

以酵素替代傳統酒麴製造清酒之研究

陳昭安、陳鴻章

E-mail: 9404807@mail.dyu.edu.tw

摘要

清酒是利用 *Aspergillus oryzae* 及 *Sacchomyce cerevisiae* 這兩種微生物作用在蒸米上所製作出來一種傳統日式酒精性飲料。在傳統製作清酒過程中，以麴製酒有許多不易掌控的因子，需要用經驗去做適當的調整，因此對於大規模清酒發酵造成一定的障礙。本研究論文主要目的是探討以商業酵素取代傳統麴米製作清酒之可行性，並找出利用酵素法釀造清酒的最適條件。使用 2 ml/kg rice 液化酵素 SpezymeR AA 蒸煮液化作用 90 分鐘後，可以使米汁 D.E. 值達到 13 以上，另搭配對澱粉糖化能力較佳之 OptimaxR HP7525 作用 72 小時後米汁中 D.E. 值可以達到 77.86；在酒醪中使用 FermentzymeR L-400 對酵母生長速度較佳，但在整體口感上仍然以 OptimaxR HP7525 所釀造出的酒較受歡迎；使用纖維酵素可以使米粒更能被糖化酵素所分解，在酵素作用 72 小時後可以提高米汁 11 度的 D.E. 值，且清酒釀造過程中，添加纖維酵素可以使發酵速度加快，在釀造第 10 天時即可以達到 15 度的酒精度。使用 6 種商業菌株釀造清酒時，在釀造過程中沒有明顯的差異，在發酵 14 天後都可以達到約 15 度酒精度。而營養素以每公斤米添加 6 克的酵母精粉效果最佳，在發酵第 6 天時可以達到 1.01×10^{10} CFU/mL 酵母菌。由品評分析結果得知義大利菌株所釀造出來的清酒平均分數最高，最受到大眾所喜好。在發酵溫度方面，以 35 度發酵條件下發酵速度最快，但其所釀造的清酒接受度較差，因此在發酵溫度方面以 25 度釀造溫度較適合。於清酒澄清作用方面，使用斯巴克膠搭配明膠、矽膠效果最佳，並且經由品評分析結果發現最受到大眾喜好。而利用酵素法取代米麴釀造之清酒經熟成後，在香氣、口感及色澤方面並無明顯變化。

關鍵詞：清酒、澱粉、酒麴、澄清、酵母

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書	iii	中文摘要	v	英文摘要	vii	誌謝	ix	目錄	x	圖目錄	
xiv 表目錄	xvii	第一章 前言	1	第二章 文獻回顧	4	(壹) 清酒	4	一 清酒種類	4	(一) 根據製法品質分類	4
						(二) 依照成品處理方法分類	6	(三) 依照儲存時間分類	7	二 傳統清酒之製造	7
						(一) 原料及處理	9	(二) 酒麴	16	(三) 酒母	22
						(四) 酒醪	23	(五) 壓榨及澄清	25	(六) 殺菌及裝瓶	25
						(貳) 酵素	26	一 釀酒有關酵素	26	(一) 內切型澱粉	29
						(二) 外切型澱粉及切支	30	(三) 蛋白質分解酵素及纖維酵素	35	(參) 酵母	36
						(肆) 影響清酒品質因子	38	一 酸度	38	二 色度	39
						三 香氣	40	四 酒液混濁原因	40	第三章 材料與方法	41
						(壹) 實驗材料	41	一 原料	41	二 酵素	41
						三 儀器設備	42	(貳) 實驗步驟	43	一 實驗設計	43
						二 實驗步驟	45	(一) 酵素作用條件之探討	45	(二) 發酵條件之探討	47
						(三) 酒醪處理條件之探討	54	(參) 檢驗方法	56	一 D.E. 值	56
						二 酒的理化分析	56	(一) 酒精度檢驗	56	(二) 可溶性固型物	58
						(三) 總酸	58	(四) 揮發酸	59	(五) 殘糖測試	59
						(六) 酵母生菌數之測定	61	(七) 酒中總酯之測定	61	(八) 色澤	62
						(九) 混濁度	62	(十) 褐變度	62	三 官能品評	63
						第四章 結果與討論	64	(壹) 酵素作用條件之探討	64	一 液化酵素作用之探討	64
						(一) 煮米用水量對液化作用之影響	64	(二) 液化酵素種類之影響	65	(三) 液化酵素用量之影響	69
						二 糖化酵素作用條件之探討	71	(一) 糖化酵素種類及用量對米粒分解之影響	71	(二) 纖維酵素對糖化作用之影響	73
						(貳) 發酵條件之探討	76	一 酒醪添加方式之影響	76	二 酵素種類之影響	80
						(一) 糖化酵素之影響	82	(二) 纖維酵素之影響	85	三 菌種種類之影響	90
						四 營養素用量之影響	94	五 原料米種類之影響	100	六 發酵溫度之影響	105
						(參) 酒醪處理條件之探討	111	一 澄清試驗	111	(一) 不同澄清劑種類及用量之影響	111
						(二) 纖維酵素對澄清效果之影響	113	(三) 低溫下之澄清效果	116	(四) 官能品評	120
						二 儲存試驗	122	第五章 結論	130	參考文獻	133
						圖 2-1、傳統清酒製程	8	圖 2-2、米粒精白成分變化			
							13	圖 2-3、清酒麴製造流程			
							17	圖 2-4、米胚乳細胞壁軟化與酵素活性之相關性			
							21	圖 2-5、澱粉分解方式			
							27	圖 2-6、添加鈣離子對液化酵素穩定性之影響			
							31	圖 2-7、 α -amylase 及 Pullulanase 酵素性質			
							34	圖 3-1、酵素法釀製清酒之實驗架構			
							46	圖 3-2、清酒添加酒醪模式			
							48	圖 3-3、酒精沸點儀			
							57	圖 3-4、揮發酸裝置			

.....60	圖4-1、液化時添加不同水量對Spezyme? AA液化速率之影響.....66	圖4-2、不同液化酵素種類及用量對米澱粉液化速率之影響.....68
.....70	圖4-3、不同液化酵素使用量對米澱粉液化速率之影響.....70	圖4-4、不同糖化酵素種類對液化後米澱粉之降解作用.....72
.....74	圖4-5、糖化酵素使用量對液化後米澱粉之降解作用.....74	圖4-6、不同纖維酵素添加量對液化後米澱粉之降解作用.....75
.....77	圖4-7、不同添飯方式製作清酒之酒精度、可溶性固形物、比重之變化.....77	圖4-8、不同添飯方式製作清酒之pH值、可滴定酸、揮發酸及總酯(乙酸乙酯)變化.....79
.....83	圖4-9、不同糖化酵素製作清酒之酒精度、可溶性固形物、比重及OD420變化.....83	圖4-10、不同糖化酵素製作清酒之pH值、可滴定酸、揮發酸及總酯(乙酸乙酯)變化.....84
.....88	圖4-11、添加纖維酵素對清酒酒醪之酒精度、比重、可溶性、固型物之影響.....88	圖4-12、添加纖維酵素對清酒酒醪之pH值、可滴定酸、揮發酸及總酯之影響.....89
.....91	圖4-13、不同菌種在釀造過程中清酒酒醪酒精度、比重及可溶性固型物之變化.....91	圖4-14、不同菌種在釀造過程中清酒酒醪pH、可滴定酸、揮發酸及總酯之變化.....93
.....96	圖4-15、不同營養素添加量在釀造過程中清酒酒醪酒精度、比重及可溶性固型物之變化.....96	圖4-16、不同營養素添加量在釀造過程中清酒酒醪pH、可滴酸、揮發酸及總酯之變化.....98
.....98	圖4-17、不同營養素添加量在釀造過程中清酒酒醪酵母菌數之變化.....98	圖4-18、不同米種類在釀造過程中清酒酒醪酒精度、比重及可溶性固型物之變化.....103
.....104	圖4-19、不同米種類在釀造過程中清酒酒醪pH、可滴定酸、揮發酸及總酯之變化.....104	圖4-20、不同發酵溫度下清酒酒醪酒精度、比重及可溶性固型物之變化.....107
.....109	圖4-21、不同發酵溫度下釀造過程中清酒酒醪pH、可滴定酸、揮發酸及總酯之變化.....109	圖4-22、於25 作用溫度下明膠及矽膠對清酒澄清效果.....112
.....114	圖4-23、於25 溫度下斯巴克膠、明膠及矽膠對清酒澄清效果...114	圖4-24、使用明膠及矽膠對纖維酵素處理過清酒澄清效果.....115
.....117	圖4-25、使用斯巴克膠、明膠及矽膠對纖維酵素處理清酒之澄清效果.....117	圖4-26、在4 下使用明膠及矽膠對清酒澄清效果.....118
.....119	圖4-27、於4 下使用斯巴克膠、明膠及矽膠對清酒澄清效果.....119	表2-1、根據製法品質分類清酒.....5
.....11	表2-2、清酒釀造用水基本條件.....11	表2-3、清酒釀造用水中微量元素對釀造酒質之影響.....12
.....15	表2-4、洗米時米中脂肪含量變化.....15	表2-5、清酒釀造中原料添加比例.....24
.....24	表2-6、澱粉酵素之分類.....24	表2-7、不同濃度氮源對 α -amylase 及Pullulanase產量之影響.....33
.....49	表3-1、仿照傳統釀造方法添加?解法酒醪.....49	表3-2、不同澄清劑種類及添加比例試驗組別.....55
.....80	表4-1、不同添飯方式製作清酒之品評結果.....80	表4-2、以不同糖化酵素釀造清酒之品評結果.....86
.....95	表4-3、不同商業酵母菌釀造清酒之品評結果.....95	表4-4、不同營養素添加量釀造清酒之品評結果.....101
.....106	表4-5、利用不同品種米釀造清酒之品評之結果.....106	表4-6、不同溫度下發酵之清酒品評結果.....110
.....121	表4-7、使用不同澄清劑處理之清酒品評結果.....121	表4-8、不同儲存條件下清酒L.a.b.值之變化.....123
.....124	表4-9、不同儲存條件下褐變度之變化.....124	表4-10、清酒在不同儲存條件下總酸、揮發酸及pH之含量.....126
.....127	表4-11、清酒在不同儲存條件下總酸、揮發酸及總酯之含量.....127	表4-12、不同熟成時間清酒之品評分數.....129

參考文獻

- Amerine, M.A. and Ough, C.S. (1980) Method for Analysis of Musts and Wine. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons. New York.
- AOAC. (1984) Official Methods of Analysis. 14th ed. Association of Official Chemists. Washington D.C., USA.
- Arikawa, Y., Yamada, M., Shimosaka, M., Okazai, M., and Mikio, F. (2000) Isolation of sake mutants producing a high level of ethyl caproate and isoamyl acetate. J. Biosci. Bioeng., 90 (6): 675-677.
- Asano, t., Kurose, N., and Tarumi, S. (2001) Isolation of high-malate-producing sake yeasts from low-maltose-assimilating mutants. J. Biosci. Bioeng., 92 : 429-433.
- Birch, G. G., Blakebrough, N., and Parker, K. J. (1988) Enzymes and Food Processing. Applied Science Publishers, London, pp.15-88.
- Boyle, J., and Hsu, L. (1990) Identification and quantitation of ellagic acid in muscadine grape juice. Am. J. Enol. 41: 43-47.
- Brandam, C., Meyer, X. M., Proth, J., Strehaiano, P., and Pingaud, H. (2003) An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. J. Biochem. Eng., 13 : 43-52.
- Chang, A. C. (2003) The effects of gamma irradiation on rice wine maturation. Food Chemistry, 83: 323-327.
- Charalambous, G. (1986) Handbook of Food and Beverage Stability. Academic Press Inc. New York. pp.773-797.
- Fujita, J., Shigeta, S., Yamane, Y.-I., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S. and Ono, K. (2003a) Production of two types of phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial koji making. J. Biosci. Bioeng., 95 (5): 460-465.
- Fujita, J., Yamane, Y.-I., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S., Shigeta, S., Suzuki, O., and Ono, K. (2003b) Production and properties of phytase and acid phosphatase from a sake koji mold, *Aspergillus oryzae*. J. Biosci. Bioeng., 95 (4): 348-353.
- Furukawa, S., Mizuma, T., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Matsushita, K., Maeda, H., Iida, S., and Nemoto, H. (2002) Observation of low-glutelin rice for sake brewing by scanning electron microscope. J. Biosci. Bioeng., 80 : 512-520.
- Hata, Y., Ishida, H., Kojima, Y., Ichikawa, E., Kawato, A., Suginami, K., and Imayasu S. (1997) Comparison of

two glucoamylases produced by *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (koji) and in submerged culture. *J. Biosci. Bioeng.*, 84 (6): 532-537. 14. Iemura, Y., Takahashi, T., Yamada, T., Furukawa, K., and Hara, S. (1999a) Properties of TCA-insoluble peptides in kimoto (traditional seed mash for sake brewing) and conditions for liberation of the peptides from rice protein. *J. Biosci. Bioeng.*, 88 (5): 531-535. 15. Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S. (1999b) Influence of amino acid content in seed mash on peptide uptake by yeast cells in main mash in sake brewing process. *J. Biosci. Bioeng.*, 88 (6): 679-681. 16. Iemura, Y., Yamada, T., Takahashi, T., Furukawa, K., and Hara, S. (1999c) Properties of the peptides liberated from rice protein in sokujo-moto. *J. Biosci. Bioeng.*, 88 (3): 276-280. 17. Iwata, H., Suzuki, T., and Aramaki, I. (2003) Purification and characterization of rice α -glucosidase, a key enzyme for alcohol fermentation of rice polish. *J. Biosci. Bioeng.*, 95 (1): 106-108. 18. Iwata, H., Suzuki, T., Takahashi, K., and Aramaki, I. (2002) Critical importance of α -glucosidase contained in rice kernel for alcohol fermentation of rice polish. *J. Biosci. Bioeng.*, 93 (3): 296-302. 19. Koburger, J.A. and Marth, E.H. (1984) Yeasts and molds. In "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food" 2nd ed., M.L. Speck (ed.), American Public Health Association, Washington, D.C. pp.197-202. 20. Kurita, O., Nakabayashi, T., and Saitho, K. (2003) Isolation and characterization of a high-acetate-producing sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, 95 (1): 65-71. 21. Linpinski, K. A. (1989) Professional Guide to Alcohol Beverage. Van Nostrand Reinhold. New York. pp.249-252. 22. Manelius, R., and Bertoft, E. (1996) The effect of Ca^{++} ion on the α -amylolysis of granular starches from oats and waxy-maize. *Journal of Cereal Science*, 24: 139-150. 23. Maruta, I., Kurahashi, Y., Takano, R., Hayashi, K., Kudo, K.-I., and Hara, S. (1998) Enzymic digestibility of reduced-pressurized heat-moisture treated starch. *Food Chemistry*, 61 (1): 163-166. 24. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31(3):326-428. 25. Mizuma, T., Furukawa, S., Kiyokawa, Y., Wakai, Y., Yamamoto, Y., Tsutsui, N., Matsushita, K., Iida, S., and Nemoto, H. (2002) Characteristics of low-glutelin rice for sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, 80: 503-511. 26. Nagamasu, Y., Ozeki, K., Kasaaki, A., Hamachi, M., Kumagai, C., and Nunokawa, Y. (1996) Production of vitamin C by *Aspergillus oryzae* and its extraction in sake. *J. Biosci. Bioeng.*, 74: 1-6. 27. Omori, T., Ogawa, K., Umemoto, Y., Yuki, K., Kajihara, Y., Shimoda, M., and Wada, H. (1996) Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment. *J. Biosci. Bioeng.*, 82 (2): 187-190. 28. Sarikaya, E., Takahiko, H., Adachi, M., and Mikami, B. (2000) Comparison of degradation abilities of α - and β -amylase on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35: 711-715. 29. Steinkraus, K. H. (1989) Industrialization of Indigenous Fermented Food. Marcel Dekker, Inc. New York. pp.127-165. 30. Wakai, Y., Miyazaki, N., Mizuma, T., Nakamura, S., Nagano, T., Fukuda, K., and Yanagiuchi, T. (1996) Suitability of rice for sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, 74 (4) : 245-254. 31. Wakai, Y., Mizuma, T., Miyazaki, N., Nagano, T., and Yanagiuchi, T. (1997) Effect of properties of rice on suitability for sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, 75 (2) : 99-109. 32. Watanabe, M., and Fujiwara, M. (1988) Organic acids in wine and cooking. *J. Brew. Soc.*, 83: 171-176. 33. Yamane, Y., Fujita, J., Izuwa S., Fukuchi, K., Shimizu, R., Hiyoshi, A., Fukuda, H., Mikami, S., Kizaki, Y., and Wakabayashi, S. (2002a) Properties of cellulose- and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to maceration of rice endosperm. *J. Biosci. Bioeng.*, 93 (1):9-14. 34. Yamane, Y., Fujita, J., Izuwa, S., Fukuchi, K., Shimizu, R., Hiyoshi A., Fukuda, H., Mikami, S., Kizaki, Y., and Wakabayashi, S. (2002b) Properties of cellulose-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae* and their contribution to material utilization and alcohol yield in sake mash fermentation. *J. Biosci. Bioeng.*, 93 (5): 479-484. 35. 王光輝 (1996) 清酒的商品常識。製酒科技專論彙編, 18: 213-216. 36. 王光輝 (1998) 清酒醪中酸度高的可能原因。製酒科技專論彙編, 20:58-59. 37. 吳鳴鈴 (2002) 米酒、穀類酒製造之簡介。食品工業, 34(1): 8-13. 38. 杜朋 (1992) 果蔬汁飲料工藝學。農業出版社。39. 林俊杰 (1996a) 製麴之理論。製酒科技專論彙編, 18:169-174. 40. 林俊杰 (1996b) 釀酒有關之酵素。製酒科技專論彙編, 18: 158-168. 41. 林俊杰 (1996c) 酵母之高濃度酒精發酵。製酒科技專論彙編, 18:63-85. 42. 林讚峰 (1994) 米類釀造酒發酵工程管理技術的新發展。製酒科技專論彙編, 16:181-208. 43. 林讚峰 (1996) 啤酒品質安定化(二)化學性渾濁之預防。製酒科技專論彙編, 18:38-52. 44. 胡鳳綬 (1993) 酒中之酯類香氣成分。製酒科技專論彙編, 15: 311-315. 45. 倪德全 (1981) 酵素與東方酒類之釀造。製酒科技專論彙編, 3: 80-85. 46. 張曙明及張采蓮 (1994) 澱粉液化分解米澱粉之探討。食品科學, 21 (4) :285-292. 47. 許瑞彬, 薛添福 (1984) 釀造用水。製酒科技專論彙編, 6: 143-153. 48. 陳怡宏 (2000) 酵母對食品香味的貢獻。食品工業, 32(7):17-25. 49. 曾昭宏 (2000) 防止橫山梨果汁渾濁生成之研究, 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文。50. 黃正財 (1979) 釀造酒中色澤之探討。製酒科技專論彙編, 1: 11-21. 51. 黃正財 (1982) 日本清酒釀工程技術之演進。製酒科技專論彙編, 4:1-6. 52. 黃正財 (1984) 酒醪中 α -amylase 之吸附與蒸米之溶解。製酒科技專論彙編, 6:1-6. 53. 黃瓊萱 (1995) 米類發酵製品及其安全性。食品工業, 27(1): 37-46. 54. 經濟部標準檢驗局 (2004) 酒類檢驗法-總酯之測定, 標準總號: 14851. 55. 劉益善 (1993) 澱粉液化酵素及其在製酒上之應用。製酒科技專論彙編, 15:71-79. 56. 劉祖君 (2002) 製酒用麴及其相關酵素之介紹。食品工業, 34(1):14-18. 57. 歐陽港生 (1994) 小麴。製酒科技專論彙編, 16:305-324. 58. 歐陽港生 (1998) 大麴。製酒科技專論彙編, 20:138-150. 59. 蔣德豐 (1975) 釀造酵母生成高濃度酒精之機構, 食品工業, 7 (2) :10-12. 60. 薛添福 (1998) 米糧酒中酯類的含量與影響。製酒科技專論彙編, 20:123-137. 61. 鍾杰輝 (1986) 清酒中之含鐵著色物質ferrichrome類。製酒科技專論彙編, 8:173-179. 62. 續光清 (1997) 食品工業, 徐氏基金會, pp. 485-487.