

清酒酵母のメタボロミクス

堤 浩子

清酒は米を主原料として、麹菌と清酒酵母の2種類の微生物を用いた発酵産物である。特に清酒醸造における清酒酵母の果たす役割は重要で、もろみ発酵過程でアルコールはもとよりさまざまな味や香りの成分を生成する。清酒醸造の環境は低温、低pH、濃糖、醸造後期には高エタノール濃度になるなど、酵母にとってはきわめて厳しいストレス存在下と考えられる。このような高ストレス条件下においても清酒酵母は旺盛に発酵することができ、他の酵母には真似のできない特徴の一つである。

図1に清酒酵母と実験室酵母を用いたもろみ発酵試験（仕込み後10日目）の状態を示す。清酒酵母はもろみ上部に泡を形成しり盛んに炭酸ガスが生成するのに対して、実験室酵母ではそのような活発な発酵は認められない。発酵終了後は、清酒酵母では20%近いアルコール濃度に達するが、実験室酵母ではその半分程度のアルコール濃度で発酵が停止する。このように、清酒酵母は清酒もろみのようなアルコール発酵において、特有の代謝活動を行っていると予測される。

2005年に清酒酵母のゲノム解析が行われ、清酒酵母と実験室酵母S288Cは塩基配列レベルでは96.2%、アミノ酸レベルでは98%以上の相同性を有することが報告されている²⁾。このように、実験室酵母と清酒酵母はゲノムレベルでは非常に類似しているが、ストレス応答やエタノール生成などの形質は大きく異なる。このような「清酒酵母らしさ」の要因を探るためにDNAマイクロアレイ解析が行われているが、全容の解明には至っていない。また清酒酵母の種類には、きょうかい7号（K7）、きょうかい9号（K9）、きょうかい10号酵母（K10）などの実用株があるが、それらのゲノムはきわめて類似してい

ると考えられている³⁾。しかしながら、これらの酵母で醸造した清酒の味わいは大きく異なり、清酒酵母の醸造特性を解明するには、ゲノムからのアプローチだけでは困難であると考えられる。

培養と試料調製

酵母の比較を行うために、エネルギー代謝などで生成される親水性低分子代謝物の検出をGC/MS分析によって行った。清酒酵母の特徴を顕著に示すためには、やはり清酒醸造過程でのもろみ中の酵母を試料とすることが望ましい。しかしながら、もろみ中には米、麹など酵母以外の成分が多く含まれるため、酵母細胞内の代謝物を正確に測定するためには、モデル系での実験が必要である。そこで、YPD培地の系をモデル系として採用し、低温発酵を再現するために低温静置条件での培養を行った。培地組成としてYPD10（10% glucose, 2% peptone, 1% yeast extract）を用いて各種酵母を15°C静置培養した。実験室酵母X2180（a/a）；X2180-1A×X2180-1B、清酒酵母K7をn=5で培養した。そのサンプリング時期を代謝物が安定するlate log phase, stationary phaseと決定した。各酵母の増殖を測定し、培地中のアルコール濃度も合わせて測定した（図2）。その結果、実験室酵母の生育は清酒酵母に比べて非常に遅く、最終菌体濃度も少なく、アルコール生産量も低かった。よって、この培養条件において清酒酵母の特性が見いだせると予測し、これらの酵母細胞内の親水性低分子代謝物を測定した。

GC/MS分析とデータ解析

酵母から低分子親水性代謝物を抽出するためにシリル

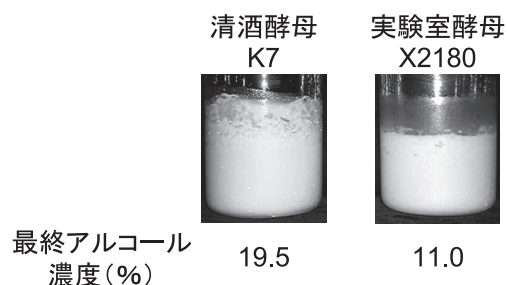


図1. 各種酵母を用いた仕込み試験

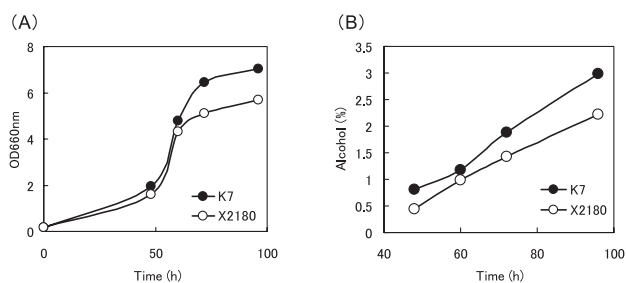


図2. 酵母の増殖 OD660 nm (A) と培地中のアルコール生成量 (B)

化、メトキシ化の誘導体化を行い、GC/MS 分析に供した。GC/MS 分析で検出されたピークの同定を行った結果、アミノ酸、有機酸、糖、糖アルコール、N 化合物などを含む54化合物を同定できた。未同定の成分もあわせたデータを用いて主成分分析を行った。主成分分析 (PCA) を用いたのは、これが多数の変数になるべく少ない変数で表す解析手法であり、酵母間の差を見いだすには有効な方法であると考えられたからである。清酒酵母と実験室酵母とで代謝物に違いがあるかどうかを見いだすため、低温増殖時の代謝物の差を調べた。

「清酒酵母」と「実験室酵母」との代謝の違い

清酒酵母と実験室酵母の細胞内代謝の主成分分析の結果を図3に示した。Factor1で清酒酵母と実験室酵母間でクラスターを形成し、Factor2では培養時間の違いによって分離した。Factor1でローディングに寄与した代謝物をみるとトレハロース、アミノ酸であった (図3)。そこで、違いが現れた代謝物の量を比較し図4に示した。これまで、実験室酵母では低温などのストレス応答にトレハロース蓄積する、あるいはそれらの生合成関連遺伝子が高発現することが報告されている⁴⁾。「低温環境→細胞内

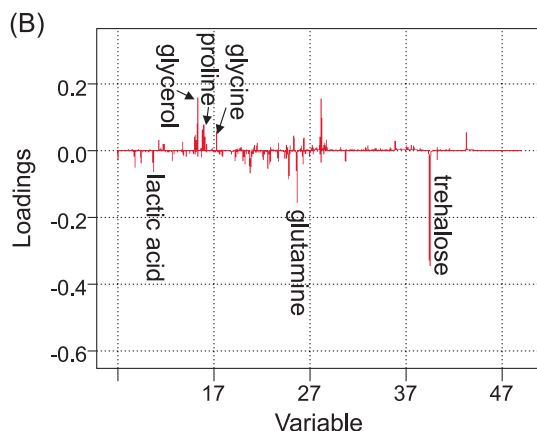
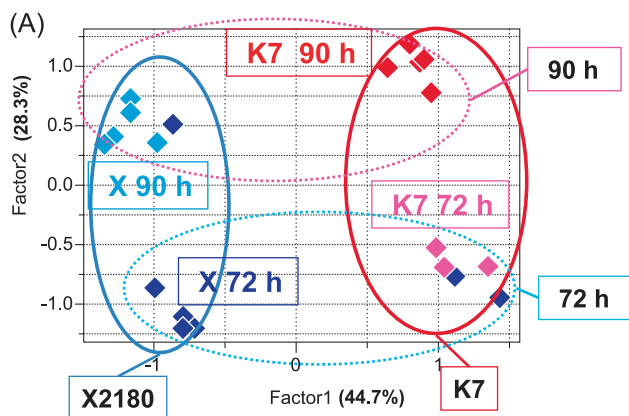


図3. 清酒酵母と実験室酵母のPCA (A) と loading plots (B)

のトレハロース蓄積によるストレス応答」であったが、清酒酵母の細胞内のトレハロースを見るかぎり非常に低濃度で、15°C 静置の条件ではほとんどストレスとなっていない様子が伺える。また、アルコール生成量を考慮すると図5のように清酒酵母と実験室酵母では代謝の流れの違いを明確に示すことができた⁵⁻⁷⁾。

清酒酵母菌株による代謝の違い

清酒酵母は、日本全国の醸造蔵から単離された酵母の中で特に醸造特性にすぐれた菌株である。これらの菌株の醸造特性の違いについては表1のように表現されている⁸⁾。このようにゲノムレベルではほとんど近種であっても、清酒の仕込みでは酵母の特性が顕著に現れる。そこで、これらの酵母を細胞内代謝の点から比較した。

上述の方法と同様の方法を用いてサンプルを調製し

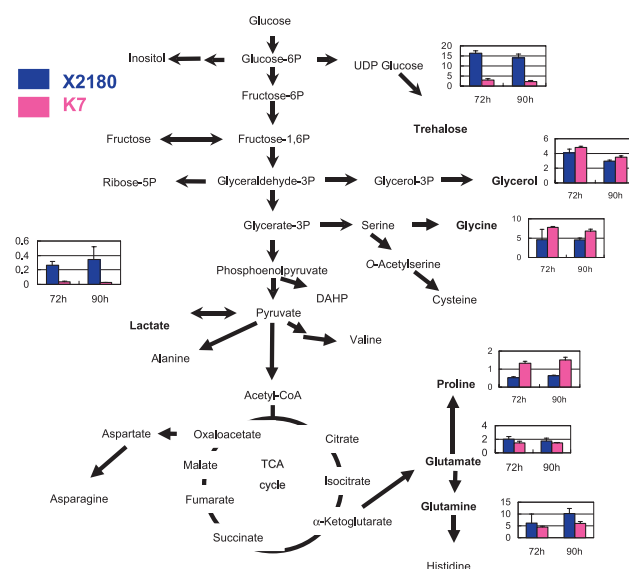


図4. 清酒酵母と実験室酵母の細胞内代謝物

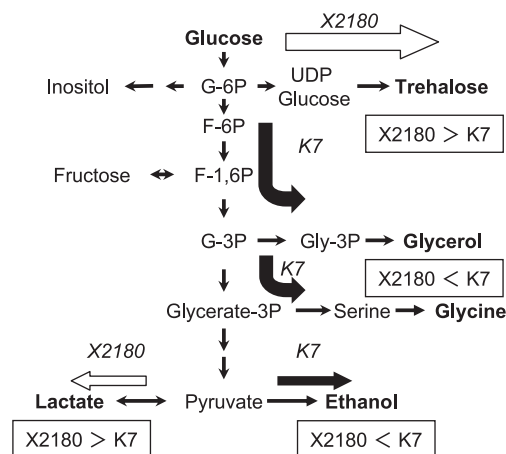


図5. 清酒酵母と実験室酵母の代謝の違い

表1. 清酒酵母の特徴⁸⁾

7号	華やかな香りで広く吟醸用および普通醸造用に適す
9号	短期もろみで華やかな香りと吟醸香が高い
10号	低温長期もろみで酸が少なく吟醸香が高い

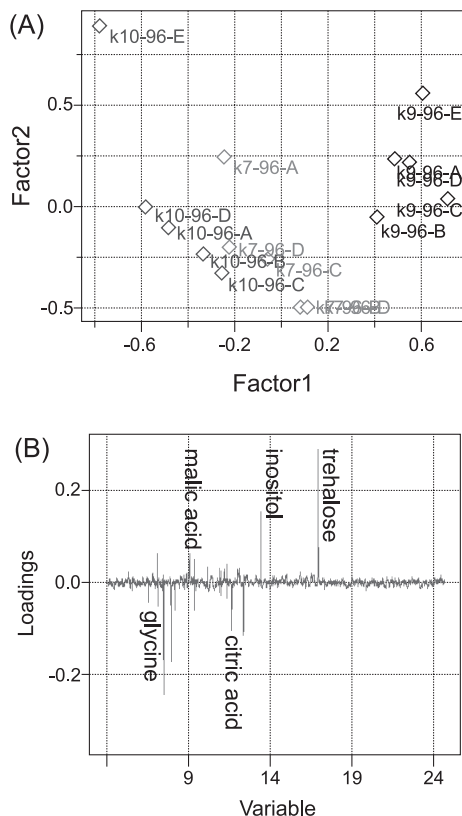


図6. 清酒酵母間のPCA (A) と loading plots (Factor1) (B).

GC/MS 分析を行い、PCAを行った(図6)。トレハロースなどもクラスター形成に寄与していたが、有機酸が分離に寄与していた。図6Bに示すようにクエン酸、リンゴ酸がクラスター形成に寄与していた⁵⁻⁷⁾。代謝物のなかでも有機酸は、味に大きく関連する代謝物である。そこで、各清酒酵母特徴の1つである有機酸に着目した。図7に示したように細胞内の有機酸濃度の違いが明確になり、きょうかい酵母の特性が明確にできたと考えている。

清酒酵母で有機酸を対象として、その量を変化させた酵母育種が行われている。よって、菌株による細胞内の有機酸生産量を知ることは、育種をするうえで菌株を選択する情報の1つとなるであろう。

これまで、定量的には表せなかった各きょうかい酵母が有する表現型の差異を代謝物の差として表すことができた。これら3種類の酵母が清酒造りにすぐれた形質を持つことは言うまでもないが、今後酵母を育種する上でも、基本的な酵母の代謝特性を把握することは重要である。

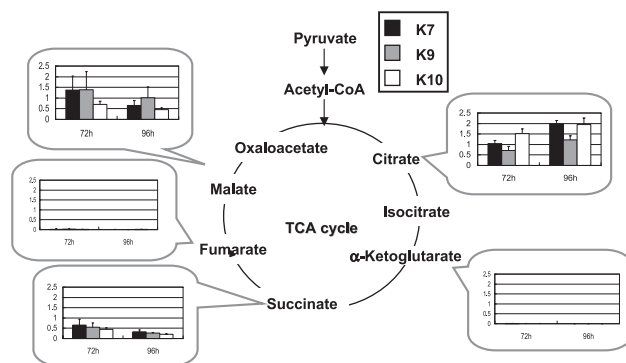


図7. 清酒酵母の細胞内有機酸の代謝比較

おわりに

今回、解析した清酒酵母は、現在の清酒醸造に用いられている代表的な酵母である。清酒酵母と実験室酵母を比較することで、清酒酵母独自の代謝が明らかにできた。このような代謝の違いが、低温やストレス条件などにさらされたときに起こりうる「清酒酵母らしさ」の一因であると考えている。

清酒酵母は長い年月、我が国の酒造蔵にすみつき醸造を繰り返しながら優良酵母が選抜・淘汰されて現在に至っている。清酒酵母の「清酒を造る能力」とは、長年の自然育種の結果、獲得されたものである。このすぐれた清酒酵母の特性は、まだまだすべて解明されたわけではなく、メタボロミクスを含めたOmics解析のような新技術を利用することで更なる発見が期待できる。

清酒酵母のようにゲノムがほとんど同じである場合、細胞内の代謝情報を得ることで、今後の酵母育種、醸造技術開発へのヒントを導き出せると考えている。また、メタボロミクス技術は、さまざまな微生物の代謝物の恩恵を受けている我々にとって、微生物研究の発展に大きな可能性を示唆するものである。

本研究は、大阪大学・福岡教授との共同研究により行われたものである。

文 献

- 1) Shimoi, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2018 (2002).
- 2) 下飯 仁: 食品工業, p.56 (2007).
- 3) Azumi, M. *et al.*: *Yeast*, **18**, 1145 (2001).
- 4) Schade, B. *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5492 (2004).
- 5) 堤 浩子: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.74 (2006).
- 6) 福岡英一郎: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p.85, (2006).
- 7) 堤 浩子ら: 日本分子生物学会講演要旨集, p.328 (2005).
- 8) <http://www.jozo.or.jp/i.kouboda.htm>