

博士論文

清酒の熟成に関与する香気成分および
その生成機構に関する研究

平成 21 年 9 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

磯谷敦子

目次

| | |
|----------------------------|----|
| 凡例..... | 1 |
| 序章..... | 2 |
| 第1章 清酒の熟成による香気成分の変化..... | 7 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料と方法 | |
| 3. 結果 | |
| 4. 考察 | |
| 5. 要旨 | |
| 第2章 市販酒の老香に関与する香気成分..... | 21 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料と方法 | |
| 3. 結果 | |
| 4. 考察 | |
| 5. 要旨 | |
| 第3章 DMTS 前駆物質の探索および同定..... | 30 |
| 1. 緒言 | |
| 2. 材料と方法 | |
| 3. 結果と考察 | |
| 4. 要旨 | |
| 総括..... | 42 |
| 参考文献..... | 44 |
| 公表論文..... | 50 |
| 謝辞..... | 51 |

凡例

本論文中に以下の略号を用いた。

| | |
|--------------------|---|
| AEDA | aroma extract dilution analysis |
| CD ₃ CN | deuterated acetonitrile |
| CH ₃ CN | acetonitrile |
| COSY | correlation spectroscopy |
| CV | coefficient of variation |
| D ₂ O | deuterium oxide |
| DEPT | distortionless enhancement by polarization transfer |
| 3-DG | 3-deoxyglucosone |
| DMDS | dimethyldisulfide |
| DMTS | dimethyltrisulfide |
| ESI | electron spray ionization |
| FD factor | flavor dilution factor |
| GC-O | gas chromatography olfactometry |
| HMBC | heteronuclear multiple bond correlation |
| HMQC | heteronuclear multiple quantum coherence |
| MeOH | methanol |
| MTA | methylthioadenosine |
| MTR | methylthioribose |
| MTR-1P | methylthioribose-1-phosphate |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| OAV | odor activity value |
| PC | principal component |
| PDMS | poly(dimethylsiloxane) |
| SBSE | stir bar sorptive extraction |
| SPME | solid phase micro extraction |
| RI | retention index |

序章

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、新酒のフルーティー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、変化した香りは「老香」とよばれる。一方で、長期貯蔵した清酒に特有の複雑な香りやなめらかな味を楽しむ消費者も増えつつある。清酒は通常製造後1年以内に出荷されるが、近年の清酒の多様化の動きともあいまって、蔵内で10年、20年と貯蔵した清酒が「熟成酒」として市場に出回るようになってきている。熟成酒を製造するメーカーのグループ「長期熟成酒研究会」では「満3年以上蔵元で熟成させた、増醸酒を除く清酒」を「長期熟成酒」としている(1)。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ができれば、清酒の劣化防止や、品質の良い熟成酒の製造が可能になると考えられる。

古酒(貯蔵した清酒)の香りを明らかにする試みは、1970~80年代にかけて精力的に行われた。Takahashiらは、60℃で1ヶ月貯蔵した清酒180Lから、焦げ臭を呈する成分として3-ヒドロキシ-4,5-ジメチル-2(5*H*)-フラノン(ソトロン)を発見した(2)。ソトロン以外にも、コハク酸モノエチル、リンゴ酸モノエチルといったエステル類(3)、酢酸等の酸類(4)、フルフラール等のカルボニル化合物(5)、ジメチルジスルフィド(DMDS)等の含硫化合物(6-7)等が、貯蔵により増加することが報告されている。これらのうち、ソトロンについては閾値が調べられ、香りへの寄与が確認されていたが、その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。

一方、近年の分析技術の進歩は目覚しく、固相マイクロ抽出(SPME)やStir Bar Sorptive Extraction(SBSE)といった簡便な香気成分抽出方法が開発され、広く利用されるようになってきている。SBSEで用いられるTwisterは、攪拌子に液相(ポリジメチルシロキサン, PDMS)をコーティングさせたもので、SPMEファイバーに比べて液相量が数十倍となっており、微量香気成分の抽出・濃縮にも適している(8)。コーヒー(9)、ウイスキー(10)、ワイン(11)等の香気成分、飲料水中のオフフレーバー成分(12)の分析等の応用例が報告されている。

また、香りに寄与する香気成分のスクリーニングには古くからGC-Olfactometryが用いられていた。近年、それぞれの香気成分の寄与をより客観的に評価するために、CharmAnalysisや、Aroma

Extract Dilution Analysis (AEDA)が開発され、食品等の香りの研究に利用されている(13)。これらは、試料の香気成分抽出液の希釈系列について GC-Olfactometry を行い、それぞれの香気成分の階層構造を明らかにするものである。

本論文の第1章では、これらの新しい手法を取り入れ、清酒の熟成に関する香気成分の解明を試みた。第2章では、比較的短時間で起こる清酒の香りの変化に着目し、一般の市販酒にみられる「老香」に寄与する成分を検討した。第3章では、清酒中での生成機構が不明であった、ジメチルトリスルフィド (DMTS) の生成機構について検討した。

Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)(14)

液-液抽出法では、試料溶液に有機溶媒を加え、その有機溶媒相へ目的成分を分配させ、濃縮を行う。有機溶媒の代わりにポリジメチルシロキサン (PDMS) 相を使用したのが Sorptive Extraction である。PDMS は常温で無極性の液体であり、目的成分は試料溶液から有機溶媒へ分配するように、PDMS 相へ分配する。

SPME (Solid Phase Micro Extraction) では、溶融シリカファイバーの周りに PDMS をコーティングしたニードルを、気体・液体試料中、または液体・固体試料上のヘッドスペース中に挿入し、目的成分を抽出する。SPME は有機溶媒を使用することなく、短時間で簡単に試料を濃縮することができるため、広い範囲で応用されている。しかしながら、SPME で用いられる汎用的な PDMS ファイバーは膜厚数 10 μm 、長さ 1 cm 程度で、PDMS の体積にすると 0.5 μL 程度である。試料溶液を数 mL~数十 mL 程度とすると、試料溶液に対して PDMS 相が非常に少ないため、目的成分の回収率が低い。また、液体の分析では、分配を早めるためにスターラーを用いて試料を攪拌しながら抽出を行うが、親油性の高い成分は PDMS 相だけでなく攪拌子へも吸着するという問題がある。

SBSE は、SPME 分析で問題となった攪拌子への成分吸着から発想を得て生まれた。SPME でポリ塩化ビフェニル (PCBs) の分析を行ったところ、PCBs が攪拌子に吸着され、回収率が非常に低くなった。そこで、逆に攪拌子を吸着剤として用いる発想が生まれ、ガラス製の攪拌子に PDMS をコーティングした Twister が 2000 年に誕生した。攪拌子に膜厚 500 μm の液相をコーティングしたことで PDMS 相は 24 μL まで増加し、SPME で問題となった目的成分の攪拌子への吸着が解消されるとともに、回収率の問題も改善された。

実際の操作としては, Figure 1 に示すように, 試料溶液に Twister を入れて一定時間攪拌した後, 加熱脱着装置を用いて捕集した成分の加熱脱着を行い, GC/MS で分析する。

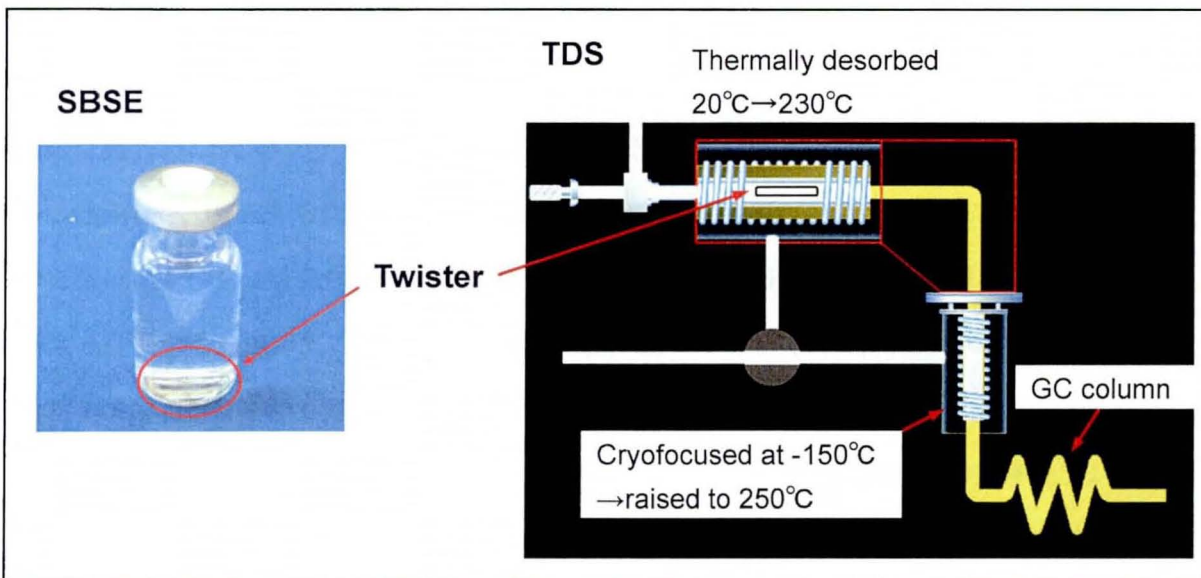


Figure 1. SBSE and thermal desorption using Gerstel TDS.

GC-Olfactometry (GC-O)(13)

一般的に, 食品には多数の揮発成分が含まれているが, 香りに寄与するのはその一部である。食品の香りのキーとなる香气成分は閾値が低く, 濃度も低い場合が多い。したがって, FID や MS のプロファイルが必ずしも食品の香りのプロファイルを反映しているとはいえない。香りの研究では, 香りに寄与する成分を選び出すことが重要なファーストステップである。

ある成分が食品の香りにどの程度寄与しているのかを推定する概念として, 濃度を閾値で除した値が用いられる。これは, Odor Activity Value (OAV), もしくは, 上立ち香の場合 odor unit, 口中香の場合 flavor unit などとも呼ばれる。しかし, OAV を求めるには成分の同定と閾値の測定が必要であり, 食品に含まれる膨大な成分の OAV を算出するには非常に時間がかかる。また, スクリーニングステップをふまないと, 重要な成分を見落としてしまう可能性がある。

GC とにおいかぎを組み合わせた GC-Olfactometry (GC-O)は, 混合物からにおい活性成分をスクリーニ

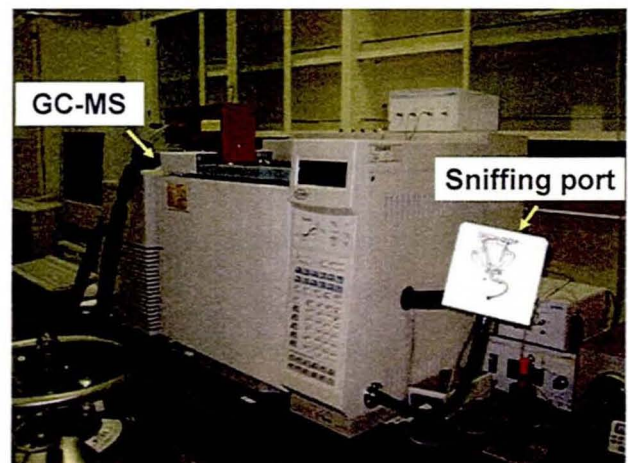


Figure 2 Equipment for GC-Olfactometry.

ングする有用な手法である。GC-O は、人間が GC カラムから流出する成分のにおいをかぐ実験である (Figure 2)。この手法を用いれば、化学構造が不明のにおい活性成分をも検出することができる。

GC-O は定性的な分析方法であるため、それぞれの化合物の香りへの寄与を 1 回の分析で判断するのは難しい。GC-O のデータを客観的に評価する方法の一つに希釈法があり、Acree らによる CharmAnalysis や Grosch らによる Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) が開発されている。これらの方法はいずれも、香気成分抽出液の希釈系列を作成して GC-O を行い、個々の化合物のにおい活性を評価するものである。においの検知閾値に基づく手法であり、においが感じられなくなる希釈率まで GC-O を繰り返す。

CharmAnalysis はコンピューター化されたシステムである。通常、希釈試料の順序をランダム化して GC-O を行う。評価者はにおいの始まりから終わりまでマウスボタンを押し、スクリーンに表示された用語からにおいの特徴を選ぶ。これを繰り返すことにより Charm value が計算され、結果は Charm クロマトグラムに表される (Figure 3)。

$$c = d^{(n-1)} \quad n: \text{応答の数}, d: \text{希釈率}$$

AEDA は Charm よりも簡略化された方法で、におい活性成分のスクリーニング手法として提案されたものである。評価者は GC-O を行い、においの有無およびその特徴を記録する。結果は、Flavor Dilution (FD) ファクター、すなわちにおいが検知される最大の希釈率として、FD クロマトグラム (Figure 4) で表される。

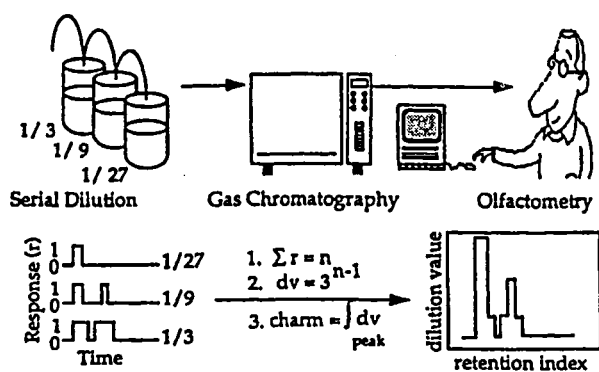


Figure 3. Schematic procedure for GC-olfactometry using CharmAnalysis.

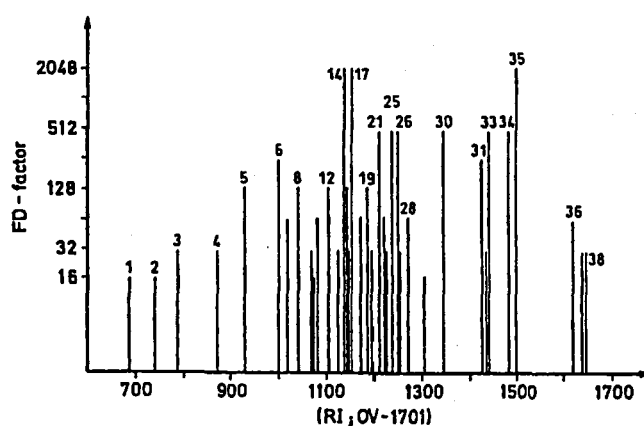


Figure 4. FD chromatogram.

Charm や AEDA によりクロマトグラム上でにおい活性ゾーンが特定されたら、においの特徴、クロマトグラフィ特性 (リテンションインデックス, RI), およびマススペクトルをもとに化合

物の同定を行う。

GC-O を行う上で注意すべき点がいくつかある。一つは、香気成分抽出液の香りがもとの食品の香りを反映していることである。化合物の分解やアーティファクトの生成を防ぐため、抽出時の加熱処理はできるだけ避けるべきである。また、香気成分の抽出にはさまざまな方法があるが、それぞれの方法によって抽出される成分は異なる可能性がある。たとえば、キャラメル様の甘いにおいを呈する furaneol は極性の高い化合物で、水蒸気蒸留法では検出されないが、溶媒抽出法では検出される。さらに、食品中に含まれるさまざまな特性の化合物を分離するために、極性の異なる2種類以上のカラムを用いることが推奨される。

GC-O の限界についても留意する必要がある。Charm や AEDA といった希釈法は閾値に基づく評価方法である。一方、閾上での用量—強度関数は化合物によって異なるため、Charm value や FD が実際の寄与率と一致しない場合もある。また、他の成分が共存する場合のにおい活性については予測できない。

Charm や AEDA により、定性的な香気成分組成は明らかになる。しかしこれは、複雑な食品の香りを理解する上での第一段階に過ぎない。今日の食品香気の研究は、官能評価および分析を組み合わせたアプローチが基本となっている。特徴香成分やオフフレーバー成分の同定は、基本的に 1. 定性的な香気成分組成 (GC-O) 2. 定量的な香気成分組成 (OAV) 3. 香りの再構成 (定量データに基づく香りのシュミレーション) の3段階で行われる。

第1章 清酒の熟成による香気成分の変化

1. 緒言

清酒を数年間貯蔵すると、色、味、香りが変化する。古酒の香りは「カラメル」、「焦げ」、「重い」、「複雑」な特徴を有するといわれる。このような清酒は劣化していると捉えられる場合が多いが、独特の香りとなめらかな味が消費者の関心を引き、3年～数十年間熟成させた清酒が「熟成酒」として市場にも出回っている。

古酒の香りに関して、多くの研究報告がある。Takahashiらは、焦げ臭を呈する成分としてソトロンを同定し、古酒中の odor unit (濃度を閾値で除した値) が 1.8~5.6 と報告している(2)。しかし、清酒の貯蔵によるソトロンの経時変化については調べられた例がなく、また、清酒中のソトロンの定量方法に関する報告はほとんどみられなかった。また、そのほかに、エステル(3)、酸(4)、含硫化合物(6-7)、カルボニル化合物(5)等が貯蔵により増加することが報告されているが、香りへの寄与が明らかでない成分も多い。

本章では、まず、溶媒抽出法および SBSE 法を用いて清酒の香気成分を抽出し、GC-Olfactometry により古酒の香りに寄与する成分を探索した。同定した香気成分の定量方法を確立し、経時変化を調べるとともに、閾値との関係から古酒の香りへの寄与について検討した。

2. 材料および方法

(1) 試薬

2-メチルブタナール, 3-メチルブタナール, 2-メチル酪酸エチル, 3-メチル酪酸エチル, DMDS, ベンズアルデヒド, フェニルアセトアルデヒド, [1,2-¹³C]-アセトアルデヒド, オキサプロピオン酸ジエチルは Sigma-Aldrich より, 酢酸イソアミル, メチオナール, コハク酸ジエチル, フェニル酢酸エチル, 酢酸フェネチル, 3-ヒドロキシ-4,5-ジメチル-2(5H)-フラノン は東京化成工業より, DMTS は Acros Organics より, アルカンスタンダード(C6-C20)はジーエルサイエンスより購入した。

¹³C₂-ソトロンは Blank らの方法(15) に従い合成した。[1,2-¹³C]-アセトアルデヒドとオキサプロピオン酸ジエチルとを無水ピリジン中で還流し、さらに塩酸および酢酸を添加して還流を続け、生成した ¹³C₂-ソトロンをジエチルエーテルにより抽出した。[1,2-¹³C]-アセトアルデヒド 1 g より ¹³C₂-ソトロン 143 mg が得られた。(回収率 5%)

(2) 清酒

酒類総合研究所で1967年～2002年に製造し、貯蔵庫（室温10～20℃）で貯蔵した清酒を用いた。一般成分等をTable 1に示す。

Table 1. Profiles of Samples

| production year (BY) | storage length (years) | polishing rate of rice (%) | alcohol (% v/v) | pH | absorbance at 430nm | 3-deoxy glucosone (mM) |
|----------------------|------------------------|----------------------------|-----------------|-----|---------------------|------------------------|
| 2002 | 0 | 40 | 16.3 | 4.2 | 0.02 | 0.11 |
| 2000 | 2 [0] | 50 | 17.3 | 4.2 | 0.03 | 0.07 |
| 1997 | 5 [3] | 50 | 18.7 | 4.4 | 0.04 | 0.10 |
| 1994 | 8 [6] | 40 | 18.0 | 4.1 | 0.06 | 0.20 |
| 1991 | 11 [9] | 50 | 19.1 | 4.4 | 0.09 | 0.34 |
| 1988 | 14 [12] | 50 | 18.0 | 4.1 | 0.08 | 0.25 |
| 1985 | 17 [15] | 50 | 18.1 | 4.2 | 0.10 | 0.29 |
| 1982 | 20 [18] | 50 | 17.8 | 4.1 | 0.12 | 0.39 |
| 1980 | 22 [20] | 50 | 17.3 | 4.2 | 0.15 | 0.46 |
| 1976 | 26 [24] | 50 | 16.9 | 4.3 | 0.15 | 0.42 |
| 1974 | 28 [26] | 50 | 19.4 | 4.5 | 0.67 | 1.37 |
| 1973 | 29 [27] | 70 | 17.9 | 4.3 | 0.64 | 1.76 |
| 1967 | 35 [33] | 50 | 16.9 | 4.4 | 0.78 | 1.09 |

[]: The concentrations of sotolon and furfural were measured in 2001.

(3) GC-Olfactometry (GC-O)

i. 溶媒抽出法による GC-O

清酒 50 mL に硫酸アンモニウム 2.5 g を加え、これにジクロロメタン 20 mL を加えて 700 rpm、10 分間攪拌した後、分液ロートにより有機溶媒相（下層）を採取した。水相に再びジクロロメタン 20 mL および 10 mL を加えて同様の操作を行った。得られた有機溶媒相約 50 mL を 3000 rpm で 10 分間遠心して水相を除去し、硫酸ナトリウムにより脱水した。これをロータリーエバポレーターにより約 10 mL まで濃縮し、さらに窒素気流下で約 150 μ L まで濃縮した。この濃縮液 1 μ L をガスクロマトグラフに注入し、Table 2-(a)に示す条件で GC-O を行った。また、同一の条件で GC-MS (Agilent 5972) による分析を行い、化合物の同定を行った。

ii. SBSE による AEDA

エタノール濃度が 10% となるように清酒に超純水を添加した後、10% エタノールで 1:5, 1:25, 1:125 に希釈した試料を作成した。この試料 10 mL と Twister (GERSTEL 社製) を 10 mL 容のガラス製ヘッドスペースバイアルに入れ、2 g の塩化ナトリウムを添加し、テフロンコーティングした

セブタムでシールした。Twister を 700 rpm で 30 分間攪拌した後、試料から取り出し、キムワイブで水分をふき取り、加熱脱着用のガラスチューブに入れた。このガラスチューブを Gerstel TDS2 加熱脱着システムに装着した。TDS2 を 20°C で 1 分間保持した後 60°C/分 で 230°C まで昇温し、4 分間保持することにより、Twister に抽出された香気成分の加熱脱着を行った。脱着された香気成分は、-150°C に冷却した CIS4 部分でいったんクライオフォーカスされ、その後、CIS4 を 12°C/秒で 250°C まで上昇させることにより、GC カラムに注入される。注入はスプリットレスモードで行った。

GC-O は Table 3-(a) に示す条件で行った。カラム出口をフロープリッターに接続し、キャリアガスをスニッフィングポートと質量分析計に 2 : 1 で分岐した。2 人のパネリストが 2 回ずつにおいかぎを行い、合計 4 回のうち 2 回においが検出されたにおいゾーンを odor active とした。リテンションインデックスは、n-アルカン (C6-C20) を参照物質とし、文献の方法(16)に従って計算した。

(4) 香気成分の定量

i. 溶媒抽出法によるソトロンおよびフルフラールの定量

Cutzach らのワインの分析方法(17)を一部改変し、ソトロンについては $^{13}\text{C}_2$ -ソトロンを用いる同位体希釈分析法(18)により行った。清酒 50 mL に内部標準として $^{13}\text{C}_2$ -ソトロン (ソトロン定量のための内部標準物質) 50 $\mu\text{g/L}$ 、3-オクタノール (フルフラール定量のための内部標準物質) 1000 $\mu\text{g/L}$ となるように添加し、(3) - i と同様にしてジクロロメタン抽出および濃縮を行った。濃縮液 2 μL を GC-MS に注入し、Table 2-(b) に示す条件で分析した。

ii. SBSE による香気成分の定量

エタノール濃度 10% になるように加水した試料に 2 g の塩化ナトリウムおよび内部標準として 3-オクタノール (5 mg/L) を添加し、(3) - ii と同様に SBSE を行った。カラムは直接質量分析計に接続し、Table 3-(b) に示す条件で分析を行った。検出は SIM モードにより、Table 6 に示すイオンを定量イオンとして用いた。

(5) 官能評価

DMTS が古酒の香りに及ぼす影響を、訓練された 10 人のパネルにより評価した。DMTS およびソトロンを、Figure 6 に示す濃度でベースの清酒 (製造後約 1 年) に添加した。ベースの清酒にはこれらの香気成分は検出されなかった。試料には 3 桁のランダムコードを付し、順序効果を排除

するため、それぞれのパネリストに異なる順序で試料を提示した。パネリストには、試料のにおいをかぎ、3つの特性（全体的なにおい強度、カラメル/焦げ臭、硫黄系のにおい）について0～5のスケールで評価するよう指示した。得られたデータについて分散分析を行った。

Table 2. Gas chromatography analysis conditions for the samples extracted with solvent

| | |
|--|--|
| (a) GC-O | |
| GC | Shimadzu GC-17A |
| Column | HP-Wax (30 m×0.32 mm i.d. 0.25 µm film) |
| Carrier | Herium, 1.3 mL/min, constant flow mode |
| Oven | 40°C (2 min)→3°C/min→230°C (40 min) |
| Injection | Splitless, 1 µL, 110°C |
| (b) Quantification of sotolon and furfural | |
| GC | Agilent 6890 |
| Column | HP-Wax (60 m×0.25 mm i.d. 0.25 µm film) |
| Carrier | Herium, 2.0 mL/min, constant flow mode |
| Oven | 40°C (2 min)→3°C/min→230°C (40 min) |
| Injection | Pulsed splitless, 2 µL, 230°C |
| Transfer line | 250°C |
| MS | Agilent 5973 |
| Mode | SIM, m/z: furfural, 96 3-octanol, 83 sotolon, 128 ¹³ C ₂ -sotolon, 130 |

Table 3. Gas chromatography analysis conditions for SBSE

| | |
|--|---|
| (a) GC-O | |
| GC | Agilent 6890 |
| Column | HP-INNOWax (30 m×0.25 mm i.d. 0.25 µm film) |
| Carrier | Herium, 1.9 mL/min, constant flow mode |
| Oven | 40°C (5 min)→5°C/min→240°C (15 min) |
| Injection | Splitless |
| MS | Agilent 5973 |
| Mode | Scan (m/z 30-450, 0.29 s/scan) |
| (b) Quantification of volatile compounds | |
| GC | Agilent 6890 |
| Column | HP-INNOWax (30 m×0.25 mm i.d. 0.25 µm film) |
| Carrier | Herium, 1.0 mL/min, constant flow mode |
| Oven | 40°C (5 min)→5°C/min→240°C (15 min) |
| Injection | Split (50:1), Splitless only for methional |
| MS | Agilent 5973 |
| Mode | SIM |

(6) 一般分析

清酒の色は、遠心後、10 mm セルで 430 nm の吸光度を測定した値とした。3-デオキシグルコソ
ン (3-DG) は、岩野らの方法(19)により測定した。なお、F-kit でピルビン酸濃度を測定した後、
大塚らの方法(20)により 3-DG の測定値からピルビン酸の影響を排除した。

3. 結果

(1) GC-O

まず、溶媒抽出により清酒の香気成分を抽出し、GC-O を行った。Table 4 に、新酒 (2000 年製
造) からは検出されず、古酒 (1967, 1973 年製造) からのみ検出された成分を示した。標準物質
とのリテンションタイムの比較および GC-MS 分析により、20.5 分の硫黄系のにおいては DMTS,
25.2 分のカラメルもしくは焦げ臭はフルフラール、27 分のフルーティーなにおいてはベンズアルデ
ヒド、34.7 分のはちみつ様においてはコハク酸ジエチル、51 分のカレー様のにおいてはソトロンと
同定した。49 分の甘いにおいては同定することができなかった。これらのうち、ソトロンとフルフ
ラールが古酒において特に強く検出された。

Table 4. Odorants found only in aged sake by GC-O and results of identification

| R.T. | 2000 | 1973 | 1967 | odor property | compound |
|------|------|------|------|---------------------|-------------------|
| 20.5 | n.d. | ○ | ○ | sulfur | DMTS |
| 25.2 | n.d. | ◎ | ◎ | caramel, burnt | furfural |
| 27.0 | n.d. | ○ | ○ | fruity | benzaldehyde |
| 34.7 | n.d. | ○ | ○ | honey | diethyl succinate |
| 49.0 | n.d. | ○ | ○ | cotton candy, sweet | unknown |
| 51.0 | n.d. | ◎ | ◎ | curry | sotolon |

n.d.: not detected, ○: moderately detected, ◎: strongly detected

次に、SBSE により香気成分を抽出し、AEDA により新酒 (2002 年製造) と古酒 (1967 年製造)
を比較した。Table 5 には両者で Flavor Dilution (FD) ファクターが異なるにおい成分を示した。
検出されたにおい成分は、新酒よりも古酒のほうが多かった。2-メチルブタナール/3-メチルブタ
ナール、2-メチル酪酸エチル、3-メチル-2-ブテン-1-チオール、4-メチルペンタン酸エチル、DMTS,
および メチオナールの FD は古酒のほうが 25~125 倍高かった。3-メチル-2-ブテン-1-チオール
はビールの日光臭の原因物質とされているが、清酒にも存在することが初めて示唆された。ただ
し、MS では確認することができなかった。3-メチル酪酸エチルおよびフェニルアセトアルデヒド

の FD は古酒のほうが 5 倍高かった。DMDS, フルフラール, フェニル酢酸エチルは古酒のみから検出されたが FD は 5 とあまり高くなかった。一方, 酢酸イソアミルや酢酸フェネチルの FD は古酒よりも新酒のほうが高かった。ソトロンはこの方法では検出されなかった。おそらく, 親水性化合物に対して PDMS の親和性が低いためと考えられる。

Table 5. Difference of odors between aged sake and fresh sake by AEDA

| RI | odor property | compound | FD | |
|------|-----------------|--|------|-------|
| | | | aged | fresh |
| 906 | aldehyde, nut | 2-methylbutanal + 3-methylbutanal ^a | 25 | |
| 993 | resin | unknown | 5 | |
| 1036 | roasted, earthy | unknown | 5 | |
| 1041 | sweet, ester | ethyl 2-methylbutyrate ^a | 125 | |
| 1055 | sweet, ester | ethyl 3-methylbutyrate ^a | 125 | 25 |
| 1061 | resin | DMDS ^a | 5 | |
| 1087 | sulfur, garlic | 3-methyl-2-butene-1-thiol ^b | 25 | 1 |
| 1103 | banana | isoamyl acetate ^a | 5 | 125 |
| 1116 | garlic, metal | unknown | 1 | 5 |
| 1154 | powder, roasted | unknown | 5 | |
| 1173 | sweet, ester | ethyl 4-methylpentanoate ^a | 25 | |
| 1323 | nut, powder | 2,3-dimethylpyrazine ^b + unknown | 5 | |
| 1369 | sulfur | DMS ^a | 125 | 1 |
| 1407 | sweet, ester | unknown | 5 | |
| 1445 | potato, roasted | methional ^b | 25 | 1 |
| 1473 | burnt, chemical | furfural ^a | 5 | |
| 1512 | grass | unknown | | 25 |
| 1617 | burnt | unknown | 25 | 5 |
| 1635 | flower | phenylacetaldehyde ^a | 25 | 5 |
| 1663 | nut, powder | unknown | 5 | 1 |
| 1721 | honey, caramel | unknown | 5 | 1 |
| 1720 | plastic, sulfur | unknown | 1 | |
| 1760 | sulfur | unknown | 1 | |
| 1771 | flower | ethyl phenylacetate ^a | 5 | |
| 1808 | flower | phenethyl acetate ^a | | 25 |
| 1821 | curry | unknown | 1 | |
| 1958 | honey, caramel | unknown | 1 | 5 |
| 2012 | roasted, wax | unknown | 1 | |
| 2097 | medicinal | unknown | 1 | |
| 2199 | cereal | unknown | 1 | |

^a Compound identified by comparison of RI value, odor property, and mass spectra with those of standard compound. ^b Compound tentatively identified by comparison of RI value and odor property of standard compound.

(2) 定量方法の精度

溶媒抽出による GC-O により検出されたソトロン, フルフラール, ベンズアルデヒド, コハク

酸ジエチル, SBSE による AEDA で古酒と新酒で FD に差がみられた 2-メチルブタナール, 3-メチルブタナール, メチオナール, フェニルアセトアルデヒド, DMDS, DMTS, 2-メチル酪酸エチル, 3-メチル酪酸エチル, フェニル酢酸エチル, 酢酸イソアミル, 酢酸フェネチルについて定量方法を検討した。

ソトロンおよびフルフラールは溶媒抽出法で定量を行った。当初はワインでの方法にしたがい、両化合物とも 3-オクタノールを内部標準物質に用いていた。しかし、Table 6 に示すようにソトロンについては繰り返し誤差が大きかった。その原因として、両者の沸点、極性などの物性の違いが考えられた。そこで、 $^{13}\text{C}_2$ -ソトロンを合成し、これを内部標準物質とする同位体希釈分析法による定量方法を検討した。その結果、変動係数は 10% 以下となり、良好な再現性が得られた。一方、フルフラールについては、3-オクタノールを内部標準とした方が良好な繰り返し再現性が得られた。

その他の成分については SBSE 法による定量方法を検討した。Table 6 に示すとおり、変動係数 (CV) は 6% 以下であった。また、清酒に標準物質を添加して回収率を求めたところ 87-103% となり、SBSE 法による定量が可能であると考えられた。

Table 6. Monitor ions, variation coefficients (CV) and recovery rates

| | monitor ion | CV (%) ^a | recovery rate (%) |
|--|-------------|---------------------|-------------------|
| sotolon (i.s. 3-octanol) | 128 | 48 | - ^b |
| sotolon (i.s. $^{13}\text{C}_2$ -sotolon) | 128 | 4.4 | - |
| furfural (i.s. 3-octanol) | 96 | 5.0 | - |
| furfural (i.s. $^{13}\text{C}_2$ -sotolon) | 96 | 58 | - |
| 2-methylbutanal | 58 | 1.9 | 98 |
| 3-methylbutanal | 58 | 5.8 | 99 |
| methional | 104 | 2.1 | 103 |
| benzaldehyde | 106 | 2.5 | 87 |
| phenylacetaldehyde | 120 | 5.7 | 89 |
| DMDS | 94 | 2.5 | 93 |
| DMTS | 126 | 2.9 | 96 |
| ethyl 2-methylbutyrate | 102 | 1.4 | 95 |
| ethyl 3-methylbutyrate | 88 | 3.1 | 94 |
| diethyl succinate | 101 | 4.9 | 98 |
| ethyl phenylacetate | 91 | 2.5 | 96 |
| isoamyl acetate | 70 | 1.8 | 100 |
| phenethyl acetate | 104 | 2.7 | 90 |

^a CV was calculated from 5 injections of standard solution. ^b Calibration curves of sotolon and furfural were constructed by analysing sake spiked with sotolon and furfural.

(3) 清酒の熟成による香気成分の変化

Table 1 の試料について上記の香気成分を測定した結果を Figure 5 に示す。ソトロンおよびフルフラールは新酒からは検出されなかったが 3 年以上貯蔵した清酒からは検出され、おおむね貯蔵期間の長いもので多くなる傾向を示した (Figure 5A, B)。2-メチルブタナール、3-メチルブタナール、フェニルアセトアルデヒド、メチオナールといったアルデヒド類もおおむね貯蔵期間の長いもので多かった (Figure 5D, E)。ただし、メチオナールは 1974 年製造のものが極端に低くなっていた。ベンズアルデヒドは 8 年貯蔵のものがピークで、以後減少した (Figure 5F)。DMDS および DMTS (ポリスルフィド) は新酒には痕跡量程度しか含まれず、貯蔵期間にしたがって増加する傾向を示した (Figure 5C)。ただし、1991 年および 1988 年製造のものは DMDS 濃度が極端に高かった。2-メチル酪酸エチル、3-メチル酪酸エチル、フェニル酢酸エチル、およびコハク酸ジエチルといったエチルエステル類も貯蔵により増加する傾向を示した (Figure 5G, H)。一方、酢酸イソアミル、酢酸フェネチルといった酢酸エステル類は貯蔵により減少する傾向を示した (Figure 5I)。

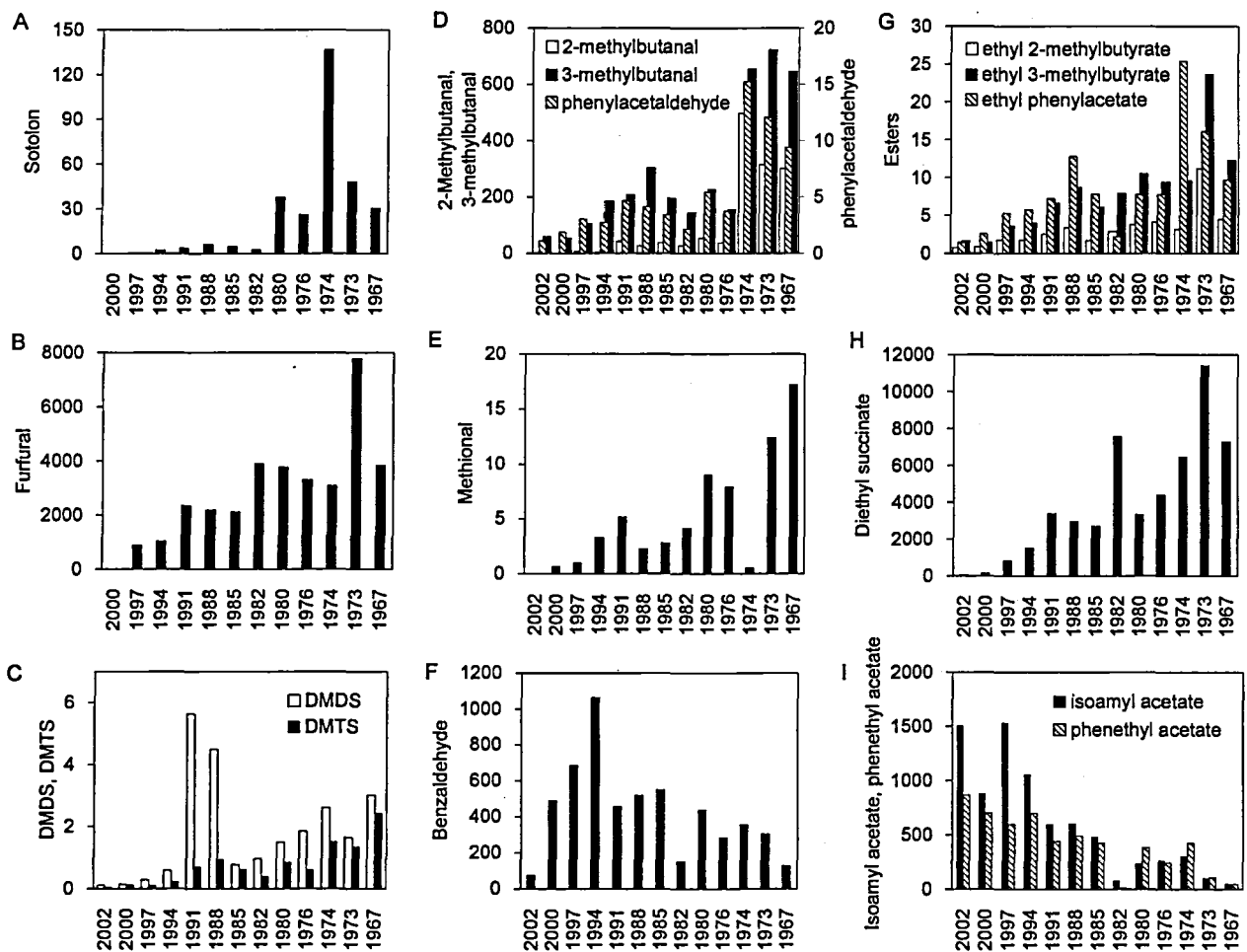


Figure 5. Concentrations of aroma compounds in stored sake ($\mu\text{g/L}$).

(4) 各香気成分の古酒の香りへの寄与

Table 7に、(3)で測定した香気成分の濃度と閾値をまとめた。Odor Activity Value (OAV)が1を超えていたのは、ソトロン、3-メチルブタナール、メチオナール、ベンズアルデヒド、およびDMTSで、このうちソトロンのOAVが最も高く、DMTSがこれに続いた。

Table 7. Concentrations of volatile compounds in stored sake, threshold values and OAV

| compound | detection threshold (µg/L) | concentration in stored sake (µg/L) | | OAV | |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------|------|-----|
| | | min | max | min | max |
| furfural | 11000 ^a | n.d. | 7800 | <0.1 | 0.7 |
| sotolon | 2.3 ^a | n.d. | 140 | <0.5 | 61 |
| 2-methylbutanal | 1500 ^d | n.d. | 496 | <0.1 | 0.3 |
| 3-methylbutanal | 120 ^a | 55 | 722 | 0.5 | 6.0 |
| methional | 10 ^c | n.d. | 17 | <0.1 | 1.7 |
| benzaldehyde | 990 ^a | 77 | 1067 | <0.1 | 1.1 |
| phenylacetaldehyde | 25 ^f | 1.1 | 15 | <0.1 | 0.6 |
| DMDS | 7 ^d | 0.11 | 5.6 | <0.1 | 0.8 |
| DMTS | 0.18 ^a | 0.04 | 2.4 | 0.2 | 14 |
| ethyl 2-methylbutyrate | 7,200 ^e | 0.8 | 11 | <0.1 | 0.1 |
| ethyl 3-methylbutyrate | 18,200 ^e | 1.6 | 24 | <0.1 | 0.2 |
| diethyl succinate | 100000 ^c | 76 | 11424 | <0.1 | 0.1 |
| ethyl phenylacetate | 100 ^c | 1.5 | 25 | <0.1 | 0.3 |
| isoamyl acetate | 300 ^b | 50 | 1531 | 0.2 | 5.7 |
| phenethyl acetate | 3000, 3800 ^d | 10 | 865 | <0.1 | 0.3 |

^{a-c} Odor threshold in sake according to Utsunomiya (36) (a), (37) (b), determined for this work in our laboratory (c). ^{d,e} Odor threshold in beer according to Meilgaard (38) (d), Moll (39) (e). ^f Odor threshold in wine according to Silva Ferreira (27).

次に、これら2つの成分を組み合わせ、清酒に添加して官能評価を行った。ソトロンの添加濃度は市販熟成酒の平均的な濃度(15 µg/L, 認知閾値の5倍)とした。DMTSの濃度は(3)で調べた濃度範囲(0~2 µg/L)とした。Figure 6A, Bに示すとおり、DMTS添加量の増加により、硫黄系のおいだけでなく、全体的なおい強度も増加した。いずれの特性についても、DMTSを1または2 µg/L添加したものは、無添加のものに比べて有意に高いスコアとなった(危険率5%)。さらに、DMTSとソトロンの相互作用について調べた。Figure 6Cに示すように、15 µg/Lのソトロンに、1 µg/LのDMTSを添加すると、DMTS無添加の場合に比べて、ソトロンの特徴であるカラメル/焦げ臭のスコアが高くなった。DMTSの硫黄系のおいに対するソトロンのマスキング効果についても調べた(Figure 6D)。その結果、ソトロンの有無にかかわらず硫黄系のおい強度はほぼ同等であった。したがって、この実験で用いた濃度では、ソトロンの硫黄系のおい

対するマスキング効果はみられないようだった。

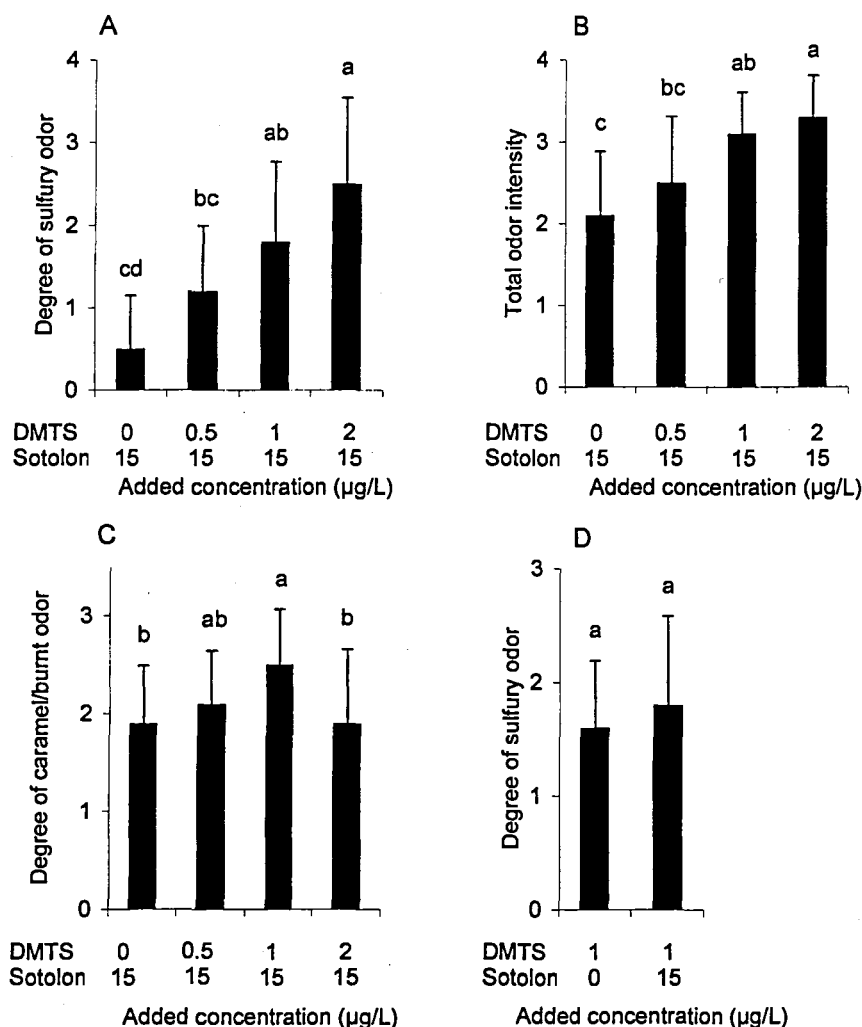


Figure 6. Effect of DMTS on sensory evaluation and interaction with sotolon. The results are shown using letters to indicate differences; any values not followed by the same letter are significantly different at the 5% level.

4. 考察

本章では、酒類総合研究所で製造・貯蔵している清酒を用いて、清酒の貯蔵による香りの変化を調べた。用いた試料は類似した条件で製造された吟醸酒であるが、貯蔵期間が0~35年と異なっている。GC-Oにより古酒の香りに寄与する成分の探索を行ったところ、ソトロン、フルフラール、アルデヒド類、エステル類、およびポリスルフィドが、新酒よりも古酒で強く検出された (Table 4, 5)。貯蔵酒中のこれらの香気成分濃度を測定し、貯蔵により増加することを確認した (Figure 5)。これらの化合物 (熟成香成分) の構造式を Figure 7 に示した。

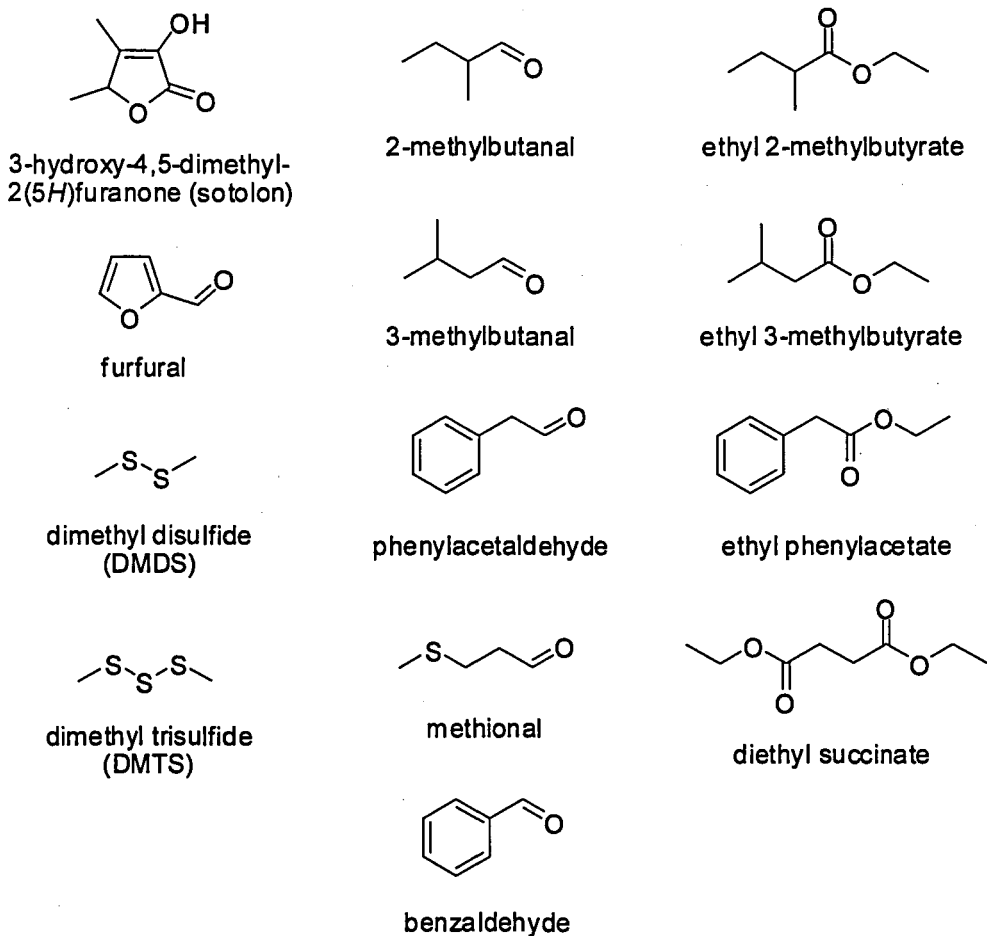


Figure 7. Chemical structures of the aroma compounds that increased during aging of sake.

これらの化合物のうち、ソトロン、3-メチルブタナール、メチオナール、ベンズアルデヒド、および DMTS は、貯蔵酒中の濃度が閾値を超えるものがあつた (Table 7)。ソトロンについては Takahashi らの報告(2)が再確認され、それ以外の成分については、本研究により古酒の香りへの寄与が初めて確認された。

ソトロンは、60°Cで1ヶ月間加温貯蔵した清酒から焦げ臭を呈する物質として単離・同定された(2)。しかし、清酒中のソトロン定量方法については報告がほとんどみられなかった。そこで、¹³C₂-ソトロンを内部標準として用い、ワイン中のソトロンの定量方法を参考にし、溶媒抽出による定量方法を確立した。この方法により貯蔵酒の分析を行ったところ、最大 140 μg/L のソトロンが検出され、検知閾値である 2 μg/L を大きく上回った。一方、フルフラールも焦げ臭を呈するが、貯蔵酒中の濃度は最大でも 8 mg/L であり、閾値である 11 mg/L を超えるものはなかった。したがって、古酒の一つの特徴であるカラメル様の香りや焦げ臭は、主にソトロンに由来すると考えられる。

ソトロンは、スレオニンが酸性下で分解して生じる α -ケト酪酸とアセトアルデヒドが縮合して生成すると考えられている(2)。一方で、Hofmannらはグルコースとシステインの加熱溶液からソトロンを検出しており(21)、メイラード反応が関与する生成機構も存在すると思われる。

3-メチルブタナールは加熱殺菌(火入れ)していない清酒(生酒)のオフフレーバーの原因物質として知られており、生酒ではイソアミルアルコールの酵素的酸化により生成する(22-24)。しかし、火入れ後の3-メチルブタナールの生成についてはあまり調べられていなかった。一方、ビールでは貯蔵中に2-メチルブタナール、3-メチルブタナール、フェニルアセトアルデヒドといったアルデヒド類が増加することが報告されている(25)。貯蔵清酒中のこれらのアルデヒド類の濃度は、メイラード反応の中間体化合物である3-DG濃度および430nmの吸光度と高い相関がみられた($R = 0.92-0.95$ および $0.85-0.90$)。このことから、これらのアルデヒド類は対応するアミノ酸のストレッカー分解により生じると考えられた。

最も貯蔵期間の長い貯蔵酒の3-メチルブタナールのOAVは6.0であり、新酒のOAVは0.5だった。3-メチルブタナールにおいては「アルデヒド」、「青臭い」、「ナッツ様」などと表現されることから、古酒の刺激的な特性に寄与すると思われる。

メチオナールについては、大場らによりその存在が推定されていたが(7)、本研究で初めて確認された。OAVはあまり高くないが(最大で1.7)、全体的な香りに対し、ある程度寄与していると考えられる。この化合物は白ワインの酸化劣化臭に関与していることが報告されている(26-28)。

ビールでは、pHや亜硫酸といった要因が、メチオナールの安定性に影響を及ぼすことが報告されている(29)。貯蔵酒の分析の結果、1974年製造の貯蔵酒が低い値となっていたが、それはpHがやや高い(Table 1)ことが一因かもしれない。

ベンズアルデヒドのOAVは1試料(1994年製造)のみ1を超えていた。ビールでは6ヶ月間の貯蔵によりこの化合物が増加することが報告されている(25)。清酒の場合はある時期まで増加し、その後減少するようであった(Figure 5F)。したがって、この化合物は一時的にのみ香りへ寄与すると思われる。ベンズアルデヒドがある時期から減少する理由についてはわからないが、安息香酸エチルが貯蔵中に増加することが観察されており(未公表データ)、その生成機構としてベンズアルデヒドの酸化およびエステル化が推察される。

DMDSは佐藤らにより貯蔵した清酒から見出され(6)、本研究においても貯蔵により増加することが確認された(Figure 5C)。しかし、DMDSの濃度は検知閾値以下だった。一方、DMTSのOAV

は8年以上貯蔵したもので1を超えており、35年貯蔵酒では14となった。したがって、古酒の硫黄系もしくはたくあん様のおい特性にはDMDSよりもDMTSの寄与が大きいと考えられる。

清酒にDMTSを添加すると、硫黄系のおいととも全体的なおい強度が増加した(Figure 6)。DMTSおよびソトロンのOAVの対数を加算した値は、全体的なおい強度のスコアと高い相関を示した($R_2=0.99$)。このことから、両化合物は独立におい強度に寄与していると考えられた。

DMTS そのものにおいては「硫黄様」、「たくあん様」、または加熱した野菜様のおいである。しかし、DMTSとソトロンを組み合わせると、DMTS無添加の場合に比べて、ソトロンの特徴であるカラメル/焦げ臭が増加した。このような増強効果の原因が、共存物質による揮発性の変化によるものなのか(30)、嗅覚神経レベルでの相乗作用なのかは(31)、現在のところ不明である。一方、DMTSに由来する硫黄系のおいが強すぎると、増強効果はみられなかった。カラメル/焦げ臭は古酒の望ましい特性なので、これら2つの化合物のバランスが重要と思われた。

硫黄系のおいに対するソトロンのマスキング効果は、本実験ではみとめられなかった(ソトロン15 $\mu\text{g/L}$, DMTS 1 $\mu\text{g/L}$)。しかし、貯蔵期間の非常に長いものでは、DMTSに対して大過剰のソトロンが含まれている。たとえば、1974年製造酒はDMTS濃度1.6 $\mu\text{g/L}$ に対し、ソトロンは140 $\mu\text{g/L}$ である。このような場合は、ソトロンによるマスキング効果が期待できるかもしれない。

清酒中のDMTS生成機構は調べられていないが、ビールでは多くの報告があり、主に二つの生成経路が研究されている(29,32-35)。一つは、ホップ由来のS-メチルシステインスルフォキサイドが酵素反応または加熱により分解してメタンスルフェン酸を生じ、メタンスルフェン酸と硫化水素との反応でDMTSを生じるというものである(32)。もう一つは、麦汁煮沸工程においてメチオニンのストレッカー分解で生じるメチオナルが貯蔵中に分解してメタンチオールを生じ、それが酸化されてDMTSとなる、という経路である(29,34-35)。清酒にはホップを添加しないので、前者の経路は可能性が低い、後者の経路は関与する可能性が考えられる。詳細については第3章で述べる。

エステル類については、2-メチル酪酸エチル、3-メチル酪酸エチル、フェニル酢酸エチル、およびコハク酸ジエチルといったエチルエステル類が貯蔵により増加した(Figure 5G, H)。ビールでも、これらのエチルエステルが増加することが報告されている(25)。しかし、これらのOAVは35年貯蔵酒でも1以下であるため、少なくとも単独では古酒の香りには寄与しないと考えられる。

酢酸イソアミルのOAVは新酒では6.0だったが、最も古い試料では0.2まで減少した。カプロ

ン酸エチルの OAV も 30 から 3 に減少した(データは示していない)。これらのエステル類の減少も、清酒の熟成による香りの変化に大きな影響を及ぼしていると考えられる。

上記の結果から、ソトロンやアルデヒド類、およびポリスルフィドが古酒の香りに寄与することが明らかとなったが、これら以外の化合物の寄与についても可能性が考えられる。上記のアルデヒド類、エステル類、ポリスルフィドおよびソトロンを新酒に添加し、古酒の香りの再構成を試みた。しかし、再構成した清酒と本物の古酒との官能評価による類似度は 50%程度だった(データは示していない)。一方、GC-O で検出されたものの同定できなかった成分もいくつか存在した。RI = 1036 および 1154 の焦げたにおい、RI = 1721 のはちみつ様のにおい、RI = 1087 の硫黄系のにおい (RI より 3-メチル -2-ブテン-1-チオールと推定) といった特性はいずれも古酒の香りの構成要素であり、これらの成分が香りに寄与する可能性は考えられる。古酒の香りの全容解明にはさらなる研究が必要であろう。

5. 要旨

清酒の熟成による香りの変化を、GC-Olfactometry (GC-O)、同位体希釈分析法、Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) 法を用いて調べた。溶媒抽出法を用いた GC-O では、古酒においてソトロンおよびフルフラールが強く検出された。SBSE 法を用いた Aroma Extract Dilution Analysis では、新酒より古酒から多くのおいさが検出され、特にアルデヒド類、ポリスルフィド、エステル類の FD が、古酒で高くなっていた。0~35 年間貯蔵した清酒について、これらの成分の定量分析を行い、熟成により増加することを確認した。これらの成分のうち、ソトロン、3-メチルブタナール、メチオナール、およびジメチルトリスルフィド (DMTS) の古酒中の濃度は閾値を超えていた。Odor Activity Value (OAV) が最も高かったのはソトロンで、DMTS がこれに続いた。官能評価の結果、DMTS の添加は、硫黄系のにおいおよび全体的なにおい強度の増加に寄与することが示された。

第2章 市販酒の老香に關与する香気成分

1. 緒言

第1章では、清酒の長期間にわたる貯蔵（～数十年）によって、ソトロン、フルフラール、アルデヒド類などのカルボニル化合物、有機酸・脂肪酸のエチルエステル、DMDS、DMTS といったポリスルフィドなどの香気成分（熟成香成分）が増加することを示した。一方、一般的な清酒の貯蔵・流通期間は数ヶ月～2年程度と考えられる。このような比較的短期間の貯蔵条件においても貯蔵劣化臭である「老香」を生じる場合は多いが、実際に老香を生じた市販清酒の香気成分について検討した例はほとんどみられない。老香はさまざまな化合物からなる複合香といわれているが(40)、それぞれの化合物の生成速度や閾値は異なり、貯蔵期間によって、香気成分組成や香りに寄与する成分も異なると考えられる。そこで、実際に官能評価により老香の指摘をうけた市販清酒を集めて香気成分分析および官能評価を行い、成分的な特徴（老香の指摘のない清酒との違い、長期熟成酒との違い）および官能評価に寄与する成分について検討を行った。

2. 材料および方法

(1) 清酒

i. 市販酒

国税庁実施の平成15年度全国市販酒類調査試料を用いた。名古屋国税局管内および広島国税局管内の小売店頭から買い上げられた清酒を20点ずつ提供していただき、計40点を試料とした。このうち20点（各国税局10点ずつ）は、それぞれの国税局で行われた官能評価において5人以上の審査員から老香の指摘を受けたもの（老香清酒）であり、残り20点は老香の指摘がなかったもの（老香なし清酒）である。

ii. 市販長期熟成酒

長期熟成酒研究会のメンバーより、各メーカーの代表的商品を提供していただいた。長期熟成酒研究会会員6名および当所職員6名の官能評価により、熟成香が感じられたもの（4段階評価で平均点が1.8点以上のもの）15点を選抜し、試料とした。

iii. 当所貯蔵酒

熟成香成分の活性炭への吸着を調べるため、当所で1973年に製造した清酒を用いた。

(2) 官能評価

市販酒の官能評価は、名古屋国税局試料については当所職員 5 名のパネルにより、広島国税局試料は当所職員 3 名のパネルにより、別々のセッションで行った。まず予備的に官能評価を行い、評価スケールの上限・下限を認識するよう依頼した。本試験では、それぞれの国税局試料について、老香清酒 10 点および老香なし清酒 3 点（老香以外のオフフレーバーについても指摘が少なかったもの）の計 13 点ずつを試料とした。老香、硫黄系のにおい、およびカラメル・はちみつを思わせる甘いにおいについて 4 段階（0：感じない←→3：強く感じる）の尺度で評価した。

（3）香気成分分析

第 1 章 2.（4）に示した方法で行った。

（4）多変量解析

SAS Institute Japan 株式会社の JMP5.1 により行った。

（5）活性炭による熟成香成分の吸着

清酒（1973 年当所製）およびそれに活性炭（MC 炭）を 1 g/L となるように添加したものを、室温にて 1 時間放置後、孔径 0.20 μm のフィルターでろ過し、香気成分を比較した。

3. 結果

（1）市販酒の官能評価と香気成分との関係

Figure 8 に名古屋国税局試料の官能評価と香気成分（閾値以上の濃度であったもの；3-メチルブタナール、ソトロン、DMTS）との関係を示した。DMTS および 3-メチルブタナールの濃度の対数と老香強度との相関係数はそれぞれ 0.72, 0.55 で、有意な相関がみられた。一方、ソトロンとの間には有意な相関はみられなかった。また、老香の一つの要素と考えられる硫黄系のにおいと DMTS 濃度の対数との間には相関がみられたが、カラメル・はちみつを思わせるような甘いにおいとソトロン濃度の対数との間には相関はみられなかった。

広島国税局試料についても、老香強度と DMTS および 3-メチルブタナール濃度の対数との間にはそれぞれ $R = 0.90, 0.76$ と高い相関がみられた。ソトロンはほとんどのものが定量下限値（1 $\mu\text{g/L}$ ）以下であった。

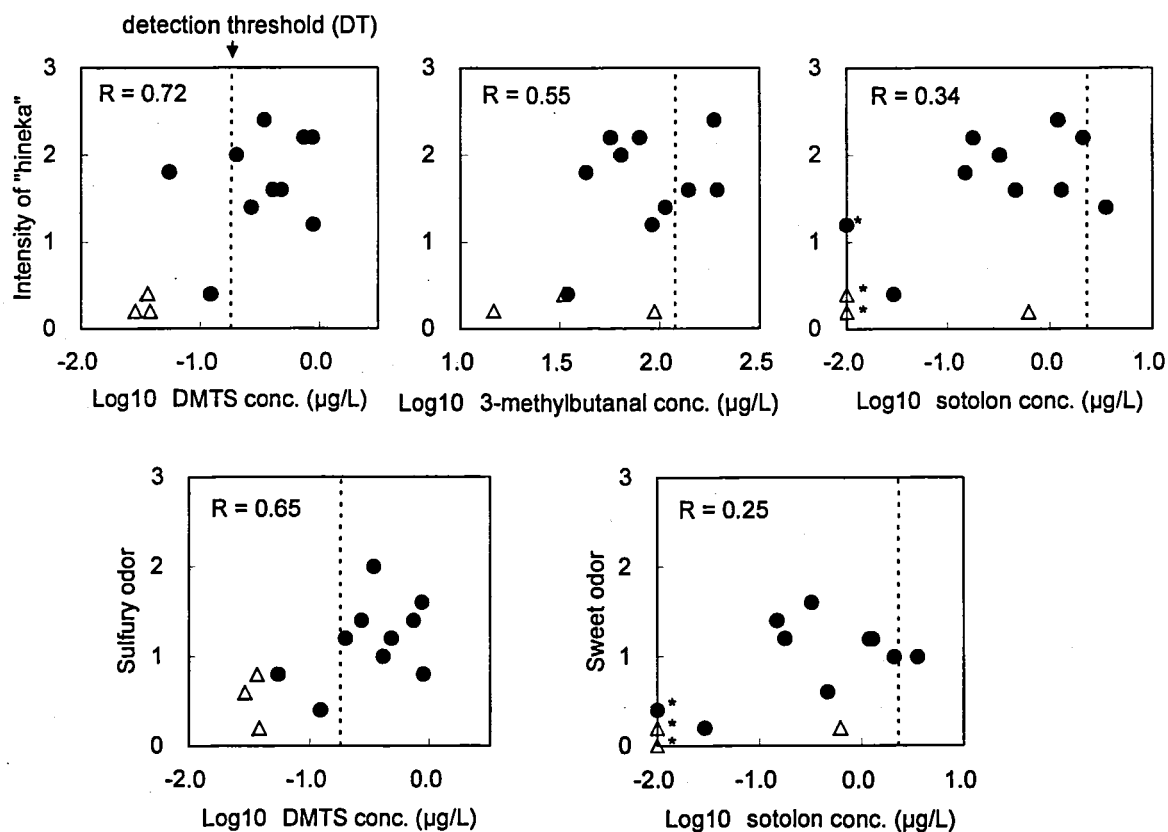


Figure 8. Relationship between sensory scores and logarithms of the concentrations of aroma compounds. Sensory scores are the means of five panelists.

Symbols : ●, commercial sake with "hineka" (n = 10) ; △, commercial sake without "hineka" (n = 3). * : below detection limit.

(2) 老香の指摘をうけた市販酒（老香清酒）と指摘のなかった市販酒（老香なし清酒）との香気成分の違い

老香清酒と老香なし清酒の香気成分濃度の平均値を比較すると、Table 8 に示すとおり、2-メチルプロパナール、2-メチルブタナール、3-メチルブタナール、フルフラール、ソトロン、イソ酪酸エチル、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、DMDS および DMTS といった熟成香成分は、老香清酒の方が老香なし清酒よりも有意に多かった（危険率 5%）。一方、酢酸イソアミルやカプロン酸エチルといった吟醸香成分は老香なし清酒の方が多かった。これらの結果は、長期貯蔵において吟醸香成分が減少し、熟成香成分が増加する傾向（第 1 章）とほぼ一致していた。

濃度を閾値で割った値 (OAV) が 1 以上の場合、その成分は香りに寄与していると考えられる。老香清酒 20 点のうち 65% のものは DMTS の OAV が 1 以上だった。3-メチルブタナールは 45% が

1以上だった。一方、ソトロンのOAVが1以上だったのは老香清酒のうち5%（1点）だった。

Table 8 Concentrations of aroma compounds and OAV

| compound | average concentration (µg/L) | | | detection threshold (µg/L) | OAV | | |
|--------------------------|---|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | commercial sake without hineka (n = 20) | commercial sake with hineka (n = 20) | commercial aged sake (n = 15) | | commercial sake without hineka | commercial sake with hineka | commercial aged sake |
| 2-methylpropanal | 13 | * ¹ 34 | * ² 171 | 1000 ^d | <1 | <1 | <1 |
| 2-methylbutanal | 7 | * ¹ 26 | * ² 122 | 1500 ^d | <1 | <1 | <1 |
| 3-methylbutanal | 75 | * ¹ 127 | * ² 279 | 120 ^a | ~1 (20) | ~2 (45) | ~4 (93) |
| benzaldehyde | 116 | | * ² 331 | 990 ^a | <1 | <1 | <1 |
| furfural | 175 | * ¹ 686 | * ² 3312 | 11000 ^a | <1 | <1 | <1 |
| sotolon | 0.1 | * ¹ 0.5 | * ² 9.8 | 2.3 ^a | <1 | ~2 (5) | ~18 (73) |
| ethyl 2-methylpropanoate | 5.0 | * ¹ 6.5 | * ² 21 | 5000 ^d | <1 | <1 | <1 |
| ethyl 3-methylbutyrate | 1.0 | * ¹ 2.0 | * ² 10 | 18,2000 ^d | <1 | <1 | <1 |
| ethyl lactate | 10841 | 10721 | * ² 45494 | 250000 ^d | <1 | <1 | <1 |
| diethyl succinate | 138 | * ¹ 329 | * ² 3867 | 100000 ^c | <1 | <1 | <1 |
| ethyl phenylacetate | 2.1 | * ¹ 3.6 | * ² 34 | 100 ^c | <1 | <1 | <1 |
| DMDS | 0.1 | * ¹ 0.8 | 1.0 | 7 ^d | <1 | <1 | <1 |
| DMTS | trace | * ¹ 0.3 | * ² 1.0 | 0.18 ^a | ~1 (5) | ~5 (65) | ~14 (93) |
| ethyl caproate | 301 | * ¹ 175 | 313 | 120 ^b | ~6 | ~6 | ~6 |
| isoamyl acetate | 996 | * ¹ 707 | 589 | 270 ^b | ~7 | ~7 | ~10 |

*¹: A significant difference was observed between commercial sake with "hineka" and without "hineka". (5% level) *²: A significant difference was observed between commercial aged sake and commercial sake with "hineka". (5% level) ^{a-c}: Odor threshold in sake according to refs 36(a), 37(b), determined in our laboratory (c). ^d: Odor threshold in beer according to ref 44.

Figures in parentheses are percentages of samples whose concentrations exceeded the detection threshold values.

(3) 老香清酒と長期熟成酒の香気成分の違い

老香清酒と市販長期熟成酒の香気成分濃度の平均値を比較すると、Table 8 に示すとおり、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、化合物によって差があった。

Table 9 に、熟成香成分を変数として主成分分析を行った結果を示した。第 1 主成分 (PC1) の寄与率は 64.5%、第 2 主成分 (PC2) の寄与率は 10.6% で、累積寄与率が 75% となった。PC1 は、すべての化合物が同一方向に寄与しており、熟成香成分全体の強度を表すと考えられた。一方、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する成分であった。

Figure 9 に、市販酒（老香なし清酒，老香清酒）および長期熟成酒の主成分スコアの散布図を示した。PC1 のスコアは、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ってい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，30 年程度熟成させたものは大きく負の方向にプロットされた。これは，長期熟成酒で貯蔵期間が長いもの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エチルが多く，ポリスルフィドが相対的に少ないことを示している。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气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エチルが多い傾向がみられた。

Table 9. Results of a principal component analysis of aroma compounds in commercial sake and commercial aged sake.

| | PC1 | PC2 |
|--------------------------|------|-------|
| variance (%) | 64.5 | 10.6 |
| factor loading | | |
| 2-methylpropanal | 0.92 | -0.20 |
| 2-methylbutanal | 0.95 | -0.17 |
| 3-methylbutanal | 0.86 | -0.26 |
| benzaldehyde | 0.46 | -0.01 |
| furfural | 0.91 | -0.11 |
| sotolon | 0.72 | -0.35 |
| ethyl 2-methylpropanoate | 0.84 | 0.13 |
| ethyl 3-methylbutyrate | 0.92 | 0.04 |
| ethyl lactate | 0.75 | 0.05 |
| diethyl succinate | 0.94 | -0.13 |
| ethyl phenylacetate | 0.85 | 0.18 |
| DMDS | 0.36 | 0.83 |
| DMTS | 0.70 | 0.59 |

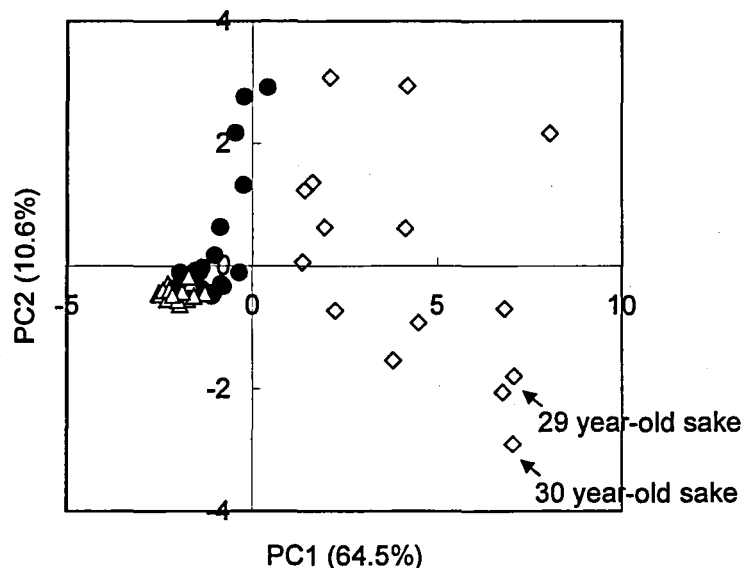


Figure 9. First two principal component scores of aroma compounds in commercial aged sake (\diamond , $n = 15$), commercial sake with "hineka" (\bullet , $n = 20$), and without "hineka" (\triangle , $n = 20$).

また，熟成香成分による老香清酒と長期熟成酒の判別を試みた (Table 10)。ステップワイズ変数選択によりコハク酸ジエチル，乳酸エチルおよびイソ酪酸エチルの3成分を用いたところ，長期熟成酒は15点中1点が老香清酒に誤判別されたが，老香清酒は20点すべて正しく判別され，誤判別率は2.9%となった。一個抜きクロスバリデーション (試料をひとつずつ除いて判別式を作

成し、除いた試料のグループを予測する)の結果、長期熟成酒は87%、老香清酒は95%が正しく判別され、良好な結果が得られた。

Table 10. Discrimination between commercial aged sake and commercial sake with "hineka" based on the concentrations of ethyl 2-methylpropanoate, ethyl lactate, and diethyl succinate

| | total number | assigned classes | | % correct recognition |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | | commercial aged sake | commercial sake with hineka | |
| commercial aged sake | 15 | 14 | 1 | 93 |
| commercial sake with hineka | 20 | 0 | 20 | 100 |
| % error rate: 2.9 | | | | |

| cross-validation | total number | assigned classes | | % correct prediction |
|-----------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| | | commercial aged sake | commercial sake with hineka | |
| commercial aged sake | 15 | 13 | 2 | 87 |
| commercial sake with hineka | 20 | 1 | 19 | 95 |
| % error rate: 8.6 | | | | |

(4) 活性炭による熟成香成分の吸着

老香を除去するといわれているMC炭による熟成香成分の吸着を検討した。DMTSは1.0 µg/Lが0.4 µg/Lとなり、約40%に減少した。エステル類は30~80%に減少したが、乳酸エチルは変化しなかった。3-メチルブタナールは1.3 mg/Lから1.2 mg/Lと10%程度しか減少せず、ソトロン(43 µg/L)はほぼ100%残存した。

4. 考察

本章では、市販酒にみられる短期間の貯蔵や流通過程で生じる老香について、成分的な特徴および官能評価に寄与する成分を検討した。

清酒の貯蔵によって増加する香気成分は、老香なし清酒と比較して老香清酒で多くなっていた。このうち、DMTS、3-メチルブタナールおよびソトロンは老香清酒中に閾値以上の濃度で含まれるものがあつた (Table 8)。DMTSについては、Figure 10のヒストグラムに示すように、老香清酒は0.9 µg/L (閾値の約5倍)まで分布し、20点中13点が閾値を上回っていたのに対し、老香なし清酒は20点中19点が0.09 µg/L以下に分布し、閾値以上であつたのは1点のみであつた。官能評価においても老香強度とDMTS濃度の対数との間に相関がみられたことから (Figure 8)、DMTSは官

能的に老香に大きく寄与していることが示唆された。宇都宮も、DMTS を清酒に添加した場合に約 3 割の技術者が「老香」と答えたと報告している(41)。また、老香の除去に用いられる MC 炭の処理により DMTS は確かに減少し、効果がみられたことから、老香への関与が裏付けられた。3-メチルブタナールについても、老香清酒は老香なし清酒よりも高濃度側に分布し (Figure 10)、老香清酒の約半数が閾値を超えていた (Table 8)。また老香強度との間に相関がみられた (Figure 8)。3-メチルブタナールは生酒の貯蔵中に顕著に増加する成分で、ムレ香の主原因物質であるが(22)、火入れ後の貯蔵劣化臭である老香にも関与していると考えられた。ソトロンは、老香清酒で閾値を超えていたのは 20 点中 1 点のみで、官能評価の結果からも (Figure 8)、老香への寄与は小さいと考えられた。老香清酒でも甘いにおいが感じられるものはあったが、これにはソトロン以外の化合物が関与していると思われる。この未同定成分については検討が必要と考えている。

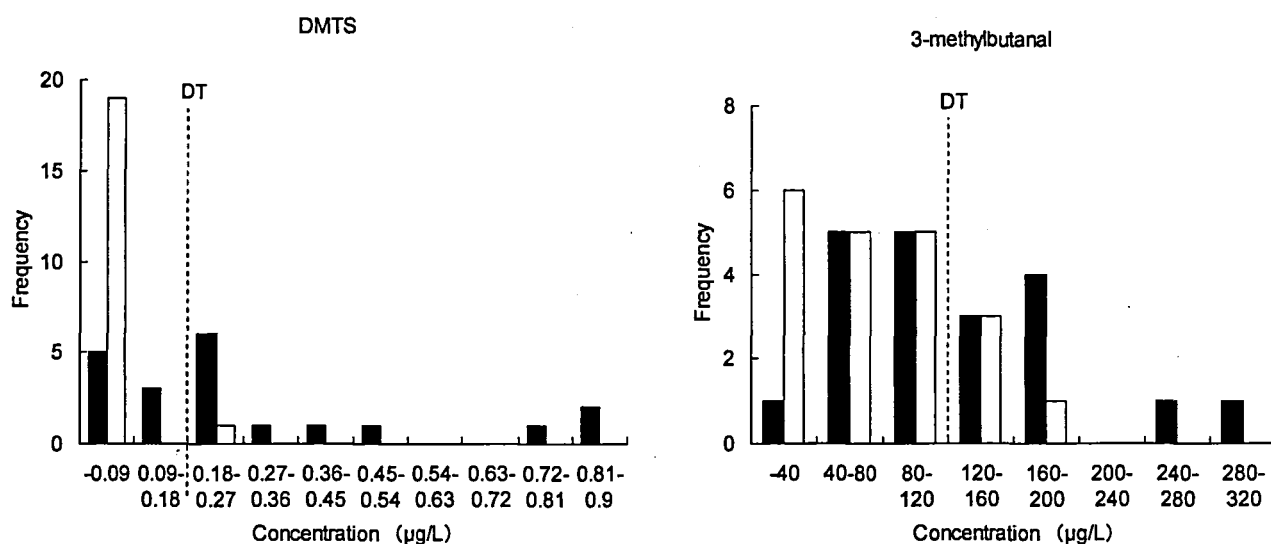


Figure 10. Histograms of the concentrations of DMTS and 3-methylbutanal in the commercial sake. Symbols: ■, commercial sake with “hineka” (n = 20) ; □, commercial sake without “hineka” (n = 20).

老香清酒と長期熟成酒の香気成分を比較すると、DMDS 以外は長期熟成酒の方が有意に多かった (Table 8)。ただし、化合物によって老香清酒/長期熟成酒の比は異なっていた。主成分分析の結果、老香清酒ではポリスルフィドが相対的に多い傾向がみられ、長期熟成酒で貯蔵期間が特に長いもので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エチルが多くなっていた。老香清酒の貯蔵期間は数ヶ月～2 年程度と考えられる。一方、今回用いた長期熟成酒の貯蔵期間は 5 年～30 年である。このことから、清酒の貯蔵初期はポリスルフィドが相対的に多くなり、貯

蔵期間が長くなるにつれてソトロンなどのカルボニル化合物や有機酸エステルの比率が高くなると考えられた。

このような香気成分組成の違いが生じる原因としては、それぞれの化合物の生成速度や、清酒中での化合物の安定性の違いなどが考えられる。ソトロン、フルフラール、アルデヒド類といったカルボニル化合物の生成にはメイラード反応が関与していると考えられるため(42,43)、比較的長い時間が必要と思われる。また、コハク酸や乳酸などの有機酸の化学的なエステル化反応にも長い時間が必要と考えられ、これらのエチルエステルを用いると老香清酒と長期熟成酒が判別可能であった (Table 10)。

ポリスルフィドの清酒中における生成機構は明らかではないが、一つの生成機構としては、メチオニンのストレッカー分解で生じるメチオナールを前駆物質とする経路が考えられる。ビールにおいては、麦汁由来のメチオナールが DMDS 生成に寄与していることが報告されている(34)。一方、佐藤らが行った清酒の分画試験によると、DMDS には複数の前駆物質が存在するようである(6)。ポリスルフィドは他の熟成香成分と挙動が異なっていたことから、上記のメイラード反応以外の要因が存在する可能性も考えられる。

市販酒でみられる老香には DMDS の寄与が大きいと考えられ、その生成を制御することが老香の抑制につながると考えられる。第3章では、清酒における DMDS の生成機構について検討する。

5. 要約

一般の市販酒において生じる老香に関与する香気成分を明らかにするため、全国市販酒類調査試料より老香を指摘された清酒を選抜して香気成分分析および官能評価を行い、官能評価に寄与する成分および香気成分組成の特徴(老香のない清酒や長期熟成酒との違い)について検討した。

老香に寄与する成分としては、老香清酒の65%に閾値以上のDMDSが含まれていたこと、また、DMDS濃度の対数と老香強度との間に相関がみられたことから、DMDSが官能的に老香に大きく寄与していることが示唆された。一方、ソトロンは老香清酒ではほとんどが閾値以下の濃度であり、官能評価への寄与は小さいと考えられた。

成分的な特徴としては、アルデヒド類、エチルエステル類、ポリスルフィド(DMDS, DMDS), フルフラール、ソトロンといった貯蔵によって増加する香気成分は、老香なし清酒<老香清酒<長期熟成酒の順に多くなった。主成分分析の結果、老香清酒はポリスルフィドが相対的に多く、

長期熟成酒で貯蔵期間が特に長いものは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多い傾向がみられ，両者の香気成分組成の違いが示唆された。

第3章 DMTS 前駆物質の探索および同定

1. 緒言

清酒を数ヶ月から 2 年程度貯蔵すると、「老香」と呼ばれる貯蔵劣化臭を生じる場合がある。第2章では、この「老香」に寄与する主要成分の一つが DMTS であることを示した。DMTS は硫黄様、タマネギ様のにおいを呈する物質で、加熱調理したタマネギ(45)、ブロッコリ(46)、牛乳(47)、チーズ(48)、ウイスキー(49)、ビール(33)、ワイン(50)といった食品や飲料から広く見出されている。

DMTS の生成経路および前駆物質に関していくつかの報告がある。前駆物質の一つとして、ネギ属やアブラナ属の植物に含まれる S-メチルシステインスルフォキサイドが報告されている(51,52)。システインスルフォキサイドリアーゼの作用もしくは加熱処理によりこの物質が分解すると、DMTS を生じる(51,53)。植物中の DMTS 前駆物質として、ほかに、ブロッコリなどのアブラナ属植物に含まれるスルフォラファン (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanate) が報告されている(54)。この物質も、熱または酵素によって分解し、DMDS および DMTS を含む様々な含硫化合物を生じる(55,56)。

カマンベールやチェダーチーズの「熟成した」香りにも DMTS が寄与している。これらのチーズでは、メチオニンがバクテリアにより分解されてメタンチオールを生じ、これが酸化されて DMTS を生じる。さまざまな種類のバクテリアがメチオニンからメタンチオールを生成することが報告されている(48)。

ウイスキーの蒸留工程においては、ウオッシュ中のメチオナールがメタンチオールを経て DMDS および DMTS に変化する(57)。ビールの貯蔵中にもメチオナールから DMTS を生じることが報告されている(29,34)。メチオナールの由来はメチオニンのストレッカー分解と考えられている。麦汁煮沸のような加熱工程がメチオニンのストレッカー分解を促進すると考えられる。ビールでは、ホップ由来の S-メチルシステインスルフォキサイドも前駆物質の一つであると報告されている(32)。

佐藤らは、清酒の貯蔵における DMDS の生成について検討している(6)。清酒を酸性、塩基性、および中性画分に分画し、DMDS の生成に対する寄与を調べたところ、どのフラクションからも DMDS が生成した。しかし、メチオニンとシステイン以外の前駆物質は同定されなかった。また、清酒における DMTS の生成機構については研究が行われていない。老香の生成を制御するためには、においに寄与する DMTS の生成機構の解明が必要である。

本章では、清酒を分画して DMTS 生成に対する寄与を調べ、さらに DMTS 前駆物質の同定を行った。

2. 材料および方法

(1) 試薬

[*methyl-d*₃]-メチオニンおよびアセトニトリル-*d*₃は、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. より、Dowex 50WX4 (200-400 メッシュ) はムロマテテクノス株式会社より購入した。その他の試薬については和光純薬株式会社の特級、HPLC 溶媒については HPLC grade のものを使用した。試薬の調製および HPLC 溶媒には Mili-Q 水 (Millipore 社) を用いた。

(2) 清酒

市販清酒は清酒メーカーから直接購入した。純米酒 3 種類 (J1, J2, J3), 本醸造酒 2 種類 (H1, H2) の合計 5 種類の清酒を用いた。アルコール濃度は 15.5–18.0%, 製造年は 2004–2007 年だった。

(3) [*methyl-d*₃]-メチオニンを清酒に添加した強制劣化試験

清酒 H1 のメチオニン濃度を測定し、同濃度メチオニンまたは [*methyl-d*₃]-メチオニンを H1 に添加した。これらの試料を 9 mL ずつ 10-mL 容のガラスバイアルに入れ、PTFE/シリコンセプタムでシールした。このバイアルを 70°C で 1 週間インキュベーションし、強制劣化試験を行った。GC-MS 分析は第 1 章 2. (4) – ii と同様の方法で行った。ただし、インジェクションはスプリットレスモードで行い、[*methyl-d*₃]-DMTS および [*dimethyl-d*₆]-DMTS の分析は SIM モードで *m/z* 129 および 132 のイオンをモニターした。

(4) 陽イオン交換樹脂による分画および DMTS 生成ポテンシャルの測定

清酒成分の分画は、佐藤らの方法(6)を一部変更して行った。100 mL の清酒を超純水で 1 : 1 に希釈し、ガラスカラムに充填した陽イオン交換樹脂 (Dowex 50WX4, H⁺形, 200–400 メッシュ, 60 mL) に通液した。カラム体積の 3 倍の超純水で洗浄後、溶出液を合わせて N 画分 (陽イオン交換樹脂非吸着画分) とした。次に、カラム体積の 10 倍の 0.5 M アンモニア水を通液し、溶出液を A 画分 (陽イオン交換樹脂吸着画分) とした。それぞれの画分を減圧濃縮後凍結乾燥し、20 mL の超純水に溶解した。このうち 1.8 mL を 10-mL 容のガラスバイアルに入れ、清酒と同濃度となるようエタノールを添加し、超純水で 9 mL にメスアップした。清酒と同じ pH (4.2–4.4) に調整後、

(3) と同様に強制劣化試験を行った。第 1 章 2. (4) – ii と同様の方法で DMTS の分析を行

った。ただしインジェクションはスプリットレスモードで行った。定量下限値および検出下限値はそれぞれ 0.04 および 0.01 $\mu\text{g/L}$ だった。清酒 1 mL もしくはそれに相当する量の画分の強制劣化試験によって生成する DMTS 量 (ng) を DMTS 生成ポテンシャルと定義した。

(5) 清酒から DMTS 前駆物質の精製

Figure 11 に示すスキームで、清酒 J3 から DMTS 前駆物質を精製した。逆相クロマトグラフィーには、5 mL のサンプルループを装着した Gilson 社製 model 305 を用い、イオン排除および順相クロマトグラフィーには、50 μL のサンプルループと UV-VIS 検出器を備えた LC-10ADvp (島津製作所製) 用いた。Frac-920 (Amersham Biosciences 製) を用いてフラクションを回収した。

清酒 1 L を、500 mL の Dowex 50WX4 を充填したガラスカラム (50 x 500 mm) に通液し、N 画分を得た。これを濃縮、凍結乾燥後、120 mL の超純水に溶解し、逆相カラム (TSKgel ODS-80Ts, 21.5 x 300 mm, 東ソー製) で分画した。クロマトグラフィーは以下の条件で行った。

試料 4 mL を注入し、流速 4 mL/分で超純水を 75 分間流した後、62.5 分間でメタノール濃度を直線的に 50%まで増加させ、75 分間保持した。溶出液は 10 mL ずつ回収した。この操作を 29 回繰り返した。フラクションの一部 (2.7 mL) をコハク酸緩衝液に添加し、(6) に述べる方法で DMTS 生成ポテンシャルを測定した。DMTS を生成したフラクション (DMTS 生成フラクション) を集めて濃縮、凍結乾燥し、12 mL の 20 mM ギ酸溶液 (pH 2.8) に溶解した。超純水のかわりに 20 mM ギ酸溶液を移動相として、再度逆相クロマトグラフィーを行った。DMTS 生成フラクションを濃縮、凍結乾燥し、3 mL の超純水に溶解した。50 μL をイオン排除カラム (IC-Pak Ion-Exclusion, 7.8 x 300 mm, Waters 製) に注入し、溶離液として 20 mM ギ酸を 0.6 mL/分で流した。溶出液は 0.3 mL ずつ回収した。この操作を 55 回繰り返した。DMTS 生成フラクションを集めて濃縮、凍結乾燥し、

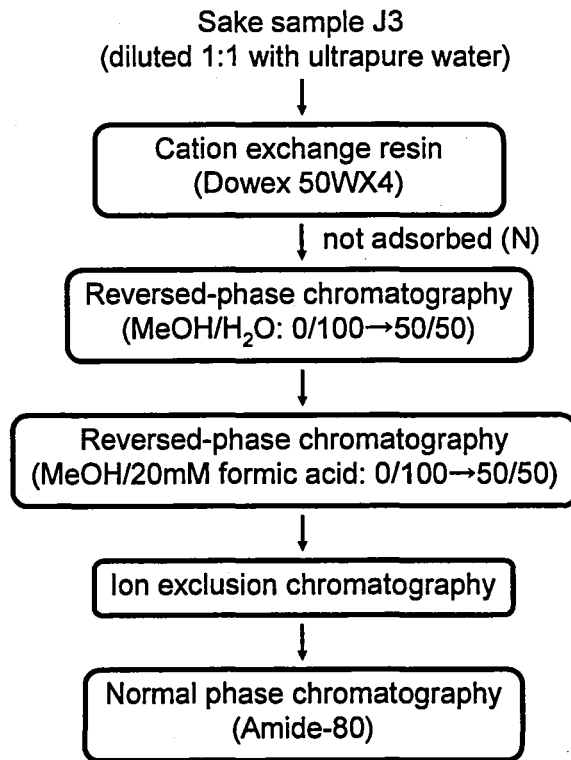


Figure 11. Scheme of the purification of DMTS precursor compound (DMTS-P1) from sake.

1.5 mL の 80% のアセトニトリル水溶液に溶解した後、Amide-80 カラム (4.6 x 250 mm, 東ソー製) に供した。80% のアセトニトリル水溶液を溶離液として 0.5 mL/分で流した。この操作を 29 回繰り返して、精製された DMTS 前駆物質 (DMTS-P1) を得た。

(6) クロマトグラフィーフラクションの DMTS 生成ポテンシャルの測定

クロマトグラフィーフラクション、エタノール 1.6 mL、緩衝液 (100 mM コハク酸緩衝液, pH 4.0) 0.9 mL を 10-mL 容のガラスバイアルに入れ、超純水を加えて 9 mL とした。フラクションに有機溶媒が含まれる場合は、減圧濃縮および凍結乾燥により除去し、残渣を超純水に溶解した。フラクションの添加量は、強制劣化試験の総体積 (9 mL) を濃縮率 (前駆物質が 1 つのフラクションに回収率 100% で溶出すると仮定して計算) で除した量とした。強制劣化試験を行い、DMTS 生成ポテンシャルを求めた。

(7) 高分解能 LC-MS 分析

質量分析装置 JMS-T100LP (日本電子製) に Agilent-1200 HPLC システム (Agilent 製) を連結させた装置を用いた。精製した DMTS-P1 を JK-C18 カラム (2.0 x 150 mm, Imtakt 製) に供し、超純水を移動相として 0.2 mL/分で流した。溶出液を ESI(+)-TOF マススペクトロメトリーに導入した。正確に質量を分析するため、内部標準としてギ酸ナトリウムを添加した。

(8) 核磁気共鳴分光法 (NMR)

NMR スペクトルは日本電子製 ECP-500 スペクトロメーターにより測定した。NMR 操作および解析にはソフトウェア Delta を用いた。¹H NMR は 500.16 MHz, ¹³C NMR は 125.77 MHz で行った。測定は CD₃CN/D₂O (80:20) 溶液中で、5°C で行った。化学シフトは、CD₃CN の δ_H 1.93 および δ_C 1.28 を内部標準とした。¹H および ¹³C NMR, ¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC いずれも標準パルスシーケンスにより測定した。

1,2-Dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-one. ¹H NMR: δ 2.57 (s, 3H, H-6), 2.89 (m, 1H, H-5 α), 3.00 (m, 2H, H-4), 3.05 (m, 1H, H-5 β), 3.70 (dd, 1H, $J = 3.0, 12.0$ Hz, H-1 α), 3.79 (dd, 1H, $J = 3.0, 12.0$ Hz, H-1 β), 4.21 (t, 1H, $J = 3.5$ Hz, H-2). ¹³C NMR: δ 31.5 (C-4, CH₂), 37.2 (C-6, CH₃), 46.2 (C-5, CH₂), 63.2 (C-1, CH₂), 77.8 (C-2, CH), 210.4 (C-3, C=O). COSY data: H-1 \rightarrow H-2; H-2 \rightarrow H1; H-4 \rightarrow H5; H-5 \rightarrow H-4. HMQC data: H-1 \rightarrow C-1; H-2 \rightarrow C-2; H-4 \rightarrow C-4; H-5 \rightarrow C-5; H-6 \rightarrow C-6. HMBC data: H-1 \rightarrow C-3; H-2 \rightarrow C-3; H-4 \rightarrow C-3, 5; H-5 \rightarrow C-3, 4, 6; H-6 \rightarrow C-5

(9) その他の化学分析

メチオニン濃度は JLC-500 アミノ酸分析計（日本電子製）で測定した。メチオナル濃度は第 1 章 2. (4) - ii に示した方法で測定した。有機酸濃度は島津製作所製有機酸分析装置で測定した。グルコース濃度はアークレイ社製グルコースオートアンドスタットで測定した。

3. 結果および考察

(1) [methyl-d₃]-メチオニンを添加した強制劣化試験

まず、メチオナルの前駆物質であるメチオニンが DMTS の生成に及ぼす影響について検討した。メチオニンのストレッカー分解により DMTS が生じるなら、[methyl-d₃]-メチオニンを清酒に添加すれば、[methyl-d₃]-DMTS および[dimethyl-d₆]-DMTS が生じるはずであると考えた (Figure 12C)。そこで、清酒 H1 に天然のメチオニンと同濃度(66 μM)の[methyl-d₃]-メチオニンを添加した。コントロールとして無標識のメチオニンを同量添加した。強制劣化試験前の試料には DMTS は検出されなかった。強制劣化後、[methyl-d₃]-メチオニンを添加した試料から、[methyl-d₃]-DMTS に相当する m/z 129 の小さなピークが、無標識の DMTS (m/z 126) の少し前に検出された (Figure 12A)。コントロールからは[methyl-d₃]-DMTS のピークは検出されなかった (Figure 12B)。これらの結果から、メチオニンのメチル基が DMTS に導入されることが示された。しかし、[methyl-d₃]-DMTS のピーク面積は無標識の DMTS のわずか 6%であり、また、[dimethyl-d₆]-DMTS に相当する m/z 132 のピークは検出されなかった。メチオニンのストレッカー分解だけで DMTS が生じると仮定すれば、無標識の DMTS と[methyl-d₃]-DMTS および[dimethyl-d₆]-DMTS の量比は 1 : 2 : 1 となるはずである。以上の結果から、清酒貯蔵中の DMTS 生成に対するメチオニンのストレッカー分解の寄与は小さく、他の前駆物質や生成機構の存在が推察された。清酒 H1 から少量のメチオナル (10 μg/L) が検出されたが、メチオナルから DMTS への変換率は 0.1%と報告されていることから(34)、生成した DMTS 量 (0.2 μg/L) の約 10%しか説明できない。

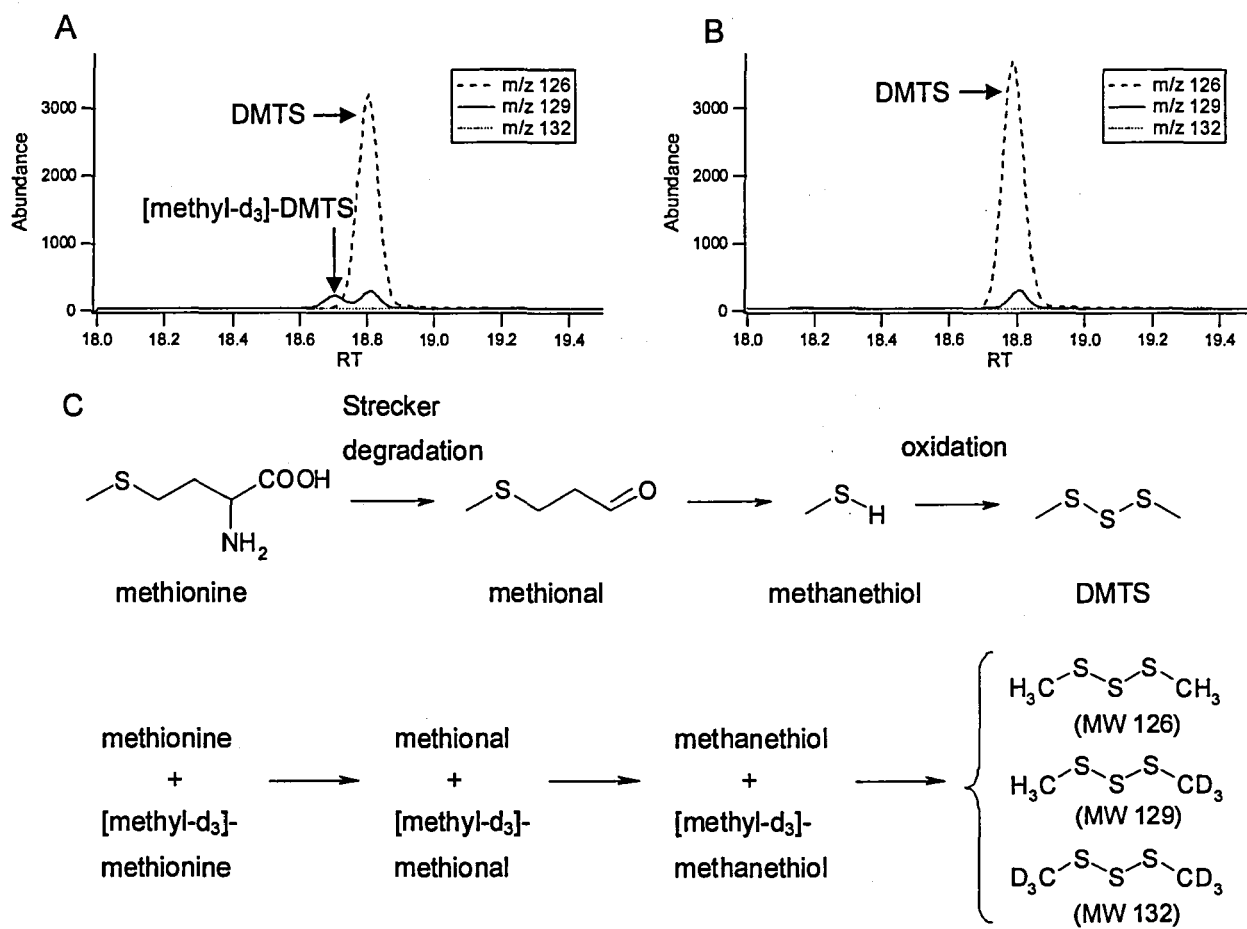


Figure 12. GC-MS chromatograms of sake samples spiked with [methyl- d_3]-methionine (A) and control (B) after accelerated aging, and the pathway of DMTS formation from methionine via Strecker degradation (C).

(2) 陽イオン交換樹脂による分画

DMTS 前駆物質を探索するため、3 種類の清酒 (J1, J2, H2) を陽イオン交換樹脂で分画し、DMTS 生成ポテンシャルを測定した。Table 11 に未処理の清酒と分画画分の DMTS 生成ポテンシャルを示した。いずれの清酒についても、陽イオン交換樹脂に吸着しなかった画分 (N 画分) は吸着画分 (A 画分) よりも DMTS 生成ポテンシャルが高かった。A 画分にはアミンやアミノ酸といった塩基性成分が含まれ、N 画分には酸性および中性成分が含まれる。これらの結果から、DMTS 前駆物質は主に酸性/中性画分に存在することが示唆された。意外なことに、N 画分の DMTS 生成ポテンシャルは未処理 (分画前) の清酒よりも高

Table 11. DMTS-producing potential before and after fractionation by cation exchange resin

| fraction | DMTS producing potential (ng DMTS/ml sake) | | |
|----------------------|---|-----|------|
| | J1 | J2 | H2 |
| before fractionation | 14 | 10 | 0.2 |
| adsorbed (A) | 0.1 | 1.1 | n.d. |
| not adsorbed (N) | 112 | 22 | 22 |
| A + N | 26 | 8.8 | 3.2 |

n.d., not detected.

かった。N画分にA画分を添加すると(A+N), DMTS生成ポテンシャルが減少したことから、A画分にはN画分からのDMTS生成を抑制する成分が含まれると考えられた。

(3) 清酒からのDMTS前駆物質の精製

DMTS前駆物質を他の成分と分離するため、逆相シリカゲル(ODS)を用いたクロマトグラフィーによりN画分をさらに分画した。Figure 13に示すとおり、DMTS生成ポテンシャルを有する主要ピークが2つ見出された。これらは、N画分の主要成分である有機酸(クエン酸、リンゴ酸、乳酸、コハク酸)およびグルコースとは分離されていた。1番目のピークのDMTS前駆物質(DMTS-P1)は水のみで溶出し、2番目のピーク(DMTS-P2)はメタノールのリニアグラジエントで溶出したことから、DMTS-P1はDMTS-P2よりも極性が高いと考えられた。

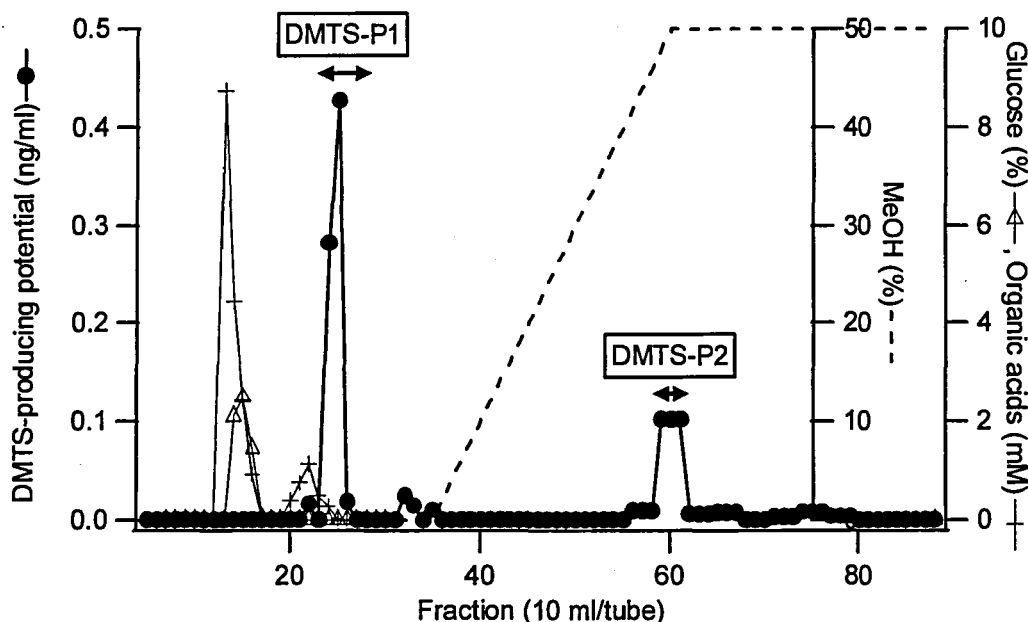


Figure 13. Reversed-phase chromatogram with MeOH/H₂O as eluent. DMTS-producing potential of the fractions 5–40 was measured by directly adding the fractions to the buffer solution. For the fractions 41–89, every three fractions were combined, lyophilized, and dissolved in 10 mL of ultrapure water. The potential was measured in the same way as fractions 5–40 and represented by dividing the measured value by three.

また、DMTS-P1 および DMTS-P2 と N 画分 (1/16 希釈したもの) との間には相乗効果がみられた。Figure 14 に示すとおり、DMTS-P1 または DMTS-P2 に N 画分を添加すると、単独の場合に比べて、それぞれ 10 倍程度 DMTS 生成量が増加した。この結果は、DMTS-P1 および DMTS-P2 が DMTS の生成に関与していることを示唆している。

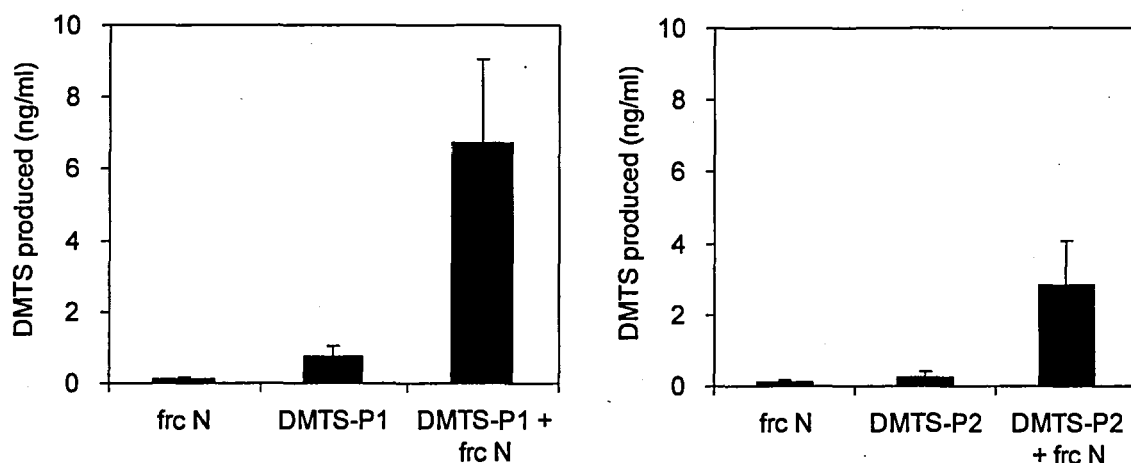


Figure 14. Combination effect of DMTS-P1 or DMTS-P2 with diluted fraction N. DMTS-P1 or DMTS-P2 was incubated with and without fraction N (1/16 dilution) in 10 mM succinate buffer (pH 4, containing 18% EtOH), and the amount of generated DMTS was measured. Bars indicate SE (n =3).

DMTS-P1の方がポテンシャルが高かったため、さらにクロマトグラフィーにより精製した。20 mM ギ酸 (pH 2.8) を移動相とした逆相カラムでも、水を移動相とした場合と同じリテンションタイムで DMTS-P1 は溶出した。pH の異なる溶離液を用いたクロマトグラフィーでも同じ挙動を示したことから、DMTS-P1 は酸性成分ではなく中性成分であると考えられた。さらに、イオン排除カラムおよび順相カラム (Amide-80) を用いて DMTS-P1 を精製した。Figure 15 に示すとおり、Amide-80 カラムを用いた HPLC で、DMTS-P1 は画分 7 の単一ピークとして分離された。

Table 12. Summary of the purification of DMTS-P1 from sake.

| chromatography step | DMTS-producing potential (ng/ml) |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| sake | 4.3 |
| cation exchange | 182 |
| reversed-phase | 2.4 |
| reversed-phase (20mM formic acid) | 0.82 |
| ion exclusion | 0.04 |
| amide-80 | 0.04 |

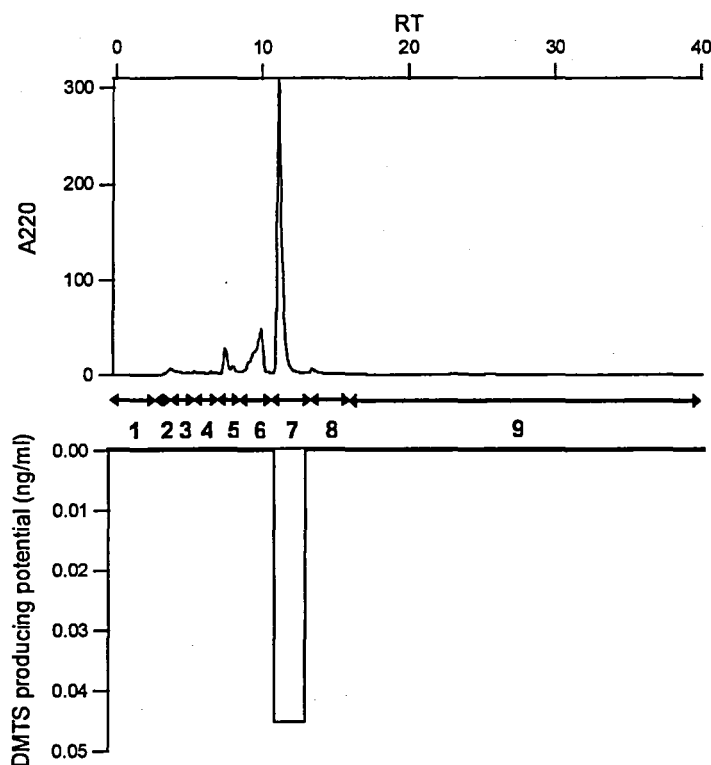


Figure 15. Separation by the Amide-80 column. The effluent was collected in nine fractions, as indicated by the arrows.

DMTS-P1 の精製を Table 12 にまとめた。DMTS 生成ポテンシャルは精製ステップにおいて徐々に減少したが、濃縮や凍結乾燥の前後ではポテンシャルの変化がみられなかった（データは示していない）ことから、カラムでの精製により他の前駆物質または触媒成分が除去された可能性が考えられた。

(4) DMTS-P1 の構造決定

MS および NMR によって得られたデータをもとに、DMTS-P1 の構造決定を行った。Figure 16 に示すとおり、ポジティブモードの高分解能 ESI-MS により、DMTS-P1 の分子式は $C_6H_{12}O_4S$ と推定された (m/z 181.0534, $[M+H]^+$, Δ -0.1 mmu)。 m/z 361.0988 のピークは二量体 $[2M+H]^+$ であり、 m/z 117.0566 のピークは組成式 $C_5H_9O_3$ (calcd. 117.0552) と推定され、メチルスルフォキサイド部分が脱離した構造 $[M-S(O)Me]^+$ と考えられた。

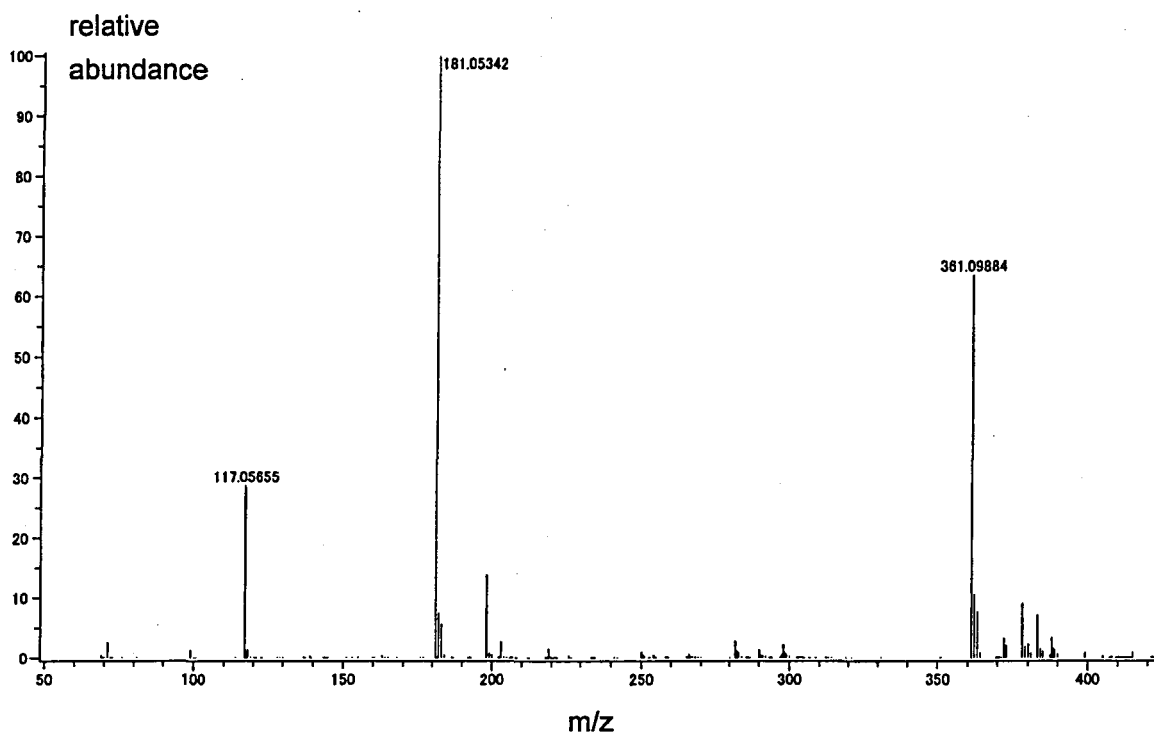


Figure 16. High-resolution mass spectra of DMTS-P1.

DMTS-P1 の 1H および ^{13}C NMR, 1H - 1H COSY, HMQC スペクトル解析を行ったところ、すべての ^{13}C および 1H シグナルを帰属することができた。 ^{13}C NMR および DEPT スペクトルから、DMTS-P1 の 6 つの炭素は、カルボニル炭素、2 つのメチレン炭素、酸素が結合した 2 つの sp^3 炭素、およびメチル基であることが明らかとなった。高分解能 ESI-MS 分析の結果より、DMTS-P1

にメチルスルフォキサイド部分が含まれることが示唆されたため、 δ_H 2.57 のシングレットシグナルはメチルスルフォキサイド部分 C-6 のメチルプロトンと帰属した。 ^1H - ^1H COSY スペクトルでは、 δ_H 3.70, δ_H 3.79 (H-1 $_\alpha$ および H-1 $_\beta$)、および δ_H 4.21 (H-2) の間に相関ピークがみられた。したがって、2つの水酸基がそれぞれ C-1 (δ_C 63.2) および C-2 (δ_C 77.8) に結合していると考えられた。

HMBCにおいて、カルボニル炭素 (C-3) と H-1, H-2, H-4 および H-5 プロトンとの間に相関がみられ、メチレン炭素 (C-5) と H-6 のメチルプロトンとの間に相関がみられたことから、C-2 および C-4 炭素はカルボニル炭素 (C-3) に結合しており、メチルスルフォキサイド部分は C-5 に結合していることが示唆された (Figure 17)。

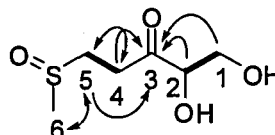


Figure 17. Key HMBC (indicated by arrows from ^1H to ^{13}C), and ^1H - ^1H COSY (indicated by bold lines) for 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one.

以上の結果から、DMTS-P1 の構造は、1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルスルフィニル)ペンタン-3-オンと決定した。我々の知る限りにおいて、本化合物はこれまでに文献等には報告されていない。

(5) DMTS-P1 から DMTS の生成

高分解能 ESI-MS 分析において検出された m/z 117.0566 のイオンは、メチルスルフォキサイド部分が脱離した構造に相当する。したがって、メチルスルフォキサイド部分は DMTS-P1 から容易に脱離し、DMTS の生成に寄与すると考えられる。Ostermyer らは、S-メチルシステインスルフォキサイドの加水分解により不安定なメタンスルフェン酸を生じると報告しており (58), Chin らは、メタンスルフェン酸から生じるメタンチオールの酸化によって DMDS が生じると報告している (53)。メタンチオールの酸化によって、DMDS とともに DMTS も生じる (48)。S-メチルシステインスルフォキサイドの場合と同様に、DMTS-P1 についても、メチルスルフォキサイド部分から β -脱離によりメタンスルフェン酸を生じると考えられ、Figure 18 にまとめた経路により DMTS が生成すると推定される。

なお、DMTS-P1 と N 画分との間には相乗効果がみられた (Figure 14)。DMTS-P1 の分解によって生じると考えられるメタンスルフェン酸は反応性が高いため、N 画分中の他の含硫化合物と反応して DMTS を生じる可能性がある。

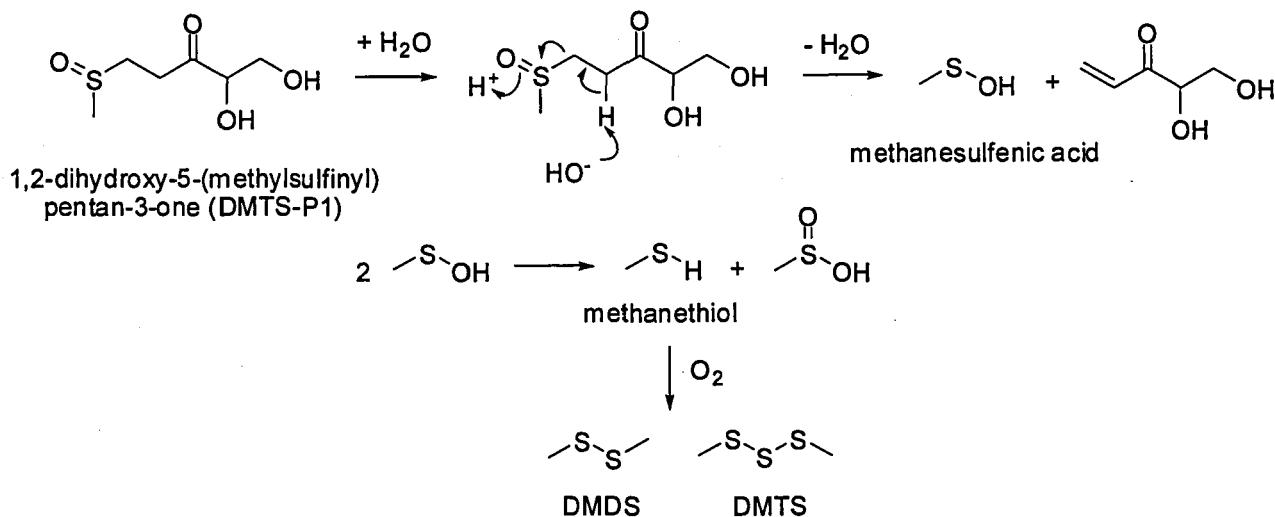


Figure 18. Estimated mechanism of the formation of DMDS and DMTS from DMTS-P1.

(6) DMTS 前駆物質の由来の推定

DMTS-P1 は新規化合物であるため、清酒製造工程においてどのように生成するのかは不明である。一つの可能性として、メチルチオアデノシン (MTA) からメチオニンを再生するメチオニン再生経路が考えられる。この経路はバクテリア(59,60), 酵母(61), 植物(62), および動物(63)に幅広くみられる。この経路では(60), まず MTA の加水分解によりメチルチオリボース (MTR) を生じ, MTR-1-リン酸 (MTR-1P) に変換される。続いて MTR-1-P は, イソメラーゼ, デヒドラターゼ, エノラーゼ, ホスファターゼによる一連の酵素反応により 1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルチオ)-1-ペンテン-3-オンを生じる (Figure 19)。この不安定な化合物は, 好氣的条件において自発的に分解して 2-ケト-4-メチルチオ酪酸または 3-メチルチオプロピオン酸を生じるか (64), もしくはジオキシゲナーゼにより酵素的に 2-ケト-4-メチルチオ酪酸に変換される (63)。最終的に, このケト酸がアミノ基転移反応によりメチオニンになる。

Saccharomyces cerevisiae のゲノムからも, この経路をコードする遺伝子が同定されている(65-67)。

1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルチオ)-1-ペンテン-3-オンと DMTS-P1 の化学構造を比較すると, 前者のスルフィド基が後者ではスルフォキサイドに酸化され, 前者のエンジオールが後者ではジオールとなっている点異なるが, 両者は類似している (Figure 19

および Figure 17)。したがって DMTS-P1 がメチオニン再生経路と関連している可能性が推察される。しかし, この仮説を確認するためにはさらに研究が必要である。

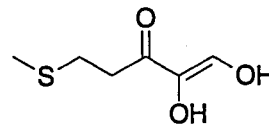


Figure 19. Structure of 1,2-dihydroxy-5-(methylthio)-1-penten-3-one, an intermediate compound of the methionine salvage pathway.

本研究では、ほかの前駆物質として DMTS-P2 も見出された。DMTS-P2 の精製は現在行っており、DMTS-P1 に比べて Amide-80 カラムに対する親和性が低いことが観察されている（データは示していない。）このことは、DMTS-P1 よりも疎水的な性質であること（Figure 13）と矛盾しない。しかし、メチオニン再生経路の代謝中間体は、水酸基やリン酸基を有する親水性の化合物なので、DMTS-P2 はこの経路には含まれないと思われる。DMTS-P2 の由来を解明するには、構造解析等の情報が必要である。

さらなる研究が必要であるが、DMTS-P1 および DMTS-P2 の発見は、清酒製造工程中の生成機構の解明を通じて、清酒の老香の制御の可能性を提示するものと思われる。

4. 要旨

ジメチルトリスルフィド (DMTS) は「老香」よばれる清酒の劣化臭に寄与するが、清酒貯蔵中の生成機構は明らかとなっていない。本報では、清酒中の DMTS 前駆物質について検討した。*[methyl-d₃]*-メチオニンを用いた実験から、DMTS 生成に対するメチオニンのストレッカー分解の寄与は小さいことが示された。陽イオン交換樹脂により清酒成分を分画したところ、DMTS 前駆物質は塩基性画分よりも酸性／中性画分に存在することが明らかとなった。DMTS 生成ポテンシャルを指標として、各種クロマトグラフィーにより DMTS 前駆物質を精製した。高分解能 ESI-MS および 1D/2D NMR により、前駆物質のひとつは 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。

総括

清酒の貯蔵による香りの変化は一般的に劣化ととらえられ、「老香」とよばれる。一方で、長期間貯蔵した清酒に特有のカaramel様の香りやなめらかな味を楽しむ消費者もあり、意図的に長期間貯蔵した清酒が「熟成酒」として市場に出回っている。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ができれば、清酒の劣化防止や、品質の良い熟成酒の製造が可能になると考えられる。

清酒の貯蔵により増加する香气成分として、これまでにさまざまな化合物が報告されていた。しかし、濃度や閾値が不明であるなど、香りへの寄与が明らかでない成分も多かった。本研究では、GC-O, GC-MS を用いた定量分析により、清酒の熟成に関与する香气成分について検討した。その結果、既に報告されていたソトロン、フルフラール、DMDS等のほか、DMTS、アルデヒド類、エステル類等のさまざまな香气成分を見出した。このうち、ソトロン、3-メチルブタナール、DMTS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示唆された。

一方、全国市販酒類調査試料を用いて、「老香」を指摘された市販清酒（老香清酒）の香气成分を調べた結果、一般的な貯蔵・流通期間（数ヶ月～2年程度）で市販清酒に生じる「老香」には、DMTSが大きく寄与することが明らかとなった。また、老香清酒と長期熟成酒（貯蔵期間5年～30年）の香气成分組成の比較から、DMDSやDMTSといったポリスルフィドは老香清酒を特徴付ける成分であり、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エチルは、長期間貯蔵した清酒を特徴付ける成分であることが明らかとなった。

清酒の貯蔵により増加する香气成分（熟成香成分）とその生成機構を Figure 20 にまとめた。ソトロン、フルフラール、アルデヒド類といったカルボニル化合物は、アミノ酸と糖との反応であるメイラード反応により主に生成すると考えられる。コハク酸ジエチル、2-メチル酪酸エチル、3-メチル酪酸エチル等のエチルエステル類も貯蔵により増加する。清酒中に高濃度（15～20%）含まれるエタノールと、有機酸や脂肪酸とのエステル化反応により生成すると考えられる。

DMDS, DMTS といったポリスルフィドについては、ビール、ウイスキー、野菜類において前駆物質が報告されていたが、それらの前駆物質の清酒中の含有量は微量もしくは検出されず、清酒中の生成機構は解明されていなかった。そこで、清酒中より DMTS 前駆物質を探索した。その結果、二つの主要前駆物質が見いだされ、そのうちのひとつ（DMTS-P1）は、新規化合物 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。DMTS-P1 の由来については現

在のところ不明であるが、メチオニン再生経路の代謝中間体と構造が類似していることから、この代謝経路が関与する可能性が考えられる。

最近金井らは、清酒もろみにマグネシウムイオンを添加すると、酵母によるメチオニンの取込みが促進されるとともに、貯蔵による DMTS の生成が抑制されることを見出している(68)。また、奥田らは、清酒中の含硫アミノ酸の総量と貯蔵により生じるポリスルフィドとの間に相関がみられること、また、メイラード反応に由来する清酒の色とポリスルフィドの生成には、それぞれ別の要因が関与すること示している(69)。これらの報告と本研究の結果をあわせて、ポリスルフィドの生成には含硫アミノ酸の代謝関連成分が関与すると推察される。

清酒の熟成の制御という観点から、たとえば、アミノ酸や糖濃度を高めるような方法で清酒を製造すれば、貯蔵中にメイラード反応が促進され、ソトロンなどのカルボニル化合物の多い熟成酒をつくるのが可能と考えられる。一方、ポリスルフィドはアミノ酸から直接に生成するわけではないので、たとえば DMTS-P1 の生成を抑制するような製造条件や酵母を見出せば、他の成分とは別に、ポリスルフィドのみを制御することが可能になると考えられる。今後、さらに DMTS の生成機構についての解明が進み、老香の制御や予測といった技術につながることを期待したい。

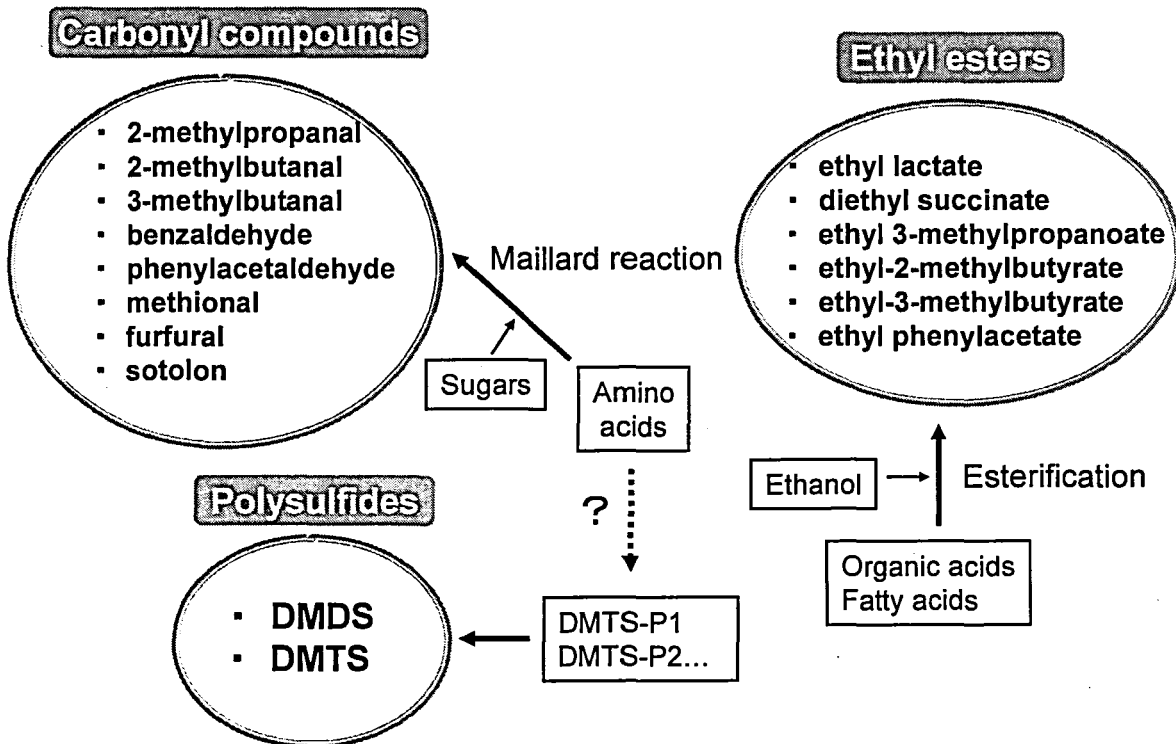


Figure 20. Aroma compounds increased during aging and the mechanism of their formation.

参考文献

- (1) <http://www.vintagesake.gr.jp/kosyutoha-1.htm>
- (2) Takahashi, K.; Tadenuma, M.; Sato, S. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone, a burnt flavoring compound from aged sake. *Agric. Biol. Chem.* **1976**, *40*, 325-330.
- (3) 佐藤信; 蓼沼誠; 高橋康次郎; 根立恵夫 清酒の熟成による香味の変化に関する研究(第1報) 不揮発酸の変化, 醸協, **1974**, *69*, 595-598.
- (4) 佐藤信; 蓼沼誠; 高橋康次郎; 根立恵夫 清酒の熟成による香味の変化に関する研究(第2報) 揮発酸の変化, 醸協, **1974**, *69*, 838-840.
- (5) 佐藤信; 蓼沼誠; 高橋康次郎; 小池勝徳 清酒の熟成による香味の変化に関する研究(第9報) ガスクロマトグラフィーによる清酒中のカルボニル化合物の定量, 醸協, **1976**, *71*, 799-802.
- (6) 佐藤信; 蓼沼誠; 高橋康次郎; 小池勝徳 清酒の熟成による香味の変化に関する研究(第5報) 貯蔵による揮発性含硫化合物の変化, 醸協, **1975**, *70*, 588-591.
- (7) 大場俊輝; 高橋康次郎; 飯田修二; 北本勝ひこ; 佐藤信; 難波康之祐 清酒の熟成による香味の変化に関する研究(第20報) 清酒中の中高沸点硫黄化合物の検索, 醸協, **1981**, *76*, 487-490.
- (8) <http://www.gerstel.co.jp/Product/Twister/Twister.html>
- (9) Bicchi, C.; Iori, C.; Rubiolo, P.; Sandra, P. Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 449-459.
- (10) Demyttenaere, J. C.; Martinez, J. I.; Verhe, R.; Sandra, P.; De Kimpe, N. Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *985*, 221-232.
- (11) Hayasaka, Y.; MacNamara, K.; Baldock, G. A.; Taylor, R. L.; Pollnitz, A. P. Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 948-955.
- (12) Ochiai, N.; Sasamoto, K.; Takino, M.; Yamashita, S.; Daishima, S.; Heiden, A.; Hoffman, A. Determination of trace amounts of off-flavor compounds in drinking water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. *Analyst* **2001**, *126*, 1652-1657.
- (13) Marsili, R. (editor) in FLAVOR, FRAGRANCE, and ODOR ANALYSIS, Marcel Dekker, Inc., New York · Basel, **2002**; pp297-331.

- (14) GERSTEL TWISTER 取り扱い説明 Ver. A. 00. 00. Agilent Technologies, 2000.
- (15) Blank, I.; Lin, J.; Fumeaux, R. Formation of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone (sotolon) from 4-hydroxy-L-isoleucine and 3-amino-4,5-dimethyl-3,4-dihydro-2(5H)-furanone. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 1851-1856.
- (16) Halang, W. A.; Langlais, R.; Kugler, E. Cubic spline interpolation for the calculation of retention indices temperature-programmed gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1978, 13, 1829-1832.
- (17) Cutzch, I.; Chatonnet, P.; Dubourdieu, D. Role of sotolon in the aroma of sweet fortified wines. Influence of concentration and ageing conditions. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 1998, 32, 223-233.
- (18) Marsili, R. (editor) in FLAVOR, FRAGRANCE, and ODOR ANALYSIS, Marcel Dekker, Inc., New York · Basel, 2002; pp 92-94.
- (19) 岩野君夫; 来間健次; 衣山陽三; 中村伝市; 河地元彦 清酒の貯蔵出荷管理に関する研究 (第1報) 貯蔵中に増加する 3-デオキシグルコソンの測定方法, 醸協, 1970, 65, 59-62.
- (20) 大塚謙一 多様化清酒の成分について (第1報), 醸協, 1980, 75, 221-224.
- (21) Hofmann, T.; Schieberle, P. Evaluation of the key odorants in a thermally treated solution of ribose and cysteine by aroma extract dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2187-2194.
- (22) Nishimura, A.; Kondo, K.; Nakazawa, E.; Mishima, H.; Takemura, S. Identification and measurement of "Mureka" in sake. *Hakko Kogaku Kaishi* 1989, 67, 237-244.
- (23) Motoyoshi, T.; Nishimura, A.; Kondo, K.; Nakazawa, E.; Mishima, H.; Takemura, S. Changes of "Mureka" compounds in sake and the presumed pathway forming these compounds. *Hakko Kogaku Kaishi* 1991, 69, 1-6.
- (24) Nishimura, A.; Takeuchi, M.; Kubodera, T.; Motoyoshi, T.; Kondo, K. Characterization of a Mureka-forming enzyme and conditions of its production by molds used for making koji. *Seibutsu Kogaku Kaishi*, 1996, 74, 91-96.
- (25) Vanderhaegen, B.; Neven, H.; Coghe, S.; Verstrepen, K. J.; Verachtert, H.; Derdelinckx, G. Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *J. Agric. Food. Chem.* 2003, 51, 6782-6790.
- (26) Escudero, A.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. *J. Agric. Food. Chem.* 2000, 48, 4268-4272.

- (27) Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg, T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 5919-5924.
- (28) Silva Ferreira, A. C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Identification of key odorants related to the typical aroma of oxidation spoiled white wines. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 1377-1381.
- (29) Gijis, L.; Chevance, F.; Jerkovic, V.; Collin, S. How low pH can intensify β -damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. *J. Agric. Food. Chem.* **2002**, *50*, 5612-5616.
- (30) Williams, A. A.; Rosser, P. R. Aroma enhancing effect of ethanol. *Chem. Senses* **1981**, *6*, 149-153.
- (31) Duchamp-Viret, P.; Duchamp, A.; Chaput, M. A. Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odour mixture. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *18*, 2690-2696.
- (32) Peppard, T. L. Dimethyltrisulphide, its mechanism of formation in hop oil and effect on beer flavour. *J. Inst. Brew.* **1978**, *84*, 337-340.
- (33) Williams, R. S.; Gracey, E. F. Beyond Dimethyl Sulfide: The significance to flavor of thioesters and polysulfides in canadian beers. *ASBC Journal* **1982**, *40*, 68-71.
- (34) Gijis, L.; Perpete, P.; Timmermans, A.; Collin, S. 3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers. *J. Agric. Food. Chem.* **2000**, *48*, 6196-6199.
- (35) Gijis, L.; Collin, S. Effect of the reducing power of a beer on dimethyltrisulfide production during aging. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **2002**, *60*, 68-70.
- (36) 宇都宮仁; 磯谷敦子; 岩田博 清酒に添加したにおい物質の閾値 (第 1 報), 醸協, **2004**, *99*, 652-658.
- (37) 宇都宮仁; 磯谷敦子; 岩田博 清酒に添加したにおい物質の閾値 (第 2 報), 醸協, **2004**, *99*, 729-734.
- (38) Meilgaard, M. Flavor chemistry of beer: Part ii: flavour and threshold of 239 aroma volatiles. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* **1975**, *12*, 151-168.
- (39) Moll, M. in *Beer & Cooler*, English ed., Intercept Ltd.: Andover, **1994**; pp 298.
- (40) 高橋康次郎 清酒の古酒の香り, 醸協, **1980**, *75*, 463-468.
- (41) 宇都宮仁; 磯谷敦子; 岩田博 清酒のにおい標準の検討, 平成 16 年度日本醸造学会大会講演要旨集, **2004**, p12.

- (42) Camara, J. S.; Marques, J. C.; Alives, M. A.; Silva Ferreira, A. C. 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone levels in fortified Madeira wines: relationship to sugar content. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 6765-6769.
- (43) 木村進; 中村敏郎; 加藤博通 食品の変色の化学, 光琳, **1995**; pp 304-314.
- (44) 日本醸造協会編 醸造物の成分, 日本醸造協会, **1999**; pp 224.
- (45) Tokimoto, Y. Volatile components of cooked onions. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **1995**, *42*, 279-287.
- (46) Maruyama, F. T. Identification of dimethyl trisulfide as a major aroma component of cooked brassicaceous vegetables. *J. Food Sci.* **1970**, *35*, 540-543.
- (47) Vazquez-Landaverde, P. A.; Torres, J. A.; Qian, M. C. Quantification of trace volatile sulfur compounds in milk by solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 2919-2927.
- (48) Curioni, P. M. G.; Bosset, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy Journal* **2002**, *12*, 959-984.
- (49) Lee, K.-Y. M.; Paterson, A.; Piggott, J. R. Origins of flavour in whiskies and a revised flavour wheel: a review. *J. Inst. Brew.* **2001**, *107*, 287-313.
- (50) Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3022-3026.
- (51) Marks, H. S.; Hilson, J. A.; Leichtweis, H. C.; Stoewsand, G. S. S-Methylcysteine sulfoxide in *Brassica* vegetables and formation of methyl methanethiosulfinate from *Brassica* sprouts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2098-2101.
- (52) Kubec, R.; Drhova, V.; Velisek, J. Thermal degradation of S-methylcysteine and its sulfoxide—important flavor precursors of *Brassica* and *Allium* vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4334-4340.
- (53) Chin, H.-W.; Lindsay, R. C. Mechanism of formation of volatile sulfur compounds following the action of cysteine sulfoxide lyases. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1529-1536.
- (54) Nakagawa, K.; Umeda, T.; Higuchi, O.; Tsuzuki, T.; Suzuki, T.; Miyazawa, T. Evaporative light-scattering analysis of sulforaphane in broccoli sample: quality of broccoli products regarding

- sulforaphane contents. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 2479-2483.
- (55) 西脇俊和 酵母発酵による沢庵臭の低減法, 醸協, **2007**, *102*, 432-440.
- (56) Jin, Y.; Wang, M.; Rosen, R. T.; Ho, C. T. Thermal degradation of sulforaphane in aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3121-3123.
- (57) Prentice, R. D.; McKernan, G.; Bryce, J. H. A source of dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide in grain spirit produced with a coffee still. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **1998**, *56*, 99-103.
- (58) Ostemayer, F.; Tarbell, D. S. Products of acid hydrolysis of *S*-methylcysteine sulfoxide; the isolation of methyl methanethiosulfonate, and mechanism of the hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 3752-3755.
- (59) Sekowska, A.; Denervaud, V.; Ashida, H.; Michoud, K.; Haas, D.; Yokota, A.; Danchin, A. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiol.* **2004**, *4*:9.
- (60) Ashida, H.; Saito, Y.; Kojima, C.; Kobayashi, K.; Ogasawara, N.; Yokota, A. A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* **2003**, *302*, 286-290.
- (61) Marchitto, K. S.; Ferro, A. J. The metabolism of 5'-methylthioadenosine and 5-methylthioribose-1-phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **1985**, *131*, 2153-2164.
- (62) Kushad, M. M.; Richardson, D. G.; Ferro, A. J. Intermediates in the recycling of 5-methylthioribose to methionine in fruits. *Plant Physiol.* **1983**, *73*, 257-261.
- (63) Wray, J. W.; Abeles, R. H. The methionine salvage pathway in *Klebsiella pneumoniae* and rat liver: identification and characterization of two novel dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3147-3153.
- (64) Myers, R. W.; Wray, J. W.; Fish, S.; Abeles, R. H. Purification and characterization of an enzyme involved in oxidative carbon-carbon bond cleavage reactions in the methionine salvage pathway of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24785-24791.
- (65) Subhi, A. L.; Diegelman, P.; Porter, C. W.; Tang, B.; Lu, Z. J.; Markham, G. D.; Kruger, W. D. Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49868-49873.
- (66) Bumann, M.; Djafarzadeh, S.; Oberholzew, A. E.; Bigler, P.; Altmann, M.; Trachsel, H.; Baumann, U. Crystal structure of yeast Ypr118w, a methylthioribose-1-phosphate isomerase related to regulatory

eIF2B subunits. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 37087-37094.

(67) Pirkov, I.; Norbeck, J.; Gustafsson, L.; Albers, E. A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS Journal* **2008**, *275*, 4111-4120.

(68) 金井宗良; 瀬尾佳子; 村上ゆみ; 磯谷敦子; 岩田博; 向井伸彦; 藤井力; 家藤治幸 清酒のミネラル添加仕込みによる劣化臭 (DMTS) の抑制効果, 平成 20 年度日本醸造学会講演要旨集, **2008**, p10.

(69) 奥田将生; 磯谷敦子; 上用みどり; 後藤奈美; 三上重明 清酒の硫黄化合物含量と貯蔵によるポリスルフィド生成の関係, 醸協, **2009**, *104*, 131-141.

公表論文

第1章

Isogai, A.; Utsunomiya, H.; Kanda, R.; Iwata, H. Changes in the Aroma Compounds of Sake during Aging. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4118-4123.

磯谷敦子; 宇都宮仁; 岩田博 清酒の熟成によるソトロンおよびフルフラールの変化, 醸協, **2004**, *99*, 374-380.

第2章

磯谷敦子; 宇都宮仁; 神田涼子; 岩田博; 中野成美 市販酒の老香に関与する香気成分, 醸協, **2006**, *101*, 125-131.

第3章

Isogai, A.; Kanda, R.; Hiraga, Y.; Nishimura, T.; Iwata, H.; Goto-Yamamoto, N. Screening and Identification of Precursor Compounds of Dimethyltrisulfide (DMTS) in Japanese Sake. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *54*, 2479-2483.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました、国立大学法人広島大学大学院生物圏科学研究科 後藤奈美客員教授に謹んで感謝の意を表します。また、有益なご助言とご指導をいただきました、同研究科 家藤治幸客員教授、ならびに堀貫治教授、日本獣医生命科学大学 西村敏英教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、多大なるご指導とご配慮をいただきました、独立行政法人酒類総合研究所 情報技術支援部門 宇都宮仁副部門長、関東信越国税局鑑定官室 岩田博室長、生物系特定産業技術支援センター 中野成美氏に心より感謝いたします。

また、NMR 分析をご指導いただきました、広島大学大学院理学研究科 平賀良知博士、質量分析にご協力いただきました、日本電子株式会社の皆様、全国市販酒類調査試料の提供にご協力いただきました、名古屋国税局鑑定官室 遠山亮主任鑑定官、沖縄国税事務所 高江州朝清鑑定官に深く感謝いたします。

さらに、独立行政法人酒類総合研究所において惜しみないご協力と有益なご助言をいただきました、藤田晃子主任研究員、遠藤路子非常勤職員に感謝の意を表します。最後に、本研究の遂行にあたり、終始多大なるご協力をいただきました、神田涼子非常勤職員に心より感謝いたします。