

多酸性酵母の育種 (第1報)

一多酸性酵母の分離一

食品発酵部 郡司 章 長谷川裕正
市川 重和 石神 靖裕*

1. 緒言

果実酒製造において、原料中に含まれる酸量の多少により製品の品質が影響され易く、特に酸の少ない原料で仕込んだ果実酒は、香味の面で何か物足りなさを感じる。そこで、酸を多量に生成する酵母の育種を目的として、原料果実からの多酸性酵母の分離及び細胞融合に用いる親株の選択試験を実施した。

2. 実験方法

1) 多酸性酵母の分離

酵母の分離法は、原料果実の一つである中国福建省産の竜眼を材料として、常法¹⁾の希釈法、拭き取り法により分離した。また、発酵性が高い酵母で *Saccharomyces* 属の酵母を分離し易くするために、培地のグルコースをエンリッチにした集積培養法を併用した。

一次スクリーニングは、分離した酵母をナシマストとマスカットマストで発酵させて、官能的に問題がなく、発酵能の強い株を選んだ。更に、二次スクリーニングでは、優良なワイン酵母 (*Saccharomyces cerevise* - W3, 71B) と比較して、滴定酸度²⁾で2倍以上多いもめを多酸性酵母として選択した。

2) 分離多酸性酵母の性質・

形態学性質及び生理学的性質は常法³⁾⁴⁾⁵⁾に従い試験した。

3) 有機酸の生成条件⁶⁾

有機酸の生成条件を検討するために、糖の種類別、糖量及び培地の差異による影響を試験した。糖の種類としては、Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Galactose を使用して、Bacto Yeast nitrogenbase (Difco 社) にそれぞれ 3% 添加した培地に酵母を接種し、培養後の酸度を測定した。糖の量の影響では、Glucose を 5~20% に変えて試験した。培地の違いによる影響には、リンゴマスト、マスカットマスト、ナシマスト、試作じた竜眼マスト、Brix 15° にした Bacto Yeast nitrogenbase を使用して、酵母を接種し 25℃ で 7 日間静置培養して、発酵後の液について分析した。

* 陶々酒製造株式会社 千代田工場

4) 有機酸の分析法

有機酸の分析では、酵素法と高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) を検討した。酵素法はペーリンガー・マンハイム社のFキットを使用した。HPLC1 ま島津 LC - 6A を用い、前処理 7L として試料を中性とした後、ウォーターズ社製 Sep - PackC₁₈ カートリッジで夾雑物を除去し、次の条件で分析した。Shim - pack SCR - 101H (7.9mm×30cm) のカラムを用いカラム温度 55 , Mobil phase は pH2.1HC10₄ , 流速は 0.6ml/min で行い、検出器は VU - 210nm で、試料量は 10μl 注入した。

5) 呼吸欠損株の分離

エチジウムプロマイド (20μg/ml) を含む平板培地に、*S. cerevisiae*71B を塗抹し 30° C で 2~3 日間培養した。出現した小型コロニーを釣菌し培養後、TTC 染色で白色を呈しグリセリン培地で生育しないコロニーを吸収欠損した。吸収欠損株の安定性は、6 回継代いして確認した。

表1 *S. cerevisiac* 71B 及び分離酵母 (No. 473株) の性質

3. 実験結果及び考察

1) 多酸性酵母の分離

竜眼より一次スクリーニングで 500 株の酵母を分離し、二次スクリーニングで 21 株の多酸性酵母を分離した。

二次スクリーニングで分離した 21 株について、小仕込試験を実施し、宮能検査により優良であった No. 437 株を選定した。

2) 分離多酸性酵母の性質

優良ワイン酵母である *S. cerevisiae*71B 及び分離した No. 473 株について形態学的、生理学的性質を調べた結果を表 1 に示す。この結果から N 473 株は *Sacchsromyces* 属の酵母であると思われる。

3) 多酸性酵母の有機酸生成条件

有機酸の生成に及ぼす糖の種類の影響を検討するために、Glucose, Fructose, Sucrose, Maltose, Galactose を用い Bacto - Yeast nitrogenbase (Difco) にそれぞれ 3% 添加した培地に酵母を接種し、培養後の酸度を分析した結果を図 1 に示した。Galactose の場合は酸度が低いが、他の糖ではほぼ同量の酸度であり差異は少なかった。

| 項目 | 菌株 | <i>S. cerevisiae</i> 71B | No. 473 |
|--------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| 形 態 | | 球~楕円, 出芽 約 6.0×8.0 μm | 球~楕円, 出芽 約 6.0×7.5 μm |
| 反 性 菌 糸 | | — | — |
| 液 体 培 養 | | Ring(-), Film(-) | Ring(-), Film(-) |
| D B B による呈色反応 | | — | — |
| 37℃での生育 | | + | + |
| 50% Glu.-Yeast A での生育 | | + | + |
| シクロヘキシミド (μg/ml) に対する抵抗性 | | 100 (-) 1000 (-) | 100 (-) 1000 (-) |
| イノシトール要求性 | | — | + |
| 硝 酸 塩 質 化 性 | | — | — |
| 資 化 性 | Glucose | + | + |
| | Galactose | V | V |
| | Maltose | + | + |
| | Sucrose | + | + |
| | Lactose | — | — |
| | Raffinose | + | + |
| | Ethylamine Hcl | +W | + |
| 発 酵 性 | Glucose | + | + |
| | Galactose | — | — |
| | Maltose | + | + |
| | Sucrose | + | + |
| | Lactose | — | — |
| | Raffinose | 1/3 | 1/3 |

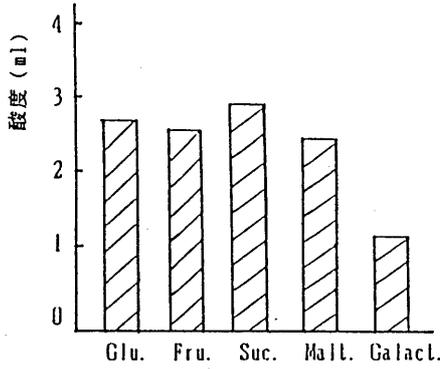


図1 糖の種類による酸度の比較

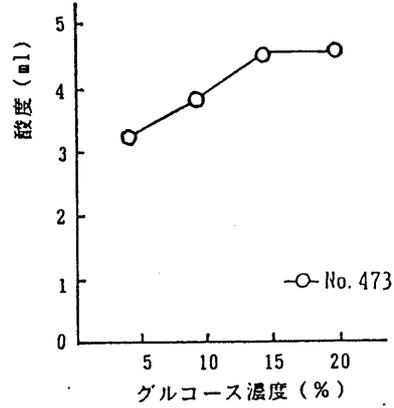


図2 酸度に及ぼす糖の濃度の影響

Glucose の濃度による影響について試験した結果を図2に示した。濃度が15%までは酸度が増加しているが、それ以上になっても酸度は増加しなかった。

培地の違いによる影響を調べるために、リンゴマスト、マスカットマスト、ナシマスト、試作した竜眼マスト、及び Brix15° にした Bacto - Yeast nitrogen を使用して、*S. cerevisiae* 71B 及び分離した No. 473 酵母を接種し、25° C で7日間静置培養後に酸度を分析した結果を図3に示した。。これより *S. cerevisiae* 71B ではどの培地でもほぼ同量の酸度であったが、分離した No. 473 株では、使用する培地により酸度が異なっており、かなりの影響を受けているのがわかり、多酸性酵母の分離において培地の選択が重要であるとおもわれる。

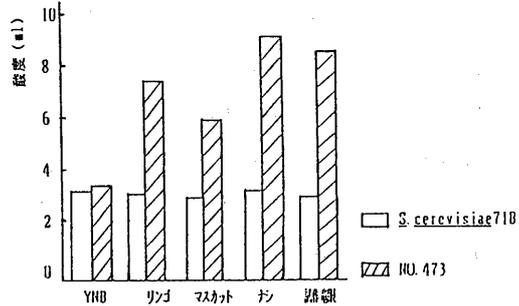


図3 培地及び酵母の差による酸度の比較

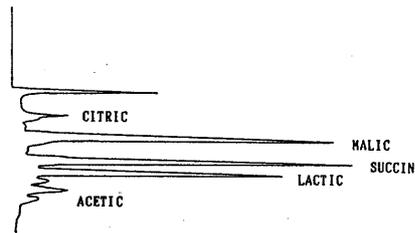


図4 ナシマストを分離酵母 (No.473 株) で発酵させた液のHPLCによるクロマトグラム

4) 生成有機酸の分析

ナシマストを用いて、分離した NO. 473 酵母で発酵させた液について HPLC で有機酸の分析を行った結果を図4に示す。Lactic acid, Malic acid, Succinic acid, Acetic acid 等の有機酸が分離されたが定量性に問題があり、他の分析法を検討する必要がある。

ナシマスト発酵液の Lactic acid を HPLC と酵素法で定量した結果を表2に示す。HPLC と酵素法で

定量した Lactic acid 量との相関係数は 0.946 となり高い相関を示した。

酵素法により, *S. cerevisiae*71B と分離した No. 473 株を用いてナシマストを発酵させ,液の有機酸を測定した結果を図5に示す。No. 473 株と *S. cerevisiae*71B とでは, *S. cerevisiae*71B の場合 Lactic acid をほとんど生成しないが, No. 473 株では Lactic acid の生成が顕著であった。

5) 融合用親株の選択

細胞融合用親株として, 優良ワイン酵母で新酒タイプに向き, 華やかなブーケを有する等の特長を持つ *S. cerevisiae*71B からエジウムプロマイドにより吸収欠損株を分離した。6回継代し安定な3株の吸収欠損株を得た。多酸性酵母 No. 473 株の E thy1amine の資化性, イノシトール要求性を育種時のマーカーとして利用できると思われた。

参考文献

- 1) 山里一英ら: 微生物の分離法, R&D プ ラニング (1986)
- 2) 注解編集委員会編: 第3回改正国税所定分析法注解, 日本醸造協会 (1984)
- 3) N. J. W. Kreger - vanRij: The Yeasts a taxonomic study, 3rd, ed., Elsevier Sci. Publ. B. V., AmSterdam (1984)
- 4) 長谷川編著: 改訂版微生物の分類と同定, 学会出版センター (1984)
- 5) 後藤, 飯塚著: 酵母の分類同定法, 東京大学出版会 (1973)
- 6) 角田潔和, 小泉武夫, 野白喜久雄, 小玉健吉: 日本農芸化学会昭和61年度大会講演要旨集, p 484
- 7) 中西載慶, 横塚弘毅: 召本食品工業学会誌, 34, 362~369 (1987)
- 8) 月岡本, 廣井忠夫, 一鈴木恒夫: 日本農芸化学会誌, 62, 1649 (1988)
- 9) Toyohiko YamazaKi, Akito Hirota, Hideo Nono1nura: J. Inst. Eno1. Vitic. Yamanashi Univ. 19, 19~28 (1984)

表2 乳酸の分析法の違いによる定量値

(ナシマスト発酵液) (mg/ml)

| 分析法 | ロットNo. | 1 | 2 | 3 |
|-----------|--------|------|------|------|
| 酵 素 法 | | 4.42 | 4.41 | 4.76 |
| H P L C 法 | | 4.40 | 4.48 | 4.66 |

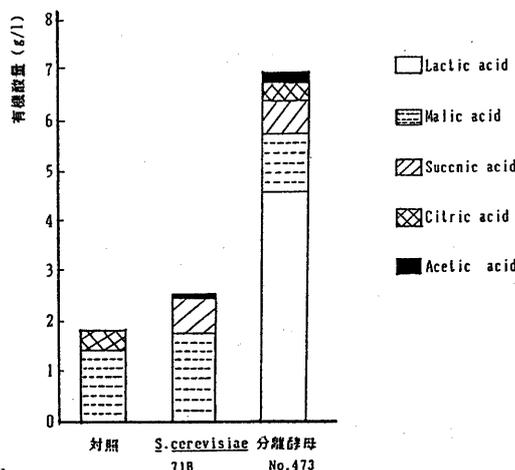


図5 *S. cerevisiae* 71B及び分離酵母 (No.473 株) による有機酸生成量