麦焼酎もろみの発酵特性改善に対する白麴の寄与

小笠原博信・高橋克文・飯塚兼仁・伊藤 清・石川雄章
(国税庁醸造試験所)

平成2年10月29日受理

Contribution of Hemicellulase in *Shochu koji* to the Resolution of Barley in *Shochu Mash*

Hironobu OGASAWARA, Katsufumi TAKAHASHI, Kenji IITSUKA,
Kiyoshi ITO and Takeaki ISHIKAWA
(National Research Institute of Brewing, 2-6-30, Takinogawa,
Kita-ku, Tokyo 114, Japan)

Effects of xylanase from *Aspergillus kawachii* IFO 4308 on the dissolution of barley in *shochu mash* were studied to improve the fermentation efficiency.

A large amount of xylanase was produced by *A. kawachii* grown in liquid culture containing xylan, while the xylanase activity was not detectable with other carbon sources, starch or monosaccharides. It was suggested that xylan induced the xylanase production in the strain. Steamed barley in the mash was dissolved rapidly and efficiently by adding both crude enzyme solution prepared from barley *koji* and purified xylanase from culture broth of *A. kawachii*. Larger amount of xylanase was also induced when *A. kawachii* was cultured on barley than on rice. Therefore, the fermentation efficiency, such as fermentation rate, fluidity or alcohol yield of barley *shochu mash*, could be improved by using barley *koji*.

Key words: キシラナーゼ・大麦焼酎・*Aspergillus kawachii*

緒 言

一般に米麴を使用した麦焼酎もろみは米焼酎もろみに比べて溶解が悪く、発酵速度及び発酵歩合も悪いことが知られている¹⁾。岩野らは大麦の溶解が悪いのは大麦の澱粉がセルロース、ヘミセルロース等でガードされているためであると考え²⁾、溶解を促進するためにはセルラーゼ、ヘミセルラーゼ等の植物細胞壁溶解酵素の使用が有効であることを報告している³⁾。

焼酎白麴菌には本来的にこれらの溶解酵素を生成する能力があり^{4,5)}、大麦の溶解に寄与していることも考えられる。そこでまず白麴菌の生産する細胞壁溶解酵素の一つであるキシラナーゼをとりあげ、発酵特性の改善に対する寄与について検討した。

実 験 方 法

1. 供試菌株

焼酎白麴菌 (*Aspergillus kawachii*, IFO 4308) を用い

た。

2. 製 麴

精米歩合 90% の日本晴及び精麦歩合 80% の大麦を原料とし、恒温恒湿器を用い、岡崎ら⁶⁾の方法により製麴した。

3. 液体培養

基本培地 (Bactotryptone 1 g; 酵母エキス 5 g; ショ糖 3 g; NaNO₃ 1 g; FeSO₄·7H₂O 0.001 g; 蒸留水 1 l; pH 5.5) に Table 3 に示した炭素源を 2% となるように添加し、30°C で5日間振とう培養した。

4. 酵素液の調製

常法に従い、米麴、及び麦麴 10 g を 50 ml の酢酸緩衝液 (pH 5.0, 0.5% NaCl) に浸漬し、3時間室温 (20°C 以下) で放置後、汙過、透析して粗酵素抽出液とした。

5. 酵素力価の測定

キシラナーゼ活性の測定は以下のような方法で行った。1%キシラン (from oat spelt, Sigma) 懸濁液に酵

素を作用させ、生成した還元糖の増加を Somogyi-Nelson 法で測定しキシラン糖化力を求めた。酵素反応は pH 5, 40°C で 30 分間行い、1 分間に 1 μ mol の還元糖を生成する力価を 1 単位 (U) として表した。またエンド型キシラナーゼ活性は Remazol Brilliant Blue Xylan (RBB-xylan, Sigma) 法⁷⁾により測定した。その他の酵素力価の測定は国税庁所定分析法注解⁸⁾に従った。

6. 大麦溶解試験

アルファ化大麦 1 g に酵素液 (pH 5.0, 20 mM 酢酸緩衝液) 10 ml を添加し、30°C で反応させた後 5,000 g, 10 分間遠心分離を行い、上清中の全糖量をフェノール硫酸法で測定し、溶解量とした。

7. 小仕込試験

焼酎もろみの小仕込みは、Table 1 に示す仕込配合により、椎木ら⁹⁾の方法に従って行い、焼酎酵母 SH2 株を使用し 25°C で発酵させた。発酵経過はもろみ重量の減少から二酸化炭素発生量を求め、モニターした。

実験結果及び考察

1. 焼酎麴中のキシラナーゼ活性

米麴と麦麴中の酵素力価を Table 2 に示した。麦麴は米麴に比べ、著しく多量のキシラナーゼを生産することがわかった。

2. 液体培養麴中のキシラナーゼ活性

麦麴と米麴でキシラナーゼ生産に差があるのは、炭素源に差があるためと考えられたので、液体培養法を用い検討した。基本培地に各炭素源 2% を添加し培養後、培養液中のキシラナーゼ活性を測定し、その結果を Table 3 に示した。グルコース、キシロース、澱粉培地ではキシラナーゼ活性はほとんど認められなかったが、キシランを添加した培地では顕著に活性が増加した。また米を炭素源とした場合にはキシラナーゼ活性が著しく低かったのに対し、大麦を炭素源とした場合にはキシラナーゼ活性が米に比べ著しく高かった。また米に等量のキシランを添加した場合にはキシラナーゼ活性の著しい増加が認められた。このことから麦麴のキシラナーゼ力価が米麴よりも高いのは麦中のキシランが誘導源となった結果であると推定した。

3. 米麴と麦麴粗酵素による大麦溶解試験

麦麴は米麴に比較しキシラナーゼを多く生産することがわかったので、両者の粗酵素液を用い大麦の溶解試験を行った。大麦溶解量は反応上清中の全糖量として測定し、その結果を Fig. 1 に示した。麦麴粗酵素は米麴粗酵素に比較し α -アミラーゼ活性がほぼ同等、グルコアミラーゼ活性が 60% (Table 2) であるにもかかわらず大麦の溶解速度が高かった。

Table 1 Proportion of raw materials.

	seed	main	total
<i>koji</i>	20		20 g
barley		50	50 g
water	24	100	124 ml

Barley *shochu* mash was fermented at 25°C with *shochu* yeast SH-2.

Table 2 Enzyme activities in *shochu koji* (U/g).

	rice	barley
xylanase (1)*	0.08	0.45
xylanase (2)**	0.078	0.209
α -amylase	98	111
glucoamylase	145	85
acid protease	7,484	14,526

A. kawachii IFO 4308 was grown on rice or barley at 30°C for 2 days to prepare *koji* and enzyme activities in *koji* were measured.

* measured by RBB-xylan method

** measured by Somogyi-Nelson method

Table 3 Effects of carbon source on xylanase production by *A. kawachii*.

carbon source	relative activity (%)
xylan	100
xylose	0
glucose	0
starch	0
xylose+xylan	63
glucose+xylan	95
rice	5
barley	60
rice+xylan	98

Activity was shown as the relative value to xylan medium.

4. 精製キシラナーゼの大麦の溶解補助効果

麦麴は米麴に比較して大麦をよく溶解することがわかったが、この効果が真にキシラナーゼ等の細胞壁溶解酵素によるものかどうかを確認するために、精製キシラナーゼを用いて検討を行った。精製方法及び酵素の諸性質等の詳細については別途¹⁰⁾報告するが、Fig. 2 に示した粗酵素の DEAE クロマトのパターンより、焼酎白麴菌は少なくとも 4 種類のエンド型キシラナーゼを生産することがわかった。タンパク質として比較的回収量が多かったものをキシラナーゼ A, B, C とし、この中で最も多量に生産したキシラナーゼ A を用い、大麦に対する溶解補助作用について検討した。反応は粗酵素液の場合と同様に行ったが、麴の代わりにアミラーゼ剤 (Gluc-100, 0.1%) を用い、精製キシラナーゼの添加効果を Fig. 3

Fig. 1 Dissolution of barley by crude enzymes from *koji*.

Steamed barley was treated with crude enzymes prepared from rice *koji* or barley *koji*, and dissolved sugar was measured by phenol sulfuric acid method.

○ : rice *koji*, ▲ : barley *koji*

Fig. 2 Separation of xylanase by HPLC.

Crude enzyme was separated by HPLC (TSK-gel DEAE-5PW) and xylanase activities in each fraction was measured by RBB-xylan method.

— : protein; OD²⁸⁰, —○— : xylanase activity; OD⁵⁹⁵

に示した。精製キシラナーゼの添加 (1 U/ml) により溶解速度が上昇し、また最終的な溶解量にも若干の改善が認められた。従って、焼酎麴中のキシラナーゼは大麦の溶解改善に寄与していることが確認された。また焼酎白麴菌はキシラナーゼの他にもセルラーゼ、ペクチナーゼ等の細胞壁溶解酵素を生産するので、大麦の溶解に当たってはキシラナーゼの他にこれらの酵素も作用していることが考えられる^{4,5)}。

5. 麦麴による麦焼酎もろみの発酵特性改善

麦麴は米麴に比較しキシラナーゼを多量に生産するこ

Fig. 3 Effect of purified xylanase on the dissolution of barley.

Steamed barley was treated with crude amylase (gluc-100, 0.1%) with or without purified xylanase, and dissolved sugar was measured by phenol-sulfuric acid method.

○ : without purified xylanase, ▲ : with purified xylanase (1 U/ml)

Fig. 4 Fermentation course of barley *shochu*.

Barley *shochu* mash was prepared using rice *koji* or barley *koji* and the rate of fermentation was compared by CO₂ evolution.

○ : rice *koji*, ▲ : barley *koji*

とがわかったので、麦麴を使用した大麦焼酎もろみの小仕込みを行い、発酵特性改善効果を比較検討した。Fig. 4 に示した二酸化炭素発生曲線から明らかなように麦麴使用区分は対照である米麴使用区分に比較し、初期の発酵速度が高く、最終的な二酸化炭素発生量もやや高かった。また Table 4 に示したように汙液量、アルコール取得量等の発酵歩合の向上も確認された。特にもろみの性状については、流動特性が著しく改善され、もろみ中で大麦の組織が崩壊していることが観察された。またその結果汙過性も改善され垂れ歩合が向上した。このように麦麴を使用することにより、セルラーゼ剤の添加と同様の効果があることがわかった。

以上、麦麴を製造することによってキシラナーゼをはじめとする細胞壁溶解酵素を誘導生産させ、麦焼酎もろ

Table 4 Properties of fermented mash and filtrate.

	rice <i>koji</i>	barley <i>koji</i>
filtrate (ml/100g)	179	193
cake (g/100g)	55	41
alcohol (%)	17.9	18.1
sake meter	+9.5	+5.0
extract (%)	4.1	6.8
alcohol (1) (ml/100g)	32.0	34.9
alcohol (2) (ml/100g)	36.9	38.6

Resulting mash was filtered to separate the cake.

(1) : absolute alcohol yield in filtrate

(2) : absolute alcohol yield in total mash

みの発酵特性を改善した結果を示したが、これは微生物の本来持っている能力を培養環境を考慮することによって引き出すことができたものといえ、意義のあることだと考えられる。焼酎白麴菌の生産するキシラナーゼをはじめとする植物細胞壁溶解酵素の詳細についてはさらに検討し、それらの相乗効果等についても今後検討する予定である。

要 約

1. 大麦を原料として製麴した白麴は米を原料としたものに比べ多量のキシラナーゼを生産したが、これは大麦中のキシランが酵素生産の誘導源となった結果であることがわかった。

2. 麦麴から調製した粗酵素液は米麴粗酵素液よりも

大麦をよく溶解した。

3. 精製キシラナーゼを添加することにより大麦の溶解速度、溶解量が上昇し、溶解補助効果が認められた。

4. 麦麴を用いて大麦焼酎の小仕込みを行ったところ、キシラナーゼ等による溶解補助効果により発酵特性が改善され、米麴区分に比較して発酵速度が大きく、またもろみの流動特性が著しく改善され、発酵歩合も向上した。

文 献

- 1) 岩野君夫, 三上重明, 福田清治, 椎木 敏, 島田豊明: 醸協, 81, (8) 554 (1986)
- 2) 岩野君夫, 三上重明, 石田謙太郎, 椎木 敏: 醸協, 83, (7) 491 (1988)
- 3) 岩野君夫, 田中純太, 三上重明, 椎木 敏: 日本醸酵工学大会講演要旨集 (昭和 62 年度), p.182
- 4) 村尾沢夫著: セルラーゼ, 講談社サイエンティフィック (1987)
- 5) G. OKADA: *Methods in Enzymology* 160, 259 (1988)
- 6) 岡崎直人, 弘中吉雄, 嶋崎順一, 菅間誠之助: 醸協, 73, (5) 402 (1978)
- 7) P. BIELY, D. MISLOVICOVA, R. TOMAN: *Methods in Enzymology*, 160, 536 (1988)
- 8) 第三回改訂国税庁所定分析法注解
- 9) 椎木 敏, 岩野君夫, 三上重明, 清水慎一郎: 醸協, 82, (9) 651 (1987)
- 10) K. ITO *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, 投稿中