

土田酒造蔵付き酵母を用いた実地醸造試験と全ゲノム解析

渡部貴志・柳澤昌臣・星野元希*・土田祐士*・赤尾 健**

Demonstration of on-site brewing experiments using Tsuchida shuzo house sake yeast and its whole genome analysis

WATANABE Takashi, YANAGISAWA Masaomi, HOSHINO Genki*,
TSUCHIDA Yuji* and AKAO Takeshi **

清酒酵母の能力は、清酒の吟醸香と味に大きく影響を与える。我々は、山田錦を用いた総米200 gの小仕込み試験により、土田酒造蔵付き酵母から優良な醸造特性を示す酵母2小-4を選抜した。また、土田酒造において山廃もと造りで総米500 kgの実地醸造試験を実施し、対照株のきょうかい701号（K701）に比べ、2小-4で造ったお酒は酢酸イソアミルの濃度が2倍以上高かった。これらのことから2小-4は、IDO酵母として実用化することになった。一方、2小-4を含む5株の土田蔵付き酵母の全ゲノム解析を行い、より詳細に系統を調べることができた。

キーワード：蔵付き清酒酵母、実地試験醸造、全ゲノム解析

The quality of *ginjyo*-aroma and taste on brewed sake is directly affected by the ability of sake yeast. We demonstrated the small scale (200 g of total rice) sake brewing test using yamadanisiki, and selected strain 2S-4 from house sake yeast of Tsuchida shuzo. By 500 kg of on-site brewing experiments revealed that brewed sake with strain 2S-4 contains twice higher concentrate of acetic-isoamyl than that with strain K701. Therefore, strain 2S-4 was named IDO yeast and practicalized. Additionally, 5 house sake yeasts were demonstrated whole-genome analysis.

Keywords: house sake yeasts, on-site brewing experiments, whole genome analysis

1 はじめに

近年の地酒ブームにより、全国各地の酒造会社は、独自性があり高品質な清酒の開発に取り組んでいる。その取り組みの一つにアルコール発酵と香味に影響する清酒酵母の差別化があり、(公財)日本醸造協会が頒布する優良清酒酵母や、県独自で開発された酵母などを、目的とする酒質に合わせて選び、用いている。土田酒造株式会社(土田酒造)では、菩提酏(ぼだいもと)造り¹⁾という蔵付き酵母の育成を促す手法を用い、酵母無添加の清酒造りを行った。

バイオ・微生物係

* 土田酒造株式会社

** 独立行政法人酒類総合研究所

我々は、その過程の中で酵母を単離し、醸造特性と系統解析を行ったところ、全てが泡無し株であり、優良清酒酵母の系統であることが分かった²⁾。また、蔵付き酵母の醸造特性には、多様性が認められたことから、土田酒造の独自性を示しやすい株を探し出せると考えられた。

しかしながら、前回の報告では α 化米と乾燥麴をもちいた総米20 gの小仕込み試験の結果でしか無く、試験ロット間でも成分値の比較がしにくかった。このことから、規模をもう少し大きくし、候補株を絞って再度の選抜試験を行う必要があると考えられた。そこで本研究では、139株の土田酒造蔵付き酵母から、取得時期と醸造特性、きょうかい7号(K7)系かK7系以外かを

指標に、土田酒造独自酵母の候補として16株を選抜し、再度の選抜試験を行った。

また、土田酒造では全量生醗系酒母造りを行っていることから、中温速醗造りで行う群馬産業技術センターのパイロットプラントでの試験醸造は、土田酒造の酒質には参考になりにくいとも考えられた。よって、上記試験で最終選抜した2小-4について、土田酒造で実地醸造試験を行い、酒質を調査し、最終的に「IDO酵母」として実用化することになった。さらに、小仕込み試験で醸造特性に優れた株について、(独)酒類総合研究所で全ゲノム解析を行って頂いたのを併せて報告する。

2 実験材料と方法

2.1 供試酵母

土田酒造蔵付き酵母は、前報¹⁾のものの中から16株選抜して用いた。また、選抜した2小-4の実地醸造試験では、対照に日本醸造協会のきょうかい701号(K701)を用いた。

2.2 山田錦を用いた小仕込み試験

土田酒造蔵付き酵母16株に対し、平成29年度兵庫産山田錦40%精米を用いた総米200gの小仕込み試験を、表1に示す仕込み配合で行った。麴エキス(Brix 5°)2.5 mLに酵母を一白金耳接種し、23°Cで2日間静置培養を行った。これを酒母の代わりに用い、滅菌酒母用汲水12 mLに置換したものを添加した。麴米はハイG(樋口松之助商店)を種麴として製麴したものを用いた。掛米は洗米後、38%吸水率となるように浸水し、蒸籠で蒸したものを用いた。汲水は水道水を用い、追水は蒸留水で4日目に10 mL、7日目と11日目に15mLずつ行った。仕込み温度は8~12°Cで経日的に変化させる吟醸造りとした。

表1 山田錦を用いた小仕込み配合

	酒母	一段	二段	追水	計
総米(g)		40	160		200
掛米(g)			160		160
麴米(g)		40			40
汲水(mL)	12	58	200	40	300
温度(°C)	-	12	8~12	-	-

上槽は、28日後に遠心分離(7000×g, 15 min)で行い、得られた製成酒について、後述する成分分析と、土田酒造清酒製造技術者2名、センター職員2名で官能評価を行い、実地試験醸造に用いる最終候補株を選抜した。

2.3 分析方法

酸度、アミノ酸度、日本酒度、エタノールは国税庁所定分析法に従い、分析を行った。グルコース、マルトースは、高速液体クロマトグラフ、示差屈折率検出器を用い、分析を行った。香氣成分(酢酸エチル、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、イソブチルアルコール)は、ヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

2.4 実地醸造試験

山田錦を用いた小仕込み試験で選抜した候補株(2小-4)を用い、平成30年度群馬県産あさひの夢70%精米を用いた総米500kgの実地醸造試験を行った。群馬産業技術センターで麴エキス(Brix 5°)500 mLの拡大培養を行い、冷蔵の宅配便で土田酒造に輸送した。酒母は山廃もと造り、もろみは三段仕込みの通常の市販酒を造る方法で行った。なお、対照としてK701を用いた。製成酒については、センター職員3名で官能検査を行った

2.5 土田蔵付き酵母の全ゲノム解析

実地醸造試験で用いた土田2小-4に加え、前報¹⁾の系統解析で異なる由来であり、山田錦を用いた小仕込み試験で発酵力が高かった4株(2中-20、3大-21、3小-16、1-7大)について、全ゲノム解析を行った。

各酵母をYM寒天培地(酵母エキス3 g/L、麦芽エキス3 g/L、ペプトン5g/L、グルコース10 g/L、寒天20 g/L)に接種し、培養は行わず、(独)酒類総合研究所に常温で輸送した。酵母の諸性質を調べた後、全ゲノム解析を外部委託により行った。

3 結果と考察

3.1 小仕込み試験結果と株の選抜

いずれの株でも70%精米のα化米を用いて行った試験²⁾と比較して、酸度とアミノ酸度が明らかに減少しており、かつエタノ

ール (EtOH) と日本酒度が株間で大きくバラツキが出た (表 2)。これらのことから、酵母の増殖に必要な栄養成分が少ない高精白の山田錦を用いることで、醸造特性の株間の差が分かりやすくなることが確認された。

全株の中でも 1-7 は K9 系、2 中 -20 は KAZE 酵母系 (K9 系でカプロン酸エチルを出す) で発酵経過が良く、3 小 -16 (K7

系) は全ての株の中で最も発酵力が強い株であった (図 1)。一方、小仕込み試験酒の官能評価により、2 小 -4 を実地醸造試験用の最終選抜株として選んだ。この株は、2 回の独立した試験でも醸造特性が安定し、発酵力が高く、かつ K7 系と分類されながら酢酸イソアミルの生産量が高く、小仕込み試験の分析結果と重ねても独自性が高いことが確認された。

表 2 山田錦を用いた小仕込み試験各分析値のまとめ

	1-7大	1-12小	2大-8	2大-22	2中-2	2中-5	2中-20	2中-21
重量減少量 (g)	55.0	56.9	56.1	48.0	51.5	48.9	51.8	48.0
日本酒度 (-)	-0.7	-0.5	-1.1	-12.1	-2.3	-4.6	0.1	-1.5
酸度 (mL)	2.0	2.0	2.1	1.9	1.7	1.6	1.6	1.6
アミノ酸度 (mL)	15.0	15.2	15.2	12.9	14.0	13.4	14.1	14.0
EtOH (%(v/v))	1.0	1.1	1.0	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2
Glucose (%)	2.1	2.0	2.1	3.4	2.5	2.8	2.2	2.4
Maltose (%)	1.0	1.0	1.0	1.4	0.8	1.0	0.7	0.8
イソアミルアルコール (ppm)	164.7	182.0	178.6	172.0	165.0	153.9	155.8	157.4
酢酸イソアミル (ppm)	4.0	5.0	4.6	4.7	5.1	5.1	4.9	5.4
カプロン酸エチル (ppm)	1.3	1.8	1.7	1.2	7.3	5.9	6.2	7.4
酢酸エチル (ppm)	74.3	85.1	78.4	65.3	60.9	53.6	60.3	63.4
イソブチルアルコール (ppm)	58.8	66.2	65.5	72.1	64.3	67.0	63.9	60.7
E/A (-)	2.5	2.8	2.7	2.7	3.1	3.4	3.2	3.4
酵母の系統	K9系	K7系	K9系	K9系	K9系	K9系	K9系	K9系

	2小-4	2小-14	2小-23	3大-15	3大-21	3小-9	3小-16	3小-22
重量減少量 (g)	56.5	49.2	45.7	52.2	53.6	55.1	58.0	54.7
日本酒度 (-)	-0.2	-15.0	-16.2	-6.0	-2.7	-3.3	1.7	-2.2
酸度 (mL)	2.1	1.9	1.7	2.1	2.0	2.0	2.0	2.0
アミノ酸度 (mL)	15.1	13.1	12.3	13.8	14.4	14.7	15.6	14.6
EtOH (%(v/v))	0.9	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	1.0
Glucose (%)	2.1	3.9	4.0	2.7	2.4	2.5	2.0	2.5
Maltose (%)	0.8	1.2	1.3	1.0	0.9	0.9	0.7	0.8
イソアミルアルコール (ppm)	217.5	154.8	152.5	166.1	166.9	198.5	205.6	173.7
酢酸イソアミル (ppm)	8.5	6.1	5.4	4.1	4.5	7.2	7.7	4.8
カプロン酸エチル (ppm)	2.1	1.6	1.3	1.5	1.8	1.9	2.3	1.9
酢酸エチル (ppm)	104.4	68.3	68.6	69.3	75.0	86.5	92.9	75.5
イソブチルアルコール (ppm)	85.0	64.2	64.7	57.8	55.1	72.3	78.1	58.8
E/A (-)	3.9	3.9	3.4	2.5	2.7	3.6	3.8	2.8
酵母の系統	K7系	K7系	K7系	K6系?	K6系?	K7系	K7系	K7系

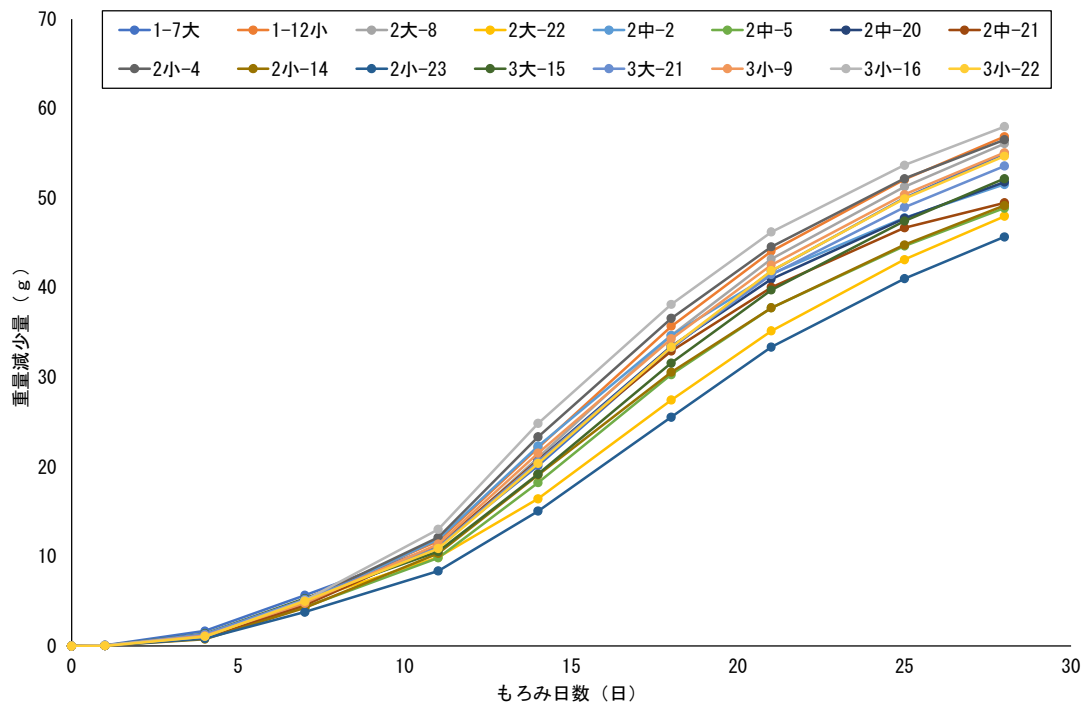


図1 山田錦小仕込み試験での炭酸ガス重量減少量の経日変化
 総米200gの山田錦40%精米で2回の独立した試験の平均値を示す。

3. 2 実地醸造試験による評価

小仕込み試験による最終選抜株2小-4を用い、群馬県産あさひの夢70%精米で総米500kgの実地醸造試験を行った。製成酒は、対照のK701に比べ、酢酸イソアミルが高い反面、酢酸エチルの値も高くなっていった(表3)。また、3名の評価者による官能評価では、酸味と甘味が特徴として挙げられ、土田酒造の酒質の特徴に適した仕上がりと感じられた。なお、本酵母は、IDO酵母と命名し、令和元年度より実用化している。

表3 実地試験醸造酒の分析値

	K701	2小-4
Glucose (%)	1.3	2.0
Maltose (%)	0.4	0.9
イソアミルアルコール (ppm)	257.4	214.7
酢酸イソアミル (ppm)	4.0	6.8
カプロン酸エチル (ppm)	1.4	1.3
酢酸エチル (ppm)	100.9	150.7
イソブチルアルコール (ppm)	110.5	85.0
E/A (-)	1.6	3.2

3. 3 土田蔵付き酵母の系統解析

前報で我々が行った酵母の系統解析²⁾は、簡易識別法のPCR増幅断片の有無を見ているに過ぎず、土田酒造蔵付き酵母の正確な由来を判断するのは難しい。(独)酒類総合研究所では、日本醸造協会が頒布している優良清酒酵母や、全国各地の清酒酵母の全ゲノム解析を行い、膨大なゲノム情報を蓄積している。(独)酒類総合研究所のゲノム解析を行う枠から、5つ頂けることができたので、最終選抜株2小-4と特徴のある4株の解析をすることにした。

まず、各酵母の識別を表4のように整理し、諸性質を調べた。フローサイトメトリー(Propidium Iodide: PI染色)による染色体倍数性推定では、用いた5株はいずれも2倍体であることが分かった(図2)。

表4 各酵母の識別と名前の対応

識別	酵母名
Gunma1_T2S4	2小-4 (IDO酵母)
Gunma2_T2M20	2中-20
Gunma3_T3L21	3大-21
Gunma4_T3S16	3小-16
Gunma5_T1-7	1-7大

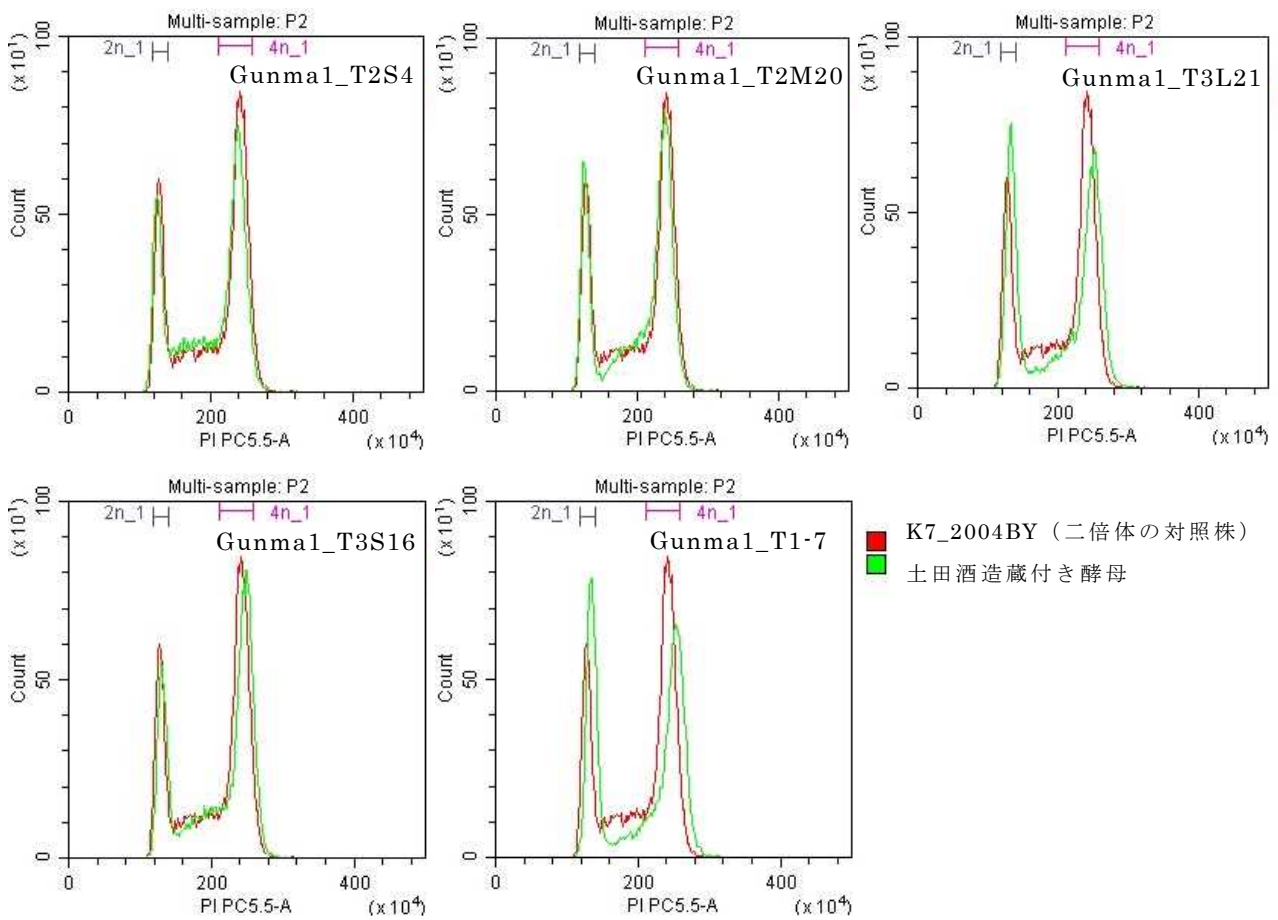


図2 フローサイトメトリー（PI染色）による染色体倍数性推定結果

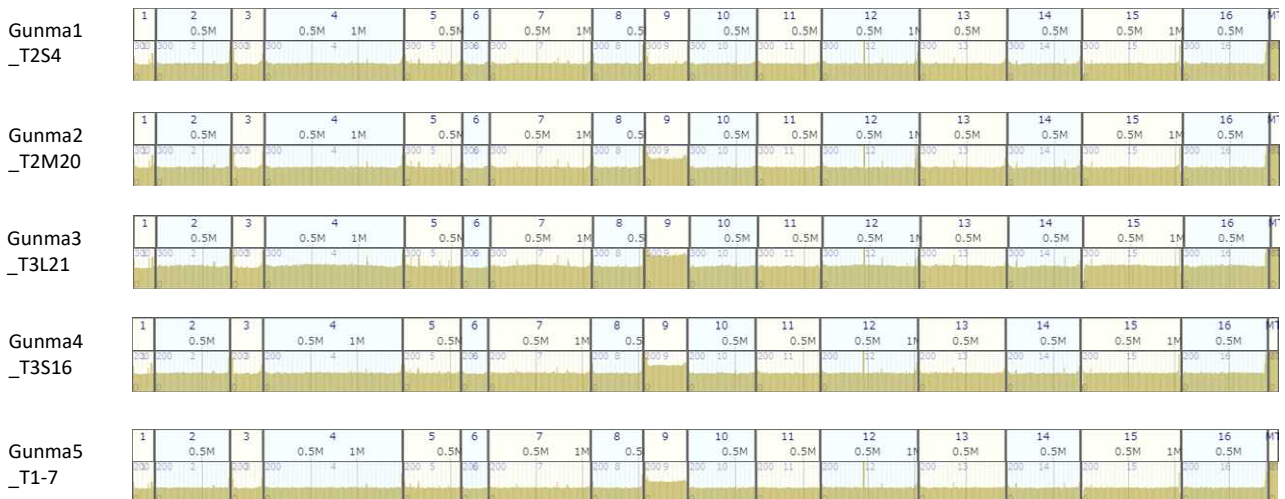


図3 染色体異数性の有無の評価

つづいて、K7ゲノムを参照配列とし、各酵母の全ゲノム配列データをマッピングして染色体異数性を調べたところ、IDO酵母と命名した2小-4（T2S4）は、K7ゲノムと染色体が同数であったのに対し、その他の酵母は9番染色体の深度が深く、3本であることが推測された（図3）。

さらに、全ゲノム配列データを用いて系統解析を行ったところ、2小-4と3小-16は、K7系統に属し、その他の3株はK9系統に属していることが明らかとなった（data not shown）。我々は、3大-21をK6系であると予測してしたが²⁾、K9系統に属していたため、簡易識別法の限界と考えられる。

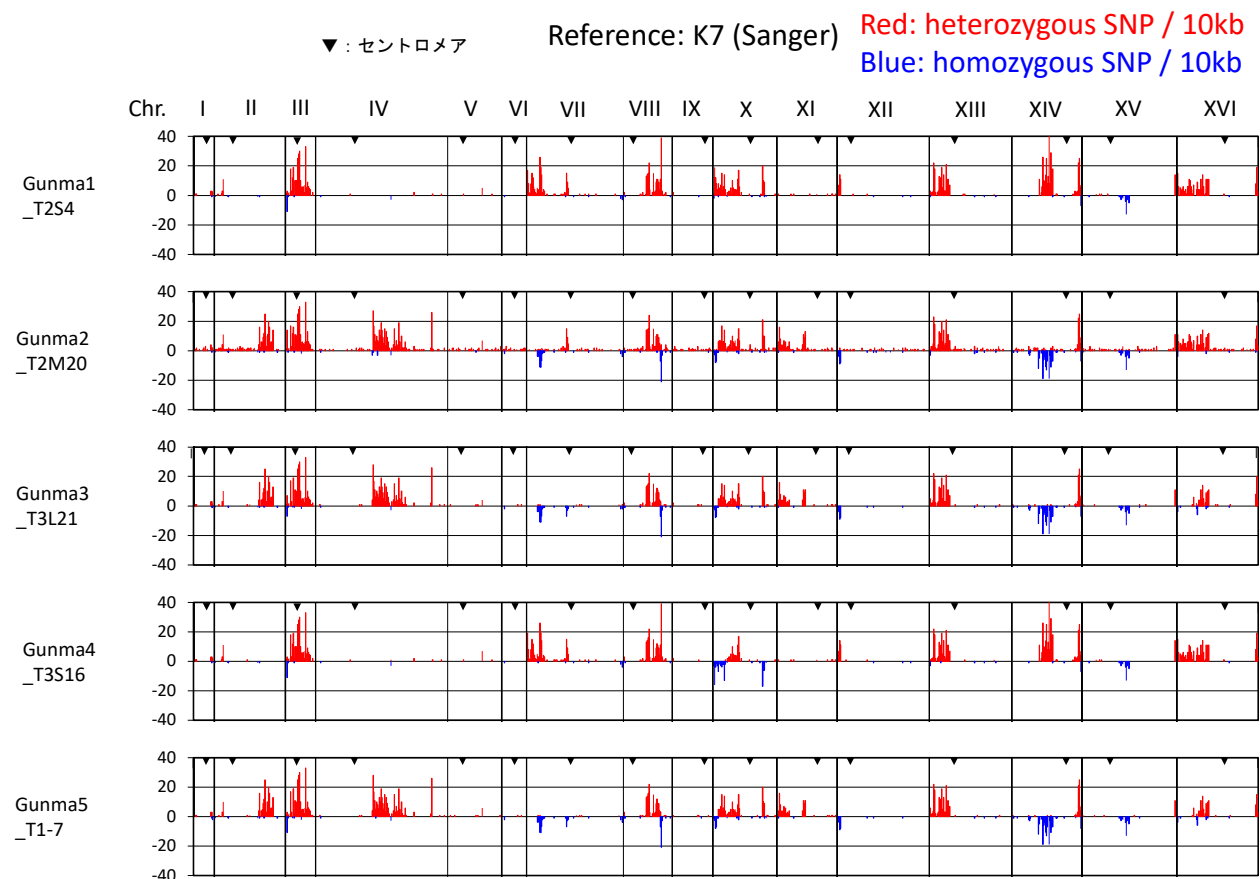


図4 SNP解析の結果

一方、2大-20は、K9系統に入るが、最近のK901の系統である1-7大、3大-21とは分岐した位置にあった（data not shown）。我々は、2大-20がカブロン酸エチル高生産性を示すK9系酵母であることから、平成4年のK901を親株とするKAZE酵母と推測しており²⁾、それを補完するデータとなっていると考えられた。

K7を参照配列にしたSingle Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析によると、K7系統の2小-4と3小-16、K9系統の2中-20、3大-21、1-7大はそれぞれ似た位置に一塩基多型が見受けられる（図4）。一方で、細かく見ると2中-20は、3大-21、1-7大に比べて新規なヘテロ変異が入っており、系統樹の枝が長いこと（data not shown）とも一致していた。

4 まとめ

本研究では、土田酒造株式会社の菩提造りのもろみの中から分離した139株の蔵付き酵母から、K701より酢酸イソアミル

生産性が良い2小-4を選抜し、実地醸造試験を経てIDO酵母と命名し、実用化を行った。また、全ゲノム解析により系統解析を行い、5株の供試株はそれぞれK7またはK9系統に属していると判明した。

なお、今回の実地醸造試験に用いていない他の3株（1-7大、2中-20、3小-16）についても、これまでの清酒酵母とは特徴が異なるため、独自性が高い新規酵母として有望である。

謝 辞

本研究の一部は、土田酒造株式会社との平成30年度群馬産業技術センター公募型共同研究により実施した。全ゲノム解析は、（独）酒類総合研究所の研究費で実施して頂いた。

文 献

- 1) 秋元裕一ら：日本醸造協会誌 75、314-319 (1980)
- 2) 渡部貴志ら：令和3年度群馬県立産業技術センター研究報告、38-50