大麦焼酎の醸造工程における γ -アミノ酪酸及び S-アデノシルメチオニンの生成

外蘭英樹¹・猫垣加奈子¹・梶原康博¹・高下秀春¹・岡崎直人¹・大森俊郎^{1,2}

(¹三和酒類株式会社・²株式会社大麦発酵研究所)

平成 17 年 7 月 8 日受理

Production of γ -aminobutyric acid and S-adenosylmethionine in barley-*shochu* making

Hideki HOKAZONO¹, Kanako NEKOGAKI¹, Yasuhiro KAJIWARA¹, Hideharu TAKASHITA¹, Naoto OKAZAKI¹ and
Toshiro OMORI^{1,2}

(¹Sanwa Shurui Co. Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa 879-0495

²Barley Fermentation Technologies, Inc., 2211 Yamamoto, Usa 879-0467)

We examined concentrations of γ -aminobutyric acid (GABA) and S-adenosylmethionine (SAME) in barley-*shochu* mash and the barley-*shochu* distillation residue of a different *koji* ratio. The concentrations of both GABA and SAME in barley-*shochu* mash depended on the *koji* ratio. Although the level of GABA concentration in barley-*shochu* mash was almost constant, the concentration of SAME increased in proportion to the ratio of yeast death. Furthermore, SAME was detected only in the residue from the vacuum distillation process, while GABA was found in both atmospheric and vacuum distillation residues. About 70% of SAME in barley-*shochu* mash remained after the vacuum distillation process.

Key words : 大麦焼酎, γ -アミノ酪酸, S-アデノシルメチオニン

緒 言

本格焼酎の生産に際して年間約 50 万トン副生する焼酎粕の効率的処分法又は未利用資源としての有効利用法に関する研究開発が各方面で行われている。そこでの研究成果や近年の健康志向の高まりを背景に、焼酎粕中に豊富に含まれるクエン酸やアミノ酸の機能性を利用した健康飲料が広く市販されるようになった^{1,2)}。我々はこれまでに、大麦焼酎生産に際して副生する焼酎粕の機能性に関する検討を行っており³⁻⁶⁾、機能性に関与する物質の同定や作用機序解明等が現状の課題となっている。

γ -アミノ酪酸 (以下, GABA) は、自然界に広く

分布するアミノ酸の一種で、哺乳類中では中枢神経系における抑制性の神経伝達物質である。医薬品としては、脳卒中や脳動脈硬化症、頭部外傷後遺症による頭痛、耳鳴り、意欲低下などの治療に用いられており、その他にも血圧降下作用、精神安定作用、記憶学習能向上作用など多岐に亘る機能性が報告されている。最近では血圧が高めの人に適する特定保健用食品の関与成分として注目されている⁷⁾。これまでに、醸造品における GABA に関しては、味噌⁸⁾や清酒^{9,10)}の製造工程における GABA の由来や挙動について報告されている。また、各種焼酎粕中には高濃度の GABA が含まれており、特に大麦焼酎粕中の含量が高いことが明らかとなっている¹¹⁾。

一方、たんぱく質や核酸など生体分子のメチル化反応のメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン（以下、SAmE）は、酵母の液胞中に蓄積され、死滅により漏出することが知られている。SAmE の生理作用として、うつ病¹²⁾、関節炎¹³⁾、肝障害¹⁴⁾ 等の治療効果が報告されている。醸造品の SAmE に関しては、主に品質管理の観点から、清酒醸造工程における報告が幾つかなされている^{15~18)}。アルコールが除かれた焼酎蒸留粕中に SAmE が保存されていれば、機能性食品素材としての焼酎粕の利用が更に拡がることが期待される。

今回我々は、大麦焼酎醸造における機能性物質 GABA 及び SAmE のもろみ中の経時的な生成挙動、並びに、蒸留粕中の保存状況について、麹歩合や蒸留法の観点から検討したので報告する。

実験方法

1. 実験試料

実験には 65% 精麦の二条大麦（豪州産）を使用した。大麦麹は常法により調製した麹を用いた。

2. 小仕込試験

精麦大麦を用い、Table 1 に示す仕込配合でラボスケールの大麦焼酎もろみを製造した。1 次もろみは 100 g の大麦麹、120 ml の水及び鹿児島焼酎酵母（Ko）を 1 仕込み当たり 1×10^8 個接種し、25°C で 5 日間発酵させた。2 次もろみは 1 次もろみにそれぞれ 0, 100, 200 g の大麦麹、200, 100, 0 g の蒸麦及び水 330 ml を加え、25°C で 10 日間発酵させた。2 次最終もろみは、常圧又は減圧条件下にて蒸留を行った¹⁹⁾。

なお、麹歩合は全原料量に対する麹原料量の割合と定義し、麹歩合 33%（一般的な仕込配合）、67%、100%（全麹仕込）のそれぞれ 3 本ずつ仕込を行った。

3. 分析用サンプルの調製

適量のもろみ又は蒸留残液をガーゼ濾過することにより濾液を得た。この濾液を用いてもろみ中の総菌数、生菌数を測定した。遊離アミノ酸、GABA 及び SAmE の測定は、この濾液を遠心分離（3000 rpm、10 分間）した上清を孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター（ADVANTEC 社製）で濾過することにより調製したサンプルを用いた。

酵母中 SAmE を測定するため、蒸留前後のもろみ 100 ml を遠心分離（3000 rpm、10 分間）し、回収した沈澱を 100 ml の蒸留水で 2 回洗浄後、後藤ら¹⁷⁾ の方法に従って SAmE を漏出させた。すなわち、回収した沈澱をアルコール濃度 30%、1% グルコース、0.1 M 酢酸緩衝液（pH 4.3）100 ml 中に 30°C で 3 時間保持して SAmE を漏出させた。

4. 分析方法

ガーゼ濾液を適宜希釈し、総菌数を検鏡法により測定した後、生菌数は 0.01% メチレンブルー染色液を用いて測定した。

遊離アミノ酸及び GABA 濃度は、日立アミノ酸自動分析計 L-8500（ニンヒドリン法）を用いて測定した。

SAmE 濃度は、SIGMA 社製 S-(5'-Adenosyl)-L-methionine chloride を標準とし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて分析した。分析条件を以下に示した。装置；Waters Alliance 2695（Waters 社製）、カラム；Hydrosphere C18（5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm I.D.；YMC 社製）、カラム温度；37°C、移動相；20 mM リン酸緩衝液（pH 3.5）、流速；1 ml / min、検出波長；254 nm、検出器；Waters 2487 UV/VIS Detector（Waters 社製）、サンプル注入量；8 μ l。

Table 1 Composition of raw materials for fermentation test.

Koji ratio* (%)	Seed mash		Main mash		
	Barley-koji (g)	Water (ml)	Barley-koji (g)	Steamed barley (g)	Water (ml)
33 (Standard)	100	120	0	200	330
67	100	120	100	100	330
100 (All koji)	100	120	200	0	330

*Koji ratio indicates % of koji weight to the total material weight.

5. 統計処理

実験データは全て平均値±標準偏差で示し、平均値の有意差検定は、Tukey の HSD 検定を用いた。

結果及び考察

1. 大麦焼酎もろみ上清の GABA 及び SAmE 濃度

麴歩合の異なる大麦焼酎もろみについて、上清中の GABA 及び SAmE 濃度の経時変化を Table 2 に示した。

もろみ上清の GABA 濃度は、サンプリングを開始した 2 次仕込 2 日目（1 日経過）時点から麴歩合間での有意差が認められ、もろみ末期まで一定濃度で推移した。原料である大麦及び大麦麴をそれぞれ塩酸加水分解した時の遊離 GABA 濃度を測定した結果、大麦が 3.3 mg/100 g（乾燥重量）であるのに対して、大麦麴は 33.3 mg/100 g（乾燥重量）であったことから、

製麴過程で麴菌により GABA が生成されていることが裏付けられた。一方、もろみ上清における GABA は、麴菌の死滅に伴い新たな生成がストップすること、及び、酵母が増殖における窒素源として GABA をあまり利用しないことに基因し、一定濃度で推移したものと考えられた^{20,21)}。

もろみ上清の SAmE 濃度は、2 次仕込 5 日目以降で麴歩合間の有意差が観察された。結果には示していないが、メチレンブルー染色率及び遊離メチオニン濃度の上昇と高い相関で、SAmE 濃度が上昇した（それぞれ $r=0.881$, $r=0.904$ ；ともに $p<0.001$ ）。なお、仕込中の各時点における酵母数は、麴歩合間で差異がなかった。

2. 大麦焼酎蒸留残液上清の GABA 及び SAmE 濃度

麴歩合の異なる大麦焼酎蒸留残液について、上清中

Table 2 Time course of GABA and SAmE concentrations in barley-*shochu* main mash. (ppm)

<i>Koji</i> ratio		Fermentation time (day)					
(%)		1	2	4	6	8	9
GABA	33	86.0± 3.6 ^a	85.4± 4.6 ^a	85.9± 6.0 ^a	93.0± 1.7 ^a	104.2± 4.3 ^a	105.6± 2.7 ^a
	67	145.9± 0.9 ^b	135.9± 8.6 ^b	141.8±14.6 ^b	141.7±16.2 ^b	155.9±31.1 ^b	146.8±39.6 ^{ab}
	100	180.7±28.3 ^b	183.2±22.2 ^c	183.0±25.0 ^b	185.3± 5.5 ^c	190.8±12.6 ^b	200.6± 9.9 ^b
SAmE	33	3.8± 0.8	3.9± 0.7	4.5± 0.3 ^a	5.4± 1.5 ^a	6.7± 1.0 ^a	6.2± 2.1 ^a
	67	3.6± 0.8	4.2± 1.1	7.9± 1.0 ^b	9.4± 2.2 ^{ab}	13.2± 1.0 ^b	14.6± 1.6 ^b
	100	4.6± 1.6	5.6± 1.7	10.5± 2.0 ^b	13.0± 4.1 ^b	18.2± 3.2 ^b	19.4± 2.5 ^b

Values represent means±SD (n=3). Values for each sample with different letters in the same fraction are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's HSD test.

Table 3 Concentrations of GABA and SAmE in various barley-*shochu* residues. (ppm)

	<i>Koji</i> ratio (%)	Atmospheric distillation residue	Vacuum distillation residue
GABA	33	196.9±31.2 ^a	273.7±40.0 ^a
	67	305.9± 4.7 ^b	354.9±36.2 ^a
	100	467.0±26.6 ^c	503.2±36.5 ^b
SAmE	33	N. D.	26.1± 0.1 ^a
	67	N. D.	39.9± 0.9 ^b
	100	N. D.	45.7± 0.5 ^c

Values represent means±SD (n=3). Values for each sample with different letters in the same fraction are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's HSD test. N. D. ; Not detected.

の GABA 及び SAME 濃度を Table 3 に示した。

蒸留残液上清の GABA 濃度は、もろみ上清の結果と同様に、麴歩合の上昇に伴い高くなった。常圧・減圧いずれの蒸留条件においても同様の傾向が観察され、全麴仕込によって、普通仕込の約 2 倍に GABA を富化することが可能であった。

次に、麴歩合の異なる大麦焼酎蒸留残液の上清中 SAME 濃度を測定した。常圧蒸留残液の上清については SAME が検出されなかったことから、蒸留時の加熱によってメチルチオアデノシン等に分解されたものと推察された。減圧蒸留残液の上清 SAME 濃度は、蒸留前のもろみ上清で観察された差と同様、麴歩合に依存して高かった。減圧蒸留時の加熱条件（60°C、約 2 時間）においては、SAME はある程度保存されていることが明らかとなった。

3. 大麦焼酎もろみ（1 l 分）とその減圧蒸留残液における SAME の量と局在

大麦焼酎もろみの減圧蒸留残液にどの程度 SAME が保存されているか、また、その局在を明らかにするため、蒸留前後における上清及び沈澱の SAME 量を測定した。すなわち、蒸留前もろみ 1 l 分の上清及び沈澱から抽出した SAME 量（蒸留前 SAME 総量）と、

蒸留後の上清及び沈澱 SAME 量（蒸留後 SAME 総量）を、麴歩合ごとに算出した結果を Fig. 1 に示した。この結果より、各麴歩合（33%、67%、100%）の蒸留前 SAME 総量を 100% とした場合、蒸留後ではそれぞれ 70%、72%、70% であった。すなわち、減圧蒸留工程において、麴歩合に関わらず約 3 割の SAME が分解していることが明らかとなった。また、減圧蒸留工程における酵母死滅に伴い、SAME が上清中に漏出されていることが確認された。

以上の結果から、大麦焼酎もろみ中の機能性物質 GABA 及び SAME 濃度は、麴歩合に依存して高くなることが確認された。また、SAME は減圧蒸留残液中にのみ確認されたことから、各種製法により副生される大麦焼酎蒸留残液を、それぞれの用途に応じて利用する可能性が示唆された。今後、*in vivo* における機能性の検証が必要と考えている。

おわりに、本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言を賜りました独立行政法人酒類総合研究所の家藤治幸氏に深謝致します。

要 約

大麦焼酎醸造における機能性物質 GABA 及び

Fig. 1 The amount and localization of SAME in barley-shochu mash (1 l) and residue (from vacuum distillation).

SAMe のもろみ中の経時的な生成挙動、並びに、蒸留残液中の保存状況について検討した。その結果、大麦焼酎もろみ中の GABA 及び SAMe 濃度は、麴歩合に依存して高くなることが確認された。また、GABA がもろみの初期から末期まで一定量で推移するのに対して、SAMe は酵母死滅に伴い経時的に上昇することを確認した。さらに、GABA は常圧・減圧双方の蒸留残液中に検出されたのに対して、SAMe は減圧蒸留残液にのみ検出され、蒸留前の約 70% が保存されていることが明らかとなった。

文 献

- 1) 石川信夫：醸協，**95**，520-525 (2000)
- 2) 竹嶋直樹：FOOD Style 21, **9**(2), 53-54 (2005)
- 3) 望月 聡，宮本安紀子，萩原美和子，竹嶋直樹，大森俊郎：醸協，**96**，559-563 (2001)
- 4) 梅木美紀，安東史子，岩橋妙子，外菌英樹，林圭，大森俊郎，望月 聡：日本食物繊維研究会誌，**7**，81-88 (2003)
- 5) 大森俊郎：醸協，**99**，398-403 (2004)
- 6) 望月 聡，宮本安紀子，大神彩子，甲斐千晴，大島孝平，田中寿一，外菌英樹，竹嶋直樹，大森俊郎：醸協，**100**，135-140 (2005)
- 7) 梶本修身，平田洋，西村明：健康・栄養食品研究，**6**，51-64 (2003)
- 8) 宮間浩一，阿久津智美，渡邊恒夫，岡本竹己：醸協，**92**，689 (1997)
- 9) 片岡浩平，岩井洋子，家村芳次，原昌道：醸協，**91**，658 (1996)
- 10) 高橋俊成，岩井洋子，溝口晴彦，原昌道：平成 12 年度日本生物工学会大会要旨集，62 (2000)
- 11) 土谷紀美，松田豊和，西村賢了，岩原正宜：醸協，**98**，132-138 (2003)
- 12) Bressa GM. : *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, **154**, 7-14 (1994)
- 13) Glorioso S, Todesco S, Mazzi A, Marcolongo R, Giordano M, Colombo B, Cherie-Ligniere G, Mattara L, Leardini G, Passeri M, Cucinotta D. : *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.*, **5**, 39-49 (1985)
- 14) Mato JM, Camara J, Fernandez de Paz J, Caballeria L, Coll S, Caballero A, Garcia-Buey L, Beltran J, Benita V, Caballeria J, Sola R, Moreno-Otero R, Barrao F, Martin-Duce A, Correa JA, Pares A, Barrao E, Garcia-Magaz I, Puerta JL, Moreno J, Bois-sard G, Ortiz P, Rodes J. : *J. Hepatol.*, **30**, 1081-1089 (1999)
- 15) 蓼沼誠，高橋康次郎，佐藤信：醸協，**70**，581-584 (1975)
- 16) 蓼沼誠，高橋康次郎，林積徳，佐藤信：醸協，**70**，585-587 (1975)
- 17) 後藤邦康，土肥和夫：醸協，**87**，230-234 (1992)
- 18) 進藤齊，土井弥市，麻布暁史，坂野和章，角田潔和，吉沢淑，小泉武夫：醸協，**93**，389-395 (1998)
- 19) 大森俊郎，岩田太輔，梅本泰史，辻本祥子，下田雅彦，幡手泰雄：醸協，**89**，726-731 (1994)
- 20) 岩野君夫，伊藤俊彦，長谷川恵美子，高橋和弘，高橋仁，中沢伸重：醸協，**99**，55-63 (2004)
- 21) 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**，735-742 (2004)