

LED 夢酵母の尿素低生産性株の取得

Isolation of Lower Urea Productivity Mutants from *S.cerevisiae* LED Yume Koubo

岡久 修己*

OKAHISA Naoki

抄 録

LED を用いて育種した清酒酵母「LED 夢酵母」について、アルギナーゼ欠損変異株を選抜することで、尿素低生産性株の取得を試みた。得られた変異株について、清酒小仕込み試験による選抜により、尿素低生産性を示す優良酵母を 2 株取得した。当該酵母について実用規模の清酒醸造試験を実施し、実用化に向けてのデータを取得した。

1 はじめに

これまでの研究で、UV-LED を使用して清酒酵母の育種試験を行い、吟醸酒の主要な香気成分であるカプロン酸エチルを高生産し、発酵力が強い清酒酵母を選抜した¹⁾。当該酵母は「LED 夢酵母」として H27 年度から実用化している。今後の LED 夢酵母の活用方法として、製成酒の海外への輸出が考えられる。一方、清酒を含む発酵食品に少量含まれているカルバミン酸エチルは、一部の国で規制値が設定されている。よって、LED 夢酵母仕込み清酒の輸出数量を増加させるためには、カルバミン酸エチルの低減化が必要となる。

清酒中でカルバミン酸エチルは、尿素とエタノールの反応により生成する²⁾ことから、アルギナーゼ欠損による尿素低生産性酵母を用いて清酒醸造を行うことで、清酒中のカルバミン酸エチルを低減できることが報告されている³⁾。そこで本研究では、UV-LED を用いて LED 夢酵母に再度変異処理を行うことで、清酒醸造中の尿素生成を可能な限り低減化した新規 LED 夢酵母の育種を試みた。また、当該酵母による実用規模清酒醸造試験を行い、実用化に向けてのデータ取得を行った。

2 実験方法

2・1 供試菌株

カプロン酸エチルを高生産し、酸の生成が少なく、発酵力の強い LED 夢酵母 No.4206 株⁴⁾を酵母育種試験の親株に用いた。

2・2 微生物育種用UV-LED照射装置

微生物育種用UV-LED照射装置は、既報^{1) 4)}で試作した装置を使用し、LED光源として日亜化学工業社製NCSU334(ピーク波長280nm)を用いた。

2・3 アルギナーゼ欠損変異株の分離

北本らの方法³⁾を参考に実施した。すなわち、YPD 液体培地 (1%酵母エキス, 2%ポリペプトン, 2%ブドウ糖) で28℃, 2日間培養した酵母培養液を、遠心分離にて集菌後、生理食塩水に懸濁し、約 2×10^7 cfu/mL の菌懸濁液を調整した。菌懸濁液20mL を直径90mmのシャーレに取り、ピーク波長280nmのLEDを用いて照射距離50mm, 放射束18mWで紫外線を40秒, 60秒, 120秒, 180秒, 240秒, 300秒照射した。照射後の菌液を遠心分離にて集菌し、CAO 寒天培地 (0.17%Yeast Nitrogen Base W/O Amino Acids and Ammonium Sulfate, 10ppm L-Cana vanine, 5mM L-Ornithine Hydrochloride, 1mM L-Arginine Hydrochloride, 2%Glucose, 2%Agar) に塗布し、28℃, 20日間培養した。生育したコロニーをアルギニン (Arg) 寒天培地 (0.17%Yeast NitrogenBase W/O Amino Acids and Ammonium Sulfate, 5mM L-Arginine Hydrochloride, 2% Glucose, 2% Agar) および オルニチン (Orn) 寒天培地 (Arg 培地の L-Arginine Hydrochloride の代わりに 5mM の L-Ornithine Hydrochlorideを含む培地) に移植し、Arg 寒天培地では生育せず、Orn 寒天培地で生育する株をアルギナーゼ欠損変異株として単離した。

* 食品応用生物担当

2・4 アルコール脱水麴添加培地による発酵試験

アルコール脱水麴添加培地による発酵試験は、斎藤らの方法⁵⁾を参考に行った。YPD液体培地を用い25°Cで3日間培養した酵母培養液を、アルコール脱水麴添加培地に添加し、15°C、20日間培養した。麴は徳島製麴社製の乾燥麴G-50を使用した。培養後に、炭酸ガス減少量を測定し、培地上清について、香気成分の測定を行った。

2・5 200g規模清酒小仕込試験

表1に示した仕込み配合で総米200gの清酒小仕込み試験を行った。酵母の前培養は、アルコール脱水麴添加培地で、25°C、2日間行った。掛米は徳島製麴社製 α 化米AA-50、麴は徳島製麴社製乾燥麴G-50を用いた。品温は、初添15°C、仲添10°C、留添6.5°Cとし、その後9日目に最高品温が10.5°Cとなるように約0.5°C/日ずつ品温を上昇させ、以後上槽までこの温度を維持した。留以降の炭酸ガス減少量が58g以上となった時点で、遠心分離により上槽した。

表1 総米200g清酒小仕込み試験仕込み配合

	水麴	初添	仲添	留添	計
蒸し米(g)	0	28	46	86	160
麴米(g)	10	0	14	16	40
汲水(mL)	80	0	100	180	360

2・6 実用規模清酒醸造試験

県内酒造企業の協力を得て実施した。令和3年度に県内酒造企業にて、No.4206株とNo.12756株について総米600kgの、No.13088株について総米400kgの仕込みを実施した。麴米、掛米共に精米歩合50%の徳島県産「吟のさと」を使用した。仕込み配合を表2に示した。

表2 実用規模清酒醸造試験仕込み配合

No.4206	酒母	初添	仲添	留添	4段	計
総米(kg)	45	87	175	293	0	600
蒸し米(kg)	30	65	140	240	0	475
麴米(kg)	15	22	35	53	0	125
汲水(L)	55	110	220	460	40	885

No.12756	酒母	初添	仲添	留添	4段	計
総米(kg)	45	87	175	293	0	600
蒸し米(kg)	30	65	140	240	0	475
麴米(kg)	15	22	35	53	0	125
汲水(L)	55	110	220	460	0	845

No.13088	酒母	初添	仲添	留添	4段	計
総米(kg)	32	66	112	190	0	400
蒸し米(kg)	20	50	90	155	0	315
麴米(kg)	12	16	22	35	0	85
汲水(L)	40	90	180	270	0	580

仕込温度は、初添12°C、仲添10°C、留添7.5°Cとし、最高温度は11~12.5°Cとした。No.4206株の仕込みについては、10日目と12日目に計40Lの追水を行った。

2・7 成分分析

培地上清、もろみおよび製成酒の日本酒度は、京都電子工業社製振動式密度計 DA-640 を用いて、酸度およびアミノ酸度は国税庁所定分析法に従い分析した。アルコール分は、島津製作所社製高速液体クロマトグラフ Nexera XR（検出器：示差屈折率検出器、使用カラム：BioRad 社製発酵モニター用カラム）を用いて測定した。香気成分の測定は、アジレント・テクノロジー社製ガスクロマトグラフ GC8890（使用カラム：アジレント・テクノロジー社製 DB-Wax）を用いたヘッドスペース法にて行い、成分の定量は内部標準法に従った。内部標準として、カプロン酸メチルを用いた。尿素は酵素法（Fキット 尿素/アンモニア）により測定した。BMD 値は、もろみ日数にボーメ度を乗じて算出した。

3 結果および考察

3・1 アルギナーゼ欠損変異株の取得

LED 夢酵母 No.4206 株を親株とし、ピーク波長280nmの紫外線を照射することで、アルギナーゼ欠損変異株の取得を試みた。照射後の菌液を CAO 培地に塗抹したところ、コロニーが多数発生した。この中から比較的大きいコロニーを1,524株単離して、Arn 培地と Orn 培地に移植した。その結果、Orn 培地では生育するが Arg 培地では生育しない株を、アルギナーゼ欠損変異株として、343株取得した。

また、紫外線照射を行わない自然変異株についても同様の手法で6株のアルギナーゼ欠損変異株を取得した。

紫外線照射時間と照射後の酵母生菌数および変異株取得数を表3に示す。照射無と比較して40秒、60秒、120秒、180秒照射時は、変異株の取得数が10倍以上となり、LEDによる紫外線照射によって変異株の取得効率が大幅に向上した。一方で240秒以上の照射では、酵母死滅率が高くなるためか、180秒までの照射と比較すると変異株の取得数は減少した。

表3 紫外線照射時間と変異株取得数

	照射時間 (sec)	酵母死滅率 (%)	変異株 取得数
照射無	0	0	6
照射有	40	20	64
	60	50	79
	120	90	72
	180	99	74
	240	99.9	33
	300	99.99	21

3・2 アルコール脱水麴添加培地発酵試験

LEDによる紫外線照射によって得られたアルギナーゼ欠損変異酵母343株について、アルコール脱水麴添加培地を用いた発酵試験を行い、炭酸ガス減少量、培地上清の香気成分の分析を行った。変異株の多くは親株と比較して炭酸ガス減少量が低下しており、変異処理によって、発酵力が低下している可能性が示唆された。炭酸ガス減少量が親株と同等以上となった株は25株確認され、これらを親株と同等以上の発酵力を有する優良株として選抜した。選抜株の炭酸ガス減少量とカプロン酸エチル生産量を表4に示す。優良株の取得数は紫外線40秒～180秒照射の条件で多く、照射時間120秒が最も多くなった。紫外線240秒照射と300秒照射の条件では優良株の取得数は少なくなった。カプロン酸エチル生産性は各株共に親株と比較して、多少の増減は認められたものの大きな差は認められなかった。

表4 アルコール脱水麴添加培地発酵試験結果

菌株	照射時間 (sec)	炭酸ガス 減少量 (g)	カプロン酸 エチル (ppm)
4206	(親株)	3.77	4.7
9838	40	4.23	3.2
13088	40	3.83	4.7
13091	40	3.84	4.6
13104	40	3.92	4.7
10387	60	4.15	6.5
13134	60	3.91	4.8
13159	60	3.84	4.8
13161	60	3.84	4.8
13183	60	4.03	4.8
13199	60	3.85	4.3
10440	120	4.00	4.6
12730	120	3.84	6.6
12756	120	3.80	7.0
12758	120	4.15	6.0
13206	120	3.89	4.5
13233	120	3.84	5.0
13240	120	3.88	4.6
13249	120	4.15	5.0
13266	120	3.84	5.6
10486	180	4.10	3.4
10510	180	4.01	3.2
10531	180	4.10	3.9
13277	180	4.28	6.7
9922	240	4.00	3.2
9929	300	4.06	3.7

3・3 清酒小仕込み試験

アルコール脱水麴培地を用いた発酵試験で選抜した優良株25株について、200g規模の清酒小仕込み試験を行った。小仕込み試験製成酒の分析結果を表5に示す。尿素生成量は多くの株で検出限界(1.0ppm)以下となり大幅に減少していたが、減少が確認できない株や、半減程度に留まる株もいくつか見られた。もろみ日数が親株と同じ28日と、1日伸びた29日の株について、親株と同程度の発酵力を維持していると考え、これら10株を取得した。これらの株は紫外線照射時間が40秒と60秒の条件で多く取得された。このことから、紫外線照射時間が伸びると得られる変異株の発酵力が低下しやすくなる可能性が示唆された。

表5 200g 規模清酒小仕込み試験結果

菌株	照射時間 (sec)	もろみ日数 (日)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	日本酒度	アルコール 度 (%)	酢酸エチル (ppm)	酢酸 イソアミル (ppm)	イソアミル アルコール (ppm)	カプロン酸 エチル (ppm)	尿素 (ppm)
4206	(親株)	28	2.1	0.8	1.4	18.0	91.4	2.4	141	6.4	15.1
9838	40	29	2.3	0.9	4.3	18.0	103.9	2.7	154	5.9	N.D.
13088	40	28	2.2	1.1	4.2	18.2	90.3	4.1	162	5.1	N.D.
13091	40	28	2.3	0.9	3.6	18.1	86.8	3.0	153	5.3	N.D.
13104	40	28	2.2	1.0	5.1	18.3	94.8	4.2	173	4.9	8.3
10387	60	28	2.2	0.9	6.7	17.5	101.9	2.2	144	6.6	9.4
13134	60	29	2.1	1.1	4.6	17.9	87.3	3.0	150	5.5	5.1
13159	60	28	2.1	1.0	4.9	18.3	90.1	4.1	170	5.1	2.9
13161	60	30	2.2	0.9	4.5	17.8	93.0	3.1	152	5.1	N.D.
13183	60	28	2.3	0.9	4.7	18.2	91.1	4.3	167	5.2	N.D.
13199	60	30	2.5	0.9	2.2	16.9	91.1	5.1	131	5.0	N.D.
10440	120	37	3.3	1.1	-0.6	17.9	125.8	6.9	167	7.9	1.1
12730	120	30	2.0	0.8	5.8	18.4	102.1	4.3	171	5.5	6.7
12756	120	29	2.1	0.8	4.8	17.7	68.6	2.3	163	5.7	N.D.
12758	120	33	2.1	1.0	3.6	18.1	75.3	2.4	158	6.3	3.4
13206	120	30	2.3	1.0	3.9	17.7	89.2	3.0	158	5.6	N.D.
13233	120	30	2.2	0.9	3.8	17.5	89.8	2.9	145	5.7	N.D.
13240	120	35	2.4	1.0	2.3	17.6	69.8	2.6	145	5.6	N.D.
13249	120	30	2.2	1.1	3.9	17.8	84.7	3.2	166	7.5	N.D.
13266	120	35	2.4	1.0	2.4	17.7	78.9	2.7	160	8.5	N.D.
10486	180	29	2.3	0.9	6.7	18.1	119.9	4.2	144	7.2	8.5
10510	180	30	2.7	0.9	-3.5	17.7	95.4	2.6	151	8.3	1.5
10531	180	31	2.4	1.1	-5.0	17.8	97.8	2.4	214	7.5	11.9
13277	180	32	1.7	1.1	4.8	18.1	95.7	4.3	150	9.3	N.D.
9922	240	30	2.3	1.2	2.6	17.8	101.7	2.8	152	7.0	8.0
9929	300	31	2.5	1.1	-3.7	17.8	77.3	3.4	149	5.9	N.D.

N.D. : 検出限界 (1.0ppm 以下)

もろみ日数 29 日以内, 酸度 2.2mL 以下, 日本酒度 1.0 以上, カプロン酸エチル 5.0ppm 以上, 尿素 1.5 ppm 以下の株を優良酵母として選抜したところ, 紫外線 40 秒照射で取得した No.13088 株と 120 秒照射で取得した No.12756 株の 2 株が得られた。

3・4 実用規模醸造試験

県内酒造企業の協力を得て, No.13088 株, No.12756 株および親株の No.4206 株を総米 400kg~600kg 規模の純米吟醸酒の醸造に用いた。もろみ品温経過を図 1 に示す。No.4206 株と No.12756 株の仕込みは No.13088 株と比較して, 初期は高温の経過となった。中期はほぼ同じ品温経過となったが, 後期は日本酒度が早めに低下した No.13088 株は, 他の 2 株よりもやや早く品温を低下させた。

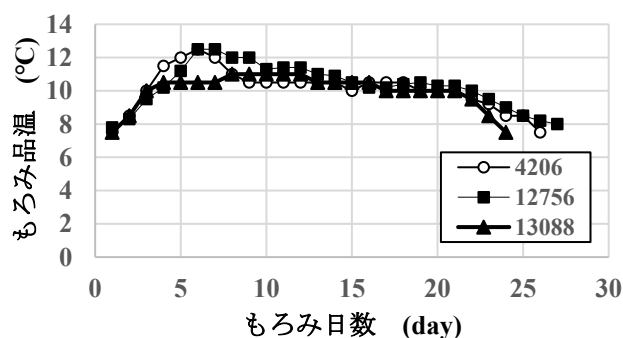


図1 もろみの品温経過

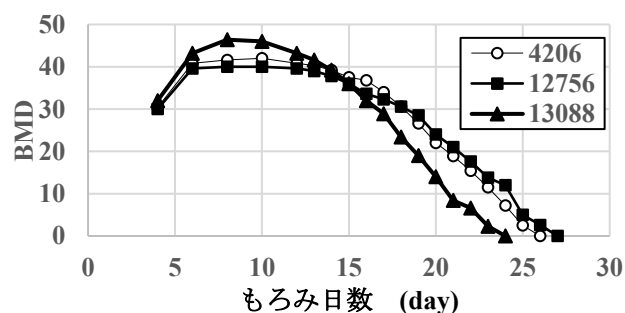


図2 もろみの BMD 経過

表6 製成酒の分析結果

菌株	もろみ日数 (日)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	日本酒度	アルコール 度 (%)	酢酸イソ アミル (ppm)	イソアミル アルコール (ppm)	カプロン酸 エチル (ppm)	尿素 (ppm)
No.4206(親株)	26	1.3	1.3	0	15.9	2.3	164.1	8.0	22.2
No.12756	27	1.4	1.4	0	16.0	1.0	122.1	9.8	N.D.
No.13088	24	1.3	1.2	0	15.9	2.2	205.6	9.5	N.D.

N.D. : 検出限界 (1.0ppm 以下)

日本酒度が0となった時点の、No.13088株は24日目、No.4206株は26日目、No.12756株は27日目に上槽した。

もろみ管理の指標となるBMD値の経過を図2に示す。No.4206株とNo.12756株の仕込みは、よく似た経過となったが、No.13088株の仕込みは他の2株と比較してもろみ初期のBMD値が高くなり、もろみ後期は早めに減少した。仕込み配合や温度経過が異なるため一概には言えないが、No.13088株はもろみ後期の発酵力が他の2株と比較してやや高めである可能性が示唆された。

製成酒の分析結果を表6に示す。アルコール度は3株とも同程度であった。No.12756株はNo.4206株と比較して、酸度、アミノ酸度が若干高めとなり、もろみ日数は1日長くなった。香気成分については、酢酸イソアミル、イソアミルアルコールは低めとなり、カプロン酸エチルは若干高めとなった。No.13088株はNo.4206株と比較して、酸度は同程度、アミノ酸度は若干低めとなり、もろみ日数は2日短くなった。香気成分については酢酸イソアミルは若干低く、イソアミルアルコールとカプロン酸エチルは若干高めとなった。両株共に親株と比較して分析値に若干の違いはあるものの、その差は酒質を大きく変えるほどではなかった。尿素についてはNo.12756株、No.13088株共にNo.4206株と比較して大きく低減していた。データは示していないが、官能評価では製成酒の香味に明確な差は認められなかった。以上の結果からNo.12756株、No.13088株共に尿素を大幅に低減しながら、親株のNo.4206株の特徴であるカプロン酸エチル高生産性と低酸度を維持しており、十分に実用化可能であると判断した。

4 まとめ

LEDを用いて育種した清酒酵母「LED夢酵母」の実用株No.4206株に、主波長280nmのLEDを用いて紫外線照射することにより、343株のアルギナーゼ欠損変異株を取得した。これらについてアルコール脱水麹培地を用いた発酵試験を行い、カプロン酸エチルを高生産し、炭酸ガス減少量が親株と同等以上の株を25株選抜した。選抜株を用いて200g規模の清酒小仕込試験を行ったところ、発酵力、カプロン酸エチル生産性、酸生産性等が親株と同程度であり、尿素生産性が大幅に低下した株を2株取得した。取得したNo.12756株とNo.13088株を用いて実用規模の醸造試験を行ったところ、製成酒の酒質は親株であるNo.4206株で醸造したものと比較して遜色なく、尿素生産性が大幅に低下していたことから、両株共に実用化が十分可能な酵母であると判断した。

参考文献

- 1) 岡久修己, 宮崎絵梨, 日開野輔, 中村怜. "UV-LEDを用いた清酒酵母の育種" 徳島県立工業技術センター研究報告, 2015, 24, p. 23-25.
- 2) 原昌道, 吉沢淑, 中村欽一. "尿素生産能の低い酵母による清酒醸造" 醸協, 1988, 83, p. 355-359.
- 3) 北本勝ひこ, 宮崎佳緒子, 山岡洋, 五味勝也, 熊谷知栄子. "変異処理を行わないウレア非生産性清酒酵母の単離" 醸協, 1992, 87, p. 598-601.
- 4) 岡久修己, 池田絵梨, 中村怜. "UV-LEDを用いた清酒酵母の育種" 徳島県立工業技術センター研究報告, 2017, 26, p. 41-44.
- 5) 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. "アルコール脱水麹を用いる培地による優良酵母の分離とその性状" 醸協, 1992, 87, p. 915-921.