

ソバ焼酎製造における麹菌，酵母および酵素等の応用研究(第2報)

水谷 政美*1・工藤 哲三*1・山本 英樹*1・高山 清子*1・柏田 雅徳*2

Study on *Koji*, Yeast and Enzymes in Manufacturing of Buckwheat *Shochu* (II)

Masami MIZUTANI, Tetsuzo KUDO, Hideki YAMAMOTO, Kiyoko TAKAYAMA
and Masanori KASHIWADA

ソバ抽出物によりi-アミルアルコールが増大する原因の究明と影響緩和を図る目的で，酸性プロテアーゼやカルボキシペプチダーゼの影響，香気成分の経時的変化，酸性プロテアーゼの添加量およびソバ抽出物の酵素阻害性について検討した。その結果，酸性プロテアーゼにより影響緩和が可能であり，0.01～0.02%の添加濃度で酒質改善が可能であると考えられた。また，アミノ酸と有機酸量は香気成分量の増減と複雑に関与していることが推察された。

キーワード：ソバ，焼酎，酵母，酵素，香気成分，酸性プロテアーゼ

1 はじめに

ソバ焼酎は，国内シェアの高い本県特産品である。しかし，最近の大手メーカーの焼酎業界への参入により競争が激化している。それゆえに，消費者の嗜好の多様化に対応した個性的な焼酎の開発など，品質や生産性の向上が必須となってきた。

ソバ焼酎の製造において，原料ソバのタンパクが酵母の作る香気成分量に影響を及ぼし，n-プロピルアルコール(n-PrOH)量が少なくi-アミルアルコール(i-AmOH)量が多いことに起因して苦味が発生することを報告してきた¹⁻⁵⁾。また，香気成分のバランスが変化して苦味が発生することも報告してきた。この影響を回避する方法として，酵母と麹，水麹や酵母の混合仕込について検討してきた⁶⁾。今回，酵素を用いて，原因と影響緩和について検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 発酵試験

発酵試験は，グルコース10%，酵母エキス1%，ペプトン2%の培地100mlにソバ抽出物を0.1%

添加し，オートクレーブ滅菌(121℃，21min)後，酵母(宮崎酵母 10^7 個/ml) 1mlを加え28℃で7～14日静置培養を行った。なお，酸性プロテアーゼ(*Aspergillus saitoi*, シグマアルドリッチジャパン(株))および酸性カルボキシペプチダーゼ(wheat, 和光純薬工業(株))は，滅菌後の培地に0.1%添加した。

2-2 香気成分等の測定

香気成分は，発酵液10mlにNaCl1.0gを加えn-ヘキサンで抽出後，ガスクロマトグラフ(カラム：DB-WAX, ϕ 0.53mm×30m, 検出器：FID)を用いて分析した。また，生成したエチルアルコール量は，簡易アルコール測定器(理研計器, AL-2)を用いて測定した。

培養液のアミノ酸は，培養液2mlに0.5mlの0.1N HClを加えろ過後(0.45 μ)，0.02N HClで6倍に希釈したものをアミノ酸分析機を用いて分析した。また，有機酸は，培養液を水で5倍希釈後ろ過(0.45 μ)し有機酸分析機を用いて分析した。

酸性プロテアーゼの活性測定は，国税庁所定分析法⁷⁾に準じて行った。なお，緩衝液にソバ抽出物を添加したことから，それぞれについてブランクを測定し，その差から活性を求めた。

*1 応用微生物部

*2 現 食品開発センター所長兼食品開発部長

3 結果および考察

3-1 酸性プロテアーゼおよびカルボキシペプチダーゼの影響

ソバ抽出物添加により発酵がやや促進されたが、炭酸ガス減量から判断して、培地に酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼを添加することによる影響はなかった(図1)。

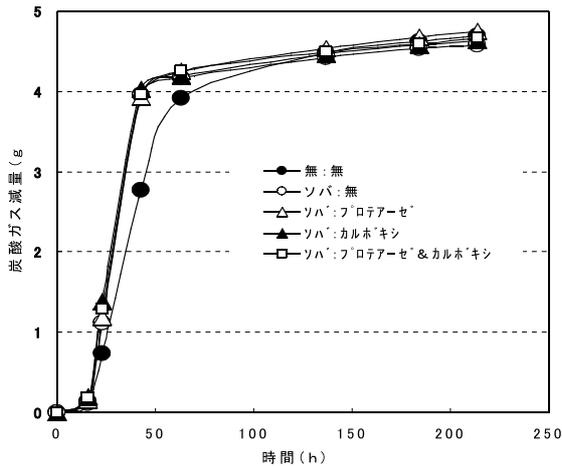


図1 炭酸ガス減量による発酵経過

発酵終了後の培地の香り成分量を測定した結果を図2に示す。ソバ抽出物を添加することによりi-アミルアルコールが増加したが、酸性プロテアーゼを添加することによりi-アミルアルコールの大幅な減少が認められた。一方、カルボキシペプチダーゼの添加では、香り成分量の変化は生じなかった。

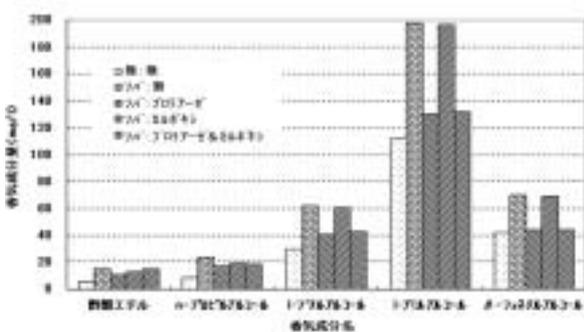


図2 香り成分量への影響

発酵液中のアミノ酸量は、ソバ抽出物を添加することにより、Thr, Ser, Ile, Leu, PheおよびLysが減少した。これに酸性プロテアーゼを添加することにより、アミノ酸の大幅な増加が認められた(図3)。特にGlu, Ala, Leu, LysおよびArgのアミノ酸の変化が顕著であった。これは、酸性プロテアーゼの添加により培地中のタンパクが分解され、これらのアミノ酸が増加したものと考えられた。三枝らは⁸⁾、高アミノ酸度状態ではi-アミルアルコール生成が抑制されることを報告しており、この場合においてもアミノ酸量と香り成分量は逆の関係が認められたことから、酸性プロテアーゼの添加により高アミノ酸状態となり香り成分生成量が減少した可能性が考えられた。また、カルボキシペプチダーゼの添加では、アミノ酸の若干の増加が認められたが、香り成分量の変化を及ぼす程度ではなかったと推定された。

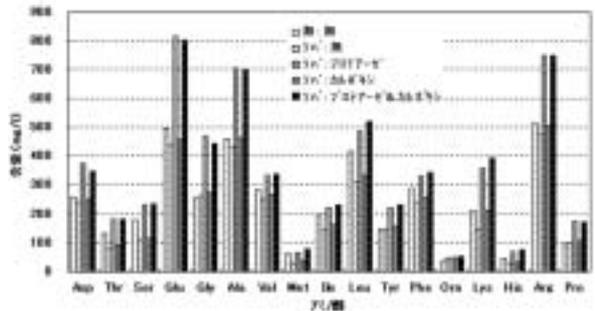


図3 アミノ酸量への影響

有機酸量はアミノ酸量ほどの変化は認められなかったが、クエン酸、酢酸およびピルビン酸はアミノ酸と、またリンゴ酸とコハク酸は香り成分とほぼ同じ挙動をしており、何らかの関与が考えられた(図4)。

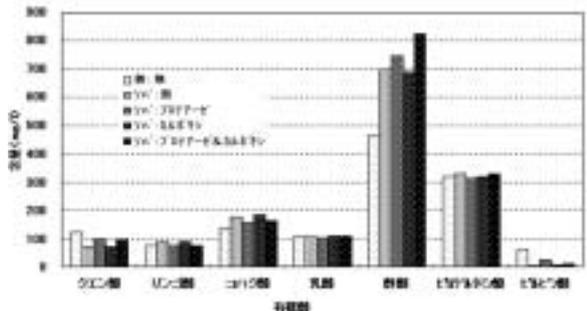


図4 有機酸量への影響

以上のように、ソバ抽出物や酵素の添加により香気成分、アミノ酸および有機酸の量が影響を受けていた。また、ソバ抽出物や酵素以外にも香気成分等に影響を及ぼす物質もあり得ることから、さらに検討していく必要があると思われた。

3-2 香気成分量の経時変化

対照(図5)、ソバ抽出物添加(図6)およびソバ抽出物と酸性プロテアーゼ添加(図7)での発酵における香気成分の経時変化を測定した。

どの条件においても β -フェネチルアルコール以外の香気成分は、比較的発酵初期にピークとなり、 β -フェネチルアルコールは徐々に増加することが確認された。なお、酢酸エチルは、揮散により発酵後半に減少に転じたと考えられた。ソバ抽出物添加により*i*-アミルアルコール生成量が大幅に増加するが、酸性プロテアーゼを添加することにより、*i*-アミルアルコールの生成が発酵初期から抑制されることが確認された。

3-3 酸性プロテアーゼの添加量と成分変化

酸性プロテアーゼの添加量を0から0.5%と変化させ、香気成分量等にどのような影響を及ぼすか検討した。

炭酸ガス減量から酸性プロテアーゼ添加量が0.01~0.2%では発酵に影響ないが、0.5%と多量に添加すると発酵に影響することが分かった(図8)。

酵素添加量と香気成分量について図9に示す。酵素添加量が0.1%までは各成分とも減少しているが、0.2、0.5%と高くなると β -フェネチルアルコール以外の成分は逆に増加する傾向が見られた。図10に*i*-アミルアルコールと*n*-プロピルアルコール量の差の変化を示した。酵素添加量が0.01~0.1%までは差が小さくなっているが、0.1%を超える添加量ではほとんど同じレベルであった。ソバ焼酎の苦味がこの差が大きくなると発生しやすくなることから、この発酵系においては酸性プロテアーゼを0.01~0.02%添加することにより酒質の改善が可能であると考えられた。

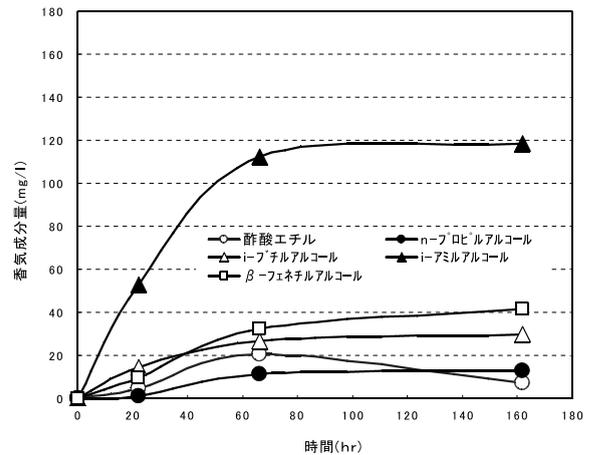


図5 香気成分の経時変化(対照)

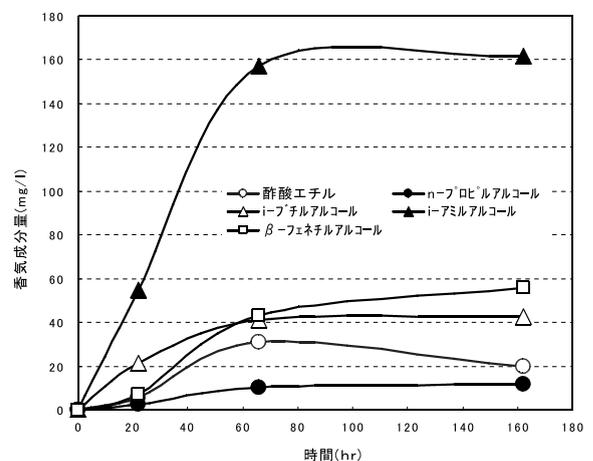


図6 香気成分の経時変化(ソバ抽出物)

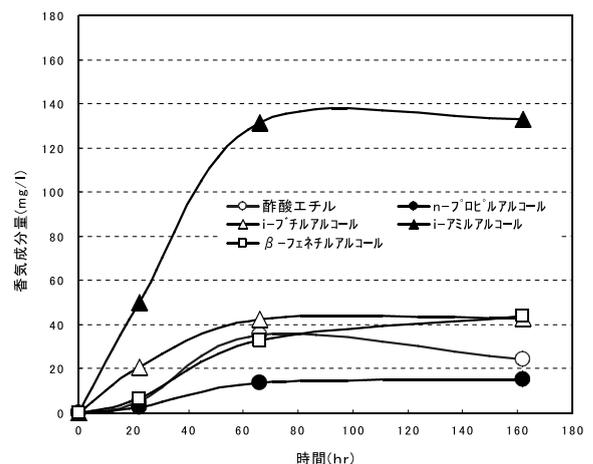


図7 香気成分の経時変化(ソバ抽出物および酸性プロテアーゼ)

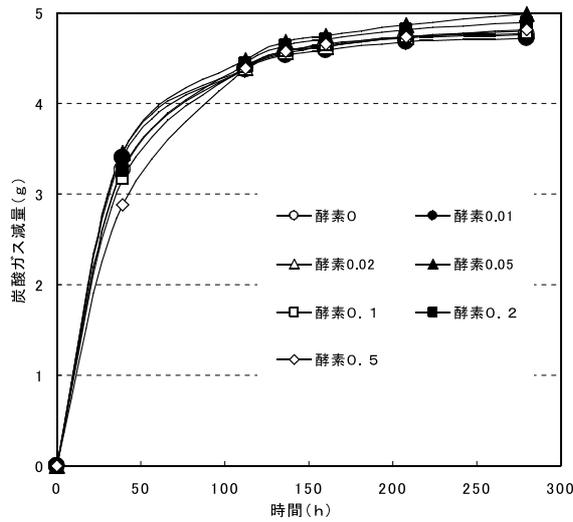


図8 酵素添加量と炭酸ガス減量

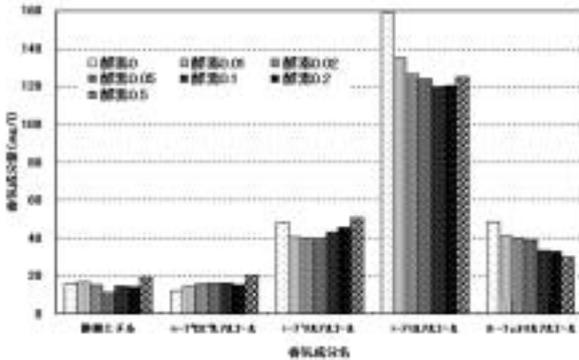


図9 酵素添加量と香気成分量

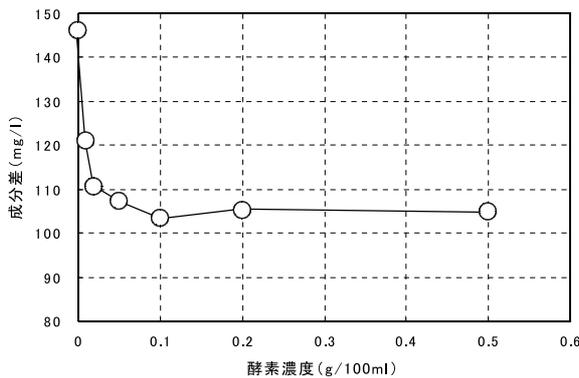


図10 酵素添加量とi-アミルアルコールとn-プロピルアルコールの差

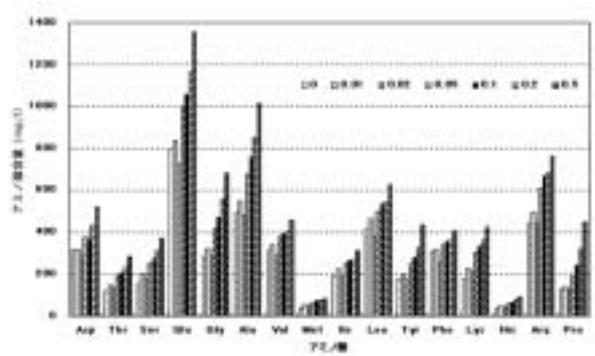


図11 酵素添加量とアミノ酸量

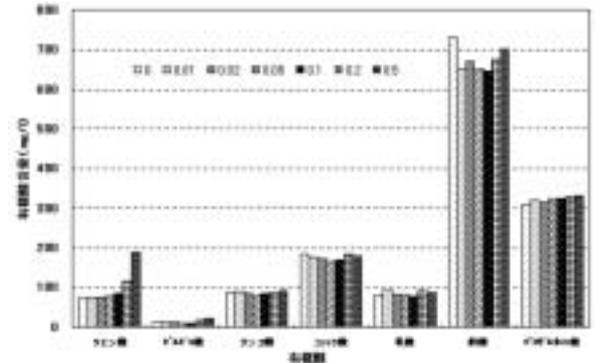


図12 酵素添加量と有機酸量

発酵液中のアミノ酸量を測定すると、図11に示すように、全てのアミノ酸が酸性プロテアーゼ添加量が多くなるにつれて増加していた。特にGlu, ArgおよびAlaの量が多くなっていた。アミノ酸量が増加しても逆に香気成分量は減少するという逆の関係になっていたが、酵素濃度が0.5%と高くなると、アミノ酸量が増加しても香気成分量が増加する現象が生じた。これについては単純にアミノ酸量だけで説明できないことから、さらに今後検討を加えていきたい。

有機酸量については、リンゴ酸、コハク酸、酢酸など香気成分量と同じ挙動をしていた。有機酸、アミノ酸および香気成分は、代謝経路上繋がっていることから、さらに実験を行い検討していく。

3-4 酸性プロテアーゼとソバ抽出物

ソバ抽出物を添加して発酵試験を行うと、アミノ酸量が減少していた。ソバ抽出物がプロテアーゼ活性を阻害することにより、タンパクの分解が

進まず低アミノ酸状態となり、香气成分が増加することも考えられた。そこで、ソバ抽出物を添加して黒麹、白麹および黄麹の酸性プロテアーゼ活性を測定したところ、表1に示したとおり阻害は認められなかったことから、酵素阻害とは異なる原因で低アミノ酸状態が発生していると考えられた。

表1 酸性プロテアーゼ活性比較

	黒麹	白麹	黄麹
対照	20.3	26.1	15.9
ソバ抽出物添加	23.3	28.7	17.8

単位： $\mu\text{g}\cdot\text{Tyr}/\text{hr}$

4 まとめ

ソバ抽出物によりi-アミルアルコールが増大する原因の究明と影響緩和を図る目的で、酸性プロテアーゼやカルボキシペプチダーゼの影響、香气成分の経時的変化、酸性プロテアーゼの添加量およびソバ抽出物の酵素阻害性について検討したところ、以下のことが分かった。

- ①酸性プロテアーゼ添加によりi-アミルアルコール生成が抑制されるとともに、アミノ酸、有機酸量が増加することが確認された。
- ②酸性プロテアーゼを0.01~0.1%添加することによりi-アミルアルコール量が減少したが、0.1%を超えると逆に増加に転じた。
- ③香气成分の生成は、酸性プロテアーゼにより発酵初期から徐々に抑制されていた。
- ④ソバ抽出物は、酸性プロテアーゼ活性を阻害しなかった。

なお、実際の醸造条件での確認試験や理論などさらに検討する必要がある。

5 参考文献

- 1) 水谷政美,工藤哲三,日高照利,柏田雅徳,宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター報告,43,117(1998)
- 2) 水谷政美,工藤哲三,日高照利,柏田雅徳,宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター報告,44,125(1999)
- 3) 水谷政美,日高照利,工藤哲三,岡崎益己,柏田雅

徳,醸協,97(6),461-467(2002)

- 4) 水谷政美,工藤哲三,岡崎益己,柏田雅徳,宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター報告,47,123(2002)
- 5) 水谷政美,工藤哲三,山本英樹,柏田雅徳,宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター報告,48,131(2003)
- 6) 水谷政美,工藤哲三,山本英樹,柏田雅徳,宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター報告,49,107(2004)
- 7) 第四回改正国税庁所定分析法注解,223(2003)
- 8) 三枝維彦,原田倫夫,醸協,89(6),435-440(2003)