糖化後発酵法に用いる糖化液の製造条件の検討

秋 田 修・大 場 俊 輝*・中 村 欽 一

(国税庁醸造試験所, *現福岡国税局鑑定官室)

昭和 60 年 10 月 29 日受理

Making of Saccharified Solution Used for Fermentation Following after Saccharification

(Studies on the Brewing of Alcoholic Beverage by the System
of Fermentation Following after Saccharification (Part 1))

Osamu AKITA, Toshiteru OHBA, Kin-ichi NAKAMURA

National Research Institute of Brewing, 2-6-30,
Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114)

Polished rice and rice koji were used as the raw materials for making of saccharified solution which was used for fermentation following after saccharification. The effects of saccharification conditions on saccharification yield (yield) and composition of saccharified solution were studied. Results obtained are summarized as follows.

(1) By the use of boiled polished rice, the yield from raw materials increased comparing with the use of steamed rice.

(2) The saccharified solution, the yield of which was 80%~85%, was prepared by the liquefaction with heat resistant enzyme at 75°C for 30 min and then the saccharification with rice koji and enzyme at 55°C for 5 hrs.

(3) In proportion as the amount of koji used, acidity, formol nitrogen, direct reducing sugar (D. R. S) and ratio of D. R. S to the total sugar in the saccharified solution increased, but the yield was not influenced.

(4) By the use of less water, the saccharified solution with high concentration of sugars was prepared, but in this case the yield decreased. To recover sugars from separated cake, the cake was washed twice with same volume of water to cake, by this treatment the total yield reached to 91%.

Key words : 糖化後発酵, 酵素剤, 糖化率

緒 言

醸造酒の製造方法は発酵形式により大きく3種類に分類されており¹⁾, ブドウ酒醸造を代表とする単行発酵, ビール醸造を代表とする糖化と発酵の分離された単行発酵, 清酒醸造における糖化と発酵が同時に進行する並行複発酵とがある。我国を代表する醸造酒である清酒は米麴の酵素による蒸米の溶解糖化と同時に酵母によるアルコール発酵を進めること及び段仕込により高濃度のアルコールを付与することが可能となっている。並行複発酵形式は醸造法として優れた点を多く持っているが, 発酵管理上重要とされる糖化と発酵の調和を保つことが難

しいという面も持っている。並行複発酵の発酵管理に関する研究もなされている²⁾ が, 現在でも熟練した技術者の経験にたよっている部分も残っている。このような点を解決する方法の1つとして糖化と発酵を分離した発酵形式による清酒の製造が考えられている。この方法によれば糖化と発酵を独立に制御することができ, 製造管理がより単純になり再現性良く安定した品質の製品を製造することが比較的容易になるものと考えられる。この発酵形式による清酒あるいは醸造酒の製造もいくつか試みられている³⁾ が実際に製品にまで結びついたものは数少ない⁴⁾。一方近年, 清酒の需要開発を目的とした製品の1つとして, 低アルコール, ライトタイプの清酒の開発が進められている。その主なものは, 本来高いアルコール濃度が得られる醸造法である並行複発酵型式によるもので

糖化後発酵法による醸造酒の製造に関する研究 (第1報)

あり、低アルコール化するために水の添加⁵⁾、発酵能の弱い酵母の利用⁶⁾など、また低アルコール化に伴う味の不調和化を補うための非発酵性糖の利用⁷⁾、炭酸ガスの付与⁸⁾などの方法がとられている。これに対し、糖化と発酵を分離した発酵法によれば、発酵に用いる糖化液の糖濃度の調整のみによって最終的なアルコール濃度を加減することができ、また味の調和についても、糖については糖化液の発酵性糖と非発酵性糖の量比によって、また酸味については発酵条件の操作によってある程度制御が可能である。このように低アルコール酒の製造については、糖化と発酵を分離した醸造法が適している点が多い。そこで筆者らは、先ず白米と米麴を原料とし糖化と発酵を分離した醸造法による低アルコールタイプの醸造酒の製造を試みることとし、初めに糖化液の製造について、特に原料利用率、糖化液の成分組成と糖化条件との関係について検討した結果について報告する。なお、本報ではこの発酵方法を糖化後発酵法と称することとする。

実験方法

1. 糖化液の分析

糖化終了後 5,000rpm (3,000 g) 15 分の遠心分離を行ないその上澄液を糖化液として分析した。グルコース濃度は富士電機製グルコースメーター⁹⁾を用いて測定した。直糖は国税庁所定分析法¹⁰⁾により測定した。全糖は 2 N 塩酸で沸とう浴 3 時間加水分解後の直糖を分析しグルコース換算値で表示した。酸度、フォルモール窒素は試料 10 ml に対する 0.1 N 水酸化ナトリウムによる滴定値を用いた。原料利用率は原料として用いた白米と米麴の全糖総量のうち、糖化液中の全糖として回収された量を百分率で表わした。

2. 糖化方法

(1) 原料及び酵素剤

58 年産日本晴の 75% 精白米及び同白米にて製造した麴を用いた。酵素剤は耐熱性液化酵素 M-30 (協和マイルス (株)) と清酒用糖化酵素グルク-100 (天野製薬) を用いた。酵素力価の測定は国税庁所定分析法¹⁰⁾と岩野らの方法^{11,12)}で行った。

(2) 原料処理、液化、糖化方法

基本的には Fig. 1 の方法で行なったが、糖化時間の検討では時間を、水の使用量の検討では水の量を、麴の使用量の検討では麴の量をそれぞれ変えて検討した。

蒸米は、白米 40 g を使用し酒米研究会統一分析法¹³⁾で用いるコシキにより得た。また蒸煮はオートクレーブを用い、白米 40 g に水 300 ml を加え常圧または 0.5 kg/cm² の加圧下で行いカユ状とした。蒸米には蒸し中

Fig. 1 Process of Saccharification

に吸水した分も含め総量が 300 ml となるように水を加えた後、液化、糖化を行った。

液化は耐熱性液化酵素 20 mg を使用し 75°C、120 分間行った。酵素剤を使用しない場合でも 75°C で 120 分間保持した後糖化を行った。糖化は 55°C に冷却後麴を 30 g 加え、糖化酵素剤を使用した場合は 200 mg を用い 5 時間行った。

3. 粕からの糖の回収

粕からの糖の回収を行った。白米 900 g、水 4,050 ml を用い常圧で 100°C、60 分蒸煮後、耐熱性液化酵素剤 450 mg で 75°C、60 分の液化を行った。品温を 55°C とし、麴 675 g、糖化酵素剤 1,800 mg で 5 時間糖化後 5,000rpm、15 分遠心分離し、上澄を糖化液とした。沈澱部を粕とし同量の水を加え粕を均一に懸濁した後再度遠心分離をした上澄液を回収液とした。再度同様の回収操作を行い、糖化液と回収液の全糖量から原料利用率、回収率を求めた。

結果及び考察

1. 原料処理、酵素剤利用の効果

原料処理方法や酵素剤の使用による、糖化液量、糖濃度、原料利用率に対する影響について試験を用い最も効率の良い方法を検討した。

原料処理方法としては 3 種類、液化酵素剤、糖化酵素剤を使用した場合、使用しない場合を組合せ Table 1 に示した 12 区分について Fig. 1 の方法で 2 回糖化試験を行った。分析値は 2 回の結果の平均値を用いた。

用いた麴と酵素剤の酵素力価を Table 2 に示した。

Fig. 2 に示したように原料処理条件による差を比較した場合、蒸米 (A) よりも、白米をカユ状 (B) にして糖化することにより全糖、グルコース濃度が高くなった。しかし、常圧 (B) と加圧 (C) では差はなかった。糖化酵素剤の使用により全糖、グルコース濃度とも増加す

Table 1 Condition of Saccharification

Condition of rice-treatment	No.	Amounts of enzymes (mg)	
		M-30	Gluc-100
A. Steaming	A-1	0	0
	A-2	0	80
	A-3	20	0
	A-4	20	80
B. Boiling	B-1	0	0
	B-2	0	80
	B-3	20	0
	B-4	20	80
C. Boiling under 0.5 kg/cm ²	C-1	0	0
	C-2	0	80
	C-3	20	0
	C-4	20	80

Table 2 Activities of Koji and Enzymes

	α -Aase (U/g $\times 10^3$)	GAase (U/g $\times 10^3$)	APase (U/g $\times 10^3$)	ACPase (U/g $\times 10^3$)
Koji	1	0.2	1.7	3.4
M-30	1,266	12.89	trace	trace
Gluc-100	260	57.2	514	242

 α -Aase: α -Amylase, GAase: Glucoamylase

APase: Acid protease, ACPase: Acid carboxypeptidase

Fig. 2 Effects of rice-treatment and use of enzymes on saccharification.

Polished rice was steamed (A), boiled (B) or boiled under pressure (C).

For conditions of saccharification, see Table 1.

Legends show saccharification conditions: G and M in indicated gluc-100 and M-30, respectively.

Glucose content was shown as the lower part in the bar.

るが特にグルコース濃度の増加に効果があった。液化酵素剤の使用は全糖濃度の増加に効果があった。これら酵素剤の効果の違いは、用いた酵素剤の酵素バランスの違いによるものと考えられ、液化酵素剤は α -アミラーゼ主体であり 20 mg の使用量では α -アミラーゼは25,330 単位、グルカミラーゼは258 単位となるのに対し糖化酵素剤 80 mg では α -アミラーゼは20,800 単位、グルカミラーゼは47,576 単位とグルカミラーゼの比率が高くなっており、グルコースの生成に寄与しているものと考えられる。酵素バランスの異なる酵素剤を利用することにより糖組成の異なる糖化液の調整が可能とな

Fig. 3 Effects of rice-treatment and saccharification means on liquid volume after saccharification.

For legends, see Fig. 1

Fig. 4 Effects of rice-treatment and saccharification means on saccharification yield.

For legends, see Fig. 1

Saccharification yield was calculated from following equation.

$$\frac{(\text{concn. of total sugar}) \times (\text{vol. of saccharified solution})}{\text{total sugar of rice and koji used}} \times 100$$

り¹⁴⁾、これを発酵させればタイプの異なる製成酒が得られるものと考えられる。

Fig. 3 には糖化液の液量と粕量を示した。糖化液の液量は白米をカユ状にすること、及び液化酵素剤の使用により増加し、逆に粕量は減少する。従って Fig. 4 に示した原料からの糖の糖化液中への回収量で表わした原料利用率もカユ状にし液化酵素剤を使用した場合 (B-4) に最も高い 85% となった。原料利用率は加圧下でカユ状 (C-4) にしても常圧の場合と差はなかった。

Table 3 Analysis of variances for the data in Fig. 1-3.

Source	Calculated F			
	Vol. of sup.	Concn. of D. R. S.	Concn. of T. S.	Saccharification yield
Rice treatment (A)	56.8** (31.5)	21.4** (25.2)	25.2** (35.0)	51.5** (35.4)
Enzyme M-30 (B)	145.6** (40.9)	44.2** (26.7)	43.7** (30.9)	115.5** (40.1)
Enzyme G-100 (C)	21.9** (5.9)	40.6** (24.4)	10.6** (6.9)	19.8** (6.0)
A × B	16.4** (8.7)	6.7* (7.1)	5.7* (6.8)	9.7** (6.1)
A × C	3.8	—	2.0	2.7
B × C	14.0** (3.7)	5.0* (2.5)	4.1* (2.2)	7.9* (2.4)

** : Significance at 1% level

* : Significance at 5% level

() : Contribution ratio

以上のことは分散分析の結果 (Table 3) から示されている。原料処理、液化酵素剤の使用、糖化酵素剤の使用は、糖化液の液量、直糖濃度、全糖濃度、原料利用率に対していずれも1%の危険率で有意であり効果が認められた。寄与率からみると液量、全糖濃度については原料処理、液化酵素剤使用の寄与率が高く、従って原料利用率に対しても寄与率が高い。糖化酵素剤の使用は直糖濃度に対する寄与率が最も高かった。

以上原料利用率を向上させるには原料処理方法としては、蒸米を用いるよりも水とともに蒸煮してカユ状にすることが効果があり、また耐熱性液化酵素剤の利用が、全糖濃度も高くなり液量も増加し効果が認められた。耐熱性の酵素は近年デンプン質原料の糖化に利用され¹⁵⁻¹⁷⁾効果を上げている。その使用法はデンプンの糊化温度まで温度を上昇させる際に用いることが多い。そこでオートクレーブで白米を蒸煮する際に耐熱性液化酵素剤を添加して効果を検討したが、今回用いた酵素剤と常圧蒸煮の条件下では効果はなかった。液化条件を酵素剤の使用量、液化時間について白米40gを用い、液化条件以外はTable 1のB-4と同一条件で検討した結果、使用量は白米重量の1/4,000、液化時間は30分でも充分であることが判った (Table 4)。

2. 糖化時間、麴の使用量、水の使用量の影響

1. の実験では糖化時間を5時間とし行ったが、糖化時間を長くした場合の糖濃度、原料利用率に対する影響を検討する目的で、Table 1のB-4の条件で糖化時間2~8時間での直糖濃度、原料利用率を測定した。結果をFig. 5に示したが、5時間以後はともにほぼ定常値を示し、雑菌汚染防止や工程時間を短くすることを考慮し、糖化時間は5時間が適切であると考えた。清酒醸造においても酵素剤糖化四段を行う場合55℃で糖化を行うが、ポーメ、直糖濃度が定常になるまで12~16時間

Table 4 Effect of enzyme M-30 on saccharification yield

Amount of enzyme (mg) (enzyme/rice)	Saccharification yield (%) (Volume of saccharified solution (ml))		
	Liquefaction time (min)		
	30	60	120
10 (1/4,000)	82.7 (294)	—	—
20 (1/2,000)	82.4 (300)	—	—
40 (1/1,000)	78.3 (289)	—	—
80 (1/500)	81.9 (305)	78.9 (302)	78.4 (300)

Fig. 5 Time course of saccharification **Fig. 6** Effects of addition of Koji on saccharification

を要する¹⁸⁾。蒸米の使用、吸水歩合の違い、酵素剤の使用量の違いなどが理由として考えられるが、本方法での白米をカユ状にすること、耐熱性液化酵素剤使用の効果が大きいものと考えられる。

次に麴の使用量の糖化液成分に与える影響について検討する目的で、Table 1のB-4の条件で麴の使用量のみを0, 5, 10, 20, 30, 40gと変えて糖化を行った。結果をFig. 6に示した。麴の使用量を変えても原料利用率に差は認められなかったが直糖濃度、酸度、フォルモール窒素は麴の使用割合を多くすると高くなった。水の使用量を一定としているため成分濃度が麴の使用量の増加につれ高くなるのは当然であるがそれ以上に麴から

Fig. 7 Effect of addition of water on saccharification.

の溶出の効果が大きいものと考えられる。直糖/全糖の比率は麴の使用割合が多くなる程高くなり、麴を使用しない場合は28%，白米の1/2使用の場合は69%，白米と同量使用の場合は82%に達した。以上のように麴の使用割合を変えることにより、原料利用率に影響することなく、酸度、フェルモール窒素、直糖濃度、直糖と全糖と比率の異なる糖化液が得られ、これを発酵することにより種々のタイプの醸造酒を製造することも可能である。

水の使用量の影響について検討する目的で、Table 1のB-4の条件で水の使用量を180, 240, 300 mlと変え糖化を行った。結果をFig. 7に示した。実験を行った使用範囲内では水の量を多くすると原料利用率は良くなるが、直糖濃度、フェルモール窒素は低下した。発酵終了時のアルコール濃度に影響する直糖濃度は水の使用量によっても変化し、高い直糖濃度を得るためには水の使用量を少なくする必要がある。しかしその場合原料利用率が低下することになる。データは示していないが水の使用量を変えても粕量及び粕の水分含量は変わらないことから水の使用量を少くした場合、粕中へ高い糖濃度の糖化液の一部が移行しそのために原料利用率が低下するものと考えられる。そこで原料をより有効に利用する目的で遠心分離後の粕から洗浄による糖分の回収を試みた。結果をTable 5に示した。第一回目の洗浄で糖濃度8.1%の洗浄液が得られ全糖では原料中の糖分の14%が回収できた。第2回目の洗浄でも糖濃度3.4%，全糖濃度8.7%の洗浄液が得られ、これら2回の回収液と糖化液を合計すると原料の全糖量の91.9%が回収され、高い原料利用率となった。また原料全糖のうち67.1%がグルコースとして回収できた。清酒製造での原料利用率を計算した例は少ないが、豊澤¹⁰⁾らによれば仕込に用いた原料の全糖分のうち製成酒中に75.85%，オリ、粕中に8.95%，欠減が15.2%と報告している。また当研究

Table 5 Recovery of sugar from residue

	Volume (ml)	Glucose		Total sugar	
		Concn. (%)	Yield*	Concn. (%)	Yield*
Sup. after saccharification	3,875	17.0	52.5	21.85	67.5
Sup. after 1st washing	1,675	8.1	10.8	10.5	14.0
Sup. after 2nd washing	1,370	3.45	3.8	8.75	9.6
Total	—	—	67.1	—	91.1
Final residue	1,035	—	—	10.2	8.4
Total	—	—	—	—	99.5

(Total sugar contained in rice and koji)=1.26 kg

* Yield: Glucose or Total sugar produced/Total sugar contained in rice and koji.

室での総米100 kg，粕歩合22%の仕込において粕の成分はアルコール10.4 v/w%，全糖分26.8 w/w%，水分59.4%であり、アルコール分をグルコースに換算し全糖分と合計すると、この値は使用した75%白米の掛米と麴中の全糖総量の10.7%となる。粕以外のすべてが欠減なく製成酒中に回収されたと考えた場合原料利用率は89.3%となる。これらの結果から、本報での糖化方法でも粕中に移行した溶解糖分の回収を、糖化液量の多くなるような固液分離法により有効に行えば、清酒醸造の場合と比較して遜色のない原料の利用が可能なのと考えられる。

要 約

白米と米麴を原料とし糖化と発酵を分離された糖化後発酵法に用いる糖化液の製造条件について検討した結果次の点が明らかとなった。

1. 原料処理として白米を蒸煮しカユ状にすることによって原料利用率が向上した。
2. 耐熱性液化酵素剤で75℃、30分の液化、麴と糖化酵素剤の併用で55℃5時間の糖化により原料利用率80~85%の糖化液を得ることができた。
3. 麴の使用割合を多くすることにより原料利用率を変えることなく直糖濃度、酸度、フェルモール窒素が高く、直糖/全糖比率の高い糖化液が得られた。
4. 水の使用量を少くすると糖濃度の高い糖化液が得られるが原料利用率は低下する。しかし粕を同量の水で2回洗浄するだけで、粕中の糖分を回収でき糖化液と合わせると原料中の全糖総量の91%が回収できた。

なお、本報文の内容の一部については昭和59年度日本農芸化学大会（東京）において発表した。

文 献

- 1) 大塚謙一編著：醸造学，p. 8，養賢堂
- 2) 布川弥太郎：醸酵工学 58, 391 (1976)

- 3) 今安 聡：清酒酵母の研究, p.319, 清酒酵母研究会編
- 4) 竹田正久：特許出願公開, 昭 54-117090 (1979)
- 5) 日本酒造組合中央会東京支部銘酒研究委員会：醸造 74 (1) 61 (1979)
- 6) 原 昌道, 嶋崎孝行, 北野一好, 飯村 穰：醸協 78, (5) 390 (1983)
- 7) 布川弥太郎, 椎木 敏, 斎藤和夫, 矢野善嗣：醸協, 77, (1) 53 (1982)
- 8) 嶋崎孝行, 北野一好, 飯村 穰, 原 昌道：醸協 77, (1) 68 (1982)
- 9) 梅原康夫, 来間健次, 高森章作, 大沢久男：醸協 78, (1) 75 (1983)
- 10) 国税庁所定分析法注解：日本醸造協会 (1974)
- 11) 岩野君夫, 風間敬夫, 布川弥太郎：醸協 71, (5) 383 (1976)
- 12) 岩野君夫, 布川弥太郎：醸協 71, (10)792(1976)
- 13) 吉澤 淑：醸協 72, (5) 331 (1977)
- 14) 岩野君夫, 山崎 繁, 布川弥太郎：醸協 74, (1) 53 (1979)
- 15) 服部文雄, 中村 勝, 田治 襄, 野尻増浩, 中井正, 草井 清：特許出願公告, 昭 58-34117 (1983)
- 16) 芳賀 成, 西原昌史, 竹村伊三夫：特許出願公告, 昭和 59-38 (1984)
- 17) 熊谷知栄子, 田中利雄, 秋山裕一, 植田浩行, 森永謙三：特許出願公開, 昭 59-88080 (1984)
- 18) 広島県工業試験場：醸協 64, (5) 413 (1969)
- 19) 豊澤 誠, 米崎治男：醸工 34, 257 (1965)