

生物機能利用技術研究

K-9酵母のアミノ酸アナログ耐性濃度の検討

化学食品部 食品技術研究室
小金丸和義 江口良寿 増田照雄

アミノ酸のアナログに対する耐性濃度について検討を行った。

酵母としては日本醸造協会9号酵母（以下K-9）を用い、アミノ酸のアナログとしては、フェニルアラニンのアナログであるp-フルオロフェニルアラニン、イソロイシンのアナログであるイソロイシンヒドロキサメイト、またロイシンのアナログであるロイシンヒドロキサメイトを用いた。

今回使用したアミノ酸のアナログの中では、p-フルオロフェニルアラニンがK-9酵母の増殖抑制効果が高かった。イソロイシンヒドロキサメイトやロイシンヒドロキサメイトは高濃度になると若干の増殖抑制がみられた。しかし、増殖抑制効果が高いほど香氣生成能が高いとは限らないので、それぞれのアナログ耐性株を分離し香氣生成能を調べる必要がある。

1.はじめに

発酵食品において微生物が生成する香氣成分は、品質の特徴をなす重要な要因の1つである。清酒醸造においては、最近の吟醸酒ブームに伴い、吟醸香をはじめとする香氣成分が注目され、酵母による香氣成分についての報告も数多く見られる。

清酒の香氣成分としては表-1に示すような成分が知られており、この中でバナナ様の甘い香りのイソアミルアルコールや、バラ様の香りの β -フェネチルアルコール、バナナ・リンゴ様の香りの酢酸イソアミル、桃及びヒヤシンス様の香りの酢酸 β -フェネチル、果実様の香りのカプロン酸エチルなどの成分を多く含む吟醸香の高い清酒の研究が行われている。

香氣成分の中の高級アルコール類は、図-1のようにロイシンやバリンのようなアミノ酸が脱アミノされケト酸となって生成されるエールリッヒ経路と、アミノ酸の生合成経路の中間代謝物であるケト酸から生成される生合成経路がある。これらの反応により関連するアミノ酸より炭素数の1つ短いアルコー

表-1 清酒中の香り成分と香り（△は不快臭に属する）

分 類	香 気 成 分	香 気	清酒中の含量 (ppm)
高級アルコール類	イソブタノール	アルコール臭、やや脂肪臭	30~70
	イソアミルアルコール	バナナ様甘い香	110~270
	フェネチルアルコール	バラ様	20~75
カルボニル化合物	アセトアルデヒド	木香様	~50
	ダイアセチル	△ツワリ香	~0.5
酸 類	酢 酸	△酸臭	30~120
	酪 酸	△酸敗臭	~2
エ ス テ ル 類	酢酸エチル	セメダイン様	20~120
	酢酸イソブチル	バナナ様	0.2~1.5
	酢酸イソアミル	バナナ・リンゴ様	3~15
	カプロン酸エチル	リンゴ様	3~10
	カプリル酸エチル	果実様	5~10
	カプリン酸エチル	"	10
	硫化水素	△腐敗臭	0

ルが生成される。つまり、ロイシンからイソアミルアルコールが、バリンからイソブチルアルコールが、フェニルアラニンからは β -フェネチルアルコールが生成される。

高級アルコールの生成量は、発酵醪中のアミノ酸量の組成や濃度によって影響されるが、清酒醪中で

は、米や麴に由来するアミノ酸によってフィードバック阻害を受けるため、おもにエールリッヒ経路によって生成されと考えられている。つまり、図-2に示すように米や麴の中のタンパク質が麴の酵素によって分解され、ロイシンやフェニルアラニンなどのアミノ酸になり、これらのアミノ酸が清酒酵母中に取り込まれてイソアミルアルコールや β -フェネチルアルコールなどの高級アルコールが生成される。

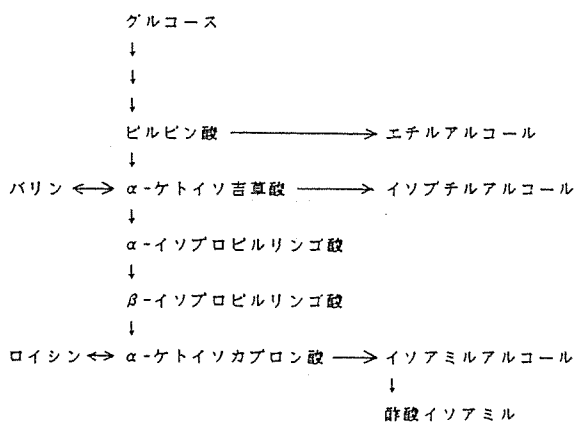


図-1 高級アルコールの生成経路

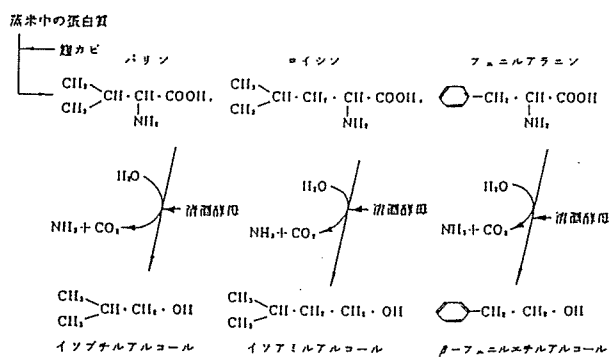


図-2 アミノ酸から高級アルコールの生成

そこで、アミノ酸による抑制機構が解除された変異株では、外部環境のアミノ酸濃度に無関係に生合成経路からの高級アルコールが生成される可能性がある。このような変異株はアミノ酸のアナログ耐性

株から分離されることが多い。そこで、今回はアミノ酸アナログの酵母に対する増殖抑制濃度について検討を行った。

2. 実験方法

最小培地（グルコース 2%、Yeast nitrogen base w/o amino acids 0.67%）にアミノ酸のアナログを種々の濃度になるように添加して、それに最小培地で増殖させた酵母を植菌して30℃で培養した。酵母の増殖は経時的に濁度を測定した。

酵母は日本醸造協会9号酵母（K-9）を使用した。アミノ酸のアナログとしては、フェニルアラニンのアナログとしてp-フルオロフェニルアラニンを、イソロイシンのアナログとしてイソロイシンヒドロキサメイトを、ロイシンのアナログとしてロイシンヒドロキサメイトを用いた。

3. 実験結果および考察

アミノ酸アナログの各種濃度におけるK-9酵母の増殖曲線を図-3から図-8に示す。

p-フルオロフェニルアラニンは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でかなり酵母の増殖を抑制し、濃度が高くなるほど酵母の増殖は抑制された。p-フルオロフェニルアラニン耐性酵母の分離には、100から200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように最小培地に添加すればよいと思われる。（図-3）

イソロイシンヒドロキサメイトは400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で酵母の増殖抑制効果が若干見られ、濃度が濃くなるほど酵母の増殖は抑制された。しかし、24時間後では無添加区とほぼ同じ増殖を示し、酵母の生育の対数増殖期において若干の増殖抑制効果がみられた。イソロイシンヒドロキサメイト耐性酵母の分離には、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように最小培地に添加し、生育してきた大きなコロニーを取ればよいと思われる。（図-4）

ロイシンヒドロキサメイトは400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で若干の酵母の増殖抑制がみられたが、24時間後には無添加区とほぼ同じ増殖となった。また、イソロイシンヒドロキサメイト程の増殖抑制効果は見られな

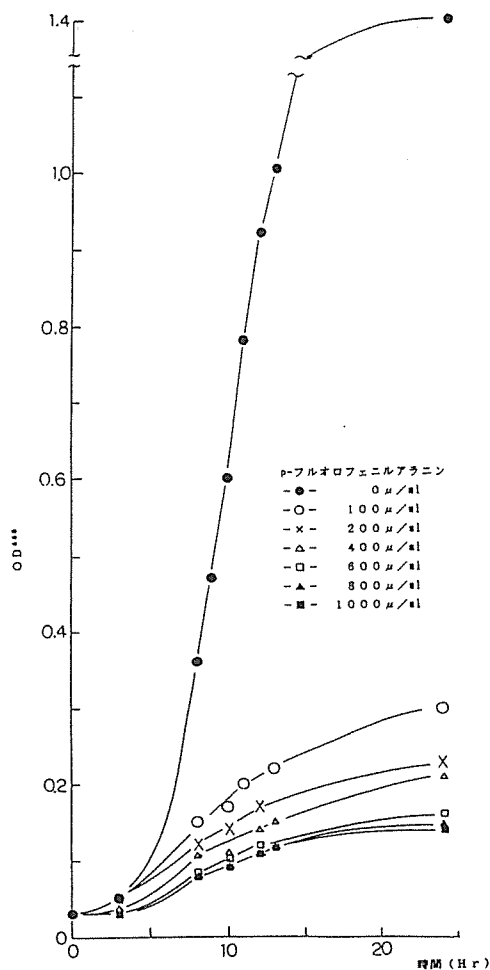


図-3 K-9酵母の氨基酸アナログ耐性
(p-フルオロフェニルアラニン)

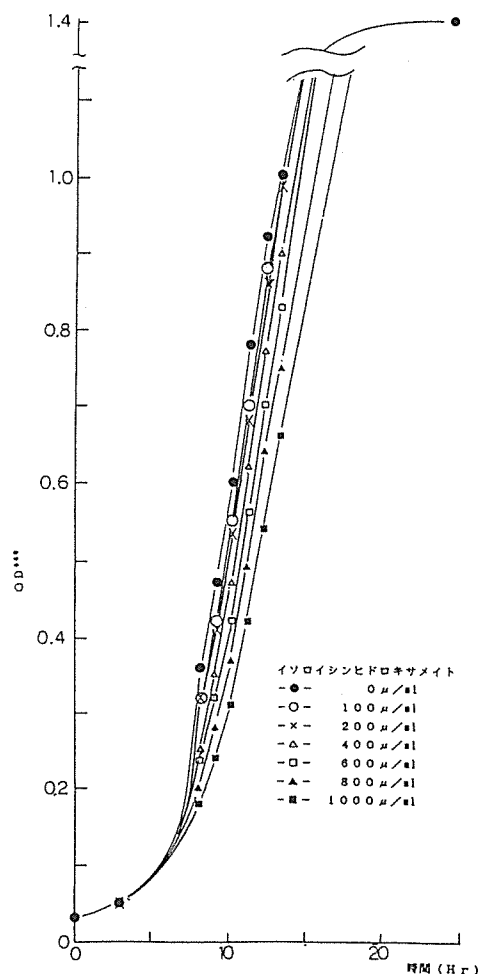


図-4 K-9酵母の氨基酸アナログ耐性
(イソロイシンヒドロキサメイト)

った。(図-5)

アミノ酸アナログを併用した場合の結果を図-6から図-8に示す。p-フルオロフェニルアラニンを200 μg/mlとし、イソロイシンヒドロキサメイトの濃度を変えて酵母の増殖を測定したが、イソロイシンヒドロキサメイトの濃度が600 μg/ml以上の濃度になると、増殖初期においてはp-フルオロフェニルアラニン単独よりも増殖が抑制された。2種以上のアナログを併用することによって、変化に富んだ香気生成能を有する酵母が分離されると期待される。(図-6)

p-フルオロフェニルアラニンにロイシンヒドロキサメイトを加えたときは、p-フルオロフェニルアラ

ニン単独の方が酵母の増殖抑制効果があった。(図-7)

イソロイシンヒドロキサメイトとロイシンヒドロキサメイトを併用したときは若干の増殖抑制効果は見られたが、24時間後には無添加区とほぼ同じ増殖となった。(図-8)

4.さいごに

1) K-9酵母のアミノ酸アナログの耐性濃度について検討を行ったが、p-フルオロフェニルアラニンがアナログとしての酵母の増殖効果が一番大きく、耐性株を得るには最適と判断された。

2) イソロイシンヒドロキサメイト耐性株を得るには、酵母を培養して大きなコロニーを分離すればよいと思われた。

3) p-フルオロフェニルアラニンと他のアナログを併用すると、p-フルオロフェニルアラニン単独より酵母の増殖抑制効果が低下した。

4) しかし、酵母の増殖抑制効果が高いからとい

って、香気生成能の高い酵母が多く得られるとは限らないので、それぞれのアナログ耐性株を分離し、香気生成能を調べる必要がある。

5) さらに、アナログを併用することによって、多様な香気生成能を有する酵母が得られることが期待される。

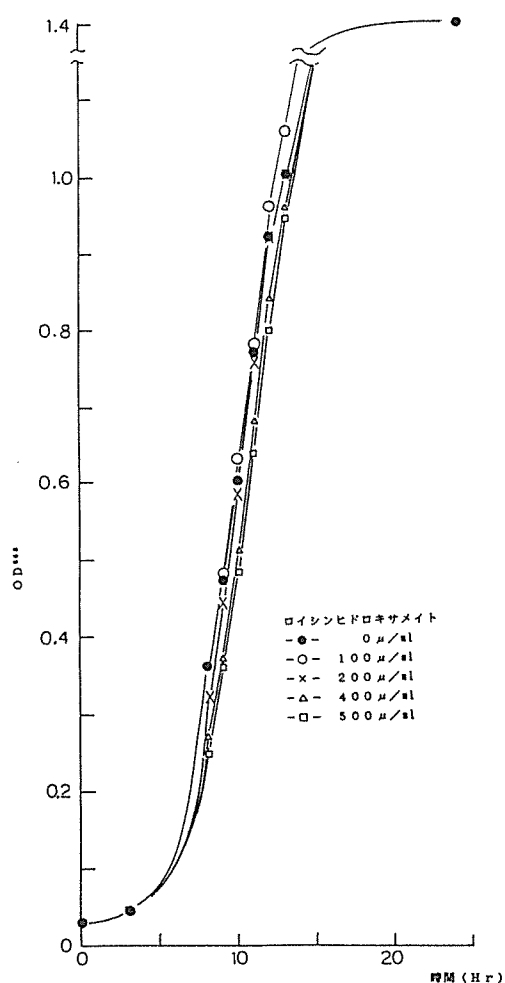


図-5 K-9 酵母のアミノ酸アナログ耐性
(ロイシンヒドロキサメイト)

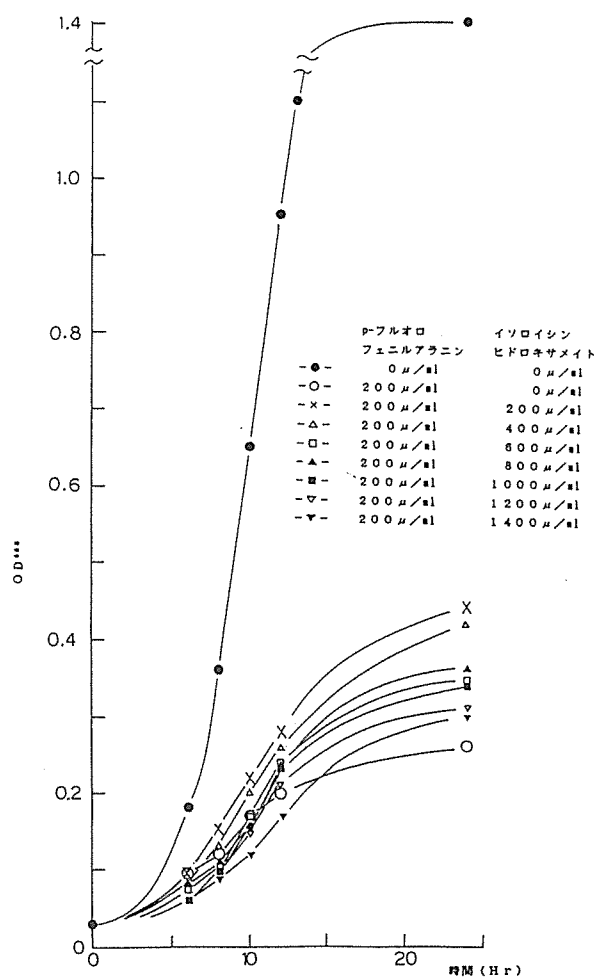


図-6 K-9 酵母のアミノ酸アナログ耐性
(p-フルオロフェニルアラニン + イソロイシンヒドロキサメイト)

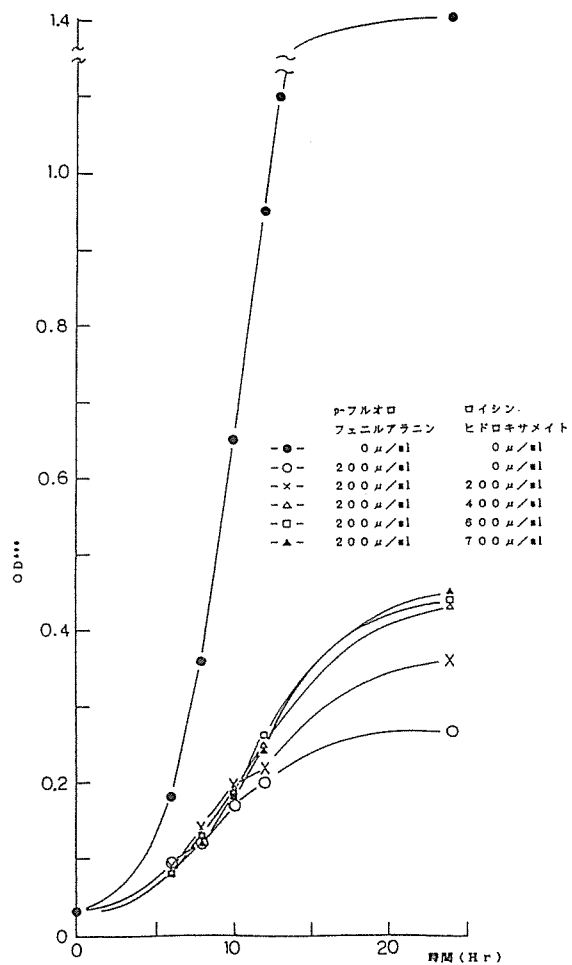


図-7 K-9 酵母のアミノ酸アナログ耐性
(p-フルオロフェニルアラニン + ロイシンヒドロキサメイト)

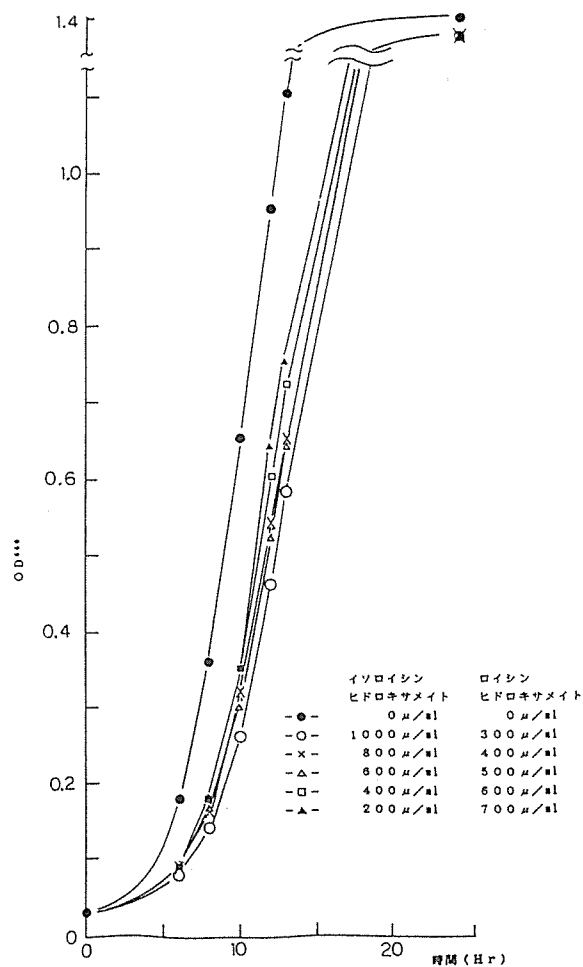


図-8 K-9 酵母のアミノ酸アナログ耐性
(イソロイシンヒドロキサメイト + ロイシンヒドロキサメイト)