糖化酵素を用いた芋焼酎製造における香味成分の検討

高峯和則・木田建次*・園田頼和*・生田六也・塚田定清

(田苑栗源酒造<株>, 熊本大学工学部応用化学科*)

平成2年7月7日受理

Studies on Flavor and Taste Components in *Shochu* Making from Sweet Potato using a Saccharifying Enzyme

Kazunori TAKAMINE, Kenji KIDA*, Yorikazu SONODA*, Rokuya IKUTA
and Sadakiyo TSUKADA*

(The Den-en Kurimoto Shuzo Shochu Brewing Co., Ltd., 11356-1, Tounohara,
Hiwaki-cho, Kagoshima-ken 895-12, Japan, Department of Applied
Chemistry, Faculty of Engineering, Kumamoto University, 2-39-1,
Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto-ken 860*)

The *shochu* made from cooked sweet potato using a saccharifying enzyme was a new type one, but its taste lacked smoothness. To improve the taste, fermentation tests were done by the same method as in the previous paper except for the use of *shochu* yeast, SZ.

The fermentation was terminated after 48 hr at 27°C with the enzyme concentration of 30 U/g total sugar, but the *shochu* made from the mash fermented for 72 hr lacked smoothness, either.

Main flavor components produced were *n*-propyl, *i*-butyl, and *i*-amyl alcohols, and their formation could be explained by the over flow theory in the amino acid biosynthetic pathway, which was proved by fermentation tests using an auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*, HM2 (Ile⁻, Val⁻).

However, the concentration of isoamyl acetate was low, being 3.2 mg/l. The concentration of isoamyl alcohol was almost the same as compared with that produced by Kyokai 7 and 701, but the activity of alcohol acetyltransferase (AATase) was only one forth that of the latters.

Ethyl stearate, ethyl oleate and ethyl linoleate in *shochu* made from the fermented mash were also much less than those in *shochu* made by the conventional method with rice *koji*. Then, fermentation of cooked sweet potatoes by adding either cooked or raw rice was done under the same conditions, resulting in an increase of isoamyl acetate and ethyl esters of higher fatty acids in *shochu*, which made the taste smoother. The *shochu* made by this method is a new type one with good flavor and satisfactory smoothness.

Key words: 高級アルコール・脂肪酸エチルエステル・糖化酵素

緒 言

前報で、焼酎製造コストの削減を目的に、糖化酵素を用いた無蒸煮および蒸煮発酵法についてマルトース発酵能の高い *Saccharomyces cerevisiae* 発研1号を用い検討し報告した¹⁾。その結果、発酵原料として蒸煮した甘藷を、糖化酵素として DABIASE_{TM} K-27 を用いることにより、発酵時間が大幅に短縮され、辛口で新しいタイプの焼酎を製造することが可能となったが、味に幅が

なかった。

本報ではこの問題点を克服するために芋焼酎の製造に使用されている焼酎酵母 SZ 株を用い、以下の手順で検討した。

① 発酵速度および alcohol acetyltransferase (以下 AATase とする) 活性に及ぼす発酵温度の影響

② 本プロセスにおける高級アルコール生成機構

③ 味におよぼす高級脂肪酸エステルの影響

その結果、糖化酵素を用いる芋焼酎製造プロセスにお

新規プロセスによる本格焼酎の製造 (第2報)

いて、発酵原料として蒸煮した甘藷に米を加えることにより前報¹⁾で問題とした丸味を製品に付与することができたので報告する。

実験方法

1. 使用菌株

酵母として焼酎酵母 SZ、清酒酵母である協会 7 号、701 号および耐熱性酵母である *S. cerevisiae* EP1 とその栄養要求変異株である HM2 (Ile⁻, Val⁻)²⁾ を使用した。

2. 使用培地

酒母用培地として Yeast extract 1%, Polypeptone 2%, Glucose 2% からなる YPD 培地を用いた。

3. 使用酵素

糖化酵素として前報¹⁾で使用した DABIASETM K-27 (ダイキン工業社製) を用いた。酵素力価は 7,700 U/g-酵素剤であった。また、酵母の細胞壁溶解酵素として Zymolyase 20 T (キリンビール社製) を用いた。

4. 糖化酵素を用いた蒸煮発酵法

前報¹⁾に記載した 500 ml 容三角フラスコを発酵槽とする回分発酵装置を用い、同様にして蒸煮発酵試験を行った。既ち、へらで潰した蒸煮甘藷 200 g、酒母 30 ml、汲み水 70 ml および糖化酵素 30 U/g-全糖を発酵槽に加え回分発酵を行い、発生する炭酸ガスをカメラで撮影することにより発酵経過を追跡した。なお、酒母は YPD 培地で 30°C、15 時間振盪培養したものである。

5. プロトプラストの調製

発酵醪 30 g をガーゼ濾過した濾液から北本³⁾らの方法に準じて酵母を分離した。この酵母をテフロン製遠心管に 10⁹ cells/ml になるようにプロトプラスト調製液 5 ml に懸濁し、25°C の条件で 80% 以上のプロトプラスト形成率を得るまで反応させた。その後、8,000 rpm、10 min 遠心分離した後、0.6 M KCl 溶液 2 ml に懸濁し、プロトプラスト懸濁液を調製した。なお、プロトプラスト調製液の成分は Zymolyase 20 T 5 mg、2-Mercaptoethanol 2.8 μ l、1.5 M KCl 2 ml および 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 3 ml である。

6. AATase 活性測定

YOSHIOKA ら⁴⁾の方法を一部改変した方法により測定した。即ち、上述したプロトプラスト懸濁液 0.5 ml、pH 7.5 phosphate buffer で調製した 2.4 mM acetyl CoA 溶液 0.5 ml および 135 mM isoamyl alcohol 0.5 ml を 30 ml 容のバイアル瓶に加えシリコセンをした後、25°C、60 分間振盪し反応させた。その後、NaCl 1 g を加え反応を停止させた。AATase 活性は、生成した isoamyl acetate 濃度 (mg/l $\cdot$ 10⁹ yeast cells) で表示した。

7. 分析方法

発酵醪のエタノール濃度および低沸点香氣成分並びに蒸留して得られた製品の isoamyl acetate および中高沸点香味成分は前報¹⁾に従って分析した。なお、AATase 活性測定において生成した isoamyl acetate 濃度は、停止した反応液に内部標準液 (10³ mg/l *n*-amyl alcohol 溶液) 100 μ l を加え、セプタムとアルミキャップで密封後 50°C、30 分間加温し、そのヘッド・スペース部のガス 1 ml をガスクロマトグラフに注入することにより測定した。濃度定量は、isoamyl acetate を 5 mg/l になるように加えた標準添加法⁵⁾で得られた面積差から求めた。

実験結果および考察

1. 焼酎酵母 SZ による芋焼酎の製造

糖化酵素を用いた蒸煮発酵法により発酵速度および製品に及ぼす発酵温度の影響を調べた。

Fig. 1 に示すように発酵は温度が高くなるほど迅速に行われ、27 および 32°C において発酵はほぼ 48 時間で終了することから、*S. cerevisiae* 発研 1 号で得られた結果と全く遜色なかった¹⁾。発酵温度 22°C では発酵速度が低下したため 72 時間後においてもなおガスの発生が見られた。発酵 72 時間後の生成エタノール濃度を Table 1 に示したが、各発酵温度における発酵歩合は使用した醪中の全糖濃度 17.8% (w/w) からそれぞれ

Fig. 1 Effect of temperatures on ethanol fermentation with cooked sweet potato.

300 g of mash (total sugar, 17.8%) was composed of cooked sweet potato 200 g, seed 30 ml and water 70 ml. After addition of the saccharifying enzyme DABIASETM K-27 (30 U/g total sugar) to the mash, fermentation tests were done at each temperature. The sweet potato cooked for 30 min in a steam vessel was crushed by a spoon. The saccharifying enzyme activity was 7,700 U/g enzyme. One unit of enzyme activity was defined as that which converted the substrate (soluble starch) to 1 μ mol glucose for 1 min at pH 4.5 and 45°C.

○: 22°C, ●: 27°C, △: 32°C

Table 1 Comparison of flavor components among fermented mash made from cooked sweet potato, using the saccharifying enzyme.

Flavor components	(unit: mg/l)		
	22°C	27°C	32°C
Acetaldehyde	65.6	76.4	108.0
Ethanol (unit: g/l)	72.5	84.5	86.0
Ethyl acetate	52.9	69.0	87.9
n-Propyl alcohol	40.7	46.4	40.1
Isobutyl alcohol	132.5	157.3	128.1
Isoamyl alcohol	193.9	256.1	223.8
Activeamyl alcohol	98.2	123.8	105.2

The mashes used for assay were ones fermented for 72 hr as described in Fig. 1. The amounts of flavor components were assayed by gas chromatography.

79.7, 92.9, 94.5% であった。香氣成分として好ましくない acetaldehyde と香氣成分である ethyl acetate は、表示したように発酵温度が高くなるほど高かったが、香氣成分として重要な低沸点高級アルコール濃度は、発酵温度 27°C で最も高かった。

この発酵醪を蒸留して得られた製品（エタノール濃度 25% に調製）の官能試験を行った。発酵温度 22°C ではワイン様臭・穀類臭・重い、発酵温度 32°C では米様臭・重いと評価されたが、発酵温度 27°C では軽快・辛口と前報¹⁾で報告した *S. cerevisiae* 発研 1 号で得られた製品とほとんど変わらなかった。しかし、製品の味に幅がなかった。発酵温度 22°C より 27°C で得られた製品が官能的に優れていたのは、両発酵温度で生成された isoamyl acetate 濃度は 9.9 および 5.4 mg/l と極めて低く、そのため Table 1 に示したように高級アルコール濃度に左右されたものと考えられる。

Isoamyl acetate は、acetyl-CoA と isomyl alcohol を基質として酵素 AATase により生成される。そこで、AATase 活性に及ぼす発酵温度の影響を調べ、Fig. 2 に示した。酵素活性は、発酵温度が高くなるほど低く、また各発酵温度における酵素活性は、協会 7 号や 9 号で報告⁶⁾されているように発酵初期に最も高く発酵にともない低下した。発酵温度 22°C で $2.1 \text{ mg/l} \cdot 10^9 \text{ cells}$ と最大活性を示したが、この値は清酒酵母に比べかなり低いものと考えられた。

そこで、発酵速度も考慮して発酵温度 27°C で焼酎酵母および清酒酵母を用いて発酵試験を行った。Table 2 は発酵 24 時間後における結果を示しているが、生成されたエタノールおよび isoamyl alcohol 濃度は、使用した酵母間で大差はなかったが、焼酎酵母の AATase 活性は清酒酵母に比べやはり低く $1/3 \sim 1/4$ であった。

2. 高級アルコールの生成機構

低沸点高級アルコールの生成は、糖化酵素を用いた芋

Fig. 2 Course of change in alcohol acetyltransferase (AATase) activity during ethanol fermentation.

The conditions of fermentation and symbols are the same as described in Fig. 1. The AATase activity was defined as the amount of isoamyl acetate formed for 60 min at pH 7.5 and 25°C per 10^9 yeast cells ($\text{mg/l} \cdot 10^9 \text{ cells}$).

Table 2 Comparison of ethanol*¹, isoamyl alcohol*² and alcohol acetyltransferase (AATase) activity*³ among shochu and sake yeasts.

Strain	Ethanol (g/l)	Isoamyl alcohol (mg/l)	AATase activity ($\text{mg/l} \cdot 10^9 \text{ cells}$)
SZ (shochu)	84.6	275.2	1.0
Kyokai 7	78.3	290.5	4.6
Kyokai 701	76.5	259.4	3.7

*1, *2 Ethanol and isoamyl alcohol in the fermented mash after 72 hr were assayed by gas chromatography.

*3 The definition of AATase activity is the same method described in Fig. 2.

Ethanol fermentation with the mash containing total sugar of 17.2% was done at 27°C in the same manner as described in Fig. 1.

焼酎製造においては Ehrlich 経路^{7,8)}よりアミノ酸生合成経路^{8,9)}で優先的に行われていると推察された¹⁾。

そこで、著者らが保有している耐熱性酵母である *S. cerevisiae* EP 1 およびその栄養要求変異株である HM 2 (Ile⁻, Val⁻) を用いて糖化酵素を用いた蒸餾発酵法および米麴を使った従来法¹⁰⁾により発酵試験を行った。

Table 3 に示したように HM 2 株の生成する isobutyl alcohol, isoamyl alcohol および activeamyl alcohol 濃度は、野生株である EP 1 と比較するとそれぞれ $1/10$ 以下に低下したが、n-propyl alcohol は 10 倍以上に増加し、また生成されなかった n-butyl alcohol は 220 mg/l も生成された。HM 2 株により生成される高級アルコールの成分組成の変化は、Fig. 3¹¹⁾ に示した isoleucine および valine 生合成経路から ethyl methanesul-

Table 3 Comparison of components of higher alcohol among the fermented mash made by each method of addition of either saccharifying enzyme or rice *kōji*, using *Saccharomyces cerevisiae* EP 1*¹ and HM 2*², respectively.

Higher alcohols	(unit: m/l)			
	Saccharifying enzyme* ³		Conventional* ⁴ (Rice <i>kōji</i>)	
	EP-1	HM-2	EP-1	HM-2
<i>n</i> -Propyl alcohol	40.4	472.0	133.0	264.0
Isobutyl alcohol	264.0	12.3	128.2	111.5
<i>n</i> -Butyl alcohol	ND	221.6	ND	ND
Isoamyl alcohol	639.2	69.0	197.2	195.9
Activeamyl alcohol	164.3	13.7	79.1	69.6

The mashes used for assay were ones fermented for 72 hr.

*¹ EP-1 is a wild type strain.

*² HM-2 is an auxotrophic strain (Ile⁻, Val⁻) derived from EP-1.

*³ Ethanol fermentation with the mash containing total sugar of 17.5% was done in the same manner as described in Fig. 1.

*⁴ The first mash composed of rice *kōji* 90g, yeast seed 20g and water 90g was fermented for 120 hr at 24°C. The second mash composed of the first mash 50g, sweet potato 150g and water 100g was fermented for 72 hr at 27°C.

fonate (EMS) による変異処理により α -ketobutyrate (α -KB) から α -acetohydroxybutyrate (α -AHB) の反応および α -acetolactate (α -AL) から dihydroxyvalerate (DHV) の反応に関与する酵素の生成が抑制されたためと考えられる。しかし、米麴を用いることにより HM 2 株は *n*-butyl alcohol を生成しなくなるだけでなく、野生株 EP 1 とほとんど変わらない高級アルコールの生成を示した。これは米麴を用いることによりアミノ酸を含む窒素源が増加し、その結果高級アルコールの生成はアミノ酸生合成経路から Ehrlich 経路に転換したものと云える。

以上、糖化酵素を用いた芋焼酎の製造においては低沸点高級アルコールは、アミノ酸生合成経路における over flow 説⁹⁾により生成されることが明らかとなった。

3. 味の付与

糖化酵素を用いた蒸煮発酵法で得られる製品は従来法と比較すると味に幅がなく辛口タイプの製品であった。この原因として丸味、甘味、濃味といった「物理的な味」¹²⁾ を付与する高級脂肪酸エチルエステル類が従来法の 1/10 から 1/100 とほとんど含まれていないためと考えられた。これは、甘藷の脂質含量は 0.2% と精白米の脂質含量の 1.3%¹³⁾ に比べて非常に少なく、本製造法では米を使用していないことに起因するものと考えた。

そこで、発酵原料として蒸煮した甘藷に米を加え上述してきたプロセスにより芋焼酎の製造を行った。即ち、

Fig. 3 Pathway of synthesis of main amino acids and higher alcohols.

n-PrOH, normal propyl alcohol; *i*-BuOH, isobutyl alcohol; *n*-BuOH, normal butyl alcohol; *a*-AmOH, activeamyl alcohol; *i*-AmOH, isoamyl alcohol; α -KB, α -ketobutyrate; α -AL, α -acetolactate; α -AHB, α -acetohydroxybutyrate; DHV, dihydroxyvalerate; DHMV, dihydroxy- β -methylvalerate; KV, α -ketoisovalerate; KMV, α -keto- β -methylvalerate; α -IPM, α -isopropylmalate; β -IPM, β -isopropylmalate; KIC, α -ketoisocaproate.

蒸煮した甘藷 150g に生米換算で 35g の蒸米を加えた後、酒母 30ml および糖化酵素を 30 U/g-全糖になるように加え、汲み水で全量を 300g として発酵試験を行った。

Fig. 4 に示したように蒸米を用いた場合発酵は 100 時間で終了したが、生米を用いた場合発酵は 24 時間以降緩慢となり 120 時間後においてもなお炭酸ガスの発生が見られた。Table 4 は発酵 120 時間後の醪中の生成エタノール濃度を示しているが、蒸米および生米を添加したそれぞれの発酵歩合は、醪中の全糖濃度から 93.5% および 84.7% であった。低沸点高級アルコールである *n*-propyl alcohol 濃度は蒸米を用いると生米に比べ 63% に減少したが、これは既に報告¹⁾している蒸煮発酵で減少する結果と一致した。一方、isobutyl alcohol, isoamyl alcohol および activeamyl alcohol 濃度は蒸米と生米で大差なかった。この結果は、能勢¹⁴⁾の無蒸煮発酵法では高級アルコール濃度が増加するとの報告と一致しないが、これはプロセスと使用した原料の違いによるものと考えられる。

Table 5 は、エタノール濃度を 25% (v/v) に調整した製品中の香味成分の分析結果を示している。米を添加することにより β -phenethyl acetate 濃度は、従来法と同

Fig.4 Ethanol fermentation with cooked sweet potato by adding either cooked or raw rice.

300 g of mash (total sugar, 22.8%) was composed of cooked sweet potato 150 g, either cooked or raw rice 35 g (as raw rice), seed 30 ml and water 85 ml. Ethanol fermentations with these mash were done at 27°C in the same manner as described in Fig. 1. The rice was cooked for 40 min in the steam vessel.

○: cooked rice, ●: row rice

Table 4 Comparison of flavor components between the fermented mash made from cooked sweet potato by adding either cooked or raw rice.

(unit: mg/l)

Flavor components	Saccharifying enzyme	
	cooked rice	raw rice
Acetaldehyde	279.6	349.0
Ethanol (unit: g/l)	108.9	98.7
Ethyl acetate	40.9	62.1
<i>n</i> -Propyl alcohol	34.9	55.1
Isobutyl alcohol	179.6	208.6
Isoamyl alcohol	299.6	314.7
Activeamyl alcohol	172.8	186.2

The mashes used for assay were ones fermented for 120 hr as described in Fig. 4.

程度まで低下するが、isoamyl acetate 濃度は酵素法に比べ約 8 倍に、従来法に比べても 2 倍に増加した。また、高級脂肪酸エチルエステル類についても生米よりも蒸米を添加することにより、従来法で得た製品には及ばないものの大幅に増加した。

以上、甘藷に米を添加することにより香気および香味成分は大幅に増加した。その結果、製品に甘味が加わり味に幅をもたせることができ、切れの良い新しいタイプの焼酎の生産が可能となった。

Table 5 Comparison of flavor and taste components among shochu made from the mash in which fermented cooked sweet potato was fermented with either cooked rice or raw rice.

(unit: mg/l)

Flavor components	Saccharifying enzyme			Conventional (rice <i>koji</i>)
	Sweet potato*1	Sweet potato		
		Cooked rice*2	Raw rice*2	
Isoamyl acetate	3.2	26.1	24.3	12.0
β -Phenethyl acetate	10.5	1.8	1.3	1.9
β -Phenethyl alcohol	67.2	9.2	9.7	14.2
Ethyl palmitate	4.1	28.1	10.7	117.0
Ethyl stearate	0.2	0.9	0.7	4.6
Ethyl olethe	0.3	39.2	15.8	89.3
Ethyl linoleate	4.5	21.1	9.2	96.2

Shochu in which the concentration of ethanol was adjusted to 25% (v/v) with distilled water were made by distilling each of the fermented mash described in Table 1 (*1), Table 4 (*2), and Table 3 (*3).

The amounts of flavor and taste components were assayed by head-space gas chromatography.

要 約

焼酎酵母 SZ を用いて糖化酵素法による芋焼酎の製造を行い、香味成分を検討した。得られた結果を要約すると次のとおりである。

1. 発酵温度 27°C および 32°C では発酵は迅速に進み、約 48 時間で終了した。72 時間後の醪中のエタノー

ル濃度から発酵歩合はそれぞれ 92.9, 94.5% と高いものであった。しかし、官能的に最もよかった製品においてもやはり味に幅がなく辛口タイプであった。

2. 焼酎酵母は、協会 7 号や 701 号に比べ生成される isoamyl acetate 濃度は低く、AATase 活性も 1.0 mg/l・10⁹ cells と約 1/4 であった。

3. 糖化酵素を用いた焼酎製造において生成される低沸点高級アルコールは、栄養要求株 HM 2 (Ile⁻, Val⁻) を用い発酵試験から アミノ酸合成経路における overflow 説により生成されることが明らかとなった。

4. 蒸米もしくは生米を添加することにより生成される isoamyl acetate および高級脂肪酸エチルエステル類が大幅に増加し、その結果味に幅をもたせることができ、切れの良い新しいタイプの焼酎を製造することが可能となった。

ヘッド・スペース法によるガスクロマトグラフィーをご指導下さいました熊本県工業技術センターの各位に謹んで感謝致します。また、本研究に協力された卒論学生梅田靖人君に謝辞を述べます。

文 献

- 1) 高峯和則, 木田建次, 園田頼和, 生田六也, 塚田定清: 醸協, 84, (8) 560 (1989)
- 2) 浅野真一, 久安智香, 山抱基純, 森村 茂, 岸本眞希男, 木田建次: 醸酵工学, 65, 169 (1987)
- 3) 北本勝ひこ, 高橋康次郎, 戸塚 昭, 吉沢 淑: 醸酵工学, 63, 289 (1985)
- 4) K. YOSHIOKA, N. HASHIMOTO: *Agr. Biol. Chemistry*, 45, 2183 (1981)
- 5) 塩見紘一, 尾崎華織: 島津評論, 43, 25 (1986)
- 6) 栗山一秀, 芦田晋三, 斉藤義幸, 杉並孝二, 今安聰: 醸酵工学, 64, 169 (1986)
- 7) 吉沢 淑: 醸協, 61, (6) 481 (1966)
- 8) 吉沢 淑: 醸協, 75, (6) 451 (1980)
- 9) T. ÄYRÄPÄÄ: *J. Inst. Brew.*, 71, 341 (1965)
- 10) しょうちゅう醸造技術 p. 34 (財)日本醸造協会 (東京 1983)
- 11) H. D. ROBICHON-SZULMAJSTER, Y. SUNDIN-KERJAN: "The yeasts" Vol. 2, p. 335, Academic Press (1971)
- 12) 小原正美編著: 食品の味, p. 143, 光琳書院 (1967)
- 13) 日本食品基準成分表 (四訂), p. 50, 60 科学技術庁資源調査会 (1985)
- 14) 熊勢 晶, 岩野君夫, 椎木 敏, 平井光雄, 吉沢淑: 醸酵工学, 66, 469 (1988)