

新たな泡盛用酵母の探索に関する調査

玉村隆子、望月智代、比嘉賢一

泡盛の酒質多様化を目的に、現在主流の泡盛 101 号酵母とは異なる特性を有する、新たな泡盛用酵母の探索を行った。当センターにて、泡盛 101 号酵母普及以前に県内醸造所の泡盛もろみから採取、保存されていた酵母株や環境中から採取された酵母等を用い、101 号酵母とは異なる酒質となる菌株を選抜した。

1 はじめに

泡盛の出荷額は 2004 年度をピークに減少傾向にあり、その対策として、酒質の多様化が求められている。酒質に影響する因子は原料、製造工程および貯蔵と多岐に渡るため、これまで当センターでは原料米の違い¹⁾²⁾や、蒸留工程における酒質制御³⁾⁴⁾、貯蔵の影響⁵⁾などについて研究を行ってきた。

一方、清酒・焼酎では新規酵母の開発・利用による新商品開発が盛んであり、泡盛においても、酵母菌の違いが泡盛の酒質に与える影響について確認されている⁶⁾が、泡盛酵母 101 号が現在の主流であり、使用できる酵母の選択肢が他の酒類に比べて少ない。そこで本調査では、当センター所有の酵母菌株を中心に、新たな泡盛用酵母の実用化に向けた調査を行った。特に、泡盛 101 号酵母とは異なる特徴を有する酵母の探索を行った。

2 実験方法

2-1 供試菌株

2-1-1 沖縄県工業技術センター凍結保存株

1980 年代に県内泡盛醸造所から分離保存されていた 15 株、テキーラもろみから分離された 2 株、サトウキビ切り株から分離された 2 株の計 19 株を用いた。

2-1-2 泡盛発酵もろみからの酵母サンプリング

県内醸造所から、発酵後期のもろみを中心に採取した 10 株を用いた。もろみは適宜希釈し、PDA 寒天培地上に塗布して 30℃で 48hr 培養した。得られたコロニーを YPD 液体培地(酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2%)に取り、30℃で 24hr 培養の後、発酵試験等に供した。PDA 寒天培地上のコロニーに目視で違いが確認された場合は、それぞれ分離した。

2-1-3 醸造環境中からの酵母サンプリング

醸造環境中からのサンプリングは、高峯ら⁷⁾の方法に順じた。すなわち醸造所の壁、麹棚などから綿棒でふき取り、PDA 寒天培地に塗布、2 日間 30℃で培養したのち、寒天培地を切り取ってエタノール 5%、pH3.2 の YPD 液体培地にけん濁し、7 日間室温で静置した。その後培養液を適宜希釈し、PDA 寒天培地にまいて、30℃で 48hr

培養して得られた酵母様コロニーをサンプリング株とした。

2-2 発酵試験

一次スクリーニングでは Brix13、pH5.3 の麹汁培地を使用した。小仕込み試験およびプラント試験には、当センターで製麹した単一ロットの麹を用いた。小仕込み試験は麹仕込み量 120g、汲み水歩合 170%、発酵期間 16 日、発酵温度 25℃で行った。熟成もろみは試留機を用いて蒸留した。蒸留条件は回収蒸留液がアルコール 45%程度となるまで蒸留を行った。

プラント試験は麹 15kg、汲み水歩合 170%とし、麹に対し、2%量の種もろみを作成して酵母を添加した。仕込から 6 日目までは発酵温度 25℃で管理し、その後は室温での管理とし、14 日目で発酵終了とした。蒸留はたて型蒸留機により、初留後約 1 時間かけて行い、後留画分がアルコール度数 10~15%になるまで蒸留を行った。

2-3 成分分析

2-3-1 前処理

もろみは 3000rpm で 20 分間遠心分離後、上澄みを 0.2 μm のメンブレンフィルターでろ過したものを用いた。泡盛は蒸留後アルコール度数が 40%となるよう加水し 0.45 μm のメンブレンフィルターでろ過したものを各分析に用いた。

2-3-2 アルコール度数、pH、酸度および日本酒度

国税庁所定分析法⁸⁾に準じた。

2-3-3 グルコース濃度

グルコーステスト C II Wako (和光純薬)を用いて測定した。

2-3-4 フェノール化合物、香気成分

小関ら⁹⁾の方法を改変して測定し、分離カラムに wako sil II 5C18 (ϕ 4.6 mm×250 mm)を用い、カラム流量 1ml/min で 0.1%リン酸とアセトニトリルによるグラジエント分析を行った。

香気成分分析は既報¹⁾に従い測定した。各サンプルはエタノール濃度 15%に調整したものをを用いた。

2-4 官能評価

当センター職員により、味および香りについて官能評

価を行った。味は、まろやかさ、きれいさ、軽さ、濃淡、甘辛について5段階評価とした。香りは6つのタイプ(豊か、華やか、上品、さわやか、ソフト、乏しい)から選択することとした。総合評価は、1：すばらしい、2：良好、3：無難、4：やや難あり、5：難点の5段階とした。

2-5 選抜株の種の推定

選抜株について、糖類発酵性試験と炭素源資化性試験を行った。糖類発酵性試験および炭素源資化性試験は常法¹⁰⁾に従い行った。糖類および炭素源としてD-glucose、D-galactose、sucrose、maltose、lactose、raffinose、melibiose、 α -methyl-D-glucoside およびD-xyloseを用いた。

また、遺伝子による微生物推定解析用サンプルとしてPDA寒天培地上のコロニーより、微生物推定解析用PCRキット SimplePrep reagent for DNA (タカラバイオ株式会社製)を用いて調製し、rRNA 遺伝子のD1/D2領域の塩基配列とデータベース上の配列との相同性検索により推定した。

3 実験結果および考察

3-1 一次スクリーニング

表1に今回の発酵試験に用いた酵母株と、麹汁培地培養での炭酸ガス減量比、香りの特徴を示した。

泡盛1号酵母の普及以前に収集された、いわゆる家付き酵母のうち、バナナに似た香りである酢酸エチル様の香りを呈した7006株、7009株、7014株、7016株、独特の発酵臭を呈した7024株、リンゴ様香気を呈した7110株を選抜し、小仕込み試験へ用いた。

3-2 二次スクリーニング

表2に小仕込み14日目のもろみエタノール濃度を示した。7110株、7024株の発酵14日目もろみエタノール濃度は101号酵母と同程度かそれ以上であり、炭酸ガス発生量も101号酵母と同様な経過を示したが、7006株、7009株、7014株および7016株は10%以下と低い値を示した。

また、H22-K1株、H22-K2株、H23-K1株およびH23-K7bの発酵14日目もろみエタノール濃度は101号酵母と同程度かそれ以上であり、炭酸ガス発生量も101号酵母と同様な経過を示した。これらは101号酵母と考えられる株であるが、小仕込みもろみでも香りに違いが認められたことから、101号酵母の変異株か、蔵付き酵母の可能性が考えられた。醸造環境由来のH23-dおよびH23-f株、テキーラもろみ由来の7022株と7023株、サトウキビ切り株由来の7031株も十分アルコールを生成した。

表1. 一次スクリーニング結果

菌株番号	由来	炭酸ガス減量比*	香りの特徴
<u>泡盛もろみから採取(1号酵母普及以前)</u>			
7001	泡盛もろみ	0.87	酢酸エチル様
7002	泡盛もろみ	0.91	酢酸エチル様
7006	泡盛もろみ	0.91	酢酸エチル様
7007	泡盛もろみ	0.91	酢酸エチル様(弱い)
7009	泡盛もろみ	0.94	酢酸エチル様、発酵臭
7010	泡盛もろみ	0.48	酢酸エチル様、発酵臭
7011	泡盛もろみ	0.91	酢酸エチル様、発酵臭
7014	泡盛もろみ	1.05	酢酸エチル様(弱い)
7015	泡盛もろみ	0.92	酢酸エチル様(弱い)
7016	泡盛もろみ	0.91	発酵臭
7018	泡盛もろみ	0.85	発酵臭
7021	泡盛もろみ	0.86	発酵臭
7024	泡盛もろみ	1.01	発酵臭
7110	泡盛もろみ	1.02	リンゴ様
7125	泡盛もろみ	1.01	酢エチ臭
<u>泡盛もろみから採取(101号酵母普及以降)</u>			
H22-K1B	泡盛もろみ	1.19	発酵臭、木香、果実様
H22-K2B	泡盛もろみ	1.12	酢酸イソアミル
H23-K1	泡盛もろみ	0.97	やや重い、乳様
H23-K2	泡盛もろみ	0.87	果実様、重い
H23-K3	泡盛もろみ	0.89	果実様
H23-K4	泡盛もろみ	0.87	果実様
H23-K5	泡盛もろみ	0.93	軽い、果実様
H23-K6	泡盛もろみ	0.95	やや弱い
H23-K7b	泡盛もろみ	0.81	甘い
H23-K7w	泡盛もろみ	0.51	やや弱い溶媒臭
<u>その他</u>			
7022	テキーラもろみ	0.94	発酵臭、木香
7023	テキーラもろみ	1.06	酢酸エチル様(弱い)
7027	サトウキビ切り株	0.94	発酵臭
7031	サトウキビ切り株	1.18	発酵臭、甘い
<u>醸造所環境中から採取</u>			
H23-a1	麹棚	0.75	弱い草様
H23-a2	麹棚	0.41	やや甘い
H23-b1	麹棚	0.37	弱い草様、甘い
H23-b2	麹棚	0.53	弱い草様
H23-c	麹棚	0.95	軽い草様
H23-d	貯蔵カメロ付近	1.00	草様、やや甘い
H23-e	貯蔵タンク付近	0.97	溶媒臭
H23-f	醸造室内壁	1.02	溶媒臭

*:101号酵母の炭酸ガス減量に対するそれぞれの炭酸ガス減量比

表2 小仕込み14日目のもろみエタノール濃度

菌株番号	エタノール濃度(%)
7006	9.13
7009	9.08
7014	8.15
7016	6.27
7024	17.39
7110	17.49
H22-K1	17.40
H22-K2	16.70
H23-K1	15.70
H23-K7b	17.59
H23-d	15.04
H23-f	16.28
7022	15.90
7023	16.35
7031	15.99
101	16.67

本調査は101号酵母と異なる新規酵母の探索が目的であることから、101号酵母の可能性が高いH23-K1株およびH23-K7b株を除外し、H23-d株、H23-f株および7031株の3種類の株を用いてプラント試験を行うこととした。

3-3 プラント試験

発酵経過を図1に示した。今回選抜した3つの株は、いずれも101号酵母に比べて発酵立ち上がりが遅いものの、発酵14日目で101号酵母の10日目と同程度のアルコールを生成したことから、酒造用酵母として実用可能な範囲であると考えた。

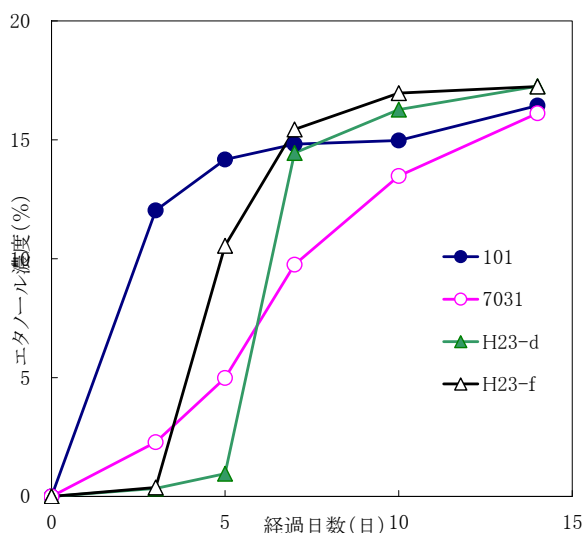


図1 プラント試験泡盛の発酵経過

表3に発酵14日目のもろみ性状を示した。酸度およびpHに大きな差はないが、7031株は他の株よりも日本酒度が低く、またグルコース量が多い結果となった。7031株は発酵中にもろみ上部に灰汁状のものが浮き、攪拌時にタンクや攪拌用具に油状成分の付着が見られた。また、H23-d株およびH23-f株は、発酵初期にもろみ表面に膜

を生成するという特徴があるが、攪拌時にもろみ中に混ぜ込むことで、その後の発酵が活発になった。

表3 プラント試験14日目のもろみの性状

菌株	エタノール濃度(%)	日本酒度	グルコース量(mg/100mL)	酸度	pH
101号	16.4	7.11	32.7	14.9	3.6
7031	16.1	1.5	213.2	14.2	3.7
H23-d	17.3	5.93	36.5	15.7	3.6
H23-f	17.2	5.56	8.1	15.3	3.5

3-4 成分分析

3-4-1 フェノール化合物

表4にもろみおよび試作泡盛のフェノール化合物濃度を示した。泡盛古酒成分の一つとされるバニリンは、4-VGを前駆体とし、その生成経路の一つは蒸留によるフェルラ酸からの変換と考えられている。蒸留工程でフェルラ酸が4-VGに変化し、泡盛中に流出する歩合は、全体の1割程度であるとされる¹¹⁾ことから、もろみ中の4-VG量が高いほど、泡盛への高い4-VG量留出が期待できる。今回の選抜株では7031株もろみの4-VGが101号酵母の約9倍量含まれており、蒸留後も約8倍量含まれることが確認された。

表4 もろみおよび試作泡盛のフェノール化合物濃度

菌株番号	(単位:ppm)			
	F	4-VG	VA	VAA
14日目もろみ				
101	15.94	13.73	3.23	3.4
7031	4.03	120.56	3.27	9.38
H23-d	8.29	trace	2.92	4.28
H23-f	6.75	trace	3.51	5.61
蒸留後				
101	-	16.84	trace	-
7031	-	120.41	0.15	-
H23-d	-	6.54	trace	-
H23-f	-	3.25	-	-
分析下限値	0.1	3	0.1	0.5
F:フェルラ酸、4-VG:4-ビニルグアヤコール VA:バニリン、VAA:バニリン酸 trace:分析下限値以下 - :不検出				

3-4-2 香気成分

試作泡盛の香気成分量を、101号酵母泡盛の場合を1とした時の値として表5に示した。

7031株は2-methyl-1-propanolを初めとするフーゼルアルコール類が101号酵母よりも多く、1-octen-3-olや2-phenylethanolも多く含まれていた。一方、中沸点エステル類の含有量は101号酵母よりも少なく、ethyl myristate、ethyl olerateおよびethyl linorateが多く含まれていた。これら高級脂肪酸エチルエステルは、貯蔵中の

酸化により泡盛の品質劣化に影響するため、現在は冷却過程により過剰な高級脂肪酸エチルエステルの除去が行われ、酒質が向上したとされている。しかしながら、適度な高級脂肪酸エチルエステルは味に丸みを与えているおり、冷却過程技術のない時代の泡盛製造でも高品質な古酒を作り上げている。したがって、4-VG や高級脂肪酸エチルエステルを多く生産する 7031 株は、古酒用に特化した酵母として活用できる可能性が考えられた。

H23-d 株と H23-f 株は同じような傾向で、フーゼルアルコール類は 101 号酵母と同程度含まれており、2-phenylethanol は半分程度であった。中沸点エステル類の含有量は 101 号酵母よりもやや少なく、ethyl myristate および ethyl linorate がやや多く含まれていた。また、H23-d 株では ethyl olerate は痕跡程度であった。

表5 プラント試作泡盛の香気成分比較
(101号酵母使用泡盛を1とした場合)

成分名	7031	H23-d	H23-f
2-methyl-1-propanol	1.26	1.01	0.90
1-butanol	0.35	2.41	2.37
2-methyl-1-butanol	1.40	1.01	1.09
3-methyl-1-butanol	1.31	1.04	1.07
1-octen-3-ol	1.42	1.16	1.36
2-phenylethanol	1.82	0.53	0.52
isoamyl acetate	0.57	0.76	0.35
ethyl caproate	0.20	0.61	0.72
ethyl caprylate	0.26	1.02	0.90
isoamyl caproate	0.18	0.64	0.59
isobutyl caprylate	0.17	0.84	0.94
ethyl caprate	0.47	1.07	1.05
isoamyl caprylate	0.26	0.88	0.96
acetic acid 2-phenylester	1.06	0.20	0.23
ethyl laurate	0.61	1.03	1.25
isoamyl caprate	0.37	0.73	1.08
ethyl myristate	1.44	1.21	1.44
ethyl olerate	6.05	0.00	3.83
ethyl linorate	2.11	1.91	2.29
octanoic acid	0.48	0.89	1.28

3-5 官能評価

試作泡盛の香り特性を表6に、味プロファイルを図2に示した。7031株とH23-f株は101号酵母に比べて濃醇なタイプであり、H23-d株は他の株に比べ甘味に特徴があることが明らかとなった。また、7031株は今回の試作泡盛の中でも最もまろやかと評価された。7031株の香り特性は、上品もしくは乏しいと評価された。香気成分分析結果より、他に比べて中沸点エステル類が少ないために、香り立ちが弱いと感じられ、乏しいという評価となったと考えられたが、表7に示すように総合評価点は2.43と101号酵母よりも良い結果であった。総合評価ではH23-f株が1.57と最も高い評価を得た。

表6 香り特性

	101号	7031	H23-d	H23-f
豊か	1	0	0	0
華やか	1	1	1	0
上品	2	2	2	1
爽やか	0	0	0	2
ソフト	1	1	3	2
乏しい	1	2	0	1

(指摘人数)

表7 総合評価

No.	総合評価点
101	2.70
7031	2.43
H23-d	1.86
H23-f	1.57

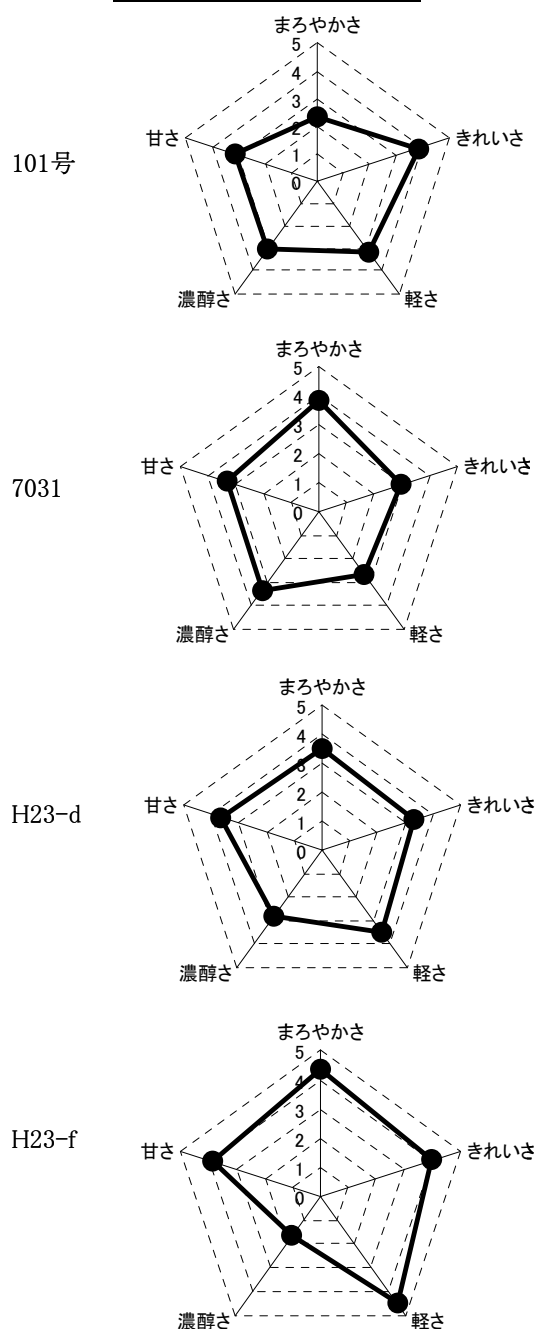


図2 プラント試作泡盛の味プロファイル

3-6 選抜株の種の推定

菌株の生理学的性質を調べるため、糖類発酵性試験を行った。表8にその結果を示した。選抜した3つの株は、いずれも D-glucose、D-galactose、sucrose、maltose および raffinose の発酵性が確認された。

表8 糖類発酵性試験結果

	101	7031	H23-d	H23-f
D-glucose	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+
lactose	-	-	-	-
raffinose	+	+	+	+
melibiose	-	-	-	-
α-methyl-D-glucoside	-	-	-	+
D-xylose	-	-	-	-

7031株では3週間後の結果は101号酵母と同じであるものの、D-galactoseについては101号酵母より一週間の遅れが見られた。H23-d株は、D-galactose、sucrose、raffinoseで遅れが見られたが、101号酵母より二週間遅れで炭酸ガスの発生が認められた。H23-f株では、α-methyl-D-glucosideで炭酸ガスの発生が認められた。

表9に炭素源資化性試験の結果を示した。101号酵母と比較して、7031株、H23-d株およびH23-f株は、melibiose、α-methyl-D-glucoside および D-xylose を炭素源として資化できることが確認できた。選抜株はいずれも D-xylose を資化することが明らかとなったが、7031株の生育はH23-d株およびH23-f株にやや遅れていた。また、ヨード反応は確認されなかった。

表9 炭素源資化性試験

	101	7031	H23-d	H23-f
D-glucose	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+
lactose	+W	+W	+W	+W
raffinose	+	+	+	+
melibiose	-	+W	+	+W
α-methyl-D-glucoside	+W	+	+	+
D-xylose	-	+	+	+

糖資化性試験および炭素源資化性試験より、選抜株が *Saccharomyces* 属とは異なる可能性が考えられた。そこで遺伝子による微生物推定解析を行った結果、7031株、H23-d株およびH23-f株は、いずれも *Pichia* 属であることが推定された。沖縄県内から採取された酵母の中では、アルコール生産性のある株として *Pichia kudriavzevii* が確認されている¹²⁾。また、清酒の多様化の一手法とし

て、栗田ら¹³⁾により、清酒酵母と異種酵母である *Pichia* 属の混合培養により香气成分の増強を図る清酒製造が検討されている。今後は選抜株の実用化を目標に、101号酵母との混合培養や、スケールアップを検討する予定である。

4 まとめ

新たな泡盛用酵母の選抜を目標に、沖縄県工業技術センター凍結保存株や、醸造環境中から採取した酵母等のスクリーニングを行った。その結果、

1)小仕込み試験で選抜した株(サトウキビ由来1種類、環境由来2種類)について麹15kgのプラント試験を行ったところ、サトウキビ由来の株(7031株)は、もろみ中で顕著に4-VGの生産が確認され、蒸留後も101号酵母の約8倍含まれていることが確認できた。

2)選抜した3種類の株で試作した泡盛の官能評価を行ったところ、それぞれ101号酵母よりも甘味のあるものや、濃醇な味わいが感じられるものなど、101号酵母とは異なる風味を持ち、またいずれも101号酵母と同程度、あるいは高い評価を得ることができた。

3)選抜株はいずれも *Pichia* 属と推定された。

本研究は「新たな泡盛酵母の探索に関する研究(2010技001)」の一環として行ったものである。

謝辞

本調査は、日本酒造組合中央会の単式蒸留焼酎に係る研究テーマの一つとして採択いただきました。

参考文献

- 比嘉賢一、玉村隆子、西平守智、照喜名重智、村田亮、池間洋一郎：沖縄県工業技術センター研究報告、第10号、P23-30(2008)
- 比嘉賢一、玉村隆子、西平守智、照喜名重智、村田亮、池間洋一郎：沖縄県工業技術センター研究報告、第10号、P31-41(2008)
- 泉川達哉、金城洋、比嘉賢一、玉村隆子、宮里吉廣、又吉英進：沖縄県工業技術センター研究報告、第11号、P31-36(2009)
- 泉川達哉、金城洋、比嘉賢一、玉村隆子、宮里吉廣、又吉英進：沖縄県工業技術センター研究報告、第11号、P37-41(2009)
- 玉村隆子、比嘉賢一：沖縄県工業技術センター研究報告、第12号、p17-20(2010)
- 照屋比呂子、照喜名重智、田村博三：沖工試業務報告書第15号(1987)

- 7) 高峯和則、大山修一、吉崎由美子、玉置尚徳、鮫島吉
廣：醸協、105巻、第8号、p548-555（1990）
- 8) 第五回改正国税庁所定分析法注解
- 9) 小関卓也、伊藤清、伊藤康郎、岩野君夫：醸協、89
巻、p408-441（1994）
- 10) 日本生物工学会編著「生物工学実験書」培風館（1992）
- 11) 福地香、比嘉賢一：沖縄県工業技術センター研究報
告第3号、p25-32(2001)
- 12) 沖縄微生物ライブラリ <http://omljp.jimdo.com/>
- 13) 栗田修、中林徹：三重県科学技術振興センター工業研
究部研究報告，30，p172-173（2006）

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。