

鹿児島酵母の香気成分高生産株の育種

上村芳三, 今村恵, 下田雅彦*, 幡手泰雄

(受理 平成3年5月31日)

Breeding of strains having high aroma compound productivity by mutagenesis of Kagoshima Yeast

Yoshimitsu UEMURA, Megumi IMAMURA, Masahiko SHIMODA*
and Yasuo HATATE

Breeding of strains having high aroma compound (β -phenethylalcohol) productivity was carried out by a mutagenesis of Kagoshima Yeast. Growth rates of the mutants were about a half to the same as that of the wild strain (Kagoshima Yeast). Some mutants produced larger amounts of β -phenethylalcohol than 10 times of that of the wild strain. The maximum factor was 23.

緒言

焼酎の香りは酒質の重要な要素の1つであり、従って香気成分の制御は酒質制御の重要な部分を占める。鹿児島県の特産品である甘藷焼酎に関しては、香気成分の由来は下記のように大別できる^{1,2)}。

物質群	由来
モノテルペンアルコール類	甘藷中のモノテルペンアルコール類配糖体が麴の生産する β -グルコシダーゼにより加水分解され、生成
モノテルペンアルコール以外のアルコール、エステル等	酵母の代謝産物(例： β -フェネチルアルコール)

甘藷焼酎の特徴臭は、前者のモノテルペンアルコールであり、芳香物質の代表的なものに、酵母の代謝産物の一つである β -フェネチルアルコールがある。 β -フェネチルアルコールは、バラのような香りを持ち、甘藷焼酎以外にも様々な酒類に含まれている。代表的な例としては、清酒(70ppm)、ビール(20ppm)、ワイン(50ppm)、ウイスキー(15ppm)、ブランデー(5ppm)が挙げられる。Akitaら³⁾は、清酒用酵母協会7号の β -フェネチルアルコール高生産株を育種する方法と

してアナログ耐性株の取得を報告した。図1³⁾にそれに関係する酵母の調節系を示す。

本研究においては、突然変異株をスクリーニングすることにより、 β -フェネチルアルコール高生産能株を育種することを目的とした。具体的には、突然変異誘発剤であるエチルメタンсульフォネート(以下EMSと略す)によって焼酎酵母である鹿児島酵母に変異処理を施した後、フェニルアラニンのアナログであるP-フルオロフェニルアラニンの耐性株を分離することにより、 β -フェネチルアルコール高生産株の育種を試みた。

1. 実験

1.1 培地

本研究においては、表1に示すような培地をその目的に応じて使用した。

1.2 スクリーニング実験

1.2.1 変異処理及び1次スクリーニング

鹿児島酵母をスラントから1白金耳とり、綿栓付き試験管中の5mlのYCB培地に接種し、30℃で24時間振とう培養した。その後、遠心分離(3000rpm×5min)により集菌し、滅菌水10mlを注いだ。これを再び遠心分離し、菌体を0.2gのグルコースを含む0.1Mのリン酸バッファー溶液10ml中に懸濁した。EMS

*：三和酒類株式会社

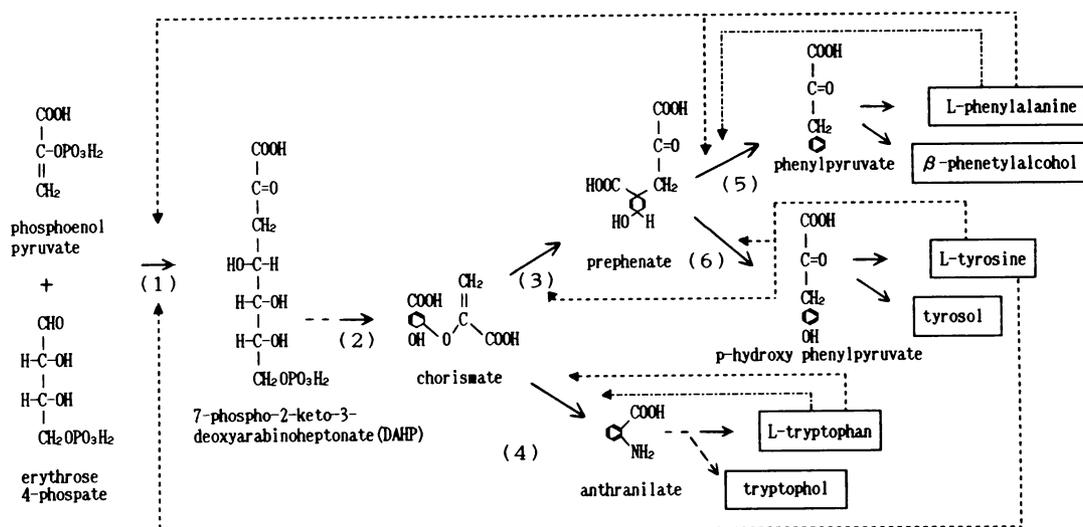


図1 *S. cerevisiae* における芳香族アミノ酸の生合成調節系
 (-----阻害、- - -抑制、(1) DAHP synthetase, (2) chorismate syntase, (3) chorismate mutase, (4) anthranilate synthetase, (5) prephenate dehydratase, (6) prephenate dehydrogenase)

表1 培地組成

培地名	組成
YCB 培地	1.17% yeast carbon base (Difco) 0.50% casamino acids (Difco)
フェニルアラリンを含む YCB 培地	1.17% yeast carbon base (Difco) 0.33% L-phenyl- α -alanine 2.0% glucose
p-FPA プレート	0.67% yeast nitrogen base (Difco) 2.0% glucose 2.0% agar 0.5mg/ml p-fluorophenylalanine (SIGMA)
YEP 培地	1.0% yeast extract (Difco) 2.0% glucose 2.0% tryptone (Difco)
発酵力試験用 YCB 培地	1.17% yeast carbon base (Difco) 0.5% casamino acids (Difco) 15.0% glucose
菌株保存用 スラント培地	1.0% yeast extract (Difco) 2.0% tryptone (Difco) 2.0% glucose 2.0% agar

を0.3ml加え30℃で45分間振とうした後、EMSの中和のために5% Na₂S₂O₃溶液10mlを加えた。10分間放置し、菌体を2回洗浄後、10mlの滅菌水中に懸濁した。その液を100倍に希釈して0.3mlずつp-FPAプレート上にコンラージ棒とターンテーブルを使用してひろげた。このプレートを30℃で2週間インキュベートした。

1. 2. 2 2次スクリーニング

2週間のインキュベート後、p-FPAプレート上に生育したコロニーから1白金耳をとり、綿栓付き試験管中の5mlのフェニルアラニンを含むYCB培地に接種した。30℃に保ったインキュベーター中で2日間静置培養し、増殖したものをp-FPA耐性変異株とした。

1. 2. 3 3次スクリーニング

1) 増殖力試験

綿栓付き試験管中の5mlのYEP培地にp-FPAプレート上のコロニーから1白金耳を接種した。30℃に保ったインキュベーター中で2日間静置培養した（前培養）。シリコ栓付きの三角フラスコ中の100mlのYEP培地に前培養液を2ml接種した。30℃のインキュベーター中で12時間静置培養し、1時間毎に菌体密度を測定した。

2) 発酵力試験

増殖力試験と同じ条件で前培養を2日間行い、シリコ栓付きの三角フラスコ中の100mlのYCB培地に前培養液を2ml接種した。30℃のインキュベーター中で9日間静置培養し、フラスコ重量と菌体密度を毎日

測定した。その際、培養液中の菌体の濃度が均一になるようにフラスコを軽くふった。3、6及び9日後の培養液上清をガスクロマトグラフにより分析し、エタノールとβ-フェネチルアルコールを定量した。グルコース測定試薬を用いて残存グルコース量の定量も行った。

3次スクリーニングでは比較の対象として鹿児島酵母を必ず入れた。

1. 3 分析方法

1. 3. 1 菌体密度の測定

試料0.3mlを2.7mlの生理食塩水で10倍に希釈し、660nmにおける吸光度を分光光度計（日本分光UV1DEC α-1型）で測定した。

1. 3. 2 培養液上清のエタノール及び微量成分の分析

採取した培養液を3000rpmで5分間遠心分離した後、その上清と内部標準物質を混合し、ガスクロマトグラフにより分析した（試料量1μl）。詳細な条件を表2に示す。

2. 結果と考察

2. 1 1次及び2次スクリーニングの結果

1次及び2次スクリーニングは合計3回実施した。1次スクリーニングでは合計48の変異株が残り、2次スクリーニングでは1次スクリーニングに残った計48

表2 ガスクロマトグラフによる分析の条件

ガスクロマトグラフ カラム	GC-9A（島津製作所） ガラスキャピラリーカラム HP Fused Silica Capillary Column Ultra #2 Crosslinked 5% Phenyl Methyl Silicone
エタノールの分析	
内部標準物質	酢酸エチル
カラム温度 (initial)	40℃ (7 min)
(final)	40℃
インジェクション温度	250℃
内部標準物質使用量	試料 2 ml に対し 0.2 ml
β-フェネチルアルコール及びその他の微量成分の分析	
内部標準物質	カプリン酸メチル (0.44wt%)
カラム温度 (initial)	40℃ (8 min)
(final)	210℃
昇温速度	10℃/min
インジェクション温度	250℃
内部標準物質使用量	試料 2 ml に対し 0.4 ml

の変異株のすべてがコロニーを形成し、p-FPA耐性変異株であることがわかった。鹿児島酵母のEMS変異処理後の生存率は23%であった。また変異処理後の酵母のp-FPA耐性変異株の出現率は 2.9×10^{-3} %であった。つまり鹿児島酵母にEMS変異処理を施してp-FPAプレート上に耐性変異株を得る確率は、 6.7×10^{-4} %であった。Akitaら³⁾は、清酒用酵母協会7号について同様な操作を行った結果、EMS処理生存率として57%、p-FPA耐性株分離率として 2.2×10^{-5} %を報告した。

2.2 3次スクリーニングの結果

2.2.1 増殖力試験の結果

増殖力試験は、2.1で得られた48の耐性株のうち、2次スクリーニングのプレート上のコロニーが極めて小さいもの17を除いて計31の株について行った。増殖力試験は、計5回実施し、その結果を最大比増殖速度として表3にまとめた。増殖パターンの典型例を図2及び3に示す。これらは第5回目の増殖力試験の結果をプロットしたものである。図の横軸は時間、縦軸は培養液濁度(660nm)である。5回の増殖力試験の結

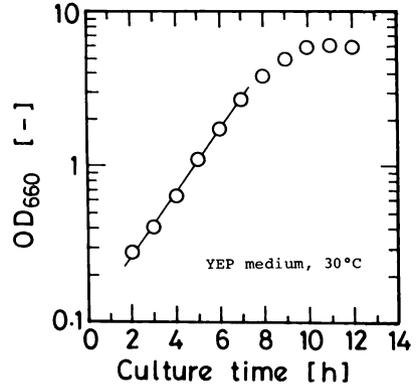


図3 比増殖速度を決定するためのプロット (鹿児島酵母)

表3 増殖力試験の結果

株名	μ_{max} [hr ⁻¹]				
鹿児島酵母	0.46	0.37	0.46	0.44	0.45
KY1-1	0.41			0.38	
KY1-2	0.37			0.40	
KY1-3	0.37		0.38		
KY2-1		0.34		0.41	
KY2-2		0.34		0.36	
KY2-3		0.31		0.37	
KY2-4		0.32		0.44	
KY2-5		0.29		0.30	
KY2-6		0.32		0.37	
KY2-7		0.20		0.19	
KY2-8		0.35		0.33	
KY2-9		0.29			
KY2-10			0.14		
KY2-11			0.29		
KY2-12			0.10		
KY2-13			0.07		
KY2-14			0.07		
KY2-15			0.29		
KY2-16			0.05		
KY2-17			0.29		
KY3-2				0.33	
KY3-3				0.29	
KY3-5				0.40	
KY3-6				0.39	
KY3-8				0.32	
KY3-9				0.42	
KY3-14				0.32	
KY3-18				0.40	
KY3-19				0.32	
KY3-24				0.29	
KY3-25				0.44	

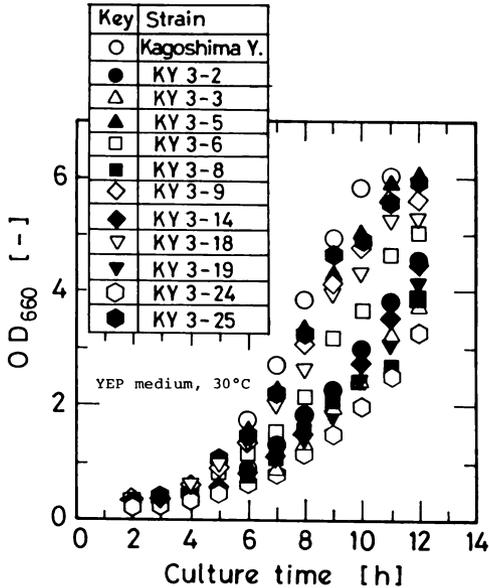


図2 増殖力試験の結果 (菌体密度と時間との関係、第5回目)

果、何れの回でも図2の様なパターンを示し、鹿児島酵母の増殖が最も早かった。図3に鹿児島酵母の場合の片対数プロットを示す。この直線部分が対数増殖期であり、この直線の傾きから、以下の式に従い、表3に示す最大比増殖速度を求めた。

$$x_t = x_0 \exp(\mu t) \quad (1)$$

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (2)$$

ここで、 x_0 は菌体の初発濃度、 x_t は菌体の培養t時間後の濃度である。表3に示す結果から、変異株の最大比増殖速度は、鹿児島酵母のそれと比べると1/2からほぼ同等であることがわかる。

2. 2. 2 発酵力試験の結果

表4に発酵力試験の結果を示す。エタノールの生成量に大きな差は無かった。物質収支からは、グルコースのほとんどがエタノールに変換されたことがわかった。 β -フェネチルアルコールの生産力は、元株と同等のものから約23倍におよぶものまで様々であった。元株の10倍以上の β -フェネチルアルコール生産力を持つものは6株であった。

表4 発酵力試験の結果

株名	培養液中エタノール濃度 [wt%]	培養液中の β -フェネチルアルコール濃度 $\times 10^3$ [wt%]
鹿児島酵母	7.67	3.29
KY1-1	7.68	11.0 (3.3倍)
KY1-2	7.80	18.9 (5.7倍)
KY1-3	7.71	22.6 (6.9倍)
KY2-1	7.55	42.6 (12.9倍)
KY2-2	7.67	12.6 (3.8倍)
KY2-3	7.67	22.0 (6.7倍)
KY2-4	7.69	49.2 (15.0倍)
KY2-5	7.75	32.0 (9.7倍)
KY2-6	7.58	29.3 (8.9倍)
KY2-8	7.85	25.4 (7.7倍)
KY2-11	7.54	3.87 (1.2倍)
KY2-15	7.68	3.70 (1.1倍)
KY2-17	7.67	3.72 (1.1倍)
KY3-2	6.79	75.5 (22.9倍)
KY3-3	6.61	3.80 (1.2倍)
KY3-5	6.38	5.45 (1.7倍)
KY3-6	6.72	29.8 (9.1倍)
KY3-8	7.03	53.7 (16.3倍)
KY3-9	7.02	31.4 (9.5倍)
KY3-14	7.04	6.18 (1.9倍)
KY3-18	7.04	52.3 (15.9倍)
KY3-19	8.02	11.7 (3.6倍)
KY3-24	7.35	61.9 (18.8倍)
KY3-25	6.64	5.09 (1.5倍)

結 言

鹿児島酵母の変異処理による香気成分高生産株の育種を行い、以下の結果を得た。

1) 親株である鹿児島酵母に比べ、 β -フェネチルアルコールの生成量が多い変異株が得られ、そのなかで最高のもは、鹿児島酵母の23倍の β -フェネチルアルコールを生成した。

2) 比増殖速度は、鹿児島酵母の同等から1/2程度であった。

本研究により、このような香気成分高生産株の利用あるいは新種酵母の育種により新しい品質の焼酎が作り出される可能性が示された。

引用文献

- 1) 太田剛雄：醸造協会誌，86，250 (1991)。
- 2) 柄倉辰六郎：“酵母のバイオサイエンス”，p.107，学会出版センター (1990)。
- 3) Akita, O., T.Ida, T.Obata and S.Hara: J.Ferment. Bioeng., 69 (2), 125 (1990)。