

カプロン酸エチル高生産性G酵母の開発(第1報)

澤井美伯、吉村明浩

Development of high Ethyl caproate producing Sake yeast strain NF-G (I)

Yoshinori SAWAI and Akihiro YOSHIMURA

吟醸酒の製造で主流となっているカプロン酸エチル高生産性酵母の開発を目指して、泡なしG酵母(以下NF-G)に変異処理を行い、セルレニン耐性を利用して選抜を行った。得られた215株から、官能評価や小規模試験醸造で14株を選抜した。その中から5/1.2株を用いて総米7kgの試験醸造を行った結果、6.2ppmのカプロン酸エチルを生成した。

1. はじめに

清酒用酵母は現在、吟醸香の主体が酢酸イソアミルである従来型の酵母と、カプロン酸エチルが主体である新しいタイプの酵母があり、近年、吟醸酒や純米吟醸酒などの製造においては、カプロン酸エチル系の酵母が多く使われている。岐阜県が保有するNF-Gは、酢酸イソアミル系の酵母であり、カプロン酸エチル系の酵母は保有していない。そのため県内の酒造場からその開発が期待されている。そこで本研究では、NF-Gからカプロン酸エチル高生産性酵母の開発を目指した。本年度は、NF-Gからセルレニン耐性株の取得と選抜、試験醸造の結果について報告する。

2. 実験

2.1 セルレニン耐性株の取得と簡易選抜

セルレニン耐性株の取得は市川ら¹⁾の方法に従って行った。NF-G培養液(YM培地、5ml)から遠心分離機と生理食塩水を使って洗浄、回収した酵母菌体を、表1の条件でエチルメタンスルホン酸(EMS)による変異処理を行った。変異処理後の菌体は生理食塩水で洗浄後、1%セルレニンを含むYM寒天培地に塗抹して培養(30℃)し、コロニーを形成した株をセルレニン耐性株として釣菌した。取得したこれらの耐性株は、20mlのYM培地で20℃3日間培養し、官能評価でカプロン酸エチル生産性の有無を判断し、選抜した。

表1 EMS処理条件

処理区	1(2.6%)	2(1.2%)	3(0%)
滅菌水(ml)	0.12	0.19	0.25
0.2M PB pH8.0 (ml)	4.5	4.5	4.5
40% Glucose (ml)	0.25	0.25	0.25
EMS (ml)	0.13	0.06	0
処理条件	30℃、30分、振とう		

2.2 総米200g小規模試験醸造

表2に示した仕込配合で、総米200gの試験醸造を行った。白米は60%精白のひだほまれを使用し、米麴は一括して製造し冷蔵保存したものを使用した。

酵母はYM(8%)培地で20℃、2日間培養したものを添加し、

表2 総米200g試験醸造 仕込配合

	初添	仲添	留添	合計
総米(g)	35	65	100	200
蒸米(g)	20	55	80	155
麴米(g)	15	10	20	45
汲水(ml)	55	75	146	276
乳酸(ml)	0.2	-	-	0.2
酵母(ml)	2.0	-	-	2.0

比較対照はNF-Gを用いた。仕込みは初添15℃、仲添12℃、留添10℃とし、留添翌日から1日に1℃ずつ昇温し、環境温度15℃に達してから発酵終了まで保持した。アルコール発酵に伴い発生する炭酸ガス量を、醪重量の変化から算出し、発酵経過を観察した。炭酸ガス発生に伴う醪重量の減少が少なくなった15日目に発酵を終了した。上槽は、遠心分離機を用いて行い製成酒を得た。製成酒の分析は国税庁所定分析法²⁾に従って行い、香气成分はヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

2.3 総米7kg試験醸造

表3に示した仕込配合で総米7kgの試験醸造を行った。

米、麴は60%精白のひだほまれを使用した。酒母は中温速醸法を用いて調製し、仕込みは初添14℃、仲添10℃、留添7℃を目標とした三段仕込み法とした。発酵は30L容量のステンレス容器を用いて、三洋電機(株)製低温恒温器MIR-253内で行った。発酵管理は、日本酒度、アルコール、酸度、アミノ酸度の分析結果を参考にしながら温度調整、追水等を行い、アルコール17.5%以上、日本酒度+3以上、カ

表3 総米7kg試験醸造 仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	合計
総米(kg)	0.42	1.17	2.10	3.31	7.00
蒸米(kg)	0.28	0.82	1.63	2.67	5.40
麴米(kg)	0.14	0.35	0.47	0.64	1.60
汲水(L)	0.525	1.225	2.570	5.130	9.450
乳酸(ml)	3.7	-	-	-	3.7
酵母(ml)	10	-	-	-	10

表4 総米200g小規模試験醸造結果

※香気成分の単位はppm

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
酵母名(開発コード)	3/1.2	5/1.2	6/1.2	12/1.2	16/1.2	20/1.2	27/1.2	29/1.2	32/1.2	35/2.6	41/2.6	111	120	Ce41	協会酵母
炭酸ガス減量(g)	57.22	55.23	58.44	57.35	57.63	57.37	57.35	56.37	57.30	56.70	57.75	55.03	57.32	53.97	55.85
製成酒(ml)	288	285	293	293	289	292	299	295	296	299	303	291	290	278	288
アルコール(%)	18.7	18.1	19.1	18.6	18.6	18.9	18.6	18.5	19.0	18.3	18.8	18.3	18.5	17.5	18.0
日本酒度(度)	-5.4	-10.0	-3.3	-5.7	-4.8	-5.7	-5.0	-6.1	-4.8	-7.8	-4.4	-7.6	-5.8	-14.1	-9.6
酸度(度)	1.82	1.84	1.92	2.04	1.90	1.90	1.86	1.86	1.79	1.81	1.80	2.20	1.92	2.11	1.93
アミノ酸度(度)	1.74	1.88	1.66	1.81	1.80	1.81	1.90	1.86	1.79	2.00	1.89	1.65	1.90	1.90	1.81
酢酸エチル	236.6	183.4	212.9	215.6	206.5	211.6	217.0	208.4	203.6	210.9	226.9	215.0	202.9	132.7	188.6
酢酸イソアミル	10.4	7.3	8.5	8.9	8.2	8.1	8.1	7.5	6.8	9.2	9.4	9.9	6.8	6.6	7.2
イソアミルアルコール	223.6	198.4	223.4	223.2	217.8	213.5	221.2	221.2	208.8	224.2	201.4	220.6	177.9	169.7	189.2
カブロン酸エチル	7.5	11.1	6.4	8.6	3.1	7.8	8.0	8.1	8.3	9.0	8.5	7.9	9.6	18.8	11.1

ブロン酸エチル8ppm以上を目標とする純米酒の製造を試みた。上槽後の製成酒は香気成分等を分析した後、岐阜県市販酒研究会に参考出品して官能評価を行った。

3. 結果

3.1 セルレニン耐性株の取得と簡易選抜

EMS処理を行ったNF-Gをセルレニン含YM寒天培地に塗抹し培養した結果、2.6%処理区から109株、1.2%処理区から106株(0%処理区からは取得できず)、合計215株のセルレニン耐性変異株を取得した。これらの株をYM培地(20ml)で培養して香りを官能で評価し、カブロン酸エチルを生成していると思われた40株を選抜した。

3.2 総米200g小規模試験醸造

選抜した40株を使って総米200gの小規模試験醸造を数回に分けて行い、得られたカブロン酸エチル生成量や発酵能からさらに14株を選抜した。高香気性協会酵母を対照として再度小規模試験醸造を行い、醸造特性を評価した。

カブロン酸エチル生成量は3.1~18.8ppmと酵母間に差があった。小規模試験醸造では香気成分が高めに生成する傾向はあるが、Ce41株(No.14)18.8ppmや5/1.2株

(No.2)11.1ppmについては、協会酵母(No.15)11.1ppmと同等以上に生成し、それ以外の株でも7~9ppm生成することが確認された。

発酵能は、炭酸ガス減量、製成酒量、アルコール濃度、日本酒度の値から比較検討した。Ce41株は、いずれの値も低い値となり他の酵母と比べて発酵能が低いことが示唆されたが、それ以外の酵母については対照の協会酵母と同等以上の発酵力を示した。

官能評価では、華やかな吟醸香の5/1.2株とCe41株、香味が調和した32/1.2株、35/2.6株、41/2.6株が高く評価された。これら5株を候補株とし、この中から、カブロン酸エチル生成量、発酵能が高い5/1.2株を使って、総米7kgの試験醸造を行った。

3.3 総米7kg試験醸造

5/1.2株を使った試験醸造の発酵経過を図1に、製成酒の分析結果を表5に示した。

留添時の品温7°Cで発酵を開始し、4日目に最高ボームが6.2、アルコールが5.3%となった。4~6日目にそれぞれ100mlずつ追水を行い、9日目の品温が12.6°Cで最高となった以降、徐々に品温を下げていき、18日目に上槽した。ア

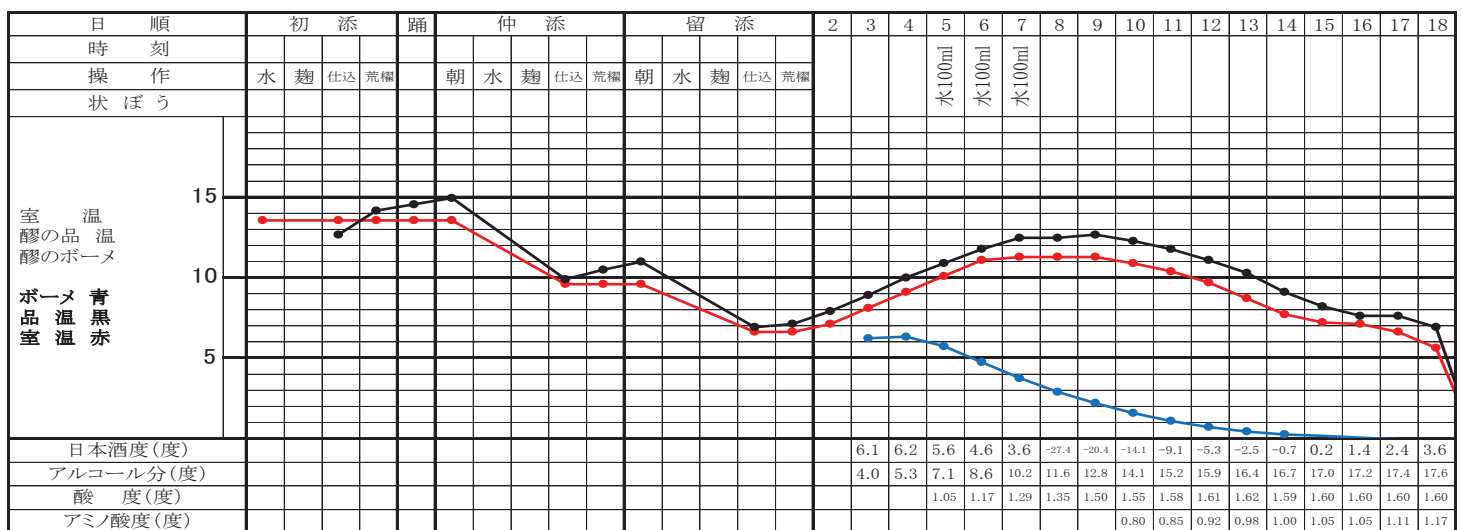


図1 総米7kg試験醸造の発酵経過

アルコール濃度が高く酵母にとって厳しい環境となる後半においても、発酵は順調に進み、目標のアルコール濃度と日本酒度にすることができたことから、5/1.2株は十分な発酵能を有していると考えられた。これに対しカプロン酸エチル生成量は、6.2ppmとなり目標としていた8ppmより低い値となった。

市販酒研究会での官能評価では、多くの審査員から吟醸香が華やかと評価したが、「香り重い」、「脂肪酸臭」などの指摘も多くあり、慎重に評価していく必要がある。また、Ce41株など他の候補株の醸造特性についても評価していく予定である。

表5 総米7kg試験醸造結果

酵 母	5/1.2
製成酒量(ml)	7000
アルコール分(度)	17.7
日本酒度(度)	+3.9
酸度(度)	1.5
アミノ酸度(度)	1.2
酢酸エチル(ppm)	105.7
酢酸イソアミル(ppm)	3.1
イソアミルアルコール(ppm)	149.2
カプロン酸エチル(ppm)	6.2

4. まとめ

カプロン酸エチル高生産性酵母を開発するため、NF-GをEMS処理し、215株のセルレニン耐性株を取得した。これら

から官能評価と小規模試験醸造でカプロン酸エチルを生成する14株を選抜した。この中から5/1.2株を用いて総米7kgの試験醸造を行った結果、カプロン酸エチル生成量が6.2ppmであった。

【謝 辞】

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 遠藤斉治朗記念科学技術振興財団から研究助成金を頂きましたことに、感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) Ichikawa *et al*, *Agric. Biol. Chem.*, 55(8), pp.2153-2154, 1991
- 2) 日本醸造協会, 国税庁所定分析法注解.

Abstract

We tried to develop high Etyl caproate producing yeast from Gifu original Sake yeast strain NF-G. 215 cerulenin –resistant mutants were obtained by treating NF-G with ethyl methane sulfonate. Furthermore, we selected 14 mutants by sensory evaluation and 200g small scale fermentation test. One mutant strain 5/1.2 produced 6.2ppm Etyl capronete in Sake brewed on 7kg scale test.