

清酒酵母の香気生成の研究

堤 浩子

清酒にはアルコールの他に香りや味の成分が多種類含まれているが、特に香りは清酒を特徴づける重要な因子である。香りはフレーバーホイール¹⁾で示されるように、花様、果実様、ナッツ様、カラメル様、脂質様とさまざまな成分に分けられ、各成分のバランスにより、清酒の「香り」は特徴づけられる。吟醸香などの香気成分の多くは清酒酵母によって生成されることが明らかとなったため、清酒醸造過程においてフルーティーさを付与する吟醸香を多く含み、オフフレーバーを抑える工夫がこれまでなされてきた。吟醸香の代表的な香りには、リング様の香りのカプロン酸エチルとバナナ様の香りとして酢酸イソアミルがあるが、酵母の育種方法が開発されるまでは、それらの香りの高い清酒を安定して醸造することは容易ではなかった。しかしながら、清酒酵母での各香気成分生合成経路や代謝制御機構が明らかになり、それらの成分を高生産させる酵母の育種方法が開発されたことで実用化に至っている。本稿では吟醸香成分の生合成経路の研究ならびに積極的に吟醸香を多く生成するような酵母育種技術について紹介する。

カプロン酸エチル

生合成 リング様の香りを有すカプロン酸エチルはカプロン酸 (C6:0) を前駆体として、エステル化することで生成される。カプロン酸は、主に清酒酵母の脂肪酸合成経路においてアセチルCoAとマロニルCoAを基質として生合成 (図1) される。その脂肪酸の鎖長伸長反応は、脂肪酸合成酵素によって行われるが、その酵素はFAS1遺伝子産物 (Fas1p: β サブユニット) とFAS2遺伝子産物 (Fas2p: α サブユニット)、それぞれ六量体から形成されている多量体 ($\alpha 6\beta 6$ サブユニット) 酵素である²⁾。

カプロン酸高生産酵母 カプロン酸エチルを高生産させるための方法として、前駆体であるカプロン酸の高生産菌を育種する方法が開発されている³⁾。 *Cephalosporium*

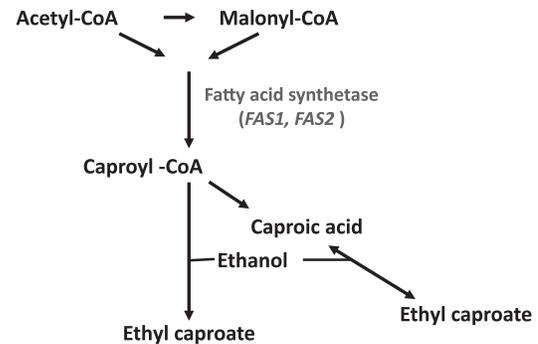


図1. カプロン酸エチルの生成経路

caerulens が産生する抗真菌剤セルレニンは、脂肪酸合成酵素の β -ケトアシル-ACP合成を阻害することが知られている。セルレニン含有培地で酵母を培養すると、セルレニン耐性を示す株は多剤耐性株を除いて、Fas2pのGly1250Ser変異により長鎖脂肪酸合成が減少し、カプロン酸を多量に生成していた。YPD10培地 (10% Glucose, 2% Polypeptone, 1% Yeast extract) でセルレニン耐性株と親株を15°C 5日間静置培養し、細胞内の脂肪酸含有量を測定した結果、親株に比べてセルレニン耐性株はカプロン酸の含有量が多く、長鎖脂肪酸の含有量が少ないことが示された (図2)。

そこで、きょうかい9号酵母 (K9) からセルレニン耐性酵母 (K9CerR) を取得し、総米1kgの仕込み試験 (三段仕込み, 15°C一定) を行ったところ、耐性酵母から醸造された上槽酒は約5倍のカプロン酸エチルを含有しており、官能評価でも“香り”において高い評価を得た (表1)。

酢酸イソアミル

生合成 酢酸イソアミルはバナナ様の香りを有し、イソアミルアルコールの6位の炭素鎖がアセチル化されることにより生合成される。イソアミルアルコールは口

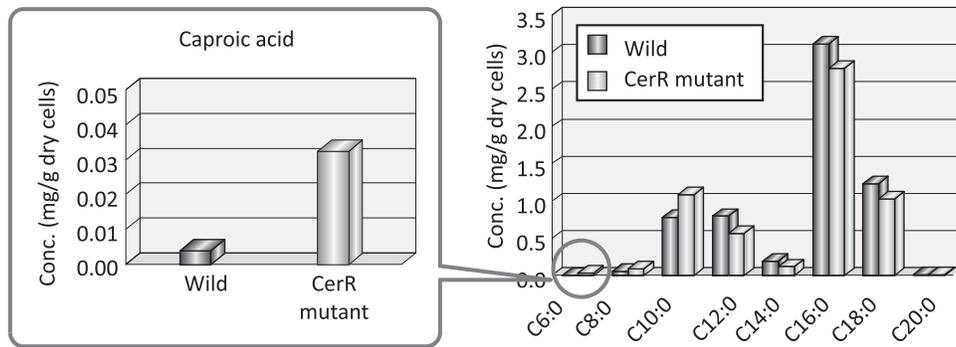


図2. セルレニン耐性酵母の細胞内脂肪酸含有量

表1. セルレニン耐性酵母で醸造した上槽酒の成分分析

	K9	K9 CerR
日本酒度	-1.0	-2.0
エタノール (%)	18.7	18.5
総酸 (ml)	3.1	3.2
アミノ酸度 (ml)	2.6	2.5
カブロン酸エチル (ppm)	1.1	5.7

イシン生合成経路から分岐して生合成されるため、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (Leu4p, Leu9p) による反応において、ロイシンによるフィードバック制御を受け、ロイシンなどのアミノ酸とともにイソアミルアルコールの生成量も調節されている (図3)。

イソアミルアルコールから酢酸イソアミルへの変換には、*ATF1*と*ATF2*にコードされる2種類のアルコールアセチルトランスフェラーゼ (AATFase) が関与しているが⁴⁾。清酒醸造では、イソアミルアルコールから酢酸イソアミルへの変換は、主にAtf1pによるものである⁵⁾。さらにAtf1pはエタノールを基質とし酢酸エチルを生成するのに対し、Atf2pは基質とはしないことも明らかとなっている。また、*ATF1*,*ATF2*の発現調節も異なり、*ATF1*は酸素と不飽和脂肪酸による発現抑制を受けるのに対し、*ATF2*は酸素の発現抑制を受けるが、不飽和脂肪酸では逆に発現が促進される。

イソアミルアルコール高生産酵母⁶⁾ 酢酸イソアミルの生成量の増加するためには、前駆体であるイソアミルアルコールの生成を増やすことで達成できる。そこで

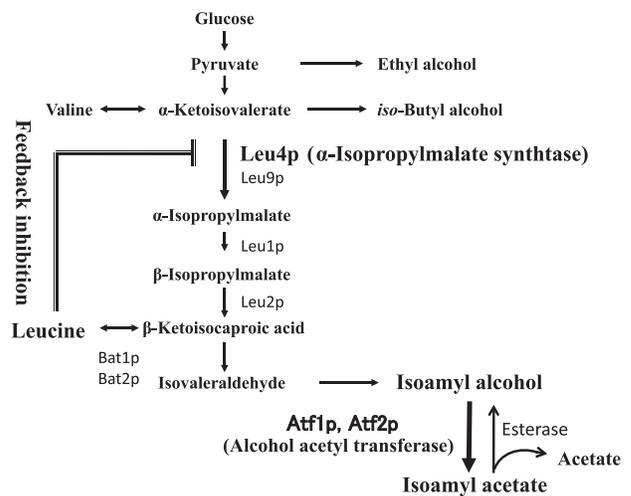


図3. イソアミルアルコールおよび酢酸イソアミルの生成経路

ロイシンによるフィードバックが解除された変異株を得るために、きょうかい7号酵母 (K7) を親株にロイシンアナログである5',5',5'-トリフルオロロイシン (TFL) 耐性酵母 (K7 TFL) を取得した。K7 TFL株は、 α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ (*LEU4*, *LEU9*) のLeu4pに変異が生じた株である。そこで、K7 TFL株を用いて総米1 kgの仕込み試験を行ったところ、上槽酒中のイソアミルアルコール生成量が2.5倍以上に上昇し、結果として酢酸イソアミル量も増加していた (表2)。しかしながら、イソアミルアルコールを多く含む清酒は、溶媒様臭やイソアミルアルコールの酸化により生じるイソバレルアルデヒドによるオフフレーバーが問題となる。酢酸イソアミルへの変換率であるE/A比 (酢酸イソアミル量/イソアミルアルコール量 \times 100) を上昇した

表2. TFL耐性酵母で醸造した上槽酒の成分分析

	K7	K7 TFL
日本酒度	-1.0	-1.0
エタノール (%)	18.8	18.6
総酸 (ml)	1.7	1.7
アミノ酸度 (ml)	2.6	2.5
酢酸イソアミル (ppm)	1.2	3.4
イソアミルアルコール (ppm)	130.0	370.0
E/A 比	0.92	0.92

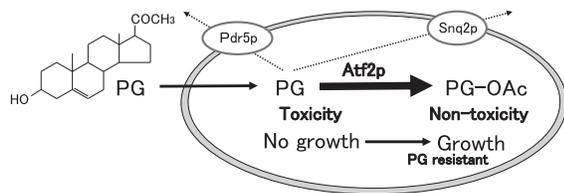


図4. 酵母でのプレグネノロンのエステル化反応

酵母を育種できればオフフレーバーが低減されると考えられる。

酢酸イソアミル高生産酵母⁷⁾ 酢酸イソアミル高生産酵母を育種するためには、E/A比を向上させることが望ましい。そこで、イソアミルアルコールから酢酸イソアミルに変換するAATFaseに着目し、酵母育種を行った。Atf1pとAtf2pは基質特異性が異なり、Atf1pはエタノールを基質とし酢酸エチルを生成することから、ATF1の高発現はオフフレーバーの増加を引き起こす可能性が考えられる。そこでAtf2pの高発現株の取得を行った。Atf2pはイソアミルアルコール以外にステロイドホルモンの前駆体であるプレグネノロン (PG) を基質とする⁸⁾。PGは酵母に対して増殖抑制効果を示すが、Atf2pによるエステル化によりPGは無毒化されるため、耐性株ではATF2の高発現が期待される(図4)。そこで高濃度のPGを用いてPG耐性株を取得した結果、耐性株ではAtf2pが高発現しており、醸造試験においても高いE/A比を示した。

実用酵母の育種

実用酵母の育種は、ターゲットとする表現型が仕込み系で実現することが必要となる。また吟醸酵母の育種では、香気成分が多く生成しても、最終の生産物である清酒としてエタノール生産性・味・香りがそろわなければならない。そのため、実用酵母育種には選択培地で生育した酵母から、いかに効率的に実用化に適した酵母を選択できるかが鍵となる。酵母のテストは大スケールでの仕込みが望ましいがいきなりの大スケールの検討では難しいため、小スケールで酵母の特徴を見極められるかが重要である。これらの香気生成に関する育種方法は、特許出願や実用化されたものが多く、現在も実用酵母育種の基礎技術として使用されている。

おわりに

清酒は香りだけでなく味とのバランスで評価されるため、高香気生成酵母の育種でも味・香り・発酵力といったトータルで評価される。吟醸酵母の育種方法が開発されるまでは杜氏の勘と経験により、低温かつ清酒酵母にストレスをかけて吟醸香を多く生成する醸造方法であった。香気成分の同定や生合成経路の解明、酵母の育種方法の開発は吟醸造りに対し大きな技術革新をもたらしたといえる。近年では、清酒酵母のゲノムも解読され、機器分析技術の進歩も目覚ましいことから清酒醸造の香気成分からみた新たな育種方法も開発が期待される。

文 献

- 1) 宇都宮：醸協, **101**, 730 (2006).
- 2) Stoops, J. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 8364 (1981).
- 3) Ichikawa, E. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2153 (1991).
- 4) Mason, A. B. and Dufour, J. P.: *Yeast*, **16**, 1287(2000).
- 5) 藤井, 長澤:清酒酵母の研究-90年代の研究-, p.111, 清酒酵母・麴研究会 (2003).
- 6) Ashida, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2016 (1987).
- 7) 堤ら：特開2002-191355.
- 8) Cautet, G. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **261**, 317 (1999).