

## 2-デオキシグルコース耐性株からの マルトース資化性清酒酵母の分離

宮岡俊輔 逢阪江理\* 酒井美希\* 金本直晃

High Maltose Assimilation Activity Strains Isolated from 2-Deoxyglucose Resistant Mutant of *Sake* Yeast

MIYAOKA Shunsuke, OHSAKA Eri, SAKAI Miki and KANAMOTO Naoaki

清酒酵母をビール醸造に利用することを目的に、マルトース資化性の向上した清酒酵母の育種を行った。2-デオキシグルコース (2-DG) を添加したマルトース培地を用いてマルトース資化性を高めた自然変異株の取得を行ったところ、当所で開発の EK-7 酵母から 1 株、きょうかい 14 号酵母 (K14) から 6 株得ることができた。本酵母は、ビール酵母と同程度に麦汁を発酵することができ、ビール醸造への利用が期待できる。

キーワード：ビール、清酒酵母、マルトース資化性、2-デオキシグルコース耐性、2-DG

### はじめに

消費者ニーズの多様化によりクラフトビールが人気を集め、これを製造する小規模ブルワリーの数は、291 (2017 年)、384 (2018 年)、417 (2019 年) と年々増加している。これらの企業では、差別化が必須であるため、地域特産品を利用するなどの技術開発が求められている。特に近年はコロナウイルス感染拡大により料飲店での需要が減少しており、輸出を含め新規需要開拓が強く求められている。一方、独自の歴史の中ではぐくまれた「清酒酵母」は、日本固有のものでありまた、清酒の多様化の中で各地域にオリジナルな酵母が数多く存在する。これをビール醸造に利用できれば輸出等にむけた地域性の高い製品が期待できる。

しかし、清酒酵母はビール酵母と異なり、マルトース資化性が低いため、麦汁を効率的に発酵できない。そこで、本研究ではマルトース資化性の向上を目的として、2-DG を添加したマルトース培地を用いてマルトース資化性を高めた自然変異株の取得方法を検討するとともに、分離酵母の特性を検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 供試酵母

当所開発酵母 (EK-1、EK-3、EK-7、KKR5-14、AT15-1、EK-11) およびマルトース資化能が高い<sup>1)</sup> 清酒酵母きょうかい 14 号 (K14) の 7 種類を元株として使用した。また、麦汁の発酵試験の対象として、ビール酵母 IFO 2011 株を用いた。

#### 2. 2-デオキシグルコース (2-DG) 耐性株の取得

自然界から分離した酵母にパン製造への利用目的としてマルトース資化性を付与した関口や間瀬ら<sup>2) 3)</sup> の方法を一部改変した方法を用いた。すなわち、50 mL の YPD 液体培地 (イーストエキス 1%、ポリペプトン 2%、グルコース 2%) にスラントから 1 白金耳植菌し 30°C、80 rpm、吸光度 2.0 になるまで振とう培養した。これを遠心分離により集菌、洗浄後、10 mL の滅菌水に懸濁、0.02% の 2-DG を含有する YNB-M 寒天培地 (イーストニトロゲンベース 0.67%、マルトース 2%、寒天 2%) に塗抹した。30°C で 7 日間培養後、生育したコロニーを釣菌した。安定した形質の菌株を得るため、2-DG の含有量 0.02% で 2 回、0.04% に濃度を上げてさらに 2 回同様の操作を繰り返し、2-DG 耐性株を得た。

#### 3. マルトース資化性の評価

\* (現) 愛媛県庁 経済労働部 産業創出課

この研究は、「えひめの柑橘等特産物の特徴を生かした酒類の開発」の予算で実施した。

2-DG 耐性株スラントから、ダーラム管の入ったマルトース基礎液体培地（イーストエキス 0.5%、マルトース 2%、ペプトン 1%）に 1 白金耳植菌し、30℃、3 日間培養後、培養液の白濁と発泡を観察、マルトース資化能を評価した。

#### 4. 麦汁の発酵試験

2-DG 耐性株を YPD 液体培地で 28℃、濁度 2.0 になるまで振とう、前培養液を得た。滅菌した 50 mL の麦汁（Brix.14.1、ホップ入、梅錦山川株式会社）に前培養液 1 mL を植菌し、30℃、2 日間発酵後、遠心分離して上清のアルコールを日本酒分析システム（全自動 SDK システム、京都電子工業株式会社）を用いて分析した。

### 結果と考察

#### 1. 2-DG 耐性株の取得

グルコースのアナログである 2-DG を含む寒天培地上では、グルコースリプレッションを受ける酵母は生育が阻害されるため、この機構が解除された変異株を取得するために利用できる<sup>4)~6)</sup>。すなわち、2-DG を含むマルトースを唯一の糖源とする培地で生育できる株は、マルトース資化能を有している可能性が高い。そこで、0.02%の 2-DG を含む YNB-M 培地上での各種酵母の生育を表 1 に示した。7 株の清酒酵母について検討し、2 株でコロニーの発生がみられた。得られた 2 株は塗抹酵母数を 5 倍に増加したものであった。自然変異株を取得しているため、変異株の発生頻度は低く、塗抹酵母数を多くすることが有効と考えられた。

EK-7 から得られた変異株について、2-DG 含有 YNB-M 培地への塗抹を繰り返し 0.04%2-DG を含む YNB-M 培地で生育できる 15 株の耐性株を得た。同様に K-14 から 7 株、合計 22 株の耐性株を取得し、以下その性質を評価した。

表 1 0.02%の 2-DG 含有 YNB-M 培地上での各種酵母の生育

酵母名	塗抹酵母数 (個/枚)	コロニー発生 (シャーレ1枚あたり)
EK-1	$2.0 \times 10^7$	0
EK-3	$1.0 \times 10^8$	0
EK-7	$1.0 \times 10^8$	1.0
KKR5-14	$2.0 \times 10^7$	0
AT15-1	$2.0 \times 10^7$	0
EK-11	$2.0 \times 10^7$	0
K-14	$1.0 \times 10^8$	6.3

#### 2. マルトース資化性の評価

取得した 2-DG 耐性の 22 株について、マルトース資化性を評価した結果を表 2 に示した。22 株にはマルトース基礎培地で生育するのに 3 日以上時間を必要とするものが含まれていた。これらを除外し 3 日後に発泡、白濁するものをマルトース資化性とした。EK-7 から 4 株、K14 から 6 株の変異株にマルトース資化性が認められた。

#### 3. 麦汁の発酵試験

マルトース資化性が認められた 10 株について麦汁の発酵試験を行い、結果を表 3 に示した。対照としたビール酵母よりアルコール生成が高い株が、EK-7 由来に 1 株、K-14 由来に 6 株存在した。これら 7 株は麦汁の発酵が可能と考えられるので、ビール醸造への利用が期待できる。10 株のうち、EK-7 由来の 3 株は麦汁の発酵性が低かった。マルトース資化性は確認できており、麦汁を発酵しない理由について今後検討する必要がある。

表2 2-DG 耐性株のマルトース基礎培地での生育

酵母名	マルトース基礎培地での生育				マルトース資化性※
	3日		7日		
	白濁	発泡	白濁	発泡	
K14-1	++	++	++	—	○
K14-2	++	++	++	—	○
K14-3	++	++	++	—	○
K14-4	++	++	++	—	○
K14-5	++	++	++	—	○
K14-6	++	++	++	—	○
K14-7	++	—	++	++	×
EK7-1	++	++	++	—	○
EK7-2	+	—	++	++	×
EK7-3	+	—	++	++	×
EK7-4	+	—	++	++	×
EK7-5	++	++	++	++	○
EK7-6	+	—	++	—	×
EK7-7	++	++	++	—	○
EK7-8	++	—	++	—	×
EK7-9	+	—	++	++	×
EK7-10	+	—	++	++	×
EK7-11	++	—	+	—	×
EK7-12	++	++	++	—	○
EK7-14	++	—	++	++	×
EK7-16	++	—	++	+	×
EK7-17	++	—	++	—	×

※ 3日培養後、白濁・発泡した株をマルトース資化性とした。

表3 麦汁の発酵試験

	アルコール分 (v/v %)	エキス分
K14-1	5.5	6.5
K14-2	5.5	6.6
K14-3	5.6	6.5
K14-4	5.5	6.5
K14-5	5.3	6.8
K14-6	5.7	6.3
EK7-1	5.3	6.9
EK7-5	1.8	12.3
EK7-7	1.8	12.3
EK7-12	2.1	11.9
ビール酵母 IFO2011	4.2	8.1

## ま と め

清酒酵母のマルトース資化性向上を目的として、2-DG を含むマルトース培地による自然変異株の分離と分離酵母の特性を検討し、以下の結果を得た。

1. 7種類の清酒酵母について検討し、2種類で変異株を得ることができた。発生頻度の低い自然変異株を得るため、培地に塗抹する酵母数を増加することが有効であった。
2. 当所開発酵母 EK-7 から 15 株、きょうかい 14 号酵母 K14 から 7 株の合計 22 株の変異株を分離した。
3. 分離した 22 株についてマルトース資化性を評価したところ、EK-7 から分離した 4 株、K14 から分離した 6 株に資化性が認められた。
4. マルトース資化性が認められた 10 株の麦汁発酵性を調べた結果、EK-7 株から分離した 1 株、K14 から分離した 6 株は麦汁を発酵することができ、ビール醸造への利用が期待できる。

## 文 献

- 1) 向井伸彦, 岡田明彦, 鈴木昭紀, 高橋利郎: ビール酵母とその他の醸造用酵母のビール醸造特性, 醸協, 93, 967-975 (1998).
- 2) 関口昭博: 製パン用酵母「美の和酵母」の改良研究, 群馬県立群馬産業技術センター研究報告 2008, 9-12 (2008).
- 3) 間瀬雅子, 瀬見井純, 斎藤 恵, 幅 靖志, 安田 (吉野) 庄子, 小野奈津子: パン用花酵母の育種, あいち産業科学技術総合センター研究報告, 3, 82-83 (2014).
- 4) 水野昭博, 岩渕正文, 木曾邦明, 佐藤和夫, 高橋利郎: 2-デオキシグルコース耐性株からのリンゴ酸高生産清酒酵母の分離, 醸協, 97, 228-233 (2002).
- 5) Srdjan Novak, Tony D' Amore, Inge Russell, Graham G. Stewart: Sugar uptake in a 2-deoxy-D-glucose resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Industrial Microbiology, 7, 35-39 (1991).
- 6) R.M. Jones, I. Russell, G.G. Stewart: The Use of Catabolite Derepression as a Means of Improving the Fermentation Rate of Brewing Yeast Strains, Journal of the American Society of Brewing Chemist, 44, 161-166 (1986).