

清酒醸造用酵母の育成と特性

久保義人*・稲木幸夫**・安田智慧子*

Breeding and Properties of Sake Brewing Yeast

Yoshito KUBO, Yukio INAKI and Chieko YASUDA

清酒の品質向上を目的として、香气成分生産性を主な指標とした清酒醸造用酵母の育成を行った。県内清酒製造場のもろみより分離した株をもとに、自然変異株の選抜を主な手法として育成に取り組んだ結果、FK-214a, FK-3a, FK-301 の 3 株を取得した。

3 株とも、日本醸造協会 14 号酵母に比べて高い香气成分生産性を示した。FK-214a は酸度が低く、香气成分生産性が最も高い。FK-3a は酸度が高く、旺盛な発酵力を示す。FK-301 は FK-3a の泡なし変異株で、FK-3a の特徴を有しながら酸度が低下している。

Key Words : 清酒, 酵母, 新品種

I. 緒言

清酒の品質や特徴は、原料米の品種や精米歩合、原料処理の良否、麹菌や酵母の種類、発酵経過等の要因に影響される。その中でも酵母の種類は、酒の主体であるエタノールはもとより、香气成分や有機酸の生成に大きく関与している。このことから、現在の清酒醸造では、日本醸造協会が頒布する協会酵母をはじめ、各企業や自治体が独自に開発したものなど多種多様の酵母が、製品の差別化や多様化を図る目的で使用されている¹⁾。福井県においては、これまで県独自の酵母は存在せず、その育成が期待される場所であった。このような状況を背景に、県産清酒の品質向上を目的として、県独自の清酒醸造用酵母の育成に取り組んだ。

清酒酵母は孢子形成能が殆どなく、無性世代での出芽増殖を主な生活環とする。このため、交配による育種が困難であり、薬剤等の変異原を使用した変異処理法が育種手段として使用されている。しかしながら、変異処理法は変異導入部位および頻度のコントロールが困難であり、目的以外の遺伝子に変異がおこり、酵母が元来有していた醸造特性に悪影響を与える恐れがある。清酒には、酵母の代謝産物の大部分が含まれるため、僅かな変化が酒質に大きく影響する。これらのことから、今回の育種にあたっては変異原による変異処理は行わず、自然に変異を起こした株の選抜を主な手法とし、清酒としてのバランスを重視した育成を行った。

II. 実験方法

1. 使用培地

通常の培養には、YPD 培地(2%グルコース, 2%ペプトン, 1%酵母エキス)を使用した。酵母の分離には、AP 培地(1.17%イーストカーボンベース, 4%ショ糖, 0.1%酵母エキス, 0.5%L-メチオニン, 0.0025%アニリンブルー, 0.005%ポンソー 2R)を使用した。カナバニン耐性株の分離には、CAN20 培地(2%グルコース, 0.67%イーストナイトロジェンベース アミノ酸不含, 20ppm L-カナバニン)を使用した。各培地での平板培養の際には、2%寒天を添加しプレートとした。

2. 酵母の分離とカナバニン耐性株の選抜

神田らの知見²⁾をもとに、福井県内 8 清酒製造場の 23 本のもろみより酵母の分離を行った。清酒もろみを適宜希釈して AP プレートに塗布し、コロニーを形成させた。もろみに使用した酵母を対照として、AP プレート上で色調の異なるコロニーを選抜した。選抜株を CAN20 培地に植え継ぎ、生育する株をカナバニン耐性株とした。

3. 小仕込試験

総米 200g の小仕込試験は、難波らの方法³⁾に従った。総米 10g の小仕込試験は、難波らの方法を一部改変し、麹歩合 20%の一段仕込とし、汲水歩合は 130%とした。両仕込とも、麹には凍結麹を、掛米は α 米を使用し、初発菌数が汲水あたり 1×10^7 cells/ml となるように供試株を添加した。比較対象には、(財)日本醸造協会の協会 9, 10, 14 号酵母を使用した。上槽は遠心分離により行い、使用原料の精米歩合および発酵温度は、試験の目的に応じて個々に設定した。

* 福井県農業試験場 食品加工研究所

** 現 ふじや食品株式会社

4. 清酒成分の分析

一般分析は、国税庁所定分析法注解¹⁾に従った。香氣成分分析はヘッドスペース法を用いたガスクロマトグラフ(島津製作所製, GC-15A)を使用し、内部標準にn-アミルアルコールおよびカブロン酸メチルを使用した。有機酸分析には有機酸分析システム(島津製作所製)を使用した。

5. 低温発酵性の改良

供試株を10ml YPD培地に接種後、30℃にて振とう培養した。培養終了後、培養液の一部を新たな培地に植え継ぎ、同条件で培養した。この操作を10回繰り返すことにより自然変異を誘発した後、YPDプレート上で10℃にてコロニーを形成させた。生育の良好なコロニーを選び、低温発酵性改良株として選抜した。

6. 泡なし変異株の分離

大内らのFroth flotation法²⁾に準じて以下のように行った。供試株を10mlの麴エキス培地に接種し、30℃にて静置培養した。対数増殖後期～定常期に達したときに(1~5×10⁷cells/ml)空気を吹き込み、気泡吸着性のある酵母を、生じる泡とともに培養管外にあふれさせた。培養液容量が約1mlとなった時点で通気を停止し、残った培養液5~100μlを新しい培地に接種した。この操作を10回繰り返した後、希釈平板法にて培養液より酵母を純粋分離し、泡なし変異株とした。

7. 育成株の電気泳動的核型解析

供試株をアガロースゲルブロック中で溶菌・除タンパクして高分子DNAを調製し³⁾、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)に供した。PFGE装置はCHEF-DR II(パイオラッド社製)を使用し、ゲル濃度1%、電圧200V(6V/cm)、スイッチタイム60~120秒、緩衝液0.5×TBE、泳動時間24時間の条件で泳動した。泳動後の染色には、エチジウムブロミドを使用した。標準試料には、DNA Size Standards・Yeast Chromosomal(パイオラッド社製)を使用した。

Ⅲ. 育成経過

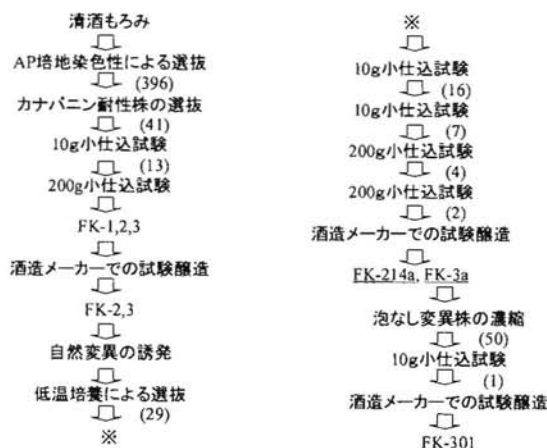
育成の概略を、第1図に示す。

1. 目標形質の設定

育成に先立ち、県内酒造業者を対象に、目標形質に関する意向調査を行った。その結果、大部分が「吟醸香を多く作る」というものであった。吟醸香の主成分は、酢酸イソアミルとカブロン酸エチルであることはすでに明らかとなっているので、この2成分の高生産性を目標形質とした。

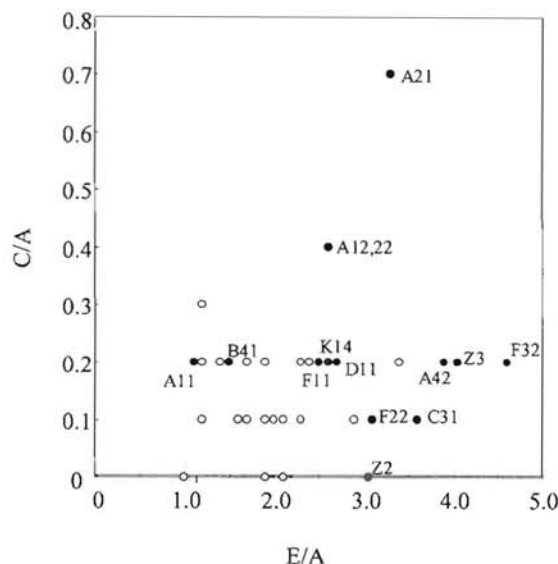
2. 酵母の分離とカナバニン耐性株の選抜

平成5酒造年度(平成5年7月~平成6年6月)に、福井県内8清酒製造場の23本のもろみより、AP培地上



第1図 FK-214a, 3a, 301の育成経過

図中()内は、各段階での選抜株数を示す。



第2図 もろみ分離株のE/A-C/Aプロット

E/A= 100×酢酸イソアミル/イソアミルアルコール

C/A= 100×カブロン酸エチル/イソアミルアルコール

で使用酵母と異なる色調を示す396株の酵母を分離した。次に、カナバニン耐性を指標として、香氣成分生産能が増加した株を選抜した。分離株をCAN20培地に植え継いだところ、396株中41株が生育を示した。そこで、この41株をカナバニン耐性株として選抜した。

3. 選抜株の小仕込試験

選抜した41株を使用して、総米10gの小仕込試験による選抜を行った。選抜に際しては、清酒の主要香氣成分である酢酸イソアミルおよびカブロン酸エチルに着目し、E/A比(イソアミルアルコール含量に対する酢酸イソアミル含量の割合)およびC/A比(イソアミルアルコール含量に対するカブロン酸エチル含量の割合)を指標

第1表 小仕込試験酒の成分分析

strain	CO ₂ 減量 (g)	EtOH (%)	酸度	アミノ酸度	E/A ¹⁾	C/A ²⁾	評点 ³⁾		
							香	味	総合
K-14	70.8	20.7	2.4	1.6	1.8	0.2	2.0	2.0	2.0
A11	70.7	20.8	3.2	1.7	1.4	0.3	2.2	2.3	2.2
A12	69.9	21.2	2.6	1.6	1.8	0.3	1.9	1.9	2.0
A21	70.4	20.5	2.0	1.8	1.7	0.7	1.7	1.9	2.1
A22	69.8	20.9	2.0	1.6	2.3	0.8	1.6	1.6	1.9
A42	68.2	21.1	2.4	1.7	2.3	0.2	2.0	2.1	2.2
B41	68.7	20.6	2.1	1.8	1.4	0.2	1.9	1.9	2.1
C31	69.0	20.9	2.6	1.4	2.4	0.2	2.2	2.5	2.5
D11	70.0	20.8	2.9	1.5	1.7	0.2	2.0	2.2	2.2
F11	72.2	21.9	2.6	2.0	2.0	0.2	1.8	1.9	2.0
F22	68.2	21.1	2.3	1.6	1.6	0.2	1.3	1.9	1.9
F32	67.3	20.5	2.9	1.5	2.3	0.2	1.9	2.1	2.2
Z2	67.8	21.0	2.6	2.0	3.0	0.3	1.8	1.9	1.9
Z3	62.5	19.7	2.0	1.9	2.4	0.6	1.9	1.6	1.8

- 1) E/A = 100 × 酢酸イソアミル/イソアミルアルコール
 2) C/A = 100 × カプロン酸エチル/イソアミルアルコール
 3) 3点法. 1: 良い, 2: 普通, 3: 悪い

とした。第2図に、分離株のE/A-C/Aプロットを示す。協会14号酵母(K-14)に対して異なる香氣成分生産性を示す13株を選抜した。

選抜株はさらに、総米200gの小仕込試験による選抜に供した。選抜の指標として、E/A、C/A値の他に酸度およびきき酒評価も加えた。製成酒の分析結果を、第1表に示す。炭酸ガス減量およびエタノール濃度に関しては大差が見られないが、他の成分には菌株ごとの差が観察された。各種分析値をもとにZ2、Z3、F22の3株を選抜し、それぞれFK-1,2,3と命名した。FK-1はE/A比が高く、FK-2はC/Aが高く酸度が低い、FK-3はきき酒による香りの評価が高い等の特徴を有していた。

4. 低温発酵性の改良

県内の酒造メーカーにおいて、FK-1,2,3株を使用した試験醸造を行い、製造担当者に意見を求めたところ、FK-1,3株では酸度の高さが、FK-1,2株では成育の遅さや低温域での発酵の弱さが指摘された。これらの指摘を基に、FK-1,2株の低温発酵性の改良に取り組んだ。

最初に、自然変異を誘発させるために、10 mlのYPD培地にて10回植え継ぎを行った後、10℃にてコロニーを形成させた。大きいコロニーを約30株選択し、再度10℃での生育を観察した。良好な生育を示す株を29株(FK-1由来14株、FK-2由来15株)選抜し、10gの小仕込試験に供した。小仕込試験の発酵温度は10℃一定とし、28日目に上槽した。発酵の程度を示す炭酸ガス減量を指標とし、FK-1,2に比べて炭酸ガス減量が大きく、E/AおよびC/Aが低下していない株を16株(FK-1由来8株、FK-2由来8株)選び、上槽前に各もろみから分離した酵母を選抜株とした。

次に、選抜した16株にFK-3を加えて、再度10gの小仕込試験を行った。発酵温度は前回と同様の10℃一

定とし、発酵が終了した時点で6℃まで温度を下げ10日間放置後、もろみから酵母を分離した後に上槽した。選抜指標は前回と同様とし、6株(FK-1由来3株、FK-2由来3株)を低温発酵性改良株として選抜した。なお、FK-3についても上槽前もろみからの酵母分離を行い、低温発酵性を強化したFK-3aを取得した。

第2-1表 小仕込試験酒の成分分析(1)

strain	CO ₂ 減量 (g)	EtOH (%)	酸度	アミノ酸度	評点 ¹⁾
K-14	74.7	22.2	2.3	2.1	2.0
FK-1	59.9	20.7	2.5	2.2	1.9
FK-2	61.6	18.8	1.8	2.2	1.8
FK-3a	67.5	21.6	2.2	1.9	1.9
FK-110a	65.5	20.8	3.0	2.3	1.9
FK-210a	53.2	16.9	1.8	2.2	2.1
FK-214a	53.5	17.7	1.8	2.3	1.8

- 1) 3点法. 1: 良い, 2: 普通, 3: 悪い

第2-2表 小仕込試験酒の成分分析(2)

strain	香氣成分					有機酸			
	i-AmOAc ¹⁾ (mg/L)	i-AmOH ¹⁾ (mg/L)	CapOEt ¹⁾ (mg/L)	E/A ²⁾ (mg/L)	C/A ²⁾ (mg/L)	リンゴ酸 (mg/L)	コハク酸 (mg/L)	乳酸 (mg/L)	酢酸 (mg/L)
K-14	2.9	187.7	0.5	1.5	0.3	14.8	27.2	18.0	12.9
FK-1	6.9	173.6	0.6	4.0	0.4	22.9	18.1	20.1	14.0
FK-2	2.2	142.8	0.6	1.6	0.4	17.2	19.7	22.6	10.5
FK-3a	5.2	217.2	0.6	2.4	0.3	15.0	26.0	16.4	15.5
FK-110a	5.0	163.9	0.6	3.1	0.4	26.0	16.7	20.2	11.9
FK-210a	3.5	142.7	0.7	2.4	0.5	17.9	22.0	25.7	7.0
FK-214a	3.6	161.9	0.7	2.2	0.4	15.2	21.6	24.7	8.3

- 1) i-AmOAc: 酢酸イソアミル, i-AmOH: イソアミルアルコール, CapOEt: カプロン酸エチル
 2) E/A = 100 × 酢酸イソアミル/イソアミルアルコール, C/A = 100 × カプロン酸エチル/イソアミルアルコール

第3表 小仕込試験によるFK-3aとFK-301の比較

strain	CO ₂ 減量 (g)	EtOH (%)	香氣成分				有機酸				
			i-AmOAc ¹⁾ (mg/L)	i-AmOH ¹⁾ (mg/L)	CapOEt ¹⁾ (mg/L)	E/A ²⁾ C/A ²⁾	リンゴ酸 (mg/L)	コハク酸 (mg/L)	乳酸 (mg/L)	酢酸 (mg/L)	
FK-3a	3.7	17.8	1.7	251.5	0.2	0.7	0.1	140.4	450.9	1210.6	736.4
FK-301	3.3	18.5	3.4	252.2	0.3	1.4	0.1	117.9	381.6	1435.9	288.3

1) i-AmOAc: 酢酸イソアミル, i-AmOH: イソアミルアルコール, CapOEt: カプロン酸エチル

2) E/A = 100× 酢酸イソアミル/ イソアミルアルコール, C/A = 100× カプロン酸エチル/ イソアミルアルコール

5. 低温発酵性改良株の小仕込試験

低温発酵性を改良した 7 株を使用して, 200g の小仕込試験を行った. 原料米に精米歩合 70 %のα米を使用し, もろみの最高温度は 12 °Cとした. 上槽は, 1 日あたりの炭酸ガス減量が 1 g 以下となった時点とした. 炭酸ガス減量, E/A 比, C/A 比, 酸度, きき酒結果などを総合的に判断し, 4 株 (FK-1 由来 1 株, FK-2 由来 2 株, FK-3 由来 1 株) を選抜した.

次に, 選抜した 4 株に FK-1, 2 を加えて, 精米歩合 50% の五百万石を原料米とした 200g の小仕込試験を行った. もろみの最高温度は 10.5 °Cとし, 1 日あたりの炭酸ガス減量が 0.5 g 以下となった時点で上槽した. 製成酒の分析結果を第 2-1, 2-2 表に示す. 炭酸ガス減量, E/A 比, C/A 比, 有機酸含量, きき酒結果, 酒造メーカーの意見などを総合的に判断し, FK-214a, FK-3a の 2 株を選抜し育成株とした.

6. FK-3a由来泡なし変異株の取得

FK-3a を使用した試験醸造の結果, もろみでの泡の高さ, 2 ~ 3 日間の発酵の遅れ, 生成酒の酸味の強さが指摘された. 指摘された問題点は気泡吸着性を低下させることで解決できると考え, FK-3a 由来泡なし変異株の取得を試みた.

Froth flotation 法により得られた 50 株を使用して, 10 g 小仕込試験を行った. 50 株全てにおいて, 起泡性の低下と高泡期間中の発酵速度上昇および酢酸含量の低下が観察された. E/A 比が高く, 酢酸生産量の低い 1 株を選抜し, FK-3a 由来泡なし変異株 (FK-301) とした. 10g 小仕込試験による両株の比較を第 3 表に示す. FK-301 は FK-3a に対して, 酢酸イソアミルと乳酸の生成量が増加し, 酢酸含量が半分以下に減少した.

7. 育成株の電気泳動的核型

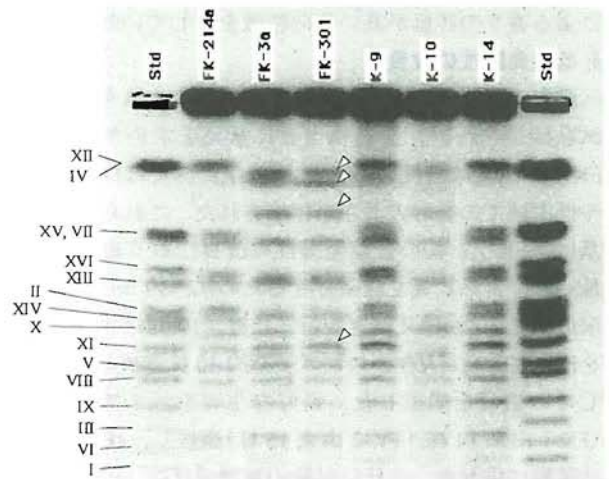
育成株と協会酵母の相同性を調べるため, パルスフィールド電気泳動による泳動パターンを比較を行った (第 3 図). FK-214a は, K-9 や K-14 と同様の泳動パターンを示すことから, 9 号系の酵母と考えられる. 一方 FK-3a

および FK-301 は, 第IV, VII, XII, XV 染色体のパターンが K-10 とほぼ同様でありながら, 第V染色体と第 XI 染色体間に存在する K-10 固有のバンドを持たないなど, 特異的なパターンを示した.

8. 育成株の特性

FK-214a は香氣成分生産性が高く, 協会 14 号酵母に対して E/A 比, C/A 比とも増加している. また, 酸度は低く, 特に酢酸含量が低い. このため, かなり軽やかな酒質となるが, 乳酸含量が高いため薄く感じることはない. FK-3a は, E/A 比が増加しており, エタノール生産量も高い. 酸度は K-14 と同程度であるが, 酢酸含量が高い. 従って, 酒質は K-14 に比べて味に厚みが出る.

(第 2-1, 2-2 表) FK-301 は FK-3a の泡なし変異株であり, FK-3a より酢酸含量が低く軽やかな酒質となる (第 3 表).



第3図 育成株のパルスフィールドゲル電気泳動による核型解析

図中矢印は, 特異的バンドを示す.

IV. 結 言

自然変異株の選抜を主な手法として、FK-214a, FK-3a, FK-301 の 3 株を育成した。育成株は、飛び抜けた香気成分生産性を持つわけではないが、K-14 と比較して高い香気成分生産性を示した。商品設計にもよるが、香味バランスを重視する場合には十分実用に耐えるものと考えている。

また、FK-3a および FK-301 は、主要な醸造用酵母である K-9, 10, 14 とは異なる電気泳動的核型を有していた。このことは、FK-3a および FK-301 の大きな特徴であり、もろみの純度検定や使用認証への応用も可能であると考えられる。

なお、FK-301 は、福井県酒造組合連合会により「うららの酵母」と命名され、平成 11 年 10 月 1 日より「うららの酵母」を使用した清酒が商品化されている。

最後に、本研究を実施するにあたり、資料の採集および試験醸造等にご協力を賜った県内の酒造会社各位に、厚く感謝を致します。

引用文献

- 1) 注解編集委員会編 (1993). 第四回改正国税庁所定分析法注解. 日本醸造協会, 東京. pp. 7-33.
- 2) 神田晃敬・三森智子・松井菊恵・浜地正昭・本馬建光 (1990). エステル高生産清酒酵母の分離. 醸協 85(6): 417-421.
- 3) Mark D. Rose, Fred Winston and Philip Hieter (1990). METHOD IN YEAST GENETICS. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 164-165.
- 4) 難波康之祐・小幡孝之・萱島進・山崎与四良・村上光彦・下田高久 (1978). 小仕込試験法の設定. 醸協 73(4): 295-300.
- 5) 大内弘造 (1997). 酒と酵母のはなし. 技報堂出版, 東京. pp. 130-137.
- 6) 清酒酵母研究会 (秋山裕一ほか編) (1992). 清酒酵母の研究-80年代の研究-. 清酒酵母研究会, 東京. pp. 79-126.

Breeding and Properties of Sake Brewing Yeast

Yoshito KUBO, Yukio INAKI and Chieko YASUDA

Summary

The three strains of yeast, namely FK-214a, FK-3a and FK-301, were bred to improvement of sake (Japanese alcoholic beverage). The breeding was carried out with the selection of a natural mutant as a main procedure. These strains showed high aromatic component productivity compared with Kyokai no. 14.

FK-214a had the highest aromatic component productivity and low acid productivity. FK-3a showed high acid productivity and high fermentation rate. FK-301, which was non-forming mutant from FK-3a, had low acid productivity compared with FK-3a.

The strain FK-3a and FK-301 had originate chromosomal pattern compared with Kyokai no. 9, 10, 14 analyzed by pulse field gel electrophoresis.