生でんぷん分解酵素 (*Chalara paradoxa* 起源) による碎米の糖化発酵

桜井 廣・斎藤博之・大森勝雄・*飯野久栄

(岩手県醸造食品試験場, *現在農林水産省食品総合研究所)

平成元年 8 月 25 日受理

Saccharification of Crushed Rice by a Raw Starch-digesting Amylase from
Chalara paradoxa and Alcoholic Fermentation of Glucose Formed
Utilization of a Raw Starch-digesting Amylase from *Chalara paradoxa* for Brewing(part 1)

Hiroshi SAKURAI, Hiroyuki SAITO, Katsuo OMORI and *Kyuei IINO

(Iwate Prefectural Brewing and Food Research Institute, 26 Tsushida, Tonan-mura, Shiwa-gun,
Iwate 020 and *National Food Research Institute, 2-1-2 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305)

A non-cooking sacchrification method was examined by using a raw starch-digesting amylase from *Chalara paradoxa*, for the purpose of simplifying the process of sake production. Broken rice formed on polishing and rice bran were used as materials. Broken rice was ground to powder, mixed with 3.3 times its volume of water, and the mixture was kept at 25°C with the amylase. The hydrolysis ratio of the mixture was calculated to be 86.1±6.9%. The amount of the amylase required could be reduced by grinding the material more finely. Alcoholic fermentation was carried out by the sake yeast simultaneously with saccharification of starch. The fermentation ratio was influenced by nutrients, temperature and the amount of water added, and a value 70.1±9.7% was obtained at 25°C and 333% adding ratio of water with yeast extract as nutrient. The enzyme of *Chalara paradoxa* was considered to be useful for sake and *shochu* making.

Key words : 無蒸煮・碎米・*Chalara paradoxa*

緒 言

清酒, 焼酎の製造に用いられているでんぷん質原料は蒸煮処理後, 麴または酵素で糖化され, 生成糖分は酵母によりアルコールに変換され製成酒となる。一方では省力, 省エネルギーの観点より生でんぷん分解力の強い微生物, 酵素を利用してでんぷん質原料を無蒸煮で糖化発酵しアルコール, 酒類を製造する方法も報告されている¹⁻⁶⁾。本報ではでんぷん質原料として碎米, 米粉(白糠)を用い, これに *Chalara paradoxa* 起源の生でんぷん糖化酵素^{7,8)}と清酒酵母を加えて, 無蒸煮による糖化と発酵を行い, 酒造へ応用するための基本的条件について検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 酵 素 剤

明治製菓(株)で調製した *Chalara paradoxa* 起源の生でんぷん糖化酵素を用いた。酵素活性を第1表に示した。

Table 1 Activities and components of enzyme from *Chalara paradoxa*.

Raw starch-digesting activity	918 IU/g
Gelatinated starch-digesting activity	2244 "
Activity of α -amylase	1420 "
Total sugar	564 mg/g
Reducing sugar	61 "
Crude protein	250 "

Enzyme of *Chalara paradoxa* used was prepared by Meiji Seika Co. Ltd.

Chalara paradoxa 酵素の酒造への利用 (第1報)

Table 2 Hydrolysing conditions.

Experimental number	Factor			
	Raw material*1	Hydrolysing temperature (°C)	Enzyme concentration*2 (%)	Adding ratio of water*3 (%)
1	Crushed rice	15	0.1	333
2	Crushed rice	15	0.1	200
3	Crushed rice	15	0.5	333
4	Crushed rice	15	0.5	200
5	Crushed rice	25	0.1	333
6	Crushed rice	25	0.1	200
7	Crushed rice	25	0.5	333
8	Crushed rice	25	0.5	200
9	Rice flour	15	0.1	333
10	Rice flour	15	0.1	200
11	Rice flour	15	0.5	333
12	Rice flour	15	0.5	200
13	Rice flour	25	0.1	333
14	Rice flour	25	0.1	200
15	Rice flour	25	0.5	333
16	Rice flour	25	0.5	200

*1 Raw material (Starch value : 80.2)

Crushed rice (Rice of 70% polishing yield was crushed by small polishing mill. Mesh of Crushed rice, 16 to 100.)

Rice flour (After grinding crushed rice finely, its flour was sieved though 100 mesh.)

*2 Enzyme concentration (%) = enzyme(g)/raw material (g) × 100

*3 Adding ratio of water (%) = water(ml)/raw material (g) × 100

Table 3 Factor of fermentation condition.

Factor	Level 1	Level 2
Raw material*1	Crushed rice	Rice flour
Temperature	15°C	25°C
Enzyme concentration*1	0.1%	0.5%
Adding ratio of water*1	333%	200%
Yeast-extract*2	(+) 0.3% added	(-) non

*1 Raw materials, enzyme concentration and adding ratio of water are same as Table 2.

*2 Yeast-extract was added in the mash as nutrient for the fermentation.

2. 糖化試験

Chalara paradoxa の生でんぶん糖化酵素は 45°C, pH 4.5 付近に最適活性を示めすが、醸造ではこの最適条件からはずれたところで行われる。そこで本酵素が清酒、焼酎製造条件に近い環境でどの程度の糖化力を示すかを検討した。

(1) 試験区設定要因

試験要因として原料米の粒度、酵素濃度、汲水歩合及び発酵温度について取り上げ、4 因子 2 水準の四元配置により糖化試験を行った (第 2 表)。糖化スケールは 200 ml ビーカーに無蒸煮の基質 (碎米・米粉) を 30 ないし 50 g とり、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.5) 100 ml を加え、酵素剤は基質に対し 0.1 ないし 0.5% (生

Table 4 Orthogonal layout on fermentation conditions.

Experimental number	Factor				
	Raw material	Fermentation temperature (°C)	Enzyme concentration (%)	Adding ratio of water (%)	Yeast-extract
1	Crushed rice	15	0.1	333	+
2	Crushed rice	15	0.1	200	-
3	Crushed rice	15	0.5	333	-
4	Crushed rice	15	0.5	200	+
5	Crushed rice	25	0.1	333	-
6	Crushed rice	25	0.1	200	+
7	Crushed rice	25	0.5	333	+
8	Crushed rice	25	0.5	200	-
9	Rice flour	15	0.1	333	-
10	Rice flour	15	0.1	200	+
11	Rice flour	15	0.5	333	+
12	Rice flour	15	0.5	200	-
13	Rice flour	25	0.1	333	+
14	Rice flour	25	0.1	200	-
15	Rice flour	25	0.5	333	-
16	Rice flour	25	0.5	200	+

でんぶん分解活性として 1 ないし 5 IU/g-基質) になるように加え、ラップでビーカーを密閉して試験を行った。

3. 発酵予備試験

(1) 試験区設定要因とわりつけ

試験要因として原料米の粒度、酵素濃度、汲水歩合、発酵温度及び発酵助成剤の影響について取り上げ、第 3 表に示す水準を設定した。これら 5 因子 2 水準を L_{16} 型直交表に割付けた (第 4 表)。

(2) 発酵試験条件

酵母は清酒用岩手 2 号を初発酵母数が 10%/ml になるよう添加し、糖化と発酵が同時に進行する並行複発酵方式で行った。発酵スケール及びその他の条件は糖化試験と同じに行った。

4. 小仕込試験

発酵原料をより実地に近いものとする意図から、発酵原料として破碎精米と白糠を使用し、酵素濃度、汲水歩合及び攪拌の効果について、発酵予備試験の 2 倍のスケールで試験を行った。

5. 糖化発酵原料

発酵試験で用いた碎米は精米歩合 70% の岩手県産コガネヒカリを荒砕し、16~100 メッシュのものを、米粉は同碎米をさらに粉碎し、100 メッシュパスのものを、用いた。

また小仕込試験で用いた破碎精米は政府払い下げの加工用多用途米を用い、白糠は精米歩合 85~60% で得られたものを用いた。

Table 5 Results of hydrolysing mash and the ratio of hydrolysis.

	day	Experimental number*1															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Reducing sugar concentration (%)	1	0.0	0.8	1.6	0.0	1.6	2.6	6.8	12.0	7.5	10.6	12.8	15.0	9.9	12.6	16.2	21.9
	7	3.8	8.0	7.8	11.1	10.3	12.6	17.0	15.6	9.4	12.0	14.9	22.9	9.7	19.8	22.2	23.2
	14	8.3	13.2	15.0	18.8	17.6	19.7	21.4	25.1	13.0	17.5	19.1	26.2	17.5	22.5	23.7	28.5
Hydrolysis ratio of filtrate*2 (%)	14	31.1	29.6	56.1	42.2	65.8	44.2	80.1	56.3	48.6	39.3	71.5	58.8	65.5	50.5	88.7	64.0

*1 Experimental number : conditions of Table 2.

*2 Hydrolysis ratio of filtrate(%)=final reducing sugar(g)/initial total sugar (g)×100

Table 6 Analysis of variance from the data of Table 5.

Factor	Reducing sugar concentration (%)						Hydrolysis (%)			
	1 day		7 day		14 day		14 day		effect (mean 55.8%)	F value
	effect (mean 8.2%)	F value	effect (mean 13.8%)	F value	effect (mean 19.2%)	F value	effect (mean 19.2%)	F value		
Raw material	-5.1	81.0** (60.5%)	-3.0	22.7** (26.4%)	-1.8	28.5** (11.8%)	-5.1	13.6*	(9.3%)	
Saccharification temperature	-2.2	15.4* (10.9%)	-2.5	16.0* (18.3%)	-2.8	68.7** (29.2%)	-8.6	38.8** (27.9%)		
Enzyme concentration	-2.5	20.4* (14.7%)	-3.1	23.5** (27.4%)	-3.0	80.2** (34.1%)	-8.9	41.8** (30.0%)		
Adding ratio of water	-1.2	4.4 (2.6%)	-1.8	8.9 (9.6%)	-2.2	44.0** (18.5%)	7.7	30.6** (21.8%)		

*: Significance at 5% level, **: Significance at less than 1% level, (): Contribution rate

Table 7 Results of fermenting mash and the yield.

	day	Experimental number*1															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Alcohol concentration (%)	7	3.4	1.5	1.1	5.9	3.7	11.6	12.3	7.0	0.9	4.6	5.1	1.7	10.8	4.8	4.2	12.0
	14	5.9	3.8	2.8	9.9	8.4	13.9	14.2	10.6	2.4	10.1	9.9	3.9	12.5	8.5	7.4	12.9
Reducing sugar concentration (%)	7	0.5	1.3	1.6	1.4	0.0	1.1	1.8	10.4	6.4	11.4	11.1	15.2	7.8	12.3	13.2	19.2
	14	0.0	7.0	12.7	7.4	4.2	5.4	0.0	14.0	9.8	2.8	4.1	19.1	0.0	10.3	8.8	10.9
Yield*2 (%)	41	34.3	13.3	16.3	34.5	48.8	48.5	82.6	37.0	14.0	35.2	57.6	13.6	72.7	29.6	43.0	45.0

*1 Experimental number : conditions of Table 4

*2 Yield (%)=formed alcohol(ml)/((total sugar(g) of raw material)×0.6435)×100

6. 成分分析

1) 原料分析：碎米等の原料米の生でんぶん価は国税庁所定分析法注解⁹⁾に準じて加水分解し、還元糖分をSomgyi-Nelson 法¹⁰⁾で測定し算出した。

2) 酵素剤成分及び酵素力価：貝沼ら⁷⁾の方法によった。

3) 反応液の分析：直接還元糖，エタノールは糖化液及び発酵液を東洋濾紙 No.2 でろ過し，そのろ液を測定した。直接還元糖は Somogyi-Nelson 法，エタノールはガスクロマトグラフ（日立 073 型）を使用し，西谷ら¹¹⁾の方法に準じて測定した。

実験結果及び考察

1. 糖化条件の検討

第5表に糖化液中の直接還元糖の推移及び14日目の糖化率を示した。第5表の数値を基に糖化率に対する主効果，交互作用を分散分析により検討した。この際，有意でない交互作用を誤差項に含み再計算した結果を第6表に示した（以下同様）。生成糖濃度を高くする要因は糖化初期は原料の粒度の効果が大きく，後半は酵素濃

度，糖化温度が効いていた。また糖化率を高めるには，米粉，25℃，酵素濃度 0.5%，吸水歩合 333% の組合せで 86.1±6.9% が得られると推定され，*Chalara paradoxa* 起源の生でんぶん糖化酵素を醸造条件で適応できることが分かった。

2. 発酵条件の検討

第7表にアルコール濃度の推移及び14日目の発酵液中の残存糖分（直接還元糖として），発酵率の結果を示した。第7表の数値を基に残存糖分，発酵率に対する主効果と交互作用を分散分析により検討し第8表に示した。発酵率を高くする最適組合せは 25℃，吸水歩合 333%，酵母エキスの組合せで 70.1±9.7% と推定された。特に温度と酵母エキスの効果が大きかった。このことはオール酵素剤仕込みの場合，酵母エキスが発酵液における酵母の栄養源不足を補った効果と酵母の生育至適温度付近であったことから酵母の増殖が促されたことによるものと思われる。また発酵原料として米粉を用いた試験区はほとんど発酵開始2日目の糖分が10%以上となっており，残存糖分（14日目）が多くなっていた（第1図）。これら残存糖分が多くなる要因として，第

Table 8 Analysis of variances from the data of Table.4.

Factor	Reducing sugar concentration (%)		Yield (%)	
	14 day effect (mean 7.3%)	F value	14 day effect (mean 39.1%)	F value
Raw material	-0.9	2.3 (1.8%)	0.3	0.0 (0.8%)
Fermentation temperature	0.6	0.9 (0.0%)	-11.8	29.1*(34.5%)
Enzyme concentration	-2.3	14.2*(18.4%)	-2.1	0.9 (0.0%)
Adding ratio of water	-2.3	13.9*(17.9%)	7.0	10.4*(11.5%)
Yeast-extract	-3.4	30.7*(41.3%)	12.2	31.1*(36.9%)

*: Significance at less than 1% level.
(): Contribution rate

8 表の分散分析の結果から酵母エキスの添加の有無が大きく効いており (寄与率 41.3%), 栄養源の不足が酵母の増殖停滞の一因となり, 糖分の蓄積が進み, 残存糖分が多くなったと思われる。これらのことから残存糖分を少なくし発酵率を高めるには, 生成された糖分を蓄積することなくアルコールへ変換させるため, 初発の酵母添加数を多くするか, 酵素濃度を下げ初期の糖の生成量を抑え気味にして酵母の増殖をはかる環境を整えて糖化発酵させることが必要と思われる。

3. 小仕込試験

発酵試験の結果より発酵率をよくする効果の大きかった 25℃, 発酵助成剤添加 (酵母エキスとして 0.3%) を各試験区共通とし, 破碎精米, 白糠を用いて小仕込試験を行った。また粒度の細かい原料は発酵初期に糖分の生成が多いことが先の試験により分かった (第 1 図) ので, 白糠への酵素使用量を前回の米粉の場合に比べ 1/5~1/10 に下げ, また攪拌の効果についても検討した。第 9 表に示した 3 因子 2 水準の三元配置法により糖化発酵を行った。発酵液中のアルコール分の推移を第 2, 3 図に示した。27 日目のアルコール濃度, 発酵率を第 10 表に, その数値を基に発酵率を高くする要因効果につい

Fig.1 Relation between reducing sugar after 2 and 14 days fermentation.

●: Crushed rice, ○: Rice flour

Fig.2 Time course of fermentation (Crushed rice for manufacturing) Numbers in the figuer are experimental numbers in Table 9-(1).

て分散分析をした結果を第 11 表に示した。

攪拌の効果は発酵初期には認められた (白糠・汲水歩合 200%) もの, 発酵が進むにつれて漸減した。これ

Table 9 Fermentation conditions.

1) Crushed rice for manufacturing*1 as a raw material

Experimental number	Factor		
	Enzyme concentration (%)	Adding ratio of water (%)	Stirrerred*3
1	0.1	333	+
2	0.1	333	-
3	0.1	200	+
4	0.1	200	-
5	0.5	333	+
6	0.5	333	-
7	0.5	200	+
8	0.5	200	-

2) Rice bran*2 as a raw material

Experimental number	Factor		
	Enzyme concentration (%)	Adding ratio of water (%)	Stirrerred*3
1	0.02	333	+
2	0.02	333	-
3	0.02	200	+
4	0.02	200	-
5	0.05	333	+
6	0.05	333	-
7	0.05	200	+
8	0.05	200	-

Fermentation temperature was 25℃ and 0.3% Yeast-extract was added into mash.

*1 Crushed rice for manufacturing (Starch value: 78.8)

*2 Rice bran (obtained in polishing ratio, 85 to 60%, Starch value: 67.4)

*3 Stirrerred (+: do, -: non)

Fig.3 Time course of fermentation(Rice bran). Numbers the in figuer are experimental number in Table 9-(2).

は攪拌なしでも発酵の進行と共に米粉、白糠が発酵ガスによって対流が生じ、強制攪拌を行ったものとの差がなくなったためと思われる。

(1) 破碎精米

発酵旺盛な期間は3日間ほどで、その後はブツブツとガスが湧き出る程度であった。また発酵開始後7日目頃より攪拌なしの区分では米粒が浮遊し始めた。発酵液中の糖分は No.7, 8 (酵素濃度 0.5%, 汲水歩合 200%) を除いた各区とも3日目以降 1% を越えることはなく、発酵が進行した。第7表の結果に基づいて分散分析を行ったが、発酵率を高くする要因効果は認められなかった(分散分析表省略)。

(2) 白糠

発酵液中の糖分は2日目の 6.1% (No.8) が最高で3日目以降は 1% を越えることなく、破碎精米と同様であった。発酵率については酵素濃度 0.05% 添加区分で効果が認められた(第12表)。

白糠のように粒度の細かい場合は酵素剤使用量を原料に対し 0.02~0.05% (生でんぶん分解活性として 0.2~0.5 IU/g) と碎米における酵素剤使用量の 1/5~1/10 に減らしても同程度の糖化発酵結果を示し、原料粒度の小さい方が酵素コストの面で有利であることが示唆された。

以上のことより、酒造へ応用するために更に検討しなければならない点として、白糠のように粒度の細かい原料を用いる場合は汲水歩合 200% では仕込直後はダンゴ状のもろみとなり、均一化を図ることが困難であるので、実地醸造の場合は汲水をのぼすか、発酵溶解の進行につれて原料を追加補充していく方法がよいと思われる。また碎米、白糠を発酵原料として *Chalara paradoxa* 起源の酵素剤による無蒸煮糖化及び酵母によるア

Table 10 Alcohol concentration and yield after 27 days fermentation. (Crushed rice for manufacturing as a raw material)

	Experimental number*1							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Alcohol concentration (%)	8.0	12.1	15.0	13.6	12.0	13.0	17.6	16.4
Yield*2 (%)	49.1	73.3	62.1	58.0	72.3	78.4	71.9	66.7

*1 Conditions of experimental number are shown in Table 9-(1).

*2 Yield(%)=formed alcohol(ml)/((total sugar(g) of raw material) × 0.6435) × 100

Table 11 Alcohol concentration and yield after 27 days fermentation. (Rice bran as a raw material)

	Experimental number*1							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Alcohol concentration (%)	9.8	10.1	14.2	14.7	10.2	10.3	16.0	15.9
Yield*2 (%)	69.8	70.1	68.1	71.5	73.3	73.0	76.1	77.0

*1 Conditions of experimental number are shown in Table 9-(2).

*2 Yield(%)=formed alcohol(ml)/((total sugar(g) of raw material) × 0.6435) × 100

Table 12 Analysis of variance for the data in Table 11.

Factor	Yield (%)	
	effect	F value
Enzyme concentration	-2.5	19.3* (69.7%)
Adding ratio of water	-0.8	2.1 (4.0%)
Stirrerred	-0.5	0.9 (0.0%)

*: Significance at 5% level, (): Contribution rate

ルコール発酵を行った場合、発酵助成剤の効果が認められたが、製品品質に与える影響も考慮して選択しなければならないと思われる。

要 約

Chalara paradoxa 起源の生でんぶん糖化酵素及び清酒酵母を利用して、碎米、米粉(白糠)の無蒸煮による糖化と発酵を行い、酒造へ応用するための基本的条件を検討し、次の結果を得た。

1) 糖化率を高める組合せは米粉、糖化温度 25℃、酵素濃度 0.5%, 汲水歩合 333% で、糖化率は 86.1 ± 6.9% が得られた。

2) 清酒酵母を加え糖化発酵させたところ、発酵率には発酵助成剤、温度及び汲水歩合が大きく影響し、発酵助成剤有、25℃、汲水歩合 333% の組合せで発酵率 73.3 ± 9.9% を得、清酒、焼酎への利用が可能と思われる。

3) 発酵助成剤の必要性が認められたが、実地醸造に

においては何を選択するか検討が必要である。

4) 発酵原料は粒度が細かいほど酵素使用量を減少することができた。

本研究は農林水産省バイオマス変換プロジェクトの委託を受けて行ったものである。なお本報告の概要は昭和63年日本醸酵工学会大会（大阪市）及び平成元年度日本食品工業学会（仙台市）にて発表した。

文 献

- 1) 山崎何恵, 上田誠之助: 農化, 24, 181 (1951)
- 2) 山崎何恵, 上田誠之助, 島田豊明: 発酵協会誌, 21, 83 (1963)
- 3) S. UEDA and Y. KOBAYASHI: *J. Ferment. Technol.*, 58, 237 (1980)
- 4) 熊谷知栄子, 宮入正法, 黄正財, 鈴木逸郎, 田中利雄, 秋山裕一: 醸酵工学, 60, 77 (1982)
- 5) 永井英雄, 高橋康次郎, 吉沢 淑: 醸協, 81, (4) 268 (1986)
- 6) 椎木 敏, 岩野君夫, 三上重明, 福田清治: 醸協 82, (1) 60 (1987)
- 7) K. KAINUMA, H. ISHIGAMI and S. KOBAYASHI: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 132 (1985)
- 8) H. ISHIGAMI, H. HASHIMOTO and K. KAINUMA: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 32, 189 (1985)
- 9) 注解編集委員会編: 第3回改正国税庁所定分析法, 日本醸造協会 (1974)
- 10) N. NELSON: *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944)
- 11) 西谷尚道, 佐藤哲朗, 菅間誠之助: 醸協, 73, (6) 486 (1978)