

## UV-LEDにより育種した新規清酒酵母「LED夢酵母」

(徳島県立工業技術センター 食品・応用生物担当) 岡久 修己

徳島県では、世界有数のLEDメーカーが立地する優位性を活かし、LED関連企業の集積を基本目標とした「LEDパレイ構想」を推進し、LED応用製品の開発や、LEDの新用途開発に取り組んでいる。徳島県立工業技術センターでは、2013年よりUV-LEDを用いた紫外線照射による清酒酵母の育種試験に取り組み、吟醸酒の主要な香気成分であるカプロン酸エチルを高生産し、発酵力に優れた「LED夢酵母」を実用化した。本稿では、UV-LEDを用いた清酒酵母育種技術と「LED夢酵母」の特徴について紹介する。

### 280 nm UV-LEDを用いた育種試験

香味良好な清酒を醸造する目的で、新規清酒酵母の育種は、全国各地で盛んに取り組まれている。育種手法としては、水銀ランプを用いた紫外線照射やエチルメタノスルフォネートなどの薬剤処理により、突然変異を誘発する方法が一般的に行われているが、研究を始めた2013年当時は、変異誘発に効果的な、波長300 nm以下の深紫外LEDが十分普及していなかったため、LEDを用いた清酒酵母の育種は報告例がなかった。筆者は当時入手可能であった主波長280 nmのUV-LEDを光源とした紫外線照射により、清酒酵母に突然変異を誘発させ、カプロン酸エチルを高生産し、発酵力に優れた徳島県独自の清酒用酵母の取得を目指し、研究を実施した。

主波長280 nm、出力2 mWのLEDを2つ実装した光源を作製し、照射方法の検討を行った。さまざまな条件を検討した結果、使用したLEDの出力が低いことや、LEDは光の直進性が高いことを考慮し、至近距離で直径60 mmシャーレ中の約 $1 \times 10^7$  cells/mLの菌懸濁液8 mLに照射する方法を採用した。

きょうかい901号酵母（K-901）に対する照射距離および照射時間と酵母生菌数の関係を図1に示す。照射距離40 mmでは約4分、50 mmでは約6分、60 mmでは約8分で約90 %の酵母が死滅した。本試験では、目的遺伝子に変異を誘発し、他の遺伝子への変異を最小限にとどめることで発酵力を維持した酵母の取得を目指したため、照射条件を酵母の生存率が40～50 %となる照射距離50 mm、照射時間4分とした。

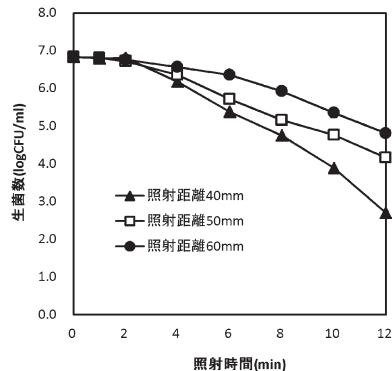


図1. 280 nm紫外線照射時の酵母生菌数

育種試験は、K-901を親株とし、カプロン酸エチル高生産株を取得するため、Ichikawaら<sup>1)</sup>の方法を参考にセルレニン耐性株の分離を行った。すなわち、紫外線照射後の菌懸濁液をセルレニン含有YPD寒天平板培地に塗布し、生育した酵母コロニーをセルレニン耐性株として単離した。得られたセルレニン耐性株について、アルコール脱水麹培地<sup>2)</sup>による発酵試験を行った。照射条件が定まらず試行錯誤をしていた際は、カプロン酸エチル高生産株がまったく取得できなかったが、照射条件がある程度確立するにつれて、取得効率は悪いものの、カプロン酸エチル高生産株が取得できるようになった。最終的には1915株のセルレニン耐性株から、カプロン酸エチルを親株の3倍以上生成し、発酵力の指標となる炭酸ガス減少量が親株と同程度の株が3株取得できたことから、UV-LEDにより清酒酵母の育種が可能であることが示された。

### 波長による育種効率の検討

2015年には研究開始当時と比較して試験に使用できるUV-LEDの波長が多様化し、高出力化したことから、主波長260 nm (18.7 mW), 270 nm (7.3 mW), 280 nm (4.5 mW), 330 nm (4.3 mW) のUV-LEDを1つずつ実装した光源をそれぞれ作製し、波長による優良酵母取得効率への影響を検討するとともに、さらなる優良酵母の取得を図った。

照射距離50 mmの際のK-901に対する波長および紫外線照射時間と酵母生菌数の関係を図2に示す。照射距

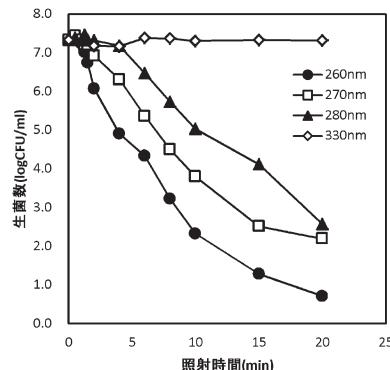


図2. 260～330 nm紫外線照射時の酵母生菌数

離50 mmの際に、酵母の生存率が40～50 %となる照射時間、すなわち、260 nmは1.5分、270 nmは2分、280 nmは4.5分で育種試験を行った。また、図2では20分までしか示していないが330 nmは120分の連続照射でも生菌数の減少が見られなかったため、照射時間60分で育種試験を行った。

上記の照射条件で得られたセルレニン耐性株1302株について、アルコール脱水麹培地による発酵試験を行い、カプロン酸エチルを親株の3倍以上生産し炭酸ガス減少量が親株と同等以上の株を14株選抜した。選抜株について総米200 gの清酒小仕込み試験を行い、カプロン酸エチルを高生産し、発酵力の低下が少ない株を優良酵母として選抜した。その結果、260 nm照射では該当株がなく、270 nm照射では3株、280 nm照射では2株、330 nm照射では3株が得られた。LEDの波長により優良酵母の取得効率に差がある可能性が示唆されたが、優良酵母の取得数が少ないとことや、使用したLEDの出力が異なるため、今後さらに検討を行う必要があると考えている。

### LEDにより育種した「LED夢酵母」の特徴

一連の試験で取得した優良酵母について、徳島県内の酒造企業の協力を得て、実用規模の醸造試験を行い、良好な結果を得た3株について「LED夢酵母」と命名し、徳島県内酒造企業に頒布を開始した。

2015年に280 nmのUV-LEDにより育種したNo.3643株とNo.3826株<sup>3)</sup>を実用化し、続いて2016年に270 nmのUV-LEDにより育種したNo.4206株<sup>4)</sup>を実用化した。この内No.3643株とNo.4206株は、カプロン酸エチルを高生産し、製成酒の酸度が低く、発酵力が強い特徴を持つ。No.4206株のほうがNo.3643株よりもやや発酵力が強い。この2株は2019年時点で、徳島県内酒造企業9社が使用しており、製成酒は、華やかでフルーティな香りが強く、すっきりして飲みやすい酒質となる。また、仕込みを行った酒造企業からは発酵力が強いため、もろみ後半のボーメの切れが良いことから、純米吟醸酒や、

表1. 製成酒の分析結果

使用酵母	K-901	3643	4206
もろみ日数(日)	29.0	33.0	31.1
日本酒度	3.5	-0.7	0.5
アルコール(%)	16.5	16.4	17.0
酸度(mL)	1.8	1.4	1.3
アミノ酸度(mL)	0.9	0.8	0.8
酢酸イソアミル(ppm)	2.6	1.0	1.0
イソアミルアルコール(ppm)	135	116	115
カプロン酸エチル(ppm)	1.8	11.8	10.1

純米大吟醸酒の醸造に使いやすいとの声を頂いている。

No.3826株は、カプロン酸エチルとリンゴ酸を高生産する特徴を持つことから、酸度が高い個性的な清酒製造用に実用化した。2019年時点では徳島県内の酒造企業1社が純米吟醸酒の仕込みに使用している。製成酒は、フルーティな香りが強くリンゴ酸の爽やかな酸味が特徴の個性的な酒質となる。

2016年から2019年までの4年間で徳島県内の酒造企業で製造された精米歩合40 %以下の純米大吟醸酒の内K-901を使用して製造した2点、No.3643株を使用して製造した7点、No.4206株を使用して製造した11点の成分分析結果の平均値を表1に示す。

K-901を使用して製造した清酒と比較するとNo.3643株およびNo.4206株を使用して製造した清酒は、カプロン酸エチル濃度が非常に高く、酢酸イソアミルとイソアミルアルコールは低い特徴となっている。No.3643株と比較してNo.4206株は、もろみ日数が短く、日本酒度とアルコールが高いことから、発酵力がより高いことがわかる。

### おわりに

LEDメーカーによる深紫外LEDの開発が加速していることから、今後も波長や出力の異なるLED光源を使用し、最適な照射条件の確立や、より優良な性質の酵母の取得を目指し、研究を進めていきたいと考えている。21世紀の光源として普及しているLEDと古来受け継がれてきた伝統の清酒酵母という異色の組合せから誕生した「LED夢酵母」が、新たなブランドとして定着することを期待している。

本研究を実施するにあたり、実用規模の醸造試験を快く引き受けいただいた徳島県内酒造企業の方々に厚く感謝いたします。

### 文 献

- 1) Ichikawa, E. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153 (1991).
- 2) 斎藤久一ら: 日本醸造協会誌, **87**, 915 (1992).
- 3) 岡久修己ら: 徳島工技セ研報, **24**, 23 (2015).
- 4) 岡久修己ら: 徳島工技セ研報, **26**, 41 (2017).