

機能的アミノ酸に着目した高エタノール生産性酵母の開発と 清酒醸造への応用

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・教授 高木 博史

■ 目的

清酒の主要な芳香成分(高級アルコール、エステル類)は酵母の発酵過程で主にアミノ酸から生成されることから、清酒の品質向上や酒質の差別化には、アミノ酸の組成や生成量に特徴を有する酵母の開発が重要である。また、清酒製造工程の改良(エタノール生産性の向上、発酵時間の短縮等)には、清酒醸造におけるストレス環境(高濃度エタノール・高浸透圧・低温等)に耐性を有する酵母の育種が要求されている。助成者は、酵母のアミノ酸代謝に着目した新しいストレス耐性機構を解析し、産業酵母の育種への応用に取り組んでいる。これまでに、アミノ酸代謝系を人為的に改変し(合成系酵素遺伝子の高機能化、分解系酵素遺伝子の破壊等)、プロリンを細胞内に蓄積する産業酵母(パン、ビール、バイオエタノール等)を作製したところ、発酵生産環境のストレス下(エタノール、浸透圧、冷凍、乾燥等)において生存率や発酵力が親株に比べて顕著に向上することを明らかにした。また、プロリン以外にも、アルギニン、リジン、グルタミン酸等の荷電アミノ酸がストレスから酵母を保護することを見出した。これらの知見に基づき、実用化可能な清酒酵母を開発するために、「アミノ酸アナログ耐性」を指標として、有用アミノ酸を高蓄積する変異株を効率的に選抜できる方法を考案した。以上の背景から、本研究ではストレス耐性に関与するアミノ酸を高蓄積する清酒酵母の変異株を分離し、得られた変異株の醸造特性をもとに、親株よりも高いエタノール生産性を示す菌株を取得することを目的とした。

■ 方法

実用清酒酵母「協会酵母 901 号」の細胞をエチルメタンスルホン酸とインキュベートすることで、突然変異処理を施した。各菌株の細胞内外のプロリン含量については、アミノ酸アナライザーで測定した。得られた菌株を用いて、総米 200g の清酒小仕込み試験を 20°C、一段仕込みで行い、もろみ 1g 中のエタノール濃度をアルコメートで測定した。また、各菌株におけるプロリン代謝関連遺伝子の塩基配列を DNA シーケンサーで決定した。

■ 結果および考察

ストレス耐性に関与するアミノ酸の中で、産業酵母で実績のある「プロリン」に着目した。まず、代表的な清酒酵母の「協会酵母 901 号」を突然変異処理後、プロリンのアナログであるアゼチジン-2-カルボン酸(AZC)を含有する最少寒天培地で生育できる変異株を多数分離した。次に、各変異株を最少液体培地で 2 日間培養後、細胞内のプロリン含量が親株よりも 5 倍以上蓄積した株を選抜した。さらに、寒天培地でのスポット試験によって、親株よりもエタノール耐性の高い 4 株を選抜した(プロリン含量は親株の 6.2 ~ 10.4 倍)。得られた 4 株を用いて、清酒小仕込み試験を行った結果、4 株中 3 株は常に親株よりもエタノール濃度が高く、最も高い株では親株(18.9%)よりも 0.7%程度増加していた(19.6%)。また、4 株のうち 1 株に、細胞内のプロリン合成量を制御している鍵酵素(γ -グルタミルキナーゼ)の遺伝子(*PRO1*)にアミノ酸置換(Pro247 → Ser)を伴う変異を見出した。

■ 結語

今後、今回取得した清酒酵母の変異株について、プロリンを高蓄積するメカニズムを遺伝子レベルや酵素活性レベルで解析し、プロリン蓄積清酒酵母の育種戦略を確立する。酒造所にとっても、新たな酵母の開発は製造機への投資が不要で、製造コストの削減も可能であるため、導入へのハードルは低いものと予想している。