

有用清酒酵母の開発

羽田野 雄大¹、一松 時生²、大場 孝宏²、末永 光²、満生 慎二³、境 正志³

Selection and breeding of Useful Sake Yeast for Ginjo-Sake Brewing

Hatano Yudai,¹ Tokio Ichimatsu,² Takahiro Oba,² Hikaru Suenaga,² Shinji Mitsuiki,³ Masashi Sakai³

In the case of sake, malic acid ethyl caproate and are considered to be closely associated with good taste and flavor. To development of useful sake yeast for ginjo-shu brewing, we have first isolated yeast strains from sake-mash made at sake breweries in Fukuoka Prefecture. 253 strains isolated were tested on their malic acid-producing activity using koji extract culture medium. By the brewing tests on a small scale, 4 strains (16BY1-10, 16BY2-2, 16BY7-6, 16BY8-9) were selected as high malic acid-producing strains. After UV irradiation, 62 cerulenin-resistant mutants were isolated from these 4 strains. (Serulenin is an inhibitor of fatty acid synthase.) The sake brewing characteristics of each of five mutants were examined by using koji extract culture medium. Finally, 5 mutant strains (15BY14-6-C1, 16BY7-6-C2, 16BY8-9-C1, 16BY8-9-C2, 16BY8-9-C3) were selected as a result of that test. These mutant strains showed high producing ability for malic acid- and ethyl caproate-producing ability, but not enough fermentation ability. Thus, further studies such as hybridization are need to breeding of useful sake yeast.

Key words: Sake yeast, Ginjo-Sake, breeding

1: 緒言

清酒は日本独特の発酵技術を用いて作られている代表的な醸造酒である。古来より品質の安定化や品質の向上化を図るために原料の酒米や水だけでなく清酒麴や清酒酵母を使用した清酒開発が行われている。これにより全国的に安定した造りが可能となり、風味豊かな清酒が増えてきた。

しかし近年の清酒需要は、毎年数%ずつ減少する傾向にあり、今後は更なる減少が懸念されている。その要因として焼酎ブーム、発泡酒や雑酒の人気上昇に加え、若年層の清酒離れと言った問題が挙げられる。

それらの問題を解決するため現在、様々な技術を応用した麴菌や清酒酵母の育種、改良が試みられている。中でも清酒酵母はアルコールを生産するだけでなく、味成分や香気成分も作り出すことが分かっており清酒酵母の開発により特色を持った清酒造りが可能になる。

このような背景のもと、本研究では清酒酵母に着目し、味や香りに富んだ清酒造りを目的として有用清酒酵母の開発、育種を試みた。

2: 実験方法および結果

2-1: リンゴ酸高生産株の取得

2-1-1: 清酒酵母の分離

酒蔵よりサンプリングした清酒もろみを希釈後 YM 培地に塗布し、30℃で3日間培養した。

2-1-2: 有機酸生産能による一次選抜

生育の良いコロニー10株を、それぞれランダムに分離後、30 ml 麴汁培地へ接種し、30℃で3日間発酵させた。3,500 rpm で10 min 遠心分離後、上澄みを0.45 μm フィルターろ過した。有機酸含量をHPLCで分析し、高生産能を示した株を一次選抜した。

2-1-3: 小仕込み試験による選抜

一次選抜した清酒酵母を使用し、三段仕込みで小仕込み試験を行った(もろみ日数21日、発酵温度13℃、総米300g、総水448.5ml)。生成した清酒もろみを上槽し、清酒の有機酸量、エタノール量をHPLCにて分析した。

2-2: リンゴ酸及びカプロン酸エチル高生産株の取得

2-2-1: 前培養

2-1-3 で選抜したリンゴ酸高生産株の一回金耳量を3 ml YPD 培地へ接種し、30℃で1晩振とう培養した。

2-2-2: 本培養

前培養液100 μl を100 ml YPD 培地へ接種し、30℃で1日間振とう培養した。

¹九州産業大学工学研究科

²福岡県工業技術センター生物食品研究所

³九州産業大学工学部

2-2-3: 紫外線照射生存率の測定

本培養液 10 ml を 7 本の遠心管に分注し、3,500 rpm で 10 min 遠心分離後、上澄みを除き、菌体洗浄を行った。10 ml 滅菌水に懸濁し紫外線ランプ(15W、2537A、距離 35 cm)で 0、20、40、60、80、100、120 秒間照射した。各条件の菌液を 10 倍濃縮し、100 μ l を YPD 培地へ塗布し、30 $^{\circ}$ C で 3 日間培養後、コロニー数をカウントし生存率(生存曲線)を算出した(Fig. 1)。生存率 10%以下の照射時間を選抜条件として決定した。

2-2-4: セルレニン耐性株の取得

本培養液 10 ml を 7 本の遠心管に分注し、3,500 rpm で 10 min 遠心分離後、上澄みを除き、菌体洗浄を行った。10 ml 滅菌水に懸濁し、紫外線を決定した時間(80、100、120 秒)照射した。照射液の 10 倍濃縮したものを 1 μ l/ml セルレニン含有 YPD 培地へ塗布し 30 $^{\circ}$ C で 7 日間培養した。

2-2-5: ガスクロマトグラフィーによる選抜

生育した耐性株を 30 ml 麹汁培地へ接種し、30 $^{\circ}$ C で 3 日間発酵させた。3,500 rpm で 10 min 遠心分離後、上澄みをガスクロマトグラフィー(GC)で分析し、カプロン酸エチル高生産株を選抜した。

3: 結果及び考察

清酒酵母のリンゴ酸高生産株の取得を行った結果、もろみ 30 サンプルより 253 株の一次選抜を行い、13 株の有望株を選抜することが出来た。これらを小仕込み試験に供し、生成した清酒の有機酸生産能を HPLC にて解析した結果、菌株ごとの生産能は異なっていることが明らかとなり、16BY1-10、16BY2-2、16BY7-6、16BY8-9 の 4 株をリンゴ酸高生産株として選抜した(Fig. 2)。中でも 16BY8-9 ではエタノール生産量は親株(K-9)と同等でリンゴ酸生産能は 2.6 倍という値を示した。

選抜したリンゴ酸高生産株を使用し、紫外線照射での突然変異誘発によるセルレニン耐性株の取得を行った結果、62 株のセルレニン耐性株を取得することが出来た。62 株の麹汁培養液の香り成分をガスクロマトグラフィーにて解析した結果 15BY14-6C1、16BY7-6C1、16BY8-9C1、16BY8-9C2、16BY8-9C3、の 5 株をカプロン酸エチル高生産株として選抜した(Fig. 3)。しかしながら、これら 5 株のリンゴ酸生産能およびエタノール生産能を解析した結果、対照株との差が見られず、リンゴ酸高生産能とエタノール生産能が低下していることが明らかとなった。紫外線照射に伴い、他の部位にまで変異が起こったものと考察した。

今後は、一倍体接合法による酵母の育種を試みるなどして(Fig. 4)、引き続き有用清酒酵母の開発、育種を進めていきたい。

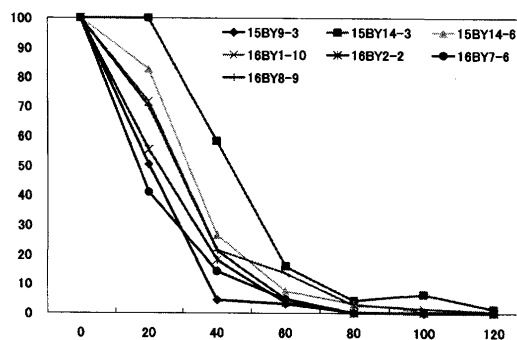


Fig. 1 紫外線照射による生存曲線

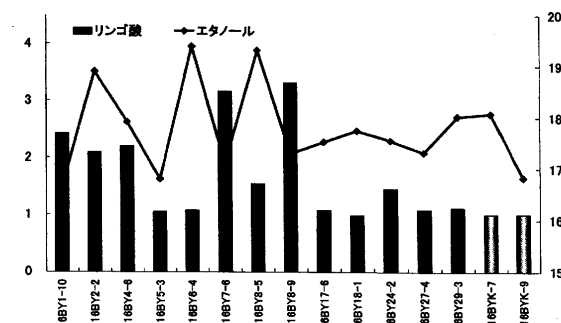


Fig. 2 選抜株のリンゴ酸生産能

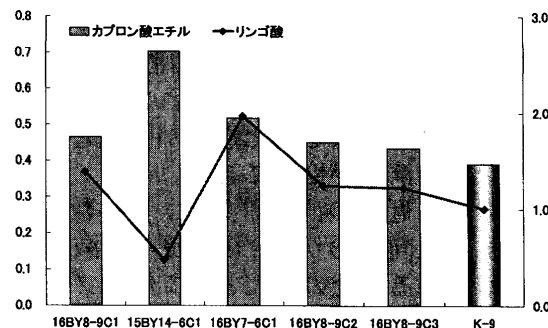


Fig. 3 カプロン酸エチル及びリンゴ酸生産能

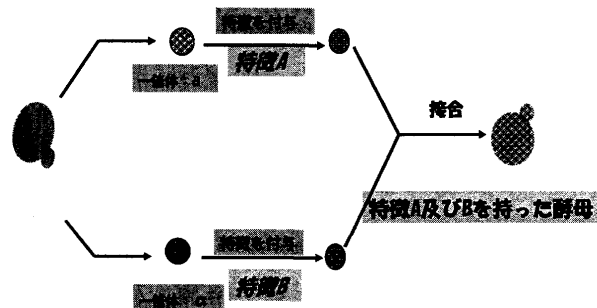


Fig. 4 一倍体接合法による清酒酵母の開発

参考文献

浅野忠男, 黒瀬直孝: 清酒酵母の有機酸生成について, 日本醸造協会誌, 95, 227-234 (2000)