

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：33114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22570

研究課題名（和文）新たな果実様香気を生成する醸造用酵母の開発と酒類製造への応用

研究課題名（英文）Development of a sake yeast strain that produces a new fruity flavor and its application in sake production

研究代表者

栗林 喬（Kuribayashi, Takashi）

新潟食料農業大学・食料産業学科・講師

研究者番号：00775728

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：清酒製造において、酵母はその品質を左右する上で重要な香り成分を生成する。申請者は、新たにパイナップル様香気を呈するカプリル酸エチル高生産性酵母の単離に成功した。本研究では、カプリル酸エチル高生産性酵母の醸造特性の解明と、その原因遺伝子変異の特定を試みた。工業的規模の清酒醸造試験を実施した結果、同酵母を用いた製成酒中のカプリル酸エチル濃度は親株の3.4倍に上昇し、ユニークな吟醸香が生成されることがわかった。さらに、本酵母の原因遺伝子変異をFAS2-F1279Y変異と特定し、変異部位の識別系の構築に成功するとともに、既存酵母のとの育種交配によって、新規香りプロファイルを有する実用酵母を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、カプリル酸エチル高生産性酵母を用いることにより、これまでは官能的に知覚できなかったパイナップル様香気を有する清酒の工業的生産が可能になる点で非常に独創的であり、清酒業界にとっても極めて重要な技術となる。加えて、カプリル酸エチル高生産性の原因変異の特定に基づくハイスループット検出系を開発し、変異部位をDNAマーカーとして利用することによって、既存の高香り生産性酵母や他酒類用酵母との交配/育種が極めて容易となることから、ワインやビールといった様々な酒類製品の多様化や個性化も促進し、酒類産業全体の活性化に繋がるものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：During sake production, the yeast produces aromatic components that are important in determining the quality of the sake. We previously isolated a new yeast strain that has high ethyl caprylate productivity and produces a pineapple-like aroma. In this study, we attempted to elucidate the brewing characteristics of this new yeast strain and identify the causative genetic mutation. Industrial-scale sake brewing tests showed that the concentration of ethyl caprylate was 3.4 times higher in sake made with this yeast than in sake made with the parent strain, and that it produced a unique ginjo aroma. Furthermore, we identified the F1279Y mutation in the FAS2 gene as the causative mutation in this yeast and constructed a system to identify this mutation. Moreover, we developed a practical yeast strain with a novel aroma profile by crossbreeding this new strain with existing sake yeast strains.

研究分野：醸造学

キーワード：清酒酵母 酒類醸造 カプリル酸エチル 脂肪酸合成酵素 吟醸香

## 1. 研究開始当初の背景

酒類製造において、酵母はアルコールの生産だけでなく、酒質を左右する重要な香り成分も生成する。品質向上に寄与する香り成分として代表的なものは、カブロン酸エチルや酢酸イソアミルなどの、いわゆる「吟醸香」として知られている。特に清酒業界において、脂肪酸合成阻害剤であるセルレニンに耐性を示し、カブロン酸エチルを多量に生産するセルレニン耐性変異株が広く用いられている。しかし、既に、これらの香り成分を高生産する清酒酵母が全国的に普及していることから、市場における清酒製品の画一化が進み、近年の清酒出荷量の低迷に拍車をかけている。この様な状況の中、申請者は、清酒の高付加価値化による需要新興を目的として、清酒酵母に焦点を当てながら、カブロン酸エチル高生産性酵母の香り生成量を飛躍的に向上させる育種法や、清酒の製品識別のための DNA マーカーを付与した酵母の開発を行ってきた。

本研究は、これまでの研究成果の下、全国的に使用されている清酒酵母きょうかい 901 号 (K901) のセルレニン耐性変異株の中より、新たにパイナップル様香気を生成するカプリル酸エチル高生産性酵母 (K901C8) の単離に成功したことから、この変異株の清酒製造における醸造特性の解明とその原因遺伝子変異の同定に焦点を当て、パイナップル様の香りを有する酒類製造を目的としたカプリル酸エチル高生産性酵母の醸造特性の解明、カプリル酸エチル高生産性酵母の原因遺伝子変異の特定を試みた。さらに、その研究成果をもとに、変異部位を酵母の育種 DNA マーカーとして利用するための検出系を構築し、既存のカブロン酸エチル高生産性酵母と交配することにより、新たな香りプロファイルを有した酒類製造を可能とする醸造用酵母の開発を目指した (図 1)。

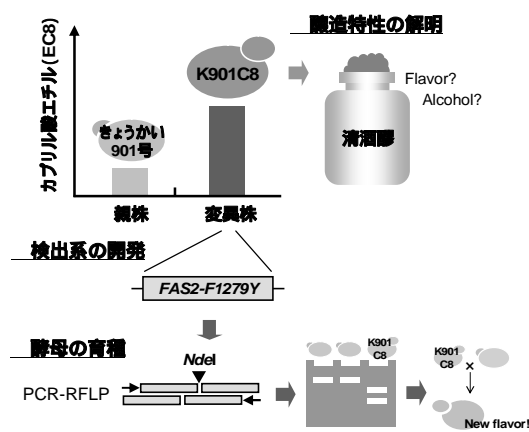


図 1. 本研究の概要

## 2. 研究の目的

本研究では、実験室レベルでの清酒小仕込試験によって、K901C8 株の最適な醸造条件を明らかにし、この知見をもとに、工業的規模での実地醸造を行うことによって、清酒にパイナップル様の新しい香味を付与できる清酒酵母の開発を目的とした。また、K901C8 株には脂肪酸合成酵素 (FAS2) の活性中心のアミノ酸残基に変異 (FAS2-F1279Y) が存在することから、カプリル酸エチル高生産性の形質が FAS2-F1279Y 変異に由来することを検証するとともに、変異部位を DNA マーカーとして醸造用酵母の育種改良に活用するための迅速かつ簡便な検出系を構築し、新規香りプロファイルを生成する醸造用酵母を開発した。

## 3. 研究の方法

### (1) K901C8 株の醸造特性の解明

K901C8 株を用いた清酒小仕込試験により、カプリル酸エチル生産性が最適となる仕込配合や発酵条件を明らかにした後、総米 100 kg 程度の実地醸造により、K901C8 株の実用レベルにおける醸造特性を解析した。

### (2) カプリル酸エチル高生産性の原因となる遺伝子変異の同定

K901C8 株の次世代シーケンス解析を行うことによって、既に存在が確認されている K901C8 株の FAS2-F1279Y 変異について、他の変異が存在する可能性も含め調査した。

### (3) 変異部位検出系の構築と新規香りプロファイルを生成する酵母の開発

FAS2-F1279Y 変異の塩基配列を利用した PCR-RFLP 系を構築し、清酒酵母における変異の有無を迅速かつ簡便に判定できる系を開発した。さらに、K901C8 株およびリンゴ様の香りを生成するカブロン酸エチル高生産性清酒酵母からハプロイドを取得するとともに、カブロン酸エチル高生産性酵母を戻し親とする戻し交配を行ない、交配株の清酒製造における香りプロファイルを分析した。

## 4. 研究成果

### (1) K901C8 株の醸造特性の解明

K901C8 株の清酒醸造特性を調べるため、小仕込と実規模で醸造試験を行った。総米 200 g の小仕込試験で K901C8 株と K901 株から得られた製成酒のアルコール度数、酸度、アミノ酸度の一般成分は、K901C8 株と K901 株で大きな差はなかったが、K901C8 株の発酵経過が K901 株よりも遅れたことにより、米の溶解が進み K901C8 株の日本酒度は K901 株よりも低かった。製成酒中の

脂肪酸濃度は、カプリル酸の濃度では K901C8 株のほうが K901 株よりも約 3.7 倍高かったが、カプロン酸の濃度では両菌株の差はなかった。脂肪酸濃度と同様に、カプリル酸エチルの濃度も K901C8 株は K901 株よりも約 4.0 倍高い数値を示した。

総米 100 kg の実規模醸造試験において、K901C8 株は K901 株とほぼ同様の発酵経過を示した。さらに、製成酒の一般成分も両菌株で差がなかった。K901C8 株の製成酒では K901 株の製成酒よりもカプリル酸濃度が 4.0 倍、カプリル酸エチル濃度は 3.4 倍高い値であり、小仕込試験と同様に K901C8 株はカプリル酸高生産能を示した。実規模醸造での製成酒にカプリル酸エチル由来の pinaapple 様の香りが感じられるか官能試験を行ったところ、10 名のパネラー全てが K901 株では pinaapple 様の香りは感じられないが、K901C8 株では pinaapple 様の香りを感ずると回答した。

小仕込と実規模での清酒醸造試験の結果より、K901C8 株は清酒醸造において親株である K901 株とほぼ同様の醸造特性を有し、K901 株より多くのカプリル酸エチルを生成する性質を有することが確認された。

## ( 2 ) カプリル酸エチル高生産性の原因遺伝子変異の同定

K901C8 株の次世代シーケンス解析を実施し、他の変異が存在する可能性を検討した結果、FAS2-F1279Y 変異以外の候補となる変異は確認できなかったことから、K901C8 株におけるカプリル酸エチル高生産性遺伝子変異は FAS2-F1279Y 変異と決定された。

## ( 3 ) 変異部位検出系の構築と新規香気プロファイルを生成する酵母の開発

ミスマッチプライマーを用いることによって、K901C8 株の FAS2-F1279Y 変異を識別することが可能な PCR-RFLP 検出系の開発に成功した。さらに、K901C8 株およびカプロン酸エチル高生産性清酒酵母からハプロイドを取得し、両者を交配させた結果、ユニークな香気プロファイルを有する新規清酒酵母の開発にも成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takashi Kuribayashi, Akira Hatakeyama, Jun Yarimizu, Keigo Arimoto, Mitsuoki Kaneoke, Yuji Tasaki, Takashi Hara, Toshio Joh	4. 巻 28
2. 論文標題 Isolation and brewing properties of a sake yeast mutant with high ethyl caprylate productivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 217-224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3136/fstr.FSTR-D-21-00308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takashi Kuribayashi, Toshiki Sakurai, Akira Hatakeyama, Toshio Joh, Mitsuoki Kaneoke	4. 巻 -
2. 論文標題 Genotypic analysis of the FAS2-F1279Y (3836T>A) polymorphism conferring high ethyl caprylate productivity in industrial sake yeast strains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2022.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗林喬、櫻井敏規、小熊哲也、渡邊剛志
2. 発表標題 カプリル酸エチル高生産性清酒酵母のFAS2遺伝子における変異の検出法
3. 学会等名 日本菌学会第65回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗林喬、畠山明、小熊哲哉、渡邊剛志、原崇、城斗志夫
2. 発表標題 カプリル酸エチル高生産性酵母の清酒醸造特性と1倍体を用いたカプロン酸エチル高生産性酵母との交配
3. 学会等名 令和3年度日本醸造学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	畠山 明 (Hatakeyama Akira)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------