

# 琉球大学学術リポジトリ

## 泡盛醪発酵期間中の $\alpha$ -amylase と遊離糖の消長について(農芸化学科)

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語:<br>出版者: 琉球大学農学部<br>公開日: 2008-02-14<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 宮里, 興信, 大城, 清, Miyazato, Koshin, Oshiro, Kiyoshi<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/4427">http://hdl.handle.net/20.500.12000/4427</a>  |

# 泡盛醪発酵期間中の $\alpha$ -amylase と遊離糖の消長について

宮 里 興 信\* 大 城 清\*

Koshin MIYAZATO and Kiyoshi OSHIRO: Studies on quantitative changes of  $\alpha$ -amylase and free sugar in fermentation of Awamori Moromi

## I 緒 言

著者らは前報(7)において泡盛醸造における製造技術の改善と酒質向上に資する目的で泡盛醪発酵経過中の一般化学成分の変化について報告した。ところで発酵経過中泡盛麴より溶出する $\alpha$ -amylase および糖類の消長について解明することも泡盛製造工程の機能的管理に貢献するものと考えられる。

すでに清酒醪中における $\alpha$ -amylase の消長については多くの研究者により報告されている。すなわち正井(5)、三吉(8)、徳岡(11)、北原(3)は $\alpha$ -amylase は発酵初期にはそのほとんどが蒸米に吸着されているが、発酵が進むにつれて醪液の中にその活性が移行すると述べている。しかもその醪液中の活性は後期においても残存し、また糖化力は糖成分の変化と一致していることを認めている。

糖類の消長については、蔭山ら(2)の清酒醪の研究があり、甘藷粉を原料とする酒精醪については大谷ら(10)、泡盛醪について外間(1)の報告がある。いずれもペーパークロマトグラフィーによって発酵性糖類と非発酵性糖類について検索、同定、定量を行なっている。

本報においては、前報(7)同様泡盛酒造所の醪中より経時的に試料を採取して、 $\alpha$ -amylase の力価、糖化力、ペーパークロマトグラフィーによる糖類の検索、同定および定量を行なったので報告する。

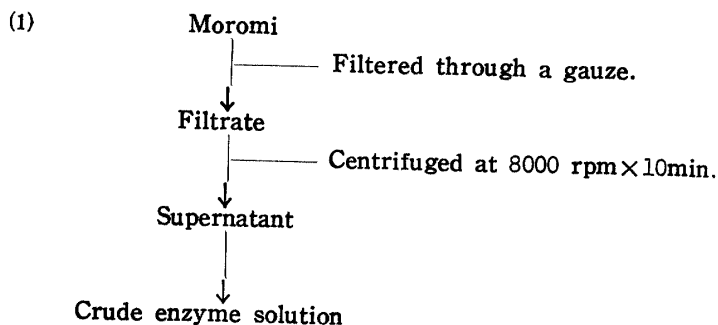
## II 実 験 方 法

### 1. 試料の採取

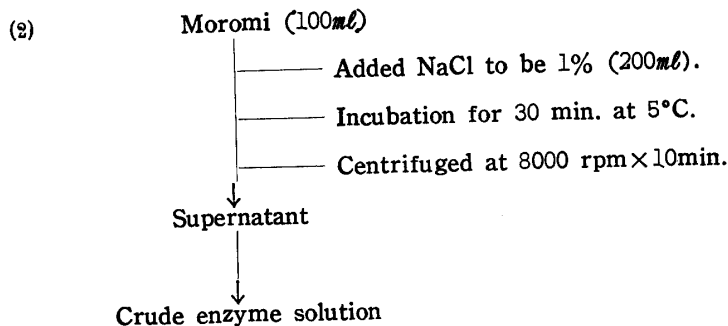
試料は、那覇市首里崎山町、瑞泉酒造所の醪から前報(7)同様採取し供試料とした。なお、仕込別に2回採取した。

### 2. 粗酵素液の調製

粗酵素液の調製は次に示す(1)(2)の通り行なった。



\* 琉球大学農学部農芸化学科  
琉球大学農学部学術報告 20: 115~124



(1) について、 $\alpha$ -amylaseの力価、糖化力、直接還元糖および比重を測定し、(2) については、 $\alpha$ -amylaseの力価、糖化力の外に $\text{Cl}^-$ 量を測定した。

### 3. $\alpha$ -amylaseの力価測定法

1%可溶性でん粉液50mlに0.1M-sodium acetate buffer solution (pH 5.0) 10ml, 粗酵素液10ml添加して40°Cで反応を行なわしめ、経時的に反応液を採りヨード液反応の消失する時間を測定した。その力価は $D_{30}^{40}$  (Wohlgemuth Value) で示した。

### 4. 糖化力の測定法

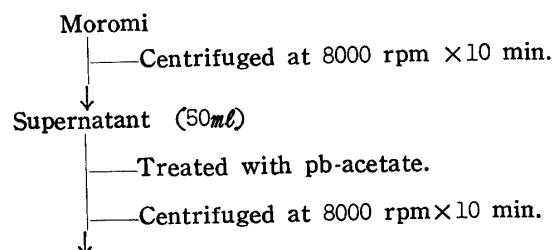
1%可溶性でん粉液1.0mlおよび0.1M-Citrate Phosphate buffer (pH 5.5) 3.0mlの混液に粗酵素液1.0ml添加して40°C, 20分間反応させSomogyi法により還元糖を定量した。(9) 糖化力は粗酵素液1.0mlに対するglucoseのmg数で示した。

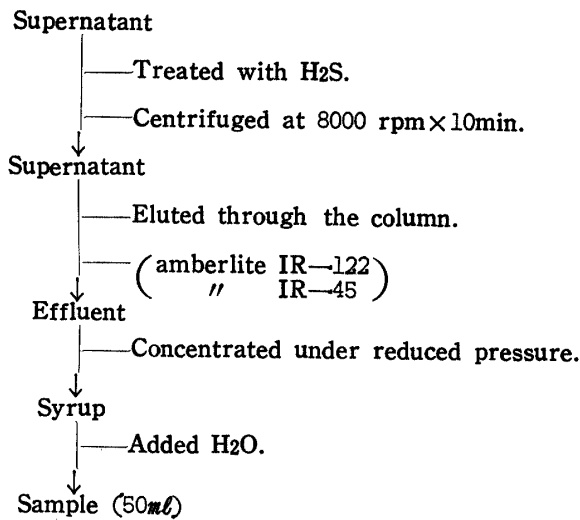
### 5. ペーパークロマトグラフィー

- (1) 滷紙は東洋滷紙No.52, 40×40cmを使用
- (2) 展開は主にn-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)を展開剤として使用し、室温で4回多重展開を行なった。二次元法は、該展開剤で一方向に4回多重展開を行ない、他方向にPhenol :  $(\text{NH}_3)$  water (4 : 1)で1回展開させた。なお1枚のペーパーには供試料、他のペーパーには標準糖をスポットして同一条件で同時に展開させた。
- (3) 呈色にはアニリンフタル酸を用いた。

### 6. ペーパークロマトグラフィーによる糖類の検索と定量法

下記に示す通りに調製した試料と標準糖をそれぞれスポットして展開させ糖類の検索、同定を行なった。次に該試料0.05mlをスポットしてガイドストリップによりGlucose, maltoseの位置を確認して、それぞれのスポットに相当する部分を切り取り蒸留水で20時間抽出後25mlにfill upした。その25ml中より2ml採りSomogyi-Nelson法により糖定量を行なった





### 7. 糖定量法

#### (1) Somogyi-Nelson法

Somogyi銅液 2 mlに抽出糖液 2 ml加え沸騰湯浴中で10分間加熱する。水道水で冷却後 Nelson 試薬 2 ml加えさらに蒸留水 2 ml加えて希釈する。生じた青色を光電比色計（波長560m $\mu$ ）で測定する。既知量の glucose, maltoseより作成した標準曲線から生成糖量を計算した。

標準曲線は第1図に示す通りである。

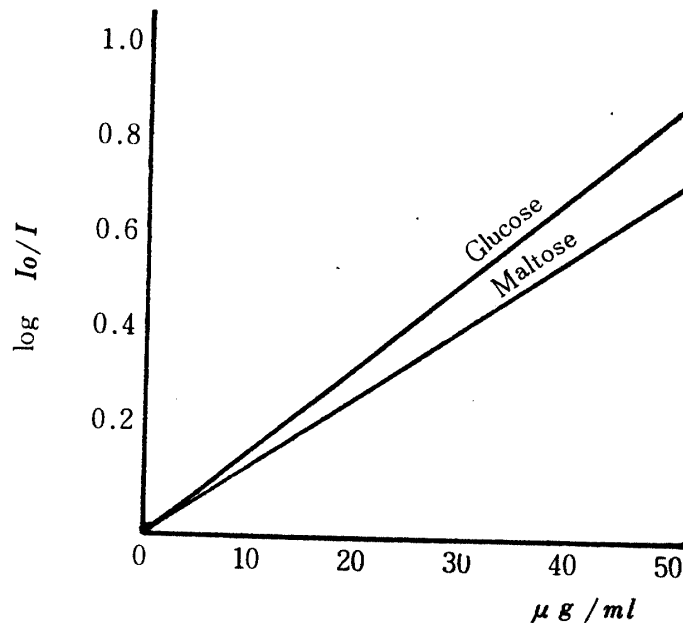


Fig. 1. Standard curve of monosaccharides

#### (2) 直接還元糖の定量法

ベルトラン氏法により測定した。

#### (3) Somogyi法

常法によって行ない、0.005Nチオ硫酸ナトリウムの消費量から糖量を算出して試料 5 ml中の glucose (mg) として示した。なお、あらかじめ純粋な glucoseについて検量線を求め、これより糖量を算出し

た。検量線は第2図に示した通りである(9)。

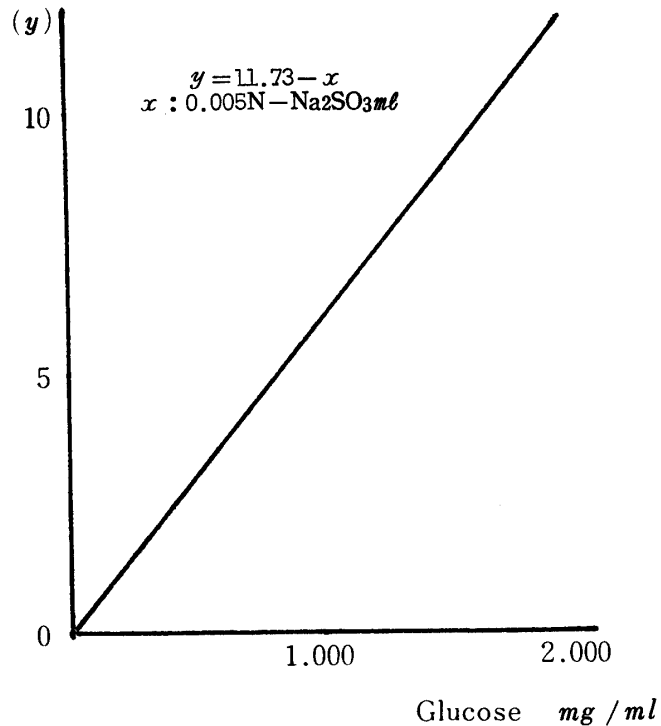


Fig. 2. Standard curve of reducing sugar

### 8. 醱液相量の定量

泡盛醱中に存在する $\alpha$ -amylaseの表示基準を設定するため、三吉ら(8)の方法にしたがって食塩法により定量した。すなわち前記(2)、により調製した粗酵素液中に存在する $Cl^-$ を $0.1N \cdot AgNO_3$ で定量し、 $Cl^-$ の減少度より逆算して醱100ml中に含まれる液量を測定した。

その液量に対する $\alpha$ -amylaseの力価と糖化力をそれぞれ換算して表示した。

## III 実験結果

### 1. 泡盛醱中の $\alpha$ -amylaseの消長

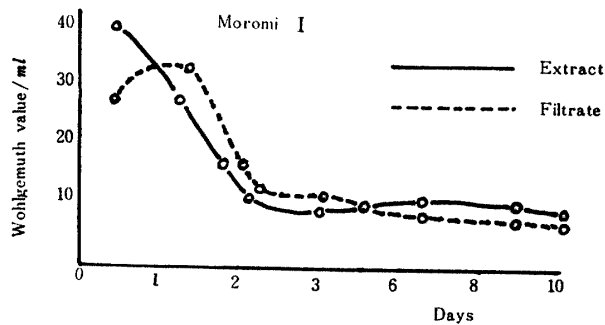
実験結果は第1表および第3図～第6図に示した通りである。表および図で明らかのように $\alpha$ -amylaseは仕込当初において抽出液中の力価が醱液に比べて1.5～2倍も高い値を示している。その後時間の経過ともななって吸着あるいは結合状態にある $\alpha$ -amylaseは溶出し約24～34時間目頃にはほとんど抽出液力価と醱液力価は一致していることがわかる。なおMoromi I (第3図, 5図) Moromi II (第4図, 第6図) とほぼ一致した傾向を示している。2日目頃に急激な減少を示していることもほとんど一致している。

**Table 1. Changes of  $\alpha$ -amylase and general components during fermentation Moromi I**

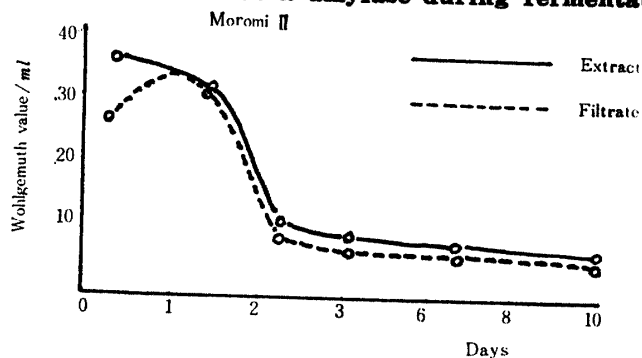
| Days<br>(hour) | Sp. gr. | Direct<br>sugar<br>(as Glucose)<br>mg/ml | Amylolytic power |         |                      |         | Liquid<br>phase of<br>moromi |
|----------------|---------|--|------------------|---------|----------------------|---------|------------------------------|
|                |         |  | wohlgemuth value |         | Total reducing sugar |         |                              |
|                |         |  | Filtrate         | Extract | Filtrate             | Extract |                              |
| 0 (10)         | 1.016   | 4.35                                     | 25.0             | 37.2    | 23.0                 | 84.9    | 54                           |
| 1 (30)         | 0.995   | 1.04                                     | 30.1             | 27.9    | 34.3                 | 61.3    | 62                           |
| 2 (53)         | 0.984   | 2.25                                     | 12.3             | 11.0    | 31.0                 | 30.3    | 83                           |
| 3 (72)         | 0.984   | 1.69                                     | 10.7             | 9.3     | 28.0                 | 25.2    | 78                           |
| 6 (126)        | 0.975   | 1.16                                     | 8.3              | 9.8     | 26.5                 | 28.3    | 72                           |
| 8 (176)        | 0.978   | 0.039                                    | 7.1              | 7.3     | 23.1                 | 28.8    | 81                           |
| 10(221)        | 0.970   | 0.014                                    | 7.5              | 8.1     | 23.8                 | 26.4    | 71                           |

**Moromi II**

|         |       |      |      |      |      |      |    |
|---------|-------|------|------|------|------|------|----|
| 0 (6)   | 1.023 | 5.90 | 16.7 | 35.1 | 25.8 | 76.3 | 52 |
| 1 (32)  | 0.992 | 0.82 | 30.3 | 30.8 | 39.1 | 62.8 | 60 |
| 2 (53)  | 0.990 | 2.66 | 7.9  | 8.9  | 28.8 | 31.2 | 66 |
| 3 (72)  | 0.986 | 1.73 | 7.2  | 8.2  | 25.3 | 30.2 | 69 |
| 6 (126) | 0.980 | 1.07 | 6.0  | 7.1  | 26.3 | 26.1 | 68 |
| 8 (176) | 0.972 | 0.35 | 5.2  | 6.0  | 22.0 | 22.7 | 79 |
| 10(223) | 0.966 | 0.02 | 5.0  | 5.9  | 20.1 | 22.8 | 67 |



**Fig. 3. Patterns of  $\alpha$ -amylase during fermentation**



**Fig. 4. Patterns of  $\alpha$ -amylase during fermentation**

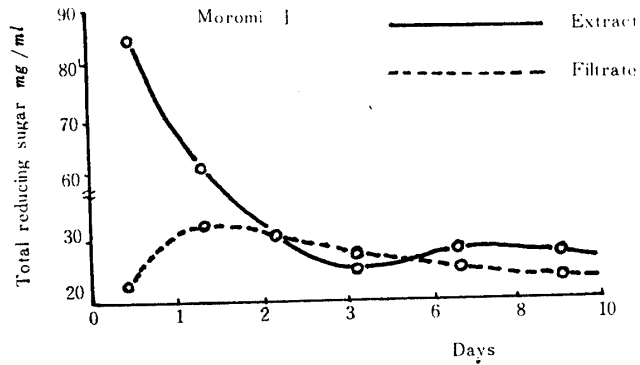


Fig. 5. Patterns of amyolytic power during fermentation

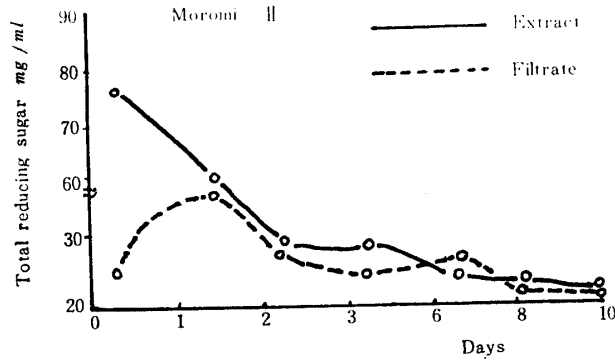


Fig. 6. Patterns of amyolytic power during fermentation

2. 直糖および比重について

直接還元糖および比重の測定結果は第7図に示した通りである。図で明らかなように、直接還元糖は仕込後6時間目頃までにいちじるしく増加し、その後時間の経過とともに急激に減少し、30~34時間目頃からふたたび増加して、60時間目頃を境にして次第に減少している。このことは前報(7)で述べたことと全く一致した経過を示している。

比重については、図でわかるように発酵が進むにつれて低下している。

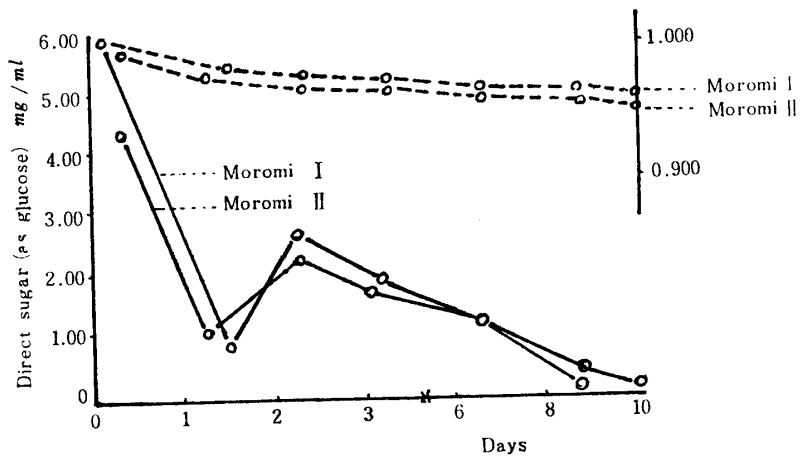


Fig. 7. Patterns of direct sugar and specific gravity during fermentation

3. ペーパークロマトグラフィーによる糖類の検索, 同定および定量について

泡盛醪の発酵経過中の糖類について, 仕込時から蒸留直前までの10日間経時的に採取した試料のペーパークロマトグラムによる実験結果は第8図に示した通りである。

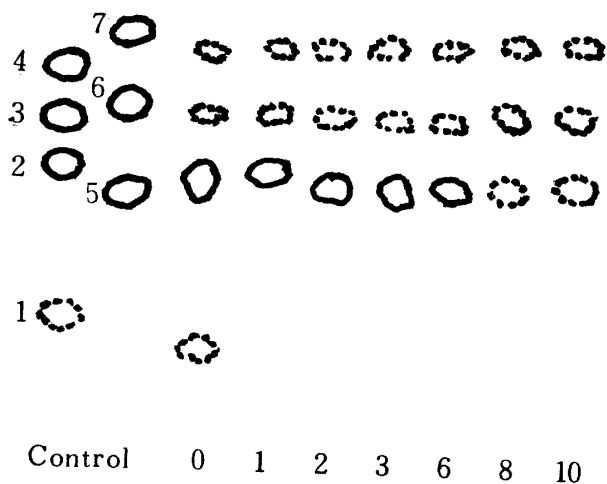


Fig. 8. Paper chromatogram of the sugars during fermentation

1. maltose 2. glucose 3. mannose 4. xylose 5. galactose

6. arabinose 7. ribose Solvent : n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)

Paper : Toyo No. 52 (40×40) 4 times developed.

図でわかるように発酵期間中常時検出されたのは, glucose, arabinose, riboseであった。仕込当初においては, maltoseも検出され, 2日目以後の試料については, わずかながらxylose, galactoseも検出されている。

第9図, 10図はそれぞれ, xylose, galactose, arabinose, riboseについて同定した結果を示した。なお第9図は, 仕込後3日目, 6日目試料について行なったものであり, 第10図は6日目の試料をスポットしたものでブタノール系で4重展開, フェノール系で1回展開させたものである。

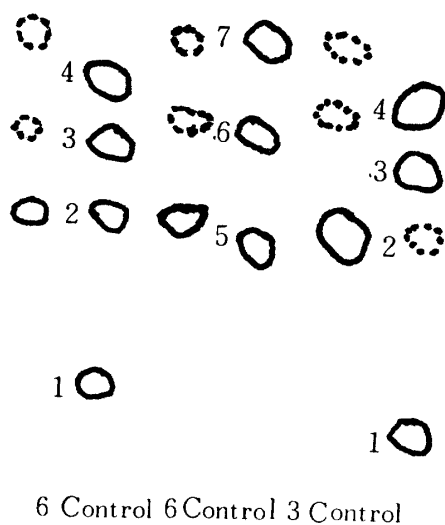


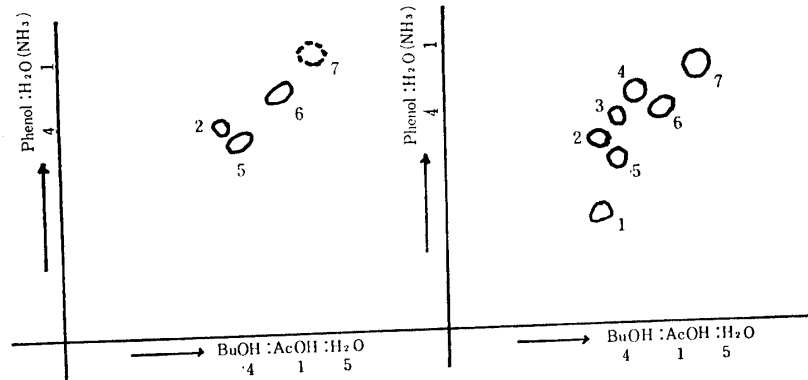
Fig 9. Paper chromatogram of the sugar during fermentation

1. maltose 2. glucose 3. mannose 4. xylose 5. galactose

6. arabinose 7. ribose. solvent : n-butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 5)

Paper : Toyo 52 (20×40) 4 times developed

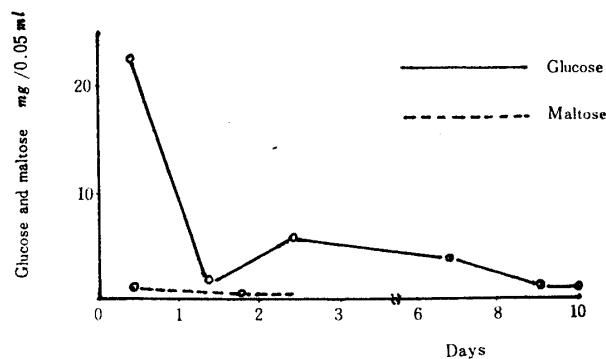




**Fig. 10. Paper chromatogram of the sugar during fermentation**  
 1. maltose 2. glucose 3. mannose 4. xylose 5. galactose  
 6. arabinose 7. ribose  
 Solvent : n-butanol:acetic acid:water(4:1:5), phenol:H<sub>2</sub>O(NH<sub>3</sub>) (4:1)  
 paper : Toyo No. 52(40×40) 4 times developed and one time developed.  
 Right : control, Left : sample

#### 4. 泡盛醪発酵経過中における glucose と maltose の消長について

泡盛醪発酵経過中の glucose と maltose の消長は第11図に示した通りである。図で明らかなように、glucoseは仕込当初 第7図に示した直接還元糖と関連して最大値に達するが仕込後30時間目頃に至り急激に減少している。その後漸次増加して、発酵が進むにしたがって再び減少することを示している。一方 maltose については仕込当初わずかに確認されたが、24時間目以後は全く認められなかった。



**Fig. 11. Patterns of glucose and maltose during fermentation**

## IV 考 察

筆者らは前報(7)で泡盛製造法の改善、酒質の向上をはかるために、泡盛麹菌や耐酸性の強い酵母の優良株を検索して、これを利用することにより、微生物管理を行なうこと、また泡盛醪の発酵経過を科学的に管理することも重要であると述べた。

本実験では、前報同様泡盛酒造所の発酵醪中より経時的に試料を採取し  $\alpha$ -amylase と遊離糖の消長について検討し、あわせてペーパークロマトグラフィーにより糖類の検索、同定を行なった。

実験結果については、第1表および第1図～11図に示した通りである。

はじめに $\alpha$ -amylaseについては、第3図、4図に示したように、仕込当初においては麹菌体から醪液中への移行はほとんど見られず、時間の経過にしたがって液中に移行している。その後24時間目頃最高に達するが、24時間目を境にして急激に減少している。

正井ら(6)は清酒醪の実地醸造において、蒸米が水飽和するまで麹から溶出された酵素は蒸米の吸水と平行して蒸米に吸着されるため液中相の酵素活性は常に低く、蒸米が水飽和すると麹から溶出される酵素は吸着されずに液中相に移行すると述べている。

泡盛醪は全麹にして仕込むのでおそらく麹菌体から分泌される酵素は麹米が水飽和に達するまで(約2～3時間)は醪液中への溶出はなくその後液中相への移行がはじまり測定時(仕込後6時間目、10時間目)には麹菌体から分泌された $\alpha$ -amylaseは液中相へ移行し、その活性は仕込後24時間目頃最高に達するものと思われる。その後アルコール発酵が進むにしたがって48時間目を境にしてゆるやかに減少している。6日目以後抽出液中の活性が液中の活性よりわずかに高い値を示している。これは発酵後期に近づくにつれて麹米の分解物であるオリ状物質あるいはオリ状物質のコロイドが生じて、 $\alpha$ -amylaseが再びこの物質に吸着されるためであろうと考える。

糖化力については、第5図、6図に示した通りであるが、 $\alpha$ -amylaseの活性(第3図、4図)とほとんど一致した傾向を示している。

次に醪中の遊離糖についての検索結果は第8図、9図、10図に示した通りである。図でわかるように検出された糖類は、maltose, glucose, xylose, galactose, arabinose, riboseの6種類であった。

蔭山ら(2)によれば清酒醪中でglucose, maltose, isomaltoseを検出しており、泡盛醪について外間(1)はglucoseとmaltoseのみ検出したと報告している。今回の実験においては、glucose, maltose, 以外にxylose, galactose, arabinose, riboseも検出されている。これはおそらく原料米(外碎米)に由来するものと思われる。

松下(4)によれば米種子の遊離糖として、glucose, sucrose, maltose, raffinose, fructoseも検出している。このことについては、泡盛原料米の糖類についても検討しなければならない問題であると思われる。

maltoseとglucoseの量的変化については、第11図に示した通りである。仕込当初 $\alpha$ -amylaseによって米でん粉がmaltoseの単位に切断されるが糖化力が強いので、ただちにglucoseに分解され、仕込後30時間目頃までにはmaltoseがほとんど消失するものと考えられる。

## V 要 約

1. 泡盛醪中の $\alpha$ -amylaseは発酵初期において麹米に吸着されているか、あるいは麹菌体に結合状態にあるが発酵が進むにしたがって醪液中相に溶出する。
2. 糖化力は糖成分の変化と一致している。
3. ペーパークロマトグラフィーにより泡盛醪中からglucose, maltose, xylose, galactose, arabinose, riboseの6種類の糖類を検出した。
4. maltoseは発酵初期においてわずかに検出されたが30時間目頃にはほとんど消失した。

本研究に際し終始御指導、御助言をいただいた本学農学部農芸化学科当山清善教授、同知念功助教授に深く感謝致します。

試料を御恵与くださいました瑞泉酒造所社長佐久本政敦氏に深謝致します。

## 参 考 文 献

1. 外間宏一 1962 泡盛醱酵期間中における還元性糖類消費に関する研究, 琉大農学報, **9** : 214
2. 蔭山公雄, 杉田脩 1953 清酒醸造中に於ける各成分の変化 (第1報続) 澱粉の消化について, 醸工, **31** : 191~192
3. 北原覚雄, 村田卯一 1953 糸状菌類のDiastase組成に関する研究 (第11報) 清酒の醱酵中に於けるDiastaseの消長, 醸工, **31** : 352~354
4. 松下アヤコ 1971 種子の成熟過程における遊離糖含有量の変化 (第3報) 米, 蔬菜および花卉植物について, 農化, **45** : 46~47
5. 正井成之 1969 酵素剤利用による清酒醸造に関する研究 (第1報) 蒸米による $\alpha$ -amylaseの吸着および溶出について, 醸工, **47** : 70~74
6. 正井成之, 秋田利彦, 山下勝, 梅村泰一, 徳村治彦, 酒井達也, 柴田正人, 大倉鎮夫, 山田鍾英, 河村稔 1969 酵素剤利用による清酒醸造に関する研究 (第3報) 実地醸造におけるamylaseの動態について, 農化, **45** : 250
7. 宮里興信, 大城清 1972 泡盛醱酵経過中の一般化学成分の変化について, 琉大農学報, **19** : 291~296
8. 三吉和重, 照井堯造, 加賀谷謙治, 小松信弥 1967 清酒醸造における酵素バランスについて (第1報) 醱中酵素の消長, 醸工, **45** : 963~965
9. 日本化学会編 1957 実験化学講座, **23** : 412, 東京, 丸善株式会社
10. 大谷義夫, 高橋慧, 福田喜明 1958 酒精醱の改良に関する研究 (第15報) ペーパークロマトグラフィによる液体麴中の糖類の検出と定量について (其の1), 醸工, **36** : 117
11. 徳岡有三 1936 麴アミラーゼについて (第2報) 酒醱の醱酵に伴うアミラーゼの消長及びアミラーゼの吸着について, 農化, **12** : 1189

## Summary

1. As Awamori fermentation proceeds,  $\alpha$ -amylase of the Koji was gradually eluted to the Moromi (mash) solution. Saccharifying activity of the Moromi was in agreement with the change in the composition of sugar.
2. Glucose, maltose, xylose, galactose, arabinose and ribose were chromatographically detected from the Awamori Moromi.
3. In the beginning of the fermentation, a small amount of maltose was detected in the Moromi solution. After the fermentation proceeded for 30 hrs., however, the maltose disappeared almost.