

香り及び味覚の優れた清酒をつくる酵母のスクリーニング法の開発

大橋正孝^{*1)}，藤岡靖弘^{*1)}，都築正男^{*1)}，清水浩美^{*1)}

Development of a Screening Method to Evaluate Sake Yeasts to Make Fragrant and Delicious Japanese Sake

OHASHI Masataka^{*1)}, FUJIOKA Yasuhiro^{*1)}, TSUDUKI Masao^{*1)}, SHIMIZU Hiromi^{*1)}

香り及び味覚の優れた清酒と奈良県内で市販されている清酒をメタボリックプロファイリングにより解析したところ、味覚の優れた清酒に特徴的な代謝産物を10成分まで絞り込むことができた。その代謝産物を選抜マーカーとして、試験管培養液及び新たに得られた酵母を使って小仕込み試験を行った試料で酵母の評価を行ったところ、その選抜マーカーで酵母の評価がある程度可能であることが認められた。

1. 緒言

全国の清酒の消費量の推移を見ると、最も消費された昭和50年には1675千kLだったのが、平成22年には589千kLと約35%程度にまで減少している¹⁾。これは、清酒の仕込み配合等が旧態依然であり、清酒のほとんどのものが、既存の醸造協会系酵母を使用して製造され、その個性がなくなっていること、さらに果汁を使用した低アルコール飲料を飲みなれているため、清酒に抵抗感のある若年層の清酒離れが進んでいる²⁾ことに代表されるように、消費者の嗜好の変化に十分対応しきれていないことも要因の一つとして考えられる。その状況を打破するために、新しい酵母を分離して消費者の嗜好に合った清酒の開発が進められている。

酵母のスクリーニングは、土や花など様々なところから酵母を採取して、多様な手法で清酒の醸造に適する酵母を取得していく作業であるが、最終的に得られた酵母を使って、実際に清酒を作ってみないと、その酵母が目的とした酵母かどうかの評価ができない。又、清酒を作るには、大きなタンクで、長い時間がかかる。もし、酵母を試験管培養や小さいスケールの小仕込み試験等で、酵母を評価することができれば、容易に酵母を選抜することができる。そこで、我々は、香り及び味覚の優れた清酒と市販清酒に含まれる代謝産物を比較し、優れた清酒に特徴的な代謝産物を選抜マーカーとして、酵母の評価に応用できないかを検討した。

2. 実験方法

2.1 試薬

有機酸の酒石酸、ギ酸、ピルビン酸、リンゴ酸、マロン

酸、酢酸、乳酸、マレイン酸、クエン酸、フマル酸、ピログルタミン酸、コハク酸、香り成分の酢酸エチル、酢酸イソブチル、酪酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル、プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコール、内部標準物質のアミルアルコール、カプロン酸メチル、その他試薬のメタノール、クロロホルム、0.1M水酸化ナトリウム溶液（容量分析用）、0.1M塩酸溶液（容量分析用）、アセトン、アセトニトリル、超純水、リン酸二水素ナトリウム、メトキシアミン、ピリジンは、和光純薬工業株式会社製を用いた。N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）は、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社製を用いた。固相抽出カートリッジは Waters 社製 Sep-pak Accell plus QMA を用いた。麴汁液体培地は、米麴1kgに水3000mLを加えて55℃で一晩加温後ろ過搾汁して得られた麴汁を Brix10 となるように水で希釈した後、乳酸で pH を調整してからオートクレーブで滅菌した。

2.2 装置

12種類の有機酸は、Waters 社製 UPLC を用いて測定した。（この UPLC は平成21年度地域イノベーション創出形成事業により整備された装置である）。9種類の香り成分は、GC/MS（アジレント社製ヘッドスペースオートサンプラー HP-7694 及び株式会社島津製作所製 GC-MS QP2010）を用いて、ヘッドスペース法で測定した。温度の平衡化は東京理化学器械株式会社製恒温恒湿器 KCL-2000W で行った。味覚は、株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー製味覚センサー TS-5000Z を用いて数値化した。メタボリックプロファイリングについて、代謝産物の測定は GC/MS（アジレント社製 HP-6890 を用

^{*1)} バイオ・食品グループ（旧食品チーム）

いて、保持時間の決定、積分及びライブラリー検索等の解析は株式会社島津製作所製 GC-MS QP2010 に付属の GCMSSolution を用いて、主成分分析はフリーソフトである「R」を用いて行った。サンプルのホモジナイズは倉敷紡績株式会社製サンプルホモジナイザーSH-100 で行った。遠心分離は、日立工機株式会社製微量高速遠心機 CF15RX を用いた。遠心濃縮は東京理化学器械株式会社製遠心エバポレーターCVE-1000 で行った。凍結真空乾燥は、日本真空技術株式会社製凍結真空乾燥機 ULVAC DF-01H で行った。マイクロチューブの振とうはタイテック株式会社製恒温振とう培養機 Deep Well Maximizer M・BR-022UP で行った。データ管理はMicrosoft 社製 Microsoft Access2000 で構築したデータベースで行った。

2.3 サンプル

奈良県内で市販されている市販清酒 111 サンプルと、香り及び味覚の優れた清酒として、全国新酒鑑評会で優れた酒質であると審査された金賞受賞酒と世界で最も影響力のあるコンペティションとして知られている IWC (インターナショナルワインチャレンジ) の SAKE 部門で Gold あるいは Silver に入賞した清酒 19 サンプル (以下、出品酒) の合計 130 サンプルを清酒サンプルとした。

また、試験管培養液及び新たに得られた酵母を小仕込み試験して得られたサンプルを酵母評価サンプルとした。試験管培養では、液体麹汁培地に酵母を入れないで 37°C で 2 日培養した液 (Blank) と、液体麹汁培地に、一般的に清酒醸造で用いられている協会酵母 701 号を加えて 37°C、2 日及び 3 日培養した液をサンプルとした。また、小仕込み試験では、 α 化米及び乾燥麹米 (合計 200g) に、汲み水 3 12mL を加えて、あらかじめ麹汁液体培地 10mL で 30°C 振とう培養させた酵母 (県内で新たに採取された酵母のうち、*Saccharomyces cerevisiae* と同定された酵母) 培養液と乳酸 0.12mL を加えて 20°C~25°C で 18 日間醸造し、ろ過した清酒をサンプルとした。

2.4 有機酸分析

下記の方法で前処理を行い、得られたサンプル溶液を UPLC に注入し、絶対検量線により有機酸の定量を行った。

- (1) 清酒 1mL を 10mL 試験管に採取し、アセトンを加えて 10mL に定容する。
- (2) 0.45 μ m メンブレンフィルターでろ過し、その溶液 2mL を 10mL 試験管に採取し、水で 10mL にする。
- (3) あらかじめ水及び 0.1M NaOH で平衡化した固相抽出カートリッジに全量負荷した。
- (4) 水 10mL で 3 回洗浄し、0.1M 塩酸溶液で溶出し、UPLC サンプル溶液とした。

12 種類の有機酸成分は酒石酸、ギ酸、ピルビン酸、リンゴ酸、マロン酸、乳酸、酢酸、マレイン酸、クエン酸、

フマル酸、ピログルタミン酸、コハク酸である。

UPLC の測定条件は下記のとおりである。

カラム : Acquity UPLC HSS T3 (2.1×150mm, 1.8 μ m)

カラム温度 : 30°C, 注入量 : 6 μ L, UV 測定波長 : 210nm

移動相 A 80%アセトニトリル

B 5mM NaH₂PO₄(pH2.8)

Gradient 条件

時間 (分)	流量 (mL/分)	A	B
0	0.5	0	100
5	0.5	0	100
6	0.5	70	30
7	0.5	0	100
10	0.5	0	100

2.5 香り成分の分析

清酒を恒温恒湿機の中で 15°C に平衡化させ、清酒 1.8mL と内部標準液 (アミルアルコール, カブロン酸メチル含有) 0.2mL をバイアルに採取し、クリンプキャップで固く締める。バイアルをアジレント社製ヘッドスペースオートサンブラー HP 7694 あるいは GC-MS QP2010 にセットして、香り成分を測定した。GC 条件及びヘッドスペース条件は下記のとおりである。

【GC 条件】

カラム HP-INNOWax (0.25mm i.d.×60m, 0.25 μ m)

昇温条件 40°C(5分)-5°C/分-120°C-10°C/分-200°C(5分)

スプリット Pulsed Split ratio5:1

注入温度 200°C

【ヘッドスペース条件】

Oven 温度 70°C 30分 ; 注入温度 200°C

9 種の香り測定成分は酢酸エチル, 酢酸イソブチル, 酪酸エチル, 酢酸イソアミル, カブロン酸エチル, カプリル酸エチル, プロパノール, イソブタノール, イソアミルアルコールである。

2.6 味覚の分析

測定した味覚項目は、酸味、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味コク、甘味の 9 種である。酸味は CA0 センサー、苦味雑味 (先味) 及び苦味 (後味) は、C00 センサー、渋味刺激 (先味) 及び渋味 (後味) は AE1 センサー、旨味 (先味) 及び旨味コク (後味) は AAE センサー、塩味は CT0 センサー、甘味は GL1 センサーを用いて測定し、補正式にもとづいてそれぞれの味覚の値を算出した。いずれも株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー製のセンサーである。

味覚センサーの標準液の調製、保存は、東京理化学器械株式会社製恒温恒湿器 KCL-2000W を用いた。

味覚センサーは、基準サンプルに対する相対値として、測定サンプルの味覚を数値化する。大手酒造会社の普通酒

は「厳格な品質管理をされているため味覚の変動が少ない」と仮定して、基準サンプルに用いた。

2.7 メタボリックプロファイリング

前処理は、文献³⁾を参考にして行った。2mL マイクロチューブに、清酒 70 μ L、水 430 μ L、リビトール水溶液 (1000 μ g/mL) 60 μ L、メタノール/クロロホルム溶液 (1:2) 900 μ L を入れ、サンプルホモジナイザーで、1600rpm、180秒振とうさせた。微量高速遠心機で 15000rpm、5 分間遠心分離を行い、上清 400 μ L を別の 2mL マイクロチューブに移した。3 個ほどの穴を開けたキャップをかぶせて、遠心エバポレーターで 30 分間濃縮を行った後、-80 $^{\circ}$ C で凍結させた。十分凍結させたサンプルを凍結真空乾燥機で乾燥させた。乾燥したサンプルにメトキシアミン・ピリジン溶液 (20mg/mL) を 50 μ L 加えて残渣を溶解させた後、恒温振とう培養機で、30 $^{\circ}$ C、90 分間オキシム化を行った。オキシム化終了後、速やかに MSTFA100 μ L 加えて、恒温振とう培養機で 37 $^{\circ}$ C、30 分間誘導体化を行い、試験溶液とした。

【GC/MS 条件】

GC/MS : HP 社製 HP6890 (MS:HP5973)

GC

スプリット Pulsed Split (ratio 25:1)

注入温度 200 $^{\circ}$ C

昇温条件 65 $^{\circ}$ C (2min) -@5-280 $^{\circ}$ C (2min)

カラム DB-5MS (0.25mm i.d. \times 30m, 0.25 μ m)

ガス流量 27.0mL/min (He)

注入量 1 μ L

2.8 データ管理

清酒サンプルが 130 サンプルで、測定項目が有機酸 12 項目、香り成分 9 項目、味覚成分 9 項目と合計約 12 万以上になる。しかもメタボリックプロファイリングを行うとさらに、多量のデータを取り扱うこととなる。これを、従来よく使われている Microsoft Excel といった表計算ソフトで管理すると、ファイル数が増えたり、一つのファイル容量が大きくなったりして非常に非効率的なため、ファイル形式のリレーショナルデータベースである Microsoft Access を用いて、新たに清酒データベースを構築した。UPLC, GC/MS, 味覚センサーで得られるデータは、すべて Excel 形式に変換可能な形式でエクスポートが可能である。VBA (Visual Basic for application) によるプログラムを適切に記載することによって、そのエクセルデータを Access のフォーム上から自動的にインポートした。この自動化によって、データ管理を非常に効率化できた。比較したいサンプルの必要なデータは、適宜エクセル形式にエクスポートし、レーダーチャートはエクセルで作成し、回帰分析や主成分分析は「R」を用いて行った。

3. 結果及び考察

3.1 ターゲット分析

清酒中の代謝産物の中から、あらかじめ 12 種類の有機酸、9 種類の香り成分、9 種類の味覚を選んで定量した。その合計 30 種類のどれとどれが相関あるかを、「すべて」、「出品酒」、「出品酒以外」、「純米系」、「純米系以外」、「吟醸系」、「吟醸以外」、「純米大吟醸」、「純米吟醸」、「大吟醸」、「吟醸」、「純米酒」、「本醸造」、「普通酒」、「特別純米酒」、「菩提もと純米酒」の 16 分類で単回帰分析を行った。

「苦味雑味：渋味刺激」、「酢酸イソブチル：酢酸イソアミル」、「苦味雑味：渋味」については、すべての分類で決定係数 0.52 以上の正の相関があった。またすべての分類ではないが、「酸味：旨味」、「渋味刺激：渋味」は決定係数 0.57 以上の負の相関があった。苦味雑味が増えると、渋味、渋味刺激が、酢酸イソブチルが増えると酢酸イソアミルが増す傾向にあることが分かった。また、酸味が増すと、旨味が減少する傾向にあることが分かった。旨味を増やすためには、酸味を抑えるというのも方法の一つと考えられる。

一方、出品酒に特徴のある組み合わせは「プロパノール：イソアミルアルコール」(決定係数；0.620)、「乳酸：ピログルタミン酸」(決定係数；0.608) で、正の相関があった。

有機酸 11 変数 (マロン酸がすべてのサンプルで検出されていないので、変数から外す)、香り 8 変数 (GC/MS の不具合により、出品酒のカプリル酸エチルを測定できなかったため、変数から外す)、味覚 5 変数 (後味、先味を一つとしたため、苦味雑味、渋味刺激、旨味コクを外す。また塩味は清酒の味覚としては不適當なので外す) を用いて、主成分分析を行った。

香り 8 変数で行った主成分分析の第 1 主成分、第 2 主成分の散布図を図 1 に示す。固有ベクトルから、第 1 主成分 (PC1) は、カプロン酸エチルが若干プラスに評価されて

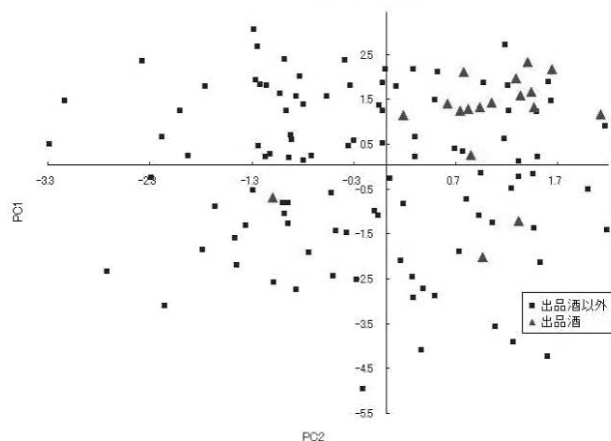


図 1 香り 8 変数による主成分分析

いるので、リンゴ様の吟醸香に関する香り、第 2 主成分 (PC2) は、カブロン酸エチル、酢酸イソアミル、酢酸イソブチル、酪酸エチルがプラスに評価されているので、エステルに関する香りが評価されている。散布図では、出品酒は PC1 と PC2 の正の領域に多くかたまっているが、出品酒以外は全体にまんべんなく広がっており、明らかな差が見られた。出品酒は、エステル系の香りを多く含む清酒である可能性がある。これは、出品酒は吟醸系の清酒が 19 サンプル中、14 サンプルと多いためであると考えられる。有機酸 11 変数と味覚 5 変数による主成分分析では、出品酒とそれ以外で明確な差は見られなかった。

3.2 メタボリックプロファイリング

ターゲット分析では、味覚及び有機酸成分のそれぞれのカテゴリー中での相関は見られたが、有機酸成分と味覚成分の相関、香り成分と味覚成分の相関は見られなかった。また、主成分分析でも第 2 主成分までの累積寄与率が 80% に満たないことから若干データの信頼性に問題が残ったため、あらかじめ目的成分を決めずに、網羅的に代謝産物を測定するメタボリックプロファイリングを検討した。メタボリックプロファイリングのデータは、清酒中に含まれる水溶性の物質でオキシム化及び MSTFA で揮発する成分を GC/MS により測定して得られるものを採用した。アジレント社製 GC/MS の解析ソフトは、非常に古く、積分やライブラリー検索等の一括処理を行いくいたため、cdf 形式にデータをエクスポートして、そのデータを島津製作所製 GC-MS QP2010 に付属の GCMSSolution で読み込み、保持時間、積分処理、ライブラリー検索等の解析の一括処理を行った。得られたデータは、エクセル形式にエクスポートして、清酒データベースにインポートした。

GC/MS で得られたデータを使ってメタボリックプロファイリングをする際に、それぞれのピークの独立変数、従属変数を設定する必要がある。今回、我々は、保持時間を 1,000 倍した値を保持 ID とし、その保持 ID を独立変数とし、それぞれのピーク面積値をそれぞれのサンプルにあらかじめ入れてある内部標準物質のリピトールのピーク面積値で割った値の 10,000,000 倍をピーク面積比として、そのピーク面積比を従属変数とした。同じ代謝成分でもサンプル毎に保持時間は若干揺らぐため、単に保持時間を 1,000 倍しただけでは、同じ代謝成分でも異なる保持 ID になってしまうという問題が出てくる。そこで、一定の幅の保持 ID を抽出し、ライブラリー検索で同じ成分である保持 ID をすべて同じ保持 ID として補正した。また、ライブラリー検索では、マスパターンの類似度が一番高い成分が一位となってヒットするが、一位と二位が同じ類似度の場合、サンプルによっては、異なるライブラリー検索になる場合もあり、それらも考慮しながら保持 ID を修正する必要がある。これらの保持 ID の修正は、非常に手間と時間が

かかる作業であるが、VBA を駆使して、できる限り効率的に行えるようにした。そのようにして決定した保持 ID は 230 以上あり、すべての保持 ID を用いて、主成分分析を行っても、第 2 主成分までの累積寄与率が著しく低い結果しか得られなかったため、保持 ID の絞り込みを行った。まず、同じ保持 ID を持つサンプル数が 20 以上の保持 ID を選抜したところ保持 ID が 86 となり、その保持 ID とピーク面積比を使って主成分分析を行ったところ、第 2 主成分の累積寄与率が 37.5% と低かった。そこで、主成分の係数である Loadings の絶対値が 0.15% 以上の保持 ID を選抜し (保持 ID が 34 個)、同様に主成分分析を行っても、まだ累積寄与率が 80% 以上にならなかったため、Loadings の絶対値を一定以上の保持 ID を選抜して主成分分析を行い、第 2 主成分までの累積寄与率が 80% を越えるまで同様の作業を行った。その結果、保持 ID が 10 個になるまで絞り込むと累積寄与率が 85.7% となった。その 10 個の保持 ID のうち、8 個がアミノ酸に由来する成分であった。

第 1 (Factor1) 及び第 2 主成分 (Factor2) の Loadings を図 2 に示す。

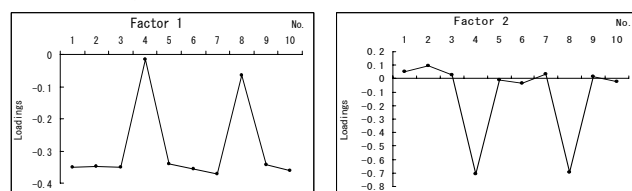


図 2 第 1 及び第 2 主成分の Loadings 値

第 1 主成分は No4 と 8 以外が負に寄与する成分を代表とし、第 2 主成分では No4 と 8 が負に寄与する成分を代表とする代謝成分であった。それぞれのサンプルの第 1 主成分の値を X 軸(PC1)に、第 2 主成分の値を Y 軸(PC2)にとった散布図を図 3 に示す。

図 3 に示すとおり、出品酒は青い点線に囲まれた領域、つまり PC1, PC2 ともに正の領域に集中しており、出品酒以外は赤い点線に囲まれた領域に集中している、完全ではないがほぼ分離した。以上の結果から、今回絞り込んだ 10 個の保持 ID が味覚の優れた清酒に特徴的な代謝産物として、選抜マーカーと決定した。

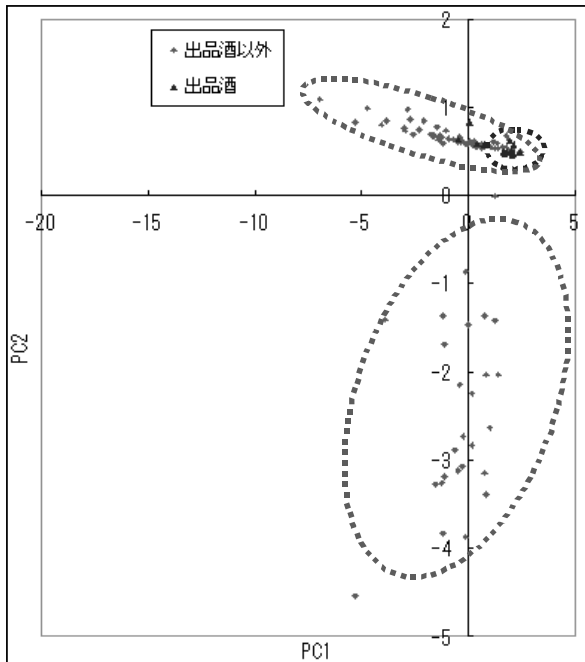


図 3 出品酒及び出品酒以外の散布図

3.3 選抜マーカ-の評価

試験管培養したサンプル及び小仕込み試験で得られた清酒について、同様にメタボリックプロファイリングを行い、10個の選抜マーカ-を用いて、主成分分析を行った。それぞれのサンプルの第1主成分の値をX軸(PC1)に、第2主成分の値をY軸(PC2)にとった散布図を図4に示す。また、試験培養液と小仕込み試験で得られた清酒がプロットされた拡大図を図5に示す。

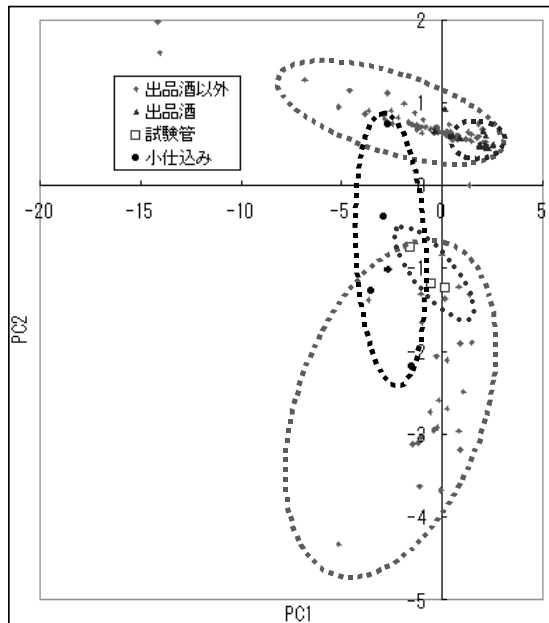


図 4 散布図

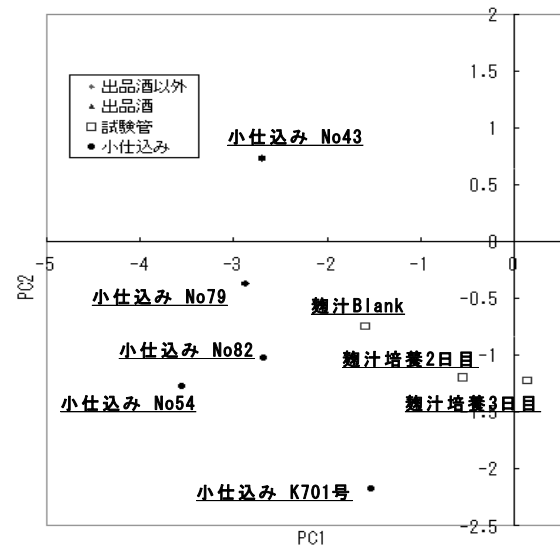


図 5 拡大図

図5に示すように、K701を使用した培養2日目と3日目で小仕込み701号は離れた場所に位置していて、それほど相関性がなかった。これは、試験管培養では試験管の形状から、 α 化米や乾燥麹米を加えることができないためと考えられる。このことから、試験管培養でのスクリーニングは困難と判断した。小仕込み試験は、総米200gといった簡易な小仕込み試験であり、大きなタンクを使った小仕込み試験に比べて、操作が非常に簡便で手軽に試験可能であり、スクリーニングとして最適な方法と考えられる。

図4に示すとおり、試験管培養及び小仕込み試験は、香り及び味覚の優れた清酒である出品酒と離れたところに位置していること、官能検査でも優れた清酒とはいえないことから、今回の選抜マーカ-は、ネガティブな評価であるが、マーカ-として利用可能であることが分かった。

3.4 今後の課題と問題点

今回得られた選抜マーカ-でポジティブなスクリーニングが可能かが不明であった。今後、新たに得られる酵母を使って醸造し、官能検査でも味覚の優れた清酒をつくり、このマーカ-が適用できるかを調査する必要がある。

4. 結言

香り及び味覚の優れた清酒と奈良県内で市販されている清酒をメタボリックプロファイリングにより、解析したところ、味覚の優れた清酒に特徴的な代謝産物を10成分まで絞り込んだ。その代謝産物を選抜マーカ-として、試験管培養液及び新たに得られた酵母を使って小仕込み試験を行ったサンプルを用いてメタボリックプロファイリングを行い、酵母の評価を行った。その結果、ネガティブな評価は可能であることが分かった。

参考文献

- 1) 国税庁ホームページ
[http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gai-kyo/shiori/2008/pdf/06.pdf#search=酒類販売\(消費\)数量の推移](http://www.nta.go.jp/shiraberu/senmonjoho/sake/shiori-gai-kyo/shiori/2008/pdf/06.pdf#search=酒類販売(消費)数量の推移)
- 2) 財団法人 秋田経済研究所「あきた経済」平成 19 年 8 月号(No.339) : 若年層の清酒アンケート調査
http://www.akita-bank.co.jp/houjin/keiei/keizai/tyousa_topic/190803.html
- 3) W. Pongsuwan *et.al.*, Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting, *J. Agric Food Chem.*, 55, 231-236 (2007) .