



# 展 TENBO 望

理工学部会 企画

## イオンビーム微生物育種による 新規清酒酵母の開発と実用化



増淵 隆

Masubuchi Takashi  
(群馬産業技術センター)

### 1 清酒酵母育種の歴史

清酒醸造工程の基本を表現する言葉として「一麴（いちこうじ）二酏（にもと）三造り（さんつくり）」というものがある。それぞれ、蒸した原料米にコウジカビを生育させた“麴”，アルコール発酵の主体である酵母を大量に育てる“酏（あるいは酒母ともいう）”，そしてその両者に改めて仕込み水と蒸し米を加える“醪（もろみ）”造りについて述べたものである。

微生物利用の観点から見ると、清酒醸造には様々な微生物が複雑に関与している。清酒の醪の中では、麴菌由来の糖化酵素が原料米のデンプンをブドウ糖に分解する糖化と、酵母がブドウ糖をアルコールに転換する発酵とが同時に行われており、並行複発酵と呼ばれる。その他、生酏若しくは山廃酏と呼ばれる酒母製造法においては、硝酸還元菌や乳酸菌の働きにより、雑菌に汚染されず酵母のみが生育できる環境を作り上げている。

今日のような微生物に対する知識のなかった時代においては、いわゆる“家付き”“蔵付き”の微生物が経験的に利用されていたため、品質が安定しないばかりか、時として発酵がうまく

いかず“腐造”を生じて多大なる損害が生じることもあった。しかし、科学の発展に伴って発酵における微生物の働きが明らかになるとともに、有用な形質を持つ菌株を純粋培養し、それを用いるようになった。

清酒酵母については、明治37年に国立の研究機関として醸造試験所（現在の（独）酒類総合研究所の前身）が設置され、近代的な醸造技術の研究開発がなされる一方で、各地の酒造蔵から優秀な酵母株の分離が行われていった。明治39年には醸造協会（現在の（財）日本醸造協会の前身）が設立され、優秀な酵母の頒布を事業の柱の1つとして活動することとなる。醸造協会から頒布される酵母は“きょうかい酵母”として現在でも全国で広く利用されている。

一方、各地方自治体の試験研究機関が独自に開発した清酒酵母も数多く存在する。これは地酒が観光や地場産業振興のツールとして重要な役割を担うため、地酒の品質を向上させるとともにほかとの差別化を図るポイントとしてオリジナル酵母の開発ニーズがあるためである。群馬県で開発・実用化されている“群馬 KAZE 酵母”もこの範疇に属する。このほかに大学や民間機関が開発した酵母もあり、酵母の種類は

更に多様化している。

## 2 清酒酵母育種の方向性

かつて清酒は近代日本を支える役割を担っていた。明治32年には酒税が国税の税収第1位であり、以降も長らく国家の主要な財源の1つだった。しかし、ほかの飲料との競合など様々な理由により清酒製造は昭和48年を頂点として製造量・製造蔵数ともに長期減少傾向に転じ、現在に至っている。一方で、清酒の種類のうち吟醸酒や純米酒などの付加価値を有するものについては、清酒全体が消費量を減らす中でも何とか踏みとどまっており、各酒造蔵はこの分野に生き残りを賭け注力してきた。群馬県では、県内清酒の高品質化・差別化を意図して平成3年度から県独自の清酒酵母育種を開始し、平成13年度に“群馬 KAZE 酵母”として実用化した。当該酵母使用の清酒は全国新酒鑑評会等で入賞を重ねる実績を上げてきた。しかし消費者の嗜好は時代とともに変化していくため、新たなタイプの酵母開発を続け、市場ニーズに適応していくことが必要と考え、平成20年度より群馬県立群馬産業技術センターと日本原子力研究開発機構との共同研究で清酒酵母の育種に着手した。

近代以降、優秀な酵母株を得る手段としては酒造蔵や自然界から新しい酵母を分離するのが主であったが、バイオテクノロジーの発達により、既存の分離株に何らかの変更を加え、必要な形質を創出する試みが数多くなされるようになった。その方法としては、紫外線や薬剤などで変異株を得るもの、性的接合やプロトプラスト融合により交雑株を得るものなどが挙げられる。

本研究では、吟醸酒に使用する香氣成分高生産株の取得を主目的とするため、発酵力が良好で吟醸酒での使用実績も多いきょうかい901号酵母（日本醸造協会の日本酒等の清酒酵母）を主な親株とし、変異処理で更に優良酵母を得る

ことを試みた。変異処理にはエチルメタンスルフォネート（EMS）を用いることが多いが、今回は炭素イオンビーム照射を行い、薬剤処理とは異なる変異スペクトルの発現を期待した。選抜の指標として、吟醸酒の主要な香氣成分であるカプロン酸エチルの生成能を重視し、併せて発酵力・酸生成の度合いなどを測定することで、実製造に適した清酒酵母を絞り込んでいった。

## 3 イオンビーム育種技術の特徴

イオンビーム育種技術は我が国が世界を先導する量子ビームテクノロジーの1つである。サイクロトロンなどの大型の加速器で光の速度の数十%まで加速させたイオン粒子を植物の種子や葉、微生物の細胞に当てて、有用な形質の品種を育成する。イオンビームは、 $\gamma$ 線や電子線とは異なり、遺伝子の限られた場所だけに大きなエネルギーを与えるため、原品種の良い特性を保持しながら、目的の形質だけをワンポイントで改変できることや、ほかの育種法では得られにくい新しい形質を作り出せることが特徴とされている。これまでに、キク、カーネーション、メロン、イネなどの植物の新品種、バイオ肥料やバイオ農薬として使用する農業微生物がイオンビーム育種によって作出されている。群馬県においても、県農業技術センターらの共同開発によりオステオスペルマムの新しい花色の品種“ヴィエントフラミンゴ”が実用化された。

## 4 清酒酵母へのイオンビーム照射

### 4.1 ビーム照射用試料の調製

イオンビーム照射に供する試料は、水分が残存することで生じる副反応の影響を除くために乾燥状態にすることが望ましい。

試料の調製は、酢酸セルロースメンブラン上に酵母菌体を塗布し、60 mm 径シャーレ中で

凍結乾燥後にカプトン膜で上面を覆って行った。凍結乾燥の保護材として10%グリセリン、10%スキムミルク+1%グルタミン酸ナトリウムの両者を検討したが、いずれも効果が認められず、操作性も悪かった。よって保護材を用いず、十分に培養した菌体を0.9% NaClで洗菌及び再懸濁した後、減圧濾過ユニット(ADVANTEC社 KP47-S)を用いてメンブラン上に濾別し、凍結乾燥する方法を採った。

#### 4.2 ビーム照射条件

照射は日本原子力研究開発機構・高崎量子応用研究所のAVFサイクロトロンを用いて加速した $^{12}\text{C}^{5+}$  (220 MeV)で、50~300 Gy照射した。

## 5 カプロン酸エチル高生成株の選抜

### 5.1 セルレニン耐性株の取得

カプロン酸エチル高生成株を取得する方法としては、セルレニン耐性を指標とする方法が広く用いられている。

カプロン酸エチルは脂肪酸の一種であるカプロン酸のエチルエステルである。カプロン酸は脂肪酸合成酵素(FAS)により生成されるが、カプロン酸エチル生合成系における制限因子はカプロン酸であり、脂肪酸合成の多寡がカプロン酸エチルの生成量を左右することが知られている。セルレニンは脂肪酸生合成を阻害する抗生物質であるため、セルレニン耐性を示す変異株は脂肪酸合成能に優れ、結果的にカプロン酸エチル生成量が多いことが期待できるわけである。

本実験系では、イオンビーム照射後の試料にYPD培地5 mLを添加して30℃、2時間保持し、適宜集菌、希釈して培地に塗布した。選択培地は、市川英治ら<sup>1)</sup>の方法に準じセルレニン12.5  $\mu\text{M}$ を含むYPD寒天培地を用いた。

### 5.2 発酵試験による一次選抜

得られたセルレニン耐性変異株を齋藤久一ら<sup>2)</sup>の方法を改変した発酵試験に供した。比較

的簡便に多数の変異株の比較を行うことができるため、初期段階の選抜に適した方法である。

発酵試験では所定の培地で15℃、7日間の培養後に重量減少量(CO<sub>2</sub>放出量)を測定し、発酵力の目安とした。また、得られた上清をヘッドスペースガスクロマトグラフにより、イソアミルアルコール、酢酸エチル、酢酸イソアミル、カプロン酸エチルの各成分を定量して香気生成能を評価した。

発酵試験は平成20年度に774株、21年度に887株について実施した。

### 5.3 小仕込み試験による二次選抜

発酵試験において香気生成能が良好な株について布宮雅昭ら<sup>3)</sup>の変則二段仕込みを改変した方法で小仕込み試験(総米200 g)を行った。この方法は約1か月の期間を要するが、麴や蒸し米を用いることで、より清酒製造に近い条件での選抜が可能である。

### 5.4 小仕込み試験結果

平成20年度は35株について小仕込み試験を行った。良好な結果を示した変異株(No.227及び231)は125 Gyの照射区分で得られたものである。これらを小仕込み試験に供し、群馬KAZE酵母(1号及び2号)、及び親株であるきょうかい901酵母と比較した。変異株No.227は若干発酵力が弱い傾向があるが、No.231は親株に劣らない発酵力を有した。カプロン酸エチル生成能は両株とも親株に比較して格段に向上したため、小規模醸造試験に供し、どのような発酵特性を示すか更に検討することとした。

平成21年度は発酵試験で良好な17株について小仕込み試験を行った。いずれも対照としたKAZE-2号よりも高い香気生成能を示したため、最も有望と思われた株(No.1333)を小規模醸造試験に供することとした。この株も125 Gyの照射区分で得られたものである。

No.1333株はカプロン酸エチル生成能が高く、酢酸エチル、酢酸イソアミルが少ない特徴がある。発酵力が弱い、従来の酵母とは異なる

る香りが得られることを期待して選抜した。

## 6 小規模醸造試験

### 6.1 小規模醸造試験の意義

小仕込み試験まで行って絞り込んだ変異株について、小規模ながら酒造蔵の醸造工程と同じ方法で清酒を製造し、醪での諸成分の挙動を調査すると共に製成酒の分析と官能評価等を行うことで、使用した酵母が実製造に適するかどうか判断することができる。

### 6.2 仕込み配合と原料処理・醪管理目標

得られた変異株の中から発酵力・香气生成能が良好と判断した株を選び、40%精白山田錦を原料とした57kg規模醸造試験を行った。対照としてKAZE-2号を用いた。発酵終了時の目標成分はアルコール度16%、日本酒度-3とした。

### 6.3 小規模醸造試験結果（平成21年度）

平成21年度は20年度に選抜したNo.231株とNo.227株について試験醸造を行った。

醪のBMD曲線を図1に、製成酒の歩合・成分を表1に示す。BMDは醪日数に日本酒度を乗じた値で、醪の発酵状態を示す指標となるものである。No.231株は、BMD値の経時曲線がKAZE-2号とあまり変わらなかったが、No.227株は醪後半のBMD値の減りが緩やかで、KAZE-2号より発酵力は弱いことを示した。一方、No.227株の醪中のカブロン酸エチル量は三者の中で最も多かった。上槽した清酒を官能評価すると、No.227株は香りの甘さやふくらみなど、新しい香りの傾向を示し、新たな吟醸酵母として期待が持てる。これについては次年度以降、更に醸造条件の検討を行い、実用化に必要なデータの収集に努めることとした。

### 6.4 小規模醸造試験結果（平成22年度）

平成22年度は21年度に選抜したNo.1333株

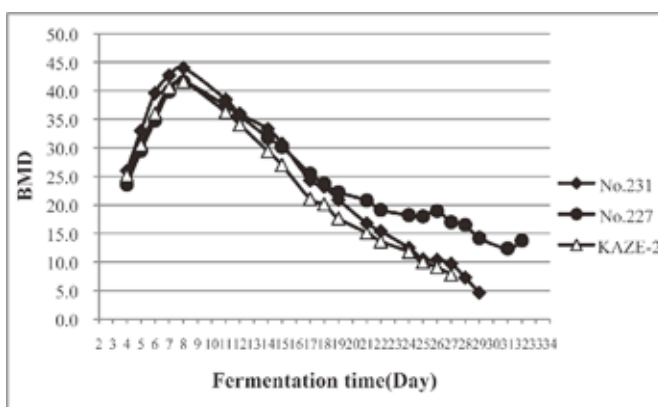


図1 醪のBMD曲線（平成21年度）

表1 製成酒の歩合・成分（平成21年度）

	No.231	No.227	KAZE-2
もろみ日数（日）	29	32	27
粕歩合（%）	48.1	47.2	47.8
純アルコール取得量（L）	275.1	268.9	204.0
日本酒度	+4.2	+4.2	+4.6
アルコール分（%）	18.2	18.2	18.0
酸度（mL）	1.6	1.5	1.4
アミノ酸度（mL）	1.0	1.1	1.1
酢酸エチル（ppm）	40.9	27.6	30.5
イソアミルアルコール（ppm）	136.4	111.5	119.6
酢酸イソアミル（ppm）	2.21	1.28	1.48
カブロン酸エチル（ppm）	2.48	4.44	3.44

と、前年度の小規模醸造試験で有望だったNo.227株について行った。

醪のBMD曲線を図2に、製成酒の歩合・成分を表2に示す。No.1333株は非常に高いカブロン酸エチル生成能を示したが、発酵力が弱く、目標の日本酒度に到達しないまま上槽せざるを得なかった。一方、No.227株については前年の試験醸造の結果を考慮し、酵母が旺盛に発酵するよう最高温度を高め設定し、更に温度が高い期間を長めにするなどの管理を行った結果、発酵力も順調で所定の醪日数（32日）で目標成分に達し、カブロン酸エチル生成能も現有のKAZE-2号を上回る結果を示した。



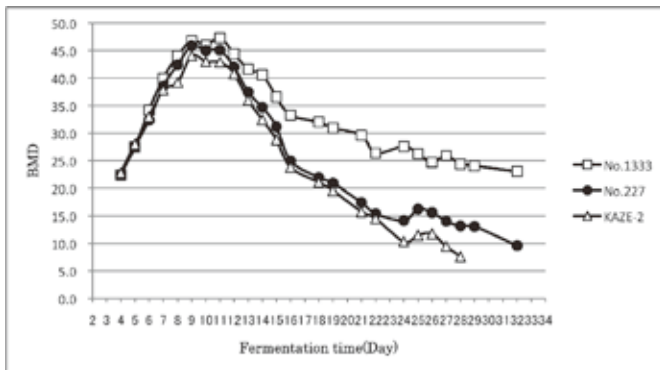


図2 醪のBMD曲線(平成22年度)

表2 製成酒の歩合・成分(平成22年度)

	No.1333	No.227	KAZE-2
もろみ日数(日)	33	32	28
粕歩合(%)	43.2	50.4	55.1
純アルコール取得量(L)	278.9	263.4	249.3
日本酒度	+0.7	+4.0	+4.3
アルコール分(%)	17.9	18.3	18.0
酸度(mL)	1.7	1.4	1.3
アミノ酸度(mL)	1.2	1.0	0.8
酢酸エチル(ppm)	21.7	31.8	23.4
イソアミルアルコール(ppm)	88.8	120.3	127.9
酢酸イソアミル(ppm)	0.7	2.0	2.5
カブロン酸エチル(ppm)	11.0	7.4	5.6

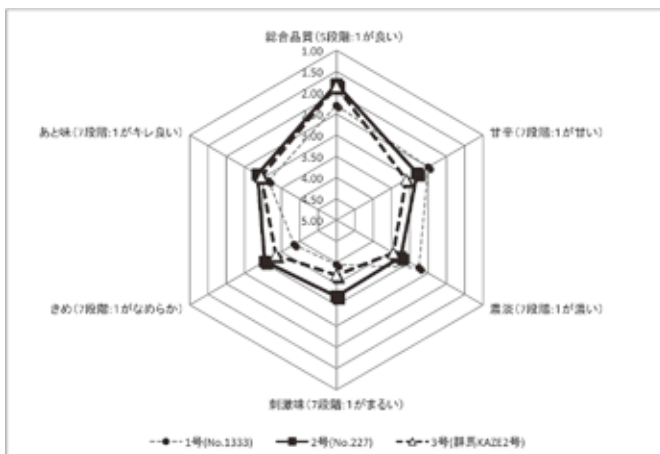


図3 製成酒のプロファイル評価(平成22年度)

酒造関係者20名により製成酒のプロファイル評価を行った結果を図3に示す。

No.227株について対照のKAZE-2号と比較すると、総合評価はほぼ同評価、きめ・あと味・刺激味の3項目では良い評価を得た。また、前年同様に甘い香りを呈し、KAZE-2号と異なる香り傾向を示した。以上の結果よりNo.227株は新たな吟醸酵母として十分期待できると判断した。

## 7 実製造規模試験及び製品化

平成22年度より県内酒造蔵の協力を得て、実製造規模での試験を行った。おおむね良好な結果が得られたため、平成24年に群馬県の新しい吟醸用清酒酵母として、群馬産業技術センター及び原子力研究機構が共同でプレス発表を行った。また、同年より本格的に酵母の頒布を開始し、群馬県内の複数の酒造蔵で製品に使用されている。また、現在群馬県では農業技術センターが育種した酒造好適米“舞風”及び産業技術センターが保有・頒布している酵母を使用した“オール群馬産の清酒”の普及に取り組んでおり、本研究により開発された酵母もその一翼を担うものとして期待されている。

## 8 今後の展望…海外展開を見据えて

イオンビーム照射により得られた変異株(No.227)は良好な香気成分生成能・発酵力を有し、新たな吟醸酵母として期待されているが、この変異株が示した形質がどのような遺伝子の変異によるものかは今後の検討課題である。従来の変異誘発法で

は得られなかった遺伝子の構造変化を伴うのであれば、清酒酵母の新たな育種法として、更なる可能性が見いだせるものと考えており、現在、前橋工科大学を加えた共同研究体制<sup>4)</sup>で遺伝子の解析を進めているところである。これらの成果により、更なる優良株をより簡便に育種できるようになることを目指していきたい。

従来、清酒の主たる市場は国内であったが、近年の清酒輸出量は右肩上がりが続けており、平成24年においては平成元年の2倍以上となっている。更に平成25年にはユネスコの無形文化遺産に“和食”が登録された。和食を構成する重要な要素として、国内外から清酒へ注がれる期待は熱い。これから海外でどのような清酒が求められていくのか、その方向性はまだ定まっていないが、イオンビーム照射やその他の

手法による優良酵母の育種は、今後とも清酒の更なる品質・嗜好性向上に貢献し、海外展開の一助となり得るものと確信している。

#### 参考文献

- 1) 市川英治, 川合菜穂美, 秦洋二, 安部康久, 杉並孝二, 今安聰, 1988年度日本農芸化学会大会講演要旨集, 435 (1988)
- 2) 斉藤久一, 渡辺誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章, 日本醸造協会誌, **87**, 915-921 (1992)
- 3) 布宮雅昭, 須貝智, 小島弥之祐, 鈴木弥兵衛, 佐藤昭仁, 和田多聞, 石垣浩佳, 松田義弘, 小関敏彦, 日本醸造協会誌, **90**, 217-221 (1995)
- 4) 増淵隆, 日向弘和, 林秀謙, 池永裕, 佐藤勝也, 手島光平, 群馬県立産業技術センター研究報告 (2013), in press