

山口県オリジナルの酢酸イソアミル高生産酵母の開発

田中 淳也*・近藤美裕貴*・有馬秀幸*

Research of Yamaguchi Prefecture's original yeast for high isoamyl acetate production
Junya Tanaka, Miyuki Kondo and Hideyuki Arima

1. 緒 言

清酒に含まれるエステル類は香りに影響するため、製品を特徴付ける上で重要視されている。中でも、リンゴ様の香りを呈するカプロン酸エチルとバナナ様の香りを呈する酢酸イソアミルはともに「吟醸香」と呼ばれ、清酒にフルーティさ、華やかさを付与している。この2つの吟醸香のうち、カプロン酸エチルを香りの主体とする清酒がこれまで多く製造されてきたが、近年では、他製品との差別化や吟醸酒の多様化を図るため、酢酸イソアミルを香りの主体とする清酒も注目されている。山口県では、カプロン酸エチルを高生産する独自酵母はすでに開発されているが、酢酸イソアミルを高生産する酵母はなく、清酒業界からその開発が求められていた。

そこで、酢酸イソアミルを高生産する山口県独自の吟醸用酵母の開発を実施したので報告する。

2. 試験方法

2・1 使用菌株

酵母の親株には、山口県独自の酵母「山口9E(以下, 9E)」¹⁾及び生酏系清酒用酵母「やまぐち山麩酵母(以下, Y)」²⁾を使用した。

2・2 変異処理

9E及びYをYPD液体培地(1%酵母エキス, 1%ポリペプトン, 2%グルコース)を用いて30℃で24時間培養した後、培養液1mlを遠心分離して酵母を集菌した。集菌した酵母を滅菌水で2回洗浄し、0.1Mリン酸緩衝液を用いて5%に調製したエチルメタンサルホン酸(以下, EM)を1ml加え、室温で1時間振盪して変異処理を行った。その後、7%チオ硫酸ナトリウム1ml加えて中和し、再び滅菌水で2回洗浄した。

2・3 変異株の選択

変異処理後、滅菌水で洗浄した酵母菌体に5mlの滅菌水を加えて懸濁し、選択培地³⁾0.019%5,5-トリフルオロロイシンプレート(0.019%5,5-トリフルオロロイシン, 0.67%イーストナイトロジェンベース w/o アミノ酸, 2%グルコース, 2%寒天)に100 μ L塗布した。28℃で5日間培養し、生育したコロニーを選抜した。

2・4 発酵試験

α 化米(精米歩合60%:徳島製麴)80g, 乾燥麴(精米歩合60%:徳島製麴)20g, 汲水140gの一段仕込みで行った。発酵は12℃で30日間行い、遠心分離機(Avanti HP-25I:ベック

マンコールター:6,000rpm, 20分)によって上槽した。

2・5 泡なし株の選抜

2・5・1 泡なし株の分離

泡なし株の選抜は大内らの方法⁴⁾に従った。選抜株をYPD液体培地で24時間培養し、その培養液に0.25%に調製したシュガーエステル(P-1570:三菱ケミカル)を1ml加えて激しく振盪した。その後、遠心分離機(1,000rpm, 5分)により凝集菌体を沈殿させ、上部液を1ml採取して新たなYPD液体培地で24時間培養した。この培養液に対して、シュガーエステルを添加し、以降、同様の作業を繰り返した。最終的に、上部液100 μ LをYPDプレート(1%酵母エキス, 1%ポリペプトン, 2%グルコース, 2%寒天)に塗布し、生育したコロニーを釣菌して泡なし株の候補とした。

2・5・2 高泡形成能の判別

高泡形成能の判別は布川らの方法⁵⁾に従った。泡なし株の候補として選抜した株を生理食塩水に懸濁し、等量のベンゼンと混合して激しく振盪した後、静置して液相が分離した混合液の水相の濁度を紫外可視分光光度計(V-730BI0:日本分光)を用いて測定し、濁度が1.0を超えた菌株を泡なし株と判別した。

2・5・3 泡なし株の酢酸イソアミル生成能力による選抜

2・4と同様の方法により泡なし株の発酵試験を行い、製成酒の酢酸イソアミル濃度を測定した。

2・6 小仕込み試験

小仕込み試験の仕込みは、 α 化米(精米歩合60%:徳島製麴)及び乾燥麴(精米歩合60%:徳島製麴)を使用し、表1に示す仕込み配合により三段仕込みで行った。仕込み時の品温は、初添13℃, 仲添10℃, 留添7℃とし、もろみ10日目に最高品温12℃に達するよう昇温した。最高品温を維持し、アルコール濃度が16%に達した時点で遠心分離機により上槽した。得られた製成酒の一般成分は国税庁所定分析法⁶⁾, 香气成分はガスクロマトグラフ(7890B:アジレント・テクノロジーズ)を用いて測定した。

表1 小仕込み試験の仕込み配合

	初添	仲添	留添	合計
総米(g)	150	300	550	1,000
蒸米(g)	110	230	460	800
麴米(g)	40	70	90	200
汲み水(ml)	200	400	700	1,300

* 技術支援部

表2 パイロット試験の仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	合計
総米(kg)	4	7	15	24	50
蒸米(kg)	3	5	12	20	40
麴米(kg)	1	2	3	4	10
汲み水(L)	5	7	20	33	65

2・7 醸造試験

2・7・1 パイロット試験

総米 50kg のパイロット試験は、山田錦(精米歩合 60%)を使用し、表 2 に示す仕込み配合により三段仕込みで行った。酒母は中温速醸で製造した。酒母の仕込み時の品温は 20℃とし、3 日目まで 25℃を維持した。4 日目に 20℃、5 日目に 10℃、6 日目に 5℃と段階的に温度を下げ、8 日目に初添で使用した。もろみの仕込み時の品温は、初添 13℃、仲添 10℃、留添 6℃とし、もろみ 8 日目に最高品温 11℃前後に達するよう調整した。最高品温を 5 日間程度維持した後、徐々に温度を下げ、アルコール濃度が 16%に達した時点で上槽した。

得られた製成酒の一般成分は国税庁所定分析法⁶⁾、香气成分はガスクロマトグラフ(7890B: アジレント・テクノロジーズ)を用いて測定した。

2・7・2 酒造会社における醸造試験

県内の酒造会社 3 社の協力を得て、実製造規模における醸造試験を実施した。

A 社では、E12 及び E17 を使用し、雄町(精米歩合 65%)を原料とした総米 300kg の醸造試験を表 3 に示す仕込み配合により実施した。さらに、E12 を使用し、山田錦(精米歩合 65%)を原料とした総米 1,000kg の醸造試験を表 4 に示す仕込み配合により実施した。

B 社では E11, E12, E17, E23 を使用し、山田錦(精米歩合 40%)を原料とした総米 1,180kg の醸造試験を表 5 に示す仕込み配合により実施した。

C 社では E12 を使用し、山田錦(精米歩合 50%)を原料とした総米 400kg の醸造試験を表 6 に示す仕込み配合により実施した。

表3 A社総米300kgの仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	水	合計
総米(kg)	15	50	90	145		300
蒸米(kg)	10	35	70	120		235
米麴(kg)	5	15	20	25		65
汲み水(L)	25	55	110	230	75	495

表4 A社総米1,000kgの仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	水	合計
総米(kg)	60	170	275	495		1,000
蒸米(kg)	40	120	210	420		790
米麴(kg)	20	50	65	75		210
汲み水(L)	60	160	350	830		1,400

表5 B社の仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	水	合計
総米(kg)	75	190	350	565		1,180
蒸米(kg)	50	140	290	475		955
米麴(kg)	25	50	60	90		225
汲み水(L)	85	200	470	880	150	1,785

表6 C社の仕込み配合

	酒母	初添	仲添	留添	水	合計
総米(kg)	24	65	123	188		400
蒸米(kg)	16	48	99	160		323
米麴(kg)	8	17	24	28		77
汲み水(L)	28	62	155	230	適宜	475+α

得られた製成酒の香气成分はガスクロマトグラフ(7890B: アジレント・テクノロジーズ)を用いて測定した。

2・8 官能評価

醸造酒の官能評価は酒造関係者を対象として実施した。官能評価は、酢酸イソアミルの香りについては「1=感じない、2=わずかに感じる、3=感じる、4=強く感じる」、イソアミルアルコールについては「1=感じない、2=感じるが許容範囲、3=強く感じる、4=問題あり」の4段階で評価した。

3. 結果及び考察

3・1 酢酸イソアミル高生産酵母の取得

酢酸イソアミルは、イソアミルアルコールとアセチル CoA が結合して生成されるため、その高生産酵母を得るためにはイソアミルアルコールの生合成が旺盛な酵母を選抜する必要がある。イソアミルアルコールは、酵母がロイシンを代謝する過程において生合成されるが、最終生産物が蓄積すると代謝が抑制されるフィードバック阻害が発生する。そのため、酢酸イソアミル高生産酵母の育種には、ロイシンのアナログ耐性株を取得することが有効である³⁾。そこで、ロイシンアナログである 5,5,5-トリフルオロロイシン耐性のある酵母の取得を試みた。

親株 9E 及び Y に対し、EMS による変異処理を施し、ロイシンアナログ含有培地で培養したところ、9E の変異株から

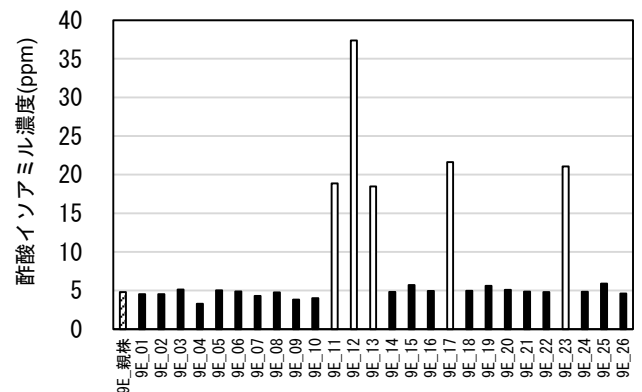


図1 9E変異株の酢酸イソアミル濃度

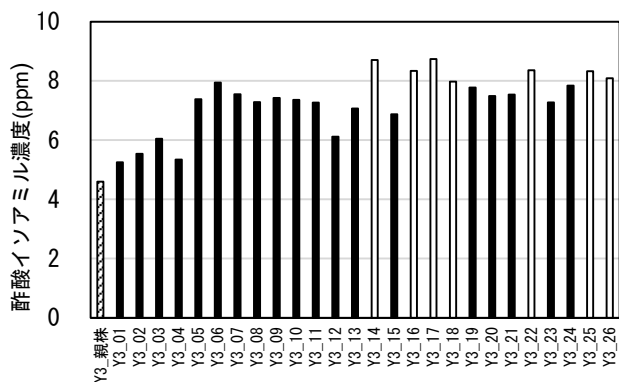


図2 Y変異株の酢酸イソアミル濃度

26株, Yの変異株から26株のアナログ耐性株が得られた。これらの変異株を用いて総米100gの発酵試験を行い, 醸成酒の酢酸イソアミル濃度を測定したところ, 9Eの変異株では親株の酢酸イソアミル濃度を大きく上回る5株を得た(図1)。また, Yの変異株では取得したすべての株において親株よりも高い値を示した(図2)。これらの結果から, 酢酸イソアミル濃度が8ppm以上である9Eの変異株から5株, Yの変異株から7株の計12株を酢酸イソアミル高生産候補酵母として選抜した(グラフ内の白抜きで示した株)。

3・2 泡なし株の取得

3・2・1 泡なし株の選抜

泡なし酵母は高泡を形成しないため, 高泡を形成する泡あり酵母よりも仕込量を増やすことができ, また, タンク内壁に付着した泡の残渣の清掃作業が減るため, 経済性や作業性, 衛生面の観点から近年の清酒製造において広く使用されている。そのため, 本研究において開発する酵母も泡なし株を取得することとした。

酵母の培養液に界面活性剤であるシュガーエステルを添加すると泡あり酵母は凝集体を形成するが, 泡なし酵母は凝集体を形成しないことが見出されている⁴⁾。これは酵母の細胞壁構造の違いに起因しており, 界面化学的な性質により泡への付着性に差異が生じていると考えられている。この性質を利用したシュガーエステル凝集法により, 変異株12株からそれぞれ8~13株, 合計111株の凝集性が低いと推定される株を取得した。

3・2・2 高泡生成能の判別

泡への付着性が高い酵母の細胞表面は疎水的であり, 有

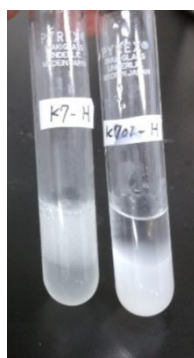


図3 有機溶媒による泡なし酵母の識別 (左: 協会7号(泡あり) 右: 協会701号(泡なし))

機溶媒と混合すると泡あり酵母は有機溶媒相へ移行するが, 泡なし酵母は水相へ移行することが見出されている⁴⁾(図3)。そこで, 取得した凝集性が低いと推定される菌株について, その懸濁液とベンゼンを混合し, 水相の濁度(OD660)を測定した結果, 111株のうち23株の水相濁度が1.0以上であった。この23株について, 培養と識別試験を繰り返し, いずれの試験においても水相濁度が1.0を超えた20株を泡なし株として選抜した(表7)。

3・2・3 泡なし株の酢酸イソアミル生産能力による選抜

選抜した20株について, 総米100gの発酵試験を再度行い, 酢酸イソアミルの生成能力を検証した。醸成酒の香气成分を測定した結果, すべての株において, 酢酸イソアミル濃度が親株に比べて高い値を示した(図4)。中でも, 2回の発酵試験において安定して10ppm以上の酢酸イソアミル濃度を生成した5株を最終候補として選抜した。

3・3 小仕込み試験

選抜した5株について, 総米1kgの小仕込み試験を実施し, 香气成分の生成能力や発酵特性, 高泡形成を検証した。5株の選抜株のうちY17については対照株としたK-701やK-901よりも旺盛な発酵経過をたどり, もろみのアルコール濃度が16%を超えた25日目で上槽した。その他の候補株については, もろみ後半で発酵が緩慢になり, E17は35日目に, E11, E12及びE23は37日目に上槽した(図5)。E12については, アルコール濃度が16%に達しなかった。

表7 判別試験における水相の濁度

記号	泡なし前	No.	濁度	No.	濁度	No.	濁度	No.	濁度
Y14	0.21	11	1.62	13	1.22				
Y16	0.64	5	1.64	6	1.64	7	1.64	8	1.59
Y17	0.61	6	1.16	8	1.43				
Y18	0.18	8	1.01						
Y22	0.20	8	1.03						
Y25	0.27	3	1.20						
Y26	0.24	1	1.70	5	1.77				
E11	0.67	1	1.17	2	1.09				
E12	0.67	5	1.02						
E13	0.71	9	1.13	13	1.18				
E17	0.56	7	1.15						
E23	0.59	12	1.20						

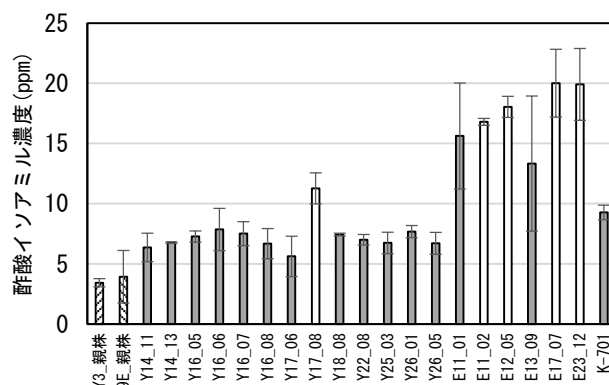


図4 選抜した泡なし株の酢酸イソアミル濃度

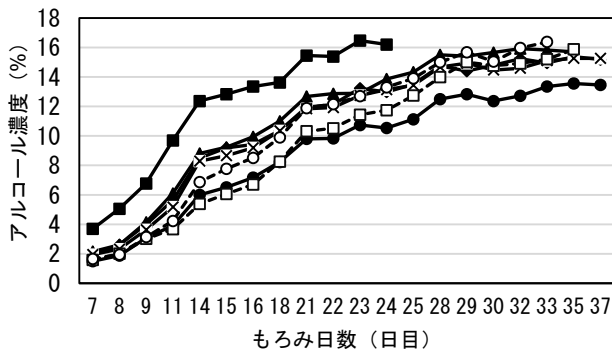


図5 小仕込み試験におけるアルコール濃度の推移
Y17 (■), E11 (◆), E12 (●), E17 (▲),
E23 (×), K-701 (○), K-901 (□)

表8 小仕込み試験における製成酒の成分

	Y17	E11	E12	E17	E23	K-701	K-901
アルコール (%)	16.5	16.0	14.4	16.2	15.9	16.6	16.5
日本酒度	-19	-23	-36	-22	-22	-13	-16
酸度	2.1	2.4	2.5	2.5	2.3	1.7	2.0
アミノ酸度	1.3	2.4	2.9	2.3	2.5	1.1	2.1
酢酸イソアミル (ppm)	11.9	11.5	9.6	16.1	11.6	6.1	3.9
イソアミルアルコール (ppm)	362	288	276	367	280	157	134
カブロン酸エチル (ppm)	2.0	2.2	2.0	2.5	2.2	1.3	1.1

やまぐち山麴酵母は生醗系酒母で使用することを想定した酵母であり、仕込み初期におけるアルコール生成能力の高さを指標として選抜していることから、Y17の発酵力の強さは親株の性質が引き継がれた結果と考えられる。一方、9Eを親株とした選抜株では、もろみ初期のアルコール生成は親株や協会酵母と同程度であったが、E12については、もろみ中期以降の発酵が緩慢になった。EMSによる突然変異では、複数の遺伝子にランダムに変異が起きていると考えられ、E12においてはアルコール生成に関わる遺伝子に変異し、発酵が弱まった可能性が考えられる。また、高泡の形成については、いずれの選抜株も泡なし株であるK-701やK-901と同程度の形成状態であった。

製成酒の一般成分及び香気成分の測定結果を表8に示す。アルコール濃度については、発酵が旺盛だったY17株は16.5%、次いで上槽が早かったE17は16.2%であった。発酵が緩慢であったE12は14.4%であった。いずれの選抜株も一般的な清酒製品のアルコール濃度である15%前後となっており、清酒製造で使用できる発酵能力を有することが確認された。

一方、酢酸イソアミル濃度について、選抜株では9~16 ppmの範囲で検出されており、いずれも対照としたK-701やK-901よりも高い値であり、仕込み規模を拡大しても高い酢酸イソアミル生成能力が再現されることを確認した。

3・4 醸造試験

3・4・1 パイロット試験

選抜酵母を用いて総米50kgの醸造試験を実施した結果、Y17以外の選抜株については、K-901と概ね同等の発酵経過をたどり、23日目前後で上槽目標としたアルコール濃度16%に到達した(図6)。E12については、もろみ後半のアルコー

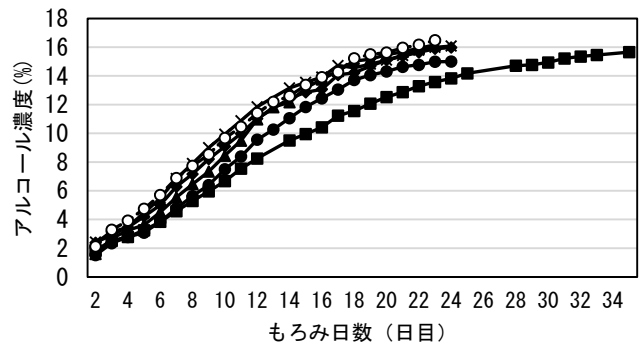


図6 パイロット試験におけるアルコール濃度の推移
Y17 (■), E11 (◆), E12 (●), E17 (▲),
E23 (×), K-701 (○)

表9 パイロット試験における製成酒の成分

	Y17	E11	E12	E17	E23	K-901
アルコール (%)	15.7	16.1	15.8	16.1	16.2	16.4
日本酒度	-2.3	-3.5	0.2	0.2	-2.3	-0.2
酸度	3.4	2.2	2.4	2.3	2.3	2.2
アミノ酸度	1.6	1.1	1.4	1.5	1.4	1.4
酢酸イソアミル (ppm)	7.4	9.8	9.9	11.2	10.8	4.6
イソアミルアルコール (ppm)	619	237	252	278	233	126
カブロン酸エチル (ppm)	0.8	2.6	4.9	4.5	3.4	2.1

ル濃度の推移が停滞したため、小仕込み試験と同様に16%に到達しないまま上槽した。Y17については、もろみ初期から発酵が緩慢であり、上槽までに35日を要した。小仕込み試験では発酵が旺盛であり、選抜株の中では最も早く上槽目標のアルコール濃度に達していたため、パイロット試験では何らかの発酵不良が生じたと考えられた。また、高泡の形成については、いずれの候補株もK-901と同等であることを確認した。

製成酒の酢酸イソアミル濃度は、E17が最も高い11.2 ppm、Y17が最も低い7.4 ppmであったが、いずれの候補株もK-901より高い値を示した(表9)。これらの結果は、小仕込み試験と比較するとやや低くなっているものの、製成酒を官能評価したところ、Y17以外の選抜株では酢酸イソアミルが呈するバナナ様の香りが感じられた。しかしながら、前駆体であるイソアミルアルコールが呈するインク様の臭いも感じられた。

3・4・2 酒造会社における醸造試験

A社における醸造試験では、E12のもろみにおいて粘稠な高泡(図7)がみられ、センターにおけるパイロット試験に比べてアルコール生成に遅れがみられた。この原因として、泡



図7 総米300kg試験におけるもろみの状態
左: E12 右: E17

の表面には酵母が付着しており、泡が高く上がっている間はもろみ中の酵母数が減るため発酵が遅くなり、アルコールの生成が遅れたものと考えられる。E12株を使用した総米1,000kgの試験においても同様の傾向がみられた。本試験において高泡が形成された要因については検証が必要である。

B社及びC社における醸造試験においても、E12のもろみ経過は他の選抜株や通常の製造で使用している酵母に比べて緩慢な傾向がみられた。パイロット試験でも他の選抜株に比べてE12の発酵経過は緩慢であったことから、E12はもろみ後半において発酵力が弱まり、アルコールの生成が遅れる性質があると考えられる。なお、B社及びC社の醸造試験では高泡の形成はみられなかった。

酒造会社における醸造試験の醸成酒の香気成分を表10に示す。製清酒の酢酸イソアミル濃度は、いずれの選抜株もパイロット試験と比較して低かった。特に、E12については3社で試験を実施したが、1.8~7.3ppmと大きくばらつき、製造方法や仕込量の違いによって酢酸イソアミルの生成量に差が生じることが確認された。一方、イソアミルアルコール濃度は、パイロット試験と比較して減少したものの、200ppm前後の濃度で検出された。醸成酒の官能評価では、酢酸イソアミル濃度が低いものやE/A比(酢酸イソアミル濃度÷イソアミルアルコール濃度×100)の値が低いものは、酢酸イソアミルの香りを「感じない」とする評価者の割合が高かった(図8)。

一方、イソアミルアルコールの香りに対する評価では、多くの評価者が「感じない」「許容範囲」と評価したが、イソ

表10 小仕込み試験における醸成酒の成分

使用酵母	製造者	仕込総米(kg)	酢酸イソアミル(ppm)	イソアミルアルコール(ppm)	E/A比
E11	センター	50	9.8	237	4.1
	B社	1,200	7.3	219	3.3
E12	センター	50	9.9	252	3.9
	A社	300	1.8	161	1.1
	A社	1,000	4.1	183	2.2
	B社	1,200	7.3	181	4.0
	C社	400(普通)	4.2	166	2.6
	C社	400(低アル)	4.0	154	2.6
E17	センター	50	11.2	273	4.1
	A社	300	2.1	181	1.2
	B社	1,200	6.8	214	3.2
E23	センター	50	10.8	233	4.6
	B社	1,200	6.0	170	3.5
901	センター	50	4.6	126	3.7

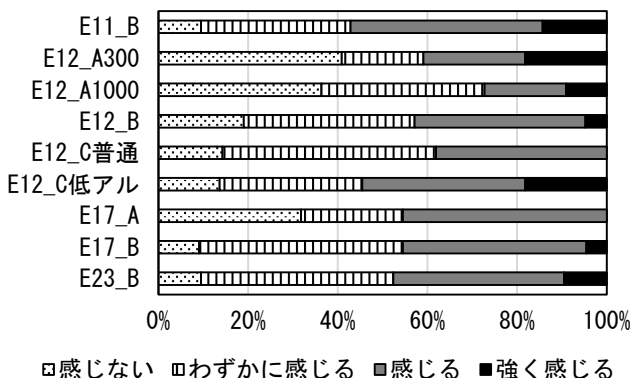


図8 醸成酒の酢酸イソアミルの香りに対する評価

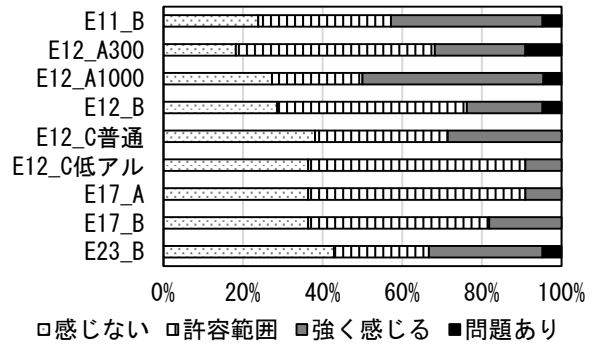


図9 醸成酒のイソアミルアルコールの香りに対する評価

アミルアルコール濃度が200ppmを超えるものやE/A比の値が低いものでは、「強く感じる」「問題あり」とする評価者の割合が増加した(図9)。これらの結果から、E/A比が高いほどイソアミルアルコールの呈するインク様のオフフレーバーに対する感受性が緩和されるものと考えられる。また、カプロン酸エチル等の他の香気成分の濃度が高かったものもあり、それらもオフフレーバーの感受性に影響を及ぼしたのと考えられる。

以上の結果から、実地試験に供した4株を実用化するためには、酢酸イソアミル生産性の安定化、イソアミルアルコール濃度の低減、非高泡形成の再現性が課題として残った。

4. 結 言

吟醸酒の多様化が進む近年、従来のカプロン酸エチルではなく酢酸イソアミルを高生産する酵母の開発が求められており、山口県の独自酵母を使用した酢酸イソアミル高生産酵母の育種を試みた。突然変異処理を施した酵母のうち、酢酸イソアミルの前駆物質であるイソアミルアルコールの生産量が増加する変異株を取得し、酢酸イソアミルの生成量を指標に選抜した。これらの選抜株から、凝集性が低く、醸造時に高泡を形成しにくい「泡なし株」を選抜し、最終候補として5株の酵母を得た。この5株を使用して総米50kgのパイロット試験を実施したところ、山口9Eを親株とした変異株4株について、協会901号酵母と同等の発酵経過を示す一方で、酢酸イソアミルを高生産することが確認された。これら4株のうち任意の株を用いた実製造規模の醸造試験を県内酒造会社3社の協力により実施したところ、酢酸イソアミルの生成量や高泡の形成にばらつきがあり、求める能力を安定的に発揮できない点やイソアミルアルコールのインク様のオフフレーバーが残る点などの課題が明らかとなった。今後、県独自の酵母としてブランド化を図るためには、選抜株の改良が必要であると考えられる。

本研究の遂行にあたり、実製造規模での醸造試験にご協力いただいた酒造会社の皆様に感謝いたします。また、官能評価へご協力いただきました酒造関係者の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1) 有富和生：山口県産業技術センター技術報告, **11**, p. 33-34(1999).
- 2) 田中淳也：山口県産業技術センター技術報告, **28**, p. 33-38(2016).
- 3) 市川英治：日本醸造協会誌, **84**, p. 166-170(1989).
- 4) 大内弘造：日本醸造協会誌, **67**, p. 54-57(1972).
- 5) 布川弥太郎：化学と生物, **11**, p. 216-224(1973).
- 6) 第四回改正国税庁所定分析法注解, p. 7-33(1993).