

変異処理による清酒用酵母の育種 (第2報)

高酢酸イソアミル・高カプロン酸エチル生産株の育種

蟻川幸彦・近藤君夫・桑原秀明

吉川茂利・馬場 茂・小栗 勇

緒 言

清酒中の主要な香気成分としては、酢酸イソアミルおよびカプソン酸エチルが知られている。前報¹⁾において、清酒用酵母のEMS変異株の中よりロイシンアナログ耐性株を分離し、高酢酸イソアミル生産株を育種したことを報告した。今回、その高酢酸イソアミル生産株に市川ら²⁾の方法により高カプロン酸エチル生産性を付与し、高酢酸イソアミル・高カプロン酸エチル生産株を育種することを試みた。

カプロン酸エチル生成反応では、カプロン酸が律速となることが知られている³⁾。よってカプロン酸を過剰に生産する株を育種することができれば、高カプロン酸エチル生産株を育種することが可能と思われる。*Cephalosporium caerulens*由来の抗生物質であるセルレニンは、アセトアセチルCoAとアセチルCoAとの縮合反応を阻害する。さらに類似の反応であるアセチルCoAとマロニルCoAの縮合反応によるアセトアセチルCoAの生成を阻害する。したがって、このセルレニンは脂肪酸合成を抑える。このことより、セルレニン耐性株の中には脂肪酸であるカプロン酸の合成能に優れた株が存在することが考えられる。

そこで高酢酸イソアミル生産株を親株に用い、市川ら²⁾の方法に準じてセルレニン耐性株を分離し、高酢酸イソアミル・高カプロン酸エチル生産株を育種したので報告する。なお親株として高酢酸イソアミル生産株でないものを用いた結果および前報で報告した手法に従い育種した協会901号由来ロイシンアナログ耐性変異株の小仕込試験の結果についても併せて報告する。

実験方法

1. 供試菌株

長野酵母NP₁₄、協会901号および5, 5, 5-trifluoro leucine (TFL)耐性株NP₁₄-5F¹⁾、K901-5F¹⁴

2. 培 地

YPD培地(グルコース2%, 酵母エキス2%,

ポリペプトン1%), YPCD培地(YPD培地+25uMセルレニン), YNB培地(Difco)

3. セルレニン耐性株の分離および香気成分生成能の測定

市川ら³⁾の方法に準じて行った。すなわち常法によりEMSで変異処理したのち、YPCD培地に処理菌体を塗布し、生じたコロニーより耐性株を分離した。分離株を、1%カザミノ酸および5%グルコースを含むYNB培地で30℃3日間培養したのち、培養液中の香気成分濃度をヘッドスペースガスクロマトグラフィーで測定した。

4. 小仕込試験

一次スクリーニングでカプロン酸エチル生成能の高かった株について、表1の仕込配合で15℃一定の小仕込試験を行った。なお酵母はYPD培地7mlで2日間培養した菌体を洗浄後、全量加えた。

表1 小仕込試験 仕込配合

	水麴	初添	仲添	留添	合計
総米(g)	10	25	65	100	200
蒸米(g)		25	55	80	160
麴米(g)	10		10	20	40
汲み水(ml)	55	8	91	154	308

結果および考察

1. セルレニン耐性株の分離および香気成分生成能

表2にEMS処理時における生存率および耐性株の出現頻度を示す。NP₁₄およびNP₁₄-5F¹⁾では多数の耐性株コロニーがシャーレ上に出現したため、おおきめのコロニーを中心に11株および15株を分離した。協会901号では変異率が低く、3株を分離したのみであった。さらにK901-5F¹⁴では耐性株を分離することができなかった。市川ら²⁾も述べているように、株によって耐性株の分離のしやすさが違うように思われる。

次に菌株の香気成分生成能を測定した。結果を図1に示す。耐性株の中には、親株よりもカプロン酸エチル生成能の低い株も存在したが、親株の

表2 変異試験

菌 株	生存率(%)	変異率 ($\times 10^{-6}$)
NP ₁₄	76.4	1.01
K 901	98.4	0.044
NP ₁₄ - 5 F 1	82.2	0.89
K 901 - 5 F 14	69.1	0

20倍近い生成能を示す株も存在した。

2. 小仕込試験

カプロン酸エチル生成能の高い耐性株として、NP₁₄由来耐性株より2株(C-3、C-44)、協会901号由来耐性株より1株(C-9)およびNP₁₄-5F1由来耐性株より3株(C-11、C-14、C-39)を小仕込試験に供した。発酵曲線を図2に示す。NP₁₄-5F1由来の耐性株C-11を除いて、耐性株は親株とほぼ同一の経過を示

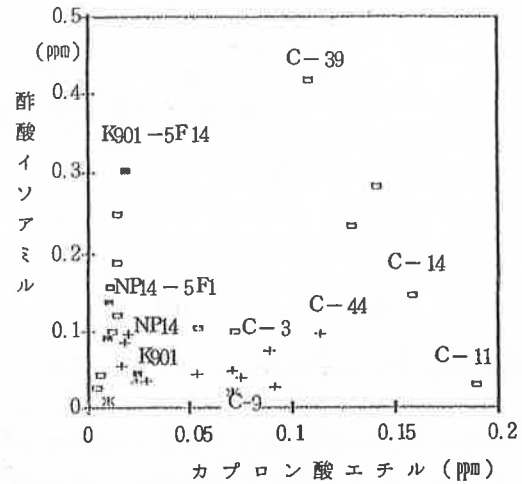


図1 酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチル濃度分布

(+), NP₁₄ 由来変異株 ; (*), 協会 901 号由来変異株, (□), NP₁₄-5F1 由来変異株

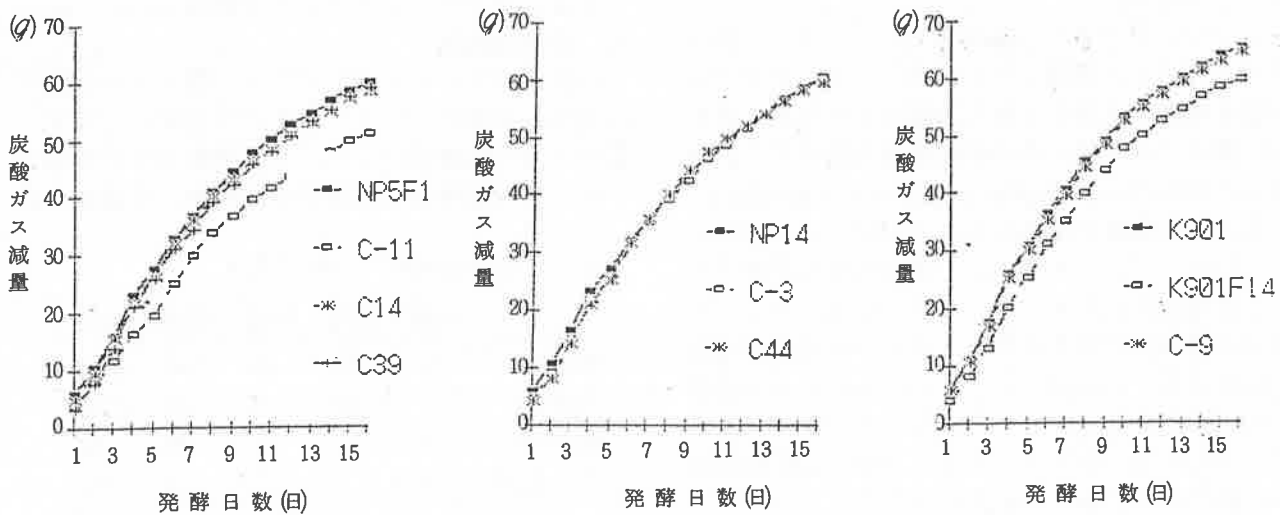


図2 各酵母の発酵曲線

表3 小仕込試験一般分析結果

菌 株	日本酒度	エタノール (V/V)	総 酸	アミノ酸
NP ₁₄	- 4.1	17.49	3.78	1.66
K 901	+ 4.8	19.28	3.01	1.87
NP ₁₄ - 5 F 1	- 4.4	17.05	3.71	1.40
K 901 - 5 F 14	- 5.3	18.14	3.30	1.75
C - 3	- 4.0	18.41	3.22	1.43
C - 9	+ 3.6	20.47	2.44	1.88
C - 11	- 31.1	15.30	4.02	1.51
C - 14	- 14.3	18.58	3.57	1.72
C - 39	- 11.1	17.55	3.50	1.58
C - 44	- 10.0	17.76	3.19	1.89

表4 小仕込試験 香気成分分析結果

菌 株	EtoAc	n-PrOH	i-BtOH (PPM)	i-AmoAc	i-AmOH	ca-Et	E/A
NP ₁₄	63.89	183.04	94.21	2.60	195.39	0.20	1.33
K 901	91.45	112.06	98.23	7.43	168.01	0.33	4.42
NP ₁₄ - 5 F 1	54.48	139.60	40.38	9.99	608.35	0.19	1.64
K 901 - 5 F 14	91.76	108.92	23.02	21.67	483.75	0.47	4.48
C - 3	60.59	133.98	89.39	3.42	176.88	0.76	1.93
C - 9	80.56	109.42	87.60	5.47	158.25	1.18	3.46
C - 11	56.35	105.44	73.80	2.81	163.42	1.12	1.72
C - 14	53.11	99.40	34.95	10.96	415.37	1.57	2.64
C - 39	45.49	77.45	46.52	18.74	534.66	1.90	3.51
C - 44	40.93	131.28	92.92	2.88	181.78	1.14	1.58

EtoAc; 酢酸エチル, n-PrOH; プロピルアルコール, i-BtOH; イソブチルアルコール, i-AmoAc; 酢酸イソアミル, i-AmOH; イソアミルアルコール, ca-Et; カプロン酸エチル

表5 小仕込試験 官能検査結果

菌 株	香 り	味	総 合
NP ₁₄	2.3	2.2	2.4
K 901	1.9	1.7	1.7
NP ₁₄ - 5 F 1	2.0	2.3	2.2
K 901 - 5 F 14	1.3	1.9	1.8
C - 3	1.7	2.0	1.9
C - 9	1.4	1.9	1.8
C - 11	2.8	2.9	2.9
C - 14	1.7	2.3	2.0
C - 39	1.7	2.2	2.0
C - 44	1.8	2.0	2.0

n = 9, 3点法

した。生成酒の分析結果を表3および表4に、官能検査結果を表5に示す。高酢酸イソアミル生産株であるNP₁₄-5F1由来の耐性株は、2度の変異処理のためか3株とも親株に比べ切れが悪くなったが、C-39株は親株の10倍のカプロン酸エチル生成能を示し、酢酸イソアミル生成能も高い値を保持した。この様に、TFL耐性かつセルレニン耐性株を育種することにより、清酒中の主要成分である酢酸イソアミルとカプロン酸エチルの両成分を多量に生成する酵母の育種が可能になったと考えられる。なお協会901号由来耐性株C-9は、カプロン酸エチル生成能は親株の3倍程度であり、酢酸イソアミルは若干劣ったが、香りの

バランスに優れ、酸の生成も低かったため、官能的に高い評価を得た。また前報の方法により育種した、協会901号由来TFL耐性酵母K901-14については、セルレニン耐性株は得られなかったが、この株自身は、酢酸イソアミル生成能が高く、官能的に高い評価を得た。

要 約

清酒中の主要な香気成分である酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルを増大させるため、高酢酸イソアミル生産株よりセルレニン耐性変異株を分離し、高酢酸イソアミル・高カプロン酸エチル生成能を持つ清酒用酵母を育種することを試み、以下の結果を得た。

- 1) EMS変異処理後セルレニンを含む培地上に塗布生育させることにより、供試4株中3株よりセルレニン耐性株を分離した。変異株の出現頻度は菌株により差異があった。
- 2) 合成培地での1次スクリーニングでは、親株に比べ20倍近いカプロン酸エチル生成能を示す株が存在した。
- 3) 小仕込試験に供試したセルレニン耐性株6株は、親株の3~10倍のカプロン酸エチル生成能を示した。高酢酸イソアミル生産株であるTFL耐性株NP₁₄-5F1由来のセルレニン耐性株C-39は、高酢酸イソアミル生成能を保持したまま、親株の10倍のカプロン酸エチル生成能を示した。また協会901号由来耐性株C-9は

官能的に香りが優れていた。

- 4) 前報に準じて取得した協会 901 号由来 T F L 耐性株 K 901 - 5 F 14 は 酢酸イソamil生成能が高く，官能的に高い評価を得た。

文 献

- 1) 蟻川幸彦・近藤君夫・桑原秀明・吉川茂利・馬場 茂・小栗 勇：長野食工試研報，**16**，

42 (1988) 。

- 2) 市川英治・川合菜穂美・秦 洋二・安部康久・杉並孝二・今安 聡：1988 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 P 435
3) 栗山一秀・芦田晋三・斉藤義幸・秦 洋二・杉並孝二・今安 聡・醗酵工学，**64**， 253 (1986) 。