β -(2-チエニル)アラニン耐性変異株からの
 β -フェネチルアルコール、酢酸 β -
 フェネチル高生産性清酒酵母の分離

蟻川幸彦・馬場 茂・近藤君夫

桑原秀明・吉川茂利・小栗 勇

(長野県食品工業試験場)

平成2年12月17日受理

Breeding of Sake-yeast Producing a Large
 Quantity of β -Phenethyl Alcohol and
 β -Phenethyl Acetate from β -(2-
 Thienyl)-DL-Alanine-resistant
 Mutants

Yukihiko ARIKAWA, Shigeru BABA, Kimio KONDO,
 Hideaki KUWABARA, Shigetoshi YOSHIKAWA
 and Isamu OGURI

(Nagano State Laboratory of Food Technology,
 205-1 Nisibanba, Kurita, Nagano-shi,
 Nagano-ken, 380)

Sake-yeasts (*S. cerevisiae*), which produced excellently β -phenethyl alcohol, were screened from β -(2-thienyl)-DL-alanine (THA)-resistant mutants. THA-resistant mutants produced in sake brewing about 4-fold amounts of β -phenethyl alcohol and β -phenethyl acetate compared with wild strains. These mutants produced a large quantity of tyrosol, whereas *p*-fluorophenylalanine (*p*-FPA)-resistant mutant produced only a little. In addition, THA-resistant mutants and *p*-FPA-resistant mutant were different in their tryptophol productivity and in effects of tyrosine on generation time and productivities of aroma compounds. From these reasons, THA-resistant mutants were seemed to be mutated in different point from *p*-FPA-resistant mutants. Practical applications of THA-resistant mutants to the production of various characteristic sake were expected.

Key words : β -フェネチルアルコール・清酒・酵母

緒言

清酒中に含まれる香気成分の β -フェネチルアルコールおよび酢酸 β -フェネチルは、バラ様香を有すること

で特異な成分として注目される。最近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 (*p*-FPA) 耐性酵母から、両成分を多量に生産する酵母を育成する試みがなされている^{1,2)}。

今回筆者らは、フェニルアラニンのアナログ、 β -(2-チエニル)アラニン (THA) 耐性株の中より、 β -フェネチルアルコールおよび酢酸 β -フェネチルを多量に生産する株を分離し、*p*-FPA 耐性株との若干の差異を見いだしたので報告する。

実験方法

1. 使用菌株、培地

協会7号 (K 7), 協会901号 (K 901), および協会10号 (K 10)

THA 培地 (0.67% Difco yeast nitrogen base W/O amino acid, 2% グルコース, 5 mg/ml β -(2-チエニル)-DL-アラニン, 1.5% 寒天), YCB 培地 (1.17% Difco yeast carbon base, 0.5% カザミノ酸, 15% グルコース), YNB 培地 (0.67% Difco yeast nitrogen base W/O amino acid, 15% グルコース)

2. 変異処理および発酵試験

EMS で変異処理後、THA 培地に塗布し 30°C で培養した。生じたコロニーを耐性株として分離し、YCB 培地で 25°C 9日間静置培養して、その発酵液中の β -フェネチルアルコール、酢酸 β -フェネチル、チロソールおよびトリプトフォール含量について、秋田らの方法³⁾に準じてガスクロマトグラフィーにより定量した。なお、カラムは OV-1 (ガスクロマト工業) を用いた。

3. 小仕込試験

難波らの方法⁴⁾に準じて総米 200 g で行った。15°C 一定温度で、留め後 17 日目に遠心分離により上槽した。

実験結果および考察

1. β -(2-チエニル)アラニン耐性株の分離と発酵試験

EMS 変異処理して得た K 7, K 901 および K 10 それぞれの THA 耐性株 20 株ずつを発酵試験に供した。発酵液中の β -フェネチルアルコール および チロソール含量の分布を Fig. 1 に示す。耐性株の中には、 β -フェネチルアルコールを親株の 10 倍程度生成する株が存在した。また β -フェネチルアルコール高生産株では、同時にチロソールを高生産する性質を持った株が多く得られた。

2. 小仕込試験

YCB 培地による発酵試験で β -フェネチルアルコール生産能の高かった耐性株 (K 7-T 5, K 901-T 12, K 10-T 7) を、それぞれの親株ならびに秋田らの方法³⁾により

Fig. 1 Relationship between concentrations of β-phenethyl alcohol and tyrosol in the liquors fermented with parents and THA-resistant mutants.

Symbols indicate parents (□), and THA-resistant mutants (■)

分離した *p*-FPA 耐性株 (K 901-P 2) を対照として小仕込試験を実施した。発酵経過は、協会 7 号の耐性株 K 7-T 5 が若干遅れただけで、他の耐性株については、親株とほぼ同一の経過を示し、得られた生成酒の一般成分についても差はなかった。生成酒の香氣成分分析結果を Table 1 に示す。β-フェネチルアルコール生成能は、親株に比べ K 901-T 12 で 4.2 倍、K 10-T 7 で 3.8 倍および K 7-T 5 で 3.7 倍と高い値を示した。しかし発酵試験で多量の β-フェネチルアルコールを生産した *p*-FPA 耐性株の K 901-P 2 では 2.5 倍程度であった。また酢酸β-フェネチルについては、K 10-T 7 で親株の 4.8 倍に生成量が増加した。さらに THA 耐性株では、チロソール生成量も最高 5.7 倍になった。官能的に THA 耐性株による試験酒は、含み香に特徴を持ち、味の面でも苦味成分であるチロソールが多いためか親株による試験酒と差異が認められた。今後これらの特徴を活かした清酒醸造条件の検討を進めたい。

3. THA 耐性株と *p*-FPA 耐性株の違いについて

THA 耐性株を用いた場合、YCB 培地による発酵試験よりも小仕込試験の方が β-フェネチルアルコール生成量が増大した。逆に *p*-FPA 耐性株では減少した。

今回発酵試験に用いた YCB 培地中のチロシンおよびフェニルアラニン濃度は、それぞれ 0.17 mM, 0.66 mM であり発酵経過と共に消費され減少した。一方、清酒もろみでは並行複発酵により常時アミノ酸の供給がなされ、チロシンおよびフェニルアラニン濃度は、両者とも約 0.5 mM から 1 mM にもろみ日数の経過に従い増加した。そこで培地中のアミノ酸量、組成の影響について検討した。Fig. 2-A に示したように、YNB 培地だけでは K 901-P 2 での生成が親株の 40 倍と最も高いが、チロ

Fig. 2 Effects of the addition of tyrosine, phenylalanine and both amino acids to YNB medium on concentrations of β-phenethyl alcohol (A), tyrosol (B) and tryptophol (C) in the liquors fermented with K 901, its THA-resistant mutant : K 901-T 12 and its *p*-FPA-resistant mutant : K 901-P 2.

Table 1 Aroma components in curde Sake.

(mg/l)

Strain	β-PheOH	β-PheOAc	Tyrosol	Tryptophol	<i>i</i> -AmOH	<i>i</i> -AmOAc
K 7	151 (30)	2.9	30 (7)	11 (trace)	247	7.2
K 7-T 5	553 (238)	9.5	119 (93)	33 (trace)	210	6.8
K 901	141 (22)	2.0	28 (5)	9 (trace)	229	5.7
K 901-T 12	596 (237)	9.0	161 (108)	27 (trace)	223	6.6
K 901-P 2	354 (1,130)	8.9	19 (trace)	38 (102)	240	10.4
K 10	153 (32)	3.0	49 (10)	13 (trace)	262	6.0
K 10-T 7	584 (339)	14.3	143 (162)	39 (trace)	195	8.8

β-PheOH, β-phenethyl alcohol ; β-PheOAc, β-phenethyl acetate ; *i*-AmOH, isoamyl alcohol ; *i*-AmOAc, isoamyl acetate () : Concentrations accumulated in the YCB medium.

シンを 1 mM 濃度で添加した培地では生成が抑制された。一方、K 901-T 12 では YNB 培地だけでは親株に比べ 16 倍量生産されたが、チロシンおよびフェニルアラニンの添加による抑制は認められない。従って THA 耐性株と *p*-FPA 耐性株の YCB 培地と小仕込試験での β-フェネチルアルコール生成量の違いは、両条件でアミノ酸組成と量が異なっていたことが原因であると考えられる。

さらに K 901-P 2 ではトリプトファンを高生産し、β-フェネチルアルコール同様その生産量はチロシンにより抑制を受ける (Fig. 2-C)。しかし K 901-T 12 ではチロソールを高生産し、チロシンによる抑制は受けない (Fig. 2-B)。またデータは示さないが、*p*-FPA 耐性株ではチロシンの含まない培地での増殖が親株の 1/2 に低下した。しかし THA 耐性株では同等であった。

以上の結果より THA 耐性株と *p*-FPA 耐性株では明らかに変異点が異なると考えられる。今後酵素活性の測定および変異遺伝子のクローニングにより変異点の特定を行うことを予定している。

要 約

1. 清酒酵母より分離した β-(2-チエニル)アラニン (THA) 耐性変異株は、小仕込試験で β-フェネチルアル

コールおよび酢酸 β-フェネチルを親株の 4 倍程度生成し、*p*-フルオロフェニルアラニン (*p*-FPA) 耐性株とは異なりチロソールも高生産した。これらの株は、香味において特徴を有する清酒を醸造するうえで使用が期待された。

2. *p*-FPA 耐性株は、培地中へのチロシン添加により β-フェネチルアルコール生成能の低下がみられたが、THA 耐性株ではみられなかった。チロソール生成能、トリプトファン生成能ならびにチロシン添加の影響の違いにより、THA 耐性株は *p*-FPA 耐性株とは異なる変異点を有すると考えられた。

終わりにあたり、β-フェネチルアルコール分析法等において適切な御助言をいただきました東京国税局鑑定官室、秋田 修氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 秋田 修, 井田哲朗, 小幡孝之, 原 昌道: 醸協, 85, (7) 501 (1990)
- 2) K. FUKUDA, M. WATANABE, K. ASANO, H. UEDA and S. OHTA: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 269 (1990)
- 3) O. AKITA, T. OBATA and S. HARA: *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 125 (1990)
- 4) 難波康之祐, 小幡孝之, 萱島 進, 山崎与四良, 村上光彦, 下田高久: 醸協, 73, (2) 295 (1978)