

**Effect of fermentation type and temperature on quality and flavor  
components of honkaku shochu**

**本格焼酎の酒質と香味成分に及ぼす  
発酵形態及び発酵温度の影響**

The United Graduate School of Agricultural Sciences Kagoshima University

鹿児島大学大学院連合農学研究科応用生命科学専攻

**劉 根僑**

**2022 年**

## 目次

第 1 章 緒論 .....	1
第 1 節 焼酎の歴史と変遷 .....	1
1.1.1. 仕込み方法の変遷 .....	3
1.1.2. 麴菌の変遷 .....	5
1.1.3. 酵母の変遷 .....	5
第 2 節 中国焼酒（白酒）製造の変遷と固体糖化の目的と意義 .....	7
第 3 節 本格焼酎の酒質に与える製造工程の研究動向 .....	9
第 4 節 本論文の研究目的とその内容 .....	11
第 5 節 参考文献 .....	13
第 2 章 サツマイモ固体糖化後仕込みによる芋焼酎製造の可能性.....	15
第 1 節 緒言 .....	15
第 2 節 実験方法 .....	16
2.2.1. 使用菌株および供試材料 .....	16
2.2.2. 製麴と麴分析 .....	16
2.2.3. サツマイモの固体糖化 .....	17
2.2.4. 固体糖化物の酸度の測定 .....	17
2.2.5. 可溶性糖の分析 .....	17
2.2.6. 有機酸の測定 .....	18
2.2.7. 酵素活性の測定 .....	21
2.2.8. 糖化物揮発成分の分析 .....	23

2.2.9. 小仕込み試験 .....	25
2.2.10. 二次醪および焼酎の分析 .....	27
2.2.11. 官能評価 .....	27
2.2.12. 芋焼酎の揮発成分分析 .....	27
第 3 節 実験結果および考察 .....	28
2.3.1. 固体糖化条件の検討 .....	28
2.3.2. 固体糖化物揮発成分の経時変化 .....	48
2.3.3. 固体糖化後仕込み法による芋焼酎の仕込み試験 .....	52
2.3.4. 焼酎の官能評価 .....	55
2.3.5. 焼酎の香气成分 .....	57
第 4 節 要約 .....	62
第 5 節 参考文献 .....	63

### 第 3 章 芋焼酎の酒質に及ぼす二次醪温度の影響..... 66

第 1 節 緒言 .....	66
第 2 節 実験方法 .....	67
3.2.1. 実験材料 .....	67
3.2.2. 麴抽出液および醪粗酵素液の調整 .....	67
3.2.3. 小仕込み試験 .....	67
3.2.4. 二次醪および焼酎の一般分析 .....	70
3.2.5. 有機酸とアミノ酸及び糖の定量 .....	71
3.2.6. 麴汁培地を用いた発酵試験 .....	73
3.2.7. 官能評価 .....	73
3.2.8. ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS).....	73

3.2.9. プロトプラスト懸濁液の調製 .....	73
3.2.10. AATFase 活性 .....	74
第 3 節 実験結果 .....	75
3.3.1. 小仕込み試験 .....	75
3.3.2. 醗分析 .....	79
3.3.3. 官能評価 .....	81
3.3.4. 香気成分分析 .....	83
第 4 節 要約 .....	89
第 5 節 参考文献 .....	90
 第 4 章 総括及び結論 .....	 92
謝辞 .....	95



## 第 1 章 緒論

### 第 1 節 焼酎の歴史と変遷

焼酎は日本の伝統的な蒸留酒である。蒸留方法によって、単式蒸留焼酎（焼酎乙類）、連続式蒸留焼酎（焼酎甲類）に分類される。各地域を代表する農作物を発酵の主原料とした芋焼酎や米焼酎、麦焼酎、黒糖焼酎などがある。平成 14 年（2002）から、焼酎乙類のうち原料が穀類や芋類、清酒粕、黒糖の他に 49 品目の原料に限定され、これに麴を用い単式蒸留機で蒸留したアルコール 45 度以下のもので、添加物をまったく加えないものを「本格焼酎」と呼称できるようになった<sup>1)</sup>。2019 年現在、年間約 379,000 KL の焼酎が製造されており、芋焼酎は原料由来のサツマイモの風味があり、これが消費者に好まれており、総生産量の 50% 以上を占めている<sup>2)</sup>。

焼酎が文献に出てくる最も古い記録は、ポルトガルの貿易商人であったジョルジェ、アルヴァレスがフランシスコ・ザビエルに書き送った報告書「日本報告」であり<sup>3)</sup>、天文 15 年（1546）に鹿児島県南薩の山川地域で米焼酎が飲まれていたことが記されている。また、昭和 29 年（1954）北薩の大口郡山八幡神社解体修理工事で柱貫に隠されていた落書きが見つかった。「其時座主ハ大キナコすてをちやりて一度も焼酎ヲ不被下候、何共めいわくな事哉」と書いてあった。永禄 2 年（1559）8 月以日と日付入りで、かつ 2 人の署名入りである。発見された当時の焼酎に関する最古の記録であったと同時にその当時から「焼酎」という文字が使われていたことがわかった（Fig. 1-1<sup>4)</sup>）。焼酎は少なくともその数十年前からあったと思われるので、焼酎の歴史は 500 年以上ということになる。ちなみに、サツマイモは 1605 年に中国の福建省から沖縄を経て、宝永 2 年（1705）に鹿児島に持ち込まれているので芋焼酎が鹿児島で造られるようになったのは 17 世紀中

期以降であると推定される<sup>5,6)</sup>。



**Fig. 1-1 The oldest written record of Japanese "shochu" <sup>4)</sup>.**

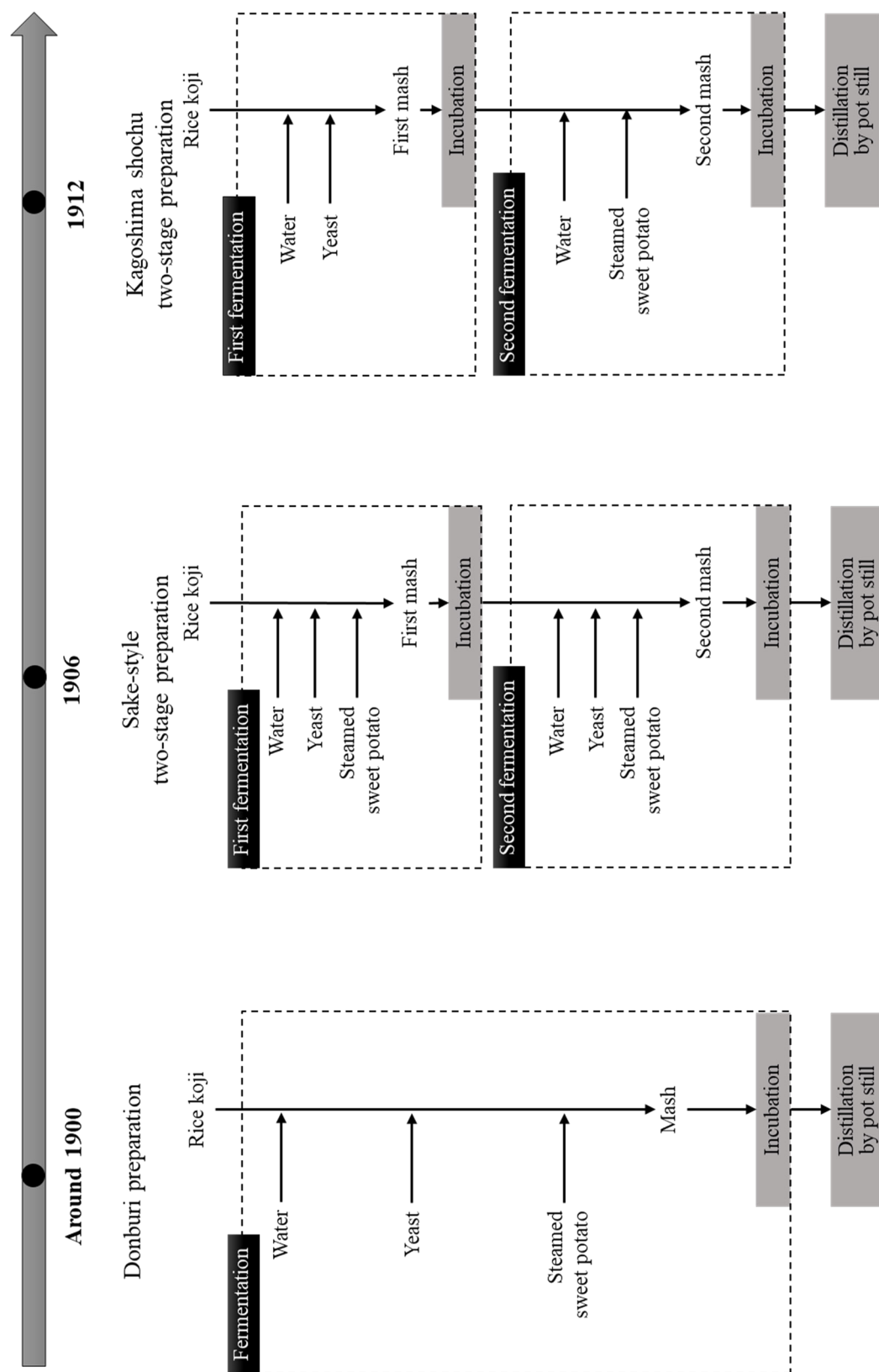
焼酎の技術は 13~14 世紀頃に日本へ伝来したといわれ、琉球経路、南海諸国経路及び朝鮮半島経路説の 3 説が有力であるとされている。中国と韓国の蒸留酒に関する最古の記録は、いずれも 13 世紀頃のものである<sup>7,8)</sup>。中国の焼酒（白酒）の起源は、唐代、宋代、元代などいくつかの説があるが、明代の著名な学者である李時珍の「本草綱目」には、中国の焼酒の起源が元時代（1271~1368）にあることが記録されており、その製造工程も詳細に記されている<sup>8)</sup>。韓国の蒸留酒を代表する焼酎も 1300 年頃、高麗が元王朝の支配下にあった時期にはじめて製造されている<sup>7)</sup>。焼酎製造技術の歴史的な起源をたどることは困難であるが、醸造技術の交流と融合は何世紀にもわたって続けられていたと推察される。

### 1.1.1. 仕込み方法の変遷

焼酎の仕込みはドンブリ仕込みから、清酒式二段仕込み、そして二次仕込み法へと変遷した。明治 33 年 (1900) 頃までは、ドンブリ仕込みが主流であった。この仕込み法は清酒の酒母に該当し、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) で造った米麴と蒸し米やサツマイモ等の主原料と水を一度に仕込む方法である<sup>9)</sup>。この仕込み法では酒母を造らないため、温暖な地域では 30℃近い温度で発酵させることから醪は腐造しやすかった。また、特に芋焼酎の場合、醪の粘性が高く腐造しやすかった。

そのため、米麴と主原料、水を 2 回に分けて仕込む清酒における酒母と初添えに該当する仕込み法が開発された。この方法では、1 回の仕込み量が少なくなるので米焼酎においては腐造することなく製造できた。しかし、サツマイモは蒸すとデンプンの 1/3 がマルトースに加水分解されるため仕込み即下の醪中の糖分濃度が高くなることや、醪の粘性が高く流動性がなく攪拌も困難なため、芋焼酎醪は腐造しやすく仕込み法の改善が必要であった。

大正元年 (1912) 頃、麴と主原料を別々に仕込む二次仕込み法が導入され定着した。この方法では一次仕込みでは麴と水を用いて仕込み、5 日間ほど発酵後、主原料と水を加える。この仕込み法は、酵母が十分に増殖した一次醪に、糖分を多く含むサツマイモを加えると大量の酵母により短時間でアルコールに変えることができ、生じる二酸化炭素で醪は自然に攪拌されるため、安全性の高い製法である。さらに、同時期には泡盛で使用されているクエン酸を生産する黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) を用いた芋焼酎の製造が導入され、二次仕込み法との組み合わせで醪の安全性が飛躍的に高まり、酒質とアルコール収得量の向上に結びついた。この仕込み法は現在も変わることなく全国の焼酎製造に使用されている (Fig. 1-2)。



**Fig. 1-2 Changes in the production process of Imo-shochu**

米焼酎は大正 8 年頃に清酒式二段仕込み法が、昭和 17 年 (1942) 頃に二次仕込み法が導入された<sup>10)</sup>。壱岐の麦焼酎は明治 33 年頃に酒母、初添、仲添、留添の三段の添えを行う清酒の仕込み法が導入された後、昭和 17 年頃に二次仕込み法へと移っている。

### 1.1.2. 麹菌の変遷

日本では古くから「一麹、二酛、三造り」といわれて、麹の出来はそれらを醸造する上で最も重要であるとされている。黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) は、日本で最も広く発酵食品に使用されている麹菌であり、平成 18 年 (2006) に「国菌」として認められた。焼酎の製造に用いられる麹菌として、明治 40 年代まで黄麹菌が使われていた。しかし、泡盛の製造に用いられていた黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) が、クエン酸を大量に生産することで醪中を酸性条件にし、雑菌の増殖を抑え、明治時代の末期から芋焼酎の製造に黄麹菌の代わりに黒麹菌を使用するようになった。さらに、大正 13 年 (1924) に河内源一郎によって泡盛黒麹菌の突然変異体として白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) が取得され、昭和 20 年代から白麹菌の使用が始まった<sup>11)</sup>。近年、焼酎の製造に紅麹を使うことも注目されている<sup>13)</sup>。紅麹菌 (*Monascus purpureus*) は、抗高脂血症の特効薬である monacolinK や  $\gamma$ -アミノ酪酸、紅色色素等の機能性二次代謝産物を生産する微生物として有名である<sup>12)</sup>。

### 1.1.3. 酵母の変遷

焼酎製造における酵母は昭和 27 年 (1952) に角田ら<sup>14)</sup>により泡盛の醪から分離された鹿児島酵母 (Ko)，そして、鹿児島県で最も広く使われている酵母として、鹿児島 2 号 (K2) は昭和 35 年 (1960) 頃に尾上らにより Ko 酵母から分離された。平成 8 年 (1996) には高峯ら<sup>15)</sup>により実用化された鹿児島 4 号 (C4) と鹿

児島 5 号 (H5), 平成 13 年に安藤ら<sup>16)</sup>によって黒糖焼酎醪から分離された鹿児島 6 号 (A6) などがある。Ko が利用されるようになるまでは, 自然湧き付きで仕込まれていたが, 収得量のばらつきや, 腐造の危険性もあったことから, 分離した酵母の培養液を添加する手法へと移行した。更に, 焼酎製造においては, 3 日目の一次醪の一部を次の仕込みに培養液の代わりに使う差し酀が行われている。一般的に差し酀は焼酎酵母が一次醪で馴養され, 純粋酵母より発酵の立ち上がりが早いという利点もあるが種類によっては野生酵母に汚染されやすい。

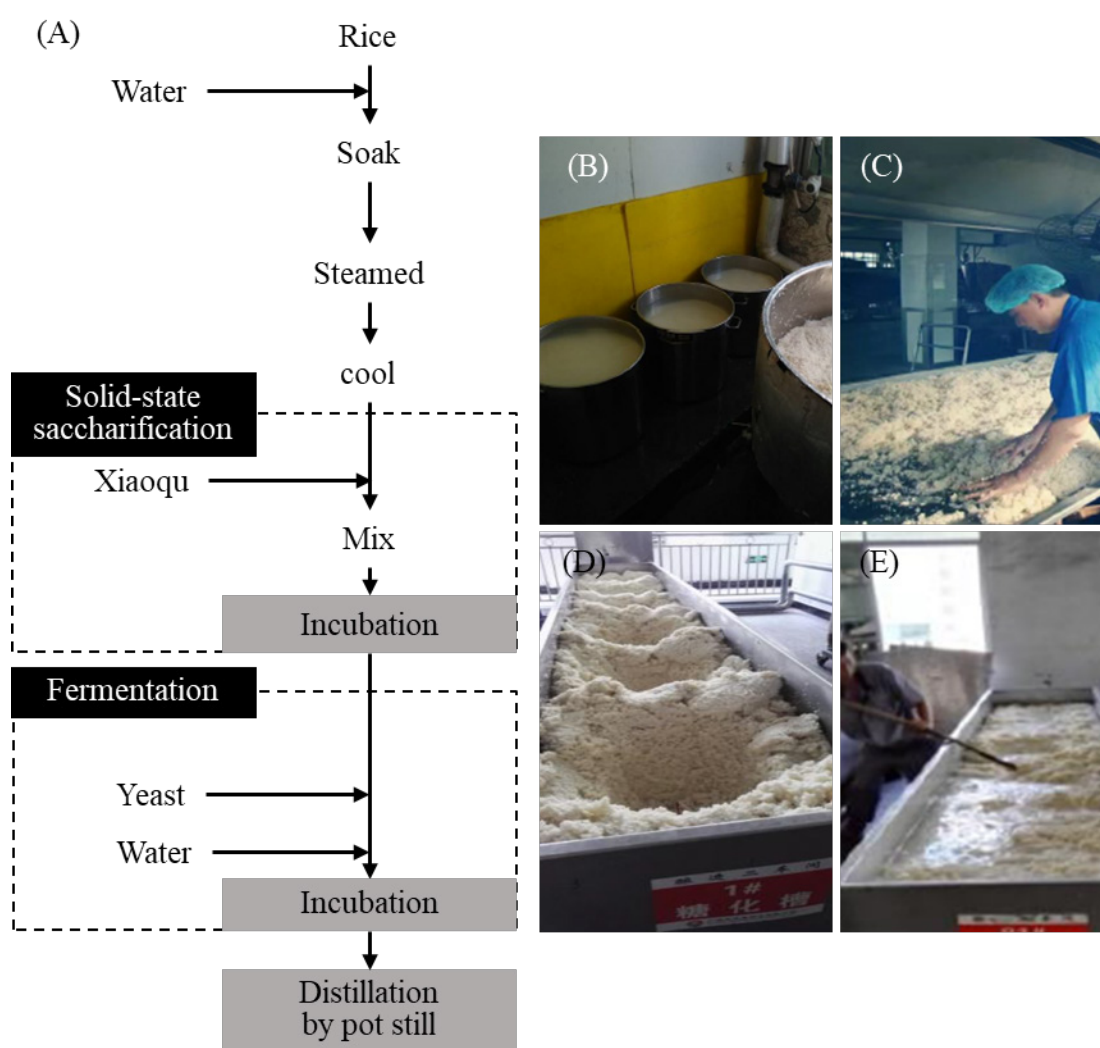
## 第2節 中国焼酒（白酒）製造の変遷と固体糖化の目的と意義

中国の黄河流域の政治・文化・経済の中心であった宋の時代以前は、醸造用の原料は主に小麦、ソルガム、トウモロコシなど北方の穀物が利用されていた。このことは、『斉民要術』の関連する記録によって検証されている。しかし、南方経済の発展に伴い、特に宋の時代から政治の中心が徐々に南下し、南宋の時代になると、支配地域が徐々に江蘇、浙江、江西、広東、福建の南方地域に絞られ、作物は主に米であったため、黄酒の醸造原料は主に米が用いられるようになり、醸造を繰り返すことで、もち米が最も適した原料であることが判明し、浙江地域ではほとんどの黄酒にもち米が使われるようになった。江蘇省およびその他の地域北部のいくつかの地域では、山東省の蘭陵酒のように、伝統的な技術の影響を受けて、今でもトウモロコシを使った白酒が造られている。

長沙の馬王堆にある前漢の墓から出土した絹本『養生方』と『雜療方』に、酒造りの記録が残っており、これが最古のものとされている。これは、先秦時代の醸造技術に関する記録である。この工程は2種類の麴を使用し、麴を最初に浸し、浸した麴の絞り汁で発酵する。発酵後期では、醪に良酒を3段階に分けて加えていたが、これは古来「三重の酒」、つまり「酎酒」と呼ばれていた工程である。その後、醸造技術の変遷は、漢の時代の『斉民要術』や、宋の時代の『酒經』、『北山酒經』などに記されている。

蒸留酒に関しては、白酒（焼酒）は数百年の歳月を経て変遷し、現在では香りの特徴から「濃香型」、「醬香型」、「清香型」、「米香型」など合計12種類に分類されている。その中の代表的な一つ、米香型白酒の生産工程において、麴と主原料を別々に仕込むのではなく、まず原料と麴を固体糖化させた後にアルコール発酵させるという特異的な仕込み方法がある (Fig. 1-3)。この仕込み方法はビールやウイスキーにみられる麦芽を用いて糖化後発酵させる単行複発酵と呼ばれる発酵形態である。ちなみに、焼酎や清酒などは糖化と発酵が同時に行われる並

行複発酵の形態である。米香型白酒の固体糖化工程は、デンプンを分解するだけでなく、*Rhizopus* 属をはじめとする微生物群の増殖を促すと共に、アミラーゼやプロテアーゼの生産が行われる工程でもあるため、日本の製麹工程に類似する<sup>17)</sup>。また、米型白酒の固体糖化工程では、原材料中のデンプンとタンパク質も効果的に分解し、エタノール発酵の初期段階で炭素源と窒素源の濃度を大幅に増加させる。



**Fig. 1-3 The production process of Rice-flavor baijiu.** The photo respectively represents the process of soaking rice (B), mixing xiaoqu with raw materials (C), solid-state saccharification (D), and fermentation(E) in the production process(A).



### 第3節 本格焼酎の酒質に与える製造工程の研究動向

本格焼酎の製造工程は製麹、一次仕込み、二次仕込み、蒸留の4工程がある。製麹は麹菌を蒸し米に接種して2日間培養することで行われる。麹の役割は、デンプン分解酵素やタンパク質分解酵素などの酵素供給と、醪のpHを低下させて温暖な地域でも醪を腐造させずに発酵が可能となるクエン酸の供給がある。製麹工程で得られた麹に水と酵母を加え一次仕込みを行い、約5日間発酵させる。得られた一次醪に蒸したサツマイモと水を加え二次仕込みを行い、約10日間発酵させる。発酵終了後の醪を蒸留すると焼酎が得られる。これらの工程において、これまで酒質に関与する研究について以下に紹介する。

原料サツマイモの研究において、奥津<sup>18)</sup>らは、使用したサツマイモ(品種コガネセンガン)を植え付けの120, 150, 180日後に収穫し、それぞれ芋焼酎を製造し酒質の評価を行った。栽培期間がより長いサツマイモは、花のような香りと芋焼酎の特徴的な味を強化するという官能評価が示された。150日間栽培したサツマイモで調製した芋焼酎は他の焼酎と比べてより甘い味を有していると評価された。180日間栽培したサツマイモで調製した芋焼酎は、120日間栽培したものと比べてモノテルペンアルコールの濃度がより低かったが、 $\beta$ -ダマセノン、ローズオキシド、脂肪酸エステルの濃度がより高かった。また、サツマイモは品種によっても酒質が異なり<sup>19, 20)</sup>、皮が赤色系の品種を用いると、酒質は軽快、華やか、野菜的などと評価され、紫系サツマイモを原料とした芋焼酎は、甘酸っぱく、ヨーグルト的な風味を持つ酒質であり、その風味にジアセチルが大きく影響していることが分かった。橙系サツマイモを用いた製品には加熱処理したニンジンやカボチャの香りと評価された。原料加熱方法の研究について、吉崎ら<sup>21)</sup>はサツマイモを恒温器で加熱及び蒸煮して、焼酎の酒質に与える影響について検討した。恒温器加熱サツマイモおよび恒温器と蒸煮加熱サツマイモ製芋焼酎において、香りでは甘香およびフルーティーの評価が高く、味では甘味および濃厚

になる傾向を示した。恒温器加熱サツマイモ製芋焼酎は高級アルコールやアルデヒド、エステル類など、揮発成分において蒸煮サツマイモ製芋焼酎より高い含有量を示し、生イモ臭がなくなることが示された。

焼酎酵母には「鹿児島 2 号, 4 号, 5 号, 6 号」や「宮崎酵母」, 「熊本酵母」, 「泡盛 1 号」, 「焼酎用協会 2 号, 3 号」, など様々な種類が存在する。酵母はアルコールを生産すると同時に, 高級アルコールとそのエステル, 脂肪酸, カルボニル化合物及びそのエステルや硫黄化合物などの香気成分を生成する。香気成分の生成量は発酵条件にもよるが, 酵母の種類によって異なる<sup>22)</sup>。酵母が生成する香気成分は芋焼酎の風味に大きく寄与することから, 酒質を決める上で酵母の選択は重要な要素である。鹿児島 2 号は, 鹿児島県で最も多く使用されている酵母であり, 鹿児島 2 号を使った芋焼酎は, 「さわやか」, 「無難」, 「口当たり良」と評価された。鹿児島 4 号は高級アルコールとそのエステルの生成量が高く, 芋焼酎は「華やか」, 「味香りソフト」の特徴がある。また, 鹿児島 5 号は鹿児島 2 号と比べて「甘い」, 「こくがある」, 「香味に特徴があり従来とは少し異なる香り」と評価された。

麹菌の研究において, 白石ら<sup>23, 24)</sup>は黄麹菌, 黒麹菌および白麹菌を実験室規模で製麹し, 同じ条件で発酵蒸留させ, 得られた焼酎の評価を行った。黄麹製の芋焼酎の香りは華やか, 麹の香り, 焼菓子, 草やハーブ様と指摘された。白麹製及び黒麹製の焼酎は, 共通して果実様, ロースト, ナッツ様といったコメントが多かった。白麹製の芋焼酎はライト, シャープのコメントがあり, 黒麹焼酎はオイリー, まろやか, クリーム等のコメントが特徴的であった。味のコメントは香りと類似した傾向を示し, 白麹焼酎ではドライ, バランスといったコメントがみられるのに対し, 黒麹焼酎では芳醇, 重厚といったコメントが得られた。

仕込み配合の研究においては, 米焼酎や麦焼酎では麹原料と主原料の重量割合が 1:2 が一般的であるが, 芋焼酎の場合は麹米とサツマイモの割合が 1:5 で

ある。この割合を変えると、1:5の焼酎が最も芋焼酎らしく、1:8の芋焼酎が最も華やかであり、味では1:1の焼酎が最も端麗であり1:8の焼酎が最も濃厚であることが分かっている<sup>25)</sup>。

醪pHにおいては、高級アルコールと酢酸エステルは醪pHが高くなるに従い緩やかに増加する傾向が認められた。 $\beta$ -ダマセノンとアルデヒドは醪pHが高くなると減少する傾向にあった。醪pHの影響を明らかに受けている成分として、 $\alpha$ -テルピネオール、リナロール、ネロリドール、ネロールおよびネロルオキサイドがあった。ローズオキサイドとシトロネロールは、pHが高くなるに従い緩やかに増加する傾向が認められた。醪pHが低pHほど酒質は「華やか」や「柑橘香」などと評価され、pHが高くなるほど「蒸し芋臭」や「黄麹様」などと評価されていることが報告されている<sup>26)</sup>。

#### 第4節 本論文の研究目的とその内容

芋焼酎の酒質は、これまでの研究において用いる酵母と麹菌の種類、原料サツマイモの栽培期間、原料加熱方法、麹とサツマイモの配合割合、二次醪pH等の製造要因が関与することが明らかになってきている。しかしながら、芋焼酎の製造工程である二次仕込みの工程が、香気成分や焼酎の品質に影響を与える重要な工程ではあるが、大正時代から二次仕込み法が導入され定着した以来、仕込み法に関する改変は行われてきていない。発酵形態には単発酵、単行複発酵および並行複発酵がある。果実など糖質を原料とする単発酵ではワインやブランデーが該当する。一方、デンプン質を原料とする発酵では、デンプンを糖化する必要があり、糖化後発酵させる単行複発酵と、糖化と発酵が同時に起こる並行複発酵がある。前者には米香型白酒やウイスキーが該当し、後者には清酒や焼酎が該当する。この発酵形態が焼酎の酒質に与える影響についてこれまで検討した例はない。また、二次仕込みでは、蒸したサツマイモを加えることで醪の粘度が高く

なり、二次醪の温度管理が難しくなる。二次醪温度においては、醪の温度が高温経過をたどると「濃厚で複雑な香味の酒質」となり、低温で管理をすると「淡麗で華やかな酒質」になると経験的にいわれているが、発酵温度と酒質との関係は科学的な知見からは明らかとなっていない。

そこで、焼酎の酒質に関与する製造要因として、二次醪の温度の影響および新たな仕込み方法である固体糖化があげられることから、これらが酒質にどのような影響を与えるのかについて明らかにすることを目的とした。

具体的には、第 1 章では焼酎とアジア蒸留酒の歴史から、現在の焼酎生産技術とこれまで芋焼酎酒質の多様化に取り組む研究動向と本研究の目的について概略した。

第 2 章では、日本と中国の蒸留酒の仕込み法を融合した新たな製造法の可能性について、サツマイモを白麹で固体糖化後に発酵させる新たな発酵形態の開発と酒質に与える影響について検討した。

第 3 章では、二次仕込み高温経過をたどると「濃厚で複雑な香味の酒質」となり、低温で管理をすると「淡麗で華やかな酒質」になると経験的にいわれている。この酒質の違いを科学的に明らかにするため、二次醪温度を 25℃一定、最高温度 32℃及び最高温度 38℃で管理することで醪の発酵経過及び酒質に与える影響について検討した。

そして第 4 章では、上記各論の結果を総括し、本研究の内容をまとめた。

## 第5節 参考文献

- 1) 焼酎に関するもの | 国税庁,  
<https://www.nta.go.jp/about/organization/tokyo/sake/abc/abc-shochu.htm>.
- 2) 2019 National Tax Agency Report | National Tax Agency,  
[https://www.nta.go.jp/english/Report\\_pdf/2019.htm](https://www.nta.go.jp/english/Report_pdf/2019.htm).
- 3) 岸野 久: J. アルヴァレスの日本報告, 日本歴史, 368号, 吉川弘文館, **98**,  
(1979)
- 4) 指定文化財 | 伊佐市 | 鹿児島県伊佐市, 「郡山八幡神社」  
<https://www.city.isa.kagoshima.jp/culture/shisetsu-bunka/shiteibunka/>.
- 5) 小林晃: 焼酎原料用サツマイモ : 品種開発の変遷と今後の展望, 日本醸造  
協会誌 **114**, 71 (2019).
- 6) 鶴飼保雄, 大澤良: 「サツマイモ」品種改良の日本史: 作物と日本人の歴  
史物語, 悠書館.
- 7) T.-W. Kim: Food Sci. Ind. **52**, 410 (2019).
- 8) X.-W. Zheng , B.-Z. Han: J. Ethn. Foods **3**, 19 (2016).
- 9) 鮫島吉広: 日本醸造協会誌 **99**, 495 (2004).
- 10) 鮫島吉廣: 日本醸造協会誌 **84**, 829 (1989).
- 11) 焼酎学へのいざない (日本生物工学会): 2019-02 | 書誌詳細 | 国立国会図書  
館サーチ.
- 12) A. Endo: J. Antibiot. (Tokyo) **33**, 334 (1980).
- 13) 吉崎由美子, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 鮫島吉廣, 高峯和則: 日本醸  
造協会誌 **113**, 265 (2018).
- 14) 西谷尚道: 日本醸造協会雑誌 **77**, 872 (1982).
- 15) 高峯和則: 鹿児島県工業技術センター平成7年度研究報告 **8**, 1 (1994).

- 16) 安藤義則, 高峯和則, 亀沢浩幸: <http://www.kagoshima-it.go.jp/public/happyo/happyo2003/12-3.pdf>
- 17) X. Yin, Y. Yoshizaki, M. Ikenaga, X.-L. Han, K. Okutsu, T. Futagami, H. Tamaki, K. Takamine, J. Biosci. Bioeng. **129**, 315 (2020).
- 18) K. Okutsu, Y. Yoshizaki, M. Kojima, K. Yoshitake, H. Tamaki and T. Kazunori, J. Inst. Brew. **122**, 168 (2016).
- 19) 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上田次郎, 瀬戸口智子, 緒方新一郎, 日本醸造協会誌 **101**, 437 (2006).
- 20) 神渡巧, 瀬戸口智子, 上田次郎, 吉永優, 緒方新一郎, 瀬戸口眞治, 高峯和則, 鮫島吉廣, 日本醸造協会誌 **104**, 49-56 (2009).
- 21) 吉崎由美子, 松山晃佑, 大庭暁紘, 園田舟, 奥津果優, 玉置尚徳, 高峯和則: 日本醸造協会誌 **110**, 349 (2015).
- 22) 高峯和則, 鮫島吉廣, 日本醸造協会誌 **103**, 601 (2008).
- 23) 白石洋平, 竹浦滯, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則, 日本醸造協会誌 **116**, 39 (2021).
- 24) 白石洋平, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則, 日本醸造協会誌, **116**, 49 (2021).
- 25) 高峯和則, 味わいある低濃度アルコール芋焼酎製造法.
- 26) 高峯和則, 小島舞, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 吉崎由美子, 日本醸造協会誌, **113**, 375 (2018).

## 第2章 サツマイモ固体糖化後仕込みによる芋焼酎製造の可能性

### 第1節 緒言

焼酎の仕込み法は麴と主原料を別々に仕込む二次仕込み法で行われている。この仕込み法は1906年(明治36年)に芋焼酎に導入された<sup>1)</sup>。それ以前は、米麴と主原料、水を一度に仕込むどんぶり仕込み法と呼ばれる清酒の酒母を蒸留したものに相当する仕込みであった。この仕込み法では、焼酎の主産地である鹿児島や宮崎など温暖な地域においては醪温度が30℃近くになるため腐造しやすかった。そのため、米麴と主原料、水を2回に分けて仕込む二段仕込み法(清酒醸造の酒母と初添えに相当)が開発された。この方法は米焼酎では腐造せずに発酵させることができた。しかし、芋焼酎では主原料のサツマイモのデンプン価が米の半分以下のため、米の2倍以上加える必要があることと、サツマイモの食物繊維は保水力が高いこと、そして蒸すとデンプンの約3分の1がマルトースに加水分解されることなどから、仕込み直後の醪は糖濃度と粘度が高く流動性がなく攪拌も困難であり、腐造の危険性が高かった。これらの問題を改善できる二次仕込み法が芋焼酎に導入され、大正元年(1912)頃には定着し<sup>1)</sup>、現在もなおこの仕込み法で製造されている。

一方、中華人民共和国で製造される蒸留酒である白酒には、米酒の発酵技術と蒸留工程を融合した米香型白酒がある<sup>2)</sup>。この製造方法は、小曲(日本の麴に相当)と水分60%程度に蒸煮した米を混ぜ合わせて、35℃付近で24時間固体糖化させた後に加水しアルコール発酵させる。この固体糖化工程において小曲に含まれる *Rhizopus* 属の増殖によりデンプン分解酵素などの酵素類と乳酸が生産されることで米デンプンの約70%が糖化され、加水した後速やかな発酵と乳酸による醪の腐造防止が可能となっている<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、日本と中国の蒸留酒の仕込み法を融合した新たな製造法の可能性について、サツマイモを白麹で固体糖化後に発酵させる新たな芋焼酎製造方法の開発と酒質に与える影響について検討した。

## 第2節 実験方法

### 2.2.1. 使用菌株および供試材料

白麹菌 (*Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*) の種麹は、樋口松之助商店社製のヒグチとヒグチ (米)、ビオック社製の K 型、秋田今野社製の雪こまち、焼酎用, IV-2, 河内源一郎社製の L 型, S 型, 白麹 G, 河内白麹の 10 種類を用いた。一般成分分析に使用した試薬類は、特に明記しない限り市販の特級試薬を使用した。米は本坊商店 (株) より購入した焼酎用原料を使用した。サツマイモは焼酎造りに最適な品種であるコカネセンガンを用いた。 $\alpha$ -アミラーゼはスミチーム L (新日本化学工業 (株) 社製), プロテアーゼはニューラーゼ F3G (天野エンザイム (株) 社製) を使用した。

### 2.2.2. 製麹と麹分析

米麹の製麹は、以下の手順で行なった。米を水道水で三回洗い、1 時間浸漬した後水切りを 1 時間行った。この米を家庭用蒸し器で蒸煮した。60 分間蒸煮後、蒸し米の温度が約 40°C になるまで冷却し、生米重量の 1/1000 量の種麹をよく混ぜて植菌した。分生子が十分に拡散するように攪拌した後、プラスチック製のカゴにネル布を敷き、その上に種付けした米を入れて厚さ約 3 cm になるように形状を整えた。麹の温度は恒温恒湿器で温度を調整した。手入れは種麹を散布 19 時間後、24 時間後および 28 時間後に恒温恒湿器の外に出して攪拌した。枯らしは麹を薄く広げ室温で 1 時間行なった。

得られた麹を国税庁所定分析法に従い<sup>4)</sup>、出麹酸度は麹 10 g を 100 mL 容三角



フラスコにとり、これに脱塩水 50 mL を加え室温にて時々振り混ぜながら 3 時間静置し、No.2 のろ紙でろ過した。ろ液 10 mL をホールピペットで取り、100 mL 容三角フラスコにいれ、混合指示薬を 2~3 滴加えて、0.1 N 水酸化ナトリウム溶液で淡緑色を呈した時点を滴定の終点とした。滴定に要した 0.1 N 水酸化ナトリウム溶液の液量にそのファクターを乗じた値を酸度とした。

### 2.2.3. サツマイモの固体糖化

サツマイモを 1 時間蒸煮した後、5~10 mm サイズに粉碎し、その 20 g を 50 mL 容プラスチックチューブに入れて水浴中にて一定温度で 10 分間放置した後、米麴 2 g を加え水浴中で良く混合し、密栓して固体糖化を行った。固体糖化中は攪拌は行わなかった。

### 2.2.4. 固体糖化物の酸度の測定

固体糖化して得られた糖化物 5.0 g に脱塩水 10 mL 添加しガラス棒で良く混合し、遠心分離 (7,000 × g, 15 分間) した。沈殿物に脱塩水 10 mL を加え混合し遠心分離し、この操作を再度行い得られた上清液を脱塩水で 50 mL に定容した。この 10 mL を用いて 0.01M NaOH にて中和滴定し、中和に要した滴定量を酸度とした。

### 2.2.5. 可溶性糖の分析

サツマイモ、米麴および固体糖化して得られた糖化物をそれぞれ 5.0 g に 80% エタノール 20 mL を加えてガラス棒で良く混合し、遠心分離 (7,000 × g, 15 分間) した。沈殿物に 80%エタノール 20 mL を加え混合し遠心分離し、この操作を再度行い得られた上清液を 80%エタノールで 100 mL に定容し抽出液とした。抽出液は C18 Spin Columns (Havard Apparatus 社製)および 0.45 μm のメン

ブレンフィルターでろ過し、可溶性糖分析用試料とした。この試料は、分析に使用するまで-20℃に保存した。可溶性糖の分析は、高速液体クロマトグラフィー（(株) 島津製作所社製）を用いて行った。カラムは LiChrospher100 NH<sub>2</sub> (粒径 5 μm) (Merck Millipore 社製) を用い、移動相はアセニトリルと水 (3 : 1) の混合液によるアイソクラティック溶出で、オーブン温度は 40℃、流速 1.0 mL/min で測定した。検出器は示差屈折率検出器 RID-10A ((株) 島津製作所社製) を用いて定量した。分析条件は Table 2-1 を示す。

#### 2.2.6. 有機酸の測定

糖化物 10 g に脱塩水 25 mL を加えてガラス棒で良く混合し、遠心分離 (7,000 × g, 15 分間) した。沈殿物に脱塩水 25 mL を加え混合し遠心分離し、この操作を再度行い得られた全ての上清液を脱塩水で 100 mL に定容し抽出液とした。抽出液は C18 Spin Columns (Havard Apparatus 社製) および 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過した。有機酸分析は、カラムは Shim-pack SCR-102H ((株) 島津製作所) を 2 本連結して用いた。カラムオーブン温度は 50℃ で、移動相は 4 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液を使用し、流速は 0.8 mL/min で送液した。カラムより溶出後、反応液 (4 mM *p*-トルエンスルホン酸溶液, 16 mM Bis-Tris, 80 μM EDTA 溶液) 0.8 mL/min と混合し、電気伝導度検出器にて検出した (CDD-10AVP, (株) 島津製作所)。分析条件は Table 2-2 を示す。

**Table 2-1 HPLC condition for soluble sugars**

<b>Analysis equipment</b>	: SHIMADZU-LC (Shimadzu corporation)
<b>Analytical column</b>	: COSMOSIL Sugar-D Packed Cloumn (250 mm I. × 4.6 mm I.D., 5 µm)
<b>Guard column</b>	: COSMOSIL Sugar-D Packed Cloumn (10 mm I. × 4.6 mm I.D., 5 µm)
<b>Mobile Phase</b>	: Acetonitrile: Water = 75:25
<b>Flowrate of Mobile Phase</b>	: 1.0 mL/min
<b>Column Temp.</b>	: 40°C
<b>Injection Vol.</b>	: 10 µL
<b>Detector</b>	: SHIMADZU RID-10A, Refractive Index Detector

**Table 2-2 HPLC conditions for organic acids**

<b>Analysis equipment</b>	: SHIMADZU-LC (Shimadzu corporation)
<b>Analytical column</b>	: SHIMADZU Shim-pack SCR102H, 2 columns in eries (300 mm l. × 8.0 mm I.D., 7 µm)
<b>Guard column</b>	: SHIMADZU Shim pack SCR102HG (50 mm l. × 6.0 mm I.D.)
<b>Mobile Phase</b>	: 4 mM <i>p</i> -toluenesulfonic acid monohydrate
<b>pH Buffering Solution</b>	: 4 mmol/L <i>p</i> -toluenesulfonic acid monohydrate, 16 mM Bis-Tris, 80 µM EDTA
<b>Flowrate of Mobile Phase</b>	: 0.8 mL/min
<b>Flowrate of pH Buffering Solution</b>	: 0.8 mL/min
<b>Analysis time</b>	: 57min
<b>Column Temp.</b>	: 50°C, 25°C
<b>Injection Vol.</b>	: 10 µL
<b>Detector</b>	: SHIMADZU CDD-10A VP Conductivity detector

### 2.2.7. 酵素活性の測定

米麴および糖化物に含まれる粗酵素の抽出は国税庁所定分析法<sup>4)</sup>に従った。米麴および糖化物 10 g に塩化ナトリウム溶液 (0.5% (w/v) NaCl を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5)) 50 mL を加え、一晚冷蔵庫内で浸出した後、No.5C のろ紙でろ過し、そのろ液 10 mL を透析膜に入れ、0.01 M 酢酸緩衝液に対して低温で一夜透析した後、水で 20 mL とし酵素液とした。

$\alpha$ -アミラーゼ活性測定はキット (キッコーマン (株), 千葉) を用いて行なった。反応液の組成は、基質液 0.5 mL, 酵素溶液 0.5 mL, 20 mM クエン酸緩衝液 (pH 3) 0.4 mL, 酵素液 0.1 mL とし 37°C で 10 分間反応させた後、反応停止液 (炭酸ナトリウム溶液) 2 mL を加えて反応を停止し、400 nm の吸光度を測定した。 $\alpha$ -アミラーゼの 1 U は、1 分間に N3-G5- $\beta$ -CNP (2-クロロ-4-ニトロフェニル 65-アジド-65-デオキシ- $\beta$ -マルトペンタオシド) から 1 mol の CNP (2-クロロ-4-ニトロフェノール) を遊離する酵素量と定義した。グルコアミラーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、それぞれの測定キット (キッコーマンバイオケミファ (株) 社製) を用いて測定した。

グルコアミラーゼは糖化力分別定量キット (キッコーマン (株)) を用いて測定した。このキットはグルコアミラーゼと  $\alpha$ -グルコシダーゼによる G2- $\beta$ -PNP 分解活性を示し、これを測定試料中の糖化力とした。糖化力測定の反応液の組成は、基質液 0.5 mL, 酵素溶液 0.5 mL, 酵素液 0.1 mL とし、37°C で 10 分間反応させた後、反応停止液 (炭酸ナトリウム溶液) 2 mL を加えて反応を停止し、400 nm の吸光度を測定した。

酸性カルボキシペプチダーゼ測定は酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット (キッコーマンバイオケミファ (株), 東京) を用いて行った。反応液の組成は、基質溶液 1.0 mL, 酵素液 0.1 mL とし、37°C で 10 分間反応させた後、反応停止液を 2 mL 加えて反応を停止した。定量用酵素液を 0.1 mL 加え 20 分間反応させ、

さらに定量用発色液を 0.1 mL 加え 10 分間反応させた後、吸光度 460 nm で測定した。酸性カルボキシペプチダーゼの 1 U は、1 分間に Cbz-Tyr-Ala から 1  $\mu$ mol の L-アラニンを遊離する酵素量と定義した。

$\beta$ -グルコシダーゼ(以下, BG)活性は太田ら<sup>37)</sup>の方法に従って行った。すなわち, 4 mM *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside (PNPG) 0.25 mL, 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 0.50 mL に酵素液 0.25 mL を加えて, 37°C で 15 分間反応させ, 200 mM 炭酸ナトリウム溶液 2 mL を加えて反応を停止した後, 410 nm の吸光度を測定して遊離 *p*-nitrophenol を定量した。PNPG に作用して 37°C, 1 分間に 1 nmol の *p*-nitrophenol を生じさせる酵素力価を 1 U とした。

インベルターゼ活性は FRANKENBERGER and JOHANSON<sup>5)</sup>の方法を一部改変して行った。すなわち, 0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.2) を用いて調製した 10% スクロース溶液 0.9 mL に粗酵素液 0.1 mL を添加し, 40°C~80°C で反応させた後 1 M NaOH 0.5 mL を添加し室温に 15 分間静置し反応を停止させた。この溶液に 1 M HCl 0.5 mL を添加して中和し, 可溶性糖の分析を行った。

### 2.2.8. 糖化物揮発成分の分析

試料 10 mL と内部標準物質である 1-pentanol (10 mg/L) 1 mL を 200 mL 容の専用ボトルに入れ、密閉し 30°C の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc. の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 mL 吸引し、GC-MS に自動注入した。焼酎の揮発成分の同定および定量分析はアジレント・テクノロジー (株) の GC-MS (GC, Agilent 6890; MS, Agilent 5979B) により行った。成分の一次同定は、Agilent ChemStation ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより行った。GC-MS 分析条件は以下の Table. 2-3 に示す。

分析に用いた試料は、固体糖化物全量に 80%エタノール溶液 25 mL を加え良く攪拌し、遠心分離した。沈殿物に再度 80%エタノール溶液 25 mL を加え良く攪拌し、遠心分離した。これを 2 回繰り返す、得られた上澄み液を 100 mL に定容した。そして、25%アルコールに蒸留水で希釈し、これを GC-MS 分析用の試料とした。分析条件 Table 2-3 に示す。

Table 2-3 GC/MS analysis condition of the samples	
<b>Thermodesorption system</b>	: Entech 7100A
<b>Injection volume</b>	: 10 mL
<b>GC</b>	: Agilent 6890N
<b>Column</b>	: DB-WAX (60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film)
<b>Carrier</b>	: Helium, 1 mL/min., constant flow mode
<b>Oven</b>	: 40°C, 5 min. hold → 3°C/min. to 240°C → 240°C, 5 min hold
<b>Analysis time</b>	: 71.6 min
<b>Injector temperature</b>	: 220°C
<b>Transfer line</b>	: 250°C
<b>Quadrupole ion trap temperature</b>	: 150°C
<b>Ion source temperature</b>	: 250°C
<b>MS</b>	: Agilent 5975B
<b>Mode</b>	: SCAN



### 2.2.9. 小仕込み試験

従来の仕込み法 (以後, 従来法) と固体糖化後仕込み法 (以後, 固体糖化法) について Fig. 2-1 に示す。従来法は, 麴米 140 g 相当の米麴に酵母培養液 2 mL を含む脱塩水 168 g を加えて一次仕込みを行い, 30°Cの恒温水槽中で 4 日間発酵させた。この一次醪全量に脱塩水 394 g と粉碎した蒸煮サツマイモ 700 g を加えて, 30°Cで 7 日間恒温水槽中にて発酵させた。一方, 固体糖化法は, 麴米 70 g 相当の米麴に粉碎した蒸煮サツマイモ 700 g を加え良く攪拌し, 60°Cで 24 時間固体糖化させた。この糖化物全量と脱塩水 479 g を, あらかじめ麴米 70 g 相当の米麴と酵母培養液 1 mL を含む脱塩水 84 g で一次仕込みを行い 30°Cで 4 日間発酵させた一次醪に加え, 二次仕込みを行い 30°Cで 7 日間発酵させた。発酵経過は, 醪の重量を毎日測定し重量減少量から追跡した。蒸留は醪 900 g を 2 L 容のガラス製蒸留器にて, 蒸気直接吹き込みによる常圧蒸留で行った。蒸留の終点は末垂れのアアルコール度数が約 10%に到達した時点とした。終点のアアルコール度数の測定は携帯型密度計 DMA-35 (株) アントンパール・ジャパン社製) を用いた。原酒をアルコール濃度が 25%になるよう脱塩水にて割水して孔径 5  $\mu\text{m}$  の親水性 PTFE メンブレンフィルターでろ過し, 暗所にて約 2 ヶ月間室温で保存した。なお, 保存期間中は, 数日おきに攪拌して硫黄やアルデヒド由来のガス成分を除去し, ガスが抜けたことを香りから確認した後, 焼酎の分析と官能評価に使用した。

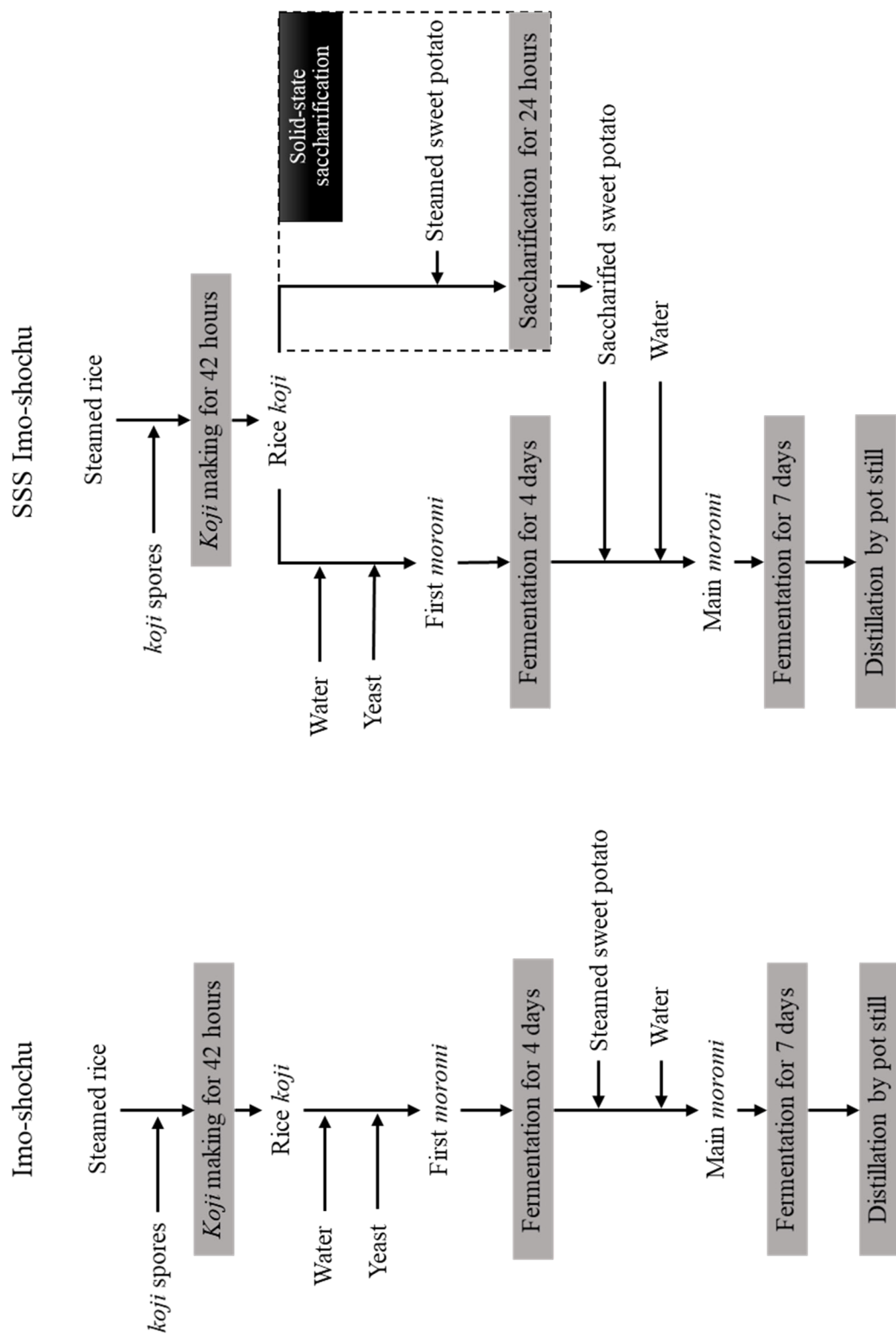


Fig. 2-1 Diagram of the Imo-shochu and solid-state saccharification (SSS) Imo-shochu production process.

#### 2.2.10. 二次醪および焼酎の分析

醪酸度とアルコール濃度は所定分析法に従って測定した<sup>6)</sup>。アルコール濃度の測定は酒類用振動式密度計 DA-155 (京都電子工業 (株) 社製) を用いた。酵母数は、ガーゼろ過した醪 0.5 mL, 脱塩水 2 mL およびメチレンブルー溶液 2.5 mL を試験管に加え、ボルテックスミキサーで混合し 15 分間静置した。測定前に再度懸濁させた後、ヘマトメーターを用いて顕微鏡観察下で計測した。醪の全糖と直接還元糖は高峯ら<sup>7)</sup>の方法に従った。

#### 2.2.11. 官能評価

糖化物の官能評価は鹿児島大学農学部附属焼酎発酵学教育研究センター教員 3 名およびきき酒の訓練を受けた学生 11 名をパネルとして、焼き芋香の強度試験 (0 : なし, 1 : なんとなく感じる, 2 : 感じるが弱い, 3 : 楽に感じる, 4 : 強く感じる, 5 : 強烈に感じる) と香りのコメントを求めた。焼酎の官能評価は鹿児島県工業技術センター食品・化学部職員 5 名および同教育研究センター教員 3 名の計 8 名が、ブラインドテストで実施した。香り 6 項目 (アルコール, 果実様, 蒸し芋様, 焼き芋様, 油様, 花様) と、味 6 項目 (酸味, 甘味, 刺激味, 苦味, 濃厚, キレ) の香味の有無について官能評価を行い、有りと評価した人数を評点とした。

#### 2.2.12. 芋焼酎の揮発成分分析

芋焼酎の揮発成分は TDS (Thermal desorption system, GERSTEL K. K. Japan 社製) を用いて GC-MS 分析し、マススペクトルのライブラリー検索とリテンションインデックスから揮発成分を同定した<sup>8)</sup>。同定した成分については定量を行い t 検定による統計解析を行った。

### 第3節 実験結果および考察

#### 2.3.1. 固体糖化条件の検討

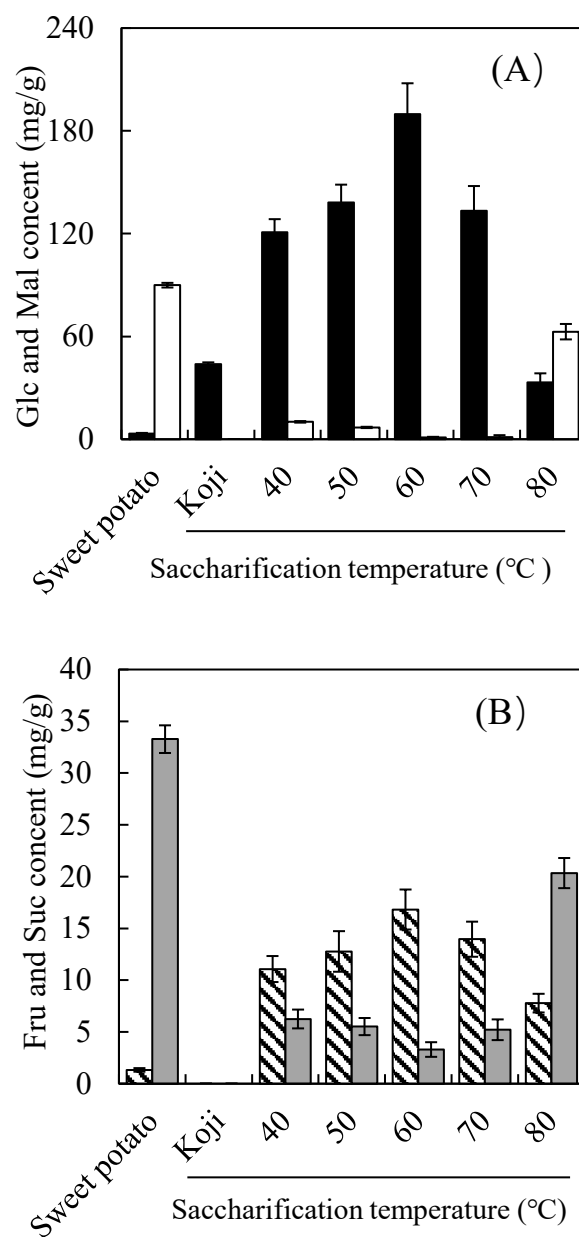
##### 2.3.1.1. 固体糖化温度の影響

固体糖化に使用した米麴の水分、酸度、 $\alpha$ -アミラーゼ活性およびグルコアミラーゼ活性はそれぞれ 27.5%, 7.0, 222 U/g-乾燥麴および 201 U/g-乾燥麴であった。この値は一般的な麴と同等の値であった<sup>9)</sup>。蒸煮サツマイモの可溶性糖は、Fig. 2-2 に示すようにフルクトース、グルコース、スクロースおよびマルトースがそれぞれ 1.3 mg/g, 3.2 mg/g, 33.4 mg/g および 89.9 mg/g であった。また、米麴にはグルコースのみが検出され、その濃度は 43.9 mg/g であった。このサツマイモと米麴を用いて、40°C~80°Cで 24 時間固体糖化を行った。

その結果、Fig. 2-2 (A) に示すように 40°C~70°Cでは糖化が進みグルコース濃度は 60°Cで最大の 193 mg/g であったが、80°Cでは 33.4 mg/g とほとんど糖化しなかった。これは、白麴菌の生成する  $\alpha$ -アミラーゼとグルコアミラーゼの至適温度は 70°Cであり、80°Cでは最大活性のそれぞれ 20%程度および 10%であることと、60°C以下では酵素の熱安定性が高く、90%以上の活性が残存するためと考えられる<sup>10)</sup>。マルトースは 60°C~70°Cではほとんど検出されなかった。これは Inokuchi et al.<sup>11)</sup>によると *Aspergillus saitoi* から精製したグルコアミラーゼは、マルトースを加水分解し pH 2.5~7.5 で安定であり、50°Cまで熱安定性があり、70°Cを超えると活性を失うと報告していることから、グルコアミラーゼによってマルトースは加水分解されたものと考えられる。また、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、 $\alpha$ -グルコシドの非還元末端やマルトオリゴ糖、可溶性デンプン、アミロース、グリコーゲンなどの  $\alpha$ - (1-4) 結合を持つ複合ポリマーから  $\alpha$ -グルコースを遊離する触媒である。*Aspergillus* の  $\alpha$ -グルコシダーゼの至適温度は 50°C~65°Cの間である<sup>18)</sup>。

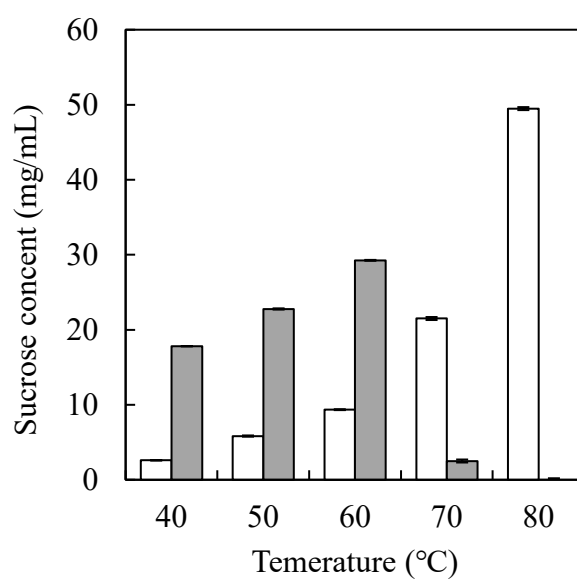
Fig. 2-2 (B) に示すように、サツマイモに含まれるスクロースとフルクトースはそれぞれ 33.3 mg/g と 1.3 mg/g であったが、米麴にはいずれも検出されなかった。このことから、固体糖化 0 時間における糖化物中のスクロースとフルクトースはそれぞれ 30.3 mg/g と 1.2 mg/g と算出される。一方、糖化温度 60°C における糖化物中のスクロースとフルクトースはそれぞれ 3.3 mg/g と 16.8 mg/g であったことから、糖化物 1 g 当たりスクロースは 0.079 mmol 減少し、フルクトースが 0.087 mmol 増加したことになり、そのモル比は 1 対 1.10 であった。糸状菌や酵母、細菌にはインベルターゼの存在が報告されている<sup>12,13)</sup>。また、瀬戸口と間世田<sup>14)</sup>は米麴にはインベルターゼが含まれると報告している。更に、氏原ら<sup>15)</sup>はサトウキビ絞り汁の pH が 4.5 以下においてスクロースは加熱により加水分解を受けると報告している。そこで、インベルターゼ活性の測定法を用い 10% スクロース溶液に麴粗酵素液または沸騰浴中で 10 分間失活させた粗酵素液を添加し 24 時間反応後のスクロース濃度を測定した。なお、サツマイモ 20 g に米麴 2 g を添加した糖化物の pH は 4.2 であったことから、pH 4.2 のクエン酸緩衝液でスクロース溶液を調製した。Fig. 2-3 には、反応 0 時間のスクロース濃度から失活させた粗酵素液を添加した反応液中のスクロース濃度を差し引いた値、すなわち加熱によって加水分解されたスクロース濃度として、また、失活させた粗酵素液添加液中のスクロース濃度から粗酵素液添加溶液中のスクロース濃度を差し引いた値、すなわち酵素分解を受けたスクロース濃度を示している。スクロースは反応温度が高くなるほど加熱による加水分解を受けやすく、また、酵素分解では 60°C が最も分解活性が高かった。これらのことから、サツマイモの固体糖化によるスクロースの減少は、40°C~70°C では加熱分解および米麴に含まれるインベルターゼと推定される酵素により加水分解されたものであり、80°C では加熱によるものと考えられる。糖化物の酸度は 40°C, 50°C, 60°C, 70°C および 80°C それぞれ、5.6, 5.4, 6.1, 5.6 および 5.8 と大差無かった。糖化物の官能評価の結

果，焼き芋香の強度はそれぞれ，1.5，1.3，3.9，3.8 および 3.3 と 60℃が最も強度が高かった。70℃と 80℃では若干焼き菓子様の香りとのコメントがあった。一方，40℃と 50℃では味噌様や酸臭とのコメントがあったことから，50℃以下では酢酸を生産する微生物汚染が考えられる。以上の結果から，固体糖化の至適温度は 60℃であることがわかった。



**Fig. 2-2 Effect of temperature on soluble sugar content production in solid-state saccharification for 24 hours.**

The difference in the content of soluble sugar after 24 hours of solid-state saccharification at 40°C~80°C. (A) is the difference in glucose ( ■ ) and maltose ( □ ). (B) is the difference in fructose ( ▨ ) and sucrose ( ▩ ). Sweet potato and *koji* were used as raw materials to be analyzed before solid-state saccharification. Sweet potato was used after being steamed for 1 hour.



**Fig. 2-3 Effect of temperature on the thermal decomposition and invertase decomposition of sucrose for 24 hours.**

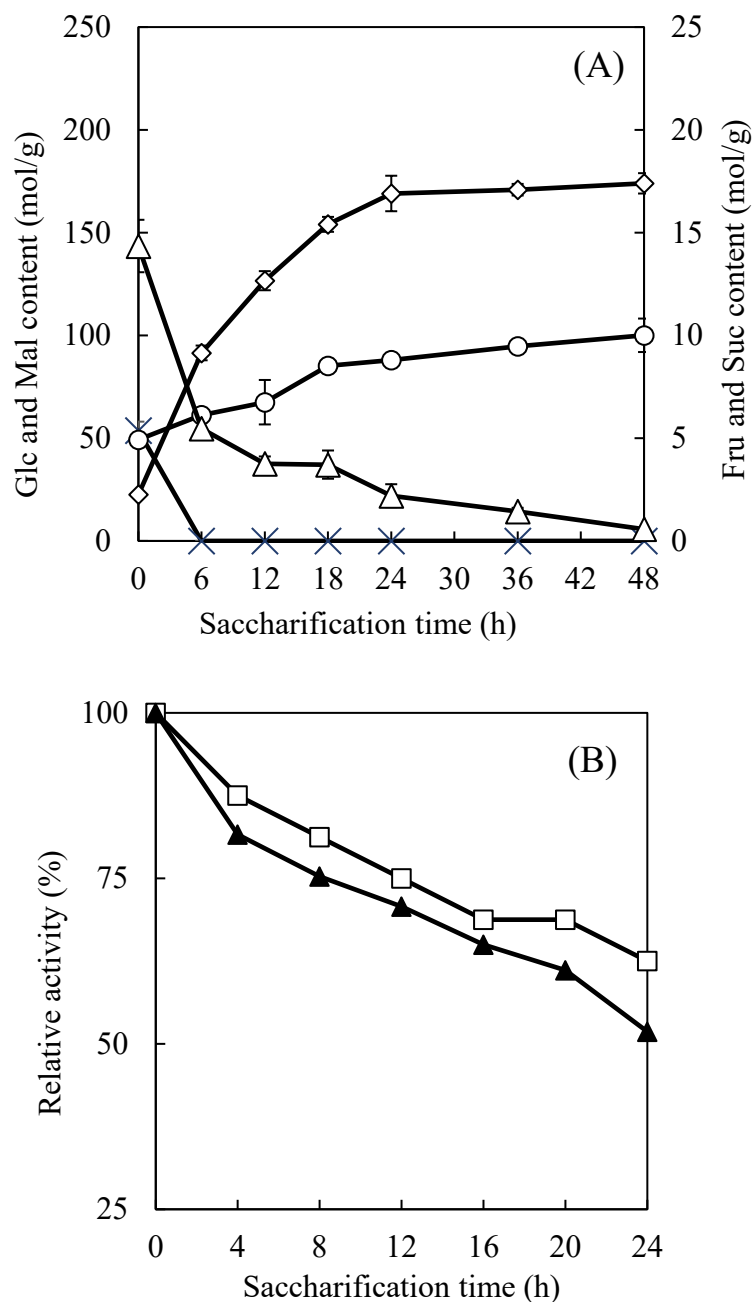
The open bar graph ( □ ) indicated the difference between the initial sucrose content with distilled water and the sucrose content after 24 hours of culture with inactivated crude enzyme, the thermal decomposition amount of sucrose. The closed bar graph ( ■ ) indicates the difference between the sucrose content after 24 hours of incubation with deactivation and not deactivation crude enzymes, the amount of invertase decomposition.



### 2.3.1.2. 固体糖化時間の影響

至適温度 60°Cで固体糖化時間の影響について検討した。その結果, Fig. 2-4 (A) に示すように, 糖化開始から 24 時間まではグルコースの増加が認められた。マルトースは糖化 6 時間後には消失し, スクロース濃度は糖化前が 14.3 mg/g であったが, 糖化 6 時間までは急激にその後は緩やかに減少し 48 時間後には 0.57 mg/g であった。フルクトースはスクロースの分解に伴い増加した。

糖化物に含まれる  $\alpha$ -アミラーゼ活性およびグルコアミラーゼ活性は Fig. 2-4 (B) に示すように, 糖化前の活性を 100%とすると経時的に相対活性は低下し, 24 時間後に残存する相対活性はそれぞれ 62.5%および 51.8%であった。芋焼酎製造における麴歩合は 20%が標準であるが麴歩合を 10%に低下しても発酵は遜色なく進む<sup>16)</sup>ことから, 24 時間後の相対活性は 50%以上残存しているため, 二次醪における発酵への影響はないと考えられる。



**Fig. 2-4 Time-dependent changes in soluble sugar content and enzyme relative activity during solid-state saccharification.**

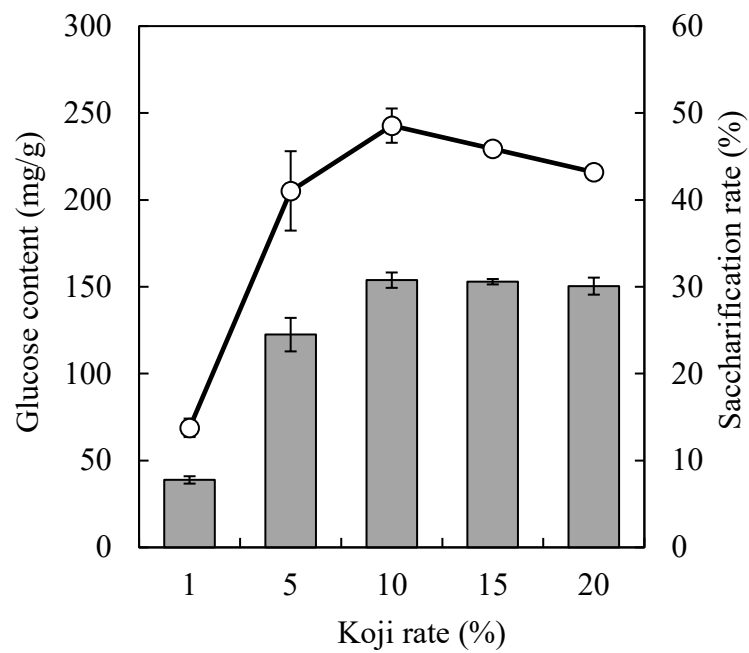
- (A) Glucose (  $\blacklozenge$  ), maltose (  $\blacktimes$  ), fructose (  $\bullet\bigcirc$  ) and sucrose (  $\blacktriangle$  ) contents change during solid-state saccharification at 60°C for 48 hours.
- (B)  $\alpha$ -Amylase(  $\blacksquare$  ) and glucoamylase (  $\blacktriangle$  ) changes during the 24 hours solid-state saccharification process at 60°C. Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

### 2.3.1.3. 麴歩合の影響



蒸煮芋 20 g に対して麴歩合が 1%~20%になるように米麴を添加し、60℃で 24 時間固体糖化を行った。なお、麴歩合とはサツマイモに対する重量%である。その結果、Fig. 2-5 に示すように麴歩合が 10%まではグルコース濃度および糖化率は増加し、麴歩合が 10%の時、それぞれ 158 mg/g および 48.5%であった。しかし、麴歩合 15%と 20%ではグルコース濃度の増加は認められず、麴歩合 20%における糖化率は 43%と麴歩合 10%と比べて低かった。

これには 2 つの理由が考えられる。1 つ目は、固体糖化工程で還元糖の濃度が徐々に上昇し、一定濃度に達すると糖化酵素活性が阻害されるためと考えられる。2 つ目は、 $\alpha$ -アミラーゼの蒸し米への無効吸着の影響があるものと考えられる。 $\alpha$ -アミラーゼはデンプンそのものではなく蒸し米を基質とするときに吸着現象が起こりやすい、また、 $\alpha$ -アミラーゼの吸着は pH 4 台において最も大きく、pH 5.1 では吸着しなくなることが明らかとなっている<sup>17)</sup>。そこで、麴歩合が 1%、5%、10%、15%および 20%の 24 時間糖化後の糖化物の pH を測定した結果、それぞれ pH 5.1、4.6、4.3、4.1 および 3.9 と麴歩合が高くなるほど pH が低くなった。このことから、麴歩合が高くなるほど無効吸着が起きやすい環境になっていると考えられる。

上記の可能性を踏まえて、糖化率を上げるため、汲水歩合、種麴の品類及び酵素剤を用いて無効吸着について実験を行った。

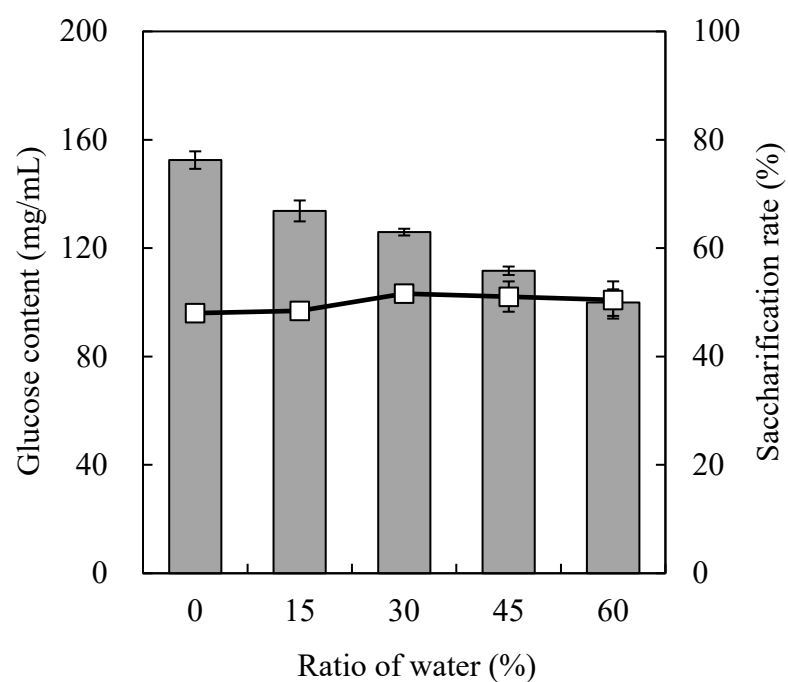


**Fig. 2-5 Effect of the rate of rice *koji* on the degree of solid-state saccharification.**



Glucose content (  ) and saccharification ratio (  ) were solid-state saccharified at 60°C for 24 hours. Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

#### 2.3.1.4. 汲水歩合の影響

米や麦などの穀類原料のデンプン含有量が約 70%であるのに対し、サツマイモのデンプン含有量は 25%~30%である。また、芋焼酎の仕込配合は、全体の汲水歩合 65%~75%が一般的である<sup>36)</sup>。芋焼酎の醪では、汲水歩合が少なすぎると醪の粘度が高く攪拌することが困難になった、発酵温度の制御が難しくなる<sup>37)</sup>。汲水歩合が多すぎると醪の pH が上がり、醪が雑菌に汚染されやすくなり、蒸留廃液量も増えることになる<sup>38)</sup>。そこで、蒸煮芋 20 g に対して汲水歩合が 0%~60%になるように脱塩水を添加し、60℃で 24 時間固体糖化を行った。その結果を Fig. 2-6 に示す。汲水歩合が増えると、糖化物のグルコース濃度は低下して、糖化率はほぼ一定であったから、サツマイモの糖化には汲水量は影響を与えないことがわかった。そして、サツマイモ固体糖化における白麹の糖化力は、高い糖濃度によって阻害されないことが示された。



**Fig. 2-6 Effect of the rate of water on the degree of solid-state saccharification.**

Glucose content (  ) and saccharification ratio (  ) were solid-state saccharified at 60°C for 24 hours. Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

### 2.3.1.5. 種麴の影響

本研究で使用した種麴で製麴した麴の酸度と酵素力価などを Table 2-4 に示す。対照は河内白とした。酸度はヒグチ，雪こまちおよび IV-2 以外は対照と遜色ない値であった。 $\alpha$ -アミラーゼ活性は L 型以外は対照と比べて高い値であった。糖化力は雪こまちと IV-2 は対照の 1/6 程度と非常に低かったが，両麴は  $\alpha$ -アミラーゼ活性が 30 倍以上高かった。

これらの麴を蒸煮サツマモ 10 g 当たり，Table 2-4 に示す麴添加量を加えて，固体糖化実験を行った。その結果を Fig. 2-7 に示す。対照の河内白の還元糖量である 232 mg/g と比べて，雪こまちおよび IV-2 以外は大差がなかった。雪こまちおよび IV-2 は  $\alpha$ -アミラーゼ活性が高いためデンプンの液化が進行し，還元糖の増加が期待されたが，還元糖量はそれぞれ 180 mg/g と 112 mg/g と対照より低い値となった。グルコース濃度は対照が 185 mg/g (糖化率 53.5%) に対して，還元糖量と同様に雪こまちおよび IV-2 以外は大差がなかった。雪こまちおよび IV-2 のグルコース量はそれぞれ 120 mg/g と 75 mg/g と対照と比べて低い値であった。これは，麴の糖化力が対照と比べて 1/6 程度と非常に低いためと考えられる。種麴を変えても対照と比べて糖化率が向上することはなかったが，糖化力が対照と遜色ない麴を用いると，いずれの麴においても同等の糖化率が得られることがわかった。

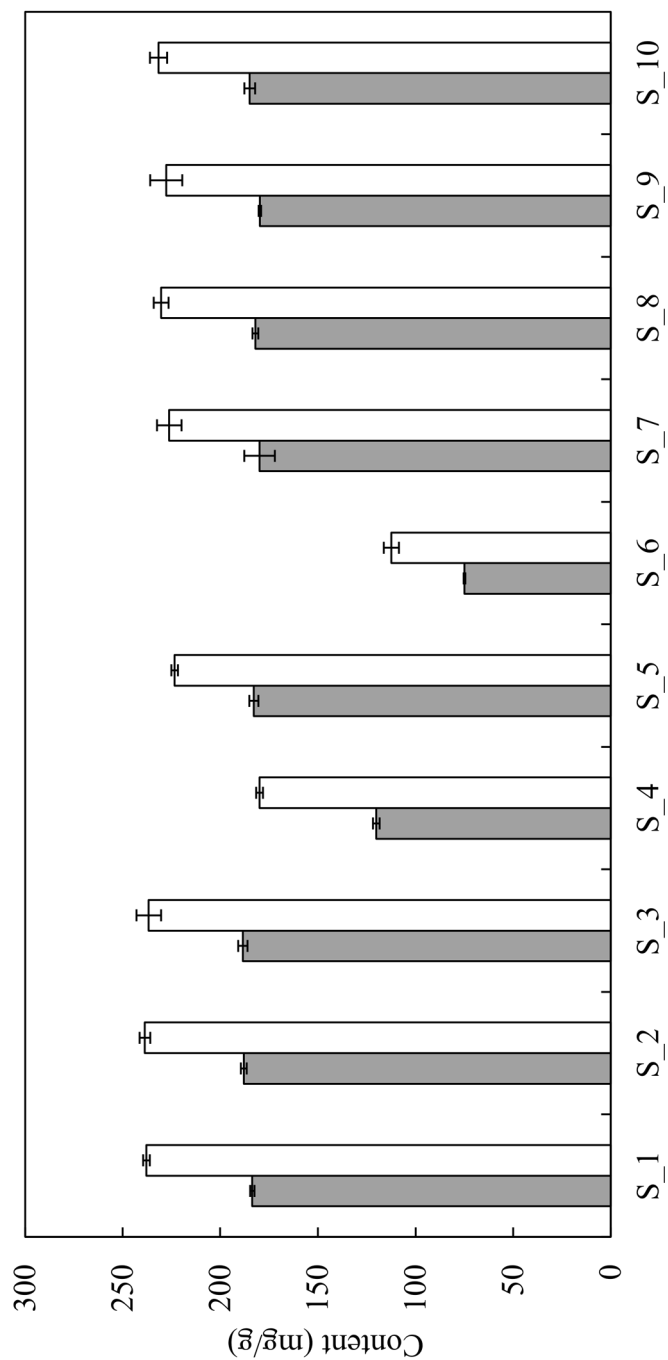
Table2-4 The quality and amount of different koji

	Moisture (%)	Consumption (g)	Titratable acidity	Enzyme activity (U/g dry <i>koji</i> )			
				$\alpha$ -Amylase	Glucoamylase	$\beta$ -Glucosidase	Acid Carboxypeptidase
S_1	36.6	1.38	1.3	224	608	609	1,532
S_2	35.8	1.36	6.1	89	346	45	21,182
S_3	36.5	1.38	6.5	67	314	129	18,651
S_4	36.8	1.38	0.1	1,502	50	25	7,460
S_5	36.8	1.38	5.5	64	202	27	20,782
S_6	36.6	1.38	0.1	1,848	65	35	9,259
S_7	34.8	1.34	5.6	45	322	41	50,156
S_8	34.7	1.34	5.3	69	374	31	21,182
S_9	37.2	1.39	4.9	76	331	34	20,449
S_10	34.1	1.33	5.1	53	369	30	22,913

S\_1: ヒグチ, S\_2: ヒグチ(米), S\_3: k 型, S\_4: 雪こまち, S\_5: 焼酎用

S\_6: IV-2, S\_7: L 型, S\_8: S 型, S\_9: 白 G, S\_10: 河内白





**Fig. 2-7 Effect of different *koji* on the degree of solid-state saccharification.**

Glucose content (  ) and reducing sugar (  ) were solid-state saccharified at 60°C for 24 hours.

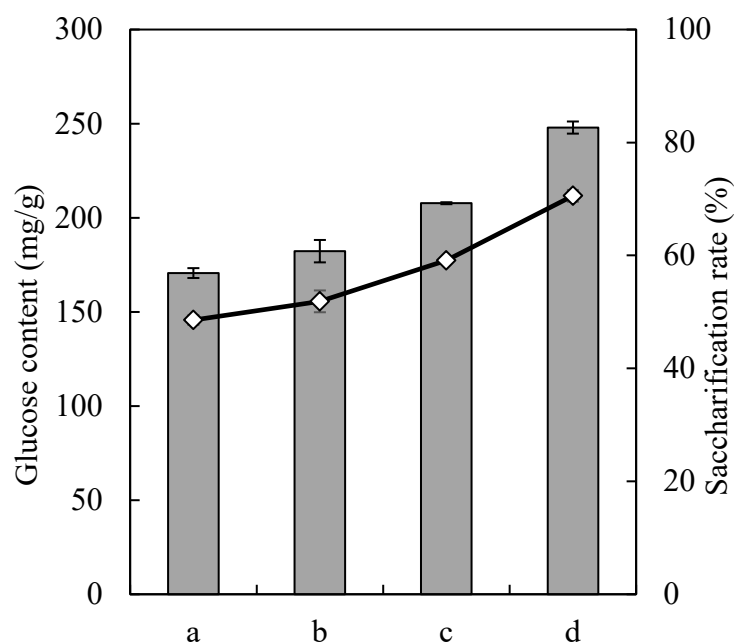
Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

S\_1: ヒグチ, S\_2: ヒグチ(米), S\_3: k型, S\_4: 雪こまち, S\_5: 焼酎用



S\_6: IV-2, S\_7: L型, S\_8: S型, S\_9: 白G, S\_10: 河内白

#### 2.3.1.6. 無効吸着の影響

蒸し米また蒸煮芋の溶解性を高めるために  $\alpha$ -アミラーゼを添加しても溶解性に影響はほとんど示さず、むしろ酸性プロテアーゼの影響が大きいことが明らかにされている<sup>17)</sup>。糖化率が上昇しなかった理由が「 $\alpha$ -アミラーゼの無効吸着」であるかどうかを調べるために、米麴中の  $\alpha$ -アミラーゼ活性と同量のスミチーム L とニューラーゼ F3G を添加して固体糖化を行った結果、Fig. 2-8 に示すように、 $\alpha$ -アミラーゼを添加しても対照の酵素無添加と比べグルコース濃度と糖化率に大差なかった。一方、ニューラーゼ添加の場合、濃度依存的に向上し 100 mg 添加において、グルコースおよび糖化率がそれぞれ、248 mg/g および 70%と、対照と比べ 1.4 倍に増加した。Yin et al.<sup>3)</sup>は米香型白酒製造において、固体糖化は最大で糖化率が 70%程度であると報告している。これらのことから、麴歩合が高くなっても糖化率が向上しない要因として、 $\alpha$ -アミラーゼの蒸し米への無効吸着が影響していると考えられる。



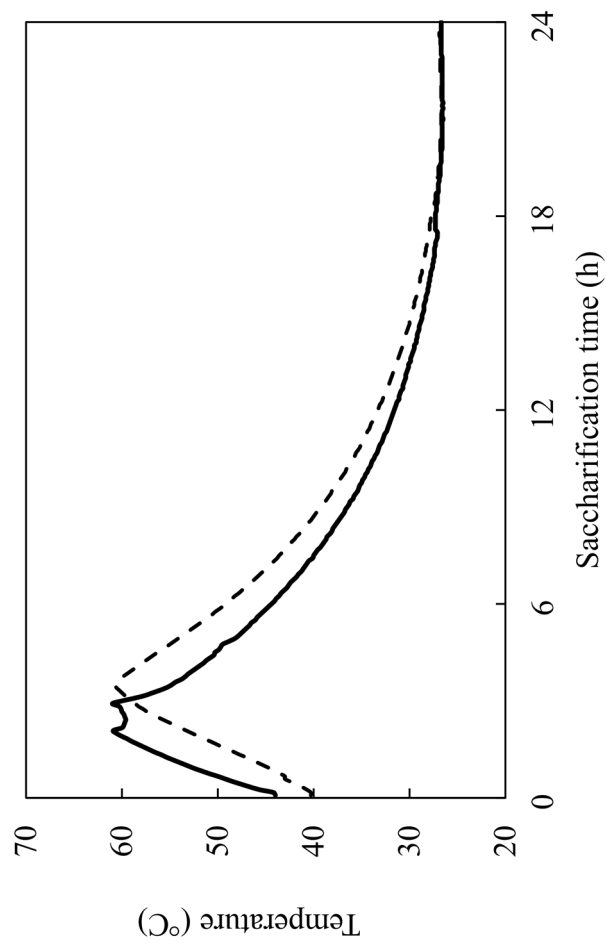
**Fig. 2-8 Effect of the rice *koji* or enzyme content on the degree of solid-state saccharified saccharification.**

Glucose content (  ) and saccharification rate (  ) were solid-state saccharified at 60°C for 24 hours. Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

- a:** Rice koji (1.0 g) was added in sweet potato (10 g).
- b:** Rice koji (1.0 g) and  $\alpha$ -Amylase (30 mg) were added in sweet potato (10 g).
- c:** Rice koji (1.0 g) and Newlase (10 mg) were added in sweet potato (10 g).
- d:** Rice koji (1.0 g) and Newlase (100 mg) were added in sweet potato (10 g).

#### 2.3.1.7. 自然冷却下での固体糖化

現場において、固体糖化の温度を 60°C一定に保つことはコスト上昇につながる。大量のサツマイモをその場で蒸した後、ゆっくりと冷却する際の温度変化のシミュレーションを行った。粉碎サツマイモと麴を混合し、固体糖化物の温度変化について Fig. 2-9 に示す。麴とサツマイモを混ぜ合わす間に温度が下がり、炊飯ジャーに入れたときは 40°Cであった。これを保温し、炊飯ジャー温度が 60°Cになってから 1 時間加温している、電源を切った。それにより糖化物は 60°C付近まで上昇後、30°C付近まで自然冷却された。60°C一定で 24 時間糖化したサンプル中のフルクトース、グルコース及びスクロースはそれぞれで 7.7 mg/g, 174.8 mg/g 及び 10.4 mg/g であった。一方、加温なしで固体糖化させた糖化物はフルクトース、グルコース及びスクロースの含有量それぞれ 6.9 mg/g, 160.4 mg/g 及び 11.7 mg/g であり、ほぼ同じ値であった。



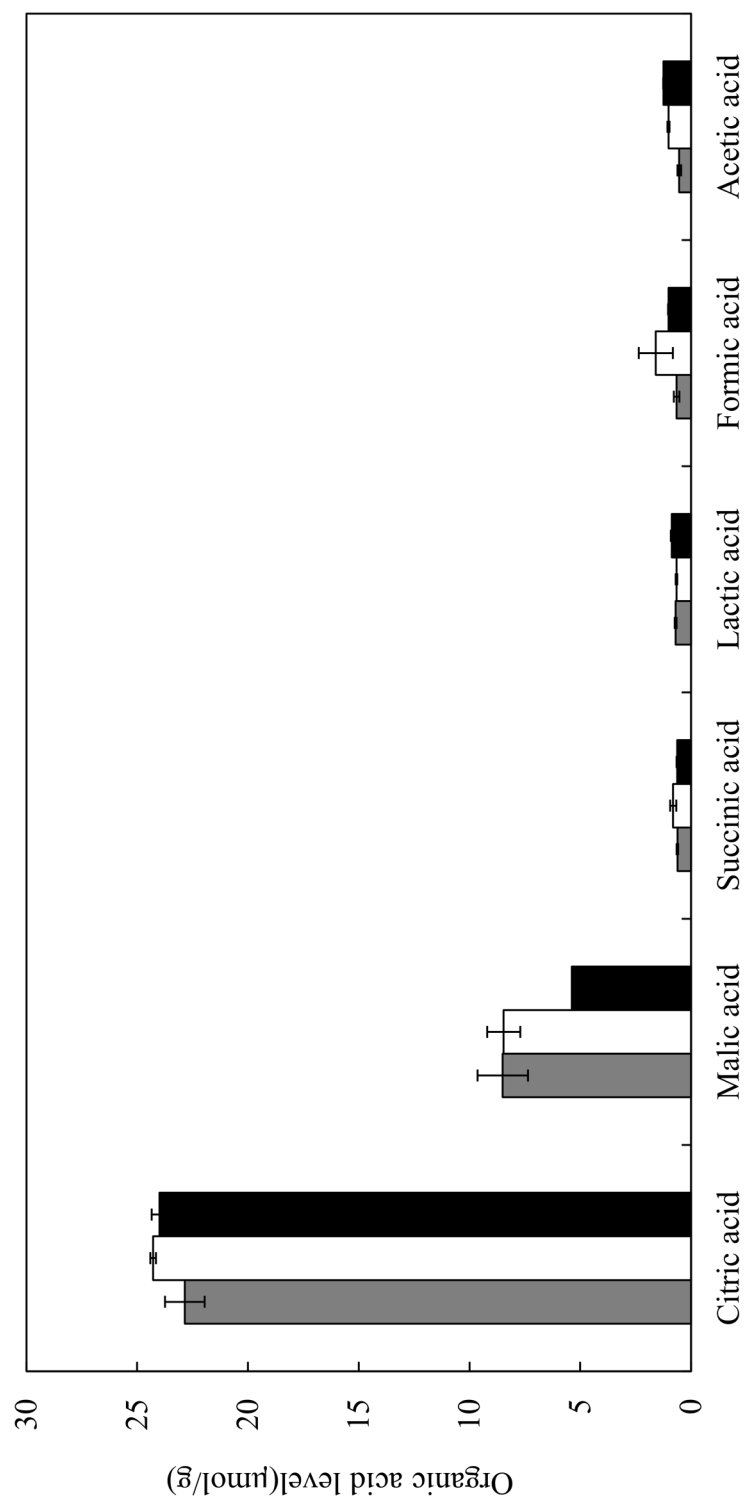
**Fig. 2-9 Time-dependent changes in temperature during solid-state saccharification.**

Jar atmosphere temperature ( — ) and sample core temperature ( - - - ) are indicated by the solid line and dotted line, respectively.

Fig. 2-10 に、糖化なし、加温無し糖化、および 60℃一定で糖化させたサンプルの有機酸含有量を示す。

加温無し糖化および 60℃一定糖化のサンプル中の乳酸含有量は、糖化前とほぼ同じ濃度であった。このことから、糖化物が乳酸菌やその他の雑菌に汚染されていないと考えられる。また、炭酸カルシウム含む PDA 寒天培地を用い試験を行って、いずれサンプルとも生酸菌は検出されなかった。

以上の結果から、本手法の特徴は米麴の至適糖化温度が 60℃であるが、それ以下の温度であっても十分に糖化が進行することが分かった。また、60℃で糖化を開始し、その後は自然に温度が低下しても糖化率は 60℃一定と遜色なく、生酸菌の汚染もなく、また、麴菌の増殖も認められなかった。従って、現場規模において、60℃程度に冷却したサツマイモを粉碎するとき麴を混合し仕込みタンクにそのまま放置して糖化することができる。このことから、本糖化工程は新規な装置を導入する必要がない。また、サツマイモは 30℃以下に通風しながら冷却するが、本工程ではサツマイモの冷却温度が 60℃程度までで良いことから、冷却コストの低減も可能である。



**Fig. 2-10** Organic acid content after different saccharification forms

The bar graphs indicate no saccharification(  ), natural saccharification(  ), and saccharification at 60°C(  ), for 24 hours, respectively.

Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

### 2.3.2. 固体糖化物揮発成分の経時変化

固体糖化した蒸煮サツマイモに含まれる揮発成分の消長を確認した。GC-MS 分析の結果、Table. 2-5 に示す 31 成分が同定された。アルコール類 1 成分，エステル類 5 成分，アルデヒド 4 成分，テルペン類 3 成分フラン類 1 成分およびその他として 17 成分である。

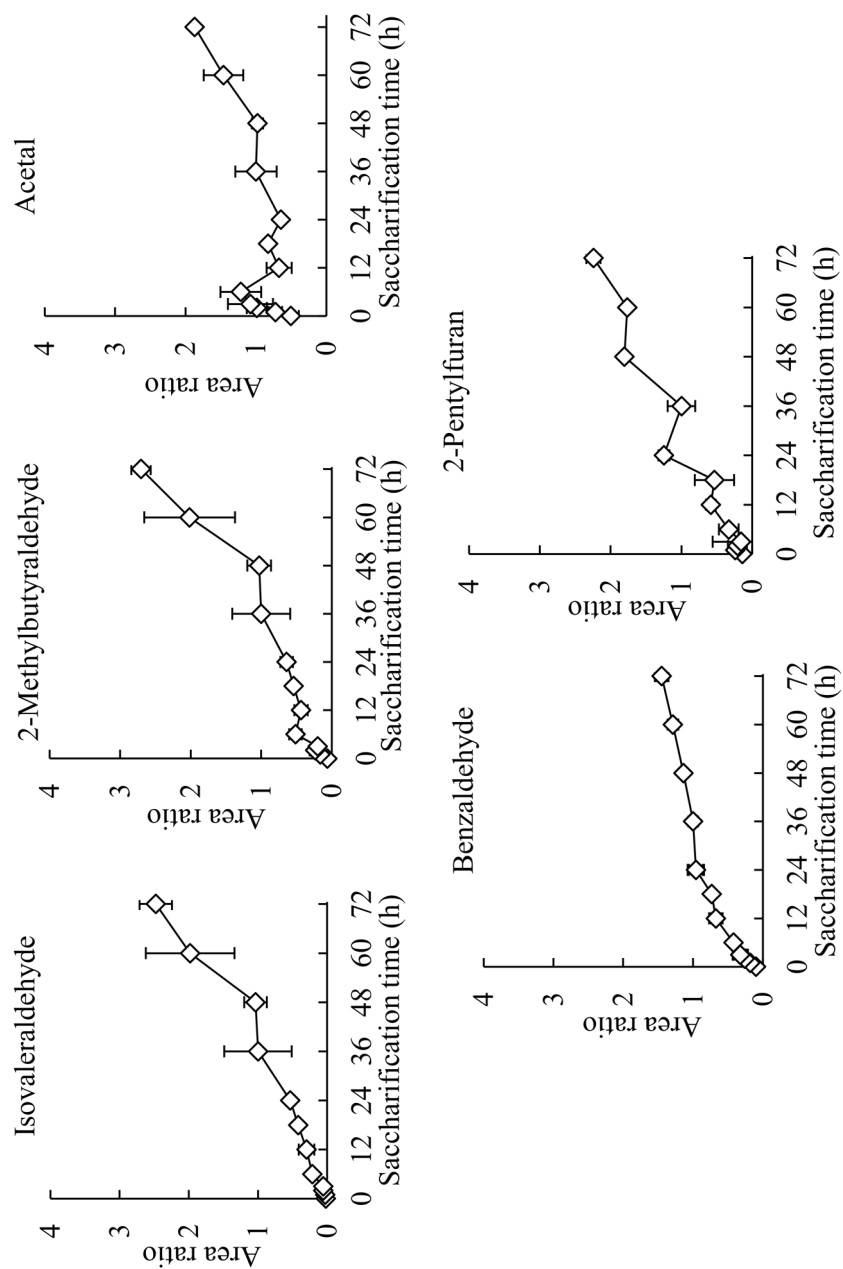
Fig. 2-11 に示すアルデヒド類と 2-ペンチルフラが経時的に増加した。アルデヒド類と 2-ペンチルフラは還元糖とアミノ酸のメイラード反応で生成することが知られている。固体糖化によって糖濃度とアミノ酸濃度が増加したため、メイラード反応が促進した。また、キシロースは 2-ペンチルフランの形成を促進することが報告されている<sup>38)</sup>。更に、2-ペンチルフランは、リノール酸からの典型的な酸化化合物で、「野菜や豆のような」香りを発することが知られている<sup>28)</sup>。2-ペンチルフラは比較的低い匂い閾値 (5 µg/L) であることから、固体糖化の香氣において重要な役割を果たす可能性がある。アセタールは刺激的で、木香臭と指摘されるが、ウイスキーやナッツ様の特徴も有している。2-メチルブチルアルデヒドは刺激的であるが、ココアやコーヒー様の香りである。イソバレルアルデヒドはリンゴ様の特徴を有している。ベンズアルデヒドは特徴的な香りを有しアーモンド様の香りである。一方、カプリン酸エチルとラウリン酸エチルは経時的に減少した。カプリン酸エチルとラウリン酸エチルは、それぞれ 12 個と 14 個の炭素原子を持つ脂肪酸エステルであり、固体糖化中の加熱とメイラード反応によって熱分解が進行したと推測される。



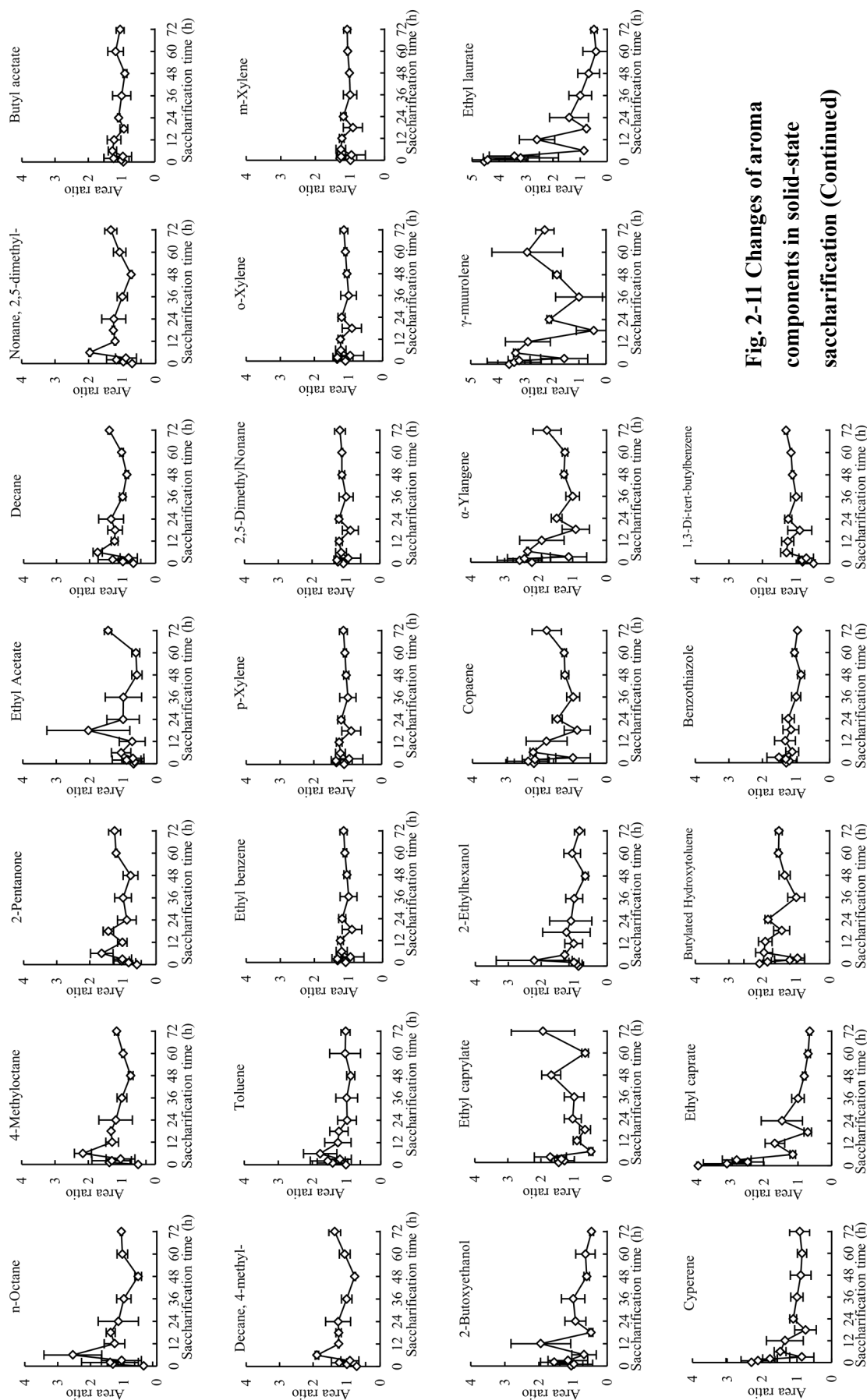
**Table 2-5 Volatile components in the saccharified sample**

<b>Compounds</b>	<b>Peak-RI</b>	<b>CAS No.</b>	<b>m/z</b>
<b>Alcohols (2)</b>			
1-Pentanol*	1259	71-41-0	55
2-Ethylhexanol	1497	104-76-7	57
<b>Esters (5)</b>			
Ethyl acetate	888	141-78-6	43
Butyl acetate	1082	123-86-4	43
Ethyl caprylate	1441	106-32-1	88
Ethyl caprate	1647	110-38-3	88
Ethyl laurate	1843	106-33-2	88
<b>Aldehyde (4)</b>			
Acetal	895	105-57-7	45
2-Methylbutyraldehyde	913	96-17-3	57
Isovaleraldehyde	917	590-86-3	44
Benzaldehyde	1537	100-52-7	106
<b>Terpenoids (3)</b>			
Styrene	1264	100-42-5	104
Copaene	1505	3856-25-5	161
Cyperene	1545	2387-78-2	204
<b>Furan (1)</b>			
2-Pentylfuran	1237	3777-69-3	81
<b>Others (17)</b>			
n-Octane	800	111-65-9	43
4-Methyloctane	853	2216-34-4	43
2-Pentanone	979	107-87-9	86
Decane	998	124-18-5	57
2,5-DimethylNonane	1004	17302-27-1	57
4-methyldecane	1008	2847-72-5	71
Toluene	1045	108-88-3	91
Ethylbenzene	1136	100-41-4	91
p-Xylene	1143	106-42-3	91
o-Xylene	1150	95-47-6	91
m-Xylene	1150	108-38-3	91
2-Butoxyethanol	1413	111-76-2	57
1,3-Di-tert-butylbenzene	1434	1014-60-4	175
$\alpha$ -Ylangene	1496	14912-44-8	161
$\gamma$ -muurolene	1705	30021-74-0	161
Butylated Hydroxytoluene	1906	128-37-0	205
Benzothiazole	1959	95-16-9	135

※Internal standard substance (10 mg/L).



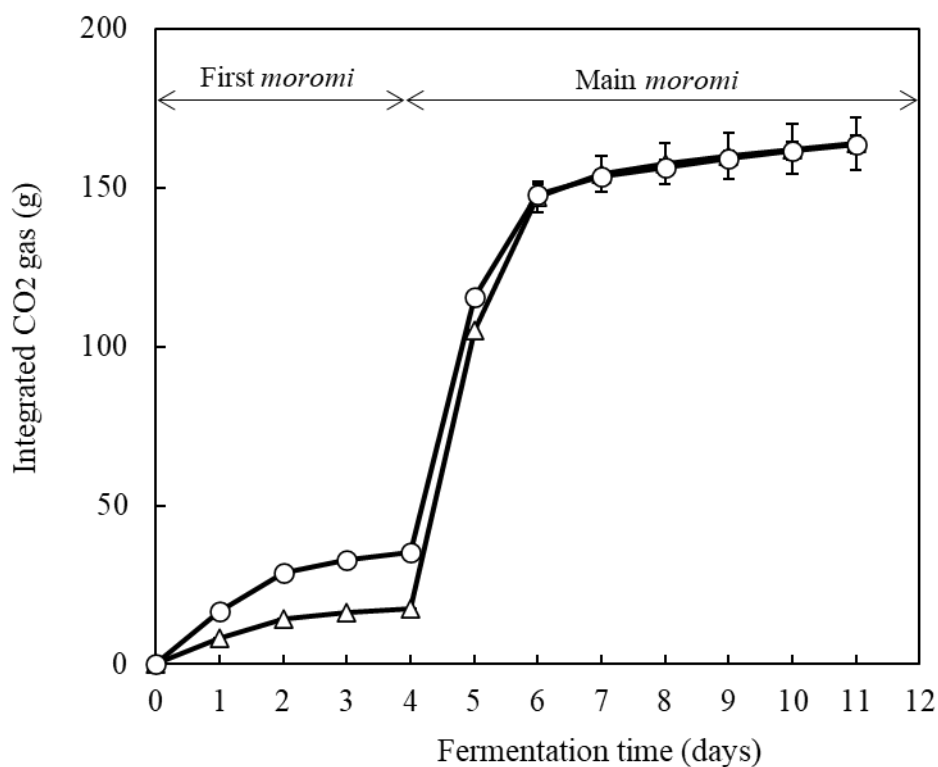
**Fig. 2-11 Changes of aroma components in solid-state saccharification.**



**Fig. 2-11 Changes of aroma components in solid-state saccharification (Continued)**

### 2.3.3. 固体糖化後仕込み法による芋焼酎の仕込み試験

サツマイモ 700 g, 麴歩合 10%, 固体糖化温度 60°Cおよび糖化時間 24 時間の条件で固体糖化を行い芋焼酎の小仕込み試験を行った。Fig. 2-12 に示す発酵経過のとおり, 固体糖化法の一次醪は使用した米麴が従来法の半分量のため, 醪重量減少量も半分程度であった。二次醪では, 発酵初期は固体糖化法が若干ではあるが発酵が速かった。固体糖化法では固体糖化によりグルコース量が増加することで二次仕込み即下の糖濃度が従来法と比べて高くなるため, 酵母が発酵阻害を受ける懸念があったが, その影響は認められなかった。二次醪 3 日目以降は両仕込み法とも同様の発酵経過であり, 固体糖化による発酵阻害は認められなかった。発酵終了後のもろみの分析結果を Table 2-6 に示す。醪アルコールはいずれも 14.6%, 全糖および還元糖にも大差がなかったことから, 固体糖化法による発酵への影響は認められないことが分かった。また, 醪酸度と揮発酸度には大差がないことから, 固体糖化法による生酸菌の汚染の可能性は認められないといえる。



**Fig. 2-12 Time course of alcohol fermentation.**

Alcohol fermentation of Imo-shochu ( —○— ) or SSS Imo-shochu ( —△— ). Alcohol fermentation was monitored by determining the amount of carbon dioxide gas generated, which was calculated by measuring the reduction in weight of the fermented sample every day. The integration curve for the weight reduction was plotted on a graph. Vertical bars indicate the standard deviations of three independent experiments.

Table 2-6 Analysis of fermented 2<sup>nd</sup> stage mash

	Imo-shochu		SSS※ Imo-shocho	
	Mean	± SD	Mean	± SD
Alcohol content (%)	14.6	± 0.1	14.6	± 0.4
Volatile acidity	0.9	± 0.0	1.0	± 0.2
<i>Moromi</i> acidity	6.9	± 0.1	6.6	± 0.2
Total sugar (%)	1.1	± 0.2	1.3	± 0.1
Direct sugar (%)	0.2	± 0.0	0.3	± 0.1
Total yeast count (× 10 <sup>8</sup> cells/mL)	4.0	± 0.1	4.2	± 0.6
Viable yeast count (× 10 <sup>8</sup> cells/mL)	1.1	± 0.1	1.0	± 0.4
Viable yeast ratio (%)	26	± 3.0	23	± 5.0

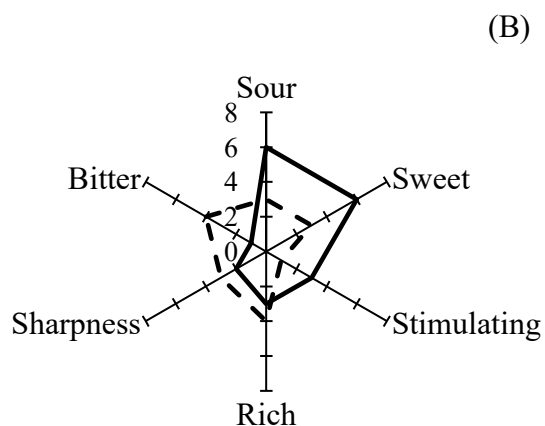
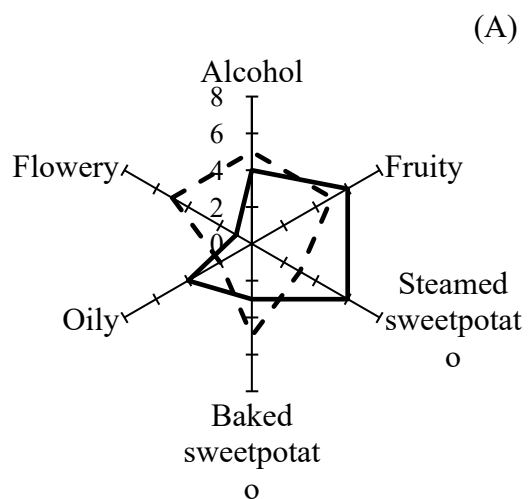
※SSS: Solid-state saccharification.

#### 2.3.4. 焼酎の官能評価

官能評価の結果 Fig. 2-13 に示すとおり、固体糖化法で得られた焼酎（以後、固体糖化焼酎）の香りは従来法で得られた焼酎（以後、従来焼酎）と比べて花様と焼き芋様の評点が高く、蒸し芋様の評点が低かった。花様の評点が高かった理由については、焼酎の香気成分の項目で考察する。蒸し芋様の評点が低かった理由は、サツマイモを固体糖化する工程で焼き芋様の香りが形成されたため、蒸し芋の香りがマスクされたのではないかと推察される。一方、従来焼酎は蒸し芋様と油様の評点が高かった。蒸し芋の香りが強すぎると経験的にガス臭として指摘されるが、適度であれば原料由来の特徴香として評価される。官能評価に使用した焼酎は、蒸留後保存期間中に数日おきに攪拌してガス抜きを積極的に行い、ガスが抜けたことを香りから確認した後に官能評価に供している。このことから、従来焼酎における蒸し芋様の評価は、原料由来の特徴香としてとらえて良いと考えられる。油様とは、焼酎に含まれる油性成分であるパルミチン酸エチルやリノール酸エチルなどに由来する甘さや柔らかなさをイメージするものである。このことから、従来焼酎の特徴をまとめるのではなく固体糖化焼酎の方をまとめるべき。

味は、固体糖化焼酎は従来焼酎と比べて苦味の評点が高かった。本研究では、味の強度試験は実施しなかったが、適度な苦味はビールやコーヒー、渋茶などで親しまれている味覚でもある<sup>19,20)</sup>ことから、苦味は固体糖化焼酎の特徴的な味ととらえて良いと考えられる。また、固体糖化焼酎は従来焼酎と比べてキレと濃厚さの評点が高かった。芋焼酎の特徴味である甘味が従来焼酎では評点が6点と高く、また、酸味と刺激味も高かった。焼酎は若干酸味を感じた方が甘味や丸味を感じやすくなることが経験的に知られている。Table 2-6 に示すとおり揮発酸度には大差がないことから、酢酸に起因する酸味ではなく感覚としての酸味を感じたものと考えられる。

以上の結果から、固体糖化法は従来法と大きく異なる香味を特徴する芋焼酎を製造できることが分かった。



**Fig. 2-13 Spider plot for sensory evaluation of odours (A) and tastes (B).**

Imo-shochu ( — ) and solid-state saccharification (SSS) Imo-shochu ( - - · ) are indicated by the solid line and dotted line, respectively.



### 2.3.5. 焼酎の香気成分

焼酎の香気成分を GC-MS で分析した結果を Table 2-7 に示す。同定された 42 成分のほとんどが、従来焼酎と比べて僅かではあるが固体糖化焼酎高濃度に含まれ、その内 17 成分が両焼酎間の濃度に有意差があることが分かった。特に、花様や果実様の香りに寄与する成分を多く含むエステル類では、同定された 26 成分のうち 10 成分で両焼酎間の濃度に有意差があることが分かった。

OAV (odor activity value) とは成分濃度を成分匂い閾値で除した値であり、この値が 1 を超えると閾値以上に含まれることを示すから、試料の特徴香に寄与する成分といえる。同定された 42 成分中 OAV が 1 を超える成分が 14 成分あった。バラの香りの主成分である  $\beta$ -フェネチルアルコールと酢酸  $\beta$ -フェネチルは固体糖化焼酎において OAV がそれぞれ 7.9 と 2.2 と高く、また、花様の香りに寄与するエステル類が固体糖化焼酎が従来焼酎と比べて僅かではあるが高濃度に含まれていた。このことが、官能評価において固体糖化焼酎が花様の評点が高かった要因と考えられる。一方、酢酸イソアミルやカプロン酸エチルはリンゴやパイナップルなどの特徴香気成分であり固体糖化焼酎の OAV がそれぞれ 23 と 54 と、従来焼酎と比べて高いにも関わらず、官能評価において果実様は従来焼酎の評点が高かった。これは、花様の評点が固体糖化焼酎は 5 点と従来法の 1 点と比べ高かったことから、果実様というよりも花様と評価したパネリストが多かったためと推察される。

モノテルペンアルコール<sup>21)</sup>や  $\beta$ -ダマセノン、 $\beta$ -イオノン<sup>22)</sup>は芋焼酎の特徴香気成分として知られており、サツマイモ中には前駆体として存在し発酵中及び蒸留の酸熱反応により生成することが報告されている<sup>23)</sup>。本研究において、リナロール以外の成分は両焼酎間の濃度に有意差が認められ、固体糖化焼酎が従来焼酎と比べて僅かではあるが高濃度であった。焼き芋の特徴香に 2-ペンチルフラン、2-アセチルピロール、ゲラニオールおよび  $\beta$ -イオノンが重要香気成分と

して同定されている<sup>24)</sup>。その中で検出された 2-ペンチルフランと  $\beta$ -イオノンは固体糖化焼酎が従来焼酎と比べて、それぞれ 1.1 倍と 2.7 倍の含有量であった。これまでの結果 (Fig. 2-11) によると、固体糖化中のメイラード反応により、2-ペンチルフランが多く生成されるが、糖化物には  $\beta$ -イオノンは検出されなかった。その理由として、焼酎と糖化の GC-MS 分析に異なる注入システムメソッドを使用したためである可能性がある。しかし、 $\beta$ -イオノンの生成には、 $\beta$ -カロテンの関与が示唆された。固形糖化の過程で  $\beta$ -カロテンなどの前駆体がより多く生成され、 $\beta$ -イオノンやと  $\beta$ -ダマセノンの濃度が高まったと推測される。

官能評価において固体糖化焼酎は焼き芋様の評点が高かったが、その理由として  $\beta$ -イオノンが OAV が 1 を超えていることが要因の一つと考えられる。

Table 2-7 Volatile compounds identified Imo-shochu and SSS Imo-shochu

Name	Odor description	RI	m/z	Concentration(μ/L)				Odor		OVA※2		Ref
				Imo-shochu		SSS※1 Imo-shochu		threshold	(μg/L)	Shochu	Imo-SSS※1	
				Mean	SD	Mean	SD					
Alcohol (4)												
Isobutyl alcohol	Sweet, Fruity	1079	43	105,436 ±	24,127	122,312 ±	22,574	40,000	2.6	3.1	25)	
n-Butyl alcohol	Pungent	1133	56	3,750 ±	579	5,098 ±	1,121	5,000	<1	<1	26)	
Isoamyl alcohol	Banana,	1192	55	181,119 ±	27,589	195,155 ±	22,244	30,000	6.0	67	25)	
β-Phenyl alcohol	Roses, Floral	1866	91	61,817 ±	9,937	79,280 ±	5,070	*	10,000	6.2	7.9	25)
Ester (26)												
Ethyl acetate	Fruity, Sweet	866	43	71,195 ±	26,963	82,599 ±	25,719	12,000	5.9	6.9	27)	
Isobutyl acetate	Fruity, Floral	989	56	75 ±	11	87 ±	11	*	1,825	<1	<1	28)
Ethyl butyrate	Pineapple	1011	71	588 ±	167	473 ±	152	220	2.7	2.2	29)	
Isoamyl acetate	Banana	1114	70	5,697 ±	636	7,011 ±	652	**	300	19	23	30)
Ethyl caproate	Sweet,	1218	88	238 ±	38	268 ±	33	**	5	48	54	30)
Hexyl acetate	Apple, Cherry	1252	56	2.1 ±	0.26	2.9 ±	0.31	*	115	<1	<1	31)
Ethyl heptanoate	Fruity, Brandy	1313	88	2.1 ±	0.47	2.9 ±	0.47	**	220	<1	<1	27)
Isobutyl hexanoate	Sweet, Fruity	1333	99	1.3 ±	0.10	1.4 ±	0.04	-	-	-	-	
Ethyl caprylate	Fruity, Winey	1429	88	2,864 ±	427	3,239 ±	177	2	1432	1619	30)	
Isopentyl hexanoate	Cheese	1443	70	5.2 ±	0.85	5.6 ±	0.41	900	<1	<1	32)	
Octyl acetate	Orange, Floral	1455	43	24 ±	6.0	33 ±	6.0	50,000	<1	<1		
Ethyl nonanoate	Rose, Fruity	1515	88	5.3 ±	1.4	8.1 ±	0.6	**	3,150	<1	<1	32)

## Continued

Name	Odor description	RI	m/z	Concentration(μ/L)				Odor threshold (μg/L)	OVA※2		Ref
				Imo-shochu		SSS※1 Imo-shochu			Imo-	shochu	
				Mean	SD	Mean	SD				
Isobutyl octanoate	Fruity, Green	1533	127	3.2 ±	0.54	3.9 ±	0.44	800	<1	<1	
Ethyl caprate	Sweet, Apple	1636	88	3,546 ±	1,660	5,710 ±	1,014	200	18	29	23)
Isopentyl octanoate	Sweet, Fruity	1646	70	10 ±	2.0	12 ±	2.0	125	<1	<1	
Ethyl undecanoate	Floral, Waxy	1719	88	0.22 ±	0.01	0.22 ±	0.00	1,000	<1	<1	
Geranyl acetate	Floral, Rose	1730	69	7.1 ±	1.24	7.47 ±	0.35	-	-	-	
Methyl salicylate	Mint	1736	120	50 ±	6.4	56 ±	5.4	-	-	-	
β-Phenethyl acetate	Floral, Rose	1781	104	3,045 ±	405	3,978 ±	301	**	1800	1.7	2.2 33)
Ethyl laurate	Sweet, Floral	1826	88	47 ±	15	61 ±	7.0	500	<1	<1	27)
Isoamyl decanoate	Waxy, Banana	1841	70	3.5 ±	0.57	4.1 ±	0.61	-	-	-	
Ethyl myristate	Sweet, Waxy	2024	88	54 ±	19	66 ±	9.1	500	<1	<1	27)
Ethyl cinnamate	Sweet, Fatty	2084	131	30 ±	4.7	65 ±	5.2	**	1	27	59 34)
Ethyl palmitate	Fruity, Creamy	2231	88	307 ±	92	448 ±	140	*	14,000	<1	<1 27)
Ethyl oleate	Fatty, Oily	2451	55	26 ±	6.8	47 ±	13	*	870	<1	<1 26)
Acids (4)											
Octanoic acid	Fatty, Waxy	2013	60	1,000 ±	72	1,026 ±	75	-	-	-	
Decanoic acid	Rancid, sour	2224	60	684 ±	96	733 ±	129	-	-	-	
Lauric acid	Fatty, Coconut	2435	73	301 ±	35	331 ±	53	7,200	<1	<1	26)
Myristic acid	Waxy, Fatty	2643	73	396 ±	88	410 ±	125	-	-	-	

## Continued

Name	Odor description	RI	m/z	Concentration(μ/L)				Odor threshold (μg/L)	OVA <sup>※2</sup>		Ref	
				Imo-shochu		SSS <sup>※1</sup> Imo-shochu			Imo- shochu	SSS <sup>※1</sup>		
				Mean	SD	Mean	SD					
Others (8)												
2-Penthyl furan	Beany, Vegetable	1211	81	1.0 ±	0.08	1.1 ±	0.10	**	5	< 1	< 1	28)
Rose oxide	Rose, Spicy	1330	139	0.8 ±	0.04	0.9 ±	0.03	**	4.8	< 1	< 1	29)
Nerol oxide	Herbal, Green	1448	68	18 ±	3.4	25 ±	1.9	*	80	< 1	< 1	30)
Linalool	Citrus, Floral	1520	71	16 ±	2.3	16 ±	2.0		50	< 1	< 1	36)
Nerol	Sweet, Neroli	1767	69	14 ±	1.8	19 ±	0.9	*	5500	< 1	< 1	29)
β-Damascenone	Apple, Rose	1790	121	2.2 ±	0.32	3.1 ±	0.22	**	0.29	7.6	11	29)
Geraniol	Floral, citrus	1806	69	18 ±	5.7	24	1.4		640	< 1	< 1	29)
β-Ionone	Floral, Woody	1902	177	0.41 ±	0.09	1.1 ±	0.07	**	1	< 1	1.1	36)

<sup>※1</sup>SSS: Solid-state saccharification. <sup>※2</sup>OAV: Odor activity value.

The concentration of volatile compounds are corrected depending on a 25%alcohol concentration. Asterisks show a significant difference (\*\*;  $p < 0.01$ ,

\*;  $p < 0.05$ ) between Imo-shochu and SSS Imo-shochu according to Student's t test. MS, identification by comparison with the NIST05a mass spectral database. Mean $\pm$ SD(n=4). Odor threshold obtained from references: (25) H. Guth et al., 1997. (26) P. Salo et al., 1972. (27) L. Zea et al., 2001. (28) Y. Fu et al., 2021. (29) Y. Osafune et al., 2020. (30) M. Crandles et al., 2015. (31) G. Takeoka, et al., 1996. (32) P.-P. Wang et al., 2015. (33) B. Zhang, et al., 2020. (34) R. López et al., 2002. (35) H. S. Lam et al., 2003. (36) T. KAMIWATARI et al., 2009.

#### 第4節 要約

米麴と主原料を別々に仕込む二次仕込み法と呼ばれる焼酎特有の仕込み法に、中国の蒸留酒である米香型白酒の仕込み法である固体糖化を融合した新規な仕込み法による芋焼酎の製造の可能性について検討した。その結果、最適な糖化条件は、温度は 60°C、時間は 24 時間、麴歩合は 10%であり、この時の糖化率は 48.5%であった。サツマイモに含まれるスクロースが米麴由来の酵素により分解されることが分かった。麴歩合を上げてても、糖化率は向上しなかった。これは、 $\alpha$ -アミラーゼの蒸し米への無効吸着が原因であることが分かった。ニューラーゼ F3G (プロテアーゼ) を添加すると糖化率は 70%に向上した。最適な糖化条件で芋焼酎を製造すると、従来の仕込み法と比べ発酵は遜色なかった。得られた焼酎は、従来法の焼酎と比べ、香りは焼芋様や花様が強く、味は苦味の評点が高くまた、キレと濃厚さがあった。また、香気成分は同定された 42 成分のほとんどが、固体糖化焼酎に従来焼酎と比べて僅かではあるが高濃度に含まれ、その内 17 成分が両焼酎間の濃度に有意差があった。これらのことから、焼酎製造における二次仕込み法に中国の米香型白酒の固体糖化工程を融合する新規な芋焼酎製造が可能であるとともに、酒質の多様化が期待できることが分かった。

## 第5節 参考文献

- 1) 鮫島吉廣: 醸協 **99**, 495-500 (2004)
- 2) X. W. Zheng and B. Z. Han: *J. Ethn. Foods.*, **3**, 19-25 (2016)
- 3) X. Yin, Y. Yoshizaki, M. Ikenaga, X. L. Han, K. Okutsu, T. Futagami, H. Tamaki and K. Takamine: *J. Biosci. Bioeng.*, **129**, 315-321 (2020)
- 4) 注解編集委員会編, 第四回改正国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会, 東京), 214 (1996)
- 5) W. T. Frankeberger and J. B. Johanson: *Plant Soil.*, **74**, 301-311 (1983)
- 6) 注解編集委員会編, 第四回改正国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会, 東京), 230 (1996)
- 7) 高峯和則, 小島舞, 奥津果優, 二神泰基, 玉置尚徳, 吉崎由美子: 醸協 **113**, 375-382 (2018)
- 8) 藏菌秀伍, 吉崎由美子, Y. Xuan, 奥津果優, 高峯和則: 醸協 **116**, 182-194 (2021)
- 9) 白石洋平, 竹浦滯, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 醸協 **116**, 39-48 (2021)
- 10) 岩野君夫, 三上重明, 福田清治, 椎木敏, 島田豊明: 醸協 **81**, 490-494 (1986)
- 11) N. Inokuchi, T. Takahashi and M. Irie: *J. Biochem.*, **90**, 1055-1067 (1981)
- 12) S. Talekar, V. Ghodake, A. Kate, N. Samant, C. Kumar and S. Gadagkar: *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, **4**, 4760-4765 (2010)
- 13) H. Manoochehri, N. F. Hosseini, M. Saidijam, M. Taheri, H. Rezaee and F. Nouri: *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **25**, 101599 (2020)
- 14) 瀬戸口眞治, 間世田春作: 醸協 **95**, 690 (2000)
- 15) 氏原邦博, 黒岩賢治, 日高福男, 杉本明: 日作九支報, **67**, 50-51 (2001).
- 16) 高峯和則: 醸協 **115**, 623-630 (2020)

- 17) 椎木敏: 醸協 **76**, 788-792 (1981)
- 18) S. del Moral, D. M. Barradas-Dermitz and M. G. Aguilar-Uscanga: *3 Biotech* volume **8**, 7 (2018).
- 19) M. Aliani and N. A. M. Eskin: Bitterness (John Wiley & Sons, Ltd), 83-103 (2017).
- 20) O. Oladokun, S. James, T. Cowley, F. Dehrmann, K. Smart, J. Hort and D. Cook: *Food Chem.*, **230**, 215-224 (2017).
- 21) T. Ohta, T. Omori, H. Shimojo, K. Hashimoto, T. Samuta and T. Ohba: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1811-1816 (1991).
- 22) 神渡巧, 瀬戸口眞治, 上田次郎, 瀬戸口智子, 緒方新一郎: 醸協, **101**, 437-445 (2006).
- 23) Y. Yoshizaki, K. Takamine, S. Shimada, K. Uchihori, K. Okutsu, H. Tamaki, K. Ito and Y. Sameshima: *J. Inst. Brew.*, **117**, 217-223 (2011).
- 24) Y. Wang and S. J. Kays: *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **125**, 638-643 (2000).
- 25) H. Guth: *J. Agric Food Chem.*, **45**, 3027-3032 (1997).
- 26) P. Salo, L. Nykänen and H. Suomalainen: *J. Food Sci.*, **37**, 394-398 (1972).
- 27) L. Zea, L. Moyano, J. Moreno, B. Cortes and M. Medina: *Food Chem.*, **75**, 79-84 (2001).
- 28) Y. Fu, T. Chen, S. H. Y. Chen, B. Liu, P. Sun, H. Sun and F. Chen: *Trends Food Sci. Technol.*, **112**, 188-200 (2021).
- 29) Y. Osafune, K. Toshida, J. Han, A. Isogai and N. Mukai: *J. Inst. Brew.*, **126**, 131-135 (2020).
- 30) M. Crandles, A. G. Reynolds, R. Khairallah and A. Bowen: *LWT - Food Sci. Technol.*, **64**, 243-258 (2015).



- 31) G. Takeoka, R. G. Buttery and L. Ling: *LWT - Food Sci. Technol.*, **29**, 677-680 (1996).
- 32) P.-P. Wang, Z. Li, T.-T. Qi, X.-J. Li and S.-Y. Pan: *Food Chem.*, **169**, 230-240 (2015).
- 33) B. Zhang, D. Xu, C. Duan and G. Yan: *Process Biochem.*, **90**, 44-49 (2020).
- 34) R. López, M. Aznar, J. Cacho and V. Ferreira: *J. Chromatogr A.*, **966**, 167-177 (2002).
- 35) H. S. Lam and A. Proctor: *J. Food Sci.*, **68**, 2676-2681 (2003).
- 36) 神渡巧, 瀬戸口智子, 上田次郎, 吉永優, 緒方新一郎, 瀬戸口眞治, 高峯和則, 鮫島吉廣: 醸協, **104**, 49-56 (2009)
- 37) 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝: 日本醸造協会誌, **86**, 536-539 (1991)
- 38) X. Li and S.-Q. Liu: *LWT*, **150**, 112017 (2021).

### 第3章 芋焼酎の酒質に及ぼす二次醗温度の影響

#### 第1節 緒言

九州南部は温暖な気候で、年間平均気温は 19℃~20℃と比較的高いため、焼酎製造時の発酵温度も他の酒類に比べて比較的高くなっている。芋焼酎の生産では、サツマイモと水を混ぜて 25℃で二次仕込みを開始して、醗の最高温度が 30℃~32℃になるように管理している。醗は粘度が高いため、酵母の発熱エネルギーにより、醗温度は仕込み後 14 時間程度で 32℃に上昇する。ほとんどの焼酎メーカーでは、二次醗での発酵初期段階で醗温度を制御し、32℃を超えないようにしている。発酵 48 時間後、酵母の発熱エネルギーが低下するとともに、醗温度は徐々に低下し約 25℃まで下がる。Fig. 3-1 (B) は、二次仕込み時の芋焼酎製造の代表的な温度経過を示す。温度をうまく制御できず、38℃近くまで上昇する場合がある (Fig. 3-1 (C))。高温経過をたどると「濃厚で複雑な香味の酒質」となることが知られている。一部の焼酎メーカーは、醗を 25℃付近の低温で管理すると (Fig. 3-1 (A))、「淡麗で華やかな酒質」になると経験的にいわれている。しかしながら、発酵温度と酒質との関係は明らかになっていない。

この酒質の違いを科学的に明らかにすることを目的とした。

## 第2節 実験方法

### 3.2.1. 実験材料

試薬類は特に表記しない限り市販の特級試薬を使用した。サツマイモは焼酎製造に一般的に使用される品種コガネセンガンを選択し、条溝が少なく外観に傷みのないものを用いた。麴米は、焼酎メーカーが一般的に使用している国産の焼酎用麴米（(株) 本坊商店，鹿児島）を使用した。白麴菌の種麴は河内源一郎商店（鹿児島）より購入した河内白麴菌を，酵母は *Saccharomyces cerevisiae* 鹿児島5号を使用した。

### 3.2.2. 麴抽出液および醪粗酵素液の調整

麴 10 g に 0.5%塩化ナトリウムを含む 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) (以後，A 液) 50 mL を加え，5°Cで一夜浸出した後， $1,420 \times g$  で 5 分間遠心分離し，上清を 50 mL メスフラスコに移し，沈殿物には A 液を 10 mL 加えよく混合し，再度遠心分離した。得られた上清を同一の 50 mL メスフラスコに移し，A 液で 50 mL に定容した。これをよく混合した後，No. 5C のろ紙ろ過し，得られたろ液を麴抽出液とした。

醪粗酵素液は，二次醪を  $9,900 \times g$  で 5 分間で遠心分離した上澄みを No. 2 ろ紙でろ過し，得られたろ液を醪粗酵素液とした。

### 3.2.3. 小仕込み試験

使用する焼酎酵母 H5 は，乾燥酵母エキス 1% (w/v)，ハイポリペプトン 2%及びグルコース 2%からなる YPD 液体培地 5 mL で 2 日間 30°Cで培養した。仕込み配合は Table 3-1 のとおりとした。サツマイモは 500 g 前後の大きさのコガネセンガンを用いた。一般的な芋焼酎の作製では一次仕込み麴米 200 g 相当量の米麴

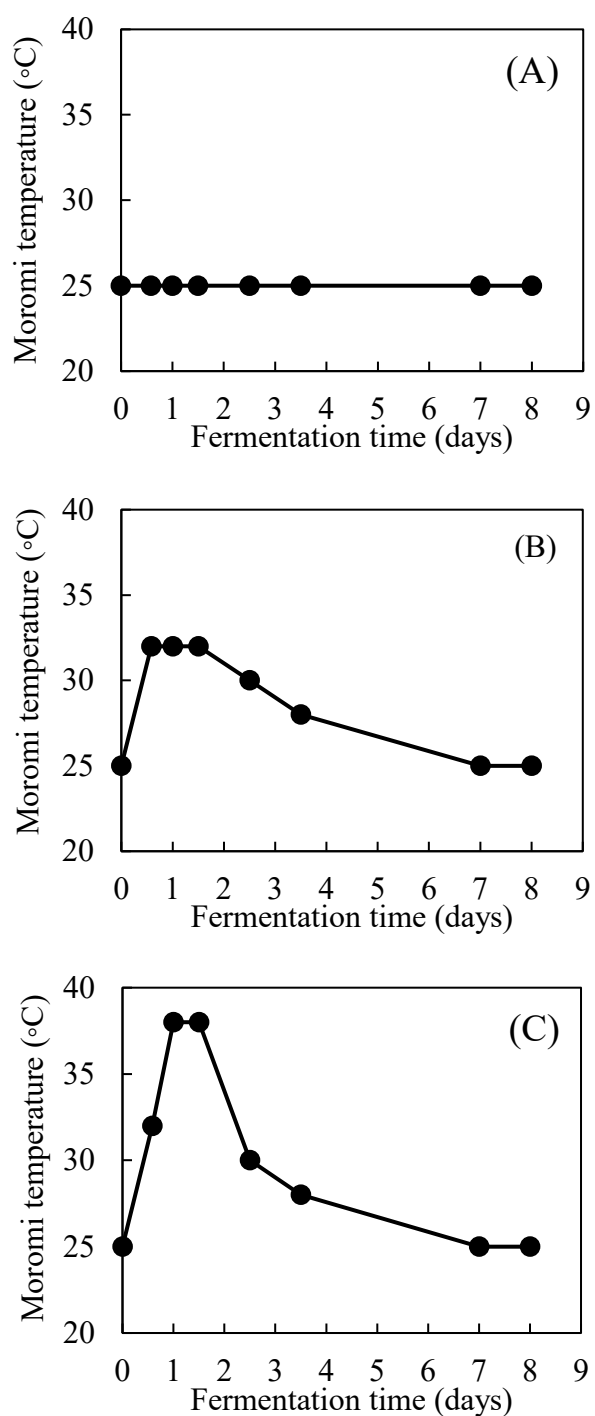
に汲み水 240 g (内, 酵母培養液 5 mL) を加えた。一次仕込みは一次醪に汲み水 564 g と蒸煮・粉碎したサツマイモ 1000 g を加え二次仕込みを行い, 恒温器を用いて水浴中で醪温度を制御した。酒造メーカーでは, 25°C前後で二次仕込みを行った二次醪は, 酵母の発酵熱により仕込み後 14 時間程度で 32°C付近まで上昇する。この時点で醪の冷却を行い, それ以上の温度上昇がないように温度管理を行っていることが一般的である。その後, 酵母の発酵能の低下と共に醪の温度は 25°C付近まで次第に低下する。しかし, 一部メーカーでは 38°C付近まで上昇することもある。そこで, 二次醪の温度制御を Fig. 3-1 に示すように, 25°C一定と, 最高温度が 32°C及び 38°Cになるように設定した。発酵経過は醪の重量減少量から追跡し, 小仕込み試験は 3 回を行い, その結果は平均値で示した。また, 本研究において対照は醪の最高温度が 32°Cのものとした。

蒸留は, 8 日間発酵させた二次醪 900 g を使用した。ガラス製の蒸留器を用い, 蒸気吹き込みによる常圧蒸留法により行った。蒸留の終点は原酒アルコールが 37%前後に達した時点とし, 終点のアルコール度数測定には携帯型密度計 DMA-35 (Anton Paar 社, Graz Austria)を用いた。原酒をアルコール濃度が 25%になるよう脱塩水にて割水して暗所にて時々攪拌してガス抜きを行い, 約 1 ヶ月室温保存した。その後, 孔径 5 µm の親水性 PTFE メンブレンフィルターでろ過した。得られたろ液を焼酎の分析と官能評価に使用した。

**Table 3-1 Proportion of raw materials for small scale shochu making**

	1st addn.	2nd addn.	Total
<b>Koji-rice (g)</b>	200 <sup>*</sup>	—	200
<b>Sweet potato (g)</b>	—	1000	1000
<b>Water (mL)</b>	240	564	804

<sup>\*</sup>Including 5 mL of the seed culture of yeast



**Fig. 3-1 Temperature during the second fermentation of Imo-shochu moromi.**  
 Low (LO) temperature process (A), Typical (TY) temperature process (B),  
 and high (HI) temperature process (C).

#### 3.2.4. 二次醪および焼酎の一般分析

醪アルコール含量は、ガーゼでろ過した醪をメスシリンダーで 130 mL 正確にとり、300 mL 容平底フラスコに移し、このメスシリンダーを約 10 mL の脱塩水で 2 回洗浄し洗液を平底フラスコに合併する。この時、消泡剤 (0.1% TRITON X-100) を 1 mL 加える。平底フラスコを冷却機に連結し、そのメスシリンダー (十分に洗浄したもの) を受器とし蒸留した。試留液が元の醪容量の約 70% (90 mL) まで達した時蒸留を止め、脱塩水で 130 mL に定容した。攪拌後アルコール濃度を、酒類用振動式密度計 (DA-155 東京電子工業 (株), Kyoto, Japan) を用いて測定した。揮発酸度は、試留液 10 mL を用い、指示薬としてフェノールフタレイン溶液を 2~3 滴加え、あらかじめファクターが求められている 0.01 N 水酸化ナトリウム溶液で滴定した。桃色がすぐに消えなくなったところを終点とした。滴定に要した 0.01 N 水酸化ナトリウム溶液の液量にそのファクターを乗じた値を酸度とした。

醪 pH の測定は pH 計 Seven Easy (メトラー・トレド(株), Tokyo, Japan) を用いて行った。アクリル製の棒で醪が均一になるように攪拌して pH 電極を直接醪に差し込んで測定した。

もろみ中の酵母数の計測は、ガーゼろ過した醪 1 mL、脱塩水 4 mL 及びメチレンブルー溶液を 5 mL 加え、ボルテックスミキサーでよく混合して 15 分間放置して染色した。この混合液塩水で 5 倍の希釈し、ヘマトメーターを用いて酵母数を計測し、その総数から総菌数を求めた。生菌数はメチレンブルーで青色に染色していない数を計測し求めた。なお、メチレンブルー溶液は、メチレンブルー 0.02 g をエチルアルコール 20 mL に溶解し、180 mL の 200 mM グリシン緩衝液 (pH 10.2) と混合したものである。醪の直接還元糖は高峯ら<sup>15)</sup>の方法に従った。醪の全糖は、乳鉢で磨り潰した醪 10 g を 200 mL 容三角フラスコに移し、脱塩水 100 mL と 25%塩酸 10 mL を加え、フラスコに直径 5 mm、長さ約 1 m のガラス

管を付け、沸騰浴中で 2.5 時間加熱した。加熱後水冷し、10% (w/w) 水酸化ナトリウム溶液で微酸性になるまで中和した。中和した溶液をメスフラスコで 200 mL に定容し、No.2 ろ紙でろ過したろ液 5 mL をソモギー変法にて測定し、醪中の全糖量を求めた。

### 3.2.5. 有機酸とアミノ酸及び糖の定量

二次醪をそれぞれ 10 g に脱塩水 25 mL を加えてガラス棒で良く混合し、遠心分離 ( $7,000 \times g$ , 15 分間) した。沈殿物に脱塩水 25 mL を加え混合し遠心分離し、この操作を再度行い得られた上清液を脱塩水で 100 mL に定容し抽出液とした。抽出液は C18 Spin Columns (Havard Apparatus 社製) および  $0.45 \mu\text{m}$  のメンブレンフィルターでろ過した。可溶性糖の分析は、高速液体クロマトグラフィー ((株) 島津製作所社製) を用いて行った。カラムは LiChrospher100  $\text{NH}_2$  (粒径  $5 \mu\text{m}$ ) (Merck Millipore 社製) を用い、移動相はアセニトリルと水 (3 : 1) の混合液によるアイソクラティック溶出で、オープン温度は  $40^\circ\text{C}$ 、流速  $1.0 \text{ mL/min}$  で測定した。検出器は示差屈折率検出器 RID-10A ((株) 島津製作所社製) を用いて定量した。有機酸分析は、カラムは Shim-pack SCR-102H ((株) 島津製作所) を 2 本連結して用いた。カラムオープン温度は  $50^\circ\text{C}$  で、移動相は  $4 \text{ mM } p\text{-トルエンスルホン酸}$  溶液を使用し、流速は  $0.8 \text{ mL/min}$  で送液した。カラムより溶出後、反応液 ( $4 \text{ mM } p\text{-トルエンスルホン酸}$  溶液,  $16 \text{ mM Bis-Tris}$ ,  $80 \mu\text{M EDTA}$  溶液)  $0.8 \text{ mL/min}$  と混合し、電気伝導度検出器にて検出した (CDD-10AVP, (株) 島津製作所)。アミノ酸組成分析については、カラムは Shim-pack AMINO-NA ((株) 島津製作所) を用い、移動相は MM-MA 液, MM-MB 液 (島津製作所) を使用した。0~33 分 (B 液 0%  $\rightarrow$  100%) のグラジェント溶出、オープン温度は  $60^\circ\text{C}$ 、流速は  $0.6 \text{ mL/min}$  で測定を行った。検出器は蛍光検出器 (RF-10AXL, (株) 島津製作所) を用いた。アミノ酸分析は以下の Table 3-2 に示す。

**Table 3-2 HPLC conditions for amino acids**

<b>Analysis equipment</b>	: SHIMADZU-LC (Shimadzu corporation)
<b>Analytical column</b>	: Shimadzu shim-pack Amino-Na (100 mmL × 6.0 mm I.D., 5 µm)
<b>Analytical trap</b>	: Shimadzu shim-pack ISC-30Na (4.0 mm I.D. × 50 mm)
<b>Oven temperature</b>	: 60°C
<b>Injection volume</b>	: 10 µL
<b>Mobile phase</b>	: Amino acid mobile phase kit (Na type) (Shimadzu corporation) SolutionA (AA-MA) 0.2 N Sodium citrate adjusting pH 3.2 by perchloric acid (containing 7% ethanol) SolutionB (AA-MB) 0.6 N Sodium citrate, 0.2 M boric acid adjusting pH 10.0 by 4 M NaOH SolutionC (AA-MC) 0.2 N NaOH
<b>Reaction solution</b>	: SolutionA (AA-RA) Carbonate boric acid buffer (pH 10.0), sodium hypochlorite SolutionB (AA-RB) 0.08% OPA, 1.4% ethanol, 0.2% 2-mercaptoethanol, 0.4% Brij-35 (10%) in carbonate-boric acid buffer (pH 10.0)
<b>Flow rate</b>	: Mobile phase: 0.6 mL/min : Reaction solution: 0.2 mL/min
<b>Detector</b>	: Shimadzu RF-10Axl fluorescence detector (Ex at 350 nm, Em at 450 nm)



### 3.2.6. 麴汁培地を用いた発酵試験

麴汁培地は以下の方法で調製した。すなわち、白麴 1 に対して水道水 4 の割合で混合し 55℃で一夜保温した。それを No.2 ろ紙でろ過し、ろ液を 10%水酸化ナトリウム溶液で pH 4.2 に調整した。更に POCKET REFRACTOMETER ( (株) アタゴ) を使用し Brix10° まで脱塩水で希釈し、オートクレーブ滅菌したものを麴汁培地とした。

発酵試験は、麴汁培地 100 mL に沸騰石 3, 4 粒と初発濃度が  $1 \times 10^6$  cells/mL になるように酵母を添加し、24 時間毎に重量と総菌数、生菌数を測定し、72 時間後にはアルコール濃度と揮発酸度も測定した。

### 3.2.7. 官能評価

官能評価は 5 年以上の経験を有する男子 4 人、女子 4 人がパネルとして、ブラインドテストで行った。香り (甘香, 酸臭, 華やかさ) と味 (甘味, 酸味, 濃厚さ) について、各項目について「わからない:0」, 「やっとわかる:1」, 「わかるかわかる:2」, 「楽にわかる:3」および「強くわかる:4」の 5 段階で評価した。

### 3.2.8. ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)

焼酎試料の香気成分は Stir bar sorptive extraction (SBSE) 法で揮発成分をアジレント・テクノロジー (株) の GC-MS (GC, Agilent 6890; MS, Agilent 5979B) に自動注入して分析した<sup>4)</sup>。成分の同定は、Agilent Chem Station ソフトウェアと NIST05a マススペクトルライブラリーにより行った。

### 3.2.9. プロトプラスト懸濁液の調製

高峯らの方法を一部改変して行った<sup>5)</sup>。二次醗を 8 枚重ねのガーゼでろ過した

ろ液約 15 mL または、YPD 液体培地で得られた酵母培養液を  $12,000 \times g$ , 5 min 遠心分離をした沈殿物に脱塩水を加え懸濁した。これを 2 回繰り返し洗浄した。その後 20 mL の脱塩水に懸濁させた。 $5 \times 10^9$  cells の酵母をテフロン製遠心管に移し  $12,000 \times g$ ,  $5^\circ\text{C}$ , 5 min 遠心分離して集菌した。これにザイモリエース 20T 5 mg, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 3 mL, 2-メルカプトエタノール 2.8  $\mu\text{g}$ , 1.5 M 塩化カリウム 2 mL を加え、卓上型振とう恒温槽ウォーターバス・シェーカー (タイテック (株)) で  $25^\circ\text{C}$ , 約 1 時間往復振盪反応をした。顕微鏡観察下でプロトプラスト形成率が 80%以上であることを確認し、 $12,000 \times g$ ,  $5^\circ\text{C}$ , 10 min 遠心分離し沈殿を 0.6 M 塩化カリウム溶液 2 mL に懸濁した。これを  $12,000 \times g$ ,  $5^\circ\text{C}$ , 10 min 遠心分離し沈殿に 0.6 M 塩化カリウム溶液 2 mL を加え懸濁した液をプロトプラスト懸濁液とした。

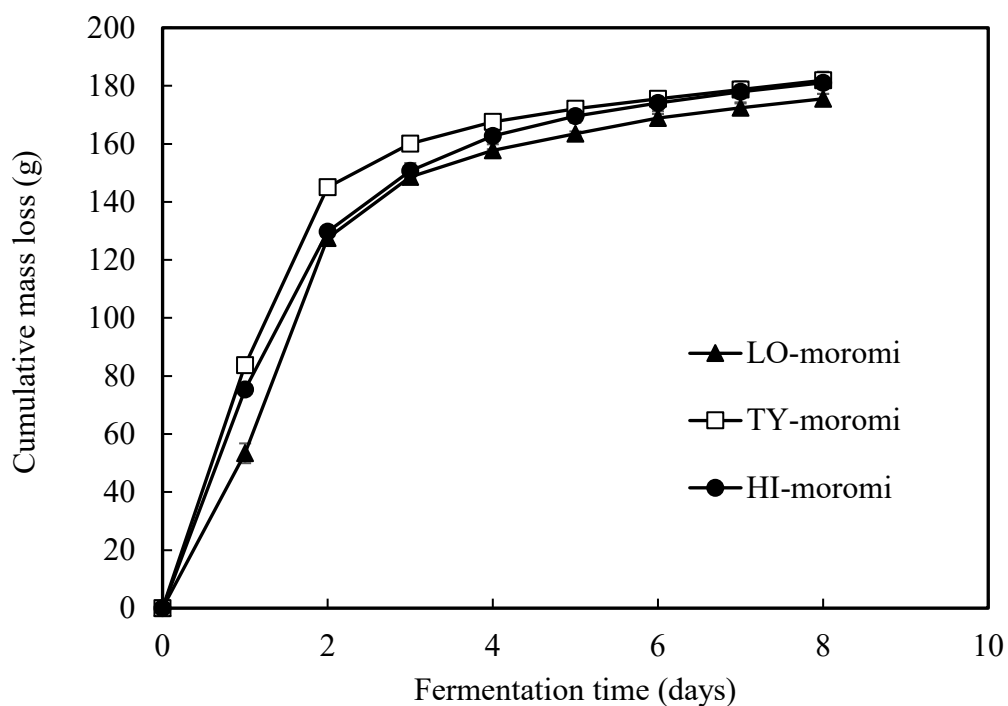
### 3. 2. 10. AATFase 活性

Yoshioka の方法<sup>6)</sup>を一部改変して測定した。すなわち、プロトプラスト懸濁液 0.5 mL に 2.4 M アセチル CoA 0.5 mL, 135 mM イソアミルアルコール 0.5 mL を加え、卓上型振とう恒温槽ウォーターバス・シェーカー (タイテック (株)) で  $25^\circ\text{C}$ , 60 分間往復振盪反応をした。2.4 M アセチル CoA と 135 mM イソアミルアルコールは 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) にそれぞれ 1.93 g/L と 11.9 g/L の割合で溶解させたものを使用した。塩化ナトリウム 1 g を加え反応を停止させ、GC-MS で酢酸イソアミルを測定した。反応液 1.4 mL と内部標準液であるノナン酸メチル (100 mg/L) を 140  $\mu\text{L}$  を 200 mL 容の専用ボトルに入れ、密閉し  $30^\circ\text{C}$  の恒温水槽内で 30 分以上保温した。Entech Instrument inc.の自動濃縮装置を使用してボトル内のヘッドスペースガスを 100 mL 吸引し、GC-MS (GC. Agilent 6890; MS. Agilent 5979B) により行った。

### 第3節 実験結果

#### 3.3.1. 小仕込み試験

小仕込み試験を行った結果について、二次醪の発酵経過を Fig. 3-2 に示す。醪の温度が 25℃で管理した醪は二次仕込み後、1 日経過した時点では発酵が遅れたが、最終的には遜色ない発酵経過であった。



**Fig. 3-2 weight loss during second fermentation of Imo-shochu moromi.**

(mean  $\pm$  standard deviation; n = 3)

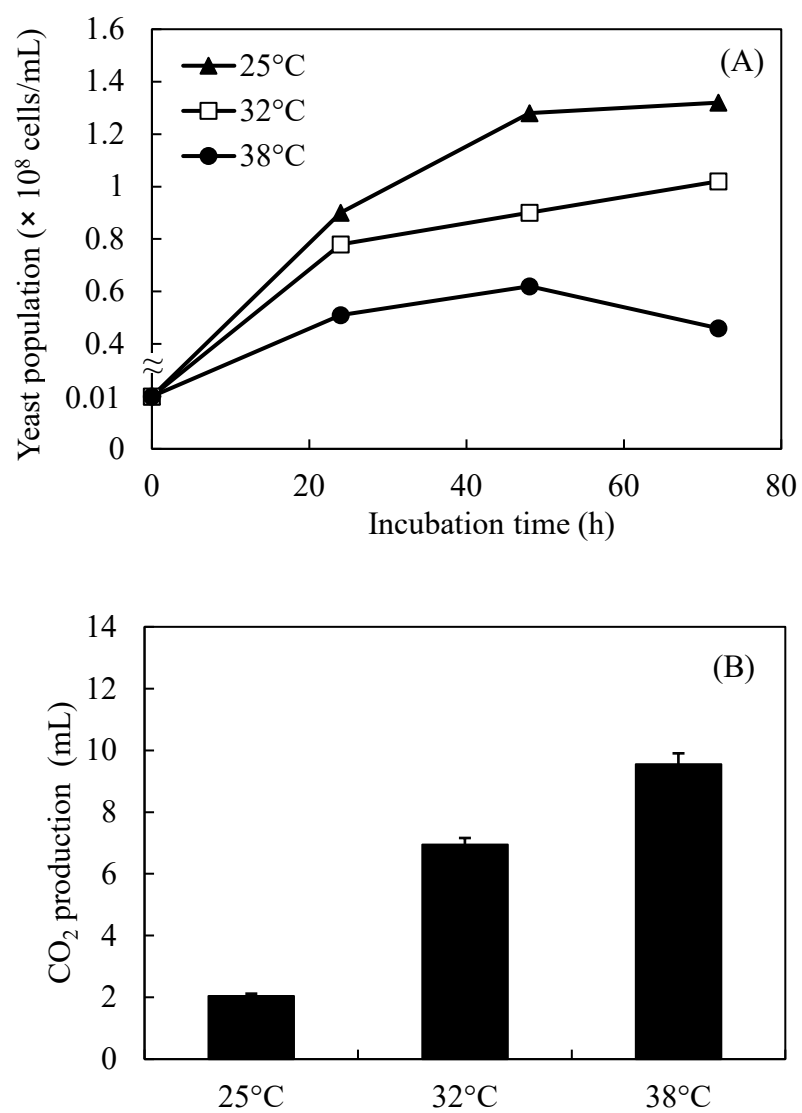
**Table 3-3 Physicochemical properties of Imo-shochu mash obtained at different fermentation temperatures**

	<b>LO-moromi</b>	<b>TY-moromi</b>	<b>HI-moromi</b>
<b>Alcohol concentration ( %(v/v) )</b>	14.60 ± 0.25 <sup>a</sup>	14.62 ± 0.06 <sup>a</sup>	14.61 ± 0.11 <sup>a</sup>
<b>Residual sugar (%)</b>	1.81 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.94 ± 0.03 <sup>a</sup>
<b>pH</b>	4.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.08 ± 0.02 <sup>a</sup>	4.06 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>Total Yeast population (×10<sup>8</sup> cells/mL)</b>	3.90 ± 0.26 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.21 <sup>c</sup>
<b>Viable yeast population (×10<sup>8</sup> cells/mL)</b>	1.77 ± 0.25 <sup>a</sup>	1.65 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.23 <sup>a</sup>
<b>Acetic acid concentration (mg/g)</b>	0.17 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.23 <sup>b</sup>

Data represent means ± standard deviations of three independent experiment results. Means followed by the same letter in the same row are not significantly different at the 5% level according to Tukey's test.

1 日後では発酵が遅れた理由として、酵母の増殖の遅れが考えられる。酵母の増殖は、発酵温度や炭素源であるグルコースやマルトース濃度、窒素源であるアミノ酸濃度に影響を受ける。そこで、まず発酵温度について考察した。麴汁培地を用いた酵母の増殖に及ぼす培養温度の影響について検討した。その結果、Fig. 3-3a に示すように、24 時間後の総菌数は、培養温度 25°C では  $9.0 \times 10^7$  cells/mL と 32°C と比べて 1.15 倍多く、72 時間後では 25°C が  $1.5 \times 10^8$  cells/mL と最も総菌数が多く生菌率は 80% 以上であった。一方、38°C では 24 時間後の総菌数は  $5.1 \times 10^7$  cells/mL と増殖が遅れるとともに 24 時間以降の増殖がほとんど認められず、72 時間後の生菌率は 3% 程度であった。また、酵母の自己消化は自然に起こるもので、高温では誘導されることが確認されている<sup>7)</sup>。また、30°C で 90 時間培養すると 25°C に比べて酵母の生菌率が低下することが報告されている<sup>8)</sup>。38°C で 72 時間培養した酵母の生菌率が極めて低かったことから、48 時間から 72 時間の間に酵母の自己消化が起こったと考えられる。したがって、25°C の酵母数の増加は、より低い温度での焼酎酵母の成長に起因するものと考えられる。しかし、酵母の初期増殖率は、25°C が 32°C および 38°C と比べて高く (Fig. 3-3 (A)), 25°C の CO<sub>2</sub> 生産性の低さとは相関しないことがわかった。

低温度管理 (LO-moromi) の CO<sub>2</sub> 生産性が低い理由としては、2 つのことが考えられる。1 つ目に LO-moromi の栄養素 (Table 3-4, アミノ酸など) の濃度が低いのは、低温でのタンパク質の酵素分解の遅延が原因である可能性がある。2 つ目に、酵母の CO<sub>2</sub> 生産性が温度に影響されている可能性がある。そこで、同じ培地を用いて 25°C, 32°C および 38°C で酵母の CO<sub>2</sub> 生成量を測定したところ、温度が高くなるにつれて増加することがわかった (Fig. 3-3 (B) )。この結果は、パン<sup>9)</sup>や麦汁発酵<sup>10)</sup>の先行研究と一致している。したがって、LO-moromi では 25°C では温度が低いほど CO<sub>2</sub> 生産性が低くなるため、発酵の初期速度が低下したと考えられる。



**Fig. 3- 3 Growth rate (A) and CO<sub>2</sub>production (B) of shochu yeast (Kagoshima No. 5) in koji extract medium at different temperatures**

### 3.3.2. 醪分析

Table 3-3 に発酵終了後の二次醪の分析結果を示す。醪温度 25℃の醪が総菌数および生菌数が最も多かった。醪アルコール、直接還元糖及び全糖にはサンプル間に大差が無く、また、発酵歩合はいずれも 81.8%程度であることから、発酵温度 25℃~38℃ではアルコール収得量に影響を与えないことがわかった。また、原酒アルコール、原酒量および蒸留歩合からいずれの醪とも良好な蒸留ができたと考えられる。

酢酸が主成分である揮発酸度は、醪の最高温度が 38℃で 2.24 と最も高い値であった。発酵終了後の有機酸分析の結果、醪の最高温度 38℃の醪において酢酸濃度が 0.36 g/L と 32℃の 0.25 g/L と比べ 1.8 倍高い値であった。そこで、麴汁培養地を用いて 25℃、30℃及び 38℃で鹿児島 5 号酵母を 24 時間静置培養し、培養液の酢酸濃度を測定した結果、それぞれ 0.4、0.3 および 1.3 g/L であり、培養温度 38℃では酢酸の生成量が増加することがわかった。また、焼酎酵母は醪温度が高くなるほど揮発酸度が高くなることが報告されている<sup>11)</sup>。これらのことから、醪の最高温度が 38℃という高温では、酵母が酢酸を生成しやすくなり、そのため揮発酸度が高くなったといえる。クエン酸は主に麴由来の有機酸であり、その 50%以上の濃度を占めた。

**Table 3-4 Amino acid concentration in Imo-shochu mash at day**

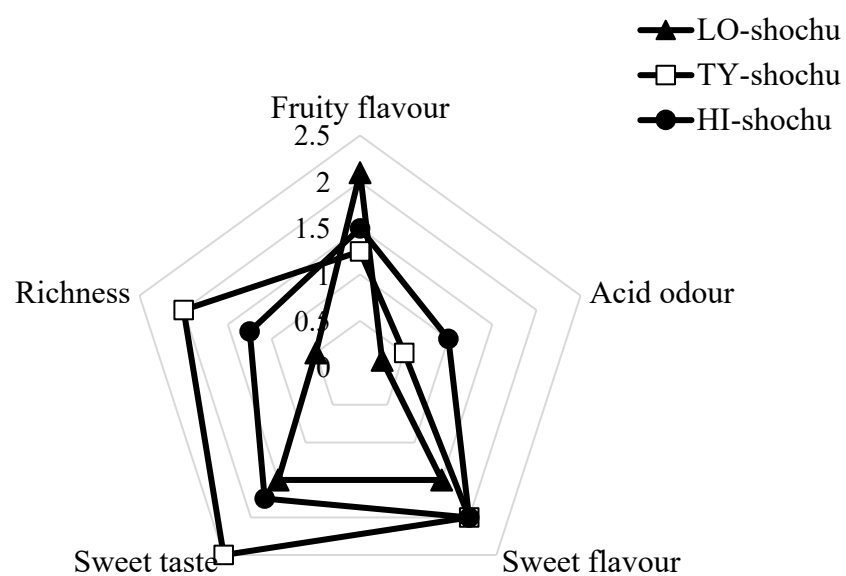
Compound	Concentration (mmol/L)		
	LO-moromi	TY-moromi	HI-moromi
Aspartic acid	0.10 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.20 <sup>b</sup>
Threonine	0.13 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.03 <sup>b</sup>
Serine	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>c</sup>
Glutamic acid	0.77 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.76 ± 0.74 <sup>b</sup>
Glycine	0.52 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.47 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.67 <sup>a</sup>
Alanine	0.65 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.42 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.42 <sup>b</sup>
Valine	0.08 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.65 ± 0.03 <sup>b</sup>
Isoleucine	0.01 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.16 <sup>a</sup>
Leucine	0.03 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.46 <sup>a</sup>
Tyrosine	0.22 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.69 ± 0.12 <sup>b</sup>
Phenylalanine	0.24 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.69 <sup>a</sup>
Histidine	0.44 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.07 <sup>a</sup>
Lysine	0.35 ± 0.31 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.30 <sup>a</sup>
Arginine	0.33 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.84 <sup>a</sup>	1.66 ± 1.44 <sup>a</sup>
Total	3.58 ± 0.25 <sup>a</sup>	6.93 ± 1.32 <sup>b</sup>	14.78 ± 1.12 <sup>c</sup>

\* The sum of the concentration of 14 amino acids. Data represent means ± standard deviations of three independent experiment results. Means followed by the same letter in the same row are not significantly different at the 5% level according to Tukey's test.



### 3.3.3. 官能評価

官能評価の結果を Fig. 3-4 に示す。「濃厚さ」は醪温度が 25℃の焼酎が評価点 0.5 と最も低かったことから淡麗な酒質といえる。一方、「フルーティー」は 2.0 と最も高かったことから、経験的にいわれてきた「醪を低温で管理すると、焼酎は淡麗で華やかな酒質になる」ことと一致した。「甘味」は醪の最高温度が 32℃の焼酎が評価点 2.5 と最も高い結果であった。また、「甘香」は醪の最高温度が 38℃と 32℃の焼酎で同じ 2.0 であった。「濃厚さ」は 32℃の焼酎が 2.0 と最も高く、38℃の焼酎は 1.4 であった。38℃の焼酎は「複雑な香味がする」とのコメントがあった。また、38℃の焼酎は「酸臭」は 1.0 で最も高かったが、これは、醪中の酢酸濃度が最も高かったことと一致した。しかし、「酸味」は評価点が 0 と酸味を感じなかった。これらのことから、醪の最高温度を 32℃付近で管理することが最も「甘香」、「甘味」、「濃厚」な酒質になることがわかった。



**Fig. 3-4. Sensory evaluation of Imo-shochu. Each value was expressed as the mean of evaluation scores (n = 8).**

### 3.3.4. 香気成分分析

GC-MS で香気成分分析を行った結果について Table 3-5 に示す。エステル類は、蒸留酒の香気成分の中で最も多種類含まれる成分であり、酒類の香気に大きく寄与し、また、果実の香気の主成分でもある。醪温度 25°Cの焼酎に含まれるエステル類のうち酢酸イソアミル、酢酸 2-フェネチル、酪酸エチルおよび中鎖脂肪酸エチルは、醪の最高温度が 32°Cの焼酎と比べて高い濃度であった。このことが、官能評価において醪温度 25°Cの焼酎で「フルーティー」と評価された要因といえる。醪の最高温度が 38°Cの焼酎はラウリン酸エチルとリノール酸エチル以外のエステル類は全て醪の最高温度が 32°Cの焼酎と比べて低い濃度であった。エステル類の中で代表的な香気成分に酢酸イソアミルがある。この成分は、バナナの香りの主成分であり、清酒の吟醸香に大きく寄与している。清酒や焼酎においては、この成分を増加させる酵母の育種が行われ、「フルーティー」と評価される清酒や焼酎が商品化されている。酢酸イソアミルはイソアミルアルコールとアセチル CoA を基質として、酵母細胞膜に存在するアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATFase) により生成する<sup>12,13)</sup>。AATFase 活性は初発アミノ酸濃度に正の相関があることが知られている<sup>14)</sup>。発酵 2 日後の 25°C, 32°C および 38°Cの醪中の AATFase 活性は、それぞれ 3.1, 1.8 および 4.2 U/10<sup>8</sup> cells であった。酵母の AATFase 活性の至適温度は 30°C付近にあり、熱安定性は低温ほど高くなることが知られている<sup>13)</sup>。また、AATFase 活性は細胞膜の不飽和脂肪酸により阻害される<sup>12,13)</sup>が、初発アミノ酸濃度の高い培地では酵母菌体の脂肪組成の不飽和度が低くなり、その結果 AATFase 活性が高くなることが報告されている<sup>14)</sup>。本研究において、AATFase 活性は 32°Cと比べて 38°Cが高かったが、これは 38°Cの醪の全アミノ酸濃度が 2,795 mg/L と 32°Cの 1,023 mg/L と比べて 2.7 倍高かったためと考えられる。ところが、38°Cの焼酎に含まれる酢酸イソアミルは 4.8 mg/L と、32°Cの焼酎と比べて 50%程度であった。酢酸イソアミル生成量

は酵素活性よりも、イソアミルアルコール濃度に依存することが報告されている<sup>14)</sup>。38℃の焼酎に含まれるイソアミルアルコールは217 mg/Lであり、32℃の焼酎の75%程度であったため、38℃の焼酎に含まれる酢酸イソアミル濃度が低くなったと考えられる。

高級アルコール類は、酵母のアミノ酸代謝と関係しており、酵母に取り込まれたアミノ酸が脱アミノと脱炭酸の後、炭素数の1つ少ないアルコールに還元される Ehrlich 経路と、アミノ酸生合成経路の中間体であるケト酸から脱炭酸後生成するアミノ酸生合成経路の2つの経路が知られている<sup>15)</sup>。また、アミノ酸濃度が低い場合は、アミノ酸濃度の高い醪と比べて高級アルコールの生成量が高くなることと、アミノ酸生合成経路が関与することが報告されている<sup>16)</sup>。醪温度25℃の焼酎は醪最高温度32℃の焼酎と比べて高級アルコール濃度が高かった。これは、醪温度25℃の醪の酵母濃度が  $3.9 \times 10^8$  cells/mL であり32℃のそれと比べて1.5倍高かったことと、Table3-4に示すとおり全てのアミノ酸が32℃と比べて低濃度であったため、高級アルコールの生成はアミノ酸生合成経路が主に関与したためと考えられる。一方、醪最高温度38℃の醪中のアミノ酸濃度は32℃と比べ高かったにもかかわらず、38℃の焼酎に含まれる高級アルコール類は32℃と比べて低濃度であった。アルギニンは酵母により優先的に資化されるアミノ酸であり、アルギニン濃度が高いと高級アルコール生成に関与するアミノ酸の資化が相対的に少なくなり、高級アルコール生成量が減少することが知られている<sup>15)</sup>。白石ら<sup>17)</sup>は芋焼酎の醪にプロテアーゼ剤を添加するとアミノ酸濃度が増加するにもかかわらず、高級アルコールの生成量が減少し、この原因がアルギニンによるものであることを明らかにした。また、アンモニアや高級アルコール生成に関与するアミノ酸以外のアミノ酸の共存する条件下では、取り込まれたアミノ酸は菌体構成成分へ転化する比率が高くなり、高級アルコール生成量が低下することが知られている<sup>18)</sup>。本研究において、発酵2日後において、38℃

の醪中の全種類のアミノ酸濃度が 32℃と比べて高く、また、アルギニン濃度は 368 mg/L と 32℃と比べ 2.1 倍高いこと、そして酵母濃度が低いことで、38℃の焼酎の高級アルコール類が 32℃と比べて低濃度となったものと考えられる。

テルペン類は、芋焼酎の特徴香気成分として知られている。その生成機構は、サツマイモに存在するゲラニル配糖体とネリル配糖体が発酵中に麹菌の生産した  $\beta$ -グルコシダーゼの作用により、それぞれゲラニオールとネロールに加水分解される。これらの一部は酵母の還元酵素によりシトロネロールに変換され、更にシトロネロールの一部は酵母の還元酵素でローズオキサイドに変換される。また、ゲラニオールとネロールの一部は蒸留中に酸熱反応によりリナロールと  $\alpha$ -テルピネオールに変換される。本研究において、ネロール及びゲラニオールの生成量はいずれの焼酎とも大差がなかった。 $\beta$ -グルコシダーゼは 50℃が至適温度であり、また、10℃~50℃の範囲で熱安定性がある。これは、用いたサツマイモと米麹がそれぞれ同一ロットのものであったため、醪中の配糖体濃度と  $\beta$ -グルコシダーゼ活性はいずれの醪とも大差がなかったためと考えられる。また、リナロールは醪温度 25℃の焼酎が 15.6  $\mu\text{g/L}$  と最も低い濃度であった。芋焼酎製造において、リナロール生成量と醪 pH とは負の相関にあり、醪 pH 3.6 で製造した芋焼酎に含まれるリナロールは pH 4.3 の焼酎の約 1.6 倍含まれることが報告されている。本研究において、リナロール濃度に若干の差が生じた原因として、Table 3-4 に示すとおり、醪 pH が醪温度 25℃、醪最高温度 32℃および 38℃において、それぞれ 4.10、4.08 および 4.06 であり、醪 pH の違いがリナロール生成に影響したものと考えられる。酵母の還元酵素の作用で生じるシトロネロールとローズオキサイドは醪中の酵母総菌数が最も少ない醪最高温度 38℃の焼酎において、最も少なかった。

脂肪酸は、ミリスチン酸以外の全ての脂肪酸が醪温度 25℃の焼酎で高い濃度含まれ、醪最高温度 38℃の焼酎で低い濃度であった。酵母は脂肪酸の生成に関

与することが報告されている<sup>19)</sup>。醪中の酵母総菌数は醪温度 25℃では 3.89 cells/mL と最も多く、醪最高温度 38℃では 1.95 cells/mL と最も低かったことが、焼酎に含まれる脂肪酸量に差が生じたものと考えられる。

β-ダマセノン<sup>20)</sup>は芋焼酎の甘い香りに寄与する物質として知られており、サツマイモ中には前駆体として存在し、発酵中及び蒸留の酸熱反応により生成することが報告されている<sup>20)</sup>。本研究においていずれの焼酎とも大差がないことから醪の発酵温度はダマセノンの生成に影響を与えないことが明らかになった。

Table 3-5 The volatiles in Imo-shochu produced at different fermentation temperature.

Compound	Peak-RI	Quantification ion (m/z)	Concentration(ug/L)		
			LO-shochu	TY-shochu	HI-shochu 38
Esters (14)					
Ethyl acetate	901	43	113,585 ± 37,790 <sup>a</sup>	138,179 ± 18,701 <sup>a</sup>	82,888 ± 17,827 <sup>a</sup>
Isobutyl acetate	1011	43	280 ± 34 <sup>a</sup>	233 ± 43 <sup>a</sup>	113 ± 35 <sup>b</sup>
Isoamyl acetate	1127	70	6,807 ± 545 <sup>a</sup>	5,855 ± 572 <sup>a</sup>	3,577 ± 695 <sup>b</sup>
2-phenylethyl acetate	1810	104	7,469 ± 646 <sup>a</sup>	6,365 ± 329 <sup>b</sup>	3,654 ± 238 <sup>c</sup>
Ethyl butyrate	1036	71	898 ± 1051 <sup>a</sup>	308 ± 54 <sup>a</sup>	182 ± 48 <sup>a</sup>
Ethyl isovalerate	1071	88	6.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.3 ± 1.2 <sup>b</sup>	7.0 ± 1.1 <sup>ab</sup>
Ethyl caproate	1236	88	256 ± 23 <sup>a</sup>	176 ± 18 <sup>b</sup>	77.8 ± 19.1 <sup>c</sup>
Ethyl heptanoate	1333	88	4.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.6 <sup>ab</sup>	2.4 ± 0.5 <sup>b</sup>
Ethyl caprylate	1443	88	1,574 ± 70 <sup>a</sup>	1,228 ± 43 <sup>b</sup>	920 ± 83 <sup>c</sup>
Ethyl nonanoate	1536	88	2.3 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
Ethyl caprate	1647	88	547 ± 57 <sup>a</sup>	327 ± 94 <sup>b</sup>	255 ± 103 <sup>b</sup>
Ethyl laurate	1844	88	5.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	3.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	6.8 ± 3.6 <sup>a</sup>
Ethyl cinnamate	2124	131	11.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	14.3 ± 0.7 <sup>a</sup>	12.2 ± 0.9 <sup>a</sup>
Ethyl stearate	2459	88	2.5 ± 4.4 <sup>a</sup>	7.7 ± 7.1 <sup>a</sup>	3.2 ± 6.3 <sup>a</sup>
Ethyl linoleate	2527	95	17.5 ± 5.8 <sup>a</sup>	11.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	18.2 ± 19.8 <sup>a</sup>
Alcohols (4)					
Isobutyl alcohol	1104	43	347,771 ± 23,652 <sup>a</sup>	285,150 ± 10,863 <sup>b</sup>	225,728 ± 10,842 <sup>c</sup>
1-Butanol	1149	56	4,447 ± 645 <sup>a</sup>	6,336 ± 45 <sup>b</sup>	2,705 ± 315 <sup>a</sup>
Isoamyl alcohol	1212	55	349,794 ± 19,001 <sup>a</sup>	287,896 ± 13,281 <sup>b</sup>	217,069 ± 17,653 <sup>c</sup>
2-Phenylethanol	1903	91	155,911 ± 21,792 <sup>a</sup>	154,786 ± 10,775 <sup>a</sup>	110,462 ± 8,856 <sup>b</sup>

## Continued

Compound	Peak-RI	Quantification ion (m/z)	Concentration(ug/L)		
			LO-shochu	TY-shochu	HI-shochu
Fatty acids (5)					
Caproic acid	1835	60	1,016 ± 27 <sup>a</sup>	897 ± 73 <sup>ab</sup>	848 ± 37 <sup>b</sup>
Caprylic acid	2049	60	1,499 ± 139 <sup>a</sup>	1260 ± 18 <sup>b</sup>	1073 ± 41 <sup>b</sup>
Capric acid	2264	60	1,261 ± 151 <sup>a</sup>	874 ± 14 <sup>ab</sup>	776 ± 233 <sup>b</sup>
Lauric acid	2475	73	508 ± 29 <sup>a</sup>	382 ± 10 <sup>b</sup>	360 ± 23 <sup>b</sup>
Myristic acid	2685	73	254 ± 66 <sup>a</sup>	210 ± 139 <sup>a</sup>	467 ± 392 <sup>a</sup>
Fatty Others (5)					
cis-Rose oxide	1352	139	0.13 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.03 <sup>b</sup>
trans-Rose oxide	1372	139	0.13 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>b</sup>
Linalool	1544	71	15.6 ± 1.9 <sup>a</sup>	18.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	19.5 ± 3.1 <sup>a</sup>
Citronellol	1761	82	23.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	22.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	16.4 ± 0.5 <sup>b</sup>
Nerol	1791	69	17.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	19.0 ± 1.1 <sup>a</sup>	17.1 ± 0.8 <sup>a</sup>
β-damascenone	1818	121	7.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	8.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.9 ± 0.3 <sup>a</sup>
Geraniol	1840	69	12.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	15.3 ± 5.4 <sup>a</sup>	14.9 ± 2.9 <sup>a</sup>

Data represent means ± standard deviations of three independent experiment values. Means followed by the same letter in the same row do not significantly differ at the 5% level according to Tukey's test.



#### 第4節 要約

二次醪温度を 25℃一定, 最高温度 32℃及び最高温度 38℃で管理することで醪の発酵経過及び酒質に与える影響について検討した。その結果, 25℃一定の二次醪は発酵経過は初期に遅れたが, 最終的には遜色ない発酵経過であった。もろみを 25℃で発酵させた場合, 酵母の数は 2 倍になったが, CO<sub>2</sub> の生産性は高温よりも 40%低くなった。GC-MS 分析の結果, 高級アルコール類や果物様の香り成分であるエステル類が対照の焼酎と比べて高濃度に含まれており, 官能評価でもフルーティーで淡麗と評価されたことから, 経験的にいわれてきた「低温で管理した焼酎は淡麗で華やかな酒質になる」ということと一致した。

最高温度 38℃の二次醪では, 対照と比べて発酵経過は童謡であったが, 酵母総菌数は少なかった。醪に含まれるは酢酸濃度が最も高く, 揮発酸度も高かった。これは, 官能評価の酸臭が強いという結果と一致した。GC-MS 分析の結果, エステル類, 高級アルコール類および脂肪酸類が少なく, 原料由来の香りによる複雑な香味につながったと考えられる。醪の最高温度を 32℃付近で管理することが最も「甘香」, 「甘味」, 「濃厚」な酒質になることがわかった。

## 第5節 参考文献

- 1) 注解編集委員会編, 第四回改訂国税庁所定分析法注解(財団法人日本醸造協会, 東京) (1993)
- 2) Y. Y. S. Rahayu, Y. Yoshizaki, K. Yamaguchi, K. Okutsu, T. Futagami, H. Tamaki, Y. Sameshima and K. Takamine, Food Chem. **224**, 398 (2017).
- 3) Z. Wang, K. Okutsu, T. Futagami, Y. Yoshizaki, H. Tamaki, T. Maruyama, K. Toume, K. Komatsu, F. Hashimoto and K. Takamine, Front. Nutr. **7**, 115 (2020).
- 4) 高峯和則, 吉崎由美子, 島田翔吾, 高屋総一郎, 玉置尚徳, 藤清伊, 鮫島吉廣: 日本醸造協会誌 **106**, 50 (2011).
- 5) 高峯和則, 木田建次, 園田頼和, 生田六也, 定清塚田: 日本醸造協会誌 **85**, 825 (1990).
- 6) A. M. Blinkovsky, T. Byun, K. M. Brown and E. J. Golightly, Appl. Environ. Microbiol. **65**, 3298 (1999).
- 7) M. Yamamura, K. Takeo and T. Kamihara, Agric. Biol. Chem. **55**, 2861 (1991).
- 8) N. R. Merritt, J. Inst. Brew. **72**, 374 (1966).
- 9) Mondal A., Datta A. K., J. Food Eng., **86**, 465–474 (2008).
- 10) K. Yoshioka and N. Hashimoto, Agric. Biol. Chem. **45**, 2183 (1981).
- 11) 二神泰基, 玉置尚徳, 後藤正利, 高峯和則, 生物工学会誌, **97**, 82 (2019).
- 12) K. Yoshioka and N. Hashimoto, Agric. Biol. Chem. **45**, 2183 (1981).
- 13) 後藤邦康, 日本醸造協会誌 **87**, 801 (1992).
- 14) 久寿米木 一裕, 出永 直樹, 吉田 秀恵日本醸造協会誌 **93**, 606 (1998).
- 15) 岩野君夫, 伊藤俊彦, 幡宮顕仁, 中村拓郎, 渡辺誠衛, 中沢 伸重: 日本醸造協会誌 **99**, 801 (2004).
- 16) 秋田修, 蓮尾徹夫, 大場俊輝, 日本醸造協會雑誌 **81**, 626 (1986).

- 17) 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則, 日本醸造協会誌 **112**, 517 (2017).
- 18) K. OUCHI, Y. YAMAMOTO, M. TAKAGISHI and H. AKIYAMA, J. Ferment. Technol. **58**, 301 (1980).
- 19) Lynen F., Biochem. J., **102**, 381 (1967).
- 20) Y. Yoshizaki, K. Takamine, S. Shimada, K. Uchihori, K. Okutsu, H. Tamaki, and K. Ito, Y. Sameshima, J. Inst. Brew., **51**, 301 (2011).

## 第 4 章 総括及び結論

芋焼酎の酒質は、用いる酵母と麹菌の種類、原料サツマイモの栽培期間、原料加熱方法、麹とサツマイモの配合割合、二次醪 pH 等の製造要因が関与することが明らかになってきている。しかしながら、芋焼酎の製造工程である二次仕込みの工程は、香気成分や焼酎の品質に影響を与える重要な工程ではあるが、大正時代に二次仕込み法が導入され定着した以来、発酵形態に関する改変は行われてきていない。また、二次仕込みでは、蒸したサツマイモを加えることで醪の粘度が高くなり、二次醪の温度管理が難しくなる。二次醪温度においては、醪の温度が高温経過をたどると「濃厚で複雑な香味の酒質」となり、低温で管理をすると「淡麗で華やかな酒質」になると経験的にいわれているが、発酵温度と酒質との関係は明らかになっていない。

第 1 章では、焼酎の歴史と現状について概括するとともに、これまで焼酎製造の仕込み方法や麹菌及び酵母の変遷についても概括した。また、芋焼酎では酒質や仕込み方法に関わる研究として、原料加熱方法、麹とサツマイモの配合割合、醪 pH が酒質に影響を与えることが明らかとなってきたが、発酵形態や発酵温度が酒質に与える影響については検討されていないことを論じ、本論文の研究内容についての目的を概説した。

第 2 章では、日本と中国の蒸留酒の仕込み法を融合した新たな製造法の可能性について、サツマイモを白麹で固体糖化後に発酵させる新たな発酵形態の開発と酒質に与える影響について検討した。その結果、最適な固体糖化条件は、糖化温度は 60℃、糖化時間は 24 時間、麹歩合は 10%であり、この時の糖化率は 48.5%であった。麹歩合を上げても、糖化率は向上しなかった。これは、 $\alpha$ -アミラーゼの蒸し米への無効吸着が原因であることが分かった。ニューラーゼ F3G (プロテアーゼ) を添加すると糖化率は 70%に向上した。サツマイモに含まれる

スクロースは米麴由来の酵素により分解されることが分かった。最適な糖化条件で芋焼酎を製造すると、従来の仕込み法と比べ発酵は遜色なかった。得られた焼酎は、従来法の焼酎と比べ、香りは焼芋様や花様が強く、味は苦味の評点が高くまた、キレと濃厚さがあった。また、香氣成分は同定された 42 成分のほとんどが、固体糖化焼酎が従来焼酎と比べて僅かではあるが高濃度に含まれ、その内 17 成分が両焼酎間の濃度に有意差があった。これらのことから、焼酎製造における二次仕込み法に中国の米香型白酒の固体糖化工程を融合する新規な芋焼酎製造が可能であるとともに、酒質の多様化が期待できることが分かった。

第 3 章では、二次醪の温度が高温経過をたどると「濃厚で複雑な香味の酒質」となり、低温で管理をすると「淡麗で華やかな酒質」になると経験的にいわれている。この酒質の違いを科学的に明らかにするため、二次醪温度を 25℃一定、最高温度 32℃及び最高温度 38℃で管理することで醪の発酵経過及び酒質に与える影響について検討した。その結果、25℃一定の二次醪は発酵経過は初期に遅れたが、最終的には遜色ない発酵経過であった。

醪を 25℃で発酵させた場合、酵母の数は 2 倍になったが、発酵初期の CO<sub>2</sub> の生産性は最高温度 32℃及び最高温度 38℃の醪と比べ 40%低くかった。GC-MS 分析の結果、高級アルコール類や果物様の香り成分であるエステル類が 25℃での焼酎と比べて高濃度に含まれていた。醪を低温で管理すると酵母総菌数は多く、AATFase 活性が高く、高級アルコール類やエステル類が高濃度に含まれていた。官能評価でもフルーティーで淡麗と評価されたことから、経験的にいわれてきた「低温で管理した焼酎は淡麗で華やかな酒質になる」ということと一致した。

最高温度 38℃の醪では、対照と比べて発酵経過は同様であったが、酵母総菌数は少なかった。酢酸濃度が最も高く、揮発酸度も高かった。これは、官能評価の酸臭が強いという結果と一致した。GC-MS 分析の結果、エステル類、高級ア

ルコール類および脂肪酸類が少なく、原料由来の香りによる複雑な香味につながったと考えられる。醪の温度が高温で経過すると、酵母総菌数は少く、醪アミノ酸含量が多く、特にアルギニンが高濃度に含まれるため、高級アルコールの生成が抑制され、高級アルコール類とそのエステル類が少なく、原料由来の香りなどの複雑な香味になる事が分かった。また、高温条件では、酵母が酢酸を高生産し、複雑な香味の酒質なることが分かった。

醪の最高温度を 32℃付近で管理することが最も「甘香」、「甘味」、「濃厚」な酒質になることがわかった。

第4章では、上記各論の結果を総括し、内容をまとめた。

本論文は、本格焼酎の香味形成の差異及び酒質に及ぼす発酵形態及と発酵温度を明らかにするために、大きく2つのテーマで研究を行った。本格焼酎の二次仕込み法における発酵形態の影響ではサツマイモを白麹で固体糖化後に発酵させる新たな発酵形態の開発と酒質に与える影響を明らかにした。糖化後仕込み焼酎は従来の方法を用いた焼酎とは異なる酒質であった。また、糖化後仕込み由来の香気成分を明らかにした。更に、発酵温度の影響については低温経過及び高温経過で醪を管理して香気成分及び香味の生成について特徴を明らかにした。

以上の結果より、焼酎の商品設計をする際の発酵形態及び発酵温度に対して新たな知見が得られ、本論文の成果は焼酎製造工程及び焼酎の酒質の多様化に貢献できるものであった。

## 謝辞

本研究を遂行並びに論文をまとめるにあたり、終始御指導御鞭撻を賜りました、国立大学法人 鹿児島大学 農学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 高峯 和則 教授に深く感謝の意を表します。また、本論文の審査及び御指導御助言賜りました琉球大学 農学部 外山 博英 教授、鹿児島大学 農学部 吉崎 由美子 准教授に厚く感謝致します。本論文の審査並びに御校閲の労を賜りました佐賀大学 後藤 正利 教授、鹿児島大学 農学部 二神 泰基 准教授に厚く感謝致します。

研究遂行にあたり御助言御指導賜りました鹿児島大学 農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター 奥津 果優 特任助教、玉置 尚徳 教授に深謝致します。

研究を行うにあたって一緒に実験を遂行した、鹿児島大学 農 学部 附属焼酎・発酵学教育研究センター 焼酎製造学部門 芹川 樹奈 氏 (令和元年度卒業生)、趙 喆 氏 (令和4年度修了生)、王 子泰 氏 (令和4年度修了生)、印 璇 氏 (令和2年度修了生)に感謝致します。また、研究を遂行するにあたり、苦楽をともにした焼酎製造学研究室並びに、醸造微生物学研究室の卒業生、在校生諸氏に厚く感謝いたします。

さらに、日本への留学の機会を与えて頂きました四川大学錦江学院白酒学院院长 四川大学輕紡および食品学院 張文学 教授に深謝致します。留学による博士課程での就学の機会および心身共に支援頂いた両親に深謝致します。

最後に、本研究の御縁を賜り研究に対する御指導、論文の作成に御教示および生活への御支援を頂きました鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター焼酎製造学部門 高峯和則 教授に再度深謝致します。