

清酒酵母の育種による新規清酒の開発

- シクロヘキシミド耐性清酒酵母のリンゴ酸生成に関する遺伝子の発現解析および実地醸造試験 -

食品工業部
小金丸和義

シクロヘキシミド耐性清酒酵母 (M7-14) のリンゴ酸生成に関する遺伝子の発現量を調べた結果, M7-14 は親株の日本醸造協会 7 号酵母 (K-7) よりトリカルボン酸 (TCA) 回路のリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードする *MDH1* や *MDH2*, グリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼをコードする *ICL1* の発現量が増加したためにリンゴ酸高生産酵母となったと結論した. また, 実地醸造試験ではリンゴ酸を通常の清酒の 3 倍から 5 倍多く含み, エタノール 12% 程度の清酒が醸造された. 仕込みの大きさや酒母の種類などに関係なくリンゴ酸が高生産され, さわやかな酸味を有する低アルコール清酒の開発が可能と示唆された.

1. はじめに

清酒中の有機酸は呈味成分として重要な因子であり, 特にリンゴ酸は「さわやかな」「すっきりした」味を与えられると言われている¹⁾. リンゴ酸高生産酵母に関しては, 相川らはジメチルコハク酸感受性株より分離し²⁾, 水野らは 2-デオキシグルコース耐性株より³⁾, Asano らはマルトース低資化能株より分離している⁴⁾. また吉田らはシクロヘキシミド耐性株よりリンゴ酸高生産株を分離している⁵⁾. 本研究ではさわやかな酸味を有する清酒の開発を目的として, シクロヘキシミド耐性株の中からリンゴ酸高生産酵母 (M7-14) の分離を行った. 前報⁶⁾ では, M7-14 は TCA 回路のミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性やグリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼ活性が強くなったためリンゴ酸生成能が向上したと推察した. そこで, リンゴ酸生成に関与する遺伝子の発現量を調べた. また, 前報では, M7-14 での清酒の小仕込み試験を行ったところ, 日本醸造協会 7 号酵母 (K-7) に比べ 2.8 倍量のリンゴ酸を含み, エタノールが 12.4% の低アルコール清酒が醸造された. そこで, M7-14 の低アルコール清酒用への実用性を検討するため清酒の実地醸造試験を行ったので報告する.

2. 実験方法

2.1 遺伝子発現量の比較

YPD 培地で 30°C, 2 日間静置培養し, Gentra 社製の RNA 単離キットを用いて全 RNA を調製し DNA マイクロアレイを用いて全遺伝子の転写レベルでの発現量の比較を行った.

2.2 清酒の実地醸造試験

佐賀県内の 4 酒造場において, M7-14 を使った低ア

ルコール清酒の実地醸造試験を行った. A 酒造場は 70% 精白米のレイホウを, B 酒造場は 65% 精白米の山田錦を, C 酒造場は 65% 精白米のレイホウを, D 酒造場は 70% 精白米のレイホウを使用した. 仕込み配合を Table 1 に示す. A 酒造場は速醸酒母で 50kg 仕込み,

Table 1 Feeding ratio of mash for sake brewing

Breweries		Moto	Soe	Naka	Tome	Total
A	Total rice (kg)	3.5	7.5	14	25	50
	Steamed rice (kg)	2.3	5.0	11	20.5	38.8
	Koji-rice (kg)	1.2	2.5	3	4.5	11.2
	Water (L)	3.8	9.6	22	34	69.4
B	Total rice (kg)	4	7	15	24	50
	Steamed rice (kg)		7	12	20	39
	Koji-rice (kg)	4		3	4	11
	Water (L)	17		18	28	69
C	Total rice (kg)	35	70	135	260	500
	Steamed rice (kg)	24	50	105	211	390
	Koji-rice (kg)	11	20	30	49	110
	Water (L)	60	65	162	363	650
D	Total rice (kg)	7	33	63	107	210
	Steamed rice (kg)		20	48	92	160
	Koji-rice (kg)	7	13	15	15	50
	Water (L)	24	28	64	126	242

B 酒造場は酵母仕込みで 50kg 仕込み, C 酒造場は高温糖化酒母で 500kg 仕込み, D 酒造場は酵母仕込みで 210kg 仕込みとした.

2.3 分析法

製成酒の一般成分は国税庁所定分析法に基づき測定した。有機酸は高速液体クロマトグラフ(島津有機酸分析システム)により分析した。

3. 実験結果及び考察

3.1 リンゴ酸生成に関する遺伝子発現解析

前報⁶⁾でシクロヘキシミド耐性株よりリンゴ酸高生産清酒酵母(M7-14)を分離し、さらにリンゴ酸の高生成機構について検討した結果、TCA回路のミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性及びグリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼ活性が高くなったためにリンゴ酸高生産株となったと推察した。そこで、リンゴ酸生成と酵素活性との関連を明らかにするためDNAマイクロアレイを用いて遺伝子の発現量の変化を調べた。DNAマイクロアレイは網羅的な遺伝子の発現解析手法として1998年頃より急速に広まってきた⁷⁾。酵母の約6400種類の遺伝子に対応できるマイクロアレイは市販されているが⁸⁾、今回は九州大学の久原研究室で作成したマイクロアレイ⁹⁾を

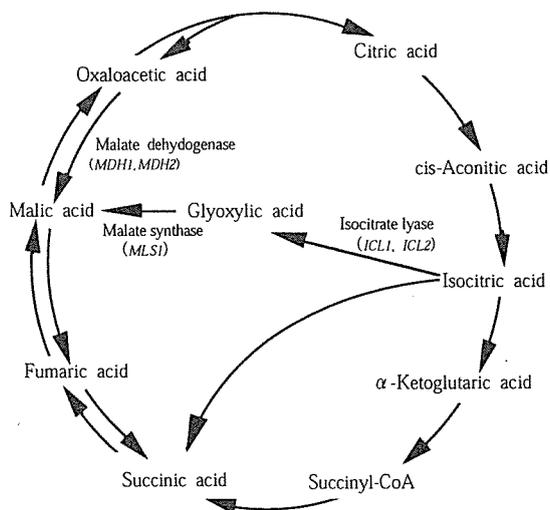


Fig. 1 Related enzymes and genes of malic acid production in TCA cycle

用いて解析した。

TCA回路及びグリオキシル酸回路のリンゴ酸生成に関与する酵素と遺伝子をFig. 1に示す。これらの遺伝子の発現量をK-7とM7-14で比較した。Fig. 2のAにK-7に対するM7-14の全遺伝子の蛍光標識の様子を、またBにMDH1を含むブロックの部分の拡大図を示す(MDH1は上から8行目、右から7列目のスポット)。さらにTable 2にK-7に対するM7-14のTCA

回路とグリオキシル酸回路、エタノール生成に関与する酵素と遺伝子の発現量を示す。リンゴ酸デヒド

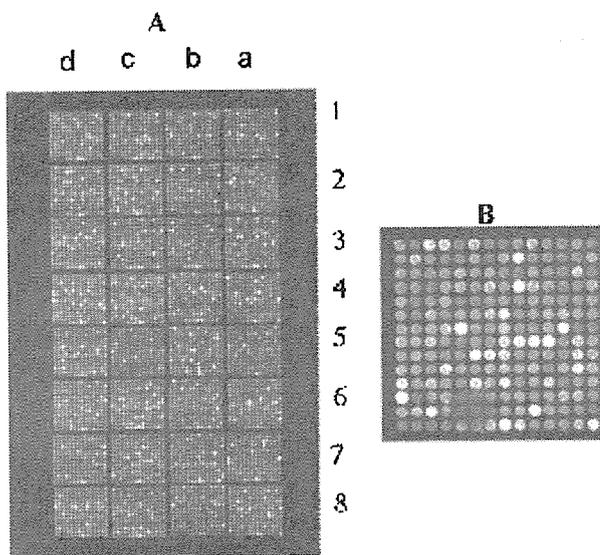


Fig. 2 DNA micro array

Table2 Ratio of gene expression of enzymes inTCA cycle(A), glyoxylicacid cycle(B), and ethanol production(C)

Enzyme	Gene	Ratio (M7-14/K-7)
A: citrate synthase	<i>CIT1</i>	1.0
"	<i>CIT3</i>	0.004
aconitase	<i>ACO1</i>	1.9
isocitrate dehydrogenase	<i>IDP1</i>	0.9
"	<i>IDP2</i>	2.3
"	<i>IDH1</i>	1.6
"	<i>IDH2</i>	0.8
α-ketoglutarate dehydrognase	<i>KGD1</i>	1.2
"	<i>KGD2</i>	0.8
succinate-coA ligase	<i>LSC1</i>	2.0
"	<i>LSC2</i>	1.3
fumarate reductase	<i>OSM1</i>	1.0
"	<i>FRDS1</i>	0.5
succinate dehydrogenase	<i>SDH1</i>	1.9
"	<i>SDH2</i>	0.003
"	<i>SDH4</i>	0.8
fumarate hydratase	<i>FUM1</i>	0.8
malate dehydrogenase	<i>MDH1</i>	1.8
B: citrate synthase	<i>CIT2</i>	1.5
isocitrate lyase	<i>ICL1</i>	1.4
"	<i>ICL2</i>	0.9
malate synthase	<i>MLS1</i>	0.7
malate dehydrogenase	<i>MDH2</i>	1.5
C: pyruvate decarboxylase	<i>PDC1</i>	0.6
"	<i>PDC2</i>	0.2
"	<i>PDC5</i>	0.3
"	<i>PDC6</i>	0.5
alcohol dehydrogenase	<i>ADH1</i>	0.2
"	<i>ADH2</i>	0.4
"	<i>ADH4</i>	0.8
"	<i>ADH5</i>	1.0

ロゲナーゼに関し、MDH1(ミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ)の発現量は、K-7に比べ1.8倍に増加し、MDH2(細胞質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ)では、K-7に比べ1.5倍に増えていた。前報で報告したように細胞質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ活性はK-7に比べM7-14は1.7倍であり、MDH2の発現量が1.5倍に増えていることとよく一致した。MDH2遺伝子破壊株では清酒中のリンゴ酸は減少し、高発現させると増加することから、MDH2はMDH1よりリンゴ酸生成に大きく関与していると報告されている^{10,11)}。しかし、M7-14の場合、ミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼは細胞質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼより活性が高いことから、細胞質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼはリンゴ酸の生成に関して影響は少ないと前報では推論した。DNAマイクロアレイでの遺伝子の発現量解析の結果、M7-14はK-7に比べMDH1の高発現が認められ前報の推論を支持した。

一方、グリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼ活性は、M7-14ではK-7の50%増の活性となっていることから、嫌気条件下でM7-14はグリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼ活性が高くなり、リン

ゴ酸高生産株になったと前報では推察した。DNAマイクロアレイでの解析の結果、イソクエン酸リアーゼをコードするICL1は1.4倍に発現量が増えており、その推察の妥当性が証明された。

また、M7-14はエタノールの生成がK-7の約70%と低下したが、DNAマイクロアレイでの解析の結果エタノール生成に関与するPDC1, PDC2, PDC5, PDC6, やADH1, ADH2, ADH4の発現量がK-7より少なく、このためにM7-14はエタノール生成能が低下したと考えられた。

3.2 清酒の実地醸造試験結果

低アルコール清酒の開発は仕込み方法等の工夫により数多くなされたきた^{12~18)}。最近では長井らは¹⁹⁾熟成酒母に四段液を添加する方法による低アルコール清酒の開発を、(株)仙醸ら三社では²⁰⁾白米の酵素液化処理後に麴や乳酸等を加えた低アルコール清酒の開発を行っている。そこで、低アルコールとなっても味が希薄化しない酒質として、原酒の酸度を高めることを試みた。単に原酒を加水して低アルコール清酒を製造すると、低アルコール化により味が希薄化するが、原酒のリンゴ酸含量が高ければ、低アル

Table3 Changes in general components by M7-14 in sake brewing

Breweries		Soe	Naka	Tome	3	5	9	12	15	18	20	23	25
A	Temperature (°C)	12	8	6.5	7	12	12	10	9.5	9.5	9	9	9
	Sake meter						4.7	3.8	3.8	3.8	3.7	3.6	3.1
	Alcohol (%)							10.3	10.7	11.0	11.3	11.3	12.8
	Acidity						2.8	3.0	3.3	3.5	3.6	3.6	3.6
B	Temperature (°C)	12	11	8	11	12	15	13	13	12	12	11	11
	Sake meter					8.8	6.5	5.6	4.2	3.6	3.4	3.1	3.1
	Alcohol (%)							9.9	12.0	12.0	12.2	12.4	12.5
	Acidity					2.2	2.8	3.6	4.4	4.4	4.4	4.7	4.8
C	Temperature (°C)	12	11	7	10	13	15	15	15	14	14	14	
	Sake meter					8.4	5.4	5.2	4.8	3.6	3.4	2.5	
	Alcohol (%)								12.0	11.0	11.5	12.0	
	Acidity					2.0	2.8	3.2	3.8	3.3	3.7	4.1	
D	Temperature (°C)	15	9	8	9	10	13	13	12	11			
	Sake meter						6.2	3.8	2.1	2.1			
	Alcohol (%)							11.0	11.4	12.0			
	Acidity						5.2	5.2	5.3	5.3			

コール化に伴う希薄化は緩和すると期待される。そこでリンゴ酸高生産酵母のM7-14を用いてリンゴ酸含量の多い低アルコール清酒の实地醸造試験をおこなった。

もろみ経過をTable 3に示す。A酒造場は速醸酒母で仕込み、もろみの最高温度は12℃であった。酸度は9日目には2.8と高く、もろみ前半から酸が多く生成された。メーターの切れがやや緩慢であったが、25日目にはエタノール分は12.8%と低アルコールで、メーター3.1と甘く、酸度が3.6と酸味のあるもろみとなった。B酒造場は酵母仕込みを行ったが、A酒造場と同じように25日目にはエタノール分12.5%、メーターが3.1で酸度はA酒造場より高く4.8のもろみとなった。C酒造場は高温糖化酒母を行いもろみの最高温度を15℃まで上げた。23日目にはアルコール12.0%の低アルコールで酸度4.1の酸味と甘味のあるもろみとなった。D酒造場は酵母仕込みであるが、添仕込みは15℃で仕込み、踊も15℃として前急型にした。もろみの最高温度は13℃で、18日目には他の酒造場と同様にエタノール分が12.0%の低アルコールで、メーター2.1の甘味のあるもろみとなった。酸度は前急型にしたためか、もろみ前半より生成量が多く5.2となった。

上槽後の清酒の分析結果をTable 4に示す。M7-14の小仕込み試験では⁶⁾エタノールの生成がK-7に比べて約70%の12.4%であったが、实地醸造試験でもほぼ同じで12%程度となった。また、メーターは小仕込み試験では-36であったが、今回は-22から-31であり、仕込み量が大きくなることによりメーターの切れがよくなることが分かった。リンゴ酸の生成に関しては、小仕込み試験ではK-7の2.8倍量生成されたが、今回も約1000 μ g/mlのリンゴ酸が生成され通常の清酒の3倍から5倍の生成量であった。实地醸造試験では仕込みの大きさや酒母の種類などが異なっていたが、リンゴ酸の生成には仕込みの大きさや酒母の種類に関係なく生成されることが分かった。このように、M7-14を使えばリンゴ酸を多く含んだ低アルコール清酒の開発が可能であることが証明された。

市販の低アルコール清酒の酸度とメーターとの関係をFig. 3に示す。主に酸度が高く甘口タイプと、酸度が低く香りの高い吟醸酒タイプとなっている。酸度が高く甘口タイプの低アルコール清酒は乳酸やリンゴ酸を多く含んでいる。今回の实地醸造試験の低アルコール清酒は、メーターが-22から-31、酸度が3.4から5.6であり、Fig. 3より市販低アルコール清酒のちょうど真ん中程の成分の清酒であった。

Table4 Components of low alcohol sake brewing by M7-14

	Breweries			
	A	B	C	D
Alcohol (%)	12.7	11.5	12.0	12.0
Sake meter	-29	-31	-24	-22
Acidity	3.4	4.4	4.0	5.6
Amino acidity	1.4	1.4	1.5	2.4
Citric acid (μ g/ml)	142	126	108	142
Pyruvic acid (")	441	418	337	383
Malic acid (")	1095	989	762	1058
Succinic acid (")	1172	927	793	992
Lactic acid (")	419	938	604	860
Acetic acid (")	76	72	57	65

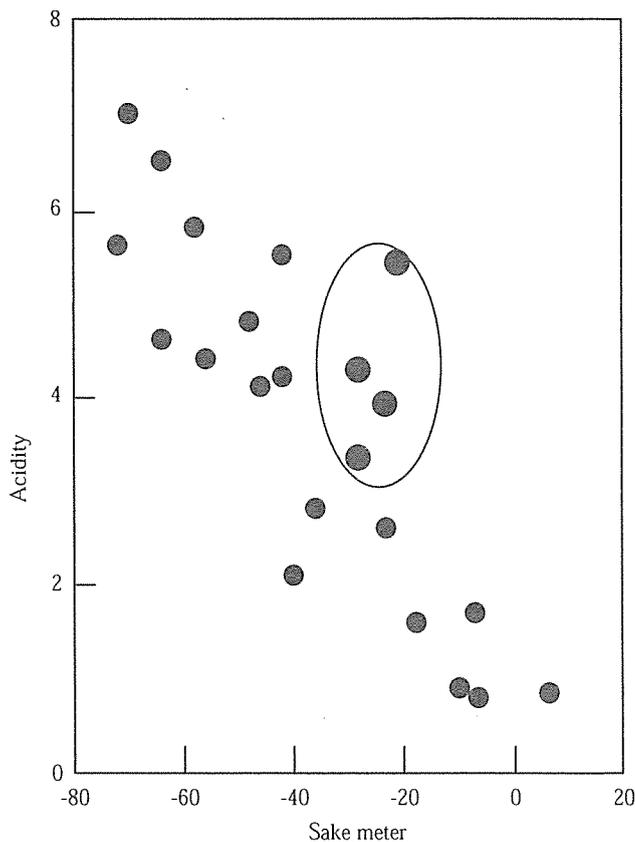


Fig. 3 Relation of sake meter and acidity in low alcohol sake

○ : values of the present industrial scale brewing

リンゴ酸を多く含んださわやかな酸味を有する低アルコール清酒が醸造された。肉料理等との相性を確認するため、一般消費者586人に対して焼き肉等の肉料理に相性がよいかアンケート調査を行った。約

半数の人が肉料理との相性がよいと答え、どちらともいえないと答えた人と合わせると80%の人が焼き肉などの肉料理との相性が良いと感じていると判断された。

以上の結果より、M7-14は実地醸造においてもリンゴ酸を高生産し、さわやかな酸味を有する低アルコール清酒の開発が可能であることが示唆された。

4. おわりに

DNAマイクロアレイによるリンゴ酸生成に関する遺伝子の発現量の変化とM7-14による清酒の実地醸造試験で次の結果を得た。

- (1) M7-14はMDH1やMDH2, ICL1の発現量が増加したためリンゴ酸高生産酵母となったことが証明された。
- (2) 清酒の実地醸造試験でもリンゴ酸が高生産され、M7-14は仕込みの大きさや酒母の種類などには関係なくリンゴ酸を高生産することが分かった。
- (3) リンゴ酸を多く含むさわやかな酸味の低アルコール清酒の製造が可能であることが示唆された。
- (4) アンケート調査の結果、この清酒は80%の人が焼き肉などの肉料理との相性がよいと答えた。

参考文献

- 1) 佐藤信, 大場俊輝, 高橋康次郎, 国分伸二, 小林幹男, 小林宏治: 醸協, 72, 801-805 (1977)
- 2) 相川元庸: 清酒酵母研究会, 清酒酵母の研究, 125 (1992)
- 3) 水野昭博, 岩淵正文, 木曾邦明, 佐藤和雄, 高橋利郎: 醸協, 97, 228-233 (2002)
- 4) T. Asano, N. Kurose, and S. Tarumi: J. Biosci. Bioeng., 92, 429 (2001)
- 5) 吉田清, 稲葉正明, 中村欽一, 野白喜久雄: 醸協, 88, 645-647 (1993)
- 6) 小金丸和義: 佐賀県工業技術センター研究報告書, 10, 39-42 (2001)
- 7) M. Schena et al.: Trends Biotech., 16, 301-306 (1998)
- 8) Amersham Biosciences: Life Science News, 4 (1998), 1, (1999), 1,2 (2002)
- 9) 松村正明, 須波弘之: DNA マイクロアレイと最新PCR法, 秀潤社出版, 67-75 (2000)
- 10) 桶詰和久, 尾関健二, 浜地正昭, 熊谷知栄子: 日本生物工学会大会講演要旨, 201 (1997)
- 11) 桶詰和久, 尾関健二, 浜地正昭, 熊谷知栄子: 日本生物工学会大会講演要旨, 31 (1998)
- 12) 岩野君夫, 佐藤俊一, 水野昭博, 高原康生, 木崎康造, 佐野英二, 辻邦司, 梅田紀彦: 醸協, 76, 768-772 (1981)
- 13) 布川弥太郎, 椎木敏, 斉藤和夫, 矢野善嗣: 醸協, 77, 53-56 (1983)
- 14) 原昌道, 嶋崎孝行, 北野一好, 飯村穰: 醸協, 78, 390-393 (1992)
- 15) 河野勇人, 産本弘之, 富部忠篤, 姫野国夫: 醸協, 87, 745-750 (1992)
- 16) 後藤邦康, 武藤彰宣, 坂本裕子: 醸協, 90, 479-484 (1995)
- 17) 小関敏彦, 森岡裕人, 飛塚幸善, 須貝智, 小島弥之祐, 鈴木弥兵衛, 佐藤昭仁, 和田多聞, 布宮雅昭: 醸協, 92, 607-613 (1997)
- 18) 栗田修, 中村徹, 坪内一夫: 醸協, 93, 825-832 (1998)
- 19) 長井潔, 広常正人: 特開2001-204457
- 20) (株)仙醸, 七笑(株), (株)檜吉: 特開2001-224353