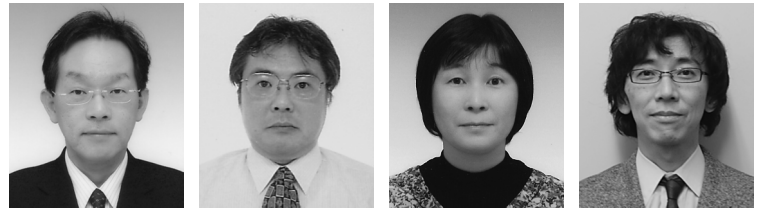


品質工程改善のためのビール酵母の
総合的基盤解析技術の開発



①

②

③

④

キリンビール株式会社 酒類技術開発センター 主査 善本裕之①
 キリンホールディングス株式会社 フロンティア技術研究所 主任研究員 吉田聡②
 キリンビール株式会社 酒類技術開発センター チーフアナリスト 金井(田中)圭子③
 キリンビール株式会社 酒類技術開発センター 主務 小林統④

はじめに

ビール類は低アルコール飲料として広く消費者に愛飲されている。日本では1990年代半ば以降から、さまざまな特徴や機能性を持つ発泡酒や新ジャンルの商品が開発されてきた。このような商品の登場により、発酵中にビール酵母が置かれる環境も大きく変化した。麦芽の低使用比率、あるいは麦芽以外の原材料を用いることで、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等の課題が発生した。しかしながら、従来のビール酵母の解析技術では、課題解決に必要なデータを十分に得ることができず、発生原因を推定することが難しかった。

ビール製造に使用される酵母には、大きく分けて上面発酵酵母と下面発酵酵母の2種類が存在する。上面発酵酵母は、比較的高温で短期間発酵が行われ、糖を食べ尽くして発酵が終わる頃に上のほうに浮いてくる性質を持ち、*Saccharomyces cerevisiae* に属する。一方、日本で主流なビールは色が淡く透き通ったピルスナータイプで、下面発酵酵母 *S. pastorianus* を用いて低温で発酵させて造る。この酵母は発酵が終わる頃、酵母同士が固まって沈む。この性質は“凝集”と呼ばれ、発酵終了時酵母を回収して次回再び使用する、いわゆる「連用（繰り返し使用）」において重要な醸造特性の一つである。下面発酵酵母は、上面発酵酵母とは遺伝学的特性が異なっていたために、*S. cerevisiae* で使用されている解析技術が十分に活用できなかった。

本研究では、従来からある解析技術に加えて、近年、飛躍的に発展してきた遺伝子、遺伝子発現、タンパク質、代謝物、表現型の各レベルの網羅的な解析技術を駆使して、下面発酵酵母の特性を解析し、品質や工程を改善するために必要な総合的基

盤技術を開発した。これらの技術を用いて、ビール類の発酵中に発生する各種課題の仮説を立て解決を試み、本技術がビール酵母の解析に有効であることを示した。

ビール酵母の総合的基盤解析技術の開発

ビール酵母における発酵の課題は、どのレベルで発生するかわからない。そこで、課題発生時の仮説立案のため、それぞれのレベルで必要とされるビール酵母の解析技術を開発した(図1)。そして、課題に応じて最適な解析レベルを選択し、解決へ向けて効率的に取り組むことを可能にした。

1. 遺伝子レベルの解析

パルスフィールドゲル電気泳動後のサザンブロットやEST等の遺伝子レベルの解析から、下面発酵酵母 *S. pastorianus* は、*S. cerevisiae* と *S. bayanus* の2種類のサブ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. bayanus* に由来する Lg 型の遺伝子 (Sc 型と90%以下の相同性を示す) のセットを持つことを明らかにした。また、下面発酵酵母株は互いに近縁であり、遺伝子レベルで識別することは容易ではなかった。そこで、近縁酵母の識別を可能とするPCRプライマー配列やSNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) 情報を基に特定の領域の塩基配列の違いにより、これらの酵母株を識別する方法を開発した(図2)。さらに、Sc型とLg型のオーソログな遺伝子の塩基配列を利用して、両者を区別して解析できる下面発酵酵母のDNAマイクロアレイを開発し、CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法を用いることで遺伝子コピー数の違いを基にした解析が可能となり、連用過程で転座が発生しやすい遺伝子領域があることを示し

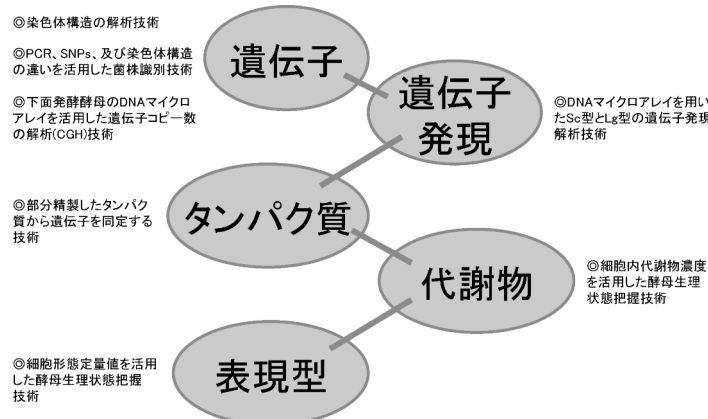


図1 開発したビール酵母の解析技術 (全体像)

た。また、量的形質に関与する遺伝子を同定するために QTL (Quantitative Trait Loci) 解析を行い、香味成分として重要な高級アルコールの生成能に関与する染色体領域が Sc 型第 IV 染色体上に座乗する可能性を強く示唆する結果を得た。

2. 遺伝子発現レベルの解析

下面発酵酵母の DNA マイクロアレイを活用し、異なる発酵温度での Sc 型と Lg 型の遺伝子発現調節を解析し、オーソログ間で発現パターンの異なる遺伝子が存在することを明らかにした (図 2)。一つの細胞内に 2 種類のゲノムセットが混在して、共に発現している生物は興味深い。いかにしてこれらの遺伝子発現が調節され、醸造の特性が生まれるかを明らかにすることは生物学的にも意義深いことである。Sc 型と Lg 型の遺伝子を区別できる解析技術を用いることで、下面発酵酵母の特徴をより正確にとらえることができるようになった。

3. タンパク質レベルの解析

目的とするタンパク質を部分精製し、得られたアミノ酸配列情報を基に候補遺伝子を絞り込み、その破壊株の評価から遺伝子を同定する技術を開発した (図 3)。イソアミルアルコール生成に関わるデカルボキシラーゼの同定のために、このタンパ

ク質の部分精製を行い、候補遺伝子の破壊株を作製し、酵素活性を測定した。その結果、この酵素反応にはピルビン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 *PDC1* が関与していることが明らかになった。この技術を用いることにより簡便に短時間で部分精製のタンパク質から遺伝子を同定することが可能となった。

4. 代謝物レベルの解析

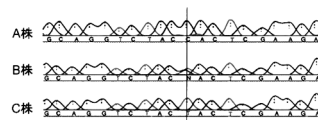
ビール酵母の細胞内イオン性代謝物を測定する手法として、CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計) による分析法を確立し、定量解析した細胞内代謝物濃度の比較から酵母の生理状態を把握する技術を開発した (図 3)。代謝物濃度のデータベースは酵母の生理状態評価に有用であり、課題発生原因の仮説を立案するために活用できることが示された。

5. 表現型レベルの解析

細胞形態を定量的に表現するシステム (CalMorph) を活用して、発酵中のさまざまな条件下の下面発酵酵母の細胞形態定量解析値を収集し、これらの値をデータベース化した (図 3)。細胞形態定量値を比較することで、酵母の生理状態をより正確に把握することが可能となった。

遺伝子レベル

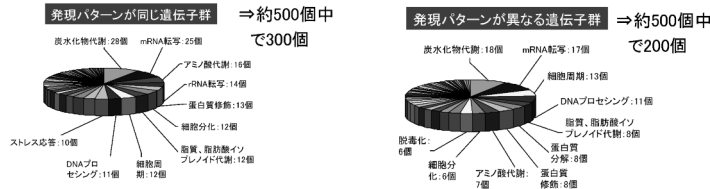
◎SNPsを活用した菌株識別技術



⇒1塩基の違いで、A、B、C株を識別できる。

遺伝子発現レベル

◎DNAマイクロアレイを用いたSc型とLg型のオーソログ遺伝子の発現解析技術

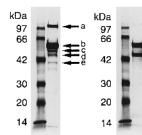


⇒発酵温度の違いで見つかった発現パターンが異なる遺伝子群は約40%であった。

図 2 遺伝子および遺伝子発現レベルの主な解析技術

タンパク質レベル

◎部分精製したタンパク質から遺伝子を同定する技術

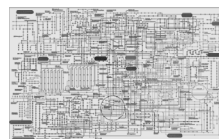


部分アミノ酸配列を用いてゲノム配列情報から候補遺伝子を絞り込む。

遺伝子破壊株を作製・評価後、同定する。

代謝物レベル

◎細胞内代謝物濃度を活用した酵母生理状態把握技術

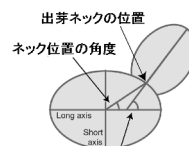


細胞内代謝物定量値から生理状態を把握する。

(KEGG)

表現型レベル

◎細胞形態定量値を活用した酵母生理状態把握技術



細胞壁、核、アクチンの細胞形態定量値から生理状態を把握する。

出芽増殖の方向 (CalMorph)

図 3 タンパク質、代謝物、および表現型レベルの主な解析技術

以下に、これらの解析技術の実用へ向けた活用事例について、いくつか例を挙げて紹介する。

ビール酵母の解析技術を活用した品質及び工程の改善

1. 品質の改善

ビール酵母を各工場へ配布する際、酵母の種類に間違いがなく、その性質が前年と同等であることを保証する必要がある。そのために、上面発酵酵母と下面発酵酵母の違いを区別するPCR解析法、SNPsを活用した菌株識別法、多型検出のためのパルスフィールドゲル電気泳動とサザンブロット解析法等を開発し、これらにより下面発酵酵母株間の違いを短期間で識別することができるようになった。一方、酵母の生理状態を正確に把握することは、高品質のビール類を製造するために不可欠である。これまで酵母細胞内pHを測定するICP法(Intracellular pH)により生理状態を推定していたが、製造方法も多岐にわたるようになり、既存のICP法だけでは発酵での課題仮説を推定することが困難な事例も確認されてきた。今回開発した代謝物、および表現型レベルの解析により、酵母の生理状態をより正確に把握することができるようになった。これらの技術開発により、発酵中に発生する課題に対する仮説立案を行い、適切な対応を取ることで品質向上に貢献した。

2. 工程の改善

発泡酒や新ジャンルの製造では、麦芽使用比率の減少のために液糖で糖源を補う場合が多い。液糖には、グルコース、マルトース、マルトトリオース等の多様な糖類が含まれている。ビール酵母は消費しやすいグルコースをより好んで消費する傾向があるが、そのような条件下では発酵遅延が発生する場合があった。代謝物および表現型レベルの解析を行った結果、これはビール酵母が窒素栄養分や微量栄養分等を発酵前半に急激に消費してしまい、これら栄養分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栄養分を消費し過ぎないように発酵前半の温度を下げる2段階温調法の開発へつなげ、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。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、ビール酵母の死滅率が上昇し、糖類の比率によっても発酵遅延が発生することが明らかになった。遺伝子発現および代謝物レベルの解析を行った結果、発酵液中のアミノ酸を増や

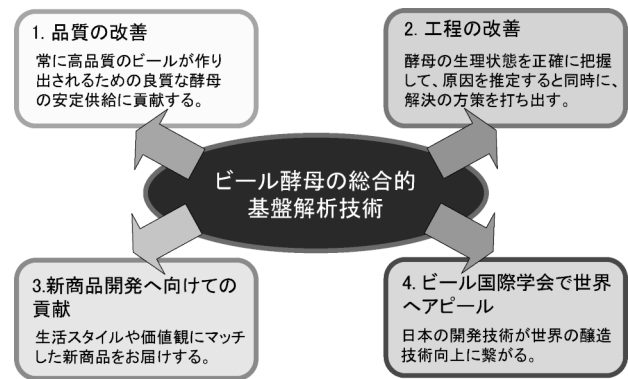


図4 開発した技術の波及効果

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。

おわりに

ビール酵母の遺伝子、遺伝子発現、タンパク質、代謝物、および表現型のそれぞれのレベルで必要な解析技術を開発し、これらを必要に応じて活用することで課題の仮説立案・原因解明を行い、ビール類の品質管理や工程改善に貢献することができた(図4)。また、さまざまな生活スタイルや価値観にマッチした新商品を開発する際に生じる課題の解決にも有効である。これらの技術について、国内のみならず、ビールの研究や開発が盛んに行われている欧米において、学会での発表を通して日本の技術力をアピールしてきた。今後も、ビール類だけでなくさまざまな発酵食品製造に応用することで発酵業界全体の発展のために貢献するとともに、お客様によりおいしいビール類をお届けするために、ビール酵母の解析技術の向上に精進を続けていきたい。

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の多くの関係者の尽力によるものであり、感謝いたします。細胞形態定量解析は東京大学・大矢禎一教授ら、細胞内代謝物解析は慶應義塾大学・曾我朋義教授らとの共同研究で取り組んだ内容であり、ご協力いただきました皆様に深く感謝いたします。また、本賞にご推薦いただきました東京大学・依田幸司教授、および選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。