

C75に対して弱感受性となった変異清酒酵母は 酢酸イソアミルを高生産する

(家政教育教室) 谷 本 昌 太
(広島県立総合技術研究所食品工業技術センター) 蔵 尾 公 紀*
(広島県立総合技術研究所食品工業技術センター) 藤 井 一 嘉
(広島大学大学院理学研究科) 平 賀 良 和

Improved Production of Isoamyl Acetate by Sake Yeast Mutants Which are Weakly Sensitive to C75

Shota TANIMOTO, Masaki KURAO, Kazuyoshi FUJII *and* Yoshikazu HIRAGA

(平成20年6月11日受理)

欧文抄録

3-Carboxy-4-octyl-2-methylenebutyrolactone (C75), a mammalian fatty acid synthase inhibitor was used to isolate sake yeast mutants which improved its production of isoamyl acetate. Mutants weakly sensitive to C75 produced higher amounts of isoamyl acetate at high frequency when fermented in *koji* extract medium. A sake yeast mutant strain, K-901-11, which was weakly sensitive to C75, demonstrated almost identical fermentation ability as the parental strain (Kyokai no. 901), but produced 1.4 times higher isoamyl acetate with lower acidity compared to the parental strain in a 1,473-g scale sake brewing test. The quality of sake prepared using K-901-11 was better than that prepared using the parental strain. The resistance of K-901-11 against 5,5,5-trifluoro-DL-leucine, L-canavanine and cerulenin was almost identical or slightly weak compared with the parental strain. The alcohol acetyltransferase activity of K-901-11 was 1.2 times higher than that of the parental strain. Therefore, it was suggested that the increase in the alcohol acetyltransferase activity of the mutants that are weakly sensitive to C75 could have been one of the

factors responsible for the improvement in isoamyl acetate productivity.

Key words : isoamyl acetate, sake yeast, C75, sake brewing

キーワード：酢酸イソアミル, 清酒酵母, C75, 清酒醸造

1. はじめに

清酒の品質において香りは重要な要素であり、フルーティーな香りの特徴とする吟醸酒では特に重視される。バナナ様の香りの酢酸イソアミルおよびリンゴ様の香りのカプロン酸エチルは、吟醸酒の品質に最も重要な香気成分であり、これらの香りを増強するために様々な方法で酵母が育種されてきた。¹⁻⁵⁾ 3-Carboxy-4-octyl-2-methylenebutyrolactone (C75) は、ほ乳類に対する脂肪酸合成酵素阻害剤であり、摂食抑制によりマウスにおける体重増加を抑える。⁶⁾ 一方、セルレニン (CEL) は C75と同様の機構で脂肪酸合成酵素を阻害し、この阻害剤に対して耐性を示す清酒酵母の中から、カプロン酸エチル高生成株が高い確率で選抜できることが報告されている。³⁾ この機構としては、脂肪酸合成酵素遺伝子の変異による酵素構造の変化により、脂肪酸合成の中間体でありカプロン酸エチル生成の律速因子であるカプロン酸の生成が高まり、結果としてカプロン酸エチルを高生産

*現広島県立総合技術研究所農業技術センター

することが明らかにされている。^{7,8)} そのため、C75に対して弱感受性となった清酒酵母を分離・選抜することにより、カプロン酸エチルを高生成する株を取得できると考えた。しかしながら、弱感受性株の中からカプロン酸エチルを顕著に増加する株は認められず、予想に反して酢酸イソアミルを高生成する株が選抜されたので報告する。また、選抜した酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性および各種生育阻害剤に対する耐性を親株と比較し、弱感受性株が酢酸イソアミルを高生成する機構について推察を行った。

2. 実験方法

2-1. 供試菌株および培地

実用清酒酵母である協会601号 (K-601) および901号 (K-901) を供試菌株とした。培地として YNB 培地 (0.67% Difco 社製イーストニトロゲンベース w/o amino acid, 2% グルコース), YPD 培地 (1% 酵母エキス, 2% ポリペプトン, 2% グルコース), 麴汁培地, アルコール脱水麴添加培地⁹⁾ を用いた。アルコール脱水麴添加培地には麴として徳島製麴(株)製の乾燥麴(精米歩合50%「山田錦」)を用いた。固体培地の場合は、上記の培地に寒天を2%になるように加えた。

2-2. C75の合成

C75は Kuhajda *et al.* の方法⁶⁾ に準じて合成した。

2-3. C75弱感受性変異株の分離

K-601および K-901をエチルメタンサルフォン酸により変異処理後、150ppm の C75を含む YNB 寒天培地に塗布し、30℃で出現したコロニーを弱感受性株として分離した。

2-4. 麴汁培地およびアルコール脱水麴添加培地による発酵試験

麴汁培地による発酵試験は以下のとおり行った。麴汁培地(ボーム6) 1 mlに酵母を一白金耳植菌し、30℃で1日間静置培養した。培養液を麴汁培地19mlに添加し、10℃で10日間静置培養した。発酵終了後、培養液中の香気成分の測定を行った。一方、アルコール脱水麴添加培地による発酵試験は、斎藤⁹⁾の方法を若干変更して

行った。すなわち、YPD 培地 3 mlに酵母を一白金耳植菌し、30℃で2日間静置培養した。培養液をアルコール脱水麴添加培地に添加し、15℃で14日間静置培養した。発酵終了後、遠心分離を行い、上清の日本酒度、酸度、アミノ酸度の測定を行った。

2-5. 清酒小仕込試験

総米196 g および1,473 g 規模の清酒小仕込試験を行った。仕込配合を表1に示す。吟醸もろみの品温経過とし、添を13℃、踊を15℃、仲を8℃、留を6℃とし、その後6日目に最高品温11℃となるように約1℃/日ずつ品温を上昇させ、その後上槽まで一定とした。掛米は精米歩合50%「千本錦」、麴は徳島製麴(株)製の乾燥麴(精米歩合50%「山田錦」)を用いた。総米196 gの清酒小仕込試験では、もろみの重量が55 g減少した時点で発酵を終了した。一方、総米1,473 gの清酒小仕込試験では、日本酒度がプラスになった時点で発酵を終了した。上槽は遠心分離により行った。製成酒の分析は一般成分(日本酒度、アルコール、酸度およびアミノ酸度)および香気成分について行った。

表1 清酒小仕込試験の仕込配合

	添	仲	留	合計
総米196 g				
総米 (g)	40	61	95	196
蒸米 (g)	30	50	80	160
麴 (g)	10	11	15	36
水 (ml)	13	14	19	46
活性酵母 (ml)	10	0	0	10
総米1,473 g				
総米 (g)	300	457	716	1,473
蒸米 (g)	225	375	600	1,200
麴 (g)	75	82	116	273
水 (ml)	394	696	1,080	2,170
活性酵母 (ml)	75	0	0	75

水には、0.42%乳酸を含む加工水を用いた。

2-6. 成分分析

一般成分¹⁰⁾は国税庁所定分析法に準じて分析した。香気成分¹⁰⁾は国税庁所定分析法に修正を加えて行った。すなわち、ガスクロマトグラフィー分析を以下の条件で行った。検出器, FID; カラム, J&W Scientific 製 化学結合型のシリカメガボアカラム DB-wax (内径0.53 mm; 長さ30 m; 膜厚1 μm); カラム温度, 40℃で1分間保持後, 20℃/分で昇温し, 80℃で1分間保持, さらに

20°C/分で昇温し、180°Cで4分間保持；注入口温度、200°C；キャリアーガス、窒素；流速、30ml/分とした。ヘッドスペース法による香気成分の捕集および導入は、バイアルに試料5mlおよび100mg/ℓのカプロン酸メチル0.5ml（内部標準）を加え、密栓し、ヘッドスペースオートサンプラー（Tekmar社製 Tekmar 7000、香気成分平衡時間；65°C、35分間）により行った。

2-7. 官能評価

製成酒の官能評価は、6人の訓練されたパネリストにより、香り、味、総合評価について、5点法（1、とても良い；2、良い；3、普通；4、悪い；5、とても悪い）で評価した。尚、評価はK-901（親株）の官能評価値をすべて3（普通）として相対的に行った。

2-8. C75弱感受性株の薬剤耐性

適当量の5,5,5-トリフルオロ-DL-ロイシン（TFL）、L-カナバニン（CAN）およびCELを含む寒天培地に培養菌体を白金耳で塗布した。尚、TFLおよびCANを含む培地にはYNB培地をCELを含む培地にはYPD培地を用いた。TFLの場合、30°C、2日間、CAN、CELの場合、4日間培養した。培養後の生育状態により3段階（++：生育、+：若干生育、-：生育せず）で判定した。

2-9. アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の分析

酵母菌体のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性は、Yoshioka and Hashimoto¹¹⁾ および栗山ら¹²⁾の方法を改変して行った。すなわち、麴汁培地（ボーム6）1mlに酵母を一白金耳植菌し、30°Cで1日間静置培養し

た。培養液0.1mlを麴汁培地10mlに添加し、30°Cで1日間静置培養した後、菌体を遠心分離により集菌した。菌体は45mM イソアミルアルコールおよび0.8mM アセチル CoA を含む100mM Tris-HCl 緩衝液（pH7.5）に懸濁した。懸濁液（1.5ml）の菌体密度はアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性に合わせて20-100mg湿菌体重量/mlとした。反応液を穏やかに振とうしながら、25°C、60分間保持した後、1gの塩化ナトリウムを加えて反応を停止した。反応により生じた酢酸イソアミルは、前述した香気成分と同様の方法（内部標準液は0.15ml）で分析した。菌体の酵素活性は、25°C、60分間に1nmoleの酢酸イソアミルを生成させる時1unitと定義した。

3. 結果と考察

3-1. C75弱感受性株の分離、麴汁培地およびアルコール脱水麴添加培地による発酵試験

K-601およびK-901を変異処理後、150ppmのC75を含むYNB寒天培地に塗布し、比較的大きなコロニーを釣菌した。K-601およびK-901からそれぞれ28および29株を取得した。これらの中からK-601およびK-901の変異株それぞれ28および24株を麴汁培地およびアルコール脱水麴添加培地による発酵試験に供した。発酵力が比較的良好で、酢酸イソアミルを高生産する株を優良株として選抜した。表2に発酵試験の分析結果を示す。結果として、K-601およびK-901からそれぞれ3および1株と高い頻度で選抜株の分離が可能であった。

3-2. 清酒小仕込試験

麴汁培地およびアルコール脱水麴添加培地による発酵試験において発酵力が比較的良好で酢酸イソアミルを高

表2 麴汁培地およびアルコール脱水麴添加培地による発酵試験の分析結果

菌株	日本酒度	酸度 (ml)	アミノ酸度 (ml)	酢酸エチル (mg/ℓ)	酢酸イソアミル (mg/ℓ)	イソアミルアルコール (mg/ℓ)	カプロン酸エチル (mg/ℓ)
K-601 (親株)	+19.7	2.5	1.7	7	0.8	75	0.6
K-601-3-1	+6.0	2.7	1.9	12	1.5	75	0.4
K-601-14	+1.5	3.2	1.9	7	1.3	87	0.6
K-601-3-2	+7.3	2.3	1.9	10	1.3	79	0.9
K-901 (親株)	+16.1	2.3	1.8	8	0.9	100	0.6
K-901-11	+10.8	2.5	1.9	7	1.4	98	0.6

香気成分は麴汁培地による発酵試験、一般成分はアルコール脱水麴添加培地による発酵試験の分析結果を示す。

表3 196 g 規模の清酒小仕込試験の分析結果

	もろみ 日数 (日)	日本 酒度	アルコール (%)	酸度 (ml)	アミノ 酸度 (ml)	酢酸 エチル (mg/l)	酢酸 イソアミル (mg/l)	イソアミル アルコール (mg/l)	カプロン酸 エチル (mg/l)	カプリル酸 エチル (mg/l)	カプリン酸 エチル (mg/l)	E/A 比 ×100
K-601(親株)	28	+1.5	17.5	2.7	0.6	73	5.5	287	1.5	1.3	0.3	1.9
K-601-14	28	+2.5	17.4	2.2	0.8	73	6.3	231	1.9	1.6	0.3	2.7
K-901(親株)	30	+5.2	17.5	2.1	0.8	64	7.8	235	1.6	1.4	0.2	3.3
K-901-11	28	+7.5	17.7	1.8	0.7	81	11.1	218	1.9	1.3	0.2	5.1

表4 1,473 g 規模の清酒小仕込試験の分析結果

	もろみ 日数 (日)	日本 酒度	アルコール (%)	酸度 (ml)	アミノ 酸度 (ml)	酢酸 エチル (mg/l)	酢酸 イソアミル (mg/l)	イソアミル アルコール (mg/l)	カプロン酸 エチル (mg/l)	カプリル酸 エチル (mg/l)	カプリン酸 エチル (mg/l)	E/A 比 ×100
K-901(親株)	36	+2.5	17.8	2.0	0.9	100	8.8	204	1.6	1.0	0.1	4.3
K-901-11	28	+6.0	17.3	1.6	0.8	117	13.0	176	1.9	1.0	0.1	7.4

生産する株 (K-601: 3株および K-901: 1株) を196 g 規模の清酒小仕込試験に供した。親株と比べてもろみ日数が同等または短く、酢酸イソアミルを高生成する株を優良株として選抜した。製成酒の成分分析結果を表3に示す。K-601および K-901からそれぞれ1株ずつが優良株として選抜された。また、両株とも親株と比べて、酸度が低く、カプロン酸エチルについては高い値を示した。特に K-901が親株である K-901-11は酢酸イソアミルを親株 (7.8mg/l) の1.4倍 (11.1mg/l) 生成した。

そこで、K-901-11について仕込規模を1,473 g にスケールアップして清酒小仕込試験を行った。製成酒の成分分析結果を表4に、官能評価の結果を表5に示す。K-901-11は親株と比べてもろみ日数は短く、日本酒度は高かった。また、アルコールはほぼ同等の値を示し、発酵力が良好であることが再確認された。味の指標である酸度は親株と比べて低く、アミノ酸度はほとんど同じであった。これらの結果は、K-901-11を使用して醸造した清酒の味は酸味が少ないことを示唆している。香氣成分は酢酸エチル、酢酸イソアミルおよびカプロン酸エチルが親株と比べて高く、一方、イソアミルアルコールが低くなった。中でも酢酸イソアミルは親株の1.5倍生成して

表5 清酒小仕込試験 (1,473 g) 製成酒の官能評価結果

	香り	味	総合評価
K-901(親株)	3.0	3.0	3.0
K-901-11	2.2±0.98	2.2±0.75	2.2±0.98

官能評価値は5点法で6人のパネリストの平均値±標準偏差。K-901(親株)の官能評価値をすべて3(普通)として相対評価した。

おり、酢酸エチル (1.2倍) およびカプロン酸エチル (1.2倍) と比べて増加率が大きかった。これらの結果は、196 g 規模の小仕込試験のそれと一致している。製成酒の官能評価の結果、K-901-11の官能評価値は香り、味、総合評価のすべてにおいて親株と比べて低く、選抜株の酒質は良好であることが示された。K-901-11を使用して醸造した清酒は、バナナ様の香りである酢酸イソアミルとリンゴ様の香りであるカプロン酸エチルの値が親株と比べて高く、酸度が低いことから、香りがフルーティーで味がすっきりしていると評価され、このような結果となったと考えられた。

3-3. C75弱感受性株の薬剤耐性

清酒酵母の酢酸イソアミル生産性の改良に関しては、変異および遺伝子工学的な方法が報告されている。L-ロイシン類似体である TFL に対して耐性となった酵母は、L-ロイシン生合成系における L-ロイシンによるフィードバック阻害が解除されるため、その前駆体であるイソアミルアルコールを蓄積し、結果として酢酸イソアミルを過剰生産する。^{2,13)} 一方、塩基性アミノ酸の酵母菌体内への取込に関与する透過酵素であるアルギニンパーミターゼ遺伝子を欠損した *can 1* 変異株は、L-アルギニン類似体の CAN に対して耐性を示す。¹⁴⁾ また、CAN 耐性株は L-アルギニンの取り込み量の低下に伴う L-ロイシンの消費量の増加によりイソアミルアルコールの生成量が増大し、その結果酢酸イソアミルも増加する。⁵⁾ したがって、C75弱感受性株は TFL や CAN に対する耐性を獲得することにより、同様の機構で酢酸イソ

表6 C75に対する弱感受性株の薬剤耐性

	TFL(μ M)			CAN(μ M)			CEL(μ M)		
	25	50	100	25	50	100	7	13	25
K-901(親株)	++	++	-	++	++	+	+	-	-
K-901-11	+	+	-	+	+	-	-	-	-

30℃, 2日間 (TFL) および4日間 (CAN, CEL) 培養後の生育状態を示す。++:生育, +:若干生育, -:生育せず。

アミルの生産が増強された可能性がある。そこで, C75弱感受性株 (K-901-11) の TFL および CAN に対する耐性を親株と比較した。また, C75と作用機作が同じと考えられる脂肪酸合成酵素阻害剤 CEL に対する耐性の比較も行った。結果を表6に示す。TFL および CAN に対する K-901-11の耐性は親株と比べて同等またはやや低かった。これらの結果は, C75弱感受性株の酢酸イソアミルの増加は, TFL や CAN 耐性株とは異なる変異により引き起こされていることを示している。また, 清酒小仕込試験において, C75弱感受性株が親株と比べてイソアミルアルコールの増加が認められなかった結果は (表3, 4), 酢酸イソアミルの増加が TFL や CAN 耐性株とは異なる機構であることを強く示唆する。一方, CEL に対する耐性は C75弱感受性株で認められなかった。

3-4. C75弱感受性株のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性

酵母による酢酸イソアミル生成において, アセチル CoA が十分に存在する条件下では, イソアミルアルコール以外にアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が律速因子となる。そこで, C75弱感受性株 (K-901-11) と親株のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性を比較した。結果を表7に示す。K-901-11の活性は親株と比べ1.2倍高く, したがって, C75弱感受性変異株はアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が高まったことにより酢酸イソアミルが高生成したと考えられ

表7 C75に対する弱感受性株のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性

	活性 (unit/mg湿菌体重量)
K-901(親株)	0.45
K-901-11	0.56

ポーム6の麴汁培地で30℃, 1日間培養した菌体を使用した。

る。これまでに, イソプレノイド類似体である1-フェルネシルピリジニウムやイミダゾール系の抗真菌剤であるエコナゾールに耐性を示す変異株^{15),16)}において, アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇することにより酢酸イソアミルを高生成することが報告されている。また, 後者における活性上昇の原因の1つとして変異による細胞内の不飽和脂肪酸含量の減少が挙げられている。今回の報告についても C75が脂肪酸合成酵素阻害剤であることから, 不飽和脂肪酸含量が減少することによりアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇した可能性が考えられるが, この点については今後の詳細な検討を要する。

酢酸イソアミルの増加の原因として, 今回の報告で検討した要因の他に, 酵母のエステラーゼ活性の低下による酢酸イソアミルの分解抑制が報告されている。⁴⁾ エステラーゼ遺伝子 (*EST 2*) はクローニングされ, この遺伝子を破壊することで酢酸イソアミルの生産量が向上する。^{17),18)} 今回の報告における酢酸イソアミルの生産量の増加にはエステラーゼが関与している可能性が残されているが, この点については今後の詳細な検討を要する。

3-5. まとめ

変異処理により C75に対して弱感受性となった株から酢酸イソアミル高生成株の選抜育種を行った。麴汁培地による発酵試験の結果, C75に対する弱感受性株が高頻度に酢酸イソアミルを高生成することが示された。1,473g規模の清酒小仕込試験の結果, 選抜株 (K-901-11) は親株と同等の発酵力を有し, 酢酸イソアミルを親株の1.4倍生成し, 生酸性は低かった。製成酒の官能評価の結果, K-901-11の酒質は官能的に良好であった。K-901-11の TFL, CAN および CEL に対する耐性は, 親株と同等またはやや弱かった。K-901-11のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性は親株の1.2倍高かった。したがって, C75に対して弱感受性となる変異によりアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が高まったことが, 酢酸イソアミル高生成の1要因と示唆された。

参考文献

- 1) 秋田修, 醸協, 第87巻, p621 (1992).
- 2) S. Ashida, E. Ichikawa, K. Suginami, and S. Imayasu, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, p2061 (1987).
- 3) E. Ichikawa, N. Hosokawa, Y. Hata, Y. Abe, K. Suginami, and S. Imayasu, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, p2153 (1991).
- 4) 柳内敏靖, 清川良文, 若井芳則, 醸酵工学, 第67巻, p419 (1989).
- 5) 秋田修, 蓮尾徹夫, 原昌道, 吉沢淑, 醸酵工学, 第67巻, p7 (1989).
- 6) F. P. Kuhajda, E. S. Rizer, J. N. Li, N. S. Mani, G. L. Frehywot, and C. A. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, p3450 (2000).
- 7) J. Inokoshi, H. Tomoda, H. Hashimoto, A. Watanabe, H. Takeshima, and S. Omura, *Mol. Gen. Genet.*, **244**, p90 (1994).
- 8) R. Akada, K. Matsuo, K. Aritomi, and Y. Nishizawa, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, p43 (1999).
- 9) 斎藤久一, 渡邊誠衛, 田口隆信, 高橋仁, 中田健美, 岩野君夫, 石川雄章, 醸協, 第87巻, p915 (1992).
- 10) 国税庁「国税庁所定分析法」, <http://www.nta.go.jp/shiraberu/zeiho-kaishaku/tsutatsu/kobetsu/sonota/070622/pdf/03.pdf> (2007).
- 11) K. Yoshioka and N. Hashimoto, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, p2287 (1983).
- 12) 栗山一秀, 芦田晋三, 齊藤義幸, 杉並孝二, 今安聰, 醸酵工学, 第64巻, p169 (1986).
- 13) D. Hirata, and T. Hiroi, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, p919 (1991).
- 14) A. Margaret and B. Howard, *Curr. Genet.*, **10**, p587 (1986).
- 15) K. Hirooka, Y. Yamamoto, N. Tutsui, T. Tanaka, *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, p125 (2005).
- 16) T. Asano, T. Inoue, N. Kurose, N. Hiraoka, S. Kawakita, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, p697 (1999).
- 17) K. Fukuda, O. Kuwahata, Y. Kiyokawa, T. Yanagiuchi, Y. Wakai, K. Kitamoto, Y. Inoue, A. Kimura, *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, p8 (1996).
- 18) K. Fukuda, N. Yamamoto, Y. Kiyokawa, T. Yanagiuchi, Y. Wakai, K. Kitamoto, Y. Inoue, A. Kimura, *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, p101 (1998).