

清酒酵母きょうかい701号を親株とした 高酢酸イソブチル生産性一倍体株の取得

桑山翔一*・田中純平*・山元翔太*・中山俊一**†・門倉利守**・鈴木健一朗**

(令和2年8月7日受付/令和2年12月4日受理)

要約: 清酒の呈味や香りに影響を与える化合物は主にアルコール発酵を担う酵母によって生成される。酵母は減数分裂の過程でゲノムの再編成が起こることから、胞子形成後の一倍体株には親株と異なる性質を示す株が現れることが知られている。そこで本研究では、酒質の多様化を目指し、清酒酵母であるきょうかい酵母 K701 を親株として一倍体株を取得し、清酒小仕込み試験により親株の醸造特性と異なる株と類似した株を取得した。特に、H14 株は発酵能と酢酸イソブチル生成能が優れていた。今後、これらの一倍体株を用いた交配により、多様な醸造特性を発揮する2倍体株への育種が期待される。

キーワード: 清酒酵母, 一倍体株, 香気生成, 醸造特性

1. 緒 言

清酒の呈味や香気成分は酵母によって生成されることから、清酒醸造に適する酵母のスクリーニングや薬剤を用いた耐性変異株の取得による育種改変により多様な香味を生み出す酵母が取得されてきている¹⁻³⁾。それら方法の一つに、一倍体の酵母同士を交配させる交雑法がある。二倍体の酵母は、胞子形成時に減数分裂を経て4つの一倍体を形成する。この減数分裂の際、ゲノムの再編成が起こることから親株とは異なる多様な性質を示す一倍体株が取得されており、これら一倍体株を交雑させることで親株とは異なる酒質を生み出す酵母が育種されてきた⁴⁻⁹⁾。清酒に特徴的な吟醸香はカブロン酸エチル等のエステル類であり、これらの香気成分や有機酸組成が改変された育種株が、清酒酵母の一倍体に対する変異処理により構築されている¹⁰⁾。この様に一倍体の酵母同士を交配させることで多様な呈味・香味成分を生み出す酵母へと育種が可能となることから、多様な酒質を生み出す清酒酵母を開発するために様々な性質を有する一倍体酵母を取得することが求められる。

一方、清酒酵母の胞子形成率は極めて低いことからその取得は困難であり¹¹⁾、育種に用いることが可能な一倍体の清酒酵母の数には限りがある。また、カブロン酸エチルや酢酸イソアミル以外の成分も改変し、官能的に異なる酒質を付与することが可能な育種株も酒質に多様性を付与するためには求められる。そこで本研究では、高泡を形成しない K701 を親株として親株と異なる香味や香りを呈し酒質の多様化に寄与する一倍体株を取得した。本研究では泡なし清酒酵母 K701 を親株として、バナナ様の香りを清酒に付与する、高酢酸イソブチル生産性一倍体株の取得につい

て報告する。

2. 実験方法

1) 使用菌株と一倍体株の取得

清酒醸造に用いられるきょうかい酵母 K701 を親株として用いた。

5 ml の YPD 液体培地 (yeast extract 1%, polypeptone 2%, glucose 2%) を用い 30°C にて 24 時間 K701 を培養後、YPD 平板培地へ塗抹し 30°C にて 24 時間培養した。コロニーを形成した YPD 平板培地へ 2 ml の滅菌水を加えて菌体を回収後、滅菌水で 2 回菌体を洗浄し 200 ng/ml のラパマイシンを含むホエール寒天培地 (sodium acetate 0.4%, pH 6.7) へ塗抹した。30°C にて 3 日間培養後、2 ml の滅菌水を加え菌体を回収し 3 ml の YPD 液体培地に接種し 30°C にて 2 時間振盪培養した。遠心分離により菌体を回収し滅菌水で 2 回洗浄後、0.6 mg/ml の Zymolyase-20T を含む 1 ml のサイモリアーゼ溶液 (0.01 M 2-mercaptoethanol, 0.6 M KCl, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5) に懸濁し、37°C にて 1 時間インキュベートした。遠心分離により菌体を回収後、1 ml の 0.05% tween 80 にて懸濁し超音波処理した。その後 65°C にて 10 分間インキュベート後、1 ml の滅菌水で 2 回洗浄し菌体を YPD 平板培地へ塗抹し 30°C にて 2 日間培養した。生育したコロニーの中で大きさが小さいものを釣菌し一倍体候補株とした。

2) 一倍体候補株の倍数性の確認

一倍体候補株を 5 ml の YPD 液体培地にて 30°C にて一晚培養した。集菌、洗浄後、OD₆₆₀ = 0.3 になるよう調整し、70% エタノールを加え 4°C にて一晚インキュベートし固定

* 東京農薬大学大学院農学研究科醸造学専攻

** 東京農薬大学応用生物科学部醸造科学科

† Corresponding author (E-mail: s3nakaya@nodai.ac.jp)

した。0.5 ml の 50 mM sodium citrate buffer (pH 7.5) で菌体を洗浄し、10 mg/ml RNaseA を 12.5 μ l 加え 50°C で 1 時間インキュベートした。その後集菌し、25 μ l の 20 mg/ml プロテアーゼ K を加え 50°C にて 1 時間インキュベートした。集菌後 1 ml の 50 mM sodium citrate buffer (pH 7.5) に懸濁し、4 μ l の 1 mg/ml propidium iodide を加え、4°C で一晩静置したものをフローサイトメーターで測定した。

接合型は一倍体候補株のゲノム DNA に対して、以下の 3 種のプライマーを用いた PCR にて増幅した MAT 遺伝子の増幅断片長から接合多型を判断した。使用したプライマーは以下の通りで、MAT a, MAT alpha とともに共通する MAT-F (5'-AGTCACATCAAGATCGTTTATGG-3') プライマーと、MAT a 特異的な MATa-R (5'-ACTCCACT-TCAAGTAAGAGTTTG-3') プライマー、MAT alpha 特異的な MAT alpha-R (5'-GCACGGAATATGGGACTAC-TTCG-3') の 3 種を混合し PCR を行い、a 型では 544 bp, alpha 型では 404 bp が増幅されることで接合型を判断した。

なお、一倍体のコントロール株として実験室酵母 BY4741 を、二倍体のコントロール株として実験室酵母 BY4743 を用いた。

3) 一倍体株の最少培地での生育能, TTC 染色性試験, 形態観察

取得した一倍体株においてアミノ酸要求性の有無を選別するために最少培地である SD10 培地 (Yeast nitrogen base without amino acids 0.67%, glucose 10%) を用いて 30°C にて生育させ、OD_{660nm} を測定することで生育能を確認した。濁度は分光光度計 UV-VIS 2020 (日立製作所) で測定し、培養 24 時間時点での OD_{660nm} が 2.4 以上のものを Good, 1.4 以下のものを Weak とした。

TTC (2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride) 染色試験は以下の方法で行った。取得した一倍体株と親株である K701 を TTC 下層培地 (Glucose 0.5%, Peptone 0.05%, Yeast extract 1.0%, KH₂PO₄ 1.0%, MgSO₄ · 7H₂O 1.0%, Agar 1.5%) に接

種後 30°C にて 3 日間培養した。その後、TTC 上層培地 (Glucose 0.5%, TTC 0.05%, Agar 1.5%) を重層し 30°C にて 3 時間インキュベートした後、目視にて TTC 還元指標である赤色への呈色度を比較した。また、細胞形態を顕微鏡 Biozero BZ-8000 (キーエンス社) にて観察した。

4) 総米 1 kg の小仕込試験とその分析

Table 1 の仕込配合により総米 1 kg の小仕込試験を行った。原料米として掛米と麴米は精米歩合 70% の美山錦を用いた。汲水はオートクレーブにて滅菌した水道水を用いた。麴歩合を 23.1%, 汲水歩合を 120% とし、酵母仕込三段 (初添時点での酵母接種濃度 5.0×10^6 cells/g) で行った。品温は 15°C の一定温度に保った。

醪の一般成分は国税庁所定分析法注解¹²⁾ に基づき分析し、有機酸量はそれぞれ既報に準じ有機酸分析システム (L-2000 型, 日立製作所) にて分析した³⁾。

香気成分は質量分析ガスクロマトグラフ質量分析計 (Agilent 7890A GC & 5975C GC/MSD, 使用カラム: DB-WAX, Agilent) を用いたヘッドスペース法 (Agilent 7697A, Agilent) ・内部標準法にて行った。内部標準液は、n-アミルアルコール (150 ppm) を用いて、試料 1.8 ml に内部標準液 0.2 ml を添加して測定した。

5) 主成分分析

主成分分析は IBM 社の SPSS を用いて解析した。

3. 実験結果及び考察

1) 一倍体株の取得と諸性質

ホエール寒天培地での胞子形成後、zymolyase 処理、ヒートショック処理にも耐性能を有し生育することができた 332 のコロニーを一倍体候補株とした。これらの一倍体候補株に対してフローサイトメーターにて DNA 量を比較することで、DNA 量の少ない一倍体株として 14 株を選抜した (H1 から H14 とした)。PCR での MAT 座遺伝子の増幅パターンから a 型 (一倍体), alpha 型 (一倍体),

Table 1 Proportion of raw materials for small-scale sake brewing.

	1st feed	2nd feed	3rd feed	Total
Total rice (g)	250	312.5	437.5	1,000
Steamed rice (g)	187.5	237.5	343.8	768.8
Koji (g)	62.5	75	93.8	231.3
Water (ml)	625	575	-	1,200
Lactic acid (ml)	1.25			

Rice: polishing rate 70% of Miyamanishiki.

Table 2 Comparison of characteristics among parental strain K701 and its haploid derivatives.

	K701	H2	H3	H4	H5	H7	H12	H14
Mating type	a/alpha	a	alpha	a	alpha	alpha	a	a
Growth in SD10 medium	Good	Weak	Good	Weak	Good	Good	Good	Weak
TTC stainability	Red	White	Red	Red	Red	Red	Red	Red

a/alpha 型（二倍体）を確認し 14 株の一倍体候補株から 12 株の一倍体株を取得した。

グルコース 10% を含む最少培地である SD 培地にてこれら一倍体株 12 株と親株である K701 を培養したところ、12 株の内 3 株において生育しなかった。最少培地には窒素源としてアンモニア態である硫酸アンモニウムは含有するもののアミノ酸は含まれないことから、これらの一倍体は減数分裂の過程でのゲノムの再編成等によりなんらかのアミノ酸要求性を持ったことが推定された。この様に栄養要求性があり低い生育能を示すことは実際の清酒醸造時には菌体の生育能の低下による発酵の遅れを及ぼすことが報告されているため^{13,14}、最少培地での生育が確認され、後述するように小仕込試験でも旺盛に発酵した 7 株に対して諸性質を調べた (Table 2)。H2, H4, H12, H14 株の接合型は a 型であり、それ以外の一倍体株は α 型であった。また、TTC 染色の結果、H2 株のみで白色を呈したのに対してそれ以外の株は親株と同様に赤色を示した。次に、これらの株について清酒の小仕込試験を行い清酒醸造時の諸性質を調べた。

2) 一倍体株を用いた小仕込試験

総米 1 kg の小仕込試験を独立して 3 回行った。その結果、2 株については極めて低い発酵能を示したことから、旺盛に発酵した一倍体株 H2, H3, H4, H5, H7, H12, H14 の合計 7 株と親株であり 2 倍体株である K701 の結果について記述した。3 回の独立した小仕込結果の代表的な一つ

について、エタノール生成量の経時変化を図 1 に示した。H7 株では若干エタノール生成能が低かったものの、多くの一倍体株は親株とほぼ同程度のエタノール生成能を示した。一方、H14 株は 10 日目から 15 日目にかけて二倍体の親株よりも高いエタノール生成能を示す、発酵能に優れた一倍体株であることが明らかとなった。

20 日目のもろみの一般分析、香氣成分量、有機酸量を Table 3 に、これらの成分量を元に主成分分析を行った結

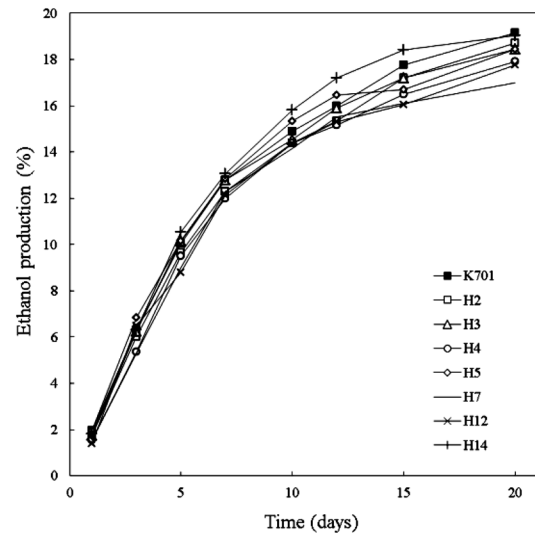


Fig. 1 Time course of ethanol concentration brewed by parental strain K701 and its haploid derivatives.

Table 3 Comparison of fermentation products brewed by parental strain K701 and its haploid derivatives.

	K701	H2	H3	H4	H5	H7	H12	H14
General analysis								
Alcohol conc. (%)	19.2	18.7	18.5	17.9	18.5	17.0	17.8	19.1
Sake meter	+12.5	+9.4	+4.2	+0.1	+1	-9.2	-2.4	+4.5
Acidity	2.7	3.2	2.2	2.6	2.0	2.3	2.0	2.4
Amino acidity	2.2	2.1	3.9	3.2	3.2	3.1	3.2	3.0
Aroma compounds (mg/L)								
Alcohols								
Isoamyl alcohol	124.7	110.5	128.2	142.5	117.7	142.8	122.7	211.4
Isobutyl alcohol	55.5	69.1	79.0	77.1	66.7	74.6	63.8	140.5
<i>n</i> -Propanol	155.2	108.0	191.0	142.5	133.1	116.8	123.2	114.9
β -Phenethyl alcohol	99.4	61.3	68.6	51.0	76.6	60.0	52.2	64.7
A/B ratio	2.2	1.6	1.6	1.8	1.8	1.9	1.9	1.5
E/A ratio	6.1	4.8	5.1	3.5	4.7	5.6	3.5	5.2
Esters								
Ethyl acetate	106.40	85.04	99.07	79.20	68.51	87.80	70.83	91.39
Isoamyl acetate	7.64	5.29	6.54	4.97	5.52	7.93	4.35	10.94
Isobutyl acetate	0.09	0.08	0.24	0.14	0.21	0.31	0.09	0.57
β -Phenethyl acetate	1.72	1.20	1.29	1.02	1.65	1.89	1.00	1.50
Ethyl caproate	1.25	0.99	1.36	1.18	1.12	1.24	1.07	0.96
Organic acids (mg/L)								
Lactate	619.4	658.4	831.1	443.4	586.0	705.2	467.9	557.5
Malate	66.2	81.0	24.7	14.9	21.7	24.7	13.5	32.4
Succinate	193.1	140.2	146.4	124.2	121.9	136.6	133.5	125.1
Acetate	26.6	46.9	31.0	40.5	18.1	40.9	77.3	46.5

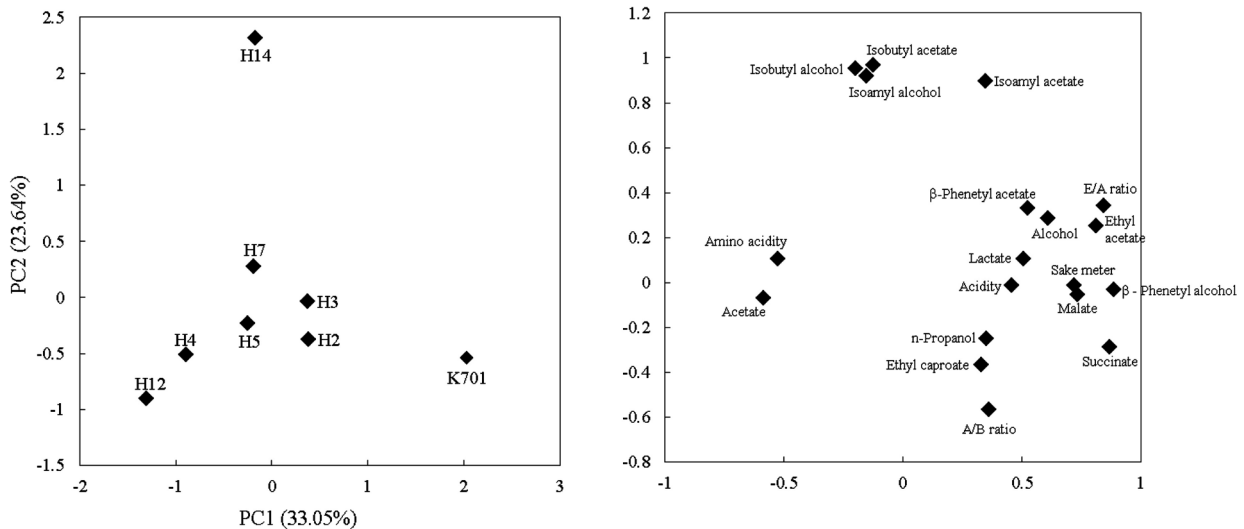


Fig. 2 Principal component analysis (PCA) based on the values of general analysis and produced metabolites by parental strain K701 and its haploid derivatives.

果を図2に示した。主成分分析の結果から、H14株は他の一倍体株と比較して遠い位置に存在し、他とは異なる性質を有することが明らかとなった。特に、酢酸イソブチル、イソブチルアルコール、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル生成量が親株であるK701よりもそれぞれ6.3, 2.5, 1.7, 1.4倍高かった。酢酸イソブチルはイソブチルアルコールとアセチル CoA から acetyl-transferase による縮合反応によって生成されることから¹⁵⁾、元となるイソブチルアルコール生成量が高いことで酢酸イソブチル生成量の増加につながったことが推察された。酢酸イソブチルの出発物質となるイソブチルアルコールは、エールリッヒ経路にてバリンから生合成される²⁾。このことから、イソブチルアルコール生成量が増加したことはバリンの代謝能が向上しているためであると推察した。同様にエールリッヒ経路にてロイシンから生合成されるイソアミルアルコールは、ロイシン生合成経路におけるフィードバック阻害が解除された変異株で生成量が増加することが報告されている¹⁶⁾。このことを考慮すると、イソブチルアルコール生成量、酢酸イソブチル生成量の増加に関してもH14株においてバリン代謝が変化したことに起因する可能性が推察された。酢酸イソブチルはバナナやナシ様の香りの香气成分であり、その分別閾値は0.5 ppm であると言われている¹⁷⁾。H14株の生成量はこの閾値を上回ることから、官能評価的にも清酒に華やかな香味が付与されることが期待できる。

H14株以外の一倍体株の香气成分はK701とほぼ同程度であったが、アミノ酸と酢酸生成量に差があった。これらのことから、H14以外の一倍体株は、香气成分に関しては親株と同程度の生産性を持つ二倍体株の育種に用いることのできる一倍体株であることも明らかとなった。

また、生理学的な性質が類似しているH3, H5, H7株は主成分分析においても近くに位置していることから、これら3株は類似していることが重ねて示唆された。一方、それ以外の一倍体株については、小仕込後の一般分析値、有機酸、香气成分、生理学的諸性質が異なることからそれぞ

れが独立した性質を有することが示された。

4. まとめ

本研究ではエタノール発酵能と酢酸イソブチル生成量に優れた一倍体株H14が取得できた。酢酸イソブチルはバナナ様の香气を示す清酒中の吟醸香の成分の一つであるが、酢酸イソブチル高生産性の一倍体株の取得は我々の知る限りでは一例のみである¹⁸⁾。酒質の多様性が求められる昨今においては、本一倍体株は交雑における有用な親株として期待される。また、親株であり清酒醸造に実際に用いられるK701株は二倍体であることから、相同組換えによる遺伝子破壊を行う際は、2つの染色体それぞれを破壊しないといけないため煩雑で困難を伴うが、香气生成や生理学的な諸性質が親株と類似した性質を示す一倍体は、染色体のセットが1つしかないため、遺伝子破壊の宿主としての利用が期待される。

引用文献

- 1) 神田晃敬, 三森智子, 松井菊恵, 浜地正昭, 本馬健光 (1990) エステル高生産清酒酵母の分離. 醸協. 85 : 417-421.
- 2) 後藤邦康 (1992) 清酒酵母の育種と特性について. 醸協. 87 : 801-813.
- 3) KOSUGI S, KIYOSHI K, OBA T, KUSUMOTO K, KADOKURA T, NAKAZATO A, NAKAYAMA S (2014) Isolation of a high malic and low acetic acid-producing sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain screened from respiratory inhibitor 2,4-dinitrophenol (DNP)-resistant strains. *J. Biosci. Bioeng.* 117 : 39-44.
- 4) 吉田 清, 稲橋正明, 野呂二三, 中村欽一, 野白喜久雄 (1993) 有機酸生成の少ないエステル高生産性清酒酵母の育種. 醸協. 88 : 565-569.
- 5) 吉田 清, 稲橋正明, 中村欽一, 秋山裕一, 野白喜久雄 (1994) コハク酸生産性の低いリンゴ酸高生産性清酒酵母の育種. 醸協. 89 : 647-651.
- 6) 稲橋正明, 吉田 清, 中村欽一 (1995) リンゴ酸高生産性赤色素生成酵母の育種. 醸協. 90 : 689-692.
- 7) 稲橋正明, 吉田 清, 中村欽一 (1996) リンゴ酸高生産性

- で総酸度低生産性清酒酵母の育種. 醸協, **91** : 587-591.
- 8) 黒瀬直孝, 浅野忠男, 垂水彰二, 川北貞夫 (2000) アルコール耐性一倍体株同士の交雑による吟醸香高生成酵母の育種. 生物工学, **78** : 191-194.
- 9) KATOU T, KITAGAKI H, AKAO T, SHIMOI H (2008) Brewing characteristics of haploid strains isolated from sake yeast Kyokai No. 7. *Yeast*, **25** : 799-807.
- 10) 市川英治 (1993) カブロン酸エチル高生産酵母. 醸協, **88** : 101-105.
- 11) 赤尾 健 (2014) ゲノムから見た清酒酵母の系統分化と育種への新たな視点. 化学と生物, **52** : 223-232.
- 12) (財)日本醸造協会 (1993) 注解研修委員会編: 第四回改正国税庁所定分析法注解.
- 13) 北本勝ひこ (1989) 醸造用酵母からのリジン要求性変異株の取得法. 醸協, **84** : 34-37.
- 14) 小杉昭彦, 小泉幸道, 柳田藤治, 鶴高重三 (1999) 清酒醸造における酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のアミノ酸透過酵素欠失による影響. 醸協, **94** : 141-149.
- 15) FUKUDA K, YAMAMOTO N, KIYOKAWA Y, YANAGIUCHI T, WAKAI Y, KITAMOTO K, INOUE Y, KIMURA A (1998) Balance of Activities of Alcohol Acetyltransferase and Esterase in *Saccharomyces cerevisiae* Is Important for Production of Isoamyl Acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4076-4078.
- 16) ASHIDA S, ICHIKAWA E, SUGINAMI K, IMAYASU S (1987) Isolation and application of mutants producing sufficient isoamyl acetate, a sake flavor component. *Agric. Biol. Chem.* **51** : 2061
- 17) (財)日本醸造協会. (1999) 醸造物の成分.
- 18) WATANABE M, TANAKA N, MISHIMA H, TAKEMURA S (1993). Isolation of sake yeast mutants resistant to isoamyl monofluoroacetate to improve isoamyl acetate productivity. *Journal of fermentation and bioengineering*, **76** : 229-231.

Isolation of High Isobutylacetate Producing Haploid Strain from Sake Yeast Kyokai No. 701

By

Shoichi KUWAYAMA*, Jumpei TANAKA*, Shota YAMAMOTO*, Shunichi NAKAYAMA**†,
Toshimori KADOKURA** and Ken-ichiro SUZUKI**

(Received August 7, 2020/Accepted December 4, 2020)

Summary : Since sake yeasts produce not only ethanol but also compounds related to flavor and taste during sake brewing, the sake yeasts exhibiting various types of fermentation products are intensively isolated. One of the major breeding methods is mating of haploid strains because of the genome rearrangement which occurs during meiosis and haploid strains showing different properties against the parental strains. In this study, we isolated a high isobutylacetate producing haploid strain H14 from diploid sake yeast Kyokai No. 701 as a parental strain. The strain H14 also showed high ethanol productivity during sake brewing. Using this haploid strain H14 showing high ethanol and isobutylacetate productivity as a parental strain leads to development of new diploid sake yeasts.

Key words : sake yeast, haploid, sake brewing, diversity

* Department of Fermentation Science, Graduate School of Agriculture, Graduate School of Tokyo University of Agriculture

** Department of Fermentation Science, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture

† Corresponding author (E-mail : s3nakaya@nodai.ac.jp)