

吟醸酒製造用清酒酵母からのピルビン酸低生産株の育種と 実製造でのピルビン酸および α -アセト乳酸の低減

佐々木 真¹・大場 孝宏²・末永 光²・稲橋 正明³・佐藤真佐恵⁴・鶴田 裕美⁴
小林 元太⁵・栢植 圭介⁴・吉村 臣史⁴・小金丸和義⁴・北垣 浩志^{1*}

¹佐賀大学農学部生物環境科学科, ²福岡県工業技術センター生物食品研究所, ³財団法人日本醸造協会
⁴佐賀県工業技術センター, ⁵佐賀大学農学部生命機能科学科

(2011年2月7日受付 2011年3月10日受理)

Breeding of a low pyruvate-producing ginjo sake yeast and its application to the fermentation industry

Makoto Sasaki¹, Takahiro Oba², Hikaru Suenaga², Masaaki Inahashi³, Masae Sato⁴, Hiromi Tsuruta⁴, Genta Kobayashi⁵, Keisuke Tsuge⁴, Takeshi Yoshimura⁴, Kazuyoshi Koganemaru⁴, and Hiroshi Kitagaki^{1*} (*Department of Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Saga University, Honjo-cho 1, Saga, Saga 840-8502*¹; *Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial Technology Center, Aikawa-machi 1465-5, Kurume, Fukuoka 839-0861*²; *Brewing Society of Japan, Takinogawa 2-6-30, Kita-ku, Tokyo 114-0023*³; *Industrial Technology Center of Saga Prefecture, Yaemizo 114, Nabeshima-cho, Saga, Saga 849-0932*⁴; *Department of Applied Biochemistry and Food Science, Faculty of Agriculture, Saga University, Honjo-cho 1, Saga, Saga 840-8502*⁵) *Seibutsu-kogaku* **89**: 222-227, 2011.

Since residual pyruvate during sake brewing leads to generation of off-flavours such as acetaldehyde and diacetyl, many researchers have challenged to develop a method to decrease pyruvate level during sake brewing. Particularly, during brewing of ginjo sake, the decrease of pyruvate level tends to be slow and a technology to decrease pyruvate level will be beneficial to improve the quality of flavour and taste of ginjo sake. In order to breed a sake yeast which produces a low amount of pyruvate during brewing of ginjo sake, mutants which are resistant to ethyl α -transcyanocinnamate were isolated. From among the resistant mutants, one strain produced a lower level of pyruvate during sake brewing relative to its parent strain. Ginjo sake was brewed with this strain on a laboratory scale, and this sake contained an increased amount of lactate (23.0%), a lower amount of acetate (24.2%), a lower amount of *n*-propanol (12.0%), a higher amount of isoamylalcohol (6.5%) and a lower amount of isoamylacetate (1.6%). Furthermore, ginjo sake was brewed with the strain on a factory scale (total 1 ton rice). It turned out that the levels of pyruvate and α -acetolactate of sake brewed with the ethyl α -transcyanocinnamate-resistant sake yeast were significantly lower than those of the parent strain throughout sake brewing, and final ethanol concentrations of sake brewed with both strains were not significantly different. These results indicate that the developed brewery yeast strain is highly practical, and that isolation of a mutant resistant to ethyl α -transcyanocinnamate is a promising method to breed a low pyruvate-producing brewery yeast.

[**Key words:** yeast, breeding, mitochondria, pyruvate, ginjo sake]

ピルビン酸はグルコースから解糖系により生成され、さまざまな物質の出発点となる物質である¹⁾。しかし同時にピルビン酸は清酒醸造において残存すると、上槽時のもろみへのエタノール添加操作時に脱炭酸されてアセ

トアルデヒドになり、上槽された清酒は木香様臭を呈するようになる²⁾。また、細胞内において α -アセト乳酸合成酵素 Ilv2 の酵素の働きでピルビン酸の2位のカルボニル炭素がアセトアルデヒド-チアミンピロリン酸により

*連絡先 E-mail: ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp

求核攻撃を受けることにより³⁾ α -アセト乳酸が合成される⁴⁾と、細胞外に漏出し、貯蔵中に非酵素的な酸化的脱炭酸によりジアセチルとなり、ジアセチル臭が発生する⁵⁾。ピルビン酸と α -アセト乳酸の濃度は清酒醸造においてほぼ一定の比率であることがわかっている⁶⁾。これらのことから、ピルビン酸の低減は酒類全般の発酵技術において大きな技術的課題であった。

一方、産業的なアルコール発酵の研究の中で、ミトコンドリアはその役割をほとんど顧みられてこなかった。これはミトコンドリアが酸素呼吸のための細胞内小器官であり、酸素呼吸のほとんど起こらないアルコール発酵においてその研究が行われてこなかったことによると思われる。また酸素呼吸と無酸素・グルコース抑制の発酵状態で酵母ミトコンドリアの存在や構造がどのように変化するかを分子生物学的手法を使って解析した研究もこれまでまったく報告されてこなかった^{7,8)}。しかし筆者らは分子生物学的にミトコンドリアに局在する蛍光タンパク質GFPを清酒酵母に導入し清酒醸造中におけるその構造を観察することで、すべての産業的なアルコール発酵で酵母ミトコンドリアが存在することを初めて明らかにした⁹⁾。さらにミトコンドリアの断片化に関与するFis1の遺伝子を清酒酵母で破壊してミトコンドリアの形態が変化した株を作成し、この株を使って仕込んだ清酒では親株と比べて物質組成が変化していることを明らかにした¹⁰⁾。これらの事実から、清酒醸造中の酵母ミトコンドリアの形態を含めた状態が清酒醸造中の物質代謝に積極的な役割を持つことがすべての産業的なアルコール発酵で初めて明らかになった。

筆者らは以上の知見と、ミトコンドリアへの物質輸送が酵母の生理に重要な役割を持つという知見¹¹⁾を活かして、ミトコンドリアの輸送に着目したピルビン酸の低減酵母の育種というまったく新しい発想の育種に成功してきた。すなわち、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤、 α -トランスシアノ桂皮酸エチルへの耐性を有する酵母を分離することで、ピルビン酸低生産株の育種に成功してきた¹²⁻¹⁵⁾。その育種戦略は以下のようなものである。筆者らはピルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤、 α -トランスシアノ桂皮酸エチルの存在下では酵母が生育できないという事実を新規に見だし、この結果はミトコンドリアが α -トランスシアノ桂皮酸エチルの存在下ではピルビン酸を獲得できず、ミトコンドリアが栄養不足になって増殖できなくなるためと解釈した。もしそうであるならば、 α -トランスシアノ桂皮酸エチルへの耐性株の中には、ピルビン酸の細胞質からミトコンドリアへの輸送が増強された株か、細胞質でピルビン酸を他の有機酸に変換してからミトコンドリアに輸送するような代謝が増強された株が含まれていると予想した。事実、ピルビン酸が低減し、他の有機酸の組成が変化した株を α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株の中から

見いだすことができた。 α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株でピルビン酸が低減するメカニズムは詳細にはまだわかっていないが、ミトコンドリアDNAを欠損させた株は α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性になることから、また α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株からミトコンドリアDNAを欠落させると多くの株で野生株と比べて異なった有機酸変化を呈する¹²⁾ことから、 α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性はミトコンドリアにおける物質代謝と関連していると考えられる。

前報¹²⁾ではおもに一般酒向けの清酒酵母である協会7号を親株として用いてピルビン酸低生産株を取得した。一方、吟醸酒の製造は低温でしかも高い精米歩合の米を使って行われるため、発酵が緩慢になりピルビン酸の残存が特に問題になる場合が多い。吟醸酒とは、精米歩合が60%以下の米を使い、麴歩合が15%以上の原料を使って吟醸造りをするなどの要件により清酒の製法品質表示基準により規定される清酒の一つのジャンルの特定名称酒である。しかし α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株の取得という方法を使って吟醸酒製造用酵母からピルビン酸低生産性酵母が育種できるかどうかはこれまでわかっていなかった。またこの新しい育種方法が特定の株にしか使えないのか、他の醸造酵母にも適用可能なのかは、技術情報として重要だと思われる。そこで、一般に吟醸酒製造に使われている熊本系の清酒酵母で育種ができるかどうかを調べるため、熊本系の清酒酵母の一つであるF-4株を用いて同様の手法でピルビン酸低生産性酵母が育種できるかどうかを調べた。その結果、吟醸酒醸造用清酒酵母でも本手法を用いてピルビン酸低生産株を取得でき、この株は総米1トンの工場における実製造でもエタノール生産性の低下を伴わずにピルビン酸・ α -アセト乳酸の顕著な低減を示すことが明らかとなったのでここに報告する。

実験方法

株 親株として、熊本系の吟醸酒製造用酵母F-4株を用いた。

突然変異処理 前報¹²⁾のとおりに行った。すなわち、酵母をYPD培地（1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose）で培養した培養液をOD₆₀₀が3.3のときに3 mlとって集菌し、1.7 mlの0.1 Mリン酸カリウムバッファー（pH7.0）に懸濁した。懸濁液に対してEthyl methane sulfate（ナカライテスク）を50 μ l加え、30°Cで60分ゆっくり振盪し、8 mlの7% Sodium thiosulfate（ナカライテスク）を混ぜ、集菌し、滅菌水で洗って300 μ lの滅菌水に懸濁し、100 μ lを1.0 mg/mlの α -トランスシアノ桂皮酸エチル（Sigma Aldrich社）を含有するYPDプレートに撒き、30°Cで数日間培養した。

原料 通常の仕込試験のときには掛米として精米70%のアルファ米（徳島精麴）、麴として精米70%の乾

Table 1. Proportions of materials used for sake brewing on a factory scale.

| | Shubo | Soe | Naka | Tome | Yodan | Total |
|-------------------|-------|-----|------|------|-------|-------|
| Total rice (kg) | 70 | 158 | 300 | 472 | | 1000 |
| Steamed rice (kg) | 46 | 112 | 240 | 392 | | 790 |
| Koji (kg) | 24 | 46 | 60 | 80 | | 210 |
| Water (l) | 77 | 160 | 375 | 628 | 10 | 1250 |

Rice polished to 65% was used as the raw material.

乾燥麹（徳島精麹）を用いた。

吟醸酒の仕込試験のときには掛米として精米40%のアルファ米（徳島精麹）、麹として精米50%の乾燥麹（徳島精麹）を用いた。

仕込配合 実験室スケールの小仕込は以下の仕込配合で行った。アルファ米 60 g, 乾燥麹 23 g, 95%乳酸 45 μ l, 蒸留水 200 ml, 酵母 2×10^9 cells. 醸造は15°Cで14日間行った。仕込んで24時間後に均一化するために葉さじで攪拌した。工場スケールの仕込はTable 1に示す仕込配合で行った。

ピルビン酸および有機酸、香気成分の測定 もろみのピルビン酸の測定には、F-kitピルビン酸（J. K. インターナショナル）を用いた。製成酒の有機酸分析はポストカラム分析法により行った。すなわち、高速液体クロマトグラフィー（日立ハイテクノロジーのL-2130型ポンプ2台）を用い、カラムにはShodexのガードカラムKC-LGおよびKC-811を2本連結したものをを用いた。流速0.5 ml/minで6 mMの過塩素酸を溶出液とし、カラム温度は40°Cに保持し、ポストカラムで0.6 ml/minの流速の0.1 mMプロモチモールブルー、30 mMリン酸一水素二ナトリウムを合流させ、検出は日立ハイテクノロジーのL-2420型UV-VIS検出器を用いて440 nmで行った。香気成分の分析はヘッドスペースガスクロマトグラフィーを用いて既報¹⁶⁾に準じて行った。

α -アセト乳酸の測定 α -アセト乳酸濃度は既報¹⁷⁾に従って高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

二点識別法 親株で発酵させた清酒と育種した株で発酵させた清酒をランダム化しブラインドにしてそれぞれ9点用意し、高度に訓練されたパネルにさわやかな酸味のする方を選ばせた。結果は二項検定により検定した。

実験結果

吟醸酵母F-4株からの α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株の分離 まず、既報¹²⁾に準じて、F-4株をethyl methane sulfateで処理し、突然変異を誘起させた。その後、ピルビン酸のミトコンドリアへの輸送阻害剤として知られている α -トランスシアノ桂皮酸エチルを1.0 mg/mlの濃度で含む培地に塗布した。その結果、1プレートあたり約100個の耐性株を取得することができた。そのうち10株を候補株として分離し以後の解析に供した。

得られた株の α -トランスシアノ桂皮酸エチルへの耐性をさらに確認するために、液体培地での増殖を確認した。耐性株と親株を0.5 mg/mlの α -トランスシアノ桂皮酸エチルを含むYPD液体培地で振盪培養したところ、親株はこの培地において2日間ではほとんど増殖しないのに対し(OD₆₀₀が1.0以下)、得られた10株中7株は明確な増殖(OD₆₀₀が4.0以上)を示した。

α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を用いた清酒小仕込試験 次に、前報¹²⁾と同じように α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株が清酒醸造においてピルビン酸の低生産性を示すかどうかを調べるために、これらの株を用いて実験方法に示す仕込配合により清酒小仕込試験を行った。それぞれ前培養から独立して3連の仕込を行った。まず炭酸ガス減量を調べると、どの耐性株も片側 t 検定で $p < 0.05$ で有意には親株と発酵能力が変わらないことがわかった(data not shown)。清酒醸造14日目におけるピルビン酸濃度を測定したところ、7株の中でF-4TCR1株だけ親株よりもピルビン酸濃度が低い傾向が認められた($p < 0.07$) (Fig. 1)ので、詳しい解析を行った。

α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を用いて醸造した清酒のピルビン酸濃度解析 F-4TCR1株の清酒醸

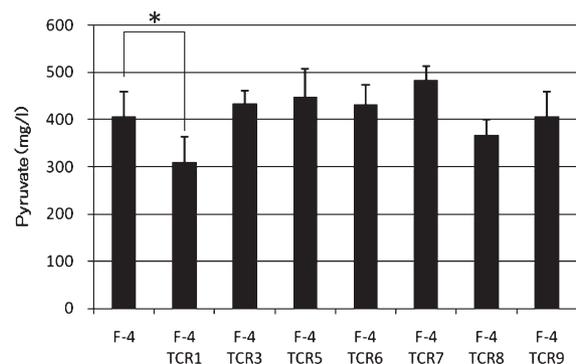


Fig. 1. Pyruvate concentrations of sake brewed with F4 and their ethyl α -transcyanocinnamate-resistant mutants on a laboratory scale. Sake brewing was performed with the method described in the Materials and Methods. Pyruvate concentrations were measured by F-kit pyruvate (J. K. International). The results are mean values \pm standard deviations (independent triplicate brewing experiments from respective starter cultures, *; $p < 0.07$, unpaired one-tailed Student's t -test without known standard deviations).

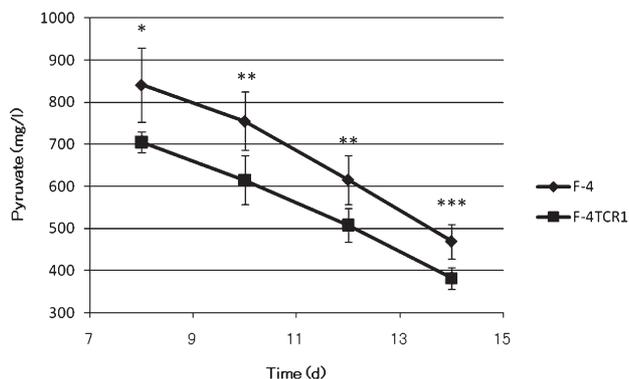


Fig. 2. Pyruvate concentrations of sake brewed with F-4 and its ethyl α -transcinnamate-resistant mutant F-4TCR1 on a laboratory scale. Sake brewing was performed with the method described in the Materials and Methods. Pyruvate concentrations were measured by F-kit pyruvate. The results are mean values \pm standard deviations (independent six brewing experiments from respective starter cultures, *; $p < 0.01$, **; $p < 0.005$, ***; $p < 0.001$, unpaired one-tailed Student's t -test without known standard deviations).

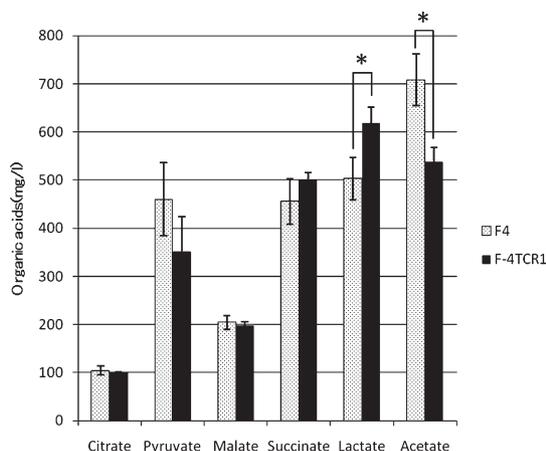


Fig. 3. Organic acid contents of sake brewed with F-4 and its ethyl α -transcinnamate-resistant mutant F-4TCR1 on a laboratory scale. Sake brewing was performed with the method described in the Materials and Methods. Organic acid contents of sake were measured by HPLC with post-column derivatization as described in the Materials and Methods. The results are mean values \pm standard deviations (independent three brewing experiments from respective starter cultures, *; $p < 0.05$, unpaired one-tailed Student's t -test without known standard deviations).

Table 2. Flavour profiles of sake brewed with F-4 and its ethyl α -transcinnamate-resistant mutant (F-4TCR1).

| | Ethylacetate | <i>n</i> -Propanol** | Isobutanol | Isoamylalcohol* | Isoamylacetate* | Ethylcaproate | E/A ratio |
|---------|----------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| F-4 | 29.6 \pm 4.2 | 104.3 \pm 1.0 | 55.4 \pm 1.7 | 152.1 \pm 5.2 | 1.26 \pm 0.20 | 1.03 \pm 0.06 | 0.83 \pm 0.10 |
| F-4TCR1 | 29.0 \pm 1.4 | 91.8 \pm 1.6 | 57.9 \pm 0.6 | 162.0 \pm 2.9 | 1.24 \pm 0.05 | 0.89 \pm 0.04 | 0.77 \pm 0.02 |

Flavour profiles were analyzed by head-space gas chromatography as described in the Materials and Methods. The results are mean values \pm standard deviations of triple independent brewing experiments from respective starter cultures (mg/l). Bold letters indicate the results that are significantly different between the strains (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.005$ (unpaired one-tailed Student's t -test without known standard deviations)).

造中のピルビン酸濃度が本当に親株よりも低いかどうかを調べるため、F-4株とF-4TCR1株で前培養から独立して6連の仕込を行い、8日目以後2日おきにサンプルを採取してピルビン酸濃度を測定し、片側 t 検定を行った。その結果、F-4TCR1株のピルビン酸は親株であるF-4株と比べて8日目には $p < 0.01$ で、10、12日目には $p < 0.005$ で、14日目には $p < 0.001$ で有意に低いことが明らかとなった (Fig. 2)。

α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を用いて醸造した吟醸酒の有機酸組成解析 以上の結果から、F-4TCR1株は清酒醸造中のピルビン酸濃度が親株よりも低いという形質を持つことがわかったので、F-4TCR1株を用いて吟醸酒を前培養から独立して3連で製造し、醸造した清酒の有機酸組成を調べた (Fig. 3)。その結果、親株であるF-4株で造った清酒と比べて乳酸が23.0%増加し ($p < 0.05$)、酢酸が24.2%減少していた ($p < 0.05$)。

α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を用いて醸造した吟醸酒の香り成分解析 次に、F-4TCR1株で醸造

した吟醸酒の香り成分を調べた (Table 2)。その結果、F-4TCR1株で醸造した吟醸酒では親株であるF-4株で醸造した吟醸酒と比べて *n*-プロパノールが12.0%減少し ($p < 0.005$)、イソアミルアルコールが6.5%増加し ($p < 0.05$)、酢酸イソアミルが1.6%減少することが明らかとなった。他の成分は $p < 0.05$ では有意差がなかった。E/A比は酢酸イソアミルとイソアミルアルコールの比を表す。酢酸イソアミルはバナナ様の華やかな香りを呈するのに対して、イソアミルアルコールに代表される高級アルコールは全般にやや重い、有機溶媒様の香りを呈するので、E/A比は吟醸香の性質を表し、高いほど吟醸酒らしい香りを呈すると考えられている。F-4TCR1株で醸造した清酒のE/A比はF-4株で醸造した清酒に比べて $p < 0.05$ で有意には差がないことが明らかとなった。このことから、若干の組成変化はあるものの、全体としてはF-4TCR1株で造った吟醸酒の香り成分は親株であるF-4株と大きくは変わらないと考えられた。

α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を用いた純米酒

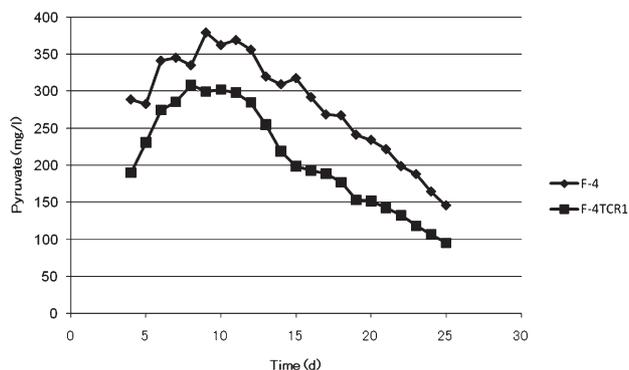


Fig. 4. Pyruvate concentrations of sake brewed with F-4 and its ethyl α -transcyanocinnamate-resistant mutant F-4TCR1 on a factory scale. Sake brewing was performed with rice polished to 65% as described in Table 1. Pyruvate concentrations of sake were measured by HPLC with post-column derivatization as described in the Materials and Methods.

の工場スケールでの実製造 以上の結果から、F-4TCR1株は実験室スケールではF-4株と比べて清酒醸造中のピルビン酸が低減していることが明らかとなった。次にこのピルビン酸の低減が工場スケールでも確認できるかを調べるため、Table 1の仕込配合により、総米1トンの清酒仕込を行った。その結果、F-4TCR1株で醸造した清酒はFig. 4に示すとおり、その親株のF-4株で醸造した清酒よりも発酵期間を通してピルビン酸が低減していることが明らかとなった。またF-4TCR1株で醸造した清酒はTable 3に示すとおり、その親株のF-4株で醸造した清酒よりもジアセチルの前駆体である α -アセト乳酸の濃度が8割近く低減していることが明らかとなった。さらにTable 4に示すとおり、最終的に上槽した清酒のエタノール濃度や日本酒度などの一般分析値もF-4株とF-4TCR1株で醸造した清酒で大きな差は観察されなかった。またTable 5に示すとおり、香氣成分はややE/A比が下がるが酢酸イソアミルの濃度は増加しており、全体として問題のないものであった。これらの結果から、工場スケールでもF-4TCR1株を用いることでエタノー

Table 3. The concentrations of α -acetolactate of sake brewed with F-4 and its ethyl α -transcyanocinnamate-resistant mutant (F-4TCR1).

| | 9 d | 14 d |
|---------|------|------|
| F-4 | 0.28 | 0.08 |
| F-4TCR1 | 0.05 | 0.02 |

The concentrations of α -acetolactate were analyzed by HPLC as described in the Materials and Methods and are expressed as mg/l.

ル生産能の低下や酒質の低下を伴わずにピルビン酸の低減を実現できることが明確に示された。

α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を用いて工場スケールで製造した純米酒の官能評価試験 工場スケールで実製造した純米酒の官能評価を行うため、まず、製造した純米酒を用いて官能評価を行い、自由記述によりその特性を記述した。その結果、味が軽い、すきっとした軽い酸味を持つなどの評価が得られた。次にこのことを客観的に検証するために、軽い味を持ち、さわやかな酸味のするものを、F-4株とF-4TCR1株で実製造した清酒からブラインドで二点識別法で選んでもらったところ、9回中8回、F-4TCR1株を用いて実製造した清酒が選択され、二項検定により $p < 0.05$ で有意にさわやかな酸味を持つことが明らかとなった。

考 察

筆者らはミトコンドリア輸送に着目することでピルビン酸の低減した清酒酵母の育種が可能であることを明らかにしてきた¹²⁻¹⁴。しかしながら、前報¹²⁾では親株として主に一般酒向けの協会7号を用いたため、他の醸造酵母で α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株がピルビン酸低生産性を示すのかどうかはまだ明らかになっていなかった。本報告において、吟醸酒製造用清酒酵母でもこの手法でピルビン酸低生産株を取得できることが明らかになった。またこの酵母を使って製造した清酒は、乳酸が増加して酢酸も減少していた。育種した酵母を使う

Table 4. General properties of sake brewed with F-4 and F-4TCR1.

| | Nihonshudo | Acidity | Amino acidity | Ethanol (v/v%) |
|---------|------------|---------|---------------|----------------|
| F-4 | +1.2 | 1.8 | 1.4 | 17.70 |
| F-4TCR1 | +1.4 | 1.8 | 1.6 | 17.93 |

Table 5. Flavour profiles of sake brewed with F-4 and its ethyl α -transcyanocinnamate-resistant mutant (F-4TCR1).

| | Ethylacetate | <i>n</i> -Propanol | Isobutanol | Isoamylalcohol | Isoamylacetate | Ethylcaproate | E/A ratio |
|---------|--------------|--------------------|------------|----------------|----------------|---------------|-----------|
| F-4 | 129.2 | 83.4 | 55.6 | 129.4 | 6.3 | 2.3 | 4.9 |
| F-4TCR1 | 131.5 | 79.2 | 62.3 | 148.1 | 6.8 | 2.4 | 4.6 |

Flavour profiles were analyzed by head-space gas chromatography as described in the Materials and Methods and are expressed as mg/l.

と工場スケールで親株と比べてエタノール生産能の低下を伴わずにピルビン酸と α -アセト乳酸の顕著な低減が認められたことから、 α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株取得による育種は他の醸造酵母にも敷衍可能な方法であり、今後他の酵母の改良の方法として普及していくことが期待される。

本方法により育種した酵母は、工場スケールでの実製造でもピルビン酸の明確な低減が認められた。緒論に記載した理由で、清酒醸造においてピルビン酸の低減は上槽のタイミングを決定する上で重要な指標となっている。Fig. 4のデータから考えると、たとえば上槽時のピルビン酸濃度を150 mg/lと設定すれば、25日間の発酵期間を20日に短縮できることになる。これだけの発酵期間の短縮が可能になれば清酒仕込の最盛期のタンクの効率的な回転が可能になり、経済的な効果は大きいと期待できる。また本酵母を使った工場スケールでの実製造でジアセチルの直接の前駆体である α -アセト乳酸が顕著に減少していたことから、本酵母を使えば貯蔵中のジアセチル臭の発生のリスクが軽減できると期待できる。

これまでに育種されたピルビン酸低生産性酵母は、ピルビン酸のアナログである β -フルオロピルビン酸への耐性を指標に選択されたものであった¹⁸⁾。この株は工場スケールでの製造でピルビン酸の低生産性を示すが、同時にエタノール生産能も低下していた。本育種株は工場スケールでの仕込でピルビン酸の低生産性を示すがエタノールの生産能は低下しておらず、エタノールの生産能低下を伴わずにピルビン酸の低生産性を示す初めての酵母育種となった。ピルビン酸のアナログ耐性酵母はピルビン酸を基質とするすべての酵素が遺伝的に変化していると考えられるのに対し、本育種酵母はピルビン酸のミトコンドリアへの輸送の関係だけが遺伝的に変化していると考えられるため、エタノール生産能への影響が少なかつたと考えられるが、この点については今後検討していきたい。

F-4TCR1株で醸造した清酒ではF-4株で醸造した清酒と比べて乳酸の濃度が増加していた。乳酸はピルビン酸が還元されることによって生合成されることから、F-4TCR1株ではピルビン酸から乳酸に代謝が多く流れていることも考えられる。この仮説については今後遺伝学的・代謝学的に検証していきたい。

今回、吟醸酒醸造用として現在広く用いられているもうひとつの酵母、協会1801号¹⁷⁾からも α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性株を分離し、清酒小仕込試験を行ってピルビン酸濃度を測定したが、ピルビン酸の低減した株を取得することができなかった。協会1801号はもとも他の株と比べてピルビン酸濃度が低く推移することが知られており、 α -トランスシアノ桂皮酸エチル耐性の

分離により得られる遺伝的変異と似た経路の遺伝的変異を内包していることも示唆される。

本研究により、ミトコンドリア輸送阻害剤耐性株取得によるピルビン酸低生産性株の取得が協会7号だけでなく他の醸造酵母でも可能であり、育種した株は工場スケールでの実製造でエタノール生産能の低下を伴わずにピルビン酸および α -アセト乳酸の低生産性を示すことが明らかとなった。今後この新しい方法を使った育種例・実用化例が蓄積していくことで、発酵微生物育種の新しい学術・技術分野として確立されていくことが期待される。

本研究は日本学術振興会・科学研究費（若手研究B70372208）、すかいらくフードサイエンス研究所、佐賀県地域産業支援センター・可能性試験とさが農商工連携応援基金事業および九州地域バイオクラスター推進協議会・事業化案件発掘・支援事業の研究助成により行われたものである。仕込にご協力いただいた清酒醸造蔵に深謝したい。

文 献

- 1) ストライヤー：生化学 8th ed., p. 264–337, 東京化学同人(1989).
- 2) 土肥和夫, 宮内俊一, 川本雅之：醸造工学, **52**, 416–422 (1974).
- 3) Agyei-Owusu, K. and Leeper, F. J.: *FEBS J.*, **276**, 2905–2916 (2009).
- 4) Chuang, L. F. and Collins, E. B.: *J. Bacteriol.*, **95**, 2083–2089 (1968).
- 5) 井上 喬：ジアセチル, p. 31–39, 幸書房 (2001).
- 6) 稲橋正明, 吉田 清, 蓼沼 誠：醸協, **92**, 151–158 (1997).
- 7) Kitagaki, H.: *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **53**, 145–153 (2009).
- 8) 北垣浩志：生物工学, **87**, 66–71 (2009).
- 9) Kitagaki, H. and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 227–30 (2007).
- 10) Kitagaki, H., Kato, T., Isogai, A., Mikami, S., and Shimoi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **105**, 675–678 (2008).
- 11) Kitagaki, H., Cowart, L. A., Matmati, N., Montefusco, D., Gandy, J., Vaena de Avalos, S., Novgorodov, S. A., Zheng, J., Obeid, L. M., and Hannun, Y. A.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 10818–10830 (2009).
- 12) Horie, K., Oba, T., Motomura, S., Isogai, A., Yoshimura, T., Tsuge, K., Koganemaru, K., Kobayashi, G., and Kitagaki, H.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 843–847 (2010).
- 13) 北垣浩志：バイオサイエンスとインダストリー, **68**, 126–128 (2010).
- 14) 北垣浩志：醸協, **105**, 560–567 (2010).
- 15) 北垣浩志：特願2010-111263
- 16) 大場孝宏, 野見山修治, 上田京子, 黒田理恵子, 鈴木正柯：醸協, **99**, 878–881 (2004).
- 17) 稲橋正明, 武藤貴史：醸協, **103**, 824–835 (2008).
- 18) 福田和郎：清酒酵母の研究—90年代の研究—, p. 84–86, 清酒酵母・麴研究会 (2002).