

# 琉球大学学術リポジトリ

## [報文]泡盛古酒用黒麹菌の開発

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): 泡盛, 古酒, 黒麹菌, フェルラ酸, 4-ビニルグアヤコール キーワード (En): 作成者: 玉城, 康智, 渡嘉敷, 唯章, 池端, 真美, 中西, 久治, 田村, 博三, 比嘉, 敏勝, TAMAKI, Yasutomo, TOKASHIKI, Tadaaki, IKEHATA, Mami, NAKANISHI, Hisaharu, TAMURA, Hiromi, HIGA, Toshikatu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016604">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016604</a>

# 泡盛古酒用黒麹菌の開発

玉城康智, 渡嘉敷唯章, 池端真美, 中西久治, 田村博三, 比嘉敏勝

\*<sup>(株)</sup>トロピカルテクノセンター

## Development of black koji-mold for aged Awamori

Yasutomo TAMAKI, Tadaaki TOKASHIKI, Mami IKEHATA  
Hisaharu NAKANISHI, Hiromi TAMURA, and Toshikatu HIGA

*Tropical Technology Center Limited,  
5-1 Suzaki Gushikawa city Okinawa*

Keywords : 泡盛, 古酒, 黒麹菌, フェルラ酸, 4-ビニルグアヤコール

### 1. 緒言

泡盛の醸造に用いられる泡盛黒麹菌は、戦前まで醸造所ごとに保管され、利用されていたが、戦争により醸造所と共に壊滅し、戦後は市販の種麹が利用されている。現在、泡盛用の種麹を販売している種麹店は、沖縄県内外に3社あり、これら種麹店が販売する3種類の種麹により県内全社の泡盛が製造されている。従って、現在ある泡盛の特徴の違いは製造方法によるところが多く、その研究は多くなされていない。

近年、小関ら<sup>1,2)</sup>の報告により、泡盛の製造工程におけるバニリンの生成機構が明らかになった。その生成機構とは、泡盛古酒の香味成分の一つであるバニリンは泡盛黒麹菌が産生する酵素により原料米からフェルラ酸として遊離する。遊離したフェルラ酸はもろみ中の酸や蒸留時の熱により4-ビニルグアヤコール(4-VG)へと変化して泡盛中に移行する。さらに泡盛中の4-VGは熟成させることによりバニリンに変化するというものであり、これが泡盛古酒独特の香味の一つとなる。従ってこれは、泡盛

黒麹菌によって古酒製造における香りの生成に影響があると考えられる。バニリン生成に関与するフェノール化合物を図1に示す。

本研究では、小関ら<sup>1,2)</sup>の報告にあるバニリン生成機構にもとづき、県内の研究機関や県外の微生物保存機関から黒麹菌を収集し、バニリン生産に関わる酵素であるフェルラ酸エステラーゼとキシラナーゼ活性および泡盛醸造に関与する酵素の活性を調べた。さらに、それら酵素活性が高い黒麹菌を泡盛古酒用黒麹菌として選抜して実際に試験醸造を行い、その選抜菌株の実用化について検討を行った。

本事業は、沖縄県の研究開発費補助事業によって行った。

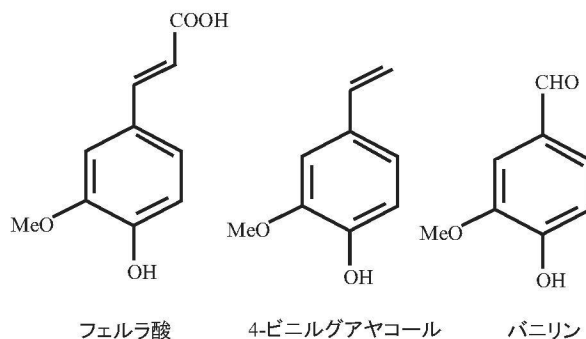


図1. バニリン生成に関与するフェノール化合物

\*沖縄県具志川市字州崎5-1

## 2. 実験方法

### 2.1. 泡盛古酒用黒麹菌のスクリーニング

#### (1) 供試菌株

黒麹菌は、沖縄県工業技術センター、東京大学分子細胞生物学研究所、勸発酵研究所にて保存されている107株を収集し、酵素活性の測定に使用した。また、通常泡盛製造に利用されている黒麹菌として、石川種麹店、㈱ビオック、河内源一郎商店の市販種麹から菌を分離収集した。収集した黒麹菌（全107株）は便宜的にTTC番号を付けた。

#### (2) 製麹方法

供試菌株の製麹はフラスコスケールで行った。タイ丸米約500gを洗米後、浸漬、水切りを行い、オートクレーブで蒸煮した。蒸米は滅菌した200ml容三角フラスコに20gずつ分注した。黒麹菌は事前にPDA培地で培養を行い、0.05%Tween80で孢子懸濁液を調整し、蒸米1gに対し孢子数が $2 \times 10^5$ 個になるようにフラスコ内の蒸米に接種した。培養は、温度38℃、相対湿度95%の恒温恒湿機で40時間培養を行った。

#### (3) 酵素活性の測定

国税庁所定分析法注解<sup>3)</sup>に従い、酵素液を調製した。麴10gに塩化ナトリウム50mlを加え、20℃で3時間ときどき振りまぜながら浸出した後ろ過した。そのろ液10mlを透析膜に入れ、0.01M酢酸緩衝液に対して低温で一夜透析した後、蒸留水で20mlにメスアップして酵素液とし、以下の酵素活性の測定に用いた。

##### ① キシラーゼ

本酵素の活性測定はIshiharaら<sup>4)</sup>の方法に従って行った。即ち、2%キシラン (from oat spelt, シグマ製) 懸濁液0.5ml、0.05M酢酸緩衝液0.4ml、酵素液0.1mlを混合し、40℃で10分間酵素反応を行った。反応後、遊離した還元糖量をSomogyi-Nelson法で測定した。キシラーゼ活性は、キシランから40℃で1分間に1  $\mu$ molのキシロースを遊離する活性を1単位とし、U/g麴として表示した。

##### ② フェルラ酸エステラーゼ

本酵素の活性測定はIshiharaら<sup>4)</sup>の方法を改変して行った。基質は小麦ふすまから調製したフェルラ酸オリゴ糖とした。酵素反応は、基質1mlに酵素液0.5mlを加え、37℃で30分間反応を行い、10分間煮沸することにより酵素反応を停止した。反応液は

5 N塩酸0.2mlを加えて酸性にした後、酢酸エチル3mlで2回、生成したフェルラ酸の抽出を行った。抽出液はエバポレーターで濃縮乾固させ、メタノール1mlに再溶解し、HPLCにより定量を行った。HPLCの測定条件を表1に示した。

フェルラ酸エステラーゼ活性は、フェルラ酸オリゴ糖から37℃で1分間に1nmolのフェルラ酸を遊離する活性を1単位とし、U/g麴として表示した。

表1. HPLC分析条件

装置	SHIMADZU LC-10AD
カラム	Wakosil-II 5C18 (4.6mm×250mm)
検出波長	320nm
移動相	50mm酢酸緩衝液 (pH4.0) (5-30%メタノールリニアグラジエント)
流速	1.0ml/min

#### ③ 醸造用酵素

$\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、国税庁所定分析法注解<sup>3)</sup>に従って測定した。酵素活性はU/g麴として表示した。

### 2.2. 選抜黒麹菌による試験醸造

#### (1) 供試菌株

泡盛古酒用黒麹菌として選抜したTTC136菌株を使用した。

#### (2) 製麹方法

試験醸造は、本社実験室で麴蓋を使用したラボスケール（原料米2kg）と沖縄県工業技術センターの自動製麹装置（回転ドラム式製麹装置）を使用したベンチスケール（原料米30kg）で行った。原料米はタイ碎米を使用した。製麹温度は、製麹前半40~42℃に保ち、製麹後半は35℃以上にならないよう調節した。

#### (3) もろみ仕込み

ラボスケールでは、ステンレス製容器に麴2.3kgをとり、汲み水3.4L（汲水歩合170%）を加え、泡盛101号酵母を $5 \times 10^5$  cells/g-原料米の割合で添加した。発酵期間中ステンレス製容器は上部をビニールで覆い、発酵温度25℃で15日間発酵を行った。ベンチスケールでは、ステンレス製容器に麴25kgをとり、汲み水38.3L（汲水歩合170%）を加え、以下ラボスケールと同様に行った。

(4) 蒸留方法

ラボスケールの蒸留は、蒸留水製造装置（清水理化学機器製作所）を使用した。15日間発酵させたもろみを蒸留装置に4.4L注ぎ込み、80~98℃で約1時間蒸留を行った。ベンチスケールの蒸留は、沖縄県工業技術センターの蒸留装置（縦型常圧蒸留装置）を使用した。15日間発酵させたもろみを蒸留装置のタンクに50L注ぎ込み、80~98℃で約1時間蒸留を行った。蒸留は蒸留液がアルコール度数47%に達するまで行い、蒸留液の分析に供した。

(5) 酵素活性の測定

麴の酵素活性は、黒麴菌のスクリーニングの時と同様、国税庁所定分析法注解<sup>3)</sup>に従い酵素を調製し、分析に供した。

(6) もろみ中の香味成分

もろみは2日毎にサンプリングを行った。各サンプルは、遠心分離（3,000rpm）後上清を0.45 μm シリンジフィルターに通し分析に供した。香味成分のHPLC分析条件は、表1と同様に行い、波長320 nm（フェルラ酸）および258nm（4-VG）で測定した。

(7) 蒸留液中の香味成分

蒸留液は、0.45 μm のシリンジフィルターに通した後、HPLCで分析を行った。HPLCによる分析はもろみと同様の条件で行った。

3. 結果及び考察

3.1. 泡盛古酒用黒麴菌の選抜

収集した黒麴菌107株のうち、バニリン生成に関与する酵素であるキシラナーゼおよびフェルラ酸エステラーゼ活性が高かった上位10株を表2と表3に示した。

キシラナーゼ活性の高い上位10株は、TTC201、TTC214、TTC131、TTC136、TTC169、TTC188、TTC218、TTC227、TTC128、TTC200の菌株で25.8~15.4U/g麴の活性を示した。フェルラ酸エステラーゼ活性の高い上位10株は、TTC138、TTC136、TTC140、TTC132、TTC213、TTC139、TTC134、TTC203、TTC220、TTC221の菌株で56.5~17.2U/g麴の活性を示した。

キシラナーゼとフェルラ酸エステラーゼの両活性では、TTC136菌株がキシラナーゼ活性4位、フェルラ酸エステラーゼ活性2位と両酵素共に優良菌株

表2. キシラナーゼ活性の高い菌株

順位	TTC No.	キシラナーゼ	フェルラ酸エステラーゼ	α-アミラーゼ	グルコミラーゼ	酸性プロテアーゼ	酸性カルボキシペプチダーゼ
1	201	25.8	7.3	190	308	14791	18929
2	214	24.4	10.1	207	339	10426	25705
3	131	22.0	11.1	171	353	8824	26382
4	136	21.6	50.2	340	271	18069	20634
5	169	17.3	3.0	131	246	19994	27575
6	188	16.2	1.1	52	209	7705	20087
7	218	16.0	5.9	52	273	9673	21385
8	227	15.7	8.2	141	221	8419	22450
9	128	15.5	11.2	226	246	11907	20779
10	200	15.4	8.3	117	272	12337	14052

単位 (U/g麴)

表3. フェルラ酸エステラーゼ活性の高い菌株

順位	TTC No.	キシラナーゼ	フェルラ酸エステラーゼ	α-アミラーゼ	グルコミラーゼ	酸性プロテアーゼ	酸性カルボキシペプチダーゼ
1	138	3.0	56.5	8	11	9381	4267
2	136	21.6	50.2	340	271	18069	20634
3	140	5.1	45.9	5	20	10400	6909
4	132	7.5	45.4	8	16	9023	6328
5	213	2.0	45.2	1	0	0	110
6	139	8.0	43.5	9	39	11127	10337
7	134	3.0	25.3	14	23	3862	6480
8	203	3.3	22.5	9	8	5480	4245
9	220	2.8	19.5	2	3	2478	1935
10	221	3.7	17.2	2	16	1916	2920

単位 (U/g麴)

として選抜されている。さらに、TTC136菌株は泡盛醸造に関する酵素活性も高く、この菌株を使用した泡盛醸造も十分可能である。従って、TTC136菌株を泡盛古酒用黒麴菌として選抜した。TTC136菌株の酵素活性と収集した全黒麴菌の酵素活性の平均値、さらに市販種麴の酵素活性の平均値を表4に示す。TTC136菌株を市販黒麴平均と比較すると、キシラナーゼ活性は2.0倍、フェルラ酸エステラーゼ活性は13.2倍、α-アミラーゼ活性は約6.5倍、グルコミラーゼ活性は1.9倍、酸性プロテアーゼ活性は2.5倍、酸性カルボキシペプチダーゼ活性はほぼ同じ活性を示し、全体的に酵素活性の高い菌株であることが確認できた。

表 4. 選抜菌株の各種酵素活性

TTC No.	キシラナーゼ	フェルラ酸エステラーゼ	$\alpha$ -アミラーゼ	グルコミラーゼ	酸性プロテアーゼ	酸性カルボキシペプターゼ
136	21.6	50.2	340	271	18069	20634
全黒麹平均	9.8	8.1	64	129	8631	17758
市販黒麹平均	10.6	3.8	52	139	7195	19427

単位 (U/g麹)

3.2. 選抜菌株による試験醸造

(1) 米麹の酵素活性

バニリン生成に関与する酵素であるキシラナーゼおよびフェルラ酸エステラーゼ活性を図2と図3に示した。比較として、市販種麹を使用した試験醸造の値を用いた。キシラナーゼ活性は、TTC136菌株で製麹した2種類の米麹が高く、ラボスケールおよびベンチスケールが市販種麹と比較して、それぞれ4.3倍および3.8倍の値であった。フェルラ酸エステラーゼ活性も同様に、ラボスケールおよびベンチスケールともに、市販種麹より高く、それぞれ14.2倍および5.6倍であった。これにより、選抜したTTC136菌株は、ドラム型自動製麹装置を使用し、原料米30kgにスケールアップしてもバニリン生成に関与する酵素活性が低下することなく製麹できることがわかった。ドラム型自動製麹装置は、県内の泡盛酒造所の多くで導入されている装置であることから、TTC136菌株を使用した泡盛酒造所での醸造も可能であると考えた。さらにTTC136菌株で製麹した米麹は泡盛醸造に関する酵素活性も高く、スケー

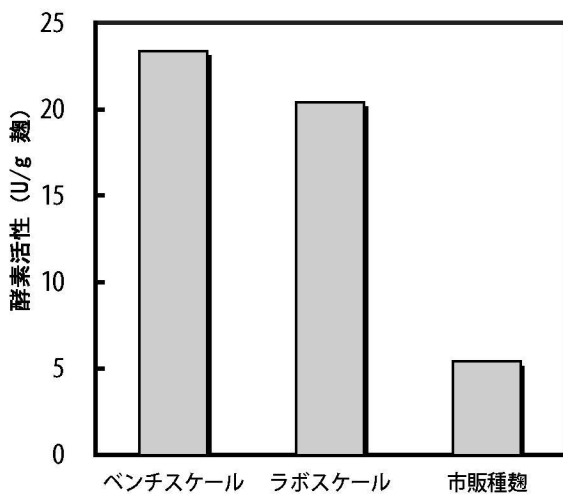


図 2. 米麹のキシラナーゼ活性

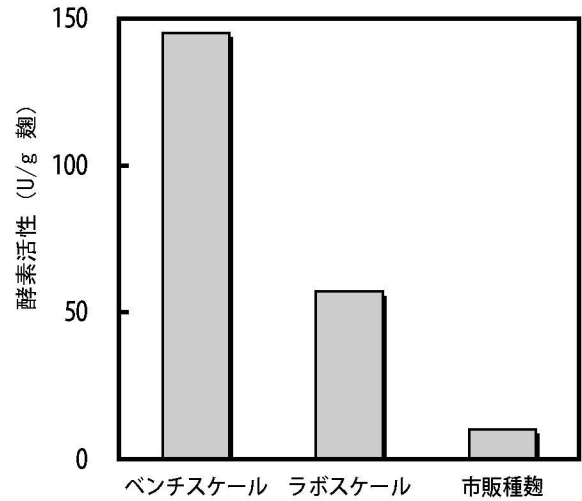


図 3. 米麹のフェルラ酸エステラーゼ活性  
 ルアップによる酵素活性の低下は見られなかった。

(2) もろみ中の香味成分

もろみ中のフェルラ酸含有量および4-VG 含有量を図4と図5に示した。15日間の発酵期間中、仕込み当日を発酵1日目とし、1日おきにサンプリングを行い分析に供した。

フェルラ酸含有量は、3種類のもろみとも発酵1日目は約1.5ppmであった。その後発酵日数が経過するとベンチスケールが増加し、発酵15日目に15.8 ppmで市販種麹の7.2倍、ラボスケールの含有量は発酵15日目に7.1ppmで市販種麹の3.2倍であった。市販種麹のフェルラ酸含有量は発酵日数が経過しても大きな変化はなく、発酵15日目で2.2ppmであっ

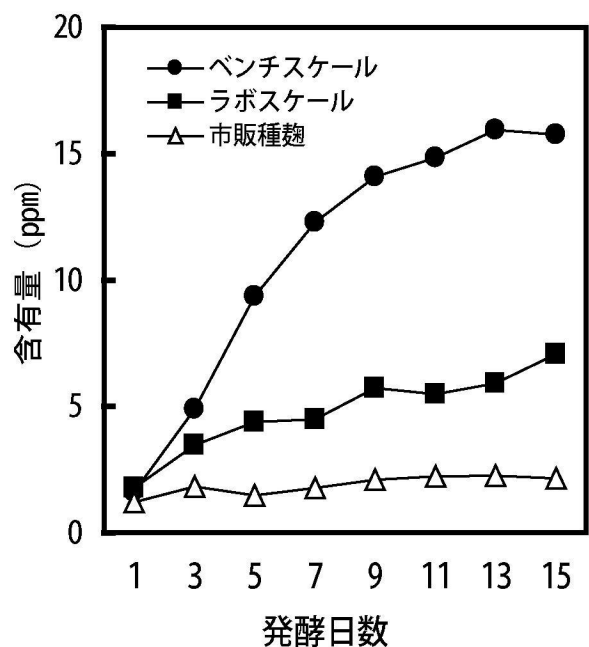


図 4. 発酵工程におけるフェルラ酸量

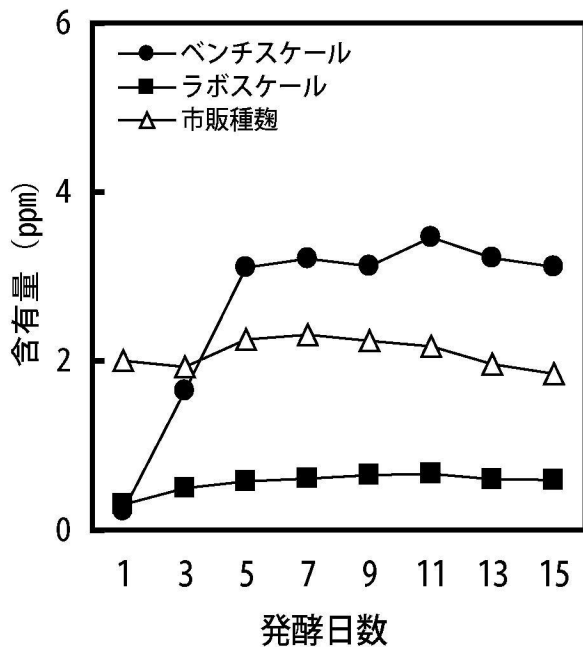


図5. 発酵工程における4-VG量

た。ベンチスケールのフェルラ酸含有量が高いのは、TTC136株の特徴であるフェルラ酸エステラーゼ活性が大きく影響していることが示唆された。4-VG含有量は、発酵1日目市販種麴が高く2.0ppm、ベンチスケールおよびラボスケールは同様に0.3ppmの値であった。その後、発酵日数が経過するとベンチスケールの4-VG量が増加し、発酵15日目には3.1ppmの値であった。ラボスケールおよび市販種麴では発酵15日目でもほとんど値は変わらず、それぞれ0.6ppmおよび1.9ppmであった。

従って、TTC136菌株は原料米30kgにスケールアップしてもバニリン生成に関与する酵素活性は高く、キシラナーゼおよびフェルラ酸エステラーゼの活発な作用が示唆された。フェルラ酸含有量の高いもろみを蒸留することで、もろみ中の酸や蒸留の熱により、フェルラ酸が4-VGに変化し蒸留泡盛への移行が期待できる。

### (3) 蒸留液 (泡盛)

蒸留液の分析結果を表5に示した。ベンチスケールの4-VG含有量は2.9ppmで市販種麴の2.2倍、ラボスケールで市販種麴の1.5倍と高い値を示し、蒸留液中の4-VG含有量の増加が確認された。これらの結果から、TTC136菌株で泡盛を醸造すると蒸留液の4-VG量が増加し、熟成によりバニリンの香味的豊かな泡盛醸造が期待できる。

しかし、ベンチスケールでのもろみ中のフェルラ

表5. 蒸留液の分析

	pH	酸度	4-VG (ppm)	バニリン (ppm)	アルコール濃度 (%)
ベンチスケール	4.7	0.7	2.9	n.d.	47
ラボスケール	5.2	0.5	1.9	n.d.	47
市販種麴	4.8	0.7	1.3	n.d.	47

酸量が市販種麴と比較して7.2倍に対し、蒸留液中に移行した4-VG量が2.2倍という結果から、もろみ中のフェルラ酸を効率良く4-VGに変換し、蒸留液中に移行させる条件の検討が必要である。

そこで、フェルラ酸から4-VGに変換する能力のある(脱炭酸活性)酵母のスクリーニングを行い、さらに耐酸性、高アルコール生産能を有する酵母を野生株から選抜している。一般に、現在酒造所で使用されている泡盛酵母は脱炭酸活性を有しておらず、フェルラ酸から4-VGへの変換は、もろみ中の酸と蒸留時の熱の力により行われている。4-VGはフェルラ酸より沸点が低いため、脱炭酸活性を有する酵母でもろみ中のフェルラ酸を4-VGに変換し、蒸留時に効率良く泡盛に移行させることが可能となる。現在、選抜した幾つかの酵母で試験醸造を行っている。

## 4. 要約

(1) TTC136菌株を香りに関する酵素活性の最も高い優良株として選抜した。TTC136菌株の酵素活性を市販黒麹平均と比較すると、キシラナーゼ活性は2.0倍、フェルラ酸エステラーゼ活性は13.2倍、 $\alpha$ -アミラーゼ活性は6.5倍、グルコアミラーゼ活性は1.9倍、酸性プロテアーゼ活性は2.5倍、酸性カルボキシペプチダーゼ活性はほぼ同じ活性を示し、泡盛醸造に関する酵素活性も全体的に酵素活性の高い菌株であることが確認できた。

(2) 選抜したTTC136菌株で試験醸造を行った結果、麴のキシラナーゼ活性は、ベンチスケールおよびラボスケールが市販種麴と比較して、それぞれ4.3倍および3.8倍の高い値であった。フェルラ酸エステラーゼ活性についても、ベンチスケールおよびラボスケールが市販種麴より高く、それぞれ14.2倍および5.6倍であった。これにより、選抜したTTC136菌株は、ドラム型自動製麴装置を使用し、

原料米30kgにスケールアップしてもバニリン生成に関与する酵素活性が低下することなく製麴できることがわかった。

(3) もろみ中のフェルラ酸含有量は、ベンチスケールで発酵15日目に15.8ppmで市販種麴の7.2倍、ラボスケールの含有量は発酵15日目に7.1ppmで市販種麴の3.2倍であった。市販種麴のフェルラ酸含有量は発酵日数が経過しても大きな変化はなく、発酵15日目で2.2ppmであった。ベンチスケールのフェルラ酸含有量が高いのは、TTC136菌株の特徴であるフェルラ酸エステラーゼ活性が大きく影響していることが示唆された。フェルラ酸含有量の高いもろみを蒸留することで、もろみ中の酸や蒸留の熱により、フェルラ酸が4-VGに変化して泡盛に移行することが期待される。

(4) 蒸留液の4-VG含有量は、ベンチスケールで2.9ppmと最も高く、市販種麴の約2.2倍、ラボスケールも比較的高い値を示し1.9ppmで市販種麴の1.5倍であった。これらの結果から、TTC136菌株を使用

して泡盛醸造を行うと、蒸留液中の4-VG量の増加が確認され、4-VGは熟成させることによりバニリンへの変化が期待できる。よって、TTC136菌株は、泡盛古酒用黒麴菌としての利用が十分可能であると考えた。

## 参考文献

- 1) Takuya Koseki, Yasurou Ito, Shinji Furuse, Kiyoshi Ito and Kimio Iwano, Conversion of ferulic acid into 4-vinylguaiacol, vanillin and vanillic acid in model solutions of *shochu*, *J. Ferment. Bioeng.*, 82, 46-50 (1996)
- 2) 小関卓也、岩野君夫：泡盛中のバニリンの意義と生成機構. 醸協93：510-517 (1996)
- 3) 第四回改正国税庁所定分析法注解、日本醸造協会 (1993)
- 4) Ishihara, M., Nakazato, N., Chibana, K., Tawata, S., and Toyama, S., Purification and Characterization of Feruloyl Esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(4), 547-557 (1992)