

甘藷焼酎用高香気生成酵母の育種開発及び実施試験 ——育種開発について——

食品工業部 ○高峯和則, 瀬戸口真治, 亀澤浩幸, 水元弘二
大口酒造協業組合 神渡巧, 緒方新一郎

1 はじめに

酒類における香気生成能に優れた酵母の育種方法は、醸造場のもろみから分離する方法、カナバニン耐性株などの薬剤耐性株から分離する方法、強制的に遺伝子を変異させる手法などがある。今回、鹿児島酵母から高香気生成能に優れた実用性のある焼酎用酵母を育種するために、秋田¹⁾の高香気生成酵母の取得方法を一部改変して、カナバニンおよび p-フルオロフェニルアラニンに耐性のある酵母の分離を行い、得られた耐性株を用い甘藷焼酎の小仕込み試験を行った。

2 実験方法

2.1 使用培地

前培養培地は YM 液体培地を用い、カナバニン耐性株分離培地はグルコース 2%, YNB w/o amino acids 0.67% および Agar 2% に 40mg/ℓ を添加したカナバニン平板培地を用いた。p-フルオロフェニルアラニン (以下, p-FPA) 耐性株分離培地はグルコース 2%, YNB w/o amino acids 0.67% および Agar 2% に 400mg/ℓ の p-FPA を添加した p-FPA 平板培地を用いた。

2.2 カナバニンおよび p-FPA 耐性株の分離

秋田の方法¹⁾を一部改変して、図 1 に示す方法で行った。YM 液体培地で 30℃, 48 時間培養した K2-2 を無菌水で 2 回洗浄した後 1×10^7 cells をカナバニン平板培地に塗抹し 30℃, 7 日間培養を行った。出現したコロニーについてカナバニン液体培地を用いて 30℃, 7 日間培養を行い酵母の増殖による白濁を肉眼的に判断し、増殖の速いものについてカナバニン液体培地で継代培養を繰り返し、分離されたカナバニン耐性株を p-FPA 平板培地に塗抹し 30℃, 7 日間培養し、生育したコロニーについて p-FPA 液体培地で培養を行い酵母の増殖による白濁を肉眼的に判断し、増殖の速いものについて p-FPA 液体培地で継代培養を繰り返した。

2.3 スクリーニング

あらかじめ 710 μm 以下に粉碎した乾燥米麹 2.35g, 水道水 4.0 ml と酵母懸濁液 0.1 ml をキャップ付きの 50 ml 容のプラスチック製の遠心分離管に加え 30℃ で 5 日間発酵させた。スクリーニングは発酵終了後のもろみを 2,000 × g, 10min 遠心分離後、得られた上澄液についてヘッドスペースガスクロマトグラフ法で香気成分を定量して行った。なお、内部標準物質としてノルマルアミリアルコールを 45mg/ℓ 添加して行った。

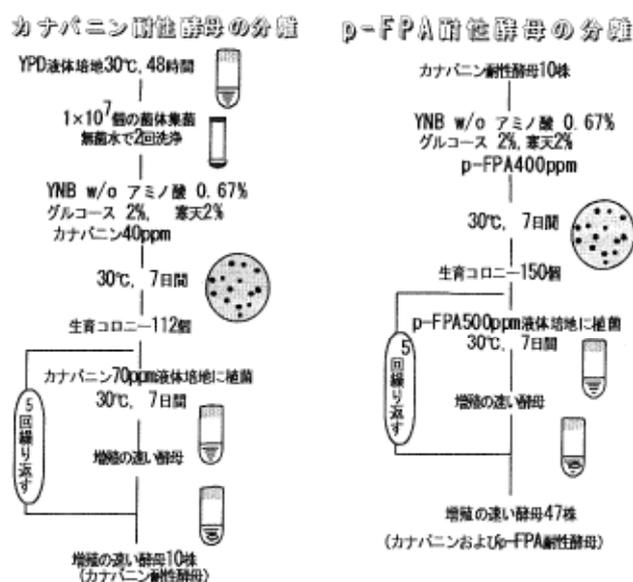


図 1 カナバニン及び p-FPA 耐性酵母の分離

2. 4 小仕込み試験

米麴 1000g および汲み水 1,180g を 3 ℓ 容サンプル瓶に加え、あらかじめ前培養した酵母液 20g を添加し 1 次仕込みを行い、30 °C で 5 日間発酵させた。これを 20 ℓ 容ステンレス容器に移し、これに蒸煮した甘藷 5,000g および汲み水 2,700g を添加し 2 次仕込みを行った。発酵温度は 30 °C で 48 時間保持した後、48 時間毎に 1 °C ずつ低下させ 7 日間発酵させた。

3 結果および考察

3. 1 カナバニンおよび p-FPA 耐性株の分離

K2-2 株を 1×10^7 cells カナバニン平板培地に塗抹し 30 °C で 7 日間培養を行った結果、112 個のコロニーが出現した。得られた 112 株をカナバニン液体培地で培養し、そのうちで増殖速度の速い 72 株について再度カナバニン液体培地で培養を行い、増殖速度の速い 30 株を分離した。この操作を更に 3 回繰り返し増殖の良好であった 10 株を分離した。この 10 株をそれぞれ p-FPA 平板培地に塗抹し出現した酵母 150 株を、p-FPA 液体培地で培養し、増殖速度の速い 85 株について再度培養を行い 57 株を分離した。この操作を更に 3 回繰り返し増殖の良好であった 47 株を分離した。

3. 2 スクリーニング

カナバニンおよび p-FPA に耐性のある 47 株について粉碎米麴を用いて発酵試験を行い、発酵終了後のもろみの香气成分としてアミルアルコール類（イソアミルアルコールと活性アミルアルコール）および β -フェネチルアルコールを測定した。その結果、親株の K2-2 のアミルアルコール類の 181mg/ℓ と β -フェネチルアルコールの 126mg/ℓ に比べ、いずれも 2 倍以上の生成量であった No.7, 13, 21 および 39 をスクリーニングした。

3. 3 小仕込み試験

No.7, 13, 21 と 39 および K2-2 の小仕込み試験における発酵経過を図 2 に、焼酎のガスクロマトグラフ分析結果について表 1 に示した。耐性株は 1 次もろみで K2-2 と比べ発酵が若干遅れたが、2 次もろみでは No.39 以外の耐性株は K2-2 と比べ発酵が良好であった。また、もろみアルコール濃度も K2-2 の 13.8 % と比べ No.7, 13 および 21 はそれぞれ 14.2, 14.2 および 14.0 と高い値であった。もろみの残全糖量も No.39 以外の耐性株は K2-2 と比べ低い値を示した。焼酎に含まれるイソブチルアルコール、イソアミルアルコールおよび β -フェネチルアルコールはそれぞれ K2-2 と比べ 1.8 ~ 3.2 倍、1.6 ~ 2.2 倍および 1.2 ~ 1.9 倍の生産量であった。酢酸イソミルおよび酢酸 β -フェネチルはそれぞれ K2-2 の 2.3 ~ 3.5 倍および 3.9 ~ 7.9 倍であった。官能評価の結果、No.7 および 39 は香りが華やかで、No.13 および 21 は香りは華やかであるが辛口タイプの焼酎であった。

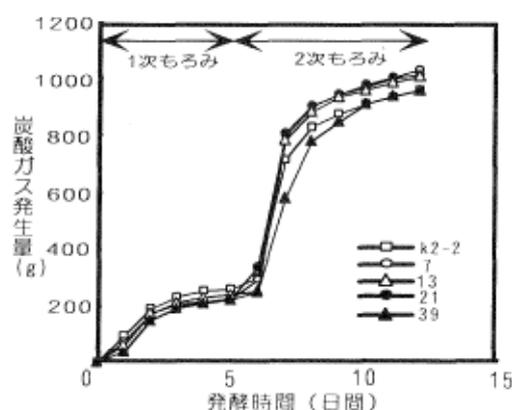


図 2 小仕込み試験

表 1 甘藷焼酎のガスクロマトグラフ分析

	K2-2	7	13	21	39
n-PrOH	87	138	91	99	90
i-BuOH	108	352	240	203	340
i-AmOH	176	380	284	283	362
Act-AmOH	85	165	133	120	155
β -PheOH	47	88	58	81	92
i-AmOAc	2.2	7.8	6.7	5.2	6.3
β -PheOAc	1.3	9.7	5.1	7.6	10.3
EtOCap	2.5	2.5	1.3	2.3	2.0

4 おわりに

鹿児島酵母からカナバニン耐性および p-FPA 耐性のある酵母を分離した。これらの酵母を用いて 10 ℓ 規模の甘藷焼酎の小仕込み試験を行った結果、イソブチルアルコール、イソアミルアルコールおよび β -フェネチルアルコールは K2-2 と比べ 1.5 倍以上の生産量であった。酢酸イソアミルおよび酢酸 β -フェネチルは K2-2 と比べ 3 倍以上生産された。

5 参考文献

- 1) 秋田修：醸協, 84, 96 (1989)