

# 多様な清酒開発に向けた製麹技術基盤の構築（第2報）

## Development of a Koji Making Technology Platform for the Development of Diverse Sake (2<sup>nd</sup> report)

会津若松技術支援センター 醸造・食品科 中島奈津子 松本大志 渡辺愛奈

県産品加工支援センター 企画支援チーム 齋藤嵩典

焼酎用として使用されてきた白麹を清酒製造に活用するため、製麹方法や黄麹との比較したときの特徴について調べた。清酒製造時に黄麹で製麹するときとほとんど変わらない方法でも麹酸度をコントロールできることがわかった。また、白麹には菌体量と酵素力価において黄麹と異なる挙動を示した。また、麹の長期保存時の環境と酵素力価の変化についても確認した。さらに、白麹の特徴である酸味を清酒に付与するための方法として、四段糖化について検討し、出麹酸度をもとに四段糖化終了時の酸度を推測するための方法を示した。

**Key words:** 白麹、製麹、グルコアミラーゼ、糖化

### 1. 緒言

麹は、清酒の香りや味を左右し、清酒製造における要とされる。本研究では、一般的な黄麹に加え、新たに黒麹や白麹を活用する技術を開発することにより、目指す酒質に合わせた多様な新製品開発を支援し、県産清酒の販路拡大を図ることを目標としている。

昨年は、平成20年から実施してきた県内酒造場で製麹された麹の酵素力価を多変量解析し、麹の品質に及ぼす要因について抽出した。また、その結果をもとに小スケール製麹を行い、麹の酵素力価に影響する大きな要因が初期水分であり、一方、製麹工程における手入れは酵素生成に大きな影響はないことを明らかにした。すなわち、原料処置に注意を払えば、手入れ作業はスケジュールによっては割愛してもよく、製造労務管理の見直しにも活用できるものと思われた。また、麹の酵素力価には製麹時の原料の物量に影響している可能性も明らかにした。なかなか力価が出ないという製造場に対しての新たな改善の視点となると思われる。

これをふまえ、本年は、新たな香味を付与するとして注目され使用頻度も高まりつつある白麹を対象とした。清酒製造に白麹を使用する目的の一つは黄麹にはない酸(クエン酸)の生成である。これまで、仕舞仕事以降から出麹までの品温が白麹の酸度に影響すると言われているが、これは焼酎用の製麹に関する報告であり、清酒においては原料および原料の保水性が異なるため挙動が異なる可能性がある。また、これまで黄麹の製麹を行ってきた製造場では、白麹の製麹管理を一から習得するのはハードルが高い。そこで、製麹途中までは黄麹と同じ温度経過を取る方法で試験を行い、麹酸度への影響について調べた。また、精米歩合の違いによる影響、また黄麹と白麹の特徴比較、加えて麹を長期保存時の保存環境による酵素力価への影響も調査したので報告する。さらに、白麹の特徴である酸味を付与するための方法として糖化液の添加について、

出麹酸度から糖化終了時の酸度を予測するための計算方法を提案する。

### 2. 実験

#### 2. 1. 白麹を用いた製麹試験

##### 2. 1. 1. 最終品温が異なる製麹

製麹：原料は福島県産五百万石(精米歩合 50%)、種麹には焼酎用 K 菌 (株ビオック) を 100g/100kg 白米量で使用した。最高品温以降、出麹までの温度維持を 30°C、35°C、40°C でそれぞれ行う 3 つの試験区を設定し、2 回試験を行った。製麹温度は、1 回目：34°C24h、38°C4h、42°C11h、温度別 6.5h の計 45.5h、2 回目：32°C24h、36°C7h、42°C3h、温度別 11h の計 45h で実施した。

麹酸度の測定：常法<sup>1)</sup>に従った。すなわち、麹 20g に水 100ml を加え、室温(20°C)にて時々振り混ぜながら 3 時間静置し、ろ過して試料を得た。これを総酸アミノ酸滴定装置(京都電子(株))にて 1/10N 水酸化ナトリウムで pH6.2 まで滴定し、滴定量を総酸度とした。

菌体量の測定：既報<sup>2), 3)</sup>により糸状菌の細胞壁構成成分である N-アセチルグルコサミン (N-AcGlcNH<sub>2</sub>) を定量した。すなわち、米麹を 100°C で 1 時間乾燥後、バイブレーションミルで粉砕した。米麹粉末 2g を 50mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で 3 回洗浄後、ヤタラーゼを 10mg/mL 含む 50mM リン酸緩衝液 (H7.0) を添加し 37°C 1 時間反応させ細胞壁を溶解した。9000rpm, 5 分遠心して得た上清 0.5mL に対し、0.8M 四ホウ酸カリウム溶液 (pH9.1) を 0.1mL 添加し、沸騰水中で 3 分加熱した後水冷した。これに p-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液 (10N 塩酸を 12.5%(v/v) 含む氷酢酸 100mL に p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 10g を溶解したものを使用時に氷酢酸にて 10 倍希釈) 3mL を加え、37°C で 20 分呈色反応させた。分光光度計にて A585 を測定し、N-AcGlcNH<sub>2</sub> を用いて作成した検量線により試料中に含ま

れる N-AcGlcNH<sub>2</sub> 量を算出した。

また、N-AcGlcNH<sub>2</sub> 量から菌体量への換算は、既報<sup>4)</sup> に従い、乾燥麹菌体 1mg あたりに含まれる遊離 N-AcGlcNH<sub>2</sub> を 139 $\mu$ g として算出した。

酵素力価の測定：キッコーマンバイオケミファ(株)製の醸造分析シリーズを用い、添付のプロトコルに従って測定した。なお、 $\alpha$ -アミラーゼは試料を 5 倍希釈して測定した。

## 2. 1. 2. 精米歩合および菌種が異なる製麹

製麹：原料は福島県産五百万石(精米歩合 50%および 70%)、種麹には(株)菱六の白夜(黄麹)と(株)ビオックの焼酎用 K (白麹) を 100g/100kg 白米量で使用した。恒温槽の庫内温度を 30°C20h、32°C9h、32°C24h に設定し、製麹を行った。

麹酸度の測定：2. 1. 1. と同様にして行った。

菌体量の測定：2. 1. 1. と同様にして行った。

酵素力価の測定：2. 1. 1. と同様にして行った。

## 2. 2. 白麹酵素活性への保存温度の影響

2. 1. 1. で製麹した麹を 10g ずつポリエチレン製のチャック付き袋に分け、5°C、1°C、- 18°C、- 40°C、- 80°C の恒温槽に保管し、保存後 1 週間、2 週間、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月後の酵素力価を測定した。保存および測定は 3 連で実施した。

酵素力価の測定は 2. 1. 1. と同様にして行った。

## 2. 3. 白麹を用いた糖化試験

表 1 に示す仕込配合にて清酒製造における四段仕込を想定した糖化試験を行った。糖化は恒温水槽にて、55°C の湯浴中で 7 時間行った。白麹は麹酸度 5.0、グルコアミラーゼ力価 600U/g・koji のものを使用した。

糖化途中の糖度(Brix)および 7 時間後の試料の糖度(Brix)、日本酒度、pH、酸度を測定した。糖度(Brix)の測定は糖度計(アタゴ)、日本酒度は SDK 迅速アルコール測定システム(京都電子)、酸度は試料を希釈し、総酸アミノ酸滴定装置(京都電子)にて pH6.2 を終点としたときの 1/10N 水酸化ナトリウムの滴定量とした。

表 1 白麹を用いた糖化試験仕込配合

試験区	白麹(g)	水(g)	水/麹
1	200	200	1
2	200	280	1.4
3	100	200	2
4	100	300	3
5	50	250	5

## 3. 結果

### 3. 1. 白麹を用いた製麹試験

#### 3. 1. 1. 最終品温が異なる製麹

仕舞仕事以降の出麹までの最終品温を 30°C、35°C、40°C にして製麹を行ったときの麹酸度と菌体量の結果を表 2 に示す。試験 1 ではシャーレ内での製麹、試験 2 はバット内での製麹を行った。試験 1 では、3 試験区での菌体量はほぼ変わらないものの、出麹温度が低いほど麹酸度が高かった。また、試験 2 では 30°C の試験区で過乾燥となってしまった。結果、麹の生育が阻害され、菌体量が著しく低くなった。ただし、麹酸度については 35°C の方が 40°C よりも高く、低温の方が酸度が高くなり、試験 1 と同様の傾向であった。

表 2 出麹温度が異なる試験区における麹酸度と菌体量

	出麹温度	麹酸度 (mL)	菌体量 (mg/gkoji)
試験 1	30°C	5.00	3.1
	35°C	3.49	3.1
	40°C	1.98	2.6
試験 2	30°C	0.77	1.0
	35°C	2.43	2.7
	40°C	1.18	2.2

#### 3. 1. 2. 菌種および精米歩合が異なる製麹

菌種および精米歩合の異なる製麹の結果を表 3 に示す。菌種の違いで比較すると、液化酵素  $\alpha$  アミラーゼの力価が白麹では著しく低く、糖化酵素グルコアミラーゼは白麹の方が高くなる傾向が見られた。また、黄麹については品温経過を白麹と同様にしても酸度の上昇は見られなかった。菌体量は黄麹が白麹の約 2 倍であり、前報の結果とも一致した。

精米歩合の違いで比較すると、精米歩合が高いほど酵素力価および菌体量が高くなり、白麹については、麹酸度も高くなった。

表 3 菌種および精米歩合が異なる製麹結果

種麹	精米歩合	酵素力価(U/g koji)			麹酸度 (mL)	菌体量 (mg/gkoji)
		グルコ アミラーゼ	$\alpha$ アミラーゼ	酸性カルボ キシペプチ ダーゼ		
白麹	70%	337	16	4211	4.38	3.3
白麹	50%	175	10	1928	2.69	3.1
黄麹	70%	201	537	3587	0.18	6.5
黄麹	50%	58	190	2452	0.23	5.2

白麹と黄麹について、菌体量と酵素力価の関係を図

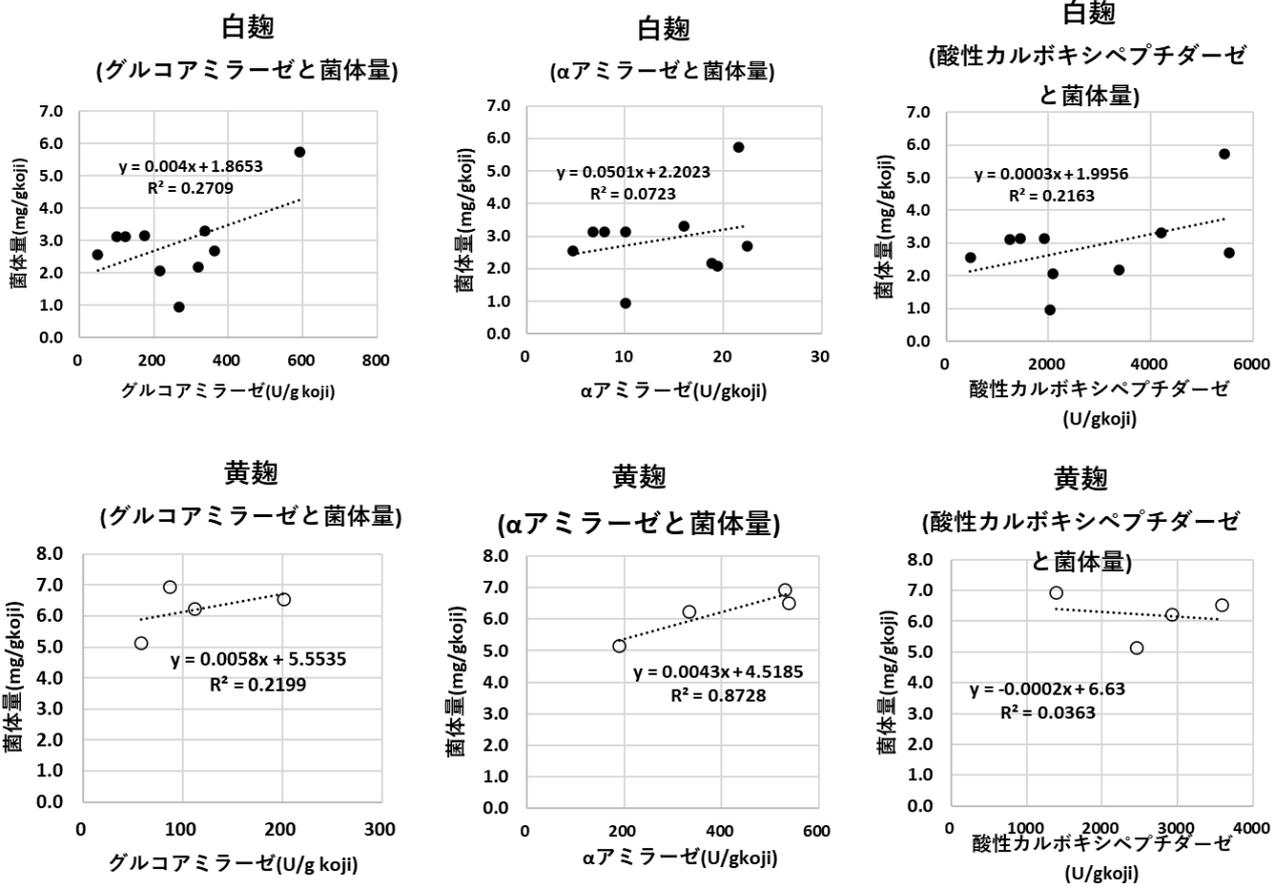


図1 白麹と黄麹における酵素力価と菌体量の関係

1に示す。菌体量と正の相関がみられたのは黄麹におけるαアミラーゼのみであった。

### 3. 2. 白麹酵素活性への保存温度の影響

保存後、1週間～6か月時点での酵素活性の変動を図2に示す(αアミラーゼは非表示)。グルコアミラーゼは-40℃の試験区を除いてほぼ10%以内の変動で安定していた。また、酸性カルボキシペプチダーゼはいずれの試験区でも保存後1ヶ月までに増加し、その後は変動なく安定していた。なお、5℃と1℃の保存区は4か月ごろから白麹以外のカビが生え始めた。参考として6か月保存の試料の酵素力価を測定したところ、

グルコアミラーゼおよびαアミラーゼの活性は変動していないものの、酸性カルボキシペプチダーゼの活性のみがおよそ140%増加していた。

### 3. 3. 白麹を用いた糖化試験

配合の異なる糖化試験の結果を表4に示す。また、この結果および麹酸度の異なる複数の白麹を水/麹=2の比率(汲水歩合200%)で同様に7時間糖化して得たBrix値を用い、白麹の麹酸度と糖化終了後の酸度の関係を図3グラフ1に示した。また、各試験区の糖化後酸度を水/麹=1の時の酸度を1として換算した値(係数)と水/麹の比率(汲水歩合)との関係を図3グラフ2に示した。

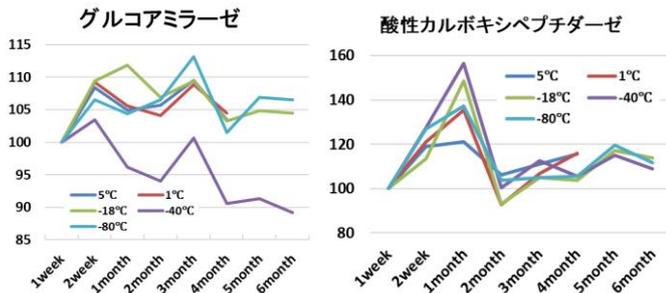
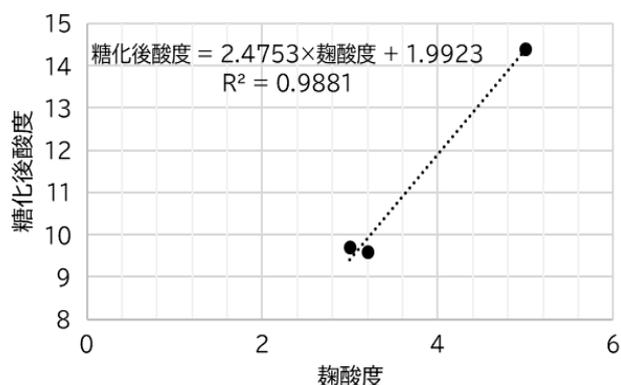


図2 白麹の酵素活性への保存温度の影響

表4 白麹を用いた糖化試験結果

試験区	pH	酸度	糖度 (Brix)	日本酒度
1	2.98	21.5	40.4	-20.1
2	3.00	18.6	36.0	-17.1
3	3.01	14.4	31.0	-14.4
4	3.05	10.6	20.8	-10.6
5	3.09	7.2	15.4	-7.6

グラフ1：麴酸度と糖化後酸度の関係 ※汲水歩合 200%のとき



グラフ2：汲水歩合が異なる場合の換算係数

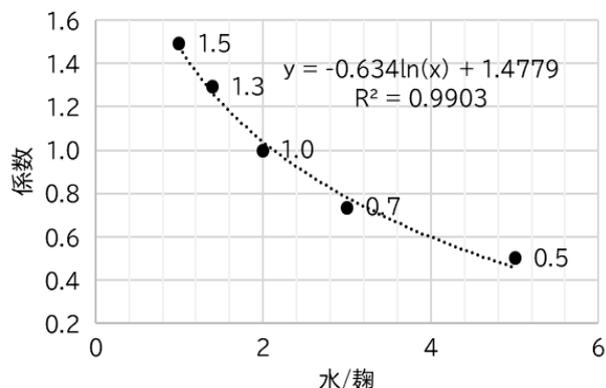


図3 白麴の麴酸度と糖化後酸度の関係および汲水歩合が異なる場合の換算係数

## 4. 考察

### 4. 1. 白麴を用いた製麴試験

#### 4. 1. 1 最終品温が異なる製麴

白麴は黄麴と異なり、製麴工程において温度を徐々に下げていく。温度を下げることでクエン酸が生成され酸度が高くなることが経験的に知られていたが、そのメカニズムについては、クエン酸輸送体の制御によるクエン酸の菌体外分泌機構が遺伝子レベルで明らかになったものの、まだ完全には解明されていない。そのため、製造現場においては、具体的な品温の目安がなく、仕上がりの麴酸度の管理は経験則に基づいている。また、これまで報告されている白麴の製麴は、焼酎製造が中心で、清酒とは原料が異なるため、清酒用麴の製造の環境や製麴温度とは異なり、清酒製造場が参考にしにくい面があった。

今回、通常は黄麴を用いて清酒製造を行っている現場でスムーズに白麴を使えることを目指し、環境や最高品温までの温度経過は黄麴での製麴と同じとし、最高品温以降、出麴までの温度管理のみを変えた場合の麴の品質や麴酸度について試験を行った。

清酒と同様の製麴経過を取った場合でも、出麴時の温度を変えることで酸度の調製ができることが明らかになった。清酒麴での出麴温度は40℃程度であるが、この条件では白麴を用いた場合でも麴酸度は上がらず、求める酸味は得られない。

#### 4. 1. 2. 菌種および精米歩合が異なる製麴

昨今の原料米高騰およびSDGsへの取り組み、また製品の多様性へのニーズを受け、精米歩合の高い清酒製造法についても関心が高くなっている。本試験では、精米歩合70%と50%での比較を行ったが、白麴にお

いては精米歩合70%の方が酵素力価、麴酸度とも高くなる結果となった。栄養価が高く、酵素の基質も多く含まれるためと考えられるが、菌体量に大きな差が見られないという点が興味深い。栄養価のみが理由であれば、麴菌の生育も促進され、菌体量も多くなると考えられる。しかし、今回の結果からは、白麴の菌体量は精米歩合によらず、また黄麴菌よりも少ない菌体量で大量の酵素生産を行っていることがわかる。

菌体量が少ないことは、製造する酒類の呈味にも影響を及ぼす可能性がある。麴菌の細胞壁には疎水性タンパク質であるヒドロフォピンが含まれており、疎水性タンパク質は一般的に苦味を呈する。菌体量が多い麴を用いて製造した清酒は、苦味や雑味が多く、キレイさを欠くことが多い。一方、白麴で製造した市販の酒類では苦みや雑味を指摘されにくい傾向があった。この理由のひとつが白麴の菌体量の少なさである可能性を示す結果と考える。

また、白麴は黄麴とは大きく異なる酵素生成機構を持つと予測されている。特に、耐酸性のアミラーゼ遺伝子が黄麴よりも多く、高い糖化力に寄与している可能性が示唆されているが、それら複数のアミラーゼの発現制御機構は複雑で、トリガー物質や転写因子の探索を含めて精力的に研究が進められているものの、全ては明らかになっていない。今回の結果では、白麴においては菌体量と酵素生産には相関は見られなかった。一定の菌体量でも大量の酵素生産を行える機構を有している可能性を示唆していると考えられる。

なお、グルコアミラーゼが高すぎると、清酒の製品化工程における熱殺菌処理においてタンパク質が変性し、製品に濁りを生じる「白ボケ」を引き起こし製品価値の低下を招く。焼酎ではもろみ製造後に蒸留工程があるため、製品にタンパク質が残存することはなく、この問題はなかったが、清酒に白麴を使用する場

合には、白ボケのリスクがあることも分かった。白麴を用いた場合に白ボケを生じる条件や回避策についての検討も今後必要と考える。

#### 4. 2. 白麴酵素活性への保存温度の影響

近年、発酵タンクや貯蔵タンクの冷却設備導入が進み、これまで冬期間のみであった清酒製造期間が年間を通して行えるようになり、従事者も季節労働型から通年雇用型に変化している。年間を通して清酒造りを行うにあたり、課題となるのは麴造りである。麴室は室内温度と外気温の差を利用して室内の湿度調整を行う。そのため、室温と外気温の差が小さくなる、または場合によっては反転してしまう夏期は、機械製麴機など外気温の影響を受けない設備を保有する製造場以外では、製麴作業を行うのは困難となる。

そこで、冬期間にまとめて製麴を行い、冷凍保存して冬季以外の仕込みに使用する方法が広く用いられている。保存により、麴の酵素力価が極端に下がることがあればこの方法は採用できない。

今回の結果では、グルコアミラーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼとも酵素活性を維持し、半年までは保存に耐えることがわかった。しかし、これは氷温域に限られており、冷蔵庫での保管は白麴以外のカビが生えてしまい保管には適さない。また、カビが生えた試料を測定したところ、グルコアミラーゼは変化しないが、酸性カルボキシペプチダーゼが増えていた。これは保存中に生育した菌類が生産しているものと思われる。

なお、氷温域での保存は1年半程度の保存まで継続確認する予定である。

#### 4. 3. 白麴を用いた糖化試験

白麴の酸味を清酒に付与するには、もろみの三段仕込みの際に黄麴の代わりに白麴を用いる方法が考えられるが、この方法では発酵中に白麴由来のクエン酸が酵母により代謝され、仕上がりの味わいを予測しにくい。そこで、糖化四段仕込による香味付与方法について検証した。糖化四段仕込は、清酒製造において甘味の調整等のために行われる方法である。麴と水を用いて糖化酵素の至適温度である 55℃付近で6～7時間保持して甘酒様とし、これを発酵中のもろみに添加することでもろみに甘味を付与する。添加後すぐに上槽（搾り）を行う場合と、添加により増加した糖分を用いてさらにアルコール発酵を進め、上槽する場合がある。一般的には黄麴で行われる糖化四段を白麴で行うことにより、甘味に加え酸味も付与されることが期待され、さらに、酵母の代謝による変化も少ないと考えられる。

四段糖化終了時の酸度が予測できれば、添加するもろみの酸度との個数計算により添加後の酸度を算出

できる。よって、本研究では四段糖化終了後の酸度を予測するための方法を構築することを目標とした。麴酸度の異なる白麴を用い、糖化終了後の酸度と糖化に用いる麴酸度の関係を直線近似とし（図3グラフ1）、また、糖化時の水と麴の配合の違いと糖化終了時の酸度の関係を対数近似した（図3グラフ2）。この2つのグラフを用いることで、製造した白麴の麴酸度を元に四段糖化終了時の酸度の予想ができる。

例えば、麴酸度4、水/麴=1.5（汲水歩合150%）の時、グラフ1を用いて麴酸度4の麴を使用したときの仕上がり酸度を1.2と読み取る。これは汲水歩合200%の時の予測値である。次に、グラフ2で汲水歩合の換算係数を読み取る。汲水歩合150%の時は1.2である。最後に、グラフ1とグラフ2で得たそれぞれの数値を掛け合わせ、糖化終了後の糖度を予測する。この場合は、 $12 \times 1.2 = 14$ が予測値となる。

出麴時の温度によって酸度の調整が可能になることはこれまでの焼酎麴の報告や本研究でわかってきた。しかし、目標の麴酸度を狙って製麴することは、まだ困難である。仕上がりの麴酸度を元に四段糖化終了時酸度を予測することができれば、もろみ添加後の仕上がり酸度と香味の調整に役立てられると考える。なお、この方法は市販の白麴を用いた場合でも活用できる。白麴を活用したいが、製麴へのハードルで躊躇しているという製造場においては本法を用いて多様な製品開発に繋げていただければ幸いである。

なお、本法については、白麴試料の追加等により順次改定し、精度を高めていく予定であり、グラフ1および2については今後修正される可能性もある。

白麴については、清酒に新たな香味を付与するとして注目され、使用頻度も高まってきている。一方、本研究で行ってきたように、高すぎる酵素力価による製品の混濁、また、生育が遅く、分生子（孢子）を形成しやすいという特徴から、オフフレーバーであるカビ臭を付与しやすいという可能性も懸念されている。その他、これまでの技術相談や市販酒分析により、黄麴では見られにくいオフフレーバーを生成する可能性も見出している。これらについては現在研究を進めており、追って報告する。白麴はこれまで蒸留酒製造に使われてきたため、醸造酒に活用することで今まではわからなかった製造場のリスクや特徴をもつ可能性がある。これらについての報告はなく、麴菌の多様性についての新たな知見になると期待している。

## 5. 結言

白麴を用いた製麴試験を行った。一般的な白麴の製麴温度ではなく、最高品温までは清酒用黄麴の製造と同じ温度経過をとりそれ以後の温度が麴酸度に及ぼす影響について検証した。黄麴と同様の経過であっても最終品温が低いほど麴酸度は高くなり、また、品温経過は麴菌

体量に影響しないことがわかった。

また、麴酸度は精米歩合が高いほど高くなり、酵素力価も高くなった。なお、白麴は黄麴比べ菌体量が少ない一方、高いグルコアミラーゼ活性を持っていた。

麴を保存条件による酵素活性への影響を調べ、冷凍温度帯であれば、6ヶ月間は酵素活性が維持されることを確認した。

白麴を用いた四段糖化試験を行い、麴酸度を元に糖化終了後の酸度を予測するための方法を示した。

#### 参考文献

- 1) 酒類総合研究所標準分析法
- 2) 藤井史子, 尾関健二, 神田晃敬, 浜地正昭, 布川弥太郎. 市販酵素剤を利用した麴菌体量簡易測定法. 日本醸造協会誌. 87(10), 1992, p757-759.
- 3) J. L. REISSIG, J. L. STROMINGER, L. F. LELOIR. A MODIFIED COLORIMETRIC METHOD FOR THE ESTIMATION OF N-ACETYLAMINO SUGARS. J. Biol. Chem. 217, 1955, p.959-966.
- 4) 五味勝也, 岡崎直人, 田中利雄, 熊谷知栄子, 井上博, 飯村穰, 原昌道. 麴菌細胞壁溶解酵素を用いた米麴中の菌体量の測定. 日本醸造協会誌. 82(2), 1987, p.130-133.