

酸味の強い大分県産酵母の解析

— 醸造した清酒の味認識装置による分析およびゲノム解析 —

陶 山 明 子¹⁾ 野 田 涼 風¹⁾

岡 本 啓 湖²⁾ 麻 生 益 直³⁾

【要 旨】

大分県産酵母 KET002 株を用いた清酒の品質向上を目的として、大分県産酵母の性質の改良を行っている。味認識装置を用いた分析により KET002 株を使用した清酒はきょうかい酵母901号を用いた清酒より酸味が著しく高く旨味は低いことが明らかになった。次に KET002 株の酸味産生に関与する遺伝子の同定を目的とし全ゲノムリシーケンス解析を行い、TCA サイクル関連遺伝子、糖トランスポーター、GID (glucose induced degradation deficient) 複合体構成遺伝子を候補として選抜した。

【キーワード】

大分県産酵母 味認識装置 有機酸 全ゲノム解析 GID 複合体

緒 言

大分県産酵母 KET002 株は、大分県酒造協同組合と別府大学との共同研究により大分県内の酒造会社の酒粕から分離した酵母である^{1,2)}。KET002 株を使用した清酒の成分をきょうかい酵母9号のものと比較すると酸度が強く、アミノ酸度が少なく、グルコース濃度は更に少なく、官能試験の総合評価はきょうかい酵母より低い結果であった^{3,4)}。そこで本研究室では大分県産酵母を用いた清酒の品質向上を目的として、大分県産酵母の性質の改良を行っている。

近年、次世代シーケンサー装置の性能向上とともに安価かつ短時間で全ゲノムシーケンスが可能となっている。きょうかい酵母7号の全ゲノム解析⁵⁾を皮切りに醸造用酵母の解析が進んでいる⁶⁾。

本研究では、KET002 株を用いた清酒について味認識装置による分析を実施して味を数値化し、きょうかい酵母を使用した清酒と比較した。その結果、酸味が著しく高いことが明らかになったことから、KET002 株による強い酸味の産生に関与する遺伝子の同定を目的として、きょうかい酵母7号をリファレンス配列とした KET002 株の全ゲノム解析を行った。

¹⁾別府大学食物栄養科学部発酵食品学科、²⁾福岡女子短期大学、³⁾大分県酒造協同組合

実験方法

1. 供試菌株

大分県産酵母 KET002 株およびきょうかい酵母901号 (K901株) を使用した。

2. 培地および培養条件

酵母は YPD 培地 (2 %D-グルコース、2 %Polypeptone、1 %Yeast Extract) を用いて26°C で振とう培養 (180 min⁻¹)、または YPD 寒天培地 (YPD 培地、3 %寒天) で26°C で培養した。

3. 清酒小仕込み試験

3段仕込みにより清酒を醸造した。添仕込として蒸米35 g、麴米15 g、水50 mL、酵母 (7 × 10⁸ cells) を加え攪拌した。15°Cで12時間静置した後、均一に攪拌し、そのまま1日置いた (踊り)。仲仕込みとして蒸米60 g、麴米15 g、水100 mLを加え、均一に攪拌した後、18時間静置し、再度均一に攪拌した。留仕込として蒸米100 g、麴米25 g、水175 mLを加え、均一に攪拌した後、15°Cで21日間発酵させた。発酵終了後、もろみを遠心分離 (8,590×g、15分) し、得られた上清をろ過したろ液を清酒とした。

4. 官能検査

本学学生 (21~22歳) 6名 (女子2名、男子4名) を対象に実施した。清酒をブラインドで供し、評価用紙に自己記入する方法で回答を得た。評価項目は、印象、甘辛、濃淡、総合とし、次のような段階評価とした。

印象	: 快い	中庸	不快		
甘辛	: 薄辛	辛口	中庸	甘口	甘難
濃淡	: 薄い	淡麗	中庸	濃醇	諄い
総合	: 優良	良好	中庸	難	

また、味の印象について自由記述で回答を得た。

5. 味認識装置による分析

測定には味認識装置 SA402B (インテリジェントセンサーテクノロジー) を用いた。基準液 (30 mM 塩化カリウム、0.3 mM 酒石酸) の3倍希釈液を用いて、2倍希釈した清酒を試料とした。

6. 全ゲノムシーケンス

酵母のゲノムは Gen とるくん™ (酵母用) High Recovery (タカラバイオ) を使用して抽出した。全ゲノムリシーケンスは、ジーンウィズ社に依頼した。

次世代シーケンシングライブラリーの調製は、各サンプルについて、100 ng のゲノム DNA を超音波処理 (Covaris S220) によりランダムに500 bp 以下に断片化した。フラグメントは、エンドプレップ酵素ミックスで処理し、1回の反応で5'リン酸化および dA テーリング、続いて両端へのアダプター付加を行った。VAHTS DNA クリーンビーズを使用し、~470 bp のフラグメント (おおよそのインサートサイズは350 bp) を回収した。次に、P5および P7プライマーを使用して、各サンプルを PCR で増幅した。シーケンスは、2 × 150ペアエンド (PE) 構成を使用して illumina HiSeq/NovaSeq を用いて実施した。

データ解析は以下のソフトを使用した。Cutadapt (V1.9.1) を使用してアダプターのシーケンス、PCR プライマー、塩基配列不明 (N) が10%を超えるリード、およびクオリティ20未満の塩基データを削除した。BWA (V0.7.17) を使用して、クリーンなデータをリファレンスゲノムにマッピングした。マッピング結果は重複を削除するために Picard (V1.119) で処理した。GATK (V3.8.1) ソフトウェアを使用して SNV/InDel を検出した。SNV/InDel のアノテーションは Annovar (V21 Apr2018) により実施した。Breakdancer と CNVnator を使用してゲノム構造変異分析を行った。

実験結果および考察

1. KET002 株およびきょうかい酵母901号を用いた清酒の呈味の比較

(1) 官能試験

先行研究^{3,4)}における官能試験の評価項目は、外見、香り、味、商品化の可能性、総合評価であった。本研究では味認識装置の分析結果との比較のため、味に関する評価項目を印象、甘辛、濃淡の3種類を増やして設定し官能試験を実施した。6名のパネラーによる KET002 株および K901株を用いた清酒の官能試験結果を図1に示す。清酒の印象について、K901株は中庸が、KET002 株は不快が最も多かった。また K901株について甘辛は中庸～薄辛(水っぽい)であり、パネラー全員が淡麗と評価した。KET002 株について甘辛と濃淡はパネラーによるばらつきが大きかったが辛口、中庸から濃醇との評価が最も多かった。総合評価は両者とも中庸の評価が最も多かったが、K901株は良好2名、難0名であるのに対して KET002 株は良好1名、難2名であり、K901株の方が高い評価となった。自由記述では K901株はなめらか、後味が良い、上品(各1名)、KET002 株は酸っぱい(3名)、辛い(1名)という回答であった。以上の結果から、KET002 株を用いた清酒は味の酸っぱさが不快な印象を引き起こしていることが考えられる。

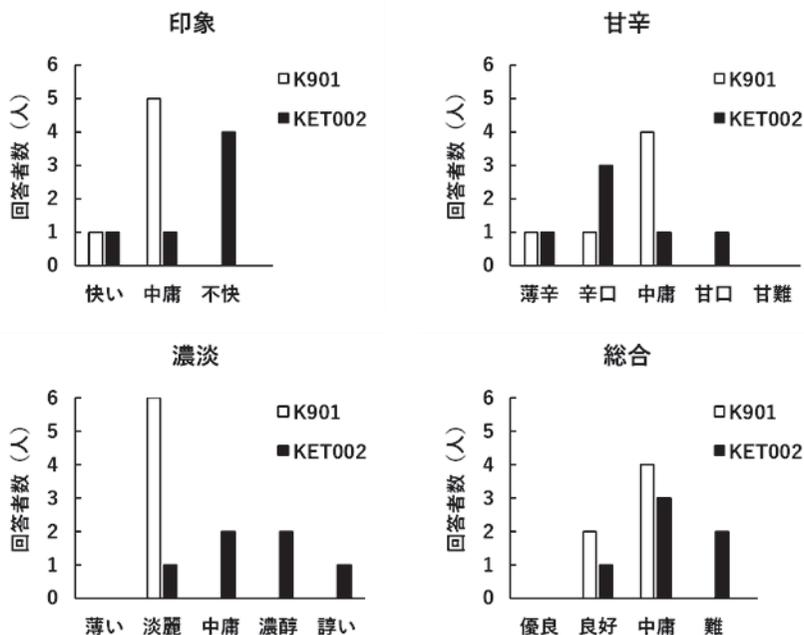


図1 KET002株および K901株を用いた清酒の官能試験結果

(2) 味認識装置による分析

味認識装置による清酒の分析結果を図2に示す。KET002株はK901株より著しく強い酸味を示し、この結果は官能試験結果において酸っぱい、辛いと評価したパネラーが多い(67%)ことと一致した。

塩味については、清酒では有機酸塩による「濃醇感」の評価に活用できる可能性が報告されている⁷⁾。KET002株の方が若干高い数値を示すため濃醇感が高いと考えられ、官能試験結果と一致した。

旨味についてはKET002株の方が低く、旨味コクについてもわずかに低かった。

苦味雑味、渋味刺激、塩味、苦味、渋味についてはほとんど差がなかった。

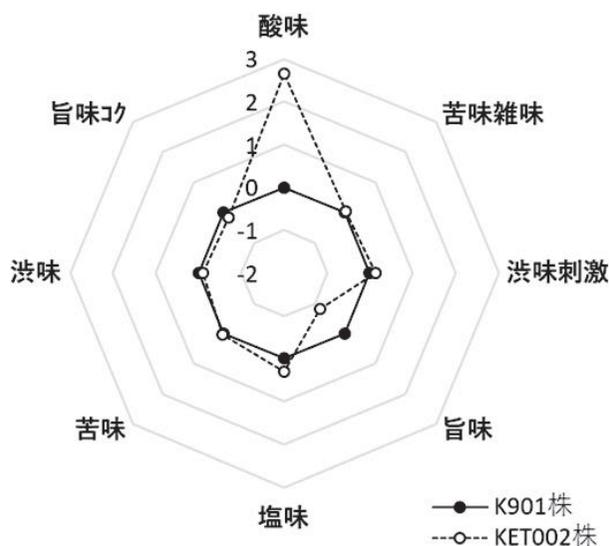


図2 味認識装置による清酒の分析結果
—●— K901株を用いた清酒、---○--- KET002株を用いた清酒

味認識装置では、酸味はクエン酸や酒石酸が呈する酸味を測定し、旨味はアミノ酸、核酸などが呈する旨味を測定していることから、KET002株は有機酸産生量がK901株より著しく多く、アミノ酸、核酸などの旨味成分の生産が少ないと考えられる。KET002株を用いた試醸清酒の成分分析を行った先行研究では、きょうかい9号(K9株)を用いた試醸清酒と比較するとKET002株のコハク酸濃度は1.6倍、アミノ酸度は0.93倍であった⁴⁾ことから、味認識装置の分析結果は成分分析結果とも一致していることが示唆された。

2. KET002株のゲノム解析

KET002株による強い酸味の産生に関与する遺伝子の同定を目的として、きょうかい酵母7号をリファレンス配列としたKET002株の全ゲノムリシーケンス解析を行った。illumina HiSeqリシーケンスシステムにより、平均リード長149.2bp、リード数16,412,306を得、推定ゲノム全長の99.83%をカバーした。

SNP(一塩基多型)とIndel(塩基の挿入または欠損による遺伝的変異)は全ゲノムの2,915ヶ所であり、表1にそれらの突然変異分布を示す。

表1 KET002 株の SNP および Indel 突然変異分布

※1 : 1 kb upstream of one gene while 1 kb downstream of another gene

※2 : 5'UTR region of one gene while 3'UTR region of other gene

Categories	Number of mutation sites
exon region	1,606
intergenic region	211
intron area	20
splicing site	0
exon region, splicing site	0
ncRNA exon region	0
ncRNA intron region	0
ncRNA splicing site	0
3' UTR region of ncRNA	0
5' UTR region of ncRNA	0
1 kb upstream of the gene	469
1 kb downstream of the gene	237
upstream ; downstream ^{※1}	372
3' UTR region of gene	0
5' UTR region of gene	0
UTR5 ; UTR3 ^{※2}	0
Total number of mutation sites	2,915

エキソン領域の SNP は変異部位による機能変化に応じて、アミノ酸が置換する変異（非同義変異、non-synonymous mutation）、アミノ酸が置換しない変異（同義変異 synonymous mutation）、ストップコドンが生じる変異(stop gain mutation)、ストップコドンを失う変異(stop loss mutation) に分類できる。KET002 株の SNP は2,617ヶ所であり、そのうちエキソン領域は1,538ヶ所であった。SNP 型の分類を表2に示す。

表2 KET002 株の SNP 型の分類

Type of SNP	non-synonymous	synonymous	stop gain	stop loss
Number of mutation sites	713	813	10	2

同様にエキソン領域の Indel はフレームシフト (frame shift) 変異の有無によって non-frame shift deletion、frame shift deletion、non-frame shift insertion、frame shift insertion に分類できる。KET002 株の Indel は298ヶ所であり、そのうちエキソン領域は68ヶ所であった。Indel 型の分類を表3に示す。

表3 KET002 株の Indel 型の分類

Type of Indel	non- frame shift deletion	frame shift deletion	non-frame shift insertion	frame shift insertion
Number of mutation sites	19	26	3	20

次に KET002 株において有機酸生成に影響を及ぼす遺伝子の探索を試みた。タンパク質のアミノ酸配列に変異が生じる non-synonymous mutation、stop gain mutation、stop loss mutation、frame shift deletion、frame shift insertion は全ゲノム中に 771ヶ所存在しており、これらの中に有機酸生成に関与する遺伝子が含まれているか解析した。

解糖系関連遺伝子 (*HXK1*、*PGI1*、*PFK1*、*TDH1*、*PGK1*、*GPY1*、*ENO1*、*ENO2*、*PKY2*) については SNP または Indel の変異は認められなかった。糖新生関連遺伝子 (*FBP1*、*ICL1*、*MDH2*、*PCK1*) にも変異は認められなかった。

TCA サイクル関連遺伝子については、クエン酸をイソクエン酸に変換する反応を触媒する酵素アコニターゼをコードしている *ACO2*、フマル酸をリンゴ酸に変換する反応を触媒する酵素フマラーゼをコードしている *FUM1* に SNP が存在した。KET002 株は 2 倍体であるため、2 本の染色体の両方に変異をもつホモ接合型変異と、片方のみ変異を持つヘテロ接合型変異がある。*ACO2* はホモ接合型変異であり、*FUM1* はヘテロ接合型変異であった。

糖トランスポーター関連遺伝子については *HXT6* に 3ヶ所、*HXT4* に 2ヶ所、*HXT5* に 1ヶ所の SNP (すべてヘテロ接合型変異) が存在し、*HXT7* には frame shift insertion (ホモ接合型変異) が存在した。アミノ酸合成経路では、トリプトファン合成に関与する *TRP5* (ヘテロ接合型変異) やロイシン合成に関与する *LEU2* (ホモ接合型変異) に SNP が存在した。

GID (glucose induced degradation deficient) 複合体の構成要素である *VID24* 変異株 (Gly131Arg) と *VID28* 破壊株はリンゴ酸高生産となる報告⁸⁾があるため、GID 複合体を構成する遺伝子群 (*VID24*、*VID30/GID1*、*RMD5/GID2*、*VID28/GID5*、*GID7*、*GID8*、*FYV10/GID9*) について変異の有無を調べた。その結果、*VID28* に SNP (ヘテロ接合型変異) が存在したため、*VID28* の SNP が KET002 株の酸味の強さに寄与している可能性が示唆された。

まとめ

大分県産酵母 KET002 株を用いた清酒は、きょうかい酵母を用いた清酒より官能試験の評価が低かった。そこで味認識装置による分析を行い味覚を数値化して、それぞれの清酒の味を解析した。その結果、KET002 株を用いた清酒は K901 株のものより、酸味が著しく高く、旨味が低いことが明らかになった。その他の味覚項目にはほとんど違いが認められなかったため、総合評価が低い要因は酸味と旨味であることが示唆された。旨味が低いと、味の印象として「酸っぱい」ことしか残らないと推察される。酸味が強いことは KET002 株の大きな特徴であるため、その性質を活かしつつ消費者が不快感を持たない程度に酸味を抑え、さらに旨味を増やすよう菌株の改良を行い、大分県産酵母の品質改良を目指す。

次に KET002 株による強い酸味の産生に関与する遺伝子の同定を目的として、全ゲノム解析を行った。アコニターゼをコードしている *ACO2*、フマラーゼをコードしている *FUM1*、糖トランスポーターである *HXT6*、*HXT4*、*HXT5*、*HXT7*、トリプトファン合成に関与する *TRP5*、ロイシン合成に関与する *LEU2*、GID 複合体の構成要素である *VID28* に変異が存在した。今後、これらの遺伝子破壊株を作成し酸生成量を解析することで遺伝子の同定を行い、KET002 株の改良に役立てていく。

参考文献

1. 中村 俊雅：酒粕からの酒造用酵母の分離に関する研究、2012年度別府大学卒業論文
2. 木村 奨：酒粕由来 DC 染色性分離菌株を用いた15℃での清酒醸造に関する研究、2014年度別府大学卒業論文
3. 小野 浩輝：大分県酒造組合選抜酵母（ハ-4, KET002）の小仕込み製造清酒の清酒酵母協会9号との品質及び特性比較、2016年度別府大学卒業論文
4. 藤原 秀彦ら：大分県酒造組合選抜酵母の小仕込み製造清酒の特性、別府大学大学院紀要, 23, 37-43 (2021)
5. Takeshi Akao et. al. : Whole-Genome Sequencing of Sake Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no.7. *DNA Research*, 18, 423-434 (2011)
6. 赤尾 健：清酒酵母のゲノム解析：その現状と展望、日本醸造協会誌, 107 (6), 366-380 (2012)
7. 豊田健太郎ら：味覚センサーを用いた清酒の後味評価、*J. Brew. Soc. Japan.*, 111 (1), 49-58 (2016)
8. 根来 宏明：有機酸高生産清酒酵母の遺伝子解析とその応用、生物工学会誌, 99 (3), 110-115 (2021)