分離酵母 5-15 株の合成培地における香気特性について

穂坂 賢・中田久保・栗山弥生・中西載慶

<東京農業大学短期大学部醸造学科>

平成 5 年 10 月 26 日受理

The Quality of Aroma Components of the Yeast Strain 5-15 Isolated from *Kokuto* in Fermented Synthetic Media

Character of the Strain Isolated from *Kokuto* Enrichment Culture Method (Part 2)

Masaru HOSAKA, Hisayasu NAKATA, Yayoi KURIYAMA and Kotoyoshi NAKANISHI
(Department of Brewing and Fermentation, Junior College of Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156)

Fermentation characteristics of the yeast strain 5-15 isolated from *Kokuto* (a non-centrifugal sugar produced in south-west islands, Japan) by enrichment culture were examined. The 5-15 strain showed low productivity of isobutyl alcohol in media containing Casamino acid, peptone or arginine as nitrogen source, giving high isoamyl alcohol/isobutyl alcohol (A/B) ratios. Wine making tests were carried out using this strain. For this purpose, a potassium pyrosulfite-resistant strain, 5-15 GS, was bred, and used in wine making tests with commercial grape juice and Muscut Bailey A must. The 5-15 GS strain showed low productivity of isobutyl alcohol, and gave high A/B ratios in commercial grape juice and wine mash using Muscut Bailey A at 18~20°C for 10 days. This strain was considered to have a good character as wine yeast.

Key words: 赤ワイン・マスカットベリー A・香気特性

緒 言

黒糖の集積培養液から分離された 1 株¹⁾ (5-15) は高糖濃度培地中での発酵力が強く、アルコール生成能も高い。また、5-15 株の香気生成能は、黒糖焼酎もろみにおいて K-7, SH 4, A-11 および Aw-1 と比較し isobutyl alcohol 生成能が低く、従って A/B (isoamyl alcohol/isobutyl alcohol) 比が高い値となる特徴¹⁾を有する。A/B 比が高いと香りは軽く華やかな官能的特徴²⁾を示すと言われている。

本分離株 (5-15) は、窒素源にカザミノ酸、ヘプトン、アルギニンを用いた場合に isobutyl alcohol 生成能は他の醸造酵母 (SH 4, Aw-1, K-7, OC No.2, IFO 2215, IFO 2220 および IFO 2252) と比較して低いことが明らかとなった。特に、アルギニンを用いた培地中で本菌株は isobutyl alcohol 生成量が低い値を示した。

黒糖の集積培養液から分離した酵母の性質 (第 2 報)

アルギニンはブドウの品種により多少の違いはあるが、ブドウ果汁中に多く含まれているアミノ酸である^{3,4)}。従って、本酵母を用いてブドウ果汁を発酵させると、低 isobutyl alcohol ワインが得られ、A/B 比の高いワインを得ることが可能と考えられる。

そこで本分離株から、亜硫酸耐性株を育成し、マスカットベリー A を原料とした赤ワインの小仕込みを実施したところ、発酵香が強く、華やかな香気を有するなど、良好な結果が得られ、ワイン醸造への利用が可能と考えられたので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

5-15¹⁾ (黒糖の集積培養液からの分離株), SH 4⁵⁾ (焼酎酵母), 泡盛 1 号酵母⁶⁾ (泡盛酵母, Aw-1), 協会 7 号酵母 (清酒酵母, K-7), ワイン酵母 (OC No.2, IFO 2215, IFO 2220 および IFO 2252) 4 株の計 8 株を用い

Table 1 Composition of synthetic medium.

glucose	250 g
N source	{ (NH ₄) ₂ SO ₄ , L-valine, L-leucine peptone, Casamino acid and arginine
KH ₂ PO ₄	0.55 g
KCl	0.425 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.125 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.125 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.5 mg
K ₃ -Citrate	5.0 g
citric acid	1.0 g
inositol	25 mg
Ca-pantothenate	2.5 mg
biotin	0.025 mg
thiamine-HCl	0.5 mg
pyridoxine-HCl	0.5 mg
distilled water	1,000 ml

た。

2. 培地組成

Table 1 に示す。窒素源としては硫酸アンモニウム (硫安) 1.0 g/l, L-バリン 0.5 g/l, L-ロイシン 0.5 g/l, カザミノ酸 2.0 g/l, ペプトン 2.0 g/l, あるいはアルギニン 2.0 g/l 各々を単独に用い、糖濃度はグルコースで 25% (w/v) とした。

3. 培養条件

それぞれの培地を 500 ml 殺菌綿栓三角フラスコに 300 ml 加え、120°C, 5 分間殺菌し、あらかじめ YM 液体培地に前培養した各々の酵母を 2×10^5 /ml となるよう添加し、18~10°C で 10 日間静置培養した。

4. 分析方法

アルコール、酸度は国税庁所定分析法注解⁹⁾に従い、香気成分の分析は濾液を等量のエーテル・ペンタン (2:1) 混合溶剤で抽出後、中性化合物を得、濃縮し、ガスタロマトグラフィー (日立 163 型) で分析を行った。

5. 亜硫酸耐性実験および耐性株の分離

市販ブドウ果汁 (Brix 16°) 50 ml を 100 ml 殺菌綿栓三角フラスコに分注し、さらにピロ亜硫酸カリウム (メタカリ) を 150 ppm になるよう添加したものに、あらかじめ YM 液体培地に前培養した各々の酵母を 2×10^5 /ml となるよう添加し、25°C で培養しながら経時的に観察し、増殖の有無を見た。耐性株の分離は塚原ら⁸⁾の馴養法を応用し、150 ppm で増殖したものを再度 150 ppm で馴養し、次に 200 ppm で培養、馴養し、さらに 250 ppm で培養、馴養を 4~5 回繰り返した。これを適宜希釈し、NaOH にて pH 5.0 に調整した市販ブドウ果汁に寒天 2% を加え、120°C, 15 分間殺菌後冷却し、メタカリを 250 ppm になるよう添加した平板培地に塗抹し、

30°C で 2 日間培養後、生育したコロニーを釣菌した。釣菌株を YM 斜面培地に 10 回植え継ぎ更新したものを、さらにメタカリ 250 ppm 添加した市販ブドウ果汁中での耐性を検討し、ワイン酵母と比較して耐性に遜色ない株を亜硫酸耐性株とした。

6. 赤ワインの小仕込試験

(1) 市販ブドウ果汁 (ウェルチエ・赤)

Brix 23° となるよう補糖し、500 ml 殺菌綿栓三角フラスコに 300 ml 分注し、オートクレーブにて 120°C, 5 分間加圧殺菌後、あらかじめ YM 液体培地に前培養した各々の酵母を 2×10^5 /ml となるよう添加し、18~20°C で 12 日間発酵させた。

(2) マスカットベリー A

新鮮なブドウ果実 1 kg を破砕、除梗後、Brix 23° となるよう補糖後、メタカリを 100 ppm 濃度となるよう添加し、2 l 容綿栓三角フラスコに加え、あらかじめ YM 液体培地に前培養した各々の酵母を 2×10^5 /ml となるよう添加し、18~20°C で 12 日間発酵させた。

実験結果および考察

1. 窒素源に硫安, L-バリン, L-ロイシンを用いた培地の中で isobutyl alcohol, isoamyl alcohol の生成

A/B 比を支配する酵母の高級アルコール生成経路の 1 つは、糖⁹⁾からアミノ酸であるバリン、ロイシンの合成経路の中間体であるケト酸から、脱炭酸され、さらに還元されてそれぞれ isobutyl alcohol, isoamyl alcohol が生成される経路である。他の 1 つは、培地中のバリンから isobutyl alcohol, ロイシンから isoamyl alcohol が生成される EHRLICH¹⁰⁾ 経路である。

そこで糖からアミノ酸生合成経路で生成される isobutyl alcohol, isoamyl alcohol 量と EHRLICH¹⁰⁾ 経路から生成される isobutyl alcohol, isoamyl alcohol 量を比較するために窒素源として硫安, L-バリン, L-ロイシンを用いた培地での isobutyl alcohol, isoamyl alcohol 生成量の結果を Table 2 に示す。

黒糖焼酎もろみで低 isobutyl alcohol 生成能を示し、A/B で大きい値を示す 5-15 株¹⁾は、硫安を用いた培地中で isobutyl alcohol 生成量 5 ppm, isoamyl alcohol 生成量 30 ppm, A/B 比 6.0 と他の醸造酵母の isobutyl alcohol 生成量 5~10 ppm, isoamyl alcohol 生成量 23~37 ppm, A/B 比 2.3~6.8 と遜色のない値を示し、とりわけ特徴のある値を示さなかった。

また、培地中に窒素源として L-バリンを用いた培地中での 5-15 株¹⁾の isobutyl alcohol 量も 83 ppm と他の醸造酵母の 73~116 ppm と比較して、遜色のない値

Table 2 Aroma components in the glucose 25% media using various nitrogen sources after fermentation at 18~20°C for days.

Strain	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0 g/l			L-valine 0.5 g/l			L-leucine 0.5 g/l		
	<i>i</i> -BuOH (ppm)	<i>i</i> -AmOH (ppm)	A/B ratio	<i>i</i> -BuOH (ppm)	<i>i</i> -AmOH (ppm)	A/B ratio	<i>i</i> -BuOH (ppm)	<i>i</i> -AmOH (ppm)	A/B ratio
5-15 (<i>Kokuto Shochu</i> yeast)	5	30	6.0	83	24	0.3	1	280	280
SH 4 (<i>Shochu</i> yeast)	5	34	6.8	116	16	0.1	2	285	142.5
Awamori No.1 (<i>Awamori</i> yeast)	8	28	3.5	73	23	0.3	3	239	79.7
K 7 (Sake yeast) (Wine yeast)	7	27	3.9	87	30	0.3	2	220	110
OC No.2	7	33	4.7	81	22	0.3	1	278	278
IFO 2215	10	23	2.3	87	18	0.2	5	285	57
IFO 2220	8	37	4.6	85	26	0.3	2	250	125
IFO 2252	8	34	4.3	91	25	0.3	3	268	89

Isobutyl alcohol and isoamyl alcohol were estimated by gas chromatography
i-BuOH; isobutyl alcohol, *i*-AmOH; isoamyl alcohol
A/B ratio; isoamyl alcohol/isobutyl alcohol

Table 3 Aroma components in the glucose 25% media using various nitrogen sources after fermentation at 18~20°C for days.

Strain	Casamino acid 2.0 g/l			Peptone 2.0 g/l			Arginine 2.0 g/l		
	<i>i</i> -BuOH (ppm)	<i>i</i> -AmOH (ppm)	A/B ratio	<i>i</i> -BuOH (ppm)	<i>i</i> -AmOH (ppm)	A/B ratio	<i>i</i> -BuOH (ppm)	<i>i</i> -AmOH (ppm)	A/B ratio
5-15 (<i>Kokuto Shochu</i> yeast)	24	130	5.4	19	165	8.7	0.5	11	22.0
SH 4 (<i>Shochu</i> yeast)	35	140	4.0	32	166	5.2	2	16	8.0
Awamori No.1 (<i>Awamori</i> yeast)	48	179	3.7	52	166	3.2	3	19	6.3
K 7 (Sake yeast) (Wine yeast)	43	136	3.2	39	226	5.8	2	23	11.5
OC No.2	76	130	1.7	38	210	5.5	2	18	9.0
IFO 2215	38	126	3.3	39	213	5.5	7	16	2.3
IFO 2220	63	108	1.7	34	224	6.7	2	18	9.0
IFO 2252	49	104	2.1	36	189	5.3	3	20	6.7

Isobutyl alcohol and isoamyl alcohol were estimated by gas chromatography
i-BuOH; isobutyl alcohol, *i*-AmOH; isoamyl alcohol
A/B ratio; isoamyl alcohol/isobutyl alcohol

を示した。L-ロイシンを用いた培地での isoamyl alcohol 量も 280 ppm と他の醸造酵母の 220~285 ppm と比較し、遜色のない値を示した。

2. 窒素源にカザミノ酸、ペプトン、アルギニンを用いた培地中での isobutyl alcohol, isoamyl alcohol の生成

種々のアミノ酸が混在するときの高級アルコールの生成は、培地中のバリンから isobutyl alcohol, ロイシンから isoamyl alcohol の生成がされるとともに、互いに共存するアミノ酸により isobutyl alcohol, isoamyl alcohol の生成が抑制¹¹⁾しあう複雑な系となり、単一のアミノ酸、硫酸の場合と異なる。そこで窒素源にカザミノ酸、ペプトンを用いた培地中での isobutyl alcohol, isoamyl alcohol 生成量を検討した結果を Table 3 に示す。5-15

株¹²⁾は、カザミノ酸を用いた培地中で isobutyl alcohol 生成量 24 ppm, isoamyl alcohol 生成量 130 ppm, A/B 比 5.4 と、他の醸造酵母の isobutyl alcohol 生成量 38~76 ppm, isoamyl alcohol 生成量 104~179 ppm, A/B 比 1.7~4.0 に対して、isobutyl alcohol 生成量が低い値を示し、従って、A/B 比は大きい値となり、黒糖焼酎もろみにおける香気組成と同じ傾向を示した。

ペプトンを窒素源に用いた培地中でも 5-15¹²⁾ 株は、isobutyl alcohol 生成量 19 ppm, isoamyl alcohol 生成量 165 ppm A/B 比 8.7 と、他の醸造酵母 isobutyl alcohol 生成量 32~52 ppm, isoamyl alcohol 生成量 165~226 ppm, A/B 比 3.2~6.7 に対して、isobutyl alcohol 生成量が低い値を示し、A/B 比も大きい値となった。以上の結果から 5-15 株の低 isobutyl alcohol 生成能は種

々のアミノ酸が混在するとき、isobutyl alcohol 生成の抑制¹⁴⁾が大きいと推察した。本要因については今後さらに検討する予定である。

5-15¹⁾ 株は高糖濃度培地中での発酵力が強く、ワイン酵母としての利用が可能であると考えられる。

ブドウ果汁中のアミノ酸としては、ブドウの品種により異なるが、アルギニンが多く含まれている^{3,4)}。そこでアルギニンを窒素源に用いた培地中での香気生成能の検討を行った。5-15¹⁾ 株は、isobutyl alcohol 生成量 0.5 ppm, isoamyl alcohol 生成量 11 ppm, A/B 比 22 と、他の醸造酵母の isobutyl alcohol 生成量 2~7 ppm, isoamyl alcohol 生成量 16~23 ppm, A/B 比 2.3~11.5 に対して、isobutyl alcohol 生成量が低い値を示し、従って、A/B 比も大きい値となった。

また、表には示していないが、糖をグルコースよりフラクトースにした培地においても 5-15 株の isobutyl alcohol の生成量は、他の醸造酵母と比較し、1/3~2/3 と低く、従って A/B 比も 1.5~2.5 倍と大きい値を示し、グルコースを用いた培地と同様の結果が得られた。

以上の結果より、本菌株をワイン醸造に利用すると、低 isobutyl alcohol, 高 A/B 比を示す製品が得られるものと思われる。

3. 亜硫酸耐性の検討と耐性株の分離

ワイン醸造におけるメタカリの利用は、殺菌効果だけではなく、ブドウ酒の品質向上にも役立っている。当然、ワイン酵母としては、亜硫酸耐性が要求される。5-15¹⁾ 株とワイン酵母の亜硫酸耐性について検討した結果を Table 4 に示す。メタカリ 150 ppm 添加で供試ワイン酵母は 1~2 日目に増殖が見られるのに対し、5-15 株は 5 日目に増殖が見られ、供試ワイン酵母と比較して、明らかに亜硫酸耐性が低い。

ところで塚原ら⁸⁾は、低濃度亜硫酸より逐次高濃度へ馴養していくと亜硫酸耐性を高めることができ、その性

Table 4 Tolerance of the yeasts to high concentration of potassium pyrosulfite in grape juice.

Strain	Added 150 ppm days					Added 250 ppm days				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
5-15	—	—	—	—	+	—	—	—	—	+
5-15 GS*						—	+	+	+	+
OC No.2	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+
IFO 2215	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
IFO 2220	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+
IFO 2252	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Incubation at 25°C

+ : growth in grape juice containing potassium pyrosulfite

5-15 GS* : strain of high tolerance to potassium pyrosulfite

質は安定すると述べている。

そこで本馴養法を応用して得られた株 (5-15 GS) と供試ワイン酵母のメタカリ 250 ppm における耐性を検討した結果を Table 4 に示す。親株の 5-15 株¹⁾は、6 日目に増殖が見られたのに対し、耐性株 (5-15 GS 株) は 2 日目に増殖が見られ、供試ワイン酵母の 1~3 日目と遜色のない耐性を示した。

4. 市販ブドウ果汁およびマスカットベリー A を用いたワインもろみ中での香気特性

5-15 株は、アルギニンを窒素源に用いた培地中で、isobutyl alcohol 生成能が低い。本菌株から馴養法⁸⁾により亜硫酸耐性株 (5-15 GS) を分離し、この株を用い、市販ブドウ果汁およびマスカットベリー A を原料としたメタカリ 100 ppm 添加赤ワインもろみ中の低沸点香気成分を検討した結果を Table 5 に示す。5-15 GS 株は、市販ブドウ果汁において、isobutyl alcohol 生成量 11.2 ppm, isoamyl alcohol 生成量 87.2 ppm, A/B 比 7.79 と、他の供試ワイン酵母の isobutyl alcohol 生成量

Table 5 Aroma components in commercial grape juice and wine mash containing potassium pyrosulfite 100 ppm using Mascut Bailey A at 18~20°C for 10 days.

Aroma components	Strain	5-15 GS	OC No.2	IFO 2215	IFO 2220	IFO 2252
n-Propyl alcohol		8.02	9.32	7.80	5.34	6.39
n-Butyl alcohol		(6.12) 2.66	(0.24) 0.19	(0.54) 0.54	(trace) 0.24	(0.28) 0.16
Isobutyl alcohol		(11.20) 40.00	(57.80) 57.00	(51.90) 109.00	(34.10) 59.00	(31.70) 71.00
Isoamyl alcohol		(82.20) 364.00	(144.70) 377.00	(107.30) 362.00	(150.50) 495.00	(126.80) 341.00
Ethyl acetate		9.55	7.98	7.78	8.86	10.42
Isoamyl acetate		3.18	1.03	1.07	1.93	1.44
A/B ratio		(7.79) 9.10	(2.50) 6.61	(2.07) 3.32	(4.41) 8.39	(4.00) 4.80

Value sares hown in ppm.

() : Analytical values of commercial grape juice

A/B ratio ; Isoamyl alcohol/Isobutyl alcohol

E/A×100 ; Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol×100

31.7~57.8 ppm, isoamyl alcohol 生成量 107.3~150.5 ppm, A/B 比 2.07~4.41 に対し, isobutyl alcohol 生成量が低い値を示し, 従って, A/B 比が最も大きい値となった。他の成分では, *n*-butyl alcohol が 5-15 GS 株では 6.12 ppm と, 他の供試ワイン酵母の trace~0.54 ppm に対して高い値を示した。

また, マスカットベリー A を用いたワインのもろみでは, 5-15 GS 株の isobutyl alcohol 生成量 40 ppm, isoamyl alcohol 生成量 364 ppm, A/B 比 9.1 と, 他の供試ワイン酵母の isobutyl alcohol 生成量 57~109 ppm, isoamyl alcohol 生成量 341~495 ppm, A/B 比 3.3~8.4 に対し, isobutyl alcohol 生成量が低い値を示し, 従って, 5-15 GS 株では A/B 比が最も大きい値となった。他の成分では, *n*-butyl alcohol が 2.66 ppm と, 他の供試ワイン酵母の 0.19~0.54 ppm に対して 5~15 倍の高い値を示した。また, エステル類については, 酢酸エチルおよび酢酸イソアミルについて定量したが, 5-15 GS 株の酢酸エチルは 9.55 ppm であったのに対し, 他の供試ワイン酵母は 7.78 ppm~10.42 ppm であり差はなかった。酢酸イソアミルは, 5-15 GS 株の 3.19 ppm に対し他の供試ワイン酵母 1.03 ppm~1.93 ppm と, 生成量に約 2 倍もの差がみられた。岸本ら¹²⁾によれば, 高級アルコールやエステル類は, ワインの香味の構成に大きく寄与しているとしている。そこで, 熟練した 5 名のパネラーによる官能検査を実施した結果, 5-15 GS 株は, 供試ワイン酵母に比較し, 香気のバランスが良好であり, エステル特に酢酸イソアミルに起因する発酵香が豊かであり, 香気の華やかな切れのよい酒質との評価を得た。

なお, 表には示していないが, もろみ中の生成アルコール濃度は, 5-15 GS 株 12.1%, 他の供試ワイン酵母 11.9~12.5%, 酸度は 5-15 GS 株 13.0 (酒石酸換算で 0.975 mg%), 他の供試ワイン酵母 11.7~13.8 (酒石酸換算で 0.875~1.035 mg%), エキス分は 5-15 GS 株 3.25, 他の供試ワイン酵母 2.97~3.28 であり, 大きな差異は見られなかった。

以上の結果より, 本菌株は, 市販ブドウ果汁およびマスカットベリー A を用いたワインのもろみ中で *n*-butyl alcohol が高い生成量を有し, isobutyl alcohol の生成量

が低く, A/B 比が大きくなる特徴ある香気特性を有することから, ワイン酵母としての利用の可能性が考えられる。

今後さらに種々の原料ブドウを使用したワイン醸造を検討する予定である。

要 約

黒糖の集積培養液から分離された 5-15 株は, isobutyl alcohol 生成能が低く, 従って, A/B 比が大きい値となる香気特性を有し, 高糖濃度培地での発酵能も強い。アルギニン窒素源に用いた培地中で 18~20°C の低温発酵にもかかわらず, isobutyl alcohol の生成量が低い値を示した。本結果により, ワインのもろみ中でも isobutyl alcohol の生成能が低いと考えられ, 馴養法⁹⁾により亜硫酸耐性株 5-15 GS 株を獲得し, 市販ブドウ果汁およびマスカットベリー A を用いた赤ワインの小仕込試験を行ったところ, 製品は isobutyl alcohol 濃度が低く, 従って, A/B 比が大きい値となった。

本菌株は, ワイン酵母として適性を有するものであらう。

文 献

- 1) 中田久保, 松永晶子, 穂坂 賢: 醸協, 87, (6) 453 (1992)
- 2) 吉沢 淑, 高橋康次郎: 醸協, 81, (10) 680 (1986)
- 3) K. HENNING, P. VENTER: *Naturwiss.*, 45, 130 (1986)
- 4) F. TERCELZ: *Ann. Tech. Agr.*, 14, 307 (1965)
- 5) 菅間誠之助: 醸協, 67, (8) 672 (1972)
- 6) 玉城 武, 忍頂寺晃嗣, 今村利久, 原田哲夫: 醸協, 76, (1) 59 (1981)
- 7) 注解編集委員会編: 第 3 回改訂国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1981)
- 8) 塚原寅次, 武田重信, 亀井宏成: 醸協, 52, (7) 598 (1957)
- 9) 吉沢 淑: 清酒酵母の研究, p.149 清酒酵母研究会 (1972)
- 10) F. EHRLICH: *Ber.*, 40, 1027 (1907)
- 11) 大内弘造, 高岸正邦, 山本泰彦, 秋山裕一: 醸酵工学, 59, 9 (1981)
- 12) 岸本宗和, 篠原 隆, 相馬英一, 後藤昭二: 醸協, 88, (9) 708 (1993)