

沖縄黒麹もろみ酢の製造方法に関する研究 (II)

— もろみ発酵条件の検討 —

比嘉賢一

黒麹もろみ酢の品質安定化に資する基礎データの集積を目的として、泡盛製造のもろみの発酵条件の検討と蒸留工程の影響を検討した。アルコール発酵の経過に比較して、総アミノ酸量および γ -アミノ酪酸(GABA)の生成量は遅れる傾向を示し、発酵温度が低い場合その傾向は顕著であった。泡盛もろみ中ではグルタミン酸脱炭酸酵素GADの活性値は低い活性値を示した。もろみ中の添加クエン酸濃度の増加に伴い、アルコール生成量および総アミノ酸量の低下が認められたのに対して GABA 生成量および酵母生菌数への影響は認められなかった。総アミノ酸量および GABA 生成量に対して発酵温度が影響を与えたが、これに比較して仕込みに用いる麹の影響が大きいことが推測された。

1 緒言

泡盛製造副産物を原料とするもろみ酢は、平成 16 年度以降その売上げは大きく低迷している。その要因のひとつとして、明確な製造技術が未だ確立されておらず、品質の安定化が困難な状況ならびにもろみ酢規格基準が明確にされていない点があげられる。一方、もろみ酢には平成 16 年に特定保健用食品の有効成分となった血圧降下作用を有する γ -アミノ酪酸(GABA)が含まれており新たな機能性として注目されている。発酵物における GABA は主に微生物の持つグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)によりグルタミン酸を原料として GABA へ変換生成されることが報告¹⁾されており、前報では製麹時における温度管理が GAD 活性に重要な管理項目であることを報告した。

本研究では、もろみ酢の品質安定化に資する基礎データの集積を目的として、もろみ酢のクエン酸含有量、アミノ酸含有量および γ -アミノ酪酸(GABA)含有量を指標として、もろみの発酵条件ならびに蒸留の影響について検討を行った。

2 実験方法

2-1 もろみ発酵試験

もろみ発酵試験は県内酒造所で製麹された麹を用い、供試酵母に泡盛 101 号酵母を用いて行った。仕込麹量 100 g、汲水歩合 160%、170%および180%、発酵温度 15℃、20℃、25℃、28℃および30℃、発酵期間 15 日間の条件で行った。

発酵期間の検討では、麹仕込量 500 g、汲水歩合 170%、発酵温度 20℃、25℃および28℃の条件で、発酵期間 26 日まで発酵および分析を行った。

クエン酸の影響については、麹仕込量 100 g、汲水歩合 170%、発酵温度 28℃、発酵期間 15 日間の条件で試

験を行い、クエン酸濃度 1%、2%および3%のクエン酸溶液を汲水として用いた。

2-2 蒸留試験

蒸留試験は県内酒造所の熟成もろみを用い、容量 1 l のガラス製丸形フラスコ、濃縮塔は、全長 400mm、内径 20mm のガラス管、ワタリ部は、濃縮塔上端から冷却管へ下向きに 25° 傾斜した全長 300mm の連結管、冷却管はリービヒ冷却管で構成する試験蒸留機を用いて行った。もろみ張り込み量は 500ml、オイルバスを用いて加熱温度 120℃、140℃および160℃の条件で蒸留試験を行った。

2-3 成分分析

もろみおよび蒸留残渣の成分分析は、試料を 3000rpm で遠心分離後上清を分析に供した。

クエン酸含有量はもろみ上清を超純水にて 100 倍に希釈後、0.45 μ m のフィルターにて濾過して測定を行った。測定装置にイオンクロマトグラフ (DX-120、ダイオネクス社)を用い、分離カラムに IonPac ICE-AS1 (ダイオネクス社製) 使用し、分析条件は溶離液 2.0mM オクタンスルホン酸溶液、流量 0.5ml/min の条件で測定を行った。遊離アミノ酸および GABA の定量は 5%トリクロ酢酸にて除タンパク後、高速アミノ酸分析計(L-8800、日立製作所社製)を用いて測定した

3 実験結果と考察

3-1 発酵期間の検討

図 1 にもろみ日数 26 日目までのアルコール度数の経時変化を示し、図 2 に総アミノ酸量の経時変化を示した。アルコール度数の経時変化はもろみ日数 15 日目以降一定水準で推移しており、アルコール発酵は終了している

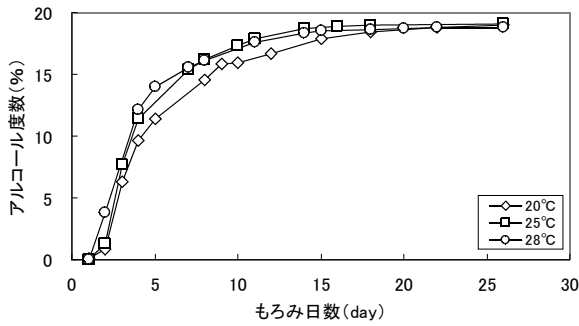


図1 アルコール度数の経時変化

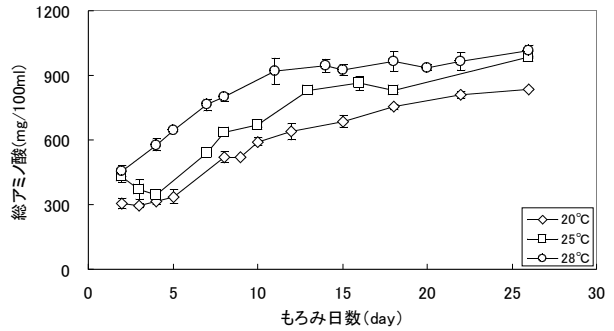


図2 総アミノ酸量の経時変化

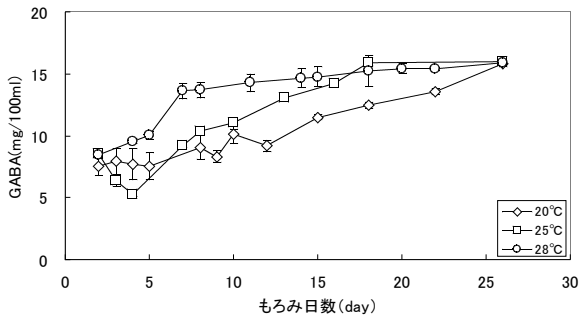


図3 GABA生成量の経時変化

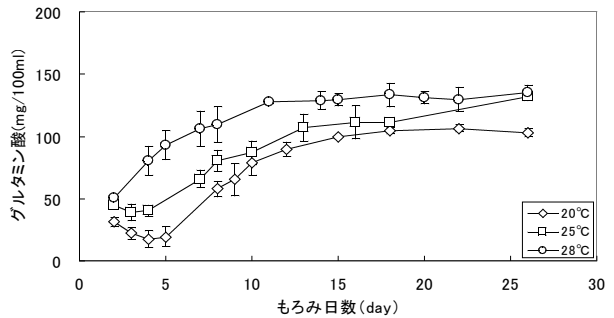


図4 グルタミン酸生成量の経時変化

と考えられた。一方、総アミノ酸量は発酵温度 28℃を除いて、もろみ日数 15 日目以降も増加を続けており、発酵温度 20℃の低い温度ではもろみ日数 26 日目でも、アミノ酸生成量はまだ平衡に達していないことが確認された。また、発酵温度 20℃に比較して発酵温度 28℃の総アミノ酸量が高い値を示しており、総アミノ酸生成量は発酵温度に影響を受けることが示唆された。

GABA 生成量の経時変化は図 3 に示したように、発酵初期段階において、発酵温度が低い場合 GABA 生成量は低い値を示したが、発酵末期のもろみ日数 26 日目では同じ生成量となった。また、GABA の前駆体物質であるグルタミン酸生成量は図 4 に示したように総アミノ酸量と同様な経時変化を示し、生成量は発酵温度により影響を受けることが示唆された。

データは示さないが、クエン酸量の経時変化は、黒麹菌により生成されるため、もろみ発酵期間を通して一定の値を示した。

以上の測定結果より、アミノ酸および GABA 生成量はアルコール発酵に比較して発酵温度の影響を強く受けることが示唆された。発酵温度 28℃ではもろみ日数 15 日で十分であるが、これより低い発酵温度で発酵を行うには、もろみ発酵期間を延ばす必要がある。しかし、全麹仕込を特徴とする泡盛もろみでは低 pH、高アルコール分と、酵母にとっては過酷な環境下にあるため、発酵

が終了した熟成もろみは酵母の自己消化により香りが劣化するのを避けるために速やかに蒸留が行われる必要がある。したがってアミノ酸含有量または GABA 生成量を高くする目的で、不用意に発酵期間を長く設定すると酒質に影響を与えることが示唆された。アルコール発酵を管理指標とした場合、もろみ日数は 15 日で十分であり、以後試験ではもろみ日数を 15 日として実験を行った。

3-2 汲水歩合の検討

図 5 に汲水歩合が総アミノ酸量に与える影響について示した。一般的に汲水歩合を上げるとアルコール取得量は増加するが³⁾、アミノ酸生成に関しては汲水の影響は少ないことが確認された。

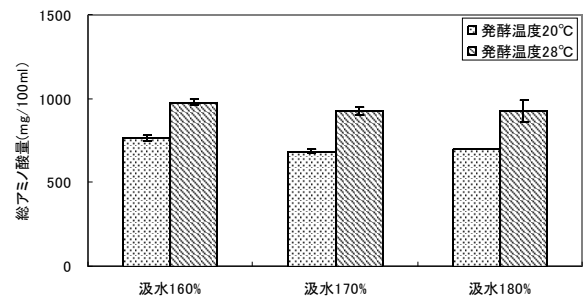


図5 アミノ酸生成に及ぼす汲水歩合の影響

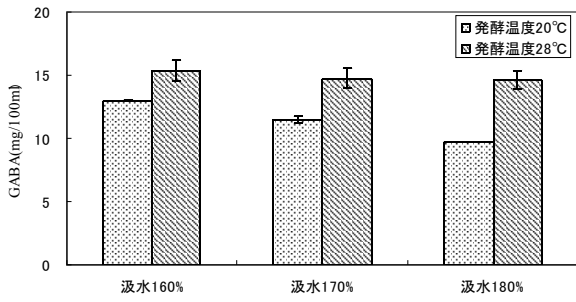


図 6 GABA生成量に及ぼす汲水歩合の影響

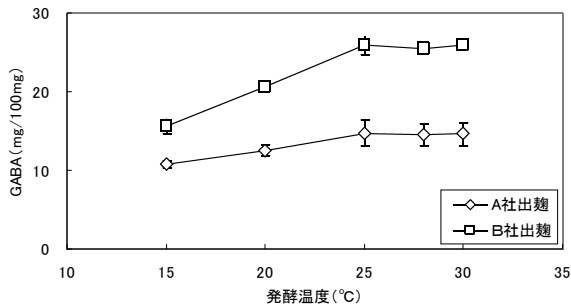


図 7 GABA生成量に及ぼす発酵温度の影響

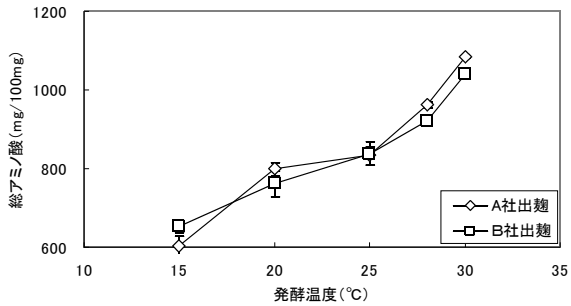


図 8 総アミノ酸生成量に及ぼす発酵温度の影響

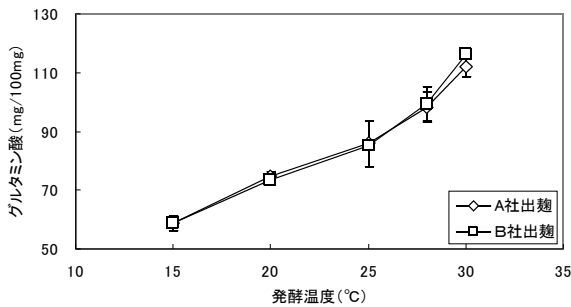


図 9 グルタミン酸生成量に及ぼす発酵温度の影響

GABA の生成量も図 6 に示したように汲水の影響は

少なく、発酵温度の影響を強く受けることが認められた。また、データは示さないが、グルタミン酸も同様に汲水歩合の影響は低かった。

3-3 発酵温度の検討

図 7 に GABA の生成量に及ぼす発酵温度の影響を示した。GABA の生成量は発酵温度の影響を受け、発酵温度が高くなるにしたがい、GABA 生成量も増加した。しかし、発酵温度 25 °C 以上では増加せず定常状態を示した。また、仕込みに用いた出麴の種類により GABA の生成量が大きく異なることが確認され、製麴条件により GABA 生成量が大きく影響を受けることが示唆された。

次に図 8 および図 9 に示したように、発酵温度が高くなるにしたがい、総アミノ酸量およびグルタミン酸の生成量は増加した。アミノ酸は、麴菌が生成する酵素、すなわちプロテアーゼ (AP) およびカルボキシペプチダーゼ (ACP) により生成されることから、酵素反応に影響を与える発酵温度の増加とともに生成量も増加していると推測された。

一方、GABA は非タンパク性アミノ酸でグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) によりグルタミン酸が脱炭酸されて生成する⁴⁾が、前駆体であるグルタミン酸は図 4 の経時変化で示したように、生成量は時間と共に増加後平衡状態を示し、減少傾向が認められない。また図 9 に示したように、総アミノ酸量と同様に発酵温度とともに増加傾向を示し、その含有量は高いことが確認された。

以上の結果より、麴酵素によりグルタミン酸は米タンパクより生成されているが、何らかの要因で GAD の活性が低く、グルタミン酸から GABA への変換効率が悪いことが推測された。

3-4 GAD活性の至適pH

Tsuchiya ら⁵⁾は液体培養の黄麴菌から GAD を精製し、反応至適 pH は pH5.5 であり pH4.0 における相対活性は 80 以上であることを報告している。泡盛もろみの pH は 3.0 ~ 3.5 とかなり酸性の条件であること、また液体培養と固体培養において GAD の相対活性に違いが予想されることから各社出麴における GAD 活性に対する pH の影響を検討した。

図 10 に GAD 活性に及ぼす pH の影響を示した。固体培養である泡盛麴は Tsuchiya らの報告に比べその至適 pH の範囲が狭く、更に pH4.0 以下では pH5.5 における活性値の約 6% しかないことが明らかとなった。

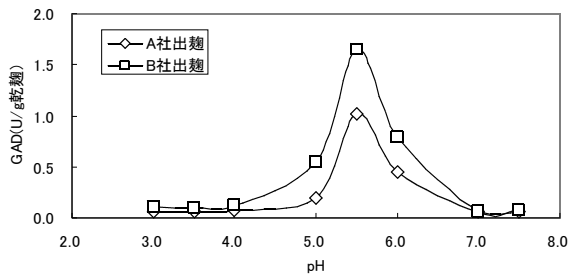


図10 GADに及ぼすpHの影響

したがって、泡盛のもろみ中では GAD の活性が弱い
ため GABA の生成が緩やかであることと、前駆体である
グルタミン酸の減少が認められないと推測された。

3-5 GABA生成に及ぼす酵母の影響

GAD は植物や微生物等に広く分布しており⁴⁾、酵母
による GABA 生成への影響を検討した。また、土屋ら¹⁾
は液体培養による糸状菌の GAD はほとんどが補酵素を
伴わないアポ酵素の状態が存在すると報告しており、固
体培養である出麴についても補酵素の影響を検討した。

前報²⁾にしたがい、出麴 2g を自己消化させこれをコ
ントロールとした。コントロールに 50 μ M となるように
ピリドキサルリン酸 (PLP) を添加した PLP 添加区分、
酵母を添加した酵母添加区分および PLP と酵母を添加
した仕込みを行った。図 11 に示したように、PLP 添加
区分では GABA 生成量はコントロールと違いは認めら
れず、固体培養の GAD はホロ酵素の状態が存在するか、
または補酵素が麴中に存在することが示唆された。

一方、酵母添加区分では GABA 生成量が増加すると
共に前駆物質であるグルタミン酸の減少が認められた。
岩野ら⁶⁾はグルタミン酸および GABA は酵母の増殖には
利用され難いアミノ酸であると報告しており、グルタミ
ン酸の減少は酵母に資化されたのではなく、GABA に
変換された結果であると推測された。しかし、泡盛 101
号酵母の GAD 活性を測定した結果、ほとんど活性は認
められなかった。

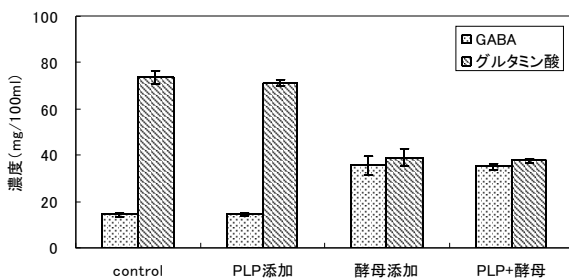


図11 GABA生成量に及ぼすPLPおよび酵母の影響

したがって、酵母添加による GABA 生成量の増加は
麹菌由来の GAD によるものと推察され、酵母が GABA
生成に何らかの要因で関与していると推測された。

3-6 蒸留工程の影響

図 12 に蒸留工程が各アミノ酸含有量に及ぼす影響を
示した。蒸留後の含有量は蒸留前後のもろみ容量から濃
縮率を算出し濃縮前に換算した。グルタミン酸、GABA
および総アミノ酸量ともに蒸留工程により、加熱前の約
80 %まで含有量が低下した。加熱温度の影響は今回の
条件では影響は認められなかったが、蒸留温度 120 $^{\circ}$ C
(蒸留時間 4 時間)におけるグルタミン酸の減少量が大き
な値を示した。この結果より、蒸留工程でアミノ酸含
有量に蒸留工程が及ぼす影響は小さいことが確認された。

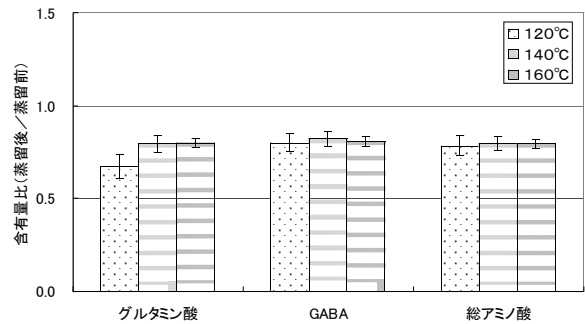


図12蒸留工程がアミノ酸含有量に及ぼす影響

3-7 クエン酸濃度が発酵に及ぼす影響

図 13 にクエン酸濃度がアルコール生成に及ぼす影響
を示した。アルコール生成量はクエン酸濃度の影響を受
け、クエン酸添加量の増加に伴いアルコール生成量の低
下傾向が認められた。データは示さないが、各クエン酸
濃度において酵母生菌数は同様な経過を示していた。も
ろみ酸度が高い仕込みではアルコール取得量の低下が経
験的に知られているが、今回の結果より、高クエン酸濃
度により酵母のアルコール発酵能に影響を与えることが
示唆された。

GABA 生成量に対してクエン酸濃度の影響は低く、
クエン酸濃度により GABA 生成量に違いは認められな
かった (図 14)。低 pH において、GAD 活性が低下す
ることを前節で示したが、低い活性値でも GABA 生成
が行われていることが確認された。

一方、総アミノ酸量はクエン酸の添加により、その生
成量の低下が認められた (図 15)。クエン酸の添加に
より、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダ
ーゼ等の酵素活性が低下したものと推測された。

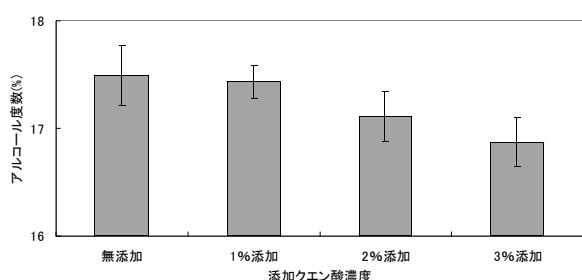


図13 クエン酸濃度がアルコール生成に及ぼす影響

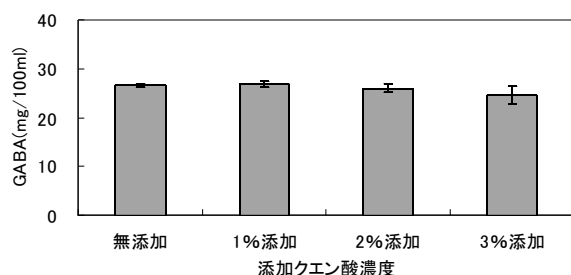


図14 クエン酸濃度がGABA生成に及ぼす影響

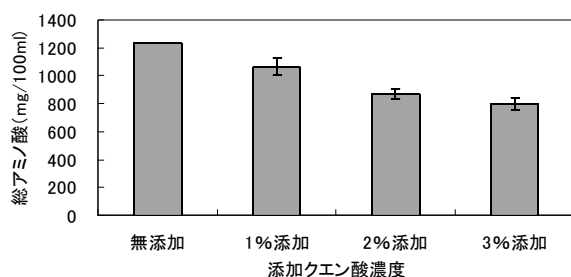


図15 クエン酸濃度がアミノ酸生成に及ぼす影響

4 まとめ

もろみ酢の品質安定化に資する基礎データの集積を目的として、もろみ発酵条件を検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1)もろみの発酵時間を検討した結果、アルコール発酵の経過に比較して GABA 生成量、総アミノ酸量の発酵経過は遅れる傾向を示した。この傾向は発酵温度が低い場合に顕著に現れた。
- 2)GABA 生成量および総アミノ酸量はもろみの発酵温度に大きな影響を受け、発酵温度の増加に伴い、生成量が増加したが、汲水歩合の影響は認められなかった。
- 3)GAD 活性は泡盛もろみ中の pH では低い活性値を示すことが確認された。
- 4)もろみ中のクエン酸濃度の増加に伴い、アルコール生

成量および総アミノ酸量の低下が認められたが、GABA 生成量および酵母生菌数への影響は認められなかった。

- 5)発酵条件を検討した結果アミノ酸量および GABA 生成量に影響を与える要因は発酵温度であることが確認されたが、発酵温度に比較して、仕込みに用いる麹が大きく影響を与えることが推測された。

本研究は平成 16 年度から平成 18 年度の健康食品品質向上総合対策事業において、株式会社トロピカルテクノセンターを管理法人として、国立大学法人琉球大学、沖縄もろみ酢製造協議会と共同で行った。

参考文献

- 1) 土屋紀美, 西村賢了: 醸協, 97, p382-386 (2002)
- 2) 比嘉賢一: 沖縄県工業技術センター研究報告, 第9号, 39-44 (2007)
- 3) (財)日本醸造協会: 本格焼酎製造技術, (財)日本醸造協会(1991)
- 4) 丸尾文治, 田宮信雄監修: 酵素ハンドブック, p634, 朝倉書店 (1987)
- 5) Tsuchiya, K., Nishimura, K., and Iwahara, M.: Food Sci. Technol. Res., 9, 283-287 (2003).
- 6) 岩野君夫, 幡宮顕仁, 中村拓郎, 渡辺誠衛, 伊藤俊彦, 中沢伸重: 醸協, 99, p735-742 (2004)

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

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.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。