

清酒の熟成に関与する香気成分およびその生成機構について (2)

DMTS前駆物質の探索および同定

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	磯谷, 敦子
発行元	日本醸造協会
巻/号	104巻12号
巻号補足	
掲載ページ	p. 919-925
発行年月	2009年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



清酒の熟成に關与する香気成分および その生成機構について (2) —DMTS 前駆物質の探索および同定¹⁾

磯 谷 敦 子

老香の主要成分の一つは DMTS であることが明らかとなった。したがって、その生成を制御することが老香の制御にもつながると考えられる。そこで、清酒における DMTS の生成機構について検討した。

1. $[\text{methyl}-d_3]$ -メチオニンを添加した 強制劣化試験

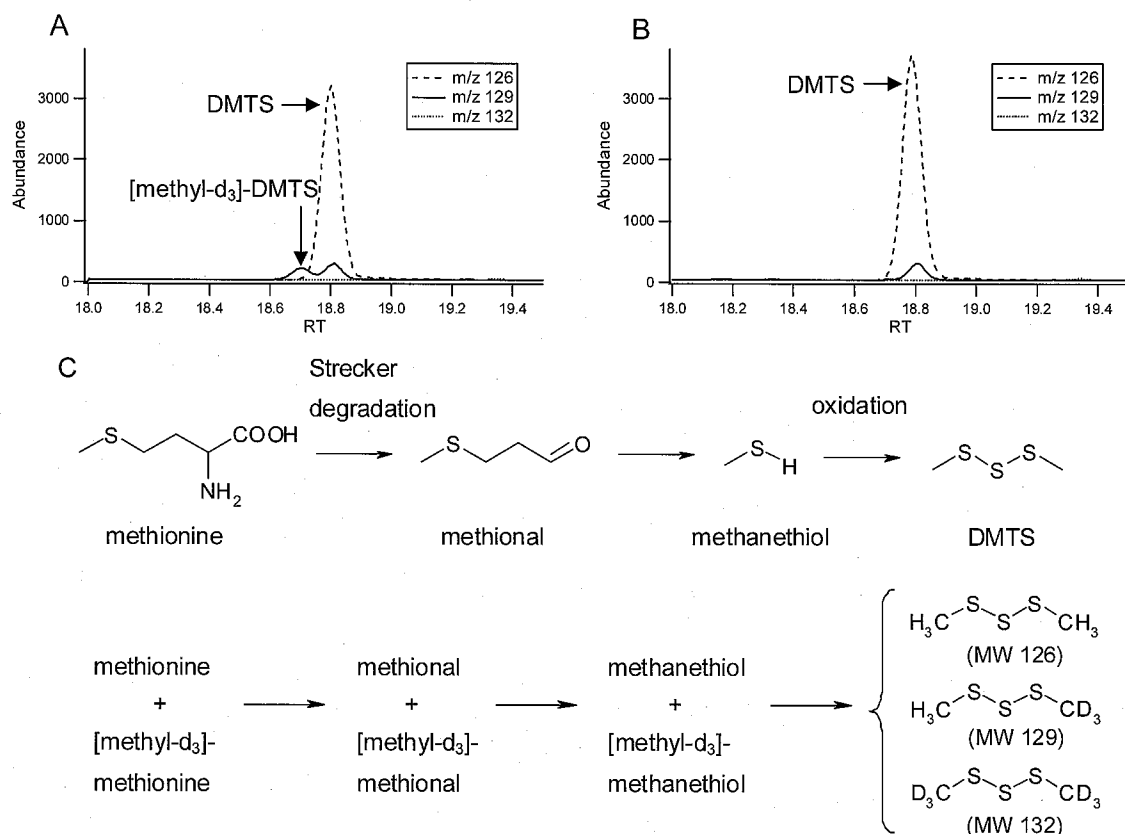
DMTS は清酒以外にも、加熱調理したタマネギ²⁾、ブロッコリ³⁾、チーズ⁴⁾、ウイスキー⁵⁾、ビール⁶⁾、ワイン⁷⁾等の食品や飲料から広く見出されている。主な生成機構としては、植物に含まれる S-メチルシステインスルフォキシドが加熱または酵素的に分解して生じる経路⁸⁻¹⁰⁾、もしくはメチオニンのストレッカー分解で生じるメチオナールを前駆物質とする経路¹¹⁻¹²⁾が報告されている。これらのうち、清酒中に比較的多く含まれるメチオニンの寄与について、まず検討した。

メチオニンのストレッカー分解により DMTS が生じるなら、 $[\text{methyl}-d_3]$ -メチオニンを清酒に添加すれば、 $[\text{methyl}-d_3]$ -DMTS および $[\text{dimethyl}-d_6]$ -DMTS が生じるはずである (第 1 図 C)。そこで、市販清酒にメチオニンと同濃度 (66 μM) の $[\text{methyl}-d_3]$ -メチオニンを添加し、70°C で 1 週間貯蔵試験 (強制劣化試験) を行った。強制劣化後、 $[\text{methyl}-d_3]$ -メチオニンを添加した試料から、 $[\text{methyl}-d_3]$ -DMTS に相当する m/z 129 のピークが、無標識の DMTS (m/z 126) の少し前に検出された (第 1 図

A)。コントロール (無標識のメチオニンを添加したもの) からは $[\text{methyl}-d_3]$ -DMTS のピークは検出されなかった (第 1 図 B)。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、 $[\text{methyl}-d_3]$ -DMTS のピーク面積は無標識の DMTS の 6% であり、また、 $[\text{dimethyl}-d_6]$ -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のみにより DMTS が生じると仮定すれば、無標識の DMTS と $[\text{methyl}-d_3]$ -DMTS および $[\text{dimethyl}-d_6]$ -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。

2. 清酒からの DMTS 前駆物質の 探索および精製

清酒中より DMTS 前駆物質を探索するため、清酒成分を各種カラムにより分画した。得られたフラクションをコハク酸緩衝液 (10 mM, pH 4, 18% エタノールを含む) に添加して強制劣化試験を行い、生成した DMTS 量 (DMTS 生成ポテンシャル) を DMTS 前駆物質の指標とした。まず、3 種類の清酒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 (第 1 表)。いずれの清酒についても、酸性/中性画分 (陽イオン交換樹脂に吸着しない画分) は、塩基性画分 (陽イオン交換樹脂に吸着し、0.5 N ア



第1図 [methyl- d_3]-methionine 添加試料(A)およびコントロール(B)の強制劣化試験後の GC-MS クロマトグラム, およびメチオニンのストレッカー分解による DMTS 生成経路(C)

第1表 陽イオン交換樹脂分画画分の DMTS 生成ポテンシャル

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

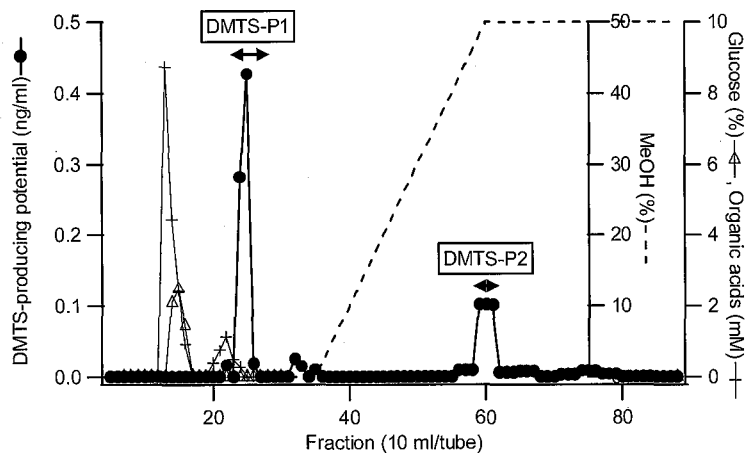
ンモニア水で溶出される画分)よりも DMTS 生成ポテンシャルが高かった。したがって, DMTS 前駆物質は主に酸性/中性画分に存在することが示唆された。なお, 酸性/中性画分画分の DMTS 生成ポテンシャルは分画前の清酒よりも高かったが, 酸性/中性画分に塩基性画分を添加すると DMTS 生成ポテンシャルが減少したことから, 塩基性画分には DMTS 生成を

抑制する成分が含まれると考えられた。

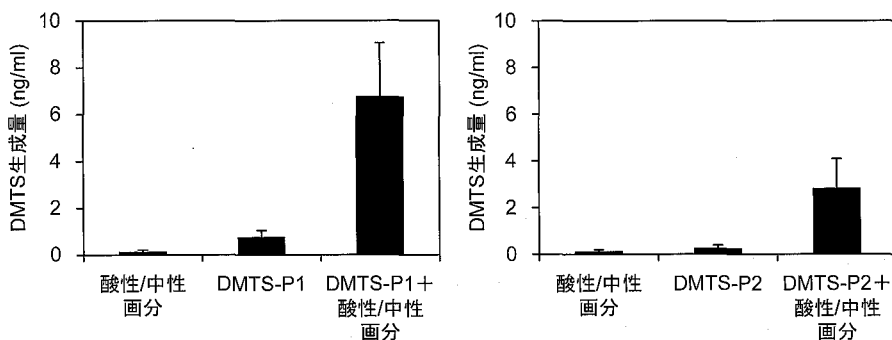
ポテンシャルの高かった酸性/中性画分を, さらに逆相クロマトグラフィーにより分画した。その結果, 第2図に示すとおり, DMTS 生成ポテンシャルを有する主要ピークが2つ見出された。1番目のピークの DMTS 前駆物質 (DMTS-P 1) は水のみで溶出し, 2番目のピーク (DMTS-P 2) はメタノールのリニアグラジエントで溶出したことから, DMTS-P 1 は DMTS-P 2 よりも極性が高いと考えられた。

また, DMTS-P 1 および DMTS-P 2 と酸性/中性画分 (1/16 希釈したもの) との間には相乗効果がみられた。第3図に示すとおり, DMTS-P 1 または DMTS-P 2 に酸性/中性画分を添加すると, 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。

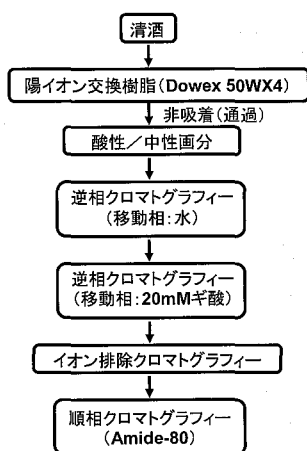
ポテンシャルが高かった DMTS-P 1 について, さらに, 第4図に示すスキームで精製を行った。最終的



第2図 酸性/中性画分の逆相クロマトグラフィー



第3図 DMTS-P1またはDMTS-P2への酸性/中性画分の添加効果 (n=3)。



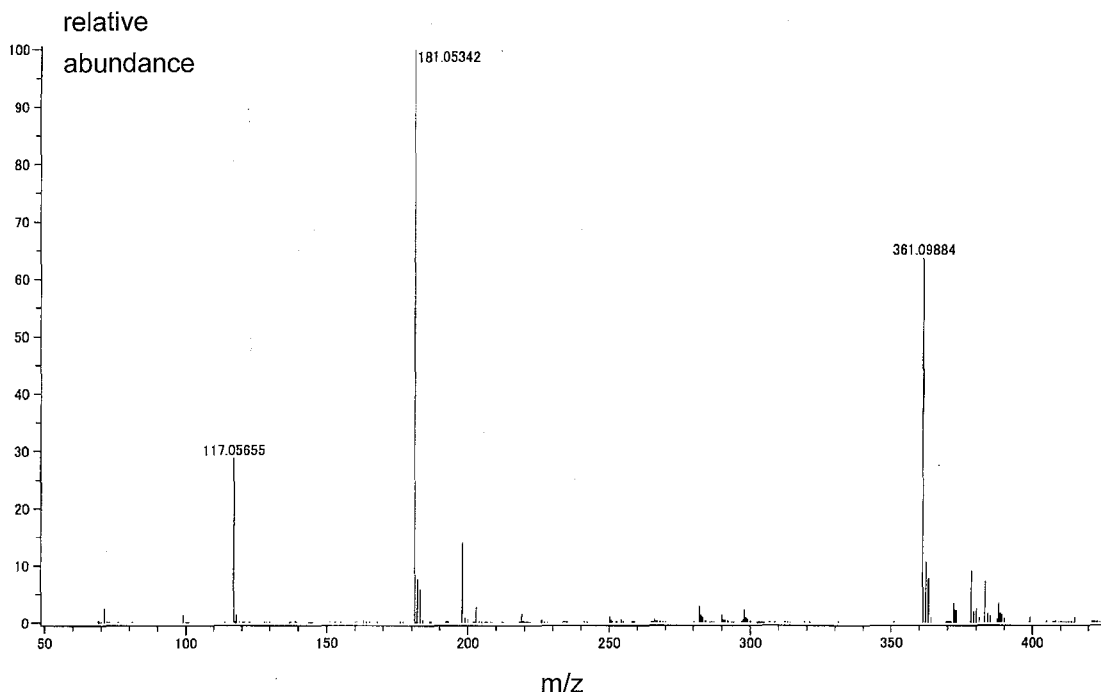
第4図 DMTS前駆物質精製のスキーム

に、DMTS-P1はAmide-80カラムにより単一ピークとして分離された。

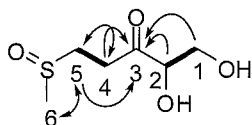
3. DMTS-P1の構造決定

得られた精製標品を用いて精密質量分析およびNMR分析を行い、DMTS-P1の構造決定を行った。第5図に示すとおり、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。

また、NMR分析においては、 ^{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示された。 1H - 1H COSYスペクトルでは、 δ_H 3.70, δ_H



第5図 DMTS-P1の高分解能ESI-(+)-マスペクトル



第6図 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl)pentan-3-oneの構造およびHMBC相関 (¹H から¹³Cへの矢印), ¹H-¹H COSY相関 (太線)

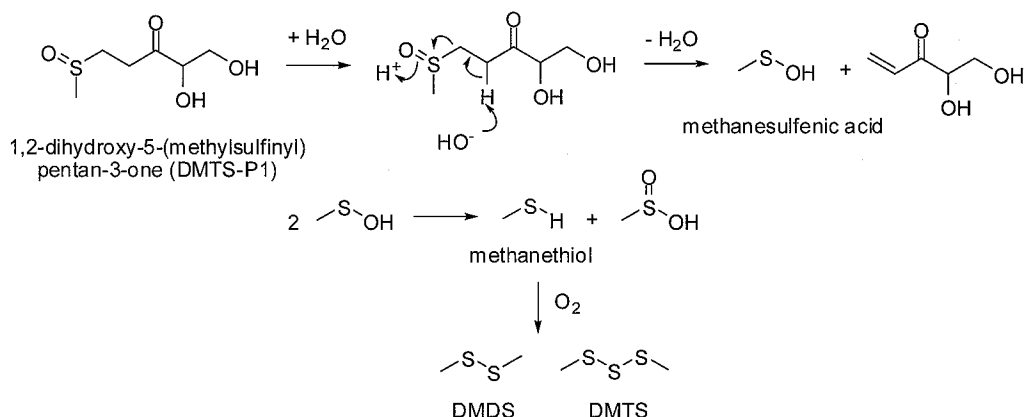
3.79 (H-1_a, H-1_β), および δ_{H} 4.21 (H-2) の間に相関ピークがみられ, 2つの水酸基がそれぞれ C-1 (δ_{C} 63.2) および C-2 (δ_{C} 77.8) に結合していると推定された。HMBC では, カルボニル炭素 (C-3) と H-1, H-2, H-4 および H-5 プロトンとの間に相関がみられ, メチレン炭素 (C-5) と H-6 のメチルプロトンとの間に相関がみられたことから, C-2 および C-4 炭素はカルボニル炭素 (C-3) に結合しており, メチルスルフォキサイド部分は C-5 に結合していることが示唆された (第6図)。

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。本化合物はこれまでに文献等には報告されていない。

4. 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。DMTS-P1 と同様にメチルスルフォキサイド構造を有する S-メチルシステインスルフォキサイドは, 加水分解により不安定なメタンスルフェン酸を生じ¹³⁾, メタンスルフェン酸から生じるメタンチオール¹⁰⁾の酸化によって DMDS が生じると報告されている¹⁰⁾。メタンチオールの酸化によって, DMDS とともに DMTS も生じる⁴⁾。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, 第7図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 以外にも, DMTS の生成に関与する成分として, 前駆物質である DMTS-P2 (第2図), 酸性/中性画分中に含まれ DMTS-P1 や



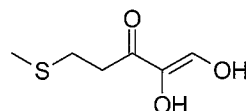
第7図 DMTS-P1 から DMDS および DMTS の推定生成経路。

DMTS-P2 からの DMTS 生成を促進する成分 (第3図), 塩基性画分に含まれ DMTS 生成を抑制する成分 (第1表) の存在が示唆された。清酒中での DMTS の生成機構はかなり複雑であると思われるが, DMTS-P1 の発見を端緒として解明が進むことを期待している。

5. 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, 酵母, 植物, および動物に幅広く見出されている¹⁴⁾。この経路では, 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 (第8図)。この不安定な化合物は, 自発的な分解もしくはジオキシゲナーゼにより 2-ケト-4-メチルチオ酪酸に変換される。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¹⁴⁾。

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,



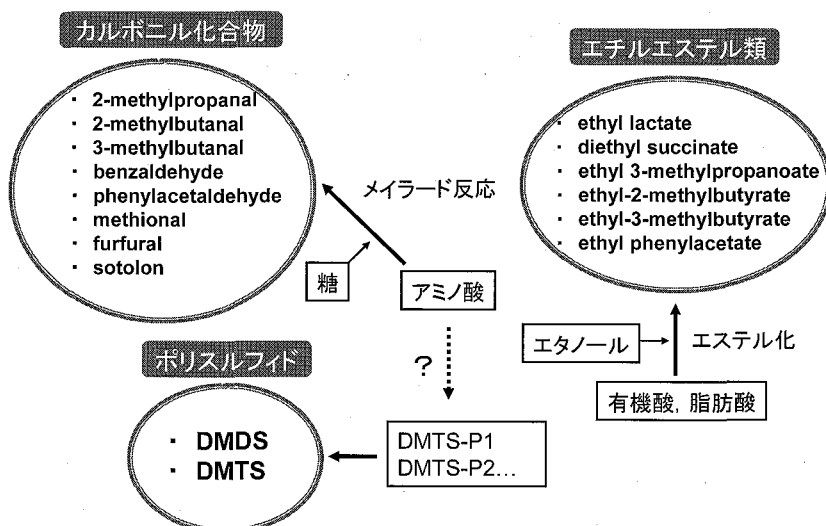
第8図 メチオニン再生経路の代謝中間体化合物である 1,2-dihydroxy-5-(methylthio)-1-penten-3-one の構造。

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 (第8図および第6図)。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。

6. おわりに

本研究では, 近年開発された分析手法を用いて清酒の熟成に関与する香気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気成分を見出した。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, 全国市販酒類調査において老香を指摘された清酒について官能評価と香気成分分析を行った結果, 一般的な貯蔵・流通期間 (数ヶ月~2年程度) に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の香気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,



第9図 清酒の熟成香成分およびその生成機構
(この他にグルコースの分解による酢酸の生成がある。)

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気成分（熟成香成分）とその生成機構を第9図にまとめた。ソトロン、フルフラール、アルデヒド類等の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、エチルエステル類は清酒中に高濃度に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。ポリスルフィドについては、清酒中の生成機構は明らかになっていなかったが、本研究により二つの主要前駆物質が見いだされ、そのうちの一つ（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の由来は現在のところ不明であるが、一つの可能性としてメチオニン再生経路の関与が考えられる。

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¹⁵⁾。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を報告している¹⁶⁾。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こと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。

<独立行政法人酒類総合研究所>

参考文献

- 1) 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.* **57**, 189-195 (2009)
- 2) Tokimoto, Y.: Volatile components of cooked onions. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku*

- Kaishi* **42**, 279-287 (1995)
- 3) Maruyama, F. T. : Identification of dimethyl trisulfide as a major aroma component of cooked brassicaceous vegetables. *J. Food Sci.* **35**, 540-543 (1970)
 - 4) Curioni, P. M. G., Bosset, J. O. : Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy Journal* **12**, 959-984 (2002)
 - 5) Lee, K.-Y. M., Paterson, A., Piggott, J. R. : Origins of flavour in whiskies and a revised flavour wheel : a review. *J. Inst. Brew.* **107**, 287-313 (2001)
 - 6) Williams, R. S., Gracey, E. F. : Beyond Dimethyl Sulfide : The significance to flavor of thioesters and polysulfides in canadian beers. *ASBC Journal* **40**, 68-71 (1982)
 - 7) Guth, H. : Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3022-3026 (1997)
 - 8) 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.* **40**, 2098-2101 (1992)
 - 9) 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.* **46**, 4334-4340 (1998)
 - 10) Chin, H.-W., Lindsay, R. C. : Mechanism of formation of volatile sulfur compounds following the action of cysteine sulfoxide lyases. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1529-1536 (1994)
 - 11) Prentice, R. D., McKernan, G., Bryce, J. H. : A source of dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide in grain spirit produced with a coffey still. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **56**, 99-103 (1998)
 - 12) Gijis, L., Perpete, P., Timmermans, A., Collin, S. : 3-Methylthiopropionaldehyde as precursor of dimethyl trisulfide in aged beers. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6196-6199 (2000)
 - 13) 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.* **82**, 3752-3755 (1960)
 - 14) Pirkov, I., Norbeck, J., Gustafsson, L., Albers, E. : A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS Journal* **275**, 4111-4120 (2008)
 - 15) 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)
 - 16) 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, **104**, 131-141 (2009)