

ビール類製造における酵母の栄養源飢餓ストレスと発酵制御

善本 裕之^{1*}・吉田 聡²・稲留 弘乃³

はじめに

ビールは、麦芽とホップを主な原料として酵母の働きにより造られる。自然の力を最大限引き出すことで美味しいビールは生まれるが、その美味しさは発酵工程で主役となる酵母の活躍で決まる。酵母は、仕込工程で製造された麦汁を栄養源として発酵工程で糖を分解してアルコールと二酸化炭素を造るとともに、ビールにとって大切な香味成分も造り出す。その働きが適度であれば人に好ましい香りや味が生まれるが、その働きが十分でなければ、人にとって好ましくない味や香り（オフフレーバー）を生じる。そのバランスの調整は難しく、安定して高品質の美味しいビールを造り続けるためには発酵制御が大切となる。発酵中の酵母は、エタノール、静水圧、二酸化炭素、温度、pH、栄養源などのさまざまな環境変化によるストレスを受けながら適応している。しかしながら、発酵中の酵母のストレス応答の挙動は大部分がブラックボックスである。本稿では、これまでの筆者らの研究から得られた栄養源飢餓ストレスと発酵制御に関する知見を紹介する。

ビール類製造における栄養源飢餓ストレス

ビール類は、酒税法の定義により、ビール・発泡酒・新ジャンルに分けられる。これらの定義の中で、ビールは麦芽の使用料が50%以上で、副原料の使用割合が重量比で麦芽の5%までに制限されている。発泡酒は麦芽の比率が50%未満、もしくは副原料の使用割合が5%を超えるもの、新ジャンルは発泡酒に麦由来のスピリッツを加えたものか、麦や麦芽以外のものを原料としているものと定義されている。これらの定義に従って、ビール、発泡酒、および新ジャンルのさまざまな商品が開発される中で、酵母は栄養源の成分が異なる麦汁や仕込液の中で発酵することを余儀なくされた。

麦芽や副原料が仕込工程で分解されることにより、ビールの麦汁にはグルコースやマルトースなどの糖類のみならず、ミネラルやビタミン、アミノ酸などの糖類以外の栄養源の成分がバランス良く含まれている。酵母は、ビール麦汁から必要な栄養源を取りながら発酵を続ける

ことができる。一方、麦芽使用比率の低いものや麦芽以外の原材料を用いる発泡酒・新ジャンルにおいては、酵母が資化することができる栄養源がビールと比較して十分でない場合が発生するようになった。不足する栄養源の中で、糖類はグルコース、マルトース、マルトトリオースなどの多様な糖が含まれている液糖などで補うことができるものの、糖類以外の栄養源がビール麦汁と比較して欠乏する。糖類以外の栄養源が少ない中で、酵母が栄養源飢餓ストレスを受けて発酵を続けることになり、ビール製造では想定できなかった発酵遅延やオフフレーバーの発生などの課題が出てきた。これらの課題に対して栄養源飢餓ストレスを受けた酵母がストレス適応できるように、温度、酵母添加率、通気などの発酵条件を変更させることで対応してきた。

その中で、栄養源のバランスを崩すと発酵遅延が発生したり、酵母が死滅したりすることが経験的に知られているが、そのメカニズムはこれまで十分に明らかにされていなかった。そこで、より安定したビール類の製造を目指して、糖類と糖類以外の栄養源のバランスがビール酵母に及ぼす影響の研究に取り組んだ。

ビール酵母

ビール醸造に用いられる酵母には、下面発酵酵母と上面発酵酵母の2種類がある。分類学的には、下面発酵酵母は *Saccharomyces pastorianus* に、上面発酵酵母は *S. cerevisiae* に属し、発酵終了後の沈降性、発酵好適温度や糖の資化性などの特性が異なる。上面発酵酵母はエールビールなどの華やかな香りや豊かな味わいのある個性的なビール類を造る際に使用され、比較的高い温度での発酵が行われ、発酵終了時に酵母が浮遊している特徴がある。一方、下面発酵酵母はピルスナータイプなどの穏やかな香りとすっきりした味わいを醸し出すビール類の製造に用いられ、低温発酵が行われ発酵終了時に酵母が沈降する特徴がある。下面発酵酵母 *S. pastorianus* は、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* のゲノムを持つ異質倍数体であり、*S. cerevisiae* に由来する Sc 型の遺伝子と *S. eubayanus* に由来する Lg 型の遺伝子 (Sc 型と 90% 以下の相同性を示す) のセットを持つ¹⁻⁴⁾。ストレスを受けた下面発酵酵母がストレ

著者紹介 ¹キリンビール株式会社 (主査) E-mail: hyoshimoto@kirin.co.jp

²キリンホールディングス株式会社 ワイン技術研究所 (主任研究員)

³キリンホールディングス株式会社 酒類技術研究所 (主任研究員)

ス適応する際には、Sc型の遺伝子とLg型の遺伝子の複雑な制御により対応していることが示されているが⁵⁾、その働きがどのように違うのかは、まだ十分に明らかになっていない。糖の資化性などの特徴は下面発酵酵母に特異的であり、今回の栄養源飢餓条件における解析は下面発酵酵母を用いて実施した。

細胞周期とオートファジー

酵母はヒトと同じ真核生物に属し、細胞周期、オートファジーをはじめ、生きていくために必要な共通のメカニズムを持っている。Hartwellらは、酵母を用いて細胞周期の遺伝学的解析を進め、サイクリンとともにサイクリン依存性キナーゼである*CDC28*と呼ばれる遺伝子が細胞周期の中心的な制御因子であることを明らかにした⁶⁾。また、Ohsumiらは、栄養源飢餓状態で細胞が自らの細胞質やミトコンドリアなどの細胞小器官の成分(合成したタンパク質など)を食べて分解することでアミノ酸などを得る機能、細胞内の「リサイクルシステム」とも言われているオートファジーのメカニズムを明らかにした⁷⁾。酵母もヒトも栄養源を取り入れて、それらを代謝しエネルギーを獲得しながら、細胞周期を回し増殖する。栄養源が不足する場合には、オートファジーが働き、自らの細胞成分を分解して、栄養源飢餓ストレスを回避する。ビール類製造における発酵においても、同じ現象が見られる。麦汁・仕込液から供給される栄養源を取り込んで、酵母は細胞周期を回し、増殖し、アルコール発酵を行う。栄養源飢餓となればオートファジーが働き、自らの細胞成分を分解して栄養源を作り栄養源飢餓ストレスの回避を行う。しかし、自らの細胞成分の分解には限界があり、それ以上に栄養源飢餓が継続すればやがて死滅することになる。発泡酒や新ジャンルの製造では麦芽使用比率が少ないために、液糖で糖源を補うことにより糖類と糖類以外の栄養源のバランスがビールと異なる。発酵遅延やオフフレーバー発生を防ぐために、異なる栄養源バランスが及ぼす影響を理解したうえで、発酵制御することが重要であると考える。

糖誘導による細胞死

酵母は栄養源のバランスを崩すと発酵遅延を生じたり、死滅したりすることが経験的に知られている。そこで、どの栄養源が酵母の死滅に大きな影響を及ぼすかを調査するために、YPD10(1%酵母エキス, 2%ペプトン, 10%グルコース)をコントロールとして、10%グルコース, 1%酵母エキス, 2%ペプトンのそれぞれ単独の培地で酵母を発酵させた際の二酸化炭素の発生や酵母死滅

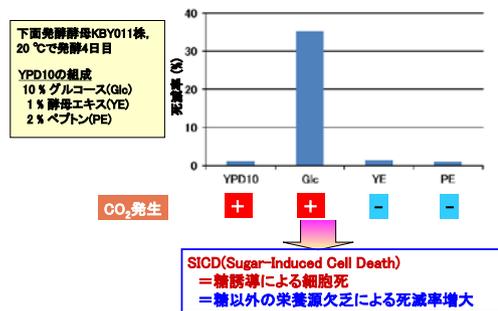


図1. 糖誘導による細胞死. YPD10, グルコース, 酵母エキス, ペプトンの培地でそれぞれ下面発酵酵母KBY011を20℃で発酵させた。グルコース培地でのみ、二酸化炭素の発生とともに酵母の死滅率の増大が見られた

との関係を調査した^{8,9)}。YPD10, グルコース, 酵母エキス, ペプトンの培地で、それぞれ下面発酵酵母KBY011を20℃で発酵させると、酵母エキス, ペプトンの培地では二酸化炭素の発生が見られず発酵が進まないが、YPD10とグルコース培地では二酸化炭素が発生し発酵が進んだ(図1)。しかしながら、酵母はYPD10培地では死滅しないが、グルコース培地では死滅した。グルコース培地では糖類以外の栄養源がないので発酵が進まないと予測していたが、意外にも二酸化炭素を発生し、芽を出した状態の酵母が多くなり死滅した。この現象は、GranotらによりSugar-Induced Cell Death (SICD)、つまり、糖誘導による細胞死(=糖以外の栄養源欠乏による死滅率増大)と報告されている¹⁰⁾。SICDは糖類が強力なトリガーとなり、周りの環境に糖類以外の栄養源がないにもかかわらず細胞周期を進めて、酵母が死滅してしまう現象で、RNAとDNAの分解、膜損傷、核の分断化、細胞のしわ化、活性酸素種(ROS: Reactive Oxygen Species)の発生、アスコルビン酸の添加により細胞死が阻害されることから、アポトーシス様であることが提案されている。

糖類以外の栄養源飢餓が酵母細胞死に及ぼす影響

酵母の死滅率が栄養源飢餓状態に応じて変化するかを明らかにするために、糖類濃度を一定として糖類以外の栄養源濃度を段階的に減少させた培地を作製し、発酵試験を行った^{8,9)}。その結果、糖類以外の栄養源濃度が減少するにつれて、酵母の生菌率は減少した(図2)。つまり、健全な発酵を行うためには、糖類と糖類以外の栄養源のバランスが重要であることが証明された。発泡酒や新ジャンル醸造においても、糖類以外の栄養源欠乏が発酵遅延や、SICDによる酵母死滅がさまざまな発酵不良につながる可能性が示唆された。

なぜ糖類以外の栄養源飢餓により発酵遅延や酵母死滅が起こり、それはどのようなメカニズムで発生するのであろうか。そこで、SICDにおける酵母細胞内代謝物や遺伝子発現の変化を調査した。前培養、YPD10培地、および、10%グルコース培地(SICD誘導培地)において、下面発酵酵母KBY011を20°Cで発酵させたサンプルを用いて、CE-MS(キャピラリー電気泳動質量分析装置)を用いたメタボローム解析を実施した(図3)¹¹⁾。その結果、解糖系においてグルコース6リン酸やフルクトース6リン酸の濃度は前培養、YPD10培地、およびグルコース培地で変わらないものの、グルコース培地ではフルクトース1,6二リン酸が前培養、YPD10培地と比較して増大していることが観察された。つまり、グルコースだけで、フルクトース6リン酸までの代謝は進行するが、

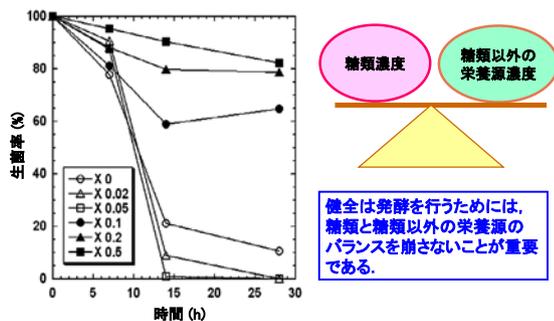


図2. 糖類以外の栄養源飢餓が細胞死に及ぼす影響。糖類濃度を一定として、通常的使用している糖類以外の栄養源濃度を×1として、×0.5, ×0.2, ×0.1, ×0.05, ×0.02, ×0として希釈した培地を作製し、下面発酵酵母KBY011を20°Cで発酵させた。糖類以外の栄養源濃度を段階的に減少させた培地で発酵させると、酵母の生菌率は減少した。

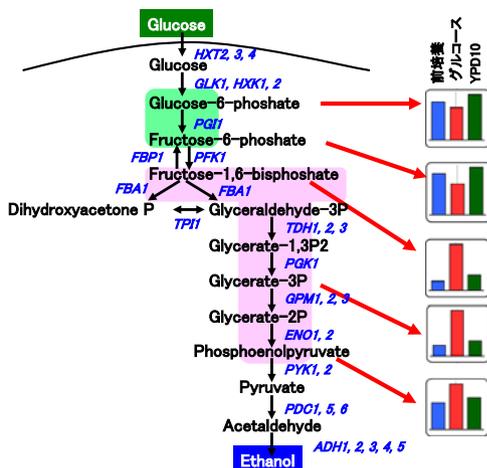


図3. SICDにおける酵母細胞内代謝物の変化。YPD10培地、および、グルコース培地において、下面発酵酵母KBY011を20°Cで発酵させたサンプルのメタボローム解析結果の解糖系代謝物の変化を示した。

フルクトース1,6二リン酸以降の代謝にはグルコース以外の栄養源が重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析において、フルクトース1,6二リン酸以降の代謝に関わる遺伝子の発現がグルコース培地で減少していることが観察された。また、細胞周期関連の遺伝子発現の増大が観察されたことから、糖類以外の栄養源がない中で細胞周期を回そうとしていると考えられる。これらのことから、糖類以外の栄養源飢餓により、解糖系の代謝が正常に働かないことや細胞周期を無理に回そうとすることで、発酵遅延や酵母死滅が発生することが示唆された。

次に、SICDにおいてアミノ酸添加が及ぼす影響を調査した。グルコース培地、およびグルコース培地に20種類のアミノ酸をそれぞれ添加した培地を作製し、下面発酵酵母KBY011を20°Cで発酵させ、死滅への影響を調査した。その結果、アルギニン、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジンをそれぞれグルコース培地に添加した場合、酵母死滅率を低減する効果が観察された。ミネラルやビタミンはないものの、特定のアミノ酸によりSICDが改善する効果が見られたことから、SICDによる酵母細胞死の改善には特定のアミノ酸増量が効果を表すことが示唆された。

また、一般的に発酵中に不足しやすい微量元素として亜鉛が知られている。亜鉛は、タンパク質の構造の維持、酵素活性の制御(たとえば、アルコールデヒドロゲナーゼ)などに関与し、生命活動を維持するうえで重要な働きをしている。亜鉛飢餓はこれらの機能に広範囲に影響を及ぼし、増殖不良や発酵遅延を引き起こす¹²⁾。麦汁からの亜鉛の供給がない、あるいは不十分な場合、酵母細胞が増えるにつれて酵母細胞内の亜鉛濃度は低下し発酵が緩慢になる(図4)。一方、麦汁からの亜鉛供給が十分にある場合には、健全な発酵が行われる。また、亜鉛が酵母細胞内で不足すれば、オートファジーが発生し、亜鉛を含むタンパク質が分解されリサイクルにより亜鉛が

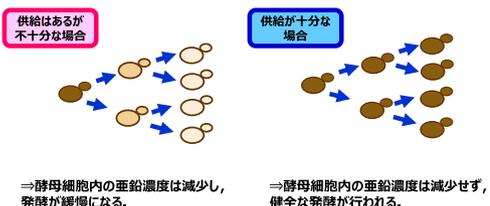


図4. 酵母細胞内の亜鉛欠乏による発酵への影響。酵母細胞内の亜鉛濃度の違いを濃さで示し、細胞全体が濃い場合、亜鉛供給が十分であると考えられる。供給があるが不十分な場合、細胞分裂とともに、細胞内の亜鉛濃度は減少するが、供給が十分であれば、減少は見られない。

供給される。それでも供給が足りない場合、リサイクルだけで賄うことができず、発酵に影響が表れると考えられる。健全な発酵を維持するためには、酵母細胞内の亜鉛の濃度が減少しないように、増殖を抑えるか、麦汁・仕込み液中への亜鉛の増量が必要となる。

糖類以外の栄養源飢餓を回避する発酵制御

これまで、糖類以外の栄養源飢餓が発酵遅延や酵母細胞死を引き起こすことを明らかにしてきた。これらを回避するためには、糖類以外の栄養源飢餓を発生させないような発酵温度、酵母添加率、通気などの発酵条件を見つけ出すことが重要となる。また、発酵を健全に行う目的で、発酵助剤となるチアミン、カリウム、亜鉛などが欠乏する場合には、それらの添加がより効果的である^{12,13)}。酵母は代謝しやすいグルコースを好んで消費する傾向があり、糖類以外の栄養源飢餓条件下では発酵遅延が発生する場合があった。酵母細胞内代謝物などの解析を行った結果、ビール酵母が窒素栄養源や微量栄養源を発酵前半に急激に消費してしまい、これら栄養源が発酵途中で枯渇してしまうことが原因であることが明らかになった。そこで、ビール酵母が急激に特定の栄養源を消費し過ぎないように発酵前半の温度を下げる二段階温調法を開発し、良好で調和のとれた香味を有するビール類の製造を行うことができるようになった¹⁴⁾。また、従来の知見ではグルコースの比率が高いほど発酵促進効果があると考えられていたが、グルコースとマルトースの濃度比率の違いで発酵遅延が発生することが明らかになった¹⁵⁾。この場合、発酵液中のアミノ酸を増やすように工程を変えることにより発酵遅延を回避することができ、工程改善につなげることができた。原材料が多様化する中で発生してくるさまざまな課題について、糖類以外の栄養源飢餓の原因となる物質を同定し、それらが飢餓とならない発酵条件に最適化したり、不足する栄養源を発酵助剤として添加したりして、課題解決につなげることができるようになってきた。発酵を終えた状態が、オートファジーによるリサイクルで必要な糖類以外の栄



図5. 健全な発酵からオートファジーを経てSICDへ、麦汁・仕込液の糖類以外の栄養源が酵母により消費されるにつれて、栄養源飢餓状態となり、オートファジーが始まる。さらに栄養源飢餓状態が続けば、SICDにより酵母は死滅する。

養源が補えたのか、あるいはSICDまで経過したのか、物質を定量しながら評価し(図5)、緻密な制御を行うことでより安定・確実な発酵制御につながる事が期待される。

栄養源のバランスが酵母の細胞死や寿命を決定

老化を遅らせて寿命を延ばす遺伝子として、サーチュイン(*SIR2*: Silent Information Regulator 2, NAD依存性ヒストン脱アセチル化酵素)が報告され、酵母からヒトまで種を越えて保存されている¹⁶⁾。Linらにより、糖類以外の栄養源を一定として糖類(グルコース)濃度を2%から0.5%に減少させて酵母を培養した場合(カロリー制限)、寿命が約30%も延びることが示された¹⁷⁾。カロリー制限によりストレス応答経路が活性化し、NAD/NADH比の増大により*SIR2*遺伝子が活性化するメカニズムが明らかになっている。糖類と糖類以外の栄養源のバランスは、酵母の細胞死を決めるだけでなく寿命も決定していることが示唆された(図6)。

ヒトの場合、適度なカロリー制限、バランスの取れた食事、過食を避けることにより、動脈硬化や高血糖の抑制、糖尿病の予防、がんの抑制などの老化要因を抑えることができる。酵母においては糖類以外の栄養源の濃度が少ない場合、酵母活性(酵母生理状態の良し悪しを示す指標)が低下して発酵不良が発生する。糖類以外の栄養源が多い場合には、酵母活性が高い状態に維持され健全な発酵を行うことができる。つまり、酵母もヒトも糖類と糖類以外の栄養源のバランスをしっかりと取ることが健全な発酵や生活習慣病の予防につながると示唆されている(図7)¹⁸⁾。

おわりに

発酵中の酵母のストレス応答の挙動は大部分がブラックボックスである中、筆者らは麦汁に含まれる栄養源飢

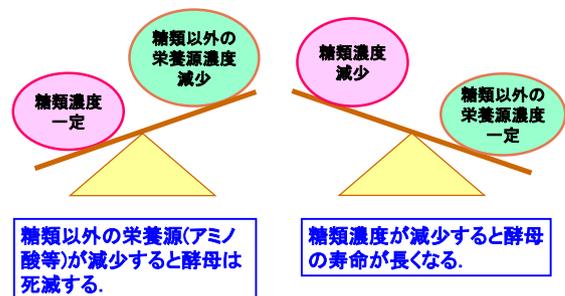


図6. 糖類と糖類以外の栄養源のバランスが酵母の細胞死や寿命を決定。糖類と糖類以外の栄養源のバランスは、酵母の細胞死を決めるだけでなく、寿命も決定していることが示唆された。

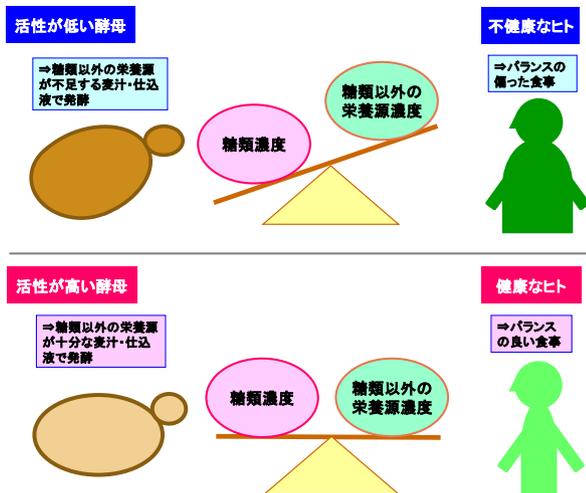


図7. 酵母とヒトにおける食環境と生活習慣病. 上図は糖類と糖類以外の栄養源のバランスが悪い酵母とヒト, 下図は糖類と糖類以外の栄養源のバランスが良い酵母とヒトを示す. 酵母もヒトも糖類と糖類以外の栄養源のバランスを取ることが, 健全な発酵や生活習慣病の予防につながることを示唆される.

餓ストレスがビール酵母に及ぼす影響に着目して研究に取り組んできた. 糖類と糖類以外の栄養源のバランスが発酵に及ぼす影響について調査したところ, 栄養源をグルコースだけにして発酵させると酵母は死滅し, 糖誘導による細胞死 (SICD) の現象がみられた. また, 糖類と糖類以外の栄養源のバランスは, オートファジーやSICDを制御しており, 良好な発酵を行うためには糖類以外の栄養源の濃度の管理が重要であることを提案した. 一方, 好氣的解糖と呼ばれるワールブルグ効果は60年以上前に発見され, がん細胞で有酸素下においてもミトコンドリアの酸化リン酸化よりも解糖系でATPが産生される現象である¹⁹⁾. がん細胞は好氣的解糖でATPを取得すると考えられており, なぜエネルギー効率の良い呼吸からエネルギー効率の悪い発酵に移行するのかが不明のままである. この解明に向けて, Alteriisらは, ATPの枯渇と細胞死の関係を調査するSICDの研究を行っている²⁰⁾. SICD, ワールブルグ効果, 糖類と糖類以外の栄養源のバランス制御などを総合的に研究することにより, がん細胞のATP獲得も含めたメカニズムが解明されることが期待される. 糖類と糖類以外の栄

養源のバランス制御は, 酵母にとっては健全な発酵のため, ヒトにとっては生活習慣病の予防のためにきわめて重要である. 発酵工程における酵母の営みが自然の一部であることを念頭において, 本編のような研究を通して生命現象の基本を理解しながら発酵ブラックボックスの解明を行い, 同時にお客様に酵母の魅力を感じていただける美味しいビールの製造につなげていきたい.

謝 辞

本成果は, キリンホールディングス株式会社, ならびにキリンビール株式会社, 共同研究先などの多くの関係者の尽力によるものであり, 関係の方々に深謝致します.

文 献

- 1) Hansen, J. and Kielland-Brandt, M. C.: *Gene*, **140**, 33 (1994).
- 2) Tamai, Y. *et al.*: *Yeast*, **14**, 923 (1998).
- 3) Yoshimoto, H. *et al.*: *J. Ferment. Bioeng.*, **86**, 15 (1998).
- 4) Yamagishi, H. and Ogata, T.: *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 341 (1999).
- 5) Minato, T. *et al.*: *Yeast*, **26**, 147 (2009).
- 6) Hartwell, L. H.: *J. Bacteriol.*, **115**, 966 (1973).
- 7) Ohsumi, Y.: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **354**, 1577 (1999).
- 8) Yoshimoto, H. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng*, **108**, 60 (2009).
- 9) Yoshida, S. and Yoshimoto, H.: *Stress Biology of Yeasts and Fungi* (Takagi, H. and Kitagaki, H. Eds.), p. 123, Springer (2015).
- 10) Granot, D. *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, **4**, 7 (2003).
- 11) 善本裕之ら: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 73 (2010).
- 12) Yoshimoto, H.: *Master Brewers Conference*, p. 11, Atlanta, Georgia, USA (2017).
- 13) Kawakubo, T. *et al.*: *World Brewing Congress*, p. 33, Portland, Orlando, USA (2012).
- 14) 榎本賢一ら: 発酵アルコール飲料の製造方法, 特許4813579号.
- 15) Mese, Y. *et al.*: *European Breweries Convention Congress*, p. 235, Glasgow, Scotland, UK (2011).
- 16) Imai, S. *et al.*: *Nature*, **403**, 795 (2000).
- 17) Lin, S. J. *et al.*: *Science*, **289**, 2126 (2000).
- 18) Rockenfeller, P. and Madeo, F.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1803**, 499 (2010).
- 19) Warburg, O.: *Science*, **123**, 309 (1956).
- 20) de Alteriis, E. *et al.*: *Cell Cycle*, **17**, 688 (2018).