

新”佐賀酵母”の育種とその醸造適性評価(第2報) -佐賀酵母, 熊本酵母及び野生酵母からの一倍体の分離及びその醸造特性-

食品工業部
澤田和敬

県内酒造メーカーの新たな佐賀酵母の育種開発へのニーズに対応するため、佐賀酵母、熊本酵母及び野生酵母から一倍体の分離を行い、分離した一倍体酵母の醸造適性を評価した。その結果、SAWA-1株から9株、KA-1株から7株、KA-4株から2株、KA4-01株から8株、高酸株から7株、さがほのか酵母から9株の一倍体を取得した。F401株からは一倍体を取得することはできなかった。麴エキスをを用いた培養試験で取得した一倍体と親株との有機酸と香気成分の相対比較を行った。その結果、親株とは異なる有機酸及び香気成分組成を示した。また、今回取得した一倍体の有機酸及び香気成分を用いた主成分分析の結果から多様性を有する菌株を取得できた可能性が示された。

1. はじめに

国酒である清酒・焼酎の消費量は飲酒人口の減少や酒類の多様化により低下する傾向にあり、大量生産・大量消費の時代から小ロット・多品目・高付加価値化の時代に移行しつつある。清酒や焼酎といった酒類醸造産業において、発酵に用いる酵母の選択は醸造産物のアルコールの生産性ととともに、香味の品質を大きく左右する重要な要因である。県内酒造メーカーからは多様化する市場ニーズに対応可能な県独自の酵母（以下、佐賀酵母）の開発が求められている。

当センターは佐賀酵母として F4 株、F4 株を親株としたカプロン酸エチル高生産酵母 F7 株、F4 株の泡なし株 F401 株、SAWA-1-13 株（現在の SAWA-1 株^{1,2)} の 4 菌株を現在県内の蔵元に頒布している。また一方で、新たな佐賀酵母の取得のために交雑育種に関する一倍体の効率的な分離方法の検討³⁾や佐賀県内の自然界から醸造適性が高い酵母の分離⁴⁾に取り組んできた。

交雑育種は、①分離した一倍体の醸造適性を評価する、②優れた特性を有する一倍体同士を交雑する、③目的とする醸造特性を有する交雑株を選抜するといった手間と労力を要する育種法である。しかし、多様な特性を有する酵母を取得できるといった利点があり、優れた実用酵母を育種するためには Steenseles らは、大規模な異系交配が有効と報告している⁵⁾。

本研究では、佐賀酵母、株式会社熊本県酒造研究所が分譲している酵母（以下、熊本酵母）及びさがほのかから分離した酵母（以下、さがほのか酵母）

から一倍体を分離取得し、醸造特性に優れた酵母の育種のための交雑育種法の材料とした。さらに、取得した一倍体の香味に関する醸造適性のスクリーニング方法について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 実験材料

本実験に用いた菌株は、佐賀酵母 F401 株、SAWA-1 株の 2 菌株、熊本酵母は KA-1 株、KA-4 株、KA4-01 株、高酸株（以下、HA 株）の 4 菌株、野生酵母としてさがほのか酵母（以下、SGH 株）の計 7 菌株を用いた。

2.2 一倍体の分離

一倍体の分離は既報³⁾に準じ行った。ただし、K901 号及び佐賀酵母は熊本酵母を親株として、分離・育種されたことから、同報の K901 号の一倍体の選抜方法を採用することとし、さがほのか酵母は作業上の観点から同様の選抜方法を採用した。

孢子形成は酢酸カリウム培地を用いた方法を、細胞壁溶解処理は Zymolyase の活性化剤を添加しない方法を、栄養細胞の除去は界面活性剤処理法を採用した。

一倍体候補株の性の判別は MAT-PCR の手法を用いた。一倍体候補の倍数性の確認はフローサイトメトリーにより行った。フローサイトメーターは、guava easyCyte 8HT（メルク株式会社製）を、細胞周期測定用アプリケーション cell cycle を用いた。

2.3 一倍体の醸造特性評価

麴エキス培地を用い、2.2 で取得した一倍体の醸造特性を親株との相対比較で評価した。麴エキスは、

表 1 親株と一倍体の香り成分と有機酸の相対比較

	SAWA-1		KA-1		KA-4		KA4-01		HA		SGH	
Number of tested haploids	9		7		2		8		7		9	
Ethyl Acetate	0.90 ± 0.32	0.41 ± 0.11	0.29 ± 0.21	0.61 ± 0.30	0.94 ± 0.11	0.70 ± 0.56	0.55 ± 0.24	1.05 ± 0.26	0.56 ± 0.55			
n-propanol	1.26 ± 0.32	1.34 ± 0.25	0.53 ± 0.32	1.02 ± 0.27	1.37 ± 0.34	0.79 ± 0.41	0.50 ± 0.33	0.76 ± 0.52	0.58 ± 0.66			
Iso-butanol	1.23 ± 0.68	0.32 ± 0.18	0.11 ± 0.10	0.79 ± 0.27	0.88 ± 0.21	0.73 ± 0.33	1.09 ± 0.15	1.01 ± 0.13	0.42 ± 0.13			
Isoamyl alcohol	1.09 ± 0.15	1.01 ± 0.13	0.42 ± 0.13	0.79 ± 0.27	0.88 ± 0.21	0.73 ± 0.33	0.94 ± 0.61	0.96 ± 0.31	0.98 ± 0.34			
Ethyl Caproate	1.29 ± 0.37	1.30 ± 0.55	1.65 ± 0.67	1.10 ± 0.41	0.98 ± 0.31	0.99 ± 0.31	1.29 ± 0.37	1.30 ± 0.55	1.65 ± 0.67			
Phosphoric Acid	1.10 ± 0.26	1.00 ± 0.42	1.13 ± 0.18	0.90 ± 0.31	1.00 ± 0.19	0.72 ± 0.25	0.85 ± 0.22	0.84 ± 0.61	0.73 ± 0.46			
Citric Acid	0.85 ± 0.22	0.84 ± 0.61	0.73 ± 0.46	0.83 ± 0.45	1.19 ± 0.33	0.35 ± 0.46	1.80 ± 0.49	0.79 ± 0.36	0.55 ± 0.15			
Pyruvic acid	1.80 ± 0.49	0.79 ± 0.36	0.55 ± 0.15	0.54 ± 0.26	0.70 ± 0.22	0.63 ± 0.34	0.89 ± 0.41	0.96 ± 0.51	0.83 ± 0.36			
Malic Acid	0.89 ± 0.41	0.96 ± 0.51	0.83 ± 0.36	0.55 ± 0.24	0.76 ± 0.22	0.62 ± 0.33	1.10 ± 0.28	0.73 ± 0.39	0.50 ± 0.14			
Succinic Acid	1.10 ± 0.28	0.73 ± 0.39	0.50 ± 0.14	0.57 ± 0.21	0.96 ± 0.25	0.62 ± 0.32	0.69 ± 0.35	1.16 ± 0.63	1.95 ± 1.51			
Lactic Acid	0.69 ± 0.35	1.16 ± 0.63	1.95 ± 1.51	0.91 ± 0.46	0.51 ± 0.17	1.09 ± 0.71						
Acetic Acid												

既報¹⁾に準じ調製した。前培養は麴エキス 5mL, 30°C, 2日間静置し行った。本培養は麴エキス培地 44 mL に前培養液 1 mL 加え, 15°C, 14日間静置した。培養終了後, 培養液を遠心分離し, 菌体を取り除き, 各種分析を実施した。なお, 本項の試験は前培養から独立した3連の系で行った。

麴エキス培地にアルコール脱水麴を添加することで香り成分の生成量が増加することが報告されている⁷⁾が, 本検討では不揮発性代謝物を用いた

醸造適性評価を指向していたため, 麴エキス培地のみで一倍体の醸造適性を評価した。

2.4 培養液の有機酸及び香り成分分析

2.3 で得た培養液の有機酸及び香り成分の分析は既報⁴⁾と同様の条件で行った。

3. 実験結果及び考察

3.1 一倍体の分離

親株として用いた菌株はどの菌株も孢子形成が認められた。

細胞壁溶解処理, 栄養細胞の除去後, 色素添加培地に生育した一倍体候補株を1親株あたり 100~150 のシングルコロニーを釣菌した。その後, MAT-PCR, 次いでフローサイトメーターを用いた倍数性の判定の結果, SAWA-1株から9株, KA-1株から7株, KA-4株から2株, KA4-01株から8株, 高酸株から7株, さがほのか酵母から9株の一倍体を取得した。F401株からは一倍体を取得することはできなかった。

3.2 一倍体の醸造特性評価

麴エキス培地を用いた一倍体の醸造特性は有機酸と香り成分で評価した。今回分離した菌株間で生育速度にバラツキが大きいことが経験的に明らかにな

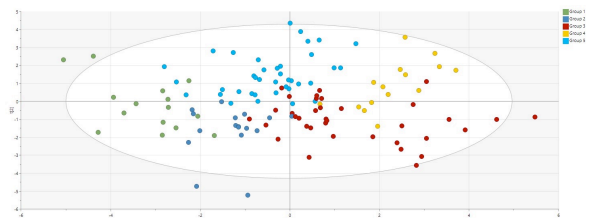


図1 有機酸及び香り成分を用いた主成分分析のスコアプロット

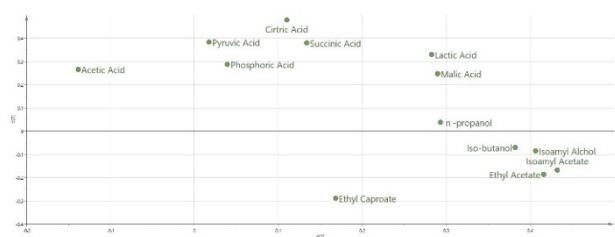


図2 有機酸及び香り成分を用いた主成分分析のローディングプロット

っている。そのため, 一倍体のアルコール生成能は菌株間によってバラツキが大きいことが予想されたため, 本試験では評価項目としなかった。

麴エキスを用いた培養試験の有機酸と香り成分の親株と一倍体との平均値の相対比較の結果を表1に示した。

その結果, 今回取得した一倍体は以下の特徴を有する可能性が示された。

- SAWA-1株から分離した一倍体はn-プロパノールと酢酸が親株よりも低生産の傾向を示す。
- KA-1から分離した一倍体は親株と同様の有機酸組成の傾向を示したが, 香り成分の組成が親株と異なる。
- KA-4株, KA4-01株, HA株, SGH株は, 有機酸組成, 香り成分ともに親株と異なる組成を示した。

次いで、上記分析で取得した有機酸と香気成分を用い主成分分析を行った。図 1 にそのスコアプロットを、図 2 にそのローディングプロットを示した。

その結果、SAWA-1 株、KA-1 株、HA 株、KA-4 株及び KA4-01 株、SGH 株を親株とする一倍体はそれぞれスコアプロット上に広範囲に分布していた。

これは親株に醸造特性に関わらず様々な醸造特性を有する一倍体を取得したことを示唆している。

また、ローディングプロットから『味タイプ（有機酸に特徴あり）』や『香りタイプ（香気成分に特徴あり）』といった酵母の特徴をスコアプロットで表現できる可能性が示された。しかし、清酒には数百～数千の含有成分が存在するといわれており、酵母の特徴に寄与する成分のさらなる探索が必要と思われる。例えば、清酒酵母は増殖環境によってアミノ酸の取込みに異なることが報告されている⁸⁾。今後、有機酸や香気成分に加えアミノ酸を分析項目として追加することで一倍体の詳細な醸造特性評価が可能になり、スコアプロット上で 5 つにクラスター化された一倍体をより精度よく分類することが期待される。

4. おわりに

佐賀酵母 F401 株及び SAWA-1 株、熊本酵母 KA-1 株、KA-4 株、KA4-01 株及び高酸株、野生酵母 SGH 株を親株とする一倍体の分離を行い、SAWA-1 株から 9 株、KA-1 株から 7 株、KA-4 株から 2 株、KA4-01 株から 8 株、高酸株から 7 株、さがほのか酵母から 9 株の一倍体を取得した。F401 株からは一倍体を取得することはできなかった。

麴エキスをを用いた培養試験で取得した一倍体と親株との有機酸と香気成分の相と異なる有機酸及び香気成分組成を示した。また、今回取得した一倍体の有機酸及び香気成分を用いた主成分分析から多様性を示す菌株が取得できた可能性が示された。

今回、麴エキスのみで醸造特性の評価を行ったが、より詳細な醸造特性を評価するためには、揮発性成分や不揮発性成分の網羅的な分析ならびに解析が課題であり、これらの分析系の確立を進めたい。併せて、麴エキスにアルコール脱水麴を添加した培地を用いた醸造適性評価や総米 100g 程度の小仕込み試験の醸造適性評価との相関を確認したい。

今後の予定として、まず SAWA-1 株と SGH 株それぞれの一倍体の交雑を行い、優良酵母の選抜を実施したい。

本研究を実施するにあたり、研究材料として熊本酵母の分譲を許可くださった株式会社熊本県酒造研究所に感謝いたします。

なお、本研究を実施するにあたり使用した酒類分析システム、有機酸分析システム、ガスクロマトグラフ直結型質量分析計は、電源立地地域対策交付金で導入した。

参考文献

- 1) 澤田和敬. 佐賀県産オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究: 佐賀酵母 F4 泡なし酵母の取得. 研究報告書, 2013, 22: 29-33.
- 2) 澤田和敬. 佐賀県産オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究: 佐賀酵母 F4 泡なし酵母の育種開発. 研究報告書, 2014, 23: 27-31.
- 3) 澤田和敬. 佐賀県産オリジナル醸造微生物の育種及び佐賀県産酒類の品質向上に関する研究: 清酒酵母の 1 倍体取得方法の最適条件検討. 研究報告書, 2015, 24:23-27
- 4) 澤田和敬.” 佐賀酵母” の育種とその醸造適性評価—さがほのかからの醸造用酵母の分離—. 研究報告書, 2017, 27:47-50
- 5) Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V., & Verstrepen, K. J. (2014). Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Applied and environmental microbiology*, 80(22), 6965-6975
- 6) 宇都宮仁. ヘッドスペース固相マイクロ抽出法による清酒中の遊離脂肪酸, 高級アルコール及びエステルの分析. 日本醸造協会誌, 1999, 94.3: 252-257.
- 7) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章. (1992). アルコール脱水麴を用いる培地による優良酵母の分離とその性状. 日本醸造協会誌, 87(12), 915-921.
- 8) 岩野君夫, 伊藤俊彦, 幡宮顕仁, 中村拓郎, 渡辺誠衛, 中沢伸重. (2004). 清酒酵母の増殖における選択的アミノ酸取込みに及ぼす醸造要因. 日本醸造協会誌, 99(11), 801-808.