

静岡県オリジナル清酒用麹の開発

バイオ科	鈴木雅博	袴田雅俊	飯塚千佳世	横澤 賢*
	高木啓詞**	勝山 聡***	岩原健二**	杉本芳邦
独立行政法人酒類総合研究所	岩下和裕			
株式会社ビオック	白石洋平	和久 豊**		
静岡県酒造組合	望月正隆	戸塚堅二郎		

Development of Shizuoka Prefecture's original sake seed koji

SUZUKI Masahiro, HAKAMATA Masatoshi, IIZUKA Chikayo, YOKOZAWA Ken, TAKAGI Hiroshi,
KATSUYAMA Satoshi, IWAHARA Kenji, SUGIMOTO Yoshikuni, IWASHITA Kazuhiro,
SHIRAIISHI Youhei, WAGU Yutaka, MOCHIZUKI Masataka and TOTSUKA Kenjiro

Until now, the main role of *Aspergillus oryzae* in sake brewing was thought to be the saccharification of raw rice. However, in recent years, it has been reported that it also has a significant effect on flavor components other than sugars contained in sake. In modern sake brewing, it is common to make koji(molt) using commercially available seed koji. However, the sake brewing industry in Japan's Shizuoka Prefecture has been calling for seed koji to be developed that is suitable for sake brewing in the prefecture using Shizuoka yeast. In this study, we will report on the development of Shizuoka's original sake seed koji, the first of its kind in Shizuoka.

Keywords:sake, *Aspergillus oryzae*, seed malt

これまで、清酒醸造における麹菌の主な役割は、原料米の糖化であると考えられてきたが、近年、清酒中の糖以外の香味成分にも大きな影響を与えていることが報告されている。現在の清酒醸造においては、市販の種麹を用いて製麹するのが一般的であるが、県内酒造業界からは、静岡酵母を用いる本県の酒造りに適した種麹の開発が求められていた。そこで本研究では、本県初となる静岡オリジナル清酒用種麹の開発を行ったので報告する。

キーワード：清酒、アスペルギルス オリゼー、種麹

1 はじめに

麹菌は産業におけるその重要性から、2006年に日本醸造学会によって「日本の国菌」に認定されている。古くから、清酒醸造における麹の重要性は認知されてきたが、これまでは、清酒醸造における麹菌の主な役割である、原料米の糖化に関する研究が多くなされてきた。

近年の研究では、麹菌が様々な二次代謝産物を生産していることが明らかになり、清酒中の糖以外の香味成分にも大きな影響を与えていることが報告されている¹⁾。しかし、現在の清酒醸造においては、市販の種麹（麹菌の種菌）を用いて米麹を製造するのが一般的であり、麹菌を用いて多様な酒質を創出

するという研究はほとんど報告されていない。一方、県内の清酒業界からは、より香味の優れた商品、または話題性や魅力のある商品の開発に向けて、酵母や米だけでなく、麹菌においてもオリジナルのものをを使って清酒を醸造したいという要望が強く寄せられていた。

そこで本研究では、静岡酵母を使って醸す、本県の清酒造りに適した独自の麹菌選抜基準を設定し、麹菌株の選抜を行った。また、選抜した麹菌株を使って静岡オリジナル清酒用種麹を試作し、試作した種麹を使った試験醸造を通してその有用性を評価した。

* 現 環境衛生科学研究所 大気水質部、** 退職、*** 現 商工業局 商工振興課

2 方法

選抜には、共同研究機関である㈱ビオックが保有する麹菌 51 株を用いた。また、試験醸造については、選抜した麹菌にて試作した種麹と静岡酵母 HD-1 を用いて行い、対照には、市販の清酒用種麹である「黒判 大吟醸用」（㈱ビオック製）を用いた。

2.1 最適麹菌株の選抜

最適麹菌株を下記の（1）、（2）及び（3）により選抜、評価した。

（1）PCR を用いた麹菌株の系統判定法による選抜

共同研究機関である（独）酒類総合研究所が保持している特許技術「麹菌株の系統判定法及び醸造特性予測法」（特開 2014-197989）²⁾を用いて、麹菌株の系統を判定した。また、製成酒中の酢酸イソアミルの多寡や酸の低生産性を指標に、事前検討にて、静岡酵母を使って醸す本県産清酒の特徴、すなわち酢酸イソアミルを主体とした品の良い香りで、口当たりが良く、すっきりと飲みやすい酒質となる系統の麹菌株を選抜した。更に、孢子形成能や褐変性を指標に選抜を行い、（2）にて貯蔵劣化臭の生成に関する酵素の活性評価に供する株とした。

（2）麹菌が有する清酒の貯蔵劣化臭（イソバレルアルデヒド）の生成に関する酵素の活性評価

吸水歩合が 130%、孢子接種量が 1.0×10^5 spores/ α 化米・g）となるように、各麹菌株の孢子懸濁液を α 化米（精米歩合 60%、徳島製麹㈱製）に添加し、シャーレ上にて、30℃で 48 時間培養して小規模の製麹試験を行った。次に、得られた米麹 2 g、0.2 M 酢酸緩衝液（pH5.0）7 mL 及びイソアミルアルコール 10 μ L をバイアルに入れ、30℃で 7 日間インキュベートした。その後、バイアルを 100℃で 2 分間湯煎して酵素を失活させた後、三井らの手法³⁾に従って、発生したイソバレルアルデヒドの定量を行った。このイソバレルアルデヒド生産量を各麹菌株の貯蔵劣化臭生成酵素の活性とし選抜を行った。

（3）総米 200 g 規模の清酒小仕込み試験

小仕込み試験は、総米 200 g の三段仕込み（初添：12℃、仲添：8℃、留添：6℃）にて行った。仕込み配合を表 1 に示す。最高品温は 11℃とした。麹には 2.1（2）の製麹試験により得られた米麹を用い、掛米には α 化米（精米歩合 60%、徳島製麹㈱製）を用いた。得られた製成酒については、既報⁴⁾に従い、一般成分、有機酸組成、グルコース濃度及び香気成

分組成の分析を行った。

表 1 総米 200 g 規模での清酒小仕込み試験における仕込み配合

	初添	仲添	留添	計
総米(g)	35	70	90	200
麹米(g)	10	14	16	40
掛米(g)	25	56	79	160
汲水(mL)	50	80	150	280
乳酸(mL)	0.2			0.2
エタノール(mL)	4			4
酵母*(mL)	35			35

*) YPD 液体培地 35 mL にて 30℃、2 日間培養したものを集菌後、汲水に懸濁して添加。推定生菌数 = 7×10^9 cells。

2.2 試作種麹を製造するためのブレンド比の検討

2.1 にて選抜した麹菌株を特定の割合でブレンドして、2.1（2）の方法と同様に小規模の製麹試験を行い、イソバレルアルデヒドの生成に関する酵素の活性評価を行った。また、これにより得られた米麹と静岡酵母 HD-1 を用いて、2.1（3）の方法と同様の仕込み配合にて、総米 200 g の清酒小仕込み試験を行った。得られた製成酒については、2.1（3）と同様に分析を行い、試作種麹を製造する際の各麹菌株のブレンド比を決定した。

2.3 総米 6 kg のプラント規模での試作種麹を用いた製麹試験及び清酒小仕込み試験

総米 6 kg のプラント規模での製麹試験及び清酒小仕込み試験は、精米歩合 40% の兵庫県産山田錦を用いた。試作種麹及び市販種麹を 100 kg 白米当り 10 g 散布し、製麹を行った。仕込み試験については、酒母省略の 3 段仕込み（初添：12℃、仲添：8℃、留添：6℃）とし、静岡酵母 HD-1 を用いて、表 2 の仕込み配合にて行った。最高品温は 11℃とした。

表 2 総米 6 kg 規模での清酒小仕込み試験における仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米(kg)	0.12	0.96	1.92	3.00	6.00
麹米(kg)	0.12	0.18	0.36	0.54	1.20
掛米(kg)	—	0.78	1.56	2.46	4.80
汲水(L)	0.48	0.90	2.28	4.44	8.06
乳酸(mL)	1.44	0.90			2.34
酵母*(mL)	24.0	—	—	—	24.0

*) YPD 液体培地 24 mL にて 30℃、2 日間培養したものを集菌後、汲水に懸濁して添加。推定生菌数 = 7×10^9 cells。

製麹した米麹の酵素力価（ α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ及び酸性カルボキシペプチダーゼ）については、キッコーマン(株)製の測定キットを用いた。酸性プロテアーゼについては、ペプチド研究所社製の測定キットを用いた。また、製成酒の一般成分、有機酸組成、グルコース濃度及び香気成分組成については、2.2と同様の方法にて分析を行った。

2.4 清酒製造実証試験

実証試験は静岡平喜酒造(株)にて実施した。仕込み配合を表3に示す。仕込み品温は、初添11.8℃、仲添8℃、留添6℃とし、最高品温は10.6℃とした。米は、麹米及び掛米ともに兵庫県産酒造好適米の山田錦（精米歩合40%）を使用した。

製成酒の一般成分、グルコース濃度及び香気成分組成について、2.2と同様の方法にて分析を行った。

表3 清酒製造実証試験における仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米(kg)	14	34	60	92	200
麹米(kg)	4.6	8.3	12	17.1	42
掛米(kg)	9.4	25.7	48	74.9	158
汲水(L)	16.6	40	83	142.4	282
乳酸(kg)	0.145				

3 結果及び考察

3.1 最適麹菌株の選抜

岩下らは、麹菌は醸造適性にて13系統に分類可能なことことを報告している²⁾。供試麹菌株についてPCRによる系統判定試験を行ったところ、A系統が1株、B系統が2株、C系統が1株、Sake・Miso系統が6株、S01系統が4株、S02系統が1株、RIB40-1系統が18株、RIB40-2系統が2株、NS2系統が15株、NS3系統が1株の計10系統が得られた。このうち、製成酒中の酢酸イソアミルの多寡や酸の低生産性を指標に、事前検討にて、静岡酵母を使って醸す、本県の酒造りに適していると判断した、B系統、C系統及びNS2系統の計18株を選抜した。

また、この18株の中から孢子形成能や褐変性を指標に、更に8株を選抜し、イソバレルアルデヒドの生産性に関する酵素の評価を行った。

イソバレルアルデヒドは、生老香の主要成分とされており、生酒の貯蔵や流通過程で生じるオフフレーバーとされている。イソアミルアルコールを出

発物質としており、酢酸イソアミル主体の吟醸香を生成する静岡酵母を使う本県産の清酒は、イソアミルアルコールを多く含んでおり、高品質な製成酒を市場に届ける上でイソバレルアルデヒドの低減が強く求められている。

各麹菌株及び対照の市販種麹のイソバレルアルデヒド生産量を図1に示す。

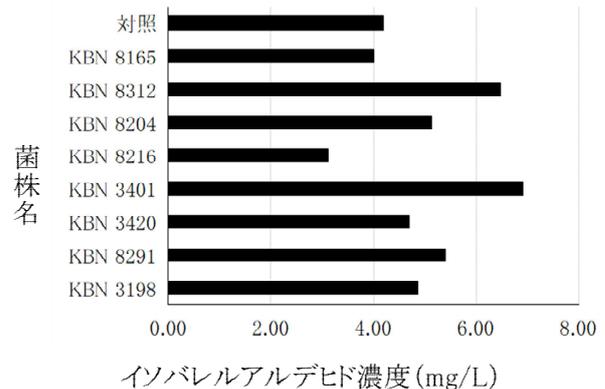


図1 各麹菌株のイソバレルアルデヒド生産量

イソバレルアルデヒドの生産量に生成に関与する酵素活性として評価した。

対照株と比較して、イソバレルアルデヒドの生産量が少ない菌株が2株得られた。特に、イソバレルアルデヒドの生産量が低かったKBN 8216株を2.2の試験の供試菌株として選抜した。

次に、イソバレルアルデヒドの生成に関する酵素の評価試験に供した8株と対照の市販種麹を用いて行った総米200g規模の清酒小仕込み試験による製成酒の成分分析結果（一部抜粋）を表4及び表5に示す。

表4 総米200g規模の清酒小仕込み試験における製成酒の一般成分

菌株名	一般成分			
	アルコール度数(%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度
対照	16.6	-1	2.0	1.5
KBN 8165	16.9	-1	2.1	1.6
KBN 8312	16.0	-14	2.1	1.9
KBN 8204	16.2	-1	2.2	1.6
KBN 8216	16.7	+1	2.4	2.0
KBN 3401	16.8	-10	2.4	2.3
KBN 3420	15.2	-7	2.4	1.9
KBN 8291	15.4	-11	2.3	1.9
KBN 3198	15.9	-6	2.5	2.3

表5 総米 200 g 規模の清酒小仕込試験における製成酒のグルコース濃度及び香気成分組成

菌株名	グルコース濃度 (%)	香気成分組成 (mg/L)		
		酢酸イソアミル	イソアミルアルコール	カブロン酸エチル
対照	1.76	5.73	160	1.87
KBN 8165	0.76	7.05	185	2.84
KBN 8312	3.50	7.33	171	2.57
KBN 8204	0.73	6.73	192	2.82
KBN 8216	1.42	7.58	185	3.15
KBN 3401	3.45	6.66	176	2.85
KBN 3420	1.28	7.84	205	2.88
KBN 8291	2.63	6.35	175	2.71
KBN 3198	1.65	8.27	191	3.36

いずれの麹菌株も、対照株と同等のアルコール度数を生成するのに必要な糖化力を有していることがわかった。日本酒度、酸度及びアミノ酸度については、株間差が大きかった。今回の選抜株については、対照株より低い酸度の菌株は得られなかったが、対照と同等の酸度である KBN 8165 株を低生酸性株として、2.2 の試験の供試菌株として選抜した。

また、グルコース濃度及び香気成分組成についても、菌株間で大きな差があることがわかった。特に、酢酸イソアミルについては、いずれの菌株も対照株と比較して、含有量が多かった。8 株のうち、最も酢酸イソアミルの含有量が多かった KBN 3198 株及び適度なグルコース濃度を示した KBN 8291 株の 2 株を 2.2 の試験の供試菌株として選抜した。

3.2 試作種麹を製造するためのブレンド比の検討

2.1 により選抜した 4 株を特定の割合でブレンドした、小規模製麹試験及び清酒小仕込み試験にて得られた米麹及び製成酒の成分分析結果（一部抜粋）を表 6 に示す。

表6 選抜株のブレンド割合と米麹及び製成酒の成分分析結果（一部抜粋）

麹菌①	麹菌②	ブレンド比①:②	イソバレルアルデヒド (mg/L)	酸度	グルコース (%)	酢酸イソアミル (mg/L)
KBN 3198	KBN 8216	1:3	2.96	2.6	1.88	4.44
KBN 3198	KBN 8165	1:1	3.07	2.5	1.63	4.50
KBN 8216	KBN 8291	1:2	3.82	2.6	2.02	3.10
KBN 8291	KBN 8165	1:1	2.98	2.5	2.02	4.60

菌株をブレンドすることで、単菌株の仕込み時に比べて、グルコース濃度（上昇）やイソバレルアルデヒド濃度（低下）を目的の酒質に近づけることができた。

しかし、今回の試験では、酸度や酢酸イソアミル濃度については、ブレンドによる改善は確認できなかった。

3.3 総米 6 kg のプラント規模での試作種麹を用いた製麹試験及び清酒小仕込み試験

2.1 及び 2.2 の結果をもとに、(株)バイオックにて表 7 のブレンド比の種麹を試作した。製麹した米麹の酵素力価及び製成酒の成分分析結果（一部抜粋）を表 8 及び表 9 に示す。

総米 6 kg のプラント規模においても、目的とする酒質（低酸度、高吟醸香）が得られており、試作種麹の実用性が確認できた。また、最も酸度が低く、酢酸イソアミル濃度が高かった試作 No. 2 の製造に用いた、KBN 8165 株単独にて製造した試作種麹を 3.4 の試験に供することとした。

表7 試作種麹の製造に用いた麹菌株とブレンド比

試作No.	使用麹菌株 1	使用麹菌株 2	ブレンド比
1	KBN 8165	KBN 8291	1:1
2	KBN 8165		単独
3	KBN 8165	KBN 3198	1:1
4	黒判 大吟醸用		対照

表8 プラント規模での製麹試験により得られた米麹の酵素力価

試作No.	米麹1gあたりの酵素力価 (U/g・麹)			
	α-アミラーゼ	グルコアミラーゼ	酸性カルボキシペプチダーゼ	酸性プロテアーゼ
1	399	152	5,502	2,342
2	320	108	5,676	2,765
3	509	172	6,262	2,927
4	328	110	7,021	2,961

表9 プラント規模での清酒小仕込試験により得られた製成酒の成分分析結果（一部抜粋）

試作No.	一般成分		グルコース濃度		香気成分組成 (mg/L)		
	アルコール度数 (%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度 (%)	酢酸イソアミル	カブロン酸エチル	
1	15.6	+4.5	1.7	1.0	2.12	4.27	1.03
2	16.4	+1.5	1.7	1.0	2.73	5.04	1.05
3	15.0	-2.0	1.8	1.0	3.12	4.34	0.97
4	15.5	+0.5	1.8	1.0	2.64	4.52	0.91

3.4 清酒製造実証試験

試作 No. 2 の種麹は、実際の製造現場における清酒製造に使用可能であると判断できたため、静岡平喜酒造(株)にて総米 200 kg 規模の製造実証試験を行った。製麹により得られた米麹の酵素力価及び製成酒の成分分析結果（一部抜粋）を表 10 及び表 11 に示す。

表 10 実製造規模での製麹試験により得られた米麹の酵素力価

使用種麹	米麹1gあたりの酵素力価(U/g・麹)		
	α -アミラーゼ	グルコアミラーゼ	酸性プロテアーゼ
試作No.2	587	147	978
黒判 大吟醸(対照)	485	213	1,701

表 11 実製造規模での試験醸造により得られた製成酒の成分分析結果(一部抜粋)

使用種麹	一般成分		グルコース濃度		香気成分組成(mg/L)		
	アルコール度数(%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度(%)	酢酸イソアミル	カプロン酸-エチル	
試作No.2	15.9	+1.5	1.2	0.9	0.35	2.62	1.43

実際の製造現場でも清酒製造に使用可能であることがわかったが、総米6kgのプラント規模での試験により得られた製成酒とは、やや異なる成分となった。これは、原料米の性質やその他の仕込み条件等が影響したためであると考えられる。今後は、小仕込み試験時と同等の酒質が得られる、試作種麹の最適な製麹条件や醗経過について検討を進めていく。

4 まとめ

本研究では、本県初となる「静岡県オリジナル清酒用種麹」を開発した。総米6kg規模までの小仕込み試験では、本研究にて開発した種麹を使用することで、静岡酵母を用いる本県産清酒の特徴である、『酢酸イソアミルを主体とする吟醸香が豊かであり、味はきれいで丸く低酸度である酒質』を実現することが出来た。

しかし、実製造規模における試験醸造では、想定していたよりグルコース濃度が低い酒質となっていた。これは、製麹経過や醗経過が小仕込み試験の時と、やや異なっていたことが影響していると考えられる。

今後は、本種麹の最適な製麹条件や仕込み条件を検討することで、実製造規模においても目的とする酒質の実現を目指す。

謝辞

本研究を行うにあたり、実験方法等について、ご指導いただきました東京農業大学応用生物科学部醸造科学科徳岡昌文教授、商業規模試作を行っていたいただいた静岡平喜酒造株式会社様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 山下伸雄 他：清酒麹菌の分子育種に関する研究. 生物工学会誌, 第84巻, 第3号, 89-95 (2006).
- 2) 岩下和裕 他：麹菌株の系統判定法及び醸造特性予測法. 特開 2014-197989 (公開日：平成26年10月23日)
- 3) 三井俊 他：HPLCによる清酒中イソバレルアルデヒドの簡便測定. 日本醸造協会誌, 113巻, 6号, 383-388 (2016).
- 4) 望月玲於 他：様々な酒類醸造用酵母株のビール醸造特性の評価. 静岡県工業技術研究所研究報告, 第13号, 55-57 (2020)