

# 清酒のジメチルトリスルフィド生成に影響する製造要因の解析

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	佐々木, 慧 西堀, 奈穂子 吉田, 聡子 金井, 宗良 磯谷, 敦子 山田, 修 後藤, 奈美 藤井, 力
発行元	日本醸造協会
巻/号	117巻2号
掲載ページ	p. 101-110
発行年月	2022年2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



## 清酒のジメチルトリスルフィド生成に影響する製造要因の解析

佐々木慧<sup>1,2,3,\*</sup>・西堀奈穂子<sup>1</sup>・吉田聡子<sup>1</sup>・金井宗良<sup>1</sup>・磯谷敦子<sup>1</sup>・山田 修<sup>1</sup>・後藤奈美<sup>1</sup>・  
藤井 力<sup>1,2,4,\*</sup>

(<sup>1</sup>独立行政法人酒類総合研究所, <sup>2</sup>広島大学生物圏科学研究科, <sup>3</sup>広島国際学院大学工学部, <sup>4</sup>福島大学食農学類)

令和3年3月1日受理

Analysis of *sake* making procedures accelerating dimethyl trisulfide formation during *sake* storage

Kei SASAKI<sup>1,2,3,\*</sup>, Nahoko NISHIBORI<sup>1</sup>, Satoko YOSHIDA<sup>1</sup>, Muneyoshi KANAI<sup>1</sup>, Atsuko ISOGAI<sup>1</sup>, Osamu YAMADA<sup>1</sup>,  
Nami GOTO-YAMAMOTO<sup>1</sup>, Tsutomu FUJII<sup>1,2,4,\*</sup>

(<sup>1</sup>National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashihiroshima 739-0046, <sup>2</sup>Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, 1-4-4 Kagamiyama, Higashihiroshima 739-8528, <sup>3</sup>Faculty of Engineering, Hiroshima Kokusai Gakuin University, 6-20-1 Nakano, Aki-ku, Hiroshima 739-0321, <sup>4</sup>Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University, 1 Kanayagawa, Fukushima, 960-1296).

Dimethyl trisulfide (DMTS) is responsible for *hineka*, an off-flavor in *sake* that develops during storage. We analyzed *sake* samples which were donated by *sake* companies, and extracted and demonstrated 4 *sake* making factors which could possibly affect DMTS concentration in *sake* after 7 days of storage at 70 °C (DMTS-pp): differences in yeast strains, differences in *shubo* (yeast seed mash called *kimoto* or *soku-jomoto*) making methods with or without of the addition of alcohol to *moromi*, and differences in *moromi* pressing methods. Small scale fermentation tests and comparisons of *sake* commercially made with similar conditions except for *shubo* revealed that the differences in yeast strains and the differences in *shubo* making scarcely affect DMTS-pp. On the other hand, we found that the addition of alcohol to *moromi* decreased DMTS-pp, probably due to a dilution effect, and that DMTS-pp decreased more than the dilution ratio. Also, the pressing process of *sake* mash was found to affect DMTS-pp. *Seme* (later fraction of *sake* obtained under high pressure) has a higher DMTS-pp compared with *arabashiri* (free run fraction) and *nakadare* (middle fraction). In *seme*, absorbance at 260 nm was higher than that of *arabashiri* and *nakadare*. These results suggest that yeast cell leakage may affect DMTS-pp in *seme*.

**Key words**: ジメチルトリスルフィド (dimethyl trisulfide, DMTS), 老香 (*hineka*), 清酒製造工程 (*sake* making procedures), アルコール添加 (alcohol addition), 上槽 (*moromi* pressing)

## 緒言

老香<sup>ひねか</sup>は清酒貯蔵中に生成する劣化臭で、その主要成分はジメチルトリスルフィド (DMTS) である<sup>1)</sup>。これに対し、長期熟成酒のカaramel様の香りはソトロン

が主成分であることが報告されている<sup>1)</sup>。これまで老香生成に影響を与える製造条件や清酒の成分についての統計解析が行われ、着色度や鉄や銅等の金属濃度と官能的な老香強度に正の相関がある<sup>2,3)</sup>こと、亜鉛濃度と老香強度の正の相関が高い<sup>4)</sup>こと、原料米の持ち

\*: corresponding authors 責任著者 E-mail address: j.sasak@edu.hkg.ac.jp

**Table 1** Sake samples used in this study at regions (A) and classification (B)

(A)			(B)			
Area of Japan	No. of breweries	No. of samples	Type of sake <sup>a</sup>	No. of samples	Kimoto <sup>b</sup>	Ekika jikomi <sup>c</sup>
Hokkaido	2	4	Ginjo	7		
Tohoku	5	10	Junmai	31	6	
Kanto	6	11	Junmaiginjo	13	1	
Chubu	14	25	Honjyozo	12	2	
Kinki	6	13	Futsushu	17		2
Chugoku	4	9	Total	80	9	2
Shikoku	4	6				
Kyushu	1	2				
Total	42	80				

<sup>a</sup>Classification was based on the standards for the labeling of the fermentation methods and quality of refined sake defined by the National Tax Agency, Japan.

<sup>b</sup>Number of samples fermented with kimoto seed mash, a traditional seed mash made with lactic acid bacteria (kimoto).

<sup>c</sup>Number of sake samples fermented with liquefaction mashing (ekika jikomi).

込む硫黄含量、硫黄含量と相関の高いタンパク含量・精米歩合は貯蔵後のDMTS濃度と正の相関が高い<sup>5,6)</sup> ことなどが明らかとなった。また、DMTSの前駆体として1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1) が同定された<sup>7)</sup>。一方、DMTSの生成のしやすさにはDMTS-P1の濃度に加え、同じDMTS-P1濃度でも緩衝液と清酒、また清酒ごとにDMTSの生成しやすさが異なることから、清酒中に含まれる何らかの成分が影響することが示唆されている<sup>8)</sup>。我々は、様々な方法で製造された清酒試料を用い、製造条件と分析値を説明変数、70℃で7日間保存(加速劣化処理)した後のDMTS濃度(DMTS生成ポテンシャル:DMTS-pp)<sup>7)</sup>を目的変数とした重回帰分析及びPartial Least Square Regression (PLSR)解析を行い<sup>9)</sup>、原料米の溶解や酵母の死滅によるDMTS-ppの増大が示唆される結果を得た。また、酵母の死滅の影響を解析し、酵母内容物の漏出がDMTS-ppを促進することを明らかにした<sup>10)</sup>。

本研究では、前報<sup>9)</sup>で数値化が難しく解析していなかった、酵母の種類やアルコール添加、上槽方法の違いといった定性的な製造要因とDMTS-ppとの関係を統計的に解析し、アルコール添加や水による希釈が希釈率以上に製成酒のDMTS-ppを下げる効果があること、上槽時の責め画分でDMTS-ppが高いことを実証したので報告する。

## 実験方法

### 1. 統計解析に用いた清酒試料

統計解析に用いた清酒試料には、前報<sup>9)</sup>で収集した清酒試料を用いた。ただし、数値化情報に欠損があったため前報<sup>9)</sup>で除外した試料5点を含めるとともに、前報<sup>9)</sup>同様、Smirnov-Grubbsの棄却検定によりDMTS-ppが極端に高い1点を除いた42社80点の試料(Table 1)を用いた。試料と同時に仕込み配合表と品温経過簿、掛け米と麴米の品種名と精米歩合、麴の破精具合(総破精か突破精か)、酵母の菌株名、仕込み水の硬軟(硬水か軟水か)、上槽方式などの質問票を回収した。

### 2. 製造要因の分類と実証試験に用いた製造要因の抽出

統計解析には統計解析ソフトPASW Statistics 18 (IBM社)を使用した。統計解析に十分な精度が得られる試料数と考えられる概ね10以上の集団となるように、検討した製造要因毎に試料集団を2集団にまとめ、集団のDMTS-ppの中央値を比較した。酒母製造方法の「生もと系」は試料数が9点だったが、例外的に解析にかけた。前報<sup>9)</sup>でDMTS-ppは正規分布しないことから、検定には正規分布を仮定しない独立した2集団の比較に適したMann-WhitneyのU検定(U検定)を用いた。U検定のp値が小さく、かつ集団間

でDMTS-ppの中央値の差が比較的大きい製造要因を、実証試験を行う製造要因として抽出した。なお、試料集団は次の基準に基づき分類し、いずれにも含まれない試料は比較対象から除外した。

掛け米の種類は農林水産省の「農産物規格規定」<sup>11)</sup>に基づき、2012年8月の時点で醸造用玄米に指定されている品種を「酒造好適米」、それ以外の品種を「一般米」に分類した。

水の分類は清酒製造場の回答により、「硬水」と「軟水」に分類した。「中硬度水」などの回答は試料数が少なかったため、解析から除外した。

麴の分類は清酒製造場の回答により、破精まわり具合から「総破精」（製麴中の破精まわりが全体の麴）と「突き破精」（製麴中の破精まわりが部分的な麴）に分類した。

使用酵母の系統は「きょうかい9号系」と「きょうかい9号系以外」の2集団に分けた。これは使用酵母の系統において統計解析に十分な試料数とみなせた集団は「きょうかい7号系」の21点と「きょうかい9号系」の15点の2集団のみであり、かつ「きょうかい7号系」ではDMTS-ppの中央値は2.04 µg/Lと全試料の中央値の1.94 µg/Lと大きな差は見られなかったため、中央値が1.42 µg/Lと低い「きょうかい9号系」に着目した。なお、「きょうかい9号系」には、きょうかい9号(K9)、きょうかい901号(K901)、熊本酵母、KA-1、KA-4と記載のあった試料を分類し、それ以外で菌株名が明記されている試料を「きょうかい9号系以外」に分類した。おいて、「自社酵母」の記述の試料は解析から除外した。

酵母の高泡形成の有無では酵母のうち高泡形成能のある株を「泡あり」、ない株を「泡なし」とした。菌株名、及び高泡形成の有無が明確でない試料は解析から除外した。

酒母製造法は「速醸もと」と「生もと系」の2集団に分類した。なお、「速醸もと」には速醸もとの記載のある試料を用い、生もとや山麴の記載のある試料は「生もと系」に分類した。超速醸もと、高温糖化、酵母仕込みと記載のある試料は、解析の対象から除外した。

四段の有無では液化四段、酵素四段、くみ出し四段の四段仕込みを行った試料を「四段あり」に、それ以外を「四段なし」に分類した。なお、水四段の記述は

加水として扱い、四段なしに分類した。

アルコール添加の有無のグループ分けでは、普通酒、本醸造、吟醸と記載のある試料を「アルコール添加あり」に、純米、純米吟醸と記載のある試料を「アルコール添加なし」に分類した。

上槽方法は、「連続自動圧搾機」と「槽」の2集団に分類した。「連続自動圧搾機」には、ヤブタ式、NSK搾り機、永田式圧搾機、圧搾機、連続自動圧搾機、フィルタープレス方式と記載のある試料を用い、袋搾り、佐瀬式槽、ヤエガキ式槽、槽、木槽の記載のある試料は「槽」に分類した。

### 3. 小仕込み試験

前報<sup>10)</sup>に従い、総米400g規模の小仕込み試験を行った。品温経過は前報<sup>10)</sup>と同様に留を7℃とし、1日1℃ずつ上げていき、最高品温15℃で4日間保持した後は1日1℃ずつ下げ、18日目に遠心分離(5000 rpm, 5 min, 4℃の後10000 rpm, 10 min, 4℃)で上槽した。

### 4. 酵母菌株を変えた小仕込み試験

酵母菌株を変えた小仕込み試験では株ごとに独立した4本の仕込みを行った。発酵の程度をそろえるため、仕込みごとに総炭酸ガス減量が106g前後に達した日に上槽した。品温経過はもろみ18日目までは先の記述と同様とし、18日目以降は9℃で固定した。酵母は、きょうかい6号(K6)、きょうかい601号(K601)、きょうかい7号(K7)、きょうかい701号(K701)、K9、K901、きょうかい10号(K10)、きょうかい1001号(K1001)、きょうかい11号(K11)、きょうかい14号(K14)、きょうかい1401号(K1401)を使用した。

### 5. 酒母製造方法の異なる清酒の比較

酒母の製造方法の違いによる影響の解析では、清酒製造場4社から酒母の製造方法以外の製造条件がほぼ同じ清酒試料を6組収集し、解析した。収集した6組は、きょうかい901号酵母を用いた精米歩合60%の純米吟醸酒2組(Table 2 A-1, A-2)、きょうかい9号酵母を用いた精米歩合55%の純米吟醸1組(Table 2 B-1)、普通酒1組(Table 2 C-1)、精米歩合55%の純米吟醸1組(Table 2 D-1)、精米歩合50%の吟醸1組(Table 2 D-2)である。

### 6. もろみへのアルコール添加試験

アルコール添加量を変えた試験では1つの小仕込み

**Table 2** DMTS-pp and the properties of sake samples with the different *shubo*-making types

	<i>Shubo</i> -making types	DMTS-pp (mg/L)	Alc. (%)	Sake meter value	Titratable acidity	Amino acidity	Abs 260
A-1	<i>Sokujyoumoto</i>	1.80	18.4	5.11	1.65	0.85	N. D.
	<i>Kimoto</i>	1.63	18.0	3.49	1.85	0.95	N. D.
A-2	<i>Sokujyoumoto</i>	2.54	18.0	-0.29	1.96	1.32	7.43
	<i>Kimoto</i>	2.32	18.8	3.76	2.34	1.39	8.28
B-1	<i>Kimoto</i>	5.66	18.4	2.75	2.13	1.63	9.27
	<i>Sokujyoumoto</i>	0.16	17.1	5.36	1.81	1.41	6.98
C-1	<i>Kimoto</i>	0.10	17.1	5.36	2.27	1.69	7.52
	<i>Sokujyoumoto</i>	1.3	20.9	18.12	2.48	1.65	N. D.
D-1	<i>Kimoto</i>	1.1	21.4	18.56	2.32	1.46	N. D.
	<i>Sokujyoumoto</i>	3.00	17.4	0	1.70	1.75	7.25
D-2	<i>Kimoto</i>	7.60	17.2	0.5	1.80	2.10	7.61
	<i>Sokujyoumoto</i>	1.90	19.0	2.5	1.50	1.40	6.29
	<i>Kimoto</i>	4.95	18.6	1.5	1.50	1.90	7.50

<sup>1</sup>Sake meter value is a kind of the specific gravity value of the sake.

N. D. : not determined.

のもろみを4つに分け、1つはそのまま対照（アルコール無添加）とし、他はそれぞれに本醸造規格上限の添加量（白米1t当たり100%エタノール116.4L）の0.5, 1.0, 1.5倍量に当たる白米1t当たり194, 388, 582L相当量の30%アルコールを添加し、添加後概ね2時間以内に遠心分離により上槽した。独立した4本の小仕込みの結果を解析に用いた。

#### 7. 清酒の希釈試験

清酒の希釈試験ではK9を用いたもろみ日数が22日間の小仕込み試験で得た火入れ前の清酒（上槽時のメチレンブルー染色率<sup>12)</sup>30.9%）に逆浸透水を加えて希釈し、DMTS-ppを測定した。清酒と逆浸透水を100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80の割合で混合し、それぞれ希釈率1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2とした。

#### 8. 上槽中の清酒の経時的サンプリング

上槽の影響の解析では、独立して仕込んだ総米10トンの仕込み3本の結果を用いた。当該仕込みはアルコール分18%前後、精米歩合69%の本醸造で、ヤブタ式連続自動圧搾機で圧搾した試料を経時的に採取した。上槽開始直後をあらばしり画分（上槽開始直後採取、圧力0.8 kg/cm<sup>2</sup>）、中期を中垂れ画分（上槽開始2時間後採取、圧力2.0 kg/cm<sup>2</sup>）、末期を責め画分（上槽開始14時間後採取、圧力6.0 kg/cm<sup>2</sup>）として解析した。

#### 9. 金属イオン添加試験

清酒に塩化亜鉛を亜鉛イオン3 mg/Lまたは15 mg/Lとなるように、塩化銅（Ⅱ）二水和物を銅イオン0.1 mg/Lまたは0.3 mg/L, 1.5 mg/Lとなるように、塩化鉄（Ⅲ）六水和物を鉄イオン0.3 mg/Lまたは1.5 mg/Lとなるように添加した後、DMTS-ppを測定した。

#### 10. 成分分析及び酵母死滅率の評価

清酒のDMTS-ppの測定は磯谷らの方法<sup>7,8)</sup>に従い、70℃で1週間貯蔵後のDMTS濃度をStir Bar Sorptive Extraction法で測定した。260 nmの吸光度（Abs260）は分光光度計（Nanodrop社ND-1000）を、アルコール分は化学センサーを用いたアルコメイトAL3（理研計器）を用いて、簡易測定した。酵母のメチレンブルー染色率<sup>12)</sup>は発酵終了時のもろみを用いて測定した。清酒のアミノ酸濃度は清酒をスルホサリチル酸で除タンパク処理した後、全自動アミノ酸分析装置（JLC-500/V, JEOL, Tokyo, Japan）を用いて測定した。それ以外の一般成分等は酒類総合研究所標準分析法<sup>13)</sup>に従った。

## 結果

#### 1. DMTS-ppに差異のある清酒製造要因の抽出

実験方法2に示した集団間の比較の結果、使用酵母の系統の違い及び酒母製造法の違いにおいて、比較し

**Table 3** DMTS-pp among groups of donated sake samples using the Mann-Whitney U-test

Factors	Groups	Frequency	DMTS-pp	
			median (μg/L)	P value
Rice for main mash	Suitable rice	39	2.29	0.258
	General rice	38	1.77	
Water used	Hard water	13	1.85	0.594
	Soft water	61	2.04	
Degree of <i>Koji</i> growth	<i>Tsukihaze</i>	22	2.22	0.154
	<i>Souhaze</i>	47	2.18	
<i>Kyokai</i> yeast family	K9 family	15	1.42	0.037 *
	Other than K9 family	48	2.28	
Presence of <i>Takaawa</i> formation	no formation	38	1.87	0.470
	formation	24	1.55	
<i>Shubo</i> making method	<i>Sokujomoto</i>	56	1.57	0.035 *
	<i>Kimoto</i>	9	3.90	
Presence of <i>Yodan</i>	With	24	2.34	0.419
	Without	56	1.77	
Alcohol addition to moromi	With	36	1.69	0.096
	Without	44	2.12	
Moromi pressing method	Traditional filtration press	11	1.46	0.179
	Automatic filtration press	68	2.19	

\*  $p < 0.05$

た集団間で有意差が認められ、中央値の差も大きかった (Table 3)。また、アルコール添加の有無、及び上槽方法の違いについては、有意差は認められないものの、危険率はそれぞれ 0.096, 0.179 と比較的 low 中央値の差も比較的大きかった (Table 3)。そこで、これら 4 つの要因の影響について、実験的に検証を試みた。

一方掛け米の種類と四段の有無では集団間の中央値の差は比較的大きかったが危険率がそれぞれ 0.258, 0.419 と大きかった (Table 3)。麴の破精まわり具合では危険率は 0.154 とやや低い数値であったが、集団間の中央値の差はほとんど見られなかった。また水の分類、酵母の高泡形成の有無は集団間の中央値の差が比較的小さく、かつ危険率も大きい結果となった (Table 3)。そこで、これら 5 つの製造要因が直接 DMTS-pp に影響を及ぼしている可能性は低いと考え、実証試験を行わなかった。

## 2. 使用酵母の系統の違いによる影響解析

代表的なきょうかい酵母 11 株を用いた小仕込み試験を行った。きょうかい 9 号系では K9 の製成酒の DMTS-pp は 5.6 μg/L と全ての株の平均の 7.0 μg/L より低かったが、K901 では 7.8 μg/L と平均値より高くなり (Table 4), 2 つの試料で一致しなかった。ま

た、きょうかい 9 号系の DMTS-pp の平均値は 6.7 μg/L で、きょうかい 9 号系以外の平均値 7.1 μg/L と比較して大きな差は見られなかった。これは非等分散の両側検定の t 検定でも  $p = 0.572$  となり、有意差は認められなかった。一方、それ以外の酵母を用いた清酒では K1401 が 4.2 μg/L と最も低く、K6 が 10.3 μg/L と最も高かった。メチレンブルー染色率、Abs 260、もろみ日数はそれぞれ DMTS-pp との相関係数は 0.392, 0.342, 0.331 と弱い正の相関がみられた。アルコール濃度と DMTS-pp の相関係数は -0.210 と相関はほとんどなく、全アミノ酸濃度と DMTS-pp は相関係数 0.558 と強い正の相関がみられた。以上のように協会酵母 11 株を用いた小仕込み試験では、酵母菌株の系統の違いによる DMTS-pp への明確な影響は認められなかった。

## 3. 酵母製造法の違いによる影響解析

収集した酒母の異なる 6 組の清酒の DMTS-pp を比較した。その結果 6 組中 2 組では生もと系酒母を用いた清酒の方が速醸系酒母を用いた清酒より 2 倍以上 DMTS-pp が高くなったが、同時にこの 2 組では生もと系の方が、アミノ酸度が高かった (Table 2 D-1, D-2)。一方、アミノ酸度に差がない 3 組では DMTS-

**Table 4** DMTS-pp, ratio of cells stained with methylene blue in sake mash (MB(%)), Abs260, *moromi* days, Alcohol concentration and Total amino acid concentration in small scale brewing with various yeast strains (n=4).

(A) Analytical values and correlation coefficients between DMTS-pp and other analyses.

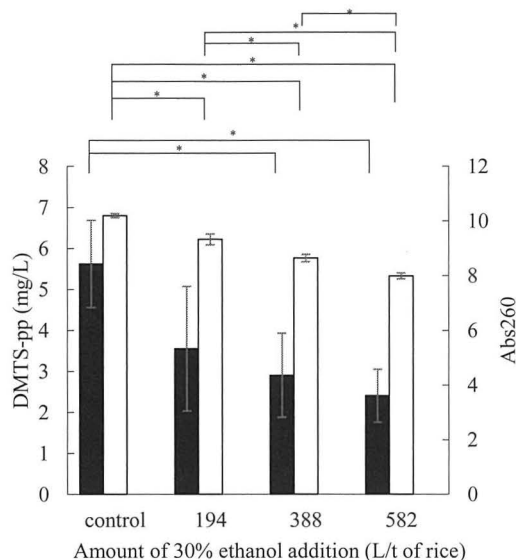
Yeast strains	DMTS-pp (μg/L)	MB (%)	Abs260	<i>Moromi</i> days <sup>1</sup>	Alcohol (%)	Total amino acid (mg/L)
<i>K9</i>	5.6 ± 1.1	17.8 ± 3.5	10.19 ± 0.07	17.5 ± 0.6	19.6 ± 1.2	2592 ± 56.7
<i>K901</i>	7.8 ± 0.8	29.2 ± 1.5	9.84 ± 0.06	18.5 ± 0.6	17.7 ± 0.1	2477 ± 37.6
Average of <i>K9</i> family	6.7 ± 1.5	23.5 ± 6.6	10.02 ± 0.20	18.0 ± 0.8	18.7 ± 1.3	2535 ± 76.3
<i>K6</i>	10.3 ± 1.0	27.4 ± 3.4	10.78 ± 0.50	21.8 ± 1.0	17.5 ± 0.1	2677 ± 114.1
<i>K601</i>	7.7 ± 0.9	24.5 ± 1.4	9.52 ± 0.19	18.5 ± 0.6	17.4 ± 0.1	2475 ± 42.9
<i>K7</i>	5.1 ± 0.8	17.4 ± 2.3	10.09 ± 0.27	21.3 ± 0.5	17.4 ± 0.2	2475 ± 57.5
<i>K701</i>	8.9 ± 1.2	22.0 ± 1.2	10.74 ± 0.10	21.5 ± 1.7	17.4 ± 0.2	2501 ± 67.3
<i>K10</i>	7.1 ± 1.1	20.1 ± 2.1	10.00 ± 0.18	20.5 ± 0.6	17.8 ± 0.2	2442 ± 52.5
<i>K1001</i>	6.5 ± 1.0	21.6 ± 1.2	10.00 ± 0.14	18.5 ± 0.6	18.1 ± 0.5	2281 ± 49.1
<i>K11</i>	7.8 ± 0.6	18.4 ± 1.1	10.45 ± 0.13	21.5 ± 1.0	18.1 ± 0.6	2431 ± 53.9
<i>K14</i>	6.1 ± 0.8	26.1 ± 2.7	10.99 ± 0.14	21.3 ± 1.0	17.7 ± 0.1	2414 ± 24.9
<i>K1401</i>	4.2 ± 0.7	21.5 ± 2.0	9.66 ± 0.11	18.5 ± 0.6	17.9 ± 0.2	2208 ± 65.4
Average of other than the <i>K9</i> family	7.1 ± 2.0	22.1 ± 3.7	10.25 ± 0.54	20.4 ± 1.6	17.7 ± 0.4	2434 ± 138.8
Average	7.0 ± 1.9	22.4 ± 4.3	10.21 ± 0.50	19.9 ± 1.7	17.9 ± 0.7	2452 ± 134.8
Correlation coefficient with DMTS-pp	1.000	0.392	0.342	0.331	-0.210	0.558

<sup>1</sup>*Moromi* days is number of days from *omezoe* to *moromi* pressing.(B) Strains showing significant difference by Tukey-Kramer tests ( $p < 0.05$ ).

Yeast strains	DMTS-pp (μg/L)	MB (%)	Abs260	<i>Moromi</i> days <sup>1</sup>	Alcohol (%)	Total amino acid (mg/L)
<i>K9</i>	<i>K6, K701</i>	<i>K901, K6, K601, K14</i>	<i>K6, K601, K701, K14, K1401</i>	<i>K6, K7, K701, K10, K11, K14</i>	<i>K901, K6, K601, K7, K701, K10, K1001, K11, K14, K1401</i>	<i>K10, K1001, K11, K14, K1401</i>
<i>K901</i>	<i>K1401</i>	<i>K9, K7, K701, K10, K1001, K11, K1401</i>	<i>K6, K701, K11, K14</i>	<i>K6, K7, K701, K10, K11, K14</i>	<i>K9</i>	<i>K6, K1001, K1401</i>
<i>K6</i>	<i>K9, K7, K10, K1001, K14, K1401</i>	<i>K9, K7, K701, K10, K1001, K11, K1401</i>	<i>K9, K901, K7, K10, K1001, K1401</i>	<i>K9, K901, K601, K1001, K1401</i>	<i>K9</i>	<i>K901, K601, K7, K701, K10, K1001, K11, K14, K1401</i>
<i>K601</i>	<i>K1401</i>	<i>K9, K7, K11</i>	<i>K9, K6, K7, K701, K11, K14</i>	<i>K6, K7, K701, K11, K14</i>	<i>K9</i>	<i>K6, K1001, K1401</i>
<i>K7</i>	<i>K6, K701</i>	<i>K901, K6, K601, K14</i>	<i>K6, K601, K701, K14</i>	<i>K9, K901, K601, K1001, K1401</i>	<i>K9</i>	<i>K6, K1001, K1401</i>
<i>K701</i>	<i>K9, K7, K1401</i>	<i>K901, K6</i>	<i>K9, K901, K601, K7, K10, K1001, K1401</i>	<i>K9, K901, K601, K1001, K1401</i>	<i>K9</i>	<i>K6, K1001, K1401</i>
<i>K10</i>	<i>K6, K1401</i>	<i>K901, K6, K14</i>	<i>K6, K701, K14</i>	<i>K9</i>	<i>K9</i>	<i>K9, K6, K1001, K1401</i>
<i>K1001</i>	<i>K6</i>	<i>K901, K6</i>	<i>K6, K701, K14</i>	<i>K6, K7, K701, K11, K14</i>	<i>K9</i>	<i>K9, K901, K6, K601, K7, K701, K10, K11</i>
<i>K11</i>	<i>K1401</i>	<i>K901, K6, K601, K14</i>	<i>K901, K601, K14, K1401</i>	<i>K9, K901, K601, K1001, K1401</i>	<i>K9</i>	<i>K9, K6, K1001, K1401</i>
<i>K14</i>	<i>K6</i>	<i>K9, K7, K10, K11</i>	<i>K9, K901, K601, K7, K10, K1001, K11, K1401</i>	<i>K9, K901, K601, K1001, K1401</i>	<i>K9</i>	<i>K9, K6, K1401</i>
<i>K1401</i>	<i>K901, K6, K601, K701, K10, K11</i>	<i>K901, K6</i>	<i>K9, K6, K701, K11, K14</i>	<i>K6, K7, K701, K11, K14</i>	<i>K9</i>	<i>K9, K901, K6, K601, K7, K701, K10, K11, K14</i>

ppも同程度であった (Table 2 A-1, B-1, C-1)。また A-2 においては生もと系 2 点のうち、速醸系と比較してアミノ酸度の高い 1 点は 2 倍以上の DMTS-pp となったが、アミノ酸度に差がないもう 1 点では同程

度の DMTS-pp となった (Table 2)。以上のように、アミノ酸度が同程度の組においては、DMTS-pp の差はほとんどなかった (Table 2)。また、速醸系と生もと系のペアを対応のあるデータとして扱い、対応のあ



**Fig. 1** Effects of the addition of 30% ethanol to *mo-romi* on DMTS-pp and Abs260.

■: DMTS-pp; □: Abs260

Dilution ratio ( $sake / (sake + 30\% \text{ ethanol})$ ) of 194L/t of rice, 388L/t of rice and 582L/t of rice are 0.918, 0.848 and 0.788 respectively.

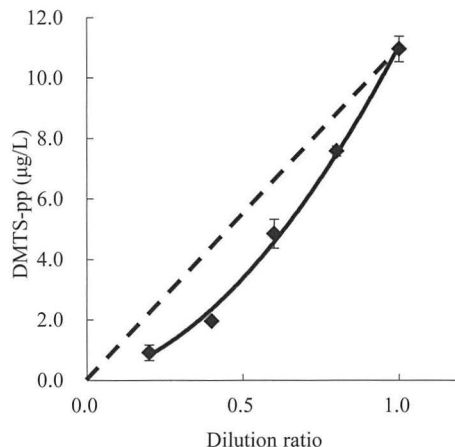
\*: Showed significant difference by Tukey-Kramer tests ( $p < 0.05$ )

るデータのノンパラメトリック検定である Wilcoxon の符号付き順位検定を行ったところ、速醸系と生もと系では  $p = 0.499$  と有意差は認められなかった。なお、Wilcoxon の検定の際 A-2 の速醸もとは生もと 2 点と対応するものとして扱った。

#### 4. アルコール添加の有無の影響の解析

アルコール添加量を変えた同一の小仕込みもろみ由来の製成酒について DMTS-pp と Abs260 を測定した。DMTS-pp はアルコール添加量依存的に減少した (Fig. 1)。また、Abs260 もアルコール添加量が多いほど低くなり、Abs260 の減少割合はアルコール添加による希釈割合とほぼ同じであった。一方、DMTS-pp の減少の割合は希釈の割合より顕著であった。なお、この条件ではアルコール添加量の違いによるメチレンブルー染色率の差はほとんどなかった (data not shown)。

次に、清酒を逆浸透水で希釈し、DMTS-pp を測定した。水で希釈した清酒の DMTS-pp は減少した (Fig. 2 実線) が、アルコール添加の時と同様に、対



**Fig. 2** Relationship between DMTS-pp and dilution ratios diluted by water

Solid line shows measured DMTS-pp. Broken line shows theoretical dilution ratios.

Dilution ratio =  $sake / (sake + water)$  (v/v).

Showed significant differences in all dilution ratio combinations by Tukey-Kramer tests ( $p < 0.05$ ).

照を基準とした希釈の効果 (Fig. 2 破線) 以上の減少率であった。なお、希釈率 0.8 は本醸造規格のアルコール添加量の上限 (Fig. 1 の 388 L / 白米 t) による希釈に相当する。

#### 5. 上槽条件の実証試験

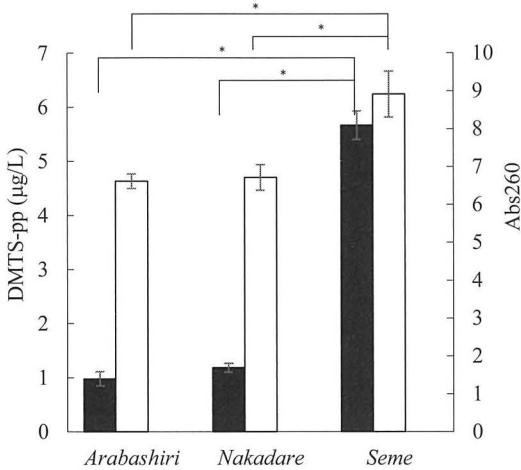
上槽方法の違いについては上槽圧力の違いに着目し、連続自動圧搾機で上槽した 3 仕込みの本醸造清酒をそれぞれ経時的にサンプリングし、あらばしり画分、中垂れ画分、責め画分の DMTS-pp を測定、比較した。あらばしり画分と中垂れ画分の DMTS-pp は変わらなかったが、責め画分の DMTS-pp は中垂れ画分の 5 倍近く高かった (Fig. 3)。酵母死滅の指標の Abs260 も責め画分で増加し、中垂れ画分の 1.4 倍であった。

上槽末期に銅、亜鉛、鉄等が増加することが知られている。そこで、清酒に亜鉛、銅、鉄の各イオンを清酒に含まれる濃度を参考に添加し、DMTS-pp を測定、解析した。金属イオン添加による清酒の DMTS-pp 増加は観察されず、銅イオン添加でむしろ抑制された (Table 5)。

#### 考 察

全国から収集した試料を、前報<sup>9)</sup>で解析できなかつ





**Fig. 3** DMTS-pp and Abs260 of *moromi* pressing fractions.

■: DMTS-pp ; □: Abs260

\*: Showed significant difference by Tukey-Kramer tests ( $p < 0.05$ )

た数値で表すことができない製造要因について2集団に分け、比較、解析した。その結果、使用酵母の系統、酒母製造法、アルコール添加の有無、上槽方法の4項目で2集団の中央値の差が大きく、有意差の危険率が低かった (Table 3)。しかしこれらの要因が直接DMTS-ppに影響するのか、またはこれらの要因に連動する精米歩合等の他の要因が原因となっているのかは明らかではなかったため、この4つの要因に注目し、検証試験を行った。

酵母菌株の系統の違いがDMTS-ppに影響するか確認するため、酵母を変えて行った小仕込み試験では、きょうかい9号系で一致した特徴は見られなかった。一方でK6, K701などのDMTS-ppが比較的大きい菌株ではもろみ日数、Abs 260、メチレンブルー染色率のいずれかの値が大きく、逆にK1401, K7, K1001などのDMTS-ppが小さい菌株ではこれらの数値は小さい結果となった。加えてメチレンブルー染色率、Abs 260、もろみ日数、総アミノ酸濃度はいずれもDMTS-ppと正の相関がみられた。これらのことから酵母の菌株の違いそのものがDMTS-ppに与える影響は小さく、もろみ日数や酵母の死滅とそれに伴う酵母内容物の漏出の方がDMTS-ppに与える影響は大きいと考えられた。

**Table 5** Effects of metal ion addition on DMTS-pp of *sake* samples.

Added metal ions	Concentration	DMTS-pp
	control	3.13 ± 0.31
Zn	3 mg/L	3.07 ± 0.25
	15 mg/L	2.85 ± 0.10
Cu	0.1 mg/L	2.90 ± 0.17
	0.3 mg/L	1.45 ± 0.21 *
Fe	1.5 mg/L	0.65 ± 0.25 *
	0.3 mg/L	2.80 ± 0.25
	1.5 mg/L	2.75 ± 0.38

\*: Showed significant difference with controls by Tukey-Kramer tests ( $p < 0.05$ ).

速醸と生もとという酒母製造法の違いに着目し、収集した6組の清酒のDMTS-ppを比較したところ、生もと系のアミノ酸度が高い組では生もと系の方がDMTS-ppが2倍以上高くなったが、アミノ酸度がほぼ同じ組においてはDMTS-ppの差はほとんどなかった (Table 2)。この結果は全国から収集した清酒では生もと系の清酒でDMTS-ppが高い傾向がみられるという解析結果 (Table 3) と異なった。その原因としてアミノ酸度の違いが考えられた。全国から収集した清酒サンプルでは生もとに分類した集団のアミノ酸度の平均値は1.79と速醸に分類した集団のアミノ酸度の平均値1.38より高かった。一方でTable 2に示した製造条件がほぼ同じ清酒サンプルの半数ではアミノ酸度に違いはなかった。また山田らは速醸もとても生もとでも、同じもろみ製造条件で製造した製成酒のアミノ酸度には違いがないことを報告している<sup>14)</sup>。生もとで造る清酒では味の濃い製品を志向する場合があります、全国から集めた清酒ではアミノ酸度の高い製品が集まった可能性が考えられた。清酒では原料米の溶解が多いか、酵母の死滅率が高いほどアミノ酸度が高くなることが報告されている<sup>15,16)</sup>。また、我々は原料米の溶解と酵母の死滅による内容物の漏出がDMTS-ppを増加させる要因となり得ることを報告した<sup>9,10)</sup>。今回、全国から収集した清酒の生もとの集団でDMTS-ppが高い傾向を示したのは高いアミノ酸度を反映している可能性があり、酒母の製造方法そのものは製成酒のDMTS-ppに影響しないものと思われた。

アルコール添加の有無の影響の解析では、小仕込み試験でアルコール添加量が多ければ多いほどDMTS-

ppが減少し (Fig. 1), アルコール添加の有無やアルコール添加量が製成酒のDMTS-ppに影響することが明らかになった。本醸造規格上限のアルコール添加量でもDMTS-ppは対照 (アルコール無添加) の約半分にまで減少し, その影響は大きかった。上述の全国から収集した生もとを用いた試料については, 9点中7点が純米酒または純米吟醸酒で (Table 1B), アルコール添加がされていない試料の割合が高いこともこの集団のDMTS-ppが高い理由の一つと考えられた。また, アルコール添加後のメチレンブルー染色率が増大せずに, Abs260の減少がアルコール添加によるもろみの希釈の割合とほぼ一致したことから, 本研究で行った2時間以内に上槽という条件では酵母死滅の影響はなく, 希釈の影響のみが反映されたと考えられた。

清酒を水で希釈し, DMTS-ppに対する希釈効果を確認した。その結果, DMTS-ppの減少は希釈率よりも大きく, 近似曲線は1次式よりも2次式に近かった (Fig. 2)。これは希釈により劣化処理中のDMTSの生成反応に関与する複数の基質の濃度が低下したためと考えた。磯谷らは清酒中のDMTSの前駆体としてDMTS-P1を報告しているが, 同時にDMTSの生成経路には複雑な反応があると考察している<sup>7,8)</sup>。現時点ではDMTSの生成反応の律速段階は不明だが, DMTS-P1中の硫黄原子は1つだけであり, 硫黄原子が3つ含まれるDMTSの生成は複数の基質による反応と考えられる。清酒を水で希釈すると反応に関与するそれぞれの基質濃度が減少するため, それぞれの基質濃度に比例する反応速度が希釈率以上に減少することは矛盾しないと考えられた。また, 今回の結果から, 清酒の貯蔵前に割水することが貯蔵中の老香の抑制に有効であると考えられる。ただし過度の割水は火落ちの危険性も増加させるので注意が必要である。

上槽方法の違いの影響については, あらばしり画分, 中垂れ画分と比較して, 責め画分のDMTS-ppが大幅に増加することが明らかになり, 上槽での圧搾の程度がDMTS-ppに影響することが示唆された (Fig. 3)。また, 責め画分ではAbs260が増加しており, 搾り後半ではもろみ固形部からの溶出物が増加するという飯野<sup>17)</sup>や進藤<sup>18)</sup>の過去の報告と一致した。責め画分で増加することが知られている金属イオンを添加してもDMTS-ppは増加しなかったことから, 責め画分でDMTS-ppが増加した原因は金属イオンの影響では

なく, 酵母内容物の漏出量の増加が原因であると考えられた。佐藤<sup>2,3)</sup>と難波<sup>4)</sup>は, FeやCu, Znと老香強度の相関を報告しているが, 佐藤らや難波らの報告で相関があるのは, 酵母内容物の漏出等を反映している可能性が考えられた。なお, 銅イオンの添加でDMTS-ppの減少が見られたが, 本機構の解明についてはさらなる解析が必要である。

以上のように本研究では, 全国の清酒製造場から収集した清酒80点のDMTS-ppと製造要因との関係を解析し, DMTS-ppに影響する可能性がある4つの製造要因を抽出し, 実証試験により解析, 次の結果を得た。

- (1) 生もたと速醸もとの違いという酒母の製造方法の違いや使用酵母の系統の違いが製成酒のDMTS-ppに与える影響は見られなかった。
- (2) アルコール添加試験及び清酒希釈試験の結果, アルコール添加による希釈や割水が製成酒のDMTS生成を抑制することが明らかになった。
- (3) 上槽末期の責め画分でDMTS-ppが増加することが明らかになった。このDMTS-ppの増大は酵母内容物の漏出によるものであることが示唆された。

これらの結果から, 純米酒や原酒では老香生成に注意が必要なこと, 上槽時に責め画分を別に取りすることで老香の生成を低減できる可能性等が示唆された。

## 要 約

ジメチルトリスルフィド (DMTS) は清酒貯蔵中に増加する劣化臭, 老香の主成分である。我々は, 全国の清酒製造場から収集した清酒の70℃で7日間貯蔵後のDMTS濃度 (DMTS-pp) と製造要因との関係からDMTS-ppを増加させる可能性がある4つの製造要因を抽出し検証実験を行った。これら4つの製造要因の中で, 使用酵母の違い及び酒母製造法の違い (生もたと速醸法) については, DMTS-ppへの明らかな影響は示されなかった。一方, アルコール添加量を変えて製造した製成酒では, アルコール添加による希釈率以上にDMTS-ppが減少した。水による希釈でもDMTS-ppが減少したことから, DMTS-ppの減少はDMTS生成に関与する成分の希釈が原因であることが示唆された。自動圧搾機と槽による上槽方法の違いについては両法の上槽圧力の違いに着目し, 自動圧搾機で上槽圧力の異なる画分を比較した。あらばしり画

分や中垂れ画分に比べ、上槽末期の責め画分でDMTS-ppが高くなることを見出した。その理由として上槽末期に増加することが知られている銅、亜鉛、鉄等イオンにはDMTS-ppを増加させる効果は認められず、上槽末期の画分で260 nmの吸光度が増加していることから、責め画分におけるDMTS-pp増加は酵母内容物漏出の影響であることが示唆された。

### 謝 辞

本研究で用いました清酒試料および製造条件のご提供にご協力くださいました清酒製造場の皆様に心より御礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) 磯谷敦子, 宇都宮仁, 神田涼子, 岩田博, 中野成美: 醸協, **101**, 125-131 (2006)
- 2) 佐藤信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 杉谷守: 醸協, **73**, 873-877 (1978)
- 3) 佐藤信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 杉谷守: 醸協, **73**, 878-882 (1978)
- 4) 難波康之祐, 大場俊輝, 高橋康次郎, 森千博, 佐藤信: 醸協, **73**, 975-978 (1978)
- 5) 奥田将生, 磯谷敦子, 上用みどり, 後藤奈美, 三上重明: 醸協, **104**, 131-141 (2009)
- 6) 奥田将生: 醸協, **105**, 262-272 (2010)
- 7) A. Isogai, R. Kanda, Y. Hiraga, T. Nishimura, H. Iwata, and N. Goto-Yamamoto: *J. Agric. Food. Chem.*, **57**, 189-195 (2009)
- 8) A. Isogai, R. Kanda, Y. Hiraga, H. Iwata, and S. Sudo: *J. Agric. Food. Chem.*, **58**, 7756-7761 (2010)
- 9) K. Sasaki, N. Nishibori, M. Kanai, A. Isogai, O. Yamada, N. Goto-Yamamoto, T. Fujii: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 166-171 (2014)
- 10) N. Nishibori, K. Sasaki, Y. Okimori, M. Kanai, A. Isogai, O. Yamada, T. Fujii, N. Goto-Yamamoto: *J. Biosci. Bioeng.*, **118**, 526-528 (2014)
- 11) <http://www.maff.go.jp/j/seisan/syoryu/kensa/sentaku/pdf/25kitei.pdf>
- 12) 注解編集委員会編: 第三回改正国税庁所定分析法注解 (日本醸造協会, 東京), 313 (1974)
- 13) <https://www.nrib.go.jp/bun/nribanalysis.htm>
- 14) 山田翼: 日本生物工学会誌, **87**, 9-15 (2009)
- 15) 布川弥太郎, 飯塚尚彦, 岩野君夫, 斉藤和夫: 醸協, **76**, 267-271 (1981)
- 16) 原昌道, 小幡孝之: 醸協, **72**, 530-533 (1977)
- 17) 飯野修一, 渡辺正平: 醸協, **84**, 555-559 (1989)
- 18) 進藤斉, 高橋康次郎, 佐藤和夫: 東京農大農学集報, **56**, 248-254 (2011)