

清酒の熟成に関する香気成分

磯谷 敦子

清酒を貯蔵すると、淡黄色から褐色へと色が変化する。色と同様に香り、味も大きく変化し、新酒のフルーティな香りが減少するとともに、カラメル、焦げ、醤油、ナッツなどと形容される複雑な香り、口当たりのなめらかさや苦味を増した味へと変化する。

一般的には清酒の変化は劣化とみなされる場合が多く、変化した香りは「老香（ひねか）」とよばれる。一方、長期間貯蔵した清酒に特有の複雑な香りや味を楽しむ消費者も増えつつある。清酒は通常製造後半年から1年程度で出荷されるが、近年、蔵内で数年以上の単位で貯蔵した清酒が「長期熟成酒」として市場に出回るようになってきている。清酒の貯蔵による香りの変化に寄与する成分を明らかにし、それらを制御することは、清酒の劣化防止や熟成酒の製造のうえで重要と考えられる。

清酒の貯蔵による香気成分の変化

貯蔵した清酒（古酒）の香りを明らかにする試みは1970～80年代に特に精力的に行われた¹⁾。現在までに、貯蔵により生じる多数の香気成分が報告されている。清酒の貯蔵による香気成分の変化を大まかにまとめると、

- ① 還元糖とアミノ酸によるメイラード反応およびそれに伴うストレッカー分解では、フルフラール、アルデヒド類、ソトロンといったカルボニル化合物を生じる。なお、ソトロンは、天然物では初めて貯蔵した清酒より単離・同定されたものである。
- ② 糖の分解などにより酢酸やギ酸といった揮発酸が増加する。
- ③ 有機酸や脂肪酸とエタノールによるエステル化が進行する一方で、酢酸イソamilなどの酢酸エステルは減少する。
- ④ トリプトファン分解により、3-メチルインドールやハルマンなどのインドール化合物が生成する。これらの成分は、光照射下で特に顕著に増加する²⁾。
- ⑤ 含硫化合物の分解によりジメチルジスルフィド(DMDS)やジメチルトリスルフィド(DMTS)といったポリスルフィドが生成する。

このほかにも、バニリン、フェニル酢酸などが貯蔵により増加することが報告されている。

では、実際に古酒の香りに寄与しているのはどの成分だろうか？ 香気成分の閾値はmg/lからng/lのレベルまで非常に幅広く、量が多いからといって香りへの寄与が大きいとはいえない。上記の成分のうち、ソトロンに

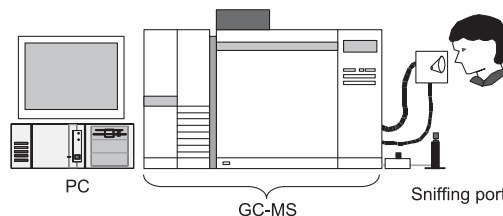


図1. GC-Olfactometry

ついては清酒中の閾値が調べられ、古酒の香りへの寄与が確認されていたが、他の成分については不明のものが多かった。

一般的に、香りに寄与する香気成分のスクリーニングにはGC-Olfactometry（においかぎ）分析が用いられる（図1）。筆者らは、古酒と新酒を試料として、GC-Olfactometry分析を行った^{3,4)}。その結果、ソトロン、フルフラール、2-メチルブタナール、3-メチルブタナール、ベンズアルデヒド、メチオナール、2-メチル酪酸エチル、3-メチル酪酸エチル、コハク酸ジエチル、フェニル酢酸エチル、DMTSなどが、新酒よりも古酒で強く検出された。

これらの成分（熟成香成分、図2）について酒類総合研究所の古酒（貯蔵期間0～35年）の定量分析を行い、清酒香気成分の閾値調査の結果⁵⁾と合わせて、古酒の香りに寄与する成分について検討した（表1）。濃度を閾値で割った値、odor activity value (OAV) が1以上の化合物は閾値以上の濃度なので、においに寄与していると考えられる。表1をみると、カラメル様のおいさを呈するソトロン、ナッツ様のおいさの3-メチルブタナール（イソバレラルデヒド）、たくあん漬け様のおいさのDMTSは古酒のOAVが1を大きく上回っている。したがって、これらの成分は古酒の香りに大きく寄与すると考えられた。

老香？ 熟成香？

前段では、数十年単位での清酒香気成分の変化について述べたが、一般的な清酒の貯蔵・流通期間は数ヶ月～2年程度である。このような比較的短期間の貯蔵条件でも老香を生じる場合が多く、品質劣化の一因となる。筆者らは、一般的な市販清酒にみられる老香にも上記の熟成香成分が関与しているのか調べるため、専門家から老

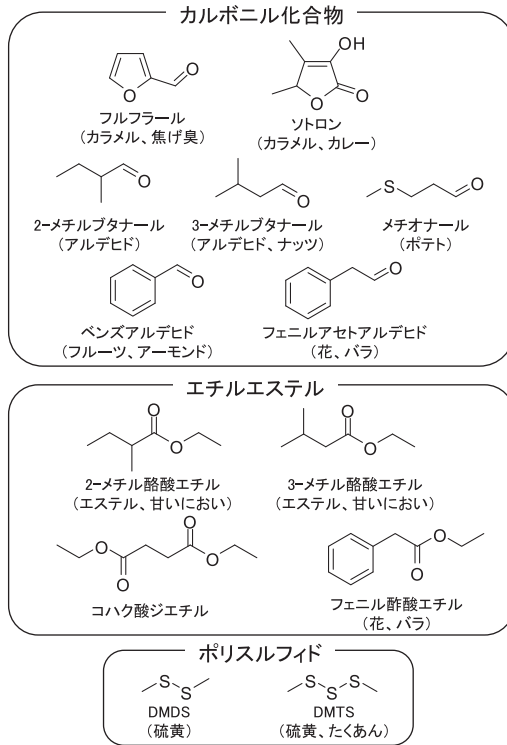


図2. 清酒の貯蔵により増加する主要香気成分 (熟成香成分)

表1. 酒類総合研究所貯蔵酒の熟成香成分濃度およびodor activity value (OAV)

化合物	閾値 (μg/l)	濃度 (μg/l)	OAV
フルフラール	11,000	~ 7800	~ 0.7
ソトロン	2.3	~ 140	~ 61
2-メチルプロパナール	1000	~ 364	~ 0.4
2-メチルブタナール	1500	~ 496	~ 0.3
3-メチルブタナール	120	55 ~ 722	0.5 ~ 6.0
メチオナール	10	~ 17	~ 1.7
ベンズアルデヒド	990	77 ~ 1067	~ 1.1
フェニルアセトアルデヒド	25	1.1 ~ 15	~ 0.6
DMDS	7	0.11 ~ 5.6	~ 0.8
DMTS	0.18	0.04 ~ 2.4	0.2 ~ 14
2-メチル酪酸エチル	7200	0.8 ~ 11	~ 0.1
3-メチル酪酸エチル	18,200	1.6 ~ 24	~ 0.2
コハク酸ジエチル	100,000	76 ~ 11,424	~ 0.1
フェニル酢酸エチル	100	1.5 ~ 25	~ 0.3

香を指摘された市販清酒 (老香清酒) の分析を行った⁶⁾。その結果、老香清酒についても、DMTS、3-メチルブタナール、ソトロンの3成分の濃度が閾値を超える (OAVが1以上) ものがあった (表2)。ただし、DMTSは老香清酒の65%が閾値以上の濃度であり、3-メチルブタナールは45%が閾値以上であったが、ソトロンが閾値以上のものは5% (20点中1点) のみであった。

一般の清酒の場合、貯蔵により変化した香りは「老香」

表2. 市販清酒および市販長期熟成酒の熟成香成分濃度とOAV

化合物	濃度の平均値 (μg/l)			OAV		
	市販清酒 老香 なし	老香 あり	長期 熟成酒	市販清酒 老香 なし	老香 あり	長期 熟成酒
2-メチルプロパナール	13	34	171	<1	<1	<1
2-メチルブタナール	7	26	122	<1	<1	<1
3-メチルブタナール	75	127	279	~1 (20)	~2 (45)	~4 (93)
ベンズアルデヒド	116	107	331	<1	<1	<1
フルフラール	175	686	3312	<1	<1	<1
ソトロン	0.1	0.5	9.8	<1	~2 (5)	~18 (73)
イソ酪酸エチル	5.0	6.5	21	<1	<1	<1
3-メチル酪酸エチル	1.0	2.0	10	<1	<1	<1
乳酸エチル	10,841	10,721	45,494	<1	<1	<1
コハク酸ジエチル	138	329	3867	<1	<1	<1
フェニル酢酸エチル	2.1	3.6	34	<1	<1	<1
DMDS	0.1	0.8	1.0	<1	<1	<1
DMTS	trace	0.3	1.0	~1 (5)	~5 (65)	~14 (93)

n = 20 (老香なし清酒, 老香清酒), n = 15 (長期熟成酒). () 内はOAVが1以上の試料の割合 (%)。

とよばれるが、意図的に長期間貯蔵した長期熟成酒の香りは「熟成香」とよばれることが多い。「老香」と「熟成香」は違うのだろうか？ 長期熟成酒として市販されている貯蔵期間5年以上の清酒について香気成分の分析を行い老香清酒と比較すると、熟成香成分はおおむね長期熟成酒の方が多かったが、DMDSは有意な差がみられなかった。また、長期熟成酒/老香清酒の比をとると、DMDSは1.2、DMTSは3.5であるのに対し、コハク酸ジエチルは12、ソトロンは18と非常に大きく、化合物による差がみられた (表2)。

老香清酒、老香なし清酒 (老香の指摘がなかった市販清酒)、長期熟成酒について、熟成香成分を変数として主成分分析を行った結果を図3に示した。第1主成分(PC1)はすべての化合物が同一方向に寄与し、熟成香成分全体の量を表すと考えられた。第2主成分(PC2)は、DMDSやDMTSといったポリスルフィドが正の方向に、ソトロンをはじめとするカルボニル化合物およびコハク酸ジエチルが負の方向に寄与していた。主成分スコアプロットについてみると、PC1は、老香なし清酒<老香清酒<長期熟成酒の順に大きくなった。これは、老香なし清酒<老香清酒<長期熟成酒の順に熟成香成分全体が多くなることを示している。PC2については、老香清酒は正の方向、すなわちポリスルフィドが多くなる方向に分布した。長期熟成酒のPC2スコアは正から負まで広く分布したが、貯蔵期間が特に長いものは負の値のものが多く、29年、30年貯蔵酒では大きく負の方向にプロッ

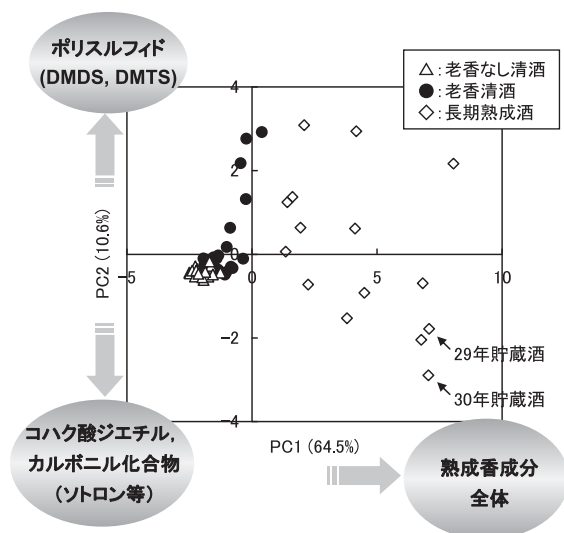


図3. 熟成香成分による主成分分析

トされた。すなわち、老香清酒と長期熟成酒で貯蔵期間が長いものとは香気成分組成において違いがみられ、前者はポリスルフィドが相対的に多いのに対し、後者はソトロンをはじめとするカルボニル化合物やコハク酸ジェチルが多い傾向がみられた。

なお、専門家による清酒のにおいの評価では、DMTSを清酒に添加した場合に約3割のパネルが「老香」と回答したのに対し、ソトロンを添加した場合は「カラメル」「焦げ臭」「カレー」という回答が多かった⁷⁾。これらのことから、長期熟成酒のカラメル様のおい特性には特にソトロンの寄与が大きく、一般的な市販清酒にみられる老香には、DMTSの寄与が大きいと考えられた。

DMTS生成機構

DMTS前駆物質の探索および同定⁸⁾ 老香を制御するにはDMTSをターゲットにすればよいことがわかったが、清酒貯蔵中のDMTS生成機構は明らかでなかった。そこで筆者らは、清酒からDMTS前駆物質を探索することにした。方法としては、液体クロマトグラフィーで清酒を分画し、そのフラクションを70°Cで1週間貯蔵する。生じるDMTS量をDMTS生成ポテンシャルと定義し、これを指標として前駆物質をしばらくこむことにした。まず、陽イオン交換カラムにより清酒を分画したところ、酸性/中性画分のポテンシャルが高く、主要な前駆物質は酸性もしくは中性成分であることが明らかとなった(表3)。なお、酸性/中性画分は分画前の清酒よりもポテンシャルが高く、酸性/中性画分に塩基性画分を加えるとポテンシャルが下がった。塩基性画分にはDMTSの生成を抑制する成分が存在すると考えられる。

表3. 陽イオン交換カラムによる清酒の分画

画分	DMTS生成ポテンシャル (ng DMTS/ml sake)		
	清酒1	清酒2	清酒3
清酒	14	10	0.2
塩基性画分	0.1	1.1	n.d.
酸性/中性画分	112	22	22
酸性/中性画分+塩基性画分	26	8.8	3.2

n.d.: 検出されず

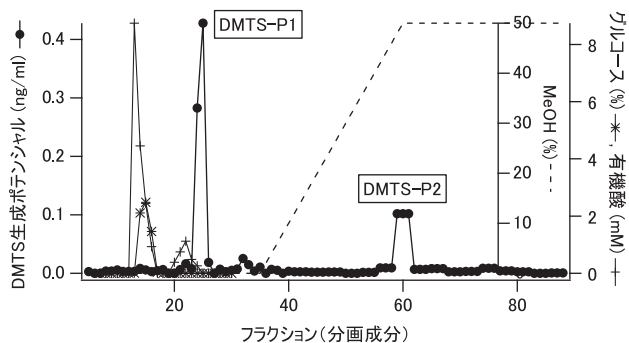


図4. 逆相クロマトグラフィーによる酸性/中性画分の分画

次に、酸性/中性画分を逆相カラムで分画したところ、DMTS生成ポテンシャルを有するピークが2つ検出された(図4)。このうち、最初に溶出する高極性成分(DMTS-P1)の方が、ポテンシャルが高かったため、この成分を、さらに各種クロマトグラフィーにより精製した。最終的に単一の標品が得られ、精密質量分析およびNMRによる構造解析の結果、1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルスルフィニル)ペンタン-3-オンと同定された(図5)。この物質は、文献などに報告がない新規化合物であった。

1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルスルフィニル)ペンタン-3-オン(DMTS-P1)からDMTSへの生成機構としては、まず、メチルスルフォキサイド部分が酸または塩基触媒によりメタンサルフェン酸の形で脱離し、不均化反応によりメタンチオールを生じ、これが酸化されてDMDSおよびDMTSとなると推定される(図5)。野菜などのDMTS前駆物質であるS-メチルシステインスルフォキサイドについても類似のメカニズムが報告されている⁹⁾。

DMTS-P1のDMTS生成に対する寄与¹⁰⁾ 市販酒中のDMTS-P1濃度を測定し、貯蔵によって生じるDMTS量との関係を見ると、DMTS-P1濃度が高い清酒ほど、おおむね貯蔵によって生じるDMTS量が多い傾向がみられた(図6)。また、清酒にDMTS-P1濃度が2倍になるように添加して貯蔵試験を行ったところ、無添加の清酒の約2倍のDMTSが生成した。これらの結果

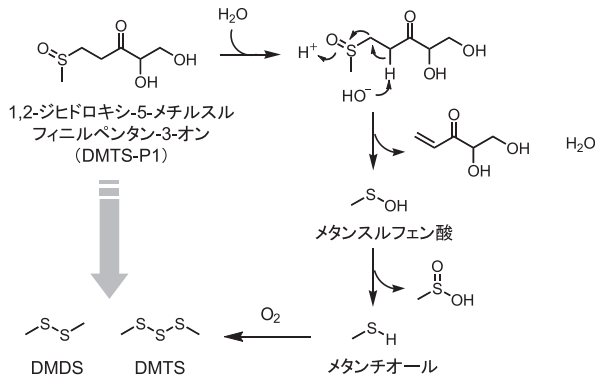


図5. DMTS-P1からDMDS, DMTSの推定生成機構

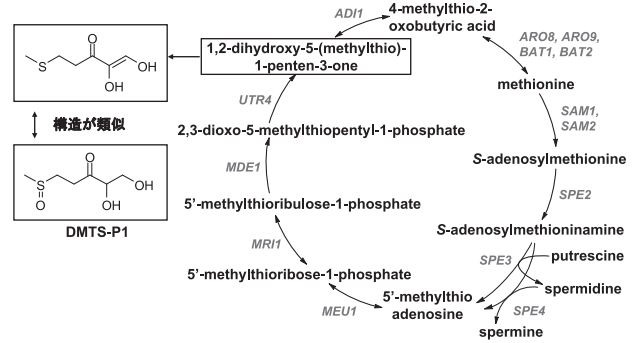


図7. 酵母のメチオニン再生経路

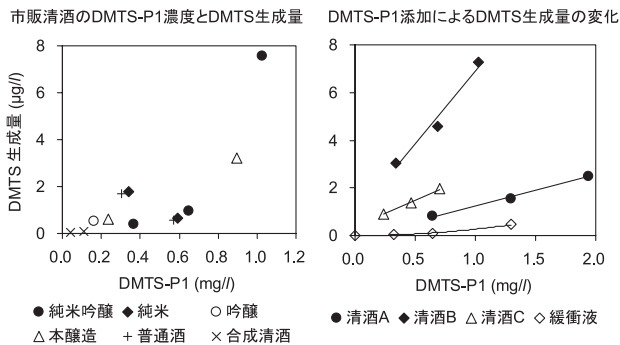


図6. DMTS-P1濃度と貯蔵(70°C 1週間)によるDMTS生成量との関係

から、DMTS-P1がDMTSの生成に大きく寄与することが明らかとなった。

一方、緩衝液と清酒に濃度を変えてDMTS-P1を添加し、貯蔵により生じるDMTS量を調べると、DMTS-P1濃度を同じように変化させた場合でも、緩衝液に比べて清酒のほうがDMTS生成量の増加が大きかった(図6)。清酒中にはDMTS-P1からDMTSへの反応を触媒するような成分が存在すると推察される。

DMTS-P1の由来 DMTS-P1は清酒製造工程でどのようにして生じるのだろうか？ DMTS-P1は発酵初期にはわずかしか検出されず、発酵に伴って増加することから、おもに酵母の代謝産物として生成すると考えられる。

動物、植物、微生物には、S-アデノシルメチオニンの分解によって生じるメチルチオアデノシンからメチオニンを再生するメチオニン再生経路が存在する(図7)¹¹⁾。この経路の代謝中間体化合物である1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルチオ)-1-ペンテン-3-オンはDMTS-P1と構造が類似していることから、DMTS-P1生成への関与が推察された。そこで、実験室酵母の遺伝子破壊コレクション

のうちメチオニン再生経路遺伝子の破壊株を用いて清酒の小仕込を行った。その結果、*meul*, *mril*, *mdel*破壊株でDMTS-P1の生成がほとんどみられず、この経路がDMTS-P1生成に関わっていることが明らかとなった¹²⁾。

おわりに

清酒貯蔵中にはさまざまな香気成分が生成する。筆者らは、このうちDMTSが老香の主要成分であることを明らかにし、DMTSの前駆物質の一つ、DMTS-P1を同定した。さらに最近、DMTS-P1生成機構の一端も明らかになりつつある。これらの知見を、老香を生じにくい清酒をつくる酵母の育種などにつなげていきたい。一方、研究の中で、DMTSの生成にはDMTS-P1以外の成分も関与することが示唆された。これらの成分の同定も含めて、DMTS生成機構の解明を目指したい。

清酒は嗜好品である。消費者の多様な嗜好を考えると、老香を抑制するだけでなく、自在に制御できることが重要と思われる。老香の出にくい清酒・出やすい清酒をつくりわけ、さらには老香の出る時期を予測するなど適正に管理する技術の確立が、本研究の最終目標と考えている。

文 献

- 1) 高橋康次郎：醸協, **75**, 463 (1985).
- 2) 小泉亜希子ら：醸協, **98**, 125 (2003).
- 3) 磯谷敦子ら：醸協, **99**, 374 (2004).
- 4) Isogai, A. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4118 (2005).
- 5) 宇都宮仁ら：醸協, **99**, 652 (2004).
- 6) 磯谷敦子ら：醸協, **101**, 125 (2006).
- 7) 宇都宮仁ら：醸協, **105**, 106 (2010).
- 8) Isogai, A. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 189 (2009).
- 9) Chin, H.-W. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1529 (1994).
- 10) Isogai, A. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7756 (2010).
- 11) Pirkov, I. et al.: *FEBS Journal*, **275**, 4111 (2008).
- 12) 若林 興ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p. 65 (2011).