

群馬県産ぶどう果実より単離した酵母の発酵食品への利用

渡部貴志・柳澤昌臣*・大和あゆみ*

Experimental production of fermentation foods brewed by Gunma grape yeasts
WATANABE Takashi, YANAGISAWA Masaomi and YAMATO Ayumi

新たな産業用微生物を取得し、発酵食品へ利用することを目的とし、群馬県産ぶどう果実から120株の酵母を単離した。単離した酵母から22株の炭素源の資化性を評価したところ、様々な酵母がいることが分かり、病原性を持つものは無かった。さらにD1/D2領域とITS領域の塩基配列を利用した遺伝子解析により酵母を同定したところ、ワイン酵母 *Torulasporea delbrueckii* OGY15-3、OGY15-4、OGY15-5が得られた。これらの3株はマルトース資化性がないため、ビール醸造は行えなかった。一方、パン製造では市販のパン酵母と同等に膨らみ、有用性が確認された。

キーワード：ぶどう、酵母、遺伝子解析、発酵食品

In order to utilize novel industrial microorganisms for fermentation food, we isolated 120 yeasts from grapes planted in Gunma prefecture. Investigated carbon assimilation abilities of 22 isolated yeasts revealed that they were several kinds of yeasts, and not identified as pathogen yeasts. OGY15-3, OGY15-4, and OGY15-5 were identified as wine yeast *Torulasporea delbrueckii* by genetic analysis. Because these three yeasts could not utilize maltose, they did not brew wort. On the other hand, they raised dough as high as commercial baker yeast.

Keywords: grape, yeast, genetic analysis, fermentation food

1 はじめに

発酵食品には、酵母や糸状菌、乳酸菌などの産業微生物が扱われている。その中でも、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (以下、*S. cerevisiae*) は、日本酒や焼酎だけでなく、ワイン、ビールなどの酒類、そしてパンに利用されている。同一属種の *S. cerevisiae* であっても、発酵食品毎に適した性質が異なり、人類は長い年月を経て酵母の選抜・利用をしてきた。このため、実験室酵母S288C株ときょうかい清酒酵母7号(K7株)の全ゲノム配列は、98%の相同性しかない¹⁾。この数字は、ヒトとチンパンジーとの遺伝子相同性の値とほぼ同じである。

従来から用いられている産業微生物は、対象とする産業に適した性質となるよう進化したと考えられる。このような産業微生物を用いた場合、良質な発酵食品を造ることができるが、他者との違いを示しにくいという性質もある。一方で、自然界から独自性のある産業微生物を探索し、実用化する試みも従来から続けられている。独自の有用な微生物が得られた場合、他者とは明確な違いが示せるため、消費者が商品を選択するきっかけになりやすい。

自然界から微生物を探索する場合、病原菌や毒素生産菌など人体に悪影響を及ぼさないものであることを確認する必要がある。微生物は、目に見えないものであるため、その同定には顕微鏡による形態観察や利用可能な炭素源の種類を調べて行われてきた。現在は、ゲノムDNAの一部の塩基配列を

食品化学開発係

* 食品・バイオ係

解析し、その相同性を調べることで簡易的かつ正確に同定することができる。また、微生物の所有権については、関係者間で事前に十分に協議しておく必要がある。我々は、群馬県独自ブランドいちごの「やよいひめ」から単離された「やよいひめ酵母」を用いた地ビール開発に成功している²⁾。しかしながら、本酵母は冷凍耐性がなくパン発酵の際のドライイースト製造には不向きである。

そこで本研究では、群馬県内から新たな産業用酵母を取得して発酵食品への利用することを目的とし、ぶどう果実から酵母の探索を行った。また、得られた酵母の微生物安全性を確保するため、遺伝子学的手法による菌の同定を行った。その結果得られたぶどう酵母を用いて実験室規模での発酵食品の製造を行ったので、報告する。

2 実験材料と方法

2.1 酵母の探索方法

集積培地は、麴エキス (Brix 7°) にクロラムフェニコールを 50 ppm 加えて作成した。集積培地 20 mL を入れた 50 mL チューブに、群馬県内ぶどう園のぶどう果実を採取して加え、30°C で 7 日間の集積培養を行った。発酵に伴う泡の発生が確認された培養液を滅菌水で適宜希釈し、単離用の YMS-C 寒天培地 (酵母エキス 3 g/L、麦芽エキス 3 g/L、ペプトン 5 g/L、スクロース 10 g/L、寒天 20 g/L、クロラムフェニコール 50 ppm) に塗布した。30°C で 2 日間培養後、寒天培地上に生育してきた酵母様のコロニーを新たな YMS-C 寒天培地に釣菌した。

2.2 供試酵母

ぶどう酵母 120 株に加え、やよいひめ酵母 *Torulaspora delbrueckii* (*T. delbrueckii*) PM13 株、(独) 酒類総合研究所より分譲して頂いた清酒酵母きょうかい 701 号 (K701)、(公財) 日本醸造協会から分譲して頂いたワイン酵母 3 号 (W-3)、群馬県独自吟醸用酵母、群馬 KAZE 酵母 (KAZE 酵母)、(株) 日清製粉製ドライイースト、スーパーカメラアを対照株として用いた。

2.3 炭素源資化性確認試験

酵母様真菌同定キット ID32C API (ピオメリユー・ジャパン社製) を用いて、31 種類の炭素源の資化性を評価した。YM 寒天培地 (酵母エキス 3 g/L、麦芽エキス 3 g/L、ペプトン 5 g/L、グルコース 10 g/L、寒天 20 g/L) で供試酵母を 30°C、静置培養を 2 日間行った。生えてきた酵母のコロニーを滅菌水 5 mL に懸濁し、ID32C API の C メディウム 7 mL に 250 µL 添加した。この混合液を ID32C API のウェル (32) に 135 µL ずつ加え、30°C で 48 時間静置培養を行い、接種株の増殖性 (炭素源の資化性) を調べた。

2.4 遺伝子解析による酵母の同定

ぶどう酵母の同定は、ribosomal DNA (rDNA) の internal transcribed spacer (ITS) 領域、および 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列を解析し、アメリカ国立生物工学情報センサー (NCBI) のホームページで Blast 検索により行った。各酵母のゲノム DNA は、Gen とるくん™ 酵母用 (High Recovery) (タカラバイオ (株) 製) を用いて抽出した。D1/D2 領域増幅用のプライマーは、NL1 (5'-GCATATC-AATAAGCGGAGGAAAAG-3')、NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') を、ITS 領域増幅用プライマーは ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAATGC-3') を用いた。PCR 反応は、KOD-FX (東洋紡 (株) 製) を用い、説明書に準拠して行った。

ITS 領域および D1/D2 領域の PCR 産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ (株) 製) を用いて精製した。BigDye Terminator Cycle Sequence V3.1 Kit (Applied Biosystem 社製) を用いて精製した PCR 産物に蛍光標識を付加した後、エタノール沈殿により精製し、ABI3100 automatic DNA sequencer directly (Applied Biosystem 社製) を用いて塩基配列の解析を行った。

2.5 濃縮麴エキスでの発酵試験

100 mL 容三角フラスコに濃縮麴エキス (Brix 20°) 40 mL を加え、酵母を一白金耳接種し、30°C で 100 rpm、48 時間回転

振盪培養を行った。菌体増殖量 (OD₆₆₀) は、分光光度計UV-1900 ((株) 島津製作所製) を用いて分析した。アルコール分は、遠心分離 (10000 rpm×1 min) し、得られた上清を用い、アルコメイトAL-3 (理研計器 (株) 製) で分析した。

2. 6 ビール小仕込み試験

試験管に麴エキス (Brix 5°) 5 mLを加え、酵母を一白金耳接種し、30℃で150 rpm、24時間振盪培養を行った。ガラス容器 (900 mL容) に500 mLの麦汁 (Brix12.7°) を加え、100℃で10分間殺菌した。これに培養酵母5 mLを接種し、15℃で静置し、24時間毎に炭酸ガス発生による重量減少量を測定した。13日目に遠心分離 (8000 rpm×15 min) して得られた上清を分析試料とした。

2. 7 分析方法

アルコール濃度、酸度は国税庁所定分析法に従い、分析を行った。pHおよびBrixはそれぞれ、pH計と糖度計を用いて分析した。糖類 (グルコース、マルトース) は、高速液体クロマトグラフ、示差屈折率検出器を用い、分析を行った。香気成分 (酢酸エチル、酢酸イソアミル、イソアミルアルコール) は、ヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

2. 8 製パン試験

パナソニック (株) 製ホームベーカリーSD-SB4を用い、食パンを試作した。強力粉は、星野物産 (株) 製の吟嶺を、業務用無塩バターとスキムミルクは、森永乳業 (株) 製のものを用いた。上白糖と食塩は、スーパーなどで購入できる一般的なものを用いた。

ホームベーカリーの取扱説明書に従い、表1に示す原料配合を基本として、ドライイーストの添加量、培養酵母の培地の種類や添加量、酵母の種類の違いによるパンの膨らみに与える影響を調べた。

培地の種類については、希釈麦汁 (Brix 3°) と市販の食品添加物用のミーストP1G (アサヒフードアンドヘルスケア (株) 製) を用いた2×YS培地 (2% 酵母エキス、4%スクロース) を用いた。また、得られた試作パンの試食による官能評価も実施した。

表1 製パン試験の基本配合

原材料	一斤分
強力粉	250 g
バター	10 g
砂糖	17 g
スキムミルク	6 g
塩	5 g
水	180 mL
酵母*	2.8 g

* ドライイーストでない場合は、培養酵母を回収し、水で懸濁して添加した。

3 結果と考察

3. 1 県内果実からの酵母の単離

東京農業大学では、麴エキスを用いて花から清酒酵母を単離する試みを行っている³⁾。そこで、*S. cerevisiae*を集積培養できるのではと考え、麴エキスにクロラムフェニコールを加えた培地を集積培養に用いることにした。また、*S. cerevisiae*の単離の報告例が多い、ぶどう果実を単離源として用いることにした。

群馬県内のぶどう園から果実20点を培養液に直接入れ、静置培養を行ったところ、いずれも2日目には発酵に伴う泡の発生が確認された。7日目には糖の消費により発酵が収まり、酵母の増殖が十分に行われたと考えられたため、YMS-C寒天培地を用いて酵母の単離を試みた。1点辺り数百コロニーの形成が確認されたため、ランダムに6株ずつ単離し、単離源20点で計120株のぶどう酵母を単離した。

3. 2 酵母の炭素源の資化性

単離したぶどう酵母から、病原性酵母を除外するため、まずは酵母様真菌同定キットID32C APIを用いて炭素源の資化性を調べることにした。単離した120株を冷蔵保存2ヶ月後、新たなYMS-C培地に接種したところ、22株だけが生育した。単離を試みている*S. cerevisiae*は、YMS-C培地での冷蔵保存2ヶ月間では死滅しないため、生育してこなかった98株はその他の酵母であると推定し、除外した。

用いた22株は、31種類の炭素源の資化性には多様性があり、複数種の酵母が混在

表 2 酵母の増殖性のまとめ

	OGY2-4	OGY4-4	OGY6-1	OGY6-3	OGY7-2	OGY7-5	OGY10-1	OGY10-3	OGY14-1	OGY14-3	OGY14-4
ガラクトース	w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
シクロヘキシミド	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
スクロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-アセチル-グルコサミン	w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
乳酸	+	-	-	-	-	-	w	w	-	-	w
L-アラビノース	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
D-セロビオース	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
ラフィノース	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-マルトース	+	+	+	+	+	-	+	w	-	-	+
トレハロース	w	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
2-ケート-グルコン酸カルシウム	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-メチル-α-D-グルコシド	+	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-マンニトール	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
ラクトース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
D-ソルビトール	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
D-キシロース	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
D-リボース	w	w	w	w	-	-	w	w	-	-	w
グリセロール	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
L-ラムノース	-	-	+	w	w	-	w	w	-	-	+
バラチノース	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
エリスリトール	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-メリビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルクロン酸ナトリウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-メレチオース	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコン酸カリウム	+	w	+	w	w	-	w	w	-	-	w
レブリン酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ソルボース	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
D-グルコサミン塩酸塩	-	w	+	+	+	-	+	+	-	-	+
エスクリン	+	w	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	OGY14-5	OGY14-6	OGY15-2	OGY15-3	OGY15-4	OGY15-5	OGY15-6	OGY16-4	OGY17-4	OGY17-5	OGY17-6
ガラクトース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
シクロヘキシミド	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
スクロース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N-アセチル-グルコサミン	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
乳酸	-	-	-	+	+	+	-	w	-	w	-
L-アラビノース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
D-セロビオース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
ラフィノース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-マルトース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
トレハロース	-	-	-	w	-	-	-	+	+	+	+
2-ケート-グルコン酸カルシウム	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
α-メチル-α-D-グルコシド	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
D-マンニトール	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
ラクトース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
イノシトール	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
D-ソルビトール	-	-	-	+	+	w	-	+	+	+	+
D-キシロース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-リボース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	+
グリセロール	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
L-ラムノース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	-
バラチノース	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	+
エリスリトール	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-メリビオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルクロン酸ナトリウム	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-メレチオース	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
グルコン酸カリウム	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
レブリン酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
グルコース	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ソルボース	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-グルコサミン塩酸塩	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
エスクリン	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

+ : 増殖性あり、w : わずかに増殖、- : 増殖性なし

していることが示唆された（表2）。ぶどう酵母 OGY6-1、OGY6-3では、同じぶどう果実から単離した株であり、似通った炭素資化性ではあるが、増殖性にばらつきがあるなど、単離株毎に炭素源の資化性を評価することが重要だと考えられた。また、OGY7-5などは限られた炭素源しか利用できないことが確認された。

3. 3 酵母の同定

先のID32C APIでは、病原性酵母を推定するものであり、正確な同定を行うことは難しい。そこで、真菌の同定で扱われるD1/D2領域およびITS領域の塩基配列を解析した。全ての株において、D1/D2領域およびITS領域共に、100%一致となる同定結果を得ることができた（表3）。

残念ながら、*S. cerevisiae*と同定された一株も存在していなかった。一方で、OGY15-3株、OGY15-4株、OGY15-5株は、*T. delbrueckii*と同定された。本酵母は、*S. cerevisiae*以外のワイン発酵酵母として扱われることがあり、やよいひめ酵母

PM13株も本属種に同定されている。従って、これら3株のぶどう酵母を発酵食品の試作に用いることにした。

3. 4 発酵力の調査

比較対照としてワイン酵母W-3株を用い、ぶどう酵母の基本的な発酵力を調べた。その結果、Brix 20° という高密度条件でもぶどう酵母は増殖し、菌体数はW-3株よりも高くなり、得られたエタノール濃度はW-3株と同等で高い発酵力を有することが明らかとなった（表4）。

3. 5 ビールの試作

自然界から単離される*S. cerevisiae*には、清酒製造には好ましくない4-ビニルグアイアコール（4-VG）を産出するものがある。やよいひめ酵母*T. delbrueckii* PM13株は、4-VGを産出したことから³⁾、同じ属種のぶどう酵母も4-VGを産出する可能性が高く、清酒製造には向かないと考えられた。そこでまず、やよいひめ酵母で実績があるビールの試作を、ぶどう酵母を用い行ってみることにした。

表3 遺伝子解析による酵母の同定結果

株名	属種	D1/D2	ITS	特徴
OGY2-4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	100%	100%	酢エチ生産酵母、産膜酵母
OGY4-4	<i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>	100%	100%	果物から単離例
OGY6-1	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY6-3	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY7-2	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY7-5	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ワインもろみから単離例
OGY10-1	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY10-3	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY14-1	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ブドウ園から単離例
OGY14-3	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ブドウ園から単離例
OGY14-4	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY14-5	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ブドウ園から単離例
OGY14-6	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ブドウ園から単離例
OGY15-2	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ブドウ園から単離例
OGY15-3	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100%	100%	花の蜜から単離例
OGY15-4	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100%	100%	花の蜜から単離例
OGY15-5	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100%	100%	花の蜜から単離例
OGY15-6	<i>Starmerella bacillaris</i>	100%	100%	ブドウ園から単離例
OGY16-4	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY17-4	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY17-5	<i>Zygoascus meyerae</i>	100%	100%	サトウキビ、ジュースから単離例
OGY17-6	<i>Kurtzmaniella quercitrusa</i>	100%	100%	果物から単離例

表 4 発酵力試験のまとめ

	OD ₆₆₀	エタノール (%)
W-3	20.9	8.7
OCY15-3	32.2	8.5
OCY15-4	31.9	8.7
OCY15-5	33.8	8.7

表 5 小仕込み試験の結果

	Blank	PM13	OGY15-3	OGY15-4	OGY15-5
重量減少量 (g)	-	18.3	5.0	4.9	5.5
アルコール (%)	-	4.5	0.7	0.8	0.7
酸度 (mL)	2.9	3.6	3.4	3.4	3.1
pH (-)	4.9	4.3	4.6	4.6	4.6
Brix (°)	12.7	7.3	11.3	11.1	11.2
Glucose (%)	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Maltose (%)	5.2	0.1	5.5	5.5	5.3
イソアミルアルコール (ppm)	-	100.3	34.4	36.9	38.2
酢酸イソアミル (ppm)	-	0.8	0.1	0.1	0.1
酢酸エチル (ppm)	-	10.3	8.2	7.6	4.2

小仕込み試験ビールの分析を行ったところ、PM13株のものはマルトースが利用されて糖度が下がり、アルコールが増えているのに対し、ぶどう酵母はマルトースが利用されていない（表5）。糖の資化性を確認すると、ぶどう酵母はマルトース資化性が無く、ビール醸造への利用は不適であることが分かった。

3. 6 各種酵母でのパンの試作

現代のパン作りでは、ドライイーストが用いられている。しかしながら、これらの工程は費用がかかるため、液体培養した酵母でパン作りを行う条件を調べることにした。その結果、食品添加物の酵母エキスを用いたものでは、説明書のドライイースト添加量の2分の1を加えた程度までパンが膨らんだ（data not shown）。

上記の検討で条件が整ったので、各種酵母を用いたパンの試作を行うことにした。ぶどう酵母①は、*T. delbrueckii* OGY15-3株であり、対照として用いたスーパーカメラとほぼ同程度膨らんだ（図4）。一方で、酵母数がほぼ同じであってもやよいひめ酵母PM13株と清酒酵母K701株の膨らみは少なかった。また、官能検査を行ったところ、対照は一般的な食パンのふくらとした味であるのに対し、ぶどう酵母はしっとりとしていた。一方、ぶどう酵母②（OGY7-5株）は、ワインもろみから単離

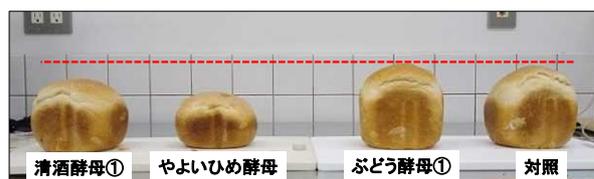


図 1 各種酵母でのパンの試作

報告例がある *Starmerella bacillaris* であるが、発酵力が無くパンが膨らまなかった（図1）。なお、群馬KAZE酵母は、今回の培養条件では酵母の増殖速度が遅く、パン作りには向かないことが分かった。

4 まとめ

本研究では、群馬県産ぶどう果実から酵母の探索し、得られた酵母の微生物安全性の確保と遺伝子解析による酵母の同定、ビールとパンの発酵食品の試作を行った。最終的に得られたぶどう酵母OGY15-3株、OGY15-4株、OGY15-5株は、いずれも *T. delbrueckii* であると同定された。これらの酵母はやよいひめ酵母PM13株とは異なり、ビール醸造には向かなかったが、パン製造への利用の可能性があることが分かった。今回得られたぶどう酵母3株は、アルコール発酵能力は高いため、ワインなどの酒類製造にも向いているのかも知れない。

謝 辞

群馬県産ぶどう果実は、奥利根ワイン株式会社のぶどう農園から採取させていただいた。

文 献

- 1) Akao et al.: DNA Research, 18, 423-434 (2011)
- 2) 渡部貴志ら: 令和2年度群馬産業技術センター研究報告、29-33
- 3) 小室友花里ら: 日本醸造協会誌 100、454-460 (2005)