

東海大學食品科學研究所
Graduate Institute of Food Science
TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組碩士論文
Master Thesis of Food Technology Section

指導教授: 顏文義 博士
Advisor: Wen-Yi Yen, Ph.D.

利用生米麴法以及生料液態發酵方式釀造米燒酎
Study on rice shochu brewing by raw rice koji with uncooked rice

研究生: 黃俊智 撰
Graduate Student: Huang, Chun-Chih

中華民國一百零二年十月

October, 2013

目 錄

中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
壹、 緒論.....	1
一、 前言.....	1
二、 研究動機.....	1
三、 研究目的.....	2
貳、 文獻回顧.....	3
一、 酒麴介紹.....	3
二、 燒酎概論.....	7
三、 生料釀酒.....	17
參、 材料與方法.....	23
一、 試驗材料.....	23
二、 試驗設備.....	23
三、 實驗流程.....	25
四、 試驗方法.....	27
五、 分析方法.....	33
肆、 結果與討論.....	40

一、	酵母菌醱培養	40
二、	根黴菌醱培養	40
三、	糖化菌在生米酒麴上之酵素生產	42
四、	生料發酵釀酒試驗	45
	(一)、酒麴用量對發酵力的影響	45
	(二)、原料粉碎度對於發酵力的影響	53
	(三)、不同發酵溫度對發酵力的影響	59
	(四)、添加乳酸對發酵力的影響	65
五、	蒸餾試驗	67
	(一)、香氣成份的檢量線的驗證	68
	(二)、發酵酒之蒸餾(初蒸)	70
	(三)、發酵酒之再蒸餾(複蒸)	76
伍、	結論	81
陸、	參考文獻	83

摘要

傳統的日式燒酎釀造，使用穀物的澱粉質原料，需先將原料加熱蒸煮，使澱粉糊化後，再利用單行或並行複式發酵步驟釀酒。採用生米麴法可對生澱粉直接糖化和發酵，具有省略蒸煮、節省時間，操作容易等優點，但是釀造過程易出現發酵遲緩、醪液酸敗、出酒率下降等問題，因此有必要探討適合生料發酵的條件。

本試驗分為三部分，首先為生米酒麴之製造，再來為生米發酵條件的探討，最後為蒸餾收集酒液並進行香氣成分分析。取粉碎之生米粉分別接種米酒釀造酵母菌 *Saccharomyces peka* 和具有糖化水解生澱粉能力之根霉菌 *Rhizopus formosensis*，培養七天製成生米酒麴，培養期間糖化酶之活性最高可達到 120.8 units/g dry koji。取培養好之生米酒麴和生米粉加適量之水進行生米酒精發酵，理想的生米釀酒條件為 15%(w/w)之酒麴用量、粉碎度 35mesh 以上之生米粉、發酵溫度 25~30°C、醪液添加乳酸調整 pH 於 4.6；發酵七天後得到酒醪，其出酒率最高可達到 61.62%。酒醪經由蒸餾收集酒液並分析其成份，除了乙醇和水外，亦含有多種微量之香氣成份，主要以高級醇為主，醇類中最多成份為異戊醇，亦含有多種酯類化合物，以乙酸乙酯和乳酸乙酯為主，生米發酵酒也能產生多量之 β -苯乙醇。本實驗經由利用生米酒麴以及生米原料發酵後，再經過蒸餾可製成米燒酎。

Abstract

In traditional rice shochu brewing, grain materials must be cooked before the micro enzymic saccharification and alcoholic fermentation proceed . A simplified process in distilled spirit brewing made with raw rice material and raw rice koji to skip rice cooking step for easy operation, but the process may cause slow fermentation or spoilage and low production yield, so there is need to explore a suitable fermentation conditions for raw material brewing of shochu.

This study is divided into three parts, the brewing began with making of raw rice koji, followed by fermentation conditions for rice wine, the final part is alcoholic distillation and aroma analysis. Koji was made of uncooked rice with *Saccharomyces peka*, the wine yeast and amylase producing fungi, *Rhizopus formosensis*. The koji was used to inoculate the raw rice material. In culture period of brew starter, glucoamylase activity can reach to 120.8 units/g dry koji in seven days. The ideal fermentation condition is 15% (w/w) koji inocution, 35mesh raw rice partical size, temperature 25~30°C and lactic acid added to pH4.6 . Crude wine obtained after 7 days fermentation. Liquor yield reached to 61.62%. The flavor of rice spirit which is mainly high alcohols . The major content is Isobutanol and higher content of ethyl acetate. And a large amount of 2-phenylethanol. Raw shochu brewing can be done with raw rice koji combined with uncooked rice method in this study.

圖目錄

圖一、生米麴(小麴)製作流程·····	26
圖二、液態生料發酵法釀造米燒酎之流程·····	27
圖三、以三角瓶之瓶口放置水封進行生料發酵·····	31
圖四、生料發酵 7 天後情形·····	31
圖五、蒸餾裝置·····	33
圖六、還原糖測定之標準曲線·····	35
圖七、氣相層析儀·····	38
圖八、酒精測定之標準曲線·····	38
圖九、頂隙氣相層析儀·····	40
圖十、 <i>Saccharomyces peka</i> 酵母菌(a)塗抹培養之酵母菌(b)搖瓶培養 24 小時之酵母菌醃·····	42
圖十一、 <i>Rhizopus formosensis</i> 根黴菌(a)PDA 培養之根黴菌(b)培養好 之白米種麴·····	42
圖十二、生白米酒麴培麴過程的生長情形·····	44
圖十三、酒麴於培麴七天過程中，糖化澱粉酶活性之變化情形··	45
圖十四、生米發酵過程中不同用麴量對於發酵力的影響·····	48
圖十五、不同酒麴用量發酵之 pH 值變化情形·····	51
圖十六、不同酒麴用量於發酵中殘糖量的變化情形·····	51

圖十七、不同生米粉碎度對發酵力之影響·····	56
圖十八、不同生米粉碎度之 pH 值變化·····	56
圖十九、不同生米粉碎度之殘糖含量變化·····	57
圖二十、不同發酵溫度對發酵力之影響·····	62
圖二十一、不同發酵溫度之 pH 值變化·····	62
圖二十二、不同生米發酵溫度之殘糖量的變化情形·····	63
圖二十三、20°C 發酵條件之蒸餾酒液之 GC 分析圖譜·····	74
圖二十四、25°C 發酵蒸餾酒液之 GC 分析圖譜·····	74
圖二十五、30°C 發酵蒸餾酒液之 GC 分析圖譜·····	75
圖二十六、添加乳酸發酵蒸餾液之 GC 分析圖譜·····	76
圖二十七、複蒸過程中餾出的酒頭之 GC 分析圖譜·····	79
圖二十八、複蒸過程中餾出的酒心之 GC 分析圖譜·····	80
圖二十九、複蒸過程中餾出的酒尾之 GC 分析圖譜·····	80

表目錄

表一、不同燒酎酵母菌株發酵之香氣成份分析·····	15
表二、酒精分析之升溫條件·····	38
表三、香味分析之升溫條件·····	40
表四、酒麴用量對於發酵過程中之酒精、總糖、pH、殘糖及出酒率的 影響·····	53
表五、不同粉碎度生米之發酵結果比較·····	59
表六、不同溫度對於生米發酵之結果比較·····	65
表七、經乳酸調整後發酵之 CO ₂ 生成量、殘糖含量、pH 的變化情 形·····	67
表八、各種香氣成份檢量線之滯留時間、測量之誤差值·····	70
表九、各發酵溫度蒸餾液之香氣成份及含量·····	73
表十、添加乳酸發酵之蒸餾液香氣成份分析比較·····	76
表十一、複蒸過程中各分段餾出液之香氣成份比較表·····	80
表十二、文獻中燒酎之香氣成份與本研究結果之比較·····	83

壹、緒論

一、前言

傳統的日式燒酎為原料米經過高溫蒸煮，放冷後加入麴黴的孢子使麴黴繁殖，至米粒完全被白色的菌絲覆蓋，通常將此階段稱為製麴（散麴或米麴）。隨後加入酒母和白米飯同時進行糖化和發酵製成釀造酒，再進一步蒸餾製成米糧蒸餾酒。燒酎為日本傳統的蒸餾酒，由於蒸餾方法不同，燒酎大致可分為甲類燒酎及乙類燒酎，甲類燒酎為採用連續式蒸餾機，或以純酒精摻水稀釋，僅添加少量本格燒酎增強香味而成，所得成品之酒精度為 36 度以下。乙類燒酎則為經過發酵，或以清酒粕等採用單式蒸餾機蒸餾而成，製程較為繁複而且變化較多，所製得之成品酒，其酒精度通常在 45 度以下。

在傳統日式燒酎釀造過程中，如果使用穀物等生澱粉質為原料時，先要對原料加熱蒸煮，使澱粉糊化後再行糖化發酵，原料蒸煮是不可缺少的一道工序，原因為蒸煮可使水及澱粉分子加速運動，澱粉粒受熱膨化，使組織間細胞破裂，水分滲入澱粉粒內部。糊化後，三維網組織張開，澱粉分子間的組成弱化，形成單分子，呈溶解狀態，易受澱粉酵素作用。由於蒸煮工序消耗大量熱能。採用小麴法可對生澱粉直接糖化和發酵，具有簡化蒸煮程序、節省時間，但是發酵過程容易出現發酵遲緩、發酵酸敗、出酒率下降等問題。

二、研究動機

臺灣自古以來以農立國，由於地處亞熱帶，民以稻米為主食，全年產糙米約 90 萬噸/年(以 100 年計)，於碾米加工廠碾製精白後，混米篩別的過程中會產生許多的碎米，推估碎米量約有 9.5 萬噸/年(以 100 年計)，目前各地方農會均會將碎米做為飼料用米廉價銷售，如能轉製成附加價值較高的釀酒用米，將可大幅提高碎米的利用價值，

提昇經濟效益。

三、研究目的

不論工業酒精發酵或穀類酒釀造皆使用原料蒸煮糊化或添加酵素劑的方式來糖化澱粉質原料，以致成本過高，本實驗擬以生米麴的方式進行生料發酵，期能省略蒸煮步驟，提高發酵力和原料出酒率，釀造出風味佳之日式米燒酎。



貳、文獻回顧

一、酒麴介紹

(一) 麴

有別於西方使用麥芽酵素釀穀類酒之方式，東方釀酒的特色之一就是使用麴來釀酒，所謂的麴是讓黴菌生長在澱粉質原料上使其蓄積大量的澱粉分解酵素及其他酵素之物質(黃，1983b；林，1996a)。以下將介紹麴之功能及小麴之培製方法。

(二) 酒麴的功能

1. 對原料澱粉之分解作用

麴的基本功能是對原料的液化與糖化。因黴菌所產生而蓄積之澱粉分解酵素包括 α -amylase、glucoamylase 等，對已糊化之澱粉發生作用而將其分解成以葡萄糖為主之簡單糖類供酵母菌為碳源(林，1996a)。

2. 供給酵母菌及乳酸菌增殖、發酵所需之生長因子

通常酵母菌接種至糖化醪後即開始生長，而其所需之氮源可由蛋白質分解而來，蛋白質是由氨基酸所構成之聚合物，有些氨基酸是酵母可自行合成的，有些是酵母菌無法自行合成的，因此為使發酵正常，麴中應含有適量之蛋白質分解酵素，才能將原料中之蛋白質水解成酵母菌可利用之氨基酸作為氮源(林，1996a)。

3. 直接或間接影響酒質

麴之老幼、乾濕皆會影響酒質，以清酒為例，使用老麴或濕麴釀造者，易著色、濃醇、雜味重、具黴味、多酸、易熟成，若用幼麴或

乾麴則反之，因此麴對酒質影響甚劇；目前已知麴的成分會影響酒質的有：deferriferrichrysin 會造成鐵質著色，目前不產生 deferriferrichrysin 之麴菌已培育成功(黃，1980)。此外，麴之種類對酒類香氣有重大影響，例如：茅台酒需使用高溫大麴才會釀出醬香型之風味，而台灣之高粱酒因使用低溫大麴而具清香型之風味(林，1993；林，1996a 黃，1983a)。

(三) 小麴的培製

小麴的發展較大麴晚了許多，大麴通常以小麥為原料，用於高粱酒的釀製，麴塊體積大，培麴期間麴塊中心易發熱，而小麴與大麴所不同的是：形狀小、以米粉為主原料、加藥材、以上一代麴為麴種而世代相傳、用麴量少(為原料的 0.4~1.0%)等；分離小麴中的菌種發現全為根霉菌及少數酵母菌，因此是個良好的菌種訓養、保存及接種的方法(歐陽，1986)。

小麴通常是接種根霉與酵母培製而成，具有製造簡單、保存容易、用麴量少、應用範圍廣、適用多種及整粒原料發酵、發酵期短、原料、澱粉利用率與出酒率高、使用方便等優點。以小麴釀酒的特點是以小麴接種於原料後，先大量繁殖所接種上去之霉菌與酵母菌，同時糖化原料澱粉，然後再進行酒精發酵(林，1996a)。

小麴之培製法由於產地之不同，在名稱、外觀形態、使用原料及製造方法上有極大差異、下面以四川酒麴主要流程舉例說明小麴之培製(1)原料：米(使用不超過一年，稻穀碾白後於一個月內用完，含水約 14%，澱粉約 77%)、草藥(草藥共有 72 種)、麴母，原料比例為米粉 96.3%、中藥 3.31%、麴母 0.30%；(2)米浸泡：通常用冷水浸泡，浸泡時間約為 20 分。浸泡品質以手捻易碎，微帶硬心為主，浸泡後應瀝乾，此時含水量為 30~32%。(3)碾碎：將濕米倒入碾槽，碾

至無粒狀米時，加入麴種再碾 1~2 分，並加入中草藥碾勻，經碾碎後之米必須粗細適當；(4)製胚：碾碎後的米立即加水拌合均勻，維持含水量為 42 % 左右。拌勻並揉緊，製成麴餅之直徑約為 8~9 cm，厚約為 3 cm，麴胚大小應均勻一致，以利控制培養時的溫度和水分，麴胚均勻至於麴盤後入箱培養；(5)生皮：入箱培養後 14 小時，為有益菌旺盛繁殖階段，產生水分，麴胚變軟甚至變形，為軟胚階段，軟胚後 3~4 小時，麴塊表面佈滿菌膜，顯微鏡下可觀察到麴胚的主要微生物根霉菌(*Rhizopus*)大量繁殖，菌絲包裹著麴塊，俗稱『生皮』；(6)翻箱：當麴胚入箱 24 時候，品溫升至 37~38 °C 即可翻箱，調節濕度與品溫，趕走因發酵所聚集的二氧化碳，此時麴塊水分由 43 % 下降至約 38 %；(7)發泡：翻箱後 14 時，麴塊水分從 38 % 降至 33 % 左右，此時水分繼續蒸發，麴塊體積不變但重量減輕，內部形成空隙，俗稱『發泡』；此時黴菌已從表面向麴心生長；(8)揭燒：發泡後為降低品溫及加強供氧，促進黴菌進一步繁殖，可將麴盤上的覆蓋物揭去，俗稱『揭燒』(9)過心：揭燒後經 48 小時，根霉菌的白色菌絲已完全佈滿麴心，俗稱『過心』。米麴出箱後移入 40 °C 烘乾室中乾燥，待麴塊含水量降至 10% 以下時即可貯存(歐陽，1994)。

(四) 製麴有關之酵素

由於米成分中，澱粉占 75% 以上，所以整個澱粉原料釀酒過程中，原料澱粉主要是依賴黴菌分泌澱粉酶(amylases)將澱粉等大分子分解成糊精(dextrin)或單糖，以提供酵母菌利用；日式發酵食品常用 *Aspergillus oryzae* 分泌糖化酵素，但其菌種只能糖化以煮熟、糊化之澱粉，而中國式發酵食品則採用 *Rhizopus* 菌，該菌產生之糖化酵素，能分解未經蒸煮、糊化之澱粉。

1. 澱粉酶

(1) α -澱粉酶：

α -澱粉酶又稱內切酶(endo-amylase)或液化酶，此酶能水解澱粉分子中的 α -1,4-葡萄糖苷鍵，生成少量糊精和小分子的葡萄糖和寡糖，因水解生成的還原糖結構都是 α 型的，因此被稱為 α -澱粉酶。

(2) β -澱粉酶：

β -澱粉酶又稱為外切酶(exo-amylase)或糖化酶，此酶水解澱粉分子中的 α -1,4-葡萄糖苷鍵，從澱粉之非還原性末端開始水解，依序切下兩個葡萄糖基，最終產物為麥芽糖，麥芽糖在澱粉分子中原來是 α 型，酶水解 α -葡萄糖苷鍵過程中，頂端葡萄糖分子發生轉位，將 α 型麥芽糖變為 β 型麥芽糖，因此被稱為 β -澱粉酶。

(3) 葡萄糖澱粉酶：

葡萄糖澱粉酶又稱為 exo-glucosidase 或糖化澱粉分解酶，能有澱粉之非還原性末端，依次水解 α -1,4-葡萄糖苷鍵，而生成 β -D-葡萄糖，亦能水解 α -1,6-葡萄糖苷鍵，能單獨將澱粉分子水解成葡萄糖，故稱為糖化酶。

2. 酒化酶：

(1) 丙酮酸脫羧酶：

丙酮酸脫羧酶有時也簡稱 α -羧化酶，可作用於經糖解作用產生之丙酮酸，形成 CO_2 和乙醛。

(2) 乙醇脫氫酶：

乙醇脫氫酶作用於乙醛，使其還原成乙醇。

3. 酯化酶：

酯化酶能將一分子的酸與一分子的醇脫水而生成酯。

二、燒酎(しょうちゅう)概論

(一) 燒酎之簡介及分類

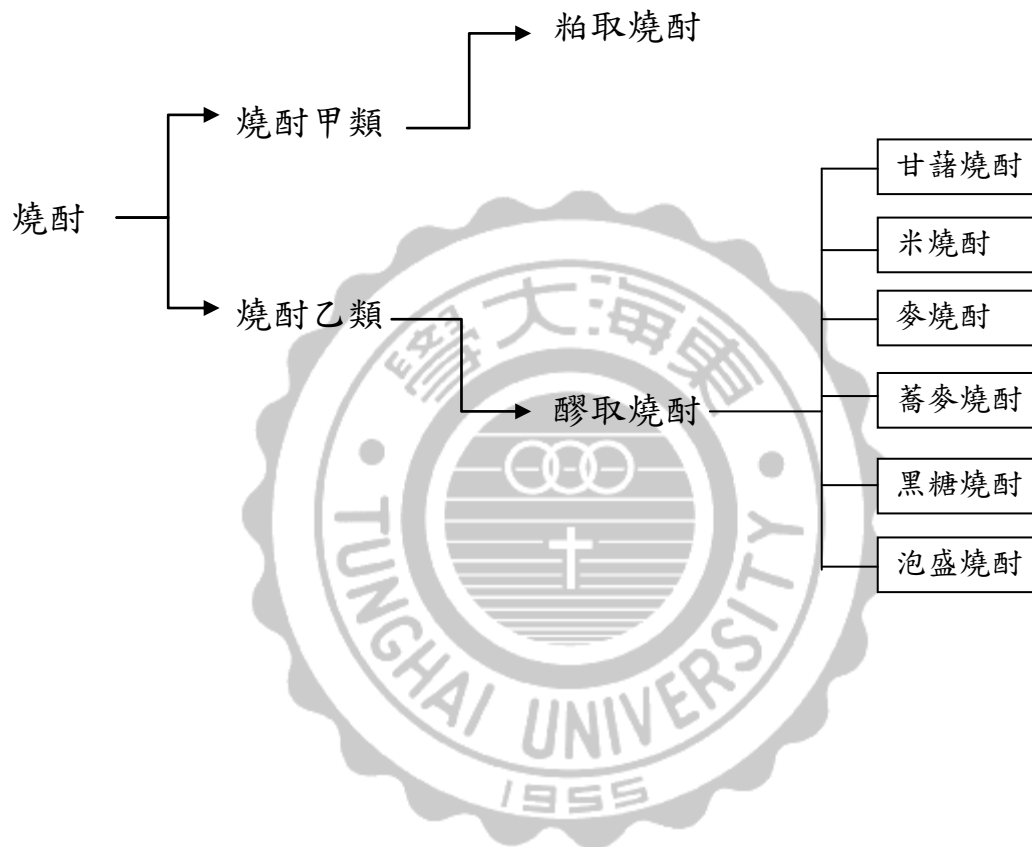
燒酎為日本傳統的蒸餾酒，為利用米、甘薯、大麥等原料，經由麴或酵素製劑，以並行複式發酵或單行複發酵後，再經過蒸餾而成，其酒精濃度為 20~45 度，成品酒帶有釀造原料風味之特徵，由蒸餾方法之不同，燒酎可大致分為燒酎甲類及燒酎乙類，燒酎乙類由於使用最傳統正宗的製法，因此又被稱做本格燒酎。

本格燒酎是日本獨特的蒸餾酒，其為原料經過發酵後，採用批次蒸餾機蒸餾而成，製程較複雜，變化較多，所得成品之酒精度在 45 度以下；燒酎甲類為採用連續式蒸餾，或純酒精摻水稀釋，或者是加入少量乙類燒酎增強香味而成，所得成品之酒精度為 36 度以下。(黃，1996；好井 等，1982)。

依據日本酒稅法之定義，本格燒酎與其他蒸餾酒類的區別為：

- (1) 以單式蒸餾機蒸餾，酒精度在 45 度以下。
- (2) 未使用發芽之穀類做為原料，以此做為與威士忌酒的區別。
- (3) 未使用水果類做為原料，以此做為與白蘭地酒類之區別。
- (4) 未使用除黑糖以外之含糖物質作為原料，以此做為與蘭姆酒類之區別。
- (5) 未使用白樺之活性碳做為過濾物質，以此做為與伏特加酒之區別。
- (6) 在蒸餾以後之操作中，不含有賦予香氣之抽出作業，以此做為與琴酒之區別。

燒酎乙類依原料之不同可再分類為如下之各種燒酎(黃，1996):



(二) 釀造燒酎之原料種類(黃，1996)：

1. 米燒酎

(1) 泡盛米燒酎—主要產地為琉球(沖繩縣)，是日本本格燒酒的始祖。

(2) 球磨燒酎—主要產地為熊本縣人吉市(球磨川流域)，另稱為人吉盆

地。類似埔里盆地很適合釀製本格燒酎。

2.甘藷燒酎

主要產地為鹿兒島縣，全年生產量為 44,000 餘 kL，佔全縣本格燒酎總生產量的約 34.4 %。

3.大麥燒酎

主要產地為宮崎縣山間部的高千穗地區及大分縣。大分縣的麥燒酎其特性為使用原料全為大麥，包含製麴原料均使用大麥，故另稱為「100%大麥燒酎」。

4.蕎麥燒酎

主要產地為宮崎縣的高千穗地區，佔南九州「蕎麥燒酎」總生產量的約 97.1 %。

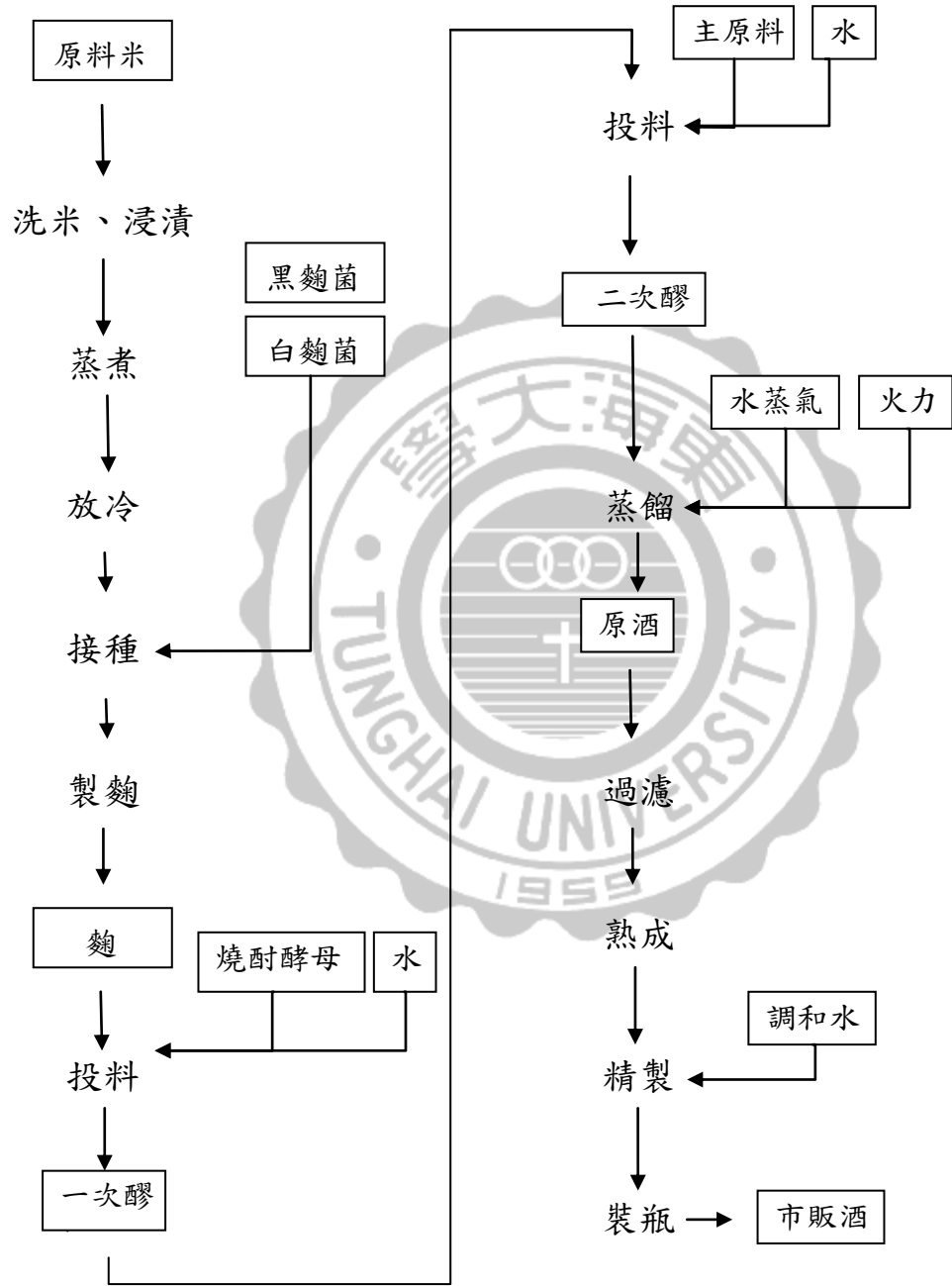
5.酒粕燒酎

主要產地為北九州(福岡縣)，由 17 世紀已有釀製酒粕燒酎的歷史記載。別稱為「早苗饗燒酎」。

6.黑糖燒酎

主要產地為奄美諸島(琉球地區)，是奄美大島唯一的財源物質。

(三) 乙類燒酎之製造流程(穀類燒酎)(黃，1996)



(四) 穀類燒酎的相關研究

1. 釀酒原料的研究

關於釀酒原料與原料處理的關係，有日本學者研究大麥成分含量與精麥率的關係，結果顯示大麥成分中的粗蛋白、磷酸、鉀等成分比稻米的含量還要多。因此，麥麴之製造工程中對於浸麥與品溫控制須與稻米之控制條件等要有明顯的差別。假如大麥的精麥率在 70% 以下時，由糊粉層除去粗蛋白、粗脂肪的含量會減低，唯精麥率在 45% 時，由於其溝條尚殘存，故可顯出大麥的精白的效果不如稻米，稻米之精白率高，糊粉層較少(許，2002a)。

2. 製麴與糖化酵素的研究

過去在製造本格燒酎的麴使用上時，主要以釀酒之安全性為考量，為防止製麴過程中遭受雜菌汙染，強調以能生產大量有機酸之菌種為主，唯近年已逐漸轉變為著重於燒酎麴中各種酵素的耐酸性、耐熱性與酵素活性之研究，故最近在製麴技術的研究題目上，皆以探討燒酎麴酵素的最大活性應用於燒酎製造技術(許，2002a)。

在傳統上，燒酎用的麴菌通常使用黑麴菌與白麴菌二種，目前使用最普遍者為白麴菌(河內菌)，其生理特性類似 *Aspergillus awamori*，且為中酸性黑麴菌的自然變異株，因此在現代分類上稱為「*A. awamori*-Var, *Kawachii*」(許，2004)。

過去研究指出，由於大麥燒酎醪在發酵期間的溶解性欠佳，且其發酵率遠較米燒酎醪低，為促進大麥溶解度，因此採用添加耐酸性之半纖維素酶(hemi-cellulase)，其對植物細胞壁有較強之水解效果(大森，1994)。

另外，燒酎麴菌中所生產的 α -amylase 有 2 種類型，一種為

taka-amylase 的 α -amylase，其具有酵素活性之最適 pH 值範圍為 4.5~9.5，另一種為 acid-stable- α -amylase 較耐酸性的 α -amylase，其具有酵素活性之最適 pH 值範圍為 2.0~6.5；顯示初期為耐酸性強之澱粉分解酵素(須藤，2002)。製麴前半段(24 小時後)的 α -amylase 均屬於非耐酸性的酵素，而在製麴後半段(44 小時後)出麴的 α -amylase 均屬於耐酸性的酵素，應用此項研究結論施行製麴管理，配合製麴工程可提供高度自動化的燒酎製造技術(須藤，2002)。

通常麴菌可以分泌多種的酵素於麴菌體外，其中最重要的酵素為分解澱粉的糖化酵素(gluco-amylase)與澱粉分解酵素(α -amylase)，唯在釀造清酒中以糖化酵素影響釀造過程及品質最大，故釀造「吟釀酒」時須特別要使用具有高活性之糖化酵素的麴菌(涉谷，1997)。

目前較普遍使用的釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)在菌體外並不能分泌產生糖化酵素與澱粉分解酵素等可以分解澱粉的酵素，因此，若以主要成分為澱粉質之釀酒原料，在接種酵母進行發酵前，須先用麴菌分泌的糖化酵素或添加酵素劑將澱粉質液化(糊精化)及糖化後，方可進行酒精發酵。

3. 燒酎酵母

燒酎釀造之品質除了受到原料種類、發酵與蒸餾條件等因素之影響外，燒酎酵母對釀造燒酎之品質也是主要影響因素之一，目前在日本普遍使用的燒酎酵母有鹿兒島酵母、宮崎酵母、泡盛 1 號、釀造協會 SH-4 號，以及最近開始使用的協會 2 號(米燒酎專用)及協會 3 號(大麥燒酎專用)燒酎酵母等。

唯目前使用的燒酎酵母，均為高品溫及低 pH 值的環境下增殖及進行發酵的，因此，具有能耐高濃度酒精和耐強檸檬酸下增殖的特性，

但由於在高品溫及高濃度酒精下進行酒精發酵，酵母的增殖皆受到嚴格的限制，同時，要達到冷卻因發酵產生的熱量，在製造成本方面恐將造成不利的因素，因此，不論在技術上或研究上，皆強調使用耐高溫性之燒酎酵母，以期降低製造成本、短縮發酵天數，並達到品質多樣化的目標。

主宰燒酎品質的因素主要為原料、微生物(麴菌，酵母)、發酵與蒸餾條件等，其中以燒酎酵母影響燒酎的香味最大，為能獲得香氣良好的燒酎，有些燒酎製造場會使用協會 9 號(吟釀酵母)，因其來源為清酒用酵母，故不適合於燒酎的製造條件，而無法發揮吟釀酵母生成高香氣的效果(土屋，1993)。

由表一得知香氣成分當中的異丙醇、異丁醇等高級醇，以 KF-3 融合酵母的生成能力較親株 S-4 株酵母為優良，至於生成的醋酸異戊酯(吟釀香指標成分)，約為親株 S-4 酵母的 1.5 倍(土屋，1999)。

目前 KF-3 融合酵母在熊本縣工業技術中心已有銷售，目前在釀造場上普及運用在製造「球磨本格燒酎(米燒酎)」(土屋，1999)。

表一、不同燒酎酵母菌株發酵之香氣成份分析。

Table1.Comparison of aroma and flavour components of the fermented mash in the 2L-scale fermentation from different yeast.

Strains	乙酸乙 酯 (ppm)	正丙醇 (ppm)	異丁醇 (ppm)	異丙醇 (ppm)	乙酸異 戊酯 (ppm)	辛酸乙 酯 (ppm)	E/A
S-4	49	152	169	343	3.2	1.4	0.93
K-9	57	121	161	279	2.5	1.7	0.90
KF-3	58	143	217	396	4.9	1.5	1.24
KF-5	54	172	252	419	4.6	1.3	1.10

E/A: Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol×100 (土屋，1999)。

4. 蒸餾

酒類屬於食品飲料的一種，在其組成成分中水和乙醇占總體積的絕大部分，其餘的即為這些呈香呈味的「芳香成分」。芳香成分包括有機化合物和無機化合物，分別由糖分、有機酸、酯、高級醇、醛、酮、酚、含氮化合物、礦物質和其他化合物共同組成。不同種類的酒，這些微量成分構成的種類和濃度亦不相同。故所謂「酒類」，就是一種含有許多化合物共同組成的混合溶液(黃和張，1999)。根霉是黃酒和小麴酒的糖化菌，含有豐富的澱粉酶和糖化酶，它的最大特點是能將澱粉分子中的 α -1,4 鍵和 α -1,6 鍵打開，澱粉最終可較完全的轉化為可發酵性糖。同時在發酵過程中可以產生較多的風味物質，從而構成了根霉麴酒的主體香味成分乙酸乙酯與乳酸乙酯的含量較高，醇厚感特別濃、入口醇和、回味悠長(黃和張，1999)。

米燒酎的組成成分除了乙醇和水外，還有 1% 左右的微量成分。這些微量成分賦予米燒酎釀造酒特有的香和味，其種類、數量及比例是否洽當，決定米燒酎的風格和品質。這些微量成分依其在蒸餾時，隨著乙醇餾出的先後次序，分為酒頭成分和酒尾成分兩大類。酒頭中餾出的微量成分主要有乙醛、乙酸乙酯、丁酸乙酯、己酸乙酯、戊醇、丁醇、丙醇等，在酒頭中的濃度最大，實際生產上表現為酒頭 > 酒心 > 酒尾。(楊 等人，2001)。

酒類香味是各種不同的揮發性和不揮發性有機化合物的複雜整體的表現。而這些化合物皆來自於生產過程中的各個階段，其中以發酵所產生的香氣化合物最多(楊 等人，2001)。燒酎的香氣成分除由酒醪生成的香氣成分外，其高沸點香氣成

分在蒸餾中被熱分解或起化學反應生成的香氣成分亦會被蒸餾至燒酎中，採用低溫的減壓蒸餾方法或將酒醪經過壓榨過濾再後施行蒸餾，皆可除去所含高沸點香氣成分，使其所得燒酎的成品為清香淡麗型本格燒酎(許，2002b)。

米香型白酒的香味成分主要為乙酸乙酯、乳酸乙酯和 β -苯乙醇，它已成為中國名優白酒中香型之一，而獨樹一幟。其代表酒種有桂林三花酒、廣西全州湘山酒、湖南瀏陽河小麴酒、廣東五華長樂燒等。這些優質小麴酒的工藝特點，都是採用米為原料，先固態培菌糖化，後半液態發酵成酒的生產工藝。白酒的化學成分中 98% 是水和乙醇，1%–2% 是呈香呈味的微量成分。其中，微量成分決定了白酒的香型和風格。中國名優白酒中，微量香味成分主要包括有機酸、酯、醇、碳基化合物和芳香族化合物等，它們的含量雖少，但卻決定著酒的品質和風味(李和盧，2003)。對於酒中的芳香風味成分，酵母菌的重要性，不僅僅是產生乙醇而已，它也是促進酒中具有典型風味的重要因素，是香味化合物的主要製造者。就如同許多酵母一般，普通的麵包酵母也是一種典型的兼香性有機體。其代謝途徑主要受到通氣、溫度和基質特性與濃度等發酵條件的限制。由於這種單細胞有機體與生長環境有極密切的接觸，因此，化合物易於從周圍的介質中轉移進入酵母的細胞中。香味是各種不同的揮發性和不揮發性有機化合物的複雜整體的表現，這些化合物皆來自於生產過程中的各個階段，其中以發酵所產生的香氣化合物最多，但是蒸餾與熟陳也具有舉足輕重的影響。(李和盧，2003)。

五、生料釀酒

(一) 生料釀酒之簡介

所謂生料釀酒就是指釀酒原料不經蒸煮糊化而直接利用微生物將生澱粉進行糖化產生葡萄糖等小分子後供酵母菌利用產生酒精和其他香味物質(李和盧,2003)。其關鍵技術就在澱粉顆粒的糖化水解，與澱粉酶水解糊化澱粉不同，只有能吸附生澱粉的澱粉酶才具有水解生澱粉的能力(蕭,2000)。生料釀酒生產工藝又分為固態法生料釀酒和液態法生料釀酒兩種，固態生料法操作較為繁瑣，勞動力需求高，酒質較好，多用高粱和玉米為原料；液態生料釀酒技術較簡單，操作方便，勞動力需求低，出酒率高，適用於大米等原料(黃,2001)。

(二) 生澱粉糖化原理

關於生澱粉之糖化原理，目前尚無一套統一之理論，一般認為，生澱粉能吸附葡萄糖澱粉酶從而發生促水解反應。葡萄糖澱粉酶又稱糖化酶，它能將澱粉從非還原性末端水解 α -1,4 葡萄糖苷鍵，也能緩慢水解 α -1,6 葡萄糖苷鍵轉化為葡萄糖。糖化酶對生澱粉的水解速率與它能否被生澱粉顆粒吸附，以及吸附強度有很大的關聯，容易被生澱粉吸附的糖化酶，其水解生澱粉的能力就強；反之則弱(沈,2001)。

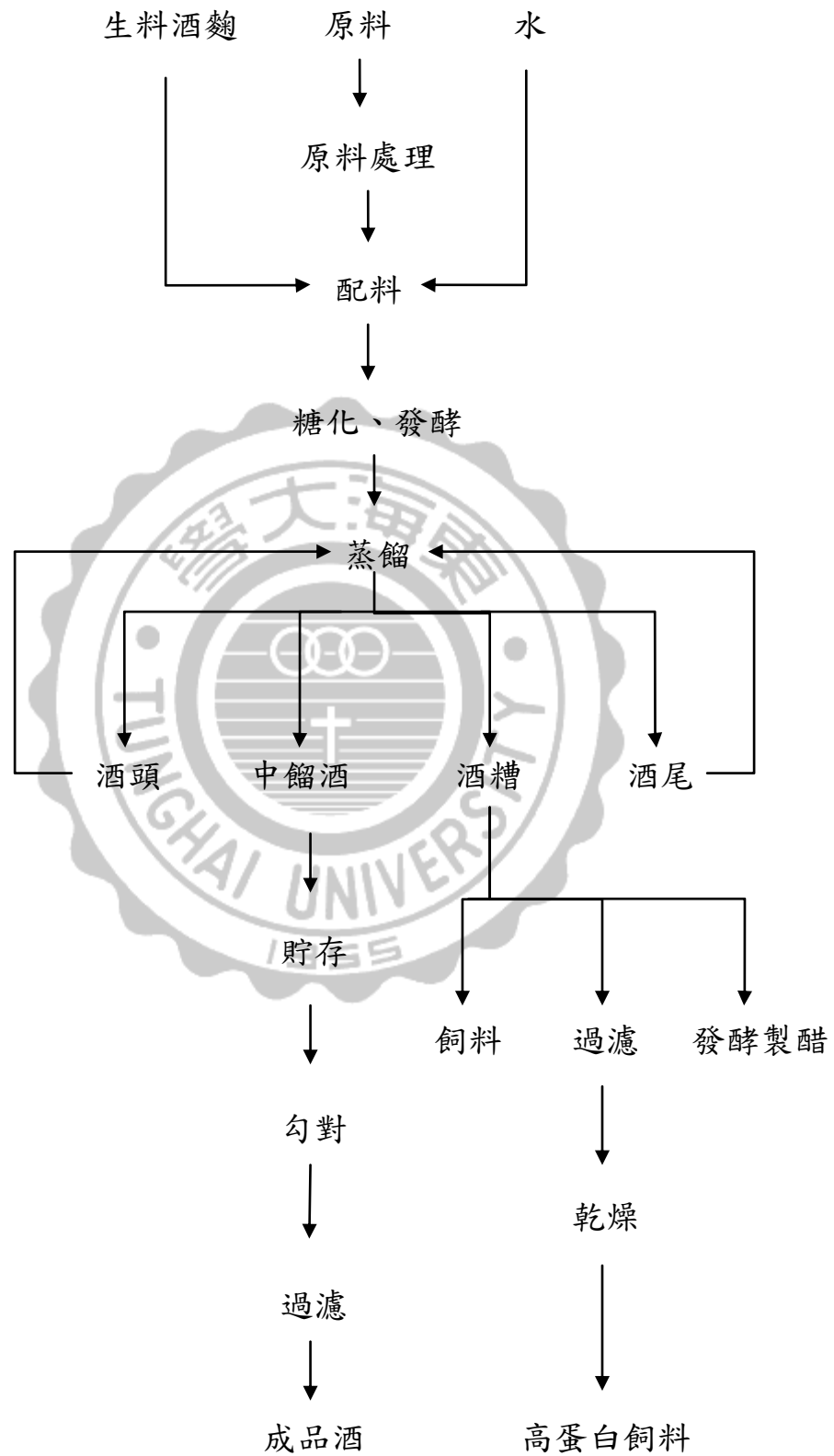
澱粉本身具有一定的吸附能力，當澱粉結晶遇水後，水分子就滲透侵入澱粉顆粒內部，與澱粉分子產生氫鍵結合，澱粉分子間隙逐漸擴大，體積膨脹，澱粉之螺旋結構伸展，暴露出大量親水之氫氧基，使其能與其他有機物連結，吸附物質，由於澱粉之吸附作用，酶做為生物催化劑，更能接近澱粉，其催化作用比完全沒有吸附作用時強，再加上糖化酶具有生澱粉親合力位置存在，使糖化酶更能接近澱粉顆粒而直接催化水解生成葡萄糖。因此，生澱粉之親和力位置加上糖化

酶之活性位置，構成糖化酶水解生澱粉之主要因素(沈，2001)。

糖化酶對生澱粉的水解能力與其酶活性強弱有關，酶活性強的糖化酶對生澱粉的水解能力就強。同時，糖化酶對生澱粉之水解能力還與原料性質、酵素含量、作用溫度、醪液濃度和 pH 值有關(沈，2001)。



(三) 生料液態釀酒的製造流程(黃，2000)



(四) 生料發酵的相關研究

1. 生澱粉糖化能力之微生物菌種

如何找出能直接糖化生澱粉和破壞澱粉三維網組織結構的微生物是生料釀酒的關鍵，絕大多數能產澱粉酶的微生物主要以黴菌為主，它們產的澱粉酶一部分具有水解生澱粉的能力，能具有生澱粉糖化能力的澱粉酶菌種有黑麴黴菌、根黴菌、泡盛麴黴、擬內孢黴、米麴黴菌、毛黴菌、枯草桿菌、芽孢桿菌、球菌等；目前用於生料糖化的菌種主要是黑麴黴菌和根黴菌(劉，2000)。

經由玉米澱粉吸附技術分離根黴菌和黑麴黴菌的葡萄糖澱粉酶(GA)，得到兩種型式的酶，GAI和GAII，其中GAI能吸附在生澱粉上，而GAII不能吸附到生澱粉上(Ueda, 1998)。而根黴菌和黑麴黴菌的GAI含量較高，米麴黴和枯草桿菌之GAI含量低，因此根黴菌和黑麴黴有較強的生澱粉水解能力(蕭，2000)。

2. 原料的種類與質量對糖化水解生澱粉的影響

以往曾經用於釀酒的澱粉原料主要有高粱、玉米、稻米、番薯等四種，番薯由於果膠質含量高，原料如不蒸煮，則釀造之成品酒中甲醇含量會很高，因此番薯不適合用於生料釀酒，其於三種原料都適宜做為生料釀酒之原料，原料出酒率由高至低分別為，稻米>玉米>高粱(鄧和程，2000)。

如以高粱做為釀酒原料，由於高粱含有較多的單寧和色素，對糖化發酵具有一定的抑制作用，傳統高粱酒之釀造皆以蒸熟之高粱進行釀造，蒸煮過程中已破壞大量之單寧和色素，因此對於糖化發酵並無明顯之抑制作用，但如以生高粱進行釀造，菌體之生長會由於單寧之抑制而降低原料出酒率(鄧和程，2000)。

對於稻米和玉米為釀酒原料而言，由於兩者精白後之胚乳占主要成分，所以原料出酒率高，但是以玉米為原料釀造之成品酒雜醇油含量過高，雜醇油含量過高則使口感過於辛辣，酒質較差。因此，就以成品酒質來說，以稻米和高粱做為原料，釀造之酒質口感較好(鄧和程，2000)。

3. 發酵 pH 值對糖化生澱粉的影響

生料發酵為多菌種、多種酵素的複式發酵，其酵素的最適作用活性 pH 值各不相同，就生澱粉糖化而言，黑麴黴菌澱粉酶之最適 pH 值為 3.5，根黴菌澱粉酶之最適 pH 值為 4.5(上田，1993)。而酵母菌大多在 pH 3.5~6.0 之範圍內能進行正常之發酵作用。

4. 發酵溫度對糖化生澱粉的影響

與熟料發酵相比，生料發酵周期長，發酵溫度低。由於澱粉酶最適活性之溫度範圍一般在 55°C~60°C，而生料發酵釀造，澱粉之水解作用一般在常溫下進行，溫度較低，故澱粉酶作用緩慢，發酵時間要延長，但如培養具高澱粉酶活性之菌種，則發酵時間可縮短。對於採用常溫釀酒酵母的生料酒麴，適宜的發酵溫度為 26°C~32°C，使用耐高溫發酵酵母之酒麴，適宜的發酵溫度為 28°C~35°C。總結來說，發酵溫度須調控在合適的範圍內，發酵溫度過低，發酵緩慢，發酵周期延長。發酵溫度過高，酵母菌易衰老，發酵不徹底，且易生酸，酒質差，原料出酒率低(上田，1993)。

5. 生料釀造之發酵周期

發酵週期與原料質量、粉碎粒度、生料酒麴質量和發酵溫度有關，其中生料酒麴為主要影響因素(上田，1993)。正常情況下，發酵 5~7

天酒精發酵過程已完成，醪液之酒精含量此時達到最高，此後醪液之酒精含量會有所下降。但未獲得更好的酒質，發酵周期會延長至 10 天或更長，已變形成較多的風味物質。在發酵周期延長期間，發酵溫度應控制在 32°C 以下，否則易生酸，出酒率下降，風味物質也不會提高(蕭，2000)。

6. 生料發酵在其它發酵工業的應用

生料發酵最初就是在釀酒過程中研發出之新技術，它是在傳統釀造方法受到能源問題挑戰的時候被提出的。傳統釀酒和酒精的生產都是先將原料蒸煮糊化後進行糖化發酵，然而，隨著生物技術和酵素工程的發展，生澱粉不經加熱糊化而直接經酵素作用糖化發酵變為可能和現實。

1981 年有學者報告利用木薯製酒精的新方法，將 *Asp.awamori* NRRL 3112 和 *Asp.niger* 接種於麩皮上於 30°C 培養 3 天製成澱粉酶，並將粉碎的木薯漿和澱粉酶、酵母菌混和，在 pH 3.5、30 °C 下發酵 5 天，生木薯的酒精產量達理論值的 82%(Seiuosuke，2000)。西方的生澱粉發酵研究主要是在生澱粉發酵製造酒精的領域，由於受到生物技術的限制，其用酶量和酵母量較大，以致未形成工業化生產。

近年來，國內外對生澱粉製造酒精進行了許多的研究，但將原料不經蒸煮進行發酵應用在製醋上的研究仍不多。有研究報告以玉米粉為原料，利用生料發酵法生產液態醋，在酒精發酵階段與熟料酒精發酵比較，除了發酵時間要延長外，發酵結果基本相同(張，1990)。

參、材料與方法

一、 試驗材料

(一) 試驗菌株

本試驗菌株為 *Rhizopus formosensis* 和 *Saccharomyces peka* 皆購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

(二) 試驗藥品

1. 3,5-dinitrosalicylic acid 購自西班牙 Panreac Quimica S.A.U 公司。
2. D-(+)-glucose 購自美國 Sigma 公司。
3. Yeast extract、potato dextrose agar(PDA)購自印度 Himedia 公司
4. Potassium sodium tartrate、NaOH、phenol、acetic acid、HCl 等一級試藥，購自台灣聯工化學廠股份有限公司。
5. Lactic acid 購自 Choneye Pure Chemicals 公司。
6. 藥用 95%酒精購自景明化工公司。
7. Sucrose(台糖精緻細砂)購自台灣糖業股份有限公司。

(三) 培養基組成

1. 菌醃培養基:potato dextrose agar(PDA)
2. 搖瓶培養基:12~13 °Brix 砂糖液、0.3% yeast extract、pH5.4
3. 測菌數培養基:yeast and malt extract agar(YMA)

二、 試驗設備

(一) 菌株培養：

1. 無菌操作台(海天科學股份有限公司，Taiwan)。
2. 旋轉式震盪培養箱(Firstek，model:S302R，一升科技，Taiwan)。

(二) 培麩：

1. 均質機(Oster regency，USA)。

2. 恆溫培養箱(Firstek, model:RI-150, Taiwan)。
3. 蒸氣直立式滅菌釜(Huxleyhl-340, 永大明儀器, Taiwan)。

(三)發酵：

1. 恆溫培養箱(Firstek, model:S302R, Taiwan)。
2. 篩分設備
3. 發酵管

(四)蒸餾：

1. 1L 蒸餾瓶(上展, GLG-145, Taiwan)。
2. 署式冷凝器(上展, GLG-145, Taiwan)。
3. 溫控式加熱包(佳鏵股份有限公司, MN-1000, Taiwan)。

(五)一般分析儀器：

1. pH meter(SP-2200, Suntex, Taiwan)。
2. 光電比色計(Spectronic 20 Genesys, model 4001, USA)。
3. 桌上型高速離心機(Hettich EBA 12, Japan)。
4. 靜態恆溫水浴槽(Firstek model:B101, 一升科技, Taiwan)。

(六)酒精分析儀器：

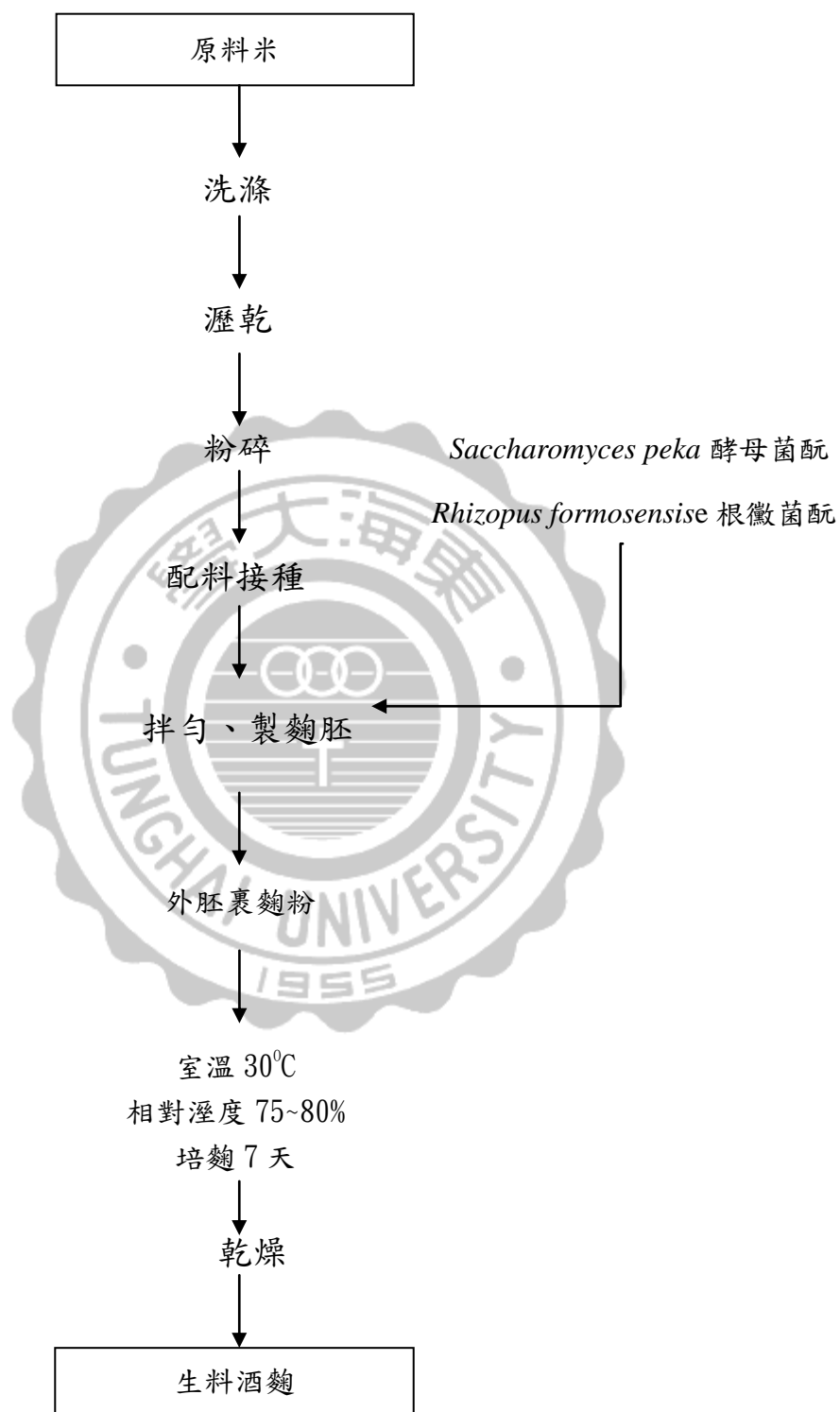
1. 氣相層析儀(gas chromatography)/火焰離子化檢測器(Flame ionization detector)(G-5000A, Hitachi)。
2. 分離管柱: capillary column, 60 m, 0.25 mm ID

(七)香氣成分分析儀器：

1. 頂隙氣相層析儀/火焰離子化檢測器(FID) (PerkinElmer Clarus 600)。
2. 分離管柱: capillary column, StabilWAX® -DA, 60 m, 0.25 mm ID, 0.25 m df。

三、 實驗流程

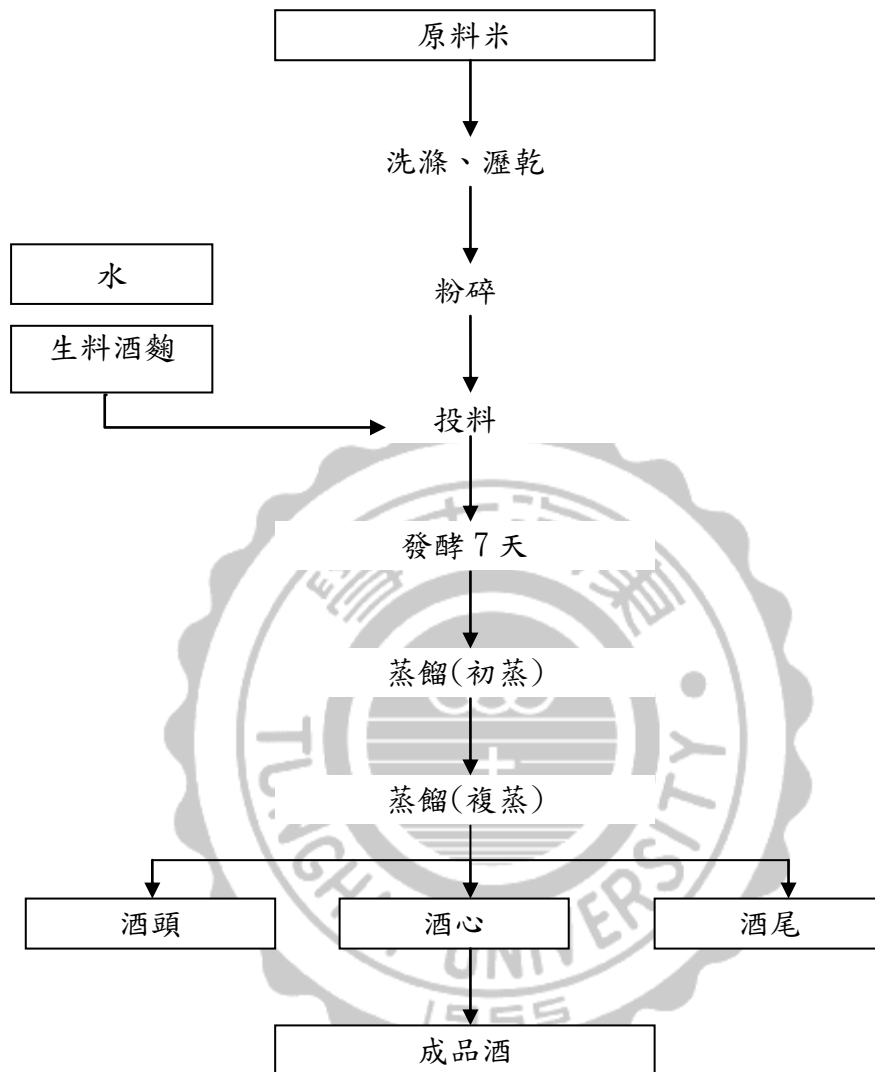
下圖一為本次實驗生米麴之製作流程。



圖一、生米麴(小麴)製作流程

Fig.1 procedure of making raw rice koji.

下圖二為本實驗生米發酵釀製日式米燒酎之流程。



圖二、液態生料發酵法釀造米燒酎之流程

Fig.2 The process of Japanese rice shochu with uncooked rice brewing.

四、 試驗方法

(一) 酵母菌醃培養

取配製好之搖瓶培養基 100 mL 裝於 250 mL 三角瓶中，以 121⁰C、20 min 條件滅菌，待冷卻後，取劃線培養之酵母菌，刮取相當 1~2 接種環量之酵母於培養基中攪拌接種，並以 80 rpm 在 30⁰C 下震盪培養 24 小時之後，取菌液 1 mL 以 0.9% NaCl 溶液經序列稀釋後，塗抹於 YMA 培養基，於 30⁰C 培養箱倒置培養 48 hr，計算每一培養皿之菌落數，測定酵母菌數。

(二) 根黴菌醃培養

1. PDA 繼代培養

取劃線培養好之根黴菌，以直徑 6 mm 之玻璃滴管切取根黴菌絲，接種於 PDA 培養皿中，於 30⁰C 培養 5~6 天，待其生成大量灰黑色孢子。

2. 根黴菌孢子收集

取上述之根黴菌於無菌操作台中，以潤濕的無菌棉花棒將孢子沾黏下來，並將棉花棒置入 0.9% NaCl 無菌水中抖落孢子，重複收集數次直到孢子收集完成。

3. 白米種麴製備

取 20 克經粉碎之白米，加入 10 mL 蒸餾水，混勻後以 121⁰C、20 min 條件滅菌，放冷後接種 5 mL 根黴菌孢子懸浮液，於 30⁰C 培養 7 天後，即為白米種麴，使用於酒麴之產製。

(三) 糖化菌在生米酒麴上之酵素生產

取一瓶培養好之白米種麴，加入 450 mL 蒸餾水後以均質機混合均勻，並以篩網過濾製成孢子懸浮液，並以粉碎之蓬來米為原料，按

原料重之 65% 水量，以 3:2 的比例分別加入 *Rhizopus formosensis* 孢子懸浮液和 *Saccharomyces peka* 酵母菌培養液，攪拌均勻後再揉製成直徑約 3-4 cm 的圓球型餅團狀，餅團表面溼潤(包覆一層水膜)，表面再裹上一層陳麩粉末(製備甚佳的熟麩)後，排列於麩盤上一併置入 30°C 培養箱中培養，控制濕度在 75-80% 左右(依季節及生長期調整溼度)，每天定時觀察酒麩生長情形，並取樣測定水分及糖化澱粉酶活性，培養七天後出麩乾燥再冷藏貯存。

(四) 發酵試驗

1. 酒麩用量對於發酵力的影響

將蓬萊白米粉碎，通過 35 mesh 之篩網過篩；分別取 60 克 35 mesh 的粉碎白米置入 250 mL 三角發酵瓶中，各發酵瓶加入麩粉量分別為 10% (w/w)、15% (w/w)、20% (w/w) 三種。

調整水分至醪液比為 1:2.5；醪液比為發酵液中固態物質和液態之比例。

瓶口放置發酵管(水封)(圖三)，每組各作三重複，於 30°C 進行發酵七天(圖四)，發酵期間定時測定總失重、殘糖量和 pH 值。以期檢討不同用麩量對於發酵力的影響。

2. 原料粉碎度對於發酵力的影響

蓬萊白米洗淨後粉碎，分別以網篩 35 mesh、20 mesh、10 mesh 過篩，並各自取 60 克過篩之粉碎白米於 250 mL 三角瓶中，用麩量 15%，調整水分至醪液比為 1:2.5，瓶口放置發酵管(水封)，每組各作三重複，於 30°C 進行發酵七天，發酵期間定時測定總失重、殘糖量和 pH 值。

3. 發酵溫度對於發酵力的影響

將洗淨之蓬萊米粉碎後，經 35 mesh 之篩網過篩，取 60 克至 250 mL 三角瓶中，各加入酒麴 15%，調整水分至醪液比為 1:2.5，瓶口放置發酵管(水封)，每組各作三重複，分別於 30°C、25 °C、20°C 下進行發酵七天，發酵期間定時取樣測定總失重、殘糖量和 pH 值。

4. 添加乳酸對於發酵力的影響

將洗淨之蓬萊米粉碎後，經 35 mesh 之篩網過篩，取 60 克至 250 mL 三角瓶中，各加入酒麴 15%，調整水分至醪液比為 1:2.5，並且用乳酸調整發酵液 pH 值到 4.6，瓶口放置發酵管(水封)，三重複試驗，於 30°C 下發酵七天，發酵期間定時測定總失重、殘糖量和 pH 值。



(a)



(b)



圖三、以三角瓶進行生料發酵

Fig.3 Uncooked rice brewing with uncook flack fermentation.



圖四、生料發酵 7 天後情形

Fig.4 Uncooked rice brewing after 7 days fermentation.

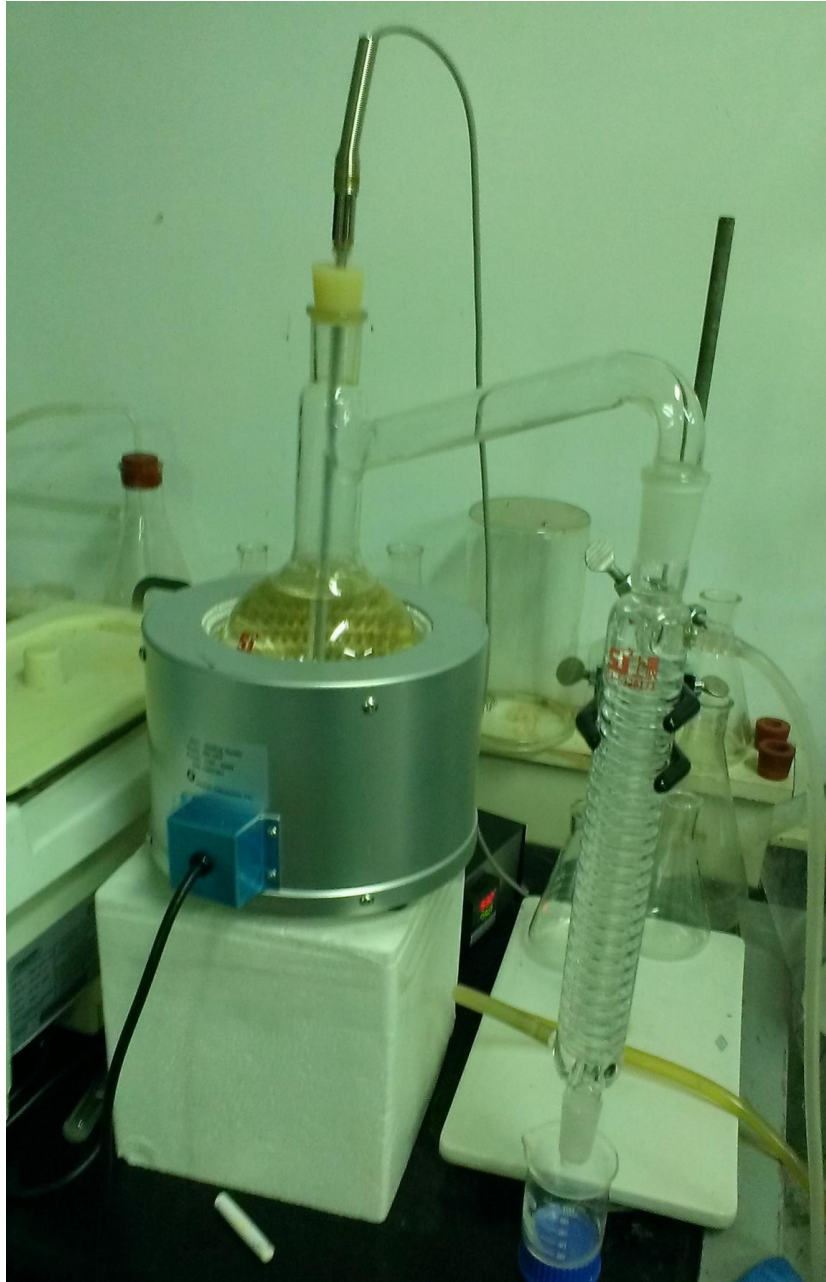
(五)蒸餾試驗

1.初蒸

發酵七天後，搖晃三角瓶以去除殘餘的 CO_2 ，取發酵液 100 mL 置於 1 L 蒸餾瓶內，加充足的水使成 300 mL，接上署式冷凝器(圖五)，控制溫度，開始蒸餾之溫度為 80°C ，並於蒸餾過程中緩慢上升至 95°C ，使蒸餾液以大約每秒一滴的速度蒸餾，收集蒸餾酒液，直到液量達到量瓶刻度 100 mL 的位置，將蒸餾液進行酒精度測定、計算出酒率和香氣成分分析。

2.複蒸

合併初蒸的酒液置於蒸餾瓶中，接上署式冷凝器(圖五)，控制溫度同上述之溫度範圍內進行蒸餾，收集之酒液分成三段，即第一段為酒頭，第二段稱為酒心，第三段稱為酒尾。酒頭收集量約為原酒液量的 1.5%，酒心的酒液則取蒸餾至酒精度 40% 時為止(胡 等人, 2003)，酒尾收集量為蒸餾至測不到酒精濃度為止，並分別取各分段之蒸餾液進行酒精含量之測定和香氣成分的分析。



圖五、常壓蒸餾裝置

Fig.5 Distillation devices.

五、 分析方法

(一) CO₂ 生成量

根據酒精發酵的原理，CO₂ 生成量若增加代表乙醇生成量增加，而發酵過程中生成之 CO₂ 由發酵管散失，因此發酵期間三角瓶每隔 24 小時秤重一次，秤重前先搖晃數次使發酵產生之 CO₂ 全部溢出瓶外再測量，而 CO₂ 溢出時所帶之水份則被硫酸吸收，利用此方法估測酒醪中二氧化碳的減重情形，並據以估算酒精生成量，做為判別生米發酵對於發酵力的影響(黃，2000)。

(二) pH 值

直接取發酵液，利用 pH meter 測定其 pH 值。

(三) 還原糖含量測定

1. 分析原理

本試驗利用修正過後的二硝基水楊酸法(Dinitrosalicylic acid, DNS)(Miller, 1959)測定試樣的糖度，原理為在鹼性條件下，含有酮、醛基的糖類，可以和 3,5-二硝基水楊酸在高溫下進行氧化還原反應，生成深褐色之 3-氨基-5-硝基水楊酸，在波長 575 nm 下吸光值的感度最大，因此利用此波長進行比色，做為還原糖的定量方法。

2. 試劑配置

A 液:1% 3,5-dinitrosalicylic acid、0.2% phenol、1% NaOH。

B 液:5% Na₂SO₄。

C 液:40% Potassium sodium tartrate。

D 液:於使用前將 1 mL B 液加入 99 mL A 液中。

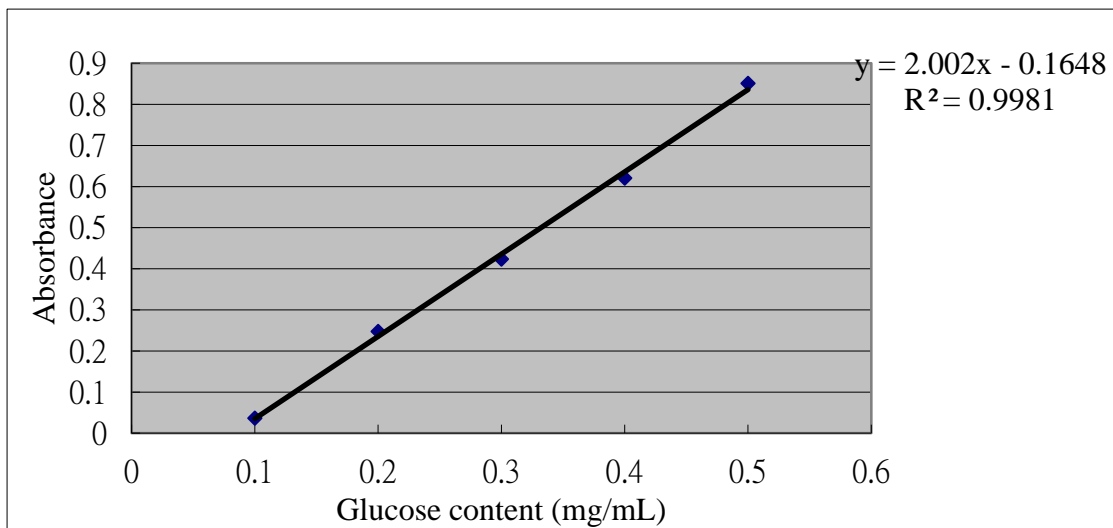
3. 分析步驟

取發酵液於 5500 rpm 離心 15 min 後，取上澄清液依序稀釋，再取 1 mL 之稀釋液加入 1 mL 之 D 液震盪混合均勻，於 100 °C 水浴加

熱 15 min，立刻加入 C 液以穩定顏色，冷卻至室溫，於 575 nm 之波長下偵測其吸光值。

標準試劑為配製不同濃度的 D-(+)-glucose 溶液，以製作還原糖標準曲線(圖六)，將測得的吸光值代入標準曲線之回歸方程式中，經由換算可得到樣品之還原糖含量。





圖六、還原糖測定之標準曲線

Fig.6 Standard curve of reducing sugar.

(四) 糖化澱粉酶活性之測定

1. 粗酵素液的製備

取 15 克培養中的米麴於 250 mL 之三角瓶中，加入 100 mL 之 0.5 % 的 NaCl 溶液，置於震盪器上震盪 3 小時，以 Whatman NO.1 濾紙過濾，所得之濾液即為粗酵素液(Narahara et al., 1982)。

2. 試劑配置

①0.2 M 醋酸緩衝液:0.2 M acetic acid solution、0.2 M Na-acetate solution 以 3:7 比例混合，以 pH meter 調整 pH 至 5.0。

②0.5 % NaCl 溶液:5 克 NaCl 加少量水溶解，加入 50 mL 之 0.2 M 醋酸緩衝液，定量至 1L。

③2%可溶性澱粉液:取 2 克可溶性澱粉，加少量蒸餾水，加熱攪拌直到液體澄清為止，冷卻後再加蒸餾水定量至 100 mL。

3. 酵素活性測定

取 10 mL 2%可溶性澱粉液置於 50 mL 三角瓶中，加入 2 mL 之 0.2 M 醋酸緩衝液，於 40⁰C 水浴 5 min，加入 1 mL 前製備好之粗酵素液，於 40⁰C 下進行反應 20 min，立刻加入 1 mL 1N NaOH 溶液停止反應，於室溫下靜置 30 min 後加入 HCl 中和，經序列稀釋後利用 DNS 法測定糖含量，空白試驗組分別改以 10 mL 蒸餾水替代澱粉液和 1 mL 蒸餾水替代粗酵素液。酵素活性單位之定義為以 40⁰C 反應 60 min 後，所生成 1 mg Glucose 定義為具有 1 個酵素活性單位(unit) (楊，1993)。

(五) 酒精含量測定和出酒率之計算

將蒸餾液先以 0.22 μm filter 過濾，利用氣相層析儀(gas chromatography, GC)進行酒精含量分析(圖七)，標準品分別以無水酒精配置 2%、5%、7%、10%、12%、15% 等不同濃度的乙醇溶液(圖八)，依其波峰之面積對照標準品計算酒精濃度。

出酒率之計算方式為利用初蒸液測得之酒精含量，根據澱粉產酒精之化學反應式，理論上計算得到的絕對酒精生成量應為 65%，因此換算成 65% 酒所具有之重量(kg)後，再除以釀酒原料之消耗量(kg)，為原料出酒率(黃，2000)，公式如下。

$$\text{原料出酒率} = \frac{\text{產 65\% (vol) 原酒(kg)}}{\text{原料總消耗量(kg)}} \times 100\%$$

表二為升溫條件，分析條件如下：

1. Detector temperature: 240°C

2. Injector temperature: 240°C

3. Carrier gas: N₂

4. Flow rate: 1.5 mL/min

5. Split ratio: 1:20

6. 注射量: 0.2 μL

表二、酒精分析之升溫條件

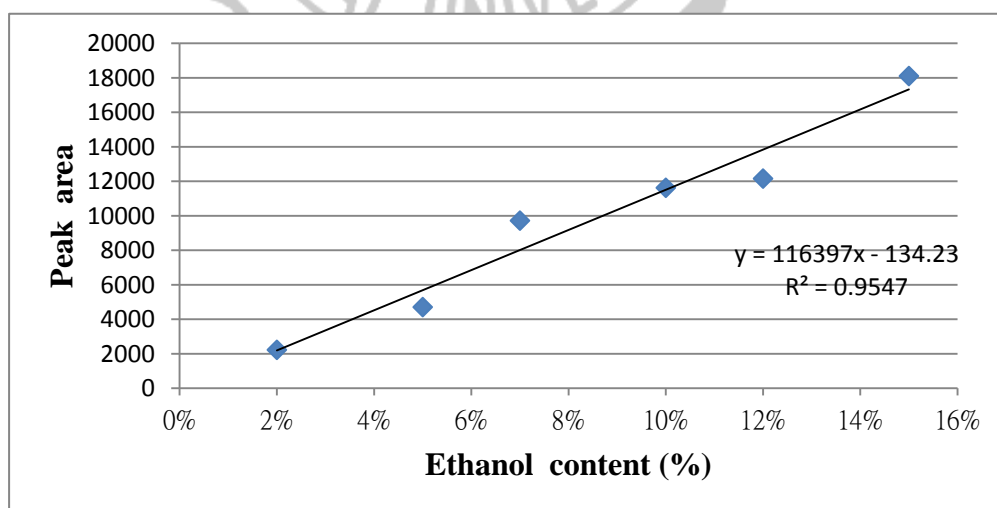
Table 2. Program temperature of ethanol analysis.

rate (°C/min)	temperature (°C)	hold (min)
-	40	4
5	240	30



圖七、氣相層析

Fig.7 Gas chromatography.



圖八、酒精測定之標準曲線

Fig.8 Standard curve of ethanol concentration.

(六) 微量香氣成分測定

1. 檢量線與標準液之配製

先用 10 mL 之定量瓶倒入適量無水酒精潤洗，蓋好定量瓶蓋子後，置於電子天平上秤重，再吸取定量之藥品加入定量瓶中，置回電子天平上秤重，記錄此時之重量值，其稱為 stock 原液。再自此 stock 原液中取七種漸進不同體積 B_1 、 B_2 、 B_3 、 B_4 、 B_5 、 B_6 、 B_7 (μL)，分別加入至另外已置入適量無水酒精之 10 mL 定量瓶中，分別以無水酒精稀釋成七種不同濃度，每組濃度做三重複。

由上述配製之不同濃度標準液利用頂空氣相層析儀分析後，得到一組實測濃度 E (mg/L)，再由配製之理論濃度 D (mg/L)，計算兩者之誤差值：

$$E-D/D \times 100\% = E' (\%)$$

誤差值應介於 -15% 至 $+15\%$ 之間。若是，表示此檢量線可信，進一步用來對未知樣品進行檢測；若否，則懷疑實測濃度 E 與檢量線斜率之正確性，應重新配製實測濃度 E 或重新調整檢量線使誤差值符合 $\pm 15\%$ 區間為止，標準品濃度與積分面積相關係數 (R^2) 需大於等於 0.995。

2. 蒸餾酒香味成份分析

將蒸餾液先以 $0.22 \mu\text{m}$ filter 過濾滴入進樣瓶中，再以頂隙自動進樣系統(圖九)將氣體依序注入氣相層析儀(HS-GC)中進行各別成分的測定，表三為升溫條件，分析條件如下：

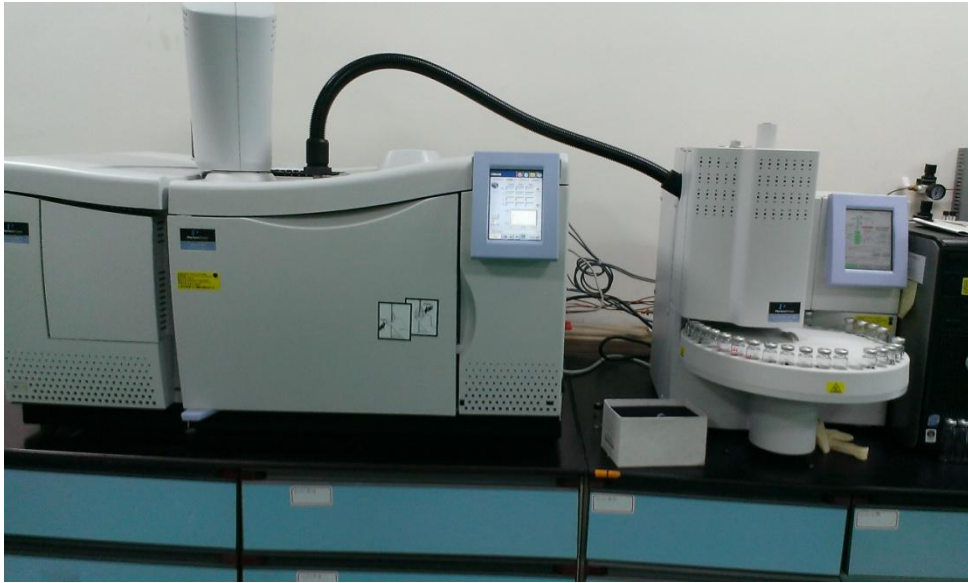
1. Detector temperature: 240°C

2. Injector temperature: 240°C

3. Carrier gas: H_2

4. Flow rate: 1.5 mL/min

5. Split ratio: 1:14



圖九、頂隙氣相層析儀
Fig.9 Headspace gas chromatography.

表三、香味分析之升溫條件
Table 3. Program temperature of aroma analysis.

rate (°C/min)	temperature (°C)	hold (min)
-	40	8
3.5	120	5
8	190	5
10	250	15

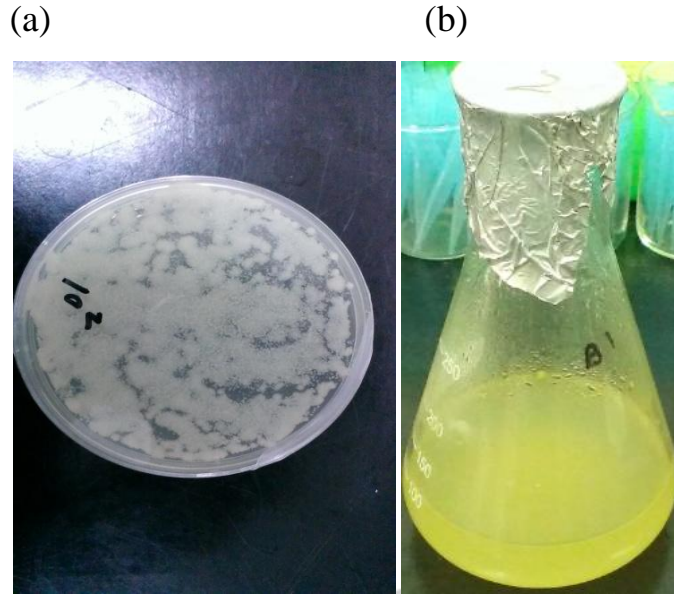
肆、結果與討論

一、 酵母菌醱培養

本試驗取米酒釀造專用酵母菌種 *Saccharomyces peka*，於斜面培養基中先勾取少量種源菌，先塗抹於 YMA 培養皿上於 30⁰C 下培養 24 小時以上(圖十 a)，等菌體快速繁殖後，勾取菌落生長良好之菌叢接入培養瓶中振盪培養 24 小時，發酵液逐漸轉變為乳黃色且濁度增加(圖十 b)，經過塗抹測定菌體數量後，菌體量約為 4.9×10^8 CFU/mL，取此培養液即可做為生米酒麴培育之需。

二、 根黴菌醱培養

本試驗取米酒釀造專用根黴菌種 *Rhizopus formosensis*，先勾取斜面培養基上生長良好的菌體，接入以 PDA 為培養基，於培養皿上作純粹培養根黴菌。於 30⁰C 培養箱培育，待菌絲逐漸生長繁殖，先長出白色菌絲，後轉變為黑灰色孢子(囊)以後(如圖十一 a)，以無菌棉花棒刮取孢子囊，收集孢子於無菌水中，即成為孢子懸浮液，可用於白米種麴之製備，再以粉碎之蓬萊米加入蒸餾水混和製成培養基，加入製備好之孢子懸浮液後培養 7 天製成生米種麴(圖十一 b)，做為製造酒麴之菌醱。

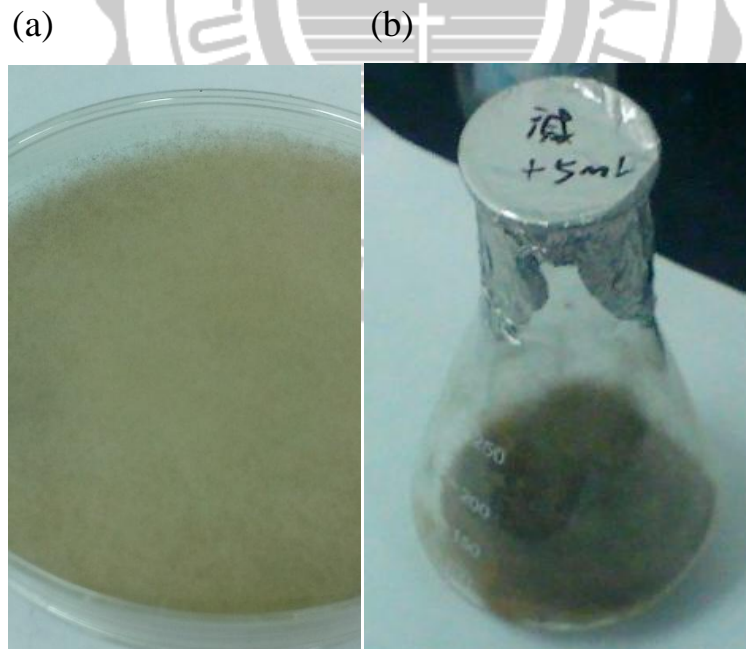


圖十、*Saccharomyces peka* 釀酒酵母菌

(a) 塗抹培養之酵母菌 (b) 搖瓶培養 24 小時之酵母菌醃

Fig .10 *Saccharomyces peka*

(a) Smear cultured *Saccharomyces peka* (b) Starter of *Saccharomyces peka* after cultured 24 hours.



圖十一、*Rhizopus formosensis* 根霉菌

(a) PDA 培養之根霉菌 (b) 培養好之白米種麴

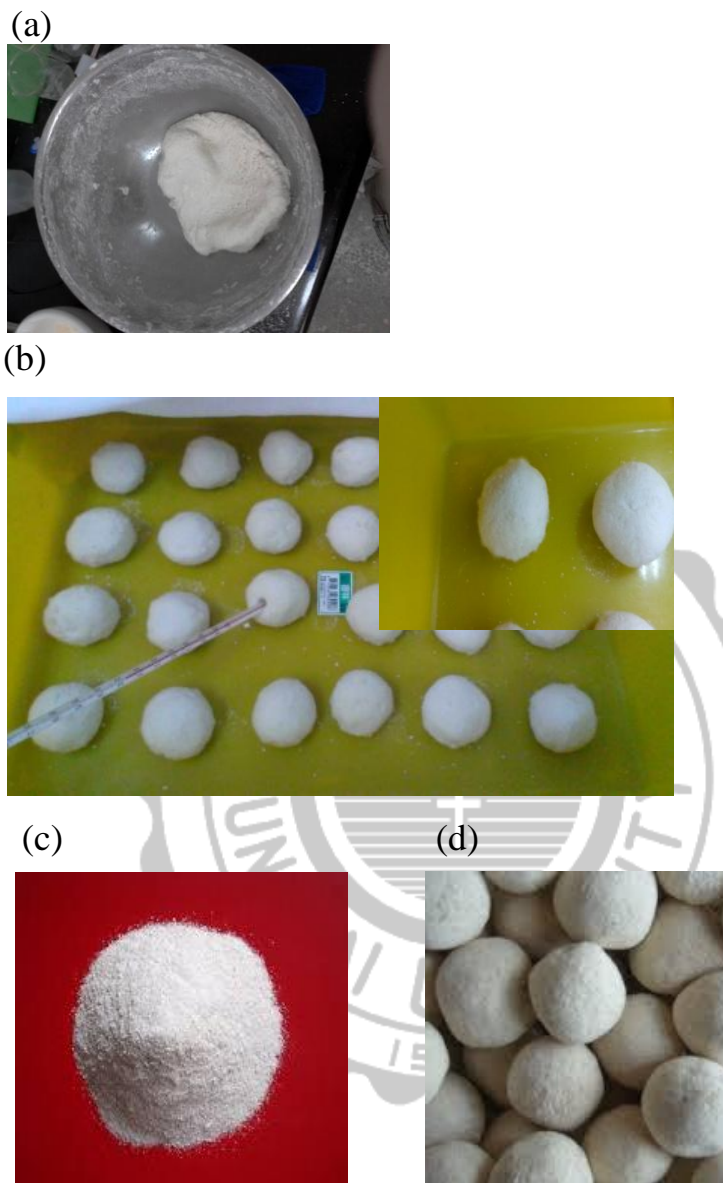
Fig.11 *Rhizopus formosensis*

(a) PDA cultured *Rhizopus formosensis* (b) Starter of *Rhizopus formosensis* after cultured 7 days.

三、糖化菌在生米酒麴上之酵素生產

本試驗以孢子懸浮液和酵母菌醃兩種做為製作生米酒麴之種源，混合均勻後拌入已經粉碎的生白米粉中(圖十二 a)，加水量與米粉量比例約為 1：1.5，使和水後的生米餅團水含量控制在 50-60%之間，外層裹上陳麴粉末(圖十二 c)；再揉製成數顆圓球型餅團，於 30°C 溫度、75-80%的溼度下的麴室中進行培麴一週，培麴期間隨時觀察生白米酒麴的生長情形、外觀變化及酒麴之品溫；生米酒麴培育情形如圖十二顯示。培麴期間每天定時取樣追蹤分析糖化酶活性的變化，結果如圖十三。

圖十二顯示為培麴期間酒麴的生長情形，可以看出經過 24 小時的培麴，根黴菌快速繁殖，麴胚表面生長出大量白色毛茸狀菌絲，麴胚略呈膨脹且有軟化現象(圖十二 b)；圖十三為酒麴培麴過程中澱粉酶活性變化情形，顯示培麴 24 小時以後的糖化酶活性即已開始快速上升；培麴到第四天以後，糖化酶活性可以達到最高點，高達 120.8 units/g dry koji；此時麴室內之溫度仍然維持在 30°C，相對濕度為 73%，而麴胚內層實測得之溫度為 34°C。當培麴至第六天以後，菌絲有逐漸消退的現象，麴胚表面的色澤逐漸由白色轉變為乳黃色或黃褐色，麴胚逐漸變得乾硬(圖十二 d)。此時黴菌菌絲已滲透入麴胚的內層，分析檢測酒麴糖化酶活性卻有些微降低的趨勢，因此如以製造糖化酶活性為目的，則培養四天即可使用；但若為生產麴菌種源，則應該培養一週，使酒麴內水活性繼續降低轉為乾硬，適宜做長期保存。

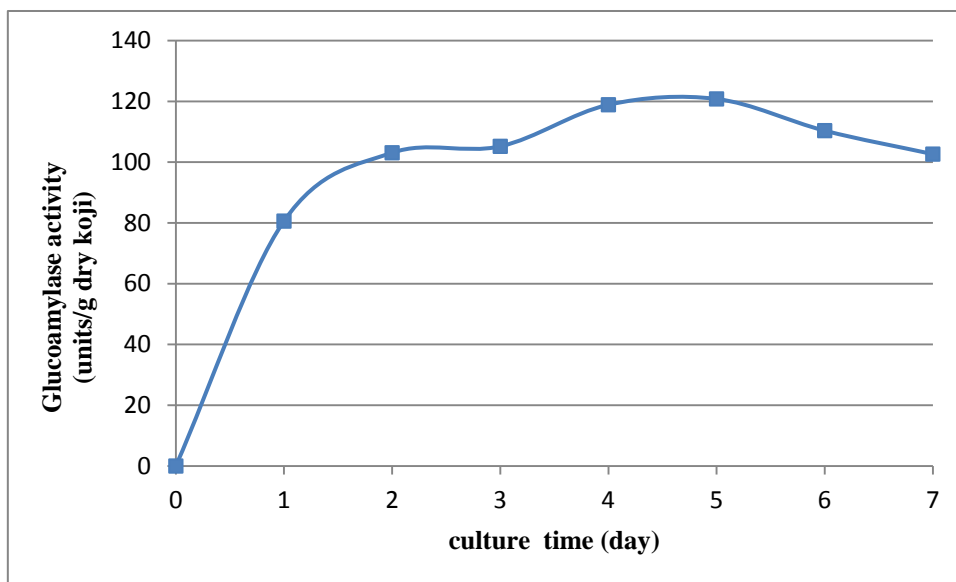


圖十二、生白米酒麴培麴過程的生長情形

(a)加入菌醃並揉製均勻之生米餅糰 (b)酒麴之培麴過程

(c)陳麴粉末 (d)經培麴七天後之酒麴

Fig.12 Raw rice koji-cultivating situation during cultured
 (a) raw rice cakes (b)koji culturing(c)koji powder(d)koji after
 cultured 7 days.



圖十三、酒麴於培麴七天過程中，糖化澱粉酶活性之變化情形

Fig. 13 Changes of glucoamylase activity of *R. formosensis* during koji-cultivating period.

四、 生料發酵釀酒試驗

(一) 酒麴用量對於發酵力的影響

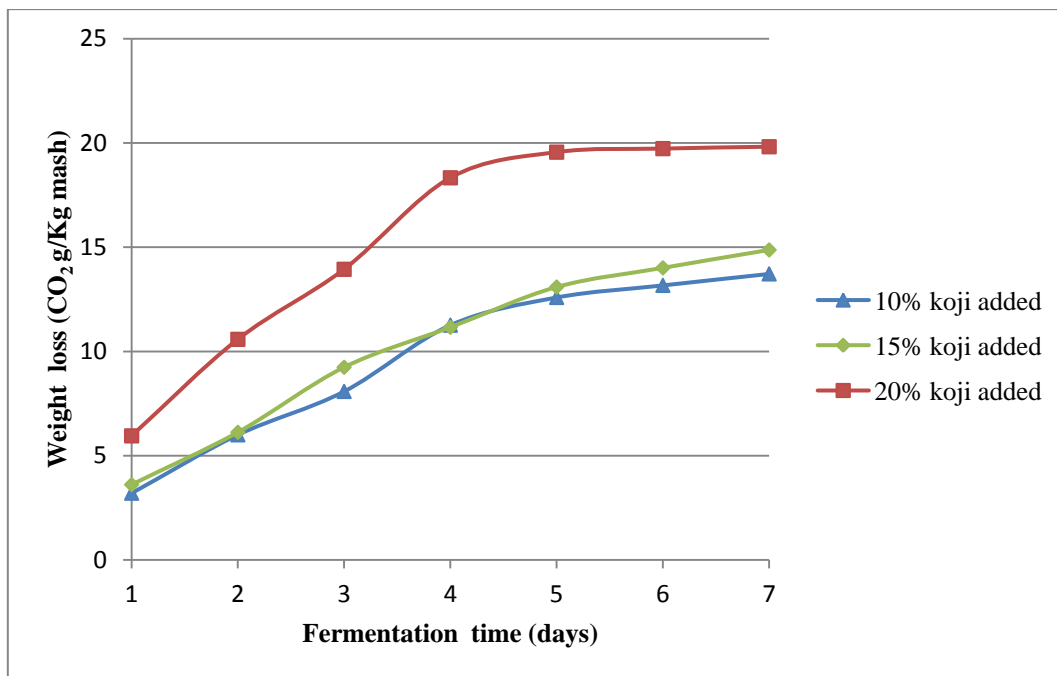
傳統以米為主要釀酒原料的中國和日本等東方地區，向來以先製作酒麴作為製酒的糖化劑和發酵劑；本試驗使用之生白米酒麴，於培養一週後始行乾燥冷藏。酒麴除了本身含有大量的糖化酶之外，內部亦大量生長繁殖許多的酵母菌，故實際應用於以米為原料釀酒時，可以提供糖化和發酵的重要的雙重發酵元素(林，1996)。為探討酒麴運用在生米發酵時之最適當的用麴量，故本項試驗分別以三種用麴量著手進行，以比較用麴量對於發酵力的影響。

發酵試驗以每支發酵瓶秤取經過粉碎，且以 35 mesh 過篩的生白米粉各 60 克，麴用量為經粉碎的麴粉，各別秤取加入 10%、15%、20% 的麴粉量，醪液比為 1:2.5，將發酵瓶置於 30 °C 下進行七天的發酵，發酵期間每天秤發酵液總失重，以估測酒醪中二氧化碳的散失情形，並據以估算酒精生成量，做為判別用麴量於生米發酵中對於發酵力的影響。圖十四為生米發酵過程中，不同用麴量對於總失重的試驗結果。

由圖十四可以看出在相同原料量、相同發酵溫度的發酵條件下，比較三種酒麴用量的差異，以 20% 的麴用量的發酵速率最快，經發酵一天的 CO₂ 生成量即已達到 6 g/Kg mash，此時液面因為產生大量的 CO₂ 的泡沫，使醪液不停翻動，而酒麴用量為 10% 和 15%，僅能產生 3 g/Kg mash 左右的 CO₂；當發酵到第六天後，以 20% 酒麴量產生的 CO₂ 量仍為最高，可以達到 19.82 g/Kg mash，經由酒精發酵作用原理，即葡萄糖發酵生成乙醇總反應式來推算酒精生成量，粗估酒精生成量可達到 20.72 g。但是在發酵五天以後，CO₂ 生成量幅度已趨緩，顯示發酵速率減弱，發酵液逐漸由白色混濁狀轉變為褐黃色透明狀；而添

加 15% 酒麴量於發酵六天後 CO_2 產生量為 14.87 g/Kg mash，雖然在發酵 5~6 天之後， CO_2 生成量仍然維持在緩慢增加之趨勢，但發酵液面逐漸趨於平靜，醪液表面呈現淡黃色，且有明顯的酒香揮發，而 10% 酒麴用量於發酵第六天以後， CO_2 產生量為 13.72 g/Kg mash，醪液表面仍然呈現白濁狀，顯示糖化及發酵力均明顯不足。因此，本試驗仍以用麴量 20% 最為理想。





圖十四、生米發酵過程中不同用麴量對於總失重的影響

Fig. 14 Weight loss changes during rice shochu fermentation with different amount koji added.

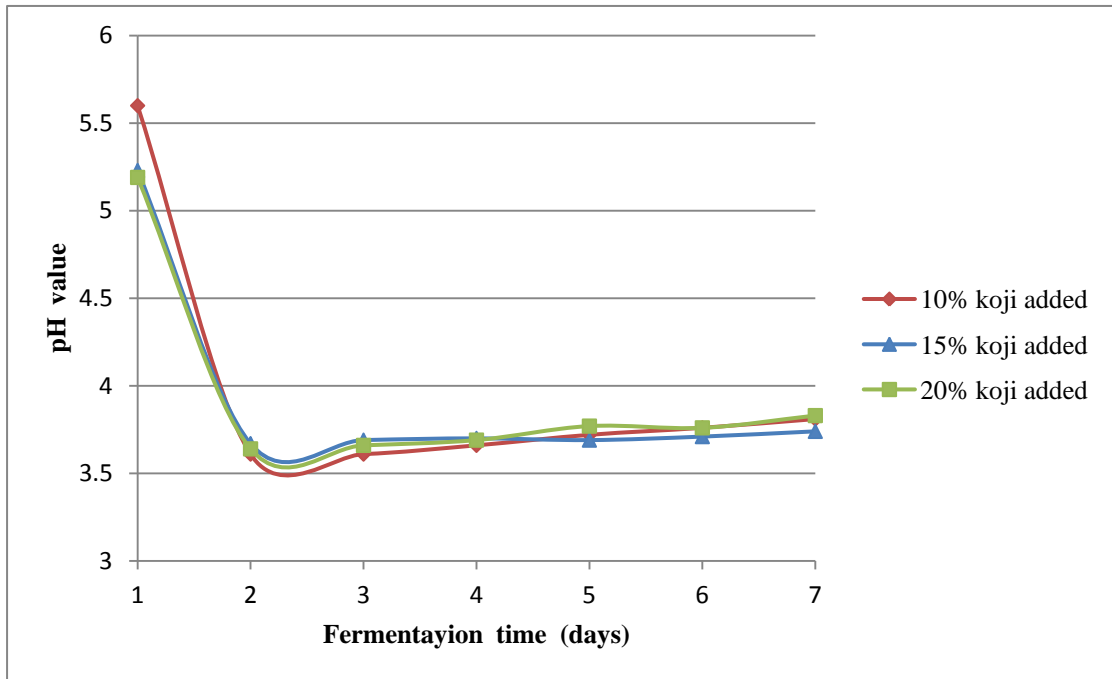
圖十五為三種不同酒麴用量發酵過程之 pH 值變化情形，顯示發酵 48 hr 以後，pH 值迅速由 5.5 驟降至 3.6，酸度快速增加；此應為酒精發酵的作用，酵母透過 TCA 循環生合成反應機制，快速將糖類轉化為酒精和二氧化碳，同時亦產生次級代謝產物，如甘油、高級醇類和部分的有機酸所致。當發酵 7~8 天以後，發酵醪液之 pH 值會略微回升，其中以 10% 和 20% 酒麴用量之發酵醪液，pH 值可微升至 3.8 左右，而 15% 麴用量在發酵後期 pH 值則無明顯的回升現象；推測 pH 值在後期發酵會造成回升的原因，應是由於發酵的後期 CO₂ 生成量已大幅度的減少，使得在分析發酵醪液的 pH 時，不致受到 CO₂ 的干擾所致；而 15% 麴用量的酒醪之 pH 並未有明顯回升，應與發酵仍然在進行，醪液中仍殘存大量的 CO₂，依然會干擾到 pH 計的實測結果，使得 pH 計仍然顯示 pH 值偏低的現象。因此，本實驗的結果顯示，酒醪中的 pH 變化，仍以用麴量 10% 和 20% 兩者較佳；但整體而言，三種不同用麴量的發酵對於 pH 的影響，彼此差異並不大。

本試驗為利用培育後的白米酒麴為菌體種源進行生米發酵，採糖化與發酵併行的複式發酵法，主要供給發酵的碳源為白米生澱粉，由根霉菌所釋放的糖化酶先行糖化作用，將生澱粉轉化而產生單糖，酵母再利用這些轉化後的單糖進一步發酵為酒精。

圖十六為不同酒麴用量發酵醪液中殘糖量的變化情形，顯示發酵的初期糖化速度較快，發酵醪液中的殘糖量較高，其中以 15% 用麴量之酒醪的殘糖量最高，以 10% 用麴量之酒醪的殘糖量最低，顯示在此階段糖化酶作用產生的糖類，足夠提供酵母進行酒精發酵時之需。比較三種不同用麴量對於初期發酵中酒醪殘糖含量的影響，顯示差異並不大。當發酵進行至第三天以後的發酵後期，酒醪中殘糖量則趨於平

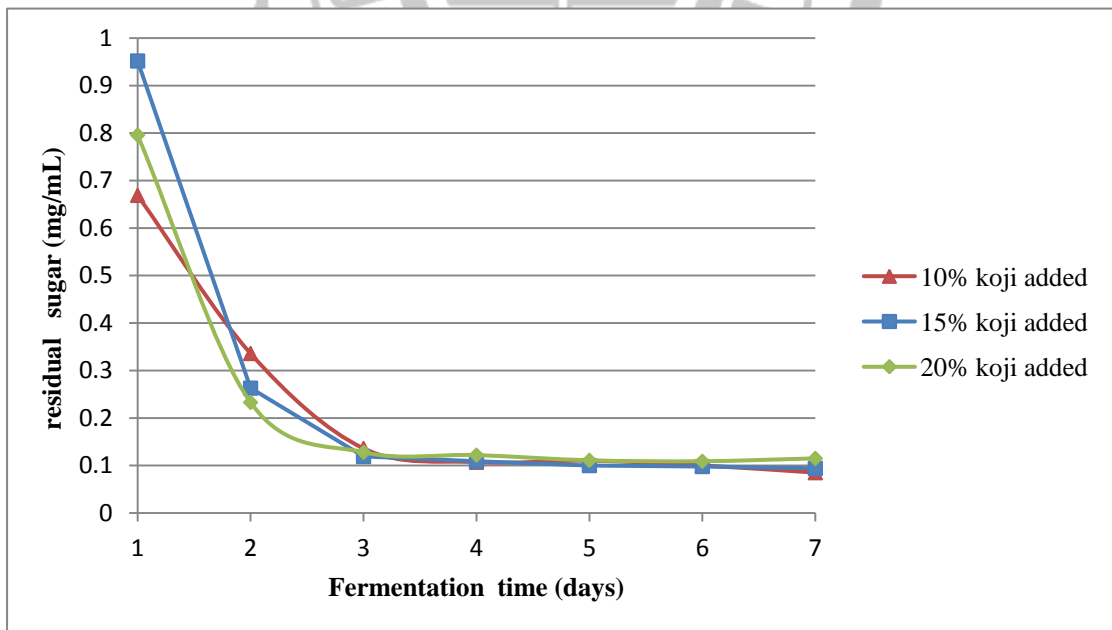
緩，顯示糖化作用與酒精發酵速度逐漸趨於平衡，且三種不同用麴量的殘糖量均僅能維持在 0.1 mg/mL 左右。整體發酵呈現前急後緩的穩定發酵狀態，酒醪亦逐漸蓄積酒精，使發酵醪的酒精濃度增高。





圖十五、不同酒麴用量發酵之 pH 值變化情形

Fig. 15 pH changes during rice shochu fermentation with different amount koji added.



圖十六、不同酒麴用量於發酵中殘糖量的變化情形

Fig. 16 Residual sugar changes during rice shochu fermentation with different amount koji added.

表四為比較三種不同酒麴用量對於發酵過程中之酒精生成量和出酒率的影響，結果顯示當用麴量為 20% 時，發酵結束後酒醪液中的酒精量為 15.4%，出酒率約為 57.24%；當用麴量減為 15% 時，發酵結束後酒醪液中酒精量為 14.5%，出酒率約為 55.23%；而用麴量在 10% 時，發酵結束後酒醪之酒精量僅有 11.5%，出酒率下降為 46.09 %。比較三者的酒精生成量和出酒率的差異，以用麴量 20% 為最高，15% 次之，10% 最少；檢討此原因，應為酒麴本身亦含有大量的澱粉，可提供部分的碳源供給酒精發酵所致，且酒麴內的大量酵母及麴酶，亦能加速發酵的進行，可以降低菌體增殖時所造成碳源的過度損耗。

綜合以上試驗結果可知，雖然酒麴用量高時生成之 CO_2 量越高，發酵速率越快。但發酵過於快速，致發酵後期菌體快速衰亡，發酵力迅即減弱，酒醪易被雜菌汙染，影響發酵後期酯化物質的生成。酒麴用量過低亦會導致發酵前期過於緩慢，糖化、發酵力均弱，因此三種不同酒麴用量的比較，最適當之酒麴用量應為 15%，既能夠避免發酵前期過於迅猛，也能避免發酵中後期過於遲緩的問題發生，同時亦能確保出酒率不致過低。

表四、酒麴用量對於發酵過程中之 pH, 殘糖, 酒精以及出酒率的影響

Table.4 Effect of amount koji added on pH, residual sugar, ethanol content and yield of producing alcohol.

Amount koji added	pH	Residual sugar (mg/mL)	Ethanol content (% ,v/v)	Production yield (%)
10%	3.81	0.085	11.59±0.52 ^b	46.09
15%	3.74	0.094	14.52±1.15 ^a	55.23
20%	3.83	0.115	15.43±0.76 ^a	57.24

Values are means±S.D. of triple determination

Values displaying different superscript letters (a, b, c) within each data are significantly different according to the Duncan test (0.05%).

(二) 原料粉碎度對於發酵力的影響

所謂生料發酵，就是微生物直接利用未經蒸煮糊化的白米，以結構未被破壞之生澱粉進行釀造，因此和以往先蒸煮糊化後再發酵的熟米比較起來，對於生澱粉糖化能力的要求較為嚴格(林，1996)。而糖化酶是否能夠直接利用生澱粉，除了要有高轉化率的糖化酶以外，基質的粉碎度也是影響因素之一，因此本試驗即利用粉碎度不同的米粉進行發酵力比較。

由於白米粉碎越細，基質與糖化酶的作用面積就會增加，水解澱粉速度增快，發酵時間就可以縮短；但粉碎越細，原料粉碎所需之動能消耗也隨之增加，因此有必要探討合適的原料粉碎度，期能在發酵力和粉碎動能消耗間取得兩者的平衡，而著手進行本項實驗。

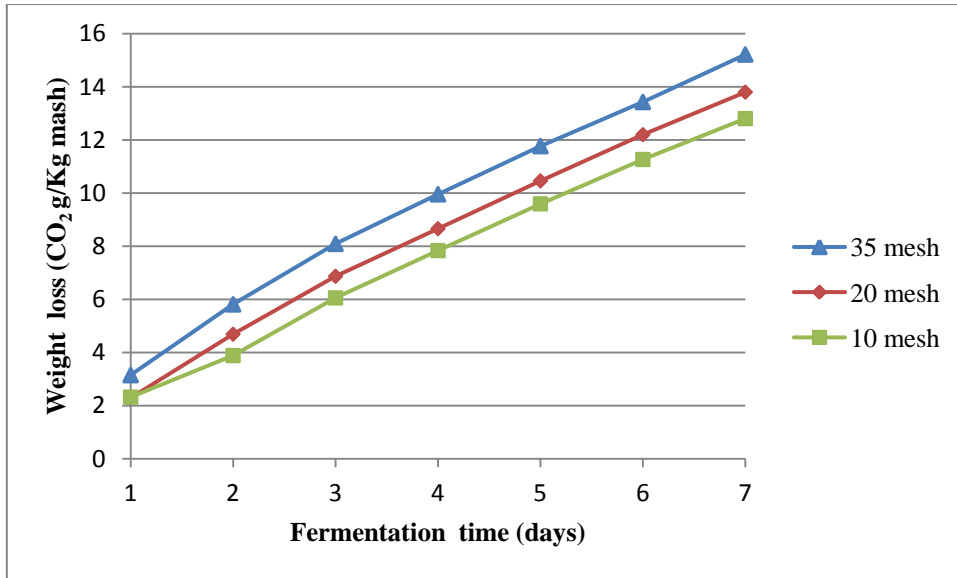
取洗淨且瀝乾之蓬來白米，經由粉碎機粉碎，將粉碎後的碎米分別以 35 mesh、20 mesh、10 mesh 三種篩網過篩，分別秤取 60 克過篩以後之粉碎的米粉，加入等量的 15%酒麴，調整醪液比為 1:2.5，於 30°C 下進行發酵七天，觀察發酵情況，並定時紀錄發酵失重、還原糖(殘糖)量和 pH 值，以做為比較不同粉碎度的白米於生米發酵過程中對於發酵力的影響。

圖十七為在相同原料量，相同發酵溫度，相同酒麴用量，不同原料粉碎度之米粉，分別以 35 mesh、20 mesh、10 mesh 之米粉為基質的生米發酵試驗，由圖十七可以看出 35 mesh 之粉碎度的生米粉於發酵 24 hr 之後，發酵醪之失重達到 3.15 g，推估 CO₂ 的生成量即達到 3.15 g/Kg mash 左右，而 20 mesh 和 10 mesh 之粉碎度的生米粉於發酵 24 hr 之後皆只有生成 2 g/Kg mash 左右的 CO₂，明顯發酵不夠旺盛，35 mesh 於發酵七天之後，CO₂ 的生成量已達到 15.21 g/Kg mash，顯示發酵力十分旺盛。比較三者的發酵雖略有差異，但均呈現

線性關係的增加。

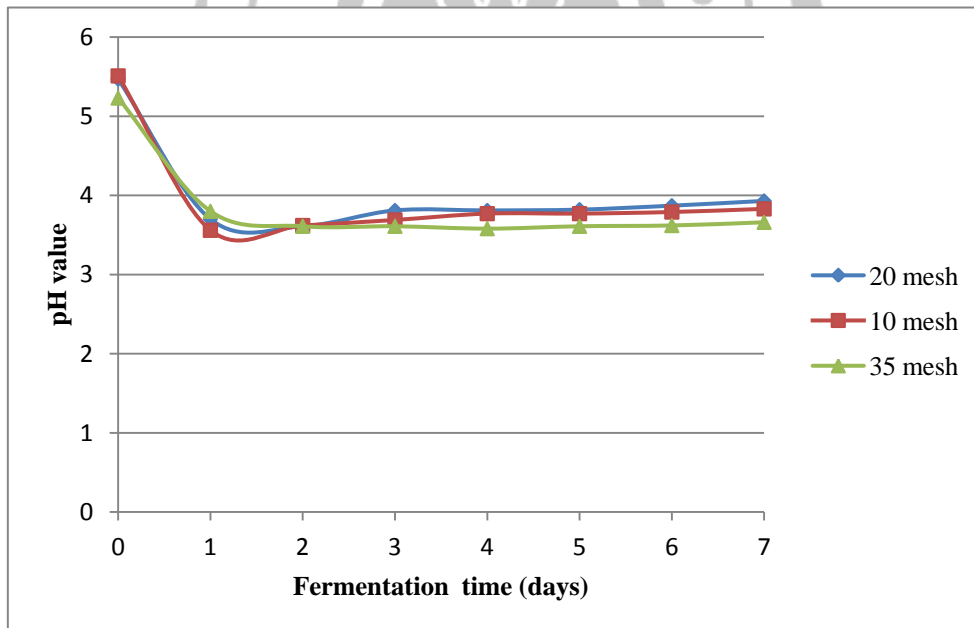
比較三種不同粉碎度的生米發酵，於發酵期間之 pH 值的變化情形，結果如圖十八顯示，當發酵 24 小時以後 pH 可由 5.6 快速降低至 3.6；當發酵至第二天時，pH 值則呈現微幅上升，其中以 20 mesh 和 10 mesh 上升略高，此因仍以主發酵結束後，發酵減緩，致發酵醪中 CO₂ 產生量驟減，而降低干擾 pH 計的因素所致。發酵後期的 pH 值，三種發酵均呈穩定的狀態，且彼此差異不大。

比較三種不同粉碎度生米發酵期間，發酵醪液之殘糖量的變化情形，結果如圖十九顯示，其中以 35 mesh 粉碎度的生米發酵的初期殘糖量由 1% 的最高處迅速降低，發酵後期已趨近於 0.1%，且能平衡維持糖化和酒精發酵得以齊頭並進，逐漸蓄積酒精濃度。而粉碎度 20 mesh 和 10 mesh 的發酵，顯然糖化和酒精發酵較不平衡，於發酵第 2 及第 3 天又呈升高現象的不規則的發酵曲線，顯示酵母發酵力弱，致使糖化作用與酒精發酵未能平衡，恐影響到發酵結果。



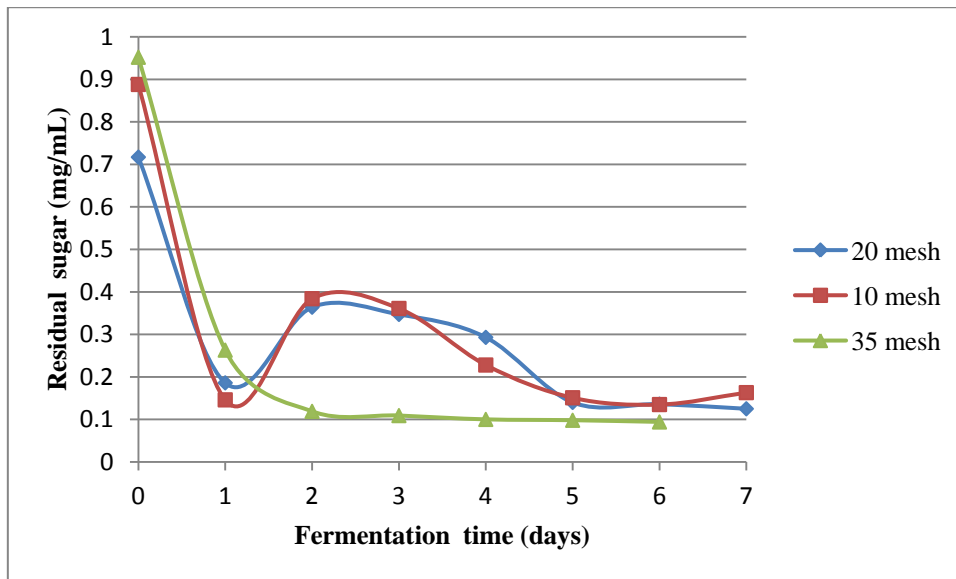
圖十七、不同生米粉碎度對總失重之影響

Fig. 17 Changes of weight loss during rice shochu fermentations with different raw rice particle size.



圖十八、不同生米粉碎度之 pH 值變化

Fig. 18 Changes of pH during rice shochu fermentations with different raw rice particle size.



圖十九、不同生米粉碎度之殘糖含量變化

Fig. 19 Changes of residual sugar during rice shochu fermentations with different raw rice particle size.

綜合以上試驗結果可知，不同原料米之粉碎度的確會影響到發酵跟糖化作用。發酵七天之後分別取發酵醪液進行蒸餾，取發酵後醪液分別測定 pH 值、殘糖量，蒸餾液測量酒精度，並且計算整體出酒率，結果顯示出酒率以 35 mesh 之碎米發酵較高，其出酒率為 56.06% (表五)，而 20 mesh 和 10 mesh 兩者由於原料顆粒過大，以致根黴菌之澱粉酶無法有效完全吸附於澱粉顆粒上進行反應分解糖化，致使出酒率僅有 44.73% 和 37.04% (表五)。

參考相關文獻，生料發酵之原料粉碎度越細，則原料與酶分子的接觸面積越大，糖化效果越佳；但是粉碎原料所需的能源消耗也隨著增加，因此，應綜合考量原料的粉碎度與發酵程度，取得最理想的生料發酵條件。

綜合以上試驗結果，三種粉碎度以 35 mesh 的發酵力最佳，其原料糖化速度與發酵速度均能保持一致，而 20 mesh 和 10 mesh 兩者之糖化作用與發酵速度並不一致，影響發酵後期之酒精生成量和出酒率。由此可知隨著原料粉碎度越細，發酵速率明顯上升，且最適之生米發酵原料粉碎度應為 35 mesh 以上。

表五、不同粉碎度生米之殘糖, pH, 酒精以及出酒率的影響

Table.5 Effect of different raw rice particle size on residual sugar, pH, ethanol content and yield of producing alcohol.

Particle size	Residual sugar (mg/mL)	pH	Ethanol content (% , v/v)	Product yield (%)
10 mesh	0.7446	3.93	9.74±0.57 ^c	37.04
20 mesh	0.7374	3.83	11.76±0.79 ^b	44.73
35 mesh	0.539	3.66	14.74±0.35 ^a	56.06

Values are means±S.D. of triple determination

Values displaying different superscript letters (a, b, c) within each data are significantly different according to the Duncan test (0.05%).

(三) 不同發酵溫度對於發酵力的影響

發酵溫度絕對是影響發酵力的重要因子之一，發酵溫度高時發酵速度快，但發酵旺盛促使發酵熱快速累積，會使發酵醪溫度迅速上升，黴菌之產酸量過高，酵母菌快速繁殖利用葡萄糖，以致於發酵後期酵母菌因無養份供應而衰亡，醋酸菌等細菌有機會大量繁殖，造成出酒率下降，發酵醪酸敗的問題。高溫亦會使大量發酵產生的香氣伴隨著CO₂而散失，且高溫發酵酵母活動力強，增加酵母生合成的速度，因此亦增加高級醇的增生。故高溫發酵對於發酵釀酒也會造成風味上的影響。

本試驗取 35 mesh 粉碎的生米粉 60 克，用麴量 15%，料水比為 1:2.5，分別於 30°C、25°C、20°C 三種發酵溫度下進行發酵七天，以比較不同發酵溫度對於生米發酵的影響。

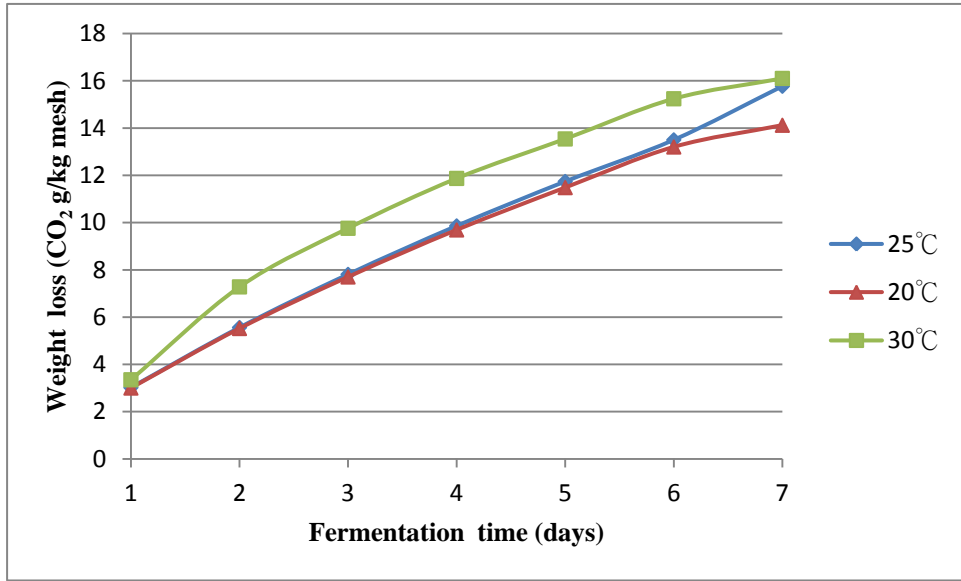
由圖二十之發酵結果顯示，發酵過程之總失重的確隨著發酵環境溫度的提高而上升，在 30 °C 環境下之生米發酵，於第七天後總失重最高，推估生成之 CO₂ 含量最高，達到 16.1 g/Kg mash，而 25°C 發酵之 CO₂ 生成量於發酵第七天也可以達到 15.77 g/Kg mash，而 20°C 發酵由於發酵溫度過低，發酵第七天 CO₂ 僅 14.12 g/Kg mash。觀察醪液的外觀，20°C 發酵酒醪的液面仍呈現白濁狀，酒味清淡且尚有原料米臭味；而 25°C 和 30°C 兩種發酵，於第七天之後的酒醪液面，已轉變為淡黃色，發酵已趨近完成，具有明顯的酒香。

比較發酵溫度對於 pH 值的影響，結果如圖二十一顯示，在發酵初期的 24 小時，發酵溫度 30°C 及 25°C 兩者，其 pH 值由 5.23 驟降至 3.8 左右，唯 20°C 發酵溫度，因為菌體受到低溫的抑制，活動力變差，發酵十分緩慢，產酸量不高，致 pH 僅呈現微幅下降。然而發酵到第三天以後，三種發酵溫度的發酵情形，其 pH 值已十分趨近，

且能維持一致的穩定狀態。

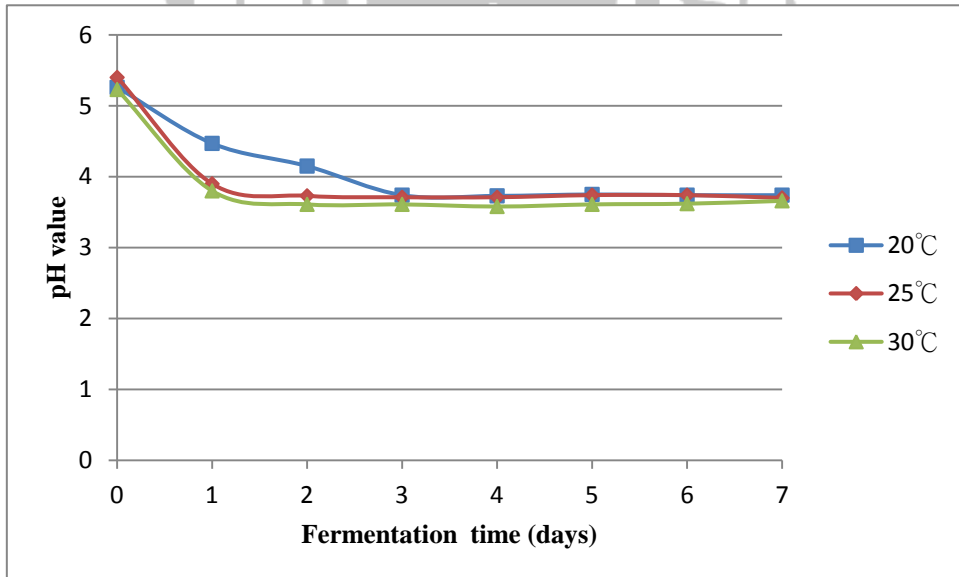
比較發酵溫度對於生米發酵過程中殘糖量的變化情形，結果如圖二十二顯示，當發酵初期的 24 時，20°C 發酵之殘糖量突增至 1.09 mg/mL，於發酵第二天又下降至 0.13 mg/mL，顯示低溫對於酵母的抑制力高於糖化酶的糖化作用，致酒醪中僅有糖化在進行，逐漸累積過多的糖量；而酵母仍在緩慢增殖，發酵力弱。25°C 和 30°C 之殘糖量則仍維持在 0.2 mg/mL 左右，糖化作用與發酵速度趨於一致。發酵第三天時，20°C 低溫發酵仍有一波殘糖量的增高情形；比較發酵後第七天的殘糖量，20°C 低溫發酵略高，顯示發酵尚未完成。





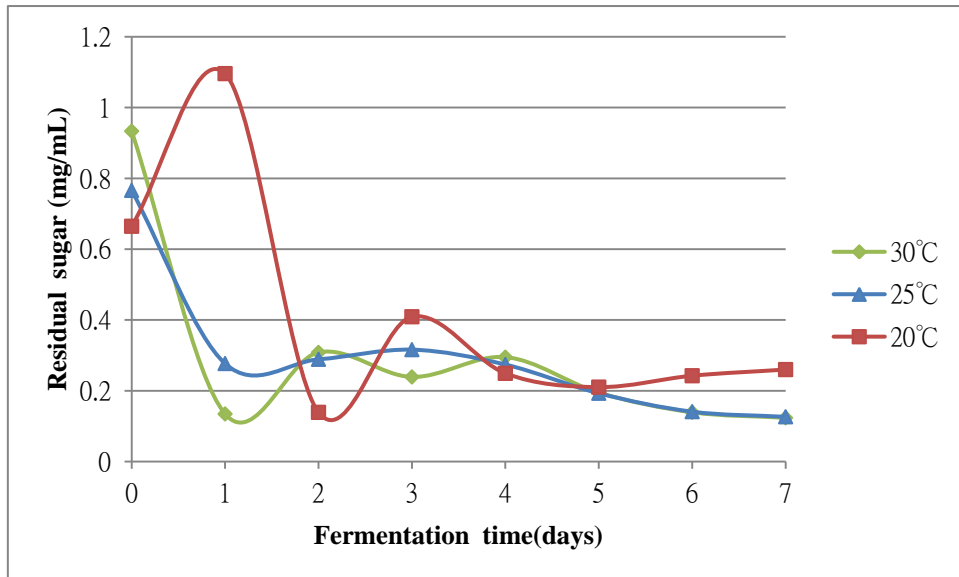
圖二十、不同發酵溫度對總失重之影響

Fig. 20 Changes of weight loss during rice shochu fermentations with different fermentation temperature.



圖二十一、不同發酵溫度之 pH 值變化

Fig.21 Changes of pH during rice shochu fermentations with different fermentation temperature.



圖二十二、不同生米發酵溫度之殘糖量的變化情形

Fig. 22 Changes of residual sugar during rice shochu fermentations with different fermentation temperature.

由表六結果顯示，酒精含量和出酒率的比較，發酵溫度為 25⁰C 和 30⁰C 之出酒率分別為 54.73%和 59.41%，而 20⁰C 的低溫發酵，由於發酵溫度過低，抑制糖化和發酵的進行，發酵速度緩慢，其出酒率僅為 37.01%，明顯偏低。

綜合以上試驗結果可知，由於釀酒是由多菌種，多種酵素綜合反應的過程，每種菌體和酵素皆有其各自之最適生長或作用的溫度範圍，而菌種之酵素活性和發酵酒的成份組成和香氣有很大的關聯性，若發酵溫度過低，酵母菌生長遲緩，酒化酵素和酯化酵素活性不足，易造成發酵速度減緩外，出酒率會降低，酒中的香氣成份也會有影響；發酵溫度高，雖然菌體生長旺盛，但酵母菌發酵產生大量之 CO₂ 易伴隨著高溫使大量香氣成份揮發，並且在發酵後期容易遭受到醋酸菌汙染，造成醪液酸敗；因此本試驗最適當之發酵溫度應高於 30⁰C，其出酒率皆可維持在 50%以上。

表六、不同溫度對於殘糖, pH, 酒精以及出酒率的影響

Table.6 Effect of different fermentation temperature on residual sugar, pH, ethanol content and yield of producing alcohol.

temperature	Residual sugar (mg/mL)	pH	Ethanol content (%, v/v)	production yield (%)
20°C	0.26	3.74	9.73±1.25 ^b	37.01
25°C	0.1267	3.7	14.39±1.51 ^a	54.73
30°C	0.1237	3.63	15.62±1.64 ^a	59.41

Values are means±S.D. of triple determination

Values displaying different superscript letters (a, b, c) within each data are significantly different according to the Duncan test (0.05%).

(四) 添加乳酸對於發酵率的影響

由於生料之中含有大量的野生菌或細菌，且整個發酵過程均處在半開放式的自然環境下，在進行常溫發酵時如未能控制好酸鹼度，使發酵醪的 pH 值維持在細菌不易滋生的條件下，恐易引起細菌的大量繁殖，造成異常發酵的發生，不但影響發酵力，並損害釀酒的品質。由相關文獻指出，根黴菌之糖化澱粉酶之最適 pH 值為 4.6 左右(上田, 1993)，因此將本試驗以乳酸作為調酸劑，調整發酵醪液的 pH 值在 4.6 左右，再進行生米發酵。基質選用 35 mesh 的碎米 60 克，麴用量為 15%，料水比為 1:2.5，於室溫 30°C 下進行發酵七天。發酵期間定期測酒醪的總失重，還原糖(殘糖)及 pH 的變化情形，以了解發酵力及出酒率。

由表七可以看出，經過調整發酵液 pH 值到 4.6 之後，發酵可以順利進行，其中以發酵第三天及第四天的發酵最為旺盛；發酵醪在發酵至第七天時，總失重達到 17.22 g，因此推估 CO₂ 總生成量已達到最高的 17.22 g/Kg mash，發酵醪之殘糖量在第六天到第七天時，均維持在低濃度的狀態，約為 0.1 mg/mL 左右，此時 pH 值約為 3.7 左右，酒精濃度最高達到 16.02%，計算出酒率最高可達到 61.62%。顯示以乳酸調整 pH 值至 4.6 確可提高發酵率，使出酒率達到最高。

表七、經乳酸調整後發酵之總失重, 殘糖含量以及 pH 的變化情形
 Table.7 Effect of lactic acid added on weight loss, residual sugar, pH and yield of producing alcohol.

Fermentation time(days)	Weight loss (CO ₂ g/Kg mash)	Residual sugar (mg/mL)	pH
1	3.35	1.953	4.59
2	7.28	0.11	3.66
3	9.76	0.432	3.73
4	12.87	0.426	3.71
5	14.54	0.236	3.67
6	16.35	0.195	3.71
7	17.22	0.172	3.76
Ethanol content(% ,v/v)	16.02±0.16	-	-
Production yield(%)	61.62	-	-

Values are means±S.D. of triple determination

五、蒸餾試驗

蒸餾是進行物質中氣、液兩相的平衡關係，揮發性物質達到沸點時，氣相中的濃度比液相中高，揮發性物質在冷凝器遇冷又凝結回液體，如此不斷透過加溫、冷卻進行物質交換，使酒液中處於臨界溫度之成分逐漸被蒸餾出來，達到分離純化酒液，提高酒精濃度的目的。本試驗以研製日式米燒酎為目的，因此將發酵完後的發酵醪液，以常壓小型蒸餾器進行蒸餾，探討不同蒸餾條件對於酒液收得量，以及對於酒質的影響。

根據相關文獻顯示，蒸餾酒的組成分中除了以乙醇和水為主之外，另外還有 1% 左右的其他微量成分。這些微量成分能賦予蒸餾酒特有的香氣和味道，而蒸餾酒中含有的微量成分的種類、數量及其比例是否適當，決定了蒸餾酒的風格和品質。這些微量成分依其在蒸餾過程中，隨著乙醇餾出的先後次序而被餾出，通常蒸餾時將這些被餾出的酒液依先後分成酒頭、酒心和酒尾三段。本試驗參考相關文獻，針對以米為原料所釀製之蒸餾酒中的香味成分進行分析，並於分析酒樣之前，先針對個別香味化合物製作該成分的檢量線，以期提高這些成分在定量分析上的精確度。

本次蒸餾試驗分為兩階段進行，首先取發酵醪適量加水之後直接加熱進行常壓蒸餾，餾出液取相當等量的蒸餾酒液，此階段稱為初蒸。次再合併各次初蒸的蒸餾酒液，復以常壓蒸餾收集餾出的酒液，以期收取酒精濃度較高的酒液，此階段稱為複蒸。蒸餾試驗過程中，分別收取不同發酵條件的初蒸酒液，記錄收得量及採樣分析；複蒸時將餾出的酒液依先後次序分三段收集，分別為酒頭、酒心及酒尾，根據文獻(胡 等人, 2003)，酒頭的酒液收得量約為蒸餾前總酒液的 1.3%，酒心的酒液則取蒸餾至酒精度 40% 時為止，酒尾的酒液量則以餾出酒

液至測不到酒精度時為止。

(一) 香氣成分的檢量線的驗證

本試驗，首先參考中國白酒相關文獻中所記載之米製蒸餾酒的各種微量成份之濃度範圍(許，2004)，依序配製漸進濃度之標準樣品，每條檢量線皆以七種濃度為基礎，每個濃度進行三重複試驗，以建立標準品濃度與積分面積相關係數(R^2)需大於等於 0.995 之檢量線。

另外，根據環保署規定之環境檢驗檢量線製備及查核指引(NIEA-PA103)(93年)，氣相層析法得到之實驗容許誤差應介於 $\pm 15\%$ 之間。故本試驗以此做為準則，如各別成分的誤差值在此範圍內，即可認定為驗證成功。

表八為 GC 氣相層析中各種香氣成份波峰之滯留時間，檢量線之相關係數和部分濃度之誤差值。由試驗結果顯示，本次總共驗證 12 條檢量線，其中除了異戊醇和正己醇的誤差值稍高以外，其餘香氣成分的標準試樣之誤差值均極低。上述測定的十二種各別香氣成分都在容許誤差值內，表示這些各別香氣成分的驗證工作結果都可以被接受。

表八、各種香氣成份檢量線之滯留時間以及測量之誤差值

Table 8. The retention time of calibration curve and measurement error of aroma compounds.

香氣成分	滯留時間	R ²	理論濃度 (mg/L)	實測濃度 1(mg/L)	誤差值 (%)	實測濃度 2(mg/L)	誤差值 (%)
Diethyl acetal (乙縮醛)	2.65	0.99709	249.6	256.92	2.94	265.48	6.36
Ethyl acetate (乙酸乙酯)	4.8	0.99839	2686.6	2711.16	0.91	2747.57	2.26
1- propanal (正丙醇)	10.35	0.99935	755.5	783.30	3.68	753.3	-0.29
Isobutanol (異丁醇)	12.8	0.99732	466.1	477.21	-4.05	452.47	-2.92
3-methyl-1-butanol (異戊醇)	18.25	0.99908	452.76	401.93	-11.22	510.7	12.68
Ethyl lactate (乳酸乙酯)	23.74	0.99833	1663.38	1560.79	-6.17	1645.63	-1.07
1- hexanol (正己醇)	23.87	0.99920	83.1	71.35	-14.13	86.69	4.32
Furfural (糠醛)	27.93	0.99849	166.6	163.97	-1.57	163.38	-1.93
2-phenylethanol (β-苯乙醇)	42.91	0.99747	37.95	38.73	2.06	42.44	11.84
Ethyl palmitate (棕櫚酸乙酯)	47.2	0.99698	21.24	18.05	-14.97	19.03	-10.38
Ethyl oleate (油酸乙酯)	52.0	0.99907	5.17	5.42	4.84	5.73	10.83
Ethyl linoleate (亞油酸乙酯)	52.0	0.99947	10.24	10.83	5.76	10.55	3.03

(二)發酵酒之蒸餾(初蒸)

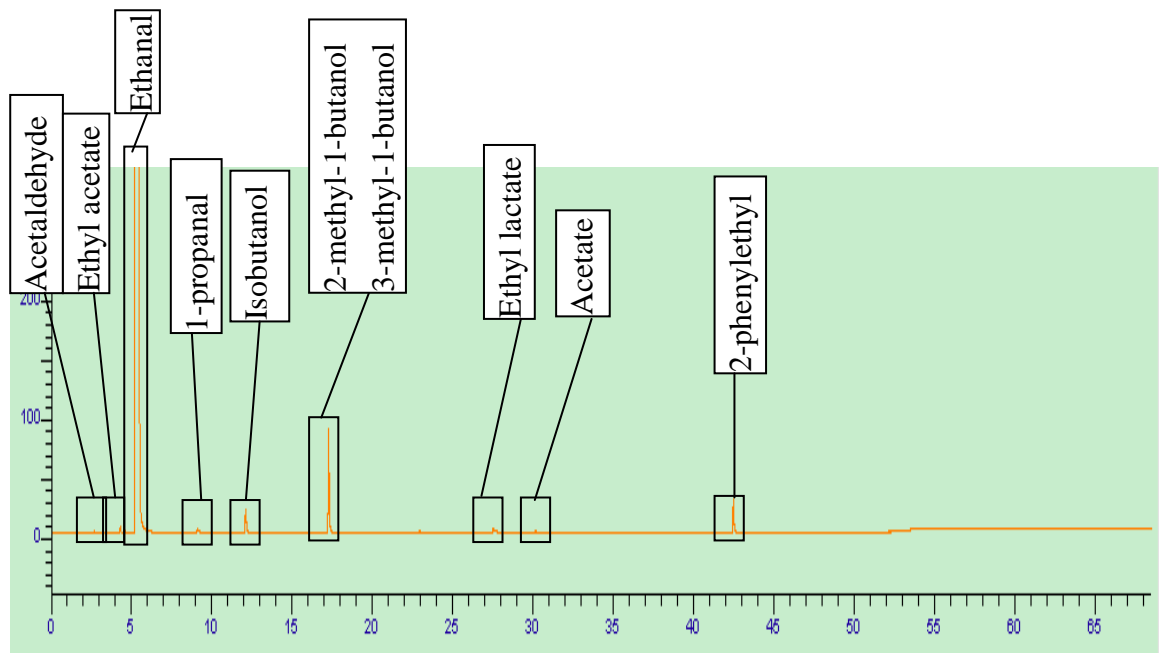
本次試驗取不同發酵條件之已發酵完成後的酒醪進行蒸餾，將發酵液秤量後直接傾入蒸餾瓶內，加入適量的水後再直接加熱，收集等量的蒸餾液。取酒樣測定酒精濃度，並由 GC 法測定酒液中的香氣成分。圖二十三為 20 °C 發酵後蒸餾酒液的層析圖、圖二十四為 25 °C 發酵後蒸餾酒液的層析圖、圖二十五為 30 °C 發酵後蒸餾酒液的層析圖，表九為三種不同發酵溫度發酵醪的蒸餾液之香氣成分及其含量的比較結果。

由上述三種層析圖及表九初蒸取得之蒸餾酒中各種香氣成分的比較結果顯示，以氣相層析法檢測初蒸酒液的香氣成分，可以被檢出而定量的成分，除了乙醇之外共有 9 種，其中以高級醇類及酯類為主，此外還有乙縮醛(Diethyl acetal)及 β -苯乙醇(2-phenylethyl)。其中以異戊醇(3-methyl-1-butanol)含量最多，異丁醇(Isobutanol)含量次之；整體而言，蒸餾酒中的香氣成份以高級醇為主，高級醇可賦予酒液具有辛辣、刺激感，適量的高級醇可使得蒸餾酒具有特殊的風味，具有增香呈味的效果；但其含量若過多，酒液辛辣刺激感強烈，易使人飲後有頭痛、潮紅及宿醉(楊 等人，2001)。由表九顯示三種不同發酵溫度的酒液，以 30°C 發酵的高級醇含量最高，達 514.7 mg/L，25°C 發酵次之，20°C 發酵最少，故發酵溫度絕對影響到高級醇生成的多寡。乙酸乙酯(Ethyl acetate)和乳酸乙酯(Ethyl lactate)為蒸餾酒中的重要酯類成分，酯類為具有芳香之化合物，在米釀製燒酎中扮演著使酒類香氣濃郁之作用，為發酵過程中酵母透過細胞內酶作用而生成的；乙酸乙酯具有類似蘋果般的芳香，乳酸乙酯香氣弱、味甜，有濃厚感(楊 等人，2001)。由試驗結果顯示，酯類成分的生成仍以 30°C 發酵者最高，乙酸乙酯含有 32.9 mg/L，乳酸乙酯含有 93.9 mg/L，而 25°C 及

20°C發酵者僅含有微量，故酯類化合物生成的多寡，應與溫度有關，發酵溫度高，生成量亦高。 β -苯乙醇(2-phenylethyl)具有玫瑰花般的芳香，可賦予酒液持久的幽雅清香，常在以米製的酒液中可以發現，由試驗結果顯示，以30°C發酵的酒液含量最高，有64.9 mg/L，25 °C發酵者次之，20°C發酵者最低(表九)，故 β -苯乙醇的生成仍與發酵溫度有關。乙醛和乙縮醛為蒸餾酒中重要的羰基化合物，乙醛為酵母酒精發酵時所生成的中間產物，由於沸點極低，蒸餾時甚易餾出而留存於蒸餾酒中，具有十分強烈的刺鼻感(黃和張，2009)；乙縮醛為乙醛進一步和乙醇發生縮合反應，生成半縮醛，繼續和乙醇反應再生成乙縮醛，因此蒸餾酒經長期貯存，會使乙醛降低而轉變為乙縮醛；乙縮醛具有乾爽的醇厚口感，能賦予蒸餾酒增香熟陳的效果(黃和張，2009)；由試驗結果顯示，乙縮醛的含量以25°C及20°C的發酵溫度最高，發酵溫度30 °C者則未能檢出(表九)，可能是乙醛和乙縮醛等羰基化合物的沸點較低，發酵溫度高易使這些成分於發酵和蒸餾過程中因為揮發作用而散失。

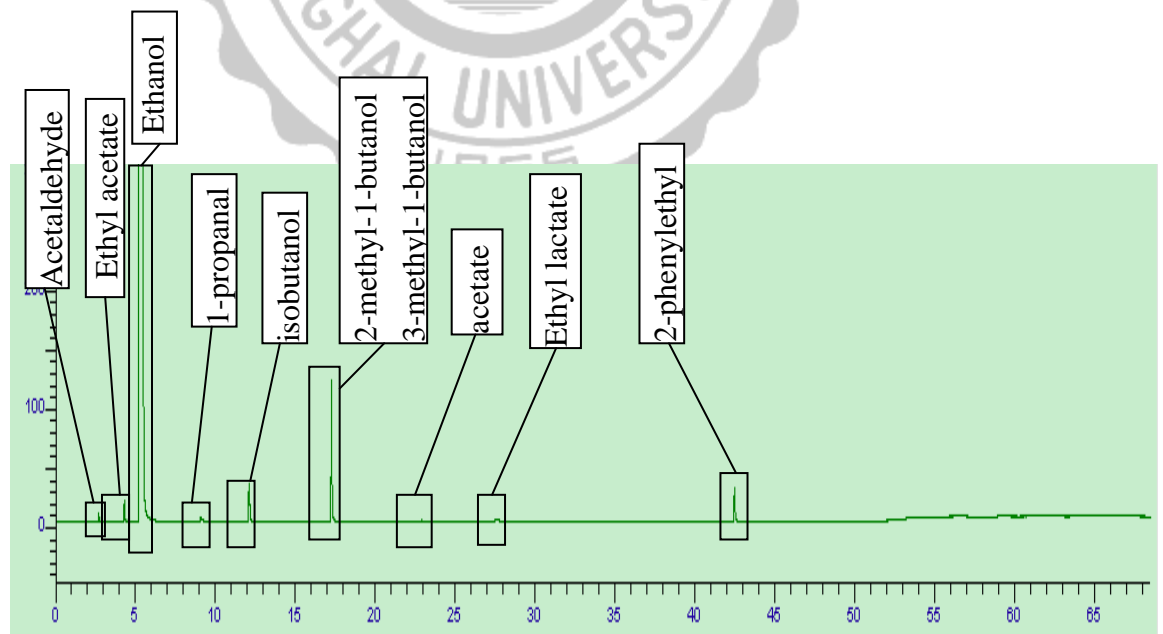
圖二十六為添加乳酸調整 pH 的生米發酵後初蒸的酒液層析圖，表十為以添加乳酸調整 pH 為 4.6 的生米發酵酒液與未使用乳酸調整發酵醪 pH 的對照酒液，將兩種發酵條件的初蒸酒液進行分析比較，結果顯示除了乙醇以外，高級醇仍然以異戊醇、異丁醇和正丙醇為主，酯類成分中以乙酸乙酯的含量為主；另亦有少量的 β -苯乙醇，此成分應為米製蒸餾酒中常見的特殊香氣成分，具有花香般的香味特徵。

比較添加乳酸發酵酒與對照酒的差異，顯示添加乳酸發酵的酒液，整體的香氣成分的含量較多，未添加乳酸的對照組的含量較少。唯 β -苯乙醇的含量反而以未添加乳酸發酵的蒸餾酒較高，此為比較特殊之處。



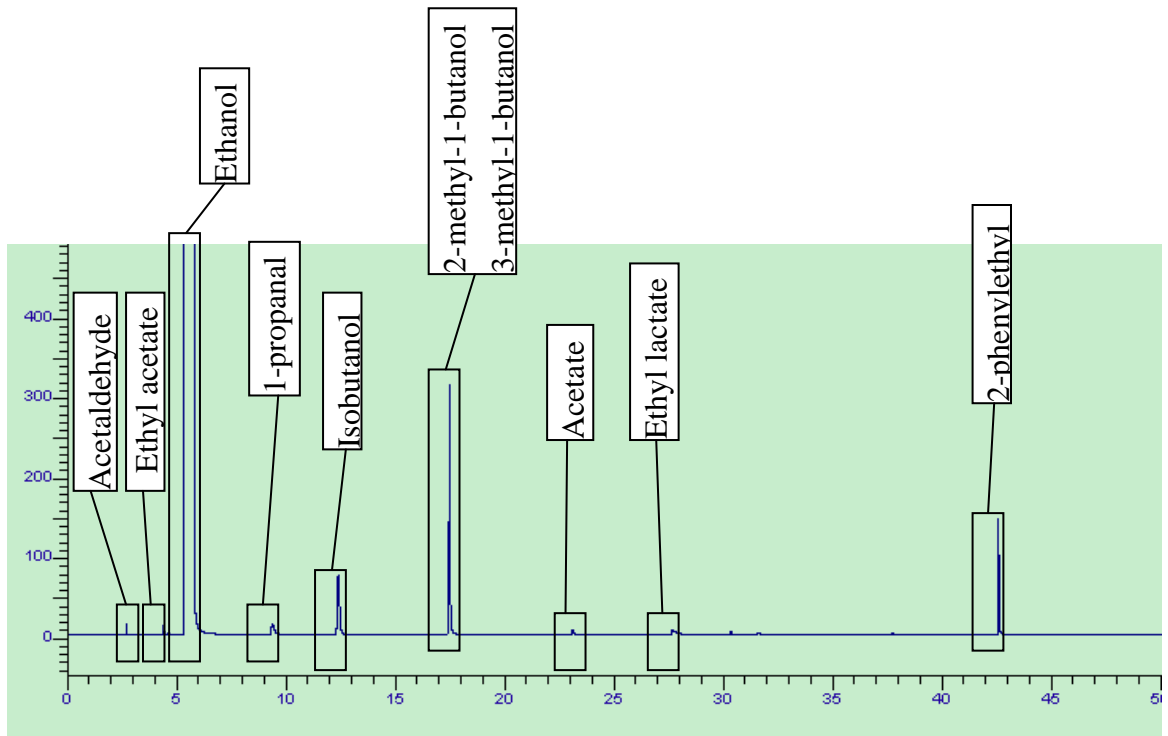
圖二十三、20°C 發酵條件之蒸餾酒液之 GC 分析圖譜

Fig.23 GC profile of 20°C fermentation.



圖二十四、25°C 發酵蒸餾酒液之 GC 分析圖譜

Fig.24 GC profile of 25°C fermentation.



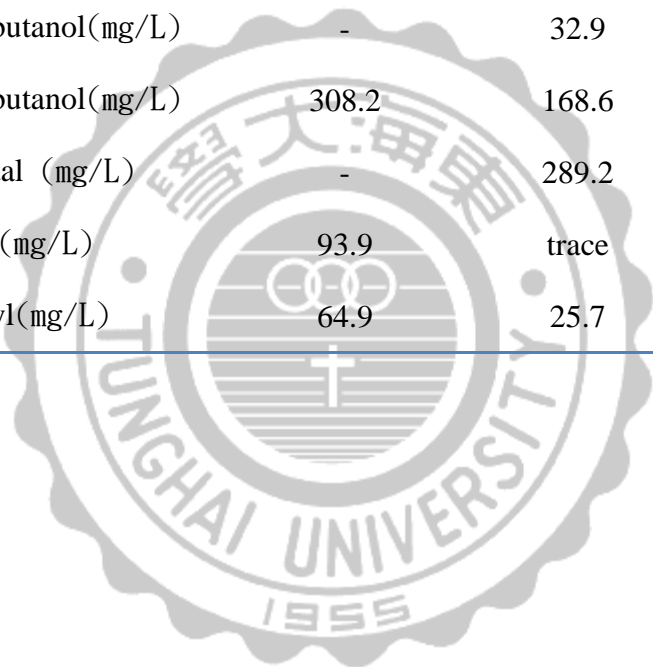
圖二十五、30°C發酵蒸餾酒液之GC分析圖譜

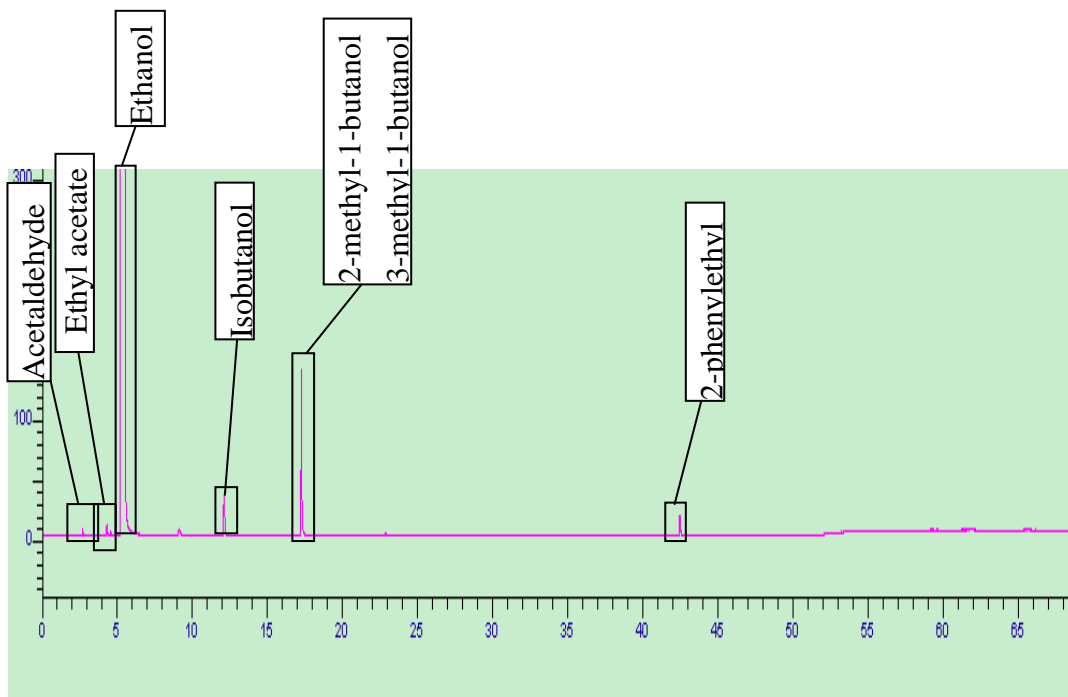
Fig.25 GC profile of 30°C fermentation.

表九、各發酵溫度蒸餾液之香氣成份及含量

Table.9 Effect of different fermentation temperature on aroma content.

Aroma	30°C	25°C	20°C
Ethyl acetate(mg/L)	32.9	trace	trace
1-propanal(mg/L)	42.7	37.8	32.8
Isobutanol(mg/L)	163.8	96.8	29.8
2-methyl-1-butanol(mg/L)	-	32.9	25.7
3-methyl-1-butanol(mg/L)	308.2	168.6	112.1
Diethyl acetal (mg/L)	-	289.2	279.1
Ethyl lactate(mg/L)	93.9	trace	trace
2-phenylethyl(mg/L)	64.9	25.7	17.6





圖二十六、添加乳酸發酵蒸餾液之 GC 分析圖譜

Fig.26 GC profile of lactic acid added fermentation.

表十、添加乳酸發酵之蒸餾液香氣成份分析比較

Table.10 Effect of lactic acid added fermentation on aroma content.

Aroma	control	pH4.6
Ethyl acetate(mg/L)	trace	trace
1-propanol(mg/L)	12.8	17.3
Isobutanol(mg/L)	28.5	54.5
2-methyl-1-butanol(mg/L)	25.5	40.3
3-methyl-1-butanol(mg/L)	114.5	189.1
2-phenylethyl(mg/L)	25.4	15

(三)蒸餾液之再蒸餾(複蒸):

複蒸操作前先以上述初蒸所取得的蒸餾酒液進行合併，混勻酒液後調查總酒量，再以蒸餾器進行常壓蒸餾，收集餾出的酒液。複蒸過程中，依餾出酒液的先後次序分三段分別收取蒸餾酒液，此三段酒液即稱為酒頭、酒心及酒尾。

本次複蒸操作共取得初蒸時的合併酒液 1L，於蒸餾器內加熱以收集餾出酒液，先取酒頭，酒頭的酒液收得量為蒸餾前原酒液量的 1.5% (胡 等人, 2003)，收得酒量約 15 mL；此段酒的酒精濃度最高，酒精度高達 63.89% (v/v)(表十一)，酒液具有十分強烈的芳香，剛餾出之酒液有類似溶劑般的強烈香味，外觀呈白濁狀的物質，隨後酒液即趨於透明狀的液體。繼續蒸餾收集餾出的酒液，此段酒即為酒心，酒心的酒液收得量則取蒸餾至酒精度 40%時為止(胡 等人, 2003)，此段酒心的酒液量最多，約有 400 ml，聞之具有濃郁的芳香，似酒精性的刺激感，感覺爽快舒服，分析此段酒液的酒精濃度為 43.76% (v/v)(表十一)。最後收集的酒液即為酒尾，酒尾的液量為以蒸餾到餾出酒液已測不到酒精度時為止，此段酒液的酒精濃度最低，約為 8% (v/v)(表十一)，聞之有明顯的怪雜味，感覺品質不佳。

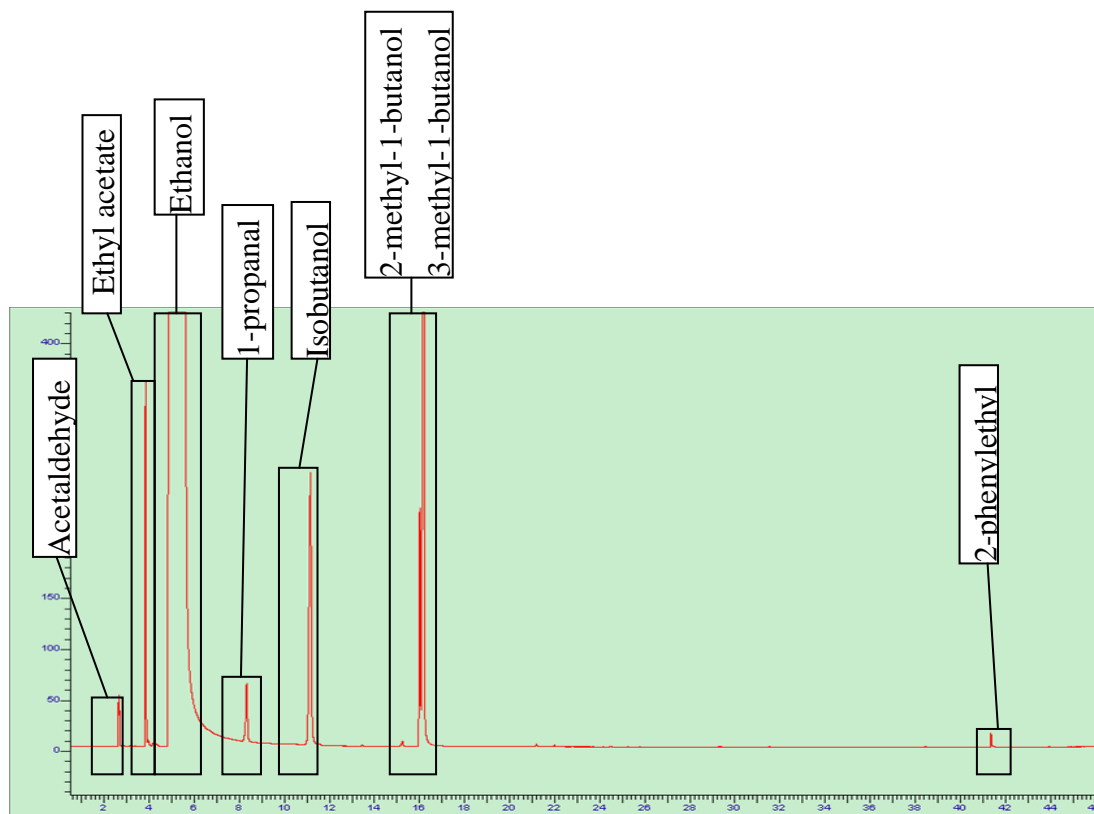
蒸餾過程中對於此三段的酒液，本實驗又將進一步了解這三段酒液中各種香氣成分的分布情形及其對於酒質的影響。

圖二十七為複蒸過程中收集得到的酒頭部分的蒸餾液所分析的 GC 圖譜，圖二十八為複蒸過程中收集得到的酒心部分的蒸餾液所分析的 GC 圖譜，圖二十九為複蒸過程中收集得到的酒尾部分的蒸餾液所分析的 GC 圖譜，表十一為酒頭、酒心及酒尾三種蒸餾酒的香氣成分比較，結果顯示除了乙醇的濃度有明顯的差異，其他微量香氣成分亦有很大的變化；這些微量成分的分布以酒頭含量最多，酒心次之，

酒尾的含量最少(表十一)，顯示蒸餾操作酒液餾出的先後次序除了乙醇在蒸餾初期濃度極高，隨著蒸餾時間而逐漸減少；而微量香氣成分大部分也是在蒸餾初期時隨著乙醇一起被蒸餾出來，隨著蒸餾的進行，酒精度逐漸降低，這些微量成分的濃度也呈現大幅度的減少，到了酒尾時低沸點的成分已趨近於微量或無。而 β -苯乙醇在蒸餾的後期仍然可以被餾出，顯示 β -苯乙醇並不會因蒸餾時間的先後而被蒸餾分離，在酒頭、酒心及酒尾都存在，且以酒尾較多(表十一)。

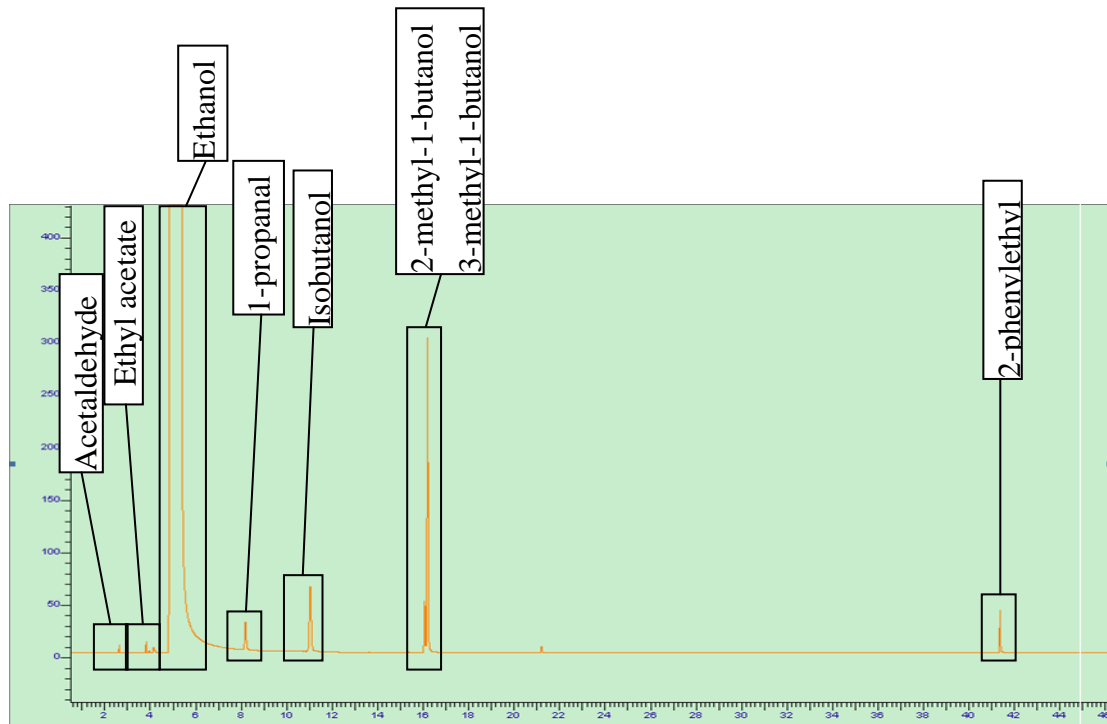
酒頭中的微量成分最為複雜且含量極多，其中以高級醇中的異戊醇含量最多，高達 2860 mg/L，異戊醇的分子量高，對人體易造成頭痛、宿醉的傷害(楊 等人，2001)；酒頭中亦含有少量的棕櫚酸乙酯、油酸乙酯和亞油酸乙酯，這些成分在初蒸時並未發現，可能是在複蒸時，因為高度濃縮而顯現，這些成分多時易使酒液有油臭味，且會造成酒液的混濁，故此為蒸餾時必須移除酒頭的主要原因。酒尾中除了異丁醇和 β -苯乙醇以外，其他成分含量極低，因此酒質不佳。

本次試驗獲得約 400 mL 的酒心，其酯類成分以乙酸乙酯為主(表十一)，具有微弱類似蘋果般的芳香，適量的高級醇賦予酒液具有酒精般的刺激感及醇厚感，微量的乙縮醛和 β -苯乙醇可賦予酒液具有優雅的酒香和醇厚的口感。因此，取酒心適度調降酒精濃度，應可獲得理想的米燒酎。



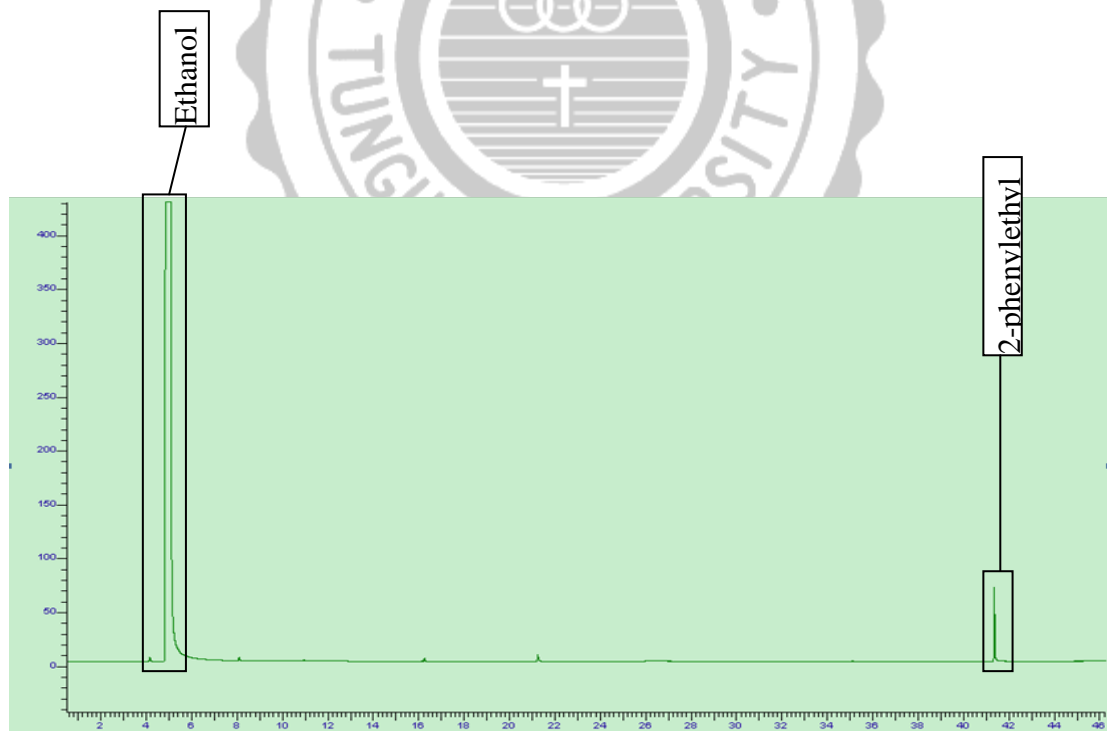
圖二十七、複蒸過程中餾出的酒頭之GC分析圖譜
 Fig. 27 GC profile of redistilled to 60% ethanol with head cut.





圖二十八、複蒸過程中餾出的酒心之 GC 分析圖譜

Fig. 28 GC profile of redistilled to 40% ethanol with middle cut.



圖二十九、複蒸過程中餾出的酒尾之 GC 分析圖譜

Fig. 29 GC profile of redistilled under 10% ethanol with tail cut.

表十一、複蒸過程中各分段餾出液之香氣成份比較表

Table .11 The effect of redistilled process on aroma content in different collection segment.

Aroma	head cut	middle cut	tail cut
Ethanol content(%)	63.89	43.76	8
Ethyl acetate(mg/L)	818.5	101.2	trace
Diethyl acetal(mg/L)	27.55	7.78	-
1-propanal(mg/L)	218.7	79.9	trace
Isobutanol(mg/L)	1091	224.0	6.16
2-methyl-1-butanol(mg/L)	367	72.0	trace
3-methyl-1-butanol(mg/L)	2860	617	trace
2-phenylethyl(mg/L)	20.4	55.9	91.1
Ethyl palmitate(mg/L)	17.3	-	-
Ethyl oleate(mg/L)	9.7	-	-
Ethyl linoate(mg/L)	4.2	-	-

(四) 文獻中燒酎之香氣成份與本研究結果之比較

表十二為文獻中燒酎與市售燒酎之香氣成份與本研究之差異，分別有大麥燒酎、黑糖燒酎、米燒酎與市售之紅鶴酎(大麥)、樽藏紅鶴酎(大麥)和 Iichiko 燒酎(大麥)，結果顯示除了乙醇濃度有明顯差異外(低酒精度酒和高酒精度酒)，其微量之香氣成份亦有很大的差異，主體香氣成份由酯類、高級醇類、芳香族化合物構成，而以高級醇類占總體香味成分比重最多，其次為酯類、芳香族化合物。本研究之高酒精度酒(40%以上)之高級醇類如異戊醇、異丁醇等含量略低於其他燒酎；酯類化合物中，乙酸乙酯含量較熟米發酵之米燒酎高(表十二)；芳香族化合物 2-phenylethyl(β -苯乙醇)略低於其他種類之燒酎(表十二)，燒酎中之酯類與 β -苯乙醇產生相互作用，能賦予米燒酎以「甜底」般的氣味，使其具有增香持久的效果；總體來說，利用生米麴和生料液態發酵之米燒酎之特徵成份為高級醇低、酯高之特點。

表十二、文獻中燒酎之香氣成份與本研究結果之比較

Table .12 Comparison of aroma content in different shochu

	Wort shochu1	Wort shochu2	Brown shochu1	Brown shochu2	Rice shochu1	Rice shochu2	Flamingo spirit	Jar Flamingo	Iichiko shochu	Rice shochu
Ethanol content(% ,v/v)	48	33	51	27	52.5	23	28.5	40	25	43
Diethyl acetal(mg/L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isobutanol(mg/L)	698	274	385	62	291	25	217	308	182	224
Ethyl acetate(mg/L)	179	39	107	-	86	16	137	211	-	101.2
1-propanol	278	214	735	362	306	25	83	97	80	79.9
2-methyl-1-butanol(mg/L)	452	161	317	41	250	18	145	209	121	72
3-methyl-1-butanol(mg/L)	1370	528	734	118	751	67	643	913	492	617
2-phenylethyl(mg/L)	111	189	69	165	84	212	72	84	76	55.9
Refrence	李(2004)	李(2004)	李(2004)	李(2004)	李(2004)	李(2004)	李(2004)	李(2004)	李(2004)	This work

伍、結論

1. 利用生米麴以及生米液態發酵的方式釀造米燒酎，經過釀酒酵母菌和根黴菌菌醎的培養，再經由製生米麴、生米酒精發酵，最後經過初蒸與複蒸步驟後可得到米燒酎。
2. 釀酒酵母菌醎的培養結果顯示，以特級砂糖配製培養液培養 *Saccharomyces peka* 酵母菌，在 80 rpm、30°C 之條件下進行振盪搖瓶培養 24 小時，即可做為製麴之酵母菌醎，其菌數可達到 4.9×10^8 CFU/mL。
3. 根黴菌菌醎的培養結果顯示，*Rhizopus formosensis* 根黴菌在 30°C 培養 24 小時，即生成大量黴菌孢子，可進行生米種麴之製備，7 天後即長滿大量孢子，可做為合適之根黴菌菌醎。
4. 利用 *Saccharomyces peka* 和 *Rhizopus formosensis* 作為發酵菌和糖化菌，混勻培養於白米粉中製作成生米酒麴，於 30°C、相對溼度 70% 左右之培麴環境中培養七天，其糖化澱粉酶之最高活性可以達到 120.8 units/g dry koji，經過乾燥後的酒麴，澱粉酶活性雖略為下降，但易於保存及使用方便。
5. 理想的生料發酵條件之酒麴用量為 15%，碎米顆粒度為 35mesh 以上，發酵溫度 30°C，並經乳酸調整發酵液之 pH 值為 4.6 左右，發酵後酒醪的出酒率可以達到 61.62%。

6. 經過生料發酵的蒸餾酒液，除了乙醇和水以外，具有多樣的成份，其中以高級醇為主，醇類中最多的成分為異戊醇，其次為異丁醇和正丙醇；酯類化合物為重要的呈香成分，以乙酸乙酯和乳酸乙酯為主； β -苯乙醇為以米釀製的酒類中的特殊成分。乙醛亦為酒精發酵中間產物，發酵及蒸餾後長期貯存會逐漸轉化為乙縮醛，可增強酒的後味，具有熟陳特徵。
7. 生米發酵後的發酵醪經過初蒸和複蒸之兩階段蒸餾，分別收集酒頭、酒心、酒尾，酒頭之高級醇較高，酒尾因具有怪雜味，因此需將酒頭和酒尾另外收取；收集的酒心部分的酒液，可進一步調製成米燒酎。



陸、參考文獻

- 上田誠之助。1993。無蒸煮酒精發酵。應用微生物。3:3-5。
- 下田雅彥。1995。本格燒酎-技術研究動向(I)。日本釀造協會誌。90-7。
- 下田雅彥。1995。本格燒酎-技術研究動向(II)。日本釀造協會誌。90-8。
- 土屋紀美。1993。吟釀香生成能力高的燒酎酵母之育種。日本釀造協會誌。88-9。
- 土屋紀美。1999。熊本縣燒酒製造場之分離菌株。日本釀造協會誌。94-1
- 大森俊郎。1994。大麥燒酎的由來和構成比較。日本釀造協會誌。89-10。
- 好井久雄、野白喜酒雄、小崎道雄。1982。釀造學。講談社。
- 李彬、盧世明。2003。中國生料釀酒第一人。釀酒。30(1):88。
- 李水課。2004。燒酎香味成份之探討。碩士論文。大同大學生物工程研究所。
- 沈怡方。2001。白酒生產技術全書。中國輕工業出版社。
- 林俊杰。1996a。製麴之理論。製酒科技專論彙編 18。169-174。

林俊杰。1996b。釀酒有關之酵素。製酒科技專論彙編 18。158-168。

胡志平、楊強、楊生智。2003。小麴白酒蒸餾曲線的研究。釀酒科技。115: 55-56。

許鈴敏。2006。利用生熟高粱進行液態發酵發展新式香型高粱酒之研究。碩士論文。國立中興大學食品暨應用生物科技學系。

許耀琳。2002a。日本最近對本格燒酎技術研究成果的概要。本格燒酎釀造資料。pp.6-19。

許耀琳。2002b。燒酎概論。釀造協會誌。pp.66-72。

許耀琳。2004。日本南九州的本格燒酎。本格燒酎釀造資料。

楊盛行。1993。小麥品種對製麴之影響。中國農業化學誌。31(3): 364-357

楊強、王衍、童國強。2001。清香型小曲酒的香味成分特點及風味特徵。釀酒科技。pp.75-76。

須藤茂俊。2002。日本酒造情報。日本國稅局。

涉谷一郎。1997。日本酒造情報。Nikka 威士忌公司生產技術研究所。35: 20-23

鄧海宴、程志娟。2000。用生澱粉生產酒精的理論研究(綜述)。釀酒科技精選。139-142。

黃平。中國酒麴(2000)。中國輕工業出版社。22: 120-145。

黃平。生料釀酒技術(2001)。中國輕工業出版社。

黃及時。1996。燒酎概論。製酒科技專論彙編 18。113-121。

黃正財。1980。釀酒微生物之最近發展。製酒科技專論彙編 2。80-85。

黃正財。1983a。釀酒用米之性質與變化。製酒科技專論彙編 5。
pp.132-144

黃正財。1983b。酒類釀造講座:麴。製酒科技專論彙編 5。pp.145-160。

黃耀勇、張國強。2009。新蒸餾白酒貯存過程中乙醛和乙縮醛的變化。
釀酒 36。pp.25-26。

臺灣糧食統計要覽。[\(100年\)](#)。行政院農業委員會農糧署。

環境檢驗檢量線製備及查核指引。(93年)。行政院環境保護署。

菸酒公賣局酒類研究年報 86 年度。pp.122-128。

菸酒公賣局酒類研究年報 92 年度。pp.138-145。

菸酒公賣局酒類研究年報 93 年度。pp.75-86。

劉益善。1983。米酒原料之蒸煮液化。製酒科技專論彙編 5。pp.11-19。

劉益善、倪德全、黃季芳。1980。米酒製造改進法之研究。製酒科技專論彙編 2。pp.72-79。

劉義剛。2000。生料糖化與釀酒研究概述。釀酒科技。5: 40-43。

歐陽港生。1986。以科學眼看中國傳統蒸餾酒製造技術。製酒科技專論彙編 7。71-89。

歐陽港生。1994。小麴。製酒科技專論彙編 16。305-324。

羅改玲。2004。汾酒香酒蒸餾中雜醇油主要組分變化情況探討。寧夏農林科技。1: 53-54。

蕭冬光。2000。生料釀酒技術有關問題探討。釀酒科技。6: 39-42。

翁國祐。2010。米根黴菌在攪拌式發酵槽中生產 L-(+)-乳酸之研究。碩士論文。國立台灣科技大學。

Chen, W.P., Chen Y., Xiong J.H., 2000. Improving the quality of liquor using rice without cooking. Liqueur-making science and technology, 27, 41-43.

Chen ,P.R., Zhan, G.X., Ye, C.Y., 2007. Study of the mechanism and fermentation conditions of no - cook rice wine making using Koji. *Liquor - making science & technology*,28,62-65.

Francesca, C., 2011 . Selected *non-Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(5),873-882.

Gong, Y.Z., LI, F.X., Guo, W.Y., Wang, X.Y., Liang S.B., 2011 .Application research progress on fermentation with uncooked materials. *Liquor-making science and technology*, 233,1427-1430.

Giacomo, M., 2009. SPME–GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiology*,2, 246-252.

Kuo, C.P., 2008. Production of kaoliang liquor using submerged culture and flavor analysis. Department of Bioengineering Tatung University, 21-26.

Miller, G.L.,1959.Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing suger.*Analytical Chemistery*, 31(3), 426-428.

Narahara, H., Koyama, Y., Yoshida, T.,Pichangkura, S.,Ueda, R. and Taguchi, H .,1982.Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae* .*J.Ferment Technol*, 60(4), 311-319.

Paola, D., 2011 .Outlining a future for *non-Saccharomyces* yeasts:

Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 170-181.

Sandra, G.,2011 .Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiology*,28(3),547-553.

Sun, C.P ., Duan, G., 2007. New enzymes and enzyme technologies for fermentation alcohol. *Liquor – making*,12,73-80.

Seiuosuke,V.C ., Duan, G., Xu H.X.,2000 . Progress of ethanol production-breakthrough of production technology by new enzyme technology . *Food and Fermentation* ,7,65-70.

Ueda, S., Zenin, C.,Monteiro, D.A and Young, K.P ., 1998 . [Alcoholic fermentation of sorghum without cooking](#). *Biotechnol & Bioeng.*23,291-299.

Xu H.X., Duan, G., 2006 . A new method for alcohol production from wheat. *Food and Fermentation Industry* ,1,98-103.

Yang, Q .,Wang, Y .,Tong G.Q ., 2001 . Aroma constituent and flavour characteristics of fen-flavour xiaoqu liquor. *Liquor-making science and technology*,2, 75-76.

Zhao ,J.S., Luo ,H.B., Wu ,S.Y ., 2005 . Application of saccharifying enzyme in the production of fen-flavor xiaoqu liquor. *Sichan University of Science&Engenerring*,77-81.

Zhan, H.L ., 2009 . Preparation and application of new liquor-makingn koji and starter of rice-flavour liquor. Modern Food Science and Technology, 3,51-53.

Zhao, J.S., Luo, H.B., Wu, S.Y ., 2006 . Application of saccharifying enzyme in the production of fen-flavor xiaoqu liquor. Food and Science Technology,2,136-140.

Zhan, H.L ., 2009 .Preparation and application of new liquor-making koji and starter of rice-flavour liquor. Modern Food Science and Technology, 4,44-45.

Zhang, F.Y., Tang, K.J., Wang, B.H., 2003 .Study of no-cook rice fermentation for alcohol.Liquer-making, 2,213-224.

Zhang, Y.G., Wei, M.M ., 2001 .White koji for alcohol fermentation using raw rice.Liquer-making science and technology,(6), 81-82.

Zhan, H.L ., 2009. Preparation and application of new liquor-making koji and starter of rice-flavour liquo. Modern Food Science and Technology, 12,1813-1815.

