

吟醸酵母の開発と利用

深谷伊和男・大倉鎮夫・久野敦史*

幅 靖志・大島克己・岡田安司

酵母は、清酒製造におけるもろみ発酵のコントロールのしやすさとか、製成酒の品質形成上非常に重要な要因である。特に最近ブームとなっている吟醸酒などの淡麗辛口の高品質酒を製造する際には酵母の選択が大きな影響を与える。

平成4年4月1日には、それまで半世紀間続いた級別制度が廃止され、いよいよ中味中心の清酒新時代が到来しており、清酒メーカーにとっては、酵母、米、水などの素材をよく吟味したコンセプトのある酒造りが強く要求されている。このような流れの中で固有の素材を持つことは清酒の個性化、物語性の創成などの観点から重要である。

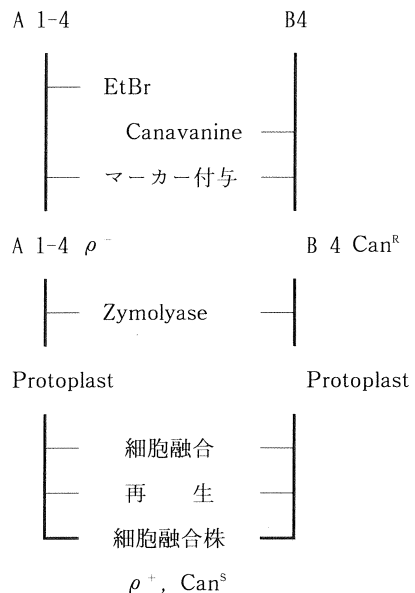
以上の理由から、本研究では愛知県固有の吟醸酵母の開発および実用化に関する検討を行った。

実 験 方 法

1. 酵母の育種

当センター保存の2種類の吟醸酵母、酸生成能が低く、香気バランスがやや不良の泡なし酵母A1-4株とやや酸生成能は多いが、香気バランスの良好な泡あり酵母B4株を親株として、細胞融合法によって酸生成能が低く、香気バランスのよい吟醸酵母を育種する。その育種プログラムを第1図に示す。

1-1. マーカー付与 細胞融合確認のために親株にマーカー（標識）の付与を行った。その際A1-4株には呼吸欠損の性質を付与し、B4株にはアルギニンのアナログであるカナバニンに対する耐性を付与した。A1-4株の呼吸欠損株化は次のように行った。A1-4株をYPD培地（1%酵母エキス、2%ポリペプトン、2%グルコース、



第1図 育種プログラム

*伊東合資会社

0.04%硫酸アデニン, pH5.6) で30℃, 1夜培養後, 培地中に臭化エチジウム (E t B r) を40 μ g/mlとなるように添加して1夜変異処理を行い, つぎにY P A D寒天プレートに蒔き培養した。出現したコロニーについて, T T C寒天プレート (下層: 0.15%酵母エキス, 0.2%ポリペプトン, 1%グルコース, 0.1% K H₂ P O₄, 0.04% M g S O₄, 3%寒天, pH5.6および上層: 0.5%グルコース, 0.05% T T C, 1.5%寒天, pH5.6) を用いてT T C染色を行い, 白色コロニー (T T C⁻) を呼吸欠損株 (ρ) として取得した。さらにY P E G培地 (1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%グリセロール, pH5.6) を用いて培養を行い, グリセロール資化性のないことを確認した。

B 4株のカナバニン耐性化は次のように行った。B 4株をまずY N B培地 (0.67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acid, 2%グルコース, pH5.6) を用いて, L-カナバニン50 μ g/mlで, 30℃1日培養し, さらに70 μ g/ml, 100 μ g/mlで培養を行って, カナバニン耐性の自然変異株を取得した。

1-2. プロトプラスト化 マーカー付与菌株をそれぞれにY P A D培地で30℃, 1夜前培養した後, 培養菌液100 μ lを25mlの同培地に接種して30℃で15時間振とう培養を行い, 集菌後4mlの10mMトリス緩衝液, pH7.4で3回洗浄した。つぎに4mlのS T溶液 (1Mソルビトール/10mMトリス緩衝液, pH7.4) に懸濁して, 10mlの60mM E D T A · 0.2% 2-メルカプトエタノール混液を加えて, 30℃で10分間処理後S T溶液で洗浄した。つぎに4mlの溶菌酵素液 (10mg Zymolyase 100T/100ml S T溶液) に懸濁し, 30℃で振とうして, A 1-4株は20分間, B 4株は75分間処理を行い, プロトプラスト化を図った。

1-3. 細胞融合 2,000rpm, 5分間遠沈して集菌後, 1mlのS T C溶液 (1Mソルビトール, 50mM C a C l₂/10mMトリス緩衝液, pH7.4) に懸濁して30℃, 15分間振とうした。集菌後P T C溶液 (30% P E G6000, 50mM C a C l₂/10mMトリス緩衝液, pH7.4) に懸濁した。つぎにプロトプラスト懸濁液の濃度をそれぞれ5 \times 10⁷ c e l l/mlレベルに調整し, 両液1mlを混合して30℃, 20分間振とうしながら細胞融合を図った。

1-4. 再生 集菌後5mlのS T C溶液で洗浄して, 同溶液で希釈後, 200 μ lを再生培地 (0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acid, 2%グルコース, 1Mソルビトール, 2%寒天, pH5.6) に蒔き, 1%寒天の再生培地を重層して30℃, 7日間培養を行い再生を図った。

1-5. 1次スクリーニング 再生培地上には多くのコロニーが出現するが, A 1-4株とB 4株の細胞融合株では, 呼吸能は復帰し, 劣性遺伝形質であるカナバニン耐性は消失してカナバニン感受性となるはずである。したがって再生培地に出現した菌株の中から, T T C (Triphenyl Tetrazolium Chloride) 染色で赤色 (T T C⁺) を示し, Y E P G培地で生育して呼吸能を持ち, かつ100 μ g/mlカナバニンを含むY N B培地で生育できないカナバニン感受性株を分離した。

2. 2次スクリーニング

1次スクリーニングで分離した細胞融合株について20mlのY M培地 (0.3%酵母エキス, 0.5%ポリペ

プトン, 0.3%麦芽エキス, 5%グルコース, pH5.6) で30℃, 2日間培養して, 培養液の酸度を測定し, ヘッドスペース¹⁾法により香氣成分の測定を行い, 酸生成能および香氣生成能の検討を行った。また泡なし酵母検定培地 (0.1%酵母エキス, 0.1%ポリペプトン, 5%シュクロース, 0.15%KH₂PO₄, 0.1%(NH₄)₂SO₄, 0.1%MgSO₄·7H₂O, 0.1%Tween80, 1.5%寒天, 50μg/mlポンソーR, 20μg/mlアニリンブルー, pH5.6) で染色を行って泡形成能の有無を判定した。

3. 小規模仕込試験

第1表に示す仕込配合により, 分離した細胞融合株を用いて総米150gの小規模仕込試験を行った。米は若水の50%白米を使用した。もろみは最高温度10℃で22日間の発酵を行った。成分分析を行い, その結果から最も有望と考えられる酵母を選択した。

第1表 小規模仕込試験の仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	計
総米 (g)		25	45	80	150
掛米 (g)		17	35	68	120
麴米 (g)		8	10	12	30
汲水 (l)	10	40	55	110	215

4. 中間規模仕込試験

小規模仕込試験で選んだ酵母を用いて, 第2表に示す仕込配合で, 総米100kgの中間規模仕込試験を行った。

第2表 中間規模仕込試験の仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	追水	アル添	計
総米 (kg)	3.5	13.5	30	53			100
掛米 (kg)	2.5	9.5	22	44			78
麴米 (kg)	1.0	4.0	8	9			22
汲水 (l)	4.0	12.0	38	81	10		145
36%Alc (l)						30	30

5. 実用規模仕込試験

中間規模仕込試験に用いた酵母を使用して第3表に示す仕込配合で実用規模仕込試験を行った。

第3表 実用規模仕込試験の仕込配合

	酒母	初添	仲添	留添	アル添	計
総米 (kg)	45	75	140	240		500
掛米 (kg)	30	50	100	200		390
麴米 (kg)	15	25	30	40		110
汲水 (l)	55	80	170	370		675
40%Alc (l)					120	120

6. もろみの成分分析

ボーメ・日本酒度，アルコール（E t O H），酸度（A c i d），アミノ酸度（A . A c i d）は国税庁所定分析法に準じて測定した。紫外外部吸収値（U V）はもろみろ液の25倍希釈液の260nmにおける吸光度を測定した。全糖（T S）はフェノール硫酸法により，グルコース（G l u）はグルコスタット法により，ピルビン酸（P y r）はF-キット法により測定した。もろみ中の残存酵素力価については， α -アミラーゼ（A A a s e）は国税庁所定分析法に準じ，グルコアミラーゼ（G A a s e），酸性プロテアーゼ（A P a s e）は岩野らの方法²⁾に準じて測定した。香気成分は，ヘッドスペース法¹⁾によりイソアミルアルコール（i A m O H），酢酸イソアミル（i A m O A c），およびカプロン酸エチル（E t O C a p）を測定し，イソアミルアルコールに対する酢酸イソアミルの比の100倍値であるE/Aを算出した。

7. ピルビン酸生成

最終的に選択した細胞融合株について，親株およびK901，K7，K1001，K9など他の酵母を対照として，8%グルコースを含むY P A D培地で30℃で培養を行い，ピルビン酸生成の比較検討を行った。

実験結果および考察

1. 1次スクリーニング

再生培地には105菌株が生育し，その中からT T C染色で赤色（T T C⁺）を呈しグリセロール資化性を有し，100 μ g/mlカナバニンを含むY N B培地に増殖しない菌株，すなわち呼吸能を有しカナバニン感受性の性質を持つ細胞融合株8菌株が分離された。

2. 2次スクリーニング

1次スクリーニングで分離した8菌株についてY M培地で30℃，2日間培養を行った。その際の酸生成を第4表に示し，香気成分生成を第5表に示す。酸度は親株A 1-4では1.55ml，B 4株では1.99mlであったが，細胞融合株では1.60~1.65mlと両親株の中間値を示した。香気成分生成については，親株A 1-4株はイソアミルアルコール（i A m O H）を169.8ppmと多く生成し，親株B 4は88.3ppmと少なく生成したが，細胞融合株は123.4~130.6ppmと両親株の中間値を示した。またポンソーR染色では8菌株とも赤紫色ではなく青紫色を呈したので，泡形成能を有するものと判定した。

第4表 酵母の酸生成

酵 母	酸 度 (ml)
A 1-4	1.55
B 4	1.95
F u - 1	1.60
F u - 2	1.60
F u - 3	1.65
F u - 4	1.65
F u - 5	1.65
F u - 6	1.65
F u - 7	1.65
F u - 8	1.60

Y M Med 30℃ 2 Day

第5表 酵母の香気成分生成

酵 母	香 気 成 分			
	iAmOH(ppm)	iAmOAc(ppm)	E/A	EtOCap(ppm)
A 1-4	169.8	0.59	0.35	0.56
B 4	88.3	0.68	0.77	0.52
F u - 1	126.1	0.78	0.62	0.53
F u - 2	126.1	0.57	0.45	0.65
F u - 3	128.4	0.63	0.49	0.58
F u - 4	127.3	0.79	0.62	0.56
F u - 5	125.6	0.62	0.50	0.48
F u - 6	123.4	0.71	0.57	0.61
F u - 7	130.6	0.71	0.55	0.44
F u - 8	126.7	0.87	0.68	0.44

YM Med 30℃ 2 Day

3. 小規模仕込試験

総米150gの小規模仕込試験を行ったところ、いずれの菌株の場合も順調なもろみ経過を示したが、22日目のもろみの成分は第6表のごとくとなった。親株A1-4株では、1) 日本酒度が-3.5と発酵の進行が速い、2) 酸度は1.95mlとB4株に比べて低い、3) アミノ酸度は1.05mlと普通である、4) アルコールは15.0%と普通である、5) 香気成分生成は、イソアミルアルコール(iAmOH)が249.4ppm、酢酸イソアミル(iAmOAc)が8.29ppmとかなり多く生成され、E/Aは3.33とやや高く、カプロン酸エチル(EtOCap)も1.82ppmとやや多く生成された。一方B4株では、1) A1-4に比べてやや発酵が遅く、日本酒度は-9.0である、2) 酸度は高く2.45mlである、3) アミノ酸度は1.35mlとやや高い、4) アルコール生成は14.6%とA1-4株に比べてやや低い、5) 香気成分生成は、イソアミルアルコールが117.2ppm、酢酸イソアミルが2.59ppm、E/Aが2.21、カプロン酸エチルは1.57ppmとなり、A1-4株に比べて総じて香気成分は少ないが、官能的な香気バランスはよかった。細胞融合株の8菌株では、1) 日本酒度は-6.0~-9.0、2) 酸度は2.10~2.60ml、3) アミノ酸度は1.05~1.30ml、4) アルコールは14.5~14.7%、5) 香気生成はイソアミルアルコールは111.4~122.0ppm、酢酸イソアミルは3.10~3.59ppm、E/Aも2.59~2.99でB4株よりやや多く、カプロン酸エチルは1.59~1.96ppmであった。第6表の結果より、F u - 6株が最も酸生成が少なく、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル生成の多い菌株と認められた。

4. 中間規模仕込試験

小規模仕込試験の結果よりF u - 6株を用いて総米100kgの中間規模仕込試験を行った。その際のもろみ成分変化を第7表に示す。1) もろみ経過は順調で、泡の低いもろみとなり、ポーメ・日本酒度の切れもよく、アルコールもアル添前で15.2%と普通であった。2) 酸度は、発酵終期で1.60mlであり、アミノ酸度も1.00ml、紫外部吸収値も0.240と普通であった。3) 全糖濃度はあまり高くならず、蒸米溶

吟醸酵母の開発と利用

第6表 小規模仕込試験のもろみ成分

(22日目)

酵母	固形分率 %	日本酒度	Acid ml	A.Acid ml	EtOH %	iAmOH ppm	iAmOAc ppm	E/A	EtOCap ppm
A 1-4	46.9	-3.5	1.95	1.05	15.0	249.4	8.29	3.33	1.82
B 4	46.9	-9.0	2.45	1.35	14.6	117.2	2.59	2.21	1.57
F u-1	50.3	-7.5	2.20	1.15	14.6	121.0	3.59	2.97	1.75
F u-2	46.9	-8.0	2.20	1.20	14.5	114.6	3.10	2.71	1.70
F u-3	49.9	-8.0	2.25	1.05	14.7	121.9	3.23	2.65	1.59
F u-4	49.7	-7.0	2.45	1.20	14.5	119.6	3.47	2.90	1.72
F u-5	48.7	-7.0	2.20	1.20	14.5	122.0	3.59	2.94	1.77
F u-6	45.7	-6.0	2.10	1.15	14.6	119.3	3.57	2.99	1.96
F u-7	40.3	-7.0	2.60	1.30	14.5	111.4	3.22	2.89	1.72
F u-8	48.0	-9.0	2.45	1.30	14.6	120.4	3.12	2.59	1.70

Acid：酸度，A. Acid：アミノ酸度，EtOH：アルコール，iAmOH：イソアミルアルコール
iAmOAc：酢酸イソアミル，E/A：iAmOAc/iAmOH×100，EtOCap：カプロン酸エチル

第7表 中間規模仕込試験のもろみ成分変化

酵母 F u - 6

日数 日	温度 ℃	状 ぼ う 操 作	固形分率 %	ボーメ 日本酒度	EtOH %	Acid ml	A.Acid ml	UV OD260	TS mg/ml	Glu mg/ml	Pyr ppm	iAmOH ppm	iAmOAc ppm	E/A	EtOCap ppm
初添	11.5														
踵	12.5		—	9.4	—	1.50	0.55	—	—	—	—	—	—	—	—
仲添	8.6														
留添	5.5														
2	6.3		75.7	5.0	—	0.80	0.20	0.088	133.4	48.8	89.9	—	—	—	—
3	6.8	筋泡													
4	7.0	水泡	72.6	5.6	—	0.90	0.35	0.104	149.5	57.3	115.5	—	—	—	—
5	7.1	泡 1cm													
6	7.5	泡 3cm	70.8	5.6	4.2	0.95	0.35	0.124	143.3	55.1	187.9	49.1	0.36	0.73	0.55
9	7.8		66.4	4.8	5.8	1.15	0.40	0.148	128.8	46.6	265.1	63.9	0.72	1.13	0.75
12	8.8		61.0	3.4	8.8	1.25	0.60	0.200	108.7	32.8	299.5	77.0	0.84	1.09	0.88
14	9.0	渋泡													
15	8.7		53.6	-20.0	12.1	1.50	0.80	0.212	87.4	21.1	297.8	97.3	1.57	1.61	1.28
16	8.0														
18	6.4	水 10 l	51.5	-11.5	13.5	1.65	0.95	0.232	80.6	15.4	228.0	106.3	1.54	1.45	1.54
21	6.0		48.3	-8.0	13.7	1.55	0.95	0.228	79.4	14.8	225.4	116.1	1.83	1.58	1.76
24	6.0		46.1	-4.0	14.6	1.60	1.00	0.232	73.0	12.0	203.6	119.4	1.97	1.65	1.98
27	5.6		45.3	0	15.0	1.60	1.05	0.244	51.1	10.2	176.6	120.9	2.03	1.68	2.03
29	5.6	Ale 30 l	—	+1.0	15.2	1.60	1.00	0.240	49.5	9.9	166.6	125.7	2.18	1.73	2.23
30		検定		+8.0	17.1	1.30	0.85	0.220	52.3	9.8	139.5	113.4	2.04	1.80	2.05

解状態もよくグルコース濃度も発酵終期まで適切に保たれていた。4) ピルビン酸生成も多く順調であった。5) 香氣成分生成については、イソアミルアルコール，酢酸イソアミル，E/Aはあまり高くなかったが，カプロン酸エチルはよく生成され，もろみ終期に2.23ppmとなった。

5. 実用規模仕込試験

F u - 6 株を用いて総米500kgの実用規模仕込試験を行った結果を第8表に示す。発酵経過は順調で，もろみ終期の酸度は1.35mlと低く，香氣成分生成ではカプロン酸エチルが2.9ppmと高い良質な吟醸酒が製成された。

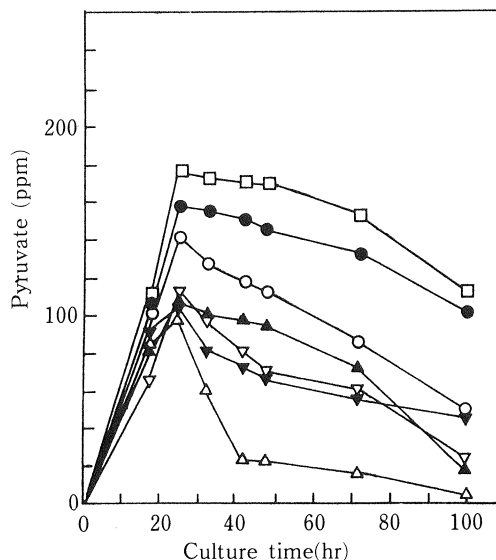
第8表 実用規模仕込試験のもろみ成分変化

酵母 Fu-6

日数 日	温度 ℃	状ぼう	ポー メ 日本酒度	EtOH %	Acid ml	ml	UV OD260	TS mg/ml	Glu mg/ml	Pyr ppm	AAase U/ml	GAase U/ml	APase U/ml	iAmOac ppm	ppm	E/A	EtOCap ppm
初添	11.5																
踊	12.5		9.9		1.20												
仲添	7.5																
留添	5.0																
2	6.0																
3	6.7																
4	6.9		5.0		0.45		0.040	104.5	54.1	81.3	5.5	14.2	41.4				
5	7.0		6.3		0.55		0.060	134.7	56.8	130.0	4.8	16.1	104.1				
6	7.5	水泡	6.0		0.70												
7	7.6																
8	8.3		5.6		0.80	0.30	0.096	103.0	48.6	196.0	44.2	18.4	145.4	33.0	0.3	0.8	0.2
9	9.0	泡															
10	9.3		5.4	5.7	0.85												
11	9.5	落泡															
12	9.6		4.3	7.8	1.00	0.35	0.132	100.0	35.1	181.0	38.0	15.2	125.4	41.5	0.9	2.1	0.7
13	9.8	玉泡	4.0	8.3	1.05	0.60											
14	9.5		3.5														
15	9.5		-28.0	10.5	1.20	0.70	0.140	86.7	22.9	170.0	34.3	14.2	80.1	79.0	1.7	2.2	1.4
16	9.0		-24.0	11.0	1.30	0.80											
17	8.6		-23.0														
18	8.3		-18.5	12.0	1.35	0.75	0.148	76.0	18.5	135.0	17.2	15.0	66.7	89.7	2.1	2.4	2.0
19	7.5		-14.5	12.3	1.35	0.70											
20	7.0		-13.0	12.6	1.40	0.70	0.144	68.9	14.1	138.0	11.0	14.8	64.1	106.6	2.5	2.3	2.3
21	6.4																
22	6.2		-11.0	13.1	1.30	0.90											
23	6.1																
24	6.1		-8.0	13.6	1.40	0.80	0.156	61.6	13.7	122.5	9.6	15.0	61.4	109.8	2.6	2.3	2.7
25	5.4		-6.0	14.0	1.35	0.90											
26	4.7		-5.0	14.4	1.35	0.90											
27	4.1		-4.0	14.5	1.30	0.90	0.148	70.2	12.0	101.0	5.3	11.9	42.7	113.4	2.7	2.4	2.6
28	3.8		-4.0	14.6	1.40	0.85											
29	4.2		-2.0	14.8	1.35	0.90											
30	4.2		-2.0	15.2	1.35	0.95											
31	4.0		-1.0	15.3	1.35	1.00	0.136	63.7	10.7	83.0	3.0	10.8	30.7	114.7	2.8	2.5	2.8
32	5.0		0	15.3	1.35	1.00	0.156	54.0	9.8	73.0	1.8	9.6	30.7	115.6	2.9	2.5	2.9
検定			+7.0	17.3	1.20	0.85	0.140	49.6	8.4	57.0	1.2	9.4	18.7	108.1	2.4	2.2	2.6

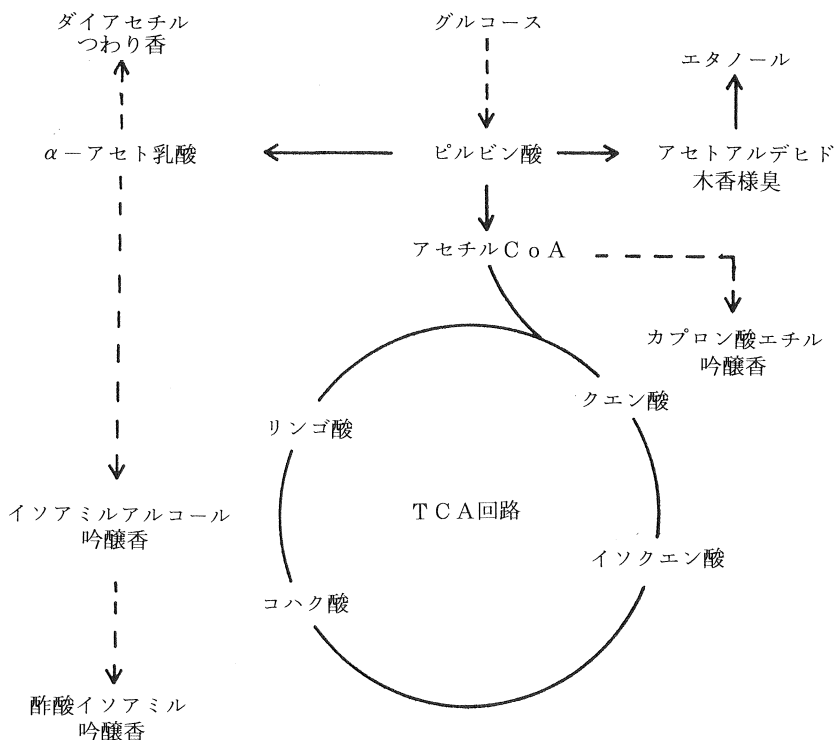
6. ピルビン酸生成

ピルビン酸生成を第2図に示す。親株A 1-4株、B 4株とも他の酵母に比べてピルビン酸をよく生成したが、Fu-6株は親株よりもさらに多く生成した。ピルビン酸は第3図に示すように、酵母の代謝系において、アルコール、酸、香气生成における鍵物質であるが、吟醸酒製造においてピルビン酸レベルが高いことは酵母の生理活性が高くもろみ後期において、低温で香气成分生成を促進する際に、それだけ香气成分がよく生成されることを意味する。したがって高いピルビン酸生成能を有するFu-6株は吟醸酵母として非常に有望と考えられる。



第2図 酵母のピルビン酸生成

- A 1-4 ● B 4 □ Fu-6
- ▲ K 7 △ K 1001 ▼ K 9 ▽ K 901



第3図 酵母の代謝系

要 約

当センター保存の2種類の吟醸酵母、酸生成が低く、やや香氣成分生成が不良な泡なし酵母A1-4と酸生成はやや多いが、香氣成分生成が良好な泡あり酵母B4株を親株として、細胞融合法によって、酸生成能が低く香氣生成能の良好な吟醸酵母の育種を試みた。その結果8株の細胞融合株が得られ、その中でもFu-6株が最も酸生成能が低く、香氣成分であるカプロン酸エチルの生成能が高いことが判明した。つぎにFu-6株について、総米100kgの中間規模仕込試験さらに総米500kgの実用規模仕込試験を行った結果、低酸度でカプロン酸エチル生成の高い良質な吟醸酒が製成された。またFu-6株について香氣成分に関与するピルビン酸の生成を比較すると他の既存酵母に比べて高いことが判明した。

文 献

- 1) 吉沢淑：日醸協誌，68，59-61(1977)
- 2) 岩野君夫，風間敬夫，布川弥太郎：日醸協誌，71，383-386，792-795(1976)