

芋焼酎の香気形成に及ぼすアミノ酸の影響

白石洋平^{1,3}・安藤有加²・奥津果優²・吉崎由美子²・二神泰基²・玉置尚徳²・和久豊³・高峯和則^{2*}
(¹鹿児島大学大学院連合農学研究科,²鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター,³株式会社ビオック)

平成 28 年 6 月 23 日受理

Effects of amino acids on the flavor formation of *imo-shochu*.

Yohei SHIRAISHI^{1,3}, Yuka ANDO², Kayu OKUTSU², Yumiko YOSHIZAKI², Taiki FUTAGAMI², Hisanori TAMAKI²,
Yutaka WAGU³ and Kazunori TAKAMINE²

(¹The United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065

²Education and Research Center for Fermentation Studies, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065

³Bio'c Co., LTD, 111-1, Murocho-Uchida, Toyohashi, Aichi, 441-8087)

In a previous study, we revealed that higher alcohols in *imo-shochu* were decreased but aldehydes were increased by the addition of protease agent to *imo-shochu moromi*. Since total amino acids were increased in *moromi* by protease agent addition, we elucidated the relationships between amino acid composition and volatile compounds such as higher alcohol and aldehydes. Although arginine concentration in the initial *moromi* was increased by protease addition, it was decreased during fermentation. Thus, it appears that arginine was dominantly uptaken by yeast, and any amino acid that was the precursor of higher alcohols would not be metabolized. In addition, aldehydes and the precursors of aldehydes were also increased in *moromi*; these increments would affect the formation of aldehydes. As the result of the distillation of the amino acid solution with xylose, aldehydes were suggested to be derived by Strecker degradation during distillation. Furthermore, it was confirmed that furfural formation from xylose during distillation was enhanced in the presence of amino acid.

Key words : 芋焼酎, アミノ酸, 高級アルコール, アルデヒド, フルフラール

緒言

前報¹⁾において、芋焼酎醪にプロテアーゼ剤を添加して発酵させたところ、醪中にアミノ酸が増加し、アルコール収得量が増加した。また、得られた焼酎は高級アルコールの生成量が低下し、アルデヒドの生成量が増加した。高級アルコールはアミノ酸の酵母による

代謝により Ehrlich 経路で生成するが、大内ら^{2,3)}はロイシンからのイソアミルアルコールの生成は NH₃ 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。また、秋田ら⁴⁾は NH₃ やその他のアミノ酸の共存量が多くなると、取り込まれたア

本論文については、*印著者あて連絡ください。

ミノ酸が高級アルコール以外に利用されるため、高級アルコール生成に対応するアミノ酸の取り込み量が増加しても高級アルコールの生成は減少すると報告している。

一方、アルデヒドはアミノ酸の酵母の代謝による生成および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り生成する。アルデヒドのうち、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ールアルデヒドは、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⁵⁾。しかし、フルフラールはアラビノース、キシロース等の直接還元糖が低pH下で加熱、脱水反応によって生成⁶⁾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醗の低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⁷⁾が、いずれもアミノ酸との関連は報告されていない。一方、奥村⁵⁾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る生成を報告している。

そこで、前報における高級アルコール生成量の低下およびアルデヒド生成量の増加と醗中のアミノ酸の増加との関係を検討した。

実験方法

1. 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醗に汲み水 392 g と蒸煮・粉碎したサツマイモ 700 g を加えた。30℃の温浴槽で一次醗は 5 日間、二次醗は 9 日間発酵させた。酵素剤は前報¹⁾選択した 4 種類を用い、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醗を製造した。

2. 蒸留

蒸留は醗 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分析試料とした。

3. 二次醗のアミノ酸分析

二次醗のアミノ酸は、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醗を No.2 ろ紙でろ過し、その後孔径 0.45 μm 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% → 100%) のグラジエント溶出、オーブン温度は 60℃、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。

4. モデル醗及び焼酎の作製

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醗 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醗に含まれる濃度を参考に添加した。

5. 焼酎香気成分の GC-MS 解析

モデル焼酎 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℃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 1 に示した。

実験結果及び考察

1. 高級アルコールとアルデヒド生成に及ぼすアミノ酸の影響

アミノ酸の一部は発酵過程で酵母の代謝により高級アルコールに変換²⁻⁴⁾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等の加熱反応によりア

Table 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
MS	Agilent 5975B
Mode	SCAN

ルデヒドに変換⁵⁾される。前報¹⁾では、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倍の濃度となり、醪中のアミノ酸濃度の増加により高級アルコールの量の増加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^{2,3)}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NH₃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. 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⁸⁾。Fig. 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

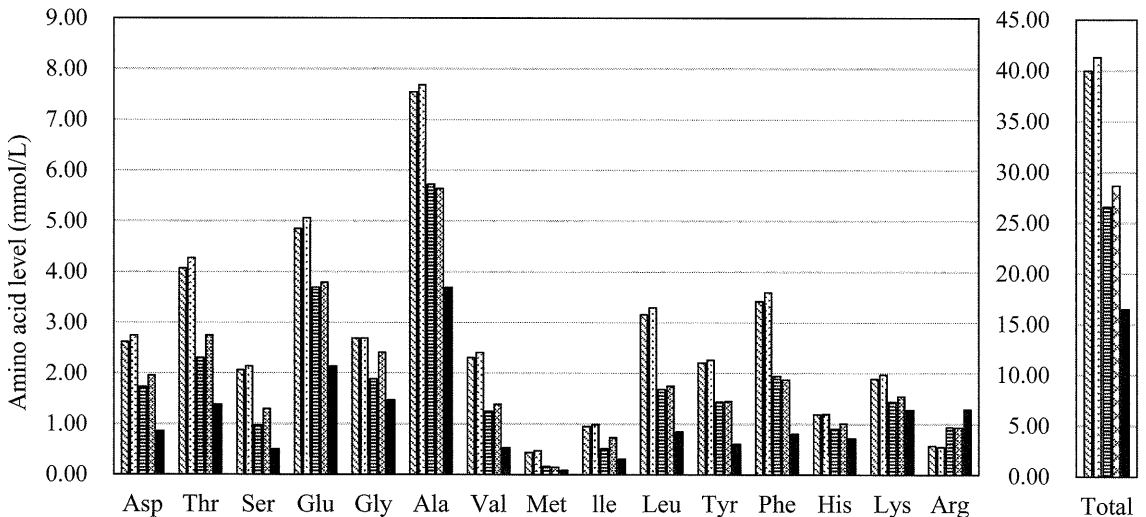


Figure 1 Amino acid composition of the second *moromi*.
 Symbol : ▨, 20A ; ▩, AY ; ■, YP-SS ; ▤, ACP-G ; ■, Control

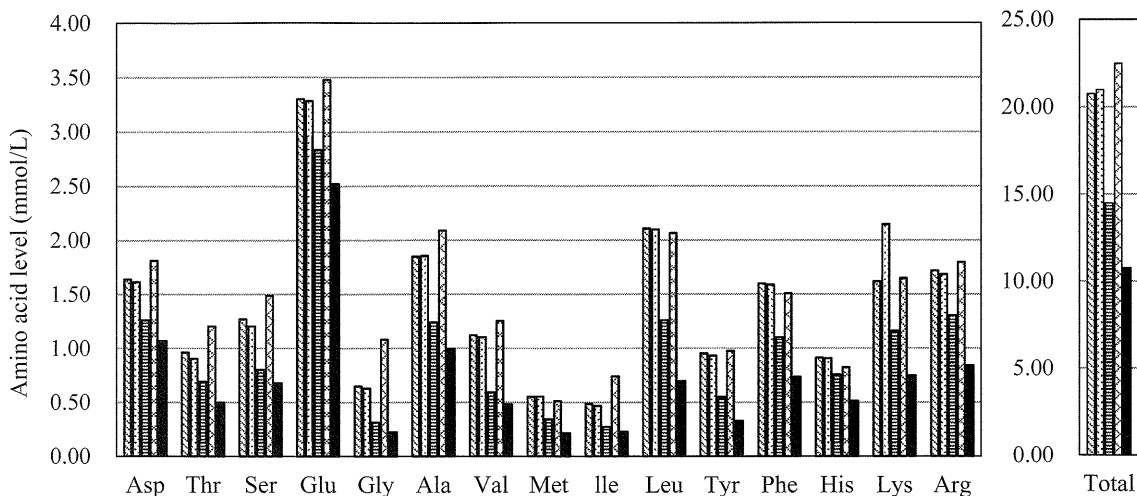


Figure 2 Amino acid composition of the sweet potato mixed with *koji*.

Symbol : ▨, 20A ; ▩, AY ; ■, YP-SS ; ▤, ACP-G ; ▧, Control

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

の初発アルギニン濃度が低いためには明らかではないことから、芋焼酎の二次醗初期の濃度を求める必要がある。しかし、芋焼酎の二次醗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°C で 12 時間反応させ、発酵初期の二次醗を再現した。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 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^{9,10}。しかし、本研究において再現した発酵初期の二次醗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、醗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。

アルデヒドは、前報¹⁾において対照と比べて酵素剤

添加焼酎で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りアミノ酸から生成¹¹⁾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⁵⁾ことが知られている。Fig. 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醗では 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。前報¹⁾に示すようにアルデヒド類の濃度が対照と比べて 1.3 ~ 3.0 倍増加した。その一例として、イソブチルアルデヒドは 1.7 倍、イソバレルアルデヒドは 3.0 倍増加しており、醗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っても増加した可能性が示唆された。

2. 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、醗中のアミノ酸を酵母が代謝し生成¹¹⁾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⁵⁾。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 α -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、キシロース等の直接還元糖が低 pH 下で加熱、脱水反応によって生成⁶⁾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醗の低 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⁷⁾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⁵⁾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. 1 に示すように、20A または AY を添加した醗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、前報¹⁾に示す酵素剤を添加した醗で直接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、モデル醗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、モデル醗に含まれるアミノ酸濃度は Fig. 1 に示す対照の蒸留前の醗及び 20A を添加した蒸留前の醗に含まれる濃度で作製し、直接還元糖は前報¹⁾に濃度になるようにキシロースを添加した。作製したモデル醗を用いて蒸留し、得られた焼酎の揮発成分を分析した結果を Table 2 に示す。キシロース濃度が対照醗の値である 0.3% の場合、アミノ酸濃度が 20A 添加醗濃度で作製したモデル焼酎に含まれるアルデヒド類は、対照醗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 添加醗の値である 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醗の場合、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 添加醗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直接還元糖との相乗効果による生成が示された。

要 約

プロテアーゼ剤を添加して芋焼酎の仕込みを行い、焼酎の高級アルコールやアルデヒド生成に及ぼすアミノ酸の影響について検討した。

醗中にアミノ酸が増加すると高級アルコール生成量は減少し、その理由として、高級アルコール生成に対応するアミノ酸以外のアミノ酸濃度が増加したためであること、醗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と考えられる。また、アルデヒド類の濃度の増加は、醗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、蒸留中にストレッカー分解によっても増加することを、モデル醗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直接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。

謝 辞

本研究は日本酒造組合中央会の「単式蒸留焼酎に係る委託調査研究」の助成を受けたものです。

Table 2 Aldehydes in distillates derived from model *moromi* solution

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

参考文献

- 1) 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: 醸協, **112** (7), 517-523 (2017)
 - 2) K. OUCHI, Y. YAMAMOTO, M. TAKAGISHI and H. AKIYAMA: *J. Ferment. Technol.*, **58**, 301 (1980)
 - 3) 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)
 - 4) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝: 醸協, **81** (9), 626-632 (1986)
 - 5) 奥村丞司: 醸協, **88** (3), 178-187 (1993)
 - 6) M. J. Antal, Jr., T. Leesomboon, W. S. Mok and G. N. Richards, *Carbohydr. Res.*, **217**, 71-85 (1991)
 - 7) 大石雅志, 田野上佳枝, 梶原康博, 高下秀春, 岡崎直人: 醸協, **103** (9), 730-734 (2008)
 - 8) 岩野君夫, 旗宮顕仁, 中村拓郎, 渡辺誠衛, 伊藤俊彦, 中沢伸重: 醸協, **99** (10), 735-742 (2004)
 - 9) 辻謙次, 秋山裕一: 醗酵工学, **59** (5), 421-429 (1981)
 - 10) D. SCHULTHESS, L. ETTLINGER: *J. Inst. Brew.*, **84**, 240-243 (1978)
 - 11) Ylva Ardo: *Biotechnology Advances*, **24**, 238-242 (2006)
-