

# 大分県酒造組合選抜酵母の小仕込み製造清酒の特性

藤原 秀彦<sup>1)</sup> 小野 浩輝<sup>1)</sup> 難波 桃子<sup>1)</sup>  
小松 潤平<sup>2)</sup> 麻生 益直<sup>2)</sup> 岡本 啓湖<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 別府大学食物栄養科学部発酵食品学科,

<sup>2)</sup> 大分県酒造協同組合,

<sup>3)</sup> 福岡女子短期大学

## 【要 旨】

大分県酒造組合加盟酒造会社の酒粕から分離した *S. cerevisiae* 菌株 (16 菌株) の中から, DC 非染色性 KET002, DC 染色性ハ-4 を大分酵母として選抜した<sup>1)</sup>。本研究では 2 種酵母ときょうかい酵母 (清酒用) 9 号 (以後協会 9 号と表記) を用いて試醸 ((株) 小松酒造場) した各清酒の成分測定より, 協会 9 号との特性を比較した。その結果ハ-4 は旨味, 甘味は僅かに低く, 酸味が僅かに高く, KET002 は酸味が強く, 旨味は少なく, 甘味は更に少ないことが判明した。

## 【キーワード】

*S. cerevisiae*, 大分酵母, 清酒酵母, 新規酵母, 協会 9 号

## 1. 緒言

現在九州管内で大分県を除く全ての県は独自の酵母を保有している。しかし (公社) 日本生物工学会で「発酵王国」と称される大分県の全清酒蔵元を抱える大分県酒造組合では独自の酵母を持たないのが現状であった。そこで平成 24 年に別府大学食物栄養科学部発酵食品学科が共同研究を組み, 大分県酒造組合と共同で清酒酵母開発委員会が設立され, 大分県名産のかほすや清酒蔵元酒粕<sup>2)</sup> から新規酵母の獲得が目指された。この取組の前 (平成 23 年度) に大分県名産である豊後梅より *S. cerevisiae* を簡易に選抜出来る方法論<sup>3)</sup> が確立され, この方法により, 平成 25 年に大分県名産のかほすから *S. cerevisiae* の純粋分離がなされたが, 全て *Candida oleophila* strain TJY 25-1<sup>4)</sup> であった。このことから自然界からの *S. cerevisiae* の純粋分離を諦め, 清酒蔵元酒粕からの *S. cerevisiae* 獲得が本格的に開始された。

平成 24 年に 4 酒類の酒粕 (酒粕 C, D, E, G) から 70 菌株が獲得され<sup>5)</sup>, これらはマルチプレックス PCR を用いた *S. cerevisiae* 株の簡易同定法 (SSU1, AWA1, BIO6, FLO1 遺伝子の存在確認) により *S. cerevisiae* と同定された<sup>6)</sup>。この 70 菌株を一段小仕込み醪モデル試験に供し, 清酒大分酵母開発委員会がこれら香りを基準にして 6 菌株 (KCT002, KDT043, KET001, KET002, KET011, KGT006) を選抜した (選抜された 6 菌株は 26S rDNA 遺伝子同定により

全て *S. cerevisiae* と 99% の相同性が得られている)。しかしこれら 6 菌株は全て DC 非染色性菌株のため、協会 7, 9 号の可能性も高いことから、再度平成 25 年に生醗系酒粕より DC 染色性 10 菌株 (ロ - 1, ハ - 1 ~ 4, チ - 2 ~ 6) が純粋分離され<sup>2)</sup>、簡易同定法により *S. cerevisiae* と同定、更に 26S rDNA 遺伝子同定によりハ - 1, チ - 6 を除く全ての菌株が *S. cerevisiae* と 89~98% の相同性が得られた<sup>6)</sup>。この結果を受け、平成 26 年に DC 非染色性 6 菌株及び DC 染色性 10 菌株を 10°C<sup>7,8)</sup> 及び 15°C<sup>9,10)</sup> での (独) 酒類製造総合研究所方法に基づいた乾燥麹及び  $\alpha$  米を用いた一段仕込み製造に供された。得られた試醸清酒の各成分分析結果の総点が協会 7, 9 号に最近似の菌株、即ち DC 染色分離菌株としてチ - 5 (10°C), ロ - 1 (15°C), チ - 2, ハ - 2 を、DC 非染色分離菌株として KET002, KDT043, KGT006 を大分県酵母として推奨された。これらの結果は清酒大分酵母開発委員会で再審議され、商品化に向けての試醸清酒に用いる菌株は DC 染色性株の KET002, 10°C でのアルコール発酵が高いハ - 4, 酸度が高いチ - 2 が決定された<sup>1)</sup>。

平成 27 年度に 70% 精米五百万石 (第 1 回), 70% 精米ひのひかり (第 2 回) を原料とし、共に三段仕込み法を用いた藤原酒造(株)による各酵母菌の試醸清酒の酸度・アミノ酸度及び pH 測定, グルコース定量, 有機酸組成解析, アミノ酸組成解析, 香気成分解析が行なわれた。第 1 回試醸清酒の全 24 項目の分析結果に於ける協会 9 号との相違性が最も高い菌株は総合点数 52 点の KET002, 第 2 位が 49 点のハ - 4, 第 3 位が 42 点のチ - 2 となった。第 2 回試醸清酒の全 24 項目の分析結果に於ける協会 9 号との相違性が最も高い菌株は 1 位が総合点数 57 点で KET002, 第 2 位が 48 点のハ - 4, 第 3 位が 37 点のチ - 2 となった<sup>11)</sup>。上記の結果から、清酒酵母開発委員会により 2 種、即ち DC 非染色性の KET002, DC 染色性のハ - 4 が大分県酵母として選ばれた。

そこで本研究では上記 2 種酵母 (KET002, ハ - 4) 及び醸造協会 9 号を用いて、試醸 (株) 小松酒造場) した各清酒の成分測定結果より、協会 9 号との相違性における特性について検討した。

## 2. 実験方法

### 2-1 清酒小仕込み試験 (株) 小松酒造場：発酵温度 15°C)

表 - 1 に示す条件により選抜酵母を用いて (株) 小松酒造場にて清酒小仕込み試験により試醸した。なお、米はひのひかりを用い、発酵温度は 15°C とした。

表 - 1 選抜酵母による小仕込純米酒の原料

種類	精米率 (%)	原料	酒母	初添	仲添	留添	水四段	計
		総米 (kg)	4.6	45.0	30.4	50.0	0.0	100.0
掛米	70	蒸米 (kg)	3.0	11.4	24.0	40.0	0.0	78.4
麹米	70	麹米 (kg)	1.6	3.6	6.4	10.0	0.0	21.6
		水 (L)	4.4	14.6	38.2	82.6	10.0	149.8

### 2-2 試醸清酒分析実験方法

#### 2-2-1 グルコース濃度測定

グルコース CII・テストワコー (和光純薬工業株式会社) により製造者の推奨する方法により測定した。

### 2-2-2 酸度, アミノ酸度測定

国税庁所定分析法に基づき測定した<sup>12)</sup>。

### 2-2-3 有機酸成分及び濃度測定

HPLC システム (SHIMADZU) により, カラム (ROA-OrganicAcidH<sup>+</sup>), 検出機 (SPD-20A), 移動相 (0.005N 硫酸) を用い分析した。分析条件はカラム温度: 40°C, 検出波長: 210nm, 流速: 0.45ml/min., 試料添加量: 20 $\mu$ L とした。

### 2-2-4 香気成分及び濃度測定

ヘッドスペースガスクロ法による清酒成分分析方法 (酒類総合研究所報告第 183 号 1-15 変法)<sup>13)</sup> により測定した。なお, 装置及び分析条件, 試料調製法は以下に示す。

#### A. ガスクロマトグラフ装置及び分析条件

ガスクロマトグラフ装置 (CTC-2014 (SHIMADZU)) により, カラム (DB-WAX  $\Phi$  0.2mmx30m, 0.25 $\mu$ m), 検出器 (FID), 移動相 (窒素) を用い分析した。分析条件はカラム温度: 75°C, 注入口温度: 200°C, FID 温度: 250°C, 流速: 1.0ml/min. (分析時間 10 分), スプリット比: 10: 1, ヘッドスペースガス量: 2 mL, 信号アッテネーション: x 1 とした。

#### B. 試料の調製法

冷凍した新鮮な標準液及び新鮮な内部標準は水中で解凍し, 氷冷したオートサンプラー用バイアル瓶に氷冷した標準液及び試料を各々 0.9mL 量り取り, 更に氷冷した内部標準 0.1mL を添加し, オートサンプラーに設置した。アルコール類は n- イソアミルアルコールを内部標準とし, エステル類はカプロン酸メチルを内部標準として各々測定した。

### 2-2-5 選抜酵母による試醸清酒の試飲会による官能検査

パネリスト 34 名 (女性 19 名, 男性 15 名) より外見, 香り, 味, 商品化の可能性, 総合評価による得点を評価対象とした。5 点満点評価法 (5 点: 大変よい 4 点: 良い 3 点: 普通 2 点: 悪い 1 点: 大変悪い) により評価し, 評価に人数を乗じたものを小計とし, 各項目の合計を合計点として評価した。なお, 「商品化の可能性」の項目のみパネリストは 29 名である。

## 3. 結果及び考察

### 3-1 試醸清酒のグルコース濃度, 酸度, アミノ酸度

試醸清酒のグルコース, 酸度, アミノ酸度を測定した結果を表 2 に示す。また協会 9 号を用いた試醸清酒の結果を 1 としたときの相対値を図 1 に示す。ハ-4, KET002 を用いた試醸清酒と協会 9 号のものを相対的に比較した結果, グルコース濃度はそれぞれ, 0.92, 0.89, 酸度はそれぞれ 1.03, 1.34, アミノ酸度はそれぞれ 0.93, 0.96 であった。グルコースは甘み, 酸度は味の濃さ<sup>14)</sup>, アミノ酸度はコクや旨味<sup>15)</sup> を清酒に与える。これらの結果から, ハ-4 や KET002 を用いた試醸清酒は協会 9 号のものと比較して, 味に差があることが期待される。

### 3-2 有機酸成分及び濃度比較

試醸清酒の有機酸濃度を測定した結果を表 3 に示す。今回  $\gamma$ -アミノ-n-酪酸 (GABA, 以後アミノ酪酸), クエン酸, 酒石酸, リンゴ酸, マロン酸, コハク酸, 乳酸, 酢酸, ピログルタミン酸を測定した。すべての試醸清酒においてアミノ酪酸, コハク酸, マロン酸, リンゴ酸, クエン酸, 酢酸・酒石酸の順に有機酸量が多く, ここでは特に濃度が高いアミノ酪酸とコハク酸のみで比較した。協会 9 号を用いた試醸清酒の結果を 1 としたときの相対値を図 1 に示す。ハ-4, KET002 を用いた試醸清酒と協会 9 号のものを相対的に比較した結果, アミノ酪酸濃度はそれぞれ, 0.92, 1.10, コハク酸濃度はそれぞれ 1.10, 1.60 であり, アミノ酪酸濃度は試醸清酒間で

あまり差異は認められなかったが、コハク酸はKET002を用いた試醸清酒が高い結果であった。

アミノ酪酸、コハク酸の一般的な特徴は以下の通りである。γ-アミノ酪酸は頭文字をとった略称GABAとして知られ、脳に存在する抑制系の神経伝達物質として、ストレスを和らげ、興奮した神経を落ち着かせる働きをしている。ドーパミンなど興奮系の神経伝達物質の過剰分泌を抑えて、リラックス状態をもたらすと言われている<sup>15)</sup>。一方、コハク酸は、貝類のうま味成分の酸としてよく知られている有機酸で、独特な酸味とうま味があり、清酒や合成酒、味噌・醤油などの味(酸味・うま味)の調整に使われている<sup>16)</sup>。

本研究ではグルコース濃度、酸度、アミノ酸度、各有機酸濃度と酒質に関する詳細な解析は行っていないため不明であるが、後述する官能評価による味の評価の違いは、これらに起因することが強く示唆された。

### 3-3 試醸清酒の香り成分及び濃度比較

選抜酵母による試醸清酒の香り成分分析を行った結果を表4に示す。全試醸清酒で最も高濃度であった香り成分は酢酸エチルで、次にイソアミルアルコール(強烈で特有な燃料臭(フーゼル油臭)<sup>18)</sup>、イソブチルアルコール、n-プロパノールと続いた。さらに、協会9号、ハ-4を用いた試醸清酒では酢酸イソアミル、カプロン酸エチルと続いた。一方、KET002を用いた試醸清酒ではカプロン酸エチル、酢酸イソアミルと続いた。

また協会9号を用いた試醸清酒の結果を1としたときの酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの相対値を図2に示す。その結果、ハ-4、KET002を用いた試醸清酒と協会9号のものを相対的に比較した結果、酢酸

表2 試醸清酒のグルコース濃度、酸度、アミノ酸度

測定項目	試醸に用いた酵母		
	協会9号	ハ-4	KET002
グルコース濃度 (%)	2.42 ± 0.02	2.22 ± 0.02	2.17 ± 0.04
酸度	2.76 ± 0.11	2.86 ± 0.06	3.72 ± 0.02
アミノ酸度	2.38 ± 0.04	2.22 ± 0.03	2.29 ± 0.08

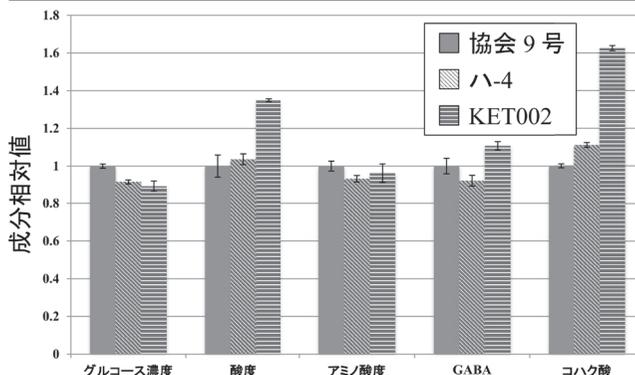


図1 選抜酵母と協会9号による試醸清酒の成分比較

表3 試醸清酒の有機酸濃度

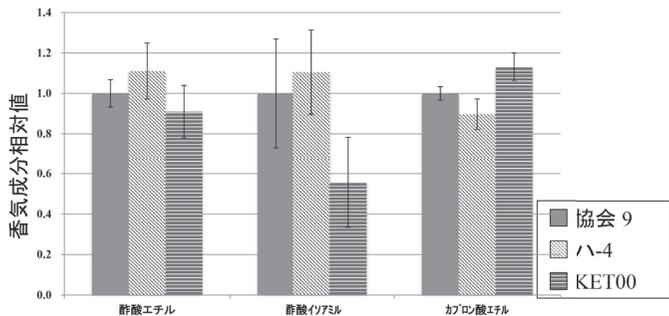
有機酸濃度 (%)	試醸に用いた酵母		
	協会9号	ハ-4	KET002
GABA	2.710 ± 0.078	2.498 ± 0.050	3.001 ± 0.047
コハク酸	0.295 ± 0.002	0.328 ± 0.003	0.479 ± 0.004

表4 試醸清酒の香り成分濃度

香り成分濃度 (ppm)	試醸に用いた酵母		
	協会9号	ハ-4	KET002
酢酸エチル	302.5 ± 14.5	336.0 ± 32.8	275.2 ± 25.2
n-プロパノール	42.8 ± 2.0	43.1 ± 3.3	46.6 ± 3.0
イソブチルアルコール	101.3 ± 8.3	77.2 ± 7.7	48.2 ± 3.9
イソアミルアルコール	189.7 ± 2.5	177.4 ± 6.0	166.1 ± 10.3
酢酸イソアミル	6.4 ± 1.2	7.0 ± 1.0	3.6 ± 0.6
カプロン酸エチル	3.5 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.9 ± 0.2

エチル濃度はそれぞれ 1.1, 0.9, 酢酸イソアミル濃度はそれぞれ 1.1, 0.6, カブロン酸エチル濃度はそれぞれ 0.9, 1.1 であった。酢酸エチルは洋梨を含むフルーティーな果実臭を<sup>17)</sup>, 酢酸イソアミルはバナナ様の香りを<sup>18)</sup>, カブロン酸エチルはパイナップルやりんご様の香り<sup>19)</sup>を清酒に与えることが知られているため、ハ-4を用いた試醸清酒は協会9号を用いたものよりフルーティーで、パイナップルやりんご様の香りが低いことが示唆され、一方KET002を用いた試醸清酒は協会9号を用いたものよりフルーティーさ、バナナ様の香りが低いものの、パイナップルやりんご様の香りが高いことが示唆された。

図2 選抜酵母と協会9号による試醸清酒の香気成分比較



### 3-4 試飲会による官能検査

試醸清酒の官能検査結果を表5に示した。各合計点数が協会9号は606点、ハ-4は575点、KET002は573点となった。これらの結果から協会9号と同様に市場に受け入れられる清酒製造に適した選抜酵母はハ-4であることが明らかとなった。

表5 各菌株による試醸清酒に対する官能検査結果

酵母	点数	外見		香り		味		商品化の可能性		総合評価		合計点
		人数	小計	人数	小計	人数	小計	人数	小計	人数	小計	
協会9号	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	606
	2	5	10	0	0	3	6	2	4	1	2	
	3	16	48	11	33	12	36	10	30	11	33	
	4	8	32	17	68	13	52	11	44	17	68	
	5	5	25	6	30	6	30	6	30	5	25	
ハ-4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	575
	2	4	8	2	4	4	8	2	4	2	4	
	3	17	51	21	63	13	39	13	39	14	42	
	4	9	36	7	28	11	44	10	40	15	60	
	5	4	20	4	20	6	30	4	20	3	15	
KET002	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	573
	2	4	8	3	6	5	10	3	6	3	6	
	3	17	51	17	51	11	33	10	30	13	39	
	4	9	36	11	44	13	52	13	52	16	64	
	5	4	20	3	15	5	25	3	15	2	10	

## 4. まとめ

大分県酒造組合との共同研究より、大分県酒造組合加盟酒造会社の酒粕から分離された *S. cerevisiae* 菌株 (16 菌株) の中から、清酒酵母開発委員会により2種、即ち DC 非染色性の KET002, DC 染色性のハ-4 が選抜された<sup>1)</sup>。本研究では、上記2種酵母菌株及び日本醸造協会頒布、協会9号を用いて、(株)小松酒造場により試醸した各清酒の成分測定より、協会9号との相違性について検討した。(株)小松酒造場による各酵母菌株を用いた試醸清酒の製造では70% 精米ひのひかりを原料とし、総米100kgの三段仕込み法を用いた。各試醸清酒の分析には、グルコー

ス、酸度、アミノ酸定量及び有機酸組成解析、香気成分解析を行った。また市販化のために官能検査をおこなった。まず、選抜酵母試醸清酒のグルコース濃度、酸度、アミノ酸度、グルコース濃度を測定し(表2)、協会9号と比較した(図1)。その結果、ハ-4は協会9号系の酵母であり、KET002は大きく相違する酵母であることが示唆された。

次に選抜酵母試醸清酒の有機酸濃度を測定し(表3)、協会9号と比較した(図1)。その結果、ハ-4を用いた試醸清酒は、アミノ酪酸は協会9号を下回るが、コハク酸は1.1倍と高い濃度を示した。一方、KET002を用いた試醸清酒はアミノ酪酸及びコハク酸濃度が協会9号より高い濃度を示した。

更に選抜酵母試醸清酒の香気成分濃度を分析し(表4)、協会9号と比較した(図2)。その結果、協会9号と比較すると、ハ-4はイソアミルアルコール(燃料臭20)が少なく、洋梨を含むフルーティーな香り(酢酸エチル)が高く、KET002はイソアミルアルコールが更に少なく、パイナップル様(カブロン酸エチル)の香りが高いことが明らかとなった。

上記特性を有する試醸清酒に対して20-22歳の男女34名をパネリストとした官能検査を行った(表5)。その結果、最大評価を得たのは協会9号(606点)、次いでハ-4(575点)、KET002(573点)となった。

以上の結果から、ハ-4が大分酵母第1号、KET002が大分酵母第2号と認定された。

## 5. 謝辞

本研究を遂行してくれた発酵食品学科発酵食品製造学研究室の卒業生諸氏に深甚たる謝意を表します。

## 6. 参考文献

- 1) 岡本啓湖, 掛橋凌, 木村奨, 張恩皓, 仁平拓哉, 常富愛香里, 藤原秀彦, 麻生益直, 「酒粕由来 *Saccharomyces cerevisiae* の特性に基づく新規清酒用酵母の開発」, 福岡女子大学紀要, 第85, 59-77 (2019)
- 2) 永松一馬著 2013年度 別府大学 卒業論文「酒粕からのDC染色性酒造用酵母の分離に関する研究」2013年1月
- 3) 平井龍一著 2012年度 別府大学 卒業論文「大分県産カボス」からの酵母分離法の確立」2011年1月
- 4) 永松一馬著 2013年度 別府大学 卒業論文「大分県産“豊後梅”からの酵母 (*S. cerevisiae*) 分離」2013年1月
- 5) 中村俊雅著 2012年度 別府大学 卒業論文「酒粕からの酒造用酵母の分離に関する研究」2012年1月
- 6) Hidehiko Fujihara, Mika Hino Kimiko Asada Hideharu Takashita Yasuhiro Kajiwara, Toshimasa Nakamura, Keiko Okamoto 1 and Kensuke Furukawa  
“Efficient Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains from Environmental Isolates that are suitable for brewing” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78 1086-1089 (2014)
- 7) 掛橋凌著 2014年度 別府大学 卒業論文「酒粕由来 DC 染色性分離菌株を用いた 10℃での清酒醸造に関する研究」2014年1月
- 8) 仁平拓哉著 2014年度 別府大学 卒業論文「酒粕由来 DC 非染色性分離菌株を用いた 10℃での清酒醸造に関する研究」2014年1月
- 9) 木村奨著 2014年度 別府大学 卒業論文 「酒粕由来 DC 染色性分離菌株を用いた 15℃での清酒醸造に関する研究」2014年1月

- 10) 張思皓著 2014 年度 別府大学 卒業論文 「酒粕由来 DC 非染色性分離菌株を用いた 16℃での清酒醸造に関する研究」2014 年 1 月
- 11) 池見 俊亮 別府大学 卒業論文「大分酒造組合選抜酵母による小仕込み試醸清酒の品質及び酵母菌の特性比較」2015 年度
- 12) 国税庁 平 19 国税庁訓令第 6 号 国税庁所定分析法 8-9
- 13) 須藤茂俊、磯谷敦子、藤田晃子、平松順一, 平成 21 酒造年度全国新酒鑑評会出品酒の分析について, 酒類総合研究所報告, 183 号, 1, (2011)
- 14) “「日本酒度」「酸度」「アミノ酸度」とは何を表す数値ですか?”, 月桂冠,  
<https://www.gekkeikan.co.jp/enjoy/qa/sake/sake05.html> (参照 2019-11-11)
- 15) GABA の効果, ギャバ・ストレス研究センター,  
<http://www.gabastress.jp/effect/index.htm> (参照 2021- 1-12)
- 16) 日本酒の「旨味」とは?【専門用語を知って、日本酒をもっと楽しく!】, SAKETIMES,  
[https://jp.sake-times.com/knowledge/word/sake\\_g\\_word\\_umami](https://jp.sake-times.com/knowledge/word/sake_g_word_umami) (参照 2021- 1-12)
- 17) “香料の化学”, 日本香料工業会, <http://www.jffma-jp.org/about/science.html> (参照 2019-11-11)
- 18) “清酒のにおいとその由来について”, 独立行政法人酒類総合研究所,  
<https://www.nrib.go.jp/data/pdf/seikoumisan.pdf> (参照 2019-11-11)
- 19) 注解編集委員会編 第四回改正国税庁所定分析法注解 16-17 (2000)
- 20) “清酒の香味に関する品質評価用語及び標準見本”, 独立行政法人酒類総合研究所,  
<https://www.nrib.go.jp/data/pdf/seiyoutai01.pdf> (参照 2019-11-11)