

## 焼酎の香気成分制御に関する研究（第3報）

水谷 政美\*<sup>1</sup>・工藤 哲三\*<sup>1</sup>・山本 英樹\*<sup>1</sup>・柏田 雅徳\*<sup>1</sup>

### Study on Controlling Flavor Components of *Shochu* (III)

Masami MIZUTANI, Tetsuzo KUDO, Hideki YAMAMOTO and Masanori KASHIWADA

ソバ焼酎醸造に適性を有する酵母*i*-59株を紫外線により突然変異させた4株について、ソバ抽出物の濃度の影響やソバの品種の違いによる影響について検討した。*i*-59株とともに4つの変異株はソバ抽出物の影響を受け、*n*-プロピルアルコール (*n*-PrOH) と*i*-アミルアルコール (*i*-AmOH) とともに大きく増加した。しかし、変異株のうち2株は*i*-AmOH生成量が宮崎酵母 (MK-021) よりも少なくソバ焼酎の品質向上に有効であると考えられた。また、ソバの品種を変えてもその影響はほとんど同じであることが確認された。さらに、変異株のエチルアルコール (EtOH) の生成能を向上させるため、代謝誘導体耐性変異株の造成についても検討した。得られた耐性変異株はさらに香気成分やEtOH生成能が向上していた。

キーワード：ソバ、香気成分、抽出物、酵母、苦味

#### 1 はじめに

ソバ焼酎において、原料ソバの蛋白が酵母の作る香気分量に影響を及ぼし、苦味が発生することを明らかにしてきた<sup>1~3)</sup>。そこで、苦味発生のないソバ焼酎製造に適した醸造技術の開発を目的として研究に着手した。昨年度、香気成分生成量に特徴を持つ酵母*i*-59株の基礎的性質とソバ焼酎醸造への適性と*i*-AmOH耐性をもつ突然変異株の造成について報告した<sup>4)</sup>。

今回、昨年得られた4つの*i*-AmOH耐性を有する突然変異株の性質の検討と代謝誘導体を用いた変異株の造成について報告する。

#### 2 実験方法

##### 2-1 供試試料

発酵試験用酵母は、当センターが所有している宮崎酵母 (MK-021) 及び*i*-59株を用いた。ソバは焼酎製造用 (中国産) 及び食用 (県内産) の2種を用いた。また、試薬類は、市販品を用いた。

##### 2-2 抽出物の調製

ソバはそのまま粉砕して抽出に用いた。抽出は、粉碎物100gに水300mlを加え、室温で2h振とうして行った。その後、遠心分離 (8,000rpm, 10 min) により上清部を集め凍結乾燥したものを抽出物として用いた。

##### 2-3 発酵試験

発酵試験は次のように行った。酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース10%の培地にソバ抽出物を0~0.20%添加した培地を121℃で20min間オートクレーブ滅菌後酵母を加え、27℃で培養した。なお、培養中は発酵経過を見るため、炭酸ガス減量を測定した。その後、生成したアルコールや香気成分を簡易アルコール測定器及びガスクロマトグラフィー (カラム: DB-WAX、φ0.53mm×30m、検出器: FID) により測定した。

##### 2-4 代謝誘導体耐性の検討

YPD培地をオートクレーブ滅菌後、エチレンプロモヒドリン (EBH)、ピルビン酸メチルエステル (PM)、β-フルオロピルビン酸ナトリウム (FP) 及びβ-クロロ乳酸 (CLA) を0~100mMになるよう混釈して平板培地を作成した。この平板培地に、酵母を10<sup>3</sup>個程度を塗抹し、27℃で培

\* 1 応用微生物部

養した。形成したコロニー数を無添加と比較して生存率を求めた。

### 2-5 酵母の突然変異処理

紫外線による突然変異処理は次のとおり行った。酵母を1白金耳とりYM培地(酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ペプトン0.5%、グルコース5%)に入れ27°Cで3日間培養後、遠心分離して酵母を集めた。集めた酵母を生理食塩水に懸濁させ、 $5 \times 10^6$ 個/mlに調製し小型のシャーレに移し攪拌しながら、紫外線(6W、距離:13.6cm)を2~8分間照射し、その0.1mlを0~8mMの代謝誘導体を含むYM培地に塗布後27°Cで培養し、成長の良いコロニーを選択した。

### 2-6 突然変異株の発酵試験

得られた突然変異株を培地(酵母エキス1%、ペプトン2%、グルコース15%)に入れ、27°Cで7日間培養後、生成したEtOH及び香気成分を測定しさらに選抜を行った。

選抜した突然変異株について、YPD培地にソバ抽出物を0.10%添加して27°Cで7日間培養後、培養液のEtOHと香気分量を測定した。

## 3 結果及び考察

### 3-1 発酵試験

MK-021、i-59、A、F、T、V(いずれもi-59株のi-AmOH耐性株)に、ソバ抽出物を0~0.20%添加発酵後の香気成分を比較した。(図1、2) i-AmOH生成量は、ソバ抽出物の添加量の増加とともに全ての酵母で増加したが、A及びF株は親株のi-59やMK-021よりも増加量が少なくなって

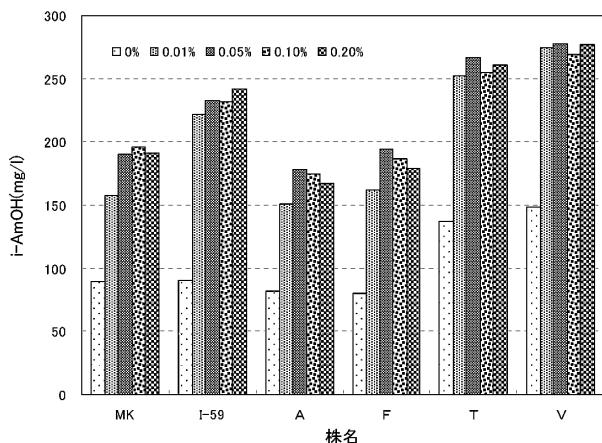


図1 ソバ抽出物添加濃度とi-AmOH生成量

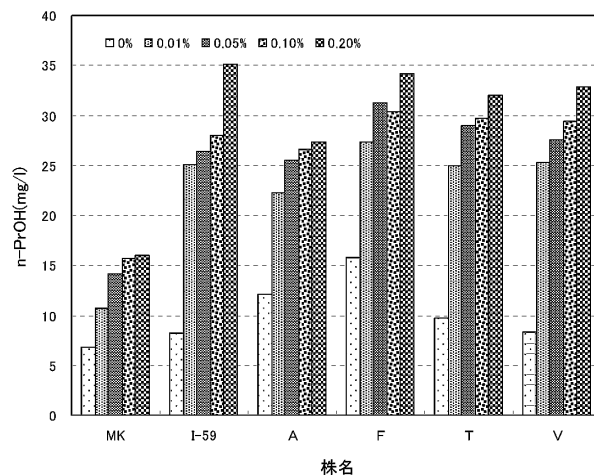


図2 ソバ抽出物添加濃度とn-PrOH

いた。また、n-PrOH生成量について見ると、i-AmOHと同様にソバ抽出物の添加量の増加とともに増加していた。しかし、増加量の程度がMK-021よりも大きくまた親株であるi-59と同程度のn-PrOH生成量を示していた。

このことから、ソバ抽出物存在下でi-AmOH生成量が少なくn-PrOH生成量の多いF株が、ソバ焼酎の品質向上に有効であると考えられた。

次に、ソバの品種の違いが、酵母のi-AmOH、n-PrOH及びEtOH生成量に及ぼす影響を調べた。(図3、4、5) i-AmOHとn-PrOH生成量はソバの品種が異なっても影響の程度はほとんど同じであった。一方、EtOH生成量は、ソバ抽出物の添加により減少する傾向にあったが、F株が最も影響を受けにくいことが分かった。

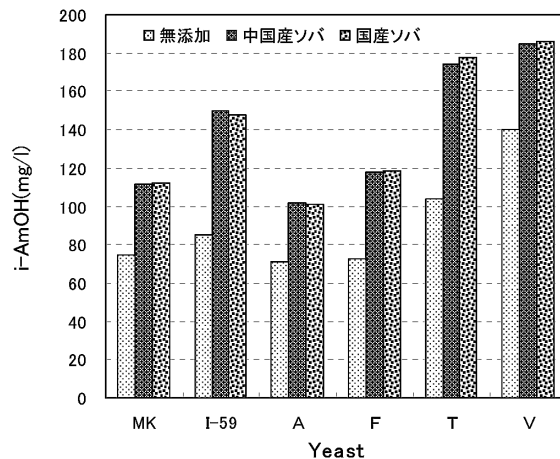


図3 ソバ品種の違いとi-AmOH生成量

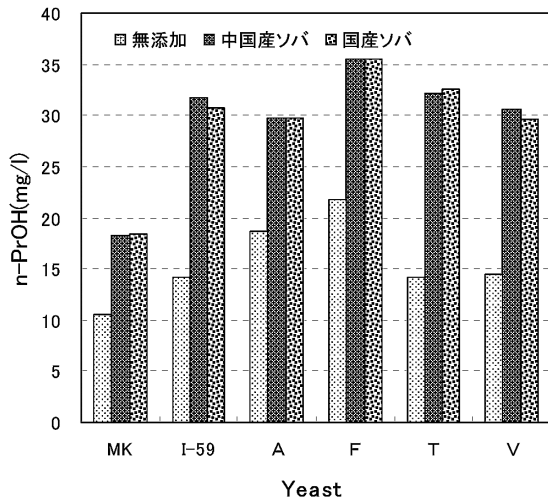


図4 ソバ品種の違いとn-PrOH生成量

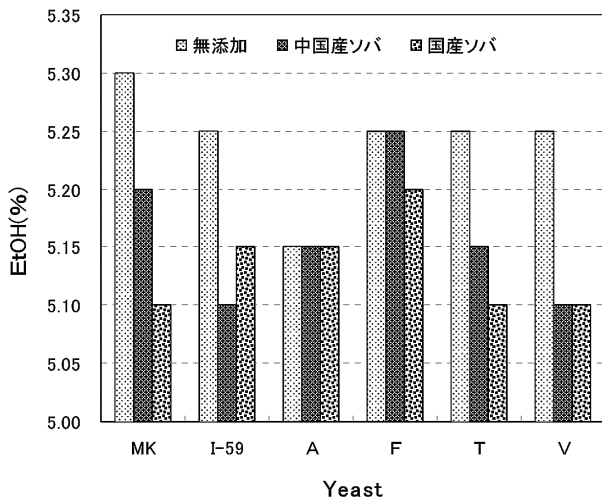


図5 ソバ品種の違いとEtOH生成量

以上のことから、得られた4つの変異株のうちソバ焼酎醸造に最も適した酵母はF株であると考えられた。

### 3-2 代謝誘導体の抵抗性

F株はEtOH生成能が向上したがまだまだMK-021に及ばなかった。そこで、i-59とF株をi-AmOHとは異なった代謝誘導体耐性突然変異株を造成しEtOH生成率の向上を図るため、i-59株を用いてそれらに対する耐性を調べた。

4種の誘導体(EBH, PM, FP, CLA)は全て酵母の香気成分生成に係わる成分の誘導体である。これらの濃度を0~100mMと変化させ、形成されたコロニー数より生育数を求めた。図6に示したように、生育できないEBH、PM、FP及びCLAの濃度はそれぞれ10mM、6mM、>100mM、80mM

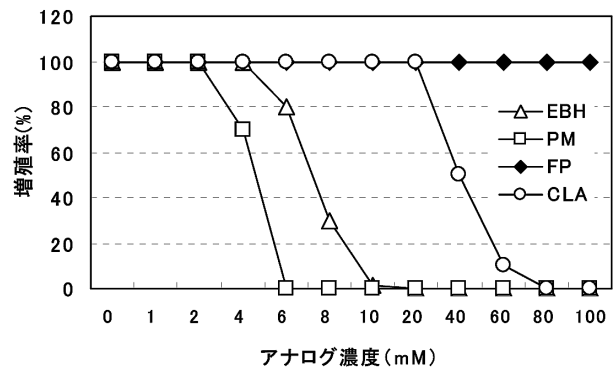


図6 i-59株の代謝誘導体に対する耐性

であった。この結果より、誘導体としてEBHとPMを用いることにした。

### 3-3 突然変異処理と発酵試験

i-59とF株に紫外線を1分間照射し、その0.1mlをEBHを6、8、10mM、PMを2、4、6mM含む培地に塗抹し培養後、コロニーの大きさから判断して生育の良い株を選んだ。これによりi-59から35株、F株から20株の誘導体耐性酵母が得られた。

表1 誘導体耐性株の香気成分

株名	香気成分 (mg/l)					EtOH (%)
	AcOEt	n-PrOH	i-BuOH	i-AmOH	$\beta$ -PheOH	
MK021	16.8	13.2	33.4	158.2	66.5	7.90
i-59	20.0	24.6	48.8	203.9	84.9	7.80
F	18.2	29.5	45.0	196.2	74.5	7.85
i59-6E3	22.1	23.6	45.6	202.7	88.4	7.85
i59-6E7	24.0	24.3	40.5	182.5	69.8	7.80
i59-8E1	26.3	28.7	46.4	191.7	69.2	7.80
i59-8E3	25.8	28.9	36.7	160.6	71.1	7.80
i59-2P1	24.9	30.2	56.8	224.3	97.5	7.75
i59-2P4	27.1	25.4	52.0	220.3	89.5	7.90
i59-2P8	18.8	23.8	45.7	195.9	82.6	7.75
i59-2P12	20.7	28.9	49.5	207.5	74.0	7.80
i59-4P3	28.3	17.9	39.1	185.3	57.5	7.90
i59-4P6	22.2	24.8	48.2	202.5	85.1	7.70
i59-4P8	24.4	26.0	51.0	213.2	83.7	7.90
F-6E1	16.9	33.6	36.6	178.9	103.5	7.80
F-2P2	19.0	31.4	35.4	167.1	95.2	7.80
F-2P5	25.0	31.0	49.6	201.3	74.1	7.80
F-2P11	24.3	34.4	47.4	198.1	75.4	7.80
F-4P1	23.6	31.0	34.8	171.0	99.1	7.90
F-4P3	22.9	38.0	50.8	197.2	70.8	7.80

55株の誘導体耐性株の発酵試験を行い、EtOH生成能に優れた酵母を選抜した。その結果、i-59から11株、F株から6株の計17株が得られた。

これらの17株をソバ抽出物を添加した培地で培養した後、香気成分やEtOH生成量を表1に示した。培地の関係上EtOH濃度が低くなったが、誘導体耐性株のうち4株が親株であるi-59やF株を上回りMK-021と同レベルまでEtOHを生成していた。特に、F-4P1株は、n-PrOH量が多くi-AmOH量が少なく苦味発生を抑えることができ、また、 $\beta$ -フェネチルアルコールも多くなっていることから、ソバ焼酎の酒質の向上に有効であると思われた。

#### 4 まとめ

昨年に引き続き、苦味発生のないソバ焼酎製造に適した酵母の造成について検討したところ、以下のことが分かった。

1) 酵母i-59を突然変異処理して得られたi-AmOH耐性株であるF株は、苦味の低減に有効であると考えられた。しかし、EtOH生成能は親株であるi-59より向上したがMK-021には及ばなかった。

2) EtOH生成能の向上を目指してi-59とF株を突然変異処理し、代謝誘導体耐性株を選抜したところ、EtOH生成能が向上した株が得られた。

3) 中国産ソバと国内産ソバでは、香気成分生成量に及ぼす影響はほぼ同じであった。しかし、EtOH生成量に及ぼす影響は、酵母により異なりF株が最も少ないと考えられた。

今後は、継代培養を行い安定性等について検討をしていく予定である。

#### 5 参考文献

- 1) 水谷政美, 工藤哲三, 日高照利, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, **43**, 117 (1998)
- 2) 水谷政美, 工藤哲三, 日高照利, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, **44**, 125 (1999)
- 3) 水谷政美, 日高照利, 工藤哲三, 岡崎益己, 柏田雅徳, 醸協, **97**(6), 461-467 (2002)
- 4) 水谷政美, 工藤哲三, 岡崎益己, 柏田雅徳, 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告, **47**, 123 (2002)