

〔醸酵工学 第64巻 第3号 169-173. 1986〕

清酒酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ*

栗山 一秀・芦田 晋三・斉藤 義幸・杉並 孝二・今安 聡

大倉酒造株式会社研究所

Alcohol acetyltransferase of *saké* yeast. KAZUHIDE KURIYAMA, SHINZO ASHIDA, YOSHIYUKI SAITO, KOJI SUGINAMI, and SATOSHI IMAYASU (*Okura Sake Company, Ltd., Research Laboratory, 25 Shimotoba, Koyanagi-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612, Japan*) *Hakkokogaku* 64: 169-173. 1986.

It has been believed that in *saké* isoamyl acetate is one of the main component of *ginjo*-flavor. It has been reported that isoamyl acetate is formed by alcohol acetyltransferase (AATase). There are many reports about AATase.

When we think about the formation of isoamyl acetate, we can suggest that the concentration of isoamyl alcohol and the activity of AATase must affect the yield of isoamyl acetate, because acetyl-CoA, another source for the formation of isoamyl acetate, is contained in the cells of *Saccharomyces cerevisiae*.

In this paper, we have studied the AATase activity relating to 1) the kinds of yeast, 2) cultivating temperatures, and 3) the methods of cultivation. We found that:

1. The AATase activities of *Saccharomyces cerevisiae* were high for Kyokai-7 and Kyokai-701, and were low for Kyokai-9 and Kyokai-10.

2. When cultivated at 30°C, the AATase activity increased on the 1st day, and decreased rapidly on the 2nd day.

3. When cultivated at 15°C, the activity reached a maximum on the 2nd day, and gradually decreased thereafter.

4. When the temperature was raised from 15°C to 30°C during cultivation, the activity of AATase decreased rapidly.

5. When the temperature was lowered from 30°C to 15°C during cultivation, the activity was kept constant.

6. The AATase activity decreased when cultivated with shaking.

7. The AATase activity increased when germ extract was added to the medium.

8. In the industrial production, the AATase activity increased at the early period of the main fermentation and decreased gradually thereafter.

From the data obtained above, we can say that the AATase activity is very unstable to a rise of temperature, and can suggest that one of the main reasons for the low temperature operation in *ginjo*-fermentation is to keep the activity of AATase at a desirable level.

清酒における香気エステルは酒質を決定する重要な因子であり、その中でも酢酸イソアミルは極めて重要な成分の一つである。^{1,2)} Nordström,³⁾ Ishikawa と Yoshizawa,⁴⁾ Yoshioka と Hashimoto⁵⁾ は酢酸イソアミルが、アルコールアセチルトランスフェラーゼ (以下 AATase と略記する) によって生成されることを報告し、最近小泉ら⁶⁾ も AATase について検討している。

* 清酒に関する酵素の研究 (第4報)

The enzymatic studies of *saké* brewing (IV)

また、AATase の精製、ならびに諸性質については、Yoshioka と Hashimoto^{5,7)} の報告があり、酢酸イソアミルの増減は細胞膜に存在する不飽和脂肪酸によってコントロールされていることが明らかにされている。

しかし、清酒醪において AATase を酵素レベルで解析した報告は見当たらない。そこで香の解析の一指標として AATase を取り上げ、活性の動態、ならびに実際の醪および醪における酵素レベルでの解析を行った結果、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

蒸し米糖化液および培地の調製 蒸し米 130 g に 0.1 M リン酸 1 カリウム溶液 150 ml と 1% 糖化酵素溶液 (コクミラーゼ錠) 50 ml を加え, 55°C で 18 時間以上放置し, ろ過して糖化液を得た. また, 蒸し米糖化液を糖濃度 5% になるように希釈し, pH 4.0 に調整後, オートクレーブ (120°C, 1 気圧, 10 分) して培地とした.

Cell free の調製 大型試験管に酵母懸濁液と酵母破碎用ビーズを加え, 冷却しながら試験管ミキサーで破碎し, ビーズおよび intact cell を除去し, cell free 溶液を得た.

AATase の活性測定 活性測定は Yoshioka と Hashimoto⁵⁾ のヘッドスペースガスクロマトグラフィー法を改良して用いた. 活性測定の組成を Table 1 に示した.

反応溶液を 10 ml のリアクティブラスコに入れ, 25°C で 1 時間ゆっくり振とうして反応させ, 1 g の塩化ナトリウムを加えて反応を停止し, *n*-ブタノールを内部標準として加えた.

これを 50°C で 30 分間加温し, ヘッドスペースガスクロマトグラフィー法で酢酸イソアミルを定量した.

活性は, 100 mg の酵母が 1 時間に生成する酢酸イソアミルの量で示した.

トレーサー実験 ROIシン-¹⁴C をニンヒドリンにより酸化し, イソバレルアルデヒド-¹⁴C とし, 次に水素化リチウムアルミニウムにより還元してイソアミルアルコール-¹⁴C を調製した. 反応は, 活性測定と同様の方法で行い, イソアミルアルコール-¹⁴C および酢酸イソアミル-¹⁴C の確認は, ラジオガスクロマトグラフィー (Shimazu GC-7A [FID]+Aloka peak analyzer) で行った.

実験結果および考察

酵母の菌体内のアセチル CoA まず, 基質の一

Table 1. Assay system for AATase.

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Acetyl-CoA | 0.8 mM |
| Isoamyl alcohol | 45.0 mM |
| pH 7.5 Phosphate buffer | 67.0 mM |
| Intact cells or cell-free extract | |
| Total vol. 1.5 ml | |

Table 2. Effects of acetyl-CoA on the formation of isoamyl acetate by *S. cerevisiae* (Kyokai-7).

| | Acetyl-CoA | Isoamyl acetate (ppm) |
|-------------------|------------|-----------------------|
| Intact cells | - | 17.6 |
| | + | 17.8 |
| Cell free extract | - | 0.0 |
| | + | 2.9 |

-, not added; +, added.

つであるアセチル CoA について検討した. 協会酵母 7号, 7号泡なし, 9号, 10号において cell free では, 反応系にアセチル CoA を加えないと酢酸イソアミルは生成されなかったが, intact cell では, Table 2 に示すようにアセチル CoA を添加しなくても酢酸イソアミルを生成した. すなわち, 菌体内にアセチル CoA あるいは, その前駆体等が存在していることが示唆された.

Yoshioka と Hashimoto⁶⁾ は, 本 AATase を利用して菌体内のアセチル CoA の測定に成功している.

Intact cell におけるイソアミルアルコールの濃度の影響 intact cell において, もう一つの基質であるイソアミルアルコールの濃度の影響を検討したところ, Fig. 1 に示す結果となり, 50~60 mM の比較的高濃度までイソアミルアルコールの濃度に応じて酢酸イソアミルの生成は増加した. 実際の醗においてイソアミルアルコールは約 2 mM 程度であり, 明らかにこれが酢酸イソアミル生成の律速となっており, 酢酸イソアミルを増加させるためには, 醗中のイソアミルアルコールの濃度を高めることが重要である.

石川ら⁴⁾ は, 醗において添加したイソアミルアルコールは酢酸イソアミルにならないと報告しているが, 筆者らはトレーサー実験を行い, 本反応系においては,

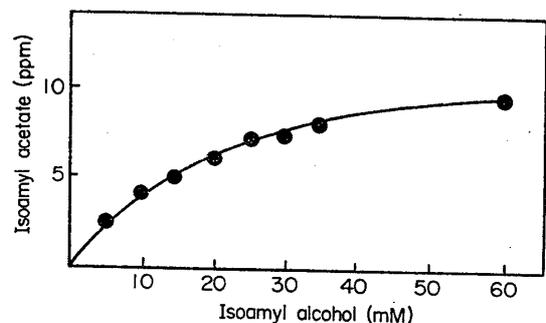


Fig. 1. Effects of isoamyl alcohol concentration on the formation of isoamyl acetate.

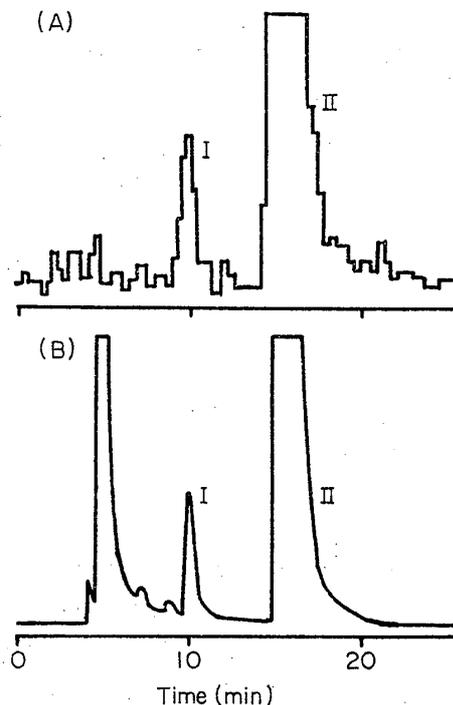


Fig. 2 Radiogaschromatogram of isoamyl acetate. (A), radioactivity; (B), flame ionization detector; I, isoamyl acetate; II, isoamyl alcohol.

確かに添加したイソアミルアルコールは、酵母により酢酸イソアミルとなることを確認した (Fig. 2).

各種酵母の AATase 活性 30°C で1日静置培養した各酵母の AATase 活性を比較した結果を Table 3 に示した. 協会酵母7号, 7号泡なしの活性は高いが, 吟醸仕込みによく使用される9号, 10号では逆に低くなった.

また, 各酵母を 30°C で静置培養した時の経時的変化を見たところ Fig. 3 のようになり, 各酵母により若干差が見られたが, いずれも本酵素活性は初期に高

Table 3. Comparison of AATase activity of yeasts.

| Strain | Isoamyl acetate (ppm) |
|------------|-----------------------|
| Kyokai-2 | 14.4 |
| Kyokai-6 | 23.6 |
| Kyokai-7 | 23.6 |
| Kyokai-701 | 21.4 |
| Kyokai-8 | 8.1 |
| Kyokai-9 | 9.2 |
| Kyokai-10 | 16.3 |
| Kyokai-11 | 8.6 |

These yeasts were statically cultured at 30°C for 1 day.

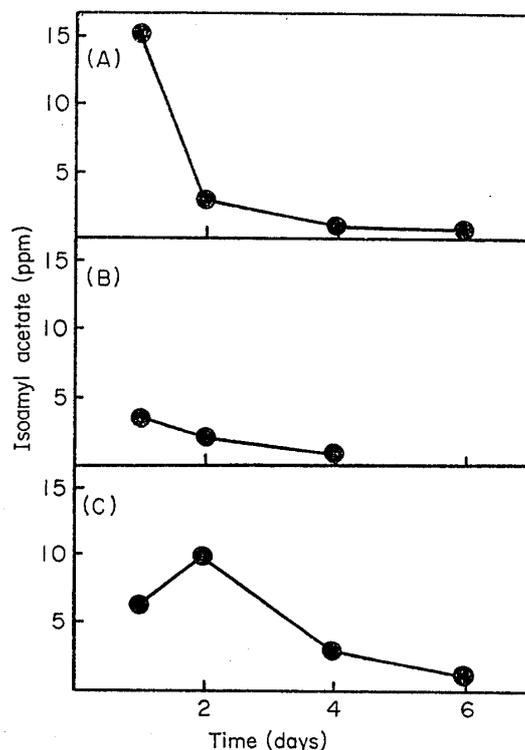


Fig. 3. Changes in AATase activity in medium. (A), Kyokai-7; (B), Kyokai-9; (c), Kyokai-10. Static culture at 30°C.

くっており, 本酵素活性の増加には, 初期の培養条件が極めて重要であることが示唆された.

温度の影響 協会酵母7号を高温 (30°C) で静置培養した場合は, 1日目に活性が高くなるが, 2日目で急激に低下した (Fig. 4). これに対し 15°C の場合は2日目で最大となり以後徐々に低下するが, かなり活性が維持されることが明らかとなった.

また, 培養温度を 15°C から 30°C に変化させるとこの活性は急激に低下したが, 30°C から 15°C に変化させるとこれはかなり維持されることがわかった (Fig. 4).

石川ら⁹⁾も報告しているように本酵素活性は, 熱に対して非常に不安定であり, 従来吟醸造りは, 低温で発酵させなければならないとされていた理由の一つは, 本 AATase 活性の維持にあったと考えられる.

振とう培養と静置培養 石川ら¹⁰⁾は, 本活性は半嫌気培養の菌よりも好気培養の方が高いとしているが, 筆者らが振とう培養と静置培養を比較したところ, Table 4 に示すように振とう培養すると酵母は良く生育したが, 本活性は静置培養に比して約1/10となり, 本酵素は振とう培養では増加しないことを明らかにし

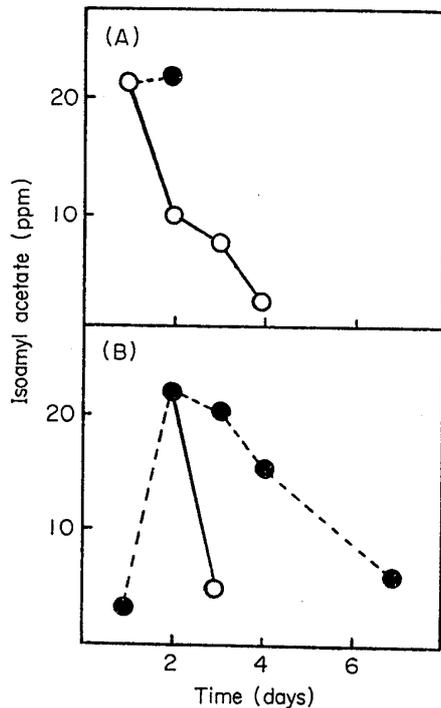


Fig. 4. Effects of temperature on AATase activity of *S. cerevisiae* (Kyokai-7). (A), 30°C and lowered from 30°C to 15°C; (B), 15°C and raised from 15°C to 30°C; (●—●), 15°C; (O—O), 30°C. Static culture.

た。

胚芽抽出液の影響 北本ら¹⁴⁾は、胚芽を添加すると酢酸イソアミルが増大することを報告しており、その原因として胚芽中のマグネシウム、リン酸、カリウムが酵母のアミノ酸取り込み能を増大させ、取り込まれたアミノ酸により酢酸イソアミルが増大すると説明している。

しかし筆者らは、胚芽は AATase 活性にも作用し、酢酸イソアミルの増大に寄与していると考え、胚芽に 6 倍量の水を入れ、乳酸酸性で抽出し、胚芽抽出液が 10% になるように培地に添加し、30°C で 1 日静置培養して、その抽出後の AATase に及ぼす影響について

Table 4. Comparison of AATase activity between shaking culture and static culture by *S. cerevisiae* (Kyokai-7).

| | Wet weight of yeast (g) | Isoamyl acetate (ppm) |
|-----------------|-------------------------|-----------------------|
| Shaking culture | 1.10 | 1.8 |
| Static culture | 0.64 | 14.3 |

Table 5. Effects of germ extract on AATase activity by *S. cerevisiae* (Kyokai-7).

| Added reagent | | | Isoamyl acetate (ppm) |
|---------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|
| Ca-pantothenate (377 ppb) | Casamino acids (ppm) | Potassium (300 ppm) | |
| — | — | — | 17.2 |
| — | — | + | 19.2 |
| — | + | — | 20.2 |
| + | — | — | 25.3 |
| + | + | + | 28.9 |
| Added germ extract | | | 30.4 |

—, not added; +, added.

検討した。その結果、Table 5 に示すように、蒸し米糖化液に胚芽抽出液を添加することにより約 2 倍近く AATase は増加した。この胚芽抽出液中の AATase に作用する成分については、各種ビタミン、各種金属などを胚芽抽出液を添加した場合と同じ濃度になるように添加して検討したところ、胚芽中に含まれる成分の中で、パントテン酸、アミノ酸、カリウムの 3 成分が AATase の増加あるいは活性化に作用していることが明らかとなり、この三者を加えるとほぼ胚芽抽出液添加と同様の効果が認められた。

胚および醪の AATase 活性 実際の胚および醪における本酵素活性の経時的変化を検討した (Fig. 5)。糖化液と同様に初期に活性が高く、以後徐々に低下した。

また、協会酵母 7 号の普通仕込みと協会酵母 9 号の吟醸仕込みを行った。吟醸仕込みには精白歩合 50% の山田錦の白米を利用した。吟醸醪の AATase 活性が高くなった (Fig. 6)。

実際の醪において酢酸イソアミルを増加させるためには、初期の AATase 活性をできるだけ増大させることと、イソアミルアルコールが生成されてくる時期

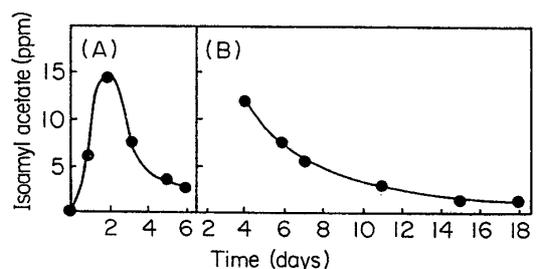


Fig. 5. Changes in AATase activity in *moto* and *moromi* with *S. cerevisiae* (Kyokai-7). (A), *moto*; (B), *moromi*.

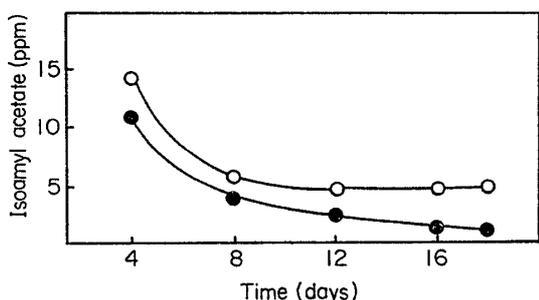


Fig. 6. Comparison of AATase activity between *ginjo moromi* and *futsuu moromi*.

(●), *futsuu moromi*, Kyokai-7, at 15°C;

(○), *ginjo moromi*, Kyokai-9, at 10°C.

まで低温に保つことによって、その活性を維持することが重要である。

要 約

- (1) 本 AATase 活性は協会酵母 7 号, 7 号泡なしでは高く, 9 号, 10 号では低かった。
- (2) intact cell では, 本活性測定にアセチル CoA は必要なく, 菌体内にアセチル CoA あるいはその前駆体等のプールが存在する。
- (3) 醪のイソアミルアルコールは 2 mM 程度の非常に低い濃度であり, 醪における酢酸イソアミル生成の増大にはイソアミルアルコールの濃度を高めることである。
- (4) 本酵素は, 熱によって急激に失活し, 低温の発酵で活性が維持された。
- (5) 振とう培養では静置培養に比べて本酵素活性は約

1/10に低下した。

- (6) 本活性の増加は増殖時に見られた。
- (7) 胚芽抽出液は AATase 活性を増大させるが, その有効成分はパントテン酸, アミノ酸, カリウムであると考えられた。
- (8) 実際の醪および醪において初期に活性が増加し, 以後徐々に低下した。

本研究は昭和57年度日本醸酵工学会大会および日本農芸化学会昭和58年度大会で発表した。

文 献

- 1) 吉沢 淑: 醸協, 61, 481 (1966).
- 2) 菟田 快, 山田正一: 農化, 40, 173 (1966).
- 3) Nordström, K.: *J. Inst. Brew.*, 69, 142 (1963).
- 4) Ishikawa, T., Yoshizawa, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 43, 45 (1979).
- 5) Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2183 (1981).
- 6) 西田三代, 角田潔和, 小泉武夫, 野白喜久雄: 日本醸酵工学会大会要旨集, p. 47 (1984).
- 7) Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2287 (1983).
- 8) Yoshioka, K., Hashimoto, N.: *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2155 (1982).
- 9) 石川雄章, 百瀬洋夫, 吉沢 淑: 醸協, 79, 62 (1984).
- 10) 石川雄章, 百瀬洋夫, 吉沢 淑: 日本農芸化学会大会要旨集, p. 408 (1979).
- 11) 北本勝ひと, 三宅 優, 渡辺誠衛, 中村欽一: 醸協, 80, 53 (1985).

(昭60.10.29受付)