

長期熟成酒のカルバミン酸エチル含有量の調査

ボルジギン ソリナ・磯谷 敦子・向井 伸彦

Survey of Ethyl Carbamate in Long-term Aged Sake

Surina BOERZHJIN, Atsuko ISOGAI and Nobuhiko MUKAI

緒 言

発酵食品や酒類中に微量に含まれるカルバミン酸エチル（以下ECと略す、ウレタンとも呼ばれる）は、動物実験において発がん性を示したことから、国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer：IARC）にて、グループ2A（ヒトに対しておそらく発がん性がある）に分類されている¹。現在、カナダ（テーブルワイン：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、酒精強化ワイン：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、蒸留酒：150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、果実ブランデーやリキュール：400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、清酒：200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{2, 3}）、アメリカ（ワイン：15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、酒精強化ワイン：60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、蒸留酒：125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{2, 4, 5}）、ブラジル（カシヤッサ：150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^{2, 5, 6}）、フランス（蒸留酒：150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、果実ブランデー：1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、チェコ共和国（カナダと同じ規制値）、ドイツ（果実ブランデー：800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）^{2, 5, 7}などの国が酒類中のEC含有量の規制値を設けている。日本においては食品衛生法上の規制値はないが、酒類の安全性を所管する国税庁として、実態の調査等対応している⁸。

酒類中のECの生成は、窒素化合物およびシアン化合物のエタノールとの反応に由来すると報告されている^{2, 5, 6, 9}。吉沢ら（1988）は清酒中のEC生成は、尿素とエタノールが大きく関与していることを認め、尿素とエタノールからEC生成の活性化エネルギーが28.0 kcal/molであることを報告している¹⁰。清酒中の尿素は原料由来の尿素以外、その多くはアルコール発酵中に酵母によるアルギニン代謝で生じることが知られている。ECの生成量は酒類中の尿素濃度が高いほど、貯蔵温度が高いほど、貯蔵期間が長いほど、アルコール濃度が高いほど、pHが中性になるほど、増加

することが報告されてきた^{10, 11, 12}。清酒中のECの低減策として、尿素非生産酵母を使用する、火入れ前にウレアーゼ処理を行う、火入れ後の温度管理を適切に行う等の方法が推奨されている⁸。

近年、様々な貯蔵方法（氷温熟成、常温熟成、タンク熟成、樽熟成等）で数年から数十年間熟成させた長期熟成酒が日本国内で人気を集めているだけでなく、高額で海外へ輸出されていることが報じられている。このように、熟成酒は海外での流通が増加する可能性を有する重要な酒類であるが、熟成酒のEC含量については、十分な知見がなく貯蔵期間中のECの増加についても研究が少ない。そのため、熟成酒の海外展開において、熟成酒中のEC含量を調査することは、基礎的な情報として重要である。そこで、本研究で長期熟成酒のEC含量を調査しその結果を報告する。

実験方法

1. 試薬

ヘキサン（試薬特級）、酢酸エチル（試薬特級）、無水硫酸ナトリウム（試薬特級）、カルバミン酸エチル（和光一級）は富士フィルム和光純薬から購入した。カルバミン酸ブチル（試薬特級）は東京化成工業社製から購入した。エキストレルトNT3カラム（液-液抽出カラム）はメルク社製のカラムを用いた。

2. 清酒試料

市販長期熟成酒43点（常温熟成酒20点、低温熟成酒（15℃以下）21点、尿素非生産酵母を使った貴醸酒2点）を2021年3月に購入した。貯蔵期間は3～53年、貯蔵容器には瓶貯蔵が多く、タンク貯蔵や樽貯蔵も含まれていた。試料の内訳の詳細

細は、Table 1にまとめた。購入後、全ての長期熟成酒を4℃で保管した。また、5つの製造場より貯蔵年数（0～15年）の異なる同一銘柄の長期熟成酒24点を提供していただいた（Table 2）。

3. 分析方法

(1) 一般成分など

アルコール分はAlcolyzer（アントンパール、オーストリア）の日本酒分析システムで測定した。グルコース濃度は全自動グルコース測定装置GA-1150（アークレイ、日本）で測定した。酸度とアミノ酸度、紫外外部吸光度及び着色度の

Table 1 The general profiles of the 43 bottles of commercial aged sake analyzed.

Production year	Storage length (Year)	Polishing rate (%)	Alcohol (%)	Glucose (mg/dL)	Acidity	Amino acidity	Absorbance at (nm)		Aged type
							280	430	
2018	3	40	16.6	2657	1.4	1.2	6.4	1.2	≤ 15℃
2018	3	50	16.9	1849	1.5	1.7	5.8	1.7	≤ 15℃
2016	5	35	16.3	2056	1.1	1.0	5.1	1.0	≤ 15℃
2016	5	60	16.9	3012	2.0	2.9	11.7	2.9	≤ 15℃
2014	7	70	14.2	12085	4.0	3.5	47.8	2.4	Kijoshu
2013	8	65	17.7	1981	1.7	1.7	9.9	1.7	Ambient
2013	8	50	17.4	3692	1.1	1.2	6.6	1.2	Ambient
2012	9	65	16.7	7795	4.3	3.0	73.8	4.7	Kijoshu
2011	10	55	16.4	1587	1.3	1.1	6.1	1.1	Ambient
2011	10	50	17.7	2112	1.6	1.7	11.2	1.7	≤ 15℃
2009	12	40	17.0	1547	1.3	1.3	6.5	1.3	≤ 15℃
2008	13	70	12.8	4441	1.7	2.3	15.3	2.3	Ambient
2005	16	45	14.9	3769	6.1	3.4	19.5	3.4	Ambient
2004	17	35	16.1	3096	1.4	1.3	6.1	1.3	≤ 15℃
2003	18	60	18.4	2746	1.3	1.6	5.6	1.6	Ambient
2002	19	40	16.5	1898	1.4	1.2	6.4	1.2	≤ 15℃
2001	20	—	17.8	6000	4.0	3.0	22.5	3.0	≤ 15℃
2001	20	38	17.5	2527	1.3	1.0	5.8	1.0	≤ 15℃
2001	20	70	18.2	2129	1.7	2.2	22.2	2.2	Ambient
1998	23	40	17.5	2038	1.1	1.0	6.1	1.0	≤ 15℃
1995	26	60	16.0	1714	1.9	2.3	12.9	2.3	Ambient
1994	27	50	18.6	1755	2.2	2.9	18.2	2.9	Ambient
1993	28	60	18.4	2071	1.5	1.6	11.8	1.6	Ambient
1993	28	55	15.5	2584	1.2	1.9	5.3	1.9	≤ 15℃
1993	28	70	16.4	3500	3.6	3.2	51.5	3.2	Ambient
1991	30	40	18.2	1915	1.3	1.2	6.3	1.2	≤ 15℃
1990	30	55	17.2	1980	1.4	1.5	4.2	1.5	≤ 15℃
1991	31	40	18.9	1837	1.2	1.3	6.6	1.3	≤ 15℃
1989	32	40	19.1	1883	1.4	1.6	12.0	1.6	Ambient
1988	33	70	19.9	2695	2.0	2.6	21.0	2.6	Ambient
1988	33	30	16.9	1922	1.5	1.2	6.9	1.2	Ambient
1987	34	—	17.4	1167	2.0	2.5	10.2	2.5	Ambient
1986	35	50	15.7	2277	1.1	1.0	6.4	1.0	Ambient
1985	36	—	15.7	1328	1.4	1.6	9.5	1.6	Ambient
1985	36	55	18.0	2019	1.8	1.9	13.9	1.9	≤ 15℃
1985	36		16.2	2536	3.7	2.0	20.0	2.0	Ambient
1984	37	40	18.2	1790	1.3	1.1	6.7	1.1	≤ 15℃
1978	43	60	18.0	1784	1.5	1.8	8.1	1.8	≤ 15℃
1978	43		16.9	5245	1.8	1.3	39.9	1.3	≤ 15℃
1978	43	40	17.2	1911	2.0	1.4	10.9	1.4	Ambient
1975	46	70	17.4	477	2.2	3.0	27.7	3.0	Ambient
1973	48	70	16.3	2903	2.3	2.7	16.3	2.7	≤ 15℃
1968	53	—	20.4	3625	4.0	3.1	57.1	3.1	≤ 15℃

Table 2 Profile of 5 brands of aged sake analyzed.

Brand	1	2	3	4	5
Polishing rate	50%	40%	65%	55%	60%
Storage temperature	-2°C	5°C~10°C	0°C~30°C	5°C~25°C	0°C~30°C
Special designation	Junmai daiginjo	Daiginjo	—	Tokubetsu junmai	Junmai
Storage length (Year)	0	0	0	0	0
				2	
	5	3	3	3	3
				4	
		5		5	5
	10	10	10	10	
	15	15	15		15

測定は酒類総合研究所標準分析法により分析した。

(2) カルバミン酸エチルの定量は既報¹³により行なった。酒 3 mL に内部標準として 10 ppm のカルバミン酸ブチルを 30 μ L 加えてポルテックス上で混合した。これをエキストレルート NT3 カラムに 10 分間保持させた後、ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1 混合溶液 9 mL で二回溶出し、溶出液を水浴温度 40°C の窒素ガス吹きつけによる濃縮装置ターボバップ LV (Zymark、アメリカ) により、約 1 mL まで濃縮し、無水硫酸ナトリウム約 100 mg を加え脱水して GC-MS 用の試料とした。定量は GC-MS 7890B-5975C (Agilent、アメリカ) 用いて、内部標準法の検量線を用いて行った。分析条件は、次に示すとおりであり、カラム：Agilent 社製 DB-WAX (長さ 60 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m)。カラム温度：100°C (1 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 146°C (10 min) \rightarrow 10°C/min \rightarrow 155°C (7.5 min) \rightarrow 30°C/min \rightarrow 230°C (3 min)、注入口温度：190°C、注入量：1 μ L (スプリットレス)、カラム流量：1 mL/min (キャリアガス：ヘリウム)、イオン化法：EI、イオン源温度：230°C、イオン化電圧：70 eV、測定イオン：62 (SIM モード)、トランスファーライン温度：220°C、保持時間：カルバミン酸エチルは 15.66 分、カルバミン酸ブチルは 23.55 分。

結果および考察

貯蔵期間が 3~53 年の市販長期熟成酒の EC 含量の結果を Fig. 1 に示す。貯蔵期間を 3~10 年、11~20 年、21~30 年、31~53 年の 4 つに分けて解析した結果、概ね EC の生成量は貯蔵期間とともに増加した。貯蔵温度で比較すると、低温熟成酒の EC 含量は 3~10 年で高い平均値を示したが、全体的に緩やかに増加し、平均値が 30 年までカナダの規制値である 200 μ g/kg 以下だった。常温熟成酒の EC 生成は速く、11~20 年の常温熟成で平均値 (373 μ g/kg) が 200 μ g/kg を超えた。一方、尿素非生産酵母を使った 7 年と 9 年貯蔵の貴醸酒は 10 μ g/kg と 84 μ g/kg の含量を示し、同年代の常

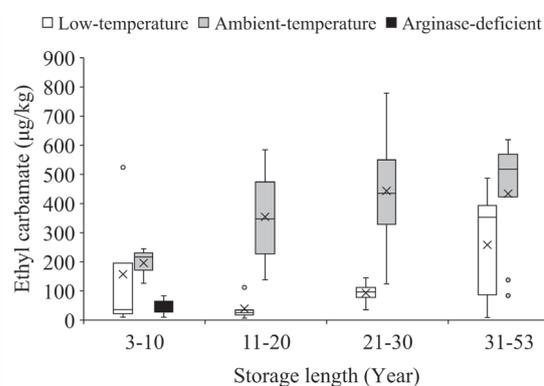


Fig. 1. Concentrations of ethyl carbamate (μ g/kg) observed in three types of aged sake: low-temperature ($\leq 15^{\circ}\text{C}$) aged sake, ambient-temperature aged sake and sake made from arginase-deficient yeast, with 3-53 years of storage length. \circ represents outliers of the data and \times represents the average value of the data.

温熟成酒 (127 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~245 $\mu\text{g}/\text{kg}$) より遥かに低い値を示した。概ね貯蔵温度が高いほど、貯蔵期間が長いほど、EC含量が多くなる過去の報告と同様であった^{10, 12, 14}が、2℃で5年瓶貯蔵の生酛仕込み無濾過の純米吟醸酒(精米歩合60%) (195 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、10年低温熟成の山廃純米大吟醸酒(精米歩合50%) (524 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、20年低温檜樽貯蔵の熟成酒 (112 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 等の低温熟成酒では同年代の低温熟成酒 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~36 $\mu\text{g}/\text{kg}$) よりかなり高いEC含量のものもあった。市販長期熟成酒43点のEC含量の最小値は精米歩合が40%の氷温31年熟成酒の9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ だった。最大値は28年常温熟成の本醸造酒(精米歩合60%)の779 $\mu\text{g}/\text{kg}$ だった。一方、同じく28年常温熟成の純米酒(精米歩合70%)のEC含量は125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、33年常温熟成の純米酒(精米歩合80%)で84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のものもあり、適切なEC低減策がとられていると思われた。

5つの製造場で造られた、貯蔵年数(0~15年)の異なる同一銘柄の長期熟成酒のEC含量の結果

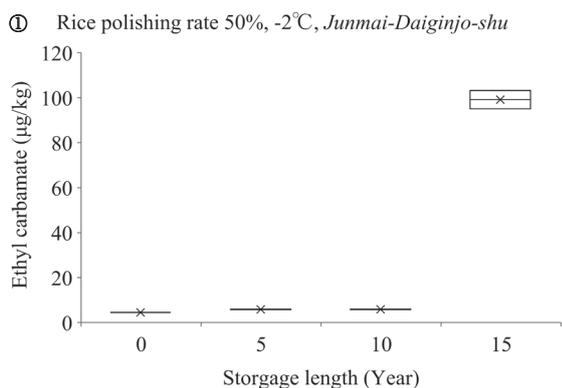


Fig. 2. Concentrations of ethyl carbamate ($\mu\text{g}/\text{kg}$) observed in *Junmai-Daiginjo-shu* ($n=2$) made from 50% polished rice and aged for 0, 5, 10, 15 years at -2°C .

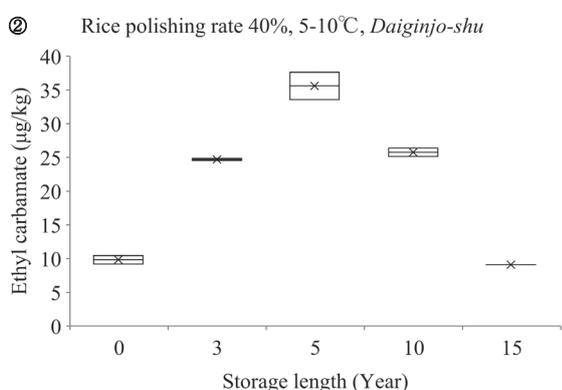


Fig. 3. Concentrations of ethyl carbamate ($\mu\text{g}/\text{kg}$) observed in *Daiginjo-shu* ($n=2$) made from 40% polished rice and aged for 0, 3, 5, 10, 15 years at $5-10^{\circ}\text{C}$.

をFig. 2~6に示す。氷温 (-2°C) 熟成の純米大吟醸酒(精米歩合50%)と5~10℃熟成の大吟醸酒(精米歩合40%)など低温長期熟成酒では0~15年間の最大EC含量がそれぞれ99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Fig. 2)と36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ だった (Fig. 3)。次に、常温熟成の0~15年熟成酒については、常温熟成 (0~30℃)

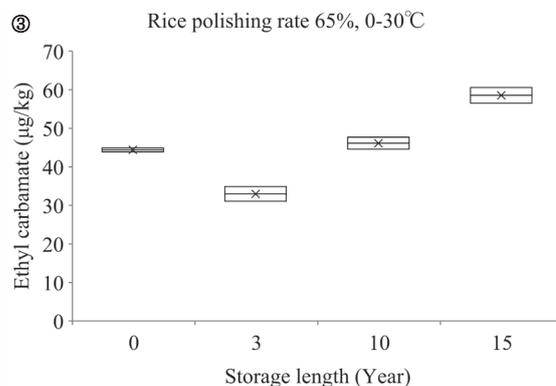


Fig. 4. Concentrations of ethyl carbamate ($\mu\text{g}/\text{kg}$) observed in *sake* ($n=2$) made from 65% polished rice and aged for 0, 3, 10, 15 years at $0-30^{\circ}\text{C}$ (ambient temperature).

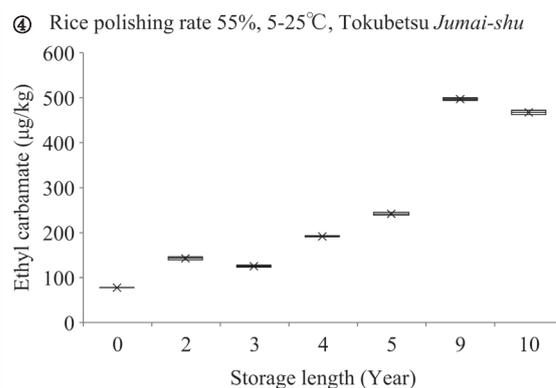


Fig. 5. Concentrations of ethyl carbamate ($\mu\text{g}/\text{kg}$) observed in special *Junmai-shu* ($n=2$) made from 55% polished rice and aged for 0, 2, 3, 4, 5, 9, 10 years at $5-25^{\circ}\text{C}$ (ambient temperature).

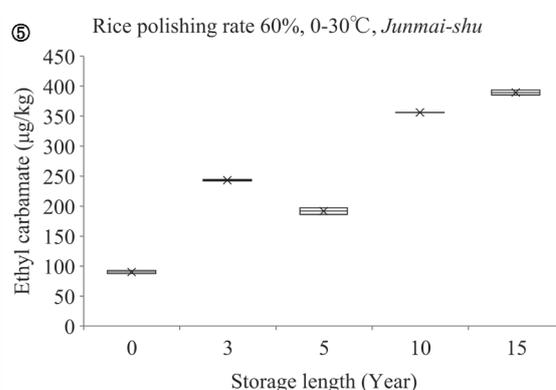


Fig. 6. Concentrations of ethyl carbamate ($\mu\text{g}/\text{kg}$) observed in *Junmai-shu* ($n=2$) made from 60% polished rice and aged for 0, 3, 5, 10, 15 years at $0-30^{\circ}\text{C}$ (ambient temperature).

で精米歩合が65%の長期熟成酒は0～15年で最大値が59 $\mu\text{g}/\text{kg}$ だった (Fig. 4)。一方、同じく常温熟成で精米歩合が55%の特別純米酒は熟成の経過に伴いEC含量が増加し、5年熟成 (241 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超えた (Fig. 5)。また、精米歩合が60%の純米酒の常温熟成では、3年熟成で243 $\mu\text{g}/\text{kg}$ まで増加した (Fig. 6)。精米歩合が高い常温長期熟成酒については、貯蔵期間中にEC生成が促進され、3～5年の貯蔵期間で海外の清酒に対して設けられた200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超える場合があった。

尿素非生産酵母で醸造した熟成酒のEC含量は低かったが、常温熟成酒では最大EC含量が779 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の清酒があり、低温貯蔵や高精白の熟成酒でも200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超える場合が見られたことから、EC低減の必要があると考えられる。海外への輸出を前提した長期熟成酒の製造では、尿素非生産酵母の使用により清酒中の尿素の生成を抑える、火入れ前にウレアーゼ処理で清酒中の尿素をアンモニアに分解させる、火入れ後の温度管理 (速やかに温度を下げる) を適切に行う、等を考慮する必要があると考えられる。

要 約

貯蔵期間が0～53年の長期熟成酒91点を対象に、発がん性が疑われているカルバミン酸エチルの含量調査をした。市販長期熟成酒43点のEC含量を調査した結果について、①ECの生成量は貯蔵期間とともに増加した。②低温熟成酒では、平均値が30年まで200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下だった。③常温熟成酒では、ECの生成が促進され、平均値が11～20年で200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超え、最大779 $\mu\text{g}/\text{kg}$ だった。④尿素非生産酵母使用の貴醸酒では、同年代の常温熟成酒より遥かに低いEC含量を示した。また、5つの製造場から収集した貯蔵期間 (0～15年) の異なる同一銘柄の長期熟成酒については、貯蔵期間中にECの生成が促進され、EC含量が200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を超える場合がみられたことから、特に、海外への輸出を前提とした常温長期熟成酒はEC低減策をとる必要がある。

謝 辞

本研究にあたり、カルバミン酸エチルの抽出作業をご指導いただきました品質・評価研究部門の伊木由香理様、また実験作業にご協力をいただき

ました品質・評価研究部門の神田涼子様にご心より御礼を申し上げます。

参 考 文 献

1. List of Classifications, Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1 – 133. IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. IARC. <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications>
2. Dyer, R. H.: J. AOAC Int., **77**, 64 (1994)
3. Health Canada's Maximum Levels for Chemical Contaminants in Foods. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/chemical-contaminants/maximum-levels-chemical-contaminants-foods.html>
4. FDA, Process Contaminants in Food, Information for Industry to Limit Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages. <https://www.fda.gov/food/process-contaminants-food/ethyl-carbamate>
5. Gowd V., Su H., Karlovsky P., Chen W.: Food Chemistry, **248**, 312 (2018)
6. Lachenmeier D., Lima M., Nóbrega L., Pereira J., Kerr-Corrêa F., Kanteres F., Rehm J.: BMC Cancer. **10**, 266 (2010)
7. Ethyl carbamate and hydrocyanic acid in food and beverages Scientific opinion of the panel on contaminants. European Food Safety Authority Journal, **551**, 1 (2007)
8. 国税庁、お酒に関する情報、酒類の品質及び安全性の確保、カルバミン酸エチル。 <https://www.nta.go.jp/taxes/sake/anzen/joho/joho01.htm>
9. 篠原 隆 : J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ. **26**, 35 (1991).
10. 吉沢 淑、高橋康次郎 : 醸協, **83**, 69 (1988)
11. 原 昌道、吉沢 淑、中村欽一 : 醸協, **83**, 57 (1988)
12. 向井伸彦、木曾邦明 : 醸協, **100**, 705 (2005)
13. 橋口知一、伊木由香理、後藤邦康 : 醸協, **101**, 519 (2006)
14. 磯谷敦子、伊豆英恵、神田涼子、池田優理子、伊木由香理、藤井 力 : 醸協, **117**, 181 (2022)