

本格焼酎の香味形成の差異に及ぼす  
タイプ別麴菌の醸造学的特性とその応用

白石 洋平

2017 年

## 目次

	頁
<b>第 1 章 緒論</b>	<b>1</b>
第 1 節  日本の国菌である麴菌	1
第 2 節  醸造食品と麴, 種麴	2
第 3 節  焼酎の歴史と現状	3
第 4 節  芋焼酎におけるこれまでの研究動向	6
第 5 節  本論文の研究目的とその内容	7
参考文献	9
<b>第 2 章 プロテアーゼ剤添加における芋焼酎への影響</b>	<b>13</b>
第 1 節  緒言	13
第 2 節  実験方法	15
2-2-1. 酵素剤	15
2-2-2. 使用原料, 菌株及び製麴条件	15
2-2-3. 芋焼酎の小仕込み	15
2-2-4. 蒸留	15
2-2-5. 二次醪及び焼酎の分析	16
2-2-6. 焼酎の官能評価	17
2-2-7. 焼酎香气成分の GC-MS 解析	17
2-2-8. モデル醪及び焼酎の作製	17
第 3 節  実験結果及び考察	19
2-3-1. プロテアーゼ剤の選抜	19
2-3-2. プロテアーゼ剤を併用した小仕込み試験	19
2-3-3. 酵素剤添加の芋焼酎の香气分析	24
2-3-4. 酵素剤を用いて作製した芋焼酎の官能評価	29
2-3-5. アルデヒド類生成に及ぼすアミノ酸と還元糖の影響	29
第 4 節  要約	33
参考文献	34

第 3 章 プロテアーゼ活性の高い黒麹菌の選抜と焼酎の酒質	36
第 1 節 緒言	36
第 2 節 実験方法	37
3-2-1. 黒麹菌選抜(一次選抜)	37
3-2-2. 黒麹菌選抜(二次選抜)	37
3-2-3. PCR による糸状菌株の <i>A. luchuensis</i> 簡易判別	38
3-2-4. 選抜株製麴	39
3-2-5. 麴の麴酸度及び酵素活性の測定	39
3-2-6. 芋焼酎の小仕込み	42
3-2-7. 蒸留	42
3-2-8. 二次醪及び焼酎の分析	42
3-2-9. 焼酎香气成分の GC-MS 解析	43
3-2-10. 焼酎の官能評価	43
第 3 節 結果及び考察	45
3-3-1. プロテアーゼ活性の高い黒麹菌の一次選抜	45
3-3-2. プロテアーゼ活性の高い黒麹菌の二次選抜	47
3-3-3. PCR による糸状菌株の <i>A. luchuensis</i> 簡易判別	49
3-3-4. 高プロテアーゼ黒麹菌選抜株麴の麴酸度と酵素活性	51
3-3-5. 黒麹菌選抜株麴を用いた芋焼酎醪と芋焼酎	54
3-3-6. 黒麹菌選抜株麴を用いた芋焼酎醪のアミノ酸組成	57
3-3-7. 黒麹菌選抜株麴を用いた芋焼酎の香气成分解析	59
3-3-8. 選抜株を用いた芋焼酎の官能評価	61
第 4 節 要約	64
参考文献	66
第 4 章 焼酎に含まれる麴が関与する主要な揮発成分	69
第 1 節 緒言	69
第 2 節 実験方法	71
4-2-1. 使用菌株と酵素剤	71

4-2-2. 米麴の製麴	71
4-2-3. 米麴焼酎	71
4-2-4. 酵素焼酎	72
4-2-5. アルコール発酵経過観察	72
4-2-6. 醪の蒸留	72
4-2-7. Large volume static headspace(LVSH)サンプリング	72
4-2-8. GC-MS/olfactometry	72
4-2-9. 質量分析	73
4-2-10. Aroma extract dilution analysis (AEDA)	73
4-2-11. 官能評価試験	73
第3節 結果及び考察	76
4-3-1. 米麴焼酎と酵素焼酎の調製	76
4-3-2. 米麴焼酎と酵素焼酎の香気の特徴	76
4-3-3. GC-MS/O と AEDA	79
4-3-4. 定量化と OAV	81
第4節 要約	82
参考文献	84
<b>第5章 麴菌菌種別芋焼酎の酒質及び香気成分の差異</b>	<b>87</b>
第1節 緒言	87
第2節 実験方法	88
5-2-1. 製麴	88
5-2-2. 麴の麴酸度及び酵素活性の測定	88
5-2-3. 芋焼酎の小仕込み	90
5-2-4. 蒸留	90
5-2-5. 二次醪及び焼酎の分析	90
5-2-6. 焼酎の官能評価	91
5-2-7. 焼酎香気成分の GC-MS 解析	91

第3節 実験結果及び考察	96
5-3-1. 各種種麴を用いた製麴と麴の酵素活性	96
5-3-2. 各麴を用いた小仕込み試験と蒸留	99
5-3-3. 一次醪及び二次醪のアミノ酸組成及び濃度	104
5-3-4. 一次醪及び二次醪の有機酸組成及び濃度	107
5-3-5. 各麴を用いた芋焼酎の官能評価	111
5-3-6. 各麴を用いた芋焼酎の GC-MS 解析と香気成分	115
第4節 要約	124
参考文献	126

第6章 総括及び結論	130
------------	-----

謝辞

本論文に関する報文

## 第 1 章 緒論

### 第 1 節 日本の国菌である麴菌

我が国では、「国花」は桜と菊(広辞苑より)、「国鳥」はキジ(1947年に日本鳥類学会により選定)、「国蝶」はオオムラサキ(1957年に日本昆虫学会が指定)、「国石」は翡翠(2016年に日本鉱物科学会が選定)とされている。様々な国を代表する、または象徴とする動植物やものが選ばれている中で、微生物には「国菌」が存在しており、このことは世界的にも稀なことである。

我が国の「国菌」は麴菌であり、2006年に日本醸造学会において認定された<sup>1)</sup>。古くから行われてきた醸造をはじめ多くの食品に用いられ、誕生から100年以上が経過した現在でも製造されている高峰譲吉博士が開発したタカジアスターゼも麴菌によって造られたものである。「国菌」認定時の宣言には菌株の範囲が設けられている。我が国で醸造及び食品に利用されている糸状菌を指し、1)和名を黄麴菌と称する *Aspergillus oryzae*, 2)黄麴菌(オリゼー群)に分類される *A. sojae* と黄麴菌の白色変異株, 3)黒麴菌に分類される *A. luchuensis* 及び黒麴菌の白色変異株である白麴菌 *A. luchuensis* mut. *kawachii* と定められている。クエン酸や酵素産業等で利用されている *A. niger* は黒麴菌とは異なる菌種であり、麴菌には含めないとされている。

これらの国菌に定められている麴菌は2000年以降に急速に遺伝子解析も進み、2005年に *A. oryzae*<sup>2)</sup>, 2011年に *A. sojae*<sup>3)</sup>及び *A. luchuensis* mut. *kawachii*<sup>4)</sup>, 2016年に *A. luchuensis*<sup>5)</sup>で全ゲノム解読も行われ、ゲノム情報も公開されている。これら遺伝子情報公開によって、最も早く公開された *A. oryzae* では飛躍的に研究及び研究者も増え成果が出ている。今後、*A. luchuensis* 等の菌株においても同様のことが起きると考えられる。また、麴菌には近縁種にカビ毒を生産する糸状菌が存在しており、安全性に関する研究も盛んに行われ、黄麴菌のアフラトキシン合成遺伝子の欠損及び非生産<sup>6-9)</sup>, 黒麴菌におけるオクラトキシンの非生産<sup>10)</sup>, 黒麴菌及び白麴菌のフモニシンの非生産<sup>11)</sup>が証明されている。

## 第2節 醸造食品と麴，種麴

麴菌は和食にとって必要不可欠な存在である。2013年12月に和食及び日本人の伝統的な食文化がユネスコ無形文化遺産に登録されたことにより，世界的に日本の食文化は認知され，注目されている。我が国の食文化を語る上で，醸造製品は欠かすことが出来ないもののひとつである。それら醸造製品の酒，味醂，味噌，醤油，食酢には必ず「麴」が使用されている。それぞれの醸造製品において，酒類では「一麴，二酛，三造り」，味噌は「一麴，二焚き，三仕込み」，醤油は「一麴，二搾，三火入れ」と経験的に言われ，麴の出来はそれらを醸造する上で最も重要であるとされている。

麴の歴史は古く，奈良時代に「播磨国風土記」の中で「大神の御糧 沾みかれいぬれてかび黴生えき，すなはち，酒を醸かもさしめて，庭酒に献りて宴しき」との記述があり，これが初めて米麴を用いた酒造りの記述である<sup>12)</sup>。この時の麴は，神饌にカビが生育してそれを用いて酒が出来たというもので，自然発生的であったと考えられる。平安時代には「延喜式」の「造御酒槽法」には「よねもやし藁」を用いて酒を仕込んだとされている。ここでの「よねもやし藁」は現在の「麴」のことである。その後，室町時代には種麴が発明された。種麴とは蒸煮米に麴菌を生育させ，大量の胞子が着生したものを乾燥させたものである。室町時代には，種麴を造る際に木灰を添加することで純粋に麴菌を培養する技術が確立された。木灰の添加は，蒸煮米をアルカリ性にして雑菌の繁殖を防ぐこと，表面の粘り気を無くし微量の金属(ミネラル)を含むため胞子形勢が良くなること，出来た胞子の貯蔵性が良くなることなどの理由が現在では言われている。我が国の麴(散麴)とは異なるものの，糸状菌を用いた麴(餅麴)を用いる国は東アジア諸国に存在する。しかし，散麴や木灰を用いたこの方法は我が国独自のものである。また日本では，450年以上前の室町時代から麴を造る際に，自然発生や友麴法ではなく，スターターとして種麴を用いる概念が存在していたことになる。

このような種麴を用いて作製した麴の醸造製品製造における役割は，

第一に原料の分解である。米、麦、大豆等の穀物原料に対して、麴菌の生産する酵素の作用によって、デンプンはグルコース、タンパク質はアミノ酸に分解される。グルコースやアミノ酸はそれ自体に味があり、麴菌の酵素による原料分解力の強弱は醸造食品の味や品質に影響を与える。清酒や焼酎ではグルコース量に影響する液化酵素及び糖化酵素はアルコール生成に関わる。また、旨味が重要視される味噌や醤油ではタンパク質分解酵素が旨味の基となるアミノ酸の量に関わり、製品に大きく影響を与える。その他に醸造食品中の乳酸菌や酵母の増殖にグルコースやアミノ酸は用いられると同時に、乳酸菌による乳酸発酵や酵母によるアルコール発酵は醸造製品には必須である。第二の役割は、ビタミンや有機酸などの代謝物の供給である。これら麴菌が合成したビタミンなどの代謝物が乳酸菌や酵母の必須栄養素として用いられる。麴菌を中心としてこれらの微生物が共存することで醸造製品に風味を与え、酒類製造ではアルコールが生成される。

### 第3節 焼酎の歴史と現状

日本固有の酒類には、醸造酒の清酒と蒸留酒の焼酎があり、日本全国のそれぞれの地域で発展を遂げてきた。

焼酎は、九州・沖縄地方を主産地として発達し、各地域を代表する農作物を原料とし、各地域の気候風土に合った伝統的な製法で造られてきた。代表的なものは、九州北部では大麦を主原料とした麦焼酎、九州中部では米を主原料とした米焼酎、九州南部ではサツマイモを主原料にした芋焼酎、奄美地方では黒糖を主原料とした黒糖焼酎が多く造られている。焼酎は1477年に沖縄本島でその存在が確認され、540年以上の歴史があり、その技術は琉球から薩摩へ伝わった後、日本全国へ広がっていった<sup>13)</sup>。焼酎の技術は琉球にアジア大陸から伝来した技術であると考えられるが、そのルートの明確なものは不明である。中国では蒸留酒の事を「焼酒」と表記し、日本の「焼酎」とは異なる。また、加藤<sup>14)</sup>は、江戸時代の前半まではほとんど「焼酒」と記し、「焼酎」と記された例は

ごく稀であり、「類聚名物考」に「せうちうは栄酒の転音なり、今世に焼酎と書は当たらず」と記され、「焼酎」は「焼酒」の転字とした説を紹介している。しかし、鹿児島県伊佐市にある郡山八幡神社で発見された「焼酎」の最古の記録は永禄 2 年(1559 年)に書かれたことが明らかであり、書物に記されている以前より、人々のあいだでは「焼酎」という名称で親しまれていたことが考えられる。また、焼酎は古くから飲料以外に医薬用としての側面もある。江戸時代は南蛮渡りの焼酎を「阿刺吉」と通称していたが、「本草綱目」では焼酎よりもアルコール度数が高く、丁字、桂皮や茴香が入っていたとの記述もある。阿刺吉は「本朝食鑑」や「和漢三才図会」にはさしこみ(疝痛)の妙薬とされ、南蛮医学に関する書物にも傷口の消毒に利用されたとされている<sup>14)</sup>。その後、19 世紀に入っても薬用的思想は変わらず、後の薩摩藩士の毛利正直は「移居記」に癖癩に良いとし、十返舎一九の「東海道中膝栗毛」では喜多人が道中の疲れを癒すために足に焼酎を吹きかける描写もある<sup>14)</sup>。このように焼酎は日本人の生活の中で古くから根付き広く重宝されていたと考えられる。

近代における焼酎の歴史を菅間<sup>15)</sup>は以下のように分類している。明治 4-31 年(1871-1898 年)を自家用焼酎製造時代とし、酒造株制度の廃止により、届け出と免許料を納めれば免許鑑札が交付され、自由に酒が造れるようになった。明治 32-43 年(1899-1910 年)は原始共同製造時代とし、自家用焼酎に対する税制上の特典が廃止され、自家用的共同製造場の設置が許可された。しかし、酒販店から必要に応じて焼酎を購入した方が経済的であることから、共同製造場は減少、営業目的の製造場が増加し、製造量の増加と共に市場の混乱を招くようになった。この頃の九州地区の米焼酎は酒母(一次醪)を用いない黄麴による酏型式の仕込み法にて行われており、芋焼酎においても同様どんぶり仕込みであった。明治 44-45 年(1911-1912 年)は改革時代とされ、市場沈静化の意味合いもあり、将来性のない企業の整理が行われ、この 2 年間で鹿児島県は約 70%の製造所が廃業したが、現在の本格焼酎業界発展の基礎を築いたと考えられる。大正 2-4 年(1913-1915 年)は混乱時代とし、企業整理の結果、各

酒造場の生産量は増加し、それに伴い設備の改善や製造方法の改良が実施された。鹿児島県ではこの頃に黒麹菌の使用が普及し、ボイラーの設置や蒸留機の改良も行われた。製造設備の改良、製造原価の低減、需要拡大はあったが、甲類焼酎が市場に加わり、更に九州の焼酎業界は混乱期を迎える。大正 5 年-昭和 43 年(1916-1968 年)は統制時代とし、2 度の大戦による戦時体制による長い統制が続いた。自由化後は生産量増加による販売競争の激化により昭和 29 年に設けられた新たな規定を受けて、製造数量の自主規制が始まり、昭和 43 年まで続いた。そして、昭和 44 年(1969 年)以降を近代化時代と分類している。

その後、本格焼酎は 1970 年代後半と 1980 年代前半に飲み方の提案、すっきりとした味わいの飲みやすい焼酎が牽引役となり、それまで焼酎を飲用していなかった消費者を引き込んだ結果、消費量は増大し製造量は 2 倍強に増加した。平成 14 年(2002 年)から甕貯蔵や檜樽貯蔵などの貯蔵焼酎や黒麹仕込み、特に芋焼酎の消費が飛躍的に増加した。この時期の本格焼酎は「健康志向」、「機能性」などの情報発信や、これまで芋焼酎が持っていた独特の香気を「臭い」ではなく、個性的な「香り」として評価されるようになったことが市場拡大に繋がったと考えられている<sup>16)</sup>。その後、本格焼酎の課税合計数量は平成 19 年(2007 年)の 569 千 KL をピークにやや減少傾向となり、平成 26 年(2014 年)には 11 年ぶりに 500 千 KL を下回った<sup>17)</sup>。

その中で近年はキーワードとして、高級志向、健康志向、嗜好の多様化が考えられる。麦焼酎や泡盛などは長期熟成酒や古酒は海外などへの市場拡大も期待される。健康志向の面では、糖質ゼロ表示などの取り組みの他に、芋焼酎において食事と一緒に飲酒した際に、他の酒類よりも血糖値上昇を抑制することが明らかとなった<sup>18)</sup>。また、焼酎においても嗜好の多様化が進み、近年では低アルコール焼酎や多種のサツマイモを用いた焼酎が支持されるなど、更なる香味や酒質の多様化が求められている。

#### 第4節 芋焼酎におけるこれまでの研究動向

芋焼酎の研究はこれまでに芋焼酎の特徴香や酵母，麴に関する研究が行われている。太田ら<sup>19)</sup>は，柑橘系の香気成分であるモノテルペンアルコールが芋焼酎の特徴的な香気に寄与していることを報告している。また，山本ら<sup>20)</sup>はサツマイモ中に $\beta$ -グリコシド結合型以外のモノテルペン配糖体が存在することを，高峯ら<sup>21)</sup>はサツマイモに含まれるモノテルペン配糖体の分布を明らかにした。その他，バラ様の香気成分の $\beta$ -ダマセノン及びローズオキサイドも同定された<sup>22)</sup>。それぞれの作用機序については， $\beta$ -ダマセノンはYoshizakiら<sup>23)</sup>が、ローズオキサイドについては高峯ら<sup>24)</sup>によって明らかにされている。原料芋の種類での香気成分については神渡ら<sup>25)</sup>によりなされ，紫色の肉質のサツマイモではジアセチル，橙色の肉質のサツマイモでは $\beta$ -イオノンが特徴香であることが報告されている。

焼酎酵母については，焼酎用協会2号と3号，宮崎酵母，熊本酵母，泡盛1号酵母の他に，鹿児島県では1952年に分離された鹿児島酵母<sup>26)</sup>と1960年代後半に分離された鹿児島2号，更に1995年には鹿児島4号酵母及び鹿児島5号酵母が，2006年には鹿児島6号酵母が開発された<sup>27)28)</sup>。宮崎県でも近年，平成宮崎酵母が開発<sup>29)</sup>され，焼酎の香気が多様化に貢献している。更に，芋焼酎独特な風味を和らげる目的で，カナバニン耐性酵母のスクリーニングを行い，イソアミルアルコール及び酢酸イソアミルが従来酵母よりも高生産する酵母も鹿児島県では保有している<sup>30)</sup>。酵母はアルコールを生産すると同時に，カルボニル化合物，高級アルコールとそのエステル，脂肪酸及びそのエステルや硫黄化合物などの香気成分を生成する。香味成分の生成量は発酵条件にもよるが，酵母の種類によって異なる<sup>31)</sup>。酵母が生成する香気成分は焼酎にそのまま移行し，芋焼酎の風味に大きく寄与することから，酒質を決める上で酵母の選択は重要な要素である。

焼酎麴菌においては，麴の原料は主に米を使用している。しかし，酒質の多様化の観点から，サツマイモを麴原料にする取り組みが行われた。

サツマイモを麴原料にする際の最大の問題点は高い水分であるが、適度に水分を調整することで麴菌を生育させることが可能となった<sup>32-34</sup>。この手法を用いることで芋 100%の芋焼酎の製造が可能となったが、酒質に関しては「芋らしい」ものではなく、「すっきり」とした酒質になる。これは、米麴が「芋焼酎らしさ」に寄与していることを意味している<sup>35</sup>。麴自体の揮発成分に着目した研究では、Yoshizaki ら<sup>36</sup>)によって、焼酎用白麴と黒麴、清酒用黄麴及び蒸米を用い揮発成分の比較がなされている。その結果、蒸米のみに検出される香気成分の他に、麴の種類で多く検出される揮発成分は異なっていた。これらの揮発成分は焼酎への直接移行、醪中で酵母に資化や蒸留時の酸と熱による変換等も考えられ、焼酎の香気成分や酒質への関与が考えられる。しかし、麴菌の選抜、育種はクエン酸を高生産する菌株の報告<sup>37</sup>)はあるが、酵母と比較すると実用化の例を含めて非常に少ない。

## 第 5 節 本論文の研究目的とその内容

焼酎を製造する上で、麴菌と酵母の存在は必須である。焼酎においては、酵母はアルコールの生産性向上や香気成分の生産性向上を目的に育種や選抜が盛んに行われ、これまで多くの実用化の例が存在する<sup>26-30</sup>。一方、麴菌においては、麴菌の $\beta$ -グルコシダーゼがサツマイモの配糖体に作用し、芋焼酎の特徴香のひとつであるモノテルペンアルコール生成に関わる報告<sup>19</sup>)はあるが、麴菌の酵素や麴由来の香気成分が芋焼酎の酒質や香気成分に与える影響についての研究は非常に少ない。芋焼酎においては、主に清酒用に用いられてきた *A. oryzae* である黄麴菌を用いた黄麴、沖縄で古くから用いられてきたクエン酸生成能を有する *A. luchuensis* である黒麴菌を用いた黒麴と、その白色変異株とされる *A. luchuensis* mut. *kawachii* である白麴菌を用いた白麴の 3 種類の麴を用いて、商品名にも麴菌の名前の一部を冠し、販売している。一般的に、芋焼酎は黒麴を使用すると濃醇な香味、白麴を使うと黒麴よりも少しマイルドで軽快な香味、黄麴は豊かな味わいを持つ焼酎になると言われて

いる。しかし、この評価は市販酒を対象にしたものであり、麴以外の条件が統一されて製造した焼酎を比較したものではないため、麴菌の種類による酒質の差異を評価しているかは不明である。

そこで本論文では、麴菌及び麴が芋焼酎の酒質に与える影響に着目をして、酒質及び香気成分の変化や違いについて検討した。具体的には、本論文は6章で構成されており、第1章では、麴菌、麴、焼酎の歴史から、焼酎業界の現状と現在までに取り組みられている芋焼酎の酒質の多様化に関する研究動向と本研究の目的について概略した。

第2章では、タンパク質分解酵素であるプロテアーゼの酵素剤を添加して芋焼酎の製造を行い、醪の性状の変化や得られた焼酎の香気成分解析を行い、麴のプロテアーゼと醪中のアミノ酸が酒質に与える影響について検討した。

第3章では、第2章の結果を受けてプロテアーゼ活性の高い黒麴菌株を選抜した。得られた黒麴菌選抜株を用いて芋焼酎の製造を行い、醪の性状や焼酎の香気成分から、菌株のもつ特徴が酒質に与える影響について検討した。

第4章では、米麴、酵母及び水で作製した米麴焼酎と、米麴の代わりに蒸米と酵素剤を用いた酵素焼酎の香気成分解析を行い、米麴が焼酎の香りに及ぼす影響を検討した。

第5章では、黄麴、白麴、黒麴を用いて麴以外は同一条件で芋焼酎の製造を行い、それぞれの酵素活性の違いや菌株の違いから生じる醪の性状、香気成分及び官能評価の差を検討した。

第6章では、上記各論の結果を総括し、本研究の内容をまとめた。

## 参考文献

- 1) 日本醸造学会 : <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
- 2) Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D., W., Galagan, J., E., Nierman, W., C., Yu, J., Archer, D., B., Bennett, J., W., Bhatnagar, D., Cleveland, T., E., Fedorova, N., D., Gotoh, O., H. Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P., R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J., R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., and Kikuchi, H., : *Nature*, **438**(7071), 1157-1161(2005)
- 3) Sato, A., Oshima, K., Noguchi, H., Ogawa, M., Takahashi, T., Oguma, T., Koyama, Y., Itoh, T., Hattori, M., and Hanya, Y., : *DNA Res.*, **18**. 165-176(2011)
- 4) Futagami, T., Mori, K., Yamashita, A., Wada, S., Kajiwara, Y., Takashita, H., Omori, T., Takegawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., and Goto, M., : *Eukaryotic Cell*, **10**, 1586-1587(2011)
- 5) Yamada, O., Machida, M., Hosoyama, A., Goto, M., Takahashi, T., Futagami, T., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Koike, H., Abe, K., Asai, K., Arita, M., Fujita, N., Fukuda, K., Higa, K., Horikawa, H., Ishikawa, T., Jinno, K., Kato, Y., Kirimura, K., Mizutani, O., Nakasone, K., Sano, M., Shiraishi, Y., Tsukahara, M., and Gomi, K., : *DNA Res.*, DOI : 10.1093/dnares/dsw032, 1-9(2016)

- 6) 松島健一朗：日本醸造協会誌, **97**, 559-566(2006)
- 7) 楠本憲一：日本醸造協会誌, **95**, 102-106(2000)
- 8) Tominaga, M., Lee, Y-H., Hayashi, R., Suzuki, Y., Yamada, O., Sakamoto, K., Gotoh, K., and Akita, O., : *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 484-490(2006)
- 9) Akao, T., Sano, M., Yamada, O., Akeno, T., Fujii, K., Goto, K., Ohashi-Kunihiro, S., Takase, K., Yasukawa-Watanabe, M., Yamaguchi, K., Kurihara, Y., Maruyama, J., Juvvadi, P. R., Tanaka, A., Hata, Y., Koyama, Y., Yamaguchi, S., Kitamoto, N., Gomi, K., Abe, K., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kashiwagi, Y., Machida, M., and Akita, O., : *DNA Res.*, **14**,47-57(2007)
- 10) Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., and Mikami, S., : *J. Biosci. Bioeng.*, **112**,233-237(2011)
- 11)橋本ルイコ, 浅野勝佳, 渡嘉敷唯章, 陰地義樹, 廣瀬(安元)美奈, 高良亮, 豊里哲也, 吉野敦, 池端真美, 劉瑩, 久米田裕子, 横山耕治, 高橋治男 : *Mycotoxins*, 63(2), 179-186(2013)
- 12) 小泉武夫：麴カビと麴の話(株式会社光琳, 東京)(1984)
- 13) 菅間誠之助：見なおされる第三の酒(株式会社朝日ソノラマ, 東京)(1975)
- 14) 加藤百一：日本醸造協会誌, **60**, 481-485(1965)
- 15) 菅間誠之助：日本醸造協会誌, **70**, 765-770(1975)
- 16) 高峯和則, 鮫島吉廣：日本醸造協会誌, **103**, 601-606(2008)
- 17) 国 税 庁：酒のしおり, 平成 28 年 3 月  
<https://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gaikyo/shiori/2016/pdf/005.pdf>
- 18) Kido, M., Asakawa, A., Koyama, K., Takaoka, T., Tajima, A., Takaoka, S., Yoshizaki, Y., Okutsu, K., Takamine, K., Sameshima, Y., and Inui, A. : *PeerJ* 4:e1853; DOI

10.7717/peerj.1853

- 19) 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝 : 日本醸造協会誌, **86**, 536-539(1991)
- 20) 山本優, 高峯和則, 吉崎由美子, 玉置尚徳, 鮫島吉廣 : 日本生物工学会九州支部会(2010)
- 21) 高峯和則, 吉崎由美子, 山本優, 吉竹一哉, 橋本文雄, 玉置尚徳, 鮫島吉廣 : 日本醸造協会誌, **107**, 782-787 (2012)
- 22) 栗山謙一, 長友正弘, 中山寿城, 吉浜義雄, 渡辺酉造 : 日本醸造協会誌, **100**, 817-823(2005)
- 23) Yoshizaki, Y., Takamine, K., Shimada, S., Uchihori, K., Okutsu, K., Tamaki, H., Ito, K., and Sameshima, Y. : *J. Inst. Brew.*, **117**, 217-223(2011)
- 24) 高峯和則, 吉崎由美子, 島田翔吾, 高屋総一郎, 玉置尚徳, 伊藤清, 鮫島吉廣 : 日本醸造協会誌, **106**, 50-57(2011)
- 25) 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上田次郎, 瀬戸口智子, 緒方新一郎 : 日本醸造協会誌, **101**, 437-445(2006)
- 26) 勝田常芳, 西野勇実, 山口力, 前原喜義 : 鹿児島県工業試験場研究速報, **1**, 5 (1952)
- 27) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀沢浩幸, 神渡巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男 : 鹿児島県工業技術センター研究報告,**8**,1-6(1994)
- 28) 安藤義則, 間世田春作, 高峯和則 : 特許第 3876975 号
- 29) Yamamoto, H., Morimura, S., Mizutani, M., Yamada, K., Ochi, H., Takayama, K., Kudo, T., Ohta, H., and Kida, K. : *J. Inst. Brew.*, **117**(4), 627-633 (2011)
- 30) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 水元弘二 : 特許 3051715 (2000)
- 31) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 神渡巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男 : 鹿児島県工業技術センター研究報告, **8**, 1 (1994)
- 32) 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 米元俊一, 宿口修一, 池田浩二, 児玉剛, 原健二郎 : 鹿児島県工業技術センター, **23**, 13-18 (2009)

- 33) 岩崎功, 藤田聡, 長友正弘, 垂水彰二, 高橋康次郎 : 日本醸造協会誌, **98**, 367-375 (2003)
- 34) 内山貴由, 岩井謙一, 後藤修一, 小野正 : 特開 2008-228620
- 35) 安藤義則 : 日本醸造協会誌, **107**, 300-305(2012)
- 36) Yoshizaki, Y., Yamato,H., Takamine, K., Tamaki, T., Ito, K., and Sameshima, Y. : *J. Inst. Brew.*, **116**,49-55 (2010)
- 37) 伊藤欣哉, 和久豊, 竹内良和, 神谷直方, 村井總一郎 : 日本醸造協会誌, **85**, 57-60(1990)

## 第2章 プロテアーゼ剤添加における芋焼酎への影響

### 第1節 緒言

芋焼酎の成分は水とエタノールの他に高級アルコール類，脂肪酸エステル，有機酸，ミネラルなどの微量成分が 0.2%程度含まれている。これらの微量成分が本格焼酎の香味に大きく影響している。芋焼酎を含む蒸留酒は清酒をはじめとする醸造酒との大きな違いの一つとしては，製造工程に蒸留工程が存在することである。従って蒸留酒では，共通して蒸留時の加熱によって生成する微量成分が含有されており，蒸留酒と醸造酒の香りの違いを生み出している。加熱による食品の香りの形成としてメイラード反応やストレッカー分解が知られている。メイラード反応はアミノ酸等のアミノ化合物と還元糖を加熱することで生じる反応で，パン等の焼成を伴う食品の重要な焦げ臭やナッツ様の香気成分を生成する<sup>1)</sup>。また，ストレッカー分解はメイラード反応の過程で $\alpha$ -ジカルボニル化合物とアミノ酸が脱水縮合して出来たアミノレダクトンが更に酸化脱炭酸を受け，アルデヒド2分子が結合してピラジンを生成する<sup>2)</sup>。ストレッカー分解により生成する化合物はアセトアルデヒドやバレルアルデヒド等の香気を有するものが多い。このことから，蒸留工程をもつ焼酎においてもメイラード反応やストレッカー分解等の加熱反応によって生じる成分が酒質に影響を与えていることが示唆され，この加熱反応にはアミノ酸が大きく関与している。

焼酎製造においては，蒸留時の加熱によって生成する成分としてフルフラールが発酵中に遊離したキシロースから，クエン酸に起因する低pH条件で蒸留時の加熱によって生成されることが明らかとなっている<sup>3,4)</sup>。また，芋焼酎においてはゲラニオールとネロールからリナロールと $\alpha$ -テルピネオール<sup>5)</sup>，シトロネロールからローズオキサイド<sup>6)</sup>が生成することが明らかになっているが，蒸留時にアミノ酸が揮発成分の生成に影響を及ぼすことについてはこれまで報告されていない。また，焼酎製造において酵素剤添加の影響については，醗物性<sup>7)</sup>や酒質<sup>5,8)</sup>に関する報告はあるが，タンパク質分解酵素に関してはこれまで報告されていない。

焼酎製造において、醪に含まれるアミノ酸は麴由来の酸性プロテアーゼや酸性カルボキシペプチダーゼの作用によって、原料である麴やサツマイモ中のタンパク質が分解され生成する。芋焼酎の醪にプロテアーゼを添加，発酵及び蒸留を行うことで、芋焼酎の酒質に影響を与える可能性がある。

そこで、芋焼酎の酒質の多様化を目的としてプロテアーゼを併用することで香気成分の生成及び香味に与える影響について検討した。また、プロテアーゼを添加した醪のアミノ酸組成を再現したモデル醪の蒸留を行い、アミノ酸が蒸留時の熱によって変化し、生成される香気成分についても解析を行った。

## 第 2 節 実験方法

### 2-2-1. 酵素剤

一次醪に添加したプロテアーゼ剤は市販の 11 種類を用いた。また、酵素剤の酸性プロテアーゼ活性及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、第四回改訂国税庁所定分析法注解に従って行った<sup>9)</sup>。

### 2-2-2. 使用原料，菌株及び製麴条件

サツマイモは 500 g 前後の大きさのコガネセンガンを用いた。また、使用酵母は焼酎用酵母である鹿児島 5 号酵母(H5)を用いた。米は、酒造メーカーが一般的に使用している国産の加工用米を用いた。種麴は市販の白麴菌(*A. luchuensis* mut. *kawachii*)を用いた。製麴は恒温恒湿機にて行い、仕舞仕事までの約 28 時間を庫内温度 35℃、湿度 95%とし、仕舞仕事以降から出麴までを庫内温度 30℃、湿度 90%で行った。麴の品温経過は、手入れ時の盛(製麴約 20 時間後)で 38℃を目標にし、仕舞仕事まで維持させた。仕舞仕事(製麴約 28 時間後)以降は 35℃付近まで品温を下げて出麴(製麴 42 時間)まで維持した。

### 2-2-3. 芋焼酎の小仕込み

一次仕込みは麴米 140 g 相当量の米麴に汲み水 168 g (内、酵母培養液 2 ml) を加えた。二次仕込みでは一次醪に汲み水 392 g と蒸煮・粉碎したサツマイモ 700 g を加えた。30℃の温浴槽で一次醪は 5 日間、二次醪は 9 日間発酵させた。酵素剤は主原料の合計重量の 1/200 量とし、一次仕込み水に懸濁した。なお、対照として酵素剤を添加しない醪を製造した。

### 2-2-4. 蒸留

蒸留は醪 900 g を 2 L 容のガラス製蒸留器にて、蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留で行った。蒸留の終点は末垂れのアルコール度数が約 10%に到達した時点とした。終点のアルコール度数の測定は携帯型密度

計（アントンパール社，DMA-35）を用いた。焼酎のアルコール度数の測定は，酒類用振動式密度計（DA-155 京都電子工業(株)，Kyoto, Japan）を用いた。原酒をアルコール度数 25%になるように脱塩水で割水し 1 日後，孔径 5  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターにてろ過をして得られたろ液を芋焼酎分析試料とした。

#### 2-2-5. 二次醪及び焼酎の分析

二次醪及び得られた芋焼酎試料の一般分析(醪アルコール，純アルコール，原酒量，原酒アルコール，収得量，蒸留歩合，pH(醪，焼酎)，酸度(醪，試留液，焼酎)，全糖，直糖，UV275 に関しては，第四回改訂国税庁所定分析法<sup>9)</sup>に従って行った。

二次醪のアミノ酸及び有機酸については，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（SHIMADZU-LC（株）島津製作所．Kyoto, Japan）を用いて定量した。サンプルはガーゼろ過した二次醪を No.2 ろ紙でろ過し，その後孔径 0.45 $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過して用いた。アミノ酸組成分析については，カラムは Shim-pack AMINO-NA（（株）島津製作所）を用い，移動相は MM-MA 液，MM-MB 液（島津製作所）を使用した。0 - 33 分（B 液 0%  $\rightarrow$  100%）のグラジエント溶出，オーブン温度は 60°C，流速は 0.6 ml/min で測定を行った。検出器は蛍光検出器（RF-10AXL, (株) 島津製作所）を用いた。有機酸分析は，カラムは Shim-pack SCR-102H（（株）島津製作所）を 2 本連結して用いた。カラムオーブン温度は 50°C で，移動相は 4 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液を使用し，流速は 0.8 ml/min で送液した。カラムより溶出後，反応液（4 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液，16 mM Bis-Tris，80  $\mu\text{M}$  EDTA 溶液）0.8 ml/min と混合し，電気伝導度検出器にて検出した（CDD-10AVP ，（株）島津製作所）。

### 2-2-6. 焼酎の官能評価

官能評価試験は、アルコール濃度を 25%に統一した焼酎にて実施した。パネル 15 名にブラインドテストを行い、それぞれの芋焼酎について自由コメント形式で行った。なお、パネルは鹿児島県工業技術センター食品・化学部職員 4 名(内、女性 1 名)、鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター教員 3 名(内、女性 2 名)と所属学生 8 名(内、女性 7 名)であった。

### 2-2-7. 焼酎香気成分の GC-MS 解析

芋焼酎試料 10 ml と内部標準物質である 1-pentanol (10 mg/l) 1 ml を 200 ml 容の専用ボトルに入れ、密閉し 30°C の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc. の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 ml 吸引し、GC-MS に自動注入した。焼酎の揮発成分の同定および定量分析はアジレント・テクノロジー (株) の GC-MS (GC, Agilent 6890 ; MS, Agilent 5979B) により行った。成分の一次同定は、Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより行った。GC-MS 分析条件は以下の Table 2-1 に示した。

### 2-2-8. モデル醪及び焼酎の作製

15%エタノールで調整した 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH4.2) 溶液にキシロース及びアミノ酸を溶解したモデル醪 900 g を用いて蒸留を行い、モデル焼酎の原酒とした。得られた原酒をアルコール濃度 25%となるように割水し、モデル焼酎とした。なお、キシロースとアミノ酸は蒸留前の二次醪に含まれる濃度を参考に添加した。

Table 2-1 GC/MS analysis condition of the samples.

Thermodesorption system	Entech 7100A
Injection volume	100 µl
GC	Agilent 6890N
Column	DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film)
Carrier	Helium, 1 ml/min., constant flow mode
Oven	40°C, 5 min. hold → 3°C/min. to 240°C → 240°C, 5 min. hold
Analysis time	57.2 min.
Injector temperature	220°C
Transfer line	250°C
Quadrupole ion trap temperature	150°C
Ion source temperature	250°C
MS	Agilent 5975B
Mode	SCAN

### 第3節 実験結果及び考察

#### 2-3-1. プロテアーゼ剤の選抜

プロテアーゼの市販酵素剤 11 種について、酸性プロテアーゼ活性及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性を測定した結果を Table 2-2 に示す。酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼ共に活性の高かった酵素剤はオリエンターゼ 20A (以下, 20A) 及びオリエンターゼ AY (以下, AY) であった。酸性プロテアーゼ活性が高かった酵素剤はプロテアーゼ YP-SS (以下, YP-SS) であり、酸性カルボキシペプチダーゼ活性が高かったものはスミチーム ACP-G (以下, ACP-G) であった。そこで、両酵素活性が高い、またはいずれかの活性が高いこれら 4 種類の酵素剤を実験に供した。

#### 2-3-2. プロテアーゼ剤を併用した小仕込み試験

選抜した 4 種類のプロテアーゼ剤を醪に添加して、芋焼酎の香気に及ぼす影響を検討した。なお、酒税法及び酒類行政関係法令等解釈通達第 86 条の 5「酒類の品目等の表示義務」によると主原料の重量の 1/1,000 以下に相当する酵素は原料として取り扱わないとの記載がある。しかし、本試験では香気に与える酵素剤の影響を明らかにする為、主原料の重量に対して 1/200 量の添加条件で実験を行った。

その結果、一次及び二次醪の発酵経過は酵素剤を添加した醪を含め良好な経過となり、酵素剤による発酵阻害は認められなかった。発酵終了時の醪及び得られた焼酎の分析結果について Table 2-3 示す。

醪アルコール濃度は対照の 15.1% と比べて、酵素剤添加の醪はいずれも高く、AY を添加した醪では 15.7% と最も高い値であった。醪に添加した酵素剤の量は 4.2 g であり、これが全てグルコースとみなし、このグルコースが全てアルコールに代謝されたと仮定すると、醪アルコールの約 0.2% 分に相当すると算出できる。しかし、酵素剤添加の醪アルコールは対照と比べてこの値以上の増加を示した。本研究において、酵素剤を添加した醪は、粘性が低下し、流動性の向上が認められた。清酒では

酸性プロテアーゼは蒸米のタンパク質を減少させ、 $\alpha$ -アミラーゼ吸着能の低下と蒸米崩壊作用により、 $\alpha$ -アミラーゼの作用を受けやすくして蒸米の溶解を促進する<sup>10)</sup>とされている。無蒸煮アルコール発酵でも、グルコアミラーゼに酸性プロテアーゼを加えることで糖化効率及びアルコールの収得率の向上<sup>11)</sup>が、そば種子類を液化及び糖化する工程ではプロテアーゼを作用させることによって、粘度上昇が抑制されアルコール収得が増加する<sup>12)</sup>ことが報告されている。本研究においても、原料であるサツマイモに対して、酸性プロテアーゼが同様の働きを示し、発酵初期では液化の促進、発酵中を通してサツマイモにデンプン分解酵素が作用しやすい状況となり、発酵が促進されたと考えられた。また、使用した酵素剤には酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼの他にも、微量ではあるがセルラーゼ等の活性を有している可能性がある。実際、セルラーゼ活性を測定すると 50 U/mg 程度の活性を有しており、それらの酵素が繊維質を分解している可能性も考えられた。しかし、全糖の値に差異が無いことから、酵素剤中のセルラーゼ活性が影響し、発酵性糖を生成しているとは言えない。以上の結果から、芋焼酎において醪へのプロテアーゼ剤添加は粘性の低下(流動性の向上)により、酵母のグルコースからアルコールへの変換効率が高まったと推察される。

醪酸度は麴菌の生産するクエン酸に起因する。Table 2-3 に示すように醪酸度は酵素剤を添加した醪で高くなった。総アミノ酸濃度が対照は 16.5 mmol/L であるのに対し、酵素剤添加醪の総アミノ酸濃度は高く、AY を添加した醪が 41.3 mmol/L と最も高かったことから、醪酸度の上昇は、アミノ酸量の増加によるものといえる。揮発酸度は、醪が乳酸菌等の雑菌汚染の可能性を推察できる指標である<sup>8)</sup>。揮発酸度が 20A 添加醪と AY 添加醪で対照の約 1.3 倍高く、また、それぞれの酢酸濃度も対照の 5.6  $\mu$ mol/L に対して約 1.3 倍高かった。一方、醪中の乳酸はいずれの条件でも 5.3  $\mu$ mol/L 程度となり同濃度であった。酵母の生成する揮発酸は温度や濃糖、pH のストレスを受けたときにも数値が上昇する<sup>13)</sup>ことから、酵素剤添加醪で揮発酸度が上昇した理由として、醪の雑菌汚染

ではなく、プロテアーゼによって糖化酵素が作用しやすくなり、醪中の糖濃度がやや高くなったことが酵母のストレスとなり揮発酸度が高くなったと推察される。

醪を蒸留して得られた焼酎は、蒸留歩合がいずれも 97.5%以上であり、良好な蒸留ができた。収得量は対照が 223.1 ml/kg に対し、酵素剤添加の焼酎はいずれも高く、中でも AY 添加醪は 230.4 ml/kg と最も高く、醪への酵素剤添加は収得量を向上させることがわかった。焼酎酸度は醪の揮発酸度と同じ傾向であり、pH には大差がなかった。波長 275nm における吸光度 (UV275) の値は焼酎に含まれるフルフラールによるものと考えられている<sup>9)</sup>。対照と比べ酵素剤を添加した焼酎では 1.7 倍以上の値であり、最も高い 20A を添加した焼酎では 3.0 倍近い値となったことから、酵素剤を添加した焼酎のフルフラール濃度の増加が示唆された。

Table 2-2 Enzyme activities of enzyme agents used in this study

Enzyme agent name	Origin	Enzyme activity (U/mg)		Maker	
		APase ※1	ACPase ※2		
Sumizyme	ACP-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	877	8,237	Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd.
	DPP-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	55	1,651	
	FL-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	142	1,075	
	LPL-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,727	345	
	FP-G	<i>Aspergillus oryzae</i>	1,330	3,926	
	AP-G	<i>Aspergillus niger</i>	5,578	68	
Orientase	20A	<i>Aspergillus niger</i>	19,361	1,045	HBI Enzyme Inc.
	AY	<i>Aspergillus sp.</i>	24,202	1,182	
Denazyme	AP	<i>Aspergillus sp.</i>	1,355	1,058	Nagase ChemteX Corporation
Denapsine	2P	<i>Aspergillus niger</i>	1,185	13	
Protease	YP-SS	<i>Aspergillus niger</i>	7,563	56	Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.

※1: Acid Protease, ※2: Acid Carboxypeptidase

Table 2-3 General components of *moromi* and *shochu*

		20A <sup>※1</sup>	AY <sup>※2</sup>	YP-SS <sup>※3</sup>	ACP-G <sup>※4</sup>	Control
<i>moromi</i>	Alcohol (%)	15.6	15.7	15.3	15.5	15.1
	pH	4.1	4.1	4.2	4.2	4.2
	Acidity (ml)	9.0	9.4	8.4	8.5	8.2
	Volatile acidity (ml)	2.5	2.6	1.9	1.8	1.9
	Total sugar (%)	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3
	Direct sugar (%)	0.7	0.6	0.4	0.3	0.3
	Total amino acid (mmol/L)	40.0	41.3	26.6	28.7	16.5
<i>shochu</i>	Distillation rate (%)	100.5	97.6	100.6	97.5	98.5
	Yield (ml/kg)	229.3	230.4	225.3	228.6	223.1
	pH	4.1	3.8	4.0	4.0	4.0
	Acidity (ml)	1.3	1.4	1.0	0.9	0.9
	UV275	0.43	0.34	0.25	0.24	0.14

※1: Orientase 20A, ※2: Orientase AY, ※3: Protease YP-SS, ※4: Sumizyme ACP-G

### 2-3-3. 酵素剤添加の芋焼酎の香気分析

アミノ酸の一部は発酵過程で酵母の代謝によって高級アルコールに変換<sup>14-16)</sup>される。また、蒸留過程でメイラード反応やストレッカー分解といった加熱反応によってアルデヒドに変換<sup>2)</sup>される。

そこで、芋焼酎に含まれる高級アルコール類とアルデヒド類についてGC-MSを用いて分析し、その結果をTable 2-4に示す。高級アルコール類は、いずれの成分とも対照が最も高い値となり酵素剤添加焼酎の1.2-2.5倍の濃度となった。醪中のアミノ酸濃度の増加により高級アルコールの量が増加することが期待されたが、アミノ酸濃度の低い醪の方が高い結果となった。大内ら<sup>14,15)</sup>はロイシンからのイソアミルアルコールのEhrlich経路による生成は、NH<sub>3</sub>やその他のアミノ酸が共存するとロイシンの取り込み量が減少すると共に、ロイシンが菌体構成成分に利用されるためイソアミルアルコールへの変換率が低下すると報告している。このことから、高級アルコールが対照と比べ酵素剤添加により減少した理由のひとつとして、Fig.2-1に示す発酵終了後の醪に含まれるアルギニン以外のいずれのアミノ酸も、酵素剤添加醪では高濃度に含有されており、高級アルコールに直接関係しないアミノ酸濃度も増加したためと考えられる。また、アルギニンは酵母が選択的に資化する代表的なアミノ酸である<sup>17)</sup>。Fig.2-1に示すアミノ酸の中でアルギニンのみが対照と比べ酵素剤添加醪において低濃度であった。これは、アルギニンが選択的に資化されたか、醪の初発アルギニン濃度が低いためかは明らかではないことから、芋焼酎の二次醪初期の濃度を求める必要がある。しかし、芋焼酎の二次醪は粘度が非常に高く均一なサンプリングが困難である。そこで、50 ml容のファルコンチューブに麴3 g、蒸煮サツマイモ14 gと酵素剤が0.1 gを含む脱イオン水を添加し、良く混合し、30℃で12時間反応させ、発酵初期の二次醪を再現した。この反応液を沸騰浴中で10分間酵素を失活させた。これを10,000×g、10分間遠心分離した上澄み液をHPLCにてアミノ酸を分析した。その結果、Fig.2-2に示すようにアルギニンは対照と比べ酵素剤を添加した反応液で1.5-2.0倍の濃度で

あり、3番または4番目に高濃度に含まれるアミノ酸であった。酵母の高級アルコール生成経路に関する研究では、合成培地や麦汁にバリンやロイシンを添加すると対応する高級アルコールの増加が報告されている<sup>18,19)</sup>。しかし、本研究において再現した発酵初期の二次醪のロイシンとバリンは対照と比べ2倍近い濃度であるにも係わらず対応する高級アルコールは対照と比べて低濃度であった。これらのことから、酵素剤添加による高級アルコール減少のもうひとつの理由として、醪中に高濃度に含まれるアルギニンが、より選択的に資化され、高級アルコール生成に関与するスレオニン、バリン、ロイシンの資化が相対的に減少したためと考えられる。

アルデヒド類は、酵素剤を添加して製造した芋焼酎が全て対照と比べて高濃度に含まれていた。アルデヒドは、発酵中に酵母の代謝によってアミノ酸から生成<sup>20)</sup>される他に、アセトアルデヒド、イソブチルアルデヒド、2-メチルブチルアルデヒドおよびイソバレルアルデヒドは、それぞれアラニン、バリン、イソロイシンおよびロイシンからストレッカー分解により生成する<sup>2)</sup>ことが知られている。Fig.2-1に示すようにこれらのアミノ酸は対照と比べ酵素剤を添加した醪では1.5-4.5倍増加していた。特に20AとAYを添加した焼酎で高濃度となり、対照と比べてアラニンでは2.1倍、バリンは4.5倍、イソロイシンは3.2倍、ロイシンは3.9倍増加していた。このことから、焼酎中のアルデヒド類の増加は、醪中に増加したアミノ酸が酵母による代謝の他に、蒸留中のストレッカー分解による可能性が示唆された。

フルフラールは焼酎の末垂れの主成分として知られており、末垂れカットのタイミングや常圧蒸留酒と減圧蒸留酒を区別できる成分である。20AまたはAYを添加して製造した芋焼酎のフルフラール濃度は対照と比べ、各々2.8倍および2.1倍高い値であった。このことから、Table 2-3に示した20AまたはAYを添加して製造した芋焼酎の波長275nmにおける吸光度(UV275)の値とGC-MSの分析結果に正の相関が認められた。

Table 2-4 Fragrance ingredient analysis in GC/MS of higher alcohols and aldehydes in *shochu*

	Peak-RI	m/z	CAS No.	20A <sup>※1</sup>	AY <sup>※2</sup>	YP-SS <sup>※3</sup>	ACP-G <sup>※4</sup>	Control
n-Propyl alcohol	1040	31	71-23-8	159	155	192	161	396
Isobutyl alcohol	1098	43	78-83-1	423	352	347	386	610
Isoamyl alcohol	1216	55	123-51-3	452	363	419	446	550
Acetaldehyde	745	44	75-07-0	2,611	2,825	2,282	2,261	1,929
Isobutyraldehyde	806	43	78-84-2	172	216	139	163	129
2-Methylbutylaldehyde	909	57	96-17-3	271	307	189	211	153
Isovaleraldehyde	912	44	590-86-3	283	271	151	157	94
Furfural	1460	96	98-01-1	2,243	1,677	1,298	1,181	814
Benzaldehyde	1523	105	100-52-7	10	12	7	6	7

※1: Orientase 20A, ※2: Orientase AY, ※3: Protease YP-SS, ※4: Sumizyme ACP-G

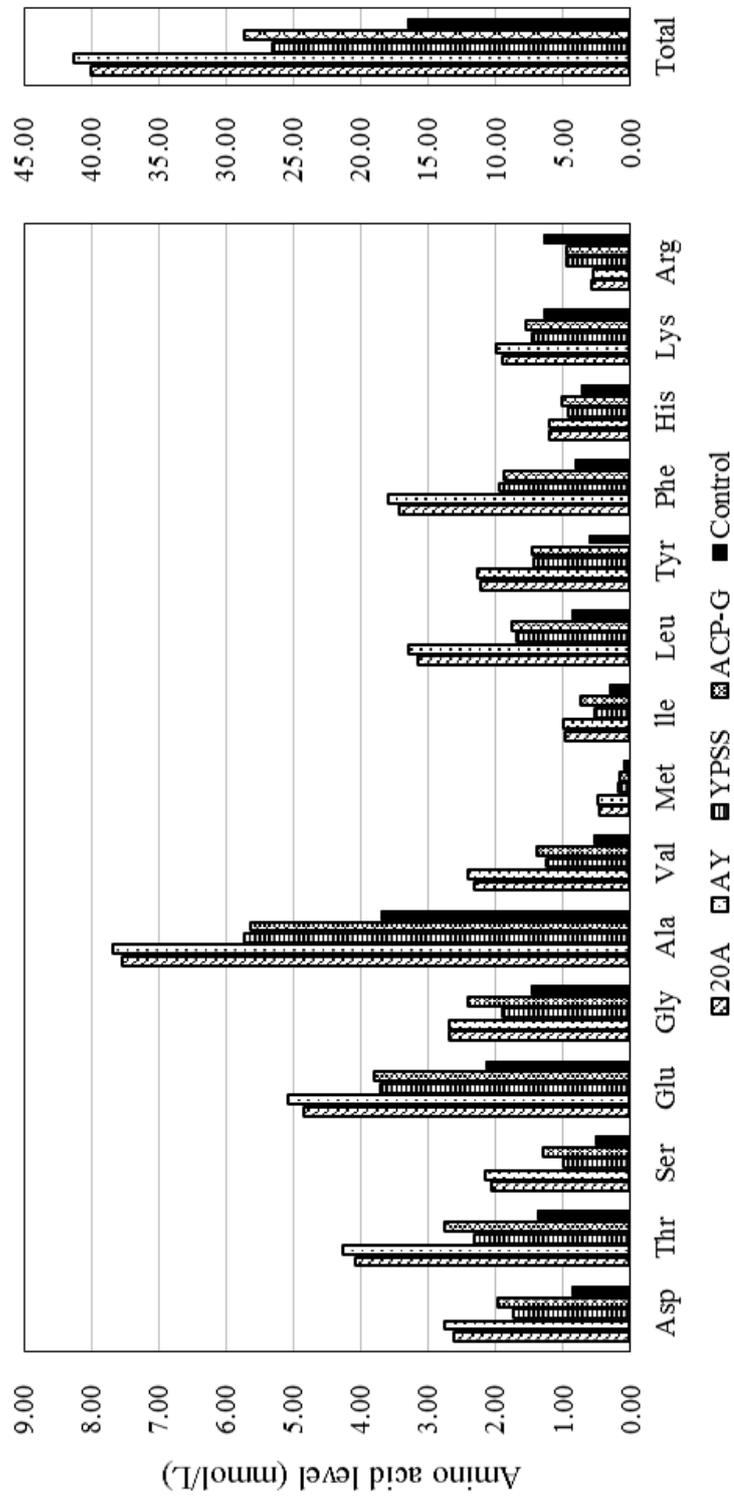


Fig.2-1 Amino acid composition of second moromi.

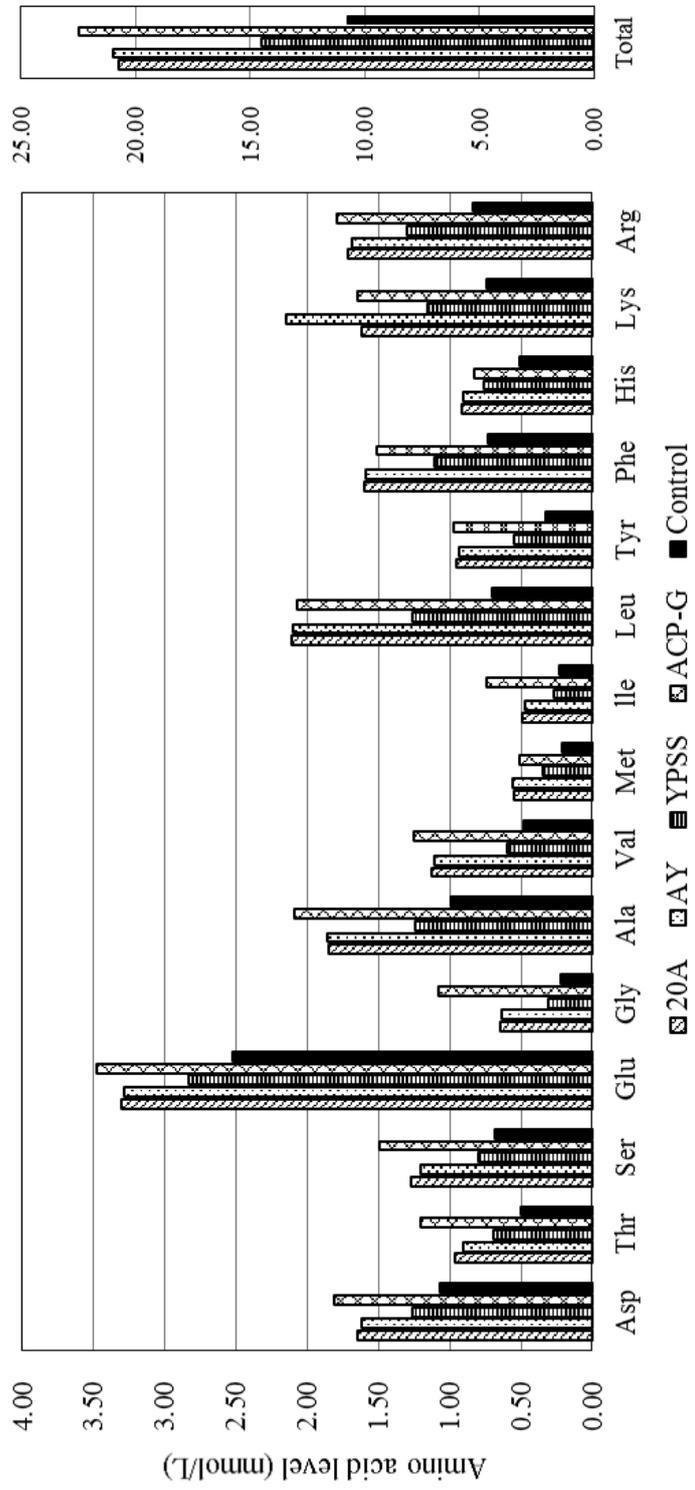


Fig.2-2 Amino acid composition of the sweet potato mixed with *koji*.

The solution was prepared by incubating *koji* (3 g), sweet potato (14 g), and enzyme (0.1 g) for 12 hr. at 30°C.

#### 2-3-4. 酵素剤を用いて作製した芋焼酎の官能評価

官能評価試験の結果、特徴的なコメントと多数の人が指摘したコメントを Table 2-5 に示す。対照と比較して酵素剤を添加した焼酎では、「まろやか」、「うまみ」、「えぐみ」等の味のコメントが特徴的であった。また、香りでは対照においても「ナッツ香」とのコメントがあるが、「果実」や「香ばしさ」、「醬様」等の食品を焼いた際に感じる香りのコメントが特徴的であった。フルフラールは高濃度含まれるとオフフレーバーである「焦げ臭」の原因となるが、低濃度では「香ばしさ」、「果実様」、「甘さ」と表現され、その他のアルデヒド類の香気に関しても同様に「果実」等の特徴を有していることから、糖、アミノ酸量や組成の違いによって焼酎中に含まれるアルデヒド類に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、香りの評価において 20A と AY 添加の焼酎では「酸臭」との指摘があった。これは焼酎酸度が高かったことと一致する。また、20A 及び AY では「渋味」の指摘が多くあり、これは試留酸度が対照と比較して高くなったことが原因と考えられた<sup>21)</sup>。

酵素剤の添加により芋焼酎に明らかな酒質の変化が認められたことから、酒質の多様化を図れることがわかった。

#### 2-3-5. アルデヒド類生成に及ぼすアミノ酸と還元糖の影響

アルデヒド類は、醪中のアミノ酸を酵母が代謝し生成<sup>20)</sup>する他に、対応するアミノ酸からストレッカー分解によっても生成される<sup>2)</sup>。ストレッカー分解はアミノ酸がメイラード反応の過程で生成する $\alpha$ -ジカルボニル化合物と反応して酸化的に分解し、もとのアミノ酸より炭素数の1個少ないアルデヒドを生じる反応である。アルデヒドの一種であるフルフラールはアラビノース、キシロース等の還元糖が低 pH 下で加熱、脱水反応によって生成<sup>22)</sup>することや、麦焼酎製造中に遊離したキシロースから、クエン酸に起因する醪の低 pH 条件下で、蒸留時の加熱によって生成することが報告されている<sup>3)</sup>が、いずれもアミノ酸との関連については報告されていない。一方、奥村<sup>2)</sup>は味噌・醤油の醸造工程において

アミノ酸と五炭糖とのメイラード反応によって生成することを報告している。Fig.2-1 に示すように、20A または AY を添加した醪では対照と比べていずれのアミノ酸も高濃度に含まれていることから、蒸留時の加熱によるメイラード反応とストレッカー分解が促進され、アルデヒド類を高濃度に含む原因となったと推察できる。また、フルフラールは酵素剤を添加した醪で還元糖濃度が対照と比べて 2 倍程度高いことがフルフラールの増加した原因と推察された。

そこで、モデル醪を用いてアミノ酸の増加がアルデヒド生成に及ぼす影響を検討した。なお、モデル醪に含まれるアミノ酸濃度は Fig.2-1 に示す対照の蒸留前の醪及び 20A を添加した蒸留前の醪に含まれる濃度で作製し、還元糖は蒸留直前の二次醪の濃度になるようにキシロースを添加した。作製したモデル醪を用いて蒸留し、得られた焼酎の揮発成分を分析した結果を Table 2-6 に示す。キシロース濃度が対照醪の値である 0.3% の場合、アミノ酸濃度が 20A 添加醪濃度で作製したモデル焼酎に含まれるアルデヒド類は、対照醪濃度で作製したモデル焼酎に含まれるそれと比べて 1.1 倍-5.0 倍の範囲で高く、キシロース濃度は 20A 添加醪の値である 0.7% の場合に、2.0 倍-62.0 倍高くなった。また、アミノ酸濃度が対照醪の場合、キシロース濃度が 0.3% から 0.7% に増加してもアルデヒド類の増加は殆ど認められなかったが、20A 添加醪のアミノ酸濃度では、顕著な増加が認められた。このことから、アミノ酸の増加がアルデヒド類の増加に影響を与えていることが明らかになった。また、フルフラールはキシロース濃度が 0.3% から 0.7% に増加してもフルフラールの増加は 1.4 倍程度であったが、キシロース濃度 0.7% で比較すると、アミノ酸濃度の増加によりフルフラール濃度は 5 倍に増加した。このことから、焼酎製造においてフルフラールはアミノ酸とキシロース等の還元糖との相乗効果による生成が示された。

Table 2-5 Sensory comments of the enzyme addition *shochu*

	20A <sup>※1</sup>	AY <sup>※2</sup>	YP-SS <sup>※3</sup>	ACP-G <sup>※4</sup>	Control
	Sweet	Sweet	Sweet	Sweet	Sweet
	Smooth	Dry	Smooth	Grainy	Balanced
	Umami	Grainy	Umami	Rich	Grainy
Taste	Astringency	Bitter	Bitter	Bitter	Bitter
	Acidity	Acidity	Dry	Asifringent	Dry
	Sweet aroma	Sweet aroma	Sweet aroma	Sweet aroma	Sweet aroma
Floral	Floral	Baked confectionery	Fruity	Nutty	Nutty
Flavor	Fruity	Smooth	Roasted	Grainy	Rich
	Grassy	Chemical	Rubbery	Soy sauce like	Oily
	Acetic smell	Acetic smell	Grassy	Grassy	

※1: Orientase 20A, ※2: Orientase AY, ※3: Protease YP-SS, ※4: Sumizyme ACP-G

Table 2-6 Aldehydes in distillates derived from model *moromi* solution.

	0.3% Xylose		0.7% Xylose	
	20A type	Control type	20A type	Control type
Isobutyraldehyde ( $\mu\text{g/l}$ )	22	20	103	9
2-Methylbutylaldehyde ( $\mu\text{g/l}$ )	50	10	118	2
Isovaleraldehyde ( $\mu\text{g/l}$ )	82	16	216	33
Furfural ( $\mu\text{g/l}$ )	1,585	1,206	7,930	1,635

#### 第 4 節 要約

芋焼酎の酒質の多様化を目的にプロテアーゼを添加して芋焼酎の仕込みを行い香気成分の生成及び香味に与える影響について検討した。まず、市販のプロテアーゼ系の酵素剤 11 種類から 4 種類の酵素剤を選抜し、芋焼酎の小仕込み試験に供した。酵素剤添加醪では醪のアルコール濃度が増加し、酸性プロテアーゼにより醪の流動性が向上し、アルコールへの変換効率が高まったと推察された。また、醪酸度及び揮発酸度も上昇した。

香気成分分析の結果、高級アルコール類はいずれの成分とも酵素剤を添加しない醪が最も高く、酵素剤添加焼酎の 1.2~2.5 倍の濃度であった。酵素剤添加焼酎は対照と比べて高級アルコールが低くなった要因として、高級アルコール生成に対応するアミノ酸以外の濃度が増加したこと、醪中に高濃度に含まれるアルギニンがより選択的に資化されたため、対応するアミノ酸の資化が相対的に減少したためと考えられる。アルデヒド類の濃度の増加は、醪中に増加したアミノ酸が酵母により代謝され生成したことと、蒸留中のメイラード反応やストレッカー分解によっても増加することを、モデル醪を用いて明らかにした。更に、これまで焼酎に含まれるフルフラールは五炭糖が低 pH で加熱・脱水反応によって生成するといわれていたが、本研究によりフルフラールはアミノ酸とキシロース等の還元糖との相乗効果によって生成することを初めて明らかにした。

官能評価の結果も対照と比較して酵素剤を添加した焼酎では、「果実」や食品を焼いた際に感じる香りのコメントが特徴的であった。

以上のことから、芋焼酎製造においてプロテアーゼ剤を添加することで酒質は明らかに変化していることが認められ、芋焼酎の酒質の多様化を図ることができた。

## 参考文献

- 1)本間清一：日本栄養・食糧学会誌,**58** (2) 85-98(2005)
- 2)奥村丞司：日本醸造協会誌,**88** (3),178-187(1993)
- 3)大石雅志,田野上佳枝,梶原康博,高下秀春,岡崎直人：日本醸造協会誌,**103** (9),730-734(2008)
- 4)高下秀春：日本醸造協会誌,**107** (6),381-388(2012)
- 5)太田剛雄,下條寛和,橋本憲治,近藤洋大,佐無田隆,大場俊輝：日本醸造協会誌,**86** (7) ,536-539(1991)
- 6)高峯和則,吉崎由美子,島田翔吾,高屋総一郎,玉置尚徳,伊藤清,鮫島吉廣：日本醸造協会誌,**106**(1),50-57(2011)
- 7)高峯和則,安藤義則,亀澤浩幸,下野かおり,間世田春作：鹿児島県工業技術センター研究報告書,No.15(2001)
- 8)高峯和則,木田建次,園田頼和,生田六也,塚田定清：日本醸造協会誌,**84**(8),560-567(1989)
- 9)日本醸造協会編：国税庁所定分析法注解,第四回改訂,日本醸造協会(1991)
- 10)椎木敏：醗酵工学,**70**(4),293-301(1992)
- 11)上田誠之助,木場洋次郎：特開 昭 59-179093
- 12)境克弘,柳生淳二,垂水彰二,高橋康次郎：特開 2003-274922
- 13)瀬戸口眞治,亀澤浩幸,高峯和則,安藤義則,間世田春作：鹿児島県工業技術センター平成 12 年度研究発表会予稿集(2000)
- 14)K.OUCHI,Y.YAMAMOTO,M.TAKAGISHI, and H.AKIYAMA :  
*J.Ferment. Technol.*,**58**,301(1980)
- 15)大内弘造,高岸正邦,山本泰彦,秋山裕一：醗酵工学,**59**(1),9-16(1981)
- 16)秋田修,蓮尾徹夫,大場俊輝：日本醸造協会誌,**81**(9),626-632(1986)
- 17)岩野君夫,旗宮顕仁,中村拓郎,渡辺誠衛,伊藤俊彦,中沢伸重：日本醸造協会誌,**99**(10),735-742(2004)
- 18)辻謙次,秋山裕一：醗酵工学,**59**(5),421-429 (1981)
- 19)D.SCHULTHESS,L.ETTLINGER：*J. Inst. Brew.*,**84**,240-243 (1978)

- 20) Ardö, Y. : *Biotechnol. Adv.*,**24**, 238-242(2006)
- 21)高峯和則,亀澤浩幸,瀬戸口眞治,神渡巧,緒方新一郎,池田浩二,根上輝治,尾ノ上国昭,濱崎幸男 : 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集(1997)
- 22)M.J.Antal,Jr.,T.Leesomboon,W.S.Mok,and G.N.Richards, *Carbohydr. Res.*,**217**,71-85(1991)

### 第3章 プロテアーゼ活性の高い黒麹菌の選抜と焼酎の酒質

#### 第1節 緒言

焼酎製造において、酵母は醸造協会による供給や各県の大学や工業技術センター等によって開発されたものによって、特に香气成分等の面で酒質の多様化に貢献してきた<sup>1-3)</sup>。一方で麹菌は、各種麹メーカーでそれぞれの所有菌株によって造られた種麹はあるものの、複菌で違いを出しているものも多く、実際の菌株自体のバリエーションという面では酵母に比べると非常に少ない。また、これまでの麹菌の選抜、育種はクエン酸に関わる報告<sup>4)</sup>はあるが、実用化の非常に少ない。

これまで著者らは焼酎醪にプロテアーゼ剤を添加して焼酎製造を行うことで、アルコール取得量の向上や香气成分中のアルデヒド類の増加による酒質が変化すること<sup>5)</sup>、醪中にアミノ酸が増加することで蒸留時の熱により、メイラード反応及びストレッカー分解によってアルデヒド類が生成されることを明らかにしてきた<sup>6)</sup>。

そこで、これまでの知見を活かし、麹菌の生産するタンパク質分解酵素である酸性プロテアーゼ(以下、AP)及び酸性カルボキシペプチダーゼ(以下、ACP)に着目し、株式会社ビオックの菌株ストックの中からそれら酵素活性の高い黒麹菌株を選抜することとした。なお、焼酎麹菌には黒麹菌の *A. luchuensis* と白麹菌の *A. luchuensis* mut. *kawachii* があるが、白麹菌はストックもバリエーションも少ないため、黒麹菌にて選抜を行うこととした。また、選抜されたタンパク質分解酵素の高い黒麹菌株を用いて、プロテアーゼ剤添加時に増加したアルデヒド類や菌株のもつ特徴に着目して酒質の変化について検討した。

## 第 2 節 実験方法

### 3-2-1. 黒麴菌選抜(一次選抜)

株式会社ビオックの保存菌株の中から、生育に異常が無く且つ分生子の黒い糸状菌の条件を満たしている 55 株を用いて選抜試験を行った。まず、一次選抜として  $\alpha$  米を用いて 55 株の製麴を行い、AP 及び ACP 活性の比較を行った。基準となる対照株は、株式会社ビオックの泡盛用黒麴菌の *A. luchuensis* var. *awamori* KBN2012 を用いた。すなわち、メリクロン培養用フラスコに精米歩合 90% の  $\alpha$  米を 20 g 分注し、綿栓したフラスコを乾熱殺菌した。放冷後、プレートに培養した糸状菌を切り出してフラスコ内に入れた。この際に切り出すサイズは植菌量に大きな差異が出ないように統一し、約 1 cm<sup>2</sup> で統一した。その後、10 ml の蒸留水をフラスコ内に入れて、吸水させた。培養は恒温恒湿機内で行い、焼酎麴の製麴に近い条件にするために、前半の 24 時間を 35℃、残りを 30℃ で培養し、恒温恒湿機に入れてから 42 時間で出麴とした。培養中に手入れは培養開始から 20 時間及び 26 時間の 2 回実施した。

得られた麴を国税庁所定分析法に従い<sup>7)</sup>、酵素抽出を行った。分析は AP の測定を国税庁所定分析法<sup>7)</sup>を参考に、ACP を酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット(キッコーマン社製)にて行い、吸光度を比較した。すなわち、AP は対照株よりも高い酵素活性の株且つ効率的に数をこなすために、対照株を基準に酵素は同一希釈倍率で行い、Blank の測定は行わず、吸光度の大小関係で分解力の強さを判断した。ACP についてもキットを用い、Main の吸光度のみ測定を行い、同様の方法で比較した。

一次選抜の判断基準は、出麴状貌に異常が無く、AP もしくは ACP が対照株よりも高いものを選抜することとした。

### 3-2-2. 黒麴菌選抜(二次選抜)

一次選抜を通過した 15 株を用いて、二次選抜を行った。二次選抜では菌株の安定性にも着目するため、別日で 2 回製麴を行い、その平均値を基に判断した。また、分析項目も一次選抜の項目に麴酸度を加えた。

麴酸度及び酵素活性の測定は、国税庁所定分析法注解<sup>7)</sup>に従い実施した。製麴は一次選抜と同様に実施した。

二次選抜の判断基準は、出麴状貌に異常が無く、AP もしくは ACP 活性が安定して対照株よりも高い株を選抜することとした。

### 3-2-3. PCR による糸状菌株の *A. luchuensis* 簡易判別

黒麴菌ドラフトゲノム解析のフモニシン遺伝子解析を参考に行った<sup>8)</sup>。

選抜株及び対照株として *A. niger* ATCC 1015 及び *A. luchuensis* IFO 4308 のゲノム DNA をテンプレートに用いた。ゲノム DNA の抽出は、蒸留水 100  $\mu$ l とガラスビーズ少量をエッペンドルフチューブに入れ、プレートに生育させた若いコロニーを菌体ごと少量投入した。ビーズビーター(FastPrep 120 Cell Disrupter System, Thermo Savant 社製)にて破碎を行い、得られた破碎液をスピンドウンし上清を回収しテンプレートとした。PCR は KOD FX Neo(TOYOBO 社製)の標準プロトコルで実施した。PCR に用いたプライマーは、Fum1\_cons\_primer (5'-GGCGGCATTGAGATCAGCACATTGGA-3') 及び Fum15\_cons\_primer(5'-AAGGTAACCCGCACAGTAACTGCCAGGCC-3')を用いて PCR 増幅を行った。1.1-kb のシグナルが得られた場合「*A. luchuensis* type」とする。なお、「*A. niger* type」の場合、fumonisin B1 生合成遺伝子クラスター由来の 6.0-kb のシグナルが得られる。

#### ○PCR condition

98°C, 2 min.

↓

98°C, 10 sec.

68°C, 6 min.

(35 cycle)

↓

8°C,  $\infty$

#### 3-2-4. 選抜株製麴

製麴に使用する米は酒造メーカーが一般的に使用している国産加工用米を用いた。種麴は、選抜した KBN4038, KBN4041, KBN4080 の 3 株を用いて株式会社ビオックにて作製したものをを用い、対照は市販種麴の泡盛黒麴菌(株式会社ビオック社製)を用いて製麴を行った。製麴は恒温恒湿器にて行い、製麴の品温経過は本格焼酎製造技術<sup>7)</sup>に従って行った。品温経過については、製麴前半を高温帯で推移させ、後半は 35℃前後で維持した。いずれの麴とも 42 時間で出麴とした。恒温恒湿器の設定及び品温、手入れのタイミング等は Table 3-1 に示した。

#### 3-2-5. 麴の麴酸度及び酵素活性の測定

麴の麴酸度の測定は、第四回改訂国税庁所定分析法<sup>7)</sup>に従って行った。

麴から酵素抽出、 $\alpha$ -アミラーゼ(以下, AA), 耐酸性 $\alpha$ -アミラーゼ(以下, AsAA), グルコアミラーゼ(以下, GA), 酸性プロテアーゼ(以下, AP), 酸性カルボキシペプチダーゼ(以下, ACP)の測定は第四回改訂国税庁所定分析法<sup>7)</sup>に従って行った。

$\beta$ -グルコシダーゼ(以下, BG)活性は太田ら<sup>9)</sup>の方法に従って行った。すなわち, 4 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (PNPG) 0.25 ml, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.50 ml に酵素液 0.25 ml を加えて, 37°C で 15 分間反応させ, 200 mM 炭酸ナトリウム溶液 2 ml を加えて反応を停止した後, 410 nm の吸光度を測定して遊離 *p*-nitrophenol を定量した。PNPG に作用して 37°C, 1 分間に 1 nmol の *p*-nitrophenol を生じさせる酵素力価を 1 U とした。

セルラーゼ(以下, CEL)活性は柏木<sup>10)</sup>の方法に従って行った。すなわち, 1%カルボキシメチルセルロース(CMC) 溶液 1 ml に, 40°C で 5 分間予熱した酵素液 0.25 ml を混合し, 40°C にて 60 分間反応させた。反応液 0.1 ml に DNS 溶液を 0.3 ml を加え, 沸騰浴中にて 5 分間煮沸した。冷却後, 蒸留水 2.5 ml を加えて, 波長 500 nm で吸光度を測定した。Blank は, 1% CMC 溶液 0.8 ml と DNS 溶液 0.3 ml を混ぜ合わ

せ、酵素液 0.2 ml を加えて 5 分間煮沸、冷却後同様に操作し吸光度を測定した。CEL 活性は、1 分間にグルコース 1  $\mu\text{g}$  に相当する還元糖を遊離する酵素液を 1U とした。

キシラナーゼ(以下, XY)活性はしゅうゆ試験法<sup>11)</sup>の方法に従って行った。すなわち、1% Xylan 溶液と透析済み酵素液をそれぞれ 0.5 mL ずつ混合し、40°C で 60 分反応させた。反応液 0.2 ml に DNS 溶液を 2 ml 加え、10 分間煮沸した。冷却後、波長 570 nm の吸光度で測定した。Blank は、1% Xylan 溶液 0.1 ml と DNS 溶液を 2 ml 混ぜ合わせたのち、酵素液 0.1 ml を加えて 10 分間煮沸させた。冷却後、同様に操作し吸光度を測定した。1 分間にキシロース 1  $\mu\text{g}$  に相当する還元糖を遊離する酵素液を 1U とした。

なお、麴酸度及び各種酵素活性は各麴の水分の値から換算して、乾燥麴当たりの値として示す。

Table 3-1 *Koji* making method using selected strains

	Cultivation time ( <i>Koji</i> making time) (hour)	Temperature(Humidity)	
		Goods	Incubator
<i>Tane-tsuke</i>	0	35-36°C	35°C(95%)
<i>Mori</i>	20±1	39-41°C	35°C(95%)
<i>Naka-shigoto</i>	24±1	40-41°C	33°C(95%)
<i>Shimai-shigoto</i>	28±1	40-42°C	32°C(90%)
<i>De-koji</i>	42	34-36°C	32°C(90%)

### 3-2-6. 芋焼酎の小仕込み

サツマイモは 500 g 前後の大きさのコガネセンガンを用いた。また、使用酵母は焼酎用酵母である鹿児島 5 号酵母(H5) を用いた。

一次仕込みは麴米 140 g 相当量の米麴に汲み水 168 g (内, 酵母培養液 2 ml) を加えた。二次仕込みでは一次醪に汲み水 392 g と蒸煮・粉碎したサツマイモ 700 g を加えた。30°C の温浴槽で一次醪は 5 日間, 二次醪は 9 日間発酵させた。

### 3-2-7. 蒸留

蒸留は醪 900 g を 2 L 容のガラス製蒸留器にて, 蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留で行った。蒸留の終点は末垂れのアルコール度数が約 10%に到達した時点とした。終点のアルコール度数の測定は携帯型密度計 (アントンパール社, DMA-35) を用いた。焼酎のアルコール度数の測定は, 酒類用振動式密度計 (DA-155 京都電子工業(株), Kyoto, Japan) を用いた。原酒をアルコール度数 25%になるように脱塩水で割水し, 孔径 5  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターにてろ過をして得られたろ液を芋焼酎とした。

### 3-2-8. 二次醪及び焼酎の分析

二次醪及び得られた芋焼酎の一般分析(醪アルコール, 純アルコール, 原酒量, 原酒アルコール, 収得量, 蒸留歩合, pH (醪, 焼酎), 酸度(醪, 試留液), 全糖, 直糖に関しては, 第四回改訂国税庁所定分析法<sup>8)</sup>に従って行った。

二次醪のアミノ酸については, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (SHIMADZU-LC (株) 島津製作所, Kyoto, Japan) を用いて定量した。サンプルはガーゼろ過した二次醪を No.2 ろ紙ろ過し, 孔径 0.45 $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過して用いた。カラムは Shim-pack AMINO-NA ( (株) 島津製作所) を用い, 移動相は MM-MA 液, MM-MB 液 (島津製作所) を使用した。0 - 33 分 (B 液 0%  $\rightarrow$  100%) のグラジエント

溶出，オーブン温度は 60°C，流速は 0.6 ml/min で測定を行った。検出器は蛍光検出器 (RF-10AXL, (株) 島津製作所) を用いた。

### 3-2-9. 焼酎香気成分の GC-MS 解析

芋焼酎 10 ml と内部標準物質である 1-pentanol (10 mg/l) 1 ml を 200 ml 容の専用ボトルに入れ，密閉し 30°C の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc. の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 ml 吸引し，GC-MS に自動注入した。焼酎の揮発成分の同定および定量分析はアジレント・テクノロジー (株) の GC-MS (GC, Agilent 6890 ; MS, Agilent 5979B) により行った。成分の一次同定は，Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより行った。GC-MS 分析条件は以下の Table 3-2 に示した。

### 3-2-10. 焼酎の官能評価

官能評価試験は，アルコール濃度を 25% に統一した焼酎にて実施した。清酒のフレーバーホイール<sup>12)</sup>を参考に香りから果実香，エステル，ナッツ香，麴香，甘香，焦臭，酸臭と焼酎は主原料の香味も重要であることから原料の 8 項目，味の中から甘味，濃淡，苦味，渋味，刺激味，酸味の 6 項目を選択した。パネルは 7 名 (男性 2 名，女性 5 名) で行い，対照の焼酎を基準 (普通=3) として焼酎の香味の強度を 1-5 で評価した (1=非常に弱い，2=弱い，3=普通，4=強い，5=非常に強い)。また、特徴的な香味を感じる際は自由コメントにて表記してもらった。官能評価の結果はそれぞれの香りごとに平均し，レーダーチャートにプロットした。

Table 3-2 GC/MS analysis condition of the samples.

Thermodesorption system	Entech 7100A
Injection volume	100 µl
GC	Agilent 6890N
Column	DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film)
Carrier	Helium, 1 ml/min., constant flow mode
Oven	40°C, 5 min. hold → 3°C/min. to 240°C → 240°C, 5 min. hold
Analysis time	57.2 min.
Injector temperature	220°C
Transfer line	250°C
Quadruple ion trap temperature	150°C
Ion source temperature	250°C
MS	Agilent 5975B
Mode	SCAN

### 第3節 結果及び考察

#### 3-3-1. プロテアーゼ活性の高い黒麴菌の一次選抜

株式会社ビオックの保存菌株の中から、分生子が黒色且つ生育に問題の無かった 55 株を用いて麴の作製を行い、菌株生育、出麴状貌、酵素活性にて菌株の選抜を行った。その結果を Table 3-3 に示す。

選抜の判断方法は、対照株を基準として菌株の生育が悪くないもの、分生子の着生が著しく悪くないもの、出麴時の麴の香りに異臭がしないもの、酵素活性において対照株と同一倍率で希釈を行い測定した際に吸光度の値が大きいものを選抜基準とした。スラント等での生育確認試験で問題の無かった菌株を用いて行っているため、製麴においてもほとんどの菌株で生育が認められた。分生子着生量は、*A. luchuensis* var. *awamori* よりも *A. luchuensis* var. *saitoi* の方が多い。黒麴菌の中でもタイプによって分生子着生量に差異があることから、今回の試験においては分生子着生量の顕著に多い菌株は対照株である *A. luchuensis* var. *awamori* とは異なるタイプの菌である可能性が考えられた。麴のしまりは菌糸の長さに影響される。製麴時の作業性の問題から麴のしまりについてはあまり強くない方が好ましいため、実用株である対照株より著しく強い菌株に関しては実用に不向きであると考えられる。菌糸の色は、黒麴菌の近縁種である *A. niger* で黄色になるものがある<sup>13)</sup>。また、出麴時の香りは、*A. niger* では土様の香りがあるとされ<sup>14)</sup>、対照株の香りと比較して異質なものに関しては除外した。酵素活性に関しては、正確な分解活性ではないものの、対照菌株よりも高い活性のものを選抜する意図から、簡便化して実施した。測定時の Blank に関してはどの菌株も類似した値になることが多いため、今回の選抜では活性測定時の Main の数値で判断している。

上記条件を満たしている 15 株を一次選抜通過株とし、二次選抜に供試した。

Table 3-3 The first selection result of the strain

KBN No.	The form of <i>de-koji</i>					OD(Main)	
	Growth	Conidia	Mycelium entanglement	Mycelium color	Flavor	AP(660nm)	ACP(570nm)
4007	○	+	±	-	-	0.170	0.606
4010	○	++	+	-	-	0.146	0.559
4011	△	±	-	-	Blue mold	0.123	0.396
4019	△	±	-	-	Blue mold	0.075	0.204
4021	○	±	+	-	-	0.145	0.646
4024	×	±	-	-	-	0.033	0.060
4035	○	-	-	-	-	0.053	0.134
4037	△	±	-	-	-	0.092	0.515
4038	○	+	+	-	-	0.319	0.614
4039	○	++	+	-	-	0.230	0.604
4040	○	++	+	-	-	0.231	0.632
4041	○	+	±	-	-	0.356	0.730
4044	○	+	±	-	-	0.157	0.858
4045	○	+	±	-	-	0.135	0.937
4048	○	++	++	-	-	0.137	0.519
4052	○	+	±	-	-	0.164	0.822
4053	○	+	±	-	-	0.188	1.274
4058	○	++	±	-	-	0.148	0.560
4059	○	++	±	-	-	0.261	0.788
4062	○	+	+	-	-	0.213	0.667
4067	○	+	+	-	-	0.111	0.472
4068	○	++	+	-	-	0.145	0.528
4069	○	+	+	-	-	0.176	0.685
4070	○	-	-	-	-	0.025	0.158
4073	○	+	±	-	-	0.240	0.606
4076	○	+	±	-	-	0.116	0.292
4079	○	+++	+	-	-	0.198	0.674
4080	○	++	+	-	-	0.306	0.693
4081	○	++	+	-	-	0.229	0.542
4087	○	+++	+	-	-	0.350	0.661
4108	○	±	+	-	-	0.193	0.290
4109	×	±	-	-	-	0.024	0.029
4110	○	+	±	-	-	0.142	0.491
4111	○	++	++	-	-	0.118	0.254
4112	○	+	++	-	-	0.182	0.596
4113	○	+	+	Yellow	Blue mold	0.158	0.678
4114	○	+	+	-	-	0.156	0.557
4115	△	+	±	-	-	0.038	0.054
4116	△	+	-	-	±	0.081	0.089
4117	○	+	±	Yellow	-	0.206	0.500
4118	×	±	-	-	-	0.020	0.025
4119	×	±	-	-	-	0.029	0.051
4120	○	±	+	-	Mold	0.237	0.568
4121	○	±	+	-	-	0.217	0.455
4122	○	++	+	-	-	0.484	0.756
4123	○	++	+	-	-	0.458	0.705
4124	○	++	+	Yellow	-	0.379	0.562
4125	○	++	+	-	-	0.458	0.682
4126	○	++	+	-	-	0.400	0.639
4127	○	+	±	-	-	0.211	0.281
4128	○	++	+	-	-	0.374	0.437
4129	○	+	±	Yellow	-	0.267	0.382
4130	○	+	±	-	-	0.119	0.162
4131	○	+++	±	-	-	0.282	0.501
4132	△	±	+	-	-	0.103	0.140
4133	○	+	-	-	Mold	0.311	0.302
<i>A. luchuensis</i> (Con.)	○	+	+	-	-	0.278	0.679

○(Good)⇔×(Bad) , +++ (Strong, Many) ⇔ - (Weak, Few)

### 3-3-2. プロテアーゼ活性の高い黒麹菌の二次選抜

一次選抜通過の 15 株を用いて、2 回以上の製麴を行い、菌株としての安定及び再現性、出麴酸度と酵素活性の測定を行った。その結果を Table 3-4 に示す。

どの菌株も一次選抜を通過しているため、生育や出麴状貌に異常のある菌株は認められなかった。出麴酸度は、著しく低い酸度の菌株は認められなかった。AP 活性は対照株よりも高い活性の株が 10 株認められた。ACP 活性は KBN4128 を除くすべての株で対照株よりも高い活性となった。そのため、酵素活性は AP 活性を基準に選抜を行った。しかし、KBN4053 に関しては、対照株の 2 倍以上の ACP 活性を有しており、特徴的な酵素活性を有していることから通過株とした。

上記の内容から、二次選抜通過株として 11 株を選抜した。

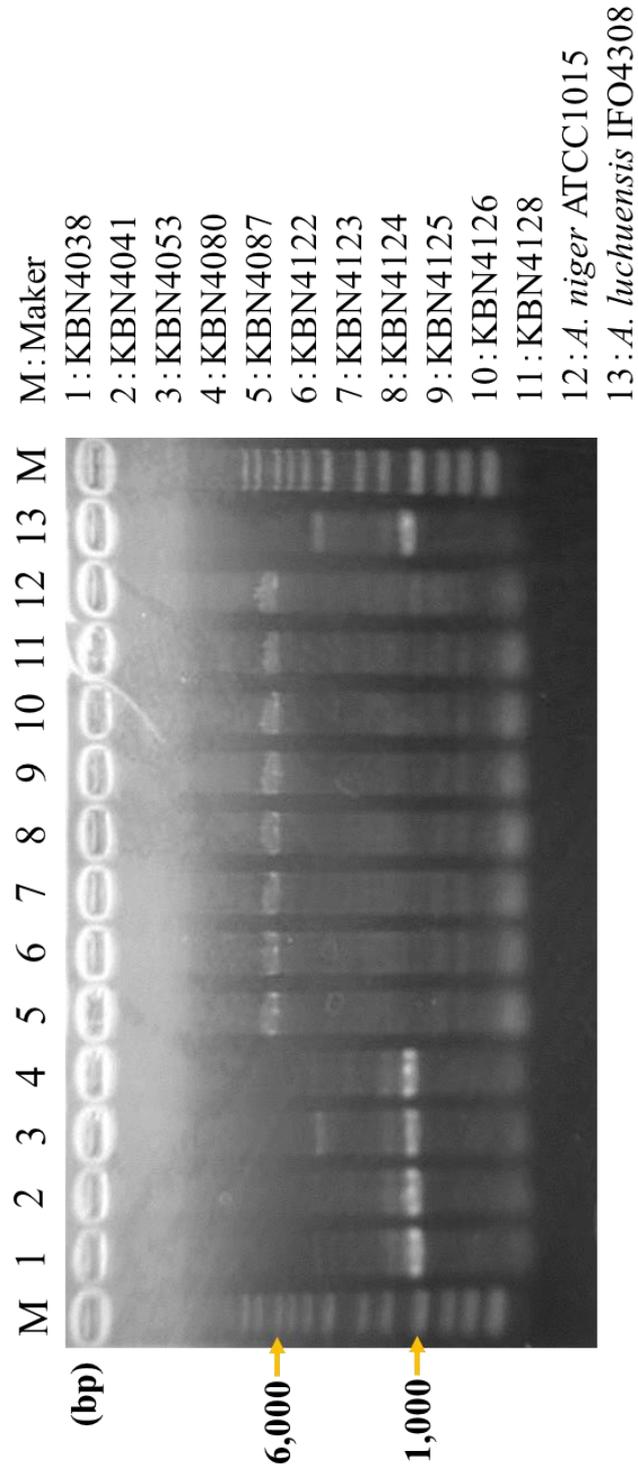
Table 3-4 The second selection result of the strain

KBN No.	The form of <i>de-koji</i>				Acidity (ml)	Enzyme activeites(U/g <i>koji</i> )	
	Growth	Conidia	Mycelium entanglement	Mycelium color		Flavor	AP
4038	○	+	±	-	3.4 ±0.3	19,029 ±1,007	2,946 ±106
4041	○	±	±	-	3.3 ±0.3	23,852 ±1,166	3,461 ±117
4044	○	+	±	-	5.3 ±0.1	6,979 ±440	2,934 ±816
4045	○	+	-	-	7.3 ±0.8	7,584 ±328	3,189 ±514
4052	○	++	±	-	5.4 ±0.1	6,957 ±405	2,733 ±154
4053	○	±	-	-	6.7 ±0.4	9,412 ±985	5,253 ±427
4059	○	+	-	-	6.4 ±0.4	11,516 ±902	2,706 ±527
4080	○	+	±	-	5.8 ±0.8	20,854 ±1,348	2,852 ±200
4087	○	+++	±	-	7.3 ±0.4	26,314 ±978	3,390 ±660
4122	○	++	+	-	6.9 ±0.1	24,003 ±257	3,230 ±405
4123	○	++	+	-	7.0 ±0.5	23,852 ±1,166	3,250 ±14
4124	○	+	+	-	4.7 ±1.1	21,373 ±146	2,231 ±223
4125	○	++	±	-	6.6 ±0.2	23,860 ±1,916	3,264 ±95
4126	○	++	±	-	5.5 ±0.6	19,366 ±2,511	2,608 ±474
4128	○	++	±	-	6.1 ±0.4	21,118 ±976	2,296 ±20
<i>A. luchuensis</i> (Con.)	○	+	±	-	5.0 ±0.1	15,547 ±861	2,526 ±188

○(Good) ⇔ ×(Bad) , +++ (Strong, Many) ⇔ - (Weak, Few)  
Mean±SD(n=2)

### 3-3-3. PCR による糸状菌株の *A. luchuensis* 簡易判別

我が国が定める国菌における焼酎麴菌株の定義は、*A. luchuensis* 及びその白色変異株である *A. luchuensis* mut. *kawachii* であり、酵素産業等で利用されている近縁種である *A. niger* は含まない<sup>16)</sup>。黒麴菌の *A. luchuensis* の近縁種である *A. niger* は、黒色の分生子を着生し、クエン酸生成能及び酵素活性を有している点で、これまでの選抜で用いてきた方法では判断できない場合がある。*A. niger* はオクラトキシンやフモニシンなどのカビ毒を生産することが知られている。これまでに山田ら<sup>17)18)</sup>は、*A. luchuensis* のチトクローム b に加え histon 3 や  $\beta$ -tubulin などをコードする 2,500 塩基対の遺伝子解析とオクラトキシン産生性について検討し、黒麴菌がオクラトキシン合成能を有しないことを遺伝子レベルで明らかにした。また、*A. niger* のオクラトキシンとフモニシン産生性を解析したところ、カビ毒産生が確認された菌株の遺伝子型は、菌種に拘わらず同様の遺伝子型に集中しており、*A. luchuensis* では、オクラトキシン及びフモニシンを産生する株は 1 株も認められない<sup>19)</sup>。そこで、*fum* 遺伝子に着目し、選抜株の中から *A. niger* を除外するために PCR による簡易判別を行った<sup>8)</sup>。得られた PCR 産物を電気泳動した結果を Fig.4-1 に示す。Lane 12 の *A. niger* ATCC 1015 と同じ 6,000 bp 付近にバンドが検出されると「*A. niger* type」となり、Lane 13 の *A. luchuensis* IFO 4308 と同じ 1,000 bp 付近にバンドが検出されると「*A. luchuensis* type」と判断できる。選抜した 11 株のうち 6 株(Lane 5-11)において、*A. niger* ATCC1015 と同じ 6,000 bp 付近にバンドが検出され、「*A. niger* type」であった。Lane 1-4 の KBN4038, KBN4041, KBN4053, KBN4080 では、目的とする *A. luchuensis* IFO 4308 と同じ 1,000 bp 付近にバンドが検出されたことから、「*A. luchuensis* type」であった。上記の結果から、KBN4038, KBN4041, KBN4053, KBN4080 を選抜の黒麴菌株とし、以後の実験に供試していくこととした。



**Fig.3-1 Result of Fum gene PCR in selected strains**

### 3-3-4. 高プロテアーゼ黒麹菌選抜株麴の麴酸度と酵素活性

選抜株の種麴を用いて製麴を行った結果を Table 3-5 に示した。なお、KBN4053 は種麴製造の際に生育がやや緩慢で著しく孢子着生が悪くなったため、種麴製造に適していない株と判断して除外した。

出麴酸度は二次選抜時と同様に KBN4038 及び KBN4041 では 3.0-4.0 ml と低い値となった。対照が二次選抜時よりも高い値となっているが、この実験では市販種麴を用いて製麴を行っている。市販種麴は酵素活性の高い *A. luchuensis* var. *awamori* と生酸性の高い *A. luchuensis* var. *saitoi* を混合している複菌と呼ばれるものである。生酸性の高い *A. luchuensis* var. *saitoi* が混ざっていることによって、単菌で行っていた二次選抜時よりも対照の出麴酸度が高くなっている。

AA 活性及び AsAA 活性は KBN4038 及び KBN4041 で対照と比較して、AA 活性で 2.1-2.8 倍、AsAA 活性で 1.9-2.4 倍と高い活性を有していた。これらの活性は醪中での液化に関わる酵素であることから原料利用率の向上につながる可能性も考えられた。また、これまで報告されている黒麹菌の AA 及び AsAA 活性<sup>7)</sup>よりも特徴的な活性であることから、酒質への影響も期待された。GA 活性に関しては、選抜株は対照と比較して遜色ない活性を有していた。BG 活性は、対照が最も高い活性を示し、最も活性の低い KBN4041 株では対照の 1/3 程度の活性であった。BG 活性は芋焼酎の特徴香のひとつとされるテルペン類の生成に関与すると考えられている<sup>9)</sup>。選抜株はあまり BG 活性が高くない菌株であることから、BG 活性の高い菌株と組み合わせて複菌の形態を取るなどの種麴作製時の方法も考えられた。CEL 活性は対照と比較して、KBN4038 で約 2.5 倍、KBN4041 で約 1.9 倍の活性となった。CEL は難分解性の糖分解に関与する酵素である。CEL 酵素剤を添加した醪では、食物繊維分解酵素添加によって醪粘度が低下し、減圧蒸留が容易となった報告<sup>19)</sup>もあることから、主原料であるサツマイモを投入した後の二次醪の流動性の向上や原料利用率の向上も期待された。XY 活性も CEL 活性同様に KBN4038 で対照の約 2.1 倍と高い活性となった。XY 活性は醪中にキシ

ロースを遊離させる。「香ばしさ」などが特徴のフルフラールは、麦焼酎製造中に遊離したキシロースから、クエン酸に起因する醪の低 pH 条件下で、蒸留時の加熱によって生成することが報告<sup>20)</sup>されている。この酵素はキシロース生成に関与し、蒸留中にキシロース、クエン酸およびアミノ酸との相互作用により、焼酎の香味の特徴のひとつであるフルフラール生成に寄与する<sup>6)</sup>ことから、焼酎中のフルフラールに影響を与える可能性も推察された。

菌株選抜の指標としたタンパク質分解系の酵素である AP 及び ACP 活性は、ACP 活性においては対照と比較して大きな差異は認められなかったが、選抜株では AP 活性では対照と比較して 1.3~1.7 倍の活性となった。選抜株の中では KBN4038 が AP 及び ACP 活性共に最も活性が高い結果であった。AP 活性については、芋焼酎醪でプロテアーゼ剤を添加した醪の流動性の向上とアルコール収得率の向上、アルデヒド類の増加に伴う酒質の変化が報告されている<sup>5)</sup>ことから、選抜株のように AP 活性の高い株を用いて焼酎製造を行うことで、同様の酒質への影響があることが期待された。

Table 3-5 Acidity and enzyme activities of selected strain *koji*

Acidity (ml)	Enzyme activities(U/g dry <i>koji</i> )								
	AA <sup>※1</sup>	AsAA <sup>※2</sup>	GA <sup>※3</sup>	BG <sup>※4</sup>	CEL <sup>※5</sup>	XY <sup>※6</sup>	AP <sup>※7</sup>	ACP <sup>※8</sup>	
KBN4038	3.5 ±0.1	424 ±40	322 ±40	198 ±5	223 ±3	453 ±2	330 ±17	44,535 ±138	8,568 ±251
KBN4041	3.3 ±0.0	317 ±16	254 ±3	253 ±12	132 ±7	345 ±0	123 ±5	39,823 ±315	7,006 ±67
KBN4080	4.6 ±0.2	173 ±6	143 ±6	162 ±3	224 ±6	212 ±36	119 ±38	34,215 ±222	6,068 ±395
Control	6.8 ±0.3	149 ±2	131 ±4	217 ±12	422 ±7	183 ±30	157 ±40	26,161 ±1,122	7,102 ±834
Mean±SD(n=2)									

※1:  $\alpha$ -Amylase, ※2: Acid-resistant  $\alpha$ -Amylase, ※3: Glucoamylase, ※4:  $\beta$ -Glucosidase, ※5: Cellulase, ※6: Xylanase

※7: Acid Protease, ※8: Acid Carboxypeptidase

### 3-3-5. 黒麴菌選抜株麴を用いた芋焼酎醪と芋焼酎

選抜した黒麴菌株を用いて作製した麴を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行った。選抜株の芋焼酎の二次醪の結果を Table 3-6 に示した。

全体的に対照である実用麴菌株(市販種麴)と比較して遜色ない値が得られ、選抜株を用いても問題なく焼酎製造が行えることが明らかとなった。pH 及び醪の酸度については、対照が最も pH が低く、酸度が高かった。これは、麴酸度に起因しており、対照の出麴酸度は選抜株の 1.5-2.0 倍であったためと考えられる。醪の pH 及び酸度は醪の腐造に関係してくるが、選抜株醪の揮発酸度は対照と大きく差があるものではなかったことから、細菌汚染はなかったと考えられる。醪のアルコール濃度は対照が最も高い値を示したが、純アルコール量に差異は認められなかった。還元糖量は選抜株と対照株で差異はないものの、全糖量では KBN4038 がやや高くなった。KBN4038 は CEL 活性が最も高い麴であり、繊維質分解やそれに伴うアルコールの増加が期待されたが、アルコール量等への影響は認められなかった。酵母の総菌数や生菌率についても、選抜株と対照株で差異は認められず、十分に酵母が生育していたと考えられた。本研究は、第 2 章に示した結果から醪中のアミノ酸量を増加させるために、プロテアーゼ活性に着目して黒麴菌株を選抜してきた。醪のアミノ酸度は、麴の酵素活性分析のプロテアーゼ活性と相関のある結果が得られた。これまで、プロテアーゼ製剤を添加し、醪中のアミノ酸濃度が増加し、得られた焼酎のアルデヒド類が増加し、香気が変化することが知られている<sup>5)</sup>。新しく麴のプロテアーゼ活性に着目し、菌株を選抜したことで、目的とする醪中のアミノ酸の増加が認められた。

蒸留後の得られた焼酎の原酒量及び蒸留歩合を Table 3-7 に示す。原酒量及び蒸留歩合から、問題の無い蒸留が行われたと考えられた。また、未だれを多く採取すると焦げ臭の原因となるが、蒸留した各醪共にほぼ同じ蒸留時間で終了している。

Table 3-6 Analysis of 2nd Ferment *moromi-mash*

	pH	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	<i>Moromi</i> Alc. (%)	Absolute alcohol (g)	Volatile acidity (ml)	Sugar		The number of the Yeast		
							Total (%)	Reducing (%)	Total ( $\times 10^8$ cells/g)	Viable ( $\times 10^8$ cells/g)	Rate (%)
KBN4038	4.4 $\pm$ 0.0	5.9 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.1	15.1 $\pm$ 0.0	151 $\pm$ 1	1.1 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	24.2 $\pm$ 4.3
KBN4041	4.4 $\pm$ 0.0	5.6 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.0	15.1 $\pm$ 0.1	150 $\pm$ 1	1.7 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2	32.3 $\pm$ 0.9
KBN4080	4.3 $\pm$ 0.0	5.9 $\pm$ 0.0	2.5 $\pm$ 0.1	15.2 $\pm$ 0.3	151 $\pm$ 3	1.1 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.1	25.8 $\pm$ 2.4
Control	4.2 $\pm$ 0.0	6.2 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.2	151 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.1	29.6 $\pm$ 0.4

Mean $\pm$ SD(n=2)

Table 3-7 Analysis of alcohol levels and *shochu*.

	Unrefined <i>shochu</i> (ml)	Unrefined <i>shochu</i> Alc. content (%)	Distillation percentage (%)
KBN4038	331 ±4	39.0 ±0.4	94.7 ±0.5
KBN4041	327 ±15	38.3 ±0.5	92.0 ±4.9
KBN4080	347 ±2	37.9 ±0.6	96.1 ±0.2
Control	333 ±13	38.2 ±0.9	92.4 ±2.9

Mean±SD(n=2)

### 3-3-6. 黒麴菌選抜株麴を用いた芋焼酎醪のアミノ酸組成

プロテアーゼ活性の高い黒麴菌選抜株麴を行い、芋焼酎の小仕込みを行ったところ、二次醪末期のアミノ酸度が対照の実用麴菌株(市販種麴)を用いた芋焼酎醪と比較して増加した。そこで、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて、アミノ酸組成及び濃度を測定した結果を Fig.3-2 に示す。総アミノ酸量において、KBN4038 が最も高い濃度となり、次いで KBN4041, 3 番目に KBN4080, 最も対照が低い濃度であった。各二次醪末期のアミノ酸度の数値と相関が得られた。また、各アミノ酸別では、ほとんどのアミノ酸が総アミノ酸量と同様の大小関係となった。ロイシン, バリン, イソロイシンなどの増加によって、酵母がそれらアミノ酸を資化して高級アルコールが生成される<sup>21-23)</sup>。アルデヒド類は、発酵中に酵母の代謝によってアミノ酸から生成<sup>24)</sup>される他に、アセトアルデヒド, イソブチルアルデヒド, 2-メチルブチルアルデヒドおよびイソバレルアルデヒドは、それぞれアラニン, バリン, イソロイシンおよびロイシンからストレッカー分解により生成する<sup>25)</sup>ことが知られている。各選抜株醪のアミノ酸量は菌株によって異なることから、香気成分への影響が考えられた。

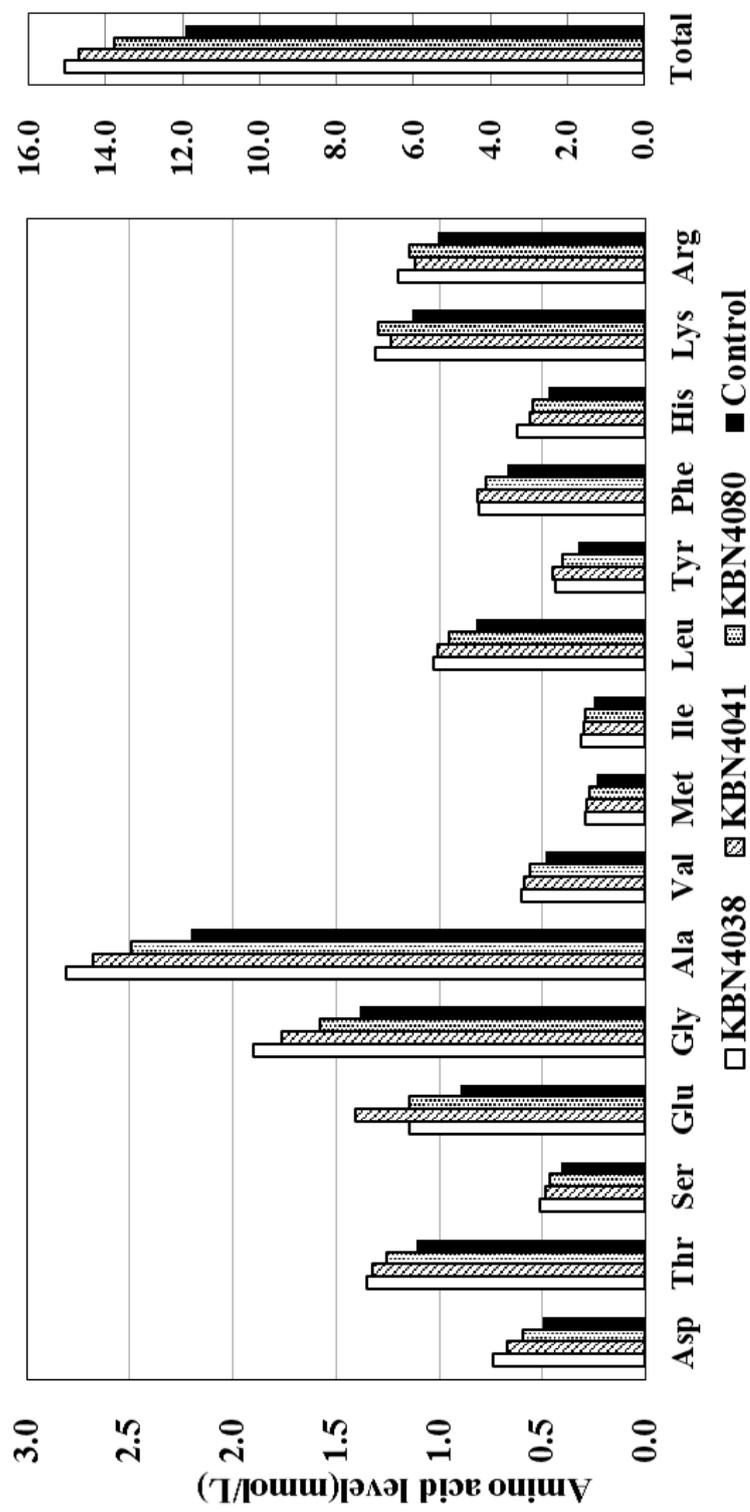


Fig.3-2 Amino acid composition and level of 2<sup>nd</sup> moromi of *imo-shochu* of black *koji* selected strain.

### 3-3-7. 黒麴菌選抜株麴を用いた芋焼酎の香気成分解析

黒麴菌選抜株麴を用いた芋焼酎の GC-MS 解析の結果を Table 3-8 に示す。第 2 章の GC-MS 解析に従い、高級アルコール類、アルデヒド類、テルペン類に着目して解析した。

高級アルコール類は、プロテアーゼ活性の高い黒麴菌選抜株を用いているが、プロテアーゼ剤を添加して作製した芋焼酎の結果<sup>6)</sup>とは異なり、イソブチルアルコールは選抜株焼酎では対照焼酎と比較して 1.1-1.2 倍であった。プロテアーゼ剤添加焼酎の結果では、対照の Arg 濃度に比べ、添加醪の Arg 濃度が 2 倍になっていた。選抜株醪では対照醪より大きく Arg 濃度が高くなることはなかったことから、酵母が高級アルコールに関わるアミノ酸類を変換し、イソブチルアルコール濃度が選抜株焼酎で高くなったと考えられた。1-オクテン-3-オールは対照焼酎と選抜株焼酎で最も含有量の差が大きいアルコール類であった。最も高かった KBN4038 焼酎では対照焼酎の 32 倍の濃度を含有していた。1-オクテン-3-オールは「キノコ臭」と知られるアルコール類である。清酒麴製造時の出麴の判断をする際に経験的に言われてきた、「栗香」と呼ばれる香りの構成成分であり<sup>26)</sup>、Yoshizaki ら<sup>27)</sup>、黄麴、白麴、黒麴の香気成分の比較において、黄麴と黒麴で 1-オクテン-3-オールが高いことを報告している。また、泡盛の特徴的な香気成分のひとつともされている<sup>28)</sup>。選抜株では、これまで芋焼酎で報告<sup>29)</sup>されてきた 1-オクテン-3-オール濃度より数倍の濃度であった。1-オクテン-3-オールは、米由来のリノール酸から生成されるとされている<sup>30)</sup>。本研究では、プロテアーゼ活性の高い菌株に着目してスクリーニングを行ってきたが、今回の結果では、プロテアーゼ活性が高い株程、1-オクテン-3-オールが高い傾向となった。麴の酵素活性の結果から、KBN4038 及び KBN4041 の 2 株は対照と比較して、BG 活性は対照株よりも両菌株ともに低い活性であったがその他の酵素では同等もしくは高い活性となり、選抜の指標に用いた AP 活性以外の酵素活性も高い傾向にあった。現時点で黒麴菌株を用いた麴<sup>27)</sup>、黒麴菌株を用いた焼酎に高い<sup>28)</sup>ことは知られているものの、関与してい

る酵素等に関しては不明な点も多い。高橋ら<sup>30)</sup>は清酒用麴では菌体量が同じでも、麴の香りが強い麴では 1-オクテン-3-オールが 3 倍、 $\alpha$ -アミラーゼや酸性プロテアーゼは 2 倍高く、麴の香りが強い麴は酵素を含めたタンパク質生産量とリノール酸量が多いと報告している。選抜株で特に 1-オクテン-3-オール濃度の高かった KBN4038 と KBN4041 については、プロテアーゼ活性以外の酵素も高かったことから、タンパク質生産量が多いといえる。本研究で選抜してきた黒麴菌株は 1-オクテン-3-オール生成が高いのは明らかであり、生成に関わる酵素の活性やタンパク質生産量等が従来在市販種麴に使用されている黒麴菌株とは異なっていることが示唆された。

アルデヒド類は、発酵中に酵母の代謝によってアミノ酸から生成<sup>24)</sup>される他に、蒸留時にメイラード反応やストレッカー分解により生成する<sup>6)25)</sup>ことが知られている。プロテアーゼ剤添加焼酎では酵母の代謝に加え、二次醪末期で残存しているアミノ酸量が多かったことから、無添加であった対照焼酎と比較して顕著に増加する結果となった。選抜株焼酎においては、プロテアーゼ剤添加焼酎のような増加はなかったものの、イソバレルアルデヒド、ベンズアルデヒドで KBN4038 及び KBN4041 の 2 株が 1.2-1.6 倍の濃度となった。イソバレルアルデヒドはストレッカー分解ではロイシンから変換される<sup>25)</sup>。選抜株焼酎では対照株よりも高い AP 活性及び ACP 活性によって醪中のアミノ酸濃度が増加し、酵母による代謝及び蒸留時にアルデヒド類に変換されたと考えられた。フルフラールは蒸留時の pH、糖及びアミノ酸に影響される<sup>6)20)</sup>。選抜株では二次醪末期のアミノ酸量は対照よりも多かったが、フルフラール濃度は KBN4080 を除いて同程度であった。醪の pH 及び酸度は対照醪が低 pH 且つ高酸度であるため、それらの影響が考えられた。

テルペン類は、BG 活性は対照麴が最も高い活性を示し、黒麴菌選抜株と比べて 1.9 倍の活性であった。しかし、テルペン類の濃度は対照焼酎及び選抜株焼酎では差異の無い結果となった。テルペン類の生産は BG 活性以外の関与の可能性も考えられた。

プロテアーゼ活性の高い黒麹選抜を用いた焼酎の香気成分は、対照焼酎と類似した傾向を示すものの、アミノ酸が関与する高級アルコール類及びアルデヒド類の濃度が若干高くなった。その他の特徴として、1-オクテン-3-オールの濃度が顕著に高く、官能評価でも酒質に影響を与えると推察された。

### 3-3-8. 選抜株を用いた芋焼酎の官能評価

選抜株焼酎の官能評価の結果を Fig.3-3 に示す。

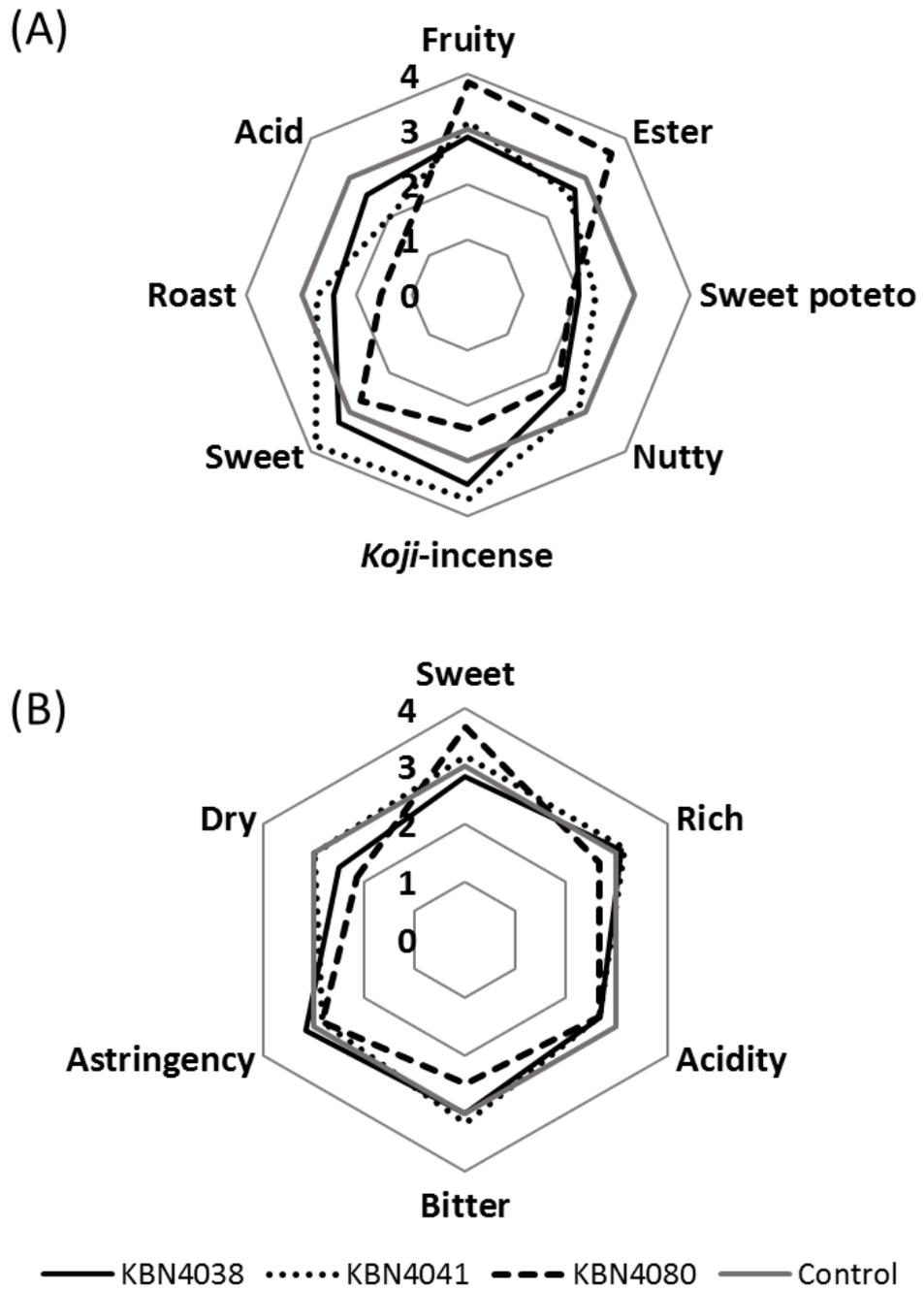
香りは KBN4038 及び KBN4041 が甘香、麴香で対照焼酎よりも強いという評価となった。KBN4038 及び KBN4041 の焼酎は香気成分の解析で 1-オクテン-3-オールが高かった焼酎である。これらの焼酎にはキノコ、出汁様とのコメントもあることから、1-オクテン-3-オールが甘香及び麴香に寄与したと考えられた。KBN4080 では果実様及びエステルが他の焼酎よりも強いとの評価を得た。プロテアーゼ剤添加した焼酎は対照と比べ果実様及び焦げの香りが強くなるとされている<sup>5)</sup>。プロテアーゼ活性の高い黒麹菌選抜株を用い焼酎製造を行った結果、醪中のアミノ酸量は増加し、得られた焼酎ではアルデヒド類のイソバレルアルデヒドが対照株よりも増加していたが、果実様では KBN4080 以外は同等となり、香ばしさでは対照焼酎が最も強い評価であった。香ばしさの要因となるフルフラールの濃度は同等であったことから、KBN4038 及び KBN4041 焼酎では甘香及び麴香によって、マスキングされた可能性が考えられた。

味は、概ね対照焼酎に類似したレーダーチャートの形になったが、選抜焼酎では、KBN4038 及び KBN4041 焼酎は、やや甘さと濃厚さがあり、刺激味の少ないまろやかな焼酎という評価になった。味の評価は、香りの評価で KBN4038 と KBN4041 は甘香が強いとの評価を受けており、香りに影響された可能性が示唆された。

選抜株焼酎は、「果実」、「まろやか」という評価において、第 2 章のプロテアーゼ剤添加焼酎と類似した点が認められた。

Table 3-8 Average and standard deviation of concentration of volatile compounds of *imo-shochu*

Compound	(unit)	Peak-RI	Volatile compounds concentration			
			KBN4038	KBN4041	KBN4080	Control
<b>Alcohol(4)</b>						
n-Propyl alcohol	(mg/l)	1,038	100 ±1	124 ±2	106 ±11	103 ±1
Isobutyl alcohol	(mg/l)	1,098	243 ±7	258 ±1	231 ±16	212 ±6
Isoamyl alcohol	(mg/l)	1,216	270 ±6	261 ±5	262 ±5	269 ±0
1-octen-3-ol	(µg/l)	1,448	527.0 ±21.6	282.4 ±29.5	173.8 ±11.5	16.1 ±0.4
<b>Aldehyde(6)</b>						
Acetaldehyde	(µg/l)	*745	1,252 ±18	1,516 ±169	1,133 ±99	1,220 ±61.4
Isobutyraldehyde	(µg/l)	907	57.7 ±1.3	64.0 ±0.6	57.0 ±10.8	64.0 ±3.4
2- Methylbutyraldehyde	(µg/l)	909	56.0 ±1.4	60.4 ±1.5	52.3 ±12.6	56.8 ±1.2
Isovaleraldehyde	(µg/l)	910	58.1 ±1.1	63.5 ±2.5	47.4 ±11.5	46.6 ±1.0
Furfural	(µg/l)	1,459	446 ±3.3	427 ±40	356 ±35	437 ±69
Benzaldehyde	(µg/l)	1,519	7.69 ±3.30	7.38 ±0.01	4.27 ±0.16	4.86 ±0.15
<b>Terpene(3)</b>						
p-Cymene	(µg/l)	1,266	0.35 ±0.08	0.37 ±0.08	0.37 ±0.17	0.37 ±0.06
Rose oxide	(µg/l)	1,369	0.38 ±0.01	0.34 ±0.02	0.34 ±0.02	0.34 ±0.02
Linalool	(µg/l)	1,545	8.28 ±0.32	7.48 ±0.09	7.48 ±0.15	7.48 ±0.28
						Mean±SD(n=2)



**Fig.3-3 Spider plot for sensory evaluation of (A) odours and (B) tastes of *imo-shochu* of black *koji* selected starin.**

#### 第 4 節 要約

株式会社ビオックの保存菌株の中から斜面培地上で黒い分生子を着生する 55 株の糸状菌から、プロテアーゼ活性の高い黒麹菌の選抜を行い、得られた黒麹菌選抜株を用いて、芋焼酎の作製を行い、酒質の差異を検討した。

候補株 55 株すべてに対して製麹を実施し、出麹状貌、菌株の安定性、麴酸度及び酵素活性から、11 株を通過株とした。しかし、実施した選抜方法では、通過株の中に *A. luchuensis* の近縁種である *A. niger* が混在している可能性がある。そこで、カビ毒のフモニシンの遺伝子に着目し、PCR による簡易判別を行い、4 株の *A. luchuensis* type の菌株を得た。選抜した 4 株の中で、KBN4053 は種麹作製の際に著しく分生子着生が悪かったことから、種麹作製に不向きな菌株であるため選抜株から除外し、KBN4038, KBN4041, KBN4080 の 3 株をプロテアーゼ活性の高い黒麹菌選抜株とした。

黒麹菌選抜株 3 株と対照として市販種麹を用いて製麹を行ったところ、選抜株は全体的に市販種麹に比べ高い酵素活性となった。特に選抜条件としてきた AP 活性は対照の 1.3-1.7 倍と高い活性となった。選抜株の中では特に KBN4038 の AP 活性が高かった。麴酸度及び BG 活性は、対照が最も高い活性となった。得られた黒麹菌選抜株麴を用いて芋焼酎の小仕込みを行った。その結果、問題の無い発酵となり、純アルコール量等も対照と遜色のない結果であった。醪の pH 及び酸度は麴酸度の影響を受けて対照が若干低 pH 及び高酸度になった。選抜株は AP 活性が高いことから、醪のアミノ酸度が対照醪よりも高くなった。醪のアミノ酸量を測定しても、アミノ酸度の値と相関が認められた。また、アミノ酸別の大小関係も大きな差異はなく、選抜株では同じようなアミノ酸組成でアミノ酸量が増加していた。

黒麹菌選抜株を用いた芋焼酎の香気成分は、高級アルコール類はイソブチルアルコール濃度が対照よりも若干増加した。その他、特徴的な差異として、選抜株焼酎では 1-オクテン-3-オールの濃度が対照焼酎と比べ

高くなり、最も高い KBN4038 では対照の 32 倍の濃度であった。1-オクテン-3-オールは、麴由来の香りであり、泡盛などでは特徴的な香りのひとつである。タンパク質生産量及びリノール酸生産量の多い麴で高いとされており、選抜株は酵素活性からタンパク質生産量が高いことが示唆され、それに伴い 1-オクテン-3-オール生成能が高く、従来の市販種麴で使用されている黒麴菌株とは大きく異なった。アルデヒド類は、選抜株焼酎でイソバレルアルデヒド濃度が選抜株で高く、高いプロテアーゼ活性によって醪中のアミノ酸濃度が増加したためと考えられる。テルペン類は BG 活性では対照麴が最も高かったものの、選抜株焼酎及び対照焼酎に顕著な差異は認められなかった。

官能評価の結果、選抜株焼酎では甘香、麴香の評価が対照焼酎より高い結果となり、1-オクテン-3-オールが寄与した結果となった。プロテアーゼ剤添加焼酎では、香ばしさや果実香が強くなったが、選抜株焼酎では対照焼酎の方が高い評価となり、KBN4038 及び KBN4041 では甘香、麴香にマスキングされた可能性が示唆された。味についても、KBN4038 及び KBN4041 焼酎ではやや甘さと濃厚さがあり、刺激が少ない焼酎との評価となり、香りに影響された可能性が示唆された。

以上より、プロテアーゼ活性の高い黒麴菌選抜株を用いて芋焼酎の作製を行うことで、従来の市販種麴とは異なる、甘さ、まろやかさ、原料として用いた麴の香りが特徴的な酒質の焼酎が得られた。特に本研究で選抜した KBN4038 及び KBN4041 の両菌株はこれまでの芋焼酎の酒質とは明らかに異なっている。単独株の種麴では個性が強すぎる可能性も高いことから、ブレンド用の特徴的な原酒としての使用も考えられた。また、特徴の異なる出麴酸度が高く、BG 活性の高い黒麴菌と組み合わせ、複菌の種麴として使用することで特徴を活かし、新たな酒質の芋焼酎製造に貢献できるものと考えられる。

## 参考文献

- 1) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀沢浩幸, 神渡巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男 : 鹿児島県工業技術センター研究報告, **8**, 1-6 (1994)
- 2) 安藤義則, 高峯和則, 亀沢浩幸 : <http://www.kagoshima-it.go.jp/public/happyo/happyo2003/12-3.pdf>
- 3) Yamamoto, H., Morimura, S., Mizutani, M., Yamada, K., Ochi, H., Takayama, K., Kudo, T., Ohta, H., and Kida, K. : *J. Inst. Brew.*, **117**(4), 627-633 (2011)
- 4) 伊藤欣哉, 和久豊, 竹内良和, 神谷直方, 村井總一郎 : 日本醸造協会誌, **85**, 57-60(1990)
- 5) 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則 : 日本醸造協会誌, 印刷中
- 6) 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則 : 日本醸造協会誌, 印刷中
- 7) 注解編集委員会編, 第四回改訂国税庁所定分析法注解(財団法人日本醸造協会, 東京) (1993)
- 8) Yamada, O., Machida, M., Hosoyama, A., Goto, M., Takahashi, T., Futagami, T., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Koike, H., Abe, K., Asai, K., Arita, M., Fujita, N., Fukuda, K., Higa, K., Horikawa, H., Ishikawa, T., Jinno, K., Kato, Y., Kirimura, K., Mizutani, O., Nakasone, K., Sano, M., Shiraishi, Y., Tsukahara, M., and Gomi, K., : *DNA Res.*, DOI : 10.1093/dnares/dsw032, 1-9(2016)
- 9) 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝 : 日本醸造協会誌, **86**, 536-539 (1991)
- 10) 柏木豊 : 発酵糸状菌の酵素 微生物遺伝子資源利用マニュアル, (16) (2004)
- 11) 日本醤油研究所 編 : しょうゆ試験法(財団法人日本醤油研究所, 東京) (1985)

- 12) 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田博, 中野成美 : 酒類総合研究所報告, 178, <http://www.nrib.go.jp/date/pdf/seikoumihou.pdf> (2006)
- 13) Reid,W.,W., : *Nature*, **165**, 190-191 (1950)
- 14) 山田修 : 公益財団法人サッポロ生物科学振興財団 第 26 回報告書, [http://www.sapporoholdings.jp/foundation/jyosei/pdf/list\\_2010\\_06.pdf](http://www.sapporoholdings.jp/foundation/jyosei/pdf/list_2010_06.pdf) (2010)
- 15) 日本醸造学会 : <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
- 16) Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., and Mikami, S., : *J. Biosci. Bioeng.*, **112**, 233-237(2011)
- 17) 山田修 : 黒麹菌小話, NRIB15 (2009)
- 18) Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M., Nishimura,K. : *FEMS Microbiolgy Letters*, **200**, 241-246 (2011)
- 19) 中村希世, 柿元智, 森村茂, 木田健次, 真野直也 : 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集, 10 (1998)
- 20) 大石雅志, 田野上佳枝, 梶原康博, 高下秀春, 岡崎直人 : 日本醸造協会誌, **103** (9), 730-734 (2008)
- 21) K.OUCHI, Y.YAMAMOTO, M.TAKAGISHI, and H.AKIYAMA : *J.Ferment.Tecnol.*, **58**, 301 (1980)
- 22) 大内弘造, 高岸正邦, 山本泰彦, 秋山裕一 : 醗酵工学, **59** (1), 9-16 (1981)
- 23) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝 : 日本醸造協会誌, **81**, 626-632 (1986)
- 24) Ardö, Y. : *Biotechnol. Adv.*, **24**, 238-242 (2006)
- 25) 奥村烝司 : 日本醸造協会誌, **88** (3),178-187 (1993)
- 26) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭 : 日本醸造協会誌, **101**, 957-963 (2006)
- 27) Yoshizaki, Y., Yamato,H., Takamine, K., Tamaki, T., Ito, K., and Sameshima, Y. : *J. Inst. Brew.*, **116**, 49-55 (2010)
- 28) 福田央, 韓錦順, 山田修 : 日本醸造協会誌, **111**, 261-270 (2016)
- 29) 福田央, 韓錦順, 水谷治, 金井宗良, 山田修 : 日本醸造協会誌, **111**,

545-555(2016)

- 30) 高橋美絵，磯谷敦子，宇都宮仁，中野成美，小泉武夫，戸塚昭：日本醸造協会誌，**102**，403-411 (2007)

## 第4章 焼酎に含まれる麴が関与する主要な揮発成分

### 第1節 緒言

焼酎の製造はウイスキーとは多くの点で異なる。特に二つの重要で且つ不可欠な点が挙げられる。一つ目は麴菌を酵素源として用いている点である。もう一つは本格焼酎においては、一回の蒸留で醪から蒸留された留液は分画することはなく、全量を使用し商品化する点である。

麴菌は主に蒸した米や麦を用いて製麴し、その間に発酵に必要な酵素である $\alpha$ -アミラーゼやグルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなどを生産する<sup>1-3)</sup>。麦焼酎や麦味噌、醤油以外の醸造製品では麴原料は主に米を用いることが多く、それらは米麴と呼ばれる。米麴は、ウイスキーにおける麦芽と類似した役割を果たし、清酒、焼酎、味噌などの日本の伝統的な醸造製品の製造に用いられる。一方、中国や韓国などの東アジアの発酵食品にも麴菌のような糸状菌を用いた曲やヌルクがあり、酵素供給源として用いられている。曲やヌルクは、穀類に自然発生的に糸状菌を含む微生物を増殖させる。これに対して、日本では *Aspergillus* 属のみをスターターとして使用し、麴を造るという点で東アジアとは異なる。特に黄麴菌 (*Aspergillus oryzae*) は、清酒、味噌、醤油などの様々な醸造製品の製造に、白麴菌 (*A. luchuensis* mut. *kawachii*) と黒麴菌 (*A. luchuensis*) は専ら焼酎製造に用いられてきた。したがって、醸造に米麴を用いることは、世界の蒸留酒と焼酎の異なる大きな点であると言える。

焼酎の製造工程は、まず米麴に水と酵母を加え一次醪を造る。5日後、水と蒸した米・麦・芋などの主原料を一次醪に加え、二次醪とする。二次醪の状態ですら更に10日間ほど発酵させ、その後、蒸留釜にて蒸留を行う。

焼酎製造では、一回の蒸留で醪から蒸留された留液は集められ、次の蒸留では新たな醪が蒸留釜に入れられる単式蒸留が一般的である。得られた焼酎について、主原料由来の香気に着目した研究が多く報告され、様々な香气成分が同定・定量されている<sup>4)5)</sup>。

麴菌は、様々な酵素を菌体外に大量に分泌する特性を有し、その分泌機構を分子生物学的に解明し、有益な酵素の大量生産への応用のために多くの研究が行われてきた<sup>6-8)</sup>。しかし、酒類の香気成分に米麴が与える影響に関する研究は、詳細には行われていない。

麴の製造には蒸米への種麴の接種から 42 時間程度を要する。この間に蒸米の香りとは異なるものとなり、出麴時には、独特な栗やキノコ、墨のような香りとなる。麴造りの現場において、これらの麴の香りの変化は、米麴の品質を判断する役割を担っており、米麴中の鍵となる香気成分を調べる研究も行われており、イソブチルアルデヒド、イソバレルアルデヒド、1-オクテン-3-オール、フェニルアルデヒドは米麴の典型的な香気成分であると同定されている<sup>9-11)</sup>。また官能評価用語に「麴」という言葉があることから<sup>12)13)</sup>、米麴の香りは清酒や焼酎といった酒の香りにも影響を与えていることが推察される。

そこで、米麴が焼酎の香りに与える影響を確認するために、2 種類の焼酎を用いた。1 つ目は米麴と酵母と水だけで造ったもの(米麴焼酎)で、もうひとつは米麴の代わりに蒸米と数種類の酵素剤を加えたもの(酵素焼酎)である。それらを用い、焼酎中に含まれる香気成分を GC-MS, GC-MS/olfactometry と AEAD 及び官能評価にて行った。

## 第 2 節 実験方法

### 4-2-1. 使用菌株と酵素剤

使用酵母は焼酎用酵母である鹿児島 5 号酵母を用いた<sup>14)</sup>。米は、酒造メーカーが一般的に使用している国産の加工用米を用いた。種麴は市販の白麴菌 (*A. luchuensis* mut. *kawachii*) を用いた。酵素剤は、グルコアミラーゼはデキストロザイム-グルコアミラーゼ(日本澱粉工業社製)、 $\alpha$ -アミラーゼはスミチーム焼酎(新日本科学社製)、プロテアーゼはオリエンターゼ 20A(エイチビイアイ社製)を用いた。

### 4-2-2. 米麴の製麴

米麴の製麴は Yoshizaki ら<sup>9)</sup>の方法に従って行った。すなわち、洗米し、1 時間浸漬を行った。水切後、1 時間蒸煮した米を 43°C まで冷却した。種麴を蒸米に接種し、恒温恒湿器内で庫内温度 35°C、湿度 90% で 45 時間培養を行った。品温をサーモメーターで確認しながら培養を行い、品温が 38°C 以上にならないように調節しながら培養を行った。45 時間で培養終了とし、米麴は -80°C にて保存した。

### 4-2-3. 米麴焼酎

約 1.6 kg の米麴(生米 1.3 kg)に 2.4 L の水、酵母培養液を 40 ml を加え混合した。この米麴焼酎醪を 30°C で 11-12 日間発酵させ蒸留した。

### 4-2-4. 酵素焼酎

約 1.8 kg の蒸米(生米 1.3 kg)に 2.2 l の 80 mM クエン酸緩衝液(pH4.0)、酵母培養液を 40 ml、3 種類の酵素剤を添加し混合した。この酵素焼酎醪を 30°C で 11-12 日間発酵させ蒸留した。なお、クエン酸緩衝液を用いた理由は、白麴菌が多量のクエン酸を生成・分泌するため、醪の pH が低下するためである。

#### 4-2-5. アルコール発酵経過観察

アルコール発酵は CO<sub>2</sub> ガスの発生量を測定することでモニターした。すなわち，醪調製後に容器を含めて重量を測定し，その後毎日攪入れ時に容器ごと重量の測定を行った。初発の重量と発酵終了時の重量の差(重量減少量)を用いて，CO<sub>2</sub> 発生量を算出した。重量減少の曲線はグラフにプロットした。

#### 4-2-6. 醪の蒸留

醪の蒸留は Yoshizaki ら<sup>4)</sup>の方法に従って行った。すなわち，約 1 kg の醪を平底フラスコに入れ，水をマントルヒーターで加熱し発生させた水蒸気を吹き込んで行う，水蒸気吹き込み式蒸留にて単式蒸留を行った。蒸留終了は得られた留液のアルコール度数が約 38%になった時点で終了とした。留液はフィルター濾過を行い，アルコール濃度 25%に割水を行った。得られた焼酎サンプルは室温にて遮光し保管した。

#### 4-2-7. Large volume static headspace(LVSH)サンプリング

ヘッドスペースの香気成分は，LVSH(Entech 7100A シリーズ; Entech Instrument inc.)にて収集した。すなわち，焼酎サンプル 10 ml と内部標準物質である 1-pentanol (10 mg/l) 1 ml を 200 ml 容の専用ボトルに入れ，密閉し 30°C の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc. の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 ml 吸引し，GC-MS に自動注入した。

#### 4-2-8. GC-MS/olfactometry

焼酎サンプルの揮発成分の同定および定量分析はアジレント・テクノロジー (株) のガスクロマトグラム(GC, Agilent 6890)と質量分析装置(MS, Agilent 5979B)とにおいかぎ装置(Gerstel)を用いた。GC 分析条件は以下の Table 4-1 に示した。

すべてのマススペクトルは EI モードで示され，定量分析は揮発成分

の GC ピーク面積を内標である 1-pentanol の GC ピーク面積と比較して算出した。匂い嗅ぎ分析は、パネリストは ODP レコーダーソフトウェア(Gerstel)を用いてリテンションタイム(RT)を記録し、香気成分を記述した。各サンプルを 4 回嗅ぎ、揮発成分が最低でも 3 回検出された場合、香気成分とした。

#### 4-2-9. 質量分析

化合物の同定は、標準のマスマスペクトルとリテンションタイム(RT),あるいは Aroma office ソフトウェア(西川計測社製)のデータベース内にあるリテンションインデックス(RI)にて行った。RI は、n-alkane(C7-C33)(島津 GLC 社製)の分析によって計算した。検量線の作成は、25%エタノール溶液に化合物を溶解、調製し、GC によって測定を行った。溶解した化合物のピーク面積を内標である 1-pentanol のピーク面積と比較した。得られた数値からターゲットとなる化合物の分析値に合わせて検量線を作成した。それぞれの揮発成分の OAV は以下の計算式で求めた。

$$\text{OAV} = \text{焼酎中の濃度} / \text{香気成分の閾値}$$

#### 4-2-10. Aroma extract dilution analysis (AEDA)

香気成分の FD (Flavor Dilution)値は AEDA によって決定した。それぞれの化合物は 25%エタノール溶液にて、3, 9, 27, 81, 243 倍に希釈した。各サンプルを 4 回ずつ匂い嗅ぎ分析を行った。揮発成分が 3 回以上検出された場合、検出されたと定義した。FD 値は GC-MS/O で検知された香気成分の最初の化合物量と最も希釈した化合物量の割合によって定義される。

#### 4-2-11. 官能評価試験

官能評価試験は、アルコール濃度を 25%に統一した焼酎サンプルにて実施した。パネルにそれぞれの特徴の強度を 0-5 で評価した(0=検出出

来ず，1=非常に弱い，2=弱い，3=適度，4=強い，5=非常に強い)。官能評価の結果はそれぞれの香りごとに平均し，レーダーチャートにプロットした。

パネルは鹿児島大学の9名(男性3名，女性6名)で行った。なお，パネルは官能評価の訓練を受けた者で行っている。

Table 4-1 GC/MS analysis condition of the samples

Thermodesorption system	Entech 7100A
Injection volume	100 ml
GC	Agilent 6890N
Column	DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d.,0.25 μm film)
Carrier	Helium,1 ml/min., constant flow mode
Oven	40°C, 5 min. hold → 3°C/min. to 240°C → 240°C, 5 min. hold
Analysis time	57.2 min.
Injector temperature	220°C
Transfer line	250°C
Quadruple ion trap temperature	150°C
Ion source temperature	250°C

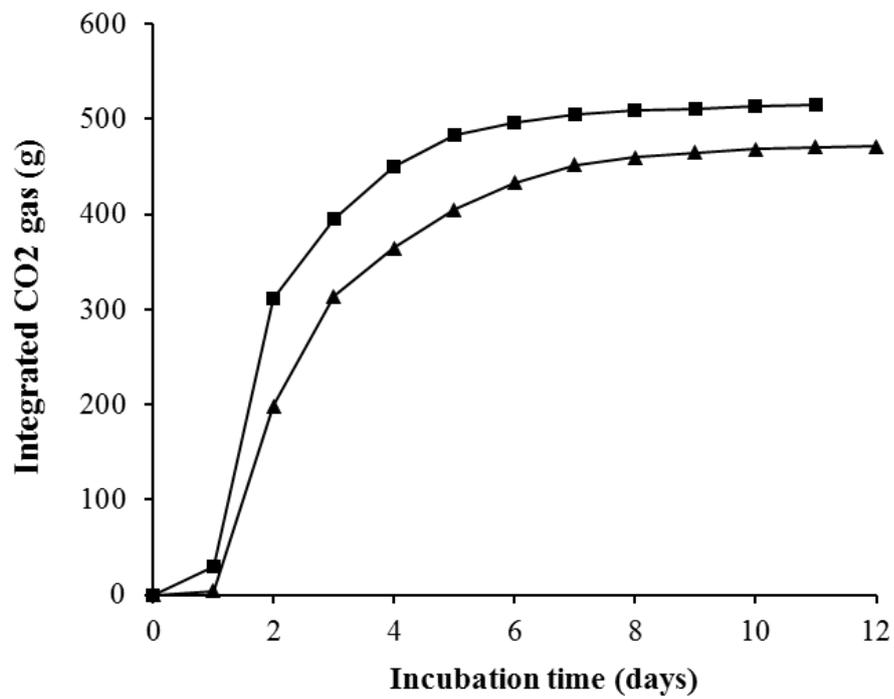
### 第3節 結果及び考察

#### 3-1. 米麴焼酎と酵素焼酎の調製

米麴焼酎には焼酎製造において一般的な白麴を用いて行った。大部分の焼酎は、蒸したサツマイモ、麦、米などの主原料を加えるが、本実験では主原料を加えずに焼酎製造を行った。この製法は、沖縄県で造られる焼酎の一種である「泡盛」と同様の全麴仕込みである。これによって主原料由来の香気成分を含まない、米麴由来のキーとなる香気成分が同定できると考えられる。一方、対照として麴の代わりに蒸米と酵素剤を添加した焼酎の製造も行った。アルコール発酵による炭酸ガス重量減少量を Fig.4-1 に示す。蒸米と酵素で作製した醪は、米麴焼酎に比べアルコール発酵による炭酸ガス重量減少が少ないものの、最終的にはほぼ同程度発酵できた。

#### 3-2. 米麴焼酎と酵素焼酎の香気の特徴

米麴焼酎と酵素焼酎の官能評価を行った。パネルには清酒のフレーバーホイール内の 21 の香りと 7 つの味の中から感じられたものを選択してもらった<sup>12)13)</sup>。香りは、果実様、アルコール、木香、草様・青臭、香辛料様、花様、穀物様、糠、麴、蒸米、甘香、カラメル、ロースト、硫黄、キノコ、ゴム、カビ、土、石鹼、油、酸の 21 項目を、味は酸味、甘味、塩味、苦味、渋味、重い、キレの 7 項目を選択項目とした。硫黄とゴムはほとんどのパネルが選択しなかった。7 つの香りと 5 つの味が多く選択される結果となった。更に、前述の香り以外に「漬物様」という香りが酵素焼酎に関しては多く指摘された。そこで、「漬物様」を加えた 8 つの香りと 5 つの味でそれぞれの焼酎の官能評価を行った結果を Fig.4-2 に示す。米麴焼酎は甘香、カラメル、ロースト香が強く、重厚な味であったのに対し、酵素焼酎では木香、漬物様が強い結果となった。



**Fig. 4-1 Time course of alcohol fermentation.**

The alcohol fermentation was observed by CO<sub>2</sub> gas generation amount. The integrated weight loss of *moromi-mash* obtained a difference between the first day and each day as the integrated CO<sub>2</sub> gas amount. The squares and triangles presented each *moromi-mash* of rice *koji*-made and enzyme-made, respectively.

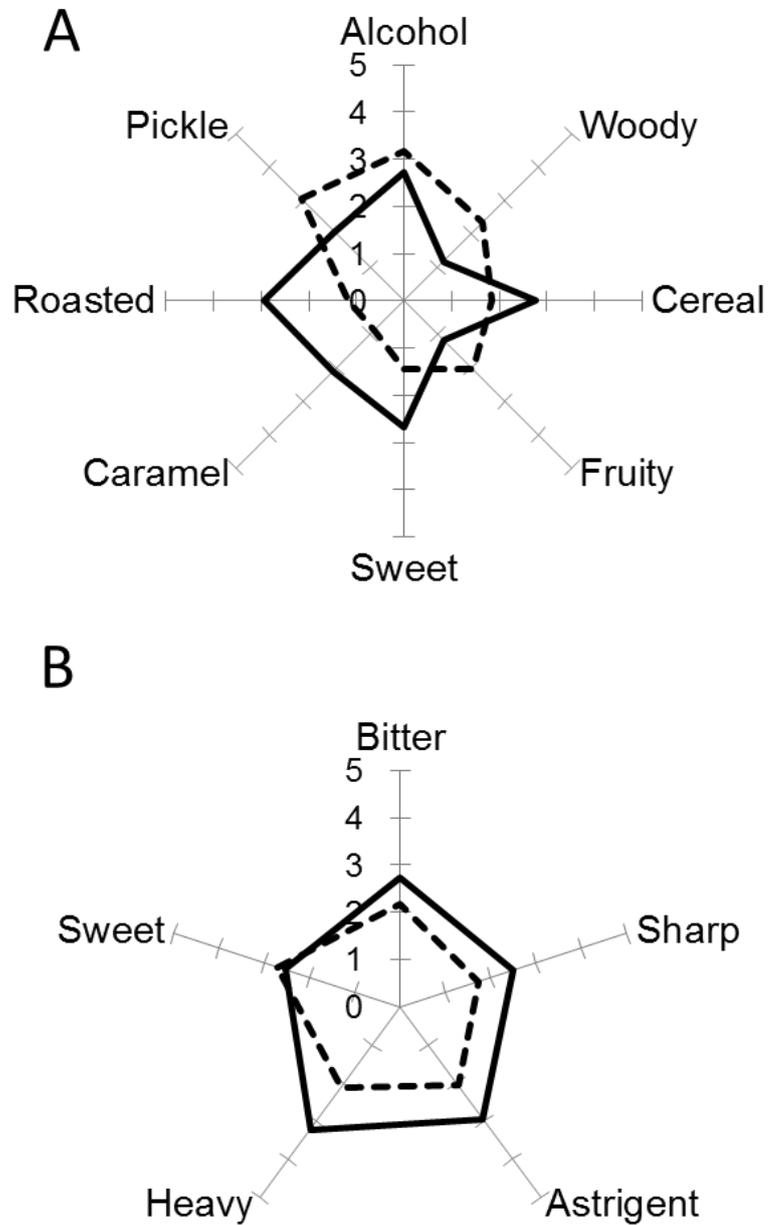


Fig.4-2 Spider plot for sensory evaluation of (A) odours and (B) tastes of rice *koji-shochu* and enzyme-*shochu*.  
 Rice *koji-shochu* and enzyme-*shochu* are indicated by the solid line and dotted line, respectively.

### 3-3. GC-MS/O と AEDA

米麴焼酎の香気成分を同定するために GC-MS/O と AEDA による分析を行った結果を Table 4-2 に示す。米麴焼酎は 31 個，酵素焼酎は 22 個の匂いピークが検出された。11 個の匂いピークはマススペクトルによる同定は出来なかった。これらのピークは unknown 1-11 とした。イソアミルアルコール，イソ酪酸エチル，酢酸イソブチル，アセトアルデヒドジエチルアセタール，ヘキサナール，unknown 2，unknown 6，unknown 7 は酵素焼酎に多く含まれていた。一方，米麴焼酎にはプロピオン酸エチル，酢酸イソアミル，イソバレルアルデヒドが多く含まれていた。カプリル酸エチル，カプロン酸エチル，ラウリン酸エチル，unknown 1，3，5，8，9，11 は米麴焼酎にのみ検出された。中でも unknown 5，8，9，11 は，ソーダ，ポテト，ラベンダー，茶様と特徴的な香りの成分であった。これら unknown の成分は，FD 値は低いものの特徴的な香りに寄与していると考えられた。高峯らは米麴の代わりに糖化酵素を添加して焼酎製造を行うと，得られた焼酎はイソアミルアルコールなどの高級アルコールが増加し，高級脂肪酸エチルエステル量が減少し，官能評価では辛み・ドライな味わいになると報告している<sup>18)19)</sup>。この報告では焼酎に主原料としてサツマイモを加えているが，イソアミルアルコールが増加する点で，本研究の結果と一致している。イソバレルアルデヒドは Yoshizaki ら<sup>9)</sup>の報告でも同定され，米麴の特徴的な化合物であるとされている。このことから，イソバレルアルデヒドも焼酎の香気成分に影響を与えていると示唆された。

**Table 4-2** Odor intensity and description of odor active compounds in rice *koji-shochu* or enzyme-*shochu*.

compounds	RI*	RI <sup>ref</sup>	Identification <sup>†</sup>	Odor description	FD		Ref
					Rice <i>koji</i> -made	Enzyme-made	
<b>Alcohols</b>							
Isoamyl alcohol	1217	1224	MS, RI	Characteristic odor	27	81	(30)
<b>Ester compounds</b>							
Ethyl acetate	858	892	MS, RI	Sweet	3	3	(30)
Ethyl propionate	939	999	MS, RI	Fruity	9	3	(30)
Ethyl isobutyrate	949	1007	MS, RI	Fruity	81	243	(30)
Isobutyl acetate	1009	1034	MS, RI	Raisin, Peer	3	9	(30)
Ethyl butyrate	1030	1055	MS, RI	Fruity	27	27	(30)
Ethyl 2-methyl butyrate	1047	1069	MS, RI	Strawberry, pineapple	81	81	(30)
Ethyl isovalerate	1062	1083	MS, RI	Apple	81	81	(30)
Isoamyl acetate	1114	1137	MS, RI	Banana, peer	3	1	(30)
Ethyl caproate	1235	1251	MS, RI	Sweet	27	27	(30)
Ethyl caprylate	1435	1441	MS, RI	Fruity, soapy	1	ND	(31)
Ethyl nonanoate	1537	1541	MS, RI	Cereal	3	1	(31)
Ethyl caprate	1635	1643	MS, RI	Fruity	1	ND	(31)
Diethyl succinate	1658	1655	MS, RI	Baked apple, roasted	9	9	(32)
Ethyl laurate	1872	1847	MS, RI	Soapy	1	ND	(31)
<b>Aldehydes</b>							
Acetaldehyde	766	713	MS, RI	Fruity, acrid	1	1	(33)
Acetaldehyde diethyl acetal	865	889	MS, RI	Sweet, vinyl	27	243	(33)
Isovaleraldehyde	890	915	MS, RI	Acrid	3	1	(32)
Hexanal	1072	1094	MS, RI	Green, grass	3	27	(31)
<b>Sulfuric compounds</b>							
Dimethyl trisulfide	1374	1385	MS, RI	Pickles	3	3	(34)
<b>Unknown compounds</b>							
Unknown 1	1024	-	-	Fruity	81	ND	
Unknown 2	1116	-	-	Fruity	1	3	
Unknown 3	1126	-	-	Vinyl	3	ND	
Unknown 4	1173	-	-	Potato, roasted	243	243	
Unknown 5	1285	-	-	Soda	3	ND	
Unknown 6	1301	-	-	Perilla	9	27	
Unknown 7	1320	-	-	Sweet	ND	1	
Unknown 8	1464	-	-	Fried potato	9	ND	
Unknown 9	1559	-	-	Lavender	1	ND	
Unknown 10	1660	-	-	Floral	1	1	
Unknown 11	1825	-	-	Tea-like	1	ND	

\* RI, retention index calculated on a DB-WAX capillary column with a series of *n*-alkanes (C7-C33).

<sup>¶</sup>RI<sup>Ref</sup>, retention index from each reference (30-34). ND, not detected.

<sup>†</sup>Identification proposal is indicated by the following: MS, identification by comparing the mass spectrum with Nist05a spectral database; RI, identification by retention indexes with literature data.

### 3-4. 定量化と OAV

焼酎の香りに影響する香気成分を検討するために、14成分の香気成分を定量した結果を Table 4-3 に示す。イソバレルアルデヒド、カプリル酸エチル、2-メチル酪酸エチルは米麴焼酎に多く検出された。カプロン酸エチル、ラウリン酸エチルも米麴焼酎で多く検出された成分であった。これらの結果より、中鎖脂肪酸のエチルエステルは米麴焼酎に多く含まれていることが認められた。ほとんどの脂肪酸エチルエステルは米麴焼酎に強い甘香を付与していた。これにより、麴由来の酵素が中鎖脂肪酸エチルエステル生成に影響を与えていることが認められた。米麴中のリパーゼが長鎖脂肪酸からのエチルエステル生成に関与していること<sup>20)</sup>が考えられた。イソアミルアルコールと酢酸イソアミルの濃度は酵素焼酎の方が高い濃度となった。高いイソアミルアルコール濃度が酢酸イソアミルの生成を促したと考えられる<sup>21)</sup>。ジメチルトリスルフィド以外のすべての化合物は1以上のOAVを示した。イソバレルアルデヒドとカプリル酸エチルはどちらの焼酎でも高いOAVと濃度を示した。特に米麴焼酎のOAVは高いことから、これらの化合物は米麴から造られる焼酎の香りに影響を与えていると考えられた。この結果より、イソバレルアルデヒドが米麴焼酎のキーとなる香気成分のひとつであることが認められた。イソバレルアルデヒドはシェリー酒、洋なしのブランデー、バーボンなどからも検出されている<sup>22-24)</sup>。また、発酵途中で酵母によって生成されるイソアミルアルコールの中間体であること<sup>25)26)</sup>、蒸留中にメイラード反応によっても生産される<sup>27)28)</sup>ことが知られている。清酒では、麴菌のアルコール酸化酵素であるイソアミルアルコールオキシダーゼによって貯蔵や室温での保管中に生成、または火入れ工程でイソアミルアルコールから生成されるとされている<sup>29)</sup>。焼酎は蒸留酒であることから、清酒のような貯蔵中での増加は考えられない。それゆえ、酵素焼酎中のイソバレルアルデヒドは酵母の代謝物、もしくは蒸留中の加熱によって生成されたと考えられる。米麴焼酎の方が酵素焼酎と比較してイソバレルアルデヒド濃度が高かったのは、酵母による代謝及び蒸留時の

生成の他に、米麴由来の香気成分であると考えられた。これらの結果より、米麴由来のイソバレルアルデヒドは焼酎の香気に影響を与えていることが明らかとなった。また、今後米麴製造過程中におけるイソバレルアルデヒドの生成経路の解明も必要であると考えられた。

#### 第 4 節 要約

日本の伝統的な蒸留酒である焼酎は、米に麴菌を生育させた米麴から造られる。米麴は、焼酎のような日本の酒では不可欠な要素であり、ウイスキーにおける麦芽と類似した役割を果たす。しかし、米麴が焼酎の香りに及ぼす影響に関する研究は未だ行われていない。そこで本研究では、米麴由来の焼酎中の香気成分に関する研究を行った。米麴の香気成分への影響を調べるために、2種類の焼酎サンプルを用意した。一つは米麴、酵母、水によって造った米麴焼酎である。もう一つは、米麴の代わりに蒸米、各種酵素剤、酵母、水を用いて作製した酵素焼酎である。香気成分は、GC-MS、GC-MS/O を用いて、AEDA によって分析した。分析の結果、酵素焼酎の方が、ジメチルトリスルフィドとヘキサナールの FD 値が高く、米麴焼酎の方が、果実様などの香りの特徴を有するエステル化合物の FD 値が高かった。Unknown の香気成分がいくつか存在し、それらはソーダ、ポテト、ラベンダー、茶様の香りの特徴を示した。14 の物質の濃度と OAV が測定出来た。これらの結果より、イソバレルアルデヒド、カプリル酸エチル、カプロン酸エチル及び 2-メチル酪酸エチルが米麴を用いることで生成される主要な揮発成分であることが明らかとなった。

**Table 4-3** Odour intensity and description of odour active compounds in rice *koji-shochu* or enzyme-*shochu*.

Compounds	concentration		OAV <sup>†</sup>		Threshold* (µg/L)	Ref
	Rice <i>koji-shochu</i>	Enzyme- <i>shochu</i>	Rice <i>koji-shochu</i>	Enzyme- <i>shochu</i>		
Isovaleraldehyde	230	80	1150	400	0.2	(15)
Ethyl caprylate	350	230	175	115	2	(16)
Acetaldehyde diethyl acetal	2,600	3,800	52.0	76.0	50	(16)
Ethyl caproate	90	40	18	8	5	(16)
Ethyl 2-methyl butyrate	16	6	16	6	1	(16)
Ethyl isobutyrate	110	90	7.3	6.0	15	(16)
Ethyl acetate	39,000	30,000	5.2	4.0	7,500	(16)
Hexanal	21	25	4.7	5.6	5	(16)
Isoamyl alcohol	139,000	278,000	4.6	9.3	30,000	(16)
Isoamyl acetate	130	310	4.3	10.3	30	(16)
Ethyl butyrate	70	50	3.5	2.5	20	(16)
Ethyl isovalerate	7	9	2.3	3.0	3	(16)
Dimethyl trisulfide	0.13	0.16	0.7	0.8	0.20	(16)
Ethyl laurate	110	80	-	-	-	(16)

\*Odour threshold were taken from the literatures (15, 16).

(15) Odour thresholds were determined in water.

(16) Odour thresholds were determined in 10% (w/w) ethanol/water solution.

<sup>†</sup>OAV were calculated by dividing the concentration by the odour thresholds.

## 参考文献

- 1) Kim,A.-J.,Choi,J.-N.,Kim,K.,Park,S.-B.,Yeo,S.-H.,Choi,J.-H.,and Lee,C.-H. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**74**, 2267-2272(2010)
- 2) Kitano,H.,Kataoka,K.,Furukawa,K.,and Hara,S. : *J. Biosci. Bioeng.*,**93**, 563-567(2002)
- 3)Kum,S.-J.,Yang,S.-O.,Lee,S.-M.,Chang,P.-S.,Choi,Y.-H.,Lee,J.-J.,Hurh,B.-S., and Kim,Y.-S. : *J. Agric. Food Chem.*,**63**, 1401-1418(2015)
- 4) 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上田次郎, 瀬戸口智子, 緒方新一郎 : 日本醸造協会誌, **101**, 437-445(2006)
- 5)Yoshizaki,Y.,Takamine,K.,Shimada,S.,Uchihori,K.,Okutsu,K.,Tamaki,H.,Ito,K., and Sameshima,Y. : *J. Inst. Brew.*,**117**, 217-223(2011)
- 6) Masai,K.,Maruyama,J.,Nakajima,H., and Kitamoto,K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**67**, 455-459(2003)
- 7) Masai,K.,Maruyama,J.,Nakajima,H., and Kitamoto,K. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,**68**, 1569-1573(2004)
- 8) Jin,F.,Watanabe,T.,Juvvadi,P.R.,Maruyama,J.,Arioka,M., and Kitamoto,K., : *Appl. Microbiol. Biotchnol.*,**76**, 1059-1068(2007)
- 9) Yoshizaki, Y., Yamato, H., Takamine, K., Tamaki, H., Ito, K., and Sameshima, Y. : *J. Inst. Brew.*, **116**, 49-55(2010)
- 10) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭 : 日本醸造協会誌, **101**, 957-963 (2006)
- 11) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭 : 日本醸造協会誌, **102**, 403-411 (2007)
- 12) 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田博, 中野成美 : 酒類総合研究所報告, 178, <http://www.nrib.go.jp/date/pdf/seikoumihou.pdf> (2006)
- 13) 宇都宮仁 : 日本醸造協会誌, **101**, 730-739(2006)
- 14) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀沢浩幸, 神渡巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男 : 鹿児島県工業技術センター研究報告,**8**,1-6(1994)

- 15) Buttery, R. G., Teranishi, R., Ling, L. C., and Turnbaugh, J. G. :  
*J. Agric. Food Chem.* ,**38**, 336-340(1990)
- 16) Guth, H. : *J. Agric. Food Chem.* ,**45**, 3027-3032(1997)
- 17) Grosch, W. : *Trends Food Sci. Technol.* , **4**, 68-73(1993)
- 18) 高峯和則,木田建次,園田頼和,生田六也,塚田定清 : 日本醸造協会誌,**84**,560-567(1989)
- 19) 高峯和則,木田建次,園田頼和,生田六也,塚田定清 : 日本醸造協会誌,**85**,825-830(1990)
- 20) 工藤哲三, 水谷政美, 本部恭平, 太田一良 : 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告,**46**, 159-164(2001)
- 21) Ashida, S., Ichikawa, E., Suginami, K., and Imayasu, S. : *Agric. Biol. Chem.* ,**51**, 2061-2065(1987)
- 22) Marcq, P. and Schieberle, P. : *J. Agric. Food Chem.* ,**63**, 4761-4770(2015)
- 23) Willner, B., Granvogl, M., and Schieberle, P. : *J. Agric. Food Chem.* ,**61**, 9583-9593(2013)
- 24) Poisson, L. and Schieberle, P. : *J. Agric. Food Chem.* ,**56**, 5820-5826(2008)
- 25) Suomalainen, H. : *J. Inst. Brew.* ,**77**, 164-177(1971)
- 26) Ardö, Y. : *Biotechnol. Adv.*,**24**, 238-242(2006)
- 27) Guth, H. and Grosch, W. : *Flavor Frag. J.* ,**8**, 173-178(1993)
- 28) Schnermann, P. and Schieberle, P. : *J. Agric. Food Chem.* ,**45**, 867-872(1997)
- 29) Yamashita, N., Motoyoshi, T., and Nishimura, A. : *J. Biosci. Bioeng.* ,**89**, 522-527(2000)
- 30) Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., and Ferreira, V. :  
*J. Agric. Food Chem.* ,**55**, 4501-4510(2007)
- 31) Umamo, K., Shoji, A., Hagi, Y., and Shibamoto, T. : *J. Agric. Food Chem.* ,**34**, 593-596(1986)

- 32) Fan, W. and Qian, M. C. : *J. Agric. Food Chem.* ,**54**, 2695-2704(2006)
- 33) Xu, Y., Fan, W., and Qian, M. C. : *J. Agric. Food Chem.* ,**55**, 3051-3057(2007)
- 34) Perez-Cacho, P. R., Mahattanatawee, K., Smoot, J. M., and Rouseff, R. : *J. Agric. Food Chem.* ,**55**, 5761-5767(2007)

## 第5章 麴菌種別芋焼酎の酒質及び香気成分の差異

### 第1節 緒言

焼酎は、九州・沖縄を主産地として発達し、それぞれの地域を代表する農作物を原料とし、各地域の気候風土に合った伝統的な製法で造られてきた。焼酎製造には、使用する微生物として麴菌と酵母が必須である。これまで、焼酎酵母では多くの研究や育種がなされ、鹿児島県で1970年代後半に耐酸性・耐熱性に優れた鹿児島2号酵母が分離された。更に1995年には鹿児島4号酵母及び鹿児島5号酵母が、2006年には鹿児島6号酵母が開発された<sup>1)2)</sup>。宮崎県でも近年、平成宮崎酵母が開発<sup>3)</sup>され、それらの酵母を用いた醸造法や製品の特徴により、焼酎の多様化に貢献している。一方、麴菌は、これまでに黄麴、白麴、黒麴の香気成分の差異に関する研究<sup>4)</sup>、全麴仕込みによる麴菌の生成する香気成分の報告<sup>5)</sup>がなされている。また、市販酒<sup>6-8)</sup>や鑑評会出品酒<sup>9)</sup>を用いた網羅的な解析の中で麴菌の違いに着目した芋焼酎の香気成分について報告されている。一般的に、芋焼酎は黒麴を使用すると濃醇な香味、白麴を使うと黒麴よりも少しマイルドで軽快な香味、黄麴は豊かな味わいを持つ焼酎になると言われているが、この評価は市販酒を対象にしたものであり、麴以外の条件が統一されて製造した焼酎を比較したものではないため、麴菌の種類による酒質の差異を評価しているかは不明である。そこで、芋焼酎製造で使用される市販種麴の黄麴、白麴、黒麴の3種類を用いて、同一条件で仕込みを行うことで、酒質に与える麴菌の影響を明らかにすることとした。

## 第 2 節 実験方法

### 5-2-1. 製麴

製麴に使用する米は酒造メーカーが一般的に使用している国産加工用米を用いた。種麴は、いずれも株式会社ビオック社製の市販種麴である、黄麴は焼酎用黄麴菌、白麴は焼酎 K 型菌、黒麴は泡盛黒麴菌を用いた。製麴は恒温恒湿器にて行い、製麴の品温経過は本格焼酎製造技術<sup>10)</sup>に従った。すなわち、黄麴は製麴前半を低温帯、後半を高温帯にし、焼酎麴の白麴及び黒麴は、製麴前半を高温帯で推移させ、後半は 35℃前後で維持した。いずれの麴とも 42 時間で出麴とした。恒温恒湿器の設定及び品温、手入れのタイミング等は Table 5-1 に示す。

### 5-2-2. 麴の麴酸度及び酵素活性の測定

麴酸度の測定は、第四回改訂国税庁所定分析法<sup>11)</sup>に従った。

麴の酵素抽出と、 $\alpha$ -アミラーゼ(以下, AA), グルコアミラーゼ(以下, GA), 酸性プロテアーゼ(以下, AP)および酸性カルボキシペプチダーゼ(以下, ACP)の活性測定は第四回改訂国税庁所定分析法<sup>11)</sup>に従った。

耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ(以下, AsAA)活性は岩野ら<sup>12)</sup>の方法及び国税庁所定分析法注解<sup>11)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、酵素液 1 ml に pH2.5 の 100 mM マッキルベイン緩衝液を 1 ml 加え、混合液を pH2.5 とし 30℃で 1 時間放置した。その後、50 mM 酢酸緩衝液(pH5.0)で酸処理した酵素溶液の pH を pH5.0 にしたものを酵素溶液とし、国税庁所定分析注解の AsAA 活性の測定方法に従い酵素活性を算出した。

$\beta$ -グルコシダーゼ(以下, BG)活性は太田ら<sup>12)</sup>の方法に従って行った。すなわち、4 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (PNPG) 0.25 ml, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.50 ml に酵素液 0.25 ml を加えて、37℃で 15 分間反応させ、200 mM 炭酸ナトリウム溶液 2 ml を加えて反応を停止した後、410 nm の吸光度を測定して遊離 *p*-nitrophenol を定量した。PNPG に作用して 37℃, 1 分間に 1 nmol の *p*-nitrophenol を生じさせる酵素活性を 1 U とした。

セルラーゼ(以下, CEL)活性は柏木<sup>14)</sup>の方法を改変して行った。すなわち, 0.5%カルボキシメチルセルロース(CMC) 溶液 1 ml に, 40°Cで 5 分間予熱した酵素液 1 ml を混合し, 40°Cにて 30 分間反応させた。反応終了後, 反応液 0.5 ml に銅試薬 0.5 ml を加え, 沸騰浴中にて 10 分間煮沸した。冷却後, Nelson 試薬を 0.5 ml 加え室温にて 15 分静置した後, 蒸留水 3.5 ml を加えて更に 15 分置き, 波長 500 nm で吸光度を測定した。Blank は, 0.5% CMC 溶液 0.25 ml と銅試薬 0.5 ml を混ぜ合わせたのち, 酵素液 0.25 ml を加えて 10 分間煮沸させた。冷却後, 同様に操作し吸光度を測定した。CEL 活性は、1 分間にグルコース 1  $\mu\text{g}$  に相当する還元糖を遊離する酵素活性を 1U とした。

キシラナーゼ(以下, XY)活性はしゅうゆ試験法<sup>15)</sup>の方法を改変して行った。すなわち, 1% Xylan 溶液と透析済み酵素液をそれぞれ 0.5 ml ずつ混合し, 40°Cで 60 分反応させた。反応終了後, 反応液 0.5 ml に銅試薬 0.5 ml を加え, 沸騰浴中にて 10 分間煮沸した。冷却後, Nelson 試薬を 0.5 ml 加え室温にて 15 分静置した後, 蒸留水 3.5 ml を加えて更に 15 分置き, 波長 500 nm で吸光度を測定した。Blank は, 1% Xylan 溶液 0.25 ml と銅試薬 0.5 ml を混ぜ合わせたのち, 酵素液 0.25 ml を加えて 10 分間煮沸させた。冷却後, 同様に操作し吸光度を測定した。1 分間にキシロース 1  $\mu\text{g}$  に相当する還元糖を遊離する酵素活性を 1U とした。

リパーゼ(以下, LIP)活性は, 山田ら<sup>16)</sup>の方法に従って行った。すなわち, 乳化オリブ油 5 ml と 0.1 M リン酸緩衝液(pH7.0) 4ml を 50 ml 容の共栓付き三角フラスコに入れ, 37°Cで 10 分予熱した。酵素 1 ml を加え, よく攪拌し反応を開始させた。20 分後, アセトン・エタノール混液を 20 ml 加え激しく攪拌させ反応を停止させた。フェノールフタレイン 50  $\mu\text{l}$  加え, 0.02 N NaOH で滴定した。Blank は, 酵素液を入れずに同操作を行い, アセトン・エタノール混液を加えて激しく攪拌させたのち酵素液を加えたものを同様に滴定した。この時, Main と Blank の値の差が 1-2 ml の範囲になるように酵素液を希釈して行った。LIP 活

性は、37°Cで基質オリブ油から1分間に1 μMの脂肪酸を遊離する酵素活性を1Uとした。

なお、麴酸度及び各種酵素活性は各麴の水分の値から換算して、乾燥麴当たりの値として示す。

### 5-2-3. 芋焼酎の小仕込み試験

サツマイモは500 g前後の大きさのコガネセンガンを用いた。また、使用酵母は焼酎用酵母である鹿児島5号酵母を用いた。

一次仕込みは麴米140 g相当量の米麴に汲み水168 g(内、酵母培養液2 ml)を加えた。二次仕込みは一次醪に汲み水392 gと蒸煮・粉碎したサツマイモ700 gを加えた。30°Cの温浴槽で一次醪は4日間、二次醪は9日間発酵させた。

### 5-2-4. 蒸留

蒸留は醪900 gを2 L容のガラス製蒸留器にて、蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留で行った。蒸留の終点は末垂れのアルコール度数が約10%に到達した時点とした。終点のアルコール度数の測定は携帯型密度計(アントンパール社, DMA-35)を用いた。焼酎のアルコール度数の測定は、酒類用振動式密度計(DA-155 京都電子工業(株), Kyoto, Japan)を用いた。原酒をアルコール度数25%になるように脱塩水で割水し1日後、孔径5 μmのメンブレンフィルターにてろ過をして得られたろ液を芋焼酎とした。

### 5-2-5. 二次醪及び焼酎の分析

二次醪及び得られた芋焼酎の一般分析(醪アルコール, 純アルコール, 原酒量, 原酒アルコール, 収得量, 蒸留歩合, pH(醪, 焼酎), 酸度(醪, 試留液), 全糖, 直糖に関しては, 第四回改訂国税庁所定分析法<sup>11)</sup>に従って行った。

二次醪のアミノ酸及び有機酸については, 高速液体クロマトグラフィ

ー (HPLC) (SHIMADZU-LC (株) 島津製作所, Kyoto, Japan) を用いて定量した。サンプルはガーゼろ過した二次醪を No.2 ろ紙ろ過し, 孔径 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルターでろ過して用いた。アミノ酸組成分析については, カラムは Shim-pack AMINO-NA ( (株) 島津製作所) を用い, 移動相は MM-MA 液, MM-MB 液 (島津製作所) を使用した。0-33 分 (B 液 0%  $\rightarrow$  100%) のグラジエント溶出, オープン温度は 60 $^{\circ}$ C, 流速は 0.6 ml/min で測定を行った。検出器は蛍光検出器 (RF-10AXL, (株) 島津製作所) を用いた。有機酸分析は, カラムは Shim-pack SCR-102H ( (株) 島津製作所) を 2 本連結して用いた。カラムオープン温度は 50 $^{\circ}$ C で, 移動相は 4 mM p-トルエンスルホン酸溶液を使用し, 流速は 0.8 ml/min で送液した。カラムより溶出後, 反応液 (4 mM p-トルエンスルホン酸溶液, 16 mM Bis-Tris, 80  $\mu$ M EDTA 溶液) 0.8 ml/min と混合し, 電気伝導度検出器にて検出した (CDD-10AVP, (株) 島津製作所)。

#### 5-2-6. 焼酎の官能評価

芋焼酎の官能評価は, パネル 8 名によるブラインドテストで行い, それぞれの芋焼酎について評価及び焼酎に用いた麴の種類を判定した。なお, パネルの内訳は鹿児島県工業技術センター食品・化学部職員 5 名 (内, 女性 1 名), 鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター教員 3 名 (内, 女性 2 名) で行った。

#### 5-2-7. 焼酎香気成分の GC-MS 解析

ヘッドスペースの香気成分は, 焼酎サンプル 10 ml と内部標準物質である 1-pentanol (10 mg/l) 1 ml を 200 ml 容の専用ボトルに入れ, 密閉し 30 $^{\circ}$ C の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc. の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 ml 吸引し, GC-MS に自動注入した。

一方, モノテルペンアルコール類と炭素数 8 以上の脂肪酸及びそのエ

ステルについては SBSE 法で揮発成分を GC-MS に自動注入した。すなわち，専用バイヤルに焼酎サンプル 10 ml と polydimethylsiloxane(PDMS)相でコーティング Twister(GERSTEL 社製)及び内部標準液であるトリデカン酸メチル(100 mg/l)を 100  $\mu$ l 入れ，マグネットスターラー上で 1,200 rpm，1 時間室温にて攪拌し，揮発成分を吸着させた。Twister を専用バイヤルから取り出し，脱塩水で洗浄，キムワイプで表面の余分な水分を拭き取り，専用のガラス管に入れ，Thermal desorption system(TDS)(GERSTEL 社製)で加熱脱着し，GC-MS に供試した。焼酎の揮発成分の同定および定量分析はアジレント・テクノロジー (株) の GC-MS (GC, Agilent 6890 ; MS, Agilent 5979B) により行った。成分の一次同定は，Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより行った。ヘッドスペースによる GC-MS 分析条件は Table 5-2 に，TDS を用いた GC-MS 分析条件は Table 5-3 に示す。

Table 5-1 *Koji* making method

	Yellow <i>koji</i>				White <i>koji</i> and Black <i>koji</i>			
	Cultivation time ( <i>Koji</i> making time) (hour)	Goods	Incubator	Temperature(Humidity)	Cultivation time ( <i>Koji</i> making time) (hour)	Goods	Incubator	Temperature(Humidity)
<i>Tane-tsuke</i>	0	30-31°C	30°C(95%)		0	35-36°C		35°C(95%)
<i>Mori</i>	20±1	33-34°C	30°C(95%)		20±1	39-41°C		35°C(95%)
<i>Naka-shigoto</i>	27±1	36-37°C	33°C(95%)		24±1	40-41°C		33°C(95%)
<i>Shimai-shigoto</i>	32±1	40-41°C	37°C(90%)		28±1	40-42°C		32°C(90%)
<i>De-koji</i>	42	41-42°C	37°C(90%)		42	34-36°C		32°C(90%)

Table 5-2 GC/MS analysis condition of the samples (Entech).

Thermodesorption system	Entech 7100A
Injection volume	100 µl
GC	Agilent 6890N
Column	DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d.,0.25 µm film)
Carrier	Helium,1 ml/min.,constant flow mode
Oven	40°C,5 min. hold → 3°C/min. to 240°C → 240°C,5 min. hold
Analysis time	57.2 min.
Injector temperature	220°C
Transfer line	250°C
Quadruple ion trap temperature	150°C
Ion source temperature	250°C
MS	Agilent 5975B
Mode	SCAN

Table 5-3 GC/MS analysis condition of the samples (TDS).

<b>Gas chromatography mass spectrometry</b>	
GC	Agilent 6890N
Column	DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d.,0.25 μm film)
Carrier	Helium,2 ml/min.,constant flow mode
Oven	50°C to 240°C at 3°C/min. ( 8 min. hold )
Injection	Solvent vent
MS	Agilent 5975B
Quadruple ion trap temperature	150°C
Ion source temperature	230°C
Ionization method	EI
<b>Thermal desorption system</b>	
TDS temperature	20°C(1 min., hold) → 260°C(60°C/min.) → 260°C(1 min., hold)
TDS transfer temperature	280°C
CIS temperature	-150°C(1 min., hold) → 270°C(12°C/min.) → 270°C(2 min., hold)

### 第 3 節 実験結果及び考察

#### 5-3-1. 各種種麴を用いた製麴と麴の酵素活性

黄麴，白麴及び黒麴の出麴酸度と酵素活性を測定した結果を Table 5-4 に示す。出麴酸度はクエン酸生成能の低い黄麴では，ほぼ生酸性は認められず，焼酎麴である白麴及び黒麴の結果とは異なった。白麴の出麴酸度は黒麴と比べてわずかに高い値であった。酵素活性は国税庁所定分析法注解に記載されている各種麴の平均酵素活性<sup>11)</sup>に類似する傾向となった。AA 活性は，黄麴の酵素活性が白麴及び黒麴と比べて 10 倍以上高い活性であった。一方，酸性条件下(pH3.0 付近)においても安定である AsAA 活性は，白麴及び黒麴が黄麴と比べて高い活性であった。AA 活性と AsAA 活性を比較すると，焼酎麴の 2 種では大きな差異は認められないが，黄麴では AsAA 活性は 1% 以下に低下した。このことから，黄麴を用いて一次醪を作製する際に，白麴や黒麴を用いた一次醪と同じ pH3 付近にまで補酸すると，黄麴の AA 活性はほとんど失活してしまうことが考えられるため，補酸時の醪の pH 管理は非常に重要であると考えられる。GA 活性は黄麴が最も高かった。岩野ら<sup>17)</sup>は黄麴の GA 活性は，AA 活性の至適 pH とは異なり pH3-4 においても高い相対活性を有していると報告しており，GA 活性においては仮に補酸を行い，低 pH 条件になっても十分な活性を有していることが考えられる。BG 活性は，白麴及び黒麴が黄麴の 10 倍以上の活性を有していた。この結果は，太田ら<sup>13)</sup>が報告した黄麴及び黒麴での BG 活性の比率に類似していたが，白麴の BG 活性は今回の麴では黒麴と同等の活性を示しており太田らの報告とは異なる結果となった。今回得られた黒麴の BG 活性がこれまでの報告よりも低い活性では無いことから，本研究で用いた白麴及び黒麴の BG 活性に差異が認められなかった要因は，今回用いた白麴菌株が特徴として BG 活性が高い菌株である可能性と，製麴条件等によって高くなった可能性が考えられる。CEL 活性も BG 活性と類似した傾向を示し，白麴及び黒麴が黄麴の 2.9 倍程度の活性であった。中村ら<sup>18)</sup>は，麦焼酎製造で発生する蒸留粕を仕込み水に利用した返し仕込み法におい

て、醪の粘度を低下する方法としてセルラーゼの効果について報告している。黄麴に比べ白麴及び黒麴を用いた焼酎醪は、高い CEL 活性により醪の粘性が低下して、流動性が向上する可能性が考えられた。XY 活性は、白麴が黄麴及び黒麴と比べ 1.3 倍程度高い活性であった。この酵素はキシロース生成に関与し、蒸留中にキシロース、クエン酸およびアミノ酸との相互作用により、焼酎の香味の特徴のひとつであるフルフラール生成に寄与する<sup>19)</sup>と考えられる。タンパク質分解系の酵素である AP 及び ACP 活性の中で、AP 活性は白麴及び黒麴が黄麴と比べ 3-4 倍高い活性を有し、ACP 活性は黄麴が白麴や黒麴よりも 2-3 倍高い結果であった。国税庁所定分析法注解<sup>11)</sup>に記載してある平均酵素活性と AP 活性は類似しているが、ACP 活性は黄麴の活性が白麴の活性と比べて高かった。これは、本研究においては、同じ原料米を用いていることや、種麴または菌株の特性である可能性が考えられる。LIP 活性は、黄麴が最も低く、白麴及び黒麴の 1/4-1/10 の活性であった。白麴と黒麴の比較では、白麴が 2.5 倍の活性を有していた。米麴を用いた焼酎では、中鎖脂肪酸のエチルエステル(C6-C12)が多く含まれていることが認められており<sup>5)</sup>、米麴中のリパーゼが長鎖脂肪酸からのエチルエステル生成に関与している<sup>20)</sup>ことが考えられる。白麴の種麴として使用される *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は黒麴の種麴菌株の *A. luchuensis* の白色変異株であるが<sup>21)</sup>、白麴と黒麴を比較すると、全体的に類似した傾向を示すものの白麴が黒麴に比べて出麴酸度及び酵素活性共に高い値であった。特に、AA 活性、AsAA 活性等の液化に関与する酵素、XY 活性、LIP 活性、AP 活性及び ACP 活性等の醪中のアミノ酸濃度や焼酎の香気成分生成に関わってくる可能性のある酵素が 1.3-2.5 倍と差異の大きい結果となった。

Table 5-4 Acidity and enzyme activities of *koji*.

Acidity (ml)	Enzyme activities(U/g dry <i>koji</i> )									
	AA <sup>※1</sup>	AsAA <sup>※2</sup>	GA <sup>※3</sup>	BG <sup>※4</sup>	CEL <sup>※5</sup>	XY <sup>※6</sup>	AP <sup>※7</sup>	ACP <sup>※8</sup>	LIP <sup>※9</sup>	
Yellow <i>koji</i>	0.2 ±0.0	2,531 ±392	14 ±8	262 ±44	34 ±6	85 ±1	76 ±3	5,761 ±311	11,230 ±1,066	0.8 ±0.4
White <i>koji</i>	8.3 ±0.1	159 ±8	144 ±12	225 ±9	433 ±32	247 ±25	102 ±4	23,659 ±1,880	5,212 ±394	9.0 ±0.5
Black <i>koji</i>	7.0 ±0.3	120 ±6	110 ±2	196 ±18	436 ±41	250 ±4	70 ±6	17,988 ±281	3,736 ±220	3.4 ±0.6
Mean±SD(n=3)										

※1:  $\alpha$ -Amylase, ※2: Acid-resistant  $\alpha$ -Amylase, ※3: Glucoamylase, ※4:  $\beta$ -Glucosidase, ※5: Cellulase, ※6: Xylanase

※7: Acid Protease, ※8: Acid Carboxypeptidase, ※9: Lipase

### 5-3-2. 各麴を用いた小仕込み試験と蒸留

各種種麴を用いて製麴した黄麴，白麴，黒麴を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行った。なお，黄麴を用いる仕込みでは補酸を行う場合があるが，乳酸を用いて補酸した焼酎は乳酸エチルが多く含まれる傾向がある<sup>4)</sup>ことから，今回の仕込みでは補酸はせずに仕込みを行った。

一次醪および二次醪の発酵経過は黄麴の二次醪初期の発酵がやや緩慢になったが，最終的な炭酸ガス発生による重量減少積算値では白麴及び黒麴に比べて黄麴醪は若干少ない程度の差となり，順調な発酵が行われた。二次仕込み直前の一次醪および二次醪発酵終了時の醪の分析結果をそれぞれ Table 5-5 および Table 5-6 に示す。

一次醪及び二次醪の pH はクエン酸生成能の低い黄麴では，白麴及び黒麴よりも中性側の結果となった。白麴と黒麴の比較では，pH の差異はあまり認められなかった。醪酸度は，黄麴は pH と同様の結果であったが，白麴と黒麴では白麴を使用した醪の酸度が一次醪及び二次醪共に高い結果となった。これは，出麴酸度の値が白麴の方が高い結果であったことに起因していると言える。アミノ酸度は，一次醪では黄麴が最も高い値であったが，二次醪末期では白麴及び黒麴が高い値であった。醪のアルコール濃度も同様に一次醪では黄麴が最も高く，二次醪では白麴及び黒麴が若干高かった。二次醪初期の流動性は，黄麴醪は白麴及び黒麴醪と比べて低かった。芋焼酎醪の流動性は，プロテアーゼ剤を醪に添加して芋焼酎を仕込むと醪の流動性が向上し，それに伴ってアルコール収得量が増加する<sup>22)</sup>ことが報告されている。黄麴と比べて白麴及び黒麴が AP 活性と CEL 活性が高いため，白麴及び黒麴が二次醪初期の醪の流動性が高くなり，発酵終了時のアルコール濃度の差異に繋がったと推察される。発酵終了時の糖濃度は，直糖に大差はなかったことから，良好な発酵が行われたと推察された。一方，全糖は白麴醪及び黒麴醪と比べて黄麴醪が高かった。芋焼酎はサツマイモに多くの食物繊維が含まれている。この食物繊維が全糖の値の大部分を占める。白麴及び黒麴は CEL 活性が黄麴と比べて高いため，食物繊維の一部が加水分解され，酵

母に資化されたため、全糖の値が低くなり、醪アルコールが高くなったと考えられる。酵母の総菌数及び生菌数はすべての醪で大差はなかったが、生菌率は白麴醪及び黒麴醪が黄麴醪と比べて、一次醪及び二次醪共に低かった。これは、焼酎酵母は耐酸性であるが、低 pH 環境は酵母の生育にはストレスを受けるためと考えられた。また、酵母は温度や濃糖、pH のストレスを受けたときにも揮発酸度が上昇する<sup>23)</sup>。揮発酸度は、各麴を用いた醪で差は少なかった。黄麴醪は、白麴醪及び黒麴醪と比較して pH のストレスは強く受けていないと考えられるが、一次醪末期のアルコール濃度が黄麴醪では白麴醪及び黒麴醪よりも高いことから、別の要因で揮発酸度が上昇したと考えられる。

純アルコール量、原酒量および原酒アルコール量を Table 5-7 に示す。蒸留歩合は各麴共に 95%以上となり問題の無い蒸留が行われた。また、純アルコール量、原酒量、原酒アルコール濃度では、焼酎麴である白麴及び黒麴で高い結果が得られ、醪のアルコール濃度、発酵経過と同様の傾向が得られた。

Table 5-5 Analysis of 1st Ferment *moromi-mash*

	pH	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	<i>Moromi</i> Alc. (%)	Volatile acidity (ml)	Number of Yeast		
						Total ( $\times 10^8$ cells/g)	Viable ( $\times 10^8$ cells/g)	Rate (%)
Yellow <i>koji</i>	4.7 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.1	9.5 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	71.5 $\pm$ 8.5
White <i>koji</i>	3.1 $\pm$ 0.1	32.8 $\pm$ 1.0	5.2 $\pm$ 0.3	16.5 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.3	58.7 $\pm$ 12.4
Black <i>koji</i>	3.1 $\pm$ 0.1	29.7 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.1	17.2 $\pm$ 0.4	3.7 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	68.3 $\pm$ 0.7
Mean $\pm$ SD(n=3)								

Table 5-6 Analysis of 2nd Ferment *moromi-mash*

	pH	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	<i>Moromi</i> Alc. (%)	Volatile acidity (ml)	Sugar			Number of Yeast		
						Total (%)	Reducing (%)	Total ( $\times 10^8$ cells/g)	Total ( $\times 10^8$ cells/g)	Viable ( $\times 10^8$ cells/g)	Rate (%)
Yellow <i>koji</i>	5.2 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.2	14.7 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	50.5 $\pm$ 3.2	
White <i>koji</i>	4.2 $\pm$ 0.1	8.9 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.1	15.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	20.5 $\pm$ 7.4	
Black <i>koji</i>	4.3 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	16.3 $\pm$ 4.2	

Mean $\pm$ SD(n=3)

Table 5-7 Analysis of alcohol levels and *shochu* .

	Absolute alcohol (ml)	Unrefined <i>shochu</i> (ml)	Unrefined <i>shochu</i> Alc. content (%)	Distillation percentage (%)
Yellow <i>koji</i>	183.8 ±4.7	337 ±3	37.7 ±0.4	95.3 ±2.3
White <i>koji</i>	190.4 ±4.8	345 ±15	38.1 ±0.3	95.3 ±2.8
Black <i>koji</i>	189.1 ±5.1	342 ±3	38.7 ±0.5	95.6 ±3.3

Mean±SD(n=3)

### 5-3-3. 一次醪及び二次醪のアミノ酸組成及び濃度

アミノ酸の一部は発酵過程で酵母の代謝によって高級アルコールに変換<sup>24-26)</sup>される。また、蒸留過程でメイラード反応やストレッカー分解といった加熱反応によってアルデヒドに変換<sup>27)</sup>され、芋焼酎においてもアルデヒド類の増加が認められている<sup>22)</sup>。一次醪及び二次醪のアミノ酸組成を分析した結果をそれぞれ Fig.5-1 及び Fig.5-2 に示す。一次醪では黄麴醪の総アミノ酸量が高く、二次醪では白麴醪及び黒麴醪が高かった。この結果は、一次醪及び二次醪のアミノ酸度の値と一致した。一次醪と二次醪の総アミノ酸量が逆転した要因として、サツマイモを投入した二次醪初期に黄麴醪の流動性は低下したが、白麴醪及び黒麴醪は AP 活性が高く、流動性の高いため原料分解が進んだ為と考えられる。

ヒスチジンとアルギニン以外のアミノ酸は、一次醪では黄麴醪が白麴醪及び黒麴醪と比べて高い濃度であった。一次醪では高級アルコール生成に関与するスレオニン、バリン及びロイシンの濃度が、黄麴醪が白麴醪及び黒麴醪と比べて高濃度であったが、二次醪ではそれらの濃度が逆転した。黒麴菌である *A. luchuensis* は黄麴菌である *A. oryzae* とは酸性プロテアーゼ遺伝子の数が異なり、*A. luchuensis* では酸性プロテアーゼの遺伝子が多い<sup>28)</sup>。遺伝子の違いによって酵素活性の差異が生じ、また、アミノ酸の組成が黄麴醪と白麴醪及び黒麴醪で差異が生じていると考えられる。

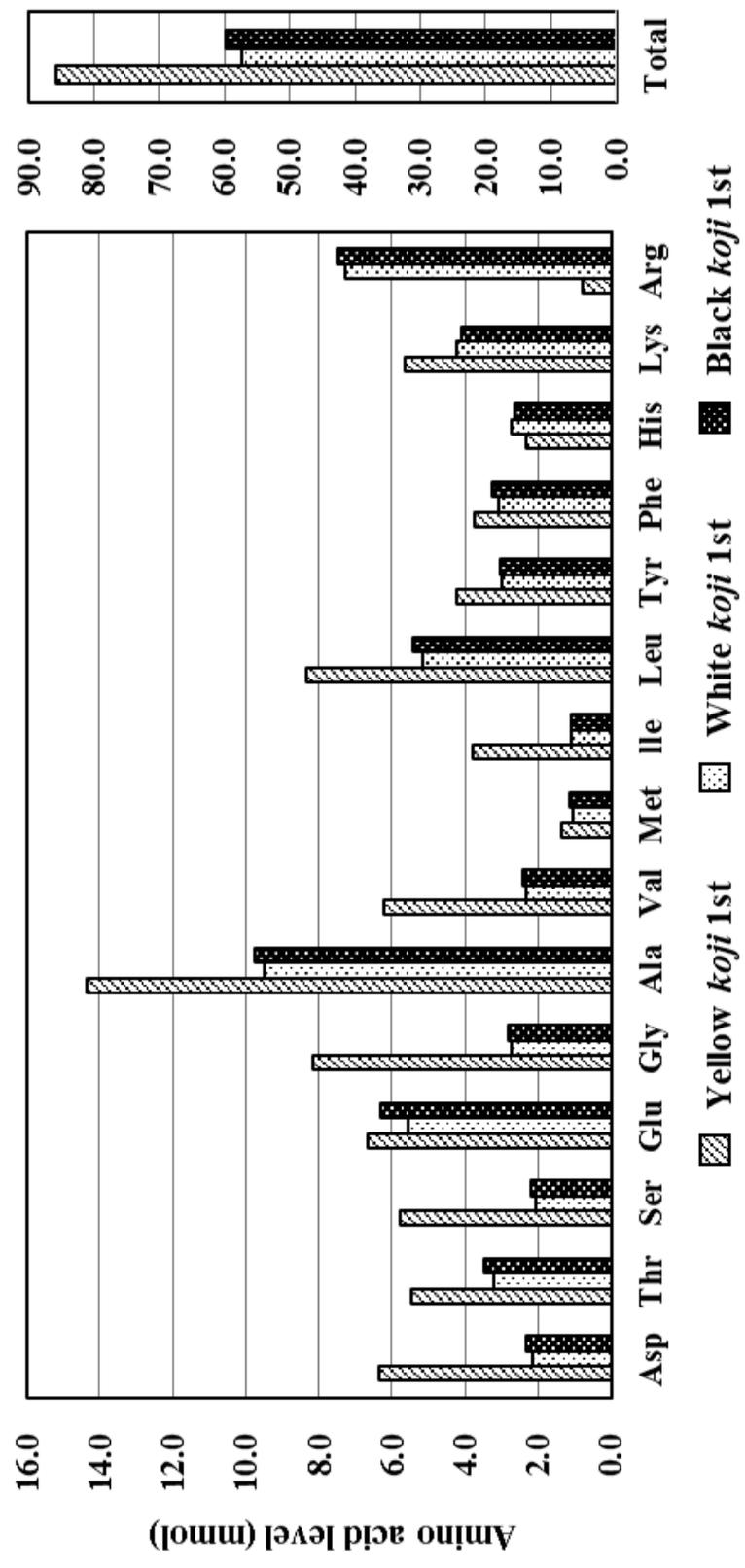
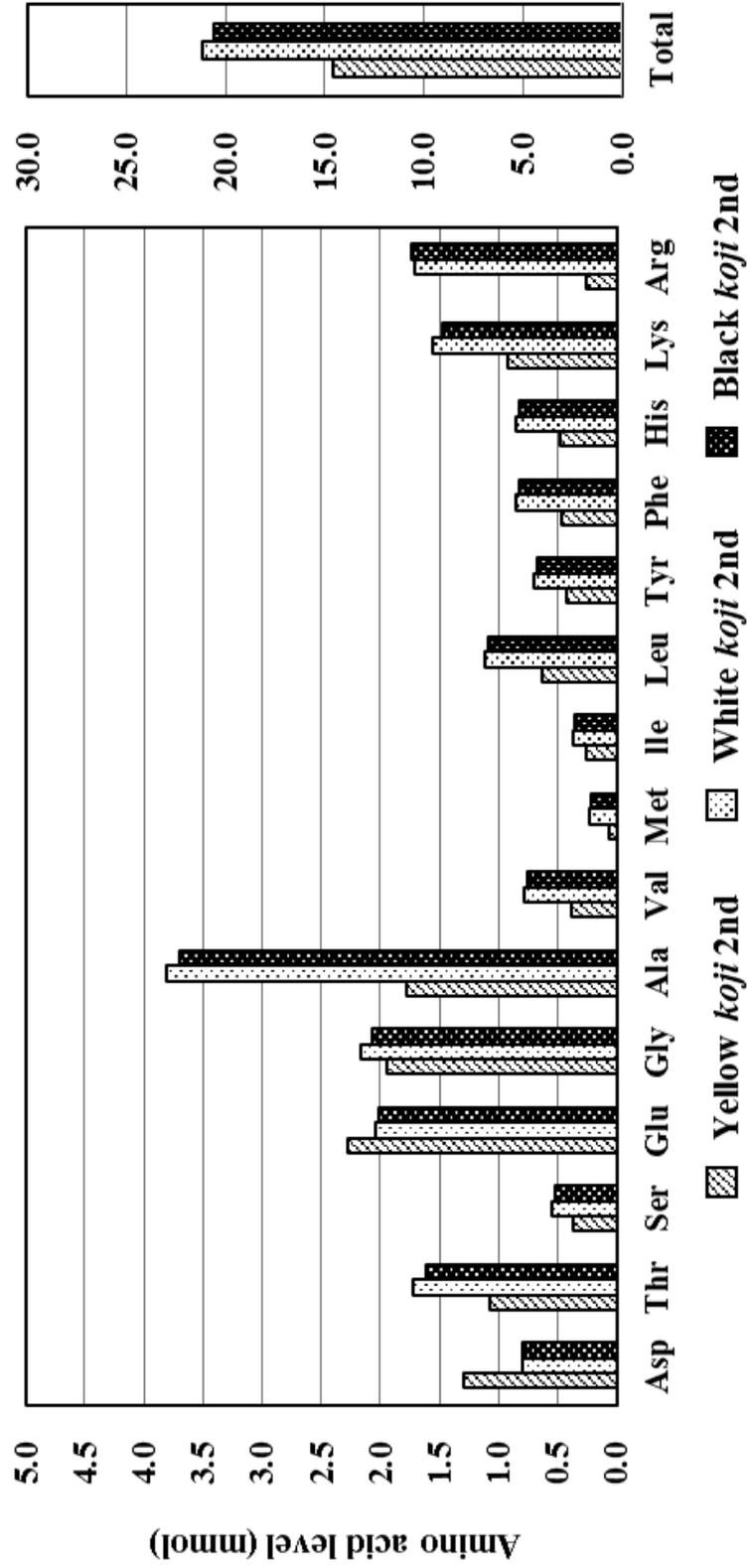


Fig.5-1 Amino acid composition and level of *imo-shochu* 1<sup>st</sup> *moromi* by different *koji*.



**Fig.5-2** Amino acid composition and level of *imo-shochu* 2<sup>nd</sup> *moromi* by different *koji*.

#### 5-3-4. 一次醪及び二次醪の有機酸組成及び濃度

白麴及び黒麴は高いクエン酸生成能を有しており、醪中にもクエン酸が多く含まれ、それによって pH が低下し高温多湿の条件下でも安全な醸造が行える<sup>10)</sup>。しかし、黄麴はクエン酸生成能が非常に低い。清酒では生酛造りや山麴造りなど乳酸菌を活用し、醪の腐造を防ぐ方法もある<sup>29)</sup>。醪中の酸組成は、香気の生成に影響を与える可能性も有ることから、HPLC を用いて焼酎醪中の有機酸組成及び濃度を測定した。その結果、Fig.5-3 及び Fig.5-4 に示すように、それぞれの一次醪及び二次醪の結果から、醪酸度と総有機酸量とは正の相関が得られた。白麴醪及び黒麴醪では一次醪の総有機酸量が二次醪と比べて、約 2.3 倍高かったが、黄麴醪ではあまり変わらなかった。焼酎醪中の有機酸の消長は、白麴及び黒麴では出麴時にはクエン酸の濃度が高く、発酵が進むにつれてそれぞれの有機酸の消長が認められ、リンゴ酸の二次醪即下での増加は原料由来と考えられている。本研究では、黄麴、白麴及び黒麴を用いているが、クエン酸については白麴醪及び黒麴醪では同様の傾向を示した。リンゴ酸は他の有機酸とは異なり、一次醪から二次醪で増加していることから、主原料であるサツマイモからの持ち込みと考えられる。また、清酒酵母ではリンゴ酸、コハク酸、乳酸の生成が明らかとなっており<sup>30)31)</sup>、各麴共に大きな差異が認められないのは酵母由来の有機酸と考えられる。瀬戸口らの報告<sup>32)</sup>では、一次醪末期及び二次醪末期共に乳酸量よりもコハク酸量が 3 倍程度多かったが、本研究では、一次醪末期ではやや乳酸量が多く、二次醪末期ではややコハク酸濃度が高い値となり、乳酸濃度及びコハク酸濃度の差異は少なかった。この二つの試験では使用している酵母が異なることから、リンゴ酸、コハク酸、乳酸の濃度については使用した焼酎酵母による可能性が示唆された。ぎ酸濃度は各麴醪共に一次醪末期の方が高く、二次醪末期の濃度が低かった。また、黄麴醪よりも白麴醪及び黒麴醪の方が高くなり、ぎ酸は、麴由来且つ焼酎麴菌の方が黄麴菌よりも多いと考えられた。酢酸濃度は、他の有機酸とは異なり黄麴醪で最も高く、一次醪末期では白麴醪及び黒麴醪の約 1.7 倍、二次醪

末期では約 1.2 倍となった。酵母は温度や濃糖，pH のストレスを受けたときにも揮発酸度が上昇する<sup>23)</sup>。黄麴醪では一次醪末期のアルコール濃度が非常に高くなっていることから，醪環境が酵母にストレスを与え酢酸を生成した可能性が考えられる。しかし，揮発酸度は一次醪末期及び二次醪で各麴醪共に顕著な差異は認められないため，酢酸以外の関与も考えられる。醪中の酢酸濃度は，一次醪末期及び二次醪末期の比較では，黄麴醪で酢酸濃度の減少量が白麴醪及び黒麴醪よりも大きかった。醪中の酢酸は酵母によってエステル化され，酢酸エチルエステルになることから，黄麴醪を使用した焼酎ではそれらの成分の濃度が白麴醪及び黒麴醪を使用した焼酎よりも高くなる可能性も考えられた。

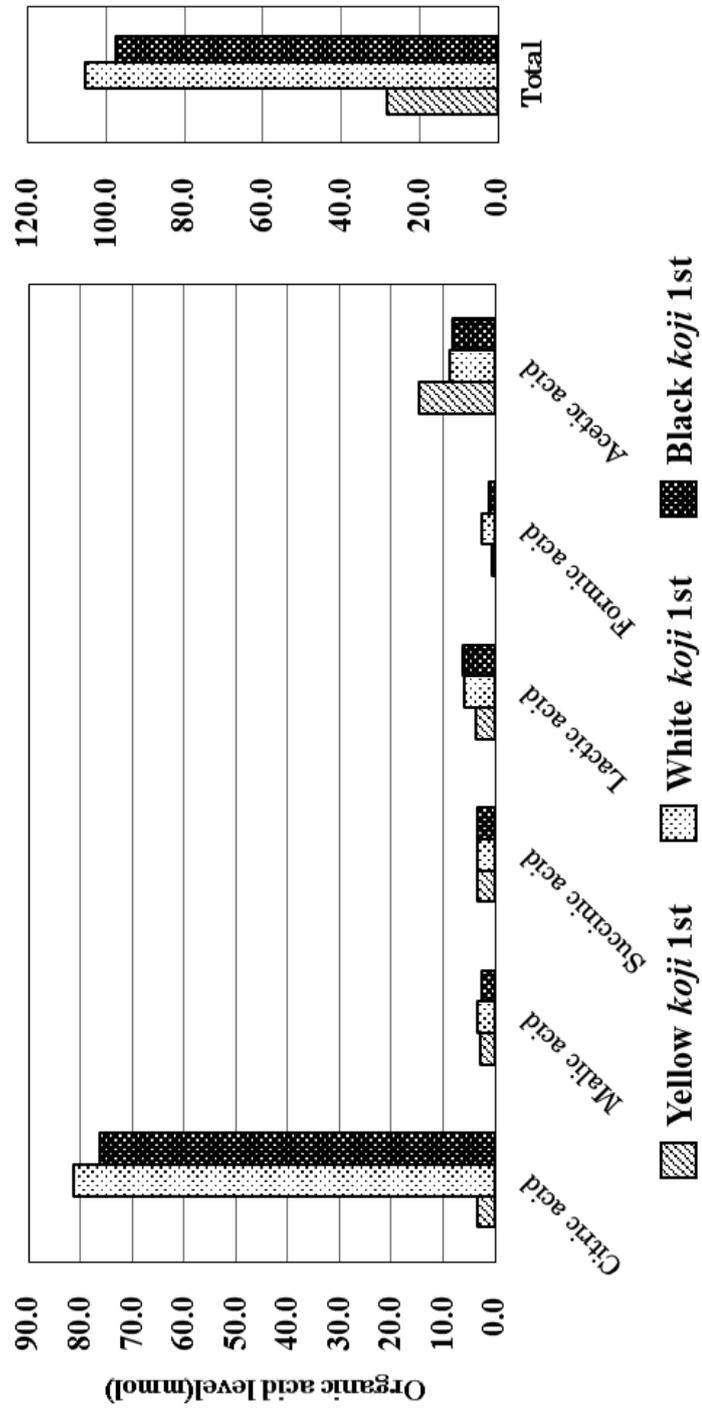


Fig.5-3 Organic acid composition and level of *imo-shochu* 1st *moromi* by different *koji*.

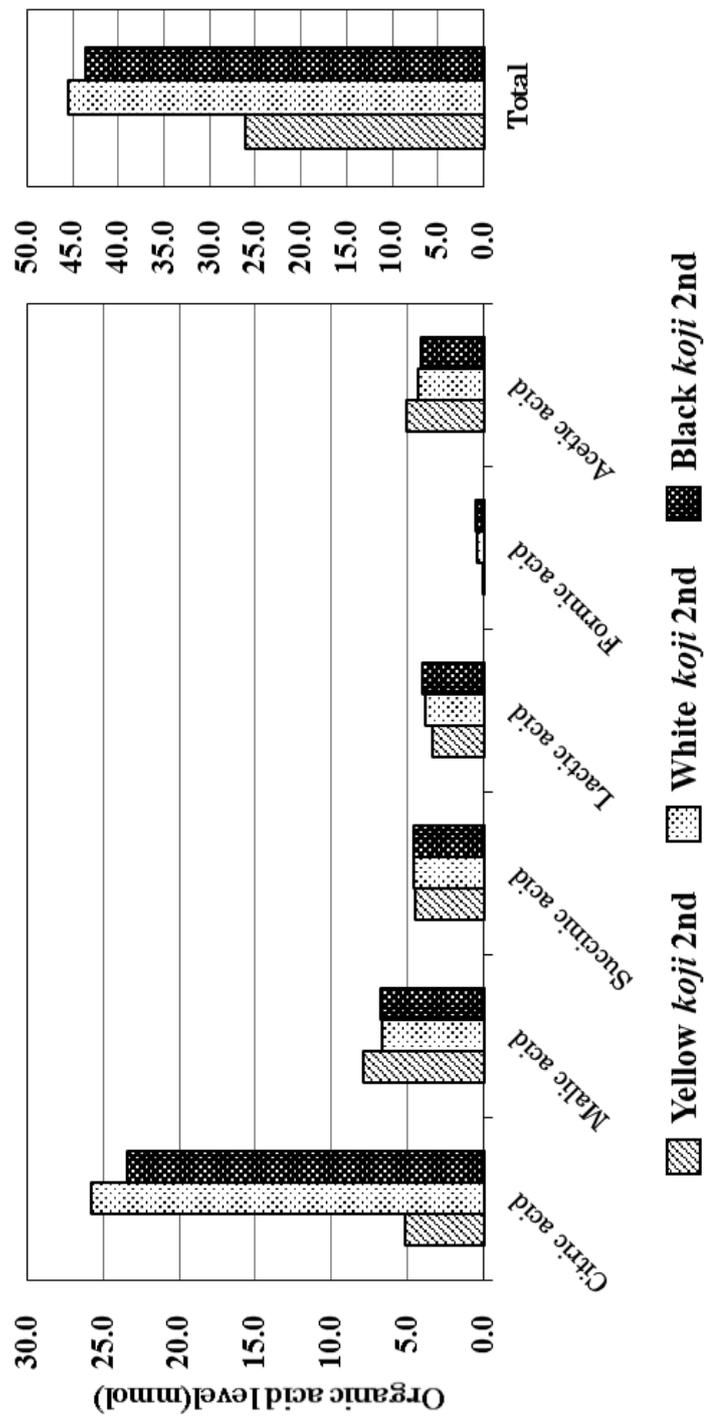


Fig.5-4 Organic acid composition and level of *imo-shochu* 2nd *moromi* by different *koji*.

### 5-3-5. 各麴を用いた芋焼酎の官能評価

各麴を用いて作製した芋焼酎の官能評価の香りの結果を Table 5-8 に、味の結果を Table 5-9 示す。香りは黄麴焼酎では華やかで麴の香り、焼菓子、草やハーブ様、高級アルコールと指摘された。白麴焼酎及び黒麴焼酎では甘い、果実様、柑橘、サツマイモ、ロースト、ナッツ様など共通のコメントが多く、基本的に類似したコメントであった。その中で、白麴焼酎はシャープ、ライトのコメントがあり、黒麴焼酎はオイリー、芳醇、クリーム等のコメントが特徴的であった。味のコメントも香りと同様に類似した傾向であったが、白麴焼酎ではドライ、バランスが良いといったコメントがみられるのに対し、黒麴焼酎では芳醇、重厚やオイリーといったコメントであった。白麴焼酎と黒麴焼酎は、香り、味とともに基本的に類似しているが、味と香りの濃淡に差異があることがわかった。

3種類の麴を用いて作製した芋焼酎を2セットに分けて、どの焼酎がどの麴を用いたものであるかブラインドテストで行った。その結果、Table 5-10のように黄麴焼酎では8.0人中7.3人が黄麴を用いた焼酎と判断し、白麴と黒麴ではそれぞれ、6.3人と5.6人といずれの焼酎とも高い確率で用いた麴の種類をきき分けることが出来た。

これまで、芋焼酎の酒質に与える麴の種類の影響については、経験的な知見に基づいて述べられてきた部分が多い。また、焼酎は製法、製造工程や使用した器具類の材質によっても香り、味などは大きな影響を受ける。本研究で作製した芋焼酎は麴以外の原料はすべて同一条件で小仕込みを実施していることから、官能評価の結果は麴の差異によるものであると考えられる。本研究により、麴の違いによる焼酎の香味の特徴的な表現を初めて明らかにすることが出来た。

Table 5-8 Sensory evaluation comments of aroma at *shochu* with different *koji*

Aroma		
Common	White <i>koji</i> and Black <i>koji</i> common	Respective characteristic
Yellow <i>koji</i>		Flesh Powdery Rich Baked confectionery <i>Koji</i> incense Fungi Earthy Chemicals Harb Vegetables
White <i>koji</i>	Flowerly Sweet Fruity Grain Alcohol Grassy	Citrus Dried fruit Aldehyde Smooth Light Sharp Roast Nutty Ester Powdery
Black <i>koji</i>		Rich Calm Oily Steamed sweet potato

Table 5-9 Sensory evaluation comments of tasting at *shochu* with different *koji*

Taste		
Common	White <i>koji</i> and Black <i>koji</i> common	Respective characteristic
Yellow <i>koji</i>		Rich Thin Mild Reverberation Grassy Harb Fungi
White <i>koji</i>	Grain Powdery Sweet potato Smooth Pungent	Mild Light Balance
Black <i>koji</i>	Roast Sharp	Rich Full-bodied Oily

Table 5-10 Identification result of *shochu*

Sample	Answer	The number of panel (n=8)		
		Yellow <i>koi</i>	White <i>koi</i>	Black <i>koi</i>
Yellow <i>koi</i>		7.3	0.0	0.7
White <i>koi</i>		0.0	6.3	0.7
Black <i>koi</i>		0.7	0.7	5.6

### 5-3-6. 各麴を用いた芋焼酎の GC-MS 解析と香気成分

GC-MS により香気成分の測定を行い、検出された成分を Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより解析した結果、65 成分を同定した。その中から、各麴を用いた焼酎間の検出成分のエリア面積を比較し、麴菌株間で差異の認められた 34 成分について標準物質を用いて検量線の作成を行い、香気成分の濃度の算出を行った。その結果を Table 5-11 に示す。

アルコール類は 4 成分に違いが認められた。菌株間で最も特徴的な差異のあった化合物は 1-オクテン-3-オールである。黒麴焼酎では、白麴焼酎と比較して濃度が 3 倍以上高かった。1-オクテン-3-オールは、リノール酸から麴由来の酵素及び自動酸化によって生成される<sup>33)</sup>。また、清酒麴の製麴において、出麴にかけて急激に生成され、出麴時の指標となる香り成分である<sup>34)35)</sup>。Yoshizaki ら<sup>4)</sup>は、各麴の香気成分を測定し、白麴が黄麴及び黒麴と比較すると明らかに 1-オクテン-3-オールが低いこと、蒸米からは検出されないことを報告している。また、福田ら<sup>36)</sup>は、白麴の全麴仕込みの焼酎よりも黒麴の全麴仕込みの焼酎の方が 1-オクテン-3-オールの含有量が多くなることを報告している。その香りの特徴としては「キノコ臭」といわれ、その閾値<sup>37)</sup>は 14 µg/l である。本研究において、黄麴焼酎及び黒麴焼酎は閾値を超えているが、官能評価のコメントに「キノコ」のコメントはなかった。調味液では 1-オクテン-3-オールの香りが「コク」の形成や増強に寄与している<sup>38)</sup>との報告もある。官能評価の中でも黄麴焼酎及び黒麴焼酎には「濃醇」との濃さに関するコメントがあることから、焼酎にも 1-オクテン-3-オールの香りが濃醇さを付与している可能性が考えられる。高級アルコール類は酵母の代謝によってアミノ酸から変換<sup>24-26)</sup>される。一次醜において、黄麴醜では白麴醜及び黒麴醜よりも全アミノ酸量は高いものの、二次醜では黄麴が低くなった。イソアミルアルコール生成に関わるロイシンは黄麴の一次醜では 2 番目に含有量の多いアミノ酸であるが、二次醜では含有量が 7 番目のアミノ酸となり、白麴醜及び黒麴醜の含有量より少なくなった。二次

醪での醪の流動性の低下による差異は考えられるものの、二次醪末期では大きく減少している。黄麴焼酎ではイソアミルアルコールが白麴焼酎及び黒麴焼酎の 1.2-1.4 倍の濃度であることから、一次醪及び二次醪の発酵期間中にロイシンが酵母によって代謝されたと考えられる。また、イソブチルアルコールについても、黄麴焼酎で白麴焼酎及び黒麴焼酎の 1.3-1.6 倍の濃度であり、前駆体であるバリンも黄麴醪ではロイシン同様に二次醪末期では少ない含有量となっていた。これらのことから、高級アルコール生成に関与するアミノ酸が醪中で酵母によって多く代謝され、黄麴焼酎の高級アルコール濃度を増加させ、華やかな香りに寄与していると考えられる。

エステル類は 18 成分で差異が認められた。黄麴焼酎ではイソ酪酸エチル、酢酸イソブチル、酢酸ブチル、酢酸イソアミル、酪酸イソアミル、酢酸ヘキシル及び酢酸 n-オクチルが白麴焼酎及び黒麴焼酎と比較して濃度が高く、1.6-3.4 倍であった。これらのエステル類は酵母によって生成される。その中でも酢酸イソアミルは、黄麴焼酎はイソアミルアルコールが高かったことから、イソアミルアルコール生成の増加に伴って増加したと考えられる。また、これらのエステル類は「バナナ」、「メロン」、「パイナップル」などの「果実様」と表現される香気成分で、官能評価でも黄麴焼酎は「エステル」とのコメントもあり、特徴のひとつであると考えられる。黄麴焼酎のエステル類は酢酸エステル類濃度が高い傾向にあった。酵母によって生成される酢酸エステルや高級アルコールは酒類においては「上立ち香」として主要な成分である<sup>39)</sup>。また、それらの酢酸エステルは酵母によってアセチル CoA とアルコールから生成されることが知られている<sup>40)</sup>。石川ら<sup>41)</sup>は、清酒酵母の協会 7 号酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ(以下、AATFase)について検討し、協会 7 号酵母の AATFase の最適反応温度及び pH は 30℃、pH6.6 と報告している。酵母によってそれぞれの AATFase の最適 pH 及び安定性は異なると考えられるが、黄麴醪では発酵工程を通して pH5 前後であるのに対し、白麴醪及び黒麴醪では pH3.1-4.3 であったことから、小仕込み

試験に用いた鹿児島 5 号酵母の AATFase 活性に影響を与えた可能性が考えられる。また、一次醪及び二次醪の酢酸は、黄麴醪が白麴醪及び黒麴醪と比較して、それぞれ 1.7 倍及び 1.2 倍であり、一次醪末期から二次醪末期の減少量も大きかったことから、醪中の酢酸の影響も推察される。一方、白麴焼酎及び黒麴焼酎ではカプロン酸エチル、カプリル酸エチル、ヘキサン酸イソアミル、ノナン酸エチル、カプリン酸エチル、ラウリン酸エチルが黄麴焼酎の 1.2-1.5 倍となった。白麴焼酎及び黒麴焼酎共に黄麴焼酎よりも含有量が多いエステル類は、脂肪酸エチルエステルが多かった。脂肪酸エチルエステルは、原料に含まれる脂質の分解によって生じた脂肪酸を酵母によってエチルエステル化して生じるとされている。また、筆者ら<sup>5)</sup>は、麴由来の酵素が中鎖脂肪酸エチルエステル生成に影響を与えていることを報告している。黄麴と比較して白麴及び黒麴ではリパーゼ活性が 2.5 倍程度あったことから、原料由来の脂質を分解して遊離の脂肪酸が醪中に増加し、酵母によって代謝されたことによって増加したと考えられる。炭素数 10 以下の脂肪酸エステルは芳香が強く、炭素数 12-16 の脂肪酸エステルは弱い香気を有している<sup>42)</sup>。Table 5-12 に示す SBSE 法を用いた GC-MS での測定の結果、黄麴焼酎に比べて白麴焼酎及び黒麴焼酎の炭素数 12 以上のラウリン酸エチル、トリデカン酸、ミリスチン酸、リノール酸のエリア面積は約 1.2-1.5 倍あり、長鎖脂肪酸エチルエステルにも関わってくる可能性が示唆された。脂肪酸エチルエステルは焼酎の「甘味」や「濃さ」に影響していると考えられる<sup>43)44)</sup>。長鎖脂肪酸エチルエステルのエリア面積は、特徴的な傾向は認められなかった。これは、濾過工程が焼酎中の長鎖脂肪酸エチルエステル濃度に影響している可能性が考えられる。これまで、脂肪酸エチルエステルを中心とした酒類の香味に関しては酵母が注目されてきたが、本研究の麴のリパーゼ活性と得られた焼酎の脂肪酸の結果から、麴菌も影響を与えることが推察される。また、SBSE 法による GC-MS の結果から、黄麴焼酎ではフェニル酢酸エチルが白麴焼酎及び黒麴焼酎よりも 5-6 倍のエリア面積となった。一方、白麴焼酎及び黒麴焼酎では桂

皮酸エチルのエリア面積が、黄麴焼酎の 2.8-4.1 倍となり特徴的であった。桂皮酸エチルは他の焼酎と比較して、芋焼酎中に多く含まれる香気成分として知られている<sup>9)</sup>。麴菌の種類では白麴焼酎及び黒麴焼酎に多い香気成分であった。

白麴焼酎と黒麴焼酎のエステル類は非常に類似した傾向を示したが、2つのエステルで顕著な差異が認められた。白麴焼酎で、2-メチル酪酸エチルは黒麴焼酎と比べて 1.9 倍多く含まれていた。2-メチル酪酸エチルは酒類中ではビール、ワイン、ブランデーなどでその存在が知られており、「デリシャスリンゴ」と称される香気特徴を有し、甘く且つフルーティな香気を有している<sup>45)</sup>。筆者ら<sup>5)</sup>は米麴を用いた焼酎と酵素剤を用いた焼酎の香気成分比較で、2-メチル酪酸エチルは米麴焼酎の特徴と報告している。また、2-メチル酪酸エチルに着目した清酒及び焼酎の香気改良剤の特許<sup>46)</sup>では、本格焼酎において 2-メチル酪酸エチル含量を 30  $\mu\text{g/l}$  に増加させると、フルーティ、やや甘い香りと描写される好ましい印象の特性が付与される。本研究では白麴焼酎に多く含有されていることが認められ、2-メチル酪酸エチルは白麴焼酎の特徴となる香気のひとつと考えられる。また、黒麴焼酎ではサリチル酸メチルが白麴焼酎と比べて 1.6 倍多く含まれていた。サリチル酸メチルは湿布などの「メントール」の香気の特徴を有し、ウィンターグリーン精油の主成分である。サリチル酸メチルは多くの植物樹皮に含まれており、芋焼酎では原料由来の香気成分<sup>47)</sup>と考えられている。また、他の焼酎と比較したものでも芋焼酎の値は大きく高い値となっている<sup>9)</sup>。しかし、本研究では黒麴焼酎で黄麴焼酎及び白麴焼酎より高くなっている。同一原料で小仕込み試験を行っていることから、黒麴焼酎のひとつの特徴である可能性が考えられた。大きく香りに寄与するものではなくても、間接的に香気形成に関与する可能性が考えられる。

アルデヒド類は全体的に黄麴焼酎と比べて白麴焼酎及び黒麴焼酎で高い濃度となった。アルデヒドは、発酵中に酵母の代謝によってアミノ酸から生成<sup>48)</sup>される他に、アセトアルデヒド、イソブチルアルデヒド、

2-メチルブチルアルデヒド及びイソバレルアルデヒドは、それぞれアラニン、バリン、イソロイシンおよびロイシンからストレッカー分解により生成する<sup>2)</sup>ことが知られている。著者らはプロテアーゼ剤を用いて焼酎醪中のアミノ酸を増加させると、酵母の代謝及び蒸留時のメイラード反応やストレッカー分解によって焼酎中のアルデヒド類が増加することを報告している<sup>22)</sup>。アミノ酸由来のアルデヒド類では、アセトアルデヒドは黄麴焼酎が最も高い濃度となった。この要因は一次醪末期と二次醪末期でのアラニン含有量が大きく減少しており、酵母によって生成されたものと考えられる。その他のイソブチルアルデヒド、2-メチルブチルアルデヒド及びイソバレルアルデヒドは、黄麴焼酎と比較して白麴焼酎及び黒麴焼酎が1.4-1.8倍の濃度であった。これらのアルデヒド類に関しては、白麴及び黒麴の酸性プロテアーゼ活性が高く、二次醪中のアミノ酸量が増加したことで酵母の代謝によって生成されたことと、二次醪末期の濃度も黄麴醪よりも高いことから、蒸留時の熱によってメイラード反応やストレッカー分解で生成されたと考えられる。フルフラールは白麴焼酎及び黒麴焼酎で黄麴焼酎の約4倍の濃度となった。フルフラールは、麦焼酎製造中に遊離したキシロースから、クエン酸に起因する醪の低pH条件下で、蒸留時の加熱によって生成することが報告されている<sup>49)</sup>。また、低pH条件下において糖とアミノ酸の相乗効果によって増加することも明らかとなっている<sup>19)</sup>。白麴焼酎及び黒麴焼酎のフルフラール濃度が高い要因としては、ひとつは白麴及び黒麴が生産するクエン酸によって醪が低pH条件になっていること、蒸留時の醪の総アミノ酸濃度が白麴醪及び黒麴醪が高かったためと考えられる。本研究において黄麴焼酎では補酸は行わずに小仕込み試験を行っていることから、黄麴焼酎でフルフラール濃度が低い要因としてはpHによる影響が考えられる。そこで、同一の黄麴醪を用いて蒸留時のpHを調整しないもの(pH5.2)と、白麴醪及び黒麴醪と同様のpH4.2にクエン酸を用いて調整して蒸留を行った。その結果、官能評価ではpH4.2に調整したもので香ばしさが付与され、フルフラール濃度は $356 \pm 40 \mu\text{g/l}$ と調整前(pH5.2)

に比べ、約 2 倍の濃度となった。その他のアルデヒド類に大きな変化はなかったため、焼酎中のフルフラール濃度は、麦焼酎と同様に芋焼酎においても醪中の pH に起因していることがわかった。ベンズアルデヒド濃度には明らかな傾向は認められなかった。

硫黄化合物のジメチルジスルフィド(以下, DMDS)及びジメチルトリスルフィド(以下, DMTS)は、黄麴焼酎が白麴焼酎及び黒麴焼酎の約 2 倍の濃度であった。これらの香気成分は「タマネギ」、「漬物様」及び「野菜様」の香気成分として知られ、閾値も非常に低い。清酒においては「老香」の原因としても知られ、その生成要因についても解っている<sup>50)51)</sup>。近年では酵母が死滅する際に酵母の内容物が溶出し、それによって DMTS 濃度が高まるとされている<sup>52)</sup>。白麴焼酎及び黒麴焼酎は、それぞれの二次醪末期での酵母の生菌率が黄麴醪の 1/2 であったことから、酵母の細胞内から醪中に DMTS の前駆体が溶出したと考えられる。しかし、二次醪末期の生菌率の高い黄麴焼酎が白麴焼酎及び黒麴焼酎よりも DMTS 濃度が高い。本研究ではシステインの測定は出来なかったが、同じ含硫アミノ酸であるメチオニンの濃度が、一次醪から二次醪末期にかけて黄麴醪で白麴醪及び黒麴醪よりも大きく減少していた。このことから、Isogai ら<sup>51)</sup>の報告にある酵母のメチオニン再生経路により DMTS の前駆体が醪中に放出され、蒸留時の熱等の反応によって DMTS が生成されたと考えられた。これらの硫黄化合物は単独では「漬物様」、「野菜様」と称され酒類ではオフフレーバーとして捉えられることが多い。官能評価においても、黄麴焼酎では「野菜様」「ハーブ様」との指摘もあった。しかし、含有量や他の香気成分との組み合わせによっては特徴となり得る香気成分ではないかと考えられる。市販酒の解析<sup>8)</sup>においても、特徴的な成分の一つとされ酒質の多様化に寄与していると考えられている。

テルペン類は芋焼酎香気成分の特徴香のひとつとされ、麴の酵素では  $\beta$ -グルコシダーゼ活性の関与が知られている<sup>13)</sup>。特に柑橘系の香気成分であるリナロールでは、白麴焼酎及び黒麴焼酎で黄麴焼酎と比較して、

1.4 倍程度であった。白麴及び黒麴の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性は黄麴の 10 倍以上の活性を有していることから、麴の酵素活性による差異が焼酎の香気成分に影響したものと考えられた。テルペン類はヘッドスペースガスクロマトグラフィーでは検出されにくいため、SBSE 法にて GC-MS 解析を実施した結果を Table 5-12 に示す。テルペン類は、ローズオキサイド、ネロールオキサイド、酢酸ネリル、リナロール、テルピネオール、ゲラニオール、*p*-シメン、ダマセノンと比べて、白麴焼酎及び黒麴焼酎のエリア面積が、1.1-6.0 倍大きかった。テルペン類は麴の  $\beta$ -グルコシダーゼ活性によって、ゲラニオールやネロールが生成され、酵母によってシトロネロール、蒸留時の酸と熱でリナロールや  $\alpha$ -テルピネオールが生成される<sup>53)</sup>。白麴焼酎及び黒麴焼酎で匂いピーク面積の大きかったテルペン類は最終的に蒸留時の酸および熱によって生成される成分が多かった。芋焼酎の特徴的な香気成分とされているテルペン類は、焼酎麴菌の生産する酵素による分解及びクエン酸による低 pH な醪環境に加え、蒸留時の酸、熱も芋焼酎の香気形成をする上で重要であると示唆された。

SBSE 法を用いた GC-MS 解析の結果では、脂肪酸や脂肪酸エステル類が検出された。脂肪酸は黄麴焼酎に比べ、焼酎麴菌を使用した白麴焼酎及び黒麴焼酎のピークエリア面積が大きい結果が得られた。黄麴では製麴中に脂肪酸が増加することが知られている<sup>33)</sup>。また、焼酎では黒麴菌を用いた時の脂肪酸の原料処理から製麴中での脂肪酸の動向<sup>54)</sup>、醪から蒸留中での変化<sup>55)</sup>が報告されている。黄麴焼酎での報告はないが、焼酎では製麴及び醪で増加し、原料処理及び蒸留で減少することが明らかになっている。黄麴焼酎と白麴焼酎及び黒麴焼酎の差は麴による差異と考えられ、酵素活性でリパーゼ活性が白麴及び黒麴で高かったことから、酵素活性の関与も考えられた。しかし、焼酎中の脂肪酸及び脂肪酸エステル類に関しては濾過の影響を受けるとことから、無濾過の焼酎を解析する必要が考えられた。

Table 5-11 The average and standard deviation of concentration of volatile compounds of *imo-shochu*

Compound	(unit)	Peak-RI	Volatile compounds concentration		
			Yellow <i>koji</i>	White <i>koji</i>	Black <i>koji</i>
<b>Alcohol(4)</b>					
n-Propyl alcohol	(mg/l)	1038	169 ±66	175 ±59	277 ±36
Isobutyl alcohol	(mg/l)	1098	659 ±130	418 ±63	517 ±109
Isoamyl alcohol	(mg/l)	1216	525 ±44	376 ±70	439 ±89
1-octen-3-ol	(µg/l)	1448	16.9 ±1.4	6.9 ±0.1	27.1 ±5.1
<b>Ester(18)</b>					
Ethyl acetate	(mg/l)	885	136 ±19	245 ±17	174 ±14
Ethyl propionate	(µg/l)	952	34.8 ±1.7	65.4 ±9.1	58.5 ±4.6
Ethyl isobutyrate	(µg/l)	960	70.7 ±59.6	44.0 ±4.6	29.0 ±4.0
Ethyl DL-2-methylbutyrate	(µg/l)	1049	4.97 ±1.12	10.70 ±0.67	5.71 ±0.27
Ethyl caproate	(mg/l)	1233	1.88 ±0.32	3.08 ±0.11	2.51 ±0.16
Ethyl caprylate	(mg/l)	1437	1.97 ±0.40	2.87 ±0.12	2.40 ±0.32
Ethyl nonanate	(µg/l)	1535	4.43 ±1.04	6.52 ±0.65	6.32 ±1.36
Ethyl caprate	(mg/l)	1642	0.95 ±0.35	1.53 ±0.12	1.21 ±0.46
Ethyl laurate	(µg/l)	*1838	25.5 ±29.4	44.7 ±19.3	60.6 ±9.4
Methyl acetate	(mg/l)	816	1.45 ±0.48	0.83 ±0.19	1.00 ±0.10
Methyl salicylate	(µg/l)	1780	14.6 ±2.1	20.1 ±3.0	32.1 ±2.1
Isobutyl acetate	(mg/l)	1010	2.74 ±1.51	1.47 ±0.14	1.20 ±0.6
Butyl acetate	(µg/l)	1070	9.97 ±59.6	4.43 ±0.62	3.67 ±0.26
Isoamyl acetate	(mg/l)	1128	26.8 ±23.2	11.3 ±1.2	10.3 ±0.1
Isoamyl butyrate	(µg/l)	1262	8.47 ±11.53	2.54 ±0.13	2.52 ±0.08
Isoamyl hexanoate	(µg/l)	1458	2.87 ±0.43	4.06 ±0.22	3.24 ±0.44
Hexyl acetate	(µg/l)	1269	3.94 ±5.41	1.14 ±0.15	1.03 ±0.04
n-Octyl acetate	(µg/l)	1473	3.15 ±0.97	0.97 ±0.14	1.04 ±0.24
<b>Aldehyde(6)</b>					
Acetaldehyde	(mg/l)	*745	7.43 ±1.37	2.62 ±0.29	3.17 ±0.02
Isobutyraldehyde	(µg/l)	907	706 ±132	1,274 ±161	1,014 ±116
2- Methylbutyraldehyde	(µg/l)	909	227 ±45	351 ±42	328 ±60
Isovaleraldehyde	(µg/l)	910	137 ±19	206 ±28	185 ±22
Furfural	(µg/l)	1459	257 ±49	1,108 ±250	1,013 ±143
Benzaldehyde	(µg/l)	1519	13.1 ±2.5	11.7 ±1.6	10.0 ±1.3
<b>Sulfur compounds(2)</b>					
Dimethyl disulfide(DMDS)	(µg/l)	1067	2.59 ±0.59	1.44 ±0.07	1.02 ±0.25
Dimethyl trisulfide(DMTS)	(µg/l)	1378	1.06 ±0.48	0.64 ±0.61	0.42 ±0.25
<b>Fran(1)</b>					
2,5-Dimethylfuran	(µg/l)	945	2.08 ±0.26	4.83 ±2.79	3.81 ±1.17
<b>Terpene(2)</b>					
p-Cymene	(µg/l)	1266	0.23 ±0.03	1.76 ±0.02	1.16 ±0.27
Linalool	(µg/l)	1545	9.65 ±0.00	13.55 ±2.65	14.02 ±3.16
<b>Other(1)</b>					
Acetaldehyde diethyl acetal	(mg/l)	889	98.8 ±1.7	43.9 ±5.8	44.7 ±3.8
					Mean±SD(n=3)

Table 5-12 Relative area of volatile compounds of *imo-shochu* for TDS.

Compound	Peak-RI	Relative area volatile compounds(Yellow <i>koji</i> area: 1.00)		
		Yellow <i>koji</i>	White <i>koji</i>	Black <i>koji</i>
<u>Ester(6)</u>				
Ethyl phenylacetate	1746	1.00	0.18	0.16
Ethyl laurate	1821	1.00	1.13	1.06
Ethyl myristate	2025	1.00	0.72	0.69
Ethyl cinnamate	2078	1.00	4.09	2.84
Ethyl palmitate	2231	1.00	0.50	0.40
Ethyl linoleate	*2492	1.00	0.88	0.80
<u>Terpene(13)</u>				
Rose oxide	1366	1.00	1.22	1.14
Nerol oxide	1459	1.00	1.81	1.99
Citronellyl acetate	1640	1.00	1.05	1.06
Geranyl acetate	1684	1.00	0.75	0.88
Nerol acetate	1698	1.00	1.22	2.04
Linalool	1517	1.00	2.87	2.56
Terpineol	1660	1.00	3.10	2.60
Citronellol	1732	1.00	0.60	0.84
Geraniol	1808	1.00	1.22	1.11
Nerolidol	2006	1.00	1.06	1.01
p-cymene	1290	1.00	3.50	4.67
Damascenones	1785	1.00	6.03	5.05
Farnesol	2269	1.00	0.51	0.59
<u>Fatty acid(6)</u>				
Caprylic acid (C8)	2011	1.00	1.13	1.05
Capric acid (C10)	2222	1.00	1.42	1.23
Lauric acid (C12)	*2431	1.00	1.41	1.22
Tridecylic acid (C13)	*2531	1.00	1.22	1.19
Myristic acid (C14)	*2627	1.00	1.22	1.12
Palmitic acid (C16)	*2809	1.00	1.58	1.47

(n=3)

#### 第 4 節 要約

芋焼酎の製造に用いられている，黄麴，白麴，黒麴を用いて，麴以外はすべて同一条件で行い，芋焼酎における麴が違うことで生じる香気成分及び官能評価の差異を検討した。

市販種麴を用いて作製した麴は，麴酸度は白麴及び黒麴で高く，黄麴は非常に低い値であった。酵素活性では AA 活性は黄麴が白麴及び黒麴と比較して非常に高い活性であったが、酸性条件下での液化に関与する AsAA 活性は白麴及び黒麴で黄麴の 10 倍の活性となった。白麴及び黒麴では BG 活性，CEL 活性，AP 活性，LIP 活性が黄麴よりも高い。白麴と黒麴の比較では，BG 活性及び CEL 活性以外の酵素活性は白麴が高い傾向を示した。

得られた麴を用いて作製した醪では，各醪共に問題なく発酵が行われた。高いクエン酸生成能を有する白麴及び黒麴の pH 及び醪酸度は黄麴醪と比べ，一次醪及び二次醪共に pH は低く，酸度は高い結果であった。二次醪の初期に白麴醪及び黒麴醪とは異なり，黄麴醪の流動性が低下した。黄麴は白麴及び黒麴よりも AP 活性が低いことから，醪の流動性に差異が生じ，醪のアルコール濃度も白麴醪及び黒麴醪が高い結果となった。また，AP 活性の高い白麴醪及び黒麴醪ではアミノ酸量は黄麴よりも高かった。一次醪末期の総アミノ酸量は黄麴醪が高く，二次醪末期では白麴醪及び黒麴醪が高くなった。黄麴醪では一次醪から二次醪にかけて高級アルコール生成に関わるアミノ酸の減少が大きかった。一方，二次醪末期では，蒸留時の熱でアルデヒド類に変換されるアミノ酸は白麴醪及び黒麴醪で高かった。醪中の有機酸は白麴醪及び黒麴醪では麴由来のクエン酸濃度が高くなった。黄麴醪では一次醪末期の酢酸濃度が白麴醪及び黒麴醪よりも高くなった。

官能評価では，黄麴焼酎の香りは華やか，麴の香り，焼菓子，草やハーブ様と指摘された。白麴焼酎及び黒麴焼酎は，共通して果実様，ロースト，ナッツ様といったコメントが多かった。白麴焼酎はライト，シャープのコメントがあり，黒麴焼酎はオイリー，まろやか，クリーム等の

コメントが特徴的であった。味のコメントは香りと類似した傾向を示し、白麴焼酎ではドライ、バランスといったコメントがみられるのに対し、黒麴焼酎では芳醇、重厚といったコメントが得られた。どの焼酎がどの麴を用いたものであるかのブラインドテストにおいても概ねきき分けが出来ていることが認められた。これまで、酒質に与える麴の影響については経験的に述べられてきたが、本研究により、麴の違いによる芋焼酎の香味の特徴的な表現が明らかとなった。

GC-MS による香気成分は、黄麴焼酎では、一般的な芋焼酎香気成分を基本として、高級アルコール及び酢酸エチルエステル、含硫化合物含量が高かった。白麴焼酎及び黒麴焼酎は類似した傾向を示している中で、黄麴よりもアルデヒド類、テルペン類が多かった。白麴焼酎と黒麴焼酎の比較では、全体的に白麴焼酎のエステル類の香気成分濃度が高かった。その中で、2-メチル酪酸エチルが黒麴焼酎と比較して大きな差異のある成分であった。黒麴焼酎は低級脂肪酸エステル類の含有量は白麴焼酎が多いものの、中鎖脂肪酸エチルエステルでは同等の濃度となり、エステル類ではサリチル酸メチルの濃度が白麴焼酎と大きく異なっていた。また、黒麴焼酎では白麴焼酎と比較して、1-オクテン-3-オールが高い結果となった。1-オクテン-3-オール濃度の麴での差異<sup>5)</sup>及び全麴仕込みによる白麴焼酎及び黒麴焼酎の差異<sup>36)</sup>から、黒麴菌由来のひとつの特徴であると考えられた。芋焼酎における白麴製と黒麴製の香気成分はこれらの濃淡、重厚さに関与する成分によって違いが生み出されていることが示唆された。

## 参考文献

- 1) 高峯和則, 瀬戸口眞治, 亀沢浩幸, 神渡巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男 : 鹿児島県工業技術センター研究報告, **8**, 1-6(1994)
- 2) 安藤義則, 問世田春作, 高峯和則 : 特許第 3876975 号
- 3) Yamamoto, H., Morimura, S., Mizutani, M., Yamada, K., Ochi, H., Takayama, K., Kudo, T., Ohta, H., and Kida, K. : *J. Inst. Brew.*, **117**(4), 627-633(2011)
- 4) Yoshizaki, Y., Yamato, H., Takamine, K., Tamaki, T., Ito, K., and Sameshima, Y. : *J. Inst. Brew.*, **116**, 49-55 (2010)
- 5) Shiraishi, Y., Yoshizaki, Y., Ono, T., Yamato, H., Okutsu, K., Tamaki, H., Futagami, T., Sameshima, Y., and Takamine, T. : *J. Inst. Brew.*, **122**, 381-387(2016)
- 6) 瀬戸口智子, 神渡巧 : 日本醸造協会誌, **109**, 49-59(2014)
- 7) 瀬戸口智子, 神渡巧 : 日本醸造協会誌, **109**, 801-807(2014)
- 8) 瀬戸口智子, 神渡巧 : 日本醸造協会誌, **111**, 345-353(2016)
- 9) 福田央, 韓錦順, 水谷治, 金井宗良, 山田修 : 日本醸造協会誌, **111**, 545-555(2016)
- 10) 西谷尚道編, 本格焼酎製造技術(財団法人日本醸造協会, 東京)(1991)
- 11) 注解編集委員会編, 第四回改訂国税庁所定分析法注解(財団法人日本醸造協会, 東京)(1993)
- 12) 岩野君夫, 福田清治, 三上重明, 椎名敏 : 日本醸造協会誌, **84**, 179-182(1989)
- 13) 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝 : 日本醸造協会誌, **86**, 536-539(1991)
- 14) 柏木豊 : 発酵糸状菌の酵素 微生物遺伝子資源利用マニュアル, (16) (2004)
- 15) 日本醤油研究所 編 : しょうゆ試験法(財団法人日本醤油研究所, 東京)(1985)
- 16) 山田浩一, 太田安英, 町田晴夫 : 日本農芸化学会誌, **36**, 10 (1962)

- 17) 岩野君夫, 三上重明, 福田清治, 椎名敏, 島田豊明, 小幡孝之, 木崎康造, 新里修一, 荒卷功, 佐伯宏 : 日本醸造協会誌, **81**, 495-498(1986)
- 18) 中村希世, 柿元智, 森村茂, 木田健次, 真野直也 : 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集, **10**(1998)
- 19) 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則 : 日本醸造協会誌, 印刷中
- 20) 工藤哲三, 水谷政美, 本部恭平, 太田一良 : 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告,**46**, 159-164(2001)
- 21) 北原覺雄, 吉田満智子 : 醗酵工学, **27**, 162-166(1949)
- 22) 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則 : 日本醸造協会誌, 印刷中
- 23) 瀬戸口眞治, 亀澤浩幸, 高峯和則, 安藤義則, 間世田春作 : 鹿児島県工業技術センター平成 12 年度研究発表会予稿集(2000)
- 24) K.OUCHI, Y.YAMAMOTO, M.TAKAGISHI, and H.AKIYAMA : *J.Ferment.Tecnol.*, **58**, 301(1980)
- 25) 大内弘造, 高岸正邦, 山本泰彦, 秋山裕一 : 醗酵工学, **59**(1), 9-16(1981)
- 26) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝 : 日本醸造協会誌, **81**, 626-632(1986)
- 27) 奥村丞司 : 日本醸造協会誌, **88** (3), 178-187(1993)
- 28) Yamada, O., Machida, M., Hosoyama, A., Goto, M., Takahashi, T., Futagami, T., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Koike, H., Abe, K., Asai, K., Arita, M., Fujita, N., Fukuda, K., Higa, K., Horikawa, H., Ishikawa, T., Jinno, K., Kato, Y., Kirimura, K., Mizutani, O., Nakasone, K., Sano, M., Shiraishi, Y., Tsukahara, M., and Gomi, K., : *DNA Res.*, doi:10.1093/dnares/dsw032,1-9(2016)
- 29) 日本醸造協会 編 : 清酒製造技術(財団法人日本醸造協会, 東京)(1979)

- 30) 林田正典, 上田隆蔵, 寺本四郎 : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 85-91(1968)
- 31) 原昌道, 戸塚昭, 水野昭博, 讃岐仁史 : 日本醸造協会誌, **74**, 838-841(1979)
- 32) 瀬戸口眞治, 山口巖, 浜崎幸男 : 鹿児島県工業試験場年報, **33**, 33-35(1987)
- 33) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭 : 日本醸造協会誌, **102**, 403-411 (2007)
- 34) Ito, K., Yoshida, K., Ishikawa, T., and Kobayashi, S. : *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 169-172 (1989)
- 35) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭 : 日本醸造協会誌, **101**, 957-963 (2006)
- 36) 福田央, 韓錦順 : 日本醸造協会誌, **111**, 750-757(2016)
- 37) GEORGE A. B. : Fenaroli's handbook of flavor ingredients, -fifth edition, CRC Press, BocaRaton (2004)
- 38) 早瀬文孝, 高萩康, 渡辺寛人 : 日本食品化学工学会誌, **60**, 59-71(2013)
- 39) 吉澤淑 : 日本醸造協会誌, **61**, 481(1966)
- 40) Howard, D., and Anderson, R.,G. : *J. Inst. Brew.*, **82**, 70-71(1976)
- 41) 石川雄章, 百瀬洋夫, 吉澤淑 : 日本醸造協会誌, **79**, 62-66(1984)
- 42) 日本醸造協会 編 : 醸造物の成分, 119-123(財団法人日本醸造協会, 東京)(1999)
- 43) 高峯和則, 木田建次, 園田頼和, 生田六也, 塚田定清 : 日本醸造協会, **84**, 560-567(1989)
- 44) 高峯和則, 木田建次, 園田頼和, 生田六也, 塚田定清 : 日本醸造協会, **85**, 825-830(1990)
- 45) 山野善正編 : おいしさの科学 (朝倉書店, 東京)(2003)
- 46) 栗山謙一, 長友正弘 : 特開 2005-210952

- 47) 宇都宮仁, 木田信, 牧則光, 磯谷敦子, 岩田博, 西谷尚道 : 日本醸造協会誌, **101**, 446-457(2006)
- 48) Ardö, Y. : *Biotechnol. Adv.*,**24**, 238-242(2006)
- 49) 大石雅志, 田野上佳枝, 梶原康博, 高下秀春, 岡崎直人 : 日本醸造協会誌,**103**,730-734(2008)
- 50) Isogi, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Nishimura, T., Iwata, H., and Goto-Yamamoto, N., : *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 189-195(2009)
- 51) Isogi, A., Kanda, R., Hiraga, Y., Nishimura, T., Iwata, H., and Sudo, S., : *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 7756-7761(2010)
- 52) Nishibori, N., Sasaki, K., Okimori, Y., Kanai, M., Isogai, A., Yamada, O., Fujii, T., and Goto-Yamamoto, N. : *J. Biosci. Bioeng.*, **118**,526-528(2014)
- 53) 安藤義則 : 日本醸造協会誌, **107**, 300-305(2012)
- 54) 西谷尚道, 佐藤哲郎, 菅間誠之助 : 日本醸造協会誌, **73**, 484-488(1978)
- 55) 西谷尚道, 佐藤哲郎, 菅間誠之助 : 日本醸造協会誌, **73**, 489-493(1978)

## 第 6 章 総括及び結論

焼酎を製造する上で、麴菌と酵母の存在は必須である。焼酎においては、酵母のアルコール発酵や香気成分生成の観点からも育種や選抜が盛んに行われ、これまで多くの実用化の例が存在する。しかし、麴菌においては、麴菌の酵素や麴由来の香気成分が芋焼酎の酒質や香気成分に与える影響についての研究は非常に少ない。芋焼酎においては黄麴、白麴と黒麴の 3 種類の麴菌を用いて焼酎製造を行っている。一般的に、芋焼酎は黒麴を使用すると濃醇な香味、白麴を使うと黒麴よりも少しマイルドで軽快な香味、黄麴は豊かな味わいを持つ焼酎になると言われているが、この評価は市販酒を対象にしたものであり、麴以外の条件が統一されて製造した焼酎を比較したものではないため、麴菌の種類による酒質の差異を評価しているかは不明である。そこで本論文では、麴菌及び麴が芋焼酎の酒質に与える影響に着目をして、酒質及び香気成分の変化や違いについて検討した。

第 1 章では、国菌としての麴菌や安全性について概括するとともに、麴及び種麴の歴史、醸造製品における麴の位置づけ、焼酎の歴史と現状についても概括した。これまで芋焼酎では酒質や香味に関わる研究として、主原料であるサツマイモ、アルコール発酵や香気生成に大きく関与する酵母は盛んに行われてきたが、麴の種類や生成物が酒質に与える影響については行われていないことを示し、本論文の研究内容についての目的を概説した。

第 2 章では、芋焼酎の酒質の多様化の一環として、プロテアーゼを添加して芋焼酎の仕込みを行い、香気成分の生成及び酒質に与える影響を検討した。まず、市販のプロテアーゼ系の酵素剤 11 種類から 4 種類の酵素剤を選抜し、芋焼酎の小仕込み試験に供した。酵素剤添加醪では醪のアルコール濃度が増加し、酸性プロテアーゼにより醪の流動性が向上し、アルコールへの変換効率が高まったと推察された。焼酎の香気成分は、高級アルコール類はいずれの成分とも酵素剤を添加しない醪が最も高く、酵素剤添加焼酎の 1.2~2.5 倍の濃度であった。酵素剤添加焼酎は

対照と比べて高級アルコールが低くなった要因として、高級アルコール生成に対応するアミノ酸以外の濃度が増加したこと、醪中に高濃度に含まれるアルギニンがより選択的に資化されたため、対応するアミノ酸の資化が相対的に減少したためと考えられる。アルデヒド類の濃度の増加は、醪中に増加したアミノ酸が酵母により代謝され生成したことと、蒸留中にメイラード反応やストレッカー分解によっても増加することを、モデル醪を用いて明らかにした。更に、これまで焼酎に含まれるフルフラールは五炭糖が低 pH で加熱・脱水反応によって生成するといわれていたが、本論文によりフルフラールはアミノ酸とキシロース等の還元糖との相乗効果によって生成することを初めて明らかにした。得られた官能評価のコメントは、対照と比較して酵素剤添加焼酎では、「果実」や食品を焼いた際に感じる香りのコメントが特徴的であった。

第3章では、第2章の結果を受けてプロテアーゼ活性の高い黒麹菌株を選抜した。株式会社ビオックの黒い分生子を着生する55株の糸状菌の中から、出麹状貌、菌株の安定性、麴酸度及び酵素活性から11株を通過株とした。しかし、実施した選抜方法では、通過株の中に *A. luchuensis* の近縁種である *A. niger* が混在している可能性がある。そこで、*fum* 遺伝子に着目し、PCRによる簡易判別を行い、4株の *A. luchuensis* type の菌株を得た。その後、種麹作製時に著しく孢子着生の悪い1株を除いた KBN4038, KBN4041, KBN4080 の3株をプロテアーゼ活性の高い黒麹菌選抜株とした。黒麹菌選抜株は全体的に市販種麹に比べ高い酵素活性となった。AP活性は対照の1.3-1.7倍と高い活性となったが、麴酸度及びBG活性は対照が最も高い活性となった。芋焼酎の小仕込みを行った結果、問題の無い発酵となり、純アルコール量等も対照と遜色のなかった。選抜株醪では、醪のアミノ酸量の増加が認められた。黒麹菌選抜株の香気成分は、高級アルコール類はイソブチルアルコール濃度が対照よりも若干増加した。その他、特徴的な差異として選抜株焼酎では1-オクテン-3-オールの濃度が対照焼酎と比べ高くなった。1-オクテン-3-オールは、麴由来の香りであり、対照焼酎とは大きく異なった。アルデヒ

ド類は、選抜株焼酎でイソバレルアルデヒド濃度が選抜株で高く、高いプロテアーゼ活性によって醪中のアミノ酸濃度が増加したためと考えられる。官能評価では、選抜株焼酎では甘香、麴香の評価が対照焼酎より高い結果となり、1-オクテン-3-オールが寄与した結果となった。プロテアーゼ剤添加焼酎では、香ばしさや果実香が強くなったが、選抜株焼酎では対照焼酎の方が高い評価となり、甘香、麴香にマスキングされた可能性が示唆された。味についても、選抜株焼酎ではやや甘さと濃厚さがあり、刺激が少ない焼酎との評価となり、香りに影響された可能性が示唆された。これらのことから、プロテアーゼ活性の高い黒麴菌選抜株を用いて芋焼酎の作製を行うことで、従来の市販種麴とは異なる酒質の焼酎が得られた。選抜株は単独株の種麴では個性が強すぎる可能性も高いことから、ブレンド用の特徴的な原酒としての使用、異なるタイプの麴菌と組み合わせる複菌の種麴として使用することで特徴を活かし、新たな酒質の芋焼酎製造に貢献できるものであった。

第4章では、米麴が焼酎の香気成分に及ぼす影響を明らかにするために、2種類の焼酎サンプルを用いて行った。一つは米麴、酵母、水によって作製した米麴焼酎であり、もう一つは米麴の代わりに蒸米、各種酵素を用いた酵素焼酎である。分析の結果、酵素焼酎はジメチルトリスルフィドとヘキサナールのFD値(香気貢献度)が高く、米麴焼酎では果実様の特徴を有するエステル化合物のFD値が高かった。14の化合物の濃度とOAVを測定し、イソバレルアルデヒド、カプリル酸エチル、カプロン酸エチルと2-メチル酪酸エチルが米麴を用いることで生成される主要な揮発成分であることが明らかとなった。

第5章では、芋焼酎の製造に用いられている、黄麴、白麴及び黒麴を用いて、麴以外はすべて同一条件で製造を行い、芋焼酎における麴の違いで生じる香気成分及び官能評価の差異を検討した。得られた麴は、麴酸度は白麴及び黒麴で高く、黄麴は非常に低い値であった。酵素活性ではAA活性は黄麴が白麴及び黒麴と比較して非常に高い活性であったが、酸性条件下での液化に関与するAsAA活性は白麴及び黒麴で黄麴の10

倍の活性となった。白麴及び黒麴では BG 活性, CEL 活性, AP 活性, LIP 活性が黄麴よりも高い。白麴と黒麴の比較では, BG 活性及び CEL 活性以外の酵素活性は白麴が高い傾向であった。

各麴を用いた醪では, 各醪共に問題なく発酵が行われた。高いクエン酸生成能を有する白麴及び黒麴の pH 及び醪酸度は黄麴醪と比べ, 一次醪及び二次醪共に pH は低く, 酸度は高い結果であった。二次醪の初期に白麴醪及び黒麴醪とは異なり, 黄麴醪の流動性が低下した。黄麴は白麴及び黒麴よりも AP 活性が低いことから, 醪の流動性に差異が生じ, 醪のアルコール濃度も白麴醪及び黒麴醪が高い。一次醪末期の総アミノ酸量は黄麴醪が多く, 二次醪末期では白麴醪及び黒麴醪が多くなった。黄麴醪では一次醪から二次醪にかけて高級アルコール生成に関わるアミノ酸の減少が大きかった。また, 二次醪末期で蒸留時の熱でアルデヒド類に変換されるアミノ酸が白麴醪及び黒麴醪では高かった。醪中の有機酸は白麴醪及び黒麴醪では麴由来のクエン酸濃度が高くなった。黄麴醪では一次醪末期の酢酸濃度が白麴醪及び黒麴醪よりも高くなった。

官能評価では, 黄麴焼酎の香りは華やか, 麴の香り, 焼菓子, 草やハーブ様と指摘された。白麴焼酎及び黒麴焼酎は, 共通して果実様, ロースト, ナッツ様といったコメントが多かった。白麴焼酎はライト, シャープのコメントがあり, 黒麴焼酎はオイリー, まろやか, クリーム等のコメントが特徴的であった。味のコメントは香りと類似した傾向を示し, 白麴焼酎ではドライ, バランスといったコメントがみられるのに対し, 黒麴焼酎では芳醇, 重厚といったコメントが得られた。どの焼酎がどの麴を用いたものであるかの概ねきき分けが出来ていることが認められた。これまで, 酒質に与える麴の影響については経験的に述べられてきたが, 本論文により, 麴の違いによる芋焼酎の香味の特徴的な表現が明らかとなった。

黄麴焼酎の香気成分は, 一般的な芋焼酎香気成分を基本として, 高級アルコール及び酢酸エチルエステル, 含硫化合物含量が高かった。白麴焼酎及び黒麴焼酎は類似した傾向を示している中で, 黄麴よりもアルデ

ヒド類，テルペン類が多かった。白麴焼酎と黒麴焼酎の比較では，全体的に白麴焼酎のエステル類の香気成分濃度が高かった。その中で，2-メチル酢酸エチルが黒麴焼酎と比較して大きな差異のある成分であった。黒麴焼酎は低級脂肪酸エステル類の含有量は白麴焼酎が多いものの，中鎖脂肪酸エチルエステルでは同等の濃度となり，エステル類ではサリチル酸メチルの濃度が白麴焼酎と大きく異なっていた。また，黒麴焼酎では白麴焼酎と比較して，1-オクテン-3-オールの濃度が高い結果となった。1-オクテン-3-オールは黒麴由来のひとつの特徴であると考えられた。芋焼酎における白麴製と黒麴製の香気成分はこれらの濃淡，重厚さに関与する成分によって違いが生み出されていることが示唆された。

第6章では，上記各章の結果を総括し，内容をまとめた。

本論文は，本格焼酎の香味形成の差異に及ぼす麴菌の影響を明らかにするために，麴及び麴菌の生産する酵素に着目し，大きく2つのテーマで研究を行った。麴菌の生産する酵素が及ぼす影響では，プロテアーゼの効果とアミノ酸が芋焼酎の酒質に及ぼす影響を明らかにした。また，得られた知見を活かし，高プロテアーゼ活性の黒麴菌株の育種を行い，選抜株を用いて作製した芋焼酎は従来の市販種麴を用いた焼酎とは異なる酒質であった。麴が焼酎の酒質に及ぼす影響では，米麴を用いた焼酎の米麴由来の香気成分を明らかにした。また，麴の種類の違いによる芋焼酎の特徴では，3種類の菌種を用いた麴及び醪の特徴，香気成分及び香味の特徴を明らかにした。以上の結果より，焼酎の商品設計をする際の種麴選択に対して新たな知見が得られ，本論文の成果は焼酎用種麴及び焼酎の酒質の多様化に貢献できるものであった。

## 謝辞

本研究を遂行並びに論文をまとめるにあたり，終始御指導御鞭撻を賜りました，国立大学法人 鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 高峯 和則 教授に深く感謝の意を表します。また，本論文の審査及び御指導御助言賜りました琉球大学 農学部 外山博英 教授，鹿児島大学 農学部 二神 泰基 准教授に厚く感謝致します。

本論文の審査並びに御校閲の労を賜りました鹿児島大学 農学部 玉置 尚徳 教授，佐賀大学 農学部 北垣 浩志 教授に厚く感謝致します。

研究遂行にあたり御助言御指導賜りました鹿児島大学 農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 吉崎 由美子 准教授，奥津 果優 特任助教に深謝致します。

社会人での博士課程の機会を頂くとともに，多大なる御支援及び御助言，貴重な時間を与えて頂きました，株式会社ビオック 村井 總一郎 代表取締役会長，村井 裕一郎 代表取締役社長，和久 豊 常務取締役，株式会社ビオック 社員の皆様に深謝致します。

焼酎の利き酒に御協力御助言等頂きました，鹿児島県工業技術センター食品・化学部職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

黒麹菌の遺伝子解析方法を御教授頂きました，独立行政法人 酒類総合研究所 山田 修 博士 に厚く御礼申し上げます。

研究を行うにあたって一緒に実験を遂行してくれた，鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 安藤 有加氏(平成 26 年度卒業生)，久 遼馬 氏(平成 27 年度卒業生)，原口 愛美氏(平成 28 年度卒業生)に感謝致します。また，研究生生活の中で日々多くの刺激を与えてくれた，焼酎学製造学及び醸造微生物学研究室の卒業生及び所属学生に御礼申し上げます。

遠方より陰ながら支えてくれた家族，親族，友人，鹿児島にて支えてくれた方々に感謝申し上げます。

最後に，本研究の御縁と御支援賜り，大学時代より終始導いてくださっている，東京農業大学 小泉 武夫 名誉教授に厚く御礼申し上げます。

## 本論文に關係する報文

1. Yohei Shiraishi, Yumiko Yoshizaki, Toshifumi Ono, Hiroaki Yamato, Kayu Okutsu, Hisanori Tamaki, Taiki Futagami, Sameshima Yoshihiro and Kazunori Takamine : Characteristic odour compounds in *shochu* derived from rice *koji* ., Journal of the Institute of Brewing, 122, 3, 381-387 (2016)
2. 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則 : 芋焼酎醪へのプロテアーゼ剤添加による揮発成分と官能評価への影響, 日本醸造協会誌, 印刷中
3. 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則 : 芋焼酎の香気形成に及ぼすアミノ酸の影響, 日本醸造協会誌, 印刷中