

液体麴の焼酎製造への利用について

小路 博志

麴菌は日本の伝統的な醸造産業において古くから用いられており、安全な微生物として広く認められている。麴菌の培養方法には、蒸煮などの処理後の原料表面に麴菌の分生子を接種して培養する方法（固体麴）と、水に原料およびその他の栄養分を添加して液体培地を調製し、殺菌のための加熱・冷却後、麴菌の分生子などを接種し培養する方法（液体麴）がある。固体麴は一般的に、装置：専用、原料：蒸すことが必要、麴菌：分生子が着生しやすい、という制限があるが、醸造に必要な多種類の酵素などを大量生産できる大変すぐれた方法である。一方、液体麴は、装置：汎用ジャーファーマンター、原料：固体・液体何でもかまわず、麴菌：菌糸植菌もできるので、低分生子形成株でも可能、他に培養パラメーターの管理をしやすいという面でも優れた点が多い。しかしながら、従来の液体麴は、アミラーゼ、セルラーゼなどの酵素生産挙動が固体培養時と大きく異なり、全般的に生産性が低下することが知られていた¹⁾。そのため、醸造産業分野では固体麴を用いる方が一般的であり、液体麴を利用することは極めて稀であった。筆者らはあえてこの高い壁に挑み、固体麴と同等の複合酵素活性が得られた暁には、従来ではできなかった商品の開発が可能となるであろうと期待し、複合酵素高生産液体麴の研究を行った。

焼酎用液体麴

事業に直結することから、焼酎用液体麴に取り組むこととした。焼酎の醸造工程では、並行複発酵によりアルコールが生成されるため、酵母へのグルコース供給に影響を与える糖質分解関連酵素が非常に重要となる。また、清酒と比較して暖かい地域で製造することが多いため、腐造防止を目的として、低いpH環境下にて醸造する。そこで、筆者らは焼酎醸造工程に非常に重要となる、低pH環境下でも活性を有するグルコアミラーゼ活性(GA)と耐酸性 α -アミラーゼ活性(ASAA)を指標に培養法を検討した。さらに、焼酎製造技術として現場利用できるようにと、さまざまな要望(食品原料を用いる・遺伝子組換え麴菌は使用しない・固体麴と同等の培養時間内・回分培養法)に応えることとした。

麴菌 焼酎用白麴菌 (*Aspergillus kawachii* NBRC4308) は、固体麴にてGAとASAAを高生産できるので、ま

ずはこの株を用いて、培地検討を進めた。分析方法は別報を参照していただきたい²⁾。

培地・培養方法 麴菌を液体培地中で培養する際、原料由来の糖質が可溶化し、酵素が少量生産された時点でグルコース濃度が高くなる。環境中にグルコースが高濃度で存在すると、糖質分解酵素の生産が抑制されてしまう³⁾。ただし、グルコースが必要量存在しないと、麴菌の生育が遅れ、培養時間が長くなってしまふ反面もある。一般的な焼酎原料を用い麴菌の液体培養を試みると、報告されている通り高い酵素活性を得ることができなかった。筆者らに有利だったのは、基礎データとして、難分解性糖質を液体麴の炭素源として利用すると、その分解のしにくさから、グルコース濃度が低く維持され、酵素生産性が高まることを見いだしていたことである⁴⁾。そこで何らかの方法により、麴原料からのデンプン溶出速度をコントロールできないか考えた。目をつけたのは穀皮である。通常焼酎原料となる大麦などは、利用しやすいように穀皮をとう精工程で除去してある。しかしながら、穀皮にある程度覆われた原料は、穀皮のない原料より分解しにくいのではないかと予想した。精麦度の異なる大麦を調製し、無菌液中で糖質分解酵素と反応させた場合のグルコース生成量を比較した(図1)。

なお、精麦度100%は玄麦を示す。精麦度が小さくなる(外側がより削られる状態)に従い、グルコース生成量が高くなった。すなわち分解しやすくなることが判明

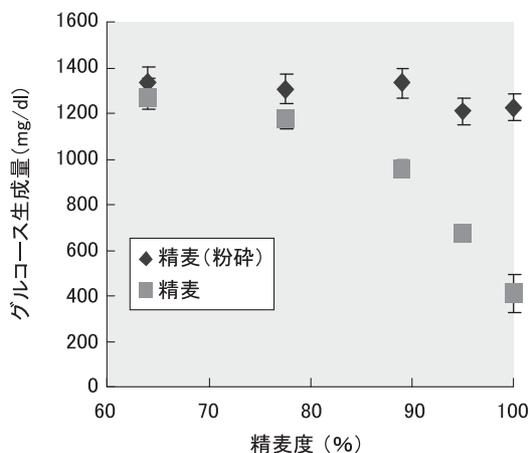


図1. 大麦原料の精麦度の違いによるグルコース生成量の比較

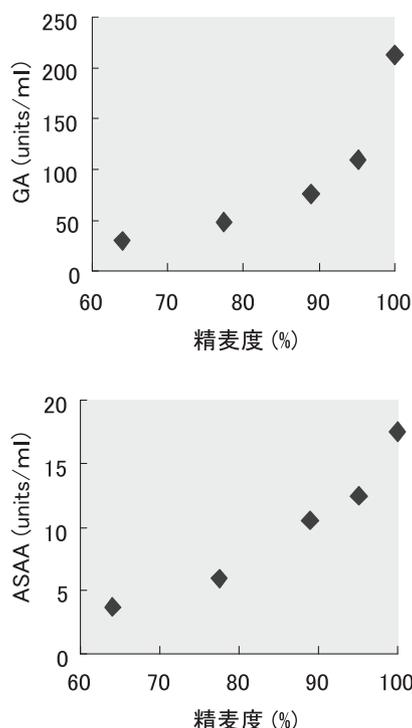


図2. 精麦度の異なる大麦原料を用いた場合の液体麴に含まれるGAとASAA比較

した。一方、これらの原料を粉砕してしまうと、グルコース生成量に差が認められないことから、穀皮の存在が原料溶出を物理的に抑制するものと考えられた。これらの精麦を用いて液体麴を製造した。精麦度の高い原料の方が、GAやASAAの生産量が高いことが判明した(図2)。特に液体培養でのASAAの生産については、長時間培養で生産された報告しかなく⁵⁾、このような簡便な方法で、かつ短時間で、GAとASAAの同時高生産が達成されたことには、驚きを隠せなかった。次に各種原料を用いて培養した際のグルコース量の変化を調べた²⁾。

穀皮を有さない丸麦(65%精麦度に相当)、粉砕玄麦、デンブンをを用いたサンプルでは培養初期に急激にグルコース濃度が上昇し、培養12時間で0.5%以上となった。一方、穀皮を有する玄麦を用いたサンプルは、培養中常に0.1%以下になっていた(図3)。これらの液体麴のGAとASAAの酵素活性を比較すると、筆者らが目標としていた両酵素の同時高生産は、穀皮を有する玄麦を用いたサンプルでのみ達成していることが判明した。このような活性が得られた1つの大きな理由は、低いグルコース濃度を保持し続け、グルコースリプレッションを回避したためと推測している。また、*Aspergillus oryzae*を用いた場合にはあるが、液体麴製造時のメタボローム解析およびマイクロアレイ解析を行った⁶⁾。玄麦を用いた液体

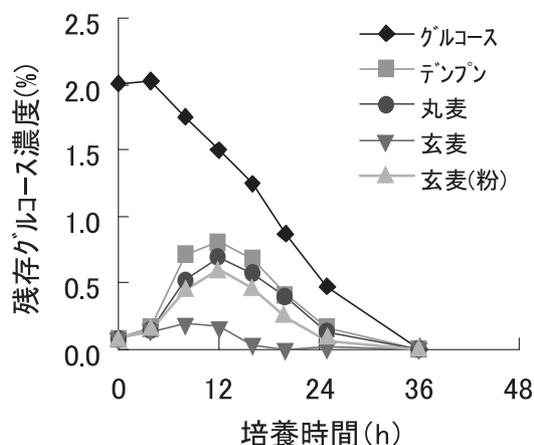


図3. 液体麴培養中のグルコース濃度

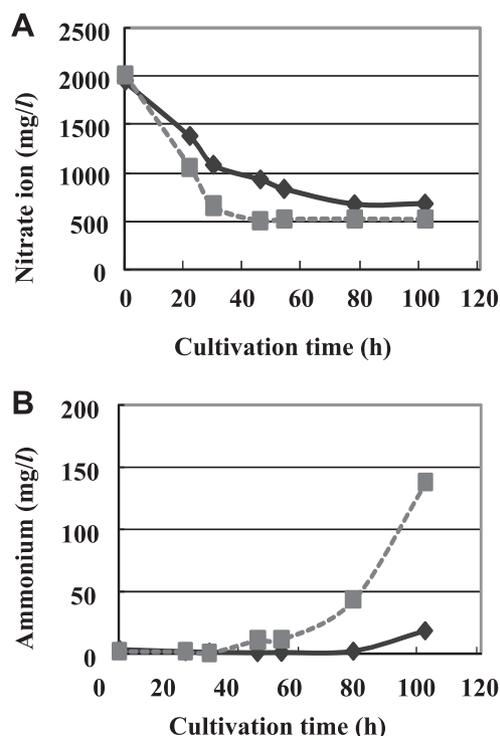


図4. 液体麴培養中の硝酸イオン (A), およびアンモニウムイオン (B) の変遷. 実線が玄麦, 点線が粉砕玄麦.

麴では、培養後半まで硝酸イオンが緩やかに代謝され、アンモニウムイオンの生成も抑制されていた。一方、原料を粉砕した液体麴では、硝酸イオンが急激に代謝され、培養中期からアンモニウムイオンが急上昇した(図4)。玄麦を用いた液体麴では、酵素生産におけるアンモニアリプレッションも回避している可能性もあるのでないかと推測している。さらに、玄麦を用いた場合、培養中期～後期において、窒素代謝関連酵素の遺伝子発現が上昇し

ていた。これらより、培養期間を通じて窒素代謝が維持されることで、酵素生産フェーズが長く続き、結果として酵素が高生産となることが考察された。

液体麴を用いた焼酎製造

発酵試験 筆者らが開発した麦液体麴と、対照として、一般的な麦固体麴を用いた焼酎小仕込み試験を実施した(表1および表2)。両試験区とも良好に発酵した。また、当時の配合では、両方のもろみに含まれる主要酵素力価バランスがよく似ていたこともあり、発酵もろみの重量減少積算量は近似したものとなった(図5)。また、発酵終了もろみのアルコール度数、主要な高級アルコールおよびエステル類の含有量に大差はなかった。

官能評価および機器分析 官能評価で差が生じないか、もう少し大きなスケール(発酵もろみ40 l)にて各焼酎を製造し、当社酒類専門パネルを用いて、定量的記述分析法による調査を行った。サンプルは減圧蒸留を行い、冷却ろ過した原酒とした。用語はS系臭、油臭、酸臭、こげ臭、エステル、原料香、スッキリ感とした。9

表1. 液体麴を用いた場合の配合表

	1次	2次	3次	合計
掛麦 (g)	301	508	508	1319
汲水 (ml)	321	766	273	1360
液体麴 (ml)	500	—	—	500

表2. 固体麴を用いた場合の配合表

	1次	2次	3次	合計
麴麦 (g)	313	—	—	313
掛麦 (g)	—	508	508	1016
汲水 (ml)	500	766	594	1860

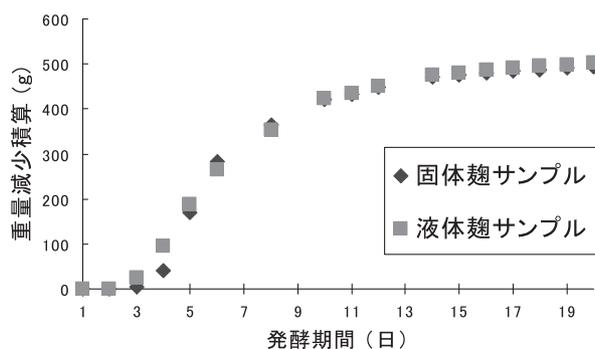


図5. 固体麴および液体麴を用いた焼酎もろみの重量減少量比較

段階評価を行ったが、有意差が得られた項目はなかった。すなわち、質の面で差は認められない似通ったタイプであることが判明した。また、液体麴麦焼酎と固体麴麦焼酎に含まれる揮発成分量をSPME-GC/MS解析した。主要香氣成分に有意差は認められなかったが、閾値に達しない微量5成分に違いが見いだされた。66試料について5成分の分析を行い、定量値を用いた主成分分析により、液体麴・固体麴麦焼酎をグループ化できることが判明した⁷⁾。

醸造特性向上 洗浄殺菌・培地調製時間を考慮すると、現場で2日に1回の出麴を達成するためには、培養時間は42時間程度に制限される。GAやASAAは、培養12時間くらいから活性が検出される。一方、セルラーゼ系の酵素の中には、培養終期(36時間程度)から酵素活性が検出されるものがある。玄麦の使用量を減らすことにより、デンプンが早く消費され、培養後期に生産される酵素群の生産時間が増大し、結果として安定生産に寄与しないか検討した。玄麦量を2.0~1.4%の範囲で調製し、42時間培養した(表3)。玄麦使用量を制限し

表3. 玄麦使用量を変更した液体麴に含まれる酵素活性比較

玄麦使用量 (%)	酵素活性 (units/ml)		
	GA	ASAA	セルロース分解活性
2.0	212	12.3	0.07
1.9	224	11.4	0.08
1.8	225	10.6	0.15
1.7	213	10.2	0.20
1.6	205	9.5	0.17
1.5	195	8.5	0.16
1.4	187	7.4	0.14

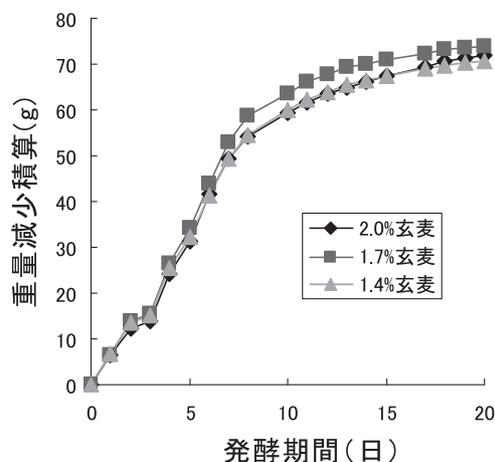


図6. 玄麦使用量を変更した液体麴を用いた焼酎もろみの重量減少量比較

表4. 玄麦使用量を変更した液体麴を用いた焼酎もろみ比較

	アルコール度数 (%)	粘度 (CP)
玄麦2.0%液体麴	18.0	194
玄麦1.7%液体麴	19.2	65
玄麦1.4%液体麴	18.6	69

ても、GAの大幅な低下は認められなかった。ASAAは大麦添加量の多い方が高かったが、極端に低下しなかった。セルロース分解活性は、中間となる1.7%玄麦使用量の場合が一番高かった。玄麦使用量2.0%、1.7%、1.4%の液体麴を用いて、ラボスケールで発酵試験を試みた。1.7%の液体麴を用いた場合、発酵速度が一番早かった(図6)。また、もろみアルコール度数が一番高く、もろみ粘度が一番低いというメリットも判明した(表4)。培地・培養条件を工夫することにより、さらなる酵素バランスの向上が図れるものと期待している。

液体麴を用いた無蒸煮発酵

原料を蒸煮せずに糖化させると、糖化工程中の粘度上昇を抑制できるため、高濃度仕込みが可能となる。焼酎用麴菌を用いて製造した固体麴のGAとASAAには生デンプン吸着部位が存在するため、生デンプンを糊化せずに直接分解できることが知られている。今回筆者らが製造した液体麴を用いても、生デンプンを直接分解できることが判明した⁸⁾。この特性をさらに強化した液体麴を開発し、効率の無蒸煮発酵を検討した。キャッサバはデンプン粒子が大きく、かつ複雑な構造を持つため、分解しにくく、無蒸煮発酵の原料として大きなスケールで成功した例はなかった。パイロットプラントを用いて、1.6 kl発酵スケールのキャッサバ無蒸煮発酵を試みた⁸⁾。雑菌数は10の5乗オーダー以下をキープし、アルコール度数は10.3%にまで到達した。発酵歩合は92.7%と

表5. 液体麴を用いた米および大麦糠無蒸煮発酵試験結果

	原料		発酵条件		結果	
	デンプン含量 (%)	使用量 (kg)	もろみ量 (l)	固形分 (%)	アルコール (%)	発酵歩合 (%)
米粉	74.4	8000	30,025	26.6	13.3	93.5
大麦糠	39.0	8000	19,800	40.4	12.1	95.1

なり、キャッサバ無蒸煮発酵としては、非常に高い数値を得ることができた(図7)。さらに実証設備を用いて、30 kl発酵スケールの米粉、20 kl発酵スケール大麦糠の無蒸煮発酵を試みた(表5)。米粉の場合、雑菌数は10の2乗オーダー付近をキープし、アルコール度数は13.3%にまで到達した。発酵歩合は93.5%と高かった。大麦糠は玄麦から丸麦へと加工する際に発生する副産物である。デンプン含量が少ないため、もろみ中のアルコール濃度を高めるために、固形分40%以上の高濃度仕込みとした。この高濃度仕込みでももろみ粘度が大きく上がらず、雑菌数は10の4乗オーダー以下をキープし、アルコール度数は12.1%にまで到達した。発酵歩合は95.1%と、低デンプン含量原料を用いたにも関わらず、かなり高いものとなった。いずれの場合でも、段仕込みで酵母の優位性を保つ製造法を採用しており、それが功を奏したものと考えている。

今後の展開

筆者らが作り上げた技術を用いて、新しいタイプの焼酎「本格麦焼酎 かのか」を上市した。また、この技術はみりん・みそ・醤油・醸造酢などの発酵飲食品の製造にも展開可能である。今後どのような産物につながるか、引き続き検討を進めていきたいと考えている。

文 献

- 1) Iwashita, K. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1938 (1998).
- 2) Shoji, H. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 203 (2007).
- 3) Ruiter, C. J. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **151**, 103 (1997).
- 4) Sugimoto, T. et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 1985 (2011).
- 5) 赤尾 健ら: *醸協*, **89**, 913 (1994).
- 6) Masuda, S. et al.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2190 (2009).
- 7) Masuda, S. et al.: *J. Inst. Brew.*, **116**, 170 (2010).
- 8) Sugimoto, T. et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s10295-011-1053-1

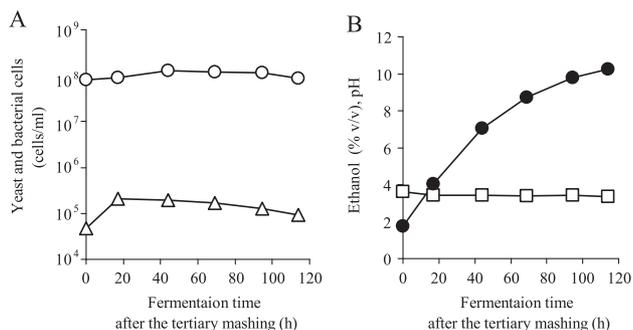


図7. 液体麴を用いたキャッサバ無蒸煮発酵経過。A:酵母数(○)および雑菌数(△), B:もろみアルコール度数(●)およびpH(□)。