

論文の内容の要旨

論文題目 酵母の生産するグリコシダーゼとワイン醸造への応用に関する研究

氏名 矢内 隆章

Saccharomyces 酵母と比較して non- *Saccharomyces* 酵母は多様な酵素を生産または分泌しており、これらの酵素がブドウ果汁中の前駆体に作用して、ワインアロマの生成に関与している可能性が指摘されている。しかし、果汁やワイン中での non- *Saccharomyces* 酵母由来の酵素の作用についての報告は少なく、アロマ生成への影響については不明である。そこで、著者は研究例の少ない non- *Saccharomyces* 酵母よりアロマの生成に関与するグリコシダーゼの探索をメルシャン株式会社中央研究所の保存株より行った。その結果、*Pichia capsulata* X91 より α -L-arabinofuranosidase を、*Pichia angusta* X349 から α -L-rhamnosidase を、*Candida utilis* IFO 0639 で β -D-xylosidase を、そして *Debaryomyces hansenii* Y-44 から β -glucosidase を見出すことに成功した。各酵素を精製し、その物理的あるいは生化学的性質の検討をした (Table 1)。
 α -L-Arabinofuranosidase (α -AF), α -L-rhamnosidase (α -Rha), β -D-xylosidase

(β -Xyl)及び β -glucosidase(β -Glu)は高濃度のグルコースやエタノール存在下においても非常に優れた活性を有していた。

α -AF は α -L-アラビノフラノシド構造に高い特異性を示し、アラビナンやアラビノガラクトンからアラビノースのみを遊離した。アラビノ-オリゴサッカライドの分解では、主要生産物は基質より一つアラビノース単位が短いオリゴサッカライドであり、本酵素はエキソ型の加水分解活性を有していた。

α -Rha は α -L-ラムノピラノシド構造に高い特異性を示し、天然フラボノイドのナリンジン、ルチン、ヘスペリジンおよびクエルシトリンのラムノシルグリコシドにも作用し、L-ラムノースのみを遊離した。その反応速度はルチンやヘスペリジンよりもナリンジンが早く、L-ラムノースとD-グルコース残基の結合様式で違いが見られ、その結合は α -1, 6-結合よりも α -1, 2-結合に特異性が高く、同じルチノースを有するルチンとヘスペリジンでは、アグリコンであるケルセチンとヘスペレチンの構造に対する特異性の違いを反映したものと推測された。

β -Xyl は β -D-キシロピラノシド構造に高い特異性を示した。キシロ-オリゴサッカライドの分解では、主要生産物は基質より一つキシロース単位が短いオリゴサッカライドであり、本酵素はエキソ型の加水分解活性を有していた。さらに、基質よりもキシロース単位が一つ長いオリゴサッカライドも検出されており、重合化の反応も認められた。

β -Glu は *p*-NP β -D-glucopyranoside と グルコースが β -1, 3 結合した laminaribiose に対する特異性が非常に高く、 β -1, 2 結合の sophorose と β -1, 4 結合の cellobiose にわずかに作用した。このことより、本 β -Glu は基質のグリコシド結合の β -アノマー配置に対する特異性が非常に高く、非還元末端の β -D-glucose の構造を厳密に認識しているものと思われた。次に、特性に優れた *D. hansenii* Y-44 の β -glucosidase 遺伝子のクローニングを行い、その配列

を初めて明らかにした。本酵素の遺伝子は、837 アミノ酸残基からなる分子量 92,289 のタンパク質をコードしており、精製した β -glucosidase の分子量と一致した。本酵素はアミノ酸の一次配列や触媒基による分類から糖質加水分解酵素の family 3 に分類され、その構造は α -helix と β -strand モジュールが一次配列上で交互に 8 回現れる $(\alpha/\beta)_8$ -barrel 構造に、7 個の β -strand から成る β 鎖リッチドメインが付加したダブルドメイン構造をしているものと推測された。

ここで得られた各酵素は、高糖濃度のブドウ果汁や高エタノール存在下のワイン中でもグリコシド配糖体に作用してアロマ活性物質であるモノテルペンを遊離化し、果汁やワインの品質を向上させることが明らかとなった (Table 2)。このことにより、non-*Saccharomyces* 酵母由来の高活性の酵素がブドウ前駆体化合物に作用して、アロマの生成に関与していることが明らかとなった。

さらに、グルコース及びエタノール耐性を有する β -glucosidase 産生能を有する *D. hansenii* Y-44 とアルコール発酵能を有する日本醸造協会ブドウ酒酵母 4 号の *S. cerevisiae* W-3 との異種間細胞融合により、グルコース及びエタノール耐性を有する β -glucosidase 活性とアルコール発酵能の形質を併せもつワイン醸造用酵母の育種にも成功した。マスカット果汁を融合株で発酵させると、テルペン香が増強され、官能的にもリナロールのきれいな香りを特徴とするテルペン香のリッチな優れたワインが得られた。さらに、発酵が難しいとされるレモン果汁からの発酵も本融合株では可能であり、得られたワインにはリナロールとシトロネロールといった有用なテルペン香が増強されていた。このことは、モノテルペン依存型の果汁からのワイン醸造において、本融合株の適用性の広さを示すものと考えられた。

以上のことより、ワインの醸造において α -L-arabinofuranosidase や β -glucosidase 活性の高い酵母を選択したり、non-*Saccharomyces* 酵母由来の高活性のこれらの酵素を利用することで、モノテルペン依存型品種を原料とし

たワインに関して、アロマのより優れたワインを醸造することが可能であることが示され、ワインの酒質の多様化や品質の向上を計る際の一つの方向性を明確に示していた。

Table 1. Properties of Glycosidases from various Microorganisms.

	α -L-Arabinofuranosidase <i>P. capsulata</i> X91	α -L-Rhamnosidase <i>P. angusta</i> X349	β -D-Xylosidase <i>C. utilis</i> IFO 0639	β -Glucosidase <i>D. hansenii</i> Y-44
Molecular mass	250,000	90,000	92,000	92,000
Isoelectric point	pI 5.1	pI 4.9	pI 5.6	pI 5.0
Optimum pH	6.0	6.0	6.0	7.0
pH stability	6.0 - 8.0	5.0 - 7.0	5.0 - 7.0	5.0 - 8.0
Optimum temperature	50°C	40°C	40°C	20°C
Temperature stability	below 30°C	below 30°C	below 30°C	below 30°C
Inhibitor	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , <i>p</i> -CMB*	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , <i>p</i> -CMB*	Hg ²⁺ , <i>p</i> -CMB*	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , <i>p</i> -CMB*
Glucose	63% at 500 mM	76% at 500 mM	30% at 500 mM	85% at 500 mM
Ethanol	116% at 15% (w/v)	80% at 15% (w/v)	150% at 15% (w/v)	113% at 15% (w/v)

**p*-CMB, *p*-chloromercuribenzoate

Table 2. Analysis of Muscat Wines with Several Glycosidases

Wine	Ethanol (%)	Reducing Sugar (g/l)	Extract (%)	pH	Total Acid (g/l)	Wine quality*
None	12.5	2.1	2.2	3.36	7.4	3.6
α -L-Arabinofuranosidase	12.5	2.0	2.2	3.40	7.5	4.5
α -L-Rhamnosidase	12.5	2.1	2.2	3.41	7.5	4.4
β -D-Xylosidase	12.5	2.2	2.2	3.39	7.4	3.8
β -Glucosidase	12.5	2.0	2.2	3.42	7.5	4.3

Wine	Monoterpenol (μ g/l)					
	Linalool	α -Terpineol	Citronellol	Nerol	Geraniol	Total
None	234	67	82	96	166	645
α -L-Arabinofuranosidase	469	82	162	94	216	1069
α -L-Rhamnosidase	457	76	88	143	280	1044
β -D-Xylosidase	283	82	107	106	183	761
β -Glucosidase	394	35	36	78	486	1025

*Wine quality, high:5, low:1