

平成28年11月22日
広島県 酒造講話会

清酒中の4-VG生成要因

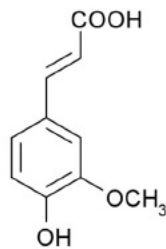
燻製



正露丸

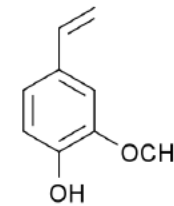


ヴァイツェン



フェルラ酸 (FA)

新潟県醸造試験場
金桶 光起



4-ビニルグアイアコール (4-VG)



(高山市HPより)

自己紹介

- 産地 岐阜県高山市
- 生年 昭和37年5月2日
- 学歴 岐阜大学大学院連合農学研究科生物資源科学専攻 卒業(農学博士)
- 平成7年4月 醸造試験場研究員
- 平成28年4月 場長

- 職歴 昭和62年～平成3年
名古屋製酪株式会社



(高山市HPより)

日本で唯一 県立の清酒研究機関

当時の試験場



醸造試験場の商標



設立86周年

所在地:新潟市中央区水道町2-5932-133
護国神社に近接 住宅街

設立:

大正13年:12月 業界が「醸造試験場
設立に関する意見書」県知事に提出

昭和4年:県財政難、酒造組合敷地と設

備整備し県に寄付。県は運営費を支出。
新潟市 敷地千坪 設備費3万円を酒造
組合に提供。酒造組合建築費3万円支
出 計6万円。(企業物価指数から計算
すると現在の価値では約6,200万円)

昭和5年:4月着工、10月18日竣工式。

建造物6棟、建坪約347坪、事務室、試
験室、伝習生室、清酒300石試醸、貯蔵
設備

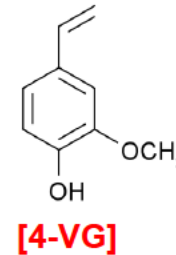
酒米の開発、新商品・技術の開発、 人材育成

- 昭和10年：**北陸12号** 開発。
- 昭和19年春試験場廃止案樹立 醸造試験室と改称
当時 アルコール添加法、3倍増醸法、軍需用品 粗酒石、
酒石酸石灰の生産、燃料アルコールの生産計画等
- 昭和27年：醸造試験場に復活
- 昭和32年：**五百万石** 開発
- 昭和45年：「**あかい酒**」開発
- 昭和47年：シャンペン風の清酒開発
- 昭和50年：酒造工場における公害防止技術の確立。
- 昭和56年：新庁舎 敷地面積1,000坪 建坪350坪。「越の風」発売。
- 平成元年：「**あかい酒 生酒**」開発。酒類用ステンレス鋼容器の開発。
- 平成6年：「**一本ヰ**」開発
- 平成9年：日本酒用チタン容器の開発
- 平成16年：「**越淡麗**」開発
- 平成21年：「**さかすけ**」乳酸醗酵酒粕 開発



ケムリ臭の正体は何か？

種 類	燻煙内の各化合物
《カルボニル化合物》 カシ・サクラの燻煙に含まれる。 甘い焦げたような匂いの元。	ホルムアルデヒド / アセトアルデヒド / プロピオンアルデヒド ブチルアルデヒド / イソブチルアルデヒド / バレルアルデヒド イソバレルアルデヒド / アクロレイン / クロトンアルデヒド メタクリルアルデヒド / チグリックアルデヒド / フルフラール メチルグリオキサール / メチルフルフラールなど
《フェノール類》 燻煙臭を代表するにおい。 カシやナラなど広葉樹に含まれる。	グアヤコール / 4-メチルグアヤコール / フェノール 4-エチルグアヤコール / オルソクレゾール / メタクレゾール パラクレゾール / 4-プロピルグアヤコール 4-アリルグアヤコール(オイゲノール) / 4-ビニルグアヤコール 2,6-メトキシフェノール / 2,6-メトキシ-4-メチルフェノール 2,6-メトキシ-4-メチルフェノール 2,6-メトキシ-4-プロピルフェノールなど
《有機酸の部》 この成分は広葉樹に多い。 鼻を突く刺激臭はこの成分のため。	ギ酸 / 酢酸 / プロピオン酸 / 酪酸 / イソ酪酸 / バレリン酸 イソバレリン酸 / カプロン酸 / ヘプタン酸 / カプリル酸 ノナン酸 / カプリン酸など



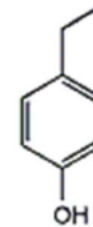
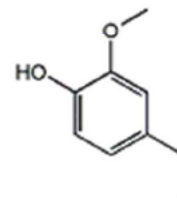
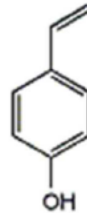
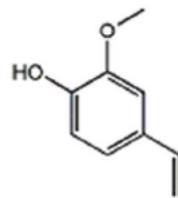
ケムリ臭はわずかの量で検知

	4-VG ($\mu\text{g/L}$)		4-VP ($\mu\text{g/L}$)	
	濃度範囲	検知	濃度範囲	検知
清酒	0-350	52	—	—
白ワイン	15-496	440	73-1150	770
赤ワイン	0-57		0-111	

ケムリ臭はわずかの量で検知

	4-VG	4-VP	4-EG	4-EP
閾値 (ppb)	32	85	25	130

* 水溶液中



4-VG: 4-ビニルグアイアコール

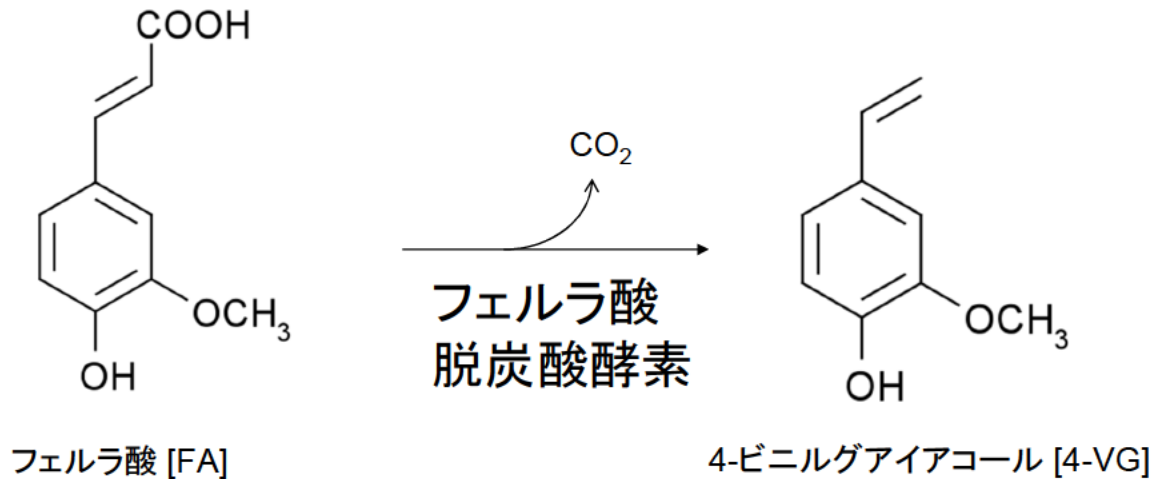
4-VP: 4-ビニルフェノール

4-EG: 4-エチルグアイアコール

4-EP: 4-エチルフェノール

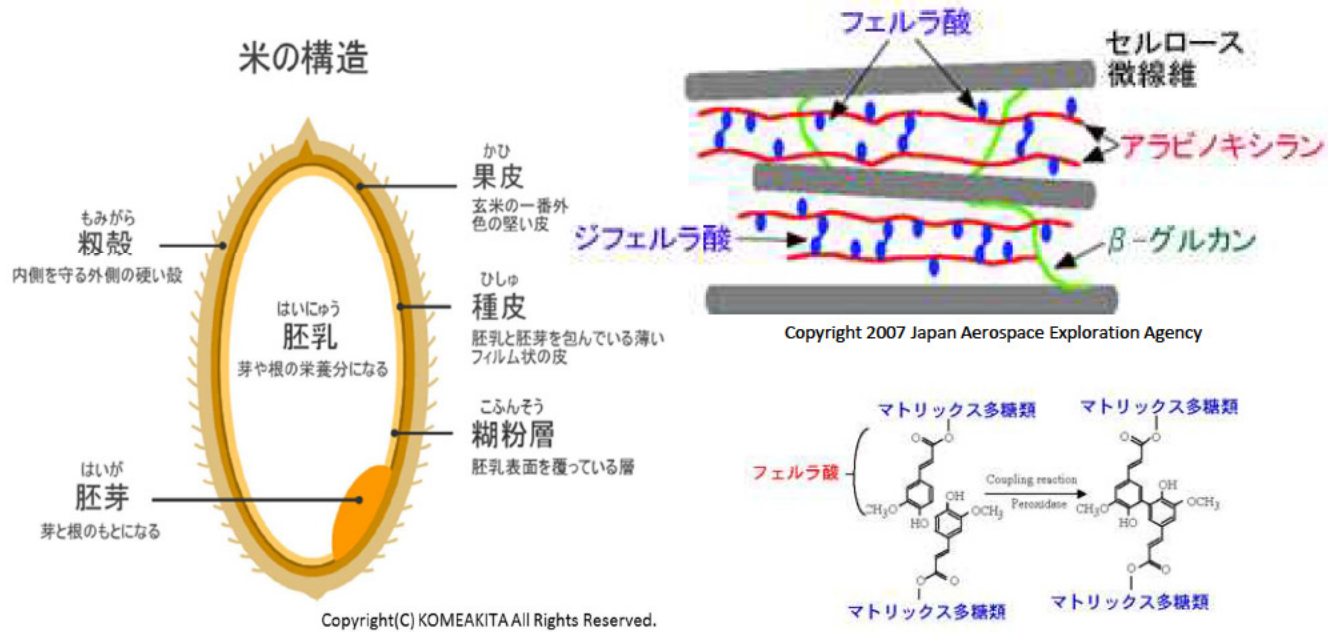
ケムリ臭はどのようにして出るのか？

フェルラ酸が微生物が持つ酵素・熱などによって、4-ビニルグアイアコールに変換される。



フェルラ酸はどこから来るのか？

フェルラ酸は米の細胞壁に含まれる



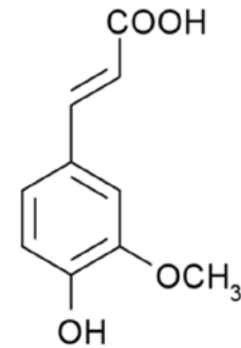
フェノール性化合物（フェルラ酸）による多糖類間架構造の形成

米にフェルラ酸はどれくらい 含まれているのか？

穀物	フェルラ酸 (mg/100 g dry sample)
玄米	41.8
精白米	9.4
胚芽米	21.4
小麦	127.2
大豆	18.5
小豆	19.7

フェルラ酸は機能性たっぷり

- 抗酸化作用
- 食品の退色・変色防止効果
- 美容作用(美白、光保護)
- 成長促進作用
- 大腸がんの発がん抑制作用
- 血糖値降下作用
- 血圧降下作用
- 脳機能改善作用(認知症予防)



フェルラ酸 [FA]

ワインでも燻製臭が発生する

フェノール性異臭 (Penolic Off-Flavor, POF)
燻製臭 (smoky)、薬品臭、香辛料臭、獣皮臭、
馬汗臭



ワイン酵母が原因

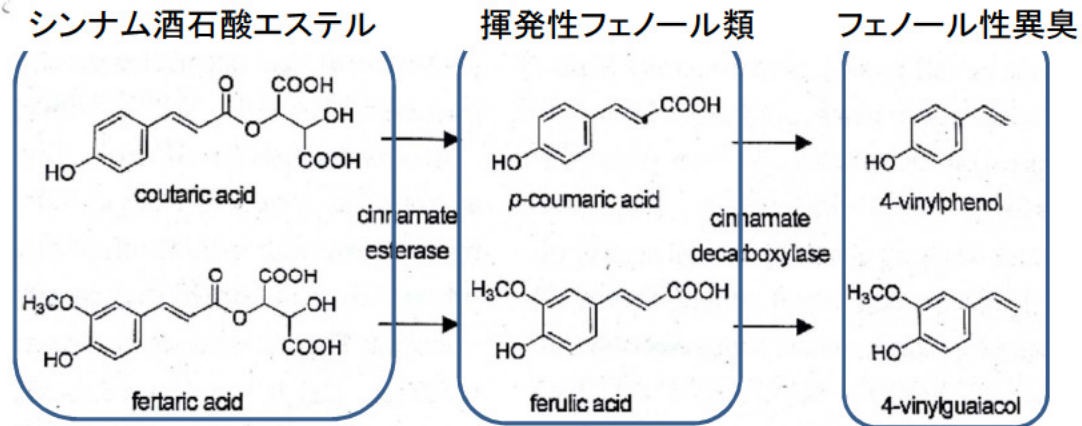
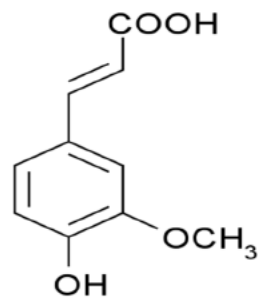


Fig. 1 Formation pathways of vinylphenol by enzyme reactions involved in winemaking.

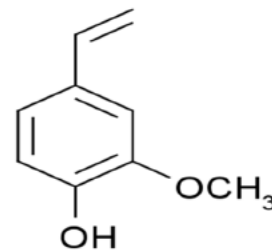
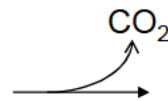
日本酒でケムリ臭がするのはなぜか？

清酒酵母は4-VGを生産しない

乳酸菌 野生酵母 その他の微生物
微生物以外の原因？

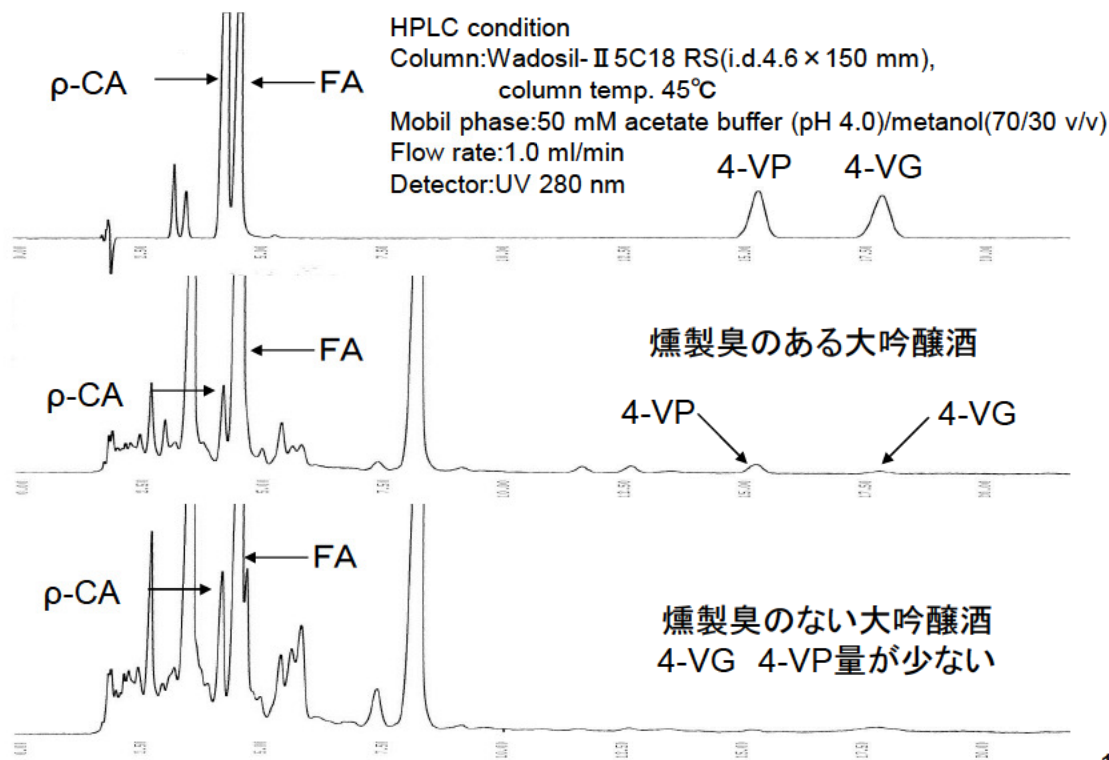


フェルラ酸 [FA]

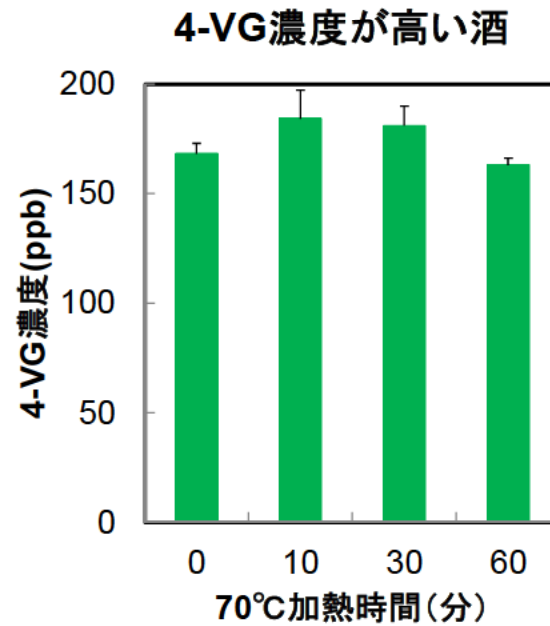
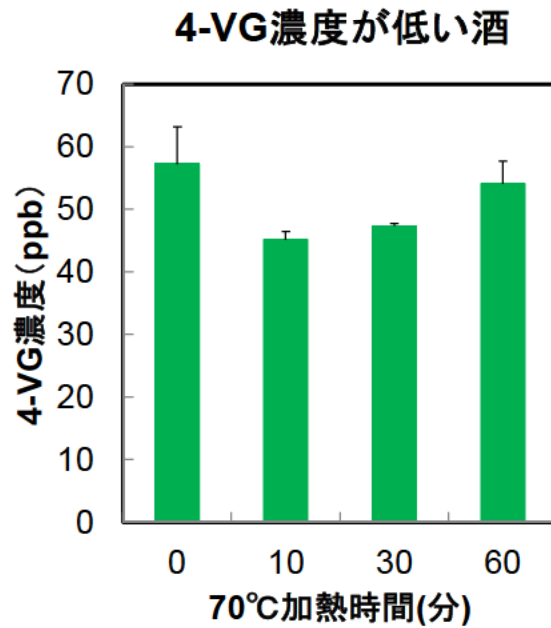


4-ビニルグアイアコール [4-VG]

ケムリ臭のする清酒には 揮発性フェノール化合物が多く含まれる



清酒の火入れ温度では 4-VGは増えない



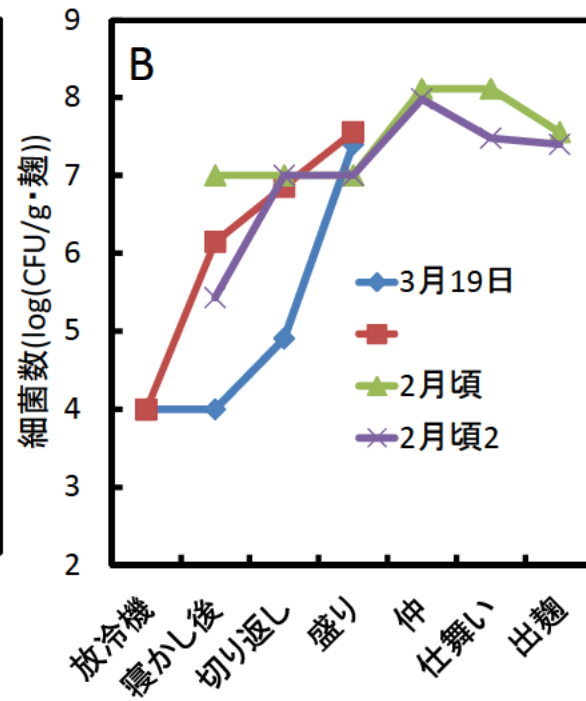
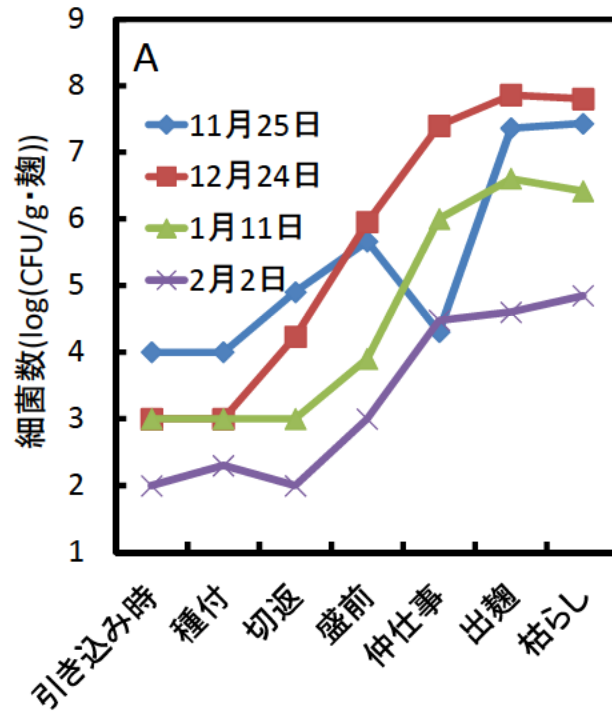
モロミには多量の細菌が入る

- 金沢局 55場
(醸協,64(9)826-829(1969))
 $2.2 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^8$
平均 1.3×10^7
- 汚染細菌として
(醱酵工学,56(2)101~109(1978))
Flavobacterium lutescens
Pseudomonas sp.
Bacillus subtilis
Bacillus megaterium
Micrococcus varians(yellow)
Micrococcus varians(white)
Micrococcus sp.

県内の麴を調べてみると
多くの細菌を検出

麴	TTC培地 (CFU/g)	抗黴培地 (CFU/g)
A	1.2×10^4	9.4×10^6
B	不検出	2.9×10^6
C	4.0×10^3	2.6×10^7
D	不検出	2.7×10^7
E	不検出	7.0×10^3
F	2.0×10^3	2.8×10^5

麴と共に細菌は増殖する



麴には細菌と酵母が混在する

細菌

Staphylococcus epidermidis

.....

Staphylococcus gallinarum

Bacillus cereus / thuringiensis

.....

Bacillus megaterium / subtilis

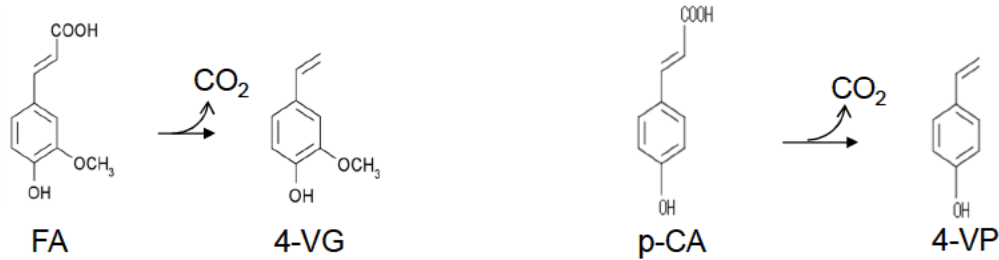
酵母

Pichia guilliermondii

.....

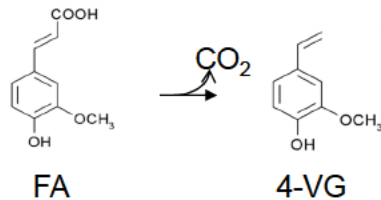
Candida sp.

分離菌はケムリ臭を出す



タイプ	株	記号	FA to 4-VG	p-CA to 4-VP
I	<i>Sta. epidermidis</i>	M11,M12,M21,M23	—	—
	<i>Bac. cereus / thuringiensis</i>	M31,M32	—	—
II	<i>Sta. gallinarum</i>	M22,M24	+	+
	<i>Bac. cereus / thuringiensis</i>	MB31,MB32,MB41,M51, M52,M61,MB61,M62, M71 ,MB71,M72,M81, M82,MB82 ,M91 ,MB91, M92,	+	+

アルコール存在下で4-VGを生産する



反応条件

0~20%アルコール含む、100ppm FA/pCAを含む

100mM P-Na pH6.2緩衝液

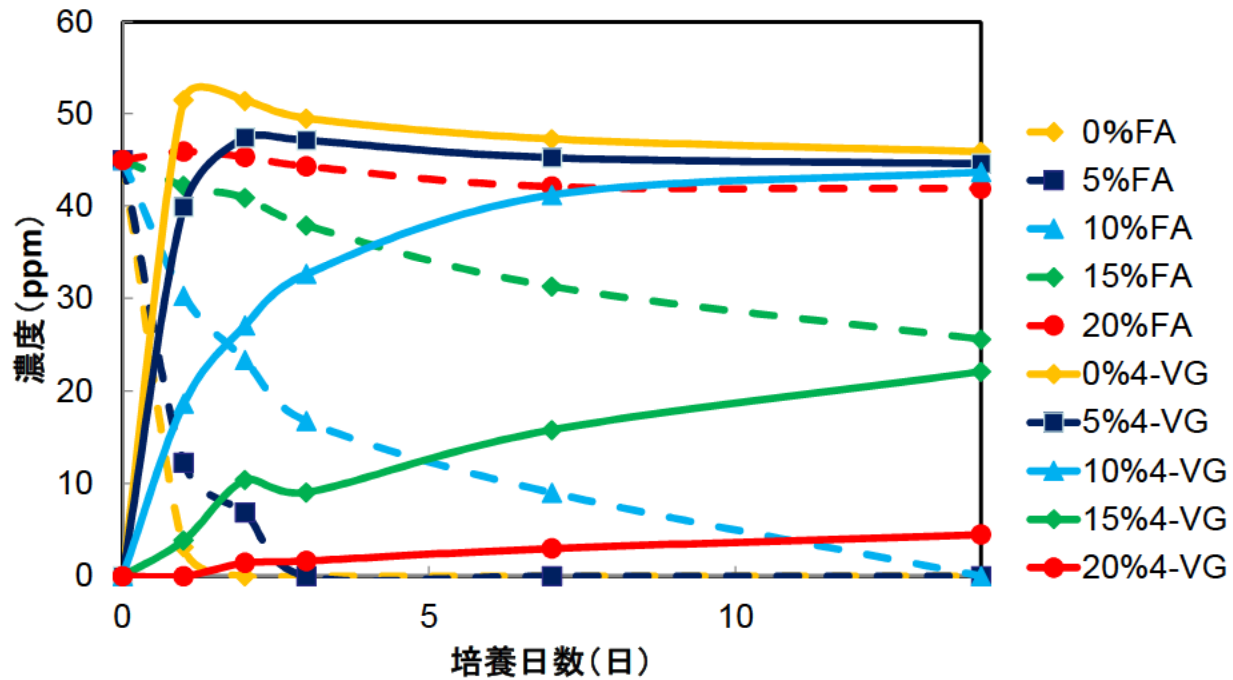
30°C、3時間反応。

反応終了後14,000rpm 1min 4°C遠心し、菌体を除去
上清を移動相で10倍希釈し分析

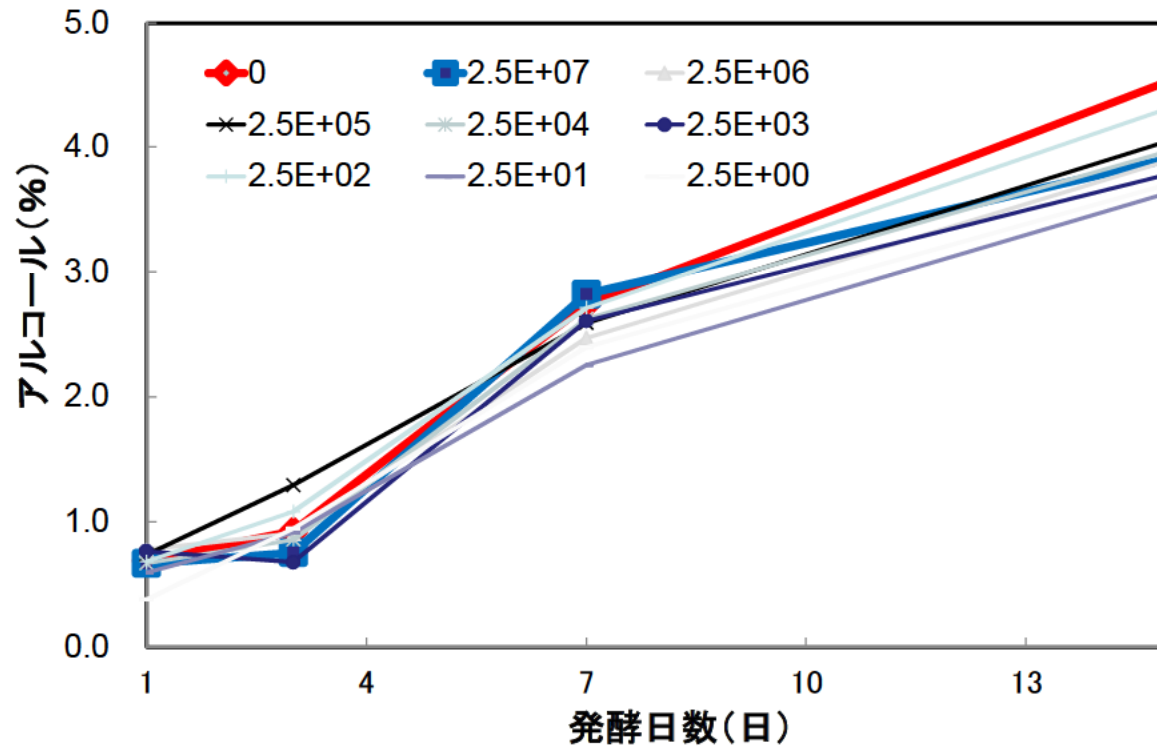
アルコール (%)	MB31	M51	M61	MB71	M81	M91
0	100	100	100	100	100	100
10	9.5	11.5	55.3	67.9	14.9	11.2
20	2.9	3.4	51.9	59.0	7.0	2.3

アルコール0%の活性を100として相対活性で示した。

高濃度のアルコール中でも 4-VGを生産する

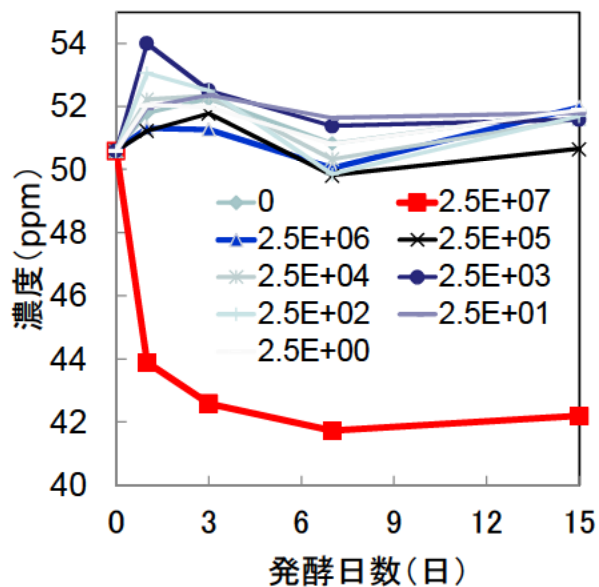


酵母以外の細菌が共存しても 醗酵に影響がない

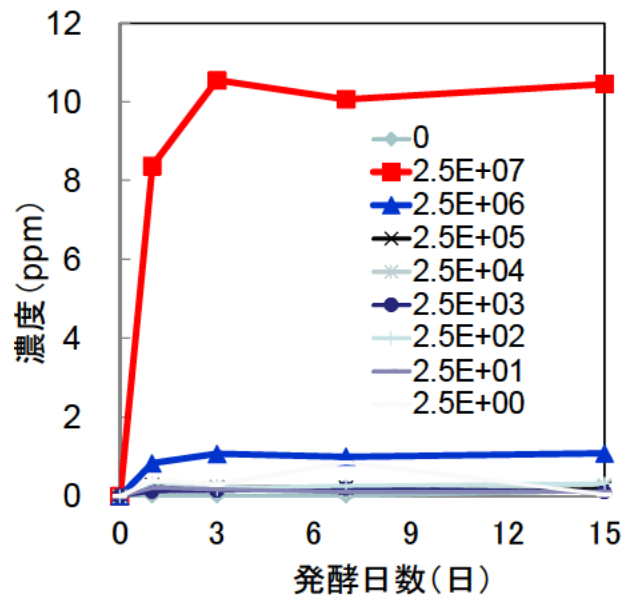


モロミ中 10^6 /mlの菌により4-VG生産

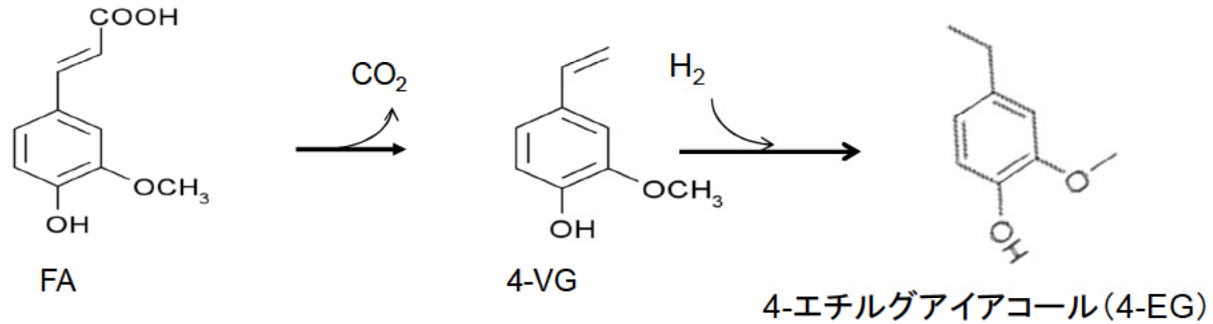
フェルラ酸 (FA)



4-ビニルグアイアコール (4-VG)

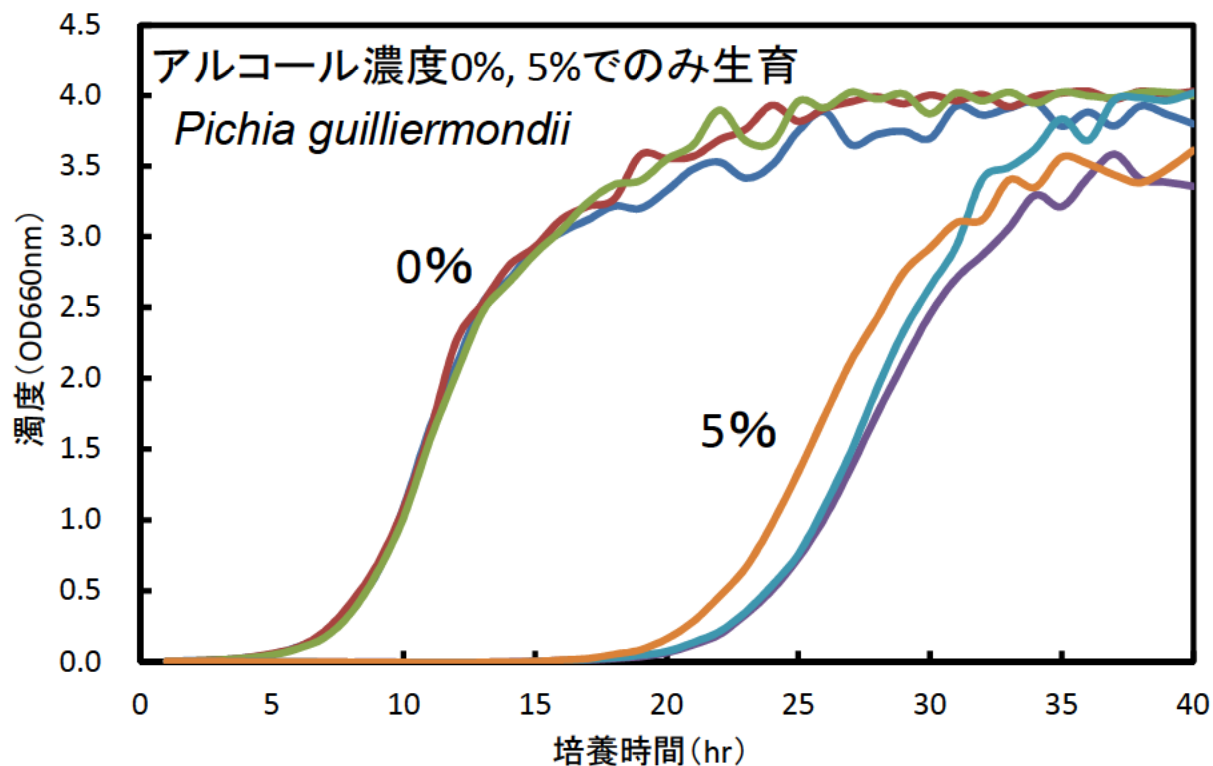


麴に混在する酵母もケムリ臭を出す

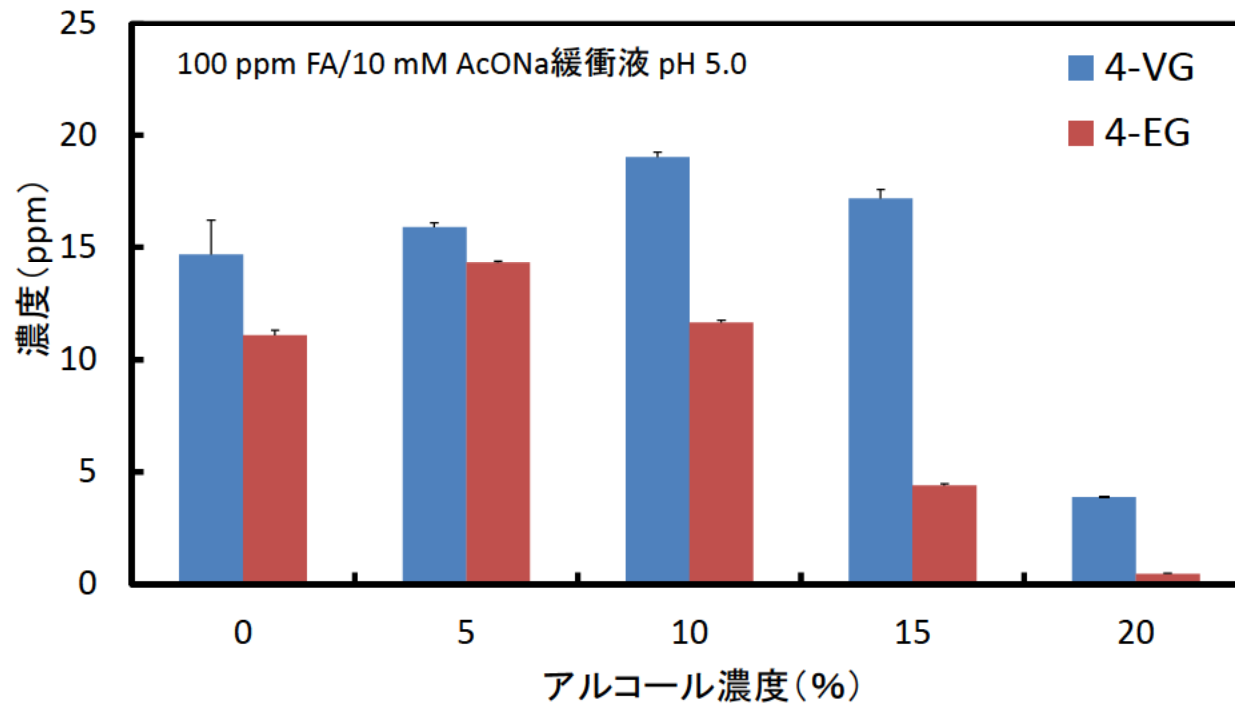


分離酵母	4-VG生産量(ppm)	4-EG生産量(ppm)
<i>Pichia guilliermondii</i> 1-1	0.950	37.8
<i>Pichia guilliermondii</i> 8-1	0.118	33.6
<i>Candida</i> sp. 5-1	痕跡	痕跡

分離酵母はアルコール存在下では 生育出来ない

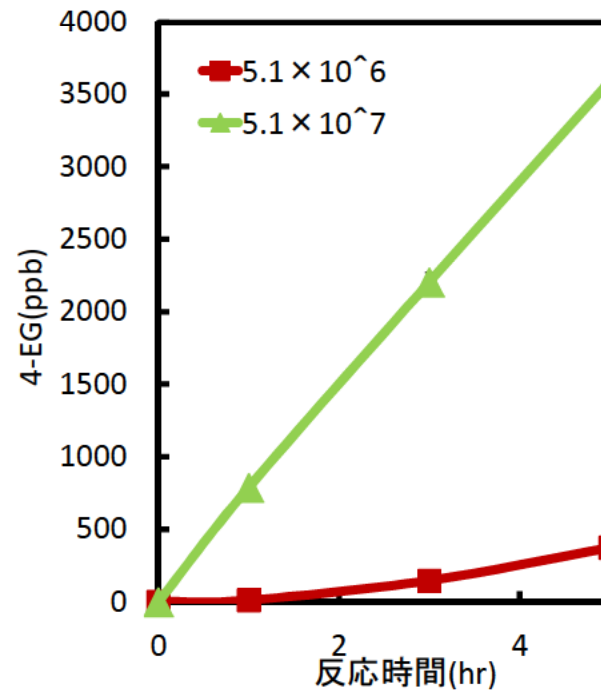
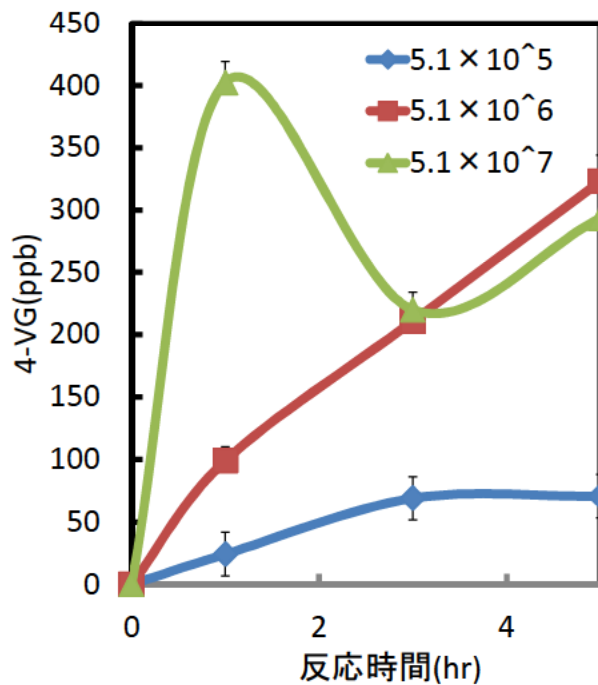


*Pichia guilliermondii*属も20%アルコール存在下で4-VGを生成する



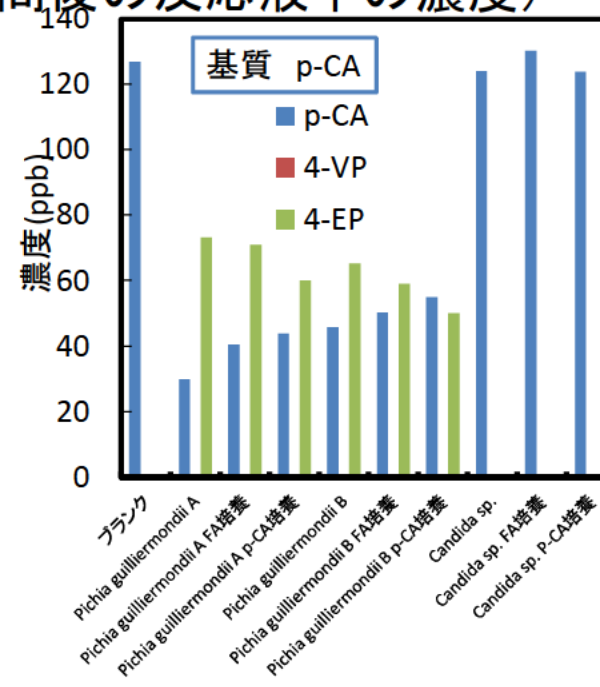
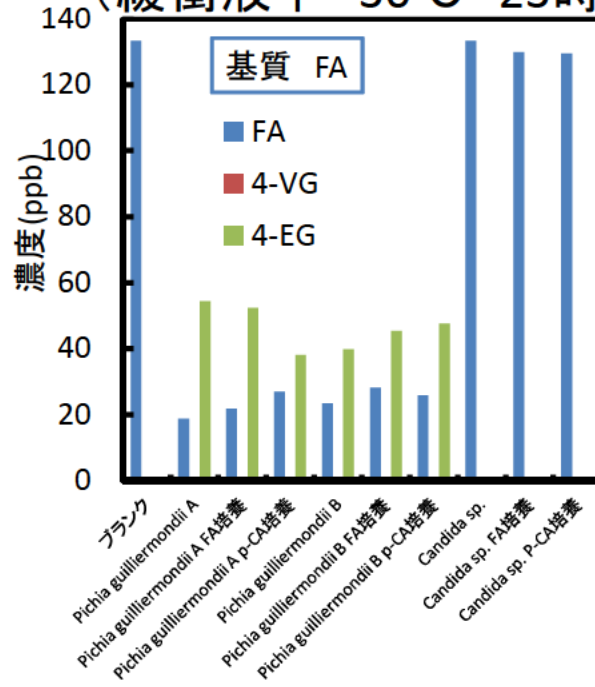
*Pichia guilliermondii*は細菌より少ない菌数で 4-VGを生成する

緩衝液中 10^5 CFU/mLの菌数で閾値を超える4-VGを生産する

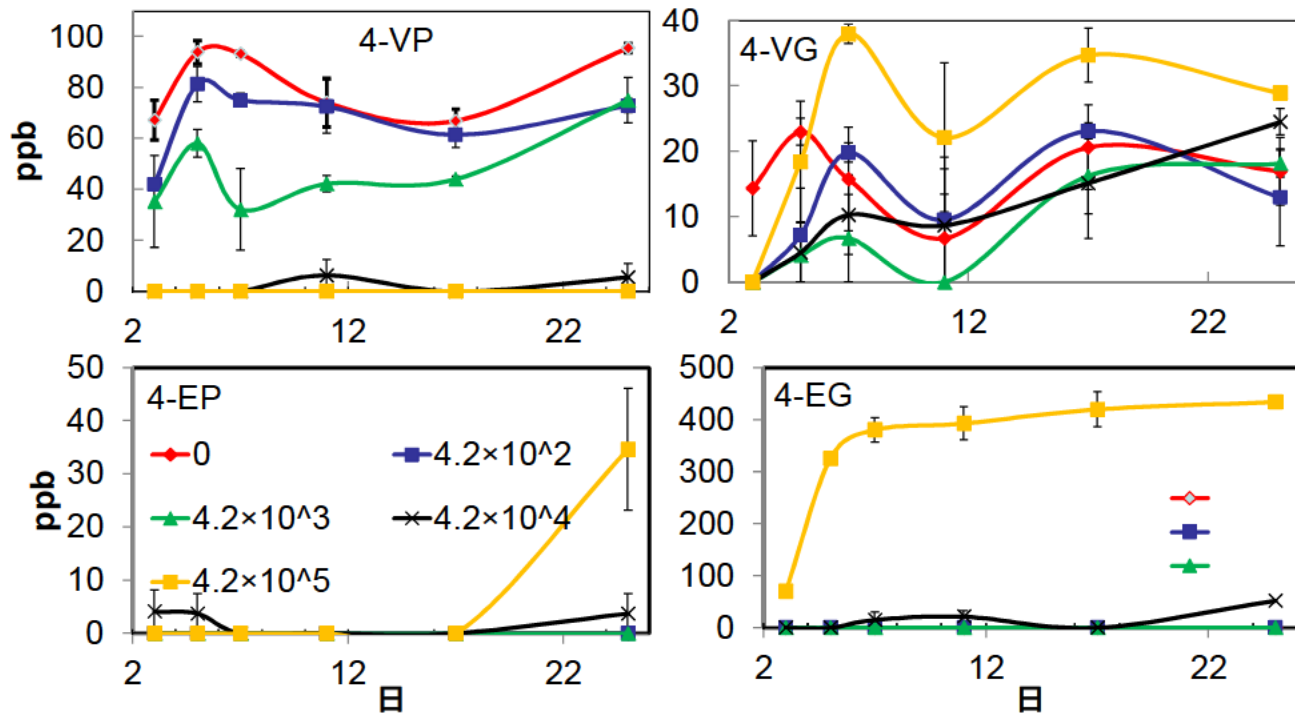


*Pichia guilliermondii*属は構成的な 変換酵素を持つ

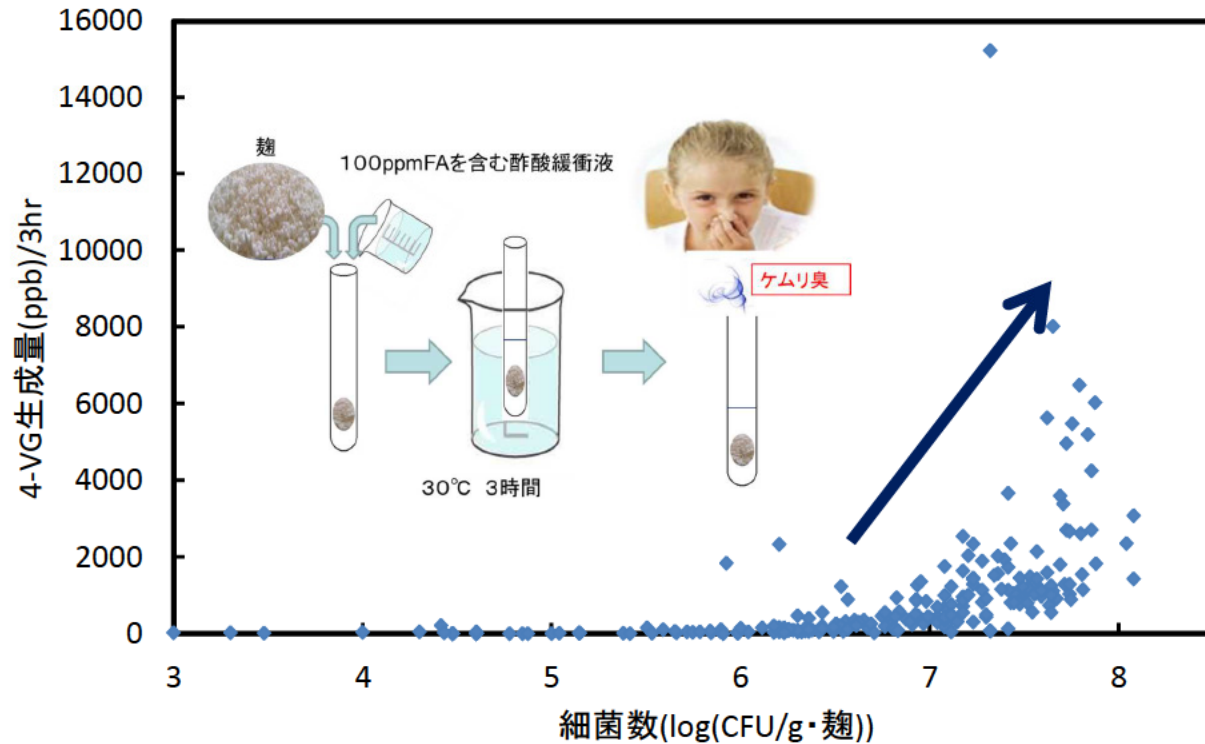
(緩衝液中 30°C 23時間後の反応液中の濃度)



*Pichia guilliermondii*属はモロミ中で4-EP/4-EGを生成する



細菌数が多いと4-VG生産量が高い



4-VG生成を再現出来る

仕込配合(3連、15°C一定)

区分	添	仲	留	計
総米 (g)	30	53	67	150
蒸米 (g)	22	40	52	114
麴米 (g)	8	13	15	36
汲水 (ml)	45 ¹⁾	70 ²⁾	88 ²⁾	211 ²⁾

1) 0.2%乳酸水、2) 蒸留水

酵母: 1801麴汁培養8.0 ml

使用麴

A: 細菌数 6.3×10^7 CFU/g・麴

B: 4-VG生成量 53.6 ppb/3hr/g・麴

細菌数 1.4×10^6 CFU/g・麴

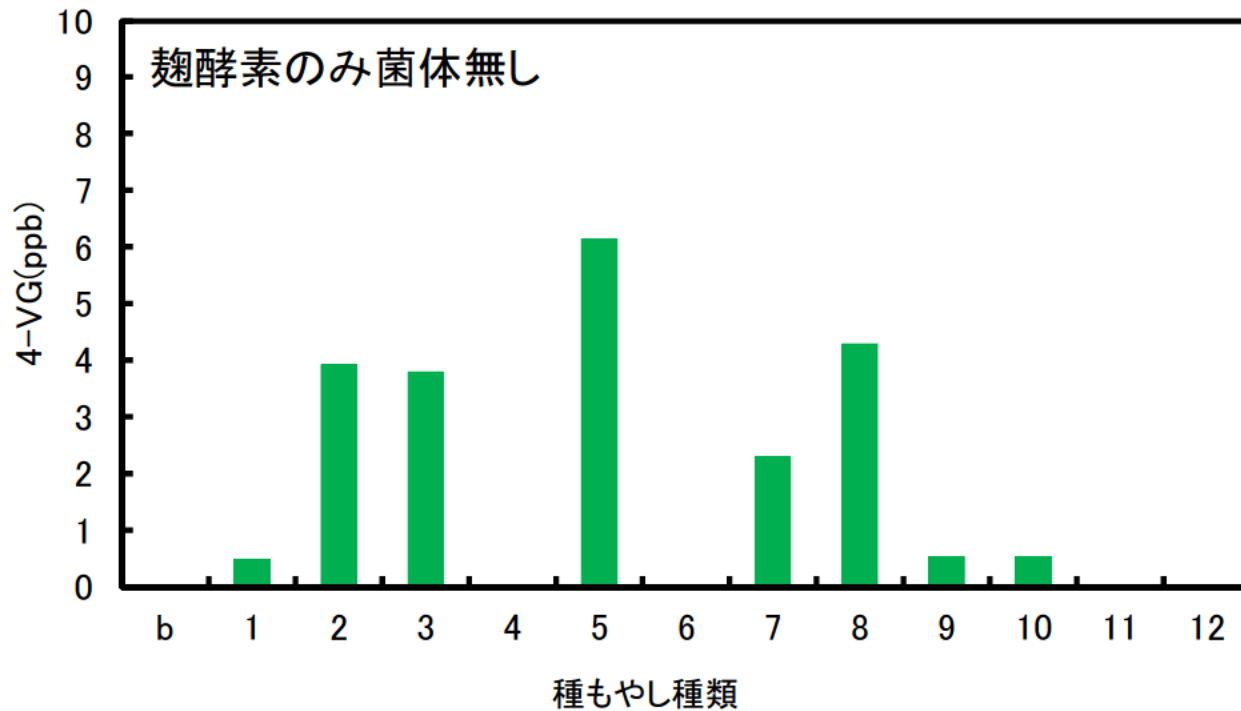
醪期間 A: 42日、B: 47日

製成酒成分

	Alc. (%)	Me	4-VG (ppb)	4-VP (ppb)
A-1	19.1	12.2	396	880
A-2	19.0	13.1	411	199
A-3	19.3	12.7	391	200
B-1	19.2	4.2	9.56	117
B-2	19.2	5.6	n.d.	114
B-3	18.6	5.9	6.27	123

細菌数多く、4-VG生成量が多い
麴を使用すると製成酒の4-VG
量が増加する事を再現した。

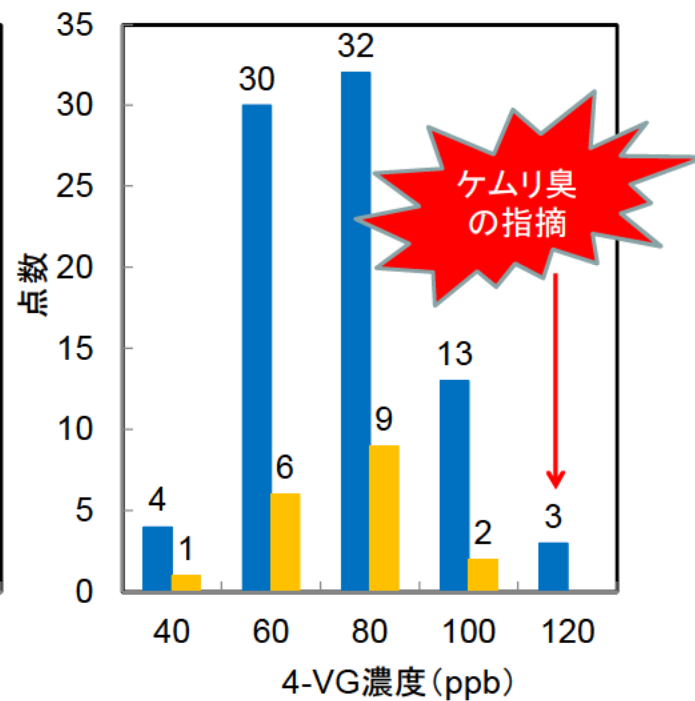
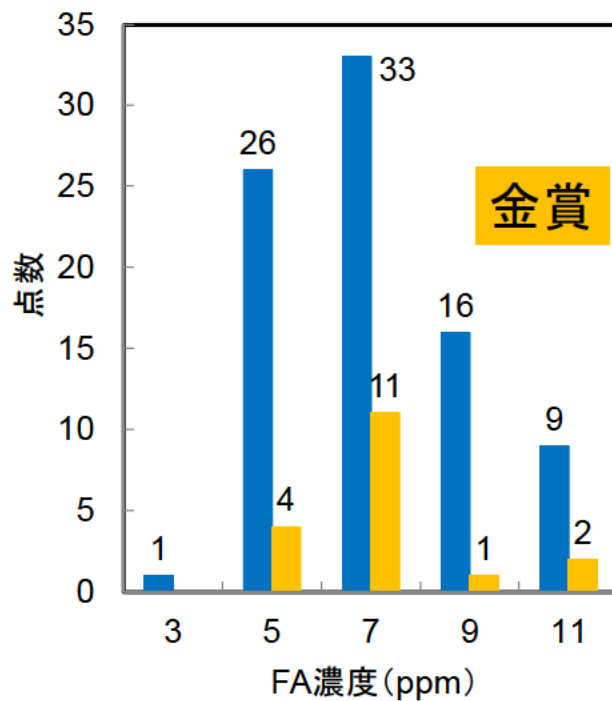
種麴は4-VGを生成しない



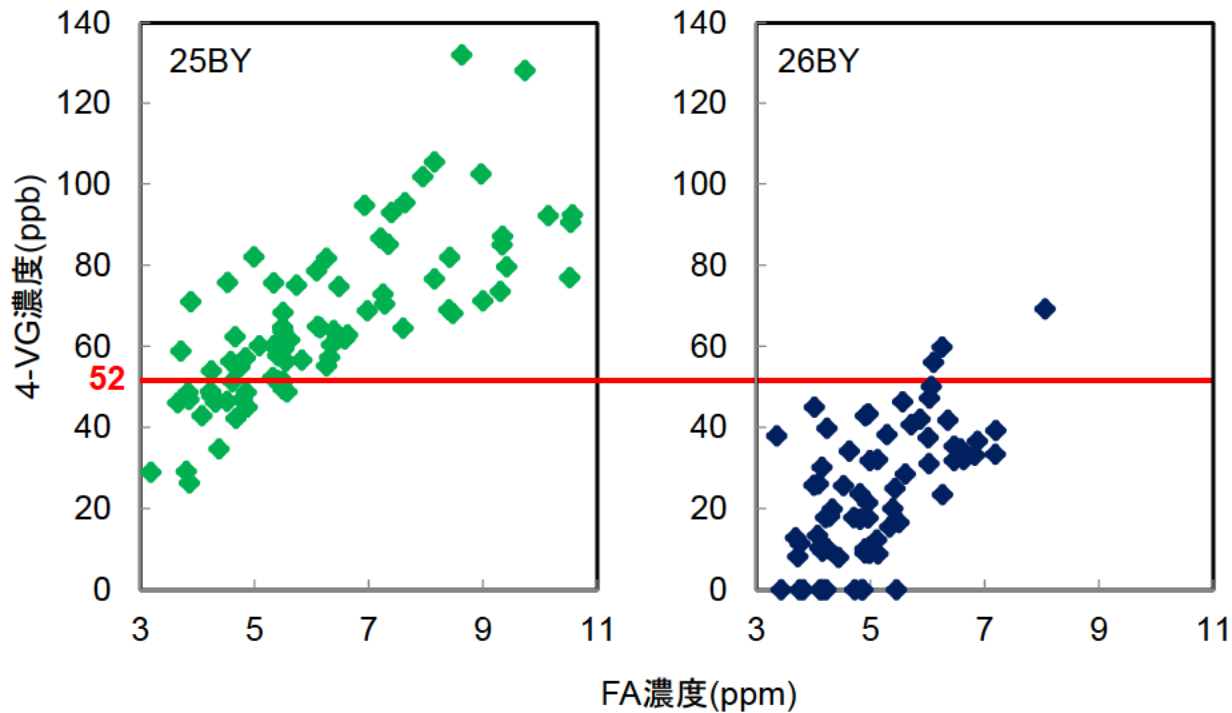
モロミ中の細菌が 清酒の香味に影響を与える

- 清酒モロミ/麴からバチルス属、スタフィロコッカス属、ピキア属、カンジダ属を分離した。
- 分離した菌株はFAおよびp-CAを4-VGおよび4-VPに変換した。さらに酵母は4-EG、4-EPに変換した。
- 20%のアルコール存在下でも変換活性を示した。
- 酵母と共存下においても変換活性を示した。
- 酵母のアルコール発酵には影響しなかった。
- 細菌は $10^6/\text{mL}$ 以上、酵母は $10^5/\text{ml}$ 以上の菌体の存在下で変換活性を確認した。

品評会出品酒には閾値を超える 4-VGが含まれていた



FA濃度が高いと4-VG濃度が高い



米の品種によりFA量に違いがある

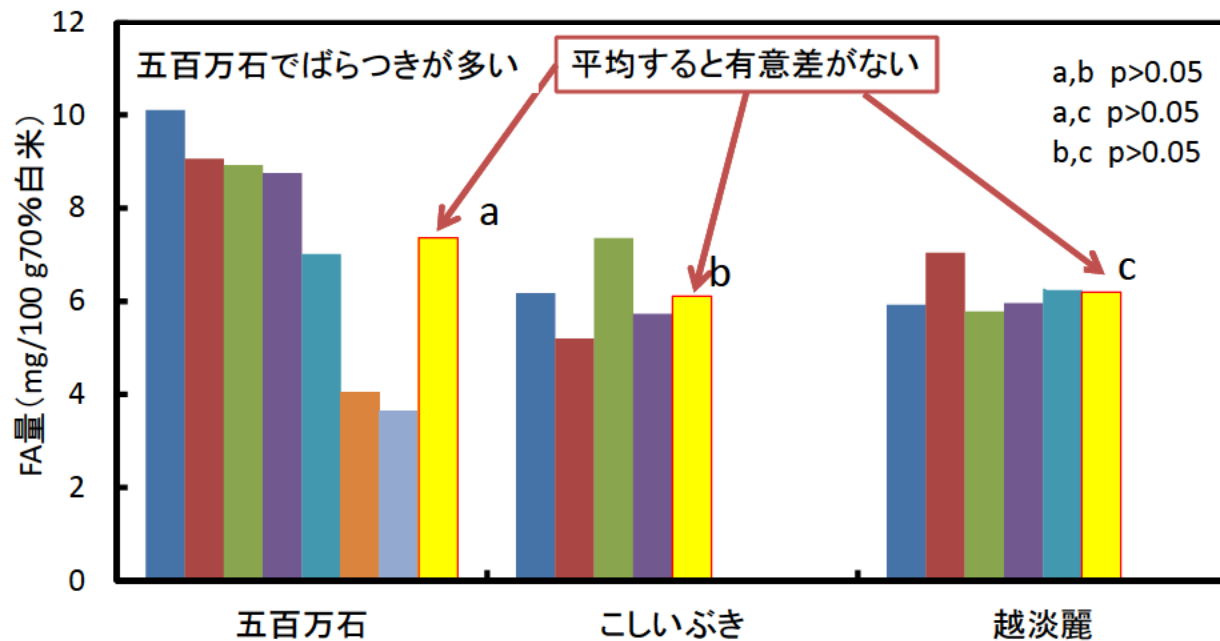
TABLE 1. Ferulic and *p*-coumaric acid contents of material brown rice.

Cultivar	FA (mg/kg)	<i>p</i> -CA (mg/kg)
Omachi	572 ± 18 ^a	105 ± 14
Miyamanishiki	483 ± 18	87 ± 2
Gohyakumannngoku	514 ± 15	121 ± 4
Yamadanishiki	384 ± 22	87 ± 13
Akitasakekomachi	387 ± 14	106 ± 11

^a Mean ± SD of three determinations.

(J. Biosci. Bioeng., vol. 118, No. 6, 640-645, 2014)

同じ品種でも栽培地域が異なるとFA含有量が異なる



精米によりFA量が減少する

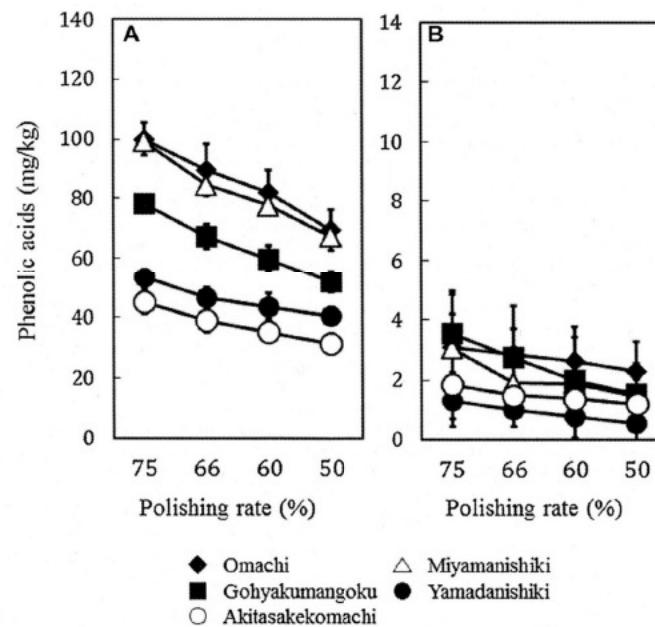


FIG. 1. Effects of polishing rate on levels of ferulic acid (A) and p-coumaric acid (B) in rice grains. Values are means \pm SD of three determinations.

(J. Biosci. Bioeng., vol. 118, No. 6, 640-645, 2014)

FA量とFAエステルラーゼ活性には 関係がある

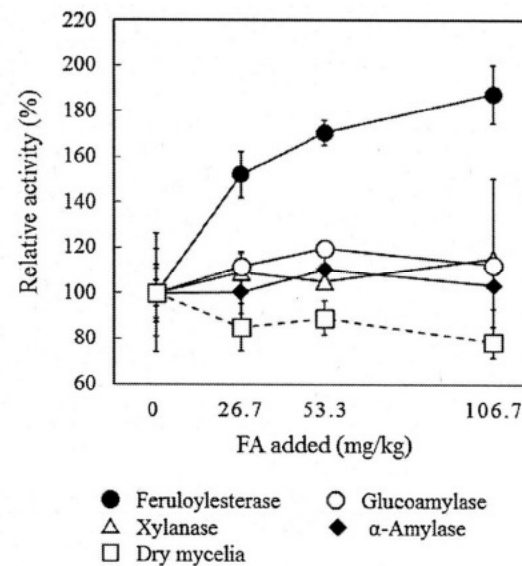
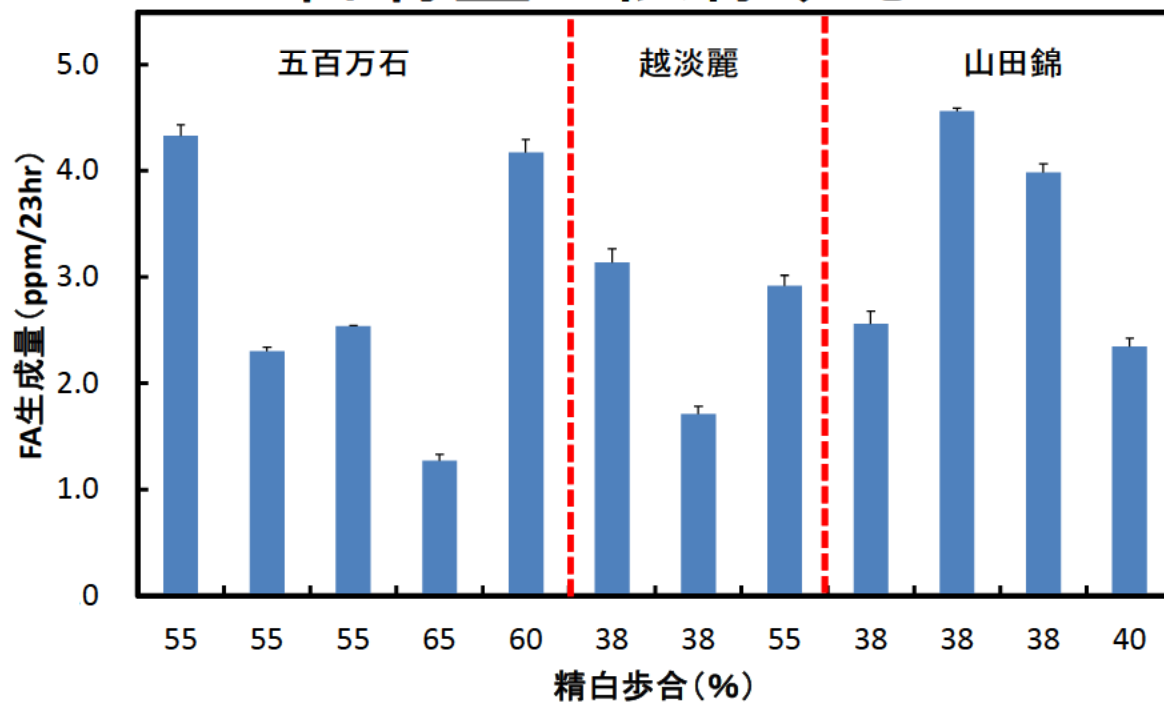


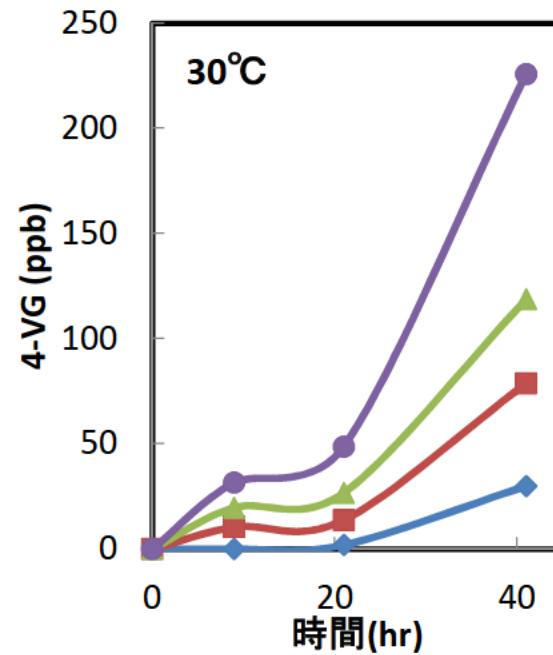
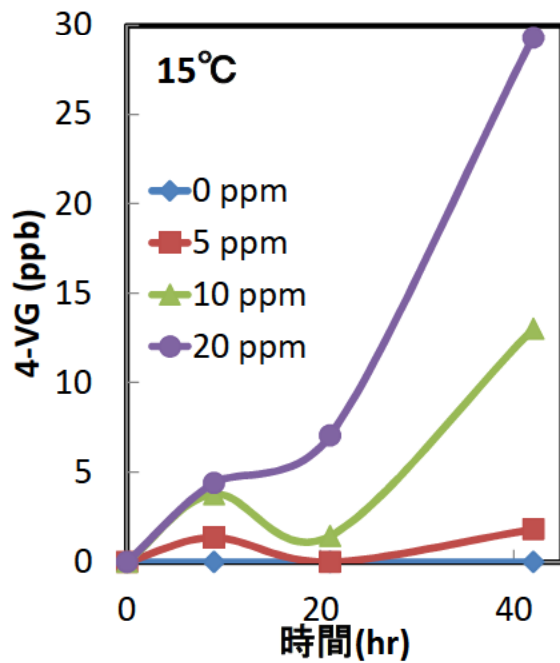
FIG. 4. Effects of ferulic acid addition on enzyme activities of rice koji made from α -rice. Relative enzyme activities per dry mycelia were compared. Values are means \pm SD of three experiments.

(J. Biosci. Bioeng., vol. 118, No. 6, 640-645, 2014)

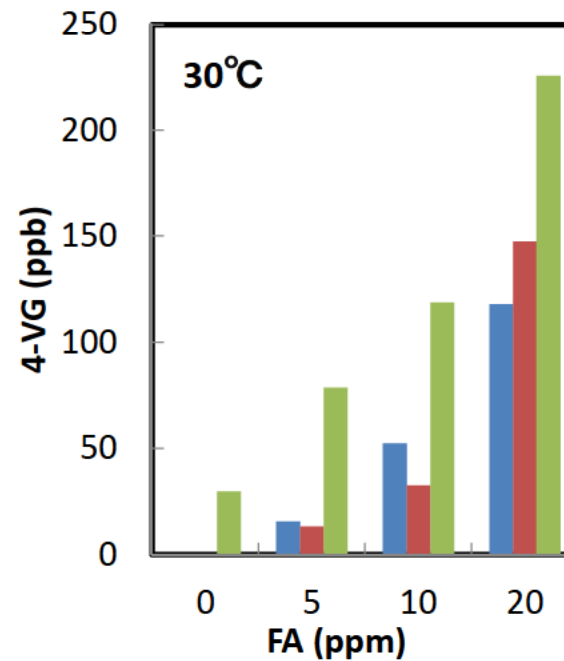
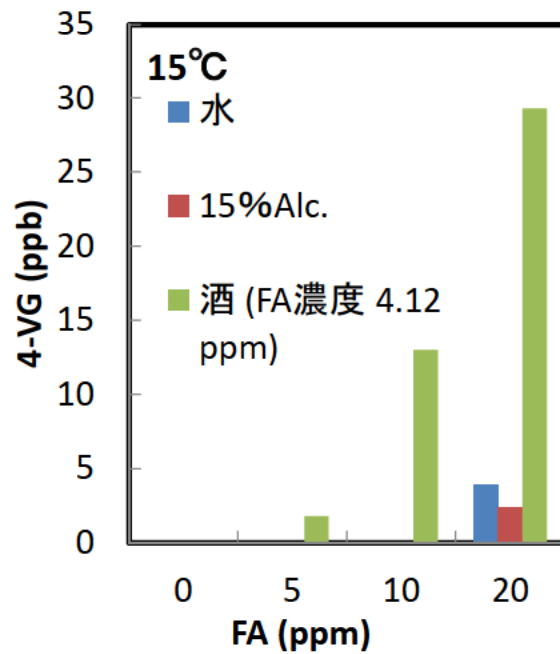
麴のFA生産性は製麴経過/米のFA含有量に依存する？



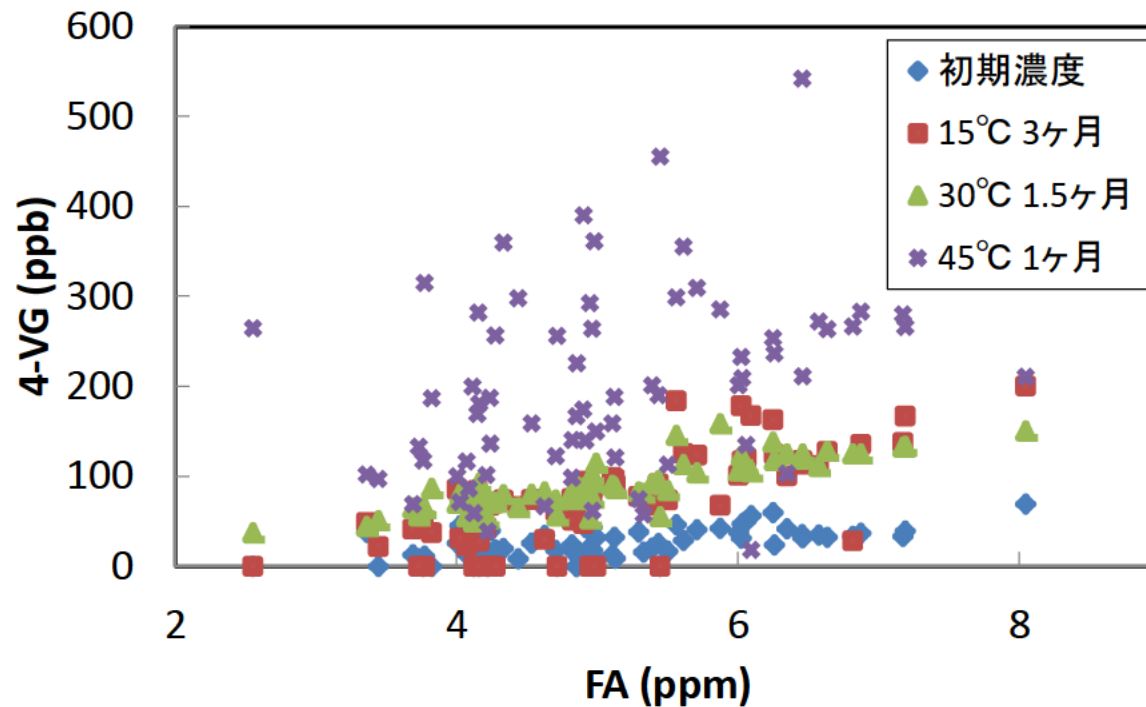
清酒にFAを添加するし加温時間が長いと4-VGが生成する



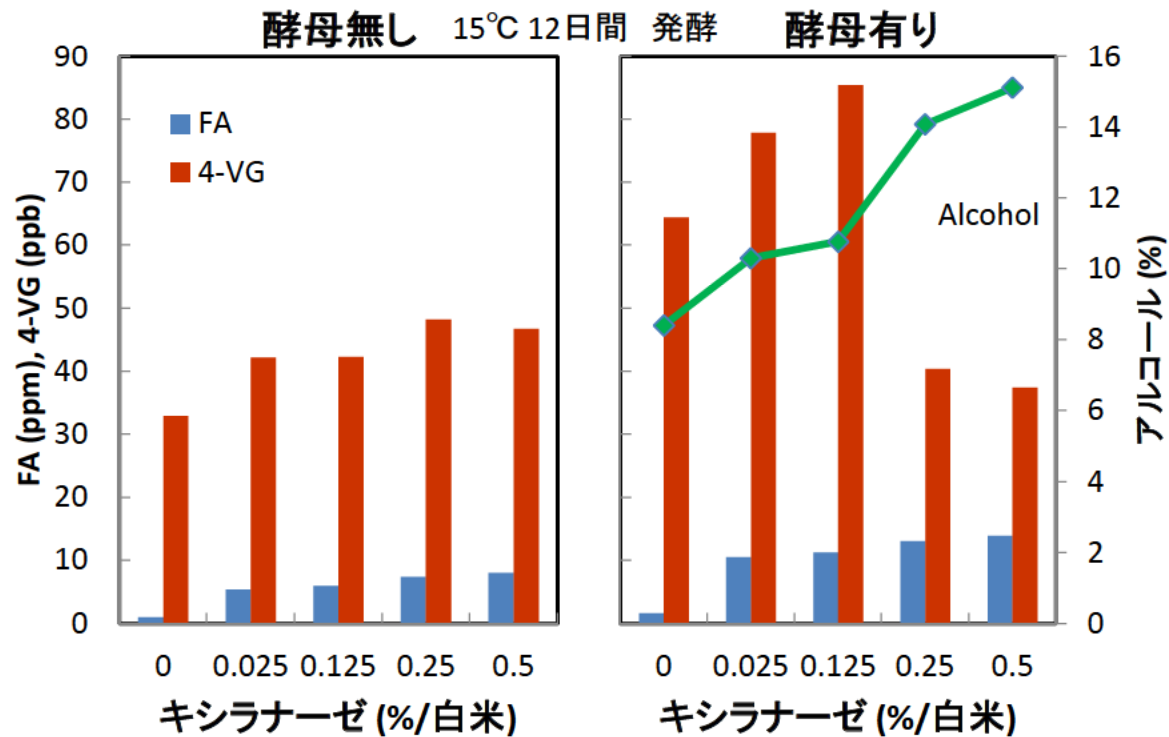
加温により水でも4-VGが生成する



FA濃度が低くても加温時間が長いと 4-VGが蓄積する



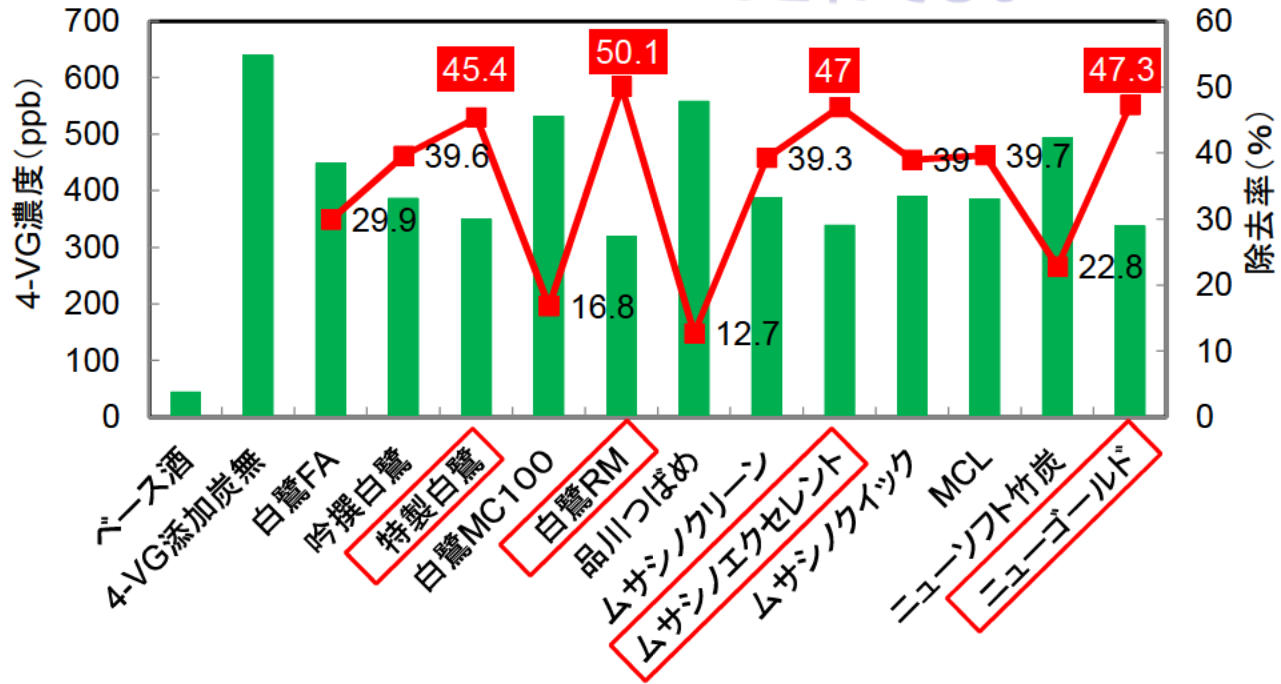
モロミ中のFA濃度を上げることで4-VG 生成量が増加する



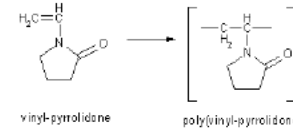
出来たケムリ臭は炭でとれる

100 g/kL

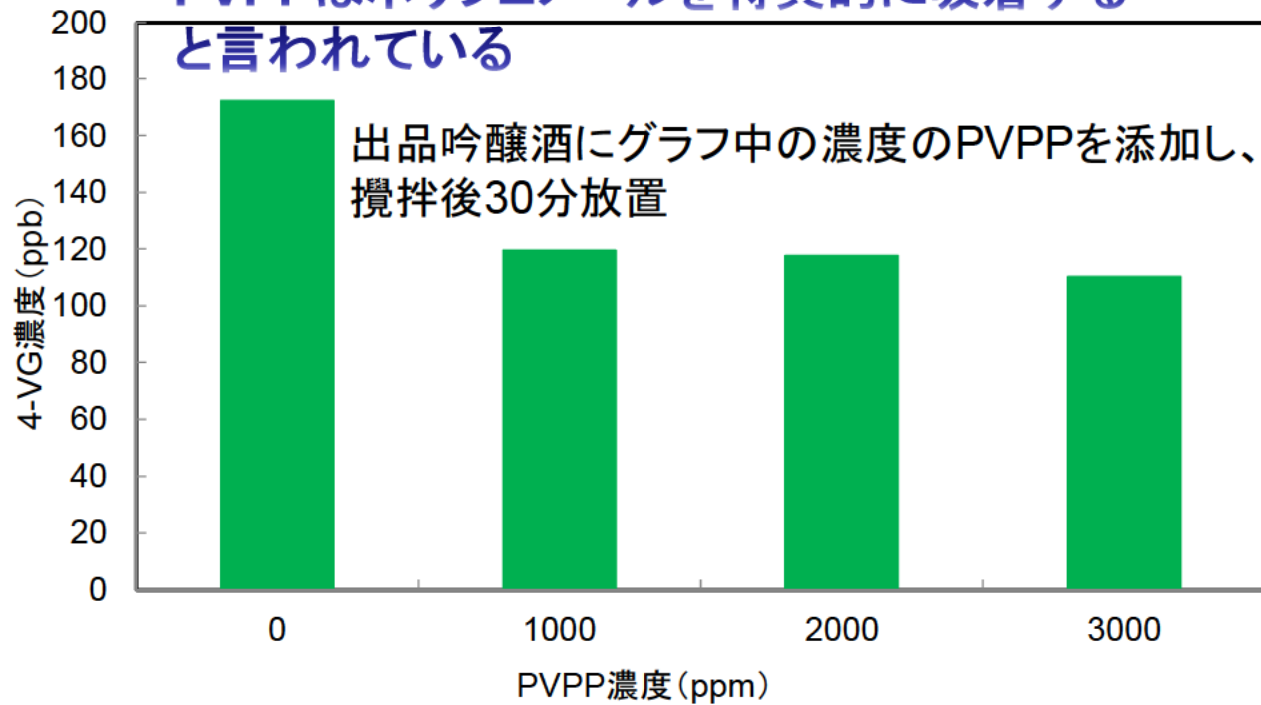
しかし吟香も吟味もとれてしまう



PVPPではどうか

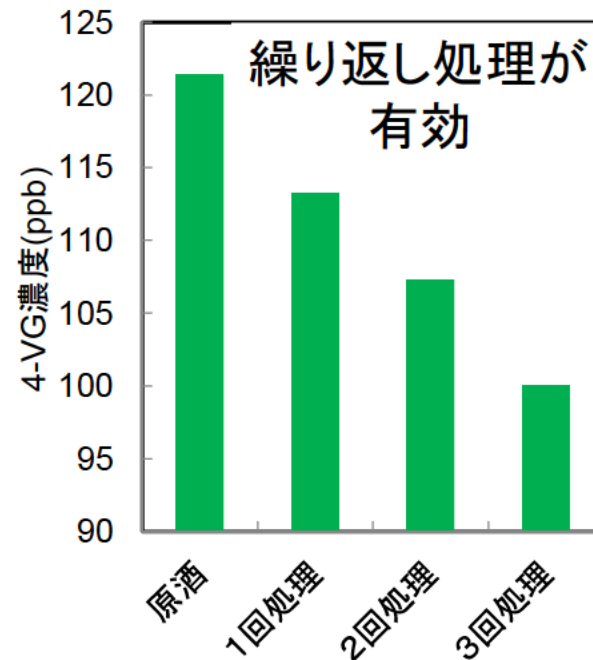
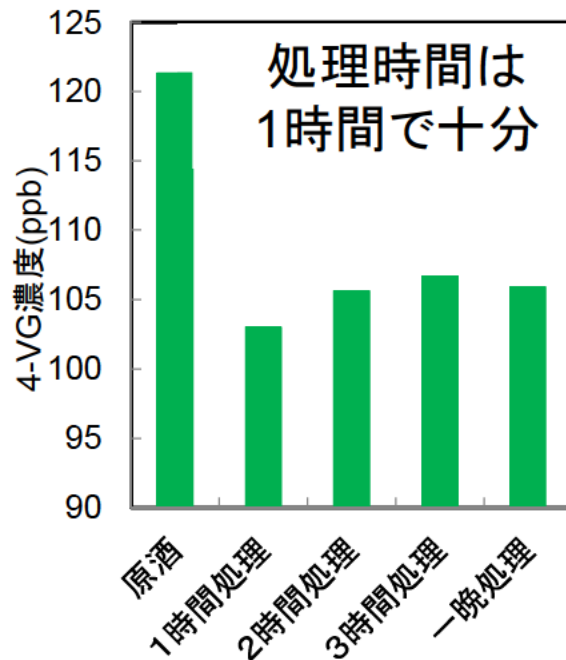


PVPPはポリフェノールを特異的に吸着する と言われている

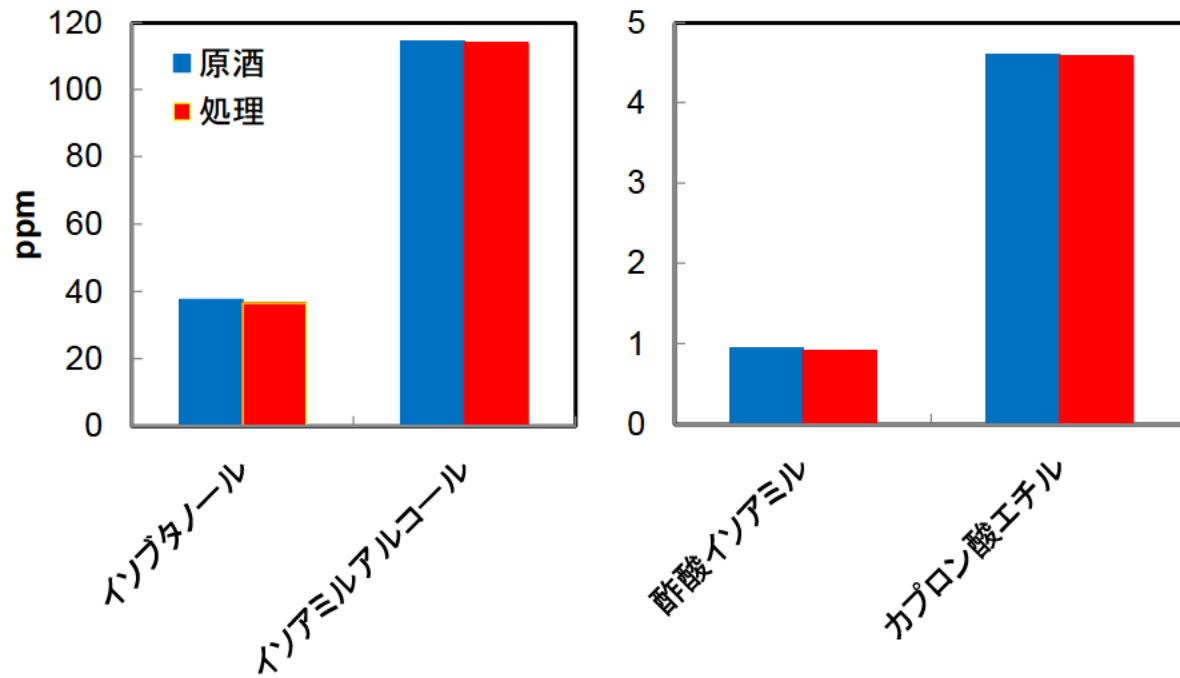


PVPPにより4-VGを低減出来る！

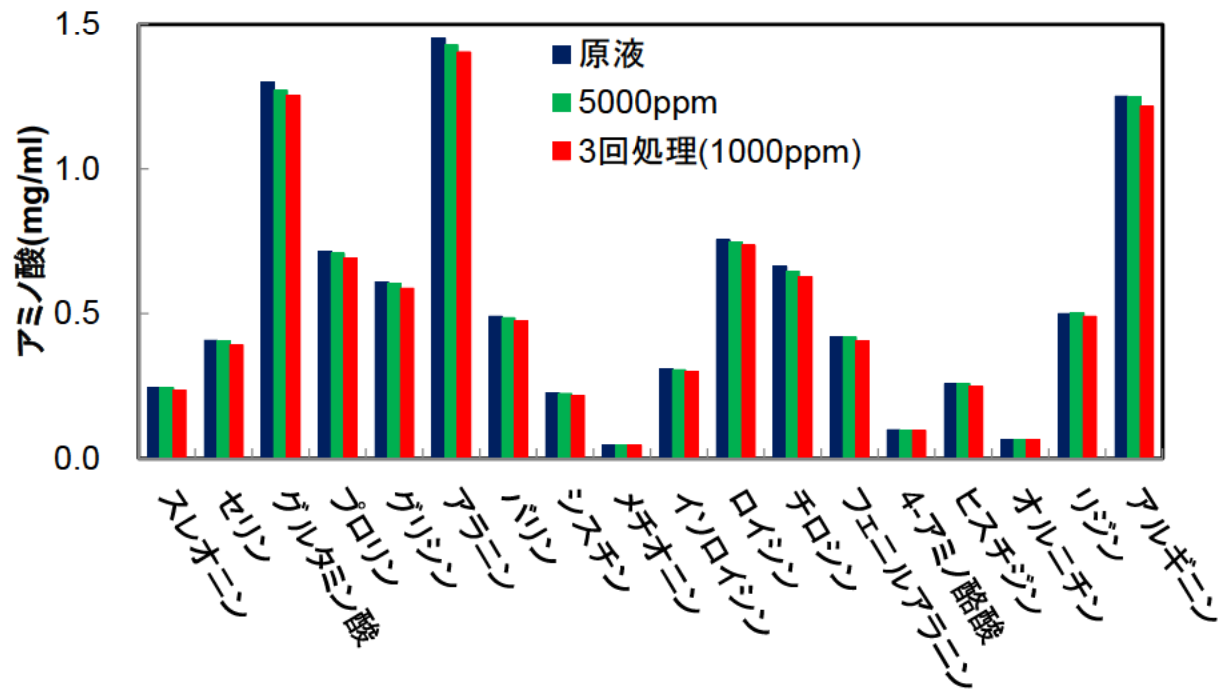
1000 ppmで処理



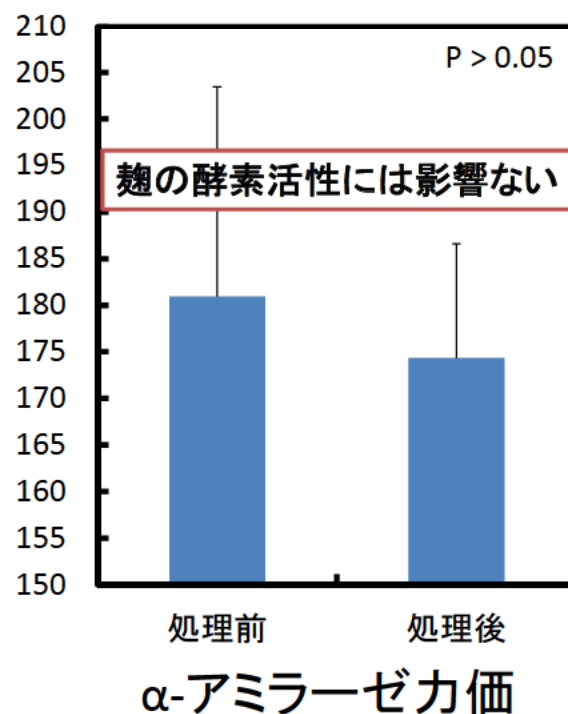
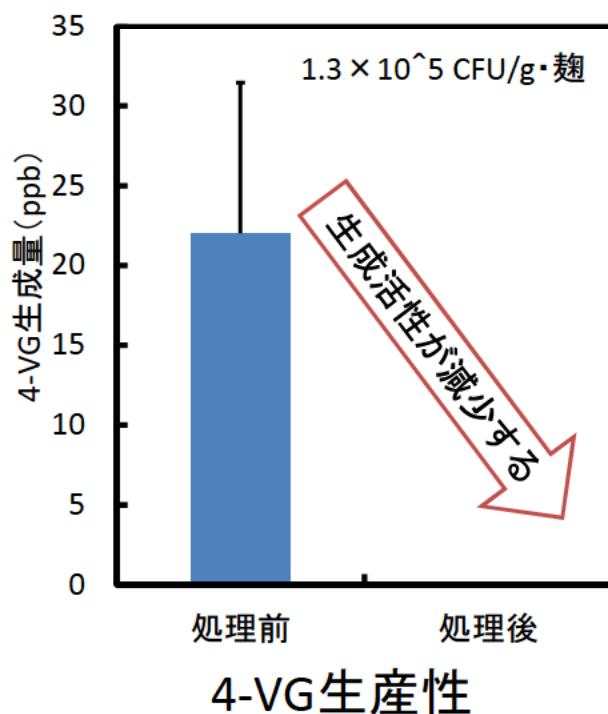
主要な香に影響がない



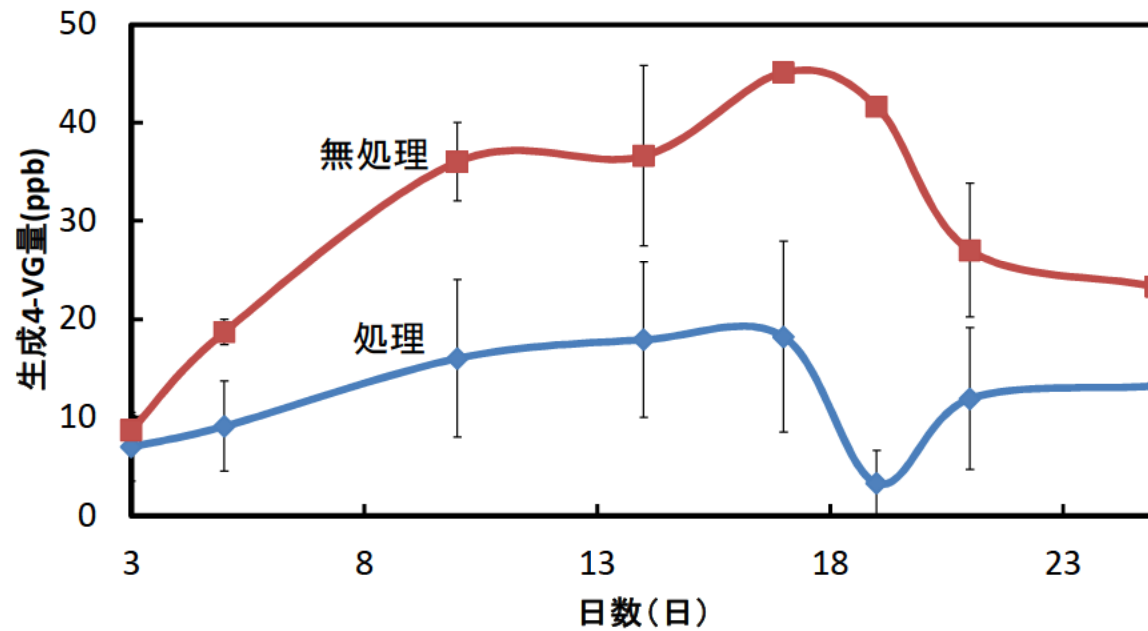
アミノ酸を吸着しない



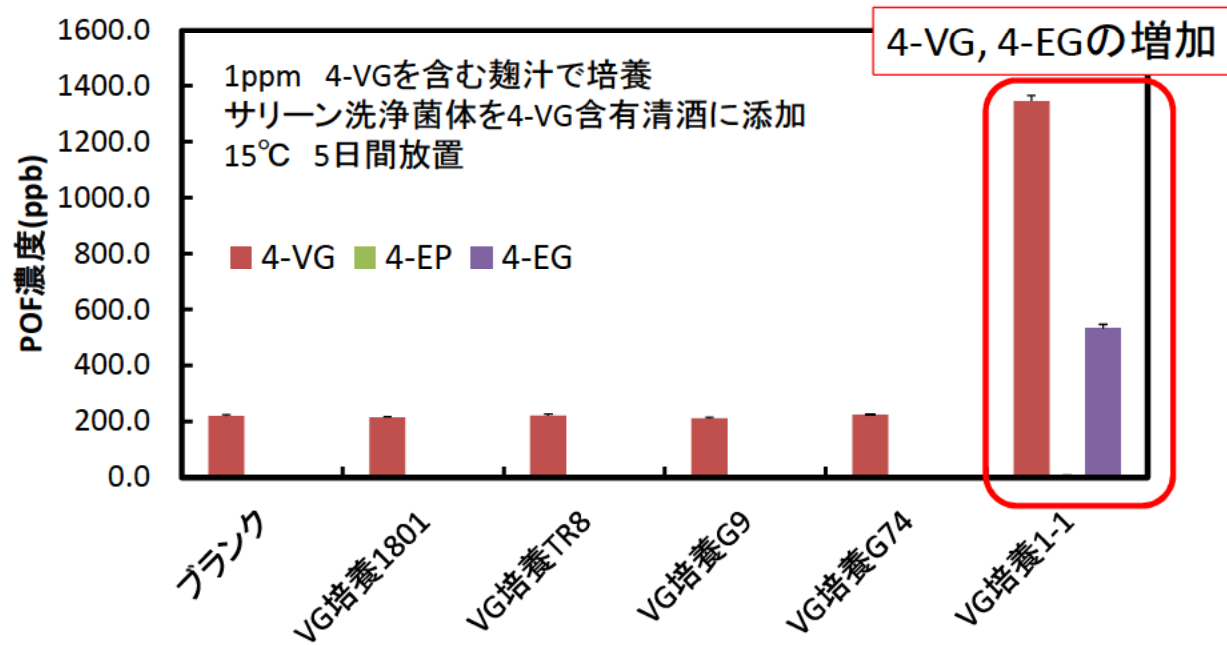
80%アルコール浸漬処理すると 4-VG生産性が低下する



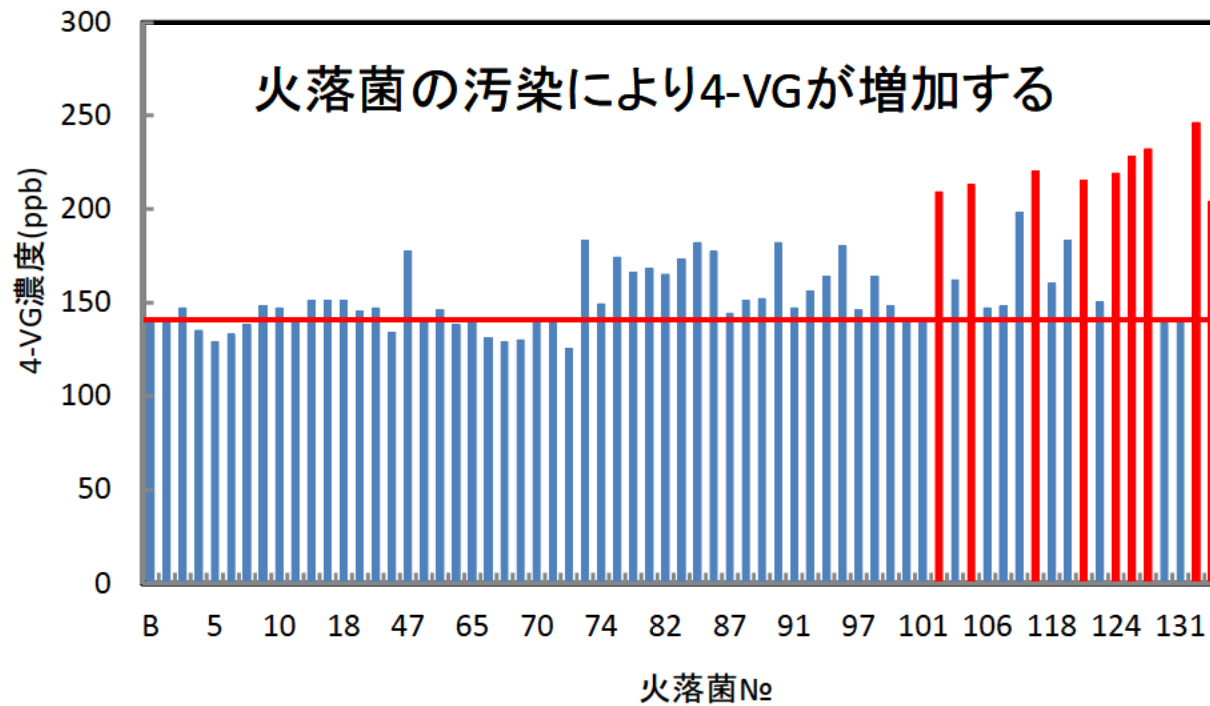
試験仕込で有効性を確認



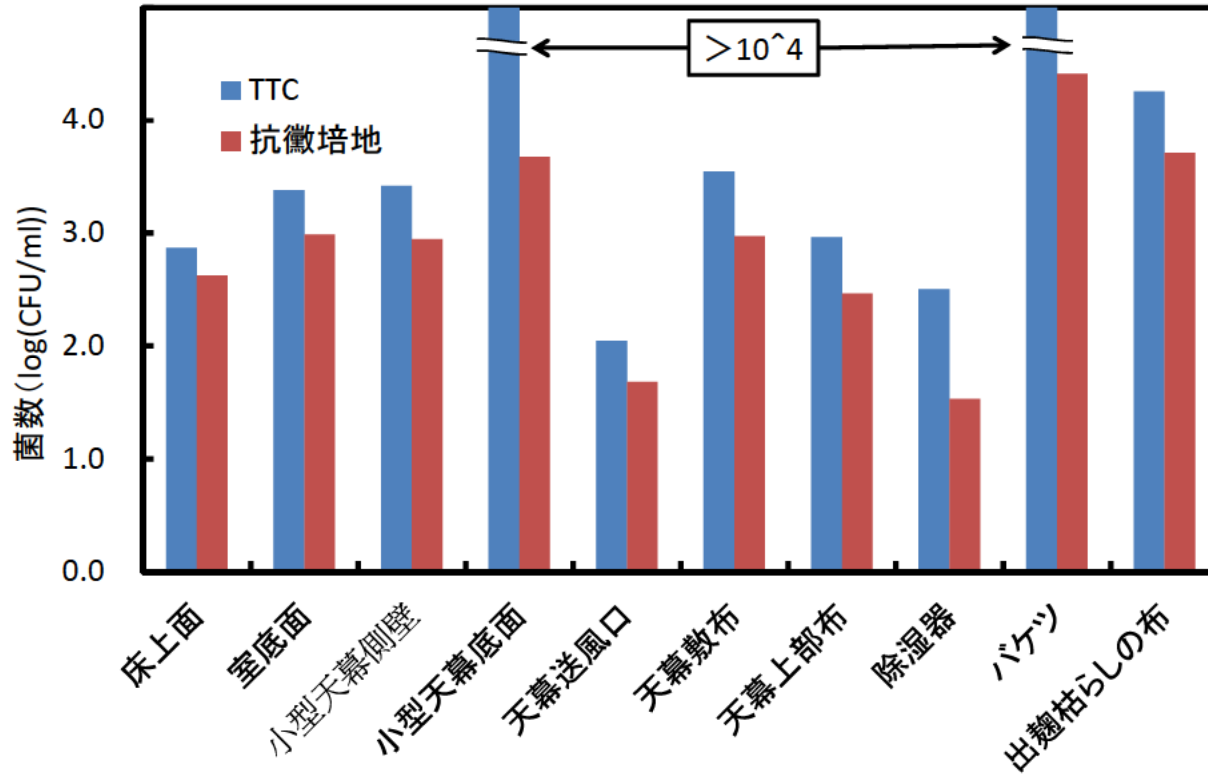
清酒酵母は4VGを分解出来ない



火落菌は4-VGを分解しない



室内の衛生管理が重要



どこに4-VG生産菌がいるのか？

検査場所	CFU/10 cm拭取	検査場所	菌	4-VG(ppb)
麹箱 下棧	20	麹箱 下棧	1-1	57564.4
床手入機	9		1-2	51406.4
除湿器 吸気口	3.7×10^2	床手入機	2-1	148.5
除湿器 吹出口	n.d.	除湿器 吸気口	3-1	42.9
床 上面	n.d.	室 ゆか面	5-1	67279.3
麹貯蔵室 ゆか	4		5-2	66015.1
室 ゆか面	n.d.	エアシューター 空気取り入れ口	6-1	65590.3
天幕内 ゆか面	n.d.	室 天窓	6-2	337.6
天幕 吹出口	n.d.		7-1	61.2
エアシューター 空気取り入れ口	9	清掃後の室内拭き取り検査結果		
室 天窓	4			

ケムリ臭を出さないためにはどうする①

- 麴の汚染菌濃度を下げる
布・器具・履き物・手の清潔、部外者の立ち入り禁止など、手袋の使用は効果的
- 不必要な多湿条件で長時間製麴を行わない
特殊な環境を造り、特定の微生物の増殖を招く
- オリと絡ませる期間を短くする
細菌数の多い麴を使用した場合
乳酸菌汚染の可能性のある場合

ケムリ臭を出さないためにはどうする②

- 麴のFAエステラーゼ活性を下げる
種菌、製麴方法など不明
- 原料米のFA含有量を下げる
栽培方法との因果関係が不明
- 酵母のFAエステラーゼ？
- 未解明の要因？

最近明らかになったこと

- グアイアコール、4-エチルグアイアコールなど他のフェノール化合物の共存により燻製臭と認識される。(酒類総研、秋田県立大)
- 生成原因は、麴から持ち込まれる細菌による変換。



外から持ち込まれる細菌数を減らす事が
異臭対策の要

過去の知見を参考に 製麴する事が重要

- 出発水分を下げる事が細菌の増殖抑制に顕著に働く。
Awを下げる。
- 麴の不均一接種は細菌の著しい増加をもたらす。
- 麴菌の増殖遅れは細菌の増殖量の増大を起こす。接種量が多ければ細菌の増殖抑制につながる。
- 攪拌は増殖した細菌菌体を蒸米上の他の未接種部位に再接種することを意味する。
- 麴菌の初期の高温での培養は汚染菌の増殖速度の増加を招く、特に、*B. subtilis*
- 汚染細菌の混入時期が培養初期、特に麴菌接種以前であるほどその影響が著しく現れる。
- 増殖を抑制するには、*B. subtilis*では高温、高水分の培養を避ける。

(麴汚染細菌の蒸し米上での増殖特性 奈良原英樹(醗酵工学会誌, 59(3), 207-216(1981))