

## 研究論文

# 「あいちの地酒」に適した吟醸酵母の開発 -カプロン酸エチル高生産酵母の選抜-

三井 俊\*<sup>1</sup>、伊藤彰敏\*<sup>1</sup>、沖塚翔太\*<sup>1</sup>

## Development of Ginjo Sake Yeast for “Sake Brewed in Aichi Prefecture” -Selection of Ethyl Caproate High-Producing Sake Yeast-

Shun MITSUI\*<sup>1</sup>, Akitoshi ITO\*<sup>1</sup> and Shota OKITSUKA\*<sup>1</sup>Food Research Center\*<sup>1</sup>

カプロン酸エチルを高生産する愛知県産清酒酵母の開発を行った。食品工業技術センターが保有している県産清酒酵母 FIA1、FIA2 に変異処理を施し、セルレニン耐性を指標として約 150 株の一次選抜株を取得した。清酒小仕込試験を行い、カプロン酸エチル濃度及びアルコール分を指標として、二次選抜株 T22、T39 を取得した。両株共に FIA1 を親株としており、カプロン酸エチルを FIA1 の 4 倍以上生産した。これらの酵母を用いて、低温下で清酒小仕込試験を行った。その結果、T22 は高いカプロン酸エチル生成能を示したが、アルコール生成能が低下した。一方、T39 も高いカプロン酸エチル生成能を示したが、アルコール生成能の顕著な低下は認められなかった。

### 1. はじめに

愛知県の清酒生産の特徴として、吟醸酒等の特定名称酒比率が低く、普通酒比率が高い点が挙げられる。そこで、愛知県の特色・オリジナリティを活かした清酒の開発が県内清酒業界の課題となっている。このような背景から、食品工業技術センター（以降、当センター）では、これまでに県産麹菌や県産酒造好適米の開発・普及に取り組み、県内清酒業界の活性化に努めてきた。

現在の吟醸酒の主要香気成分はリンゴ様の香りの特徴とするカプロン酸エチルであり、吟醸酒製造においてはこのカプロン酸エチルを高生産する酵母が使用されることが多い。しかし、当センターが保有している愛知県産純米酒用酵母（FIA1）、吟醸酒用酵母（FIA2）は共にカプロン酸エチル生産量が少なく、主要香気成分はバナナ様の香りの特徴とする酢酸イソアミルである。そのため、現在の酒質のトレンドに見合った県産酵母の開発が県内清酒業界から望まれている。本研究ではカプロン酸エチルを高生産する愛知県独自の県産清酒酵母の開発を目標とした。

### 2. 実験方法

#### 2.1 供試菌株

当センターが保有している愛知県産清酒酵母 FIA1、FIA2 を使用した。

#### 2.2 原材料

原材料として、乾燥麹（60%白米、徳島製麹（株））及び乾燥 $\alpha$ 化米（60%白米、徳島製麹（株））を用いた。

#### 2.3 使用培地

酵母の培養は麹汁培地（ボーメ 5.0、pH4.0）を使用した。変異処理前後の生存率の評価には YPD 平板培地（酵母エキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2%、寒天 2%）、セルレニン耐性酵母の分離にはセルレニン 50  $\mu$  M 含有 YPD 平板培地を使用した。

#### 2.4 セルレニン耐性を指標とした一次選抜

セルレニン耐性酵母の分離は市川ら<sup>1)</sup>の方法を改変して行った。すなわち、FIA1、FIA2 を麹汁培地 5mL で 30°C、24 時間培養後、遠心集菌し、滅菌水で菌体を洗浄した。0.2M リン酸緩衝液（pH8.0）5mL を加えて懸濁し、40%グルコース 0.25mL 及びエチルメタンサルフォネート（EMS）0.2mL を添加し、30°C で 1 時間変異処理を行った。変異処理菌体を滅菌水で洗浄し、適宜希釈した後にセルレニン 50  $\mu$  M 含有 YPD 平板培地に塗抹して、30°C、約 1 週間培養した。生育してきたセルレニン耐性株のコロニーのうち、増殖が速く、コロニー径の大きい株を一次選抜株とした。また、変異処理前後の酵母数を計測し、生存率を算出した。

#### 2.5 清酒小仕込試験による二次選抜

総米 100g（乾燥麹 20g、乾燥 $\alpha$ 化米 80g、蒸留水

\*<sup>1</sup> 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室

180mL)、又は総米 150g(乾燥麹 30g、乾燥 $\alpha$ 化米 120g、蒸留水 240mL)の仕込配合とした。一次選抜株の前培養液 10mL を添加して、15°Cで 20 日間程度発酵させた。遠心分離 (8000rpm、20 分) にて上槽し、得られた上清液を製成酒とした。

## 2.6 二次選抜株の醸造特性評価

総米 100g の仕込配合で、二次選抜株の前培養液 10mL を添加して、10°Cで発酵させた。小仕込試験容器の蓋にピンホールを空けてガス放出口を設け、容器重量を測定し、重量減少量を炭酸ガス減量として発酵経過を比較した。対照酵母として、FIA1 及び既存のカプロン酸エチル高生産酵母 (高香気性協会酵母) を使用した。

醪日数 36 日目で遠心分離 (8000rpm、20 分) し、得られた上清液を製成酒とした。

## 2.7 製成酒の成分分析

アルコール分はアルコメイト AL-2 型 (理研計器 (株)) を用いて測定した。酸度、アミノ酸度及び香気成分は国税庁所定分析法<sup>2)</sup>に準拠して分析した。有機酸は、有機酸分析システム ((株) 島津製作所) で分析した。

# 3. 実験結果及び考察

## 3.1 セルレニン耐性を指標とした一次選抜

脂肪酸合成酵素の特異的阻害剤セルレニンに対して耐性を示す酵母の中にはカプロン酸エチルを高生産する酵母が存在することが報告されている<sup>3)~5)</sup>。FIA1 及び FIA2 に EMS による変異処理を施し、セルレニン含有 YPD 平板培地上で得られたセルレニン耐性株のコロニーのうち、増殖が速く、コロニー径の大きい株として、FIA1 より 107 株 (T1~T107)、FIA2 より 62 株 (F1~F62) の一次選抜株を取得した。本変異処理条件での酵母の生存率は FIA1、FIA2 両株共に 0.8~5%であった。

## 3.2 清酒小仕込試験による二次選抜

FIA2 に関しては総米 150g の仕込配合で実施した。FIA2 の一次選抜株 F1~F62 における製成酒の成分分析を行ったところ、すべての菌株で親株 FIA2 を用いた仕込試験区 (以降、FIA2 区。他の菌株も同様) の製成酒より酸度が高くなる傾向が認められた。FIA2 は酸生成能が比較的高い酵母である。一般的に吟醸酒製造には低酸性の酵母が使用される。FIA2 を親株とした選抜株は全て酸生成能が高まり、吟醸酒製造に適さないものと判断した。

FIA1 に関しては総米 100g の仕込配合で実施した。FIA1 の一次選抜株 T1~T107 に関して、製成酒のカプロン酸エチル濃度、アルコール分を測定した。その結果、一次選抜株 107 株のうち、製成酒のカプロン酸エチル濃度が親株 FIA1 区の 2 倍以上高くなる試験区が計 10 試

験区 (T15、T22、T39、T51、T53、T63、T72、T78、T90、T93) 得られた (図 1)。特に T15、T22、T39、T53、T78 の 5 株の試験区の製成酒に関しては、カプロン酸エチル濃度が FIA1 区の 4 倍以上高くなった。しかし、これらすべての菌株の試験区の製成酒で FIA1 区よりアルコール分が低下した (図 2)。よって、FIA1 は EMS による変異処理の影響でアルコール生成能が低くなることが推測された。

以上、カプロン酸エチルを高生産する 5 株のうち、製成酒のアルコール分が 18%以上となった T22、T39 を二次選抜株とした。

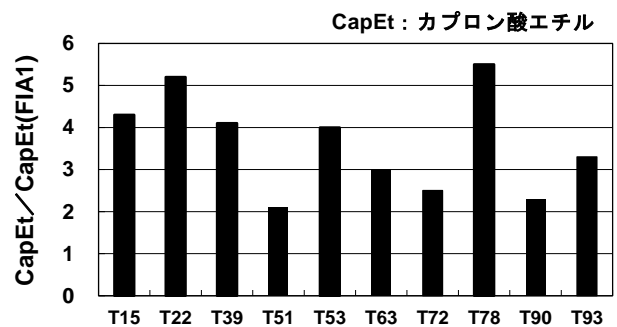


図 1 製成酒のカプロン酸エチル濃度の比較 (FIA1 による生成濃度に対する相対値)

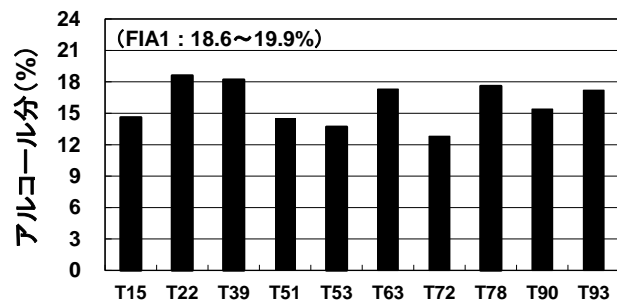


図 2 製成酒のアルコール分の比較

## 3.3 二次選抜株の醸造特性評価

### 3.3.1 発酵経過の比較

清酒醪では発酵に伴って炭酸ガスが生成し、それが揮散することで醪重量が減少する。重量減少分を炭酸ガス減量として測定することにより、発酵経過の指標とすることができる。炭酸ガスの減量経過を図 3 に示す。T22 区は FIA1 及び高香気性協会酵母の試験区と比較して発酵初期から中期にかけての炭酸ガス減量速度が小さく、最終的な炭酸ガス減量も少なかった。このことから、T22 を用いた醪は発酵経過が遅く、最終的な生成アルコール分も低くなることが推測された。T39 区についても FIA1 区と比較すると、発酵初期から中期にかけての炭酸ガス減量速度、最終的な炭酸ガス減量共に小さくなった。し

かし、高香気性協会酵母区と比較すると、発酵初期を除けば、ほぼ同程度の炭酸ガス減量速度で推移した。このことから、T39 は醗中期以降は高香気性協会酵母とほぼ同程度の発酵経過を示すことが推測された。

また、醗の泡生成状況を観察したところ、T22 区、T39 区共に親株 FIA1 区と同様に泡の低い状貌を呈し、泡無し酵母であった。

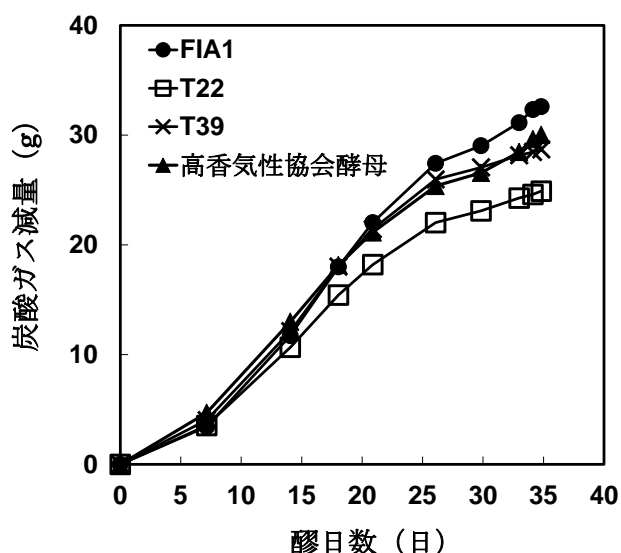


図3 炭酸ガスの減量経過の比較

### 3.3.2 製成酒の成分分析

製成酒のアルコール分、酸度、アミノ酸度の分析結果を表1に示す。T22 区ではアルコール分に関しては、FIA1 区の約 75%、高香気性協会酵母区の約 85%と低くなった。酸度に関しては、FIA1 及び高香気性協会酵母区と比較すると若干低い値を示した。アミノ酸度に関しては、FIA1 区より 0.5mL 高い値を示しており、アルコール耐性が低いことが推測された<sup>6)</sup>。一方、T39 区ではアルコール分に関しては、FIA1 区の約 85%と低くなったものの、高香気性協会酵母区に近い値を示した。酸度に関しては T22 同様に FIA1 及び高香気性協会酵母区より若干低い値となった。アミノ酸度に関しては、FIA1 区より 0.6mL 高い値を示しており、T22 同様にアルコール耐性が低いことが推測された。生成アルコール分、及び前項の炭酸ガス減量経過から、T39 は T22 と比較してアルコール生成能が高いことが推測された。

製成酒の香気成分組成を表2に示す。T22 区のカプロン酸エチル濃度は FIA1 区の約 8 倍、高香気性協会酵母区の約 2 倍高くなった。また、酢酸イソアミル濃度は FIA1 区の約 1/6、高香気性協会酵母区の約 1/3 と低くなった。オフフレーバーの前駆物質でもあるイソアミルア

ルコール濃度は FIA1 及び高香気性協会酵母区の約 70% と低くなった。一方、T39 区のカプロン酸エチル濃度は FIA1 区の約 5 倍、高香気性協会酵母区の約 1.5 倍高くなった。酢酸イソアミル濃度は FIA1 区の約 1/4、高香気性協会酵母区の約 1/2 と低くなった。イソアミルアルコール濃度は T22 同様に FIA1 及び高香気性協会酵母区の約 70%と低くなった。T22、T39 共にカプロン酸エチル高生産性に加えて、イソアミルアルコール低生産性という特徴を有していることがわかった。

製成酒の有機酸組成を表3に示す。T22 区と T39 区はほぼ同様の有機酸組成であり、リンゴ酸濃度は FIA1 区の約 130%、高香気性協会酵母区の約 160%と高くなった。コハク酸濃度は FIA1 区の約 70%、高香気性協会酵母区の約 80%と低くなった。乳酸濃度は FIA1 及び高香気性協会酵母区とほぼ同程度の値であった。T22、T39 株共に吟醸酒製造用酵母として有機酸生成能に問題はないことがわかった。

製成酒の官能評価についても、T22、T39 区共に高香気性協会酵母区と比較して酒質に問題はなかった。

表1 製成酒の成分値の比較

項目	菌株	FIA1 (親株)	T22	T39	高香気性協会酵母
アルコール分 (%v/v)		18.7	14.1	16.0	16.5
酸度 (mL)		2.3	2.1	2.0	2.2
アミノ酸度 (mL)		1.3	1.8	1.9	1.5

表2 製成酒の香気成分組成の比較

項目	菌株	FIA1 (親株)	T22	T39	高香気性協会酵母
カプロン酸エチル		2.0	15.9	10.6	7.1
酢酸イソアミル		6.7	1.2	1.6	3.8
イソアミルアルコール		141.0	92.1	98.4	132.8

(単位: ppm)

表3 製成酒の有機酸組成の比較

項目	菌株	FIA1 (親株)	T22	T39	高香気性協会酵母
リンゴ酸		23	29	31	18
コハク酸		54	34	38	46
乳酸		20	17	17	18

(単位: mg/100mL)

#### 4. 結び

吟醸酒の主要香気成分として知られるカプロン酸エチルを高生産する酵母の開発を行った。当センター保有の愛知県産清酒酵母 FIA1、FIA2 に対して薬剤を用いた変異処理を施し、変異株を取得した。変異株の中からセルレニン耐性を指標として約 150 株の一次選抜株を取得した。清酒小仕込試験を行い、カプロン酸エチル濃度及びアルコール分を指標として、二次選抜株 T22、T39 を取得した。両株共に FIA1 を親株としており、カプロン酸エチルを FIA1 の 4 倍以上生産した。吟醸酵母の開発を目指していることから、低温下で清酒小仕込試験を行い、T22、T39 の醸造特性を評価した。その結果、T22 は高いカプロン酸エチル生成能を示したが、アルコール生成能が低下した。一方、T39 も高いカプロン酸エチル生成能を示したが、アルコール生成能の顕著な低下は認められなかった。

今後は T39 を中心にスケールアップ試験を行い、より現場に近いレベルで清酒製造特性を評価する。また、そ

れらの結果を踏まえて、酵母のアルコール生成能・耐性  
能の改良等、更なる育種を進める予定である。

#### 文献

- 1) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K. and Imayasu, S. : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153(1991)
- 2) 日本醸造協会：第四回改正国税庁所定分析法注解, (2007)
- 3) 市川英治：日本醸造協会誌, **88**, 101(1993)
- 4) 市川英治, 秦洋二, 今安聡, 杉並孝二：特開平 08-023954 変異酵母
- 5) 大土井律之, 松本英之, 藤井一嘉, 谷本昌太, 末成和夫：広島県食品工業技術センター研究報告, **23**, 15 (2004)
- 6) 原昌道, 深田雄一, 野崎英雄, 小幡孝之, 野白喜久雄：日本醸造協会誌, **71**, 569(1976)