

ビール酵母の発酵に寄与する因子解明と産業への利用



アサヒビール株式会社 大室 蘭

はじめに

酵母によるアルコール発酵は酒類製造方法として人類に古くから慣れ親しまれている現象である。ビール酵母によりつくられるビールの歴史は古く、紀元前8000～4000年まで遡ると言われている。ビール醸造において、酵母は麦汁と呼ばれる大麦やその他副原料を煮てつくられる液に含まれる糖を栄養源として、発酵によりアルコールと炭酸ガスを生成する。発酵工程はビール醸造における重要な工程の一つであり、その挙動はアルコール生産量やビールの香味成分等ビール品質に大きく影響する。従って、つくりたいビールに合った発酵力の高い酵母の選択・使用が好ましい。しかし発酵は複雑な現象であり、ビール酵母の発酵については未だ分かっていないことが多くその解明が望まれている。今回はビール酵母の中でも、世界で最も飲まれるお酒の一つであるラガータイプのビールつくりに使用される下面発酵ビール酵母 (*Saccharomyces pastorianus*) の発酵性に寄与する因子について、その一端が明らかとなったので紹介する。

1. 下面発酵ビール酵母について

はじめに、ビール酵母の分類について簡単に述べる。ビール酵母はその性質により、大きく上面発酵ビール酵母 (*S. cerevisiae*) と下面発酵ビール酵母 (*S. pastorianus*) の2種類に分けられる。上面発酵ビール酵母は発酵後期に発酵中に発生する炭酸ガスとともに液上層に浮き上がることからその名が付き、高温(20°C前後)、短期間で発酵させるエールタイプのビール醸造に使用される。下面発酵ビール酵母は発酵後期において酵母が凝集し、タンク底に沈殿する性質を持ち、低温(10°C前後)で比較的時間をかけて発酵させるラガータイプのビール醸造に使用される。下面発酵ビール酵母の凝集沈降能により、遠心分離等せずにタンク底から酵母を回収して次のビール醸造に繰り返し用いることで効率的なビール製造が可能となった。

古くより使用してきた上面発酵ビール酵母と比べ下面発酵ビール酵母によるビール醸造は歴史が浅く、広まったのは19世紀になってからであるが、上述した生産効率の良さや低温発酵による微生物汚染抑制効果等により下面発酵ビール酵母を使用したラガータイプのビールは世界で主流となった。その由来について多くの研究が行われ、2011年に南米パタゴニアの森に生育するブナの葉より野生酵母 *S. eubayanus* が発見され、その全ゲノム配列解読結果より下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* と *S. eubayanus* との融合体であると考えられている¹⁾。

上述の通り、下面発酵ビール酵母は *S. cerevisiae* 型 (*Sc*型) と *S. eubayanus* 型 (*Se*型) のゲノムを有する異種高次倍数体であり、その複雑な遺伝的背景も発酵機構の解明を難しくしている。以降、筆者らが下面発酵ビール酵母の発酵寄与因子解明を目的として研究を行い得られた知見について示す。

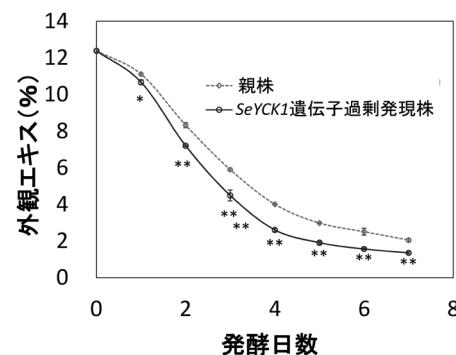
2. 染色体構造変化と高発酵に寄与する遺伝子解明

当社が現在主力商品のビール醸造に使用している下面発酵ビール酵母は、発酵速度が速いため発酵後の残糖が少なく、後味の残らないキレに優れたビールをつくりうる酵母として過去に馴化培養により選抜育種された。筆者らは、次世代シーケンサによるゲノム比較解析を行い、育種株では親株と比較してグルコース取り込み、タンパク質合成、解糖系等、発酵促進に関わる遺伝子が座乗するいくつかの染色体のコピー数が倍加していることが明らかとなった。違いがみられた染色体に座乗する遺伝子のうち、グルコース取り込みに関わる *Se*型 *YCK1* (*SeYCK1*) 遺伝子に着目した。*SeYCK1* 遺伝子を過剰発現させたモデル下面発酵ビール酵母について発酵力が向上することを確認し、育種株の高発酵力の一因を示した(図1)²⁾。以上により、*SeYCK1* 遺伝子のコピー数倍加による発酵力向上が、糖の取り込み残しを最小限にしてビール中の余分な後味を減らしてキレの良さを実現していることが示唆された。本研究では高発酵力という要素に加えて、日本市場における重要なビール特性の一つである「キレ」への関与が示唆される遺伝子を抽出した。現在、工場で使用中の本株やその他当社保有株について染色体の構造変化や遺伝子コピー数変化をモニタリングすることで「キレ」等のビール品質のさらなる安定化への取り組みが開始されている。

3. 高濃度醸造における高発酵に寄与する因子解明

3-1. 高濃度醸造について

近年、高濃度醸造と呼ばれる、通常よりも糖分等のエキス分含量の高い麦汁中でも健全に発酵可能なさらに高い発酵力を持つビール酵母が望まれている。一般的にビールは、エキス分10-12%程度の麦汁から発酵によりアルコール5% (v/v) 程度生成させて製造している。通常よりも高いエキス濃度の麦汁を発酵させ、より高いアルコール濃度のビールを製造することが出来れば、それを希釀して使用することでコスト削減や製造効

図1. *SeYCK1* 遺伝子過剰発現株の発酵挙動

(*p<0.05, **p<0.01)

ビール酵母の発酵指標として一般的に用いられている、外観エキス値について、24時間毎の測定結果を示した。

率向上が見込める他、高アルコールビールといった新価値を持つビールをつくることも可能となる。これまでにも高温発酵や酸素供給、ミネラル等の発酵助剤添加による発酵改善が試みられてきたが、ビール酵母は一般に高濃度醸造条件下（高浸透圧、高アルコール）においては増殖阻害による発酵遅延、さらには発酵停止が生じてしまうため高濃度醸造の実現は非常に困難な状況であり、その解決が期待されている。本項では、高濃度醸造における下面発酵ビール酵母の発酵寄与因子について筆者らの最新の知見について報告する。

3-2. 細胞周期移行欠損による発酵力向上

はじめに、発酵中にアルコール 20% (v/v) 程度產生可能という高い発酵力を示す清酒酵母 (*S. cerevisiae*) に着目した。近年、その高発酵力の一因として、アルコール濃度上昇を含む多様な外界ストレスを感知しても休止期移行に欠損を示して増殖・発酵を停止しないことが報告されている³⁾。多くの酵母は、ストレスを感知すると Rim15p の活性化によって休止期移行が引き起こされるが、清酒酵母では、*RIM15* 遺伝子上の機能欠失変異により休止期移行に欠損が生じる³⁾。また実験室酵母において、*G₁* 期進行に関わる *G₁* サイクリン Cln3p の分解抑制によって休止期移行を阻害する *CLN3-1* 変異を導入すると、発酵速度が向上することが明らかとなっている³⁾。筆者らは、モデル下面発酵ビール酵母を用いて清酒酵母と同様の休止期移行欠損を示す株を遺伝子工学的に作製し、高濃度条件下において発酵速度向上を示すことを明らかとした⁴⁾。本知見を活用し、酵母発酵力の判断指標として細胞周期のモニタリングを行う試みを行っており、実製造への応用展開が期待される。

3-3 S-アデノシルメチオニン高蓄積による発酵力向上

上述の通り細胞周期関連遺伝子の改変によりビール酵母の発酵速度向上に成功しているが、日本市場において、ビール醸造における遺伝子組換えのハードルは高く、遺伝子組換え技術によらない高発酵力酵母の育種技術を開発することが望ましい。そこで筆者らは統合して、発酵中の代謝産物に着目し研究を行った。前述の研究にて作製した、高発酵性を示す休止期移行欠損株における高濃度醸造下での発酵時の代謝産物について網羅解析を行い、発酵中に S-アデノシルメチオニン (SAM) の酵母内蓄積量が増加することを見出した。また、麦汁中への SAM 添加や酵母内への SAM を高蓄積することが知られる *ADO1* 遺伝子破壊が酵母の発酵速度を向上させることを示し、酵母内への SAM 蓄積が解糖系促進に作用することを明らかとした。さらに、酵母内への SAM を高蓄積することで知られるコルディセビン耐性を持つ株をモデル下面発酵ビール酵母より取得して、当該酵母が高濃度醸造下にて親株よりも発酵速度が向上したことを示した（図2）⁵⁾。本研究により遺伝子組換え技術を使わずにビール酵母の発酵力を高めるための新たな育種技術の確立に成功した。

おわりに

下面発酵ビール酵母は、その凝集沈降性や低温発酵能等、ビールつくりに合った特徴を持つ醸造酵母が自然に選抜されて得られてきた歴史がある。ビールつくりに合わせてビール酵母が進化していったと言ってもいいだろう。これからは自然選抜を待つのではなく、今回発酵性に着目して得られた知見を発酵

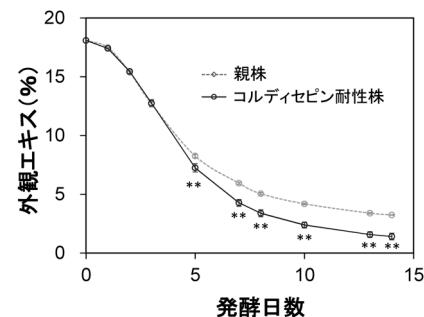


図2. コルディセビン耐性株の発酵挙動

(*p<0.05, **p<0.01)

ビール酵母の発酵指標として一般的に用いられている、外観エキス値について、24時間毎の測定結果を示した。

制御や高発酵酵母育種に活用したように、ビール酵母の特徴を研究によって裏付け、そこをターゲットとした新酵母育種技術や品質安定化、効率化に貢献する醸造技術を開発していくことが望まれる。ヒトがビール酵母を進化させることで、うまい！ビールつくりのより一層の発展を期待するとともに、本研究がその一助となれば幸いに思う。

（引用文献）

- Diego, L., Chris, T. H., Elisabete, V., Carla, G., Jim, D., Mark, J., P. G. and José, P. S., Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**(35), 14539–14544 (2011)
- Oomuro, M., Motoyama, Y., and Watanabe, T., Isolation of a lager yeast with an increased copy number of the *YCK1* gene and high fermentation performance. *J. Inst. Brew.*, DOI: 10.1002/jib.543, (2018)
- 渡辺大輔 清酒酵母の高発酵性に関する遺伝学的研究. 生物工学会誌, **91**(1), 2-9 (2013)
- Oomuro, M., Kato, T., Zhou, Y., Watanabe, Motoyama, Y., Yamagishi, H., Akao, T. and Aizawa, M., Defective quiescence entry promotes the fermentation performance of bottom-fermenting brewer's yeast. *J. Biosci. Bioeng.*, **122**(5), 577–582 (2016)
- Oomuro, M., Watanabe, D., Sugimoto, Y., Kato, T., Motoyama, Y. and Takagi, H., Accumulation of intracellular S-adenosyl-methionine increases the fermentation rate of bottom-fermenting brewer's yeast during high-gravity brewing. *J. Biosci. Bioeng.*, **126**(6), 736–741 (2018)

謝 辞 本研究の高濃度醸造発酵に関する部分の多くは、共同研究として貴重なご助言を頂き成し遂げられたものです。独立行政法人酒類総合研究所 赤尾健 醸造微生物研究副部門長、国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学 高木博史教授、渡辺大輔 助教に深謝致します。また、社内での研究遂行にあたり、ご理解とご支援頂きましたアサヒビール株式会社 渡邊哲也 酒類開発研究所長、山岸裕美 製品保証センター長、水谷正憲 酒類開発研究所開発第一部長に深く御礼申し上げます。また同じ部署にて暖かい激励を下さりました本山靖朗博士、舛田晋博士、砂川忠弘博士、加藤拓博士、また開発部署に異動後に研究成果の開発・生産への展開を応援して下さったアサヒビール株式会社の現同僚の皆様に感謝致します。皆様のご協力なくして本受賞は成し得ませんでした。関係者の皆様に深く御礼申し上げます。