

# 兼六園桜酵母の育種とオリジナル清酒の開発

山崎裕也\* 笹木哲也\*

地域性を活かしたオリジナル清酒の開発が全国各地で盛んに行われている。当場でも、兼六園の桜から分離した酵母(*Saccharomyces cerevisiae* KEN24-15株)を用いて清酒の開発を支援してきた。一方、この酵母を用いた清酒は香りが穏やかで、発酵の立ち上がりが遅いという課題があった。そこで、本研究では石川県オリジナルの清酒を開発するために、花のような香りを生成し、発酵の立ち上がりが速い酵母の育種を行うとともに、育種した酵母の醸造特性の評価を行った。その結果、酢酸β-フェネチルを高生産し、発酵の立ち上がりが速いKEP8n株を取得した。さらに、KEP8n株を用いた試験醸造の結果、KEP8n製成酒はアルコール濃度13.4%，酸度3.6，グルコース濃度3.1%を示した。酢酸β-フェネチル濃度は1.4 ppmと、KEN24-15製成酒より約1.5倍多く、花様の香りが特徴の清酒が醸造可能であることを明らかにした。

キーワード：兼六園桜酵母，育種，酢酸β-フェネチル，清酒

Breeding Improvement of Kenrokuen Sakura Yeast and Development of Original Sake

YAMAZAKI Yuya and SASAKI Tetsuya

Original sake products with regional characteristics are being actively developed in various areas of Japan. We also assisted the development of sake products brewed with a yeast (*Saccharomyces cerevisiae* KEN24-15) isolated from Kenrokuen cherry blossoms. However, the yeast had two problems: the aroma of the sake was mild and the commencement of fermentation was slow. In this study, we attempted to breed a yeast that produces a floral aroma and initiates rapid fermentation early in the brewing process, and subsequently evaluated its brewing characteristics. As a result, we obtained KEP8n, which produces high levels of β-phenethyl acetate and shows rapid fermentation commencement. In a test brew with KEP8n, the sake showed an alcohol concentration of 13.4%, an acidity of 3.6, and a glucose concentration of 3.1%. The concentration of β-phenethyl acetate was 1.4 ppm, 1.5 times higher than that of KEN24-15, indicating that KEP8n can be used to brew sake with a distinct floral aroma.

Keywords: Kenrokuen sakura yeast, breeding, β-phenethyl acetate, original sake

## 1. 緒 言

近年、食の多様化に伴い、多様なフレーバーを有するリキュール類などのアルコール飲料の消費量が増加する一方、清酒の消費量は年々減少している<sup>1)</sup>。この状況は、伝統的な酒造業界に深刻な影響をもたらしている。清酒の消費量減少に対処するため、業界では高品質化、差別化、そして地域性を推進する取り組みが行われている。

高品質化の取り組みとしては、吟醸香であるカプロン酸エチル(リンゴ様)，酢酸イソアミル(バナナ様)などの成分を多量に生成する酵母の研究が数多く行われている<sup>2)-4)</sup>。この研究は、消費者に対して高級感と独

自性を提供するために重要であり、特に香りの面での差別化を図るために重要な役割を果たしている。

また、地域の特色を反映した清酒の開発も全国各地で進められている。具体的には、大学や公設試験研究機関と連携し、名所旧跡などから分離した酵母を活用する試みが行われている<sup>5)-7)</sup>。これにより地域の魅力を清酒に反映させるとともに、観光資源としての価値も高めることが期待されている。

このような背景から、当場では平成22年度より県内の名所旧跡の花などからアルコール発酵力の高い酵母の分離に取り組んできた。その結果、兼六園の八重桜から発酵力の高い酵母(*Saccharomyces cerevisiae* KEN24-15株)の分離に成功し、これらの酵母を用いた清酒の開発を支援してきた<sup>8)</sup>。しかしながら、KEN24-

\*化学食品部

15株を用いた清酒の香りは、花を連想するような香調を有しておらず、またKEN24-15株は乳酸耐性が弱いため、醸造初期の発酵の立ち上がりが遅いといった課題があった。

そこで本研究では、KEN24-15株を基に、花のような香りである酢酸 $\beta$ -フェネチルを高生産し、発酵の立ち上がりが速い酵母の育種改良を行うとともに、育種した酵母の醸造特性の評価を行った。

## 2. 実験方法

### 2. 1 酵母の育種

#### 2. 1. 1 供試菌株と使用培地

兼六園桜酵母(KEN24-15株)を供試菌株とした。酵母の前培養にはYPD培地(酵母エキス1%, ポリペプトン2%, グルコース2%)を用いた。*p*-FPA耐性株の分離には、*p*-FPA耐性株分離培地(Yeast Nitrogen Base 0.67%, グルコース 2%, *p*-FPA 0.2 mg/ml, 寒天2%)を用いた。酢酸 $\beta$ -フェネチル高生産株の選抜には麹エキス培地を用いた。麹エキス培地は乾燥米麹(徳島製麹(株)) 300 g に蒸留水1 Lを加え、56°Cで18時間糖化した。その後、濾過した液を蒸留水でBrix10に希釈し、オートクレーブ滅菌(121°C, 20分)することで調製した。

#### 2. 1. 2 *p*-フルオロフェニルアラニン(*p*-FPA)耐性株の分離

*p*-FPA耐性株の分離は、既法<sup>9)</sup>に準じて以下の方法を行った。酵母をYPD培地3 mLに1白金耳接種し、30°Cで2日間培養した。この培養液を生理食塩水(0.85%NaCl水溶液)で3回洗浄し、*p*-FPA耐性株分離培地に100 μL塗末した。30°Cで3日間培養後、生育したコロニーから釣菌し、同様の操作を繰り返した。増殖してきたコロニーを*p*-FPA耐性株とした。

#### 2. 1. 3 酢酸 $\beta$ -フェネチル高生産株の選抜

得られた*p*-FPA耐性株100株を麹エキス培地6 mLに1白金耳接種し、30°C、3日間培養した。簡易的な官能評価を行い、花の香りを感じた20株について、酢酸 $\beta$ -フェネチル濃度を測定し、生成量の多い株を選抜した。

#### 2. 1. 4 乳酸耐性株の育種

選抜した酢酸 $\beta$ -フェネチル高生産株を供試株として、乳酸耐性株を得るために以下①～③の工程を行った。①酵母をYPD液体培地5 mLに1白金耳量を接種し、30

°Cで2日間培養した。②これを遠心分離(5000 rpm, 4°C, 5分)で集菌・洗浄した後、滅菌水に懸濁し、その懸濁液を乳酸0.1%添加したYPD寒天培地(酵母エキス1%, ポリペプトン2%, グルコース2%, 寒天2%)のプレートに塗布して、25°Cで3日間培養した。③生育したコロニーから釣菌し、①～②の操作を繰り返した。このとき、乳酸濃度を0.1%から最大0.6%まで段階的に上げて繰り返し培養し、最終的に生育したコロニーを乳酸耐性株とした。

#### 2. 1. 5 酒母発酵試験

取得した乳酸耐性株、対照株として乳酸耐性株の育種に用いた親株を酒母発酵試験に供した。酵母を麹エキス培地5 mLに1白金耳量を接種し、30°Cで2日間培養した。酒母発酵試験は、50 mLの滅菌遠心ポリチューブに乾燥米麹4.0 g, α化米10.0 g, 滅菌水(90%乳酸0.6%含有)16 mLを加えた。α化米が十分膨潤した後、酵母の培養液を滅菌水に対して1%添加して20°Cで7日間発酵を行った。発酵経過は試料の重量を測定し、炭酸ガス減量で評価した。

### 2. 2 清酒の試験醸造

#### 2. 2. 1 清酒の小仕込み試験

2. 1で選抜したKEP8n株、対照として従来酵母のKEN24-15株、協会酵母のK901株を用いて、総米600 g、麹歩合20%，汲水歩合140%の三段仕込みを行った。原料米は掛米、麹米ともに五百万石(精米歩合65%)を用いた。酒母は中温速醸配を用いた。添仕込み、踊りの温度は13°C、仲仕込みは12°C、留仕込みは10°Cを行った。その後、徐々に品温を上げ、6日目に15°Cとした。11日目から徐々に品温を下げ、20日目に10°Cとした。上槽は20日目に行った。発酵経過は酒母発酵試験と同様に炭酸ガス減量で評価した。

#### 2. 2. 2 成分分析

アルコール濃度はアルコール分析計(アルコメイトAL-2、理研計器(株))を用いて測定した。日本酒度、酸度、アミノ酸度は国税庁所定分析法に準じて測定した。グルコースはグルコース測定キット(CIIテストワコー、和光純薬工業(株))を用いて測定した。

香気成分はGC-MSを用いて固相マイクロ抽出法で測定した。試料5 mLに内部標準物質として0.1%の3-pentanol 0.1 mLをバイアル内に入れ、オートサンプラー

一(MPS2, ゲステル(株))にて, 50°Cで保持したバイアル内ヘッドスペースの香気成分をSPMEファイバー(DVB/Car/PDMS, Supelco)に30分間抽出した。ファイバーに抽出した香気成分をGC-MS(7890A/5975C, アジレント・テクノロジー(株))により, カラム(DB-WAX; 60 m × 0.25 mm × 0.15 μm, アジレント・テクノロジー(株)), 注入口温度230°C, オープン温度40°C(10分保持)→5°C/分→230°C(12分保持), スプリット比1:10の条件で分析した。香気成分の同定は, マススペクトルのNIST/Wileyライブラリとの一致, リテンションインデックスの既報文献値との一致で行った。内部標準物質のピーク強度から各成分のピーク相対強度を算出した。検量線作成のため, 酢酸β-フェネチル(東京化成工業(株))を用いて標準溶液(13%エタノール溶液)を作成した。酢酸β-フェネチル濃度は標準溶液の検量線から算出した。

### 2. 2. 3 官能評価

2. 2. 1で醸造した清酒を官能評価に供した。官能評価は, 酒造関係者10名をパネルとし, 各試料について, 香味の総合点を5点評点法で評価した。さらに, 特徴的な香り(甘い, 花様)の有無についても評価した。

## 3. 結果および考察

### 3. 1 酢酸β-フェネチル高生産酵母の選抜

清酒中に含まれる花の香りを有する成分としては, 酢酸β-フェネチルがあげられる。酢酸β-フェネチルは桃の花の香りに類似しており, フェニルアラニン生合成経路から生成される。この成分を高生産する酵母の育種には, フェニルアラニンのアナログである*p*-フルオロフェニルアラニン(*p*-FPA)に耐性を持つ株からの取得が有効であることが報告されている<sup>9),10)</sup>。そこで, *p*-FPA耐性株の分離を行い, 酢酸β-フェネチル高生産酵母の選抜を行った。

*p*-FPA耐性株の分離を行った結果, *p*-FPA耐性株を100株得ることができた。得られた100株を麹エキス培地で培養し, 簡易的な官能評価を行った。花の香りを感じた20株について, 培養液の酢酸β-フェネチル濃度を測定した。その結果を図1に示す。親株である従来酵母KEN24-15株は酢酸β-フェネチル濃度は0.2 ppmであったが, 花の香りを感じた20株中19株は酢酸β-フェネチル濃度0.2 ppm以上を示し, 酢酸β-フェネチル生産能の向上が認められた。特にKEP8株は酢酸β-フェネチ

ル濃度1.2 ppmで最も高い値を示した。*p*-FPA耐性株の中にはフェニルアラニン生合成経路の鍵酵素であるDAHPシナーゼのフィードバック阻害が解除され, 酢酸β-フェネチル生産能が向上することが報告されている<sup>9),11)</sup>。DNA解析などの詳細な検討が必要であるが, 酢酸β-フェネチル生産能が向上した19株はDAHPシナーゼのフィードバック阻害が解除されて, 酢酸β-フェネチル生産能が向上した可能性が考えられた。中でもKEP8株は最も酢酸β-フェネチル生産能の高い株であることから, 以後の試験に使用した。

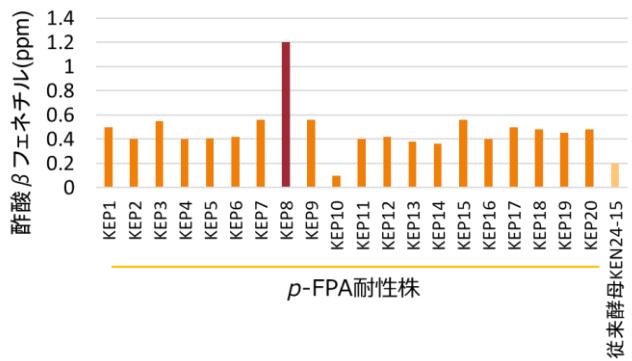


図1 *p*-FPA耐性株の酢酸β-フェネチル生産量

### 3. 2 乳酸耐性株の育種および酒母発酵試験

一般的な清酒醸造は麹エキスで酵母を前培養した後, 酒母を経て, 本発酵が行われる。兼六園桜酵母をはじめとする野生酵母は清酒醸造で通常使用される協会酵母に比べて, 乳酸に対する耐性が弱いことが知られている<sup>12)</sup>。そのため, 発酵の立ち上がりが遅く, 複数段階の酒母工程が必要であった。そこで, まずKEP8株を用いて乳酸に耐性を示す酵母の育種を行った。その結果, 乳酸0.6%でも生育可能な乳酸耐性株KEP8n株を取得することができた。

次に, 取得したKEP8n株, 対照株としてKEP8株を用いて, 酒母の発酵試験を行った。その結果を図2に示す。KEP8株は発酵の立ち上がりが遅く, 7日目の炭酸ガス減量は0.8 gであった。一方, 乳酸耐性を獲得したKEP8n株は発酵の立ち上がりがKEP8株に比べて速く, 7日目の炭酸ガス減量は2.8 gであった。清酒の醸造では, 発酵初期の立ち上がりが緩やかな場合, もろみ中のアルコール濃度が高まるまでに時間を要し, もろみの雑菌汚染リスクが高くなる<sup>12)</sup>。KEP8n株は発酵の立ち上がりが改善され, もろみの雑菌汚染リスクが低減するものと考えられる。

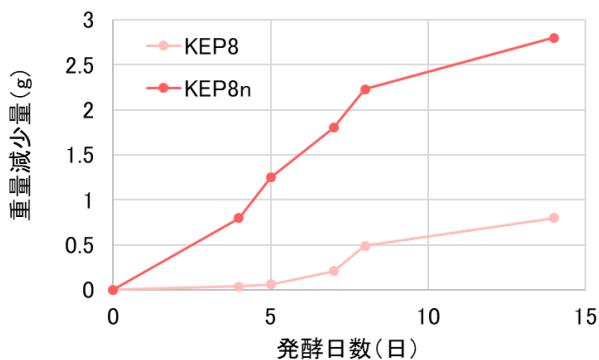


図2 酒母の発酵経過

### 3. 3 育種した酵母を用いた試験醸造

3. 2で取得したKEP8n株、対照として従来酵母のKEN24-15株、協会酵母のK901株を用いて、清酒の試験醸造(総米600 g、三段仕込み)を行い、試験で得た製成酒の成分を分析した。その結果を表1に示す。対照となるK901製成酒のアルコール濃度は18.1%を示した。一方、KEP8n製成酒、KEN24-15製成酒のアルコール濃度はそれぞれ13.4%、12.9%を示した。KEP8n株のアルコール発酵力はK901と比べてやや劣るもの、清酒醸造に十分な発酵力を示した。対照となるK901製成酒の酸度は2.2を示した。一方、KEP8n製成酒、KEN24-15製成酒の酸度はそれぞれ3.6、3.5を示した。対照となるK901製成酒のグルコース濃度は0.6%を示した。一方、KEP8n製成酒、KEN24-15製成酒のグルコース濃度はそれぞれ3.1%、3.2%を示した。KEP8n製成酒はK901製成酒よりも酸度およびグルコース濃度が高く、甘酸っぱい味わいの清酒となった。なお、KEP8n製成酒のアルコール濃度、酸度、グルコース濃度はKEN24-15製成酒と比べていずれも大きな差はなかった。

次に、試験で得た製成酒の酢酸β-フェネチル濃度を測定した。その結果を図3に示す。KEP8n製成酒の酢酸β-フェネチル濃度は1.4 ppmを示し、KEN24-15製成酒より約1.5倍多い傾向が認められた。試験醸造においても、KEP8n株は酢酸β-フェネチル高生産能を有していることが確認された。

試験した製成酒の酒造関係者10名による官能評価結果を図4に示す。KEP8n製成酒の総合点はKEN24-15製成酒およびK901製成酒の総合点よりも高い傾向が認められた。さらに香りの特徴として、KEP8n製成酒は甘い香りや花様の香りを感じるという意見がKEN24-15製成酒、K901製成酒よりも多い傾向が示された。

表1 試験した清酒の成分値

	菌株		
	KEN24-15 (従来酵母)	KEP8n (育種酵母)	K901 (協会酵母)
日本酒度	-30	-32	5.1
アルコール (%)	12.9	13.4	18.1
酸度	3.5	3.6	2.2
グルコース (%)	3.2	3.1	0.6

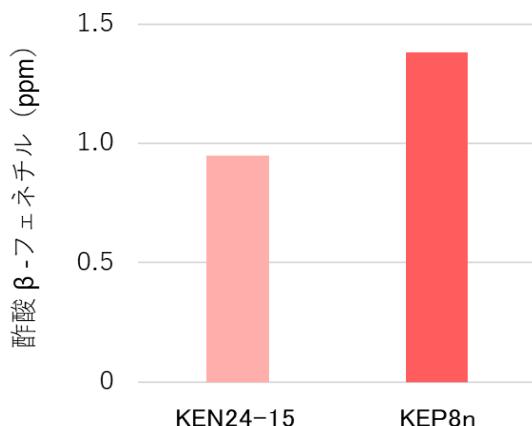


図3 試験した清酒の酢酸β-フェネチル濃度

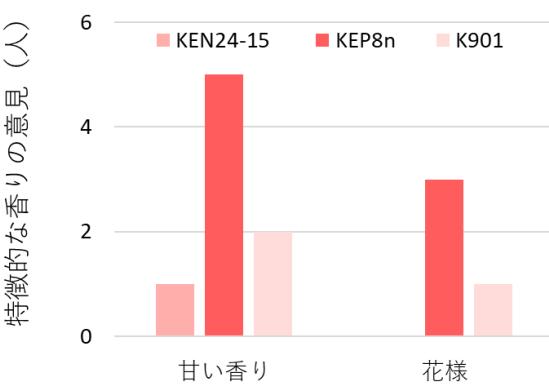
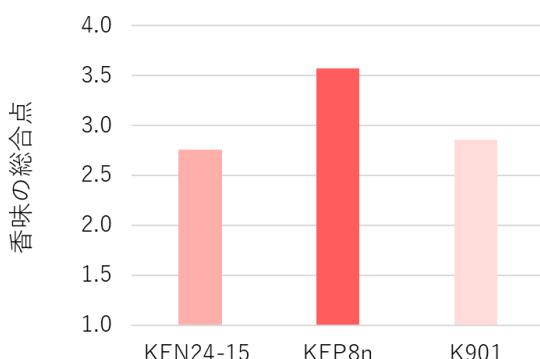


図4 試験製成酒の官能評価結果

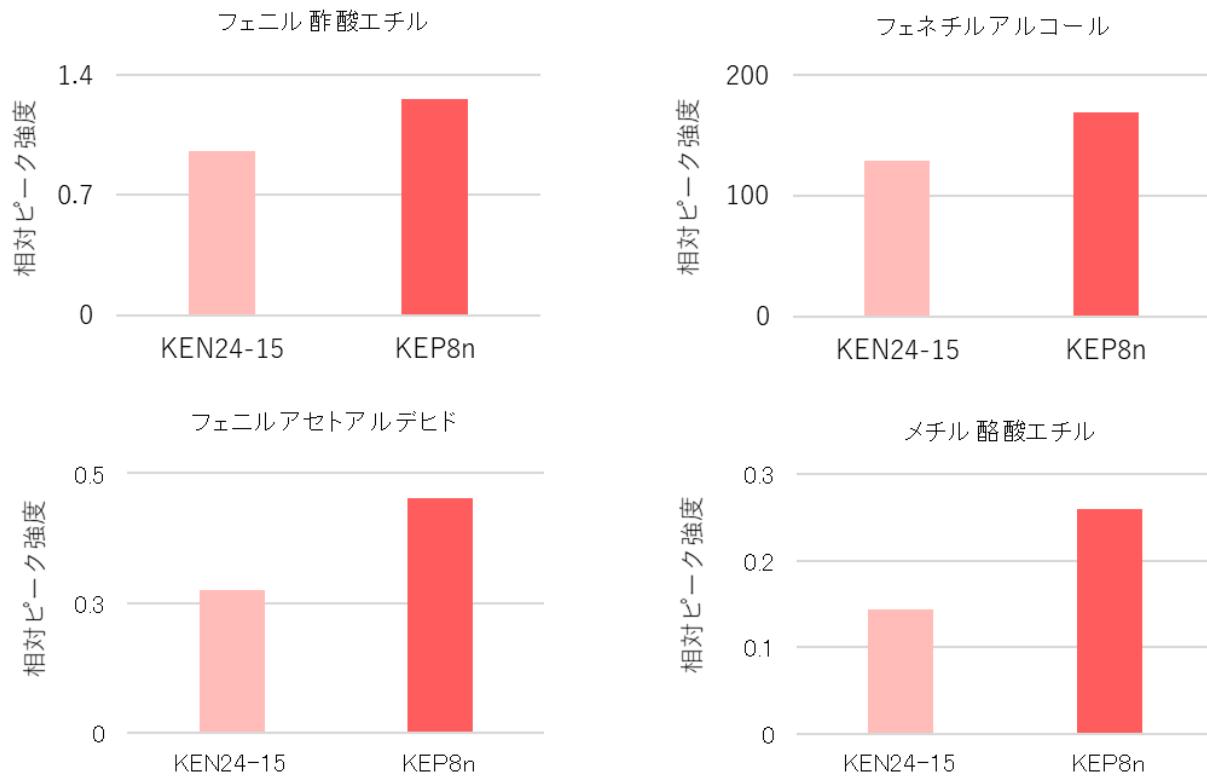


図5 花様、甘い香り成分の分析結果

さらに、これらの香りに関与すると考えられる成分の探索を行い、ピーク強度の比較を行った。その結果を図5に示す。フェニル酢酸エチル(花様)が約1.2倍、フェネチルアルコール(花様)が約1.3倍、フェニルアセトアルデヒド(花様)が約1.5倍、メチル酢酸エチル(甘い香り)が約1.5倍、KEP8n製成酒に多い傾向が示された。食品や飲料の香気は数十～数千の多種多様な成分が含まれている。各成分は香気の質や閾値が大きく異なり、濃度によって感じ方が変化する成分も含まれる。そのため、微妙な香気成分の組成バランスの変化が食品全体の風味の変化に影響を与える<sup>13),14)</sup>。各成分の濃度の把握や閾値についてはさらに詳細な検討を行う必要があるが、KEP8n製成酒の花様の香りや甘い香りはこれらの成分が関与している可能性が示唆された。

#### 4. 結 言

本研究では石川県オリジナルの清酒を開発するために、花のような香りを生成し、発酵の立ち上がりが速い酵母の育種を行うとともに、育種した酵母の醸造特性の評価を行った。

その結果、酢酸β-フェネチルを高生産し、発酵の立ち上がりが速いKEP8n株を取得した。このKEP8n株を

用いて試釀を行った結果、花様の香りや甘い香りが特徴の清酒が醸造可能であることを明らかにした。

今後、育種改良した酵母を活用した石川県オリジナル清酒の技術移転を積極的に進めていきたい。

#### 参考文献

- 1) “酒のしおり（令和6年6月）”. 国税庁.  
<https://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2024/pdf/0001.pdf>, (参照 2024-07-29).
- 2) 大土井律之, 松本英之, 藤井一嘉, 谷本昌太, 末成和夫. カプロン酸エチル高生成酵母の開発. 広島県立食品工業技術センター研究報告. 2004, no.23, p. 15-18.
- 3) Shinzo ASHIDA, Eiji ICHIKAWA, Koji SUGINAMI, Satoshi IMAYASU. Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. Agricultural and Biological Chemistry. 1987, vol. 51, no.8, p. 2061-2065.
- 4) 堤浩子. 清酒酵母の香気生成の研究. 生物工学会誌. 2011, vol. 89, no.12 p. 717-719.
- 5) 殿内暁夫, 森山裕理子, 青山嘉宏, 土岐春歌. 白神山地から分離した酵母 *Saccharomyces cerevisiae*の利用. 日本醸造協会誌. 2016, vol.111, no.7, p. 437-444.

- 6) 小室友香里, 穂坂賢, 中田久保. 桜の花から分離した酵母の醸造特性. 日本醸造協会誌. 2004, vol. 99, no.10, p. 743-749.
- 7) 柏木亨. 桜の花から分離した酵母による清酒の商品化. 日本醸造協会誌. 2002, vol. 97, no.1, p. 2-6.
- 8) 井上智実, 松田章. 花から分離した酵母を用いたオリジナル清酒の開発. 石川県工業試験場研究報告. 2017, no.67, p. 27-32.
- 9) 小金丸和義, 墨利久, 神田康三, 加藤富民雄, 田代康介, 久原哲.  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産清酒酵母の分離とその生成機構. 日本醸造協会誌. 2003, vol. 98, no.3, p. 201-209.
- 10) 秋田修, 井田哲朗, 小幡孝之, 原昌道.  $\beta$ -フェネチルアルコール, 酢酸  $\beta$ -フェネチル高生産性酵母の遺伝的背景と清酒醸造への利用. 日本醸造協会誌. 1990, vol. 85, no.7, p. 501-505.
- 11) 福田和郎.  $\beta$ -フェネチルアルコール高生産酵母の分子育種. 日本醸造協会誌. 1993, vol. 88, no.1, p. 22-28.
- 12) 勝山聰, 天野祥吾, 岩原健二, 高嶋一考. 自然界からの新たな香味を有する清酒醸造用酵母の開発（第3報）. 沼津工業技術支援センター研究報告. 2017, no.9, p. 47-52.
- 13) 飯島陽子. 食品の香気分析技術についての最近の話題. 日本調理科学会誌. 2018, vol. 51, no.4, p. 197-204.
- 14) Toru Kishimoto, Shigekuni Noba, Nana Yako, Minoru Kobayashi, Tetsuya Watanabe. Simulation of Pilsner-type beer aroma using 76 odor-active compounds. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2018, Vol. 126, no.3, p. 330-338.