

2014年度 生物工学奨励賞（江田賞） 受賞



清酒の老香成分ジメチルトリスルフィド (DMTS) の生成に関する研究

磯谷 敦子



Study on the formation of dimethyl trisulfide (DMTS),
a component responsible for “hineka” in Japanese sake

Atsuko Isogai (National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-hiroshima
739-0046) *Seibutsu-kogaku* **93**: 116-121, 2015.

はじめに

清酒は時間の経過とともに味や香りが変化する。変化した香りは「老香（ひねか）」とよばれ、一般的にはオフフレーバーととらえられる。新酒のフルーティーな香りとは異なり、老香は、カラメル、焦げ、しょうゆ、ナッツ、たくあんなどと表現される複雑な香りである。また、長期間貯蔵した清酒の香りは、熟成香ともいわれる。

老香は清酒成分の化学変化によって生じ、特に高温や酸化によって生じやすいといわれている。これまでの研究や経験の積み重ねにより、清酒貯蔵中の品質変化を抑制するには、低温での貯蔵・流通、清酒の溶存酸素濃度の制御による酸化抑制^{1,2)}などが有効であることが知られている。また、醸造工程についても、熟成しやすい製造条件が経験的に知られている³⁾。これらの方法は、貯蔵中に起こる化学変化全体を抑制し、品質を保持するものである。一方、老香に寄与する成分を明らかにし、その制御方法を確立できれば、特定の成分を増減させることが可能になり、清酒の品質の安定化だけでなく多様化にもつながると考えられる。筆者らは、まず老香に寄与する成分を解明し、さらにその生成機構を明らかにすることによって老香制御技術への応用を目指した。

老香に寄与する成分の解明

古酒（貯蔵した清酒）の香りを明らかにする試みは1970～80年代を中心に行われ、焦げ臭を呈するソトロ

ン（3-ヒドロキシ-4,5-ジメチル-2(5H)-フラノン）の発見をはじめとして、有機酸のエチルエステル類、酢酸などの酸類、フルフラールなどのカルボニル化合物、ジメチルジスルフィド（DMDS）など、貯蔵により増加する多数の成分が報告された⁴⁾。このうちソトロンについては古酒中の濃度が閾値を大きく上回り、古酒の香りに大きく寄与することが明らかにされていた。しかし、他の成分については、定性分析にとどまっていたり清酒中の閾値が不明であるなど、香りへの寄与が明らかでないものも多かった。

香りに寄与する成分のスクリーニングには、GC-Olfactometry (GC-O) という手法が用いられる。これは、ガスクロマトグラフィー (GC) の検出器として人間の嗅覚を用いる分析方法である。GC-Oにより、酒類総合研究所で製造し約30年間貯蔵されていた古酒を分析した結果、既報のソトロンやフルフラール、有機酸エチルエステルのほか、ナッツ様のおいおいの3-メチルブタナールやポテト様のメチオナールが検出され、たくあん様のおいおいのジメチルトリスルフィド (DMTS) も強く検出された。これらの成分は、新酒では不検出、もしくは弱くしか検出されなかった。GC-Oにより古酒で強く検出された香気成分（熟成香成分）を図1にまとめた。

次に、研究所の古酒（貯蔵期間0～35年）についてこれら熟成香成分の定量分析を行った。その結果、貯蔵期間が長いものほど、おおむね熟成香成分も多くなる傾向がみられた（図2）。また、清酒香気成分の閾値調査結

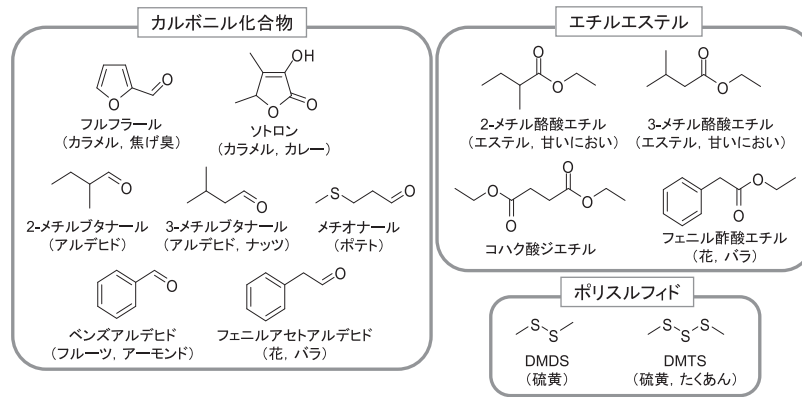


図1. GC-Oにより古酒から検出された香気成分（熟成香成分）

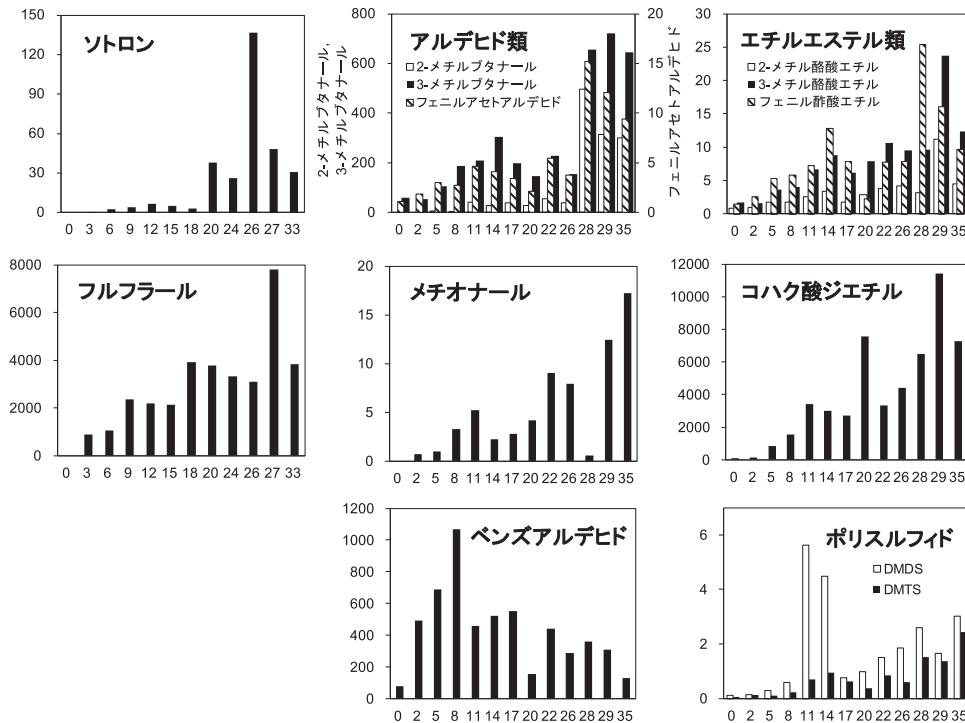


図2. 酒類総合研究所の古酒の香気成分分析結果。縦軸：濃度（ $\mu\text{g/L}$ ），横軸：貯蔵期間（年）。

果⁵⁾をもとに、各成分について Odor Activity Value (OAV, 濃度を閾値で割った値) を求めた。OAVが1以上の成分は濃度が閾値以上なので、においに寄与していると考えられる。表1に研究所の古酒の濃度とOAVの範囲を示した。ソトロン、3-メチルブタナール、およびDMTSは濃度が閾値を大きく上回り、古酒の香りに大きく寄与することが示唆された^{6,7)}。

古酒の香りは「熟成香」とよばれることもある。これは、蔵内で数年～数十年の単位で熟成させた「長期熟成酒（熟成古酒）」の香りに対して用いられる場合が多い。前段の実験に用いた試料は長期熟成酒に近いものだった。一方「老香」は、一般的な清酒の貯蔵・流通過程（数か月～2年程度）において生じる香りの変化をさす場合が多

い。では、一般の清酒にみられる「老香」にも上記の熟成香成分は寄与しているのだろうか？筆者らは、専門家による官能評価で老香を指摘された一般の市販清酒（老香清酒）20点について、熟成香成分の濃度を調べた。その結果、老香清酒においても、DMTS、3-メチルブタナール、ソトロンの濃度が閾値を超えるものがあつた。これらの成分の分布を図3に示した。DMTSは老香清酒の65%のものが閾値以上の濃度であり、もっとも高いものは閾値の5倍だった。対照として用いた老香指摘のない市販清酒（老香なし清酒）は、ほとんどが閾値以下の濃度だった。また、3-メチルブタナールについては老香清酒の45%が閾値以上であつた。一方、ソトロンが閾値以上のものは5%（20点中1点）のみで、前段の古

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	11000	~7800	~0.7
ソトロン	2.3	~140	~61
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	~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
2-メチル酪酸エチル	200	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	100000	76~11424	~0.1
フェニル酢酸エチル	100	1.5~25	~0.3
DMDS	7	0.11~5.6	~0.8
DMTS	0.18	0.04~2.4	~14

表2. 熟成香成分による主成分分析の結果

	PC1	PC2
寄与率 (%)	64.5	10.6
因子付加量		
DMDS	0.36	0.83
DMTS	0.70	0.59
3-メチル酪酸エチル	0.92	0.04
乳酸エチル	0.75	0.05
イソ酪酸エチル	0.84	0.13
フェニル酢酸エチル	0.85	0.18
コハク酸ジエチル	0.94	-0.13
2-メチルプロパナール	0.92	-0.20
2-メチルブタナール	0.95	-0.17
3-メチルブタナール	0.86	-0.26
ベンズアルデヒド	0.46	-0.01
フルフラール	0.91	-0.11
ソトロン	0.72	-0.35

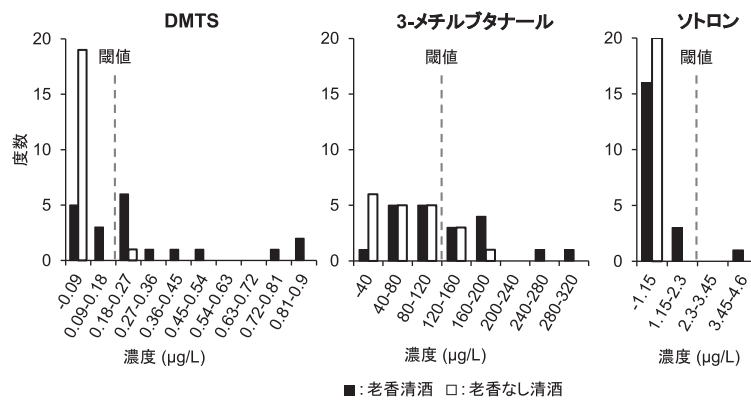


図3. 市販清酒中のDMTS, 3-メチルブタナールおよびソトロンの濃度の分布。

酒の分析結果とは異なる傾向がみられた。

次に、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分析を行い、老香清酒との違いを検討した。熟成香成分を変数として主成分分析を行ったところ(表2, 図4) 老香清酒はDMDSやDMTSといったポリスルフィドが多い傾向がみられた。長期熟成酒は老香清酒に比べて熟成香成分全体が多くなっているが、特に貯蔵期間の長いものではソトロンやアルデヒド類といったカルボニル化合物やコハク酸ジエチルが相対的に多い傾向がみられた⁸⁾。

また、専門家による清酒のにおい参照標準候補物質の評価において、DMTSを清酒に添加した場合は約3割の専門家が「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」という回答が多く、専門家がイメージする老香はDMTSのにおい

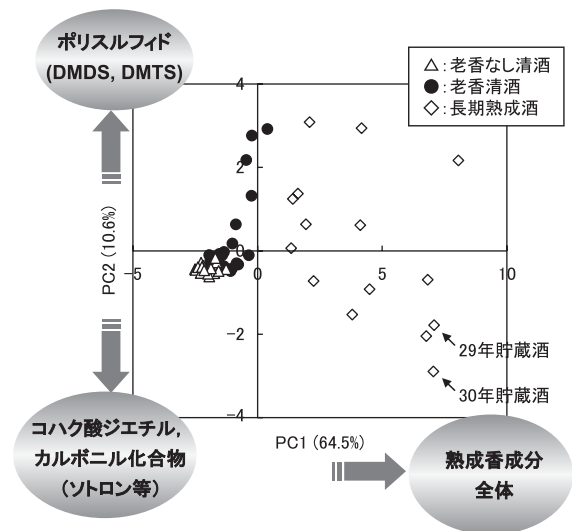


図4. 主成分スコアプロット

に近いことが示唆された⁹⁾。これらの結果をあわせて、DMTSは一般の清酒にみられる「老香」を、ソトロンは「長期熟成酒の香り(熟成香)」を特徴付ける主要成分であると考えられた。

DMTSの前駆物質の同定

DMTSは、ブロッコリーやキャベツなどのアブラナ属の野菜類や、ウイスキーなどの酒類にも含まれる。野菜類においては、*S*-メチルシステインスルフォキサイドという特殊なアミノ酸の分解によってDMTSを生じ¹⁰⁾、ウイスキーでは、もろみ中のメチオナールが蒸留中にDMTSに変換されることが報告されている¹¹⁾。しかし、清酒中においてこれらの成分は検出されないかごく微量であり、DMTSの主要前駆物質は別に存在すると思われた。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、各種クロマトグラフィーで清酒成分を分画し、得られた画分を緩衝液に添加して70°Cで1週間貯蔵し、DMTSを測定する。生成したDMTS量(DMTS生成ポテンシャル)を指標として前駆物質を探索・精製した。まず、陽イオン交換カラムで分画を行うと、非吸着画分(酸性/中性画分)の

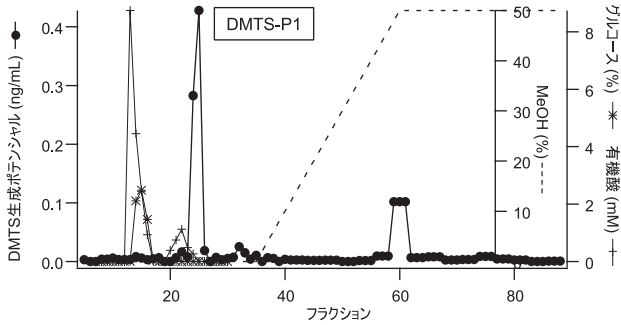


図5. 逆相カラムによる分画

DMTS生成ポテンシャルが吸着画分(塩基性画分)に比べて20倍以上高く、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。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二つ検出された(図5)。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、この画分をさらに各種クロマトグラフィーにより精製した。精製標品について精密質量分析およびNMRによる構造解析を行った結果、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6)¹²⁾。この物質は、文献などに報告がない新規化合物であった。

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ス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6)。野菜類のDMTS前駆物質*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¹⁰⁾。

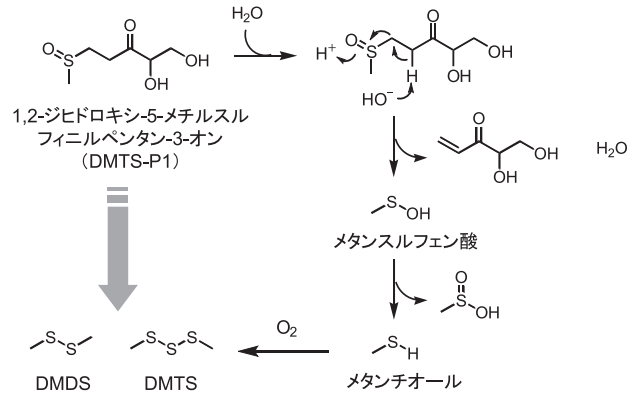


図6. DMTS-P1からDMDS, DMTSの推定生成経路

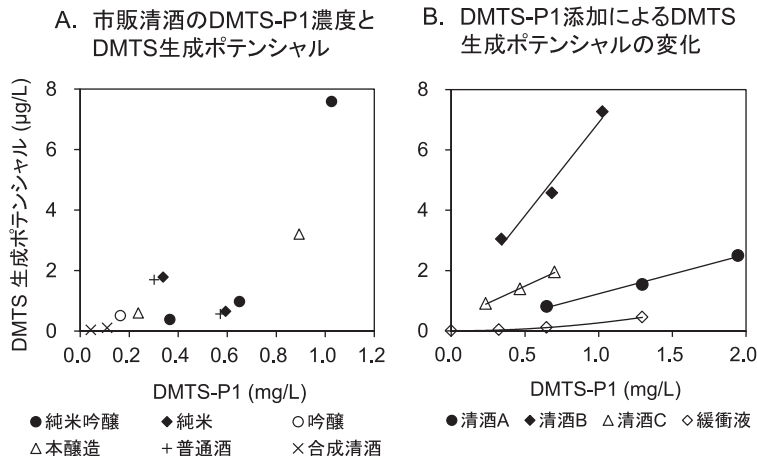


図7. DMTS-P1濃度とDMTS生成ポテンシャルとの関係

市販清酒中のDMTS-P1濃度とDMTS生成ポテンシャルとの間には正の相関がみられた(図7A)。また、清酒にDMTS-P1濃度が2倍になるように添加すると、DMTS生成ポテンシャルも約2倍に増加した。これらの結果から、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、DMTS生成ポテンシャルの変化を調べたところ、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ポテンシャルの増加が大きく、清酒の種類によっても違いがみられた(図7B)。したがって、DMTS-P1からDMTSへの変換は、清酒中の成分の影響を受けると推察される¹³⁾。

DMTS-P1の生成に関わる酵母遺伝子の同定

清酒製造工程でのDMTS-P1の消長を調べると、麹からはほとんど検出されず、発酵中に増加した(図8)。したがって、DMTS-P1は主に酵母の代謝産物として生成すると考えられた。酵母を含む多くの生物は、S-アデノシルメチオニンからポリアミンを合成する際に副産物として生じる5'-メチルチオアデノシンを、メチオニンへリサイクルする経路(メチオニン再生経路)をそな

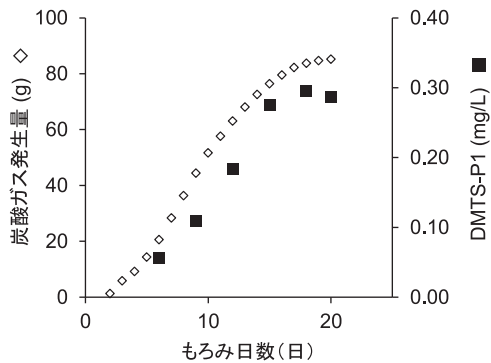


図8. 清酒もろみ中のDMDS-P1濃度の変化。総米300gの清酒の小仕込みを行い、DMDS-P1の消長を調べた。

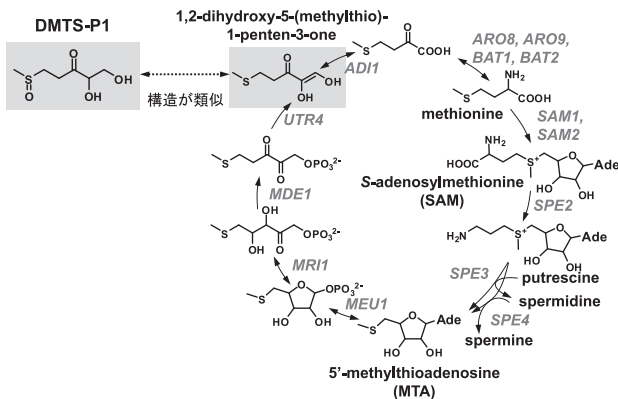


図9. 酵母のメチオニン再生経路とDMDS-P1

えている(図9)¹⁴⁾。この経路の代謝中間体の構造がDMDS-P1と類似していたことから、DMDS-P1との関連が推察された。そこで、実験室酵母の遺伝子破壊コレクションを利用して、メチオニン再生経路遺伝子の破壊株による清酒醸造試験を行った。その結果、破壊株の多くで清酒中のDMDS-P1濃度の低下がみられ、中でも、 $\Delta meul$ 、 $\Delta mri1$ および $\Delta mde1$ 株ではDMDS-P1の生成がほとんどみられなかった(図10)。この結果から、DMDS-P1の生成にはメチオニン再生経路が関与することが明らかとなった。また、このうち $\Delta mri1$ および $\Delta mde1$ 株については、DMTS生成ポテンシャルも親株に比べて大きく減少した。

清酒酵母の場合でも同様の効果が見られるか確認するため、*MR11*および*MDE1*遺伝子について清酒酵母の破壊株を構築した。清酒醸造試験の結果、実験室酵母の場合と同様に、破壊株では清酒中のDMDS-P1濃度、DMTS生成ポテンシャルともに親株に比べて大きく減少した(図11)。また、この清酒を貯蔵し、においについての官能評価を行ったところ、破壊株では親株に比べて老香強度が減少した(図12)。発酵経過やアルコール濃度などの一般成分については親株と破壊株とで大きな違いはみられなかった(表3)。以上の結果から、清酒酵母の*MR11*もしくは*MDE1*遺伝子を欠損させることにより、老香を低減できる可能性が示された¹⁵⁾。

おわりに

清酒貯蔵中の品質変化に関する研究は、少なくとも50年ほど前から報告があり^{16,17)}、現在もさまざまな視点から研究が続けられている。これは、貯蔵中に起こる変化の全容が今なお未解明であること、その制御が困難

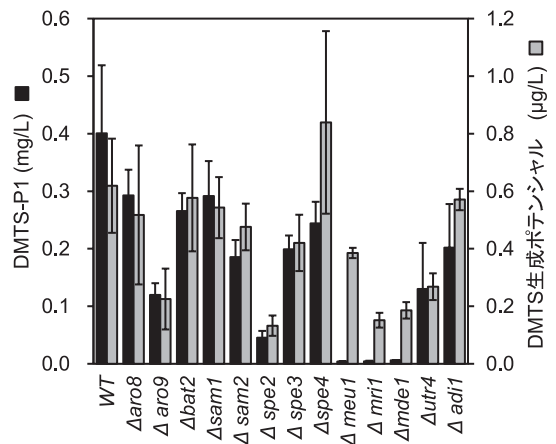


図10. メチオニン再生経路遺伝子破壊株を用いて醸造した清酒のDMDS-P1濃度とDMTS生成ポテンシャル。総米83gの小仕込試験を行った。値は二つの仕込みの平均値。エラーバーは標準偏差を示す。

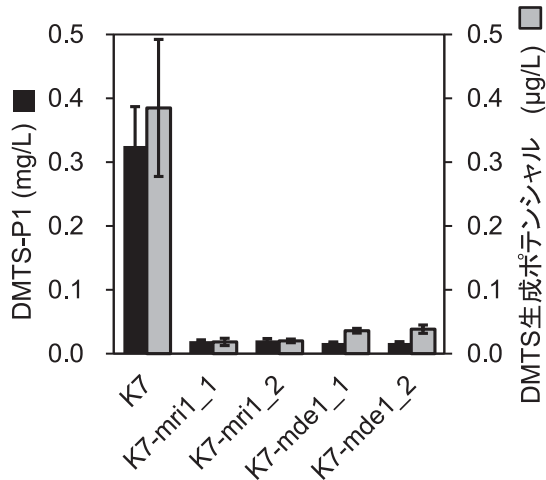


図11. 清酒酵母 (K7) の *MRII*, *MDEI* 遺伝子破壊による DMTS-P1 濃度と DMTS 生成ポテンシャルへの影響. K7 の $\Delta mri1$ および $\Delta mde1$ 株を構築し, 総米 300 g の小仕込試験を行った. 値は3つの仕込みの平均値, エラーバーは標準偏差を示す.

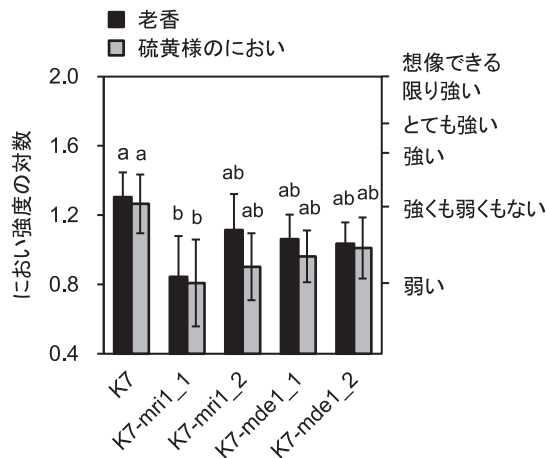


図12. *MRII*, *MDEI* 遺伝子破壊による官能評価への影響. K7 およびその $\Delta mri1$ および $\Delta mde1$ 株を用いた清酒を火入れした後 40°C で2か月間貯蔵し, 老香と硫黄様のにおいの強度について官能評価を行った. 値は8名のパネリストの平均値, エラーバーは標準誤差を示す. 同じアルファベットでつながっていない試料間には有意差がある. ($p < 0.05$)

であることの裏返しといえよう. 筆者らは, 特にオフフレーバーとしての「老香」に着目し, その主要成分が DMTS であることを明らかにするとともに, 酵母によって DMTS の生成を制御できる可能性を見いだした. DMTS 前駆物質を生産しない清酒酵母を実用化できれば, 清酒のシェルフライフ延長につながり, 特に最近増加している海外への輸出清酒の品質保持に有効ではないかと考えている. また, 貯蔵しても DMTS を生成しない清酒を長期熟成させた場合, どのような酒質になるのかも興味深い.

一方, DMTS 生成ポテンシャルを老香の生成しやすさの指標として, 清酒製造条件との関連を解析する研究

表3. K7 およびその破壊株で製造した清酒の一般成分

株	エタノール (%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度
K7	17.3 ± 0.4	-10 ± 0.0	2.1 ± 0.0	1.7 ± 0.1
K7- <i>mri1</i> _1	17.3 ± 0.5	-10 ± 2.5	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.1
K7- <i>mri1</i> _2	17.1 ± 1.0	-12 ± 6.4	2.4 ± 0.1	1.7 ± 0.0
K7- <i>mde1</i> _1	17.0 ± 0.3	-12 ± 1.8	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.1
K7- <i>mde1</i> _2	17.1 ± 0.3	-13 ± 0.8	2.2 ± 0.1	1.7 ± 0.0

平均値 ± 標準偏差 (n = 3)

も行われている. 原料米成分¹⁸⁾やもろみの溶解, 酵母の死滅^{19,20)}など, 老香生成に影響を及ぼす製造上の要因が明らかになりつつある.

今後は, これまでに得られた成果を実用に結びつけ, 老香制御技術の一つとして確立したい.

文 献

- 山下正純, 木崎康造, 伊田尚史, 本田克久, 荒巻 功, 小林信也, 岡崎直人: 日本醸造協会誌, **91**, 199–202 (1996).
- 岡本匡史, 山内 徹, 矢野駿太郎, 黒瀬直孝, 川北貞夫, 高橋康次郎, 中村輝也: 日本醸造協会誌, **94**, 827–832 (1999).
- 日本醸造協会編: 清酒製造技術, 日本醸造協会 (2007).
- 高橋康次郎: 日本醸造協会誌, **75**, 463–468 (1980).
- 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田 博: 日本醸造協会誌, **99**, 652–658 (2004).
- 磯谷敦子, 宇都宮仁, 岩田 博: 日本醸造協会誌, **99**, 374–380 (2004).
- Isogai, A., Utsunomiya, H., Kanda, R., and Iwata, H.: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4118–4123 (2005).
- 磯谷敦子, 宇都宮仁, 神田涼子, 岩田 博, 中野成美: 日本醸造協会誌, **101**, 125–131 (2006).
- 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田 博: 日本醸造協会誌, **105**, 106–115 (2010).
- Chin, H.-W. and Lindsay, R. C.: *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1529–1536, (1994).
- Prentice, R. D., McKernan, G., and Bryce, J. H.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **56**, 99–103 (1998)
- Isogai, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Nishimura, T., Iwata, H., and Goto-Yamamoto, N.: *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 189–195 (2009).
- Isogai, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Iwata, H., and Sudo, S.: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7756–7761 (2010).
- Pirkov, I., Norbeck, J., Gustafsson, L., and Albers, E.: *FEBS J.*, **275**, 4111–4120 (2008).
- Wakabayashi, K., Isogai, A., Watanabe, D., Fujita, A., and Sudo, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 475–479 (2013).
- 風間 擁: 日本醸造協会誌, **60**, 67–68 (1965).
- 岡 智, 井出 公, 清水 剛, 坂井正治: 日本農芸化学会誌, **39**, 415–419 (1965).
- 奥田将生: 日本醸造協会誌, **105**, 262–272 (2010).
- Sasaki, K., Nishibori, N., Kanai, M., Isogai, A., Yamada, O., Goto-Yamamoto, N., and Fujii, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 166–171 (2014).
- Nishibori, N., Sasaki, K., Okimori, Y., Kanai, M., Isogai, A., Yamada, O., Fujii, T., and Goto-Yamamoto, N.: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 526–528 (2014).