

酢酸イソアミルを高生産する新規吟醸酵母候補株の選抜

バイオ科 鈴木雅博 新村駿介 袴田雅俊

Screening for Potential Novel Strains of High-Isoamyl-Acetate-Producing Yeast for Ginjo Sake Production

SUZUKI Masahiro, SHIMMURA Shunsuke and HAKAMATA Masatoshi

In Shizuoka Prefecture, the public and private sectors are working together to expand overseas sales channels for locally produced sake. Ginjo sake, with its rich aroma and sharp taste, is highly regarded globally, and the industry has been calling for the development of yeast that can produce sake of this quality. Therefore, in this study, we attempted to breed a sake yeast that produces a large amount of isoamyl acetate, which has a banana- or melon-like aroma characteristic of sake produced in Shizuoka and produces a moderate quantity of organic acids. We report that we have obtained several potential strains of new ginjo sake yeast that can brew sake containing nearly twice the amount of isoamyl acetate compared to existing strains.

Keywords : sake, Isoamyl acetate, yeast

本県では官民が一体となって、県産清酒の海外への販路拡大に取り組んでいる。海外では香り豊かでキレの良い吟醸酒が高く評価されており、このような酒質を実現する酵母の開発が業界から求められていた。そこで、本研究では、県産清酒の特徴香であるバナナやメロン様の香気を示す酢酸イソアミルを多く生産し、適度に有機酸を生成する清酒酵母の育種を試みた。その結果、親株と比較して、2倍近い量の酢酸イソアミルを含む清酒を醸造できる、新規吟醸酒用酵母の候補株が複数得られたので報告する。

キーワード：清酒、酢酸イソアミル、酵母

1 はじめに

本県では、おおよそ全国の清酒製造数量の1%に相当する年間3,000 kL強の清酒が製造されている。本県は比較的温暖な気候であるが、県全体の清酒製造数量に占める特定名称酒の割合が高いことが大きな特徴の一つとなっており、この要因の一つとして考えられるのが、本県オリジナル清酒酵母である「静岡酵母」である。

「静岡酵母」は、静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センター（以下、当センター）の前身である静岡県工業試験場醸造課と静岡県酒造組合が共同研究にて開発した酵母である。この「静岡酵母」は、昭和50年代頃から研究開発が行われ、現在は7種類の酵母が当センターで保存・管理され、県内の清酒製造場のみが使用できる体制となっている。いずれの酵母も、バナナやメロン様

の香気を示す、酢酸イソアミルを香りの主体とする酵母であり、上品かつ穏やかな香りと淡麗かつまろやかな味わいの清酒をコンセプトに開発されてきた。

一方で、近年は消費者の嗜好の多様化や、他産地との競争が激しくなっており、清酒業界を取り巻く状況は大きく変化している。そのため、本県産清酒の魅力を高め、市場での競争力を高める必要があり、現在の市場ニーズに適した、新たな特徴を持つ独自の酵母の開発が求められている。

特に近年は、国内外の市場において、吟醸酒や大吟醸酒などの吟醸香豊かでフルーティーな酒質が好まれる傾向にあり、これまで以上に吟醸香成分を高生産する酵母の開発が業界からのニーズとして寄せられていた。

そこで本研究では、本県産清酒の特徴香である、

酢酸イソアミルを香りの主体とするコンセプトは維持しつつ、既存の静岡酵母に比べて、より酢酸イソアミルを高生産する新たな清酒用酵母を開発することを目指し、既存静岡酵母の育種及びプレグネノロンを用いた選抜を行い、育種株の有用性について評価した。

2 方法

育種には、既存の5種類の静岡酵母(HD-1、New-5、NO-2、CA-50及びSY-103)を使用した。

2.1 ランダム変異による静岡酵母変異株の取得

自然変異もしくは変異剤エチルメタンサルホン酸(以下、EMS)を用いて、既存静岡酵母の変異株を取得した。EMSを用いた変異処理については常法どおり行った。すなわち、既存の静岡酵母をYPD液体培地5mL(酵母エキス:1%、ポリペプトン:2%、D-グルコース:2%)中で、30℃にて一晩振とう培養を行い、菌体を集菌した後、滅菌水5mLで洗浄した。その後、0.1Mリン酸バッファー(pH7.0)に懸濁し、EMS 0.25mL(終濃度5%)を添加し、30℃で穏やかに振とうさせ変異処理を行った。処理時間は、0分(無処理区)、40分で行った。変異処理後、菌体を集菌し、5%チオ硫酸ナトリウム5mLで洗浄し、さらに滅菌水5mLで2回洗浄を行った。

2.2 変異株のスクリーニング

変異株のスクリーニングについては、堤らの方法¹⁾に従って行った。すなわち、変異処理を行った後、滅菌水で洗浄した酵母菌体にYPD液体培地5mLを加えて懸濁し、プレグネノロンプレート(イーストナイトロジェンベース:0.67%、グリセロール:2%、プレグネノロン:0.32%、寒天:2%)に100 μ L塗布した。30℃で5日培養し、生育したコロニーをプレグネノロン耐性株としてスクリーニングした。

2.3 変異株の簡易発酵試験による発酵能評価

各変異株は、YPD液体培地にて30℃で2日間、前培養した。簡易発酵試験は、斎藤らの方法²⁾を参考に、米麴抽出液に米麴を添加した麴汁培地を用いた。精米歩合60%の乾燥麴(徳島製麴(株)製、1-60)に4倍量の水を加え、60℃にて5時間糖化後、遠心分離及び0.22 μ mフィルターろ過により上清を得た。この上清をボーメ5.0及びpH5.0に

調整したものを米麴抽出液とした。この米麴抽出液22mLに乾燥麴(徳島製麴(株)製、1-60)8gを加えた後、酵母前培養液3mLを添加し、15℃にて14日間静置した。培養終了後、発酵液上清について、アルコール度数及び香气成分組成(酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、イソアミルアルコール及び酢酸エチル)を分析した。アルコール度数は、簡易アルコール分析器アルコメイトAL-3(理研計器(株)製)にて分析を行い、香气成分組成は既報³⁾に従い分析した。

2.4 乾燥麴及び α 化米を用いた総米200g清酒小仕込み試験による変異株の醸造適性評価

小仕込み試験は、総米200gの三段仕込み(初添:12℃、仲添:8℃、留添:6℃)とした。仕込み配合を表1に示す。最高品温は11℃とした。留添後28日目に遠心分離により製成酒を取得し、既報³⁾に従い、一般成分、有機酸組成、グルコース濃度及び香气成分組成の分析を行った。

表1 総米200g規模での清酒小仕込み試験における仕込み配合

	初添	仲添	留添	計
総米(g)	35	70	90	200
麴米(g)	10	14	16	40
掛米(g)	25	56	79	160
汲水(mL)	50	80	150	280
乳酸(mL)	0.2			0.2
エタノール(mL)	4			4
酵母*(mL)	35			35

* YPD液体培地35mLにて30℃、2日間培養したものを集菌後、汲水に懸濁して添加。推定生菌数=7 \times 10⁹ cells。

3 結果及び考察

3.1 ランダム変異によるプレグネノロン耐性変異株の取得

既存の静岡酵母5種類(HD-1、New-5、NO-2、CA-50及びSY-103)を親株として、変異剤EMSにより変異処理を行い、プレグネノロンプレートにて耐性株をスクリーニングした。

プレグネノロンは、ステロイドホルモンの前駆体物質として知られている。この物質に対して耐性を有する酵母は、オフフレーバーの原因となり得るイソアミルアルコールの生成が少なく、酢酸イソアミルとイソアミルアルコールの濃度比、いわゆるE/A比が高い性質を有することが報告されている。

それぞれの親株から取得できた変異株の数を表2に示す。

表2 各親株（既存静岡酵母）からの
変異株の取得数

親株	HD-1	New-5	NO-2	CA-50	SY-103
取得した変異株数 (自然変異)	23株	105株	—	—	—
取得した変異株数 (EMS処理)	230株	174株	89株	64株	10株
取得した変異株数 (合計)	253株	279株	89株	64株	10株

5種類の親株から計695株の変異株を取得した。EMS処理を行った試験区からは、いずれの親株からもプレグネノロン耐性株を取得することができたが、EMS処理を行わない自然変異試験区からは、HD-1とNew-5からのみ変異株を取得することができた。

3.2 変異株の簡易発酵試験による発酵能評価

HD-1、New-5、NO-2及びCA-50と各株から得られた変異株（一部抜粋）における麴汁での培養上清の成分分析結果について、表3～6に示す。SY-103からは、親株と比較して上清成分が大きく変化した変異株は得られなかったことから、データは省略する。

表3 静岡酵母HD-1と変異株の培養上清の
成分分析結果

菌株名	アルコール度数 (%)	香気成分				E/A比 [※]
		酢酸イソアミル (mg/L)	カプロン酸エチル (mg/L)	イソアミルアルコール (mg/L)	酢酸エチル (mg/L)	
HD-1 (親株)	18.15	11.98	1.88	173	143	6.92
CF-64 (変異株)	18.20	19.62	2.48	167	220	11.75
CF-80 (変異株)	18.00	18.34	1.91	239	161	7.67
CF-90 (変異株)	18.05	17.64	1.53	179	190	9.85
CF-94 (変異株)	18.80	13.85	2.00	180	155	7.69

※酢酸イソアミル量/イソアミルアルコール量×100

表4 静岡酵母New-5と変異株の培養上清の
成分分析結果

菌株名	アルコール度数 (%)	香気成分				E/A比 [※]
		酢酸イソアミル (mg/L)	カプロン酸エチル (mg/L)	イソアミルアルコール (mg/L)	酢酸エチル (mg/L)	
New-5 (親株)	18.10	9.27	2.10	173	128	5.36
CF-25 (変異株)	18.60	16.33	2.81	171	196	9.55
CF-115 (変異株)	18.10	5.47	1.74	138	98	3.96
CF-120 (変異株)	18.50	5.73	1.83	156	105	3.67
CF-324 (変異株)	18.70	10.52	2.36	171	149	6.15

※酢酸イソアミル量/イソアミルアルコール量×100

表5 静岡酵母NO-2と変異株の培養上清の
成分分析結果

菌株名	アルコール度数 (%)	香気成分				E/A比 [※]
		酢酸イソアミル (mg/L)	カプロン酸エチル (mg/L)	イソアミルアルコール (mg/L)	酢酸エチル (mg/L)	
NO-2 (親株)	18.15	5.22	1.85	151	95	3.46
CF-178 (変異株)	18.45	5.29	2.40	133	105	3.98
CF-186 (変異株)	18.40	7.06	2.50	137	123	5.15
CF-190 (変異株)	18.80	7.61	2.47	139	130	5.47
CF-196 (変異株)	17.80	1.35	1.67	94	39	1.44

※酢酸イソアミル量/イソアミルアルコール量×100

表6 静岡酵母CA-50と変異株の培養上清の
成分分析結果

菌株名	アルコール度数 (%)	香気成分				E/A比 [※]
		酢酸イソアミル (mg/L)	カプロン酸エチル (mg/L)	イソアミルアルコール (mg/L)	酢酸エチル (mg/L)	
CA-50 (親株)	18.00	5.00	1.77	155	90	3.23
CF-142 (変異株)	17.40	5.14	1.51	167	79	3.08
CF-148 (変異株)	17.35	5.14	2.00	140	118	3.67
CF-149 (変異株)	18.05	4.67	1.83	150	118	3.11
CF-156 (変異株)	18.35	4.52	1.76	151	88	2.99

※酢酸イソアミル量/イソアミルアルコール量×100

HD-1、New-5及びNO-2については、親株と比較して酢酸イソアミル濃度が高い変異株が複数取得できた。また、E/A比についても親株に比べて改善された変異株が複数取得できた。

またNO-2については、わずかではあるが、親株と比較してカプロン酸エチル濃度が高くなった変異株も取得できた。

一方で、CA-50については、親株と比較して酢酸イソアミル濃度やE/A比が大きく変化した変異株は得られなかった。

3.3 乾燥麴及びα化米を用いた総米200g清酒小仕込み試験による変異株の醸造適性評価

3.2の結果から、アルコール度数や香気成分組成のバランスを考慮し、表7の8株について、清酒小仕込み試験を行うこととした。また、対照として、それぞれの変異株の親株も試験に供した。

表7 清酒小仕込み試験に供した変異株

株名	親株	育種方法/選択培地
CF-25	New-5	自然変異/プレグネノロン
CF-64	HD-1	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン
CF-80	HD-1	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン
CF-90	HD-1	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン
CF-142	CA-50	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン
CF-156	CA-50	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン
CF-178	NO-2	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン
CF-186	NO-2	薬剤変異 (EMS) /プレグネノロン

総米200g規模の清酒小仕込み試験にて得られた製成酒の成分分析結果（一部抜粋）を表8及び表9に示す。

表 8 総米 200 g 規模の清酒小仕込み試験
における製成酒の一般成分

菌株名	一般成分			
	アルコール 度数 (%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度
HD-1	16.65	-9.0	2.6	2.1
CF-64	14.85	-13.5	2.8	2.3
CF-80	16.65	-9.5	3.2	2.1
CF-90	15.70	-14.0	2.8	2.3
New-5	16.85	+1.5	2.3	2.2
CF-25	16.90	+0.5	2.4	2.1
NO-2	16.75	+1.5	2.2	2.2
CF-178	16.50	-1.0	2.3	2.2
CF-186	16.65	-1.5	2.3	2.3
CA-50	16.20	-7.0	2.7	2.2
CF-142	15.40	-14.5	2.4	2.4
CF-156	16.35	-6.0	2.7	2.3

概ね、いずれの変異株も、親株と同等のアルコール生成能を有していることがわかった。また、酸度やアミノ酸度についても親株とほとんど変わらなかったが、日本酒度については株間差が大きく、味わいに差が出る事が考えられた。

表 9 総米 200 g 規模の清酒小仕込み試験に
おける製成酒の香気成分 (一部抜粋)

菌株名	香気成分組成			
	酢酸イソアミル (mg/L)	カブロン酸エチル (mg/L)	イソアミルアルコール (mg/L)	E/A比 [※]
HD-1	6.26	2.48	170	3.68
CF-64	6.46	2.65	147	4.39
CF-80	9.79	3.12	200	4.90
CF-90	11.92	1.54	182	6.55
New-5	5.27	4.02	158	3.34
CF-25	4.76	4.33	152	3.13
NO-2	4.96	3.98	158	3.14
CF-178	5.86	3.37	160	3.66
CF-186	5.49	3.85	171	3.21
CA-50	5.72	2.89	167	3.43
CF-142	8.84	3.28	192	4.60
CF-156	7.15	2.54	177	4.04

※酢酸イソアミル量/イソアミルアルコール量×100

香気成分については、HD-1、NO-2 及び CA-50 の変異株からは、親株と比較して E/A 比は低いものの酢酸イソアミル濃度は高くなった株が複数得られた。一方で、New-5 の変異株は、酢酸イソアミル濃度も E/A 比についても親株とほとんど変わらなかった。

4 まとめ

本研究では、酢酸イソアミルを主体とする吟醸香を高生産し、またオフフレーバーの原因となり得るイソアミルアルコールの生産性が低い、新規

静岡酵母候補株を複数取得することができた。

今後は、仕込みスケールを拡大して、実用化に向けてデータを収集するとともに、変異株の選抜を進めていく予定である。

また、本県産清酒のブランド力を向上するために、酵母、種麴、原料米の全てを県内産のものとしたオール静岡県産清酒の開発を目指し、本県オリジナルの清酒用種麴や酒造好適米と今回得られた変異株の組み合わせと酒質への影響についても評価を進めていきたいと考えている。

謝辞

本研究に係る研究資金については、クラウドファンディングにて調達いたしました。寄付やプロジェクトの周知に御協力いただいた皆様に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、実験方法等について、ご指導いただきました東京農業大学応用生物科学部醸造科学科進藤斉准教授に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 堤浩子 他：酢酸イソアミル高生産株の育種及びその利用. 特開 2002-191355 (公開日：平成 14 年 7 月 9 日).
- 2) 斎藤久一 他：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. 醸造協会誌, 87(12), 915-021(1992).
- 3) 望月玲於 他：様々な酒類醸造用酵母株のビール醸造特性の評価. 静岡県工業技術研究所研究報告, 第 13 号, 55-57(2020).