リンゴの発酵的利用に関する研究

(第12報) リンゴ酒醸造におけるアンモニア添加 maceration の効果

村 木 弘 行*・増 田 博*

Studies on Fermentative Processing of Apple Fruit

Part XII. Maceration of ammonia-added apple pulp in cider-making

HIROYUKI MURAKI* and HIROSHI MASUDA*

The pH value of fresh apple pulp was adjusted from 3.0 to 3.8, 4.4 and 5.0 by addition of ammonia to increase activity and stability of malic enzyme of apple fruit during "maceration" treatment in cider-making. Decrease in malic acid content of the juice during maceration became appreciably larger by neutralization of the pulp; especially pH values above 4 caused remarkable decrease. Besides, pectin and tannin contents of the juice decreased more largely; amounts of lactic and succinic acid in the juice slightly increased; and yield of the pressed juice slightly increased, by high-pH-maceration. Alcoholic fermentation of the juice obtained was rapid and ethanol content of the resulted cider was considerably high. About 85~95% of the added ammonia was assimilated by yeast and removed from the must during fermentation. Addition of an adequate amount of ammonia in the maceration treatment gives a fine cider which has an adequate acidity and no abnormal constituent or flavour.

(Received Nov. 18, 1975)

リンゴ酒醸造に当って破砕果の maceration を行うことにより果汁及びリンゴ酒の酸度は著しく低下する¹⁾。の減酸作用の主役をつとめられるのはリンゴ果実この malic enzyme (以下 ME) であるが、前報²⁾に述べたように、基質リンゴ酸濃度が通常のリンゴ果汁と同程度である場合には、この酵素の最適 pH は 7.6 近辺である。またこの酵素の安定性は pH 5 近辺で最も高く、これよりも酸性側では急激に安定性が低下する。通常のリンゴ果汁の pH は 3~4 であるから、破砕果をそのまま maceration に供したのでは、活性の高さからも安定性の面からも ME の作用に好適な pH とは言い難い。したがって maceration によってリンゴ酒の酸度を調節しようとする場合は、あらかじめ破砕果を中和して pH を上昇させたのち maceration を行った方がよいと思われる。しかし、このための破砕果中和剤としてカルシウムやナトリウムなど通常の中和剤を用いたのでは、発酵後のリンゴ酒に中和剤が残存して香味に悪影響を与える。したがって、この方法では、すでにでき上がったリンゴ酒

を中和して酸味を調節したのと大差のない結果になってしまい、特に maceration という減酸法を用いる意味がないことになる。この意味で最も適当な中和剤と思われるのはアンモニアである。アンモニアは発酵中に酵母によって窒素源として消費されるのでリンゴ酒中に残存する恐れが少なく、maceration の特長を充分に発揮することができるばかりでなく、リンゴ果汁の天然窒素源の乏しさ^{3,4)}を補なって酵母の生育、発酵を盛にすることが予想されるからである。そこで破砕果中和剤としてアンモニアを用い、pH の変化が maceration の減酸効果にどれほどの影響を与えるか、特に果汁の有機酸組成をどのように変化させるか、また加えたアンモニアが果汁の発酵にどのように影響するか、発酵終了後のリンゴ酒にどれだけ残存するかなどの点について検討を試みた。その結果を以下に報告する。

実験方法

1. リンゴ酒の調製方法

* 山梨大学工学部発酵生産学科 (甲府市武田4丁目)

Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Yamanashi University. Kofu-shi, Yamanashi-ken.

原料リンゴ果としては加工用グレードの紅玉種のものを用いた。これを水洗、潰砕し、それぞれの試験区分に従って室温で20時間のmacerationを行ったのち、ナイロン布に包み、100 kg/cm²で圧搾して果汁を採取した。これにグルコースを加えて糖分を24%に調整し、酒母(同じ果汁に培養したブドウ酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* OC-2) 2%を加えて25°Cで発酵せしめた。

2. 分析方法

遊離不揮発酸は、揮発酸を溜去した残渣をそのまま滴定し、全不揮発酸はイオン交換樹脂を用いて陽イオンを除去したのち滴定した。いずれもリンゴ酸として計算した値である。各有機酸の分離定量は、Amberlite IRA-410を用いて捕集した酸画分について、*n*-ブタノール：クロロホルム(ブタノール 5, 15, 25, 35 及び 50 各% v/v)を移動相とするシリカゲル・クロマトグラフィーを行った。ただしこの方法では乳酸とコハク酸の明確な分離が困難であったので、エタノール：28%アンモニア水：水(80：5：15)を用いて薄紙クロマトグラフィーを行い、乳酸のスポットからの溶出液を用いて乳酸を定量する方法を併用した。この定量には乳酸をアルデヒドに変えたのち *o*-ヒドロキシジフェニルを用いて比色定量する方法⁶⁾を用いた。他の分析法は通常法⁶⁾による。

実験結果

1. maceration による果汁成分変化に対する pH の影響

リンゴ破砕果に種々の量のアンモニアを加えて maceration を行った場合、得られる果汁の分析値は表1の通りである。maceration による不揮発酸減少率は pH の上昇につれて高くなり、特に破砕果 pH が4をこえると急激に高くなる。またこれと共にペクチン及びタンニンの減少も著しくなり、pH の上昇は ME のみならずフェノール酸化酵素やペクチン分解酵素の作用をも強くすることが認められる。ペクチンの減少はまた破砕果の圧搾を容易にして果汁収量の増加をもたらす。破砕果の中和能力を持たないリン酸アンモニウムでは全くこれらの効果は認められない。

2. maceration による減少不揮発酸の種類

表2に示した通り、果汁のふくむ有機酸の中で、maceration によって減少するのはリンゴ酸のみであり、pH の上昇によって、増大するのはリンゴ酸の減少であることが認められる。乳酸及びコハク酸は、かえって多少増加するが、この増加も pH の上昇と共に著しくなる傾向がある。しかし別に報告するように、maceration

表1 アンモニア添加 maceration による果汁一般分析値の変化

区分 ^{a)}	破砕果添加物		破砕果 pH	果汁収量 (l/kg)	pH	果 汁 分 析 値									
	17% リン酸ニフン モニウム (ml/kg apple)	28% アンモニア水				全糖分	全不揮 発酸		不揮発酸 減少率 (%)	遊離 不揮発酸	揮発酸	ペクチン	タンニン		アンモニア 総量
							(g/l)	(g/l)					(g/l)	(mg/l)	
B	—	—	3.0	0.61	3.0	95	9.35	—	7.78	0.4	0.44	31	6	6	
W	—	—	3.1	0.64	3.4	94	8.23	12	7.12	1.6	0.44	14	6	6	
A-1	—	2.0	3.8	0.72	4.1	79	8.10	13	5.75	1.2	0.40	8	292	292	
A-2	—	4.0	4.4	0.68	4.6	77	7.61	19	4.38	1.8	0.33	8	504	504	
A-3	—	6.0	5.0	0.70	5.0	72	7.38	21	3.20	0.6	0.13	17	788	788	
A-P	6.0	—	3.0	0.64	3.0	92	8.50 ^{b)}	9	7.23	1.4	0.44	18	243	243	

a) B は対照区として maceration を行わず、破砕果をただ圧搾、他の区分は表示の添加物に加え、室温で20時間の maceration を行ったのち圧搾。

b) 添加したリン酸を差引いた値。

表 2 アンモニア添加 maceration による果汁有機酸組成の変化

区分 ^{a)}	果 汁 有 機 酸 組 成						
	リンゴ酸 (g/l)	リンゴ酸減少率 (%)	乳酸	コハク酸 (g/l)	クエン酸	グリコール酸	フマル酸
B	8.76	—	0.12	0.08	0.13	0.17	0.06
W	7.28	17	0.19	0.13	0.18	0.21	0.09
A-1	7.16	18	0.25	0.09	0.11	0.21	0.09
A-2	6.24	29	0.56	0.17	0.24	0.35	0.09
A-3	5.63	36	1.11	0.24	0.18	0.30	0.10
A-P	7.34	16	0.40	0.17	0.16	0.21	0.09

a) 表 1 参照

に当り 100 mg/kg の亜硫酸添加によって微生物の増殖がおさえられると乳酸の増加は認められなくなる。またリンゴ果肉を 10 倍量の -8°C のアセトンと共にホモジナイズしてアセトンパウダーを調製し、これを酵素源として、pH 7.6 で乳酸と NAD^{+} とを反応させても、NADH の生成 (340 nm における吸光度の増加) も乳酸の減少も認められない。また pH 6.7 でピルビン酸と NADH を加えて反応させても乳酸の生成は認められなかった。これらの結果から考えると、リンゴ果実には乳酸の生成能はなく、乳酸の増加は maceration 中の微生物の活動による可能性が高い。

一方、コハク酸については、リンゴ果肉アセトンパウダーによる糖あるいはリンゴ酸からのコハク酸の蓄積はおこらなかったが、別報のように亜硫酸を添加した maceration においてもコハク酸の増加がおこること、あるいはリンゴ果実の CO_2 -injury によってコハク酸の増加が認められていること⁷⁾ などから考えると、maceration によるコハク酸増加にはリンゴ果実自身の酵素作用も関与している可能性がある。

3. アンモニア添加果汁の発酵速度

アンモニア添加 maceration によって得られた果汁の発酵経過は図 1 の通りで、アンモニア添加量が多いほど発酵開始が早く、エタノール生成が促進され、生成するリンゴ酒のアルコール濃度が高くなる。窒素として同程度の量であってもリン酸アンモニウムは発酵の促進効果が小さく、遊離アンモニアで中和した方が大きな効果を示した。

4. アンモニア添加 maceration によって調製したリンゴ酒の分析値

表 1 に示した各区分の果汁をそれぞれ発酵させて調製したリンゴ酒の分析値は表 3 の通りである。アンモニア添加量が窒素として 300 mg/l 程度では、発酵中に約 95% が消費され、リンゴ酒中の残存量は問題になるほ

図 1 リンゴ果汁の発酵速度に及ぼすアンモニア添加 maceration の影響
W, A-P, A-1, A-3: 表 1 参照

どではないが、添加量が 500 mg/l 以上では消費率が 85% 程度になり、かなりの量がリンゴ酒中に残存する。

アンモニアの消費につれて全不揮発酸中に占める遊離不揮発酸の比率はふたたび増大し、これに伴って pH は低下する。アルデヒド、エステルなどの生成量には、特に pH による系統的变化は認め難かった。他に乳酸及びコハク酸の多少の増加以外には、maceration によって特に異常な成分が蓄積するようなことは認められない。

研究室員 6 名によるきき酒の結果、アンモニア添加 maceration を行なったものは淡白ではあるが、明らかに酸味が温和で、のみやすいことが認められた。

考 察

リンゴ酒の減酸法としては、乳酸菌による malolactic fermentation, あるいはリンゴ酸分解性の *Schizosaccharomyces* による発酵など、微生物を用いる方法

表3 アンモニア添加 maceration によって調製したリンゴ酒の分析値

区分a)	pH	アルコール (vol %)	還元糖	全不揮発酸	逆糖不揮発酸	リンゴ酒分析値							発酵中のアン モニア消費率 (%)	
						揮発酸	リンゴ酸	乳酸	コハク酸	アルデヒド		揮発性エステル		アンモニア態窒素
										(g/l)	(mg/l)			
B	3.5	12.5	8	8.97	7.65	0.30	8.01	0.09	0.40	20	192	2	—	
W	3.7	12.4	8	7.98	6.96	0.23	6.88	0.09	0.36	15	246	2	—	
A-1	3.8	13.8	4	7.85	6.69	0.34	6.61	0.20	0.41	27	205	16	95	
A-2	4.0	13.8	3	7.43	5.96	0.32	5.70	0.44	0.55	27	285	68	87	
A-3	4.0	13.9	2	7.35	5.60	0.28	4.85	0.99	0.87	21	309	125	84	
A-P	3.5	12.5	8	8.84	7.68	0.55	6.80	0.32	0.38	42	185	14	94	

a) 表1参照

や、中和、イオン交換などの化学的方法が考えられるが、これらの方法と比較して、破砕果の maceration は、異常な成分をほとんど生成せず、香味に全く影響がなく、温和で制御しやすい点に大きな特長を持つ。この maceration の減酸効果の制御法として、アンモニア添加による破砕果の pH の調節は、酸度のみならずタンニン、ペクチンの減少、発酵速度及び発酵率の増大などの効果を伴う有効な方法と認められる。ただし適当なアンモニア添加量の決定に際しては、次のような諸点に対する考慮が必要であろう。すなわち、第一は製造するリンゴ酒の酸度としてどの程度の量を目標とするかである。第二は原料リンゴ果の品種、熟度、climacteric との関係などの条件であって、これらの条件によって果汁の当初酸度、あるいは果実の持つ ME 活性の高さなどが変化し、maceration の効果に影響を与える。さらに第3には、加えたアンモニアがリンゴ酒中に多量に残存することがないように注意することである。アンモニアを多量に加えると、減酸効果や発酵速度の増大は著しいが、発酵中に消費しきれなかったアンモニアがリンゴ酒中に残存する。本実験の結果では、残存量の点からいえば、窒素として 300 mg/l 程度の添加量におさえておくのが無難であるが、効果の点から考えると、この添加量ではやや不足で、400~500 mg/l の添加が望ましいと思われる。400 mg/l の添加量は、果汁中の遊離酸の約 30% を中和する量に当る。ただし発酵中におけるアンモニアの消費は、酵母菌株、発酵温度などが変れば、これによって大きく影響されるかも知れない。この点については、これまでにリンゴ果汁を用いた詳しい実験例がなく、今後さらにデータをつみかさねて行くことが必要であろう。これと共に、アンモニアの添加がリンゴ果汁中の天然窒素源の代謝にどのような影響を与えるかについて、今後の課題として研究が必要と思われる。

要 約

リンゴ酒醸造に当り、リンゴ果の malic enzyme の活性及び安定度を高める目的で、破砕果にアンモニアを加えて pH を 3.0 から 3.8, 4.4, 及び 5.0 にそれぞれ上昇せしめたのち、20 時間の maceration を試みて次の結果を得た。

(1) pH の上昇につれ、maceration の時の酵素作用が活発となり、果汁の酸度、ペクチン、タンニンの減少が著しくなると共に、果汁収量が増加した。

(2) 減少する酸は専らリンゴ酸であり、乳酸及びコハク酸はやや増加した。ただし乳酸の増加は微生物の作用

によるものかも知れない。

(3) アンモニア添加により、果汁の発酵速度及びエタノール生成量は増大した。

(4) アンモニアの添加量が窒素として 300 mg/l 程度ならば、発酵中に 95% が消費され、リンゴ酒中に残存する量はわずかである。これに伴って pH はふたたび低下する。添加量が 500 mg/l では 87%, 800 mg/l では 84% が消費された。

(5) meceration によって特に異常な成分の生成は認められず、酸味の温和なすぐれたリンゴ酒が得られる。

文 献

- 1) 増田 博・四条徳崇・村木弘行：醸工誌，42， 7 (1964)。
- 2) 村木弘行・山崎岩雄・増田 博：食品工誌， 22， 137 (1975)。
- 3) CLARK, D. S., WALLACE, R. H. and DAVID, J. J.: *Appl. Microbiol.*, 2, 344 (1954)。
- 4) YANG, H. Y.: *J. Agr. Food Chem.*, 1, 331 (1953)。
- 5) BARKER, S. B. and SUMMERSON, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 138, 534 (1941)。
- 6) Official methods of analysis of A. O. A. C., 10th Ed., 1965.
- 7) HULME, A. C.: *Nature*, 178, 218 (1956)。

(昭和 50 年 11 月 18 日受理)