高香気生産性酵母の分離と仕込方法の検討

布宮雅昭・須貝 智・小島弥之祐・鈴木弥兵衛・佐藤昭仁

和田多聞・石垣浩佳*・松田義弘*・小関敏彦*

＜山形県酒造組合連合会・*山形県工業技術センター＞

平成6年7月8日受理

Breeding of Sake Yeast Producing Large Amounts of Flavor Components and Studies on Brewing Conditions of New Type Sake using the Strain Obtained

Development of New Type Sake using High Flavor-Producing Sake Yeast (Part 1)

Masaaki NUNOMIYA, Satoshi SUGAI, Yanosuke KOJIMA, Yahei SUZUKI, Akihito SATO,
Tamon WADA, Hiroyoshi ISHIGAKI*, Yoshihiro MATSUDA* and Toshihiko KOSEKI*

(Association of Sake Brewing in Yamagata Prefecture, 1-7-49 Midori-cho,
Yamagata-shi 990, *Yamagata Research Institute of Technology,
683 Kurumanomae Numagi Yamagata-shi 990)

For making a low alcoholic beverage, sake yeast having high isoamyl acetate and ethyl caprate, and also organic acid producing abilities was isolated from L-canavanine-resistant mutants.

Sake brewed with the method in which material was added in one step contained more flavor components than that brewed with 2 step or 3 step addition method, but the one step addition method was not suitable for practical brewing of sake in the point of safety. Therefore, a little modified 2 step addition method, in which all *koji* was added at the first step and then steamed rice was added at the second step, was used. The amount ratio of *koji* to total rice at sake brewing influenced the production of flavor components, and sake produced with 20% *koji* ratio was more flavorful than that produced with 30% *koji* ratio.

Effects of polishing ratio and variety of rice on the production of flavor at sake brewing were also studied.

Key words: カナバニン耐性株・ソフト清酒・仕込方法

緒 言

これまで、特定名称の清酒や生酒などが牽引車になって清酒の消費を伸ばしてきたが、清酒のより一層の需要拡大のためには、アルコール濃度の低いソフト清酒の開発が求められている。これまでに「やわくち」¹⁾、「ドブ」²⁾、「越の風」³⁾、「高酸味濁り酒」⁴⁾ など個性のある商品が開発されている。しかし、これらの製造法はいずれも特殊な方法をとっているため、製造管理に厳密さを要求するとともに、安定した品質の製品が得られにくいなどの問題がみられる。そこで筆者らは、通常の製造方法でのソフト清酒の開発を目的に、酢酸イソアミルやカプロ

ン酸エチルを多量に生成するとともに、酸を適度に生成する酵母の取得と、それを用いた仕込方法について検討した。

エステル高生産性酵母の育種に関しては、秋田⁵⁾はカナバニン耐性株より、芦田⁶⁾は5,5,5-トリフルオロイソシン耐性株より、また、柳内⁷⁾はジアゾ染色法により酢酸イソアミル高生産株を取得している。カプロン酸エチルに関しては、市川⁸⁾がセルレニン耐性株より、神田⁹⁾はアニリンブルー・2R 色素とカナバニン培地を併用する方法により高生産株を取得している。一方、齋藤¹⁰⁾はアルコール脱水麴を添加した培地を用いてエステル高生産株を自然界から分離した。

筆者らは、エステル生成量が多く、かつ、適度な生酸

高香気生産性酵母によるソフト清酒の開発 (第1報)

性を有する酵母の取得を目的として、突然変異処理した酵母からカナバニン耐性を有する株を分離するとともに、得られたカナバニン耐性株と親株との細胞融合株を造成し、耐性株及び融合株の中から目的とする菌株を2株分離した。仕込方法は、製品の安定性を第一とするため通常の製造方法を基本とし、段仕込みの方法、麴歩合、原料米の品種及び精米歩合について検討したので、これらの結果について報告する。

実験方法

1. 供試菌株

県内酒造場の醗から分離した協会9号系と思われる菌株を使用した。

2. 変異株の取得法

1) カナバニン耐性株の分離法

秋田らの方法⁹⁾に従い、供試菌株から分離した。YE PD 培地 (1% Yeast extract, 2% Polypepton, 2% Glucose) で 30°C, 2 日間培養し、得られた菌株を滅菌水に懸濁し、マグネチックスターラーで攪拌しながら、紫外線ランプ (GL-15) で 25 cm の距離から 25 秒間照射した。集菌後カナバニン培地 (L-canavanine 20 ppm) を含む最少培地、以後 CAN-medium と略) に塗布し、30°C で 4 日間培養し、生育してきた株を釣菌しカナバニン耐性株を得た。これらの菌株について、麴汁 50 ml (ボーメ 6.0) を培地として、25°C で発酵試験を行い香気成分を分析した。

2) 細胞融合株の取得法

カナバニン耐性株よりも更に香気生産性の高い菌株の取得を期待して、親株とカナバニン耐性株 (YK-2911) の細胞融合を行った。それぞれの菌株を 0.7 M ソルビトールを含むザイモリアーゼ酵素溶液 (1 mg/ml) でプロトプラスト化した。これを十川らの方法⁹⁾に準じ、電気パルス細胞融合装置 (島津社製 SS-2) を用い細胞融合させ、融合株と思われる大きな細胞を取り出し、YM

培地 (0.3% Yeast extract, 0.3% Malt extract, 0.5% Polypepton, 1% Glucose) で細胞壁を再生させた後、上記と同様の発酵試験に供した。

3. 小仕込試験法

変異株の最終的な選択のため、総米 150 g, 麴歩合 20%, 汲水歩合 140% で 1 段仕込みを行った。発酵温度は 10°C 一定とし、経時的に CO₂ 発生による重量の減少を測定し発酵力とした。

4. 仕込方法の検討

1) 段仕込みの検討

Table 1 に示した仕込配合 (総米 150 g, 麴歩合 20%, 汲水歩合 140%) により、従来の三段仕込みを対照として、一段仕込み、二段仕込み及び変則二段仕込み (最初麴米全量を加え、次に蒸米のみを添加する方法) について、13°C で発酵させ、製成酒の成分を比較した。

2) 麴歩合の検討

1) の結果で最良と思われた方法で、麴歩合を 20% と 30% について検討した。発酵法は上記の方法と同じである。

3) 原料米の品種及び精米歩合の検討

品種の比較では、本県の使用量の多い一般米のキヨニシキ、雪化粧と好適米の美山錦 (いずれも山形県産米) について、また、精米歩合については雪化粧の 50% と 60% 精白について検討した。なお、仕込方法及び麴歩合は 1), 2) の結果で最良のものをを用いた。

5. 成分分析法

1) 一般成分

国税庁所定分析法¹⁰⁾によった。

2) 香気成分

吉沢のヘッドスペース法¹¹⁾によった。

実験結果及び考察

1. カナバニン耐性株と細胞融合株の発酵試験結果

得られたカナバニン耐性株 14 株と細胞融合株 5 株に

Table 1 Proportion of raw materials for small-scale sake brewing.

	First addition			Second addition			Third addition		
	Rice (g)	Koji (g)	Water (ml)	Rice (g)	Koji (g)	Water (ml)	Rice (g)	Koji (g)	Water (ml)
A	120	30	210						
B		30	210	120					
C	30	10	50	90	20	160			
D	15	10	30	40	10	60	65	10	120

Total rice : 150 g, Koji ratio : 20%, Proportion of water : 140%,

Lactic acid (0.2 ml/100 ml) was added at the first addition.

Fermentation temperature : 13.0°C.

Initially added yeast : 4×10^8

A : 1 step addition method, B : a little modified 2 step addition method, C : 2 step additoin method, D : 3 step addition method (control).

Table 2 Comparison of aroma components among sake yeasts, L-canavanine-resistant strains and fusants.

	Strain	i-AmOAc (ppm)	i-AmOH (ppm)	CapOEt (ppm)	E/A ratio*
Control	Kyokai-7	1.0	57	1.0	1.8
	Kyokai-9	1.3	70	1.5	1.9
	Kyokai-10	1.0	55	1.3	1.8
L-canavanine-resistant	YK-0001	1.9	97	1.2	2.0
	0005	0.3	34	0.5	0.9
	0022	1.7	84	1.3	2.0
	0107	3.1	140	2.0	2.2
	0224	4.5	216	2.1	2.1
	0414	1.0	67	0.4	1.5
	0693	1.1	54	0.7	2.0
	0956	0.9	44	1.0	2.0
	1336	0.2	19	0.8	1.1
	1954	0.5	31	0.3	1.1
	2181	0.8	57	0.3	1.4
	2465	2.4	125	0.8	1.9
	2731	1.4	81	1.1	1.7
	2911	5.2	196	1.4	2.7
Fusant	0-1-1-4A	1.5	81	1.0	1.9
	0-1-1-4B	1.8	101	1.5	1.8
	0-3-1-2A	1.1	86	1.1	1.3
	0-3-1-2E	0.7	45	0.5	1.6
	0-4-1-3B	1.2	71	0.8	1.7

 *: Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol $\times 100$

ついて麴汁培地で発酵試験を行い、上澄液について香気成分を測定した結果を Table 2 に示した。

親株より酢酸イソアミルとカブロン酸エチル生成量が多く、かつ、発酵力の目安と考えられるイソアミルアルコール生成量の多い株として、YK-0107, 0224, 2465, 2911 の4株を選択した。なお、これらの4株はいずれもカナバニン耐性株であり、細胞融合株の中にはこれらに勝るものはなかった。

2. 小仕込試験結果

選択した4株について、協会9号酵母を対照として発酵試験を行い、その経過を Fig. 1 に示した。

YK-0107, 2911 の発酵経過は協会9号酵母とほぼ近い経過を示し、十分実用性のあることを示した。一方、YK-0224, 2465 は非常に発酵力が弱く、最終の CO_2 発生量も協会9号酵母の75%と少なかった。

製成酒の成分を Table 3 に示したが、目的とする酸度はYK-2911が最も高く、次いでYK-2465, YK-0107と0224の順であったが、いずれの株も対照の協会9号酵母よりは高い酸度を示した。

アミノ酸度は、YK-0224が高く、YK-2911が最も低かったが、協会9号酵母に比べ大差なく、実用的に問題

Fig. 1 Time course of fermentation.

Fermentation was carried out with 1 step addition method (total rice: 150g), using selected yeasts and Kyokai No.9 yeast at 10°C.

Symbols: ●; Kyokai No.9, ■; YK-0107, ▲; YK-2911, ○; YK-0224, □; YK-2465

Table 3 General components of sake produced by parent strain and mutants.

Strain	Total acid (ml)	Amino acid (ml)	Sake-meter	Alcohol (%)
Kyokai-9	3.8	2.3	+1.0	15.6
YK-0107	3.9	2.3	-3.0	15.4
0224	3.9	2.5	-21.0	12.8
2465	4.1	2.4	-24.0	12.5
2911	4.5	2.1	-5.0	15.0

はないと判断した。

香気生成量及び香味の調和、生酸量及び発酵力から、YK-0107, 2911 の2種の酵母をソフト清酒用の有力株として選択した。

3. 仕込方法の検討

選択した株の中から、YK-0107 (選抜した2株のうち、酵母の特徴が穏やかで仕込配合等の影響を観察しやすいと思われるYK-0107を使用した) 及び対照の協会9号酵母について、Table 1 の仕込配合で仕込みを行い、製成酒についての成分分析結果を Table 4 に示した。

酢酸イソアミルとカブロン酸エチルの香気成分は、協会9号, YK-0107 酵母とも協会9号の一段仕込みを除き、一段、二段、三段と増えるに従い減少する傾向が認められ、神田らの報告¹²⁾と同様の結果が得られた。協会9号酵母の一段仕込みについては、初発の酵母数が物量に対して少なくなり、発酵に変調を来した香気成分が少なく生酸量がやや多くなったと考えられる。

このように、一段仕込みの場合は、実際の大きな仕込みにおいては安全醸造の面でやや問題があると考えられた。

Table 4 Analysis of flavor and other components of sake produced with various methods.

	Yeast	<i>i</i> -AmOAc (ppm)	CapOEt (ppm)	E/A ratio*	Total acid (mL)	Amino acid (mL)
A	Kyokai-9	1.86	1.48	1.37	3.0	2.2
	YK-0107	11.95	2.55	2.80	3.1	2.0
B	Kyokai-9	3.53	2.11	2.53	2.5	1.9
	YK-0107	5.65	2.83	2.29	2.7	1.9
C	Kyokai-9	2.31	1.62	1.51	2.5	1.8
	YK-0107	7.24	2.78	1.90	2.8	1.9
D	Kyokai-9	2.44	1.75	1.62	2.6	1.9
	YK-0107	4.64	2.23	1.34	2.6	2.0

* : Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol $\times 100$

A, B, C and D mean the same as described in Table 1.

酸度及びアミノ酸度は、一段仕込みでやや多く、二段、三段仕込みではほぼ同じであった。爽快な酒質にするためにはアミノ酸度は低い方がよく、一段仕込みはこの点でも不利と考えられた。

筆者らの一人¹³⁾は、酒母を全量麴で仕込んだ場合、従来の方法の酒母より香気成分が多く生成されることを報告している。変則二段仕込みはその発想によるもので、今回の結果でも、香気成分や酸度、アミノ酸度の生成量は適度であり、最初に麴米を発酵させるために安全性にも優れていることから、この仕込方法を採用することとした。

4. 麴歩合の検討

変則二段仕込みでの最適な麴歩合を知るために、麴歩合 20% と 30% について検討した。最初に麴 30 g (麴歩合 30% の場合は 45 g) に水 210 mL と酵母及び乳酸 (0.2 mL/100 mL) を加え 1 日踊をとった後、翌日蒸米 120 g (30% 麴歩合の場合は 105 g) を加え、発酵させた。得られた製成酒の成分分析結果を Table 5 に示した。

麴歩合を 30% に増やすと、協会 9 号, YK-0107 酵母とも酢酸イソアミル、カプロン酸エチル及び E/A 比は減少した。これは、麴歩合が高いと醪中のアミノ酸濃度が高くなり、アミノ酸合成経路からの高級アルコールの供給が少なくなるためと思われる^{14),15)}。

酸度、アミノ酸度は、協会 9 号, YK-0107 酵母とも麴歩合の増加とともに高くなった。

これらの結果から、麴歩合 20% と 30% の比較では、麴歩合は 20% が適当と考えられた。

5. 原料米の品種と精米歩合の影響

麴歩合 20% の変則二段仕込みの方法で、原料米の品種及び精米歩合の影響について検討した結果を Table 6

Table 5 Effective *koji* ratio on the production of flavor and other components in sake.

<i>Koji</i> ratio	Yeast	<i>i</i> -AmOAc (ppm)	CapOEt (ppm)	E/A ratio*	Total acid (mL)	Amino acid (mL)
20%	Kyokai-9	3.53	2.20	2.53	2.5	1.9
	YK-0107	5.65	2.83	2.29	2.7	1.9
30%	Kyokai-9	2.11	1.09	1.62	2.9	2.2
	YK-0107	2.25	0.64	0.95	3.2	2.3

* : Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol $\times 100$

Table 6 Analysis of flavor and general components of sake produced with various kind of rice.

Variety of rice:	<i>Kiyo-nishiki</i>	<i>Yuki-geshou</i>	<i>Yuki-geshou</i>	<i>Miyama-nishiki</i>
Polishing ratio (%)	50	50	60	50
<i>i</i> -AmOAc (ppm)	1.8	2.8	1.9	3.4
<i>i</i> -AmOH (ppm)	180	185	199	210
CapOEt (ppm)	2.4	2.7	2.1	2.6
E/A ratio*	1.01	1.50	0.95	1.54
Total acid (mL)	2.7	2.6	2.7	2.4
Amino acid (mL)	1.9	1.9	1.7	1.6
Sake-meter	-1.0	+1.0	+2.0	-2.0
Alcohol (%)	16.3	16.2	16.5	16.0

* : Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol $\times 100$

に示した。なお、用いた酵母は YK-0107 である。

一般米と好適米では、以前から言われているように、好適米を用いた方が香気成分の量が多く、特に酢酸イソアミルの量に差がみられた。一方、精米歩合についても、60% より 50% の方が明らかに香気成分が多く、これまでの報告¹⁶⁻¹⁸⁾と同様の結果となった。

香りの高い爽快なソフト清酒を製造するには、香気成分の生成が多く、アミノ酸の少ない綺麗な酒質となる酒造好適米を使用し、かつ、精米歩合も 50% 程度に低くすることが望ましいと考えられた。

要 約

香りの高いソフト清酒の開発を目的として、高香気生産能と適度の生酸性を有する変異株を選択し、それを用いた製造法を検討した。

県内酒造場から分離した酵母に変異処理して得られたカナバニン耐性株から、協会 9 号酵母に比較して酢酸イソアミル及びカプロン酸エチルの生成量が多く、かつ、適度に酸を生成する株として YK-0107, YK-2911 の 2 株が得られた。

仕込方法は、麴歩合 20%、汲水歩合 140% で最初、酒母及び麴全量と水を添加し、1 日踊をとった後蒸米を添加する変則二段仕込みが香気生成や酸の生成、さらに

は醸造の安全性で優れていた。

香りの高い爽快なソフト清酒を製造するには、一般米よりは酒造好適米が、また、精米歩合も 50% 程度と低い方が望ましいと考えられた。

文 献

- 1) 日本酒造組合中央会東京支部銘酒研究委員会：醸協，74，（1）61（1979）
- 2) 佐藤 信，大場俊輝，吉田隆一：醸協，77，（8）557（1982）
- 3) 秋田 修，蓮尾徹夫，原 昌道，吉沢 淑：醸酵工学，67，7（1989）
- 4) S. ASHIDA, E. ICHIKAWA, K. SUGINAMI & S. IMAYASU: *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2061（1987）
- 5) 柳内敏靖，清川良文，若井芳則：醸酵工学，67，159（1989）
- 6) E. ICHIKAWA, N. HOSOKAWA, Y. HATA, Y. ABE, K. SUGINAMI & S. IMAYASU: *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2153（1991）
- 7) 神田晃敬，三森智子，松井菊恵，浜地正昭，本馬健光：醸協，85，（6）417（1990）
- 8) 斎藤久一，渡邊誠衛，田口隆信，高橋 仁，中田健美，岩野君夫，石川雄章：醸協，87，（12）915（1992）
- 9) 十川好志，戸田健三，高山慎一郎，三浦靖高，望月宗孝，岩崎 功：島津評論，44，17（1987）
- 10) 注解編集委員会編：第4回改正国税庁所定分析法注解，日本醸造協会（1993）
- 11) 吉沢 淑：醸協，68，（1）59（1973）
- 12) 神田晃敬，松井菊恵，浜地正昭，本馬健光，布川弥太郎：日本醸造学会大会講演要旨，p. 650（1989）
- 13) 小関敏彦，前田政彦，大沼堅司：日本醸友会仙台支部酒造技術研究発表会要旨集，p. 32（1983）
- 14) K. YOSHIZAWA: *Agric. Biol. Chem.*, 29, 672（1965）
- 15) 吉沢 淑：醸協，61，（6）481，（7）585（1966）
- 16) 吉沢 淑：農化，50，115（1976）
- 17) T. ISHIKAWA & K. YOSHIZAWA: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 45（1979）
- 18) 吉沢 淑，石川雄章，野白喜久雄：農化，47，713（1973）