

## 細胞融合によるアルコール耐性酵母の造成 (第2報)

江藤 勲  
食品工業部

### Breeding of Highly Alcohol-Tolerant Yeast by the Cell Fusion Method (2nd. report)

Susumu ETO  
Food Science and Technology Division

#### 要旨

麦焼酎の醸造に適した大分酵母の造成を目指して、大分酵母として期待される性質の一つであるアルコールに高い耐性を持つ酵母を、細胞融合法で育種することを試みた。親株としては、県内で最も多く使用されている鹿児島酵母とアルコール耐性の強いワイン酵母(OC-2)を選択した。両細胞の栄養要求性変異株をプロトプラスト化し、電気融合法で融合させたところ、鹿児島酵母よりアルコール耐性の強い3株の融合細胞を得た。これらの酵母を用いて麦焼酎を小規模に試醸し、もろみの状態や芳香成分等を測定した。

#### 1. 緒言

麦焼酎は大分県の特産品となっているにも関わらず、その醸造には甘藷焼酎用に開発された鹿児島酵母や、米焼酎もろみより選抜された協会焼酎酵母が用いられているのが実状である。これらの酵母は、他県の研究機関において開発されており、本センターでも、より麦焼酎の醸造に適した大分酵母の開発を目指している。

また、焼酎業界においては、環境問題の立場から、焼酎製造に伴って廃棄物として生じる蒸留粕の適正処理、有効利用の推進、および酒税の引き上げに対応できるような製造工程の改善や製品の品質向上など、解決すべき緊急の課題が多い。これらの問題の解決方法の一つとして、高濃度のアルコール中でも生育できる酵母を用いて醸造を行うことにより、蒸留粕自体の減量とそれに伴う製造工程の改善が期待される。このことから、大分酵母の特性のひとつとして、アルコールに高い耐性を持つことも期待される。

本研究では、細胞融合法により麦焼酎の生産に適したアルコール耐性の強い酵母を造成する事を目的として、親細胞株の選定を行った後、電気融合を実施した。また、得られた融合酵母を用いた麦焼酎の試醸を行い、もろみの状態や芳香成分の分析を行ったので報告する。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 使用菌株

(財)日本醸造協会および(財)発酵研究所より醸造用酵母を中心に購入した。

##### 2.2 染色試験

常法<sup>1)</sup>に従い、トリフェニルテトラゾリウムクロライ

ド(TTC)寒天重層染色と、 $\alpha$ -ナフチルリン酸とFast blue salt Bによる、酸性ホスファターゼ(acp)の検出を行った。

##### 2.3 アルコール耐性試験

試験株をYPD液体培地中で前培養した後、各濃度のエタノールを含むYPD液体培地に接種して、振盪培養装置で増殖能を測定した。

##### 2.4 栄養要求変異株の作成

エチルメタンサルホン酸(EMS)により変異を引き起こした後、Nystatin処理を行って選択した。

##### 2.5 細胞融合

酵母細胞をZymolyase-100Tでプロトプラストとした。2種類の細胞を混合し、1MHzの高周波電圧30Vを10秒印加し、2~3個のプロトプラスト鎖を形成させた後、直流パルス電圧400V、パルス幅60 $\mu$ 秒を印加して融合させた。緩衝液等は既報<sup>2)</sup>に準じて行った。

##### 2.6 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

165Vで90秒、105秒のパルス時間で各10時間、120秒のパルス時間で12時間電気泳動を行った。

##### 2.7 麦焼酎の試醸

1次もろみは、予めYPD培地で前培養した各酵母を麴96g、水96mlに添加し26℃で6日間経過させた。その後、総麦300g、麴歩合36%、汲水歩合150%となるように、1次もろみに蒸煮麦と水を加えて、メイセル管(硫酸トラップ)を付けた1L三角フラスコに2次もろみとして仕込み、28℃恒温器で発酵させ、経時的にCO<sub>2</sub>減量を測定した。発酵終了後、もろみの酸度等を測定し、一部を蒸留して芳香成分等を測定した。

##### 2.8 もろみ香氣成分の分析

ヘッドスペース(HS)法により、各もろみから香氣成

分を含む気体を発生させて、それをキャピラリーガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC-MS) により分析した。条件は、HS 温度を 70 °C とし、GC 温度は 50 °C ~ 200 °C まで上昇させ、MS 温度は 150 °C で行った。

### 3. 実験結果及び考察

#### 3.1 栄養要求性変異株の作成

第1報<sup>3)</sup>では、鹿児島酵母の栄養要求性変異株が得られていなかったため、この変異株の作成を試みた。EMS を変異源として用いたところ、鹿児島酵母のヒスチジン要求性変異株 KOE1(His<sup>-</sup>) が得られたため、ワイン酵母 OC-2 由来のロイシン要求性変異株 OCE1(Leu<sup>-</sup>) と共に細胞融合の親株とすることとした。

#### 3.2 細胞融合

KOE1(His<sup>-</sup>) と OCE1(Leu<sup>-</sup>) を Zymolyase-100T で処理してプロトプラストとした後、2種類の細胞を混合し、電気融合法にて融合を行った。最小培地上で生育する株の内、増殖の良好であった F2, F3, F5 の3株を融合細胞として分離した。この内 F5 については *acp* は検出されたが、F2, F3 については検出されなかった (Table 1)。これは、融合したプロトプラストから細胞壁を再生する過程で何らかの変異を起こしたものである。

Table 1 融合細胞の染色性

	TTC-glucose	TTC- $\alpha$ -MG	<i>acp</i>
KOE1(His <sup>-</sup> )	PR	PR	+
OCE1(Leu <sup>-</sup> )	WP	P	+
融合細胞 F2	R	PR	-
融合細胞 F3	P	P	-
融合細胞 F5	PR	PR	+

R : 赤, P : ピンク, WP : 白っぽいピンク, PR : 赤っぽいピンク

#### 3.3 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

この3株について PFGE を行った結果、KOE1(His<sup>-</sup>) と OCE1(Leu<sup>-</sup>) の染色体パターンの中間的な性質を示し、融合細胞であることが確認された (Fig.1)。

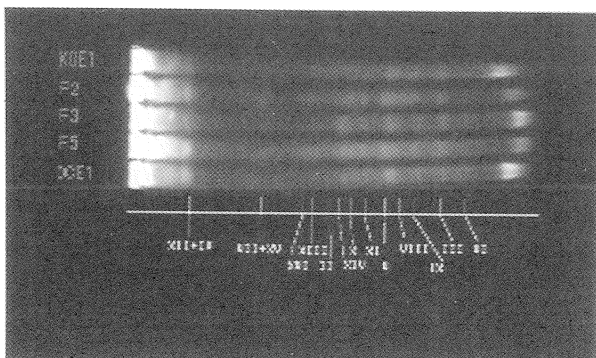


Fig.1 PFGE による融合細胞の染色体の解析

#### 3.4 融合細胞のアルコール耐性試験

3株の融合細胞のアルコール耐性について検討した。エタノールが存在しない条件では、3株とも親株と同等の増殖を示したが、10%のエタノール存在下では、F3についてはほぼ OCE1(Leu<sup>-</sup>) と同等の、F2, F5 については OCE1(Leu<sup>-</sup>) 株と KOE1(His<sup>-</sup>) 株との中間的な性質を示した (Fig.2)。

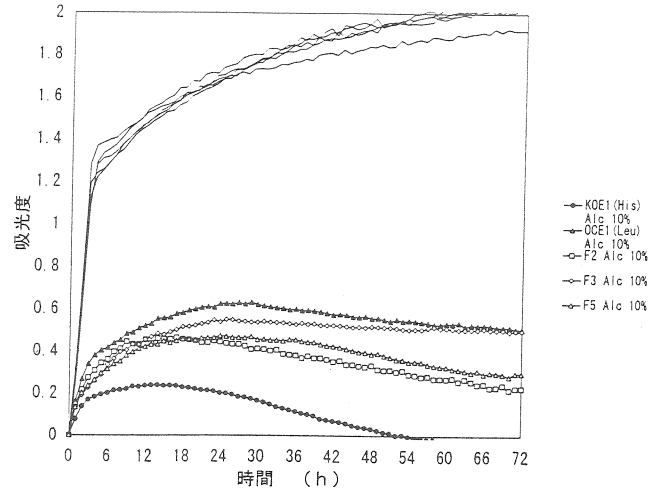


Fig.2 融合細胞の増殖に対する 10% エタノールの影響

#### 3.5 融合細胞を用いた麦焼酎の試験

親株および融合した酵母を用いて、総麦 300g の規模で麦焼酎を仕込んだところ、KOE1(His<sup>-</sup>) 株は、発酵の途中で焼酎臭が観察された。この臭いは、元の鹿児島酵母では見られず、変異株に特有のものであったが、最終的には、臭いが弱くなり、良好な焼酎香が認められるようになった。また、OCE1(Leu<sup>-</sup>) 株、及び融合株では親株のワイン酵母と同様に、果実様の香りが認められた。

#### 3.6 麦焼酎もろみの分析

試験したもろみを濾過して固形物を除去した後、酸度、pH、アルコール分等を測定した (Table 2)。酸度、pH は、各もろみごとに若干の差は見られたが、顕著なものではなかった。もろみのアルコール分は、Ko, KOE1(His<sup>-</sup>) 株が 18% 以上であったのに対して OC-2, OCE1(Leu<sup>-</sup>) 株では 17% と低く、アルコール耐性試験の結果とは異なるものであった。これは、OC-2, OCE1(Leu<sup>-</sup>) 株がアルコールには強い性質を持っているものの、麦由来の糖分をアルコールに変換する能力が低いためと思われる。融合株のもろみのアルコール分は Ko 株と同等以上であり、特に F5 株では 18.9% と高かった。これより、100g の麦から生成できるアルコールの量を算出すると、F5 株では元の Ko 株と比較して 2ml 増加しており、本融合酵母株の使用による麦焼酎の増産が期待できる。また、同量の麦焼酎に対する蒸留粕の量を算出すると、融合酵母株では 5% の減量となった。

Table 2 麦焼酎もろみの分析結果

	もろみ酸度	もろみ pH	揮発酸度	EtOH(%)	焼酎 pH	OD275	EtOH(ml)/100g	P/B	P/A	B/A
Ko	8.80	4.14	1.33	18.3	4.68	0.036	40.9	0.93	0.30	0.32
OC-2	10.30	4.00	1.70	17.1	4.33	0.105	38.8	0.93	0.32	0.34
KOE-1	9.10	4.19	2.52	18.4	4.24	0.030	41.1	0.63	0.19	0.30
OCE-1	10.20	4.01	1.76	17.0	4.08	0.246	38.0	0.85	0.34	0.40
F2	9.10	4.19	2.52	18.4	4.08	0.095	41.1	0.79	0.26	0.33
F3	9.60	4.16	2.38	18.5	4.22	0.040	41.6	1.13	0.35	0.31
F5	10.40	4.11	2.27	18.9	4.29	0.029	42.8	1.07	0.36	0.34

P:n-Propyl Alcohol B:Isobutyl Alcohol A:Isoamyl Alcohol

### 3.7 麦焼酎もろみの香気成分

濾過したもろみを、HS 法による GC-MS で分析したところ、主成分のエチルアルコールの他に焼酎の味や香りに影響するといわれているプロピルアルコール、イソブチルアルコール、イソアミルアルコールといった高級アルコール及び酢酸イソアミルやカブロン酸エチルといった香気エステル類が検出された (Fig.3)。これらの香気成分について、酵母の違いによる顕著な差は認められなかった。しかし、果実様の香りのあるもろみについては、酢酸エステルに由来すると思われる酢酸の含有量が若干多かった。

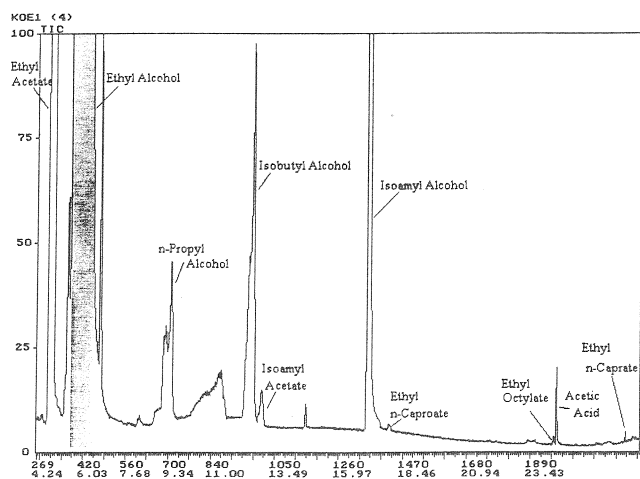


Fig.3 麦焼酎もろみの香気成分

各々のもろみを 50℃、操作圧 -660mmHg という、実際の製造工程に近い条件で減圧蒸留して、麦焼酎製品に近い蒸留液を得た。もろみ醸造時に OCE1(Leu<sup>-</sup>) 株、及び融合株で認められた果実様の香りは、蒸留液ではあまり観察されなかった。しかし、麦焼酎としての酒質は、Ko 株より得られたものと比較して、融合株でも遜色なく、本融合株は麦焼酎の醸造に適しているものと考えられた。

### 4. まとめ

麦焼酎の醸造に適した大分酵母の造成を目的として、アルコール耐性を指標に親株の選定及び細胞融合を実施した。また得られた酵母を用いて実際に麦焼酎を試醸して、次の結果を得た。

- (1) 鹿児島酵母 Ko とワイン酵母 OC-2 の栄養要求性変異株を細胞融合させ、融合株 F2, F3, F5 を得た。
- (2) 3 株の細胞は染色体を分析した結果、融合細胞であることが確認された。
- (3) アルコールに対する耐性は、3 株とも鹿児島酵母よりも強く、特に F3 株は OC-2 に匹敵する耐性を持っていた。
- (4) 融合酵母を用いて麦焼酎を小仕込みしたところ、ワイン酵母と同様の、果実様の香りのするもろみが醸造できた。
- (5) もろみ中のアルコール分は、F5 株では鹿児島酵母よりも高く、計算上 5% の蒸留粕の減量が可能と考えられた。
- (6) もろみの香気成分を HS 法による GC-MS で分析したが、酵母の違いによる香気成分の顕著な差は認められなかった。
- (7) 融合酵母のもろみで認められた果実様の香りは、減圧蒸留して得られる蒸留液では強くなかったが、鹿児島酵母と比較して酒質は良好で、麦焼酎の醸造に適していると判断された。

### 参考文献

- 1) 西谷尚道：醸協,77(10)648(1982)
- 2) 野田幸太郎、十川好志：島津評論,44,167(1989)
- 3) 江藤 勲：大分県産業科学技術センター平成 7 年度研究報告,72(1995)