

## 清酒酵母の有機酸生成に関する研究

浅野 忠男



### Studies on Organic Acid Production by Sake Yeast

Tadao Asano (Research and Development Center, Takara Shuzo Co. Ltd., 101 Yoshidencho, Shimotoba, Fushimi-ku, Kyoto 612-8381) *Seibutsu-kogaku* **85**: 63-68, 2007.

#### はじめに

清酒やワインといった醸造酒中の有機酸は味覚に大きな影響を与える。清酒には約40種類もの有機酸が含まれており<sup>1,2)</sup>、その中でも乳酸、コハク酸、リンゴ酸の3種類で全有機酸の約80%を占める<sup>3)</sup>。清酒酵母は発酵期間中に清酒中の乳酸の半分以上を<sup>4)</sup>、またリンゴ酸、コハク酸の大部分を生成する<sup>5)</sup>。

最近では、消費者の嗜好の変化に伴い、酒質の多様化が求められている。その解決方法の一つとして有機酸組成の異なる新しいタイプの清酒を提供することが考えられる。従来の製品とは酸味の異なった商品を開発するために有機酸生成の変化した清酒酵母の育種が盛んに行われている<sup>6-8)</sup>。また、清酒酵母の醪中での有機酸生成メカニズムも、遺伝子破壊などの遺伝子組換え技術<sup>9-12)</sup>、ノザン解析などの技術<sup>13,14)</sup>を利用して、ほぼ全容が明らかになった。

本稿では、清酒酵母の有機酸生成に関して1. 有機酸生成経路の解明、2. 有機酸高生成酵母の育種、3. 有機酸高生成機構の解明、4. 有機酸高生成酵母の実用化といった観点から研究、開発を行ったので紹介する。

#### 1. 有機酸生成経路の解明

清酒醪の中後期では嫌気的な環境であるためリンゴ酸およびコハク酸は細胞質において主にTCA回路の還元方向(図1)で生成されることが示唆されていた<sup>15-17)</sup>。MDH2 遺伝子(細胞質に存在するリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコード)を破壊することによりリンゴ酸が減少

することや<sup>12)</sup>、FUMI(フマラーゼをコード)遺伝子破壊株では発酵後期にコハク酸生産が減少すること<sup>10)</sup>から、リンゴ酸やコハク酸が細胞質内においてTCA回路の還元的方向で生成されることがより明瞭になった。

また、酵母が活発に増殖する際、プリン系の一つであるアデニンを生合成する。1分子のアデニル酸を生合成するのに、その中間物質であるイノシン酸を生合成する過程で1分子のフマル酸を生じる。続いてイノシン酸、アデニルコハク酸からアデニル酸に至る過程でもう1分子のフマル酸が生じ、合計2分子のフマル酸を生成する。このフマル酸から清酒中の約20%のリンゴ酸またはコハク酸が生合成されると推定されている<sup>18,19)</sup>。

しかしながら、ミトコンドリア内に局在する酵素を利用してピルビン酸からクエン酸、イソクエン酸を経て $\alpha$ -ケトグルタル酸に至る酸化的経路での有機酸生成については、ほとんど知見がなかった。本研究では清酒酵母のミトコンドリア内に局在するイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)<sup>9)</sup>、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(KGD)<sup>20)</sup>遺伝子の破壊を行い、清酒醪中での有機酸生成の変化を分析してTCA回路の酸化的方向での有機酸生成機構を明らかにした。

酵母のイソクエン酸デヒドロゲナーゼにはNADを補酵素とするIDH、NADPを補酵素とするIDP1、IDP2の3つのアイソザイムが存在する。このうちIDH、IDP1はミトコンドリア内に局在するが、IDHの方がミトコンドリア内において重要な働きをする<sup>21)</sup>。IDHはIDH1、IDH2遺伝子のどちらか片方を破壊すると酵素活性は消失する<sup>22)</sup>。

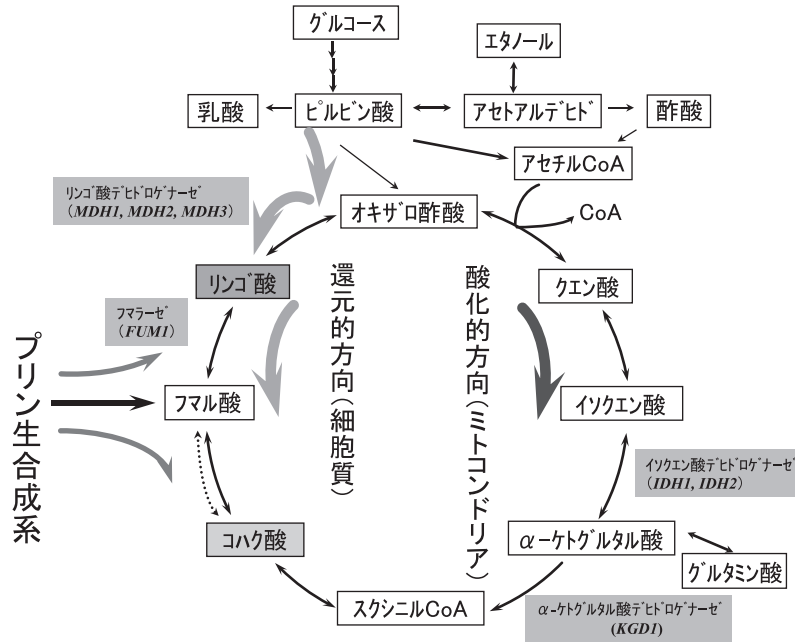


図1. 清酒酵母の有機酸生成経路

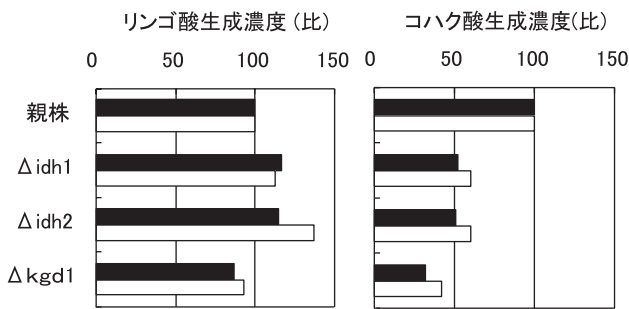


図2. 酸化的方向の酵素遺伝子破壊株を用いた清酒の有機酸組成. 親株 (■, a10; □, α41) の数値を100とし, 酵素遺伝子破壊株の値はその比で表わした. Δidh1, イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*IDH1*) 破壊株; Δidh2, イソクエン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*IDH2*) 破壊株; Δkgd1, α-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*KGD1*) 破壊株. 清酒小仕込試験は総米200 g規模の三段仕込で行った.

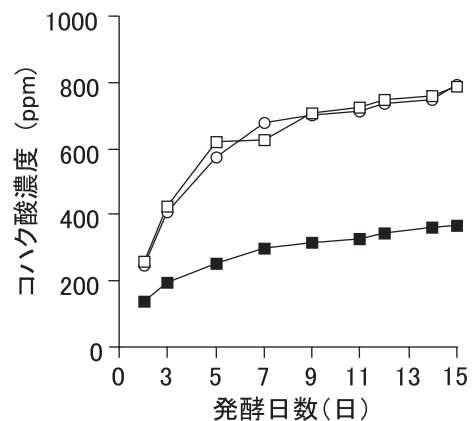


図3. *IDH* 遺伝子破壊株を用いた清酒発酵期間中のコハク酸濃度経過. 清酒小仕込試験は総米400 g規模の三段仕込で行った. ○, a10: K-701由来一倍体株; □, a10AUR: a10にpAUR101を組み込みオーレオバシジンA耐性とした株; ■, a10Δidh2: a10の*IDH2* 遺伝子破壊株.

協会701号 (K-701) から分離した一倍体株 (a10, α41) の *IDH1* または *IDH2* 遺伝子を破壊して清酒小仕込試験を行った結果, 親株と比較してリンゴ酸は若干増加し, コハク酸は約半分に減少した (図2). 清酒醪中のコハク酸生成においては, 親株 (a10) および親株に pAUR101 (遺伝子破壊用プラスミド作製の際に用いたプラスミド) を組み込んでオーレオバシジンA耐性とした株 (a10AUR) は同じ経過を示したが, *IDH* 破壊株 (a10Δidh2) のコハク酸生成は発酵初期に低下した (図3).

清酒醪中で TCA 回路の酸化的方向で有機酸が生成されていることをさらに確認するために, イソクエン酸デ

ヒドロゲナーゼの次に作用するα-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体を構成する酵素遺伝子の1つである *KGD1* 遺伝子を破壊し, 有機酸生成への影響を調べた. その結果, *IDH* 破壊株と同様にコハク酸は約半分に減少した (図2). また, 蟻川ら<sup>10)</sup>の作製した *KGD1* 遺伝子破壊株も *IDH* 遺伝子破壊株と同様に発酵初期にコハク酸生成が低下することを示している.

これらの結果から, 清酒醪の初期において清酒酵母は TCA 回路の酸化的方向で, ミトコンドリアに存在する酵素を利用してコハク酸の約半分近くを生成することが明らかとなった.

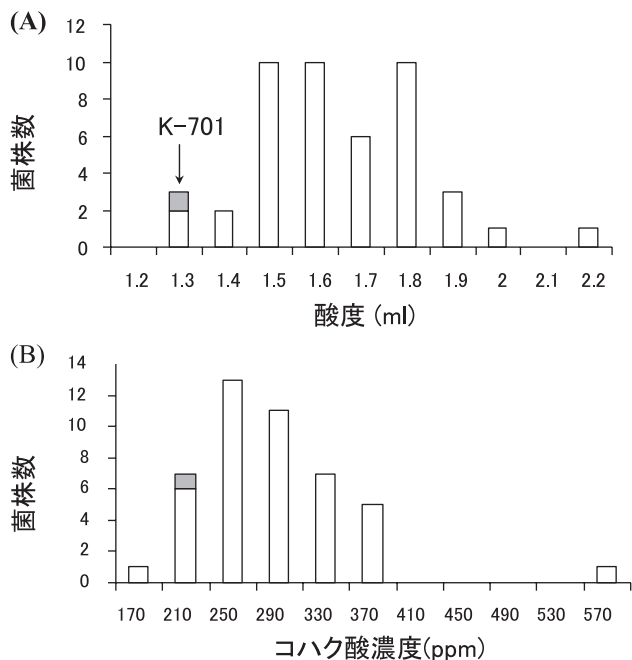


図4.  $\alpha$ -ケトグルタル酸耐性変異株の麴汁培養試験における分布図。(A) 酸度, (B) コハク酸濃度。

表1. 20G-R39株を用いた清酒小仕込試験の成分分析

	菌株	
	K-701	20G-R39
アルコール (%)	20.2	19.5
日本酒度	+2.0	-2.0
pH	4.58	4.12
酸度 (ml)	3.2	5.7
アミノ酸度 (ml)	3.1	2.0
リンゴ酸 (ppm)	398	1069
コハク酸 (ppm)	735	1246

総米, 400 g.

## 2. 有機酸高生成酵母の育種

**2-1.  $\alpha$ -ケトグルタル酸耐性株からの選択<sup>23)</sup>** 今回、明らかにした有機酸生成経路の1つであるTCA回路の酸化的方向に着目し、その中間物質でありクエン酸シンターゼの阻害物質でもある $\alpha$ -ケトグルタル酸に耐性を示す株の中から遺伝的に安定な有機酸高生成酵母を取得した。K-701を親株としてメタンスルホン酸エチル(EMS)変異処理後、25 mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸に耐性を示す株を麴汁培養試験に供した結果、そのほとんどの株で酸度は高くコハク酸生成量が多かった(図4)。これらの中で最も酸度が高く有機酸を高生成した20G-R39株の総米400 g清酒小仕込試験結果を表1に示した。20G-R39を総米

表2. 協会酵母の糖資化性

菌株	糖			
	グリセロール	グルコース	ガラクトース	マルトース
K-701	+	+	+	+
K-901	+	+	++	+
K-14	+	+	+	+
K-15	+	+	+	+
K-1001	+	+	+	±
K-1601	-	+	-	-
No.77	-	+	+	±

協会酵母を上記2%の炭素源を含む0.67% yeast nitrogen base without amino acids 平板培地に植菌し、30°C、3日間培養後、生育を観察した。

19 kg, 700 kgの清酒仕込試験に供した結果、K-701と比較して酸度は約1.8倍、リンゴ酸、コハク酸を約2倍量生成した。

**2-2. マルトース低資化性株からの分離<sup>24)</sup>** 既存とは異なった有機酸生成を示す清酒酵母を育種するために、本研究では糖の資化性に着目した。表2に示すように協会酵母の中で有機酸生成に特徴を持つ株(K1001, K1601, No.77)は糖の資化性が変化している例が多い。グルコースは*SUC*, *MAL*, *GAL* 遺伝子<sup>25,26)</sup>にコードされている二糖の代謝系の酵素を抑制する。一方、リンゴ酸、コハク酸は主にグルコースから生成される。以上のことから酵母細胞内のグルコース量に変化すれば有機酸生成量ならびに二糖の資化性も変化するのではないかと考えられた。そこで二糖の資化レベルを指標にして有機酸生産性の変化した清酒酵母の取得を試みた。

K-701をEMS変異処理後、マルトースを炭素源としてナイスタチン濃縮を行いマルトース低資化性株を分離した。得られた株を麴汁培養試験、清酒小仕込試験に供し、有機酸高生成酵母3株を取得した。その醸造特性を表3に示す。これら変異株のうち、特にリンゴ酸のみを高生成するM20株のリンゴ酸生成経路について調べた。清酒醪中においてM20株はリンゴ酸生成を発酵10日までに完了している。リンゴ酸生成が活発に行われている発酵1日目、4日目、8日目の清酒醪から酵母細胞を集菌し、リンゴ酸周辺の酵素遺伝子発現量についてK-701と比較した(図5)。その結果、M20株の1日目、4日目、8日目の*FUM1*, *MDH1*, *MDH3* 遺伝子発現量はK-701とほとんど同じであったが、M20株の4日目、8日目における*MDH2* 遺伝子発現量はK-701より多かった。また、醪中のピルビン酸濃度は発酵期間中、常にM20株の方がK-701より高かった。

ピルビン酸からオキザロ酢酸へ変換を触媒するピルビ

表3. マルトース低資化性変異株を用いた清酒小仕込試験の成分分析

	菌株			
	K-701	M20	M21	M45
日本酒度	+8.0	+9.5	-2.5	+3.0
アルコール (%)	20.7	19.5	19.5	20.3
pH	4.52	3.91	4.16	4.30
酸度 (ml)	2.5	5.2	4.4	3.7
アミノ酸度 (ml)	3.1	2.6	2.6	2.8
クエン酸 (ppm)	158	160	152	154
ピルビン酸 (ppm)	N.D. <sup>a</sup>	180	42	N.D. <sup>a</sup>
リンゴ酸 (ppm)	356	2367	1271	831
コハク酸 (ppm)	740	539	1171	1065
乳酸 (ppm)	903	1034	978	946
酢酸 (ppm)	131	141	80	140

<sup>a</sup> Not detected.  
総米, 200 g.

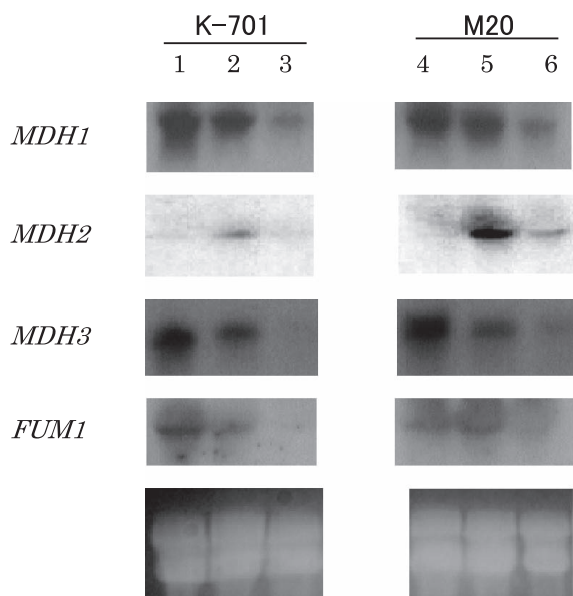


図5. *MDH1*, *MDH2*, *MDH3*, *FUM1* 遺伝子のノザン解析. 清酒発酵期間中の酵母細胞から total RNA (10 µg) を抽出しノザン解析に用いた. 最下段: total RNA (10 µg) を抽出, 電気泳動後, エチジウムブロミド染色した写真図. (Lanes 1 and 4, 発酵1日目; lanes 2 and 5, 発酵4日目; lanes 3 and 6, 発酵8日目). *MDH1*, *MDH2*, *MDH3* 遺伝子は, それぞれミトコンドリア, 細胞質, ペルオキシソームに局在するリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする. *FUM1* 遺伝子はミトコンドリア, 細胞質に存在するフマルラーゼを単一でコードする.

ン酸カルボキシラーゼはピオチンを補酵素としている. ピオチンの阻害剤であるアビジンを添加した麹汁で K-701 と M20 株を各々培養したところ, K-701 ではリンゴ酸生成の減少量は少なかったが, M20 株の減少量は多くなっていった (図6).

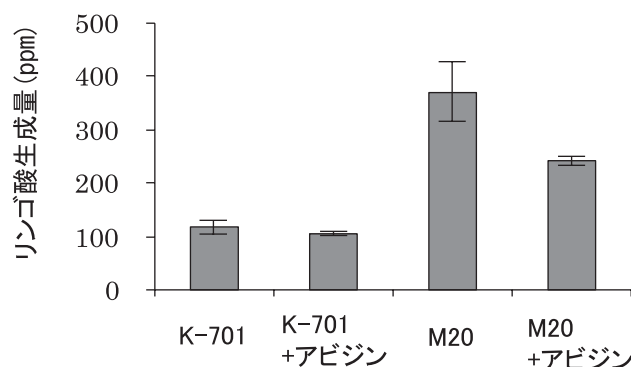


図6. M20 株のアビジン添加によるリンゴ酸生成への影響. 麹汁培地 (brix 10.0) にアビジンを添加後, K-701 と M20 株を 30°C, 2日間, 静置培養した.

以上の結果から M20 株のリンゴ酸はピルビン酸からオキサロ酢酸を経由して高生成されることが示唆された.

### 3. 20G-R39 株の有機酸高生成機構<sup>27)</sup>

$\alpha$ -ケトグルタル酸耐性株から選択した有機酸高生成酵母 20G-R39 株の有機酸高生成メカニズムを明らかにするために DNA マイクロアレイ解析を行った. K-701 と比較して 20G-R39 株で高発現していた上位 10 遺伝子を表4に示す. 20G-R39 株で高発現しているのは酸化的リン酸化, 呼吸系, 電子伝達系, TCA 回路 (ミトコンドリア局在) の遺伝子が多いのが特徴であった. これら一連の遺伝子群の発現は転写因子 HAP2/3/4/5/p 複合体により調節されている<sup>28)</sup>.

特に Hap4p はアクティベーターサブユニットであり

表4. 2OG-R39株の高発現遺伝子

Gene	Ratio	Process
ALD6	10.6	Ethanol utilization
COX4	8.0	Oxidative-phosphorylation
QCR7	7.9	Respiration
MCR1	7.7	Electron carrier
CYC1	7.4	Oxidative-phosphorylation
RIP1	7.2	Respiration
CYC7	7.2	Respiration
COX13	7.0	Oxidative-phosphorylation
IDH2	6.9	TCA cycle
CTP1	6.7	Transport

K-701と比較して高発現していた上位10遺伝子を表した。酸化のリン酸化, 呼吸系, 電子伝達系, TCA 回路(ミトコンドリア局在)の遺伝子が高発現していた。

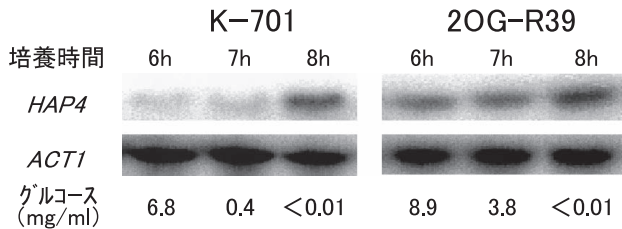


図7. *HAP4* 遺伝子のノザン解析. K-701と2OG-R39株をYPD培地(2%グルコース)で振盪培養(30°C)し, 6, 7, 8時間後に集菌した. Total RNAを抽出後, *HAP4*, *ACT1*に特異的なプローブを用いてノザン解析を行った. グルコースは各培養時間後のYPD培地中の濃度(mg/ml)を示す.

HAP複合体の調節部位である。また、その発現はグルコースにより抑制を受ける<sup>29)</sup>。しかしながら、K-701の*HAP4*遺伝子発現量はグルコース存在下抑制されたが、2OG-R39株は抑制されず発現していた(図7)。これらの結果から、*HAP4*が2OG-R39株の有機酸高生成に深く関与していることが示唆された。これを証明するためにK-701の*HAP4*遺伝子高発現株を作製して有機酸生成への影響を調べた。その結果、表5に示したように*HAP4*高発現株は親株(K-701)と比較して日本酒度、アルコール生成量は若干低下したが、酸度は2OG-R39株と同程度で高く、リンゴ酸、コハク酸を高生成した。以上の結果より*HAP4*遺伝子発現量が有機酸生成に深く関わっていることが明らかになった。

#### 4. 有機酸高生成酵母(2OG-R39株)の実用化

4-1. 料理用清酒への応用<sup>30)</sup> 清酒の調理効果については以下の事項が確認されている<sup>31,32)</sup>。味の面では「味を浸透させる」「コクを与える」、香りについては「生

表5. *HAP4*高発現株を用いた清酒小仕込試験の成分分析

	菌株		
	K-701	2OG-R39	<i>HAP4</i> 高発現株
日本酒度	-5.0	-9.0	-31.0
アルコール(%)	19.9	19.3	17.0
酸度(ml)	2.8	4.5	4.6
アミノ酸度(ml)	3.4	2.3	3.0
クエン酸(ppm)	113	148	117
リンゴ酸(ppm)	260	718	589
コハク酸(ppm)	632	1215	1355
酢酸(ppm)	157	116	43

総米, 200 g.

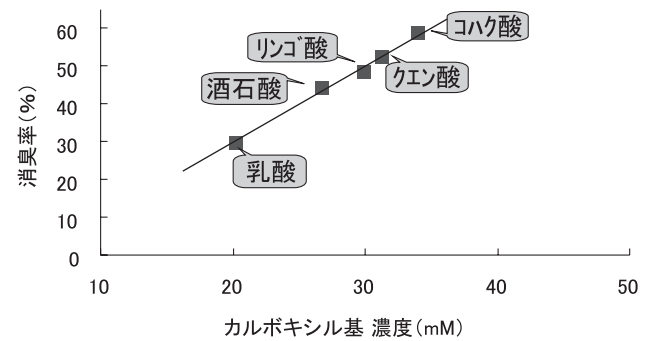


図8. 有機酸のトリメチルアミン消臭効果. 0.2%(w/v)有機酸におけるトリメチルアミン消臭率を示した。

臭みをとる」「香りを付ける(清酒の香り)」、物性では「煮崩れを防ぐ」「肉をやわらかく仕上げる」「素材の旨みを逃がさない」、保存性では「防腐効果」などである。これら調理効果の中で消費者の約80%以上が「コクを与える」「生臭みをとる」といった効果を清酒に期待している。これら2つの調理効果に共通の成分はコハク酸、イソマルトースなどの糖類である。特に清酒中のコハク酸はそれ自身が旨味成分であり、しかも清酒に含まれる有機酸の中で魚の生臭みの成分であるトリメチルアミンに対して最大の消臭効果を示した(図8)。

以上のことから、コハク酸を高生成する有機酸高生成酵母(2OG-R39株)を使用し、料理用清酒の商品化を行った。

4-2. 清酒への利用 清酒中においてコハク酸は「コク」「押し味」を付与する<sup>33)</sup>。発酵能力の高い蔵付酵母とコハク酸を高生成する有機酸高生成酵母(2OG-R39株)を併用することによりコクとキレを実現した。

#### おわりに

本研究では清酒酵母が発酵初期にミトコンドリア内の

酵素を利用して清酒中のコハク酸の約半分近くを生成することを明らかにした。次に、この経路に存在する $\alpha$ -ケトグルタル酸に耐性を示す株から有機酸高生成酵母(20G-R39株)を選択した。また、マルトース低資化性を指標として数種類の有機酸高生成酵母も分離した。さらに20G-R39株の有機酸高生成メカニズムを調べ、料理用清酒、清酒へと応用し実用化を行った。

育種した清酒酵母を単独で、あるいは市販酵母と混合することにより、清酒中のリンゴ酸、コハク酸などの有機酸の含量をある程度制御できるようになった。今後、清酒の味に影響を及ぼす有機酸以外の成分、たとえばアミノ酸、糖類などの含量も自由に醸出可能な日が来るものと期待している。

20G-R39株の有機酸高生成機構の解明は独立行政法人酒類総合研究所との共同研究であり、下飯 仁博士、伊藤 清博士(現 鹿児島大学)に心より御礼申し上げます。本研究の機会と御鞭撻を賜りました宝酒造株式会社 垂水彰二 常務執行役員、高橋康次郎 元取締役をはじめとする関係各位の皆様方に深く感謝申し上げます。また、実用化においては当社技術者、工場の皆さんに厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 日本醸造協会編：醸造物の成分，日本醸造協会(1999)。
- 2) 蓼沼 誠：醸協，**61**，1092-1097(1966)。
- 3) 林田正典，上田隆蔵，寺本四郎：J. Ferment. Technol., **46**，85-91(1968)。
- 4) 原 昌道，戸塚 昭，水野昭博，讃岐仁史：醸協，**74**，838-841(1979)。
- 5) 豊沢 誠，米崎治男，上田隆蔵，林田正典：醸協，**38**，342-350(1960)。
- 6) 相川元庸，水津哲義，市川英治，川戸章嗣，安部康久，今安 聡：醸協，**70**，473-477(1992)。
- 7) 吉田 清，稲橋正明，中村欽一，野白喜久雄：醸協，**88**，645-647(1993)。
- 8) 吉田 清：醸協，**90**，751-758(1995)。
- 9) Asano, T., Kurose, N., Hiraoka, N., and Kawakita, S.: J. Biosci. Bioeng., **88**，258-263(1999)。

- 10) Arikawa, Y., Kobayashi, M., Kodaira, R., Shimosaka, M., Muratsubaki, H., Enomoto, K., and Okazaki, M.: J. Biosci. Bioeng., **87**，333-339(1999)。
- 11) Kubo, Y., Takagi, H., and Nakamori, S.: J. Biosci. Bioeng., **90**，619-624(2000)。
- 12) 桶詰和久，尾関健二，浜地正昭，熊谷知栄子：日本生物工学会大会講演要旨集，p.201(1997)。
- 13) 蟻川幸彦：清酒酵母の研究-90年代の研究-，p.122(2003)。
- 14) Ogawa, Y., Nitta, A., Uchiyama, H., Imamura, T., Shimoi, H., and Ito, K.: J. Biosci. Bioeng., **90**，313-320(2000)。
- 15) Muratsubaki, H.: J. Biochem., **102**，705-714(1987)。
- 16) 若井芳則，嶋崎孝行，原 昌道：醸協，**58**，363-368(1980)。
- 17) Chapman, C. and Bartley, W.: Biochem. J., **107**，455-465(1968)。
- 18) 神田晃敬，石川有紀子，浜地正昭，布川弥太郎：日本生物工学会大会講演要旨集，p.53(1993)。
- 19) Magarifuchi, T., Goto, K., Iimura, Y., Tadenuma, M., and Tamura, G.: J. Ferment. Bioeng., **80**，355-361(1995)。
- 20) 浅野忠男，黒瀬直孝：醸協，**95**，227-234(2000)。
- 21) Haselbeck, R. J. and McAlister-Henn, L.: J. Biol. Chem., **268**，12116-12122(1993)。
- 22) Cupp, J. R. and McAlister-Henn, L.: J. Biol. Chem., **267**，16417-16423(1992)。
- 23) 浅野忠男，矢野駿太郎，高倉 裕，田村健一，黒瀬直孝，平松順一，高橋康次郎：醸協，**98**，217-220(2003)。
- 24) Asano, T., Kurose, N., and Tarumi, S.: J. Biosci. Bioeng., **92**，429-433(2001)。
- 25) Gancedo, J. M.: Eur. J. Biochem., **206**，297-313(1992)。
- 26) Trumbly, R. J.: Mol. Microbiol., **6**，15-21(1992)。
- 27) Yano, S., Asano, T., Kurose, N., Hiramatsu, J., Shimoi, H., and Ito, K.: J. Biosci. Bioeng., **96**，332-336(2003)。
- 28) Klein, C. J., Olsson, L., and Nielsen, J.: Microbiology, **144**，13-24(1998)。
- 29) Brons, J. F., De Jong, M., Valens, M., Grivell, L. A., Bolotin-Fukuhara, M., and Blom, J.: Yeast, **19**，923-932(2002)。
- 30) 浅野忠男：酒研会報，**42**，22-25(2002)。
- 31) 竹内征夫：食品と科学，**7**，93-99(1987)。
- 32) 掛江正浩：食品と科学，**7**，103-106(1987)。
- 33) 佐藤 信，大場俊輝，高橋康次郎，国分伸二，小林幹男，小林宏治：醸協，**72**，801-805(1977)。