

埼玉酵母の特性解析

高橋友哉*¹ 横堀正敏*² 増田こずえ*² 細井永次*² 海野まりえ*²

Analysis of Characteristics of Saitama Yeast

TAKAHASHI Tomoya*¹, YOKOBORI Masatoshi*², MASUDA Kozue*²,
HOSOI Eiji*², Umino Marie*²

抄録

埼玉酵母8株 (A, A01, BK2, C, E, F, MR, YY) と日本醸造協会酵母2株 (701, 901) の計10株について、表現型及び遺伝子型の解析から、特性の違いを明らかにすることを試みた。

ガラクトース、ツラノース、MDG、マルトースでは、酵母によって資化性に顕著な違いがあった。また、AWA1遺伝子を利用したプライマーを用いたPCR断片長から、埼玉酵母、協会酵母内でのグループ分けに成功した。

キーワード：埼玉酵母，表現型，遺伝子型，資化性，AWA1

1 はじめに

近年、県内の自然界や酒蔵から分離した酵母を埼玉酵母として実用化したことで、埼玉酵母は高香気性、多酸性等、より多様な目的に応じた使い分けが可能になった。これらは、例年、県内酒蔵の7割に使われているが、豊富な種類で特徴付けがしやすいことから、今後もさらなる需要が見込まれる。埼玉酵母を商品として販売するからには、品質には責任を負う必要があり、酵母の種類が増えてきたことから、より高度な品質管理が求められている。

そこで、本研究では、表現型及び遺伝子型の解析から、各埼玉酵母の詳細な特性、独自性を明らかにすることを試みた。

2 実験方法

2.1 供試酵母

埼玉酵母として A, A01, BK2, C, E, F, MR

,YY、対照として日本醸造協会 701, 901 酵母の計 10 株を用いた。

2.2 表現型

2.2.1 資化性

単一炭素源の利用能及び種の同定確認をアピC オクサノグラム (シスメックス・バイオメリュー) により行った。乾燥炭水化物を含むそれぞれのカップに酵母の懸濁液を接種し、28℃で3日間培養後、それぞれのカップをコントロールのカップと比較することで陽性の判定を行った。

より詳細に資化性を調べるため、バイオログ YTマイクロプレート (BIOLOG) による試験を行った。異なる炭素源が充填された96穴の各ウェルに培養液を接種し、26℃で2日間培養後、マイクロプレートリーダーで590nmの吸光度を測定した。

バイオログYTマイクロプレートによる試験の結果、酵母間での吸光度のバラつきが大きかった糖について、酵母の増殖曲線をバイオフィトレコ

*¹ 資源循環推進課

*² 北部研究所 生物学担当

ーダー（アドバンテック）により測定した。専用L字試験管にYeast nitrogen baseに糖を加えて作成した培地を無菌的に分注し、2日間培養したYPD培地3mLから200μLを接種。28℃で培養し、60分毎に660nmの吸光度を測定した。

2.2.2 小仕込試験

α化米 45g、乾燥麴 10g、水 100mL、乳酸 0.04mL、酵母培養液 1mL をガラス棒を入れた広口瓶に入れ、15℃で培養した。培養中は、全体の重量を経時的に測定し、減少重量から発酵能を測定した。2週間経過後、3000rpm で10分間遠心分離し上槽とした。上槽後、アルコール分、日本酒度、酸度、アミノ酸度、香気成分の測定を行った。

香気成分測定は、従来のヘッドスペース法に加え、濃縮分析ツール MonoTrap DCC18 (GL サイエンス) を使用し、詳細な香気成分の測定を試みた(使用装置 GCMS-QP5050A、カラム DB-WAX 60m × φ0.32mm × 膜厚 0.5μm、オープン 40℃ (5min) → 6℃/min 昇温 → 220℃ (2min)、気化室温度 230℃、インターフェース温度 230℃)。

2.3 遺伝子型

YPD 培地 3mL で 2 日間培養後、ISOPLANT (ニッポン・ジーン) により DNA を抽出した。

AWA1 遺伝子を利用したプライマーとして、以下の2種類のプライマーを使用した試験を行った：5'-ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTCAAGCC-3', 5'-TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACC-3'。PCR は、変性 94℃ (1min)、アニーリング 60℃ (1min)、伸長 72℃ (5min) を 30 サイクルの条件で行った。電気泳動には、1×TAE バッファーを用い、ゲルは 1%アガロースゲルを使用した。135V で 20 分泳動の後、エチジウムブロマイドで染色した。

RAPD解析では、5'-GAGGGTGGCGTTCT-3', 5'-GGATCCGAGGGTGGCGTTCT-3' の 2 種類のプライマー、マイクロサテライト解析では、(GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ の 3 種類のプライマーを使用した。上記の試験で判別がつかなかった

ものについては、パルスフィールド電気泳動を行った。

3 結果及び考察

3.1 表現型

3.1.1 資化性

アピ C オクサノグラムでは、試験した酵母が全て *Saccharomyces cerevisiae* であることを再確認した。

バイオログ YT マイクロプレートでは、表 1 に示す 4 つの糖について、酵母間での吸光度のバラつきが大きく、資化性に違いがあることが分かった。

表 1 バイオログでの糖の資化性の差異

糖 酵母	ガラクトース	ツラノース	MDG	マルトース
A	0.23	0	0.21	0.15
A01	0.28	0.05	0.25	0.17
BK2	0.25	0.35	0.42	0.34
C	0.60	0.37	0.40	0.31
E	0.60	0.37	0.40	0.18
F	0.20	0.48	0.18	0.39
MR	0.62	0.39	0.50	0.12
YY	0.58	0.36	0.47	0.13
701	0.21	0.42	0.36	0.13
901	0.58	0.36	0.40	0.13
標準偏差	0.18	0.15	0.10	0.10

26℃2日間培養後の 590nm での吸光度
MDG : メチル-D-グルコシド

これらの糖について、バイオフィトレコーダーにより酵母の増殖曲線を確認した。

図 1 に示すように、ガラクトースでは、バイオログYTマイクロプレートで吸光度が低かったA、A01、BK2、F、701において、対数増殖期に入るまでのラグタイムが長い傾向があった。ツラノースでもバイオログの結果同様、A、A01の吸光度が低くなっていることが確認できた。MDG、マルトースの試験についても、バイオフィトレコーダーによる試験とバイオログYTマイクロプレートの試験では同様の結果になった。

これらにより、F酵母についてはMDGとマルトースの資化性から判別が可能で、A、A01についてはMDGやツラノースに対しての資化性から他の酵母との判別が可能であることが分かった。

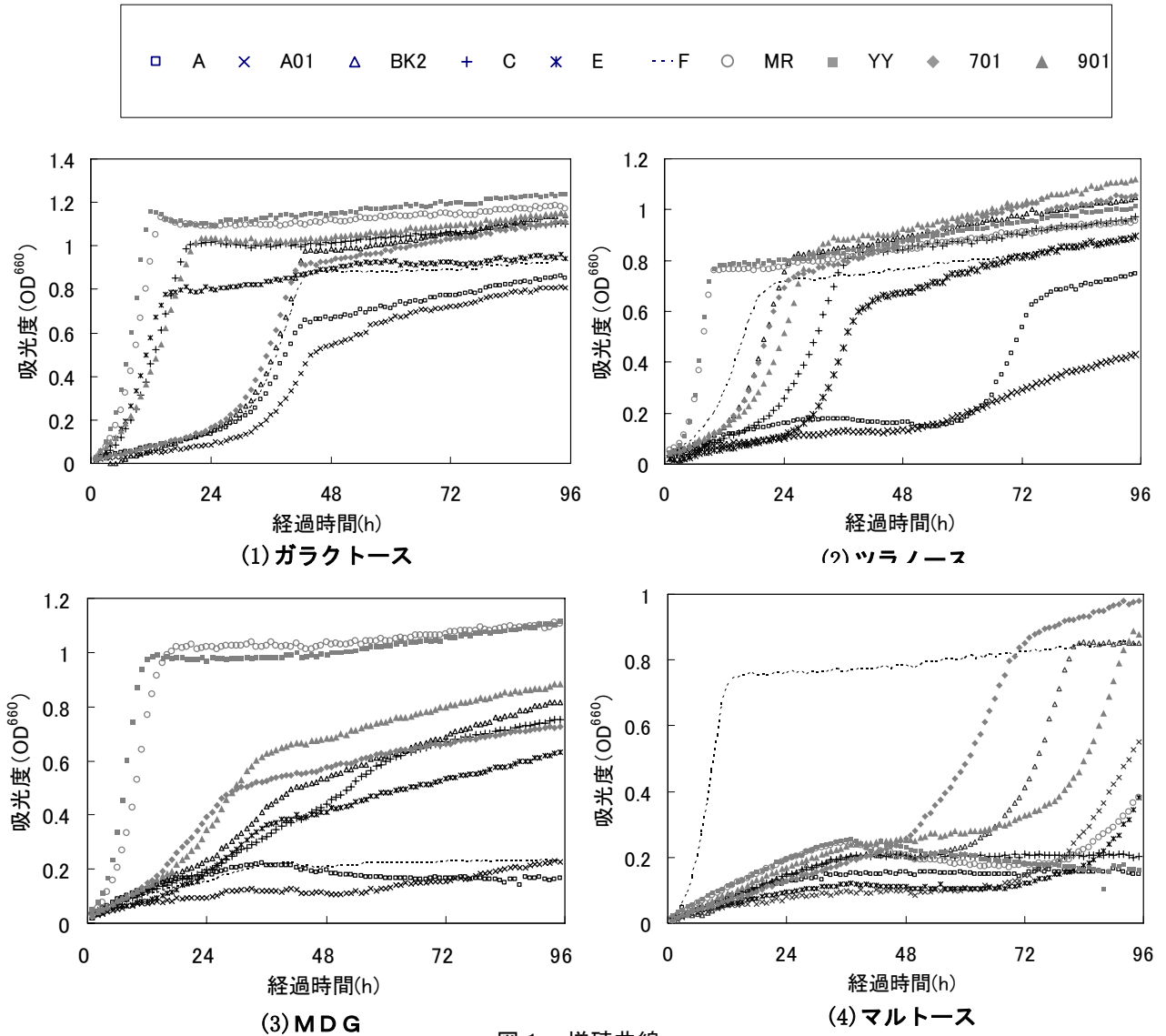


図1 増殖曲線

表2 小仕込み試験結果

酵母	アルコール分 (%)	日本酒度	酸度	アミノ酸度	香気成分 (ppm)			
					イソブタノール	酢酸イソamil	イソamilアルコール	カプロン酸エチル
A	17.0	-3.5	3.5	2.4	68	1.6	207	1.4
A01	17.1	0	2.9	2.8	77	2.2	213	1.5
BK2	16.7	-3	4.0	2.4	74	1.4	192	1.3
C	16.5	-3	3.3	2.4	81	2.5	194	2.6
E	17.4	0	3.0	2.7	112	5.2	219	1.4
F	16.5	-1	3.2	2.4	58	2.3	199	3.5
MR	14.5	-23	4.4	2.3	90	0.5	206	1.5
YY	16.0	-10	4.1	2.1	100	1.3	245	0.9
701	17.2	0	3.4	2.3	80	2.9	207	1.5
901	17.0	0	3.3	2.3	85	2.6	201	1.3

3.1.2 小仕込試験

もろみの状貌を観察したところ、A と BK2 が高泡を形成していた。上槽後の成分は、MR と YY はアルコール生成が他に比べて低く、酸度が高くなっていた。また、F は吟醸香であるカプロン酸エチルを、E は酢酸イソアミルを最も多く生成した（表 2）。濃縮分析では、1-ヘキサノールや 2,3-ブタンジオール、β-フェネチルアルコール、カプリル酸エチル、カプリン酸エチル、酢酸フェネチル、カプロン酸、カプリル酸など、多くの成分が検出された。生成の有無だけでは、これらの香気成分から酵母の特徴を断定、判別するのは困難であるため、更なる検討が必要である。

3.2 遺伝子型

AWA1 遺伝子を利用したプライマーを用いて PCR を行い、電気泳動させた結果、増幅断片長の違いによって 4 種類のグループに分けることができた（図 2、表 3）。

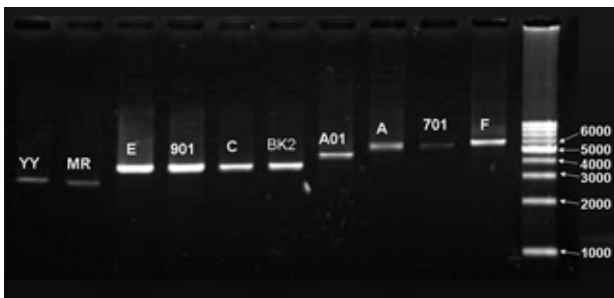


図 2 アガロースゲル電気泳動 (AWA1 遺伝子利用による PCR)

表 3 増幅断片長

	酵母	断片長 (bp)
①	A, F, 701	約 6000
②	A01	約 5000
③	BK2, C, E, 901	約 4000
④	MR, YY	約 3000

一方、RAPD、マイクロサテライト解析では、MR と YY が他とは異なるバンドパターンを示したが、他の酵母については大きな違いは出なかった（図 3）。また、資化性の試験で判別が困難であった C、E、901 の 3 株についてはパルスフィールド電気泳動も行ったが、バンドパターンに違い

は出なかった。

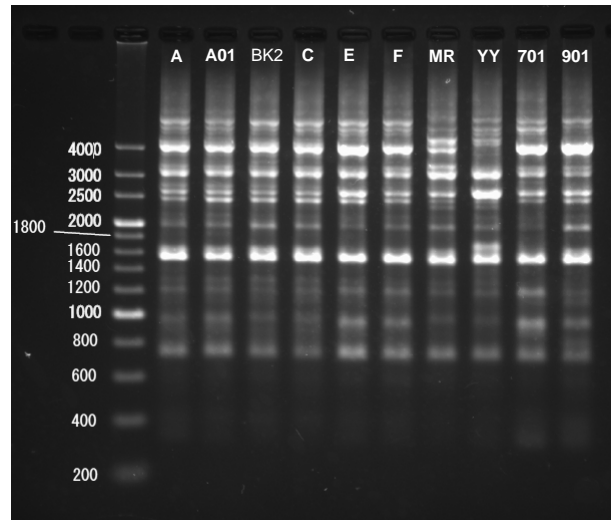


図 3 アガロースゲル電気泳動 (RAPD)

4 まとめ

表現型及び遺伝子型から埼玉酵母の特性を以下のように明らかにした。今回行った遺伝子型の試験では、AWA1 遺伝子を利用したプライマーによるものがグループ分けに最も適していた。また、表現型の特徴に近いものは、遺伝子型からも同系統であることが明らかになった。

表 4 各酵母の特異的な性質

酵母	資化性				香気成分特徴	AWA1	RAPD
	ガクトス	ツリノス	MDG	マルトス			
A	ラクトタイム長い	ラクトタイム長い	飽和吸光度低			①	
A01	ラクトタイム長い	ラクトタイム長い	飽和吸光度低			②	
BK2	ラクトタイム長い					③	
C					ガロ酸濃度高い	③	
E					酢酸イソ高い	③	
F	ラクトタイム長い		飽和吸光度低	ラクトタイム短い	ガロ酸濃度高い	①	
MR			飽和吸光度高			④	異パターン①
YY			飽和吸光度高			④	異パターン②
701	ラクトタイム長い					①	
901						③	

謝辞

本研究を進めるに当たり、客員研究員として御

指導いただきました独立行政法人産業技術総合研究所の植村浩先生に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Masashi Shimizu, Koichi Miyashita, Hiroshi Kitagaki, Kiyoshi Ito, and Hitoshi Shimoi: Amplified Fragment Length Polymorphism of the AWA1 Gene of Sake Yeasts for Identification of Sake Yeast Strains, JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, **100**, 6(2005)678
- 2) BING HUEY and JEFF HALL: Hypervariable DNA Fingerprinting in Escherichia coli : Minisatellite Probe from Bacteriophage M13, JOURNAL OF BACTERIOLOGY, **171**, 5(1989)2528
- 3) 加藤拓, 下飯仁: 清酒酵母の醸造特性の QTL 解析, バイオサイエンスとインダストリー, **67**, 6(2009)263
- 4) 横堀正敏, 鶴菌大, 高橋友哉, 増田こずえ: 微生物利用技術に関する研究—新規酵母の分離と食品への応用(3)—, 埼玉県産業技術総合センター研究報告, **6**, (2008)55
- 5) 福本亮平, 野口昭博, 高橋仁恵, 仁科淳良: 群馬県産酵母の遺伝子解析, 群馬県立産業技術総合センター研究報告, (2005)31