

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成酵母の清酒製造特性評価-

三井 俊*¹、伊藤彰敏*¹、沖塚翔太*²、山本晃司*¹

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

Shun MITSUI*¹, Akitoshi ITO*¹, Shota OKITSUKA*² and Koji YAMAMOTO*¹Food Research Center*^{1,2}

前報¹⁾で愛知県産清酒酵母 FIA1 株を親株としたカプロン酸エチル高生成酵母 T39 株の取得を報告したが、実現場での安定的なアルコール生成の観点から、アルコール生成能が低い点が課題であった。T39 株を親株としてイソアミルアルコール存在下で生存可能な株を分離した結果、アルコール生成能が向上した T39-I6 株が得られた。本株は小規模仕込試験（総米 5kg）及び中間規模仕込試験（総米 100kg）において、高いカプロン酸エチル生成能（5ppm 以上）及び十分なアルコール生成能（15%以上）を示した。醪初期のアルコール生成の遅れや後期の酸度変化の傾向は、再度、中間規模試験を行い確認する必要がある。

1. はじめに

最近の吟醸酒はリンゴ様の香りを特徴とするカプロン酸エチルを主要香り成分とするものが主流となっており、吟醸酒製造においてはカプロン酸エチルを高生成する酵母が使用されることが多い。しかし、食品工業技術センター（以降、当センター）が保有している既存の愛知県産清酒酵母（FIA1 株、FIA2 株）はカプロン酸エチル生成量が少なく、主要香り成分はバナナ様の香りを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。

このような背景から、当センターではカプロン酸エチルを高生成する愛知県産清酒酵母の開発に取り組んでいる。前報¹⁾で既存の県産清酒酵母を親株として、薬剤による変異処理、薬剤耐性を指標とした選抜、清酒小仕込試験を行い、カプロン酸エチル高生成酵母を取得した。しかし、実現場での安定的なアルコール生成を考慮すると、既存の協会酵母と比較してアルコール生成能が低い点が課題となった。そこで本研究では、取得酵母のアルコール生成能の向上を試みた。さらに、酵母の実用化に向けてスケールアップした仕込試験を行い、より製造現場に近いレベルで清酒製造特性を評価した。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

当センター保有の愛知県産清酒酵母 FIA1 株を親株として取得したカプロン酸エチル高生成酵母 T39 株¹⁾を使用した。また、対照のカプロン酸エチル高生成酵母として、高香気性協会酵母を使用した。

2.2 原材料

原材料として、乾燥麹（60%白米、徳島製麹（株））、乾燥 α 化米（60%白米、徳島製麹（株））、愛知県産酒造好適米「若水」（60%白米）、「夢吟香」（50%白米）を用いた。

2.3 使用培地

酵母の培養は麹汁培地（ボーム 5.0、pH4.0）、YPD 培地（酵母エキス：1.0%、ポリペプトン：2.0%、グルコース：2.0%）及び YM 培地（酵母エキス：0.3%、麦芽エキス：0.3%、ポリペプトン：0.5%、グルコース：10%）を使用した。これらの培地は必要に応じて、2%寒天を加えて平板培地とした。高濃度エタノール存在下で生存可能な酵母の分離にはエタノールを 18%又は 20%含んだ YPD 培地、イソアミルアルコール存在下で生存可能な酵母の分離にはイソアミルアルコールを 0.4%又は 0.6%含んだ YM 培地を使用した。

2.4 酵母のアルコール生成能の向上

2.4.1 高濃度エタノール条件下で生存可能な酵母の分離

エタノール存在下で生存可能な酵母の分離は原ら²⁾の方法を改変して行った。すなわち、T39 株を麹汁培地

*1 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室 *2 食品工業技術センター 発酵バイオ技術室（現産業労働部 産業振興課）

5ml で 30℃、48 時間培養後、エタノールを 18%又は 20%含んだ YPD 培地に接種し、15℃で 1 週間静置した。適宜希釈した後に YPD 平板培地に塗抹して培養し、生育してきたコロニーを釣菌した。

2.4.2 イソアミルアルコール存在下で生存可能な酵母の分離

イソアミルアルコール存在下で生存可能な酵母の分離は秋田ら³⁾の方法を改変して行った。すなわち、T39 株を YM 培地 5ml で 30℃、48 時間培養後、イソアミルアルコールを 0.4%又は 0.6%含んだ YM 培地に接種し、25℃で 1 週間静置した。適宜希釈した後に YPD 平板培地に塗抹して培養し、生育してきたコロニーを釣菌した。

2.4.3 分離酵母の醸造特性評価

乾燥麹 20g、乾燥 α 化米 80g、蒸留水 180mL、分離酵母の前培養液 10mL を混合して、11℃で約 30 日間発酵させた。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アルコール生成経過を比較した。対照として、T39 株及び高香気性協会酵母を使用した。遠心分離 (9,000rpm、20 分) にて上槽し、得られた上清液を製成酒とした。

2.5 小規模仕込試験

乾燥麹及び一般酒造好適米を用い、総米 5kg の三段仕込で行った。仕込配合を表 1 に示す。麹エキス培地による酵母培養液 600mL を酒母とした。対照として高香気性協会酵母を使用した。醪日数 26 日目で、遠心分離 (9,000rpm、20 分) にて上槽し、得られた上清液を製成酒とした。

表 1 仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米 (kg)	0.0	1.0	1.5	2.5	5.0
掛米 (kg)	0.0	0.8	1.2	2.0	4.0
麹米 (kg)	0.0	0.2	0.3	0.5	1.0
汲水 (L)	0.6	1.0	2.0	3.3	6.9

2.6 中間規模吟醸酒仕込試験

愛知県産酒造好適米「夢吟香」を用い、総米 100kg の三段仕込で行った。仕込配合を表 2 に示す。酒母はアンブル酒母を利用した。対照として既存の高香気性協会酵母を使用した。

表 2 仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	アル添	計
総米 (kg)	4	13	28	55		100
掛米 (kg)	0	10	22.5	46.5		79
麹米 (kg)	4	3	5.5	8.5		21
汲水 (L)	12	13.5	38	76.5		140
乳酸 (mL)	36					36
38%アルコール(L)					28	28

2.7 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⁴⁾に準拠して分析した。有機酸は有機酸分析システム (ポストカラム pH 緩衝化電気伝導度検出法、(株) 島津製作所) で分析した。

3. 実験結果及び考察

3.1 酵母のアルコール生成能の向上

酵母のアルコール生成能を向上させる方法として、原ら²⁾による高濃度エタノール条件下で馴養する手法が広く利用されている。高濃度エタノール存在下で生存可能な酵母を 25 株 (T39-E1~T39-E25 株) 分離した。それらの醸造特性評価を行った結果 (データは省略)、分離株の多くは親株 T39 株と比較して、アルコール生成経過が遅れる傾向が見られた。また、製成酒の酸度も高くなった。一般的に吟醸酒製造には低酸性の酵母が使用されるため、これらの分離株は吟醸酒製造に適さないものと判断した。

秋田ら³⁾によりイソアミルアルコールに耐性を示す酵母はエタノールに対しても高い耐性を示すことが報告されている。そこで、イソアミルアルコール存在下で生存可能な酵母を 8 株 (T39-I1~T39-I8 株) 分離した。それらの醸造特性評価を行った結果 (データは省略)、T39-I6 株を用いた仕込試験区 (以降、T39-I6 株区のように略す。) が親株 T39 株区と比較してカブロン酸エチル濃度は約 70%と低下したが、アルコール分がやや高くなり、高香気性協会酵母区により近い値となった。その他の分離株のアルコール分は親株と同等又はそれ以下であった。以上の結果より、T39-I6 株を以降の試験に使用することとした。

3.2 小規模仕込試験

総米 5kg の小規模仕込試験における製成酒の成分分析結果を表 3 に示す。T39-I6 株酒は、カブロン酸エチル濃度が高香気性協会酵母酒の約 70%と低くなったものの、目標値の 5ppm を超える値となった。また、日本酒度は 3.2 とやや低い値となったが、アルコール分は 15.5%と目標の 15%以上となり、実製造に十分使用可能と考えられた。酸度及びアミノ酸度は、高香気性協会酵母区と比較して、若干高い値となった。

表 3 小規模仕込試験製成酒の成分分析結果

項目	菌株	
	T39-I6株	高香気性協会酵母
アルコール分 (%)	15.5	15.6
日本酒度	3.2	3.9
酸度 (mL)	2.4	2.3
アミノ酸度(mL)	1.7	1.6
カブロン酸エチル (ppm)	5.1	7.1

3.3 中間規模吟醸酒仕込試験

アルコール分の経時変化を図1に示す。T39-I6株区は高香気性協会酵母区と比較すると、醪初期はやや低く推移したが、上槽時にはほぼ同じ値となった。日本酒度の経時変化を図2に示す。本酒造年度に関しては、酒米の溶解性が非常に高く、酵母の種類に関わらず、例年と比較して日本酒度がよりマイナス側にシフトする傾向にあった。T39-I6株区は高香気性協会酵母区と比較すると、全醪期間を通してマイナス側にシフトしていた。以上の結果より、実用化の際には、醪初期でアルコール生成がやや遅れる事が懸念されるため、積極的に追水（水を添加する操作）を行い、醪が濃糖状態になることを避けて、酵母の増殖を促す必要がある。

酸度の経時変化を図3に示す。T39-I6株区は高香気性協会酵母区と比較すると、醪中期以降高めに推移し、上槽時まで微増した。日本酒度がよりマイナス側にあり、酵母が濃糖状態に曝され、有機酸を生成しやすい状態にあったことが推測される。最終的な酸度は高香気性協会酵母より0.5mL高くなり、小規模仕込試験とは異なる結果となった。

アミノ酸度の経時変化を図4に示す。T39-I6株区は、香気性協会酵母区と比較すると、醪初期からやや高めに

推移したため、T39-I6株のアミノ酸取り込み能が低いことが推測された。最終的なアミノ酸度は高香気性協会酵母より0.25mL高くなった。

香気成分の経時変化を図5に示す。カプロン酸エチルに関しては、T39-I6株区は高香気性協会酵母区と比較すると、醪初期はやや低く推移したが、最終的にほぼ同じ値となった。カプロン酸エチル同様に吟醸香である酢酸イソアミルに関しては、前報¹⁾において、既存の愛知県酵母よりその生成能が低いことがわかっているが、本中間規模試験より、高香気性協会酵母区と比較しても、全醪期間を通して低く推移した。オフフレーバーの前駆物質であるイソアミルアルコールについても全醪期間を通して低く推移した。T39-I6株はカプロン酸エチル高生成性に加えて、イソアミルアルコール低生成性という特徴を有していることがわかった。

有機酸の経時変化を図6に示す。T39-I6株区は高香気性協会酵母区と比較すると、コハク酸はほぼ同様に推移したが、リンゴ酸は醪中期以降は高く推移して、上槽時まで増加し続けた。これが醪後期での酸度の微増傾向に寄与していることが推測された。乳酸及び酢酸は全醪期間を通して高香気性協会酵母区とほぼ同様の経過を示した（データは省略）。

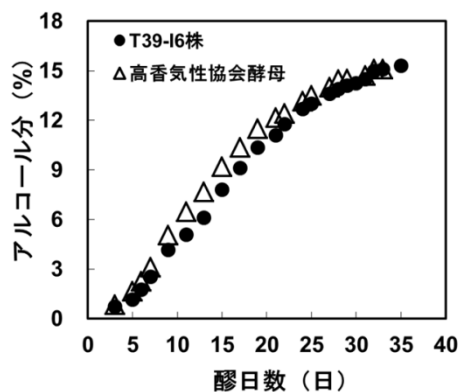


図1 アルコール分の経時変化

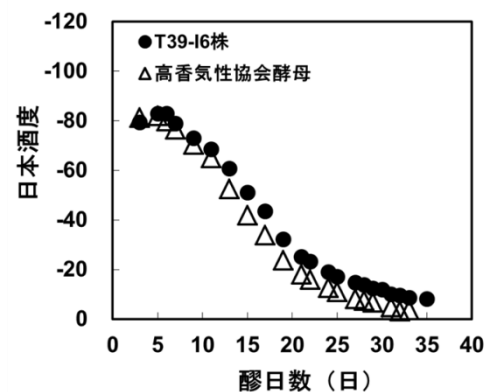


図2 日本酒度の経時変化

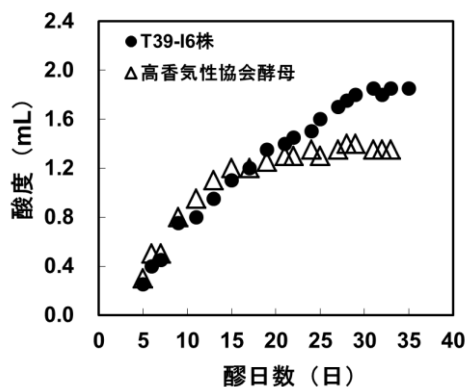


図3 酸度の経時変化

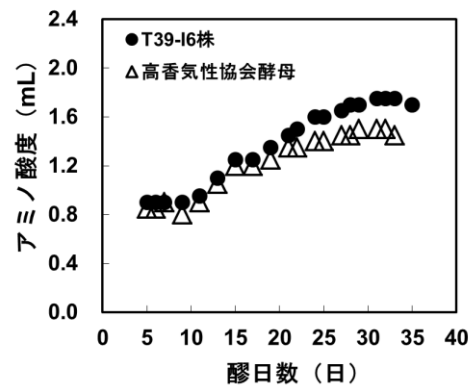


図4 アミノ酸度の経時変化

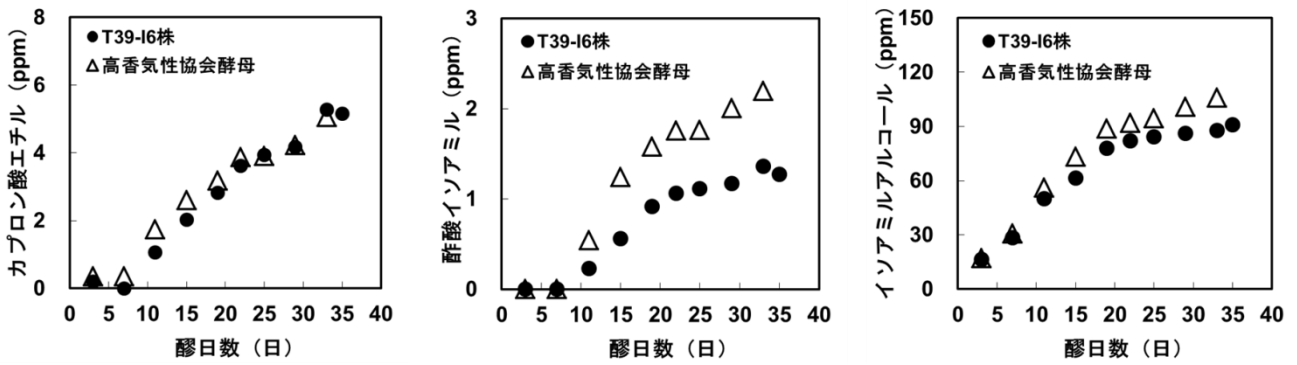


図5 香気成分の経時変化

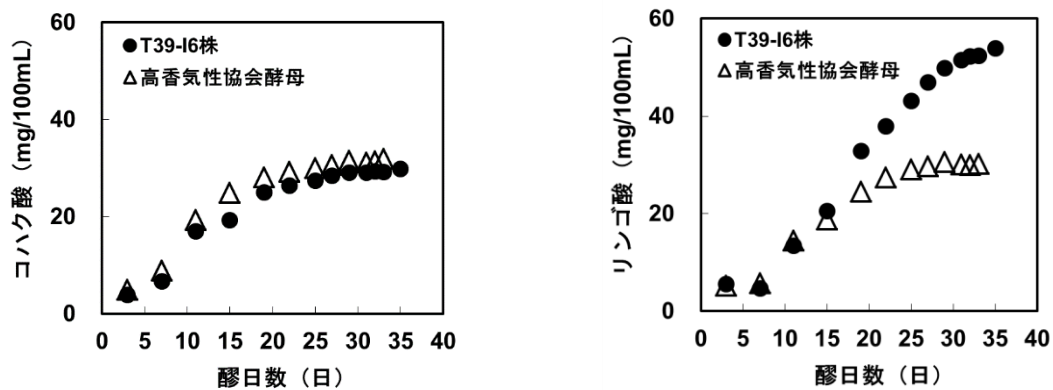


図6 有機酸の経時変化

4. 結び

吟醸酒の主要香気成分であるカブロン酸エチルを高生成する愛知県産清酒酵母の開発を行った。既存の県酒酵母 FIA1 株を親株としたカブロン酸エチル高生成酵母 T39 株を親株として高濃度エタノール存在下及びイソアミルアルコール存在下で生存可能な酵母を分離したところ、アルコール生成能が向上した酵母 T39-I6 株が得られた。本株を用いて小規模仕込試験（総米 5kg）及び中間規模仕込試験（総米 100kg）を実施した結果、製成酒は共に 5ppm 以上の高いカブロン酸エチル濃度及び 15%以上の十分なアルコール量であった。

今後は、清酒酒質が酵母の特性だけでなく、原料米の特性にも大きく影響されるため、繰り返し、中間規模の仕込試験を実施する。醪初期のアルコール生成や醪後

期における酸度変化を確認し、酵母の清酒製造特性を把握する。それらの結果を踏まえて、仕込配合や酒母形態等を決定し、酵母の実用化を目指す予定である。

文献

- 1) 三井俊, 伊藤彰敏, 沖塚翔太: あいち産業科学技術総合センター研究報告, **4**, 88(2015)
- 2) 原昌道, 佐々木雅春, 小幡孝之, 野白喜久雄: 日本醸造協会誌, **71**, 301(1976)
- 3) 秋田修, 渡辺隆幸, 蓮尾徹夫, 小幡孝之, 原昌道: 醱酵工学会誌, **68**, 395(1990)
- 4) 日本醸造協会: 第四回改正国税庁所定分析法注解, (2007)