

カプロン酸エチル高生成酵母の開発

大土井律之・松本英之・藤井一嘉・谷本昌太・末成和夫

Breeding of a Sake Yeast (Hiroshima *Ginjo* Yeast) with Improved Ethyl Caproate Productivity

Ritsushi OHDOI, Hideyuki MATSUMOTO, Kazuyoshi FUJII, Shota TANIMOTO and Kazuo SUENARI

To create individuality and to improve the quality of sake, Breeding Sake yeast that produces a large quantity of ethyl caproate that is one of the principal ingredients of the smell of *Ginjo* sake was tried. As a result, "Hiroshima *Ginjo* yeast (13BY)" that was able to brew sake that contained 10ppm ethyl caproate was developed.

清酒業界では、普通酒の低価格競争が一段と激化しており、県内の酒造会社は中小企業が多く、灘、伏見などの大手酒造会社と対等に価格競争することが難しい状況である。そこで、華やかな香りを特徴とする吟醸酒や、醸造用アルコールを添加していない純米酒などの特定名称酒を製造することによりメーカー独自の特徴を保持し、製品の売り上げ増加に寄与することが求められている。

このような背景から、本研究では、県内酒造会社の市販吟醸酒のより一層の品質向上を目的として、吟醸酒の華やかな香りの主要成分であるカプロン酸エチルを高生成する酵母の育種を試みた。

*Cephalosporium caerulens*によって生産される脂肪酸合成酵素特異的阻害剤セルレニンに対する耐性酵母の中に、カプロン酸エチルを高生成する酵母が存在していることが報告されている¹⁾。

そこで、本研究では、県内酒造会社の醪中から分離した酵母を親株として、セルレニン耐性酵母を分離し、実用規模(総米数百kgから千数百kg)で仕込試験を行い、10ppm以上のカプロン酸エチルを生成する酵母を育種したので報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株

広島吟醸酵母(12BY)²⁾および県内酒造会社の醪からサンプリングした清酒酵母を供試菌株とした。

2. 培 地

Yeast Extract 1%, Peptone 2%およびGlucose 2% (以下YPD培地と略す)を蒸留水に溶解し、121℃15分間加圧殺菌したものを培地とした。

3. 麴汁培地

乾燥麴35kg, 水150L, 天野エンザイム株式会社製の酒造用グルコアミラーゼ40gを混合し、53℃で19時間反応を続けた。その後、パントテン酸カルシウム0.01g/Lを添加した後に、フィルタークロスでろ過した。ろ液にグルコースを加えてBrixを10°に調整後、乳酸を添加してpHを4に調整し麴汁培地とした。

4. セルレニン耐性酵母の分離

セルレニン耐性酵母の分離は、Ichikawa¹⁾の方法に準じて行った。すなわちethyl methanesulfonate (以下EMSと略す)を用いて供試菌株を変異処理した後、25μMセ

ルレニンを含むYPD培地に処理菌体を塗布し、生じたコロニーより耐性酵母を分離した。なお、この分離については、月桂冠株式会社が所有する特許発明³⁾の実施に関する契約を結んでいる。

5. 小仕込試験によるセルレニン耐性酵母の選定

醸造適性が優良なセルレニン耐性酵母を選定するために、麴汁培地20mLを使用した静置培養を行った。麴汁培地によるスクリーニングでカブロン酸エチル生成能の高かった酵母を小仕込試験用セルレニン耐性酵母として選定した。原料米には、精米歩合40%の千本錦を使用し、表1に示した仕込配合で小仕込試験を行った。

表1 小仕込試験の仕込配合

	添	伸	留	合計
総米 (g)	41	62	97	200
蒸米 (g)	30	50	80	160
麴米 (g)	11	12	17	40
水 (mL)	50	90	140	280
酵母 (mL)	10			10

6. パイロットスケールの仕込試験によるセルレニン耐性酵母の選定

小仕込試験によって選定した、カブロン酸エチル生成能が高く、発酵力の強い酵母について、実用規模での適性を試験するために、パイロットスケールでの仕込試験を行った。原料米には、精米歩合40%の千本錦を使用

表2 パイロットスケール仕込試験の仕込配合

	添	伸	留	4段	合計
総米 (Kg)	14	21	35		70
蒸米 (Kg)	10	16	29		55
麴米 (Kg)	4	5	6		15
水 (L)	19	32	51	7	109
酵母 (L)	2				2

し、表2に示した仕込配合でパイロットスケールの仕込試験を行った。

7. 成分分析及び官能評価

一般分析および香気成分分析は国税庁所定分析法⁴⁾⁵⁾に準じて行った。

官能評価は、10名の酒造技術者によって3点評価法で行った。なお、1点は優れた品質の清酒、2点は標準的な清酒、3点は香りと味の不調和な清酒とした。

8. 実用規模醸造試験

小仕込試験およびパイロットスケールの仕込試験で選定したセルレニン耐性酵母について、広島県内酒造会社15社で白米数百kgから千数百kgの実用規模で醸造試験を行い、醸造適性を判断した。原料米および仕込配合は、設計された商品の味や香りに適合するように各酒造会社が決定した。

表3 小仕込試験製成酒の成分分析及び官能評価

菌株	もろみ日数 (日)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	日本酒度	アルコール度 (%)	酢酸エチル (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	イソアミルアルコール (ppm)	カブロン酸エチル (ppm)	官能評価 (点)
広島吟醸酵母 (12BY)	29	1.6	1.0	+4.4	15.9	70	4.4	148	4.3	2.2
No.12	30	1.6	1.1	-2.2	15.6	39	2.3	156	19.5	1.4
No.13	35	1.5	1.2	+3.3	15.8	37	1.7	137	16.2	1.7
No.16	32	1.5	1.3	+0.9	15.5	34	2.1	141	19.7	1.7
No.17	35	1.5	1.0	+10.0	15.9	34	1.7	127	17.7	2.0
No.19	31	1.7	1.1	+0.1	15.6	39	2.5	141	16.7	1.8
No.20	31	1.8	1.0	+1.2	15.7	35	2.1	135	18.3	1.8
No.22	35	1.5	1.2	-1.9	16.0	36	2.4	139	17.0	1.9
No.23	30	1.9	1.1	-0.6	15.6	37	2.3	147	20.2	1.8
No.24	35	1.4	1.3	+4.5	15.8	37	1.7	157	17.2	1.4
No.26	35	1.5	1.2	+9.4	16.1	30	1.5	113	15.1	1.5
No.27	29	3.5	1.7	-59.9	7.7	400	0.8	71	0.1	3.0
No.29	35	1.8	1.1	+2.8	15.8	35	1.9	133	16.9	1.8
No.30	35	1.6	1.2	+4.7	15.5	36	1.6	157	17.1	1.5
No.31	31	1.7	1.1	+0.1	15.5	36	2.3	148	21.0	2.0
No.34	29	1.7	0.9	+1.7	16.0	61	4.7	168	6.6	2.8

実験結果および考察

1. セルレニン耐性酵母の分離および小仕込試験

県内酒造会社の醪から分離した清酒酵母をEMSで変異処理した後、セルレニン耐性酵母128株を取得した。これらの酵母について麹汁培地20mLを使用した小仕込試験を行い、香気成分を測定した結果、カブロン酸エチル高生成酵母を49株選抜した。この49株について小仕込試験を行い、成分分析および官能評価結果の一部を表3に示した。もろみ日数は、試験終了までの日数であり、炭酸ガス減量が50gに達するまでの日数から決定した。この49株の中から、官能評価結果が良好であり、果実様の華やかな香りを特徴とするカブロン酸エチルを高生成し、もろみ日数が短い株を選定した。さらに以上の条件に加えて、バナナ様の軽快な香りを特徴とする酢酸イソアミルを高生成し、接着剤様の臭いを特徴とする酢酸エチルや酢酸イソアミルの基質であり重い臭いを特徴とするイソアミルアルコール濃度が低い株を選定した。官能評価の結果は表3に示したように、No.12, 24, 26および30の菌株が良好であり、この4株の中から、醸成酒のカブロン酸エチル濃度が最も高いNo.12株を以後の小仕込試験に選定した。

2. パイロットスケールの仕込試験

小仕込試験で選抜したNo.12株の醸造適性を試験するために、パイロットスケールの仕込試験を行った。広島吟醸酵母(12BY)の醸成酒を対照として、No.12株の醸成酒の成分分析結果を表4に示した。パイロットスケールでの仕込試験において、もろみ日数やアルコール生成に問題がなければ、実用規模の仕込みにおいても、醸造適性上問題ないと判断できる。このことから、No.12株は実用規模での使用が可能であると考えられた。また

表4 パイロットスケール仕込試験醸成酒の成分分析

	菌 株	
	広島吟醸酵母 (12BY)	No.12
もろみ日数 (日)	35	36
日本酒度	-7.0	-1.0
アルコール (%)	18.4	18.1
酸 度 (mL)	1.2	1.2
アミノ酸度 (mL)	0.9	1.0
酢酸エチル (ppm)	63	26
酢酸イソアミル (ppm)	1.6	1.1
イソアミルアルコール (ppm)	118	125
カブロン酸エチル (ppm)	2.9	7.0

No.12株の特徴として、華やかな香りを特徴とするカブロン酸エチル高生成の他に、官能評価で悪い評価を受ける酢酸エチルの生成が少ないことが示され、官能評価から苦みが少ないことも明らかとなった。なお、小仕込試験におけるカブロン酸エチルの高濃度は、密閉型容器の使用と遠心分離による固液分離法に起因していると考えられた。また、パイロットスケールの仕込試験では開放タンクを使用し、かつ、圧搾ろ過を行っているため、飛散によってカブロン酸エチル濃度は小仕込試験よりも低濃度となった。

3. 実用規模醸造試験

広島県内酒造会社15社で実用規模醸造試験を行った結果を表5に示した。前年の広島吟醸酵母(12BY)による醸成酒を対照として用いた場合、No.12株醸成酒の特徴であるカブロン酸エチルを10ppm以上生成し、酢酸エチル生成量が少なく、かつ、苦みが少ないことが、実用規模でも示された。

表5 実規模試験における醸成酒の成分分析結果 (15社平均値)

		菌 株	
		広島吟醸酵母 (12BY)	No.12
もろみ日数 (日)	(日)	31	33
日本酒度		+5.2	+4.6
アルコール (%)	(%)	17.9	17.7
酸 度 (mL)	(mL)	1.5	1.1
アミノ酸度 (mL)	(mL)	0.9	1.0
酢酸エチル (ppm)	(ppm)	48	27
酢酸イソアミル (ppm)	(ppm)	2.2	1.4
イソアミルアルコール (ppm)	(ppm)	105	116
カブロン酸エチル (ppm)	(ppm)	3.1	10.6

要 約

県内酒造会社の市販吟醸酒の品質向上を目的として、吟醸酒の香気成分の大部分を生成する酵母の育種を行った。香りの主要成分の一つであるカブロン酸エチルを高生成する酵母の育種を試み、実用規模でカブロン酸エチル10ppm以上の華やかな香りを特徴とする吟醸酒を製造することが可能な「広島吟醸酵母(13BY)」を開発した。

なお、この分離については、月桂冠株式会社が所有する特許発明³⁾の実施に関する契約を結んでいる。

文 献

- 1) Ichikawa,E., Hosokawa,N., Hata,Y., Abe,Y., Suginami, K. and Imayasu,S., Breeding of sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agric.Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154 (1991).
- 2) 末成和夫, 谷本昌太, 大土井律之, 藤井一嘉, 松本英之, 新たな広島清酒酵母の開発, 平成13年度版工業技術センター研究・指導成果集, 広島県, pp.8-9 (2001).
- 3) 市川英治, 秦 洋二, 今安 聡, 杉並孝二, 変異酵母, 特開平08-023954(1996.1.30).
- 4) 岡崎直人, 3 清酒, 合成酒, 第四回改訂国税庁所定分析法注解, 注解編集委員会編, (財団法人日本醸造協会, 東京), pp.7-33 (1993).
- 5) 太田剛雄, 付録Ⅲヘッドスペースガスクロマトグラフィーによる香気成分の定量, 第四回改訂国税庁所定分析法注解, 注解編集委員会編, (財団法人日本醸造協会, 東京), pp.273 (1993).