

新”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-

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、本研究では佐賀県が開発したイチゴ「さがほのか」から醸造適性が高い酵母の分離を試みた。その結果、麴エキス培地を用いた 1 次スクリーニングで産膜性を有さず、K901 号と同等の炭酸ガス減量を示す菌株を分離した。ITS 領域を用いた遺伝子解析の結果、分離株は *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。また、K701 号に対しキラー性を有していないことが確認された。さらに小仕込試験の結果、分離株は K901 号や F401 株と同等の炭酸ガス減量の経過を示し、その製成酒は吟醸香の一種である酢酸イソアミルが K901 号の約 1.6 倍生成した。

1. はじめに

現在、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も、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、多様化する市場ニーズに対応可能な佐賀県オリジナル酵母の開発が求められている。

これまで当センターでは、佐賀酵母 F4 株の泡なし株 F401 株の分離取得^{1,2)}や交雑育種に関する一倍体の効率的な分離方法の検討³⁾を行い、引き続き佐賀酵母の育種開発に取り組んでいる。

近年、醸造用酵母の育種開発の手法として、現有の酵母を親株とした薬剤耐性株や交雑株の取得のほかに、自然界から醸造適性の高い野生酵母を分離する試みが全国各地の産学官の研究機関で行われている。このような自然界から分離した野生酵母は、きょうかい酵母と醸造適性が大きく異なることが報告^{4,5)}されており、きょうかい酵母と異なるタイプの清酒の商品開発につながることを期待される。

県内酒造メーカーから当センターに対し、消費者に訴求性が高い商品を開発するため、佐賀県内の自然界から醸造適性が高い酵母の分離が求められていた。

そこで本研究では、佐賀県農業試験研究センターが開発したイチゴ「さがほのか」から醸造適性が高い酵母の分離を試み、取得した野生酵母の醸造適性について評価を行った。

2. 実験方法

2.1 実験材料

酵母の分離源として、佐賀県農業試験研究センターの圃場で収穫された「さがほのか」を使用した。

2.2 酵母の分離

分離源として用いた「さがほのか」を brix 6 に調製した麴エキス培地に浸漬し、28℃で発泡が確認されるまで集積培養を行った。その後、麴エキス培地 100mL に集積培養液 50μL 及び 1g/mL プロピオン酸ナトリウム (和光純薬株) 100μL を加え、28℃で発泡性が確認されるまで培養を行った。

培養液を YPD 寒天培地 (1% 酵母エキス (BD Bacto™), 2% ポリペプトン (日本製薬株), 2% グルコース (和光純薬株), 2% 寒天 (和光純薬株)) に適宜希釈塗布し、28℃で培養し、コロニーを得た。

取得したコロニーは麴エキス培地に接種し、20℃で 7 日間培養し、炭酸ガス減量及び産膜性の有無について評価した。

2.3 遺伝子解析による分離酵母の同定

MIRHENDI⁶⁾ や FUJITA⁷⁾ の方法を参考に、分離菌株の 18S rDNA と 26S rDNA の間に存在する ITS (internal transcribed spacer) 領域を増幅し、塩基配列を決定後、BLAST プログラムによりホモロジー検索し、遺伝子解析を行った。

2.4 分離酵母の TTC 染色性⁸⁾ 及びキラー性の確認

分離酵母を YPD 培地で培養した後、培養液を TTC 下層培地 (財日本醸造協会) に適宜プレーティングし 30℃でコロニーが 1mm 程度に出現するまで培養を行った。コロニー出現後、TTC 上層培地 (財日本醸造協会) を重層し、呈色を観察した。比較対照に K701 株を用いた。また、キラー性の評価は K701 株を

用い、竹田らの方法⁹⁾に準じて行った。

2.5 分離酵母の小仕込試験

2.2の方法により取得した分離株を難波ら¹⁰⁾の方法に従い、総米 80g のスケールで実施した。仕込は一般的な三段仕込とし、麴歩合 20%、汲水歩合 140%となるよう設定した。仕込配合を表 1 に示した。

毎日、発酵容器の重量測定を行い、重量減少量を指標に醪の発酵経過を観察した。発酵温度は12℃一定とした。

表 1 小仕込試験 仕込配合

	水麴	添	仲	留	計
総米 [g]	6	10	24	40	80
麴米 [g]	6		4	6	16
掛米 [g]		10	20	34	64
汲水 [mL]	15		28	60	108
酵母 [mL]	5				5
乳酸 [mL]	0.1				0.1

2.6 小仕込試験製成酒の成分分析

製成酒のアルコール分析は国税庁所定分析法¹¹⁾に準じた。

製成酒の有機酸組成分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度法により測定した。有機酸分析には、有機酸分析システム (株島津製作所製, NexeraXR) を用いた。分析に供したカラムは、Shim-pack SCR-102H (株島津製作所製, 300mmL×8.0mmI. D) を 2 本直列で用いた。移動相は 5 mM p-トルエンスルホン酸 (和光純薬株) 水溶液, 流量を 0.8mL/min とした。カラム温度は 40℃ とした。

検出条件として、緩衝相に 5 mM p-トルエンスルホン酸及び 100 μM EDTA (株同仁化学研究所) を含む 20mM Bis-tris (株同仁化学研究所) 水溶液, 流量を 0.8mL とした。検出器は電気伝導度検出器 CDD-10 (株島津製作所製) を用いた。

製成酒の香り成分はガスクロマトグラフ直結型質量分析計 (株島津製作所製, GCMS-QP2010) を用いて測定した。分析に供したカラムは、DB-WAX (アジレント・テクノロジー株, 60 m×0.25 mm×0.5 μm) を用いた。カラム温度は 40℃ を 5 分間保持し、5℃/min で 200℃ まで上昇させ、200℃ 達温後、5 分間保持した。MS 部はインターフェイス温度を 230℃, イオン源温度を 200℃ とした。試料の加温

と注入は、AOC-5000 オートインジェクター (株島津製作所製) を用い、試料 0.9mL に内部標準 0.1mL を加え、50℃, 1 分間攪拌しながら加温した後、ヘッドスペースガスを 1mL 注入した。キャリアガスはヘリウムガスを用い、その流速は 1.12mL/min とした。

3. 実験結果及び考察

3.1 酵母の分離

「さがほのか」を浸漬した麴エキス培地で集積培養を行ったところ、培養 48 時間で発泡性が確認できた。さらに、集積培養液をプロピオン酸ナトリウム含麴エキス培地に植え継ぎ培養したところ、培養 24 時間で培養液の白濁及び発泡性が確認された。この培養液を YPD 寒天培地に希釈塗布し、白色を呈するコロニーを 50 株取得した。

取得した 50 株のコロニーをそれぞれ麴エキス培地に接種し、産膜性及び炭酸ガス減量を確認した。

そのうち、産膜性が認められなかった No. 3 株, No. 18 株, No. 20 株及び No. 32 株の炭酸ガス減量経過を図 1 に示した。その結果、No. 32 株は比較対照区に用いた K901 号と同等の炭酸ガス減量の経過を示し、醸造適性を有することが期待された。

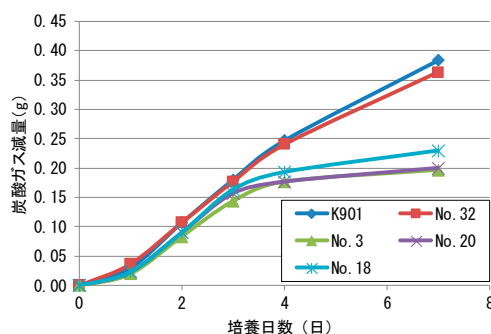


図 1 麴エキス培地の炭酸ガス減量

3.2 遺伝子解析による分離酵母の同定

ITS 領域の塩基配列相同性解析により、清酒酵母と同等の醸造適性を有することが期待される No. 32 株は *Saccharomyces cerevisiae* と同定された。

3.3 分離酵母の TTC 染色性及びキラー性の確認

アルコール発酵能の指標となる TTC 染色は K701 号を比較対照区とした。K701 号のコロニーが濃赤色を呈した一方、No. 32 株は K701 号よりもやや淡い赤色を呈した。

他の醸造用酵母を死滅させるキラー因子の分泌の有無を確認したところ、一般的に酒造に使用されている K701 号に対し、No. 32 株はキラー性を示さなかった。

3.4 分離酵母の小仕込試験

分離株 No. 32 の炭酸ガス減量を用いた小仕込試験の発酵経過を図 2 に示した。その結果、No. 32 株は県内で一般的に使用されている K901 号、K1801 号、F401 株、SAWA-1 株とほぼ同等の発酵経過を示した。

また、小仕込試験で得た製成酒のアルコール分、日本酒度、有機酸及び香気成分の分析値を表 2 に示した。

その結果、分離株 No. 32 のアルコール分及び日本酒度は県内酒造メーカーで現在使用されている K901 号、K1801 号、F401 株、SAWA-1 株と同等以上のアルコール分を生成した。

また、有機酸はコハク酸生成量がやや高い傾向にあり、爽やかな酸味を呈するリンゴ酸の生成が F401 株とほぼ同程度であった。

香気成分は、吟醸香の一種である酢酸イソアミルが K901 号の約 1.6 倍であった。オフフレーバーの原因物質の一種であるイソアミルアルコール生成量は今回使用した酵母と同程度であった。

また、吟醸香の品質評価の指標となる E/A 比は今回試験を行った菌株の中で最も高かった。

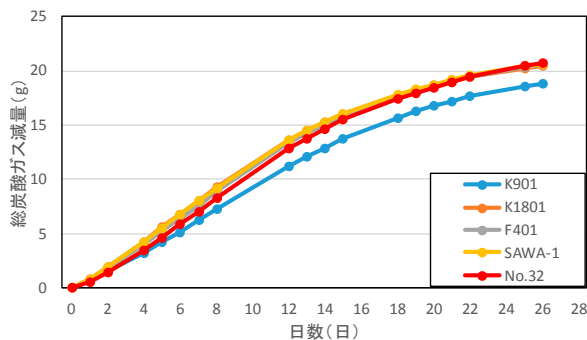


図 2 小仕込試験の炭酸ガス減量

以上の結果から、「さがほのか」から分離した No. 32 株は現在使用されている醸造用酵母と同程度のアルコール生成能を有し、爽やか酸味と吟醸香を生成する酵母であることが示された。

4. おわりに

本研究では、県内酒造メーカーの特徴ある清酒造りに資する酵母の開発を目的として、さがほのかから酵母を分離し、その醸造適性等を評価した。

その結果、「さがほのか」から分離した、産膜性を有しない菌株 No. 32 は ITS 領域を用いた遺伝子解析の結果、*Saccharomyces cerevisiae* と同定された。

分離株の TTC 染色性は淡い赤色であり、K701 号に対するキラー性を有していなかった。さらに、総米 80g の小仕込試験の結果、分離株の炭酸ガス減量は県内の酒造メーカーでよく使用されている酵母とほぼ同程度であり、その製成酒は酢酸イソアミルを K901 号の約 1.6 倍生成した。これらの結果から、分離株 No. 32 株は香味に特徴ある清酒製造及びに活用できる酵母である可能性が示された。

今後、スケールアップした仕込試験を繰り返し行い、より詳細な醸造適性の評価を行う予定である。

最後に、本研究における酵母の遺伝子解析においてご指導くださいました佐賀大学農学部の小林元太教授並びに後藤正利教授に感謝いたします。

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。

表 2 小仕込試験製成酒の成分分析

		K901 号	K1801 号	F401 株	SAWA-1 株	No. 32 株
一般成分	アルコール分 (%)	16.0	17.3	17.4	17.4	17.6
	日本酒度 (-)	-27.5	-17.5	-16.8	-17.4	-11.7
有機酸	クエン酸 (g/mL)	62	70	73	72	59
	リンゴ酸 (g/mL)	181	167	238	193	245
	コハク酸 (g/mL)	532	417	681	430	570
香気成分	酢酸エチル (g/mL)	73	80	98	86	97
	酢酸イソアミル (g/mL)	3.2	2.1	3.7	3.5	5.3
	イソアミルアルコール (g/mL)	132	144	174	151	171
	カプロン酸エチル (g/mL)	1.2	3.7	1.2	2.9	1.2
	E/A 比 (-)	2.4	1.5	2.1	2.3	3.1

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) 木下(小室)友香理, et al. 花から分離した酵母の性質と清酒醸造における特長. 2008.
- 5) 松田義弘; 上木厚子; 上木勝司. 各種果実から分離された香気生産性野生酵母の同定と香気生産特性. 日本醸造協会誌, 2009, 104.1: 57-74.
- 6) MIRHENDI, H., et al. Colony PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian Journal of Public Health*, 2007, 36.1: 40-44.
- 7) FUJITA, Shin-Ichi, et al. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *Journal of clinical microbiology*, 2001, 39.10: 3617-3622.
- 8) 古川敏郎; 秋山裕一. 清酒醸造の微生物学的管理 (第 4 報). 日本農芸化学会誌, 196327.7: 398-402.
- 9) 竹田正久, et al. sensitive 酵母の重層法による killer 酵母の検出法. 日本醸造協会雑誌, 1977, 72.11: 822-823
- 10) 西谷尚道; 注解編集委員会. 第四回改正国税庁所定分析法注解, (日本醸造協会, 東京). 1993.
- 11) 難波康之祐, et al. 小仕込試験法の設定. 日本醸造協会雑誌, 1978, 73.4: 295-300.