

微生物資源のデータベース化

渡部貴志・田島 創*・吉野 功**

Construction of bio-resource database
WATANABE Takashi, TAJIMA So, and YOSHINO Isao

群馬産業技術センターが保有する産業微生物について、微生物情報のデータベース化を行い、保存方法を決定した。約600株の保存株のうち職員間で重複するものなどを整理し、約300株に集約した。また、新たに県内企業からの寄託株や、共同研究等で開発された株などの約400株を保存し、令和5年3月末で合計726株（うち、清酒酵母が623株）を保存した。清酒酵母については、増殖性、醸造特性、高泡形成能、キラー活性なども評価した。
キーワード：微生物資源、データベース化、清酒酵母

We constructed the bio-resource database of industrial microorganisms, stocked in Gunma industrial technology center, and the storage method in the deep-freezer. About 600 strains, duplicate stocked between staff member were reduced to about 300 strains. On the other hand, about 400 strains which were deposited from manufactures in Gunma prefecture and bred in several researches, were newly stocked. Totally 726 strains (623 strains of them were sake yeast) were stocked as of March, 2023. Growth, Jyozo-properties, Foaming abilities, and killer activities of sake yeasts was also evaluated.

Keywords: bio-resource, database, sake yeasts

1 はじめに

群馬県では、昭和9年から商工課醸造試験室（昭和12年から群馬県醸造試験場）を設置し、以後組織改編を経ながら醸造工業および食品工業の支援を行いつづけている。これまでに、清酒酵母や、抗菌試験や食品微生物試験の対照株で用いる大腸菌、黄色ブドウ球菌などの多くの産業微生物を取得・保管している。世界保健機関（WHO）は、実験室バイオセーフティ指針を示しており、各国の生物を扱う機関には、安全性を確保する取り組みが求められている¹⁾。群馬産業技術センター（以下、センター）では、微生物実験安全管理規程を定め、保有微生物の管理を行っている。

光計測係

* 食品化学開発係

** 環境・エネルギー係

また、近年では微生物の性質が保存の過程で変質することが分かってきており、微生物の由来や特性を記録し、微生物が変質しないよう、 -80°C での冷凍保存（グリセロールストック）や凍結乾燥によるアンブル保存が推奨されている。さらに、多くの公設試や大学では、職員の退職や異動により、微生物が後任に引き継がれず、長年の労力と費用をかけた貴重な財産を損失してしまう危険性がある。このような損失を防ぐため、（独）酒類総合研究所（以下、酒総研）では、酒造用微生物の受託保存を長年行っており、文部科学省では2002年からナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）を立ち上げ、バイオリソースの収集・保存・提供を実施している。

このような外部機関に微生物資源の保存を委託する場合、少なからずの費用が発生するため、全ての微生物を委託することは、

現実的には難しい。一方で、微生物を一度損失してしまうと二度と同じものが手に入らないため、適切な管理を行う必要がある。そこで本研究では、職員毎に委ねられていた微生物の保管方法を統一化し、微生物の由来のデータベース化を行った。また、清酒酵母については、増殖性と醸造特性などのデータベース化を行ったので報告する。

2 実験材料と方法

2.1 供試株およびデータベース化

平成28年度以降令和4年度までに在職していた担当職員が管理していた微生物を中心に、約1200株を供試株とした。グリセロールストックにより、-80℃で冷凍保存されていた株については、酵母は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5g/L、グルコース10 g/L、寒天20 g/L）、細菌は標準寒天培地（酵母エキス2.5 g/L、カゼイン製ペプトン5.0 g/L）、ブドウ糖1.0 g/L、寒天15.0 g/L）で増殖が確認されたものを対象とした。

複数の職員が保存していた株については、グリセロールストック化されているものに集約した。データベースには、整理番号、株名、属種、取得者名、保存年月日、商標権を有する機関名を記録し、ノートなどで記録が残っている場合に由来、特徴を明記した。また、清酒酵母については、高泡形成能、増殖性、小仕込み試験による醸造特性のデータを取得した。

2.2 グリセロールストックの作成

酵母の前培養は、YM培地（酵母エキス3 g/L、麦芽エキス3 g/L、ペプトン5g/L、グルコース10 g/L）を用いた。細菌の前培養は、普通ブイヨン（NB）培地（肉エキス3.0 g/L、ペプトン10 g/L、塩化ナトリウム5 g/L）を用いた。前培養液5 mLを含む試験管に微生物を一白金耳接種し、酵母は30℃、細菌は37℃で24時間、150 rpmの振盪培養を行った。滅菌済み80%グリセロール溶液200 μLを含む凍結保存用チューブに前培養液を600 μL加え、良く混合した後、菌株名および保存日を明記し、ディープフリーザーにて-80℃で凍結してグリセロールストックを作成した。

表1 総米200 gの仕込み配合

	酒母	一段	一段	追水	計
		目	目		
総米(g)			200		200
麴米(g)		40			40
掛米(g)			160		160
汲水(mL)	12	68	200	30	310

2.3 酵母の増殖性の確認試験

YM 5mLを含む試験管に酵母を一白金耳接種し、30℃で24時間、150 rpmの振盪培養を行った。YD培地（酵母エキス10 g/L、グルコース20 g/L）15 mLを100 mL容三角フラスコに加え、前培養液15 μLを接種し、30℃で150 rpmの振盪培養を行った。培養12、24、32時間後に各酵母の培養液を200 μL採取し、菌体増殖量（OD₆₆₀）を分光光度計UV-1900（（株）島津製作所）を用いて分析した。

2.4 酵母の高泡形成能の評価試験

15 mL容ファルコンチューブに濃縮麴エキスを5 mL加え、酵母を一白金耳接種し、30℃で24時間静置培養を行った。培養液を遠心分離（3000 rpm×1 min）し、得られた菌体ペレットを5 mLの蒸留水で再懸濁した。ネジ付き試験管に懸濁液1 mLとベンゼン1 mLを加え、蓋を閉めた後に試験管ミキサーで10秒間激しく混合した後、水相に菌体が残っているものを高泡形成能無し（泡無し）株として判定した²⁾。

2.5 総米200 gの小仕込み試験

清酒酵母については、表1に示す条件を基準とした総米200 gの小仕込み試験を行った。α化米および乾燥麴は、精米歩合70%一般米の規格で、徳島製麴（株）で調製したものを購入した。また、センターで蒸きょうして用いた原料米は、山田錦または舞風であり、精米歩合は40~60%であるものを購入した。

麴エキス（Brix 5°）2.5 mLに酵母を一白金耳接種し、23℃で4日間静置培養を行った。この培養液1 mLに滅菌酒母用汲水（リン酸二水素カリウム1.0 g/L、硫酸マグネシウム・七水和物0.2 g/L、塩化ナトリウム0.15 g/L、乳酸5 mL）11 mLを加えたものを酒母の代わりとして用いた。麴米は乾燥麴あるいはセンターで製麴したも

のを用いた。掛米は α 化米を用いる場合は、蒸米までの吸水分を考慮し、汲水を52 mL増やした。また、センターで原料米を蒸きょうする場合は、洗米後、35%吸水率となるように浸水し、蒸籠で蒸きょうしたものをを用いた。また、汲水は水道水を用い、6、12、15日目に10 mLずつ追水を行った。仕込み温度15°C、18日後に上槽を遠心分離（7000×g, 15 min）で行った。

2. 6 分析方法

酸度、アミノ酸度、日本酒度、エタノールは国税庁所定分析法に従い、分析を行った。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、イソアミルアルコール、酢酸イソアミル、カプロン酸エチル、イソブチルアルコール）は、ヘッドスペースガスクロマトグラフで分析した。

2. 7 キラー活性検定試験

酒総研の意見を参考にし、キラー活性検定培地は、酵母エキス10 g/L、ペプトン20 g/L、グルコース20 g/L、グリセロール100 g/L、クエン酸0.5 g/L、クエン酸三ナトリウム0.2 g/L、寒天20 g/Lを組成とし、各酵母を接種して30°Cで24時間静置培養した。続いて、K701をYM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）5 mLで30°C、150 rpmで24時間振盪培養した。上記のキラー活性検定用培地を加温加圧滅菌して50°C以下まで冷却した後、清酒酵母きょうかい701号（以下、K701）の培養液を1%加えてよく混合し、被検体が生育している培地上に上層した。20°Cで2日間静置培養し、被検体の周りにK701の生育を阻害したハロが形成しているかを目視し、キラー活性を判定した。

3 結果と考察

3. 1 保有株の整理

センターには、平成4年度にディープフリーザーが導入されて、微生物のグリセロールストックが作成されていたが、平成14年度以降は作成されていなかった。これは、当時推奨されたグリセロールストッ

クの作成方法では、グリセロール濃度が50%と高く、氷温下でも復帰作業中に融解してしまうことが要因と考えられた。このため、当時のグリセロールストックからは、微生物が7割程度しか復帰させることができなかった。

また、これまでは、醸造協会の方法を参考に県独自酵母などをスラント（寒天培地を試験管で斜面状に作製したもの）に植え継ぎ、保存していた。スラント保存では、清酒酵母の性質が変わりやすく、一つの県独自酵母でも複数の系統のスラントを作製し、毎年醸造特性を調べて県内酒造会社に提供する清酒酵母を決めていた。このため、複数の職員が保有していた同一名の県独自酵母などを整理し、平成28年度時点で保管されていた微生物約600株を約300株に集約した。

この過程において、県独自酵母は可能な限り元の性質のものを県内酒造会社に提供するように改めることに成功した。特に群馬G2酵母の泡無し株の取り直し³⁾や、平成初期以降頒布されなくなった群馬G1酵母を見出し、泡無し化を行うこと⁴⁾ができた。なお、清酒酵母は、異なる遺伝子型を有する2つの一倍体が接合したヘテロサイガスな二倍体であり、植え継ぎによりヘテロな配列が部分的にホモ化するLoss of Heterozygosity (LOH)により、性質が変わると考えられている⁵⁾。

平成28年度以降には、県内企業からの微生物の寄託保存に加え、県独自酵母の尿素非生産性化研究⁶⁻⁸⁾、清酒酵母の泡無し化研究³⁻⁴⁾、やよいひめ酵母を用いたビール製造研究⁹⁾、蔵付き酵母研究¹⁰⁻¹¹⁾などを令和5年3月現在で約400株を保存し、微生物保管簿に726株（うち、623株が清酒酵母）記載している。

3. 2 酵母の増殖性

酵素タンパク質や抗生物質などの有用物質生産では、増殖速度が速く、一細胞当たりの生産量が高い微生物が、単位体積単位時間当たりの生産効率が高くなる。このため、微生物の基本的な性質評価の項目の一つに、経時的な菌体量の変化（増殖性）がある。そこで、清酒酵母を中心に470株の酵母の増殖性をデータベース化した。

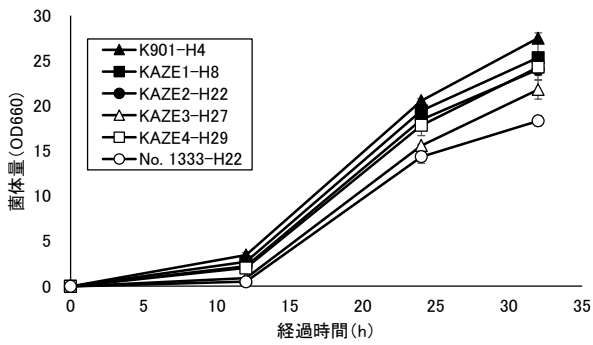


図1 群馬KAZE酵母関連酵母の増殖曲線
独立した3回の試験結果の平均値を示す。

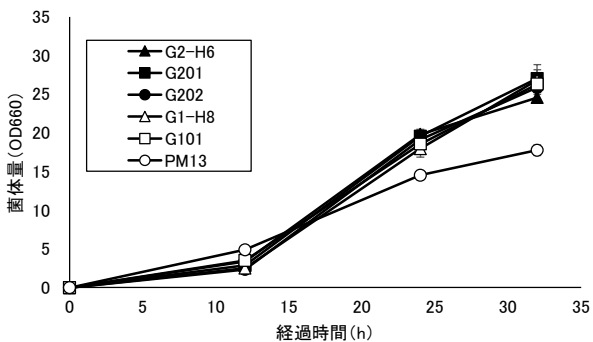


図2 その他の県独自酵母の増殖曲線
独立した3回の試験結果の平均値を示す。

代表的な県独自酵母である群馬KAZE酵母（KAZE酵母）¹²⁾に関連する酵母の増殖曲線を一例として示す（図1）。親株である平成4年度頒布の清酒酵母きょうかい901号（K901）に比べ、KAZE1、KAZE2、KAZE4はやや増殖性が悪くなるだけに留まっていた。一方、KAZE3およびイオンビーム酵母（No. 1333、親株は平成20年度頒布のK901）¹³⁾は顕著に増殖性が悪くなっていた。しかしながら、KAZE3はNo. 1333より24時間後の増殖量は多かった。これらは、酒造りのもろみ初期のボエの良し悪し、もろみ後半のキレの良し悪しと傾向が似ており、増殖性を評価する重要性が確認された。

つづいて、その他の県独自酵母の増殖曲線を見てみると、群馬G2酵母および群馬G2酵母の泡あり株、泡無し株ともに差はほとんど認められなかった（図2）。酒造りでは、群馬G1酵母が群馬G2酵母よりも発酵力が高く、もろみ初期でのエタノール生産性が良い。YD培地の増殖曲線では、両者の増殖速度には差がなかったことから、



図3 水-ベンゼン混濁を用いた簡易識別

もろみ初期の高糖ストレス耐性などが、発酵力に影響を与えていることが考えられた。一方で、ビール用のやよいひめ酵母PM13は、群馬G1、G2酵母に比べると培養初期の菌体量は高いが、培養後半で低くなっており、酵母の違いにより増殖性の違いがあることが確認された。

3.3 酵母の高泡形成能の評価

酵母の高泡形成能とは、もろみ発酵中の炭酸ガスに酵母細胞が吸着して生じる泡が高く形成される性質である。古来より用いられてきた清酒酵母は、高泡形成能を有する「泡あり株」であり、酒造りの際に桶から泡が流出する恐れがあり、衛生上にも問題があった。現代では「泡無し株」が開発され、酒造りの主流になっている。このため、平成28年度以前に保管され高泡形成能が不明であった清酒酵母83株と、その後の研究で取得・開発した酵母155株の計238株について、水-ベンゼンの混濁による簡易的手法²⁾を用いて高泡形成能を評価した（図3）。その結果、平成6年度以前に保存された株の多くが泡あり株であったのに対し、それ以降は泡無し株が主流となっていることなどが確認された（データ略）。

3.4 酵母の醸造特性の評価

清酒酵母の醸造特性は、造られる酒質に大きな影響を与える重要項目である。また、酒類は嗜好性のものであり、その時代に合わせた酒質となる酵母を選定するためにも、保有する酵母の醸造特性のデータベース化と適切な管理が必要と考えられる。そこで、平成28年度時点で保有されていた清酒酵母161株と、その後の研究で取得・開発した酵母347株を合わせた計508株の醸造特性のデータベース化を行った。

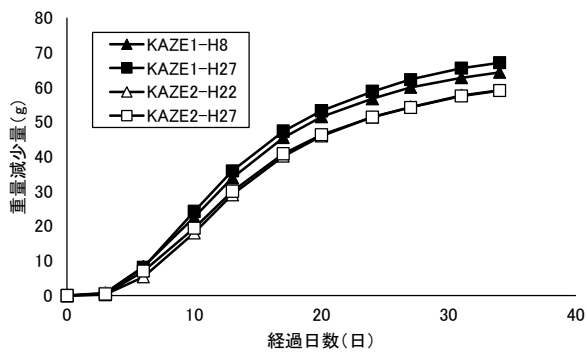


図4 KAZE酵母の重量減少量の経時変化

小仕込み試験では、用いる原料米や精白歩合、収穫年度、種麴などにより原料の状態が大きく異なる。また、仕込時期により水道水や地下水の水質、外気温も異なることや、仕込み条件にも影響を受けることから、醸造特性の比較は同ロットの試験結果でしか行えない。ここでは、KAZE1およびKAZE2のグリセロールストック作成時期の違いを調べた結果について示す。発酵力を示す炭酸ガス発生による重量減少量の経時変化では、平成8年度のKAZE1よりも平成27年度のKAZE1の方が高い発酵力となっていることが確認された(図4)。また、小仕込み試験酒の分析値を見てみると、新しい年のKAZE1、KAZE2の方が古い年のものよりもイソアミルアルコール、酢酸エチル、イソブチルアルコールなどの高いとオフフレーバーとされる香気成分が高くなり、カプロン酸エチルや酢酸イソアミル

などの高いと高評価される香気成分が低くなる傾向が示された(表1)。

スラントでの植え継ぎでは、保存期間中に生き残った細胞が選抜されてしまう。平成27年度までは、半年から一年間というとても長い周期で行っており、酵母の発酵力や醸造特性が変質要因になったと考えられる。これらのことから、平成29年度以降はスラントでの植え継ぎ酵母の提供は中止し、既定のグリセロールストックから毎年起こし直して提供することになった。

ところで近年では、リンゴ様の香気成分カプロン酸エチルを高生産する酵母が開発され、その酵母で造られた清酒が人気となっている。一方で、昔ながらのバナナ様の香気成分酢酸イソアミルを高生産する酵母で造られた清酒が際評価されるようになってきた。平成6年度に群馬G2酵母の、平成8年度に群馬G1酵母のグリセロールストックが作製されていたことにより、酢酸イソアミルを生産する群馬県独自酵母を提供することができていると考えられる。

3. 5 酵母のキラ活性の評価

酵母のキラ活性とは、ある酵母がキラーチシンを産出し、同じ属の酵母を殺す作用をもつものである¹⁴⁾。キラ酵母で汚染された場合、優良酵母をもろみに添加しても、キラ酵母により駆逐されてしまい、目標とした酒質の酒が得られない要因になってしまう。蔵付き酵母などを酒造り

表2 KAZE酵母の小仕込み試験結果のまとめ

	KAZE1-H8	KAZE1-H27	KAZE2-H22	KAZE2-H27
重量減少量(g)	64.2	67.0	59.1	59.0
日本酒度(-)	-2.7	+2.7	-9.4	-10.7
酸度(mL)	2.0	2.0	1.9	1.9
アミノ酸度(mL)	2.3	1.9	2.2	2.1
Ethanol(%(v/v))	17.2	18.4	15.8	15.7
Glucose(%)	4.0	3.6	5.2	5.2
イソアミルアルコール(ppm)	160.4	165.1	139.4	154.6
酢酸イソアミル(ppm)	6.2	5.8	7.3	5.6
カプロン酸エチル(ppm)	7.6	6.6	10.8	9.3
酢酸エチル(ppm)	76.1	96.3	67.5	68.6
イソブチルアルコール(ppm)	67.0	84.0	57.9	63.9
E/A(-)	3.9	3.5	5.3	3.6

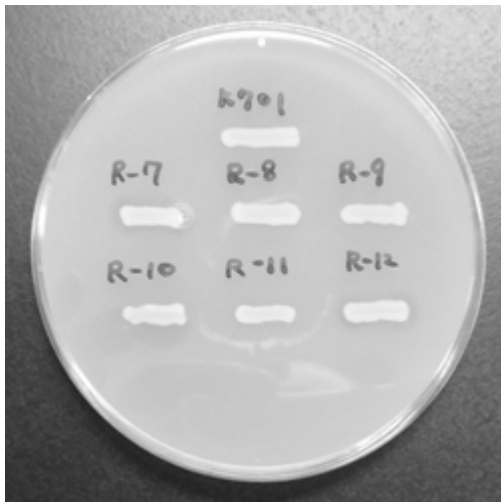


図5 キラー活性検定試験結果の一例

K701をキラー感受性株として用い、酵母の周りにハロ（阻止円）ができたものをキラー活性ありと判定する（R-7、R-12）。

に使うか検討する場合には、キラー活性を調べる必要がある。そこで、群馬県内酒造会社の蔵付き酵母60株について、重層法によるキラー活性検定試験を実施した。

報告例の多いキラー活性判定試験は、画線法と呼ばれ、供試株とキラー感受性株（キラー活性により殺される株）を同時に培地に接種し、交差した部位の酵母の増殖が阻止されているかいないかで判定している。しかしながら、この方法ではキラー活性ありの株が活性無しであると誤判定されることが多い。酒総研の助言により、重層法により調べたところ（図5）、60株中28株にキラー活性が確認された。また、これらの株はTTC染色法ではきょうかい7号（K7）系の優良清酒酵母と判定される赤色にはならず、野生型清酒酵母と判定される桃色になる株であった（データ略）。これらのことから、蔵付き酵母を利用した酵母無添加の酒造りをする酒造会社では、定期的にキラー活性を調べ、キラー酵母の混入を注意する必要があると考えられる。

4 まとめ

本研究では、群馬県が保有する産業微生物の保管方法を定め、また有効活用するため、微生物資源のデータベース化に取り組んだ。その結果、令和4年3月現在で微生物保管簿に726株（うち、623株が清酒酵

母）記載した。清酒酵母については、増殖性、醸造特性、高泡形成能、キラー活性などについても評価を行い、データ化した。今後も県内産業振興に向けて、微生物を適切に管理し、産業利用に貢献したい。

謝 辞

微生物資源の整理では、前群馬産業技術センター職員の上山修氏、高橋仁恵氏、増淵隆氏、関口昭博氏、前橋工科大学の林秀謙准教授に資料の提供をして頂いた。キラー活性検定試験では、（独）酒類総合研究所の赤尾健部門長に助言を頂いた。また、県独自酵母などの開発には、県内酒造会社との共同研究や、科研費基盤C（21K12528）などの研究費を利用した。

文 献

- 1) バイオメディカル研究会：実験室バイオセーフティ指針（WHO 第3版）（2004）
- 2) 布川弥太郎ら：化学と生物 11、216-224（1973）
- 3) 渡部貴志ら：令和2年度群馬産業技術センター研究報告、23-28
- 4) 渡部貴志ら：令和4年度群馬産業技術センター研究報告、56-61
- 5) 赤尾健：日本醸造協会誌、366-380（2012）
- 6) 渡部貴志ら：平成29年度群馬産業技術センター研究報告、11-14
- 7) 渡部貴志ら：平成30年度群馬産業技術センター研究報告、1-4
- 8) 渡部貴志ら：令和4年度群馬産業技術センター研究報告、62-67
- 9) 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
- 10) 渡部貴志ら：令和3年度群馬産業技術センター研究報告、38-50
- 11) 渡部貴志ら：令和3年度群馬産業技術センター研究報告、51-56
- 12) 上山修ら：平成13年度群馬県工業試験場研究報告、39-43
- 13) 増淵隆ら：平成22年度群馬産業技術センター研究報告、25-27
- 14) 原昌道：科学と生物 23、151-161（1985）