

県内資源からの清酒酵母の探索・育種と醸造技術の開発(第一報)

吉村明浩・澤井美伯・正木和夫

Development of highly ethyl caproate-producing sake yeast strain G

Akihiro YOSHIMURA, Yoshinori SAWAI and Kazuo MASAKI

全国で吟醸酒の人气が高まり、岐阜県でも製造数量のおよそ3割を純米吟醸酒あるいは吟醸酒が占めるようになった。吟醸酒の魅力の一つは香りであり、最近は特に「カプロン酸エチル」に由来するリンゴ様の香りが消費者に好まれているため、県内酒造場から県オリジナルのカプロン酸エチル高生産酵母の開発が求められている。これまでに県保有のG酵母(NF-G)を基に開発した変異株Ce41株は、カプロン酸エチルを高生産するが、発酵力が弱いことがわかった。一方で親株のNF-Gは強い発酵力を備えていることから、この発酵力をCe41株に付与する方法として、交雑育種を検討してきた。本研究では、NF-Gの一倍体作製、Ce41株との交雑育種を行い、優良株の選抜を開始した。一次選抜を経て得られた交雑株46株のうち25株の醸造特性を総米100gの小仕込み試験で調べたところ、いずれもNF-G(1.8ppm)の1.7倍以上のカプロン酸エチル生成量を示した。特に、このうち15株は市販酵母と同等の発酵力を示した。

1. はじめに

清酒酵母はアルコールとともに、清酒の呈味および香味成分を生産する。本県のオリジナル清酒酵母、「G酵母(NF-G)」はバナナ様の香り「酢酸イソアミル」を主な香気成分として生成し、吟醸酒や純米酒などの特定名称酒に用いられている。NF-Gは県内の20以上の酒造場に用いられているが、近年はリンゴ様の「カプロン酸エチル」の香りが消費者に好まれており、県内酒造場からカプロン酸エチル高生産酵母の開発が求められている。岐阜県の清酒製成数量は平成23年から少しずつ回復の兆しがみられるものの、国内だけでなく国外でも販売競争は激しく、他地域の清酒と差別化する一つの要素として、県オリジナルの酵母が期待されている。

平成26年度までにNF-Gをエチルメタンスルホン酸処理して、市販酵母より多量のカプロン酸エチル(以下、CapEt)を生産する変異株「Ce41株」を得たが、本変異株はNF-Gや市販酵母と比べて発酵力が弱いことが判明した¹⁾。また昨年度は、Ce41株がホモ接合型(α/α 型)であり、NF-G一倍体とCe41株との交雑が可能であることを確認した²⁾。NF-Gは強い発酵力を備えており、この発酵力をCe41株に付与できれば、実用化の可能性があり、かつ野生酵母との交雑変異を予防できる。

本研究では昨年度把握したNF-Gの孢子形成条件を利用して、一倍体株の取得を進め、さらにCe41株との交雑株の作成と、小規模試験醸造による選抜を実施したので報告する。

2. 実験

2.1 一倍体の取得と接合型の確認

NF-Gの一倍体の取得は、大津らの方法²⁾を一部変更して行った。すなわち、NF-G培養物を孢子形成培地(2%(w/v)あるいは4%(w/v)酢酸カリウム、0, 100もしくは200 ng/mlのラパ

マイシンを含む)に添加し、30°C、4日間培養し、孢子を形成させた。子嚢を回収して、zymolyase処理したのち、遠心分離で沈殿を回収し、洗浄後、滅菌水で再懸濁してYPD寒天培地に塗抹し、30°Cで培養した。出現したコロニーの接合型をPCR³⁾で確認した後、NF-G一倍体株として保存した。

2.2 Ce41株との交雑と接合の確認

NF-Gのa型一倍体株とCe41株との交雑はマスメーティング法で行った。NF-G一倍体株とCe41株をYPD寒天培地上で混合して、30°Cで2~3日間培養し、さらに4°Cで10日間静置した。細胞塊を回収して、12.5 μ Mセルレニンを含むYPD寒天培地に塗布して、30°Cで培養した。出現したコロニーを回収して、PCRに供し、MATaおよびMAT α 遺伝子の増幅が確認できたものを交雑株とした。

2.3 一倍体株の増殖特性評価

一倍体株を3 mlのYPD培地で前培養し、遠心分離で回収、生理的食塩水で洗浄した。OD₆₆₀が0.01となるように10%グルコースを含むSD培地に添加して、25°Cで3日間静置培養し、培養液を10倍希釈してOD₆₆₀を測定した。

2.4 Ce41-G交雑株の一次選抜

CapEt高生産株の一次選抜は、匂いかぎ試験で行った。交雑株を20 mlの8%グルコースを含むYM培地で25°C、3日間培養し、培養液の上立ち香でCapEt生成の有無を判定した。

2.5 小規模試験醸造による二次選抜

選抜した交雑株を用いて、総米100gの試験醸造を行った。仕込み配合は三井らの方法⁴⁾を参考に、乾燥麹 20 g(精米歩合60%、徳島製麹(株))、掛米 80 g(精米歩合60%、 α 化米、徳島製麹(株))、汲水 180 ml、乳酸 0.6 ml、酵母 0.1 OD₆₆₀/ml-汲水とし、一段仕込み、15°C一定で、対照株のNF-Gの炭酸ガス減量が30 gに達したところで上槽した。上槽は12,000 xg、10分間の遠心分離により行い、上清を製成酒として得た。醪の重量減少をアルコール生成に伴う、炭

酸ガス減量として発酵経過を記録した。

製成酒の分析は国税庁所定分析法⁵⁾に従って行い、香氣成分はヘッドスペースガスクロマトグラフ⁶⁾で分析した。なお、アミノ酸度はエタノール法により測定した。

3. 結果および考察

3. 1 一倍体株の分離と増殖特性

清酒酵母は孢子形成率と発芽率が低いことが知られており、それらを回復させる方法の一つとして、Nakazawaらはきょうかい7号酵母を用いて、ラパマイシン処理が有効であることを報告している⁷⁾。そこで、NF-Gにラパマイシン処理を適用したところ、報告と同様に2孢子子を有する子嚢が多く観察されたが、4孢子子の子嚢は処理により減少する傾向があった。孢子子の発芽率にも明確な差異は認められず、NF-Gに対するラパマイシン処理の有効性は明らかでなかったが、39株のNF-G一倍体を得ることができた。

このうちa型は15株、α型は24株であった。得られた一倍体のうち接合型がα型であるCe41株と交雑できるa型の15株について、増殖特性を調べた。親株のNF-Gが最も増殖が良かったが、Ce41株と比べて増殖の良い株が5株あった(表1)。培養液を観察したところ、Ce41株とa型株のNo.61, 166および314に凝集性が認められた。特にNo.314は増殖性が著しく悪かったため、交雑は行わないこととした。

3. 2 Ce41株とa型NF-G一倍体との接合

Ce41株とa型一倍体14株とを接合させ、Ce41株の形質であるセルレニン耐性を示すコロニーの中から、MAT遺伝子座を確認し、交雑株として154株を得た。接合効率は一倍体株により異なり、No.312との接合では交雑株が得られなかった。

3. 3 Ce41-G交雑株の一次選抜

培養液の上立ち香に含まれるCapEtの有無を判定し、154株から46株を選抜した。併せて細胞の凝集性を確認したところ、交雑によりCe41株にあった凝集性は解消されていた。凝集性のあったNo.61および166との交雑でも解消されていた。酵母の拡大培養や酒母の育成において、凝集性があると同様に分散させづらい。交雑は凝集性の解消をもたらし、取り扱いやすさが改良された。

3. 4 小規模試験醸造

二次選抜として、交雑株の醸造特性を調べるため、NF-Gおよび高香氣性市販酵母を比較対照に使用して、総米100gの小規模試験醸造を行った。本報告では先行実施した46株中の25株の評価を示す(表1)。

炭酸ガス減量の経日変化、アルコール量や日本酒度から発酵力を評価したところ、いずれの交雑株もNF-Gと比べて発酵力は劣るものの、15株は市販酵母と同程度と認められた(表2)。酸度が全て4.0以上と高いが、これは添加した乳酸に由来する。

昨年度までの試験醸造において、Ce41株は市販酵母よりもアミノ酸度が0.4程度高くなる傾向があった。昨年度までの試験醸造とは仕込み配合等が異なるため、直接の比較はできないが、本実験では、5株を除いて市販酵母と比べて0.3以内に収まり、交雑による改善が示唆された。

製成酒のCapEt濃度を測定した結果、交雑株はいずれもNF-G (1.8 ppm) と比べて、1.7倍以上に増加し、中でも12株は市販酵母 (5.4 ppm) より高い値を示した。すなわち、交雑株がCe41株のCapEt生成能を保持していることが示唆された。また製成酒に含まれる遊離脂肪酸量をKuribayashiらの方法⁸⁾に従って測定したところ、交雑株は全てNF-G (9.6 ppm) より高い値を示した(表2)。Ce41株は42 ppmであり、脂肪酸生成能、つまり前駆体のカブロン酸生成能が強く、結果としてCapEtが多くなっていると推察され、その形質を交雑株が引き継いでいると考えられた。

発酵経過と成分分析の結果から、25株中10株(表2*で示したもの)について三次選抜試験に供する予定である。

4. まとめ

CapEt高生産性酵母を開発するため、NF-GとCe41株とを交雑し、得られた交雑株の醸造特性を検討した。一次選抜により交雑株として46株を選抜し、小規模試験醸造において、発酵力は市販酵母に近く、CapEt生成能はNF-Gの1.7倍以上の株が10株得られた。今後、引き続き、残りの21株の醸造特性を調べたのち、さらに実用性の高い株の選抜を行う。

【参考文献】

- 1) 大津ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, No. 9, pp. 36-38, 2015
- 2) 大津ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, No. 10, pp. 47-49, 2016
- 3) Katou *et al.*, *Yeast* 25, pp. 799-807, 2008
- 4) 三井ら, あいち産業科学技術総合センター研究報告, pp. 84-87, 2016
- 5) 日本醸造協会, 国税庁所定分析法注解
- 6) 吉沢淑, 醸協, 68(1), pp. 59-61, 1973
- 7) Nakazawa *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 113, pp. 491-495, 2012
- 8) Kuribayashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, pp.391-394, 2012

表1 NF-G 一倍体の増殖能. 72 時間培養後の濁度.

| 一倍体 No. | NF-G 一倍体 | | | | | | | | | | | | | | | NFG |
|-------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 39 | 48 | 55 | 61 | 86 | 95 | 105 | 113 | 152 | 160 | 166 | 282 | 296 | 312 | 314 | |
| OD ₆₆₀ | 0.628 | 0.531 | 0.539 | 0.044 | 0.665 | 0.623 | 0.554 | 0.282 | 0.563 | 0.451 | 0.531 | 0.609 | 0.649 | 0.468 | 0.039 | 0.699 |
| 凝集性 | なし | なし | なし | あり | なし | なし | なし | なし | なし | なし | あり | なし | なし | なし | あり | なし |

表2 交雑株を用いて得られた製成酒の成分

| 交雑株 No. | * 39-6 | * 39-13 | 39-14 | * 39-16 | * 48-1 | * 48-3 | 48-5 | 48-10 | * 48-11 | 61-12 | * 61-16 | * 55-6 | 86-5 | 86-7 |
|---------------|-----------|------------|-------|------------|-----------|-----------|-------|-------|------------|-------|------------|-----------|-------|-------|
| アルコール(%) | 15.6 | 15.5 | 15.7 | 15.5 | 15.4 | 15.8 | 15.5 | 15.3 | 15.7 | 16.0 | 15.6 | 15.4 | 12.3 | 12.8 |
| 日本酒度 | -17.4 | -16.5 | -15.0 | -16.3 | -19.3 | -13.9 | -17.0 | -17.8 | -14.6 | -12.5 | -16.8 | -18.8 | -48.2 | -42.5 |
| 酸度 | 4.8 | 4.9 | 5.0 | 5.1 | 5.0 | 5.1 | 5.1 | 5.2 | 5.2 | 4.9 | 5.0 | 4.7 | 5.5 | 5.4 |
| アミノ酸度(EtOH 法) | 1.6 | 1.6 | 1.7 | 1.6 | 1.4 | 1.5 | 1.5 | 1.5 | 1.4 | 1.5 | 1.6 | 1.5 | 1.7 | 1.7 |
| 遊離脂肪酸 | 31.7 | 27.4 | 30.5 | 37.8 | 35.1 | 26.5 | 34.6 | 35.4 | 33.9 | 30.6 | 29.5 | 29.0 | 42.4 | 36.1 |
| カプロン酸エチル | 5.6 | 3.5 | 5.2 | 7.2 | 5.6 | 4.7 | 6.0 | 6.2 | 6.6 | 6.1 | 5.7 | 6.3 | 6.7 | 5.8 |

| 交雑株 No. | 95-11 | 95-12 | 95-14 | 95-15 | 105-9 | 105-11 | * 113-13 | 113-16 | 152-1 | * 152-2 | 152-3 | NFG | 市販 酵母 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------|--------|-------|------------|-------|------|----------|
| アルコール(%) | 13.2 | 12.2 | 14.0 | 12.9 | 13.1 | 10.7 | 14.4 | 12.0 | 11.5 | 14.0 | 11.7 | 16.3 | 14.7 |
| 日本酒度 | -40.0 | -44.2 | -29.4 | -39.4 | -41.3 | -61.9 | -29.8 | -47.9 | -55.7 | -31.1 | -52.2 | -8.9 | -23.3 |
| 酸度 | 5.4 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.2 | 5.6 | 4.7 | 5.7 | 5.5 | 5.3 | 5.4 | 4.8 | 4.9 |
| アミノ酸度(EtOH 法) | 1.6 | 1.6 | 1.5 | 1.4 | 1.6 | 1.9 | 1.6 | 1.7 | 1.5 | 1.5 | 1.6 | 1.5 | 1.3 |
| 遊離脂肪酸 | 28.2 | 25.7 | 23.9 | 28.0 | 33.2 | 40.0 | 30.4 | 24.1 | 34.0 | 27.5 | 26.4 | 9.4 | 25.8 |
| カプロン酸エチル | 4.6 | 3.6 | 4.0 | 4.0 | 4.5 | 5.0 | 6.0 | 3.0 | 4.7 | 4.0 | 3.7 | 1.8 | 5.4 |

遊離脂肪酸とカプロン酸エチルの濃度は ppm。

* : 発酵能と成分分析が良好な株