

## 泡盛古酒用麴の製造技術に関する研究

福地香、田村博三、比嘉賢一

### 1. はじめに

泡盛は、貯蔵することでよい香りや味に変化する。それは泡盛には香味成分のもととなるものが豊富に含まれているため、これらが貯蔵中にうまく変化することにより古酒の品質向上につながる。逆に、香味成分のもととなる成分が多く含まれていない泡盛を貯蔵した場合、香味豊かな古酒を得ることができない。したがって、貯蔵用泡盛はこれらの成分をつくり出すような製造方法を採用する必要がある。

古酒の甘い香りのひとつにバニリンがあげられる。近年、小関らの報告<sup>1)</sup>において、泡盛の製造工程におけるバニリンの生成機構が明らかになっている。その生成機構を以下に示した。それによると、バニリンは原料米に由来し、バニリンの前駆体とされるフェルラ酸は、黒麹菌が生産する酵素によって切り出される。もろみ中に遊離したフェルラ酸は蒸留過程で酸と熱によって 4-β-ニルグアイアコールに変換される。その後、熟成過程でバニリンが生成する。本センターではこの生成機構を参考にし、古酒香成分を豊富に含むような泡盛の製造条件を検討した。

今年度は、泡盛製造の第一段階である製麴について、時間及び温度を変化させ、酵素力の面から製造条件の検討を行った。

原料米 ⇒ ⇒ フェルラ酸

フェルラ酸エステラーゼ  
キシラナーゼ

⇒ 4-β-ニルグアイアコール ⇒ バニリン  
酸・熱 熟成

本年度の検討範囲

### 2. 実験方法及び実験条件

#### 2-1. 製麴方法

##### (1) 供試種麴

供試種麴は沖縄県酒造協同組合で製造している種麴とし、照屋ら<sup>2)</sup>の方法に従い調製した。すなわちセンター保存菌株 2401 株 (*Asp. saitoi* タイプ) 及び 2201 株 (*Asp. awamori* タイプ) の種麴を 2:1 の割合で混合し、製麴試験に用いた。

##### (2) 製麴方法 1

製麴時間の検討には、以下の製麴法を用いた。

タイ丸米 1kg をネットに入れ、30 分間浸漬した。次に 30 分間の水切りを行い、オートクレーブにて 121 °C で 10 分蒸煮した。オートクレーブから取り出し、米をほぐした後、再び蒸煮し

表 1 各製麴時間における条件

製麴 条件	製麴温度		製麴時間 (hr)
	前半 (20hr)	後半	
I	37°C	35°C	36
II			38
III			40
IV			42
V			44
VI			46

使用タイ米 : 1kg

表 2 各製麴温度における条件

製麴 条件	製麴温度 (°C)		製麴時間 (hr)
	前半 (20hr)	後半	
VII	35°C	35°C	40
VIII	37°C		
IX	42°C		

使用タイ米 : 150g

た。放冷後、前述の種麴を 0.1 %接種し、温度 37 °C、相対湿度 95 %に設定した恒温恒湿機で培養を行った。培養開始から 20 時間以降、温度を 35 °Cに設定した。手入れは 18 時間目と 24 時間目に行った。36 時間後から 2 時間毎に約 50g の試料を採取した。製麴条件を表 1 に示した。

### (3) 製麴方法 2

製麴温度の検討には照屋の方法<sup>3)</sup>に基づき製麴を行った。

タイ丸米 150g を測りとり、洗米後、195g となるまで浸漬水を加えて 3 時間限定吸水を行った。オートクレーブにて 121 °Cで 5 分蒸煮した。放冷後、前述の種麴を 0.1 %接種し、温度をそれぞれ 35 °C、37 °C、42 °C、相対湿度を 95 %に設定した恒温恒湿機で培養を行った。20 時間培養後、温度を 35 °Cに設定した。手入れは 20 時間目と 25 時間目に行い、40 時間後を出麴とした。培養条件を表 2 に示した。

## 2-2. pH、酸度、水分の測定

得られた麴の酸度は国税庁所定分析法注解<sup>4)</sup>の方法に従って測定した。pH の測定は、酸度の測定に用いた麴の水浸出液の pH の値とした。

水分の測定は赤外線水分計 (型式 7093 01、(株)カールツアイス ザルトリウス) を用いて測定した。麴 約 3g を測りとり、15 分間赤外線をあてて水分を測定した。測定条件は、所定分析法に従って測定したときの水分値と同じ値が得られるような条件を設定した。

## 2-3. 各種酵素活性の測定

得られた麴について、フェルラ酸エステラーゼ及びキシラナーゼの酵素活性を測定した。また、調製した麴の状態を把握するため、 $\alpha$ -アミラーゼ、耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼの活性についても併せて測定した。

### (1) 酵素液の調製

酵素の抽出は国税庁所定分析法注解<sup>4)</sup>の方法に従った。麴 10g に酢酸緩衝液 (pH 5.0、0.5% NaCl) 50 ml を加え、室温で三時間ときどき振りまぜながら浸出した後ろ過した。そのろ液 10ml を透析膜に入れ、M/100 酢酸緩衝液に対して低温で 1 夜透析した後、水で 20ml にし酵素液とした。

### (2) フェルラ酸エステラーゼの活性測定

フェルラ酸エステラーゼの活性測定は石原らの方法<sup>5)</sup>に準じて行った。

#### ① 基質の調製

基質は小麦ふすまから調製したフェルラ酸含有オリゴ糖とした。

小麦ふすまを粉碎機 (ZM100、三田村理研工業(株)) で 0.5 メッシュに粉末化した。本粉末 20g に蒸留水 245ml、1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 2.5ml、1 % アジ化ナトリウム溶液 2.5ml 及びメイヨーラーゼ (明治製菓株式会社、ロット No. 10710) 2g を混合し、37 °Cで 2 日間酵素反応を行った。反応後、7000 回転で 20 分間の遠心分離を行い、上澄液を 20 分煮沸して酵素反応を停止した。その後、12000 回転で 10 分間遠心分離を行い、フェルラ酸含有オリゴ糖を含む上

澄液を得た。

### ②フェルラ酸エステラーゼの酵素反応

前述した基質溶液 1ml に酵素液 0.5ml を加え、37℃で 50 分間酵素反応を行った。反応液を 10 分間煮沸することにより反応を停止した。本反応液に 5 N 塩酸 0.2 ml を加えて酸性とした後、酢酸エチル 3 ml を 2 回に分けて加えて生成したフェルラ酸の抽出を行った。3000 回転で 5 分間の遠心分離後、採取した酢酸エチル抽出液をエバポレーターで乾固し、0.05 % リン酸-アセトニトリル (4:3) 溶液 1ml に溶解した。本溶液中のフェルラ酸量は高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

フェルラ酸エステラーゼ活性は、フェルラ酸オリゴ糖から 37℃で 1 分間に 1  $\mu$  mol のフェルラ酸を遊離する活性を 1 単位とした。

### ③高速液体クロマトグラフィーによるフェルラ酸の測定

フェルラ酸の定量は島津高速液体クロマトグラフを用いて右記の条件で逆相クロマトグラフィーにより行った。フェルラ酸量は、検量線法により求めた標準物質のピーク面積比から算出した。

#### HPLC の測定条件

カラム	: 5C18-250A (GL Sciences Inc.)
溶離液	: 0.05 % リン酸-アセトニトリル (4:3)
流量	: 0.8 ml/min
装置	: 紫外可視検出器 (320nm) SPD-M10A vp
システムコントローラー	SCL-10A vp
ポンプ	LC-10AD vp
カラムオープン	CTO-10AC vp
オートインジェクター	SIL-10AD vp
デガッサー	DGU-12A
クロマトグラフィーデータシステム	CLASS-VP

#### (3) キシラナーゼの活性測定

キシラナーゼの活性測定は伊藤らの報告<sup>6)</sup>に準じて行った。

0.2% キシラン (from oat spelt, SIGMA) 懸濁液 0.5ml、50mM 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 0.4ml 及び酵素液 0.1ml を混合し、40℃で 30 分間酵素反応を行った。遊離した還元糖を Somogyi-Nelson 法で測定した。

キシラナーゼ活性は、キシランから 40℃で 1 分間に 1  $\mu$  mol のキシロースを遊離する活性を 1 単位とした。

#### (4) 一般的な各種酵素活性の測定

$\alpha$ -アミラーゼ、耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼの酵素活性の測定は、国税庁所定分析法注解<sup>4)</sup>の方法に従った。

### 3. 実験結果及び考察

フェルラ酸が植物細胞壁から脱離するためにはフェルラ酸エステラーゼやキシラナーゼといった麴酵素の活性が必要となる。麴酵素の生成には麴の培養条件が影響することから製麴時間と温度を検討し、各条件の出麴についてフェルラ酸エステラーゼ及びキシラナーゼの酵素活性を測定した。また、麴の状態を把握するために pH、酸度、水分のほか、一般的な酵素活性についても測定した。

### 3-1. 製麴時間が各酵素活性に及ぼす影響

タイ丸米 (1kg) を蒸煮して種麴を接種し、製麴を行った。36 時間の培養以降、2 時間毎に計 6 回、麴を採取して酵素活性の測定に供した。各製麴時間における出麴の pH、酸度、水分の分析結果を表 3 に示した。

酸度は 42 ~ 44 時間製麴で高い値となり、その後減少が見られた。

製麴時間の変化によるフェルラ酸エステラーゼ及びキシラナーゼの酵素活性の推移を調べた (図 1)。フェルラ酸エステラーゼ活性は時間経過による大きな差はみられなかった。44 時間付近でわずかに活性が増加していた。キシラナーゼの活性においても同様の傾向がみられた。

次に各アミラーゼの酵素活性を測定した (図 2)。いずれのアミラーゼにおいても製麴時間の経過に伴って増加する傾向がみられた。ただし、製麴 46 時間でグルコアミラーゼ活性に減少がみられた。

酸性プロテアーゼと酸性カルボキシペプチダーゼの活性の変化を図 3 に示した。こちらも徐々に増加する傾向がみられた。

いずれの酵素においても、36 ~ 46 時間における製麴時間の違いによる酵素活性への大きな影響は観測できなかった。岡崎らの報告<sup>7)</sup>によると、清酒麴の  $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼは適当な温度条件下においてそれぞれの酵素生産は 36 時間製麴で最大に達し、それ以後の生産は少ないと報告されている。したがって、今回黒麴が生産した各酵素においても 36 時間培養以降、酵素の生産は穏やかな状態になっていると考えられる。

また、製麴時間経過に伴う酸度の増加にも大きな変化がみられなかった。これをふまえると今回の製麴は好条件で進んだため、培養 36 時間ですでに破精まわりの良い、出麴に近い状態となっており、各製麴条件の差が観測しづらかったことも考えられる。

以上の結果及び実際の工場での製麴時間が約 42 時間であることを含め、製麴時間は 40 時間前後であればデンプンの消費が抑えられ、かつ酵素が生産された麴が得られると考えられる。

表 3 各製麴時間における pH、酸度、水分

製麴時間 (hr)	pH	酸度	水分 (%)
36	3.49	2.68	27.9
38	3.51	2.68	25.1
40	3.54	2.68	26.2
42	3.48	2.78	25.5
44	3.56	2.80	25.7
46	3.52	2.74	25.9

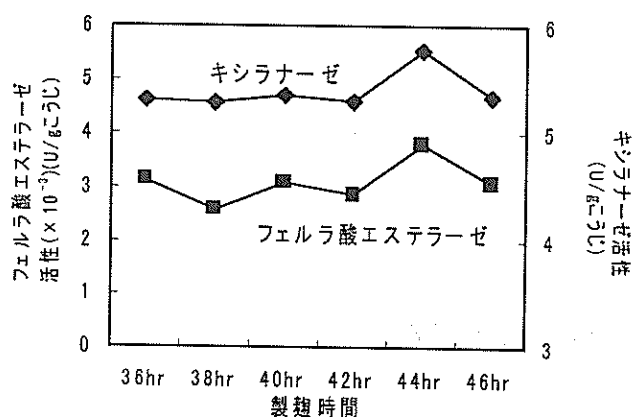


図 1. フェルラ酸エステラーゼ、キシラナーゼの酵素活性に及ぼす製麴時間の影響

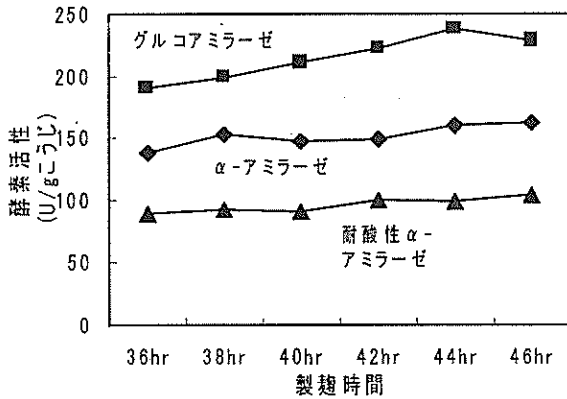


図 2.  $\alpha$ -アミラーゼ、耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼの酵素活性に及ぼす製麹時間の影響

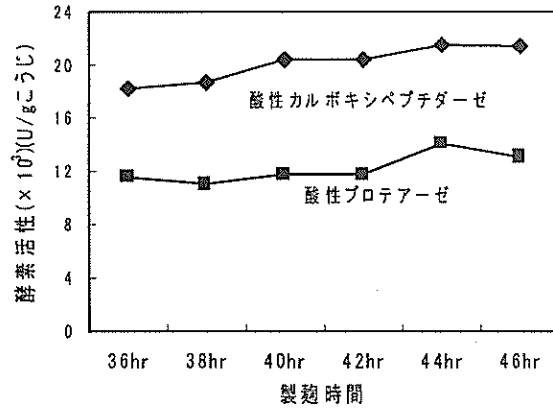


図 3. 酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼの酵素活性に及ぼす製麹時間の影響

### 3-2. 製麹温度が各酵素活性に及ぼす影響

タイ丸米 (150g  $\times$  3) を蒸煮して種麴を接種し、製麹を行った。培養開始から 20 時間までは各温度条件 (35  $^{\circ}$ C、37  $^{\circ}$ C、42  $^{\circ}$ C) で培養を行い、その後 20 時間は培養温度を 35  $^{\circ}$ C に設定した。

この 3 条件における出麴の pH、酸度、水分の分析結果を表 3 に示した。このとき、前半の培養温度が高いほど酸度が高くなる傾向がみられた。

各製麹温度におけるフェルラ酸エステラーゼ及びキシラナーゼの活性を図 4 に示した。フェルラ酸エステラーゼ活性については各製麹条件の間に大きな差はみられず、42  $^{\circ}$ C 製麹でわずかに低い活性値を示した。キシラナーゼ活性において、37  $^{\circ}$ C 製麹が他の 2 条件に比べて活性が高い傾向がみられた。

$\alpha$ -アミラーゼ、耐酸性  $\alpha$ -アミラーゼの活性では 3 条件で大きな差はみられなかった (図 5)。グルコアミラーゼ活性では 37  $^{\circ}$ C 製麹で高い値を示した。

一般に  $\alpha$ -アミラーゼ、グルコアミラーゼは製麹温度が高いほどその酵素生産が多くなる。しかし、 $\alpha$ -アミラーゼについて岩野らは次のように報告している<sup>9)</sup>。すなわち、焼酎白麴を製麹したとき、製麹前半を 35  $^{\circ}$ C または 40  $^{\circ}$ C にし後半をいずれも 35  $^{\circ}$ C にした場合、 $\alpha$ -アミラーゼ活性の違いはわずか 5 U (4%) であると報告している。製麹前半の設定温度差よりもむしろ高温 (40  $^{\circ}$ C) の積算時間が  $\alpha$ -アミラーゼに大きく影響するという。したがって、黒麴の  $\alpha$ -アミラーゼにおいても前半の培養温度の違いによる影響はほとんどないと考えられる。

グルコアミラーゼに関しては製麹の前半を高温で製麹するほうが菌の増殖とともに高い活性を示すことがわかっている。しかし、図 5 のグルコアミラーゼの結果では 42  $^{\circ}$ C 製麹で低い活性となっていた。今回の黒麴の製麹では 42  $^{\circ}$ C の温度設定が黒麴菌にとっては高温となり、菌の生育を阻害して酵素活性が低くなったことが考えられた。これを確かめるため、37  $^{\circ}$ C と 42  $^{\circ}$ C 製麹

表 4 各製麴温度における pH、酸度、水分

製麴温度		pH	酸度	水分 (%)
前半	後半			
35℃	35℃	3.50	1.97	28.2
37℃	35℃	3.52	2.21	28.5
42℃	35℃	3.47	2.61	27.8

製麴時間：40時間

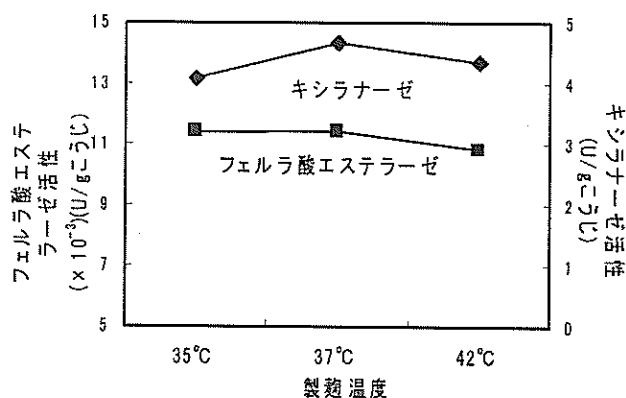


図 4. フェルラ酸エステラーゼ、キシラナーゼの酵素活性に及ぼす製麴温度の影響

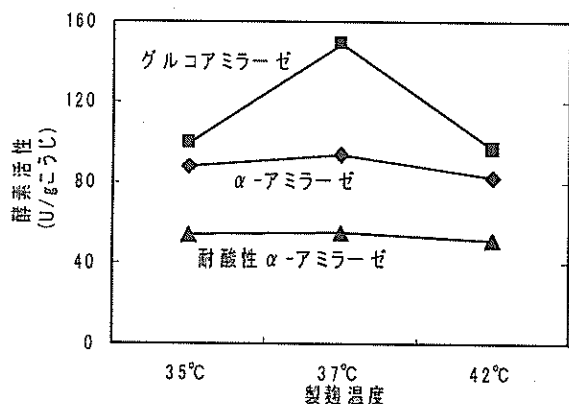


図 5. α-アミラーゼ、耐酸性 α-アミラーゼ、グルコアミラーゼの酵素活性に及ぼす製麴温度の影響

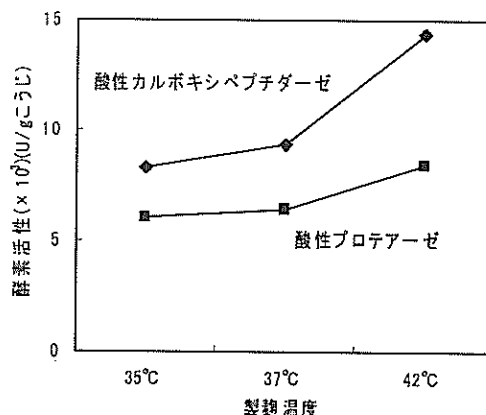


図 6. 酸性プロテアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼの酵素活性に及ぼす製麴温度の影響

表 5. 37℃または42℃製麴における出麴の菌体量

製麴条件	麹菌量* (mg/g 麹)
37℃→35℃	6.79
42℃→35℃	7.52

※乾燥麹あたりの菌体量とした。

表 6. 37℃または42℃製麴における菌体量あたりの酵素活性

酵素活性 (U/mg 菌体量)	37℃製麴	42℃製麴
フェルラ酸エステラーゼ (x 10 <sup>3</sup> )	2.40	2.00
キシラナーゼ (x 10 <sup>1</sup> )	9.79	8.02
α-アミラーゼ	19.4	15.1
耐酸性 α-アミラーゼ	11.3	9.50
グルコアミラーゼ	31.3	17.7
酸性プロテアーゼ (x 10 <sup>3</sup> )	1.32	1.55
酸性カルボキシペプチダーゼ (x 10 <sup>3</sup> )	1.86	2.64

について出麴の菌体量を測定し、生育の度合いを比較した。菌体量は麹菌量測定キット (キッコーマン株式会社) を用いて測定した。その結果、42℃製麴が 37℃製麴に比べて菌体量が多いことがわかった (表 5)。

この結果をふまえ、酵素生産の面ではどちらの条件が適当かを判断するため、菌体量あたりの

各種酵素活性を算出した (表 6)。この値が大きいほうが効率よく酵素を生産している。その結果、糖化系酵素においては 37℃ 製麴で高い値が得られた。

フェルラ酸エステラーゼ及びキシラナーゼの酵素活性もまた 37℃ 製麴で高い値を示した。以上の結果より、製麴前半における温度条件は、42℃ 設定の場合は菌の増殖に適していたが、酵素活性の面では 37℃ の設定が最も適当であることがわかった。

#### 4. おわりに

1) フェルラ酸エステラーゼやキシラナーゼなどの酵素活性に及ぼす製麴時間の影響について、36～46 時間の範囲では大きな差が認められなかった。デンプンの消費を抑えつつ酵素が生産された麴を得るため、40 時間前後の製麴時間が適当であると考えられた。

2) 製麴前半の培養温度が及ぼす麴への影響について 35℃、37℃、42℃ の 3 条件で検討した。その結果、フェルラ酸エステラーゼやキシラナーゼ活性に大きな変化はみられなかった。グルコアミラーゼ活性が高い値を示した 37℃ 製麴と、酸性プロテアーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼ活性が高かった 42℃ 製麴で麴の菌体量を比較したところ、42℃ 製麴の菌体量が多かった。フェルラ酸エステラーゼ及びキシラナーゼの菌体量に対する活性は 37℃ 製麴の麴が高く、効率よく酵素を生産することがわかった。

#### 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、酵素剤を提供していただいた明治製菓株式会社の皆様に厚くお礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Koseki, T., Furuse, S., Iwano, K., and Matsuzawa, H., Purification and Characterization of a Feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62(10), 2032-2034, 1998.
- 2) 照屋、田村、赤嶺、種麴別泡盛試験醸造 — 3 種類の試作泡盛種麴による泡盛試験醸造結果について — 沖工試業務報告第 14 号 1986
- 3) 照屋、泡盛種麴の製造技術に関する研究 (第 1 報) 沖工試業務報告第 8 号 1980
- 4) 注解編集委員会編、第四回改正国税庁所定分析法注解、1993
- 5) Ishihara, M., Nakazato, N., Chibana, K., Tawata, S., and Toyama, S., Purification and Characterization of Feruloyl Esterase from *Aspergillus awamori*. *Food Sci. Technol. Res.*, 5(3), 251-254, 1999
- 6) Ito, K., Ogasawara, H., Sugimoto, T., and Ishikawa, T., Purification and Properties of Acid Stable Xylanases from *Aspergillus kawachii*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(4), 547-550, 1992
- 7) 岡崎、竹内、菅間、製麴条件の増殖および酵素生産に及ぼす影響、*J. Brew. Soc. Japan*, Vol.74, No.10, p.683～686(1979)
- 8) 岩野、三上、福田、能勢、椎木、焼酎白麴の各種酵素生産に及ぼす製麴条件の影響、*J. Brew. Soc. Japan*, Vol.82, No.3, p.200～294(1987)

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

TEL (098)929-0111

FAX (098)929-0115

URL : <http://www.pref.okinawa.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターにご連絡ください。