

博士論文

醸造用酵母のリンゴ酸生成に関する研究

平成25年9月

石川県立大学大学院 生物資源環境学研究科

松田 章

目次	
略語	1
緒言	2
第1章 酸味に特徴を有する酵母の選抜と試験醸造	
1-1. 緒言	3
1-2. 実験方法	3
1-2-1. 供試菌株及び使用培地	3
1-2-2. 多酸性酵母の予備選抜	3
1-2-3. YM-10 培地による1次選抜	4
1-2-4. 麴エキス培地による2次選抜	4
1-2-5. 小仕込試験 (総米 500g)	4
1-2-6. 試験醸造 (総米 3kg)	4
1-2-7. 分析方法	5
1-2-8. 官能評価	5
1-2-9. ジメチルコハク酸感受性	5
1-3. 実験結果および考察	5
1-3-1. 酵母の選抜	5
1-3-2. ジメチルコハク酸(DMS)感受性	6
1-3-3. 小仕込試験 (総米 500g)	7
1-3-4. 試験醸造 (総米 3kg)	7
(1) 発酵曲線	7
(2) 一般成分	8
(3) 有機酸	9
(4) 香気成分	10
(5) 官能評価	11
1-3-5. 清酒のタイプ分類	12
要約	14
参考文献	15
第2章 清酒の小仕込み試験における酒質、特に有機酸生成に及ぼす影響因子	
2-1. 緒言	16
2-2. 実験方法	16
2-2-1. 原材料	16
2-2-2. 仕込み方法	16
2-2-3. 仕込み容器及び条件	17
2-2-4. 分析方法	19

2-3.	結果および考察	19
2-3-1.	小仕込試験 1 : 容器形状の影響	19
2-3-2.	小仕込試験 2 : もろみ表面積の影響	21
2-3-3.	小仕込試験 3 : 容器空間の違い	23
2-3-4.	小仕込試験 4 : もろみ表面積及びもろみ高さの影響	25
	要約	30
	参考文献	31
第3章	醸造用酵母のリンゴ酸生成に関連する酵素に及ぼす培養法の影響	
3-1.	緒言	32
3-2.	実験方法	33
3-2-1.	供試菌株と使用培地	33
3-2-2.	培養方法	33
3-2-3.	ミトコンドリア画分及び細胞質画分の調製	34
	① ミトコンドリア画分の調製	34
	② 細胞質画分の調製	34
3-2-4.	酵素活性測定	34
	① チトクローム C オキシダーゼ (CCO _x) 活性	35
	② リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) 活性	35
	③ イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICDH) 活性	35
	④ ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 活性	35
	⑤ コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) 活性	35
	⑥ イソクエン酸リアーゼ (ICL) 活性	35
3-2-5.	タンパク質の定量	36
3-2-6.	培養液の有機酸分析	36
3-3.	実験結果	37
3-3-1.	ミトコンドリア画分及び細胞質画分の酵素活性	37
	① CCO _x 活性	37
	② K-701 の酵素活性	37
	③ K-901 の酵素活性	38
	④ MT-K1401-8 の酵素活性	38
	⑤ FKW-A245 の酵素活性	39
	⑥ その他の特徴	39
3-3-2.	培養液中の有機酸濃度	44
3-3-3.	各種培養法における培地中の溶存酸素	49

3-4. 考察	50
3-4-1. 好气的条件における各リンゴ酸生成経路の推察	50
3-4-2. 嫌气的条件における各リンゴ酸生成経路の推察	51
3-4-3. リンゴ酸高生成酵母のリンゴ酸生成経路の推察	52
① MT-K1401-8	52
② FKW-A245	53
要約	54
参考文献	55
まとめ	57
謝辞	59
論文リスト	60

略語

DMS	dimethyl succinate
TCA	tricarboxylic acid
KPB	potassium phosphate buffer
2-ME	2-mercaptoethanol
AEBSF	4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
CCOx	cytochrome C oxidase
MDH	malate dehydrogenase
ICDH	isocitrate dehydrogenase
PDH	pyruvate dehydrogenase
SDH	succinate dehydrogenase
ICL	isocitrate lyase
BSA	bovine serum albumin

緒言

きょうかい酵母の普及による清酒の品質向上や、原料米の精白技術の発展による吟醸酒、大吟醸酒の醸造と、清酒醸造はこれまでに数々の発展を遂げてきている。そして現在も醸造方法の改良や優良な麹菌および酵母の育種などの研究が進められており、清酒醸造技術はますます高まっていくものと考えられる。

しかしながら、今日では清酒消費量の大幅な低下が問題となっている。清酒の消費量は昭和 50 年の約 167 万 kL をピークに減少を続けており、平成 22 年には約 59 万 kL と、約 100 万 kL 以上もの落ち込みを見せている。こうした問題の背景には、消費者の食生活の変化や嗜好の多様化により、清酒以外のアルコール飲料の需要の拡大が考えられる。

したがって、清酒においても、このような多様化する嗜好に対応できる新たな商品の開発が望まれる。

本研究では、アミノ酸と並ぶ清酒の呈味性要因の一つである酸味に着目し、酸生成の原因となる影響因子について検討を行った。酸は酒造りにおいて重要な要素であり、従来より酢酸のような揮発性の酸は、明らかに香味に負の評価を与えてしまう。しかし、酸によっては、たとえばさわやかな酸味を与えるリンゴ酸は、濃度次第では正の評価を与えることができる。したがって、清酒醸造過程における酸生成の要因を把握し、酸の種類と生成量を制御可能にすることができれば、酒造りひいては清酒の酒質の多様化に重要な意義をなすものと考えられる。

第 1 章では、たとえば洋食とワインの組み合わせに見られるように、多様化する食生活に合わせて酒質も多様化させることを検討した。具体的には、有機酸組成を変化させることで、新たなタイプの清酒を提供することを目的に、さわやかな酸味を有するリンゴ酸を多く生成する酵母を分離した。また、この分離株の発酵特性について検討した。

第 2 章では、小仕込み試験と実際の醸造試験との製成酒の成分含量、特に酸度（有機酸含量）が現実的には一致していない場合が多く見られることに着目し、小仕込み試験と工業規模の清酒醸造における製成酒の成分の相違の原因について検討した。具体的には、小仕込み試験の結果と実際の醸造結果を相似させることを目的として、仕込み容器の容量や形状、同一容器を用いて仕込み総量を変化させた場合の製成酒の成分含量に及ぼす影響について検討した。

第 3 章では、有機酸の生成は主として酵母の働きによるものであることから、リンゴ酸高生成酵母を含む 4 種類の酵母を用いて、リンゴ酸生成機構を明らかにすることを目的に、リンゴ酸生成に関連する酵素の活性に及ぼす培養法、特に酸素供給の異なる培養方法の影響について検討した。

第1章 酸味に特徴を有する酵母の選抜と試験醸造

1-1. 緒言

近年、食の多様化や嗜好の変化に伴い、洋食に合うワインなどの消費が増加し、清酒の売り上げが伸び悩んでいる。それゆえ、石川県内酒造企業からも清酒の多様化と需要拡大を図るために、若年層や女性をターゲットとして、清酒の旨味を残しつつ洋風料理とも相性の良いワインのような酸味を付与した清酒の開発が求められている。

清酒の酸味のもととなる有機酸は約40種類も含まれていると報告されている^{1,2)}が、乳酸、リンゴ酸、コハク酸の3種類で80%以上を占める³⁾。このうちリンゴ酸は「さわやかな」味で官能的にも評価が高い。これまでにもリンゴ酸を多く生成する酵母が開発され、生成機構等についての報告がなされている⁴⁻¹⁵⁾。しかし、多くは酵母の発酵力に課題があり、甘口の清酒や低アルコール清酒となる傾向があった。

本研究では、アルコール発酵力の低下がなく、リンゴ酸生成能の高い酵母の取得を目的に、変異処理を行わないできょうかい酵母のシクロヘキシミド耐性株や石川県下の清酒もろみ、清酒酵母とワイン酵母との細胞融合株から選抜を行った。また、選抜した酵母を用いて清酒の試験醸造を行った。

1-2. 実験方法

1-2-1. 供試菌株及び使用培地

清酒用きょうかい酵母(7号泡あり,泡なし(K-7,K-701),9号泡あり,泡なし(K-9,K-901),14号泡なし(K-1401)及び15号泡あり,泡なし(K-15,K-1501))は,(財)日本醸造協会より入手した。酵母の培養及び分離・選抜にはYPD培地(1%酵母エキス,2%ポリペプトン,2%グルコース),YM培地(0.3%酵母エキス,0.3%麦芽エキス,0.5%ポリペプトン,1%グルコース),YM-10培地(YM培地のグルコース濃度を10%にしたもの),メチルオレンジ(MO)培地(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids,1%グルコース,1%MO(50mg/100ml)水溶液),シクロヘキシミド(CH)培地(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acids,1%グルコース,1mg/l CH)を用いた。また,平板寒天培地は各液体培地に寒天を2%加えて調製した。

1-2-2. 多酸性酵母の予備選抜

選抜の対象とした酵母は以下のA,B,C群である。A群:清酒用きょうかい酵母を対象(K-7,K-701,K-9,K-901,K-1401,K-15,K-1501)に吉田ら⁵⁾の方法に準じて1ppmのCH寒天培地上に自然誘発により生育した34株,B群:平成12,16,17酒造年度に石川県内の清酒製造企業から採取した清酒もろみ85種類(泡あり,泡なしの各酵母を含むいずれのもろみからも)を滅菌水により適宜希釈した後YMプレートに塗布し,30℃,3日間培養を行って得られた1700株,C群:平成5年度に石川県工業試験場で行った清

酒用きょうかい9号酵母泡なし株(K-901)とワイン酵母(OC-2)との細胞融合¹⁶⁾株の保存株37株を用いた。

A, B, C群の各酵母をM0培地に接種して30°Cで1~2日間培養し、培地の色がK-7, K-9に比較して赤もしくは赤橙色となったものを予備選抜した。

1-2-3. YM-10 培地による1次選抜

A, B, C群から予備選抜した酵母をそれぞれ5mlのYM-10培地を加えたL字管に接種した。30°Cで2日間前培養し、その100 μ lを30mlの同培地(100ml容三角フラスコ)に接種して20°C, 3日間静置培養した。遠心分離を行い、上清中の有機酸を分析し、対照酵母(K-7, K-9)よりリンゴ酸量の多い株を選抜した。

1-2-4. 麴エキス培地による2次選抜

1次選抜した酵母を5mlの麴エキス培地(ボーム7, pH5.1)を加えたL字管で前培養した。この前培養液を用いて、ほぼ同じ菌数 1×10^6 cells/mlとなるように30mlの同培地(100ml容三角フラスコ)に接種して、15°C, 14日間静置培養した。1次選抜と同様にリンゴ酸生成量が多く、香味が良好な株を2次選抜酵母とした。

1-2-5. 小仕込試験(総米500g)

リンゴ酸生成量が多く、香味の調和のとれた選抜酵母を用いて、表1-1に示す仕込配合により総米500gの小仕込試験を行った。原料米として掛米は精米歩合70%の五百万石(平成17年度石川県産)を、麴米は乾燥麴(徳島製麴(株)製I-60:精米歩合60%, 米品種ニシホマレ)を使用した。麴歩合を23.2%, 汲水歩合を130%とし、3段の酵母仕込(初添時点での酵母接種濃度 1.3×10^7 cells/g)で行った。品温管理は初添, 踊で15°C, 仲添は8°C, 留添は6°Cで行った。その後、もろみの品温を徐々に上げ最高温度を12°Cとし、その後徐々に温度を下げ、日本酒度 ± 0 を目標として圧搾法により上槽した。

1-2-6. 試験醸造(総米3kg)

選抜酵母を用いて総米3kgの試験醸造を行った。仕込配合は表1-1の割合としスケールアップしたが、汲水歩合は一般的によく使用される

表1-1 清酒の仕込配合(総米500g)

		初添	仲添	留添	計
総	米(g)	89	143	268	500
	掛 米(g)	60	111	213	384
	麴 米(g)	29	32	55	116
汲	水(ml)	134	174	342	650
乳	酸(ml)	0.4	-	-	0.4

原料米: 70%精米五百万石(2005)

麴: 乾燥麴I-60(徳島製麴(株))

130%及びさらに汲水を少なくした120%の2通りとした。これは本試験醸造に先だつて行った汲水歩合130%での試醸酒(1回目,水麴時間;3時間)の官能評価では,酸味が強く感じられ,味のバランスからもっと濃醇な味わいにすることが望ましいとの意見が多かったためである。そこで,本試験醸造では汲水歩合130%(2回目,水麴時間;23時間)に加えて,味の濃醇なタイプを目指した汲水歩合120%を追加した。

仕込操作は500gの場合に準じたが,初添時点での酵母接種濃度は 2.6×10^6 cells/g,もろみの最高温度は13°C程度とし,上槽は槽しぼりで行った。

1-2-7. 分析方法

発酵液(YM-10培地,麴エキス培地)及び清酒の一般成分は国税庁所定分析法注解¹⁷⁾に基づき分析を行い,有機酸量は有機酸分析システムShodex OA(昭和電気(株)製)を用いて,ポストカラム誘導体化法により行った。清酒の香气成分の測定は,ヘッドスペースガスクロマトグラフシステムHSS-4A(GC-17A)(株島津製作所製)とカラムDB-WAX(J&W Scientific)0.25mmI.D.×30mを用い,昇温プログラム(60°C,4分保持,昇温速度10°C/分,最高温度:160°C)で測定した。

1-2-8. 官能評価

総米3kgの試醸酒については13酒造企業(石川県下)27名の製造担当者らの協力を得て,味,香り及び総合評価を5段階(1:良,2:やや良,3:普通,4:やや悪,5:悪)で官能評価した。

1-2-9. ジメチルコハク酸感受性

1.5%のジメチルコハク酸(DMS)を添加したYPD寒天培地上に培養酵母を適宜塗布し,30°Cでの生育の有無を検討した。

1-3. 実験結果および考察

1-3-1. 酵母の選抜

YM-10培地による1次選抜で18株,さらに麴エキス培地による2次選抜で6株を選抜した。この6株は,K-7及びK-9とほぼ同等のアルコール発酵能を示したので,麴エキスの発酵液について酒造企業の製造担当者による官能評価を行い,香味が良好な3株(以下A株(泡なし株),B株(泡あり株),C株(もろみ状貌から泡なし株と考えられる))を選抜した(図1-1)。A株はK-1401のCH耐性株である。CH耐性株は取得を試みた各酵母から得られたが,目的とするリンゴ酸高生産株を得ることができたのはK-1401株のみであった。ただし,得られたK1401のCH耐性株すべてが目的株ではなく,その中からさらにリンゴ酸高生産株を発酵試験で分離する必要がある。K1401のCH耐性株の分離頻度は約 8.4×10^{-7} であり,そのうち目的株の分離頻度はさらに1/10程度の

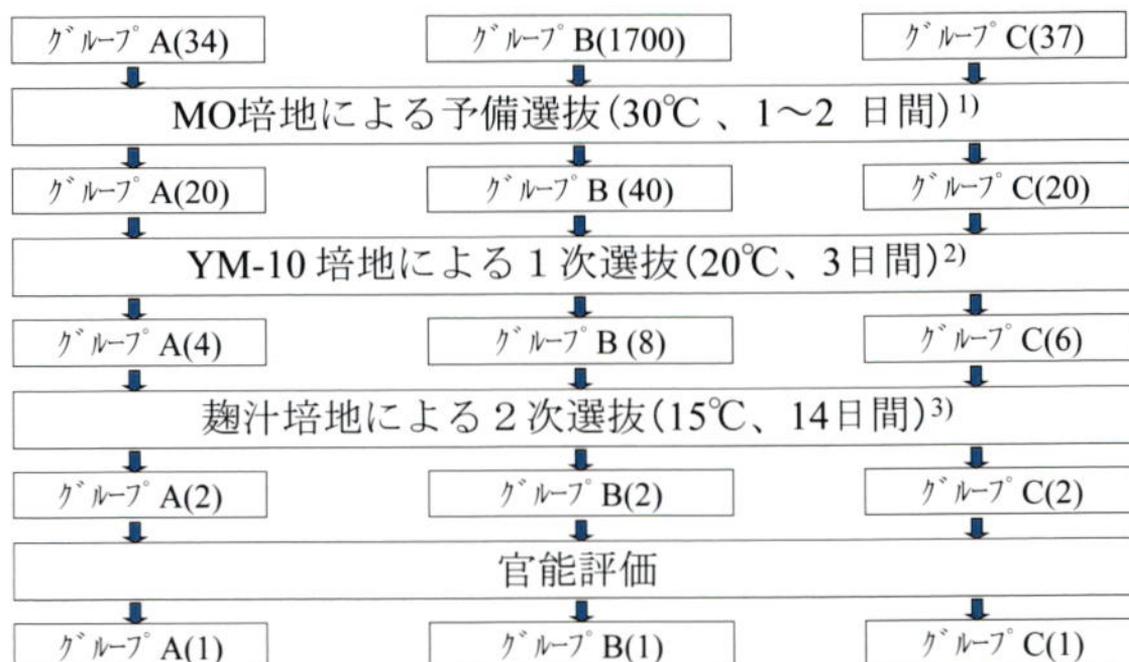


図1-1 リンゴ酸高生産酵母の選抜スキーム

- 1): 発酵後、培地のオレンジ色を赤または橙赤色に変えた株を選抜
 2)3): 発酵後、K-9以上に高いリンゴ酸濃度を示した株を選抜
 (): 選抜株数

8. 4×10^{-8} 程度であった。B株はもろみに仕込んだ酵母が K-7 であったこと及び β アラニン培地を用いて 20°C で生育可能で、35°C で生育不可であったことより K-7 由来の変異株と考えられた。また、C株は K-901 と OC-2 との細胞融合酵母である。

1-3-2. ジメチルコハク酸 (DMS) 感受性

A, B, C 株はいずれも 1.5% DMS 含有の YPD 培地に生育し、DMS に非感受性であった。リンゴ酸高生産酵母に関する既報において、相川ら⁴⁾はコハク酸デヒドロゲナーゼの阻害剤である DMS に感受性のある株より、吉田ら⁵⁾はシクロヘキシミド耐性株より分離しているが、両酵母とも DMS に感受性であることからトリカルボン酸(TCA)回路のコハク酸デヒドロゲナーゼなどが変異していると報告している^{4,5)}。しかし、今回分離した 3 株は DMS に非感受性であることから、リンゴ酸の高生産に関してはコハク酸デヒドロゲナーゼ以外の酵素が関与していることが示唆された。

清酒もろみのような嫌気的環境下では、リンゴ酸は TCA 回路の還元的方向、すなわちオキザロ酢酸よりリンゴ酸デヒドロゲナーゼにより生成されると言われている¹⁸⁾。このことから、選抜酵母 A, B, C 株のリンゴ酸高生産に関しては、ミトコンドリア内のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された可能性が考えられる。

また、近藤ら¹⁹⁾によると、清酒もろみ中でコハク酸及びリンゴ酸は TCA 回路のバイ

パスであるグリオキシル酸回路からも生成されるとの報告がある。したがって、リンゴ酸はグリオキシル酸回路からの生成も考えられる。詳細については今後さらに検討する必要がある。

1-3-3. 小仕込試験 (総米 500g)

A, B, C の 3 株を用いて 500g の小仕込試験を行い、試醸酒のリンゴ酸をはじめ有機酸含有量を測定した結果 (表 1-2), 3 株とも対照の K-9 と比較して試醸酒中のリンゴ酸は 1.5~2 倍の高い値を示した。また, B 株の乳酸, 酢酸の値は, K-9 と比較して高い値を示した。生成したアルコールはいずれも 17.5%前後で, 対照の K-9 とほぼ同等のアルコール発酵能を, 酸度はいずれも K-9 より高い値を, アミノ酸度はほぼ同等の値を示した (表 1-3)。

表1-2 清酒中の有機酸濃度 (mg/l)

	クエン酸	ピルビン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸	ピログルタミン酸
K-9	85	74	185	612	738	233	22
A 株	127	N.D.	423	668	838	271	4
B 株	98	108	416	545	1016	500	25
C 株	106	85	348	529	710	285	13

総米:500g, A株:シクロヘキシミド耐性株, B株:もろみから分離された株, C株:清酒酵母(K-901)とワイン酵母(OC-2)との細胞融合株, N.D.: Not Detected
 乳酸の各値は初添で加えた乳酸を含む。

表1-3 清酒の一般成分

	アルコール (%)	日本酒度	酸度(ml)	アミノ酸度(ml)
K-9	17.5	+2.5	2.5	2.2
A 株	17.7	+0.9	3.1	2.1
B 株	17.3	-1.6	3.5	2.2
C 株	17.3	-2.6	3.4	2.1

総米:500g, A株:シクロヘキシミド耐性株, B株:もろみから分離された株, C株:清酒酵母(K-901)とワイン酵母(OC-2)との細胞融合株、乳酸の各値は初添で加えた乳酸を含む。

1-3-4. 試験醸造 (総米 3kg)

(1) 発酵曲線

汲水歩合を 130%及び 120%として, A, B, C 株及び K-9 株を用いた総米 3kg の試験醸造 (8 種類) の発酵曲線をそれぞれ図 1-2, 図 1-3 に示した。A 株はいずれの汲水歩合

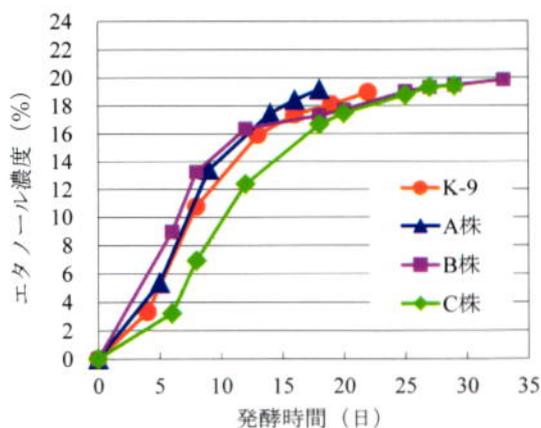


図1-2 A株、B株、C株及びK-9によるエタノール生成曲線（汲水歩合130%）

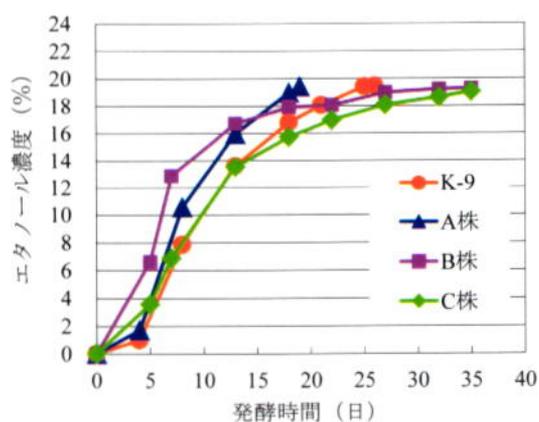


図1-3 A株、B株、C株及びK-9によるエタノール生成曲線（汲水歩合120%）

でも K-9 と同等もしくはそれ以上のアルコール生成能を示した。B 株はいずれの汲水歩合においても、もろみ発酵期間の前半では K-9 よりも発酵力が旺盛であったが、後半では発酵速度が低下し、結果的にもろみ日数が長くなった。また、C 株は汲水歩合 130% で、もろみの発酵期間全般において K-9 より発酵速度が低く、汲水歩合 120% では K-9 と同様に汲水歩合 130% の場合より発酵速度が低下し、もろみ日数が長くなった。A, B, C 株はもろみ日数に差はあったが、いずれも 18% 程度の高いアルコール生成を示した。

(2) 一般成分

試醸酒の一般成分の分析結果を表 1-4 に示した。

生成アルコール濃度は 17~19% で、選抜酵母のアルコール生成能は十分であった。また、A, B, C 株の酸度はいずれの汲水歩合でも K-9 に比較して高い値を示した。アミ

表1-4 清酒の一般成分

酵母/汲水歩合	アルコール(%)	日本酒度	酸度(ml)	アミノ酸度(ml)
K-9/130%	17.2	+1.0	2.3	2.3
A株/130%	16.7	+2.3	2.8	1.9
B株/130%	19.0	-3.5	3.1	2.8
C株/130%	19.1	-0.6	3.7	2.8
K-9/120%	18.6	-3.0	2.6	3.0
A株/120%	18.6	+1.4	3.2	2.3
B株/120%	18.8	-9.9	3.1	3.5
C株/120%	18.0	-14.2	4.0	3.3

ノ酸度はK-9に比較してA株は低く、B、C株は高い値を示したが、いずれも汲水歩合120%で130%の場合よりも高い値を示した。

日本酒度は、A株では汲水歩合に関係なくプラス(+2.3, +1.4)の値を示し、B株及びC株では、汲水歩合130%でそれぞれ-3.5, -0.6, 120%でそれぞれ-9.9, -14.2といずれもマイナスを示した。

特に、汲水歩合120%の場合、B、C株による試醸酒は、日本酒度と酸度がそれぞれ(-9.9, 3.1)及び(-14.2, 4.0)でK-9の場合(-3.0, 2.6)に比較して酸度が高く、甘味の残るタイプとなった。このことから、A株とB、C株とは発酵経過及びその結果としての酒質が異なるものと考えられた。

(3) 有機酸

8種類の試醸酒のリンゴ酸生成の経時変化をそれぞれ図1-4、図1-5に、上槽後の清

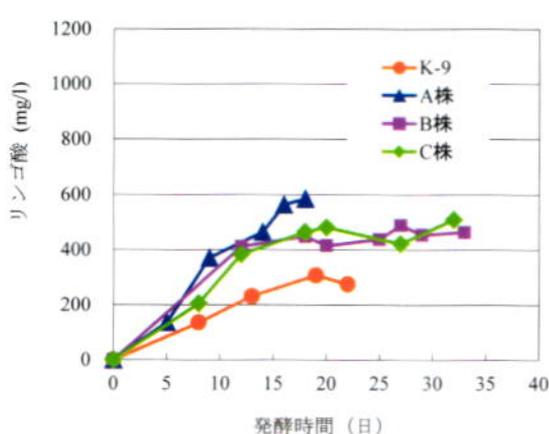


図1-4 A株、B株、C株及びK-9によるもろみ中のリンゴ酸の消長 (汲水歩合130%)

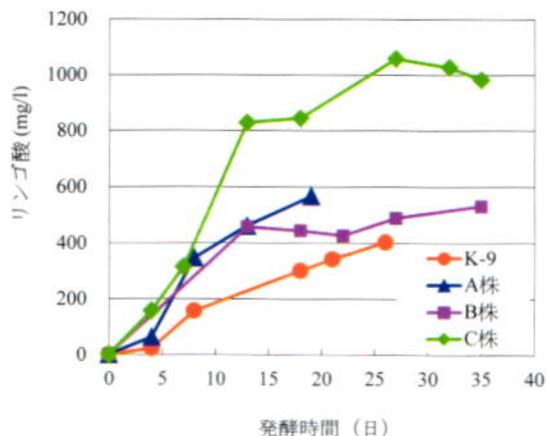


図1-5 A株、B株、C株及びK-9によるもろみ中のリンゴ酸の消長 (汲水歩合120%)

酒の有機酸含量の結果を表1-5に示した。図1-4、図1-5の結果より、選抜酵母はもろ

酵母/汲水歩合	クエン酸	ピルビン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸	ヒロクタルミン酸	計
K-9/130%	72	20	269	562	1025	58	20	2026
A/130%	78	128	534	516	1075	149	28	2508
B/130%	88	N.D.	464	466	1168	316	37	2539
C/130%	98	107	563	385	1431	201	42	2827
K-9/120%	91	N.D.	432	628	1136	70	56	2413
A/120%	81	130	601	459	1044	153	24	2492
B/120%	97	N.D.	531	592	1588	307	56	3171
C/120%	106	63	950	474	1796	91	61	3541

N.D.:Not Detected. 乳酸の各値は初添で加えた乳酸を含む。

値は23時間の水廻期間後に生成した清酒中の値である。

上で示された汲水歩合130%の清酒中のリンゴ酸濃度は、他の有機酸成分や香気成分におけるわずかな違いを除いては、3時間の水廻期間後に作られた以前のものとほとんど同じ値を示した。

み発酵 5 日目以降で K-9 と比べ、リンゴ酸生成量が多くなることが明らかとなった。

また、表 1-5 より、得られた試醸酒のリンゴ酸量は A 株を用いた場合、汲水歩合 130%、120% で K-9 のそれぞれ約 2 倍、約 1.4 倍、B 株を用いた場合、約 1.7 倍、約 1.2 倍、また C 株を用いた場合はいずれも約 2 倍の高い値を示し、いずれの試醸酒のリンゴ酸量も総米 500g 仕込と同様、K-9 と比較して 1.5~2 倍の高い値を示した。また、汲水歩合 130% の A 株、B 株のリンゴ酸量は、それぞれ 534mg/l、464mg/l、120% の場合は 601mg/l、531mg/l で、汲水歩合がリンゴ酸生成量に及ぼす影響は A 株、B 株では認められなかった(いずれも約 1.1 倍)。しかし、汲水歩合 120% の K-9 株及び C 株のリンゴ酸量はそれぞれ 432mg/l、950mg/l で、汲水歩合 130% の場合の 269mg/l、563mg/l のそれぞれ約 1.6 倍、約 1.7 倍に増加し、K-9 株、C 株では汲水歩合の影響が認められた。

乳酸量は、汲水歩合 130% の場合、A 株、B 株では K-9 とほとんど同量(約 1100mg/l)であったが、C 株のみ 1431mg/l で K-9 の 1025 mg/l の約 1.4 倍の高い値を示した。また、汲水歩合 120% の B 株、C 株の乳酸量はそれぞれ 1588mg/l、1796mg/l で、K-9 の 1136mg/l に比較して約 1.5 倍高い値を示した。

酢酸量は、汲水歩合 130% では A、B、C 株は K-9 のそれぞれ 2.6 倍、5.5 倍、3.5 倍高い値を示した。また、汲水歩合 120% の場合、A、B、C 株は K-9 のそれぞれ 2.2 倍、4.4 倍、1.3 倍で、A、B 株は、いずれの汲水歩合でも酢酸量が高い特徴を示した。

コハク酸量は、A、B 株ではいずれの汲水歩合においても K-9 と大きな差は見られなかったが、C 株の場合のみ 385mg/l、474mg/l と K-9 の 562mg/l、628mg/l に比べてやや低い値を示した。

総有機酸量は、汲水歩合 130% の場合、A、B、C 株は K-9 のそれぞれ 1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍を示し、120% の場合、A、B、C 株は K-9 のそれぞれ 1.0 倍、1.3 倍、1.5 倍を示し、いずれの汲水歩合でも C 株の総有機酸量が高いことが明らかとなった。

以上のことより、B 株の乳酸や酢酸の生成が大きいこと、及び C 株のリンゴ酸、乳酸の生成量が多いことは、解糖系で生成したピルビン酸からアセトアルデヒドを經由してエタノールへ進む代謝の流れの一部が酢酸生成や TCA 回路の方に進んだためと考えられる^{10,20)}。また、C 株では K-9 と同様に汲水歩合 120% では 130% の場合に比較してアルコール発酵速度が遅く、もろみ日数が長くなった。これは、汲水歩合 120% において酵母細胞の周りの栄養成分(糖分やアミノ酸など)濃度が高いため、代謝産物である有機酸等の生成濃度が高くなったために、もろみ発酵後期でアルコール発酵が緩慢となったものと推察された¹⁰⁾。

(4) 香気成分

香気成分の結果を表 1-6 に示す。A 株、B 株は K-9 とほぼ同等の香気成分を示した。また、C 株は K-9 に比較して n-プロパノールやイソブタノール、イソアミルアルコール

表1-6 清酒の香気成分

(mg/l)

酵母/汲水歩合	AcOEt	n-PrOH	i-BuOH	AcOi-Am	i-AmOH	CaprOEt	計
K-9/130%	44	95	78	1.7	222	0.3	441
A株/130%	42	158	94	1.9	199	0.2	494
B株/130%	30	127	111	0.9	231	0.3	499
C株/130%	32	197	177	1.5	331	0.2	739
K-9/120%	46	147	92	1.4	249	0.2	535
A株/120%	42	187	100	1.8	233	0.3	563
B株/120%	37	129	103	1.2	224	0.4	494
C株/120%	37	307	224	1.6	318	0.2	887

AcOEt : 酢酸エチル、n-PrOH : n-プロパノール、i-BuOH : イソブタノール、AcOi-Am : 酢酸イソアミル
i-AmOH : イソアミルアルコール、CaprOEt : カプロン酸エチル

の高級アルコールの成分値が高く、官能的に他の清酒酵母とは異なり個性のある香気を示した。また、総香気分量は、汲水歩合130%の場合、A、B、C株はK-9のそれぞれ約1.1倍、1.1倍、1.7倍を示し、120%の場合、A、B、C株はK-9のそれぞれ約1.1倍、0.9倍、1.7倍を示した。したがって、いずれの汲水歩合でもC株の総香気分量が、総有機酸量と同様、高いことが明らかとなった。

これらのこととC株のアルコール発酵速度が遅く、もろみ日数が長くなったことは、先の有機酸の生成と同様に、代謝の流れが高級アルコールなどの香気成分生成回路へも進んだためと推察された^{10,21)}。

(5) 官能評価

8種類の試醸酒について官能評価を行った結果、バラツキはあったものの普通の評価点3.0より評価が良かったものは、汲水歩合

130%ではA株、また汲水歩合120%ではB株、C株であった。酸味と甘味を併せ持った汲水歩合120%のB株、C株による試醸酒に高い評価点が見られた(図1-6)。

汲水歩合120%のB株及びC株は日本酒度が-9.9、-14.2とマイナスで、汲水歩合130%の場合よりも濃醇な味わ

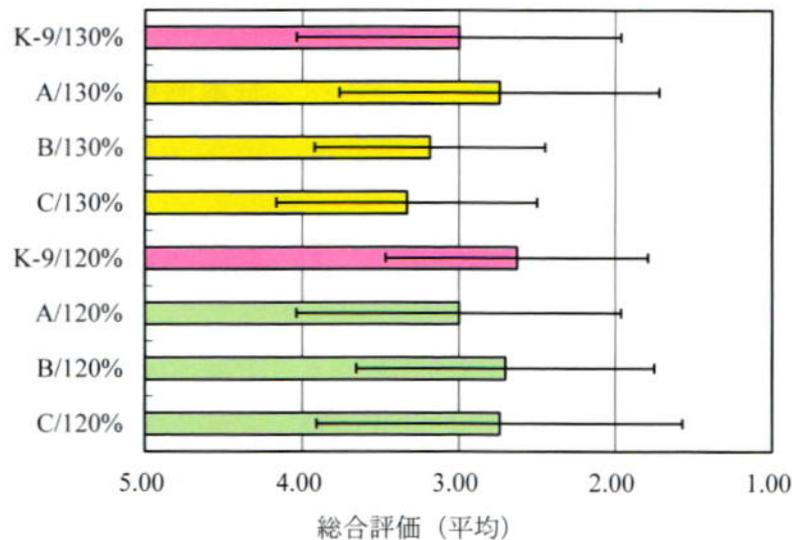


図1-6 清酒の官能評価

いであった。酸味の強さと甘味とのバランスが良好な評価につながったものと考えられた。逆にA株は汲水歩合130%、120%でそれぞれ日本酒度は+2.3、+1.4といずれもプラスで、汲水歩合120%では酸味がより強く感じられたため、味のバランス上、酸味のやや穏やかな汲水歩合130%が好まれたためではないかと考えられた。

1-3-5. 清酒のタイプ分類

清酒は図1-7に示すように、酸度と日本酒度との組み合わせで淡麗辛口、淡麗甘口、濃醇辛口、濃醇甘口の4つのタイプに分類できる。今回試験醸造した8種類は濃醇辛口のタイプであった。

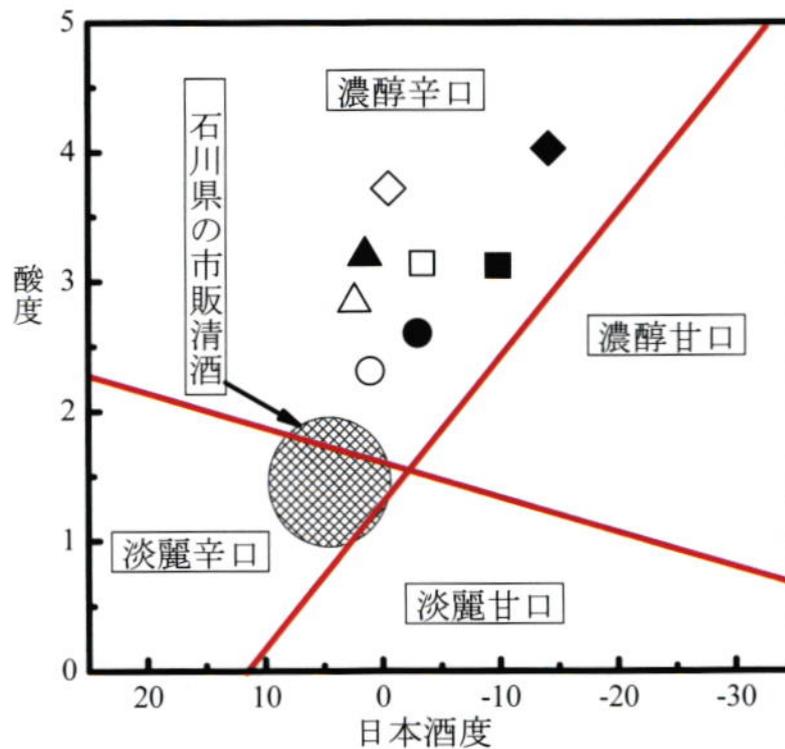


図1-7 清酒のタイプ

- K-9, △A株, □B株, ◇C株 (汲水歩合130%)
- K-9, ▲A株, ■B株, ◆C株 (汲水歩合120%)

石川県の市販酒は網掛けした部分で示されるように、酸度・日本酒度の狭い領域に限られる傾向にある。また、ほとんどが原酒を加水したものであることから、今回試験した清酒が原酒であることを考えると直接の比較はできないが、汲水歩合120%でB株、C株を用いた場合、濃醇辛口の中でも濃醇甘口に近い味わいとなり、味の幅を広げるこ

とができたと考えられる。

本研究では、アルコール発酵力を低下させずに、有機酸の中でもリンゴ酸含有量を特異的に増大させる酵母を選抜することができた。これにより、従来の清酒がもつ旨味に、リンゴ酸のもつ後味のすっきりとしたさわやかな酸味を付与することができた。また、発酵経過の異なる3タイプの酵母を選抜したことでさらに清酒の多様化にも貢献できるものと考えられる。

要約

1. 清酒の多様化を目的に、3株のリンゴ酸高生産酵母を選抜した。3株は、きょうかい酵母14号の泡なし(K-1401)株の自然誘発によるシクロヘキシミド耐性株(A株)、石川県内の酒造企業の酒蔵から採取した清酒もろみ85種類(1700株)の中から選抜した株(B株)、きょうかい酵母9号の泡なし(K-901)株とワイン酵母(OC-2)との細胞融合株(C株)である。
2. 選抜酵母3株を用いて総米500gの清酒の小仕込試験を行った結果、いずれの酵母も対照のK-9と比較して、リンゴ酸を1.5~2倍多く生成した。
3. 総米3kgの試験醸造を汲水歩合130%と120%で行った結果、アルコール発酵能の低下がなく、リンゴ酸高生産に関して500gと同様な傾向を示した。汲水歩合120%でB、C株を用いた場合、汲水歩合130%の場合よりも味が濃醇で評価も比較的良好であった。
4. A株を用いた場合、清酒中のリンゴ酸量は汲水歩合130%、120%でK-9のそれぞれ約2倍、約1.4倍高い値を示した。A株の発酵力はいずれの汲水歩合でもK-9と同等以上で、同株で日本酒度プラスの清酒を製造することができた。
5. B株及びC株の発酵力は、K-9と比較してもろみ発酵後期に弱く、もろみ日数が長くなったが、最終的に約18%のアルコールを生成した。汲水歩合120%でB株、C株を用いた試醸酒は、日本酒度マイナスでK-9と比較して酸度が高く濃醇な味わいとなった。

参考文献

- 1) 日本醸造協会編：醸造物の成分，日本醸造協会，p. 50-62(1999)
- 2) 蓼沼 誠：醸協，**61**, 1092-1097 (1966),
- 3) 佐藤信，大場俊輝，高橋康次郎，国分伸二，小林幹男，小林宏治：醸協，**72**，801-805 (1977)
- 4) 相川元庸，水津哲義 市川英治，川戸章嗣 安部康久，今安 聰：発酵工学，**70**，473-477 (1992)
- 5) 吉田 清，稲橋正明，中村欽一，野白喜久雄：醸協，**88**, 645-647(1993)
- 6) 吉田 清：醸協，**90**, 751-758(1995)
- 7) 稲橋正明，吉田 清，中村欽一：醸協，**90**, 689-692(1995), 稲橋正明，吉田 清，中村欽一：醸協，**91**, 587-591(1996)
- 8) 浅野忠男，黒瀬直孝：醸協，**95**, 227-234(2000)
- 9) 宮岡俊輔，新谷智吉，森本 聡：醸協，**96**, 115-120(2001)
- 10) 小金丸和義，大浦有実，神田康三，村田 晃，加藤富民雄：醸協，**96**，275-281(2001), 小金丸和義，神田康三，安田正昭，加藤富民雄，田代康介，久原哲：醸協，**98**, 303-309(2003), 小金丸和義，墨 利久，神田康三，加藤富民雄，田代康介，久原 哲：醸協，**99**, 365-373(2004)
- 11) 水野昭博，岩渕正文，木曾邦明，佐藤和夫，高橋利郎：醸協，**97**, 228-233(2002)
- 12) 浅野忠男，矢野駿太郎，高倉 裕，田村健一，黒瀬直孝，平松順一，高橋康次郎：醸協，**98**, 217-220(2003)
- 13) 大場孝宏，野見山修治，上田京子，黒田理恵子，鈴木正柯：醸協，**99**，878-881(2004)
- 14) Yukihiro Arikawa, Tomoko Kuroyanagi, Makoto Shimosaka, Haruhiro Muratsubaki, Keiichiro Enomoto, Ritsuko Kodaira and Mitsuo Okazaki : *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 28-36(1999)
- 15) Yoshito Kubo, Hiroshi Takagi and Shigeru Nakamori : *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 619-624(2000)
- 16) 松田章，道島俊英，佐渡康夫，松井圭三，竹下和美：石川県工業試験場研究報告，No. 43, 19-26(1994)
- 17) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解，(財)日本醸造協会(1993)
- 18) 若井芳則，嶋崎孝行，原昌道：発酵工学，**58**, 363-368(1980)
- 19) 近藤洋大，井畑紀史，吉田清，小林信也：日本農芸化学大会講演要旨集, 313(1995)
- 20) 上代淑人 監訳：ハーパー・生化学，p.127-160, 丸善 (株) (2005)
- 21) 吉澤 淑編：酒の科学，p.38-48, 朝倉書店(1995)

第2章 清酒の小仕込み試験における酒質，特に有機酸生成に及ぼす影響因子

2-1. 緒言

近年，清酒の多様化と需要拡大を図るために，もろみや花，果実などから分離した香味に特徴ある新規な酵母や地域の酒造好適米を用いて新しい清酒の開発が行われている¹⁾⁻⁹⁾。実用化には，工業的規模のタンクを用いた醸造試験の前に，たとえば総米 100g～1kg 程度の小仕込み試験や総米 30～60kg 程度の中仕込み試験が行われている。しかし，これまでの小仕込み試験の結果では，工業的規模の醸造¹⁰⁾と比べて酒の成分含量，特に酸度が高くなる傾向があり¹¹⁾⁻¹⁸⁾，リンゴ酸やコハク酸，乳酸など，清酒の味を決定する有機酸の含量が異なることが多い。新規酵母や新規酒造好適米の試験を行う際には，小仕込み試験と実際の醸造試験との製成酒の成分含量が同等になることが望まれるが，現実的には一致していない場合が多く見られる。

そこで本研究では，小仕込み試験と工業規模の清酒醸造における製成酒の成分の相違の原因について検討し，小仕込み試験の結果と実際の醸造結果を相似させることを目的として，仕込み容器の容量や形状，同一容器を用いて仕込み総量を変化させた場合の製成酒の成分含量に及ぼす影響を検討し，興味ある知見を得たので報告する。

2-2. 実験方法

2-2-1. 原材料

掛米は見かけの精米歩合 70%に精米した五百万石，麴米は徳島製麴（株）製の純米酒用乾燥麴 I-60 を使用した。酵母は麴汁培地（ポーメ 5）で培養したきょうかい酵母 701 号を使用し，仕込水には 0.1%乳酸水（乳酸は和光薬品工業（株）製の食品添加物用）を使用した。

2-2-2. 仕込み方法

仕込方法は山田ら¹⁷⁾，有手ら¹⁸⁾の方法に準じた。仕込配合を表 2-1 に示す。水麴の調製は，仕込み容器に麴米，仕込み水，0.1%乳酸水，培養酵母（最終濃度 1×10^5 cells/g）を入れて混合し，1 日間 15°C で保持した。

掛米 80g を 1 時間浸漬後水切りし，1 時間蒸きょうし，30 分間放冷した後，水麴に加えてもろみとした。温度を 15°C 一定に保ち，約 20 日間発酵させた（総米 100g 仕込み）。本条件下で，積算炭酸ガス発生量が 33.5g 以上，または 1 日あたりの炭酸ガス発生量が 0.5g 未満に達した時点を上槽の目安とした。上槽は遠心分離（高速冷却遠心機（日立工機（株）製 CR21G II ; 5°C, 3000g×15 分）により行い，仕込みは同一条件のものを 3 系列で行った。

表2-1 総米100gでの仕込配合

	水麴	初添
蒸米(g)		80.0
乾燥麴(g)	17.2*	
汲水(ml)	33.4**	
0.1%乳酸水(ml)	100**	

原料米：精米歩合70%の五百万石(2010)，

*麴：17.2gの乾燥麴I-60（徳島製麴株製）は20gの麴の86%に相当する。操作マニュアルに従って17.2gの乾燥麴の20%重量の3.44mlの水を加えることで麴20gに相当する。

**汲水歩合：130%

2-2-3. 仕込み容器及び条件

仕込み容器の大きさ及び形状の違いによる製成酒の成分含量への影響を検討する目的で、小仕込み試験1では様々な形状の4種類の容器、1000mL大びん(A)（アズワン(株)製アイボトルφ100mm×245mm）、500mL太びん(B)（アズワン(株)製アイボトルφ102mm×157mm）、500mL細びん(C)（アズワン(株)製アイボトルφ86mm×195mm）、500mLRびん(D)（清酒用リターナブルびん500ml；中央会500）を用いて小仕込み試験を行った（図2-1）。小仕込み試験2では2000mL、1000mL、500mL、250mLのポリプロピレン製

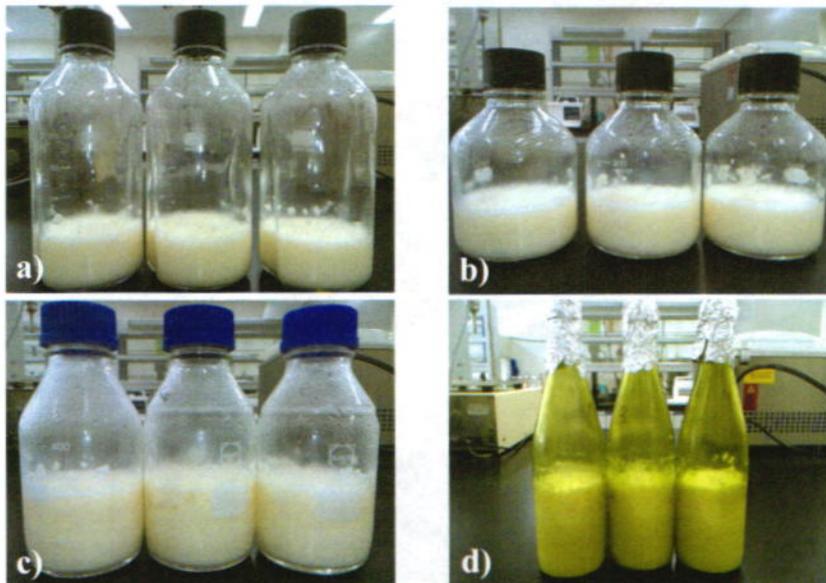


図2-1 種々の形状容器での小仕込み試験

a)1000mL, b)500mL(φ102mm), c)500mL(φ86mm), d)500mL(清酒用Rびん)

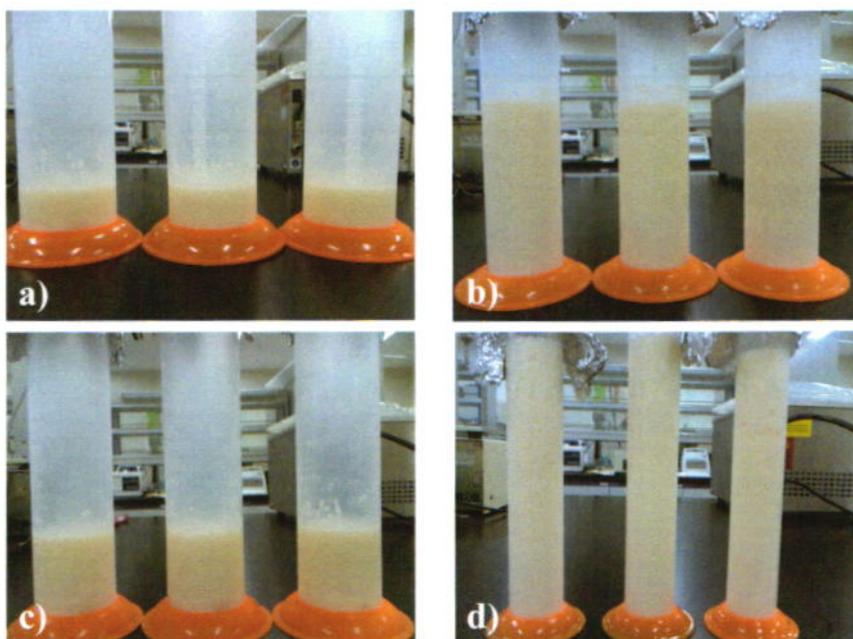


図2-2 種々の形状容器での小仕込み試験
 a)2000mL, b)1000mL, c)500mL, d)250mL(プラスチック製シリンダー)

シリンダー（アズワン（株）製）を使用した（図2-2）。小仕込み試験3では、容器の空間体積を段階的に変化させる目的で、2000mL容保存密閉びん（アズワン（株）製）を用いて総米100g, 200g, 300g, 400gの各小仕込み試験を行った（図2-3）。なお、仕

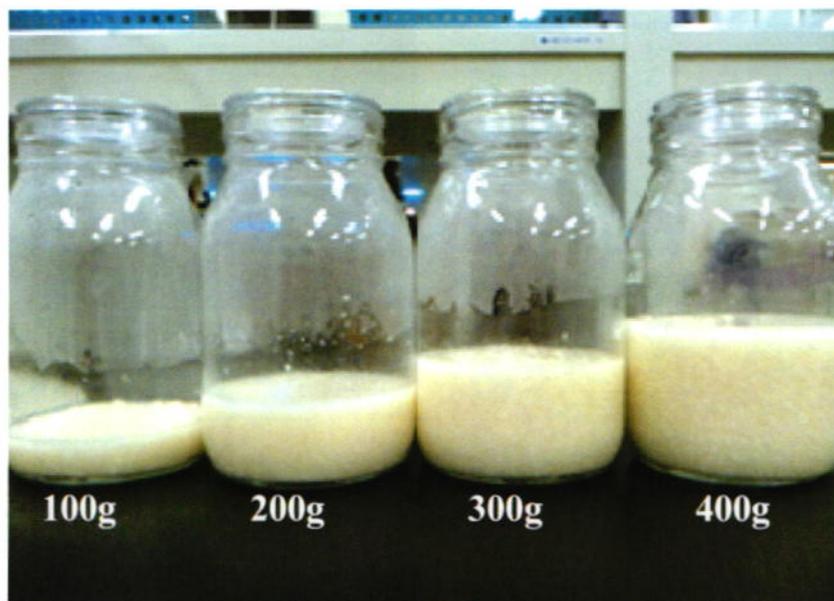
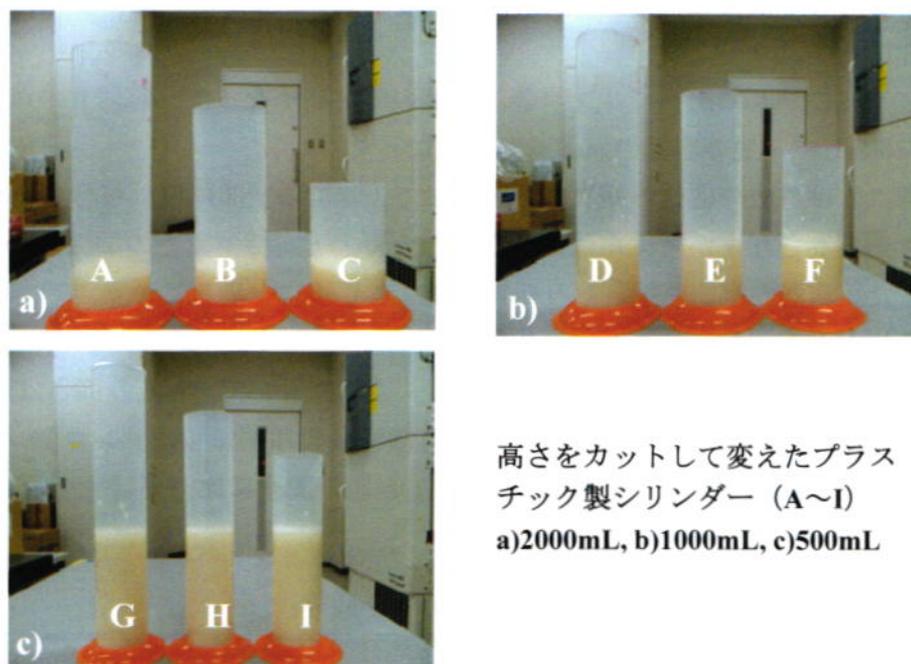


図2-3 種々の形状容器での小仕込み試験
 同一容器内で異なる総米量100g~400gを用いたもろみ

込み配合量は総米 100g をもとにスケールアップした。小仕込み試験 4 では 2000mL, 1000mL, 500mL の各ポリシリンダーをカットして高さを調節した容器を使用した (図 2-4)。いずれの場合も容器は密閉せず, 専用のキャップで緩やかに閉めるかまたはアルミホイルで軽く覆う程度とした。



高さをカットして変えたプラスチック製シリンダー (A~I)
a)2000mL, b)1000mL, c)500mL

図2-4 種々の形状容器での小仕込み試験

2-2-4. 分析方法

製成酒の一般成分は, アルコールについては簡易アルコール分析器アルコメイト (理研計器 (株) 製 AL-2), 日本酒度は密度比重計 (京都電子工業 (株) 製 DA-500), 酸度, アミノ酸度は国税庁所定分析法注解¹⁹⁾に基づき分析を行った。有機酸量は, フィルターユニット (日本ミリポア (株) 製 Millex 0.45 μm) でろ過した試料を有機酸分析計 ((日本ダイオネクス (株) 製 ICS-1500, カラム: IonPac ICE-AS6 (日本ダイオネクス (株) 製), 移動相: 0.4mmol/L ヘプタフルオロ酪酸, 流速: 1.0mL/min, カラム温度: 19°C, 検出器: 電気伝導度) により分析した。また, 総米 100g と 400g のもろみ中の溶存酸素を測定した。測定は仕込み 3 日目と 21 日目の遠心分離 (1080g \times 10 分) による上清を, 25°C (飽和溶存酸素 8.11mg/L) に設定したジャーファーマンター (エイブル (株) 製 BMS-03PI (DO センサ付属)) を用いてすみやかに行った。

2-3. 結果および考察

2-3-1. 小仕込試験 1 : 容器形状の影響

1000mL 大びん (A), 500mL 太びん (B), 500mL 細びん (C), 500mLR びん (D) を仕込

み容器として用いて、総米 100g の小仕込みを行った。この結果、発酵期間中の炭酸ガス減量曲線から仕込み容器の違いによる、発酵力、発酵経過の違いは見られなかった(データ省略)。また、製成酒の一般成分の分析結果を表 2-2 に示す。容器 A から D において、アルコール度数、酸度、アミノ酸度には仕込み容器による違いは見られなかった。ただし、B の日本酒度は+17.4 で他の容器に比べてやや高くなった。有機酸の分析結果を表 2-3 に示す。

容器 C, D は A, B に比べてリンゴ酸、乳酸の値が高くなった。容器 D のコハク酸は 74.8mg/100mL で、他の容器の値よりも低くなった。

製成酒における成分含量の差異の要因として、容器の空間体積、もろみ表面積、空間高さ、もろみ高さなどが考えられた。それらの要因と有機酸量との関係を図 2-5 (a~d) に示した。容器の空間体積、もろみ表面積は同じ傾向を示しており、それらの値が大きくなるほどリンゴ酸、乳酸が減少し、コハク酸、酢酸が増加した。また、空間高さは相関係数が低いものの、同様の傾向であった。これに対して、もろみ高さはこれらと逆の傾向を示した。なかでも、もろみ表面積と有機酸量の相関係数はリンゴ酸、コハク酸、乳酸に対して、それぞれ 0.63, 0.86, 0.61 と他の関連に比べ高い値を示した。

表2-2 清酒の一般成分

	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
A	19.7±0.5	15.9±0.6	2.4±0.1	2.2±0.1
B	20.4±0.2	17.4±0.4	2.3±0.1	2.4±0.1
C	20.3±0.2	16.4±0.5	2.4±0.1	2.2±0.0
D	20.0±0.3	17.1±0.9	2.3±0.2	2.2±0.2

A:1000mL, B:500mL(φ102mm), C:500mL(φ86mm),
D:清酒用Rびん(ca.530mL)

表2-3 清酒中の有機酸濃度 (mg/100mL)

	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	コハク酸	酢酸
A	0.1±0.2	11.9±0.6	42.7±3.3	88.2±3.4	88.9±5.0	15.1±3.5
B	0.0±0.0	11.6±0.2	41.3±2.4	87.2±1.7	86.9±1.0	12.2±1.5
C	0.0±0.0	11.9±0.6	47.5±1.9	104.7±2.8	84.5±7.9	8.9±3.8
D	0.8±0.7	11.5±0.4	45.6±5.5	98.4±5.7	74.8±1.8	10.0±0.8

A:1000mL, B:500mL(φ102mm), C:500mL(φ86mm), D:清酒用Rびん(ca.530mL)

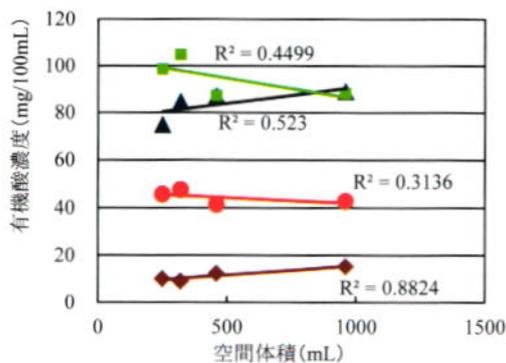


図2-5a 空間体積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

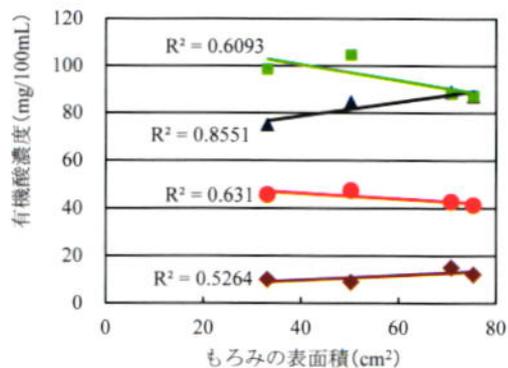


図2-5b もろみの表面積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

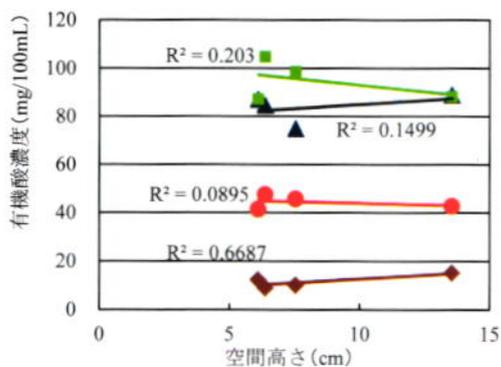


図2-5c 空間高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

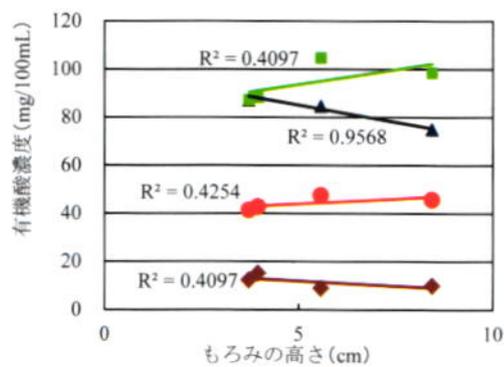


図2-5d もろみの高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

2-3-2. 小仕込試験2：もろみ表面積の影響

小仕込み試験1の結果から、有機酸量の差異はもろみ表面積に関係しているものと考えられた。そこで、もろみの表面積を段階的に変えられるように、2000mL, 1000mL, 500mL, 250mLのシリンダーを用いて総米100gの小仕込みを行った(図2-2)。

炭酸ガス減量曲線では、250mL容器の1日当たりの炭酸ガス発生量は他の容器の場合よりも高くなったが、他はほぼ同程度であった(データ省略)。

一般成分の分析結果を表2-4に示す。2000mL, 1000mL, 500mL容器ではアルコール度

表2-4 清酒の一般成分

シリンダーの容積 (もろみの表面積)	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
2000mL(63.6cm ²)	19.5±0.3	14.4±0.2	2.7±0.3	2.4±0.1
1000mL(38.5cm ²)	20.0±0.3	14.7±0.5	2.5±0.0	2.2±0.1
500mL(23.7cm ²)	19.8±0.3	12.9±1.8	2.5±0.0	2.2±0.1
250mL(12.6cm ²)	20.0±0.1	4.2±2.2	3.1±0.1	2.2±0.0

数、酸度、アミノ酸度に大差は見られなかった。250mLの日本酒度は+4.2で他の容器よりもやや低い値となった。

有機酸の分析結果を表2-5に示す。容器容量すなわちもろみ表面積が大きくなるほど、

表2-5 清酒中の有機酸濃度 (mg/100mL)

シリンダーの容積 (もろみの表面積)	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	コハク酸	酢酸
2000mL(63.6cm ²)	0.1±0.3	12.3±0.3	42.4±1.0	90.6±1.1	99.5±1.7	14.2±0.2
1000mL(38.5cm ²)	0.2±0.3	12.4±0.4	51.9±0.5	94.5±3.5	90.1±1.9	7.1±0.3
500mL(23.7cm ²)	11.6±1.9	13.1±0.4	87.4±2.4	109.8±2.2	80.9±1.9	10.8±5.6
250mL(12.6cm ²)	7.0±3.5	12.8±0.3	79.7±9.6	124.5±20.2	84.1±2.8	6.2±1.3

乳酸及びリンゴ酸が少なく、コハク酸が多くなる傾向が見られた。リンゴ酸は容器の違いによる影響が大きく、500mL容器では2000mL容器の場合の2倍以上の生成(87.4mg/100mL)が見られた。また、500mL容器では、ピルビン酸が11.6 mg/100mLで他の容器より多く含まれていた。

仕込み容器の空間体積、もろみ表面積、空間高さ、もろみ高さの4つの要因と有機酸量との関係を図2-6(a~d)に示す。

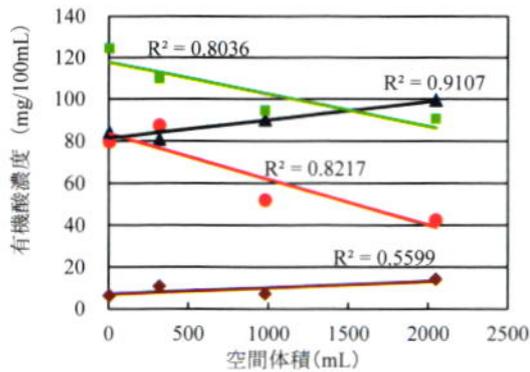


図2-6a 空間体積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

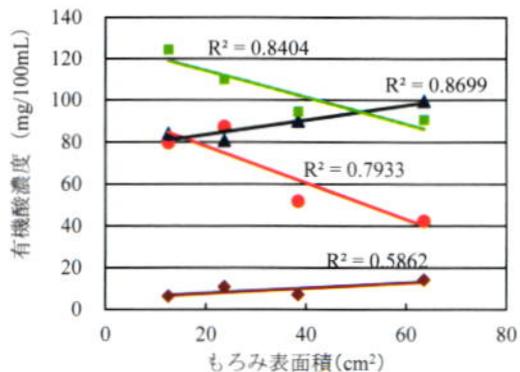


図2-6b もろみ表面積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

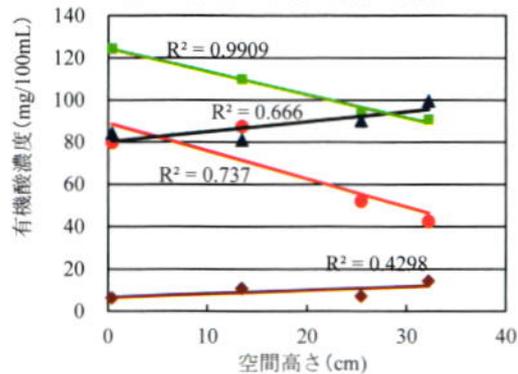


図2-6c 空間高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

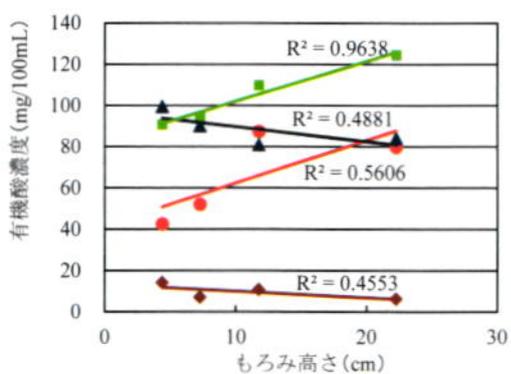


図2-6d もろみ高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

小仕込み試験1の結果と同様に、もろみ表面積、空間体積、空間高さとも有機酸量との関係は同じ傾向を示しており、値が大きくなるほどリンゴ酸、乳酸が減少し、コハク酸が増加した。もろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。

なかでも、もろみ表面積と有機酸量の相関係数はリンゴ酸、コハク酸、乳酸に対して、それぞれ0.79、0.87、0.84と高い値であった。もろみ表面積以外にも容器の空間体積及び容器の空間高さも生成有機酸量との相関が成り立ち、リンゴ酸、コハク酸、乳酸に対する相関係数は、それぞれ0.82、0.91、0.80、及び0.74、0.67、0.99と高い値を示した。有機酸量の差異はもろみ表面積のほかに容器の空間体積にも深く関係していることが示唆された。

2-3-3. 小仕込み試験3：容器空間の違い

小仕込み試験1、2の結果から、製成酒の有機酸成分含量の差異はもろみ表面積のほか、容器空間にも関係していると考えられた。そこでもろみ表面積を一定にし、容器の空間体積を段階的に変化させられるように、2000mL容密閉びんを用いて、総米100g、

200g, 300g, 400g の小仕込みを行った (図 2-3)。その結果, 各仕込み量における炭酸ガス発生量の最大値は 300g まではほぼ比例して増加したが, 400g では 300g とほぼ同程度の値であった (データ省略)。

一般成分の分析結果を表 2-6 に示す。

表2-6 清酒の一般成分

	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
100g	18.6±1.4	14.5±2.3	2.8±0.2	2.6±0.1
200g	19.3±0.4	17.8±1.4	2.5±0.1	1.9±0.1
300g	19.4±1.1	17.7±2.8	2.5±0.1	1.9±0.3
400g	18.5±1.2	19.6±0.6	2.5±0.1	1.8±0.2

総米量が多くなるほど日本酒度が高く, 酸度, アミノ酸度が低くなる傾向を示し, 淡麗辛口の酒質になる傾向が見られた。製成酒のアルコール度数は総米量による大差は見られなかった。

有機酸の分析結果を表 2-7 に示す。

表2-7 清酒中の有機酸濃度 (mg/100mL)

総米 (空間体積)	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	コハク酸	酢酸	計
100g (1895mL)	0.0±0.0	11.1±0.6	31.8±2.5	83.5±6.6	109.7±3.5	42.7±7.5	278.9
200g (1615mL)	0.1±0.2	10.6±0.7	42.9±3.0	102.1±5.7	87.0±6.4	16.1±2.9	258.7
300g (1335mL)	1.7±2.5	10.7±0.3	49.7±2.6	115.6±1.4	77.7±5.0	9.0±1.3	264.5
400g (1055mL)	3.6±3.2	10.9±0.1	49.8±6.2	116.1±5.9	75.3±3.3	10.9±2.6	266.6

リンゴ酸は, 総米 400g で 49.8mg/100mL 含まれており, 総米 100g の 31.8mg/100mL より 1.5 倍以上多かった。同様に, 総米 400g では乳酸が 116.1mg/100mL 含まれており, 総米 100g (83.5mg/100mL) の約 1.4 倍多く含まれていた。それとは反対に, コハク酸は総米 400g では 75.3mg/100mL で, 総米 100g (109.7mg/100mL) の約 0.7 倍と少なくなった。

しかし, 400g 仕込みの総有機酸量は 300g 仕込みとほぼ同量であった。

容器の空間体積, もろみ体積, 空間高さ, もろみ高さの 4 つの要因と有機酸量との関係を図 2-7 (a~d) に示した。

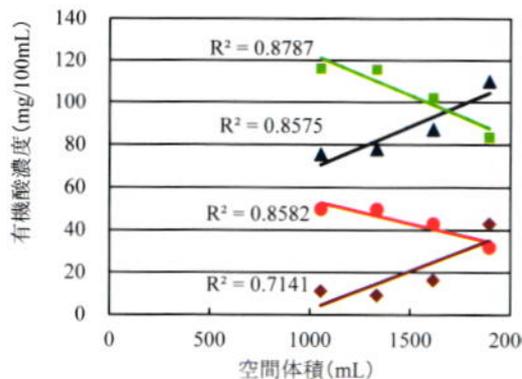


図2-7a 空間体積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

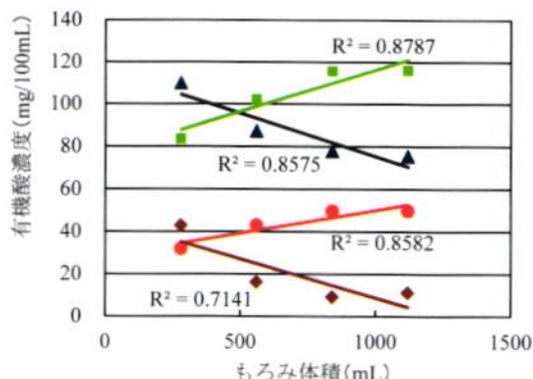


図2-7b もろみ体積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

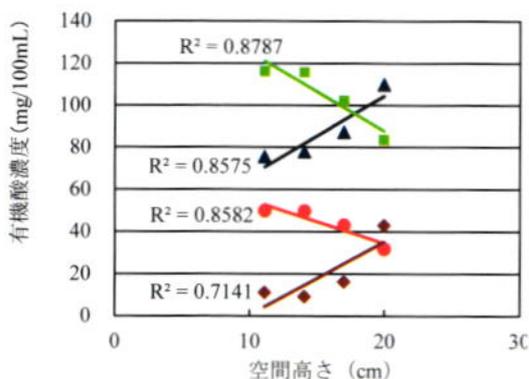


図2-7c 空間高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

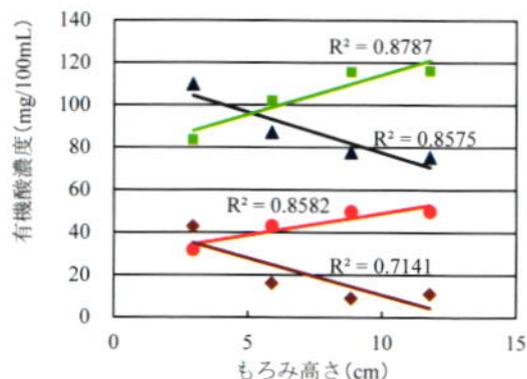


図2-7d もろみ高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

容器の空間体積，空間高さとは有機酸量の関係は同じ傾向を示しており，値が大きくなるほどリンゴ酸，乳酸が減少，コハク酸，酢酸が増加した。もろみ体積及びもろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。空間体積，空間高さ，もろみ体積，もろみ高さの4つの要因と有機酸量の相関係数はリンゴ酸，コハク酸，乳酸に対して，それぞれ0.86，0.86，0.88と高い値を示した。

2-3-4. 小仕込試験4：もろみ表面積及びもろみ高さの影響

小仕込み試験1～3から，製成酒の有機酸含量の差異は仕込み容器の形状や容量に影響されることが分かった。そこで次に，小仕込み試験4では，製成酒の有機酸量は，容器の空間体積・空間高さもしくはもろみ表面積・もろみ高さのどちらに強く影響されるかを検討することを目的とした。2000mL，1000mL，500mLシリンダーの高さを調節し，総米100gの小仕込み試験を行った(図2-4)。シリンダーの高さ及び容器空間の体積，空間高さ及び一般成分を表2-8に示す。

表2-8 容器形状が清酒の一般成分に及ぼす影響

	容器 (シリン ダー)	もろみ 表面積 (cm ²)	もろみ 高さ (cm)	容器の 空間体積 (ml)	容器の 空間高さ (cm)	アル コール (%)	日本 酒度	酸度 (mL)	アミノ 酸度 (mL)
A	2000mL	63.6	4.4	1627.6	25.6	19.0	15.9	2.7	2.6
B	2000mL	63.6	4.4	1214.2	19.1	18.6	15.8	2.7	2.5
C	2000mL	63.6	4.4	610.2	9.6	18.6	15.9	2.7	2.5
D	1000mL	38.5	7.3	874.0	22.7	19.3	16.5	2.7	2.5
E	1000mL	38.5	7.3	643.2	16.7	19.2	16.9	2.7	2.4
F	1000mL	38.5	7.3	412.4	10.7	19.3	16.0	2.7	2.4
G	500mL	23.7	11.8	432.4	18.2	19.3	17.1	2.7	2.3
H	500mL	23.7	11.8	301.8	12.7	19.6	15.0	2.7	2.3
I	500mL	23.7	11.8	206.8	8.7	19.3	16.5	2.7	2.3

発酵期間中の積算炭酸ガス発生量では、もろみ表面積が大きくなるほど1日あたりの炭酸ガス発生量のピークが大きくなり、最大値A(4.95g)と最小値H(3.62g)との差は約1.3gであった。一方、容器空間の高さは発酵経過に影響しなかった(データ省略)。

製成酒の一般成分を分析した結果、容器の容量、高さの違いによる一般成分値に大差は見られなかった(表2-8)。

有機酸の分析結果を表2-9に示す。容器の空間体積が最も小さい容器Iのリンゴ酸量

表2-9 清酒中の有機酸濃度 (mg/100mL)

	シリンダー容積 (空間体積)	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	コハク酸	酢酸
A	2000mL(1627.6mL)	0.0	9.3	37.3	82.3	78.3	8.7
B	2000mL(1214.2mL)	0.0	9.0	37.6	81.7	79.1	14.9
C	2000mL(610.2mL)	0.0	9.5	38.2	81.6	75.5	8.8
D	1000mL(874.0mL)	0.0	8.7	41.7	86.7	67.4	5.1
E	1000mL(643.2mL)	0.0	8.9	41.1	86.1	64.9	5.2
F	1000mL(412.4mL)	0.0	8.9	40.8	85.7	65.5	4.1
G	500mL(432.4mL)	0.0	8.9	42.3	90.6	57.9	4.0
H	500mL(301.8mL)	0.0	9.0	45.6	95.8	60.6	4.0
I	500mL(206.8mL)	0.5	9.2	43.6	90.2	62.6	5.8

は、空間体積の最も大きい容器Aと比べ6.3mg/100mL多くなった。また、容器Iは容器Aと比べて乳酸が7.9mg/100mL多くなり、コハク酸は15.7mg/100mL少なくなった。

仕込み容器の空間体積、空間高さ、もろみ表面積、もろみ高さの4つの要因と有機酸量との関係を図2-8(a~d)に示す。

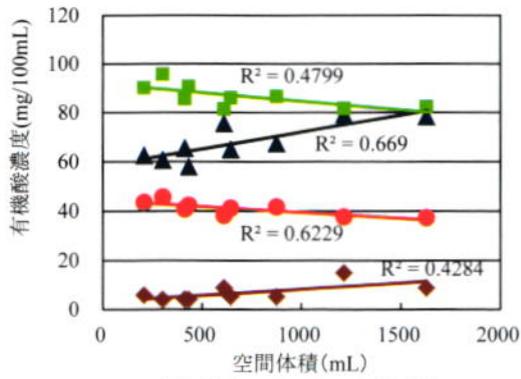


図2-8a 空間体積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

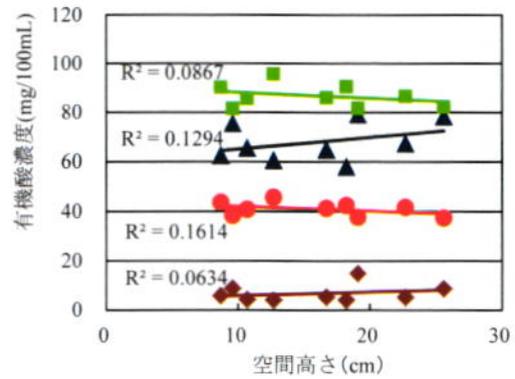


図2-8b 空間高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

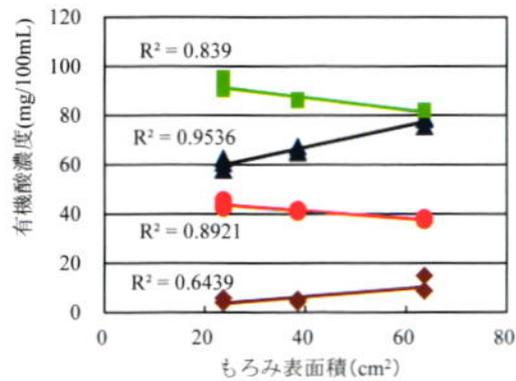


図2-8c もろみ表面積が清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

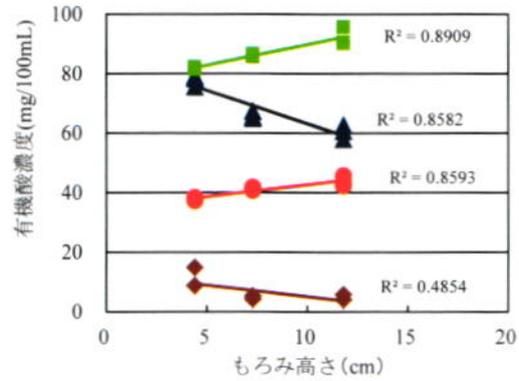


図2-8d もろみ高さが清酒中の有機酸量に及ぼす効果

●リンゴ酸 ▲コハク酸 ■乳酸 ◆酢酸

空間体積，空間高さ，もろみ表面積と有機酸量の関係は同じ傾向を示しており，これらの値が大きくなるほどリンゴ酸，乳酸が減少，コハク酸が増加した。もろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。もろみ表面積と有機酸量の相関係数はリンゴ酸，コハク酸，乳酸に対して，0.89，0.95，0.84 と高い値を示した。また，もろみ高さとしてリンゴ酸，コハク酸，乳酸との相関係数もそれぞれ0.86，0.86，0.89 と高い値であった。それとは反対に，空間体積，空間高さとして有機酸量との相関係数はいずれも低くなったため，有機酸量の差異は容器の空間体積・空間高さより，もろみ表面積・もろみ高さにより強く影響されることが示唆された。

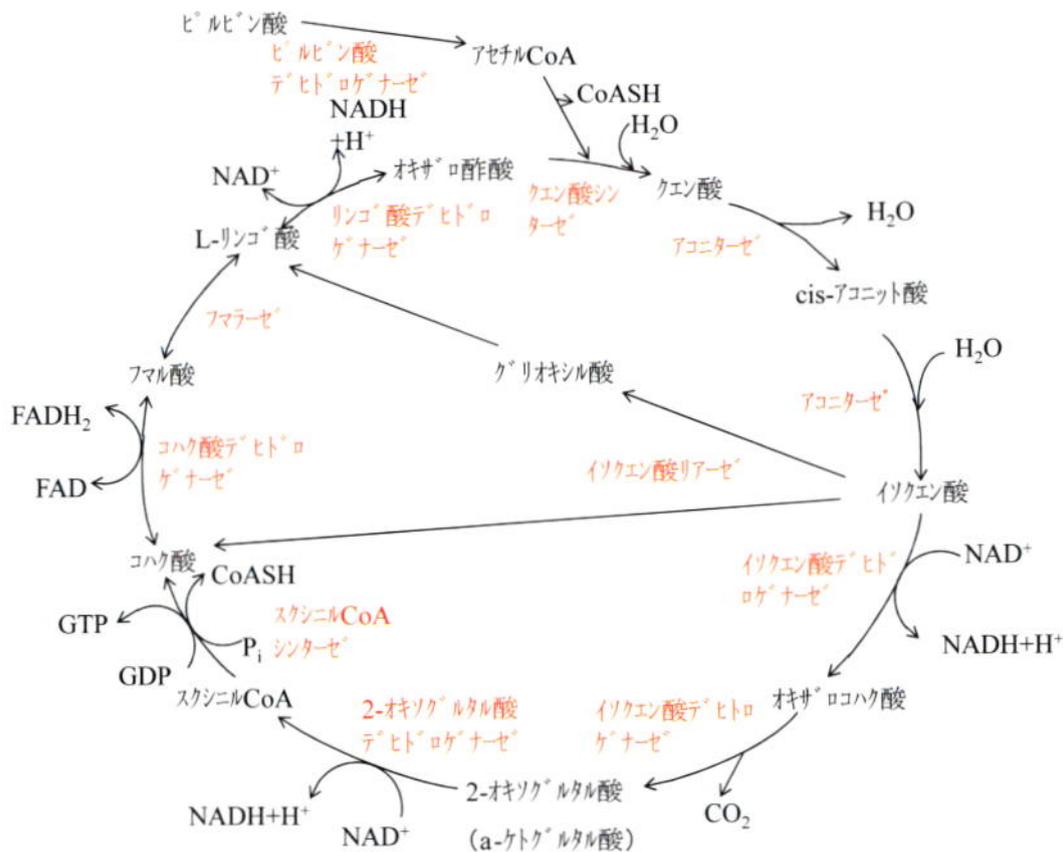


図 2-9 TCA 回路

清酒中の有機酸は主に清酒酵母の有するミトコンドリア中の TCA 回路 (図 2-9) を経ることによって生成される。発酵中のもろみは発生する炭酸ガスにより嫌気的環境に置かれている。この場合 TCA 回路は還元的方向に進み、ピルビン酸からオキサロ酢酸を経て、リンゴ酸が生成し、このリンゴ酸がフマル酸を経てコハク酸に変換される。一方、酸素がある場合、TCA 回路は酸化的方向に進み、クエン酸がイソクエン酸に変換され、このイソクエン酸から 2-オキソグルタル酸を経てコハク酸及びリンゴ酸が生成する場合と、グリオキシル酸回路を経て、リンゴ酸とコハク酸が生成する場合がある。本実験において、もろみの表面積及びもろみ高さがもろみ中のリンゴ酸及びコハク酸の含量に影響を及ぼしていることを明らかにした。すなわち、もろみの表面積が増大するとリンゴ酸含量が減少しコハク酸含量が増加するが、もろみ高さが高くなると逆にリンゴ酸含量が増大しコハク酸が減少する。Nakayama ら²⁰⁾は、*S. cerevisiae* が好気的条件下においても、TCA 回路が酸化的方向に進行することを示している。小仕込み試験 3 において溶存酸素を測定した結果、もろみは全くの嫌気的環境ではなく、非常に低濃度であ

るが溶存酸素が存在していることが明らかとなった。すなわち、密封容器を用いて、総米 100g 及び 400g の小仕込みの清酒もろみ中の溶存酸素を測定した結果、3 日目では平均 0.95mg/L 及び 0.70mg/L で、21 日目では 0.85mg/L、0.73mg/L であった。一般的に、液体の表面積が増大または溶液の高さ（深さ）が減少すると空気（酸素）がその溶液に溶解やすくなることから、おそらく、もろみにおいても同様な現象が起こっているものと推察できる。もろみの溶存酸素濃度が有機酸生成量に関与しており、通気により溶存酸素濃度（DO）が高くなると酸度は高くなり、リンゴ酸と乳酸が減少し、コハク酸、酢酸が増加することが報告されている²¹⁾²²⁾。また、工業的規模で造られているもろみ表面近傍の炭酸ガス濃度は開放系であるにも関わらずほぼ 90%以上あるのに対して、総米 3kg 程度の小仕込みにおけるもろみ表面近傍の炭酸ガス濃度は 30%程度で、酸素も 10%程度含まれている（データ未発表）。

これらのことから考えると、酵素化学的なデータは必要であるが、もろみ表面積の減少に比例して、また、もろみ高さの増加に比例して、リンゴ酸の生成量が増加し、コハク酸の生成量が減少する理由として、コハク酸脱水素酵素及びフマラーゼ活性が、もろみ中にわずかに含まれる酸素により増大したためと推察している。

したがって、小仕込み試験の結果を実用規模での清酒製造に近づけるためには、以下のことが考えられる。小仕込み試験で使用する容器は、もろみ表面近傍を炭酸ガスで満たせるような形状が望ましいと考えられる。すなわち、もろみ表面近傍の嫌気的条件を高めること、言い換えれば、いかに酸素を除去するか、酸素濃度をゼロに近づけるかが重要と考えている。具体的には、もろみ表面の気相を炭酸ガスや窒素ガスで通気、置換する小仕込み試験が考えられる。これらの実験については現在行っているところであり、今後、データがまとまれば報告を行いたい。

また、最近 TCA 回路すなわちリンゴ酸などの生成関連酵素群が存在するミトコンドリアの清酒醸造における役割が解析され²³⁾、リンゴ酸やコハク酸の生成に及ぼすミトコンドリア活性についての報告²⁴⁾がなされた。今後、清酒もろみ等の酵母環境が酵母の酸生成に及ぼす影響を検討する上で参考としたい。

要約

清酒醸造では小仕込みと実際の醸造において製成酒の成分含量、特に有機酸含量が変化することが多い。小仕込みの結果と実際の醸造の結果を相似させることを目的として、小仕込みにおける仕込み容器の容量や形状、仕込み総量を変えることによる製成酒の成分含量の変化について検討した。得られた結果は以下のとおり。

1. さまざまな形状の容器 4 種類を用いて総米 100g の小仕込み試験を行った結果、容器の空間高さ・体積、もろみ表面積は値が大きくなるほどリンゴ酸、乳酸が減少、コハク酸が増加した。もろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。なかでも、もろみ表面積は強い影響を与えた。
2. 2000mL, 1000mL, 500mL, 250mL のシリンダーを用いて、総米 100g の小仕込み試験を行った結果、容器の空間高さ、空間体積、もろみ表面積の値が大きくなるほどリンゴ酸、乳酸が減少し、コハク酸が増加した。もろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。
3. 密閉ビンを用いて総米 100g, 200g, 300g, 400g の小仕込み試験を行った結果、空間体積・高さが大きくなるとリンゴ酸、乳酸が減少し、コハク酸が増加した。もろみ高さ・体積はそれらと逆の傾向を示した。
4. 2000mL, 1000mL, 500mL のシリンダーの高さを調節して総米 100g の小仕込み試験を行った結果、空間体積・高さ、もろみ表面積が大きくなるほどリンゴ酸、乳酸が減少、コハク酸が増加した。もろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。その影響は空間体積・高さに比べて、もろみ表面積・高さで顕著であった。
5. 製成酒のリンゴ酸、コハク酸、乳酸の含量は仕込み容器、容器空間の違いに影響されることが明らかになった。有機酸含量の相違は、仕込み容器の違いで生じる嫌気的環境の変化に関係しており、それが TCA 回路及びグリオキシル酸回路における酵素の働きに影響を与えるのではないかと推察している。

参考文献

- 1) 柏木亨：醸協，**97**(1), 2-6(2002)
- 2) 松田義弘，和田弥寿子，菅原哲也，小関敏彦，上木厚子，上木勝司：醸協，**102**(1), 71-82(2007)
- 3) 木下(小室)友香理，門倉利守，数岡孝幸，穂坂賢，中田久保：東京農大農学集報，**53**(2), 100-106(2008)
- 4) 松田義弘，上木厚子，上木勝司：醸協，**104**(1), 57-74(2009)
- 5) 大場孝宏：醸協，**106**(5), 262-270(2011)
- 6) T. Kuda, A. Matsuda, H. Yasunaka and T. Yano : *Jpn. J. Food Microbiol.*, **28**(2), 114-122(2011)
- 7) 松本英之，大土井律之，橋本寿之，土屋義信，末成和夫，手島義春，土屋隆生，勝場善之助：醸協，**95**(5), 373-377(2000)
- 8) 大土井律之，松本英之，橋本寿之，土屋義信，末成和夫，手島義春，土屋隆生，勝場善之助：醸協，**95**(6), 465-471(2000)
- 9) 高橋仁，田口隆信：醸協，**98**(9), 598-609 (2003)
- 10) 日本醸造協会編：醸造物の成分，(財)日本醸造協会，p.1-7(1999)
- 11) 秋田修，井田哲朗，小幡孝之，原昌道：醸協，**85**(7), 501-505(1990)
- 12) 布宮雅昭，須貝智，小島弥之祐，鈴木弥兵衛，佐藤昭仁，和田多聞，石垣浩佳，松田義弘，小関敏彦：醸協，**90**(3), 217-221(1995)
- 13) 穂坂賢，中田久保，坂井劭：醸協，**95**(11), 837-842(2000)
- 14) 小金丸和義，墨利久，神田康三，加藤富民雄，田代康介，久原哲：醸協，**98**(3), 201-209(2003)
- 15) 小金丸和義，墨利久，神田康三，加藤富民雄，田代康介，久原哲：醸協，**99**(5), 365-373(2004)
- 16) 恩田匠，長沼孝多，辻政雄，渡辺正平，飯村穰：山梨県工業技術センター研究報告，**19**, 45-47(2005)
- 17) 山田幸信，松田章，三輪章志：石川県工業試験場研究報告，No.57, 43-46(2008)
- 18) 有手友嗣，山田幸信，三輪章志，松田章，中村静夫：醸協，**107**(8), 611-619(2012)
- 19) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解，(財)日本醸造協会(1993)
- 20) S.Nakayama, K. Tabata, T.Oba, K. Kusumoto, S. Mitsuiki, T. Kadokura and A. Nakazato : *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(3), 281-285(2012)
- 21) 永井英雄：清酒酵母の研究－90年代の研究－，清酒酵母・麴研究会，p138～143(2003)
- 22) 永井英雄：醸協，**88**(4), 64-271(1993)
- 23) 北垣浩志：生物工学会誌，**87**(2), 66-71(2009)
- 24) S. Motomura, K. Horie and H. Kitagaki : *J. Inst. Brew.*, **118**(1), 22-26(2012)

第3章 醸造用酵母のリンゴ酸生成に関連する酵素に及ぼす培養法の影響

3-1. 緒言

清酒醸造において、きょうかい酵母の普及や原料米の精白技術の進歩は、酒質向上に大きく貢献してきた。今後も、麹菌や酵母、乳酸菌などの優良な微生物の育種や特性・発酵機構の解明等に関する研究が清酒醸造技術に大きく貢献するものと考えている。しかしながら、清酒の消費量は大幅な低下が問題となっており、昭和50年の約167万klをピークに減少を続け、平成22年には約59万klと、約100万klもの落ち込みが見られる¹⁾。こうした問題の背景には、消費者の食生活の変化や嗜好の多様化により、清酒以外のアルコール飲料が選ばれるようになったことがあげられる。その解決策の一つとして、酒質の多様化を目的に、香味に特徴のある、たとえば有機酸組成の異なる新しいタイプの清酒の開発・提供などがあげられる。これまでも醸造法^{2~5)}や酵母^{6~21)}、麹菌^{22, 23)}などで酸味に特徴を打ち出した清酒や低アルコール清酒などの開発が盛んに進められてきた。

清酒中の呈味成分の一つである酸味は有機酸から成り、清酒中には約40種類もの有機酸が含まれている²⁴⁾。その中でも、コハク酸、乳酸、リンゴ酸は清酒中の主体をなす酸で、約80%を占める²⁵⁾。清酒に含まれるこれらの有機酸の中でリンゴ酸は官能的な評価が高く、清酒にさわやかな酸味を与えることが報告されている²⁵⁾。そのため清酒醸造におけるリンゴ酸の存在が重要視され、有機酸生成能の変化した清酒酵母の育種や、リンゴ酸高生成酵母などの新しい清酒酵母の選抜が進んでいる^{9~21)}。

その一方で、小仕込みと実際の醸造では製成酒の成分含量、特に旨味を伴う酸味のコハク酸や穏やかな酸味を示す乳酸、さわやかな酸味を示すリンゴ酸など、清酒の味を決定する有機酸の含量が変化することが知られている。その一因として、仕込み量や容器の大きさ・形状の違いによる可能性が見出された²⁶⁾。清酒醸造において、醪は酵母のアルコール発酵により嫌気的狀態にほぼ保たれていると考えられている。しかし、酵母は振盪培養や静置培養のように、培養法の違いにより生成する有機酸量に違いが生じるといった結果が報告されている^{24, 27, 28)}ことから、清酒の醸造環境に関わる気相の変化が、有機酸の生成に影響している可能性は十分に考えられる。

主として有機酸の生成は酵母の働きによるものであり、酵母ミトコンドリア内のTCA回路での酸化的反応、逆の還元的反応、プリン合成系、さらにはグリオキシル酸回路による生成等が提唱されている^{16, 29~31)}。しかしその生成機構については、未だ不明な点が多く、また、最近では酵母ミトコンドリアのTCA回路以外の系も提唱されつつある^{32, 33)}。

そこで本研究では、リンゴ酸高生成酵母を含む4種類の酵母を対象に、リンゴ酸生成に関連する酵素活性に及ぼす培養法、特に酸素供給の異なる培養方法の影響について検討し、リンゴ酸生成機構を明らかにすることを目的とした。

3-2. 実験方法

3-2-1. 供試菌株と使用培地

きょうかい酵母 701 号 (K-701) 及びきょうかい酵母 901 号 (K-901) と、石川県工業試験場で選抜された 2 株のリンゴ酸高生成酵母, MT-K1401-8 (シクロヘキシミド耐性酵母) 及び FKW-A245 (細胞融合株 K-901×OC-2) の計 4 株を使用した。

3-2-2. 培養方法

酵母は、5mL の YM-5 培地(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, polypepton 0.5%, glucose 5%)で 1 日間、前培養した後、表 3-1 に示した条件で本培養を行った。

表 3-1 酵母の培養条件

培養の種類	培養培地	培地量 (mL)	菌接種量(μL)	培養温度 (°C)	振盪 (rpm)	培養時間 (hr)
静置	YM-5	200	1000	30		約 24
静置 (軟寒天)	YM-5+agar 0.15%	200	1000			約 24
振盪	YM-5	200	100		120	約 16
振盪 (バッフル)	YM-5	100	50		120	約 16

いずれも 300mL 容三角フラスコを使用



図 3-1 各培養条件による酵母培養液

静置培養及び静置（軟寒天）培養（以後、軟寒天培養と称す）は、酵母の発酵に伴う二酸化炭素の生成により培地中は嫌気的狀態に保たれ、酵母は嫌気的環境で増殖する。なかでも軟寒天培養は培地に寒天を加えることで、嫌気的狀態でありながら培地全体で酵母が増殖する培養法であり、清酒醸造時の清酒醪と類似した環境、すなわち、清酒醪では醪全体で酵母が増殖している環境、となるように設定してある（図 3-1）。

振盪培養及び振盪（バッフル）培養（以後、バッフル培養と称す）は培養条件として振盪させることで、酸素が存在する好気的狀態で酵母が増殖している。なお、バッフル培養ではバッフル付フラスコを使用しているが、これは酵母への振盪による好気的条件の影響をより高めるためである。

3-2-3. ミトコンドリア画分及び細胞質画分の調製

① ミトコンドリア画分の調製

表 3-1 に示すように所定時間培養した培養液を遠心分離(2470g×5 分間)して菌体を得た。この菌体を生理食塩水で 2 回洗浄した(1470g×5min) 後、菌体に最終濃度が 1M ソルビトール、50mM KPB(pH7.5)、20mM 2ME (2-mercaptoethanol) , 6units/ml Zymolyase-20T になるように、水を加えて全量を 10ml とした。その後、35℃で 120 分間ゆっくりと振盪させ、プロトプラスト化を行った。プロトプラスト化終了後、遠心集菌(750g×5 分; 4℃) し、集菌した菌体を 1M SP Buffer(1M ソルビトール含有 50mM KPB (pH7.5)) 10mL で 2 回洗浄した。その後 SEB 液(0.65M ソルビトール、0.1mM EDTA、0.05%牛血清アルブミン(BSA)) 10 ml に懸濁し、菌体液を 50ml ビーカーに移し、氷冷しながら 2 分間超音波処理(TAITEC Ultrasonic processor VP-60, %Duty Cycle 10, Output Control 1) を行った。処理後の菌体液から遠心分離(2500g×10 分、4℃) にて細胞片等を除去し、上清を遠心分離(27000g×20 分、4℃) した。この沈殿部分に SEB 液 5ml を添加して洗浄、再び 27000g×20 分(4℃) で遠心した。さらにこの沈殿部分に 1M SP-Buffer 1ml を加えて溶解させ、遠心(1080g×5 分、4℃) により不溶部分を除去し、得られた上清をミトコンドリア画分(粗酵素液) とした。

② 細胞質画分の調製

上記と同様に培養した酵母培養液 20 mL (軟寒天培養は 40 mL) を 1470g×3 分の遠心により集菌し、生理食塩水で 2 回洗浄後、1mL の 2mM AEBSF を添加した 50mM KPB (pH7.0) で懸濁した。ビーズ破砕機 μ T-01 (タイテック株) を用いて 3600 rpm×1 分の破砕処理及び 2 分間の氷水冷却を繰り返す、計 4 分間の破砕処理を行った。破砕処理後、遠心(12000g×10 分) を行い、上清を細胞質画分(粗酵素液) とした^{34,35)}。

3-2-4. 酵素活性測定

酵素活性測定対象は、ミトコンドリアの標識酵素であるチトクローム C オキシダーゼと、有機酸生成に関与する TCA 回路に存在する 5 種の酵素とした。

なお、酵素活性 1unit は 1 分間あたり、それぞれの基質あるいは補酵素等の変化量 (1nmol) とし、比活性はタンパク質 1mg あたりとした。

① チトクローム C オキシダーゼ (CCOx) 活性

CCOx 活性は David らの方法³⁶⁾に従い、1000mM リン酸バッファー(KPB)(pH7.0) 100 μ L, 1% フェリチトクローム C 70 μ L, 水 810 μ L, 粗酵素液 20 μ L で全量 1000 μ L とし、30 $^{\circ}$ C, 測定波長 550nm でのフェリチトクローム C の酸化に伴う吸光度の減少を測定し、初速度法により活性を求めた。なお、フェリチトクローム C のモル吸光係数は 2.18×10^4 L/mol/cm とした。

② リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) 活性

MDH 活性は Karyl らの方法³⁷⁾に従い、300mM KPB (pH7.5) 100 μ L, 4mM オキサロ酢酸 100 μ L, 2mM NADH 100 μ L, 水 650 μ L, 粗酵素液 50 μ L で全量を 1000 μ L とし、30 $^{\circ}$ C, 測定波長 340nm での酸化反応に伴う補酵素 NADH の吸光度減少を測定し、初速度法により活性を求めた。なお、NADH のモル吸光係数は 6.22×10^3 L/mol/cm とした。

③ イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (ICDH) 活性

ICDH 活性は Kornberg らの方法³⁸⁾に従い、500mM KPB (pH7.0) 67 μ L, 100mM MgCl₂ 33 μ L, 25mM NADP 7 μ L, 5mM イソクエン酸 Na₃ 33 μ L, 300mM KCN(pH7.0) 33 μ L, 水 727 μ L, 粗酵素液 100 μ L で全量 1000 μ L とし、30 $^{\circ}$ C, 測定波長 340nm で補酵素 NAD(P)の還元に伴う NAD(P)H 生成による吸光度増加を測定し、初速度法により活性を求めた。

④ ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 活性

PDH 活性は Kresze らの方法³⁹⁾に従い、(1000mM Tris-HCl-Buffer(pH8.1)+10mM MgCl₂ +5mM CaCl₂) 100 μ L, 2mM TPP(Thiamin Diphosphate) 100 μ L, 25mM NAD 100 μ L, 20mM L-cysteine-HCl 100 μ L, 40mM Na-pyruvate 100 μ L, 粗酵素液 100 μ L, 水 380 μ L, 6.5mM CoASH 20 μ L で全量を 1000 μ L とし、30 $^{\circ}$ C, 測定波長 334nm で補酵素 NAD の還元に伴う NADH 生成による吸光度増加を測定し、初速度法により活性を求めた。

⑤ コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) 活性

SDH 活性は Ackrell らの方法⁴⁰⁾に従い、(32mM Tris-HCl Buffer (pH7.5)+166 μ M EDTA) 500 μ L, 200mM Succinic Acid (pH7.0) 100 μ L, 10mM K₃ [Fe(CN)₆] 10 μ L, 水 290 μ L, 粗酵素液 100 μ L で全量を 1000 μ L とし、30 $^{\circ}$ C, 測定波長 420nm で酵素反応に伴うフェリシアン化カリウムの色調変化を測定し、初速度法により活性を求めた。なお、フェリシアン化カリウムのモル吸光係数は 1.08×10^3 L/mol/cm とした。

⑥ イソクエン酸リアーゼ (ICL) 活性

ICL 活性は Michelet らの方法⁴¹⁾に従い、(500mM HEPES-NaOH(pH7.2)+100mM MgCl₂) 100μL, 200mM イソクエン酸 200μL, 水 600μL に粗酵素液 100μL を加えて全量を 1000μL とし、30℃で 1, 6, 11 分間反応させた。反応終了後直ちに 3 分間ボイルした後、氷冷した。その後、12000g×15 分で遠心分離を行い、上清 500μL に 40mM フェニルヒドラジン 100μL, 水 400μL を加え、30℃で 5 分間反応させた後、波長 324nm で酵素反応に伴うフェニルヒドラゾン生成に対する色調変化を測定した。なお、フェニルヒドラゾンのモル吸光係数は $1.70 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ とした。

3-2-5. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、牛血清アルブミン (BSA) を標準物質として、Bradford 法 (Bio-Rad, Quick Start プロテインアッセイ) により測定した⁴²⁾。

3-2-6. 培養液の有機酸分析

本培養した酵母培養液を 1920g×5 分 (4℃) で遠心し、得られた上清を有機酸測定用の試料とした。有機酸量は、試料をフィルターユニット (日本ミリポア (株) 製 mixed cellulose ester, 0.45μm) でろ過し、有機酸分析計 (日本ダイオネクス (株) 製 ICS-1500, カラム : IonPac ICE-AS6 (日本ダイオネクス (株) 製), 移動相 : 0.4mmol/L ヘプタフルオロ酪酸, 流速 : 1.0mL/min, カラム温度 : 19℃, 検出器 : 電気伝導度) により分析した。

3-3. 実験結果

3-3-1. ミトコンドリア画分及び細胞質画分の酵素活性

清酒中の有機酸は酵母によって生成され、主としてその合成系は酵母ミトコンドリアの TCA 回路に由来すると言われている。すなわち TCA 回路による酸化的反応、還元反応、プリン合成系、グリオキシル酸回路による生成などである^{16,29~31)}。このことから、ミトコンドリア画分の酵素活性に着目した。

一方、近年になって、酵母細胞の細胞質内の酵素がリンゴ酸生成に大きく影響するという報告^{33,44)}がなされてきているので、細胞質画分についても同様に検討を行った。

4種の酵母のミトコンドリア画分及び細胞質画分の酵素活性を培養法と関連づけて比較した結果を図 3-2~図 3-9 に示す。

① CCOx 活性

CCOx 活性はすべての菌株及び培養法で検出された。このことによりミトコンドリア画分が調製されていることを確認できた。一方、細胞質画分から存在しない CCOx の活性値が検出され、細胞質画分調製時に、ミトコンドリアの一部が破壊され抽出されたことがわかった。ただし、その比活性が低いことからミトコンドリアの破壊は多くないものと推察した。

② K-701 の酵素活性

K-701 のミトコンドリア画分及び細胞質画分における酵素活性の結果をそれぞれ図 3-2、図 3-3 に示した。

MDH 活性は、ミトコンドリア画分では静置培養、軟寒天培養（嫌氣的条件）での比活性がそれぞれ 859 units/mg, 795 units/mg で、振盪培養、バツフル培養（好氣的条件）のそれぞれ 305 units/mg, 448 units/mg よりも約 2 倍高くなった。また、細胞質画分でも、ミトコンドリア画分と同様に、静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ 986 units/mg, 921 units/mg で、振盪培養、バツフル培養でのそれぞれの比活性 516 units/mg, 595 units/mg よりも約 2 倍高かった。

SDH 活性は、ミトコンドリア画分では振盪培養、バツフル培養での比活性がそれぞれ 180 units/mg, 147 units/mg となり、静置培養、軟寒天培養でのそれぞれの比活性 58 units/mg, 53 units/mg の約 3 倍高い値を示した。また、細胞質画分では静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ 21 units/mg, 36 units/mg, 振盪培養、バツフル培養ではそれぞれ 11 units/mg, 9 units/mg でミトコンドリア画分よりも低い値であった。

PDH 活性は、ミトコンドリア画分では振盪培養、バツフル培養での比活性が、それぞれ 49 units/mg, 90 units/mg, 静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ 73 units/mg, 23 units/mg で、ばらつきはあるものの大きな差はなかった。また、細胞質画分では静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ 486 units/mg, 342 units/mg となり、振盪培養、バツ

フル培養のそれぞれの比活性 86 units/mg, 77 units/mg よりもそれぞれ約 5.7 倍, 約 4.4 倍高かった。

ICDH 及び ICL 活性は, 培養法及び画分に関わらず著しく低い値であった。

③K-901 の酵素活性

K-901 のミトコンドリア画分及び細胞質画分における酵素活性の結果をそれぞれ図 3-4, 図 3-5 に示した。本菌の酵素活性は K701 と類似していることから, 高い比活性を示した酵素活性のみに言及する。

MDH 活性は, ミトコンドリア画分では静置培養, 軟寒天培養での比活性がそれぞれ 937 units/mg, 893 units/mg で, 振盪培養, バッフル培養でのそれぞれの比活性 482 units/mg, 540 units/mg よりも 1.7~1.9 倍高かった。また, 細胞質画分でもミトコンドリア画分と同様に, 静置培養, 軟寒天培養での比活性がそれぞれ 1013 units/mg, 1106 units/mg となり, 振盪培養, バッフル培養のそれぞれの比活性 711 units/mg, 560 units/mg よりも 1.4~2.0 倍高かった。

SDH 活性は, 振盪培養及びバッフル培養のミトコンドリア画分のみで高く, その比活性はそれぞれ 160 units/mg, 108 units/mg であった。

PDH 活性は, 静置培養及び軟寒天培養の細胞質画分のみで高く, その比活性はそれぞれ 423 units/mg, 463 units/mg であった。

ICDH 及び ICL 活性は, 培養法及び画分に関わらず著しく低い値であった。

④MT-K1401-8 の酵素活性

MT-K1401-8 のミトコンドリア画分及び細胞質画分における酵素活性の結果をそれぞれ図 3-6, 図 3-7 に示した。

MDH 活性は, ミトコンドリア画分では静置培養, 軟寒天培養での比活性がそれぞれ 1605 units/mg, 1375 units/mg となり, 振盪培養, バッフル培養でのそれぞれの比活性 267 units/mg, 397 units/mg よりも 3.5~6.0 倍高くなった。また, 細胞質画分ではミトコンドリア画分と同様に, 静置培養, 軟寒天培養での比活性がそれぞれ 1010 units/mg, 1175 units/mg で, 振盪培養, バッフル培養でのそれぞれの比活性 531 units/mg, 787 units/mg よりも 1.5~1.9 倍高くなった。K701 と比べると, 静置培養及び軟寒天培養のミトコンドリア画分で約 2 倍の比活性が検出された以外は, 大きな差はなかった。

SDH 活性は, 振盪培養及びバッフル培養のミトコンドリア画分でのみ比較的高かった (比活性はそれぞれ 199 units/mg, 81 units/mg)。また, PDH 活性は, 静置培養及び軟寒天培養の細胞質画分でのみ比較的高かった (比活性はそれぞれ 389 units/mg, 314 units/mg)。しかし, これらの活性は K701 と同程度であった。その他の培養法及び画分では低い活性であった。

ICDH 及び ICL 活性は, 培養法及び画分に関わらず著しく低い値であった。

⑤FKW-A245 の酵素活性

FKW-A245 のミトコンドリア画分及び細胞質画分における酵素活性の結果をそれぞれ図 3-8, 図 3-9 に示した。

MDH 活性は、ミトコンドリア画分では静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ 609 units/mg, 693 units/mg で、振盪培養、バツフル培養でのそれぞれの比活性 151 units/mg, 184 units/mg よりも 3.8~4.0 倍高かった。また、細胞質画分では静置培養、軟寒天培養での比活性がそれぞれ 391 units/mg, 373 units/mg で、振盪培養、バツフル培養でのそれぞれの比活性 212 units/mg, 217 units/mg よりも 1.7~1.8 倍高かった。K701 と比べると、静置培養及び軟寒天培養のミトコンドリア画分で若干低い比活性であったが、同培養の細胞質画分では 1/2 以下の比活性であった。

SDH 活性は、振盪培養のミトコンドリア画分のみ、244 units/mg の比活性が検出されたが、K701 の比活性と同程度であった。また、PDH 活性は、静置培養及び軟寒天培養の細胞質画分でのみ比較的高く、その比活性はそれぞれ 195 units/mg, 133 units/mg であり、K701 に比べると 1/2 程度であった。その他の培養法及び画分では低い活性であった。

ICDH 及び ICL 活性は、培養法及び画分に関わらず著しく低い値であった。

⑥その他の特徴

MDH 活性は、全ての菌株でミトコンドリア画分及び細胞質画分の両画分に存在した。K-701 及び K-901 では、すべての培養法において、ミトコンドリア画分よりも細胞質画分に若干高い比活性が見られた。これに対して、MT-K1401-8 及び FKW-A245 では、静置及び軟寒天培養では細胞質よりもミトコンドリア画分の方が高く、逆に振盪及びバツフル培養ではミトコンドリア画分よりも細胞質画分の方がやや高くなっていた。

また PDH 活性が静置培養及び軟寒天培養における細胞質画分で比較的高い比活性が認められた。ICDH 及び SDH は低い活性を示す傾向が認められ、特に細胞質画分では ICL 活性はほとんど検出されない程度であった。

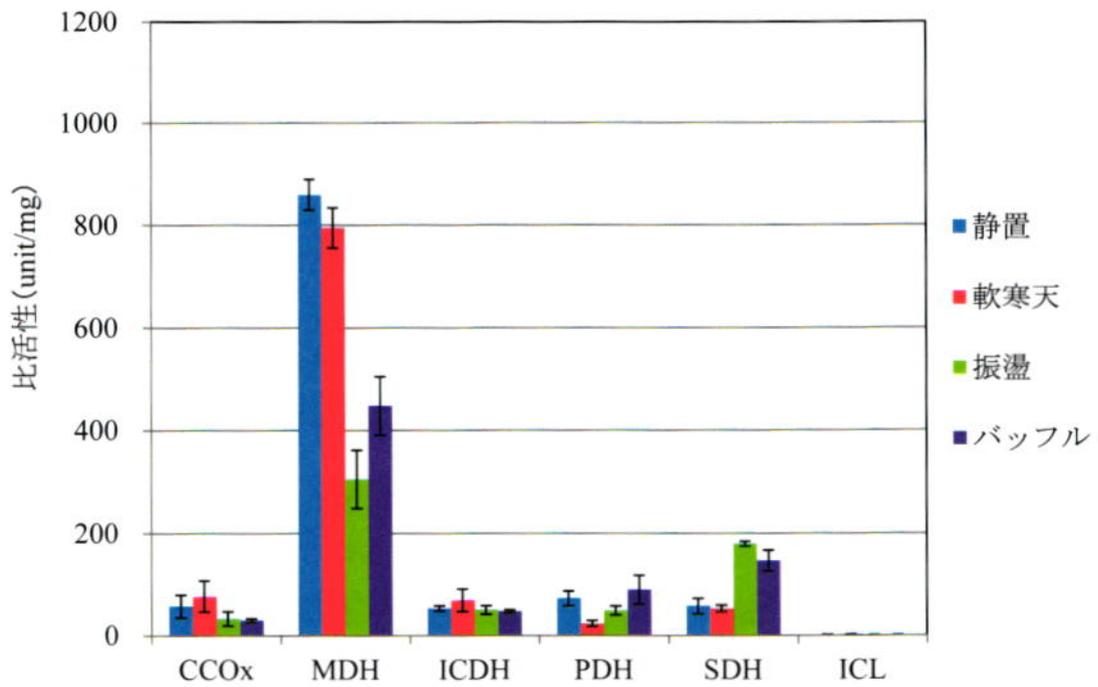


図 3-2. K-701 のミトコンドリア画分における各酵素の比活性

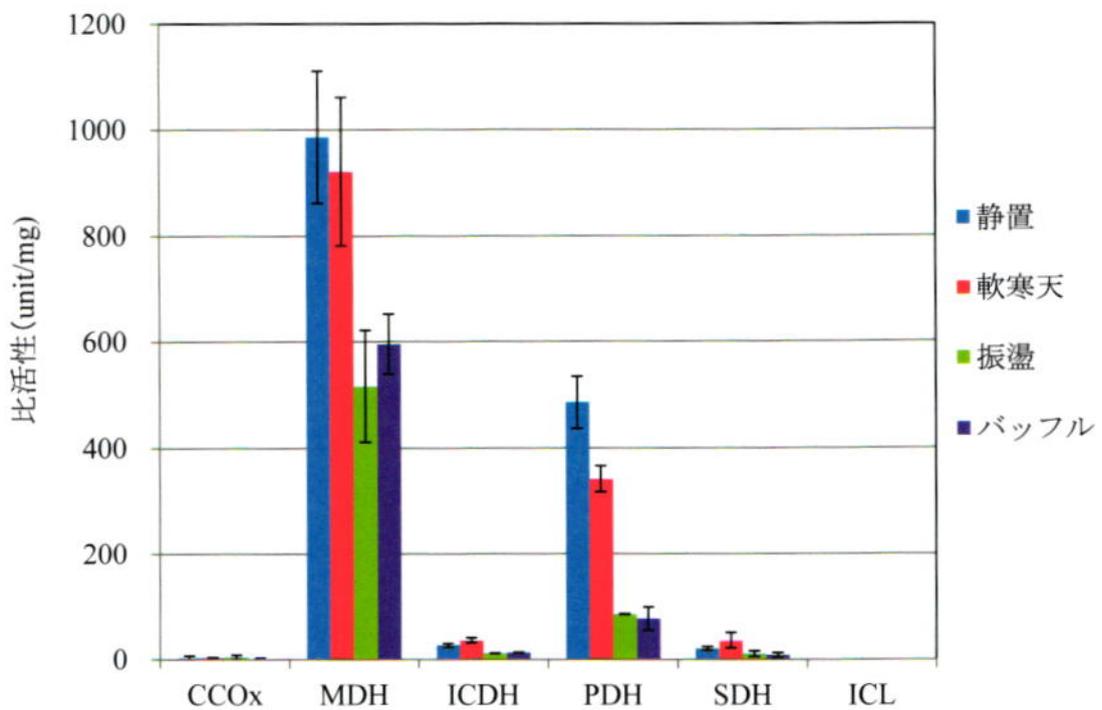


図 3-3. K-701 の細胞質画分における各酵素の比活性

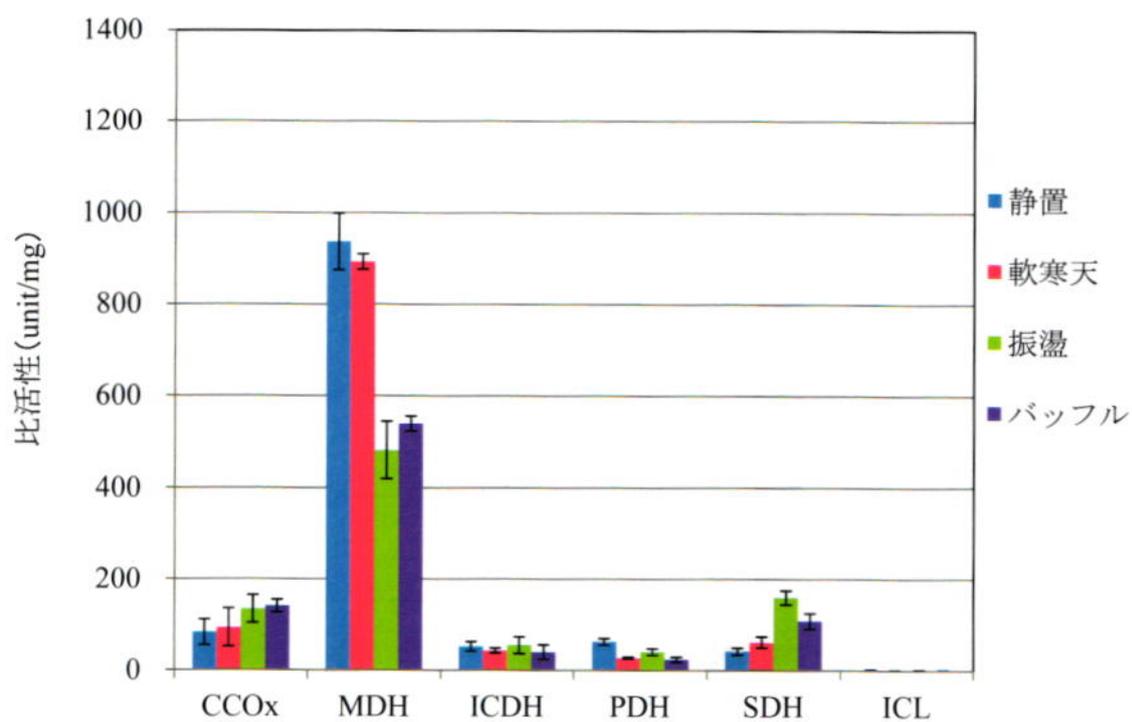


図 3-4 K-901 のミトコンドリア画分における各酵素の比活性

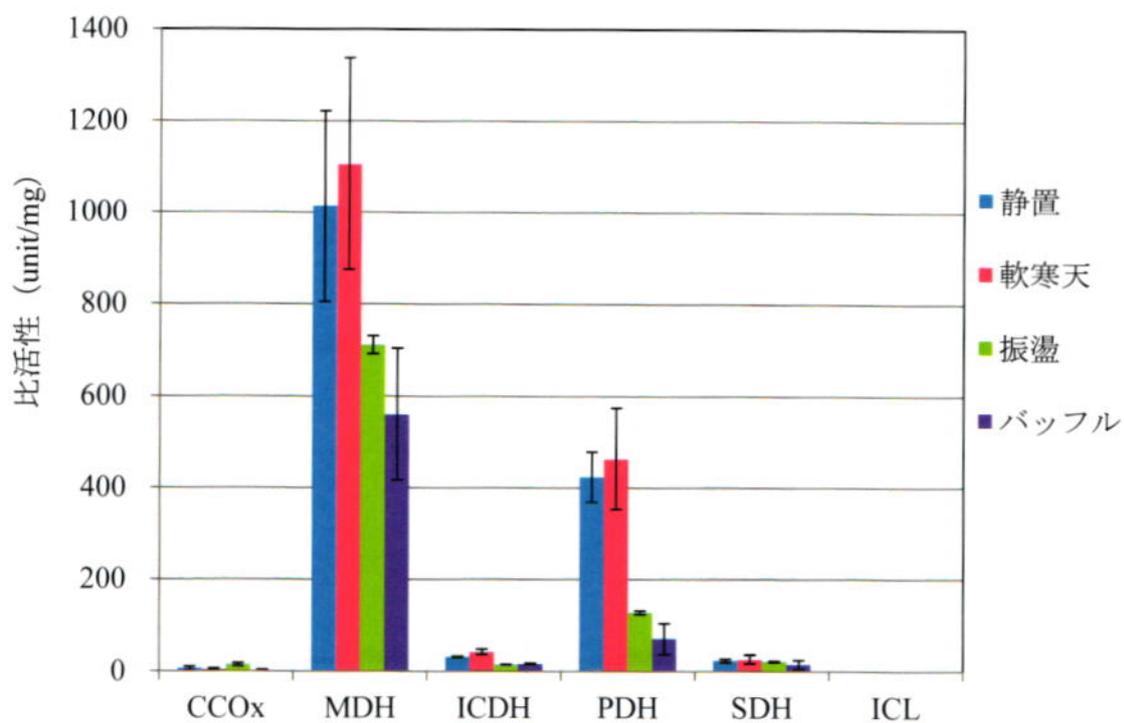


図 3-5 K-901 の細胞質画分における各酵素の比活性

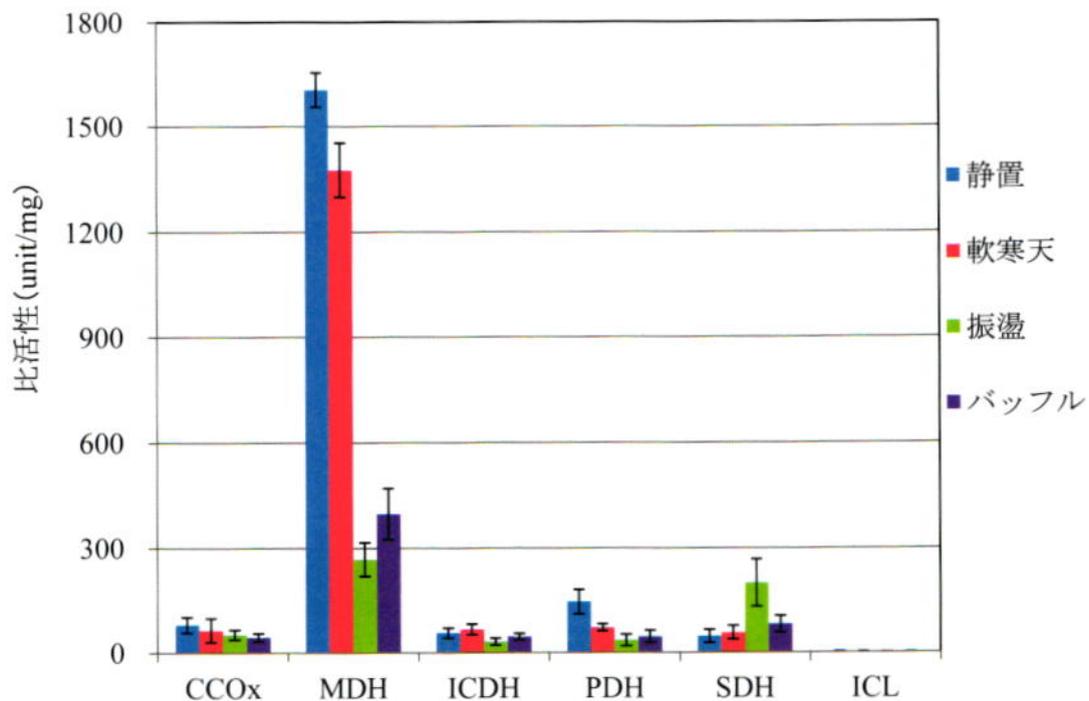


図 3-6 MT-K1401-8 のミトコンドリア画分における各酵素の比活性

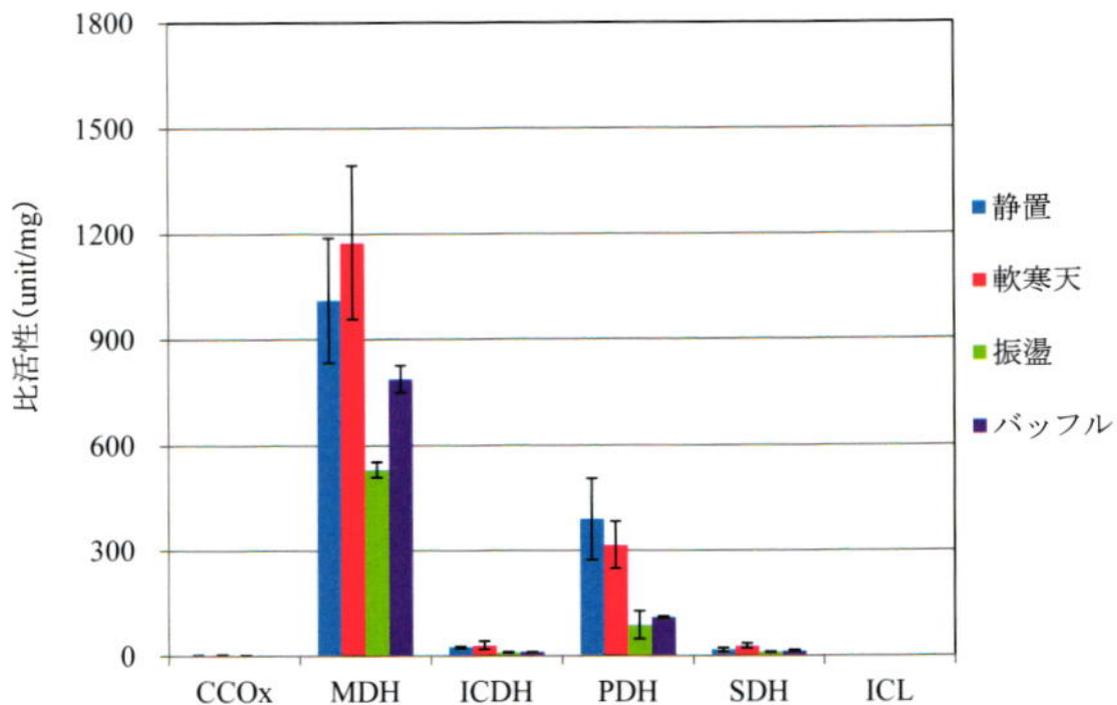


図 3-7 MT-K1401-8 の細胞質画分における各酵素の比活性

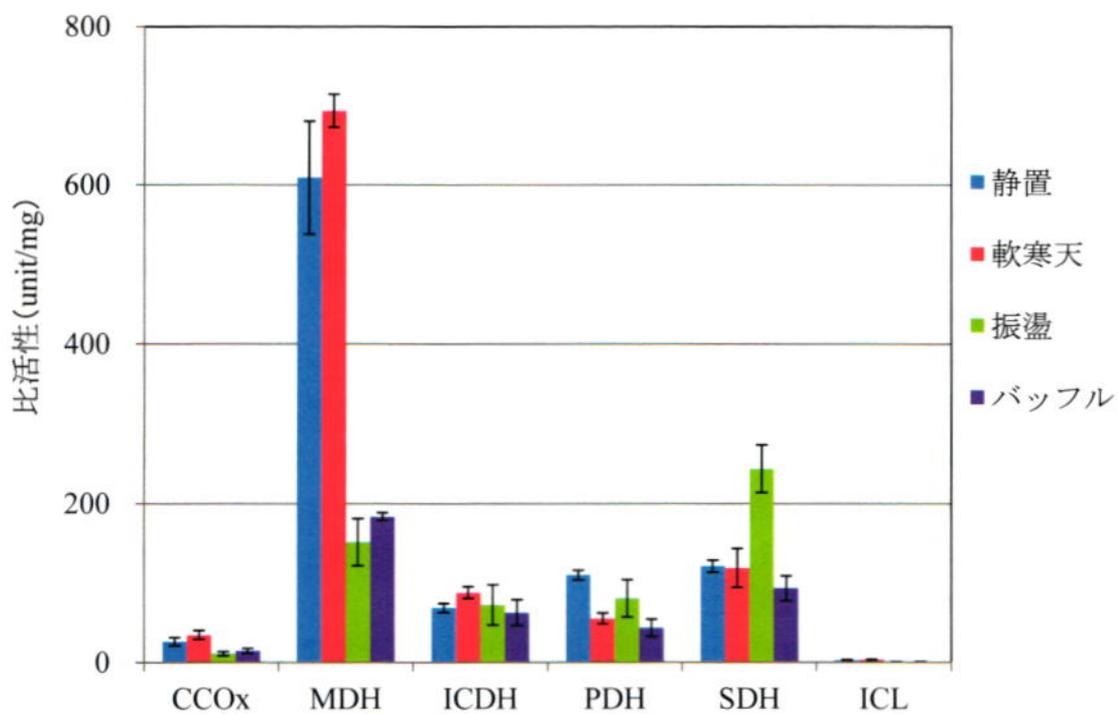


図 3-8 FKW-A245 のミトコンドリア画分における各酵素の比活性

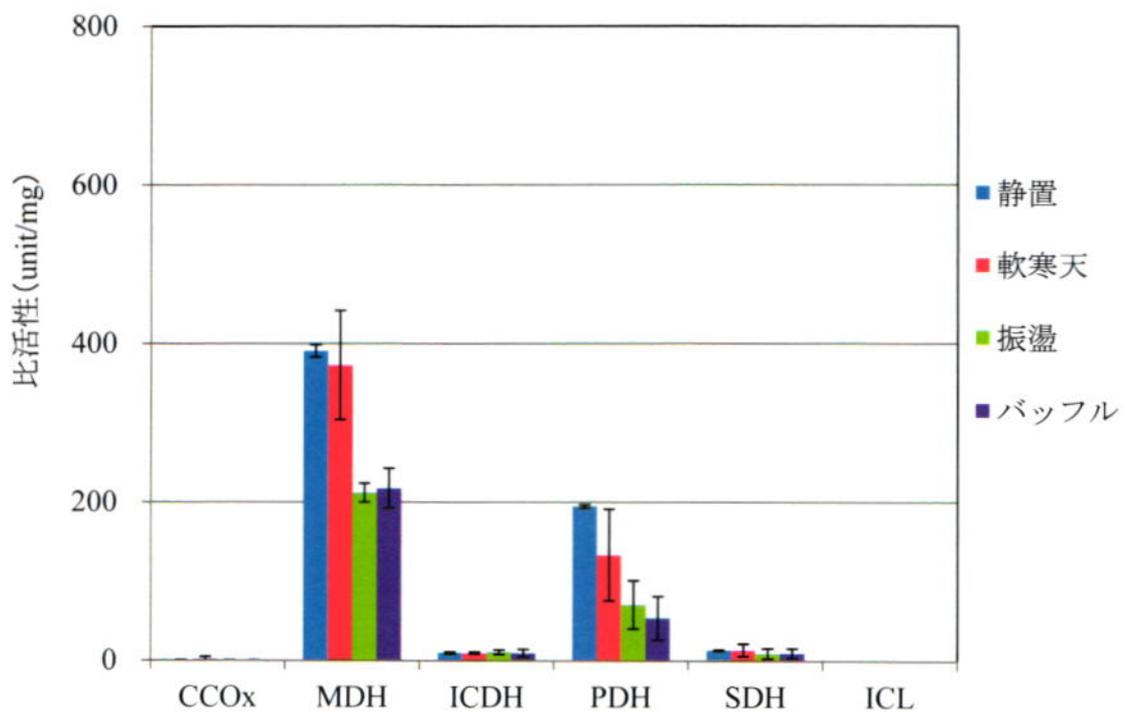


図 3-9 FKW-A245 の細胞質画分における各酵素の比活性

3-3-2. 培養液中の有機酸濃度

YM-5 培地を用いた酵母の静置培養及び軟寒天培養では 24 時間、振盪培養及びバツフル培養では 16 時間後の培養液の有機酸測定結果を表 3-2~3-5 に示した。

リンゴ酸生成量は、静置培養及び軟寒天培養で高く、それぞれ K-701 では 50 mg/L , 54mg/L, K-901 では 48 mg/L , 55mg/L, リンゴ酸高生成酵母 MT-K1401-8 では 144 mg/L, 138mg/L, もう一つのリンゴ酸高生成酵母 FKW-A245 では 78 mg/L , 96mg/L であり、振盪培養及びバツフル培養に比べ著しく高かった。

また、菌株間では静置培養及び軟寒天培養において、リンゴ酸高生成酵母である MT-K1401-8 及び FKW-A245 は高いリンゴ酸生成量を示した。

その他の有機酸では、ピルビン酸、乳酸が軟寒天培養においてやや高くなる傾向を示した。それ以外の有機酸は培養法、菌株間で顕著な差は認められなかった。

一方、リンゴ酸生成量とミトコンドリア画分及び細胞質画分の MDH 活性の関係をそれぞれ図 3-10, 図 3-11 に示した

ミトコンドリアの MDH 活性との関係では以下のような結果であった。すなわち、静置培養及び軟寒天培養では、K-701 及び K901 は同程度の MDH 活性と同程度のリンゴ酸生成量を示した。4 種の酵母菌株の中では MT-K1401-8 の活性が最も高く、リンゴ酸の生成量も最も高い値を示した。しかし、FKW-A245 では、リンゴ酸生成量が MT-K1401-8 に次いで高い値を示したにもかかわらず、MDH 活性は 4 株中で最も低い値を示した。

同様に、細胞質の MDH 活性との関係では以下のような結果であった。すなわち、この場合も静置培養及び軟寒天培養において、K-701, K901 及び MT は同程度の MDH 活性を示した。リンゴ酸生成量は K-701 と K901 は同程度であったが、MT-K1401-8 のリンゴ酸生成量は最も高い値を示した。一方、FKW-A245 は、ミトコンドリアの場合と同様に、リンゴ酸生成量は MT-K1401-8 に次いで高い値を示したが、MDH 活性は 4 株の中で最も低い値を示した。

表 3-2 K-701 培養培地中の有機酸量(単位 mg/L)

	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	ピログル タミン酸	酢酸	コハク酸
静置	194.42 (18.33)	16.18 (0.61)	49.74 (5.53)	76.00 (3.36)	177.89 (4.65)	141.29 (42.71)	158.24 (7.71)
軟寒天	270.71 (38.89)	13.78 (7.00)	53.59 (2.94)	148.60 (13.22)	179.91 (6.11)	157.90 (25.60)	231.22 (26.89)
振盪	161.57 (5.20)	11.50 (0.52)	14.90 (0.52)	111.43 (5.30)	149.50 (1.21)	78.60 (2.88)	73.27 (1.43)
バッフル	249.03 (34.25)	18.20 (9.04)	12.93 (0.91)	84.33 (5.71)	175.47 (11.88)	201.03 (10.13)	186.40 (7.99)

【平均値(標準偏差)】

表 3-3 K-901 培養培地中の有機酸量(単位 mg/L)

	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	ピログル タミン酸	酢酸	コハク酸
静置	226.25 (8.54)	15.70 (0.42)	47.64 (5.82)	85.27 (4.14)	175.89 (9.83)	107.91 (9.37)	135.09 (16.49)
軟寒天	270.52 (34.31)	18.88 (0.25)	54.66 (1.36)	133.77 (3.78)	179.61 (1.07)	156.76 (2.40)	201.04 (5.93)
振盪	225.27 (5.70)	13.20 (0.70)	18.67 (0.68)	126.70 (6.42)	180.97 (4.11)	136.13 (7.34)	138.87 (5.35)
バッフル	170.89 (77.11)	13.53 (2.17)	14.11 (4.13)	91.25 (17.13)	175.25 (6.45)	174.44 (13.59)	182.67 (3.55)

【平均値(標準偏差)】

表 3-4 MT-K1401-8 培養培地中の有機酸量(単位 mg/L)

	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	ピログル タミン酸	酢酸	コハク酸
静置	150.46 (25.04)	17.80 (3.53)	144.32 (12.34)	76.92 (14.23)	176.74 (8.59)	171.93 (49.48)	156.32 (17.73)
軟寒天	279.02 (17.14)	18.08 (1.57)	138.07 (13.68)	138.15 (10.01)	159.48 (27.26)	157.82 (51.14)	186.28 (42.13)
振盪	188.07 (36.18)	14.93 (0.42)	21.63 (1.56)	142.60 (9.61)	175.67 (10.89)	83.27 (3.54)	120.17 (4.51)
バッフル	212.30 (28.91)	16.94 (1.97)	20.99 (4.26)	126.83 (27.55)	174.25 (6.32)	143.44 (28.23)	156.45 (24.54)

【平均値(標準偏差)】

表 3-5 FKW-A245 培養培地中の有機酸量(単位 mg/L)

	ピルビン酸	クエン酸	リンゴ酸	乳酸	ピログル タミン酸	酢酸	コハク酸
静置	265.91 (11.31)	18.29 (1.08)	78.05 (8.64)	103.60 (2.63)	177.02 (3.75)	181.75 (37.22)	118.06 (14.38)
軟寒天	342.96 (42.38)	19.18 (0.30)	96.10 (18.48)	183.64 (16.54)	172.39 (12.16)	264.93 (30.08)	125.04 (11.63)
振盪	204.87 (26.83)	15.77 (0.91)	32.47 (1.74)	204.20 (15.36)	183.77 (5.01)	119.43 (8.55)	76.37 (8.94)
バッフル	160.69 (11.81)	14.69 (0.95)	18.39 (10.63)	130.03 (50.77)	180.64 (4.87)	199.05 (0.63)	61.90 (13.56)

【平均値(標準偏差)】

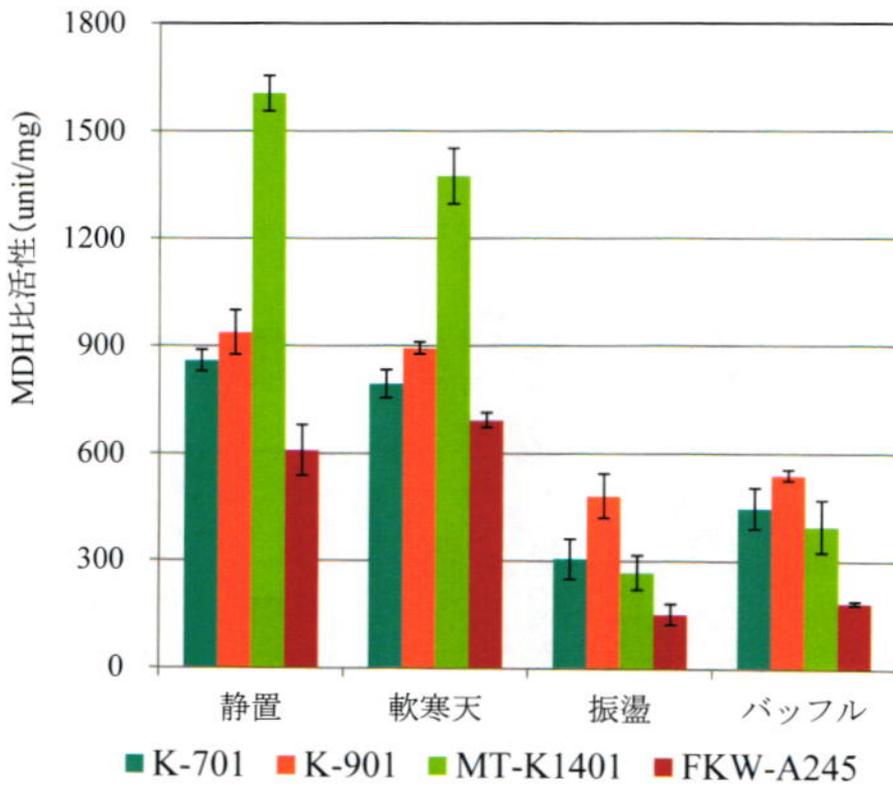
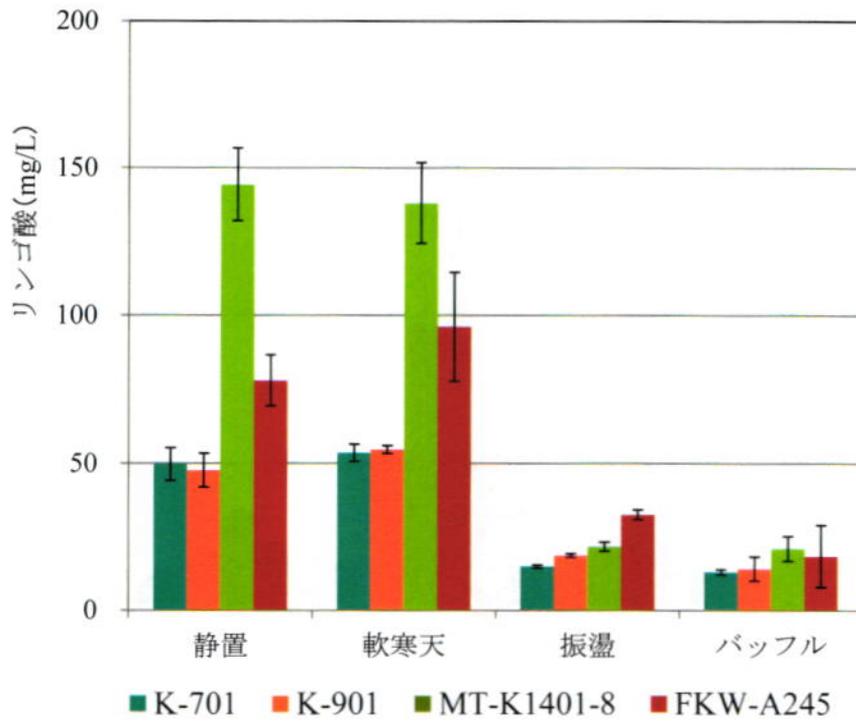


図 3-10 ミトコンドリア画分の MDH 活性とリンゴ酸生成量の関係

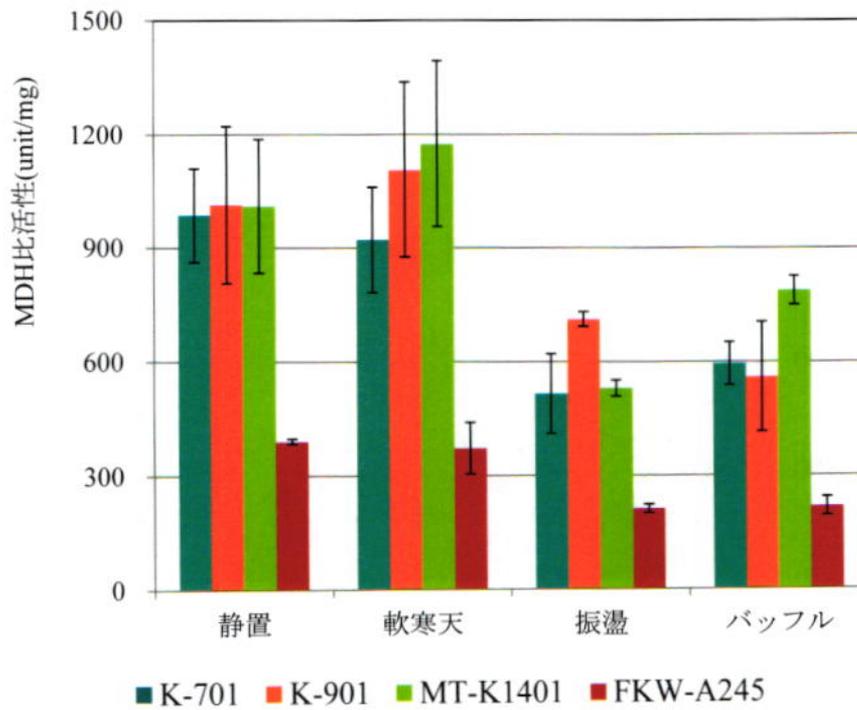
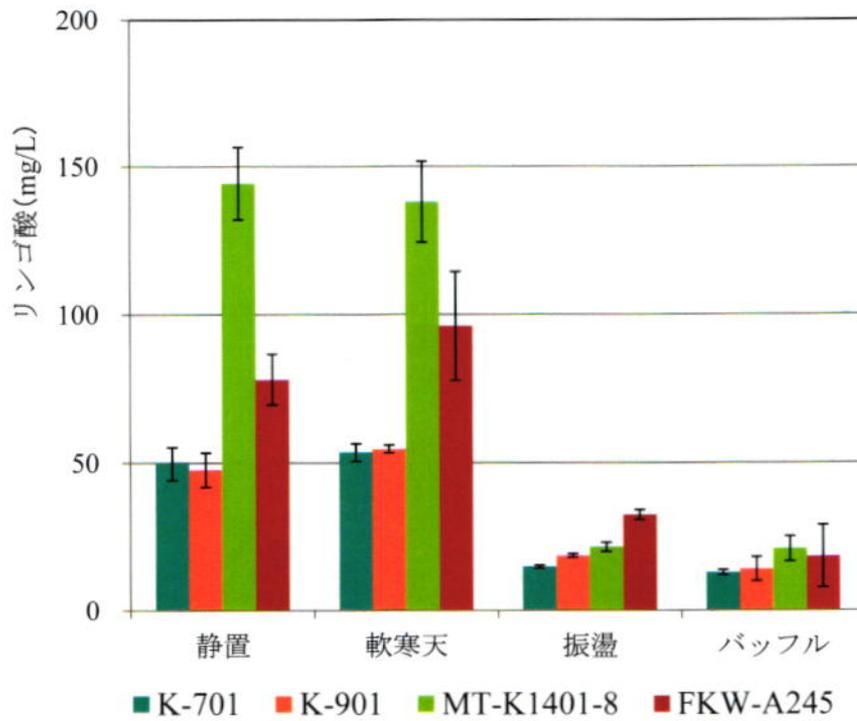


図 3-11 細胞質画分の MDH 活性とリンゴ酸生成量の関係

3-3-3. 各種培養法における培地中の溶存酸素

すべての培養法で、コントロール（酵母培養前）と比較して酵母培養後の溶存酸素濃度は減少する結果となった（データ省略）。静置培養及び軟寒天培養は発酵に伴う二酸化炭素の影響で培地中の酸素濃度は減少すると考えられるが、振盪培養における溶存酸素濃度の減少の理由は明らかではない。各コントロールと比較しても培養間で溶存酸素濃度に大きな変化がみられなかったことから、酵母のリンゴ酸生成に関連する酵素の活性に対し、溶存酸素の影響は少ないと考えられた。ただし、溶存酸素は振盪を止めた瞬間から変化することから、この結果が酵母の酵素活性にどの程度影響しているかは不明である。

3-4. 考察

以上の結果をふまえて、好気的あるいは嫌気的条件、さらにはリンゴ酸高生成酵母 MT-K1401-8 及び FKW-A245 によるリンゴ酸生成に関して以下のように考察した。

3-4-1. 好気的条件下における各リンゴ酸生成経路の推察

十分な酸素が供給されている好気的条件下では、ミトコンドリア内 TCA 回路の酸化反応が促進される⁴⁵⁻⁴⁷。好気的条件下にある振盪及びバッフル培養では、静置及び軟寒天培養に比べてリンゴ酸生成量の低下と酸化反応の SDH 活性が高くなる傾向がみられた。そのため好気的条件下にある振盪及びバッフル培養では、TCA 回路の酸化反応が促進されている可能性が高く、それに伴うリンゴ酸からオキザロ酢酸への流れが強まることから、リンゴ酸の蓄積が起これないと考えられた (図 3-12)。

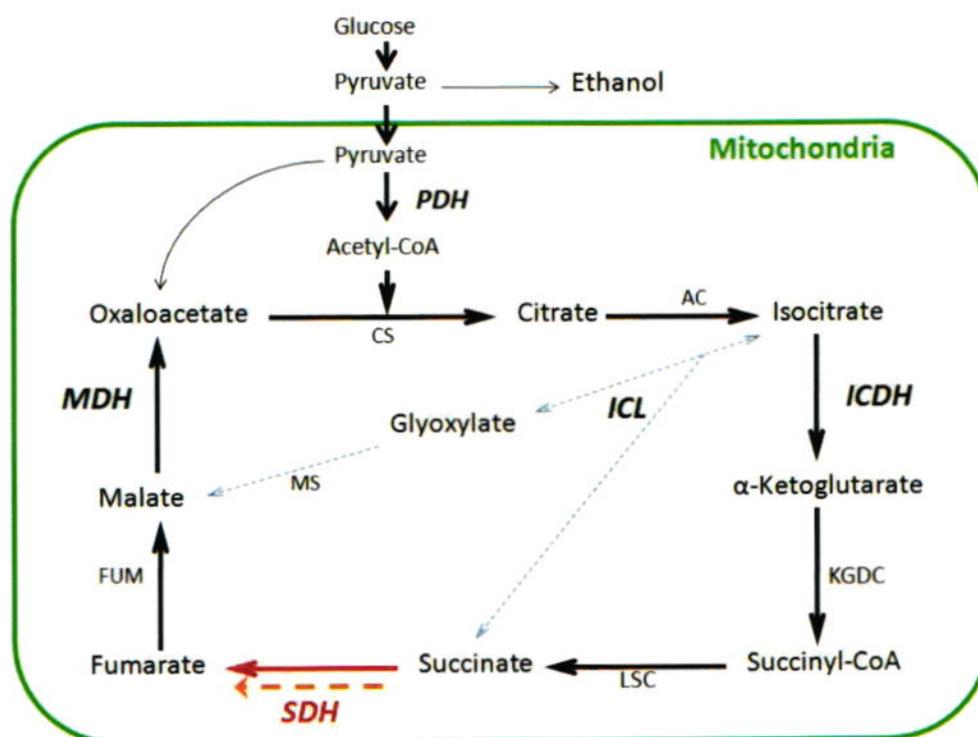


図 3-12 ミトコンドリア TCA 回路の酸化的反応経路

3-4-2. 嫌氣的条件における各リンゴ酸生成経路の推察

一方、ミトコンドリア画分において、嫌氣的条件下にある静置及び軟寒天培養は、振盪及びバッフル培養に比べて、リンゴ酸の生成量と還元的反応の MDH 活性がともに高くなる結果を示した。嫌氣的条件下では酵母のアルコール発酵が進み、炭酸ガスの発生により、さらに培養液は嫌氣状態に置かれる。このように酸素が不足している状態ではミトコンドリアの活性は低下する。TCA 回路はアセチル CoA からの酸化的反応が促進されず、ピルビン酸からオキザロ酢酸、そしてリンゴ酸への還元的反応が促進される^{33,44}。そのため、嫌氣的条件にある静置及び軟寒天培養では、TCA 回路の還元的反応に伴う MDH 活性の向上により多量のリンゴ酸が生成されたものと考えられた (図 3-13)。

また、細胞質画分における MDH もミトコンドリア画分と同様、振盪及びバッフル培養に比べ、静置及び軟寒天培養で高い活性を示した。嫌氣的条件に曝された酵母では、ミトコンドリア内の TCA 回路の流れが還元的方向へ促進されるほか、細胞質に存在する MDH の活性が高まるという報告がなされている^{33,35,43,44}。本研究においても、酸素不足によるミトコンドリアの活性の低下に伴い、細胞質内にピルビン酸が蓄積することでオキザロ酢酸を経てリンゴ酸が生成する経路が活性化したものと考えられた (図 3-13)。

このことから、静置及び軟寒天培養 (嫌氣的条件) にみられる多量のリンゴ酸生成は、酵母の TCA 回路の還元的反応、及び細胞質に存在する MDH の活性化の両機構が関与していることが示唆された。

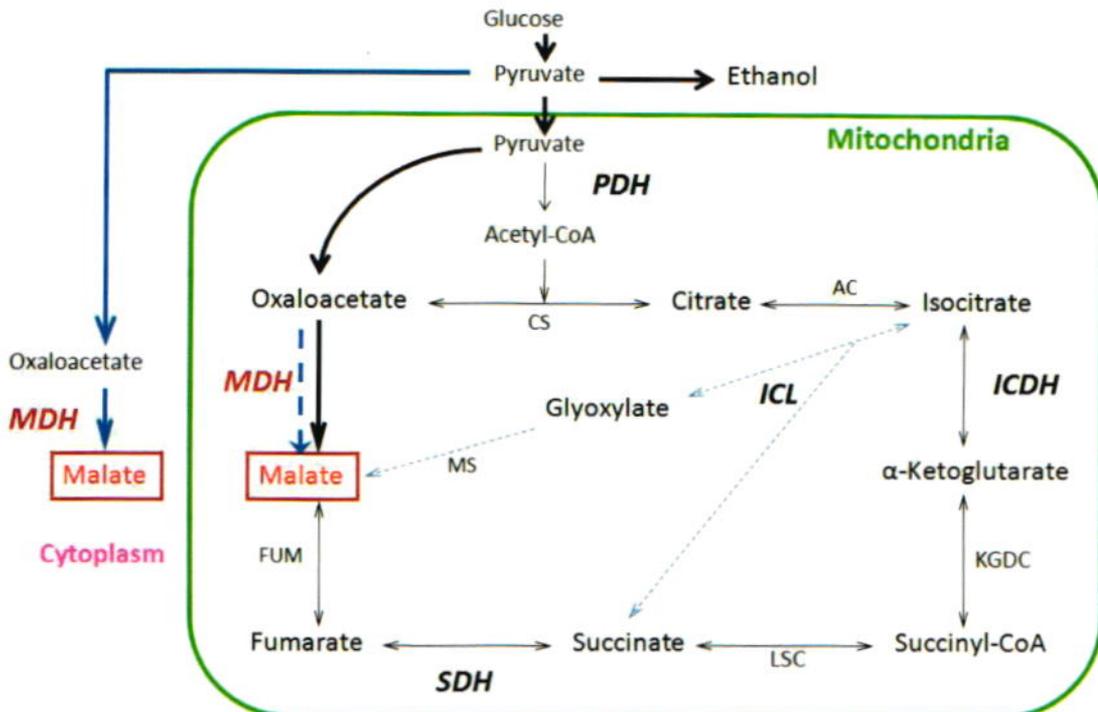


図 3-13. ミトコンドリア TCA 回路の還元的反応経路と細胞質画分の MDH

3-4-3. リンゴ酸高生成酵母のリンゴ酸生成経路の推察

① MT-K1401-8

リンゴ酸高生成酵母の一つである MT-K1401-8 は、静置及び軟寒天培養の嫌氣的条件下において、リンゴ酸生成量が最も高く、細胞質、ミトコンドリアの両画分の MDH 活性も最も高い値を示した。また、MDH 以外の酵素群である ICDH, SDH, ICL の活性は、K-701 や K-901 と比較しても大差は認められなかった。これらのことから、MT-K1401-8 は、嫌氣的条件下で K-701 及び K-901 以上に細胞質、ミトコンドリアの両画分の MDH の活性が高まっている可能性が考えられた。また細胞質、ミトコンドリアの両画分を比較した結果、ミトコンドリア画分に MDH の高い比活性が認められたことから、本酵母のリンゴ酸生成は、特にミトコンドリアの還元的反応による影響が大きいと考えられた (図 3-14)。

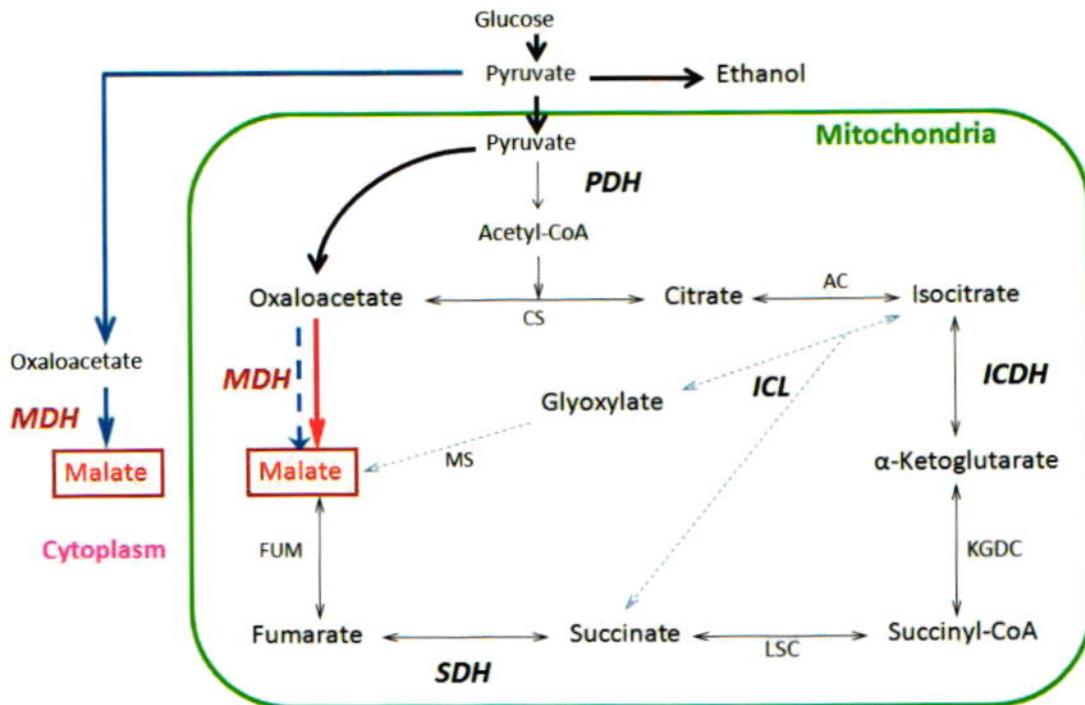


図 3-14. MT-K1401-8 で予想されるリンゴ酸生成経路 (嫌気条件)
(特にミトコンドリア内の MDH 活性が高い)

② FKW-A245

もう一つのリンゴ酸高生成酵母である FKW-A245 は、他の酵母と同様、好气的条件に比べて嫌气的条件で高い MDH 活性を示した。また MDH 活性は MT-K1401-8 と同様にミトコンドリアに由来する MDH の割合が大きいものと推察された。

その一方で、FKW-A245 は MT-K1401-8 に次いで多量のリンゴ酸を生成しているにも関わらず、ミトコンドリア、細胞質のそれぞれから抽出・調製した MDH 活性は他の酵母と比べて低い値であった。このため、本酵母は嫌气的条件において MDH 以外の酵素が関与している可能性が考えられ、リンゴ酸生成機構は他の3つの酵母とは異なると推察しているが、その生成機構の解明にはさらなる検討が必要であると考えている。

要約

清酒用きょうかい酵母 (K-701, K-901) 及びリンゴ酸高生成酵母 (MT-K1401-8, FKW-A245) について、培養法 (静置培養, 軟寒天培養, 振盪培養, バッフル培養) ごとにおけるリンゴ酸生成に関連する酵素の活性, 及び有機酸生成量について検討した。酵素活性は, ミトコンドリア画分及び細胞質画分について測定し, その結果を基に酵母のリンゴ酸生成機構について考察した。それらの結果を以下に要約する。

1. 培養法で比較すると, すべての酵母菌株で, また, ミトコンドリア, 細胞質の両画分において, 振盪培養及びバッフル培養の好氣的条件よりも静置培養及び軟寒天培養の嫌氣的条件で, リンゴ酸の高生成及び MDH の高い活性が見られた。
2. MDH 活性は, 全ての菌株に, また, ミトコンドリア, 細胞質の両画分に存在した。K-701 及び K-901 では, すべての培養法において, ミトコンドリア画分よりも細胞質画分に若干高い MDH の比活性が見られた。これに対して, MT-K1401-8 及び FKW-A245 では, 静置培養及び軟寒天培養では細胞質よりもミトコンドリア画分で高く, 逆に振盪培養及びバッフル培養ではミトコンドリアよりも細胞質画分でやや高かった。
3. リンゴ酸の生成に関し, 好氣的条件では TCA 回路の酸化的反応の促進に伴いリンゴ酸が減少し, 嫌氣的条件では TCA 回路の還元的反応, 及び細胞質の MDH を介する経路の活性化によりリンゴ酸が増大したと考えられた。
4. リンゴ酸高生成酵母である MT-K1401-8 は, 他の酵母と比較して嫌氣的条件で最も多量のリンゴ酸の生成と, ミトコンドリア, 細胞質の両画分で高い MDH 活性を示した。また, ミトコンドリア画分で最も高い MDH 活性を示したことから, 本酵母はきょうかい酵母に比べて上記 3) の嫌氣的条件での MDH の活性化, 特にミトコンドリア画分の MDH で促進する経路が活性化しているものと考えられた。
5. もう一つのリンゴ酸高生成酵母である FKW-A245 は, 嫌氣的条件で MT-K1401-8 に次いで多量のリンゴ酸を生成したが, 他 3 種の酵母と比較して MDH は低い活性を示した。このことから, 本酵母は TCA 回路及び細胞質の MDH 以外に, 他のリンゴ酸生成経路が存在する可能性が考えられた。

参考文献

- 1) 国税庁課税部酒税課(平成 24 年)：酒のしおり
- 2) 高橋康次郎, 白石常夫, 国分伸二, 泉健, 里見弘司, 石川雄章, 佐川浩昭, 田丸二三人, 秋本雄一：醸協, **76**, 549-552(1981)
- 3) 大場俊輝, 中村欽一, 佐藤信：醸協, **79**, 879-881(1984)
- 4) 佐無田隆, 片桐康雄, 伊藤伸一, 荒卷功：醸協, **93**, 567-574(1998)
- 5) 松田章, 松田喜洋, 道島俊英, 佐無田隆：石川県工業試験場研究報告, No.50, 36-41(2001).
- 6) 中野成美, 佐藤和幸, 千田茂, 脇田征也, 斎藤至正, 須田安彦, 長縄真琴, 大内弘造：醸協, **79**(10), 695-699(1984)
- 7) 小関敏彦, 森岡裕人, 飛塚幸喜, 須貝智, 小島弥之祐, 鈴木弥兵衛, 佐藤昭仁, 和田多聞, 布宮雅昭：醸協, **92**, 607-613(1997)
- 8) 久田孝, 矢野俊博, 松田章：日本食品微生物学会雑誌 **28**(2), 114-122(2011)
- 9) 相川元庸, 水津哲義, 市川英治, 川戸章嗣, 安部康久, 今安聰：醱酵工学会誌, **70**(6), 473-477(1992)
- 10) 吉田 清, 稲橋正明, 中村欽一, 野白喜久雄：醸協, **88**, 645-647(1993)
- 11) 吉田 清：醸協, **90**, 751-758(1995)
- 12) 稲橋正明, 吉田 清, 中村欽一：醸協, **90**, 689-692(1995),
- 13) 稲橋正明, 吉田 清, 中村欽一：醸協, **91**, 587-591(1996)
- 14) 浅野忠男, 黒瀬直孝：醸協, **95**, 227-234(2000)
- 15) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 森本 聡：醸協, **96**, 115-120(2001)
- 16) 小金丸和義, 大浦有実, 神田康三, 村田晃, 加藤富民雄：醸協, **96**(4), 275-281(2001)
- 17) 水野昭博, 岩淵正文, 木曾邦明, 佐藤和夫, 高橋利郎：醸協, **97**, 228-233(2002)
- 18) 浅野忠男, 矢野駿太郎, 高倉 裕, 田村健一, 黒瀬直孝, 平松順一, 高橋康次郎：醸協, **98**, 217-220(2003)
- 19) 大場孝宏, 野見山修治, 上田京子, 黒田理恵子, 鈴木正柯：醸協, **99**, 878-881(2004)
- 20) 松田章, 山田幸信, 有手友嗣, 中村静夫, 矢野俊博：醸協, **105**(1), 39-48(2010)
- 21) 大場孝宏：醸協, **106**(5), 262-270(2011)
- 22) 佐藤信, 大場俊輝, 吉田隆一：醸協, **77**, 557-561(1982).
- 23) 桑原秀明, 馬場茂：醸協, **90**, 82-86(1995).
- 24) 蓼沼誠：醸協, **61**, 1092-1097 (1966)
- 25) 佐藤信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 国分伸二, 小林幹男, 小林宏治：醸協, **72**, 801-805 (1977)
- 26) 松田章, 有手友嗣, 中村静夫, 辻奈緒子, 澤野礼奈, 矢野俊博：醸協, **108**(7), 527-538(2013)

- 27) 蓼沼誠, 武藤浩, 古市明紀, 設楽和平 : 醸造試験所報告, **135**, 64-73 (1963)
- 28) 蓼沼誠, 加藤有造, 武藤浩, 佐藤信 : 醸協, **61**(5), 449-452 (1966)
- 29) 若井芳則, 嶋崎孝行, 原昌道 : 発酵工学, **58**(5), 363-368(1980)
- 30) 蟻川幸彦 : 清酒酵母の研究—90年代の研究—, 清酒酵母・麴研究会, p.122-126(2003)
- 31) 浅野忠男 : 生物工学会誌, **85**(2), 63-68(2007)
- 32) 大場孝宏, 吉瀬友紀, 泉本英次, 中山俊一, 北垣浩志 : 日本醸造学会講演要旨集 (平成 24 年度)
- 33) S. Motomura, K. Horie and H.Kitagaki : *J. Inst. Brew.*, **118**(1), 22-26(2012)
- 34) Shunichi Nakayama, Tomotake Morita, Hideyuki Negishi, Toru Ikegami, Keiji Sakaki and Dai Kitamoto : *FEMS Yeast Res.*, **8**(5), 706-714(2008)
- 35) S. Nakayama, K. Tabata, T. Oba, K. Kusumoto, S. Mitsuiki, T. Kadokura and A. Nakazato : *J. Biosci. Bioeng.*, **114**(3), 281-285(2012)
- 36) David C. Wharton and Alexander Tzagoloff : *Methods in Enzymology*, **10**, 245-250(1955)
- 37) Karyl I. Minard and Lee McAlister-Henn : *Mol. Cell. Biol.*, **11**(1), 370-380(1991)
- 38) Arthur Kornberg and W. E. Pricer, Jr. : *J. Biol. Chem.*, **189**(1), 123-136(1951)
- 39) Georg-B. Kresze and Hedwig Ronft : *Eur. J. Biochem.*, **119**, 573-579(1981)
- 40) Brian A. C. Ackrell, Edna B. Kearney, and Thomas P. Singer : *Methods Enzymol.*, **53**, 466-483(1978)
- 41) Laure Michelet, Mirko Zaffagnini, Helene Vanacker, Pierre Le Marechal, Christophe Marchand, Michael Schroda, Stephane D. Lemaire, and Paulette Decottignies : *J. Biol. Chem.*, **283**(31), 21571-21578(2008)
- 42) http://www.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/186441/M3580_ProteinAssaySeriesManual.pdf
- 43) 北垣浩志 : 生物工学会誌, **87**(2), 66-71(2009)
- 44) Takahiro Oba, Hikaru Suenaga, Shunichi Nakayama, Shinji Mitsuiki, Hiroshi Kitagaki, Kosuke Tashiro, and Satoru Kuhara : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(10), 2025-2029(2011)
- 45) 木村光 : 食品微生物学, p.100~101
- 46) 林典夫, 廣野治子 : シンプル生化学, p.113~136
- 47) 上代淑人 : ハーパー・生化学 (原書 27 版) , p.146~147, p.160~165

まとめ

第1章

清酒の多様化を目的に、3株のリンゴ酸高生成酵母を選抜した。3株は、きょうかい酵母14号の泡なし(K-1401)株の自然誘発によるシクロヘキシミド耐性株(A株)、石川県内の酒造企業の酒蔵から採取した清酒もろみ85種類(1700株)の中から選抜した株(B株)、きょうかい酵母9号の泡なし(K-901)株とワイン酵母(OC-2)との細胞融合株(C株)であった。選抜酵母3株を用いて総米500gの清酒の小仕込試験を行った結果、いずれの酵母も対照のK-9と比較して、リンゴ酸を1.5~2倍多く生成した。また、仕込量を拡大して総米3kgの試験醸造を汲水歩合130%と120%で行った結果、アルコール発酵能の低下がなく、リンゴ酸高生成に関して500gと同様な傾向を示した。具体的には、A株を用いた場合、清酒中のリンゴ酸量は汲水歩合130%、120%でK-9のそれぞれ約2倍、約1.4倍高い値を示した。A株の発酵力はいずれの汲水歩合でもK-9と同等以上で、同株で日本酒度プラスの清酒を製造することができた。一方、汲水歩合120%でB株及びC株を用いた場合、汲水歩合130%の場合よりも味が濃醇で評価も比較的良好であった。また、B株及びC株の発酵力は、K-9に比較してもろみ発酵後期に弱く、もろみ日数が長くなったが、最終的に約18%のアルコールを生成した。汲水歩合120%でB株あるいはC株を用いた試験酒は、日本酒度マイナスでK-9に比較して酸度が高く濃醇な味わいとなった。これらのことから選抜酵母各3株と汲水歩合との組み合わせで味の幅を、特に酸味の幅を広げることができた。

第2章

清酒醸造では小仕込みと実際の醸造において製成酒の成分含量、特に有機酸含量が変化することが多いことは従来から指摘されていたが、これまでに定量的にまとめた報告がなかった。そこで、本章では小仕込みの結果と実際の醸造の結果を相似させることを目的として、小仕込みにおける仕込み容器の容量や形状、仕込み総量を変化させることによる製成酒の成分含量の変化について検討した。その結果、さまざまな形状の容器やシリンダーを用いて総米100gの小仕込み試験を行った結果、容器の空間高さ・体積、もろみ表面積の値が大きくなるほどリンゴ酸、乳酸が減少、コハク酸が増加した。もろみ高さはそれらと逆の傾向を示した。なかでも、もろみ表面積は強い影響を与えた。また、同一容器を用いて総米100g、200g、300g、400gの小仕込み試験を行った結果、空間体積・高さが大きくなるとリンゴ酸、乳酸が減少し、コハク酸が増加した。もろみ高さ・体積はそれらと逆の傾向を示した。製成酒のリンゴ酸、コハク酸、乳酸の含量は仕込み容器の容器空間の違いに影響されることが明らかになった。

第3章

4種の酵母を用いて培養法を変えて、リンゴ酸生成に関連する酵素の活性、及び有機酸量について検討した。また、酵素活性についてはミトコンドリア画分及び細胞質画分における比活性の比較を行い、酵母のリンゴ酸生成機構について検討した。その結果、培養法で比較すると、静置及び軟寒天培養の嫌氣的条件では多量のリンゴ酸生成とMDHの高い活性が認められた。一方、振盪及びバッフル培養の好氣的条件では、リンゴ酸生成量、MDH活性ともに嫌氣的条件の1/2程度またはそれ以下であった。このことから好氣的条件下ではTCA回路の酸化的反応の促進に伴いリンゴ酸生成量は減少し、逆に嫌氣的条件ではTCA回路の還元的反応、及び細胞質のMDHを介する両経路の活性化によりリンゴ酸生成量が増大したと考えられた。リンゴ酸高生成酵母であるMT-K1401-8は、嫌氣的条件下で他の酵母よりも高いリンゴ酸生成量を示し、ミトコンドリア及び細胞質の両画分によるMDHでも高い活性を示した。とりわけミトコンドリア画分で最も高いMDHの比活性が確認されたことから、本酵母は特にミトコンドリアでのオキザロ酢酸からリンゴ酸への還元的反応に関与するMDH活性が他の酵母に比べて高まっているものと考えられた。もう一つのリンゴ酸高生成酵母FKW-A245は、嫌氣的条件でMT-K1401-8に次いで多量のリンゴ酸を生成したが、他の3種の酵母と比較してMDHは低い活性を示した。このことから、本酵母はTCA回路及び細胞質のMDH以外に、他のリンゴ酸生成経路が存在する可能性が考えられた。

本研究では、清酒の呈味性に深く影響を与える有機酸、特にさわやかな呈味性で評価の高いリンゴ酸の生成について、清酒酵母及びそれを取り巻く影響因子について検討した。その結果、リンゴ酸を多く生成する酵母を取得するとともに、きょうかい酵母(K-701, K-901)との酵素活性の比較から、リンゴ酸生成量の増大は、主にミトコンドリア及び細胞質に存在するMDH活性の増大によることがわかった。また、小仕込み試験でリンゴ酸を高めるための条件を見出した。これらは、清酒製造において、酸の制御や酸味を中心とした多様化する酒質設計に大きく貢献できるものと考えている。

謝辞

末筆ながら本研究を行うにあたり、丁寧にご指導をいただき、また、本論文の作成に、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、石川県立大学生物資源環境学部食品科学科 矢野俊博教授に衷心より感謝の意と御礼の言葉を申し上げます。

また、酵素実験にあたり、石川県立大学生物資源環境学部食品科学科鈴木隆元教授、榎本俊樹教授、小西康子 教授に感謝申し上げます。

溶存酸素測定にて丁寧にご指導下さいました、生物資源工学研究所・中川章様に心から感謝申し上げます。

本論文作成の機会を与えていただきました、石川県工業試験場北村修場長をはじめ、歴代の場長、次長、中村静夫企画指導部長、笠森正人化学食品部長に深く感謝いたします。

また、本研究を実施するにあたり、終始協力していただきました、石川県工業試験場化学食品部笹木哲也主任技師、武春美主任技師、辻篤史技師、井上智実研究主幹、石川県農林総合研究センター農業試験場有手友嗣技師、石川農林総合事務所山田幸信農業指導専門員並びに石川県立大学生物資源環境学部食品科学科の澤野礼奈さん、表千晶さん、佐々木基岐君、辻奈緒子さん、森吉雄太君、磯野晃君、志村瞳さん他学生諸氏に深く感謝いたします。

最後に、研究を進めていく上で、ご助言やご協力をいただきました食品安全研究領域の皆様、そして食品管理学研究室の皆様に心から感謝致します。

論文リスト

1. 松田 章, 山田幸信, 有手友嗣, 中村静夫, 矢野俊博: 日本醸造協会誌 (醸協), **105(1)**, 39-48(2010), 酸味に特徴を有する酵母の選抜と試験醸造
2. 松田 章, 有手友嗣, 中村静夫, 辻奈緒子, 澤野礼奈, 矢野俊博: 日本醸造協会誌 (醸協), **108(7)**, 527-538(2013), 清酒の小仕込み試験における酒質, 特に有機酸生成に及ぼす影響因子