

バイオテクノロジーの応用による製造合理化に関する研究

清酒酵母の育種

長谷川裕正* 添田 泰徳**

吉浦 貴紀* 郡司 章*

1. はじめに

嗜好の高級化,多様化の時代を迎え,華やかな香りを特徴の一つとする吟醸酒が高付加価値商品として脚光をあびるようになった。吟醸酒の製成には原料や発酵管理技術等いろいろな要因が影響を及ぼすがその中でも酵母の役割は大きいものがある。

そこで,明利小川酵母に変異処理を行い,醸造適性を損なわず吟醸香の高い酵母の育種を目指し実験を行った。変異処理については蟻川ら¹⁾²⁾の方法に従い高酢酸イソアミル生産株の分離を試みた。次に得られた変異株と親株に対し変異処理を行い高カプロン酸エチル生産株の分離を試みた。得られた変異株の培養液についてヘッドスペース法によるガスクロマトグラフィで分析した結果,親株より香氣成分を多く生成する株が得られたので報告する。

2. 方法

2.1 高酢酸イソアミル生産株の分離

(1) 供試菌株

明利小川酵母(協会10号泡なし酵母)

(2) 培地

a. YPD 培地

グルコース4%,ポリペプトン 1%,酵母エキス0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%

b. YM 培地

グルコース5%,ポリペプトン0.5%,酵母エキス0.3%,マルトエキス0.3%

c. TFL 培地

YNB (Yeast Nitrogen Base) 0.67%, グルコース2%,寒天2%

TFL(5,5,5-trifluoro-DL-leucine) 1mM

(3) 高酢酸イソアミル生産株の分離

YPD 斜面培地に30 , 2日間培養し,その菌体を一白金耳とり,エチルメタンサルフォネート(EMS)にて一時間変異処理を行った。遠心集菌をし, 5ml 無菌水で二回洗浄後, TFL 培地に塗布し,生育してきた株を釣菌した。

*食品発酵部 **明利酒類株式会社

4) 香気成分生成能の測定

TFL 培地に生育してきた株を、YM 液体培地で 30t, 2 日間培養し、培養液中の香気成分濃度をヘッドスペース法でガスクロマトグラフィーで測定し、親株と比較した。そのうち、香気成分生成能に優れていると思われる株について小仕込試験を行った。

(5) 小仕込試験

米 120g, アルコール脱水麹 40g, 水 250ml, 50%乳酸 0.18ml, YPD 酵母培養液 5ml を用い、三角フラスコで 15 , 16 日間培養した。上槽は、遠心分離(3,000rpm, 10min)により行った。一般成分を国税庁所定分析法 4) で、香気成分をヘッドスペース法により分析を行った。

2.2 高カブロン酸エチル生産株の分離

(1) 供試菌株

明利小川酵母(協会 10 号泡ナン酵母)

TFL-12

(2) 培地

- a. YPD 培地
- b. YPCD 地
- c. YNB 培地

YNB (Yeast Nitrogen Base) 1%, グルコース 5%, カザミノ酸 1%

(3) 高カブロン酸エチル生産株の分離

YPD 斜面培地上のコロニ-より一白金耳をとり、EMS で一時間処理し、無菌水で二回洗浄後、YPCD 培地に塗布し、生じたコロニ-を釣菌した。

(4) 香気成分生成能の測定

YPCD 培地に生育してきた株を、YNB 液体培地で 25 , 3 日間培養し、培養液中の香気成分濃度をヘッドスペース法でガスクロマトグラフィーで測定し、親株と比較した。

3. 結果

清酒の吟醸香の主要な成分である、酢酸イソアミルとカブロン酸エチルの高生産株を小川酵母を親株として分離を試みた結果、香気成分の生成量が親株より優れた変異株が得られた。そのおもなものについて YM 培地、小仕込における分析値を表 1~5 に示した。高酢酸イソアミル生産株が期待される TFL 耐性変異株については表 1~3 に分析値を示した。分離した 50 株のうちほとんどが YM 培地においても小仕込においても親株よりも生成するイソアミルアルコール、酢酸イソアミル濃度が高く、3 倍近い生成量を示す株もみられた。また、アルコールの生成量についても親株と同程度の能力を持つことがわかった。

高カブロン酸エチル生産株が期待されるセルレニン耐性変異株については、表 4 に TFL 耐性株として分離した TFL-12 を

親株として得られたもの、表5には小川酵母を親株として得られた株についてYNB液体培地における分析結果を示した。TFL-12に二度目の変異処理をしたものはイソアミルアルコールの生成が親株より低くなり、中には、小川酵母より低くなったものも見られた。

表1 YM液体発酵試験香气成分分析結果(TFL耐性株)

菌 株	イソアミル アルコール (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	カプロン酸エチル (ppm)	E/A 比
小川酵母	133.4	1.20	0.09	0.90
TFL-12	176.6	2.79	0.10	1.58
13	155.4	2.34	0.11	1.51
21	163.0	2.28	0.09	1.40
31	162.0	2.00	0.08	1.23
32	179.5	2.06	0.07	1.45
33	158.8	1.31	0.08	0.82
37	169.4	2.46	0.11	1.45
42	171.3	1.43	0.06	0.83
44	163.0	1.33	0.07	0.82
47	164.3	2.13	0.11	1.30
48	149.5	2.35	0.12	1.57

表2 小仕込試験一般分析結果(TFL耐性株)

菌 株	日本酒度	アルコール (%)	酸 度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	直 糖 (%)
小川酵母	+ 6	19.95	3.0	3.7	0.44
TFL-12	+ 3	20.15	3.0	3.4	0.66
13	+ 5	20.00	3.2	3.4	0.50
21	+ 6	20.10	3.3	3.3	0.38
31	+ 4	20.15	3.2	3.5	0.61
32	+ 4	20.20	3.1	3.6	0.63
33	+ 5	19.40	3.4	3.3	0.32
37	+ 1	19.90	3.0	3.7	0.64
42	+ 3	20.10	2.9	3.7	0.58
44	+ 6	20.35	3.4	2.8	0.17
47	+ 5	19.80	3.0	3.6	0.31
88	+ 2	19.95	3.1	3.6	0.64

表3 ・小仕込試験香気成分分析結果(TFL 耐性株)

菌 株	イソアミル アルコール (ppm)	酢酸イソアミル (ppm)	カプロン酸エチル (ppm)	E/A 比
小川酵母	333.94	6.65	0.76	1.99
TFL-12	472.89	9.57	0.83	2.02
13	442.22	10.09	0.79	2.28
21	443.90	8.86	0.75	2.00
31	443.18	8.92	0.78	2.01
32	453.18	7.97	0.74	1.76
33	446.43	9.59	0.78	2.15
37	450.84	7.50	0.67	1.66
42	465.30	8.17	0.76	1.76
44	541.67	11.37	0.75	2.10
47	438.92	7.73	0.78	1.76
48	461.90	8.26	0.76	1.79

表4 YNB 液体発酵試験分析結果(セルレニン耐性株)

菌 株	アルコール (%)	酸 度 (ml)	イソアミル アルコール (ppm)	酢 酸 イソアミル (ppm)	カプロン酸 エチル (ppm)	E/A比
小川酵母	4.95	1.3	60.08	1.19	0.26	1.98
TFL-12	4.90	1.3	148.06	2.60	0.18	1.76
C-12-6	4.90	1.5	49.18	0.56	1.44	1.14
12	4.85	1.4	61.03	0.20	0.43	0.33
13	4.90	1.5	113.04	2.96	0.28	2.61
14	4.85	1.8	111.25	1.04	0.15	0.95
15	4.65	1.3	55.60	0.08	1.72	0.14
17	4.70	1.5	53.59	0.80	1.72	1.49
27	4.55	1.5	64.38	0.24	0.42	0.37
29	4.55	1.2	49.06	0.22	0.55	0.45
34	4.45	1.3	49.59	0.17	0.44	0.34
35	4.60	1.3	81.85	0.95	0.13	1.16

表5 YNB 液体発酵試験分析結果(セルレニン耐性株)

菌 株	アルコール (%)	酸 度 (<i>m</i> ℓ)	イソアミル アルコール (ppm)	酢 酸 イソアミル (ppm)	カプロン酸 エ チ ル (ppm)	E/A比
小川 酵 母	4.95	1.3	60.08	1.19	0.26	1.98
C-10-2	4.60	1.4	91.65	0.42	0.07	0.46
7	4.65	1.3	46.22	0.21	0.32	0.45
11	4.75	1.1	40.97	0.43	2.83	1.05
12	4.75	1.2	69.17	0.94	0.24	1.36
14	4.85	1.5	64.12	1.22	0.40	1.90
15	4.90	1.3	36.06	0.48	2.64	1.33
18	4.85	1.4	53.19	1.01	2.04	1.90
26	4.65	1.4	34.24	0.46	2.90	1.34
30	4.70	1.3	55.08	1.06	0.23	1.92
33	4.70	1.5	75.39	2.44	0.35	3.24

カプロン酸エチルについてはどちらの親株についても変異株の方が多くなっているものが見られたが香気成分のバランスについては問題があるものが多く今後小仕込を行いさらに検討する必要がある。

4. まとめ

明利小川酵母を親株としてEMSによる変異処理により吟醸用酵母の育種試験を行った。

- 1) 高酢酸イソアミル生産株の分離についてはYM液体培養、小仕込いずれにおいても親株より高生産株が得られた。
- 2) 高カプロン酸エチル生産株の分離については、高酢酸イソアミル生産株及び小川酵母を親株として変異処理を行った。カプロン酸生成量が高くなるものもあるが酢酸イソアミル生産能が低下するものが多く香気成分のバランスのとれたものはほとんど得られなかった。
- 3) セルレニン耐性株については今後小仕込によりさらに検討する必要がある。

参考文献

- 1) 蟻川ら：長野食工試報告, No.16,42 (1988)
- 2) 蟻川ら：長野食工試報告, No.17,52 (1989)
- 3) 吉沢 淑：醸造協会誌,68(1),59 (1973)
- 4) 注解編集委員会編：国税庁所定分析法注解