尿素生産能の低い酵母による清酒醸造

原 昌道・飯村 稔・五味勝也・吉沢 淑・中村欽一

(国税庁醸造試験所)

昭和 62 年 12 月 1 日受理

Sake Making with Sake Yeast Having Low Urea-Producing Ability

Shodo HARA, Yuzuru IMURA, Katsuya GOMI, Kiyoshi YOSHIKAWA and Kin-ichi NAKAMURA

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

We had previously bred sake yeasts having low urea-producing ability. To reduce urea concentration in sake, these mutants were used in laboratory-scale and pilot-scaled sake-making experiments.

In the experiment using a mutant, K-7 U-9, which was derived from the sake yeast Kyokai No. 7, vigorous fermentation took place in *moromi* mash as well as in *shubo* starter, whereas the urea concentration was reduced to about 30% of the control mash obtained with the parent strain. But, the resultant total acidity was little higher than the control mash. Then, the non-foaming strain of K-7 U-9 was efficiently used to reduce the acidity. A mutant, K-9 U-14, which was derived from the sake yeast Kyokai No. 9, was also used for the sake making, showing the remarkable reduction of urea concentration in the product.

These results show that these mutants can be extensively used to reduce the urea concentration in large scale sake making.

Key words: 尿素生成・清酒酵母・清酒醸造

緒 言

著者らは前報¹⁾において、清酒酵母に紫外線照射して得られたカナバニン耐性突然変異株のなかから、ナイス タチン濃縮法により L-アルギニンを唯一の窒素源とする培地における生育が親株に比べ遅くアルギニン資化能の低い酵母を分離した。更に、これらの突然変異株のなかから、麴と蒸米を用いた総米 20 g の小仕込試験により、尿素生産能の低い二、三の株を選択した。

そこで、これらの株を用いて清酒醸造試験を行ない、酒母および醪における尿素生産能と生成酒の尿素濃度を親株の場合と比較したところ、尿素濃度が大幅に低い清酒の醸造が可能ながことが示されたので報告する。また、これら突然変異株から分離した泡なし変異株による清酒醸造試験の結果についても、併わせて報告する。

実験材料および実験方法

1. 供試菌株

前報¹⁾の協会 7 号および 9 号から得られた尿素生産能の低い突然変異株を用いた。なお、協会 7 号および協会 9 号から得られた変異株を、それぞれ K-7 U 系および

K-9 U 系とする。また、対照の酵母として協会 7 号、協会 9 号およびそれらの泡なし変異株を用いた。

2. 泡なし変異株の取得

大内ら²⁾の Froth flotation 法を用いた。

3. 小仕込試験

供試株を麴汁 (ボーリング 8 ϕ) 5 ml で 30 $^{\circ}$ C, 静置培養して得られた菌体を酒母として用いた。醪の仕込配合は Table 1 の通りで、原料米は日本晴種 70% 精白米で、掛米にはその α 化したものを使用した。容器としてガラス広口ビンを使用し、恒温槽で温度制御して最高温度を 15 $^{\circ}$ C とした。発酵経過は CO₂ 発生による重量減を目安とし、重量が 55~60 kg 減少した時点で上槽を行った。

4. 中間規模の清酒醸造試験

Table 2 に示す仕込配合により、総米 100 kg の製造試験を行った。なお、原料米としては日本晴種 70% 精白を用いた。

5. 酒母、醪および生成酒の成分分析と官能試験

尿素の分析については、試料 5 ml をビタチェンジ 1 g で 2 回処理してアンモニアを除去した後、F キット (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。なお、

Table 1 Recipe of ingredient for laboratory-scale sake making.

		First addition	Second addition	Final addition	Total
Total rice	(g)	32	60	91	183
Kakemai	(g)	22	45	71	138
Kojimai	(g)	10	15	20	45
Water	(ml)	65	104	172	341
Supplemented water ¹⁾	(ml)	2	0	0	2

1) Water supplemented with 1.3% KH_2PO_4 , 0.25% NaCl and 6% lactic acid

Table 2 Recipe of ingredient for pilot-scale sake making.

	Shubo Starter	First addition	Second addition	Final addition	Total
Total rice (kg)	7	15	28	50	100
Kakemai (kg)	4	10	22	41	77
Kojimai (kg)	3	5	6	9	23
Water (l)	8	18	35	74	135

酵母の尿素分析に当っては、試料の pH を 5 付近に調整し、ビタチェンジ処理の効果が上がるようにした後に行った。また、一般成分については国税庁所定分析法注解³⁾によった。

生成酒の酒質については、特に異臭味の在否を中心に数名のパネルにより試験した。

実験結果および考察

1. 協会 7 号から分離した突然変異株 (K-7 U 系) による小仕込試験

前報¹⁾で得られた協会 7 号の突然変異株のなかから、特に尿素生産能の低い株として、K-7 U-9, K-7 U-14 および K-7 U-B を選び、これらを用いて小仕込試験を行った。Fig. 1 に留後の発酵経過を示した。K-7 U-9 および K-7 U-B は協会 7 号に比べ僅かに遅い傾向であるが、旺盛な発酵力を示した。K-7 U-14 については醗後期に発酵が大幅に遅れた。

一方、生成酒の各成分を調べ、その結果を Table 3 に示した。K-7 U-9 および K-7 U-B は、アルコール生産が協会 7 号に近く発酵が順調であり、主目的である尿素濃度も、協会 7 号の 30~40% 程度まで大幅に低減された。ただし、総酸については 0.4~0.7 ml 程度の増加傾向が見られた。そのほかの成分および酒質については協会 7 号との間に大差は認められなかった。

Fig. 1 Time course of fermentation with mutants, K-7 U-9, K-7 U-14 and K-7 U-B and the parent strain, Kyokai No. 7.

(□) K-7 U-9, (●) K-7 U-14, (△) K-7 U-B and (○) Kyokai No. 7

Table 3 Analysis of sake produced in laboratory-scale makings with the mutants derived from Kyokai No. 7.

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Total acid (ml)	Amino acid (ml)	Urea (ppm)
K-7 U-9 ¹⁾	+3.5	17.0	3.4	2.0	10.1
K-7 U-14 ¹⁾	-16	14.2	2.2	2.7	21.1
K-7 U-B ¹⁾	-2.0	16.4	3.7	1.9	13.1
Kyokai No. 7	+8.5	17.6	3.0	1.9	31.0

1) Mutant derived from Kyokai No. 7

Table 4 Urea concentration and total acidity of sake produced in laboratory-scale sake makings with non-foaming mutants and parent strains.

Strain	Produced CO ₂ (g)	Urea concentration (ppm)	Total acid (ml)
Kyokai No. 7	49.2	17.7	2.9
K-7 U-9	46.0	6.9	3.7
K-7 U-901 ¹⁾	49.3	8.5	3.2
K-7 U-902 ¹⁾	47.2	8.9	3.1
K-7 U-903 ¹⁾	48.7	8.2	3.2
Kyokai No. 9	52.5	15.5	2.8

1) Non-foaming mutant derived from K-7 U-9

2. 泡なし変異株による小仕込試験

一般に、泡なし酵母は泡あり酵母に比べ生成酒の総酸度が低くなることが知られている。先に述べたように、K-7 U-9 は協会 7 号に比べ生成酒の総酸度が高いという問題点があり、これを解決するため泡なし変異株を取得し、それを用いて小仕込試験を行った。Table 4 は泡なし株 3 株を用いた試験結果である。いずれの泡なし株も、協会 7 号に匹敵する旺盛な発酵力を示し、総酸度も

Table 5 Time course of components in *shubo* starters using a mutant, K-7 U-9, and Kyokai No.7.

Strain	Component	Cultural time (days)					
		2	3	5	7	8	10
K-7U-9 ¹⁾	Bé		15	12.6	9.0	7.8	6.9
	Reducing sugar (%)	19.2	21.4	17.0	13.5	9.8	9.7
	Total acid (mL)		5.2	6.1	7.1		7.7
	Urea (ppm)	2.8	4.9	0.5	0.4	0.5	0.8
Kyokai No.7	Bé		14	11.8	9.0	7.8	6.8
	Reducing sugar (%)	19.9	19.1	15.2	12.2	11.0	9.4
	Total acid (mL)		5.7	6.8	7.5	7.2	7.4
	Urea (ppm)	2.6	4.1	6.4	5.2	6.2	4.3

1) Mutant derived from Kyokai No.7

Table 6 Time course of components in *moromi* mashers using mutants, K-7 U-9 and K-7 U-901, and Kyokai No.7.

Strain	Fermentation time(days)								
	Odori	3	5	7	10	12	14	17	19
K-7U-9	Bé	9.8	6.3	5.8	4.5	4.2	3.4	-23	-14.6
	R. S. ¹⁾ (%)	12.4	11.2	7.7	6.9	6.7	5.7	4.5	3.4
	Alcohol (%)			5.8	7.8	10.0	12.6	14.4	17.5
	Total acid (mL)	2.4	0.9	1.3	1.8	2.2	2.8	3.2	3.4
	Amino acid (mL)	2.3	1.0	1.1	1.6	2.2		2.8	3.2
K-7U-901	Bé	8.9	5.5	5.4	3.6	-20	-10.5	-4.0	
	R. S. ¹⁾ (%)	12.7	9.2	6.4	5.6	4.2	2.6	1.3	
	Alcohol (%)			7.8	10.0	11.8	15.9	17.2	
	Total acid (mL)	2.9	1.0	1.7	2.3	2.9	3.1	3.3	
	Amino acid (mL)	1.2	0.4	0.6	0.7	1.3	1.7	1.8	
Kyokai No.7	Bé	9.6	6.8	6.5	5.8	4.4	3.2	-16.5	-9.3
	R. S. ¹⁾ (%)	13.0	10.6	7.9	7.8	6.5		3.2	2.1
	Alcohol (%)			5.8	8.2	10.4	13.0	15.8	18.5
	Total acid (mL)	2.4	0.9	1.3	1.7	2.0	2.4	2.7	3.0
	Amino acid (mL)	2.2	0.8	1.1	1.4	1.8		2.7	3.0

1) Reducing sugar

協会7号に比べるとやや高かったが、K-7 U-9 に比べ大幅に低減され、泡なし化の効果が顕著であった。

3. K-7 U-9 およびその泡なし変異株 K-7 U-901 を用いた清酒醸造

小仕込試験で最も低い尿素濃度を与え、かつ総酸度も比較的低かった K-7 U-9 とその泡なし株 K-7 U-901 を用いて総米 100 kg の中間規模の仕込試験を行って酒母および醪における尿素をはじめ各成分濃度の経時変化を調べた。Table 5 は酒母の経過である。

尿素濃度については、K-7 U-9 および協会7号とも初期に 4 ppm 程度の蓄積があり、協会7号については酒母日数に伴って漸増したのに対して、K-7 U-9 の場合は逆に減少が見られ、酒母使用時には、協会7号の約 20% まで減少し、K-7 U-9 の効果が顕著に現われた。この結果は K-7 U-9 については、酒母初期に蒸米の溶解によって溶出した尿素が窒素源として資化され、その後の尿素生産量が少ないため生産と資化のバランスの結果、尿素濃度の低下傾向が現われたのに対し、協会7号

Table 7 Analysis of sake produced in pilot-scale sake makings with mutants, K-7 U-9 and K-7 U-901, and Kyokai No. 7.

Strain	Sake meter	Alcohol (%)	Reducing sugar (%)	Total acid (ml)	Amino acid (ml)	Urea (ppm)
K-7U-9 ¹⁾	-11.0	18.1	3.3	3.6	3.2	10.0
K-7U-901 ¹⁾	-4.0	17.2	1.3	3.3	1.8	11.0
Kyokai No.7 ¹⁾	-6.6	19.1	2.1	3.0	3.2	31.1
K-7U-9 ²⁾	+3.0	20.1		2.9	2.1	11.4
K-7U-901 ²⁾	+4.0	19.5		2.8	1.7	9.5
Kyokai No.7 ²⁾	+2.5	19.9		2.5	2.0	29.5

1) Before alcohol addition

2) After alcohol addition

Fig. 2 Time course of urea concentration and fermentation in *moromi* mash of pilot-scaled sake making using mutants, K-7 U-9 and K-7 U-901, and the parent strain, Kyokai No. 7.
(□) K-7U-9, (●) K-7U-901 and (○) Kyokai No. 7
(—) Urea concentration, (---) Alcohol concentration

については、尿素生産量が資化される量より多くなったため、漸増する傾向が現われたものと考えられる。

K-7U-9、泡なし変異株 K-7U-901 および対照に協会 7 号を用いた醪における尿素濃度、および各成分の醪日数に伴う経時変化を、それぞれ Fig. 2 および Table 6 に示した。

尿素濃度については、酒母と同様の傾向が見られ、K-7U-9 および K-7U-901 では醪前半で減少傾向が現われ、後半の上昇も緩やかであったが、対照の協会 7 号では前半から上昇し、特に後半の上昇は急激であった。上槽直前では K-7U-9 および K-7U-901 による醪では、尿素濃度が協会 7 号の約 30% 程度に抑制され、尿素低減の効果が顕著であった。

一方、尿素以外の成分では、総酸度が小仕込試験結果と同様、K-7U-9 の醪において上昇したが、泡なし株 K-7U-901 の醪では、総酸度を僅かな上昇に抑えるこ

Table 8 Urea concentration and total acidity of sake produced in laboratory-scale sake makings with mutants, K-9U-8 and K-9U-14, and Kyokai No. 9.

Strain	Produced CO ₂ (g)	Urea concentration (ppm)	Total acid (ml)
K-9U-8	54.4	10.7	2.4
K-9U-14	57.6	10.8	2.9
Kyokai No. 9	59.8	23.9	2.3

とができた。その他の成分では、K-7U-9 に 1 日程度の経過の遅れがあったが、いずれも発酵は順調であった。また、生成酒の成分については Table 7 に示すように、尿素濃度では突然変異株による生成酒が、協会 7 号の約 3 分の 1 で著しく低減された。そのほかの成分では総酸度が高かった。生成酒の官能試験結果については、突然変異株による生成酒が協会 7 号のものに比べ酸味がやや強かったほかは、ほぼ同様の酒質であった。

以上述べた、酒母、醪の経過および生成酒の成分と酒質が総合的に判断して、尿素濃度が低い清酒の製造にとって、協会 7 号から造成した尿素生産能の低い K-7U-9 および K-7U-901 は、きわめて効果が高いと考えられる。

4. 協会 9 号から分離した突然変異株 K-9U-8 および K-9U-14 株 (K-9U 系) を用いた清酒醸造

前報¹⁾で得られた協会 9 号の突然変異株のうち、特に尿素生産能の低かった K-9U-8 および K-9U-14 を用いて小仕込試験を行い、その結果を Table 8 に示した。K-9U-8 は、協会 9 号に比べ発酵経過は遅れくが、生成酒の尿素濃度は大幅に低減された。また総酸度については大差がなかった。一方、K-9U-14 については、発酵経過は順線で尿素濃度も大幅に低下したが、総酸度が上昇する傾向にあった。

更に、K-9U-14 を用いて中間規模の清酒製造を行い、その醪日数に伴う成分の経時変化および生成酒の成

Table 9 Time course of components in *moromi* mash of pilot-scale sake making using a mutant, K-9 U-14, derived from Kyokai No. 9.

	Fermentation time (days)							Product ¹⁾
	8	12	14	17	20	22	25	
Bé	5.0	3.6	3.0	-20	-16	-13	-11	-1.0
Alcohol (%)	8.2	11.6	13.4	15.4	16.2	16.6	17.4	19.6
Total acid (ml)	1.6	2.2	2.7	3.3	3.3	3.3	3.6	2.9
Urea (ppm)	6.1	7.2	8.2	10.1	10.1	11.9	12.6	11.4

1) Filtrate after adding alcohol

分を Table 9 に示した。尿素濃度については急激な上昇はなく、生成酒で 11 ppm 程度に抑えることができた。また総酸度も K-7 U 系に比べ低く、酒質についても特異臭などの異常はなく良好であり、K-9 U-14 は尿素濃度の低い清酒の製造に効果が高いと思われる。

要 約

協会 7 号および 9 号酵母から分離した尿素生産能の低い突然変異株を用いて、小仕込試験および総米 100 kg の中間規模の清酒製造試験を行い、次の結果を得た。

(1) 協会 7 号から分離した K-7 U 系の変異株を用いた清酒製造では、対照の協会 7 号と比べ、酒母、醪とも発酵経過に大差はなく旺盛な発酵力が示された。一方、尿素については、尿素生産能の低い K-7 U 系の酵母を用いた場合、生成濁の尿素濃度を協会 7 号の約 3 分の 1 (10 ppm 程度) に抑えることができた。

(2) K-7 U 系酵母による生成酒の一般成分については、協会 7 号のものに比べ総酸度が高かったが、その

他の成分についてはほぼ同様であり、酒質も良好であった。なお総数の多いことは、K-7 U 系酵母を泡なし株にして用いることにより緩和された。

(3) 協会 9 号から分離した尿素低生産性突然変異株 (K-9 U 系) についても、小仕込および中間規模の清酒製造試験を行ったところ、K-7 U 系と同様の結果が得られた。

(4) 尿素生産能の低い K-7 U および K-9 U 系の株は、尿素含量の少ない清酒を製造するための実用株としての効果が高いと判断された。

文 献

- 1) 原 道昌, 飯村 稔, 五味勝也, 吉沢 淑, 中村 欽一: 醸協, 83, (5) 351 (1988)
- 2) K. OUCHI and H. AKIYAMA: *Agric. Biol. Chem.*, 35, 1024 (1971)
- 3) 注解編集委員会編: 国税庁所定分析法注解, p. 17 日本醸造協会 (1974)