

泡盛古酒用もろみ及び蒸留に関する研究

福地香、比嘉賢一

1. 緒言

泡盛の総出荷量は順調に推移しており、特に2000年度の県外出荷は1991年度と比較して4倍近い伸び率である。泡盛における古酒の役割は清酒の吟醸酒と同様に、順調な出荷量のリーディングアイテムとして果たす役割は大きい。泡盛古酒の熟成については西谷ら¹⁾により泡盛中の不飽和脂肪酸エチルが貯蔵中に古酒特有の香味を形成すること、また小関ら²⁾により原料由来のフェルラ酸が4-ビニルグアイアコール(以下4-VG)を経て甘い香りのバニリンへ変化する生成機構が報告されている。したがって、古酒用の泡盛についてはこれら成分を含む古酒香前駆体の含有率を高くする製造方法並びに製造条件の検討が必要である。

本研究では小関らが報告したバニリン生成機構を元に、バニリンを指標として古酒香成分を豊富に含む泡盛の製造条件の検討を行っている。前年度はフェルラ酸の遊離に関与している酵素活性の面から製麹条件の検討を行い³⁾、今年度はもろみ及び蒸留工程について検討を行った。

2. 実験方法

2-1 フェルラ酸の測定

遊離フェルラ酸の測定は、もろみ約1.5gを3000rpmで15分間遠心分離し、上清液1mlを前報³⁾に準じて抽出後、小関らの方法²⁾に従って高速液体クロマトグラフィー(HPLC)でフェルラ酸を測定した。全フェルラ酸量は西澤らの方法⁴⁾に従い処理後HPLCにより測定した。

HPLC測定条件 カラム：5C18-250A (GLサイエンス社製)

溶離液：50mM酢酸緩衝液(5-45%アセトニトリルリニアグラジェント)

検出波長：280nm

2-2 4-VGの測定

蒸留画分に含まれる4-VGは、試料を0.45 μ mのメンブレンフィルターでろ過後、前記のHPLC条件で測定した。

2-3 フェルラ酸含有培地における酵母生育試験

フェルラ酸を0、20、40、60、80及び100mg/Lの各濃度に調整したYPD培地10mlに、泡盛101号酵母を約1.0

$\times 10^6$ 個添加し、30 $^\circ$ Cで2日間振とう培養を行った。酵母増殖の確認はバイオフォトレコーダーを用い、660nmにおける吸光度で確認した。

2-4 フェルラ酸脱炭酸活性の測定

泡盛101号酵母のフェルラ酸脱炭酸活性の測定は大森らの方法⁵⁾に準じた。すなわち、YPD培地で30 $^\circ$ C、約12時間振とう培養を行った酵母培養液を3000rpmで15分間遠心分離し、酵母菌体を得た。これにリン酸緩衝液(0.05M、pH6.0)10mlを加えて攪拌し、遠心分離後得られた菌体に再び緩衝液を加えて酵母懸濁液を調製した。この酵母懸濁液の660nmにおける吸光度が0.4~0.6になるように脱イオン水で希釈し、希釈液10mlにフェルラ酸1ml(1g/L-95%エタノール)を添加し、30 $^\circ$ Cで2時間静置培養した。培養後の混合液1.5mlを5000rpmで15分間遠心分離し、上清中の4-VG濃度を測定し、フェルラ酸脱炭酸活性とした。

2-5 小仕込み発酵試験

2-5-1 供試酵母

沖縄国税事務所が保有する泡盛101号泡なし酵母を用いた。酵母は麹汁培地(Bx.8、pH5.5)で37 $^\circ$ C、2日間前培養後、発酵試験に用いた。

2-5-2 仕込み配合及び発酵条件

発酵試験に用いた麹は表1に示した出麹No.2を使用した。表1におけるフェルラ酸エステラーゼ活性及びキシラーゼ活性は前報³⁾に、他の分析項目は国税庁所定分析法に準じて測定した。

500ml容三角フラスコに麹100gを採り、滅菌水を加え、 1.0×10^7 個/mlとなるよう酵母を添加し、もろみ日数14日間とした。発酵条件は、温度25 $^\circ$ C、汲み水歩合170%を基本とし、発酵温度を15、20、25及び30 $^\circ$ C、汲み水歩合を150、160、170及び180%に条件を設定した。

また、出麹酸度を3、4及び5、フェルラ酸エステラーゼ活性を通常の麹(出麹No.2)を基準として、1.2、2.4及び3.6倍に調製した仕込みを行った。フェルラ酸エステラーゼの調製は、800gの麹を国税庁所定分析法に従い、抽出濾過後、濾液3Lに対して40-80%飽和の範囲で硫酸塩析を行い粗酵素液を調製し、適宜希釈して出麹No.3を用いた小仕込み試験の汲み水に使用した。

表1 もろみ調製用各出麹の成分と酵素活性¹

	出麹1	出麹2	出麹3
出麹水分(%)	27.0	25.8	39.4
酸度	4.1	3.0	5.2
pH	3.2	3.4	3.3
グルコアミラーゼ	78.4	126	86.2
- アミラーゼ	72.4	84.1	56.9
耐酸性 - アミラーゼ	47.9	57.9	36.5
酸性プロテアーゼ	6756	12622	4054
酸性カルボキシペプチダーゼ	10620	17578	14205
フェルラ酸エステラーゼ	3.78	3.95	ND ²
キシラナーゼ	4.55	4.40	3.89

1) 酵素活性の単位はU/g麹
2) 検出されなかった

2-5-3 もろみの一般分析

熟成もろみを3000rpmで15分間遠心分離後、上清についてアルコール度数、pH、日本酒度、還元糖量及び全糖量を国税庁所定分析法に準じて測定した。

2-6 蒸留試験

2-6-1 モデルもろみによる蒸留試験

フェルラ酸50、100及び200mg/L、pH3.0、4.0及び5.0に調製したアルコール度数15%のモデルもろみを調製し、試留装置にて300mlを蒸留した。留出液中の4-VG濃度を測定し4-VG変換率を算出した。

2-6-2 熟成もろみの蒸留試験

熟成もろみは表1に示す2種の出麹10kg(出麹No.1 = 6kg、出麹No.2 = 4kg)に汲み水170%(14.6L)と酵母を添加し、25、14日間発酵して調製した。その熟成もろみの一般成分を表2に示す。

蒸留試験は熟成もろみ300gを用いて試留装置で行った。

表2 蒸留試験用熟成もろみ一般成分

フェルラ酸濃度(mg/L)		アルコール分(%)	pH	日本酒度	還元糖量(%)	全糖量(%)
遊離状態	全フェルラ酸(結合型+遊離)					
15.44	28.94	16.93	3.7	10.5	0.19	0.64

表3 蒸留条件 - 加熱電圧と時間 -

	加熱はじめ～垂れはじめ		垂れはじめ～終了		蒸留時間	採取量(ml)
	加熱電圧	時間	加熱電圧	時間		
短時間蒸留	90V	5分	90V	20分	25分	2000
長時間蒸留	30-40V	40分	70V	45分	85分	2000

初めの留出まで1時間かけて加熱し、蒸留画分を50mlずつ分取し、初留、中留、後留とした。これら3画分の4-VG濃度をHPLCにより測定した。

また、変圧器(YAMABISHI)が接続された実験室用小型蒸留機(5L容量)を用いてもろみ4Lの蒸留を行った。蒸留時間の差異による4-VG生成量への影響を調べるため、表3に示す2条件で蒸留試験を行い4-VG量を測定した。蒸留画分はそれぞれ200mlずつ計10画分採取した。

2-6-3 官能審査

表3に示す蒸留条件で得られた試料の初留及び後留部分を除く、蒸留画分3番目から7番目の20mlずつをブレンド調製した試料を用いた。官能審査は当センター6名のパネラーによるプロファイル法により行った。

3. 結果および考察

3-1 泡盛101号酵母に対するフェルラ酸の影響

石原ら⁶⁾はパイナップル茎部から調製し、遊離したフェルラ酸について1.0mMで大腸菌に対して約70%の抑制力を示すと報告している。そこでフェルラ酸を含むYPD培地における泡盛101号酵母の生育試験を行った。その結果、20~100mg/Lのフェルラ酸濃度において対照と同様の生育傾向がみられ、泡盛101号酵母の増殖に対するフェルラ酸の影響は本条件下では認められなかった。

3-2 泡盛101号酵母の脱炭酸活性

大森ら⁵⁾はビール及びワイン酵母においてフェルラ酸を4-VGに変換するフェルラ酸脱炭酸活性を有する酵母の存在及び焼酎酵母とビール酵母を細胞融合処理しフェルラ酸脱炭酸活性並びにクエン酸耐性を有する新規酵母について報告している。

今回、泡盛101号酵母について脱炭酸活性を測定した

が、4-VGは検出されず、活性は認められなかった。今後、フェルラ酸脱炭酸活性を有する泡盛酵母の開発も必要であると考ええる。

3-3 もろみ発酵における遊離フェルラ酸の経時変化

出麹100gで小仕込み試験を行い、フェルラ酸が遊離するための最適条件を検討した。14日間発酵後の熟成もろみの成分分析結果を表4に示した。また、発酵経過に伴う遊離フェルラ酸の経時変化を図1～4に示した。いずれの条件でも発酵初期から約4mg/Lの遊離フェルラ酸が確認された。また14日間発酵後は12～16mg/L程のフェルラ酸が生じていた。

3-3-1 もろみ発酵温度

遊離フェルラ酸生成に及ぼす発酵温度の影響を調べたところ、温度条件によって遊離フェルラ酸量に違いがみられた(図1)。発酵前半では15℃での低温条件の場合、他の3条件より遊離フェルラ酸量が少なかった。しかし、後半は低温経過(15℃、20℃)の2条件でフェルラ酸濃度の増加傾向が大きかった。25℃、30℃のもろみでは発酵日数6日目以降、遊離フェルラ酸濃度の増加はみられなかった。今回の試験において30℃の条件下では、日本酒度が-28.9ときれが悪く、酵母の生育環境としてかなり厳しい条件であったと考えられる。

発酵前半で、15℃の条件に比べて20～30℃の高温条件でフェルラ酸の増加傾向が高かったのは、フェルラ酸エステラーゼの最適温度が40～50℃であることから⁷⁾⁸⁾、

高温条件のほうがフェルラ酸エステラーゼの最適反応条件に近い発酵条件であったことが考えられる。一方、発酵後半において低温条件で遊離フェルラ酸が増加する要因として、フェルラ酸エステラーゼの温度安定性が⁴⁵と低く⁸⁾、低温条件が高温条件に比べて酵素が失活しにくくなるためと考えられる。

前半の遊離フェルラ酸の増加傾向及び最終のアルコール生成量から、発酵温度は20℃付近が適していると示唆された。

3-3-2 麹酸度

次に、麹酸度の違いによる遊離フェルラ酸量への影響を検討した(図2)。酸度3、4及び5の3条件で発酵試験を行ったところ、発酵終了時に酸度3と4のもろみにおいて遊離フェルラ酸量は同濃度であり、酸度5のもろみでは11.9mg/Lと少ない値を示した。いずれの麹酸度条件でも発酵後半における遊離フェルラ酸濃度の増加傾向は認められなかった。発酵過程前半において、酸度3のもろみは他の2条件に比べてフェルラ酸がより早い発酵日数で遊離している傾向を示した。その要因として、フェルラ酸エステラーゼは最適pH5⁷⁾⁸⁾であることから、麹酸度3のもろみ条件が酸度4または5の条件に比べて酵素反応の最適条件下で発酵が進み、発酵初期のフェルラ酸生成に差が生じたのではないかと考えられる。

3-3-3 汲み水歩合

異なる汲み水歩合150%～180%でもろみ発酵試験を行っ

表4 各発酵条件でのもろみ一般成分

発酵条件	フェルラ酸 (mg/L)	アルコール分 (%)	pH	日本酒度	還元糖量 (%)	全糖量 (%)
温度	15	16.30	16.01	3.6	4.4	1.08
	20	16.45	17.93	3.6	8.3	1.04
	25	13.29	17.80	3.7	5.6	1.27
	30	11.44	14.80	3.8	-28.9	4.90
汲み水	150%	16.23	16.29	3.8	18.9	5.63
	160%	16.43	16.36	3.8	12.0	4.29
	170%	13.29	17.80	3.7	5.6	1.27
	180%	13.27	18.14	3.7	8.9	0.58
麹酸度	3	13.29	17.80	3.7	5.6	1.27
	4	13.27	18.22	3.6	4.1	1.48
	5	11.90	17.53	3.5	-0.9	1.83
フェルラ酸 エステラーゼ 活性	0倍	5.41	17.30	3.5	4.0	0.50
	1.2倍	9.64	16.40	3.3	2.0	0.52
	2.4倍	9.49	16.30	3.2	1.0	0.51
	3.6倍	10.01	16.60	3.1	-0.2	0.52

)各条件は出麹No.2のフェルラ酸エステラーゼ活性に対する活性比で示した。

たところ、発酵初期における遊離フェルラ酸濃度の増加傾向はいずれの条件においても同様な経時変化を示した(図3)。発酵終了後のフェルラ酸濃度は汲み水歩合が少ない方が多い値を示したが、単位麹あたりの遊離フェルラ酸量に換算すると大きな差は認められなかった。

3-3-4 フェルラ酸エステラーゼ活性の及ぼす影響

硫酸塩析で得たフェルラ酸エステラーゼを含む粗酵素液を、汲み水へ添加した発酵試験の結果及び粗酵素液の酵素活性を図4並びに表5に示した。本試験に使用した麹はフェルラ酸エステラーゼ活性が認められなかった麹であるが、発酵終了後、5.41mg/Lのフェルラ酸生成が認められた。また、発酵初期において、汲み水に粗酵素液を多く用いたもろみ程わずかながら遊離フェルラ酸の生成が多かったが、発酵終了時にはほとんど同濃度を示した。これらのことから、遊離フェルラ酸生成に関して、酵素の量は現在の製麹方法で十分な酵素量であることが示唆されるが、フェルラ酸エステラーゼを単離し、確認の試験が必要である。

表5 粗酵素液の酵素活性

酵素活性 (U/ml)	
グルコアミラーゼ	12.5
- アミラーゼ	20.82
耐酸性 - アミラーゼ	13.63
フェルラ酸エステラーゼ	9.97
キシラナーゼ	2.22

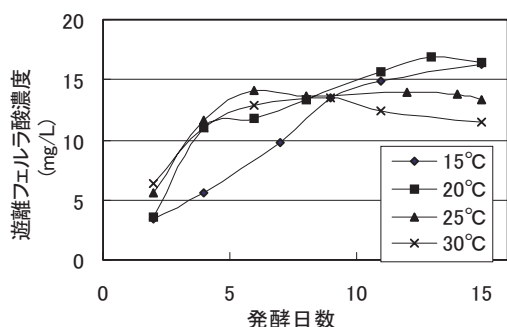


図1 各発酵温度でのもろみ中遊離フェルラ酸の挙動

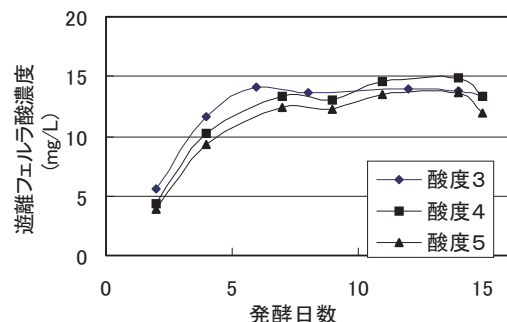


図2 各酸度でのもろみ中遊離フェルラ酸の挙動

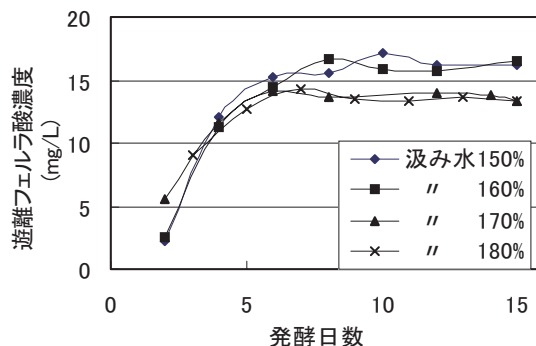


図3 各汲み水条件でのもろみ中遊離フェルラ酸の挙動

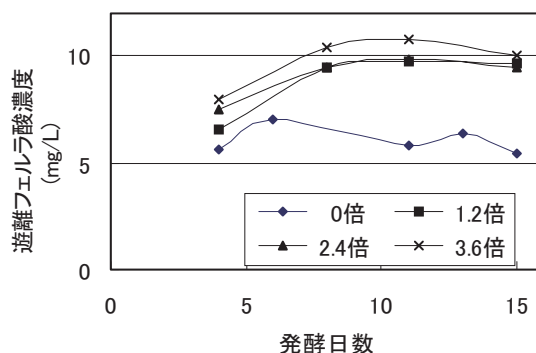


図4 酵素活性の異なるもろみでの遊離フェルラ酸の挙動
各条件は出麹No.2のフェルラ酸エステラーゼ活性(3.95U/g麹)に対する活性比で示した。

3-4 蒸留試験

3-4-1 モデルもろみによる蒸留試験

小関ら²⁾は遊離フェルラ酸は酸の存在下で熱を加えることで4-VGに変換されることを報告している。そこでモデルもろみを用いて蒸留試験または還流を行い、フェルラ酸から4-VGへの変換に対する最適条件について検討した。

蒸留画分中及びモデルもろみ残液中の4-VG量

200mg/Lのフェルラ酸を含む50mMクエン酸緩衝液(pH4.0、アルコール分15%)300mlを試留装置にて蒸留し、蒸留画分を50mlずつ3画分分取し、フェルラ酸から4-VGへの変換率をモル比で計算した(図5)。その結果、蒸留画分中には5.9%の変換率で4-VGが含まれていた。また、後留中に3.6%の割合で、初、中留に比べて4-VGが多く含まれることがわかった。蒸留後の残液中にフェルラ酸が89%、4-VGが5.1%残っていることが確認された。

また、50~200mg/Lの各フェルラ酸濃度で調製したモデルもろみを用いて蒸留試験を行い、4-VG変換率を比較した(図6)。その結果、いずれの濃度でも蒸留画分の4-VG変換率は6%前後であり、フェルラ酸が4-VG

に変換される場合、その割合はフェルラ酸濃度に影響されないことが分かった。以下の4-VG変換条件を検討する場合に使用するモデルもろみは、200mg/Lのフェルラ酸濃度とした。

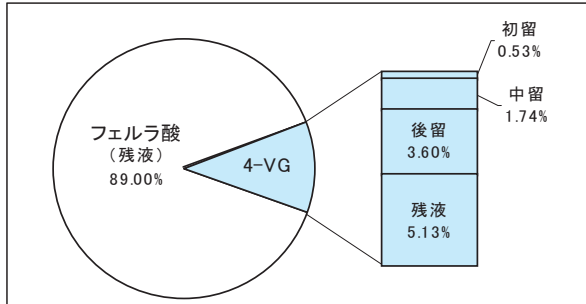


図5 モデルもろみ蒸留による4-VG変換率の測定 (変換率はモル比で算出。)

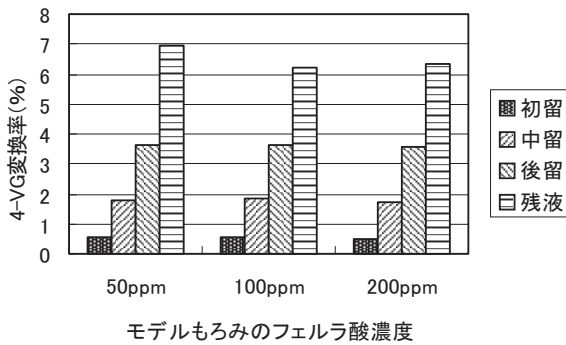


図6 各フェルラ酸濃度のモデルもろみでの4-VG変換率の比較

4-VG変換条件の検討

異なるpHに調製したモデルもろみ300mlを70 で2時間還流し、4-VG変換率を比較した(表6)。その結果、pH3からpH5の範囲では、pHが高いほど4-VG変換率が增加する傾向がみられた。

表6 各pH条件での4-VG変換率

pH条件	4-VG変換率 (%)
pH3.0	1.27
pH4.0	1.38
pH5.0	1.87

) 70 で2h還流。
変換率はモル比で算出。

加熱時間に対する4-VG変換率の変化を調べるため、モデルもろみ (pH4.0) を70 で加熱還流し経時変化を確認したところ、4-VG変換率は時間に比例して増加していた(図7)。

還流温度の違いによる4-VG変換率への影響について調べた(図8)。還流温度60~100 の範囲では、80

付近の温度から徐々にフェルラ酸から4-VGへの変換が促進されることがわかった。

以上の還流試験の結果から、4-VG変換に適した条件は、酸度を抑えたもろみで、高温でなるべく時間をかけて留出を行うことである。そこで、この結果をもとに実際の熟成もろみを用いて蒸留試験を行い、4-VGの定量及び官能評価を行った。

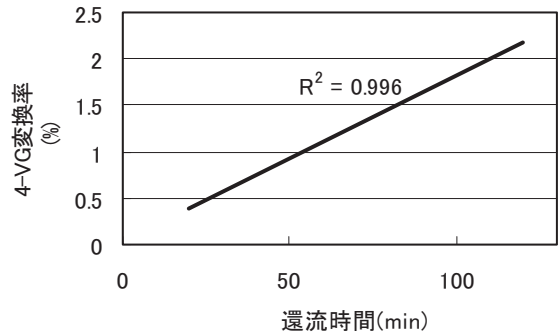


図7 各還流時間における4-VG変換率

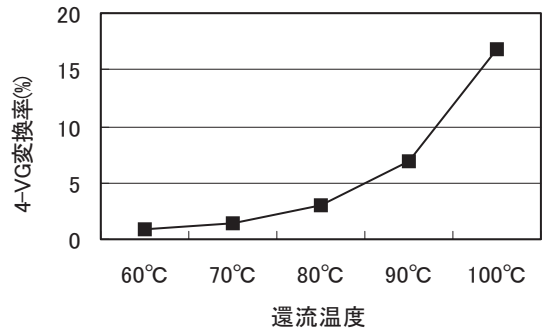


図8 各還流温度における4-VG変換率

3-3-2 発酵もろみによる蒸留試験

蒸留試験に用いたもろみのフェルラ酸濃度を表2に示した。この熟成もろみ300gを用いて試留装置で蒸留し、留出液中の4-VG量を測定した(表7)。初留中に4-VGは検出されず、後留に4.43mg/Lの高濃度で4-VGが含まれていた。

表7 蒸留後のフェルラ酸及び4-VG量

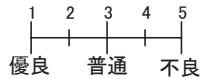
	4-VG(mg/L)	遊離フェルラ酸(mg/L)
蒸留画分		
初留	ND	ND
中留	1.7	ND
後留	4.43	ND
蒸留残さ	-	17.17

ND: 検出されなかった

表8 異なる加熱条件の蒸留における留出液の官能評価

No.	蒸留方法 (蒸留時間)	4-VG (mg/L)	評点			短評
			香り	味	総合点	
1	短時間蒸留(25分)	1.04	2.67	2.33	2.50	焦げ臭、アルコール臭 味まるい、適度な甘さ
2	長時間蒸留(85分)	1.47	2.83	3.00	3.33	爽やか、アルコール臭、未だれ臭、豊か 適度な甘さ、雑味、渋味、あらい

) 評価は下記による。



加熱時間の異なる蒸留条件での4-VG留出量の違いを検討するため、発酵もろみ4Lを用いた蒸留試験を行った(図9)。その結果、留出液中の4-VG量に差があり、最終蒸留画分では、長時間加熱蒸留の4-VG量は短時間加熱蒸留の約1.5倍であった。それぞれの条件での蒸留画分3～7番目の混合液について官能評価を行った(表8)。総合的に短時間蒸留の評点が良く、味がまるく適度な甘さがあるという評価であった。長時間蒸留は爽やか、適度な甘さなどの長所もあったが、未だれ臭、雑味、渋味などの欠点が短時間蒸留に比べて多い。4-VGはワインなどでフェノール性異臭の原因物質とされ、その閾値は32 µg/Lと低く、2～4mg/Lでは不快臭とされる⁹⁾。したがって4-VGの香りそのものがオフフレーバーであり、貯蔵熟成を経ないと香り豊かな泡盛にならないことが確認された。今後、ろ過及び貯蔵をふまえた官能評価が必要である。

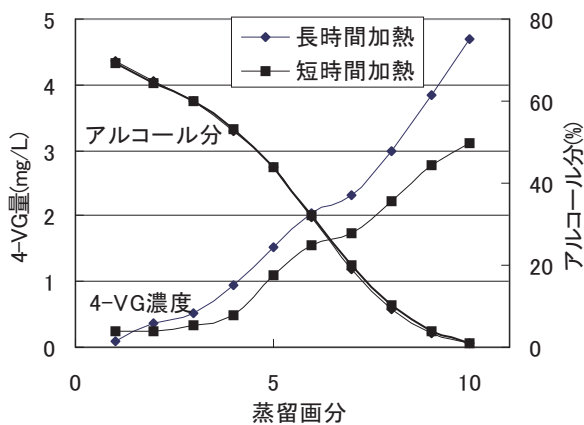


図9 発酵もろみ蒸留での4-VG留出量

3-4 まとめ

もろみ及び蒸留におけるフェルラ酸並びに4-VGの挙動を調べた結果、以下のことを確認した。

もろみ中において、原料米細胞壁にエステル型で結合

しているフェルラ酸及び遊離型のフェルラ酸の割合は47:53の割合であった。今回小仕込みに用いた麹は泡盛製造業者から提供していただいた麹であり、フェルラ酸エステラーゼ活性は現場の状況を反映している。したがって、泡盛製造工程において、遊離フェルラ酸は原料中の全フェルラ酸量の53%しか遊離していない。

蒸留工程において、4-VGへ変換後留液に回収した量は遊離フェルラ酸量の8.5%、全フェルラ酸量に対しては4.6%であった(図10)。小関ら²⁾によるとパニリンの30%アルコール溶液中における閾値は0.2mg/Lと低く、わずかの量でも含有量が増加すれば、酒質の改善に大きく影響を与える。

したがって、本研究の結果よりパニリン生成を指標とした古酒の製造方法は、次の問題解決が必要である。つまり遊離フェルラ酸から4-VGへ変換効率を上げる為の蒸留方法の検討あるいはフェルラ酸脱炭酸活性を有する泡盛酵母の開発であり、これについては今後の研究課題である。

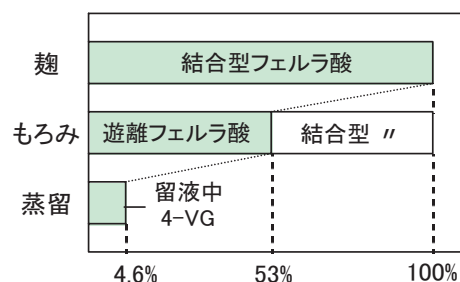


図10 麹中フェルラ酸に対する4-VGの回収率

4. 要約

- (1)泡盛101号酵母の生育に対するフェルラ酸の阻害は見られず、また酵母のフェルラ酸脱炭酸活性も認められなかった。
- (2)もろみ発酵における遊離フェルラ酸濃度の経時的变化を調べた。発酵初期から約4mg/Lの遊離フェルラ酸が確認され、14日間発酵後には12 - 16mg/Lのフェルラ酸が生じていた。
- (3)もろみ発酵における温度条件（15 及び20 ）では、発酵後半に多くフェルラ酸を生成していた。
- (4)モデルもろみ及び発酵もろみを蒸留したときの4-VG変換について、初、中留に比べ後留中に4-VG量が多く含まれていた。
- (5)異なるpHまたは温度でモデルもろみを還流したとき、pH3-5の範囲では、pHが高い条件で、また長時間、高温条件で、より多く4-VGが生成していた。
- (6)発酵もろみ4L規模の蒸留において、長時間加熱の場合、留出液中に4-VG量が多く含まれていた。
- (7)もろみ工程で遊離したフェルラ酸は全フェルラ酸量の53%であり、蒸留工程で回収された4-VG量は、全フェルラ酸量に対して4.6%であった。

謝 辞

本研究を実施するに当たって、麹を提供して下さいました忠孝酒造株式会社及びヘリオス酒造株式会社に心から感謝申し上げます。

本研究は、泡盛古酒の品質等製造に関する調査研究として、沖縄県酒造組合連合会より委託された受託研究である。

5. 参考文献

- 1)西谷尚道，大内弘造，飯村穰：特開昭58-158174
- 2)Koseki : Biosci.Biotechnol.Biochem., 62(10), 2032-2034(1998)
- 3)福地香，田村博三，比嘉賢一：沖工技セ研究報告第 2 号，77(2000)
- 4)西澤千恵子，太田剛雄，江頭祐嘉合，真田宏夫：日食工誌，45(8)，499-503(1998)
- 5)大森俊郎，辻本祥子，高下秀春，下田雅彦：特開平 9-238675
- 6)石原昌信，長谷川真由，平良東記，当山清善：日食工誌，47(1)，23-29(2000)
- 7)Ishihara : Food Sci.Technol.Res., 5(3), 251-254(1999)
- 8)小関卓也，岩野君夫，農化，70，684-686(1996)
- 9)篠原隆，醸協，96，182-188(2001)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

TEL (098)929-0111

FAX (098)929-0115

URL : <http://www.pref.okinawa.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。