

鳥取オリジナル麹菌の吟醸酒用変異株の育種開発

Development of Original Tottori Mutant Koji-strain for Ginjo-shu Sake Brewing

茂 一孝

Kazutaka Shigeru

電子・有機素材研究所 発酵生産科

独自の麹菌の開発を行い、清酒の差別化を図る目的で、自然界より分離した麹菌について、さらなる製品（特に吟醸酒）への活用と品質向上を目指して、高いグルコアミラーゼ活性を持つ麹菌の開発を試みた。

その結果、2 変異株を育種・選抜し小仕込試験を行ったところ、一方は、淡麗で雑味が少ない酒質の吟醸酒に、もう一方は濃厚な酒質の純米酒に利用できることを確認した。

1. はじめに

日本酒において麹は必須な原料であり、デンプンやタンパク質を分解して発酵に必要な糖分やアミノ酸を供給するとともに、その分解物は製品の味に大きく影響する。麹とは、米、麦などの原料に種麹と呼ばれる麹菌を接種し、生育させることで造られ、酵素の供給源となっているが、その麹菌は国内数社によって製造・販売されている。

鳥取県においても市販種麹を用いて各製造場で麹が造られているが、県産酒の差別化・ブランド力向上に寄与することを目的に「鳥取ブランド純米酒」の開発に取り組み、オリジナルの新しい麹菌を取得し、その特性を評価した¹⁾。

その結果、新たに取得した麹菌は、日本酒醸造の中で非常に重要視されている糖化力が強く、有望であるが、麹の褐変性（ひいては酒粕の褐変）が認められた。

本レポートでは、褐変性を示さない麹菌の育種を行うと同時に、さらなる製品（特に吟醸酒）への活用と品質向上を目指して、高いグルコアミラーゼ活性を持つ麹菌の開発を試みたところ、有望な2つの変異株を得ることができたのでその内容について報告する。

2. 実験方法

2.1 供試素材

2.1.1 供試種麹及び菌株

種麹としてハイG及び白峯（株）樋口松之助商

店社製 粒状種麹）を使用した。また、育種する親株として自然界からの分離株 *Aspergillus oryzae* WMF1（当センター保有）を使用した¹⁾。

2.2 試験方法

2.2.1 非褐変性変異株の育種方法

既報に従い変異株の取得を行った²⁾。また、選択方法としては、Czapek 培地（Czapek-Dox Broth, Difco 社製）中で孢子からの発芽の遅い菌株の中に非褐変性の変異株が存在することを利用した³⁾。A. *oryzae* WMF1 を麹汁斜面培地に 30 °C で 7 日間培養し、5 ml の孢子懸濁液（0.1% tween80）に分生子を懸濁し、ガラスフィルター（3G-3）で濾過後、得られた上澄み液の分生子濃度を 2×10^6 孢子/ml に調整した。その孢子懸濁液 2 ml をシャーレ（直径 3 cm）に移し、スターラーバーで攪拌しながら、クリーンベンチ内で 15W の殺菌灯を用い、20 cm の距離で 5 分間紫外線照射を行った。30 分間遮光後、3,000 rpm で 10 分遠心し、得られた孢子を 100 μ l の孢子懸濁液に再懸濁後、全量を麹汁平板培地に塗布し 30 °C で 5 日間静置培養を行った。

孢子懸濁液 10 ml を用いて、平板培地の分生子の回収を 2 回行い、ガラスフィルター（3G-3）で濾過後、3,000 rpm で 10 分遠心し、沈殿物を 10 ml の滅菌水に再懸濁した。その後、遠心分離を行い、得られた沈殿物を孢子懸濁液 0.5 ml に懸濁し、50 ml の Czapek 培地に全量添加後、28 °C で 2 日間振とう培養を行った。

その培養液をガラスフィルター(3G-3)でろ過後、遠心分離で未発芽胞子を回収し、胞子懸濁液 5 ml に懸濁した。さらに、より細かい目のガラスフィルター(3G-4)でろ過処理を行い、1 ml の胞子懸濁液で懸濁後、麴汁平板培地に塗布し、30 °Cで2日間培養を行った。

2.2.2 非褐変性変異株の選抜方法

選抜方法はフラスコを用いた簡易製麴⁴⁾を行い、褐変性の有無を判定した。まず、100 ml 容三角フラスコに α 米 10 g を入れ、95 °Cで2時間乾熱殺菌を行った。また、2.2.1 で得られたコロニーを 5 ml 麴汁斜面培地に塗布し、30 °Cで7日間培養した。胞子懸濁液 5 ml を用いて分生子を懸濁し、調整した胞子懸濁製麴水 (2×10^5 胞子/ml) 4 ml を α 米に加え、攪拌後 35 °C、80%RH で 36 時間培養した。その後、50 ml の 0.5%NaCl 溶液を添加し、室温で2時間静置後、ろ紙(No.5C)で濾過し、残渣の褐変性を試験した。

2.2.3 各種酵素活性の測定

製麴はシャーレ製麴法⁵⁾に従い行った。シャーレ(直径 9 cm)に α 米 15 g を入れ、95 °Cで2時間乾熱殺菌を行った。次いで、胞子懸濁製麴水 (2×10^5 胞子/ml) 6 ml を α 米に加え、攪拌後、シャーレを恒温恒湿槽で培養した。30 °C、90%RH で 20 時間培養後、さらに 35 °C、85%RH で 24 時間培養を行い、得られた米麴について酵素力価の測定を行った。

尚、酵素力価測定(α -アミラーゼ、糖化力)にはキッコーマン社製の測定キットを用いた。

2.2.4 小仕込み試験と製成酒の評価

分離した菌株及び市販種麴を用い、総米 150 g の仕込試験を行った。原料米は α 化米(AA-60、徳島精工(株)製)又は山田錦(精米歩合 40%)を用い、酵母は協会 9 号を使用した。発酵は 15 °C又は 12 °C 一定で行い、炭酸ガス減量を測定することで発酵経過を観察した。遠心分離により得られた製成酒の分

析は、国税庁所定分析法注解⁶⁾に従い行った。

3. 結果と考察

3.1 非褐変性変異株の分離

発芽の遅い変異株約 320 株について、簡易製麴し、褐変性が低下した 5 株を取得した。その後、継代培養による特性の安定性試験により 3 株を選抜し、その内 2 変異株(WMF1-1024, WMF1-1036、以下それぞれ No.1024, No.1036 と記す)が吟醸酒用麴菌の特徴である高い G/A 比(グルコアミラーゼ活性/ α -アミラーゼ活性)を示した。その酵素力価の結果を図 1、2 に示す。

No.1024 変異株については、親株と比較すると、 α -アミラーゼ活性、グルコアミラーゼ活性ともに減少しているが、 α -アミラーゼ活性の減少割合が大きかった。そのため、G/A 比は高い値となったが、吟醸酒用市販種麴であるハイ G との比較では、その G/A 比には及ばない結果であった。

一方、No.1036 変異株についても、親株との比較では、同様な酵素力価の傾向を示した。また、一般的な種麴である白峯と比較すると、高い G/A 比を示し、吟醸酒用市販種麴であるハイ G と同程度の値を示した。

また、カビ毒として知られるアフラトキシンについて米麴中の分析を行ったところ検出されず、No.1024, No.1036 変異株ともにアフラトキシンを産生しないことを確認した((財)日本食品分析センター調べ)。

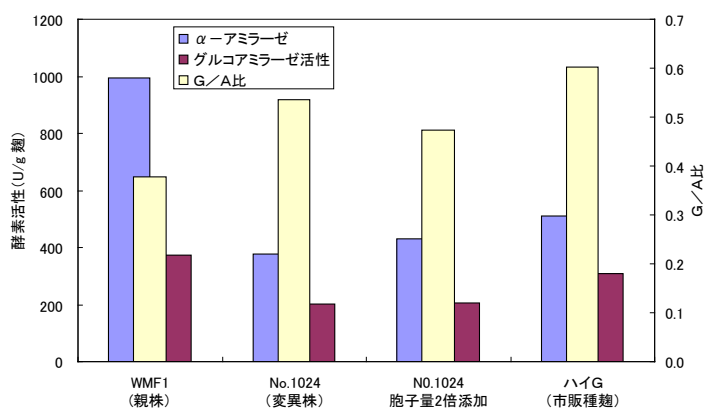


図 1 米麴の酵素力価比較 (No. 1024 変異株)

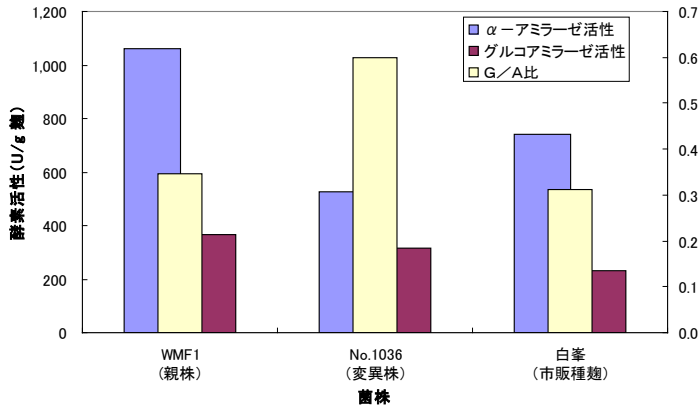


図2 米麹の酵素力価比較 (No. 1036 変異株)

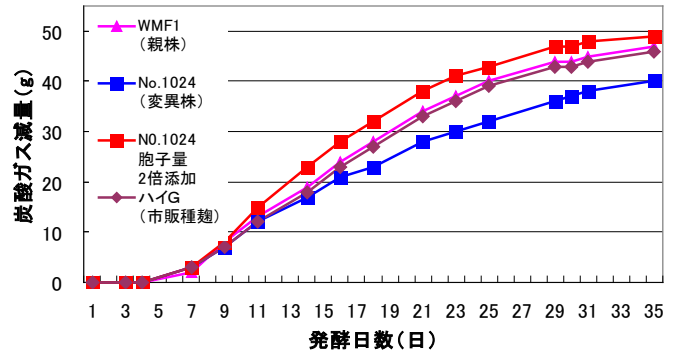


図3 炭酸ガス減量測定による発酵経過

(No. 1024 変異株)

3.2 小仕込み試験

発酵経過を図3、4及び得られた製成酒の分析結果と酒粕の評価を表1、2に示す。

No.1024 変異株については、製麹中の生育が遅れ気味の傾向であり、酵素活性が低かったため、孢子添加量を増やした製麹条件で作成した米麹を用いたところ、順調な発酵経過を示した。その要因は、孢子添加量を増やすことで、α-アミラーゼ活性の改善によるものと推測された。

製成酒の成分分析の結果、アミノ酸度は1.0であり、親株及び市販種麹と比較して、低い値を示した。官能評価は、低いアミノ酸度の日本酒の特徴である淡麗で雑味が少ない酒質であった。また、酒粕の褐変はほとんど認められなかった。

一方、No.1036 変異株は、発酵経過は順調で、得られた製成酒の成分分析の結果は、酸度が3.7と比較的高めで、アミノ酸度は2.7と親株と同程度であった。蛋白分解酵素が比較的高いために((株) 樋口松之助商店調べ)、モロミ中で米の溶解が進んだことが要因として推測された。官能評価は、酸度とアミノ酸度が比較的高いため、芳醇な酒質であった。また、酒粕の褐変は認められなかった。

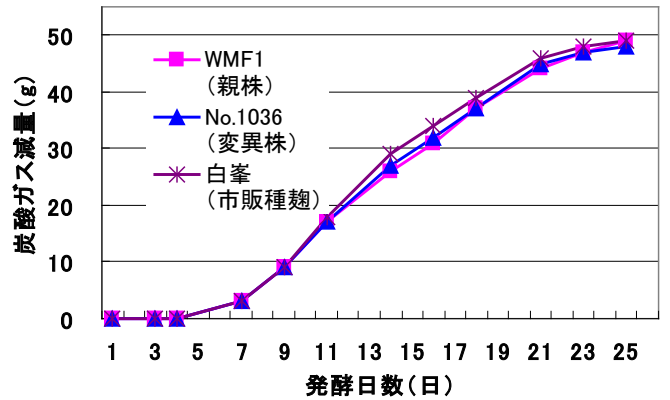


図4 炭酸ガス減量測定による発酵経過

(No. 1036 変異株)

表1 製成酒の成分値及び酒粕の褐変 (No. 1024 変異株)

菌株	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	酒粕の褐変
WMF1 (親株)	19.3	1.1	3.0	2.7	++
No.1024 (変異株)	17.4	13.2	2.7	1.0	±
NO.1024 孢子量2倍添加	19.5	16.4	2.4	1.0	±
ハイG (市販種麹)	19.4	11.0	2.9	2.1	-

表2 製成酒の成分値及び酒粕の褐変 (No. 1036 変異株)

菌株	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	酒粕の褐変
WMF1 (親株)	18.5	0.0	3.3	2.7	++
No.1036 (変異株)	18.7	8.5	3.7	2.7	-
白峯 (市販種麹)	19.1	11.6	2.8	2.4	-

4. おわりに

自然界から分離したオリジナル麹菌(褐変性あり)から、褐変性が著しく低下した3変異株を育種した。選抜した3株中の2株は、吟醸酒用として重

要な特徴である高いG/A比を示した。

No.1024 変異株は、製麹条件を変更することで、

順調な発酵経過を示し、得られた製成酒は顕著に低いアミノ酸度であった。官能評価は、淡麗で雑味が少ない酒質であったため、吟醸酒に活用できることを確認した。

一方、No.1036 変異株は、十分な酵素活性をもち、且つ高い G/A 比を示し、順調な発酵経過を示した。得られた製成酒は比較的芳醇な酒質であったため、濃厚な酒質の純米酒に利用できることを確認した。

今後、規模を大きくした製麹試験、発酵試験や麹菌を活用した甘酒などの食品への応用も検討予定である。

謝 辞

種麹についてご助言、ご協力いただいた（株）樋口松之助商店に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 茂一孝, 西尾昭; 鳥取県産業技術センター研究報告, (13), p21-23(2010).
- 2) 五味勝也; 日本醸造協会誌, 84(7), p.465-470(1989).
- 3) 原昌道ら; 日本醸造協会誌, 70(5), p.348-352(1975).
- 4) 原昌道ら; 日本醸造協会誌, 70(3), p.169-173(1975).
- 5) 岡崎直人; 日本醸造協会誌, 74(11), p.738-739(1979).
- 6) 第4回改正国税庁所定分析法注解(1993).