

- 8) Yokotsuka, K. *et al.*: *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 293 (1988).
- 9) Yokotsuka, K. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 156 (1991).
- 10) Yokotsuka, K. and Singleton, V. L.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 13 (1997).
- 11) 奥田 徹ら: 日本ブドウ・ワイン学会誌, **10**, 110 (1999).
- 12) Jang, M. *et al.*: *Science*, **275**, 218 (1997).
- 13) Okuda, T. and Yokotsuka, K.: *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 93 (1996).
- 14) Jeandet, P. *et al.*: *Agric. Food Chem.*, **43**, 316 (1995).
- 15) 高柳 勉ら: 日本ブドウ・ワイン学会誌, **10**, 96 (1999).

泡盛の香りはどこからくるのか

小関 卓也

醸造食品は熟成により、うま味成分が増したり香味がまろやかになるとともに個々の食品に特有な香味成分が生成されることにより、好ましい形に変化する。酒類においても清酒では搾り立ての新酒にはフルーティーさはあるが、まだ荒々しさが残り、秋口に飲み頃になるとされている。また、ワインなどでは貯蔵中の熟成によりブドウの持つ特性が形成される。しかしながら、焼酎を熟成させることは、沖縄の泡盛以外の焼酎ではあまり見られなかった。泡盛では特に3年以上貯蔵し、熟成させたものは古酒（コース）と称される。本稿では、泡盛（コース）の熟成中に起きる香味に影響を与える成分の化学変化、特に原料から由来する香り成分の生成機構について紹介する。

1. 泡盛中に見いだされたフェノール化合物

焼酎の原料は多種類で、原料特性が官能的に把握されていてもどのような成分が関わっているのか解明されたものはほんの一部で、これまで焼酎において論じられた香味は酵母が主体となって生成あるいは変換された成分であった。

甘藷焼酎、熟成泡盛および大麦焼酎に存在する芳香成分の中には、原料中に前駆体として存在し、醸造工程で麹菌の生産する加水分解酵素により遊離し、さらに蒸留や貯蔵工程で化学的に変化して芳香成分になるものが存在することが明らかにされた。^{1,2)}

コースおよび大麦焼酎をHPLCにて分析したところ、この中にフェノール性の香り成分であるバニリン(VA)が見いだされ、その他にもフェルラ酸(FA)、バニリン酸(VAA)および4-ビニルグアヤコール(4-VG)なども見いだされた。また、蒸留直後と5年貯蔵後とは顕著な成分変化が見られ、蒸留直後に多く存在した4-VGは5年貯蔵後の泡盛では検出されず、FAも減少した。さらに、5年貯蔵後の泡盛ではVAが大きく増加し、VAAも見いだされた。以前よりコースは、官能的に甘い香り

を有することは知られていたが、その一つにVAが関与していることが示された。VAを官能的に感じる最低限の濃度（閾値）は0.2 mg/l程度と推定され、清酒、大麦焼酎および泡盛においてはVAが香りの形成に寄与していることが推察された。ところで、4-VGは閾値の低いオフフレーバーとされている。大麦焼酎や蒸留直後の泡盛の香りに4-VGが関わっていると思われるが、5年貯蔵後の泡盛には、4-VGはほとんど見いだされず、他の化合物に変換されたものと考えられた。

2. VAの生成機構

FA, 4-VG, VAおよびVAAの構造式は、3位にメトキシおよび4位に水酸基を持つことからFAからすべて変換されたものだろうと推測し、モデル焼酎による変換のメカニズムを探った。FA(1 mM)のみを含む100 mMクエン酸緩衝液(pH 5.0)からなるアルコール濃度15%のモデル焼酎溶液を作成し、温度80°Cにて蒸留し、留出の初期、中期および後期区分を分画した。溶液は固相抽出法により濃縮し、逆相HPLC分析に供した。その結果、初留区分においては主にFAが検出されたが、中留区分においては4-VGが、そして後留区分においては4-VGと若干のVAおよびVAAなどが見いだされた。このことは、蒸留中にFAが変換されることを示し、主に4-VGに変換されると推察された。また、4-VGが主に含有する中留画分を37°C、20日間貯蔵すると、検出される化合物はVAおよびVAAであることから、貯蔵中に4-VGはVAに変換され、さらにVAAまで変化したものと考えられた。

FA変換における貯蔵中の温度、pHおよびアルコール濃度の影響を上記モデル焼酎溶液を用いて調べた。貯蔵温度が4°Cでは、FAの変換はほとんど見られなかったが、37°Cにおいてはかなり4-VGに変化し、VAおよびVAAなども見いだされ、常温に近い温度でも変換が進むことが示された。また、pHを3.0、4.0および5.0

に設定しFA変換の程度を調べたところ、pHが低いほどVAAが、またpHが高いほどVAが多く、pH 5.0においてはVAAは検出されなかった。同様にアルコール濃度の影響については、20%および40%で調べたところ、濃度が高いほどVAが多くなることから、アルコールが酸化を抑制することが示唆された。ところで泡盛においては蒸留直後のpHが3~4、アルコール濃度が40%程度であり、清酒に比べるとアルコール濃度が高く、貯蔵期間が長い。この要因がコースにおいて清酒よりもVAが多いことのひとつと思われる。

3. 原料に存在するフェルラ酸と遊離に関わる麹菌酵素

FAは植物細胞壁リグニンを構成し、また、ヘミセルロースを構成するアラビノキシランのアラビノース側鎖にエステル結合していることが報告されており、³⁾原料の米あるいは麦に由来することが考えられた。麴中にFAのエステル結合を加水分解する酵素（この酵素はフェルラ酸エステラーゼと呼ばれている。）の存在の有無を調べると、麴中にはこの酵素が存在し、FAは麹菌の生産するフェルラ酸エステラーゼによって原料から遊離し、泡盛醸造工程中に4-VG, VAおよびVAAに変換されることが示唆された (Fig. 1)。次いで、泡盛麹菌 *Aspergillus awamori* IFO4033 の小麦ふすま培養液から主要なフ

ェルラ酸エステラーゼを精製した。精製酵素をふすまに作用させると、フェルラ酸および *p*-クマール酸が遊離した。*p*-クマール酸もフェルラ酸と同様にアラビノキシランのアラビノース側鎖にエステル結合しており、本酵素は植物細胞壁からのフェノール酸の遊離に関わる酵素であった。また、ふすまにキシラナーゼとエステラーゼを作用させるとエステラーゼのみを作用させた場合に比べ、遊離するFAが8倍程度増加し、キシラナーゼがFAの生成に大きく関わっていることが示された。これらのことはリグニンを含めてリグノセルロースの分解には、主鎖を分解する酵素に加えて、側鎖を分解する酵素も必要であり、それらが共存することにより分解率が高まることを想像させる。精製酵素はDFPやPMSFで活性が阻害されることから、セリンエステラーゼでありセリンプロテアーゼやリパーゼと同じ触媒機構を有すると推察され、酵素遺伝子の機能を解析するために *A. awamori* フェルラ酸エステラーゼ遺伝子 (*fleA*) をクローニングした。⁴⁾推定されるアミノ酸配列からN-末端アミノ酸配列および内部のアミノ酸配列はペプチドシーケンスと一致した。本酵素は281アミノ酸残基からなり、成熟タンパク質は260アミノ酸残基で構成され、その配列は *Aspergillus niger* フェルラ酸エステラーゼ (FAEA) と90%の高い同一性が認められた。また糸状菌 *Aspergillus*

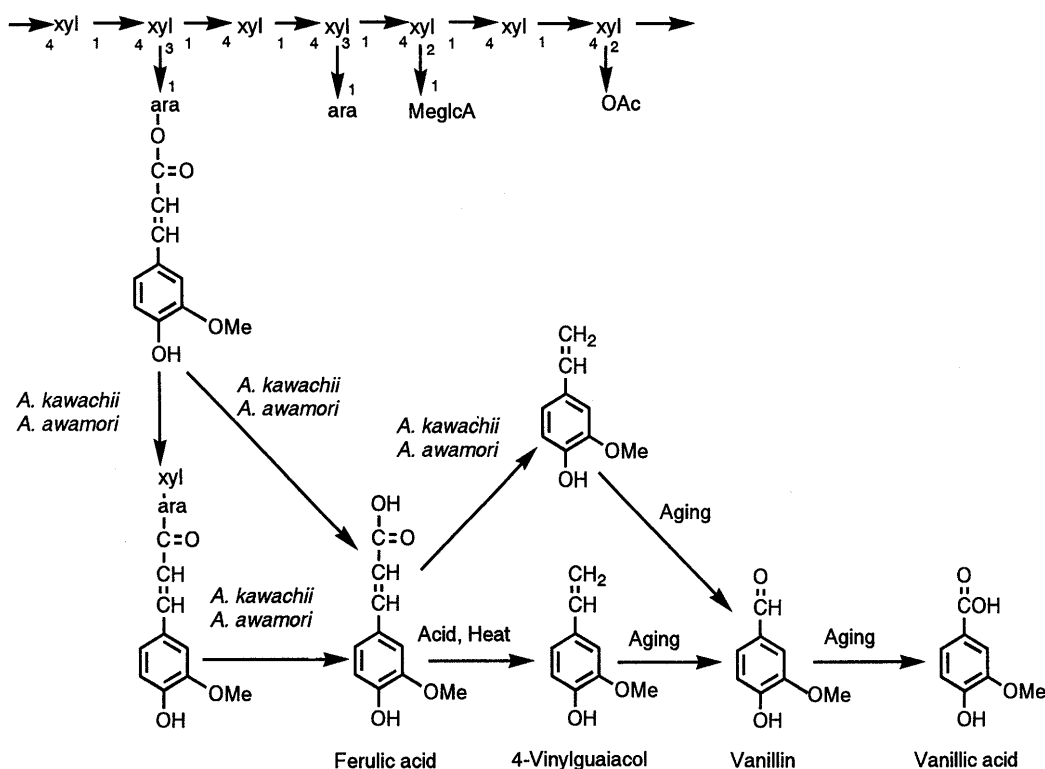


Fig. 1. A proposed mechanism for the conversion of ferulic acid in *awamori*. xyl, β -D-Xylopyranose; ara, α -L-arabinofuranose; MeglcA, 4-O-methylglucuronic acid; Ac, acetic acid.

oryzae, *Penicillium camembertii*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus niveus* および *Humicola lanuginosa* のモノ・ジアシルグリセロールリパーゼおよびトリアシルグリセロールリパーゼとも類似性が認められ、活性中心 Ser 近傍のモチーフ (GHSLG) が一致し、X 線結晶構造解析で明らかとなった *R. miehei* および *R. niveus* リパーゼの触媒残基である Asp および His が FLEA においても見いだされ、本酵素の catalytic-triad は Ser¹³³, Asp¹⁹⁴, His²⁴⁷ と推察された。

同様に *A. awamori* の生産するアセチルエステラーゼを精製し、その性質を調べると本酵素はキシランに存在するアセチル基の遊離に関わっていた。また、フェルラ酸や *p*-クマール酸エステルを加水分解できず、基質特異性はフェルラ酸エステラーゼと異なっていた。本酵素遺伝子 (*aceA*) をクローニングし、シーケンスしたところ推定アミノ酸配列は *A. niger* アセチルキシランエステラーゼと 92% 一致したが、*Trichoderma reesei* のそれとは類似性が見いだせなかった。また、フェルラ酸エステラーゼとも類似性がなかった。他に類似性が見いだされたタンパク質は *Geotrichum candidum* および *Candida cylindracea* のリパーゼの活性中心 Ser 近傍において見いだされた。⁵⁾ このように一次構造上ではフェルラ酸エステラーゼとアセチルエステラーゼの相同性はなかったが、両酵素ともリパーゼと同様な触媒機構を有することが示唆された。

4. *Saccharomyces cerevisiae* フェルラ酸耐性株の性質

醸造用酵母の中で、ある種のビール酵母およびワイン酵母は FA から 4-VG への変換能を有し、清酒酵母および焼酎酵母はその変換能を有しないことが報告されている。FA から 4-VG へのバイオコンバージョンは、フェルラ酸を脱炭酸する酵素による。また、フェルラ酸は抗菌活性を有し、フェルラ酸の濃度が、ある濃度以上では酵母の増殖が停止する。ケイ皮酸などのフェニルアクリル酸感受性変異の酵母から、それを相補する遺伝子として Phenylacrylic acid decarboxylase 遺伝子 (*pad1*) が分離されたが、⁶⁾ ワイン酵母のフェルラ酸脱炭酸酵素遺伝子はこれとは異なることも報告されている。⁷⁾ このように酵母のフェルラ酸に対する耐性と脱炭酸酵素との関連については、まだ明らかにされていないことからフェルラ酸感受性の酵母から耐性変異株を取得し、その性質を調べた。⁸⁾ フェルラ酸耐性株は 800 mg/l のフェルラ酸を含む培地でも増殖し、シクロヘキシミドに対しても耐性を示し、また、細胞質膜の脂肪酸組成は高級不飽和脂肪酸比率が親株より高くなる傾向があった。さらに FA 耐性株は、親株では見いだされなかった FA から 4-VG への

変換能を有し、フェルラ酸脱炭酸酵素活性も上昇しており、FA 耐性と脱炭酸酵素活性が密接に関連していることが示唆された。安息香酸などフェノール酸の細胞への取り込みについても、*Pseudomonas putida* においてこれらの基質の膜輸送を担うトランスポーターの機能が詳細に検討されており、⁹⁾ 酵母においてもこのような輸送システムを解析することは FA に対する耐性の面からも興味深い。

おわりに

最近の分析技術の進歩は、今まで確認されていなかった成分を見だし、それらの諸成分の由来や発酵熟成工程での変化あるいは香味との関係を解明することを可能にし、その結果、これら酒類中に存在する諸成分が酒としての個性や品質を強く支配していることを明らかにしている。しかし見いだされた成分以外にも官能的には把握されているが、それがどんな化合物なのか明らかにされていないものがまだたくさんある。

また、焼酎などの蒸留酒でも蒸留前のもろみの段階で麹菌および酵母の作用による糖化発酵と共に香味に関与する成分のバイオコンバージョンが起きていることも見逃すことができない。酵母における香味成分の生成については種々の報告があるものの、麹菌によるコンバージョンについてはあまり報告がない。香味成分の前駆体となる基質がもろみ中に存在し、麹菌によっても焼酎の香りに関与する成分も生成しているものと思われる。

以上、泡盛の特徴的な香り成分の生成について述べてきた。しかし熟成を論じる場合、物理的な面から見た場合もあり、物理的パラメーターと官能的な熟成度との相関性について検討されている。このように熟成現象にはまだ究明されていない新しい課題も残されており、一つ一つ解明されることにより幅広い焼酎醸造の展開が期待される。

文 献

- 1) Ohta, T. *et al.*: *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 1353 (1990).
- 2) 小関卓也ら: 醸協, **89**, 408 (1994).
- 3) Kato, Y. and Nevins, D. J.: *Carbohydr. Res.*, **137**, 139 (1985).
- 4) 小関卓也ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 107 (2000).
- 5) Koseki, T. *et al.*: *Biochem. J.*, **326**, 485 (1997).
- 6) Clausen, M. *et al.*: *Gene*, **142**, 107 (1994).
- 7) 吾郷昇志ら: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 24 (1998).
- 8) 我部政晴, 小関卓也: 醸協, **95**, 65 (2000).
- 9) 武尾正弘: 生物工学, **78**, 167 (2000).