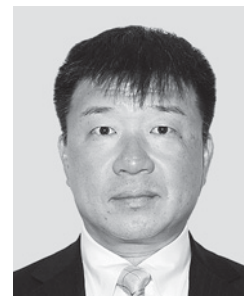


2015年度 生物工学奨励賞（江田賞） 受賞



大麦焼酎製造に適した焼酎酵母 BAW-6の醸造適性に関する研究

高下 秀春



Studies on characteristics of shochu yeast BAW-6 suitable for barley shochu making

Hideharu Takashita (Research & Development Laboratory, Sanwa Shurui Co., Ltd., 2231-1 Yamamoto, Usa, Oita 879-0495) *Seibutsu-kogaku* **94**: 104-109, 2016.

はじめに

優良な醸造用酵母として分離された清酒酵母、焼酎酵母の分離源はすべて醪由来であるが、当時は大麦焼酎醪から分離された優良な焼酎酵母はなかった。良好な醪から分離された酵母菌がその醸造環境に適した変異株であれば、その酵母を再使用することで品質の良い大麦焼酎を継続的に製造することが可能となる。通常の焼酎の醪は麴と水に酵母を加えて酵母の増殖を図る一次醪と、一次醪にさらにデンプン質原料および水を加えて主発酵を行う二次醪に分けられる。一次醪は二次醪のスターターに相当するが、一次醪の一部は次の一次醪のスターターとしても使用され、これを「差しもと」と称している。当社焼酎工場内の大麦焼酎醪において、親株に鹿児島酵母 (Ko) を使用して差しもつを繰り返した際に、酵母の呼吸能の有無を目視にて判定するTTC染色法¹⁾と構成性酸性ホスファターゼ (cAPase) の有無を目視にて判定するジアゾカップリング (DC) 染色法^{2,3)}にて酵母純度を確認したところ、TTC染色は差しもつ回数の増加に関わらず安定して赤色を示したが、DC染色では最初はすべてのコロニーが茶色 (cAPase活性あり) であったが、徐々に白色 (cAPase活性なし) の割合が増加し、アルコール取得量も増加する現象が認められた (図1)。これまでに焼酎酵母の育種に関する研究は数多くなされてきたが、「差しもつを繰り返した大麦焼酎醪」に着目した焼酎酵母の育種に関する報告はない。これは、大麦を原料

とした培地にエタノールとクエン酸を添加した天然培地による集積培養法を利用した手法ともいえる。また、現在頒布されている優良な醸造用酵母は、cAPase活性が失われた株が多いが、「差しもつを繰り返した大麦焼酎醪」から分離された焼酎酵母でもcAPase活性が失われていたことから、醸造用酵母のcAPaseの遺伝的不安定性と醸造特性との関連性について興味もたれた。

そこで筆者らは、差しもつを繰り返した大麦焼酎醪から分離された焼酎酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BAW-6の焼酎醸造適性とcAPaseの遺伝的不安定性について明らかにすることを目的とした。

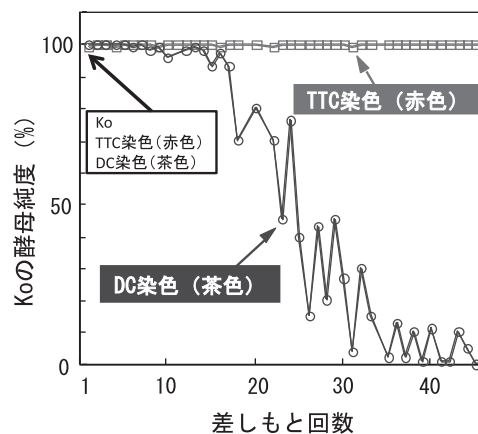


図1. 大麦焼酎一次醪4日目の酵母純度



図2. 大麦焼酎製造に適した焼酎酵母の探索方法

大麦焼酎醪に適した焼酎酵母の育種⁴⁾

焼酎酵母は、クエン酸存在下で25～32°Cの温度下で十分アルコールを生産する能力が必要とされている。従来、本格焼酎製造には米麹が使用されてきたが、麹にも大麦を使用する大麦麹、大麦掛仕込の大麦焼酎が開発された。しかし、そのような条件では米麹製醪から分離された従来の焼酎酵母の発酵力は十分ではなく、従来酵母は大麦麹を含む発酵環境に対して適性が合致していないのではないかと推論した。そこで、大麦焼酎醪に適した焼酎酵母を分離することを目的として、初発種酵母としてKoを使用し、差しもとを約2か月間繰り返した大麦焼酎醪を分離源とし、大麦麹汁培地において増殖速度が速く、アルコール耐性を有するアルコール高生産酵母の選抜を行った。その結果、10%アルコールを含むBrix 10の大麦麹汁培地において良好な増殖を示し、発酵力の指標であるTTC染色によって大きな赤いコロニーを示す10株を取得した(図2)。さらに12%アルコール添加培地による発酵力試験により、発酵液中のアルコール度数、生菌数ともに高かったBAW-6を選抜した(図3)。BAW-6はKoと比較して、アルコール耐性、クエン酸耐性が付与されており、これらが大麦麹汁において良好な増殖を示す原因の一つと考えられた。また、小仕込試験の結果、BAW-6は酵母にとってアルコールのストレスが大きい二次醪後半でも発酵力が旺盛であった。BAW-6はKoに比べ蒸留前醪のアルコール度数が0.5%増加し、アルコール取得量も11 L/ton向上した(表1)。以上の結果より、BAW-6は大麦焼酎製造において十分な醸造特性を持っていることが確認された。

焼酎、清酒酵母のcAPaseの遺伝的不安定性⁵⁾

優良清酒酵母や焼酎酵母BAW-6はともに醸造用に適した酵母として分離されているが、いずれもcAPase活

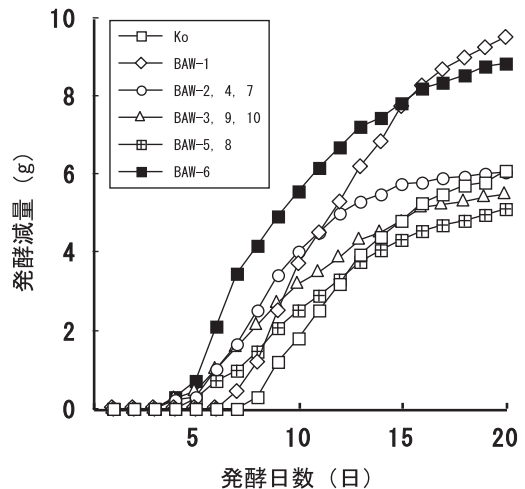


図3. 12%アルコール添加大麦麹汁培地による発酵力試験

表1. 蒸留前大麦焼酎醪の分析値の比較

使用酵母	BAW-6	Ko
取得量 (L/ton)	417	406
エタノール (%)	17.3	16.8
n-プロパノール (ppm)	62	86
i-ブタノール (ppm)	74	93
酢酸イソアミル (ppm)	2.3	2.5
i-アミルアルコール (ppm)	217	260

性を有していないことから、BAW-6の親株である焼酎酵母KoのcAPaseの遺伝的不安定性および酵母のcAPase活性の有無と醸造特性との関連性について興味を持たれた。Koを培養すると、YPD培地では0.3%、大麦焼酎醪では1%の割合でcAPase⁻株が出現したことから、KoのcAPase活性に不安定性が確認された(図4)。その不安定性はYPD液体培地よりも大麦焼酎醪のほうが促進されることがわかった。原料大麦もしくは白麹菌による生成分解物がcAPase活性の不安定性を促進することが推定された。

*S. cerevisiae*は細胞表層に2種類の酸性ホスファターゼ(EC 3.1.3.2)をもっている。一つは、*PHO5*遺伝子にコードされ、環境の無機リン酸によりその生産が抑制される抑制性酸性ホスファターゼであり、他の一つは、*PHO3*遺伝子にコードされ構成的に生産されるcAPaseである⁶⁾。*PHO5*、*PHO3*遺伝子はいずれも1404 bpの塩基配列および467個のアミノ酸残基からなるタンパク質をコードしており、塩基配列およびアミノ酸配列で80%以上の相同性があり、第II染色体右腕に連続してタンデムに配置していることが知られている。cAPaseはチアミンに抑制を受けていることが証明され^{7,8)}、*PHO3*が構造遺伝子で*PHO6 (THI2)*がその調節遺伝子であること

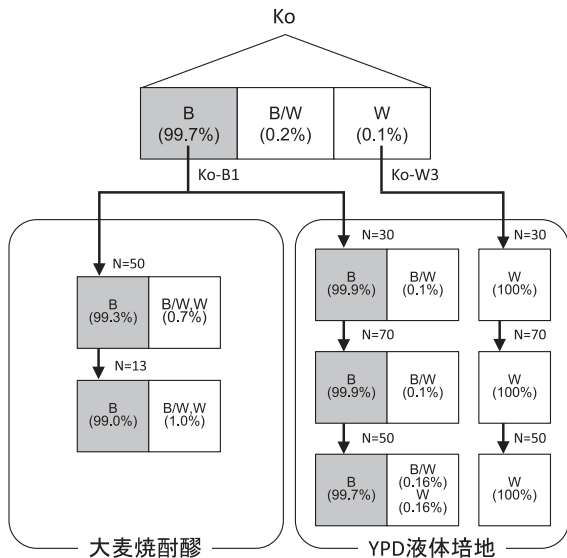


図4. Koの継代培養によるDC染色の変化. N, 世代; B, 茶色; B/W, セクター (茶色コロニーに白色の部分が出る); W, 白色.

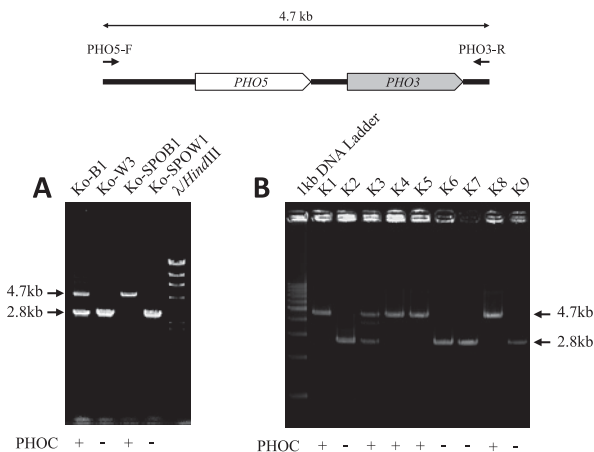
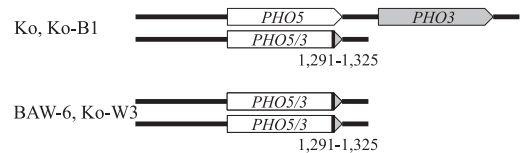


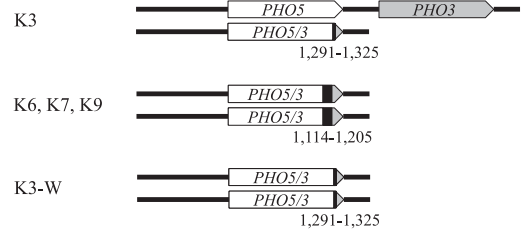
図5. 焼酎酵母 (A), 清酒酵母 (B) の *PHO5-PHO3* 遺伝子領域のPCR解析. PHOCはcAPase活性の有無を示している. *PHO5-PHO3* 遺伝子領域が欠失型 (*PHO5/3*) の場合, 2.8 kbの増幅断片が検出される.

がわかった⁹⁾. Koは二倍体であるが, その酸性ホスファターゼ遺伝子を解析すると, *PHO3* 遺伝子について野生型と欠失型のヘテロ接合型 (*PHO3/pho3*) で, 清酒酵母K3も同様の遺伝子型であった. しかし, DC染色で白色のcAPase⁻株では欠失型のホモ接合型 (*pho3/pho3*) になっていた. cAPase活性がない清酒酵母 (K6, K7, K9) も欠失型のホモ接合型 (*pho3/pho3*) であった (図5). 欠失型株の *PHO5-PHO3* 遺伝子領域の塩基配列を調べた結果, 5'部分が *PHO5*, 3'部分が *PHO3* に由来するキメラ遺伝子 (*pho5/3*) が生成しており, *PHO3* プロモーターと *PHO3* 遺伝子の近位部分が欠失したため, *pho3Δ* となったことがわかった (図6). その融合箇所は同じ清

A. 焼酎酵母



B. 清酒酵母



C. 実験室酵母



図6. 焼酎, 清酒酵母の *PHO5-PHO3* 遺伝子領域の塩基配列. 白色は *PHO5*, 灰色は *PHO3*, 黒色は融合箇所を示している.

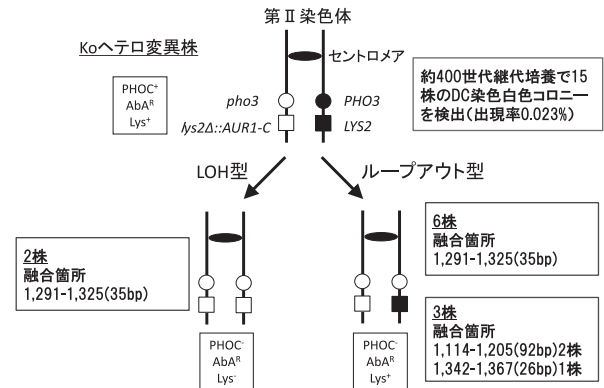


図7. Koヘテロ変異株による遺伝的不安定性の解析

酒酵母でも K3 (1291-1325) と K6, K7, K9 (1114-1205) では異なっていた. *PHO3* がヘテロ接合型の K3 も Ko と同様に cAPase 活性が遺伝的に不安定になるか継代培養による試験を行った結果, 実験室株 BY4947 からは約 212 世代で 0.009% の低頻度で PHOC⁻ 株 (BY4947-W) が出現したのに対して, K3 からは約 66 世代で 0.3-0.6% の頻度で PHOC⁻ 株 (K3-W) が発生したことから, K3 の遺伝的不安定性が確認された. 次に, 第II染色体右腕の *PHO3* 遺伝子より下流側約 43 kb に隣接している *LYS2* 遺伝子を破壊したヘテロ変異株を作成し, 約 400 世代の継代培養で発生した白色コロニー 15 株の表現型を調べた結果, 11 株がループアウト型で 4 株が LOH 型 (ヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) によりホモ化された変異型) だった (図7). また, 11 株 (ループアウト型 9 株, LOH 型 2 株) について *PHO5-PHO3* 遺伝子領域の塩基配列を調べた結果, 野生型から欠失型

にキメラ化した融合箇所は3タイプに分けられた。LOH型はすべてホモ化していたが、ループアウト型にも融合箇所が同一の株が7株存在していた。ループアウト型で融合箇所が異なっていた3株のうち2株は1114-1205 (92 bp) で比較的相同領域が長かったが、1株は1342-1367 (25 bp) と非常に短く、*PHO3*側に偏っていた。以上の結果から、KoのcAPaseの遺伝的不安定性の原因は、ヘテロ接合型*PHO3/pho3*のループアウトまたはLOHによるホモ化であると推定した。Koの*PHO3*遺伝子破壊株ならびに*PHO3*および*pho3*の単孢子一倍体株の発酵試験を実施したが、cAPase活性の有無とアルコール生産性に関連性は認められなかった。しかし、cAPase活性の有無により酢酸エチルの生産性に違いが認められたことから、酒質への影響が示唆された。DC染色によるcAPase活性の検出は簡便であることから、親株のcAPase遺伝子がヘテロ型(*PHO3/pho3*)である場合は、DC染色によってホモ型株(*pho3/pho3*)を選択することによって形質が安定し醸造特性に多様性を兼ね備えた菌株を育種することができることが示された。

BAW-6の競合的優位性と薬剤耐性¹⁰⁾

筆者らは、大麦焼酎醪中で差しもとを繰り返した場合BAW-6がKoに対して割合が増加することを確認し、さらに大麦焼酎醪でBAW-6がKoより増殖が速い原因がBAW-6のストレス耐性に関係しているかどうかを検討した。大麦焼酎仕込による競合培養試験を実施した結果、差しもと回数が増えるに従い醪中に占めるBAW-6の割合が高くなった。アルコール生産性に関しては、培養試験の回数に関わらず酵母全体に占めるBAW-6の割合が5割以上であればKo単独培養よりも高い値を示していた(図8)。大麦麹汁培地における増殖試験の結果、培地のBrix濃度が高い場合、BAW-6の最大比増殖速度(μ_{max})はKoと比べて抑制されにくいことから、大麦または大麦麹に由来する何らかの成分による増殖阻害効果に対して、BAW-6はKoよりも耐性であることが示唆された。大麦由来の抗菌性物質として塩基性タンパク質、チオニンが知られている。チオニンは主に麦類に含まれる分子量が約50 kDaのペプチドで8個のシステインを含む¹¹⁾。そこで、BAW-6とKoの小麦由来のチオニンに対する増殖阻害効果を調べたが、両者で差は認められなかった。大麦焼酎醪では、チオニンは白麹菌が生産するプロテアーゼにより分解された可能性があることから、難消化性のペプチドやポリフェノールなどの抗菌性物質が存在するかもしれない。

次に、筆者らは大麦焼酎醪では酵母は発酵工程でさまざまなストレス(アルコール、温度、酸)にさらされて

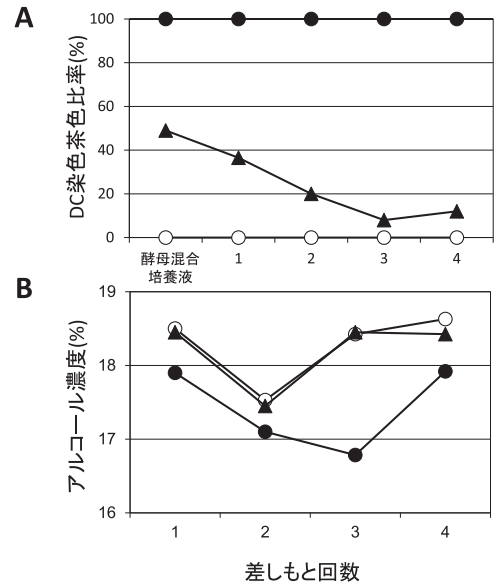


図8. BAW-6とKoの大麦焼酎仕込による競合培養試験。A. 醪中の酵母DC染色茶色比率; B. 発酵終了時のアルコール度数。●, Ko; ○, BAW-6; ▲, 酵母混合培養。

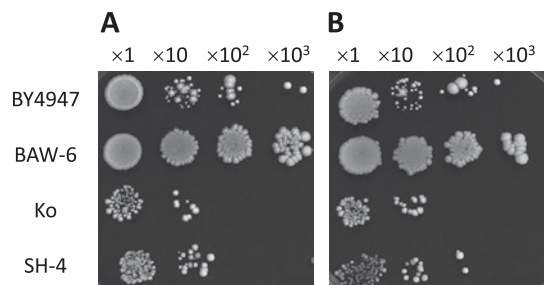


図9. 焼酎酵母, 実験室酵母のdiethylstilbestrol耐性 (YPD寒天培地)。A, diethylstilbestrol; B, diethylstilbestrol + bafilomycin-A1。

いることから、BAW-6は何らかのストレスに対して耐性を有することでKoに対して優位性があると考えた。そこで、各酵母の薬剤耐性を調べた結果、BAW-6はSD培地ではcerulenin, YPD + 8% ethanol (pH 4.5) 培地¹²⁾ではdiethylstilbestrolに対して他の酵母と比較して耐性を示した。特に、BAW-6はYPD培地ではエタノールを含む酸性条件下でなくてもdiethylstilbestrol耐性がKoよりも強化されていた(図9)。BAW-6がdiethylstilbestrol耐性を有する原因の一つとして液胞H⁺-ATPase活性が関与している可能性が考えられたのでその活性阻害剤bafilomycin-A1¹³⁾を添加しても耐性能に変化はなかったことから、diethylstilbestrol耐性は酵母細胞膜のH⁺-ATPase活性に原因があると判断した。そこで、BAW-6のH⁺-ATPase活性を反応溶液中のpHを低下させる能力で測定するとKoより高いことがわかった(図10)。このことは、BAW-6は発酵後半のアルコールストレス環境

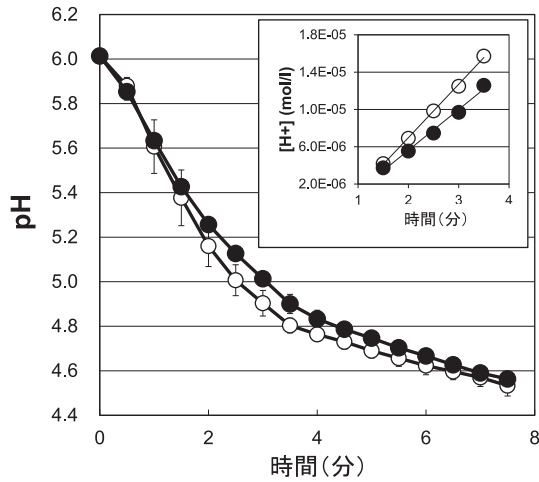


図10. 酵母細胞外pH値の経時変化. ●, Ko; ○, BAW-6.

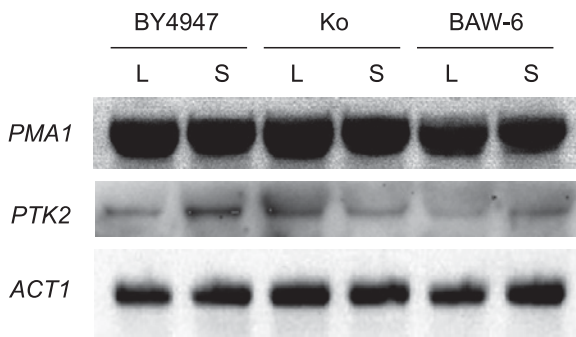


図11. *PMA1*, *PTK2*のノーザンブロット解析. L, 対数増殖期; S, 定常期.

下においても細胞内のイオン恒常性を保ちやすいことを示唆している. BAW-6の H^+ -ATPaseの高活性の原因を調べた結果, 予想に反して H^+ -ATPaseの構造遺伝子である*PMA1*の高発現によるものではなかった. タンパク質レベルで活性化を促進することが報告されているプロテインチロシキナーゼをコードしている*PTK2*遺伝子^{14,15)}について調べたところ, Koは対数増殖期では高発現していたが, 定常期では減少していたのに対して, BAW-6は実験室株と同様に対数増殖期は弱く, 定常期には強く発現していた(図11). したがって, BAW-6の細胞膜 H^+ -ATPase高活性の原因は, 定常期におけるPtk2pを介したPmalpの活性化によるものと推察した. 以上の結果から, BAW-6は親株Koよりも大麦焼酎醪の発酵環境に適応しているために優れた発酵力を示したものと結論づけた.

おわりに

本研究は大麦焼酎醸造に適した酵母を分離し, その遺伝的特性と醸造特性を明らかにすることを目的とした.

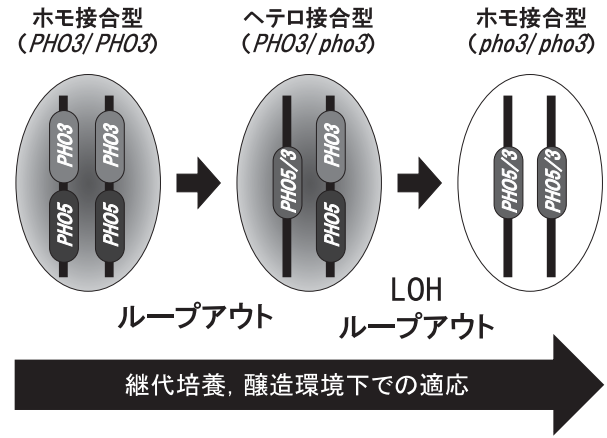


図12. 焼酎, 清酒酵母の適応進化

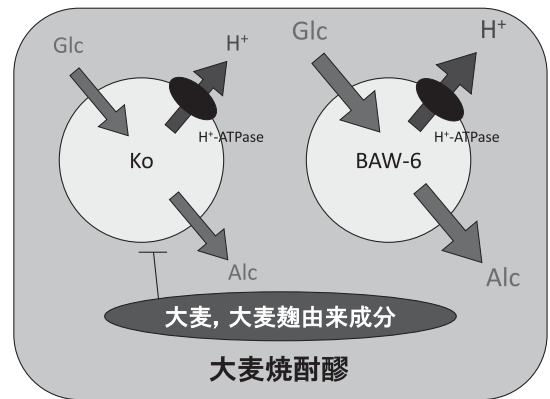


図13. BAW-6が大麦焼酎製造に適している理由. 大麦焼酎醪に存在する大麦, 大麦麴由来成分による増殖阻害効果に対してBAW-6はKoより耐性がある. BAW-6の H^+ -ATPase活性はKoより高いことから, 発酵後半でもアルコール生産性が高く, より多くのグルコースをアルコールに変換することができる.

また, 大麦焼酎醪で発生したダイナミックな菌株遷移の原因についても追求した. その結果, 大麦焼酎醪より分離した焼酎酵母BAW-6は, *PHO5-PHO3* 遺伝子領域でLOHもしくはループアウトが発生したためcAPase⁻となっており, さらに, 大麦焼酎醸造に適した特性を持っていることがわかった. また, 焼酎・清酒醸造用の優良酵母にcAPase活性が欠失した株が多い原因は, 長期に及ぶ継代培養, もしくは繰り返し発酵の環境によってヘテロ型株からホモ型株が発生し, その後ホモ型株が優勢になったものと推察された(図12). これらの変異株では親株が持っていない有用形質を獲得する場合があります. 焼酎酵母BAW-6では H^+ -ATPase活性が強化されていた. BAW-6が持つ発酵後半でもアルコール生産性が高い特性は, 特筆すべき有用形質であり, 現在も「いいちこ酵母」として大麦焼酎製造に使用されている(図13). 本論文は, BAW-6の醸造特性および大麦焼酎醪から継代培養

によりcAPase活性が欠失した変異株が選抜されたメカニズムについて明らかにした。今後、本研究で明らかとなった、(1) 大麦・大麦麹由来の培地にて継代培養を繰り返し実施する、(2) 親株がヘテロ変異株 (*PHO3/pho3*) である場合は、DC染色法による白色コロニー出現率が高まるまで継代培養を繰り返す、(3) cerulenin と diethylstilbestrol に対して多剤耐性が付与された変異株を取得する、などの方法を組み合わせることによってさらなる有用形質を獲得した醸造用酵母の取得が期待できる。

最後に、本稿で紹介させていただいた研究は三和酒類株式会社の藤原絵美研究員、古寺美保子チームリーダー、梶原康博副所長、大森俊郎取締役、下田雅彦副社長とともに、崇城大学の松岡正佳教授、小川隆平元教授との共同研究で実施したものです。研究を行うにあたって、多くのご指導・ご協力をいただきました。心より御礼申し上げます。また、恩師である広島大学大学院先端物質科学研究科の小埜和久教授（現・広島工業大学 教授）に深く感謝申し上げます。

文 献

1) 村上英也, 吉田 清, 野呂二三, 稲橋正明, 服部裕子: 醸造協会誌, **77**, 181–184 (1982).

- 2) Toh-e, A. and Oshima, Y.: *J. Bacteriol.*, **120**, 608–617 (1974).
- 3) 溝口晴彦, 藤田栄信: 醗酵工学, **59**, 185–188 (1981).
- 4) 高下秀春, 大森奈菜子, 大森俊郎, 下田雅彦: 醸造協会誌, **90**, 878–882 (1995).
- 5) Takashita, H., Kajiwara, Y., Shimoda, M., Matsuoka, M., Ogawa, T., and Ono, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 71–78 (2013).
- 6) Bajwa, W., Meyhack, B., Rudolph, H., Schweingruber, A. M., and Hinnen, A.: *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7721–7739 (1984).
- 7) Schweingruber, M. E., Fluri, R., Maundrell, K., Schweingruber, A. M., and Dumermuth, E.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 15877–15882 (1989).
- 8) Nosaka, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1038**, 147–154 (1990).
- 9) Nishimura, H., Kawasaki, Y., Kaneko, Y., Nosaka, K., and Iwashima, A.: *FEBS Lett.*, **297**, 155–158 (1992).
- 10) Takashita, H., Fujihara, E., Furutera, M., Kajiwara, Y., Shimoda, M., Matsuoka, M., Ogawa, T., Kawamoto, S., and Ono, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 79–84 (2013).
- 11) Florack, D. E. A. and Stiekema, W. J.: *Plant Mol. Biol.*, **26**, 25–37 (1994).
- 12) 高橋俊成, 近藤紗代, 溝口晴彦: 醸造協会誌, **102**, 607 (2007).
- 13) Bowman, E. J., Siebers, A., and Altendorf, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7972–7976 (1988).
- 14) Goossens, A., de la Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., and Portillo, F.: *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 7654–7661 (2000).
- 15) Eraso, P., Mazón, M. L., and Portillo, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 164–170 (2006).