

アミノ酸変動を指標とした新規清酒酵母開発に関する基礎的検討(第1報) —異なる清酒酵母間のアミノ酸取込能の比較—

バイオ系チーム 清野 珠美, 廣岡 青央

要 旨

京都独自の新規清酒酵母開発を目指し、香気エステルや有機酸産生による選抜ではなく、アミノ酸を選抜指標とした清酒酵母の開発を行うため、清酒酵母のアミノ酸代謝の特性を把握することを検討した。

本報ではまず、異なる清酒酵母間でのアミノ酸の取込能の違いを調べるため、きょうかい酵母(601号, 701号, 901号, 1001号)を麴汁培地で一定期間培養した時の、培地中の各アミノ酸減少率を比較した。その結果、遺伝的に極めて近縁な菌株であるきょうかい酵母にも関わらず、苦味アミノ酸の取込能に差があることが示された。この知見を基に清酒酵母開発を行うことができれば、苦味成分の量を制御した高品質清酒製造につながると考えられる。

1. はじめに

研究所では長年にわたり、特色ある産技研オリジナル清酒酵母の開発を行っており、現在もさらなる優良清酒酵母の開発を目指し、研究開発を行っている。これまでに、清酒の香り、味に大きく寄与する香気エステルおよび有機酸の産生に特徴を持った清酒酵母の開発に成功し、実用化してきた^{1), 2), 3)}。しかし現在まで、清酒の味に寄与するアミノ酸を選抜指標とした清酒酵母開発は行って来なかった。なぜなら、清酒製造におけるアミノ酸の動きは、清酒酵母による代謝(取込と排出)に加えて、麴による原料米のタンパク質分解が影響するため、アミノ酸に対する清酒酵母の応答と清酒の品質との関連を考察することが難しいからである。

しかし、清酒業界の現在の流行である吟醸酒のように、残存タンパク質の低い高精白米を使用した清酒造りでは、少しのアミノ酸増加が雑味を増やし、吟醸酒としての品質を下げる可能性がある。このような高品質の清酒造りを行うためには、麴の酵素力価や原料米のタンパク質だけでなく、清酒酵母のアミノ酸代謝の特性も重要因子になると考えられる。

本報では、アミノ酸を選抜指標とした清酒酵母開発に向けて、異なる清酒酵母間のアミノ酸取込能を比較して検討を行ったので、報告する。

2. 実験方法

2.1 使用清酒酵母

本研究には、日本醸造協会から分譲されている清

酒酵母であるきょうかい酵母601号, 701号, 901号, 1001号を選択し、麴汁スラント培地にて4℃で保存されているものを使用した。

2.2 使用培地

前培養では、2 mlのYNB培地(2%グルコース-0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acids [Difcolaboratories]), 本培養では、2 mlの麴汁培地(既報^{4), 5)}に従い、ボーメ度5に調製したもの)を用いた。

2.3 培養条件

前培養では、麴汁スラント培地から1白金耳分の菌体を採取して、前培養用YNB培地に播種し、30℃で2-3日間の培養を行った。本培養では、前培養液から酵母を回収し、濁度(610nm)が0.1になるように本培養液に播種した。本培養試料は試験管に5本ずつ作製し、15℃で培養を行った。培養5日目まで毎日試験管1本ずつ培地を回収して濁度を測定したのち、培地を0.45μmのフィルターに通して酵母を除去し、アミノ酸分析に供した。

2.4 培地のアミノ酸分析

回収した培地は、適宜0.1%ギ酸で希釈し、分析に供した。アミノ酸分析は既報に準じて行った⁶⁾。20種類の遊離アミノ酸濃度の合計を総遊離アミノ酸として算出した。

3. 結果

3.1 異なる清酒酵母間の濁度と培地中の総遊離アミノ酸の変化

図1に培養中の濁度と培地中総遊離アミノ酸変化のグラフを示す。培養4日目まで濁度は増加し、5日目で平行になる傾向が見られた。培養5日目の濁度は、701号で最も低く、1001号で最も高かった。総遊離アミノ酸濃度は、濁度増加と連動して減少する傾向が見られた。培養5日目の総遊離アミノ酸減少率は701号で低く(82%), 901号で高かった(92%)。

3.2 異なる清酒酵母間の培地中の各アミノ酸の変化

個々のアミノ酸20種類についても同様に培養中の変化を調べて比較した。その結果、各アミノ酸によって様々な変化パターンが見られたため、一定の条件を

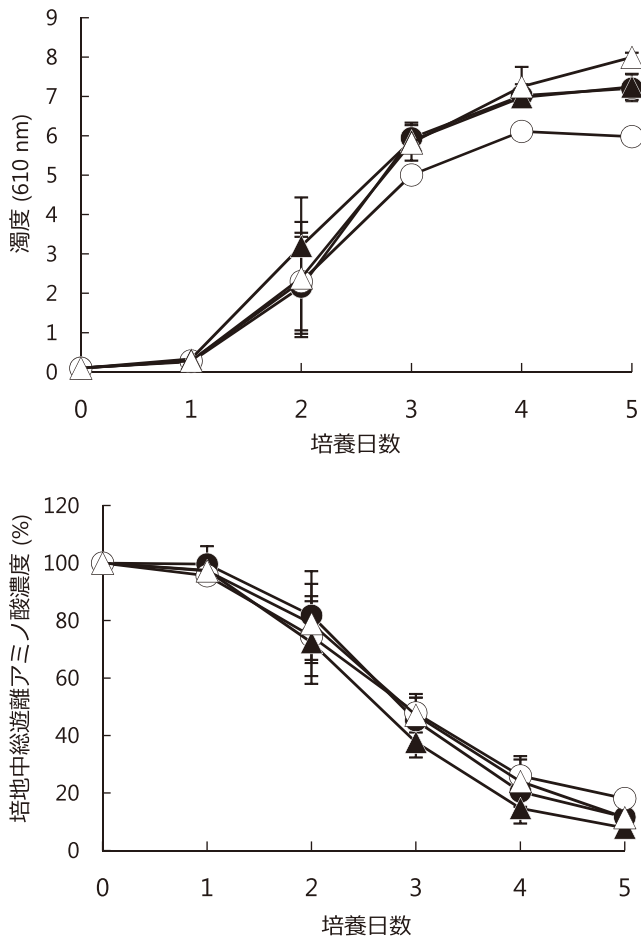


図1 異なる清酒酵母における濁度変化(上)と培地中の総遊離アミノ酸濃度変化(下)
(アミノ酸濃度は培養0日目を100%として、培養0日目に対する割合で示す。エラーバーは標準偏差を表す。●: 601号, ○: 701号, ▲: 901号, △: 1001号)

定めてアミノ酸20種類を分類することを試みた。表1に示すように、培養5日目におけるきょうかい酵母4系統の各アミノ酸減少率と、その変動係数(CV値)に基準値を定め、この基準値以上か、未満かを分類条件とし、図2に示す3群に分類した。「アミノ酸減少率の大きさ」を「アミノ酸取込能の大きさ」、及び「アミノ酸減少率の変動係数の大きさ」を「アミノ酸取込能の系統間差の大きさ」と見なすと、図2のA群は「取り込まれやすく、取込能に系統間差がある」、B群は「取り込まれやすく、取込能に系統間差がない」、C群は「取り込まれにくい」アミノ酸と見なすことができる。

各群の一例として、A群:アルギニン, B群:ロイシン, C群:プロリンの培養中の変化を図3に示す。

4. 考察

4.1 清酒酵母の増殖に依存しないアミノ酸取込能

今回の培養条件では、培養5日で濁度増加が平行になっている(図1)。濁度は清酒酵母の菌体量を示しているため、この結果から、培養5日目で清酒酵母増殖は定常期に入っていると考えられる。

表1 アミノ酸の変化パターンの分類条件

分類条件	分類条件の意義
減少率が4系統すべて50%	以上 → 取り込まれやすいアミノ酸 未満 → 取り込まれにくいアミノ酸
4系統の減少率のCV値が10%	以上 → 取込能に系統間差がある 未満 → 取込能に系統間差がない

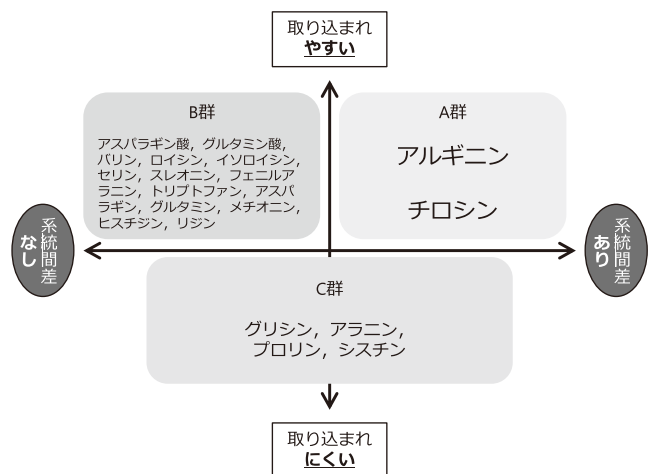


図2 表1の分類条件を基にした、清酒酵母の取込能の違いによるアミノ酸の分類

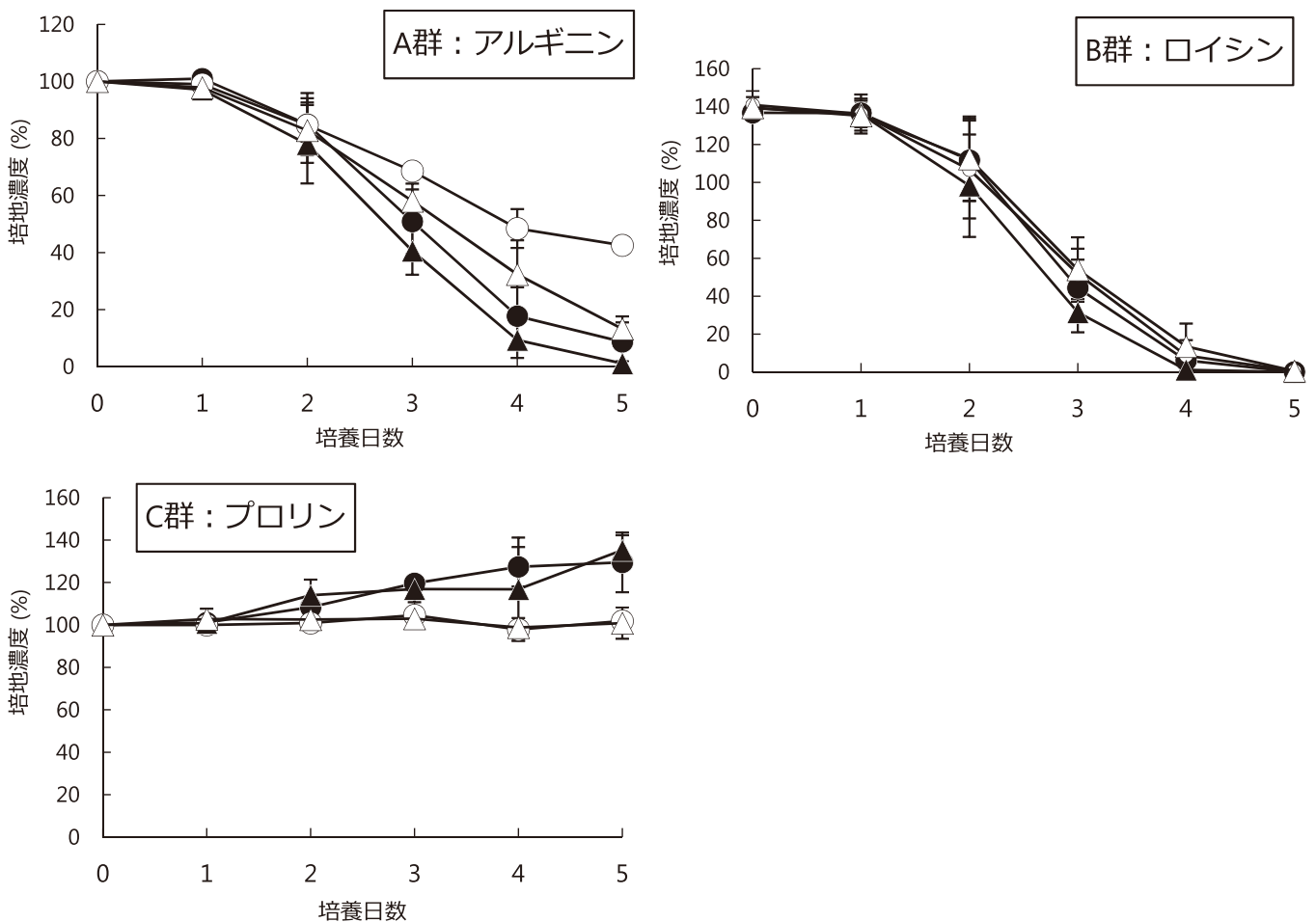


図3 異なる清酒酵母における培地中のアミノ酸濃度変化
 A群：アルギニン，B群：ロイシン，C群：プロリン
 (濃度は培養0日目を100%として，培養0日目に対する割合で示す。エラーバーは標準偏差を表す。●：601号，○：701号，▲：901号，△：1001号)

清酒酵母は培養中，窒素源を補給して自身を増殖させるために，培地中のアミノ酸などの窒素含有物を取り込んでいる。つまり清酒酵母が増殖し，菌体量が増えれば，それに伴い培地中のアミノ酸減少量，つまり清酒酵母のアミノ酸取込量も大きくなると考えられる。しかし図1において，濁度が最も大きいのは1001号であるが，一方でアミノ酸減少量が最も大きいのは901号であった。これは，清酒酵母のアミノ酸取込量が，常に菌体増殖の大きさに依存するわけではないことを示唆する。

4.2 異なる清酒酵母によって取込能に差があるアルギニン

図3より，取り込まれやすいアミノ酸群であるAおよびB群のうち，B群のロイシンは，図1の濁度の増加と連動して減少し，系統間差もほぼない。グラフか

らも明らかのように，清酒酵母の系統に関係なく，取り込まれやすいアミノ酸であるといえる。

一方で，A群のアルギニンは，培養5日目における減少率の変動係数は22%であり，図1の濁度の変動係数12%よりも大きかった。また，前述の総遊離アミノ酸と同様に，アルギニン減少量が最も大きいのは901号であり，濁度の大きさと関連していなかった。つまり，きょうかい酵母4系統におけるアルギニン取込能には，各酵母の菌体増殖の差よりも大きな系統間差があることを示唆する。

アルギニンは清酒の苦味に大きな影響を及ぼすアミノ酸と言われている⁷⁾。また，同じA群であるチロシンも，単独で苦味を呈するアミノ酸である⁸⁾。今回の結果から，異なる清酒酵母によって，上記のような苦味を呈するアミノ酸の取込能に差が見られたことから，その性能差の原因を解明できれば，苦味アミノ酸

の取込能を制御した清酒酵母の開発が期待できる。

4.3 清酒酵母の培養中に放出されるプロリン

図3のプロリンについては、減少率はすべて50%未満を示したものの、601, 901号においては逆に培養中の増加が見られた。今回用いた麴汁培地は100℃の加熱殺菌を行っており、培地中の各種酵素は失活している。またその他のアミノ酸の増加が見られないことから、清酒酵母がタンパク質分解酵素を菌体外に分泌しているとは考えにくい。つまりこのプロリンの増加は、酵母からの特異的排出に起因すると考えられる。

過去の研究では、プロリンは酵母に取り込まれず、逆に培養中に菌体外に放出されるアミノ酸であると報告されている⁹⁾。ただし、これはきょうかい酵母901号のみの結果である。今回の結果は、901号について既報と一致しているが、新たに601号でもプロリンの放出が見られ、新しい知見を得られた。合わせて601, 901号はアルギニン取込能も大きい系統であることから、清酒酵母菌体内のプロリン・アルギニン代謝機能に関連性があり、これに系統間の違いが存在する可能性がある。

5. まとめ

遺伝的に極めて近縁な菌株である¹⁰⁾ きょうかい酵母でも、特に苦味アミノ酸に関連する取込能に差があることが示された。この知見を基に清酒酵母開発を行うことができれば、吟醸酒造りにおける苦味成分残存のリスクの低減や、低精白米を使用しても苦味を抑えた清酒造りなど、高品質清酒製造につながると考えられる。

さらに、清酒酵母のアミノ酸代謝は、香味成分（エステル、アルコール、有機酸）産生能力の違いにも影響するため、様々な醸造特性を持つ清酒酵母の機能解明につながることが期待される。今後は、きょうかい酵母以外の研究所保有清酒酵母についても、アミノ酸取込能の比較を実施して、同時に香味成分産生との関連を調べていく予定である。

参考文献

- 1) 廣岡青央 他：京都市工業試験場研究報告, No.30, p.5 (2002).
- 2) K. Hirooka, Y. Yamamoto, N. Tsutsui, T. Tanaka : J. Biosci. Bioeng., 99, 125 (2005).
- 3) 廣岡青央 他：京都市産業技術研究所研究報告,

No.5, p.26 (2015).

- 4) 廣岡青央 他：京都市産業技術研究所研究報告, No.4, p97 (2013).
- 5) 和田潤 他：京都市産業技術研究所研究報告, No.6, p17 (2015).
- 6) 清野珠美：酒研会報, No.55, p.20 (2016).
- 7) 岩野君夫 他：日本醸造協会誌, 99, 659 (2004).
- 8) 岸恭一, 木戸康博：“タンパク質・アミノ酸の新栄養学”, p.12, 講談社 (2007).
- 9) 岩野君夫 他：日本醸造協会誌, 99, 735 (2004).
- 10) 赤尾健：化学と生物, 52, 223 (2014).