

新“佐賀酵母”の育種とその醸造適性評価（第4報） —佐賀酵母 F401 株を親株とするカプロン酸エチル高生産酵母の育種選抜—

食品工業部
澤田和敬

県内酒造メーカーからの吟醸香を高生産する佐賀酵母の開発ニーズに対応するため、F401 株を親株として脂肪酸合成阻害抗生物質セルレニンに耐性を有するカプロン酸エチル高生産酵母の育種に取り組んだ。その結果、150 株のセルレニン耐性株を取得した。その培養上清の遊離脂肪酸量、次いで小仕込試験の結果から 3 株を選抜した。選抜した 3 株は F401 株に比べ、4～6 倍のカプロン酸エチルを生成したが、発酵速度及び増殖能が実用株に比べ低かった。カプロン酸エチル高生産佐賀酵母の実用化には、本研究で得た選抜株の増殖能の改善が必須であることが示された。

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・大量消費から多品目・小ロット生産・高付加価値化への対応が求められている。清酒や焼酎の酒類製造では、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。

当センターは県独自の酵母である佐賀酵母として 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 株の泡なし酵母 F401 株、SAWA-1-13 株（現在の SAWA-1 株）^{1,2)} の 4 株を県内酒造メーカーに頒布している。県内酒造メーカーの多様なニーズに対応する新たな佐賀酵母を作出するため、これまで交雑育種に関する一倍体の効率的な分離方法の検討³⁾やその交雑株の醸造特性評価⁴⁾及び佐賀県内の自然界から醸造適性が高い酵母の分離⁵⁾に取り組んできた。

純米吟醸や大吟醸といった高付加価値商品では伝統的な吟醸造りに加え香氣成分を特徴づける酵母、特に吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチルを高生産する酵母が使用されている。

代表的なカプロン酸エチル高生産酵母として日本醸造協会が頒布している 1801 号が挙げられる。1801 号は酸度とアミノ酸生成が低い⁶⁾ため、県内酒造メーカーは F401 株などと混合使用し、香味の調和を図っているが、製造時の再現が難しい。また、F7 株は F4 株を親株とするカプロン酸エチル高生産酵母だが、醪末期のアルコール耐性が低く、脂肪酸臭が残存しやすいことから、県内酒造メーカーから佐賀酵母を親株とするカプロン酸エチルと味成分の調和がとれた新たな酵母の作出が求められていた。

カプロン酸エチル高生産株は脂肪酸合成の阻害剤であるセルレニンに対する耐性を指標に選抜が数多く行われており、選抜によって得られた菌株は吟醸用酵母として実用化されている^{7~12)}。

本報では、県内酒造メーカーで広く用いられている佐賀酵母 F401 株を親株とするセルレニン耐性株の分離を行い、取得したセルレニン耐性株からカプロン酸エチル高生産酵母を選抜し、醸造特性の評価を行った結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

本実験では、親株として F401 株を、比較対象株に SAWA-1 株、F7 株を用いた。

本試験で用いた麹エキスイ培地は、乾燥麹（徳島製麹株式会社）1 kg に対し、3～5 L の水を加え、55℃で 8～16 時間糖化後、ろ過した。ろ液を沸騰水中で加熱、氷で急冷後、静置し、上澄を Brix10 に調整し、各試験に使用した。

セルレニン耐性株分離用培地として、0.67% Difco yeast Nitrogen Base w/o Amino acids (BD Bacto™), 2% glucose (富士フイルム和光純薬株), 2% agar (富士フイルム和光純薬株) にセルレニン (Sigma-Aldrich) を添加したセルレニン含 SD 寒天平板培地を用いた。

2.2 F401 株のセルレニン耐性株の分離

F401 株を麹エキスイ培地で 25℃、3 日間静置培養後、集菌洗浄し、滅菌水で 2 回洗浄したのち、生理食塩水に懸濁した。

調製した菌懸濁液を Ichikawa ら¹³⁾の方法を参考に以下に示すようにセルレニン耐性株の分離を行った。すなわち、菌懸濁液をセルレニン含 SD 寒天平板

培地に塗布し、28℃で4日間培養後、生育した酵母コロニーを釣菌し、セルレニン耐性株とした。

2.3 F401 セルレニン耐性株の醸造特性評価

2.3.1 アルコール脱水麴添加麴エキスを培地を用いた一次選抜

麴エキスを培地を用い、KURIBAYASHI ら¹⁴⁾の方法を参考に以下に示す方法で行った。すなわち、前培養は麴エキスを培地5 mL に2.2で単離したコロニーを釣菌し、25℃で2日間静置培養した。次にグルコース10%含麴エキスを培地に前培養液を加え、15℃で14日間静置培養した。培養上清を用い遊離脂肪酸の定量に供した。遊離脂肪酸の定量はラボアッセイTM NEFA(富士フイルム和光純薬㈱)を用い、付属のマニュアルに準じ測定を行った。ただし、分析に用いた試料量はマニュアルに記載している試料量の2.5倍とした。

2.3.2 総米80g仕込による二次選抜、三次選抜

麴エキス及びアルコール脱水麴を用いた3段仕込みで選抜を行った。表1に示す仕込み配合で難波らの方法¹⁵⁾に準じ行った。発酵温度は12℃一定とした。二次選抜及び三次選抜は初期菌数を揃え、前培養から独立した系で行った。上槽は遠心分離で4℃、3000×gで行った。

2.3.3 総米1.2kg仕込による四次選抜

2.3.2で選抜した酵母を麴エキス及びアルコール脱水麴を用いた3段仕込みで表2に示す仕込み配合で選抜を行った。留の温度は5.5℃、最高温度11℃とし、12日目に最高温度になるよう0.5℃/日で昇温させ、2日おきに1℃降温した。醪5, 7, 9日目に追水操作を行った。上槽は遠心分離で4℃、12,000×gで行った。

表1 総米80g仕込み配合

	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)	20		28	60	108
乳酸 (mL)	0.1				0.1

表2 総米1200g仕込み配合

	水麴	添	仲	留	水四段	計
総米 (g)	60	180	360	600		1200
麴米 (g)	20	70	60	90		240
掛米 (g)	40	110	300	510		960
汲水 (mL)	78	228	414	900	180	1800
乳酸 (mL)	0.5					0.5

2.4 製成酒のアルコール分、有機酸及び香気成分分析

2.3で得た製成酒のアルコール分の分析は国税庁所定分析法¹⁶⁾に準じ、有機酸及び香気成分の分析は既報⁴⁾と同様の条件で行った。

2.5 多変量解析

多変量解析は、多変量解析ソフトSIMCA Ver. 14 (Umetrics 社製)に供した。2.4で取得したデータを正規化した後、階層的クラスター分析を実施した。

3. 実験結果及び考察

3.1 F401株のセルレニン耐性

F401株のセルレニンに対する耐性を比較対照にSAWA-1株、K901号を用い、調べた結果を表3に示す。

F401株、K901号はセルレニン濃度3.125μM以上の濃度で生育の阻害が認められ、SAWA-1株は12.5μMまでわずかに生育が認められた。SAWA-1株はF4株の泡なし酵母の分離時に取得した菌株であり、セルレニンを指標とした選抜を経て分離した菌株ではないがセルレニンに対しF401株と異なる生育パターンを示した。この結果から、SAWA-1株の脂肪酸合成に何らかの変異が生じていることが推測される。SAWA-1株と明確に異なる菌株を分離するために、本研究におけるセルレニン濃度は25μMとし以降の実験を進めた。

3.2 F401株のセルレニン耐性株の選抜

F401株のセルレニン耐性株を150株取得した。次いで、150株の培養上清を用い、NEFAキットで遊離脂肪酸生成量による選抜を行った。既に実用化されているSAWA-1株よりも高い上立香が欲しいという県内酒造メーカーから要望に応えるため、SAWA-1株を比較対照区とした。その結果、SAWA-1株よりも遊離脂肪酸生成量が多い89株を得た。

3.3 総米80g仕込みにによる有望株の選抜

3.2で選抜した89株の醸造適性評価は総米80gの小仕込試験の製成酒の成分分析で選抜を行った。評価項目はアルコール度数、有機酸7成分(リン酸、ピルビン酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、

表3 F401株、SAWA-1株、K901号のセルレニン耐性

	セルレニン (μM)				
	0	3.125	6.25	12.5	25
F401株	+	-	-	-	-
SAWA-1株	+	±	±	±	-
K901株	+	-	-	-	-

+ : 生育が認められた、± : わずかに生育が認められた、- : 生育が認められなかった

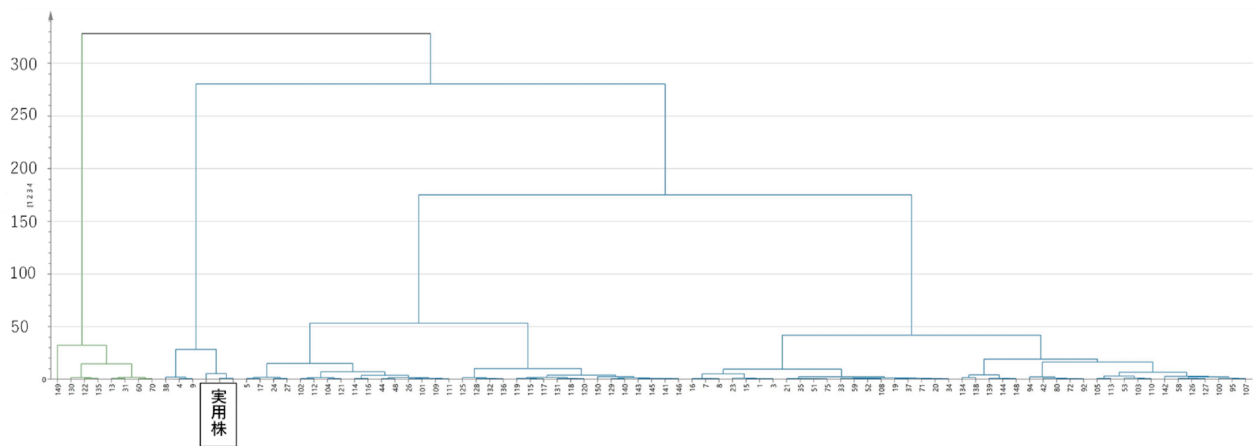


図1 選抜株の階層的クラスター分析結果

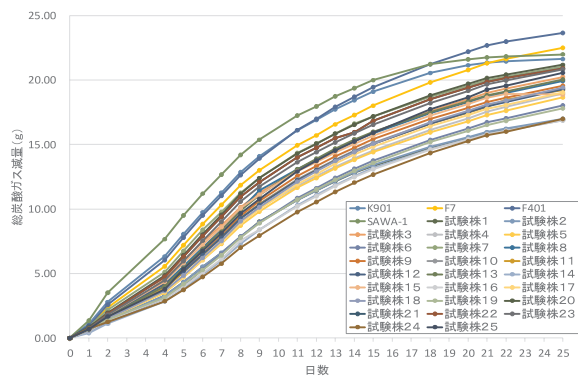


図2 三次選抜の発酵経過（総米 80g）

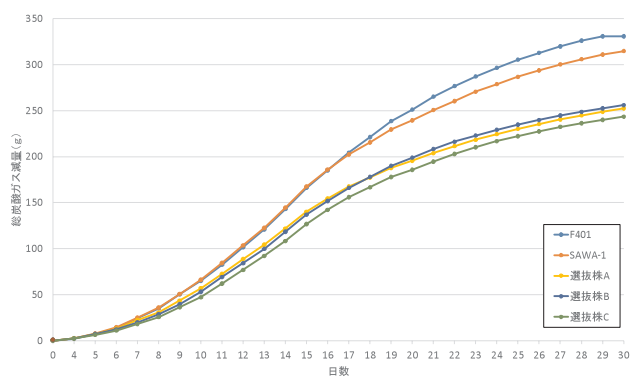


図3 四次選抜の発酵経過（総米 1.2 kg）

表4 四次選抜 製成酒の有機酸及び香気成分分析結果

	リン酸	クエン酸	ピルビン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸	酢酸	アセト アルデヒド	酢酸 エチル	酢酸 イソブチル	酢酸 イソアミル	イソアミル アルコール	カブロン酸 エチル
F401	222	80	377	290	518	498	29	75	111	0.44	5.59	225	2.1
SAWA-1	226	81	271	240	381	463	15	56	69	0.22	3.02	185	7.7
選抜株A	212	70	27	461	131	414	35	20	35	0.25	3.72	189	12.3
選抜株B	250	95	341	485	144	400	13	42	31	0.18	2.15	188	12.5
選抜株C	212	72	32	431	122	412	61	31	32	0.24	3.5	224	9.4

mg/L

酢酸）及び香気成分6成分（酢酸エチル、n-プロパノール、イソブタノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、カブロン酸エチル）とした。これらの評価項目を変数に階層的クラスター分析を行った結果を図1に、総米 80g の小仕込試験の発酵経過を図2に示す。

二次選抜では階層的クラスター分析の結果を用い、カブロン酸エチル生成濃度が高いグループの菌株を優先的に選抜し、グループ間でカブロン酸エチル濃度が同等であった場合はアルコール生成濃度及び炭酸ガス減量から発酵能が高い株を選抜し、25 株の有望株を得た。

三次選抜では、二次選抜の評価項目に炭酸ガス減量の傾き及びサンプル群間のバラつき、製成酒の上立香の官能評価を加え（データは示さず）、アルコール生成能及び炭酸ガス減量でバラツキがみられる菌株を除外し、3 株を選抜した。

3.4 総米 1.2kg 仕込による選抜株の醸造特性評価

3.3 で選抜した3 株を総米 1.2 kg の小仕込試験に供した。醗立では中温速醸とした。選抜株の炭酸ガス減量を用いた発酵経過を図3に示す。F401 株を実製造に用いる際の醗温度を基準に小仕込試験の温度を用いたところ、F401 株やSAWA-1 株に比べ、選抜株は醗初期では発酵の立ち上がりの遅れ、醗末期で

の発酵速度のキレが鈍るといった現象が見られ、F401 株と異なる醗操作が必要であることがわかった。表4に小仕込試験の製成酒の有機酸及び香気成分分析の結果を示す。

本研究でターゲットとした香気成分であるカプロン酸エチル濃度は選抜株Bが最も高かった。また、選抜株Cは酢酸イソamil及びカプロン酸エチルの生成量がSAWA-1株よりも高く、“香りに厚みがあるタイプ”の酵母が選抜できた可能性が示唆された。

有機酸は、清酒の旨味・押し味に寄与するコハク酸が全ての選抜株においてF401株及びSAWA-1株よりも生成量が少なかった。また、ピルビン酸は選抜株BがF401株、SAWA-1株と同等の生成量であったが、選抜株A及びCは約10%程度の生成量であった。

アルコール発酵では、グルコースがピルビン酸からアセトアルデヒドを経たのち、エタノールへと変換される。選抜株Bはピルビン酸が選抜株A及びCよりも残存しており、選抜株Bに適した温度管理や追水などの醗操作を適切に行うことで発酵経過が改善されることが期待される。

4. おわりに

本報ではカプロン酸エチル高生産性佐賀酵母の作出に取り組んだ。佐賀酵母F401株を親株に用い、脂肪酸合成阻害抗生物質セルレニンに耐性を有する菌株を取得し、遊離脂肪酸の生成量による選抜や小仕込試験による醸造特性の評価を実施した。

総米1.2kgの小仕込試験の結果から、F401株やSAWA-1よりもアルコール生成速度が遅いが、製成酒の香気成分に特徴的な菌株を分離することが出来た。

官能評価に参加した酒造メーカーがこの選抜株を試験的に使用したところ、今までの佐賀酵母にない吟醸香が特徴的だが、菌株の増殖速度が遅いため、実使用は難しいという評価であった。現在、本報で取得した菌株の実用化に向けて増殖が早い菌株の再選抜や低温条件下で馴養を行い、選抜株の増殖能の改善に取り組んでいる。

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、有機酸分析装置、ガスクロマトグラフ質量分析計は、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. 佐賀県工業技術セン

ター研究報告書, 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. 佐賀県工業技術センター研究報告書, 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. 佐賀県工業技術センター研究報告書, 2015, 24: 23-27
- 4) 澤田和敬. 新”佐賀酵母”の育種とその醸造適性評価(第3報) 佐賀酵母の交雑育種株の取得及びその醸造特性. 佐賀県工業技術センター研究報告書, 2019, 28: 37-39.
- 5) 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—. 佐賀県工業技術センター研究報告書, 2017, 27: 47-50
- 6) 吉田清. きょうかい酵母清酒用 1801 号. 日本醸造協会誌, 2006, 101. 12: 910-922.
- 7) 三井俊; 伊藤彰敏; 沖塚翔太. 「あいちの地酒」に適した吟醸酵母の開発. 2015.
- 8) MASUBUCHI, Takashi. Ion Beam Breeding of “Sake Yeast” and Application for Brewing. JOURNAL OF THE BREWING SOCIETY OF JAPAN, 2015, 110. 8: 544-548.
- 9) 長俊広, et al. 山形県産高香気性酵母の開発. 2017.
- 10) 岡久修己; 池田絵梨; 中村怜. 短波長 UV-LED を利用した清酒酵母の育種. 2017.
- 11) 甫木嘉朗, et al. 酢酸イソamilとカプロン酸エチルを高生産するセルレニン耐性酵母のスクリーニング. 2017.
- 12) 藤原朋子, et al. 交雑育種による広島吟醸酵母 13BY の発酵能及びカプロン酸エチル生成能の改良. 2017.
- 13) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., & Imayasu, S. (1991). Breeding of a sake yeast with improved ethyl caproate productivity. *Agricultural and biological chemistry*, 55(8), 2153-2154.
- 14) 栗林喬; 金桶光起; 渡邊健一. 酵素法による清酒の遊離脂肪酸の定量. 2012.
- 15) 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.
- 16) 国税庁. 国税庁所定分析法. 改正平, 1961, 24: 24.