

分裂酵母を使用した高品質清酒製造法の開発（第2報）

佐藤憲亮・小松正和・木村英生

Development of Making Procedure of Sake of Yamanashi by *Schizosaccharomyces* sp. (2nd Report)

Kensuke SATO, Masakazu KOMATSU and Hideo KIMURA

要 約

既報では清酒中の尿素を低減するために分裂酵母を用いた醸造方法について検討を行った。本報では独自の分裂酵母を取得することを目的に、効率的な単離方法を検討するとともに、山梨県の自然界から独自の分裂酵母菌株の取得を試みた。検討した集積培養方法を用いて、分裂酵母と推定される菌株を単離した。単離した菌株2株を同定した結果、100%の一致率で分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* であると同定された。

1. 緒 言

近年、清酒の国内消費量は減少する傾向にあるが、各清酒メーカーでは低アルコール清酒や発泡性清酒の開発など、多様な製品の開発に取り組んでいる。また、近年では清酒の海外輸出も促進され¹⁾、今後さらに輸出が増加すると見込まれる。

清酒の醸造に用いられる酵母のほとんどは出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae*（以下 *S. cerevisiae*）が用いられており、製成される清酒の酒質の多様性に欠けるといった指摘がある。またカルバミン酸エチルの前駆体である尿素が含まれるといった、品質上の課題が問題視されることがある。

そこで本研究ではワインの醸造において、ウレアーゼ活性や²⁾、香気成分の生成を行うと報告されている^{3,4)} 分裂酵母 (*Schizosaccharomyces* 属酵母) を用いて、実用的な清酒醸造への応用を目指す。

既報⁵⁾では国内研究機関保有の分裂酵母菌株について、培養温度が細胞増殖に与える影響やエタノール耐性などを検討した。本報告では山梨県内の自然環境中から、新規な分裂酵母菌株の取得を試みた。

2. 実験方法

2-1 供試菌株

分裂酵母標準菌株として、(独)製品評価技術基盤機構保有菌株 *Schizosaccharomyces pombe*（以下 *Sz. pombe*）NBRC344, 347, 349 を用いた。比較対照の清酒酵母として本県で取得した *S. cerevisiae* FJA025 株⁶⁾を用いた。菌株は平板培地で復元後、液体培地にて2回継代培養したものをを用いた。

2-2 使用培地

菌株の復元にはイーストモールド培地 (YM 培地, Difco 社製) を、継代培養には YM 培地または麴汁培地を用いた。麴汁培地は既報⁵⁾と同様に調製した。すなわち乾燥麴 (精米歩合 70%, 徳島製麴社製) に4倍量の滅菌蒸留水を加え、55°Cで12時間保温することで高温糖化处理した後、遠心分離 (8,000 rpm, 10 分間) して得た上清に、クロラムフェニコール (0.1 g/l) を添加して調製した。

また酵母の分離操作には、プロピオン酸ナトリウム (1 g/l) および、クロラムフェニコール (0.1 g/l) を含有したポテトデキストロース培地 (PDA 培地, 日水製薬社製) を用いた。培地には適宜、乳酸や酢酸を添加し、分離操

作に用いた。

2-3 分裂酵母の効率的単離方法の検討

分裂酵母は比較的酸に強いことが知られている⁷⁾。本研究ではその性質を利用して、酢酸による集積培養について検討した。酢酸を0.75%含有するYM液体培地に分裂酵母標準菌株3株をそれぞれ 1×10^5 個/mLの濃度で添加し、それぞれの試験区に*S. cerevisiae* FJA025を同濃度で添加した。それぞれ20°Cで3日間静置培養を行い、顕微鏡観察による細胞形態からそれぞれの細胞の割合を計測した。図1に示すように、円筒型およびセプタム形成がある細胞を*Sz.pombe*、円～楕円型および出芽がある細胞を*S.cerevisiae*と判定した。形態が曖昧で判別不可能な場合はその他とした。また比較対照として酢酸を含有しない培地における細胞の割合を測定した。



図1 *Sz.pombe* (左：円筒型) および *S.cerevisiae* (右：楕円型) の顕微鏡画像

2-4 自然界からの単離

2-4-1 分離源の採取

平成28年2月～平成30年2月まで山梨県内の自然環境中の花、果実、河川湖水、樹液、土壌などから試料を採取した。採取方法は、直接採取または拭き取り試験による採取とした。収集した試料は分離操作まで密封して冷暗所で保存した。

2-4-2 酵母の単離方法

2-4-1で採取した分離源試料の一部を、試験管に注した麴汁培地に植菌し、25°Cで3日から1週間培養した。発酵による気泡が確認されたものについて、適宜希釈し、PDA平板培地に塗布した。25°C、1週間培養し、生じたコロニーのうち、コロニー形態からバクテリア(着色、凹凸、遊走性)や糸状菌(菌糸)と思われるコロニーを除外した。PDA培地におけるコロニー色調が白からベージュであることを確認し、分離酵母菌株として取得した。

得られた菌株は0.8%乳酸を含む麴汁培地に植菌し、25°C、1週間の培養を行った。産膜を形成しない、かつ発泡性のある株を取得し、これを一次選抜とした。同様

に0.75%酢酸を含むPDA培地に植菌し、生育可能なコロニーを二次選抜とした。さらに顕微鏡観察を行い、これを三次選抜とした。すなわち、細胞形態が長さ7～15μm、幅3～5μm程度の円筒型細胞であること、体細胞分裂期に見られるセプタムが確認できること、細胞分裂様式が分裂型であることなどについて確認を行い⁸⁾、分裂酵母と推定される菌株とした。図2に分離酵母菌取得の流れを示した。

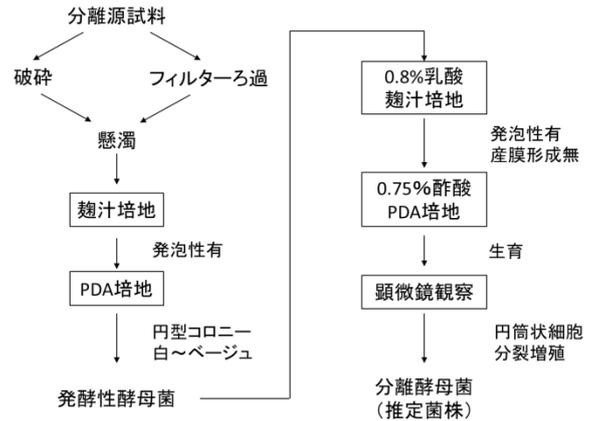


図2 酵母菌の取得方法

2-5 単離酵母菌株の同定

選抜した酵母推定菌株の同定方法を図3に示した。選抜された酵母菌について、より生育速度が速い2株について、遺伝子レベルの同定試験として、26s-rDNA D1/D2領域の塩基配列を調べ、国際塩基配列データベース(GeneBank/DDBJ/EMBL)に基づく相同性解析を実施した。遺伝子レベルの同定試験は外部機関に委託した。



図3 酵母菌の同定方法

3. 結果と考察

3-1 分裂酵母の効率的単離方法の検討

分裂酵母は一般的な酵母と同様に糖を栄養源としており、自然界では *S.cerevisiae* を初めとした様々な酵母と混在していると推察される。そこで酢酸を含有した培地を用いて効率的な分裂酵母の取得方法を検討した。分裂酵母は比較的酸に耐性を示すことが知られていたため、酢酸を含有した培地による集積培養を検討した。

0.75%酢酸含有培地における、細胞形態観察による *Sz.pombe* と *S.cerevisiae* の割合を図4に示す。

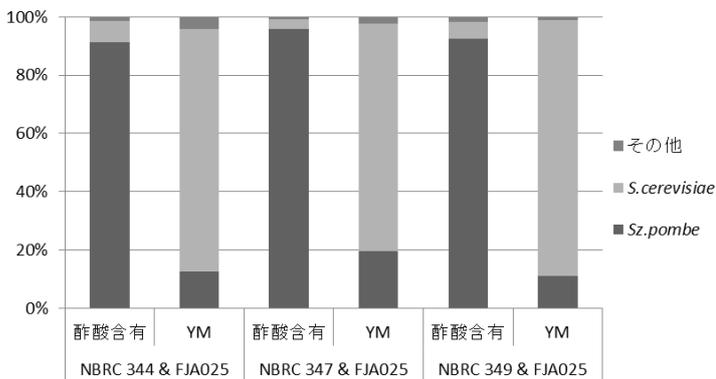


図4 *Sz.pombe* と *S.cerevisiae* の細胞の割合

酢酸を含有しない培地においては *S.cerevisiae* の生育がより早く、細胞の割合も多くなる傾向が見られたのに対し、酢酸を含有する培地では *Sz.pombe* が優位に生育できることがわかる。このことから酢酸含有培地を用いることで *S.cerevisiae* の生育を抑制し、*Sz.pombe* を選択的に取得できる可能性が示唆された。

3-2 自然界からの単離

山梨県内から収集した分離源試料の概要を表1に示した。試料は本県の特徴ある農産物等を中心に、県内環境中から幅広く取得した。

表1 分離源試料の概要

種類	試料数
果実	315
植物	423
河川湖水	21
土壌	49
その他	76
計	884

これらの分離源試料を培地に植菌し、発泡性を示した試料から 6,780 のコロニーを取得した。ここから乳酸を含有する麹汁培地で発泡性を有するコロニー 597 菌株を得た。さらに酢酸含有培地で生育可能な菌株 184 株を得て、顕微鏡による形態観察から分裂酵母と推定される菌株 7 菌株を選抜した。菌株の選抜状況については表2に示す。

表2 菌株の取得状況

	菌株数
取得コロニー	6,780
一次選抜	597
二次選抜	184
三次選抜	7

3-3 単離酵母菌株の同定

3-2 で選抜した 7 菌株はその表現形質から *Schizosaccharomyces* 属酵母であるものと推定した。このうち生育が早く、比較的低温で生育可能な 2 菌株について 26 s -rDNA の D1/D2 遺伝子解析を実施した。これら 2 菌株は相同性解析の結果から、分裂酵母 *Sz.pombe* であると推察された。以上のことから本県の自然環境から *Sz.pombe* が 2 菌株得られたことになる。

ここで得られた塩基配列から分離株 1 菌株について、図5に示す系統樹を作成した。

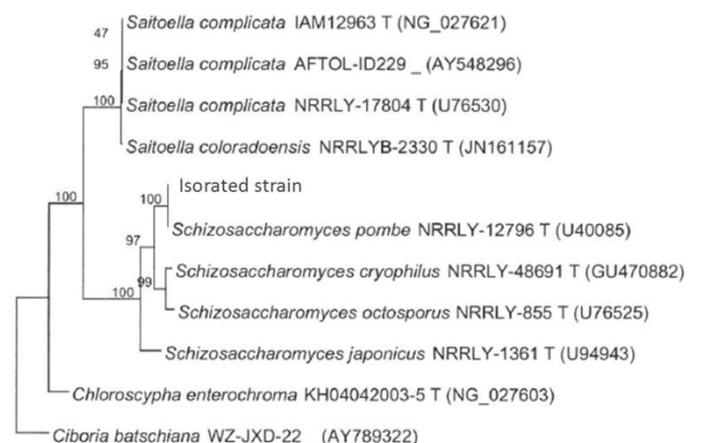


図5 分離した *Schizosaccharomyces* 属酵母の系統樹

酢酸含有培地を用いた選抜において *Sz.pombe* 以外と推定される菌株も取得された。顕微鏡観察からも分裂酵母の円筒型細胞以外にも円型、楕円型、アーモンド型な

ど様々な細胞が観察された。これは自然界には、酢酸に耐性がある酵母 (*Zygosaccharomyces bailii*, *Candida* 属の一部など)⁹⁾も広く存在することを示唆し、選択培地による、より効率的な *Sz.pombe* の単離には酢酸濃度や培養温度、培地の栄養源など、さらなる検討の余地があると考えられる。

今後は、今回得られた分裂酵母について更なる検討を行い、以後の研究では得られた 2 菌株の *Sz.pombe* について、酵素活性や醸造適正等を確認するとともに、既存の山梨県産清酒酵母との混醸なども検討し、本県の特徴を活かしつつ、利用しやすい形での活用を検討する。

4. 結 言

1. 分裂酵母の選択的単離方法を検討した結果、酢酸を含有した培地で集積培養を行うことで効率的な単離が可能であることが示唆された。
2. 検討した単離方法などの集積培養を行い、分離源から単離した 6,780 コロニーから生育可能な 184 コロニーを取得し、形態学的解析などから分裂酵母と推定される菌株、7 菌株を取得した。
3. 遺伝子解析から分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* と同定される菌株を 2 菌株分離した。

参考文献

- 1) 国税庁：酒のしおり
<<http://www.nta.go.jp/taxes/sake/shiori-gaikyo/shiori/2018/index.htm>> (2018-3-30 参照)
- 2) Lubbers MW *et al.* : Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*, *RJ.Can J Microbiol.* 1996 Vol.42, No.2, pp.132-140 (1996)
- 3) S. BENITO *et al.* : Potensial of *Sc. Pombe* in Red Winemaking, *Food technol. Biotechnol*, Vol.52, No.3, pp.376-382 (2014)
- 4) Benito A *et al.* : Selected *Schizosaccharomyces pombe* Strains Have Characteristic That Are Beneficial for Winemaking, *PLOS ONE*.
<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151102>> (オンライン論文, 2018-3-30 参照)
- 5) 佐藤憲亮, 小松正和, 木村英生 : 分裂酵母を使用した高品質清酒製造法の開発, 山梨県産業技術センタ

一研究報告 No.31, pp.29-35 (2014)

- 6) 長沼孝多, 橋本卓也, 木村英生 : 県産酵母を使用した清酒の品質向上 (第 2 報), 山梨県工業技術センター研究報告 No.28, pp.29-35 (2014)
- 7) Pramuan S., Toshihide N., Jun S., : Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses., *J Biosci Bioeng* Vol.108 , No.3 pp.216-219 (2018)
- 8) Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. : *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Vol.2 (5th ed) (Elsevir Science, Amsterdam) . pp.779-784 (2011)
- 9) 多山賢二 : 食酢と微生物, *Modern Media*, Vol.63 , No.3, pp.83-93 (2016)