を Fig. 9 に示した。脂肪酸である caproic acid (No.65)、caprylic acid (No.78)、capric acid (No.90) 含量がソバ焼酎より米焼酎で多い場合、エステル体である ethyl caproate (No.16)、ethyl caprylate (No.32)、ethyl caprate (No.51) 含量も多い傾向を示した。麦焼酎の ethyl caprylate (No.32)、ethyl caprate (No.51) 含量は最も多いにも関わらず、caprylic acid (No.78)、capric acid (No.90) の含有量はいずれも最も低い値を示した。

Table 10 Comparison of alcohol in cereal *Shochu*

		Buckwheat	Rice	Barley
<i>n</i> -propyl alcohol (P)	mg/l	1.58	2.45	2.53
isobutyl alcohol (B)		32.70	41.00	39.40
isoamyl alcohol (A)		551.83	651.18	610.27
total		585.11	694.63	652.20
ratio	A/P	349.25	265.79	241.21
	A/B	16.88	15.88	15.59
	B/P	20.70	16.73	15.57

第5項 低沸点高級アルコール類の比較

原料の異なる本格焼酎のアルコール類の含有量組成を Table 10 に示した。*n*-propyl alcohol (No.6)、isobutyl alcohol (No.11) および isoamyl alcohol (No.15) は本格焼酎の香気成分を形成する重要な揮発性成分でありソバ、米および麦焼酎を分類する指標とされている。

これまで西谷らにより、

I、*n*-propyl alcohol (No.6) 含量

原料による差は認められない。

II、isobutyl alcohol (No.11) 含量

米焼酎に多く、麦焼酎に少ない。

III、isoamyl alcohol (No.15) 含有量

ソバ焼酎に少ない。

IV、isoamyl alcohol (No.15) と *n*-propyl alcohol (No.6) の含有量比 (A/P 比)

ソバ焼酎で高く、麦焼酎で低い。

V、isoamyl alcohol (No.15) と isobutyl alcohol (No.11) の含有量比 (A/B 比)

麦焼酎で高い。

VI、sobutyl alcohol (No.11) と *n*-propyl alcohol (No.6) の含有量比 (B/P 比)

麦焼酎で低い。

と報告<sup>8)</sup>されている。

Table 10 の結果より、I、III、IV、VIの結果についてはこれまでの報告と一致した。

## 第4節 考察

米焼酎、麦焼酎はそれぞれの原料で製麹が可能であることから米原料のみ、麦原料のみで醸造が可能である。ソバ焼酎においては醸造に適したソバ麴を作ることは麹菌の着生、酵素量の調節が確立されていないために、ソバ単独の製麹が出来ず、麴原料は麦または米を採用しているのが現状である<sup>46)81)</sup>。そこで、本章ではソバ焼酎の麴原料に麦を併用した。Table 8 より澱粉 1,000g 当たりのエタノール生成量はソバ焼酎 839ml、米焼酎 871ml、麦焼酎 922ml であり、ソバ焼酎のアルコール生成量が低かった。これは、ソバ澱粉が効率的に糖化、発酵してない結果<sup>46)</sup>にあり。多様なアミノ酸で構成されるタンパク質に原因があると推測される。Table 2 の結果より澱粉価は米、麦より少なく粗タンパク質が多いことから、エタノール生成に影響を与えていると考えられる。小麦グロブリン画分に $\alpha$ -アミラーゼ阻害物質が認められていることや、焼酎酵母の増殖に影響を与えるという報告からも、 $\alpha$ -アミラーゼ活性阻害作用の機能を持つソバタンパク質の存在が考えられる<sup>52)82)</sup>。

いずれの焼酎も pH による溶媒抽出法で、中性画分の次に酸性画分で多くのピークが認められた。フェノール性画分のピークも含めると酸性化合物が本格焼酎には多く存在することになる。本格焼酎は麹菌由来のクエン酸の影響で醪、本格焼酎の pH が低い<sup>83)</sup>。そのため蒸留した製品自体も酸性であり、酸性化合物が多く含まれることが推察された。

Table 9 の結果より低沸点区分において 8 種類の新規の揮発性成分を明らかにした。これらの揮発性成分はヘッドスペース法では低濃度のため検出できないが、第7項の低沸点揮発性成分分析条件を用いることで初めて同定できた。

$\beta$ -phenylethyl alcohol (No.73) は、pH による溶媒抽出法で得た全ての画分で認められた。このように全ての画分で認められた揮発性成分は低沸点揮発性成分 (ethyl alcohol (No.2)、*n*-propyl alcohol (No.6)、isobutyl alcohol (No.11)、isoamyl alcohol (No.15)) でも確認された。これらの揮発性成分の共通点は高級アルコール類で含有量が多いことである。高級アルコール類は構造上 pH の影響で解離しにくいこと、溶媒抽出工程におけ

る分配作用による液相間の移動よりも高い含有量のため容易に他の溶液に移動することが考えられる。このような傾向は米、麦焼酎においても同様に認められた。

本章で初めて甘藷焼酎以外で複数のテルペン類を同定した。これまでモノテルペンアルコール類は、甘藷に配糖体として存在し、白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) 由来の酵素  $\beta$ -glucosidase で生成すると報告されている<sup>84)85)</sup>。ソバ焼酎も白麹菌 (*Aspergillus kawachii*) を使用しているため、これらモノテルペンアルコール類は同様の過程を経て生成された可能性がある。一方で、蒸したソバ粉には geraniol (No.68)、nerol (No.63) が存在することからソバ焼酎に直接移行することも考えられる<sup>86)</sup>。ソバ焼酎の linalool (No.44) は、geraniol (No.68) が醪中の酸 (クエン酸等) と蒸留で発生した熱の影響により生成したと考えられる<sup>17)</sup>。そのため、今回ソバ焼酎で geraniol (No.68) が検出されなかったのは linalool (No.44) へほとんど変換したためと考えられる。

米を使用する泡盛についてもモノテルペンアルコール類の存在が報告されている<sup>79)</sup>。蒸したソバ粉と同様に、蒸した米にも linalool (No.44) が存在することから  $\beta$ -glucosidase の酵素反応は受けなくても生成可能と推測された。穀類の脂肪酸は linoleic acid、palmitic acid で構成され、特に linoleic acid は caproic acid の前駆体としても重要である。ソバ、米および麦焼酎の linoleic acid (No.105) は平均 0.023mg/l であるが、エステル体の ethyl linoleate (No.98) は平均 0.240mg/l と約 10 倍であった。これは醪中の高級脂肪酸とエタノールがエステラーゼによってエステル化反応を引き起こすと推測される。このようにほとんどの高級脂肪酸はエステル化によりエステル化合物に生成されていると考えられる。

## 第5節 小括

ソバ、米および麦焼酎を PorapackQ 濃縮、pH による抽出分別法を用いて GC および GC/MS 分析を行い、それぞれ 86 種類、81 種類、84 種を同定および定量した。その中で新規の揮発性成分はソバ焼酎 29 種類、米焼酎 23 種類、麦焼酎 29 種類をそれぞれ同定した。

ソバ、米焼酎の ethyl caproate (No.16)、ethyl caprylate (No.32) および ethyl caprate (No.51) とそのカルボン酸含量にはエステル化反応によると考えられる相関性が認められた。しかし、麦焼酎には認められなかった。

テルペン類の linalool (No.44)、citoronerol (No.61)、nerol (No.63)、nerolidol (No.76) および trans,trans-farnesol (No.91) と米焼酎のみであるが  $\alpha$ -terpineol (No.56) を、米、麦焼酎で garaniol (No.68) を甘藷焼酎以外から初めて同定した。

# 第3章 臭い嗅ぎ GC (GC-O) を用いた穀類本格焼酎の香気寄与成分の検討とソバ焼酎の特徴香の探索

## 第1節 序論

第2章ではソバ、米および麦焼酎の揮発性成分を同定し、低沸点アルコール類の含有量比により、ソバ、米および麦焼酎を分類した。しかし、官能検査では味、香りに差があることは明白である。これは、高級アルコール類の結果だけでは説明出来ない。本格焼酎の香りは数多くの揮発性成分から構成されている。そのため、低濃度の揮発性成分でも、本格焼酎の香りを形成する重要な役割を担う可能性がある。また、GC クロマトグラム上の全てのピークは、匂いが認められる香気寄与成分として関与しているわけではない。さらに、香りの強さには閾値があり単純に含有量のみで香りへの貢献度を決定することは出来ない。すなわち、本格焼酎の香りの評価は分析機器のデータのみで結論づけるには早急であり、官能試験の評価を含めて判断する必要がある。これまで、本格焼酎の揮発性成分の指標は、含有量の多さや清酒に代表されるアルコール飲料で芳香とされた揮発性成分を用いてきた。しかし、原料の異なる本格焼酎にこの指標が全て当てはまるか疑問である。近年、様々な食品で官能評価を用いた揮発性成分分析が報告されている<sup>87)88)</sup>。GC に匂い嗅ぎ装置を装着し、直接単離した揮発性成分の匂いを分析する臭い嗅ぎ GC 法 (Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O)) がある。GC-O は揮発性成分の匂いの質、強さ、個々の食品の特徴となる香りについての分析を可能とし、複雑な香りが解明できるようになった<sup>89)</sup>。このような方法を用いた例として、清酒で品質劣化成分の指標とされるムレ香成分の同定や熟成についての報告がある<sup>90)91)</sup>。また、林らは米焼酎用の酵母育種に関して、玉村らは泡盛の熟成に関して報告している<sup>92)93)</sup>。しかし、穀類本格焼酎の香気寄与成分に関する研究は少ない<sup>15)</sup>。

本論では、ソバ、米および麦焼酎の「香り」に関与する揮発性成分の分析を行った。匂いの質は GC-O を用いて、匂いの強さは香気強度検出法 (Aroma Extract Dilution Analysis



(AEDA))法でそれぞれ分析し、原料の異なる本格焼酎の香気寄与成分の解明を行った。特にソバ焼酎については、特徴香を解明するために、炎光高度検出器 (Flame photometric detector (FPD)) より高感度で、選択的に含硫化合物を検出する硫黄化学検出器 (Sulfur chemiluminescence detector (SCD)) および窒素化合物を選択的に検出する元素発光検出器 (Atomic emission detector (AED)) を用いて GC 分析を行った。

## 第2節 実験方法

### 第1項 試料調製および試薬

ソバ、米および麦焼酎の本格焼酎濃縮サンプル、pH による溶媒抽出法によって得られた、塩基性画分、フェノール性画分、中性画分および酸性画分は第2章2節7項の方法で得た。全ての試薬 (和光純薬工業 (株)、Aldrich Chem. Co.、Research Chemicals Ltd.、ICO Biomedicals Inc.、東京化成工業 (株)) は特級またはそれに準ずる試薬を用いた。

### 第2項 Gas chromatography-Olfactometry (GC-O) 法

GC は FID 検出器を装着した GC (GC18A、(株) 島津製作所製) を使用した。分離カラムは DB-WAXetr (60m×0.32mm.i.d.、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific 社製) を使用した。分離カラムには検出器側にインナーシール Y コネクター (cat.no. 1010-45030、ジーエルサイエンス (株) 製) とフューズドシリカカラム 30cm を接続し、それぞれ検出器と匂い嗅ぎ装置 (ODO-I、ジーエルサイエンス (株) 製) へ接続した。乾燥を防ぐメイクアップエア、揮発性成分の滞留を防ぐトランスファーエアはそれぞれ 90 ml/min、500 ml/min で行った。GC の分析条件は第2章2節7項と同条件で行った。(Fig. 10)

A)



B)



**Fig. 10 Analysis of cereal *Shochu* using GC-O**

A) : Olfactory test was carried out by GC equipped with olfactometer. B) : The operation of GC-O.

### 第3項 香気寄与成分分析

GC-O を用いた官能試験のパネラーは、雲海酒造（株）研究開発部で日常、本格焼酎の品質検査（官能テスト）に携わる部員3名と、ソバ製粉メーカー社員1名の協力により実施した。GC-O の分析条件は第2章2節7項と同様の方法で実施した。まず、GC モニターを見ないで匂いの有無を検討した。1名3回ずつ実施し全てのパネラーが2回以上匂いを確認したリテンションタイムを香気寄与成分とした。匂いの質は予め本論の試験とは関係ない濃縮サンプルでGC-O を行い、ワイン、食品の香気を表す代表的な用語を参考<sup>94,96)</sup>にしてパネラー間で統一した用語を作成した。香気寄与成分の匂いの質は、これらの用語のみを用いて決定した。

なお、本論ではGC分析で同定、定量した全ての成分を揮発性成分とした。さらに、GC-O を用いて匂いを確認した成分を香気寄与成分、ソバ焼酎を連想する香りの成分を特徴香と定義して以下に使用した。

### 第4項 極性の異なるカラムを用いたソバ焼酎特徴香の分析

強極性カラムはDB-WAXetr（60 m×0.32 mm.i.d.、膜厚0.25 μm、J&W Scientific 社製）を使用した。中極性カラムはRtx-225（30 m×0.32 mm.i.d.、膜厚0.25 μm、Restek Corporation 製）をインナーシールコネクタ（cat. no. 101-45026、ジーエルサイエンス（株）製）で2本を接続し60 mにして使用した。微極性カラムはDB-5（60 m×0.32 mm.i.d.、膜厚0.25 μm、J&W Scientific 社製）を用いた。それぞれのカラムはGCおよびGC-O に装着し、第2章2節7項と同条件で実施した。

### 第5項 Aroma extract dilution analysis（AEDA）法

本格焼酎濃縮サンプルはジエチルエーテルで1、4、16、64、256、1024倍に順次希釈した。各々希釈したサンプルはGC-O分析を1名3回ずつ実施し、全てのパネラーが2回以上匂いを確認した香気寄与成分はその希釈率でも匂いがあると判断した。このようにして、匂いが無くなるまで測定しFlavor dilution（FD）ファクターを決定した。FDフ

アクターnは4<sup>n</sup>希釈したサンプルを分析した結果を表している。

#### 第6項 GC-Sulfur chemiluminescence detector (GC-SCD)

検出器として硫黄化学検出装置 (SCD (MODEL355DETECTOR、Sievers Instruments, Inc. 製)) を装着した GC (HP-6890、Hewlett Packard 製) を使用した。分離カラムは DB-WAXetr (60 m×0.32 mm.i.d., 膜厚 0.25 μm, J&W Scientific 社製) を使用した。インジェクション部分はプログラマブル温度気化注入口 (Programmable temperature vaporization (PTV)) を採用し、保持温度 260°C、ホールド時間 0.00 min. の条件で使用した。カラム流量、昇温プログラムは第2章2節7項と同条件で実施した。

#### 第7項 GC- Atomic emission detector (GC-AED)

原子発光検出器 (AED (G2530A、Agilent 製)) は GC (HP-6890、Hewlett Packard 製) に装着し分析に用いた。AED の検出波長は 174 nm で窒素元素を測定した。分離カラムは CP-WAX (60 m×0.32 mm.i.d., 膜厚 0.25 μm, クロムパック社製) を使用した。カラム流量、昇温プログラムは第2章2節7項と同条件で実施した。

### 第3節 結果

#### 第1項 香気寄与成分と AEDA 法の分析

香気寄与成分は延べ 30 種類同定した。内訳はソバ、米焼酎および麦焼酎でそれぞれ 23 種類認である (Table 11)。また、この中で同定できなかった香気寄与成分は 8 種類であり、主に中高沸点に多く存在した。低沸点揮発性成分の ethyl isobutyrate (No.3)、ethyl butyrate (No.7)、unidentified (No.8)、isoamyl acetate (No.12)、isoamyl alcohol (No.15) が香気寄与成分であることが分かった。エステル系の匂いを示す香気寄与成分は 16 種類で、エステル化合物、テルペン類であった。高沸点 (No.85、No.86) で未同定のコゲ臭が認められた。含硫化合物と推測される味噌、硫黄の香りの香気寄与成分は 3 種類認め

られたが、No.36は3-ethyl-2-heptanolと同一しており含硫化合物ではなかった。

また青臭、バニラ系および医薬品系の匂いはそれぞれ1種類ずつ確認した。オイル系の匂いをもつ揮発性成分は3種類 (ethyl butyrate (No.7)、isoamyl alcohol (No.15)、ethyl lactate (No.28)) であり、低沸点から中沸点に存在する傾向であった。甘藷焼酎の特徴香であるモノテルペン類の linalool (No.44) がFD ファクター0 と低いながらも、ソバ、麦焼酎で香気寄与成分として検出された。米焼酎は第2章で同一および定量しているが香気寄与成分としては認められなかった (Table 9)。linalool (No.44) 以外のテルペン類は含有量が少ないことから香気寄与成分とは認められなかった。

AEDA 法の分析結果より、isoamyl alcohol (No.15)、phenethyl alcohol (No.73) が最も強い値 (FD ファクター4) を示した。共にアルコール化合物で含有量が非常に多いという共通点を持っていた。FD ファクター2 以上を示す揮発性成分はソバ、米および麦焼酎でそれぞれ、10 種類、7 種類、6 種類であることから、ソバ焼酎の香りは種類が多く、匂いの強度の強い揮発性成分が多いことが認められた。特に ethyl cinnamate (No.81) は米、麦焼酎で香りが検出されなかったのに対しソバ焼酎では FD ファクター2 と強く、ソバ焼酎の香りを構成する香気寄与成分の1つであると示唆された。

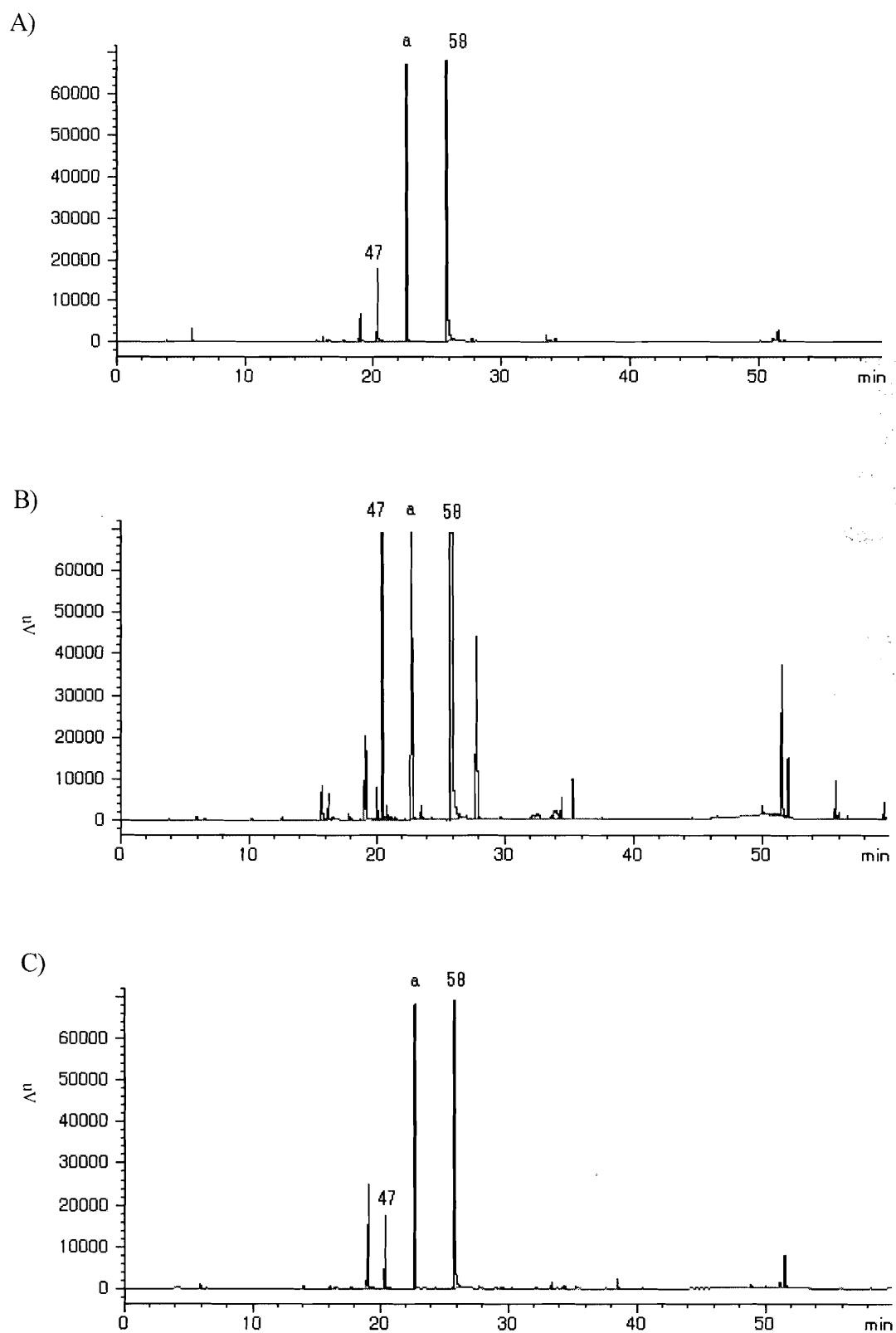
**Table 11 Aroma-active compounds (FD>0) of cereal *Shochu* detected during AEDA method**

Peak no.	Aroma compounds	Aroma quality		FD factor		
				Buckwheat	Rice	Barley
3	ethyl isobutyrate	ester	fruity	1*	1*	n.d.
7	ethyl butyrate	floral	oily	0*	0*	0*
8	unidentified	ester	green	2	2	2
12	isoamyl acetate	ester	banana	1	2	1
15	isoamyl alcohol	oily		4	4	4
16	ethyl caproate	ester	rose	0	1	2
18	3-methyl-3-buten-1-ol	floral		0*	n.d.	n.d.
28	ethyl lactate	deep fried	popcorn	0	0	1
32	ethyl caprylate	ester	adzuki bean	3	2	2
36	3-ethyl-2-heptanol	sulfurous		2	1	1
44	linalool	ester	citrus	0	n.d.	0
49	butanoic acid	ester		0	0	0
50	unidentified	musty	<i>miso</i>	0	1	0
52	1-nonanal	grassy		n.d.	n.d.	0
53	isovaleric acid	buttery	nut	3	2	2
55	diethyl succinate	ester	floral	0	0	0
58	methionol	sulfurous	<i>miso</i>	2	0	1
62	ethyl phenylacetate	ester	green	n.d.	0	0
64	$\beta$ -phenethyl acetate	ester	floral	2	1	1
66	unidentified	ester	citrus	n.d.	n.d.	0
69	unidentified	medicinal		n.d.	n.d.	1
72	unidentified	ester	floral	2	1	0
73	phenethyl alcohol	ester	floral	4	3	4
75	unidentified	vanilla	caramel	1	1	1
81	ethyl cinnamate	ester	floral	2	n.d.	n.d.
83	2-phenoxy ethanol	ester		n.d.	0	n.d.
84	1-tetradecanol	ester		n.d.	0	n.d.
85	unidentified	smoky		n.d.	n.d.	1
86	unidentified	roasty		0	2	n.d.
88	ethyl palmitate	woody	medicine	0	0	n.d.

Peak no. was the same as that of Table9. \* : newly identified, n.d. : not detected.

## 第2項 GC-SCD を用いた香気寄与成分の分析

Fig. 11 の結果より、いずれの本格焼酎からも、methylthiopropoate (No.47)、methionol (No.58) を同定した。クロマトグラムより米焼酎はソバ、麦焼酎よりピーク本数が多かった。米焼酎には、methionol (No.58) 溶出直後に1本、50min.以降に3本のピークが検出された。Table 11 より、含硫化合物を連想させる香気寄与成分は全ての本格焼酎で3種類(3-ethyl-2-heptanol (No.36)、methionol (No.58))認められた。3-ethyl-2-heptanol (No.36)、unidentified (No.50) は香気寄与成分として硫黄系の匂いが認められたが、ピークが検出されないことから含硫化合物では無いと考えられる。methylthiopropoate (No.47) と methionol (No.58) の間に、大きなピークが全ての本格焼酎でも検出された。しかし香気寄与成分としては検出されなかった。



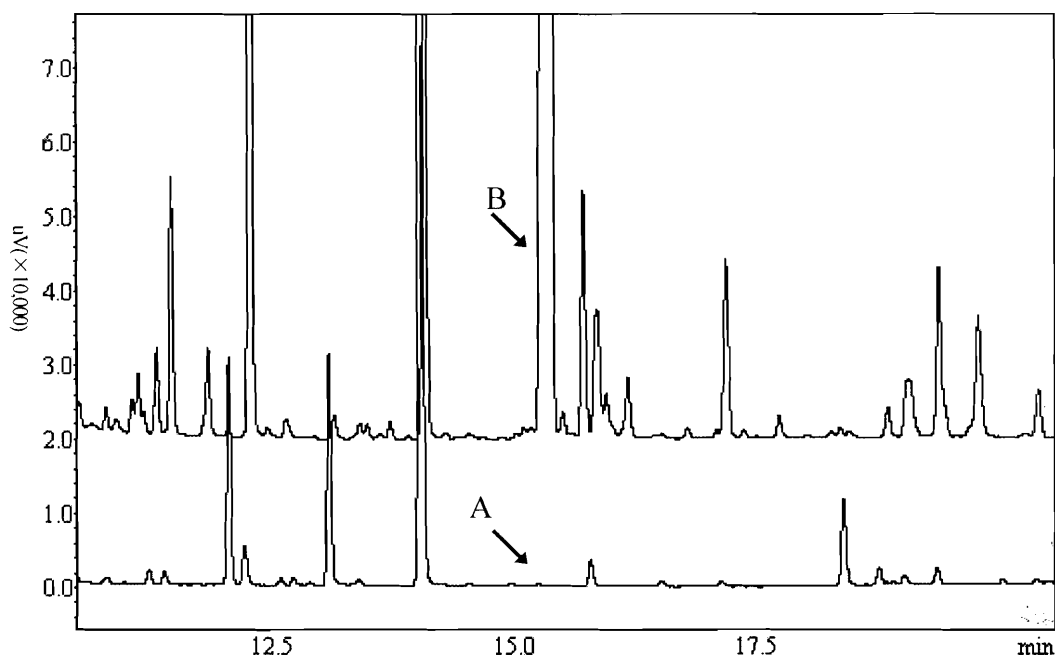
**Fig. 11 GC chromatograms of cereal *Shochu* by GC-SCD**

A): Buckwheat *Shochu*. B): Rice *Shochu*. C): Barley *Shochu*. (47): methylthiopropoate. (58): methionolethyl. a): This peak was not detected by GC-O and GC/MS.



### 第3項 ソバ焼酎の特徴香の検討

GC-O 分析の結果より、ethyl caprylate (No.32) はソバ焼酎の特徴香であることが分かった (Table 11)。しかし、ethyl caprylate (No.32) は米、麦焼酎でも検出されているが、匂いの質が異なった。ソバ焼酎の ethyl caprylate (No.32) の匂いの質はエステル香と小豆香であるが、米、麦焼酎ではエステル香のみであった。以上の結果より、ソバ焼酎の特徴香を表す ethyl caprylate (No.32) のピークは単一ではなく、他の揮発性成分が重なっていると推察された。そこで、pH による溶媒抽出法で得た塩基性画分、フェノール性画分、中性画分および酸性画分の GC-O を試みた。その結果、ソバ焼酎の特徴香は塩基性画分で検出された (Fig. 12)。中性画分の ethyl caprylate (No.32) のピークの匂いの質は米、麦焼酎と同様にエステル香のみ確認された。一方、塩基性画分は ethyl caprylate (No.32) と同じリテンションタイム 15.3 min. (以下 15.3t と省略) 付近にピークは検出されなかった。しかし、ソバ焼酎の特徴香である小豆香は認められた。また、ソバ、米および麦焼酎の中性画分の ethyl caprylate (No.32) はいずれも含有量が約 1.5 mg/l で FD ファクター 2 であるが、ソバ焼酎の塩基性画分の含有量は 0.01 mg/l 以下でありながら、FD ファクター 2 と閾値が非常に小さいことも分かった (Table 12)。米、麦焼酎の塩基性画分は、ソバ焼酎の特徴香を共に検出しなかった。



**Fig. 12 Gas chromatogram of neutral and basic fraction isolated from the Buckwheat *Shochu* by pH fractionation method**

A : Basic fraction(Fig.8(A)). Only adzukibean odor was detected.

B : Neutral fraction(Fig.8(B)). Only ester odor which similar to odor of ethyl caprylate standard, was detected.

**Table 12 Comparison of 15.3t in GC chromatogram of basic and neutral fraction isolated from cereal *Shochu* using pH fractionation method**

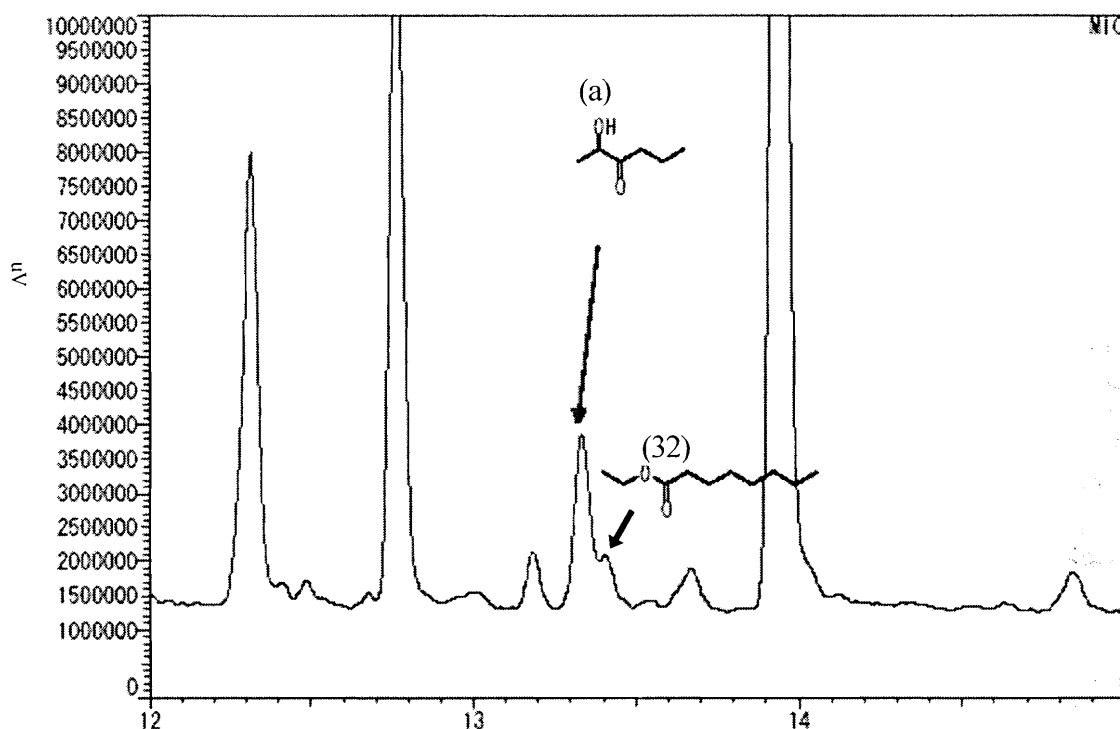
fraction	Buckwheat <i>shochu</i>		Rice <i>shochu</i>		Barley <i>shochu</i>	
	Basic	Neutral	Basic	Neutral	Basic	Neutral
Aroma quality	Adzuki bean	Ester	nd	Ester	nd	Ester
Concentration (mg/l)	tr	1.252	nd	1.686	nd	1.835
FD factor	2	2	nd	2	nd	2

15.3t indicated that retention time of GC, GC -O was 15.3min. The compounds of 15.3t of neutral fraction from buckwheat, rice and barley *shochu* was identified as ethyl caprylate. nd : not detected. tr : less than 0.01mg/ml.

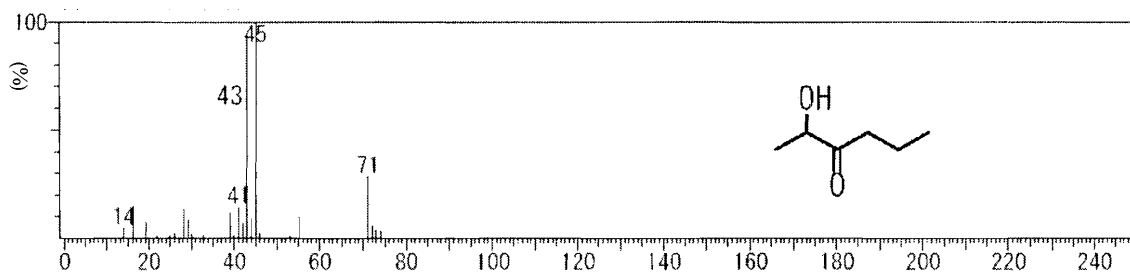
#### 第4項 GC/MS を用いた特徴香の分析

第3項の結果より、ソバ焼酎特徴香は塩基性画分に存在することが明らかとなった。そこで、ソバ焼酎の塩基性画分濃縮物について GC/MS 分析を行った。EI-MS スペクトル、CI-MS スペクトルの結果より、リテンションタイムが一致したことから 2-hydroxy-3-hexanone と同定した (Fig. 13)。2-hydroxy-3-hexanone と隣接して ethyl caprylate (No.32) も微量ではあるが同定した。Fig. 12 で特徴香と ethyl caprylate (No.32) が重なると推測しているが、本章でも同様の結果を得た。合成した 2-hydroxy-3-hexanone について GC-O 分析を行った結果、匂いの質は青臭であり、ソバ焼酎の特徴香の匂い (小豆香) とは明らかに異なっていた。この結果は、塩基性画分の 15.3t に 2-hydroxy-3-hexanone とソバ焼酎の特徴香が重なることを示唆する結果となった。

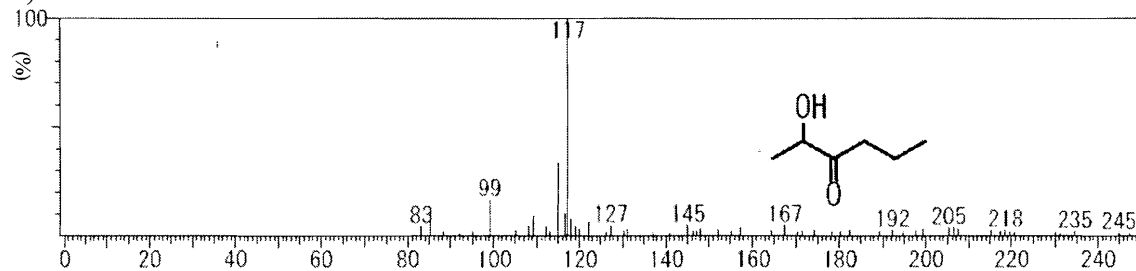
A)



B)

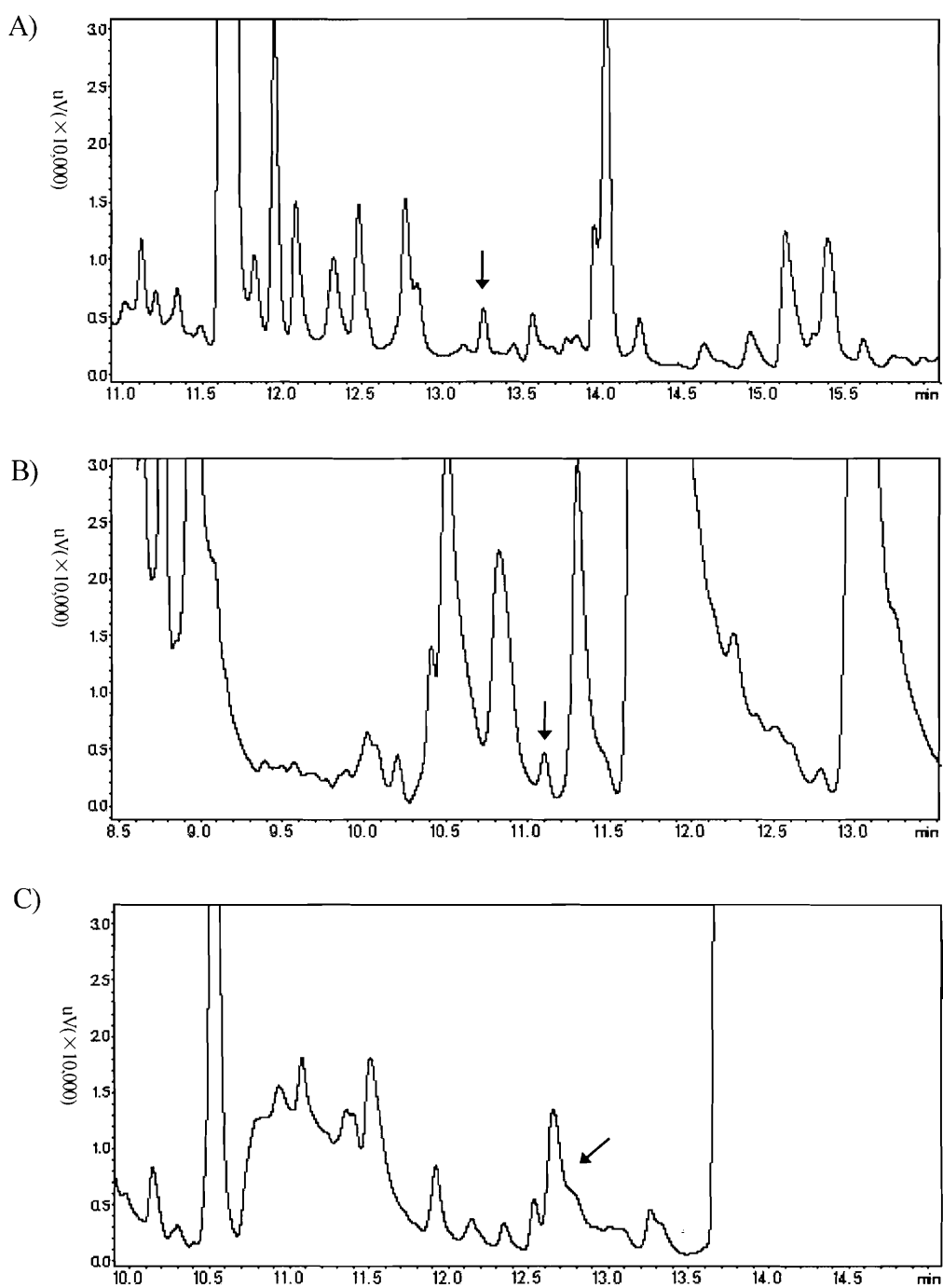


C)



**Fig. 13 Chromatogram of basic fraction in Buckwheat *Shochu* by GC/MS**

A) : Total ion chromatogram. B) : Mass spectrum of GC-EI. C) : Mass spectrum of GC-CI. (32) : ethyl caprylate. (a) : 2-hydroxy-3-hexanone.



**Fig. 14 Comparison of chracteristic flavor in Buckwheat *Shochu* by GC using variety polar column**

A) : GC Chromatogram of polar column (DB-WAXetr). B) : GC Chromatogram of middle polar column (rtx-225). C) : GC Chromatogram of nonpolar column (DB-5). Arrows were detected chracteristic flavor of Buckwheat *Shochu* by GC-O.

#### 第5項 極性の異なるカラムを用いた特徴香の分析

第4項の結果より、塩基性画分に存在するソバ焼酎の特徴香は 2-hydroxy-3-hexanone と重なる可能性が考えられた。そこで、極性の異なる（強極性、中極性、微極性）カラムを用いて特徴香と 2-hydroxy-3-hexanone の分離を試みた結果を Fig. 14 に示した。GC-O の分析結果より、強極性と中極性カラムは特徴香のピークの高さ、エリアおよび GC/MS 分析のマスペクトルが類似していることから、特徴香と 2-hydroxy-3-hexanone を分離するには至らなかった。微極性カラムは隣接するピークと重なることから有益な結果を得るには至らなかった。

#### 第6項 GC-SCD を用いた特徴香の分析

特徴香は塩基性化合物の可能性が高いことから、窒素、硫黄元素を含む揮発性成分の可能性が考えられる。そこで硫黄元素を検出する GC-SCD 分析を行った結果を Fig. 15 に示した。methionol (No.58) のみを同定した。特徴香 (15.3t) 付近でピークを検出しないことから、ソバ焼酎特徴香は含硫化合物ではないと推測した。

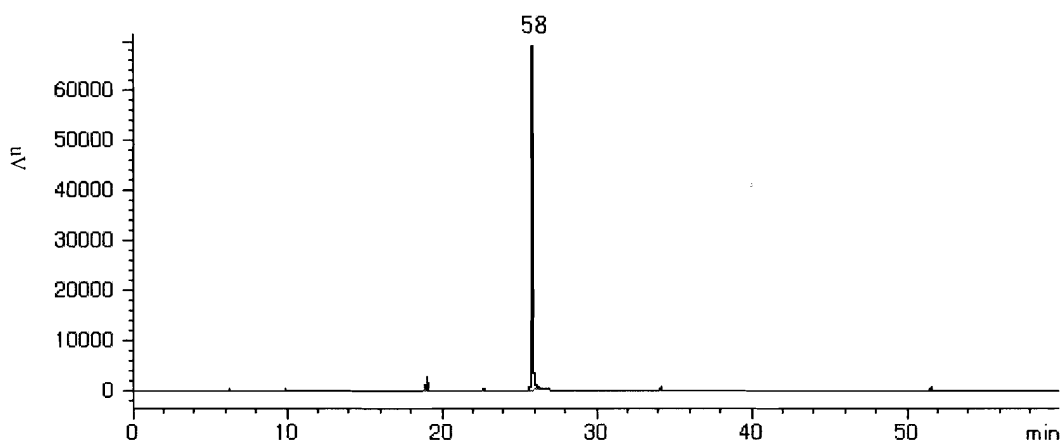
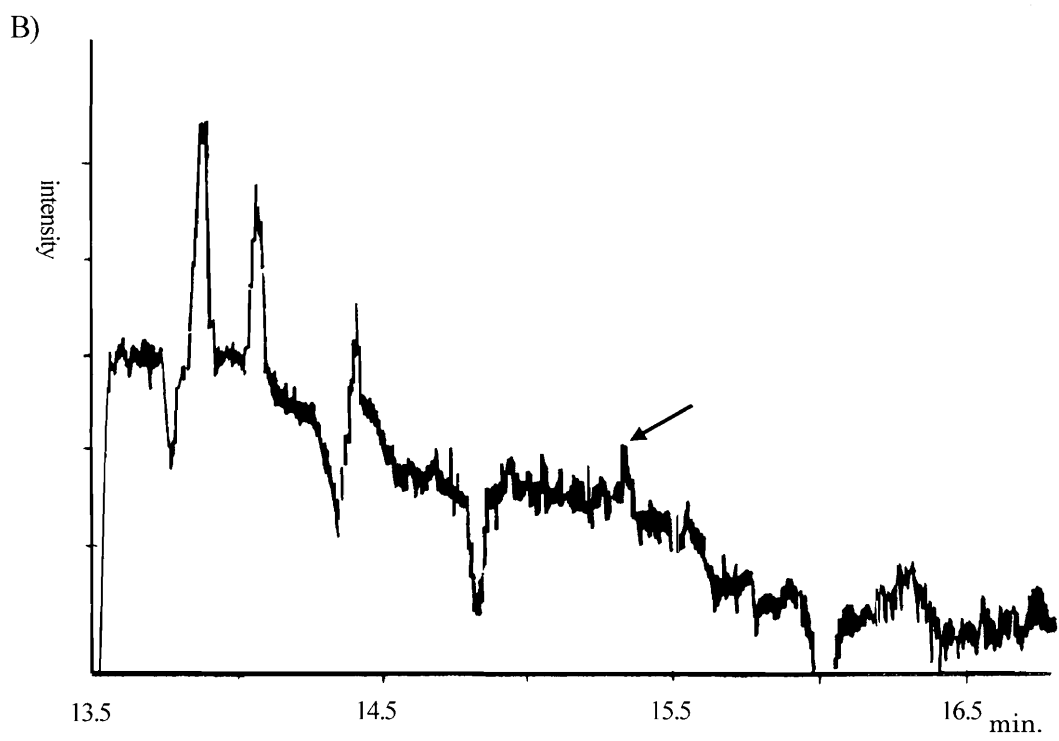
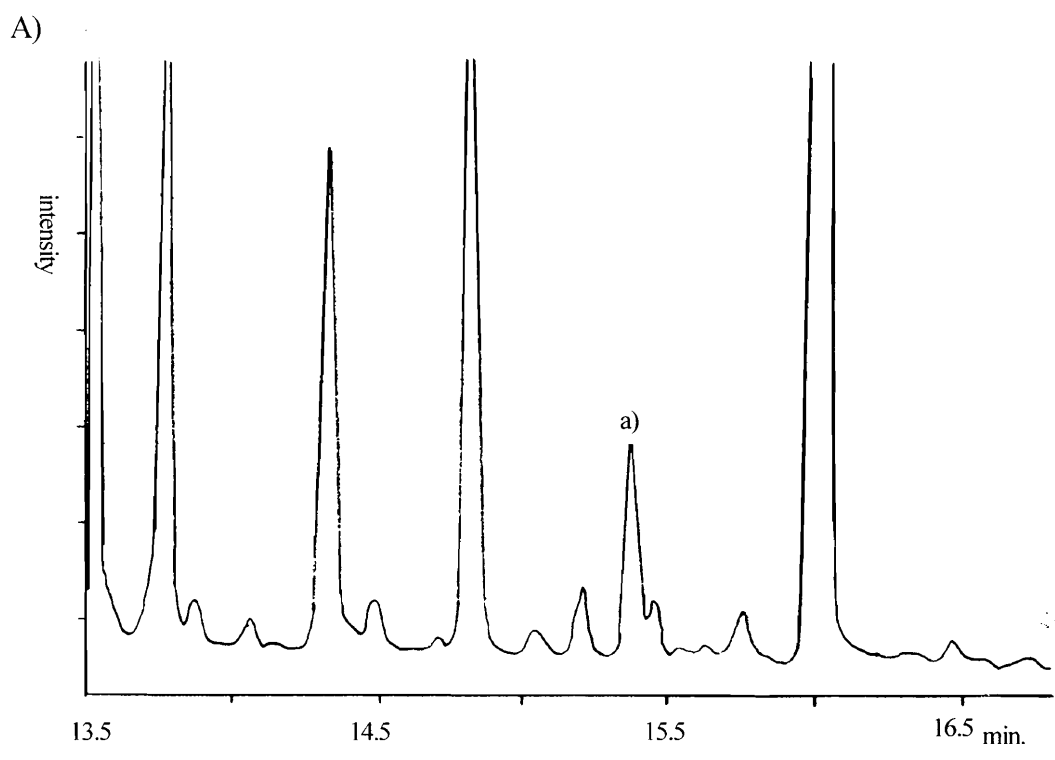


Fig. 15 GC-SCD chromatogram of basic fraction from Buckwheat *Shochu*

## 第7項 GC-AED を用いた特徴香の分析

窒素元素を検出する GC-AED 分析を行った結果を Fig. 16 に示した。GC-FID 分析で認められたソバ焼酎の特徴香のリテンションタイム付近に、僅かではあるが窒素元素反応を検出した。このピークは GC/MS 分析のマスキロマトグラム (Fig. 13) でも窒素化合物を示すマススペクトルを検出しなかったことから、非常に微量であると推測された。



**Fig. 16 Chromatogram of characteristic flavor in basic fraction isolated from buckwheat *Shochu***

A) : Chromatogram of characteristic flavor by GC-FID. B) : Chromatogram of characteristic flavor by GC-AED: Arrow indicated existence of nitrogen compounds. a) : Peak of a characteristic flavor of Buckwheat *Shochu* and 2-hydroxy-3-hexanone.



## 第4節 考察

GC-O、AEDA 法の結果より、FD ファクターが2以上と穀類本格焼酎の香りに強い影響を与える香気寄与成分は、ソバ焼酎で10種類、米焼酎で7種類、麦焼酎で6種類とソバ焼酎が最も多かった (Table 11)。また未同定の香気寄与成分を8種類確認したが中には非常に含有量の少ないものもあった。これまでのGC分析方法等では見逃されてきた揮発性成分であり、非常に微量な成分でも本格焼酎の香りとして重要であることが判明した。

ソバ粉の特徴香は *n*-hexanal、*n*-nonanal、*n*-octanal および 2-octanal 等の脂肪族アルデヒド類である<sup>97)98)</sup>。これらは果実、野菜の鮮度を示す香り (fresh green 様) として知られている<sup>99)</sup>。蒸したソバ粉や本格焼酎に *n*-hexanal、*n*-nonanal および *n*-octanal が報告されており、発酵過程で反応を受けず直接製品に移行したと推測される<sup>100)</sup>。また、ソバ焼酎で存在が認められた 1-hexanol (No.29)、2-nonanol (No.40) および *n*-octanol (No.45) は、原料に存在していた脂肪族アルデヒドが還元反応を受け生成したとも考えられる。この様にソバ粉の特徴香はソバ焼酎でも認められたが、香気寄与成分は 1-nonanal (No.52) のみでFDファクターも0と低く、匂いの質もソバ焼酎の特徴香とは明らかに異なった。

これまで甘藷焼酎でのみ報告されていた ethyl cinnamate (No.81) をソバ焼酎、米焼酎で同定した<sup>78)</sup>。特にソバ焼酎では、低濃度 (0.05 mg/l) であるがFDファクター2と低い閾値であることが明らかとなった。さらに、少ないフローラル様の中高沸点香気寄与成分であること等から、ソバ焼酎の香気寄与成分として重要であると考えられる。蒸したソバ粉に cinnamaldehyde の存在が報告されている<sup>100)</sup>。そこで醪に直接 cinnamaldehyde を添加したところ、ethyl cinnamate (No.80) 含有量が増加し、酵母の関与が明らかとなった。また米、麦原料には cinnamaldehyde が存在しないことから、ソバ焼酎の香気寄与成分 ethyl cinnamate (No.81) はソバ原料由来であることが示唆された。

ソバ焼酎ではモノテルペンアルコール類を5種類同定した (第2章)。その中で香気寄与成分は linalool (No.44) のみで、FDファクター0とソバ焼酎の香りへの貢献度は低い

結果となった。しかし、香りは多くの揮発性成分の相乗効果やマスキング効果など様々な作用のうえに成り立つことから、低い FD ファクター値であってもソバ焼酎の香りに重要であると考えられる。

Fig. 12、Table 12 より、ソバ焼酎の特徴香のピークは ethyl caprylate (No.32) および 2-hydroxy-3-hexanone と重なることが明らかになった。ほとんどの香気寄与成分は中性または酸性画分で検出されるのに対し、特徴香は塩基性画分のみに存在する。さらに、GC-AED で検出されることから、窒素元素を含む化合物の可能性が示唆された<sup>101)</sup>。GC/MS では窒素元素を含むスペクトルは検出されなかったことから、極めて微量な含有量であると推測される。AED は GC/MS より感度、選択性に優れている。本論で使用した GC/MS は 1~10 mg/l レベルは検出可能であることから、GC-AED で検出したピークはそれ以下の含有量であることが推察される。窒素化合物の閾値は極めて低く、濃度により匂いの質が異なる性質を持つ<sup>102)103)</sup>。ソバ焼酎の特徴香は閾値が低く芳香系であることから窒素化合物の可能性は十分に考えられる。今後同定を行うには、GC/MS 分析が可能な含有量を確保するため前処理法を検討する必要がある。

本格焼酎は揮発性成分の含有量で、香りの重要性が述べられてきた。しかし、香りの強さは必ずしも含有量に比例しない。また、濃度により香りの質が変化する揮発性成分も存在する。少ない含有量でも香りとして重要な揮発性成分も存在することを明らかにし、官能試験の重要性が再認できたと考えられる。

## 第5節 小括

GC-O を用いた官能試験の結果、香気寄与成分としてソバ、米および麦焼酎にそれぞれ 23 種類認められた。

ethyl cinnamate (No.80) はソバ焼酎のみで確認され、低濃度でありながら FD ファクター2 であること、フローラル様の匂いであること等から、ソバ焼酎の香りを構成する

重要な香気寄与成分であることが認められた。

ほとんどの香気寄与成分は中性または酸性画分で検出されるのに対し、ソバ焼酎の特徴香は塩基性化合物であることが示唆された。さらに、GC-AED 分析の結果、窒素元素を含む化合物であること推測された。

## 第4章 含み香測定装置 (RAS) を用いた穀類本格焼酎の含み香と立ち香分析

### 第1節 序論

本格焼酎を飲用する際、まずグラスを鼻に近づけ本格焼酎の香りを認知し (立ち香)、次に口に含み、口腔内で香り (含み香) および味を認知している。立ち香 (orthonasal aroma) と含み香 (retronasal aroma) の違いはきき酒で認識されていたにも関わらず、科学的に解明されていない。これは口腔内を再現することが困難であるためと考えられた。Robertsらは口腔内を模した装置Retronasal aroma simulator (RAS)について報告した<sup>22)23)</sup>。RASは口腔内の唾液量 (成分)、咀嚼、呼吸量および温度を再現しており、様々な食品の揮発性成分の放散について分析可能となった。そこで、口腔内における本格焼酎揮発性成分の放散を再現可能な装置についてRASを参考に検討した。RASで発生した揮発性成分の吸着剤としては、アルコール飲料および清涼飲料の揮発性成分分析で多くの報告があるsolid phase micro extraction (SPME)ファイバーを採用した (Fig. 17)。SPME法は1990年、Pawliszynにより開発されたクロマト分析用の試料抽出、濃縮および導入用調整法である<sup>104)</sup>。揮発性成分はポリマー液相でコーティングしたフューズドシリカファイバー (Coated SPME fused silica faiber : Fig. 17) を試料中に露出する事で、試料マトリックス/液相間の分配作用により分配平衡に到達するまで、ファイバー液相に吸着される。その後、ファイバーは加熱したGCインジェクションポート内に露出する事で、吸着している揮発性成分は迅速に熱脱離し、キャリアガスにより分析用キャピラリーカラムに移送され分離後、検出器で測定される。これは代表的な濃縮法である溶媒抽出法および固相抽出法等と比較して、有機溶媒を必要とせず操作方法が簡易である利点がある。さらに、ファイバー抽出相は9種類揃っており、様々な試料濃縮に対応可能なことから急速に活用され始めた<sup>105-108)</sup>。ethyl caproate、ethyl caprylate等の中級脂肪酸エチルエステル類は本格焼酎の香りに重要である<sup>109)</sup>。一方で、ethyl palmitate、ethyl stearate、ethyl oleate

および ethyl linoleate 等の高級脂肪酸エチルエステル類は酸化によって、本格焼酎の品質劣化の指標とされる油臭の原因物質となる。そのため、高級脂肪酸エチルエステル類は製造過程でほとんど除去される<sup>28)</sup>。口腔内における揮発性成分の放散抑制に、タンパク質、脂質等の疎水性化合物の関与が報告されており<sup>22)110-112)</sup>、本格焼酎に多量に含まれる高級脂肪酸エチルエステル類も疎水性化合物であることから考慮する必要がある。

本章では、RAS を用いた本格焼酎の測定に最適な SPME ファイバーの検討を行った。さらに、RAS を用いてソバ、米および麦焼酎の含み香と立ち香の測定を試みた。また、唾液成分と高級脂肪酸エチルエステル含量は本格焼酎の揮発性成分の放散にどのような影響を与えるのか、本格焼酎の主要香気寄与成分である中級脂肪酸エチルエステル類のモデル溶液を用いて分析を行った。

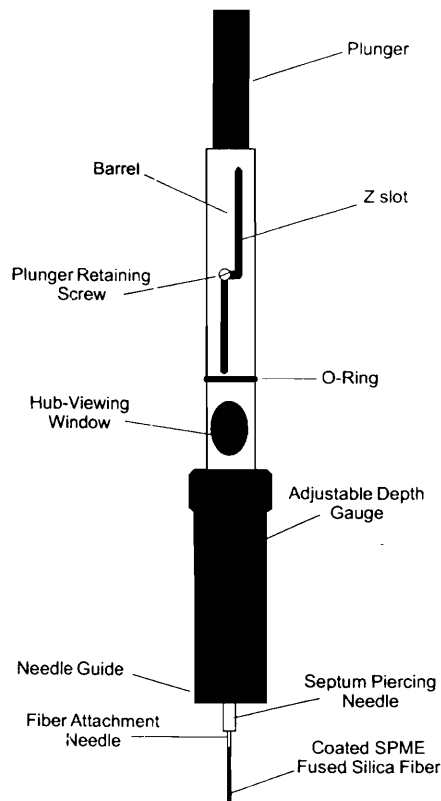


Fig. 17 SPME fiber manual holder

## 第2節 実験方法

### 第1項 実験試薬及び材料

今回使用した全ての試薬（和光純薬工業（株）、Aldrich Chem. Co.、Research Chemicals Ltd.、ICO Biomedicals Inc.、東京化成工業（株））は特級またはそれに準ずるものを用いた。 $\alpha$ -アミラーゼ（シグマ社製）はブタ膵臓由来のものを用いた。ムチン（和光純薬工業（株））はブタ胃由来のものを用いた。

### 第2項 ソバ、米および麦焼酎の調製

それぞれの本格焼酎は第2章2節と同法で調製した。得られた本格焼酎原酒はガス抜きのために12時間の攪拌を行った。さらに2°C、24時間静置後、5Aろ紙（東洋濾紙（株）製）を装着したオムニテストフィルター（T-185、（有）塚本鑛吉商店製）に本格焼酎原酒を加え窒素ガスで加圧しながら冷却ろ過を行った。ろ液は以下の実験に用いた。なお、全ての作業は2°Cで行った。

### 第3項 Retronasal aroma simulator (RAS) の作成

Fig. 18 に RAS の概略図を示した。ムエンケ式ねじ口洗浄瓶 1L の中管入口とフローメーター（東京計装（株）製）はシリコンチューブで接続した。また、フローメーターと窒素ガスボンベもシリコンチューブで接続した。さらに中管出口と SPME 固定台（Fiber receiver）もシリコンチューブで接続した。ねじ口洗浄瓶の温度はウォーターバスで制御した。攪拌はスターラー（UM-24G、小池精密機器製作所製）を設置して以下の実験に使用した。

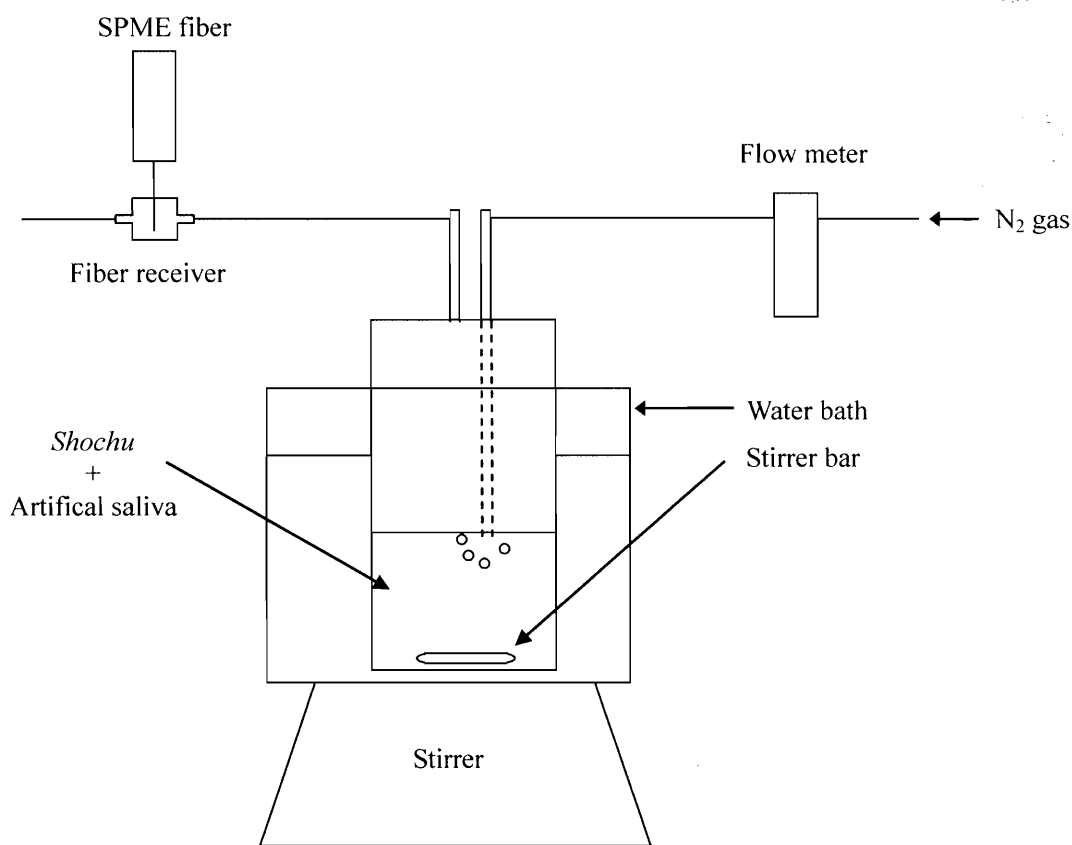


Fig. 18 Diagram of retronasal aroma simulator (RAS)

#### 第4項 人工唾液の調製

人工唾液は Odake らの方法を一部改変し、Table 13 に示した人工唾液の成分を用いて作成した<sup>113)</sup>。すなわち、本格焼酎またはモデル溶液に蒸留水 (D.W.) のみ添加したものを std 区分とした。WS 区分は D.W. と塩類、すなわち  $\text{NaHCO}_3$  5.208 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.369 g、 $\text{NaCl}$  0.877 g、 $\text{KCl}$  0.477 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.441 g を D.W. に溶解後、全量を D.W. で 1,000 ml に調製した。WSM 区分は D.W.、塩類およびムチンで構成されている。すなわち WS 区分と同様の方法で予め溶解した塩類溶液でムチン 2.000 g を溶解後、D.W. で全量を 1,000 ml に調製した。WSA 区分は D.W.、塩類および  $\alpha$ -アミラーゼで構成されている。すなわち、予め溶解した塩類溶液で  $\alpha$ -アミラーゼ 0.080 g を溶解後、D.W. で全量を 1,000 ml に調製した。WSAM 区分は D.W.、塩類、ムチンおよび  $\alpha$ -アミラーゼで構成されている。すなわち、予め溶解した塩類溶液にムチン 2.000 g、 $\alpha$ -アミラーゼ 0.080 g の順で溶解後、D.W. で全量を 1,000 ml に調製した。std 区分以外の区分については、1M HCl で pH 7.0 に調製した後に D.W. で全量を 1,000 ml にした。

**Table 13 Artificial saliva composition**

Substrate	std	WS	WSM	WSA	WSAM
salts	-	+	+	+	+
mucin	-	-	+	-	+
$\alpha$ -amylase	-	-	-	+	+
D.W.	+	+	+	+	+

W : D.W. S : salts. M : mucin. A :  $\alpha$ -amylase. salts :  $\text{NaHCO}_3$  5.208 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1.369 g,  $\text{NaCl}$  0.877 g,  $\text{KCl}$  0.477 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.441 g. + : added. - : not added.



## 第5項 Solid phase micro extraction (SPME) ファイバーの検討

SPME ファイバー (スペルコ社製) は9種類市販しているが、本研究では液体専用ファイバー1本を除く8種類で分析を実施した (Table 14)。ファイバーのコンディショニングはGCインジェクションポートにおいて、PDMS、PDMSaおよびCW/DVBは250°C、1時間の条件で行った。以下同様に、PDMSbは320°C、4時間、PDMS/DVBは260°C、1時間、PACは300°C、2時間、CAR/PDMSは280°C、1時間、DVB/CAR/PDMSは270°C、4時間の条件でそれぞれ実施した。測定方法は、ソバ焼酎原酒をエタノール濃度25% (v/v) になるようにD.W.で希釈した本格焼酎サンプル400 mlをねじ口洗浄瓶に添加し、37°C、3分間予備攪拌した。攪拌終了後、窒素ガス流量20 ml/s、攪拌速度1350 rpm、37°CでSPMEファイバーを露出して揮発性成分を10分間吸着させた。吸着終了後、SPMEファイバーはGC分析に供した。1つのファイバーにつき測定は5連で行った。

**Table 14 SPME fiber**

Stationary phase	coating ( $\mu$ m)	abbreviation
Polydimethylsiloxane	100	PDMS
Polydimethylsiloxane	30	PDMSa
Polydimethylsiloxane	7	PDMSb
Polydimethylsiloxane/divinylbenzene	65	PDMS/DVB
polyacrylate	85	PAC
Carboxen/polydimethylsiloxane	75	CAR/PDMS
Carbowax/divinylbenzene	70	CW/DVB
Divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane	50/30	DVB/CAR/PDMS

## 第6項 RAS を用いた本格焼酎の揮発性成分分析

第2項で得たソバ、米および麦焼酎原酒はエタノール濃度25% (v/v) にD.W.で希釈した。希釈した本格焼酎サンプル400 mlは、希釈による揮発性成分の放散を防ぐため実験ごとに調整した。RASの条件はRobertsらの方法を一部改変して用いた<sup>22)23)</sup>。すなわち、該当するD.W.のみ、または、Table 13に示した人工唾液成分のいずれかの区分100 mlをねじ口洗浄瓶に添加し、37°C、3分間予備攪拌した。攪拌終了後、本格焼酎サンプル

400 ml は予め D.W.または人工唾液成分を添加したねじ口洗浄瓶に加え、窒素ガス流量 20 ml/s、攪拌速度 1350 rpm、温度 37°Cで SPME ファイバーを SPME 固定台にセットした。SPME はファイバーが露出するまでプランジャー (plunger) を押し下げた (Fig. 18)。ストッパー部の保持用ネジ (plunger retaining screw) が Z 型スロット (Z slot) の水平部分左側 (ストッパー部) になるようにプランジャーを時計回りに回転させた状態で揮発性成分を 10 分間吸着させた。吸着終了後、プランジャーを反時計方法に回してストッパーを収納した。そして SPME ファイバーは、速やかに GC および GC/MS 分析に使用した。

#### 第 7 項 中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液と高級脂肪酸エチルエステル溶液の調製

ethyl caproate、ethyl caprylate、ethyl caprate、ethyl laurate および ethyl myristate をそれぞれ 0.25 mg/l になるように 400 ml の 25%エタノール溶液に溶解した混合液を中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液とした。また、ethyl palmitate、ethyl stearate、ethyl oleate および ethyl linolate を等濃度になるように 99.5%エタノールに溶解した混合液を高級脂肪酸エチルエステル溶液とした。この混合液は、目的の濃度になるように中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液 400 ml に添加して用いた。

#### 第 8 項 RAS による中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液の分析

中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液 400 ml は、第 6 項と同様の方法で測定を実施した。すなわち、該当する D.W.のみ、または、Table 13 に示した人工唾液成分のいずれかの区分 100 ml をねじ口洗浄瓶に添加し、37°C、3 分間予備攪拌した。攪拌終了後、中級脂肪酸エチルエステルモデル溶液 400 ml を、予め D.W.または人工唾液成分の入ったねじ口洗浄瓶に加え、窒素ガス流量 20 ml/s、攪拌速度 1350 rpm、温度 37°Cで SPME ファイバーを露出して揮発性成分を 10 分間吸着させた、吸着終了後、SPME ファイバーは GC および GC/MS で分析を行った。

## 第9項 GC およびGC/MS の分析条件

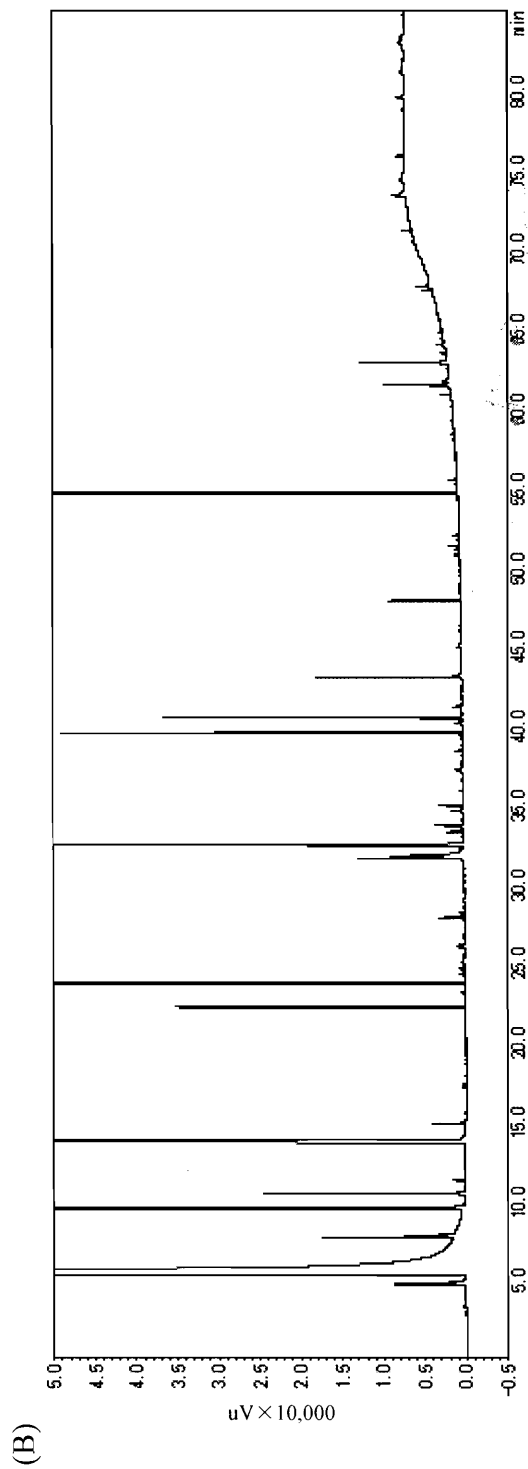
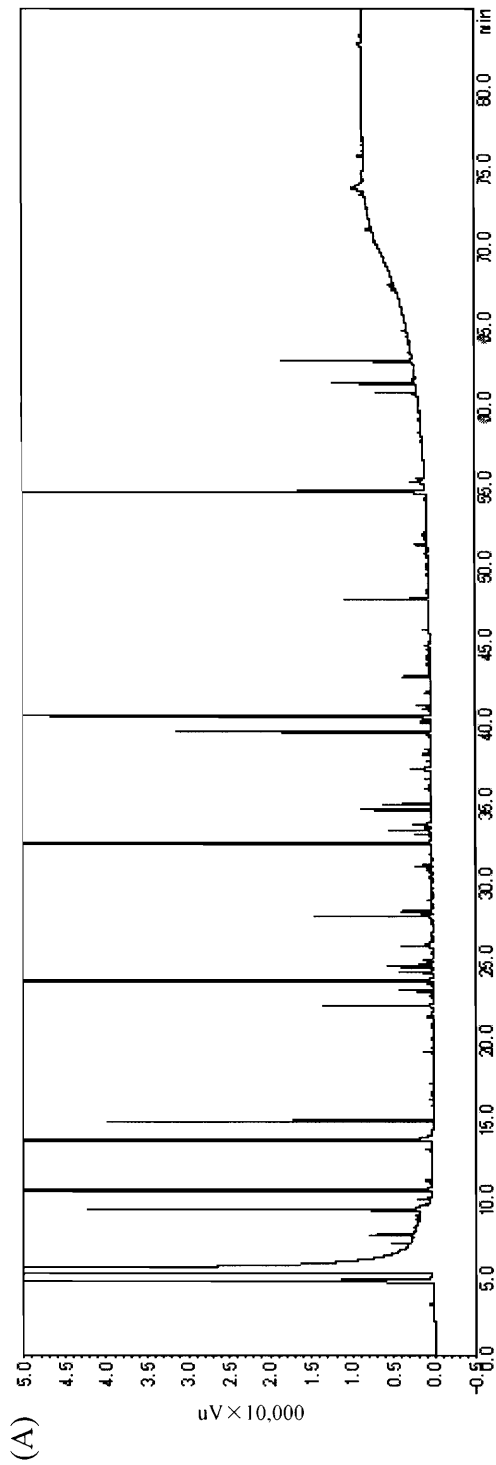
RAS で発生する揮発性成分の同定および定量に使用した装置はFID を装備したGC を用いた。キャリアガス (He) 圧 150 kpa、カラム温度は40°Cから 240°Cまで 3°C/min で昇温後 34 分間保持した。分離カラムは DB-WAXetr (60 m×0.32 mm i.d.、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific 社製) を使用した。SPME 用ガラスインサート (cat.no. 2633905、スペルコ社製) を装着した GC インジェクションポートの温度は 240°C、検出器の温度は 260°Cとした。SPME ファイバーはファイバーを収納したままで GC インジェクションポートのセプタムにセプタム貫通針 (septum piercing needle) を通し、ニードルガイド (needle guide) 端がセプタムナットに当たるまでホルダーを押し下げた (Fig. 18)。次にプランジャー (plunger) をストッパーの位置まで押し下げた。プランジャーを時計回りに回転させ、ストッパー部の保持用ネジ (plunger retaining screw) を動かして Z 型スロット (Z slot) 水平部分左側に位置させた。この状態で 10 分間ファイバーに吸着した揮発性成分を脱離させた。引き続き、ファイバーに揮発性成分が残存しないように、5 分間、スプリット比 1:10 でクリーニングを行った。GC/MS はイオン化電圧 70eV で測定した。分離カラムは DB-WAXetr (60 m×0.25 mm i.d.、膜厚 0.25 μm、J&W Scientific 社製) を使用した。他の条件は第2章2節7項の GC 分析と同様に実施した。

## 第3節 結果

### 第1項 SPME ファイバーの検討

Table 14 に示した 8 種類の SPME ファイバーについて GC 分析した。Fig. 19 には PDMS と PDMSa のクロマトグラムを示した。PDMS、PDMSa および PDMSb は、ほぼ同数のピークが出現したが、PDMS と比較すると、PDMSa はリテンションタイム 20~30min. にかけてピーク面積が小さかった。また、PDMSb は全体的にピーク高が低かった。PDMS のピーク面積の変動係数は 15%以下であるのに対し、PDMS/DVB および DVB/CAR/PDMS は 30%以上のピーク面積が多かった。PAC、CAR/PDMS は他のファイ

バーと比較してベースラインが安定しなかった。CAR/PDMS はリテンションタイム 45min.以降のピーク高が低かった。以上の結果から PDMS が最も適していると判断した。



**Fig. 19 Comparison of SPME fiber using RAS**  
 (A) : PDMS, (B) : PDMSa.

**Table 15 Identified volatile compounds from buckwheat *Shochu***

Peak no.	Compounds	Retention time	Peak area ( $\mu V \times 1000$ )				
			std	WS	WSM	WSA	WSAM
X	ethyl acetate	4.6	149.7	227.7	155.2	287.0	304.9
2	ethyl alcohol	5.3	18801.1	14120.0	9657.0	22212.4	19404.0
3	ethyl isobutyrate	5.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	<i>n</i> -propyl alcohol	7.5	29.1	34.7	24.5	47.2	30.2
11	isobutyl alcohol	9.0	117.2	153.3	117.2	211.1	137.7
12	isoamyl acetate	10.2	937.3	1028.3	849.8	978.4	1008.9
15	isoamyl alcohol	13.3	1546.9	1865.8	1520.4	2313.6	1717.2
16	ethyl caproate	14.5	121.5	129.6	112.7	120.7	121.6
29	1-hexanol	18.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	ethyl caprylate	23.3	1329.2	1356.8	1254.5	804.6	515.0
38	ethyl hexanol	25.6	5.1	5.0	4.9	6.5	4.6
40	2-nonanol	26.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
43	ethyl <i>n</i> -nonanoate	26.9	19.0	17.4	16.8	5.9	tr
44	linalool	27.3	n.d.	tr	tr	n.d.	tr
46	isobutyric acid	29.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
51	ethyl caprate	32.0	1981.1	1887.9	1623.3	127.8	21.3
52	1-nonanal	32.8	29.7	29.0	23.8	5.1	tr
56	$\alpha$ -terpineol	34.4	38.4	35.7	34.9	37.6	35.7
62	ethyl phenylacetate	36.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
63	nerol	37.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
64	$\beta$ -phenethyl acetate	38.9	139.8	128.0	128.0	142.9	139.5
67	ethyl laurate	39.1	407.5	380.2	222.3	5.2	tr
73	$\beta$ -phenethyl alcohol	41.4	15.4	14.7	13.7	20.9	18.9
77	ethyl myristate	46.5	81.2	76.5	29.9	5.8	6.3
81	ethyl cinnamate	49.1	tr	tr	tr	tr	tr
88	ethyl palmitate	53.3	281.1	236.2	109.7	72.7	51.1
90	capric acid	53.5	5.8	5.3	n.d.	tr	4.9
95	ethyl stearate	59.6	7.9	tr	n.d.	18.4	15.1
97	ethyl oleate	60.1	34.5	16.6	16.3	53.3	72.5
98	ethyl linoleate	61.5	85.4	46.0	38.0	15.0	20.6

Peak no. indicated the same as that of Table 9. Peak no. X identified using the RAS. n.d. : not detected. tr : less than 4.0. std : *Shochu*+D.W. WS : std.+salts+D.W. WSM : WS+mucin. WSA : WS+ $\alpha$ -amylase. WSAM : WSA+mucin.

**Table 16 Identified volatile compounds from rice *Shochu***

Peak no.	Compounds	Retention time	Peak area ( $\mu V \times 1000$ )				
			std	WS	WSM	WSA	WSAM
X	ethyl acetate	4.6	426.1	135.1	408.9	433.6	273.8
2	ethyl alcohol	5.3	22715.3	13830.7	24578.0	40284.5	17599.4
3	ethyl isobutyrate	5.7	7.2	tr	6.4	7.0	5.9
6	<i>n</i> -propyl alcohol	7.5	64.2	26.6	40.9	53.4	34.9
11	isobutyl alcohol	9.0	306.1	101.2	278.9	420.6	252.1
12	isoamyl acetate	10.2	974.5	634.1	1019.9	1303.7	958.3
15	isoamyl alcohol	13.3	2034.2	1035.8	1914.1	2724.8	1796.0
16	ethyl caproate	14.5	259.4	218.7	263.0	329.3	244.1
29	1-hexanol	18.8	4.8	4.4	4.7	4.2	tr
32	ethyl caprylate	23.3	4851.0	4389.8	4537.2	3777.5	2249.5
38	ethyl hexanol	25.6	10.9	9.8	9.2	4.2	11.7
40	2-nonanol	26.3	8.0	6.6	6.8	tr	tr
43	ethyl <i>n</i> -nonanoate	26.9	163.2	147.2	146.5	37.5	20.3
44	linalool	27.3	37.5	34.1	34.4	10.4	8.7
46	isobutyric acid	29.8	4.7	4.1	4.4	tr	tr
51	ethyl caprate	32.0	15795.7	14376.7	13773.1	749.5	362.2
52	1-nonanal	32.8	5.2	4.5	4.6	4.9	4.3
56	$\alpha$ -terpineol	34.4	39.3	39.4	34.1	38.8	38.6
62	ethyl phenylacetate	36.8	tr	n.d.	tr	n.d.	n.d.
63	nerol	37.4	tr	n.d.	tr	n.d.	n.d.
64	$\beta$ -phenethyl acetate	38.9	136.7	125.1	127.5	138.8	132.3
67	ethyl laurate	39.1	4926.0	4144.1	2909.6	19.9	38.7
73	$\beta$ -phenethyl alcohol	41.4	20.5	15.5	21.3	14.1	18.9
77	ethyl myristate	46.5	1353.8	956.1	471.0	16.0	26.0
81	ethyl cinnamate	49.1	tr	n.d.	tr	n.d.	n.d.
88	ethyl palmitate	53.3	177.1	138.7	116.6	58.4	53.1
90	capric acid	53.5	9.6	9.9	6.7	5.2	5.3
95	ethyl stearate	59.6	4.8	tr	5.0	12.8	5.7
97	ethyl oleate	60.1	28.8	14.6	20.6	66.2	57.2
98	ethyl linoleate	61.5	71.0	39.8	43.9	10.2	18.3

Peak no. indicated the same as that of Table 9. Peak no. X identified using the RAS. n.d. : not detected. tr : less than 4.0. std : *Shochu*+D.W. WS : std.+salts+D.W. WSM : WS+mucin. WSA : WS+ $\alpha$ -amylase. WSAM : WSA+mucin.

**Table 17 Identified volatile compounds from barley *Shochu***

Peak no.	Compounds	Retention time	Peak area ( $\mu V \times 1000$ )				
			std	WS	WSM	WSA	WSAM
X	ethyl acetate	4.6	488.2	199.9	265.1	458.1	520.5
2	ethyl alcohol	5.3	20617.3	8596.5	11321.5	18561.2	11321.5
3	ethyl isobutyrate	5.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	<i>n</i> -propyl alcohol	7.5	63.3	26.0	45.9	48.1	44.4
11	isobutyl alcohol	9.0	247.3	114.9	117.6	192.1	240.3
12	isoamyl acetate	10.2	1163.3	872.3	827.0	1089.9	1207.3
15	isoamyl alcohol	13.3	2150.6	1437.1	1407.3	2357.6	2363.3
16	ethyl caproate	14.5	177.1	162.0	130.7	158.5	174.0
29	1-hexanol	18.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
32	ethyl caprylate	23.3	4095.1	3770.1	3990.5	2163.7	1736.7
38	ethyl hexanol	25.6	14.6	13.1	14.8	12.1	13.2
40	2-nonanol	26.3	tr	tr	8.3	n.d.	n.d.
43	ethyl <i>n</i> -nonanoate	26.9	84.5	75.5	80.7	18.0	7.9
44	linalool	27.3	44.3	35.0	42.2	9.8	11.0
46	isobutyric acid	29.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
51	ethyl caprate	32.0	15131.3	13412.5	14005.6	798.6	223.7
52	1-nonanal	32.8	398.2	343.8	347.4	11.4	9.3
56	$\alpha$ -terpineol	34.4	39.9	35.9	41.0	34.3	40.5
62	ethyl phenylacetate	36.8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
63	nerol	37.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
64	$\beta$ -phenethyl acetate	38.9	163.5	146.5	167.1	132.5	163.5
67	ethyl laurate	39.1	3743.7	3176.4	2703.9	19.2	21.8
73	$\beta$ -phenethyl alcohol	41.4	22.0	20.2	23.6	17.5	23.2
77	ethyl myristate	46.5	775.2	653.0	475.7	13.7	17.7
81	ethyl cinnamate	49.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
88	ethyl palmitate	53.3	105.8	73.4	98.6	40.3	40.6
90	capric acid	53.5	5.5	4.9	4.2	4.3	4.6
95	ethyl stearate	59.6	4.9	tr	tr	8.3	8.1
97	ethyl oleate	60.1	9.5	7.4	13.6	67.5	54.4
98	ethyl linoleate	61.5	100.1	88.2	62.2	19.0	37.2

Peak no. indicated the same as that of Table 9. Peak no. X identified using the RAS. n.d. : not detected. tr : less than 4.0. std : *Shochu*+D.W. WS : std.+salts+D.W. WSM : WS+mucin. WSA : WS+ $\alpha$ -amylase. WSAM : WSA+mucin



## 第2項 RAS を用いたソバ、米および麦焼酎の含み香測定

揮発性成分は、含み香を表す WSAM 区分において、ソバ焼酎では 24 種類、米焼酎では 27 種類、麦焼酎では 23 種類をそれぞれ同定した (Table 15-17)。得られたソバ焼酎の揮発性成分はエステル 15 種類、アルコール 8 種類、有機酸 1 種類に分類できた。米焼酎については、エステル 15 種類、アルコール 10 種類、有機酸 2 種類に分類できた。また、麦焼酎については、エステル 14 種類、アルコール 8 種類、有機酸 1 種類に分類できた。ethyl acetate (No.X) は第 2 章で定量出来なかったが、本章では定量できたことから、リストに加えた。ソバ、米および麦焼酎 std 区分において、ethyl alcohol (No.2) を除く isoamyl alcohol (No.15)、ethyl caprylate (No.32)、ethyl caprate (No.51)、isoamyl acetate (No.12) および ethyl laurate (No.67) のピーク面積は、全ピーク面積の 1% 以上をそれぞれ示した (Table 15)。さらに、ethyl palmitate (No.88) はソバ焼酎 std 区分のみで、ethyl myristate (No.77) は米および麦焼酎の std 区分のみで、ピーク面積が全ピーク面積の 1% 以上をそれぞれ示した。第 3 章で明らかとなった、ソバ焼酎の香気寄与成分 ethyl cinnamate (No.81) は、ソバ焼酎の全ての区分で同定した。しかし、米焼酎は WS 区分、WSA 区分および WSAM 区分で検出されなかった。また麦焼酎は全ての区分で未検出であった。ソバ焼酎の std 区分と WSAM 区分のピーク面積を比較すると、ethyl caprate (No.51) および ethyl laurate (No.67) が約 1/90 と著しく減少した。また、ethyl myristate (No.77) も約 1/13 へと減少した (Table 15)。同様の傾向は米、麦焼酎でも認められた (Table 16,17)。std 区分と  $\alpha$ -アミラーゼと塩類を含む WSA 区分のピーク面積を比較すると、ethyl caprate (No.51) が約 1/15、ethyl laurate (No.67) が約 1/80 そして ethyl myristate (No.77) が約 1/13 と WSAM 区分と同様に減少した。米および麦焼酎の ethyl laurate (No.67) については、全ての区分の中で、WSM 区分のピーク面積が最も少なかった。一方、ムチンと塩類を含む WSM 区分は WSAM 区分のピーク面積のような著しい減少が認められなかった。塩類のみの WS 区分のピーク面積は std 区分および WSM 区分のピーク面積と同様の傾向を示した。このように、ソバ、米および麦焼酎のピーク面積の値を比較すると、std 区分、WS 区分および WSM 区分と、WSAM 区分、WSA 区分の 2 つのグループに分

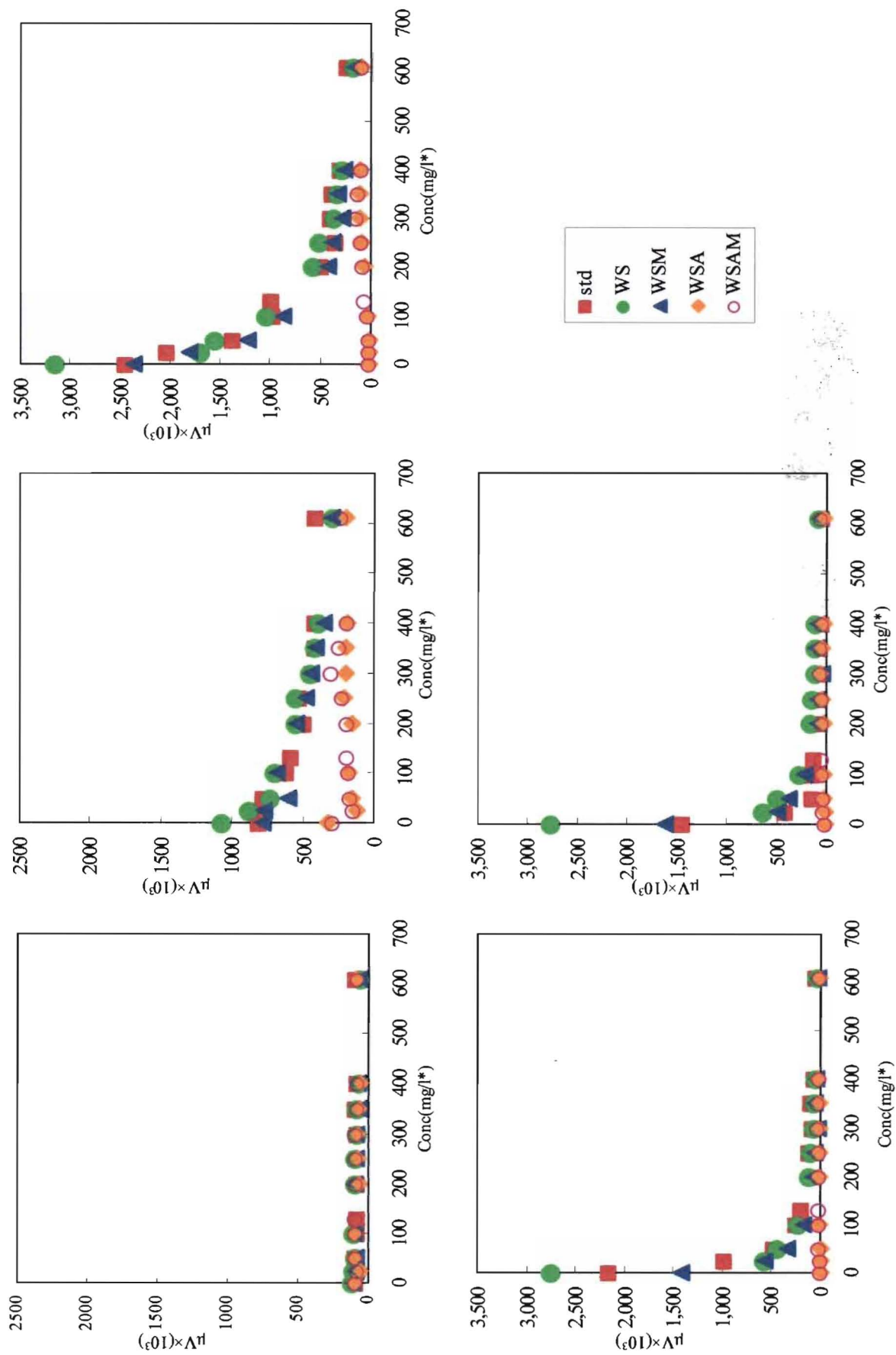
類できた。この2グループの違いは、 $\alpha$ -アミラーゼの添加の有無であった。以上の結果より、 $\alpha$ -アミラーゼは、中級脂肪酸エチルエステル類のピーク面積の減少に大きく関与していることが示唆された。

### 第3項 高級脂肪酸エチルエステルが中級脂肪酸エチルエステルの含み香および立ち香に与える影響

Fig. 20 より、それぞれの中級脂肪酸エチルエステル (ethyl caproate、ethyl caprylate、ethyl caprate、ethyl laurate および ethyl myristate) の WSAM 区分は、高級脂肪酸エチルエステル濃度の影響を受けず一定のピーク面積で推移した。ethyl caproate の std 区分は高級脂肪酸エチルエステル濃度の影響を受けず、WSAM 区分と同様に一定のピーク面積で推移した。しかし、ethyl caprylate の std 区分は高級脂肪酸エチルエステル濃度が増加するにつれて、緩やかな減少を示した。さらに ethyl caprate、ethyl laurate および ethyl myristate に関しては、高級脂肪酸エチルエステル濃度 0 mg/l の時に最大のピーク面積を示し、濃度が増加するにしたがいピーク面積は急激に減少した。最終的には WSAM 区分と同程度のピーク面積に近づくパターンを示した。ethyl caprate の WSA 区分は、WSAM 区分と同様のパターンを示した。さらに、WS 区分および WSM 区分は、std 区分と同様のパターンをそれぞれ示した。このように、std 区分、WS 区分および WSM 区分と、WSAM 区分、WSA 区分の2つのグループに分類できた。この分類は Fig. 20 の ethyl caprylate (B)、ethyl caprate (C)、ethyl laurate (D) および ethyl myristate (E) にも認められた。

高級脂肪酸エチルエステルの濃度が 0 mg/l の時、ethyl caproate の std 区分は WSAM 区分のピーク面積と同じ値を示した。同様に、ethyl caprylate では、WSAM 区分のピーク面積は std 区分のピーク面積の約 1/3 であった。この結果は、ソバ、米および麦焼酎の ethyl caprate、ethyl caprylate の std 区分と WSAM 区分のピーク面積の値と同じであった (Table 15-17)。さらに、ethyl caprate も、同様の結果が得られた。このように、Fig. 20 の結果は、実際の穀類本格焼酎に含まれる中級脂肪酸エチルエステル類の放散を再現していると考えられた。

蒸留直後の高級脂肪酸エチルエステル含量は、約 130 mg/l であるが製品時には約 0.2 mg/l まで除かれる<sup>28)114)</sup>。本研究で使用した穀類本格焼酎の高級脂肪酸エチルエステル含量は約 0.5 mg/l であった。立ち香に相当すると考えられる std 区分は高級脂肪酸エチルエステル溶液の添加量が 0 mg/l から 130 mg/l に増加するに従い、ピーク面積は ethyl caproate (C6 : 炭素数 6) で約 0%、ethyl caprylate (C8) で約 60%、そして ethyl caprate (C10)、ethyl laurate (C12) および ethyl myristate (C14) で約 90%それぞれ減少した。5 種類の中級脂肪酸エチルエステルは、それぞれ、炭素数が 2 つ異なる直鎖脂肪酸エチルエステル類である。炭素数の増加に伴い、ピーク面積の減少率が大きくなることが明らかとなった。



**Fig. 20 Effect of long-chain fatty acid ethyl esters and artificial saliva components in model solution included in middle-chain fatty acid ethyl esters.**  
 (A): ethyl caproate. (B): ethyl caprylate. (C): ethyl caprylate. (D): ethyl laurate. (E): ethyl myristate. \*: total long-chain fatty acid ethyl esters concentration.

#### 第4節 考察

本章で開発した RAS は、Roberts らの装置<sup>22)</sup>と同様の結果が得られたことから、本格焼酎の含み香および立ち香測定が可能と判断した。揮発性成分吸着剤として SPME ファイバーを導入した。これまではガラスカラム充填剤である Tenax を用いた報告が多かった。Tenax は GC に加熱脱着式のインジェクションポートが必要となる。一方、SPME ファイバーは、液体、気体いずれの条件でも対応可能である。また、特殊な GC インジェクションポートが必要なく、吸着した揮発性成分を速やかに GC 分析できる利点がある。SPME ファイバーは Tenax より樹脂量は少ないが、未同定を含めると多くのピークを検出したことから、RAS を用いた分析は十分に応用可能であると考えられる。また、再現性は変動係数 15%以下であった。SPME ファイバーの吸着能力は揮発性成分の種類で異なることから、幾つかの SPME ファイバーを組み合わせることで、更にピーク数の増加や変動係数の改善が可能と考えられる。std 区分は、人工唾液成分の代わりに D.W. を添加した本格焼酎を RAS で測定したものである。立ち香に近い条件である本格焼酎のみの分析や 25°Cでの分析結果も std 区分と同様の傾向を示した。このように、std 区分の分析結果は直接鼻腔で感じる立ち香に相当すると考えられた。

口腔内の揮発性成分放散に関わる因子は、飲料の揮発性成分の場合、咀嚼、温度および呼吸量よりも、唾液成分の塩類による塩析効果や、ムチン、 $\alpha$ -アミラーゼとの吸着による場合が多い<sup>27)</sup>。本格焼酎の揮発性成分の放散を抑制しているのは $\alpha$ -アミラーゼであることを明らかにした。デンプン等を含む食品は、 $\alpha$ -アミラーゼの酵素反応が食品の構造変化を引き起こし、揮発性成分の放散に影響を与えることが報告されている<sup>115-117)</sup>。本格焼酎はデンプンを含まないため、 $\alpha$ -アミラーゼの酵素的作用による影響は考えにくい。むしろ、揮発性成分が $\alpha$ -アミラーゼとの疎水結合やファンデルワールス力による吸着で放散が抑制されると推測された<sup>110)118)</sup>。一方、糖タンパク質のムチンを含む WSM 区分は揮発性成分の放散を抑制していない。ethyl caproate と methyl caproate の放散量が異なること、さらに、これらの揮発性成分は $\beta$ -ラクトグロブリンと $\beta$ -ラクトアルブミンでも

放散量が異なることが報告されている<sup>119)</sup>。これは、揮発性成分とタンパク質の吸着に特異性があるためと考えられる<sup>29)</sup>。WSAM 区分の揮発性成分のピーク面積は std 区分より減少している (Table 15-17)。しかし WSAM 区分のピーク面積が増加している揮発性成分も幾つか検出した。特にソバ焼酎の ethyl acetate (No.X) のピーク面積は std 区分より約 2 倍の値を示している。このピーク面積増加の原因は塩析効果<sup>120)121)</sup>と低い沸点 (b.p. 77°C) であると推測される。揮発性成分の放散量は、構造、タンパク質および脂質等の種類および濃度により増加することも報告されている<sup>122-124)</sup>。そのため、重要な揮発性成分については放散量の検討を個別に行う必要がある。以上の結果は、本格焼酎の立ち香と含み香の官能的な違いについて、部分的ではあるが、そのメカニズムを初めて解明した。

立ち香に相当する std 区分のピーク面積は、高級脂肪酸エチルエステル類の濃度が増加するにしがいが減少した (Fig. 20)。これは保香効果、すなわち疎水性化合物である高級脂肪酸エチルエステルが増加した結果、同様に疎水性化合物である中級脂肪酸エチルエステルの溶解作用が増し安定化することで、放散が抑制されたと推察された。ただし、ethyl caproate は疎水性化合物であるが、高級脂肪酸エチルエステルの影響を受けることなく一定のピーク面積で推移した。これは沸点 (b.p. 167°C) が低いため、唾液成分の塩類による塩析や、高級脂肪酸エチルエステルの添加による保香効果の有無に関わらず放散すると考えられる。

高級脂肪酸エチルエステルは、立ち香に相当する std 区分の中級脂肪酸エチルエステル類の放散に強く関与していると推察された。対照的に含み香を表す WSAM 区分のピーク面積は変動が少なかった。高級脂肪酸エチルエステル類と  $\alpha$ -アミラーゼは同様に放散抑制作用を示された。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼは揮発性成分との吸着で放散抑制するのに対し、高級脂肪酸エチルエステル類は保香効果による放散抑制と作用原理が異なる。そのため、全ての揮発性成分にこの結果は適応しない。揮発性成分の種類によって結果は異なると考えられる。

## 第5節 小括

揮発性成分吸着剤として SPME ファイバーを装着した RAS は本格焼酎の含み香と立ち香測定が可能であると判断された。また、8 種類の SPME ファイバーについて検討した結果、PDMS が本研究には最適であることから RAS に採用した。

RAS で本格焼酎を測定した結果、ソバ焼酎では 24 種類、米焼酎では 27 種類、麦焼酎では 23 種類をそれぞれ同定された。

ソバ、米および麦焼酎において、含み香を表す WSAM 区分のピーク面積は std 区分のピーク面積より減少した。原因は唾液成分に含まれる  $\alpha$ -アミラーゼのタンパク質構造が揮発性成分と吸着しているためと推察された。

本格焼酎に含まれる高級脂肪酸エチルエステル含量の増加に伴い、立ち香に相当する std 区分において、ethyl caprate、ethyl laurate および ethyl myristate 等の中級脂肪酸エチルエステル類の放散は抑制された。一方、含み香に相当する WSAM 区分は高級脂肪酸エチルエステル類の影響を受けないことが明らかとなった。

## 第5章 ソバ焼酎に含まれる揮発性成分の機能性試験

### 第1節 序論

人々の健康への関心が高まる中、食品成分の抗変異原性や抗酸化性などの機能性に関する研究が注目されている。アルコール飲料に関しても例外ではなく、赤ワインは、ポリフェノールの機能性のほか、抗カビ活性を持つファイトアレキシンの一種である resveratrol が Low-density lipoprotein (LDL) の酸化を防止し、血小板凝集抑制について報告されている<sup>125-127)</sup>。清酒については、製造過程における抗酸化活性の推移についての報告がある<sup>128)129)</sup>。また、奥田は清酒中にインスリン様物質があることを報告している<sup>130)</sup>。さらに清酒中のアンギオテンシン変換酵素阻害物質についても研究されている<sup>131-133)</sup>。

本格焼酎に関しては須見らにより適量飲酒すると、ウロキナーゼ前駆体であり血栓溶解酵素で狭心症や心筋梗塞の治療薬として現在臨床中である pro- Urokinase (UK)が増加し、結果としてウロキナーゼ活性が高まり血栓溶解能力が高まることを報告した<sup>134)</sup>。このような本格焼酎の機能性に関する報告は極めて少ない。本格焼酎は蒸留酒のため圧搾工程で得られる清酒、ワインおよびビールより揮発性成分以外の有機酸、色素等の成分が少ないため関心が払われなかった。しかし、本格焼酎は酵母、麹菌を利用した並行複発酵で、多様な酵素により得られた代謝産物(揮発性成分)を単式蒸留で得ることから、蒸留酒としては香味成分が多く含まれるので、ソバ焼酎にも機能性成分を持つ可能性が考えられる。揮発性成分の機能性に関しては、本格焼酎と同様に酵母、麹菌および穀類で製造した味噌、醤油の特有香气成分である 4-Hydroxy-2(5)-ethyl-5(2)-methyl-3-furanone (HEME) に抗腫瘍性が報告されている<sup>135)136)</sup>。そこで本章では、第2章で同定したソバ焼酎の揮発性成分の中から63種類について、抗変異原性試験および抗酸化活性試験を行った。



## 第2節 実験方法

### 第1項 試薬および菌株

ラット肝臓由来 S-9 はオリエンタル酵母 (株) より購入した。抗変異原性試験で使用したサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98 株は (財) 残留農薬研究所より提供して頂いた。抗変異原性試験および抗酸化試験に用いた試料 (和光純薬工業 (株)、Aldrich Chem. Co.、Research Chemicals Ltd.、ICN Biomedicals Inc.、東京化成工業 (株)) は特級またはそれに準ずるものを用いた。その他、特に言及しない限り特級またはそれに準ずる試薬を用いた。

### 第2項 Ames 法

TA98 菌株保存培養液は 20 ml ブロス培地 (8.0% Nutrient broth (Difco 製)、5% NaCl) に接種し、37°C、14 時間暗所で好氣的に振とうして前培養とした。間接変異原物質として 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido(4,3-b)indol (Trp-P-1、酢酸塩、和光純薬工業 (株)) をプレート 1 枚あたり 1.5 ng 使用した。dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した試料 (ソバ焼酎で同定した揮発性成分の市販試薬品を使用)、ラット肝臓由来 S-9 に補酵素溶液 (8 mM MgCl<sub>2</sub>、33 mM KCl、5 mM Glucose-6-Phosphate、4 mM NADH、4 mM NADPH、5 mM ATP、100 mM Phosphate buffer、pH7.4) を添加した S-9mix を滅菌小試験管で混合した。試料の最終濃度は 1mM とした。ここに、前培養した TA98 菌株懸濁液を加え、37°C、20 分間振とうした。振とう後、小試験管にトップアガー (0.05 mM L-histidine、0.05 mM L-biotine、0.6% NaCl、0.8% Bacto Agar (Difco 社製)) を加え、最少グルコース培地 (2% D-glucose、1% Vorgel-Bonner、1.5% Bacto Agar) に重層した。シャーレは 37°C、48 時間暗所で倒置培養し生じたヒスチジン非要求性復帰変異コロニー数を計数した。抗変異原性 (%) は次式により求めた。陽性対照試験として直接変異原物質である 4-nitroquinoline-1-oxide を用いた場合は、S-9mix の代わりに滅菌水を用いた。また、抗変異原物質のコントロールとして、(-)-Epigallocatechin gallate ((-)-EGCG) を終濃度 500 μ

M で用いた。試料そのものの変異原性および抗菌性は試験結果に影響が無いことを予め確認した。測定は3連で行った。Trp-P-1 のみ添加した時のプレートコロニー数は141±13であった。

$$\text{抗変異原性 (\%)} = (1 - (\text{A}-\text{B}) / (\text{C}-\text{B})) \times 100$$

A : 試料と Trp-P-1 添加時のコロニー数

B : 添加物無しのコロニー数 (自然復帰)

C : Trp-P-1 のみ添加時のコロニー数

### 第3項 リコンビナント硫酸転移酵素の調製

リコンビナント硫酸転移酵素はヒト肝臓由来の Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hDHEA ST) を使用した<sup>137)</sup>。hDHEA ST をコードしている遺伝子を発現用ベクターpGEX-2TK に、サブクローニングしたものを大腸菌 BL21 に導入した。この時のプライマーは 5'-GGCGAATTCATGTCGGACGATTTCTTA-3' と 5'-GGCGAATTTCTTATTCCCATGGGAACAGCTC-3' を使用し、hDHEA ST の Open reading frame (ORF) を増幅した。hDHEA ST を組み込んだ大腸菌を LB 培地 (1% NaCl, 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.01% Ampicillin) で培養後、0.1mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加えさらに培養し、目的タンパク質の発現を誘導した。培養終了後、遠心分離 (1,800×g, 10 min.) で得られた菌体をフレンチプレス (スペクトロニック社製) で破碎し、再び遠心分離 (13,000×g, 15 min., 4°C) により上清を粗酵素画分として回収した。得られた粗酵素画分はグルタチオンセファロースに吸着させ、Thrombin buffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) で洗浄し、Thrombin (5 units/μl) を加え酵素処理により GST と hDHEA ST を分離し、遠心分離後 (8,000×g, 10 min., 4°C)、得られた上清画分を精製酵素とした。なお、全ての操作は4°Cで行った。

### 第4項 リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法

測定法は Glatt et al らの方法を改変して行った<sup>138)</sup>。すなわち、活性硫酸である 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) を 16.7 μM になるように Buffer B (150 mM

KCl、15 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、15 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM Phosphate Buffer、pH7.4) で調製した。次に第3項で得た酵素液を 60 μg/ml になるように BufferC (150 mM KCl、0.5 mg/ml BSA、10 mM Phosphate buffer、pH7.4) で調製した。さらに前培養した TA98 菌株懸濁液を加えた。間接変異原物質として 9-hydroxymethylanthracene をプレートあたり 104.1 ng 使用した<sup>139)</sup>。最後に、最終濃度が 1mM になるよう DMSO に溶解した試料を小試験管で混合した。以下、第2項の Ames 法と同様に行った。陽性対照試験および抗変異原性 (%) の算出法は第2項と同様に実施した。9-hydroxymethylanthracene のみ添加した時のプレートのコロニー数は 180 ± 5 であった。

#### 第5項 DPPH ラジカル消去能測定

35%エタノールに溶解した各試料 2.1 ml を 500 mM Acetate buffer (pH 5.5) 300 μl、99.5% エタノール 300 μl、0.25 mM DPPH エタノール溶液 300 μl とともに試験管に加えた後よく攪拌し、暗所で室温、1時間反応後、517 nm の吸光度を分光光度計 (UV-1600、(株) 島津製作所製) で測定した。試料の最終濃度は 1 mM とした。試料の代わりに 35%エタノールを対照として次式のようにして求めた。また陽性対照試験として最終濃度 2.5 μM (-)-EGCG を用いて行った。

ソバ、米および麦焼酎と甲類焼酎の測定に用いた試料は市販焼酎を用いた。また、対照は 35% (v/v) エタノールを使用した。分析方法および消去活性算出法は次式より求めた。全ての測定は3連で行った。

$$\text{DPPH ラジカル消去率 (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

A : ブランクの吸光度 (O.D.<sub>517</sub> 0.207)

B : 試料添加時の吸光度

### 第3節 結果

#### 第1項 Ames法およびリコンビナント硫酸転移酵素を用いたAmes変法による抗変異原性試験

抗変異原性試験の結果はTable 18に示した。S-9を用いたAmes法において、9サンプルが20%以上の抗変異原性を示した。その中で7サンプルがエステル化合物であり、さらに6サンプルがエチルエステル化合物であった。不飽和脂肪酸およびそのエチルエステル体であるNo.103/oleic acid ( $46.1 \pm 0.4\%$ )、No.98/ethyl linoleate ( $53.7 \pm 0.5\%$ )は40%以上の抗変異原性を確認した。

リコンビナント硫酸転移酵素を用いたAmes変法において、13サンプルが20%以上の抗変異原性を示した。特にNo.64/ $\beta$ -phenethyl acetate ( $28.1 \pm 2.6\%$ )、No.71/benzyl alcohol ( $20.2 \pm 4.7\%$ ) およびNo.73/phenethyl alcohol ( $28.3 \pm 3.6\%$ )等のフェニル化合物で抗変異原性が認められた。また、40%以上の抗変異原性はNo.65/caproic acid ( $40.1 \pm 1.7\%$ )で認められた。従来のAmes法は中高沸点試料で高い抗変異原活性が認められたのに対し、硫酸転移酵素を用いたAmes変法は低沸点試料で20%以上の抗変異原性が5サンプル認められた。No.6/1-propanol ( $15.8 \pm 3.6\%$ )、No.11/isobutyl alcohol ( $9.4 \pm 1.5\%$ ) およびNo.14/1-ethoxy-2-propanol ( $11.8 \pm 3.4\%$ )等のプロパノール化合物より、No.13/1-butanol ( $28.6 \pm 0.8\%$ )やNo.15/isoamyl alcohol ( $39.4 \pm 1.1\%$ )のブタノール化合物で高い抗変異原性が認められた。

**Table 18 Antimutagenicity of volatile compounds from buckwheat *Shochu* by Ames test and modified Ames test using sulfotransferase**

No.	Compounds	Inhibition(%)	
		Ames test	Modified Ames
X	ethyl acetate	n.d.	4.8±1.3
1	isopropyl alcohol	n.d.	15.8±4.2
3	ethyl isobutyrate	n.d.	34.7±3.7
4	allyl formate	n.d.	23.6±5.2
5	isobutyl acetate	n.d.	14.0±1.5
6	1-propanol	12±4.3	15.8±3.6
10	butyl acetate	n.d.	2.4±0.7
11	isobutyl alcohol	18.1±4.1	9.4±1.5
12	isoamyl acetate	n.d.	31.0±7.6
13	1-butanol	n.d.	28.6±0.8
14	1-ethoxy-2-propanol	n.d.	11.8±3.4
15	isoamyl alcohol	n.d.	39.4±1.1
16	ethyl caproate	n.d.	5.8±1.5
18	3-methyl-3-buten-1-ol	n.d.	6.3±2.6
21	3-hydroxy-2-butanone	3.6±7.9	n.d.
23	4-methyl-1-pentanol	n.d.	n.d.
24	2-heptanol	n.d.	30.5±5.8
25	3-methyl-2-buten-1-ol	n.d.	n.d.
26	3-methyl-1-pentanol	n.d.	n.d.
29	1-hexanol	n.d.	n.d.
30	4-octanol	n.d.	10.3±3.5
31	2-ethylhexyl acetate <sup>C)</sup>	n.d.	6.7±0.8
32	ethyl caprylate. <sup>C)</sup>	n.d.	n.d.
33	1-octen-3-ol	n.d.	n.d.
34	1-heptanol	15.2±2.9	n.d.
35	acetic acid	n.d.	8.1±2.4
38	ethylhexanol	n.d.	3.2±1.5
41	ethyl DL-3-hydroxybutyrate	36.5±5.1	8.1±1.2
43	ethyl n-nonanoate	33.3±7.0	n.d.
44	linalool	n.d.	n.d.
45	<i>n</i> -octanol	n.d.	25.4±4.1
46	isobutyric acid	n.d.	13.0±3.3

**Table 18 (continued)**

No.	Compounds	Inhibition(%)	
		Ames test	Modified Ames
51	ethyl caprate	n.d.	9.4±2.5
52	1-nonanol	n.d.	11.0±1.4
53	isovaleric acid	n.d.	4.7±1.3
55	diethyl succinate	n.d.	4.3±0.2
58	methionol	n.d.	n.d.
59	valeric acid	n.d.	20.7±1.5
60	2-ethylbutyric acid	n.d.	n.d.
62	ethyl phenylacetate	12.2±5.3	n.d.
63	nerol	n.d.	8.9±1.5
64	$\beta$ -phenethyl acetate	34.1±6.8	28.1±2.6
65	caproic acid	n.d.	40.1±1.7
70	2-methyl-hexanoic acid	n.d.	28.6±1.8
71	benzyl alcohol	14.7±4.1	20.2±4.7
73	phenethyl alcohol	n.d.	28.3±3.6
76	nerolidol(cis- & trans- mixture) <sup>A)</sup>	n.d.	n.d.
77	ethyl myristate	35.3±3.1	n.d.
78	caprylic acid	3.7±8.2	n.d.
80	1-methyl-4-hydroxybenzene	30.9±3.5	n.d.
81	ethyl cinnamate <sup>B)</sup>	n.d.	n.d.
82	ethyl pentadecanoate	30.6±0.2	n.d.
88	ethyl palmitate	13.0±3.2	n.d.
90	capric acid	-	-
91	trans,trans-farnesol <sup>A)</sup>	8.1±2.2	5.3±1.2
95	ethyl stearate	-	-
97	ethyl oleate	31.9±0.7	2.6±0.8
98	ethyl linoleate	53.7±0.5	n.d.
99	ethyl nonadecanoate	-	-
100	myristic acid	-	-
102	palmitic acid	-	-
103	oleic acid	46.1±0.4	n.d.
105	linoleic acid	-	-
	(-)-EGCG <sup>*</sup>	76.2±6.2	86.1±3.0

No. indicated the same as that of Table 9. No. X identified in chapter 4. A): Final concentration of sample was 20  $\mu$  M. B): Final concentration of sample was 100  $\mu$  M. n.d.: not detected. -: Sample could not be dissolved in DMSO. Value showed means  $\pm$  S.D. (N = 3). \*: Final concentration of EGCG was 500  $\mu$  M.

**Table 19 DPPH radical scavenging activity of volatile compounds from buckwheat *Shochu***

No. Compounds	Radical scavenging activity(%)	No. Compounds	Radical scavenging activity(%)
X ethyl acetate	n.d.	51 ethyl caprate	n.d.
1 isopropyl alcohol	n.d.	52 1-nonanol	n.d.
3 ethyl isobutyrate	n.d.	53 isovaleric acid	n.d.
4 allyl formate	n.d.	55 diethyl succinate	n.d.
5 isobutyl acetate	n.d.	58 methionol	3.9 ± 1.3
6 1-propanol	n.d.	59 valeric acid	n.d.
10 butyl acetate	n.d.	60 2-ethylbutyric acid	n.d.
11 isobutyl alcohol	n.d.	62 ethyl phenylacetate	n.d.
12 isoamyl acetate	n.d.	63 nerol	n.d.
13 1-butanol	n.d.	64 $\beta$ -phenethyl acetate	n.d.
14 1-ethoxy-2-propanol	n.d.	65 caproic acid	n.d.
15 isoamyl alcohol	n.d.	70 2-methyl-hexanoic acid	3.4 ± 1.5
16 ethyl caproate	n.d.	71 benzyl alcohol	n.d.
18 3-methyl-3-buten-1-ol	n.d.	73 phenethyl alcohol	n.d.
21 3-hydroxy-2-butanone	n.d.	76 nerolidol(cis- & trans- mixture)	n.d.
23 4-methyl-1-pentanol	n.d.	77 ethyl myristate	n.d.
24 2-heptanol	n.d.	78 caprylic acid	n.d.
25 3-methyl-2-buten-1-ol	n.d.	80 1-methyl-4-hydroxybenzene	74.4 ± 0.9
26 3-methyl-1-pentanol	n.d.	81 ethyl cinnamate	n.d.
29 1-hexanol	n.d.	82 ethyl pentadecanoate	n.d.
30 4-octanol	n.d.	88 ethyl palmitate	n.d.
31 2-ethylhexyl acetate	n.d.	90 capric acid	n.d.
32 ethyl caprylate	n.d.	91 trans,trans-farnesol	n.d.
33 1-octen-3-ol	n.d.	95 ethyl stearate	n.d.
34 1-heptanol	n.d.	97 ethyl oleate	n.d.
35 acetic acid	n.d.	98 ethyl linoleate	n.d.
38 ethylhexanol	n.d.	99 ethyl nonadecanoate	n.d.
41 ethyl DL-3-hydroxybutyrate	n.d.	100 myristic acid	n.d.
43 ethyl n-nonanoate	n.d.	102 palmitic acid	n.d.
44 linalool	n.d.	103 oleic acid	n.d.
45 <i>n</i> -octanol	n.d.	105 linoleic acid	n.d.
46 isobutyric acid	n.d.	(-)-EGCG*)	71.0 ± 0.0

No. indicated the same as that of Table 9. No. X identified in chapter 4. n.d : not detected value showed means ± S.D. (N = 3). \*) : Final concentration of EGCG was 2.5  $\mu$  M.

## 第2項 DPPH ラジカル消去能測定

No.80/1-methyl-4-hydroxybenzene ( $74.4 \pm 0.9\%$ ) は最も高い抗酸化性が認められた。フェニル化合物である no.71/benzyl alcohol、no.73/phenethyl alcohol、no.64/ $\beta$ -phenethyl acetate および no.81/ethyl cinnamate については活性は認められなかった (Table 19)。No.80/1-methyl-4-hydroxybenzene の活性は EGCG ( $71.0 \pm 0.0\%$ ) と同程度であるが、測定に用いた濃度が 1-methyl-4-hydroxybenzene の 1mM に対して (-)-EGCG の  $2.5 \mu\text{M}$  と大きく異なることから、(-)-EGCG の抗酸化性より劣っていた。Table 20 より、本格焼酎の抗酸化活性は僅かではあるが甲類焼酎より高いことが認められた。

**Table 20 DPPH radical scavenging activity of cereal *Shochu***

	<i>Honkaku Shochu</i> <sup>(a)</sup>			<i>Korui Shochu</i> <sup>(b)</sup>
	Buckwheat	Rice	Barley	
Radical scavenging activity(%)	$9.0 \pm 0.4$	$7.3 \pm 0.2$	$2.1 \pm 0.0$	n.d.

(a): *Honkaku Shochu* was obtained from single-process distillation.

(b): *Korui Shochu* was obtained from continuous-process distillation.

n.d. : not detected



## 第4節 考察

oleic acid、linoleic acid などの不飽和脂肪酸は、高い抗変異原活性および抗腫瘍活性が報告されている<sup>140-142)</sup>。また、エチルエステル体の ethyl linoleate でも抗変異原性が報告されている<sup>143)144)</sup>。No.98/ethyl linoleate (53.7±0.5%) の抗変異原性は、これまでの報告を裏付ける結果となった。柑橘類特有の芳香を形成し、機能性成分として注目されているテルペン類のリモネンは発ガン抑制効果が報告されている<sup>145)</sup>。しかしながら、No.91/trans,trans-farnesol (8.1±2.2%) を除く No.44/linalool (n.d.)、No.63/nerol (n.d.) および No.61/nerolidol (n.d.) のテルペン類において抗変異原性は認められなかった。2通りの抗変異原性試験で 20%以上の活性が認められたものは No.64/ $\beta$ -phenethyl acetate (34.1±6.8%、28.1±2.6%) だけであった。むしろ、それぞれの抗変異原性の結果は活性が大きく異なる傾向が強かった。これは、間接変異原物質を直接変異原物質に代謝活性化する異化代謝経路が、S-9mix の酸化還元反応を利用 (薬物代謝の第一相反応) している Ames 法と、リコンビナント硫酸転移酵素による極性の高い物質との硫酸抱合反応 (薬物代謝の第二相反応) を利用した Ames 変法の違いによると示唆された。いくつかの高級脂肪酸および高級脂肪酸エチルエステルは、溶媒 DMSO に溶解しにくいいため分析不能であった。これらの高級脂肪酸およびエチルエステルは、特に不飽和脂肪酸において、これまでの報告から抗変異原性をもつ可能性が高いと推測される<sup>140-142)</sup>。また、不飽和脂肪酸の抗変異原性の報告が多い中で、前駆変異原物質として *N*-nitrosodimethylamine を使用したとき、飽和脂肪酸である lauric acid が抗変異原性を示すという報告もある<sup>146)</sup>。このように条件次第で異なる結果が得られることも十分に考えられる。使用する前駆変異原物質や溶媒の選択は今後の課題である。

DPPH ラジカル消去活性法の結果を Table 19 に示した。アントシアニジンの B 環に水酸基が増えると抗酸化活性は高まることから、芳香環の水酸基すなわちフェノール基の存在が重要である<sup>147)148)</sup>。そのため、フェノール基を持つ No.80/1-methyl-4-hydroxybenzene (74.4±0.9%) は活性が確認され、芳香環に水酸基を持たない No.71/benzyl alcohol (n.d.)

は活性が検出されなかったと考えられる。No.80/1-methyl-4-hydroxybenzene ( $30.9 \pm 3.5\%$ ) は従来の Ames 法についても抗変異原活性が確認されたが、リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法において活性は認められなかった。また、2通りの抗変異原性試験および抗酸化性試験で共に活性のある試料は認められなかった。

## 第5節 小括

抗変異原性試験は、Ames 法とリコンビナント硫酸転位酵素を用いた Ames 変法で実施した。Ames 法は No.98/ethyl linolate で最も高い活性が認められた。リコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法は No.65/caproic acid で最も高い活性が認められた。

本格焼酎の揮発性成分はアルコール類、脂肪酸が多くを占めるため No.80/1-methyl-4-hydroxybenzene 以外に抗酸化活性は認められなかった。

## 総括

本格焼酎の揮発性成分は、風味などの二次機能を決定する重要な因子である。現在まで、これらの揮発性成分については、甘藷焼酎を中心に検討されており、特にその特徴香と香気寄与成分はテルペン類であることが報告されている。一方、宮崎県においては、甘藷焼酎にとどまらず、ソバ、米および麦焼酎なども生産されており、それらの生産高は甘藷焼酎に匹敵する。しかしながら、これらの揮発性成分については、高級アルコール、脂肪酸エステルなど約 70 種類程度が同定されているに過ぎず、数百種類存在すると言われていた揮発性成分の大半は不明である。しかもこれらの揮発性成分のうち、どの成分が特徴香と香気寄与成分の決定因子となるのか、ほとんど検討されていない。本論文では、ソバ、米および麦焼酎の品質向上を目的として、特に宮崎県で開発されたソバ焼酎の揮発性成分とその特徴香および香気寄与成分の同定を行った。

まず、本研究で分析試料として用いるソバ焼酎製造に最適なソバの検討を行った。品種、収穫年度および産地の異なるソバ 6 種類について 10 項目の分析を実施した。一般成分分析の澱粉価、粗タンパク質の結果より、内蒙古在来種は、醸造用原料として最も優れていることが分かった。マンカン種、キタワセ種についても醸造用原料として十分に利用可能と考えられた。また、ソバを 16 画分に分画製粉した結果、醸造に必要な成分を含むソバ粉を分画可能であることが分かった。これにより、造粒技術を用いた醸造用ソバの検討に参考となる知見を得られた。

ソバ、米および麦焼酎の濃縮は porapakQ を用いた固相抽出法で行った。得られたサンプルを GC、GC/MS で分析した結果、ソバ焼酎では 86 種類、米焼酎では 81 種類そして麦焼酎では 84 種類同定した。この中で新規の揮発性成分はソバ焼酎では 2-dodecanone などを含む 29 種類の新規の揮発性成分を同定した。米焼酎では isobutyric acid などを含む 23 種類、麦焼酎では decanal などを含む 29 種類の新規の揮発性成分を同定した。

GC に匂いかぎ装置を接続した GC-O を用いて官能試験を試みた結果、ソバ、米および麦焼酎でそれぞれ 23 種類の香気寄与成分を同定した。未同定の香気寄与成分は 8 種類

であった。この結果はこれまでの GC/MS を用いた分析では含有量が低いために見過ごされてきた揮発性成分に、香りのある成分として重要な役割を担っていることを証明した。さらに、ethyl cinnamate (No.80) の香りがソバ焼酎で確認され、FD ファクター2 とソバ焼酎の香りを構成する重要な揮発性成分であることが認められた。ソバ焼酎の特徴香は pH による溶媒抽出法で塩基性画分に存在し、GC-AED で検出されたことから窒素元素を含む化合物と示唆された。さらに、GC/MS の分析でも検出されないことから微量であると推測された。

SPME ファイバーを装着した RAS を開発し含み香を測定した結果、ソバ焼酎では 24 種類、米焼酎では 27 種類、麦焼酎では 23 種類をそれぞれ同定した。含み香の放散量は、立ち香の放散量より減少した。この原因は、人工唾液に含まれる  $\alpha$ -アミラーゼのタンパク質構造が、揮発性成分と吸着することにより放散が抑制されるためと推察した。さらに、本格焼酎に含まれる高級脂肪酸エチルエステルが立ち香の放散抑制に関与することを明らかにした。本格焼酎に含まれる高級脂肪酸エチルエステル含量の増加に伴い、立ち香において、ethyl caprate、ethyl laurate および ethyl myristate 等の中級脂肪酸エチルエステルの放散は抑制された。

ソバ焼酎で同定した揮発性成分について機能性評価試験を実施した。薬物代謝の第一相反応である S-9mix を用いた Ames 法では、ethyl linoleate に最も強い抗変異原活性が認められた。また、薬物代謝の第二相反応であるリコンビナント硫酸転移酵素を用いた Ames 変法では、caproic acid に最も強い抗変異原活性が認められた。

本文は、醸造用原料に適したソバの検討、ソバ、米および麦焼酎の揮発性成分、香気寄与成分の同定および定量、ソバ焼酎の特徴香の解明、含み香の放散機構そしてソバ焼酎の揮発性成分の機能性試験を行い新たな知見を得た。これらの結果は、ソバ焼酎の品質向上および商品開発にとって価値ある情報であり、製造現場での活用が期待される。

## 謝辞

本稿を終えるに当たり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜りました宮崎大学農学部応用生物科学科水光正仁教授には、深甚なる謝意を表します。

また、本論文を御審査下さいました、宮崎大学農学部福田亘博教授、鹿児島大学農学部菅沼俊彦教授、佐賀大学農学部加藤富民雄教授、琉球大学農学部安田正昭教授、ならびに宮崎大学農学部西山和夫助教授、宮崎大学農学部榊原陽一助教授に謹んで感謝の意を表します。

原料分析、GCMS および GC-SCD 分析に便宜を与えて頂いた宮崎県食品開発センター一井料田一徳所長をはじめスタッフの方々に厚くお礼申し上げます。

ソバを快くご提供いただきました飯坂そば製粉（株）および榊田そば製粉（株）に厚くお礼申し上げます

本研究を遂行するにあたり、宮崎大学農学部応用生物科学科の諸先生方および水光、榊原研究室の方々に御指導、御高見を賜り、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に対し深い御理解と御支援を賜りました弊社中島勝美代表取締役社長、中島美幸代表取締役副社長、飯干勝利専務取締役、甲斐孝憲取締役研究開発部長、ならびに研究開発部の皆様に厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 西谷尚道、第 I 章 総論、「本格焼酎製造技術」、((財) 日本醸造協会、東京都)、pp. 1-6 (1991)
- 2) 川越政則、焼酎文化図譜、(鹿児島民芸館、鹿児島)、pp. 1377-1380 (1987)
- 3) 鮫島吉廣、本格焼酎製造方法の成立過程に関する考察 (その 1)、醸協、**84**、11、746-755 (1989)
- 4) 石母田建編、酒類食品統計月報、((株) 日刊経済通信社、東京)、**45**、5、pp. 65-69 (2003)
- 5) 鈴木建夫、そばの栄養、((社) 日本蕎麦協会、東京)、pp. 62 (2000)
- 6) 長友大、ソバの科学、(新潮社、東京)、pp. 1-332 (1984)
- 7) 池田清和、伝統食品としての蕎麦とその良さを探る、栄食誌、**55**、5、295-297 (2002)
- 8) 農林水産省、農林水産統計速報、(農林水産省、東京)、pp. 1-10 (2002)
- 9) 須藤茂俊、焼酎白麹菌の耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ生産特性、醸協、**89**、10、468-774 (1994)
- 10) 下田雅彦、本格焼酎の技術研究動向 (I)、醸協、**90**、7、524-528 (1995)
- 11) 鮫島吉廣、小峰修一、本格焼酎における新しい蒸留法の開発、醸協、**93**、9、709-715 (1998)
- 12) 小川喜八郎、藤井昇、幸賢二、一瀬英志、平原敏幸、片渕勇敢、プロトプラスト電気融合法による焼酎酵母の改良、醸協、**86**、447-453 (1991)
- 13) 石川雄章編、醸造物の成分、((財) 日本醸造協会、東京)、pp. 115-137 (1999)
- 14) 野白喜久夫、吉沢淑、鎌田耕造、水沼武二、蓼沼誠編、醸造の辞典、(朝倉書店、東京)、pp. 64-135 (1988)
- 15) 太田剛雄、甘藷焼酎の香気、醸協、**86**、4、250-254 (1991)
- 16) 佐無田隆、木崎康造、新里修一、荒巻功、古市明紀、百瀬洋夫、イオン交換樹脂処理によるしょうちゅうの成分変化、醸協、**79**、12、895-899 (1984)
- 17) Ohta, T., Morimitsu, Y., Sameshima, Y., Samuta T. and Ohba, T., Transformation from geraniol, nerol and their glucosides into linalool and  $\alpha$ -terpineol during shochu distillation, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 347-351 (1991)
- 18) Iwashita, K., Shimoi, H. and Ito, K., Extracellular soluble polysaccharide (ESP) from *Aspergillus kawachii* improves the stability of extracellular  $\beta$ -glucosidase (EX-1 and EX-2) and is involved in their localization, *J. Ferment. Bioeng.*, **91**, 134-140 (2001)
- 19) 岩下和裕、白麹菌の  $\beta$ -グルコシダーゼと菌体外可溶性多糖、醸協、**96**、669-678 (2001)
- 20) Iwashita, K., Todoroki, K., Kimura, H., Shimoi H. and Ito, K., Purification and characterization of extracellular and cell wall bound  $\beta$ -glucosidases from *Aspergillus kawachii*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1938-1946 (1998)
- 21) 岩崎好陽、第 2 章 臭気の数値化、「臭気の嗅覚測定法」、((社) 臭気対策研究会、東京)、pp. 21-33 (1997)
- 22) Roberts, D., D. and Acree, T., E., Simulation of retronasal aroma using a modified headspace technique: investigating the effects of saliva, temperature, shearing, and oil on flavor release, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2179-2186 (1995)
- 23) Roberts, D., D. and Acree, T., E., Effects of heating and cream addition on fresh raspberry aroma using a retronasal aroma simulator and gas chromatography olfactometry, *J. Agric.*

- Food Chem.*, **44**, 3919-3925 (1996)
- 24) Margomenou, L., Birkmyre, L., Piggott, J., R. and Paterson, A., Optimisation and validation of the strathclyde simulated mouth for beverage flavour research, *Journal of The Institute of Brewing*, **106**, 101-106 (2000)
  - 25) 木崎康造、新里修一、佐無田隆、荒巻功、古市明紀、木幡孝之、百瀬洋夫、佐伯宏、昭和59年しょうちゅう鑑評会出品酒の分析について、*醸協*, **80**, 195-199 (1985)
  - 26) Ohta, T., Ikuta, R., Nakashima, M., Morimitsu, Y., Samuta, T. and Saiki, H., Characteristic flavor of kansho-shochu (Sweet Potato Spirit), *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1353-1357 (1990)
  - 27) Schirle-keller, J., P., Chang, H., H. and Reineccius, G., A., Interaction of flavor compounds with microparticulated proteins, *J. Food Sci.*, **57**, 1448-1451 (1992)
  - 28) 椎木敏、西谷尚道、鈴木昭紀、志垣邦雄、本格しょうちゅうに関する研究 (第9報)、*醸協*, **66**, 257-258 (1971)
  - 29) Overbosch, P., Afterof, W., G., M. and Haring, P., G., M., Flavor release in the mouth, *Food Reviews International*, **7**, 137-184 (1991)
  - 30) 村松敬一郎編、茶の科学、(朝倉書店、東京)、pp. 124-188 (1991)
  - 31) 大庭理一郎、五十嵐喜治、津久井亜紀夫編、アントシアニン、(建帛社、東京)、pp. 103-105 (2001)
  - 32) 今安聰、川戸章嗣、清酒の健康と美容効果 (その2)、*醸協*, **94**, 3, 201-208 (1999)
  - 33) 奥田拓道、清酒・酒粕中の生理活性物質の解明、*醸協*, **98**, 11, 750-755 (2003)
  - 34) 高橋豊三、ビールの機能性—II. 医学生理学的機能 (1)、*醸協*, **95**, 3, 183-192 (2000)
  - 35) 近藤恵二、ビールの健康機能性 (ビールの生活習慣病予防効果)、*醸協*, **98**, 4, 228-240 (2003)
  - 36) 川戸章嗣、清酒はどこまでヘルシーか、*生物工程*, **78**, 458-461 (2000)
  - 37) 須見洋行、本格焼酎・泡盛の機能性、*醸協*, **96**, 8, 513-519 (2001)
  - 38) 篠原和毅、鈴木建夫、上野川修一編、食品機能研究法、((株)光琳、東京)、pp. 252-290 (2000)
  - 39) Maron, D., M. and Ames, B., N., Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, **113**, 173-215 (1983)
  - 40) 新本洋士、木村俊之、山岸賢治、鈴木雅博、東北地方で生産される野菜及び山菜類の抗変異原性試験、*食科工*, **49**, 736-739 (2002)
  - 41) 任恵峰、高木敬彦、包航、後藤純雄、遠藤英明、林哲仁、有機無農薬栽培による野菜類抗変異原性の変化、*食科工*, **47**, 460-464 (2000)
  - 42) 榊原陽一、硫酸転位酵素の多様な機能性、*農化*, **77**, 11, 12-19 (2003)
  - 43) 榊原陽一、水野貴之、M. C. Liu、水光正仁、硫酸転位酵素を用いた抗変異原試験法による食品の機能性評価、*ニューフードインダストリー*, **45**, 10, 60-64 (2003)
  - 44) 二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真、抗酸化物質—フリーラジカルと生体防御—、((株)学会出版センター、東京)、pp. 3-12 (1994)
  - 45) 岩見明彦、大森俊郎、焼酎製造における豪州産大麦の原料事情、*醸協*, **99**, 784-793 (2004)
  - 46) 岩野君夫、能勢晶、三上重明、椎木敏、焼酎製造における醸造特性について、*醸協*, **84**, 1, 55-57 (1989)
  - 47) 大久長範、大能俊久、進藤晶、Y. Wang、明石信廣、低温気流粉碎したそば粉の性質、*食科工*, **49**, 1, 46-48 (2002)
  - 48) 水間智哉、古川幸子、清川良文、若井芳則、低アミロース米の醸造適性、*醸協*, **98**, 4, 293-302 (2003)

- 49) 焼酎原料の醸造適性に関する調査研究 (平成 12 年度 調査研究成果報告書 (振興対策事業))、(日本酒造組合中央会、大分県酒造協同組合、東京)、pp. 1-131 (2001)
- 50) 下田雅彦、本格焼酎の技術研究動向 (I)、醸協、**90**、524-528 (1995)
- 51) 西谷尚道監修、202 原料米、「第四回改正国税庁所定分析法注解」、((財) 日本醸造協会、東京)、pp. 139-187 (1993)
- 52) 水谷政美、工藤哲三、日高照利、柏田雅徳、平成 11 年度宮崎県食品開発センター研究報告、**44**、125-128 (1999)
- 53) 大坪研一、比色法による米の脂肪酸度の測定、食総研報、**51**、59-65 (1987)
- 54) 中村道徳、鈴木繁男、澱粉科学ハンドブック、(朝倉書店、東京)、pp. 174-189、(1977)
- 55) 水間智哉、宮崎紀子、小林拡美、柳内敏靖、若井芳則、酒米新系統「滋系 56 号」の品種特性、醸協、**94**、3、237-243 (1999)
- 56) 水谷政美、日高照利、工藤哲三、岡崎益己、柏田雅徳、ソバ種子中の蛋白が焼酎の酒質に及ぼす影響、醸協、**97**、6、461-467 (2002)
- 57) 中島勝美、そば粉造粒体並び造粒そば麴の製造方法、それらを用いた酒類の製造方法、そばを用いた酒類製造用掛け原料及び造粒そば麴並びにそれらを用いた酒類、特許出願番号 2004-118564 号 (2004.4.14)
- 58) 清酒酵母・麴研究会、清酒酵母の研究—90 年代の研究—、((財) 日本醸造協会、東京)、pp. 107-110 (2003)
- 59) 草野毅徳、宮下晴世、ソバの栄養成分について (第一報)、栄養と食料、**26**、4、(1973)
- 60) 有田俊幸、生理機能性をもつめんについて、食品と科学、**10**、86-91 (1998)
- 61) 井上直人、中田美穂、ソバ粉のアミロース含量の地理的変異、雑穀研究、**14**、1-4、(2001)
- 62) 中田美穂、井上直人、アジア産ソバ粉の粘性関連形質の地理的変異、北陸作物学会、**36**、87-90 (2001)
- 63) 水間智哉、古川幸子、清川良文、若井芳則、低アミロース米の酒造適正、醸協、**98**、4、293-302、(2003)
- 64) 吉沢淑、百瀬洋夫、蓮尾徹夫、米粒の構造と消化に関する研究 (第 12 報)、醸協、**76**、8、557-560 (1981)
- 65) 照屋比呂子、第 VI 章 蒸留、「本格焼酎製造技術」、((財) 日本醸造協会、東京)、pp. 165-209 (1991)
- 66) 大森大陸、秋山裕一、市販焼酎への主成分分析法の適用、醸協、**80**、418-421 (1985)
- 67) 秋田修、蓮尾徹夫、大場俊輝、宮野信之、酵母による高級アルコール、酢酸イソアミル生成に及ぼすアミノ酸の影響、発酵工学、**65**、1、19-26 (1987)
- 68) 秋田修、酵母の香気成分、醸協、**84**、11、739-745 (1989)
- 69) 石川雄章、百瀬洋夫、吉沢淑、清酒酵母の Acetyl-CoA:alcohol acetyltransferase について、醸協、**79**、1、62-66 (1984)
- 70) 下田満哉、箆島豊、香気成分の分析と評価 その 1 試料調製法、日調科誌、**33**、510-514 (2000)
- 71) 下田満哉、箆島豊、香気成分の分析と評価 その 2 匂い濃縮物の分画及び GC 匂い嗅ぎ法、日調科誌、**34**、114-117 (2001)
- 72) 坂本宏司、下田満哉、箆島豊、清酒香気成分のポラパック Q カラムによる濃縮、農化、**67**、685-692 (1993)



- 73) 下田満哉、平野好司、箆島豊、ポーラスポリマーカラムによる食品香気成分の濃縮、分析化学、**36**、792-798 (1987)
- 74) 玉村隆子、和田浩二、高良健作、石川信夫、岩淵久克、仲宗根洋子、知念功、ポーラスポリマービーズを用いた固相抽出法による泡盛の香気分析、食科工、**48**、202-209 (2001)
- 75) 小柳津勤、下田満哉、松本清、後藤正、茶芽の熟度による緑茶香気成分の変化、食科工、**49**、5、327-334 (2002)
- 76) 岩野君夫、第IV章 製麴、「本格焼酎製造技術」、((財) 日本醸造協会、東京)、pp. 87-113 (1991)
- 77) Maneerat, C., Hayata, Y., Kozuka, H., Sakamoto, K. and Osajima, Y., Application of porapak Q column extraction method for tomato flavor volatile analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3401-3404 (2002)
- 78) 木原清、醤油品質の評価法と考察 (その7) 醤油フレーバーの状態別分離法、日本醤油研究所雑誌、**22**、293-296 (1996)
- 79) Ohta, T., Ikuta, R., Nakashima, M., Morimitsu, Y., Samuta, T. and Saiki, H., Characteristic flavor of kansho-shochu (Sweet Potato Spirit), *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1353-1357 (1990)
- 80) 清水健一、酒類の香りとモノテルペン類、醸協、**89**、594-600 (1994)
- 81) 西谷尚道、本格焼酎の香味 (I)、醸協、**75**、8、641-649 (1980)
- 82) 田辺創一、渡辺純、園山慶、渡辺道子、難治性の小麦アレルギーに挑む、科学と生物、**39**、7、440-447 (2001)
- 83) 岩野君夫、福田清治、三上重明、椎木敏、焼酎麴の酵素生産に及ぼす種麴の影響、醸協、**84**、3、179-182 (1989)
- 84) Ohta, T., Ohmori, T., Shimojo, H., K. Hashimoto, K., T. Samuta, T. and Ohba, T., Identification of monoterpene alcohol  $\beta$ -glucosides in sweet potatoes and purification of a shiro-koji  $\beta$ -glucosidase, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1811-1816 (1991)
- 85) 太田剛雄、下条寛和、橋本憲治、近藤洋大、佐無田隆、大場俊輝、白麴の $\beta$ -グルコシダーゼ活性と甘藷焼酎香気への寄与、醸協、**86**、536-539 (1991)
- 86) Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H., Uchida, H. and Hayashi, K., Volatile flavor compounds of boiled buckwheat flour, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 729-738 (1983)
- 87) Matsui, T., Guth, H. and Grosch, W., A comparative study of potent odorants in peanut, hazelnut, and pumpkin seed oils on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA) and gas chromatography-olfactometry of headspace sample (GCOH), *Fett/Lipid*, **100**, 2 51-56 (1998)
- 88) Oluola, L. and Olga, A R., Effect of storage on some volatile aromatic compounds in fresh-cut cantaloupe melon, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4043-4047 (2002)
- 89) 田村啓敏、柑橘香気の客観的評価法、食科工、**44**、11、745-752 (1997)
- 90) 西村顕、近藤恭一、中沢英五郎、三島秀夫、竹村成三、清酒「ムレ香」成分の同定とその定量方法、発酵工学会誌、**67**、4、237-244 (1989)
- 91) 岩田博、清酒の熟成について、醸協、**98**、1、49-50 (2003)
- 92) 林田安生、酵母の育種による米焼酎(減圧)の香気改良、醸協、**93**、7、504-509 (1998)
- 93) 玉村隆子、和田浩二、種岡文恵、高良健作、石川信夫、仲宗根洋子、知念功、泡盛製造工程における香気特性の変化、食科工、**50**、90-95 (2003)
- 94) 下田満哉、食品の匂いに関する統計的解析、日食工誌、**38**、260-267 (1990)
- 95) 熱田貴編、ワインの鑑賞とその表現法、「2000 ソムリエ・ワイン アドバイザー・ワインエキスパート教本」、(日本ソムリエ協会、東京)、pp. 693-695 (2000)

- 96) 宮野信之、岩田博、新里修一、高宮義治、藤田正邦、志垣邦雄、忍頂寺晃嗣、中尾俊幸、田中康、本格焼酎官能審査用語の整理について (II)、醸協、**75**、698-703 (1980)
- 97) 青木雅子、小泉典夫、そば粉の揮発成分の官能的特性とその製粉後の消長、日食工誌、**33**、769-772 (1986)
- 98) 青木雅子、小泉典夫、小川玄吾、吉崎朋三、そば粉の揮発成分の同定とその製粉区分別のフレーバー比較、日食工誌、**28**、476-481 (1981)
- 99) Noordermeer, M., A., Goot, W., V., D., Kooij, A., J., V., Veldsink, J., W., Veldink, G., A. and Vliegthart, J., F., G., Development of a biocatalytic process for the production of C6-aldehydes from vegetable oils by soybean lipoxygenase and recombinant hydroperoxide lyase, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4270-4274 (2002)
- 100) Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H., Uchida, H. and Hayashi, K., Volatile flavor compounds of boiled buckwheat flour, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 729-738 (1983)
- 101) 本間伸夫、味噌の香気と香気成分について (その2)、醸協、**82**、547-553 (1987)
- 102) 川崎通昭、司英隆、8. 化学構造とにおい特性、「味とにおいの分子認識」、(学会出版センター、東京)、pp. 156-158 (1999)
- 103) Roujou de Boubee, D., Van Leeuwen, C. and Dubourdieu, D., Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red bordeaux and loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4830-4834 (2000)
- 104) Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.*, **62**, 2145-2148 (1990)
- 105) Conner, J., M., Paterson, A. and Piggott, J., R., Release of distilled flavour compounds in scotch malt whisky, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1015-1020 (1999)
- 106) 宇都宮仁、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法による清酒中の遊離脂肪酸、高級アルコール及びエステルの分析、醸協、**94**、252-257 (1999)
- 107) 宇都宮仁、山田修、橋口知一、北部北九州吟醸酒の遊離脂肪酸、高級アルコール、エステルの分析、醸協、**95**、214-218 (2000)
- 108) Pino, J., Marti, M., P., Mestres, M., Perez, J., Busto, O. and Guasch, J., Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma, *J. Chromatogr.*, **954**, 51-57 (2002)
- 109) 米元俊一、本格焼酎編第IV章エステル、「醸造物の成分」、石川雄章編、(日本醸造協会、東京)、pp. 119-123 (1999)
- 110) Fischer, N. and Widder, S., How proteins influence food flavor, *Food Technology*, **51**, 68-70 (1997)
- 111) Deborah, D., Roberts and Terry, E., Acree, Retronasal flavor release in oil and water model systems with an evaluation of volatility predictors, *Flavor Food Interaction*, **16**, 179-187 (1996)
- 112) Saskia, M., van Ruth, Isabelle, G., Mike, G. and Conor, M., Delahunty, Interactions between artificial saliva and 20 aroma compounds in water and oil model systems, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2409-2413 (2001)
- 113) Odake, S., Jacques, P., Roozen and Jack, J., Burger, Flavor release of diacetyl and 2-heptanone from cream style dressings in three mouth model systems, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2523-2529 (2000)
- 114) 境田博至、中原徳昭、渡司奈穂子、甲斐孝憲、中島美幸、榊原陽一、西山和夫、福田亘博、水光正仁、蕎麦焼酎の特徴香および穀類本格焼酎の揮発性成分分析、食科工、**50**、555-562 (2003)
- 115) van Ruth, S., M. and Roozen, J., P., Influence of mastication and saliva on aroma release in

- a model mouth system, *Food Chemistry*, **71**, 339-345 (2000)
- 116) Saskia, M., Van Ruth, Jacques, P., Roozen and Jan, L., Cozijnsen, Changes in flavour release from rehydrated diced bell peppers (*Capsicum annuum*) by artificial saliva components in three mouth model systems, *J. Sci. Food Agric.*, **67**, 189-196 (1995)
  - 117) Saskia, M., Van Ruth, Jacques, P., Roozen, Denise, F., Nahon, Jan, L., Cozijnsen and Maarten, A., Posthumus, Flavour release from rehydrated French beans (*Phaseolus vulgaris*) influenced by composition and volume of artificial saliva, *Z Lebensm Unters Forsch*, **203**, 1-6 (1996)
  - 118) Anne, M., Vincent, R., Michele, D. and Claude, G., Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution, *International Dairy Journal*, **14**, 681-690 (2004)
  - 119) Fabre, M., Aubry, V. and Guichard, E., Comparison of different method : static and dynamic headspace and solid-phase microextraction for the measurement of interactions between milk proteins and flavor compounds with an application to emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1497-1501 (2002)
  - 120) Denise, F., N., Marcus, H. and Jacques, P., R., Modeling flavor release from aqueous sucrose solutions, using mass transfer and partition coefficients, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1278-1484 (2000)
  - 121) Swen, R., Ulrich, K. and Ralf, G., B., Dynamic flavor release from sucrose solutions, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5058-5066 (2003)
  - 122) Perla R., Marjorie, F. and Elisabeth, G., Effect of fat nature and aroma compound hydrophobicity on flavor release from complex food emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6257-6263 (2004)
  - 123) Enkelejda, P., K., Isabelle, S., Eric, L., Nathalie, M. and Michele, M., Composition rather than viscosity modifies the aroma compound retention of flavored stirred yogurt, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3048-3056 (2004)
  - 124) Hansen, A., P. and Heinis, J., J., Benzaldehyde, citral, and *d*-limonene flavor perception in the presence of casein and whey proteins, *J. Dairy Sci.*, **75**, 1211-1215 (1992)
  - 125) 佐藤充克、ワインと健康、醸協、**92**、2、96-107 (1997)
  - 126) Bertelli, A., A., Giovannini, L., Giannessi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M. and Bertelli, A. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine, *J. Tissue React.* **17**, 1, 1-3 (1995)
  - 127) 横塚弘毅、赤ワインブームは科学的に立証できるか?、生物工学、**78**、461-464 (2000)
  - 128) 太田剛雄、高下秀春、轟木康一、岩野君夫、大場俊輝、清酒中に存在する抗酸化性物質、醸協、**87**、12、922-926 (1992)
  - 129) 北垣浩至、清酒中の製造工程における DPPH ラジカル消去能の推移、醸協、**98**、8、589-593 (2003)
  - 130) 奥田拓道、清酒・酒粕中の生理活性物質の解明、醸協、**98**、11、750-755 (2003)
  - 131) Yamada, T., Hiratake, J., Aikawa, M., Suizu, T., Saito, Y., Kawato, A., Suginami, K. and Oda, J., Cysteine protease inhibitors produced by the industrial koji mold, *Aspergillus oryzae* O-1018, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 907-914 (1998)
  - 132) Saito, Y., Wanezaki(Nakamura), K., Kawato, A. and Imayasu, S., Antihypertensive effects of peptide in Sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 812-816 (1994)
  - 133) Saito, Y., Wanezaki(Nakamura), K., Kawato, A. and Imayasu, S., Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from Sake and Sake lees, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1767-1771 (1994)
  - 134) Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H. and Mihara, H., Urokinase-like plasminogen

- activator increased in plasma after alcohol drinking, *Alcohol and Alcohol.*, **23**, 33-43 (1988)
- 135) 菅原悦子、酵母がつくる味噌、醤油の特徴的な香り成分、*FFI Journal*, **193**, 57-65 (2001)
- 136) 片岡茂博、長原歩、醤油香り成分の抗腫瘍効果、*醸協*, **95**, 336-340 (2000)
- 137) Suiko, M., Sakakibara, Y. and Liu, M., C., Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferase, *Biochem Biophys Res Commun.*, **267**, 80-84 (2000)
- 138) Glatt, H., Pauly, K., Czich, A., Falany, J., L. and Falany, C., N., Activation of benzylic alcohols to mutagens by rat and human sulfotransferases expressed in *Escherichia coli.*, *Eur J Pharmacol*, **293**, 173-181 (1995)
- 139) James, W., F., Jamie, H. and Andreas, F., L., 9-sulfooxymethylanthracene is ultimate electrophilic and carcinogenic form of 9-hydroxymethylanthracene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 239-243 (1998)
- 140) Burgos-Hernandez, A., Lopez-Garcia, R., Njapau, H. and Park, D., L., Partial chemical/structural elucidation of anti-mutagenic compounds from corn, *Toxicology*, **166**, 161-170 (2001)
- 141) Park, K., Y., Jung, K., O., Rhee, S., H. and Choi, Y., H., Antimutagenic effects of *doenjang* (korean fermented soy paste) and its active compounds, *Mutat Res.*, **43**, 523-524 (2003)
- 142) 山崎和子、大崎好子、加藤哲太、宮崎利夫、杏仁及び桃仁に含有される抗変異原性成分について、*薬学雑誌*, **112**, 934-939 (1992)
- 143) 海老根英雄、味噌の生体調節機能。味噌の科学と技術、**43**, 339 (1995)
- 144) 片桐充昭、米・麦味噌の脂肪酸エステル生成、*醸協*, **91**, 222-227 (1996)
- 145) 矢野昌充、カンキツ類の機能性研究、*食品と開発*, **33**, 4-7 (1998)
- 146) Negishi, T. and Hayatsu, H., Inhibitory effect of saturated fatty acids on the mutagenicity of N-nitrosodimethylamine, *Mutat. Res.*, **135**, 87-96 (1984)
- 147) Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., and Osawa, T., Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus Vulgaris L.*, *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 1033-1039 (1996)
- 148) Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M. and Yamakawa, O., Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1652-1655 (2001)