

# 焼酎酵母の代謝産物（焼酎の香気成分）

## の網羅的解析



水光正仁（農学部）

田辺公子（機器分析センター）

### 要旨

これまでに、本格焼酎の香気成分についての報告はあるが、特徴香については芋焼酎のみであり、他の焼酎については特徴香を見いだすまでに至っていない。近年、香気成分の分析手法や、分析機器の改良等で様々な香気成分が明らかとなった。しかし、ソバ焼酎についての香気成分は報告が殆どないのが現状である。そこで、今回は現在、香気成分分析の主流となっているポーラスポリマービーズを用いた固相抽出法、GC-におい嗅ぎ装置、GC-MSでソバ焼酎の香気成分の同定を行ったのでここに報告する。

#### 1. 緒言

酵母の全ゲノム配列が決定されて既に5年が経過している。しかしながらいまだに焼酎醸造に関しては職人的な経験と勘が大きな比重を占め、焼酎酵母に関する分子レベルでの系統だった研究は行われていない。そこで本研究において、本格焼酎の特性を決定している要因を焼酎酵母を分子（代謝産物）レベルで網羅的に解析した。

今年度は特に酵母の代謝産物の中で焼酎の特性を決定する一番の要因である香気成分に関してソバ焼酎と米焼酎に含まれる成分を比較した。

#### 2. 実験方法

##### 焼酎試料の作成

ソバ焼酎原料は中国産を使用。麴は麦麴（白麴）を使用。麦麴に水、酵母を加え5日間発酵させ、酒母を作成した。掛け原料ソバは脱殻、グリッツ状に処理後散水、蒸し後酒母に添加して10日間発酵した。発酵工程終了後、減圧蒸留を実施し焼酎原酒を得た。これを、アルコール10%に希釈したものを濃縮工程用サンプルとした。米焼酎は麴、掛け原料共に米を使用した。発酵工程及び、麴、酵母は全てソバ焼酎と同様である。

##### 香気成分の濃縮

ポーラスポリマービーズ（50-80メッシュ、Porapak Q樹脂、Waters社製）は前処理工程として、ヘキサンを溶媒とするソックスレー抽出法により精製した後、40ml

をガラスフィルター付きのガラスカラム (20cm×3.0cm i.d.) に充填し、メタノール 80ml、エーテル 80ml、脱イオン水 160ml で洗浄後使用した。Alc.10%サンプル 1000ml をカラムに流して成分を樹脂に吸着させた後、エーテルで成分の回収を行った。得られた抽出物は pH 分画処理を行い、それぞれ塩基性、弱酸性、酸性、中性の 4 画分に分画した。得られたエーテル溶液は無水硫酸ナトリウムで脱水後、窒素気流下で約 1ml まで濃縮し機器分析あるいは匂い嗅ぎ装置用試料とした。

### 分析方法

#### i) GC分析及びGC-匂い嗅ぎ装置 (GC-olfactometry)

装置として島津 GC-18A ((株) 島津製作所製) を用い、検出器は FID (水素炎イオン化検出器) を使用した。カラムは DBWAXetr (J&W 製、長さ 30ml、内径 0.25mm、膜厚 0.25 $\mu$ m) を用い、導入口温度 260 $^{\circ}$ C、検出口温度 260 $^{\circ}$ Cとした。昇温プログラムは 70 から 240 $^{\circ}$ Cまでを 3 $^{\circ}$ C/min. で昇温した。キャリアーガスはヘリウムガスを使用し、スプリット比 1/50、圧力 150kpa、カラム内線速度は 42.5cm/sec.とした。検出器の出口にガラス製の匂い嗅ぎ装置を接続した。匂い嗅ぎ装置は検出器から溶出する匂い成分の滞留を防ぐために約 100ml/min の加湿した空気を流した。

#### ii) GC-MS

質量分析計は JMS-AX505 (日本電子データム (株)、EI 法) は使用した。GC (ヒューレットパッカード製) は FID を検出器とし、スプリットレス、注入温度 200 $^{\circ}$ C、イオン源温度 250 $^{\circ}$ C、昇温条件及びカラムは GC と同じで行った。香気成分の同定は質量スペクトル、相対保持時間法を用いて行った。

### 3. 結果及び考察

pH分画の分析結果からは中性画分に 27 の香気成分が同定あるいは推定された。また全ての画分について匂い嗅ぎ装置で香りの官能的分析を行った (表 1、図 1、図 2)。その結果、図 1 の No.33 がソバ粉の特徴香に非常に近い香りであった。No.33 は GC-MS、相対保持時間法の同定結果より、カプリル酸エチルと同定された。ソバ粉の主要香気成分の 1 つである n-ヘキサナールが焼酎酵母の影響を受けカプリル酸エチルに代謝されたと推測できる。しかし、標準試薬を使用した確認 GC-匂い嗅ぎ装置の官能結果は同一の香りと結論づけることが出来なかった。ソバ焼酎はソバ麴の製麴方法が確立されておらず、米又は麦麴を使用して掛け原料でソバを使用している。そのためソバ焼酎の香りが麴あるいは掛け原料のどちらから代謝産物として生み出されたのか明らかでない。そこで対照として米焼酎の分析を行い、26 の香気成分が同定あるいは推定された。図 2 の No.38 は GC-MS、相対保持時間法の同定結果よりカプリル酸エチルであるが、GC-匂い嗅ぎ装置の分析結果では図 1 の No.33 やカプリル酸エチル標準試薬とも異なる香りであることから、更に多方面の分析が今後必要である。これまでの報告ではソバ粉の主要香気成分は脂肪酸アルデヒド類の n-ヘキサナール、n-ノナナール、n-オクタナールが報告されている。パン酵母を有酸素条件下におくと、n-ヘキサナールがヘキサノ酸 (カプロン酸) に

酸化される代謝経路が報告されている。今回のソバ焼酎の香気成分と推測されるカプリル酸エチルに関しても、カプリル酸（オクタン酸）が構造的にもn-ヘキサナールと同様に代謝されることが推測される。また脂肪酸のエチルエステル化については焼酎酵母の重要な代謝経路の一つであることを考えると、ソバ原料の主要香気成分であるn-オクタナールが発酵工程でカプリル酸エチルに代謝されることが仮定できる。

### 3. 将来展望

今後は穀類原料が酵母、麹の影響でどのような香気成分へ代謝されるのか更なる分析が必要である。またこれら香気成分の生合成経路に関わる酵素に関する遺伝子及びタンパク質の網羅的解析から得られた結果と実際に焼酎の特性を決定づけている香気成分の生成量の関係を明らかとする。また分析方法としても、香気成分の解析に使用したガスクロマトグラフィー以外に、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）の使用、さらに最近代謝産物の網羅的解析（メタボローム解析）において有用とされているキャピラリー電気泳動の導入を検討している。

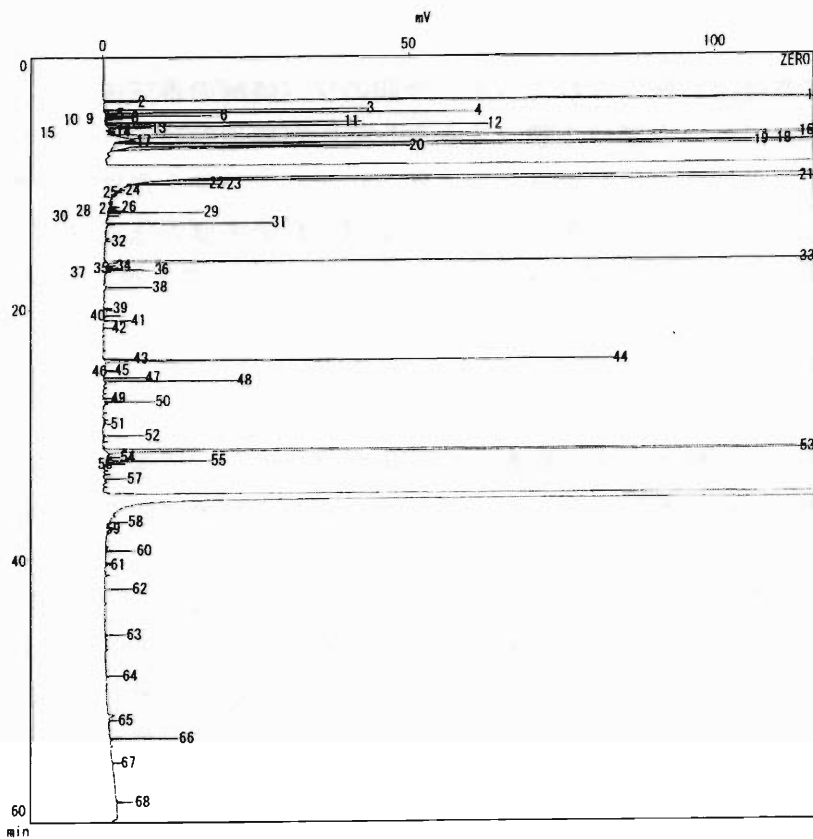


図1 ソバ焼酎の香気成分のクロマトグラム

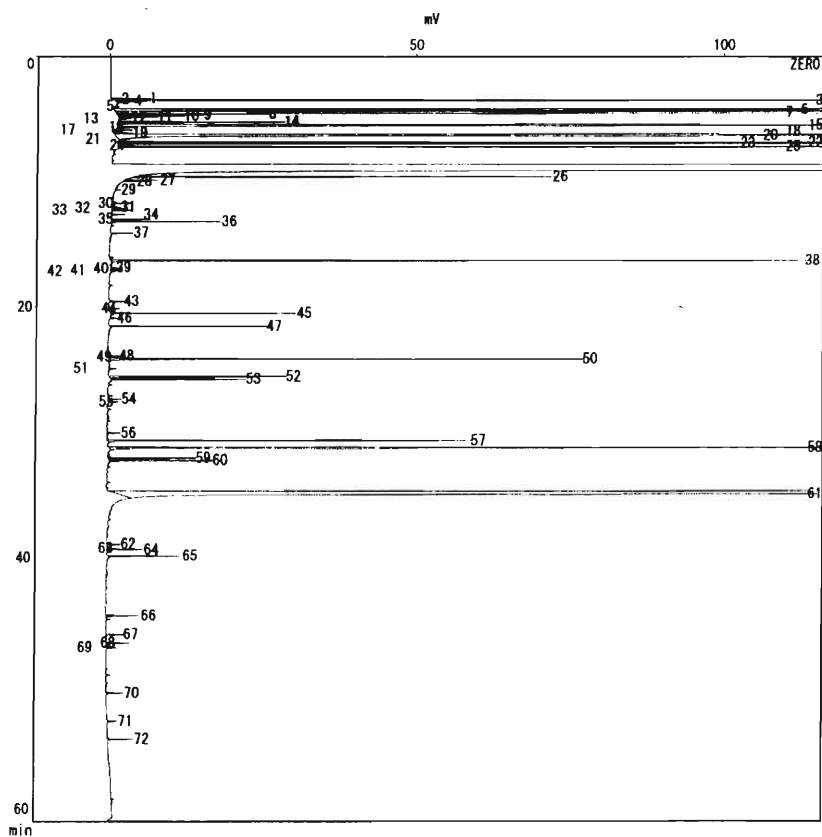


図2 米焼酎の香気成分のクロマトグラム

表1 ソバ焼酎及び米焼酎の揮発性成分

ソバ焼酎		米焼酎	
ピーク No.	揮発性成分	ピーク No.	揮発性成分
4	酢酸エチル	14	2-フタノール
17	アリアルアルコール	16	n-プロピルアルコール
33	カプリル酸エチル	21	アリアルアルコール
36	1-ヘプタノール	22	カプリル酸エチル
38	エチルヘキサノール	37	4-オクタノール
40	リナロール	38	カプリル酸エチル
41	n-オクタノール	40	1-ヘプタノール
44	カプリル酸エチル	45	リナロール
46	1-オクテン-3-オール	46	n-オクタノール
47	安息香酸エチル	50	カプリル酸エチル
48	コハク酸ジエチル	51	1-オクテン-3-オール
50	メチオノール	52	安息香酸エチル
51	シトロネロール	53	コハク酸ジエチル
52	フェニル酢酸エチル	54	メチオノール
53	酢酸βフェネチル	56	フェニル酢酸エチル
55	ラウリン酸エチル	57	ネロール
56	ゲラニオール	58	酢酸βフェネチル
57	ベンジルアルコール	59	ラウリン酸エチル
58	ネロリドール(+)	60	ゲラニオール
60	ミスチン酸エチル	57	ベンジルアルコール
61	カプリル酸	64	ミスチン酸エチル
62	桂皮酸エチル	65	カプリル酸
63	パルミチン酸エチル	67	パルミチン酸エチル
64	ファルネソール	68	カプリル酸
65	オレイン酸エチル	71	オレイン酸エチル
66	リノール酸エチル	72	リノール酸エチル
68	オレイン酸		