

## 県産食品の網羅的成分分析と品質管理への利用 — 清酒をモデルとして —

樋口誠一\* 横堀正敏\* 仲島日出男\*

### Gas Chromatography/Mass Spectrometry based Metabolomic Analysis in the Evaluation of Food Quality

— Application to Japanese Sake —

HIGUCHI Seiichi\*, YOKOBORI Masatoshi\*, NAKAJIMA Hideo\*

#### 抄録

近年注目されているメタボロミクスの手法を用いた食品の品質評価を行うため、清酒をモデルとして検討を行った。清酒の揮発性成分と不揮発性成分に分けて、ガスクロマトグラフ質量分析計にて分析を行い、得られたデータの主成分分析を行った。その結果、スコアプロットでは清酒の特徴を反映して分類され、ローディングプロットからそれに寄与する成分が明らかとなった。これらの結果は従来からの日本酒度やアミノ酸度などによる評価とも傾向が一致した。今後このような手法が、製品開発や品質評価といった食品製造現場における課題解決手段の一つとなることが期待される。

キーワード：メタボロミクス，GC/MS，清酒，主成分分析

## 1 はじめに

食品の味や香りには非常に多くの成分が関わっており、その構成は原料や発酵・加工条件の違いなどにより複雑に変化する。その評価にあたっては、官能評価が重要な役割を果たすが、評価者には熟練の技術が必要とされている。一方で、近年の分析技術の向上により、「オミクス解析」と呼ばれる、多くの情報を網羅的に解析する手法が開発され、生命化学の様々な分野に用いられている。その一つであるメタボロミクスは生物の代謝物を網羅的に解析するものであるが、食品の味や香り成分は、原料等由来の代謝物も多く、総合的な品質評価にこの技術の応用が可能である。そのため

官能評価とこの手法を組み合わせ、よりよい品質評価につなげようとする試みが注目されてきている<sup>1-3)</sup>。本研究では、比較的取り扱いがしやすい清酒をモデルとして、食品製造の現場に導入しやすい方法による網羅的成分分析とその評価を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

既報<sup>4)</sup>により報告した、平成26年12月に製造試験により得られた清酒を用いた。原料米は同一のもの、添加酵母培養液は埼玉 G 及び E 酵母（以下 G、E）を用い、G のみ、G:E=2:1、G:E=1:2 及び E のみとした4種（1～4号、表1参照）である。それぞれ瓶詰め後、火入れし、4℃にて約10ヶ月間保存しておいたものを試料とし

\* 北部研究所 食品・バイオ技術担当

た。

## 2.2 不揮発性成分

不揮発性成分の分析は、誘導体化法により行った<sup>2)</sup>。まず、試料 20  $\mu$ L に内部標準物質溶液（リビトール、0.2mg/mL 水溶液）60  $\mu$ L を加え、遠心エバポレーター及び凍結乾燥機にて試料の乾燥を行った。これにメトキシアミン塩酸塩溶液（20mg/mL ピリジン溶液）100  $\mu$ L を加えて、攪拌しながら 30°C にて 90 分間インキュベートした。その後、*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド 50  $\mu$ L を加えて、攪拌しながら 37°C にて 30 分間インキュベートした。この液を遠心分離（13400 $\times$ g、4°C、3 分間）し、上清をガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で測定した（*n*=3）。装置は GC 部 Agilent 6890N（アジレント・テクノロジー社製）及び MS 部 JMS-Sun200（日本電子(株)製）を用いた。カラムは InertCap 5MS（30m $\times$ 0.25mm i.d.、膜厚 0.25  $\mu$ m、ジーエルサイエンス(株)製）を用い、カラム温度は 80°C で 2 分間保持した後、5°C/min で 330°C まで昇温し、その後 330°C で 13 分間保持した。注入口温度は 230°C とした。キャリアーガスにはヘリウムを用い、流速は 1.1mL/min とした。トランスファーラインの温度は 250°C、MS 部のイオン源温度は 200°C、イオン化電圧は 70eV とし、質量範囲 *m/z* 85~500、スキャン間隔 0.3 秒で測定した。

## 2.3 揮発性成分

揮発性成分の分析は、ヘッドスペース固相マイクロ抽出法（HS-SPME）により行った<sup>5)</sup>。20mL バイアルに試料 5mL、塩化ナトリウム 1g 及び内部標準物質溶液（3-オクタノール、1mg/mL エタノール溶液）5  $\mu$ L を加えて、50°C にて 10 分間ブレインキュベート後、SPME ファイバー（ジビニルベンゼン(DVB)/carboxen/ポリジメチルシロキサン(PDMS)、膜厚 50/30  $\mu$ m、スペルコ社製）をヘッドスペース部に 10 分間露出させて揮発性成分を吸着させた後、GC/MS の注入口にて 240°C で 5 分間脱着を行い、分析を行った（*n*=3）。装置は前項と同様、カラムは DB-WAX（30m $\times$

0.25mm i.d.、膜厚 0.25  $\mu$ m、アジレント・テクノロジー社製）を用い、カラム温度は 40°C で 5 分間保持した後、5°C/min で 250°C まで昇温し、その後 250°C で 5 分間保持した。キャリアーガスにはヘリウムを用い、流速は 1.0mL/min とした。トランスファーラインの温度は 250°C、MS 部のイオン源温度は 200°C、イオン化電圧は 70eV とし、質量範囲 *m/z* 35~450、スキャン間隔 0.3 秒で測定した。

## 2.4 データ処理

GC/MS にて得られたデータは netCDF フォーマットに変換し、不揮発性成分はソフトウェア「MetAlign」<sup>6)</sup>にてピーク検出及びアライメント、ソフトウェア「AIoutput」<sup>7)</sup>にてアノテーション及びデータ解析を行った。一方、揮発性成分はソフトウェア「AMDIS」<sup>8)</sup>にてピーク検出及びアノテーション、「SpectConnect」<sup>9)</sup>にてアライメント、「Tool for statistical analysis on Microsoft Excel」<sup>10)</sup>にてデータ解析を行った。

## 3 結果及び考察

試験醸造酒の不揮発性成分について、GC/MS 分析により 57 成分を同定し、これらを対象とした主成分分析を行った。なお、各成分の強度は内部標準物質により標準化した。図 1 a に各試料の第一主成分（PC1、寄与率 53%）及び第二主成分（PC2、同 23%）のスコアをプロットしたものの（スコアプロット）を、図 1 b にそれに寄与する物質をプロットしたものの（ローディングプロット）を示した。図 1 a では 1~3 号は近くに、4 号は分かれてプロットされた。図 1 b において、1~3 号がプロットされた領域にはアミノ酸類や糖類が多かった。スコアプロット及びローディングプロットの位置関係は対応しているため、これらが 1~3 号を特徴づける成分となっていることがわかった。一方、4 号ではチロソール（Tyrosol）、グリセロール（Glycerol）などであった。

揮発性成分の GC/MS 分析に関しては、65 成分（うち未知は 21 成分）を検出し、上記と同様に

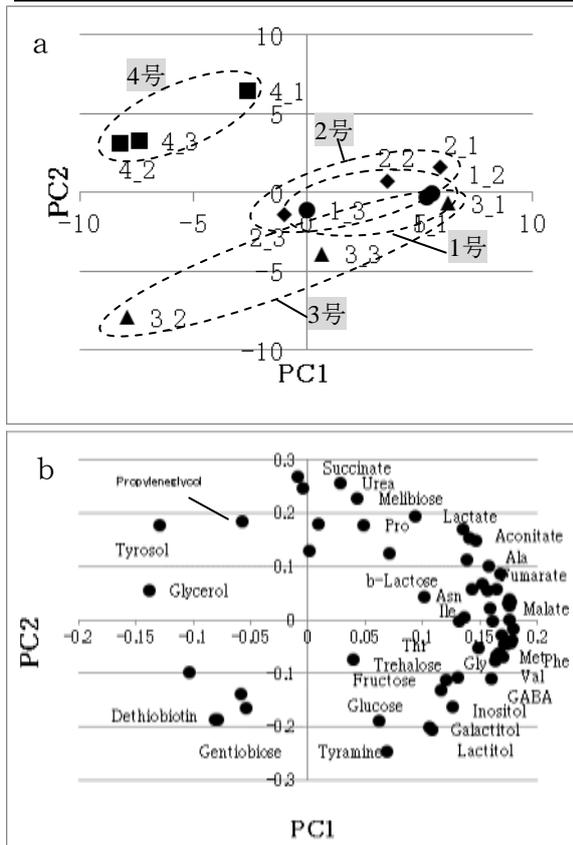


図1 不揮発性成分の主成分分析によるスコアプロット (a)、ローディングプロット (b)

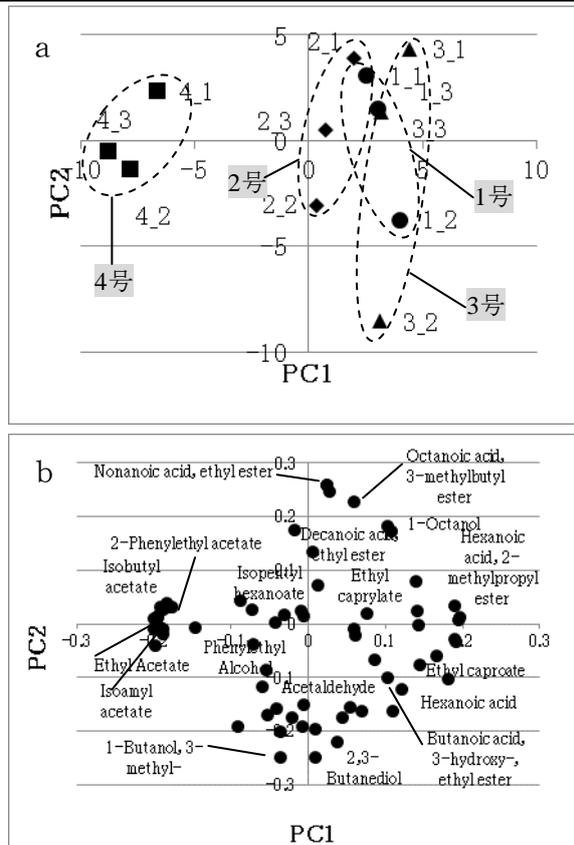


図2 揮発性成分の主成分分析によるスコアプロット (a)、ローディングプロット (b)

主成分分析を行った。図2 aに第一主成分(寄与率 36%)及び第二主成分(同 21%)のスコアプロットを、図2 bにローディングプロットを示した。図2 aでは不揮発性成分の場合と同様、1~3号は近くに、4号は分かれてプロットされた。図2 bにおいて、1~3号がプロットされた右側の領域にはカプロン酸エチル (Ethyl caproate) などの脂肪酸エステル類や脂肪酸類がプロットされ、これらが1~3号を特徴づける物質となっていることがわかった。一方、4号では酢酸イソアミル (Isoamyl acetate) など酢酸エステル類などが多かった。

ここで、得られた結果を評価するため、表1に示す従来から行われている清酒の分析評価値との比較を行った。試料として用いた清酒は二種類の酵母の混合仕込したものであるが、既報<sup>4)</sup>において、単独仕込の1号のみならず2、3号も埼玉G酵母が大幅に優勢になり、埼玉E酵母のみの4号だけが異なる酒質を示したという結果が得ら

れている。今回の不揮発性成分の結果は、表1に示すとおり、1~3号は4号よりも日本酒度が低く(エキス分が多い)、アミノ酸度が高いという特徴と傾向が一致した。また、揮発性成分の結果も表1に示す香気成分の定量結果と傾向が一致し、カプロン酸エチルが多い埼玉G酵母、酢酸

表1 清酒試料の各種分析値

順号	1	2	3	4
酵母仕込比率*	G	G2:E1	G1:E2	E
アルコール分(%)	17.3	17.2	16.4	17.9
日本酒度	-9	-8.5	-15.5	-2
酸度	2.1	1.95	2.05	1.9
アミノ酸度	2.7	2.6	2.75	2.0
香気成分(ppm)				
カプロン酸エチル	11.3	10.4	13.9	2.0
酢酸イソアミル	0.6	0.7	0.6	3.9
酢酸エチル	31	32	24	90
イソアミルアルコール	116	117	108	149
イソブタノール	38	39	37	66

既報<sup>4)</sup>より引用

\*: G: 埼玉G酵母培養液、E: 埼玉E酵母培養液

イソアミルが多い埼玉 E 酵母の特徴を反映していることがわかった。以上のことにより、解析の妥当性が確認された。

一方で、従来分析ではわからなかった結果もあった。例えば、4号の不揮発性成分には苦味などに関与するチロソールが多いという特徴が見られた。このような情報も品質評価の指標にすることが可能であると考えられた。

以上の結果から、GC/MS による網羅的解析により、酒質の違いを視覚的に判別することができた。また、この違いにどのような物質が関与しているかもわかった。既に報告されているように、官能評価結果と組み合わせれば、詳細な品質予測も可能となる<sup>2,3)</sup>。また他にも同様の手法で、発酵に関与する微生物を育種することなどにも応用できる<sup>11)</sup>。今後は、製造工程と製成酒の成分との関係を明らかにすることが必要であり、製造現場へのフィードバックが期待される<sup>12)</sup>。

#### 4 まとめ

メタボロミクスでは高価な最新機器と解析ソフトウェアが用いられることが多い。こうした機器では高度な分析が可能であるが、簡単には導入しづらい面もある。一方で解析ソフトウェアは一般公開されているものもある。今回、導入から長時間経過し、感度が比較的低い機器を用いたが、各種のソフトウェアを利用することによりメタボロミクスの手法を用いた解析を行うことができた。食品製造現場で抱える問題は、品質管理や製品開発など複雑な場合が多く、糸口もつかみにくい。ここで用いた方法は、様々な分野において、比較的簡単に実施、あるいは導入することができ、得られる情報も多いので、今後、課題解決手段の一つになるのではないかと期待する。

#### 参考文献

- 1) 福崎英一郎：フードメタボロミクス, 生物工学学会誌, 85, 11 (2007) 475
- 2) Mimura, N., Isogai, A., Iwashita, K., Bamba, T. and Fukusaki, E. : Gas chromatography/mass

spectrometry based component profiling and quality prediction for Japanese sake, *J. Biosci. Bioeng.*, 118, 4 (2014) 406

- 3) Sugimoto, M., Koseki, T., Hirayama, A., Abe, S., Sano, T., Tomita, M. and Soga, T., Correlation between sensory evaluation scores of Japanese sake and metabolome profiles : *J. Agric. Food Chem.*, 58, 1 (2010) 374
- 4) 横堀正敏, 増田こずえ：高香気生成酵母の利用性向上に関する研究－埼玉G酵母と埼玉E酵母の混合仕込－, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, 13 (2015) 47
- 5) 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分析, 日本醸造協会誌 94, 3 (1999) 252
- 6) Lommen, A. : MetAlign : an interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan MS data pre-processing : *Anal. Chem.* 81, 8 (2009) 3079, <http://www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Onderzoeksinstituten/rikilt/show/MetAlign.htm>, 2016.3.10
- 7) Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T. and Fukusaki, E. : GC/MS based metabolomics: development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA), *BMC Bioinformatics*, 12, (2011) 131, [http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/AIoutput/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/AIoutput/index.html), 2016.3.10
- 8) Stein, S.E. : An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10, (1999) 770, <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/downloads/>, 2016.3.10
- 9) Styczynski, M.P., Moxley, J.F., Tong, L.V., Walther, J.L., Jensen, K.L. and Stephanopoulos, G.N. : Systematic identification of conserved metabolites in GC/MS data for metabolomics and

- biomarker discovery, *Anal. Chem.*, 79, 3 (2007)  
966, <http://spectconnect.mit.edu/>, 2016.3.10
- 10) Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T., Ma, Y., Higgins, B., Ikeda, K., Kanazawa, M., VanderGheynst, J., Fiehn, O. and Arita, M. : MS-DIAL: data independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis, *Nature Methods*, 12, 6 (2015) 523, [http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics\\_Software/StatisticalAnalysisOnMicrosoftExcel/index.html](http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/StatisticalAnalysisOnMicrosoftExcel/index.html), 2016.3.10
- 11) 吉田聡 : メタボロミクスを利用した下面発酵酵母の育種, *生物工学会誌*, 89, 2 (2011) 58
- 12) 織田健 : メタボローム解析はお酒をさらに美味しくするか? (バイオメディア), *生物工学会誌*, 93, 4 (2015) 219