

エタノール・農産物等の同位体組成に関する調査研究

＜原材料・原産地評価のための適切なデータベース因子の抽出に関する研究＞

## 報 告 書

令和 3 年 3 月

一般社団法人日本海事検定協会

(理化学分析センター)

## 目次

1. はじめに	.....	3
2. 背景	.....	3
3. 研究目的	.....	4
4. 分析サンプル	.....	4
5. 分析方法	.....	5
6. 分析結果	.....	6
7. 総括	.....	10

# エタノール・農産物等の同位体組成に関する調査研究

## ＜安定同位体比を用いたハチミツの産地、種別の研究＞

### ＜味覚センサーを併用したコーヒー豆の産地判別＞

#### 1. はじめに

安定同位体比分析装置を用いた研究として、これまで食の安心安全をテーマとした「食品の原材料/原産地識別」あるいは「食品の天然/養殖/化学合成品の判定」を行ってきた。昨年度に引き続き、ハチミツの産地判別に安定同位体比分析が適用できるかをテーマとした。

#### 2. 背景

##### (1) ハチミツの有用性

ハチミツはその栄養価の高さから、様々な健康効果が期待されている。疲労回復、殺菌効果、美容効果等、ハチミツの効果・効能は多岐に渡る。ハチミツはその高栄養価と殺菌・抗菌効果から、健康食品や美容関連製品にも多く使用されており、国産をはじめ、様々な国でハチミツが精製され、流通している。輸入生産国としては中国、アルゼンチン、カナダ等様々であり、わが国では新型コロナウイルス感染症の影響による巣籠り需要として家庭内での消費が増大している。そのため、ハチミツのデータ収集は非常に意義のあるテーマだと考えられる。

##### (2) 加糖ハチミツによる偽装問題

しかしながら、ハチミツの需要増加に伴い、ハチミツに偽和物を混ぜた偽和ハチミツが増加していることがしばしば問題となっている。ハチミツの表示には、「加糖ハチミツ」というカテゴリーがあり、純粋ハチミツに対し異性化糖等を加えたものを称する。液糖がハチミツより価格が安いことから、本物のハチミツに液糖を混ぜて加量し、「加糖ハチミツ」の表示を行わない輸入品も存在する。砂糖よりもでん粉から作られるブドウ糖や転化糖が利用される傾向にあり、現在は異性化糖が主要な偽和物となっている。

異性化糖に関する偽和検査法は複数確立されており、日本では、薄層クロマトグラフィによる方法がとられているが、海外では炭素安定同位体比による検査法が普及しており、いずれも **Official Methods of Analysis of AOAC International(Horwitz, 2006)**に掲載されている。

##### (3) 炭素安定同位体比

自然界には安定的に存在する炭素の同位体が知られる。原子の中に中性子を 6 個持つ **12C** と 7 個持つ **13C** はいずれも安定で、存在比は **98.9%** と **1.1%** である。植物には光合成で炭酸ガスから糖を生成する際に、二つの同位体を分け隔てなく使う「**C4 植物**」と軽い方を選別して使う「**C3 植物**」がある。砂糖の原料となるサトウキビや、異性化糖の原料となるトウモロコシ等は **C4 植物**、一方で多くの植物は **C3 植物** である。したがってハチミツは通常 **C3 植物** の炭素安定同位体比を示す。

このハチミツにトウモロコシを原料とした異性化糖を加えると同位体比が **C4 植物** の傾向に動く。これを利用してハチミツの糖を構成する炭素安定同位体比調べ、異性化糖の存在を検出する。

### (3) 安定同位体比分析から産地判別へ

安定同位体比を利用した産地判別は多くの食物に試みられている。炭素安定同位体比を利用した異性化糖の検査では、糖を生成する植物の特徴を利用してその添加濃度を算出していく。つまり、ハチミツの蜜源である植物が違えば、それぞれの植物の特徴が見られると考えられる。

ハチミツの異性化糖を検査していく中で、ハチミツの原産地と花の種類によってデータベースを作成していくことで、安定同位体比分析がハチミツの産地判別に活用できることが期待でき、産地偽装等への検査にも繋がると考えた。

以上のことから、ハチミツの炭素安定同位体比と窒素安定同位体比によるデータベースを作成し、産地判別へ活用できるかを検討するものとした。

### (4) 味覚センサーによる味情報の分析

安定同位体比のデータベースを作成することで産地判別の可能性が広がる一方で、植物であれば生育環境の影響によるデータのブレも懸念されており、傾向が取れない場合も予想される。そこで、安定同位体比のデータを取得するとともに味覚センサーによる産地判別の可能性を模索する。

味覚についてはこれまで官能評価が主流であったが、センサーの発達により味の客観判別が可能となり微妙な味の違いを数値化することができるようになった。この技術を用いて複数のデータを合わせることでより精度の高い産地判別ができることを期待している。

## 3. 研究目的

ハチミツの産地を判別するための手法として EA/IRMS 法による炭素・窒素安定同位体比測定の可能性・有効性を明らかにするため、今年度はサンプル数を大幅に増やし、生産国別・原料花別の傾向を比較する。味覚センサーを用いた検討では、当分析センターで 2017 年に測定した安定同位体比データを元に同じ産地・種類の焙煎豆を測定し、客観的判別が可能かどうか検討を行った。

## 4. 分析サンプル

### 4-1. ハチミツの安定同位体比

準備したハチミツは生産国別の集計で、中国産 284 種、アルゼンチン産 35 種、カナダ産 27 種、ウクライナ産 9 種、ハンガリー産 6 種、ブラジル産 2 種、メキシコ産・イタリア産・スペイン産・グアテマラ産各 1 種の計 367 種類のサンプルを使用した。

原料花別での集計で、アカシア 54 種、レンゲ 36 種、ひまわり 5 種、ローズマリー・コーヒー・オーガニックアンジェコ各 1 種、ホワイト 136 種、ELA 67 種、百花蜜 8 種の計 309 種類について解析を行った。

※ホワイト、ELA 及び百花蜜に関しては花の種類は特定できない

### 4-2. コーヒー豆の味覚センサー測定

当分析センターでは過去、コーヒー豆の安定同位体比を測定し報告している（2017 年）。今回の検討では当時と同じ生産国・品種 16 種類の焙煎豆を自家焙煎店し使用した（表 1）。焙煎豆は店舗で中挽きにてグラインドし、使用するまで真空パック詰めで -20℃で保管した。

表 1. 味覚センサーにて測定したコーヒー豆の種類・産地

番号	名称	生産国	品種
1	シダモアラングァディ	エチオピア	ティピカ種
2	モカイルガチェフ	エチオピア	ティピカ系在来品種
3	サントスデカフェ	ブラジル	カツーラ種
4	小室スペシャル	ブラジル	カツーラ種
5	フローレスタ・デ・ヴィセンチ	ブラジル	情報なし
6	モンテショコラード	ブラジル	ムンドノーボ/カトゥアイ種
7	アルーシャキリマンジャロ	タンザニア	ブルボン種・ケント種その他
8	アルコイリスバレー	ペルー	情報なし
9	エルナンデスモンターナ	コロンビア	カスティージョカツーラ種
10	ラ・リベルタード	グアテマラ	ブルボン/カツーラ
11	ヴェルメーリオアンティグア	グアテマラ	レッドブルボン100%
12	マンデリンアチェベラート	インドネシア	ティピカ カティモール他
13	リースプレミアムセレクト	タイ	ブルボン アマレロ種
14	マドリス SHG スペシャル	ニカラグア	ブルボン/カツーラ種
15	ミスティハイランド	パプアニューギニア	情報なし
16	ティモールロロサエ	東ティモール	ハイブリッドティモール種

## 5. 分析方法

### 5-1. EA/IRMS 法による炭素・窒素安定同位体比測定

ハチミツを未処理で測定すると炭素安定同位体比は得られるが、窒素安定同位体比が得られない。AOAC 法に従いハチミツに含まれるタンパク質を抽出し、EA/IRMS にて測定することで窒素安定同位体比を得た。

### 5-2. 味覚センサーによる味覚測定

コーヒー抽出物を脂質膜型味覚センサーTS-5000Z(株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー社製)で酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、渋味及び旨味コクを測定した。なお、抽出方法は家庭でも広く使用される①ペーパードリップ法、②フレンチプレス法にて行った。味覚センサーのセンサー部は高温では測定できないため、コーヒー抽出液の測定は常温にて行った。

#### ①ペーパードリップ法

中挽き豆 12 g に 90°C から 95°C のお湯 150 cc 注ぎ、蒸らし工程を経ずに抽出を行った。

#### ②フレンチプレス法

中挽き豆 15 g に 90°C から 95°C のお湯 200 cc 注ぎ、4 分間静置したのち付属の金属フィルターで濾しながら抽出物を別容器に移した。

味覚センサーのデータは比較となる指標が必要なため、自動販売機等で広く市販されており、複数豆をブレンドして香料の入っていない市販ブラックコーヒー飲料を標準比較品として使用した。

## 6. 分析結果

### 6-1 EA/IRMS 法による炭素・窒素安定同位体比（産地別測定）

ハチミツの炭素・窒素安定同位体比について、生産国別の比較を Fig 1 に纏めた。

今回測定した試料では、 $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は $-23.5\sim-27.5\text{‰}$ の範囲に、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  は $-1.0\sim 6.0\text{‰}$ の間にプロットされた。

産地別に比較したところ、中国産において  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は全域に広がっており、 $-25.5\sim-27.5\text{‰}$ の範囲に中心がみられ、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  は $-1.0\sim 3.0\text{‰}$ の範囲に見られ、特に  $1.5\sim 2.5\text{‰}$ の特定範囲に偏っていた。

同じく、カナダ産では  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$   $-26.5\sim-27.5\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$   $3.0\sim 4.5\text{‰}$ の範囲、アルゼンチン産では  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$   $-25.5\sim-26.5\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$   $3.5\sim 4.5\text{‰}$ の範囲に集中してプロットされる傾向にあった。

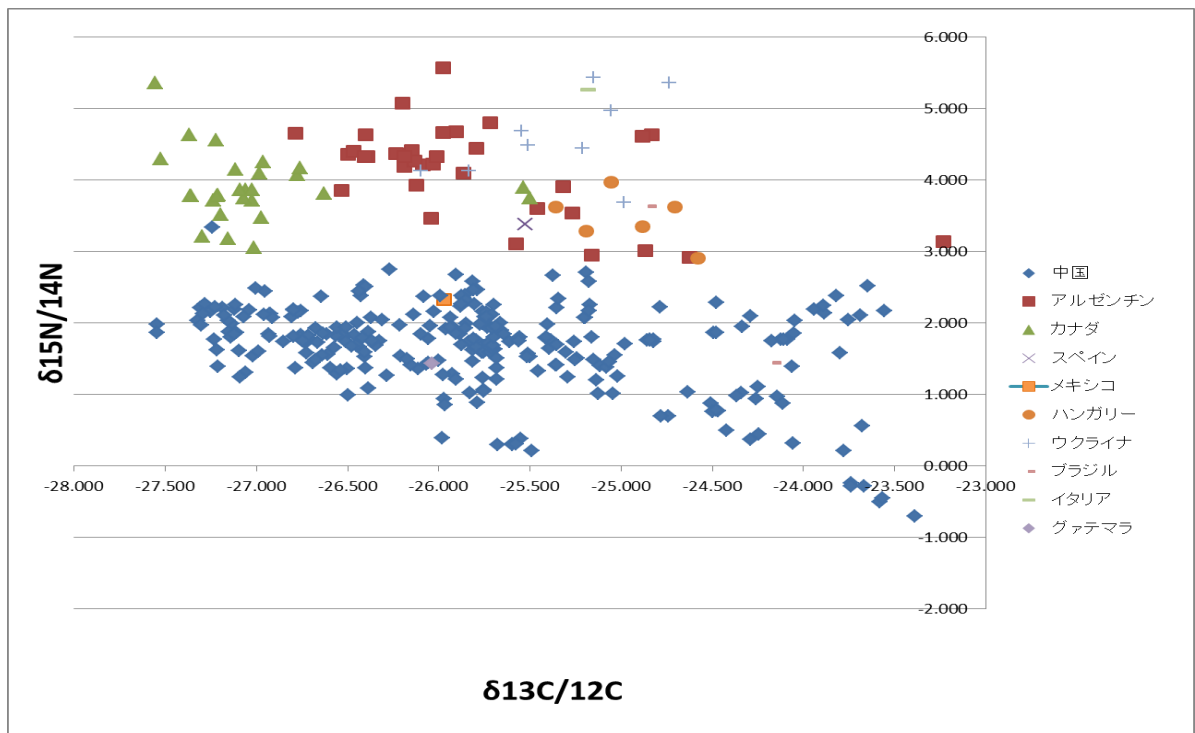


Fig 1. 産地毎の炭素・窒素安定同位体比

### 6-2 EA/IRMS 法による炭素・窒素安定同位体比（原料花の種類別）

原料花の種類別の炭素・窒素安定同位体比を Fig 2 に纏めた。

今回測定した試料の中ではアカシアが最も多く、主要な範囲は  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は $-24.5\sim-23.5\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  は  $0.5\sim 2.5\text{‰}$ であった。次いで多かったレンゲにおいては、主要範囲は  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は $-27.0\sim-25.5\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  は  $1.5\sim 2.5\text{‰}$ であった。ひまわりはサンプル数が少ないものの、 $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  は $-25.5\sim-25.0\text{‰}$ 、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  は  $3.5\sim 4.5\text{‰}$ と比較的狭い範囲に集中していた。

複数の花蜜が混在しているホワイトや ELA については個別に傾向をみることはできなかった。

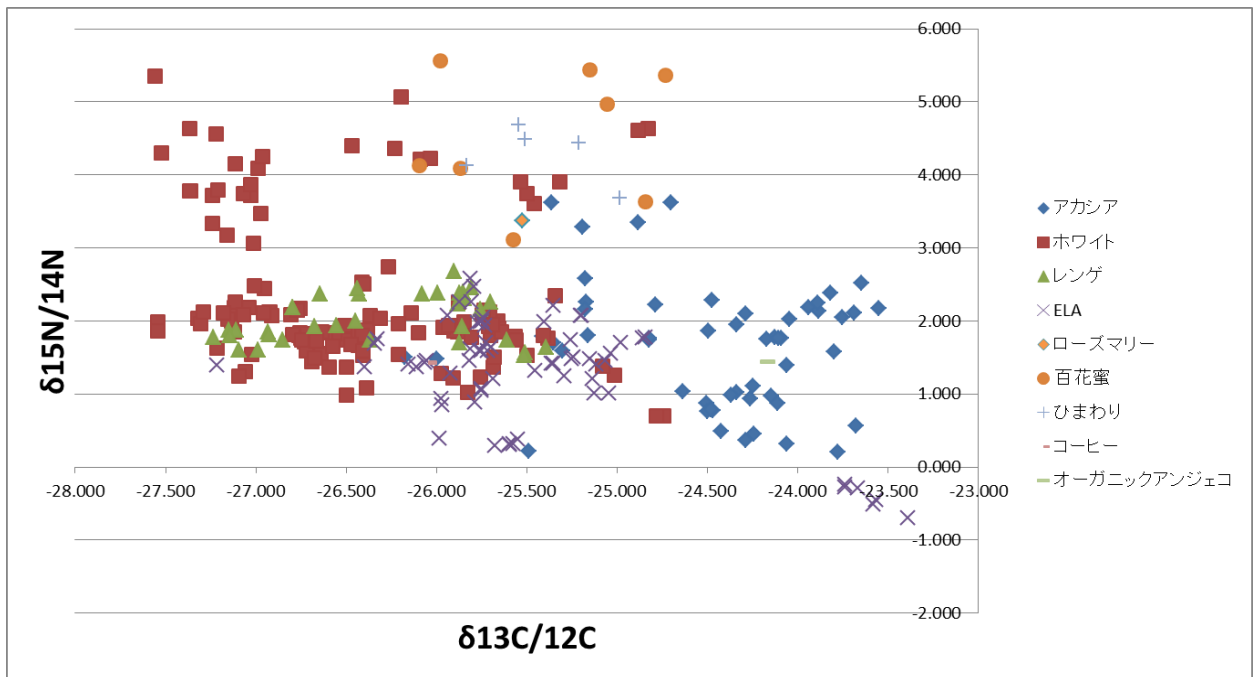


Fig 2. 花の種類毎の炭素・窒素安定同位体比

### 6-3 コーヒー豆の味覚センサーによる測定

すべての試料を測定し、その平均値を標準値として各試料を比較したところ、酸味・苦味・雑味・旨味など、味に関する要素について抽出方法で大きな差は認められなかった。ただし、ペーパードリップ抽出では塩味が増大し、使用したフィルターの影響と考えられた。(表 2, 3)

コーヒーの味を決める大きな要因として比較される酸味・苦味雑味について生産国別・品種別に値をプロットしたところ、ブラジル及びグアテマラで近い値をとる傾向が見られた。対して、エチオピアの豆では同じティピカ種であっても大きな差が認められた。その他、生産国によって 1 種類しか手に入らなかった豆については比較検討することができず、引き続きデータを取得する必要がある。

精選別に見た場合、ナチュラル・パルプドナチュラル・ウォッシュド差は明確で、値をプロットした場合はかなり強い相関が認められた。(Fig 3,4,5)

表2. ペーパードリッパ法による測定結果

名称	生産国	精選	品種	酸味	苦味雑味	渋味刺激	旨味	塩味	苦味	渋味	旨味コク
平均値との比較				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
シダモアラングァディ	エチオピア	ナチュラル	ティピカ種	-0.93	0.55	0.08	0.42	-1.63	0.08	-0.22	-0.64
モカイルガチーフ	エチオピア	ウォッシュド	ティピカ系在来品種	1.39	-1.40	0.29	-0.14	0.06	-0.26	0.61	-0.31
サントスデカフェ	ブラジル	ナチュラル	カソーラ種	-2.15	0.98	0.23	0.47	0.73	0.53	-0.13	0.81
小室スペシャル	ブラジル	パルプドナチュラル	カソーラ種	-2.99	1.42	0.21	0.64	0.55	0.68	-0.29	1.10
フローレスタ・デ・ヴィセンチ	ブラジル	パルプドナチュラル		-3.15	1.22	0.45	0.96	0.89	0.64	-0.13	0.83
モンテシヨコラード	ブラジル	ナチュラル	ムンドノーボ/カトゥアイ種	-1.95	0.52	0.34	0.55	0.76	0.43	0.01	0.97
アルーシャキリマンジャロ	タンザニア	ウォッシュド	ブルボン種・ケント種その他	1.12	-0.27	0.74	-0.05	0.05	0.37	0.59	0.45
アルコイリスバレー	ペルー	ウォッシュド		1.27	-0.25	0.79	-0.52	-0.27	0.22	0.36	0.45
エルナンデスモンターナ	コロンビア	ウォッシュド	カスティージョカソーラ種	2.19	-1.44	0.72	-0.59	-0.34	-0.34	0.61	-0.04
ラ・リベルタード	グアテマラ	ウォッシュド	ブルボン/カソーラ	0.68	0.09	-0.52	-0.31	-0.65	-0.46	-0.34	-0.72
ベルメーリオアンティグア	グアテマラ	ウォッシュド	レッドブルボン100%	0.60	0.10	-0.69	-0.29	-0.82	-0.38	-0.45	-0.82
マンデリンアチェベラート	インドネシア	ウェットハル	ティピカ/カティモール他	1.29	-0.41	-0.23	-0.06	0.76	-0.06	0.17	-0.47
リースプレミアムセレクト	タイ	ウォッシュド	ブルボン/アマレロ種	0.23	0.14	-0.75	-0.35	-0.50	-0.39	-0.45	-0.44
マドリスSHGスペシャル	ニカラグア	ウォッシュド	ブルボン/カソーラ種	1.48	-0.25	-0.41	-0.48	-0.40	-0.09	-0.08	-0.71
ミスティハイランド	パプアニューギニア	ウォッシュド		0.34	-0.66	-0.75	-0.39	-0.54	-0.84	-0.41	-0.48
ティモールロロサエ	東ティモール	ウォッシュド	ハイブリッドティモール種	0.52	-0.31	-0.43	0.14	1.39	-0.07	0.21	-0.02

表3. フレンチプレス法による測定結果

名称	生産国	精選	品種	酸味	苦味雑味	渋味刺激	旨味	塩味	苦味	渋味	旨味コク
平均値との比較				0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
シダモアラングァディ	エチオピア	ナチュラル	ティピカ種	-0.64	0.65	0.13	0.54	-0.55	0.14	-0.25	0.12
モカイルガチーフ	エチオピア	ウォッシュド	ティピカ系在来品種	1.34	-1.22	0.49	-0.14	0.01	-0.34	0.46	0.15
サントスデカフェ	ブラジル	ナチュラル	カソーラ種	-1.62	0.89	0.01	0.37	-0.02	-0.09	-0.48	0.19
小室スペシャル	ブラジル	パルプドナチュラル	カソーラ種	-2.51	1.52	-0.07	0.68	-0.37	0.23	-0.60	0.10
フローレスタ・デ・ヴィセンチ	ブラジル	パルプドナチュラル		-2.58	1.15	0.05	0.80	-0.19	0.04	-0.50	0.20
モンテシヨコラード	ブラジル	ナチュラル	ムンドノーボ/カトゥアイ種	-1.82	0.55	0.03	0.49	-0.04	0.04	-0.29	0.30
アルーシャキリマンジャロ	タンザニア	ウォッシュド	ブルボン種・ケント種その他	0.90	-0.08	0.62	-0.21	-0.70	0.07	0.22	0.00
アルコイリスバレー	ペルー	ウォッシュド		0.96	-0.03	0.63	-0.65	-1.13	-0.02	0.07	-0.17
エルナンデスモンターナ	コロンビア	ウォッシュド	カスティージョカソーラ種	1.73	-1.18	0.91	-0.53	-0.25	-0.29	0.57	0.05
ラ・リベルタード	グアテマラ	ウォッシュド	ブルボン/カソーラ	0.81	-0.07	-0.61	-0.47	-0.87	-0.19	-0.27	-0.57
ベルメーリオアンティグア	グアテマラ	ウォッシュド	レッドブルボン100%	0.41	-0.07	-0.54	-0.10	-0.11	0.06	-0.02	-0.27
マンデリンアチェベラート	インドネシア	ウェットハル	ティピカ/カティモール他	1.23	-0.62	-0.20	-0.16	0.90	0.07	0.32	-0.34
リースプレミアムセレクト	タイ	ウォッシュド	ブルボン/アマレロ種	0.29	-0.04	-0.69	-0.31	0.27	-0.03	-0.17	-0.23
マドリスSHGスペシャル	ニカラグア	ウォッシュド	ブルボン/カソーラ種	1.51	-0.51	-0.15	-0.55	0.38	0.15	0.31	-0.08
ミスティハイランド	パプアニューギニア	ウォッシュド		-0.16	-0.72	-0.42	0.02	0.82	-0.19	0.09	0.14
ティモールロロサエ	東ティモール	ウォッシュド	ハイブリッドティモール種	0.19	-0.25	-0.17	0.15	1.83	0.34	0.53	0.37



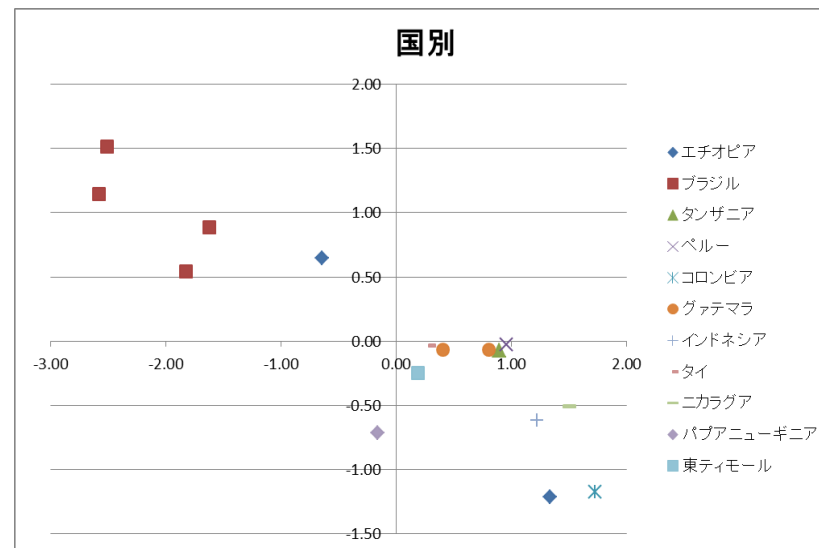
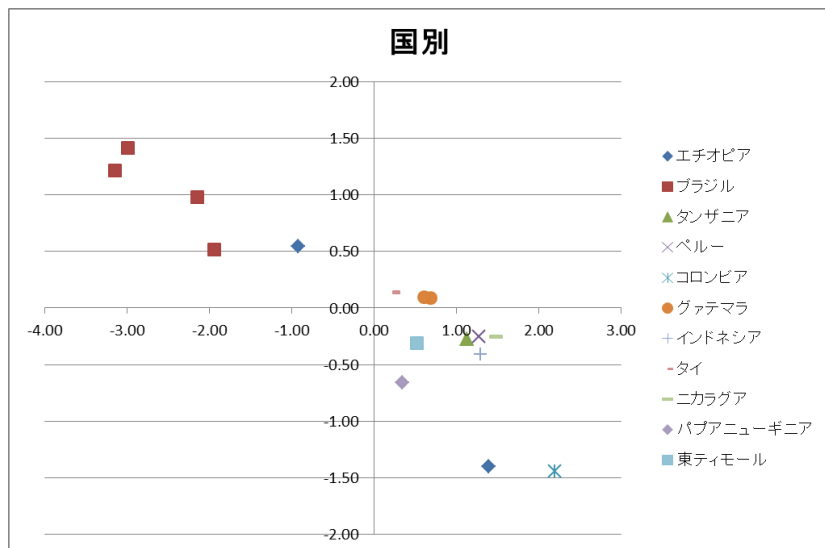


Fig 3. 国別プロット表 (左：ペーパードリッ、右：フレンチプレス)

※X軸「苦味」、Y軸「苦味雑味」

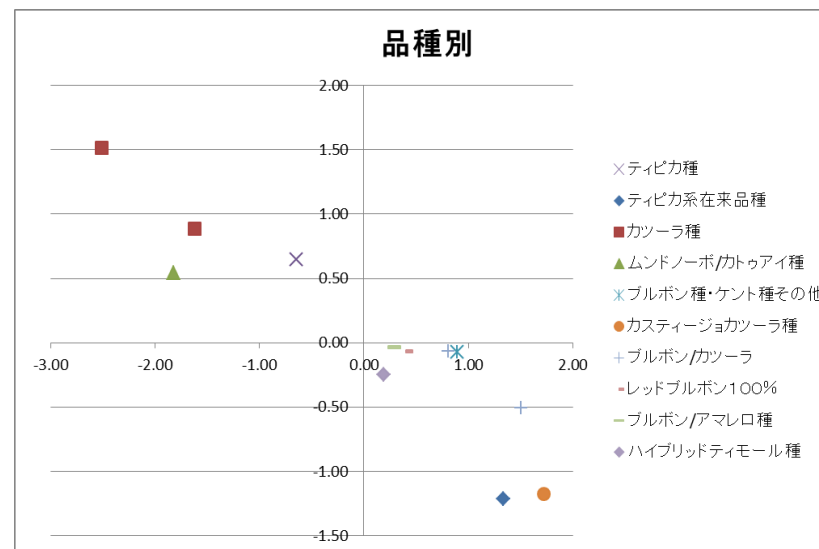
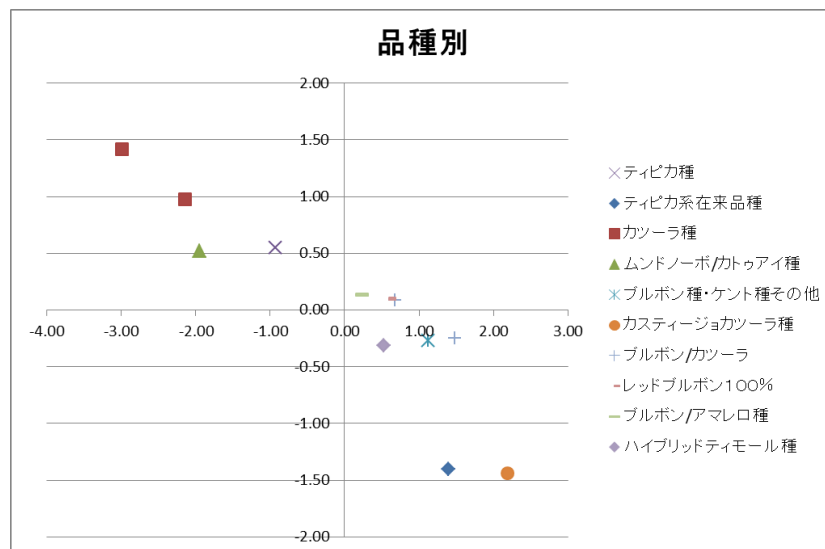


Fig 4. 品種別プロット表 (左：ペーパードリッ、右：フレンチプレス)

※X軸「苦味」、Y軸「苦味雑味」

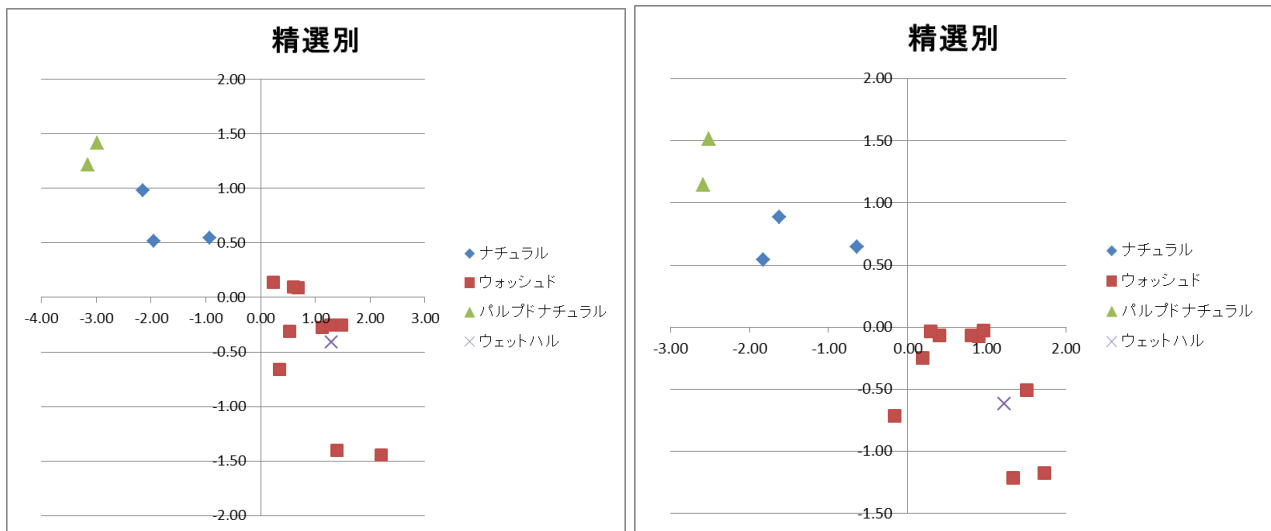


Fig 5. 精選別プロット表 (左：ペーパードリップ、右：フレンチプレス)

※X軸「苦味」、Y軸「苦味雑味」

## 7. 総括

### 7-1. EA/IRMS 法による炭素・窒素安定同位体比

ハチミツの安定同位体比を国別で比較したところ、中国産では  $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  値が幅広く測定されるものの、 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  は比較的狭い範囲となる傾向が見られた。同じく、アルゼンチン産・カナダ産についてもプロット表の特定領域に偏る傾向が見られ、供試サンプル数が多いほど顕著に特徴付けられることが判明した。ハチミツの同位体比は土壌や降雨など周囲の環境にも影響を受けるため、現段階では即判別可能とは言い切れないが、引き続きサンプルを集めてデータを取得することで、産地判別一役を担う可能性が期待できる。

原料花の種類別に見たところ、製品として多く出回るアカシアではプロット範囲が広く、大きな特徴は見られなかったが、レンゲについてはある程度の偏りが見られ、花の種類によっては判別できる可能性が示唆され、供試数の少ないひまわりでも偏りの傾向がみられた。 $\delta^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  に限って比較すると、マメ科であるアカシア・レンゲは値が低く、キク科であるヒマワリは値が高めに出ることから、種ごとの代謝系によって生成される物質などが関連している可能性もある。今後、花の分類ごとに比較することにより、種類別のデータを取得することでも産地判別に繋がる可能性がある。

ハチミツの安定同位体比測定は、もともとは偽装ハチミツの偽和を判別する技術として AOAC に記載されているが、これまで蓄積したデータからはハチミツの産地判別についての可能性が示唆された。ただし、現在のところ産地・原料花を比較することをベースとしており、単独の測定で推定することには困難である。今後さらにデータを積み重ね、比較することで判別確率が上がることを期待している。

### 7-2. コーヒー豆の味覚センサー測定

当分析センターで 2017 年報告したに安定同位体比を測定したデータからは、焙煎具合によって同位体比が重くなる傾向が確認され、大きな変動が認められた。そのため、生豆と焙煎豆で同列比較することはできず、焙煎具合の差（深炒り・浅炒り）によっても注意する必要があるとされた。一方で、地域ごとにプロットをとってみると南アメリカ・中東アフリカ・東南アジアで地域性が確認されたことから、地域判別の可能性が見出せた。

今回の検討では安定同位体比による産地判別の可能性を補完する目的で、同じ品種でも産地によって味・風味が変わるといったコーヒーの特性を利用して味覚センサーによる判別を試みた。一般的に利用される2種の抽出方法は、抽出方法によるオイルの差によって値が変わることが予想されたため設定した。専門家であるバリスタが豆の品質を判断する「カップping」の際はフレンチプレスに近い状態で行われる。今回の試験からオイルの影響がないことが判明したため、抽出方法はフレンチプレスが適していると考えられる。

味覚センサーの値をプロットしたグラフを見ると、一見して産地別に偏りがあるように見えるが、これらは精選別による差であることが示唆された。各精選の特徴は下記の通りである。

精選区別	処理方法	特徴
ナチュラル	果実のまま乾燥	酸味穏やか、独特の香りと甘み、個性的
ウォッシュド	粘液質を水で洗浄	すっきりとした酸味
パルプドナチュラル	粘液質のまま乾燥	酸味が和らぎ、甘味を感じる
ウェットハル	生豆の状態乾燥	酸味穏やかで独特な香りと余韻、濃厚

主に洗浄・乾燥方法の違いによるものであり安定同位体比に与える影響は不明であるが、酸味や甘味、風味に影響を与えるため、精選区別によって味覚センサーにその特徴が出たものと考えられる。

以上のことから、味覚センサーでの産地判別を行うには、産地別のほか精選区別による差も考慮し、数多くのデータを取得する必要がある。コーヒー豆はその土地の気候風土による影響を大きく受けるため味の特徴が出やすい嗜好品であるため、フェアトレードの流れからも産地判別を味覚センサーでの行う可能性については引き続き検討していきたい。