

酵母の早期凝集沈降性 (PYF) に関する研究 —PYFの精製とその性質—

山下 博・下田 由紀子・首藤 夏音・高藤 麻里奈

九州女子大学家政学部栄養学科 北九州市八幡西区自由ヶ丘1-1 (〒807-8586)

(2014年6月5日受付、2014年7月10日受理)

要 旨

酵母の熟成前の早期凝集沈降現象 (PYF) は、数年に一度の頻度で発生することが知られており、醸造業界に於いては大きな問題となっている。この現象を誘導する因子については、これまでもいろいろな研究がなされてきたが、いまだ十分に解明されてはいない。そこで、その性質を明らかとする目的で、異なる地域、時期に発生したカナダ産と国内産のPYF現象を示す各々の麦芽から精製を行った。最終的に約3mg、13mgのPYF活性画分を得ることができた。本物質は、いずれも精製段階での挙動から高分子の酸性多糖であり、分子量は約800K、500K、300KDaから構成されていることが判った。その酸性多糖含有率は全糖中約15%を占めること、更に中性糖組成としてはグルコース、ガラクトース、マンノースを主に含むことが確認できた。また、このPYF因子は酸加水分解にセンシティブであり、pH2.0の条件で凝集活性が失われることから、PYF因子の構造解析には部分分解法として加水分解が使用できないことが判った。そこで、糖質分解酵素剤を用いて酵素分解を行い、分解物を精製して分子量を測定した結果、最終分解物として約25KDaのPYF活性を持った低分子画分を得ることができた。

緒 言

PYF (Premature Yeast Flocculation: 酵母の熟成前の早期凝集沈降現象) とは、アルコールの発酵工程中において酵母の資化可能な糖成分がまだ残っているにもかかわらず、酵母が凝集・沈降してしまい、その結果発酵が停滞してしまう現象である¹⁾。

このPYFの現象は、数年に1度といった散発的に発生することが知られていて、ビール醸造の場合発酵中しかも比較的初期の段階で起こることから、完全な発酵が阻止され^{2)、3)}、熟成できなくなる。その結果、出来上がり製品はビールとしては劣悪な組成⁴⁾で、甘味が残り、アルコール濃度が低く、好ましからざる香気特性 (未発酵臭) を与え^{1)、3)、5-7)}、場合によっては廃棄せざるを得ない場合もあるなどの大きな経済的損失を招くことになる⁷⁻¹¹⁾。

このように醸造工業においてPYFは重大な問題であることから、昔から多くの研究者によって発生原因やこの早期凝集を行わせる成分について研究されてきたが、未だ正確なPYF因子の性質やそのメカニズムについては解明されるまでに至っていない。この理由としては、

PYFという言葉が様々な原因による“異常な凝集”の総括的な使い方をされてきたことに原因している。更に、このPYFによる酵母凝集の現象はビールの発酵工程上にて発生するものであるが、この工程だけでなく、大麦から麦芽を製造する製麦工程も関与し合っていることも複雑にする原因と言える。即ち、実際にPYFは大麦の栽培環境の影響や、製麦工程、そして醸造工程中の全ての要因が複雑に絡んで発生してくるものと判断されるからである。

しかしながら、これまで数多くの研究者によって地道な研究がつけられてきており、諸説の中から信頼性のおける部分を取り上げ、明らかとされたところについて紹介する。

過去におけるPYFの事故が発生した際の穀物・大麦の調査の結果から、大麦や製麦工程を経た麦芽に付着している微生物がかかわっていることが推察され⁴⁾、¹²⁻¹⁴⁾、またその際の麦芽を洗浄することや穀皮を除去することでPYF現象が緩和されることが判り¹⁵⁾、現象を誘発するPYF因子は麦芽穀皮に付着していることが明らかとされた。

現時点ではこの要因に関しては、酸性多糖成分⁶⁾、¹²⁾あるいは抗菌ペプチド成分¹⁵⁻¹⁹⁾が関与しているとの2説が提唱されている。

そこで本研究では、これらの説をもとにまずカナダ産PYF麦芽及び国内産PYF麦芽からPYF因子を精製して両者の性質を調べ明らかにすることにより、PYF因子の特性を確定づけると共に、PYF因子の機能発現に直接関与する必須基本構造の解析を目的として部分分解等の手法を使って低分子化を計った。また、最終目的でもあるPYF現象が発生した場合の対応法についても併せて調査することとした。

実験材料及び方法

1. 材料

カナダ産PYF麦芽及び国内産PYF麦芽（茨城）を材料として、PYF因子の精製を行った。

2. 方法

(1) PYF因子の精製

精製法に関しては、これまでのペプチド説・酸性多糖説からの諸性質を踏まえ、いずれもが対応できる方法を主に用い、各精製ステップ毎に特性波長OD215・280nmや、たんぱく質量の分析はBradford法²⁰⁾を用い、全糖分析にはフェノール硫酸法²¹⁾を用い測定した。

(2) 発酵試験によるPYF因子の確認試験法

PYF因子の存在を確認する方法として、新たに開発した3ml光学セルを発酵槽とする発酵試験法²²⁾を用いた。無菌化処理した光学セルに、発酵CO₂ガス分離剤として多孔性沸石（ケミカルストーン、関谷理科株）6粒を置き、Brix13°にグルコースで補糖したコングレス麦汁3ml、PYF因子成分100～300μlを加えた後、標準酵母SMA（独VLB）をユニバーサル増殖法で調製した培養酵母を初発酵母数約10×10⁶ cells/mlとなるように加え、

25°Cの恒温下にて発酵を行い継時的に600nmの吸光度を測定することで酵母の凝集性を追跡調査した。本試験法の概要と発酵試験経過（濁度測定値）の例をFig.1に示す。

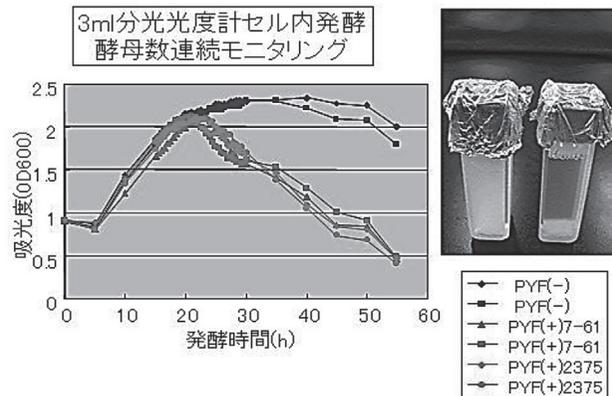


Fig.1 PYF活性確認発酵試験法（3mlセル法）

(3) PYF因子の一般的性質の調査

a. 分子量の推定

想定される分子量に適ったゲルとしてSephacryl S-400、200 (26mm×1m、100mM pH7.0リン酸塩緩衝液) 及びS-100 (18mm×40cm) を使い、分子量マーカーとしてプルラン (P-800,P-400,P200,P-100:昭和電工製) を使用して、ゲル濾過法による分子量の推定を行った。

b. 構成単糖組成

精製したPYF因子3mgを4Mトリフルオロ酢酸中で100°C、3時間加水分解を行った後、減圧下にて乾固、続いて2-プロパノールを加え攪拌後乾固した。乾固物をアセトニトリル水 (7:3) 溶液に溶解し、LC-CAD分析 (カラム:AsahiPAK NH2 250×4.6mm、5 μ m) に供した。

c. NMR解析

高分子多糖構造を推定する目的で、BRUKER AV600 (Bruker Biospin GmbH,Rheinstetten,Germany) を使い、精製したPYF因子をD₂Oに溶解後¹Hは600MHzで、また¹³Cの場合は150MHzでNMR解析を行った。尚、¹³C-NMRでは約33,000回の積算を行って解析に供した。

d. 酸性多糖成分含有割合の推定

精製したPYF因子について、その一部を用いてフェノール硫酸法による全糖量に対する酸性多糖含有量をガラクトツロン酸を標準としてカルバゾール硫酸法により測定し、全

体における酸性多糖割合として算出した。

e. 構造解析のための加水分解法の検討

PYF因子は、約800KDaなどの高分子であることから、凝集活性の本体と想定されるコア構造を得るために中性糖成分等を加水分解する酸濃度（塩酸、硫酸）について検討を行った。

f. 酵素分解によるPYF構造の解析

スクラーゼA（三菱化学フーズ製）を用いpH4.5 酢酸緩衝液（50mM）、40°Cの条件下で24時間処理を行った後、加熱処理を行い酵素類を失活させた。反応液をDEAEカラムを使って分解物と分け、PYF活性画分を分取し、本画分についてゲル濾過法により分子量を推定した。

結 果

1. PYFの精製

(1) カナダ産麦芽からのPYFの精製

カナダ産PYF麦芽からのPYFの精製は以下のスキーム（Fig.2）に従って精製を行った。

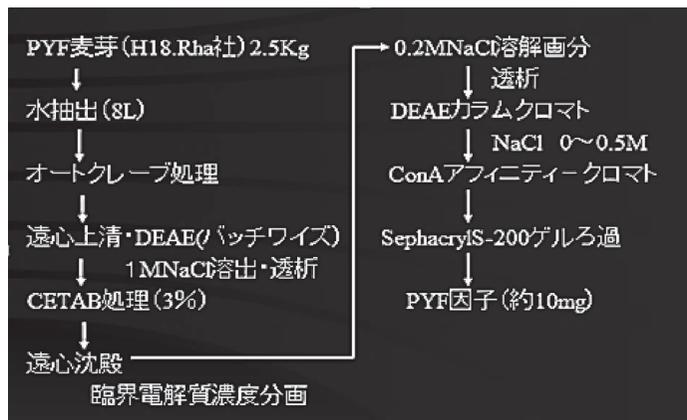


Fig.2 PYF精製スキーム

a. DEAEカラムクロマトグラフィー

DEAEカラム（5×15cm）クロマトグラムをFig.3に示す。Tris-HCl緩衝液（pH8.5、50mM）を用い、NaCl 0～0.5M（各500ml）のグラジエント溶出で分画（各10ml）した。溶出画分の内ペプチド、糖成分が検出された画分について、発酵試験を行ってPYF活性を調べた。その結果、フラクションNo.77から112の画分にPYF活性が確認できたことから、この画分をアフィニティークラムクロマトグラフィーに供した。

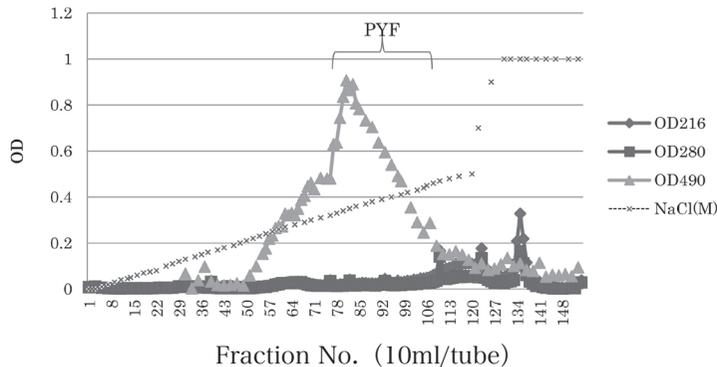


Fig.3 DEAEカラムクロマトグラフィー

b. ConAアフィニティカラムクロマトグラフィー

DEAEにより分画した活性画分を脱塩処理後、Tris-HCl (pH7.4、20mM、0.5MNaCl) で平衡化したConAカラム (3×15cm) にか、 α -Methyl-D-Mannosideのステップワイズ (5mM、10mM、50mM) で溶出させた。PYF活性画分はFig.4に示すように、5mM 溶出画分 (フラクションNo.79から88) に活性が確認でき、この画分を集め凍結乾燥、透析を繰り返して得られた標品をゲル濾過に供した。

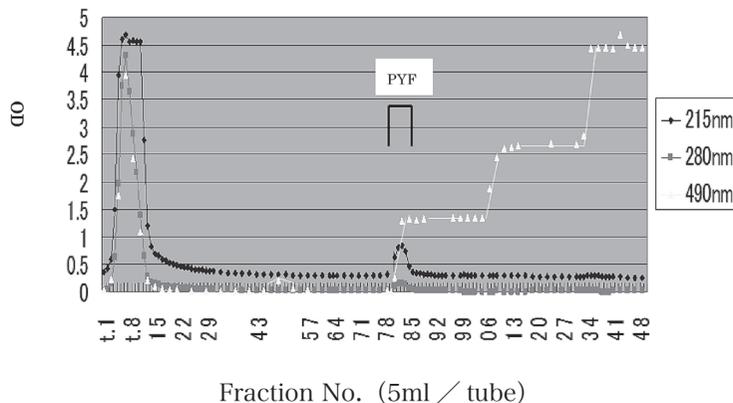


Fig.4 ConAアフィニティカラムクロマトグラフィー

c. Sephacryl S-200によるゲル濾過

ConAクロマトにより得られた凍結乾燥品を、約2mlのリン酸緩衝液 (pH7.0,50mM) に溶解後、同緩衝液にて平衡化したSephacryl S-200のカラム (2.6×100cm) に供した。ゲル濾過の溶出状況をFig.5に示す。困った画分 (フラクションNo.64から68) を最終的にPYF精製画分として、その後の性質の分析に供した。

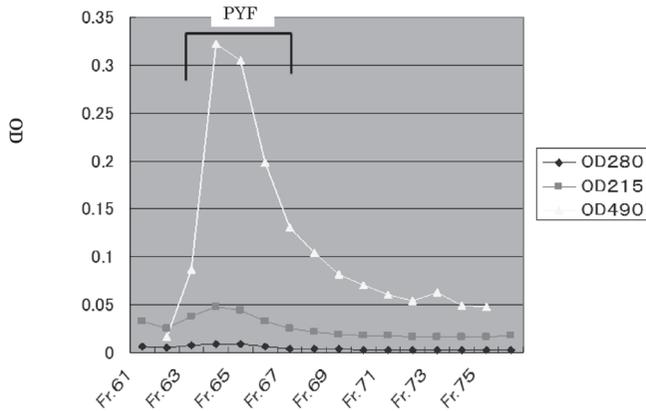


Fig.5 Sephacryl S-200 ゲル濾過

(2) 国内産麦芽からのPYFの精製

PYF成分の性質を明らかにするために、国内で発生したPYF麦芽からもPYF成分を精製し、カナダ産麦芽由来のPYF成分と比較することとした。尚、その際Fig.2で示した精製法により得られたPYFは、構造解析として実施したNMR解析の結果、メチレン基の特徴を持つ脂質鎖がPYF成分に強く結合していることが判った。そこで、国産麦芽からのPYF成分の精製には、原因として推察されるCETABを使った処理法に代わる方法として溶媒分画を繰り返し行い精製した。最終的に本方法により、国産PYF麦芽 5 Kgから13.3mgのPYF精製品を得ることができた。

2. PYFの性質

(1) 分子量

カナダ産麦芽由来のPYFについて、精製に用いたSephacryl S-200のカラムを用いて、ゲル濾過法による分子量の推定を行った結果、分子量は約500kDaと推定された。

また、別法により精製した国内産麦芽由来のPYFに関しては、Sephacryl S-400による解析を行った結果、Fig.6に示すようにフラクションNo.61、65、69にピークとPYF活性が確認でき、分子量はFig.7に示すように、それぞれ約800kDa、500kDa、300kDaであることが判った。

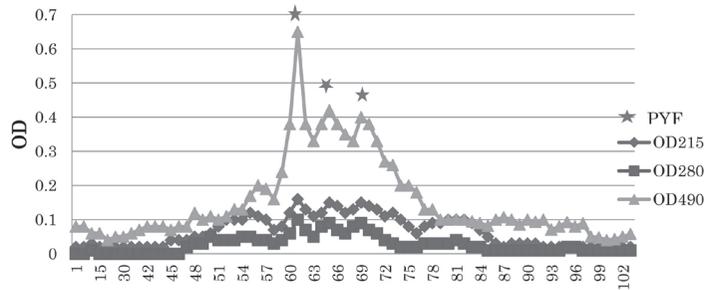


Fig.6 PYFのゲル濾過

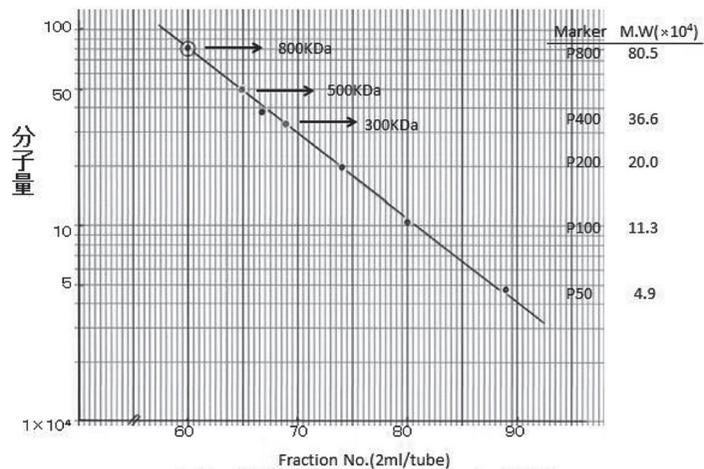


Fig.7 PYF因子の分子量推定(Sephacryl S-400 ゲル濾過法)

(2) 構成糖組成分析

精製したPYF因子を加水分解後、LC-CAD分析に供した。その結果、PYFを構成する中性糖は、グルコースを主成分として、ガラクトース、マンノースの他、フコース（またはラムノース）、アラビノース、キシロースなどが検出され、種々の糖質がほぼ以下の割合で含まれていることが判った。

$$\text{Ala} : \text{Xyl} : \text{Gal} : \text{Glu} : \text{Mn} : \text{Rha} (\text{Fco}) = 1 : 1 : 8 : 17 : 5 : 3$$

(3) NMR解析

a. ^{13}C のNMR解析

カナダ産麦芽からCETABを使って精製したPYF因子3.3mgを0.5mlの D_2O に溶解し、BRUKERにより分析した。Fig.8に ^1H スピンデカップリング条件下、室温下でFT法により約33000回積算して測定したスペクトルを示す。各シグナルは、グルコースのCに従って帰属した。

C1のシグナルが103ppm付近に認められることから β 結合の可能性が示唆された。

一方で、59ppm付近にシャープなシグナルがまた40、20ppmにも同様にシグナルが検出されていることから脂肪酸様の結合を持つ成分が含まれていることが明らかとなった。今回の、PYF因子精製法ではCETABによる臨界電解質濃度分画法を効率化のために用いたが、PYF因子に結合した状態であるものと推察された。

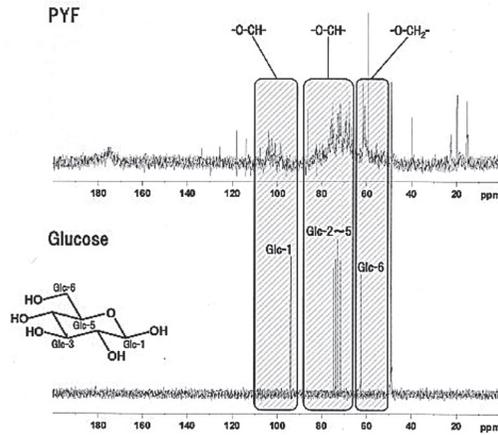


Fig.8 ^{13}C NMRスペクトル

b. 二次元NMR解析

今回は $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ロングレンジシフト相関二次元NMR (HMBC) 法により解析し、その図をFig.9に示す。複合多糖であり、酸性多糖を含むことから各々のシグナルの帰属はできていないが、59~60ppmに観察されるシグナルは20、40ppmにも共通のシグナルが観察され、精製に用いたCETABがイオン結合の形でPYF因子に結合しているものと推察された。

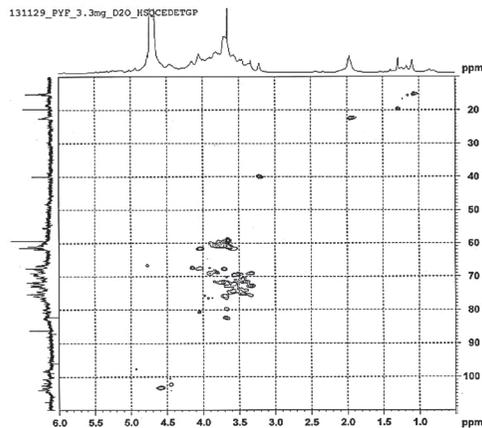


Fig.9 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ ロングレンジシフト相関二次元NMR (HMBC)

(4) 酸性多糖成分含有割合の検討

エタノール分画法を繰り返し使って精製した国内産PYF因子について、ガラクトツロン酸を標準とした検量線よりウロン酸含量を、カルバゾール硫酸法により測定し、グルコースを標準としたフェノール硫酸法の全糖量に対する割合から酸性糖量を算出した。その結果、PYF因子中における酸性糖の比率は約15%であることが推定された。

(5) 構造解析の検討

a. 酸加水分解の検討

PYF因子は約800KDaの高分子多糖であることから、酵母の凝集に直接関与する部分(コア構造部分)の構造解析を目的に、加水分解の酸濃度の影響を調べた。Fig.10に示すように、酸濃度0.01Nで既にPYF活性の喪失が観察され、PYF因子は極めて酸に対してセンシティブな活性中心構造を持つものと推察された。

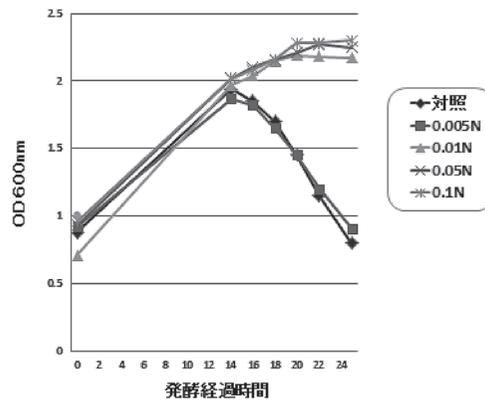


Fig.10 PYFの加水分解における酸濃度の影響

b. 酵素分解の検討

ペクチナーゼ、キシラナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼなどを含む複合酵素製剤スクラーゼAを用い、最適条件下で酵素分解処理を行い得られてくる画分をDEAEカラムクロマトにより分画を行った (Fig.11)。低分子化したと推定される活性画分を集め、ゲル濾過法により分子量推定を行った結果、約25KDaであることが明らかとなった。

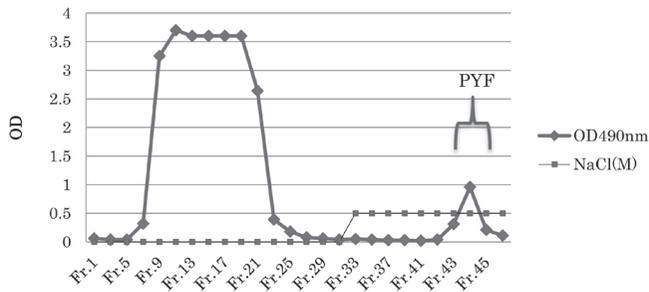


Fig.11 DEAEカラムクロマトグラフィー

考 察

PYF因子そのものに関しては、緒言にて述べたように酸性多糖説と抗菌ペプチド説とが提唱されている。精製の各ステップでは、ペプチドの画分と糖質画分に注目して、発酵法によるPYF活性を調べてきた。その結果、PYF活性は常に糖質画分と挙動が一致していることから、酸性多糖である可能性が濃厚となった。このような理由から、酸性多糖に絞り込んだ精製法を組み立てて進めてきた。中でも、4級アンモニウム塩であるCetyl Trimethyl Ammonium Bromideを使った臨界電解質濃度分画が共存するタンパク質やペプチド類との分離にきわめて高い効果を示したことから、本方法を導入してプロテアーゼ処理段階を省く方法として精製してきた。

しかしながら、今回のNMR解析によりPYF因子に結合してその後の溶媒洗浄や抽出操作、透析、カラム等の精製段階に於いても解離することなく最終精製品の段階まで結合したままであることから、今回の場合、本方法はそぐわないと判断した。そこで、エタノールを用いた溶媒分画法を繰り返し使って精製する方法により、国産PYF麦芽5kgから約13mgのPYF因子精製品を得ることができた。

グルコースをはじめガラクトース、マンノース、ラムノース、キシロースなどの中性単糖を含み酸性の高分子多糖であるため、NMR解析では未だ構造推定には至っていない。また、PYF因子中に含まれる酸性多糖の比率は、ウロン酸換算で約15%におよぶことが判った。

更に、凝集活性のコア構造解析のために酸加水分解を試みたが、極めて酸にセンシティブな構造を持つようであり、0.01Nの酸濃度で既に分解されることが明らかとなった。このため、コア構造に迫る方法としての酸加水分解は採れないものと推察される。従って、種々の糖質分解酵素類含む酵素剤により処理して得られてくる酸性糖質画分の分子量を測定した結果、PYF活性を保持した状態での酵素処理による最終産物は、約25KDaであると推定された。今後は、この画分についてNMRによる構造解析を行ってコア構造の解明へと進める。

また一方で、PYFが酸性下で不安定であるといった結果は醸造現場に於いてはPYF麦芽による酵母早期凝集の抑制法としての可能性を示唆するものである。現在、この結果の実現場における応用方法を提案し検討中である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、実験試料及び実験装置など共同研究のかたちで多面のご支援並びにご鞭撻を賜りましたアサヒビール株式会社にお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Koizumi H, Structural features of barley malt polysaccharides inducing premature yeast flocculation, *J Am Soc Brew Chem*, 67 (3) , 129-134 (2009)
- 2) Ishimura S, Kudo S, Hattan M, Yoshida T, J. Kataoka, Selection of small vessels for fermentation test in the laboratory, *Rept Res Lab Kirin Brewery Co Ltd*, 10, 61-65 (1967)
- 3) Stratford M, Yeast flocculation: a new perspective, *J Advan Microb Physiol*, 33, 1-72 (1992)
- 4) Axcell B, Van Nierop S, Vundla W, Malt induced premature yeast flocculation, *Tech Q Master Brew Assoc Am*, 37 (4) , 501-504 (2000)
- 5) Koizumi H, Ogawa T, Rapid and sensitive method to measure premature yeast flocculation activity in malt, *J Am Soc Brew Chem*, 63 (4) , 147-150 (2005)
- 6) Koizumi H, Barley malt polysaccharides inducing premature yeast flocculation and their possible mechanisms, *J Am Soc Brew Chem*, 66 (3) , 137-142 (2008)
- 7) Lake JC, Soers AA, Discussion of malt-induced premature yeast flocculation, *Tech Q Master Brew Assoc Am*, 45 (3) , 253-262 (2008)
- 8) Jibiki M, Sasaki K, Kagami N, Kawatsura K, Application of a newly developed method for estimating the premature yeast flocculation potential of malt samples, *J Am Soc Brew Chem* 64,79-85 (2006)
- 9) Kaur M, Evans E, Stewart D, Sheehy M, Speers AR, Lake J, Bowman J, Microbial T-RFLP as a solution for premature yeast flocculation assurance for malt, In, *Proceedings of the 32nd European Brewery Convention Congress*, Hamburg, Germany, oral presentation L51
- 10) Pnteloglou AG, Box WG, Smart KA, Cook DJ, Optimization of a small -scale fermentation test to predict the premature yeast flocculation potential of malts, *J Inst Brew*, 116, 413-420 (2010)

- 11) Pnteloglou AG, Smart KA, Cook DJ, PYF from the perspective of brewing yeast: Impacts of nutrient uptake and yeast fermentation characteristics. In, Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, Sanibel Island, Florida, oral presentation O17
- 12) Herrera VE, Axcell BC, Induction of premature yeast flocculation by a polysaccharide fraction isolated from malt husk, *J Inst Brew*, 97, 359-366 (1991)
- 13) Jin YL, Ritecy LL, Speers RA, Dolphin PJ, Effect of cell surface hydrophobicity, charge and zymolection density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*, *J Am Soc Brew Chem*, 59, 1-9 (2001)
- 14) Nakamura Y, The practical hints for brewing from premature yeast flocculation malt, Oral presentation O48 at the World Brewing Congress, Honolulu (2008)
- 15) Van Nierop SNE, Cameron-Clarke A, Axcell BC, Enzymatic generation of factors from malt responsible for premature yeast flocculation, *J Am Soc Brew Chem*, 62, 108-116 (2004)
- 16) Van Nierop SNE, Axcell BC, Cantrell IC, The impact of microorganisms on barley and malt quality—a review, *J Am Soc Brew Chem*, 64, 69-74 (2006)
- 17) Okada T, Yoshizumi H, A lethal toxic substance for brewing yeast in wheat and barley. Part II. Isolation and some properties of toxic principle, *J Agr Biol Chem*, 34 (7) , 1089-1094 (1970)
- 18) Okada T, Yoshizumi H, The mode of action of toxic protein in wheat and barley on brewing yeast , *J Agr Biol Chem*, 37 (10) , 2289-2294 (1973)
- 19) Okada T, Yoshizumi H, Terashima Y, A lethal toxic substance for brewing yeast in wheat and barley. Part I , Assay of toxicity on various grains and sensitivity of various yeast strains, *J Agr Biol Chem*, 34 (7) , 1084-1088 (1970)
- 20) Bradford MM, *Anal Biochem*, 72, 248 (1976)
- 21) Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, *Anal Chem*, 28, 350(1956)
- 22) Sasaki K, Yamashita H, Kono K, Kitagawa Y, Investigation of the causes of PYFmalt using a Modified analytical method for the PYF potential, poster presentation, P183 at the World Brewing Congress, Honolulu (2008)

Research on the Premature Yeast Flocculation (PYF) — Purification and Properties of PYF —

Hiroshi YAMASHITA, Yukiko SHIMODA, Nao SHUTO, Marina TAKATO

Department of Nutrition, Faculty of Home Economics,

Kyushu Women's University

1-1 Jiyugaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-shi, 807-8586, Japan

Abstract

Premature yeast flocculation (PYF) is a recurring problem in the brewing industry. This phenomenon is known to have significant financial implications resulting from the associated incomplete extract utilization by brewing yeast. Although considerable research efforts have been undertaken to elucidate the PYF phenomenon, its definitive cause and mechanism has not yet been disclosed. Therefore the objective of this work is to identify a PYF factor and to clarify the molecular and structural properties. For this purpose, we purified the active components from malts exhibiting PYF phenomena that have been produced in various Canadian and Japanese regions and different cultivation periods. As a consequence, two active fractions weighing 3mg and 13 mg were obtained. From the behavior during the purification processes, these substances were shown to be acidic polysaccharides, the molecular weights of which are ca 800kDa, 500kDa and 300kDa. It was also found that the identified acidic polysaccharides occupy approximately 15 % of the total sugar constituents and the neutral sugar components principally consist of glucose, galactose and mannose. It was further indicated that the PYF factors are sensitive to the acid hydrolysis and the flocculation activities are lost under the conditions of pH 2.0. Therefore the hydrolysis was considered to be unsuitable for the structural analysis of PYF factors as a partial decomposition method. Instead the glycoside hydrolases were adopted for the partial breakdown of the PYF factors. As a result, we successfully obtained a lower molecular weight fraction of 25 kDa that possesses a PYF activity.