セルレニン耐性による酢酸低生産性清酒酵母の分離

後藤(山本)奈美・劉 宏芳*・石川雄章・岡崎直人

(*現在：中国，合爾濱瑞赤新技術開發公司，国税庁醸造研究所)

平成 12 年 1 月 19 日受理

Low Acetic Acid-Producing Strains Isolated from Cerulenin-Resistant Mutants of Sake Yeast

Nami GOTO-YAMAMOTO, Liu Hong-Fang, Takeaki ISHIKAWA and Naoto OKAZAKI

(National Research Institute of Brewing, 3-7-1, Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, 739-0046)

Low acetic acid-producing strains were isolated from cerulenin-resistant mutants of the sake yeast K7 (*Saccharomyces cerevisiae*). Acetic acid is considered to be an intermediate metabolite of the cytosolic acetyl CoA synthetic pathway from acetaldehyde. Cytosolic acetyl CoA is used for the biosynthesis of sterols, fatty acids, etc. Cerulenin is an inhibitor of fatty acid synthase. Thus, a mutant producing lower levels of acetic acid and higher levels of acetyl CoA is supposed to show cerulenin resistance. Out of 80 cerulenin-resistant mutants, four were selected as low acetic acid-producing mutants using a fermentation test with a liquid synthetic medium and a small scale sake fermentation test. K7 and one mutant, K7-163, produced 136.6 mg/ℓ and 16.4 mg/ℓ of acetic acid, respectively, in pilot scale sake making. Three of the four mutants showed higher acetyl CoA synthetase (ACS) activity than K7 during the late period of growth, which appeared to be the reason for their low acetic acid productivity. However, all four mutants showed multi-drug resistance, and/or high ethyl caproate productivity, which was probably caused by *FAS2* mutation. Thus, further studies are needed to confirm the relationship between low acetic acid productivity and cerulenin resistance.

Key words : 酢酸・清酒酵母・セルレニン耐性

緒 言

清酒をはじめとする酒類では，酢酸は酸臭の原因となるため，高濃度にならないよう，注意が必要な成分とされている。清酒醸造では，乳酸菌汚染のない場合でも，過剰な通気によって酢酸の生成が上昇することが報告されており¹⁾，小仕込みを行うと酢酸濃度が高くなるのはこのためと考えられる²⁾。またワイン醸造では，原料糖濃度が高いほど酢酸の生成が多いほか，酵母菌株の違いや pH の影響を受けることが知られている^{3,4)}。

清酒酵母は，長い間に酢酸生成の少ない株が選択されていると考えられるが，酢酸の過剰な生成を避ける

には，通気や糖濃度に，ある程度の注意が必要である。そこで，突然変異によって，比較的高糖濃度条件でも酢酸低生産性を示すような酵母の育種を試みた。

発酵条件において，酢酸はアセトアルデヒドから細胞質のアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALD) によって生成され，生成した酢酸はアセチル Co-A シンセターゼ (ACS) によってアセチル Co-A 合成の基質として消費される。実験室酵母では，ACS 活性が高く，ALD 活性の低い株は酢酸の生成が低いことが報告されており⁵⁾，発酵条件での酵母による酢酸の生成は，細胞質におけるアセチル Co-A 合成系の代謝中間体として生成した酢酸がリークしたものと考えられる。

細胞質のアセチル Co-A は，ステロールや脂肪酸等

の生合成に使用される。従って、脂肪酸合成酵素の阻害剤であるセルレニン耐性株の中には、酢酸からアセチル Co-A の合成に代謝が傾き、アセチル Co-A プールが大きいため、セルレニンで脂肪酸合成酵素の大部分が阻害された条件でも、ある程度脂肪酸が合成されて生育可能であり、酢酸の生成が少ない株があるのではないかと考えた。そこで、協会 7 号酵母のセルレニン耐性株からの酢酸低生産性変異株の分離を行ったので、報告する。

実験方法

1. セルレニン耐性株の分離

協会 7 号酵母を 0.1 M リン酸バッファー (pH 8.0) に懸濁し、5% (v/v) のエチルメタンサルフォネイト (EMS) を添加して 30°C、60 分間静置した。その後、5% チオ硫酸ナトリウム溶液に懸濁して反応を停止し、滅菌水で洗浄後、1 または 5 mg/ℓ のセルレニンを含む YEPG (1% 酵母エキス, 1% ポリペプトン, 4% グリセロール) 寒天培地に塗抹した。30°C で培養後、生育したコロニーを同濃度のセルレニン含有 YEPG プレートに画線し、単コロニーを分離した。ここで、グリセロールを炭素源としたのは、多剤耐性を示す呼吸欠損株の分離を避けるためである。

2. 酢酸低生産性変異株の選択

液体発酵試験には、Wickerham の合成培地 (Difco) を基本とし、窒素源をイネのグルテリンの主要アミノ酸である 850 mg/ℓ アルギニン, 994 mg/ℓ グルタミン, 370 mg/ℓ グリシン, 650 mg/ℓ ロイシン, 518 mg/ℓ セリン, 579 mg/ℓ バリンの混合物、炭素源を 10% グルコースとし、乳酸で pH 4.0 に調整した合成培地 (以下、合成培地) を用いた。この合成培地にプレートで培養した菌体を懸濁し、15°C で 7 日間静置培養した後、OD₆₆₀ 及び酢酸濃度を測定した。

3. 小仕込み試験及びパイロットスケールの清酒醸造試験

小仕込みは、凍結麹と α -米を用い、Table 1 に示す仕込み配合で行った。酵母は B6 6.4 の麹エキスで、25°C で 1 日振とう培養後、1 日静置培養し、集菌・洗浄後、 2×10^7 cells/ml になるように添えの仕込み水に添加した。留め後は 1 日 1°C 昇温し、15°C で一定とし、協会 7 号の 1 日当たりの炭酸ガス減量が 2 g よりも小さくなった 22 日目に遠心分離で上槽した。対照として、

Table 1 Proportion of raw materials used in small scale sake making.

	1 st	2 nd	3 rd	Total
α -rice (g)	50	85	185	320
Frozen koji (g)	25	31.25	43.75	100
Water (mℓ)	118	185.5	345.5	650
Lactic acid (mℓ)	0.35			0.35
Temperature (°C)	15	13	12	

協会 7 号、及び酢酸生成の低い No. 86 を用いた。

パイロットスケールの清酒醸造は、精米歩合 70% の日本晴を用い、総米 100 kg、速醸酒母を用い、通常の仕込み方法で行った。留めは約 10°C とし、8~9 日目に最高品温約 15°C とした後、約 12°C まで徐々に降温し、20 日目に上槽した。

4. 分析方法

酢酸は酵素法、または HPLC⁶⁾ で、有機酸は HPLC、香気成分はヘッドスペース-GC 法⁷⁾ で定量した。アルコール分は蒸留後、振動密度計で、日本酒度も振動密度計で測定した。その他の分析は国税庁所定分析法に従った。菌体の ACS 活性は、菌体破碎液上澄を用い、POSTMA ら⁸⁾ の方法で測定した。菌体破碎液のタンパク質濃度は、パイオラッド社製プロテインアッセイキットを用い、ウシ血清アルブミンで作成した検量線を用いて測定した。小仕込み試験による製成酒の官能評価は、当室員 10 名をパネルとし、1: 良い~5: 悪いの 5 点法で行った。各種抗生物質の変異株に対する最少生育阻害濃度は、曲淵ら⁹⁾ の方法に従い、4% グリセロールを炭素源とする Wickerham の寒天培地を用いて、30°C での生育の有無で判断した。

結果

1. セルレニン耐性株からの酢酸低生産性変異株の分離

得られたセルレニン耐性株 80 株を用いて、液体静置培養を行ったところ、OD₆₆₀ の値が協会 7 号と大差なく、培養液上澄の酢酸濃度が協会 7 号より低い株が 14 株得られた。これらの株を用いて小仕込み試験を行ったところ、協会 7 号の製成酒の酢酸濃度が 442.2 mg/ℓ であったのに対し、7 株の製成酒は 300 mg/ℓ 以下、そのうち 4 株は 200 mg/ℓ 以下と低い値を示した (Table 2)。Table 2 に示さなかった 3 株の製成酒は、

Table 2 Analysis of sake fermented by low acetic acid-producing strains.

Strain No.	Acteta mg/ℓ	Pyruvate mg/ℓ	Isoamyl acetate mg/ℓ	Ethyl caproate mg/ℓ	Alcohol %	Sake-meter	Titerable acidity mℓ	Sensory evaluation	Overall result
K-7	442.2	19.2	2.89	1.80	18.9	4.1	3.0	3.6	/
No.86	120.7	18.5	3.87	6.38	19.5	1.7	2.1	NT	/
K 7-88	381.6	17.2	1.84	5.22	19.2	7.0	2.6	3.1	×
K 7-99	703.3	17.0	NT	NT	18.7	-2.2	3.5	3.5	×
K 7-100	253.5	21.2	1.92	0.82	18.7	1.7	3.0	3.2	△
K 7-104	440.9	16.7	1.98	1.19	19.9	7.8	3.3	3.5	×
K 7-105	175.2	192.8	1.75	1.12	19.4	8.6	3.2	3.9	×
K 7-112	288.2	15.6	1.74	0.87	20.1	9.3	3.0	3.2	△
K 7-117	335.7	23.4	1.77	1.01	17.1	-17.2	3.0	3.4	×
K 7-133	4.8	229.7	5.09	2.90	18.4	11.3	2.8	3.0	×
K 7-136	14.3	25.8	4.64	10.74	18.1	-5.6	2.2	1.7	○
K 7-157	299.2	32.7	1.47	5.13	19.3	9.7	3.0	2.8	△
K 7-163	176.7	17.0	2.61	8.41	19.4	4.8	2.6	2.3	○

NT : not tested.

Sensory evaluation : 1, good~5, bad.

Overall result : ○, good ; △, moderate ; ×, bad

協会7号と同程度かそれ以上の酢酸濃度を示した。酢酸濃度が200 mg/ℓ以下であった4株のうち、K 7-105とK 7-133の2株の製成酒は高いピルビン酸濃度を示し、醗期間を延長してもこの傾向は変わらなかった。また、Table 2に示す11株のうち、4株はカブロン酸エチル高生産性を示した。

官能評価の結果、K 7-136とK 7-163が高い評価を得た。このうち、K 7-136は、醗末期の発酵が緩慢に進まなくなる傾向にあったため、K 7-163を用いてパイロットスケールの試験醸造を行った。

2. 試験醸造結果

協会7号とK 7-163は、ほぼ同様の品温およびアルコール分の経過を示した。一方、醗ろ液の酢酸濃度は、協会7号が留め後7日目までに大きく上昇したのに対し、K 7-163では終始低い値で推移し(Fig. 1)、製成酒(純米)の酢酸濃度は、協会7号が136.6 mg/ℓに対し、K 7-163は16.4 mg/ℓであった。

K 7-163の製成酒は、協会7号の製成酒に比較して、アルコール分、日本酒度ともやや低い値を示し、アミノ酸度は高い値を示した(Table 3)。上槽前の酵母のメチレンブルー染色率は、協会7号が4.3%に対し、K 7-163は9.5%とやや高い値を示した。

また、K 7-163の製成酒は、リンゴ酸及びカブロン酸エチル濃度が高い値を示した。その他の分析項目では、大きな差異は認められなかった。

3. 高浸透圧条件での酢酸生成

酵母は、高浸透圧条件では、菌体内浸透圧を高めるため、グリセロールを高生産することが知られている¹⁰⁾。グリセロール生産ではNADHが消費されるため、同時にNAD⁺を消費してNADHを生成するアセトアルデヒドや2-オキソグルタン酸の酸化反応が促進され、酢酸やコハク酸の生成が促進されると考えられている¹¹⁾。そこで、今回得られた酢酸低生産性変異株4株の高浸透圧条件での酢酸生産性を調べるため、グルコース濃度を2%とした合成培地を対照とし、対照に0.5 M グルコースを添加した11%グルコース培地、

Fig. 1 Change of alcohol and acetic acid concentrations during a pilot scale sake fermentation test using K 7 (broken line) and its mutant, K 7-163 (unbroken line).

Table 3 Analysis of sake made on a polot scale.

Yeast strain		K 7	K 7-163
General analysis	Alcohol (%)	19.5	19.2
	Sake meter	2.02	-1.59
	Titerable acidity (mℓ)	1.9	1.9
	Formol nitrogen (mℓ)	1.6	1.9
Organic acid (mg/ℓ)	Malic acid	262.8	387.4
	Succinic acid	434.0	403.4
	Lactic acid	528.6	533.9
	Acetic acid	136.6	16.4
	Pyruvic acid	25.7	20.4
Flavour component (mg/ℓ)	i-AmOH	179.1	156.3
	i-AmOAc	4.56	3.81
	EtOCap	1.62	7.16

Fig. 2 Acetic acid concentration of the medium after fermentation under anaerobic conditions (A) and semi-aerobic conditions produced using cotton plugs (B). K-7 and its low acetic acid-producing mutants were cultivated in the synthetic medium containing 2% glucose (closed bar), synthetic medium containing 2% glucose and 0.5 M sorbitol (shaded bar) or synthetic medium containing 11% glucose (hatched bar) at 20°C.

及び対照に 0.5 M ソルビトールを添加した培地を用い、発酵栓を付けた嫌気的狀態 (A) と樹脂性綿栓 (シリコ栓) を付けたやや好氣的狀態 (B) で、20°C で静置培養を行った。なお、発酵前の 11% グルコース培地と

0.5 M ソルビトール添加培地は同じ浸透圧を示す。

アルコール発酵終了後、協会 7 号は、2% グルコース培地、0.5 M ソルビトール添加培地、11% グルコース培地の順に培養液の酢酸濃度が高くなった。変異株 4

Fig. 3 Acetyl Co-A synthetase activities of crude extracts of yeast cells (A) and acetic acid concentrations of the medium (B). K-7 and its low acetic acid-producing mutants were cultivated in synthetic medium containing 10% glucose at 20°C to an OD₆₆₀ of 0.5-1.0 (closed bar) or greater than 2.0 (hatched bar).

Table 4 Minimum inhibitory concentration (mg/ℓ) of various antibiotics for the low acetic acid producing mutants.

	Cycloheximide	Oligomycin	Clotrimazole	Cerulenin
K 7	0.1-0.2	0.5-1.0	0.5-1.0	0.2-0.5
K 7 105	5<	1.0-2.0	10.0-20.0	1.0-2.0
K 7 133	2.0-5.0	1.0-2.0	5.0-10.0	5.0<
K 7 136	2.0-5.0	2.0-5.0	10.0-20.0	5.0<
K 7 163	0.1-0.2	0.5-1.0	0.5-1.0	2.0-5.0

Aerobically precultured cells were spotted onto agar plates of Wickerham's media containing 4% glycerol as a carbon source and an antibiotic, and incubated at 30°C.

株の2%グルコース培地での酢酸生産性は協会7号と大差なく、0.5 M ソルビトール添加培地においても協会7号と同様、2%グルコース培地よりも高い酢酸濃度を示した。従って、変異株は浸透圧の影響を受けなくなっているのではないと考えられる。一方、変異株の11%グルコース培地の酢酸濃度は、親株よりも低

く、0.5 M ソルビトール添加培地と同程度であった。また、発酵栓を付けない若干好気的な条件での酢酸の生産性は親株より低かった (Fig. 2)。なお、発酵終了後の酢酸濃度とコハク酸濃度との間に、一定の傾向は認められなかった。

4. ACS 活性

協会 7 号及び変異株のうち 3 株を合成培地で 20°C、静置培養し、OD₆₆₀ が 0.5~1.0 を示す増殖初期と、2.0 以上を示す増殖後期に菌体をサンプリングし、菌体抽出液の ACS 活性を測定した。その結果(Fig. 3)，協会 7 号では増殖後期に ACS 活性が大きく低下するのに対し、変異株の 3 株では増殖後期も ACS 活性が比較的高く保たれていた。また、同時に採取した培養液上澄の酢酸濃度も、協会 7 号では増殖後期に酢酸濃度が高くなるのに対して、変異株では増殖後期も酢酸濃度があまり上昇しなかった。

従って、変異株では ACS 活性が増殖後期まで高く保たれていることが、酢酸生成の低い原因の少なくとも 1 つであると考えられた。

5. 多剤耐性

酵母においても複数の作用機作の異なる抗生物質に対して耐性を示す多剤耐性変異が知られている。そこで、酢酸低生産性変異株に対する、シクロヘキシミド(タンパク質合成阻害剤)、オリゴマイシン(酸化的リン酸化阻害剤)、クロトリマゾール(エルゴステロール合成阻害剤)、及びセルレニンの最少生育阻害濃度を調べた。その結果(Table 4)、K 7-163 は、セルレニン以外の抗生物質に対しては協会 7 号と同じ濃度で生育阻害を受けたが、他の 3 株は供試した 4 種類の抗生物質に対して協会 7 号よりも高い耐性を示し、多剤耐性を獲得していることが示された。

考 察

清酒酵母の抗生物質耐性変異株から、香气成分や有機酸生成能、アルコール発酵能などの醸造特性の変異した株が種々分離されている^{9,12~15)}。このうち、セルレニン耐性によるカブロン酸エチル高生産性変異は、脂肪酸合成酵素をコードする *FAS 2* の変異が原因であることが報告されている¹³⁾。今回得られた酢酸低生産性を示すセルレニン耐性株 4 株のうち 2 株は *FAS 2* 変異によると考えられるカブロン酸エチル高生産性を示した。しかし、*FAS 2* 変異が酢酸の生産性に变化を与えないことは、上東ら¹⁶⁾の報告に示されており、酢酸低生産性は併せ持つ他の変異によると考えられる。今回得られた変異株 3 株は増殖後期も高い ACS 活性を示し、これが酢酸低生産性の原因の少なくとも一つであると推察された。今後、菌体内アセチル Co-A 濃

度や各種条件下での ACS 活性の測定等を行い、酢酸低生産性となる要因の検討を行いたい。

一方、酢酸低生産株 4 株のうち 3 株は多剤耐性を示し、多剤耐性を示さなかった K 7-163 も *FAS 2* 変異によると考えられるカブロン酸エチル高生産性を示した。従って、セルレニン耐性株の中から比較的高頻度で酢酸低生産性株を分離することができたが、セルレニン耐性と酢酸低生産性がリンクしているか否かも今後の検討課題である。

要 約

協会 7 号酵母のセルレニン耐性株 80 株のうち 14 株が液体培養で、さらに 4 株が清酒の小仕込み試験で酢酸低生産性を示し、1 株はパイロットスケールの清酒試験醸造においても低い酢酸生産性を確認した。これら 4 株は、0.5 M ソルビトールを添加して高浸透圧とした液体培地では、親株と同様、対照の 2% グルコース培地よりも酢酸生成が促進されたが、11% グルコース培地では親株よりも低い酢酸生成を示した。また、このうち 3 株は増殖後期も高い ACS 活性を示し、これが酢酸低生産性に関与しているものと推察された。しかし、これら 4 株は多剤耐性または *FAS 2* 変異によると考えられるカブロン酸エチル高生産性を示し、セルレニン耐性と酢酸低生産性がリンクしているかどうかは今後検討を要する。

終わりに、本研究に対し、貴重なディスカッション及びご協力を戴いた、白鶴酒造研究開発室、赤松誠司氏、並びに当所福田央主任研究員に感謝します。

文 献

- 1) 永井英雄, 近藤恭一, 三島秀夫, 竹村成三: 醸工, **70**, 361-369 (1992)
- 2) 蓼沼誠, 武藤浩, 古市明紀, 設楽和平: 醸試報, **135**, 64-73 (1963)
- 3) Y. SHIMAZU and M. WATANABE: *J. Ferment. Technol.*, **59**, 27-32 (1981)
- 4) F. RADLER: Wine microbiology and biotechnology. G. H. FLEET (ed.), P. 169-172. Harwood Academic Publishers, Chur (1993)
- 5) C. VERDUYN, E. POSTMA, W. A. SCHEFFERS and J. P. VAN DIJKEN: *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 395-403 (1990)
- 6) 木崎康造, 福田央, 高橋康次郎: 醸協, **93** (2),

- 148-152 (1998)
- 7) 石川雄章, 荒巻功, 後藤奈美, 福田央, 高橋康次郎: 醸研報, **171**, 1-11 (1999)
- 8) E. POSTMA, C. VERDUYN, W. A. SCHEFFEERS and J. P. VAN DIJKEN: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 468-477 (1989)
- 9) 曲淵哲朗, 森川貴子, 岩瀬利徳, 福田秀雄, 佐々木清祐: 醸協, **92** (2), 143-150 (1997)
- 10) S. HOHMANN: Yeast stress response, S. HOHMANN and W. H. MAGER (eds.), p. 101-145, Springer, New York (1997)
- 11) F. REMIZ, J. L. ROUSTAN, J. M. SABLAYROLLES, P. BARRE and S. DEQUIN: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 143-149 (1999)
- 12) E. ICHIKAWA, N. HOSOKAWA, Y. HATA, Y. ABE, K. SUGINAMI and S. IMAYASU: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153-2154 (1991)
- 13) 市川英治: 醸協, **88** (2), 101-105 (1993)
- 14) 溝口弘子, 渡辺睦, 西村顕, 近藤恭一: 生物工学, **76**, 194-199 (1998)
- 15) 溝口(藤城)弘子, 渡辺睦, 永井英雄, 西村顕, 近藤恭一: 醸協, **93** (8), 665-670 (1998)
- 16) 上東治彦, 中川悦子, 森山洋憲, 永田信治, 味園春雄: 醸協, **94** (1), 63-71 (1999)