

【研究論文】

【令和元年度～令和3年度 県単独試験研究】

新たな宮城県産酵母の育種 — 清酒製造技術の高度化 —

石川 潤一, 吉村 緑, 瀬尾 直美^{*1}, 稲生 栄子, 有住 和彦
食品バイオ技術部
(*1 現 北部地方振興事務所)

製成酒が酢酸イソアミルを主体とした香りの特徴とする酵母を育種するために宮城マイ酵母を親株として UV 照射による変異誘導を行い、候補菌株を取得した。麹汁培地での増殖能力やマルトースの資化能力などを調査し、数値を Z スコアにより標準化して評価した。小仕込み試験を行う前の選抜手法として、全体を小スケール化したマイクロ小仕込み試験を考案し選抜を行った。

キーワード: 宮城マイ酵母, UV 変異, 酢酸イソアミル, Z スコア, マイクロ小仕込み試験

1 緒言

当センターでは県内の酒類製造業者に培養酵母を有償で配付する培養微生物配付事業を平成 13 年度から継続的に実施している。この事業では当センターで開発し、保有している純米酒用の宮城マイ酵母泡なし株 *Saccharomyces cerevisiae* MY3227 株および MY3216 株など種々の酒造用酵母を配付している。製造業者からは純米吟醸酒用の酵母としてより香りが豊かで扱いやすい酵母を望む声が聞こえてくるが、現状では必ずしもその需要を満たしているとは言えない。

そこで、本研究では宮城マイ酵母泡なし株 MY3227 株および MY3216 株を親株として、醸造特性が良好でかつ、純米酒および純米吟醸酒として好まれる酢酸イソアミルを主体とした豊かな香りを有し、純米酒および純米吟醸酒の製造に適する新たな宮城県産酵母を育種することを目的とした。

2 材料と方法

2.1 供試菌株

本研究で使用した微生物はすべて *S. cerevisiae* であることから、菌株名のみ記載した。育種の親株は、MY3227 株、MY3216 株を選択した。MY3227 株は平成 16 年度から令和 2 年度まで、MY3216 株は令和 3 年度から宮城マイ酵母泡なし株として酒造企業向けに当センターで配付している。

2.2 突然変異株の取得

酵母において、酢酸イソアミルはロイシンとイソアミルアルコールにアルコールアセチルトランスフェラーゼが作用して生成される¹⁾。この経路はロイシンによってフィードバックされて発現抑制されることから、ロイシンのアナログを使用してフィードバックの解除された菌株を育種することにより酢酸イソアミル生成量の多い菌株が取得できることが報告されている。²⁾

突然変異株の取得は紫外線(UV)による変異誘導法³⁾により行った。親株は YPD[1% 酵母エキス{(株)アサヒ飲料製}, 2% Pepton(Becton, Dickinson 製, 米国), 2% グルコース{富士フィルム和光純薬工業(株)製}]培地 10 mL を用いて 30°C, 48 h 培養し, 8,000×g, 15 min にて遠心分離して菌体を得た。菌体はリン酸緩衝液で 2 回洗浄し, 10% グルコース水溶液 10 mL に分散させ, ディスポシャーレに全量に移した。クリーンベンチ内においてシャーレに分散した菌体をゆっくりと攪拌しながら, 40 cm の距離で UV 殺菌灯(GL-15)を点灯させ, 60 sec から 90 sec UV を照射した。UV 照射後, 直ちに菌体を回収して 10⁵ 倍まで段階希釈し, 1 mM 5,5,5-Trifluoro-DL-leucine(Merck 製, ドイツ, 以下, TFL)を添加した DOB 寒天培地[2% グルコース, 0.17% Yeast nitrogen base(Becton, Dickinson 製), 0.5% 硫酸アンモニウム{和光純薬工業(株)}, 2% 寒天{和光純薬工業(株)製}]を選抜培地として播種した。30°C で 1 週間程度培養後, コロニーが出現したシャーレから順次回収し, 釣菌した。釣菌した菌株は一時的に選抜培地上に保存し, 同培地を

用いて画線培養を 2 回繰り返してコロニーを単離した。単離したコロニーは、Potato dextrose agar (Becton, Dickinson 製) 培地に穿刺して保存し、これを候補菌株とした。

2.3 選抜

2.3.1 エタノール麴汁培地における増殖性

麴汁は市販の麴 6 kg に水 14 L を添加して 55°C, 24 h 加熱し、No.101 のろ紙[東洋濾紙(株)製]を用いて濾過し、リン酸二水素カリウム[食品添加物, 和光純薬工業(株)製]12 g, 硫酸マグネシウム[食品添加物, 和光純薬工業(株)製]4.8 g, 塩化カルシウム[食品添加物, 和光純薬工業(株)製]1.2 g を添加し、乳酸[食品添加物, 和光純薬工業(株)製]を用いて pH 4.0 に調整したものをを用いた。滅菌した 96well マイクロプレート (Nunc 製) の各ウェルに、比重 12 Bh に調整して 5 v/v % になるようにエタノールを添加した麴汁 (以下、エタノール麴汁培地) を 150 μ L ずつ分注し、YPD で 20°C, 1 週間前培養した候補菌株培養液を 10 μ L ずつ分注して植菌した。マイクロプレートをインキュベーター内で 20°C, 1 週間保持した。培養開始後 2 日目および 7 日目に各ウェルから 10 μ L ずつ採取し、別のマイクロプレートにサンプリングして蒸留水を用いて 10 倍に希釈し、マイクロプレートリーダー (Spark-20, Tecan 製, スイス)を用いて、600 nm の吸光度から酵母の増殖性を評価した。

2.3.2 マルトース資化性

滅菌した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 2% グルコースを 10% マルトース[和光純薬工業(株)製]に置き換えた DOB 培地 (以下、Mal-DOB) を 150 μ L ずつ分注した。これに、YPD で 20°C, 1 週間前培養した候補菌株培養液を 10 μ L ずつ各ウェルに分注して植菌し、このマイクロプレートをインキュベーター内で 20°C, 1 週間保持した。培養開始後 2 日目および 7 日目に各ウェルから 10 μ L ずつ採取し、別のマイクロプレートにサンプリングして蒸留水を用いて 10 倍に希釈した。マイクロプレートリーダーを用いて、600 nm の吸光度から酵母の増殖性を評価し、これをマルトース資化性とした。

2.3.3 酸度・アミノ酸度測定

滅菌した容量 2.2 mL の 96 ディープウェルプレート

(BIO-BIK 製)の各ウェルに、比重 8 Bh に調整した麴汁 (以下、麴汁培地) を 1,200 μ L ずつ分注し、YPD で 20°C, 1 週間前培養した候補菌株培養液を 10 μ L ずつ植菌した。ディープウェルプレートはインキュベーターで 20°C, 1 週間保持し、7 日目に検体として 1.0 mL ずつ採取した。

酸度の測定は国税庁所定分析法に準じ、試料量と水酸化ナトリウム水溶液の濃度をそれぞれ 1/10 にして用いた。すなわち、酸度は採取した検体 1.0 mL に対して N/100 水酸化ナトリウム水溶液[富士フィルム和光純薬工業(株)製]を用いて pH 7.2 を中和点として滴定し、滴定に要した水酸化ナトリウム水溶液の容量(mL)を検体の酸度とした。

2.3.4 香気成分分析

滅菌したウェル容量 2.2 mL の 96 ディープウェルプレート (BIO-BIK 製)の各ウェルに、麴汁培地を 1,200 μ L ずつ分注し、YPD で 20°C, 1 週間前培養した候補菌株培養液を 10 μ L ずつ植菌した。ディープウェルプレートと Aneropack ケンキ[三菱ケミカル(株)製]を嫌気ジャーに入れ、インキュベーター内で 20°C, 1 週間保持し、7 日目に検体として 1 mL ずつ採取した。1 mL 検体と 0.1 mL 内部標準液を 10 mL 容ヘッドスペースバイアル(株式会社島津製作所製)に入れて密栓後、オートクレーブにて 63°C, 60 min 加熱し、室温で冷却した。ヘッドスペース GC 分析は GC-8010[(株)島津製作所製]を用いた。分析条件は表 1 に示した。

表 1 HS-GC 分析条件

検出器	FID
キャピラリーカラム	DB-WAX10m 内径: 0.1 mm 長さ: 10 m 固定相: PEG 膜厚: 0.1 μ m
試料導入部温度	250°C
カラム温度	50°C
検出器温度	250°C
キャリアガス	N ₂ 流量: 6.0 mL 圧力: 60.1 kPa
スプリット比	1 : 50
ヘッドスペース温度	80°C
バイアル保持時間	15 min

2.3.5 マイクロ小仕込み試験

50 mL 容の遠心チューブ(TPP 製)に 1 min 程度ミルで挽いたアルコール脱水麴(A 麴)⁴⁾と乳酸水を混合し、予め麴汁培地で 1 週間培養した供試菌株を植菌して 2 日間培養した(水麴)。チューブの水麴に α 化米, ミネラルウォーター(Crystal Geysler; CG ロクサーヌ LLC 製, 米国)を加えて vortex ミキサーにて混合後, 遠心分離機で軽くスピンドウンしてチューブのスクリーキャップを半回転ほど緩めて静置し, これをもろみとした。もろみの詳細は表 2 に示した。もろみをインキュベーターにて 15°C に保持し, 毎日重量の測定を行った。もろみ期間はアルコール度数がおよそ 16%となる, 全体重量の減少量が 3.84 g に達した日までとし, もろみ期間が終了した検体は直ちに遠心分離機を用いて 8,000 \times g, 15 min で上槽した。すべてのもろみを上槽後, 清酒はオートクレーブにて 63°C, 60 min の火入れを行い, -5°C にて保存した。

表 2 マイクロ小仕込み配合

	水麴	仕込み
α 化米 (g)		9.2
A 麴 (g)	2.8	
水 (mL)		3.6
酵母水 (mL)	0.3	
0.05%乳酸 (mL)	20	
汲水歩合 130%		
(α 米と A 麴の補水量: 各 30%)		

3 結果と考察

近年, 酵母の育種で使用された変異処理の主たる方法は, エチルメタンスルホン酸(EMS)処理であるが, 作業面等の安全性で優位と考え, 本研究では UV 照射法による突然変異処理を行った。

MY3216 株および MY3227 株の菌体分散液に対して UV 照射を行ったところ, 照射時間が 60 sec から 80 sec で変異株取得の目安となる死滅率 90%程度に到達した(図 1)。データは示さないが, MY3227 株に対し UV 照射を 60 秒行った場合, 希釈倍率 10^2 の TFL-DOB 寒天にコロニーが出現した。ゆえに生菌数当たりの TFL 耐性獲得率は 10^{-4} 程度であると推察した。

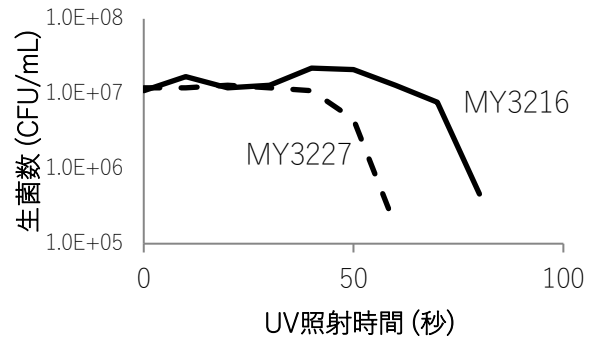


図 1 紫外線照射による MY3227 株(破線)と MY3216 株(実線)の生存曲線

変異により TFL 耐性を獲得したコロニーを拾い, 保存前にそれを再度 TFL-DOB 寒天培地上に画線してコロニーの単離を試みた。図 2 に画線培養した写真を示した。図の矢印の先が petite colony⁵⁾とみられる小さなコロニーで, 候補菌株のコロニーとは明確に大きさや数が異なった。我々は, このコロニーの大きさの違いは, 画線培養の前段階, すなわち TFL 寒天平板から釣菌した段階では TFL に耐性を獲得した菌株を完全には単離できず, TFL に対する耐性の弱い菌株がわずかに混在している場合もあると考えた。ゆえに, 1 回の画線培養では菌株の単離には不十分であり, 画線培養から釣菌したコロニーをさらにもう 1 回画線し, petite colony が発生しないことを確認して保存することとした。今後, 単離した菌株に petite colony が発生する可能性を留意しつつ, 保存と継代に努めていきたいと考えている。



図 2 TFL-DOB 寒天培地上に出現した取得コロニーの画線培養(1 回目)。矢印の先端に見えるのが petite colony

表 3 に単離した年度ごとの菌株数を示した。また、図 3 に麴汁培地における増殖性試験およびマルトース資化性試験の結果を示した。各データは標準偏差が大きく、試験における菌株の成長速度のばらつきが大きいことを示しており、UV による変異操作が有効であったことを示唆していた。しかしながら、それぞれの試験項目で有意差検定(ANOVA)を行った結果、同じ項目でも年度毎の集団に有意差ありの判定となった。つまり、第一段階選抜において全体を母集団とみなすと、同じ条件で実施したとしても年度単位で集団にバイアスがかかると考えた。

表 3 年度ごとの単離菌株数

	親株	単離菌株数
令和元年度	MY3227	1,479
令和 2 年度	MY3216	1,152
令和 3 年度	MY3216	1,152

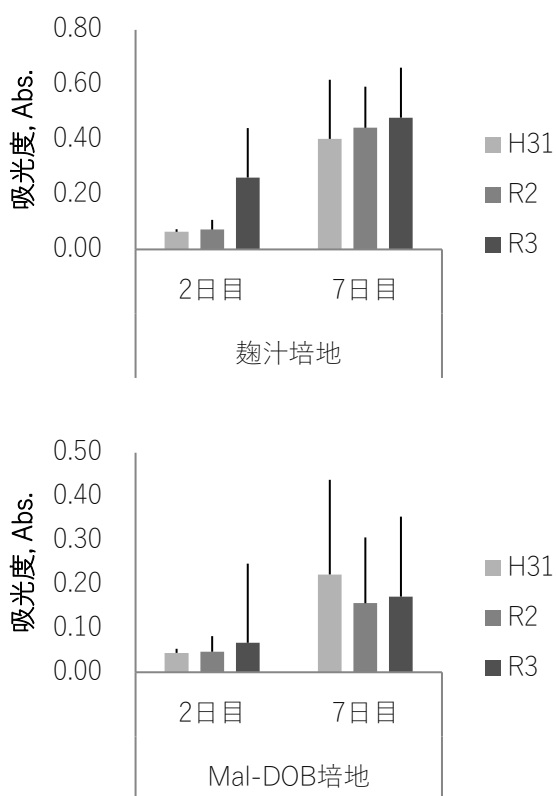


図 3 アルコール麴汁培地(上)と Mal-DOB 培地(下)で培養した菌株の吸光度。エラーバーは標準偏差。ANOVA により、すべての項目で有意差あり(p**<0.01)

群間に有意差のある母集団から優秀な酵母を選抜するための考え方として Z スコアによるデータの標準化を行った。いま、試験項目ごとに測定された菌株培養液の吸光度が正規分布に従うと仮定し、試験項目毎、年度単位の試験群をそれぞれ母集団とした場合、母集団の平均値を μ 、標準偏差を σ すると、吸光度が X である菌株 A の Z スコアは、

$$Z_A = (X_A - \mu) / \sigma$$

と表せる。選抜ではすべての試験項目において菌株ごとの Z スコアを求め、エタノール麴汁培地における 2 日目、7 日目の Z スコアを Z_{k2} 、 Z_{k7} 、Mal-DOB 培地も同様に Z_{m2} 、 Z_{m7} とし、総合 Z スコア Z_t を

$$Z_t = Z_{k2} + Z_{k7} + Z_{m2} + Z_{m7}$$

とした。スクリーニングは年度ごとの母集団から Z_t の大きい順に上位の菌株を選抜した。Z スコアは、菌株の吸光度が平均値よりも大きい場合は正の値を示し、平均値から遠ざかるとその絶対値は大きくなる。したがって、母集団の中で増殖能力が大きい株ほど Z スコアは正方向に大きくなる。また、Z スコアは標準偏差で規格化されているため、正規分布に従う母集団であればバイアスを極力排除して比較することができると考えた。エタノール麴汁培地及び Mal-DOB 培地の 7 日目における吸光度は酵母が最大限に増殖した場合の酵母数を想定しているが、その増殖速度までは反映しないと考え、2 日目の吸光度を測定した。2 日目は増殖の初期段階であるため、一般的な微生物の増殖曲線から、その吸光度は増殖の立ち上がりの早さを反映するものと考えた。すなわち、このスクリーニングは各条件における増殖能力のみならず、初期の増殖速度を考慮したものとなっている。また、2 日目の吸光度の標準偏差は平均値に対して大きく離れたデータが多いため、2 日目の吸光度の大きい菌株は Z スコアも大きくなり、結果として初期の増殖速度の大きい菌株が選抜される傾向であった。

我々は、年度ごとに分離した菌株から、各年度の Z_t が上位の菌株を選抜し、2 段階目の選抜として酸度測定、香気成分分析に供した。選抜した菌株数は、作業の手数や時間などを考慮し、マイクロプレートのウェル数と同じ 96 菌株とした。表 4 および図 4 に酸度測定の結果を示した。酸度は平均 3.77 と一般的な市販清酒(0.8 から 1.5 程度)よりも高い値を示した。これは今回の試験系において、もろみではなく麴汁培地を用いたこと

と、1.2 mL の小スケールであったことから、溶存酸素の影響により酢酸やコハク酸などの有機酸が増加したため⁶⁾、結果的に全体の酸度が上昇したと考えられた。

表 4 供試菌株の酸度の統計量

データ数	平均酸度(mL)	標準偏差	中央値
284	3.77	0.76	3.63

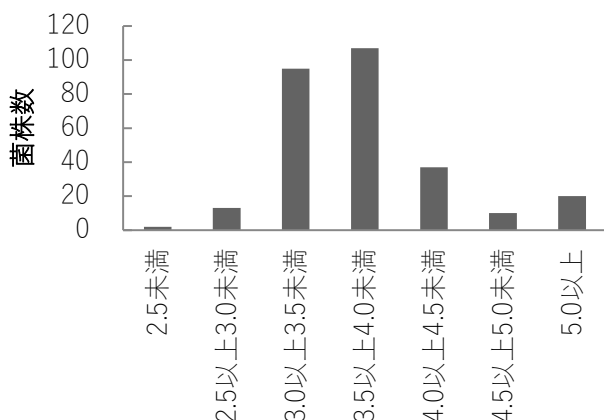


図 4 菌株の酸度分布

表 5 に香氣成分分析の結果を示した。もろみとは異なる条件ではあるが、親株である MY3227 よりも酢酸イソアミルの生成が大きく、さらに E/A 比が大きい菌株が多く選抜された。

酢酸イソアミルの生産量が多い菌株を選抜するため、各菌株の E/A 比を求めた。E/A 比は香氣成分のうちエステル(E, 酢酸イソアミル)とアルコール(A, イソアミルアルコール)の濃度比(ppm / ppm)で表され、

$$E/A \text{ 比} = 100E / A$$

と定義される⁷⁾。E/A 比が大きくなれば酢酸イソアミルがハナヤカでイソアミルアルコールの重い香りが少ない吟醸香となると考えられる。これらから酸度の高い株を除外するため、E/A 比の Z スコア(Z_{EA})から、酸度の Z スコア(Z_{Ac})を除いたものを菌株のスクリーニングスコア(Z_{Sc})とし、 Z_{Sc} の高い菌株を選抜した。

$$Z_{Sc} = Z_{EA} - Z_{Ac}$$

Z_{Sc} により選抜した上位 10 菌株の香氣成分と E/A 比を表 5 に示した。いずれの菌株も親株より高い濃度の酢酸イソアミルおよびイソアミルアルコールを生成した。また、

E/A 比も親株よりも高い値を示し、良好な香氣を生成する可能性があることが期待された。

表 5 麹汁培地で培養した菌株の香氣分析結果

(単位: ppm)				
菌株 ID	E ^{※1}	A ^{※2}	酢酸エチル	E/A 比
724	5.2	135.4	- ^{※3}	3.8
907	5.2	120.9	-	4.3
1292	5.1	124.3	-	4.1
248	4.8	108.3	60	4.4
1239	4.8	105.3	-	4.6
508	4.7	122.8	57.4	3.8
816	4.7	110.6	-	4.2
1246	4.7	123.4	-	3.8
1421	4.6	115.9	-	4.0
516	4.6	99.2	53	4.6
MY3227	1.2	64.2	-	1.9

※1 酢酸イソアミル

※2 イソアミルアルコール

※3 検出下限(10.7)以下

今回、我々は分離株の増殖速度や生成物などをスクリーニングの指標としてきたが、いずれの試験系も麹汁培地や合成培地を用いるなど、もろみを模倣してはいるものの、実際とは異なる結果になっていると考えた。我々は、酵母のスクリーニングの評価においても実際のもろみに極力近づける手法として、極少量の小仕込み試験(以下、マイクロ小仕込み試験)を考案した。マイクロ小仕込み試験は、小仕込み試験⁸⁾と比較して、総米量と汲水量を 1/12.5 に縮小し、50 mL 容量の遠心チューブで実施可能となった。また、簡易化のために温度管理はインキュベーター内で一定温度とした。上槽を行ったところ、およそ 22 mL の清酒を取得することができた。成分分析は 1/10 濃度の酸度・アミノ酸測定、香氣成分分析に限定し、アルコール度数測定やグルコース濃度測定は割愛した。マイクロ小仕込み試験の成分分析は限定的であるが、実際のもろみ条件において、もろみ日数が極端に長い菌株や極端に酸度の高い菌株を排除するとともに、香氣成分分析に基づく選抜が可能となると考えた。

図 5 に実用菌株を含む 120 菌株のマイクロ小仕込みで得られたもろみ日数の分布を示した。親株の MY3216 株と同等か、より短いもろみ日数を示した候補株が 68 菌株あった。酸度・アミノ酸測定、香氣成分分析については実施中であり、これらの結果を検討したうえで今後の選抜試験や通常の小仕込み試験に臨む予定である。

表 6 マイクロ小仕込み試験のもろみ日数

供試菌株数	平均(日)	中央値(日)	標準偏差
120	13	13	2.3

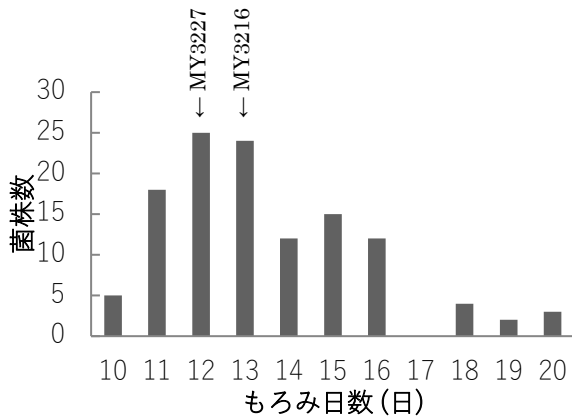


図 5 マイクロ小仕込み試験のもろみ日数分布

4 結論

本研究では次の結果が得られた。

- ・ 親株を UV により変異させ、3,783 菌株の TFL 耐性菌株を選抜した。
- ・ エタノール麴汁培地における増殖性とマルトース資化性を評価し、288 菌株を選抜した。
- ・ 麴汁培地での培養による香气成分分析と酸度・アミノ酸度の評価からおおよそ 120 菌株を選抜した。
- ・ 小仕込み試験を縮小化したマイクロ小仕込み試験を考案し、もろみ日数を簡易的に評価した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、新潟県醸造試験場の金桶光起場長および新潟薬科大学大学院応用生命科学研究科高久洋暁教授からアドバイスをいただきました。心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 堤浩子: におい・香り環境学会誌, 46, 5 pp.346-349 (2015)
- 2) 市川英治: 醸協, 84, 3, pp.166-170 (1989)
- 3) 河村大造, 門隆興, 東江昭夫: 醗酵工学, 64, 25, pp.25-27 (1986)

- 4) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章: 醸協, 87, 12, pp.915-921 (1992)
- 5) Day Martin: *Adv Appl Microbiol.*, 85, pp.1-41 (2013)
- 6) 松田章, 有手友嗣, 中村静夫, 辻奈緒子, 畢野礼奈日, 矢野俊博: 醸協, 108, 7, pp.527-538 (2013)
- 7) 永井英雄: 醸協, 88, 4, pp.264-271 (1993)
- 8) 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: 醸協, 73, 4, pp.295-300 (1978)