清酒もろみからの多酸性清酒酵母の 分離とその特性

大場孝宏^{1*}・末永 光¹・一松時生¹・羽田野雄大²・満生慎二²・鈴木正柯³(¹福岡県工業技術センター生物食品研究所・²九州産業大学・³福岡県酒造組合)

平成 20 年 4 月 28 日受理

Isolation and Characterization of a High Acid-
Producing Yeast Strain from *Sake*-mash obtained
from *Sake* Breweries.

Takahiro OBA¹, Hikaru SUENAGA¹,Tokio ICHIMATSU¹, Yudai HATANO²,Shinji MITSUOKI², and Masae SUZUKI³

(¹Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka
Industrial Technology Center, Aikawa-machi
1465-5, Kurume, Fukuoka 839-0861, Japan.

²Department of Applied Chemistry and Biochemis-
try, Kyushu Sangyo University, 2-3-1, Matsukadai,
Higashi-ku, Fukuoka, 813-8503, Japan.

³Sake Brewer's Association of Fukuoka Prefecture,
1-24-36, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka,
812-0054, Japan)

We isolated a sake yeast from sake mash unique for its organic acid productivity throughout five years of brewing. Results were that 9 strains, which showed the high productivity of malate over 2 times than the parent, were obtained from sake mash using the K9 derivative strain. The resistance to cycloheximide and dimethyl succinate was similar to the parental strains, and the assimilation of maltose and glycerol fell in comparison with the parent. The high malate-producing strains obtained exhibited lower acetate productivity than the parent. Thus, we proposed the following mechanism for acquiring high malate-production: During the fermentation period, sake yeast was mutated in order to activate the malate biosynthetic pathway from acetyl-CoA made from the acetate and glyoxylate, and then the high malate-producing yeast acquired malate high productivity.

Key words: 清酒酵母 (sake yeast), リンゴ酸

(malate), 清酒もろみ (sake mash)

緒 言

酒質の多様化を目的として、有機酸生産性が変化した清酒酵母の開発が盛んに行われている。リンゴ酸高生産性酵母の開発に関しては、相川ら¹⁾がジメチルコハク酸感受性株より、また吉田ら²⁾がシクロヘキシミド耐性株より分離を行ったことが報告されている。2つの有機酸の生産性を増大させた例として浅野らが α -ケトグルタル酸耐性株よりコハク酸とリンゴ酸高生産株の分離を行ったこと³⁾及び栗田らがリンゴ酸と乳酸高生産株の分離を行ったこと⁴⁾を報告している。以上の例は変異処理により行われている。自然突然変異を利用した酵母の開発に関しては、水野ら 2-デオキシグルコース耐性株よりリンゴ酸高生産酵母の分離⁵⁾を、また宮岡らが清酒もろみからの多酸性酵母の分離⁶⁾を報告している。清酒もろみからの酵母分離は変異処理等を行わないため、優良形質の欠損の可能性が低いと考えられる。我々も低アルコール清酒用の酵母開発を目的とし、清酒もろみからさわやかな酸味を有するリンゴ酸の生産性が増大した酵母の取得を行い、前報で報告した⁷⁾。

そこで今回我々は同様の手法を用い、清酒もろみからコハク酸、リンゴ酸、乳酸等の有機酸の生産が変化した自然突然変異した株の分離に取り組んだ。その結果、清酒もろみからリンゴ酸を高生産する酵母のみが、しかも協会 9 号系酵母からのみ得られたので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

福岡県内酒造メーカーの平成 12 から 16 酒造年度清酒もろみから分離した 763 株を用いた。また、協会 7 号酵母 (K 7) 及び協会 9 号酵母 (K 9)、協会 901 号酵母 (K 901)、熊本酵母 (KA-1) 及び KA-1 系自社分離株を対照として用いた。

2. 発酵試験による有機酸生産性に特徴のある酵母の選抜

採取した清酒もろみを滅菌水により適宜希釈した後、YM プレート (0.3%酵母エキス, 0.3%麦芽エキス, 0.5%ペプトン, 1%グルコース, 2%寒天) に塗布し、30°C, 3 日間培養を行った。生育してきた株をそれぞ

れ 30 ml の麴エキスを培地（ボーメ 7）に一白金耳接種し、20°C、3 日間静置培養後、遠心分離を行い、上清中の有機酸濃度を測定し、対照酵母よりコハク酸、リンゴ酸、乳酸の生産量の多い株を選抜した。

3. 清酒の小仕込試験

清酒の小仕込試験の仕込配合は総米 300 g、麴歩合 20%、汲水歩合 140%で行った。麴米には乾燥麴（徳島金長(株)製 TG-50）を使用し、掛米には α 化米（徳島金長(株)製 AA-50）を用いた。供試酵母は麴エキス（ボーメ 7）10 ml に酵母を植菌し、30°C、2 日間培養後、酒母として使用した。添仕込、踊の温度は 12°C、仲及び留仕込はそれぞれ 9°C 及び 7°C で行い、1 日あたり 1°C 温度を上昇させて最高温度を 13°C とし、その後 13°C 一定で発酵させ、留添後、21 日目に上槽した。上槽は 5,000 g で 15 分間遠心分離により行った。

4. 製成酒の一般成分分析

製成酒の一般成分分析は、国税庁所定分析法（第四回改正）⁸⁾ に従った。

5. 製成酒の有機酸分析

製成酒の有機酸分析は、高速液体クロマトグラフィー（島津有機酸分析システム、使用カラム：Shim-pack SCR-102 H）で行った。

6. 菌学的性質

シクロヘキシミドへの耐性試験は 0.5 ppm シクロヘキシミドを含有した YM 寒天培地での生育状況で判定した²⁾。また、ジメチルコハク酸への耐性試験は 1.5% ジメチルコハク酸を含有した YPD 寒天培地での生育状況で判定した¹⁾。マルトース資化性及びグリセロール資化性試験は Asano らの方法⁹⁾を参考にした。すなわち、供試株を 30°C でマルトース最少培地 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% マルトース, 2% 寒天) あるいはグリセロール最少培地 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% グリセロール, 2% 寒天) において 3 から 7 日間培養し、生育状況を観察した。

結果及び考察

1. 清酒もろみからの有機酸の生産性に特徴のある酵母の選抜

我々は、5 酒造年度にわたり清酒もろみからの有機酸の生産性に特徴のある酵母の分離を行った。まず、清酒もろみを寒天培地に接種し生育してきたコロニー

を取得した。その際に酵母とそれ以外の微生物は形態で区別した。1 種類のもろみから 10 株をめどに酵母菌株の取得を行った。なお、取得した菌株が麴汁での発酵試験において生育が極めて悪い場合は酵母ではない可能性が高いため、取得菌株から削除した。K 7 系酵母を使用した 30 種類の清酒もろみから合計 240 株の酵母を取得し、それらを用いて麴汁による発酵試験を行った結果、親株の K 7 酵母に対してリンゴ酸の高生産性を示す 17 株が得られたが、清酒の小仕込試験を行った結果、親株の K 7 酵母に対してリンゴ酸あるいはコハク酸、乳酸の高生産性を示す株は得られなかった（データは示さない）。一方、K 9 系酵母を使用した 75 種類の清酒もろみから合計 523 株の酵母を取得し、それらを用いて麴汁による発酵試験を行った結果、親株の K 9 系酵母に対してリンゴ酸の高生産性を示す 39 株が得られた。39 株について清酒の小仕込試験を行った結果、親株の K 9 系酵母に対して 2 倍以上のリンゴ酸の高生産性を示す株が合計 9 株得られた（Table 1）。これらリンゴ酸高生産 9 株及び K 7、K 9、K 901、KA-1 について、TTC 染色性及び β -アラニン培地での生育性を検討した。リンゴ酸高生産 9 株はすべて TTC 染色性が+であり、麴や蔵内などからの野生酵母の混入ではないと考えられる。また β -アラニン培地での生育性が+であり、K 7 由来ではないと考えられる。したがって、リンゴ酸高生産 9 株は K 9 系酵母の変異株であることが示唆された。Table 1 にこれら 9 株の親株名、採取もろみ日数、清酒の小仕込試験より製造した清酒の一般成分、有機酸組成を示す。得られたリンゴ酸高生産株の採取もろみ日数からいづれももろみ中期から末期で得られていることがわかる。得られたリンゴ酸高生産株は、KA-1 系自社株から 2 株、K 901 から 7 株得られた。ただし、15 BY 14-3、15 BY 14-5、15 BY 14-6、15 BY 14-7、15 BY 14-9 は同一もろみ由来であるので、もろみの種類としては 3 種類である。15 BY 14-3、15 BY 14-5、15 BY 14-6、15 BY 14-7、15 BY 14-9 が得られたもろみからは 10 株中 5 株がリンゴ酸高生産株であり、きわめて高頻度にリンゴ酸高生産株が得られている。また、すべての株の酢酸生産量は親株に比べて半分以下である。リンゴ酸高生産株 9 株すべての香気成分の生産性は親株と同程度であった。

Table 2 に各酒造年度の処理もろみ数と得られたリ

Table 1 Analysis of sake fermented with high malate-producing strains on 300 g-scale brewing

Strains	Parental strain	Sampling period from sake mash	Ethanol (%)	Sake meter	Total acidity	Amino acidity	Malate (ppm)	Succinate (ppm)	Lactate (ppm)	Citrate (ppm)	Pyruvate (ppm)	Acetate (ppm)
K 901	KA-1 derivative		18.5	-2	2.6	1.7	261	567	715	85	86	96
KA-1			18.0	-6	2.6	1.7	203	485	637	76	165	171
12 BY 24-2	KA-1 derivative	30	18.4	-3	2.8	1.8	354	583	632	63	61	157
15 BY 14-3			18.0	-6	3.1	1.7	597	590	385	88	92	53
15 BY 14-5	K 901	15	18.4	-4	3.4	1.7	709	648	679	84	125	32
15 BY 14-6	K 901	15	18.6	-6	3.3	1.7	701	591	766	89	225	34
15 BY 14-7	K 901	15	18.5	-3	3.6	1.6	813	607	694	72	68	42
15 BY 14-9	K 901	15	18.5	-6	3.4	1.7	759	615	823	95	257	12
16 BY 4-6	KA-1 derivative	23	18.9	-4	3.6	1.9	841	656	796	88	152	47
16 BY 7-6			17.9	-5	3.0	1.1	567	407	750	66	257	54
16 BY 8-9	K 901	18	17.1	-8	3.2	1.1	819	542	718	61	67	43
	K 901	16	17.3	-9	3.4	1.0	852	638	701	67	116	41

Table 2 Comparison of treated sake mash using each parental strain

Brewery year	K 9	K 901	KA-1	KA-1 derivative
12 BY	7	0	5	4
13 BY	3	0	2	5
14 BY	0	0	0	3
15 BY	3	5	3	6
16 BY	3	2	2	10
Frequency ^a	0/16	3/7	0/12	2/28

^a Frequency is defined as numbers of sake mash obtaining high malate-producing strains/number of total sake mash.

ンゴ酸高生産株の頻度をまとめた。5 酒造年度の間に K 9 使用のもろみの 16 種類、KA-1 使用のもろみの 12 種類から分離を行ったが、リンゴ酸高生産株は得られなかった。KA-1 由来自社培養株からは 28 もろみのうち 2 もろみからリンゴ酸高生産株が得られている。K 901 使用のもろみからは、7 もろみのうち 3 もろみから得られていてかなり高頻度といえる。泡あり酵母である K 9 及び KA-1 から得られていない点、泡あり酵母である KA-1 由来自社培養株からの分離頻度は K 901 からのそれより低い点を考えると、K 901 の泡なし性がリンゴ酸高生産性獲得に影響しているのかもしれない。

2. 清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産株の特性

Table 3 に得られたリンゴ酸高生産株の菌学的性質を示す。リンゴ酸高生産株の分離の表現型として用いられているシクロヘキシミドへの耐性及びジメチルコハク酸への耐性は親株と同じであり、シクロヘキシミドへの耐性株あるいはジメチルコハク酸感受性株とは異なったメカニズムでリンゴ酸高生産性を獲得したと考えられる。また、KA-1 自社保存株由来である 12 BY 24-2 及び 16 BY 4-6 は親株と同等のマルトース資化性を有していたが、K 901 由来の 15 BY 14-3、15 BY 14-5、15 BY 14-6、15 BY 14-7、15 BY 14-9、16 BY 7-6、16 BY 8-9 はマルトースの資化性を有してないか弱いことがわかった。さらに、グリセロール資化性について、16 BY 4-6 はあるものの K 901 由来の 7 株及び 12 BY 24-2 はないことがわかった。したがって、K 901 由来の 7 株は Asano ら⁹⁾ が報告し

Table 3 Growth Characteristics

Strains	Cycloheximide (0.5 ppm) ^b	Dimethyl succinate(1.5%) ^b	Maltose minimal media ^b	Glycerol minimal media ^b
K 9	—	+	+++	+++
K 901	—	+	+++	+++
KA-1	—	+	+++	+++
KA-1 derivative	—	+	+++	+++
12 BY 24-2	—	+	++	—
15 BY 14-3	—	+	+	+
15 BY 14-5	—	+	+	+
15 BY 14-6	—	+	—	+
15 BY 14-7	—	+	+	+
15 BY 14-9	—	+	+	+
16 BY 4-6	—	+	+++	++
16 BY 7-6	—	+	—	+
16 BY 8-9	—	+	+	+

^b Growth was scored on a scale from +++>++>+>-after 3-7 d of incubation at 30°C

ているマルトース低資化性株と資化性においては同様な性質を有しているが、マルトース低資化性株のリンゴ酸生産量は親株の約7倍である点や酢酸の生産量から判断して、Asano らが報告しているマルトース低資化性株とは異なる性質を持った菌株と考えられる。12 BY 24-2 はマルトース資化性を有する点、16 BY 4-6 はマルトース及びグリセロール資化性を有する点で、マルトース低資化性株とは異なる菌株と考えられる。

3. 清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産株のリンゴ酸高生産性メカニズムの推定

我々は、本研究のリンゴ酸高生産株のリンゴ酸高生産性獲得メカニズムについて次のように考えた。Fig. 1 にリンゴ酸生成に関する代謝経路を示す。今回分離したリンゴ酸高生産株9株すべてが親株より酢酸生産量が低下している。したがって、清酒もろみから分離したリンゴ酸高生産株は酢酸から生成しアセチル-CoA とグリオキシル酸からリンゴ酸を生成する経路が活性化されるような変異がおきているため、リンゴ

Fig. 1 Biosynthetic pathway from glucose to malate

酸高生産性を獲得したのではないかと考えた。

今後は、リンゴ酸高生産株9株でマルトース及びグリセロール資化性に違いがある点も考慮し、親株とリンゴ酸高生産株のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びリンゴ酸シンターゼ活性や遺伝子の塩基配列の比較などを行い、さらなるリンゴ酸高生産性獲得メカニズムの解明を行いたい。

要 約

- (1) K9系酵母使用の清酒もろみから親株より2~3倍のリンゴ酸生産性を示す9株を取得した。アルコールの生成、ボーメの切れは親株と同等であり、9株ともに親株よりリンゴ酸を2~3倍生産し、酢酸の生産量は半分以下である。
- (2) K901使用のもろみからは、高頻度でリンゴ酸高生産株が得られた。
- (3) 得られたリンゴ酸高生産株について、シクロヘキシミドへの耐性及びジメチルコハク酸への耐性、またマルトース資化性及びグリセロール資化性を調べた結果、既に報告されている菌株と異なる性質を持っていると考えられる。
- (4) 分離したリンゴ酸高生産株すべてが親株より酢酸生産量が低下していることから、分離したリンゴ酸高

生産株では酢酸から生成したアセチル-CoAとグリオキシル酸からリンゴ酸を生成する経路が活性化されるような変異がおきているため、リンゴ酸高生産性を獲得したのではないかと推察される。

文 献

- 1) 相川元庸, 水津哲義, 市川英治, 川戸章嗣, 安部康久, 今安 聡: 発酵工学, **70**, 473-477 (1992)
- 2) 吉田 清, 稲橋正明, 中村欽一, 野白喜久雄: 醸協, **88**, 645-647 (1993)
- 3) 浅野忠男, 矢野駿太郎, 高倉 裕, 田村健一, 黒瀬直孝, 平松順一, 高橋康次郎: 醸協, **98**, 217-220 (2003)
- 4) 栗田 修, 中林 徹, 坪内一夫: 醸協, **93**, 555-561 (1998)
- 5) 水野昭博, 岩渕正文, 木曾邦明, 佐藤和夫, 高橋利郎: 醸協, **97**, 228-233 (2002)
- 6) 宮岡俊輔, 新谷智吉, 森本聡: 醸協, **96**, 115-120 (2001)
- 7) 大場孝宏, 野見山修治, 上田京子, 黒田理恵子, 鈴木正柯: 醸協, **99**, 878-881 (2004)
- 8) 注解編集委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法注解, 日本醸造協会 (1993)
- 9) Asano T, Kurose N, Tarumi S.: J. Biosci. Bioeng., **92**, 429-433 (2001)