

## 小課題名「新しいアルコール飲料の開発」

### 研究の背景とねらい

新しいアルコール飲料の特徴は、従来の評価基準である味のキレイさや香りの高さではなく、近年の食生活の変化等に対応した味に巾があり、肉料理等に負けない酒質のものである。研究課題としては、清酒の新しい個性を発揮させるべく酸味と苦味に特徴があるアルコール飲料の開発を目標とした。具体的には、清酒の酸味・苦味（コク）など今まで未開発であった部分への研究を進め、最終的にはすべての成果を融合し新しいアルコール飲料の開発を行う。試醸酒は市場調査を行い消費者動向の把握を行う。また、研究の独自性を確保するため、多方面からの特許取得を目指し、開発酵母の特性はジーンライブラリーとして確立する。

### 共同研究の体制と役割分担

研究者名：河東田茂義（山形大学農学部）、和田弥寿子（和田酒造合資会社）森岡裕人、小関敏彦、松田義弘、飛塚幸喜、石垣浩佳、工藤晋平、安食雄介、村岡義之（山形県工業技術センター）

### 研究の経緯

#### （フェーズ の段階）

- 平成 10 年 シクロヘキシミド耐性株から高リンゴ酸生産酵母の分離開始  
チロシン合成系の変異株を分離するためにさまざまなアミノ酸アナログを用い選抜開始。また、チロソール定量法の確立を目指す。  
センター所有、高酢酸イソアミル生成酵母の遺伝子 LEU4 の解析開始。
- 平成 11 年 清酒中の血栓溶解酵素ウロキナーゼ活性化促進物質の探索・精製を開始。  
ガクソロ分析によるピークのグルーピング特性判定法の研究開始。  
高リンゴ酸生成酵母 A37 株の取得、チロソール定量法の確立
- 平成 12 年 チロシンアナログの 2-フルオロ-L(-)-チロシンから高チロソール生産酵母分離。A37 の改良株 2408 の実用化に向けた改良試験の開始

#### （フェーズ の段階）

- 平成 13 年 2408 の改良株 2408-2 を用い試験醸造。結果を踏まえ希望する県内酒造メーカー12 社に酵母を頒布し試験醸造を行った。チロソール高生産酵母の特性の固定化試験と最適醸造方法の検討(TY24 株を選抜)。LEU4 遺伝子の解析完了  
NF1-1 株のアルコール発酵能試験開始。
- 平成 14 年 高リンゴ酸清酒の市場調査・試験販売、2408-2 株の泡なし株の分離開始  
高チロソール生産酵母 TY24 株による試験醸造と貯蔵・ろ過試験

高チロソール生産酵母の ARO 遺伝子の解析開始。

酸味・苦味(チロソール)双方の特性を持つ酵母の開発開始

平成 15 年 TY24 株の 2 回目の試験醸造

好氣的エタノールの製造

## 研究成果

(フェーズ )

- i. 高リンゴ酸生成酵母を用いて、工業的規模により試験した結果、リンゴ酸に富むアルコール飲料を得た。
- ii. 芳香族成分を産生する酵母を取得した。さらに、その呈味成分の定量的分析法及び香気成分の精密な分析手法を確立し、酒質評価の新たな基準の可能性を予見した。

(フェーズ )

- i. 高リンゴ酸酵母(2408-2 株)は、酸度が高い特徴に加え、対象となる酵母(協会7号)の約3倍量(1,000ppm程度)のリンゴ酸を生成する。特性試験やパイロットスケールでの仕込み試験から実用に耐えうる酵母であると確認された。また、作業の利便性やタンク効率の向上を目的として、同酵母の泡無し株を作成した。
- ii. 平成13年度には県内酒造メーカー12社による試験醸造を実施した。その結果、原料米の品種や精米歩合、異なる仕込み配合、仕込み条件に関わらず、安定してリンゴ酸を高生産することが確認された。12メーカーのリンゴ酸量の平均は  $1010 \pm 140$  ppm であり、これは通常の清酒の3倍以上である。
- iii. さらにインターネット上でモニターを募集し、アンケート調査(有効数401)を実施した。また、東京、仙台、山形の3会場において試飲アンケート調査(有効数316)を行った。その結果、いずれのアンケート調査においても、約半数の方が「日本酒でも白ワインでもない新しいアルコール飲料である」と評価した。これは、研究目的である「新しいアルコール飲料の開発」の目指すところであり、市場調査より成果を確認することが出来た。現在は、得られたデータをもとに酒質の改良を行った。
- iv. 酸味・苦味双方の特性を持つ酵母の開発に関しては、酵母の選抜を進めている。
- v. 高リンゴ酸酒を開発する過程で、変異原処理により、好氣的に高エタノール発酵能を有する新規の清酒酵母変異株 NH1-1 株を取得した。この変異株を用いて好氣的条件下において廃棄農産物バイオマスを用いてエタノール発酵を行うことにより、高生産のエタノールの製造が可能である。また、高品質の果実などを用いることにより、新たなアルコール飲料が開発可能である。
- vi. 高チロソール(苦味)生産酵母に関しては、チロソールの定量法の検討を加えながら、チロソール生成に関係すると思われるアミノ酸生合成系中のアミノ酸アナログを各種用意し耐性株の分離を行った。定量法についてはベンジルアルコール10%を内部標準とする酢酸エチルによる抽出法を確立し、酵母開発では2-フルオロ-L(-)-チロ

シンから高チロソール生産能を持つ酵母を 24 株分離した。

- vii. 発酵力や特性の安定等の試験を行った結果、最も実用性のある高チロソール生産酵母として TY24 株を選抜した。TY24 株を使用して、段仕込みの検討を行った。
- viii. 遺伝子解析では、香気関連遺伝子である LEU4 の解析が終了し、現在チロソール関連遺伝子である ARO の解析が進んでいる。

#### 成果とその意義

- i. 高リンゴ酸酵母は平成 14 年春に 3 社から試験販売が開始され、平成 15 年春には 7 社 8 銘柄に販売が拡大している。現在も県内酒造メーカーにおいて試験醸造を行っており、市場調査から得られたデータをもとに酒質の改良を行い、更に販売方法等についても検討を加えている。
- ii. 苦味(高チロソール生産)酵母は、平成 14 年 1 月に特許出願を行い、平成 15 年度は高リンゴ酸酵母と同様に県酒造組合の協力を得ながら試験醸造を行う予定である。また、得られた試験醸造酒を用いて高リンゴ酸清酒と同様に市場調査を行う準備も進んでいる。
- iii. このように、本研究成果である高リンゴ酸清酒・高チロソール清酒は、確実に製品化がはかられており(予定も含む)、吟醸酒や純米酒等の高級酒の販売量が多い本県酒造業界や清酒市場の活性化に大きく貢献するものと期待できる。また、高リンゴ酸・高チロソール双方の特性を持つ清酒への期待も大きい。
- iv. 開発清酒の評価法においても、これまでのカプロン酸エチルや酢酸イソアミル等を代表とする単一ピーク評価法でなく、特性を総合的に判断しようとした点で新規性があり有効であった。
- v. 遺伝子解析では、香気関連遺伝子である LEU4 の解析が終了し、現在チロソール関連遺伝子である ARO の解析が進んでいる。その後はリンゴ酸関連遺伝子の解析も行う必要がある。現在、P.A.の問題がありなかなか組換え酵母を実用することは難しいが、それらが解決なされた時点でいち早く個性的な酵母を開発できる手段として、ジーライブラリーを構築することは大変有効である。

#### 今後の研究展開

最終的な目標は、酸味と苦味双方の特徴を持つ清酒の開発である。(単独酵母で目的とする特性を表現できれば良いが、出来ない場合、複数酵母の混合発酵や生成酒のブレンド等についても検討する必要がある。)製品の市場評価を高めるため徹底的な市場調査を行い、適性なアルコール濃度、比重(日本酒度)等、また、発泡性の有無についてもこれから検討を加える必要がある。

特性を示す遺伝子のカセット化については、開発した酵母の遺伝子解析率が低く今後と

も努力を継続し、遺伝子ライブラリーを構築する。最終的には、香りの遺伝子カセット、リンゴ酸の遺伝子カセット、苦味の遺伝子カセットを用意し、酵母にそのカセットを挿入すると目的の特性が発現するという様なレベルにまで完成させる。

【成果を表す具体的な図表】

開発した高リンゴ酸生産酵母の特性を表 1 に示す。

表 1 有機酸分析

	リン酸	クエン酸	ピルビン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸
K7	240	130	60	300	510	490	80
A37	300	190	80	1000	580	440	10
2408	300	130	80	830	450	400	30
2408-2	270±70	110±20	180±70	1010±140	510±70	480±100	±0

(ppm)  $n=12$

(K7：清酒酵母、A37：平成 11 年試験醸造酵母、

2408：平成 12 年試験醸造酵母、2408-2：平成 13 年試験醸造酵母)

試醸した高リンゴ酸清酒のアンケート調査結果を表 2，3 に示す。

表 2 アンケート調査

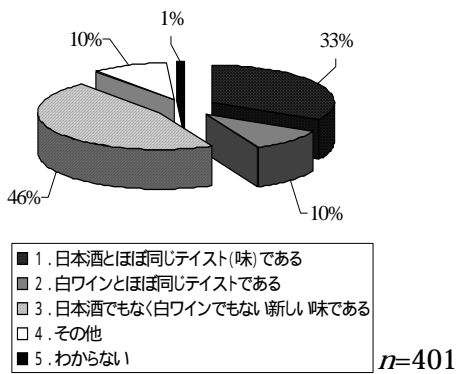
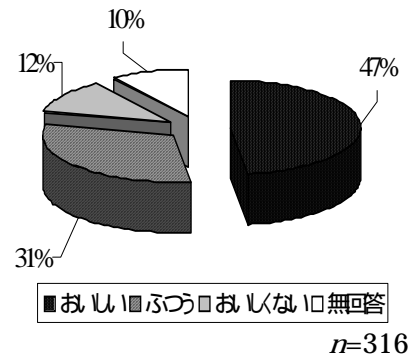
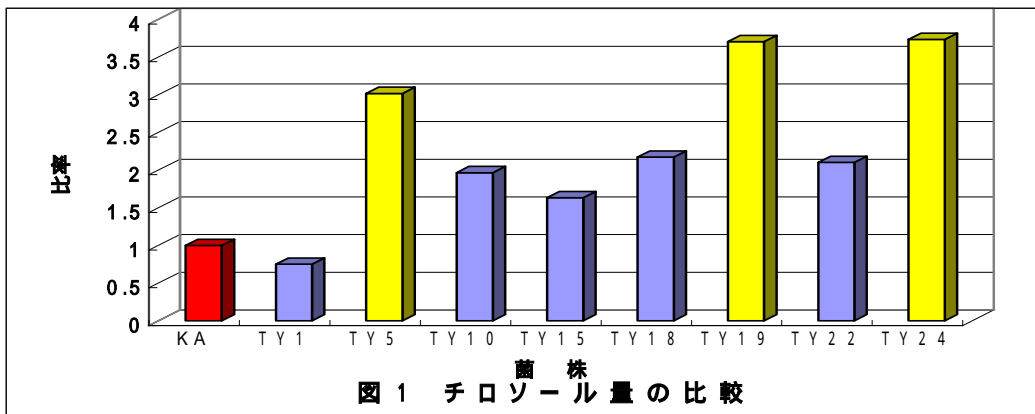


表 3 アンケート調査



親株 (KA) と比較した開発酵母のチロソール生産量の比較を図 1 に示す。



総米 100 Kg で行った高チロソール生産酵母の試験醸造結果を図 2 , 3 および表 4 に示す。

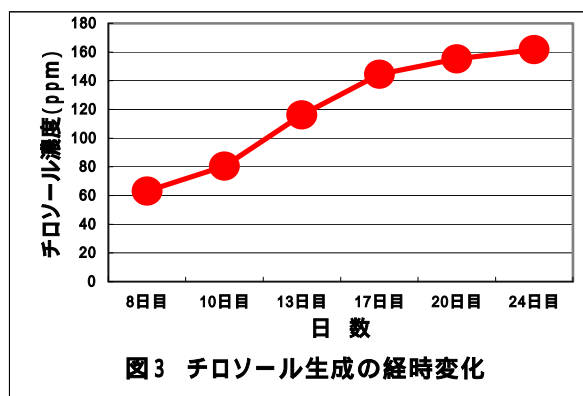
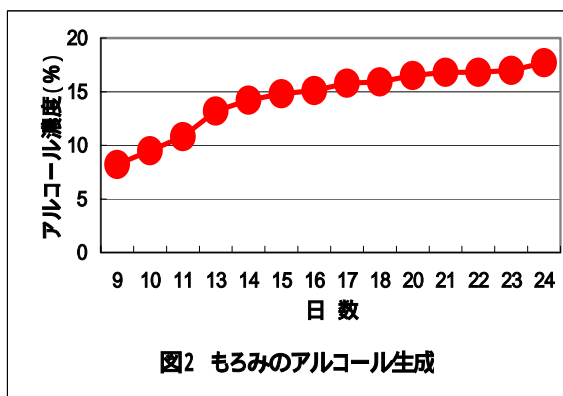


表 4 高チロソール生産酵母使用の上槽時の一般成分

日本酒度	アルコール (%)	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	チロソール (ppm)
+3	17.7	2.58	1.58	161.76

当センター所有の高酢酸イソアミル生成酵母 YK2911 の LEU4 遺伝子のホモロジーとヘテロデュプレックス解析を図 4、5 に示す。

1st Nucleotide Sequence : K9  
 2nd Nucleotide Sequence : YK2911

```

1441' AGTTTAGTCAATTATAATGTTGAAAAATTCGGCACTGAACGTAGAGTGTTCACTGGGCAA
*****
1441" AGTTTAGTCAATTATAATGTTGAAAAATTCGGCACTGAACGTAGAGTGTTCACTGGGCAA

1501' GTCAAAGTAGGCGACCAGATCGTTCGATATTGAAGGTACAGGTAATGATCCAATCTCTTCT
*****
1501" GTCAAAGTAGGCGACCAGATCGTTCGATATTGAAGGTACAGGTAATGATCCAATCTCTTCT

1561' TTGGTCGACGCCCTATCAAACCTGTTGAACGTGAGATTTGCCGTAGCAAACCTACACAGAG
*****
1561" TTGGTCGACGCCCTATCAAACCTGTTGAACGTGAGATTTGCCGTAGCAAACCTACACAGAG
    
```

Gly  
G  
 Asp  
A

[ 1859 bp / 1860 bp match ]

図 4 LEU4 遺伝子解析

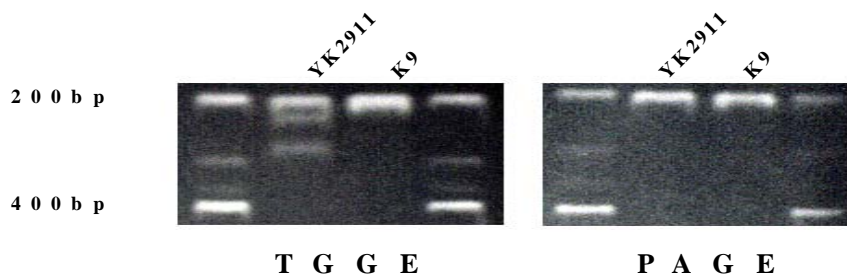


図 5 ヘテロデュプレックス解析