

# 穏やかな香りと優れた発酵力を持つ純米酒製造に適した 新規酵母の開発 (第1報)

Development of Original Tottori Yeast with Mild Fruity Aroma and High Fermentation Ability  
for Junmai-shu Brewing (1st Report)

茂 一孝\*・西垣ひろ美\*・西尾 昭\*\*

Kazutaka Shigeru, Hiromi Nishigaki and Akira Nishio

\*電子・有機素材研究所 有機・発酵担当、\*\*電子・有機素材研究所

高香気生産性酵母の発酵力を改善し、香りが高すぎない上品な香りと発酵力に優れた新規酵母の開発を目的に、交雑育種法を用いた酵母の育種を行い、発酵試験を行った。その結果、親株と比較して、半分程度のカプロン酸エチル(リンゴ様香)濃度及び改善された発酵力を示す4株の交雑2倍体酵母を育種した。

## 1. はじめに

日本酒は全国で生産されているが、日本酒の製品の差別化の1つとして、吟醸香(主成分としてカプロン酸エチル)を特徴とする製品がある。この吟醸香は、発酵中に酵母によって生成される。

鳥取県内の酒造場においても、吟醸香を高生産する高香気生産性酵母を用いた純米酒製造に取り組んでおり、特に高品質な純米吟醸酒などでこの高香気生産性酵母が用いられている。

しかしながら、高香気生産性酵母は発酵力が弱いため、発酵に要する日数が長くなりがちで、酵母の自己消化により異臭、雑味が発生し、香味が劣化する場合がある。

かねてより、県内企業からは鳥取オリジナル酵母の開発が求められており、最近の市場ニーズとしては、香りが高すぎる日本酒は敬遠される傾向がある。

そこで、本研究では、香りが高すぎない上品な香りと優れた発酵力を持つ新規酵母の開発を試み、優良な育種株候補を選抜したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 供試素材

#### 2.1.1 供試菌株

酵母は、親株として当センター保有の APN1 (高香気生産性酵母)、KU61 (高発酵性酵母) を使用した。また、酵母の接合型確認のため、対照として NBRC1050 (a 型) 及び NBRC10506 ( $\alpha$  型) (独立行政法人製品評価技術基盤機構) を使用した。

#### 2.1.2 試薬及び培地

1 倍体取得のため、孢子形成培地 (2%酢酸カリウム、0.005%塩化カルシウム、2%寒天) 又は 200ng/ml ラパマイシン (和光純薬工業株式会社製) を含む孢子形成培地を用いた<sup>1)</sup>。1 倍体細胞分散のための細胞壁破壊は、Zymolyase-20T (ナカライテスク株式会社製) を用いた。

接合型確認のための Polymerase Chain Reaction (以下、PCR) 及び PCR 産物染色には、それぞれ PremixTaq™ (タカラバイオ株式会社製) 及び GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (ナカライテスク株式会社製) を使用した。

#### 2.1.3 原料米及び乾燥麹

原料米は、 $\alpha$  化米 (AA-60, 徳島精工株式会社製) 又は精米歩合 60% の兵庫県産「山田錦」(平成 29 年産) を使用し、乾燥麹は 1-60 (徳島精工株式会社製) を使用した。

## 2.2 試験方法

### 2.2.1 1倍体酵母の取得及び接合型確認

1倍体の取得は、K. Katou ら<sup>2)</sup>の方法を基に改変して行った。すなわち、親株 (APN1 又は KU61) を YPD 平板培地で培養し、その菌体を孢子形成平板培地の中央に塊状に植菌し、28℃で5日間培養した。その後、1mg/ml Zymolyase を含む 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.5) で懸濁し、室温 (20~25℃) で2時間静置し、細胞壁破壊を行った。超音波処理により分散させた後、65℃で10分間加熱処理することで2倍体細胞の殺菌を実施した。得られた菌体液を適度に希釈後、YPD 平板培地に塗布し、28℃で2~4日間培養した。生育したコロニーの中で、生育が遅く、コロニー表面が粗面なものを1倍体候補として取得した。

取得した1倍体の接合型は、接合型遺伝子 (mating type gene、以下 MAT 遺伝子) の PCR 増幅の判定により確認した。すなわち、楊枝を用いて採取したコロニーを PCR 反応液に懸濁し、PCR を行った後、得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により増幅断片サイズを確認した。

### 2.2.2 1倍体酵母の選抜

得られた1倍体酵母を、3ml の麴汁培地 (Brix10、pH5) に植菌し、28℃で2日間前培養した。乾燥麴10g を含む 30ml 麴汁培地に前述の前培養液を全量添加し、15℃で14日間培養した。その後、遠心分離を行い、上清液を分析に供した。分析は、国税庁所定分析法注解<sup>3)</sup>に従い行った。日本酒度は、密度比重計 DA-105 (京都電子工業株式会社製)、アルコール度数はアルコール濃度計 YSA-200 (矢崎計器株式会社製) を用い、香气成分はヘッドスペース GC-MS 分析装置 (株式会社島津製作所製) を使用した。

### 2.2.3 交雑2倍体の取得と接合型確認

選抜した1倍体酵母を 2ml の YPD 液体培地に植菌し、28℃で1昼夜培養した。新たな 2ml YPD 液体培地に、a 型と  $\alpha$  型それぞれの培養液 0.2ml づつを接種し、28℃で1昼夜混合培養した。その後、適度に希釈した培養液を、YPD 平板培地に塗布し、28℃

で2~3日間培養した。生育したコロニーの中で、生育が早く、コロニー表面が滑面なものを2倍体候補として取得した。

取得した2倍体の接合型は、2.2.1と同様に MAT 遺伝子の PCR 増幅の判定により確認した。

### 2.2.4 交雑2倍体の選抜

2.2.2と同様に行った。

### 2.2.5 選抜した交雑2倍体の評価

選抜した交雑2倍体は、総米 200g の小仕込み試験を行い、さらに選抜を行った後に、総米 1kg の小仕込み試験を行った。仕込み試験の仕込み配合を表1及び表2に示す。

表1 総米 200g の仕込み配合

総米 (g)	195 (総米200g相当)
掛米 (g、 $\alpha$ 化米 (AA-60))	160
麴米 (g、乾燥麴 (1-60))	35 (麴米40g相当)
乳酸 (ml、90%乳酸)	0.24
培養酵母 (ml)	15
汲水 (ml)	325

表2 総米 1kg の仕込み配合

総米 (g)	1,000
掛米 (g)	800
麴米 (g)	200
乳酸 (ml、90%乳酸)	1.2
培養酵母 (ml)	100
汲水 (ml)	1,350

## 3. 結果と考察

### 3.1.1 1倍体酵母の取得

APN1 酵母 (高香气生産) より 128 株、KU61 酵母 (発酵力強い) より 62 株の1倍体を取得した (表3)。

表3 1倍体酵母の取得結果

		親株	
		APN1 (高香气生産)	KU61 (発酵力強い)
選択コロニー数		635	544
接合型	a	3	29
	$\alpha$	125	33
	計	128	62

### 3.2 1倍体酵母の選抜

それぞれの親株から得られた1倍体酵母の発酵試験を行い、親株と同等以上の発酵能を示す1倍体を選抜し、香気成分分析を実施した。

APN1酵母から得られた1倍体については、香気成分の酢酸エチル及びイソアミルアルコールが親株より少なく、カプロン酸エチルの濃度が親株の2倍を超えないものとして、13株を優良なものとして選抜した(図1)

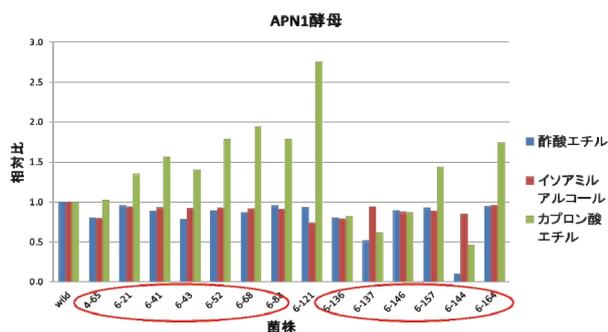


図1 親株 APN1 より取得した1倍体の評価結果

同様に、KU61酵母から得られた1倍体については、香気成分の酢酸エチル及びイソアミルアルコールが親株より少ないものとして、16株を優良なものとして選抜した(図2)

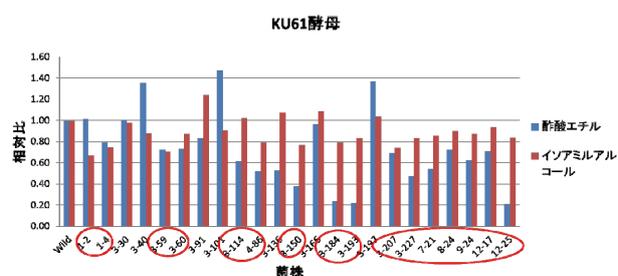


図2 親株 KU61 より取得した1倍体の評価結果

### 3.3 交雑2倍体の取得と選抜

上記3.2で得られた1倍体について、さらに絞り込み、a型とα型の交雑組み合わせとして24通りの組み合わせから、合計124株の交雑2倍体候補を取得した。得られた交雑2倍体は、3.2と同様に発酵試験を行い、親株と同等以上の発酵能を示す交雑2倍体を選抜し、香気成分分析を実施した。

香気成分の酢酸エチル及びイソアミルアルコールが親株 KU61 と同程度もしくはより少なく、且つ

カプロン酸エチルの濃度が親株 APN1 より低く、親株 KU61 より高いものとして、8株を優良なものとして選抜した(図3)。

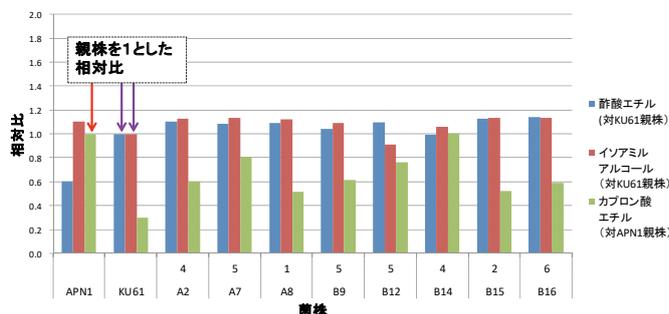


図3 取得した交雑2倍体酵母の評価結果

### 3.4 選抜した交雑2倍体の評価結果

3.3で得られた8株の交雑2倍体について、総米200gの小仕込み試験を行ったところ、菌株A8-1及びB14-4は、親株 APN1 より発酵経過が遅い傾向であった(図4)。

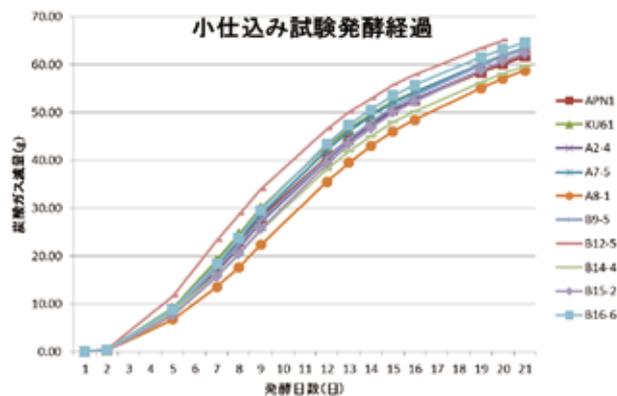


図4 総米200gの小仕込み試験の発酵経過

さらに、香気成分分析結果からカプロン酸エチル濃度が親株 APN1 より低いもの、且つ、官能評価結果から親株より評価が良いものとして、菌株 A2-4、B9-5、B12-5、B15-2 及び B16-6 の5株を選抜した(データ非掲載)。

続いて、総米1kgの小仕込み試験を実施した。発酵経過を図5に示す。菌株 B12-5 は、親株 APN1 と同様に醪後半に BMD 値の減少が鈍くなっており、発酵力の改善は見られなかった。その他の4株については、BMD 値の減少が親株 APN1 より早く、発

酵力が改善されていた。特に、菌株 B9-5 は、もう一方の親株 KU61（高発酵性）と同程度の発酵力であった。

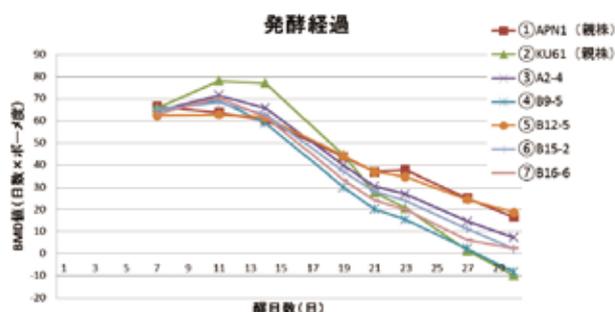


図5 総米 1kg の仕込み試験の発酵経過

上槽液の成分分析、香気成分分析及び官能評価の結果を表4に示す。

選抜した5株とも、カプロン酸エチル濃度が親株 APN1 の半分程度の 3.6~4.1ppm であり、穏やかな香りを有していた。官能評価（5点法、評価者7名）を行ったところ、菌株 A2-4、B9-5、B12-5 及び B16-6 が 2.2~2.5 点で良い評価であった。

発酵力及びカプロン酸エチル濃度の結果より、最終的に菌株 A2-4、B9-5、B15-2 及び B16-6 を優良な育種株として選抜した。

表4 総米 1kg 仕込み試験の製成酒の成分分析結果

	番号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦
	試料名	APN1 (親株)	KU61 (親株)	A2-4	B9-5	B12-5	B15-2	B16-6
一般成分	アルコール度数(%)	18.4	18.4	18.6	19.1	18.1	18.7	18.8
	日本酒度	-5.5	3.3	-2.4	2.8	-6.2	-0.7	-0.8
	酸度(ml)	3.05	3.25	3.20	2.95	2.95	2.95	2.90
	アミノ酸度(ml)	1.90	1.85	2.00	2.15	2.30	2.15	2.20
官能評価 (5点法、n=7)		2.0	2.7	2.3	2.5	2.2	3.2	2.3
香気成分 (ppm)	酢酸エチル	68.5	77.2	80.6	82.5	74.5	79.7	88.6
	イソブチルアルコール	50.4	63.0	59.5	56.0	64.5	53.0	52.9
	酢酸イソアミル	4.2	4.5	5.3	4.8	6.4	5.4	6.0
	イソアミルアルコール	163.3	166.3	171.0	168.0	149.1	165.2	167.8
	カプロン酸エチル	7.3	1.1	3.6	4.0	3.6	3.9	4.1

#### 4. おわりに

今回、交雑育種法を用いて、香りが高すぎない上品な香りと発酵力に優れた新規酵母の開発を試み、カプロン酸エチル濃度が親株の半分程度（3.6~4.1ppm）の穏やかな香りを持ち、発酵力が改善された酵母を育種することができた。

その内、菌株 B9-5 は親株 KU61（高発酵性）と同程度の発酵力を示し、有望であることが示唆された。

今後、規模を大きくした発酵試験を検討予定である。

#### 謝辞

交雑育種法についてご助言・ご支援いただいた広島県立総合技術研究所 食品工業技術センター様に厚くお礼申し上げます。

#### 文献

- 1) N.Nakazawa et al.; Immunosuppressive drug rapamycin restores sporulation competence in industrial yeasts, J. Biosci. Bioeng., 113, p.491-495, (2012)
- 2) T. Katou et al.; Brewing characteristics of haploid strain isolated from sake yeast Kyokai No.7, Yeast, 25, p.799-807(2008)
- 3) 第4回改正国税庁所定分析法注解(1993)