

育種酵母による吟醸酒製造試験

小澤麻由美*、中山繁喜*、櫻井 廣*

新しい育種操作により得られた酵母 2 株 (YK-45、YK-47) について総米 180kg の試験醸造を行った。YK-45 は発酵が順調であり、香気が穏やかで、味の良い製成酒が得られた。また、YK-71 の発酵はゆっくりではあるが、目的まで発酵させることができ、カブロン酸エチルの多い華やかな香りの製成酒が得られた。

キーワード：4 倍体酵母、減数分裂分離体、試験醸造

Sake Brewing with Hybrid Yeast strains from New Mating Competent mutants

OZAWA Mayumi, NAKAYAMA Shigeki, SAKURAI Hiroshi

Eight hybrid sake yeast strains were constructed by crossing mating-competent isolated the method of Nakazawa et al.¹⁾ These strains and derivative nineteen strains from them were tested by small scale fermentation(details not shown). We selected two strains, YK-45 and YK-71. They were tested by total rice 180kg sake making fermentation test. Strain YK-45 favorably fermented and did not form a high froth head on low temperature fermentation. And the strain produced a well-harmonized aroma and taste as judged by human senses. Strain YK71 fermented slow and more or less weakly at low temperature. But the strain produced ethyl caproate at high level without forming a froth head.

key words ; tetraploid yeast, meiosis strain, fermentation test

1 緒 言

級別廃止などの酒税法改正、消費者のニーズの多様化により、清酒業界では差別化商品競争が激化している。清酒の商品アイデンティティーは旧来の「酒銘・級」だけではなく、産地、原料米、酵母、麹、製造方法などで区別されている。この中で酵母は清酒の酒質に与える影響が非常に大きいため、全国的に優良酵母の研究開発が行われている²⁾³⁾。岩手県でも清酒のイメージアップを図るため岩手オリジナル酵母の開発を平成 3 年度から「アロマ計画」とし⁴⁾、平成 5 年度には吟醸酒用酵母を業界に提供した⁵⁾。しかし、清酒は嗜好品であり、その時代にあった製品を消費者に提供しなければならず、平成 5 年度から(財)岩手生物工学研究センターと共同研究体制をとり、バラエティーに富んだ酵母開発を行って

いる。この中で、新育種技術¹⁾により特徴的な高香気生成酵母を収得することができた。本研究ではこの酵母について試験醸造を行い、その酵母の有用性について検討したので報告する。

2 実験方法

2 - 1 原料米および原料処理

原料米は平成 8 年岩手県産美山錦、精米歩合 50 % の白米を使用した。洗米は M J P 式洗米機 (白垣産業(株)製)を用い、2 分間洗米し、吸水率が 28 ~ 30 % となるよう浸漬・水切りした。蒸米の調整は O H 式二重蒸気槽付き甑 (増田商事(株)製)を用い、50 分間蒸きょうし、最後に乾燥蒸気 10 分間を通した。

* 醸造技術部

2-2 使用酵母

センター保有の特徴のある3酵母(IB-89、IB-95、IB-97)を用い、Nakazawaらの方法¹⁾により融合遺伝子(*STE6p-PHO5*および*MFalp-PHO5*)を用いて接合型を示さない株(a/a型)から接合型を示す株(a/a型あるいはa/a型)を簡便に見だし、これらの株を培地状で交雑させ育種したYK45(4倍体、以下4nと表記)および、IME1遺伝子を4倍体であるYK47に導入し、孢子形成させ、ランダム孢子分離法により減数分裂分離体株を取得したYK71(2倍体、以下2nと表記)と、対照として平成5年度に当センターが開発した吟醸用酵母(IS-2)を使用した。親株の特徴及び交雑の組み合わせを表1に示した。

表1 使用酵母の特徴

酵母名	特徴および交雑の組み合わせ
IS-2	対照株、本県開発の吟醸酵母
IB-89	濃醇な味を生産する酵母、a型
IB-95	高香気生成酵母、a型
IB-97	低酸性酵母、a型
YK45	交雑育種体 IB97×IB89
YK47	交雑育種体 IB97×IB95
YK71	YK45の減数分裂分離体

2-3 仕込み配合

表2に示した仕込み配合で仕込み試験を行った。アルコール添加量は白米トンあたり90L用いた。

表2 総米180kg仕込み配合表

	初添	仲添	留添	総計
総米 (kg)	30	63	87	180
蒸米 (kg)	21	51	72	144
麹米 (kg)	9	12	15	36
30%アルコール (L)				54
水 (L)	38	80	134	261

2-4 製麹方法

製麹はハクヨウ(株)製自動製麹機(120kg用)を使用した。種麹は(株)菱六製の特殊吟醸用純粋種麹を用い、白米100kg当たり、添・仲麹で40g、留麹で30g使用した。製麹時の切り返しは行わなかった。

2-5 仕込み方法

酒母廃止の酵母を加える酵母仕込み法とした。仕込みの1時間前に水麹を行い、初添11~12、仲添8~9、留添7を目標に仕込みを行った。もろみ管理は品温を1日に0.5℃ずつ上昇させ、9日目に最高温度11℃に達することを目標とした。仕込み容器は、初添に100Lのサーマルタンク、仲添以降は500Lの開放ホーロータンクで行った。もろみ成分が日本酒度-1~-3、アルコール16%台に達した時点でアルコール添加を行った。添加2時間後に袋つりによる上槽を行った。

2-6 麹、もろみ、製成酒の分析

麹の分析は堀江らの方法⁶⁾によって、もろみ、製成酒の一般分析は国税庁所定分析法⁷⁾に準じて行った。なお、総エステルは酸化滴定法⁸⁾で、酵母の死滅率はアルカリ-メチレンブルー染色法⁹⁾で行った。低沸点香気成分はオートサンプラー付きヘッドスペースクロマトグラフ装置(Hewlett Packard社製)、有機酸は(株)東京理化S-3000型カルボン酸分析計を、アミノ酸は、日本電子(株)JLC-300アミノ酸分析機を用いた。官能試験は熟練したパネラー9人により描写法により行った。

3 結果

3-1 原料処理

洗米時の水温は10~11℃で、浸漬時間は14~17分、浸漬吸水率26~30%、蒸し米吸水率37~42%で、やや硬めの蒸し米であった。原料処理結果を表3に示す。

表3 原料処理状況

	吸水時間(分)	浸漬吸水率(%)	甑前吸水率(%)	蒸米吸水率(%)
添、仲麹米	15.8	28.8	28.1	39.9
留麹米	16.5	30.2	30.0	41.7
添掛米	16.5	29.2	28.4	39.1
仲掛米	15.7	28.8	27.9	38.3
留掛米	14.7	26.8	25.5	37.0

3-2 麹

麹の製造経過表を図1に示す。蒸し米をある程度さましてから麹室に引き込み、品温30℃前後で種麹を振った。盛り時の水分は添・仲麹で31.3%、留麹で33.3%であった。最高温度は41℃と低く、また最高温度の時間は6~8時間と短かった。出麹の麹歩合は添・仲麹で24.2%、留麹で25.7%であった。

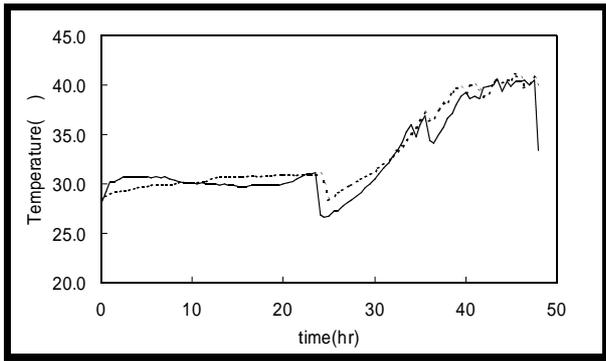


図1 製麴経過

—— 添、仲麴 - - - - 留麴

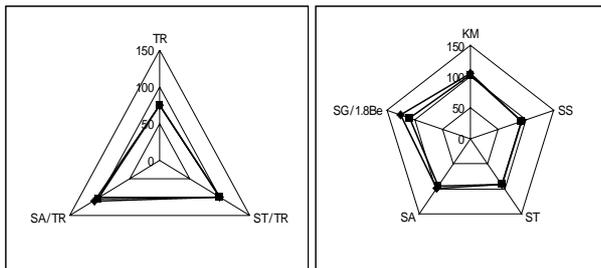


図2 レーダーチャートによる麴の性質

TR：総合力価、SA/TR：アミノ酸比、ST/TR：糖化比
 KM：麴水分、SG/1.8Be：グルコース、SA：真のアミノ酸度、ST：真の糖化性、SS：真の消化性
 —— 添、仲麴 - - - - 留麴

麴の分析チャートを図2に示す。いずれの麴も総合力価、真の消化性、真の糖化性が低く、アミノ酸比、グルコース比が高かった。

3-3 もろみ

もろみの製造経過表を図3に示した。仕込み温度を目的どおりに管理できず、最高温度を予定の日数まで上げることができなかつたため、酵母の増殖が遅く、糖化が進みすぎた。また、もろみ後半で温度を保持することができず、温度の上下変化が激しかった。そのため、酵母にストレスがかかりボームの切れが悪く、予定した日数より長期のもろみとなった。しかし、最終的には目的のボーム（日本酒度-1～-3）まで切ることができた。いずれの酵母も、もろみの状態は泡なし酵母の様子を呈したが、後半にはちりめん様の蓋がかかった。特にYK71の蓋が厚かった。もろみ末期（アル添前）の酵母のメチレンブルー染色率はIS-2が36.7%、YK-45が20.2%、YK71が27.7%であった。

IS-2は留後37日目、YK-45は36日目、YK-71は56日目の上槽であった。製成歩合を表4に示す。

3-4 製成酒

製成酒の成分を表5に示した。YK-45は対照のIS-2に比べ酸度が低く、中でもクエン酸、リンゴ酸の含量が

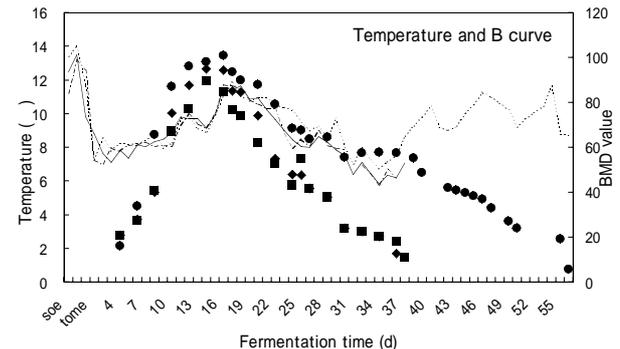
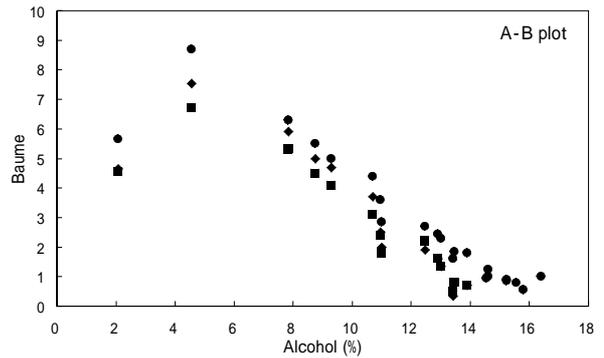


図3 発酵経過表及びB曲線、A-B値

発酵温度 —— IS-2 - - - - YK-45 - - - - YK-71
 :IS-2, :YK-45, :YK-71

表4 製成実績

	もろみ 熟成歩合 (%)	粕歩合 (%)	アルコール 収得 (100% EtOH l/1000kg rice)	汲み水 歩合 (%)
IS-2	103.9	48.1	300.7	180
YK-45	87.2	61.0	263.1	180
YK-71	86.1	22.8	357.3	190

低かった。しかし、旨味に關係するコハク酸¹⁰⁾はやや多かった。アミノ酸度は同じくらいであった。認識閾値以下¹¹⁾ではあるが、組成にかなり差が見られ、セリンや着色に關係するトリプトファン¹²⁻¹⁵⁾の含量が少なかった。逆に良酒ほど多いとされるアルギニン¹⁶⁾含量が多かった。香気成分はエステルがやや少なかった。吟醸香に代表される酢酸イソアミルとカプロン酸エチルの含量は1:1であった。

YK-71はもろみ日数が長かつたため、酸度とアミノ酸度が高かつた。有機酸では、リンゴ酸が特に多く、IS-2の2倍以上あつた。アミノ酸はすべてにおいてIS-2より多く、閾値以上で多いのは、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニンであつた。また、着色に關係するチロシン、トリプトファン¹²⁻¹⁵⁾も多かつた。香気成分

ではカブロン酸エチルが著しく多く、IS-2の2.5倍であった。

官能評価の結果、YK-45は対照に比べ香気が穏やかで、味の調和が良く、YK-71は香りが極めて高く、味が濃厚であるという評価を得た。

4 考 察

対照も含め3試験区とも、もろみのポーメの切れが鈍く、もろみ日数が長くなった。このことは酵母の発酵特性だけとは言い難く、平成8年産の原料米が溶けやすかったこと、麴の品質、もろみの品温管理の不適切さ等の要因が考えられる。温度管理面では、最高温度を予定の日数までに上げることが出来なかったため、必要な酵母数が確保できなかった。そのため、もろみ前半では糖化が進みすぎ酵母にかなりのストレスがかかったと推察される。

また、使用した麴は蒸し米が硬かったこと、製麴経過でも盛り時の温度低下が大きく、最高温度保持時間も短かったこと等、良質な麴製造のためには好ましくない条件が重なった。このために麴力価が弱く(図2)、もろみ後半のグルコース濃度が低くなり、アルコールの生成やポーメの減少が停滞する現象がみられた。それでも試験酵母の死滅率はもろみ末期でも20~30%しかなかった。このことからこれら試験酵母はストレスに強い酵母であるといえる。特に、YK71はもろみ日数が長く、もろみ中期からの温度変化の上下が大きかったにもかかわらず、死滅率が26.7%(温度が上下する前は12%)と低

かったことからそれだけ強い酵母であることがいえる。

試験酵母はもろみ後半、蓋がかかったため、香氣成分の散逸が少なく、もろみ後半まで香氣成分がよく生成された。

YK-45の製成酒は、他の酵母に比べ総酸度が低く、中でもクエン酸含量が少なく、閾値以下であった。加えて、旨味に關与するコハク酸¹⁰⁾は多く、閾値の2倍近くあった。このことはYK-45の官能評価において味わいがある、味がなめらかであるといった評価の裏付けとも考えられる。アミノ酸含量はIS-2と同量であったが、組成にかなりの差がみられ、良酒ほど多いとされるアルギニン酸の含量が多かった¹⁶⁾。また、着色に關係するトリプトファンの含量が少なかった¹²⁻¹⁵⁾。僅差ではあるが苦味のアミノ酸の含量がIS-2より多かった。しかし、その量は認知閾値以下であるため、これらは酒の濃さとして感じられた。このことは、佐藤の報告¹⁷⁾と一致する結果を得た。

YK-71の製成酒は、総酸度、アミノ酸が高く、香氣成分の中では、カブロン酸エチルが著しく高かったが、官能評価では雑味や酸はなれ、香りはなれ等の悪い指摘はなかった。その理由として、1.有機酸中のリンゴ酸が特に多く、酒に爽快さ¹⁸⁾を与えた。2.苦味成分のアミノ酸(苦味として感じない閾値以下、なおかつ雑味として感じるより少なく、酒の濃さとして感じる程度¹⁷⁾)がIS-2の1.5倍もあり、酸味や香氣成分のバランスを保っている等が推察される。しかし、老香に關係するスレオニン¹⁹⁾や着色に關係するチロシン、トリプトファン

表5 吟醸酒一般分析

ホ-メ	RS (%)	TA (ml)	AA (ml)	EtOH (%)	有機酸 (mg/100ml)					アミノ酸 (mg/100ml)											
					酢酸	リンゴ酸	コハク酸	酪氨酸	酪氨酸	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	
IS-2	+3.5	2.67	1.65	1.00	18.3	2.50	6.92	6.69	7.06	0.53	4.35	3.71	6.18	21.23	10.71	22.32	2.26	11.18	1.92	5.67	12.16
YK-45	+3.0	3.04	1.45	1.10	17.7	2.14	5.86	6.88	6.62	0.00	4.19	3.81	4.45	20.86	10.99	23.66	2.48	11.78	1.87	5.88	12.42
YK-71	+4.0	2.84	2.25	1.60	18.0	2.68	13.48	6.15	7.55	0.53	7.40	6.30	7.95	31.11	12.72	27.79	3.18	14.95	3.28	7.92	18.28

アミノ酸 (mg/100ml)										総エステル (%)	E/A E/B ratio (ppm)										
Tyr	Phe	His	Orn	Lys	NH ₄	Trp	Arg	Pro			Aldehyde	AcOEt	i-BuOAc	PrOH	i-BuOH	i-AmOAc	BuOH	i-AmOH	CapEt	ratio (%)	ratio (%)
IS-2	13.83	14.28	5.49	1.36	6.46	3.20	0.95	10.34	11.18	0.26	26.74	48.97	0.21	46.13	40.13	4.77	0.82	111.13	3.55	4.3	24.9
YK-45	14.28	15.01	5.47	1.25	5.77	4.25	0.80	12.55	12.50	0.25	28.31	45.92	0.13	65.51	34.29	3.55	1.38	110.76	3.53	3.2	9.0
YK-71	20.20	21.73	8.06	1.70	10.34	4.01	1.40	18.05	12.83	0.24	25.09	36.12	0.02	44.87	34.22	1.91	1.07	97.56	9.08	2.0	2.2

RS:直接還元糖、TA:総酸度(0.1N NaOH ml)、AA:アミノ酸度(0.1N NaOH ml)、EtOH:アルコール含量(vol.%)
 Aldehyde:アセトアルデヒド、AcOEt:酢酸エチル、i-BuOAc:酢酸イソブチル、PrOH:プロパノール、i-BuOH:イソブチルアルコール、i-AmOAc:酢酸イソアミル、BuOH:ブタノール、i-AmOH:イソアミルアルコール、CapEt:カブロン酸エチル、E/A ratio:i-AmOAc*100/i-AmOH、E/B ratio:i-BuOAc*100/i-BuOH

¹²⁻¹⁵⁾の含量が多いことは問題である。一般に、アミノ酸含量は製造方法により量比が変動する²⁰⁾ため、酵母による特性だけだとは言いがたい。実際、本試験では追水やもろみ日数の関係でもろみ熟成歩合やかす歩合等が異なっている(表4)。今後の検討を要する。

今回新育種技術により育種したYK-45は、発酵性が親株と変わることなく、香気生成等の発酵副産物に特徴を持った酵母であった。また、YK-47の減数分裂分離体であるYK-71は、カプロン酸エチルを多く生成する酵母であった。カプロン酸エチルを多く生成する酵母は、それ自体の阻害作用により死滅率が高く、ストレスに弱い酵母が多い。事実、高カプロン酸エチル生成株で、YK-71の親株であるYK-47は総米30kg仕込み試験において死滅率が50%にも達していた。しかし、YK-71はYK-47と同等の高カプロン酸エチル生成にもかかわらず死滅率が低く、発酵性は親株より優れていた。

5 結 語

様々な特徴を持った酵母を親とし、中沢らが開発した酵母育種法により育種した酵母6株を(財)岩手生物工学研究センターから提供を受けた。今回はその中から香気のバランスが良いと思われるYK-45と、高カプロン酸エチル生成株YK-47を減数分裂させたYK47-71の計2株について総米180kgの試験醸造を行った。その結果、YK-45は発酵力が優れ、香気穏やかで、味の調和が良い製成酒が得られ、YK47-71は発酵は遅いが、目的のボーメまで達することができ、香気がきわめて華やかで味が濃醇である製成酒が得られた。

以上のことから新しい育種法により開発した酵母は確実に、高頻度で、特徴を持った酵母を育種することができる。また、得られた交雑体で発酵力が劣っていても減数分裂分離体を収得することにより発酵力を向上させることが可能であることがわかった。

本研究を実施するに当たって酵母を提供、また、ご助言を頂きました(財)岩手生物工学研究センター江井仁所長、中沢伸重主任研究員に感謝申し上げます。

文 献

- 1)清酒酵母研究会編：改訂清酒酵母研究
- 2)清酒酵母研究会編：清酒酵母の研究 - 80年度の研究
- 3)小澤麻由美,米倉裕一,中山繁喜,齋藤博之,大森勝雄：岩手県醸造食品試験場報告,27,38(1993)
- 4)中山繁喜,櫻井廣,齋藤博之,小澤麻由美：岩手工技七研報,1,65(1995)
- 5)N.Nakazawa,K.Tsuchihara,T.Hattori,K.Akita,S.har-

- ashima and Y.Oshima : *J.Ferment.Bioeng.*,78,6 (1994)
- 6)堀江修二,土佐典昭,細谷達夫：醸協、87,57(1992)
- 7)注解編集委員会編：第4回改正国税庁所定分析法注解
- 8)日本醸造協会編：成分一覽
- 9)佐見学：醸協、90,536(1995)
- 10)山田正一：醸造分析法、産業図書
- 11)吉田正昭,二宮恒彦,池田真吾,山口静子,吉川知子,小原正美：農化、40,295(1966)
- 12)高瀬澄夫,酒井佑,江頭勇次,村上英也：醸協、63,783 (1968)
- 13)佐藤信,中村欽一,蓼沼誠：醸協、65,255(1970)
- 14)中村欽一,佐藤信,蓼沼誠,吉江輝征：醸協、65,1120 (1970)
- 15)S.Sato,K.Nakamura and M.Tadenuma : *Agr.Bio. Chem.*,35,308(1971)
- 16)小崎道雄,安井俊雄,住江金之：発協、20,102(1962)
- 17)佐藤信：食の科学、36,102(1977)
- 18)全国清涼飲料研究会：ソフトドリンクス、清涼ハンドブック、光琳書院
- 19)(財)日本醸造協会：清酒製造技術
- 20)山本醸,新田啓一：醸協、58,1067(1963)