

〔生物工学会誌 第78巻 第9号 377-381. 2000〕

清酒もろみ製造工程におけるリパーゼの効果

木崎 康造¹・桑田 浩史^{1,3}・佐藤 深雪^{1,4}・山根 雄一²・金尾 丞泰²
 福田 央^{1*}・三上 重明¹・若林 三郎¹

国税庁醸造研究所,¹ 榊心山根本店²

¹〒739-0046 東広島市鏡山3-7-1

²〒723-0011 三原市東町353-2

(平成12年5月29日受付 平成12年6月20日受理)

Effect of Lipase in the Sake *Moromi* Brewing Process

YASUZO KIZAKI,¹ HIROSHI KUMEDA,^{1,3} MIYUKI SATO,^{1,4} YU-ICHI YAMANE,² TSUGIHIRO KANAO,² HISASHI FUKUDA,^{1*} SHIGEAKI MIKAMI,¹ and SABURO WAKABAYASHI¹ (*National Research Institute of Brewing, 3-7-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-0046*¹; *Suishin Yamane Honten Co. Ltd., 353-2 Higashi-machi, Mihara 723-0011*²) *Seibutsu-kogaku* **78**: 377-381, 2000.

To examine the possibility of controlling the flavor of sake by enzyme addition, the effects of ten kinds of commercially available lipases on flavor production during sake *moromi* fermentation were investigated. The results showed that lipase addition tended to increase the ethylcaproate content and decrease the isoamylacetate content. Among the lipases examined, Lipase PS had the most marked effect, and this lipase was selected for more detailed investigation. Six runs of sake *moromi* fermentation were carried out with varying amounts of Lipase PS. The results were as follows. The isoamylacetate content drastically decreased in all runs, while the ethylcaproate content increased with increasing lipase addition. Apart from isoamylacetate and ethylcaproate, other parameters were not affected. When lipase purified from Lipase PS was supplied during sake *moromi* fermentation, similar results to the above were obtained. No significant effects were observed when deactivated lipase was added. Since purified lipase degraded both isoamylacetate and ethylcaproate in an *in vitro* experiment, the increase in ethylcaproate resulting from lipase addition appears to be a characteristic unique to sake *moromi* fermentation.

[**Key words:** lipase, isoamylacetate, ethylcaproate, sake *moromi* fermentation]

ここ数十年での我が国における消費者の生活スタイルの多様化を反映して、清酒に対する嗜好もまた多様化する傾向にある。そのため、さまざまな芳香や味わいを有する清酒を製造するための技術が開発されてきている。たとえば、清酒の芳香を改変することを目的として、高級アルコールや芳香エステルを高生産する清酒酵母の育種¹⁻²⁾や、清酒麹菌からの変異株の誘導³⁾あるいは清酒もろみ工程の温度管理技術の最適化⁴⁻⁵⁾などの研究が報告されている。

一方酵素面からみると、清酒もろみではさまざまな酵素が重要な働きを担っていることも知られており、⁶⁻⁷⁾種々の醸造用酵素剤が開発され市販されてきた。しかし、これまで行われてきた醸造用酵素剤に関する研究は、その多くが清酒醸造における経済性、すなわち原料利用率の向上を主目的としてきたと考えられ、酵素を用いることで清酒の芳香を改変しようとした試みは少なく、わずかに、吉沢らがリパーゼ剤を用いた白米浸漬による清酒の芳香の改善を報告しているのみである。⁸⁾

そこで、酵素による清酒の芳香制御の可能性を探る目的から高香気を有する吟醸酒を想定し、リパーゼ剤の低温発酵もろみに及ぼす影響を検討した。さらにリパーゼ

* 連絡先, Corresponding author.

現在, ³四国醸材株式会社(〒799-1522 今治市桜井2-6-68), ⁴榊心山根本店(〒015-0404 由利郡矢島町七日町26)

剤からリパーゼを精製し、香氣成分に与える影響を考察したので報告する。

実験方法

使用リパーゼ剤 清酒もろみの発酵試験に供したリパーゼ剤は、いずれも天野製薬㈱製でリパーゼ A (*Aspergillus niger* 起源), リパーゼ AK (*Pseudomonas* sp. 起源), リパーゼ AY (*Candida rugosa* 起源), リパーゼ D (*Rhizopus delemar* 起源), リパーゼ F-AP-15 (*Rhizopus oryzae* 起源), リパーゼ G (*Penicillium camembertii* 起源), リパーゼ L (*Candida lipolytica* 起源), リパーゼ M (*Mucor javanicus* 起源), リパーゼ PS (*Pseudomonas* sp. 起源), およびリパーゼ RF (*Penicillium roqueforti* 起源) を用いた。おのおのの酵素剤が有する各酵素活性を測定した結果を Table 1 に示す。なお、清酒もろみ発酵試験での各酵素剤の使用量は、特に断らない場合、いずれも原料米(粳米+掛米)の重量に対して0.1%とした。

リパーゼの精製 リパーゼの香氣成分に対する影響を検討するために、上記の各リパーゼ剤のうち、リパーゼ PS よりリパーゼの精製を行った。精製は以下の手順で行った。まず、リパーゼ PS 粉末 1 g を 20 ml の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) に加え、4°C で一晩ゆっくりと攪拌して溶解させた後、遠心分離 (5000 rpm, 30 min) した。そして上清液を、同緩衝液に対して 4°C で一晩透析した。

次に透析液を、10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) で予め置換した陰イオン交換カラム (Poros PI/M, Nihon PerSeptive Ltd.) に注入し、同緩衝液中で 0~500 mM の NaCl 勾配を与えて分画した。リパーゼ活性を有するフラクションを集め、さらにこれをゲルクロマトグラフィー (カラム: TSKgel G-2000, Toso Co. Ltd.) で、200 mM

Table 2. Proportions of materials used for sake *moromi* fermentation.

		First feed	Second feed	Third feed	Total
Total rice	(g)	20.0	30.0	50.0	100.0
Steamed rice	(g)	15.0	25.0	40.0	80.0
Koji	(g)	5.0	5.0	10.0	20.0
Water	(ml)	23.5	40.0	65.0	128.5
Mineral solution	(ml)	1.0	—	—	1.0
Yeast broth	(ml)	0.5	—	—	0.5

の NaCl を含む 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.0) により分画し、精製リパーゼを得た。精製リパーゼは、SDS-PAGE によって単一バンドであることを確認した。

酵素活性測定法 リパーゼ活性は、リパーゼ測定キット (リパーゼキット S: 大日本製薬㈱) により、三酪酸ジメルカプロールを基質として測定した。リパーゼ活性 1 unit は、三酪酸ジメルカプロールより 1 μ mol の 5-チオ-2-ニトロ安息香酸を 1 分間に遊離させる酵素量とした。エステラーゼ活性は、Mase らの報告⁹⁾ に従い、*p*-ニトロフェニルエステルを基質として測定した。エステラーゼ活性 1 unit は、1 分間あたり 1 μ mol の *p*-ニトロフェノールを生成する酵素量とした。 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロテアーゼおよび酸性カルボキシペプチダーゼ活性は、国税庁所定分析法¹⁰⁾ に従ってそれぞれ測定した。酸性フォスファターゼ活性は、岡部らの報告¹¹⁾ に従って測定した。キシラナーゼ活性は、Kitprechanich らの報告¹²⁾ に従って測定した。

清酒もろみ発酵試験 清酒もろみ発酵試験は難波らの方法¹³⁾ に準じて、粳米 100 g の小スケールで行った。原料米には精米歩合 50% の日本晴を用い、Table 2 に示した仕込配合のもと 3 段仕込で行った。麴は同じく日本

Table 1. Enzyme activities in commercially available lipases.^a

	α -Amylase	Glucoamylase	Acid protease	Acid carboxy-peptidase	Phosphatase	Lipase	Xylanase
Lipase A	30.58	5.80	43.2	299.1	16.33	117	0.151
Lipase AK	0.10	n.d.	18.1	n.d.	0.18	27,920	n.d.
Lipase AY	0.04	n.d.	4.5	n.d.	0.21	11,580	n.d.
Lipase D	1.65	12.28	275.5	n.d.	0.21	16,590	n.d.
Lipase F-AP-15	2.68	7.66	11.6	n.d.	0.21	10,700	n.d.
Lipase G	0.06	0.39	31.6	n.d.	0.69	28	n.d.
Lipase L	0.02	n.d.	68.4	63.5	0.33	22	n.d.
Lipase M	0.06	0.39	145.8	18.5	0.21	1,710	n.d.
Lipase PS	0.12	n.d.	n.d.	n.d.	0.23	15,120	n.d.
Lipase RF	0.74	0.29	0.6	49.4	0.68	8,270	n.d.

^a Each enzyme activity is expressed as units per mg crude enzyme powder.
n.d., Not detected.

晴（精米歩合50%）を使用して常法に従って製造したものを -30°C で凍結保存し、発酵試験の度に用いた。なお、使用した麴からはほとんどリパーゼ活性は検出されなかった。酵母は協会9号酵母を使用し、 30°C で48時間静置培養した培養液を、添時に酵母数が 4.0×10^7 個/ml仕込水となるよう調整して添加した。また添時に、仕込水の一部として仕込加工水1 mlを添加した。仕込加工水は、 KH_2PO_4 1.3 g, NaCl 0.75 g および乳酸 27 ml にイオン交換水を加えて 300 ml に調整した。なおリパーゼ剤を添加する場合は、特に断らない場合、いずれも留時に添加する仕込水に予めこれを溶解した。

仕込温度は、添 15°C 、踊り（1日） 15°C 、仲 12°C 、留 10°C とし、以後は 10°C 一定として発酵を行った。同時に発酵試験を開始した各もろみのうち、いずれかの炭酸ガス減量が概ね 25 g に達した時点で上槽を行った。上槽は遠心分離 (6000 rpm, 30 min) で行った。

製成酒の成分分析 上槽後の製成酒に含まれるイソアミルアルコール、酢酸イソアミル、およびカプロン酸エチルの定量は国税庁所定分析法¹⁰⁾に従い、GC ヘッドスペース法にて行った。また他の成分についても国税庁所定分析法¹⁰⁾に従って分析した。

結果と考察

清酒もろみ発酵に及ぼすリパーゼ剤の影響 各種リパーゼ剤を留時に加えた清酒もろみ発酵試験を行い、得られた製成酒の香気成分を分析した結果を Fig. 1 に示す。なおリパーゼ剤無添加の発酵試験も併せて行い、対照とした。

イソアミルアルコール生成量については、対照と各リパーゼ添加もろみにおいて顕著な相違は見られなかった。しかし酢酸イソアミル生成量については、対照と比

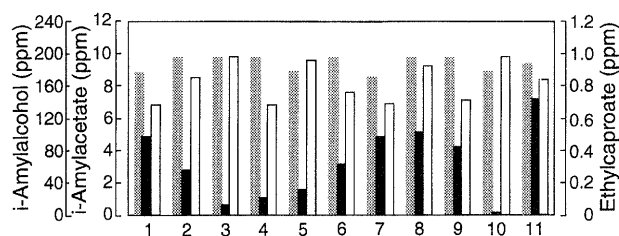


Fig. 1. Flavor contents in sake produced with addition of commercially available lipases. Numbers on the horizontal axis indicate each run of sake *moromi* fermentation: 1, control (without lipase addition); 2, with Lipase A; 3, Lipase AK; 4, Lipase AY; 5, Lipase D; 6, Lipase F-AP-15; 7, Lipase G; 8, Lipase L; 9, Lipase M; 10, Lipase PS; 11, Lipase RF. Bars: □, *i*-amylalcohol; ■, *i*-amylacetate; ▨, ethylcaproate.

較して、概ね各リパーゼ添加もろみにおいて低下する傾向が見られ、特にリパーゼ PS 添加もろみではきわめて低い値となっていた。またカプロン酸エチルについては、対照と比較して、概ね各リパーゼ添加もろみにおいて増加する傾向があり、特にリパーゼ PS およびリパーゼ AK 添加もろみにおいては対照の約1.44倍に達していた。

そこで、各リパーゼ剤中の酵素活性 (Table 1) とそれを添加して醸造した各もろみ中の香気成分含量について相関係数を求めた。その結果を Table 3 に示す。表からも明らかなように、リパーゼ活性のみが酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルの含量とある程度の相関が見られた。このことは、リパーゼが清酒もろみでの香気成分である脂肪酸エステルの消長に何らかの関与をなしていることを示唆するものと考えられる。

清酒もろみ発酵に及ぼすリパーゼ PS の影響 前述したもろみ発酵試験において用いた10種類のリパーゼ剤のうち、対照と比較して脂肪酸エステル含量にもっとも大きな変動を与えたリパーゼ PS について、以下、さらに検討を加えることとした。ここでは、添加するリパーゼ PS の量を原料米の重量に対して0.05~2.0%の6段階としてもろみ発酵試験を行い、リパーゼ無添加の対照試験と比較した。各発酵試験により得られた製成酒の一般成分を Table 4 に示す。アルコール濃度あるいはボーメといった一般成分は、リパーゼ PS の添加量によりほとんど変動しなかった。このことは、これらの諸成分に対して、リパーゼそれ自体をはじめリパーゼ PS に含有される各成分はほとんど影響を及ぼさないことを示している。またこれは、リパーゼ PS に含まれるリパーゼ以外の酵素活性 (Table 1) が、麴に含まれる活性と比較して無視できることから理解される。

一方、各製成酒の香気成分含量を分析した結果を Fig. 2 に示す。酢酸イソアミルについては、リパーゼ PS の

Table 3. Correlation coefficients between flavor content and enzyme activity.^a

	<i>i</i> -Amyl alcohol	<i>i</i> -Amylacetate	Ethylcaproate
α -Amylase	-0.2702	-0.0256	-0.0812
Glucoamylase	-0.2223	-0.1884	0.1474
Acid protease	-0.0974	-0.0650	0.2136
Acid carboxypeptidase	-0.0833	0.1384	-0.0017
Phosphatase	-0.2721	-0.0041	-0.0823
Lipase	0.1380	-0.6338	0.5647
Xylanase	-0.2944	-0.0246	-0.0881

^a Each correlation coefficient was calculated using the data in Table 1 and Fig. 1.

Table 4. Analytical results for components in sake produced with various amounts of added Lipase PS.

	Alcohol ^a (%)	Sake meter ^a (-)	Acidity ^a (ml)	Amino acidity ^a (ml)
Control ^b	15.9	-9.0	2.35	1.15
Lipase PS 0.05% ^c	16.0	-7.8	2.30	1.09
Lipase PS 0.10%	15.7	-6.5	2.28	1.13
Lipase PS 0.20%	15.9	-5.8	2.25	1.18
Lipase PS 0.50%	15.6	-7.0	2.38	1.27
Lipase PS 1.00%	15.4	-8.5	2.50	1.17
Lipase PS 2.00%	15.2	-10.8	2.75	1.50

^a Measured values according to the methods in reference (10).

^b In this case, sake *moromi* fermentation was carried out without addition of Lipase PS.

^c The percentage indicates the amount of Lipase PS added in relation to the total amount of rice used.

添加量が対原料米比0.05%であっても、ほとんど検出されなかった。またカプロン酸エチルの含量はリパーゼ PS の添加量と比例して増加し、対原料米比で2.0%添加した場合は 5.19 ppm と、対照 (0.88 ppm) と比較して実に5.9倍に達していた。これらの結果は、リパーゼが清酒もろみの発酵過程において、脂肪酸エステルの消長に対してのみに影響をおよぼしていることを強く示唆している。

精製リパーゼの香気成分への影響 以上の結果を踏まえ、リパーゼ PS に含まれるリパーゼ自体が、清酒もろみの脂肪酸エステルの消長にいかなる影響を及ぼすのか検討することとした。そこで、実験方法の項において述べた方法に従い、まずリパーゼ PS よりリパーゼを精製した。

次に、精製されたリパーゼを用いてもろみ発酵試験を行った。発酵試験は4区分行い、これらはそれぞれ：

(1) リパーゼ無添加の対照区；(2) リパーゼ PS 添加区；(3) 精製リパーゼ添加区；(4) 熱失活させた精製リパーゼの添加区とした。ここで、(2) では対原料米比0.10%のリパーゼ PS を添加し、また (3) では (2) と同等のリパーゼ活性を与えるため、原料米あたり 12 units となるよう精製リパーゼを添加した。また (4) では、(3) と同量の精製リパーゼを5分間沸騰水で湯浴させることで失活させて添加した。各発酵試験の結果得られた製成酒の脂肪酸エステル含量を分析した結果を Fig. 3 に示す。(2) リパーゼ PS 添加区および (3) 精製リパーゼ添加区においては酢酸イソアミルはほとんど検出されず、またカプロン酸エチルは増加し、それぞれ (1) 対照区の1.8倍および2.0倍に達していた。一方、(4) 熱失活させた精製リパーゼ添加区においては、(1) 対照区とほぼ同程度の酢酸イソアミルが検出され、カプロン酸エチル含量もまた (1) 対照区とほぼ同程度のレベルに留まった。以上の結果より、リパーゼが発酵中の清酒もろみにおいて、酢酸イソアミルを分解し、またカプロン酸エチルの生成を促進することが明らかとなった。

リパーゼは広い意味でエステラーゼに分類される。¹⁴⁾ これまでに得られたリパーゼの脂肪酸エステルに対する影響は、リパーゼのエステラーゼとしての作用によると考えられる。そこで精製リパーゼが有するエステラーゼ活性の基質特異性を、ラウリン酸-*p*-ニトロフェニル、カプロン酸-*p*-ニトロフェニルおよび酢酸-*p*-ニトロフェニルをそれぞれ基質として測定した。その結果を Fig. 4 に示す。いずれの基質を用いた場合でもエステラーゼ活性は確認されたことから、リパーゼがエステラーゼとして作用することで、清酒もろみの脂肪酸エステル含量に変化が見られたものと考えられる。また脂肪酸の鎖長が短い酢酸 (C₂) に対してよりも、より鎖長が長いラウリ

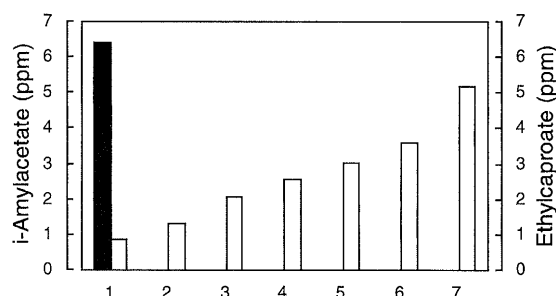


Fig. 2. Flavor contents in sake produced with various amounts of added Lipase PS. Numbers on the horizontal axis indicate each run of sake *moromi* fermentation: 1, control (without lipase addition); 2, with 0.05% Lipase PS; 3, 0.10%; 4, 0.20%; 5, 0.50%; 6, 1.00%; 7, 2.00%. Bars are the same as in Fig. 1.

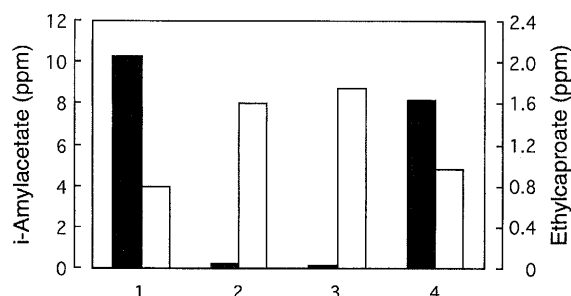


Fig. 3. Flavor contents in sake produced with or without lipase purified from Lipase PS and with deactivated lipase. Numbers on the horizontal axis indicate each run of sake *moromi* fermentation: 1, control (without lipase addition); 2, with Lipase PS; 3, with purified lipase; 4, with deactivated lipase. Bars are the same as in Fig. 1.

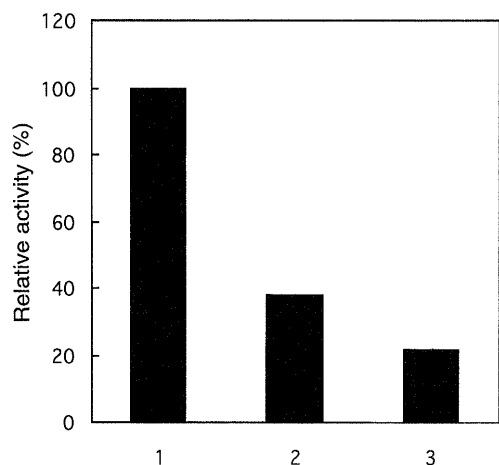


Fig. 4. Substrate specificity of lipase purified from Lipase PS. The activities are expressed relative to the activity for *p*-nitrophenyl-laurate. Numbers on the horizontal axis indicate: 1, the activity for *p*-nitrophenyl-laurate; 2, for *p*-nitrophenyl-caproate; 3, for *p*-nitrophenyl-acetate.

ン酸 (C₁₂),あるいはカブロン酸 (C₆) に対してエステラーゼ活性が高い基質特異性を示している. この基質特異性が, 清酒もろみにおいて酢酸イソアミルは分解されるものの, カブロン酸エチルは増加するという相反する現象に何らかの関わりがあると推定することもできよう.

一方, マッキルベイン緩衝液中で酢酸イソアミルまたはカブロン酸エチルに精製リパーゼを作用させる *in vitro* の試験では, 精製リパーゼは両エステルを分解した(データは省略). このことから, 今回確認されたリパーゼ添加によるカブロン酸エチル含量の増加は, 清酒もろみという特異な反応環境において生じる現象と考えられる. この現象が, 低温, 高アルコール濃度, あるいは弱酸性といった清酒もろみのいかなる特性によって生じたのかは, 今のところ不明である. 今後, 清酒もろみにおけるリパーゼの作用機作に関し, さらに検討を加える予定である.

本研究の結果は, 従来, 主に酵母あるいは麹菌といった醸造微生物の機能を改変することにより行われてきた清酒などの発酵食品の芳香の制御を, 酵素を用いてより簡便に行い得る可能性を示すものである.

要 約

酵素による, 清酒の芳香を制御する可能性の検討を目的として, リパーゼが清酒もろみにおける香気成分の消長に及ぼす影響を検討した. 10種類の市販リパーゼ剤を用いた清酒もろみ発酵試験の結果, リパーゼ剤の添加に

より, 製成酒の酢酸イソアミル含量が低下し, カブロン酸エチル含量が増加する傾向が見られた. 用いたリパーゼ剤のうち, 両エステル含量に対してもっとも大きな変動を与えたリパーゼ PS を用いて, その添加量を対原料米比0.05~2.0%の6段階としたもろみ発酵試験を行ったところ, 酢酸イソアミルはいずれの場合もほとんど検出されなかった一方, カブロン酸エチル含量は, 酵素剤添加量の増加にともない増加していた. またこの時, 製成酒の一般成分は酵素剤の添加により何ら影響されなかった. リパーゼ PS よりリパーゼを精製し, これを清酒もろみ発酵試験に供したところ, 精製リパーゼの添加により酢酸イソアミルの消失とカブロン酸エチルの増加が見られた一方, 熱失活させた精製リパーゼではこのような効果は見られなかった. また精製リパーゼは *in vitro* において, 酢酸イソアミルおよびカブロン酸エチルの双方を分解したことから, 清酒もろみにおけるカブロン酸エチルの増加は清酒もろみ特有の現象であると考えられた. 以上の結果は, 酵素による清酒の芳香を制御する可能性を強く示唆するものと考えられた.

本研究を行うに当たり, 酵素剤を提供していただきました天野製菓株式会社へ深謝いたします.

文 献

- 1) 秋田 修, 小幡孝之: 化学と生物, **29**, 586-592 (1991).
- 2) 福田和郎: 生物工学, **75**, 111-124 (1997).
- 3) 山下伸雄, 窪寺隆文, 永井英雄, 近藤恭一: 生物工学, **74**, 375-379 (1996).
- 4) Matsuura, K., Hirotsune, M., Hamachi, M., and Nunokawa, Y.: *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 112-116 (1992).
- 5) 松浦一雄, 広常正人, 浜地正昭: 生物工学, **72**, 453-460 (1994).
- 6) 布川弥太郎: 醸酵工学, **58**, 391-398 (1980).
- 7) 椎木 敏: 醸酵工学, **69**, 293-306 (1992).
- 8) 吉沢 淑, 石川雄章: 醸酵工学, **63**, 161-173 (1985).
- 9) Mase, T., Matsumiya, Y., and Matsuura, A.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 329-330 (1995).
- 10) 注解編集委員会編: 第4回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993).
- 11) 岡部正人, 桜田博克, 清水弘人, 中谷俊多美, 三上重明, 岩野君夫: 醸協, **91**, 203-208 (1996).
- 12) Kitprechavanich, V., Hayashi, M., and Nagai, S.: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 63-69 (1984).
- 13) 難波康之祐, 岩野君夫, 磯見昭夫: 醸協, **71**, 61-63 (1976).
- 14) 岩井美枝子: リパーゼーその機能と応用一, p. 5, 幸書房 (1991).