

異なる黒麹菌を用いた本格焼酎の酒質の多様化

白石洋平¹・原口愛美²・村田梨恵¹・久遠馬²・奥津果優²・吉崎由美子²・
二神泰基²・玉置尚徳²・和久豊¹・高峯和則^{2*}

(¹株式会社ビオック, ²鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター)

平成 29 年 12 月 4 日受理

Diversification of *Honkaku-shochu* using different *Aspergillus luchuensis*.

Yohei SHIRAIISHI¹, Ami HARAGUCHI², Rie MURATA¹, Ryoma HISASHI², Kayu OKUTSU², Yumiko YOSHIZAKI²,
Taiki FUTAGAMI², Hisanori TAMAKI², Yutaka WAGU¹ and Kazunori TAKAMINE^{2*}

(¹Bio' c Co., LTD, 111-1, Murocho-Uchida, Toyohashi, Aichi, 441-8087, ²Education and Research Center for Fermentation Studies, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, 1-21-24, Korimoto, Kagoshima, 890-0065)

We previously reported that the flavor of *imo-shochu* was changed by increments of amino acids in *moromi mash*. We therefore investigated the effects of protease activity produced by *Aspergillus* sp. on the flavor of *imo-shochu* in this study.

Three strains of *Aspergillus luchuensis* –KBN 4038, KBN 4041, and KBN 4080– were selected from 55 candidate strains by enzyme activities. *Koji* made with the selected strains showed higher enzyme activities than the control, which was made with commercial *tane-koji*. In particular, the acid protease activities of the selected strains were 1.3 to 1.7 times higher than that of the control. A small scale fermentation test of *imo-shochu* revealed that the amino acid contents in *moromi-mash* made with the selected strains increased in proportion with their protease activity.

The concentration of 1-octen-3-ol in *imo-shochu* using KBN 4038 was 32 times higher than the control.

Sensory evaluation revealed that sweet and *koji-like* flavors were stronger in *imo-shochu* made with selected strains compared to the control. The taste of *imo-shochu* made with KBN 4038 or KBN 4041 was evaluated as sweeter, richer, and less irritating than that with the control. *Imo-shochu* made with KBN 4080 had fruity and floral flavors, with a sweeter taste compared to the control.

As a result, the enzyme activity of *A. luchuensis* significantly affected the sensory quality of *imo-shochu*; accordingly, selection of the *Aspergillus* strain by enzyme activity would be beneficial for diversification of the *imo-shochu* flavor.

Key words: 芋焼酎, *Aspergillus luchuensis*, 菌株選抜, 1-octen-3-ol

緒言

焼酎製造において酵母は、香気成分やアルコール生成能の違いなどの性質を有している。例えば、鹿児島

県酒造組合から販売されている鹿児島2号は耐熱性と耐酸性に優れた酵母であり、鹿児島4号はエステル香が高く、鹿児島5号はアルコール取得量が高い。また、鹿児島6号は果糖資化性が高く黒糖焼酎製造用として

本論文については、*印著者あて連絡ください。

使用され、鹿児島香り酵母はイソアミルアルコールと酢酸イソアミル生成能が高い性質を有している。また、公益財団法人日本醸造協会や宮崎県、熊本県、大分県、沖縄県からも個性的な酵母が販売されており、少なくとも15種類の酵母が焼酎製造に使用されている¹⁻³⁾。一方、麹菌では種麹メーカーでそれぞれの所有菌株によって造られた種麹はあるものの、菌株自体のバリエーションは酵母に比べると少ない。また、焼酎麹菌の選抜や育種はクエン酸に関わる報告⁴⁾がみられる程度で、酵素活性に着目した育種や焼酎の香気に関する報告は非常に少ない。これまでに著者ら⁵⁾は、焼酎醪にプロテアーゼ剤を添加して焼酎製造を行うことで、アルコール取得量の向上や香気成分中のアルデヒド類の増加により酒質が変化することを明らかにしてきた。これは醪中の酵素活性が酒質の変化に関与する知見である。

そこで、麹菌の生産するタンパク質分解酵素である酸性プロテアーゼ（以下、AP）および酸性カルボキシペプチダーゼ（以下、ACP）を指標に、酵素活性が高く、従来の焼酎製造に使用している黒麹菌株とは異なる特長を有した菌株を取得することを目的とした。さらに、選抜された黒麹菌株を用いて、芋焼酎の小仕込み試験を行い酒質に与える影響について検討した。

方法

1. 使用菌株

本研究に使用した菌株は全て株式会社ビオック社製のものを用いた。すなわち、スラント上で黒い分生子を着生し、生育に異常が無く、生酸性が高い55株と、対照として酵素生成が高い*A. luchuensis* var. *awamori* KBN2012および市販黒麹種麹（以下、市販黒麹）を用いた。

2. 製麹方法

一次選抜および二次選抜では、 α 米を用いて製麹を行った。すなわち、メリクロン培養用フラスコに精米歩合90%の α 米20gを加え、綿栓を施して90℃で120分間乾熱殺菌した。放冷後、ポテトデキストロス寒天培地にて30℃で5日間培養した糸状菌のジャイアントコロニーを、約1cm²の大きさに切り出してフラスコ内に入れ、攪拌した。その後、10mLの蒸留水をフラスコ内に加え、水分が均一になるように適宜攪拌しながら吸水させた。製麹は恒温恒湿器内（湿

度95%）で行い、焼酎麹の製麹に近い条件にするために、製麹開始から24時間は35℃、それ以降は30℃で培養し、42時間で出麹とした。製麹中の手入れは製麹開始から20時間後および26時間後の2回実施した。なお、対照株はKBN2012を用いた。

選抜株の製麹は1,000gスケールで実施し、原料米は酒造メーカーが一般的に使用している精米歩合90%の国産加工用米を用いた。製麹は恒温恒湿器にて行い、品温経過および製麹操作は本格焼酎製造技術⁶⁾に従い制御し、いずれの麹も42時間で出麹とした。対照株は、市販黒麹を用いた。

3. PCRによる糸状菌株の*A. luchuensis*簡易判別

黒麹菌ドラフトゲノム解析のフモニシン遺伝子解析を参考に行った⁷⁾。すなわち、選抜株および対照株として*A. niger* ATCC 1015および*A. luchuensis* IFO 4308のゲノムDNAをテンプレートに用いた。ゲノムDNAの抽出は、蒸留水100 μ Lとガラスビーズ少量をエッペンドルフチューブに入れ、3日間プレートに生育させたコロニーを菌体（分生子および菌糸）ごとマイクロスパーテル1杯分投入した。ビーズビーター（FastPrep 120 Cell Disrupter System, Thermo Savant社製）にて破碎を行い、得られた破碎液をスピンドウンし上清を回収しテンプレートとした。PCRはKOD FX Neo（TOYOBO社製）の標準プロトコルで実施した。プライマーとして、Fum1_cons_primer（5'-GGCGGCATTGAGATCAGCACATTGGA-3'）およびFum15_cons_primer（5'-AAGGTAACCCGCACAGTAACTGCCAGGCC-3'）を用いてPCR増幅を行った。1,000bp付近のシグナルが得られた場合「*A. luchuensis* type」とする。「*A. niger* type」の場合、fumonisin B1生合成遺伝子クラスター由来の6,000bpのシグナルが得られる。なお、PCRは、98℃、2min. → 98℃、10sec. → 68℃、6min.（35 cycle）→ 8℃、 ∞ で行った。

4. 麹の分析方法

得られた麹の酵素抽出、酸度および酵素活性の分析は国税庁所定分析法⁸⁾に従った。

一次選抜では、APとACPのみ測定し、吸光度の値を比較した。なお、ここでは作業性を考慮し酵素液は透析をせず分析に供したため、ACPの測定には酸性カルボキシペプチダーゼ測定キット（キッコーマン社製）を使用した。二次選抜では酸度、APおよび

ACP 活性を測定し、麴 1 g (湿重量) 当たりで示した。選抜株での試験は、 α -アミラーゼ (以下, AA), 耐酸性 α -アミラーゼ (以下, AsAA), グルコアミラーゼ (以下, GA), AP および ACP 活性を測定した。また、 β -グルコシダーゼ (以下, BG) 活性は太田ら⁹⁾の方法, セルラーゼ (以下, CEL) 活性は柏木¹⁰⁾の方法, キシラーゼ (以下, XY) 活性はしょうゆ試験法¹¹⁾に従った。なお, 酸度および各種酵素活性は乾物重量に換算して示した。

5. 芋焼酎の小仕込み試験

麴米 140 g 相当量の米麴を用いて著者らの方法⁹⁾に従い仕込んだ。また, 得られた醪と焼酎の分析, 焼酎の揮発成分の同定および定量分析は著者らの方法⁹⁾に従った。

6. 焼酎の官能評価

官能評価試験は, アルコール濃度を 25% (v/v) に蒸留水で割り水して実施した。

清酒のフレーバーホイール¹²⁾を参考にして, 香りは果実香, エステル, ナッツ香, 麴香, 甘香, 焦臭, 酸臭および原料香の 8 項目について, 味は甘味, 濃淡, 苦味, 渋味, 刺激味および酸味の 6 項目について, 7 名のパネル (男性 2 名, 女性 5 名) が, 対照の焼酎を基準 (普通 = 3) として香味の強度を 1 ~ 5 で評価した (1 = 非常に弱い, 2 = 弱い, 3 = 普通, 4 = 強い,

5 = 非常に強い)。また, 特徴的な香味を有する場合は, コメントを記すこととした。官能評価の結果はそれぞれの香りごとに平均し, レーダーチャートにプロットした。

結果および考察

1. プロテアーゼ活性を指標にした酵素活性の高い菌株の選抜

供試菌 55 株を用いて製麴による選抜試験を行った。一次選抜では, 蒸米上でも十分に生育し, KBN2012 と比較して分生子着生量に遜色がなく, AP の吸光度 (660 nm) が 0.3 以上もしくは ACP の吸光度 (570 nm) が 0.7 以上で, 出麴時の菌体の生育や香りが良好で, しまりが強くない株を 15 株選抜した。

二次選抜の結果を Table 1 に示す。出麴酸度は, KBN2012 の 5.0 と比べて KBN4038, 4041 および 4124 は低い値であった。AP 活性は KBN2012 と比べて KBN4038, 4041 などの 10 株で高い値であった。ACP 活性は KBN4124 と KBN4128 を除く株で KBN2012 と比べて同程度からやや高い活性の株が多かった。これらの結果から, AP 活性が高い株と, AP 活性は低い ACP 活性が対照と比べて 2 倍以上高い Fig.1 に示す 11 株を選抜した。

Table 1 The second selection result of the strain

KBN No.	The form of <i>de-koji</i>					Acidity	Enzyme activities (U/g <i>koji</i>)	
	Growth	Conidia	Mycelium entanglement	Mycelium color	Flavor		AP	ACP
4038	○	+	±	-	-	3.4 ± 0.3	19,029 ± 1,007	2,946 ± 106
4041	○	±	±	-	-	3.3 ± 0.3	23,852 ± 1,166	3,461 ± 117
4044	○	+	±	-	-	5.3 ± 0.1	6,979 ± 440	2,934 ± 816
4045	○	+	-	-	-	7.3 ± 0.8	7,584 ± 328	3,189 ± 514
4052	○	++	±	-	-	5.4 ± 0.1	6,957 ± 405	2,733 ± 154
4053	○	±	-	-	-	6.7 ± 0.4	9,412 ± 985	5,253 ± 427
4059	○	+	-	-	-	6.4 ± 0.4	11,516 ± 902	2,706 ± 527
4080	○	+	±	-	-	5.8 ± 0.8	20,854 ± 1,348	2,852 ± 290
4087	○	+++	±	-	-	7.3 ± 0.4	26,314 ± 978	3,390 ± 650
4122	○	++	+	-	-	6.9 ± 0.1	24,003 ± 257	3,230 ± 405
4123	○	++	+	-	-	7.0 ± 0.5	23,852 ± 1,166	3,250 ± 14
4124	○	+	+	-	-	4.7 ± 1.1	21,373 ± 146	2,231 ± 223
4125	○	++	±	-	-	6.6 ± 0.2	23,860 ± 1,916	3,264 ± 95
4126	○	++	±	-	-	5.5 ± 0.6	19,366 ± 2,511	2,608 ± 474
4128	○	++	±	-	-	6.1 ± 0.4	21,118 ± 976	2,296 ± 29
<i>A. luchuensis</i> (Control)	○	+	±	-	-	5.0 ± 0.1	15,547 ± 861	2,526 ± 138

○ (Good) ⇔ × (Bad), +++ (Strong, Many) ⇔ - (Weak, Few)

Mean ± SD (n=2)

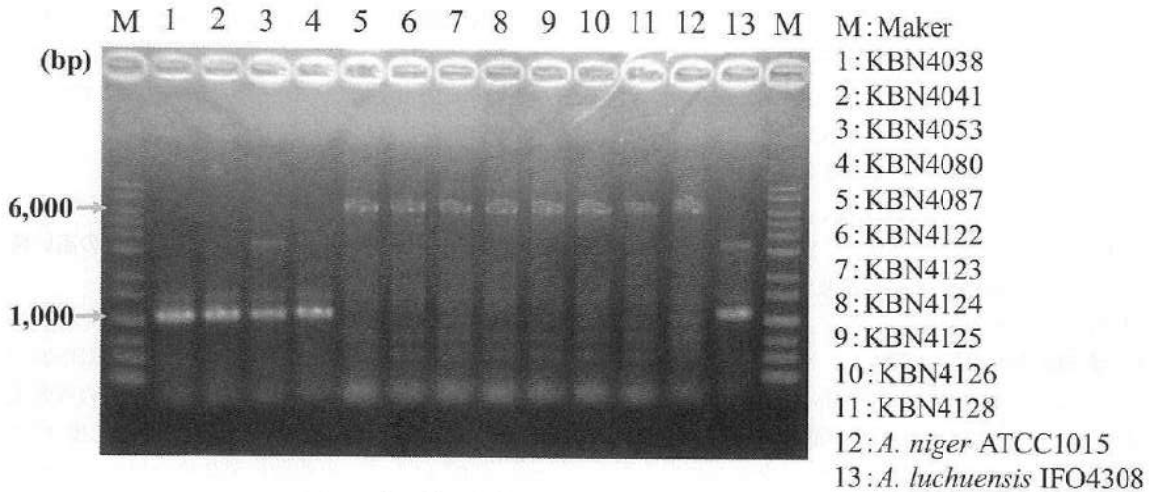


Fig. 1 Results of Fum gene PCR in selected strains.

2. PCRによる菌株の*A. luchuensis*簡易判別

日本醸造学会が国菌と定めた麹菌のなかで、焼酎麹菌は黒麹菌に分類される*A. luchuensis*および黒麹菌の白色変異株である*A. luchuensis* mut. *kawachii*とされ、近縁種である*A. niger* (クロカビ)は、黒麹菌とは異なる菌種であり、麹菌には含めない¹³⁾とされている。*A. niger*はオクラトキシンやフモニシンなどのカビ毒を生産する株があることが知られている。これまでに山田ら^{14,15)}は、*A. luchuensis*の2,500塩基対の遺伝子解析とオクラトキシン産生性について検討し、オクラトキシン合成能を有しないことを遺伝子レベルで明らかにした。また、*A. niger*を解析したところ、カビ毒産生が確認された菌株の遺伝子型は、菌種に拘わらず同様の遺伝子型に集中しており、*A. luchuensis*では、オクラトキシンおよびフモニシンを生産する株は1株も認められない¹⁶⁾。

そこで、*fum*遺伝子に着目し、選抜した株の中から*A. niger*を除外するためにPCRによる簡易判別を行った。得られたPCR産物を電気泳動した結果をFig.1に示す。Lane 12の*A. niger* ATCC 1015と同じ6,000 bp付近にバンドが検出されると「*A. niger* type」となり、Lane 13の*A. luchuensis* IFO 4308と同じ1,000 bp付近にバンドが検出されると「*A. luchuensis* type」と判断できる。供試11株中7株(Lane 5～11)は、6,000 bp付近にバンドが検出され、「*A. niger* type」と判別した。Lane 1～4のKBN4038, KBN4041,

KBN4053およびKBN4080では、1,000 bp付近にバンドが検出されたことから、「*A. luchuensis* type」と判別した。

なお、これら4菌株は、独立行政法人酒類総合研究所による解析により、*A. luchuensis*であることが証明されている。

3. 選抜株を用いた製麹

選抜したKBN4038, KBN4041およびKBN4080の3株で製麹した結果をTable 2に示す。なお、KBN4053は種麹製造時に生育が緩慢で著しく分生子着生が悪かったため、実用に適していない株と判断し、除外した。

出麹酸度は対照の市販黒麹と比べて、3株ともに低く、50～60%の値であった。

酵素活性は、AA活性およびAsAA活性が対照と比べてKBN4038とKBN4041はそれぞれ、2.1～2.8倍および1.9～2.4倍と高い値であった。これらの酵素は醗中でのデンプンの液化に関与することから、原料利用率の向上につながると考えられる。GA活性は、選抜株は対照と比較して遜色ないものであった。芋焼酎の特徴香のひとつとされるテルペン類の生成に関与するBG活性は、対照が最も高く、KBN4041は対照の1/3程度であった。CEL活性は対照と比較して、KBN4038で約25倍、KBN4041で約1.9倍であった。XY活性もCEL活性同様にKBN4038で対照の約2.1倍高かった。AP活性は3菌株とも対照の1.3～1.7

Table 2 Acidity and enzyme activities of the selected *koji* strain

	Acidity	Enzyme activities (U/g dry <i>koji</i>)							
		AA ^{※1}	AsAA ^{※2}	GA ^{※3}	BG ^{※4}	CEL ^{※5}	XY ^{※6}	AP ^{※7}	ACP ^{※8}
KBN4038	3.5 ± 0.1	424 ± 40	322 ± 40	198 ± 5	223 ± 3	453 ± 2	330 ± 17	44,535 ± 138	8,568 ± 251
KBN4041	3.3 ± 0.0	317 ± 16	254 ± 3	253 ± 12	132 ± 7	345 ± 0	123 ± 5	39,823 ± 315	7,006 ± 67
KBN4080	4.6 ± 0.2	173 ± 6	143 ± 6	162 ± 3	224 ± 6	212 ± 36	119 ± 38	34,215 ± 222	6,068 ± 395
Control	6.8 ± 0.3	149 ± 2	131 ± 4	217 ± 12	422 ± 7	183 ± 30	157 ± 40	26,161 ± 1,122	7,102 ± 834

Mean ± SD (n=2)

※ 1: α-Amylase, ※ 2: Acid-resistant α-Amylase, ※ 3: Glucoamylase, ※ 4: β-Glucosidase, ※ 5: Cellulase, ※ 6: Xylanase, ※ 7: Acid Protease, ※ 8: Acid Carboxypeptidase

Table 3 Analysis of the 2nd ferment *moromi-mash*

	pH	Acidity	Amino acidity	Moromi alcohol (%)	Absolute alcohol (g)	Volatile acidity	Sugar		The number of yeasts		
							Total (%)	Reducing (%)	Total (×10 ⁸ cells/g)	Viable (×10 ⁸ cells/g)	Rate (%)
KBN4038	4.4 ± 0.0	5.9 ± 0.3	2.8 ± 0.1	15.1 ± 0.0	151 ± 1	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	24.2 ± 4.3
KBN4041	4.4 ± 0.0	5.6 ± 0.0	2.7 ± 0.0	15.1 ± 0.1	150 ± 1	1.7 ± 0.0	1.6 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	32.3 ± 0.9
KBN4080	4.3 ± 0.0	5.9 ± 0.0	2.5 ± 0.1	15.2 ± 0.3	151 ± 3	1.1 ± 0.0	1.6 ± 0.2	0.3 ± 0.0	1.7 ± 0.6	0.4 ± 0.1	25.8 ± 2.4
Control	4.2 ± 0.0	6.2 ± 0.2	2.0 ± 0.1	15.3 ± 0.2	151 ± 2	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1	29.6 ± 0.4

Mean ± SD (n=2)

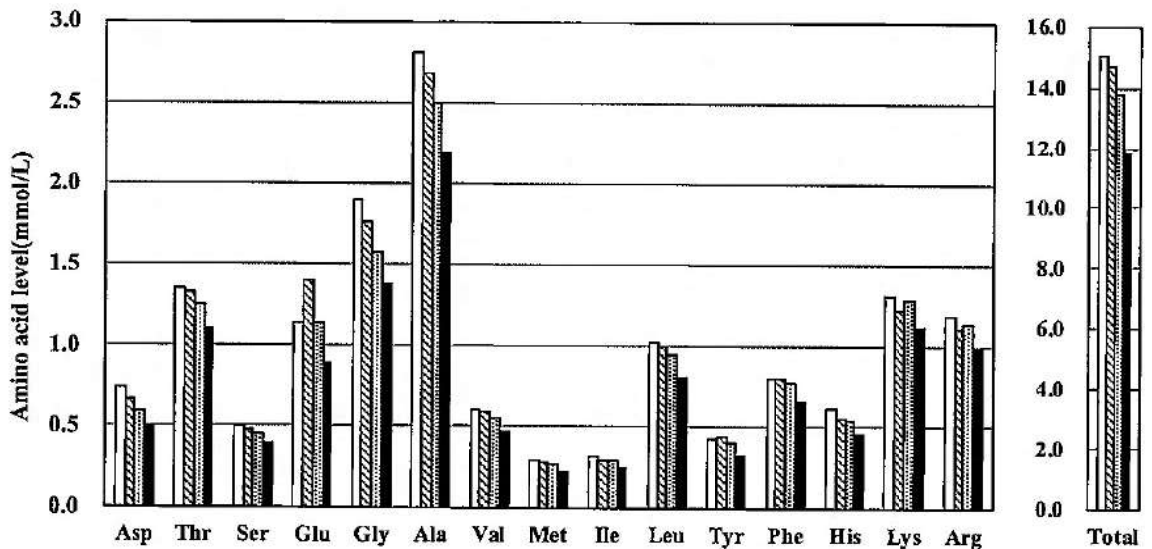


Fig. 2 Amino acid composition and level of the 2nd *moromi* of *imo-shochu* of a black *koji* selected strain
Symbol: □, KBN4038; ▨, KBN4041; ▩, KBN4080; ■, Control;

倍高く、KBN4038はAPおよびACP活性共に最も活性が高かった。

本研究で得られた選抜株は、市販黒麹と比べて、AA, AsAA, CELおよびAP活性が高く、生酸性が低いという特長を有していた。特に、KBN4038とKBN4041は全体的に酵素活性が高い傾向を示した。

4. 選抜株を用いた仕込み試験

選抜した黒麹菌株で製麹した麹を用いて芋焼酎の小仕込み試験を行い、発酵終了後の二次醪の分析結果をTable 3に示す。

いずれの値とも対照の市販黒麹と比較して遜色ないことから選抜株は問題なく焼酎製造が行えることが明

Table 4 Average and standard deviation of concentrations of volatile compounds of *imo-shochu*

Compound	(unit)	Peak-RI	Volatile compounds concentration			
			KBN4038	KBN4041	KBN4080	Control
Alcohol (4)						
n-Propyl alcohol	(mg/l)	1,038	132±0	140±8	135±4	145±5
Isobutyl alcohol	(mg/l)	1,098	267±6	264±12	257±2	240±1
Isoamyl alcohol	(mg/l)	1,216	304±3	284±1	279±18	299±1
1-octen-3-ol	(μg/l)	1,448	527±22	282±30	174±12	16±0
Aldehyde (6)						
Acetaldehyde	(μg/l)	*745	1,252±18	1,516±169	1,133±99	1,220±61
Isobutyraldehyde	(μg/l)	907	57.7±1.3	64.0±0.6	57.0±10.8	64.0±3.4
2-Methylbutyraldehyde	(μg/l)	909	56.0±1.4	60.4±1.5	52.3±12.6	56.8±1.2
Isovaleraldehyde	(μg/l)	910	58.1±1.1	63.5±2.5	47.4±11.5	46.6±1.0
Furfural	(μg/l)	1,459	446±33	427±40	356±35	437±69
Benzaldehyde	(μg/l)	1,519	7.69±3.30	7.38±0.01	4.27±0.16	4.86±0.15
Terpene (3)						
p-Cymene	(μg/l)	1,266	0.35±0.08	0.37±0.08	0.37±0.17	0.37±0.06
Rose oxide	(μg/l)	1,369	0.38±0.01	0.34±0.02	0.34±0.02	0.34±0.02
Linalool	(μg/l)	1,545	8.28±0.32	7.48±0.09	7.48±0.15	7.48±0.28

Mean ± SD (n=2)

らかとなった。醪のpHは対照が4.2と最も低く、酸度は6.2と最も高かった。これは、対照の出麴酸度が6.8と選抜株の3.3～4.6と比べて1.5～2.0倍高かったためである。焼酎製造において出麴酸度は4以上が必要とされ、不足する場合は一次醪酸度が16以上となるよう補酸が必要とされている⁹⁾。この値と比べてKBN4038とKBN4041は低い値であることから、これらの選抜株を実用化するためには、乳酸を用いた補酸を行うことが安全に発酵できるようにする。または、出麴酸度が4以上となる製麴条件を確立する必要がある。

純アルコール量は、150～151gと差異は認められなかった。還元糖量は選抜株と対照には大差はないものの、全糖量はKBN4038がやや高い値であった。KBN4038はCEL活性が最も高い麹であり、繊維質分解やそれに伴うアルコールの増加が期待されたが、醪の粘性等も対照と比べて大差はなく、アルコール取得等への影響は認められなかった。酵母の総菌数や生菌率についても、選抜株と対照株で差異は認められず、選抜株が酵母の増殖に影響を与えないことがわかった。AP活性が最も高いKBN4038が醪のアミノ酸度も最も高かった。

発酵終了後の二次醪に含まれるアミノ酸組成および

濃度を測定した結果をFig.2に示す。総アミノ酸量は、KBN4038が15.1 mmol/Lと最も高く、対照が11.9 mmol/Lと最も低かった。また、ほとんどのアミノ酸が総アミノ酸量と同様の大小関係となった。

5. 選抜株を用いた芋焼酎の香気成分分析

Table 2に示すように、選抜株は対照と比べてAP活性は高い傾向にあり、BG活性は低かった。APの作用により生じるアミノ酸の一部は酵母の代謝により高級アルコールやアルデヒドに¹⁷⁾、また、蒸留中にアルデヒドに変換され^{18,19)}、BGは発酵中にサツマイモに含まれるモノテルペン配糖体からモノテルペンアルコールを遊離させる⁹⁾ことが報告されている。そこで、選抜株を用いた芋焼酎のGC-MS分析を行い、高級アルコール類、アルデヒド類およびテルペン類について解析し、その結果をTable 4に示す。

高級アルコール類は、対照と比べて大きな差はなかった。著者ら⁹⁾はプロテアーゼ剤を醪に添加した場合、高級アルコール類の濃度が、無添加と比べて40～60%に低下し、これは、プロテアーゼ剤を添加したことで増加したアルギニンが優先的に資化され、高級アルコール生成に関与するアミノ酸の資化される量が減少したためと考察した。しかし、本研究において同様の傾向は認められなかった。これは、前報⁹⁾では添加し

た酵素量が対照の約30倍で、二次醗初期アルギニン濃度が対照の1.5～2.0倍高く、発酵終了後の醗中のアミノ酸量も対照の2.5倍高かった。一方、本研究では選抜株の酵素活性が対照と比べ最大で1.7倍程度であった。また、本研究では二次醗初期アミノ酸濃度は測定しなかったが、発酵終了後の醗中のアミノ酸量が対照の1.3倍程度の増加に過ぎなかったことから、二次醗初期アルギニン濃度も顕著な増加はしていないと推察される。そのため、酵母によるアルギニンの資化が優先されず、結果として高級アルコールの生成量に大差がなかったものと考察される。

アルデヒド類は、イソパレルアルデヒドとベンズアルデヒドがKBN4038およびKBN4041において、対照と比べて1.2～1.6倍の濃度であった。フルフラールは大差なかった。フルフラールは蒸留工程で還元糖とアミノ酸によるメイラード反応により生成し、pHが低いほど、また、還元糖およびアミノ酸濃度が高いほど生成量が増加する^{19,20)}ことが知られており、選抜株では二次醗末期のアミノ酸量は対照と比べて1.3倍ほど多かったが、醗pHは対照が選抜株と比べて僅かに低かったことがフルフラールの含有量に大差がなかった要因と考えられる。

テルペン類の生成に関与するBG活性は対照が最も高く、選抜株と比べて1.9～3.2倍であった。しかし、テルペン類の濃度は対照と選抜株製の焼酎には大差がなかった。焼酎中のテルペン類の生成は、 β -プリメペロシダーゼの関与も報告されており²¹⁾、BG以外の酵素の関与が考えられる。

1-オクテン-3-オールは対照の16 $\mu\text{g/L}$ と比べKBN4038では527 $\mu\text{g/L}$ と32倍の濃度であった。1-オクテン-3-オールの香りはキノコ様の香りである。清酒麴製造時の出麴の判断をする際に経験的に言われてきた、「栗香」と呼ばれる香りの構成成分と報告されている²²⁾。焼酎麴では、市販種麴を用いて製麴した貴麴と黒麴は白麴と比べて1-オクテン-3-オール濃度が高濃度含まれていたと報告され²³⁾、泡盛の特徴的な香气成分のひとつでもある²⁴⁾。1-オクテン-3-オールは、原料米由来のリノール酸から生成される²⁵⁾ことが知られているものの、関与している酵素等に関しては不明な点が多い。KBN4038では、これまで芋焼酎で報告²⁶⁾されてきた1-オクテン-3-オール濃度 $15.3 \pm 8.0 \mu\text{g/L}$ の34倍の濃度であった。高橋ら²⁵⁾は

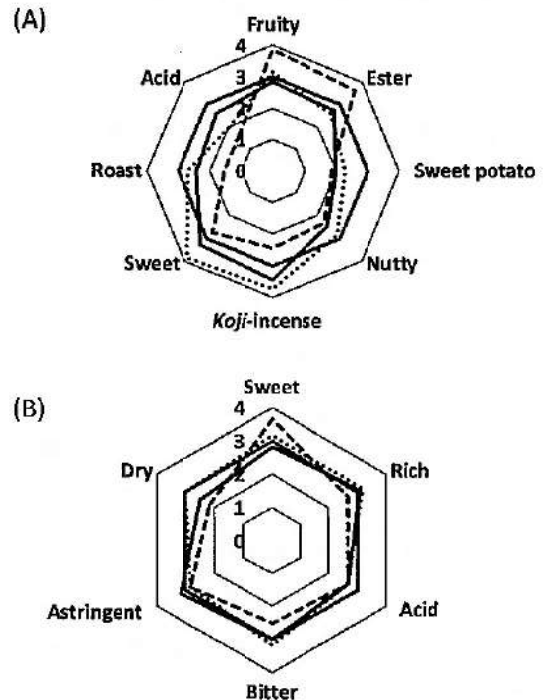


Fig. 3 Spider plot for sensory evaluation of (A) odors and (B) tastes of *imo-shochu* of a black koji selected strain.

Symbol: —, KBN4038; ····, KBN4041; ---, KBN4080; - · - ·, Control;

清酒用麴では菌体量が同じであっても、麴の香りが強い麴は、1-オクテン-3-オールが3倍高濃度に含まれており、その麴はAA活性やAP活性が2倍高く、酵素を含めたタンパク質生産量とリノール酸量が多いと報告している。Table 2に示すとおり本研究で選抜した株は対照と比べて酵素活性が高い傾向であった。KBN4038とKBN4041は対照と比べて、BGとACP活性以外の酵素が2～3倍高いことから、これらの麴菌はタンパク質生産量が多いと考えられる。このことが、選抜株で製造した焼酎に1-オクテン-3-オール濃度が高い理由のひとつと考えられる。一方、KBN4080は対照と比べて酸性プロテアーゼしか活性が高くないことから、この株はタンパク質生産量が対照と大きな差はないと推察される。そのため、1-オクテン-3-オールの増加はタンパク質以外の要因、例えば麴中の含有量や製麴中の消長、出麴酸度や醗pHとの関係などが考えられ、今後1-オクテン-3-オール生

成に関与する要因を明らかにする必要がある。

6. 選抜株を用いた芋焼酎の官能評価

選抜株を用いた芋焼酎の官能評価結果を Fig.3 に示す。香りは、対照と比べてKBN4038およびKBN4041は甘香および麴香が強く、KBN4080は果実様およびエステルが強いと評価された。また、KBN4038およびKBN4041はキノコ、出汁様とのコメントが得られた。1-オクテン-3-オール濃度が対照と比べ高く、このことが甘香および麴香に寄与したものと考えられる。味は、概ね対照に類似したレーダーチャートの形になったが、KBN4038およびKBN4041は、やや甘さと濃厚さがあり、刺激味の少ないまろやかな焼酎という評価、KBN4080は、甘く、まろやかな焼酎であると評価された。

AP活性の高い菌株を選抜し小仕込み試験を行った結果、1-オクテン-3-オール濃度が高く、官能的に高い評価が得られた焼酎となった。選抜株の酵素活性や菌株由来成分が焼酎の香气成分に寄与していることが示唆され、酒質の多様化が図られることが分かった。

要約

麹菌の生産するプロテアーゼを指標に酵素活性の高い黒麹菌の選抜および製麹、芋焼酎の小仕込みを行い酒質への影響について検討した。

候補菌株から *A. luchuensis* KBN4038, KBN4041 および KBN4080 の3株を選抜した。この3株を用いて製麹を行ったところ、AP活性が市販黒麹と比べて1.3~1.7倍高かった。出麴酸度は3.3~4.6と対照の6.8と比べ低かった。芋焼酎の小仕込み試験の結果、AP活性に相応して醪中のアミノ酸総量が1.25倍に増加した。しかし、アミノ酸増加に伴う高級アルコール類とアルデヒド類生成量は対照と比べて顕著な差は認められなかったが、1-オクテン-3-オールが顕著に増加し、甘香や麴香、果実香などが強く、濃厚な焼酎となることがわかった。

本研究の結果から、選抜株はいずれも酒質を大きく変えることができたことから、有用麹菌選抜の指標としてプロテアーゼ活性に着目することが有効であることが示唆された。

参考文献

1) 高峯和則, 瀬戸口真治, 亀沢浩幸, 神渡巧, 緒

- 方新一郎, 尾ノ上昭昭, 濱崎幸男: 鹿児島県工業技術センター研究報告, 8, 1-6 (1994)
- 2) 安藤義則, 高峯和則, 亀沢浩幸: <http://www.kagoshima-it.go.jp/public/happyo/happyo2003/12-3.pdf>
- 3) Yamamoto, H., Morimura, S., Mizutani, M., Yamada, K., Ochi, H., Takayama, K., Kudo, T., Ohta, H., and Kida, K.: *J. Inst. Brew.*, 117, 627-633 (2011)
- 4) 伊藤欣哉, 和久豊, 竹内良和, 神谷直方, 村井總一郎: 醸協, 85, 57-60 (1990)
- 5) 白石洋平, 安藤寛加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 醸協, 112, 517-523 (2017)
- 6) 西谷尚道 編, 本格焼酎製造技術 (財団法人日本醸造協会, 東京) (1991)
- 7) Yamaoka, O., Machida, M., Hosoyama, A., Goto, M., Takahashi, T., Futagami, T., Yamagata, Y., Takeuchi, M., Kobayashi, T., Koike, H., Abe, K., Asai, K., Arita, M., Fujita, N., Fukuda, K., Higa, K., Horikawa, H., Ishikawa, T., Jinno, K., Kato, Y., Kirimura, K., Mizutani, O., Nakasone, K., Sano, M., Shiraiishi, Y., Tsukahara, M., and Gomi, K.: *DNA Res.*, 23, 507 (2016)
- 8) 注解編集委員会編, 第四回改訂国税庁所定分析法注解 (財団法人日本醸造協会, 東京) (1993)
- 9) 太田剛雄, 下條寛和, 橋本憲治, 近藤洋大, 佐無田隆, 大場俊輝: 醸協, 86, 536-539 (1991)
- 10) 柏木豊: 発酵糸状菌の酵素 微生物遺伝子資源利用マニュアル, (16) (2004)
- 11) 日本醤油研究所 編: しょうゆ試験法 (財団法人日本醤油研究所, 東京) (1985)
- 12) 宇都宮仁, 磯谷敦子, 岩田博, 中野成美: 酒類総合研究所報告, 178, <http://www.nrib.go.jp/date/pdf/seikoumihou.pdf> (2006)
- 13) 日本醸造学会: <http://www.jozo.or.jp/koujikinnituite2.pdf>
- 14) Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M., and Mikami, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, 112, 233-237 (2011)
- 15) 山田修: 黒麹菌小話, NRIB15 (2009)
- 16) Yokoyama, K., Wang, L., Miyaji, M., Nishimura, K.: *FEMS Microbiology Letters*, 200, 241-246 (2011)
- 17) Ardó, Y.: *Biotechnol. Adv.*, 24, 238-242 (2006)
- 18) 奥村丞司: 醸協, 88, 178-187 (1993)

- 19) 白石洋平, 安藤有加, 奥津果優, 吉崎由美子, 二神泰基, 玉置尚徳, 和久豊, 高峯和則: 醸協, **112**, 563-568 (2017)
- 20) 大石雅志, 田野上佳枝, 梶原康博, 高下秀春, 岡崎直人: 醸協, **103**, 730-734 (2008)
- 21) Sato, Y., Han, J., Fukuda, H., and Mikami, S.: *J. Biosci. Bioeng.*, **125**, 218-223 (2018)
- 22) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭: 醸協, **101**, 957-963 (2006)
- 23) Yoshizaki, Y., Yamato, H., Takamine, K., Tamaki, T., Ito, K., and Sameshima, Y.: *J. Inst. Brew.*, **116**, 49-55 (2010)
- 24) 福田央, 韓錦順, 山田修: 醸協, **111**, 261-270 (2016)
- 25) 高橋美絵, 磯谷敦子, 宇都宮仁, 中野成美, 小泉武夫, 戸塚昭: 醸協, **102**, 403-411 (2007)
- 26) 福田央, 韓錦順, 水谷治, 金井宗良, 山田修: 醸協, **111**, 545-555 (2016)