

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

平成 25 年 3 月 31 日

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. 研究目的と背景	3
3. 年度別スケジュール	4
4. 平成 23 年度の成果	4
5. 平成 24 年度の研究内容	4
6. 研究成果の概要	6
7. 研究結果	8
7-1 【研究 A】エタノールの原料・原産地判別	8
7-2 【研究 B】エタノールとエタノール原料の安定同位体比	15
7-3 【研究 C】トウモロコシの産地判別精度向上に関する研究	19
8. 所見	24
9. 文献	24
巻末資料	25

1. はじめに

わが国で食の安心安全が話題となる中、食品の産地偽装、ブランド偽装が後を絶たない。現在、原材料・原産地及び品種を明らかにするための分析手法として、遺伝子分析（DNA）及び金属元素分析による方法が確立されつつあるが、それぞれに短所と長所を抱えている。例えば、DNA分析は種別の特定に特化し、既に多くの農産物に適用されているが、原産地を特定することはできない。また、金属分析は原産地識別に用いられるが、加工食品には金属を含んだ食品添加物や強化剤が使われているため識別が困難である。

一方、安定同位体比分析は、半永久的に普遍的な安定同位体の存在比を求めることで食品の原料及び原産地を識別するものであり、軽元素同位体比¹は農産物が育った環境条件を反映するといわれ、DNA分析や金属分析では困難な原産地判別の可能性が期待されている。しかし、安定同位体比分析は、現在一部の研究機関や企業で研究されているものの、ほとんどの機関で原材料及び原産地識別の実用化に至っているとは言い難い。

2. 研究目的と背景

本研究は食の安心安全を確立するための策として、軽元素安定同位体比に着目し、原材料及び原産地を識別するための手法の確立に資することを目的とし、3ヵ年計画で実施する。

エタノールと農産物を対象とし、データを集積する。

石油化学資源の危機や地球温暖化抑止対策として、需要が右肩上がりに伸びているバイオエタノールは、エタノール混合ガソリンとして政府が主体となって普及のための検証事業も行われているが、温暖化抑止の観点からして配合するエタノールはバイオ由来でなければならない。現在、ガソリンに混ぜるエタノールについては、原材料・原産地を明記した原産地証明書が必要であるが、根拠となるのが申請書類だけであるため、疑義が生じた場合に限って、理化学的手法による判別分析が必要となる。しかし、エタノールのように製造工程が複雑な貨物の詳細な原産地・原材料判別は難しく、研究実績も多くない²。

農産物については、いまだ偽装表示などの報道を耳にする。そこで消費者へ安心安全のアピールとして生産者の名前や顔を包装に表示する取り組みや、トレーサビリティの導入等も増えているが、科学的根拠をもってそれを保証することは農産物を守ることにも繋がる。実際に、コシヒカリなどのブランド農産物の産地判別に関する研究が安定同位体比によって行われている例がある³が、個々にデータベースが必要となる安定同位体比の事例はまだまだ少ないのが現状である。

¹ ここでの軽元素とは、水素 H、炭素 C、窒素 N 及び酸素 O を言う。

² 引用文献（第 6 項参照）

³ 引用文献（第 6 項参照）

3. 年度別スケジュール

年度	分類	エタノール	農産物
平成 23 年度	内容	海外産エタノール 13 検体についての原料・産地判別	種々の品目（落花生／桃／さくらんぼ／お茶／繊維／コーヒー／植物油）についての検討
	結果	原料の違い（C3，C4 及び合成エタノール）による判別	脱脂処理した落花生サンプルについて国内・海外の判別の可能性
平成 24 年度	内容	海外産エタノール 20 検体についての原料・産地判別	トウモロコシによる前処理の違いによる判別の有効性の検討
	結果	工場単位での判別の可能性 蒸留による同位体濃縮の可能性 測定方法の変更による精度の向上	未処理のサンプルについて産地判別の可能性
平成 25 年度	予定	海外産エタノールについての原料・産地判別の精度の向上	未処理トウモロコシの測定による判別精度の向上（データ数の確保）

4. 平成 23 年度の成果

原料や原産地の異なるエタノールを収集し，炭素，酸素及び水素の同位体比を測定したところ，原料の違い（C3 植物，C4 植物，化学合成エタノール）を判別することが可能となった。

さらに，農産物の評価として落花生の産地判別を行うべく，落花生（可食部）の安定同位体比を測定したが明確に産地判別することが出来なかった。そこで脱脂後の落花生を測定サンプルとしたところ，産地判別の精度が向上した。すなわち，測定する構成部位や組織・成分等を限定することで産地判別の精度が向上する可能性が見出された。

5. 平成 24 年度の研究内容

昨年度の成果を踏まえ，本年度は次の 3 つの研究を行った。

【研究 A】エタノールの原料・原産地判別

昨年度実施したエタノールの原料・原産地判別のデータ数を増やすため，本年度は 20 検体を海外から収集し，炭素，酸素及び水素の安定同位体比を測定した。

【研究 B】エタノールとその原料の安定同位体比の違い

エタノール原料と，それを使用して作られたエタノールの安定同位体比の違いを比較することで，製造工程の違いによる原料の安定同位体比の変化を調査する。製造工程がどれほど安定同位体比に影響するのかを知ることで，エタノールの原料・原産地判別の精度向上に資する。

【研究 C】トウモロコシの産地判別精度向上に関する研究

昨年度は落花生の産地判別を試みたが，本年度はトウモロコシを対象サンプルとした。油溶性成分や水溶性成分を取り除く効果について調査するため，未処理，脱脂，脱脂＋水洗浄の 3 条件で安定同位体比を測定し，前処理することによる判別の有効性について検討した。

【安定同位体比分析法とは (IRMS 法)】

安定同位体は半永久的に崩壊しない元素であり，地球上の存在比 (%) はほぼ一定である。しかし，気候 / 降水量 / 緯度等によって僅かではあるが存在比が異なっており，地域による違いは小数点以下 4 桁目が僅かに変動する程度である。この僅かな違いを識別して原産地や原料を判別する方法が安定同位体比分析法である。

例えば，植物原料による同位体比の違いは，光合成回路の違いによって現れる。植物は二酸化炭素を吸収し，ブドウ糖や酸素などを生成する (光合成)。この光合成回路の炭酸固定システム (反応経路) は植物の種類によって異なり，炭素の安定同位体比は僅かに変動する。この僅かに変動する炭素の安定同位体比から，原材料を判別することができる。

【安定同位体比の表記方法】

安定同位体比の値の表記方法は「 δ (デルタ)」が使われる。は偏差比を表しており，特定の基準となる標準物質の安定同位体比に対する千分率 (‰ , パーミル) として表記する。

例えば，一般的に炭素同位体比では次のように表記する。

$$\begin{aligned} {}^{13}\text{C} &= \frac{\text{サンプルの炭素同位体比} - \text{標準の炭素同位体比}}{\text{標準の炭素同位体比}} \times 1000 \\ &= \left(\frac{\text{サンプルの炭素同位体比}}{\text{標準の炭素同位体比}} - 1 \right) \times 1000 \end{aligned}$$

サンプルの炭素同位体比： サンプルの炭素 ${}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C}$ 比

標準の炭素同位体比： 標準物質の炭素 ${}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C}$ 比

- (1) ${}^{13}\text{C}$: 炭素安定同位体比 (${}^{12}\text{C}$ と ${}^{13}\text{C}$ の存在比)
- (2) ${}^{15}\text{N}$: 窒素安定同位体比 (${}^{14}\text{N}$ と ${}^{15}\text{N}$ の存在比)
- (3) D : 水素安定同位体比 (${}^1\text{H}$ と ${}^2\text{H}$ の存在比。 ${}^2\text{H}$ は以下 D と記載する)
- (4) ${}^{18}\text{O}$: 酸素安定同位体比 (${}^{16}\text{O}$ と ${}^{18}\text{O}$ の存在比)

6. 研究成果の概要

平成 24 年度の研究成果の概要は以下の通りである。

【研究 A】エタノールの原料・原産地判別

本研究では、海外で製造されたエタノールの安定同位体比測定を行うことで、エタノールの原料・原産地判別の確立を目的とする。本年度は、タイ、インドネシア（スマトラ島、ジャワ島）及びブラジルから収集したエタノールを対象としてサンプル（データ数）を増やし、判別精度向上に努めた。

本年度の研究ではすべてがサトウキビ及びモラセス由来のエタノールであったため、原料判別に関する新しい知見は得られていない。

一方、原産地判別では、タイ、インドネシアのスマトラ島（A 工場）、スマトラ島（B 工場）、ジャワ島及びブラジルの 5 ヶ所のエタノールを対象とした結果、スマトラ島（B 工場）が大きく他のサンプルと分布が分かれたため識別が可能となった。他の産地はプロット点の分布が近接しているものの、スマトラ島（B 工場）のみは「酸素×水素プロット」によって識別できる可能性が見出された。すなわち、同じ国であっても工場が異なると安定同位体比も異なることが明らかとなり、原産国ではなく地域によるきめ細かな判別の可能性が見出された。また、ブラジル産のエタノールについては、同じ地域であっても工場等の詳細な情報が不明であり、今回のデータからの識別は困難であった。昨年度のデータについても原産国ではなく、製造場所 で分けられる可能性があることから、工場単位でのサンプル収集及びサンプル数の集積によって判別を確立していきたい。

サンプル間の分析値の偏差では、不純物量が少ないサンプルについて偏差が少ないことから、より高い精度での原料・原産地判別を行うためには不純物を排除した分離分析が不可欠である。

また、今年度から測定した分離分析による炭素同位体比については、バルク測定よりも明らかな精度の向上が確認された。

【研究 B】エタノールとその原料の安定同位体比の違い

エタノールの安定同位体比が発酵・精製プロセスを経てどのように変化しているかを明らかにすることは、原料・原産地判別の一助となると考え、エタノールとその原料の安定同位体比を測定した。対象サンプルはエタノール、サトウキビ、モラセス、水（製造工程で使用）である。

分析の結果、原料とエタノールの炭素安定同位体比に差異はなく、製造工程中の炭素同位体比に変化はなかった。しかし、酸素及び水素同位体比については、原料とエタノール間で明らかにエタノールの同位体比が低くなっていることが確認され、これは製造工程の蒸留によって軽い同位体が濃縮され、同位体比が低くなったと推測された。

また、エタノールサンプル中の酸素及び水素同位体比については、バルク分析で測定したため、サンプル中に含まれるエタノールと水及び不純物の酸素及び水素同位体比を同時に測定した結果になっている。今後は、分離分析によって酸素及び水素同位体比を測定し、製造工程におけるエタノール中の水酸基の交換性についても調査していきたい。

【研究C】トウモロコシの産地判別精度向上に関する研究

本年度は、落花生に代わりトウモロコシを対象サンプルとした。トウモロコシは、食用、飼料用、燃料用として幅広い分野で消費され、今後さらに需要が高まると予想される。トウモロコシの産地判別手法を確立するため、前処理を変えて安定同位体比を測定した結果、前処理を重ねるごとに安定同位体比が変化し、判別精度が向上することはなかった。中でも、前処理をしない未処理試料の安定同位体比を「炭素×酸素プロット」及び「炭素×水素プロット」すると、6道県のうち、3県は識別が可能であった。今後、サンプル数を増やすことで判別精度を上げたい。

7. 研究結果

本年度の研究結果は以下の通りである。

7-1 【研究A】エタノールの原料・原産地判別

安定同位体比を用いた原料・原産地判別を行う際、一般的に、炭素同位体比は原料を反映し、酸素及び水素同位体比は原産地の環境を反映すると言われている。

昨年度の研究報告において、エタノールの炭素安定同位体比から C3 植物由来、C4 植物由来、化石燃料由来（化学合成品）の判別が可能であることが示された。これは原料である植物の光合成プロセスの違いが炭素同位体比に大きく反映されていることによるものである。

一方、昨年度の研究では酸素・水素同位体比から原産地を判別するには至らなかったが、その理由の一つとしてサンプル数が少なかったことが挙げられる。よって、本年度は更に 20 検体のサンプルを収集し安定同位体比を測定した。

また、昨年度の炭素同位体比は、EA-IRMS 法でバルク分析（サンプルを不純物ごと測定）していたが、本年度はエタノール成分のみを分離して測定する GC/C/IRMS 法を適用した。

(1) 測定サンプル

東南アジア産 10 検体（モラセス由来）及びブラジル 10 検体（サトウキビ由来）について GC/C/IRMS 法（炭素同位体比測定法）及び TCEA/IRMS 法（酸素・水素同位体比測定法）で安定同位体比を測定した⁴。表 1 に昨年度分を含めてサンプルの一覧を示す。

(2) 測定結果及び考察

炭素、酸素及び水素の安定同位体比を表 2、表 3 及び表 4 にプロットした。明らかとなった事項は以下の通りである。

炭素、酸素、水素の同位体比について

本年度のサンプルの炭素同位体比は -10 ‰ ~ -12 ‰ 付近にプロットされた。これは、C4 植物の特徴と合致している。炭素同位体比だけで C4 植物、C3 植物及び合成エタノールの識別が可能である。また、僅かに産地・工場別で炭素同位体比に差異があることから、それらの識別の可否を明らかにするためには今後もサンプル数を増やして調査する必要がある。

本年度サンプルの酸素同位体比は 0 ~ 20 ‰ の間で産地により数値が異なっている。特に、インドネシアのスマトラ島（B 工場）で生産されたエタノールは他の産地と酸素同位体比が異なるため、識別が可能である。同じインドネシアのスマトラ島であっても生産工場が異なると酸素同位体比も大きく異なることが明らかとなった。

本年度サンプルの水素同位体比は -270 ~ -170 ‰ の間で産地により数値が異なっている。特に、インドネシアのスマトラ島（B 工場）で生産されたエタノールは他の産地と水素同位体比が異なるため、酸素同位体比と同様に判別が可能である。

原料判別について

本年度はサトウキビ及びモラセス由来のエタノールしか分析していない為、原料の判別について新しい知見は得られていない。

⁴ 分析方法は巻末資料参照

原産地判別について

今回分析したインドネシアのスマトラ島 B は、他の原産地、工場とは異なる酸素及び水素同位体比を示したため、識別できる可能性が見出された（表 2、表 3 及び表 4）。スマトラ島 B 以外のタイ、インドネシアサンプルは、「酸素×水素」プロットによって僅かな違いが確認されたため、識別できる可能性がある。しかし、分布が近接しているため、更なる調査で明確な識別をしたい。

また、ブラジルについては土地が広大であり、サトウキビの生産地とエタノールの製造工場が大きく離れていることが予想される。今後はより詳細な情報で分布を確認していきたい。

サンプル間の分析値の偏差

今回分析したインドネシアサンプル（スマトラ島 A、スマトラ島 B 及びジャワ島）の同一工場での分析値のばらつきを確認したところ、インドネシアのジャワ島の酸素及び水素同位体比にサンプル間で偏差が見られないもしくは、他の工場よりも偏差が少ないことが確認された。

今回の酸素及び水素同位体比測定は、製造工程中に生成される不純物もエタノール及び水と合算で測定されている。また、工場によってプラントの性能や酵母の種類等さまざまであり、不純物の量も異なる（表 1）。その中でもインドネシアのジャワ島サンプルは、他のサンプルに比較し、極端に不純物量が少なく、エタノールの精製度合いが高い。また、不純物量もサンプル間で一定（すべて 0.01 g/L）であることから、同一工場内で生産されたスマトラ島 A 及び B の酸素及び水素同位体比の値を変動させていたのは、不純物であることが推測された。

今後、原料及び原産地判別を行う上で、分析値の偏差を減らすことが求められる。以上のことから、エタノールだけを分離測定することで原料・原産地判別の精度をあげることができるものと考えられる。

分析方法の違いによる分析値のばらつき

今年度、炭素同位体比測定はエタノール中の炭素のみを抽出した分離分析（GC/C/IRMS）で測定した。昨年度の炭素同位体比は水や他の不純物を含む状態で分析（バルク分析）したものであり、比較すると分離分析で測定することで明らかな精度の向上が確認された。（図 1）

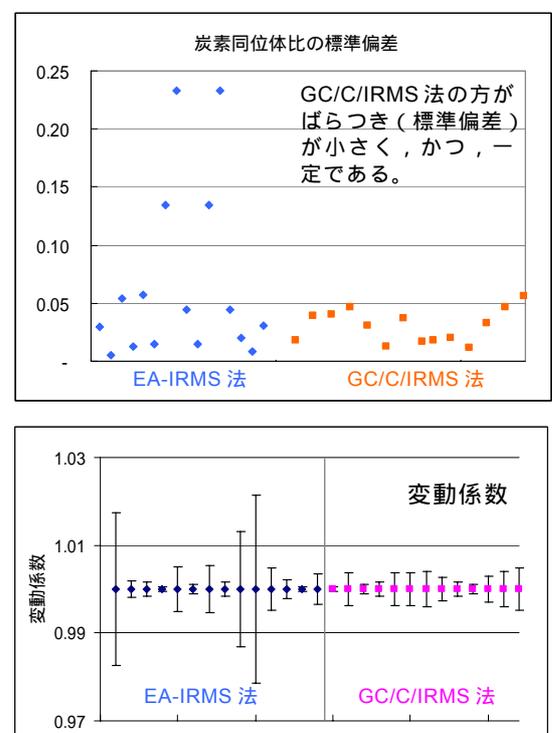


図 1 分析方法の違いによる分析値のばらつき（炭素同位体比）

(3) 小括

本年度の研究ではモラセス由来のエタノールのみを分析したため、原料識別に関する新しい知見は得られていない。

原産地判別では、スマトラ島(B工場)が大きく他のサンプルと分布が離れたため、識別が可能となった。他の産地は分布が近接しているものの、「酸素×水素」プロットによって識別できる可能性が見出された。

すなわち、同じ国であっても工場が異なると安定同位体比も異なることが明らかとなり、原産国ではなく、地域によるきめ細かな判別の可能性が見出された。

また、ブラジル等の広大な土地では同位体比の変動も大きく、同一産地内での変動が大きいと推測される。そのため、今後は工場あるいは地域による識別が必要になると考える。

サンプル間の分析値の偏差では、不純物量が少ないサンプルについて偏差が少ないことから、より高い精度での原料・原産地判別を行うためには不純物を排除した分離分析(ガスクロ分離)が不可欠である。

炭素同位体比については、昨年度からの分析方法の違いによる精度の向上が確認された。今後は酸素及び水素同位体比についても分離分析により精度を上げていきたい。

表1 エタノールサンプル一覧

サンプル 取得年	通し 番号	産地	原料名 ⁵	水分量 wt%	総不純物量 g/L	分析方法		
						炭素		酸素 / 水素
						EA	GC/C	TC/EA
2011 年度	1	タイ	タビオカ	4.75	0.16			
	2	タイ	モラセス	6.08	0.02			
	3	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	5.78	0.34			
	4	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	0.52	1.12			
	5	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	5.28	0.04			
	6	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	6.22	0.03			
	7	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	5.81	0.01 以下			
	8	メキシコ	サトウキビ	6.42	0.08			
	9	インドネシア (スマトラ島ランブーン)	モラセス	5.54	0.02			
	10	カナダ (オンタリオ州)	トウモロコシ	5.83	0.01 以下			
	11	アメリカ (イリノイ州)	トウモロコシ	6.25	0.01 以下			
	12	中国 (安徽省)	小麦スラリー	0.31	1.74			
	13	- (参考品)	エチレン (合成)	0.03	0.01 以下			
2012 年度	14	タイ	モラセス	7.06	0.03			
	15	インドネシア スマトラ島 A	モラセス	6.34	0.08			
	16	インドネシア スマトラ島 A	モラセス	5.41	0.04			
	17	インドネシア スマトラ島 A	モラセス	5.35	0.03			
	18	インドネシア スマトラ島 B	モラセス	5.11	0.12			
	19	インドネシア スマトラ島 B	モラセス	4.99	0.13			
	20	インドネシア スマトラ島 B	モラセス	5.50	0.56			
	21	インドネシア ジャワ島	モラセス	5.87	0.01			
	22	インドネシア ジャワ島	モラセス	5.91	0.01			
	23	インドネシア ジャワ島	モラセス	5.91	0.01			
	24	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	5.49	0.84			
	25	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	5.68	0.03			
	26	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	6.24	1.44			
	27	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	6.43	0.47			
	28	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	0.35	6.38			
	29	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	6.34	0.14			
	30	ブラジル (サントス)	サトウキビ	7.21	0.46			
	31	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	6.48	0.45			
	32	ブラジル (サンパウロ)	サトウキビ	5.95	0.45			
	33	ブラジル (パラナ)	サトウキビ	6.88	0.52			

EA : EA-IRMS GC/C : GC/C/IRMS TC/EA : TC/EA-IRMS

⁵ 日本へ輸入されるエタノールはサトウキビ由来のブラジル産が8割を占めている (平成22年データ)。また、ブラジルではサトウキビの絞り汁 (ケーンジュース) を使用してエタノールを生産することが多いが、インドネシアやタイ等では砂糖を製造した後の廃糖蜜 (モラセス) を利用してエタノールを生産することが多い。

表2 安定同位体比 (数値プロット)

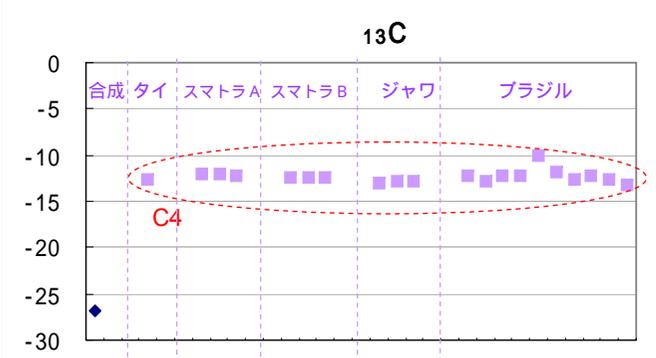
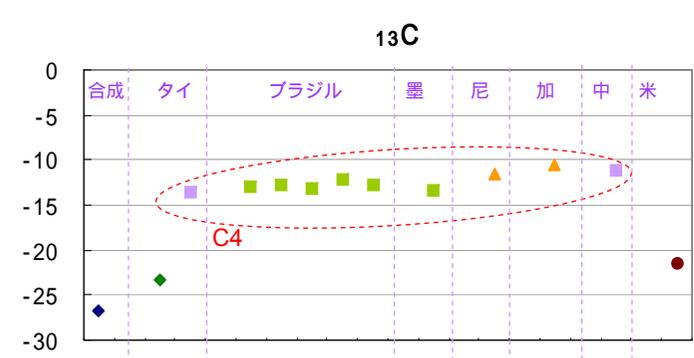
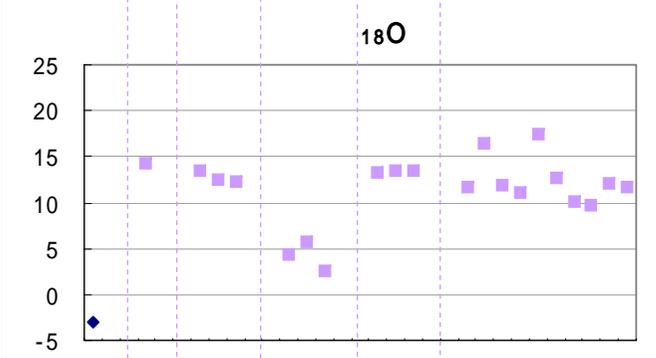
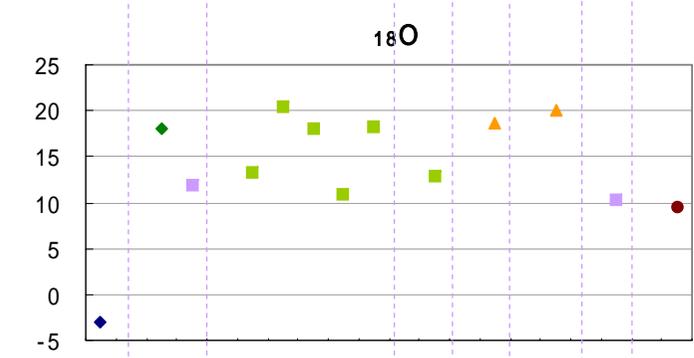
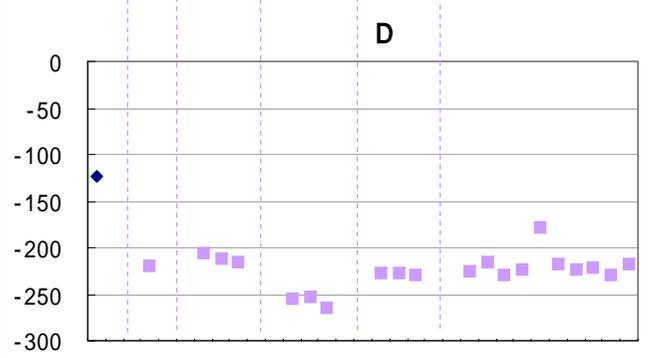
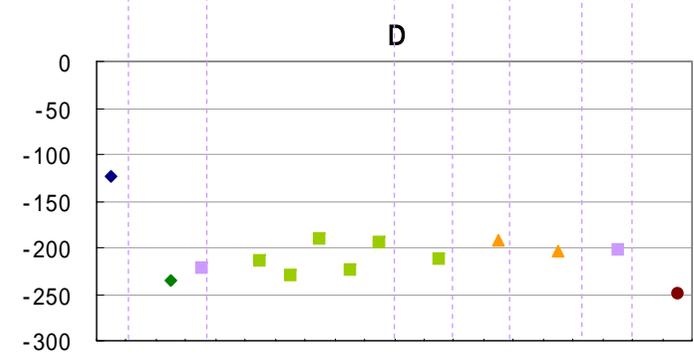
2012 年度	2011 年度	所見
<p style="text-align: center;">¹³C</p> 	<p style="text-align: center;">¹³C</p>  <ul style="list-style-type: none"> ◆ 合成 ■ サトウキビ ▲ トウモロコシ ◆ タピオカ ■ モラセス ● 小麦スラリー 	<p style="text-align: center;">【炭素同位体比】</p> <p>合成, C4 植物, C3 植物の判別が可能である。 モラセスはサトウキビを原料としたものであることを考慮すると、2011 年度のトウモロコシとモラセス・サトウキビは識別できる可能性がある。</p>
<p style="text-align: center;">¹⁸O</p> 	<p style="text-align: center;">¹⁸O</p>  <ul style="list-style-type: none"> ◆ 合成 ■ サトウキビ ▲ トウモロコシ ◆ タピオカ ■ モラセス ● 小麦スラリー 	<p style="text-align: center;">【酸素同位体比】</p> <p>2012 年度サンプルの酸素同位体比は産地によって分布が異なり、特にスマトラ島 B は他のサンプルよりも大きく離れており識別が可能である。また、不純物量が少ないジャワ島サンプルは、データ間の偏差が少ないことが確認された。</p>
<p style="text-align: center;">D</p> 	<p style="text-align: center;">D</p>  <ul style="list-style-type: none"> ◆ 合成 ■ サトウキビ ▲ トウモロコシ ◆ タピオカ ■ モラセス ● 小麦スラリー 	<p style="text-align: center;">【水素同位体比】</p> <p>2012 年度サンプルの水素同位体比は産地によって分布が異なり、特にスマトラ島 B は他のサンプルよりも大きく離れているため、識別が可能である。また、不純物量が少ないジャワ島サンプルは、データ間の偏差が少ないことが確認された。</p>

表3 安定同位体比の分布(原料別)

2012 年度	2011 年度	所見
		<p>【炭素×酸素】</p> <p>2011 年度はモラセス、サトウキビ及びトウモロコシ(C4植物)に差異がなく、判別が困難であった。ただし、トウモロコシについてはサンプル数を増やすことで判別出来る可能性がある。</p> <p>一方、2012 年度サンプルは同じ原料であるにも関わらずスマトラ島Bだけが大きく離れており、他は判別できない。</p>
		<p>【炭素×水素】</p> <p>2011 年度はモラセス、サトウキビ及びトウモロコシが大きく分かれず、判別困難であった。</p> <p>一方、2012 年度サンプルは同じ原料であるにも関わらずスマトラ島Bだけが大きく離れており判別できる。</p>
		<p>【酸素×水素】</p> <p>2011 年度は合成以外の原料はすべてが混在しており、判別不可能である。</p> <p>一方、2012 年度サンプルは同じ原料であるにも関わらず、産地・工場によって分かれていることから、更にサンプルを増やすことで判別精度が上がる可能性がある。</p>

表4 安定同位体比の分布（産地別）

2012 年度	2011 年度	所見
		<p>【炭素×酸素】</p> <p>2011 年度は、合成、タイ及び中国以外は識別不能であった。 一方、2012 年度サンプルはタイ、スマトラ島 A 及びジャワ島が分布の近接しており、判別は困難である。しかし、スマトラ島 B は上記サンプルから分布が離れているため、識別可能である。</p>
		<p>【炭素×水素】</p> <p>2011 年度はモラセス、サトウキビ及びトウモロコシが大きく分かれず判別が困難であった。 一方、2012 年度サンプルは同じ原料であるにも関わらず、スマトラ島 B だけが大きく離れており、判別できる。</p>
		<p>【酸素×水素】</p> <p>2011 年度は合成以外、判別できなかったのに対し、2012 年度はスマトラ島 B の分布が分かれており、産地判別が可能である。他の産地では分布が近接しているものの、サンプル数を増やして調査することで判別できる可能性がある。</p>

7-2 【研究B】エタノールとエタノール原料の安定同位体比の違い

エタノールは酵母菌による発酵プロセスを経て作られた後に蒸留精製される。製造工程において水などと安定同位体の交換反応が起こる可能性も考えられ、同じ産地の原料を使用しているにもかかわらず最終製品エタノールの酸素・水素・炭素同位体比が異なる可能性がある。

本研究では、エタノールの同位体比が発酵・精製プロセスを経てどのように変化しているかを明らかにすることが、原料・原産地判別の一助となるものと考えている。本研究で対象としたサンプルは、エタノール、サトウキビ、モラセス、水（製造工程で使用）である。

エタノールの安定同位体比に影響する要因を以下に挙げる。

- ・原料 使用する原料品種の違いや配合割合の違い
- ・原料の産地 原料が生育する場所により水源が異なる。
- ・酵母菌 工場ごとに生産性の高い酵母菌が開発・使用される。
- ・製造工程 工場ごとに精留塔の数や性能が異なる。
- ・水酸基の交換 エタノールの水酸基の水素同位体交換効率が不明である。

アルコール発酵は糖類が酵母などにより嫌気条件で分解され、エタノールと二酸化炭素を生成する反応である。したがって、エタノールの安定同位体は原料であるサトウキビ・モラセスに由来するものである。



主なエタノールの製造工程は以下の通りである。(ただし、工場により一部の工程が異なる)



同位体交換は、製造工程を経るごとに起きる可能性があり、同位体交換が特に起き易いと想定される工程は以下の通りである。

- ・加水抽出塔：疎水性の高い微量不純物を除去するために水を加える工程
- ・精留塔：純度の高いエタノールを抜き出すための蒸留工程

(1) 測定サンプル

タイ及びインドネシアから収集したエタノール製造に使用されているサトウキビ、モラセス及び水と最終製品のエタノールについて測定した。測定したエタノールとその原料を表5に示す。

表5 産地及びサンプルの種類と検体数

産地	試料数			
	サトウキビ	モラセス	水	エタノール
タイ	-	2	3	1
インドネシア スマトラ島B	1	1	1	3
インドネシア ジャワ島	1	1	1	3

(2) 測定方法

対象サンプルの形態によって以下の方法で分析した。

固体サンプル（サトウキビ，モラセス）

サトウキビは皮を削り取った後，繊維を凍結乾燥させて粉碎し粉末サンプルとした。また，モラセスは試料をそのままサンプルとした。

炭素同位体比は EA-IRMS 法，酸素及び水素同位体比は TC/EA-IRMS 法で分析した。

液体サンプル（エタノール，水）

エタノールの炭素同位体比は GC/C/IRMS 法，水及びエタノールの酸素及び水素同位体比は TC/EA-IRMS 法で分析した。（表 6）

(3) 測定結果及び考察

エタノール及び原料（サトウキビ，モラセス）の安定同位体比から明らかとなった事項は以下の通りである。

工場別の安定同位体比（表 7）

工場の場所に関わらず，酸素及び水素同位体比は原料（サトウキビ，モラセス）よりも

エタノールの方が低い。これは，製造工程に蒸留があることで軽い同位体だけが濃縮された可能性を示すものである。また，原料にはエタノールを生成する糖類以外の成分が多く含まれており，これらを一緒くたに分析することで安定同位体比に違いが出ている可能性も考えられる。一方，エタノールの酸素及び水素同位体比は，エタノール中に含まれる不純物及び水を含んだ合算値であり，今回のデータだけで水の影響は受けていないとは判断できない。

炭素同位体比については，工場及びサンプルの違いに関わらずすべてが同等の値である。これはすべてのエタノールが C4 植物由来であり，かつ，サトウキビ及びモラセスが C4 植物であるためと考えられる。すなわち，エタノールの炭素同位体比は原料を反映し，製造工程では殆ど変化していないことが示された。

XY プロット図（表 8）

酸素，水素，炭素同位体比をそれぞれ XY プロットしたが，すべてのプロット図で，原料とエタノールは大きく離れており，グルーピングすることは出来ない。すなわち，原料とエタノールの同位体比に相関は見られない。

インドネシア B 工場とジャワ島では，原料の同位体比に大きな差異がないのに対し，製造されたエタノールの酸素及び水素同位体比の差は顕著であり，エタノールは原料よりも製造工程に影響を受けることが示された。

(4) 小括

同一工場内でのエタノールの酸素及び水素同位体は，原料に比べて低くなることから，エタノールは蒸留工程によって軽い同位体が濃縮された可能性がある。また，炭素同位体比は原料を反映し，酸素及び水素同位体比は製造工程に影響を受けることが確認された。

また，本年度はエタノールの酸素及び水素同位体比についてバルク分析で測定したが，今後分離分析を行うことで，製造工程での影響をより詳細に明らかにすることができると考える。

表 6 測定方法

サンプル	δC	δO	δH
サトウキビ	EA-IRMS 法	TC/EA-IRMS 法	TC/EA-IRMS 法
モラセス			
水	-		
エタノール	GC/C/IRMS 法		

表7 エタノールと原料の安定同位体比の比較（工場別）

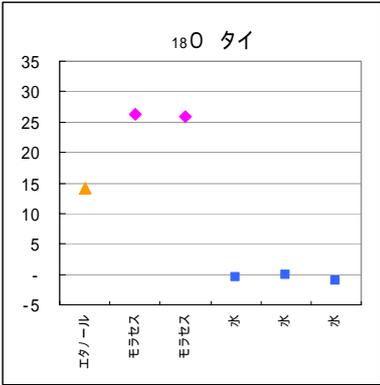
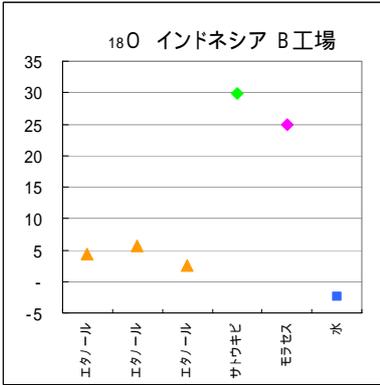
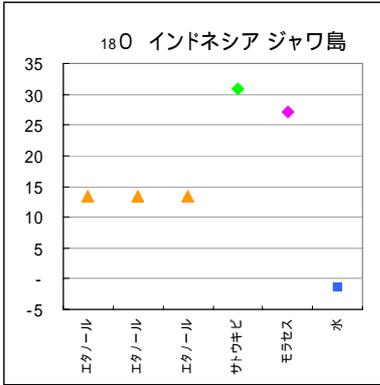
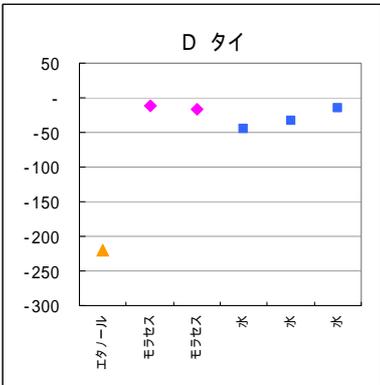
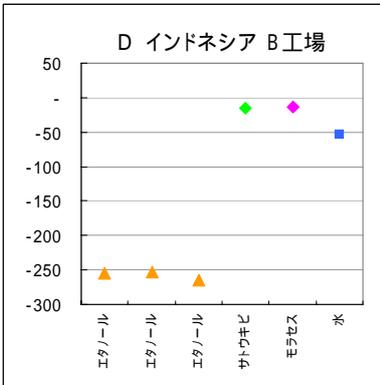
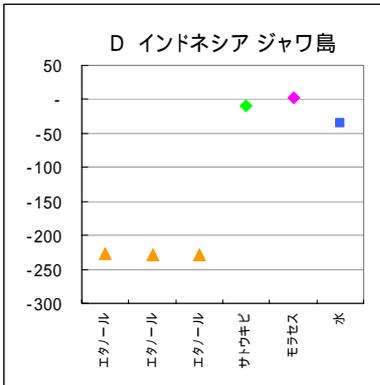
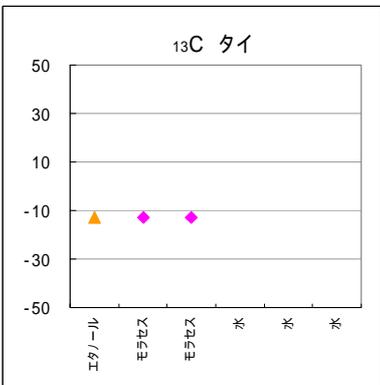
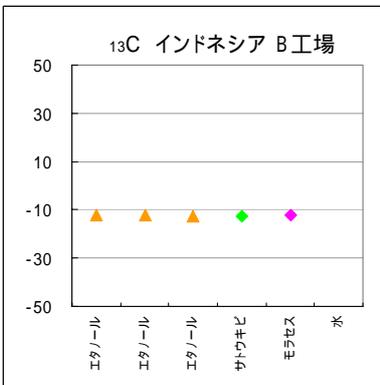
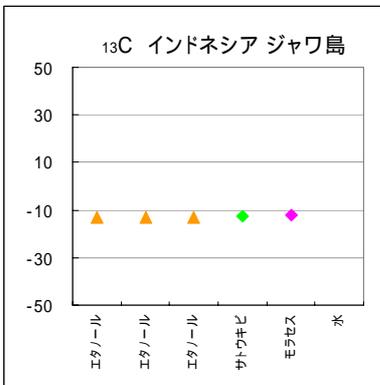
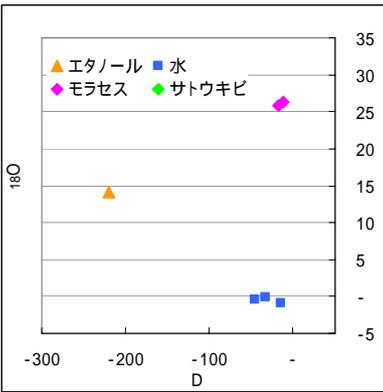
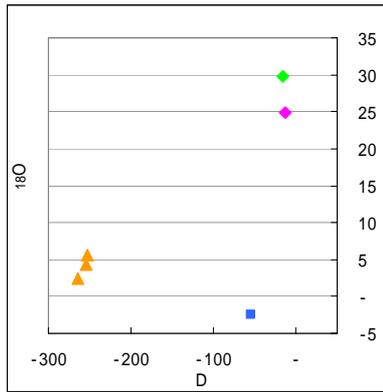
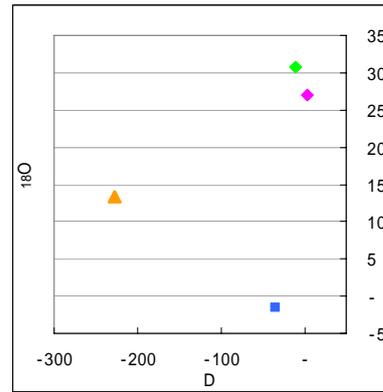
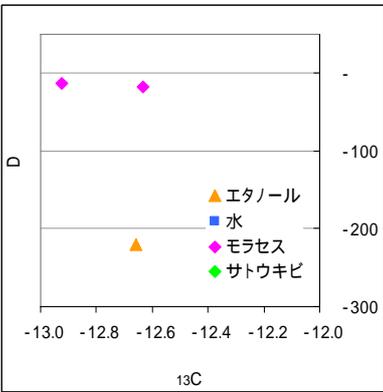
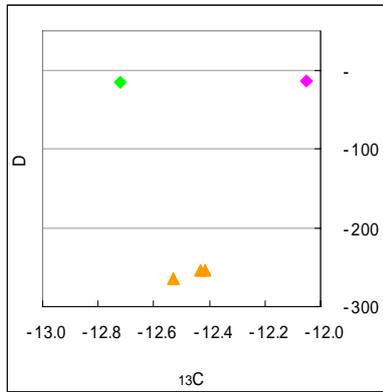
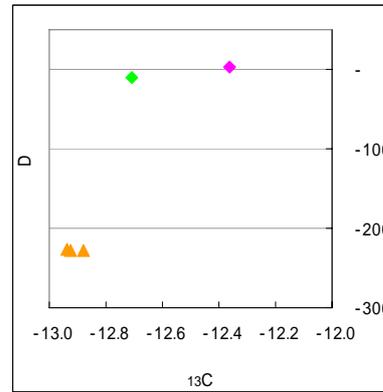
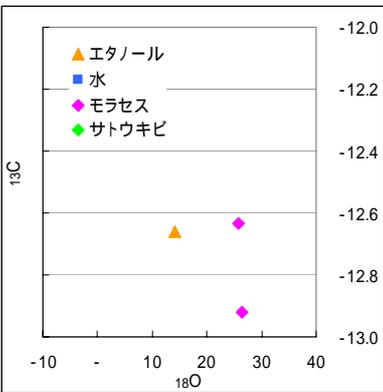
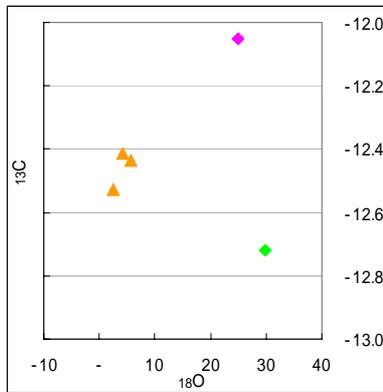
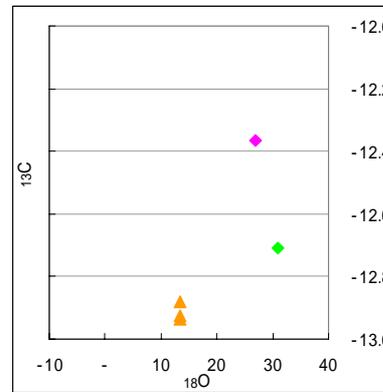
項目	タイ	インドネシア B工場	インドネシア ジャワ島
^{18}O			
D			
^{13}C			
まとめ	<p>酸素・水素同位体比は、原料とエタノールでまったく異なる。しかし、炭素同位体比はエタノールと原料であるモラセスで同等である。</p>	<p>タイと同様に、酸素・水素同位体比は原料とエタノールで数値が全く異なる。しかし、炭素同位体比は原料であるサトウキビ・モラセスとエタノールは同等である。</p>	<p>タイと同様に、酸素・水素同位体比は原料とエタノールで数値が全く異なる。しかし、炭素同位体比は原料であるサトウキビ・モラセスとエタノールは同等である。</p>
所見	<p>酸素・水素同位体比は、原料（サトウキビ、水）とエタノールで大きな差異があり、製造中に同位体が濃縮された可能性がある。また、酸素同位体比はサトウキビとモラセスで分布が分かれている。</p> <p>炭素同位体比については、工場及びサンプルの違いに拘らずすべてが同等の値である。これはすべてのエタノールが C4 植物由来であり、かつ、サトウキビ及びモラセスが C4 植物であるためである。すなわち、炭素同位体比では原料と最終製品の違いは見出すことは出来ない結論される。</p>		

表 8 エタノールと原料の安定同位体比のXYプロット図(工場別)

項目	タイ	インドネシア B工場	インドネシア ジャワ島
^{18}O x D			
D x ^{13}C			
^{13}C x ^{18}O			
所見	<p>酸素、水素、炭素同位体比をそれぞれ XY プロットしたが、すべてのプロット図で、原料とエタノールは大きく離れており、グルーピングすることは出来ない。 同じインドネシア(B工場及びジャワ島)で生産された原料の同位体比は大きな差異がないのに対し、製造されたエタノールの同位体比の差は顕著であることから、エタノールは原料よりも製造工程に影響を受けることが推測された。</p>		

7-3 【研究C】トウモロコシの産地判別精度向上に関する研究

植物は光合成を行い、二酸化炭素を固定して糖類等の様々な代謝物を作り出す。光合成において、二酸化炭素を葉に取り込む工程や、酵素によって炭素が固定される工程の前後で、炭素の同位体比が変わることが知られている。このように同位体の比率が変わることを同位体分別と呼ぶ。

同位体分別はあらゆる反応を経るたびに起こる可能性があり、一般的には、反応を多く経て作られた生成物ほど同位体比が低くなることが知られている。

脂質は有機化合物全体の中でも特に低い安定同位体比を示すことが知られている⁶。サンプルに含まれる脂質の量の違いが同位体比に影響を及ぼすと考えられるため、脂質量が一定でないサンプル同士を比較する場合には、前処理として脱脂を行うことが通例となっている。脱脂方法は塩素系溶剤とメタノールの混合溶剤にサンプルを浸漬させる方法が主流である。

昨年、落花生を脱脂処理して測定したところ、国内産と中国産の判別精度が向上した。農産物の産地判別については国産米の判別などが報告されている⁷が、一部の地域において明確な判別が難しいため、より精度の高い判別方法の開発が期待されている。

本年度は、食用、飼料用、燃料用として幅広い分野で消費され、今後さらに需要が高まると予想されるトウモロコシを対象サンプルとした。トウモロコシの主成分はデンプンであり、油脂分は可食部 100g あたり 1.7g 程度である（五訂増補日本食品標準成分表）。約 50%の油脂を含む落花生と比較すると、トウモロコシの油脂分は極めて少ない。そこで、脱脂処理だけでなく、水洗浄処理を追加し、前処理の有効性及び産地判別の精度向上について検討した。

(1) 測定サンプル

収集したトウモロコシサンプルを表 9 に示す。

トウモロコシ（学名 *Zea mays*）は、世界三大穀物の一つといわれ、穀物として人間の食料や家畜の飼料となるほか、デンプン（コーンスターチ）や植物油、バイオエタノールの原料としても需要が高く、年間世界生産量は 2009 年に 8 億 1700 万トンに達している。日本で消費されるトウモロコシはアメリカからの輸入がメインであり、価格は 2007 年頃から高騰している。トウモロコシは用途によって品種が様々あるが、本研究では、生食用や缶詰用によく用いられるスイートコーンを対象とし、2012 年に栽培され収穫したばかりのトウモロコシを日本各地から計 38 検体収集した。

(2) 測定方法

脱脂処理及び水洗浄処理の有効性を検討するため、以下の 3 条件で前処理を行い、炭素・窒素同位体比は EA-IRMS 法、酸素・水素同位体比は TC/EA-IRMS 法で分析した。

未処理サンプル

トウモロコシの苞皮を剥ぎ、絹糸を取り除いた後、中央部を 5 cm 切り出した。その後、食用部分である種実部のみを包丁で切り落とし、凍結乾燥して粉碎した。

脱脂サンプル

石英ウールを詰めた細身のカラムに未処理サンプルを詰め、有機溶媒⁸（フォルチ液）を流した後、フォルチ液を満たして浸潤させた。その後、溶媒をメタノールのみに変えて十分

表 9 対象サンプル

産地	検体数
北海道	6
青森	14
長野	6
茨城	8
群馬	2
高知	2

⁶ 引用文献（第 6 項参照）

⁷ 引用文献（第 6 項参照）

⁸ ジクロロメタンとメタノールを 1:1 で混合したもの。

に洗浄した後，カラムからサンプルを取り出して乾燥した。

脱脂水洗サンプル

脱脂サンプルを水に浸漬して超音波をかけた後，減圧ろ過しながら更に水洗浄し，凍結乾燥した。

(3) 測定結果及び考察

トウモロコシについて安定同位体比を測定した結果，明らかとなった事項は以下の通りである。

前処理の違いによる安定同位体比の違い（図5）

炭素同位体比は産地により前処理後の数値の変化傾向が異なっている。

北海道及び青森は未処理に比べて脱脂水洗すると炭素同位体比が低くなっているが，長野，茨城，群馬及び高知では，未処理に比べて脱脂水洗試料の値が大きい。脱脂処理試料の同位体比測定は青森県でのみ実施したが，サンプルによって高低が見られ，一定の傾向が見られない。油脂の炭素同位体比は低いことから，脱脂によってサンプルの炭素同位体比が上がると考えられたが，その傾向は見られなかった。

窒素同位体比は，未処理と脱脂水洗処理で殆ど差異がない。油分は窒素が含まれないため，同位体比に影響は与えないはずであるが，水溶出物（アミノ酸，可溶性でんぷん，水溶性タンパク質等）も窒素同位体比に大きく影響しない可能性が見出された。これは，水溶出物が微量であるためと考えられる。

酸素同位体比は産地に拘らず，未処理よりも脱脂水洗試料の値が低い。また，未処理に比べて，脱脂や水洗など，処理を重ねるほど酸素同位体比が低くなる傾向が見られた。

水素同位体比は未処理に比べて脱脂水洗試料の値が低い。一方，脱脂試料は未処理よりも高いか，あるいは同等である。水素は油分及び水溶出物に必ず含まれる元素であり，それらが抜かれたことで水素同位体比に影響したと考えられるが傾向が一定でない。したがって，今後サンプル数を増やすなどして原因を明らかにしたい。

XYプロット図（表12）

前処理方法別に炭素，酸素，水素，窒素同位体比をXYプロットした結果，未処理サンプルの「炭素×酸素プロット」及び「炭素×水素プロット」が産地識別可能なプロット方法として有効性が見出された（図2）。前処理を行うことで，判別の精度向上を期待したが，脱脂あるいは脱脂水洗を行っても分布が産地ごとに分かれることはなく，識別は困難である。

判別分析（表10，表11）

XYプロットで産地識別が出来る可能性が見出された。更に，統計処理手法の判別分析を適用して未処理試料及び脱脂水洗試料について解析した。

（図3，図4）

未処理試料では，北海道，長野，高

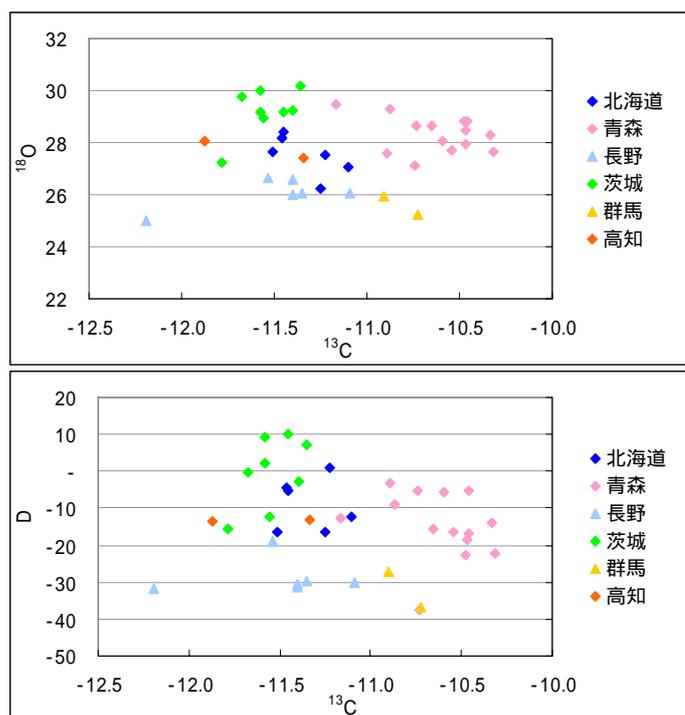


図2 未処理試料のXYプロット図

知の的中率が 80%以下と低い。すなわち、これら 3 県の判別が困難という結果が得られた。

一方、脱脂水洗試料では、長野、茨城、群馬の的中率が 80%以下と低い。

すなわち、現段階ではこれら 3 県を識別することは難しいが、残りの都道府県は判別できている。今後、サンプル数を増やすことで判別精度が上がる可能性に期待したい。

(4) 小括

トウモロコシについて前処理を変えて安定同位体比を測定した結果、前処理を重ねるごとに安定同位体比が変化するが、判別精度が向上することはなかった。中でも、前処理をしない未処理試料の安定同位体比を「炭素×酸素プロット」及び「炭素×水素プロット」すると、6 道県のうち、3 県は識別が可能であった。今後、測定部位を細かく選定し、サンプル数を増やすことで判別精度を上げたい。

表 10 未処理試料の判別分析結果

試料の産地 (測定数)	予測値(判別結果)						試料の産地 (試料数)
	北海道	青森	長野	茨城	群馬	高知	
北海道(20)	14	0	1	2	0	3	70%
青森(70)	2	62	0	4	2	0	89%
長野(30)	1	0	22	0	4	3	73%
茨城(37)	0	0	0	31	0	6	84%
群馬(10)	0	0	0	0	10	0	100%
高知(10)	4	0	0	0	0	6	60%

表 11 脱脂水洗処理試料の判別分析結果

試料の産地 (測定数)	予測値(判別結果)						判別率
	北海道	青森	長野	茨城	群馬	高知	
北海道(9)	9	0	0	0	0	0	100%
青森(20)	0	18	2	0	0	0	90%
長野(26)	0	3	20	3	0	0	77%
茨城(40)	0	0	8	22	0	10	55%
群馬(10)	0	2	0	0	8	0	80%
高知(6)	0	0	0	0	0	6	100%

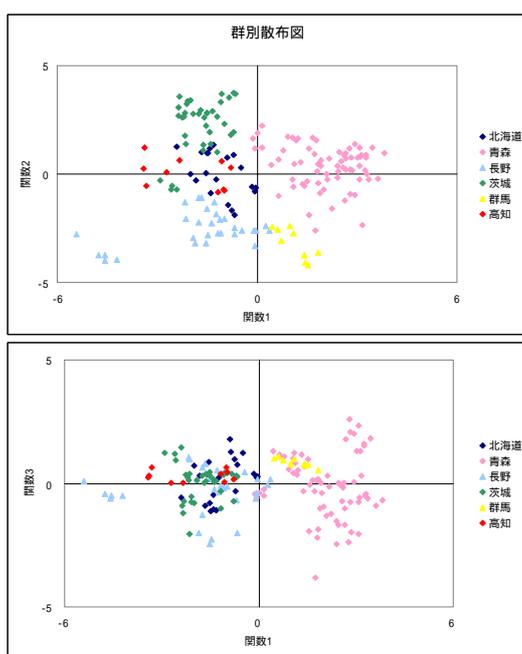


図 3 未処理試料の判別分析プロット

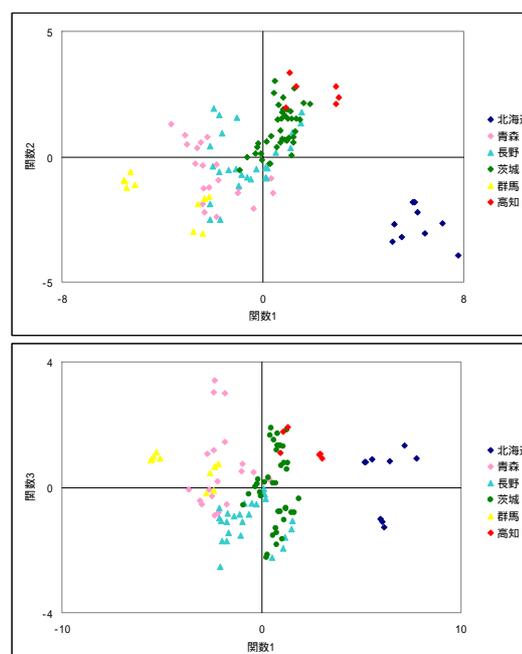


図 4 脱脂水洗試料の判別分析プロット

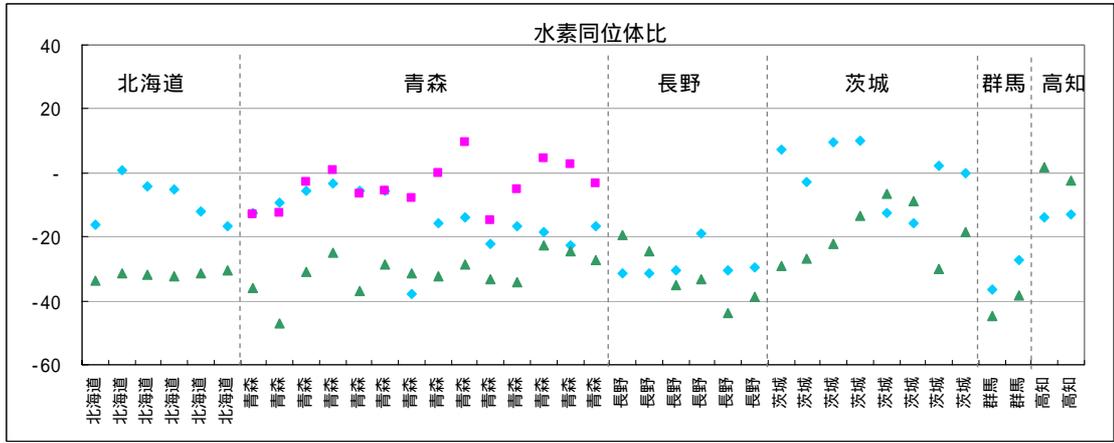
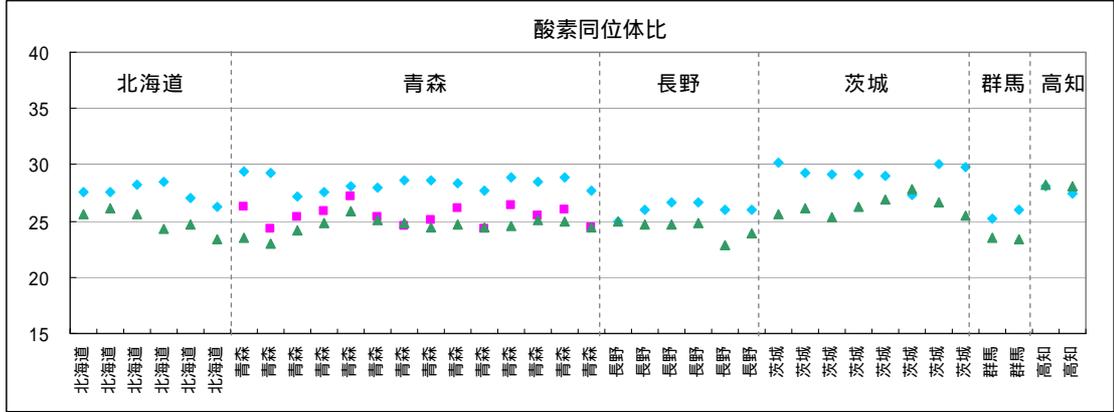
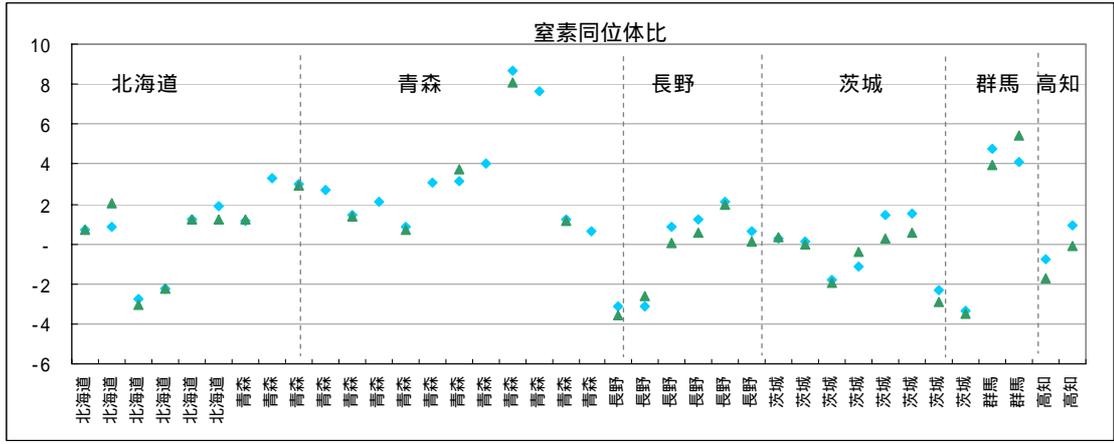
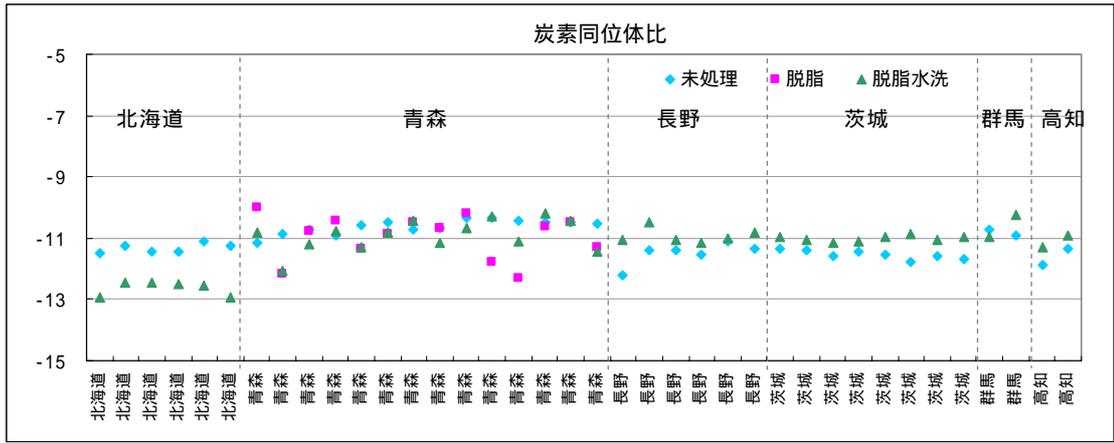
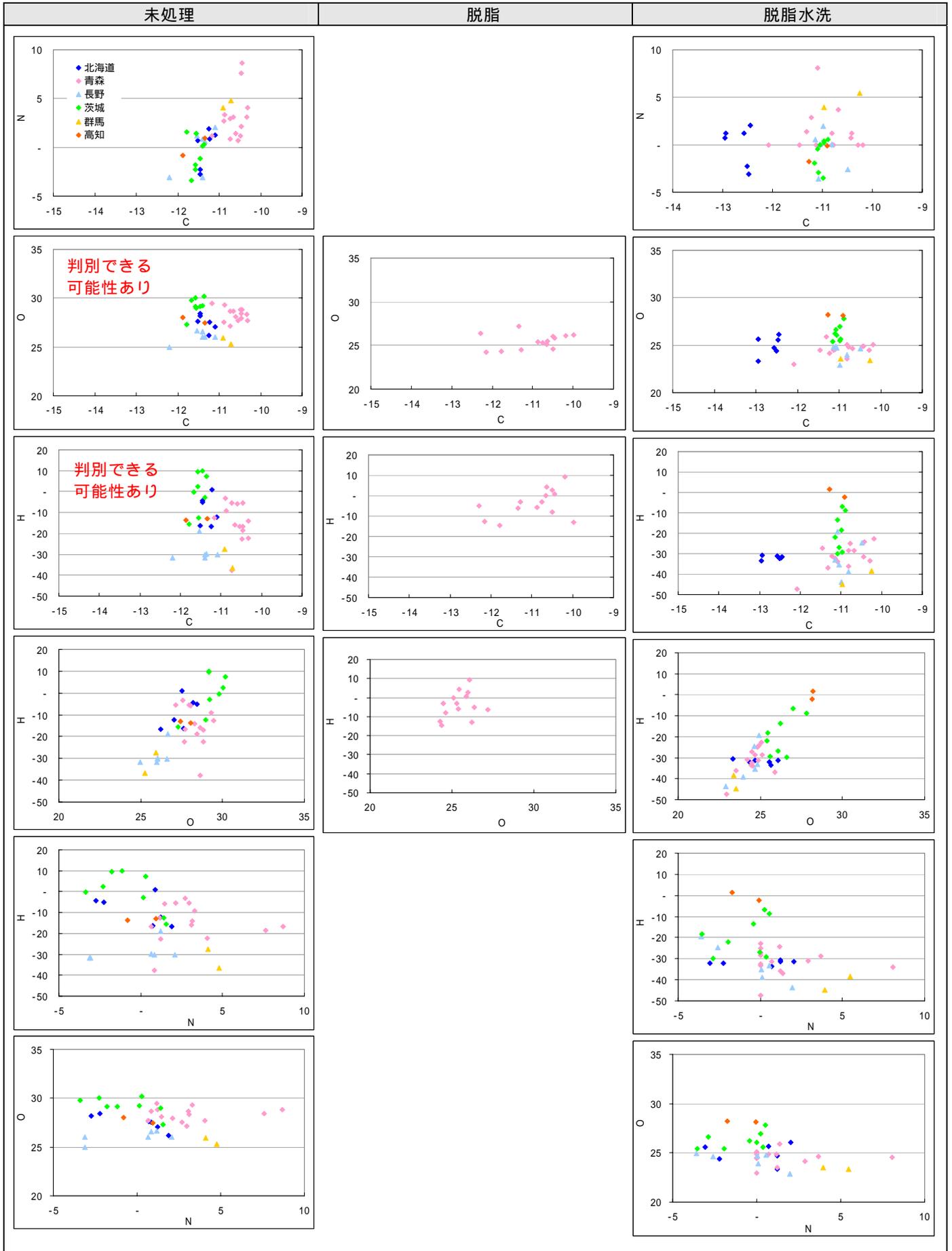


図5 トウモロコシの安定同位体比

表 12 トウモロコシの前処理の違いによる安定同位体比の分布



8. 所見

本年度の研究から明らかとなった事項は以下の通りである。

【研究A】エタノールの原料・原産地判別

本年度の研究ではサトウキビ及びモラセス由来のエタノールのみを分析したため、原料判別に関する新しい知見は得られていない。

原産地判別では、タイ、インドネシアのスマトラ島（A工場）、スマトラ島（B工場）、ジャワ島及びブラジルの5ヶ所のエタノールを対象として測定した。測定の結果、スマトラ島（B工場）が大きく他のサンプルと分布が分かれたため識別が可能となった。他の産地は分布が近接しているものの、「酸素×水素プロット」によって識別できる可能性が見出された。

すなわち、同じ国であっても工場が異なると安定同位体比も異なることが明らかとなり、原産国ではなく、地域によるきめ細かな判別の可能性が見出された。

また、不純物によるデータ変動の可能性が示唆されたため、今後はエタノールの分離分析による原料・原産地判別の精度向上を目指す。

炭素同位体比測定については、分離分析による精度の向上が確認された。

【研究B】エタノールとその原料の安定同位体比の違い

同一工場内のエタノールの酸素及び水素同位体比は、原料に比べて低くなっていることから、蒸留工程で軽い同位体が濃縮された可能性がある。また、炭素同位体比は原料に、酸素及び水素同位体比は製造工程に影響を受けることが確認された。

本年度はエタノールの酸素及び水素同位体比についてバルク分析で測定したが、今後は分離分析を行うことで、製造工程での影響をより詳細に明らかにすることができると思われる。

【研究C】トウモロコシの産地判別精度向上に関する研究

トウモロコシについて前処理を変えて安定同位体比を測定した結果、前処理を重ねるごとに安定同位体比が変化するが、判別精度が向上することはなかった。中でも、前処理をしない未処理試料の安定同位体比を「炭素×酸素プロット」及び「炭素×水素プロット」すると、6道県のうち、3県は識別が可能であった。今後、サンプル数を増やすことで判別精度を上げたい。

9. 引用文献

Keiko Ishida-Fujii,他 Botanical and Geographical Origin Identification of Industrial Ethanol by Stable Isotope Analyses of C, H and O. Biosci. Biotechnol. Biochem, 69(11), 2193-2199, 2005

鈴木彌生子他, 安定同位体比分析による国産米の産地及び有機栽培判別の可能性 ぶんせきかがく Vol58, No.12 pp1053-1058(2009)

奈良岡浩, 分子レベル安定同位体比を用いた有機化合物の地球表層における地球化学サイクル 日産科学振興財団研究報告書, 19 (1996)

巻末資料

表 13 安定同位体比の測定条件

図 6 トウモロコシサンプルのデータのばらつき

表 13 安定同位体比の測定条件

前処理装置	測定条件	詳細
ガスクロマトグラフ / 同位体比質量分析計 (GC/C/IRMS 法) (¹³ C)	試料量	試料 1 μl をシクロヘキサン 1ml に混合した溶液を 1 μl 注入した。
	注入方法	スプリット (スプリット比= 1 : 20)
	使用カラム	DB-5 (30m×0.25μm×0.25mm)
	昇温条件	35 (5分保持)→2 /分→80 →20 /分→180
	燃烧炉の温度	1030
	標準物質	Ethanol from vodka (Indiana University) Ethanol from rum (Indiana University)
酸化還元元素分析計 (EA-IRMS 法) (¹³ C, ¹⁵ N)	サンプル量	Reference gas. と同強度になるようにサンプル量を設定した。
	注入方法	錫カプセル (直径 5.0 mm / 高さ 9 mm) に封印し , 固体サンプル用オートサンプラーにて注入した。
	酸化炉の温度	750
	還元炉の温度	1000
	分離カラムの温度	40
	標準物質	USGS34, Potassium Nitrate IAEA-600, Caffrine IAEA-CH-7, Polyethylene IAEA-N-2, Ammonium Sulfate USGS41, L-glutamic acid USGS25, Ammonium Sulfate
熱分解元素分析計 (TC/EA-IRMS 法) (^D , ¹⁸ O)	サンプル量	Reference gas. と同強度になるようにサンプル量を設定した。
	注入方法	銀カプセル (直径 3.3 mm / 高さ 5 mm) に封印し , 固体サンプル用オートサンプラーにて注入した。
	熱分解炉の温度	1400
	分離カラムの温度	70
	標準物質	IAEA-601, Benzoic Acid IAEA-602, Benzoic Acid USGS34, Potassium Nitrate Coumarin (Indiana University) C-36 (Indiana University)

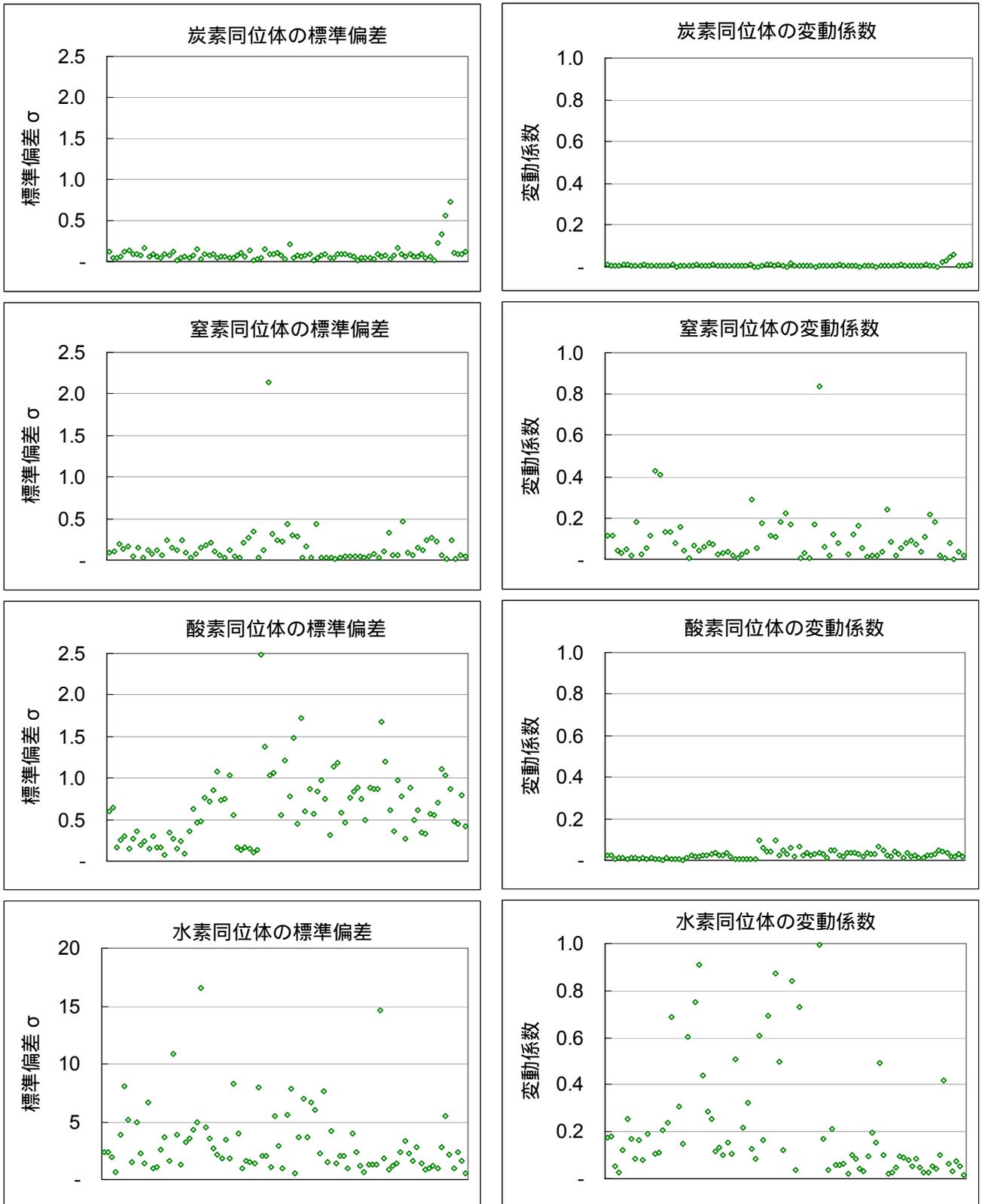


図6 トウモロコシサンプルのデータのばらつき

窒素同位体比と水素同位体比のばらつきが若干大きい。