

海洋深層水が清酒発酵中の酵母に与える影響

Effects of deep seawater on yeast during “sake”-fermentation

佐見 学¹・杉山 洋¹・上神 久典²・中尾 みか¹・加藤 麗奈³・上東 治彦³
Manabu SAMI, Hiroshi SUGIYAMA, Hisanori UWAGAMI, Mika NAKAO, Reina KATOH
and Haruhiko UEHIGASHI

Abstract

Deep seawater (DSW) is pumped up from a depth of 320 meters off Muroto in Kochi Prefecture, Japan. Since DSW is known to be less polluted and contains various minerals, it has been used for a variety of fermented foods in Japan. To investigate the effects of DSW in Japanese “sake”-fermentation, we carried out small-scale (1–2 L) fermentation tests. The addition of DSW elevated levels of aroma components, including isoamyl acetate, ethyl caproate and ethyl caprylate. For further elucidation of the mechanism underlying this phenomenon, we used cDNA microarray analysis for studying yeast gene expression during fermentation. The addition of DSW substantially increased the transcript levels of several genes known to be involved in the biosynthesis and metabolism of amino acids and fatty acids. It is therefore suggested that the rise in transcription of these genes resulted in the increased aroma production. The sensory evaluation revealed that the addition of DSW in fermentation resulted in significantly superior flavor profile of the final products compared with the addition of NaCl, a major component of seawater. Interestingly, the microarray analysis demonstrated the addition of NaCl by itself induced stress during fermentation as indicated by mRNA levels in “sake” yeast. The addition of DSW appeared to ameliorate the negative effect induced by NaCl. Taken together, these results indicate that addition of DSW in the fermentation processes provides unique advantages for the “sake” production.

Key Words: deep seawater, “sake”, fermentation, yeast, DNA microarray

要 旨

高知県室戸市では水深 320 m の海中から海洋深層水 (DSW) を取水している。DSW はその清浄性および多くのミネラルを含むことから、様々な発酵食品に応用されている。今回、清酒発酵に与える DSW の影響を調べることを目的として、小スケールでの清酒発酵試験 (1–2 L) を行った。従来から DSW を発酵中に添加することにより、清酒の香気成分すなわちイソアミルアルコール、カプロン酸エチルおよびカプリル酸エチルの生成を亢進することが知られている。この現象のメカニズムを探る目的で、DSW を添加して発酵させた場合の酵母の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、DSW の添加により高級アルコールおよび脂肪酸の代謝・生合成に関連する遺伝子の発現上昇が認められた。これらの発現上昇が清酒の香気成分の生成量を増加させたものと推察された。また、DSW を添加した清酒の小仕込を行い、官能検査を実施したところ、NaCl や DSW の主要ミネラルを添加した場合に比べて総合評価が有意に高いことが明らかとなった。さらに興味深いことに、NaCl を単独添加した場合、ストレスに関連する遺伝子の発現が上昇することが見出された。一方、DSW を添加した場合、このストレス関連遺伝子の発現上

¹アサヒビール株式会社, R & D本部, 未来技術研究所 (〒302-0106 茨城県守谷市緑 1-1-21)

²アサヒビール株式会社, 商品技術開発本部, 酒類研究所 (〒302-0106 茨城県守谷市緑 1-1-21)

³高知県工業技術センター, 食品加工部 (〒781-5101 高知県高知市布師田 3992-3)

昇は抑えられた。以上の結果から DSW を清酒醸造に応用することの重要性が示されたものと思われる。

キーワード：海洋深層水，酒，発酵，酵母，DNA マイクロアレイ

1. はじめに

DSW は、一般的に 200 m 以深の太陽光が十分には届かないところの海水を指すと言われている。DSW は、1920 年代フランスの科学者によるキューバ沖での温度差発電の検討に始まり、1980 年代にはハワイにて産業資源としての研究が開始した。我国においても昭和 60 年、科学技術庁が海洋深層水資源の有効利用を目的にアクアマリン計画を打ち出し、室戸を始めとした地域がモデルとなった。平成元年には高知県内に海洋深層水研究所が設立され、ビジネス化に向けた研究が開始された。その後、化粧品、スポーツ飲料を始めとし、豆腐、納豆、パン、漬物、酒類といった多くの商品に DSW が用いられるようになった。酒類においては、高知県内の多くの酒造メーカーから十数種の清酒が販売されている。また、醸造工程で DSW を使用した発泡酒も開発された。しかし、酒類における DSW の効果についての研究は少なく、久武ら (2000)¹⁾ が清酒発酵において、アルコール収率、吟醸香の上昇および雑味の低減等を報告しているのみである。

近年、多くの生物においてゲノムの解読が進み、DNA チップによる網羅的な遺伝子解析が可能となってきた。特に酵母のゲノム研究は古くから行われており、1997 年に全ゲノムの配列が決定し、約 6 千 2 百個の遺伝子が同定された。また、これら遺伝子に関する情報は、MIPS、SGD 等のデータベースで提供されている。さらに、酵母の DNA チップは数年前から市販されていることから、酵母は遺伝子発現解析を行う上で非常に有利な生物であると言える。

そこで、我々は、酒類発酵中の酵母に与える DSW の効果について、DNA チップを用いて、酵母の遺伝子発現の観点から解析を行い、DSW の作用メカニズムについて考察したので、以下に報告する。

2. DSW の効果検証

清酒は通常並行複発酵で造られているが、本研究では DSW が酵母に与える影響を調査するため、酵母単独による発酵系を作製し実験を行った。すなわち、予め麹により白米を糖化させた後、DSW (高知県海洋深層水研究所より分与) を 1% となるように添加することによりもろみを調整した (著者らの検討により DSW を 1% 添加した場合、最も香気成分の生成が高くなることが判っている)。このもろみに協会 701 号酵母を接種し発酵を行った。

これまで清酒発酵中に DSW を添加すると清酒の吟醸香が増すことが知られていた。今回、酵母単独での発酵系への DSW 添加試験を実施した結果、発酵中の Brix 低下や酵母の生育に関しては DSW 添加群と無添加群で大きな差は見られなかったが (図-1)、吟醸香の顕著な増加が観察された (図-2)。従って、DSW による吟醸香増加において、DSW の酵母への効果が寄与していることを確認することができたものと思われる。一方、表層海水を添加した場合も、DSW と同様に吟醸香の増加が確認された (データ示さず)。しかし、食品産業に応用する場合、清浄性および成分安定性の面から DSW の利点は大きいものと考えられる。

次に、発酵中の酵母について DNA チップ解析を行うことにより DSW の吟醸香生成促進効果のメカニズムについて考察することとした。

3. DSW の吟醸香生成促進のメカニズム解析

まず、酵母の全遺伝子 (約 6 千 2 百) を機能別に 111 のグループ (図-3) に分類した。次に各々の遺伝子について、蒸留水に対する DSW 添加における発現量比 (DSW を添加した場合の発現量 / 蒸留水を添加した場合の発現量) を求めた。実験は発酵試験から DNA チップ実験まで独立に 3 回繰り返

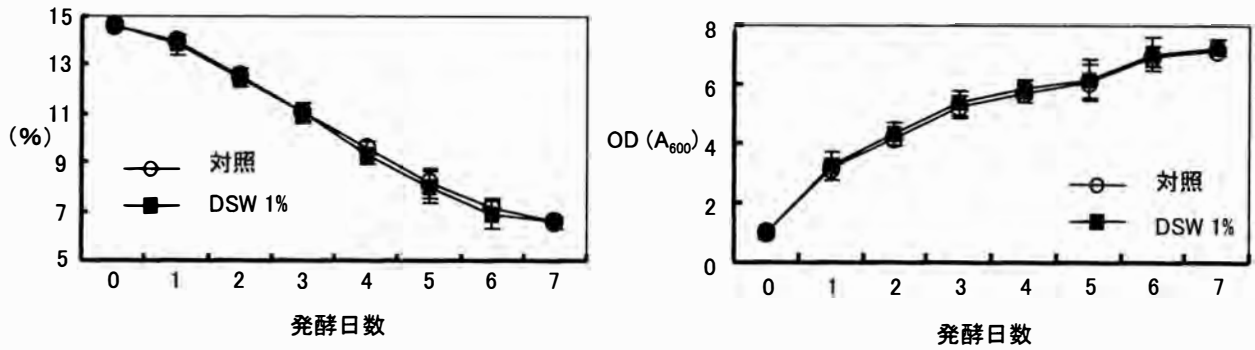


図-1 DSW 添加発酵試験の経過 (上下のバーは標準偏差を示す)

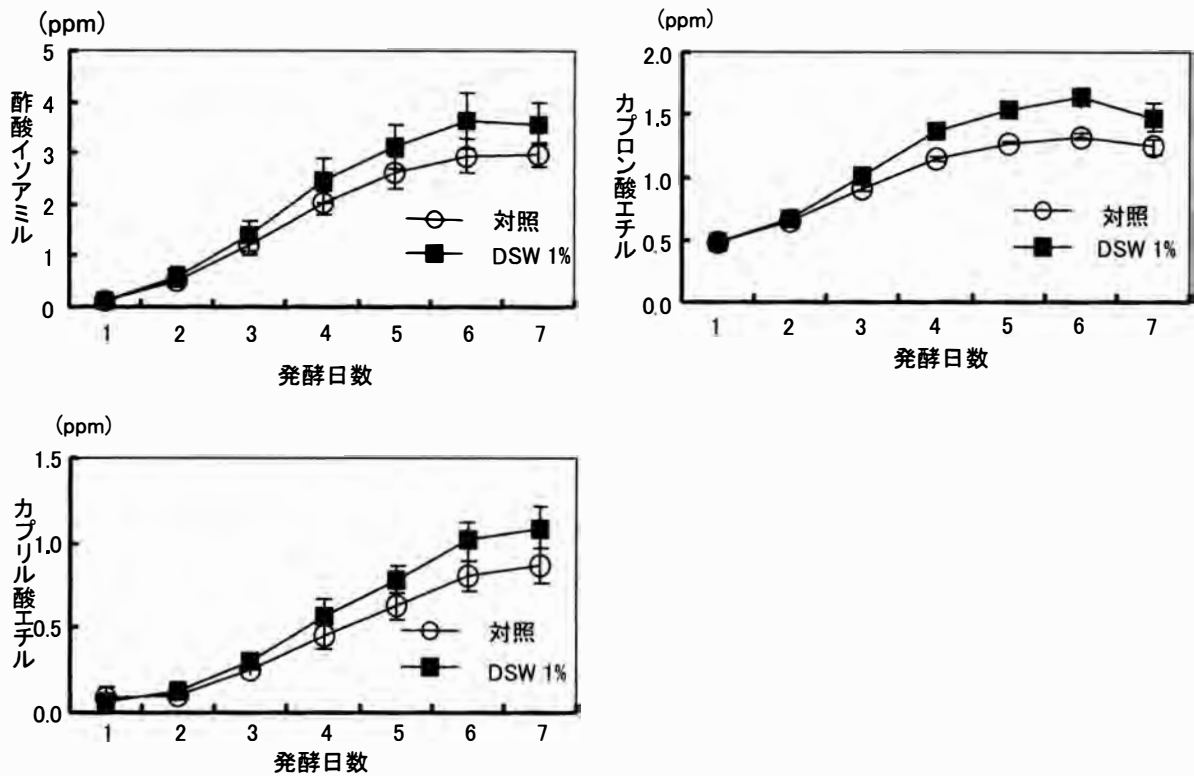


図-2 DSW 添加発酵試験における香り成分の生成 (上下のバーは標準偏差を示す)

して実施した。それぞれの機能別遺伝子グループ内における発現量比が2以上の遺伝子の割合 (%) について、発酵1~3日目の結果を図-3に示した(発酵4日目以降は発現量比が有意に増加する遺伝子群が存在しなかった)。この結果を基にグループ内の割合が20%を超える遺伝子群を表-1に示した。リストアップされた遺伝子群は12群であったが、そのうち8群が脂肪酸およびアミノ酸(N源)代謝・生合成に関連する遺伝子群(表中アンダーライン)であった。

これらの結果から、DSWは、脂肪酸およびアミノ酸代謝・生合成に関連する遺伝子群に影響を与え

ていることが推察された。

清酒の吟醸香として重要な成分は、カプロン酸エチル、カプリル酸エチル等の脂肪酸エステルおよび酢酸イソアミルを代表とする高級アルコールエステルである。脂肪酸エステルを構成するエタノールや、酢酸イソアミルを構成する酢酸は、発酵もろみおよび酵母菌体中、豊富に存在するため、これらエステルの生成量を決定付けるのは、脂肪酸とイソアミルアルコール量であることが知られている。今回のDNAチップ解析結果から推定されたDSWによる脂肪酸およびアミノ酸代謝・生合成の活性化は、脂肪酸やイソアミルアルコールの生成を促すものであ

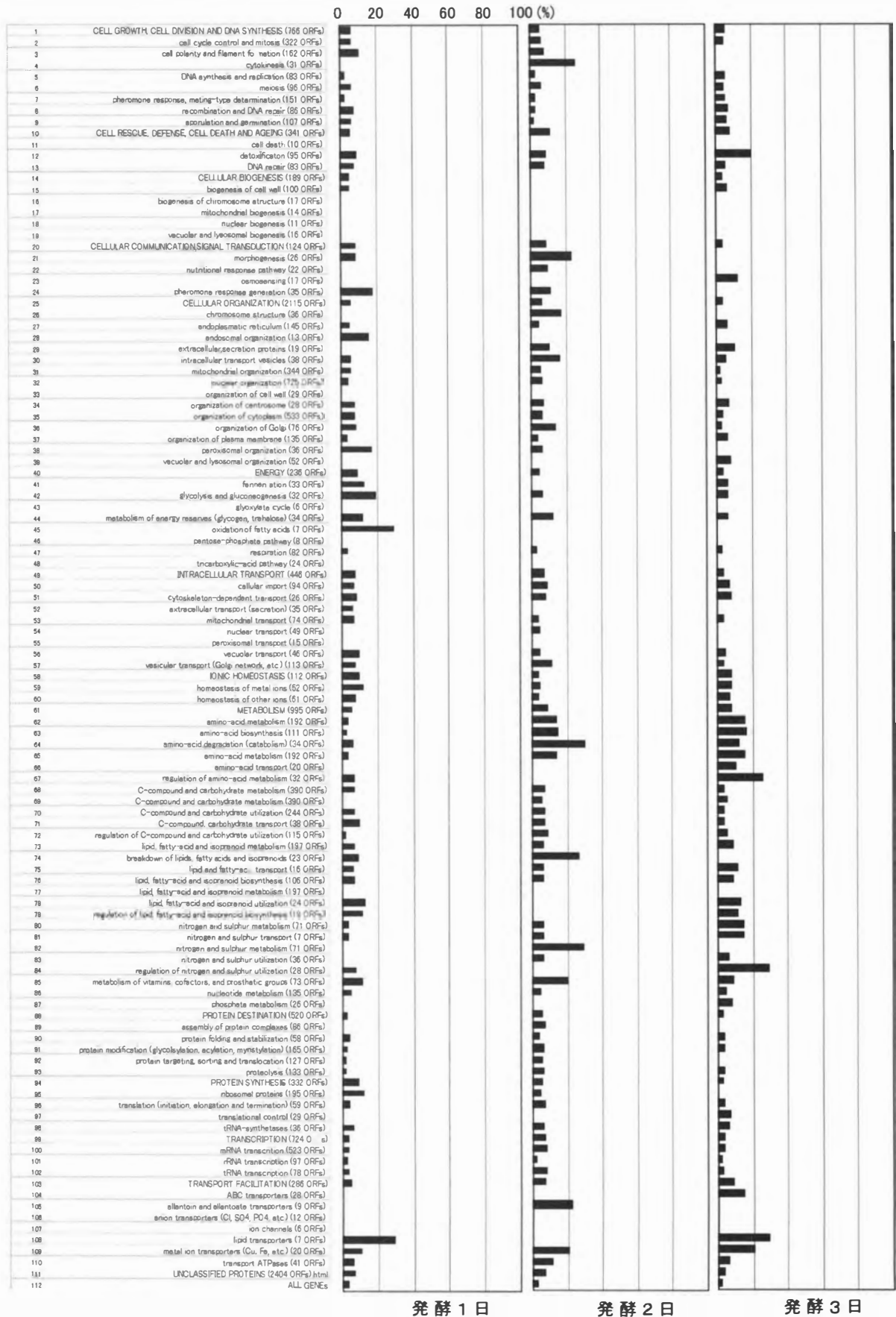


図-3 DSW 添加により発酵中発現が亢進する酵母遺伝子群

表-1 DSW 添加により発酵中発現が亢進する酵母遺伝子群
(下線は脂肪酸およびアミノ酸代謝・生合成に関連する遺伝子群)

発酵 1 日目	発酵 2 日目	発酵 3 日目
<u>oxidation of fatty acids</u> lipid transporters	cytokinesis morphogenesis <u>amino-acid degradation</u> <u>breakdown of lipids, fatty acids</u> <u>nitrogen and sulphur metabolism</u> allantoin and allantoate transporters	<u>regulation of amino-acid metabolism</u> <u>regulation of nitrogen & sulphur utilization</u> <u>lipid transporters</u> metal ion transporters

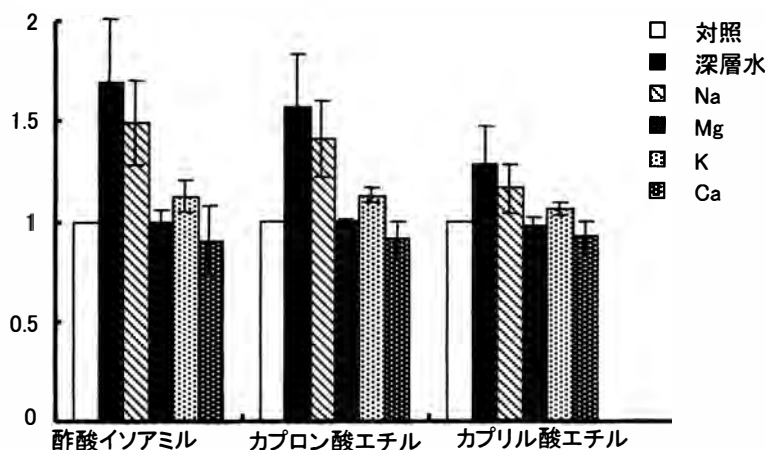


図-4 各種ミネラルの添加が吟醸香生成に及ぼす影響
(対照の香気成分濃度を1とした時の比 (n=2))

ると予想される。その結果として、脂肪酸エステルや高級アルコールエステルの生成量が増加したものと推定された。一方、これら2つのエステルを合成する酵素、アルコールアセチルトランスフェラーゼ (AAT) およびアルコールアシルトランスフェラーゼ (AACT) をコードする遺伝子については、DSW による発現上昇は観察されなかった。

4. 吟醸香の生成促進に関与する DSW 中の成分

DSW に含まれる主要ミネラルである Na, K, Mg および Ca の4種について、それぞれ DSW を1%添加した場合の個々のミネラル濃度と同じになるように、各ミネラルを塩化物としてもろみ上清に添加後、発酵試験を実施した。その結果、糖消費 (Brix 低下)、酵母生育 (酵母数) に関しては顕著な差は認められなかった (データ示さず)。一方、吟醸香の生成においては、Na 添加群が無添加群に比べ顕著に増加した (図-4)。K, Mg および Ca

添加群においては、吟醸香の生成促進は殆ど観察されなかった (図-4)。

次に、これらのミネラルを様々な組み合わせで添加した発酵試験を実施した結果を図-5に示した。カプロン酸エチルの生成に与える Na + Mg + K (図中 NMK で表示) の効果が、DSW の効果と同等であったものの、全ての吟醸香成分の生成促進において DSW と同等の効果をもつミネラルの組み合わせは見出されなかった。

以上の結果から、DSW の効果において Na のある程度の寄与が確認された。しかし、主要ミネラルの相乗効果は殆ど見られず、主要ミネラルのみで、DSW の効果全てを説明することはできないと考えられた。

5. Na と DSW の効果の違い

これまでの結果から、吟醸香生成の促進において主要なミネラルである Na と DSW が発酵中の酵母

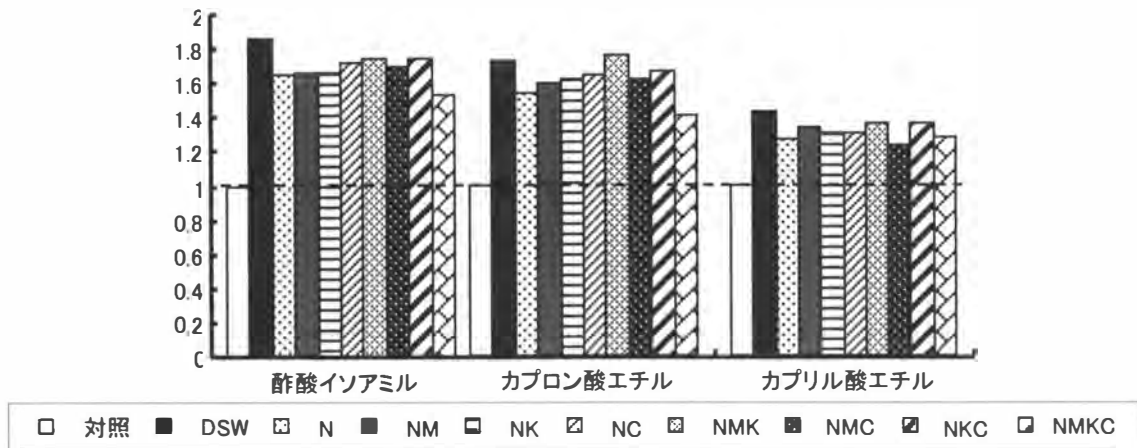


図-5 ミネラルを複数添加した場合の吟醸香生成比 (対照の濃度を1とした時の比 (n=2, N=NaCl, K=KCl, M=MgCl₂, C=CaCl₂))

表-2 グループAの遺伝子リスト

発酵日数	ORF名	遺伝子名	発現量比 (DSW/NaCl)	機能
1	YGR180C	RNR4	2.77	ribonucleotide reductase
1	YJR156C	THI11	2.52	thiamine biosynthesis
1	YLR134W	PDC5	2.30	pyruvate decarboxylase
1	YNL079C	TPM1	2.15	tropomyosin
1	YOR230W	WTM1	2.08	meiotic silencing
1	YPL082C	MOT1	2.05	helicase
1	YNL332W	THI12	2.02	pyrimidine biosynthesis
2	YHR055C	CUP1-2	2.66	copper-binding metallothionein
2	YHR053C	CUP1-1	2.36	copper-binding metallothionein
2	YJR091C	JSN1	2.09	mRNA turnover
2	YJL166W	QCR8	2.04	aerobic respiration
3	YIL123W	SIM1	3.22	microtubule biogenesis
3	YIL068C	SEC6	2.34	polar budding
3	YIL150C	DNA43	2.12	DNA replication
3	YGR258C	RAD2	2.01	DNA repair

表-3 グループBの遺伝子リスト

発酵日数	ORF名	遺伝子名	発現量比 (DSW/NaCl)	機能
1	YHR094C	HXT1	3.37	hexose transporter
1	YIL043C	CBR1	2.60	cytochrome reductase
1	YJR158W	HXT16	2.53	hexose permease
1	YBR256C	RIB5	2.03	riboflavin synthase
2	YLR433C	CNA1	3.25	calcineurin subunit
2	YBL074C	AAR2	3.15	mRNA splicing
2	YPL120W	VPS30	2.72	vacuolar protein targeting
2	YNL111C	CYB5	2.51	cytochrome b5
2	YLR319C	BUD6	2.27	budding
2	YNL142W	MEP2	2.24	ammonia transporter
2	YLR443W	ECM7	2.15	cell wall biogenesis
2	YDR268W	MSW1	2.08	mitochondrial tRNA synthetase
2	YBR296C	PHO89	2.05	Na ⁺ /Pi symporter
2	YBR193C	MED8	2.01	RNA polymerase II transcription mediator
2	YLR234W	TOP3	2.00	DNA Topoisomerase III

に与える影響をDNAチップで比較解析することにより、DSWの機能性を考察することを試みた。

まず、DSWにおけるNa以外の成分の機能について解析するため、以下の2つの挙動を示す遺伝子をピックアップした(表-2, 3)。

グループA: (DSWを添加した場合の発現量 / NaClを添加した場合の発現量) が2以上

かつ (DSWを添加した場合の発現量 / 蒸留水を添加した場合の発現量) が2

未満の遺伝子

グループ B：(DSW を添加した場合の発現量 / NaCl を添加した場合の発現量) が 1/2 未満

かつ (NaCl を添加した場合の発現量 / 蒸留水を添加した場合の発現量) が 2 未満の遺伝子

すなわち、これらの遺伝子群は、以下のように言い換えることができる。

グループ A：Na がもつ発現の抑制的影響を Na 以外の成分により影響が消去される遺伝子群

グループ B：Na 以外の成分が抑制的影響を与える遺伝子群

表-2 に示した 15 の遺伝子がグループ A の挙動を示すものとしてリストアップされたが、そのうち多くものが増殖に深く関わりのある遺伝子であった。また、エタノール発酵に重要な pyruvate decarboxylase をコードする *PDC5* およびその代謝に関連している *THI11* および *THI12* (Hohman and Meacock, 1998) がグループ A に含まれていた。但し、実際の発酵経過中の酵母増殖やエタノール生成量において顕著な差を見出すことは出来なかった。

また、グループ B には 15 の遺伝子がリストアップされた (表-3)。このうち 8 つの遺伝子 (*CNA1*, *VPS30*, *BUD6*, *MEP2*, *ECM7*, *PHO89*, *HXT1*, *16*) がストレスに関連する遺伝子であった。その中でも、*CNA1*, *BUD6*, *PHO89*, *HXTs* は、Na を含むイオンストレスにレスポンスして発現する遺伝子であることが知られている (Norbeck and Blomberg, 1997)。

以上の結果をまとめると、DSW は清酒の吟醸香を増加させる効果を有していることが知られていたが、今回得られた結果より DSW が酵母の脂肪酸およびアミノ酸代謝・生合成関連遺伝子群に影響を与えることが推定された。また、DSW 成分のうち主

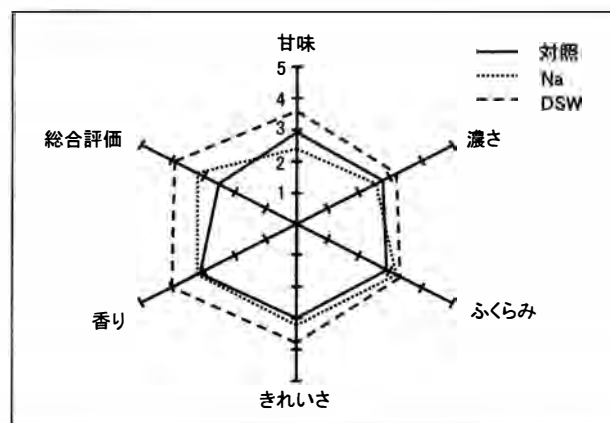


図-6 官能検査結果 (n=10 の平均値)

要ミネラルの中では Na が吟醸香を増加させる効果に寄与していることが明らかとなった。そこで、DSW と Na の機能について詳細に調べたところ、Na は酵母のストレス関連遺伝子の発現を上昇させることが判った。一方、DSW はこの Na による影響を抑制する効果を有していることが見出された。

6. 官能評価

これまで清酒における酵母単独発酵のモデル系を用いて、DSW 効果のメカニズム、さらに DSW 中の成分については、その機能について考察してきた。ここでは、官能 (香味, おいしさ) の観点から、DSW と Na の機能の違いについて、再度検証することを目的として、発酵中に DSW あるいは NaCl を添加した並行複発酵で清酒を製造し、専門パネリストによる官能検査を実施した。

並行複発酵の経過においては、NaCl, DSW 添加群では対照に比べ酵母数が多くなりグルコース消費が促進される結果となった。

官能検査は熟練したパネリスト 10 名でブラインドにて実施し、図-6 記載の各項目を 5 段階で評価した。その結果、最も総合評価の高かったのは DSW 添加群であり、以下 NaCl 添加群, 対照の順であった (図-6)。この順位については、Friedman 検定を実施したところ、危険率 1% で統計的に有意であった。この結果より、DSW を添加

して発酵させた清酒のおいしさの向上は、Na 単独では再現できず、DSW に含まれる様々な成分の複合的な働きにより実現することが明らかとなった。

以上全ての結果より、①清酒の吟醸香増加、②発酵中の酵母に与える影響、および③おいしさ向上の観点から、発酵中に DSW を使用することの意義が示されたものと考えられる。

7. 総括

DSW が清酒の吟醸香生成を促進する効果において、その作用メカニズムとして、DSW が酵母代謝に作用するポイントを考察した。すなわち、DSW は酵母のアミノ酸および脂肪酸代謝・生合成に関連する遺伝子群の発現を上昇させることを明らかにした。

また、①吟醸香を増加させる効果、②発酵中の酵母に与える影響、および③おいしさを向上させる効果の3つの観点から、酒類の発酵中に DSW を使用することの意義が示されたものと考えられる。

謝辞

官能評価を実施するにあたりご協力を賜りました土佐鶴酒造株式会社の皆様に心より感謝申し上げます。

文献

- 久武陸夫・上東治彦・森山洋憲・鶴田望 (2000): 海洋深層水の発酵食品への利用と効果. 醸協, 95, 478-484.
- Hohmann, S. and Meacock, P. A. (1998): Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1385, 201-219.
- Norbeck, J. and A. Blomberg (1997): Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. *J. Biol. Chem.*, 272, 5544-5554.

(2003. 11. 10 受付, 2004. 5. 28 受理)