

カプロン酸エチル高生産性G酵母の開発(第2報)

大津崇、吉村明浩

Development of High Ethyl Caproate Producing Sake Yeast Strain NF-G(II)

Takashi OTSU and Akihiro YOSHIMURA

吟醸酒や純米吟醸酒の製造では、リンゴ様の香りであるカプロン酸エチルを有する酵母の使用比率が高くなっている。カプロン酸エチルを高生産する酵母を開発するため、本県開発のG酵母あるいは泡なしG酵母に変異処理を行い、セルレニン耐性を指標としてカプロン酸エチル生産株を集積した。得られた75株から、官能評価により12株を選抜した。これらを小規模試験醸造に供したところ、3株に高いカプロン酸エチル生成能が認められた。

1. はじめに

清酒用酵母は生成する吟醸香の成分により分類すると、主体が酢酸イソアミルである従来型の酵母とカプロン酸エチルが主体である新しいタイプの酵母に大別される。近年、吟醸酒や純米吟醸酒の製造においては、カプロン酸エチルを高生産する酵母が多く使われている。岐阜県が保有する清酒酵母「G酵母」は、酢酸イソアミル系の酵母であり、カプロン酸エチル系の酵母は保有していない。そのため県内酒造場からカプロン酸エチル高生産酵母の開発が期待されている。そこで本研究では、泡ありG酵母(G)あるいは泡なしG酵母(NF-G)を親株として、セルレニン耐性株の取得と選抜、試験醸造を行ったので、その結果について報告する。

2. 実験

2.1 自然変異によるセルレニン耐性株の集積

GあるいはNF-Gを3 mlのYPD培地で30℃、一晚振とう培養し、得られた前培養液0.1 mlを10 mlのYPD培地で30℃、5時間振とう培養した。これを遠心分離機と生理食塩水を使って洗浄、回収した菌体を、12 μMまたは6 μMセルレニンを含むYM (1.0%(w/w)グルコースを含む、以下YM1) 寒天培地に塗抹して30℃で培養し、得られたコロニーを、再度12 μMセルレニンを含むYM1寒天培地に画線し、十分に生育したものを自然変異によるセルレニン耐性株とした。取得した耐性株は20 mlの8.0%(w/w)グルコースを含むYM培地(以下YM8)で20℃、3日間培養し、官能評価でカプロン酸エチル生産性の有無を判断し、選抜した。

2.2 薬剤変異によるセルレニン耐性株の集積

薬剤変異によるセルレニン耐性株の取得はIchikawaら¹⁾の方法に従って行った。NF-G静置培養液(YM8、5 ml)から遠心分離機と生理食塩水を使って洗浄、回収した菌体を、表1の条件でエチルメタンスルホン酸(EMS)により変異処理した。変異処理後の菌体は生理食塩水で洗浄後、12 μMセルレニンを含むYM1寒天培地に塗抹して30℃で培養し、コロニーを形成した株を薬剤変異によるセルレニン耐性株とした。取得した耐性株は、20 mlのYM8培地で20℃、3日間

培養し、官能評価でカプロン酸エチル生産性の有無を判断し、選抜した。

表1 EMS処理条件

処理区	2.6%	1.2%
滅菌水 (ml)	0.12	0.19
0.2M PB pH8.0 (ml)	4.50	4.50
40% Glucose (ml)	0.25	0.25
EMS (ml)	0.13	0.06
処理条件	30℃、20分または15分、振とう	

2.3 総米200g小規模試験醸造

表2に示した仕込配合で、総米200 gの試験醸造を行った。白米は60%精白のひだほまれを使用し、米麴は一括して製造し冷蔵保存したものを使用した。

酵母はYM8培地で20℃、2日間培養したものを添加し、比較対照としてNF-Gを用いた。仕込みは初添15℃、仲添12℃、留添10℃とし、留添翌日から1日に1℃ずつ昇温し、環境温度15℃に達してから発酵終了まで保持した。アルコール発酵に伴い発生する炭酸ガス量を、醪重量の変化から算出し、発酵経過を観察した。炭酸ガス発生に伴う醪重量の減少が少なくなった15日目に発酵を終了した。上槽は、遠心分離機を用いて行い、上清を製成酒として得た。製成酒の分析は国税庁所定分析法²⁾に従って行い、香気成分はヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

表2 総米200 g小規模試験醸造 仕込配合

	初添	仲添	留添	合計
総米 (g)	35	65	100	200
蒸米 (g)	20	55	80	155
麴米 (g)	15	10	20	45
汲水 (ml)	55	75	146	276
乳酸 (ml)	0.2	-	-	0.2
酵母 (ml)	2.0	-	-	2.0

表3 総米200 g小規模試験醸造結果

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
酵母名(開発コード)	H26.5	H26.8	H26.20	H26.22	H26.25	H26.46	H26.49	H26.50	H26.59	H26.76	H26.81	H26.83	Ce41	NFG	協会酵母
炭酸ガス減量(g)	57.3	57.5	53.9	57.6	57.0	55.7	57.5	57.7	56.6	58.0	58.1	58.7	55.0	58.4	56.4
製成酒(ml)	295	306	302	305	300	296	305	305	296	304	308	305	301	305	305
アルコール(%)	18.6	18.8	18.0	18.6	17.9	18.2	18.4	18.6	18.3	18.6	18.7	18.6	17.8	18.6	18.2
日本酒度(度)	-1.8	-5.3	-14.7	-5.4	-6.1	-9.4	-5.0	-5.1	-6.7	-4.8	-5.4	-1.7	-12.5	-2.5	-8.0
酸度(度)	2.5	2.1	2.0	2.1	2.3	2.0	2.1	2.1	1.9	2.2	2.1	2.4	2.0	2.2	2.0
アミノ酸度(度)	1.3	1.9	2.3	1.8	1.7	2.0	1.9	1.9	1.7	1.9	2.0	1.6	2.3	1.8	1.9
酢酸エチル	171	150	83	133	101	88	101	104	91	109	102	108	72	96	104
酢酸イソアミル	16.7	11.5	5.4	9.0	8.2	6.2	8.8	10.2	10.0	9.3	9.7	8.0	6.3	13.2	7.2
イソアミルアルコール	199	180	154	174	204	167	179	182	176	196	178	187	154	157	180
カブロン酸エチル	6.1	6.2	10.2	5.9	5.0	8.6	6.5	6.9	9.0	6.5	6.3	5.0	15.1	2.6	10.4

2. 4 遺伝子解析

PCRによる*MAT*遺伝子座位の確認および遺伝子量の確認(フローサイトメトリー解析:FACS解析)はKatouらの方法に従って行った³⁾。

3. 結果

3. 1 自然変異によるセルレニン耐性株の集積

昨年度実施したEMS処理による選抜では、カブロン酸エチル生産能が高いものの、発酵力が親株と比較して低下する傾向が見られた⁴⁾。EMS処理ではランダムな変異が発生するため、発酵力に影響のある部位も変異している可能性がある。そこで自然変異株の取得を検討した。GおよびNF-Gを親株として、それぞれ6株、9株の計15株の自然変異セルレニン耐性株を集積し、これらの株をYM培地(20 ml)で培養し、香りを官能評価した。しかし、カブロン酸エチルの生成を明確に感じさせるものはなく、良好な変異株は得られなかった。

3. 2 薬剤変異によるセルレニン耐性株の取得と簡易選抜

先の結果を受けてEMS処理により変異株の取得を再度行うこととした。NF-Gに対してEMS濃度を変えて変異処理を行った結果、2.6%処理区から39株、1.2%処理区から21株、合計60株の薬剤変異セルレニン耐性株を取得した。これらの株をYM8培地(20 ml)で培養して香りを官能評価し、カブロン酸エチルの生成が認められた12株を選抜した。

3. 3 総米200 g小規模試験醸造

今回選抜した12株と昨年度分離したCe41株、高香気性の協会酵母、親株NF-Gの計15株を使用して、総米200 gの小規模試験醸造を行い、醸造特性を評価した(表3)。

NF-Gを使用した場合の生成酒に含まれるカブロン酸エチル量は2.6 ppmであったが、変異株はいずれも増加した。各変異株で5.1~10.4 ppmと酵母間に差が認められ、特に3株、No.3, No.6, No.9はNF-Gの3倍以上のカブロン酸エチル生成を示した。官能評価では、今回選抜した12株のうちNo.3およびNo.6について華やかな吟醸香が高く評価された。

しかし、No.3およびNo.6のいずれも日本酒度がそれぞれ-14.7、-9.4となりNF-Gと比較して発酵能が低く、アミノ酸度も高いことがわかった。

3. 4 Ce41の特性評価

本年度の変異株の選抜においても発酵力の強さを保持したカブロン酸エチル高生産株は取得できなかった。そこで、昨年度選抜したCe41の実利用および発酵力向上への育種の可能性を探るために醸造特性の再確認と遺伝子解析を行った。本株はカブロン酸エチル生成量が多いが、発酵力の弱い特性があった。再試験においても、カブロン酸エチル生成量は15.1 ppm、日本酒度、アルコール製成量他も再現性が認められ、香りは華やかだが、発酵力に課題が残ることが確認された。

NFGおよびCe41のゲノムDNAを調製し、*MAT*遺伝子座位のPCR増幅パターンを確認したところ、NFGは*MATa*および*MATα*の両遺伝子が確認できたが(図1B)、一方Ce41は*MATα*遺伝子を示すバンドのみしか検出されなかった(図1C)。

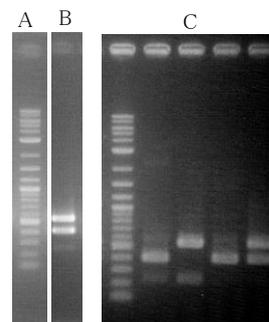


図1 NF-GおよびCe41のPCR解析

A: パネルBと同一ゲルで泳動した分子量マーカー, B: NF-G, C: レーン左から分子量マーカー, Ce41, BY4741 (*MATa*), BY4742 (*MATα*), BY4743 (*MATa/α*)

さらにCe41についてFACS解析を実施してDNA含量を解析し、実験室二倍体株(BY4743)と比較したところ、Ce41は

二倍体または二倍体以上の異数体である可能性が見出された(図略)。Ce41は変異処理の過程で $MATa$ 遺伝子を損なったと推察された。このためCe41は現場での変異の可能性があり、実利用では管理に特に注意が必要と考えられた。

4. まとめ

カプロン酸エチル高生産性酵母を開発するため、自然変異により15株、EMS薬剤変異により60株のセルレニン耐性株を取得し、これらから官能評価により良好な株を12株選抜した。これらの小規模試験醸造を行い、カプロン酸エチルを8 ppm以上高生成する株を新たに3株見出した。

Ce41について小規模試験醸造で発酵力等を再評価し、カプロン酸エチル生成量の高さ等に再現性が得られた。

しかし、実用化した場合に変異の可能性があるため、改善の必要も認められた。

【参考文献】

- 1) Ichikawa *et al*, *Agric. Biol. Chem.*, 55(8), pp.2153-2154, 1991.
- 2) 日本醸造協会, 国税庁所定分析法注解.
- 3) Katou *et al*, *Yeast* 25, pp.799-807, 2008.
- 4) 澤井ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 8, pp.48-50, 2014.