

氏名	稲橋正明
学位(専攻分野の名称)	博士(醸造学)
学位記番号	乙第918号
学位授与の日付	平成28年10月20日
学位論文題目	有機酸生成に特徴を持つ清酒酵母の育種と清酒醸造への応用に関する研究
論文審査委員	主査 教授・博士(農学) 柏木 豊 准教授・博士(醸造学) 進藤 斉 准教授・博士(醸造学) 門倉 利守 工学博士 佐藤 和夫*

論文内容の要旨

1. 研究の背景と目的

清酒はわが国独自の伝統醸造酒であり、アルコール飲料として独特の呈味性を示すとともに、和食献立の呈味を引き立てる役割を担い、わが国の伝統食との関連を持ちつつ、優れた品質の製品が製造されてきた。清酒の呈味には、糖、アミノ酸、有機酸が主要な作用を示すが、有機酸は清酒に濃醇な呈味を与え、中でもリンゴ酸は冷酒において爽やかで軽快なすっきりした酸味を示し、乳酸は燗酒においてまろやかな酸味と旨味を示すことが知られている。

近年20~30年の清酒品質の動向調査によれば、清酒の製造技術の発展と消費者の嗜好の変化によって、市販清酒の70%の生産量をしめる一般酒(普通酒)では、辛口淡麗が好まれ、酸度(総酸)及びアミノ酸度が低く、エキス分が減少した、日本酒度が高い(+の方に变化)清酒が多く生産されてきた。しかし、酸度の減少(乏酸)によって、清酒の味の「しまり」や「ふくらみ」が欠けるようになり、ごく最近では辛口淡麗化から離れた濃醇な酒質を示す清酒が求められるようになってきた。すなわち、冷酒では爽やかで軽快な酸味をもつリンゴ酸が、燗酒ではまろやかな酸味と旨味をもつ乳酸が主体となる呈味を示す清酒が求められている。

清酒に含まれる有機酸の約70%が醗中にて酵母により生成されることから、有機酸の生成に特徴をもつ清酒酵母を育種し、これを清酒醸造に利用することにより求められる酒質を自在に製造するこれまでにない技術が開発できると考えられた。

そこで、まずリンゴ酸を特異的に多量に生成する新規の清酒酵母株を育種し、それらの醸造特性を明らかにした。続いて、新規の清酒酵母を実用化するためには、保

存菌株の管理や清酒醗中の菌株管理の観点から、使用菌株を迅速に検出し判別する技術の開発が求められる。このため、酵母判別法であるTTC染色法における下層培地組成や培養温度を改変すると、酵母の染色性が変化することに着目し、醸造酵母のTTC染色性の特徴及びBurkholder培地における酸性ホスファターゼ活性の有無に基づいて、各種の醸造酵母株の簡便な判別法を確立した。

さらに、乳酸を特異的に生成する優良清酒酵母の育種は難しいことから、ワイン醸造において汎用されているマロラクティック発酵(MLF)を清酒醸造に応用することを考え、清酒醗中にリンゴ酸高生産性清酒酵母とMLF能を有する乳酸菌を共存させて、MLFによりリンゴ酸と乳酸の組成比を調整する技術の開発を目指した。このために、酒造における各工程から新規に分離された乳酸菌の中からMLFに適した菌株を選択し、酵母/乳酸菌の初発菌数比と乳酸添加時期の検討により、リンゴ酸/乳酸の組成比を調整する方法を確立し実用化した。

2. リンゴ酸を高生産する清酒酵母の育種

(1) リンゴ酸とカプロン酸エチルを高生産する清酒酵母(No. 77)の育種

吟醸酒に用いることができる清酒酵母の育種を目指して、リンゴ酸及びカプロン酸エチルを高生産する清酒酵母を作成した。

まず、協会酵母K-1001(K-1001)を孢子形成させて一倍体K-1001-22Cを取得した後、エチルメタンスルフォネート(EMS)変異処理を行い、シクロヘキシミド(CYH)耐性株を取得し、リンゴ酸が全有機酸の60

* 元東京農業大学 教授

～70% を占める CHp-18 (MATa) を選抜した。次いで、この株からセルレニン耐性による選択を行い CHp-18-1 (MATa) を得た。この株と協会酵母 K-7 の半数体株 Hp-1-7 (MATα) とを交配し、さらに戻し交配を行った後、泡なし化を行った。本酵母を用いた小仕込み試験の結果、K-701 及び K-1001 (親株) より、長期醪となり日本酒度はマイナスの酒となったが、アルコール分は親株と比較して遜色なかった。醪 27 日目で親株の酸度がそれぞれ 2.8, 2.4 に対して 3.8, リンゴ酸含量 1, 423 μg/mL (リンゴ酸含有比 68.0%) であり、親株を用いた場合の 4～5 倍のリンゴ酸を含む製成酒が得られた。また、本酵母は吟醸香成分であるカブロン酸エチル含量も親株による場合の約 3 倍量生成 (4.8 ppm) し、目的とするリンゴ酸高生産、かつ高香気生成株であることから清酒酵母「きょうかい No. 77」として実用化した。

(2) リンゴ酸高生産性で総酸度の低い清酒酵母 (No. 25) の育種

リンゴ酸高生産株 CHp-18 (MATa) を発酵力が強く、孢子形成率の高い清酒酵母 KM1 の半数体株 (MATα) と交配して、Dp-20 を取得し、さらに半数体化し Dp-20-5 (MATα) を得た。これに、戻し交配を繰り返してより発酵力の強いリンゴ酸高生産株を取得し、泡なし化を行った。本酵母を用いた小仕込み試験の結果、親株と遜色のない発酵力を示し、醪 19 日目で酸度 3.0, リンゴ酸含量 700 μg/mL (リンゴ酸含有比 50.0%) の製成酒が得られた。本株は、リンゴ酸が親株の約 2.4 倍生成したにもかかわらず、総酸度が親株や通常の清酒酵母 (K-7, K-9, K-10) と同等かやや低い醸造特性をもち、清酒酵母「きょうかい No. 25」と命名した。本酵母は通常の仕込みに近い酸度及び日本酒度甘酸バランスを採り得る清酒酵母である。

「No. 25」を育種する過程で、Hp-20-5 (MATα) を CHp-18 (MATa) と交配した株の中に、親株より醪は長期醪となり、日本酒度はマイナスの酒となるが、アルコール分は親株と比較して遜色ない酵母 Dp-12-28 も得られた。醪 27 日目で親株 K-1001 の酸度 2.4 に対して 4.6, リンゴ酸含量 2,110 μg/mL (リンゴ酸含有比 70.9%) であり、親株の 7 倍以上のリンゴ酸を生産し、総酸度の高い株 (Dp-12-28) であった。本株の醸造特性を確認してリンゴ酸高生産性で総酸度の高いことから、清酒酵母を「きょうかい No. 28」と命名した。また、「No. 25」「No. 28」両清酒酵母とも、親株と同等の香気成分生成量を示した。

(3) アデニン非要求性赤色色素生産・リンゴ酸高生産性酵母 (No. 5-2) の取得

有機酸生成に特徴をもつ酵母株 CHp-18 (MATa) を取得する過程において、アデニン非要求性で赤色色素を生産する高リンゴ酸生産株 CHp-18A (MATa) を得た。この株を KM1 の半数体株 (MATα) と交配、さらに戻し交配によって高リンゴ酸生成赤色清酒酵母 No. 5-2 を造成した。本酵母を用いた小仕込み試験の結果、親株と遜色のない発酵力を示し、酸度 6.9, リンゴ酸含量 3,683 μg/mL (リンゴ酸含有比 81.7%) の製成酒が得られ、リンゴ酸が親株 K-1001 の 10 倍以上生成した。この酵母により、鮮紅色の清酒が醸造できることを確かめた。本酵母は酒質の多様化への適用が期待される。

(4) リンゴ酸高生産性として育種された酵母 No. 25, No. 28 及び No. 77 のリンゴ酸生成経路の推定

No. 25, No. 28 及び No. 77 の高リンゴ酸生成機構については、生成する有機酸組成 (リンゴ酸/コハク酸比) を検討した結果、ピルビン酸が pyruvate carboxylase により CO₂ を付加されてオキサロ酢酸になり、これが malate dehydrogenase により還元され、リンゴ酸が高生産されるという経路が想定された。また、No. 25, No. 28 及び No. 77 は、親株の K-1001 と同様、pyruvate Carboxylase と malate dehydrogenase 活性が高いものの、ミトコンドリアの活性が低く、細胞内のピルビン酸やリンゴ酸等の有機酸代謝が低下することで、細胞質内でのピルビン酸からリンゴ酸への生成経路が活性化されることが強く示唆された。さらに、好気条件下で培養すると、No. 25, No. 28 では著量のコハク酸を生成することから、ミトコンドリアの活性低下の程度が No. 25, No. 28 と No. 77 とでは異なる可能性があることをグリセリン培地での生育性の違いから推察した。

3. 清酒醸造における微生物管理のための育種株の判別法の開発

(1) 醸造用酵母の培養条件 (培養温度, C 源及び N 源) と TTC 染色性

各種清酒酵母それぞれの性質を把握し、簡便に判別できることは清酒醸造の微生物管理にとって重要である。優良清酒酵母の識別法として TTC 染色法が広く用いられているが、TTC 下層培地の糖源 (C 源) あるいは窒素源 (N 源) を単一アミノ酸に変え、かつ培養温度を 30℃ 又は 35～38℃ にすることにより、清酒酵母を判別できることを明らかにした。

清酒酵母 19 種類の中でセルレニン耐性を有する No. 77, K-1601, K-1701 及び K-1801 は、セルレニン含有

培地で生育し、そのコロニーの TTC 染色性は赤色を示すが、これら 4 株以外の非セルレニン耐性のうち、パントテン酸欠、 β -アラニン含有培地 35°C における生育性、TTC 培地の糖源をグルコースからマルトース及びガラクトースに改変した培地を用いることにより酵母間での判別が可能となった。すなわち、 β -アラニン含有培地 35°C では、7 号系酵母のみ生育できない。育種したリンゴ酸を高生産する清酒酵母 No. 25、No. 28 はマルトース培地 30°C で生育し、TTC 染色性が赤色を示すが、No. 77 はピンクに染色される。また、ガラクトース培地 30°C で、No. 28 のみがピンクに染色される。以上のことから、育種した酵母がそれぞれ判別できる。さらに、9 号系である K-9 及び K-14 (泡無し酵母も含む) においても、アラニンを単一窒素源とする培地を用い 38°C での生育性と TTC 染色性を確認することにより、9 号系酵母間の菌株でも本法により判別することができる。

清酒酵母の TTC 染色試験において、セリン、チロシン、アスパラギン及びアスパラギン酸をそれぞれ単一窒素源とする培地を用い 35°C 以上で培養すると、TTC 染色が白色となる株が高頻度で出現した。これら TTC 白色株は、すべてグリセリン培地に生育出来ない呼吸欠損菌であった。

(2) ジアゾカップリング法による判別

低リン酸培地 (PO_4^{3-} , 0.07mM) では、いずれの酵母もジアゾカップリング反応による酸性ホスファターゼ活性が検出されるが、高リン酸培地 (PO_4^{3-} , 7.7mM) で活性が検出されるのは、K-1, 2, 3, 4, 5, K-8, No. 25 及び No. 28 のみであった。以上の結果から、No. 25、No. 28 の 2 株と No. 77 との判別にジアゾカップリング法が適応できることを明らかにした。

4. リンゴ酸高生産性酵母 (No. 28) と乳酸菌のマロラクティック発酵 (MLF) を応用した乳酸高含量清酒の製造

MLF への利用を目指して、清酒製造各工程及び市販清酒から 24 株の乳酸菌を分離した。取得した菌株から MLF に使える可能性のある菌として、No. 8 株を選抜した。本菌は山廃仕込み醪から分離した菌株であり、16S rRNA の塩基配列から、*Lactobacillus paracasei* であると同定された。

この *Lactobacillus paracasei* No. 8 株 (「No. 8」) をリンゴ酸高生産性酵母の清酒醪に共存させてアルコール発酵とともに MLF を生起させる条件を検討した。その結果、酵母と No. 8 の初発菌数比を変えること、あるいは

No. 8 を発酵醪に添加する時期を変えることにより、リンゴ酸の低減率を 3.6~99.5% の間で変化させ、MLF を応用した乳酸高含有清酒の醸造法により醪、製成酒のリンゴ酸と乳酸の比率を広範囲にわたって調整・制御できることを明らかにした。

本法によるリンゴ酸を対照酒の 93.8% 減少させた乳酸高含有清酒は、酸度及び有機酸を除いて、日本酒度など一般成分は対照酒と比較して大きな差は認められず、アルコール生成は良好、酸度は対照酒より少なく、アミノ酸度はやや多めの結果を得た。また、2 点識別テストにおいて、危険率 1% で両酒を識別でき、官能試験により、MLF 菌添加乳酸高含有清酒は、まろやかで爽快な酸味を有すると評価された。

5. 総括

リンゴ酸を特異的に高生産することにより、冷酒において爽快な酸味を与え、かつ吟醸香の成分カブロン酸エチルを高生産し、吟醸酒に用いることができる清酒酵母の育種を目的として、醸造特性が優れた清酒酵母「きょうかい No. 77」を実用化した。さらに、リンゴ酸高生産性で、かつ総酸度が低く、増殖性の良い酵母の育種を行い、生成有機酸に占めるリンゴ酸比率が約 50% で、コハク酸生成が少ない低総酸度の酵母を育種し、「きょうかい No. 25」を実用化した。本酵母は通常酒に近い酸度及び日本酒度で甘酸バランスを採り得る酵母である。この「No. 25」の育種過程において No. 25 と同様の有機酸組成であり、総酸度 4.0 以上の高酸度株も得られた。この株は「きょうかい No. 28」として実用化した。また、これらの多酸性清酒酵母の育種過程で、アデニン非要求で赤色色素を生産する高リンゴ酸生産株を取得した。

No. 77、No. 25 及び No. 28 の高リンゴ酸生成機構は、有機酸の生成パターン、特にリンゴ酸/コハク酸比から、ピルビン酸がオキサロ酢酸を経て還元され、リンゴ酸が高生産される経路に、ミトコンドリアの活性低下が影響を与えることによってリンゴ酸を高生産し、コハク酸が低生産性になると推定した。

新規清酒酵母の保存管理や醪における菌株管理の観点から、実用酵母菌株の簡便判別する方法が求められた。培地組成や培養温度によって TTC 還元能が菌株で異なることに着目し、実用酵母菌株の体系的判別法を確立した。さらに培地中のリン酸含量による酸性ホスファターゼ活性の差異によって新規酵母菌株の判別が可能であることを明らかにした。

飲酒時の酒温が高温 (燗酒) では、清酒中の乳酸の含

有比が高いと、爽やかで、かつまろやかな酸味を与えるが、乳酸を高生産する清酒酵母の育種はこれまでに報告例がない。そこで、新規に清酒醪より分離した *Lactobacillus paracasei* No. 8 株をリンゴ酸高生産性清酒酵母とともに共存させて仕込みに用い、マロラクティック発酵 (MLF) を生起させて乳酸含有比を調整するとともに、乳酸を主要有機酸とする清酒の醸造方法を確立した。

本研究による有機酸生成に特徴をもつ清酒酵母の育種とその実用化及び MLF を応用した清酒醸造法によって、製成酒に含まれる有機酸の比率を現行の醸造技術による範囲を超えた領域に拡大することが可能となり、得られた酵母株は、冷酒や燗酒といった広い飲酒温度に対応する清酒を製造し、商品化を目指す現在の技術的ニーズに応えたものである。

審査報告概要

市販清酒の品質の経年変動調査から、消費ニーズにより淡麗辛口の傾向が強まり、酸度が低く（乏酸）味の薄い清酒が多数を占めることが判明した。これに対して、有機酸が高く濃醇な味の品質をもつ清酒が求められている。そこで、清酒酵母について、リンゴ酸等の高い有機酸生産性を持つ変異株の育種とともに、これを活用した乳酸含量の高い清酒の製造技術を確立することをめざした。「きょうかい清酒酵母」を親株として、セルレニン、シクロヘキシミド耐性を指標としてリンゴ酸高生産性酵母変異株 No. 77, No. 28, No. 25 株および赤色色素生産性酵母 No. 5-2 株を創出し、これらの醸造適性を解析

した。「きょうかい酵母 No. 77」および「同 No. 28」株は、市販高級酒の生産に実用化された。続いて醸造酵母管理のために、TTC 染色とアミノ酸培地を組み合わせた「きょうかい清酒酵母」菌株判別法を確立した。また、新規分離した MLF 乳酸菌 No. 8 株を用いた高乳酸清酒の醸造技術を開発した。以上の様に、膨大な変異株ライブラリーの作成により新規の清酒酵母株の創出・実用化とともに高有機酸生成の機構の推定を行ったことは、実学的および学術的に価値の高い研究である。よって、審査員一同は博士（醸造学）の学位を授与する価値があると判断した。