

オルニチン高生産清酒酵母に見出したフィードバック阻害非感受性型 N-acetyl glutamate kinase 変異体の機能解析

バイオ・食品グループ
大橋 正孝

研究の概要

■ 目的・背景

特徴のある清酒酵母の取得のため育種を行った結果、肝臓の働きを促進する機能性アミノ酸「オルニチン」を酵母の細胞内に高生産する清酒酵母の分離に成功した。得られたオルニチン酵母を用いて、清酒小仕込み試験を行ったところ、清酒及び酒粕中にオルニチンが高含有していた (Fig. 1)。そのオルニチン酵母の遺伝子解析を行った結果、N-アセチルグルタミン酸をリン酸化する酵素NAGKをコードするARG5,6遺伝子に変異 (ARG5,6 T340I) があり、遺伝子産物であるNAGKの340番目のスレオニン (T) がイソロイシン (I) に置換されていた。

NAGKは、アルギニンによるフィードバック阻害を受けて活性が低下する (Fig. 2) が、そのアミノ酸置換により、フィードバック阻害が解除されるため、オルニチンが高生産されることを既に解明した。さらに、Thr340の側鎖の水酸基とLys336の主鎖のカルボニル基との水素結合が、NAGKとアルギニンとの結合に重要であることが推測された (Fig. 3)。

今回、Thr340をアラニン (A)、グルタミン酸 (E)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、アスパラギン (N)、アルギニン (R)、セリン (S) に置換し、オルニチン生産に与える影響及びNAGKのアルギニンによるフィードバック阻害への影響を解析し、その水素結合の重要性を確認した。

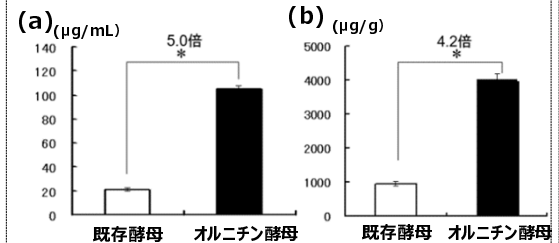


Fig. 1 清酒(a)及び酒粕(b)中のオルニチン量

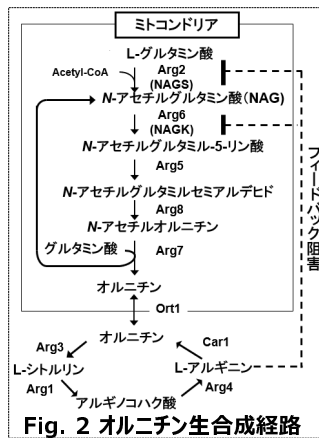


Fig. 2 オルニチン生合成経路

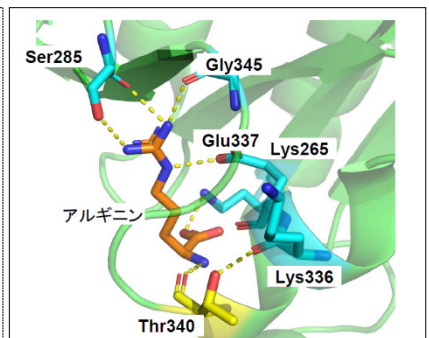


Fig. 3 *Saccharomyces cerevisiae* NAGK (PDB ID code:3ZZH) におけるアルギニン結合部位の構造

■ 結果

- 1) 野生型ARG5,6^{WT}と変異型ARG5,6^{T340X}を発現させた時の細胞内オルニチン量は、T340SではWTと同等で、それ以外では顕著に高かった (Fig. 4)。
- 2) 変異型NAGK-T340SのIC₅₀^{Arg}は、野生型NAGK-WTと同程度に顕著に低く、それ以外の変異型NAGKのIC₅₀^{Arg}は顕著に高かった (Table 1)。
- 3) 以上の結果から、T340Sはアルギニンによるフィードバック阻害を受けないため、オルニチンを高生産しないことが示唆された。セリンは、スレオニンと同様に側鎖に水酸基を有している (Fig. 5)、Lys336と水素結合による相互作用することが推測され、NAGKのアルギニンとの結合に重要であることが強く示唆された。

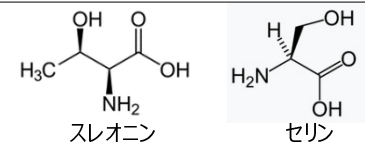


Fig. 5 スレオニン、セリンの構造式

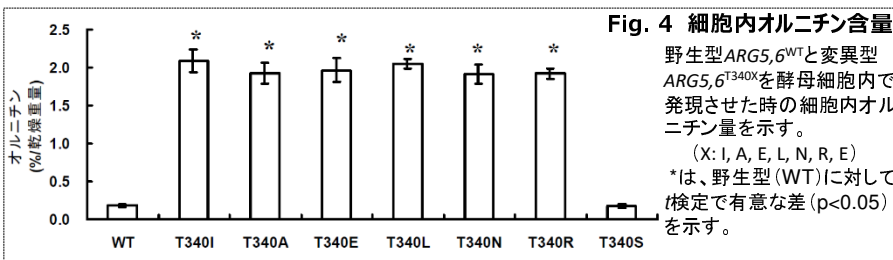


Fig. 4 細胞内オルニチン含量

野生型ARG5,6^{WT}と変異型ARG5,6^{T340X}を酵母細胞内で発現させた時の細胞内オルニチン量を示す。
(X: I, A, E, L, N, R, E)
*は、野生型 (WT) に対して検定で有意な差 (p < 0.05) を示す。

Table 1 NAGK比活性及びアルギニン阻害動力学

	比活性 ¹⁾ (U / mg)	IC ₅₀ ^{Arg 2)} (mM)
WT	1.57 ± 0.03	0.09 ± 0.38
T340I	1.27 ± 0.07	>100
T340A	1.27 ± 0.09	2.25 ± 0.20
T340E	0.98 ± 0.04	6.87 ± 1.00
T340L	1.35 ± 0.06	10.46 ± 0.80
T340N	1.20 ± 0.04	23.98 ± 5.36
T340R	1.16 ± 0.09	2.48 ± 0.67
T340S	1.25 ± 0.02	0.17 ± 0.12

- 1) アルギニン未添加時のNAGK比活性
- 2) IC₅₀^{Arg}値は、活性を50%阻害するアルギニン濃度を示す。

アピールポイント

- オルニチン高生産清酒酵母の育種に成功
- オルニチン高含有清酒の開発に成功
- オルニチン高生産メカニズムの解明に成功

用途・適用分野

- 食品製造分野
- 発酵醸造分野

■ お問い合わせ先 ■

奈良県産業振興総合センター 産業技術研究部 研究支援室

〒630-8031 奈良県奈良市柏木町129-1 Tel : 0742-33-0863

ナラノヤエザクラ酵母のビール醸造特性

バイオ・食品グループ
栗原 智也

研究の概要

■ 背景・目的

ナラノヤエザクラ酵母は、奈良県が2008年に国立大学法人奈良国立大学機構奈良女子大学と共同で奈良公園のナラノヤエザクラの花から分離した酵母であり、2009年には特許出願するとともに本酵母を使用した清酒が商品化され、現在も製造・販売されている。しかし、特許出願後から現在に至るまで、ナラノヤエザクラ酵母の使用が特定の1者のみに留まっていることから、ナラノヤエザクラ酵母の新たな活用方法として、近年全国的に醸造所が増加しているクラフトビール醸造に適用できないか検討を行った。

■ 実験方法及び結果

(1) マルトース資化能調査

ビール原料の麦汁に含有する糖の大半がマルトースであるため、マルトースを唯一の炭素源とする最少培地 (SMal培地) を用いてマルトース資化能を調査した。その結果、市販ビール酵母US-05と同等のマルトース資化能であった (図1)。

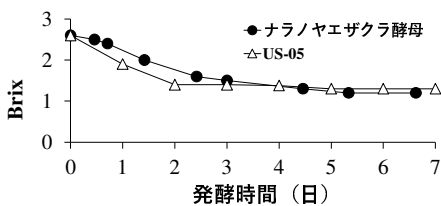


図1 SMal培地におけるBrixの経時変化

(2) 麦汁発酵試験

初期比重1.0560、苦味価25に調製した麦汁を用いて20℃で21日間発酵試験を行った。その結果、ナラノヤエザクラ酵母で醸造したビールはUS-05で醸造したビールよりもアルコールや外観発酵度が高く、非常に高い麦汁発酵性を示した (表1)。

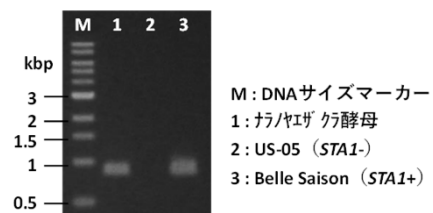
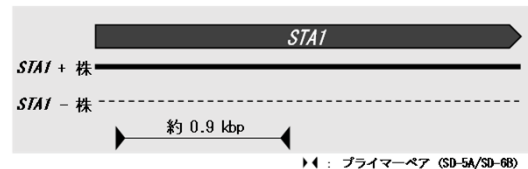
表1 麦汁発酵試験結果

	ナラノヤエザクラ酵母	US-05
アルコール (%)	6.25	5.90
初期比重	1.0560	1.0560
最終比重	1.0073	1.0104
外観発酵度 (%)	87	81
pH	4.3	4.6

(3) *S. cerevisiae* var. *diastaticus*簡易識別

麦汁発酵試験の結果より、ナラノヤエザクラ酵母は分泌性グルコアミラーゼを産生できる *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (*S. diastaticus*) である可能性が出てきたことから、PCR法による簡易識別を行った (図2)。

*S. diastaticus*の特徴である分泌性グルコアミラーゼをコードする*STA1*遺伝子の一部を既知のプライマーペアで増幅させたところ、*S. diastaticus*の市販ビール酵母Belle Saisonと同じ約0.9 kbpのDNA断片が増幅され (図3)、ナラノヤエザクラ酵母は、*STA1*遺伝子を所有する*S. diastaticus*であることが示唆された。



➤ *S. diastaticus*はベルギービールの1つであるセゾンスタイルのビールに利用されており、ナラノヤエザクラ酵母もセゾンスタイルのビールに利用可能な酵母であることが示された。

アピールポイント

- 県独自酵母を使用したビール、パンへの製品展開
- セゾンスタイルビール醸造に利用可能

用途・適用分野

- 食品製造分野
- 発酵・醸造分野

■ お問い合わせ先 ■

奈良県産業振興総合センター 産業技術研究部 研究支援室
〒630-8031 奈良県奈良市柏木町129-1 Tel: 0742-33-0863

白ワイン向けブドウ「モンドブリエ」を用いたワインの 褐変防止

バイオ・食品グループ
都築 正男

研究の概要

■ 目的・背景

奈良県にはブドウ産地が点在しており、主として生食用として出荷している。近年、ワイン用ブドウの生産が増加しており、また、2022年の夏に県内初のワイナリーが香芝市に開業し、奈良県産のブドウを用いたワインが作られはじめるようになった。このような状況において県内の各公設試ではワイン用ブドウの栽培からワインの製造技術の確立、ワイナリーの開業支援などを行ってきた。

ワイン用ブドウは近年も様々な品種が開発されており、中でも山梨県で育成された「モンドブリエ」は耐病性があり栽培しやすく、奈良県での栽培でも糖度が高い果実が得られ、白ワイン用ブドウの有望な品種である。しかし、「モンドブリエ」は搾汁時に種子が割れてしまうと果汁の褐変が非常に速く進行し、ワインの品質評価に重要な要素である色調が損なわれる。そこで、「モンドブリエ」を用いたワインの褐変防止方法について検討した。

■ 研究内容

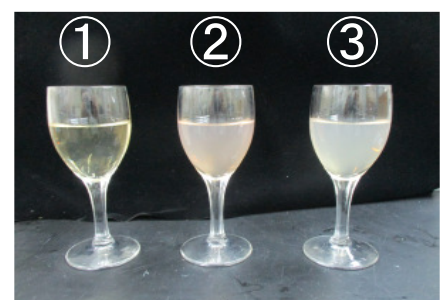
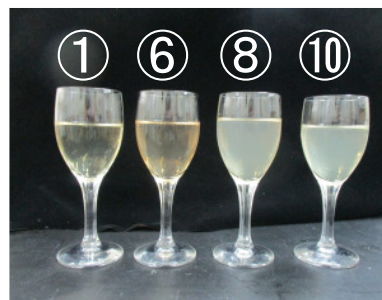
「モンドブリエ」を原料に搾汁時の酸化防止剤（メタカリ）の添加量や時期等を検討してワインを製成し、成分分析と官能試験し、色調は吸光度を測定して評価した。

①搾汁直前にメタカリを果実重量の0.04%添加すると、吸光度は最も低く、褐変をほぼ防止可能であった。冷凍ブドウでは0.06%添加すると褐変をほぼ防止可能であった。（写真真中）

②酵母により褐変度合いが異なる。W-4が最も吸光度が低く、褐変しにくいと考えられた。（写真右）



モンドブリエ



品種等	モンドブリエ9/2 (ハウス/メタカリ0.04) (1)			モンドブリエ9/2 (ハウス/メタカリ 0.02) (2)		モンドブリエ9/2 (ハウス/冷凍/メタ カリ0.06) (3)		モンドブリエ9/2 (ハウス/冷凍/メタ カリ0.08) (4)	
	W-4	OPALE2.0	UOA MaxiThiol	W-4	OPALE2.0	W-4	OPALE2.0	W-4	OPALE2.0
符号	①	②	③	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪
アルコール(%)	11.75	12.00	12.35	10.10	11.10	12.05	10.08	10.03	11.20
pH	3.8	3.8	3.8	3.7	3.5	3.6	3.6	3.6	3.6
酸度(PP)	7.0	6.6	6.4	6.6	6.2	7.8	8.0	7.6	7.2
発酵日数	13	8	9	7	6	20	9	30	14
発酵前 Brix	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	25.0	25.0
発酵後 Brix	8.4	9.2	8.6	9.8	9.6	8.2	9.0	9.4	9.6
A570(黄)	0.027	0.192	0.189	0.057	0.444	0.138	0.416	0.158	0.327
A615(橙)	0.018	0.140	0.146	0.036	0.328	0.111	0.335	0.132	0.270
A705(赤)	0.010	0.090	0.098	0.021	0.204	0.080	0.235	0.101	0.201

アピールポイント

- 奈良県産ブドウを使用したワインへの製品展開
- 褐変しやすいブドウから果実色を生かした白ワインが製造可能

用途・適用分野

- 食品製造分野
- 発酵・醸造分野
- 農産物加工分野

■ お問い合わせ先 ■

奈良県産業振興総合センター 産業技術研究部 研究支援室
〒630-8031 奈良県奈良市柏木町129-1 Tel : 0742-33-0863

キハダの葉と実の遊離アミノ酸含有量について

バイオ・食品グループ
首藤 明子

研究の概要

■ 目的・背景

キハダは、ミカン科キハダ属の落葉高木である。樹皮からコルク層を取り除き乾燥させた内皮がオウバクという生薬で、健胃整腸作用がある。食用可とされているキハダの葉や実はこれまであまり活用されていなかったが、近年、キハダの葉や実を利用した商品が少しずつ市場に出回るようになってきた。

当センターでは、キハダの葉と実に関して栄養成分や抗酸化成分等を明らかにしており、さらなる葉や実の食利用を進めるため、今回、キハダ葉と実の遊離アミノ酸を測定した結果を報告する。

■ 研究内容

アミノ酸の中でもGABA(γ-アミノ酪酸)やテアニン等は、機能性表示食品制度において機能性関与成分として届け出されている。そこで、当センターで測定可能な38種類の遊離アミノ酸について、2019年～2022年に県内で採取したキハダ葉59検体と実19検体（凍結真空乾燥後粉碎）を測定した。

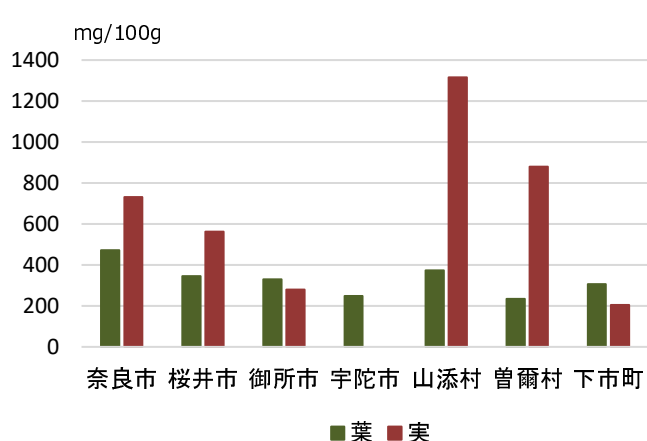


図1 市町村別遊離アミノ酸含有量

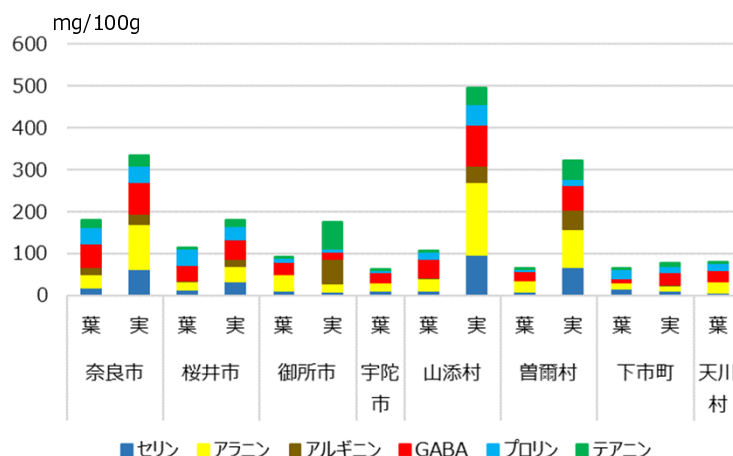


図2 市町村別機能性アミノ酸含有量

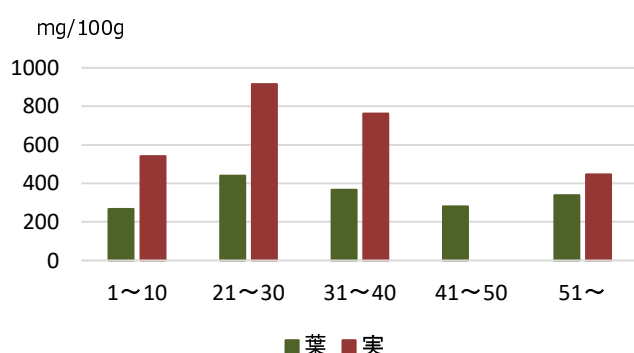


図3 樹齢別遊離アミノ酸含有量

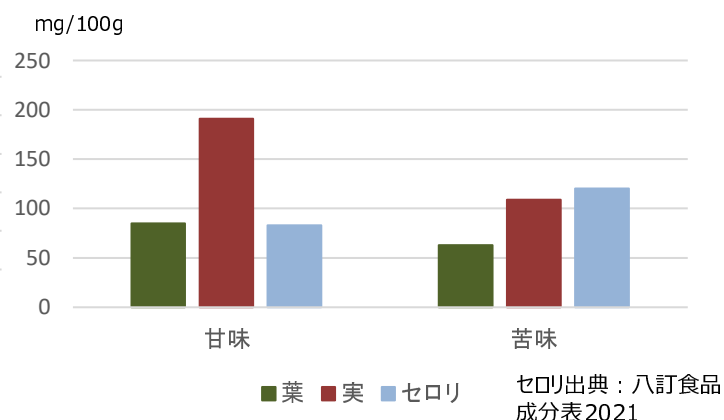


図4 呈味成分別遊離アミノ酸含有量

- キハダの葉と実にはリラックス効果があるとされるGABAや筋力の増強に効果的なアラニンが比較的多く含まれていた。
- キハダ実には葉と比較して甘味や苦味を呈する遊離アミノ酸が多く含有していた。

アピールポイント

- 葉と比較して遊離アミノ酸の多いキハダ実
- 機能性成分のある素材としての利用

用途・適用分野

- 食品加工分野
- 化粧品・医薬部外品分野

■ お問い合わせ先 ■

奈良県産業振興総合センター 産業技術研究部 研究支援室
〒630-8031 奈良県奈良市柏木町129-1 Tel: 0742-33-0863

奈良県産シャクヤク花からの *Saccharomyces cerevisiae*の単離と醸造特性

バイオ・食品グループ
立本 行江

研究の概要

■目的・背景

奈良県では「奈良県漢方のメッカ推進プロジェクト」を立ち上げ、薬用作物の増産から漢方薬や漢方関連商品の製造・販売促進、周知活動まで部局横断で取り組んでいる。これまでに、生薬採取を目的に栽培されるシャクヤクやボタンの花からの清酒醸造等に供される酵母分離の事例はないことから、新たな漢方関連醸造商品を目指し、奈良県内の栽培地で生薬用、観賞用として栽培されているシャクヤク及びボタン花試料を採取し、清酒等の醸造に適した酵母の分離と選抜を行い、分離した酵母の醸造特性を明らかにした

■研究内容

<酵母の分離>

- ・2022年4月～5月に奈良県内のシャクヤク及びボタン栽培地11カ所から136の試料を採取し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae*を5菌株分離。
(No.18,87,88,105,111)

<酵母特性>

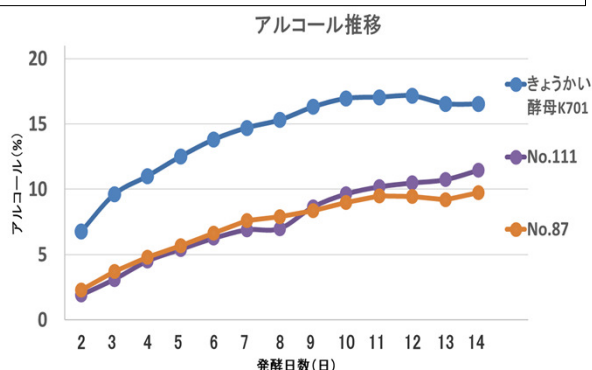
- ・きょうかい酵母と異なる菌株で、キラー性を示さず酒造現場で他の酵母に影響を与えず使用可能。
- ・アルコール耐性は15%での生育を確認しきょうかい酵母と同等の能力。
- ・小仕込み試験より酸味と香りの調和が良いNo.87とNo.111を候補とした。
- ・酸を多く生成し(酸度 No.87 6.2, No.111 5.9)甘口(日本酒度No.87 -69.65 No.111 -58.35)低アルコール(No.87 9.8% No.111 11.5%)向け清酒醸造に使用可能。
- ・奈良県産ワイン用ブドウによりワイン醸造に使用可能確認。
- ★漢方関連の発酵食品に今後、貢献する素材として期待。



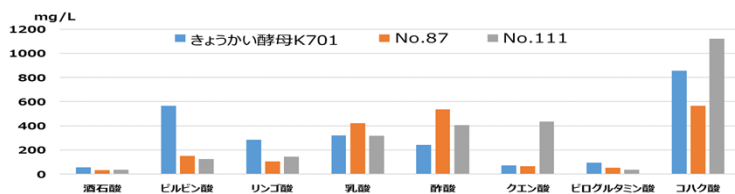
No.87 No.88 No.105 No.111



No.18 No.87 No.88 No.105
分離酵母による醸造ワイン



総米1 kg 仕込み試験のアルコール量推移



総米1 kg 仕込み試験の有機酸

アピールポイント

- 発酵食品への製品展開
- 酵母エキスを活かした化粧品
- 植物発酵による染色技術
- バイオマスの活用

用途・適用分野

- 食品製造分野
- 化粧品分野
- 生活用品分野
- 環境分野

■ お問い合わせ先 ■

奈良県産業振興総合センター 産業技術研究部 研究支援室

〒630-8031 奈良県奈良市柏木町129-1 Tel : 0742-33-0863