

〔経常研究 A〕

高品質化に向けたはりま酵母の育種開発

西村友里

1 目的

平成 25 年度に播磨国風土記編纂 1300 年記念酒「庭酒」開発のために当センターで取得された初の兵庫県産酵母（以下はりま酵母）は、有機酸の中でも特に酢酸およびコハク酸の生成量が高いという特徴を持っている。通常、酢酸は清酒の味や香りに害をもたらすといわれており、少ないことが望ましい。また、はりま酵母は香りの面でも独特な特徴があるため、はりま酵母で造った清酒である庭酒は通常の清酒とは異なった個性的な酒質となっている。そこで、本研究では低酸生産性かつ香気成分組成の改善を試みることで飲みやすい酒質となるはりま酵母の取得を目的とする。特に香気成分では、はりま酵母の酒質に合うと考えられるバナナ様香の酢酸イソアミルの生成量の向上を試みる。

2 実験方法

2.1 低酸生産性株の育種

2.1.1 セルレニン耐性株の分離

脂肪酸合成を阻害する抗生物質セルレニンに耐性を持つ株を選抜し、低酸生産性はりま酵母の取得を目指す。セルレニン耐性株は、リンゴ様香であるカプロン酸エチル高生産株となりやすいことが広く知られているが、酢酸の生成量が低下することも報告されている¹⁾。

そのため、今回は Ichikawa ら²⁾の方法に従って薬剤変異によるセルレニン耐性株の取得を行った。はりま酵母（NJ1 株）としてストックされていた中で低酸生産性であった NJ2 を親株として使用し、エチルメタンスルホン酸（EMS）で変異処理を行った。その後、50 μ M セルレニン含有 YNB 平板培地（2 %グルコース、0.67 %酵母ニトロゲンベース、2 %寒天）に塗抹し、30 $^{\circ}$ C、3～5 日間培養して変異株を取得した。

2.1.2 低酸生産性変異株の選抜（液体発酵試験）

得られたセルレニン耐性株をグルコース 10 %を含む YM 培地（10 %グルコース、0.5 %ペプトン、0.3 %酵母エキス、0.3 %麦芽エキス）にて 30 $^{\circ}$ C で 72 時間静置培養した後、その上清に含まれる有機酸を測定した。有機酸はイオンクロマトグラフィー（Thermo Fisher SCIENTIFIC 製 ICS-5000）で定量した。

2.1.3 小仕込み試験

総米 150 g で小仕込み試験を行った。仕込配合は表 1 に示す。15 $^{\circ}$ C で一定とし、15 日目に遠心分離で上槽した。得られた製成酒の有機酸、香気成分の測定を行った。有機酸はイオンクロマトグラフィー、香気成分はヘッドスペース - GC 法（島津製作所製 GC-2010 Plus）で定量した。

表 1 総米 150 g 仕込配合

乾燥麹	α 化米	汲水	乳酸（90%）
28.8 g	109.2 g	261ml	0.15ml

2.2 酢酸イソアミル高生産株の育種

2.2.1 オーレオバシジン耐性株の分離

スフィンゴ脂質の生合成を阻害する抗生物質であるオーレオバシジン A に耐性を示す酵母変異株の中から酢酸イソアミル高生産株を選抜したとの報告があったため³⁾、同方法にて酢酸イソアミル高生産株

の分離を行った。低酸生産性株の育種で取得した C54 株を親株として使用し、EMS で変異処理を行った後、0.3 $\mu\text{g/ml}$ オーレオバシジン含有 YNB 平板培地に塗布し、30 $^{\circ}\text{C}$ 、3～5 日間培養して変異株を取得した。

2.2.2 小仕込み試験

総米 25 g および 150 g、1 kg で小仕込み試験を行った。総米 25 g、150 g は一段仕込みであるが、1 kg では実際の酒造りに近くなるように三段仕込みで行った。総米 25 g の仕込配合は表 2、総米 1 kg の仕込配合を表 3 に示す。総米 25 g、150 g では 15 $^{\circ}\text{C}$ で一定とし、15 日目に遠心分離で上槽した。総米 1 kg では 15 $^{\circ}\text{C}$ でスタートし、留は約 10 $^{\circ}\text{C}$ とした。留後に 1 日 1 $^{\circ}\text{C}$ ずつ昇温し、最高品温 15 $^{\circ}\text{C}$ とした後、アルコール濃度が 15% となった時点で遠心分離にて上槽した。得られた製成酒の一般成分、有機酸、香气成分の測定を行った。アルコール濃度および日本酒度はアルコライザー法（アントンパール製 DMA4100M、Alcolyzer SAKE ME）、酸度およびアミノ酸度は指示薬滴定法、有機酸はイオンクロマトグラフィー、香气成分はヘッドスペース - GC 法で分析した。

表 2 総米 25 g 仕込配合

乾燥麹	α 化米	汲水	乳酸 (90%)
28.8 g	109.2 g	261ml	0.15ml

表 3 総米 1 kg 仕込配合

	添	仲	留	合計
乾燥麹換算 (g)	58	57	77	192
α 化米換算 (g)	100	200	428	728
汲水 (補填込)	318	462	960	1760
90%乳酸 (ml)	0.9			0.9

3 結果と考察

3.1 低酸生産性株の育種

3.1.1 セルレニン耐性株からの低酸生産性変異株の選抜

得られたセルレニン耐性株 75 株を用いて、10 %グルコース YM 培地にて培養を行った結果、酢酸生成量が親株 NJ2 の生成量の 80% 以下となった 8 株および親株 NJ2 の有機酸測定結果を図 1 に示す。

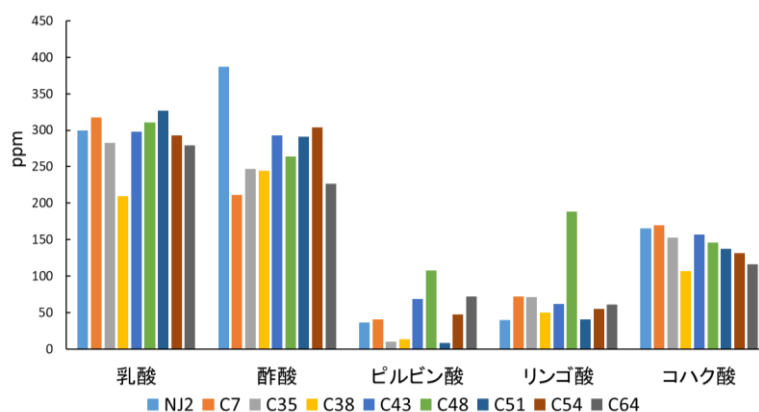


図 1 液体発酵試験における有機酸生成量

3.1.2 小仕込み試験

液体発酵試験にて親株の酢酸生成量の80%以下となった変異株8株とNJ1、NJ2を用いて小仕込み試験で得られた製成酒の有機酸、香気成分分析結果を図2、3に示す。製成酒の酢酸濃度が親株NJ2と比較してC51株が77%、C54株が52%低下した。また、製成酒の官能検査を行ったところ、C51株はオフフレーバーが強く、味もはりま酵母と異なる味ではあったがよい呈味ではなかった。しかし、C54株ははりま酵母特有の渋みが軽減され飲みやすい酒質へと変化していた。その他の株は、大きく変化のあったものはなかった。今回、発酵経過、分析結果とともに考えると、酢酸生成量が大きく低下しているC54株を低酸生産性のはりま酵母として選抜することとした。

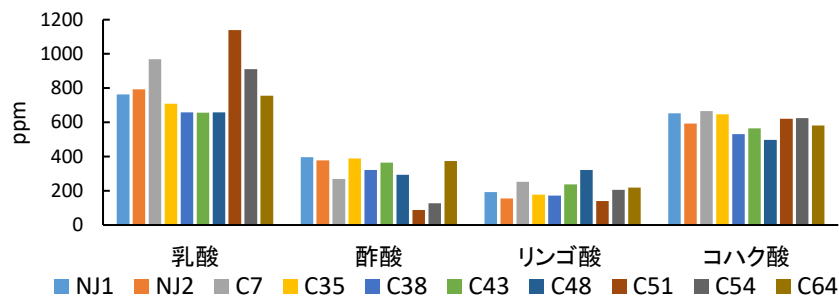


図2 小仕込み試験における有機酸含有量

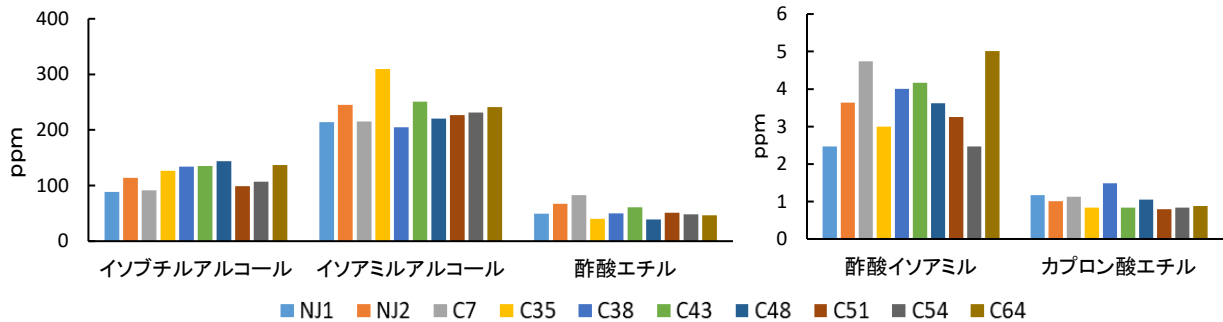


図3 小仕込み試験における香気成分生成量

3.2 酢酸イソアミル高生産株の育種

低酸生産性のはりま酵母C54株を親株として得られたオーレオバシジン耐性株32株を用いて行った総米25gの小仕込み試験の香気成分測定結果を図4に示す。9株で酢酸イソアミル生成量がNJ1と比較して1.8倍以上となった。続いてその9株を総米150gの小仕込み試験に供したところ、NJ1と比較して酢酸イソアミルの生成量がA17株で3.0倍、A26株で2.7倍となった。

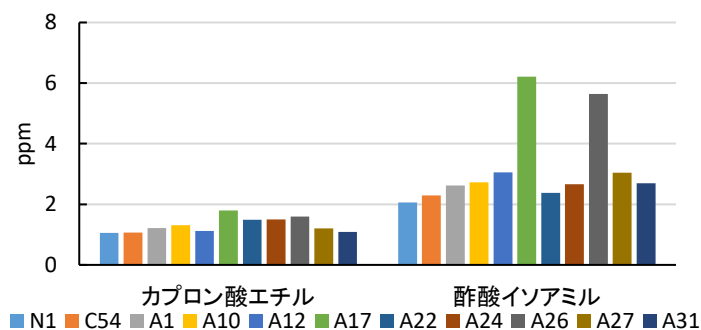


図4 総米150g小仕込み試験での香気成分生成量

実際の仕込みでも酢酸イソアミル高生産性がみられるか確認するために、総米 1 kg の三段仕込で小仕込み試験を行った。その結果を図 5～7 および表 4 に示す。NJ1 と比較して A17 株は 2.6 倍、A26 株は 3.1 倍に酢酸イソアミル生成量が向上した。総米 150 g の小仕込みと比較して、酢酸イソアミル生成量が減少したが、NJ1 との相対値ではほぼ同様の結果となった。総米 150g での小仕込みでは 15℃ 一定であるため酢酸イソアミル生成量が全体的に増加した可能性が高い。加えて官能評価も行った結果、香りでは総米 150 g の小仕込みと比較して A17 株、A26 株ともに酢酸イソアミル生成量が減少した分バナナという印象は薄くなったが、NJ1 と比較するとよりフルーティーな庭酒という印象であった。呈味において、総米 150 g 規模では A26 株でより渋みを強く感じたが、総米 1 kg 規模では A17 株で渋みを強く感じた。本研究では、この 2 株を酢酸イソアミル高生産性はりま酵母の候補株とする。

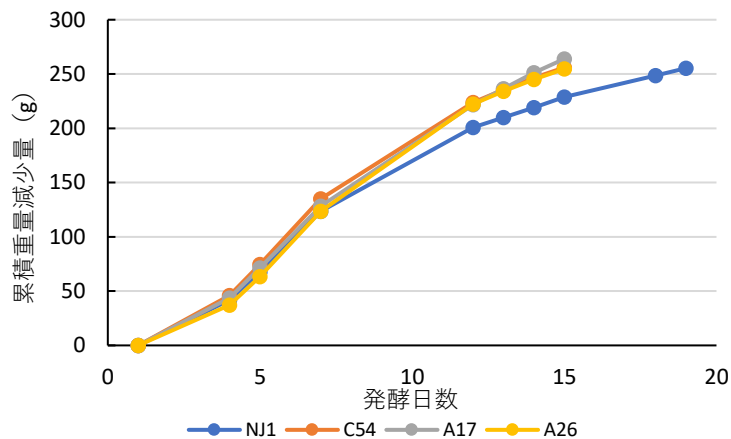


図 5 発酵経過

表 4 一般分析結果

	アルコール度数	日本酒度	酸度	アミノ酸度
NJ1	14.6	-14.1	5.4	1.6
C54	15.2	-7.2	4.0	1.4
A17	14.9	-7.9	3.8	1.5
A26	14.9	-7.7	3.7	1.4

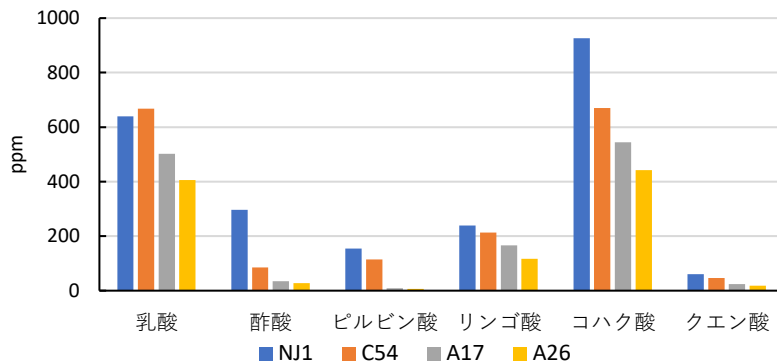


図 6 総米 1kg 小仕込み試験における有機酸生成量

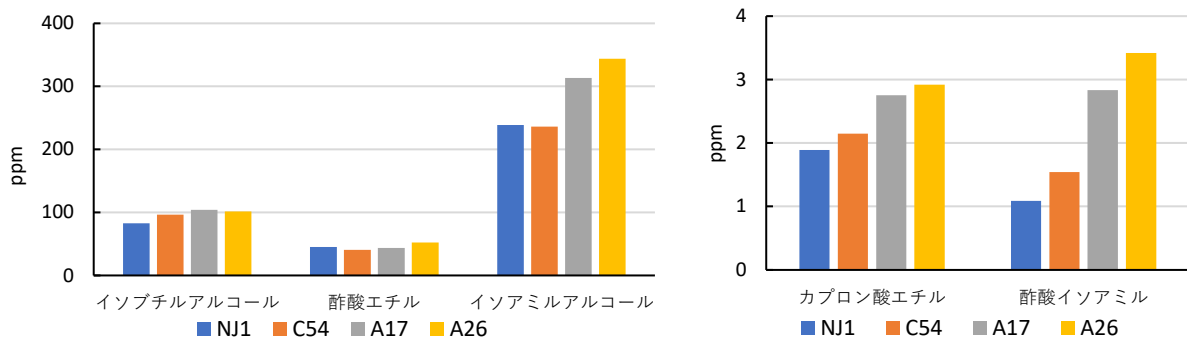


図7 総米 1kg 小仕込み試験における香気成分生成量

4 結論

NJ2 のセルレニン耐性株 75 株のうち 8 株が液体発酵試験で NJ2 の酢酸生成量の 80% 以下に低下した。さらにそのうち 2 株が小仕込み試験で NJ2 の酢酸生成量の 50% 以下に低下した。官能検査の結果より、C54 株を低酸生産性はりま酵母として選抜した。C54 株は、味においては酸が減少したことで飲みやすい酒質へと変化した。香気においては庭酒特有の香りが強く、変化が見られなかった。そのため、はりま酵母の酒質に合う香気成分と考えられるバナナ様香の酢酸イソアミルの生成量の向上を試みた。C54 株のオーレオバシジン耐性株 32 株のうち 9 株が総米 25 g の小仕込み試験で NJ1 と比較して酢酸イソアミル生成量が 1.8 倍以上となった。さらに総米 150 g の小仕込み試験で、NJ1 と比較して酢酸イソアミルの生成量が A17 株で 3.0 倍、A26 株で 2.7 倍となった。その 2 株を三段仕込で総米 1 kg の小仕込み試験に供したところ、NJ1 と比較して酢酸イソアミル生成量が A17 株は 2.6 倍、A26 株は 3.1 倍となった。製成酒の官能評価を行ったところ、どちらの株も NJ1 と比較するとよりフルーティーな庭酒という印象であった。しかし、総米 150 g 規模では A26 株でより渋みを強く感じたが、総米 1 kg 規模では A17 株で渋みを強く感じたため、どちらを酢酸イソアミル高生産性はりま酵母として選抜するかより大規模な清酒醸造試験にて判断する必要がある。

参考文献

- 1) 後藤奈美, 劉宏芳, 石川雄章, 岡崎直人, J. Brew. Soc. Japan. Vol.95, No.7, pp. 533-539 (2000)
- 2) E. Ichikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami and S. Imayasu. Agric. Biol. Chem., 55, pp.2153-2154 (1991)
- 3) T. Takahashi, Y. Ohara, M. Sawatari, and K. Sueno, Journal of Bioscience and Bioengineering, 123, pp.71-77 (2017)

(問合せ先 西村友里)
(校閲 原田知左子)