

## 論文の内容の要旨

論文題目 清酒醸造における酵母のアミノ酸取り込み能に関する研究

氏名 北本勝ひこ

著者らは、気象条件の異なるいくつかの圃場を選定して、原料米の産地および品種がその米質にどの様に影響するかを明かにし、さらに、酒造用原料米としての適性を気象条件から早期に判断する方法の確立を目的として、原料米の分析と小仕込による清酒醸造試験を実施し、統計解析を行った。そのなかで、白米の胚芽残存率が高いものは、製成酒のアミノ酸度が低く、酒質においても味、香りとも良好であるという結果を得た。蛋白含量の多い胚芽が残存した白米を使用した仕込で、製成酒のアミノ酸量が少なくなるという事実は、これまでの清酒醸造で得られている知見では説明できない。そこで、これらの現象を明らかにするため、以下の研究を行った。

第1章では、胚芽単独に添加した仕込を行い、その効果を確認した。胚芽添加により、アミノ酸度、総窒素、 $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$ 、酸度等は胚芽の添加量に応じて減少した。特に、アミノ酸度は対照の約50%となった。各アミノ酸のうち、オルニチン、トリプトファン、プロリンを除いてすべて減

少しだが、顕著な減少を示したアミノ酸の中に高級アルコールの生成に関与するバリン、ロイシン、イソロイシン等のアミノ酸の減少が含まれ、それに相応する高級アルコール等の香気成分の増加が認められた。

胚芽添加時期を変えて仕込を行いその効果を調べたところ、留時に添加のものに比べ、留後5日目添加ではややアミノ酸の減少は悪くなり、10日目添加ではその効果は認められなかったことから、酵母の増殖の盛んな醪前半に胚芽中の有効成分がアミノ酸減少に働いていることが示された。

次に、胚芽中の有効成分をアミノ酸量の減少を指標として調べ、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ 、 $K^+$  の3種が必要であることを明らかにした。

多元配置法により、これら3種の主効果が認められ、その寄与率は $Mg^{2+}$  80.2%、 $PO_4^{3-}$  10.7%および $K^+$  7.5%と計算された。これら3種の添加量の最適組合せは、汲水50ml当り $Mg^{2+}$  0.3 mmol（仕込水に換算すると145.8 ppm）、 $PO_4^{3-}$  0.2~0.4 mmol（同380.0~760.0 ppm）および $K^+$  0.4 mmol（同312.8 ppm）の添加であった。この最適組合せによる添加仕込により得られた製成酒のアミノ酸度は、無添加の対照酒の1.34に対し、0.72と約半分となった。 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ は、酵母のアミノ酸取り込みに対し促進作用を示すが、反対に $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ は阻害作用を示すことを明らかにした。

第2章では、醪仕込時に、胚芽や無機イオン（ $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ ）を添加すると、製成酒のアミノ酸量が対照の約50%に減少する機作を明らかにするために、3本の工場的規模の試験仕込を行い、酵母のアミノ酸取り込み能、酵母菌体内アミノ酸プール、および醪濾液のアミノ酸組成の変化を調べた。醪濾液中のアミノ酸は、対照醪では留仕込後漸増するのに対し、胚芽や無機イオン添加醪では留仕込後5~7日まで減少した後増加した。特にグルタミン酸やアラニンという醪中で酵母に取り込まれにくいといわれているアミノ酸でその差は顕著であり、そのときのアンモニア量は低いレベルで維持されていた。醪中の酵母のアミノ酸取り込み能は、対照醪では留仕込後すぐに漸減するのに対し、胚芽や無機イオン添加醪では高い取り込み能が醪の中期まで続いていた

ことから、これが製成酒のアミノ酸減少の主な原因であると考えた。この時の、醪濾液中および製成酒の無機イオンの変化を調べたところ、酵母のアミノ酸取り込みに有効な $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $PO_4^{3-}$ の3つの無機イオンは対照醪では一時期酵母の増殖に必要であるとされている量以下になるのに対し、胚芽や無機イオン添加醪ではそのレベルは十分であり高く維持された。清酒において、その官能熟度と相関の高いといわれている $Zn^{2+}$ は、 $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $PO_4^{3-}$ 等とは反対に、対照醪より胚芽や無機イオン添加醪で少なくなった。

またこの時の、醪濾液中および製成酒の香気成分の変化と、これらと関連が深いと考えられるアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性についても併せて検討した。酵母によるアミノ酸代謝と関連の深い高級アルコールの生成については、胚芽添加醪で*i*-AmOH（イソアミルアルコール）の生成が多かったが、無機イオン添加は対照醪と大きな差はなかった。*i*-AmOAc（酢酸イソアミル）は胚芽添加は多く、次いで無機イオン添加、対照の順であった。また、官能的に香気特性として重要なE/A比（酢酸イソアミル x 100 / イソアミルアルコール）では、胚芽添加、無機イオン添加が対照酒に比べ、生成酒でそれぞれ1.3、1.2倍となった。

*i*-AmOAcの生成に関与しているといわれているアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の変化は、留仕込後に減少し醪末期に再上昇したが、*i*-AmOAc量の生成パターンと見かけ上相関はなかった。

清酒醸造では、原料から由来するアミノ酸が酵母により取り込まれ、種々の代謝産物が生産される。これらの代謝産物は最終製品である清酒の香味成分として重要である。

第3章では、これらの現象の基礎的研究として、遺伝解析の可能な実験室株 (*S. cerevisiae* haploid 株) を用いて、細胞内アミノ酸分布とその動態について調べた。まず、酵母、*S. cerevisiae* の細胞を低濃度の $Cu^{2+}$ 処理により細胞膜のみを選択的に透過性にするることにより細胞質および液胞内アミノ酸プールを簡易に測定する方法を設定した。この分別定量法を用いて種々のアミノ酸を添加したYNBD培地で生育した細胞中のアミノ酸プールの分析を行っ

た。10mMのアルギニンを追加した場合、液胞内に約430mMという高濃度のアルギニンが蓄積された。この液胞内アルギニンは窒素飢餓時にN源として利用された。この時、液胞から細胞質に移動するアルギニンに対して、その反対に細胞質から液胞にK<sup>+</sup>が流入するのが認められた。液胞は、アミノ酸等種々の代謝産物の貯蔵庫として働いており、アミノ酸代謝や浸透圧調整に重要な役割を果たしていると考えられているが、これらの働きを調べるのに本法は有効であることを示した。この方法は代表的な清酒酵母である協会7号、協会9号等でも適用可能であり、清酒醪中の酵母細胞内アミノ酸プールの解析に有効であると思われる。

次に、液胞内アミノ酸プールの変化した変異株の単離を試みた。リジンまたは、そのアナログであるAEC（アミノエチルシステイン）に高感受性となった変異株を単離し、その細胞内アミノ酸プールの測定結果から細胞質内アミノ酸組成に変化がなく液胞内リジンプールが小さくなった変異株を4株選定した。KL97株 (lys1 slp1-1) と戻し交配により栄養要求性をなくした KL197-1A株 (slp1-1) は、10mMリジンを添加したYNBD培地で生育が著しく不良であった。KL97株は次のような多面発現を示した。1) 液胞内リジン、ヒスチジン、アルギニンのプールは同時に低下していた。2) 高濃度リジン、ヒスチジン、Ca<sup>2+</sup>、重金属イオン、抗生物質等に高感受性を示した。3) 細胞内に通常見られる大きな液胞は認められず、代わりに多数の小胞が存在した。4) 液胞膜のマーカー酵素である $\alpha$ -mannosidase活性には変化はなかったが、液胞内酵素であるproteinase A、proteinase B、carboxypeptidase Yの活性は低下していた。これらの結果から、slp1-1変異株は液胞形成の初期過程に欠損があり、そのため液胞内リジンプールが低下したものと推定された。そこで、YCpG11を用いた yeast gene library から、この遺伝子をクローニングした (pYKK100)。クローン化されたDNA断片の大きさは制限酵素地図の作成から7.7Kbであった。組み込み型ベクターを用いた解析から、クローン化した遺伝子は SLP1 であることを確認した。

清酒醸造における酵母液胞の役割を明らかにすることを目的として、正常な

液胞形成ができないために液胞生理機能の欠損した変異株 (slp1-1変異株) を用いて清酒醸造を行った。予期したように、slp1-1変異株は野生型株に比べ、醪中の増殖が弱くアルコールの生成も低かった。YEPD培地での予備的試験の結果、高い糖濃度、乳酸酸性で slp1-1 変異株の生育が野生型株に比べ低下した。このように、酵母液胞は、アミノ酸の取り込み、貯蔵に関与しているばかりでなく、清酒醪での過酷な条件下で耐糖性や耐酸性等の重要な働きをしていることが示唆された。

清酒醸造における酵母のアミノ酸  
取り込み能に関する研究

北本勝ひこ

Study on the Amino Acid Uptake by Yeast Cells  
in Sake Brewing

Katsuhiko Kitamoto

## 目 次

緒 言		----- 1
第 1 章	胚芽添加によるアミノ酸の少ない清酒の製造	----- 3
1.	胚芽添加仕込みによる清酒醸造	3
2.	胚芽添加時期の製成酒に及ぼす影響	14
3.	アミノ酸減少に関与する胚芽中の有効成分	18
第 2 章	清酒醪における酵母のアミノ酸取り込み能の変化と 酵母菌体内外のアミノ酸	----- 29
1.	胚芽、無機イオン添加仕込醪における酵母のアミノ 酸取り込み能の変化と菌体内外のアミノ酸	29
2.	胚芽、無機イオン添加仕込醪における無機イオンの 変化	41
3.	清酒醪中の香気成分生成に及ぼす胚芽、無機イオン 添加の影響	48
第 3 章	酵母細胞内アミノ酸の動態について	----- 57
1.	酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 細胞における細 胞質と液胞内アミノ酸プールの分別定量法	57
2.	液胞内アミノ酸プールの変化した変異株 ( <u>s l p 1</u> ) の単離とその性質	74
3.	<u>S L P 1</u> 遺伝子のクローニング	90
4.	<u>s l p 1</u> 変異株による清酒醸造	95
結 言		----- 105
研究論文総覧		----- 112
謝 辞		----- 118



## 結 言

清酒中のアミノ酸は、清酒に旨味、濃醇さを与える主たる成分であるが、多すぎると雑味として感じられ、貯蔵中に着色を進め、香味を劣化させる。近年、消費者の嗜好は清酒においても軽快さを求める傾向にありアミノ酸の少ない清酒が望まれている。

アミノ酸の少ない清酒の製造法としては、大きく分けて二つの方法がある。すなわち、1) 原料(白米および米麴)中のタンパク量を少なくするか、白米中のタンパクを変性させることによりアミノ酸生成を減少させる方法、および 2) 醪中のプロテアーゼ、ペプチダーゼ力価を下げることにより生成するアミノ酸を減少させる方法である。いずれも醪中で生成されるアミノ酸量を少なくすることにより製成酒のアミノ酸量を減少させようとするものである。

1)の方法としては、高精白米の使用、 $\alpha$ 化した白米の使用、加圧下に白米を蒸きょうする方法が、2)の方法としては、麴の代わりに酵素剤を使用する方法が知られている。精米歩合50%という高精白米とハゼ廻りを抑えた麴を用いて、かつ低温で発酵させる、いわゆる吟醸酒の製造方法は両者の方法を併用しているといえよう。

本論文では、タンパク含量の多い胚芽の残存する白米を原料とした清酒中ではアミノ酸量が少なくなるという、一見矛盾した統計解析結果を検証するため、数多くの清酒小仕込試験を行い検討した結果について述べる。第1章では、胚芽単独の添加仕込を行ない、胚芽の添加量に応じてアミノ酸量の少ない清酒ができること、そしてその胚芽中の有効成分は、 $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、および  $PO_4^{3-}$ であること、第2章では、工場的規模の仕込試験を行い、そのアミノ酸減少が酵

母による多量のアミノ酸取り込みの結果であること、その時の醪中の酵母のアミノ酸取り込み能の変化、酵母菌体内外のアミノ酸組成等を解析した結果について述べる。これまで、清酒中のアミノ酸については、白米、麴、酵母等による生成という観点からのみ論議されてきたが、酵母によるアミノ酸の取り込みという「消費」の観点からの研究は初めてである。第3章では、これらの基礎的研究として主に実験室株を用いた酵母細胞内のアミノ酸分布とその動態について解析した結果について述べる。

## 第1章 胚芽添加によるアミノ酸の少ない清酒の製造

### 1. 胚芽添加仕込みによる清酒醸造

清酒醸造において、原料米の精白度を高くするほど良質の清酒ができることが経験的に知られている。胚芽や玄米外層部には、タンパク質、脂質、灰分等が多く、これらが製成酒の着色、雑味成分となり酒質を劣化させるので、精米によってこれら有害成分を除去する必要がある<sup>1)</sup>、とされている。

しかし、著者らは種々の品種、産地の白米（精米歩合75%）の一般分析値と、それらを原料とした小仕込により得た製成酒の成分との相関関係を調べ、白米の胚芽残存率が高いものは製成酒のアミノ酸度が低く、酒質においても味、香りとも良好であるという結果を得た<sup>2)</sup>。特に、胚芽残存率とアミノ酸度とは  $r = -0.907 (n = 12)$  と危険率1%で有意な相関であった。

タンパク含量の多い胚芽が残存した白米を使用した仕込では、製成酒のアミノ酸量が少なくなるという事実は、これまでの知見では説明できない。そこで、統計的に得られた結果を確認するため、胚芽を単独に添加した仕込を行い、胚芽の及ぼす影響について検討した。

### 実験方法

#### 使用白米および胚芽

白米は胚芽が完全に除去される精米歩合70%の日本晴を、胚芽は精米時に生じたヌカから32メッシュのふるいで分離したものを

使用した。また、脱脂胚芽は分離した胚芽をジエチルエーテルにより脱脂、調製した。

### 仕込方法

Table 1 に示した仕込配合により、総米 200 g の小仕込<sup>3)</sup>、および通常の

清酒醸造法

による総米

100 Kg

の試験仕込

を行った。

胚芽は、留

仕込時に白

米と同様に

蒸きょう後

添加した。

使用酵母お

よび酒母

総米 200 g の小仕込には、協会 701 号酵母を用いた酵母仕込により、総米 100 Kg の試験仕込には、協会 7 号酵母を用いた普通速醸酒母を使用した。

### 醪および製成酒の分析

1) 一般分析: 200 g の小仕込酒のアルコール分はガスクロマトグラフにより分析したが、それ以外は国税庁所定分析法<sup>4)</sup>によった。

**Table 1.** Proportion of raw materials for pilot scale brewing.

(A)

	mizu- koji	1st addn.	2nd addn.	3rd addn.	total
total amount of rice (g)	10	25	65	100	200
rice for steaming (g)	—	25	55	80	160
rice for koji (g)	10	—	10	20	40
water (ml)	55	—	75	130	260
temperature (°C)	15	15	9	7	

(B)

	secd mash	1st addn.	2nd addn.	3rd addn.	total
total amount of rice (kg)	7	14	26	53	100
rice for steaming (kg)	4	10	20	43	77
rice for koji (kg)	3	4	6	10	23
water (l)	8	14	36	72	130

3.5 kg of defatted rice germ was added at 3rd addition.

- 2) 官能検査: 200gの小仕込酒は、パネル4~6名で3点法(1:良、2:普通、3:不良)で、100kg仕込酒はパネル20名で5点法によりアンバーグラスを用いてきき酒を行った。
- 3) 全窒素: ケルホス自動分析装置16210型により測定した。
- 4) アミノ酸量: 1%スルホサリチル酸存在下で30℃、15分振とうし、遠心分離後、除タンパクされた上清を日立835型アミノ酸アナライザーで測定した。
- 5) 香気成分: 吉沢のヘッドスペース法<sup>5)</sup>、または菅間らの直接法<sup>6)</sup>によるガスクロマトグラフィーにより測定した。
- 6) その他: 有機酸は有機酸分析計S303(盛進製薬株式会社)により、金属は原子吸光法<sup>7)</sup>により測定した。

## 実験結果

### 製成酒に及ぼす胚芽の効果

胚芽無添加、および胚芽を0.5g、1.5g、5.0g、10.0g、または20.0g添加した総米200gの小仕込を行い、胚芽の影響を検討した。胚芽の効果が明確に出るように単独に多量に添加したが、白米200gに相当する玄米に含まれる胚芽量は、およそ5gと計算される。

得られた製成酒の一般分析値、アミノ酸組成、香気成分、有機酸組成、金属含量の結果をTable 2、3、4、5 および 6 に示す。

アミノ酸度、総窒素、OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>、酸度等は胚芽添加量が10.0gまでは、その添加量に応じてほぼ直線的に減少し胚芽の効果が明確に示された(Table 2)。官能検査の結果は、味に関

Table 2. General components of sake brewed by rice germ addition.

	control	0.5g added	1.5g added	5.0g added	10.0g added	20.0g added
sake meter	-9.8	+12.0	+12.5	+13.5	+16.2	+12.8
alcohol content (%)	14.5	16.6	15.9	15.6	16.7	16.4
extract	6.74	3.37	3.10	2.84	2.64	3.17
reducing sugar (%)	2.81	0.61	0.57	0.35	0.20	0.31
acidity	3.35	2.75	2.60	2.30	2.06	2.32
amino acidity	2.20	2.09	1.90	1.62	1.25	1.54
OD at 260 nm	13.68	11.88	12.16	11.04	9.50	11.30
OD at 260 nm	15.52	14.70	14.84	13.04	11.52	14.41
OD at 430 nm	0.039	0.038	0.039	0.049	0.064	0.074
pH	4.16	4.33	4.23	4.37	4.54	4.72
alkaline buffer action	4.25	3.65	3.85	2.90	2.85	3.40
color increase by storage	0.024	0.020	0.017	0.016	0.017	0.033
sake cake yield (%)	37.6	25.9	29.2	27.4	30.4	31.6
sensory test (odor)	1.75	1.75	2.25	2.00	2.50	2.50
sensory test (taste)	2.75	2.00	2.25	1.50	1.25	1.75
peptide content (mg/g)	4960	5903	4198	2938	2014	1852
total nitrogen (N%)	0.17	0.150	0.139	0.106	0.078	0.085

Table 3 Amino acid composition of sake brewed by rice germ addition.

	control		0.5g added		1.5g added		5.0g added		10.0g added		20.0g added	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Asp	89.8	2.5	83.6	2.6	74.2	2.6	60.2	2.5	42.8	2.4	60.6	2.7
Thr	230.5	6.5	230.3	7.2	213.4	7.5	199.3	8.1	126.8	7.1	161.0	7.3
Ser	132.5	3.7	120.5	3.7	111.0	3.9	89.9	3.8	57.6	3.2	74.7	3.4
Glu	357.7	8.7	290.4	9.1	262.2	9.2	230.2	9.8	160.6	9.1	255.3	11.6
Gly	127.7	3.6	126.1	3.9	117.8	4.1	105.2	4.4	94.5	5.3	123.4	5.6
Ala	297.6	8.5	294.9	9.2	202.0	7.1	163.9	6.9	152.8	8.6	206.9	9.4
Cys	100.1	2.8	101.9	3.2	77.0	2.7	60.0	2.5	40.6	2.3	48.2	2.2
Val	182.0	5.2	152.9	4.8	137.9	4.8	104.9	4.4	67.6	3.8	78.7	3.5
Met	34.0	0.9	31.3	0.9	23.5	0.8	15.3	0.6	7.5	0.4	14.5	0.6
Ile	79.0	2.2	68.8	2.1	62.7	2.2	49.3	2.1	32.2	1.8	35.1	1.6
Leu	260.2	7.4	234.6	7.3	217.7	7.4	171.2	7.2	115.4	6.5	130.1	5.9
Tyr	193.1	5.5	153.1	4.8	142.8	5.0	101.9	4.3	70.7	4.0	70.2	3.2
Phe	129.7	3.7	110.4	3.4	101.5	3.5	81.2	3.4	57.3	3.2	18.9	3.1
<i>l</i> -ABA	29.1	0.8	24.5	0.7	22.9	0.8	14.7	0.6	7.9	0.4	12.9	0.5
Orn	15.0	0.4	31.5	7.9	32.1	1.1	34.1	1.4	21.5	1.2	39.1	1.7
Lys	137.1	3.9	134.6	4.2	134.7	4.7	109.2	4.6	79.2	4.4	102.9	4.6
EtOHNH <sub>2</sub>	80.1	2.2	78.1	2.4	75.9	2.6	65.5	2.7	62.4	3.5	71.7	3.2
NH <sub>2</sub>	17.5	0.5	17.2	0.5	9.1	0.3	9.6	0.4	15.2	0.8	16.6	0.7
His	54.7	1.5	55.3	1.7	55.5	1.9	55.4	2.3	39.4	2.2	50.3	2.2
Trp	1.3	0.0	1.7	0.0	1.7	0.0	1.7	0.0	1.7	0.1	5.5	0.2
Arg	826.3	23.6	668.9	21.0	621.6	21.8	435.2	18.5	336.0	19.0	329.1	15.0
Pro	176.4	5.0	164.7	5.1	155.0	5.4	189.4	8.0	175.1	9.9	238.4	10.8
Total	3501.4		3175.3		2845.2		2347.3		1764.8		2194.0	

しては胚芽添加仕込酒は雑味の少ない、淡れいな酒質と評価された。

香りについては、又カ臭が感じられ評点は悪くなったが、華やかな

エステル臭

も感じられ

た。

各アミノ

酸について

は、プロリ

Table 4. Aroma components of sake brewed by rice germ addition.

(ppm)

	control	0.5g added	1.5g added	5.0g added	10.0g added	20.0g added
CH <sub>3</sub> CHO	17.4	15.8	18.8	18.4	19.8	8.7
EtOAC	57.3	79.6	76.2	85.4	101.8	87.8
<i>n</i> -PrOH	26.7	37.4	33.1	30.7	27.6	39.6
<i>i</i> -BuOH	48.5	29.0	34.0	38.3	78.0	80.6
<i>i</i> -AmOH	112.9	124.4	120.7	147.2	211.8	243.8

ン、オルニチン、トリプトファンを除いて、胚芽添加により減少した (Table 3、Fig 1)。醸造物の発酵では、高級アルコールの生成に Ehrlich 経路 ( $R-CHNH_2COOH \rightarrow R-CO-COOH \rightarrow R-CHO \rightarrow R-CH_2OH$ ) に関連した制御機構が重要な役割を果たしていることが示されている<sup>8~10)</sup>が、これに関連のあるバリン、ロイシン、イソロイシン等のアミノ酸もよく減少した。

これは生成され  
た高級アルコー  
ルの分析結果 (Table 4) から  
も確認された。  
すなわち、i-B  
uOH、i-A  
m  
OHは胚芽添加  
量に応じて増加  
し、胚芽10.0  
g添加で、それ  
ぞれ78.0 p  
pm、211.8 ppmと無添加のものに比べ約2倍となった。こ  
のことは製成酒のアミノ酸度の減少は、多量のアミノ酸が酵母によ  
り取り込まれるためであることを示唆している。

**Table 5. Organic acid composition of sake brewed by rice germ addition. (mg/l)**

	control	0.5g added	1.5g added	5.0g added	10.0g added	20.0g added
Lactic acid	506.7	475.0	479.5	454.3	396.9	420.2
Acetic acid	476.8	371.8	250.1	129.2	115.9	133.7
Pyruvic acid	214.5	17.4	45.3	15.7	8.7	8.7
Malic acid	416.4	415.3	436.1	397.8	243.7	278.7
Citric acid	74.0	39.0	31.2	74.0	74.0	85.7
Succinic acid	588.4	698.8	706.1	660.0	659.9	662.0
Total	2276.8	2017.3	1948.3	1731.0	1499.1	1589.0

**Table 6. Cation contents of sake brewed by rice germ addition. (ppm)**

	control	0.5g added	1.5g added	5.0g added	10.0g added	20.0g added
Na	11.3	8.5	7.7	7.7	12.6	69.6
K	31.1	43.4	29.5	49.3	73.1	123.9
Ca	50.6	50.5	62.6	71.8	70.0	94.1
Mg	6.7	9.3	17.9	30.9	52.5	89.8
Mn	2.2	2.2	2.3	2.9	3.9	5.4
Zn	2.0	1.7	1.8	1.2	1.1	2.1
Fe	0.32	0.36	0.42	0.60	0.86	0.96
Cu	0.10	0.14	0.08	0.10	0.10	0.20

有機酸は、胚芽添加によりコハク酸のみがやや増加したのに対し、他の有機酸はすべて減少した。なかでも、清酒にとって好ましくない酢酸、ピルビン酸の減少が顕著であった (Table 5)。

胚芽中には、  
白米と比べ多量  
の金属を含むが、  
胚芽添加仕込酒  
中の含量はK、  
Mg、Mn、Fe  
において増加  
し、Na、Cu  
はほぼ同じであ  
り、Znは減少  
した (Table 6)。

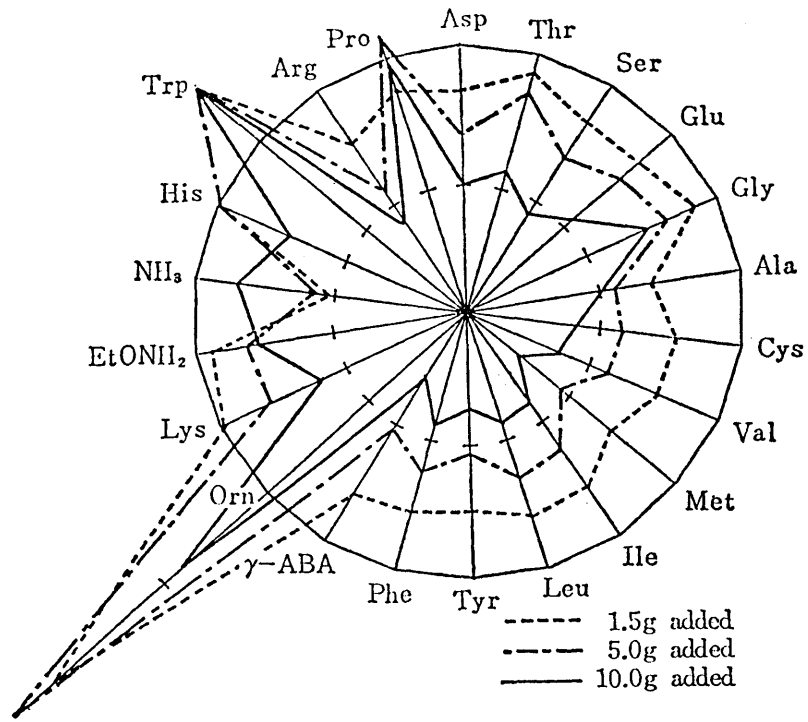


Fig. 1. Amino acid ratio of sake brewed by rice germ addition to the control.

総米200gの小仕込において、胚芽10g添加、および対照として無添加の仕込を独立に4回行い、胚芽の効果の再現性を調べた。醪日数は17~20日としたが、仕込No3は同時に上槽し醪日数を同じとしたもの、No4は対照醪の日数を長くすることにより日本酒度をほぼ同じにした仕込である。製成酒の一般分析値はTable 7に

Table 7. General components of sake brewed by rice germ addition.

	brew. -1		brew. -2		brew. -3		brew. -4	
	cont.	added	cont.	added	cont.	added	cont.	added
sake meter	+3.5	+15.0	+3.5	+12.5	-4.0	+9.0	+10.5	+12.0
alcohol (%)	16.5	17.2	16.9	18.3	15.8	17.7	17.5	17.2
acidity	2.34	2.00	2.81	2.81	3.20	2.71	2.00	1.90
amino acidity	2.05	0.98	2.07	1.03	2.21	1.33	2.00	0.90
OD at 280 nm	9.70	8.93	10.90	9.78	10.96	10.50	9.12	7.67
OD at 260 nm	11.63	10.31	12.46	11.00	13.04	11.94	10.87	9.34

Table 8. Analytical data for sake brewed by rice germ addition.

	sake meter	alcohol (%)	acidity	amino acidity	OD <sup>280</sup>	sensory test		
						odor	taste	total
control	-5.0	17.6	2.75	2.05	11.10	2.75	3.10	2.95
rice germ added	+2.0	17.2	2.15	0.90	8.10	2.10	2.30	2.22



示したように、アミノ酸度、酸度、 $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$ の値は胚芽添加により、どの仕込でも同様に減少し、それぞれ平均値で51%（対照2.08、胚芽添加1.06）、84%（対照2.61、胚芽添加2.20）、89%（対照12.00、胚芽添加10.65）、91%（対照10.17、胚芽添加9.22）に減少した。

### 胚芽添加仕込試験

これまで、総米200gの小仕込により胚芽の効果を調べたが、通常の清酒醸造法に従い総米100kgの工場的試験仕込を行い、醪中の経時的変化を調べた。なお、3.5kgの脱脂胚芽（約4.4kgの無処理胚芽に相当）を留仕込時に蒸きょうし添加した。

一般分析値およびきき酒結果はTable 8に示すように小仕込試験で得られた結果と同様にアミノ酸度が約半分に減少した。脱脂胚芽を用いて香りの改善を試みたが、脱脂処理が不完全であったためか、完全にヌカ臭を除去することはできなかった。

香気成分、有機酸組成、アミノ酸組成について  
は、工場的規模での仕込試験に

Table 9. Aroma components of sake brewed by rice germ addition. (ppm)

	CH <sub>3</sub> CHO	EtOAC	<i>i</i> -BuOH	<i>i</i> -AmOH	<i>i</i> -AmOAC
control	52.9	156.0	30.5	187.7	5.1
rice germ added	33.1	187.8	58.0	275.4	7.1

Table 10. Organic acid composition of sake brewed by rice germ addition.

	mg/l (%)						
	Lactic acid	Acetic acid	Pyruvic acid	Malic acid	Citric acid	Succinic acid	Total
control	396 (21.6)	151 (8.5)	175 (9.8)	368 (20.6)	77 (4.3)	629 (35.2)	1786 (100.0)
rice germ added	311 (20.9)	23 (1.5)	71 (4.8)	359 (24.1)	71 (4.8)	655 (44.0)	1490 (100.0)

おいても、200gの小仕込で得られた結果と同様に、香氣成分の増加、酢酸およびピルビン酸の減少、プロリンを含む全てのアミノ酸の減少が認められ、胚芽の効果が確認された。(Table 9、10、11)

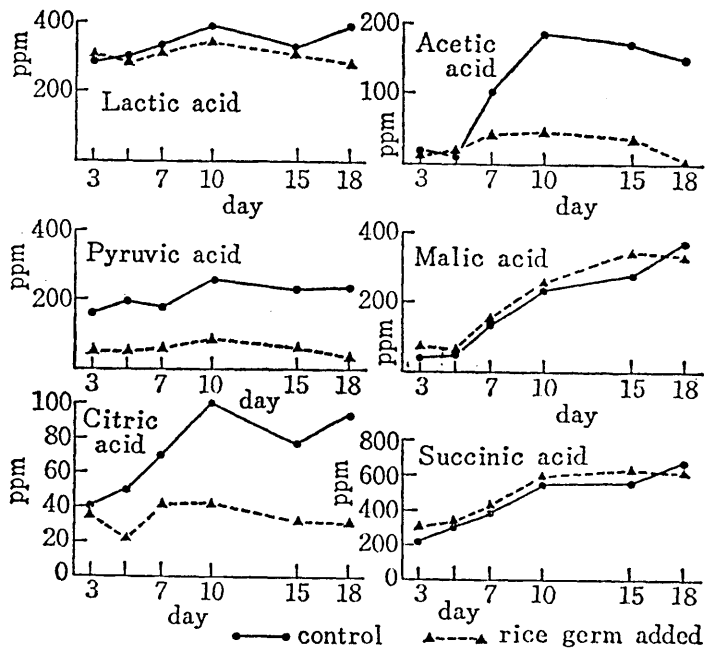


Fig. 2. Changes in organic acid contents during moromi fermentation.

Fig. 2 に有機酸の醪中の経時的変化を示す。

Table 11. Amino acid composition

乳酸、リンゴ酸、コハク酸は対照醪と差は認められなかったが、酢酸、ピルビン酸は胚芽添加醪では常に低レベルで推移していた。クエン酸も同様の傾向を示した。

これらの結果は、胚芽添加により酵母の有機酸代謝に関して大きな影響を及ぼしていることを示唆しているが、

	control		rice germ added	
	mg/l	%	mg/l	%
Asp	72.9	3.0	21.3	2.6
Thr	194.2	7.9	52.1	6.3
Ser	96.4	3.9	18.6	2.2
Glu	223.8	9.1	88.6	10.7
Gly	153.1	6.2	75.6	9.1
Ala	223.7	9.1	83.2	10.1
Cys	99.0	4.0	25.1	3.0
Val	136.5	5.6	43.9	5.3
Met	22.5	0.9	2.3	0.3
Ile	76.9	3.1	19.2	2.3
Leu	189.3	7.7	59.9	7.2
Tyr	134.7	5.5	40.4	4.9
Phe	88.9	3.6	20.4	2.5
r-ABA	75.6	3.1	0.9	0.1
Orn	7.8	0.3	0.0	0.0
Lys	106.4	4.3	59.8	7.2
EtOHNH <sub>2</sub>	69.5	2.8	63.8	7.6
NH <sub>3</sub>	13.1	0.5	1.7	0.2
His	49.8	2.0	27.1	3.3
Trp	3.4	0.1	0.0	0.0
Arg	372.6	15.2	91.3	11.0
Pro	45.3	1.8	33.4	4.0
Total	2455.1	100	827.7	100

その機作については不明である。有機酸は、アミノ酸と異なり、量的に多いコハク酸、乳酸、リンゴ酸は減少せず量的に少ない酢酸、ピルビン酸、クエン酸が減少することから、有機酸全体を示す酸度はアミノ酸度の減少ほど大きな変化を示さないと考えられる。

## 考 察

タンパク含量の多い胚芽の残存率が高い白米を用いた仕込で得られた清酒はアミノ酸度が低いという、一見矛盾した相関関係を検定するために、胚芽を段階的に添加した小仕込を行った。その結果、0 g から 10 g までの胚芽添加仕込では製成酒中のアミノ酸量はその添加量に応じて直線的に減少し、この相関関係が偽相関ではないことが示された。

この胚芽添加の効果は、アミノ酸量の減少のほか、総窒素、OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>、酸度においても減少が認められた。

また、アミノ酸のうちバリン、ロイシン、イソロイシン等の減少が顕著であり、これらから酵母により生合成される高級アルコールが大幅に増加したことから、製成酒のアミノ酸が減少するのは、酵母によるアミノ酸の取り込みが活発となるためと考えられた。

## 要 約

白米の胚芽残存率と、それを用いて仕込んだ清酒のアミノ酸度との間に、高度な負の相関が認められたので、それを確認するために胚芽を単独に添加した仕込を行い、その効果を確認した。

胚芽添加仕込により得られた清酒は、次のような成分的特徴を持

っていた。

1. アミノ酸度、総窒素、 $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$ 、酸度等は胚芽の添加量に応じて減少した。特に、アミノ酸度は対照の約50%まで減少した。

2. 各アミノ酸のうち、オルニチン、トリプトファン、プロリンを除いてすべて減少したが、顕著な減少を示したアミノ酸の中には高級アルコールの生成に関与するバリン、ロイシン、イソロイシン等のアミノ酸が含まれ、また、それに相応する高級アルコールの増加がみられた。

3. 有機酸のうち、清酒にとって好ましくない酢酸、ピルビン酸の顕著な減少を認めた。

## 文 献

- 1) 難波、百瀬、大場 編：清酒製造技術、p 70 日本醸造協会（1979）
- 2) 高橋、北本、戸塚、吉沢、中村、大橋、庭山：醸協 79、307（1984）
- 3) 難波、小幡、萱島、山崎、村上、下田：醸協 73、295（1978）
- 4) 日本醸造協会編：国税庁所定分析法注解、日本醸造協会（1974）
- 5) 吉沢：醸協 68、59（1973）
- 6) 菅間、西谷、岡崎、大塚：醸試報 150、10（1978）
- 7) 戸塚、泉谷、難波、小武山：醸酵工学 49、457（19

7 1 )

8 ) 吉沢：醸協 6 1、4 8 1 ( 1 9 6 6 )

9 ) 大内、高岸、山本、秋山：醸酵工学 5 9、9 ( 1 9 8 1 )

1 0 ) K. Ouchi, Y. Yamamoto, M. Takagisi, H. Akiyama: J. Fer-  
ment. Technol., 58、301 (1980)

## 2. 胚芽添加時期の製成酒に及ぼす影響

前節で、留仕込時に胚芽を添加することにより製成酒のアミノ酸度を対照酒の約半分とすることができることを述べた。本節では、胚芽添加時期を変えて小仕込を行い、製成酒に対する影響を調べた。

### 実験方法

#### 仕込方法

総米200gの小仕込を5本行った。そのうちわけは、No1：通常の仕込配合による対照醪、No2：留仕込時に10gの胚芽を添加、No3：留仕込後5日目に10gの胚芽を添加、No4：留仕込後10日目に10gの胚芽を添加、No5：留仕込時に10gの胚芽をガーゼに包んで添加し、8日目に取り除いた。なお、No1～No4までの4本は同時に仕込んだが、No5は、同じ仕込配合、同じ原料であるが別に仕込んだ。このときの、対照仕込の結果は示さないが、No1とほぼ同様の分析値が得られた。

### 実験結果と考察

#### 製成酒の一般分析

Table1に示すように、アミノ酸度は、留仕込時に胚芽を添加したものが対照の2.21に比べ1.23と約半分となり、5日目添加では1.48と減少がやや悪くなり、10日目添加では2.36と添加効果はなくなった。酸度、OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>でも同様の傾向を示しており、留仕込後5日目まで胚芽が存在することが重要であると考

えられた。

### 有機酸

Table 2 に示すように、留仕込時に胚芽を添加したものはコハク酸を除いて少なくなり、特に酢酸の減少が著しいが、留仕込後5日目以後の添加では胚芽の効果は認められなかった。

Table 1 General components of sake

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
sake meter	-4.0	+9.0	+8.0	0.0	+13.5
alcohol content(%)	15.8	17.7	16.7	16.0	17.8
reduced sugar	2.54	1.19	1.20	1.85	0.41
acidity	3.20	2.71	2.66	3.25	1.90
amino acidity	2.21	1.23	1.48	2.36	0.75
OD at 280 nm	10.96	10.50	10.74	12.96	7.35
OD at 260 nm	13.04	11.94	12.96	15.30	9.42
color(OD at 530nm)	0.039	0.089	0.076	0.096	0.036

Table 2 Oraganic acid composition of sake

(ppm)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
lactic acid	351	269	341	357	293
acetic acid	719	177	507	602	145
pyruvic acid	62	51	51	51	30
malic acid	238	215	240	284	279
succinic acid	545	735	643	650	592
total	1915	1447	1782	1893	1339

Table 3 Metal ion contents of sake

(ppm)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
Na	9.8	10.5	11.9	16.3	10.2
K	19.6	36.6	504	666	64.4
Mg	9.3	100	96	106	64.9
Ca	29.6	27.4	28.4	29.2	30.3
Mn	2.13	4.09	4.78	4.34	3.7
Zn	0.54	0.37	0.79	1.74	0.27
Fe	0.10	0.42	0.63	0.68	0.08
Cu	0.08	0.11	0.18	0.14	0.13

### 金属

Table 3 に示すように、留仕込時に胚芽を添加したものは、K、

Mg、Fe等で対照酒より高い値を示すがCa、Znは少なくなつた。一方、5日目以後に添加したものでは、Caを除いてすべて増加した。これらの金属が留仕込後5日目までは酵母により取り込まれることを示唆している。

### 香気成分

Table 4 に示すように、清酒の香気成分として重要な *i*-AmOH (イソアミルアルコール) および *i*-AmOAc (酢酸イソアミル) の生成からも胚芽添加時期の影響が認められた。

胚芽添加時期を変えた仕込から、胚芽添加が醪中の酵母に与える影響は、留仕込直後から5日目までが主であり、10日目頃には少なくなると推定された。

Table 4 Aroma components of sake (ppm)

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
<i>i</i> -BuOH	35	86	111	65	72
<i>i</i> -AmOH (A)	94	194	142	132	180
<i>i</i> -AmOAc (E)	1.8	4.0	3.8	1.8	4.2
E/A (x 100)	1.91	2.06	2.68	1.36	2.33

このことから、留仕込時に胚芽を添加し、8日目にそれを取り除いても、ほぼ同じアミノ酸の少ない清酒が得られると考えられるが、実際、胚芽をガーゼに包んで留め仕込時に添加し8日目に除いた仕込 (No.5) では、アミノ酸量が少なく着色度の低い清酒が得られた。



## 要 約

留仕込時に胚芽を添加することにより、製成酒のアミノ酸を対照酒の約半分とすることが可能であるが、胚芽添加時期を変えて仕込を行い、その影響を調べた。留時に添加のものに比べ、留後5日目添加ではアミノ酸の減少効果はやや低下し、10日目添加ではその効果は認められなかった。このことから酵母の増殖の盛んな醪前半に胚芽中の有効成分がアミノ酸減少に働いていることが示唆された。

### 3. アミノ酸減少に関与する胚芽中の有効成分

前節で、胚芽添加仕込を行った清酒では、通常の仕込酒と比べ、アミノ酸量が約50%に減少し、i - A m O H、i - A m O A c等の香気成分が約2倍に増加することを述べた。

予備実験の結果、胚芽を灰化したものを用いた小仕込でも、アミノ酸の少ない清酒が得られたので、胚芽灰化物中の無機成分から清酒醪中のアミノ酸減少に関与する有効成分の検討を行った。さらに、各種無機イオンを添加した場合の酵母のアミノ酸取り込み量の変化から、アミノ酸減少に必要な無機イオンの量とその最適組み合わせについて検討した。

さらに、得られた最適組み合わせによる総米200gの小仕込試験を行い、胚芽添加仕込酒と成分の比較を行った。

### 実験方法

#### 胚芽中の有効成分の検索

次の2種類の方法を用いた。1) Fig. 1に示すように10種類のアミノ酸 (G l u, G l y, A l a, V a l, M e t, I l e, L e u, P r o) を添加した

*S. cerevisiae* (Kyokai-7) was preincubated in YM medium at 30°C, for 2 days

↓  
Harvested by centrifugation and washed with water 2 times

↓  
200  $\mu$ l of cell suspension was inoculated to 10 ml of YNB medium containing 10 kinds of amino acids\* and each fraction

↓  
incubated at 30°C, for 3 days

↓  
amino acid content of the culture was determined by amino acid analyzer

**Fig.1** Assay of the effective components in rice germ. (1)

\* Glu, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Arg, Pro; 1 m mole each.

合成培地 (Yeast Nitrogen Base W/O amino acid,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Difco), 20% glucose) に Y M 培地で前培養した協会 7 号酵母を植菌し、3 日間培養後のアミノ酸の減少を測定する。

2) Table 1 の仕込配合によって総米 40 g の小仕込を行い、留め仕込時の汲水

**Table 1** Assay of the effective components in rice germ. (2)

に無機イオンを

Pilot scale brewing

	mizu koji	1st addn.	2nd addn.	3rd addn.	total
total amount of rice (g)	2	5	13	20	40
rice for steaming (g)	—	5	11	16	32
rice for koji (g)	2	—	2	4	8
distilled water (ml)	11	—	15	24	50
temp. (°C)	15	15	15	15	

添加し、4 日後

の醪中のアミノ

酸量を測定する。

なお、添加した

Filtrate was analysed at 4th day after 3rd addition.

無機イオンは、 $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  は塩化物を、 $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  は硫酸塩を、 $\text{PO}_4^{3-}$  は  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を使用した。

小仕込による清酒醸造は前節の方法と同様に行った。無機イオンは留仕込時に添加した。

### 製成酒の分析

一般分析、香気成分、金属等は前節の方法と同様に行った。無機リンは Allen の方法<sup>1)</sup>、アミノ酸量はニンヒドリン法<sup>2)</sup>およびアミノ酸アナライザー (日立 835 型) により、無機陰イオンはイオンクロマトグラフ (Dionex 2010 型) により定量した。

## 結 果

### 有効成分の検索

#### (1) 胚芽抽出物の分画による方法

Fig. 2 に示すように、5 g の胚芽を 650 °C、10 時間灰化し、

その熱水抽出物をDowex 50x4 (H<sup>+</sup>) で分画した。各区分の無機イオンは、

Table 2 に示すように、非吸着区分は PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> が、0.5 N HCl 溶出区分は K<sup>+</sup> が、また 2.0 N HCl 溶出区分は Mg<sup>2+</sup> が主体であった。

分画した各区分について Fig. 1 の方法により、酵母によるアミノ酸の取り込み量を調べた

結果、Fig. 3 に示したように、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> を含む非吸着区分、Mg<sup>2+</sup> を含む 2.0 N HCl 溶出区分に大きな効

果が認められたほか、K<sup>+</sup> を含む 0.5 N HCl 溶出区分および、

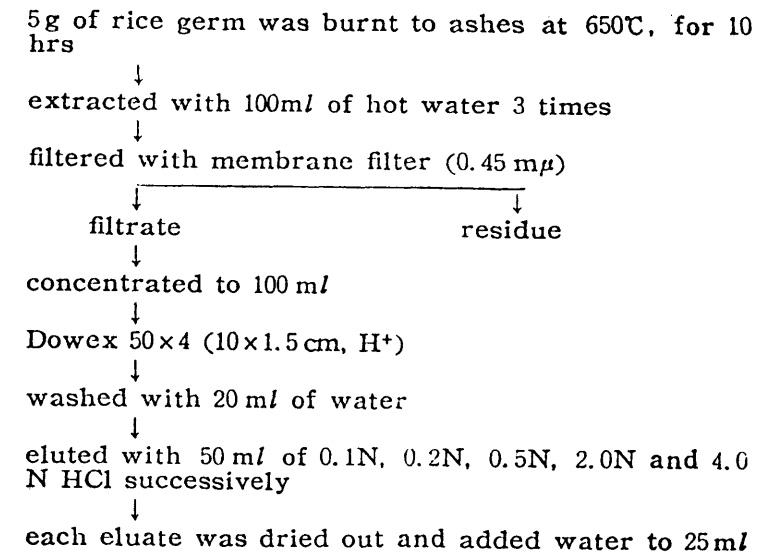


Fig. 2 Fractionation of effective components in rice germ.

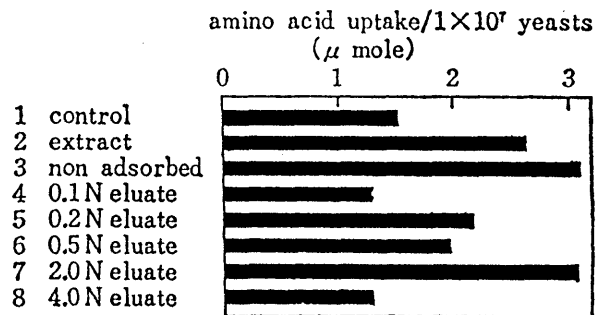


Fig. 3 Effect of the each fraction on amino acid uptake.

Table 2 Cations and anions in the extract from ash of rice germ. (ppm)

	Ex-tract	non ad-sorbed	0.1N eluate	0.2N eluate	0.5N eluate	2.0N eluate	4.0N eluate
Mg	46	8	4	1	2	40	0
K	536	0	0	0	540	5	1
Ca	1.2	0	0	0	0	0	0
Mn	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	—	—	—	—	—
Cl	0.4	2.6	—	—	—	—	—
NO <sub>2</sub>	0	0	—	—	—	—	—
PO <sub>4</sub>	220.0	210.2	—	—	—	—	—
Br	0	0	—	—	—	—	—
NO <sub>3</sub>	0	0	—	—	—	—	—
SO <sub>4</sub>	0.5	0.5	—	—	—	—	—

0.2 N HCl 溶出区分にもわずかな効果が認められた。一方、

0.1 N および

4.0 N HCl 溶

出区分には、アミ

ノ酸の取り込みを

阻害する成分が含

まれることが考え

られた。

(2) 無機イオンの添加試験による方法

Table 1 の仕込配合による総米 40 g の小仕込を行い、留仕込時の汲水に無機イオンを添加する方法により、アミノ酸量を減少させる無機イオンを検索した。

胚芽中の無機イ

オンの定量値から、

0.8 g (胚芽灰化

物を添加した予備

実験から、アミノ

酸の減少に対し最

も大きな効果を示す胚芽添加量は総米 40 g の仕込に対して 0.8 g

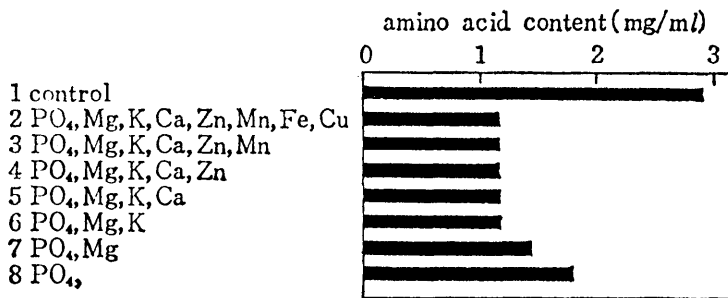
であった。) の胚芽に含まれる無機イオンの組合せを添加し、アミ

ノ酸の減少に対する効果を調べた。 Fig. 4 および Fig. 6 に示す

ように、8種類の無機イオンのうち、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ の

3種が必須であることが明らかになった。一方、無機イオン単独の

場合においても、Fig. 5 に示したように、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および



$PO_4$ ; 337  $\mu$  mole, Mg; 183  $\mu$  mole, K; 267  $\mu$  mole, Ca; 11.2  $\mu$  mole, Zn; 1.73  $\mu$  mole, Mn; 2.49  $\mu$  mole, Fe; 0.748  $\mu$  mole, Cu; 0.929  $\mu$  mole

Fig. 4 Effect of inorganic ions contained in rice germ (0.8g) on reduce of amino acid content in moromi.

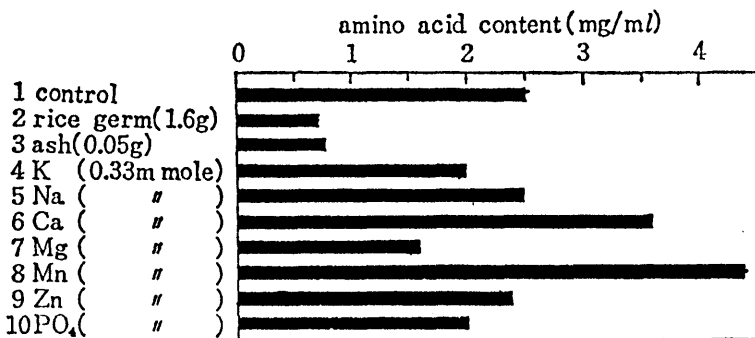


Fig. 5 Effect of inorganic ions on reduce of amino acid content in moromi.

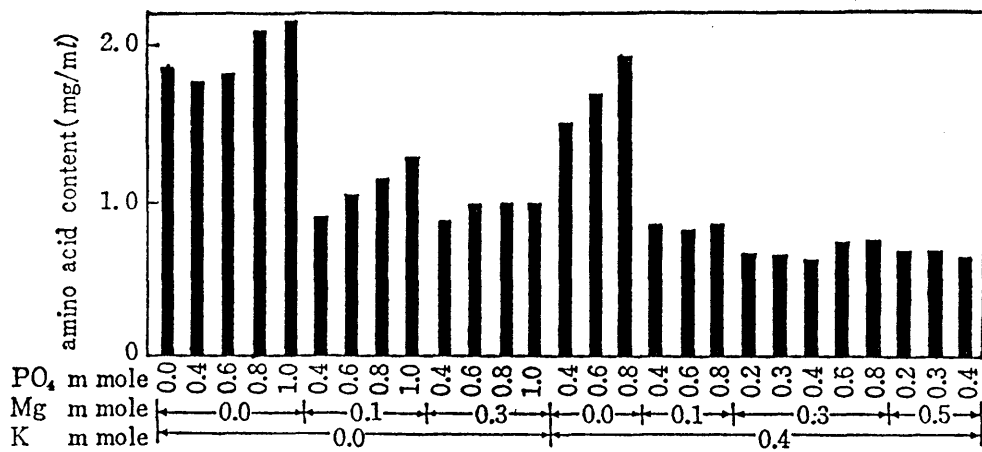


Fig. 6 Effect of  $PO_4$ , Mg and K addition on reduce of amino acid content in moromi.

	$PO_4$ 0.4mmole	Mg 0.3mmole	K 0.4mmole	ratio of amino acid content	
				0	1
1	-	-	-	1.0	1.0
2*	-	-	+	0.8	0.8
3**	-	+	-	0.7	0.7
4	-	+	+	0.6	0.6
5*	+	-	-	0.8	0.8
6	+	-	+	0.7	0.7
7	+	+	-	0.6	0.6
8	+	+	+	0.5	0.5

Fig. 7 Factorial effect of  $PO_4$ , Mg and K on reduce of amino acid content in moromi.

$K^+$ に効果が認められたが、胚芽、胚芽灰化物には及ばなかった。

なお、 $Mn^{2+}$ および $Ca^{2+}$ には、

\*: Significance at 5% level.  
\*\*: Significance at 1% level.

逆に醪中のアミノ酸量を増加させる効果が認められた。

以上、(1)および(2)の結果から、清酒醪中のアミノ酸量を減少させる有効成分は、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ であり、これらのイオンが共存した場合に、最大の効果が認められることが明らかとなった。

#### アミノ酸の減少に対する無機イオンの最適濃度

アミノ酸を減少させる有効因子として、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ の3種が明らかとなったので、これらの最適濃度を検討した。Fig. 6に示すように、総米40gの小仕込において、 $Mg^{2+}$  0.3 mmol、 $PO_4^{3-}$  0.2~0.4 mmol および $K^+$  0.4 mmolの添加の条件が、アミノ酸度を胚芽添加醪(アミノ酸量 0.69 mg/ml)と同程

度まで減少させることができた。

次に、3種のイオンの最適濃度で、 $2^3$ の組合せにより総米40gの小仕込への添加試験を行い、その結果をFig. 7に示した。分散分析の結果、 $Mg^{2+}$ が1%以下の、 $PO_4^{3-}$ と $K^+$ が5%以下の危険率で醗中のアミノ酸の減少に対して有意となった。なお、寄与率は、 $Mg^{2+}$  80.2%、 $PO_4^{3-}$  10.7%および $K^+$  7.5%であった。

### 無機イオン添加による小仕込試験

これらの無機イオンの効果を確認するために、総米200gの小仕込を行い、その製成酒の一般分析、香気成分の分析を行った。なお、同時に胚芽添加仕込も行ったが、胚芽は脱脂後、蒸きようせずに添加した。Table 3に製成酒の分析結果を示す。3種のイオンの最適組合せである仕込No.4は、アミノ酸度が0.72と胚芽添加

Table 3 Analytical data for sake brewed by inorganic ion addition.

	Sake meter	Acidity	Amino acidity	Alcohol %	Color OD <sup>436</sup>	PO <sub>4</sub> ppm	<i>i</i> -AmOH ppm	<i>i</i> -AmOAc ppm	E/A
No.1 Control	+3.0	2.2	1.34	17.8	0.037	75.1	243.5	2.36	0.97
No.2 Defatted rice germ 8g	+9.0	2.2	0.68	18.7	0.123	241.2	425.0	4.99	1.17
No.3 0m mole K 1.5m mole Mg 1.5m mole PO <sub>4</sub> 1.5m mole	+1.0	2.3	0.96	17.3	0.038	87.2	235.9	5.82	2.47
No.4 2.0 " 1.5 " 1.5 "	+6.0	2.3	0.72	18.3	0.037	77.4	269.2	7.69	2.86
No.5 2.0 " 1.5 " 3.0 "	+4.5	2.3	0.90	18.4	0.036	136.8	266.7	6.15	2.31
No.6 2.0 " 2.0 " 1.5 "	+5.5	2.7	0.91	18.3	0.036	78.0	259.0	7.23	2.79

の仕込No.2の0.68とほぼ同じ値となり、対照の1.34の約50%となった。香気成分は、胚芽添加では、*i*-AmOH、*i*-AmOAcともに対照の2倍となるため、E/A比は変化しなかった。しかしながら、無機イオン添加では、*i*-AmOHは対照とほぼ等しいのに対し、*i*-AmOAcは約3倍に増加したためE/A比も2.5~3.0倍に改善された。

無機イオン添加による製成酒は、胚芽添加製成酒の持つ着色度、又カ臭等の問題点は解決され、エステル系の香りを持つ、淡れい辛口タイプであったが、多量の無機塩添加によるためか、後味にやや苦みを感じられた。

## 考 察

清酒醪中のアミノ酸減少に働く胚芽中の有効成分を、胚芽灰化物から抽出し、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ がその効果を有することを見いだした。これらのイオンは、総米40gの小仕込試験でも、単独で効果が認められ、その最適濃度の組合せは、 $Mg^{2+}$  0.3 mmol (仕込水に換算すると145.8 ppm)、 $PO_4^{3-}$  0.2~0.4 mmol (同380.0~760.0 ppm) および $K^+$  0.4 mmol (同312.8 ppm)の添加であった。この最適組合せ条件で総米200gの小仕込を行ったところ、得られた製成酒は胚芽添加と同様に対照酒の約50%のアミノ酸量となった。

このアミノ酸を最も減少させる3種のイオンの最適濃度はTable 4に示すように、

宮水の15~80倍の量となり、一般の酒造用水の最大値よりも

**Table 4** Inorganic ion contents in brewing water. (ppm)

	Used in many breweries	Used in Nada (Miyamizu)	Used in this experiment
K	0.10~58.0	19.69	312.8
Mg	0.20~33.04	5.61	145.8
$PO_4$	0.0~65.4	6.97	570.0

はるかに多い量である<sup>3)</sup>。

難波ら<sup>4)</sup>は、これら3種の無機イオンは主として原料米から供給され、その総量は酵母が発酵に必要とする量と比べ、 $K^+$ がやや不足



気味であるが、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ は十分であるとした。しかし、この値は蒸し米中に含まれるこれらの無機イオンがすべて溶出した場合であって、蒸し米の溶解が完全に進んでいない醪前半では、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ の溶出は $K^+$ と比べ遅く、酵母の増殖の最も盛んな高泡時には欠乏すると考えられる。また、この時期は酵母によるアミノ酸の取り込みの最も盛んな時期でもある。この点から、仕込水中の $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ の量は製成酒のアミノ酸量に大きく影響すると考えられる。

3種のイオンのうち、アミノ酸減少に対する寄与率が80.2%と高い $Mg^{2+}$ は、これまで硬度という概念から $Ca^{2+}$ との合計量として扱われてきた。しかし、酵母によるアミノ酸の取り込みという点では、 $Mg^{2+}$ と $Ca^{2+}$ は取り込み促進と阻害という逆の作用をするので、今後は両者を分けて取り扱うのが適当と思われる。

アミノ酸を増加させる因子として $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ および他の実験結果<sup>5)</sup>から得られた $Zn^{2+}$ があるが、これらは主として原料米から醪中へ溶出されるといわれている<sup>6~7)</sup>。すなわち、アミノ酸取り込みの活発な醪前半に蒸し米の溶解が早く進んだ場合には、これらのアミノ酸増加因子が働き、アミノ酸の多い清酒となると推察される。

なお、この胚芽中の有効成分の検索には、製成酒のアミノ酸量が、胚芽添加では対照酒の約50%となることを指標として行った。しかし、胚芽10gから麴によって糖化(55℃、14時間)されたとき遊離するアミノ酸量は234mg(麴のみのブランクを引いた値。)と計算される(Table 5)。すなわち、胚芽添加醪では、対照

と比べ多量のアミノ酸が供給される。それにもかかわらず、10gの胚芽を添加した仕込酒（アミノ酸総量529mg）は対照酒（10

50mg）に比

べ521mg少

なくなる。胚芽

添加では、発酵

中に酵母が取り

込むアミノ酸量

は、胚芽の持込

みのアミノ酸を

も取り込んで対

照酒の約50%

とするのにたい

し、無機イオン

添加仕込では持

込みはなく取り

込み量は少なく

てよい。アミノ

酸取り込み量が少ないことは、Leuを取り込んで生成するi-A

mOH含量が対照とほぼ同じであるのに対し、胚芽添加では約2倍

となっていること（Table 3）からもその違いが明らかである。こ

れは、灰化によって失われた有効成分が存在する可能性を示唆する

が、その寄与は無機イオンほどではないと考えらる。

**Table 5** Amount of amino acids derived from rice germ. mg/10g rice germ

	Difference I and II	I Koji	II Rice germ +Koji
Asp	28.8	16.8	45.6
Thr	12.1	27.9	40.0
Ser	11.5	13.8	25.3
Glu	5.5	19.1	24.6
Gly	12.1	7.7	19.8
Ala	21.6	16.7	38.3
Cys	1.6	5.9	7.5
Val	14.0	15.2	29.2
Met	3.0	7.7	10.7
Ile	8.7	11.0	19.7
Leu	9.2	25.5	34.7
Tyr	5.2	18.1	23.3
Phe	7.6	13.2	20.8
γ-ABA	15.7	8.3	24.0
Orn	0.1	1.3	1.4
Lys	18.9	17.8	36.7
EtOHNH <sub>2</sub>	1.2	1.5	2.7
NH <sub>3</sub>	4.7	3.2	7.9
His	10.3	5.3	15.6
Trp	6.7	2.8	9.5
Arg	23.1	23.7	46.8
Pro	12.5	10.8	23.3
Total	234.2	272.9	507.1

After 60g of rice koji was incubated with and without 20g of rice germ at 55°C, for 14 hours, the filtrate was analysed by an amino acid analyzer.

## 要 約

胚芽添加仕込により、製成酒のアミノ酸度、酸度が減少し、香気成分が増加する。そこで、胚芽中の有効成分をアミノ酸量の減少を指標として調べ、次の結果を得た。

1. 灰化胚芽にも同様な効果が認められたので、胚芽中に含まれる無機成分の組合せの添加試験を行い、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ 、 $K^+$ の3種が必要であることを明らかにした。

2. 多元配置法により、これら3種の主効果が認められ、その寄与率は $Mg^{2+}$  80.2%、 $PO_4^{3-}$  10.7%および $K^+$  7.5%と計算された。

3. これら3種の添加量の最適組み合わせは、汲水50ml当り $Mg^{2+}$  0.3 mmol (仕込水に換算すると145.8 ppm)、 $PO_4^{3-}$  0.2~0.4 mmol (同380.0~760.0 ppm) および $K^+$  0.4 mmol (同312.8 ppm)の添加であった。

4. この最適組合せの添加試験を総米200gの小仕込で行った。製成酒のアミノ酸度は、無添加の対照は1.34であるのに対し、0.72と約半分であった。

5.  $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ は、酵母のアミノ酸取り込みに対し促進作用を示すが、反対に $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ は阻害作用を示した。

## 文 献

- 1) B. Allen: Biochem. J. 348 58 (1940)
- 2) S. Moore and W. H. Stein: J. Biol. Chem. 176 367 (1948)
- 3) 難波、百瀬、大場編: 清酒製造技術 p 45 日本醸造協会

( 1 9 7 9 )

4) 難波、戸塚、伊藤、小野：醸協 72 893 (1977)

5) 未発表

6) 前川：醸協 73 140 (1978)

7) 難波、大場、高橋、森、佐藤：醸協 73 975 (1978)

## 第2章 清酒醪における酵母のアミノ酸取り込み能の変化と酵母菌体内外のアミノ酸

### 1. 胚芽、無機イオン添加仕込醪における酵母のアミノ酸取り込み能の変化と菌体内外のアミノ酸

醪仕込時に胚芽、もしくは  $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ 、 $K^+$  を添加することにより製成酒のアミノ酸量を対照酒の約50%とすることができる。その機作を明らかにするために、準工場的規模の総米100kgの仕込を行い、醪中の酵母を経時的に単離し、酵母のアミノ酸取り込み能、酵母菌体内アミノ酸プールを分析した。また、そのときの醪濾液中のアミノ酸組成、およびその他の成分についても分析した。

### 実験方法

#### 仕込方法

協会7号酵母を用いて、高温糖化酒母により総米100kgの仕込 (Table 1) を行った。

Table 1. Proportion of raw materials for *saké* brewing.

なお、標準的な仕込で

ある対照醪のほかに、  
留仕込時に1.5kgの  
脱脂胚芽を添加したも  
の、および第1章に記  
したアミノ酸減少の最  
適組合せとなる  $Mg^{2+}$  (0.75 mol)、 $PO_4^{3-}$  (0.75 mol)、

	Seed mash	1st addition	2nd addition	3rd addition	Total
Total rice (kg)	7	14	26	53	100
Rice for steaming (kg)	4	10	20	44	78
Rice for <i>kōji</i> (kg)	3	4	6	9	22
Water (l)	8	14	36	72	130
Mash temperature (°C)	18-22	15	11	8	

The temperature of *saké* mash increased 1°C a day until it reached a maximum of 15°C, and after that it was kept at 14 to 16°C. Three *saké* brewings were done using white rice of 70% polishing yield and Kyokai no. 7 yeast strain. Brewing no. 1, control; no. 2, 1.5 kg of defatted rice germ was added at the 3rd addition; no. 3,  $MgSO_4$  (0.75 mol),  $KCl$  (1.0 mol) and  $NaH_2PO_4$  (0.75 mol) were added at the 3rd addition.

$K^+$  (1.0 mol) の無機イオンを添加した合計3本の仕込を行った。

#### 清酒醪からの酵母の単離

植村らの方法<sup>1)</sup>に準じて、醪15gを採取し、蒸留水35mlを加え500rpm、2分の遠心により米粒を分離し、液部を1000rpm、4分の遠心でデンプン粒と酵母に分ける。下層の酵母区分を集め蒸留水30mlを加え、1000rpm、4分の遠心を繰り返す。顕微鏡的に純粋な酵母画分を得た。この単離した酵母は蒸留水10mlに懸濁し、酵母数を測定し、以下の分析に供した。

#### 酵母のアミノ酸取り込み能

500 $\mu$ lの酵母懸濁液 (約 $1 \times 10^7$  cells/500 $\mu$ l) に200 $\mu$ lの0.05Mフタレート緩衝液 (pH5.6) と100 $\mu$ lの20%グルコース溶液を加え、30分振とうする。次に、20 $\mu$ mol/mlのア르기ニンまたはロイシン溶液200 $\mu$ lを加え、30℃、10分間の遠心により菌体を除き、その上澄をアミノ酸アナライザーで分析し、減少した量をアミノ酸取り込み能とし、nmol/min/ $10^8$  cells で表示した。

#### 酵母菌体内アミノ酸プール

Inoue et al. の方法<sup>2)</sup>にしたがい、3~5mlの酵母懸濁液から遠心により菌体を集め、氷冷下で2mlのM/15  $KH_2PO_4$  で洗浄後、10%TCA5mlで抽出した。抽出液からエーテルで、TCAを除去後、沸騰水中でエーテルを除き、0.02N HClで10mlとし、アミノ酸アナライザーにより分析した。

#### 醪濾液中のアミノ酸組成

醪から遠心分離により得られた濾液を1%スルフォサリチル酸存

在下で30℃、15分振とうし、遠心分離後、除タンパクされた上澄をアミノ酸アナライザーで分析した。

### その他の分析

清酒の一般分析は、国税庁所定分析法<sup>3)</sup>に従い行った。アミノ酸組成の分析は、日立835型アミノ酸分析計を用いた。

## 実験結果

### 発酵経過および製成酒の一般分析

対照醪、胚芽添加醪、無機イオン添加醪の発酵経過と製成酒の一般成分をTable 2に示す。胚芽添加醪は留仕込後17日目に、その

Table 2. Fermentation profiles and analyses of *saké*.

	Brewing no.	Brewing time (days)					<i>Saké</i>
		10	12	14	16	18	
<i>Saké</i> meter value	no. 1	-43.0	-35.0	-22.3	-13.5	-7.5	-3.9
	no. 2	-19.0	-15.0	-6.5	-1.2	—	+4.7
	no. 3	-50.0	-37.0	-23.5	-10.5	-3.5	+2.1
Alcohol (%)	no. 1	11.0	11.8	13.8	15.8	16.7	17.6
	no. 2	12.2	13.9	15.6	17.1	—	17.0
	no. 3	10.5	11.6	14.2	16.0	17.6	17.6
Acidity	no. 1	1.9	2.2	2.4	2.7	2.8	2.7
	no. 2	1.6	1.8	2.1	2.2	—	2.5
	no. 3	1.8	2.1	2.3	2.4	2.5	2.6
Formol-N (ml)	no. 1	1.4	1.5	1.8	2.0	2.0	2.2
	no. 2	0.4	0.3	0.6	0.7	—	0.8
	no. 3	0.5	0.7	0.8	1.0	1.0	1.1
Number of yeast cells/g mash ( $\times 10^6$ )	no. 1	3.21	2.38	2.16	2.47	2.91	—
	no. 2	4.12	3.38	5.77	5.34	—	—
	no. 3	3.36	4.35	4.99	4.92	4.62	—

Samples were assayed by the standard method established by the National Tax administration Agency. no. 1, control; no. 2, rice germ added; no. 3,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $PO_4^{3-}$  added.

他は19日目に上槽した。前に記したように、胚芽添加、無機イオン添加醪ではアミノ酸度は対照と比べ半分以下と少なく、淡れい辛口の清酒が得られた。

## 醪濾液中のアミノ酸量の変化

発酵中の醪濾液中の遊離アミノ酸総量の変化は Fig. 1 に示すように、通常の醪では留仕込後次第に増加するが、胚芽添加醪では5日目まで減少し、その後漸増する。しかし、これを個々のアミノ酸について調べてみると、その挙動は様々である。Fig. 2 にアスパラギン酸、グルタミン酸、アラニン、

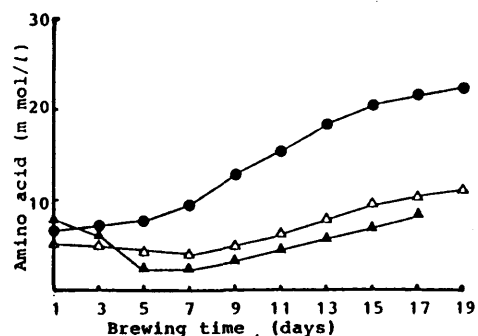


Fig. 1. Changes in total amino acid contents in *sake* mash filtrate.

Amino acid content was measured using an amino acid analyzer after treatments of filtration by a milipore filter and deproteinization with 1% sulfosalicylic acid.

●, control; ▲, rice germ added; △,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  and  $PO_4^{3-}$  added.

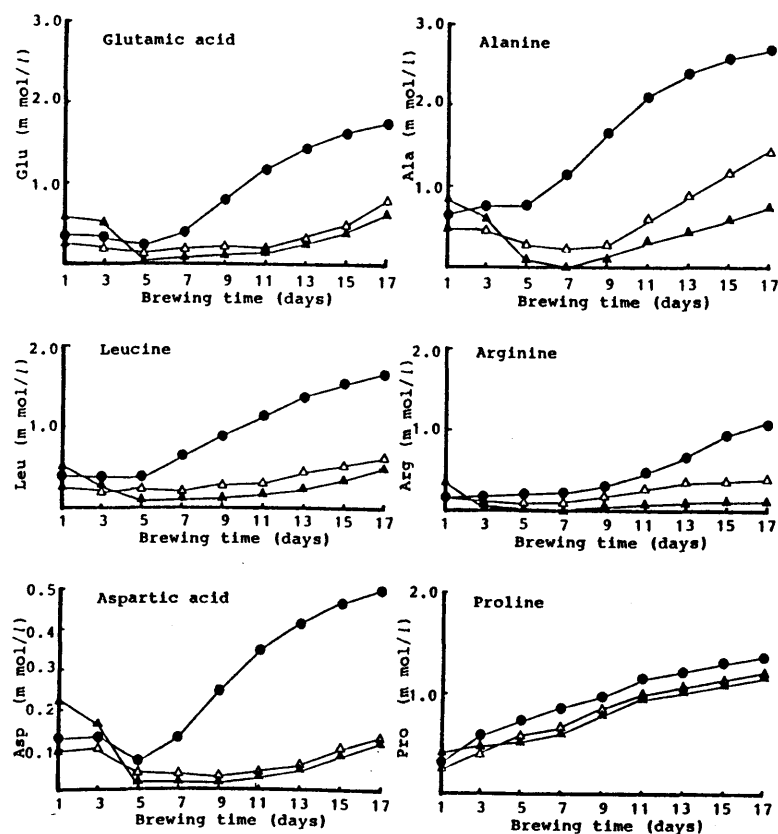


Fig. 2. Changes in some amino acid contents in *sake* mash filtrate.

The symbols and method are the same as described in the legend to Fig. 1.



ロイシン、アルギニン、およびプロリンの変化を示す。布川<sup>1)</sup>は清酒醪において酵母により消費されやすい順にアミノ酸を4つのグループに分類しているが、アスパラギン酸は最も消費されやすい第1グループ、ロイシン、アルギニンは次に消費されやすい第2グループ、グルタミン酸、アラニンは第3グループ、プロリンはほとんど消費されない第4グループに分類されているものである。また、グルタミン酸、アラニン、ロイシンは酵母細胞中では細胞質に局在し、アルギニンは液胞に局在するアミノ酸として知られている<sup>5, 6)</sup>。胚芽添加によって、比較的酵母によって消費されにくいとされているアミノ酸がよく減少していることがわかる。Fig. 3はアンモニアの変化を示すが、胚芽や無機イオン添加醪では、アンモニアのレベルは低く維持されている。

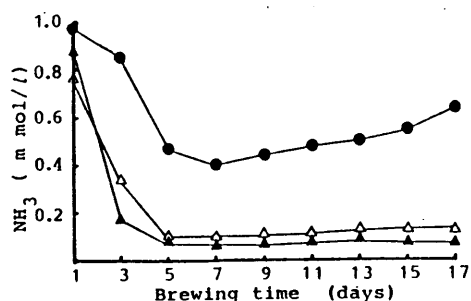


Fig. 3. Changes in ammonia content in *saké* mash filtrate. The symbols and method are the same as described in the legend to Fig. 1.

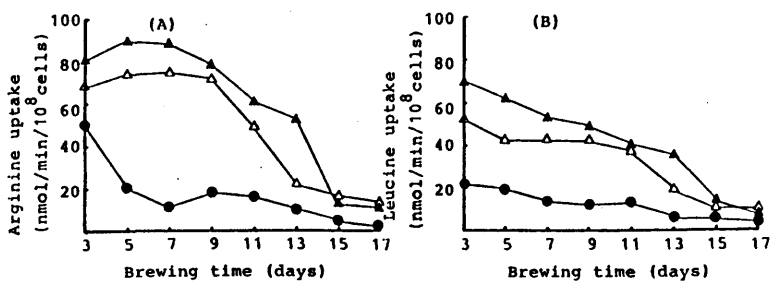


Fig. 4. Amino acid uptake by the isolated yeast cells from *saké* mash. Yeast cells were isolated from *saké* mash by repetition of centrifugation at 500-1000 rpm and assayed for arginine (A) and leucine (B) uptakes. The symbols are the same as described in the legend to Fig. 1.

## アミノ酸取り込み能の変化

これまで、胚芽や無機イオンを添加することにより、製成酒のアミノ酸量が減少することを述べてきた。このアミノ酸が減少する原因を明らかにするため、醪中から酵母を単離し、アミノ酸取り込み能の変化を測定した。ここで多くのアミノ酸について検討するのが望ましいが、醪から酵母を単離してから数時間のうちに実験を行わなくてはならないという制約があり、酵母によく取り込まれるアミノ酸としてアルギニンを、*i*-AmOH等の香気成分との関連からロイシンを選択し、この2種のアミノ酸について検討した (Fig.4)。アルギニンを用いたアミノ酸取り込み能の変化から、対照醪では留仕込後漸減するのに対し、胚芽や無機イオン添加では留仕込直後の高い活性が11~13日目まで維持される。この結果はロイシンを用いた取り込み能でも同様であった。

## 酵母菌体内アミノ酸の変化

醪中の酵母菌体内アミノ酸総量の変化は、Fig. 5 に示すように、対照醪では  $0.7 \sim 1.4 \mu\text{mol} / 10^8 \text{ cells}$  の範囲で増加していき、醪後半に減少した。胚芽や無機イオン添加醪では、アミノ酸

量はやや少なく、かつ上槽まで漸増が続いた。個々のアミノ酸ではグルタミン酸、アラニン、ロイシン等多くのアミノ酸が同様の傾向を示したが、液胞に局在し貯蔵N源として利用されるアルギニンでは無機イオン添加醪が最も高いレベルで推移し、特徴のあるバター

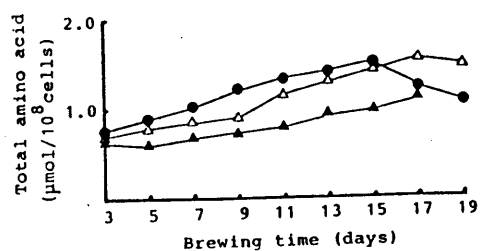


Fig. 5. Changes in total intracellular amino acid content during *saké* mash fermentation. Intracellular amino acids of yeast cells isolated from *saké* mash were analyzed using an amino acid analyzer. The symbols are the same as described in the legend to Fig. 1.

ンを示した (Fig. 6)。

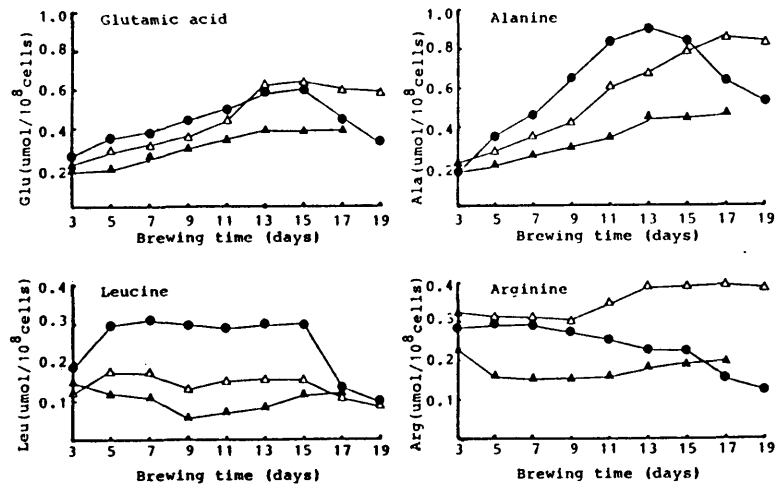


Fig. 6. Changes in intracellular amino acid content during *saké* mash fermentation. The symbols and method are the same as described in the legend to Fig. 5.

### 醪中のアミノ酸の分布

対照醪の酵母菌体内アミノ酸の変化 (Fig. 5) から、醪末期に菌体内アミノ酸の漏出が想起されるが、これが醪末期に菌体内アミノ酸の上昇にどの程度寄与するかを調べるため、留仕込後 17 日目の酵母菌体内アミノ酸組成と醪濾液のアミノ酸組成を示したのが Table 4 である。醪中での量的組成を比較するために、どちらも醪 1 g 中に含まれるアミノ酸量に換算してある (酵母は  $2.48 \times 10^8$  cells/g 存在し、醪固形分を 15% として計算した)。醪 1 g 中のアミノ酸は濾液中に  $18.2 \mu\text{mol}$  であるのに対し、酵母菌体内にはその約 30% の  $6.1 \mu\text{mol}$  含まれている。そして菌体内アミノ酸組成は醪濾液中と比べグルタミン酸とアラニンが多く含まれ、両者で約半分を占めているのが特徴と言える。この組成は醪初期から上層までほぼ一定であった。

## 考 察

胚芽や無機イオン添加醪の酵母はアミノ酸取り込み能が高く、かつそのレベルが醪中期まで維持されることから、これらの醪中の酵母菌体内アミノ酸量は、単純に考えると多くなって然るべきであるが、実際にはFig. 5、6で示したように、ほとんどのアミノ酸では対照醪の酵母より低いレベルで推移した。

酵母細胞において、アミノ酸は生合成系、代謝系、および細胞膜に於ける輸送系について複雑な制御システムが存在することが知られており、特に細胞膜における輸送系ではN化合物の多くが能動輸送により取り込まれ、かつN化合物による抑制が働いていることが報告されている<sup>7)</sup>。この中でアミノ酸に関しては、アルギニン、リジン、メチオニン、ロイシン等がよく調べられており、そのK<sub>t</sub>値はそれぞれ10 μM、200 μM、12 μM、50 μMとされている。さらに、ロイシンについては細胞外濃度の6倍まではその濃度勾配に逆らって能動輸送が行われる。

このロイシンを一例として、醪中のアミノ酸の菌体内外の分布を考察してみると、そのK<sub>t</sub>値の50 μM付近ではロイシンの菌体内への取り込み活性は著しく低下することになる。すなわち、アミノ酸取り込み能の測定は4 mMという高濃度で行っているのに対し、実際の胚芽や無機イオン添加醪中の濃度は約100~200 μM (Fig. 2、9日目)とロイシンのK<sub>t</sub>値付近となっていることから、これらの酵母のアミノ酸取り込み能は高いが、実際の醪中での酵母菌体内への取り込み量は、対照醪(醪中の濃度は約1000 μMとK<sub>t</sub>値の50 μMよりはるかに高い)中の酵母に比べむしろ低いと

考えられる。また、対照醪中の酵母菌体内ロイシンレベルが胚芽や無機イオン添加醪中のそれと比べ2～3倍と高いこと (Fig. 6) は、細胞外 (すなわち醪濾液) からロイシンの取り込みの効率は悪くなることを意味している。このことは対照醪の酵母のアミノ酸取り込み能の低下の1つの原因とも考えられる。

胚芽等の添加による酵母菌体のアミノ酸取り込み能の活性化および、細胞内アミノ酸の代謝の活性化による細胞質アミノ酸レベルの低下により、高いアミノ酸取り込み能が醪中期まで維持されることが可能となり、アミノ酸の少ない清酒が得られると考えられた。

胚芽や無機イオン添加醪での酵母細胞内アミノ酸レベルの低いことは、細胞内に取り込まれたアミノ酸はその制御システムによって速やかに分解、代謝を受け細胞タンパクの形成に使用されることが考えられる。これらについて検討した結果をTable 3に示す。ここで、通常の醪で生成されるアミノ酸量は布川の報告<sup>5)</sup>の6350 mg/lを使用した。1.5 Kgの胚芽から生成されるアミノ酸量としては、胚芽の麴による糖化試験の結果から220 mg/lと推定し

Table 3. Correlation between the amount of amino acids consumed by yeast cells and number of yeast cells.

Brewing no.	Amino acid content (mg/l)			(D) Number of yeast cells** ( $\times 10^8$ cells/ml)	(D)/(C) ( $\times 10^7$ cells/mg)
	(A) produced by <i>koji</i> *	(B) in the finished <i>saké</i>	(C) consumed by yeast cells		
No. 1 (Control)	6350	2766	3584	2.63	7.34
No. 2 (Rice germ added)	6570	1014	5555	4.65	8.37
No. 3 (Inorganic ion added)	6350	1374	4974	4.44	8.92

\* Amino acid content produced by *koji* was estimated from the values in Nunokawa<sup>2)</sup> and in a previous paper.<sup>4)</sup>

\*\* Number of yeast cells was shown as the average at the later stage of *saké* mash.

た。Table 3において、対照醪の酵母により消費されたアミノ酸量

(C) で酵母数 (D) を割ると、 $7.34 \times 10^7$  cells/mg アミノ酸となる。そこで、胚芽添加、無機イオン添加での酵母による消費アミノ酸量から酵母数を計算すると、それぞれ  $4.08 \times 10^8$  (実測値  $4.65 \times 10^8$ )、 $3.65 \times 10^8$  (実測値  $4.44 \times 10^8$ ) となり、やや低い値ではあるがよく一致した。このことから、取り込まれたアミノ酸は細胞増殖、すなわち菌数増加に使われたと考えられる。

醪 1 g 中のアミノ酸の分布について調べた結果、醪濾液と酵母菌体内では、それぞれ  $18.2 \mu\text{mol}$ 、 $6.1 \mu\text{mol}$  であり、酵母菌体内アミノ酸組成は醪濾液中と比べグルタミン酸とアラニンが多く含まれ、その両方で約半分を占めてい

た。このことは、醪末期にアルコール添加等によりアミノ酸度が急上昇することが知られているが<sup>8)</sup>、酵母菌体内の遊離アミノ酸が、もし全量漏出したとすると、約 30% のアミノ酸度の上昇をもたらし、その組成においてグルタミン酸とアラニンが特異的に増加することを示している。しかしながら、アルコール添加によってアミノ酸度が増加したとき、このようなアミ

ノ酸の特異的増加は認められていない<sup>9)</sup> ので、アルコール添加後のアミノ酸増加の主な原因は酵母菌体内アミノ酸の漏出よりは、原ら

Table 4. Amino acid compositions of filtrate and yeast cells.

Amino acid ( $\mu\text{mol/g}$ sake mash)	Filtrate	Yeast cells
Aspartic acid	0.43	0.05
Threonine	1.38	0.15
Serine	0.75	0.07
Glutamic acid	1.44	1.10
Glycine	1.70	0.29
Alanine	2.35	1.59
Cystine	0.38	0.17
Valine	1.27	0.12
Methionine	0.12	0.01
Isoleucine	0.48	0.02
Leucine	1.39	0.02
Tyrosine	0.73	0.01
Phenylalanine	0.60	0.06
$\gamma$ -Amino butyric acid	0.49	0.02
Ornithin	0.12	0.48
Lysine	0.64	0.25
Ethanolamine	1.16	0.14
Ammonia	0.55	0.75
Histidine	0.20	0.22
Tryptophane	0.01	0.01
Arginine	0.88	0.37
Proline	1.13	0.19
Total	18.20	6.09

10) の報告のように酵母菌体内カルボキシペプチダーゼ等の活性化による増加が主因と考えられる。

## 要 約

醪仕込時に、胚芽や無機イオン ( $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ ) を添加すると、製成酒のアミノ酸量が対照の約50%となるが、その機作を明らかにするために、3本の試験仕込を行い、酵母のアミノ酸取り込み能、酵母菌体内アミノ酸プール、および醪濾液のアミノ酸組成の変化を調べ、次のような結果を得た。

(1) 醪濾液中のアミノ酸は、対照醪では留仕込後、漸増するのに対し、胚芽や無機イオン添加醪では留仕込後5~7日まで減少した後増加した。特にグルタミン酸やアラニンという醪中で酵母に取り込まれにくいといわれているアミノ酸でその差は顕著であり、そのときのアンモニア量は低いレベルで維持されていた。

(2) 醪中の酵母のアミノ酸取り込み能は、対照醪では留仕込後すぐに漸減するのに対し、胚芽や無機イオン添加醪では高い取り込み能が醪の中期まで続いていたことから、これが製成酒のアミノ酸減少の主な原因であると考えた。

(3) 醪1gに含まれる酵母菌体内および濾液中のアミノ酸量を比較し、醪末期の醪濾液中のアミノ酸増加に対する醪中の酵母菌体内アミノ酸の寄与について考察した。

## 文 献

- 1) 植村：微生物実験法、p181、共立出版、東京(1957)

- 2) T. Inoue, Y. Yamamoto, E. Kokubo, Y. Kuroiwa: Rept. Res. Lab. Kirin, Kirin Brewery Co., Ltd. , No16, 11 (1973)
- 3) 村上: 国税庁所定分析法注解、日本醸造協会、東京 (1974)
- 4) A. Wiemken, M. D rrr: Arch. Microbiol. 101 45 (1974)
- 5) 布川: 醸協 76、705 (1981)
- 6) 大隅、安楽、北本: 醸協 80 11 (1985)
- 7) T. G. Cooper: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces(J. N. Strathern et al.), 399, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
- 8) 土肥: 清酒酵母の研究 (秋山、大内編)、294、清酒酵母研究会、東京 (1980)
- 9) 川島、大内、小幡、鈴木、山下、増子、和久井: 醸協 70, 750 (1975)
- 10) 原、小幡: 醸協 72、530 (1977)



## 2. 胚芽、無機イオン添加仕込醪における無機イオンの変化

前節では、胚芽、無機イオンを添加した総米100kgの仕込において醪中の酵母菌体内外のアミノ酸について調べた。ここでは、アミノ酸減少に及ぼす有効成分である無機イオンについて、醪中の変化について分析を行った。

### 実験方法

#### 仕込方法

本章 1. と同じ。

#### 金属イオンの分析

$K^+$ 、 $Na^+$  は炎光分析により、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  は原子吸光法により測定した<sup>1, 2)</sup>。

#### $PO_4^{3-}$ の定量

Allen の方法<sup>3)</sup>により測定した。

### 実験結果

Fig. 1~Fig. 6 に各イオンの醪濾液中の変化を、Table 1 に製成

酒の分析結果を示す。アミノ酸減少に有効な成分として  $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$  があるが、 $Mg^{2+}$  は対照醪で

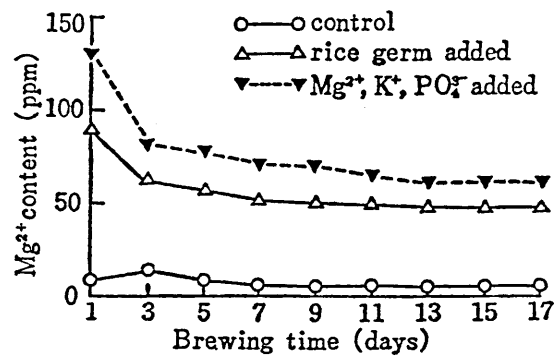


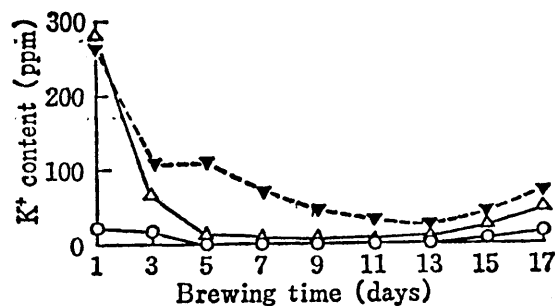
Fig. 1 Changes in  $Mg^{2+}$  content in sake mash filtrate

は、胚芽添加醪に  
 比べ醪期間中を通  
 し低いレベルで推  
 移した (Fig. 1)。

また、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$   
 $^{3-}$  は醪後半では大  
 きな差はなくなる

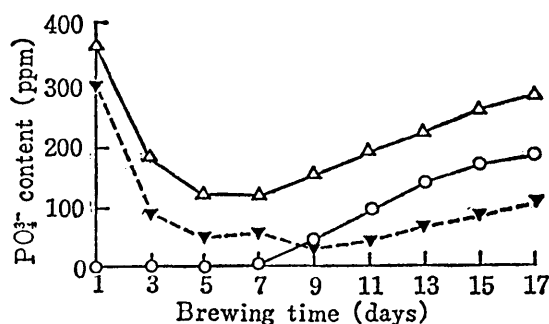
が、酵母の増殖の盛んな高泡時期までは対照醪では  $K^+$  が 3 ~ 27 p  
 pm、 $PO_4^{3-}$  が 1 ~ 3 ppm と少なく、胚芽添加醪でのそれぞれ  
 10 ~ 283 ppm、120 ~ 390 ppm と比べ、その差は大き  
 かった (Fig. 2、  
 Fig. 3)。

酵母のアミノ  
 酸取り込み能を  
 高くするこれら  
 のイオンの醪中  
 の変化で特徴的  
 なことは、胚芽  
 添加や無機イオ  
 ン添加で高いレ  
 ベルが維持され  
 ることであり、  
 かつ留仕込後 5  
 日目までの初期



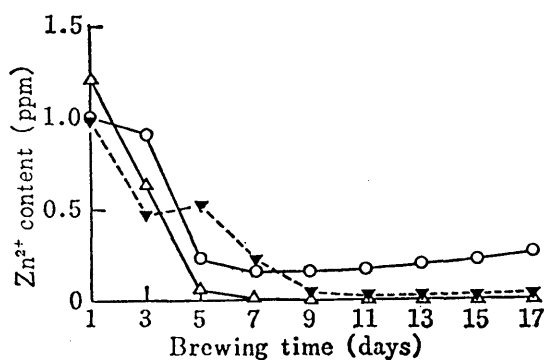
**Fig. 2** Changes in  $K^+$  content in sake mash filtrate

The symbols are the same as described in the legend to Fig. 1



**Fig. 3** Changes in  $PO_4^{3-}$  content in sake mash filtrate

The symbols are the same as described in the legend to Fig. 1



**Fig. 4** Changes in  $Zn^{2+}$  content in sake mash filtrate

The symbols are the same as described in the legend to Fig. 1

に減少が著しいことである。すなわち、酵母の増殖と高いアミノ酸取り込み能の維持のためには、これらのイオンが必要であることを示唆している。酵母のアミノ酸取り込み能を阻害する  $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  の醪中での変化は、Fig. 4、Fig. 5 のとおりである。 $Zn^{2+}$  は  $Mg^{2+}$  など

の有効成分の  
変化と同様に  
留仕込後5日  
目までの減少  
がいずれの醪

でも認めら  
れたが、無  
機イオンや  
胚芽添加醪

では醪後半  
0.01 ppm  
以下とな  
ったのに対  
し、対照醪

では0.16  
~0.32 p  
pmと高く、  
製成酒でも

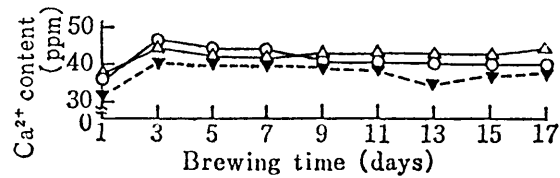


Fig. 5 Changes in  $Ca^{2+}$  content in sake mash filtrate

The symbols are same as described in the legend to Fig. 1

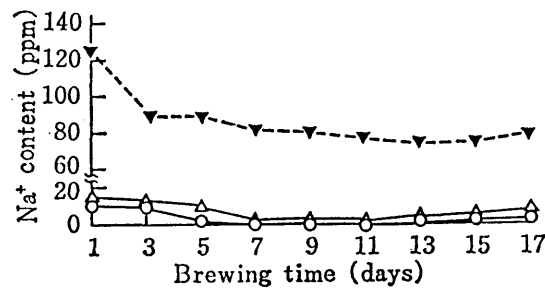


Fig. 6 Changes in  $Na^{+}$  content in sake mash filtrate

The symbols are the same as described in the legend to Fig. 1

Table 1 Contents of inorganic ions in the sake (ppm)

	$K^{+}$	$Na^{+}$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$	$Zn^{2+}$	$PO_4^{3-}$
No.1 Control	24.2	8.1	33.8	6.8	0.40	227.1
No.2 Rice germ added	55.7	8.0	43.2	47.0	0.09	285.6
No.3 $Mg^{2+}$ , $K^{+}$ , $PO_4^{3-}$ added	96.0	83.0	38.8	65.0	0.13	144.1

その差が大きかった (Table 1)。このことは、酵母により  $Zn^{2+}$

の取り込みが、胚芽や無機イオンの添加により活性化されたと考えられる。

醪濾液中に  $\text{Ca}^{2+}$  は約 40 ppm と比較的少量に含まれ、その量はいずれの醪でも大差はなく、全醪期間を通して増減の変化は少なかった (Fig. 5)。

$\text{Na}^+$  は対照醪と胚芽添加醪では大差はなく、無機イオン添加醪では  $\text{PO}_4^{3-}$  を  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  で添加したため初期値が 126 ppm と高く、その後も高いレベルのまま推移した (Fig. 6)。

### 考 察

留仕込時に胚芽もしくは  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$  を添加することにより製成酒のアミノ酸度が通常約半分となるが、このような仕込において醪中での無機イオンの変化を測定した。

酵母の生育や発酵に対する無機イオンの必要量については、研究者により数値にばらつきがあるが、最近の Jones ら<sup>4)</sup> の総説によると次のように記されている。 $\text{Mg}^{2+}$ ：生育と発酵の最適濃度は 2 ~ 4 mM (48 ~ 96 ppm) で、最小必要量は 1.7 mM (40.8 ppm) であり、グルコースの取り込みとアルコール生成の速度に影響を及ぼす。 $\text{K}^+$ ：生育の最適濃度 2 ~ 4 mM (78 ~ 156 ppm)。 $\text{Zn}^{2+}$ ：4 ~ 8  $\mu\text{M}$  (0.26 ~ 0.52 ppm) が生育に必要。30  $\mu\text{M}$  (1.95 ppm) 以上で細胞の自己消化を引き起こす。 $\text{Ca}^{2+}$ ：最小必要量は 0.25 ~ 0.50 mM (10 ~ 20 ppm)。1 mM (40 ppm) 以上ではアミノ酸取り込みを阻害する。

一方、Fujitani<sup>5)</sup>によると清酒酵母（協会6号）では、生育には  $Mg^{2+}$  0.4 mM (9.6 ppm)、 $K^+$  4 mM (96 ppm)、 $PO_4^{3-}$  1 mM (96 ppm)、発酵には、それぞれ0.2 mM (4.8 ppm)、1~2 mM (24~48 ppm)、1 mM (96 ppm) が最適濃度とされている。 $Mg^{2+}$  の最適濃度が、Jones の報告値と大きな差があるが、菌株の差か実験法の違いかは明かではない。

実際、3本の仕込の醪中の無機イオン量を比べてみると、醪初期に $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ は胚芽、無機イオン添加醪では十分含まれているが、対照醪では欠乏していると考えられる。 $Mg^{2+}$ については、Jones の報告値<sup>4)</sup>から判定すると $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ と同様に対照醪で不足していると判定されるが、Fujitani<sup>5)</sup>の報告値は維持されている。通常清酒醪における $Mg^{2+}$ 量(5~14 ppm)は発酵には十分であるが、アミノ酸の取り込みには不足しているとも考えることができる。とにかく、 $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ という酵母が比較的多量に必要とする無機イオンは、通常清酒醪においては酵母にとって最適濃度以下(少なくとも $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ において)になっていると想定される。また、逆に、これらの多量に要求されるイオンを制限することによって、清酒醪の発酵調節を行ってきたとも考えることができる。清酒中の $Zn^{2+}$ 量は官能熟度と相関があり、 $Zn^{2+}$ そのものが熟成に直接関与するものではなく、含窒素化合物、アミノ酸などの熟成関与成分の代用特性を持つ<sup>6)</sup>とされている。Fig. 4に示したように、分析した無機イオンの中で $Zn^{2+}$ のみが胚芽添加より対照醪での含量が有意に高かった。前述のように、多量の

$Zn^{2+}$  は酵母の自己消化を促進する<sup>4)</sup>ということを考慮すると、胚芽や無機イオン添加により製成酒のアミノ酸が減少すると共に  $Zn^{2+}$  含量も少なくなるということは興味深い。

なお、無機イオンの添加量は、アミノ酸度が対照の約50%となるという条件で設定した最適組合せから  $Mg^{2+}$  0.75 mol、 $K^+$  1.0 mol、 $PO_4^{3-}$  0.75 mol (仕込水全量で割った値から計算すると、それぞれ138 ppm、300 ppm、554 ppmとなる) 添加したが、醪中のこれらのイオンの変化を胚芽添加と比べると、その添加量はこの1/2~1/3でも、ほぼ同様のアミノ酸度の減少した清酒が得られると考えられる。

無機イオン添加仕込の製成酒のきき酒結果では、淡れい辛口のタイプであったが、やや後味に収れん味が残るという指摘があった。このような点からも、アミノ酸度を50%と極端に減少させることの必要のない実際の仕込では無機イオンの添加は少なくして良いと思われる。

## 要 約

総米100Kgの仕込を3本(対照醪、胚芽添加醪、 $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$  添加醪)行い、醪濾液中および製成酒中の無機イオンの変化を調べた。

酵母のアミノ酸取り込みの有効な $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ の3つの無機イオンは対照醪では酵母の増殖に必要であるとされている量以下になるのに対し、胚芽や無機イオン添加醪ではそのレベルは十分

量であり高く維持された。

清酒において、その官能熟度と正の相関のある  $Zn^{2+}$  は、 $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$  等とは反対に、対照醪より胚芽や無機イオン添加醪で少なくなった。

#### 文 献

- 1) 難波、戸塚、大崎、佐藤：醸協 72、305 (1977)
- 2) 難波、戸塚、小坂、小野：醸協 72、599 (1977)
- 3) B. J. Allen: Biochem. J. 34, 858 (1940)
- 4) R. P. Jones, P. F. Greenfield: Process Biochem. April 48 (1984)
- 5) T. Fujitani: Agric. Biol. Chem. 29, 477 (1965), 30, 925 (1966)
- 6) 難波、大場、高橋、森、佐藤：醸協 73、975 (1978)

### 3. 清酒醪中の香気成分生成に及ぼす胚芽、無機イオン添加の影響

清酒の香気成分として、 $i-A m O H$ 、 $i-A m O A c$ 等が重要であり、これらの香気成分と酵母によるアミノ酸取り込みとは密接な関係があることは、第1章で述べた。ここでは、総米100Kgの仕込で胚芽もしくは無機イオンを添加した醪での香気成分の生成について述べる

#### 実験方法

##### 仕込方法

本章 1. と同じ。

##### 清酒醪からの酵母の単離

植村らの方法<sup>1)</sup>に準じて、醪15gを採取し、蒸留水35mlを加え500rpm、2分の遠心分離により米粒を分離し、液部を1000rpm、4分の遠心分離でデンプン粒と酵母に分ける。下層の酵母区分を集め蒸留水30mlを加え、1000rpm、4分の遠心分離を繰り返す、顕微鏡的に純粹な酵母画分を得た。この単離した酵母は蒸留水10mlに懸濁し、酵母数を測定し、アルコールアセチルトランスフェラーゼの活性測定に使用した。

##### $i-A m O H$ 、 $i-A m O A c$ の測定

吉沢<sup>2)</sup>のhead space法を次のように一部改変して分析した。醪濾液または清酒1mlを10ml容のバイアルにとり、1gのNaCl、100 $\mu$ lの内部標準液（2000ppmのn-



AmOH、100 ppmのカブロン酸メチルを含む。)を添加し、シリコンストッパーで栓をし、50℃、30分加温後、head space gas 2 mlをガスクロマトグラフ(DNP 1m x 0.3 mm φ, column temp. 75℃, N<sub>2</sub> 40 ml/min)に注入し分析した。

β-フェネチルアルコール(Ph e OH)、チロソール(Ty r OH)、トリプトフォール(Tr p OH)の定量

醱濾液または清酒20 mlをpH 7.0に調製後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 gで飽和し、クロロホルム:酢酸エチル(1:1)80 mlで抽出、エバポレーターにより減圧乾個させ、内部標準として0.4% methyl behenateを含むエタノール溶液 0.2 mlで溶解し、ガスクロマトグラフ(column: 10% Carbowax 20M 60~80 mesh, 2m x 0.3 mm φ, column temp. 225℃, 35分保持後、240℃まで10℃/minで昇温し以後30分間240℃, injection temp. 270℃, N<sub>2</sub> 40 ml/min, sample volume 3 μl)に注入して分析した。

アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の測定

Yoshiokaら<sup>3)</sup>の方法を一部改変した方法<sup>4)</sup>により測定した。すなわち、10 ml容のバイアルに酵母懸濁液(1~2 x 10<sup>8</sup> cells/ml) 0.5 ml、Tris-HCl buffer (pH 7.5) 0.5 ml、45 mM i-AmOH 0.5 mlを加え、シリコンストッパーで栓をした後、25℃ 60分間ゆっくり振とうし、NaCl 1 gおよび内部標準液(20 ppm n-AmOH) 100 μlを添加し、50℃、30分間保持後、そのhead space gas 2 mlをガスクロマトグラフ(column: PEG6000, 2 m x 0.3 mm φ, column te

mp. 80 °C , injection temp. 140 °C、N<sub>2</sub> 40 ml/min ) に注入し、生成された *i*-AmOH を定量した。アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性は生成 *i*-AmOH 量 (ppm) / 10<sup>8</sup> yeast cells で表示した。

## 実験結果

### 香気成分の変化

酵母菌体内に取り込まれたアミノ酸のうちロイシン、イソロイシン、バリン等の中性アミノ酸は Ehrlich 系路 (p 7 参照) により脱炭酸、脱アミノさ

れ、炭素数の一つ少ない高級アルコールになることが知られている<sup>5~6</sup>

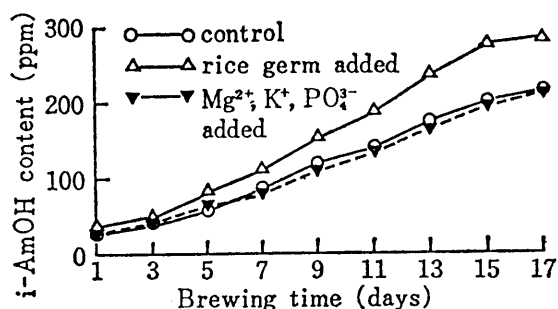


Fig.1 Changes in *i*-AmOH content in sake mash filtrate

主要な香気成分の

一つである *i*-AmOH の醪中での変化を調べた。Fig. 1 に示すように、アミノ酸供給が多くかつそのアミノ酸が酵母により多量に取り込まれた胚芽添加醪では *i*-AmOH の生成量が多くなったが、無機イオン添加醪では対照醪と大差なかった。製成酒では対照酒の 211.1 ppm に対し、胚芽添加 279.2 ppm、無機イオン添加 200.3 ppm であった (Table 1)。

バラの様な香りを持つとされている  $\beta$ -フェネチルアルコールは、Fig. 2 のように *i*-AmOH の生成パターンと異なり、3つの醪で大差なく”落泡時”と”地”にピークが2つあるという特徴的な変

化を示した。これは酵母の状態により生成と分解の2つが働いていることを示唆し、*i*-AmOH生成に認められているように、Ehrlich系路とは異なる系が存在すると考えられる<sup>5)</sup>。ただし、 $\beta$ -フェネチルアルコールは抽出されにくい成分とされているので今後さ

Table 1 Aroma components in sake

		(ppm)					
		<i>i</i> -AmOH	<i>i</i> -AmOAc	E/A ratio	PheOH	TyrOH	TrpOH
No.1	Control	211.1	3.88	1.84	87.6	101.2	14.1
No.2	Rice germ added	279.2	6.67	2.39	103.6	144.8	17.1
No.3	Mg <sup>2+</sup> , K <sup>+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> added	200.3	4.38	2.19	121.8	129.7	20.1

らに検討を要する

と思われる。香気

成分ではないが、

アミノ酸から生成

される高級アルコ

ールであるチロソ

ール、トリプトフ

ールの醪中での変化も分析したが、*i*-AmOHの生成パターン

とほぼ同様であった (Fig. 3)。チロソールは苦み成分として知ら

れているが、胚芽添加仕込酒で、144.8 ppmと対照酒の101

.2 ppmより少し多くなったが、チロソールの閾値である346 p

ppm<sup>7)</sup>よりはるかに低い値であり、味に直接影響するほどではない

と思われる。

*i*-AmOHから生成される*i*-AmOAcは、吟醸香の主要な

香気成分の一つであるが、胚芽添加醪では醪中期以後、その生成量

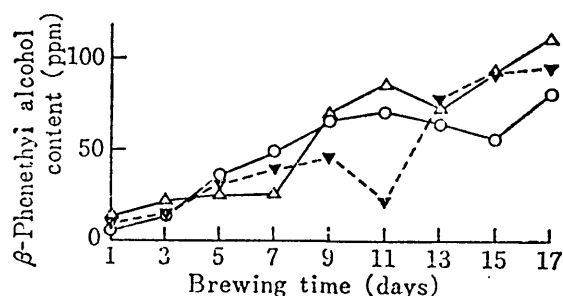


Fig.2 Changes in  $\beta$ -phenethyl alcohol content in sake mash filtrate

The symbols are the same as described in the legend to Fig.1

は高く、製成酒でも対照酒の3.88 ppm、無機イオン添加の4.

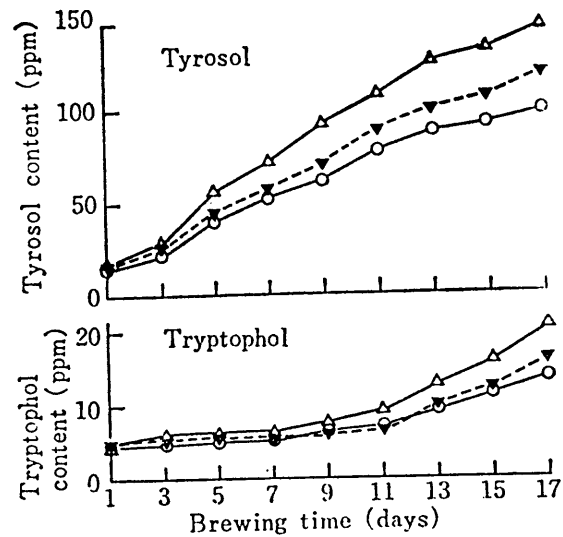
38 ppmに対して  
6.67 ppmと高く  
なった (Fig. 4、Ta  
ble 1)。清酒の香  
気成分の場合、単純  
にこれらの成分が多  
いことより、i-Am  
OAcのi-Am  
OHに対する比率、  
E/A比が高くなる

ことが重要であ  
る。そこでE/  
A比の変化を調  
べた。Fig. 5に  
示したように、  
胚芽添加醪では  
醪後半に高くな

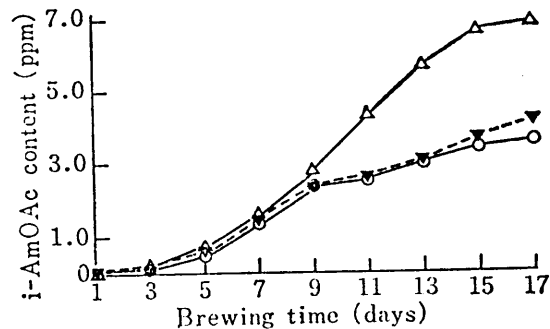
り、製成酒で対照酒の約1.3倍となった。無機イオン添加では、小  
仕込試験の結果 (第1章) ほどではないが約1.2倍となり、両仕込  
ともわずかながらE/A比の改善がみられた。

#### アルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の変化

i-AmOAcはi-AmOHとアセチルCoAとの縮合反応に  
より生成され、その生成にはアルコールアセチルトランスフェラー



**Fig.3** Changes in tyrosol and tryptophol contents in sake mash filtrate  
The symbols are the same as described in the legend to Fig.1



**Fig.4** Changes in i-AmOAc content in sake mash filtrate  
The symbols are the same as described in the legend to Fig.1

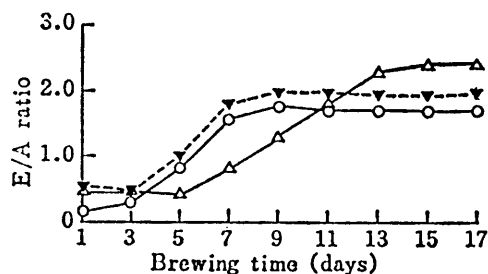
ゼが働いているとされている<sup>3)</sup>。そこで、醪中より酵母を単離し、酵母細胞のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の変化を測定した。Fig. 6に示すように、胚芽添加醪では他の2つに比べ、やや低いレベルで推移

したが、その活性の変化のパターンはすべて同じで、留仕込後のもっとも高い活性が徐々に減少し、醪後半に再び上昇し

た。ここでは活性を  $10^8$  yeast cells で生成する i - A m O A c 量で表示したが、胚芽添加醪では

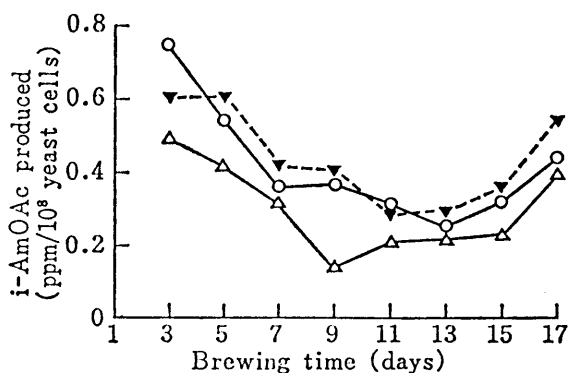
醪 1 g 当りのアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性を

計算すると、胚芽添加、無機イオン添加醪中の活性が対照醪よりは大きくなる。



**Fig.5** Changes in E/A ratio in sake mash filtrate

The symbols are the same as described in the legend to Fig.1



**Fig.6** Changes in alcohol acetyltransferase activity of yeast cells isolated from sake mash

The symbols are the same as described in the legend to Fig.1

## 考 察

留仕込時に胚芽もしくは  $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$  を添加することにより酵母のアミノ酸取り込み能が高くなり、アミノ酸の少ない清

酒が得られる。ロイシン等のアミノ酸は酵母に取り込まれると、それに相当する高級アルコールが Ehrlich 系路により生成されることが知られているので、 $i-A m O H$ 等の高級アルコールの醪中の変化、および主要な香気成分の一つである  $i-A m O A c$  の変化について、その生成酵素であるアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性と ATP 量の変化とをあわせて検討した。

Table 1に示したように、製成酒の  $i-A m O H$ 、 $i-A m O A c$  の量は胚芽添加では両者とも多く、無機イオン添加では  $i-A m O H$  が対照と変わらないのに対し、 $i-A m O A c$  がやや高くなったので、E/A比では胚芽添加、無機イオン添加、対照の順となった。胚芽や無機イオン添加仕込により、わずかではあるがE/A比が高くなることは、総米200gの小仕込で同様の結果が得られているので再現性のある結果と考えらる。

栗山ら<sup>4)</sup>の報告では、清酒醪中での酵母のアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の変化は、留仕込直後に最大活性を示し、以後上槽まで減少するパターンを示し、 $i-A m O A c$ 生成には  $i-A m O H$ 量が律速条件であるとされている。しかし、Fig. 6に示したように、著者らの分析では、留仕込後、漸減する酵素活性が醪後半に再び増加に転じている。Yoshiokaら<sup>8)</sup>はアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性が通気や不飽和脂肪酸の添加により阻害され、その活性が様々の調節下におかれていることを報告しているが、醪後半の活性上昇がその阻害解除によるのか、アルコールアセチルトランスフェラーゼとは別のエステル合成酵素であるかは現在のところ不明であるが、 $i-A m O A c$ が生成される醪後半にその活性が

上昇することは興味深いところである。

## 要 約

総米 100 kg の仕込を 3 本（対照醪、胚芽添加醪、 $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$  無機イオン添加醪）行い、醪濾液中および製成酒中の香气成分の変化について調べた。また、これらと関連が深いと考えられるアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性についても併せて検討した。

酵母によるアミノ酸代謝と関連の深い高級アルコールの生成については、胚芽添加醪で *i*-AmOH の生成が多かったが、無機イオン添加は対照と大きな差はなかった。チロソール、トリプトファンも *i*-AmOH とほぼ同様のパターンを示したが、 $\beta$ -フェネチルアルコールの醪中の生成パターンはこれらと異なり、“落泡時”と“地”にピークが 2 つあるという特徴的なパターンを示した。

*i*-AmOAc は胚芽添加で多く、次いで無機イオン添加、対照の順であった。また、E/A 比では、胚芽添加、無機イオン添加が対照酒に比べ、製成酒でそれぞれ 1.3, 1.2 倍となった。

*i*-AmOAc の生成に関与しているといわれているアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の変化は、留仕込後に減少し、醪末期に再上昇したが、*i*-AmOAc 量の生成パターンと見かけ上相関はなかった。

文 献

- 1) 北本、高橋、戸塚、吉沢：醸酵工学 63、289 (1985)
- 2) 吉沢：醸協 68、59 (1973)
- 3) K. Yoshioka, N. Hashimoto: Agric. Biol. Chem. 45、2183 (1981)
- 4) 栗山、齊藤、芦田、杉並、今安：醸酵工学大会要旨集 p 193 (昭和57年)
- 5) 吉沢：醸協 61、481 (1966)
- 6) 大内、高岸、山本、秋山：醸酵工学 59、9 (1981)
- 7) 難波、百瀬、大場 編：清酒製造技術 p 276 日本醸造協会 (1979)
- 8) K. Yoshioka, N. Hashimoto: Agric. Biol. Chem. 47, 2287 (1985)



### 第3章 酵母細胞内アミノ酸の動態について

#### 1. 酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞における細胞質と液胞内アミノ酸プールの分別定量法

酵母によるアミノ酸の取り込み系には、大別して2つの系が存在することが知られている。すなわち、通常存在する約20種のアミノ酸全てに関与する一般的アミノ酸透過系、および個々のアミノ酸に特異的なアミノ酸透過系の2つである。

酒類の醸造では、原料から由来するアミノ酸が酵母により取り込まれ、種々の代謝産物が生産される。これらの代謝産物は最終製品である酒類の主要な香味成分となる。

第1章、第2章で、清酒仕込時に胚芽を添加すると、酵母によるアミノ酸取り込み量が大となりイソアミルアルコールや酢酸イソアミル等の香气成分が多量に生成されることについて述べた。これらの現象の基礎的解析として、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 細胞内のアミノ酸分布を調べ、その動態を知ることは重要である。

酵母、*Saccharomyces cerevisiae* の液胞は細胞全体積の約25%を占める最も大きなオルガネラであり、液胞膜にアミノ酸の特異的輸送系を持ち巨大な貯蔵庫としても機能している。また、この細胞内コンパートメントが細胞のホメオスタシスに重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある<sup>1, 2)</sup>。

例えば、アルギニンは細胞内で数10mMというアルギニンの分解系の初発酵素であるアルキナーゼを誘導するのに十分な濃度で存在するにもかかわらず、通常アルギナーゼレベルは低く保たれてい

る。このことは細胞内アルギニンの90%以上が液胞に存在しており、細胞質のアルギニン濃度は低く保持されているという細胞内コンパートメントによって説明されている。

すなわち、酵母細胞内のアミノ酸プールの動態を解析するためには、細胞質および液胞の2つのプールを分けて測定することが重要である。細胞質と液胞の2つのプールを分けて抽出する方法として、等張下で細胞膜のみを透過性にした後、細胞質を抽出し、次に浸透圧ショックにより液胞膜を破壊して液胞内プールを抽出する方法が一般的に行われている。C. utilis や S. cerevisiae に対して報告されているものは、poly-L-lysine<sup>3)</sup>, DEAE-dextran<sup>4)</sup>, もしくは cytochrome c<sup>5)</sup> 処理により細胞膜を透過性にするという3つの方法がある。しかし、これらの方法は、対数増殖期初期の若い細胞にのみに有効であること、適用できる菌株が限定される、というような制約がある。現在、世界で最も一般的に使用されている実験室株である S. cerevisiae X2180-1A 株について、これらの方法を追試したところ、どれも満足すべき結果は得られなかった。

本節では、簡単な  $Cu^{2+}$  処理により細胞膜のみが透過性になることを利用して、細胞質および液胞内アミノ酸プールを段階的に抽出、測定する方法を設定した。また、設定した方法を用いて、酵母細胞内アミノ酸プールに及ぼす培地中へのアミノ酸添加の影響、窒素飢餓時におけるアミノ酸プールの動態等について解析した。

## 実験方法

### 使用菌株および培地

菌株は、*S. cerevisiae* X2180-1A (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley) を、培地は、栄養培地として YEPD (1% 酵母エキス、2% ポリペプトン、2% グルコース) 培地を、合成培地としては、YNBD (0.67% Difco yeast nitrogen base、2% グルコース) 培地を使用した。Cu<sup>2+</sup> 処理による細胞抽出の条件設定のためには、10 mM アルギニンを添加した YNBD 培地を主に使用した。

### 試薬

DEAE-dextran はファルマシア社、poly-L-lysine と cytochrome c はシグマ社より購入した。接合フェロモン、 $\alpha$ -factor は、Dünze らの方法<sup>6)</sup> によって調製した。

### アミノ酸の分析

酵母細胞抽出液のアミノ酸量はニンヒドリン法<sup>7)</sup> により、アミノ酸組成は日立 835 型アミノ酸分析計により測定した。

### その他の分析

タンパク定量は牛血清アルブミンを標準にして Lowry 法<sup>8)</sup> により測定した。カリウム含量は Perkin-Elmer 370 原子吸光光度計により測定した。

### Cu<sup>2+</sup> 処理による細胞質と液胞の段階的抽出の標準法

酵母細胞 ( $3 \times 10^8$  cells/ml) を遠心分離により集菌し蒸留水で 2 回洗浄後、1.5 ml の 0.6 M ソルビトール、10 mM グルコース、0.2 mM CuCl<sub>2</sub> を含む 2.5 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 6.0)

に懸濁する。30℃、10分間保持後、1.0 ml の細胞懸濁液をメンブレンフィルター (Sartorius, 0.45  $\mu$ m) で濾過する。さらに、0.5 ml の 0.6 M ソルビトールを含む 2.5 mM 燐酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) で4回洗浄する。濾液と洗浄液を併せ (3 ml)、細胞質抽出区分として使用した。フィルター上の細胞は3.0 ml の蒸留水中に懸濁し、15分間煮沸した後、5000 rpm で遠心しその上清を液胞抽出区分とした。

### 実験結果

#### 細胞質と液胞のアミノ酸プールの段階的抽出法の最適条件の検討

Fig. 1 に YEPD 培地で生育したトータルの細胞内アミノ酸組成、

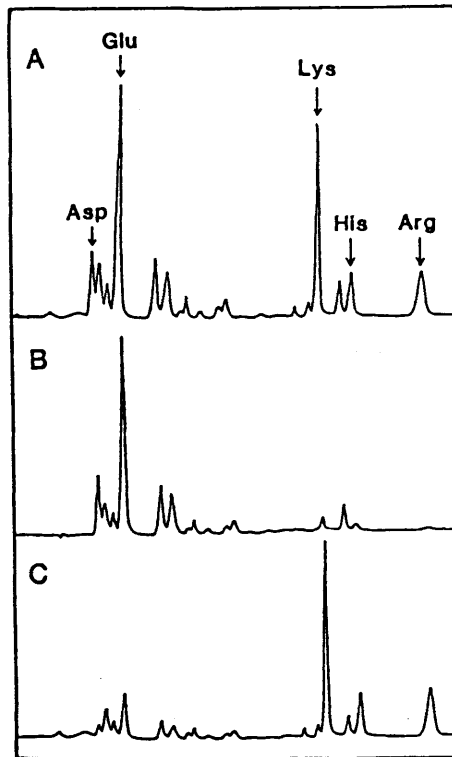


Fig. 1 Amino acid compositions of total cellular, cytosolic and vacuolar pools.

X2180-1A cells were grown in YEPD medium and their pools were analyzed as described under "Materials and Methods".

A, total cellular pool; B, cytosolic pool; C, vacuolar pool.

および細胞質と液胞中のアミノ酸組成を示す。細胞質と液胞アミノ酸ブールは  $Cu^{2+}$  処理法により段階的に抽出されたものであるが、20種のアミノ酸についての回収率はすべて90%以上であった。細胞質ブールには全アミノ酸の53%が存在し、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、アラニン等が主たるアミノ酸であった。残りの47%は液胞ブールに存在し、その主たるものはリジン、アルギニン、ヒスチジンであった (Table 1)。  $Cu^{2+}$  処理による細胞質と液胞の段階的抽出法は酵母細胞に対する  $Cu^{2+}$  の働き<sup>9)</sup> を考慮して決定された。すなわち、細胞内の細胞質と液胞の2つのブールが選択的に抽出されるためには、細胞膜が完全に透過性となり、かつ液胞膜は intact に保たれていることが重要である。そのため、次の5つの条件 (a~e) について検討を行った。YEPD培地および10mMのアルギニンを含むYNBD培地で30℃で生育させ、対数増殖期で集菌した酵母細胞を使用した。アルギニンとグルタミン酸はそれぞれ液胞と細胞質のマーカーアミノ酸として使用した。

(a) 温度:  $Cu^{2+}$  処理は、温度依存性があり<sup>9)</sup>、0℃ではアミノ酸の細胞外への漏出は認められない。そこで、標準法では30℃に設定した。

(b) pHおよび緩衝液: 酵母細胞に対する  $Cu^{2+}$  の作用はpH依存性があり<sup>9)</sup>、液胞膜の安定性もpHにより大きく影響される。そのため、pHと磷酸カリウムの濃度の影響について検討した。2.5mM磷酸カリウム緩衝液 (0.6Mソルビトールを含む) では、pH6.0のとき細胞からのアミノ酸の抽出は最も早く、30℃、10分

TABLE 1. Amino acid compositions of cellular pools and distributions between pools

	YEPD		YNBD+ASP		YNBD+GLU		YNBD+PRO		YNBD+GLY		YNBD+MET		YNBD+HIS		YNBD+LYS		YNBD+ARG		YNBD	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Asp	39	11	49	9	12	74	13	42	11	14	9	48	22	40	19	33	11	22	11	22
Thr+Gln	38	40	49	49	69	37	36	73	16	34	19	54	19	48	32	42	94	64	94	64
Ser	16	23	11	39	7	63	30	73	4	46	10	43	12	46	4	42	10	47	10	47
Glu+Cit	144	14	130	19	126	24	76	55	69	15	93	61	148	47	104	32	144	34	144	34
Gly	42	21	16	42	9	46	255	46	7	47	16	34	13	48	5	37	11	48	11	48
Ala	42	23	36	40	37	42	32	62	24	18	29	42	30	37	40	35	49	42	49	42
Cys	4	21	6	48	7	49	9	62	7	53	7	53	10	62	4	53	6	51	6	51
Val	11	34	17	48	14	51	16	63	16	38	16	58	15	52	10	50	16	52	16	52
Met	5	23	5	50	6	49	1	-	34	27	6	45	5	45	3	53	7	52	7	52
Ile	9	36	6	50	5	53	5	52	4	56	7	57	6	55	4	67	6	54	6	54
Leu	15	32	5	65	4	63	3	-	6	55	6	60	7	66	3	77	4	63	4	63
Tyr	2	64	5	44	3	48	4	44	6	55	5	51	4	50	2	54	4	50	4	50
Phe	5	-	1	-	-	-	1	-	1	-	3	-	2	-	1	-	1	-	1	-
Orn	7	99	12	76	17	81	57	94	31	84	19	76	12	72	24	80	16	90	16	90
Lys	106	89	24	77	26	83	20	81	35	82	43	66	660	96	16	61	30	79	30	79
NH <sub>3</sub>	26	20	41	37	60	72	45	53	62	56	102	45	117	51	46	30	53	52	53	52
His	36	76	8	66	16	80	6	99	12	75	628	96	13	71	4	99	25	62	25	62
Arg	53	94	16	93	24	98	61	98	81	92	22	80	20	56	319	97	45	97	45	97
Pro	2	-	3	-	9	-	-	-	-	-	-	-	4	-	9	-	2	-	2	-
Total	600	47	440	38	451	54	670	62	426	54	1040	80	1119	77	649	70	534	55	534	55

2180-1A cells grown in YEPD medium or YNBD medium supplemented with 10 mM concentrations of various amino acids were treated with CuCl<sub>2</sub> as described under "Materials and Methods" and their pools were analyzed with an amino acid analyzer. A, total cellular amino acid content (nmol/1 x 10<sup>8</sup> cells); B, percent of total in vacuolar extract. For the calculation of the concentration of amino acid in each pool, we assumed that cell volumes of haploid cell as 29 μm<sup>3</sup> and the vacuoles account for approximately 25% of the cell volume. Total amino acid concentration (mM): 0.345 x A, vacuolar concentration (mM): 0.0138 x A x B.

で平衡に達した。この条件で、全グルタミン酸の90%が抽出され、アルギニンについては6%以下であった。このことは、細胞膜のみが透過性となっていて、液胞膜がintactに保たれていることを示す。pH 5.0では、細胞質区分に抽出されるグルタミン酸の量がpH 6.0の時の約半分となり、抽出が不完全であることが示唆された。10 mM 磷酸カリウム緩衝液(pH 6.0)を使用したとき、同様なアミノ酸組成を持つ細胞質抽出区分が得られたが、平衡に達するのに20分以上時間がかかった。イミダゾール、クエン酸、MES/Tris等の緩衝液は $\text{Cu}^{2+}$ をキレートするために、またはアミノ酸分析を妨害するために使用することは適当ではなかった。ソルビトールで等張にしない場合、液胞膜が破壊されたことを示す大量のアルギニンが細胞質抽出区分に検出された。以上の点から、0.6 M ソルビトールを含む2.5 mM 磷酸カリウム緩衝液を使用することとした。

(c) 処理時間: Fig. 2 に細胞質および液胞プールの抽出に必要な $\text{Cu}^{2+}$ 処理の時間を示す。YEPD培地で生育した細胞では(Fig. 2A)細胞質プールは約8分の処理で十分であるが、YNBD培地(Fig. 2B)ではやや長く約10分の処理時間が必要であった。酵母細胞の種々の生理状態での細胞内プールを測定できることが重要であるので、合成培地であるYNBD培地の10分間を処理時間とした。

(d)  $\text{Cu}^{2+}$ 濃度の影響: Fig. 3 に示すように、YNBD培地で生育した細胞では、10分、30℃の処理条件のとき、0.2 mM  $\text{CuCl}_2$ で2つのプールは選択的に抽出された。YEPD培地で

は 0.1 mM  $\text{CuCl}_2$  で十分であった。

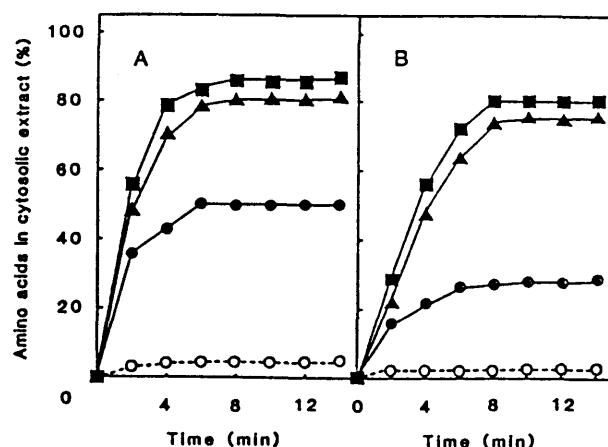


Fig. 2 Time courses of release of amino acids on  $\text{Cu}^{2+}$ -treatment.

X2180-1A cells grown in YEPD medium (A) or in YNBD medium supplemented with 10 mM arginine (B) were treated with 0.2 mM  $\text{CuCl}_2$  for the indicated times, and released amino acids were analyzed with an amino acid analyzer. Releases of total amino acids (●), aspartate (■), glutamate (▲), and arginine (○) are shown as percentages of those in the total cellular pool.

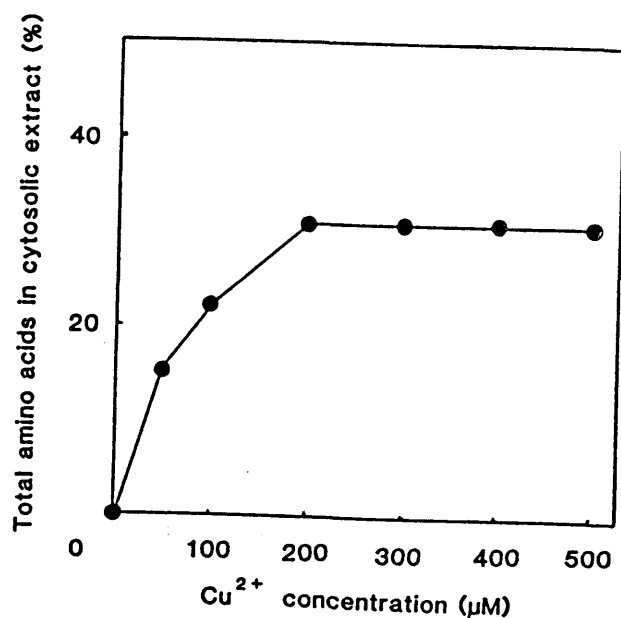


Fig. 3 Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration on differential extraction.

X2180-1A cells grown in YNBD medium supplemented with 10 mM arginine were treated with  $\text{CuCl}_2$  at the indicated concentrations for 10 min.



(e) グルコース添加の影響：定常期に入った細胞では  $Cu^{2+}$  処理に対して抵抗性を持つようになる<sup>9)</sup>。10 mMのグルコースの添加はこのような定常期の細胞に対しても2つのプールの抽出に効果があった。グルコース添加によって、抽出効率、2つのプールの抽出比率やアミノ酸組成に変化は認められなかったので、より広い適用性を持たせるため、10 mMグルコースは、通常の標準法において添加することとした。

実験方法に記した抽出法による  $Cu^{2+}$  処理は、ニュートラルレッドによる細胞染色から判断して、ほとんど全ての細胞 (> 98%) の細胞膜を透過性に行っていることが確認された。

#### 増殖時期による液胞内アミノ酸プールの変化

$Cu^{2+}$  処理法により、増殖時期の違いによる液胞および細胞質中のアミノ酸の変化を調べた。細胞当りの全アミノ酸量は、対数増殖中期 ( $2 \times 10^7$  cell/ml) までは漸増した。細胞質と液胞プール中の20種のアミノ酸の相対的濃度は増殖時期によって大きな変化はみられなかった。

#### 液胞内アミノ酸プールに及ぼす培地中のアミノ酸の影響

アミノ酸代謝およびアミノ酸プール形成における液胞の生理的役割を明らかにするため、種々のアミノ酸を添加した YNB D 培地で生育させた酵母細胞を  $Cu^{2+}$  処理法により段階的に抽出し、液胞および細胞質アミノ酸プールを分析した (Table 1)。リジンまたはヒスチジンを添加した YNB D 培地では、細胞内全アミノ酸含量は無添加の約2倍に増大した。そして、リジン添加の場合液胞内リジンは27倍に、ヒスチジン添加の場合42倍となったが、それらの

細胞質アミノ酸プールには大きな変化はみられなかった。アルギニン添加の場合、液胞内アルギニンは7倍になった。アスパラギン酸、グルタミン酸、メチオニン、プロリンの添加は、細胞質プールのこれらのアミノ酸をそれぞれ5、2、5、4倍に増加させた。しかし、これらのアミノ酸はグルタミン酸を除いて、量的に少ないものであるので、全アミノ酸プールの総量はそれほど大きく変わらなかった。グルタミン酸は、全アミノ酸プールを増大させたが、その分布は変わらなかった。グリシンの添加は、全アミノ酸プールを増大させ、その分布は細胞質と液胞の2つのプールにほぼ等しく分布した。

#### 窒素飢餓時のアルギニンプールの変化

Table 1の結果は、酵母細胞は液胞中に430 mM（細胞の体積を約 $29 \mu\text{m}^3$ とし、液胞の体積はその25%として計算した。）もの高濃度のアルギニンを蓄積できることを示している。液胞は窒素源の貯蔵庫として働いていることが考えられるので、この大きなアルギニンプールが窒素欠乏時にどのような動きを示すかを調べた。初めに、10 mMアルギニンを添加したYNBD培地で生育した細胞を、窒素源を含まないYNBD培地に移した後の細胞内プールの変動を測定した。Fig. 4に示すように、4時間の窒素飢餓培養中の液胞中のアルギニンは時間と共に減少している。この間に、細胞数は約4倍になったが、その窒素源としてはこの液胞内アルギニンが使われたことになる。液胞中のアミノ酸の大きな変化とは反対に、細胞質中のアミノ酸プールはほぼ一定であった。

窒素飢餓時の細胞の顕微鏡観察では、多量に蓄積されたアルギニンが減少するにもかかわらず、液胞の大きさには大きな変化は認め

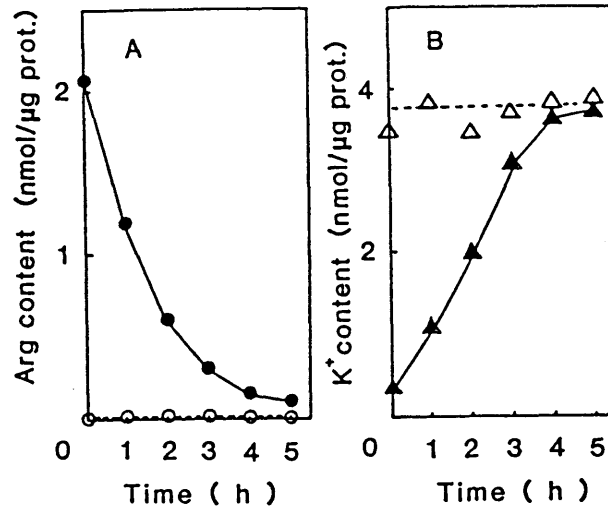


Fig. 4 Changes in arginine and K<sup>+</sup> contents during nitrogen starvation.

X2180-1A cells grown in 25 ml of YNBD medium supplemented with 10 mM arginine were harvested, washed twice with 25 ml of nitrogen-free YNBD medium, and then transferred to 25 ml of nitrogen-free YNBD medium. At the indicated times after transfer, cytosolic (open symbols) and vacuolar (closed symbols) pools were extracted by the Cu<sup>2+</sup>-method described under Materials and Methods and the arginine (A) and K<sup>+</sup> (B) contents were determined.

られなかった。このことは液胞内浸透圧を維持するために、アルギニンの液胞から細胞質への移動と共に、別のカチオンが液胞内に入って行くと考えられた。そこで、酵母細胞内に多量に含まれるカチオンで、かつ一般的に浸透圧調節に働いているK<sup>+</sup>含量についてその変化を測定した。Fig. 4Bに示すように、液胞内アルギニンの減少と共に、K<sup>+</sup>は液胞内に入って行くことが認められた。このときのアルギニンとK<sup>+</sup>の動きは、その初速度から判断して1:1であ

ると計算された。なお、このときの細胞質内  $K^+$  濃度はほぼ一定に保たれていた。

#### アルギナーゼ誘導時の液胞中アルギニンの変化

アルギナーゼは、培地にアルギニンを添加したときに細胞内に取り込まれたアルギニンを分解するために誘導されてくる酵素であるが、培地中にアルギニンがないときにもアルギナーゼが誘導されることが知られている。すなわち、リジンが培地中にある場合と、a型細胞が接合フェロモンの $\alpha$ -ファクターにより処理された場合にアルギナーゼが誘導される<sup>10, 11)</sup>ことが知られており、リジンや $\alpha$ -ファクターが液胞中のアルギニンを細胞質に移動させることによって、アルギナーゼが間接的に誘導されるのであろうと考えられている。そこで、この説明が正しいかどうかを調べるため、液胞および細胞質のアルギニンプールの測定をした。

10 mMのアルギニンを添加したY N B D培地で生育した細胞を滅菌水で洗浄した後、10 mMリジンを含むY N B D培地に移し、経時的に細胞質および液胞中のアミノ酸プールを測定した (Fig. 5)。液胞中のリジンは時間と共に増加し、アルギニンは減少した。すなわち、液胞中のアルギニンは細胞質へ移動したと考えられるが、細胞質中のアルギニンの増加は認められなかった。これは、細胞質に出たアルギニンはすみやかにアルギナーゼで分解されたためと考えられる。

Fig. 6 はY E P D培地で生育している細胞に $\alpha$ -ファクター処理をしたときの液胞中のアルギニンの変化を示す。 $\alpha$ -ファクター処理により液胞中のアルギニンは減少するのに対し、細胞中のグルタミ

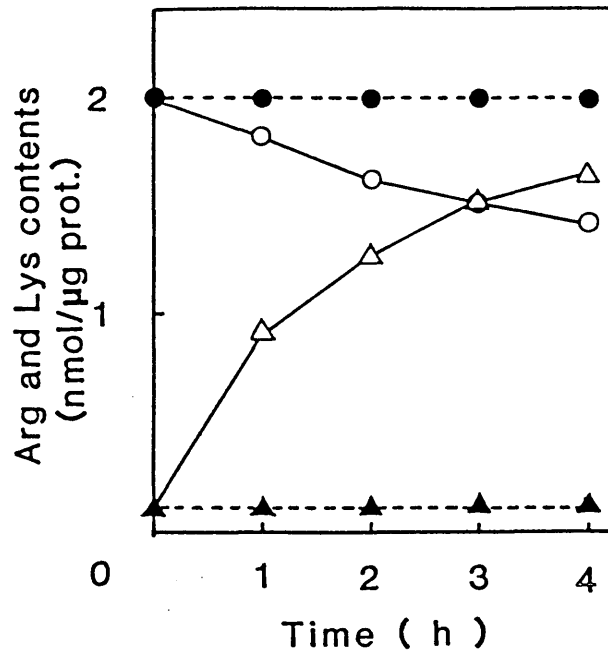


Fig. 5 Release of arginine from vacuoles by exchange with lysine.

X2180-1A cells grown in 25 ml of YNBD medium supplemented with 10 mM arginine were harvested, and washed with 25 ml of YNBD medium supplemented with 10 mM lysine or with 10 mM arginine. At the indicated times after transfer, the cytosolic and vacuolar pools were extracted as described under Materials and Methods and the arginine and lysine contents were determined. When the cells were transferred to lysine supplemented medium, their vacuolar contents of arginine (○) and lysine (△) changed significantly. When the cells were transferred to arginine supplemented medium, their vacuolar contents of arginine (●) and lysine (▲) did not change.

ン酸は対照と同じく一定であることから、 $\alpha$ -ファクター処理により液胞からアルギニンが特異的に細胞質に出て行くと考えられる。

これらの結果により、 $Cu^{2+}$  処理による細胞質と液胞との選択的抽出法が、種々の生理的条件下にある細胞での液胞のダイナミックな働きを調べる上で有効であることが示された。

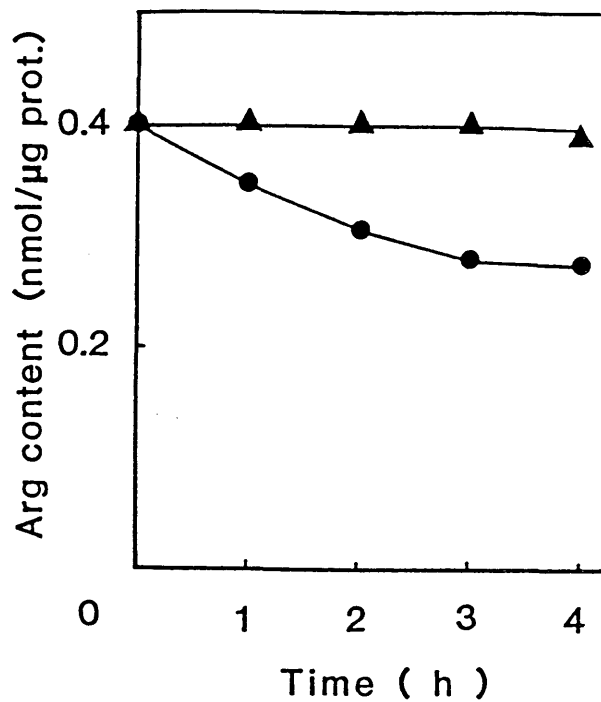


Fig. 6 Release of arginine from vacuoles on treatment with  $\alpha$ -factor.

X2180-1A cells were grown in YEPD medium and  $\alpha$ -factor was added to the cell suspension at a concentration of 50 U/ml. The cytosolic and vacuolar pools were extracted as described under Materials and Methods. The arginine contents of vacuoles of cells incubated with (●) or without (▲)  $\alpha$ -factor for the indicated times are shown. The glutamate content of the cytosol was not affected by the presence of  $\alpha$ -factor.

#### 考 察

$Cu^{2+}$  処理による細胞質と液胞との選択的抽出法が、種々の生育条件にある酵母細胞のアミノ酸プールの分析に有効であることを示した。この方法は、cytochrome c、DEAE-dextran、polylysine等の polycationが菌株による制約があるのに対し、多くの菌株 (A363A, A56-1A, A13-18) に対して適用可能であった。また、実験室株ばかりでなく、清酒酵母 (協会 6号、7号、9号) も同様に分析可能で

あった。

佐藤ら<sup>12)</sup>は、単離、精製した液胞膜小胞を使った速度論的解析から、液胞膜には7つの独立のアミノ酸輸送系（アルギニン、アルギニン-リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン-トリプトファン、チロシン、グルタミン-アスパラギン、イソロイシン-ロイシン）が存在し、 $H^+$ /アミノ酸対向輸送系により、10種のアミノ酸が液胞内に能動輸送されることを報告している。この時、メチオニン、グリシン、プロリンは液胞膜小胞には取り込まれなかった。Table 1に示した液胞内アミノ酸組成は、液胞膜小胞を用いたin vitroでの実験結果とよく一致した。

種々のアミノ酸を添加したY N B D培地で生育した酵母細胞のアミノ酸プールの分析では細胞質プールでは培地中のアミノ酸に対して大きな変動を示さない（192-367 nmol/ $10^8$  cells）のに対し、液胞内プールでは大きな変動（167-862 nmol/ $10^8$  cells）がみられた。このことは、基本的な生命活動は細胞質で行われ、液胞は細胞のホメオスタシス機能を担っており、種々の代謝産物の貯蔵庫として機能しているというこれまでの報告<sup>2)</sup>と一致するものである。アルギニンは液胞内に約 430 mM と高濃度に蓄積され、窒素飢餓時には、貯蔵されたアルギニンがN源として使用されることを直接確認することができた。これは、液胞が生理的に活動的なコンパートメントであり、細胞内アミノ酸代謝に関与していることを強く示唆するものである。

## 要 約

酵母、*S. cerevisiae* の細胞を低濃度の  $Cu^{2+}$  処理により細胞膜

のみを選択的に透過性にすることにより細胞質および液胞内アミノ酸プールを簡易に測定する方法を設定した。この分別定量法を用いて、種々のアミノ酸を添加した Y N B D 培地で生育した酵母細胞中のアミノ酸プールの分析を行った。10 mM のアルギニンを添加した場合、液胞内に約 430 mM という高濃度のアルギニンが蓄積された。この液胞内アルギニンは窒素飢餓時に N 源として利用された。この時、液胞から細胞質に移動するアルギニンに対して、その反対に細胞質から液胞に  $K^+$  が流入するのが認められた。液胞内アルギニンは、細胞質リジンの液胞への流入により細胞質へ押し出されること、接合フェロモンである  $\alpha$ -factor により細胞質へ移動することを直接的に観察することが可能であった。液胞は、アミノ酸等種々の代謝産物の貯蔵庫として働いており、アミノ酸代謝や浸透圧調整に重要な役割を果たしていると考えられているが、これらの働きを調べるのに本法は有効であると思われる。

## 文 献

- 1) Y. Anraku: Bioenergetics, Structure and function of energy transducing systems (T. Ozawa, and S. Papa) p 249, Japan Scientific Societies Press and Academic Press, Tokyo and New York. (1987)
- 2) 大隅、安楽、北本: 醸協 80、11 (1985)
- 3) C. A. Zacharski and T. G. Cooper: J. Bacteriol. 135, 490 (1978)



- 4 ) V. Huber-Wälchli, and A. Wiemken: Arch. Microbiol. 120, 141 (1979)
- 5 ) F. Messenguy, D. Colin, and J-P, Ten Have: Eur. J. Biochem. 108, 439 (1980)
- 6 ) W. Düntze, D. Stötzler, E. Bücking-Throm, and S. Kalbityzer: Eur. J. Biochem. 35, 357 (1973)
- 7 ) E. W. Yemm, and E.C. Cooking: Analyst 80, 209 (1955)
- 8 ) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
- 9 ) Y. Ohsumi, K. Kitamoto, and Y. Anraku: J. Bacteriol. in press (1988)
- 1 0 ) P. A. Whitney, and B. Magasanik: J. Biol. Chem. 248, 6197 (1973)
- 1 1 ) R. Sumrada, and T. G. Cooper: J. Bacteriol. 136, 234 (1978)
- 1 2 ) T. Sato, Y. Ohsumi, and Y. Anraku: J. Biol. Chem. 259, 11505 (1984)

## 2. 液胞内アミノ酸プールの変化した変異株 (slp1) の単離とその性質

液胞内には、リジン、ヒスチジン、アルギニンという塩基性アミノ酸が高濃度に蓄積されることは、前節で示した。これらのアミノ酸のほかにも、S-アデノシルメチオニン、燐酸、Ca、Mg等が液胞に蓄積される。単離した液胞膜小胞の速度論的解析から、10種類のアミノ酸に対する7つの能動輸送系の存在が明らかにされた。液胞によく蓄積されるリジンは、この輸送系のうち1つの系のみで液胞に輸送されること<sup>1)</sup>、*S. cerevisiae* はリジンとヒスチジンを分解することができないこと<sup>2)</sup>から、高濃度リジンもしくは、リジンアナログであるS-2-aminoethyl-L-cysteine(AEC)に対して感受性となった株を分離することにより、液胞内にリジンを蓄積することができない変異株を取得することができると考えた。このようにして、取得される液胞内リジンプールの小さい変異株の中には、3種類の変異株が存在すると考えられた。すなわち、1) 液胞膜リジン輸送系に変異を持つもの、2) H<sup>+</sup>-ATPaseのようなエネルギー生産系に変異を持つもの、3) 液胞形成そのものに欠損があるもの、である。以上のことより、液胞内リジンプールの小さい変異株を多数分離し、その性質を調べた結果について述べる。

### 実験方法

#### 使用菌株および培地

使用した菌株を Table 1 に示した。培地は、前節に記した Y E P

D 培地、Y N B D 培地を使用した。固形培地には上記培地に 2 % 寒天を加えた。変異株の単離培地として、8 mM リジンもしくは 0.1 mM リジンと 0.5 mM S-2-aminoethyl-L-cysteine(AEC) (Sigma)を使用した。孢子形成には、1 % 酢酸カリウム、0.1 % 酵母エキス、0.05 % グルコース、2 % 寒天を含む培地を使用した。

Table 1 *S. cerevisiae* strains used

Strain	Genotype	Source
X2180-1A	MAT a	The Yeast Genetic Stock Center, Berkeley
A13-1A	MAT a <u>lys1</u>	This laboratory
A56-1-1A	MAT $\alpha$ <u>adel</u>	This laboratory
KL97	MAT a <u>lys1</u> <u>slp1-1</u>	This work
KL65	MAT a <u>lys1</u> <u>slp1-2</u>	This work
KL197-1A <sup>a</sup>	MAT a <u>slp1-1</u>	This work

<sup>a</sup>The haploid strain KL197-1A was one of segregants from the diploid strain constructed by crossing KL97 and A56-1-1A.

### 変異株の単離

液胞膜の変異による液胞内リジンプールの減少した株は、高濃度リジン、またはリジンアナログの AEC に対して感受性となることが期待される。細胞膜のリジン輸送系の変異や、リジン生合成系の変異による変異株が単離されるのを防ぐため、親株として X2180-1A由来のリジン要求株である、A13-18 株(a lys1)を使用した。

#### 1) AEC 感受性変異株

A13-18 株を Y E P D 培地 10 ml で一夜培養し、遠心分離により集菌後、無菌水で 1 回洗浄。10 ml の 0.1 M 燐酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、0.3 ml の EMS (ethylmethanesulfon

ate)を加え、ゆっくり攪はんし、室温で60分放置後遠心分離により集菌、5回無菌水で洗浄し、1枚のプレートに100~200のコロニーが出るように希釈してYEPDプレートにまき、これをマスタープレートとした。30℃で2~3日培養し、生じたコロニーを0.5mM AEC添加YNBDプレート(0.1mMリジンを含む)とAEC無添加YNBDプレート(0.1mMリジンを含む)にレプリカする。AEC添加YNBDプレート上で生育の悪い株をAEC感受性変異株として単離した。約5500の変異処理をしたコロニーから62株のAEC感受性変異株を取得した。

## 2) リジン感受性変異株

上と同様に変異処理をした細胞をYEPDプレートで生育させ、そのコロニーを0.3mMのリジンを含むYNBDプレートと8mMのリジンを含むYNBDプレートにレプリカした。低濃度リジンプレートでは親株と同様に生育し、高濃度リジンプレートで生育の遅い株をリジン感受性株として単離した。

リジン感受性株の単離には、この他、下記のようなナイスタチン処理による変異株の濃縮処理<sup>3)</sup>も併せて行った。

EMS変異処理菌体を洗浄後、その0.1mlをとり、8mMリジン1mlを含むYNBD培地で25℃、一晚培養し、集菌、洗浄後、リジンを含まないYNBD培地0.9mlに懸濁し3時間30℃で培養する。次いで、100μg/mlのナイスタチン溶液0.1mlを加えさらに90分間培養を続ける。この時、親株は前培養時にリジンを液胞に蓄積しているため、リジン要求株であるにもかかわらず、生育が続けられるのに対し、液胞にリジンを蓄積できない変異株は

生育できないので、ナイスタチンにより濃縮されると考えられる。

ナイスタチン処理後、滅菌水で2回洗浄し、0.3 mMのリジンを含むY N B Dプレートにまき、生じたコロニーを上と同様に、0.3 mMと8 mMのリジンを含むY N B Dプレートにレプリカし、リジン感受性株を単離した。

直接レプリカ法により約5500のコロニーから4株の、ナイスタチン濃縮法により約1000のコロニーから11株のリジン感受性株を単離した。

#### 細胞内アミノ酸プールの分析

細胞内全アミノ酸プールの抽出は熱水抽出により、細胞質および液胞の段階抽出は前節に記した方法により行った。そのアミノ酸組成は日立835型アミノ酸分析計により分析した。

#### 遺伝解析

胞子形成および4分子解析は、MortimerとHawthorneの方法<sup>7)</sup>により行った。

#### 酵素活性の測定

Y E P D培地で30℃48時間培養した細胞を集菌、洗浄後、0.1M Tris/HCl 緩衝液(pH 7.6)に懸濁し、ガラスビーズ(0.45 mm)でホモジェナイズ(Braun homogenizer)する。35000x g 30分の遠心分離により得た上清を下記の酵素活性の測定に使用した。proteinase Aは、Lennyの方法<sup>4)</sup>によりヘモグロビンを基質として、proteinase B、Carboxypeptidase YはJonesの方法<sup>5)</sup>によりそれぞれ azocoll と N-benzoyl-L-tyrosine を基質として測定した。 $\alpha$ -mannosidaseはOpheimの方法<sup>6)</sup>によった。

## 結 果

### 変異株の単離とその性質

単離した62株のAEC感受性株と15株のリジン感受性株について、YEPD培地で対数増殖期になるまで生育させ、第1次スクリーニングとして細胞内全アミノ酸組成の分析をした。この結果から、27株のリジンプールの減少した変異株を選定した。さらに、

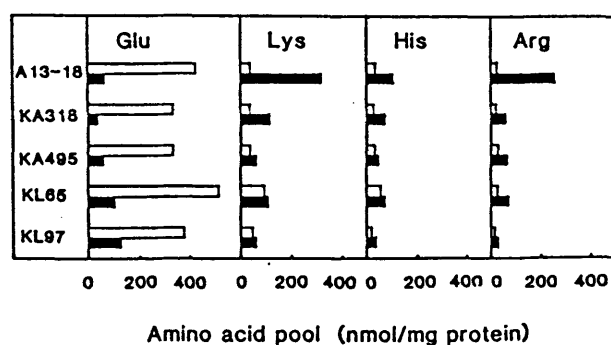


Fig. 1 Amino acid pools in wild type (A13-18) and mutant strains.

Cells were grown in YEPD medium. Cytosolic (open bars) and vacuolar (closed bars) pools were extracted differentially and analyzed in an amino acid analyzer.

これらの株について、 $Cu^{2+}$  処理法により細胞質および液胞内アミノ酸プールの組成を分析し、両者の濃度比が低下したものを目的の変異株として選定した。最終的に2株のAEC感受性株 (KA318, KA495) と、2株のリジン感受性株 (KL65, KL97) を選定した。この2株のリジン感受性株はナイスタチン濃縮により得られたものであった。これら4株は、細胞質アミノ酸マーカーであるグルタミン酸について正常値を示しているが、液胞内リジンプールは親株と比べ19~36%と著しく減少している (Fig. 1)。液胞内アミノ酸プー

ルのうちリジンだけ特異的に減少した株は得られず、他の液胞内アミノ酸であるアルギニン、ヒスチジンも同時に減少していた。そして、それらの細胞質に対する液胞内アミノ酸量の濃度比は顕著に減少しており、液胞内への蓄積する機構に欠損があることが示唆された。

#### 変異株の増殖特性

単離した4株について5 mMのリジンを添加したY N B D培地で対数増殖期になるまで培養し、遠心分離による集菌、滅菌水による洗浄を3回繰り返す、リジン無添加のY N B D培地に移し、その後の22時間の増殖を調べた。親株のA13-18株 (*lys1*) は、液胞内に蓄積されたリジンを使って、細胞数で約3倍になるまで増殖を続

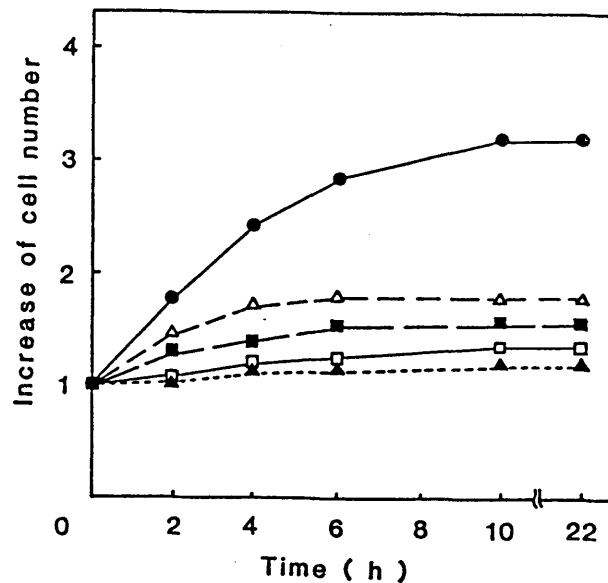


Fig. 2 Growth of mutants during lysine starvation.

Cells of the wild type strain, A13-18 (●), and mutant strains KA318 (■), KA495 (□), KL65 (△) and KL97 (▲) were grown in YNBD medium containing 5 mM lysine for 16 h at 30°C, harvested and washed three times with sterile distilled water. Then the cells were transferred to lysine-free YNBD medium and their growth was followed.

けたが、変異株では、1.1～1.5倍で増殖は停止した（Fig. 2）。これらの結果は、リジン要求株がリジン飢餓時に液胞内のリジンを利用し、その増殖は液胞内に貯蔵されたリジン量により決定されることを示している。

Table 2 は、塩基性アミノ酸、AEC、カナバニン等による増殖への影響を調べたものである。KL97 株は、10 mMのリジン、ヒスチジンに強い感受性を示した他、顕著な形質を示したので、後述するように遺伝解析を行い、slp1 (small lysine pool)と命名した。

Table 2. Effects of basic amino acids and analogs on growth properties of isolated mutants

Strain	YNBD medium containing <sup>a</sup>				
	Lysine 10 mM	Histidine <sup>b</sup> 10 mM	Arginine <sup>b</sup> 10 mM	AEC <sup>c</sup> 0.5 mM	Canavanine <sup>b</sup> 0.01 mM
A13-18	++	++	++	++	++
KA318	++	++	++	+	++
KA495	++	+	++	+	+
KL65	+	+	++	++	+
KL97	-	-	++	++	+

<sup>a</sup> Cells were grown on YNBD plates with <sup>b</sup>0.3 mM or <sup>c</sup>0.1 mM lysine and with amino acids or analogs at the concentrations indicated. After 2 days growth of colonies was scored as follows: ++, good; +, poor; -, none.

### 形態的観察

位相差顕微鏡による観察で、KL97 株(a slp1 lys1)とKL197-1A 株(a slp1)は、液胞が認められない。KA495 株とKL65 株は親株の1/3の小さい液胞が認められた。KA318 株は形態的には、親株と差はなかった。クロロキンによる染色での蛍光顕微鏡観察<sup>8)</sup>ではKL97 株は、大きな液胞は観察されなかったが、多数の小胞が観察された（Fig. 3）。Fig. 4 にKL197-1A 株の凍結置換法<sup>9)</sup>による電子顕



微鏡の超薄切片像を示す。細胞には、対数増殖期、静止期いづれにおいても大きな液胞は認められず、その代わりに細胞内に均一に分布している多数の小胞が観察された。これらの小胞の数は、対数増殖期から静止期に増加するようであった。これらの観察から、KL97株の変異は、液胞の形成の過程に欠損があり、central vacuoleが形成できず、液胞内アミノ酸プールが小さくなり、その結果高濃度リジンに対して感受性を示すようになったと考えられた。

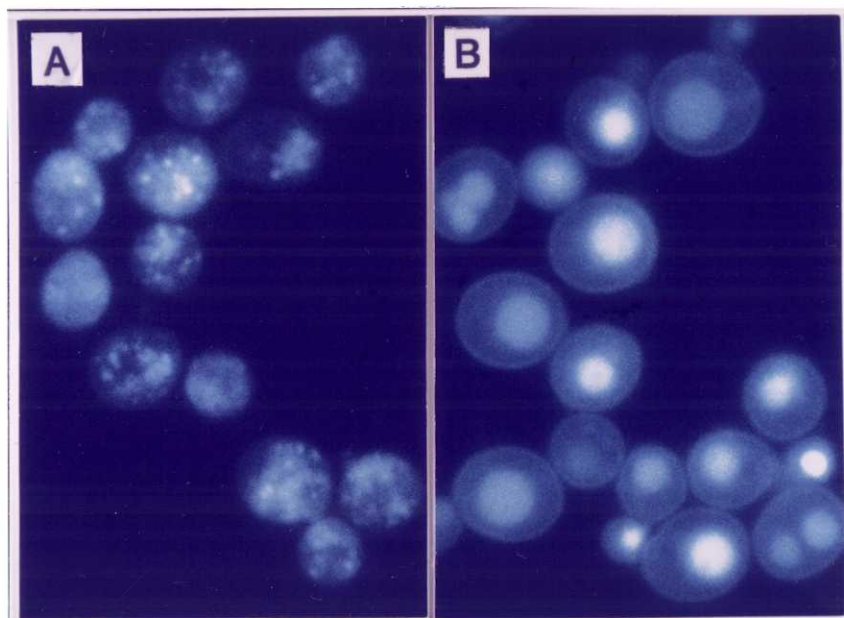


Fig. 3 Fluorescence photomicrographs of cells of the slp1-1 mutant and wild type strain

Cells of the slp1-1 mutant, KL197-1A (A) or wild type strain, A13-18 (B) in the mid-logarithmic growth phase were suspended in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, at 30°C. Cell suspensions were incubated in the presence of 2% glucose and 10 mM chloroquine for 20 min. Fluorescence was observed with a Nikon Optiphot fluorescence microscope.

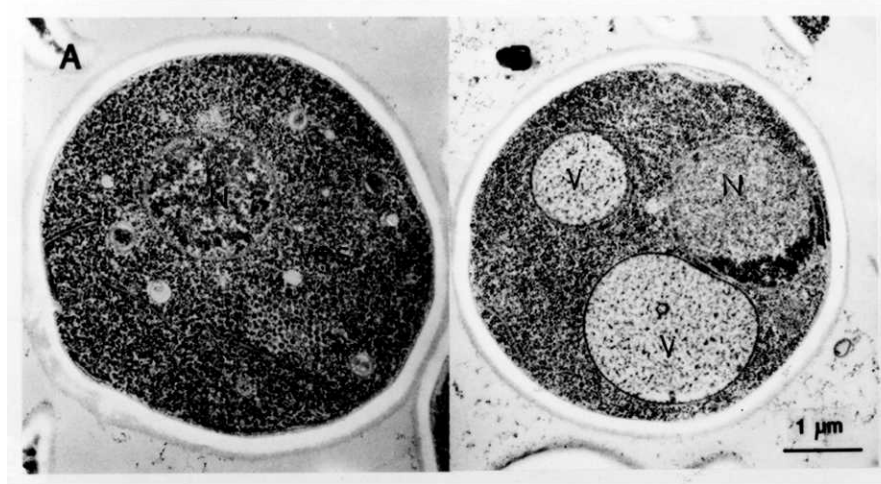


Fig. 4 Electron photomicrographs of slp1-1 mutant and wild type strain cells.

Cells of the slp1-1 mutant, KL197-1A (A) or wild type strain, A13-18 (B) grown in YEPD medium to the mid-logarithmic phase were observed by the freeze-substitution method (2). N, Nucleus; V, Vacuoles; Ves, Vesicles (shown by arrowheads).

#### 遺伝解析

KL97 株 (a lys1 slp1) のリジン感受性、液胞の形成欠損が単一の変異かどうかを調べるため、A56-1-1A 株 ( $\alpha$  adel) との 2 倍体を作成した。得られた 2 倍体はリジン感受性を示さず液胞形成も正常であったので、この変異は劣性と判定された。次に、2 倍体から孢子形成後、4 分子分析を行った。得られた 40 組の 4 孢子は全てリジン感受性株と非感受性に関して 2:2 の分離を示した。このことから、この変異は染色体上の単一変異と判定された。その他のヒスチジン感受性、液胞形成についても 40 組の 4 分子全てについてリジン感受性の表現型と同様に分離した。他の 3 株との相補性試験の結果、KL65 株とは相補しなかったため、KL97 株の変異を slp1(sma

ll lysine pool)-1, KL65 株の変異を slp1-2 と命名した。 slp1-1 の変異をホモに持つ 2 倍体は孢子形成能がなかった。相補性試験の結果 slp1 変異を相補しなかった KA318 株と KA495 株は、異なる変異を持つと判定されるが、A56-1-1A 株との 2 倍体の孢子形成が不良であったため遺伝解析はできなかった。

#### slp1-1 変異株の生育に関する表現型

20 種類のアミノ酸を、それぞれ YNBD 培地に添加して、 slp1-1 変異株の生育に対する影響を調べた (Table 3)。リジン、ヒスチジンは KL197-1A 株 (slp1-1) の生育を著しく抑えた。これらのアミノ酸は液胞に局在し、かつ細胞内で代謝されないアミノ酸である<sup>2)</sup>。一方、液胞に局在するが、酵母の窒素源として代謝されるアルギニンについては生育の阻害は認められなかった。

Table 3 Effects of amino acids on the growth rate

YNBD and addition	(mM)	Growth rate (hr <sup>-1</sup> )	
		X2180-1A (wild type)	KL197-1A ( <u>slp1-1</u> )
None		0.22	0.12
Lysine	1	0.21	0.07
	5	0.18	0.06
	10	0.19	0.05
Histidine	1	0.18	0.12
	5	0.19	0.00
	10	0.14	0.00
Arginine	1	0.22	0.12
	5	0.22	0.12
	10	0.19	0.13
Glutamate	1	0.22	0.12
	5	0.25	0.17
	10	0.20	0.17

Ca<sup>2+</sup><sup>10, 11)</sup> やポリリン酸<sup>12)</sup> は液胞に局在することが知られているので、これらの影響も調べた (Table 4)。100 mM CaCl<sub>2</sub> では阻害がみられたが、リン酸等では阻害はみられなかった。

Table 4 Effects of inorganic ions on the growth rate

YNBD and addition(100 mM)	Growth rate (hr <sup>-1</sup> )	
	X2180-1A (wild type)	KL197-1A (slp1-1)
None	0.22	0.12
KCl	0.17	0.13
NaCl	0.19	0.10
MgCl <sub>2</sub>	0.17	0.14
CaCl <sub>2</sub>	0.19	0.05
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.23	0.17

YEPDプレート上での重金属添加試験では、Hg<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>が生育を阻害した（実験データは省略）。

#### 液胞関連酵素活性

*S. cerevisiae*の液胞内マーカー酵素として、proteinase A、proteinase B、carboxypeptidase Yが、液胞膜マーカー酵素としてはα-mannosidaseが知られている。slp1-1変異が液胞形成の過程に基本的に欠損があるのではないかを検討するため、これらのマーカー酵素の活性を測定した（Table 5）。液胞内にあるproteinaseは親

Table 5 Activities of vacuolar enzymes in wild type and slp1-1 mutant

Vacuolar enzyme <sup>a</sup> (x 10 <sup>3</sup> U/mg protein)	A13-18(a <i>lys1</i> )	KL97(a <i>slp1-1</i> )
Proteinase A	2.0	1.0
Proteinase B	0.96	0.10
Carboxypeptidase Y	1.76	0.30
α-Mannosidase	0.452	0.459

株と比べ、いずれも低い活性を示したが、液胞膜にあるα-mannosidaseの活性は低下していなかった。これらの結果は液胞膜そのものに異常はないが、液胞形成のための膜の融合過程に欠損があることを示唆する。

## 考 察

酵母細胞のアミノ酸代謝における液胞コンパートメントの生理的重要性を調べるため、正常な液胞内リジンプールを形成できない変異株の単離を行った。リジンは液胞内へ1つの輸送系（アルギニン-リジン輸送系）によって取り込まれる<sup>11)</sup>ので、リジン感受性変異株はこの特異的輸送系に欠損のある株、または、この能動輸送に必要な液胞膜ATPase<sup>13)</sup>に欠損のある株が単離されると考えられた。しかし得られた変異株は、このどちらでもなく、液胞形成過程に欠損があり、不完全な液胞を持つため液胞内リジンプールが小さくなりリジンに対して感受性となった株と想定された。

Messenguyら<sup>14)</sup>は"small pool"または"smap"と呼ばれる細胞内塩基性アミノ酸プールの小さくなった変異株をカナバニン高感受性株として単離している。しかし、この"smap"変異株は、細胞質と液胞のアミノ酸の濃度勾配については正常であること、形態的に液胞に異常があるという報告がないことから、slp1-1変異株とは異なる変異株と思われる。

Jones<sup>15)</sup>は、液胞に局在しているproteinaseの欠損株として多数のpep変異株を単離している。これらのうち、pep4変異株については、詳細に解析が進められており、PEP4遺伝子はproteinase Aの構造遺伝子であることが最近明らかにされた<sup>16)</sup>。このpep4変異株はアミノ酸アナログに対して高感受性を示さないが、アミノ酸プールの減少、胞子形成能がなくなることが知られている。相補性試験の結果、slp1-1変異株はpep4変異株とは異なることが明らかとなった。他の6つのpep変異株、pep3、pep5、pep6、pep7、pep

12、 pep14 については、カナバニンに対する高感受性や、アミノ酸ブールの減少、胞子形成能の欠損等が報告されており、これらの中に slp1-1 変異株と同じ相補性グループの株が存在するかもしれない。これらについては、現在、遺伝的解析が進められている。

最近、Emrら<sup>17)</sup>は、液胞内酵素である carboxypeptidase Y が細胞表層に分泌される株を単離することにより sorting system に異常のある vpt 変異株を取得している。これらの変異株のうちいくつかは典型的な液胞は認められず、液胞形成に欠損のある株が含まれている。(S. Emr 私信) しかしながら、slp1-1 変異株について、液胞内酵素である carboxypeptidase Y と  $\alpha$ -mannosidase の細胞表層の活性は、野生型と同様に検出されなかったことから、vpt 変異株とは異なるものと考えている。

最近、和田(東大理)らは、液胞形成に欠損のある変異株を多数分離しており、10の相補性グループに分けている。slp1 変異はそのうちの1つと allelic であるという(私信)。

また、Jones<sup>18)</sup>と、Schekman<sup>19)</sup>のグループは独立にクラスリン遺伝子を破壊し、細胞の形態を観察したところ液胞の形成が不完全であったと報告している。液胞形成の不完全な変異の報告としては初めてであるが、その制限酵素地図(次節)の比較から SLP1 遺伝子はクラスリン遺伝子とは異なっていた。

正常な液胞形成のできない KL97 株は、YEPD 培地の様な栄養培地では増殖することができるが、その増殖速度は親株の 1/2 と遅い。また、リジン、ヒスチジン、カナバニン、 $Ca^{2+}$ 、重金属イオンに対して感受性を示す。さらに、geneticin (G418)、

kanamycin, tetracycline, methylglyoxal等の種々の薬剤に対して親株と比べ高感受性を示した（YEPDプレート上での生育阻害ゾーン直径は、親株と比べそれぞれ 4、>10、2、3倍であった）。これらの結果は、液胞がアミノ酸等の栄養分の貯蔵庫として働いている他に、種々の薬剤や、重金属のような、細胞質中に高濃度に存在すると好ましくない物質の隔離のためにも働いていることを示唆するものである。slp1-1変異をホモに持つ2倍体では孢子形成できなくなることから液胞が孢子形成に関しても重要な機能を持っていることが確認された。

#### 要 約

リジンまたは、そのアナログであるAECに高感受性となった変異株をそれぞれ15株、62株単離した。前節の方法によりその細胞内アミノ酸プールを測定し、その中から細胞質内アミノ酸組成に変化がなく、かつ液胞内リジンプールが小さくなった変異株を4株選定した。KL97株（a lys1 slp1-1）と戻し交配により栄養要求性をなくした株のKL197-1A株（a slp1-1）は、10mMリジンを添加したYNBD培地で生育が著しく不良であった。遺伝的解析の結果、slp1-1変異は劣性変異であり、核性の単一変異であったので、slp1（small lysine pool）と命名した。KL97株は次のような多面発現を示した。1）液胞内リジン、ヒスチジン、アルギニンのプールは同時に低下していた。2）高濃度リジン、ヒスチジン、Ca<sup>2+</sup>、重金属イオン、抗生物質等が高感受性を示した。3）細胞内に通常見られる大きな液胞は認められず、代わりに多数の小胞が存在した。

4) 液胞膜のマーカ酵素である $\alpha$ -mannosidase活性には変化はなかったが、液胞内酵素であるproteinase A、proteinase B、carboxypeptidase Yの活性は低下していた。これらの結果から、slp1-1変異株は液胞形成の初期過程に欠損があり、そのため液胞内リジンブールが低下したものと推定された。

#### 文 献

- 1) T. Sato, Y. Ohsumi, and Y. Anraku: J. Biol. Chem. 259, 11505 (1984)
- 2) T. G. Watson: J. Gen. Microbiol. 96, 263 (1976)
- 3) R. Snow: Nature 211, 206 (1966)
- 4) J. F. Lenney: J. Bacteriol. 122, 1265 (1975)
- 5) E. W. Jones: Genetics 85, 23 (1976)
- 6) D. J. Ophelm: Biochim. Biophys. Acta. 524, 121 (1978)
- 7) R. Mortimer, and D. Hawthorne: The Yeast (A. H. Rose and J. S. Harrison ed.) vol. 1 Academic Press, Inc., New York.
- 8) A. G. Lenz, and H. Holzer: Arch. Microbiol. 137, 104 (1984)
- 9) M. Baba, and M. Osumi: J. Electron Microsc. 5, 249 (1987)
- 10) Y. Eilam, H. Lavi, and N. Grossowicz: J. Gen. Microb



iol. 131, 623 (1985)

- 1 1 ) Y. Ohsumi, and Y. Anraku: J. Biol. Chem. 258, 5614  
(1983)
- 1 2 ) L. A. Okorokov, L. P. Lichko, and I. S. Kulaev: J. Bacteriol. 144, 61 (1980)
- 1 3 ) E. Uchida, Y. Ohsumi, and Y. Anraku: J. Biol. Chem.  
260, 1090 (1985)
- 1 4 ) F. Messenguy, D. Colin, and J-P. Ten-Have: Eur. J. Biochem. 108, 439 (1980)
- 1 5 ) E. W. Jones: Yeast Genetics (J. F. T. Spencer et al. ed.) Springer-Verlag, New York (1983)
- 1 6 ) G. Ammerer, C. P. Hunter, J. H. Rothman, G. C. Saari, L. A. Valls, and T. H. Stevens: Mol. Cell. Biol. 6, 2490 (1986)
- 1 7 ) V. A. Bankaitis, L. M. Johnson, and S. D. Emr: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9075 (1986)
- 1 8 ) S. K. Lemmon and E. W. Jones: Science 238, 504 (1987)
- 1 9 ) G. S. Payne, T. B. Hasson, M. S. Hasson, R. Schekman: Mol. Cell. Biol. 7, 3888 (1987)

### 3. SLP1 遺伝子のクローニング

液胞生理機能欠損変異株 (slp1 変異株) は、液胞形成が正常にできない。そこで、遺伝子レベルでの解析を目的として、SLP1 遺伝子のクローニングを試みた。

#### 実験方法

使用菌株および yeast gene library

使用した S. cerevisiae は Table 1 に示す。プラスミドの調製等には、Escherichia coli DH1(F<sup>-</sup>recA1 gyrA96thi-1 hsdR17 [hsdR<sup>-</sup> hsdM<sup>+</sup>] sup E44)を使用した。yeast gene library はベクターとして YCpG11 (Fig. 1) を使用したものをを用いた<sup>1)</sup>。

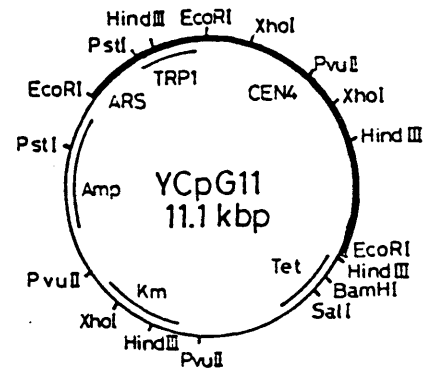


Fig. 1 Restriction nuclease map of the plasmid YCpG11

The thick line represents yeast DNA sequences; the thin lines represent pBR322 or pAJ50 DNA sequences.

Table 1 Yeast strains used

Strain	Genotype	Remarks
KL97	a <u>lys1 slp1-1</u>	
KL65	a <u>lys1 slp1-2</u>	
KL397-30A	a <u>trp1 slp1-1</u>	This study
KL4972-11C	$\alpha$ <u>lys1 ura3</u>	This study
KL4972-5A	a <u>ura3 slp1 his1</u>	This study

## 酵母の形質転換および遺伝解析

Ito ら<sup>2)</sup>の酢酸リチウム法を一部改変した Rodriguez と Tait の方法<sup>3)</sup>によった。遺伝解析は Sherman ら<sup>4)</sup>の方法を用いた。

## 実験結果

### slp1-1変異を相補するDNA断片の単離

yeast gene library<sup>1)</sup> (vector: YCpG11, Trp1, G418<sup>r</sup>) を用いて、KL397-30A株 (a trp1 slp1-1) の形質転換を行い、trp<sup>+</sup>、G418<sup>r</sup>で、10 mMヒスチジン添加培地で生育できるようになった株を候補株として取得した。さらに、候補株を非選択培地で生育させることにより、Trp<sup>-</sup>、G418<sup>s</sup>となると同時に10 mMヒスチジンに感受性となった株を目的とする形質転換株として単離した。単離した形質転換株からプラスミドDNAを回収し、pYKK100と命名した (Fig. 2)。

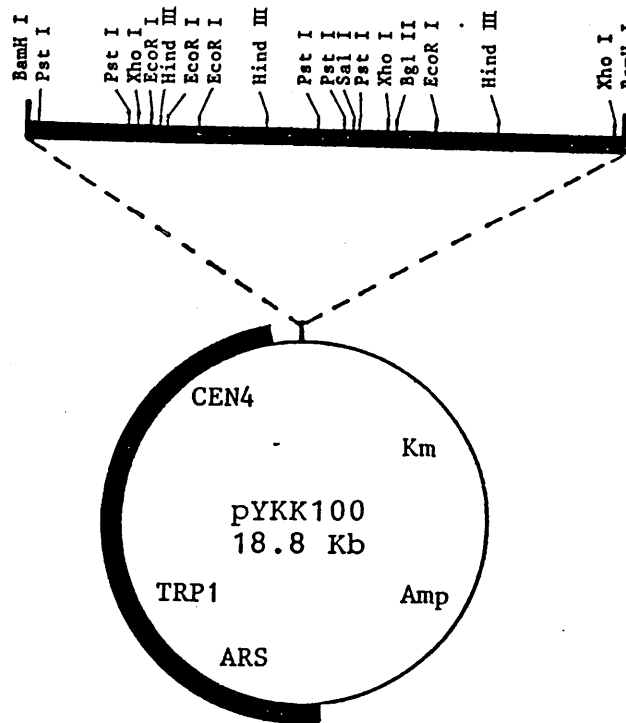


Fig. 2 Restriction nuclease map of the plasmid pYKK100.

pYKK100を用いて、KL97 株(a lys1 slp1-1)の形質転換を行ったところ、得られた形質転換株は正常な液胞を持ち、高濃度リジンおよびヒスチジンに対しても感受性を示さなかった。このことから、slp1-1変異が多面発現変異であることが確認された。pYKK100による形質転換によりKL65 株(a lys1 slp1-2)も同様に野生型に復帰した。

クローン化されたDNA断片制限酵素地図

Fig. 2 に示すように、pYKK100 は約7.7 Kb の挿入断片を持っていた。この挿入されたDNA断片を切り出し、プラスミド YEp13 と Ylp5 の BamHI サイトにつなぎ、それぞれpYKK200、pYKK300 を作成した。また、slp1変異を相補する必須領域を調べるためサブクローニングをした結果をFig. 3 に示す。

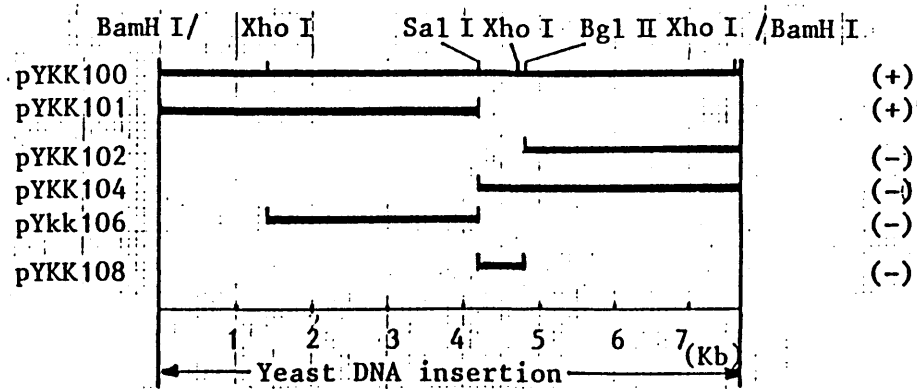


Fig. 3 Complementation of slp1 mutation.

#### クローン化されたDNA断片が SLP1 遺伝子であることの確認

Ylp5 の BamHI サイトにクローン化したDNA断片をつないだ pYKK300 は挿入断片中に1カ所 BglII サイトがある。そこで、pYKK300 を BglII で切断したのち、KL4972-11C 株 ( $\alpha$  lys1 ura3)

を形質転換し、 SLP1 遺伝子の位置に pYKK300 を組み込んだ。この形質転換株と KL4972-5A 株 (a ura3 slp1 his1) との接合により得た 2 倍体を用いて、4 分子分析を行った。Table 2 に示すように、ura3 と slp1 の分離は常に挙動を共にしたことから、確かにクローン化した DNA 断片は SLP1 遺伝子であることを確認した。

多コピープラスミドである YEp13 につないだ pYKK200 による KL97 株の形質転換でも野生型に復帰したが、液胞生理機能の強化等は認められなかった。

Table 2 Tetrad analysis between KL4972-11C ( $\alpha$  lys1 ura3::[URA3 SLP1]) and KL4972-5A (a ura3 slp1 his1)

	<u>ura3</u>				<u>slp1</u>				<u>lys1</u>				<u>his1</u>			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
2	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
3	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
4	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
6	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
7	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
8	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
9	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
10	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
11	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
13	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
14	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
15	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
16	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+

## 要 約

液胞生理機能欠損変異株 (KL97 株、slp1-1変異株) は、正常な液胞形成をすることができず、高濃度リジン、ヒスチジン添加培地では生育できない。YCpG11を用いた yeast gene library から、この遺伝子をクローニングした (pYKK100)。クローン化された DNA 断

片の大きさは制限酵素地図の作成から 7.7 K b であった。pYKK100 はセントロメアを持っているため、細胞内でのコピー数は 1 である。そこで、7.7 K b の挿入断片を切り出し多コピープラスミド、YEpl3 および組み込み型プラスミド、Ylp5 につなぎ、それぞれ pYKK200, pYKK300 を作成した。BglIII で 1ヶ所切断した pYKK300 で ura3 株を形質転換し、染色体上の SLP1 遺伝子上に組み込まれた転換株を得た。この転換株と ura3 slp1 株とを接合させ 4 分子分析を行った。SLP1 の表現型は、2:2 分離を示し、URA3 と完全に同じく分離したことから、クローン化した遺伝子は SLP1 であることを確認した。

#### 文 献

- 1) Y. Ohya, S. Miyamoto, Y. Ohsumi, and Y. Anraku: J. Bacteriol. 165, 28 (1986)
- 2) H. Ito, Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura: J. Bacteriol. 153, 163 (1983)
- 3) R. Rodriguez, and R. C. Tait: Recombinant DNA techniques ; an introduction, p.186, Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass.(1983)
- 4) F. Sherman, G. R. Fink, and J. B. Hicks: Method in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1981)

#### 4. s l p 1 変異株による清酒醸造

協会7号を始め多くの清酒酵母は液胞が他のものに比べ、大きく、発達していることが報告されている<sup>1)</sup>。また、最近、Shiozakiら<sup>2)</sup>は液胞に蓄積されるS-アデノシルメチオニンの生産株のスクリーニングを178株の酵母について行った結果、協会6号、7号、9号等の清酒酵母が最もよく蓄積することを明らかにした。

これらのことは、清酒醸造において液胞が重要な役割を果たしていることを示唆している。これらの役割を明らかにすることを目的として、液胞生理機能欠損変異株 (s l p 1 変異株) を用いた清酒醸造を行った。

なお、 $Cu^{2+}$  処理による細胞質および液胞内アミノ酸プールの分別抽出法が清酒醪中の酵母にも適用できるかどうかについても検討した。

#### 実験方法

##### 使用菌株

Table 1の通り。

##### 仕込試験

難波ら<sup>3)</sup>の方法により、総米200gの清酒醸造を行った。

##### 酵母細胞内アミノ酸プールの分析

前節で設定した方法により細胞質および液胞内プールを抽出し、日立835型アミノ酸分析計により測定した。なお、清酒醪からの酵母単離は、植村らの方法<sup>4)</sup>に準じて次のように行った。醪1.5gを採取し、蒸留水3.5mlを加え500rpm、2分の遠心により

米粒を分離し、液部を1000rpm、4分の遠心分離でデンプン粒と酵母に分ける。下層の酵母区分を集め蒸留水30mlを加え、1000rpm、4分の遠心分離を繰り返し、顕微鏡的に純粋な酵母画分を得た。

Table 1 Yeast strains used

Strain	Genotype	Remarks
Kyokai 701	a/α	sake yeast
Kyokai 7	a/α	sake yeast
KM1	a/α	sake yeast
X2180-D	a/α <u>adel</u> /+ <u>lys1</u> /+	laboratory yeast
KLD-97*	a/α <u>adel</u> /+ <u>lys1</u> /+ <u>slp1</u> / <u>slp1</u>	
KM1-11D	a	
KM1-97	α <u>slp1</u>	
X2180-1A	a	laboratory yeast
KL97*	a <u>slp1</u> <u>lys1</u>	
KL197-1A*	a <u>slp1</u>	

\* These strains were originated from X2180-1A.

### 製成酒の一般分析

国税庁所定分析法<sup>5)</sup>により行った。

### 実験結果

#### 小仕込試験(1)

総米200gの仕込で、使用酵母はTable 1に記したように協会701号(清酒酵母としての対照)、X2180-D株(実験室株由来の2倍体株で、野生型株としての対照)、KLD-97株(実験室株由来の2倍体株で、slp1変異をホモに持ち、正常な液胞を形成することができない株)の3株を用いた。

発酵経過はFig. 1に示すように、KLD-97株はその野生型



株である X 2 1 8 0 - D 株に比べ、増殖が悪く、製成酒のアルコール生成も良好ではなかった ( Table 2 )。しかし、 X 2 1 8 0 - D 株もパン酵母由来のためか清酒酵母に比べると発酵は良好ではなかったことから、次に、孢子形成能の高い清酒酵母である K M 1 株を用いた仕込試験を行った。

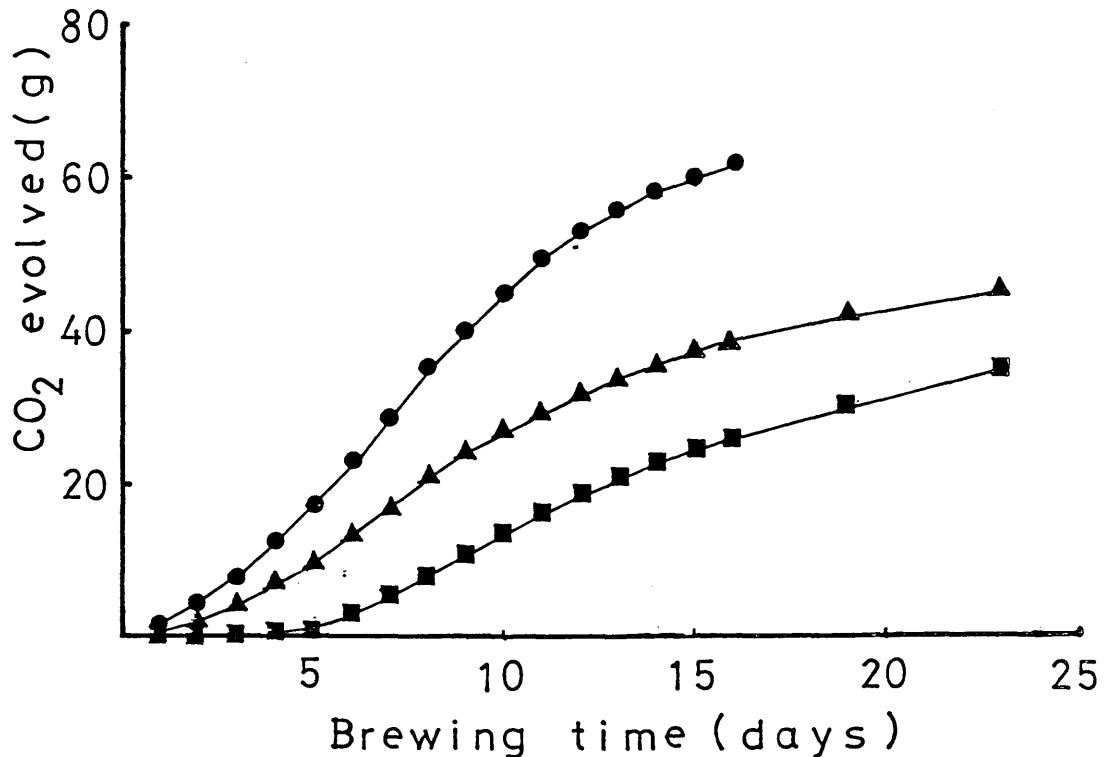


Fig 1 Sake brewing using slp1 mutant (1)  
 ● , Kyokai 701; ▲ , X2180-D; ■ , KLD-97

Table 2 Analytical data of obtained sake

Strains	Alcohol content (%)	acidity	amino acidity
Kyokai-701	16.6	3.1	2.5
X2180-D	10.2	3.5	3.3
KLD-97	5.6	3.7	4.3

小仕込試験 ( 2 )

K M 1 株 ( 2 倍体清酒酵母 )、 K M 1 - 1 1 D 株 ( K M 1 株由来

の半数体株)、KM1-11D-97株 (slp1変異を持つ半数体株)の3株を用いて同様にして小仕込を行った。発酵経過および製成酒の一般分析値は Fig. 2、Table 3に示したように、液胞形成に欠損のある株では、増殖が遅れ、アルコール生成が4.4%で停止した。これらの結果は、清酒醸造において液胞が重要な役割を果たしていることを示唆している。

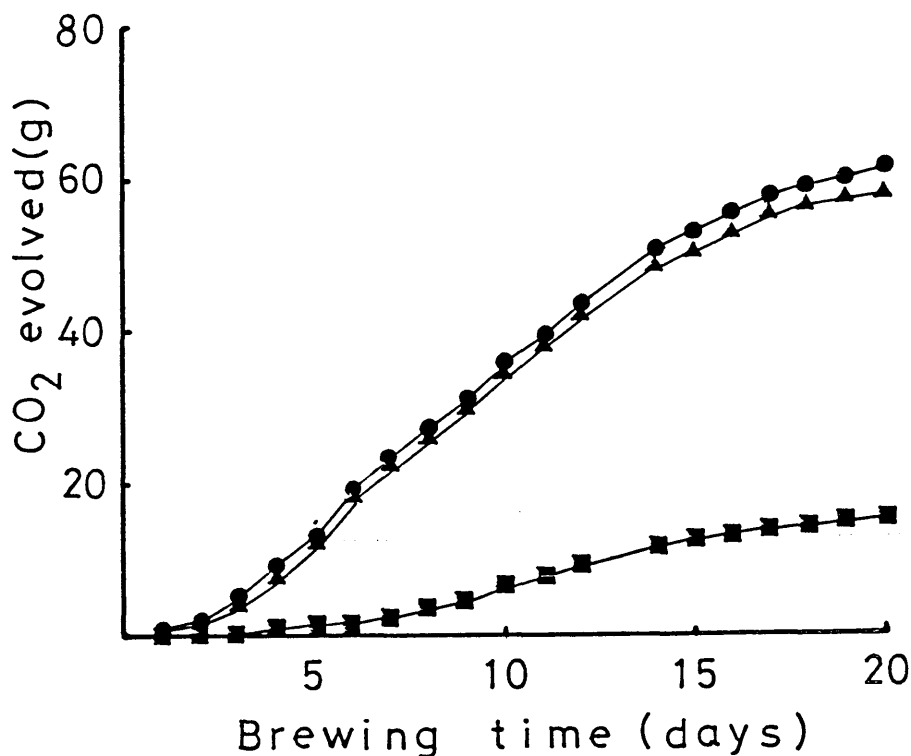


Fig 2 Sake brewing using slp1 mutant (2)  
 ● , KM1; ▲ , KM1-11D; ■ , KM1-97

Table 3 Analytical data of obtained sake

Strains	Alcohol content (%)	acidity	amino acidity
KM1	18.0	3.1	4.4
KM1-11D	16.4	2.8	4.5
KM1-97	4.4	5.0	3.9

そこで、清酒醸造において液胞はどのような働きをしているのかを

明らかにするための予備的な試験として、酒母や醪での環境を考えて、以下の検討を行った。

アルコール生成に及ぼすグルコース濃度の影響

slp1変異株と野生型株（半数体株、および2倍体株のそれぞれについて）を2～20%のグルコースを含むYEPD培地4mlに植

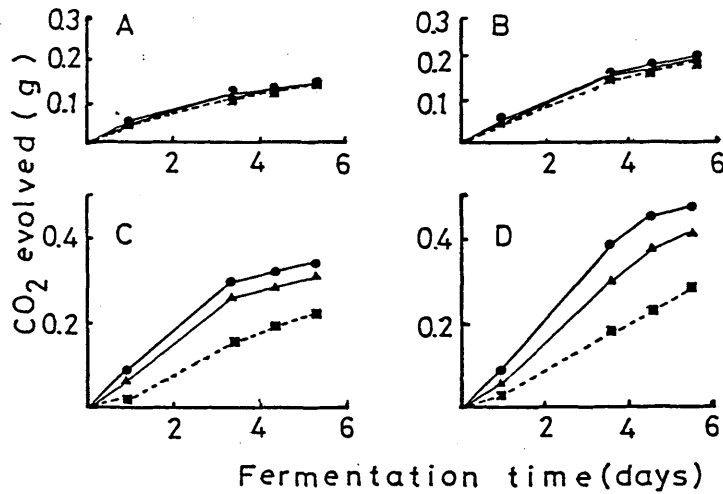


Fig. 3 Effect of glucose concentration on fermentation using diploid strains  
 A, 2% glucose; B, 5% glucose; C, 10% glucose; D, 20% glucose  
 ● , Kyokai 7; ▲ , X2180-D; ■ , KLD-97

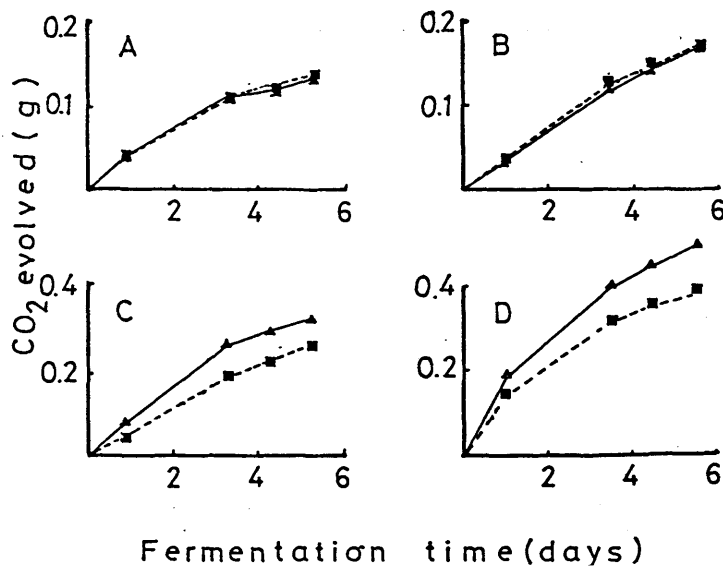


Fig. 4 Effect of glucose concentration on fermentation using haploid strains  
 ▲ , X2180-1A; ■ , KLD97

菌し、30℃、6日間静置培養した。生育は発生するCO<sub>2</sub>減少量により、アルコール生成は培養終了後の濾液をガスクロマトグラフにより測定した。Fig. 3、Fig. 4、Fig. 5のようにグルコース濃度が5%までは生育、アルコール生成共に差は認められないが、10%以上では、slp1変異株では生育が遅くなりアルコール生成も悪くなった。

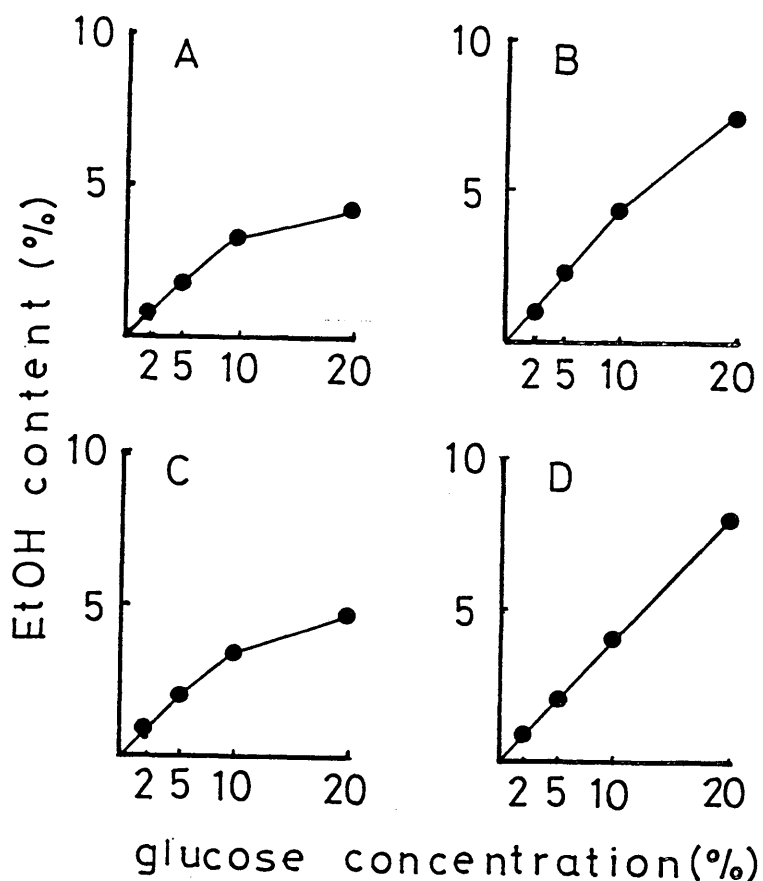


Fig. 5 Effect of glucose concentration on ethonol formation  
A, KLD-97; B, X2180-D; C, KL97; D, X2180-1A

#### 生育に及ぼす乳酸の影響

異なるグルコース濃度（5%、10%）、乳酸濃度（0、0.5、1.0%）のYEPD培地4mlに slp1 変異株と野生型株を植菌し、

生育に対する影響を調べた。グルコース濃度が5%で、乳酸濃度が1%のとき生育に若干の影響が認められたが、その程度はグルコースほどではなかった (Fig. 6)。

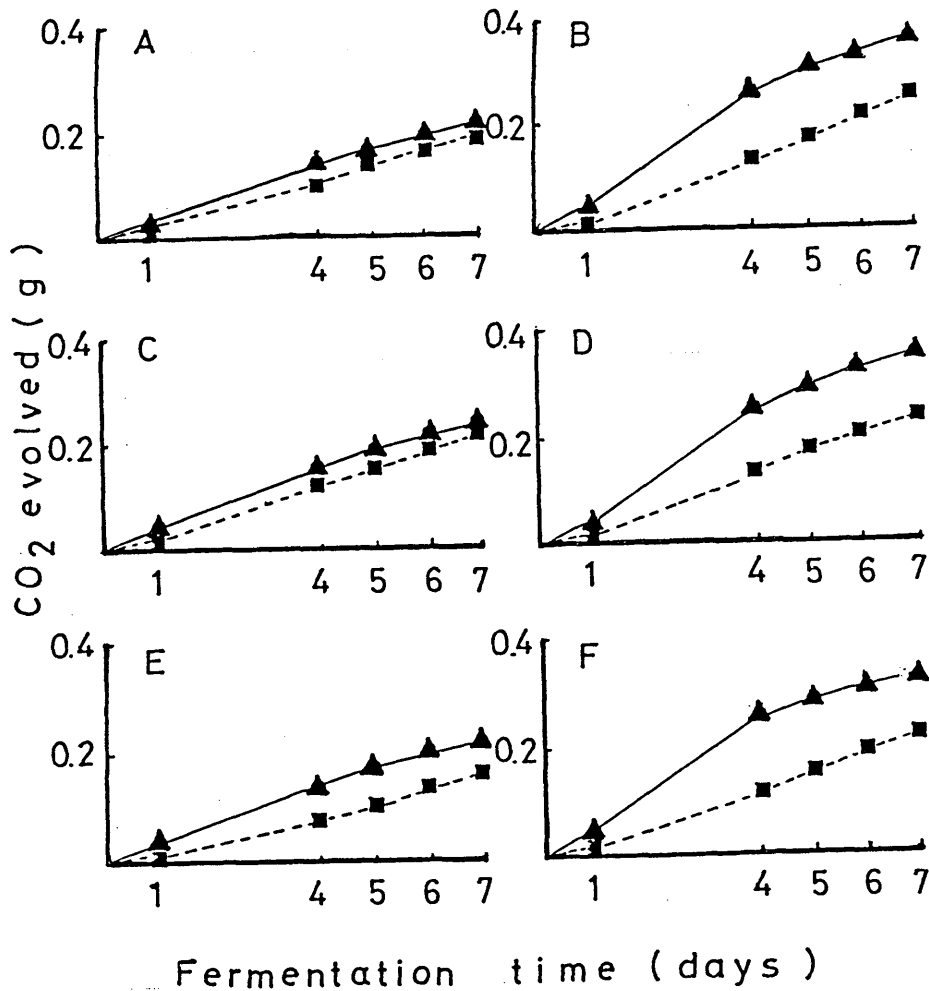


Fig. 6 Effect of lactic acid on fermentation  
 A, 5% of glucose without lactic acid ; B, 10% of glucose without lactic acid ; C, 5% of glucose with 0.5% of lactic acid ; D, 10% of glucose with 0.5% lactic acid; E, 5% of glucose with 1.0% lactic acid ; F, 10% of glucose with 1.0% of lactic acid  
 ▲ , X2180-1A; ■ , KL197-1A

#### 清酒醪中の酵母細胞内アミノ酸プールの解析

小仕込試験(1)で協会701号の10日目の醪から酵母を単離し、細胞内アミノ酸プールの測定を行った。細胞質および液胞内ア

ミノ酸組成は Table 4の通りであった。醪中の酵母も、本章第1節の結果と同様に、グルタミン酸等の酸性アミノ酸は細胞質に、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸が液胞に局在していた。

Table 4 Amino acid compositions of cytosolic and vacuolar pool

Amino acid n mol/10 <sup>8</sup> cells	cytosolic pool	vacuolar pool
Asp	17.9	2.3
Thr	32.3	23.0
Ser	21.2	6.3
Glu	345.2	58.2
Gly	85.2	23.3
Ala	425.3	136.0
Cys	50.1	13.6
Val	32.1	15.6
Met	2.8	1.4
Ile	4.6	2.5
Leu	5.3	2.6
Tyr	1.4	2.2
Phe	15.3	8.5
Orn	21.3	109.6
Lys	10.3	85.3
NH <sub>3</sub>	28.5	17.5
His	10.0	75.3
Arg	8.4	136.2
Pro	26.3	50.2
Total	1143.7	769.6

## 考 察

協会7号を代表とする清酒酵母は、数百年にわたる清酒醸造という自然のスクリーニングによって、清酒醸造に最も適した酵母が選択されてきたといえる。そして、現在清酒醸造に使用されている酵母が発達した液胞を持つということは、清酒醸造の各ステップに見られる過酷な条件（酒母での高い乳酸濃度（約1%）と糖濃度（約22

%)、醪での20%に及ぶアルコール濃度等)下で、液胞が重要な働きをしていることが推定される。

今回、液胞形成のできない slp1 変異株を用いた小仕込試験により得られた製成酒は酸が多く発酵が不完全であるためアルコール分が低く残糖が多いものであった。このことから、清酒醸造には液胞が重要な働きをしていることが明らかになった。酒質としては、通常の清酒と全く異なるタイプであるが、酸味と甘味の調和のとれた新しいタイプの低アルコール清酒のひとつと言えるものであった。そして、予備的な試験から、液胞が耐糖性や乳酸耐性に関与していることが示唆された。

様々な液胞機能のうち、清酒醸造にとって何が重要であるかを、本章で述べた  $Cu^{2+}$  処理による細胞質および液胞内アミノ酸プールの分別抽出法、および液胞生理機能欠損変異株 (slp1 変異株) と清酒酵母との比較等から明らかにすることが可能と思われる。

## 要 約

清酒醸造における酵母液胞の役割を明らかにすることを目的として、正常な液胞形成ができないうえに液胞生理機能の欠損した変異株 (slp1-1 変異株) を用いて清酒醸造を行った。予期したように、slp1-1 変異株は野生型株に比べ、醪中の増殖が弱くアルコールの生成度も低かった。YEPD培地での予備的試験の結果、高い糖濃度、乳酸酸性でslp1-1 変異株の生育が低下したことから、清酒醪での過酷な条件下で液胞が重要な働きをしていることが示唆された。

また、 $Cu^{2+}$  処理による細胞質および液胞内アミノ酸プールの分

別抽出法が清酒醪中の酵母にも適用できることを確認した。

文 献

- 1) 竹田、塚原： 農学集報 16、59 (1971)
- 2) S. Shiozaki, S. Shimizu, H. Yamada: Agric. Biol. Chem. 48, 2293 (1984)
- 3) 難波、小幡、萱島、山崎、村上、下田： 醸協73、295 (1978)
- 4) 植村： 微生物実験法、p 181、共立出版、東京 (1957)
- 5) 日本醸造協会編： 国税庁所定分析法注解、日本醸造協会 (1974)



## 結 言

著者らは、気象条件の異なるいくつかの圃場を選定して、原料米の産地および品種がその米質にどの様に影響するかを明かにし、さらに、酒造用原料米としての適性を気象条件から早期に判断する方法の確立を目的として、原料米の分析と小仕込による清酒醸造試験を実施し、統計解析を行った。そのなかで、白米の胚芽残存率が高いものは、製成酒のアミノ酸度が低く、酒質においても味、香りとも良好であるという結果を得た。タンパク含量の多い胚芽が残存した白米を使用した仕込で、製成酒中のアミノ酸量が少なくなるという事実は、これまでの清酒醸造で得られている知見では説明できない。そこで、これらの現象を明らかにするため、以下の研究を行った。

第1章では、胚芽を単独に添加した仕込を行い、その効果を確認した。胚芽添加により、アミノ酸度、総窒素、 $OD_{260}$ 、 $OD_{280}$ 、酸度等は胚芽の添加量に応じて減少した。特に、アミノ酸度は対照の約50%となった。各アミノ酸のうち、オルニチン、トリプトファン、プロリンを除いてすべて減少したが、顕著な減少を示したアミノ酸の中に高級アルコールの生成に関与するバリン、ロイシン、イソロイシン等のアミノ酸が含まれ、それに相応する高級アルコール等の香気成分の増加が認められた。

胚芽添加時期を変えて仕込を行いその効果を調べたところ、留時に添加のものに比べ、留後5日目添加ではアミノ酸の減少度はやや低下し、10日目添加ではその効果は認められなかったことから、

主に酵母の増殖の盛んな醪前半に胚芽中の有効成分がアミノ酸減少に寄与していることが示された。

次に、胚芽中の有効成分をアミノ酸量の減少を指標として調べ、 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ 、 $K^+$  の3種が重要であることを明らかにした。多元配置法により、これら3種の主効果が認められ、その寄与率は $Mg^{2+}$  80.2%、 $PO_4^{3-}$  10.7%および $K^+$  7.5%と計算された。これら3種の添加量の最適組合せは、汲水50ml当り $Mg^{2+}$  0.3 mmol（仕込水に換算すると145.8 ppm）、 $PO_4^{3-}$  0.2~0.4 mmol（同380.0~760.0 ppm）および $K^+$  0.4 mmol（同312.8 ppm）の添加であった。この最適組合せによる添加仕込により得られた製成酒のアミノ酸度は、無添加の対照酒の1.34に対し、0.72と約半分となった。 $Mg^{2+}$ 、 $PO_4^{3-}$ および $K^+$ は、酵母のアミノ酸取り込みに対し促進作用を示すが、反対に $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ は阻害作用を示すことを明らかにした。

第2章では、醪仕込時に、胚芽や無機イオン（ $Mg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $PO_4^{3-}$ ）を添加すると、製成酒中のアミノ酸量が対照の約50%に減少する機作を明らかにするために、3本の工場的規模の試験仕込を行い、酵母のアミノ酸取り込み能、酵母菌体内アミノ酸プール、および醪濾液のアミノ酸組成の変化を調べた。醪濾液中のアミノ酸は、対照醪では留仕込後漸増するのに対し、胚芽や無機イオン添加醪では留仕込後5~7日まで減少した後、増加した。特にグルタミン酸やアラニンという醪中で酵母に取り込まれにくいといわれているアミノ酸でその差は顕著であり、そのときのアンモニア量は低い

レベルで維持されていた。醪中の酵母のアミノ酸取り込み能は、対照醪では留仕込後すぐに漸減するのに対し、胚芽や無機イオン添加醪では高い取り込み能が醪の中期まで続いていたことから、これが製成酒中のアミノ酸減少の主因であると考えた。この時の、醪濾液中および製成酒の無機イオンの変化を調べたところ、酵母のアミノ酸取り込みに有効な $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $PO_4^{3-}$ の3つの無機イオンは、対照醪では一時期酵母の増殖に必要であるとされている量以下になるのに対し、胚芽や無機イオン添加醪ではそのレベルは十分に高く維持された。清酒において、その官能熟度と相関の高いといわれている $Zn^{2+}$ は、 $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $PO_4^{3-}$ 等とは反対に、対照醪より胚芽や無機イオン添加醪で少なくなった。

またこの時の、醪濾液中および製成酒の香気成分の変化と、これらと関連が深いと考えられるアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性についても併せて検討した。酵母によるアミノ酸代謝と関連の深い高級アルコールの生成については、胚芽添加醪で*i*-AmOH（イソアミルアルコール）の生成が多かったが、無機イオン添加では対照醪と大きな差はなかった。*i*-AmOAc（酢酸イソアミル）は胚芽添加は多く、次いで無機イオン添加、対照の順であった。また、官能的に香気特性として重要なE/A比（酢酸イソアミル  $\times$  100 / イソアミルアルコール）では、胚芽添加、無機イオン添加が対照酒に比べ、製成酒でそれぞれ1.3、1.2倍となった。

*i*-AmOAcの生成に関与しているといわれてるアルコールアセチルトランスフェラーゼ活性の変化は、留仕込後に減少し、醪末

期に再上昇したが、i-Am.OAc量の生成パターンと見かけ上相関はなかった。

清酒醸造では、原料から由来するアミノ酸が酵母に取り込まれ、種々の代謝産物が生産される。これらの代謝産物は最終製品である清酒の香味成分として重要である。

第3章では、これらの現象の基礎的研究として、遺伝解析の可能な実験室株 (*S. cerevisiae* haploid 株) を用いて、細胞内アミノ酸分布とその動態について調べた。まず、酵母、*S. cerevisiae* の細胞を低濃度の  $Cu^{2+}$  処理により細胞膜のみを選択的に透過性にすることにより、細胞質および液胞内アミノ酸プールを簡易に測定する方法を設定した。この分別定量法を用いて、種々のアミノ酸を添加した YNB D 培地で生育した酵母細胞中のアミノ酸プールの分析を行った。10 mM のアルギニンを添加した場合、液胞内に約 430 mM という高濃度のアルギニンが蓄積された。この液胞内アルギニンは窒素飢餓時に N 源として利用された。この時、液胞から細胞質に移動するアルギニンに対して、その反対に細胞質から液胞に  $K^+$  が流入するのが認められた。液胞は、アミノ酸等種々の代謝産物の貯蔵庫として働いており、アミノ酸代謝や浸透圧調整に重要な役割を果たしていると考えられているが、これらの働きを調べるのに本法は有効であることを示した。この方法は代表的な清酒酵母である協会7号、協会9号等でも適用可能であり、清酒醪中の酵母細胞内アミノ酸プールの解析に有用であると思われる。

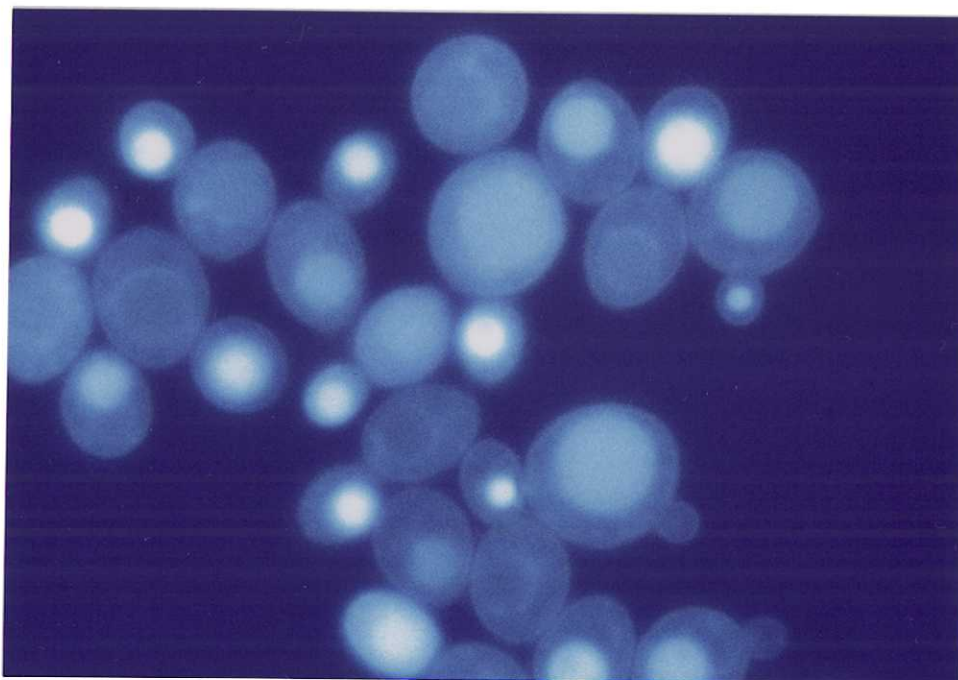
次に、液胞内アミノ酸プールの変化した変異株の単離を試みた。リジンまたは、そのアナログである AEC (アミノエチルシステイ

ン) に高感受性となった変異株を単離し、その細胞内アミノ酸プールの測定結果から、細胞質内アミノ酸組成に変化がなく、かつ液胞内リジンプールが小さくなった変異株を4株選定した。KL97株 (lys1 slp1-1) と戻し交配により栄養要求性をなくした KL197-1A株 (a slp1-1) は、10 mMリジンを添加した YNB D 培地で生育が著しく不良であった。KL97株は次のような多面発現を示した。

1) 液胞内リジン、ヒスチジン、アルギニンのプールは同時に低下していた。2) 高濃度リジン、ヒスチジン、Ca<sup>2+</sup>、重金属イオン、抗生物質等に高感受性を示した。3) 細胞内に通常見られる大きな液胞は認められず、代わりに多数の小胞が存在した。4) 液胞膜のマーカー酵素である  $\alpha$ -mannosidase 活性には変化はなかったが、液胞内酵素である proteinase A、proteinase B、carboxypeptidase Y の活性は低下していた。これらの結果から、slp1-1変異株は液胞形成の初期過程に欠損があり、そのため液胞内リジンプールが低下したものと推定された。そこで、YCpG11を用いた yeast gene library から、この遺伝子をクローニングした (pYKK100)。クローン化された DNA 断片の大きさは、制限酵素地図の作成から 7.7 Kb であった。組み込み型ベクターを用いた解析から、クローン化した遺伝子は SLP1 であることを確認した。

清酒醸造における酵母液胞の役割を明らかにすることを目的として、正常な液胞形成ができないために液胞生理機能の欠損した変異株 (slp1-1変異株) を用いて清酒醸造を行った。予期したように、slp1-1変異株は野生型株に比べ、醪中の増殖が弱く、アルコールの生成度も低かった。YEP D 培地での予備的試験の結果、高い糖濃

度、乳酸酸性の条件下では slp1-1 変異株の生育が野生型株に比べ低下した。このように、酵母液胞は、アミノ酸の取り込み、貯蔵に関与しているばかりでなく、清酒醪での過酷な条件下で酵母細胞の耐糖性や耐酸性等にも大きく関与していることが示唆された。



上図は、清酒酵母の代表とも言える協会7号酵母の蛍光顕微鏡写真であるが、よく発達した液胞を持つ。現在、清酒醸造に使用されている協会6号、9号等も同様に大きな液胞を持つ。清酒酵母がパン酵母等 비해形態的に大きな液胞を持つことは以前から指摘されていたが、その機能についての研究はこれまでなされていない。

液胞は、酵母では細胞体積の約25%を占める最も大きなオルガネラであるが、以前は「代謝活性が低く、細胞の ”ごみため” 」という認識が一般的であった。しかしながら、近年、植物組織や酵母から液胞を単離調製する方法が開発され、液胞および液胞膜の生

化学的な研究も飛躍的にその数を増している。そして、液胞は種々の代謝産物の貯蔵庫、細胞にとって危険なものの隔離室としての機能、および種々の加水分解酵素が局在しリソゾーム様の機能を持つことが知られてきており、近年その機能が注目を集めている。

清酒醸造中の酵母の働きをこのように液胞の機能を考えて解析することにより、発酵生理をより明確に理解できると期待される。清酒醪の発酵末期には酵母細胞からS-アデノシルメチオニン(SAM)の漏出が認められ、このSAMは火入れにより苦みの強いメチルチオアデノシンに変わることが知られている。このSAMは細胞内では、そのほとんどが液胞に存在することが知られているが、その他、清酒醸造と関連の深いアミノ酸、磷酸、Fe、Mg等が液胞に蓄積されることが、*S. cerevisiae*で知られている。植物細胞では上記の他に、浸透圧の調節に働いていることが知られている。

最近、SAMの医薬としての重要性から、酵母によるSAMの生産が検討され、約200株の酵母(*S. cerevisiae*以外の属の酵母を含む)からSAM生産菌のスクリーニングが行われた。その結果、最もSAMを多く蓄積する株として、偶然にも協会7号、9号等の清酒酵母が選定されたという報告がある。

清酒醸造にとって最も適した酵母は数百年におよぶ酒造りという自然のスクリーニングを経てきたことを考えると、清酒醸造において、酵母液胞が重要な役割を果たしていることが推定される。

Cu<sup>2+</sup>処理による液胞内成分の簡易分析法や、*slp1*変異株を用いた清酒醸造により、清酒醸造における液胞の役割が、さらに明らかになることが期待される。

## 研究論文総覧

### 本論文関係

- (1) 胚芽添加仕込によるアミノ酸の少ない清酒の製造  
北本、三宅、渡辺、中村： 醸協、80、53 (1985)
- (2) 胚芽添加仕込における胚芽添加時期の製成酒に及ぼす影響  
北本、三宅、中村： 醸協、80、567 (1985)
- (3) 清酒醪のアミノ酸減少に関与する胚芽中の無機成分  
北本、三宅、河野、渡辺、高橋、戸塚、中村： 醸協、80、59 (1985)
- (4) 清酒醪における酵母のアミノ酸取り込みの能の変化と酵母菌体内外のアミノ酸  
北本、高橋、戸塚、吉沢： 醸酵工学、63、289 (1985)
- (5) 清酒醪中の無機イオンの変化： 北本、高橋、戸塚、吉沢  
： 醸協、80、564 (1985)
- (6) 清酒醪中の香气成分生成に及ぼす胚芽、無機イオン添加の影響  
北本、那須、河野、高橋、戸塚、吉沢： 醸協、80、559 (1985)
- (7) Changes induced by cupric ion in the permeability barrier of the yeast plasma membrane  
Y. Ohsumi, K. Kitamoto, and Y. Anraku: J. Bacteriol., 170, No 6 2676 (1988)



(8) Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*

K. Kitamoto, K. Yosizawa, Y. Ohsumi, and Y. Anraku:  
J. Bacteriol., 170, 2683 (1988)

(9) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defective vacuolar function

K. Kitamoto, K. Yosizawa, Y. Ohsumi, and Y. Anraku:  
J. Bacteriol., 170, 2687 (1988)

#### その他の論文

(1) 醸造用活性炭に関する研究 (第14報)

炭臭について

佐藤、蓼沼、高橋、北本、山田、三ツ沢：醸協、68、85  
6 (1973)

(2) L-Prolyl-L-leucine Anhydride A Bitter Compound Formed in Aged Sake

K. Takahashi, M. Tadenuma, K. Kitamoto, and S. Sato:  
Agric. Biol. Chem. 38, 927 (1974)

(3) 清酒貯蔵中の品温変化から3-D-Gおよび着色増加を推定する方法

椎木、北本、佐伯、坂本、河合、岩野：醸協、71、52  
(1976)

(4) 原料米の酒造適性に関する研究 (第2報)

実地醸造面からみた日本晴、レイハウ、ツクシバレの比較  
佐々木、岩永、鈴木、藤田、山城、北本：醸協、72、1  
51（1977）

（5）原料米の酒造適性に関する研究（第3報）

白米の諸性質と実地醸造結果との関係

山城、鈴木、岩永、藤田、佐々木、北本：醸協、72、1  
55（1977）

（6）キレート樹脂・粒状活性炭による除鉄試験

難波、大場、北本、網本：醸協、74、619（1979）

（7）古米使用清酒の特異臭に関する研究（第3報）

F P D - G C による米中および清酒中のジメチルスルフィ  
ド（D M S）前駆物質の定量法

北本、大場、難波：醸協、74、677（1979）

（8）古米使用清酒の特異臭に関する研究（第4報）

F I D - G C による米中のジメチルスルフィド前駆物質の  
定量法

大場、北本、城本、難波：醸協、74、829（1979）

（9）古米使用清酒の特異臭に関する研究（第5報）

F I D - G C による清酒中のジメチルスルフィドならびに  
前駆物質の定量法

大場、北本、大坪、難波：醸協、74、833（1979）

（10）古米使用清酒の特異臭に関する研究（第7報）

古米を用いた小仕込試験結果

難波、大場、高橋、北本、小林、土橋：醸協、75、58

5 (1980)

(11) 小仕込用製きく法と酵素活性

難波、大場、北本、網本、土橋：醸協、75、1006 (1980)

(12) Identification of a Heat-Stable Precursor of Dimethyl Sulfide in Sake

K. Kitamoto, T. Ohba, Y. Namba: Agric. Biol. Chem. 45, 1713 (1981)

(13) 古米使用清酒の特異臭に関する研究 (第9報)

界面活性剤処理による米中のジメチルスルフィド前駆物質の除去法

難波、大場、北本、土橋、小田垣：醸協、76、63 (1981)

(14) 清酒のトリプトファン定量法について

大場、北本、笠勝、難波：醸協、76、424 (1981)

(15) 清酒の熟成による香味の変化に関する研究 (第20報)

清酒中の中高沸点硫黄化合物の検索

大場、高橋、飯田、北本、佐藤、難波：醸協、76、487 (1981)

(16) 古米使用清酒の特異臭に関する研究 (第10報)

くん蒸剤による米中のジメチルスルフィド (DMS) 前駆物質の生成

北本、大場、難波：醸協、76、491 (1981)

(17) 濾過助剤の品質について

難波、大場、北本、河野、吉田、稲橋：醸協、76、55  
3 (1981)

(18) 古米使用清酒の特異臭に関する研究 (第11報)

新米糠中のジメチルスルフィド前駆物質の分離、同定

難波、大場、北本、平沢、唐橋：醸酵工学、60、27 (1982)

(19) 古米使用清酒の特異臭に関する研究 (第12報)

白米中のジメチルスルフィド前駆物質の分離、同定と酵素による分解

難波、大場、北本、平沢：醸酵工学、60、35 (1982)

(20) 古米使用清酒の特異臭に関する研究 (第13報)

常温古米使用清酒中のジメチルスルフィド前駆物質の分離、同定

北本、大場、難波：醸酵工学、60、417 (1982)

(21) 米粒中に含まれる塩素の定量

難波、河野、北本、中村：醸協、77、549 (1982)

(22) 清酒中のペプチドの簡易定量法

北本、梶原、大場、難波、中村：醸協、77、665 (1982)

(23) Microorganisms Isolated in Thailand

K. Saito, T. Hasuo, N. Sugano, K. Kitamoto, S. Watanabe, M. Tadenuma, K. Nakamura, M. Sato, H. Akiyama, V. Vongsuvanlert, P. Karuwanna, and J. Kumnuanta:

Rep. Res. Inst. Brewing, 155, 1 (1983)

(24) 酒造原料米の品種及び産地の米質・酒質への影響

高橋、北本、戸塚、吉沢、中村、大橋、庭山：醸協、79、  
586 (1984)

(25) アミノ酸取り込みに対するマグネシウムイオンの影響

吉沢、高橋、北本、宮崎：醸協、80、645 (1985)

(26) 清酒のアミノ酸量に及ぼす酵母の前培養の影響について

吉沢、高橋、北本、永井：醸協、80、649 (1985)

(27) 貯蔵法が米質および酒質に与える影響について

難波、大場、北本、須藤、馬場、河野：醸協、81、34  
1 (1986)

(28) プロトプラスト融合法による高温発酵性醸造用酵母の育種

宮崎、北本、高橋、吉沢：醸酵工学、65、1 (1987)

(29) pep4 変異を持つ清酒酵母の造成

北本、吉沢：醸酵工学、66、1 (1988)

## 謝 辞

本研究を行うに当たり、終始懇切なる御指導を賜った国税庁醸造試験所中村欽一博士（現在日本醸造協会）、吉沢 淑博士、戸塚昭博士、東京大学安楽泰宏教授、大隅良典助教授に深甚の謝意を表します。また、本研究の一部に共同研究者としてご協力頂いた醸造試験所高橋康次郎博士、三宅 優氏、河野正義氏、および醸造試験所研修員渡辺誠衛氏の諸氏に感謝致します。また、貴重な菌株およびプラスミドを御恵与くださった東京大学大矢禎一博士、電子顕微鏡観察の際にお世話になりました日本女子大学大隅正子教授、馬場美鈴氏に感謝致します。さらに、折りにふれ有意義な御教示を頂戴した田村学造東京大学名誉教授、山崎真狩東京大学教授、国税庁醸造試験所難波康之祐博士（現在十文字学園女子短期大学）、大場俊輝博士（現在札幌国税局）に深く感謝致します。