

平成 26 年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 平成 26 年 10 月 6 日 (火)

場所 北とぴあ 第 2 研修室

東京都北区王子 1 丁目 11 番 1 号

清酒酵母・麴研究会

プログラム

- 13:00～13:20 清酒酵母・麴研究会総会
- 13:20～13:50 「きょうかい 1801 号から得られた変異株の清酒醸造特性」
月桂冠(株) 総合研究所 小高 敦史
- 13:50～14:20 「清酒酵母の有機酸生成機構と改変」
東京農業大学応用生物科学部醸造科学科 中山 俊一
- 14:20～14:50 「岩手県オリジナル麴菌『黎明平泉』の選抜と
『オールいわて清酒』の取組」
岩手県工業技術センター 佐藤 稔英
- 14:50～15:10 休憩
- 15:10～15:40 「円盤型自動製麴装置 開発の流れ」
永田醸造機械(株) 小田嶋 保雄
- 15:40～16:45 特別講演 「焼酎麴菌の再分類」
(独) 酒類総合研究所 山田 修
- 17:00～ 懇親会 (北とぴあ9階902会議室)

きょうかい 1801 号から得られた変異株の清酒醸造特性

小高 敦史（月桂冠株式会社総合研究所）

清酒の吟醸香のひとつであるカプロン酸エチルを高生産する酵母は、脂肪酸合成酵素阻害剤であるセルレニンに対して耐性を示した株の中から選抜することができる。このような酵母の多くは、脂肪酸合成酵素の α -サブユニットをコードする *FAS2* 遺伝子に変異している。日本醸造協会から頒布されているきょうかい 1801 号 (K-1801) も、カプロン酸エチルを高生産であり、変異型 *FAS2* をヘテロに有している。また、K-1801 はきょうかい 9 号 (K-9) ときょうかい 1601 号 (K-1601) とのかけ合わせによって育種された株であり、その遺伝的背景は他の清酒酵母とは大きく異なっていることが予想される。

一方、多倍体細胞ではヘテロ接合性の消失 (LOH) という現象が知られている。LOH は点変異、組換え、欠失などが生じることによってもたらされる。K-1801 のように、交配によって育種された株は、特徴的なヘテロ接合性を示していると考えられるため、LOH が生じることによって、親株とは異なった表現型を示す可能性がある。また、特定のヘテロ接合型の LOH に注目しても、生じたプロセスが違えば、バラエティーに富んだ株が得られることも期待できる。

そこで、K-1801 の *FAS2* を指標に LOH が生じた株を多数取得し、その清酒醸造特性を調べることにした。

変異型 *FAS2* がホモ化した株の取得とその清酒醸造特性

変異型 *FAS2* をヘテロにもつ株とホモにもつ株を作製し、それぞれのセルレニン耐性を比較した。その結果、ヘテロ変異株とホモ変異株は 4 mg/L 以上のセルレニンを含む培地で区別できることがわかった。そこで、K-1801 を培養後、変異処理を施さず、4~10 mg/L のセルレニンを含む培地に塗布したところ、耐性を示すコロニーが多数生じた。シーケンスにより、*FAS2* の遺伝子型を調べたところ、変異型 *FAS2* がホモ化した株を見出すことができた。変異型 *FAS2* がホモ化された株の YPD 培地での増殖は変異株間で大きく異なっており、清酒小仕込みでは、カプロン酸エチルを親株の 2 倍程度生成した。

野生型 *FAS2* がホモ化した株の取得とその清酒醸造特性

野生型 *FAS2* をホモにもつ株は、セルレニン感受性を示す。K-1801 を培養後、UV 照射し、YPD プレートにコロニーを出現させた。これらのプレートを 2 mg/L のセルレニンを含む培地にレプリカしたところ、感受性を示すコロニーを複数確認した。シーケンスにより、*FAS2* の遺伝子型を調べたところ、野生型 *FAS2* がホモ化した株を見出すことができた。野生型 *FAS2* がホモ化された株の YPD 培地での増殖は変異株間ではほとんど差がなく、清酒小仕込みでは、カプロン酸エチルの生産が減少し、酢酸イソアミルの生産が増加するなど、様々な醸造特性を示した。

二倍体 (2n) である清酒酵母は、一倍体 (n) 取得に必要な孢子形成能が非常に低い。そのため、清酒酵母の機能解析や交配による新しい株の育種が困難となっている。これまでに清酒酵母の孢子形成能に関する様々な研究がなされているが、まだ自由自在に交配できるには至っていない。一方、清酒酵母の一般的な育種法として変異処理がある。変異処理により様々な清酒酵母が育種され、広く利用されているが、不要な変異も数多く導入されるため、同時に優良な形質が損なわれる可能性があり、複数の形質を付与するには限界がある。これらの育種法に対し、LOH を利用した酵母育種では、既にもっている形質の増強、喪失、もしくは新たな形質の顕在化といったことが期待できる。このような育種法をさらに応用することで、多様な清酒酵母を今後も育種していきたい。

1) Kotaka et al. J. Biosci. Bioeng., 109, 442-446 (2010)

2) 小高ら、平成 25 年度日本醸造学会大会講演要旨集, 6 (2013)

清酒酵母の有機酸生成機構

中山 俊一

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

清酒酵母によって生成されるコハク酸，乳酸，リンゴ酸などの有機酸は発酵期間中に生成され，これら3種類で全有機酸の約80%を占める。これら有機酸は呈味に影響を与えることから，有機酸組成を改変した清酒酵母が多数取得されてきており特に爽やかな酸味を付与するリンゴ酸生成量が増加した清酒酵母が多く育種されている。本研究では，有機酸の中でもリンゴ酸生成機構を中心に清酒酵母の有機酸生成機構についてレドックスバランスの制御の観点から紹介したい。

1. きょうかい酵母 No. 28 の高リンゴ酸生成機構

醸造協会より頒布されている高リンゴ酸生産性きょうかい酵母 No. 28 株はきょうかい酵母 K1001 を基に育種されているため、No. 28 株と K1001 の生理学的解析により高リンゴ酸生成機構の解明を試みた。

グルコース 10%を含む YM 培地で両株を培養し、リンゴ酸生成に関与する7種の酵素群の酵素活性を比較したところ両株で顕著な違いは見られなかった。一方、ミトコンドリアのプロトン勾配に依存して蛍光強度が変化する Rhodamine 123 を用いて染色し、フローサイトメーターによる個々の細胞の蛍光強度を測定することでミトコンドリア活性を比較したところ、No. 28 株のミトコンドリア活性は K1001 と比較して顕著に低下していた。ミトコンドリアはピルビン酸をはじめリンゴ酸等の各種有機酸を代謝するため、リンゴ酸生成に関連する酵素活性値が同定でリンゴ酸生成能が同等であってもミトコンドリア活性が高い場合、各有機酸がミトコンドリアで代謝され、生成量に違いが生じると予想される。これらの結果から、No. 28 株ではリンゴ酸生成能自体は K1001 と同程度であるが、ミトコンドリア活性が低く細胞内でのピルビン酸やリンゴ酸などの有機酸代謝が低下することで、リンゴ酸が増加すること予想された。

この仮説が正しければ、リンゴ酸生成に関与する酵素活性が No. 28 株とほぼ同等の K1001 でもミトコンドリア活性を低下させリンゴ酸代謝を低下させることで高リンゴ酸生成が可能となることが予想される。そこで、K1001 をエチジウムブロマイドで処理し呼吸欠損株 5 株を取得し、YM10 培地にてリンゴ酸生成量を比較した。その結果、予想通り K1001 の呼吸欠損株のリンゴ酸生成量は野生株の 2.5 倍にまで増加し、No. 28 株のリンゴ酸生成量に匹敵したことから、ミトコンドリア活性の低下が高リンゴ酸生成を引き起こすことが明らかとなった。以上の結果から、高リンゴ酸生産性の No. 28 株は、ミトコンドリア活性が低いことで解糖系で生じたピルビン酸がミトコンドリアで代謝されないため、酵素活性の顕著な増加は見

られないものの細胞質でのリンゴ酸への変換が活性化されていることが推察された。

2. K901 を親株とした DNP 耐性株による高リンゴ酸・低酢酸生産株の取得とその有機酸生成機構

No.28 の解析の結果から、ミトコンドリア活性を低下させることでリンゴ酸生成量を増加させることが明らかとなった。このことは、ミトコンドリア活性を変化させることで様々な有機酸組成を示す清酒酵母へと育種改変可能なことを示唆している。そこで、きょうかい酵母 K901 を親株としミトコンドリア活性の改変による高リンゴ酸生産性清酒酵母の取得を試みた。ミトコンドリアの膜電位を打ち消す呼吸阻害剤である 2,4-ジニトロフェノール(DNP) に耐性を示す変異株 90 株を UV 照射により取得した。得られた変異株を YM10 培地にて培養し有機酸組成を比較し、特に各有機酸が親株に対して 2 倍以上増加した株あるいは半分以下になった株 66 株を選別し、それぞれの有機酸組成を基に分類したところ 11 グループに分類できた。中でもリンゴ酸とピルビン酸生成量が増加し、酢酸生成量が減少した株が 34 株と最も多く取得された。リンゴ酸生成量が高かった 2 株(DNPR38, DNPR46 株)について小仕込を行ったところ、親株である K901 よりも 6 倍以上高い生成量を示したことから清酒醸造中でも高リンゴ酸生成能は保持されることを確認した。

得られた高リンゴ酸・低酢酸生成株についてリンゴ酸・酢酸生成に直接関与する酵素の活性を比較したが、No.28 の場合と同様に変異株と親株間で顕著な変化は見られなかった。さらに、ミトコンドリア活性についても No. 28 の結果と同様、高リンゴ酸生産性の DNP 耐性株はミトコンドリア活性の低下が確認できた。このことから、リンゴ酸生成が増加した株では共通してミトコンドリア活性が低下することが明らかとなった。

ミトコンドリア活性が低い場合細胞質内のピルビン酸がリンゴ酸に変換されやすいあるいは代謝されにくいのであれば、同様に細胞質で生成される酢酸生成量も増加するはずであるが、得られた変異株の酢酸生成量は低下しているため矛盾が生じる。リンゴ酸と酢酸生合成の経路の大きな違いは、リンゴ酸生成に NADH を要求するのに対し、酢酸生成は酸化剤である NAD⁺を要求する点である。そこで、変異株と親株の NADH/NAD⁺比を比較したところ、変異株において NADH/NAD⁺比が高いことが明らかとなった。さらに、高リンゴ酸生成株に酸化剤の一種であるアセトインを添加するとリンゴ酸生成量が低下し酢酸生成量が増加することからも、リンゴ酸や酢酸生成には NADH/NAD⁺比が重要な因子の一つであることが明らかとなった。

以上の様に、清酒酵母における有機酸生成には酵素活性以外にもミトコンドリア活性やレドックスバランスも有機酸組成を決定づける重要な因子の一つであることが明らかとなった。

岩手県オリジナル麴菌『黎明平泉』の選抜と『オールいわて清酒』の取組

地方独立行政法人岩手県工業技術センター 佐藤稔英

【緒言】

平成 23 年 3 月に発生した東日本大震災により、岩手県では死者・不明者合わせて 5,823 名、24,916 棟に及ぶ家屋倒壊と多大な被害を受けた。醸造メーカーでも 3 社(酔仙・千両男山・浜娘)が波に飲まれ、従業員 9 名が亡くなるなど壊滅的な状況に陥った。そのような背景のもと、岩手県酒造組合では被害者追悼および 3 社の早期復旧・復興を祈願した『材料全てが岩手県産の清酒造り』に着手した。これまでに、岩手県では県産ブランドの酒造好適米や、清酒酵母を開発する技術的基盤があったものの、麴菌に関しては種麴メーカーから供給された種麴を使用しており、『県産麴菌』を保有していなかった。そのため、『平成 23 年度内の清酒流通』を目標とした県産種麴の選抜に取り組んだ。

【開発】

『材料全てが岩手県産の清酒造り』を行うに当って、対象とする清酒の酒質について岩手県酒造組合内技術委員会にて①県産酒造好適米『吟ぎんが』、精米歩合 55%②県産酵母『ゆうこの想い』③純米酒もしくは純米吟醸酒、を想定することを決定した。『吟ぎんが』は柔らかい酒造好適米で、清酒にふくよかな味わいが出るが、醪で溶け易い性質を持つ。一方で『ゆうこの想い』は純米用県産酵母として広く利用されており、やや酸味の強い品質となる。これらの特徴を踏まえ、米の過剰溶解を抑えるために α -アミラーゼが出にくく、かつ製成酒のアミノ酸度が低めでペプチドの旨味を引き出すため ACP/AP 比の比較的低い酵素力価を有する麴菌を目標とした。しかし、これまで岩手県では麴菌の開発実績が無いために麴菌ストックが無く、かつ短期間での最終製品流通(選抜開始 7 月、酒造現場での製麴 12 月、最終製品流通平成 23 年度内)が求められたため、株式会社秋田田野商店および独立行政法人酒類総合研究所へ協力を依頼して菌株の提供および技術提供を受け、選抜を行った。

【結果】

選抜は、分譲された種麴 29 株をシャーレ製麴法により麴とし、出来た麴の栗香の具合など香りや状貌など官能評価から 15 株を選抜した。次に黒粕の指標となるチロシナーゼや糖化酵素、そしてアミノ酸に関わる酸性カルボキシペプチダーゼ、酸性プロテアーゼなど各種酵素活性を測定し、力価のバランスの良いもの 6 株とした。最終的には、その 6 株を試験製麴し、杜氏をはじめとする県内技術者による官能評価を行い、上位 2 株の麴菌をブレンドし使用することとした。平成 23 年 10 月 24 日に麴菌選抜が終了し、同年 11 月から各酒造メーカーでの清酒製造がスタートした。

麴菌の名称は、当所で募集しその中から岩手県知事が決定し、『黎明平泉』と名付けられた。この名前には、平泉の世界遺産登録を大震災からの復興に向けた新たなスタートの象徴として位置づけ、さらに、「夜明け」を迎えて一步を踏み出す意図が込められている。平泉は一地名にとど

まらず、仏教文化の平和思想全体を表し、今回のような災害が二度と起こらないようにとの祈りの気持ちにも通じている。

この岩手オリジナルの麹菌『黎明平泉』が開発されたことで、「米」、「清酒酵母」、「麹菌」が揃い、これらの原料を使用した「オールいわて清酒」の誕生に至った。この清酒スペックは、米を岩手県産米、酵母を『ゆうこの想い』、『ジヨバンニの調べ』などの岩手県オリジナル酵母、麹菌を『黎明平泉』とする純米酒とし、平成 24 年春から県内各社より販売されている。製造数量は、初年度 20kl、次年度 40kl と伸ばしており、今後の動向に期待したい。

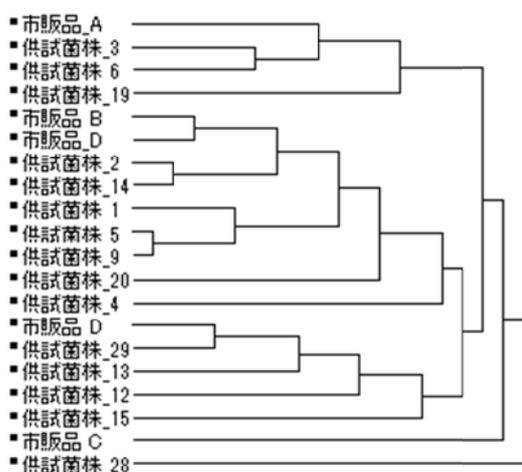


図 1. 酵素バランスによるクラスタ解析結果



図 2 黎明平泉の種麹と米麹

表 1 オールいわて清酒製造後の各社のアンケート結果

製麹の印象	酒の印象	感想
<ul style="list-style-type: none"> ・通常の種麹と変わりなし ・さばけ良好、味のりよし ・他の種麹と大きな差はない (温度経過) ・品温が上がりにくい ・ハゼの量が少ない ・キレイ、反面味が薄い ・種麹使用量を増やして使用 ・温度の上昇は普通からやや遅い方で、仕舞後の温度の上昇が早い 	<ul style="list-style-type: none"> ・酒質は軽快できれい ・香り良好、旨口 ・これまでの「ゆうこの想い」の酒よりも香りひきたつ軽快な酒ができた ・上槽直後は酸も多かったためかやや渋みも感じられた ・上槽時はすっきり ・火入れ貯蔵後、約 2 週間でふくらみのある酒質になった (吟ぎんがの特徴か?) 	<ul style="list-style-type: none"> ・今年、吟ぎんがで造ってみて、香り、近年に無く良い酒になった ・軽快ですっきりタイプの酒質となるが吟ぎんがを使用する場合は早めの火入れと貯蔵温度に注意が必要 ・当社としてはもっとふくらみ、はばのある酒質がほしい

製麴装置の推移と円盤型製麴機開発経緯

永田醸造機械株式会社 小田嶋 保雄

1960年代中頃、それまで製麴装置の主流を担ってきたのは、箱麴・カステン式・平床式等々でありましたが、醸造業界からは製麴量の増大に伴い、対応できる機械及び省力化（力仕事の軽減）機械が望まれ、開発しました。

やがて、開発の流れは1980年代の制御の自動化（作業員の低減）から2000年代のサニタリー性の重視（食の安全）へとつながります。

1963年の円盤型の開発は回転円板と回転スクリーンの組合せですが、原料搬送面（引込～出麴）から画期的なことでありました。

その後、要所の開発改善を重ねつつ、究極の円盤型製麴機を目指しております。

今回は、設計の専門的な部分は省きまして、円盤製麴機の形状変化及び開発プロセスにポイントを置きまして講演させていただきたいと思っております。

製麹装置の推移について

※ 麹蓋、箱麹、カステン式 → 単独では空調ができないので麹室が必要となる。

※ 平床式製麹装置 → 製麹室を備えているので空調ができる。」

※ 1963年に円盤型製麹装置の開発が成り、その後の開発改善によるタイプは次のように分類しております。

- ① I 型 製 麹 装 置 : シャワー式空調
(昭和 38 年) 上段ねかせ→切返し→下段本製麹
- ② II 型 製 麹 装 置 : 除湿式空調 (一床式/二床式)
(昭和 55 年) : 上段ねかせ→切返し→下段本製麹
- ③ III 型 製 麹 装 置 : 除湿式空調 (麹室利用)
(昭和 56 年) ねかせ→切返し→本製麹
- ④ 三段重ね型製麹装置 : 上段ねかせ→切返し→中段/下段分配・本製麹
- ⑤ トライベストII型製麹装置 : (吟醸麹用)
(平成 6 年) 盛込/出麹の自動化及び品質均一化の目的で
麹箱が上下左右に移動する。
- ⑥ 水平流空調の方式 : (吟醸麹用)
(平成 13 年) 無通風製麹として最適の空調をする。
- ⑦ そ の 他
 - 1) 床上/床下の除湿式空調
 - 2) ロードセル採用型: II型及びトライベストII型
 - 3) 手入時期の選定: 品温、時間、水分、菌体の増加
 - 4) 回転円盤とジャケット江田の接合推移
 - 5) 天井・壁側・底面の保湿装置

黒麹菌の再分類と安全性

山田 修(独立行政法人 酒類総合研究所)

【はじめに】 黒麹菌とは、沖縄の泡盛造りに使われている有用糸状菌であり、製麹中に大量のクエン酸を生産することでろみを酸性にし、暖地での醸造に適しているとされている。また、平成 18 年 10 月 12 日、日本醸造学会において、黄麹菌、醤油麹菌などとともに我が国を代表する微生物として「国菌」に認定された。九州では始め黄麹菌を利用した焼酎製造が行われていたが、黒麹菌が導入されるや広く使われるようになり、その後その黒い色が嫌われたのか黒麹菌の変異株とされる白麹菌 *A. kawachii* が一般的に使われていたが、近年では、黒麹菌が復活し「黒なんとか」の名称で商品化されている。

【黒麹菌の黒歴史】 黒麹菌は、1901 年に乾が *A. luchuensis* を分離し、「本菌は麹中の主要なる糸状菌にして孢子黒色なるを以て麹をして固有の黒色を帯はしむ澱粉糖化の作用は専ら本菌によるもにして」として報告された。しかし、1911 年中澤は泡盛麹から 2 種の糸状菌を単離し、「*Aspergillus luchuensis* Inui と称するものと予の α 菌とは殆ど其の形態同じく只梗子の点に於て異なるを見るのみなり」としながらも、「 α 新種と認め・・・之に *Aspergillus awamori* と命名し」報告した。一方、欧州では、1980 年は Al-Musallam が、ほぼ全ての黒麹菌株は *A. niger* 及びその変種であると整理するとともに NRRL 4948 (CBS 557.65) 株を *A. niger* var. *awamori* のネオタイプとしたが、この菌株は泡盛醸造現場由来ではなくブラジルの研究機関から受け入れたものであり、村上は NRRL 4948 株は *A. awamori* ではなく *A. niger* とすべきだと述べている。また、1991 年 Kustres van Someren らは、RFLP 解析から *A. niger* group が形態的には区別できない *A. niger* と *A. tubingensis* とに分類できると報告している。このように黒麹菌を含む黒色 *Aspergillus* の分類は混乱しており、その解明には、より広範な分子生物学的な解析が必要と考えられた。

【黒麹菌の再分類】 黒麹菌の分類学的位置を確認するため、当所保存 RIB Black *Aspergilli* 37 株、*A. kawachii* NBRC 4308 株、*A. niger* ATCC 1015 株及び *A. tubingensis* ATCC 10550 株及び泡盛醸造現場由来の 12 株(TTC 株)について、rDNA ITS 及び D1D2 領域、histone 3、 β -tubulin、cytochrome b 遺伝子部分塩基配列合計約 2,500-bp を利用し系統解析を行ったところ、RIB 株は、*A. niger* ATCC 1015 株に近い 19 株、*A. tubingensis* ATCC 10550 株に近い 3 株及び *A. kawachii* NBRC 4308 株に近い 15 株に大別された(図 1)。TTC 株は全て *A. kawachii* NBRC 4308 株グループに分類され、*A. niger* グループに分類された RIB 株のうち 2 株のみが麹由来であったのに対して、*A. kawachii* グループ RIB 株はうち 9 株が種麹など醸造現場由来であること、RIB 2642 株は *A. luchuensis* の標準株として保存されていた株であることなどから、このグループが黒麹菌の主流派をなすものと判定し、その種名を *A. luchuensis* としてはと提唱した。

【黒麹菌の安全性】 2007 年、*A. niger* CBS 513.88 株のゲノム解析が報告され、そのゲノム中に

A. ochraceus の ochratoxin A (OTA) 生産に關与する polyketide synthase (pks) ホモログ遺伝子が見いだされた。そこで、*A. niger* pks ホモログ遺伝子について、PCR 及びサザン解析によりその分布を検討したところ、*A. niger* グループ株では、ホモログ遺伝子が検出される株と検出されない株とが存在したのに対して、*A. kawachii* グループ及び *A. tubingensis* グループの菌株からはホモログ遺伝子は検出されなかった(図 1)。さらに、OTA 生産性である NBRC 6082 株の pks ホモログ遺伝子を破壊したところ、その OTA 生産性は完全に消失し、*A. niger* pks ホモログ遺伝子は OTA 生産に必須であることが示されるとともに、黒麹菌は OTA 非生産性であることが確認された。

また、近年 *A. niger* が生産すると報告された fumonisin B2 についても、黒麹菌はゲノム中に遺伝子を持たず非生産性であることを見出し、現在論文化を進めている。

【おわりに】 白麹菌 *A. kawachii* を含む黒麹菌は、その学名を *A. luchuensis* とすべきこと、OTA や fumonisin B2 などのカビ毒非生産性であることが明らかとなった。現在、黒麹菌 RIB 2604 株のゲノムを黒麹菌ゲノム解析コンソーシアムにおいて解析しており、その一部も簡単に紹介したい。

【参考文献】

Yamada *et al.*, Molecular biological researches of Kuro-Koji molds, their classification and safety, *JBB*, **112**, 233 (2011)
 Hong *et al.*, *Aspergillus luchuensis*, an Industrially Important Black *Aspergillus* in East Asia., *PLOS ONE*, **8**, e63769 (2013)
 Hong *et al.*, Taxonomic re-evaluation of Black-koji molds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 555 (2014)

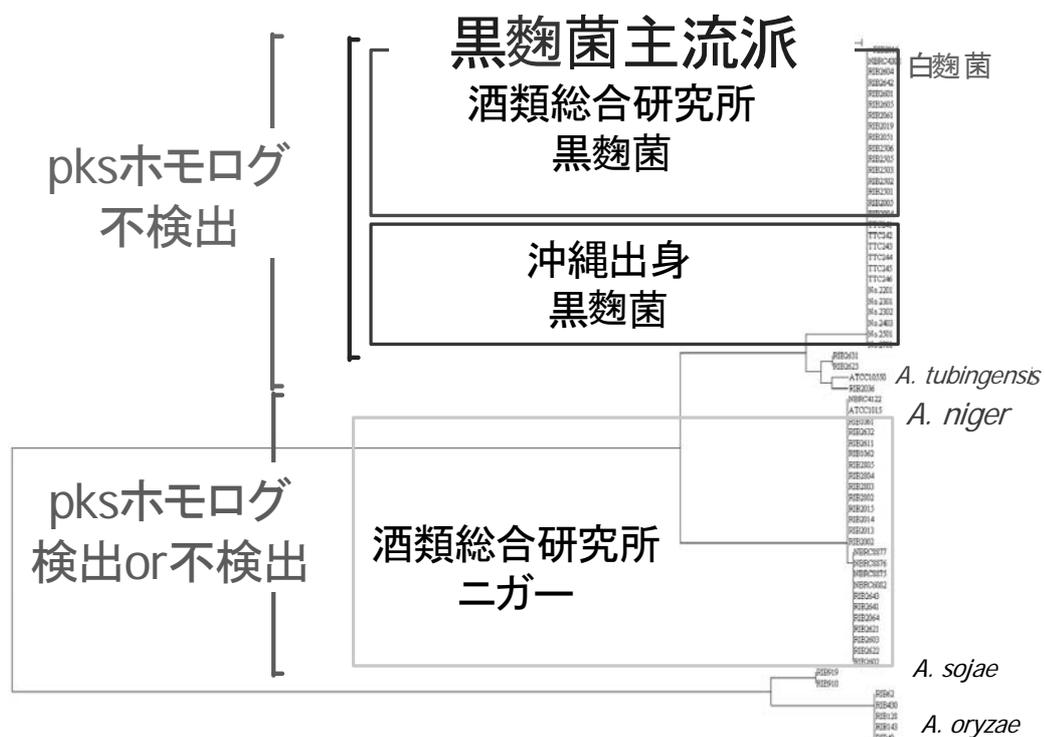


図 1 黒麹菌はpksホモログを持っていない