

## ソバ焼酎製造における麴菌，酵母および酵素等の応用研究（第3報）

水谷 政美\*<sup>1</sup>・山本 英樹\*<sup>1</sup>・越智 洋\*<sup>1</sup>・高山 清子\*<sup>1</sup>・工藤 哲三\*<sup>1</sup>

Study on *Koji*, Yeast and Enzymes in Manufacturing of Buckwheat *Shochu* (III)

Masami MIZUTANI, Hideki YAMAMOTO, Hiroshi OCHI, Kiyoko TAKAYAMA and Tetsuzo KUDO

ソバ種子中には、塩化第二鉄の染色により内部まで広く様々なポリフェノール系化合物が含まれていることが分かった。しかし、ソバ種子の構造から判断して焼酎製造の際に除去することは困難であると考えられた。また、これらのポリフェノール系化合物類の中には、培地中の溶存二酸化炭素を除去する働きがあり、その濃度を低下させることにより酵母の増殖を促進するものがあった。さらに、酵母の増殖に伴い培地中の総アミノ酸量が減少することにより、酵母の合成経路が活性化されi-アミルアルコール生成量が増加することが示唆された。

キーワード：ソバ，焼酎，酵母，ポリフェノール

### 1 はじめに

ソバ焼酎の製造において、原料ソバの成分が酵母の香気成分生成系に影響を及ぼしn-プロピルアルコール量が少なくi-アミルアルコール量が多くなる原因について、今まで検討してきた<sup>1-7)</sup>。

本研究では、ソバ種子中に含まれるルチン、ケルセチン、ケルシトリン、ハイペロシド、ネオクロロゲン酸、クロロゲン酸、ファゴピリン、シュードファゴピリン、カテキン、エピカテキン、プロアントシアニジン等タンニン類、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、クレゾール、チモール、オイゲノール、ピニルフェノール、サリチルアルデヒド、オリエンチンなど多数のフェノール系化合物<sup>8)</sup>に着目し、これらフェノール系化合物の発酵への影響を調査した。ここでは、発酵速度や香気成分生成量へ及ぼす影響及びそのメカニズムについて検討したので報告する。

### 2 実験方法

#### 2-1 ポリフェノール類の染色

ソバのできるだけ淡色の殻，種子表面及び種子の縦横断面を2%FeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>O水溶液に30分浸漬

後，目視により暗紫色に変色した部位をポリフェノールが多く存在する部位と判断した。

#### 2-2 発酵試験

発酵試験は、グルコース10%、酵母エキス1%、ペプトン2%の培地にソバ抽出物やフェノール系化合物を0.1%添加し、オートクレーブ滅菌(121°C, 21min)後、酵母(宮崎酵母10<sup>7</sup>個/ml)1mlを加え28°Cで7~14日静置培養を行った。なお、タンナーゼ(Aspergillus oryzae, 和光純薬工業)およびラッカーゼ(Rhus vernificera, シグマアルドリッチジャパン株式会社)は、滅菌後の培地にそれぞれ10mg, 1mg添加した。

#### 2-3 香気成分等の測定

香気成分は、発酵液10mlにNaCl1.0gを加えn-ヘキサンで抽出後、ガスクロマトグラフ(カラム:DB-WAX, φ0.53mm×30m, 検出器:FID)を用いて分析した。また、生成したエチルアルコール量は、簡易アルコール測定器(理研計器, AL-2)を用いて測定した。

培養液のアミノ酸は、培養液2mlに0.5mlの0.1NHClを加えろ過後(0.45μ), その1mlを0.02NHClで7mlにしたものをアミノ酸分析機を用いて分析した。また、有機酸は、培養液を水で5倍希釈後ろ過(0.45μ)し有機酸分析機を用い

\* 1 応用微生物部

て分析した。

溶存二酸化炭素（以下D<sub>CO2</sub>という。）は、発酵中のビールの溶存炭酸ガスを測定する方法<sup>9)</sup>を用いて測定した。発酵液上清を注射器で泡をたてないように20~30mlとり減圧して振とう後常圧での気液体積量から算出した。

### 3 結果および考察

#### 3-1 ソバ種子のポリフェノール類

ソバ殻、ソバ種子（断面、表面）を2%塩化第二鉄によりタンニン類を染色し、その分布を調べた。ソバ殻だけでなく種子表面や内部の胚乳まで広くタンニン類が存在しており、ソバ種子からタンニン類を完全に除去することは困難であると考えられた。

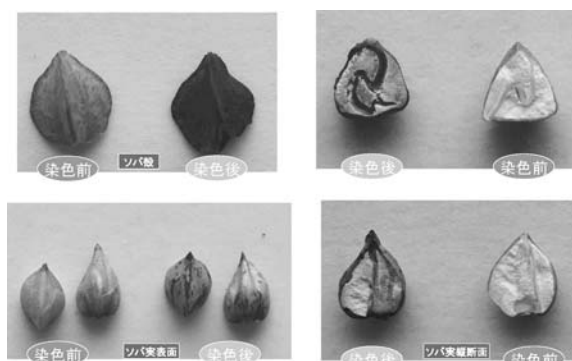


図1 ソバ種子の塩化第二鉄による染色

#### 3-2 ポリフェノール類の香気成分と有機酸生成量への影響

種々のポリフェノール類やソバ殻等を培地に添加したところ、生成する香気成分量が変化を受けた。特に、i-アミルアルコール量が最も影響を受けていたことから、i-アミルアルコールについて比較検討を行った。図2に示したとおり、最

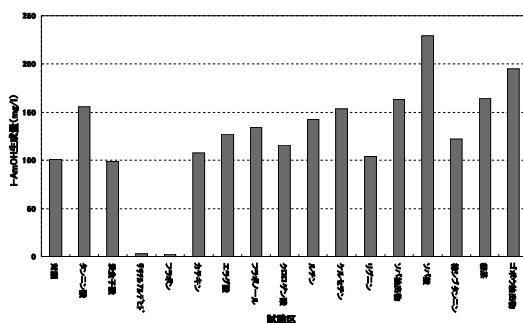


図2 ポリフェノール類のi-アミルアルコール生成量に及ぼす影響

も強く影響したのはソバ殻とゴボウ抽出物であった。

没食子酸やリグニンに影響しなかったことより、ポリフェノール類の全てのものが影響するわけではなく構造的な要因があると思われた。なお、サリチルアルデヒドとフラボンには酵母に対して増殖阻害を示した。

また、発酵終了後の有機酸量は、i-アミルアルコールが増加すると酢酸が増加する傾向が認められた。

#### 3-3 ポリフェノール化合物の構造の影響

図2で示したように没食子酸単独では影響ないが、没食子酸にラッカーゼを作用させ酸化重合させることにより香気成分生成量が増加した（図3）。このことより、ポリフェノール化合物の構造が変化することにより、香気成分生成量への影響が発生すると考えられた。

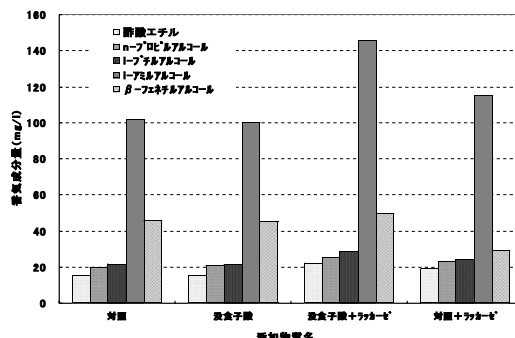


図3 ラッカーゼによる没食子酸の酸化重合と香気成分生成量への影響

また、香気成分生成量に影響を及ぼしたタンニン酸にポリフェノール加水分解酵素であるタンナーゼを添加したところ、香気成分生成量に及ぼす影響が小さくなることが観察された。このことか

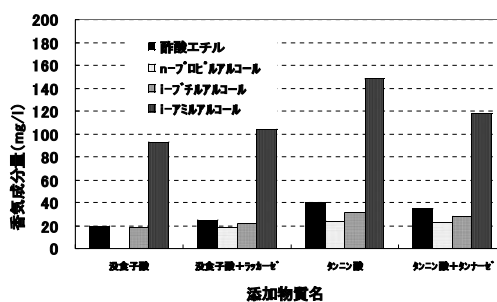


図4 タンナーゼによるタンニン酸の加水分解と香気成分生成量への影響

らも、ポリフェノール化合物の構造が大きな要因であると考えられた。

図5にソバ抽出物を添加した場合とソバ抽出物とタンナーゼを添加した場合の発酵後の香り成分生成量を示した。タンニン酸と同様にタンナーゼの添加により、i-アミルアルコール生成量がソバ抽出物だけの試験区よりも減少する結果が得られた。このことから、ソバ抽出物中のポリフェノール類が香り成分生成量に影響していると推定された。

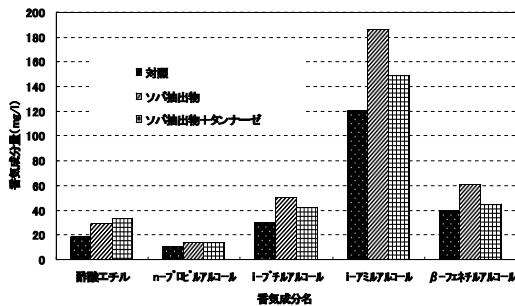


図5 ソバ抽出物とタンナーゼの影響

### 3-4 発酵初期のアミノ酸量

アミノ酸がポリフェノール類に吸着され遊離アミノ酸が減少することにより香り成分生成量が変化することが考えられた。そこで、香り成分生成量への影響が最も大きかったソバ殻を培地に添加し、発酵前の遊離アミノ酸量を測定した。無添加区の総アミノ酸量が5,093mgに対してソバ殻添加区では5,001mgと若干の減少が認められたが、アミノ酸の吸着はほとんどなく香り成分生成量に影響するほどの差ではないと考えられた。

### 3-5 炭酸ガス減量から見た発酵速度への影響

発酵速度との関係を調べるため炭酸ガス減量を測定すると、図6に示すように香り成分生成量に影響のあった試験区ほど減量速度が大きくなる傾向を示した。なお、これら以外のフェノール系化合物やソバ抽出物等も同じ減量曲線を示した。

### 3-6 炭酸ガス減量、D<sub>CO2</sub>および酵母数の比較

発酵液にソバ抽出物0.1gを添加し静置培養を行い、炭酸ガス減量、D<sub>CO2</sub>および酵母菌数を測定し無添加区と比較検討した。

炭酸ガス減量（図7）は、ソバ抽出物を添加することにより無添加区より速度が大きくなって

た。

酵母菌数（図8）を計測すると、無添加区では $5 \times 10^7$ 個/ml程度で一定となるのに対してソバ抽出物添加区では $10^8$ 個/mlまで約2倍に増加していた。

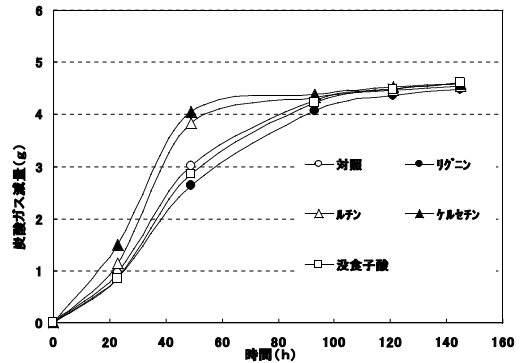


図6 炭酸ガス減量の比較

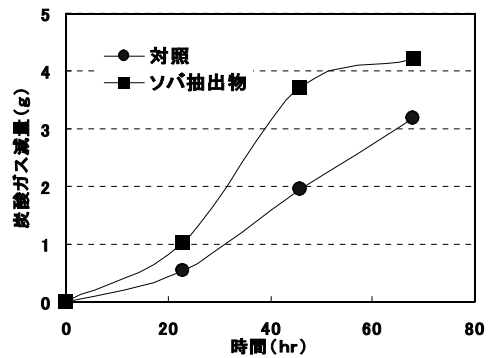


図7 炭酸ガス減量

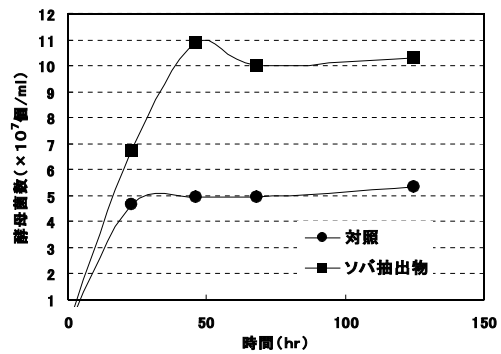


図8 酵母菌数の変化

また、培地中のD<sub>CO2</sub>（図9）は、無添加区では二酸化炭素の理論飽和濃度0.2%（15℃）を大きく超え高い濃度に達しているのに対して、ソバ抽出物添加区は飽和濃度に達することなく一時的

に増加後減少に転じていた。

これらのことから，ソバ抽出物に含まれるポリフェノール類が培地中の酵母の増殖に有害な二酸化炭素の除去に働くことにより，酵母の増殖が促進され発酵が進むものと考えられた。

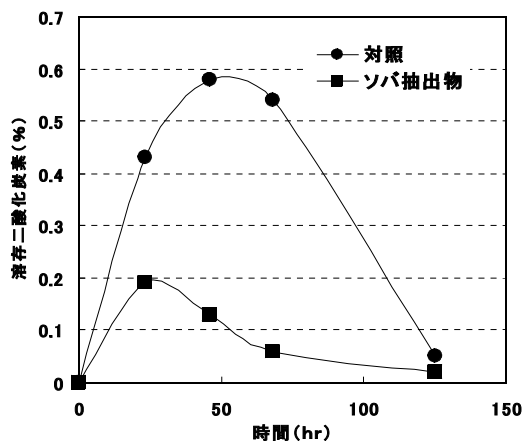


図9 溶存二酸化炭素濃度の変化

さらに，発酵液の総アミノ酸量の変化を調べたところ（図10），どちらの実験区でも発酵初期に急激に減少し，酵母菌数と逆の関係が認められた。発酵終了時の総アミノ酸量は，無添加区で4,070mgであるのに対して，ソバ抽出物添加区では3,435mgとかなり減少していた。

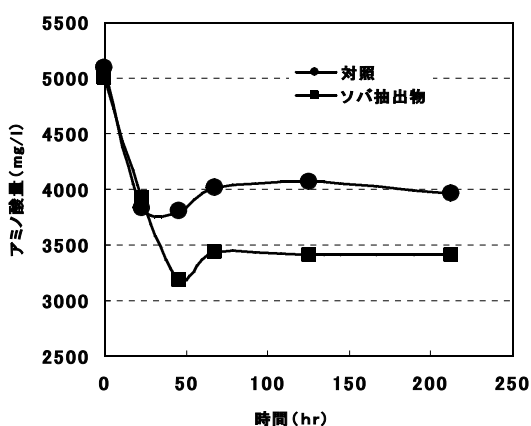


図10 発酵液中の総アミノ酸量の変化

香気成分では，最も影響を受けた i-アミルアルコール生成量の時間的な変化を測定した（図11）。i-アミルアルコールは，酵母菌数と同様の

傾向を示し発酵初期から急速に生成され対照区では25時間ではほぼ一定になったのに対し，ソバ抽出物添加物添加区では50時間まで増加しそれ以降ほぼ一定となった。

エタノール生成については，図11に示したように，ソバ抽出物添加により発酵初期の生成速度が対照区より速くなっていたが，最終的には対照区とほぼ同じ量となった。

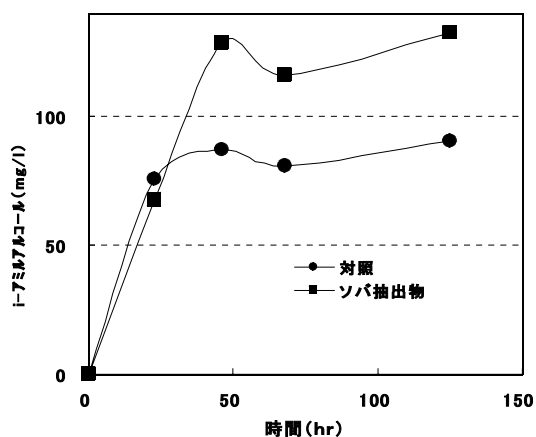


図11 i-アミルアルコール生成量の変化

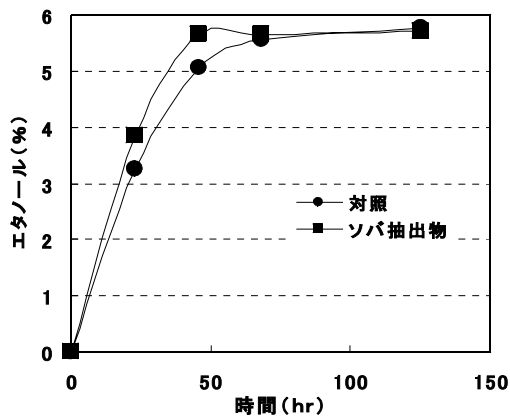


図12 エタノール生成量の変化

福田ら<sup>11, 12)</sup> や竹崎ら<sup>12)</sup> は，活性炭やセルロースパウダー等の固形物を添加することにより溶存二酸化炭素の減少，酵母菌数の増加および香気成分の増加について報告している。また，秋田ら<sup>13, 14)</sup> は，かくはん等により酵母の増殖速度が増大すると，発酵液中のアミノ酸量が減少し，酵母の香

気成分生合成系が活発化され、香気成分生成量が增加することを報告している。今回得られた結果は、これらの報告と同じ傾向を示している。つまり、ソバ抽出物に含まれるポリフェノール類は発酵液中の酵母の増殖に有害である二酸化炭素の除去に効果的に働くことにより酵母増殖を促進し、その結果、発酵液中のアミノ酸量が減少し香気成分生合成系の活発化によってi-アミルアルコール量が増加することが推定された。

#### 4 まとめ

ソバ種子中には、塩化第二鉄の染色により内部まで広く様々なポリフェノール系化合物が含まれていることが分かった。しかし、ソバ種子の構造から判断して焼酎製造の際に除去することは困難であると考えられた。また、これらのポリフェノール系化合物類の中には、発酵液中の溶存二酸化炭素を除去する働きがあり、その濃度を低下させることにより酵母の増殖を促進していた。さらに、酵母の増殖に伴い発酵液中の総アミノ酸量が減少することにより、酵母の合成経路が活性化されi-アミルアルコール生成量が増加すると考えられた。

#### 5 参考文献

- 1) 水谷政美,工藤哲三,日高照利,柏田雅徳,宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 43, p.117 (1998)
- 2) 水谷政美, 工藤哲三, 日高照利, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 44, p.125 (1999)
- 3) 水谷政美, 日高照利, 工藤哲三, 岡崎益己, 柏田雅徳. 醸協, 97 (6), p.461-467 (2002)
- 4) 水谷政美, 工藤哲三, 岡崎益己, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 47, p.123 (2002)
- 5) 水谷政美, 工藤哲三, 山本英樹, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 48, p.131 (2003)
- 6) 水谷政美, 工藤哲三, 山本英樹, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 49, p.107 (2004)
- 7) 水谷政美, 工藤哲三, 山本英樹, 高山清子, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・食品開発センター研究報告, 50, p.107 (2005)
- 8) 横澤隆子, 野中源一郎, 藤井創, 小砂憲一. New Food Industry, 44 (11), p.49-56 (2002)
- 9) B.T.Heard, J.Inst.Brew, 79, p.371 (1973)
- 10) 福田典雄, 産本弘之, 平松幹雄. 醸協, 85 (2), p.109-113 (1990)
- 11) 福田典雄, 産本弘之, 平松幹雄. 醸協, 86 (9), p.684-688 (1991)
- 12) 竹崎道代, 松浦一雄, 広常正人, 浜地正昭. 醸協, 88 (4), p.319-325 (1993)
- 13) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝. 醸協, 81 (9), p.626-632 (1986)
- 14) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝, 宮野信之. 醗酵工学, 65 (1), p.19-26 (1987)