

[生物工学会誌 第80巻 第7号 291-295. 2002]

ノ ー ト

脂肪酸低資化性を利用した清酒酵母からの 高香気生産性酵母の取得

高野 光生

辰馬本家酒造株式会社 *
〒 662-0943 兵庫県西宮市建石町 2-6

(平成14年3月29日受付 平成14年5月27日受理)

Breeding of High Aroma-Producing Sake Yeasts from Low Fatty Acid-Utilizing Mutants — Note —

MITSUO KOHNO (*Tatsuuma-honke Brewing Co., Ltd., 2-6 Tateishi-cho, Nishinomiya, Hyogo 662-0943*)
Seibutsu-kogaku 80: 291-295, 2002.

Low fatty acid-utilizing mutants were isolated from the industrial sake yeasts K-7 and K-701 to select high aroma-producing yeasts resulting from defective fatty acid β -oxidation. In a sake brewing test, mutant strain 16-5 produced one and a half times as much isoamyl acetate as the parent strain, whereas mutant strain 25-8 produced only 70 percent isoamyl acetate but one and a half times as much ethyl caproate and ethyl butyrate as the parent strain. Because strain 25-8 was isolated from a low fatty acid-utilizing yeast, it is thought that the accumulation of fatty acid or acyl-CoA and the decrease of acetyl-CoA was caused by defective β -oxidation in the stage prior to the production of these aroma components. Like K-701, the sake mash of strain 25-8 had no bubbles during the fermentation period even though the parent strain was K-7, which does cause bubbles.

[Key words: sake yeast, fatty acid, high aroma, β -oxidation]

清酒の品質上重要な香気成分である吟醸香は、エステルを主体とした果実様の香りで、清酒に華やかさを与える香気である。この吟醸香の主成分は酢酸イソアミルとカプロン酸エチルであると考えられている。このうちカプロン酸エチルは、清酒発酵系中では酵母により脂肪酸合成系を経て生産されると推定されている。¹⁾この酵母菌体内におけるカプロン酸エチル生成の際に脂肪酸合成系などで生じたカプロイル-CoAとカプロン酸が β 酸化系 (Fig. 1) など脂肪酸分解系により代謝されているならば、この系を欠損させたときカプロイル-CoAおよびカプロン酸は代謝されないで蓄積し、これらをもとに生成するカプロン酸エチルの生産量が多くなると推測される。

また同様の理由でこのときカプロン酸エチル以外の脂肪酸エチルエステルも高生産される可能性がある。

現時点では清酒発酵系中の酵母において脂肪酸分解系が誘導しているという報告はなく、誘導していたとしてもこの系のどのような変異が高香気生成につながるのかわからない。そこでまず脂肪酸低資化性株を分離後、脂肪酸分解系欠損株に絞らずにこれらの中から脂肪酸エチルエステル高生産性株を選択し、あとで取得した株が β 酸化系など脂肪酸分解系のどのような変異株であるかを検討することにした。今のところ脂肪酸低資化性株の中から総米50 gの発酵試験において香気成分に特徴のある株を取得することができたので報告する。

脂肪酸低資化性株取得のための親株として、清酒酵母

*現在、退社。連絡先〒655-0039 神戸市垂水区霞ヶ丘3-3-4

協会7号 (K-7) および協会701号 (K-701) を用いた。また清酒酵母は、すでに β 酸化系を誘導すると報告されている *Saccharomyces cerevisiae*³⁾ に属するとされているので、脂肪酸資化性がある株の標準株として実験室酵母 *S. cerevisiae* X2180-1A を使用した。

脂肪酸低資化性株の分離は以下のように二段階のスクリーニングで行った。K-7 および K-701 は二倍体であるといわれているので取得効率を上げるため、一次スクリーニングは Leij ら⁴⁾ のポジティブセレクション法をもとにして行った。本分離法において親株はカタラーゼを3-アミノ-1,2,4-トリアゾールにより阻害することで、 β 酸化系で発生する過酸化水素 (Fig. 1) が細胞内に蓄積し死滅する。したがってこの選択法を用いることで、脂肪酸分解系において β 酸化系が欠損している株を取得できる率が高くなることが予想される。ポジティブセレクション培地は Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 0.67%, ラフィノース 0.5%, ミリスチン酸 0.02%, Brij35 0.4%, L-ヒスチジン (塩酸塩) 0.002%, 75mM 3-アミノ-1,2,4-トリアゾールの寒天2%を含む平板培地を用いた。この培地で糖源をラフィノースとしたのはグルコースに比べ β 酸化系のカタボライトリプレッションが起こりにくいと考えたからである。上述の培地において親株は β 酸化系により過酸化水素が発生しているためか増殖が阻害されるが、糖源をグルコースとしたときは β 酸化系のカタボライトリプレッションによりミリスチン酸が代謝されなくなり過酸化水素が発生しなくなったためか増殖阻害が起こらなくなる。原報の通りマルトースを用

いなかったのは、もし清酒酵母から目的の株を分離できなかったときマルトース資化性のない X2180-1A から取得できるかを確認する時のためである。また3-アミノ-1,2,4-トリアゾールの濃度も原報と異なるが、これは親株である K-7 および K-701 が上記のポジティブセレクション培地でミリスチン酸が存在しているときに増殖阻害が起こる最小の濃度である。二次スクリーニングとしての脂肪酸資化性試験は、液体培地による振とう培養で以下のように行った。SD 培地 (Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 0.67%, グルコース 0.5%) において 27°C で対数増殖期まで培養した菌体を滅菌水で洗浄後、脂肪酸資化性検定液体培地 (Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 0.67%, ミリスチン酸 0.02%, Brij35 0.4%, 酵母エキス 0.01%) に 1×10^5 cells/ml となるように接種し、30°C で4~6日間振とう培養を行った後、培養液の吸光度 (波長 660 nm) を測定することで増殖を判定した。

発酵試験は精米歩合70%の白米を用い、総米50 g, 麴歩合20%, 汲水歩合130%, 品温を15°C一定の条件下で行った。酵母はSD培地において27°Cで対数増殖期まで培養した菌体を滅菌水で洗浄後、汲み水あたり 1×10^6 cells/ml となるように添加した。発酵性については、親株の炭酸ガスによる重量減が約15 gとなったとき、親株の95%以上に達していた株を良好とした。また炭酸ガス重量減が約15 gとなったとき遠心分離により上槽し、香気の特徴のある株を選択するために香気成分の測定をヘッドスペース法⁵⁾により行った。

小仕込試験は難波ら⁶⁾の方法に準じ、精米歩合70%の白米を用い、総米1 kg, 麴歩合20%, 汲水歩合130%の三段仕込で行った。最高品温を17°Cとし、炭酸ガス重量減が約300 gとなったとき遠心分離により上槽した。製成酒について一般分析は国税庁所定分析法⁷⁾に従い、香気成分の測定はヘッドスペース法により行った。

まず脂肪酸低資化性株を取得するためには親株とする K-7 および K-701 が X2180-1A と同様に脂肪酸を資化していると考えられる培養条件が必要であるので、前述の脂肪酸資化性試験における培地を以下のように検討した。ただし増殖は吸光度ではなく血球計算盤により菌数を測定することで調べた。脂肪酸エチルエステルのうち吟醸香であるカプロン酸エチルを高生産させることを目的としたのでまず脂肪酸資化性検定液体培地の脂肪酸をカプロン酸として検討したところ、3株とも脂肪酸を抜いた培地と比較して増殖が阻害され、まったく生育しなかった。この結果は炭素数6のカプロン酸より長鎖で炭素数8, 10の脂肪酸であるカプリル酸とカプリン酸でも同様

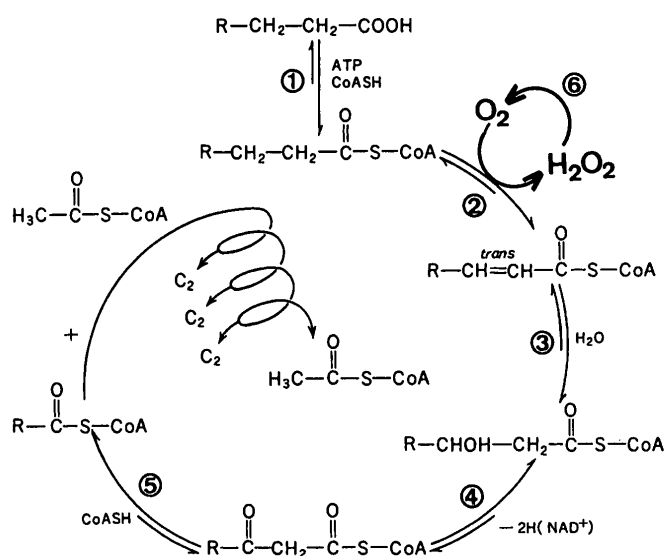


Fig. 1. Fatty acid β -oxidation.²⁾ Symbols: ①, acyl-CoA synthetase; ②, acyl-CoA oxidase; ③, enoyl-CoA hydratase; ④, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; ⑤, 3-oxoacyl-CoA thiolase; ⑥, catalase. (altered the reference 2)

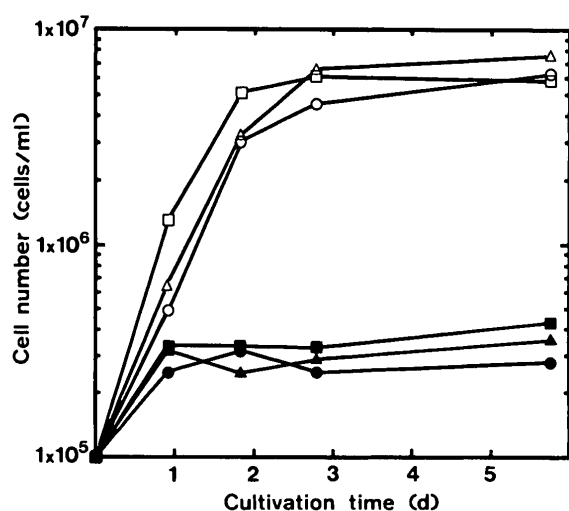


Fig. 2. Growth of K-7, K-701, and X2180-1A in liquid medium for fatty acid-utilization test. Symbols: (+ myristic acid) ○, K-7; △, K-701; □, X2180-1A. (– myristic acid) ●, K-7; ▲, K-701; ■, X2180-1A.

であった。また炭素数 12 の脂肪酸であるラウリン酸では、脂肪酸を抜いたときと比べ X2180-1A は増殖したが K-7 および K-701 は増殖が阻害された。しかし炭素数 14 の脂肪酸であるミリスチン酸では、X2180-1A はラウリン酸のときよりも強い増殖を示し、K-7 および K-701 も X2180-1A と同程度の増殖を示した (Fig. 2)。以上の結果から脂肪酸資化性検定液体培地の脂肪酸にはミリスチン酸を用い、前述の脂肪酸資化性試験の条件を親株が脂肪酸を資化する条件として用いることにした。しかし実際に β 酸化系のような脂肪酸分解系により資化しているかについては今後の検討課題である。また脂肪酸資化性検定液体培地に寒天 2% を加えた培地で上述と同様に検討したところ液体培養の時と同様の結果となったが、ミリスチン酸を脂肪酸とした場合でも増殖が微弱であったため判定が難しいと考え、寒天平板培地では脂肪酸資化性試験を行わないことにした。しかし一次スクリーニングの寒天平板培地では、増殖が微弱でもミリスチン酸の存在により親株の増殖が阻害されればよいのでこの脂肪酸で培地の検討を行った。

脂肪酸低資化性株の分離は以下のようにして行った。一次スクリーニングは、エチルメタンスルフォネイト (EMS) により突然変異処理を行った酵母を前述のポジティブセクション培地で増殖させた後、大きいコロニーを釣菌することにより行った。まず K-7 を親株として選択した。SD 培地において、30°C で 17 時間対数増殖期まで振とう培養後、50 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した菌体に変異処理を施した。変異処理は菌体を上述の緩衝液に懸濁後、EMS を 0.3% になるよ

うに添加し 30°C で 10 分間振とうすることで行った。処理菌体を 10% チオ硫酸ナトリウムに懸濁し滅菌水で洗浄後、滅菌水に懸濁した菌体をポジティブセクション培地に 1×10^7 cells ずつ塗布し、30°C で 7 日間培養後大きめのコロニーを 370 株単菌分離した。EMS 処理による生存率は 70% であった。二次スクリーニングは、これらの中から脂肪酸低資化性株を選択するために前記の脂肪酸資化性試験を行った。培養液の吸光度が親株の 0.60 ~ 0.65 に対し 0.20 ~ 0.40 と低くなった株が 11 株得られたので、これらを脂肪酸低資化性株とした。また K-701 を親株としても同様に選択した。ただし変異処理は EMS を 3% になるように添加し 45 分間振とうすることで行った。このときの EMS 処理による生存率は 50% であった。一次スクリーニングで 1000 株選択し、二次スクリーニングにより 7 株に絞った。

次にこれらの脂肪酸低資化性株から清酒醸造の系において発酵性の不良な株を除き香気に特徴のある株を選択するために、総米 50 g で発酵試験を行い上槽酒の香氣成分を測定した。K-7 由来である 11 株のすべてと K-701 由来である 7 株中 4 株は、親株の炭酸ガスによる重量減が 15 g となったとき親株の 95% 以上に達していたため発酵性は良好と考えた。またこれら発酵性の良好であった株について上槽酒の香氣成分を測定した。まず K-7 由来で脂肪酸資化性試験における吸光度が 0.25 であった株 16-5 は、酢酸イソアミルを親株 20 mg/l の 1.6 倍生産し、吟醸酒の香りの強さおよび官能評価と相関が高い酢酸イソアミル (E) とイソアミルアルコール (A) の含有比 (E/A 比) が親株の値である 7.3 の 2 倍であった。また同じく K-7 由来で脂肪酸資化性試験における吸光度が 0.30 であった 2 株は、親株に対し酢酸イソアミルが 0.6 ~ 0.7 倍と少ないが脂肪酸エチルエステルであるカプロン酸エチルと酪酸エチルを 1.4 倍以上生産した。この中で 25-8 株は、酢酸イソアミルが親株 20 mg/l の 0.7 倍と少ないがカプロン酸エチルを親株 1.3 mg/l の 1.6 倍および酪酸エチルを親株 0.8 mg/l の 1.7 倍生産した。また K-701 由来で脂肪酸資化性試験における吸光度が 0.35 であった 1 株は、カプロン酸エチルと酢酸イソアミルの両方を前述の株と同程度高生産した。

また取得した株の香気生産性をより実際の清酒醸造に近い条件で検討するために、酢酸イソアミル高生産性株として 16-5 および脂肪酸エチルエステル高生産性株として 25-8 についてはこれらの親株である K-7 とともに総米 1 kg で小仕込試験を行った。その結果 18 日目の炭酸ガス減量およびアルコール度数は親株と同様の値を示し

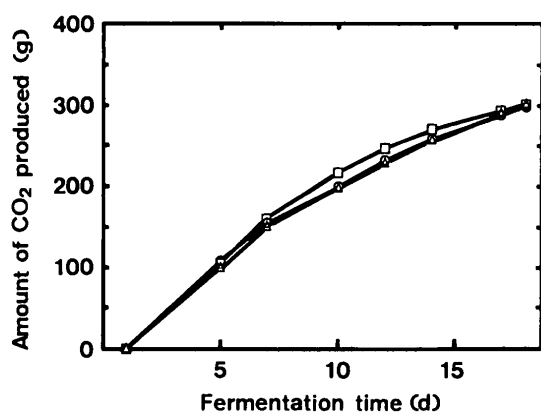


Fig. 3. Time course of fermentation in a small-scale brewing test. Symbols: ○, K-7; △, 16-5; □, 25-8.

Table 1. Analysis of sake brewed by K-7 and low fatty acid-utilizing mutants in a small-scale brewing test.

	Strain		
	K-7	16-5	25-8
Brewing time (d)	18	18	18
Amount of CO ₂ produced (g)	298	302	301
Sake meter	+4.0	+1.0	+1.0
Alcohol (%)	18.8	18.4	18.7
Acidity	2.85	2.50	2.75
Amino acidity	2.15	2.40	2.65
Isoamyl alcohol (mg/l)	338	343	324
Isoamyl acetate (mg/l)	12.3	17.6	8.8
Ethyl caproate (mg/l)	0.89	0.90	1.34
Ethyl butyrate (mg/l)	1.23	1.22	1.81
E/A × 100	3.6	5.1	2.7

E/A × 100: (Isoamyl acetate/Isoamyl alcohol) × 100.

(Table 1), 炭酸ガス減量の推移 (Fig. 3) も親株と同様であったことから、取得株の発酵能は親株と遜色がないと考えた。一方香気成分は50 g 発酵試験と同様の傾向を示した。16-5は酢酸イソアミルを親株の1.5倍生産し、E/A比も1.4倍となった (Table 1)。また上槽酒は果実様のすっきりとした華やかな香りを呈していた。一方25-8はカプロン酸エチルおよび酪酸エチルで親株の1.5倍となったが酢酸イソアミルは7割位と低かった (Table 1)。そのためか25-8の醪および上槽酒は親株とは一風変わった香りを放っており、カプロン酸エチルだけでなくこれより鎖長の長いカプリル酸エチルやカプリン酸エチル系の香りが立っていた。また25-8の醪は親株がK-7であるにもかかわらず発酵期間中K-701並の泡なし性を示した。

以上の結果から本分離法において脂肪酸低資化性酵母から親株よりも吟醸香成分の高い株が少なくとも3パ

ターン得られることがわかった。ここでは β 酸化系が働かないことにより過酸化水素が発生しないためカタラーゼを阻害しても増殖が抑制されないと考えられる株を取得し、さらにこれらの中から脂肪酸資化性の低い株を選択した。したがってこの分離法では脂肪酸を酵母内に取り込めないために資化できない株と、取り込めても脂肪酸分解系において β 酸化系が欠損しているために代謝できない株の両方を選択できると考えられる。16-5で酢酸イソアミルが高生産している理由については不明であるが、25-8で脂肪酸エチルエステルであるカプロン酸エチルおよび酪酸エチルを多く生産し同時に酢酸イソアミルの生産が低く抑えられているのは、これらの香気成分の生成の前段階として β 酸化系欠損により脂肪酸またはアシル-CoAが蓄積し同時にこれらが代謝されることで発生するアセチル-CoAの生成が少なくなったためかもしれない。現在カプロン酸エチルの高生産は脂肪酸合成系の制御により進められており、たとえば脂肪酸合成酵素の変異により小仕込清酒で親株の5倍のカプロン酸エチルが生産できるようになった。⁸⁾ 実際に比較したわけではないがこれらの株より本分離法で今回取得した株はカプロン酸エチルの生産量が低いと考えられるので、さらに取得株数を増やすことや脂肪酸資化性のより低い株の取得などで香気生成能のより高い株を分離できるかが検討課題である。しかし今回取得した株が β 酸化系など脂肪酸合成系以外の変異であれば、本法はカプロン酸エチルを高生産させる新たな育種法として期待される。またこの変異株はミリスチン酸の低資化性株から取得しているにもかかわらずこの脂肪酸のエチルエステルよりかなり短鎖であるカプロン酸エチルと酪酸エチルを高生産していることから、カプリル酸エチル以上の鎖長の脂肪酸エチルエステルも高生産している可能性がありこれらの成分についても分析することが課題である。また25-8がK-701と同様の泡なし性を示したのは興味深い結果であったが、この理由は酵母の細胞表層に変異が起こったためか、あるいは発酵期間中に泡の出にくい酒質となったためかについては不明であるので今後の検討を要する。一方K-701を親株として酢酸イソアミルが16-5並でかつカプロン酸エチルが25-8並に高生産した株を1株選択できたが、本分離法では脂肪酸を酵母内に取り込めない株の取得も可能と考えられるので、この株が吉沢ら⁹⁾により脂肪酸を酵母内に取り込めない株から取得された酢酸イソアミルとカプロン酸エチルの両方を高生産する株と同様のものか検討が必要である。

現在、上述の変異株が清酒発酵系中においてどのよう

な変異により吟醸香成分を高生産しているか検討しているところである。

要 約

清酒酵母協会7号および701号から脂肪酸 β 酸化系欠損による高香気生産性株を選択するために、脂肪酸低資化性変異株を多数取得した。

得られた脂肪酸低資化性株について醸造試験を行ったところ、親株であるK-7に対し酢酸イソアミルを1.5倍生産した株16-5と酢酸イソアミルは0.7倍であるがカプロン酸エチルと酪酸エチルを1.5倍生産した株25-8を取得した。脂肪酸エチルエステルを多く生産すると同時に酢酸イソアミルの生産量が抑えられた25-8は、脂肪酸低資化性株から取得したことから、これらの香気成分の生成の前段階として β 酸化系欠損により脂肪酸またはアシル-CoAが蓄積しアセチル-CoAの生成が少なくなった株であることが予想される。また25-8の醪は親株がK-7であるにもかかわらず発酵期間中K-701と同様の泡なし性を示した。

本研究の機会と発表の承認をいただきました辰馬本家酒造株式会社辰馬章夫代表取締役社長、研究遂行の上で急逝まで終始適切なご指導と温かいご激励を賜った故今村武司取締役醸造部

長に深甚なる感謝の意を表します。またご討論いただいた広島大学教授上領達之先生に深く感謝いたします。さらに退社後本論文を完成させるにあたり、開放型試験分析室を利用させていただきました兵庫県立先端科学技術支援センター、および酵母*Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A株を分与していただきました大阪大学大学院工学研究科金子嘉信先生に厚くお礼申し上げます。最後に研究を進めるにあたりご助力いただきましたすべての方々に感謝いたします。

文 献

- 1) 栗山一秀, 芦田晋三, 斉藤義幸, 秦 洋二, 杉並孝二, 今安 聡: 醸酵工学, **64**, 253-259 (1986).
- 2) Conn, E. E., Stumpf, P. K., Bruening, G., and Doi, R. H.: コーン・スタンプ生化学, 第5版, 巻末, 東京化学同人, 東京(1989).
- 3) Veenhuis, M., Mateblowski, M., Kunau, W. H., and Harder, W.: *Yeast*, **3**, 77-84 (1987).
- 4) Leij, I. V. D., Berg, M. V. D., Boot, R., Franse, M., Distel, B., and Tabak, H. F.: *J. Cell. Biol.*, **119**, 153-162 (1992).
- 5) 吉沢 淑: 醸協, **68**, 59-61 (1973).
- 6) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四郎, 村上光彦, 下田高久: 醸協, **73**, 295-300 (1978).
- 7) 日本醸造協会: 第4回改正国税庁所定分析法注解 (1993).
- 8) Ichikawa, E., Hosokawa, N., Hata, Y., Abe, Y., Suginami, K., and Imayasu, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154 (1991).
- 9) 吉沢幸雄, 飯村 穰, 田村学造, 小幡孝之: 日本醸造協会大会要旨集, p.666 (1992).