

交雑法を利用したカプロン酸エチル高生産性G酵母の開発

大津崇、吉村明浩

Development of high ethyl caproate-producing sake yeast strain G

Takashi OTSU and Akihiro YOSHIMURA

近年、リンゴ様の香りであるカプロン酸エチルを有する吟醸酒や純米吟醸酒が消費者に好まれる傾向がある。清酒中のカプロン酸エチルは発酵時に酵母の働きによって生成するため、実用には酵母の発酵特性が重要となる。昨年度までに県保有G酵母の薬剤変異株として得られたCe41株は、カプロン酸エチルを高生産するが、発酵力が弱く、遺伝子的に不安定であり、実用には課題が残ることを報告した。一方、親株である泡なしG酵母(NF-G)は強い発酵力を備えている。この発酵力をCe41株に付与できれば、実用化の可能性が高まる。そこで、本研究ではNF-Gの一倍体作製、Ce41株との交雑、そして交雑株の評価を行った。その結果、接合型がa型であるNF-G一倍体が25株得られた。これらとCe41株を交雑させて得られた41株について小規模試験醸造を行ったところ、12株に市販酵母と同等以上の高いカプロン酸エチル生成能力が見出された。しかし、12株はいずれも市販酵母と比べ発酵力は劣っていることもわかった。

1. はじめに

本県独自の清酒酵母であるG酵母は、バナナ様の香り「酢酸イソアミル」を主な香気成分として生成する。しかし近年はリンゴ様の「カプロン酸エチル」の香りが消費者に好まれている。各県でカプロン酸エチル高生産酵母の開発が進められており、県内酒造場においてもカプロン酸エチル高生産酵母の開発が望まれている。最近では国内販売と共に輸出でも競争力が必要となっており、他地域の清酒と差別化し、岐阜の地酒をアピールする材料の一つとして県独自の酵母の開発が期待されている。

昨年度までに泡なしG酵母(NF-G)をエチルメタンサルホン酸処理して得られた変異株「Ce41株」は、セルレニン耐性を示し、市販酵母より多量のカプロン酸エチルを生産することを示した¹⁾。しかし、Ce41株はG酵母や市販酵母と比べて発酵力が弱く、ホモ接合型(α/α)であることが示唆された。一方、親株であるNF-Gは強い発酵力を備えており、この発酵力をCe41株に付与できれば、実用化の可能性が高まると考えた。すなわち、NF-G一倍体とCe41株との交雑により、発酵力を強化し、かつ野生酵母との交雑変異を抑制する。

本研究では、NF-G一倍体の取得とCe41株との交雑株の作成と選抜、小規模試験醸造の結果について報告する。

2. 実験

2.1 一倍体の取得と接合型の確認

泡なしG酵母(以下、NF-G)の一倍体の取得は、ランダムスポア法で行った。NF-G培養物を孢子形成培地(2~6%(w/v)酢酸カリウム)に添加し、30℃、4日間培養し、孢子を形成させた。遠心分離して沈殿を回収し、滅菌水で洗浄後、回収した。得られた細胞の一部をスライドガラス上にとり、顕微鏡(オリンパス製AHBS-513)を用いて孢子を観察した。一倍体の分離はランダムスポア法により行った²⁾。沈殿物を滅菌水で10倍に希釈した後、65℃で15分間熱処理し、急冷後、

YPD寒天培地(1%イーストエキス、2%ポリペプトン、2%グルコース、2%寒天、以下YPD)に塗抹して30℃で培養した。発芽した孢子について、接合型をPCR²⁾で確認した。

2.2 Ce41株との交雑と交雑株の接合型の確認

MAT a遺伝子型と確認されたNF-G一倍体株をCe41株と交雑させた。NF-G一倍体株とCe41株をそれぞれ一白金耳採取し、YPD寒天培地で直交させるように塗抹することで接合させた。30℃で2~3日間培養後、交点を白金耳で掻き取り、滅菌水に懸濁し、セルレニンを含むYM寒天培地(12 μ Mセルレニン、0.5%ポリペプトン、0.25%イーストエキス、0.25%マルトエキス、1%グルコース、1.5%寒天、以下YM1)に塗抹して30℃で培養した。出現したコロニーは2.1と同様にPCRを行い接合を確認した。

2.3 Ce41-G交雑株の簡易選抜

交雑株を20 mlのYM培地(0.5%ポリペプトン、0.3%イーストエキス、0.3%マルトエキス、8%グルコース、以下YM8)で20℃、3日間培養した。培養液を攪拌し立ち上がる匂いを確認する匂いかぎ試験でカプロン酸エチル生成の有無を判断し、一次選抜した。その後、培養液中の酵母の増殖量を観察し、生育の良いものを二次選抜した。

2.4 総米200g小規模試験醸造

選抜した交雑株を用いて、表1に示した仕込配合で、総米200g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、米麹は一括して製造し冷蔵保存したものを使用した。2.3で選抜した酵母を用い、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Ce41株と高香気性市販酵母を用いた。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15~18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³⁾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⁴⁾で分析した。

表1 総米200g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

3. 結果および考察

3.1 胞子形成率の評価

NF-Gの胞子形成に適した胞子形成培地の酢酸カリウム濃度(2、4、6%)を検討した。各濃度の胞子形成培地でNF-Gを4日間培養後、顕微鏡下で300個の細胞を観察して胞子形成率と子嚢タイプの割合を調べた(表2)。胞子形成率は4%(w/v)酢酸カリウムの場合に最も高く11%であり、次いで2%(w/v)酢酸カリウムで9%、6%(w/v)酢酸カリウムで4%であった。4%(w/v)酢酸カリウムでは子嚢タイプが三分子あるいは四分子の割合も全体の5%と最も良好であった。以上の結果から、NF-Gの胞子形成は酢酸カリウム濃度を4%(w/v)として実験を行った。

表2 胞子形成率の評価

培地 酢酸 カリウム濃度	細胞数		
	胞子なし	1 or 2胞子	3 or 4胞子
2%(w/v)	273	22	5
4%(w/v)	266	18	16
6%(w/v)	268	5	7

3.2 一倍体および交雑株の接合型の確認

発芽した胞子についてMAT遺伝子座をPCRで確認したところ、25株がa型、16株がα型と判明した。得られた一倍体のうち接合型がa型である25株とCe41株を接合させた。Ce41株の形質であるセルレニン耐性を維持する交雑株117株を得た。これらはMAT遺伝子座のPCRにより接合していることを確認した。

3.3 Ce41-G交雑株の簡易選抜

最初に、匂いかぎ試験で培養液中のカプロン酸エチルの有無を評価し、交雑株117株から76株を選抜した。次に、培養後の菌体増殖量を比較し、最終的に41株のCe41-G交雑株を選抜した。

3.4 総米200g小規模試験醸造

41株について小規模試験醸造を実施した。Ce41株、高香気性市販酵母を比較対照に使用して、総米200gの小規模試験醸造を実施し醸造特性を評価した。結果の一部を表3

に示す。

製成酒のカプロン酸エチル濃度を測定した結果、市販酵母より濃度が高い株は41株中12株であった。Ce41株より濃度が高い株も3株あり、このうち2株は市販酵母のおよそ2倍であった。昨年度に報告¹⁾した従来の薬剤変異/セルレニン耐性株の選抜法では、市販酵母と同レベルのカプロン酸エチル生成量の酵母は75株から1株しか得られなかったことから、Ce41株を親株として交雑することで、カプロン酸エチル高生産性の酵母を高い頻度で獲得できることが示された。

Ce41-G交雑株の発酵力については、13株がCe41株より発酵中の炭酸ガス減量が高く(データ不掲載)、発酵力が改善された株もあったが、いずれも市販酵母より低い値となった。製成酒のアルコール濃度や日本酒度の数値からも市販酵母と比べて発酵力が弱いことを示しており、実用酵母として課題が残る結果であった。

4. まとめ

カプロン酸エチル高生産性酵母Ce41株の遺伝子的安定性と発酵力を改善するため、NF-Gとの交雑し、得られた交雑株の醸造特性を検討した。NF-Gからa型一倍体を取得し、α型のCe41株と交雑することで、遺伝的に安定でカプロン酸エチル高生産性の酵母を高頻度で獲得できることが明らかとなったが、発酵力については顕著な改善は見られなかった。交雑株は様々な形質を示すため、目的とする形質の組み合わせを持った交雑株を得るためには、さらなるスクリーニングが必要である。

【参考文献】

- 1) 大津ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, 9, pp.36-38, 2015.
- 2) Katou *et al*, *Yeast* 25, pp.799-807, 2008.
- 3) 日本醸造協会, 国税庁所定分析法注解.
- 4) 吉沢淑, 醸協, 68(1), pp.59-61, 1973.

表3 総米200g小規模試験醸造結果

	2-1	2-1	4-1A	4-1A	4-2A	4-2A	4-2C	4-2C	2-28	2-28	2-63	2-63	2-23	3-45	Ce	市販
	-1	-2	-2	-12	-10	-12	-2	-5	-6	-8	-9	-10	-7	-1	41	酵母
アルコール(% v/v)	14.3	15.2	11.6	14.4	13.6	13.2	14.4	14.3	15.5	15.6	13.1	13.3	13.7	13.9	15.6	16.5
日本酒度	-27.6	-24.6	-42.0	-23.2	-32.0	-34.0	-25.3	-25.6	-18.6	-19.9	-36.0	-34.0	-31.0	-32.0	-19.5	-16.9
酸度 (ml)	2.2	2.2	2.7	2.8	2.6	2.7	2.7	2.7	2.4	2.6	2.8	2.8	3.1	2.7	2.6	2.1
アミノ酸度 (ml)	2.2	2.1	2.3	1.9	2.1	2.1	2.1	2.1	1.8	2.0	2.1	2.0	2.0	2.3	2.1	1.7
酢酸エチル (mg/l)	62	76	23	55	41	41	53	53	97	86	57	64	65	46	60	89
酢酸イソamil (mg/l)	5.0	4.9	0.9	5.0	2.2	2.5	3.6	3.9	10.8	8.9	3.0	3.7	5.1	2.5	3.7	8.0
イソamilアルコール (mg/l)	139	133	82	123	95	101	121	119	161	172	130	117	152	115	117	172
カブロン酸エチル (mg/l)	10.3	10.7	9.2	12.4	18.8	18.8	12.3	12.1	7.1	5.7	6.0	6.0	4.0	13.0	12.7	9.6