

新規酒造用酵母の開発

山下浩一^{*1)}、田坂美奈^{*2)}

Development of the new yeast for brewing

YAMASHITA Hirokazu^{*1)} and TASAKA Mina^{*2)}

In order to develop original Japanese sake, the breeding of sake yeast strains having the original productivity of organic acid and amino acid was carried out. First, two haploid strains derived from the sake-yeast SK201-1 were mutagenized with EMS, then 38 mutant strains were selected by dyeing red on the YPD medium containing Erythrosine B. Next, the hybridization and the spore separation were carried out for the recovery of brewing properties. Thus, 5 diploid strains to use small-scale sake brewing test were obtained. In a small-scale sake brewing test, one (EB125) of these diploid strains produced higher concentration of glutamate and lower concentration of malate and succinate than parent strain.

1. 緒言

清酒は、古くから日本人にとって親しまれてきたアルコール飲料の一つで、現在も日本各地で製造され、販売、消費されている。しかし、近年、若年層の清酒離れ、消費者の嗜好の変化等により、清酒の消費量が年々減少している。国税庁発表によると、平成13年度の清酒課税移出数量は96万6655kL¹⁾で、前年度(101万5503kL)に比べると5%、平成3年度(137万5392kL)に比べると約30%の減少である。また、ビール、ワイン、発泡酒、焼酎等の増加により、全酒類に占める清酒の割合も、この10年間で14.5%から9.6%へと大幅に減少している。最近では、吟醸酒、純米酒等の特定名称酒が多く造られるようになり、その割合は全体の25%以上を占めるまでになっているが²⁾、清酒の消費量の減少を回復するまでには至っていない。この傾向に歯止めをかけるべく、全国各地で清酒の販売促進や品質の向上に向けたさまざまな取り組みが行われている。奈良県においても、県内の酒造業界から新商品に関する相談が当センターに数多く寄せられるようになった。

清酒の醸造において、関与する微生物が清酒の品質を決める重要な役割を担っている。中でも酵母は、アルコール生産の他にも香りを特徴付ける各種香気成分の生成や、味に関与する有機酸やアミノ酸の生産などに大きく関わっているため、清酒の品質に対する酵母の役割は大きい。したがって、性質の異なる酵母を用いることによって清酒の風味を変化させることが可能と考えられる。

本研究の目的は、奈良県由来の酵母を使用し、主に変異処理を用いて、生産する有機酸やアミノ酸組成に特徴を持つ清酒用酵母を開発し、味に特徴を持った清酒を開発することである。今回は、細胞膜の溶質透過に関連するH⁺-ATPase活性を阻害することで知られる、エリスロシンB

³⁾を変異株の選抜に使用することによって、突然変異により細胞膜の透過性に何らかの変化を生じさせ、清酒中に生産される有機酸やアミノ酸等の代謝産物の濃度を変化させるような変異株の取得が可能かどうかについて検討した。

2. 実験方法

2.1 使用菌株

当センター所有の *saccharomyces cerevisiae* の二倍体 SK201-1 から孢子分離した SK201-1-5(MATa)、および SK201-1-11(MAT-)を使用した。

2.2 培地

酵母の培養は、YPD培地(酵母エキス:1.0%、ポリペプトン:2.0%、グルコース:2.0%)を使用した。寒天培地作製時は寒天を2%添加した。また、エリスロシンB含有培地は、Bonneuらの方法⁴⁾に従い、YPD培地にエリスロシンBを7.5μMとなるよう無菌的に添加した。酵母の子のう孢子形成には、孢子形成培地(酢酸カリウム:1.0%、寒天:2.0%)を使用した。TTC染色性の調査は、(財)日本醸造協会製TTC下層培地、および上層培地を使用した。呼吸欠陥株の確認には、YPG培地(酵母エキス:1.0%、ポリペプトン:2.0%、グリセロール:3.0%)を使用した。

2.3 変異株の取得

北本の方法⁵⁾により、EMSを使用して酵母の変異処理を行い、菌株をYPD培地に塗抹してコロニーを生育させた。次に、エリスロシンB含有培地にレプリカし、30、2日後、菌体が赤く染まる株を探し、同じ場所にあるYPD培地上的菌体を変異株として分離した。また、EMS処理前後の菌数を計測し、その割合を生存率として算出した。

^{*1)}食品・毛皮革技術チーム(現:農業技術センター) ^{*2)}近畿大学農学部

2.4 発酵試験

試験管にて、乾燥麹の糖化液(麹汁培地、Brix=25.0)15ml を使用して行った。温度は 15℃一定とし、炭酸ガス減量を経日的に測定した。

2.5 変異株の交雑、育種

一倍体同士の交雑は、YPD 寒天培地上で両菌株をほぼ等量混ぜて接種して行った。30℃で一日静置後、交雑させた菌体を YPD 寒天培地に塗抹して生じた単コロニーを分離し、孢子形成培地に接種して子のう孢子形成が確認できた株を交雑株として分離した。二倍体からの孢子分離は、ランダム孢子分離法により行った。すなわち、各交雑株を孢子形成培地に接種して子のう孢子を形成させ、リン酸バッファー(pH=7.5)に溶解させた Zymolyase 20T (300mg/L)に子のう孢子を懸濁させて子のうを溶解させた。次に、滅菌水で希釈後、YPD 寒天培地に塗抹して生じた単コロニーを分離し、孢子形成培地に接種して子のう孢子形成が確認できなかった株を一倍株として分離した。標準株として *saccharomyces cerevisiae* IFO10175(MAT a)、および IFO10176(MAT-)を用いて交雑を試み、顕微鏡観察によって接合子を確認することにより、結合型を決定した。

2.6 清酒小仕込試験

清酒小仕込試験は、総米 2 kg とし、乾燥麹と 化米を使用して行った。その仕込み配合を Table1 に示す。各酵母は、麹汁培地 50ml にて培養した菌体を集菌して初添時に添加した。なお、乾燥麹と 化米の水分差を仕込時に補填した。

Table 1. Proportions of material used for small-scale sake brewing test.

	Addition			
	Initial	Intermediate	Final	Total
Total rice (g)	380	700	1030	2110
Additional rice (g)	130	150	230	510
Koji rice (g)	250	550	800	1600
Water	500	1050	1500	3050
Lactic acid (ml)	2.0			2.0

2.7 成分分析

アルコール濃度の測定は、理研計器製アルコメイトを使用した。有機酸分析は島津製作所製有機酸分析システムにより行い、分析条件は既報⁶⁾に準じた。pHの測定は東亜電波工業製 pHメーターを使用した。グルタミン酸含量の測定は、BOEHRINGER MANNHEIM 製「F-キットL-グルタミン酸」を使用した。その他の清酒成分は、国税庁所定分析法⁷⁾に従って分析した。

3. 結果および考察

3.1 変異処理条件の検討

変異処理がゆるいと、変異株がとりにくくなり、逆に強いと、細胞が死んでしまう。そのため、変異株を取得するには変異処理による生存率が 50%位になるのが望ましいといわれる⁸⁾。また、同じ酵母でも菌株や倍数体の違いによって変異の度合いが異なる。そこで、今回変異株の取得に使用する一倍体 SK201-1-5 を使用し、変異処理条件を変えて変異処理前後の菌数を計測し、そこから、生存率を算出し、変異株を取得するための最適条件の検討を行った。その結果を Table2 に示す。EMS 濃度が 3.0%の場合は生存率が 10%以下と低くなってしまったことが分かった。1.5%で 30 分処理を行った場合に、生存率が 72%となり、この条件が妥当だと思われる結果を得た。

Table 2. Effect on the condition of mutation with EMS on the cell viability.

Mutation with EMS	1.5% 15min.	1.5% 30min.	3.0% 15min.	3.0% 30min.	3.0% 60min.
Cell viability	89%	72%	10%	4.0%	0.3%

3.2 変異株の取得

変異株の選抜には、エリスロシン B (別名：食用赤色 3 号) という赤色素を含有した培地を使用した。この色素は、細胞膜の溶質透過に関連する酵素である H⁺-ATPase の活性を阻害することが報告されている³⁾ため、この色素を含有した培地上で赤く染まるような菌株を選び出すことによって、細胞膜の透過性に何らかの変化が生じた変異株の選抜を試みるものである。SK201-1-5 および SK201-1-11 について 1.5%、30 分の条件で EMS 処理した後、得られた YPD 培地上の約 6000 個のコロニーをエリスロシン B 含有培地にレプリカし、その中からエリスロシン B 含有培地で赤く染まる 38 個を変異株として分離した。SK201-1-5 由来の変異株 15 株については、EB201~EB215、SK201-1-11 由来の 23 株については、EB301~EB323 と命名した。各変異株について、エリスロシン B に対する染色性を調査するため、エリスロシン B 含有培地に接種した。その結果、変異株の中でも EB201、EB305、EB320 の 3 株が最も赤く染まることが判明した。

3.3 変異株の交雑、育種

今回の EMS による変異処理では、複数の遺伝子にランダムに突然変異が起こっていると考えられ、その結果、実際に清酒の醸造を行った場合に、アルコール発酵などの醸造特性が低下することが懸念された。そこで、DNA の相同組換えによる変位箇所の分散化を図るために、変異株と親株の交雑を行った。変異株の中から、エリスロシン B 含有培地上で最も赤く染まる EB201、EB305、EB320 を使用し、接合型の違いを利用して交雑させた。分離した親株との交雑株をそれぞれ、EB111、EB112、EB113 と命名した。これらの交雑株は、いずれもエリスロシン B 含有培地上で菌体が赤く染まらなかった。このことから、これら変異株の表現型は劣性であると考えられた。

次に、得られた交雑株 EB111、EB112、EB113 を孢子形成培地に接種して子のう胞子を形成させ、ランダム孢子分離法によってそれぞれの一倍体を取得した。その中から、エリスロシン B 含有培地上で赤く染まる株を選抜し、EB201 由来の一倍体を EB401 ~ EB411、EB305 由来の一倍体を EB421 ~ EB428、EB320 由来の一倍体を EB441 ~ EB451 と命名した。

孢子分離した一倍体の醸造特性を調べるために、麹汁培地を使用して 15 で 21 日間、発酵試験を行った。その結果を Table 3 に示す。炭酸ガス減量は、EB201 の 1.17g に対し、EB401 ~ EB411 は 1.00 ~ 1.66g であった。また、EB305 の 1.13g に対し、EB421 ~ EB428 は 0.98 ~ 1.62g、EB320 の 1.01g に対し、EB441 ~ EB451 は 0.70 ~ 1.38g であった。いずれの場合も、交雑・孢子分離によって発酵力の回復した株が得られたことがわかった。

孢子分離により得られた一倍体を使用して、清酒の醸造に用いるための二倍体の作製を行った。発酵試験の結果から、発酵力が比較的高く、酸度、アミノ酸度に若干の特徴が見られる株を選び、選んだ株同士で交雑を行った。また、本研究で行った変異酵母の育種プログラムを Fig.1 にまとめた。

以上のように作製した二倍体の中から、最終的に、EB121、EB122、EB125、EB127、EB111 の変異株 5 株を選抜し、対照としての SK201-1、協会酵母(K701)とともに以降の清酒醸造試験等に使用することにした。

3.4 変異株の性質の検討

得られた変異二倍体の諸性質を検討するために、TTC 染色性、および YPG 培地での生育について調査した(Table 4)。TTC 染色性は、K701 が赤色であるのに対し、変異株はいずれもそれより色が薄く、EB121 と EB125 が赤とピンクの中間色、EB122 と EB127 がピンク色、EB111 がピンクと白色の中間色であった。また、いずれの株も YPG 培地に生育することから、これら変異株は呼吸欠陥株()ではないことを確認した。

Table 3. Analysis of koji extract medium with mutant strains after fermentation test.

Strain	CO ₂ evolution (g)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)
EB201	1.17	3.0	4.1
EB111	1.46	3.7	3.8
EB401	1.23	3.5	4.1
EB402	1.53	3.1	4.0
EB403	1.66	3.5	3.9
EB404	1.08	2.9	4.3
EB405	1.23	2.9	4.2
EB406	1.56	3.0	3.9
EB407	1.16	2.9	4.2
EB408	1.21	2.6	4.0
EB409	1.00	2.6	4.4
EB410	1.44	3.6	4.0
EB411	1.48	3.5	3.8
EB305	1.13	3.2	4.1
EB112	1.29	3.6	3.9
EB421	1.27	3.7	3.7
EB422	0.98	3.1	4.1
EB423	1.21	3.2	3.9
EB424	1.62	3.1	3.9
EB425	1.37	3.5	4.0
EB426	1.61	3.6	3.8
EB427	1.15	2.7	4.2
EB428	1.12	3.1	4.1
EB320	1.01	3.0	4.0
EB113	1.27	3.4	4.1
EB441	0.91	2.8	4.1
EB442	1.23	2.9	4.2
EB443	0.70	2.9	4.3
EB444	0.83	3.5	4.0
EB445	1.38	3.5	4.2
EB446	0.85	3.0	4.2
EB447	0.82	2.9	4.0
EB448	1.17	3.1	3.8
EB449	0.76	2.6	4.2
EB450	0.73	2.5	4.2
EB451	1.02	2.7	4.2
SK201-1-5	1.62	3.4	3.9
SK201-1-11	1.20	3.4	4.2

Table 4. Characteristics of mutant strains.

Strain	Stainability		Growth YPG
	Erythrosin B	TTC	
EB121	Red	PR	+
EB122	Red	Pink	+
EB125	Red	PR	+
EB127	Red	Pink	+
EB111	White	PW	+
SK201-1	White	Pink	+
K701	White	Red	+

+ : good growth

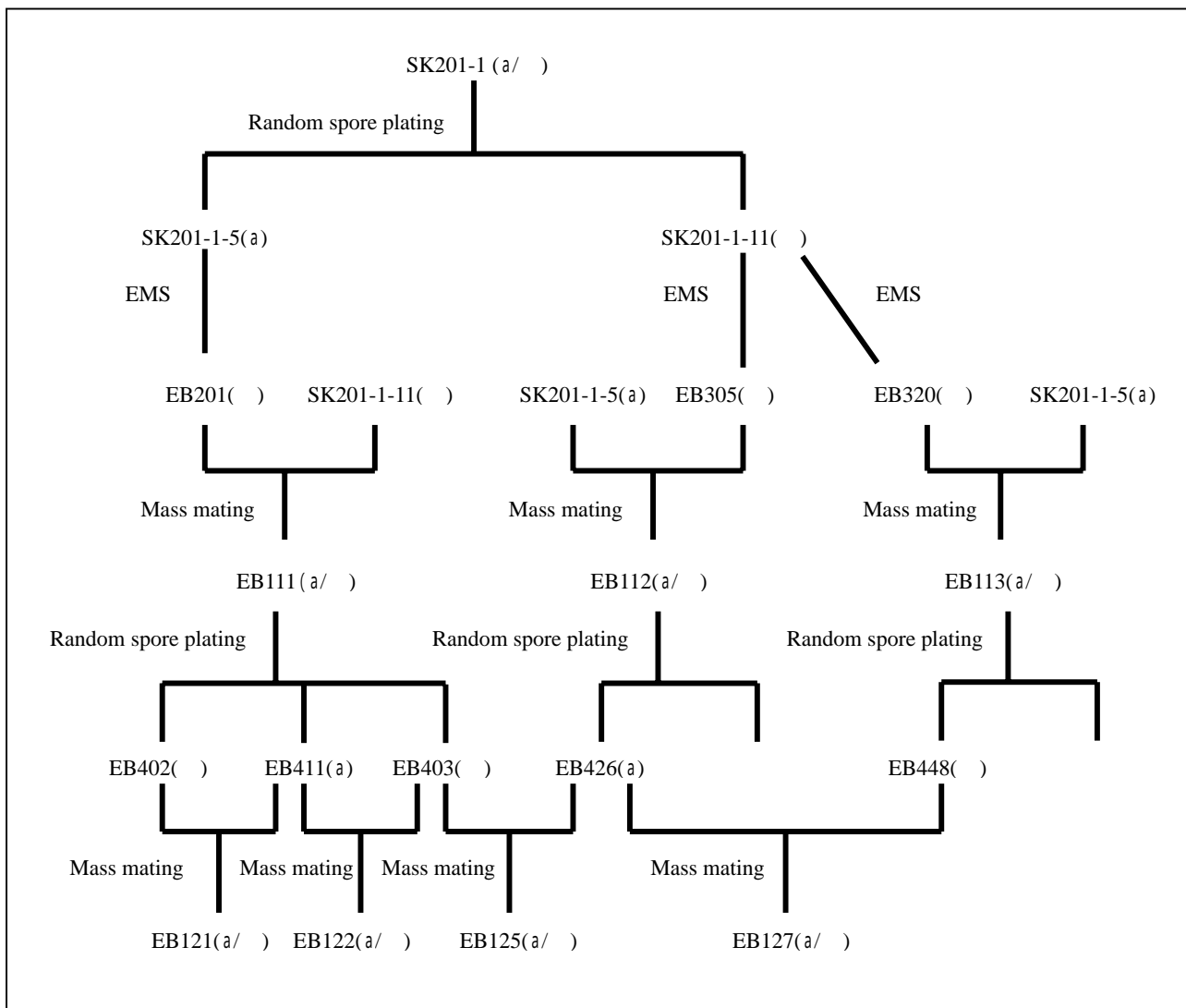


Fig.1. Program of breeding for sake yeast in this study.

Table 5. Analysis of sake brewed with parent and mutant strains.

Strain	Alcohol (%)	Acidity (ml)	Amino acidity (ml)	pH	Sake meter	Glutamic acid (mg/L)	Citric acid (mg/L)	Pyruvic acid (mg/L)	Malic acid (mg/L)	Succinic acid (mg/L)	Lactic acid (mg/L)	Acetic acid (mg/L)
EB121	18.6	3.3	2.5	4.3	-8.8	283	90	40	348	562	677	145
EB122	19.4	2.8	3.0	4.4	-0.3	317	84	30	290	592	625	151
EB125	17.1	2.7	4.1	4.6	-25.0	503	89	51	164	415	603	256
EB127	17.7	3.2	2.7	4.4	-17.8	297	82	43	361	556	700	148
EB111	18.5	3.6	2.6	4.3	-12.5	241	80	42	438	595	709	238
SK201-1	19.4	3.1	2.4	4.4	-5.9	230	74	39	312	596	681	171
K701	18.9	2.4	3.7	4.6	-3.0	461	81	30	248	678	566	82

3.5 清酒小仕込試験

実際の清酒醸造時における変異株の特徴を調査、検討するために、総米 2kg の清酒小仕込試験を行った。発酵後得られた清酒についての分析結果を Table 5 に示す。アルコールは、EB122 が 19.4% と最も高かったが、EB125 と EB127 はそれぞれ 17.1%、17.7% と発酵力が低いことがわかった。EB125 は酸度が 2.7 と低く、逆にアミノ酸度が 4.1 と最も高かった。旨味成分であるグルタミン酸についても、EB125 が 503 mg/L と最も高かった。次に、得られた清酒の有機酸分析結果を Table 6 に示す。EB125 はリンゴ酸が 164 mg/L、コハク酸が 415 mg/L と他の菌株よりも低いことがわかった。

以上のことから、変異株の中でも EB125 は発酵力がやや劣るものの、その生産する有機酸やアミノ酸に特徴を持った株であることが認められた。

一方で、EB125 は、麹汁培地による発酵試験では、有機酸やアミノ酸の生産性に特徴が見られなかった（データ示さず）ことから、清酒もろみという特殊な環境が、ある特定の遺伝子の発現に影響を与えたのかもしれない。EB125 による清酒醸造において、どの遺伝子が関与しているかということや、細胞膜の透過性との関連性は今のところ不明であり、それらを解明するにはさらなる検証が必要であろう。

4. 結言

変異処理により、生産する有機酸やアミノ酸の組成に特徴を有する酵母を育種し、特徴ある清酒の開発について検討した。

最初に、当センター所有酵母の SK201-1 由来の一倍体 2 株を使用して、EMS による変異処理を行い、エリスロシン B 含有 YPD 培地上で菌体が赤く染まる 38 株を変異株として取得した。次に、変異株と親株の交雑、育種を行い、変異箇所分散化を図ることによって醸造特性の回復を試みた。さらに、発酵力の回復した変異株同士を交雑させ、清酒の醸造に用いるための二倍体を取得し、最終的に清酒小仕込試験に用いる 5 株を選抜した。清酒小仕込試験の結果、EB125 は親株に比べて、発酵力がやや劣るものの、リンゴ酸やコハク酸が低く、逆に旨味成分であるグルタミン酸が高いことから、特徴を持った株であることがわかった。

参考文献

- 1) <http://www.nta.go.jp/category/press/press/alc13/05.htm>
- 2) <http://www.nta.go.jp/category/kenkyu/syurui/06/setumei/05a.htm>
- 3) Achim WACH, Peter GRABER: *European Journal of Biochemistry*, 201, 91 ~ 97 (1991)
- 4) Marc Bonneau Marc Crouzet, Maria Urdaci, Michel Aigle: *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 193, 225 ~ 230 (1991)
- 5) 北本勝ひこ：醸協, 84, (1) 34 ~ 37 (1989)
- 6) 松沢一幸, 山下浩一, 山中信介：奈良工試研報, 18, 28 ~ 35 (1992)
- 7) (財)日本醸造協会：第 4 回改正国税庁所定分析法注解 (2000)
- 8) 大矢禎一：醸協, 84, (11) 774 ~ 779 (1989)