吟醸酒用有用麹菌変異株の造成

五味勝也・飯村 稔・辻 巖*

井上 博**・原 昌道

(国税庁醸造試験所)

昭和61年5月6日受理

Isolation of Useful Mutants of Sake-*koji* Molds

(*Aspergillus oryzae*) for *Ginjo*-sake Production

Studies on Useful *Ginjo-koji* and Sake-*koji* Molds for *Ginjo*-sake Production (Part 1)

Katsuya GOMI, Yuzuru IIMURA, Iwao TSUJI,

Hiroshi INOUE and Shodo HARA

(National Research Institute of Brewing, 2-6-30,
Takinogawa, Kita-ku, Tokyo 114)

Breeding of the useful strains of *koji* molds for *ginjo*-sake (superior sake) production was performed by the mutagenesis of a glucoamylase-high-producing strain.

Among the culture collections of *koji* molds in National Research Institute of Brewing, *Aspergillus oryzae* RIB 642 was selected for its higher level of glucoamylase (GAase) activity. This strain showed, however, higher acid carboxypeptidase (ACPase) activity, deferriferrichrome (DF) production and browning of *koji* exposed to air after being steeped in water.

To improve the strain, mutants were induced by the repeated uv irradiation on conidia. Finally, 8 mutant strains were isolated, which showed less productivity of ACPase and DF while that of GAase still remained high. When laboratory-scale fermentations using these mutants were performed, one strain designated as 642-12-A was thought to be the most suitable one for *ginjo*-sake production, because of its ability to give *ginjo*-flavor to the resulting sake.

Key words : 麹菌変異株, 育種, 吟醸酒

緒 言

優良吟醸酒の製造において、麹の型が重要な要因になっていることは知られているが、その判定は官能的な要素が強く、吟醸酒用に適した麹に対する成分規格、或いは酵素力価等は明らかにされていない。また、現在使用されている種麹も、普通清酒の製造に選択された麹菌が主流をなしており、吟醸酒製造に適した麹菌の開発は今までなされていない。著者らは吟醸酒用有用麹菌として具備すべき条件として次のような性質を考え、それを選択の指標とした。

- (1) 種麹製造において孢子着生が大。
- (2) 蒸米上での生育が良好、破精込がよい。

吟醸酒用有用麹及び麹菌に関する研究 (第1報)

* 小西酒造(株) ** 東京国税局鑑定官室

- (3) 孢子柄が比較的短い。
 - (4) 麹及び発酵中に異常臭が認められない。
 - (5) もろみ中及び生成酒の芳香(吟醸香)が高い。
 - (6) グルコアミラーゼ(GAase)力が強い。
 - (7) もろみの発酵初期に H₂S 臭が認められる。
 - (8) 麹中のイノシトール、ビオチン含量が少ない。
 - (9) α -アミラーゼ(α Aase)、酸性プロテアーゼ(APase)は市販種麹と同程度。
 - (10) 酸性カルボキシペプチダーゼ(ACPase)力が弱い。
 - (11) チロシナーゼ力が弱く、非褐変性である。
 - (12) デフェリクローム(DF)の生産が少ない。
- これらの大部分は、普通酒製造用麹菌でも要求される性質であるが、吟醸酒用麹菌として、特に(5)~(10)が必要と考えた。

吟醸酒の製造においては、一般に若い突き破精型の麹が使用され、かつ低温発酵（最高品温 10～10.5℃）である。それ故、低温でよく発酵し、かつ粕歩合を小さくするためには、グルコアミラーゼ力強いことが必須である。また、本酵素はアミロース-脂肪酸エステル複合体（発酵末期に滓または粕と一緒に沈降する）からエステルを遊離させ、酒の芳香を高めるのに効果があることが報告されている¹⁾。他方、もろみ中のイノシトール含量が多いと香りが悪いこと²⁾、ビオチンが多いと酸（リンゴ酸）が多くなる³⁾ことが知られている。そこでこれらのビタミン類の生産の少ない麹菌の指標として、一般にパントテン酸の少ない若い麹を使用したもろみの発酵初期に発生しやすい H₂S 臭を選択の条件に加えた。

上述した（1）～（12）の条件を満足する麹菌は自然界には存在しない。従って、本報では、当所保存の麹菌の中からまず GAase 力の強い麹菌を選択し、次に紫外線処理を行うことにより吟醸酒用に適した麹菌の造成を試みた結果について報告する。

実験方法

1. 供試菌株

当所保存の麹菌 (*Aspergillus oryzae*) 248 株を使用した。また小仕込試験に用いた酵母は協会 13 号である。

2. α 米からの麹の製造

小規模の製麹試験は岡崎らのシャーレ法⁴⁾に従って行った。小仕込試験での製麹は、熱風乾燥 α 米に 2×10⁵/ml の孢子懸濁液を α 米量の半分加え、恒温恒湿装置（ナガノ科学(株) LH-20）中に 32℃ (RH 95%) で引込み、以後 35℃ (RH 90%)、38℃ (RH 85%)、40℃ (RH 80%) と品温を上昇させ 40 時間培養して出麹した。

3. 麹菌孢子に対する紫外線処理

小型シャーレに孢子懸濁液 (2×10⁶/ml) 2 ml をとり、撹拌しながら 20 cm の距離から 15 W の紫外線ランプで 5 分間照射を行った。この時の生存率は 0.1% であった。次に光修復の防止のために光を遮断して 30 分以上放置した後、平板培地（麹汁寒天培地）に懸濁液の適量を塗抹し 30℃、5 日間培養し、変異型の孢子を形成させる。このプレートに 0.01% Tween 80 溶液 20 ml を加え、白金耳で孢子をかきとり、3 G 3 ガラスフィルター（孔径 20～30 μm）で濾過し、遠心後、沈澱を滅菌水に懸濁したものを変異処理後の孢子懸濁液とした。

4. カゼイン平板培地法による低 ACPase 変異株の分離

田中ら⁵⁾は蒸米上では ACPase の低い麹菌の発芽が遅れることを利用して低 ACPase 変異株を分離している

第 1 表 カゼイン培地組成⁶⁾

KH ₂ PO ₄	0.36 g
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	1.07 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0.50 g
NaCl	0.10 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0.002 g
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0.002 g
Casein	4.0 g
Casamino acid	0.05 g
Distilled water	1,000 ml
pH	5.5

平板培地の場合 Triton X-100 3.0 g
Agar 20.0 g を含む

麹菌孢子懸濁液 (2×10⁶/ml) 2 ml

↓
紫外線 (15 W) 照射, 20 cm の距離から 5 分 (生存率 0.1～1%)

↓
光を遮断して, 30 分以上放置

↓
麹汁寒天平板培地に塗抹, 30℃, 5 日間培養

↓
平板培地上の孢子を 0.01% Tween 80 溶液 20 ml に懸濁

↓
3 G 3 ガラスフィルターにて濾過

↓
遠心分離 (4000 rpm, 10 分)

↓
カゼイン液体培地に接種, 30℃, 24 時間振盪培養

↓
3 G 3 ガラスフィルターにて濾過

↓
麹汁寒天平板培地に塗抹, 30℃, 3 日間培養

↓
カゼイン平板培地 (0.3% Triton X-100 を含む) に約菌
30℃, 3 日間培養

↓
カゼイン消化円 (halo) の小さいコロニーを分離

↓
製麹 (75%, 日本晴 α 米)

↓
麹の観察及び酵素力価の測定

第 1 図 低 ACPase 生産性変異株の分離法

が、この方法は得られた候補株を一株ずつ製麹してスクリーニングするため、操作が煩雑で分離効率が悪い。そこで前述した変異処理後の孢子懸濁液を 1 次スクリーニングとしてカゼイン液体培地に接種し、30℃、24 時間培養後、3 G 3 ガラスフィルターで濾過し、発芽しない孢子を集め 麹汁寒天培地に播種してコロニーを形成させる。次に 2 次スクリーニングとしてカゼイン平板培地に、単一コロニーからの孢子を接種し（1 枚のプレートは 6 スポット）、30℃、3 日間培養してコロニー及びカゼイン消化円 (halo) の様子を観察し、halo の生じないかまたは小さいコロニーを釣菌した。なお、カゼイン培地は、関根ら⁶⁾の組成（第 1 表）のものをを用いたが、平板培地には 0.3% Triton X-100 を加えることによりコロニーを小さくし halo の大きさを観察しやすくなった。以上の操作手順を第 1 図に示した。

5. 麹の酵素力価等の測定

酵素力価のうち、GAase は岩野ら⁷⁾の ACPase は中台らの方法を改良した岩野ら⁸⁾の方法により、また α Aase

第2表 小仕込試験・仕込配合

		添	仲	留	計
総	米	35	65	100	200(g)
掛	米	25	50	80	155(〃)
麹	米	10	15	20	45(〃)
汲	水	52	78	130	260(ml)

添時に協会13号アンブル酵母 0.5 ml, 加工水 (KH₂PO₄ 1.3 g, NaCl 0.25 g, 乳酸 6 ml/100 ml) 2 ml を添加した。

APase は国税庁所定分析法によって測定した。デフェリフェリクローム (DF) は佐藤ら⁹⁾の方法によった。麹の褐変度は抽出残渣を濾紙上に一夜放置して、褐変の度合を観察した。

6. 小仕込試験

第2表に示した仕込配合で、総米 200 g の小仕込試験を行った。原料米は日本晴の 70%, 50% 精米歩合の白米である。品温経過は 70% 白米の場合、添仕込 15°C, 仲仕込 10°C, 留仕込 8°C, 以後 1 日 1°C 昇温し最高 15°C とした。50% 白米の場合は、添仕込 13°C, 仲仕込 10°C, 留仕込 7°C とし、徐々に品温を上げて 6 日目に最高 10°C とした。発酵経過は CO₂ 減量で測定した。

実験結果及び考察

1. 吟醸酒用有用麹菌変異株の造成方法

前述した吟醸酒用有用麹菌として具備すべき条件を満たす菌株は自然界に存在しないことから、選択と変異処理によって有用麹菌を造成することを試みた。造成法を第2図に示す。まず、当所保存の麹菌の中から GAase が強く、蒸米上での生育が良好で異常臭がなく、胞子着生のよい菌株を選択した。次にこれを用いて小仕込試験を行い、発酵初期に H₂S 臭の発生があり、中期から末期にかけて吟醸香が高く、発酵が順調で異臭の認められない菌株を選択した。この菌株に紫外線処理を行

第2図 吟醸用有用麹菌変異株分の離法

い、ACPase 活性の低い変異株を造成し、更に再度紫外線処理を行って、DF 生産性ならびに褐変性の少ない菌株を造成した。このうち 50% 白米を使用した吟醸小仕込を行って、もろみ中及び生成酒の吟醸香の高い株を目的の有用菌株とした。以下に造成の各工程別の分離結果について述べる。なお、得られた造成株を用いた中間工業規模での吟醸酒製造試験については次報で報告する。

2. GAase 力の強い吟醸酒用麹菌の選択

当所保存の麹菌 248 株について α 米で麹を造り、GAase 力が市販の種麹と比較して 2~4 倍強い麹菌 12 株を選択した。これらは全て ACPase が非常に強く、また褐変性を示した。このうち出麹の香りがよく、蒸米上での生育がよい 6 菌株について再度 α 米 (70% 白米) で麹を造り、酵素力価、蒸米上での繁殖性、褐変性を調べた。その結果を第3表に示した。GAase 力価は RIB 333 と RIB 642 の2株が高く、市販種麹の約 5 倍の活性を示した。しかし、RIB 333 は出麹の香りが悪い欠点があった。一方、RIB 642 は蒸米上での生育も胞子着生もよく、出麹の異臭もなく良い菌株であるが、出麹時の栗香が低く、胞子柄が長い欠点がある。また RIB 601 は GAase が市販種麹の約 3 倍の強さで、出麹の栗香も高く (僅かに茸臭がある)、胞子柄も短い、APase, ACPase 力が強い。その他 RIB 338, 643, 1186 も GAase は強いものの、出麹に異臭があり、有用麹菌としては不適当と考えられた。なお、これら 6 菌株を用いて総米 200 g の小仕込試験を行ったが、留後 7 日目頃に RIB 338, 601, 642 に強い H₂S 臭の発生が認められた。また、発酵もろみ中の芳香 (吟醸香) は RIB 642 が最も良かった。

以上の結果から、GAase 力の強い吟醸用有用麹菌として、RIB 642 を選択した。なお、RIB 601 も有用麹菌と考えられるが、本菌については今後検討する予定である。

第3表 高 GAase 生産性の麹菌による麹の諸性質

	αAase *	GAase *	APase *	ACPase *	褐変 性	状態・香り	胞子 柄
RIB 333	1,250	530	3,010	10,230	卅	総破精・茸臭	長
338	510	350	4,670	14,260	卅	総破精・栗香・カビ臭	長
601	1,060	310	3,540	13,150	卅	やや総破精・栗香・茸臭	短
642	1,620	430	3,250	16,490	卅	総破精・低い栗香	長
643	1,060	320	3,730	11,760	卅	やや総破精・カビ臭	中
1186	1,210	370	3,770	13,550	卅	総破精・カビ臭	長
市販 ①	820	110	2,220	7,170	±	総破精・栗香・老香	—
市販 ②	720	90	1,760	6,490	±	総破精・栗香・老香	—

* u/g・α 米 (70%)

3. RIB 642 株から紫外線処理による低 ACPase 変異株の造成

上で選択した RIB 642 株の分生胞子を実験方法の項で記した紫外線処理、カゼイン培地選択法により低 ACPase 変異株を約 50 株分離した。これらの菌株について α 米で麴を造り、麴の諸性質を調べた結果、蒸米上で生育のよい菌株は全て褐変性を示したが、ACPase 力が親株の約 50% と弱く、かつ GAase 力が親株と殆ど変わらない菌株 3 株を後た。これらの麴の諸性質を第 4 表に示したが、この中で、ACPase 力が最も弱く、GAase 力が強い RIB 642-12 株を有用株として選択した。本菌は親株より胞子柄が短く、突き破精型の麴となり、破精込みもよく、出麴の香も他の 2 株に比べよかった。

第 4 表 RIB 642 の低 ACPase 変異株による麴の諸性質

	α Ase*	GAase*	APase*	ACPase*	褐変性	生育	出麴の香り	胞子柄
RIB 642	1,680	430	3,200	16,800	+++	良	低い栗香	長
642-5	1,050	300	2,500	9,250	+++	良	ややカビ臭	長
642-12	1,260	380	2,900	8,850	+++	良	低い栗香	中
642-36	1,220	320	2,650	10,300	+++	良	低い栗香	中

* $u/g \cdot \alpha$ 米 (70%)

このようにカゼイン培地選択法により、効率よく低 ACPase 生産性変異株を取得できることが明らかになった。カゼイン培地上での halo の大きさは、本来は酸性プロテアーゼ (APase) 力と比例するものと考えられる。麴菌では、APase と ACPase の生産性に相関が認められており¹⁰⁾、halo の小さい菌株を分離すれば、その中に低 ACPase 変異株が含まれている可能性が高いと考え、カゼイン培地選択法を採用したが、実際上も「製麴-酵素力価測定」という煩雑な操作がなく、多くの菌株の検定が容易にできた。また、麴菌の胞子は多核であるため、紫外線処理した胞子と完全培地に塗抹し、変異型の胞子を形成させた後、選択培地におけるスクリーニングを行うことにより変異株の取得を高めることができた。

4. RIB 642-12 株から紫外線処理による吟醸酒有用麹菌変異株の造成

上で選択した RIB 642-12 株は有用麹菌であるが、褐変性が強く、DF 生産性大で発酵中の香りにやや難点があった。そこで、再度紫外線処理をして約 50 株を釣菌し、 α 米で麴を造り、蒸米上での生育が良好で、出麴の香りがよく、褐変性が親株より弱い菌株として RIB 642-12-A~H の 8 株を分離した。このうち 2 株 (C, F) は性質が不安定なため除き、6 株について 50% 精白米 (α 米) を用いて麴を造って市販種麴と比較検討した。その結果を第 5 表に示す。ACPase は 12-B 株が強い (おそらく復帰変異) のを除いて、変異株はいずれも親

第 5 表 RIB 642-12 の変異株による麴の諸性質

	α Aase*	GAase*	APase*	ACPase*	DF**	褐変性
RIB 642	1,130	440	2,340	10,560	160	+++
642-12	900	370	1,700	4,250	160	+++
12-A	730	310	1,810	4,990	120	+
12-B	1,040	370	2,100	9,940	150	++
12-D	710	290	1,650	3,540	150	++
12-E	870	340	1,560	4,800	100	+
12-G	890	350	1,280	4,420	170	++
12-H	370	120	850	1,500	60	±
市販 ①	440	90	1,270	3,800	130	±
市販 ②	560	110	1,930	3,420	180	±

* $u/g \cdot \alpha$ 米 (50%)

** ppm

株 (RIB 642) の約半分の強さであった。特に 12-H 株は、約 10% と非常に弱かった。一方、GAase は 12-H を除いて親株の 80~90% の強さで、市販種麴の 3~4 倍の値を示した。また、 α Aase、APase とともに 12-B 株以外はいずれも親株より低かったが、市販種麴よりやや強い活性であった。褐変性については、12-H 株が市販種麴と同様に殆ど褐変性を示さず、12-A, E も褐変性が弱かった。なお、12-H は低 ACPase 生産性のためか、蒸米上での生育がやや遅く、実用的には使用し難いと考えられる。

以上の結果から、吟醸酒用有用麹菌として 12-A, 12-E が適当と考えた。

5. RIB 642 変異株を用いた吟醸小仕込試験

RIB 642 及びその変異株と市販種麴を用いて造った麴 (第 5 表) を使用して、総米 200 g の吟醸小仕込試験を行った。発酵経過を第 3 図に、生成酒の一般成分を第 6 表に示す。RIB 642 及びその変異株は、いずれも GAase が市販種麴に比較して強いので発酵速度が速く、また留後 5~8 日目に H_2S 臭が認められた。 H_2S 臭の発生は、GAase によりグルコースの供給が多く、酵母の増殖が旺盛なためにビタミン不足となったことで生じた

第 3 図 吟醸小仕込の発酵経過 (総米 200 g)

642-12-B~G の発酵経過はいずれも 642-12 と 12-H の中間に入るため省略した。

第6表 50% 白米による小仕込試験

	日本酒度	アルコール	酸 度	アミノ酸度	OD ₄₉₀	吟醸酒 (1~5点法)
RIB 642	-7.3	16.1	2.0	1.5	0.025	3
64-12	-10.7	15.2	2.2	1.4	0.022	2
12-A	+4.2	16.0	2.1	1.3	0.016	1
12-B	-7.3	15.3	2.3	1.3	0.021	3.5
12-D	+1.4	15.4	1.9	1.1	0.021	2.5
12-E	+3.7	15.0	1.9	1.2	0.021	1.5
12-G	+3.0	15.0	2.3	1.3	0.021	2
12-H	+5.5	14.7	2.2	0.9	0.014	1.5
市 販 a	+6.0	13.8	2.2	1.5	0.023	3
市 販 b	+3.2	14.8	2.4	1.5	0.023	2.5
市 販 c	±0	14.9	2.4	1.5	0.023	3

市販種麹：22 日もちろみ 変異株：20 日もちろみ

ことも考えられ、麹菌のビタミン生産が少なかったことによるものかは明らかでなく、今後ビタミン類の定量等の検討が必要であろう。もちろみの香りは、10 日目以降で 12-A と 12-H 株が良好であった。生成酒のアミノ酸は 12-H が最も低かったが、これは ACPase 力価が小さかったことによるものと考えられた。酸度は 12-D, E が低い傾向にあった。生成菌についての吟醸結果から、味・香りともに 12-A 株が最も良く、ついで 12-H 株が良好であった。なお、市販種麹で造った麹は、一般に老ねすぎているためか、酒質はあまり良くなかった。また、GAase 力が低いために発酵も遅れ、642 系のもちろみより発酵期間を 2 日間長くしたが、生成アルコールも低かった。データは示さなかったが、生成酒の香気成分の分析結果からは、642 系は市販種麹に比べて、イソアミルアルコール等のアルコール類が少なかった。また、酢酸イソアミルは大差なかったが、カブロン酸エチル含量が高かった。

上に述べた結果から、吟醸酒用有用麹菌として RIB 642-12-A 株が最も適していると考えられた。また RIB 642-12-H 株は低 ACPase 生産性のため、蒸米上での生育がやや遅く麹が造りにくいという欠点があるが、アミノ酸が少なく淡麗な酒質になることから興味深い菌株と考えられる。

要 約

吟醸酒用有用麹菌として具備すべき条件として、まずグルコアミラーゼ力に着目し、保存菌株の中からグルコアミラーゼ生産能の高い株を検索した。麹の諸性質及びそれらの麹を使用した小仕込試験の結果から、吟醸香の高い RIB 642 株を選択した。しかし、RIB 642 株は酸性カルボキシペプチダーゼ力が強く、デフェリフェリクローム生産性大で褐変性があるため、紫外線照射による変異処理を 2 回行い、8 株の有用株を分離した。これらの菌株を用いて吟醸小仕込試験を行い、麹の酵素力価、デフェリフェリクローム生産性、褐変性及び生成酒中の吟醸香等を比較検討した結果、RIB 642-12-A 株を吟醸酒用有用麹菌として選択した。

本研究を行うに当たり、ご協力いただいた中村重光氏、保坂大二郎氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 伊藤 清, 太田剛雄, 原 昌道: 昭和 60 年度日本醸酵工学大会要旨集, p. 39 (1985)
- 2) 北野一好, 嶋崎孝行, 浅黄雅彦, 原 昌道: 昭和 56 年度日本農芸化学会大会 講演要旨集, p. 30 (1981)
- 3) 嶋崎孝行, 丸尾精一, 手塚直志, 原 昌道: 昭和 56 年度日本醸酵工学大会 講演要旨集, p. 183 (1981)
- 4) 岡崎直人, 弘中吉雄, 嶋崎順一, 菅間誠之助: 醸協, 73(5) 402 (1978)
- 5) 田中利雄, 岡崎直人, 五味勝也, 今野 宏, 井出光彦: 醸協, 79(4), 274 (1984)
- 6) H. SEKINE, S. NASUNO, N. IGUCHI: *Agric. Biol. Chem.*, 33, 1477 (1969)
- 7) 岩野君夫, 風間敬夫, 布川弥太郎, 醸協, 71(5), 383 (1976)
- 8) 岩野君夫, 布川弥太郎: 醸協, 71(10) 792 (1976)
- 9) 佐藤 信, 大場皓蔵, 蓼沼 誠: 醸協, 62(8), 875 (1967)
- 10) 岩野君夫, 布川弥太郎: 醸協, 73(7), 555 (1978)