

## 清酒酵母の開発

横堀正敏\*<sup>1</sup> 高橋友哉\*<sup>2</sup> 増田こずえ\*<sup>1</sup> 阿部知子\*\*\*

### Development of Sake Yeast

YOKOBORI Masatoshi\*<sup>1</sup>, TAKAHASHI Tomoya\*<sup>2</sup>, MASUDA Kozue\*<sup>1</sup>, ABE Tomoko\*\*\*

#### 抄録

埼玉酵母を親とし、重イオンビーム照射や薬剤処理により、セルレニン耐性株260株とシクロヘキシミド耐性株305株の計565株の変異株を取得した。変異株は発酵試験を行い、香气生成や生酸性、発酵能により、カプロン酸エチル高生産性株21株、少酸株10株、多酸株11株、高発酵性株12株の計54株を選抜した。

キーワード：清酒酵母，重イオンビーム，人工変異，香气成分

## 1 はじめに

以前の研究において、自然界や酒造場から酵母を取得し、4株が実用化された<sup>1)~5)</sup>。これらは風味等に特徴はあるものの、清酒においては、大吟醸酒について更なる高香气生成や、多酸あるいは少酸などの特徴ある酵母が求められている。

本研究では、新たに実用化された株に加え、これまで使用されてきた埼玉酵母を親株とし、人工変異により新たに特徴的な酵母を取得することを目的とした。

## 2 実験方法

### 2.1 供試酵母

従来使用されてきた埼玉酵母 (A01、BK2、C、D)、及び新たに実用化された埼玉酵母 (E、F、YY、MR)<sup>1)~5)</sup>。

上に挙げた株をそれぞれ、試験管スケールでアンブル酒母とし、平板培地により単独コロニーを形成させ、各株について発酵試験を行い、香气生成、生酸性、発酵能より優秀なものをそれぞれの

\*<sup>1</sup> 北部研究所 生物工学担当

\*<sup>2</sup> 資源循環推進課

\*\*\* 独立行政法人理化学研究所

親株とした。

### 2.2 使用培地

(1) YPG 培地：グルコース 1%、ペプトン 0.2%、酵母エキス 0.3%、リン酸二水素カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム 0.04%

(2) YPG 寒天培地：YPG 培地+寒天 1.8%

(3) セルレニン耐性選択培地<sup>6)</sup> (以下CER培地)：セルレニン 0.558mg/100mL、アミノ酸不含イーストナイトロジェンベース 0.67%、グルコース 2%、寒天 2%

(4) シクロヘキシミド耐性選択培地<sup>7)</sup> (以下CYH培地)：シクロヘキシミド 0.1mg/100mL+YPG寒天培地

(5) 麴エキス：乾燥麴に3倍程度の湯を加え、55°Cで8~16時間糖化後、ろ過した。そこに同量のブドウ糖、0.3%のリン酸1カリウムとリン酸2カリウム、1%のグルタミン酸ナトリウムを加え、Brix6に調製した。

### 2.3 重イオンビーム照射

鉄イオンは、親株の培養液を CER 培地、CYH 培地、YPG 寒天培地に塗布し、蓋をしたシャーレの上から 400Gy を 10 分間照射した。その後 28°C で 1 週間以上培養した。

炭素イオンは、一晚振とう培養後水洗した菌体を水に懸濁させてマイクロチューブに分注し、そのまま 400Gy を 10 分間照射後、CER 培地、CYH 培地、YPG 寒天培地に塗布し、28℃で 1 週間以上培養した。

## 2.4 薬剤処理

YPG 培地 5mL で各親株を一晚 30℃で振とう培養し、2 回水洗した菌体を 2%グルコース含有 0.2M リン酸緩衝液 (pH8) 5mL に懸濁し、エチルメタンスルホン酸 0.3mL を加えて 30℃で 1 時間振とうした。その後 3 回水洗した菌体を適宜希釈して CER 培地、CYH 培地、YPG 寒天培地に塗布し、28℃で 1 週間以上培養した。

## 2.5 発酵試験

ヘッドスペースサンプラー用 20mL容バイアルに麴エキス 12mLと乾燥麴 2gを入れ、酵母(対照は埼玉E酵母)を添加し、15℃で培養した。培養中は経時的に重量を測定した。2 週間後、培養液から 5mLを分取して酸度<sup>8)</sup>を測定し、残りに内部標準液 1mLを加え、ヘッドスペースガスクロマトグラフィー(カラム:DB-WAX 長さ 30m×内径 0.53mm×膜厚 1μm、カラムオープン:85℃、キャリアガス:He 5mL/分、注入口:250℃、スプリット比:5、検出器:FID 250℃、ヘッドスペースサンプラー加熱温度:50℃、加熱時間:30分)により香气成分を測定した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 薬剤耐性株の取得

処理後の各培地での生存率を表1に示した。親株ごとに生存率には差があり、特に A01 を親と

表1 変異処理後酵母の生存率 (%)

培地 処理	YPG	CER	CYH
鉄イオンビーム照射	0~81	0~0.003	0.009 ~ 0.06
炭素イオンビーム照射	15~100	0~23	0.002 ~ 68
薬剤	0.001 ~ 0.5	0~0.01	0~0.003

鉄イオン照射では平板への塗布量が多すぎ測定できないものがあり、それを除いた結果。

したものではセルレニン耐性株は得ることができなかった。

### 3.2 発酵試験

セルレニン耐性株 260 株、シクロヘキシミド耐性株 305 株を取得し、発酵試験を行った。まず

(1) 炭酸ガス減量が対照の 8 割未満

(2) 酢酸エチルが 100ppm 以上

のものを除き、

(3) カプロン酸エチルが対照の倍以上

(4) 酸度が対照の 8 割未満

(5) 酸度が対照の 5 割増以上

(6) 炭酸ガス減量が対照の 2 割増以上

のものを選抜したところ、214 株となった。これらを再度発酵試験に供し、一回目の発酵試験結果を勘案して、カプロン酸エチル高生産性株 21 株、少酸株 10 株、多酸株 11 株、高発酵性株 12 株の計 54 株を選抜した。

## 4 まとめ

埼玉酵母を親とし、薬剤処理や重イオンビーム照射により、変異株 565 株を得た。

発酵試験を行い、香气生成、生酸性、発酵性により 54 株を選抜した。

## 謝辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御指導いただきました独立行政法人産業技術総合研究所の植村浩先生に感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 鶴菌大, 富永達矢, 仲島日出男, 横堀正敏: 有用機能性酵母の探索と利用, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **3**, (2005)116
- 2) 横堀正敏, 鶴菌大, 渡辺泰成, 増田こずえ, 橋本麻里: 微生物利用技術に関する研究 (2) -新規酵母の分離と食品への応用- 試料の採取と酵母の分離-, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **4**, (2006)59
- 3) 横堀正敏, 鶴菌大, 渡辺泰成, 増田こずえ: 微生物利用技術に関する研究-新規酵母の分

離と食品への応用ー，埼玉県産業技術総合センター研究報告，**5**, (2007)107

- 4) 横堀正敏，鶴藺大，高橋友哉，増田こずえ：微生物利用技術に関する研究ー新規酵母の分離と食品への応用（3）ー，埼玉県産業技術総合センター研究報告，**6**, (2008)55
- 5) 横堀正敏，高橋友哉，増田こずえ：新規清酒酵母の実用化，埼玉県産業技術総合センター研究報告，**7**, (2009)51
- 6) 市川英治：カプロン酸エチル高生産酵母，日本醸造協会誌，**88**, 2(1993)101
- 7) 吉田清，稲橋正明，中村欽一，野白喜久雄：Cycloheximide 耐性株から得られたリンゴ酸高生産性酵母，日本醸造協会誌，**88**, 8(1993)645
- 8) 注解編集委員会編：第四回改正国税庁所定分析法注解，日本醸造協会，(1993)20