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

大 場 俊 輝・高橋康次郎*・飯 田 修 三
北本勝ひこ・佐 藤 信・難波康之祐
(国税庁醸造試験所)

昭和 56 年 3 月 25 日受理

Flavor Changes During *Saké* Aging(Part 20) Analyses of Medium- and High-Boiling Sulfur Volatiles in *Saké*

Toshiteru OHBA, Kojiro TAKAHASHI, Shuzo IDA, Katsuhiko KITAMOTO,
Shin SATO, and Yasunosuke NAMBA
(Notional Research Institute of Brewing)

緒 言

揮発性硫黄化合物は、一般に閾値が非常に低いため清酒の香気に影響をもつと考えられ、硫化水素 (H_2S)、メルカプタン類については古くから研究されている¹⁾。清酒の熟成による低沸点硫黄化合物の変化については、新酒ではメチルメルカプタン (MeSH) が主体で、古酒になるとジメチルジスルフィド ($\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$) が新たに生成されること²⁾、清酒の日光臭に MeSH が関係していること³⁾、また、古米を使用した清酒の古米酒臭の本体はジメチルスルフィド ($\text{CH}_3\text{-S-CH}_3$) であること⁴⁾が明らかにされている。しかしながら、清酒中の中高沸点硫黄化合物についての報告はないので、本報は、清酒の熟成による中高沸点硫黄化合物について、炎光光度検出器付ガスクロマトグラフ (FPD) を用い検討した。

実 験 方 法

1. 試料清酒

新酒は当所試醸原酒生酒 A を、古酒としては生酒 A を 40°C で 2 ヶ月貯蔵したものを用いた。

2. クロロホルム抽出による清酒中の中高沸点硫黄化合物の分析法

第 1 図に示したように、アルカリ側ならびに酸性側において、清酒をクロロホルムで抽出し、 $4\mu\text{l}$ をガスクロ

マトグラフに注入して分析を行った。

3. 麹汁中の中高沸点硫黄化合物の分析法

麹 500g に水 1.5l を加え、 55°C で 6 時間糖化後、糖化液 500 ml を第 1 図に準じてクロロホルム 600 ml で各 2 回抽出した。

4. 酵母培養液中の中高沸点硫黄化合物の分析法

(i) 培地: Atkin 改変培地⁵⁾の各 N 源をカザミノ酸 (5g/l)、メチオニン (4.47g/l)、システイン塩酸塩 (5.77g/l)、シスチン (3.6g/l) に変えて行った。(ii) 酵母: 協会 7 号泡なし酵母 701 号を用いた。(iii) 培養: 静置培養は 25°C 、7 日間、振とう培養は坂口コルベンにて 25°C 、4 日間培養した。(iv) 抽出: 第 1 図に準じて培養ろ液をクロロホルムで抽出した。静置培養では 500ml、振とう培養では 100 ml の各培養ろ液を試料とした。

第 1 図 清酒中の中高沸点硫黄化合物の分析法

* 現在、仙台国税局鑑定官室

5. ピークH物質の分離精製

(i) 培養液：メチオニンをN源とした振とう培養ろ液3lをAmberlite XAD-2 (200ml, ϕ 2.5cm)のカラムに流し、水でカラムを十分洗滌後、吸着区分を60%エタノール、次いで水1lで溶出し、溶出区分を約40°Cで減圧濃縮し、さらに、シリカゲル(Mallinckrodt社製 silicic acid, 20g, ϕ 2cm)カラムクロマトグラフィー^{6,7)}を行った。展開溶媒はヘキサン：エーテル系各100mlを用い、ヘキサン60%溶出区分約100mlを減圧乾固し、エタノール1mlを加え、薄層クロマトグラフィー(TLC)の試料とした。TLCは、アビセルSFを用い、イソプロパノール：アンモニア：水(8:1:1)を展開溶媒として行った。精製はFPD-GCのRtおよび塩化白金酸の呈色反応で追跡し、Rf 0.6~0.7の区分をかき取り、エタノールで溶出し、約1mlに濃縮し、GLCの試料とした。(ii) 清酒：生酒A 500mlをpH 9.5に調製し、クロロホルム500mlで2回抽出後、クロロホルム層を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。シリカゲル10g(ϕ 2cm)を用い、クロロホルム-n-ブタノール系で溶出した。クロロホルム100%溶出区分を濃縮乾固し、エタノール1mlを加えGLCの試料とした。

6. ガスクロマトグラフィーの条件

FPD……機種：日立063型FPD付、充てん剤：10% Carbowax 20M/Diasolid L, 60~80メッシュ、カラム：2m $\times$ 3mm ϕ ステンレスカラム、注入口および検出器温度：200°C、カラム温度：150°C、キャリアーガス(N₂)流量：33 ml/min、感度 10³ $\times$ 32~10³ $\times$ 256

FID……機種：日立K53型、充てん剤：10% Carbowax 20M/Diasolid L, 60~80メッシュ、カラム：1m $\times$ 3mm ϕ ステンレスカラム、注入口および検出器温度：250°C、カラム温度：150°C、キャリアーガス(N₂)流量：0.8 kg/cm²、H₂ガス流量：0.6 kg/cm²、空気流量：2.0 kg/cm²

7. ガスクロマトグラフィー・マスマスペクトロメトリ(GC-MS)の条件

機種：Jasco-Finigan 1015D, 充てん剤：10% Carbowax 20M/Diasolid L, 60~80メッシュ、カラム：1m $\times$ 1/8インチ ϕ 、注入口温度：200°C、カラム温度：100 or 120°C、イオン化電圧：75 eV

結果ならびに考察

1. 新酒および古酒中の硫黄化合物の検索

新酒および古酒のクロロホルム抽出物をFPD-GCで分析したときのガスクロマトグラムを第2図に、各ピークのリテンションタイム(Rt)を第1表に示し

第2図 FPD-GCにおけるガスクロマトグラム
(古酒, クロロホルム pH 9.5 抽出) サンプル量: 4 μ l, 感度: 10³ $\times$ 32

第1表 新酒および古酒のガスクロマトグラム(FPD)におけるリテンションタイムとピーク高さ

ピーク No.	Rt (min)	ピーク高さ (cm)			
		新 酒		古 酒	
		pH 9.5	pH 2.0	pH 9.5	pH 2.0
A	1.7	2.3	20.0	0.7	0.3
B	3.0	1.5	0.8	0.3	0.6
C	3.6	0.1		6.9	
D	5.1	0.2		0.8	0.2
E	5.9	4.7	21.6	0.6	
F	7.6	1.5		0.3	
G	13.4	0.4	0.6		
H	15.2	26.0	0.4	0.3	

サンプル量: 4 μ l, 感度: 10³ $\times$ 32

た。8個のピークが検出されたが新酒ではピークA, E, Hのピーク強度が大きく、これらのピークは古酒では減少し、ピークCが増加した。ピークA, E, H物質は麹菌あるいは酵母の代謝生産物であり、ピーク7 C物質は清酒の貯蔵中に化学変化によって生成される物質であると推定された。

2. 清酒中の各ピーク物質の由来

清酒で検出された各ピーク物質が清酒製造工程のどこに由来するかを知るために、麹糖化液ならびに酵母培養中の硫黄化合物を検索した。麹糖化液のガスクロマトグラムにおけるRtとピーク強度を第2表に示した。ピークE物質は、麹菌の代謝生産物と推定された。また、Atkin 改変培地のN源を変え静置培養を行った酵母培養

第2表 麹糖化液中の硫黄化合物の検索

ピーク	Rt (min)	ピーク高さ (cm)	
		pH 9.5	pH 2.0
A	1.7	0.2	13.6
B	3.0		
C	3.6	0.2	
D	5.1		
E	5.9	3.6	30.2
F	7.6		
G	13.4		
H	15.2	2.2	

サンプル量: 4 μ l, 感度: 10³ $\times$ 128

第3表 酵母培養液中の硫黄化合物の検索（静置培養）

ピーク	Rt (min)	ピーク高さ (cm)							
		カザミノ酸		メチオニン		システイン		シスチン	
		pH 9.5	pH 2.0	pH 9.5	pH 2.0	pH 9.5	pH 2.0	pH 9.5	pH 2.0
A	1.7	スケールアウト	2.6	7.9	104.0	0.6		2.4	1.4
B	3.0		4.2	10.2	20.0	1.1	0.7	6.4	2.2
	3.3	4.1				0.8			
C	3.6	1.8	1.1	1.1		2.1		4.8	1.6
D	5.1	1.3							
E	5.9	3.1	1.3	2.2	108.0	0.4	1.8		4.5
F	7.6		0.5	1.5					
	8.7	1.0		2.6					
	10.5						0.3		1.0
	11.2					0.3		30.8	
G	13.4		0.6					1.6	
H	15.3			スケールアウト					
	20.2			1.0					

サンプル量：4 μ l, 感度： $10^3 \times 32$

液中の硫黄化合物を検索した結果を第3表に示した。各ピークのピーク強度から、ピークA物質はカザミノ酸およびメチオニンに、ピークB, E, H物質はメチオニンに、清酒に検出されなかった Rt 11.2 min の物質はシスチンに由来する酵母の代謝生産物と考えられた。林部ら⁸⁾は、酵母のメチオニン代謝生産物としてメチオノール(3-methylthiopropanol)を報告しているため、ピークB, E, H物質のいずれかがメチオノールと推定された。なお、ピークE, H物質はメチオニンをN源として振とう培養した培養液中にも著量生産された。

3. ピークH物質の同定

メチオニンをN源とした酵母培養液を試料とし、Amberlite XAD-2 カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび TLC かき取りで FPD-GC における Rt 15.3min のピークH物質を分離精製し GC-MS を行った。新酒では、pH 9.5 におけるクロホルム抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離精製し、GC-MS の試料とした。第3図に示したマススペクトルの結果からピークH物質は、メチオノールと同定した。なお、新酒で検出されたピークE物質は、Authentic 硫黄化合物の Rt との比較から、メチオノールの可能性がある。

4. 清酒中メチオノールの閾値

モレキュラー・シービング・カーボン を 500 ppm 使用し老香を除いた古酒に、メチオノールを溶解し、清酒中でのメチオノールの閾値を測定した。官能検査は、極限法、パネル6名で行った。鼻でかい場合の上閾は 1.88 ppm, 下閾は 1.41 ppm, 主観的等価値(閾値)は 1.65 ppm であり、口に含んだ場合の上閾は 2.81 ppm, 下閾は 2.97 ppm, 主観的等価値は 2.89 ppm であった。口に含んだ場合の閾値が高いのは、口に含んだ場合、清

第3図 メチオノールのマススペクトル^{9,10)}

第4表 Authentic 硫黄化合物と清酒中のピーク物質との Rt の比較

物質名	Rt (min)	
	FPD	FID
メチオノール (MW 104) <chem>CH3SCH2CH2CHO</chem>	5.9	4.6
ジメチルスルホキシド (MW 78) <chem>(CH3)2SO</chem>	11.0	8.3
メチオノール (MW 106) <chem>CH3SCH2CH2CH2OH</chem>	15.3	10.3
ジメチルスルホン (MW 94) <chem>(CH3)2SO2</chem>	36.5	26.5
清酒中のピーク C	3.6	—
E	5.9	—
H	15.3	10.3

酒中の他の香味に影響されるためと推定した。古米酒臭の DMS の閾値 8.4 ppb⁴⁾と比較するとメチオノールの閾値は非高に高い。この原因は、メチオノールが高沸点

硫黄化合物であるためと考えられる。なお、メチオノールの香りは、濃い場合にはメチオニン臭、淡い場合には漬物臭（タクワン臭）を呈した。

メチオノールは、1936年赤堀ら¹¹⁾によって、醤油香氣成分の一つとして分離され、醤油に芳醇な香気を与え、醤油独特の香氣成分であると述べ¹²⁾、一方、小幡ら¹³⁾は醤油の悪臭の原因をなすと指摘した。また、Nunomuraら¹⁴⁾は、醤油の香氣成分をGC-MSで解析してメチオノールを同定し、松井ら¹⁵⁾はビール中には1.4 ppm存在すると報告している。また、メチオノールは、じゃがいも焼酎の特異臭“ヤサイ臭”の原因物質と推定されている¹⁶⁾。

以上の結果から、メチオノールはメチオニンの酵母の代謝生産物であり、新酒に多く含まれ古酒には存在しない。メチオノールは、熟成中に増加するメチルメルカプタン、ジメチルジスルフィドなどに分解するものと考えられる。メチルオールの香りおよび閾値から考えると、漬物臭のする新酒は殆んどないで、清酒中の含量は閾値以下と推定される。今後、メチオノールの清酒中での含量を測定するとともに他の中高沸点硫黄化合物についても分離同定を試みる予定ある。

要 約

清酒中の中高沸点黄化合物をFPD-GCで検索し、次の結果を得た。

1) 新酒をクロロホルムで抽出し得た香氣濃縮物を、FPD-GCで分析した結果、8個のピークを検出した。そ

のうち、ピーク強度の一番高いピーク物質をメチオノールと同定した。

2) メチオノールは、新酒に多く古酒になると検出されなかった。

3) メチオノールは、酵母によるメチオニンの代謝生産物であり、清酒中での閾値は鼻でかい場合1.65 ppmであった。香りは、濃い場合にはメチオニン臭、淡い場合には漬物臭を呈した。

終りに、メチオノールを供与下さいました当所第7研究室長西谷尚道博士に深謝致します。

文 献

- 1) 日本醸造協会編：新版醸造成分一覽，p. 92 (1977)
- 2) 佐藤，豊沼，高橋，小池：醸協，70，588 (1975)
- 3) 佐藤，豊沼，高橋，小池：醸協，70，592 (1975)
- 4) 高橋，大場，高木，佐藤，難波：醸工，57，148 (1979)
- 5) 吉沢：醸協，61，951 (1966)
- 6) C. S. Marvel and R. D. Rands: J. Am. Chem. Soc., 72, 2642 (1950)
- 7) W. A. Bulen, J. E. Varner and R. C. Burrell: Anal. Chem., 24, 187 (1952)
- 8) 林部，河東田，大和田，吉田，片寄，寺島：醸工，48，22 (1970)
- 9) P. Scheier und F. Drawert: Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 154, 27 (1974)
- 10) S. R. Heller and G. W. A. Milne: EPA/NIH Mass Spectral Data Base, Vol. 1, p. 110 (1978)
- 11) 赤堀，金子：日化，57，832 (1936)
- 12) 赤堀，金子：日化，58，236 (1937)
- 13) 小幡，山西：農化，24，226，334 (1950/51)
- 14) N. Nunomura, M. Sasaki, Y. Asao and T. Yokotsuka: Agric. Biol. Chem., 40, 485 (1976)
- 15) 松井，天羽：農化，54，629 (1980)
- 16) 西谷：醸工，投稿中