

## 鳥取オリジナル酵母 (KU61) の泡なし株の取得

## および尿素低生産性株の選抜

Identification of a non-foaming strain of Tottori original yeast (KU61)

and selection of a strain with low urea productivity

井田昌孝・茂一孝・本多美恵

Masataka Ida, Kazutaka Shigeru, Mie Honda

食品開発研究所 発酵・機能性食品グループ

もろみ期間中の泡の発生による泡消し操作等の手間をなくし、鳥取県産清酒の輸出拡大に対応するため、鳥取オリジナル酵母 (KU61) の泡なし株の取得および尿素の生産性が低下した株の選抜を試みた。Froth Flotation 法及び凝集法を用いて泡立ち性試験、発酵試験および酒質評価により泡なし株として FF-52 株を取得した。さらに得られた FF-52 株を親株として、アルギナーゼ欠損株を取得し、小仕込み試験により KU61 の優良な性質を有している 4 株を選抜した。

## 1. はじめに

当センターにて分離した鳥取オリジナル酵母 (KU61) (以下、KU61) は発酵力が強く、バナナ様の酢酸イソアミルを主体とする吟醸酒用酵母である。しかし、もろみ期間中に泡が発生し、泡消し操作・泡掃除・仕込み量の調整等の手間、労力および生産コストを要することが課題となっていた。

また、鳥取県内の酒蔵においても近年は積極的に海外輸出に取り組んでおり、今後も需要に応じて輸出拡大されることが期待される。その一方で、輸出先によっては発がん性が懸念されるカルバミン酸エチルに規制値が設定されている国がある。カルバミン酸エチルは酵母が生産する尿素とエタノールが化学的に反応して生成されることが知られており、酒類の安全性を担保するためにも尿素の生産性が低い酵母の育種が求められる<sup>1)</sup>。

そこで、本研究では KU61 の酒質を保持しつつ利便性を向上するために泡なし株を取得し、さらにその酵母を親株として、尿素の生産性が低下した酵母を選抜することを目的とした。

## 2. 実験方法

## 2.1 泡なし株の取得

酵母は、当センターにて分離した KU61 を親株として使用した。

泡なし株の取得は、大内らの方法に準じて行った<sup>2)</sup>。具体的には、YEP 培地 (pH5.8) (0.5%酵母エキス (Difco 製)、0.5%ペプトン (Difco 製)、2%グルコース (和光純薬工業 (株) 製)、0.1%リン酸二水素カリウム (和光純薬工業 (株) 製)、0.04%硫酸マグネシウム七水和物 (和光純薬工業 (株) 製) 10mL に、KU61 を接種し、30°C で、一昼夜振とう培養した。その後、新しい YEP 培地 60mL に移し、30°C で一昼夜振とう培養した培養液を用いて、バブリングを行った。バブリングは、無菌ろ過した空気を、400~500mL/min の流速で 40 分間行い、オーバーフローによって気泡吸着性を持つ酵母を取り除いた。残った培養液 10mL を新しい YEP 培地 60mL に植菌し、30°C で一昼夜振とう培養した。この操作を 14 回繰り返して実施した。

その後、YEP 培地 40mL で培養した酵母培養液から集めた菌体と、乳酸菌用培地 (pH6.8) (0.5%酵母エキス、1%ペプトン、1%グルコース、1.5%酢酸ナト

リウム（和光純薬工業（株）製）80mLで培養した *Lactobacillus sakei* 10-C-1-1 株の培養液から集めた菌体とを混合し、凝集沈殿させ、上部液 4mL を新しい YEP 培地 40mL に接種し、30°C で一昼夜振とう培養した。この操作を 3 回繰り返し行い、得られた培養液の一部を適宜希釈し、クロラムフェニコール（富士フィルム和光純薬（株）製）100ppm を含む YEP 寒天培地に塗布した。30°C で静置培養し、得られたコロニーを釣菌し、泡なし株を分離した。

得られた泡なし株については、表 1 に示した仕込み配合で総米 195g の小仕込み試験を行った。掛米は  $\alpha$  化米（AA-60、徳島製麹（株）製）、麴米は乾燥麴（1-60、徳島製麹（株）製）を用いた。発酵は 15°C で行い、発酵経過を観察した。なお、炭酸ガス減量が 55g 以上となった時点が発酵終了と判断し、製成酒の成分分析および官能評価を実施した。

表 1 総米 195g の小仕込み試験の配合

| 仕込み配合                       |      |
|-----------------------------|------|
| 掛米 (g, $\alpha$ 化米 (AA-60)) | 160  |
| 麴米 (g, 乾燥麴 (1-60))          | 35   |
| 乳酸 (mL, 90%乳酸)              | 0.24 |
| 汲み水 (mL)                    | 325  |
| 培養酵母 (mL)                   | 10   |

さらに、表 2 に示した仕込み配合でスケールアップし、総米 4.5kg の仕込み試験を行った。原料米は令和 2 年度兵庫県産山田錦 1 等米 精米歩合 60% ((株)フジタ精米人製)を用いた。発酵経過を観察し、発酵終了後、遠心分離 (5,000rpm、20 分) を行い、製成酒の成分分析および官能評価を行った。

表 2 総米 4.5kg の仕込み試験の配合

| 仕込み配合          |     |
|----------------|-----|
| 原料米 (kg)       | 3.5 |
| 麴米 (kg)        | 1.0 |
| 乳酸 (mL, 90%乳酸) | 3.5 |
| 汲み水 (L)        | 6.2 |
| 培養酵母 (L)       | 0.1 |

## 2.2 アルギナーゼ欠損株の取得

酵母は、2.1 で得られた KU61 の泡なし株である FF-52 株を親株として使用した。

アルギナーゼ欠損株の取得は北本らの方法に準じて行った<sup>3)</sup>。具体的には、YPD 培地 (1%酵母エキス、

2%ペプトン、2%グルコース) に FF-52 株を接種し、29°C で、2~3 日間静置培養した。

その後、酵母を生理食塩水にて 2 回洗浄し、再懸濁した酵母を CAO 培地 (0.17% アミノ酸・硫酸アンモニウム不含酵母ニトロゲンベース (Difco 製)、10ppm L-カナバニン (SIGMA 製)、5mM L-オルニチン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬 (株) 製)、2% グルコース、2% 寒天 (ナカライテスク (株) 製) に塗布し、30°C で 3~4 週間培養した (第 1 スクリーニング)。

さらに生育したコロニーを再度 CAO 培地にて 30°C で 3~4 週間培養した (第 2 スクリーニング)。

得られた単一のコロニーを釣菌し、Arg 培地 (0.17% アミノ酸・硫酸アンモニウム不含酵母ニトロゲンベース、5mM L(+)-アルギニン塩酸塩、2% グルコース、2% 寒天) および Orn 培地 (上記 Arg 培地の 5mM L(+)-アルギニン塩酸塩の代わりに 5mM L-オルニチン塩酸塩を使用) にスポット培養を行い、30°C で 72 時間培養後、Arg 培地では生育できず、Orn 培地では生育した株を尿素低生産性株として選抜した。

## 2.3 小仕込み試験

表 3 に示した仕込み配合で総米 182g の小仕込み試験を行った。発酵は 15°C で行い、発酵経過を観察した。なお、炭酸ガス減量が 63g 以上となった時点が発酵終了と判断し、遠心分離 (5,000rpm、20 分) を行い、製成酒の成分分析および官能評価を行った。

表 3 総米 182g の小仕込み試験の配合

| 仕込み配合                       |      |
|-----------------------------|------|
| 掛米 (g, $\alpha$ 化米 (AA-60)) | 140  |
| 麴米 (g, 乾燥麴 (1-60))          | 42   |
| 乳酸 (mL, 90%乳酸)              | 0.28 |
| 汲み水 (mL)                    | 315  |
| 培養酵母 (mL)                   | 10   |

## 2.4 製成酒の成分分析

製成酒の一般成分 (酸度、アルコール分、日本酒度およびアミノ酸度) は、酒類総合研究所標準分析法注解に従い分析した。また、尿素は、酵素法 (F-キット 尿素/アンモニア (ロシュ・ダイアグノステ

ックス製)により分析した。

## 2.5 官能評価

パネルは酒造に関する技術指導や官能評価に 20 年以上従事している当センターの職員 2 名とし、繰り返し試験を 3 回ずつ行った。

評価方法は、KU61 の特徴とする指標 (香りのバランス、酢酸イソアミル、酢酸エチル、味のバランス、酸味、甘味) を親株は評点 3 とし、各製成酒を 5 段階評価した。データ解析は DUNNETT の多重比較検定法の両側検定により解析を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 泡なし株の取得

Froth Flotation 法 (気泡吸着性を利用する方法) 及び凝集法 (凝集性の差異を利用する方法) を用いて分離した 100 株について、泡立ち性試験を行ったところ、親株より泡立ち性が低下した 8 株と泡立ち性を欠く、泡なし 4 株を分離した。

その中から、小仕込み試験により、FF-22 株、FF-52 株、FF-98 株の 3 株を選抜し、その後、スケールアップした総米 4.5kg の仕込み試験を実施した。

官能評価 (5 点法 (1: 良~5: 悪)、評価者 5 名 (当センター職員 2 名および鳥取県内の酒類製造者 3 名により実施)) を行ったところ、FF-52 株が最も良い評価であったため、FF-52 株を優良な育種株として選抜した (表 4)。

表 4 製成酒の成分分析および官能評価結果

| 分離株 No. | 酸度 (mL) | アルコール分 (%) | 日本酒度 | 官能評価 (平均点) |
|---------|---------|------------|------|------------|
| KU61    | 2.4     | 18.0       | -1.8 | 3.2        |
| FF-22株  | 2.3     | 18.1       | -2.4 | 3.6        |
| FF-52株  | 2.5     | 17.2       | -3.4 | 2.4        |
| FF-98株  | 2.5     | 17.9       | -4.0 | 2.6        |

### 3.2 アルギナーゼ欠損株の取得

FF-52 株を親株として、70 枚の CAO 培地を用いて、第 1 スクリーニングを行い、第 2 スクリーニングでは 819 株のコロニーが得られた。最終的に、Arg 培地では生育できず、Orn 培地にて生育した 92 株を取得した。その中から、第 1 スクリーニングにて異なるコロニーから得られた 61 株をアルギナーゼ遺伝

子の欠損株として選抜した。

### 3.3 小仕込み試験

選抜した 61 株を用いて、総米 182g の小仕込み試験を行った。そのうち、もろみ日数が FF-52 株と同等の分離株 (16 株) について、得られた製成酒の成分分析および尿素の分析を行った。

その結果を表 5 に示す。得られた製成酒は FF-52 株と比べ、尿素の生産性は低下していることが分かった。

表 5 製成酒の成分分析結果

| 分離株 No. | もろみ日数 (日) | 酸度 (mL) | アルコール分 (%) | 日本酒度 | アミノ酸度 (mL) | 尿素* (ppm) |
|---------|-----------|---------|------------|------|------------|-----------|
| KU61    | 19        | 3.4     | 18.7       | -5.0 | 2.2        | 9.6       |
| FF-52株  | 27        | 3.6     | 18.9       | -3.4 | 2.7        | 6.1       |
| No.12   | 27        | 3.8     | 18.7       | -3.7 | 2.4        | N.D.      |
| No.23   | 28        | 4.1     | 18.8       | -4.8 | 2.4        | N.D.      |
| No.27   | 27        | 4.1     | 18.8       | -1.1 | 2.4        | N.D.      |
| No.31   | 26        | 4.4     | 18.7       | 0    | 2.1        | N.D.      |
| No.38   | 28        | 4.4     | 18.9       | -0.8 | 2.2        | N.D.      |
| No.39   | 26        | 4.8     | 18.7       | +2.7 | 2.2        | 1.7       |
| No.48   | 26        | 4.9     | 18.7       | +0.8 | 2.2        | N.D.      |
| No.52   | 26        | 4.6     | 18.8       | +6.3 | 2.2        | 1.7       |
| No.54   | 28        | 3.7     | 18.8       | -5.0 | 2.5        | N.D.      |
| No.61   | 27        | 4.2     | 18.8       | -2.4 | 2.3        | N.D.      |
| No.66   | 28        | 4.2     | 18.8       | -3.5 | 2.4        | N.D.      |
| No.68   | 26        | 4.0     | 19.0       | +1.0 | 2.4        | 1.6       |
| No.81   | 27        | 4.7     | 19.1       | +2.3 | 2.3        | N.D.      |
| No.94   | 28        | 4.6     | 18.7       | -1.1 | 2.3        | N.D.      |
| No.98   | 26        | 4.3     | 18.6       | -4.3 | 2.3        | N.D.      |
| No.113  | 28        | 4.0     | 18.5       | -5.0 | 2.7        | N.D.      |

\* N. D. : 検出限界 (1.5ppm以下)

### 3.4 官能評価

成分分析より酸度および日本酒度が親株として用いた FF-52 株に近似している 8 株 (分離株 No.12、23、27、54、61、66、98、113) の製成酒を選び、官能評価を行った。

製成酒は FF-52 株と比較した結果、香りには有意な差が見られなかったが (データ非掲載)、味については分離株 No.23、27、61、98 は FF-52 株に比べ、有意に酸味が強く感じられた (図 1)。

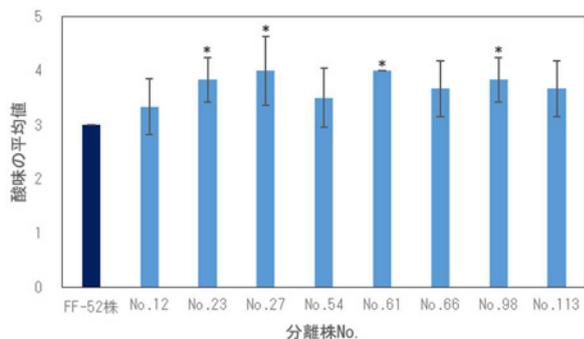


図1 官能評価結果 (n=6、\* : p<0.05)

製成酒は同じ条件で小仕込み試験を実施して得られているため、分離株 No.23、27、61、98 については FF-52 株に比べ、酸味の影響を受けやすい酒質であると考えられ、低い官能評価の結果となった。

よって、分離株 No.12、54、66、113 の4株を優良株として選抜した。

#### 4. おわりに

本研究では、KU61 と同等の酒質を有した泡なし株である FF-52 株を取得した。さらに、FF-52 株と同等な性質を有し、かつ尿素低生産性を有する4株を選抜した。今後、総米 20kg の仕込み試験を実施し、最終的に1株を選抜する予定である。

#### 文献

- 1) 原昌道ら;日本醸造協会誌, 83(1), p.57-63(1988)
- 2) 大内弘造ら ; Agr. Biol. Chem., 35(7), p.1024-1032(1971)
- 3) 北本勝ひこら;日本醸造協会誌, 87(8), p.598-601(1992)