

低温高発酵性清酒酵母の分離

清酒酵母の高香気生産性変異株は低温発酵性に劣る傾向があり、大吟醸酒の醸造のように低温で長期間発酵を行なう際に問題になることがある。著者らはこの点を改善するために、親株として低温での増殖性及び発酵性に優れた菌株を分離し、それに高香気生産性変異を付与することにより、香気生産性が高く、かつ低温で発酵性が劣らない酵母の育種に成功した。その親株の分離源として、平板培養状態で冷蔵庫に8年間保存した後に生き残った酵母群を採用した著者らの手法はユニークであり、大変興味深い。

蟻川 幸彦・榛葉 芳夫

1. はじめに

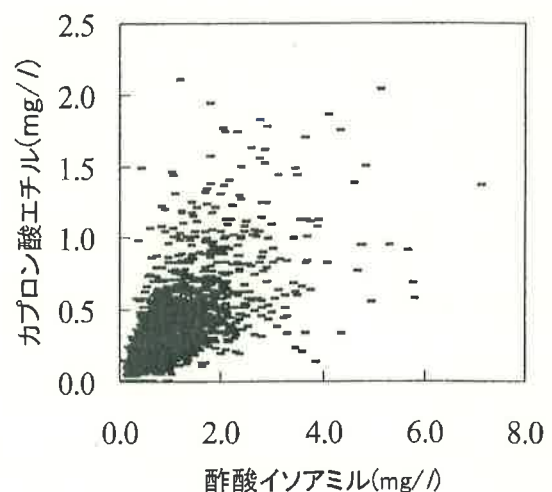
清酒の需要の低迷は深刻な状況になってきているが、その積極的な打開策としては清酒の高品質化と多様化により需要を掘り起こすことが考えられる。その一つの手段として、微生物、特に清酒酵母の育種改良が重要と思われる。当センターにおいても、前身の食品工業試験場時代を含め、細胞融合、変異処理、遺伝子組換え、自然界からの分離など様々な手法を試みてきた。遺伝子組換えは、現在の技術の中では最も優れた手法ではあるが、現状では一般消費者の認知が低く、現実的ではない。そのため、現在の育種の方法としては変異処理がよく使われている。しかし変異処理の場合でも、その親株に何をを用いるかが最も重要な要素の一つである。現在の清酒製造法に目を向けてみると、大吟醸酒ではもろみの最高品温が10℃程度で長期間の発酵である。そのため低温に耐える酵母が必要とされる。特に、近年開発されている高香気生産性の変異酵母では、低温発酵性に劣る点が問題になっている。この問題は、育種手法の必然ではあるが、少なくとも変異処理に用いる親株には低温発酵性に優れた株を用いることが望ましい。

一方、酵母を凍結や乾燥をせず長期間保存する場合、死滅を防ぐため6ヶ月から1年程度で植継ぎを行うのが一般的である。逆に長期間、一切植継ぎをしないで生存してきた菌株の中には、低温等の過酷な条件下でも発酵が旺盛な株が存在するのではないかと考え

られる。そこで変異処理後、一切植継ぎをせず、5℃で長期間保管してきた菌株の中より、低温高発酵性の株を分離することを試みた¹⁾。

2. 分離源

平成11年(1999年)、高香気生産性株を分離するため、協会901号(K901)を親株としてEMS変異処理を行った(生存率0.4%)。処理した株については一切選択圧をかけずにYPD寒天培地に塗付し、生じたコロニーから4,800株を分離し、その特性を検討した²⁾。第1図はYPD10培地(グルコース10%)を用いた発酵試験結果であるが、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル生産性の異なる様々な株が得られた。そ



第1図 分離株の香気成分生成分布

Isolation of Sake Yeast Strains with High Fermentation Abilities under Low Temperature Condition.
Yukihiko ARIKAWA, Yoshio SHINHA (Nagano prefecture General Industrial Technology Center)

第1表 小仕込試験結果

菌株	日本酒度	酸度	アミノ 酸度	エタノール	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	リンゴ酸	コハク酸	乳酸
				(%)			(ppm)			
K 901	+ 4.5	2.6	2.4	17.0	7.2	145	0.54	275	687	403
P 6-53	- 2.0	4.2	1.9	15.3	2.5	119	1.47	759	752	483
P 11-58	-3.5	2.6	2.4	16.6	7.7	129	0.90	284	503	397
P18-53	+ 4.5	2.4	2.0	17.4	7.3	120	1.75	274	500	412
P 28-36	-13.0	2.4	2.5	15.4	11.1	125	0.99	351	483	476
P 30-29	- 9.0	2.8	1.9	15.6	15.5	122	0.96	376	601	501
P 33-37	+ 3.5	2.3	1.9	18.2	17.8	149	0.48	452	608	488
P 43-14	- 3.0	3.6	1.9	16.3	16.6	149	0.58	1264	392	464

こで総米 200 g の小仕込試験を実施したところ、香氣成分生産性だけでなく、リンゴ酸高生産性を有する株も見出された(第1表)。現在、酢酸イソアミル高生産性株(P 33-37)ならびに酢酸イソアミル・リンゴ酸高生産性株(P 43-14)は、県内酒造場で特徴ある清酒を醸造するために用いられている^{3,4)}。一方、この試験で用いた YPD 寒天平板は、4,800 株を分離しても 700 枚が未処理で残っていた。一枚の平板につき約 100 コロニーほど生育していたため、計算上約 70,000 株になるが、将来の活用を考え、冷蔵庫(5°C)に密封して保管した。その後、何度か活用を考えたが、労力等の問題で保存したまま八年が過ぎた。今回、前出の理由から、ようやくこれら保存株の検討を行った。

3. 分離手順

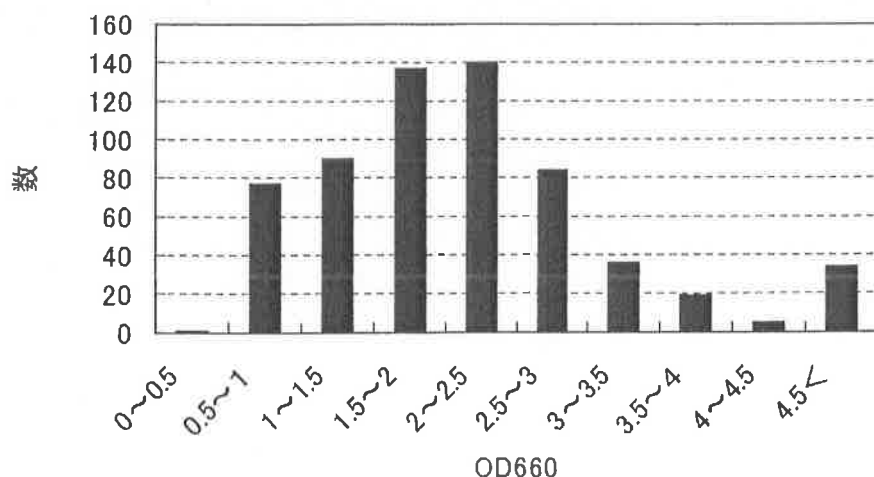
まず 700 枚のプレートから金串を使って菌を分離し、新しい YPD プレートに接種した。なお平成 11 年には菌の分離は一株ずつ楊枝で行ったが、今回は省力を図るため、特注の剣山状の金串を用いた。この金串をプレート全体に突き刺し、コロニーから菌を分離した。移植した平板に生じたコロニーから楊枝で菌を分離し、YPD 液体培地を入れた 96 穴のタイタープレートに接種し、これを元プレートとした。次に 200 μ l の YPD 液体培地が入ったタイタープレートに元プレートより 2 μ l ずつ再度接種し、10°C で一日培養した。OD 660 を測定することにより、増殖性の高い株を分離した(一次スクリーニング)。さらにグルコースを 5% 加えた麴汁 5 培地(Blix 11, pH 4.9, グルコース 12.4

%) に変えて、再度 2 枚のタイタープレートで培養した。1 枚はガスパックシステムを用いて嫌気培養を行った(二次スクリーニング)。さらに三次スクリーニング(5 ml 培養)、四次スクリーニング(バイオフォトレコーダー TN 1507: アドバンテック東洋(株)製)により検討を加えた後、総米 200 g の清酒の小仕込み試験を実施した。

4. 分離株の特性

4.1 増殖性

保存プレート 700 枚より金串で移植したコロニーのうち、生育してきたのは 623 株であった。重複して得られたものもあるので正確ではないが、約 70,000 コロニーから分離したことから考えると、約 1% の生存率であった。事前には、八年間保存から考えて、ほとんど生育してこないのではないかと考えていたが、予想以上に高い数値であった。これら菌株については 10°C における増殖性試験を行い、57 株を選抜した(一次スクリーニング)。第 2 図に一次スクリーニングに供した 623 株の増殖性の分布を示す。OD 660 で 3 以上の株を選抜した。次に二次スクリーニング、三次スクリーニングを行うことで、さらに 11 株まで絞った(データは示さない)。これら 11 株についてバイオフォトレコーダーによる検討を行ったところ(第 3 図)、30°C 培養(A)と 15°C 培養(B)では異なる結果が得られた。30°C の培養については、親株である K 901 を超える増殖性を示す株は存在しなかったが、15°C の培養においては親株よりも優れた増殖性を示す株が存在した。



第2図 分離株の増殖性分布

4.2 小仕込試験

第4図に10℃一定温度で行った小仕込試験における炭酸ガス減量の経過を示す。上槽は最も減量が大きかった株が60gを超えた19日目に遠心分離により行った。仕込み試験において親株のK901を上回る経過を示したものは8Y-17株と8Y-41株のみであった。また第2表に示すように、8Y-17株と8Y-41株は日本酒度のキレやアルコール生成量で親株を上回った。8Y-17株については、それ以外の酸度やアミノ酸度ならびに香気成分や有機酸生産性が親株であるK901と類似していた。一方、8Y-41株はカプロン酸エチル生産性がK901に比べ高かった。また酸度が親株に比べ低かった。

4.3 8Y-41株による清酒醸造

選抜した2株のうち、香気生産性に特徴を有する8Y-41株を用いて総米600kgで純米吟醸酒の醸造を行った。仕込経過を第5図に示す。最高品温は11.3℃であったが、ポーメの切れも順調で留後31日で上槽した。生成酒の成分を第3表に示す。得られた酒には酢酸イソアミルとカプロン酸エチルが程よく含まれ、軽快な酒質となった。またこの酒は、長野県原産地認定制度日本酒官能審査会において高い評価を得て認定された。

5. 高香気生産性の付与

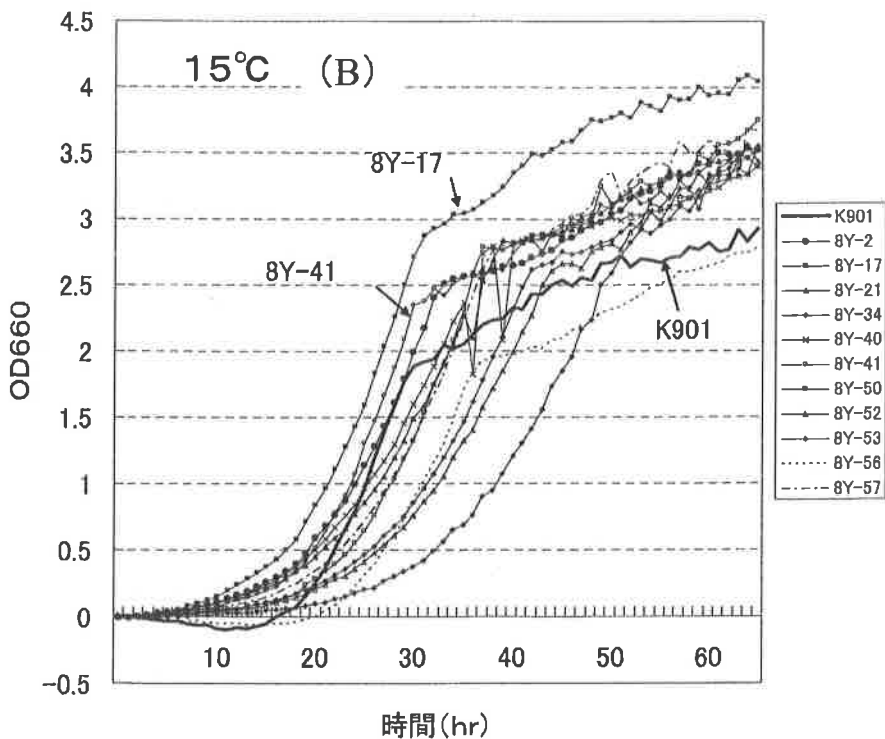
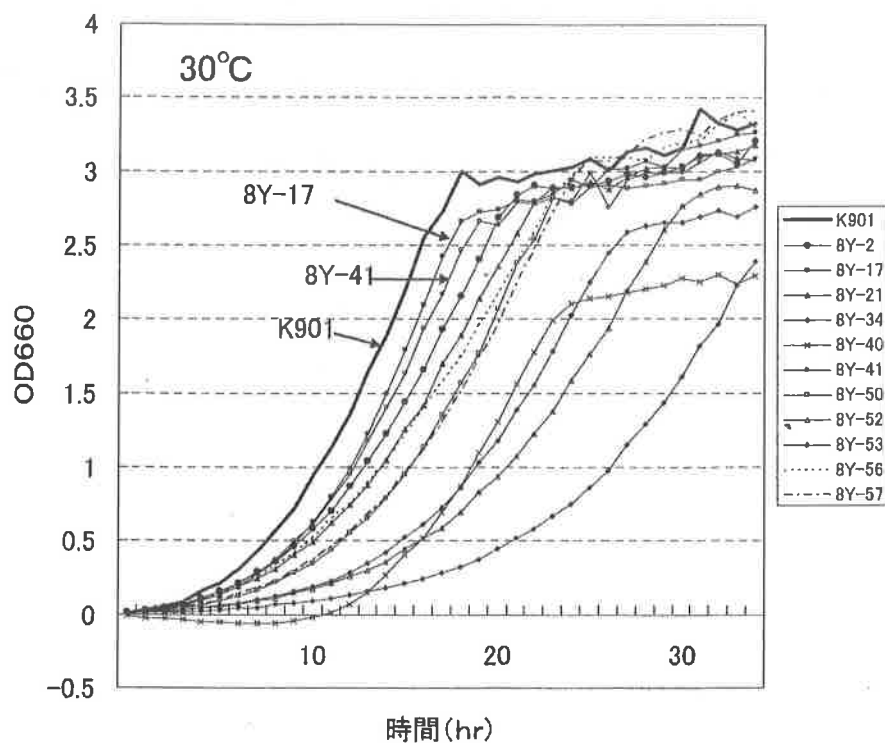
5.1 手法

次に、得られた酵母を親株として低温高発酵性で高香気生産性の株を育種することを試みた。セルレニン耐性((財)日本醸造協会が独占的通常実施権を持つ特

許第2632654号を使用)を指標として、変異処理を行ったところ、8Y-17株より47株、8Y-41株より107株の耐性変異株を得た。数回の発酵試験および小仕込試験を経て、10℃での小仕込試験での発酵性が協会901号と同程度で、カプロン酸エチルを8ppm以上生産する株、41-33を分離した。なおカプロン酸エチルを10ppm以上生産する株もあったが、発酵性に劣るため除外した。

5.2 アレル特異的PCR増幅法による変異遺伝子の確認^{5,6)}

アレル特異的PCR増幅法により41-33株の変異遺伝子の型を検討した。セルレニン耐性を誘導するFAS2変異遺伝子のみが増幅するプライマーとしてMFAS2-11(5'-GGTAACTGTTCTGTTCTA-3')を用いた。また野生型遺伝子のみが増幅するプライマーとしてWFAS2(5'-GGTAACTGTTCTGTTCTG-3')を用いた。リバースプライマーとしては共通してRFAS2(5'-GATGATTTGAATACAGCACC-3')を用いた。それぞれのプライマーセットを用いて増幅したところ、41-33株はMFAS2-11およびWFAS2のいずれの場合にも増幅した(第6図)。変異遺伝子をhomoに持つことが遺伝子シーケンスにより判明している対照株(N.B)では、MFAS2-11プライマーを用いたときのみ増幅した。また親株である8Y-41株では、WFAS2プライマーを用いたときのみ増幅した。このことより41-33株は変異遺伝子をheteroに持つことが判明した。発酵性を損なわず、カプロン酸エチルを高生産するのは、このためと思われるが、カプロン酸エチルの生産性の高

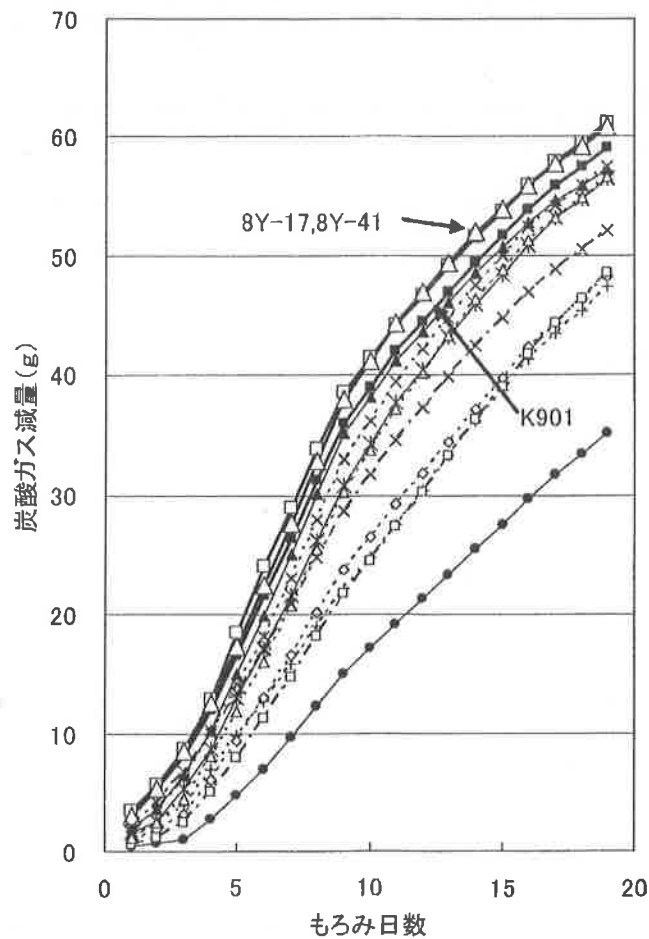


第3図 分離株の低温増殖性

きは、親株の8Y-41株が持つ形質が相乗的に働いているためかもしれない。一方、2つある遺伝子の内、片方にしか変異が入っていないことを考えると、本来の特性を保つためには継代培養時における再スクリーニングが欠かせないものと思われる。

5.2 41-33株による清酒醸造

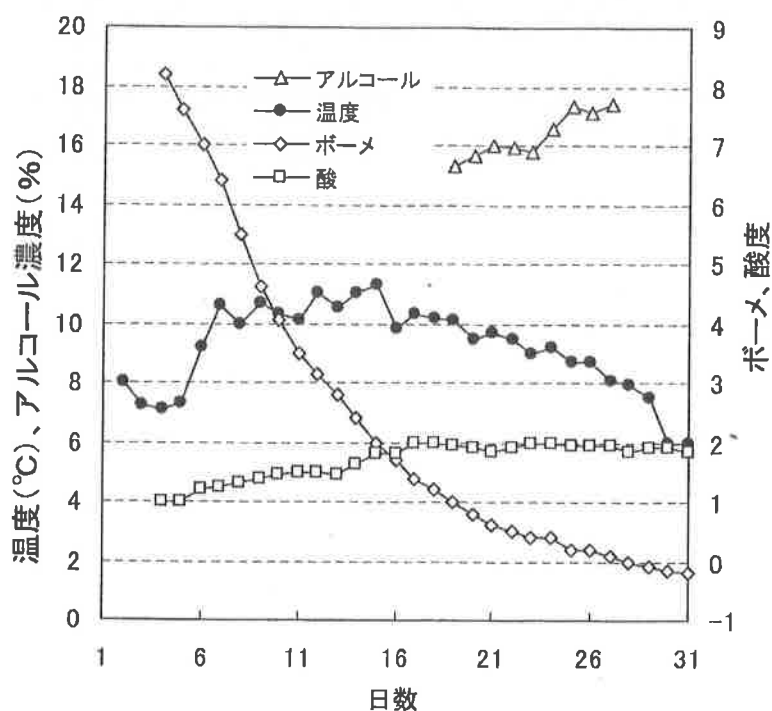
育種した41-33株を用いて、総米600kgの仕込試験を酵母仕込みで実施した。もろみ経過および香気成分の経過を第7図および第8図に示す。酵母仕込みのため、前急な経過となったが、14日程度で香気成分は



第4図 もろみ経過

第2表 小仕込試験結果

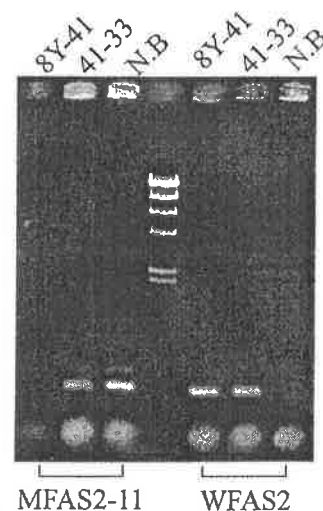
菌株	日本酒度	酸度	アミノ 酸度	エタノール	酢酸	イソアミル	カプロン酸	リンゴ酸	コハク酸	乳酸
				(%)	イソアミル	アルコール	エチル			
							(ppm)			
K 901	- 6	2.9	1.4	16.3	6.78	206	0.83	440	557	365
8 Y-2	- 6	2.5	1.7	16.0	3.91	156	3.03	343	445	346
8 Y-17	- 3	2.9	1.4	17.1	6.88	212	0.93	454	561	395
8 Y-21	-10	2.4	1.6	15.6	7.78	199	1.76	487	478	350
8 Y-34	-30	3.2	2.0	9.8	2.88	124	0.25	195	469	386
8 Y-40	-23	2.5	1.5	12.5	2.66	139	2.60	256	317	466
8 Y-41	- 1	2.3	1.4	16.4	8.02	187	2.27	297	445	342
8 Y-50	+ 2	2.1	1.3	15.9	5.07	156	2.38	241	432	370
8 Y-52	-27	2.3	2.0	13.5	10.61	129	1.62	122	541	411
8 Y-53	-26	2.7	1.9	13.8	8.73	150	1.09	448	390	365
8 Y-56	-10	2.9	1.5	15.7	5.27	154	1.93	339	379	341
8 Y-57	-10	2.0	1.4	14.9	7.29	195	1.24	238	454	345



第5図 実醸造経過

第3表 生成酒成分

菌株	8 Y-41
日本酒度	+2.0
酸度	1.85
エタノール	% 17.0
グルコース	% 1.1
酢酸イソアミル	ppm 4.6
イソアミルアルコール	ppm 127
カプロン酸エチル	ppm 2.2
ピルビン酸	ppm 83
リンゴ酸	ppm 443
コハク酸	ppm 368



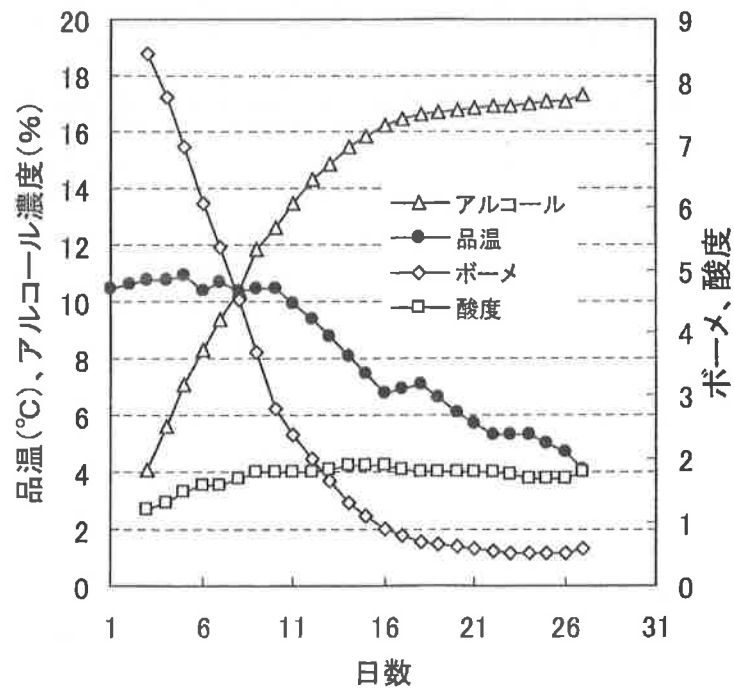
第6図 アレル特異的PCR

増幅条件1：(MFAS 2-11用) 94°C10分→94°C1分，
60°C2分，72°C2分(30回)→72°C10分
増幅条件2：(WFAS 2用) 94°C10分→94°C1分，
61°C2分，72°C2分(30回)→72°C10分

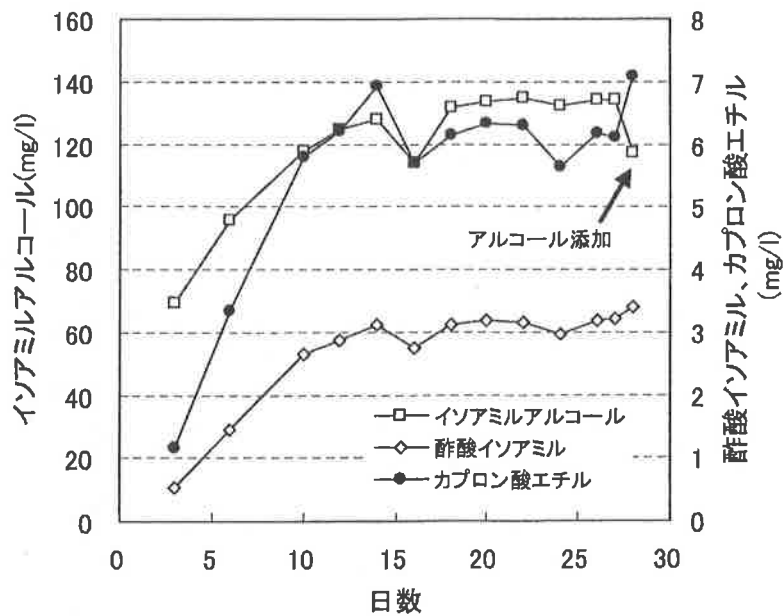
6. おわりに

八年間保管した YPD 平板より分離した 8 Y-41 株は，現在八年酵母と称している。ほど良い香り成分を生成し，低温でも活性が高い。醸造した純米酒の評価も高いことより，純米酒用酵母として用いていただ

ピークに達し，以降若干の変動はあるものの，上槽時にはカプロン酸エチル濃度が 7 ppm を超えた。生成酒の成分を第 4 表に示す (A 社)。なお第 4 表には A 社の仕込み以後，41-33 株を用いて醸造された酒の成分も併せて記載してある。ほとんどが吟醸造りなみの低温仕込みであったが，発酵性に問題はなかった。また一社を除き，カプロン酸エチル生成量も 5 ppm を超えていた。生成量の低かったもろみでは，米の溶解が足りなかったのではないかと推測しているが，原因は不明である。



第7図 実醸造経過 (41-33)



第8図 香気成分経過

ればと考えている。一方、41-33株は長野酵母D (N_D酵母)として長野県内酒造場への配布が開始された。今後、県内企業の協力を得て、実施例を解析することにより、本酵母のための最適な使用条件を求めていきたいと考えている。

最後に実醸造試験の実施やサンプル・データの提供でご協力いただいた県内酒造場の皆様に感謝申し上げます。

ます。また長期の保存で悪臭が漂う多数の寒天平板より、長期間にわたり菌を分離していただいた松川恵子さん(退職)に感謝申し上げます。

本研究の一部は、長野県酒造組合の受託を受けて実施したものです。

第4表 実醸造結果

製造会社	A	B	B	C	D	E
種類	吟醸酒	純米大吟醸	特別本醸造	純米	純米酒	大吟醸酒
米	五百万石	美山錦	美山錦	ひとごち	美山錦	美山錦
精白%	麴 40/掛米 60	49	59	60	49	49
酒母	酵母仕込	普通速醸	普通速醸	中温速醸	高温糖化	中温速醸
最高品温	°C	10.9	10.8	11.8	11.4	12.3
最高ポーメ		8.5	8.8	8.4	8.4	5.6
もろみ日数		27	36	25	26	27
日本酒度		+3	-2	+3	-1	+3
酸度		1.4	1.8	1.5	1.8	2.1
アルコール	%	18.9	16.8	19.4	17	16.8
アミノ酸度		1.3	2	2	1.6	1.2
グルコース	%	2.8	2.3	2.3	1.2	1.3
酢酸イソアミル	ppm	3.4	3.3	3.2	3.4	4.3
イソアミルアルコール	ppm	117	113	118	118	128
カプロン酸エチル	ppm	7.1	5.1	6.1	5.2	3.3
リンゴ酸	ppm	253	721	718	476	358
コハク酸	ppm	261	263	264	371	326
乳酸	ppm	317	307	293	395	429
ピルビン酸	ppm	0	41	0	0	234

文 献

- 1) 蟻川幸彦, 松川恵子, 榛葉芳夫: 長野工技センター研報, 2, p.F 1-F 4 (2007)
- 2) Arikawa, Y., Yamada, M., Shimosaka, M., Okazaki, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **90**, 675-677 (2000)
- 3) 蟻川幸彦, 下原多津栄, 田中勝巳: 長野食工試

研報, **33**, 45-46 (2005)

- 4) 蟻川幸彦, 鷲沢喜美治, 下原多津栄, 丸山睦栄, 田中勝巳, 小原忠彦: 長野食工試研報, **31**, 37-38 (2003)
- 5) Akada, R., Hirokawa, I., Hoshida, H., Nishizawa, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 189-92 (2001)
- 6) 蟻川幸彦, 小林良二, 工藤誠一, 風間 武: 長野県工技センター研報, **1**, p.F 1-F 3 (2006)

執筆者紹介 (順不同・敬称略)

蟻川幸彦 <Yukihiko ARIKAWA>

昭和35年2月5日生まれ<勤務先とその所在地>長野県工業技術総合センター食品技術部門, 〒380-0921 長野市栗田西番場205-1 <略歴>昭和57年3月信州大学理学部化学科卒業, 同年長野県技術吏員, 60年4月長野県食品工業試験場勤務 (現, 長野県工業技術総合センター食品技術部門), 平成17年信州大学大学院工学系研究科生物機能工学科博士後期課程修了, 平成17年4月長野県工業技術総合センター食品技術部門 (改組) 勤務, 現在に至る。<抱負>美味しいお酒や食べ物を味わいたい。また微生物の育種と味の評価 (ヒトとセンサ) を通じて, それらに関わりたい。<趣味>運動不足のために再開したテニス。

榛葉芳夫 <Yoshio SHINHA>

昭和23年1月23日生まれ<勤務先とその所在地>長野県工業技術総合センター食品技術部門, 〒380-0921 長野市栗田西番場205-1 <略歴>昭和47年3月信州大学農学部農芸化学科卒業, 47年4月長野県食品工業試験場勤務, 平成17年4月長野県工業技術総合センター食品技術部門 (改組) 勤務, 現在に至る。<抱負>公的機関 (長野県) 勤務を始めて, 食品加工から醸造 (酒類) の業務に従事。今後も発酵関係の分野で微力ながら貢献できればと思っています。<趣味>スポーツはテニス, スキーが好きで, 今でも楽しめるように健康でいたいと思っています。