

吟醸香の高い清酒用大分酵母の育種

陶 山 明 子¹⁾、岡 瑞 貴¹⁾、毎 田 裕 美 子¹⁾
森 義 和²⁾、岡 本 啓 湖¹⁾、米 元 俊 一¹⁾

¹⁾ 別府大学食物栄養科学部発酵食品学科、²⁾ 大分県酒造協同組合

【要 旨】

大分県産酵母の吟醸香を高めるため、突然変異によるセルレニン耐性株の取得を試みた。得られた耐性株の1段仕込み試験を行い、エタノール濃度および匂いかぎGC-MS-Oによる中高沸点香気成分を分析した。その結果、吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチルおよび果実香や甘い香りの脂肪酸エチルエステルを高生産する株を3株得た。特にK10③-5株はカプロン酸エチルを親株の4.5倍生産しており、吟醸香を高めた酵母を育種することができた。

【キーワード】

吟醸香、カプロン酸エチル、セルレニン耐性酵母、大分県産酵母、匂いかぎGC-MS-O

【諸 言】

大分県産酵母 KET002 株およびハ-4 株は、大分県酒造協同組合と別府大学との共同研究により大分県内の酒造会社の酒粕から分離した酵母である^{1, 2)}。大分県産酵母を使用した酒は協会酵母を使用した酒と比較すると、KET002 株は酸味が強く、旨味が少なく、甘みは更に少ない。ハ-4 株は旨味、甘みがかすかに低く、酸味が僅かに高く、協会酵母9号に近い味であった。男女を対象にした官能検査の結果では、点数の高い順に協会酵母9号、ハ-4 株、KET002 株という結果であった³⁾。

そこで大分県産酵母を用いた酒の品質向上を目的として、吟醸香を高めることを目指した。吟醸香の主要成分は、酢酸イソアミル（バナナ様の香）とカプロン酸エチル（リング様の香）であり、近年、吟醸酒の製造ではカプロン酸エチル高生産酵母が用いられることが多い。カプロン酸エチルを増加させるには、基質であるカプロン酸を増加させることが必要である。カプロン酸は脂肪酸合成酵素によって作られるが、通常はカプロン酸のような短鎖脂肪酸は大量に生成しない。しかし脂肪酸合成酵素の働きを弱めることにより、短鎖脂肪酸を蓄積することが出来る。そこで脂肪酸合成酵素を特異的に阻害する薬剤のセルレニンに耐性がある酵母を取得することで、カプロン酸エチル高生産株を育種した報告が多数ある⁴⁻⁶⁾。

本研究では、カプロン酸エチルを高生産する KET002 株およびハ-4 株の育種を試みた。得られた酵母を使用し、一段仕込み試験を行った後、ガスクロマトグラフィーや匂いかぎGC-MS-Oで香気成分の分析を行い、カプロン酸エチルを高生産する酵母を選抜した結果を報告する。

【実験方法】

1. 供試菌株

大分県産酵母 KET002 株およびハ-4 株を使用した。

2. 培地

KET002 株は YPD 培地 (2% D- グルコース、2% Polypeptone、1% Yeast Extract) または YPD 寒天培地 (YPD 培地、3% 寒天) で培養した。

セルレニン耐性株の選抜には、25 μ M セルレニンを含む YPD 寒天培地を使用した。

3. セルレニン耐性酵母の取得

セルレニン耐性酵母の取得は、市川ら⁵⁾の方法に準じて行った。100 mL 容三角フラスコに YPD 液体培地を 10 mL 入れ、KET002 株を 1 白金耳接種し、23°C で一夜培養した。培養液は遠心 (5000 rpm、5 min、4°C) して菌体回収後、滅菌水で 2 回洗浄した。遠心 (5000 rpm、5 min、4°C) して回収した菌体を、5% エチルメタンサルフォン酸 (EMS) を含むリン酸バッファー 600 μ L で懸濁した後 30°C で 20 分インキュベートして突然変異処理を行った。中和のため 6% チオ硫酸ナトリウム溶液を等量入れ、遠心 (5000 rpm、2 min、4°C) し、上清を除いた。菌体は、滅菌水で 2 回洗浄した。遠心 (5000 rpm、2 min、4°C) して回収した菌体を YPD 液体培地 100 μ L で懸濁し、セルレニン含有 YPD 寒天培地に塗布し 15°C で 2 週間培養した。出現したコロニーを新しいセルレニン含有 YPD 寒天培地に釣菌し、単離した。

4. 一段仕込み

YPD 液体培地を 4 mL 入れた試験管に、単離したセルレニン耐性酵母を 1 白金耳接種し、23°C で一夜、振とう培養 (120 rpm) し、前培養液とした。総米 2g、乾燥麹 4g および滅菌水 15 mL を 50 mL 容コニカルチューブに入れ、前培養液を 30 μ L 接種し、15°C で発酵させた。発酵経過の指標とするため 24 時間ごとにもろみの重量を測定した。15 日間発酵させた後、もろみをろ過し、得られたろ液のエタノール濃度をガスクロマトグラフィーで、香気成分をガスクロマトグラフィーと匂いかぎ GC-MS-O で分析した。コントロールとして KET002 株およびハ-4 株も同様に試験した。

5. ガスクロマトグラフィー

エタノール濃度の分析条件を以下に示す。

装置:GC-2014(株式会社島津製作所)、検出器:FDA 検出器、分離管: Φ 3.0 mm \times 2m、固定相:Porapak Q50/80、検出器温度:250°C、試料導入部温度:210°C、分離管温度:155°C、キャリアーガス:窒素、99.999%、流速:40 mL/min、分析試料量:2 μ L

香気成分の分析条件を以下に示す。

[ガスクロマトグラフィー]

装置:GC-2014(株式会社島津製作所)、カラム:DB-WAX (Φ 0.32 mm \times 30 m、膜厚 0.25 μ m)、カラム温度:75°C、FID 温度:250°C、キャリアーガス: N_2 、キャリアーガス流速:1.0 mL/min、スプリット比:10、ヘッドスペースガス量:1 mL、平衡時間:3 min、注入モード:スプリット、サンプリング時間:1.00 min、制御モード:圧力、圧力:38.2 kPa、全流量:1.0 mL/min、カラム流量:1.00 mL/min、線速度:20.2 cm/sec、パージ流量:0.0 mL/min

〔ヘッドスペースサンプラー〕

装置：HS-20、オープン温度：50℃、サンプルライン温度：150℃、トランスファーライン：150℃、バイアル攪拌：OFF、バイアル加圧用ガス圧力：50 kPa、バイアル保温時間：30 min、バイアル加圧時間：2 min、加圧平衡化時間：0.1 min、ロード時間：0.5 min、ロード平衡化時間：0.1 min、注入時間：1 min、ニードルフラッシュ時間：5 min、GC サイクルタイム：30 min

6. 匂いかぎ GC-MS-O

装置：7890B GC-5977AMSD (Agilent Technologies 社)、装置の上部に試料から香気成分をサンプリングする MultiPurpose Sampler (Grestel 社) を付属している。匂いかぎ装置は Olfactory Detector Port ODP 3 を用いた。

分析条件を以下に示す。

固定相マイクロ抽出 (SPME) ファイバー：Carboxen/PDMS (中極性)、試料加温条件温度：40℃、5分、GC カラム：Agilent 122-7032DB-WAX (30m × 250 μm)、カラム流量：1.9 mL/min、カラム昇温設定：40℃→100℃ (10℃ /min)、100℃→250℃ (8℃ /min)、イオン源温度：230℃、EI 法、GC-0 流量比 1 対 1

Olfactometry Temp：Transfer Temp：250℃、Exit Temp：150℃

【実験結果および考察】

1. セルレニン耐性酵母の取得

カプロン酸高生産酵母を育種するために、KET002 株およびハ-4 株に対して EMS による突然変異処理を行い、脂肪酸合成酵素を特異的に阻害する薬剤であるセルレニンに耐性がある酵母を取得した。セルレニン含有 YPD 寒天培地に出現したコロニーからランダムに 39 株選抜した。このうち KET002 株由来は 24 株、ハ-4 株由来は 15 株であった。

2. セルレニン耐性酵母の 1 段仕込み試験

選抜した 39 株および KET002 株、ハ-4 株について 1 段仕込み試験 (総米 2 g の小仕込試験) を行った。15℃、15 日間発酵させた後ろ過し、得られたろ液のエタノール濃度と香気成分を測定した。

表 1 にエタノール濃度の測定結果の一部を示す。KET002 株のエタノール濃度は 15.6%、ハ-4 株は 16.0% であった。セルレニン耐性株でエタノールが最も高かった株は K①-3 株 (19.3%)、最も低かった株は K10③-4 株 (14.3%) であった。

ガスクロマトグラフィーで測定した香気成分は、酢酸エチル、n-プロパノール、イソブタノール、イソアミルアルコールである。酢酸エチルはパイナップルに似た果実香、n-プロパノールは特異臭、イソブタノールは独特な香り・発酵した香り、イソアミルアルコールは特有のアルコール様の香りといわれている。測定結果を表 2 に示す。

KET002 株由来のセルレニン耐性株の結果についてまず述べる。酢酸エチル濃度については、K10③-4 株は KET002 株の 1.1 倍であり K10③-5 株は KET002 株と同程度であったが、それ以外のセルレニン耐性株は KET002 株の値より減少した。n-プロパノール濃度については、K10③-5 株は KET002 株と同程度であったが、それ以外のセルレニン耐性株は KET002 株の値より減少した。イソブタノール濃度については KET002 株の濃度より増加したのは 22 株であった。イソアミルアルコール濃度については、9 株が増加したが、K10③-5 株は減少していた。

次にハ-4株由来のセルレニン耐性株について述べる。酢酸エチル濃度については全てのセルレニン耐性株がハ-4株の値より減少した。n-プロパノール濃度については、2株が増加した。イソブタノール濃度については13株が増加した。イソアミルアルコール濃度については、10株が増加した。

イソアミルアルコールを多く含む清酒は、溶媒様臭やイソアミルアルコールの酸化により生じるイソバレリアルデヒドによるオフフレーバーが問題となる⁴⁾。K10③-5株のように酢酸エチル濃度は親株であるKET002株と同程度かつイソアミルアルコール濃度は減少している株の方が良いと考えられる。

さらに、一段仕込みのろ液の香りを測定者3名でかぎ、全員一致で吟醸香が高いと判定した3株(3K20①-1株、K10③-4株、K10③-5株)を選抜した。特にK10③-5株は高い吟醸香が感じられた。これらの3株はすべてKET002株由来であった。ガスクロマトグラフィーで測定した4つの香気成分について、これら3株とKET002株を比較した結果を図1に示す。

なお、カプロン酸エチル濃度については今回の分析条件ではほとんど検出できなかったため、これら3株(3K20①-1株、K10③-4株、K10③-5株)について匂いかぎGC-MS-Oで分析した。

表1 セルレニン耐性株の
エタノール濃度

菌株	エタノール濃度 (%)
親株	
KET002	15.6
ハ-4	16.0
KET002株由来セルレニン耐性株	
K①-1	17.1
K①-2	16.7
K①-3	19.3
K②-2	16.4
K②-3	16.7
K②-4	16.6
K10①-3	16.4
K10①-5	17.8
K10①-8	16.0
K10②-4	15.8
K10②-6	15.2
K10②-8	15.2
K10③-4	14.3
K10③-5	17.4
K10③-6	17.3
3K20①-1	15.7
3K20②-2	15.6
ハ-4株由来セルレニン耐性株	
ハ①-3	18.2
ハ①-4	18.2
ハ①-9	17.5
ハ②-1	18.1
ハ②-2	16.3
ハ②-3	16.9
ハ10①-2	18.2
ハ10①-4	17.3
ハ10①-5	16.4
ハ10②-2	14.6
ハ10②-6	17.8
ハ10②-8	16.0
ハ10③-4	17.4
ハ10③-8	16.4
ハ10③-9	18.5

表2 セルレニン耐性株を用いた一段仕込み試験で生成した酒の香気成分濃度

菌株	酢酸エチル (ppm)	n-プロパノール (ppm)	イソブタノール (ppm)	イソアミルアルコール (ppm)
親株				
KET002	66.3	131.7	89.1	153.1
ハ-4	52.4	85.5	76.8	132.7
KET002株由来セルレニン耐性株				
K①-1	32.8	90.9	84.0	117.2
K①-2	29.6	110.9	72.9	115.1
K①-3	32.7	81.3	129.2	149.1
K②-2	21.1	66.2	148.0	141.2
K②-3	29.1	64.3	109.5	124.0
K②-4	25.4	60.2	183.2	167.0
K10①-3	28.7	56.7	123.3	131.5
K10①-5	53.4	79.2	132.5	171.3
K10①-8	34.6	87.3	127.9	178.7
K10②-4	27.6	84.9	105.6	151.7
K10②-6	39.4	116.0	136.0	158.6
K10②-8	25.3	108.2	119.3	133.5
K10③-4	74.0	106.3	109.6	138.8
K10③-5	67.5	132.6	99.1	134.3
K10③-6	12.0	73.5	108.8	136.6
K30①	18.4	79.4	130.9	155.5
K30②	21.1	53.6	186.1	128.5
3K0①	16.2	57.6	106.4	157.3
3K0②	17.0	60.5	99.6	158.8
3K0③	20.4	62.5	103.5	159.4
3K20①	9.6	63.4	130.6	156.7
3K20①-1	59.2	93.1	121.1	137.3
3K20②	9.8	44.6	107.9	127.7
3K20②-2	46.5	73.4	120.1	146.7
ハ-4株由来セルレニン耐性株				
ハ①-3	31.2	81.2	108.5	142.1
ハ①-4	11.6	61.2	129.4	134.4
ハ①-9	14.6	76.7	67.4	123.2
ハ②-1	18.2	71.7	73.1	130.3
ハ②-2	15.8	75.1	108.3	146.4
ハ②-3	27.4	78.1	105.3	137.3
ハ10①-2	32.4	85.0	79.1	132.3
ハ10①-4	13.3	68.7	97.0	127.5
ハ10①-5	13.5	62.1	97.1	136.2
ハ10②-2	16.6	61.9	81.0	163.7
ハ10②-6	39.5	92.1	86.9	145.6
ハ10②-8	11.6	59.6	90.5	121.2
ハ10③-4	18.1	64.6	78.1	149.7
ハ10③-8	10.6	61.9	96.1	134.9
ハ10③-9	36.6	85.5	88.4	136.2

3. 匂いかぎ GC-MS-O による香気成分の分析

3K20 ①-1 株、K10 ③-4 株、K10 ③-5 株および KET002 株について匂いかぎ GC-MS-O による香気成分の分析を行った。匂いかぎは、測定者がカラムの出口に鼻を近づけ、香りを感じたらボタンを押しつつ、感じた香りを記述した。測定者は成人女性 1 名である。香り分析ソフトのアロマオフィスにより定性を行った香気成分は、一致率が 90% 以上のデータを記載した。また香気成分の濃度の比較には、得られたクロマトグラムピーク面積を用いた。

試験した 4 株のクロマトグラムを図 2 に示す。また、その解析結果を代表して K10 ③-5 株の結果を表 3 に示す。カプロン酸エチル以外にもさまざまな鎖長の脂肪酸エチルエステル類が検出された。試験した 4 株におけるこれらの脂肪酸エチルエステルの濃度の比較を図 3 に示す。すべてのセルレニン耐性株の値が KET002 株の値よりも増加した脂肪酸エチルエステルは、酪酸エチル、吉草酸エチル、カプロン酸エチル、ヘプタン酸エチル、カプリル酸エチル、パルミチン酸エチルであった。特に K10 ③-5 株はそれらの脂肪酸エチルエステル生産量が最も高かった。代表的な吟醸香であるカプロン酸エチルについては、K10 ③-5 株は親株である KET002 株の 4.5 倍生産した。またフルーティー香が特徴のラウリン酸エチルは KET002 株では検出されなかったが、すべてのセルレニン耐性株で検出された。K10 ③-4 株はミリスチン酸エチル生産量とワイン粕的な甘い匂いが特徴のヘプタン酸エチル生産量が高かったが、ノナン酸エチルは検出できなかった。

これらの結果から、K10 ③-5 株が最も吟醸香が高いと評価した。

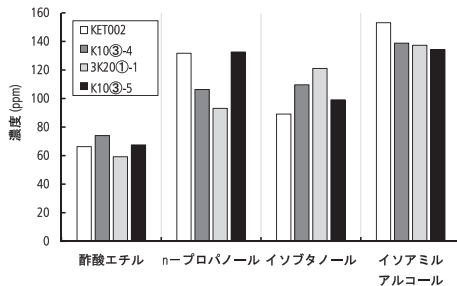


図 1 セルレニン耐性株を使用した一段仕込みの低沸点香気成分分析

表 3 セルレニン耐性株 K10 ③-5 を使用した一段仕込みの GC-MS-O による脂肪酸エチルエステル分析

No. : 図 2 (a) で脂肪酸エチルエステルを示すピークに付けた番号、RT : 保持時間 (min)

No.	RT	評価者の印象(香りの強さ)	香気成分の種類 (一致率)	概要
#1	5.24	サイダー (小)	酪酸エチル (94)	バナナ・パイナップルのような果実香
#2	6.78	フルーツ系 (小)	吉草酸エチル (94)	リンゴに似たフルーツ香
#3	8.42	サイダー (中)	カプロン酸エチル (98)	リンゴ様の果実香
#4	10.05		ヘプタン酸エチル (98)	ワイン粕的な甘い匂い
#5	11.69	フルーツ系 (小)	カプリル酸エチル (98)	アプリコット・パイナップル様フルーティー香
#6	13.29		ノナン酸エチル (97)	
#7	14.86		デカン酸エチル (99)	オイリーなナッツ・ワイン粕的な甘い匂い
#8	17.85	柑橘系 (小)	ラウリン酸エチル (99)	フルーティー香
#9	20.62	焼き菓子 (中)	ミリスチン酸エチル (99)	
#10	21.91		ペンタデカン酸エチル (98)	
#11	23.16		パルミチン酸エチル (99)	甘い香り

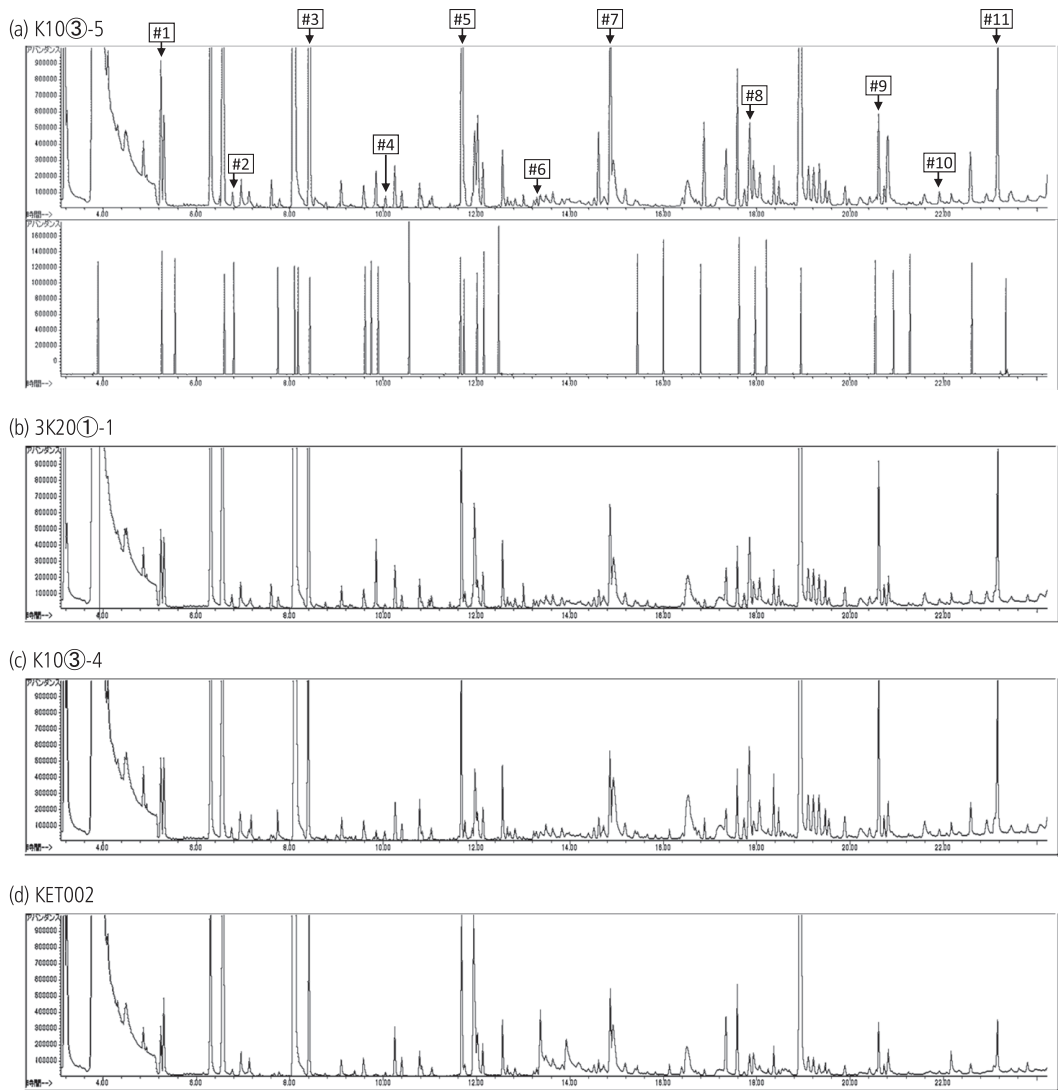


図2 匂いかぎ GC-MS-O による香気成分分析

(a) 上段：GC スペクトル。脂肪酸エチルエステルを示すピークにナンバリングした。下段：評価者が香りを感じたピーク。(b), (c), (d)：GC スペクトル。

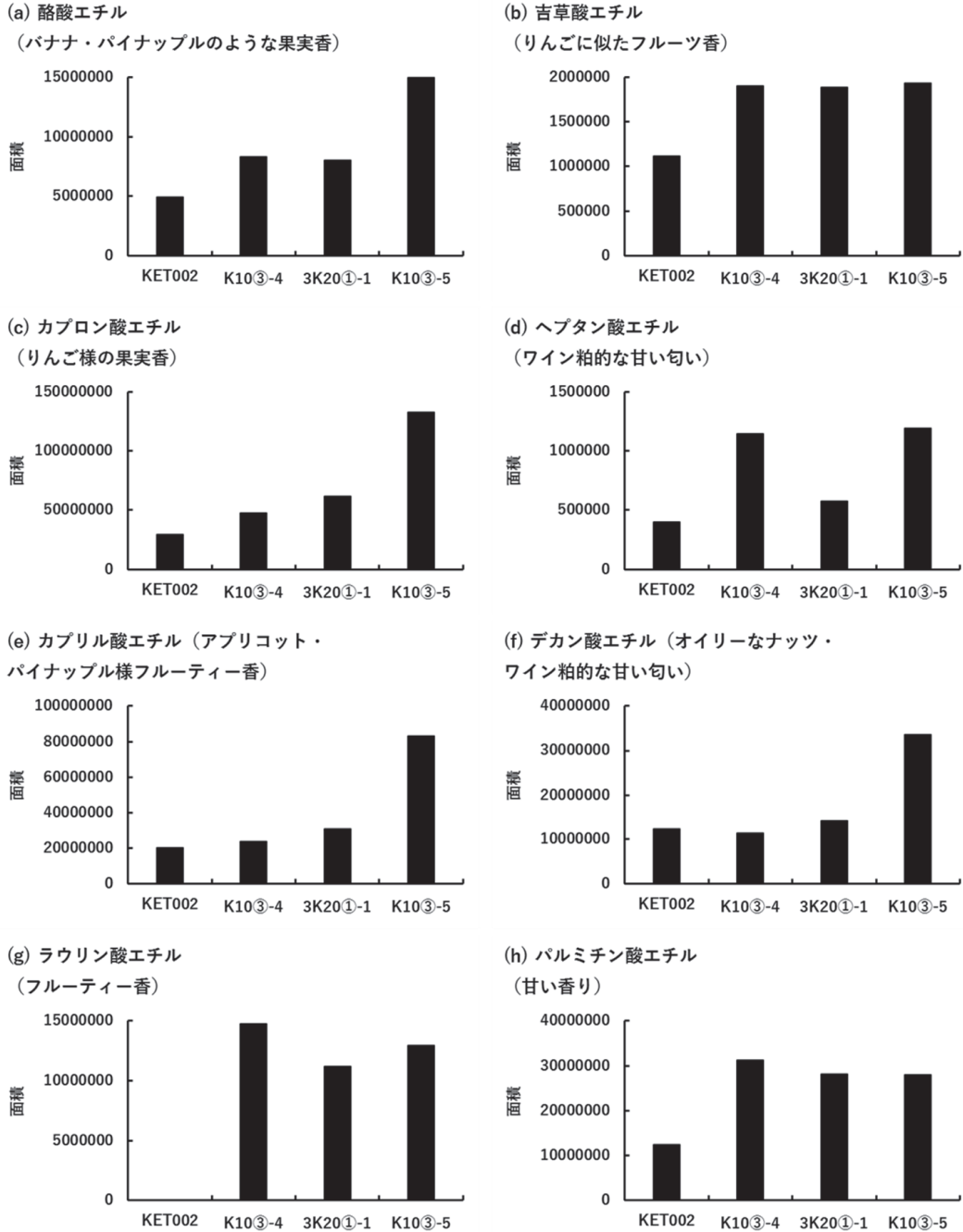


図3 KET002株とセルレニン耐性株を使用した一段仕込みの脂肪酸エチルエステルの比較
匂いかぎ GC-MS-O 分析で得られたピーク面積で比較した

【まとめ】

大分県産酵母 KET002 株およびハ-4 株の吟醸香を高めるため、突然変異によるセルレニン耐性株の取得を試みた。得られた耐性株の 1 段仕込み試験を行い、エタノール濃度および低沸点香氣成分分析に加え、匂いをかいで吟醸香の高いものを評価し、3 株選抜した。これらの株の中高沸点香氣成分をさらに GC-MS-O で分析すると、吟醸香の主要成分であるカプロン酸エチルおよびそれ以外の果実香や甘い香りの短鎖脂肪酸エチルエステルを KET002 株より多く生産していた。特に K10 ③-5 株はカプロン酸エチルを親株の 4.5 倍生産しており、吟醸香を高めた酵母を育種することができた。

今後、アミノ酸度および酸度、日本酒度を調べ、これらの酵母の更なる評価を行う。また、高い吟醸香を生産する形質が遺伝的に安定かどうかを検証する。

【参考文献】

1. 中村 俊雅：酒粕からの酒造用酵母の分離に関する研究、2012 年度別府大学卒業論文
2. 木村 奨：酒粕由来 DC 染色性分離菌株を用いた 15℃での清酒醸造に関する研究、2014 年度別府大学卒業論文
3. 小野 浩輝：大分県酒造組合選抜酵母（ハ-4, KET002）の小仕込み製造清酒の清酒酵母協会 9 号との品質及び特性比較、2016 年度別府大学卒業論文
4. 堤 浩子：清酒酵母の香氣生成の研究、生物工学会誌、89（12）：717-719（2011）
5. Ichikawa E., et.al. : Breeding of a Sake Yeast with Improved ethyl caproate productivity. *Agric. Biol. Chem.*, 55(8) : 2153-2154 (1991)
6. 大土井 律之ら：カプロン酸エチル高生成酵母の開発、広島食工技研報、No.23:15-18（2004）