

繊維分解酵素を用いた本格いも焼酎の製造に関する研究

食品工業部 高峯和則, 安藤義則, 亀澤浩幸, 下野かおり, 間世田春作

Study on Making Sweet Potato Shochu Using Dietary Fiber Degradation Enzyme

Kazunori TAKAMINE, Yoshinori ANDO, Hiroyuki KAMESAWA, Kaori SHIMONO and Shunsaku MASEDA

本格いも焼酎の酒質の多様化を目的とし、減圧蒸留に必要なもろみ粘度の低下技術およびバニリン含有量の増加法について検討した。その結果、もろみに水を添加して蒸留すると、原酒アルコール濃度、又は、蒸留歩合が低下した。甘藷に含まれるフェルラ酸含量は品種により異なった。もろみにフェルラ酸を添加すると、焼酎にバニリンおよび4-ピニルグアイヤコールが増加した。繊維分解酵素を2次仕込み時に添加すると、もろみ粘度が酵素無添加の50%以下になり、減圧蒸留して得られた焼酎はいずれも柑橘系の香りがあり、軽快な酒質となった。

Keyword : 繊維分解酵素, いも焼酎, 減圧蒸留, バニリン, フェルラ酸

1. 緒言

本格焼酎は、ソフトタイプから濃醇タイプまで幅広く、多種多様な酒質が求められている。特に、いも焼酎では原料、製法、貯蔵法などを工夫した商品の開発が進められている。ソフトタイプの焼酎製造法として減圧蒸留法の導入が考えられる。しかし、いも焼酎もろみは麦焼酎のもろみと比べ粘度が非常に高く¹⁾、そのまま減圧蒸留することは困難である。中村ら²⁾は麦焼酎製造で発生する蒸留粕を仕込み水に利用した返し仕込み法において、もろみ粘度を低下する方法としてセルラーゼの効果について報告している。また、川野ら³⁾と三上ら⁴⁾は米麹の代わりに酵素を用いていも焼酎を製造すると、収得量の向上と香りの高いいも焼酎の製造が可能になることについて報告している。

一方、泡盛の特徴香はバニラ香といわれている⁵⁾。これは、原料米の繊維に含まれるフェルラ酸が発酵、蒸留、貯蔵の各工程でバニリンに変化するためと言われている⁶⁾。いも焼酎にもバニリンは含まれているが、その濃度は泡盛の1/10以下である。小関⁶⁾はバニリンの閾値は0.2mg/Lであり、5年貯蔵の泡盛には約1.1mg/L含まれると報告している。

そこで、本格いも焼酎の酒質の多様化を目的として、減圧蒸留を導入するためのもろみ粘度の低下方法および焼酎へのバニリン含有量の増加法について検討した。

2. 実験方法

2.1 甘藷中のフェルラ酸の測定

九州農業試験場(現、九州沖縄農業研究センター)で試験栽培された10種類の甘藷⁷⁾についてフェルラ酸濃度を測定した。前処理として、甘藷を厚さ2~3mmのイチヨウ切

りにし、50℃にて1昼夜乾燥後、乳鉢状粉碎器を用いて250μm以下に粉碎した。フェルラ酸の抽出および定量は西澤ら⁸⁾の方法を一部改変して行った。すなわち、粉碎した甘藷100mgを精秤し、0.5molの水酸化ナトリウム溶液5.0mlを加えて均一な懸濁液になるまで攪拌した。これを60℃にて90分間保ち、加水分解を行った。次に、この溶液を6.0molの塩酸溶液で酸性とし1-ブタノール1.0mlで3回抽出し、この抽出液を室温で減圧乾燥させた。乾燥物に50mmol酢酸緩衝液(pH4.0):アセトニトリル溶液(1:1)混合液1.0mlを加え溶解させ、溶液を高速液体クロマトグラフィー(以後、H.P.L.C.)で分析した。

2.2 繊維分解酵素の選抜

市販されている9社43種類の繊維分解酵素の中から、甘藷の繊維に対して分解能に優れ、かつ、フェルラ酸遊離能のある酵素の選抜を以下の方法で行った。すなわち、著者らの方法⁹⁾で甘藷澱粉粕から調製した繊維を1%濃度になるように50mmolの酢酸緩衝液(pH4.0)中に懸濁させた。この懸濁液0.9mlに市販酵素溶液0.1ml添加し、40℃で20時間反応した。この反応液を遠心分離して得られた上澄み液の全糖をフェノール・硫酸法¹⁰⁾でグルコースとして測定し食物繊維分解能とした。また、フェルラ酸遊離活性は、上澄み液0.5mlに6molの塩酸溶液55μlを添加し、1-ブタノール1.0mlで2回抽出し、この抽出液を室温で減圧乾燥させた。乾燥物に50mmol酢酸緩衝液(pH4.0):アセトニトリル溶液(1:1)混合液1.0mlを加え溶解させ、H.P.L.C.で分析した。

なお、市販酵素溶液は市販酵素100mgを50mmolの酢酸緩衝液(pH4.0)10mlに懸濁後、3000rpmで10分間遠心分離して得られた上澄み液を用いた。

2.3 H.P.L.C.

フェルラ酸、バニリンおよび4-ビニルグアイヤコール(以後、4-VG)の分析はShibuyaの方法¹¹⁾を一部改変して行った。用いたカラムはGLサイエンス社製の5C18-250A、容離液はアセトニトリルを含む50mmol酢酸緩衝液(pH4.0)による30分間のグラジエント(20→50%)、流速は1.0ml/minで行った。なお、検出器の波長はフェルラ酸の分析には320nm、バニリンおよび4-VGの分析には280nmに設定した。

糖組成の分析は、松橋ら¹²⁾の方法を一部改変して行った。用いたカラムは、昭和電工製のShodex SUGAR SH1821(8×300mm)、検出器は示差屈折計(日本分光社製RID-300)、溶媒は0.0025mol硫酸、流速は1.0ml/min、カラム温度は80で行った。

2.4 粘度測定

粘度は、検体200gを300ml容のトルビーカーに取り、30の恒温にて、B型粘度計(東京計器(株)社製、BM形式)を用いて測定した。

2.5 小仕込み試験

酵母は鹿児島5号を使用した。前培養は酵母エキス1%、ポリペプトン2%およびグルコース2%からなるYPD液体培地に斜面培地より一金耳植菌し30、48時間静置培養した。小仕込み試験は以下の方法で行った。すなわち、2L容ガラス製サンプル瓶に前培養液5gと米麹200gおよび水道水235gを添加し1次仕込みを行い、5日間発酵させた。これに、蒸煮・粉碎した甘藷1.0kgと水道水560gを加え2次仕込みを行った。発酵温度は恒温槽内で30一定とした。発酵経過は、発生する炭酸ガス重量をもろみの減少重量から算出することによって求めた。なお、サンプル瓶は濃硫酸の入った発酵栓を施した。発酵終了後のもろみは常圧蒸留法または減圧蒸留法で行った。

2.6 蒸留

3L容のガラス製の蒸留器にもろみ1500gを入れ、常圧蒸留は蒸気をもろみに直接吹き込みながら行った。蒸気吹き込み開始からアルコールが流出するまでの時間は約20分間を要した。その後1.5時間程度で蒸留が終了した。減圧蒸留は、真空ポンプを用い減圧度680~720mmHgに調製し、蒸留温度は45~55で行った。

2.7 もろみの分析

発酵終了後のもろみのアルコール濃度は、もろみをガーゼで濾過し、得られた濾液200mlを用いて国税庁所定分析法¹³⁾に従い行った。もろみ中の酵母の生菌数は、YPD寒天培地上に生育してきた菌体数から求めた。

2.8 焼酎の香気成分

香気成分の分析はHP5890型ガスクロマトグラフ(GC)を使用し、カラムはキャピラリーカラムDB-WAX(60m×0.25mm

×0.25μm)を用いた。注入口温度240、カラム温度40で3分間保持後、3/minで230まで昇温し、10分間保持した。スプリット比は1:30とした。キャリアガスはヘリウムガスで、流速は2.0ml/min、検出器はFIDを使用した。

微量香気成分は、神渡ら¹⁴⁾の方法に従い固相抽出後濃縮し、ガスクロマト質量分析計(GC-MAS)を用い定量した。なお、GC-MASの分析条件は、GCと同条件で行った。

2.9 官能評価

蒸留して得られた焼酎を蒸留水でアルコール濃度25%に調整し、ADVANTEC社製のセルロースアセテート(開口径3.0μm)を用いて常圧下で濾過したものについて味と香りについて評価した。

3. 結果および考察

3.1 蒸留歩合に及ぼすもろみアルコール濃度の影響

いも焼酎もろみに水を添加するともろみ粘度が低下し、減圧蒸留が可能となる。一方、もろみアルコール濃度が低いほど、得られる焼酎原酒のアルコール濃度は低くなることは経験的に知られている。

そこで、10~20%に調製したエタノール水溶液をモデルもろみ液とし常圧蒸留を行った。なお、蒸留して得られたエタノール水溶液を原酒とし、アルコール回収率を蒸留歩合とした。また、一般的には、いも焼酎製造において原酒アルコール濃度および蒸留歩合はそれぞれ、36%および97%である。

図1に示すように原酒アルコール濃度が36%以上で、かつ、蒸留歩合が97%以上になるためには、エタノール濃度が14%以上でなければならないことがわかった。原酒アルコール濃度が36%の時、エタノール濃度が10および12%では、蒸留歩合がそれぞれ92および95%であった。また、エタノール濃度が12%の場合、蒸留歩合が97%以上になるまで蒸留を続けた結果、原酒アルコール濃度は29%まで低下した。

一般的に、いも焼酎のもろみアルコール濃度は13~14%である。このことから、もろみ粘度を低下する目的でもろ

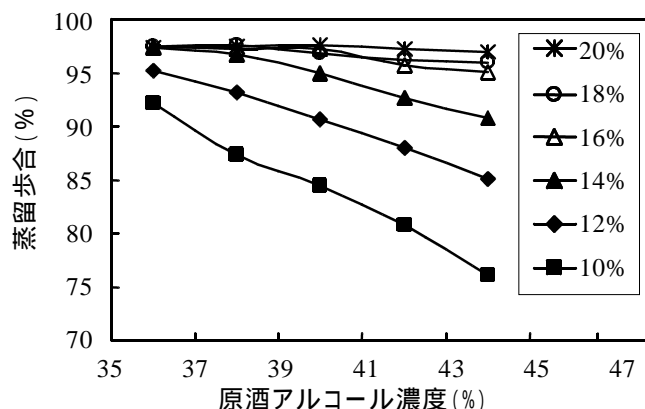


図1 もろみアルコール濃度の影響

みに水を添加し蒸留すると、原酒アルコール濃度、又は、蒸留歩合が低下することがわかった。

3.2 フェルラ酸含量 表1 フェルラ酸含量

10種類の甘藷についてフェルラ酸含量を測定した。その結果、表1に示すように、焼酎原料に使用されているコガネセンガンおよびシロユタカはフェルラ酸がそれぞれ、5および22mg/kgであった。青果用の高系14号が28mg/kgと最も高い含量であった。

品種名	mg/kg
コガネセンガン	5
シロユタカ	22
九州126号	7
九州123号	7
九系94279-2	3
九系93017-5	19
九系95243-29	21
九州121号	10
ベニオトメ	18
高系14号	28

3.3 いも焼酎製造におけるフェルラ酸添加の影響

西澤ら⁸⁾は米中にフェルラ酸が94mg/kg含まれていると報告している。表1に示すようにコガネセンガンは5 mg/kg含まれていたことから、いも焼酎もろみ中にフェルラ酸が全て遊離すると約12mg/Lと計算できる。

そこで、2次仕込み時にフェルラ酸が0~500mg/Lになるように添加し、小仕込み試験を行った。その結果、図2に示すようにフェルラ酸を500mg/L添加したもろみは、2次仕込み以降ほとんど発酵しなかった。このもろみ中の酵母生菌数を測定した結果、 1×10^6 個/g以下であった。一方、このもろみpHは4.0であり、フェルラ酸無添加もろみのpHが4.2と比べ大差はなかった。小関⁶⁾はフェルラ酸は抗菌活性を有し、フェルラ酸濃度がある濃度以上では酵母の増殖が停止すると報告した。また、我部ら¹⁵⁾は、フェルラ酸耐性株を取得し、その株が親株では見いだされなかったフェルラ酸から4-VGへの変換能を有するようになったと報告している。今回の実験においてもフェルラ酸添加濃度が500mg/Lにおいて、ほとんど発酵しなかった原因としてフェルラ酸の抗菌作用のためと考えられる。

発酵終了後のもろみを常圧蒸留法で蒸留した。表2に示すように、焼酎の香気成分はフェルラ酸を500mg/L添加した焼酎以外は対照と比べ大差はなかった。フェルラ酸添加が0~5 mg/Lでは焼酎に含まれるバニリンは26~27 μg/L

であったが、10および100mg/L添加では無添加と比べ、それぞれ2および12倍に増加した。バニリンの前駆物質である4-VGは1および10mg/L添加で無添加と比べ、それぞれ2および7倍に増加した。これらのことから、フェルラ酸が増加することで、発酵および蒸留工程において、4-VGへと変換されていくが、バニリンへの変換は緩やかであることがわかった。

官能評価の結果、フェルラ酸添加が増加するほど、対照と比べ木香様臭が強くなった。

表2 焼酎に含まれる香気成分

	フェルラ酸添加量(mg/L)					
	0	1	5	10	100	500
酢酸エチル(mg/L)	52	66	60	60	51	7
アセトール(mg/L)	3	5	4	5	5	0
アセトイン(mg/L)	2	2	1	1	2	2723
ルナル ^o ピ ^o ルアルコール(mg/L)	101	109	104	103	99	33
イソ ^o チルアルコール(mg/L)	159	157	159	166	117	10
アミルアルコール類 ^{*1} (mg/L)	345	372	345	360	305	20
-フェニルアルコール(mg/L)	64	57	63	65	44	60
酢酸イソアミル(mg/L)	5	4	4	5	3	0
酢酸 フェネチル(mg/L)	2	2	2	2	2	2
バニリン(μg/L)	26	26	27	59	325	782
4-VG ^{*2} (μg/L)	92	209	309	673	2702	28607

* 1 : イソアミルアルコール+活性アミルアルコール

* 2 : 4 - ビニルグアイヤコール

3.4 繊維分解酵素の選抜

図1の結果から、もろみ粘度を低下させる目的でもろみに水を添加すると、蒸留歩合が低下することがわかった。著者ら¹⁶⁾は、いも焼酎蒸留粕の粘度が高い原因は、蒸留粕中の不溶性画分にあると報告し、松久保ら¹⁷⁾は不溶性画分は酵母と繊維であり、その中で42%が繊維であると報告している。また、永濱¹⁸⁾は蒸留粕をアピセラゼ処理することで固液分離が改善されると報告している。これらのことから、もろみ粘度を低下させるためには、酵素で繊維を分解する必要があることがわかる。

一方、フェルラ酸は植物細胞壁にエステル結合しており¹⁹⁾、麹菌の生産するフェルラ酸エステラーゼによって原料からフェルラ酸は遊離する⁶⁾。また、福地ら²⁰⁾は、麹製造時において最高温度が37 の場合、42 と比べてフェルラ酸エステラーゼ活性が1.2倍増加したと報告している。しかし、酵素活性の増加が原料由来のフェルラ酸を効率よく遊離できるか明確ではない。

そこで、市販されている9社43種類の酵素の中から、繊維分解能に優れ、かつ、フェルラ酸遊離能のある酵素の選抜を行った。各社代表的な酵素について表3に示す。I社のNo. 3酵素は、繊維分解能が3711 μg/mlと最も高い値で

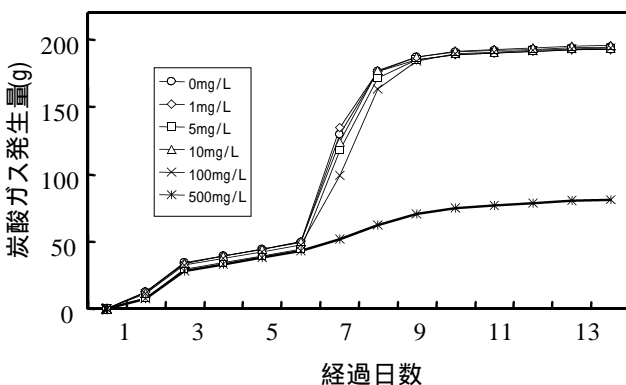


図2 発酵経過に及ぼすフェルラ酸の影響

表3 繊維分解酵素の選抜

会社 記号	酵素 番号	繊維 分解能 ($\mu\text{g/ml}$)	食物繊維が可溶化した糖組成 ($\mu\text{g/ml}$)							フェルラ酸 遊離率(%)
			Cell-4 ^{*1}	Cell-2 ^{*2}	Xy-2 ^{*3}	Gal acid ^{*4}	Glc ^{*5}	Xyl ^{*6}	Ara ^{*7}	
A	1	1554	48	0	74	490	181	399	230	3.2
B	3	2954	143	535	0	862	605	561	306	1.3
C	5	2071	88	0	0	249	754	493	285	2.3
D	1	69	0	7	0	0	18	18	0	0
E	1	3024	87	165	149	522	1134	407	284	0.8
F	1	782	0	17	0	157	216	0	3	0.3
G	2	3540	148	0	44	522	1717	577	324	0.5
	3	3503	132	0	0	553	1676	578	330	1.8
	11	3711	112	0	0	662	1801	606	359	0.2
H	1	3024	0	0	175	0	1755	0	192	3.2
I	3	3765	0	0	10	522	1912	0	170	5.5
J	2	1340	0	15	10	100	1000	150	75	1.6
	9	2254	0	0	0	820	500	20	100	9.9

*1:セロテトラオース, *2:セロピオース, *3:キシロピオース, *4:ガラクトツロン酸, *5:グルコース
*6:キシロース, *7:アラビノース

あり、その糖組成は、ガラクトツロン酸が522 $\mu\text{g/ml}$ とグルコースが1912 $\mu\text{g/ml}$ であった。フェルラ酸の遊離能についてはJ社のNo. 9酵素が9.9%と最も高い値であった。

3.5 蒸留粕粘度に及ぼす酵素添加量の影響

乳鉢で磨り潰した焼酎蒸留粕300gに6種類の酵素をそれぞれ、0.05~3.0g添加した。ロータリーシェーカー付き恒温槽で緩やかに攪拌しながら30℃で20時間反応後、B型粘度計を用い粘度を測定した。なお、酵素無添加の蒸留粕を対照とした。対照の粘度が0.83Pa \cdot sであったのに対し、図3に示すようにJ社のNo. 9酵素(J-9)以外の酵素では、0.05g添加で粘度が0.4Pa \cdot s以下に低下し、酵素添加量が増加するほど粘度が低下し、0.8g添加で0.1Pa \cdot s以下となった。J-9の酵素は、酵素添加量が増加したにも関わらず、粘度低下が緩やかであったが、これは、この酵素の主成分がペクチナーゼであるためと考えられる。I社のNo. 3酵素を0.05g添加した蒸留粕は、粘度が0.17Pa \cdot sに低下した。

一般的に、もろみを常圧蒸留するとその1.1倍量の蒸留粕が排出される。このことから、蒸留粕300gに酵素を0.05g添加すること、原料に対しては酵素添加量が0.03%と計算される。

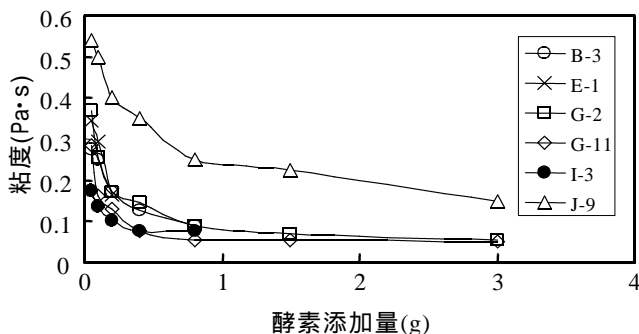


図3 蒸留粕粘度に及ぼす繊維分解酵素の添加量の影響

3.6 繊維分解酵素を添加した小仕込み試験

I社のNo. 3酵素を用いて、酵素を併用した小仕込み試験を行った。酵素添加は原料に対して0, 0.017, 0.03および0.13%になるように2次仕込み水に溶解して添加した。

図4に示すように、発酵経過は酵素添加量による違いはほとんど認められなかった。

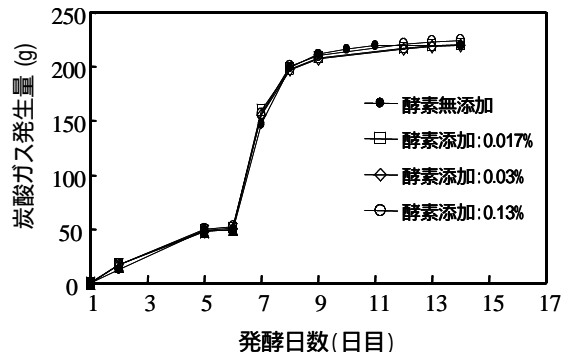


図4 酵素を併用した小仕込み試験

発酵終了後のもろみのアルコール濃度および粘度を分析した結果を表3に示す。もろみアルコール濃度に大差はなく、酵素添加による発酵阻害はなかった。また、もろみ粘度は、酵素添加量が増加するに従い低下し、0.13%添加では、0.39Pa \cdot sと無添加の3.7Pa \cdot sの約1/10に低下した。この値は、麦焼酎もろみの粘度0.25Pa \cdot s⁻¹に近い値であった。

蒸留して得られた焼酎を蒸留水でアルコール濃度25%に

表3 発酵終了後のもろみ分析

	酵素添加(%)			
	0	0.017	0.03	0.13
もろみアルコール濃度(%)	14.5	14.4	14.5	14.5
もろみ粘度 (Pa \cdot s)	3.7	1.4	0.63	0.39

調整し、セルロースアセテートを用いて常圧下で濾過後微量香気成分を分析した。その結果、表4に示すようにバニリンおよび4-VGは酵素添加による増加は認められなかった。この原因として、用いた酵素に含まれるフェルラ酸エステルはごく少量であったためと考えられる。

一方、いも焼酎の特徴香といわれているモノテルペンアルコールであるリナロール、 α -テルピネオール、シトロネロール、ネロールおよびゲラニオール²¹⁾はいずれの成分とも酵素を添加することで増加した。特に、 α -テルピネオールは酵素添加量が増加するほど含有量が増え、無添加の36 $\mu\text{g/L}$ に対し酵素添加0.13%で145 $\mu\text{g/L}$ と4倍に増加した。Ohta²¹⁾は、モノテルペンアルコール類は、甘藷中に配糖体で存在し、麹菌の β -グルコシダーゼによりモノテルペンアルコールとしてもろみ中に遊離すると報告している。今回、酵素添加によりモノテルペンアルコール類が増加した理由として、用いたI社のNo. 3酵素に β -グルコシダーゼが含まれていたためと推察される。

酵素を添加したいずれのもろみにおいても減圧蒸留ができた。得られた焼酎はいずれも柑橘系の香りがあり、軽快な酒質となった。

表4 焼酎の微量香気成分

香気成分($\mu\text{g/L}$)	酵素添加(%)			
	0	0.017	0.03	0.13
バニリン	40	38	43	50
4-ビニルグアイヤコール	62	72	51	74
リナロール	36	52	55	44
α -テルピネオール	36	80	122	145
シトロネオール	28	19	71	49
ネロール	31	23	78	61
ゲラニオール	41	24	69	59

4. 結 言

本格いも焼酎の酒質の多様化を目的として、減圧蒸留を導入するためにもろみ粘度の低下法と、バニリン含量の増加法について検討した。その結果、もろみ粘度を低下させる目的でもろみに水を添加し蒸留すると、原酒アルコール濃度、又は、蒸留歩合が低下することがわかった。

甘藷に含まれるフェルラ酸含量は、品種により異なることがわかった。また、もろみにフェルラ酸を添加すると、できた焼酎にバニリンおよびバニリンの前駆物質である4-VGが明らかに増加することがわかった。市販されている繊維分解酵素の中には、甘藷由来の食物繊維を40、pH4.0の条件で効率よく分解する酵素が存在した。その酵素を併用したいも焼酎の小仕込み試験を行った結果、原料重量の0.017%添加においてもろみ粘度が酵素無添加の50%以下に

低下した。酵素添加してできた焼酎はバニリンや4-VGの増加は図れなかったが、得られた焼酎はいずれも柑橘系の香りがあり、軽快な酒質となった。

参 考 文 献

- 1)高峯和則, 亀澤浩幸, 下野かおり, 問世田春作: 鹿児島県工業技術センター研究報告, 15, 5 (2001)
- 2)中村希世, 柿元智, 森村茂, 木田建次, 真野直也: 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集, 10(1998)
- 3)川野秋二, 鮫島吉廣: バイオサイエンスとインダストリー, 57, 31(1999)
- 4)三上重明, 園田直, 増田達也, 岩野君夫, 木崎康造: 日本醸造学会講演要旨集, 7 (1998)
- 5)小関卓也, 伊藤康朗, 伊藤清, 岩野君夫, 蓼沼誠: 醸協, 89, 408(1994)
- 6)小関卓也: 生物工学, 78, 465(2000)
- 7)高峯和則, 安藤義則, 児玉 剛, 原健二郎, 緒方新一郎, 米元俊一, 宿口修一: 本格焼酎技術開発事業研究成果報告書, 25(2000)
- 8)西澤千恵子, 太田剛雄, 江頭祐嘉合, 真田宏夫: 食科, 45, 499(1998)
- 9)高峯和則, 安部淳一, 岩屋あまね, 問世田春作, 檜作進: 応用糖質, 47, 67(2000)
- 10)M.Dubos, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers and F.Smith: Anal. Chem., 28, 350(1956)
- 11)N.Shibuya: Phytochemistry, 23, 2233(1984)
- 12)松橋信平, 畑中千歳: 農化, 65, 883(1991)
- 13) ” 第四回改正国税庁所定分析法注解 ” , (財)日本醸造協会(1993)p. 229
- 14)神渡巧, 緒方新一郎, 瀬戸口真治, 問世田春作: 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集, 9(1998)
- 15)我部政晴, 小関卓也: 醸協, 95, 65(2000)
- 16)高峯和則, 瀬戸口真治, 木田建次: 日本生物工学会九州支部大会講演要旨集, 10(1998)
- 17)松久保好太郎, 長谷場彰, 水元弘二, 田畑一郎, 伊藤博雅, 新村孝善: 地域システム技術開発事業研究成果報告書, 108(1991)
- 18)永濱伴紀: 地域システム技術開発事業研究成果報告書, 92(1991)
- 19)Y.Kato and D.J.Nevins: Carbohydr. Res., 137, 139 (1985)
- 20)福地香, 田村博三, 比嘉賢一: 沖縄県工業技術センター研究報告, 2, 77(2000)
- 21)T.Ohta, R.Ikuta, M.Nakashima, Y.Morimitu, T.Samuta and H. Saiki: Agric. Biol. Chem., 54, 1353 (1990)