

泡盛の醸造過程における4-ビニルグアヤコール生成に及ぼす乳酸菌の影響

誌名	日本醸造協会誌 = Journal of the Brewing Society of Japan
ISSN	09147314
著者名	塚原,正俊 玉城,康智 東,春奈 久貝,樹幹 外山,博英
発行元	日本醸造協会
巻/号	118巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 185-192
発行年月	2023年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



泡盛の醸造過程における 4-ビニルグアヤコール生成に及ぼす 乳酸菌の影響

塚原正俊^{1*}・玉城康智²・東 春奈¹・久貝樹幹¹・外山博英³

(¹ 株式会社バイオジェット, ² 沖縄工業高等専門学校生物資源工学科, ³ 琉球大学農学部)

令和 4 年 3 月 11 日受理

Effects of lactic acid bacteria on 4-vinylguaiacol production during the Awamori brewing process

Masatoshi TSUKAHARA^{1*}, Yasutomo TAMAKI², Haruna AZUMA¹, Tatsumoto KUGAI¹, Hirohide TOYAMA²

(¹BioJet Co. Ltd., 315 Shioya, Uruma, Okinawa, 904-2231, Japan,

²Department of Biological Resources Engineering, National Institute of Technology, Okinawa College, 905 Henoko, Nago, Okinawa Prefecture 905-2192, Japan,

³Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 1 Senbaru, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa 903-0213, Japan)

Awamori, a traditional Okinawan distilled liquor, has the characteristic that its flavor improves after aging. Vanillin is one of the aged aroma components of Awamori which is converted from 4-vinyl guaiacol (4-VG) derived from ferulic acid in fermenting mash. In this report, we analyzed the effects of lactic acid bacteria in Awamori mash on the conversion of ferulic acid to 4-VG. Lactic acid bacteria were isolated from Awamori mash of breweries, and the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Propionibacterium* were found. Several strains, such as *Lactococcus lactis*, exhibited a conversion activity from ferulic acid to 4-VG, and *Lactiplantibacillus plantarum* converted ferulic acid to dihydroferulic acid. It was also confirmed that these types of strains have a similar activity, respectively. A small-scale fermentation test with added *L. lactis* led to an increase in 4-VG, and the addition of *L. plantarum* led to its decrease, while both bacteria were unaffected in alcohol production. The effects of these lactic acid bacteria were also confirmed in Awamori after distillation. These results suggest that lactic acid bacteria in mash may affect the 4-VG concentration during the fermentation process of Awamori, and the addition of lactic acid bacteria may be a new Awamori brewing technique to increase the 4-VG concentration.

Key words : 4-ビニルグアヤコール (4-vinylguaiacol), もろみ (Moromi), フェルラ酸 (ferulic acid), バニリン (vanillin), 熟成 (matured)

緒 言

沖縄県の伝統的蒸留酒である泡盛は日本の國酒の1つで¹⁾, 熟成 (古酒化) することで香味が向上し芳醇な香りになるという大きな特徴を持つ。特に3年以上

熟成させた泡盛は「古酒 (ケース)」と呼ばれ珍重されている。この泡盛古酒に含まれる代表的な古酒香成分の1つにバニリンがある。バニリンは、原料米由来のフェルラ酸 (FA) が4-ビニルグアヤコール (4-VG) へと変化し, 熟成中にバニリンへと変化するこ

*corresponding author : tsuka@biojet.jp

とが報告されている²⁾。一方、泡盛以外の酒類では 4-VG はオフフレーバーとして低減を目指した取り組みも多く、これまでに、ワイン³⁾、ウイスキー⁴⁾、ビール⁵⁾、および清酒⁶⁾において酵母あるいは乳酸菌がフェルラ酸を脱炭酸し 4-VG に変換することなどが報告されている。また、焼酎では醸造用酵素剤を用いて 4-VG 濃度を上昇させる報告がある⁷⁾。一方、泡盛においては、最近、フェルラ酸から 4-VG への変換への黒麹菌の関与が報告され、現在の一般的な泡盛醸造において泡盛に含まれる 4-VG 濃度への黒麹菌の寄与が高いことが示された⁸⁾。

泡盛醸造において、4-VG は古酒香の増強に関与する重要な成分であるとともに、もろみ中の乳酸菌など夾雑微生物は醸造現場での環境管理の問題に直結することから⁶⁾、泡盛醸造においても、4-VG 生成がこれら夾雑微生物の影響を受けるかどうかについて検討することは重要であると考えられる。以上のことから、泡盛もろみにおけるフェルラ酸から 4-VG への変換について、乳酸菌の影響を検討した。

実験方法

1. 泡盛酒造所のもろみおよび蒸留液の試料

泡盛もろみ及び蒸留液は、沖縄県内の 4 酒造所 (A, B, C, D) から採取した。

2. もろみ生酸菌の分離及び数の測定

もろみ 0.5g に 4.5ml リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え 30 秒間振り混ぜた。その後 10^{-1} から 10^{-5} まで段階希釈し、0.5% 炭酸カルシウム含有 MRS 寒天培地 (DIFCO) を用いて混釈培養を行った。嫌気条件下で 30℃、24 時間培養し、ハローを形成したコロニーを生酸菌と判断して分離した。もろみに含まれる生酸菌は、ハローを形成したコロニー数より算出した。

3. フェルラ酸及び 4-VG, バニリンの定量

試料を 0.45 µm 再生セルロース製シリンジフィルター (トムシク) にてろ過し、高速液体クロマトグラフィー LC-20A (島津製作所) を用いて定量した。カラムは Cosmosil 5-C18-MS-II (4.6 mm I.D.×250 mm, ナカライテスク) を 40℃ で用いた。分離は、1.0 ml/min で 48% メタノール (0.5% ギ酸含有) にて 3 分間アイソクラティック分析後、0.5 分間で 75% メタノー

ール (0.5% ギ酸含有) に上昇させ 2 分間維持する条件で行い、フォトダイオードアレイ検出器 SPD-M20A (島津製作所) で検出した。各成分は標準品の保持時間と UV スペクトルの比較で同定し、各標準品で作成した検量線により定量した。

4. 生酸菌によるフェルラ酸から 4-VG への変換試験

MRS 培地で 1-2 日間前培養した生酸菌 50 µl をフェルラ酸を 70 µg/ml 含む MRS 培地 2 ml に植菌し、30℃ で 48 時間培養を行い、各香氣成分の測定を行った。*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007, *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891 は (独) 製品評価技術基盤機構からの分譲株を用いた。

5. 生酸菌のゲノム DNA 抽出及び 16S rDNA 部分配列の決定

泡盛もろみから分離した生酸菌は、MRS 培地で 1-2 日間培養後に集菌し、ISOPLANT II (ニッポンジーン) を用いてゲノム DNA を抽出した。この DNA をテンプレートとして、TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) 及びプライマー M27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3'), 520R (5'-TTACCGCGGCTGCTG GCAC-3') を用いて、98℃ で 10 秒、54℃ で 30 秒、72℃ で 30 秒の反応を 28 サイクル行い、16S rDNA の部分配列の増幅を行った。PCR 産物は、2% のアガロースゲルで確認し、AMPure XP (Beckman Coulter) で精製後、ユーロフィンジェノミクス社にシーケンス解析を依頼した。得られた塩基配列は、BLAST による相同性解析を行い、最も相同性が高い種をその菌株の推定種とした。一方、*Bacillus* については、相同性が同程度高い種が複数見いだされ種の推定が困難であったことから *Bacillus*. sp. とした。

6. 製麹, 小仕込み試験

原料米 (タイ米) を 30 分間浸漬処理し、蒸し器で 30 分間、2 回蒸煮した。種麹は石川種麹店の種麹から分離した株 (アワモリ株, サイトイ株) を 1:1 の比で混合して用い、種付けから 27 時間まで 36℃、その後 42 時間まで温度 34℃、加湿条件下で製麹した。麹 50 g, 汲水歩合 170%, 前培養した 101 号酵母を用いて 25℃ でもろみ発酵を行い、アルコール濃度はアル

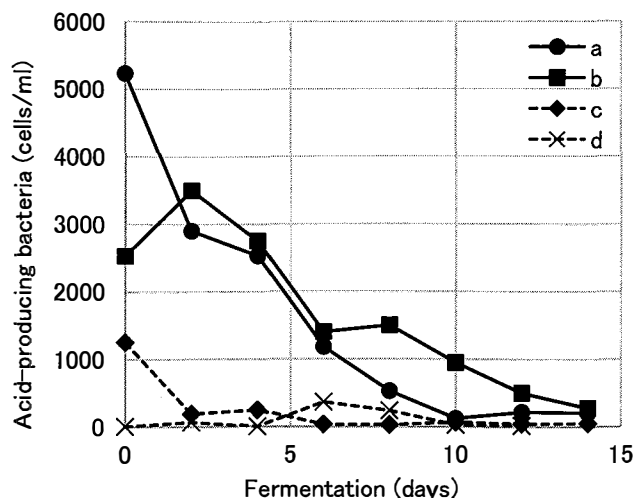


Fig. 1 Transition of the number of acid-producing bacteria contained in mash during Awamori fermentation. (a to d indicate Awamori brewery respectively.)

コメイト AL-3 (ウッドソン) を用いて測定した。もろみの蒸留は、ガラス製蒸留器具を用い、末垂れアルコール濃度は10%とした。

もろみと蒸留液の4-VG濃度の関係性評価については、14日間の発酵を行ったもろみを分取し、もろみでの濃度が0.3 (未添加), 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$ となるよう4-VG (和光純薬工業) を添加した。これらを蒸留し、もろみと蒸留液の4-VG濃度をHPLCにて定量した。

実験結果と考察

1. 泡盛もろみに含まれる生酸菌数、およびフェルラ酸、4-VG濃度

泡盛酒造所より発酵中のもろみ試料を採取し、含まれる生酸菌数の変化を調べた (Fig. 1)。その結果、生酸菌は発酵初期に多い傾向にあること、また、生酸菌数が極めて低レベルで推移する酒造所があることがわかった。これらの結果は、これまでの報告とほぼ一致する⁹⁾。

これらのもろみのフェルラ酸濃度は、発酵初期は急激に、その後一部の酒造所 (a, c) では緩やかに上昇した (Fig. 2A)。4-VG濃度は発酵初期に上昇後4日以降はほぼ一定で、最終濃度は酒造所間で3~14 $\mu\text{g/ml}$ と大きな違いがあることがわかった (Fig. 2B)。また、蒸留液の4-VG濃度を分析したところ、もろみ

の4-VG濃度と泡盛の4-VG濃度には、強い正の相関関係が確認された (Fig. 2C)。一方、蒸留前のもろみに4-VGを段階的に添加したもろみのモデルを作成しそれぞれ蒸留したところ、もろみの4-VG濃度と泡盛の4-VG濃度には直線的な関係が確認された (Fig. 2D)。以上の結果から、もろみに含まれる4-VG濃度は泡盛の4-VG濃度に直接影響していることがわかった。

2. 泡盛もろみに含まれる生酸菌の同定

得られた生酸菌78株について16S rDNAの配列により同定を行った。その結果、これらの生酸菌は10グループに分けられ、*Lactobacillus* 属とともに、*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Propionibacterium acidipropionici* などの種と推定された (Table 1)。これまでに、焼酎を含め、酒類の発酵液中からは複数の生酸菌が報告されており、*Lactobacillus* 属が多く、*Leuconostoc* 属、*Pediococcus* 属などの存在が示されている⁹⁻¹⁴⁾。今回、泡盛もろみにおいても、他の酒類と同様に*Lactobacillus* 属の他、様々な生酸菌が生きた状態で存在することが確認された。酒造所ごとに検出された種を見ると、今回の解析では、全ての酒造所で共通した種は見い出されず、酒造所ごとに菌叢が異なるという結果が得られた (Table 1)。今回の4酒造所の試料で用いられている原料米および黒麹菌は同一であったことから、共通の乳酸菌が見い出されなかつ

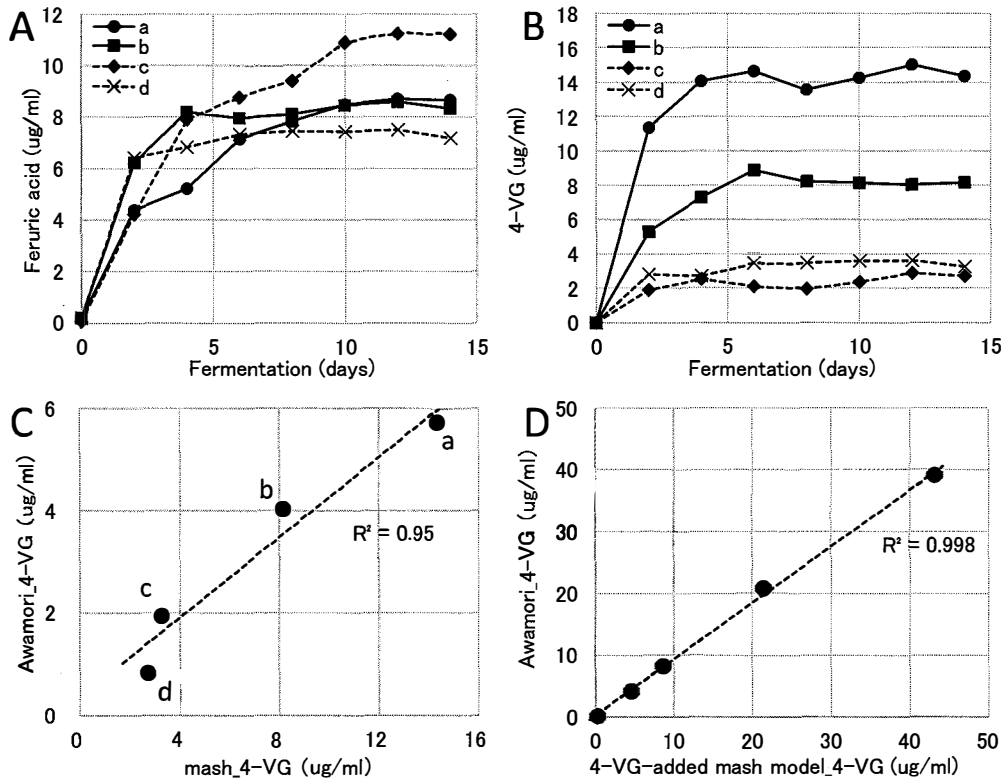


Fig. 2 Transition of the ferulic acid and 4-VG contained during Awamori fermentation.

(A-C) Samples from Awamori brewery, (A) Ferulic acid concentration, (B) 4-VG concentration, (C) Comparison of 4-VG concentration between mash and Awamori, (D) 4-VG concentration of Awamori using a mash model with 4-VG added at different concentrations. The 4-VG values of Awamori were converted to an alcohol concentration of 30%.

(a to d indicate Awamori brewery respectively.)

た理由として、これら原料のロットによる差異がある、あるいは酒造所での混入に起因しているなどの可能性が考えられた。

3. 泡盛もろみに含まれる生酸菌のフェルラ酸変換活性の評価

分離した全ての生酸菌について、フェルラ酸を添加した培地で培養を行い、培養前後のHPLCでの分析結果を比較することで、フェルラ酸から4-VGへの変換活性を有するかどうか検討した (Table 1)。その結果、*Bacillus* sp. 2, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus gallinarum* に分類された株において、顕著なフェルラ酸のピークの減少および4-VGのピークの増加が確認され、フェルラ酸から4-VGへの変換活性を有す

ると考えられた。それぞれの菌種におけるフェルラ酸から4-VGへの変換活性はいずれの株も高く、今回の評価方法では、その強さに大きな差は見られなかった。また、今回、推定した種名が同じ生酸菌はフェルラ酸から4-VGへの変換活性の有無に違いは見られなかった。

次に、これらのうち、食品生産への応用を考慮してアメリカ食品医薬品局 (FDA) より食品添加物に与えられる安全基準合格証 GRAS に含まれ安全性が高い種と判断できる *Lactococcus lactis* に注目し、標準株である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007 について、同様に活性を評価したところ、フェルラ酸から4-VGへの変換活性が確認された (Fig. 3)。従って、フェルラ酸から4-VGへの変換活性は *L. lactis* が

Table 1 Estimate of the species of acid-producing bacteria isolated from Awamori mash and their ferulic acid (FA) assimilation activity.

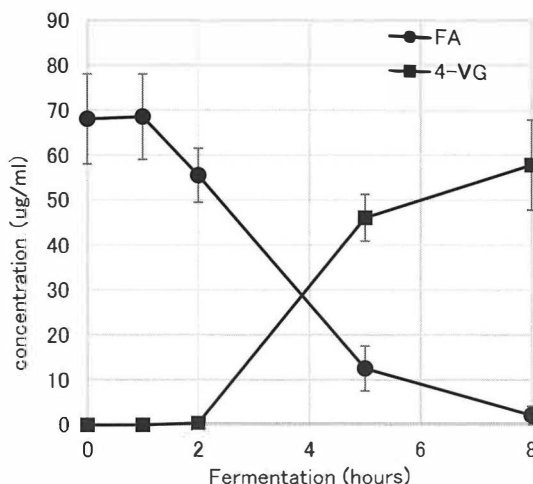
The numbers indicate the number of strains isolated from each sample.

Species	Brewery				FA to 4-VG	FA to DFA
	a	b	c	d		
<i>Bacillus</i> sp. 1	—	3	7	—	—	—
<i>Bacillus</i> sp. 2	—	2	1	—	+	—
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	—	—	—	—	—
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	3	—	—	—	—
<i>Lactobacillus casei</i>	2	7	—	—	—	—
<i>Lactobacillus fermentum</i>	—	6	—	10	—	—
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	8	1	—	8	—	+
<i>Lactococcus lactis</i>	2	—	—	2	+	—
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	—	—	—	1	—	—
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	—	—	9	2	+	—

広く保有する特性と考えられた。

一方, *Lactiplantibacillus plantarum* に分類された株では, フェルラ酸の減少とともに 4-VG 以外の物質の増加が観察された。乳酸菌は, フェルラ酸などのフェノール酸を様々な物質に代謝することが知られており¹³⁾, *L. plantarum* についてはフェルラ酸からジヒドロフェルラ酸 (dihydroferulic acid, DFA) を生成することが報告されている¹⁵⁾。このことから, DFA の標準品を用いて HPLC による保持時間と UV スペ

クトルから判断したところ, 増加した成分は DFA であると考えられた (Table 1)。さらに, 標準株である *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891 を用いて, フェルラ酸を添加した培地で培養を行い培養前後の HPLC での分析結果を比較したところ, 顕著なフェルラ酸のピークの減少および DFA のピークの増加が確認された。従って, フェルラ酸から DFA への変換活性は *L. plantarum* が広く保有する特性と考えられた。一方, 泡盛もろみに約 100 µg/ml の DFA (もろみのフェルラ酸濃度の約 10 倍) を添加し蒸留したところ, 蒸留液で DFA は検出されなかったことから (検出限界 0.5 µg/ml), もろみに含まれる DFA は蒸留液に移行せず, 泡盛は DFA を含有しないと考えられた。

**Fig. 3** Conversion activity of ferulic acid (FA) to 4-VG in MRS medium of *L. lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007.

The values are the means and standard deviations of results from three experiments.

4. 小仕込み試験による乳酸菌の影響の解析

泡盛もろみでのフェルラ酸から 4-VG 変換に対する乳酸菌の影響を検討するため, 実験室規模での小仕込み試験を行った。仕込時に, *L. lactis* K2, あるいは *L. plantarum* K34 を 1×10^5 cells/ml となるように添加し, 発酵試験を行った。その結果, 発酵過程のアルコール濃度は, いずれも 2 日経過以降で上昇し, これらの乳酸菌の添加による大きな差異は見られなかった (Fig. 4A)。乳酸菌数は, 2 日経過以降で急激に低下し, 5 日後以降ではいずれの株も検出されなかった (Fig. 4B)。このことから, 添加した乳酸菌は, アルコール濃度の上昇に伴い死滅したと考えられた。フェルラ酸濃度は, K2 株では添加無しと比較して約半分, K34

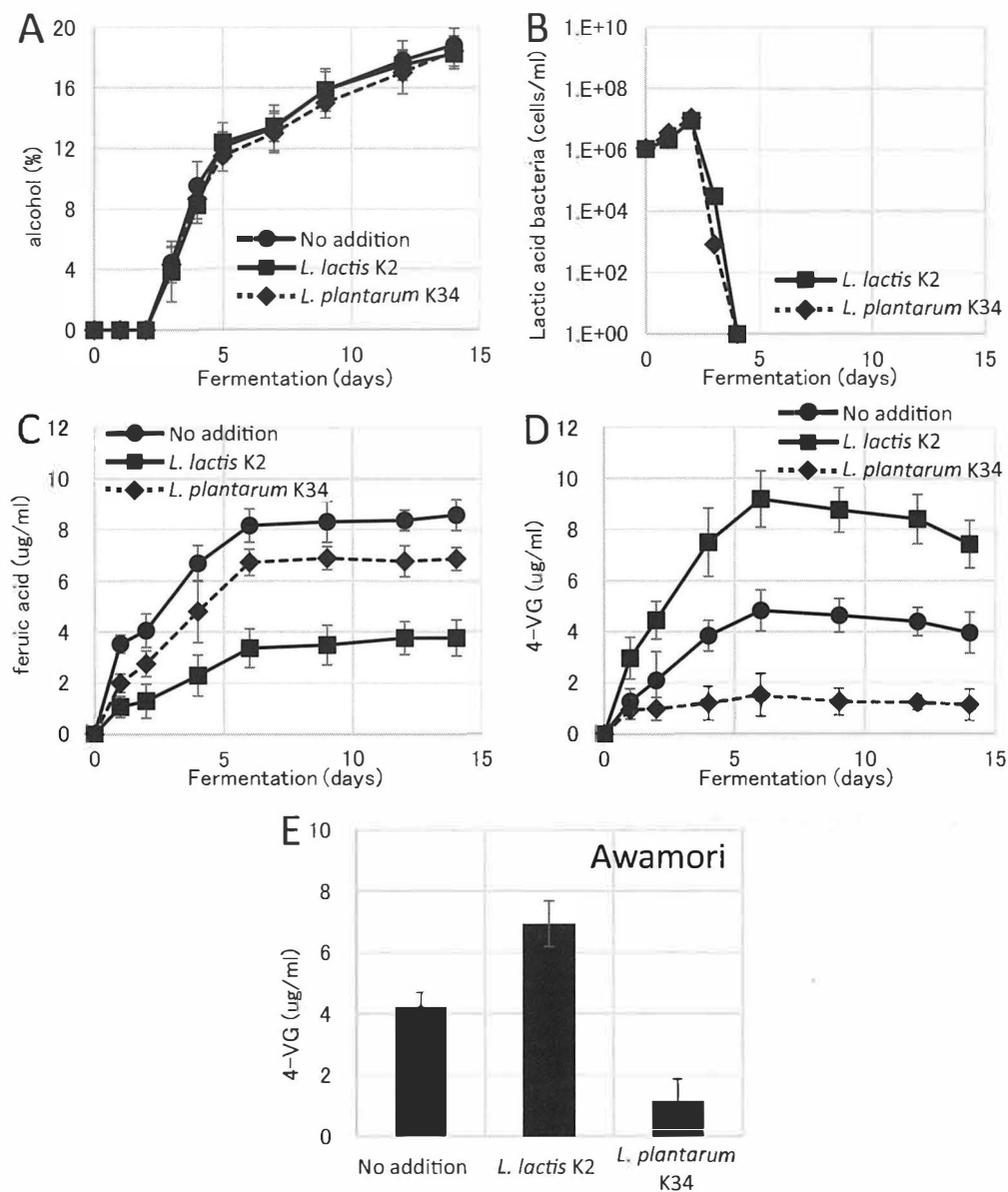


Fig. 4 The effects of added lactic acid bacteria using small scale fermentation.

(A-D) Results of mash, (A) alcohol concentration, (B) Number of lactic acid bacteria, (C) Ferulic acid concentration, (D) 4-VG concentration, (E) 4-VG concentration in Awamori. The 4-VG values of Awamori show the conversion value of alcohol concentration of 30%.

The values are the means and standard deviations of results from three experiments.

株では8割程度で推移し、4-VG濃度は、K2株では添加無しと比較して約2倍、K34株では半分以下の値で推移し、それぞれの乳酸菌のフェルラ酸に対する特性が泡盛もろみにおいても確認された (Fig. 4C, 4D)。

一方、K2株での4-VG濃度は発酵後半で減少傾向が観察された (Fig. 4D)。実機ではこのような減少は見られないこと (Fig. 2B) から、過剰な乳酸菌の存在やスケールの規模など小仕込み試験固有の条件の違い

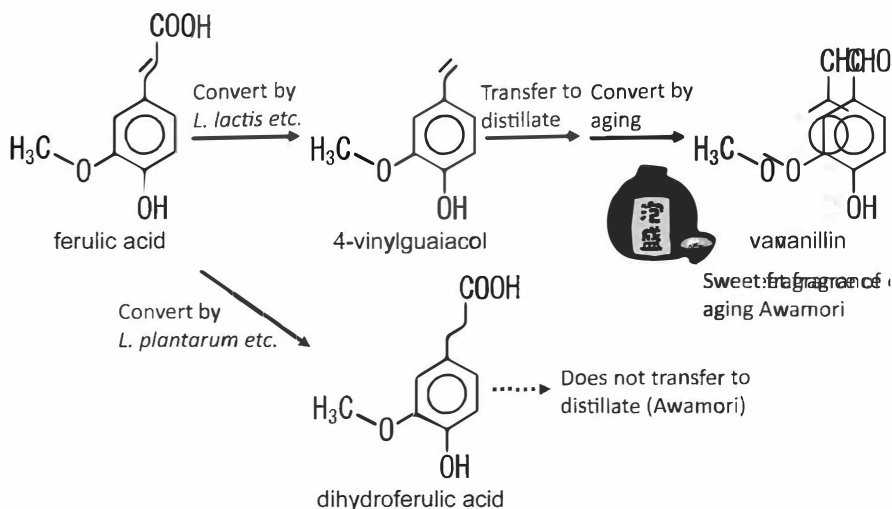


Fig. 5 Effects of lactic acid bacteria in Awamori mash on vanillin production

が影響していることが考えられた。また、これらのもろみを蒸留し、泡盛の 4-VG 濃度を評価したところ、K2 株では添加無しの約 1.6 倍、K34 株では半分以下であり、乳酸菌の影響が泡盛においても確認された (Fig. 4E)。

以上の結果から、もろみ中の乳酸菌は、*Lactococcus lactis* など 4-VG 濃度を上昇させる方向に働く菌と、*Lactiplantibacillus plantarum* のようにフェルラ酸を 4-VG 以外の物質に変換し、結果として 4-VG 濃度上昇の抑制に働く菌の存在が確認され、それぞれ泡盛のバニリン濃度に影響を及ぼしていることが強く示唆された (Fig. 5)。また、*Lactococcus lactis* については、アルコール濃度への影響はほとんど見られず 4-VG 濃度を上昇できることから、泡盛もろみの 4-VG 濃度を高める新たな醸造技術として活用が期待できると考えられた。

要 約

泡盛の大きな特徴の 1 つに熟成することで香味が向上し芳醇な香りとなることがある。この古酒香の成分の 1 つであるバニリンは、泡盛の醸造工程でフェルラ酸から 4-VG に変換され、熟成中に 4-VG からバニリンが生成すると報告されている。今回、フェルラ酸から 4-VG への変換について、泡盛もろみ中の生酸菌の影響を評価した。まず、4 酒造所のもろみにおける生酸菌数、フェルラ酸濃度、4-VG 濃度の推移を評価し

た。生酸菌数は、発酵初期に多い傾向が観察されたものの、酒造所による差異が大きかった。フェルラ酸濃度は、比較的酒造所間の差が小さい一方で、4-VG 濃度は 4 倍以上の差が確認された。

これらの酒造所から生酸菌を分離し、16S rDNA 配列による同定を行ったところ、これまで酒造のもろみで多く確認されている *Lactobacillus* 属とともに、*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Propionibacterium acidipropionici* などいくつかの種が確認され、確認された種は酒造所ごとの違いが大きかった。得られた乳酸菌についてフェルラ酸の変換活性を評価したところ、*Bacillus* sp. 2, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus gallinarum* に分類された株はフェルラ酸から 4-VG への変換活性を有すると考えられるとともに、*Lactiplantibacillus plantarum* に分類された株では、ジヒドロフェルラ酸 (DFA) に変換されると考えられた。また、標準株である *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007, および *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* NBRC 15891 がそれぞれフェルラ酸から 4-VG あるいは DFA への変換能を有すると考えられた。

泡盛もろみから採取された *L. lactis* K2, あるいは *L. plantarum* K34 を添加した小仕込み試験を行ったところ、アルコール推移の低下は観察されないこと、添加した乳酸菌は 2 日経過以降で急速に減少することが確認された。さらに、*L. lactis* K2 を添加すること

で 4-VG の推移の増加が確認され、*L. plantarum* K34 を添加することで減少が確認された。これらの結果から、泡盛の発酵過程においてもろみ中の乳酸菌の 4-VG 濃度への影響が示唆されるとともに、もろみ乳酸菌の添加は 4-VG 濃度を上昇させる新たな泡盛醸造技術として可能性があると考えられた。

謝 辞

本研究の解析に用いた試料を分与いただいた各泡盛酒造所に感謝する。菌株は、(独)製品評価技術基盤機構より分譲された。

参考文献

- 1) 佐藤宣之：醸協，**108** (10)，700-706 (2013)
- 2) 小関卓也，岩野君夫：醸協，**93** (7)，510-517 (1998)
- 3) T. Shinohara, S. Kubodera, and F. Yanagida : *J. Biosci. Bioeng.*, **90** (1), 90-97 (2000)
- 4) S. van Beek and F. Priest : *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** (12), 5322-5328 (2000)
- 5) 向井伸彦，岡田明彦，鈴木昭紀，高橋利郎：醸協，**93** (12)，967-975 (1998)
- 6) 金桶光起：醸協，**109** (5)，320-326 (2014)
- 7) 向井伸彦，木曾邦明，家藤治幸：醸協，**100** (11)，832-835 (2005)
- 8) M. Maeda, M. Motosoko, T. Tokashiki, J. Tokashiki, O. Mizutani, K. Uechi, M. Goto, T. Taira : *J. Biosci. Bioeng.*, **130** (4), 352-359 (2020)
- 9) 百瀬洋夫，内山奈々，藤倉寛子：醸協，**92** (6)，452-457 (1997)
- 10) 竹下淳子，工藤哲三，山本英樹，水谷政美，柏田雅徳：宮崎県食品開発センター研究報告，**49**，119-125 (2004)
- 11) 宮川博士，鈴木恵利香，小境敏輝，河野邦晃，岩井謙一，高瀬良和：醸協，**111** (6)，405-411 (2016)
- 12) 稲橋正明，戸塚堅二郎，相良沙奈恵，田中裕三，岡崎直人，石川雄章，佐藤和夫：醸協，**109** (8)，603-612 (2014)
- 13) 遠藤明仁：醸協，**107** (2)，92-99 (2012)
- 14) A.F. Sanchez-Maldonado, A. Schieber and M. G. Gänzle : *J. Appl. Microbiol.*, **111**, 1176-1184 (2011)
- 15) L. Svensson, B. Sekwati-Monang, D. Lopes Lutz, A. Schieber, M. G. Gänzle : *J. Agric. Food Chem.*, **58** (16), 9214-9220 (2010)