



〈特集：ワークショップ（第33回年次学術集会より）〉

バイオ技術を活用した育種酵母による新たな酒造りを目指して

竹川 薫

Studies on the breeding of yeasts suitable for Shochu-brewing

Kaoru Takegawa

Summary Shochu, a traditional Japanese distilled spirit, is produced from various ingredients, including sweet potato, barley, rice, buckwheat, and crude cane sugar. Excluding ethanol, the volatile components in Honkaku-shochu are usually present at less than 1%, but the differences among these compounds distinguish the flavour of Honkaku-shochu. After distillation, Honkaku-shochu is often diluted to an alcohol content of approximately 15% or less, consistent with a consumer preference for drinking spirits with lower alcohol strength in recent years. Therefore, it is important to identify and increase the proportion of volatile components that contribute to the taste of Honkaku-shochu under actual drinking conditions. We have comprehensively investigated the trace volatile components contained in barley Honkaku-shochu and identified those that most influence its taste. In this review, we explore the effects of indole on the sensory characteristics of barley shochu.

Key words: Honkaku-shochu, Indole, Volatile components

I. はじめに

日本の伝統的な蒸留酒である本格焼酎は、サツマイモ、麦、米、ソバ、サトウキビ糖など、様々な原料から製造される。長い間九州地域を中心に消費されてきた焼酎は、幾度かの焼酎ブームを経て全国に広く認知され、消費されるようになってきた。焼酎は、酒税法では甲類と乙類の2つに大別される。甲類焼酎は、連続式蒸留機で何度も蒸留を繰り返したものでエタノール以外の成分がほとんど分離除去されている。一方、乙類焼酎は、単式蒸留機（ポットスタイル）を用いて作られており、エタノール以外の成分も完全には除去されないため、産地や原料によっ

て独特の風味を有している。甲乙という分類呼称は、乙類が甲類に劣ると誤解される恐れがあり、1962年から「本格焼酎」という呼称の併記が認められた。1970年代後半は、芋焼酎やそば焼酎が認知されはじめた時期であり焼酎ブームが始まったが、焼酎の販売数量を大きく飛躍させたのは、1982年頃から1985年にかけて麦焼酎や甲類焼酎のすっきりとした飲みやすさが消費者に広く受け入れられたことが大きく貢献したといえる。その後、2003年から2007年の焼酎ブームにおいては、既に健康志向と多様性が認められていた焼酎の中で、新しい芋焼酎がブームを牽引した。この時期にアルコール度数を加味した本格焼酎の消費数量は、清酒の消費

九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門
〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡744

連絡先：竹川 薫
Tel: +81-92-802-4732

E-mail: takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp

Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate
School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences,
Kyushu University
744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

数量を上回り、事実上日本の蒸留酒として広く浸透した。しかし、2010年代以降、単式蒸留焼酎の消費数量は、徐々に減少する傾向になっており、焼酎市場は、新たな局面を迎えつつある。市場の縮小や若者のアルコール離れが広がる中、アルコール市場の競争激化は今後も継続していくことが予測されるが、本格焼酎が今後も市場を獲得していくためには、新たな価値観を提案していくことが必要となっている。その1つが低アルコール飲料である。

焼酎の製造は通常、黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) によって生産されるクエン酸の存在下で、糖化と発酵を同時に行うことによって行われる。発酵終了後のもろみを蒸留することで、アルコール度数約35%~45%の原酒が得られ、ほとんどの焼酎完成品はアルコール度数20~25%に調整されて販売される。エタノールを除いた揮発性成分は通常1%未満であるが、揮発性成分の違いによって本焼酎の風味が異なる。本格焼酎は、揺動、水割り、湯割りなどの方法でアルコール度数が約15%以下の低アルコールに希釈されることが多く、近年ではアルコール度数の低い蒸留酒が好まれる傾向にある。本格焼酎は蒸留酒であるため、醸造アルコール飲料に含まれるような糖類や有機酸などの一般的に知られている呈味成分は一般的に含まれていない。嗜好成分を後から添加することは法律で禁止されているため、アルコール度数の低い蒸留酒を飲む際には、風味を保つことが非常に重要である。そこで実際の飲用条件下で、本格焼酎の味覚に寄与する揮発性成分を増加させることが重要である。本格焼酎の香気成分については原料別によく研究されており、芋焼酎ではモノテルペンアルコール、 β -イオン、ジアセチルあるいは β -ダマセノンといった成分が特徴成分として報告されている^{4,5)}。また、泡盛については、熟成期間において変化する4-ビニルグアイアコールや脂肪酸エチルについてよく研究されている^{4,5)}。大麦焼酎において2-ペンチルフランが特徴的に含まれることなどが報告されている⁶⁾。

本格焼酎の一種である麦焼酎に含まれる微量揮発成分を、三和酒類株式会社の梶原らは網羅的に探索した。その結果、数百種類の揮発成分を米国国立標準技術研究所 (National Institute

of Standards and Technology, NIST) の標準物質と照合し、麦焼酎に含まれる一部の揮発性化合物との添加試験を行った結果、数種類の化合物が麦焼酎の味に影響を与える性質があることがわかった (梶原ら：未発表)。本研究では、これらの化合物の中から麦焼酎の官能特性に特徴的な味を付与する化合物「インドール」の影響を調べた。

II . 低アルコール麦焼酎の生産技術開発

本格焼酎は、通常25%のエタノールの他、1%以下含まれる微量香気成分によって香味が形成される。焼酎は通常、25%のエタノール濃度で販売されているが、味わう際には水割りやお湯割りなど薄めて飲む場合が多い。そのため、焼酎飲用者の低アルコール志向が進む中、焼酎の香味の強化が必要とされている。これまで本格焼酎の香気成分に関する研究は多いが、その官能特性として「風味 (嗅覚を加味した味覚)」に着目した研究はほとんどない。そこで、麦焼酎を希釈しても呈味性を示す、微量香気成分について三和酒類 (株) と共同で検索を行った。その結果、環状化合物インドールが呈味性を有する可能性を見出した。そこで、官能特性とともに、大麦焼酎製造工程におけるインドールの生成要因を明らかにし、焼酎原酒中のインドール含量制御技術の確立を試みた。

1. 微量香気成分“インドール”が焼酎の官能特性に及ぼす影響

本格焼酎は、原料由来の香味が豊かな官能特性を有しているが、その特性はわずか1%以下の香気成分によって構成されている。我々は、大麦焼酎に含まれる香気成分を幅広く探索し、それらの中から呈味性を検討したところ、インドールが呈味性を有する可能性を見出した。まず、標準的な香気成分を持つ銘柄の市販大麦焼酎に対するインドールの閾値測定を行った。大麦焼酎に含まれるインドールの定量は、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (Agilent社製) を用いて行った。香り及び味 (風味) の最良推定閾値については、ASTM E679-91「強制選択による上昇系列の閾値測定法」⁷⁾により測定を行った。すなわち、香りの検知閾値については15.8~

Table 1 Detection threshold value of indole in barley shochu (25% alcohol)

	Odor ($\mu\text{g/L}$)	Flavor ($\mu\text{g/L}$)
Detection threshold value	120	18

Table 2 Effects of added indole concentration on the flavor of barley shochu

Added indole concentration ($\mu\text{g/L}$)	Comments in comparison with the control (n=11)	
	Taste	Aftertaste
0.05	sweet 2, koku, mellow	dry 2, pungent, koku
0.5	koku 5, sweet 3, rich, mellow	bitter 2, koku 2, dry 2, pungent, rich, mellow
5	koku 4, sweet 2, dry, mellow, strong	koku 4, bitter 3, sweet 2, mellow 2, pungent, strong
50	koku 4, mellow 4, sweet 2, bitter 2, mild, oily	bitter 4, koku 3, mellow 2, pungent 2, soft and rich, less bitterness, mild, oily, sweet, dry
500	bitter 2, mellow 2, pungent 2, koku, dry, oily, astringent	bitter 5, dry 5, astringent 2, koku, soft and rich, less bitterness, oily
5,000	bitter 3, dry 2, chemical 2, koku, pungent, astringent, mellow	bitter 5, dry 5, astringent 2, chemical 2, smells like a marker pen, mild

504 $\mu\text{g/L}$ の範囲で2倍ずつ6段階にインドールの添加濃度を変えたサンプルを調製し、3点識別法を実施した。味(風味)については、1.11~90 $\mu\text{g/L}$ の範囲で3倍ずつ5段階でインドールの添加濃度を変えたサンプルを調製し、3点識別法を実施した。検知閾値を測定した結果をTable 1に示す。Table 1に示したように、インドールの香りの閾値は120 $\mu\text{g/L}$ 、風味の閾値は18 $\mu\text{g/L}$ と見積もられた。次に、市販大麦焼酎にインドールを様々な濃度で添加して、官能評価に及ぼす影響を検討した結果をTable 2に示した。市販の大麦焼酎に対し、インドールを濃度0.05~5,000 $\mu\text{g/L}$ の範囲で添加し、サンプルを調製した。官能評価に当たっては、ノーズクリップは装着せずに、先味と後味についてそれぞれ風味とテクスチャーを評価し、パネリストは無添加サンプルと添加サンプルとの間に感じた差異のみを記述した。なお、ここではサンプルを口に含んだ時に感じた味(風味)を「先味」、吐出後に口中に残った味(風味)を「後味」と定義した。試験には上記パネリストのうち11名が参加した。先味については0.5~50 $\mu\text{g/L}$ の範囲において複数のパネリストが「甘味」や「コク」が強化されていることを指摘しており、特に「コク」については11名中4名以上のパネリストが指摘していた。50 $\mu\text{g/L}$ 以上になると「苦味」の指摘が増加し、500 $\mu\text{g/L}$ 以上では「コク」

の指摘は減少していた。「コク」あるいは「コクミ」という表現は、本格焼酎の官能評価用語としても用いられるが、一般には、概ね複雑さを伴った香味の調和を意味する良好な特性として捉えられている。

インドールが大麦焼酎に「コク」を付与するメカニズムは明らかではないが、上記の結果から、インドール自体は、本質的に「苦味」の特性を有しているが、0.5~50 $\mu\text{g/L}$ の低濃度範囲では、本格焼酎に適度な「苦味」を付与することで香味の調和をもたらす「コク」を強化していることが考えられた。ピラジンや2-アセチルフラン、2-エチルヘキサノールあるいは1-オクテン-3-オールといった揮発成分が食品にコクを付与することが知られている⁸⁹⁾ため、インドールも何らかの香味修飾効果を有している可能性も示唆された。また、後味については、0.5~50 $\mu\text{g/L}$ の範囲で複数のパネリストが「コク」について指摘した。「苦味」に関しては0.5 $\mu\text{g/L}$ から複数のパネリストが指摘しており、濃度が高くなるほど指摘するパネリストが増加する傾向にあった。500 $\mu\text{g/L}$ 以上では半数近くのパネリストが「辛味」との指摘をしていた。

2. インドール誘導体が大麦焼酎の官能特性に及ぼす影響

L-トリプトファン (Tryptophan, Trp) は、イン

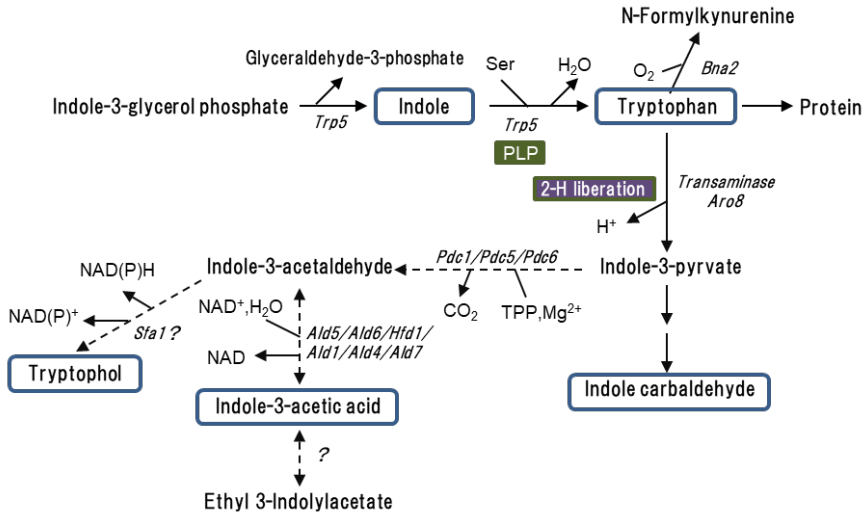


Fig. 1 Metabolic pathway of indole in yeast

ドールを経て生合成されるアミノ酸であり、その構造にはインドール環を有している。Trpは、苦味を呈することが知られているため、インドールの官能特性がTrpの呈味性と関連性があるかどうかを検討した。Fig. 1に示したようにTrpの生合成、代謝経路においてインドール環を持つ化合物としてインドール3-アルデヒド、インドール3-酢酸、トリプトフォール等が存在する。それらの化合物を大麦焼酎に0.5及び2.0 $\mu\text{g/L}$ 濃度で添加し、官能特性を評価した。Table 3に示したように、いずれの化合物も2.0 $\mu\text{g/L}$ の添加濃度で何らかの官能特性を有している可能性が示唆された。今回試験した範囲では、蒸留酒用酵母のみで検出されるという結果となった。原因は明らかではないが、酵母の種類によってインドール生産能が異なっていたことから、酵母の遺伝的背景が関係していることが示唆された。

3. 各種酵母が大麦焼酎製造工程のインドール生産に与える影響

大麦焼酎製造工程において、インドールがどのように生成しているかを検討したところ、蒸した麦や大麦麴からはインドールは検出されず、もろみ工程以降に検出されたことから、様々な酵母を用いてインドール生産の違いの有無を検討した。一次もろみは、20 gの大麦から製造した大麦麴に、24 mLの脱イオン水及びYPD培地(2%グルコース、2%ペプトン、1%酵母エキス、pH6.2)で2日間前培養した酵母を1仕込みあたり 2×10^8 cells加え、25°Cで4日間発酵させた。熟成もろみのインドール含量を測定した結果をFig. 2に示す。インドール含量については、焼酎酵母であるBAW6-SC2株、SH4-SC株、KoH14株及びウイスキー酵母NCYC87株及びDCL-M株でのみ検出されたが、その他の清酒酵母(K701株)、ビール酵母(IFO0234株、IFO2114株)、ワイン酵母(W3H3株、IFO2260株、AURI796株、CY3079株)や実験室株BY4947株では検出されなかった。イ

Table 3 Effects of indole derivative added on the sensory characteristics of barley *shochu*

Added concentration	0.5 $\mu\text{g/L}$	2.0 $\mu\text{g/L}$
Indole	Bitter, Astringent, Harsh	
Indole aldehyde	Bitter, Astringent, Harsh, Koku	Pungent, Alcoholic
Indole-3-acetate	Bitter 3	
Tryptophan	Mild 2	Mild, Smooth
Tryptophol	Bitter, Harsh	Bitter 2

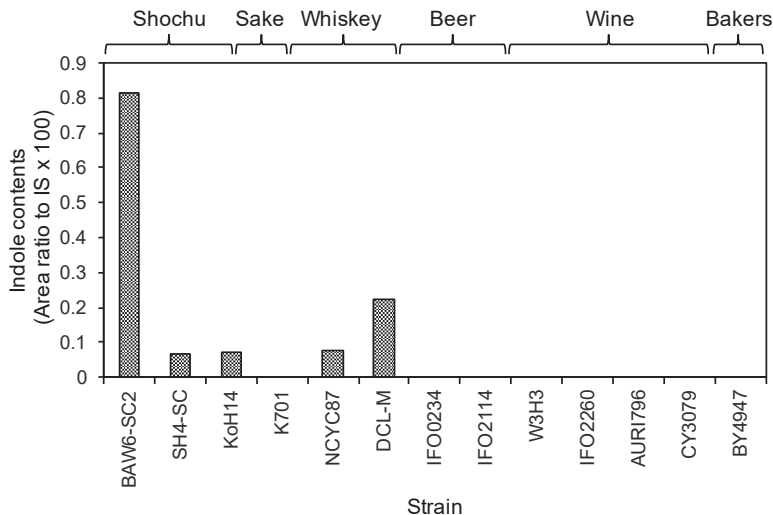


Fig. 2 Indole contents in barley shochu mash using different yeast strains.

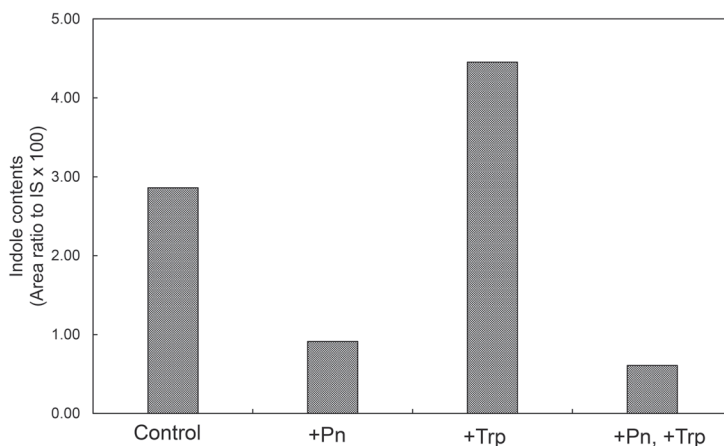


Fig. 3 Effects of Pyridoxine (Pn) or/and L-Tryptophan (Trp) to barley shochu mash on indole contents.

ンドールが検出された酵母の中では、BAW6-SC2株がもっとも高い値を示した。ビール風味飲料製造工程では、ビタミンB6が欠乏した際にTrp5pタンパクを介したインドールからTrpへの変換の反応が遅滞することによってインドールを蓄積する¹⁰⁾が、ビール発酵液に10 mg/L程度のビタミンB6類を添加することによってインドールのオフフレーバーを削減できることが知られている。大麦焼酎もろみにおいて、インドールの生産にビタミンB6やTrp濃度が関与しているかどうかを検討するために、大麦焼酎もろみの二次もろみにビタミンB6の一形態であるピリドキシン (pyridoxine, Pn)及びTrpの添加試験を行った。二次もろみは、一次もろみに40 gの大麦及び脱

イオン水66 mLを加え、25℃で9日間発酵させた (Fig. 3: control)。その結果、Trpの添加はインドール含量に大きな影響を与えなかったが、Pnの添加によって、インドールは無添加の約20-30%にまで減少していた (Fig. 3)。このことは、ビタミンB6類の添加が、大麦焼酎製造工程においてもインドール濃度を制御する重要な要因であり、少なくともBAW6-SC2株を用いた大麦焼酎もろみ中では、二次もろみにおいてインドールの代謝を一時的に停滞させる現象が生じており、その後、一定期間後に、同経路の代謝が回復あるいは別の経路によってインドール代謝機能が復旧していることが考えられた。

4. 焼酎酵母BAW6-SC2がインドールを高生産する原因の解析

もろみ中へのビタミンB6添加がインドール含量を低下させたことから、ビタミンB6を補酵素とするインドールからTrpへの転換の反応が関与している可能性が示唆された。そこで、特にインドール蓄積が多かった焼酎酵母BAW6-SC2株を中心として、同株がインドールを高生産する原因について諸検討を行った。まず、BAW6-SC2株のビタミンB6取り込みがインドール濃度に及ぼす影響を検討した。ビタミンB6トランスポーターとして知られているTpn1pはビタミンB6の触媒型であるピリドキサル5-リン酸(Pyridoxal-5-phosphate, PLP)を直接輸送できないことが知られているため¹⁰⁾、ピリドキサル(Pyridoxal, PL)、PLPを個別に添加した。またトランスポーターの拮抗阻害作用がある4-デオキシピリドキシニン(4-Deoxypyridoxin, dPN)についても添加した。その結果、PL、PLPのいずれももろみ中インドール濃度を低下させることが確認された。またdPNを添加した場合には、インドールが若干増加していた。次にPLPとdPNを同時添加した場合のインドール濃度の変化を調べた(Fig. 4)。その結果、PLP単独で添加した場合と比較して、dPNを同時添加した場合には、インドール含量が増加しており、特にもろみ後半になるほど顕著であった。これらの結果から、BAW6-SC2株のインドール蓄積には、もろみか

らのビタミンB6の取り込みが少なくとも影響しており、特にもろみ後半になるほど影響が大きくなっていることが明らかとなった。

さらに、焼酎酵母BAW6-SC2株がインドールを高生産する原因について解析するため、全ゲノムシーケンスを行い、Single-nucleotide polymorphism(SNP)解析を実施した。得られた約8,000個のSNP情報の中からインドール高生産に関与する可能性がある遺伝子を検索したが、残念ながら遺伝子の特定には至っていない。インドール高生産に関与する遺伝子、または酵素が特定できれば、ゲノム編集技術などを用いてインドール高生産株を育種できる可能性は高い。今後は焼酎酵母BAW6-SC2株がもつインドール高生産能に関与する主要原因となっている遺伝子について、さらなる解析が必要と考えている。

Ⅲ. まとめ

大麦焼酎をはじめとする本格焼酎の官能特性に及ぼす影響を評価した。インドール添加試験により、市販大麦焼酎における「香り」及び「風味」の閾値を測定し、さらにインドールの官能特性として焼酎の「コクや苦味」への寄与効果と、焼酎中の含有量の違いによる官能特性の差があることがわかった。インドールは香りの閾値よりも風味の閾値の方が約1/6も低いことか

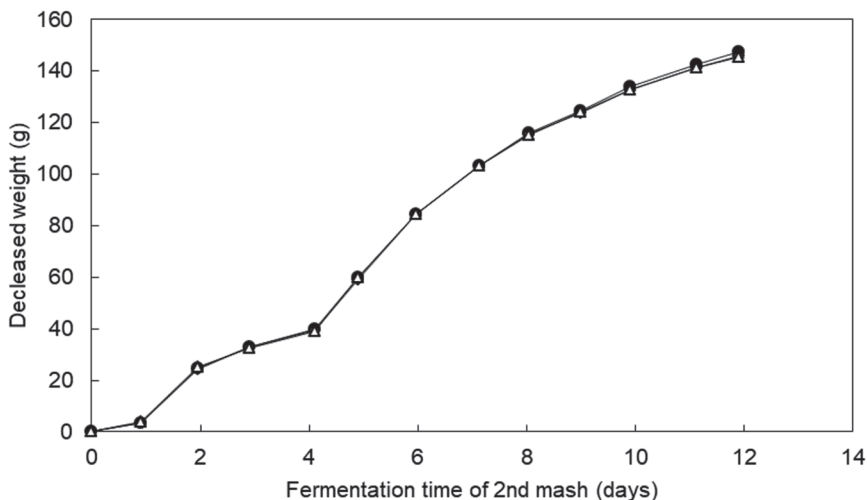


Fig. 4 Effects of addition of pyridoxal phosphate (PLP) and 4-deoxypyridoxin (dPN) on fermentation course of barley *shochu* mash. Each value is expressed as the average value and standard error of repeated two tests.

ら、インドールは大麦焼酎において、香りを感じる前に風味に影響を与えることが明らかとなった。インドールは非常に低い濃度（～約0.01%）ではジャスミンやチューベローズ様の強い花の香りを示し、1%以上の濃度では糞便腐敗臭を示すことが知られている¹²⁾。コーヒー¹³⁾やビール風味飲料¹⁴⁾においても不快臭として知られている。市販の大麦焼酎には香りの閾値よりも低い濃度でしかインドールは含まれないため、その不快臭を感じることは通常はないと考えられる。

これまでに大麦焼酎製造工程におけるインドールの生成経路について検討されていなかった。そこで、大麦焼酎製造各工程のインドール含量を検討した結果、大麦焼酎中のインドールは、原料大麦や麴由来ではなく、焼酎醪（もろみ）の発酵中に蓄積していることが示唆された。また、使用する酵母の遺伝的背景によってインドール蓄積量が異なることを明らかにした。今後はこれらの知見を利用して、低アルコール度数（10%）において従来技術の原酒よりも味の評価を高める麦焼酎原酒を開発することを試みている。

本研究は、三和酒類株式会社の梶原康博博士と共同で研究を行った。香味試験などにご協力いただいた三和酒類株式会社研究所の研究員に感謝いたします。

本論文内容に関連する著者の利益相反:なし

文 献

- 1) Ohta T, Ikuta R, Nakashima M, Morimitsu Y, Samuta T, Saiki H: Characteristic flavor of Kansho-shochu (Sweet Potato Spirit). *Agric Biol Chem*, 54: 1353-1357, 1990.
- 2) 神渡巧, 瀬戸口智子, 上田次郎, 吉永優, 緒方新一郎, 瀬戸口眞治, 高峯和則, 鮫島吉廣: 原料サツマイモの特性と芋焼酎の特徴香成分, *日本醸造協会誌*, 104: 49-56, 2009.
- 3) Yoshizaki Y, Takamine K, Shimada S, Uchihori K, Okutsu K, Tamaki H, Ito K, Sameshima Y: The formation of β -damascenone in Sweet Potato *Shochu*. *J Inst. Brew*, 117: 217-223, 2011.
- 4) Koseki T, Furuse S, Iwano K, Matsuzawa H: Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori*. *Biosci Biotech Biochem*, 62: 2032-2034, 1998.
- 5) 米元俊一: 本格焼酎の香味成分と美味しさ, *日本醸造協会誌*, 112: 96-107 2017.
- 6) 大石雅志, 猫垣加奈子, 梶原康博, 高下秀春, 下田雅彦, 岡崎直人: 大麦焼酎に含まれる香气成分の官能特性とその分類について, *日本醸造協会誌*, 108: 113-121, 2013.
- 7) ASTM, E679-91, Standard Practice for determination of odor and taste thresholds by a forced-choice ascending concentration series method of limits. *American Society for Testing and Materials*, 1991.
- 8) 齊藤知明: 食品のこくと、こく味, *日本味と匂学会誌*, 11: 165-174, 2004.
- 9) 早瀬文孝, 高萩康, 渡辺寛人: 調味液の加熱香气成分とコク寄与成分の解析, *日本食品科学工学会誌*, 60: 59-71, 2013.
- 10) 谷川篤史: ビール造りの研究とは?, *日本生物工学会誌*, 90, 242-245, 2012.
- 11) Stolz J, Vielreicher M: Tpn1p, the plasma membrane vitamine B6 transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 278: 18990-18996, 2003.
- 12) Clark GS: *Perfumer Flavorist*, 20, 21-24, 26, 28, 30-31, 1995.
- 13) Yang N, Liu C, Liu X, Kreuzfeldt T, Munchow M, Fisk I: Determination of volatile marker compounds of common coffee roast defects. *Food Chem*, 211: 206-214, 2016.
- 14) T. Arai: Analysis of the flavor compounds by brewing yeasts in insufficient nutrition. *ASBC Annual meeting*, 2009.