

## UV-LED を用いた清酒酵母の育種

岡久 修己<sup>\*1</sup>, 宮崎 絵梨<sup>\*1</sup>, 日開野 輔<sup>\*2</sup>, 中村 怜<sup>\*3</sup>

### 抄 録

清酒の香味を決定する上で、酵母は重要な要素であり、特徴的な香味生成能を有する新規酵母が育種できれば、既存の清酒とは異なった香味を有する清酒を醸造することが可能となる。そこで、UV-LEDを用いて、清酒種酵母に突然変異を誘発させることにより、特徴的な香味生成能を持ちつつ発酵力に優れた徳島県独自の清酒酵母の開発を行った。

### 1 はじめに

香味良好な清酒を醸造する目的で、新規清酒酵母の育種は、全国各地で盛んに取り組まれている。育種の手法としては、エチルメタンスルフォネート等の薬剤処理、水銀ランプを用いた紫外線照射等による変異株の取得や、酵母の接合による交雑株の取得等が挙げられる。

しかしながら、UV-LED を光源とする紫外線照射による清酒酵母の育種については、報告例が無く、本方法により、従来とは違った性質の清酒酵母が取得できる可能性が考えられる。

清酒の高品質化の指標として、吟醸酒の香りの主要な成分の一つであるカプロン酸エチルの含量が挙げられる。そこで、UV-LED を光源とした紫外線照射により、清酒酵母に突然変異を誘発させ、カプロン酸エチル生成能が高く、かつ発酵力に優れた徳島県独自の清酒酵母の取得を目指し、研究を実施した。

### 2 実験方法

#### 2・1 供試菌株および培地

親株としてきょうかい901号酵母を使用した。培地としてYPD培地（1%酵母エキス，2%ポリペプトン，2%ブドウ糖），麴汁培地（乾燥麴に4倍量の水を加えて糖化し，濾過後にBrix10%，pH4に調整した培地。乾燥麴には徳島製麴社製のG-50（精米歩合50%「山田錦」）を用いた。）およびアルコール脱水麴添加培地<sup>1)</sup>を用いた。

#### 2・2 微生物育種用UV-LED照射装置

試作した微生物育種用UV-LED照射装置は、UV-LEDを光源とする紫外線の照射距離を自在に変更でき、被照射物に対して目的の紫外線照射強度を得ることを可能とした。また、UV-LED照射装置以外からの光の影響を防ぐためのカバーを取り付け、カバー外部から照射距離および光源の電源を調整可能とした。本試験ではUV-LED光源として、主波長280nmのLED（2mW）を2つ用いた。電源は一般的なACアダプター（出力は定電圧）を利用し、基板内の電子回路で定電流制御に変換し、LEDを発光した。

#### 2・3 UV-LEDを光源とする紫外線照射試験

きょうかい901号酵母を、YPD液体培地で28℃2日間振盪培養後、集菌洗浄し、生理食塩水にて、約 $1 \times 10^7$  cells/mlの菌懸濁液を調製した。この菌懸濁液8mlを直径60mmのシャーレに入れ、菌懸濁液に対して、微生物育種用UV-LED照射装置を用いてUV-LEDを光源とする主波長280nmの紫外線を、シャーレの液体表面から40～60mmの距離で、2～6分間照射した。照射後の菌懸濁液を回収し、生理食塩水で適宜希釈後、YPD寒天平板培地に塗布し、28℃で4日間培養後、生育した酵母コロニー数をカウントした。

#### 2・4 セルレニン耐性変異株の分離

同様に調製した菌懸濁液に対して、UV-LEDを光源とする主波長280nmの紫外線をシャーレの液体表面から50mmの距離で4分間照射した後に、Ichikawaら<sup>2)</sup>の方法を参考にセルレニン耐性株の分離を行った。すなわち、紫外線照射後の菌懸濁液を12.5μMセルレニン含有YPD寒天平板培地に塗布し、28℃で4日間培養後、生育した酵母コロニーを単離した。

\*1 食品・応用生物担当，\*2 機械技術担当

\*3 電子技術担当

## 2・5 アルコール脱水麴添加培地による発酵試験

アルコール脱水麴添加培地による発酵試験は、斎藤らの方法<sup>1)</sup>を参考に行った。YPD液体培地で25℃3日間培養した酵母培養液を、アルコール脱水麴培地に添加し、15℃で20日間培養した。培養後に、炭酸ガス減少量を測定し、培地上清について、香气成分および酸度の測定を行った。

## 2・6 清酒小仕込試験

表1に示した仕込み配合で総米200gの清酒小仕込み試験を行った。酵母の前培養は、アルコール脱水麴添加培地で、25℃、3日間行った。掛米は $\alpha$ 化米YA-50(精米歩合50%「山田錦」)、麴は乾燥麴G-50(精米歩合50%「山田錦」)(いずれも徳島製麴社製)を用いた。品温は、添15℃、仲10℃、留6.5℃とし、その後9日目に最高品温が10.5℃となるように約0.5℃/日ずつ品温を上昇させ、以後上槽までこの温度を維持した。留以降の炭酸ガス減少量が58g以上となった時点で、遠心分離により上槽した。

表1 総米200g清酒小仕込み試験仕込み配合

	水麴	添	仲	留	計
蒸米(g)	-	28	46	84	158
麴米(g)	12	-	14	16	42
水(ml)	72	-	98	190	360
乳酸(ml)	0.15	-	-	-	0.15
酵母培養液(ml)	10	-	-	-	10

## 2・7 成分分析

培地上清、もろみおよび製成酒の日本酒度は、京都電子工業社製振動式密度計DA-640を用いて、酸度およびアミノ酸度は国税庁所定分析法に従い分析した。アルコール分は、日立製作所社製高速液体クロマトグラフ655A-11(使用カラム: BioRad社製発酵モニター用カラム)を用いて測定した。香气成分の測定は、パーキンエルマー社製ガスクロマトグラフClarus500(使用カラム: Agilent社製DB-Wax)を用いたヘッドスペース法にて行い、成分の定量は内部標準法に従った。内部標準液として、カプロン酸メチルを用いた。有機酸は日本分光社製有機酸分析システム(使用カラム: Shodex社製KC-811)を使用し、ポストカラム誘導体化法により測定を行った。官能検査は4人のパネラーによる5点法(1:優良, 2:

良, 3:普通, 4:やや難あり, 5:難あり)により、香り、味、総合評価について検査し、平均値を算出した。

## 3 結果および考察

微生物育種用UV-LED照射装置を用いた、主波長280nmのUV-LEDを光源とする紫外線照射試験における、照射距離および時間と酵母生菌数の関係を図1に示す。照射距離40mmでは約4分、50mmでは約6分、60mmでは約8分で約90%の酵母が死滅した。

この結果を参考に主波長280nmのUV-LEDを光源とする紫外線照射時の変異処理条件を、酵母の生存率が40~50%となる照射距離50mm、照射時間4分とした。この条件で酵母に対し、UV-LEDによる紫外線照射を行った結果、多数のセルレニン耐性株が得られた。

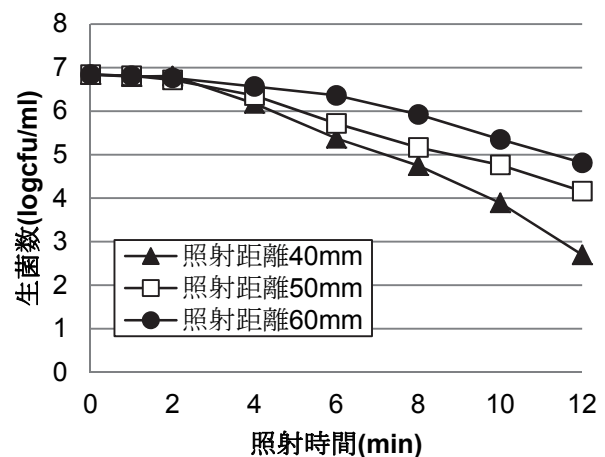


図1 UV-LEDによる紫外線照射後の酵母生菌数

得られたセルレニン耐性株の内、1915株について、アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験を行い、炭酸ガス減少量、培地上清の酸度およびカプロン酸エチル含量を測定し、有機酸生成能、カプロン酸エチル生成能および発酵力に特徴を持つ161株を選抜した。表2に特に良好な結果が得られた変異株3株と親株であるきょうかい901号との比較を示す。

変異株は3株ともアルコール脱水麴培地中で、カプロン酸エチルを親株の4倍以上生成し、炭酸ガス減少量は親株とほぼ同等であった。また、酸度は親株と比較して3826株は0.2ml高く、4067株は0.4ml高く、3643株は0.2ml低かった。

表2 アルコール脱水麹培地を用いた発酵試験結果

菌株	K-901	3643	3826	4067
炭酸ガス減少量(g)	5.1	5.0	5.1	4.9
酸度(ml)	3.0	2.8	3.2	3.4
香気成分(ppm)				
酢酸エチル	45.0	39.3	45.5	42.5
酢酸イソアミル	2.7	2.7	2.4	2.9
イソアミルアルコール	159	122	116	150
カプロン酸エチル	0.9	4.5	5.4	3.9

選抜した161株について総米200g規模の清酒小仕込み試験を行った。製成酒の分析結果について、特に良好な結果が得られた変異株3株と親株であるきょうかい901号の比較を表3に示す。

表3 清酒小仕込み試験製成酒の分析結果

菌株	K-901	3643	3826	4067
もろみ日数(日)	28	29	29	27
炭酸ガス減少量(g)	58.7	58.6	60.0	60.6
アルコール(%)	18.2	18.3	18.0	18.1
日本酒度	0.9	0.4	1.3	2.0
酸度(ml)	2.3	2.0	2.3	2.4
アミノ酸度(ml)	1.1	1.1	1.1	1.0
香気成分(ppm)				
酢酸エチル	114	74	48	56
酢酸イソアミル	4.6	2.1	1.6	1.9
イソアミルアルコール	168	127	106	134
カプロン酸エチル	1.1	5.9	13.5	6.5
有機酸(ppm)				
リンゴ酸	234	147	354	380
コハク酸	594	436	380	523
乳酸	368	340	415	405
酢酸	23.0	24.9	33.6	28.5

カプロン酸エチルの生産量は、親株と比較して3826株は約12倍、4067株は約6倍、3643株は約5倍と非常に高い値を示した。有機酸については、リンゴ酸が親株と比較して3826株は50%以上、4067株は60%以上増加し、3643株は30%以上減少した。アルコール分が18%に達するまでのもろみ日数は、親株と比較して、4067株は1日短期化し、3826株と3643株は、やや長期化したものの、その差は1日であり、発酵力の大きな低下はみられなかった。総米200g規模の清酒小仕込み試験製成酒の官能検査結果を表4に示す。親株と比較して、すべての変異株で、香りの項目が良好であり、3826株および3643株は味、総合評価に関しても一層良好な結果を示した。

表4 清酒小仕込み試験製成酒の官能検査結果

菌株	K-901	3643	3826	4067
香り	3.0	2.5	2.5	2.5
味	2.9	2.4	2.4	3.1
総合評価	3.0	2.6	2.6	3.0

注：5点法（1:優良，2:良，3:普通，4:やや難あり，5:難あり）により算出

#### 4 まとめ

清酒酵母に主波長280nmのUV-LEDを光源とする紫外線を照射することにより多数の変異株が得られた。得られた変異株から、カプロン酸エチル生成能や有機酸生成能に特徴を持ちつつ発酵力の高い3株を選抜した。

なお、本研究で取得した変異酵母のうち3643株は、NBRC110699、3826株は、NBRC110700、4067株は、NBRC110701として、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターに制限付き寄託している。

また、このうち3643株および3826株については、平成26年度に県内酒造メーカーにて実用規模の清酒醸造試験を実施し、製成酒については商品化されている。

本研究を実施するにあたり、清酒醸造試験にご協力いただいた県内酒造メーカーの方々に厚く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) 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. アルコール脱水麹を用いる培地による優良酵母の分離とその性状. 醸協, 1992, 87, p. 915-921.
- 2) Ichikawa, E.; Hosokawa, N.; Hata, Y.; Abe, Y.; Suginami, K.; Imayasu, Y. Breeding of Sake Yeast with Improved Ethyl Caproate Productivity. Agric. Biol. Chem, 1991, 55, p. 2153-2154.