

# 琉球大学学術リポジトリ

## [報文]黒麹菌の株の違いによる泡盛香味への影響

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2019-08-08 キーワード (Ja): 黒麹菌, 泡盛 キーワード (En): Aspergillus, Aspergillus luchuensis, Awamori 作成者: 塚原, 正俊, 渡邊, 泰祐, 外山, 博英, Tsukahara, Masatoshi, Watanabe, Taisuke, Toyama, Hirohide メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002017063">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002017063</a>

## 黒麹菌の株の違いによる泡盛香味への影響

塚原 正俊\*・渡邊 泰祐\*\*・外山 博英\*\*

\*株式会社バイオジェット

\*\*琉球大学農学部

### Effect of the strain difference in black koji-molds on Awamori flavor

Masatoshi TSUKAHARA\*, Taisuke WATANABE\*\* and Hirohide TOYAMA\*\*

\*Biojet Co. Ltd., \*\*Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus

キーワード：黒麹菌、泡盛

Keywords : *Aspergillus*, *Aspergillus luchuensis*, *Awamori*

#### 緒 言

泡盛醸造には、伝統的に *Aspergillus awamori* と *A. saitoi* の2菌株を混合した種麹「複菌麹」が用いられている。沖縄県には種麹店は1店舗のみで、泡盛酒造所の8割以上がこの種麹を用いている状況にある<sup>1)</sup>。これまで、2種の黒麹菌株を混合した「複菌麹」は、醸造の側面から経験的に優位性があると考えられてきたものの、それぞれの菌株あるいはこれらを混合することによる種麹の泡盛風味への影響について科学的な検証は全くなされていない。

一方、分子生物学技術を用いた解析および評価技術が近年急速に進展しており、その中核機器である次世代シーケンサーの能力や精度が飛躍的に向上している。このことから、これまで以上に微生物を遺伝子レベルで詳細かつ網羅的に解析することが可能となった。泡盛黒麹菌においてもこれら最先端の技術を利用した解析とその成果の応用が期待されている。

酒類醸造における「麹菌」の主な役割は、酵母のアルコール発酵を促すための基質を提供する酵素生産者であり、泡盛酒質に影響を及ぼす微生物としては「酵母」が中心的役割を担っていると考えられてきた。実際、泡盛酵母によって果物様の香气成分であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルがアルコール発酵時に生成されることが知られている。泡盛醸造では、全ての原料（タイ米）に麹菌を生育させる全麹仕込みという醸造方法が用いられ、他の焼酎類で行われる二段仕込み（後から原料を添加）の工程はない。したがって、泡盛は、他の焼酎類と比較して製品の品質に「麹」が大きく影響していると推察される。しかしながら、これまで麹菌菌株と泡盛酒質の関係についての詳細な解析はなされておらず、その寄与も不明である。

我々は、今回 *A. awamori* と *A. saitoi* の2種類の黒麹菌について、比較ゲノム解析、 $\alpha$ -アミラーゼ活性と酸度の比較を行うとともに、それぞれ単独の黒麹菌株のみを用いて製麹した黒麹を準備し、それぞれ単独または混合してもろみ発酵を行った場合

\*沖縄県うるま市塩屋315

\*\*沖縄県中頭郡西原町千原1

に、泡盛の香気成分の生成量にどのような違いを与えるかについて検討を行った。

## 実験材料および方法

### (1) 泡盛黒麹菌における比較ゲノム解析

有限会社石川種麹店の種麹に使用されている泡盛黒麹菌株 *A. awamori* ISH1株および *A. saitoi* ISH2株の2菌株を供試菌株として使用した。ポテトデキストロース液体培地を用いて、30℃、24 h 培養後の菌糸を回収した。回収した菌糸は、マルチビーズショッカー（安井器械株式会社製）を用いて破碎し、常法にしたがってゲノムDNAを回収した<sup>2)</sup>。その後、MiSeq システム（illumina 社製）により得られた全ゲノムデータを Mapping などの手法により解析することで、既知ゲノム配列に対する相同性解析を行った。

### (2) $\alpha$ -アミラーゼ活性および酸度測定

市販のタイ米を蒸煮後、室温近くまで放冷した。ここに、単独の黒麹菌株で調製した種麹を米重量の0.5 wt% 接種した。38℃、42 h 保温し製麹後、第四回改正国税庁所定分析法注解に基づいて、水抽出を行った。この水抽出液における $\alpha$ -アミラーゼ活性は、 $\alpha$ -アミラーゼ測定キット（キッコーマンバイオケミファ社製）を用いて測定を行った。麹水抽出物における酸度滴定は、麹20 gに水100 gを加えた水溶液から抽出した上清を中和するのに必要な0.1 N NaOH 量として算出した。

### (3) 泡盛における香気成分の検出

製麹後の麹、麹重量の1.7倍量の仕込み水および泡盛101号酵母の培養液を加え、小仕込み試験を開始した。25℃で発酵を行い14日後に蒸留を行った。未垂れアルコール濃度20%となった時点で蒸留を中止し、蒸留液に含まれる香気成分の分析を行なった。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による測定には逆相カラム（インタクト社製：CDC-18、3.0×100 mm、粒子系3 $\mu$ m）を装着した高速液体クロマトグラフィーシステム（島津社製：LC-20）を使用した。溶出は、A液（0.65% ギ酸を含む精製水）、B液（0.1%ギ酸を含むアセトニトリル）を用いたりニアグラジエント法によって行い、タイムプログラムを（B%）：5%（0分）→70%（30分）とした。

流速0.5 ml/min、検出はフォトダイオード・アレイ紫外可視分光光度計（島津社製：SPD-M20A）を使用した。カラム温度は40℃、注入量は5 $\mu$ lとした。化合物の定性は、UV スペクトルのライブラリ検索と保持時間によって行った。

ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）による成分分析は、以下の条件で行った。サンプルを20 ml容バイアルに希釈した泡盛を入れ、封をした後バイアルごと加温しながら振とうし、オートインジェクタ方式で行うオートサンプラー（AOC-5000、株 島津製作所）を使用し、固相マイクロ抽出法（SPME）を用いて、ヘッドスペース層からの香気成分を吸着させ成分の抽出を行った。成分の脱離はGCインジェクター部分にて230℃で2分間加熱することにより行った。GCは島津GC2010（株 島津製作所製）、MSは島津QP2010Plus（株 島津製作所製）を用いた。カラムはDB-WAX（内径0.25 mm、長さ30 m、フィルム厚0.5 $\mu$ m、J&W社製）を用い、注入口温度は230℃、カラム温度は45℃で2分保持し、220℃まで20℃/secで昇温した。キャリアガスはヘリウムを使用し、スプリットレスで測定し、カラム内線速度は85 cm/secとした。イオン化はEI法により行い、イオン源及びインターフェイス温度は230℃、イオン化電圧は1.45 kVとした。香気成分の同定は質量スペクトル及び標準物質により行った。

## 実験結果と考察

### (1) 泡盛黒麹菌のゲノムDNA塩基配列の比較

黒麹菌ゲノム解析コンソーシアム（代表：（独）産業技術総合研究所）にて全ゲノム解析を終えている *A. luchuensis* NBRC4314株をリファレンスとして、*A. awamori* ISH1株のMiSeqにより得られたデータを使用し相同性解析を行った結果、98.3%と非常に高い値を示した（図1）。*A. luchuensis* NBRC4314株に対する *A. saitoi* ISH2株の相同性を同様に解析した結果、97.7%であった。以上の結果から、*A. awamori* ISH1株および *A. saitoi* ISH2株は *A. luchuensis* NBRC4314株と近縁の株であることが示された。

次に、*Aspergillus niger*の標準菌株CBS 554.65株をリファレンスとして、*A. luchuensis* NBRC4314株、*A. awamori* ISH1株、*A. saitoi* ISH2株について

同様の方法で相同性解析を行った。その結果、それぞれ77.8%、78.3%、79.0%の相同性を示したことから、*A. luchuensis* NBRC4314株、*A. awamori* ISH1株、*A. saitoi* ISH2株は、*A. niger* CBS 554.65株に対して、離れたグループを形成していることが示された。

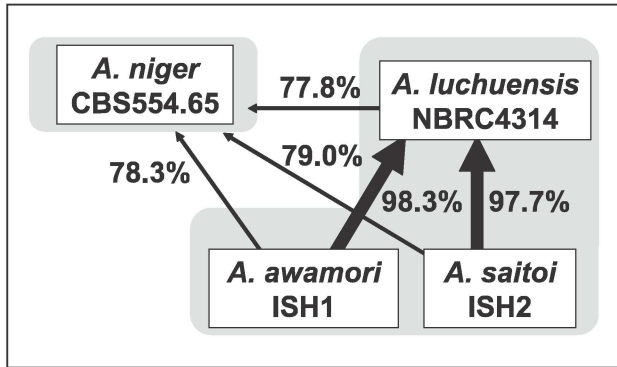


図1. 黒麹菌のゲノム DNA 塩基配列の比較



これまで長年に渡って黒麹菌と *A. niger* の分類と学名について、議論が重ねられてきた。即ち、*A. awamori* と名付けられている株の中に泡盛とは関係が無い *A. niger* 群の株が含まれていることが明らかになってきた。また、欧州では *A. awamori* がクエン酸生産に利用されている *A. niger* の異名同種であるとの報告もある。以上のような背景から、最近になって「*A. awamori*」という種名は「doubtable (疑問)」とされた<sup>3)</sup>。しかしながら、近年の分子生物学的手法を用いた系統分類とマイコトキシン生産性に関する研究から、黒麹菌は *A. niger* とは別の種であり、オクラトキシンA生合成遺伝子を持たないことが報告されており<sup>4)</sup>、黒麹菌の学名を *A. luchuensis* (1901年に泡盛麹から初めて黒麹菌が分離されたときの学名) とすることが妥当であると判断された<sup>3,5)</sup>。このような結果を受けて、2013年に(独)酒類総合研究所保有の糸状菌リストに記載されている黒麹菌の名称が *A. luchuensis* に更新された。今回我々が行った比較ゲノム解析の結果、*A. awamori* ISH1株および *A. saitoi* ISH2株は、*A. niger* とは近縁でないことが確認されたとともに、*A. luchuensis* に対して高い相同性を示した。さらに詳細な解析により、*A. awamori* ISH1株および *A. saitoi* ISH2株は、オクラトキシンA生合成遺伝子を持たないこと、*A. luchuensis* に特徴的な配列が存在していることを確認した(データ示さず)。

したがって、両株の名称はそれぞれ *A. luchuensis* var. *awamori* ISH1株、*A. luchuensis* var. *saitoi* ISH2株とするのが適当であると考えられた。

(2) α-アミラーゼ活性および酸度の比較

ISH1株もしくはISH2株単独で調製した種麹を用いて製麹を行い、両者の麹におけるα-アミラーゼ活性と酸度を比較した(表1)。その結果、ISH1株の方が高いα-アミラーゼ活性を示した。一方、酸度に関しては、ISH2株の方が高い値を示したことから、従来から言われている通りこれら2菌株は、泡盛醸造に重要な性質であるα-アミラーゼ活性とクエン酸生産性を互いに補いつていることが確かめられた。これら2菌株を混合する手法は、雑菌が生育し易い環境である亜熱帯性気候の沖縄に適した方法であると考えられた。

表1. 2種類の泡盛黒麹菌を用いて調製された麹のα-アミラーゼ活性と酸度の比較。実験室で38℃, 42h製麹した黒麹について調べた。

泡盛黒麹菌	α-アミラーゼ活性 (U/g)	酸度
 <i>Aspergillus awamori</i> ISH 1	4.09	3.21
 <i>Aspergillus saitoi</i> ISH 2	2.89	5.95

(3) 泡盛における香気成分量に対する黒麹菌株の影響

ISH1株とISH2株を使用して調製された麹の混合比率が泡盛の香気成分に与える影響について検討した(図2)。まず、泡盛古酒中における特徴香のひ

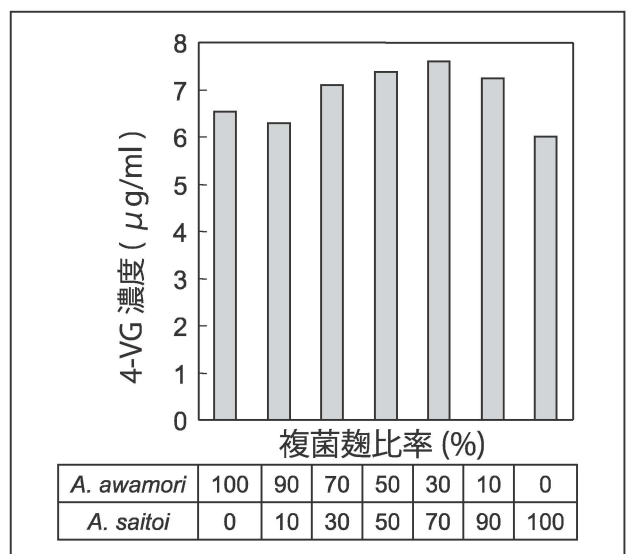


図2. 泡盛蒸留液における4-VG濃度に対する黒麹菌混合比率の影響



とつであるバニリンの前駆物質の4-ビニルグアヤコール(4-VG)に注目したところ、ISH1株のみの麴から調製した泡盛の4-VG濃度は、ISH2株のみで調製した場合に比べ高い値を示した。したがって、ISH1株とISH2株の麴を混合した場合には、ISH1株の比率が多いほど4-VGが高濃度になると予想されたが、測定の結果ISH1株30%とISH2株70%で混合した場合に、全ての混合比率の中で最も高い4-VG濃度を示した。また、ISH1株:ISH2株=10:90, 30:70, 50:50, 70:30の混合比の条件では、いずれも単独菌株の黒麴よりも高い4-VG濃度を示した。したがって、異なる泡盛黒麴菌株由来の黒麴を混合することによって、泡盛蒸留液中の4-VG濃度が上昇する効果があることが明らかになった。

次に、4-VG以外の香気物質についても異なる黒麴菌株を使用した影響を受けるかについて検討を行った(図3)。その結果、酢酸イソアミルや酢酸エチルでも4-VGと同様に、異なる泡盛黒麴菌株を混合することによって、高濃度になることが分かった。一方、イソブチルアルコール、イソアミルアルコール、*n*-カプリル酸エチル、*n*-カプリン酸エチルなどは、単独の菌株を用いた場合に高濃度であった。即ち、香気成分ごとに、泡盛黒麴菌株を混合した影響が異なることが示された。現在、ISH1株とISH2株の混合比率が異なる麴を用いた泡盛酒質の多様化について、実用化レベルで検討が行われており、この特性を利用した泡盛が既に商品化されている。

今後、黒麴菌株の違いが泡盛香味を変化させる原因を生化学的に解明できれば、泡盛酒質の多様化に繋がるのが期待できる。

## 要約

泡盛醸造に使用されている *Aspergillus awamori* ISH1株および *A. saitoi* ISH2株について、比較ゲノム解析を行った結果、これら2種類の株は *A. luchuensis* NBRC4314株と近縁であり、*A. niger* とは近縁ではないことが確認された。ISH1株で調製した麴は、ISH2株で調製した麴よりも、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が高く、酸度は低かった。泡盛中の香気物質(4-ビニルグアヤコール、酢酸イソアミル、酢酸エチル)の生産量は、異なる株から調製された麴を混合することによって上昇していた。以上の結果から、黒麴菌の株の違いによって泡盛に含まれる香気物質の割合が変化することが示された。

## 謝辞

本研究で使用した泡盛黒麴菌株を供試菌株としてご供与下さった有限会社石川種麴店の渡嘉敷みどり氏、渡嘉敷正司氏に厚く御礼申し上げます。また、本研究において行われた比較ゲノム解析は、沖縄県の泡盛域外出荷拡大出荷拡大支援事業「琉球泡盛調査研究支援事業」の協力によって得られた結果です。*A. luchuensis* NBRC4314株の全ゲノム配列は、黒麴菌ゲノム解析コンソーシアム(代表:(独)産業

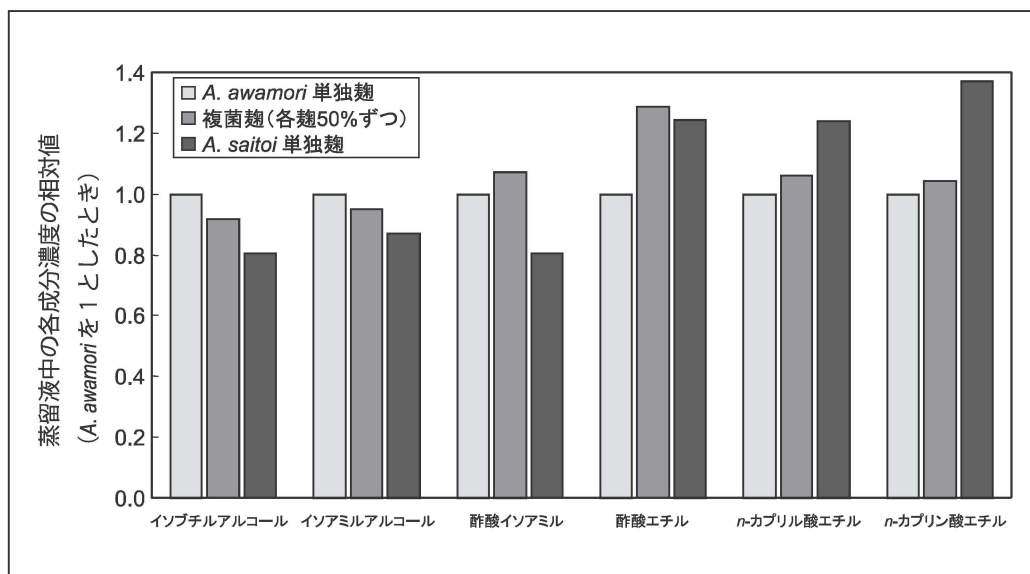


図3. 泡盛蒸留液における香気成分濃度に対する黒麴菌混合比率の影響

技術総合研究所)にて得られたデータを使用させて頂きました。関係者各位に感謝致します。

#### Abstract

As a result of a comparative genome analyses about black koji-molds, *Aspergillus awamori* ISH1 and *A. saitoi* ISH2 were closely related strains with *A. luchuensis* NBRC4314, clearly separated from *A. niger*. Koji prepared with *A. awamori* ISH1 had higher  $\alpha$ -amylase activity than koji prepared with *A. saitoi* ISH2. Koji prepared with *A. awamori* ISH1 had lower acidity than koji prepared with *A. saitoi* ISH2. Some flavor components in Awamori (4-vinylguaiacol, isoamyl acetate and ethyl acetate) is increased by mixing koji prepared by two different strains. These results show that the difference of the strains of the black koji-molds change the ratio of fragrance in Awamori.

#### 参考文献

- 1) 渡邊泰祐,他:「沖縄の伝統発酵食品と微生物～泡盛を中心に～」, 生物工学会誌, 90, 311-314 (2012).
- 2) Katsuhiko Kitamoto, Molecular biology of the Koji molds, *Adv. Appl. Microbiol.*, 51, 129-153 (2002).
- 3) 山田修:「「琉球」にちなむ黒麹菌の学名 *Aspergillus luchuensis* の復活」, バイオサイエンスとインダストリー, 71, 499-503 (2013).
- 4) Osamu Yamada *et al.*, Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety, *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 233-237 (2011).
- 5) Seung-Beom Hong *et al.*, *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia, *PLoS ONE* 8, e63769 (2013).