The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

〔醗酵工学会誌 第70巻 第6号 473-477. 1992〕

ノート

りんご酸生成能の高い清酒酵母の育種

相川 元庸*・水津 哲義・市川 英治・川戸 章嗣
安部 康久・今安 聰

月桂冠株式会社総合研究所
〒612 京都市伏見区下鳥羽小柳町24

(平成3年11月22日受付 平成4年8月17日受理)

Breeding of higher malic acid-productive mutants from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7 (K-7). —Note— MOTOTSUNE AIKAWA,* TETSUYOSHI SUIZU, EIJI ICHIKAWA, AKITSUGU KAWATO, YASUHISA ABE, and SATOSHI IMAYASU (*Research Institute, Gekkeikan Sake Co., Ltd., 24, Shimotobakoyanagi-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612*) Hakkokogaku **70**: 473-477, 1992.

Higher malic acid-productive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* (Kyokai No. 7) were isolated as sensitive mutants of dimethyl succinate, a specific inhibitor of succinate dehydrogenase. One of the mutants, No. 2-69, produced malic acid at a level three times higher than the parent strain in a culture with YEPD medium, and also in sake brewing. The productivities of other organic acids, such as lactic acid, acetic acid, citric acid or pyruvic acid, showed no significant difference between the two strains. In sake brewing, the mutant gave a fresh and acidic taste, compared with that of the parent. Lower amounts of dimethyl succinate inhibited succinate dehydrogenase activity in a crude extract of the mutant.

近年，消費者ニーズの多様化にともない清酒の個性化が図られており，そのための方法の一つとして，酸度の異なる清酒や，酸度が同じでも有機酸の組成の異なる清酒の醸造が試みられている.[1,2] 清酒中に含まれる有機酸として，約40種類が報告されており，乳酸，こはく酸，りんご酸などが主要な有機酸として知られている.[3] これらのうち乳酸は主に酛に由来し，こはく酸，りんご酸は醪発酵中に酵母によって生成されることが，豊沢,[4] 林田[5] らによって示された．清酒に含まれるこれらの有機酸の中で，りんご酸は官能的に高く評価されており清酒にさわやかな酸味を与えることが報告されている.[6] 我々はりんご酸生成能が高く，しかも清酒醸造用酵母としてのすぐれた形質を兼ね備えた酵母の育種を目的に，Succinate dehydrogenase (SDH) の阻害剤である，dimethyl succinate (DMS) を用いて実用清酒酵母のスクリーニングを行った．その結果，協会7号酵母のDMS感受性変異株の中にりんご酸高生成能を有する株を見いだし，本育種法で得られた菌株が有機酸生成量や組成の異なる清酒の醸造に有効と考えられたので報告する.

親株としては，*Saccharomyces cerevisiae* 協会7号酵母 (K-7) を用いた．酵母の培養には，YEPD培地（1.0%酵母エキス，2.0%ペプトン，2.0%グルコース）を用い，寒天培地はこれに1.5%の寒天を加え調製した.

まず，DMSのK-7に対する生育阻害率を調べるために，0.5-3.0%のDMSを含むYEPD寒天培地を調製し，各プレートに生育してくる細胞数を計測した．その結果，DMS濃度が0%から1.5%の範囲では，生育細胞数はDMSによる影響を受けなかった．しかしながら，2.0%のDMSで生育細胞数は10%に減少し，2.5%で酵母の生育は完全に阻止された．以上の結果から，変異株のスクリーニングには，1.5% DMSを

* 連絡先，Corresponding author.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

含むYEPD寒天培地を用いることにした．酵母の変異処理はLindegrenらの方法に準じ,[7] 0.3% ethyl methane sulfonate (EMS) 溶液中で60分間行った．変異処理後YEPD寒天培地に生育してきたコロニーを，DMSを含むYEPD培地にレプリカし，このプレートに生育できない株をDMS感受性株として52株分離した．

以上のようにして得られた変異株52株について酸生成能を調べるために，10%グルコースを含むYEPD培地で30°C，3日間静置培養し，培養液について滴定酸度と有機酸組成を測定した．滴定酸度の測定法は国税庁所定分析法に準じた.[8] また，有機酸組成分析は島津製高速液体クロマトグラフ有機酸分析システムを用いて，ポストカラムpH緩衝化電気伝導度検出法によって行った．変異株のうち7株について，滴定酸度の測定結果をTable 1に示した．この中で酸生成能が高い4株No. 1-45, No. 1-85, No. 1-96, No. 2-69の各変異株について有機酸組成を調べた．その結果，Table 2に示すように，ピルビン酸，乳酸，酢酸等については若干の増減が見られるものの，株間に大きな差は見られなかった．しかしながら，TCA回路関与の有機酸である，こはく酸，りんご酸は変異株においていずれも増加が認められ，中でもNo. 2-69株はもっともりんご酸の生成が高く，K-7の約3倍生成していた．生成したりんご酸についての光学活性は測定していないので不明である．

次に，清酒醪におけるりんご酸生成能，および実用性を検討するため小仕込試験を行った．小仕込試験は難波らの方法に準じ,[9] 精米歩合72%の日本晴を用い，総米4.5 kg, 麹歩合20%, 汲水歩合130%の三段仕込で，発酵温度は15°C一定で行った．上槽酒の一般成分は国税庁所定分析法に準じて測定した.[8] また，香気成分は，ヘッドスペース法によるガスクロマトグラフィーで測定した.[10]

Table 1. Acid production of mutants from Kyokai No. 7.

Strain	Titration acidity (ml)
K-7	1.70
1-45	2.04
1-85	1.95
1-96	2.02
1-117	1.56
2-52	1.97
2-69	2.08
2-90	1.29

Yeast strains were cultivated in 300 ml-flasks at 30°C for 3 d in 130 ml of YEPD medium containing 10% glucose. Titration acidity was measured by the method of the National Tax Administration.[8]

小仕込試験の結果，No. 2-69は発酵中期までは親株と比較して発酵能に差は見られなかったが，中期以降発酵が緩慢になった (Fig. 1)．滴定酸度の経時的変化はFig. 2に示すように，5日目ではNo. 2-69株はK-7よりも約0.3 mlほど高い酸度を示したにすぎず，大きな差は見られなかったが，以後の経過ではK-7はわずかに酸度が上昇したのに対し，No. 2-69株では経時的に酸度が増加し，最終的にはK-7の約1.5倍の滴定酸度を示した．この時の各有機酸の経時的変化について調べたところ，ほとんどの有機酸については，No. 2-69株はK-7とほぼ同様の生成パターンを示した．しかしながら，りんご酸は，Fig. 3に示すように，発酵日数と共に生成量の差が顕著になり，上槽時にはK-7の200 ppmに対し，No. 2-69株で620 ppmとなり，約3倍のりんご酸を生成した．以上の結果より，No.

Table 2. Organic acid contents in culture broth.

Strain	Content of organic acid (ppm)						
	Pyruvic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid	Fumaric acid	Malic acid
K-7	132.7	32.5	42.3	4.7	102.3	[a]ND	55.0
1-45	136.6	28.1	50.3	10.7	140.4	ND	95.1
1-85	135.9	50.1	41.3	6.7	116.7	ND	105.8
1-96	133.3	25.6	43.7	12.6	111.5	ND	110.1
2-69	123.3	31.8	34.0	5.5	112.0	ND	152.0

All strains were cultivated under the same condition as in Table 1 in 300 ml-flasks containing 130 ml of a YEPD medium with 10% glucose. Organic acids were measured by the method referred to in the text.
[a]ND: not detected.

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

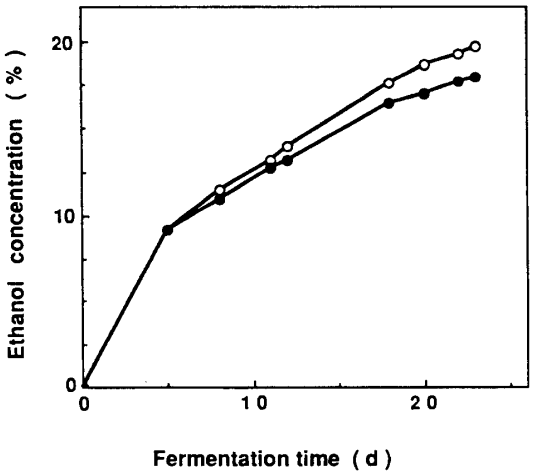

Fig. 1. Time courses of ethanol production in *moromi* mash by Kyokai No. 7 and mutant strain, 2-69. Sake brewing with both strains were carried out by the method of Namba *et al.*[9] 4680 g of steamed rice, 1080 g of rice koji, 6075 ml of tap water, 0.3 ml of lactic acid and 1×10^9 of yeast were mixed, and incubated at 15°C for 23 d. The ethanol concentration of each *moromi* mash was measured by the method of the National Tax Administration.[8] Symbols: ○, K-7; ●, mutant strain, 2-69.

2-69株は醪中においてもりんご酸高生成能を示すことが確認でき，本変異株で醸造した清酒の滴定酸度が高いのは，主にりんご酸の増加によるものであると考えられる．Table 3に上槽酒の一般成分および香気成分量を示す．No. 2-69株は，K-7に比べ発酵が遅れたために，アルコールは約2%低い値になった．滴定酸度はりんご酸の影響により，K-7の約1.5倍の4.03 mlと高い値を示した．アミノ酸度は株間に大きな差は見られなかった．香気成分では，イソブチルアルコール，イソアミルアルコール，酢酸イソアミルがK-7より若干高い値を示したが，官能試験の結果酒質には影響はなかった．上槽酒の有機酸組成(Table 4)より明ら

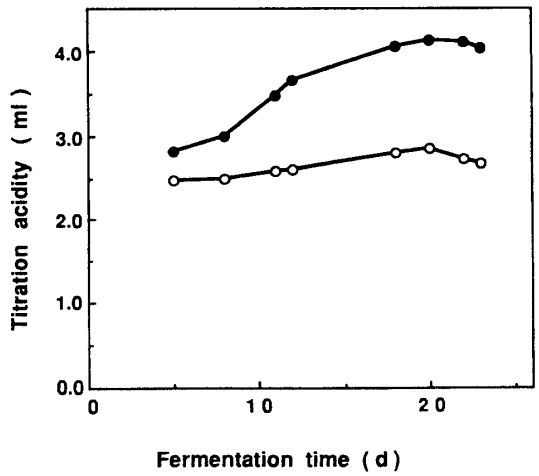

Fig. 2. Time courses of acidity production in *moromi* mash by Kyokai No. 7 and mutant strain, 2-69. The fermentation test was performed under the same conditions as described in the legend of Fig. 1. Titration acidity was measured by the method of the National Tax Administration.[8] Symbols: ○, K-7; ●, mutant strain, 2-69.

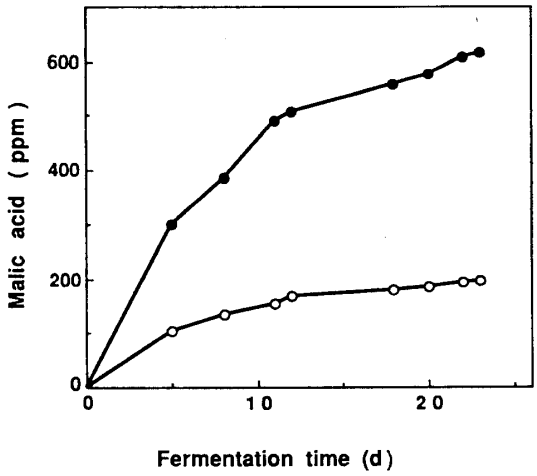

Fig. 3. Time courses of malic acid content of *moromi* mash by Kyokai No. 7 and mutant strain, 2-69. Each strain was brewed under the same conditions as described in the legend of Fig. 1. The content of malic acid was measured by the method described in the text. Symbols: ○, K-7; ●, mutant strain, 2-69.

Table 3. General analysis and aroma compounds in fermented sake.

General analysis	Strain	
	K-7	2-69
Sake meter	+1.0	−3.0
Alcohol (%)	19.7	17.6
Total acidity (ml)	2.68	4.03
Amino acidity (ml)	2.45	2.65
Aroma compound		
Isobutyl alcohol (ppm)	87	138
Isoamyl alcohol (ppm)	200	268
Isoamyl acetate (ppm)	3.7	6.9
Ethyl caproate (ppm)	1.1	1.2

Sake meter, alcohol, total acidity, and amino acidity were assayed by measuring as described by the National Tax Administration.[8] Aroma compounds were measured by head space gas chromatography.[10]

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Table 4. Organic acid contents in sake brewed by K-7 and mutant strain, 2-69.

Strain	Contents of organic acid (ppm)						
	Pyruvic acid	Lactic acid	Acetic acid	Citric acid	Succinic acid	Fumaric acid	Malic acid
K-7	51.9	542.1	150.4	116.8	507.6	[a]ND	201.4
2-69	76.8	526.3	121.5	109.0	587.4	ND	617.3

Organic acid was measured by the method referred to in the text.
[a]ND: not detected.

かなように，No. 2-69 株の上槽酒は対照と比較して，こはく酸とりんご酸が高い特徴を有しており，官能試験の結果酸味のきいたさわやかな酒質であった．以上のように，今回得られたりんご酸高生成能を有する変異酵母の使用によって，従来とは異なる酒質の清酒を醸造することが可能になった．変異株 No. 2-69 株の DMS 感受性変異は SDH が変異しているためと予想される．このことを明らかにするために，SDH 活性に及ぼす DMS の影響について *in vitro* で調べた．まず，10%のグルコースを含む YEPD 培地にて 30°C, 48時間振とう培養した菌体を 200 mM phosphate buffer (pH 6.0) に懸濁し，フレンチプレス（Aminco 社製）で菌体を破砕した．次に，この破砕液を 3000×g, 10分間遠心分離して得た上澄を 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) で一晩透析後，3000×g, 10分間遠心分離し，上澄液を得てこれを菌体内粗酵素液とした．粗酵素のタンパク量は Bradford らの方法に準じて測定し，[11] SDH は Veeger らの方法に準じて活性を測定した．[12]

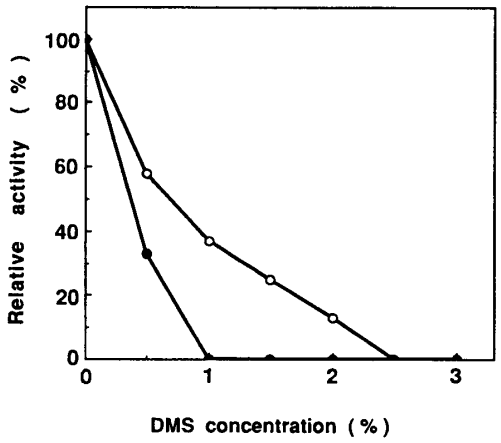

Fig. 4. Effect of DMS concentration on Succinate dehydrogenase activity of cell-free extracts from Kyokai No. 7 and mutant strain, 2-69. Both strains were cultivated at 30°C for 2 d in 500 ml-flasks containing 100 ml of YEPD medium with the shaking. The enzyme activities of cell-free extracts were assayed by measuring the initial rate of FAD oxidation, as described in the text.[12] Symbols: ○, K-7; ●, mutant strain, 2-69.

K-7 と No. 2-69 株よりそれぞれ菌体内粗酵素液を調製し，DMS による SDH の阻害を調べた結果 (Fig. 4), K-7 では酵素反応液中に 1 % DMS を添加することで，SDH 活性は約50%に低下し，2.5% DMS の添加で完全に SDH 活性は阻害された．しかしながら，No. 2-69 株では 1 % DMS の添加で SDH 活性は100%阻害され，粗酵素における SDH 活性の DMS 感受性が高くなっていることが示唆された．このように，本変異株は SDH に変異が存在しているものと推測されたが，他の部位にも変異が存在している可能性も考えられるため，今後，さらに詳細に，本株のりんご酸高生成能の機作を明らかにしていく予定である．

要　　約

協会 7 号酵母を用いてりんご酸生成能の高い酵母の育種を行った．協会 7 号酵母を EMS 処理し，1.5% DMS を含む YEPD 培地に生育しない株を DMS 感受性株として単離した．得られた DMS 感受性株の中で酸生成能の高い株の有機酸組成を調べた結果，りんご酸の生成が顕著に増加していた．DMS 感受性株の中から No. 2-69 株を選択し，小仕込試験を行った結果，清酒醪においても No. 2-69 株の特徴であるりんご酸高生成能が認められた．上槽酒の滴定酸度は，K-7 の約1.5倍で，4.03 ml であった．りんご酸は 620 ppm であった．今回得られた DMS 感受性変異酵母は粗酵素液における SDH の DMS に対する感受性が高くなっていた．

文　　献

1) 若井芳則，松田智彦，小西康夫：日本醗酵工学会大会要旨集，p. 50 (1984).
2) 菅野信男，藤井　均，梅田修治，中村欽一，佐藤信：日本醗酵工学会大会要旨集，p. 150 (1981).

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

3) 蓼沼 誠：醸協，**61**, 1092–1097 (1966).
4) 豊沢 誠，米崎治男，上田隆蔵，林田正典：醗工，**38**, 342–350 (1960).
5) 林田正典，上田隆蔵，寺本四郎：醗工，**46**, 85–91 (1968).
6) 佐藤 信，大場俊輝，高橋康次郎，国分伸二，小林宏治：醸協，**72**, 801–805 (1977).
7) Lindegren, G., Hwang, Y.-L., Oshima, Y., and Lindegren, C. C.: *Can. J Genet. & Cytol.*, **7**, 491–499 (1965).
8) 日本醸造協会：第3回国税庁所定分析法注解 (1981).
9) 難波康之祐，小幡孝之，萱島 進，山崎与四良，村上光彦，下田高久：醸協，**73**, 295–300 (1978).
10) 吉沢 淑：醸協，**68**, 169–173 (1986).
11) Bradford, J. F.: *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
12) Veeger., Dervartanian, D. V., and Zeylemaker, W. P. P.: *Methods in Enzymology*, (Lowenstein, J. M.), Vol. 13, p. 81, Academic Press, New York and London (1969).

NII-Electronic Library Service