

新“佐賀酵母”の育種とその醸造適性評価（第5報）

—薬剤耐性を付与した1倍体酵母の取得及びそれらを用いた交雑育種株の醸造特性評価—

食品コスメ部

澤田和敬

本報では佐賀酵母 SAWA-1 株及び野生酵母 SGH 株から取得した1倍体酵母に薬剤耐性を付与し、交雑育種することで、吟醸香成分に特徴があり、醸造適性が高い菌株の育種に取り組んだ。親株に α 型1倍体として SAWA-1-48 株を、 α 型1倍体として SGH32-65 株を用いた。薬剤耐性が付与された1倍体株をコニカルチューブスケールの醸造試験でアルコール生成能と官能により選抜し、有望と思われる1倍体株の交雑育種を行った。醸造適性が高い菌株の濃縮を目的に実製造に近い条件で培養を繰り返し、生育が見られた組み合わせで小仕込試験を行ったところ、交雑育種で取得した菌株のアルコール生成能はいずれも親株と同等であった。さらに小仕込試験で取得した製成酒の成分分析値を用いて、主成分分析を行ったところ、目的の香気成分であるカプロン酸エチルや酢酸イソアミルを高生産する菌株を主成分分析のスコアプロットの位置から効率よく選抜できる可能性が示唆された。

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。

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)}、さがほのかから分離した SGH 株の5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1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気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、醗末期のアルコール耐性が低く、脂肪酸臭が残存しやすい。SAWA-1 株は発酵力が高く、6mg/L 程度のカプロン酸エチルを生成し、酢酸イソアミルも比較的良好に生成される。その一方、上立香を感じにくく、県内酒造メーカーから SAWA-1 株よりも香りを印象付けるような新たな酵母の作出が求められていた。

前報では、F401 株を親株とするセルレニン (Cer) 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することを試みたが、取得したカプロン酸エチル高生産性の菌株は増殖能やアルコール発酵能が親株に比べ劣る菌株であった⁷⁾。

一方で、カプロン酸エチルと同様に、吟醸香成分とされる酢酸イソアミル高生産酵母の育種開発についても強く求められている。

アミノ酸アナログである 5,5-トリフルオロロイシン (TFL) に耐性を有する菌株は酢酸イソアミルの前駆体であるイソアミルアルコールを生合成する経路において、ロイシンのフィードバック阻害を受けにくく、イソアミルアルコール生合成能が向上し、酢酸イソアミル高生産能を獲得することが報告されている⁸⁾。

そこで、本報では佐賀酵母 SAWA-1 株、さがほのかから分離した野生酵母 SGH 株から取得した1倍体酵母に薬剤耐性を付与し、吟醸香成分の生成能を増強させた菌株同士の交雑育種を行い、醸造適性が高く、

香気成分生成能が高い菌株の育種について取り組んだ結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 実験材料

本実験では、a 型 1 倍体の親株として SAWA-1-48 株を、 α 型 1 倍体の親株として SGH32-65 株を用いた。

本試験で用いた麴エキスパ地は、乾燥麴（徳島製麴（株）製）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。

薬剤耐性株分離用基本培地は、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)) とし、セルレニン (Sigma-Aldrich) を終濃度 5 μ M になるように、5,5,5-トリフルオロロイシン (Sigma-Aldrich) を終濃度 5 mM になるようにそれぞれ添加し薬剤耐性株の分離を行った。

2.2 薬剤耐性株の分離

SAWA-1-48 株及び SGH32-65 株を麴エキスパ地で 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 Cer 含 SD 寒天平板培地あるいは TFL 含 SD 寒天培地に塗布し、28℃で 4 日間培養後、生育した酵母コロニーを釣菌し、薬剤耐性株とした。

2.3 アルコール脱水麴添加麴エキスパ地を用いた 1 倍体株の選抜

前培養は麴エキスパ地 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。次に麴エキスパ地 30 mL にアルコール脱水麴 10 g を加え、前培養液を加え、15℃で 14 日間静置培養した。培養上清に目的とする香気成分が官能的に感知でき、生成アルコール分を親株の 80% 以上生成する株を交雑育種に用いる菌株として選抜した。

2.4 1 倍体株の交雑及び交雑株の選抜

2.3 で選抜した薬剤耐性を有する 1 倍体は以下の方法で交雑を行った。前培養は試験管を用いて 5 mL の麴エキスパ地で静置培養を行った。

48well プレートに a 型 1 倍体と α 型 1 倍体の前培養液を菌数がそれぞれ 1.0×10^5 cell/ mL 相当になるように加え、1 ウェルあたり最終液量が麴エキスパ

地 800 μ L とし、25℃で 5 日間培養し、生育した菌株を交雑株とした。

次に、グルコース濃度 10% 相当になるように調製した麴エキスを 48well プレートに分注し、培養液を植え継ぎ、10℃で培養した。

同様に、培地をグルコース濃度 10%、エタノール 10 vol% 相当の培地に植え継ぎ、5℃で培養し、醗初期の環境条件で生育のよいと思われる交雑株の選抜を行った。

2.5 交雑株の小仕込試験

2.4 の方法により取得した交雑株を難波ら⁹⁾の方法に従い、総米 80 g のスケールで小仕込試験に、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醗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 成分分析

2.3 及び 2.5 で取得した製成酒の分析は、アルコール分及び日本酒度の分析は国税庁所定分析法¹⁰⁾に準じ、香気成分及び有機酸の分析は前報と同様の方法で行った。

2.7 多変量解析

2.6 の成分分析値を多変量解析ソフト SIMCA Ver. 14 (Umetrics 社製) に供し、正規化した後、主成分分析を実施した。

3. 実験結果及び考察

3.1 薬剤耐性株の取得及び選抜

SAWA-1-48 株の Cer 耐性株を 20 株、TFL 耐性株を 28 株取得した。SGH32-65 株の Cer 耐性株を 11 株、TFL 耐性株を 66 株取得した。

これらの耐性株のうち、アルコール脱水麴添加麴エキスパ地で上清に親株以上の上立香を感じ、アル

コール分を親株の80%以上生成した菌株を選抜した。その結果、SAWA-1-48株のCer耐性株を20株、TFL耐性株を14株取得した。また、SGH32-65株のCer耐性株を10株、TFL耐性株を30株取得した。

3.2 1倍体株の交雑及び交雑株の選抜

3.1で取得した選抜株の組み合わせは、カプロン酸エチルを高生産する菌株の取得を目的とする交雑として、SAWA-1-48株、SGH32-65株及びCer耐性株の組み合わせで $21 \times 11 = 231$ 通り、酢酸イソアミルを高生産する菌株の取得を目的とする交雑としてSAWA-1-48株、SGH32-65株及びTFL耐性株の組み合わせで、 $15 \times 31 = 465$ 通りが想定される。

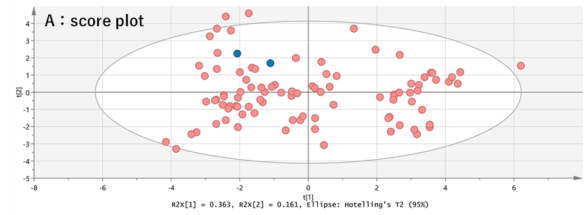
これら多数の組み合わせから、アルコール存在下での増殖性、濃糖耐性、低温増殖性といった特性を有し、香味に特徴ある菌株を効率よく選抜するため、酒母あるいは醪初期に近い条件で培養し、醸造適性を有すると推測される菌株の組み合わせを見出し、Cer耐性を有する組み合わせで25菌株、TFL耐性を有する組み合わせで57菌株選抜した。

3.3 交雑株の醸造適性評価

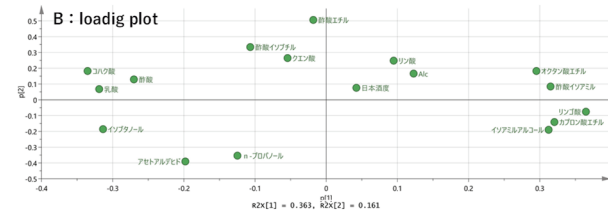
3.2で選抜した82株の醸造適性評価を実施し、選抜を行った。評価項目はアルコール度数、日本酒度、有機酸7成分（リン酸、ピルビン酸、コハク酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、酢酸）及び香気成分6成分（酢酸エチル、n-プロパノール、イソブタノール、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール、カプロン酸エチル、オクタン酸エチル）とした。

醸造適性評価を行った結果、ほとんどの菌株が親株と同等以上のアルコール生成能を有していた。また、これらの評価項目を変数に主成分分析を行った結果、スコアプロット（図1A）では、交雑の親株であるSAWA-1株及びSGH株は第二象限に位置していた。一方、ローディングプロット（図1B）では、吟醸香の構成成分である酢酸イソアミルは第一象限に、カプロン酸エチルは第四象限に位置しており、スコアプロット上でプロットされている位置によって、これらの香気成分を高生産する菌株を効率よく選抜できる可能性が示唆された。

また、ローディングプロットで、パイナップル様の香りを呈するオクタン酸エチルは第一象限に、爽やかな酸味を呈するリンゴ酸は第四象限にプロットされている交雑株に寄与していることが示唆された。これは、目的としていたカプロン酸エチルや酢酸イソアミルを高生産する菌株のほかに、特徴的な香味



A スコアプロット
(水色:親株, 赤色:交雑株)



B ローディングプロット

図1 主成分分析の結果

を産生する菌株が存在することを示唆している。

4. おわりに

佐賀県内の酒造メーカーから、「センターが育種開発した酵母は県酵母として広く使用され、出来上がった清酒の香味は特長的であり、他県産の商品と差別化しやすい」という評価をいただいている。

これまでの酵母育種は、市販酒に広く使用されることを目的に行ってきた。ユーザーである酒造メーカーからは、これらの酵母に加え各種コンテストに使用できるようなカプロン酸エチルや酢酸イソアミルといった吟醸香を高生産する酵母が求められていた。

そこで本報では佐賀酵母 SAWA-1株及び野生酵母 SGH株から取得した1倍体酵母に薬剤耐性を付与し、交雑育種することで、吟醸香成分に特徴があり、醸造適性が高い菌株の育種に取り組んだ。吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチル高生産株を取得するためにCer耐性を、酢酸イソアミル高生産株を取得するためにTFL耐性を1倍体株に付与することとし、親株にa型1倍体としてSAWA-1-48株を、α型1倍体としてSGH32-65株を用いた。薬剤耐性が付与された1倍体株をコニカルチューブスケールの醸造試験でアルコール生成能と官能による選抜を行い、有望と思われる1倍体株の交雑育種を行い、醸造適性が高い菌株の濃縮を目的に実製造に近い条件で培養を繰り返し、生育が見られた組み合わせで小仕込試験を行った。交雑育種で取得した菌株のアルコール生成能はいずれも親株と同等であった。

また、小仕込試験で取得した製成酒の成分分析値

を用いて、主成分分析を行ったところ、目的の香気成分であるカブロン酸エチルや酢酸イソアミルを高生産する菌株を主成分分析のスコアプロットの位置から効率よく選抜できる可能性が示唆された。さらに、パイナップル様の香りを呈するオクタン酸エチルや爽やかな酸味を呈するリンゴ酸といった特徴的な香味を産生する菌株が分離できる可能性が示唆された。

現在県内で使用されている熊本酵母を親株とし、佐賀県内で独自の育種が重ねられた佐賀酵母（F4 株、F7 株、F401 株及び SAWA-1 株）並びに自然界から分離した SGH 株はいずれも醸造適性が高い酵母であり、それらを使用した仕込みは酒造メーカーが蓄積した知見によって、酵母の特性をうまく活用し、製造に使用されている。一方、これらの菌株の遺伝学的特性については調べておらず、きょうかい酵母との遺伝学的な違いや佐賀酵母の特徴的な表現型の遺伝学的背景は不明である。

今後は、酒造メーカーのニーズに応える酵母の育種を引き続き行うとともに、これら実用化あるいは実用化に近い菌株の遺伝学的特性について調べていく必要がある。

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) 澤田和敬. ”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 株を親株とするカブロン酸エチル高生産酵母の育種選抜.” 研究報告書 29 (2020): 37-40.

8) 市川英治. ”酢酸イソアミル高生産酵母の取得法.” 日本醸造協会誌 84. 3 (1989): 166-170.

9) 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.

10) 国税庁. 国税庁所定分析法. 改正平, 1961, 24: 24.