

DNA マイクロアレイ手法による次世代酵母の開発

小山誠司*・橋本建哉*・関東宣道**・伊藤謙治**

*食品バイオ技術部・**宮城県酒造組合

清酒製造に使用されている酵母は、もろみ中で高泡を形成することが知られており、泡の形状等の状ぼうを発酵管理の指標として利用してきた。しかし、近年では成分分析により管理する手法が一般的となり、必ずしも泡の形成は必須ではなくなっている。宮城県が開発した純米酒用酵母「宮城マイ酵母」は高泡形成株であり、その泡無し化について要望があった。そこで、宮城マイ酵母の泡無し株の開発を行った。

キーワード：清酒、酵母、高泡非生成

1. 緒言

清酒製造に使用されている酵母は、もろみや酒母中でかさ高い泡(高泡)を形成することが知られている。もろみの泡をはじめとする状ぼうは、発酵管理の指標として有効であるが、今日、通常発酵管理においては、もろみ成分を分析して管理する手法が一般的となっており、必ずしも泡の形成は必須のものではなくなっている。他方、もろみの泡は、発酵槽の使用効率を低下させ、また泡消しなど煩雑な操作を必要とする。そのため、高泡を形成しない高泡非形成株(泡無し株)の開発がこれまで進められており、泡無し株の利用は広く行われている。宮城県では協会酵母 12 号原株を親株として純米酒用酵母(宮城マイ酵母：宮城酵母 MY-3102 株)を開発し、県内各酒造場へ広く普及しているが、高泡を形成する酵母であることから泡無し株の要望があった。そこで、本研究では、宮城マイ酵母の高泡非形成株の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 供試酵母菌株及び培養方法

酵母菌株については当センター保存菌株を使用した。特に断りがないときは完全培地(ブドウ糖 20g、ポリペプトン 5g、酵母エキス 5g、リン酸一カリウム 1g、硫酸マグネシウム・7 水和物 0.4g を水に溶かして 1L にする)を使用した。固体培地の場合は、これに 2.5%の寒天末を添加し

た。仕込み試験の際は、前培養として麴液培地を使用した。麴液培地は以下のように調整した。米麴 0.5kg に対し水 1L、塩化カルシウム 0.2g、リン酸一カリウム 2g、硫酸マグネシウム・7 水和物 0.8g を加え、少量のグルク SB、グルク 100 を添加して 65℃、20 時間インキュベートした。その後 95℃、2 時間加温し、室温まで冷却後ろ過を行った。このろ液を麴液原液とした。この原液をボーメ 6.0 まで水で希釈した後、乳酸を用いて pH4.0 に調整し、121℃、30 分オートクレーブして麴液培地とした。

2.2 高泡非形成株の分離

2.2.1 Froth floatation 法

Froth floatation法は布川らの方法¹⁾に従った。50mLの液体培地中で 30℃、48 時間培養を行い、7,000～8,000rpm、15 分間遠心分離を行って酵母菌体を回収した。これを水で 3 回洗浄した後、50mLの水に懸濁してこれを酵母懸濁液とした。この酵母懸濁液を一部取り、酵母の終濃度が O.D.660nm で 0.3～0.4 程度になるように、30mL の 0.2% 蔗糖エステル P-1570 及び水を加えて 100mL に希釈した。この希釈液 80mL をシリンダに取り、エアポンプを用いて底面から通気した。この際の通気量は 600mL/min 程度とし、泡がシリンダ上部から溢れ出なくなる時点を終点とした。残存した液を少量採取して液体培養に供し、以後同様の操作を繰り返した。

2.2.2 蔗糖エステル法

蔗糖エステル凝集法は大内らの方法²⁾に準じた。10mLの液体培地中で30℃、24時間培養を行い、これに1.0mLの0.25%蔗糖エステルP-1570を加えた。これを1分間激しく攪拌した後、0.5～1時間静置した。この際、高泡形成、非形成株を対照として同様の操作を行い、それぞれについて生じる沈殿を注意して観察、比較した。その後、この液の上部から一部取り、液体培養に供してこの操作を繰り返した。

2.2.3 気泡吸着性試験

30℃、24時間静置培養した2mLの酵母培養液をよく攪拌し、光学顕微鏡で観察した。この際、倍率は400倍とし、スライドグラスに滴下する際やカバーグラスを乗せる際に細かい気泡が液中に残るように注意した。

2.3 醸造試験

2.3.1 小仕込試験

小仕込試験は難波ら³⁾の方法に準じて行い、蒸米、麴に換えてα化米、乾燥麴を使用した。総米200gの場合は炭酸ガス発生に伴う総重量の減少を基にし、それ以上の総米量の場合はもろみから一部分取して成分分析を行い、発酵管理した。品温の制御は水浴によって行い、急激な温度変化を起こさないよう注意した。

2.3.2 試験醸造

試験醸造は総米量を200kgとし、難波らの方法に準じた。発酵はもろみを一部分取して成分分析を行うことによって管理した。上槽はアルコール度として約19%を目標とした。

2.3.3 成分分析

成分分析はもろみを一部分取して、ろ過または遠心分離した試料に対して国税庁所定分析法⁴⁾に準じて行った。酸度、アミノ酸度の測定の際は湯浴及び激しく攪拌することにより、炭酸ガスによる誤差の影響を防いだ。

3. 実験結果及び考察

3.1 突然変異株の分離

高泡形成する清酒酵母は、細胞表面の疎水・親水度の性質により気泡に対して吸着性を示す。この性質を利用することにより、突然変異によって生じた泡無しの高泡非形成株を分離することが出来る。

宮城酵母MY-3102株は高泡形成する酵母であるため、気泡に対して吸着性を示す。そこで2.2.1に従ってMY-3102株を親株とし、Froth floatation法を行った。高泡非形成の対照株として協会酵母901号を使用し、泡の生じ方や量などを適宜比較したところ、10回の試行でおよそ901号と同程度となった。そこで残存液の一部を分取して48時間培養し、平板培地に接種した。単一コロニーとして約1,500株を分離し、これらの株について顕微鏡観察による気泡吸着性の評価をそれぞれ行った(図1)。同時に蔗糖エステル凝集法によってフロック形成の有無を観察し、これらの結果より、突然変異株として60株を分離した。

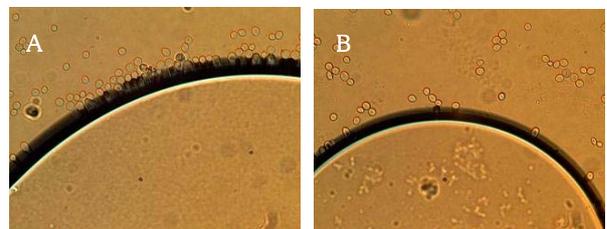


図1 気泡吸着性試験

A : 宮城酵母MY-3102株、B : 高泡非形成突然変異株

3.2 高泡非形成株の選抜

得られた60株について、総米200gの小仕込試験を実施した。培養期間中に高泡形成した5株を除外し、試験中に高泡形成が観察されなかった55株を評価対照として選抜した。これらのもろみを遠心分離し、得られた製成酒の成分分析と官能評価を行った。親株MY-3102の製成酒と比較し、アルコール度が同等以上で酸度、アミノ酸度が低い7株を選抜した。7株からさらに選抜するために、総米1kgの小仕込試験に供し、アルコール度が19%以上となるまで発酵させた後、同様に成分分析を行った

(表 1)。

表 1 総米 1kg 小仕込試験における各変異株の比較

菌株	時間 (日)	アルコール (%)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
MY-3102	21	19.0	3.02	1.60
MY-3203	19	19.2	2.80	1.68
MY-3207	19	19.1	2.60	1.62
MY-3226	20	19.1	2.65	1.70
MY-3227	18	19.1	2.70	1.60
MY-3230	19	19.2	2.70	1.75
MY-3235	18	19.0	2.80	1.75
MY-3241	18	19.3	2.75	1.87

表 2 試験醸造酒の一般成分比較

株	時間 (日)	アルコール (%)	日本酒度	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)
MY3102	22	18.9	+4.5	2.50	1.30
MY3227	21	19.0	+7.0	2.10	1.16

いずれの変異株も、発酵の全期間を通じて泡は形成しなかった。発酵の速度は標準株である MY-3102 株より 1~2 日程度先行し、最終的なアルコール度は同等であった。変異株のうち、官能的にすぐれており、アミノ酸度が低い MY-3227 株を選択し、総米 10kg の小仕込試験を実施したが、MY-3102 株の値より酸度、アミノ酸度ともに低く、アルコール度、発酵速度はやや高くなること確認された。

3.3 試験醸造

MY-3227 株が実用株として十分な性能を有しているかを検証するために、総米 100kg の試験醸造を実施した。米は精米歩合 60% の宮城県産ひとめぼれを使用した。もろみの経過 (図 3) は最高品温を 13.5~14.0℃とし、アルコール度が 15% 付近のとき徐々に温度を下げていった。

高泡を形成する酵母は泡中に存在し、高泡形成期には酵母による酸の生成が高まる傾向がある。そのため、高泡非形成変異により製成酒の酸度が低下することが知られている。MY-3227 株及び親株である MY-3102 株を使用して醸造された製成酒の成分分析値を表 2 に示す。ほぼ同等のアルコール度となるのに MY-3227 株の方が 1 日早く、酸度は MY-3102 株を下回っていた (図 4)。アミノ酸度は、親株と比較して若干低い値となり、末期においても十分な生存率であることが示された。

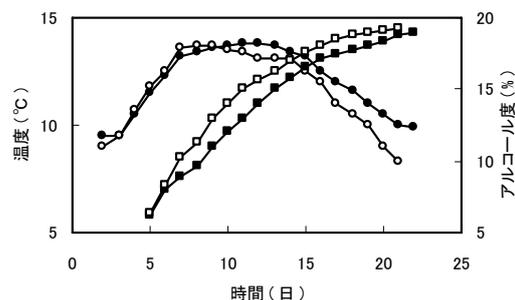


図 3 もろみの温度経過とアルコール度の推移

● : MY-3102 (温度)、○ : MY-3227 (温度)
■ : MY-3102 (Alc. %)、□ : MY-3227 (Alc. %)

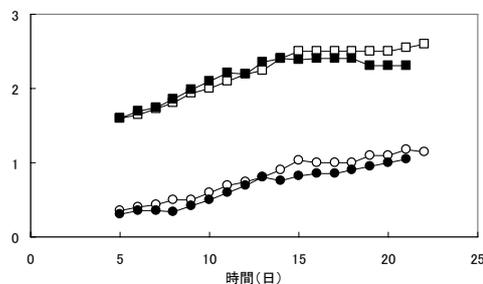


図 4 もろみの酸度とアミノ酸度の推移

■ : MY-3102 (酸度)、□ : MY-3227 (酸度)
● : MY-3102 (アミノ酸度)、○ : MY-3227 (アミノ酸度)

これらの結果を受けて、県内の酒造会社 8 社において実地醸造をおこなったところ、いずれの場合でももろみ全期間において高泡の形成は見られなかった。また MY-3102 株による製成酒と比較して酸度もやや低い傾向が見られ、発酵の速度は 1~1.5 日程度早かった。最終到達アルコール度は 19% 台で親株と同等であり、もろみ末期でも酵母の死滅によるアミノ酸度上昇が観察されず、安定した発酵性を示した。これらにより、実地醸造においても実用上問題ないことが示された。

4. 結言

以上の結果から、宮城県の純米酒用酵母 MY-3102 株より高泡非形成株 MY-3227 株が造成された。MY-3227 株は全期間を通じて泡無しの形質であり、もろみ末期まで安定した発酵性を示すことが確認された。製成酒も MY-3102 株とほぼ同等で、且つ酸度の低い値となることが示された。

なお、本研究は宮城県酒造組合との共同研究であり、県内各酒造会社の協力を得て実施されました。この場を借りて感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 布川弥太郎, 堀越直樹, 大内弘造 : 日本醸造協会誌 **67**(1972), p.968-971
- 2) 大内弘造, 布川弥太郎 : 日本醸造協会誌 **67**(1972), p54-57
- 3) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島進, 山崎与四郎, 村上光彦, 下田高久 : 日本醸造協会誌 **73**(1978), p.295-300
- 4) 西谷直道, 伊藤清, 岩野君夫, 太田剛雄, 大場俊輝, 岡崎直人, 小幡孝之, 木崎康造, 北本勝ひこ, 熊谷知栄子, 小林信也, 五味勝也, 斎藤和夫, 斎藤泰夫, 佐伯宏, 高橋利郎, 高宮義治, 蓼沼誠, 玉城武, 蓮尾徹夫, 若林三郎 : 国税庁所定分析法注解 第四回改正(1993), p.12-33