

LED 夢酵母の尿素低生産性株の取得 II

Isolation of Lower Urea Productivity Mutants from *S.cerevisiae* LED yume koubo II

岡久 修己*
OKAHISA Naoki

抄 録

カブロン酸エチルとリンゴ酸を高生産する「LED 夢酵母」No.3826-2 株について、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、アルコール脱水麴添加培地及び清酒小仕込み試験による選抜により、親株と類似の性質を示しつつ、尿素低生産性となった優良酵母を 3 株取得した。当該酵母のうち最も親株と類似した性質を示した 1 株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、香味良好な日本酒を製造可能な優良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。また、令和元年度からは LED 夢酵母製成酒の海外輸出促進のため、一部の国で規制値が設定されているカルバミン酸エチル低減のための、尿素低生産性株の育種試験に取り組んだ²⁾。これまでに、カブロン酸エチル高生産性の LED 夢酵母 No.4206 株を親株とし、香気成分生産性と発酵力が親株と同程度で、尿素生産量が減少した No.13088 株と、香気成分生産性は低いものの、製成酒の酸が低く、食中酒の醸造に適した尿素低生産性株の No.12422 株を取得している。

一方で、カブロン酸エチルとリンゴ酸を高生産し、華やかな香りと爽やかな酸味が特徴の日本酒醸造が可能な LED 夢酵母 No.3826-2 株については、尿素低生産性株の取得がなされていなかった。当該酵母を用いて醸造した日本酒について、輸出を増やしていく動きもあることから、本研究では、No.3826-2 株を親株とし、UV-LED を用いて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

カブロン酸エチルとリンゴ酸を高生産し、発酵力はやや弱めの LED 夢酵母 No.3826-2 株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) 2)}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NCSU334B(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°C, 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60~120秒間照射した。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°C, 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

* 食品応用生物担当

(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。

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⁴⁾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GK-60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GK-60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。留添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5年度に県内酒造企業にて, 親株の No.3826-2株と選抜株のNo.13500株について総米2000kgの仕込みを実施した。麴米, 掛米共に精米歩合58%の徳島県産山田錦を使用した。仕込み配合を表2に示した。仕込み温度は, 初添11.5~12.0°C, 仲添8.5~9.0°C, 留添6.5

~7.0°Cとし, 最高温度は12.0~12.5°Cとした。No.3826-2株の仕込みについては, 4日目, 5日目, 7日目に計300Lの追水を行った。No.13500株の仕込みについては, 3日目, 4日目, 6日目, 10日目に計360Lの追水を行った。

表2 実用規模清酒醸造試験仕込み配合

No.3826-2	酒母	初添	仲添	留添	4段	計
総米(kg)	130	295	555	1020	0	2000
蒸し米(kg)	90	220	430	860	0	1600
麴米(kg)	40	75	125	160	0	400
汲水(L)	155	320	700	1550	300	3025

No.13500	酒母	初添	仲添	留添	4段	計
総米(kg)	140	280	580	1000	0	2000
蒸し米(kg)	95	205	450	850	0	1600
麴米(kg)	45	75	130	150	0	400
汲水(L)	168	252	696	1584	360	3060

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 (E キット Liquid 尿素/アンモニアおよびE キット Liquid 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.3826-2 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 252 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、36 株取得した。

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。前報⁴⁾の結果を参考に、最も変異株取得効率の高かった 60 秒照射及び 120 秒照射によって変異株の取得を試みたところ、照射無しでは変異株を取得できなかったのに対し、60 秒及び 120 秒の照射により変異株が取得できた。60 秒照射の変異株の取得数が 120 秒照射の 2 倍となり、No.3826-2 を親株とした際は、60 秒照射が変異株取得に適している可能性が示唆された。

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	0
照射有	60	50	24
	120	90	12

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 36 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 4 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。優良株は、紫外線照射時間 60 秒で 3 株、120 秒で 1 株が取得された。カプロン酸エチル生産性は各株共に親株と比較して、同等かやや増加していた。

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)
3826-2	(親株)	3.39	5.0
13500	120	3.48	5.6
13548	60	3.46	5.0
13559	60	3.47	5.1
14160	60	3.54	7.1

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4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。尿素生成量は全ての株で親株より減少しており、特にNo.13500株、No.13559株、No.14160株は親株の3分の1以下に減少していた。リンゴ酸は全ての株で親株よりも高くなっており、親株の特徴であるリンゴ酸生産性の高さは維持されているか、より強化されている可能性が示唆された。カプロン酸エチルは、No.13548株がやや低くなったものの、他の3株は親株と同程度か、やや高くなっており、これらの株はカプロン酸エチル生産性について、親株の特徴を維持している可能性が示唆された。発酵力については、No.13548株は、親株よりももろみ日数が短くなっており、発酵力が強くなっていたが、他の3株は、もろみ日数、日本酒度、アルコールについて、親株と比較して、大きな差は確認できず、親株と同程度の発酵力である可能性が示唆された。以上の結果から、No.13500株、No.13548株、No.14160株の3株を、親株であるNo.3826-2株の特徴を維持した尿素低生産株として取得した。

表 5 200g 規模清酒小仕込み試験結果

菌株	もろみ日数 (日)	日本酒度	アルコール 度 (%)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	リンゴ酸 (ppm)	コハク酸 (ppm)	乳酸 (ppm)	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 (mg/L)
3826-2	36	-9.6	16.7	3.4	1.8	68.4	65.5	35.5	52.2	1.6	152	6.1	15.0
13500	36	-7.2	17.1	3.4	2.2	77.3	62.2	32.6	68.1	2.3	168	6.3	1.0
13548	32	-11.5	16.4	3.7	2.0	86.7	74.1	31.4	39.4	1.4	148	5.5	9.0
13559	36	-11.8	16.6	3.5	2.1	86.3	69.6	28.9	47.2	1.6	140	6.3	4.0
14160	37	-11.7	16.5	3.4	2.5	96.6	44.5	37.1	33.2	0.7	107	7.4	3.4

3・4 実用規模醸造試験

小仕込み試験の結果、親株と最も類似した特徴を示した尿素低生産株のNo.13500株と、親株のNo.3826-2株について県内酒造企業の協力を得て、総米2000kg規模の実用規模醸造試験を実施し、比較を行った。もろみ管理の指標となるBMD値の経過を図1に示す。No.13500株とNo.3826-2株の仕込みは、類似の経過となり、発酵力は同程度であることが示唆された。日本酒度-20程度を上槽の目標とし、No.3826-2株は20日目に日本酒度-20.5で、No.13500株は同じく20日目に日本酒度-21.0で上槽した。

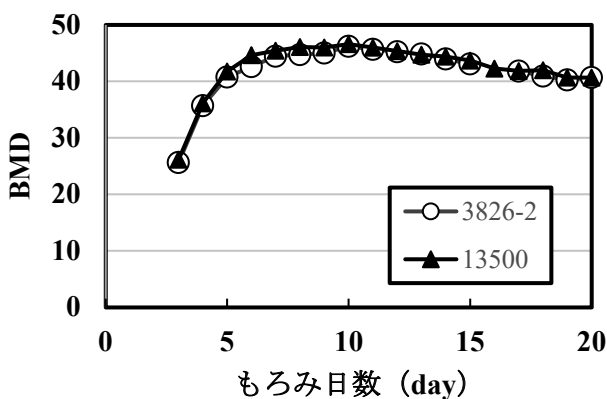


図1 もろみのBMD経過

製成酒の分析結果を表6に示す。アルコール度、酸度、アミノ酸度は2株とも同程度であった、有機酸については、No.13500株はNo.3826-2株の特徴である高いリンゴ酸生産性を示し、コハク酸、乳酸も同程度の生成量であった。香気成分については、酢酸エチル、イソアミルアルコール、酢酸イソアミルはやや高めとなり、カプロン酸エチルはやや低めとなったが、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、No.13500株はNo.3826-2株と比較して3分の1以下に減少した。以上の結果からNo.13500株は、尿素を大幅に低減しながら、親株のNo.3826-2株の特徴であるリンゴ酸とカプロン酸エチル高生産性を維持しており、発酵力も同程度であることから、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.3826-2株に、主波長280nmのLEDを用いて紫外線照射することにより、36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4株選抜した。選抜株を用いて200g規模の清酒小仕込み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3株取得した。当該酵母のうち最も親株と類似した性質を示したNo.13500株を用いて実用規模醸造試験を行ったところ、製成酒の酒質は親株であるNo.3826-2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、No.13500株は実用化が十分可能な酵母であると判断した。

参考文献

- 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.
- 岡久修己. “LED夢酵母の尿素低生産性株の取得” 徳島県立工業技術センター研究報告, 2022, 31, p. 19-23.
- 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.
- 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.

謝辞

実用規模醸造試験を快く引き受けていただいた徳島県内酒造企業の皆様に厚く感謝いたします。

表6 実用規模醸造試験製成酒の分析結果

菌株	もろみ日数 (日)	日本酒度	アルコール度 (%)	酸度 (mL)	アミノ酸度 (mL)	リンゴ酸 (ppm)	コハク酸 (ppm)	乳酸 (ppm)	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 (mg/L)
3826-2	20	-20.5	14.8	2.7	1.0	56.8	39.9	45.1	51.1	1.4	147	6.8	8.8
13500	20	-21.0	14.7	2.7	0.9	56.9	41.6	46.9	71.1	2.0	210	5.0	2.3