

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2報)

吉村明浩、澤井美伯、正木和夫、周延*、五島徹也*、赤尾健*

Development of highly ethyl caproate-producing sake yeast strain G (II)

Akihiro YOSHIMURA, Yoshimori SAWAI, Kazuo MASAKI, Zhou YAN*, Tetsuya GOSHIMA* and Takeshi AKAO*

要約 岐阜県の清酒製成数量のうち70%は特定名称酒であり、その半分は純米吟醸酒を含む吟醸酒で、特に純米吟醸酒の数量が伸びている。吟醸酒は果実様の香りと透明感のある味わいが魅力であり、最近は特に「カプロン酸エチル」に由来するリンゴ様の華やかな香りが消費者に好まれている。カプロン酸エチルは発酵中に酵母により生成されることから、カプロン酸エチル高生産性を備えた酵母の開発を実施している。前報で県保有の清酒酵母、G酵母(NF-G)への変異処理および交雑法による育種を開始し、得られた交雑株の醸造特性を評価して、10株の優良株を選出したことを報告した。

本年度は優良株の選抜を継続した。昨年度および本年度の試験で選出した計16株から試験醸造による再評価等を経て3株までにしぼりこみ、総米600 gの試験醸造を実施したところ、3株を用いて醸造した製成酒にはカプロン酸エチルが11.4-13.1 ppm含まれ、市販清酒酵母(8.5 ppm)より多いことがわかった。選抜株3株による発酵はいずれも市販清酒酵母より前緩型で経過したが、このうち1株(No.61-16)は上槽時の累積炭酸ガス減量が同量に達し、アルコール度も差はなく、実用的と考えられた。

1. はじめに

清酒醸造において酵母は、アルコールのほか、有機酸などの呈味成分、エステルなどの香気成分の生成に機能している。その生成能は酵母によって異なり、その差は清酒の香味を左右するため、酒造場では種々の酵母から目的とする酵母を選択して使用している。岐阜県ではオリジナル清酒酵母「G酵母」から、泡なし酵母(NF-G)の育種を行い、県内の29社に使用されている。NF-Gは酢酸イソアミルを主な香気成分として生成する酵母で¹⁾、純米酒の醸造を中心に利用されている。本県では年々特定名称酒の比率が増加しており、最近は特に純米吟醸酒の製造量が増加している。そこで、県内酒造場からリンゴ様の華やかな香気成分「カプロン酸エチル」を多く製成する酵母が求められたことから、NF-Gを基にカプロン酸エチル高生産酵母の開発を開始した。

昨年度までにNF-Gへの変異処理や接合操作を施して複数の交雑株を取得した²⁾。また優良株の選抜を実施して、カプロン酸エチル(CapEt)を従来のNF-Gの1.7倍以上生成する株が10株得られた²⁾。本研究では、NF-Gと比較してカプロン酸エチルを高生産し、市販酵母のように優れた発酵力を備え、かつ異なる特徴を実用的な酵母を求めて、昨年度に引き続き酵母の選抜を実施したので報告する。

2. 実験方法

2.1 交雑株の倍数性確認

倍数性はフローサイトメーターを用いて、各細胞の蛍光

強度を測定し、二倍体対照株(X2180)および一倍体対照株(X2180-1B)と比較することで調べた。各菌株をYPD培地で培養後、集菌し、終濃度70%のEtOHで固定した。細胞を回収後、50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)で洗浄、再懸濁した後、RNase A(終濃度0.25 mg/mL)、Proteinase K(30 U)で順次処理した。細胞を回収し、Propidium Iodideで染色してサンプルとした。

2.2 FAS2遺伝子の解析

NFGおよびCe41のゲノムDNAをテンプレートとしてFAS2遺伝子領域をPCRで増幅した。得られた5.7 kbpのPCR断片をダイレクトシーケンスしてFAS2遺伝子配列を決定した。DNAシーケンス解析は(株) macrogen・JAPAN社に依頼し、アライメントはGENETYX-SV/RC Ver.13を使用した。

2.3 小規模試験醸造

2.3.1 総米100 g試験醸造(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³⁾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。

2.3.2 総米100 g試験醸造(醸造特性の再評価)

交雑株5株(No.48-3、No.55-6、No.61-16、No.160-1、No.160-16)、対照株NF-G、Ce41、きょうかいK1801を用いて、総米100 gの試験醸造を行った。乾燥麹19.2 g(精米歩合60%、徳島製麹(株))、掛米72.8 g(精米歩合60%、

*独立行政法人 酒類総合研究所

α 化米、徳島製麴(株)、汲水174 ml、乳酸0.1 ml、酵母 1.0×10^8 cells/ml-汲水とし、一段仕込み、15°C一定で、日毎炭酸ガス減少量が0.5 g未満を目途として、発酵開始から17日目あるいは18日目で上槽した。上槽は4°C、5,000 rpm、15分間の遠心分離により行い、上清を製成酒として得た。醪重量は経日的に測定し、アルコール生成に伴う炭酸ガス減少量として記録した。本試験はn = 3で行った。

2. 3. 3 総米600 g試験醸造 (製成酒評価)

交雑株3株 (No.61-16, No.160-1, No.160-16)、対照株にNF-G、市販高香気性酵母を用いて、表1の仕込み配合で、酵母は 1.0×10^8 cells/ml-汲水となるよう添加し、総米600 gの試験醸造を行った。

白米は60%精白のひだほまれを使用し、米麴は一括して製造し冷蔵保存したものを使用した。仕込みは初添15°C、仲添10°C、留添8°Cとし、留添翌日から1日に1°Cずつ昇温し、環境温度12°Cに達してから発酵終了まで保持した。発酵経過は経日的に醪重量を記録して追跡した。上槽は留添後20~21日目に遠心分離機を用いて行い、上清を製成酒として得た。

表1 総米600 g試験醸造 仕込配合

	初添	仲添	留添	合計
総 米 (g)	105	195	300	600
蒸 米 (g)	60	165	240	155
麴 米 (g)	45	30	60	45
汲 水 (ml)	165	225	438	276
乳 酸 (ml)	0.6	-	-	0.6
酵 母 (ml)	6.0	-	-	6.0

2. 4 その他

製成酒の分析は国税庁所定分析法に従って行い⁴⁾、香気成分はヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した⁵⁾。製成酒の官能評価はパネル3名で行った。

3. 結果と考察

3. 1 二次選抜 (前報の続き)

前報でNF-GとCe41との交雑を報告した。すなわち、NF-GをEMS処理して得られたセルレニン耐性変異株Ce41が α 型の接合型を示すことに着目し⁶⁾、NF-Gの α 型一倍体と交配させることにより、CapEt高生産性を維持したまま、発酵力を補強することを試みた。

交雑株は一次選抜試験で46株を選び、交雑株の醸造適性を調べるために総米100 gの小規模試験醸造を行った。前報では46株中の25株を評価して10株を選出した。今回はまず未報告の21株の結果を報告する。

前報と同様に、炭酸ガス減少量の変化、アルコール生成量、日本酒度を指標に発酵力を比較したところ、21株中6株は市販酵母と同等以上であった (表2)。交雑株製成酒

のCapEt濃度はいずれもNF-G製成酒 (1.7 ppm) と比べて2倍以上 (3.4 - 9.6 ppm) に増加し、21株中12株は市販酵母 (5.5 ppm) 以上であった。交雑株製成酒は全て遊離脂肪酸量が増加しており、CapEt前駆体であるカブロン酸生成能が強く、結果としてCapEt生成量が増加しているものと推察された。

今回得られた発酵力とCapEt生成能の両方に優れた6株と前報で選出した10株を以下の試験に供し、優良株を選ぶこととした。

3. 2 交雑株の倍数性

NF-Gは二倍体の対照株X2180のG1期およびG2-M期のピーク位置が一致したが、Ce41はやや右側にシフトしていたことから、NF-Gは二倍体であり、Ce41は二倍体もしくは異数体と推察された (図1A, 1B)。孢子形成-ランダムスポア法で分離した α 型NF-Gのうち、No.61は一倍体の対照株とピーク位置が一致したが (図1C)、No.48, No.55およびNo.160はシフトしており、一倍体もしくは異数体と推察された。これらとCe41との交雑株であるNo. 48-3, No. 55-6, No. 61-16 (図1D)、No. 160-1, No. 160-16はいずれも三倍体から四倍体の位置にピークを示し、交配による遺伝子量の増加が確認できた。

二次選抜で選出した交雑株には、ピーク形状が異常なものが認められた。これらは菌株の継代維持が困難と予想されるため、三次選抜にはNo. 48-3, No. 55-6, No. 61-16, No. 160-1, No. 160-16の5株を選んだ。

3. 3 Ce41および交雑株のCapEt高生産性

二次選抜において、交雑株は全て遊離脂肪酸生成量が増加していることを確認した。親株のCe41も同様に遊離脂肪酸生成量が増加しており、同じ機構で生成すると考えられる。セルレニン耐性酵母のCapEt高生産能は、FAS2遺伝子の一塩基置換によるGly1257のSerへの置換が理由とされている⁷⁾。Ce41のCapEt生成量の増加原因を明らかにするため、FAS2遺伝子配列を調べたところ同一塩基置換を有しており、同様のメカニズムによりCapEt生成量を増加させていると考えられた。Ce41の変異はホモ型であったが、交雑株はヘテロ型であり、NF-GとCe41に由来すると考えられる。

3. 4 三次選抜

前述のNo.48-3他、4株の三次選抜を実施した。発酵特性および生成物量の再評価のため、乾燥麴と α 化米を使用した一段仕込による試験醸造を行った。NF-Gと比較してCe41は前急後緩型で経過した (図2)。交雑株ではNo. 48-3がNF-Gと比較して前緩型で経過したが、データは省略するが他4株はNF-Gに近い経過を示した。

交雑株の日本酒度はそれぞれ異なったが、いずれもCe41以上に切れた。炭酸ガス減少量の経過と日本酒度から、交配によりCe41の発酵力が補強されたと考えられ、特にNo.61-16はNF-Gと同等以上に切れ、エタノール生成量もNF-G (18.8%) と同等であった (表3)。

製成酒のCapEt濃度はNF-G製成酒が1.1 ppmであった

のに対して、交雑株製成酒は少なくとも3倍以上 (3.3 - 5.1 ppm) であった。Ce41製成酒は6.4 ppmであり、交配によりやや低下したが、No. 160-1はK1801と同じく5.1 ppmを生成した (表3)。

CapEtと酢酸イソアミルとの濃度比 ([CapEt]/[酢酸イソアミル]) は、NF-Gは0.3、K1801は1.2であった。No.48-3は1.0であったが、その他は1.3以上で、特にNo.160-16は1.7とCapEtの比率が高く、きょうかい酵母とは特徴の異なる製成酒が得られると考えられた (表3)。

特徴の認められたNo.61-16、No.160-1 およびNo.160-16について、発酵条件を変えて試験醸造を行い、製成酒の官能評価を実施した。

精米歩合60%の酒造好適米を使用した三段仕込み、留添時温度を8℃、最高温度は12℃として発酵を行ったところ、対照の市販酵母と比較してNo.61-16はやや前緩型に推移したが、上槽時の累積炭酸ガス減少量は同程度に達した。No.160-1とNo.160-16はいずれも醪初期の8-12℃の低温下で発酵が遅れ、上槽時の累積炭酸ガス減少量も少なかった。この2株は製成酒の日本酒度も低く、清酒醪での発酵力の弱さが示唆された。一方で、交雑株製成酒のCapEt濃度は全て、対照株製成酒 (8.5 ppm) と比較して高い値 (11.4-13.1 ppm) を示した (表4)。パネル3名により官能評価したところ、No.61-16は市販酵母と比較して味の評価は低いものの、香りの評価は良好であった。

4. まとめ

前報に続き、交雑株の二次選抜を実施して計16株を選出した。さらに三次選抜を実施して3株を選出し、試験醸造による評価を行ったところ、いずれもCapEt生成能が高いことがわかった。発酵経過および成分分析から3株のうちNo.61-16が最も良好な発酵力を示すことがわかったため、今後は本株を用いて総米10 kgの試験醸造を行い、適切な発酵条件の検討を行う。

Ce41および交雑株のCapEt高生産性の原因について検討し、*FAS2*遺伝子の一塩基置換が認められたことから、市販酵母と同様の機構によるものと考えられた。

【参考文献】

- 1) 澤井美伯ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 5, pp.46-48, 2011.
- 2) 吉村明浩ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 11, pp.39-41, 2017.
- 3) 三井俊ら, あいち産業科学技術総合センター研究報告, pp.84-87, 2016.
- 4) 日本醸造協会, 国税庁所定分析法注解.
- 5) 吉沢淑, 醸協, 68(1), pp.59-61, 1973.
- 6) 大津崇ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 10, pp.47-49, 2016.
- 7) J. Inokoshi et al., *Mol. Gen. Genet.*, 244, pp. 90-96, 1994.

表 2 交雑株を用いて得られた製成酒の成分

交雑株 No.	152-6	152-7	152-8	152-15	* 160-1	160-3	160-5	* 160-7	* 160-8	160-11	* 160-16	166-4
アルコール(%)	14.3	14.3	13.5	14.4	15.7	13.5	14.2	15.3	15.2	13.9	15.2	14.2
日本酒度	-27.0	-29.2	-38.2	-26.9	-15.9	-37.3	-30.2	-18.8	-18.2	-34.0	-19.6	-26.9
酸度	5.2	4.9	4.5	4.9	4.6	4.9	4.8	4.6	4.6	4.8	4.7	5.2
アミノ酸度(EtOH 法)	1.5	1.6	1.7	1.5	1.5	1.7	1.5	1.5	1.4	1.6	1.4	1.4
遊離脂肪酸	20.1	23.9	41.3	25.4	28.1	39.5	34.4	29.9	31.4	41.0	27.9	28.8
カプロン酸エチル	4.5	4.5	8.9	5.2	7.3	8.4	8.2	7.4	8.2	9.6	7.0	5.0

交雑株 No.	* 166-8	166-9	282-1	282-6	282-10	* 282-11	296-3	296-14	NFG	市販 酵母
アルコール(%)	15.1	12.8	12.8	14.7	13.8	14.8	12.6	11.8	16.3	14.8
日本酒度	-17.7	-43.7	-41.9	-21.7	-30.5	-20.6	-45.2	-50.3	-7.7	-21.3
酸度	5.3	4.8	4.2	5.4	5.1	5.1	5.0	5.3	4.7	4.6
アミノ酸度(EtOH 法)	1.5	1.6	1.6	1.4	1.5	1.4	1.7	1.5	1.3	1.2
遊離脂肪酸	28.9	28.7	32.2	16.6	21.0	24.8	26.6	26.3	8.1	21.4
カプロン酸エチル	5.6	6.4	6.5	3.4	4.3	6.0	4.9	4.7	1.7	5.5

遊離脂肪酸とカプロン酸エチルの濃度は ppm

*: 発酵経過と製成酒の成分分析結果を指標に次段階試験に選出した株

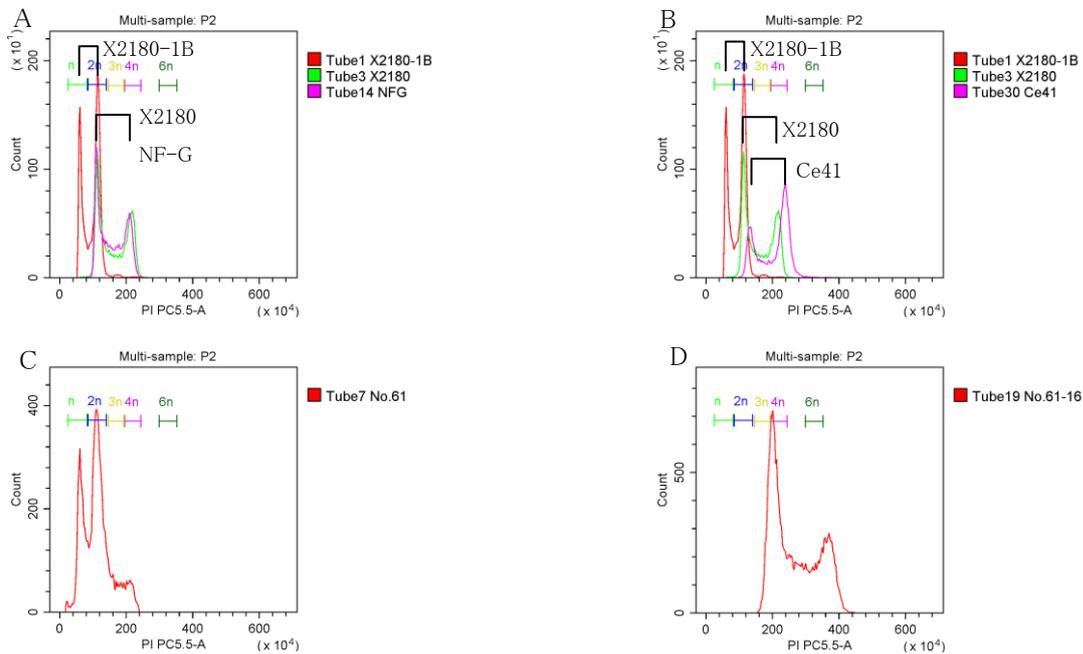


図1. フローサイトメリーによる倍数性の確認 A: NF-G; B: Ce41; C: No.61, D: No.61-16

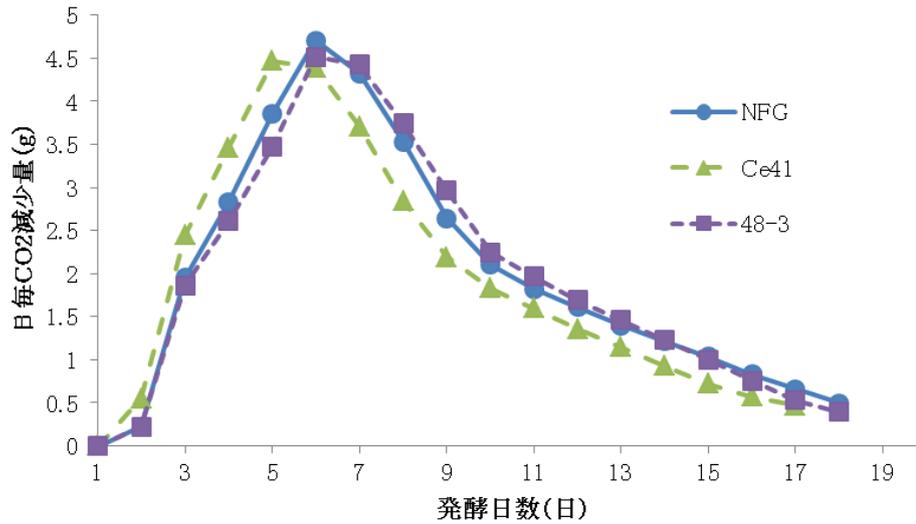


図2. 総米100 g試験醸造における日毎炭酸ガス減少量の推移

表3. 総米100 g試験醸造で得られた製成酒の成分

	NFG	K1801	Ce41	48-3	55-6	61-16	160-1	160-16
日本酒度	+0.5 ± 0.3	+3.3 ± 0.2	-9.0 ± 0.2	-0.2 ± 0.1	+0.5 ± 0.1	+1.3 ± 0.3	-0.3 ± 0.1	-3.2 ± 0.8
エタノール (%)	18.8 ± 0.1	19.2 ± 0.1	17.6 ± 0.1	18.6 ± 0.0	18.8 ± 0.1	18.8 ± 0.1	18.6 ± 0.1	18.1 ± 0.1
酸度	3.5 ± 0.1	3.0 ± 0.0	3.3 ± 0.0	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.0	2.9 ± 0.0	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.0
アミノ酸度	1.9 ± 0.0	1.8 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1
カブロン酸エチル	1.1 ± 0.0	5.1 ± 0.1	6.4 ± 0.0	3.3 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.2 ± 0.1	5.1 ± 0.1	4.5 ± 0.2
酢酸イソアミル	3.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	2.9 ± 0.0	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.1 ± 0.3	3.6 ± 0.2	2.7 ± 0.4
カブロン酸エチル / 酢酸イソアミル	0.3	1.2	2.2	1.0	1.5	1.3	1.4	1.7

カブロン酸エチルと酢酸イソアミルの濃度は ppm
 試験は n = 3 で行い、平均値と標準偏差を示した。

表4. 総米600 g試験醸造で得られた製成酒の成分

		NFG	市販酵母	61-16	160-1	160-16
一般成分	アルコール	18.8	17.9	15.5	16.3	15.9
	日本酒度	-10	-19	-21	-27	-29
	酸度	2.1	2.4	2.2	2.3	2.5
	アミノ酸度	1.9	1.7	1.9	1.7	1.7
香气成分 (ppm)	酢酸エチル	184.3	116.3	82.2	92.6	84.4
	酢酸イソアミル	13.3	7.4	4.5	7.5	5.4
	イソアミルアルコール	159.0	150.4	135.4	139.3	137.6
	カブロン酸エチル	2.0	8.5	11.4	13.1	12.4
	E.C./I.A.	0.1	1.1	2.5	1.7	2.3
官能評価	香り	7	6	4	6	5
	味	7	3	6	6	6
		味多い、キレ、 荒い、エチル	シブ、キレる スッキリやや甘	荒さ残る、まとまる 甘酸、なめらか	丸味、シブ、甘 やや重、キレイ	やや酸、甘

官能評価はパネル 3 名でカブロン酸エチル高生産株として品質の良いものを 1 点とする 3 点法で行った。