同位体希釈分析法 (SIDA 法) による酒類および発酵液中の DMTS 前駆物質 1,2-dihydroxy-5- (methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1) の分析

磯谷敦子・神田涼子・須藤茂俊・松丸克己
(独立行政法人酒類総合研究所)

平成 25 年 1 月 15 日受理

Quantitation of the DMTS precursor, 1,2-dihydroxy-5- (methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1) in alcoholic
beverages and fermented solutions by a stable isotope dilution analysis

Atsuko ISOGAI, Ryoko KANDA, Shigetoshi SUDO and Katsumi MATSUMARU

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashihiroshima, 739-0046, Japan)

A method for the quantitation of DMTS-P1, a precursor of DMTS, was developed by using a stable isotope of DMTS-P1, DMTS-P1- d_3 , as an internal standard, in which the methyl group was labeled by three deuterium atoms. The recovery rate from various kinds of samples was improved to $100 \pm 10\%$ using this method. Application of the method to various commercial alcoholic beverages revealed that the DMTS-P1 concentration in sake was higher than in other beverages. When sake, wine, and beer yeast were cultivated in the same medium, sake yeast produced higher amounts of DMTS-P1 than other yeasts. The correlation of DMTS-P1 concentration and DMTS producing potential (production of DMTS after storage) was observed for commercial sake, but not for wine, suggesting the presence of other components responsible for DMTS production. A small-scale sake brewing test was carried out and changes in the DMTS-P1 concentration were investigated. DMTS-P1 increased during fermentation, and a slight increase was observed after filtration. A high fermentation temperature increased both DMTS-P1 concentrations and the DMTS producing potential.

Key words : 1,2-ジヒドロキシ-5-(メチルスルフィニル)ペンタン-3-オン (DMTS-P1), ジメチルトリスルフィド (DMTS), 同位体希釈分析法 (SIDA), 老香

緒 言

貯蔵した清酒の香り, 老香は, さまざまな香りからなる複合香と考えられているが¹⁾, このうち特にジメチルトリスルフィド (DMTS) は, 老香の感じられる多くの清酒で閾値以上の濃度であること²⁾, 専門家のイメージする老香に近いおいであること³⁾などから, 老香の主要成分であると考えられる。

清酒貯蔵中の DMTS 生成機構の全容はいまだ明らかでないが, 我々はこれまでに, DMTS の主要前駆物質の一つ, 1,2-dihydroxy-5-(methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1) を清酒中より探索・同定した⁴⁾。また最近, 若林らは DMTS-P1 の生成に関与する酵母遺伝子を同定した。これらの遺伝子を破壊した酵母でつくった清酒には DMTS-P1 はほとんど検出されず, DMTS 生成ポテンシャル (貯蔵によって生じる

DMTS 量）も親株の 10～30%程度にまで減少した⁵⁾。この結果からも、DMTS-P1 は DMTS の生成に大きく寄与することが確認された。DMTS-P1 の生成要因や製造工程における消長を知ることは、DMTS を制御するうえで重要と思われる。

DMTS-P1 の分析は、これまで、1,5-pentanediol を内部標準物質として試料に添加し、LC-MS を用いて行っていたが⁶⁾、添加回収試験を行うと試料によって大きな違いがみられた。この原因として、目的物質と共溶出する成分によるイオン化の障害が考えられた。LC での分離向上も改良方法の一つの選択肢であるが、DMTS-P1 は極性が高く逆相系の担体に吸着しないことから、共溶成分と完全に分離することは難しいと考えられた。そこで、DMTS-P1 の安定同位体を内部標準物質として用いる同位体希釈分析法（stable isotope dilution analysis, SIDA）を採用することにした。安定同位体で標識された内部標準物質は、目的物質とは質量のみが異なり、物理化学的性質（反応性、分配係数、クロマトグラフィーでの挙動など）はほぼ同等である。質量分析計を検出器として用いる場合には理想的な内部標準物質といえる⁷⁾。本研究では、SIDA 法による DMTS-P1 分析方法を確立し、この方法を用いてさまざまな酒類や酵母培養液の分析を行うとともに、清酒製造工程での DMTS-P1 の消長を検討した。

実験方法

1. 試料

市販清酒、ワイン、ビール系飲料は、東広島市内の小売店、または通信販売で購入した。清酒酵母きょうかい 7 号（K7）、701 号（K701）、901 号（K901）、ワ

イン酵母（きょうかいぶどう酒用 4 号）は日本醸造協会より購入した。ビール酵母（W34/70）は当所水野部門長より分譲いただいた。

2. 内部標準物質の合成

内部標準物質 1,2-dihydroxy-5-（ $^{2}\text{H}_3$ ）methylsulfinyl）pentan-3-one（DMTS-P1- d_3 ）合成のスキームを Fig. 1 に示した。まず、Sen らの方法⁸⁾により、 $^2\text{H}_3$ methyl iodide および ethyl 3-mercaptopropionate（化合物 1）から 3-（ $^{2}\text{H}_3$ ）methylthio）propanal（化合物 3）を合成した。ethyl 3-（ $^{2}\text{H}_3$ ）methylthio）propionate（化合物 2）の還元においては、収率向上のため、 LiAlH_4 の代わりに DIBAL-H（diisobutylaluminium hydride）を用いた。低温下（ -73°C 以下）で反応を行い、化合物 2 から直接化合物 3 を得た。化合物 1 を出発物質として、収率 69%で純度 98%の化合物 3 が得られた。続いて、化合物 3 を用いて、DMTS-P1 と同様の方法⁶⁾で DMTS-P1- d_3 （化合物 6）を合成した。なお、化合物 5（5-（ $^{2}\text{H}_3$ ）methylthio）-1-penten-3-one）までの合成は株式会社ケミカルソフト開発研究所に委託した。化合物 3 から化合物 5 の収率は 12%で、純度は 96%（GC で確認）であった。化合物 5 を、固定化オスミウム触媒（Os IC-I, 和光純薬）を用いて酸化し、DMTS-P1- d_3 を含む反応生成物をカラムクロマトグラフィーにより精製した。DMTS-P1- d_3 のマスペクトルを Fig. 2A に示す。DMTS-P1- d_3 は分子内に 1 個の硫黄原子を含むことから、精製標品の硫黄濃度を ICP 発光分析装置（ICPS 1000IV, 島津製作所）により測定し、これをもとに合成標品の濃度を算出した。化合物 5 から DMTS-P1- d_3 の収率は 0.5%であり、DMTS-P1 の場合⁶⁾とほぼ同等であった。

Fig. 1 Synthetic pathway of DMTS-P1- d_3 .

Fig. 2 LC-MS data of DMTS-P1- d_3 (A) and DMTS-P1 (B).

3. SIDA 法による DMTS-P1 の分析

内部標準物質として DMTS-P1- d_3 を用い、既報⁶⁾に従って前処理を行った。すなわち、試料 1 mL に DMTS-P1- d_3 (20 mg/L 水溶液) 25 μ L を添加し、Mili-Q 水で 2 mL にメスアップした。これを、再生済み陽イオン交換樹脂 (Dowex 50WX4, H⁺ form, 200 – 400 mesh, ムロマテテクノス株式会社) 約 1 mL を充填したカラムにアプライし、Mili-Q 水でカラムを洗浄した。カラム通過液を合併して凍結乾燥し、Mili-Q 水 1 mL に溶解した後 0.20 μ m のメンブランフィルターでろ過した。LC-MS 分析には、既報⁶⁾のイオントラップ質量分析計またはタンデム四重極質量分析計を用いた。分析条件を Table 1A および B に示した。DMTS-P1 と DMTS-P1- d_3 とを 1 : 10 – 10 : 1 の割合

で混合した水溶液 (DMTS-P1 濃度 0.1 – 4.0 mg/L) を用いて検量線を作成するとともに、清酒、ワイン、ビールに既知濃度の DMTS-P1 を添加して分析を行い、回収率を求めた。

4. DMTS-P1 生成試験

ボーメ 5 に調製した麴エキス 5 mL に、K701 を 1×10^6 cells/mL となるように植菌し、30℃ で 1 ~ 7 日間もしくは 15℃ で 5 ~ 30 日間培養を行った。培養液の吸光度 (A₆₀₀) を測定し、遠心 (2500 rpm, 5 分) により上清と菌体を分離した。上清については、フィルターろ過し、DMTS-P1 の測定を行った。菌体については、Chattopadhyay らの方法⁹⁾に準じて過塩素酸による抽出を行った。菌体を蒸留水で洗浄後、1 mL の 10% 過塩素酸溶液を加え、室温で 2 時間放置した。

Table 1 LC-MS conditions for DMTS-P1 analysis

(A)	
LC-MS : Surveyor HPLC coupled with LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific)	
Column : BDS Hypersil C18 (3.0×150 mm)	
Mobile phase : Mili-Q (isocratic)	
Flow rate : 0.3 mL/min	
Injection volume : 10 μ L	
Ionization : ESI, positive	
Sheath gas flow rate : 30 arb (“arbitrary unit” according to equipment procedure)	
Auxiliary gas pressure : 10 arb	
Spray voltage : 5 kV	
Capillary temperature : 250°C	
Capillary voltage : 5 V	
Collision energy : 30 %	
Monitor of ion transitions :	
DMTS-P1	m/z 181 $\rightarrow$ 117
DMTS-P1- d_3	m/z 184 $\rightarrow$ 117

(B)	
LC-MS : Aquity UPLC coupled with Quattro premier™ XE (Waters)	
Column, mobile phase, and flow rate are the same as (A).	
Injection volume : 5 μ L	
Ionization : ESI, positive	
Capillary voltage : 3 kV	
Source temperature : 130°C	
Desolvation temperature : 150°C	
Desolvation gas flow : 350 l/hr	
Cone gas flow : 50 l/hr	
Cone voltage : 15 V	
Collision energy : 10 V	
Monitor ions are the same as (A).	

遠心して上清を採取し、沈殿を蒸留水 2 mL で洗浄し、洗液も加えて DMTS-P1 の測定に供した。

また、酵母による DMTS-P1 生成量の違いを調べるため、清酒酵母、ワイン酵母、ビール酵母について、麹エキスを 30°C 7 日間培養を行い、上清の DMTS-P1 を測定した。K701, ワイン酵母, ビール酵母については、YPD 培地を用いて同様の試験を行った。

5. 清酒小仕込み試験

難波らの方法¹⁰⁾に従い、 α 化米 (AA-70, 徳島製麹株式会社) および乾燥麹 (I-70A, 徳島製麹株式会社) を用いて、Table 2 に示す仕込み配合で小仕込み試験を行った。水麹時に、乳酸 (18 mM), および K701 のアンプル 0.2 mL (約 4×10^8 cells) を添加した。温度の影響を調べるため、Table 2 に示す 2 通りの条件で発酵を行った。条件 1 は、留後 1 日 1°C ずつ温度を上げ、最高温度 15°C とした。条件 2 は、留後 2 日で 1°C ずつ温度を上げ、最高温度 10°C とした。各条件

Table 2 Proportion of raw materials and setting of fermentation temperature for small sake brewing

Raw materials		soe	naka	tome	total
Total rice	(g)	52.5	97.5	150	300
α rice	(g)	37.5	82.5	120	240
Dried koji	(g)	15	15	30	60
Water	(mL)	97	140	237	474
Temperature		soe	naka	tome	maximum
Condition 1	(°C)	15	9	7	15
Condition 2	(°C)	13	9	7	10

3 本ずつ仕込みを行い、このうち 1 本は経時変化を調べるため定期的サンプリングに用い、残り 2 本は炭酸ガス減量の測定に用いた。条件 1 では留後 20 日、条件 2 では留後 25 日で、遠心により上槽した。上槽酒は 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し、約 1 ヶ月間 5°C で貯蔵した後、火入れ (63°C 5 分間) を行った。得られた製成酒について DMTS-P1 濃度の測定を行うとともに、70°C で 1 週間貯蔵し、生成する DMTS 量 (DMTS 生成ポテンシャル) を既報⁴⁾にしたがって測定した。

実験結果

1. SIDA 法による DMTS-P1 定量方法の改良

既報⁶⁾では、内部標準物質として 1,5-pentanediol を用い、DMTS-P1 がほとんど含まれない市販合成清酒に DMTS-P1 を添加して検量線を作成し、DMTS-P1 の定量を行った。しかし、Table 3 に示すように試料によって回収率が大きく異なった。データは示さないが、1,5-pentanediol のピーク面積は試料間であまり大きな変動はみられないのに対し、DMTS-P1 添加によ

Table 3 Recovery rate of DMTS-P1 determined by the conventional method

Sample	Calculated concentration of DMTS-P1 (mg/L)		Recovery rate (%)
	sample	sample + DMTS-P1	
Gousei shu 1	0.03	1.00	97
Gousei shu 2	0.07	0.98	91
Honjozo shu	0.53	1.11	58
Jyunmai ginjo shu	0.18	0.85	67
Wine	0.14	0.57	43
Beer	0.02	0.50	48

The concentration of DMTS-P1 added was 1.0 mg/L.

るピーク面積の増加量は試料間で 2 倍程度の変動がみられた。このことから、回収率変動のおもな要因は、DMTS-P1 と共溶出する成分によって DMTS-P1 のイオン化が阻害されるためと考えられた。しかし、DMTS-P1 は高極性化合物であり、LC カラムで夾雑物質と完全に分離することは難しいと思われたため、目的物質の安定同位体を内部標準物質とする SIDA 法を採用することにした。

DMTS-P1 の安定同位体として、硫黄原子に結合したメチル基を 3 つの重水素で置換した 1,2-dihydroxy-5- ($[^2\text{H}_3]$ methylsulfinyl) pentan-3-one (DMTS-P1- d_3 , Fig.1) を用いた。DMTS-P1- d_3 の合成は、まず、3-(methylthio)propanal のメチル基を 3 つの重水素で置換した 3- ($[^2\text{H}_3]$ methylthio)propanal を合成し、これを出発物質として DMTS-P1 と同様の方法で行った。Fig. 2 に DMTS-P1- d_3 および DMTS-P1 のマススペクトルを示した。DMTS-P1 のベースピーク m/z 181 に対して、DMTS-P1- d_3 では m/z 184 にピークがみられる。一方、MS/MS 分析においてこれらのイオンから生じる主要なプロダクトイオンはともに m/z 117 であった。これらの結果をもとに、DMTS-P1 については m/z 181 から生じる m/z 117 のイオンを、DMTS-P1- d_3 は m/z 184 から生じる m/z 117 のイオンをそれぞれモニターした。

検量線は、DMTS-P1 と DMTS-P1- d_3 を適当な濃度比 (DMTS-P1/DMTS-P1- d_3 = 0.1~10) で混合した水溶液 6 点を分析し、DMTS-P1 と DMTS-P1- d_3 の濃

Fig. 3 Calibration curve for the quantitation of DMTS-P1.

Table 4 Recovery rate of DMTS-P1 determined by SIDA method

Sample	Calculated concentration of DMTS-P1 (mg/L)		DMTS-P1 added (mg/L)	Recovery rate (%)
	sample	sample + DMTS-P1		
Gousei shu 1	0.03	0.92	1.0	89
		0.52	0.5	96
Honjozo shu	0.90	1.84	1.0	94
		1.44	0.5	107
Wine	0.61	1.43	1.0	83
		1.10	0.5	98
Beer	0.11	1.23	1.0	112
		0.55	0.5	89

度比を縦軸に、ピークの強度比を横軸に作成した (Fig. 3)。検量線の直線性は $R^2 = 0.999$ 、レスポンスファクター（濃度比/ピーク強度比）は 1.016 であった。同一サンプル 7 回の繰り返し分析より求めた RSD 値は 5.8%、低濃度 (0.12 mg/L) の清酒試料の繰り返し分析の標準偏差をもとに計算した検出下限は 0.027 mg/L であった。また、市販清酒、ワイン、ビールへの DMTS-P1 の添加回収試験を行ったところ、概ね $100 \pm 10\%$ であり (Table 4)、この方法では回収率による補正は不要と考えられた。なお、質量分析装置としてタンデム四重極質量分析計 (Table 1B) を用いた場合でも、イオントラップ型質量分析計 (Table 1A) の場合と定量値はほぼ同じであった。

2. 市販清酒、ワイン、およびビール系飲料中の DMTS-P1 の定量

市販清酒 20 点の DMTS-P1 の定量的結果、最も低いものが 0.03 mg/L、高いものは 0.70 mg/L で、0.1 ~ 0.3 mg/L の範囲のものが多かった (Fig. 4)。これらの試料について DMTS 生成ポテンシャルを測定したところ、DMTS-P1 濃度が高いものはポテンシャルも高い傾向がみられたが、DMTS-P1 が平均的な濃度であっても DMTS 生成ポテンシャルが極端に高いものがみられた。なお、DMTS-P1 が最も低かった純米吟醸 1 は古酒であった。この試料は 70℃ 1 週間の貯蔵により DMTS が減少したため、ポテンシャルがマイナスの値となった。

ワイン¹¹⁾やビール¹²⁾中にも DMTS が存在することが報告されている。そこで市販ワインおよびビール系飲料の DMTS-P1 の定量を行った (Fig. 5)。ワイン中

Fig. 4 Concentration of DMTS-P1 and DMTS producing potential of commercial sake.

Fig. 5 Concentration of DMTS-P1 and DMTS producing potential of commercial wine and beer.

の DMTS-P1 濃度は清酒に比べると低いものが多かった。濃度が高い 2 点（赤ワイン 3 および白ワイン 5）は亜硫酸無添加ワインであった。DMTS 生成ポテンシャルについても高い値のものがあつたが、DMTS-P1 濃度との間に相関はみられなかった。ビール系飲料の DMTS-P1 濃度は全般的に低く、概ね 0.1 mg/L 以下であつた。また、DMTS 生成ポテンシャルも清酒よりかなり低かつた。平均値を比較すると、ビール系飲料の DMTS-P1 濃度は清酒の約 1/6、DMTS 生成ポテンシャルは約 1/100 であつた。

3. 各種酵母による DMTS-P1 生成試験

上記の結果から、清酒はワインやビールといった他の醸造酒に比べて DMTS-P1 濃度が高い傾向がみられた。DMTS-P1 の生成には酵母が関与することから、各酒類に使用される酵母の違いが DMTS-P1 濃度の違いの一因である可能性が考えられた。そこで、各種醸造用酵母を同一条件で培養し、DMTS-P1 の生成を調べることにした。

試験に先立って、まず清酒酵母 K701 を麴エキスイ培地で 30℃、15℃ で培養し、増殖と培養液中の DMTS-P1 濃度の経時変化を調べた (Fig. 6)。DMTS-P1 濃度は経時的に増加したが、増殖よりはやや遅れて 30℃ では 3 日から 5 日の間、15℃ では 10 日から 15 日の間に大きく増加し、その後の増加は緩やかであつた。培養温度を比較すると、30℃ 7 日間培養後の DMTS-P1 濃度は 15℃ 30 日培養後の約 3 倍であつた。また、酵母菌体中の DMTS-P1 含有量を調べるため、30℃ で 7 日間培養した菌体を 70% 過塩素酸で処理し、過塩素

酸抽出液中の DMTS-P1 を分析した。その結果、菌体抽出液中からは DMTS-P1 はほとんど検出されず、DMTS-P1 の大部分は酵母菌体外に存在すると考えられた。

次に、清酒、ワイン、ビール用酵母を麴エキスイ培地で 30℃ 7 日間培養し、DMTS-P1 の生成を調べた。その結果、Fig. 7 に示すように清酒酵母はビール、ワイン酵母に比べて DMTS-P1 生成量が有意に多かつた。清酒酵母の中では K7、K701 が K901 に比べて生成量が多かつた。また、麴エキスイ培地の代わりに YPD 培地で K701、ビール酵母、ワイン酵母を培養した場合、増殖、DMTS-P1 生成量ともに麴エキスイの場合よりも

Fig. 7 Production of DMTS-P1 by sake, wine, and beer yeast (means $\pm$ S.D., $n = 3$). Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ by Student's t -test.

Fig. 6 Changes in the concentration of DMTS-P1 and growth of yeast in koji extract at 30℃ and 15℃ (means $\pm$ S.D., $n = 3$).

増加したが、麴エキスと同様に清酒酵母で DMTS-P1 生成量が多い傾向がみられた。

4. 清酒製造工程での DMTS-P1 の消長

DMTS-P1 は清酒の発酵中に増加することを既に報告しているが⁶⁾、上槽後の変化については検討していなかった。また、上記の培養試験から、DMTS-P1 の生成に温度が大きく影響を及ぼすことが示唆された。そこで、仕込みの最高温度を 15℃（条件 1）および 10℃（条件 2）の二通りに設定して小仕込み試験を行い、発酵中、上槽後、および火入れ前後の DMTS-P1 および DMTS 生成ポテンシャルの消長を調べた。

もろみ中での DMTS-P1 濃度の経時変化を Fig. 8 に示した。条件 1, 2 いずれにおいても発酵にともなって増加し、発酵終了に近づくとはほぼ横ばいとなった。一方、DMTS 生成ポテンシャルは発酵後半で大きく

増加し、上槽時まで増加し続けた。上槽後火入れまでの生酒期間中には、DMTS-P1、DMTS 生成ポテンシャルともに増加する傾向がみられた（Fig. 9）。特に条件 1 では、いずれも危険率 1% で有意差がみられた。火入れの前後では、DMTS-P1、DMTS 生成ポテンシャルともに大きな変化はみられなかった。

考 察

DMTS-P1 の分析は、これまでは試料ごとに回収率を求める必要があり煩雑であったが、SIDA 法を採用することで比較的簡単に分析できるようになった。この方法を用いて市販清酒の DMTS-P1 濃度の測定を行い、あわせて DMTS 生成ポテンシャルの測定を行った。その結果、DMTS-P1 濃度が高いもので DMTS 生成ポテンシャルも高い傾向はみられたが、DMTS-

Fig. 8 Changes in the CO₂ emission, concentration of DMTS-P1, and DMTS producing potential during fermentation. ◆ : condition 1 (maximum temperature 15℃), □ : condition 2 (maximum temperature 10℃)

□ : just after filtration, ▒ : before pasteurization, ■ : after pasteurization

Fig. 9 Changes in the concentration of DMTS-P1 and DMTS producing potential after filtration of sake (means ± S.D., n = 3). **: significantly different at $p < 0.01$, *: significantly different at $p < 0.05$.

P1 が平均的な濃度でもポテンシャルが極端に高いものがあつた (Fig. 4)。このことは、DMTS-P1 以外にも DMTS の生成に関与する成分が存在することを示している。最近沖森らは、上槽前の酵母のメチレンブルー染色率と上槽後の清酒の DMTS 生成ポテンシャルの間に相関がみられること、酵母内容物を清酒に添加すると DMTS 生成ポテンシャルが増大することを報告している¹³⁾。一方、本研究の酵母の培養試験の結果、DMTS-P1 の大部分が培養液中に存在することが示唆され、また、清酒小仕込試験では、酵母の死滅率が上昇すると思われるもろみ末期において、もろみ中の DMTS-P1 濃度はほぼ横ばいで推移した (Fig. 8)。これらの結果から、酵母の死滅と DMTS-P1 の生成は独立の現象と考えられる。我々はこれまでに、DMTS-P1 から DMTS への変換効率は清酒によって異なること⁶⁾、また、DMTS-P1 以外にも DMTS 前駆体が存在すること⁴⁾を報告している。これらの成分の解明および酵母の死滅との関係については今後の課題である。

「古酒」と表示されている市販清酒の DMTS-P1 の測定を行ったところ、測定試料の中では最も濃度が低かった。この試料には貯蔵試験前から DMTS が検出されたことから、DMTS-P1 から DMTS への反応がすでに進行していたと考えられる。一方、この試料を 70℃で 1 週間貯蔵すると DMTS 濃度は減少した。貯蔵試験は密閉条件で行っており揮発の可能性は低いので、DMTS がさらに別の物質に変換された可能性が考えられる。ブロッコリの加熱調理工程では、S-methylcysteine sulfoxide から DMTS が生成し、さらに DMTS と dimethyl sulfide とが反応して 2,3,5-trithiahexane が生じるというメカニズムが考えられている¹⁴⁾。清酒の場合も、共存する成分によっては類似の反応が起こるのかもしれない。

市販ワインおよびビール系飲料の分析の結果、DMTS-P1 は検出されたが、清酒と比較すると低濃度であり、特にビール系飲料の濃度は低かった (Fig. 5)。清酒、ワイン、およびビール酵母を同一条件で培養し、DMTS-P1 生成量を比較すると、清酒酵母>ワイン酵母>ビール酵母の順であつたことから (Fig. 7)、清酒の DMTS-P1 濃度が高い原因の一つに酵母の DMTS-P1 生成能が影響していると考えられた。一方、市販ワインの中には DMTS-P1 濃度が比較的高いものもみ

られた。今回調べたワイン酵母は 1 種類のみだが、ワイン酵母の中にも DMTS-P1 生成能が高いものが存在する可能性が考えられる。DMTS 生成ポテンシャルについては、ビール系飲料は清酒に比べて非常に低かつたが、ワインでは比較的高いものもみられた。しかし、ワインの DMTS-P1 濃度と DMTS 生成ポテンシャルとの間には相関はみられなかった。ワインでは、シュール・リーのように意図的に酵母の自己消化行う場合があり、酵母内容物等の影響がより大きい可能性がある。

DMTS-P1 の生成には培養温度が大きく影響し、温度が高いほど増加した。麹エキスによる培養試験では 30℃で 15℃の約 3 倍 (Fig. 6)、清酒小仕込試験では 15℃で 10℃の約 1.5 倍 (Fig. 8)、DMTS-P1 が多く生成した。DMTS 生成ポテンシャルについても、15℃では 10℃の 4 倍程度高くなった。したがって、DMTS 生成を制御するためにはもろみの温度管理も一つの重要なポイントと考えられる。

生成酒の DMTS-P1 濃度は、上槽から火入れまでの間に 3～5 割程度増加した (Fig. 9)。増加の理由の一つとしては、DMTS-P1 生成に関与する酵素が生酒中でも機能した可能性が考えられる。一方、発酵後期のもろみ中の DMTS-P1 濃度はほぼ一定であることから、上槽後の酸化的環境の影響も考えられる。メチオニンなどのスルフィド化合物は、過酸化水素等で容易に酸化され、スルフォキサイドを生じることが知られている¹⁵⁾。DMTS-P1 の詳細な生成機構についてはまだ不明な部分が多いが、酵母の酵素反応ではスルフィドの形 (1,2-dihydroxy-5- (methylthio) pentan-3-one) で合成され、その後非酵素的にスルフォキサイド (1,2-dihydroxy-5- (methylsulfinyl) pentan-3-one, DMTS-P1) へ変化する可能性も考えられる。DMTS-P1 の生成にメチオニン再生経路が関与することは明らかとなっているが⁵⁾、メチオニン再生経路のどの化合物から DMTS-P1 が生成するのかはまだ不明である。DMTS-P1 の直接の前駆体の構造を明らかにできれば、DMTS-P1 生成機構の全体像が明確になると思われる。

要 約

SIDA 法による DMTS-P1 分析方法を設定した。メチル基を 3 つの重水素で標識した DMTS-P1-*d*₃ を内部標準物質として用いることで、回収率は 100±10%

程度となった。この方法を用いて市販清酒、ワイン、ビール系飲料の分析を行ったところ、清酒は他の酒類に比べて DMTS-P1 濃度が高い傾向がみられた。酵母の培養試験から、清酒酵母はワイン、ビール酵母に比べて DMTS-P1 生成能が高いことが示唆された。DMTS-P1 と DMTS 生成ポテンシャルとの関係については、清酒では相関がみられたが、DMTS-P1 濃度が低くても DMTS 生成ポテンシャルの高いものもみられた。また、ワインでは相関がみられず、DMTS-P1 以外の成分の関与が示唆された。清酒小仕込み試験を行い DMTS-P1 の消長を調べたところ、発酵に伴って増加したが、生酒期間にもやや増加がみられた。発酵温度が高いと DMTS-P1 濃度、DMTS 生成ポテンシャルともに増加した。

謝 辞

合成を受託していただきました株式会社ケミカルソフト開発研究所、ビール酵母を分譲していただきました酒類総合研究所水野部門長、LC-MS 分析方法をご教授くださいました徳岡昌文博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 高橋康次郎：醸協，**75**，463-468（1980）。
- 2) 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）。
- 3) 宇都宮仁，磯谷敦子，岩田博：醸協，**105**，106-115（2010）。
- 4) Isogai, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Nishimura, T., Iwata, H., Goto-Yamamoto, N.: *J. Agric. Food*

Chem., **57**, 189-195（2009）。

- 5) 若林興，磯谷敦子，渡辺大輔，藤田晃子，須藤茂俊：第 63 回日本生物工学会大会講演要旨集，65（2011）。
- 6) Isogai, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Iwata, H., Sudo, S.: *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7756-7761（2010）。
- 7) MARSILI, R. (editor) : Flavor, fragrance, and odor analysis (Marcel Dekker, Inc., New York /Basel), 179-185（2002）。
- 8) Sen, A. and Grosch, W.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **192**, 541-547（1991）。
- 9) Chattopadhyay, M.K., Tabor, C.W., Tabor, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 203-207（2006）。
- 10) 難波康之祐，小幡孝之，萱島進，山崎与四良，村上光彦，下田高久：醸協，**73**，295-300（1978）。
- 11) Guth, H.: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3022-3026（1997）。
- 12) Gijs, L., Chevance, F., Jerkovic, V., Collin, S.: *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5612-5616（2002）。
- 13) 沖森祐太，西堀菜穂子，藤井力，佐々木慧，金井宗良，磯谷敦子，神田涼子，後藤奈美，山田修：日本農芸化学会 2012 年度（平成 24 年度）大会講演要旨集，688（2012）。
- 14) Bredie, W. L. P. and Petersen, M. A. (editor) : Flavour Science: Recent Advances and Trends (Elsevier B. V.), 309-314（2006）。
- 15) Mashima, R., Nakanishi-Ueda, T., Yamamoto, Y.: *Anal. Biochem.*, **313**, 28-33（2003）。